

1. はじめに

ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus, HIV)により引き起こされるエイズ(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)はいまだ世界に蔓延しつつあり、ワクチンや特效薬の開発が待ち望まれている疾病の一つである。これまでエイズ治療薬開発のために HIV のライフサイクルを遮断する物質の探索が世界中で数多く行なわれてきた。中でもウイルスのゲノム RNA を DNA に逆転写する際に必須な逆転写酵素 (reverse transcriptase, RT) とウイルス由来の前駆体蛋白質を切断し、成熟型ウイルスにするために必須なプロテアーゼ (protease, PR) の 2 種の酵素が主なターゲットとして検討されてきた。その結果, AZT (RT 阻害剤) や saquinavir, indinavir (PR 阻害剤) の様に臨床的に有効な薬物も開発された。これらの薬物を併用すると血液中のウイルスは検出限界以下まで下がるが、少量のウイルスはまだ免疫細胞内に静止状態で潜伏している。¹⁻³⁾ HIV は高頻度に変異を起こすため、長期間構造の類似した薬物を使用すると薬剤耐性が起こる可能性が高くなる。その上、これら薬剤を臨床的に使用すると顕著な副作用が発現し、エイズ患者に長い期間服用し続けることは困難である。また、発展途上国のエイズ患者にとって上記薬物は余りにも高価すぎて広く治療に用いられない現状でもある。従って、新しいタイプまたは新しい作用メカニズムを有する安価なエイズ治療薬の開発が望まれている。

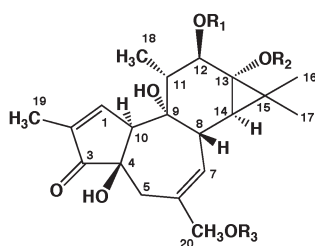
このような状況から我々は世界各地から伝統薬物を収集し、HIV-RT 阻害、HIV-PR 阻害、また、MT-4 細胞に感染させた HIV そのものの増殖を抑制する効果(抗 HIV 作用)を指標として探索を行ってきた。これまで約数百種以上の伝統薬物について検討し、その成果の一部は総説として報告している。⁴⁾ 今回は最近の研究成果、特に伝統薬物から活性成分の同定、およびそれらを基に創薬を目指した研究について述べる。

2. *Croton tiglium* に含まれるホルボールエステル類の抗 HIV 作用^{5,6)}

抗 HIV 活性は、HIV-1 を MT-4 細胞に感染させた後、細胞懸濁液と検体溶液をマイクロプレートに加え、5 日後、細胞の状態を光学顕微鏡で観察し、阻害濃度(IC)を決定する方法で行った。本法によりエジプト民間薬 92 種類についてスクリーニングを行ったところ *Croton (C.) tiglium* L. 種子のメタノール及び水抽出エキスに効果が見られ、その 100%阻害濃度 (IC₁₀₀ 値) はそれぞれ 0.025, 2.0 µg/ml であった。⁷⁾ また、*C. tiglium* のメタノールエキスは巨細胞形成も強く阻害した。*C. tiglium* の種子 (巴豆) は tigliane 型のホルボールエステルを数多く含むことが知ら

れている。ホルボールエステル類にはこれまで発がんプロモーションをはじめ多くの生物活性を示すことが知られている。⁸⁻¹⁴⁾ *C. tiglium* 種子のメタノールエキスをヘキサン可溶部, エーテル可溶部, 水可溶部に分け, 抗 HIV 作用を調べるとエーテル可溶部に強い活性があった。エーテル可溶部をシリカゲルのカラムクロマトグラフィー及び中圧分取クロマトグラフィーを用いて 8 種類の化合物 1—8 を単離した(Fig. 1)。この内, 化合物 1 から 5 の 5 種は新規化合物であった。⁵⁾

Figure 1. Structures of isolated compounds



	R ₁	R ₂	R ₃
1	H	acetate	9Z,12Z-octadecadienoate
2	H	tiglate	9Z,12Z-octadecadienoate
3	acetate	tiglate	H
4	decanoate	2-methylbutyrate	H
5	tiglate	2-methylbutyrate	H
6	acetate	decanoate	H
7	2-methylbutyrate	dodecanoate	H
8	tetradecanoate	acetate	H

Table 1. Anti-HIV activity and protein kinase C activation

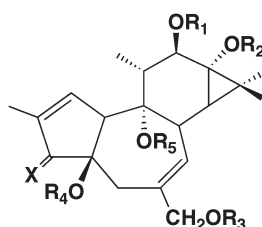
Compound	Anti-HIV (μg/ml)		PKC activation	
	IC ₁₀₀	CC ₀	%* MAC (μg/ml)	
1	15.6	62.5	0	
2	7.81	62.5	14	
3	125	500	16	
4	7.81	31.3	0	>50
5	31.3	62.5	10	
6	0.0076	62.5	0	>100
7	15.6	62.5	16	
8	0.00048	31.3	100	0.01
DS8000	3.9	>1000		

*Inhibitory Percentage of a control (TPA) at 10 ng/ml
MAC, minimal activation concentration

単離したホルボールエステルについて抗 HIV 作用を調べると化合物 **8** と **6** に非常に強い活性があり、IC₁₀₀ 値はそれぞれ 0.48, 7.6 ng/ml で、次いで化合物 **2** と **4** (IC₁₀₀ 値は共に 7.8 μg/ml) であった (Table 1)。

従って *C. tigilium* 種子の活性本体はこれらホルボールエステル類であると結論した。ところで、プロテインキナーゼ C (PKC) はイオンの膜透過の調節、受容体の抑制調節、平滑筋の収縮などを行うシグナルの伝達に重要な役割を担っている。化合物 **8** すなわち TPA のようなホルボールタイプの化合物は PKC を活性化し、強い発がんプロモーション作用を示すことが知られている。しかし、TPA の 12-デアシル体である prostratin のように発がんプロモーター作用がなく、抗 HIV 作用のある化合物も報告されていること¹³⁾から、ホルボールエステル類を化学的に種々変化させ、発がんプロモーター作用を示さず、かつ、抗エイズウイルス作用を示す物質の探索研究を行った。単離したホルボールエステルについて PKC の活性化作用を測定した結果、化合物 **8** は強い活性化を示したが、化合物 **4** と **6** では 10 ng/ml の濃度で活性化は見られず、最小活性化濃度は両者とも 50 μg/ml 以上であった (Table 1)。以上の結果から、化合物 **6** (12-*O*-acetylphobol 13-decanoate) をリード化合物として化学構造を変換することにより新しいタイプの抗 HIV 作用を有する化合物の開発が可能ではないかと考えた。そこで、ホルボール及びイソホルボールを基本骨格として種々の誘導体を合成し、抗 HIV 作用と PKC の活性化を検討した。⁶⁾

Table 2. Anti-HIV activity of phorbol derivatives and their activation of PKC (1)



No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	Anti-HIV (μg/ml)		PKC Activation %*
							IC ₁₀₀	CC ₀	
9	H	H	H	H	H	O	NE	1000	8
9a	Ac	H	H	H	H	O	NE	500	13
9b	H	Ac	H	H	H	O	125	>1000	0
9c	Ac	Ac	H	H	H	O	NE	>1000	57
9d	Ac	Ac	Ac	H	H	O	62.5	125	0
9e	Ac	Ac	Ac	Me	H	O	31.3	125	0
9f	Ac	Ac	Ac	H	H	β-OH, H	500	1000	0
9g	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	O	125	250	0
12	Bz	Bz	Bz	H	H	O	NE	31.3	100

*Percentage of activation at 10 ng against that of TPA (**8**). NE : no activity

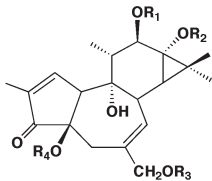
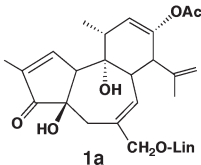
巴豆油(クロトン油)を水酸化バリウムで加水分解し、原料となるホルボール(**9**)、イソホルボール(**10**)、4-デオキシホルボール(**11**)を得、ホルボール **9** から 7 種の化合物を合成した。またイソホ

ルボール **10** からは4種の誘導体を作った。これら誘導体の抗 HIV 作用と PKC の活性化を測定したが、ホルボールやそのモノ及びジアセチル体(**9**, **9a-9c**)には抗 HIV 活性はなかった、しかし、トリアセチル体(**9d**)には活性が見られ、そのメチル体(**9e**)では活性が2倍程増強され、3-デオキシ体(**9f**)では活性が消失した。また **9d** と **9e** には PKC の活性化も見られなかった。その他、イソホルボール誘導体には抗 HIV 活性はなく、PKC の活性化も認められなかった。

以上の結果から、ホルボール類の構造と抗 HIV 活性に関して次の様に考えた。①抗 HIV 活性には4β-ヒドロキシル基すなわち A/B トランス体が必要であり、また、② 3位のカルボニル基を還元すると活性が消失する。③ 活性発現にはジエステルが必要であり、④ 13,20-ジエステル体より 12,13-ジエステル体の方が強い阻害活性を示した。そして⑤ ジエステルは C-12 アセチル(C₂)と C-13 デカノイル(C₁₀)との組み合わせが最もよく、この場合 PKC の活性化も見られなかった。

そこで、これまでの結果をもとに化合物 **1**, **4**, **6**, **8** についてさらに修飾を行った。これら化合物について抗 HIV 活性と PKC の活性化を測定した結果を Table 3 に示す。化合物 **1a**, **1b** では **1** に比べ抗 HIV 活性は2倍程強くなった。PKC の活性化は **1a** では24%あったが、**1b** では見られなかった。化合物 **4** もアセチル化により抗 HIV 活性は増強した。また PKC の活性化濃度は50 µg/ml 以上であった。一方、化合物 **6** 及び **8** ではアセチル化、メチル化により抗 HIV 活性が大きく下がった。また最も強い抗 HIV 活性と PKC の活性化を示した **8** では、アセチル化やメチル化により PKC の活性化作用もなくなった。また、13,20-ジアシル誘導体 **8d** では弱い抗 HIV 活性が見られたが、**8** の異性体 **8c** では抗 HIV 活性も PKC の活性化もなかった。

Table 3. Anti-HIV activity of phorbol derivatives and their activation of PKC (2)

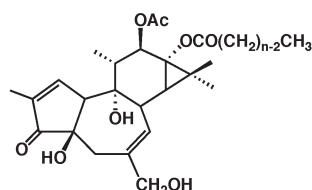



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Anti-HIV (µg/ml)		PKC activation	
					IC ₁₀₀	CC ₀	%*	Minimal activation (µg/ml)
1	H	Ac	C ₁₈ H ₃₁ O	H	15.6	62.5	0	
1a					7.81	125.0	24	
1b	Ac	Ac	C ₁₈ H ₃₁ O	H	7.81	62.5	0	
4	C ₁₀ H ₁₉ O	2-Me butyryl	H	H	7.81	31.3	0	>50
4a	C ₁₀ H ₁₉ O	2-Me butyryl	Ac	H	3.90	15.6	10	>50
6	Ac	C ₁₀ H ₁₉ O	H	H	0.0076	62.5	0	>100
6a	Ac	C ₁₀ H ₁₉ O	Ac	H	15.6	31.3	11	
6b	Ac	C ₁₀ H ₁₉ O	Ac	Me	NE	1.95	0	
8	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	H	H	0.00048	31.3	100	0.01
8a	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	Ac	H	15.6	62.5	0	
8b	C ₁₄ H ₂₇ O	Ac	Ac	Me	NE	15.6	0	
8c	Ac	C ₁₄ H ₂₇ O	H	H	NE	125.0	0	
8d	Ac	C ₁₄ H ₂₇ O	C ₁₄ H ₂₇ O	H	62.5	125.0	0	

*Percentage of activation at 10 ng against that of TPA (**8**). NE : no activity

次に、アシル側鎖の違いによる活性の変化を調べるため、13位が種々の炭素数のホルボールエステルを合成した。これら化合物について抗 HIV 作用と PKC の活性化を測定すると、炭素鎖の短いアシル化化合物では抗 HIV 活性はなく、n=9 で活性が見られ、n=10 では最も強い抗 HIV 作用を示した。またこの時 PKC の活性化は認められなかった (Table 4)。

Table 4. Anti-HIV activity of 12-O-acetylphorbol 13-O-acylates and their activation of PKC



n	抗 HIV 作用 ($\mu\text{g/ml}$)		PKC 活性化作用 %*
	IC ₁₀₀	CC ₀	
n=2	NE	>1000	57
n=5	125	500	16
n=6	NE	62.5	27
n=9	31.3	31.3	10
n=10	0.0076	62.5	0
n=12	250	500	35
n=14	NE	125	0

*Percentage of activation at 10 ng against that of TPA (8). NE : no activity

本研究により、12-O-acetylphorbol 13-decanoate (6)には非常に強い抗 HIV 効果がみられ、PKC の活性化も無いことがわかった。強力な発がんプロモーション作用を示すことで知られている TPA (8)とは、構造がわずかに異なるだけで、PKC の活性化に大きな違いを示した。

3. カフェー酸誘導体の HIV-1 RT 阻害活性¹⁵⁾

パナマ産生薬について行ったスクリーニングで *Cordia spinescens* L.の葉が *in vitro* で HIV-1 RT に対して強い阻害活性を示した(メタノールエキスの IC₅₀ 値は 36 $\mu\text{g/ml}$, 水エキスは 6 $\mu\text{g/ml}$).¹⁵⁾ *C. spinescens* はムラサキ科に属し、メキシコ西南部からベネズエラ、ペルーの標高 1600 m までの高湿の森林に生育する高さ 3 m 程度の低木である。ベネズエラのインディアンは根を煎じて発熱や頭痛に使い、¹⁶⁾ またパナマの Guaymi Indian は "Diguiman Goi (スペイン語では Bejuco negro)" と呼び、木部を粉末にし、スリ傷の治療に使っている。¹⁷⁾

C. spinescens の水エキスをイオン交換樹脂を用いて中性、酸性、塩基性画分に分けると活性は中性画分に見られた。この画分を更に各種カラムクロマトグラフィーを用いて分離を行い、活性成分としてカフェー酸三量体である Mg lithospermate (13)や、二量体の Ca rosmarinate (14), Mg rosmarinate (15)を得た (Fig. 2)。関連化合物についても合わせて、RT 阻害活性を測

定した結果を Table 5 に示す。

Figure 2. Structures of caffeic acid derivatives

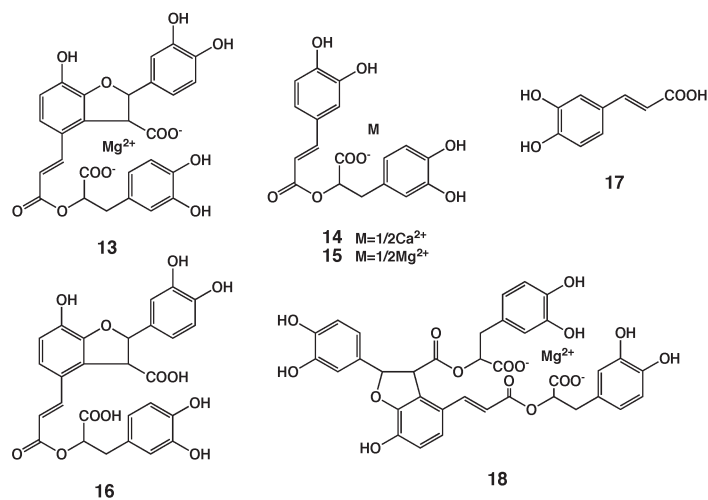


Table 5. Compounds of caffeic acid derivatives and their anti-HIV-RT and

Compound	RT inhibition	PR inhibition
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
Monomer		
Caffeic acid (17)	>1000	>100
Dimer		
Ca rosmarinate (14)	5.8	>100
Mg rosmarinate (15)	3.1	>100
Trimer		
Mg lithospermate (13)	0.8	>100
Lithospermic acid (16)	34	
Tetramer		
Mg lithospermate B (18)	68	

化合物 13 は最も強い阻害活性を示したが、遊離型のカルボン酸 lithospermic acid (16)では阻害活性は 1/40 以下となった。これはカルボン酸塩を形成している金属イオンが影響しているた

めと考えられる。また Ca 及び Mg rosmarinate (14,15)も強い阻害作用を示した。RT 阻害作用は単量体(17), 二量体(14,15), 三量体(13,16)の順で強くなったが、四量体(18)では逆に弱くなった。化合物 13 の阻害様式は Lineweaver-Burk プロットから非競合的阻害であることがわかり、化合物 13 は基質の結合部位 (活性中心) と異なる部位で酵素と結合し、酵素活性を阻害していると考えられる。

4. トリテルペン類の HIV-PR 阻害活性¹⁸⁻²⁰⁾

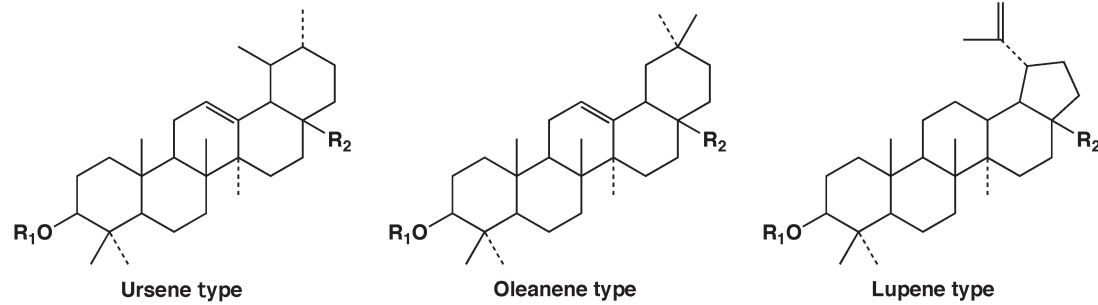
HIV-PR 阻害活性を指標とした漢薬及び蒙薬のスクリーニングで“鎖陽”に比較的強い阻害活性が見られた。²¹⁾ 鎖陽は オシヤグジタケ科 *Cynomorium songaricum* の茎で、主に内蒙古に生育する寄生植物である。中国では古くから強壯薬として用いられており、²²⁾ 成分としてはトリテルペン、ステロイド、脂肪酸が知られている。^{23,24)}

4.1 鎖陽トリテルペンとその誘導体の合成

鎖陽の抽出エキスから ursolic acid (19), acetyl ursolic acid (20), malonyl ursolic acid hemiester (21)の他、14 種の既知化合物を単離した。これらについて 100 µg/ml の濃度で HIV-PR 阻害活性を測定すると 19, 20, 21 には比較的強い活性が見られたが(19-21 の IC₅₀ 値はそれぞれ 8, 13, 6 µM), 他の 15 種の化合物には効果はなかった。¹⁸⁾ 鎖陽に含まれる酸性トリテルペン類(19-21)に HIV-PR 阻害活性が見られ、3 位にマロン酸ヘミエステルの導入で、更に阻害活性が増大した。

そこで構造の類似した ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid について一連のジカルボン酸ヘミエステルの合成を行い、構造と活性相関を検討した(Table 6)。トリテルペン類の 3 位にエステル結合で酸性基を導入した場合、oxalyl (C₂), malonyl (C₃), succinyl (C₄), glutaryl (C₅) と炭素数が増えるに従って阻害活性も強くなった。最も強い glutaryl hemiester (26, 35, 42) の IC₅₀ 値は 4 µM で、元のトリテルペン(19, 29, 37: IC₅₀=8-9 µM)の約 2 倍の強さであった。これらのカルボキシル基をメチル化すると活性は大きく減少し (27, IC₅₀ >50 µM; 36, IC₅₀ >50 µM; 43, IC₅₀=40 µM), トリテルペンの 3 位と 17 位の極性基が酵素と相互作用していることが示唆された。化合物 19, 29, 37 の 17 位のカルボキシル基をメチル化した化合物も活性が顕著に減弱した(23, IC₅₀=14 µM; 30, IC₅₀=20 µM; 38, IC₅₀ >25 µM)。また、17 位がカルボキシル基ではなくメチル基の場合も、活性が著しく低かった[α-amyrin (22), IC₅₀=80 µM; β-amyrin (28): IC₅₀ >100 µM], 従って、17 位の極性基も酵素との相互作用に深く関与することが支持される。

Table 6. Anti-HIV-PR activity of three types of triterpene derivatives

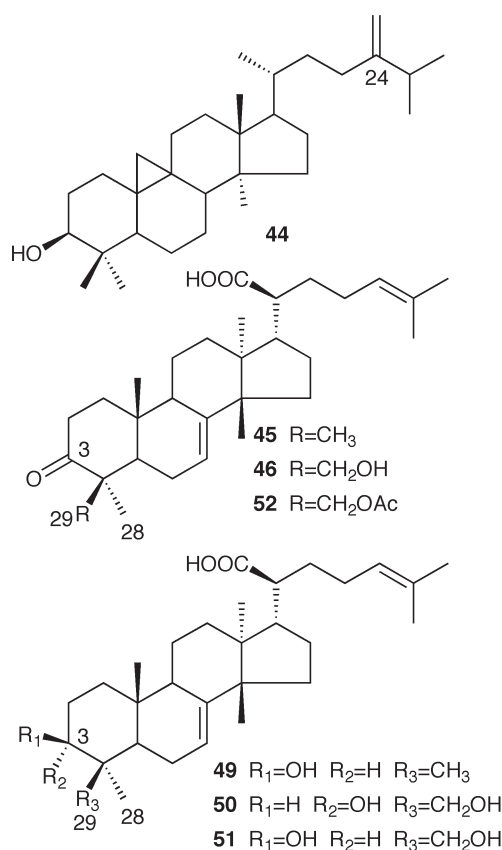


R ₁	R ₂	Ursane type IC ₅₀ (μM)		Oleanane type IC ₅₀ (μM)		Lupane type IC ₅₀ (μM)	
H	CH ₃	α-amyrin (22)	80	β-amyrin (28)	>100		
H	COOH	ursolic acid (19)	8	oleanolic acid (29)	8	betulinic acid (37)	9
H	COOCH ₃	23	14	30	20	38	>25
COCH ₃	COOH	20	13	31	9		
COCOOH	COOH	24	7	32	20	39	7
COCH ₂ COOH	COOH	21	6	33	8	40	6
CO(CH ₂) ₂ COOH	COOH	25	6	34	4	41	6
CO(CH ₂) ₃ COOH	COOH	26	4	35	4	42	4
CO(CH ₂) ₂ COOCH ₃	COOCH ₃					43	40
CO(CH ₂) ₃ COOCH ₃	COOCH ₃	27	>50	36	>50		

4.2 文冠木の抗 HIV-PR 成分

蒙薬文冠木 (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge の木部)の抽出エキスも中程度の HIV-PR 阻害活性を示した。文冠木は中国内蒙古に生育するムクロジ科の低木で、中国語では"Wen Guan Mu", モンゴル語は"Shen Deng"と呼び、木部をリウマチや痛風などに用いている。果実からはこれまでいくつかのサポニン類が単離されている^{25,26)}が、木部の成分に関する報告はまだ少ない。^{27,28)} 文冠木のメタノールエキスから新規トリテルペン xanthocerasic acid (46), 新 A-タイプ プロアントシアニン二量体 (48)の他、11 種の既知トリテルペン及びフラボノイドを単離した。¹⁹⁾ 単離した化合物について HIV-PR 阻害活性を測定すると化合物 45, 29, 48 のみに活性が見られ、IC₅₀ 値はそれぞれ 20, 10, 70 μg/ml であった。Oleanolic acid (29)の HIV の増殖とそのプロテアーゼの阻害活性は既に報告されており,^{18,29)} 今回の実験結果と一致している。また、化合物 45 は HIV-PR 阻害活性を持つ初めての tirucallane 型のトリテルペンである。化合物 45 と 46 では構造がわずかに異なるだけにもかかわらず、HIV-PR 阻害活性に大きな差が見られる。そこで化合物 45 及び 46 のアナログについて検討を行った。化合物 49 と 51 に中程度の活性 (IC₅₀=100 μg/ml)が見られたが、検討した化合物の種類が少ないため、tirucallane 型トリテルペンに関する構造と活性相関について結論を出すことはできなかった。

Figure 3. Structures of compounds isolated from *X. sorbifolia*

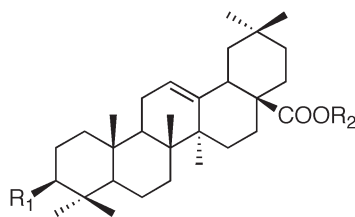


4.3 オレアノール酸誘導体の合成と HIV-PR 阻害活性

これまで述べてきたように、ある種のトリテルペン類は HIV-PR に対して非常に強い阻害効果を有している。そこで更に系統的にトリテルペン類の構造変換を行い、その構造と HIV-PR 阻害活性の相関関係について検討を行った。²⁰⁾ 前述の3種のトリテルペン (ursolic acid, oleanolic acid, betulinic acid) の活性に大きな差が見られないこと、また、天然に豊富に存在することを考慮して出発原料として oleanolic acid (**29**, IC₅₀=8 μM)を用いた。先に oleanolic acid, ursolic acid, betulinic acid の3位に炭素数5までのジカルボン酸ヘミエステルを合成し、阻害効果を検討したが、oleanolic acid について更に炭素鎖の長い化合物を合成し、HIV-PR 阻害活性を検討した。その結果、炭素数が6から8の時最も強く、その IC₅₀ 値は 3 μM であった。更に炭素鎖が長い化合物ではこれらより阻害活性は弱くなった。アシル側鎖に2つのメチル基を持つ化合物(**57**)の活性は直鎖状の化合物(**35**)とほぼ同じであった。28位または3位のカルボキシル基をメチル化すると活性は減少した(**54**, **58** の IC₅₀ 値は 7.5 及び 5.6 μM)。また、両方のカルボキシル基ともメチル化すると活性が消失した(**59**, IC₅₀ >20 μM)。次に、3位がヒドロキシル基ではなく他の官能基に変えた時、あるいは前述したように最も阻害活性の強い炭素数6の

ジカルボン酸を導入した時の阻害活性を調べた (Table 7)。Oleanolic acid の 3 位ヒドロキシル基をオキソ基やヒドロキシイミノ基に変えた化合物 (61, 63) でも阻害活性は変わらなかった。一方, 28 位メチルエステル体の 3 位ヒドロキシル基をオキソ基やアミノ基に変えても活性は弱いままであった (62, 65-66) が, ヒドロキシイミノ基体 (64) では 3 位ヒドロキシル基体 (30) に比べ約 2 倍強くなった。また, 3 位ヒドロキシイミノ基やアミノ基に炭素数 6 のジカルボン酸を導入すると 28 位が遊離カルボン酸(69, 71) でもメチルエステル(68, 70, 72) でも非常に強い阻害活性を示した。尚, 28 位に遊離カルボン酸を有する 3-アシルヒドロキシイミノ化合物 67 は例外で, アシル基を持たない化合物 63 の活性とほぼ同じであった。化合物 68 にさらにアミド基を導入すると活性は減少した(73, IC₅₀=6.0 μM)。この化合物のメチル化体(74)は遊離のカルボキシル基を持たない他の化合物と同様活性はなかった。二量体 (75) は単量体と類似した阻害活性を示した。遊離カルボキシル基を持たない化合物(76)には活性が無く, 二つの遊離のカルボキシル基を有する二量体 75 は単量体 69 に匹敵する強い活性を示した。

Table 7. Anti-HIV-PR activity of oleanolic acid derivatives

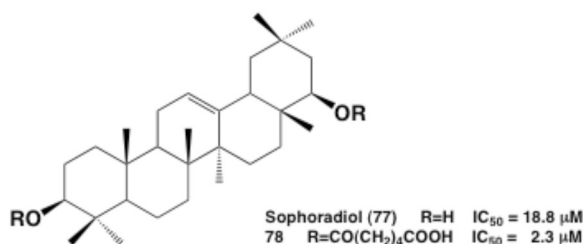


R1	R ₂ = H		R ₂ = CH ₃	
	Compound	IC ₅₀ (μM)	Compound	IC ₅₀ (μM)
β-OH	29	8	30	20
=O	61	5.5	62	20
=NOH	63	5.5	64	9.5
β-NH			65	>20
α-NH			66	>20
=NOCO(CH ₂) ₄ COOH	67	5.5	68	4.0
β-NHCO(CH ₂) ₄ COOH	69	3.0	70	3.0
α-NHCO(CH ₂) ₄ COOH	71	2.1	72	3.5
β-NHCO(CH ₂) ₄ CONH(CH ₂) ₃ COOH			73	6.0
β-NHCO(CH ₂) ₄ CONH(CH ₂) ₃ COOCH ₃			74	>20
β-NHCO(CH ₂) ₄ CONH-β-oleanolic acid 28-R ₂	75	3.3	76	>20

Oleanolic acid の 3 位に炭素数 6 の酸性側鎖を導入すると強い HIV-PR 阻害活性が見られた。

そこで、オレアナン骨格にもう一つの酸性側鎖の導入を試みた。Sophoradiol (77)はオレアナン型トリテルペンで3位と22位に二つのヒドロキシル基を有している。この二つのヒドロキシル基の距離は12.3 Åでoleanolic acidの3-OHと17-COOH基間の距離(12.4 Å)とほぼ同じである。化合物77をadipoyl chlorideと反応させて3,22-di-*O*-adipoyl sophoradiol (78)を得た(Fig. 4)。化合物78は元の77より8倍以上強い活性を示した(78: IC₅₀=2.3 vs. 77 IC₅₀=18.8 μM)。

Figure 4. Structures of sophoradiol and di-adipoyl esters



二つの酸性側鎖を持つ化合物78が強い活性を示したことからoleanolic acidの3位と28位に2個の酸性側鎖を持つ化合物80を合成した。HIV-PR阻害活性を測定すると予想したとおり、化合物80は更に強い活性を示し、そのIC₅₀は1.7 μMであった。また、28位に一つだけ酸性側鎖を持っている化合物79も80と同程度の強い活性を示し、元のoleanolic acidの4倍以上の強さであった(Table 8)。この理由として、oleanolic acidでは28位のカルボキシル基がやや立体障害を受けた状態にあるため、酵素との水素結合または静電的相互作用が弱いのに対し、28位に側鎖を持つ79では、カルボキシル基と酵素が強く結合できるためと考える。

Table 8. Anti-HIV-PR activity of oleanolic acids having acidic side chain(s) at C-3 and/or C-28

	R ₁	R ₂	IC ₅₀ μM
29	OH	OH	8
53	OCO(CH ₂) ₄ COOH	OH	3.0
79	OH	NH(CH ₂) ₅ COOH	1.7
80	OCO(CH ₂) ₄ COOH	NH(CH ₂) ₅ COOH	1.7

以上の結果より、oleanene骨格に酸性の側鎖、特に炭素数6の酸性基を導入すると、HIV-PR

に対する阻害活性が大きく増加することがわかった。また、今回用いたトリテルペンヘミエステル類のエステル結合は消化酵素リパーゼによって加水分解されなく安定であった。HIV-PRは同一のペプチドが二量体を形成して初めてプロテアーゼ活性を示す。そこで、トリテルペン類のプロテアーゼ阻害作用のメカニズムを検討するため、サイズ排除型クロマトグラフィー実験を行った。トリテルペン共存下では HIV-PR は単量体として溶出されたので、トリテルペンは活性型酵素（二量体）の活性中心に直接結合して阻害するのではなく、酵素の二量体化を阻害していることが示唆された。また、HIV-PR と同じアスパラギン酸プロテアーゼに属するペプシン（単量体で活性を示すプロテアーゼ）に対する阻害活性を測定すると、これらトリテルペン類は全く阻害活性を示さず、酵素の二量体化を阻害していることを支持した。

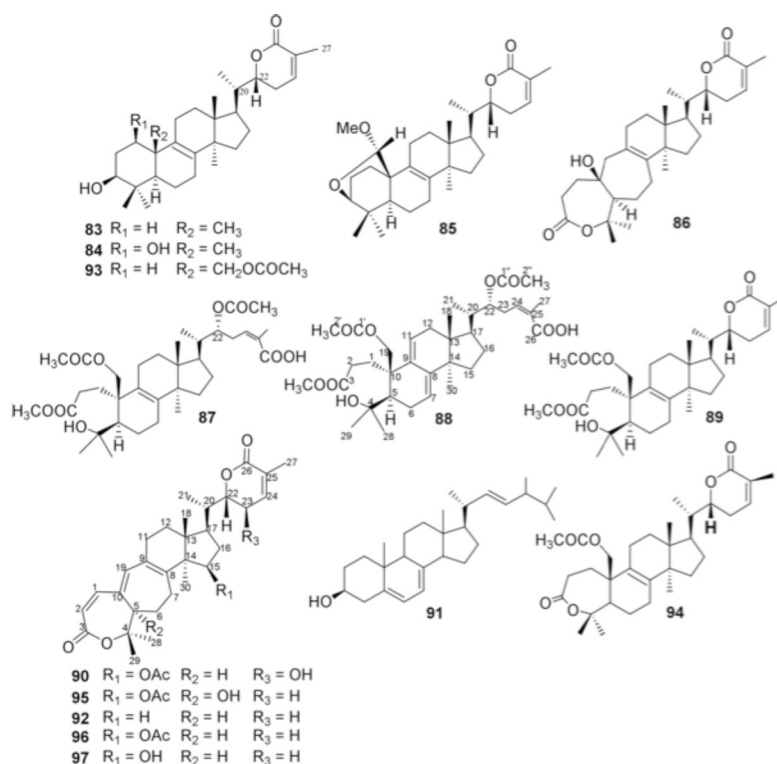
4.4 霊芝トリテルペンとその誘導体

我々は *G. lucidum* Karst. から種々の抗 HIV-PR 及び抗 HCV-PR 活性を有するトリテルペンを単離しているが、^{30,31)} 新たにベトナム産のキノコ *G. colossum* (FR.) CF Baker 及び中国産の薬用キノコ *G. sinense* Zhao, Xu et Zhang の成分に関して研究を行った。*G. colossum* のクロロホルム抽出物から繰り返しカラムクロマトグラフィーを行い、colossolactones I (83), II (84), III (85), IV (86), V (87), VI (88), VII (89), VIII (90) と名付けた 8 種の新規ラノスタン型のトリテルペンを単離した (Fig. 5)。また、新規化合物以外にも ergosterol (91), schisanlactone A (92), colossolactones B (93), C (94), G (95), E (96), D (97) などの既知化合物を同時に単離、同定した (Fig. 5)。Schisanlactone A (92) は *Kazura longipedunculata* から既に単離されている化合物であり、HIV-PR に対する阻害物質として報告されている。³²⁾ Colossolactones V (87) と VI (88) の CD スペクトルの比較から化合物 88 の C-22 の立体配置は同じく *R* と決定した。

Table 9. HIV-1 protease inhibitory activities of triterpenoides isolated from *G. colossum*

Compound	IC ₅₀ (μM)	Compound	IC ₅₀ (μM)
83	4.1	91	271.3
84	4.4	92	10.8
85	>201.3	93	35.8
86	12.0	94	179.0
87	14.5	95	72.4
88	>162.1	96	15.3
89	24.7	97	29.1
90	58.3		

Figure 5. Structures of triterpenes isolated from *G. colossum*



G. sinense は *G. lucidum* と同様に中薬「霊芝」として中国薬典に記載されている。しかしながら *G. lucidum* に比べて、*G. sinense* の化学成分の研究はほとんどなされていない。そこで我々は *G. sinense* 子実体の成分化学的研究を開始し、ファルネシルヒドロキノンがエステル結合したトリテルペン(98–100) (Fig. 6)や5種の高度に参加されたラノスタン型のトリテルペン(101–105)を単離、構造決定した。新規化合物の構造は分光学的手法で決定し、ganosinensins A–C (98–100), ganoderic acid GS-1 (101), ganoderic acid GS-2 (102), ganoderic acid GS-3 (103), 20(21)-dehydrolucidenic acid N (104) 及び 20-hydroxylucidenic acid A (105)と命名した。また、既知化合物として ganoderiol A, ganoderiol D, ganoderic acid (106), 20(21)-dehydrolucidenic acid A (107), 20-hydroxylucidenic acid N (108), lucidenic acid D2 (109), ganodermanontriol (110), ganoderiol F (111), cerevisterol, 5,6-dihydroergosterol 及び ergosterol peroxide を単離、同定した。

次に、我々は *G. sinense* から単離した11種の化合物及び *G. lucidum* からの11種 112–122を加え HIV-PR 阻害活性を調べた (Table 10)。 *G. sinense* の主たる 24(25)不飽和ガノデリン酸(101–103, 106, 116 など)の中では、3-オキソ体は3-ヒドロキシ体より強い阻害作用を示した。

ところが化合物 **104**, **105**, **107–109** などのルシデニン酸類では 3-ヒドロキシ体は 3-オキソ体より強い阻害作用を示した。化合物 **110**, **111** 及び **117–122** などの霊芝アルコールにおいては、**24(25)**不飽和化合物は **24**-ヒドロキシ化合物より強い阻害作用を示した。化合物 **112–115** などの *G. lucidum* 子実体の主成分である 23-オキソガノデリン酸は HIV-PR 阻害作用が認められなかった。化合物 **111**, **108**, **102**, 及び **105** などは顕著に HIV-PR を阻害し、その IC₅₀ 値はそれぞれ 22, 25, 30, 48 μM であった。^{35,36)}

Figure 6. New triterpene-farnesyl hydroquinone conjugates from *G. sinense*

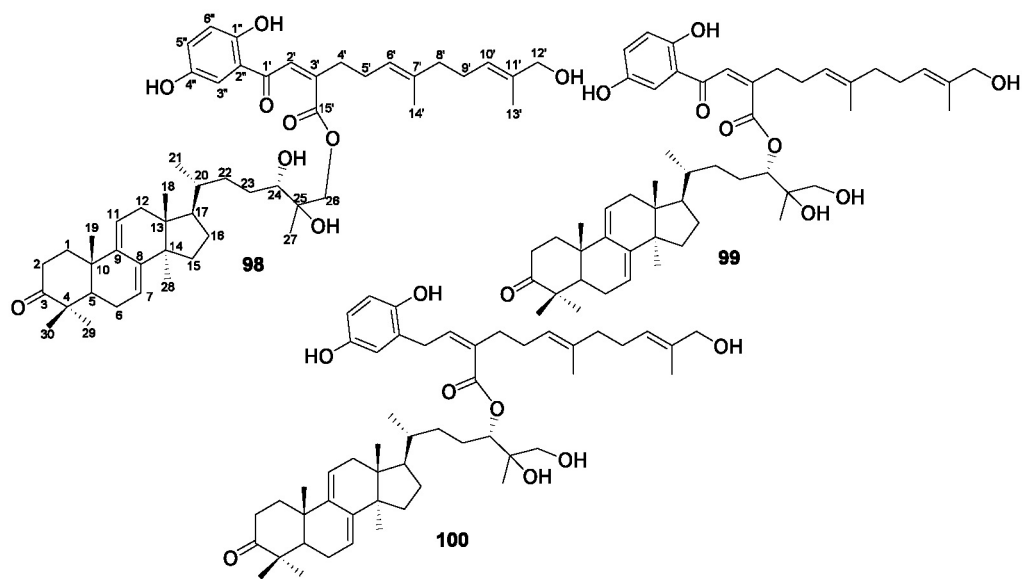
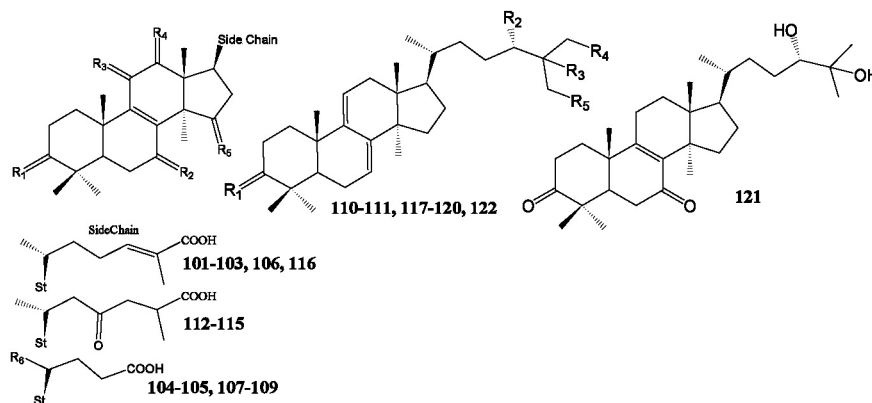


Table 10. Structures and anti-HIV-1 protease activities of Ganoderma triterpenes



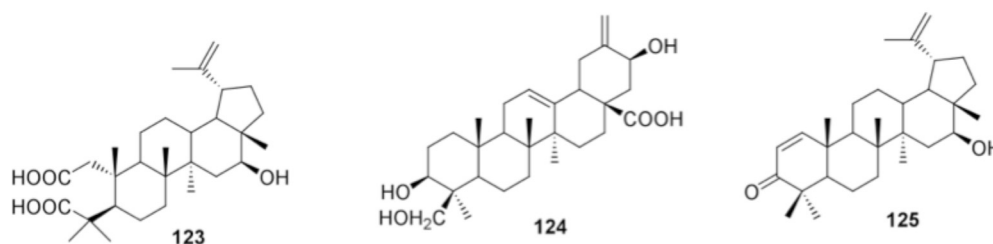
No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	IC ₅₀ (μM)
101	O	β-OH	O	H ₂	O		58
102	O	β-OH	O	H ₂	α-OH		30
103	β-OH	β-OH	O	β-OAc	O		>200
104	β-OH	β-OH	O	H ₂	O	Δ ²⁰ (21)	48
105	O	β-OH	O	H ₂	O	CH ₃ , OH	>200
106	β-OH	β-OH	O	H ₂	O		116
107	O	β-OH	O	H ₂	O	Δ ²⁰ (21)	>200
108	β-OH	β-OH	O	H ₂	O	CH ₃ , OH	25
109	O	O	O	β-OAc	O	α-CH ₃	>200
110	O	OH	OH	OH	H		65
111	O	Δ ²⁴ (25)		OH	OH		22
112	O	β-OH	O	H ₂	α-OH		>200
113	β-OH	β-OH	O	H ₂	O		>200
114	O	β-OH	O	H ₂	O		>200
115	β-OH	β-OH	O	β-OH	O		>200
116	O	O	H ₂	H ₂	H ₂		38
117	β-OH	OH	OH	OH	H		80
118	β-OH	Δ ²⁴ (25)		OH	H		29
119	O	OH	H	OH	H		>200
120	β-OH	Δ ²⁴ (25)		OH	OH		>200
121							99
122	β-OH	OH	OH	H	H		>200
pepstatin A							2.1

4.5 A-*seco* (開環) 型のトリテルペノイド

Stauntonia obovatifolia とその近縁植物は中国においては鎮痛、鎮静薬として使われている。

我々は *S. obovatifoliola* Hayata subsp. *intermedia* (Y. C. Wu) T. Chen から 3 種の新規トリテルペンを含む 14 種の化合物を単離、構造決定した。新規化合物は分光学的方法により、16-hydroxy-2,3-seco-lup-20(29)-ene-2,3-dioic acid (**123**), 3,21,24-trihydroxy-30-nor-oleana-12,20(29)-dien-28-oic acid (**124**), 16-hydroxylupa-1,20(29)-dien-3-one (**125**)と決定した (Fig. 7)。

Figure 7. New triterpenoides isolated from *S. obovatifolia*



これらトリテルペノイドのうち、トリテルペンの A 環が開裂し、1 位と 4 位にカルボキシル基を有する化合物 **123** は最も強く HIV-PR 阻害を示すことが明らかになった。³⁷⁾ そこで、我々は betulin, oleanolic acid (**29**), ursolic acid (**19**), glycyrrhetic acid 及び lupenone などの 5 環性トリテルペンから A 環の開裂した化合物を合成した (Fig. 8)。2 種の A 環の開裂した化合物 **129c** と **129e** は HIV-PR を強く阻害し、それらの IC₅₀ 値はそれぞれ 5.7 及び 3.9 μ M であった (Table 11)。一方、他の 4 種の化合物 **129a**, **129b**, **129d**, **129f** は IC₅₀ 値が 15.7 から 88.1 μ M で中程度か、あるいは弱い阻害作用を示した。2,3-seco-2,3-dioic acid 化合物 (**129a–129e**) は二官能基を有する A 環の開裂したトリテルペン誘導体 **129f** より HIV-PR に対し強い阻害を示した。

Figure 8. Structures of A-seco type triterpenoids and related compounds

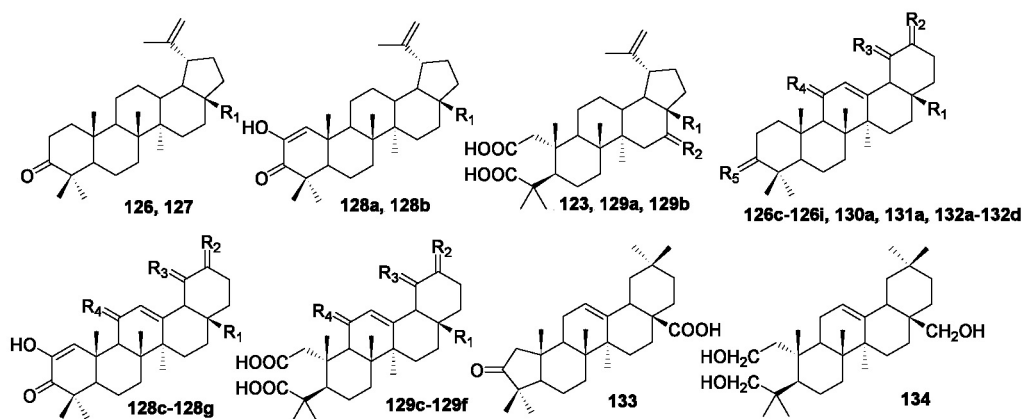


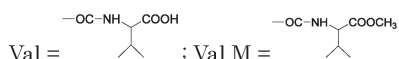
Table 11. Inhibition of HIV-PR by A-seco type triterpenes and related compounds

Comp	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	IC ₅₀ (μM) ± RSD (%)
						HIV PR
126	CHO					31.9 ± 3.8
127	Me					>235.6 ± 4.5
126c	Me	Me, βCOOH	H, H	O	O	23.6 ± 8.5
126d	COOH	H, αMe	H, βMe	H, H	O	37.5 ± 1.3
126e	COOH	Me, Me	H, H	H, H	O	27.4 ± 4.9
126f	D-Val M	Me, Me	H, H	H, H	O	41.4 ± 4.2
126g	L-Val M	Me, Me	H, H	H, H	O	37.0 ± 3.4
126h	D-Val	Me, Me	H, H	H, H	O	45.2 ± 2.3
126i	L-Val	Me, Me	H, H	H, H	O	14.6 ± 4.3
128a	COOH					18.8 ± 4.3
128b	Me					24.6 ± 6.1
128c	Me	Me, βCOOH	H, H	O		15.8 ± 6.0
128d	COOH	H, αMe	H, βMe	H, H		25.4 ± 4.5
128e	COOH	Me, Me	H, H	H, H		19.2 ± 2.8
128f	D-Val	Me, Me	H, H	H, H		49.7 ± 2.9
128g	L-Val	Me, Me	H, H	H, H		40.5 ± 6.5
123	Me	H, βOH				10.9 ± 5.9
129a	COOH	H, H				15.7 ± 3.4
129b	Me	H, H				25.4 ± 5.1
129c	Me	Me, βCOOH	H, H	O		5.7 ± 1.2
129d	COOH	H, αMe	H, βMe	H, H		17.6 ± 2.6
129e	COOH	Me, Me	H, H	H, H		3.9 ± 2.9
129f	D-Val	Me, Me	H, H	H, H		88.1 ± 8.6
131a	L-Val M	Me, Me	H, H	H, H	H, βOAc	21.3 ± 3.2
132a	D-Val	Me, Me	H, H	H, H	H, βOH	47.3 ± 5.2
132b	L-Val	Me, Me	H, H	H, H	H, βOH	10.6 ± 4.3
132c	D-Val M	Me, Me	H, H	H, H	H, βOH	32.3 ± 1.3

132d	L-Val M	Me, Me	H, H	H, H	H, β OH	24.6 \pm 3.8
133						28.6 \pm 2.4
134						30.4 \pm 5.0
^a PC A						1.0 \pm 2.9

^aPepstatin A: positive control for HIV PR. Data represent means \pm RSD for three independent experiments.

LC, lead compound: 16 β -hydroxy-2,3-*seco*-lup-20(29)-en-2,3-dioic acid.



これら化合物の構造と活性相関は以下の様に考えられた。

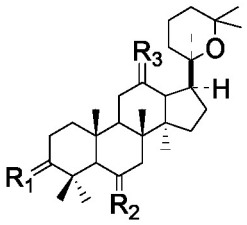
- ① C-28 或いは C-30 位 にカルボン酸が直接結合した 2,3-*seco*-2,3-dioic acid 誘導体は HIV-PR に強い阻害活性を示した。
- ② 2,3-*seco*-2,3-dioic acid 誘導体において 28-メチル基より 28-カルボン酸置換基を有する方が強い阻害活性を示した。
- ③ 2,3-*seco*-2,3,28-trioic acid 誘導体 129e を 2,3-*seco*-2,3,28-triol 誘導体 134 に還元すると HIV-PR に対する阻害が減弱した。
- ④ C-2 にオキソ基を有し、A 環が縮環したトリテルペンは元の A 環が開裂した化合物より HIV-PR 阻害活性が減弱した。
- ⑤ A 環が開裂したトリテルペノイドの C-28 位にアミノ酸 (D-バリン) を結合させると阻害活性は減弱した。

C 型肝炎ウイルスプロテアーゼ (HCV-PR)、レニン、トリプシンなど他のプロテアーゼに対する、これらの A 環の開裂した化合物の阻害作用を検討した結果、これらのプロテアーゼには顕著な阻害を示さなかった ($IC_{50} > 80.3 \mu M$)。このことは A 環の開裂したトリテルペノイドが HIV-PR に高い選択性を持っていることを示している。³⁸⁾

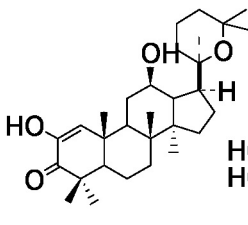
4.6 HIV 及び HCV-PR を阻害するダンマラン型のトリテルペン誘導体の合成

薬用人参に含まれるダンマラン型のトリテルペンを用いて、各種の誘導体を合成し、HIV-PR や他のプロテアーゼに対する阻害活性を調べた (Table 12)。薬用人参の抽出物を酸加水分解すると主生成物として panaxadiol (PD, 135) と panaxatriol (PT, 136) が得られる。これらを出発原料として A, B, C 環のヒドロキシル基を修飾することにより各種の化合物を得た。Table 12 にこれら誘導体の HIV-PR, HCV-PR に対する阻害活性を示す。この場合、陽性コントロールとして HIV-PR には pepstatin A、HCV-PR に HCV NS 3 阻害物質 2 を用いた。それぞれの IC_{50} 値は 1.3 及び 0.5 μM であった。出発物質 PD 及び PT は HIV-PR 或いは HCV-PR のどちらも阻害しなかったが、誘導体は強く阻害したので、構造-活性相関を検討した。

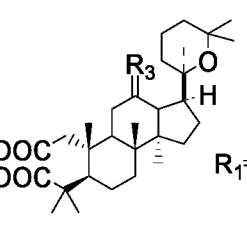
Table 12. Inhibition of HIV- and HCV-PRs by dammarane-type triterpene derivatives



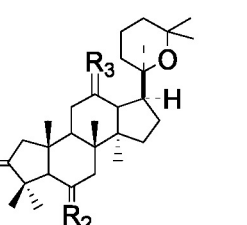
135,136,137a- 137d
141a- 141f



138a



139a-139b



140a-140d

Comp	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ± RSD (%)	
				HIV PR	HCV PR
135	H, βOH	H, H	H, βOH	>217.1 ± 1.3	>217.1 ± 1.3
136	H, βOH	H, αOH	H, βOH	>209.9 ± 3.1	>209.9 ± 3.1
137a	O	H,H	H, βOH	39.4 ± 2.4	>218.0 ± 4.3
137b	O	O	H, βOH	42.3 ± 2.5	>213.0 ± 6.2
137c	O	H, H	O	>218.0 ± 4.3	72.3 ± 4.5
137d	O	O	O	24.2 ± 4.5	>213.0 ± 4.6
138a				28.5 ± 6.4	>212.0 ± 3.0
139a			H, βOH	11.9 ± 6.8	>198.0 ± 3.6
139b			O	22.8 ± 2.2	9.1 ± 5.4
140a	βCOOH, αOH	H, H	H, βOH	10.0 ± 1.0	>204.0 ± 3.8
140b	βCOOH, αOH	O	H, βOH	29.9 ± 5.2	>213.0 ± 7.2
140c	βCOOCH ₃ , αOH	H, H	H, βOH	>198.0 ± 2.8	>198.0 ± 3.2
140d	βCOOCH ₃ , α OH	O	H, βOH	>193.0 ± 3.4	>193.0 ± 4.7
141a	H,βDMS	H, H	H, βOH	2.7 ± 4.3	30.4 ± 3.0

141b	H, β DMS	H, H	O	6.5 \pm 0.1	62.2 \pm 3.5
141c	H, β DMS	H, α OH	H, β OH	3.9 \pm 0.1	>166.0 \pm 0.4
141d	H, β OH	H, α DMS	H, β OH	2.7 \pm 0.4	>166.0 \pm 1.8
141e	H, β DMS	H, α DMS	H, β OH	5.4 \pm 3.8	1.8 \pm 2.6
141f	H, β DMS	H, α DMS	O	10.9 \pm 1.5	18.9 \pm 1.6
^a PC A				1.3 \pm 4.0	nt
^b PC B				nt	0.5 \pm 1.5

^aPC A, Pepstatin A, positive control for HIV PR; ^bPC B: Hepatitis Virus C NS 3

Data represent means \pm RSD for three independent experiments.

Protease Inhibitor 2, positive control for HCV PR; nt: not tested. DMS = 

①ダンマラン型のトリテルペンの 3-オキシ誘導体の中では化合物 **137a**, **138a** 及び **137b** は HIV-PR を中程度に阻害しそれぞれの IC₅₀ 値は 39.4, 28.5 及び 42.3 μ M であったが、HCV-PR に対しては阻害を示さなかった。② 他方、2,3-*seco* 誘導体 **139a** 及び **139b** は、HIV-PR に対して IC₅₀ 値がそれぞれ 11.9, 22.8 μ M で中程度の阻害を示したが、化合物 **139b** は HCV-PR に対して唯一、強力な阻害剤であった(IC₅₀, 9.1 μ M).このことは 3-*seco* 誘導体においては、12-オキシ基が遊離ヒドロキシル基 (**139a**, IC₅₀ > 198 μ M) に比べて有意な HCV-PR 阻害増強作用があることを示している。③ A 環にカルボキシ基を有し、A 環が縮環した A-ノル ダンマラン型の化合物 **140a** 及び **140b** は HIV-PR に対して中程度の阻害を示し、その IC₅₀ 値は 10.0, 29.9 μ M であった。しかしながら、HCV-PR には無効であった。④ 化合物 **140b** の様に C-6 位にオキシ基を有する化合物の場合は、HIV-PR に対して弱い阻害活を示した。さらに⑤ メチルエステル化合物 **140c** 及び **140d** では両プロテアーゼに阻害活性を示さなかった。⑥モノアシル(**141a**–**141d**)及びジアシル(**141e** 及び **141f**)化合物は HIV-PR を強く阻害した(IC₅₀ は 2.7 から 10.9 μ M). この場合、モノアシル化体は、ジアシル体より強力であった。他方、ジアシル体は明らかに HCV-PR を阻害した。特に化合物 **141e** は強く HCV-PR を阻害し、その IC₅₀ 値は 1.8 μ M であった。モノアシル体とジアシル体を比較する(**141d** 対 **141e** 及び **141b** 対 **141f**)と、前者は主として HIV-PR を阻害し、後者は両プロテアーゼを阻害した。従って、モノアシル体の方がジアシル体より、プロテアーゼに対して選択的であるといえる。更に、⑦12-ヒドロキシ体(**141a** 及び **141e**)は 12-オキシ体(**141b** 及び **141f**)より強い阻害を示した。

我々はウイルスプロテアーゼに強い阻害作用を示した 8 種の化合物(139a, 139b 及び 141a–141f)がレニンやトリプシンに対する阻害効果を検討した。どの化合物も 1 mg/ml 程度の高濃度においてもレニンやトリプシンに対する阻害は認められなかった。これらの結果はガンマラン型のトリテルペンが HIV-PR や HCV-PR に対して強い阻害作用と高い選択性を持っており、生体内に存在するヒトプロテアーゼを阻害し、生体内の生理機能を損なうことはないと考えた。⁴⁰⁾

結論として、抗 HIV 活性を有する betulinic acid の例で示されるように、トリテルペンは興味ある生物活性を持つ天然物である。ごくありふれたトリテルペンを出発原料としてその構造を修飾し、例えば bevirimat (DSB, PA-457)の様に抗エイズ薬としての臨床も含めて、開発が進められているものもある。このように、抗ウイルス活性を有する新規トリテルペン誘導体の開発は多くの研究グループにおいて活発に行われており、新規トリテルペン誘導体が HIV 及び HCV の感染予防や治療のための薬物候補となる可能性は高い。

4. おわりに

これら研究は主として天然物化学の立場から行ったものである。幸いにもいくつかの阻害活性のある化合物へと導くことができた。しかし、実際に抗ウイルス薬として臨床の場で用いられるにはまだまだ克服しなければならない問題点が数多くあると思われる。抗エイズ薬を最も必要としているのは発展途上国の人々であるが、既存のエイズ治療薬は非常に高価であるためその多くの人々は使用することができない。しかし、彼らが日頃用いている伝統薬物を用いたエイズ治療薬が開発されることは、成果がその地域の人々へ還元されるだけでなく、安価でかつ大量供給へとつながる。伝統薬物から実用的に用いられる治療薬が開発されることを願って、今後も更に有効な物質の探索を進めていく予定である。

最後に、本研究は以下の研究室在籍者の協力によるものであり、実験を担当した Yasumina Aura Lim, Sahar El-Mekkawy, Meselhy Ragab Meselhy, Riham Salah El-Dine, 佐藤直人、危英博士らに深く感謝する。

参考文献

- 1) N. E. Kohl, E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolinick, I. S. Sigal, Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4686-4690 (1988).
- 2) J. K. Wong, M. Hezareh, H. F. Günthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina, D. D. Richman, Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of

- plasma viremia. *Science*, **278**, 1291-1295 (1997).
- 3) D. Finzi, M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman, R. F. Siliciano., Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, **278**, 1295-1300 (1997).
 - 4) I. T. Kusumoto, M. Hattori. Searching for anti-HIV agents among the traditional medicines. In: H. Watanabe and T. Sibuya, Editors, "Pharmacological Research on Traditional Herbal Medicines," p. 219-235, Harwood Academic Publishers (1999).
 - 5) S. El-Mekkawy, M. R. Meselhy, N. Nakamura, M. Hattori, T. Kawahata, T. Otake. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry*, **53**, 457-464 (2000).
 - 6) S. El-Mekkawy, M.R. Meselhy, N. Nakamura, M. Hattori, T. Kawahata, T. Otake. 12-*O*-acetylphorbol-13-decanoate potently inhibits cytopathic effects of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), without activation of protein kinase C. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1346-1347 (1999).
 - 7) T. Kawahata, T. Otake, H. Mori, M. Morimoto, N. Ueba, I.T. Kusumoto, S. El-Mekkawy, M.Hattori, T. Namba. Screening of Egyptian folk medicinal plant extract for anti-human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) activity. *J. Trad. Med.*, **13**, 59-65 (1996).
 - 8) F. J. Evans, S. E. Taylor. Pro-inflammatory tumor-promoting and anti-tumor diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymeleaceae. In: Herz, W., Grisebach, H. and Kirby, G.W. Editors, "Progress in The Organic Chemistry of Natural Products," vol. 44, Springer-Verlag, New York, pp. 1-99 (1983).
 - 9) F. J. Evans, C. J. Soper. The tigliane, daphnane and ingenane diterpenes, their chemistry, distribution and biological activities. *J. Nat. Prod.*, **41**, 193-233 (1978).
 - 10) E. Hecker, In: Slaga, T.J., Sivak, A. and Boutwell, R.K. Editors, "Carcinogenesis," vol. 2 Raven Press, New York, pp. 11-48 (1978).
 - 11) P. M. Blumberg, R. K. Boutwell. In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: Part 1. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **8**, 153-197 (1980).
 - 12) S. Kupchan, I Uchida, A. Branfman, R. Dailey Jr, and B. Fei. Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. *Science*, **191**, 571-572 (1976).
 - 13) K. R. Gustafson, J. H. Cardellina II, J. B. McMahon, R. J. Gulakowski, J. Ishitoya, Z. Szallasi, N. E. Lewin, P. M. Blumberg, O. S. Weislow, A nonpromoting phorbol from the

- Samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1. *J. Med. Chem.*, **35**, 1978-1986 (1992).
- 14) M. Gschwendt, E. Hecker. On the active principles of the spurge family. II. Skin irritant and cocarcinogenic factors from *Euphorbia triangularis* Desf. *Z. Krebsforsch Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.* **81**, 193-210 (1974).
 - 15) Y. A. Lim, S. Kojima, N. Nakamura, H. Miyashiro, H. Fushimi, K. Komatsu, M. Hattori, K. Shimotohno, M. P. Gupta, M. Correa. Inhibitory effects of *Cordia spinescens* extracts and their constituents on reverse transcriptase and protease from human immunodeficiency virus. *Phytother. Res.*, **11**, 490-495 (1997).
 - 16) J. F. Morton, "Atlas of Medicinal Plants of Middle America," p.719, Springfield (1981).
 - 17) L. G. Joly, S. Guerra , R. Séptimo , P. N. Solís , M. D. Correa , M. P. Gupta , S. Levy , F. Sandberg , P. Perera. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guaymi Indians in western Panama. Part II. *J. Ethnopharmacology*, **28**, 191-206 (1990).
 - 18) C.-M. Ma, N. Nakamura, H. Miyashiro, M. Hattori, K. Shimotohno. Inhibitory effects of constituents from *Cynomorium songaricum* and related triterpene derivatives on HIV-1 protease. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 141-145 (1999).
 - 19) C.-M. Ma, N. Nakamura, M. Hattori, H. Kakuda, J. C. Qiao, H. L. Yu. Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of *Xanthoceras sorbifolia*. *J. Nat. Prod.*, **63**, 238-242 (2000).
 - 20) C.-M. Ma, N. Nakamura, M. Hattori. Chemical modification of oleanene type triterpenes and their inhibitory activity against HIV-1 protease dimerization. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1681-1688 (2000).
 - 21) C.-M. Ma, H. Miyashiro, M. Hattori, K. Shimotohno. Screening of Chinese and Mongolian traditional medicines for the inhibitory activity on human immunodeficiency virus type 1 protease. *J. Trad. Med.*, **12**, 418-419 (1995).
 - 22) 江蘇新医学院編, 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, p. 2395 (1997).
 - 23) C.-M. Ma, S. S. Jia, T. Sun, Y. W. Zhang. Triterpenes and steroidal compounds from *Cynomorium songaricum*. *藥學學報*, **28**, 152-155 (1993).
 - 24) S.Z. Zhang and S.Y. Zhang, Chemical constituents of *Cynomorium songaricum*, *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, **26**, 649-651(1991).
 - 25) Y.-J. Chen, T. Takeda, Y. Ogihara. Studies on the constituents of *Xanthoceras sorbifolia* BUNGE. II. Major sapogenol and a prosapogenin from the fruits of *Xanthoceras sorbifolia* BUNGE. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3378-3383 (1984).

- 26) Y.-J. Chen, T. Takeda, Y. Ogihara. Studies on the constituents of *Xanthoceras sorbifolia* BUNGE. III. Minor prosapogenins from the fruits of *Xanthoceras sorbifolia* BUNGE. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 127-134 (1985).
- 27) Y.-F. Huang, X.-Z. Feng, *Zhongcaoyao*, **18**, 199-202 (1987).
- 28) C.-B. Cui, Y.-J. Chen, X.-S. Yao, G.-X. Qu, Y.-L. Xian. *Zhongcaoyao*, **18**, 297-298 (1987).
- 29) Y. Kashiwada, H.-K. Wang, T. Nagao, S. Kitanaka, I. Yasuda, T. Fujioka, T. Yamagishi, L. M. Cosentino, M. Kozuka, H. Okabe, Y. Ikeshiro, C.-Q. Hu, E. Yeh, K.-H. Lee. *Anti-AIDS Agents*. **30**. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.*, **61**, 1090-1095 (1998).
- 30) B.S. Min, N. Nakamura, H. Miyashiro, K. W. Bae, M. Hattori. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1607-1612 (1998).
- 31) S. El-Mekkawy, R. M. Meselhy, N. Nakamura, Y. Tezuka, M. Hattori, N. Kakiuchi, K. Shimotohno, T. Kawahata, T. Otake. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, **49**, 1651-1657 (1998).
- 32) Q. Z. Sun, D. F. Chen, P. L. Ding, C. M. Ma, H. Kakuda, N. Nakamura, M. Hattori. Three new lignans, longipedunins A—C, from *Kadsura longipedunculata* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 129-132 (2006).
- 33) R. S. EL Dine, A. M. El Halawany, N. Nakamura, C. M. Ma, M. Hattori. New lanostane triterpene lactones from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum* (FR.) C. F. BAKER. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 642-646 (2008).
- 34) R. S. EL Dine, A. M. El Halawany, C. M. Ma, M. Hattori. Anti-HIV-1 protease activity of lanostane triterpenes from the Vietnamese mushroom *Ganoderma colossum*. *J. Nat. Prod.*, **71**: 1022-1026 (2008).
- 35) N. Sato, C. M. Ma, K. Komatsu, M. Hattori. Triterpene-farnesyl hydroquinone conjugates from *Ganoderma sinense*. *J. Nat. Prod.*, **72**, 958-961 (2009).
- 36) N. Sato, Q. Zhang, C. M. Ma, M. Hattori. Anti-HIV-1 protease activity of new lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma sinense*. *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1076-1080 (2009).
- 37) Y. Wei, C. M. Ma, D. Y. Chen, M. Hattori. Anti-HIV-1 protease triterpenoids from *Stauntonia obovatifoliola* Hayata subsp. *intermedia*. *Phytochemistry*, **69**, 1875-1879 (2008).
- 38) Y. Wei, C. M. Ma, M. Hattori. Synthesis and evaluation of A-*seco* type triterpenoids for

- anti-HIV-1 protease activity. *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 4112-4120 (2009).
- 39) Y. Wei, C. M. Ma, M. Hattori. Anti-HIV protease triterpenoids from the acid hydrolysate of *Panax ginseng*. *Phytochem. Lett.*, **2**, 63-66 (2009).
- 40) Y. Wei, C. M. Ma, M. Hattori. Synthesis of dammarane-type triterpene derivatives and their ability to inhibit HIV and HCV proteases. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 3003-3010 (2009).