

キイロスズメバチに由来する
生物薬剤の開発研究

2008

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物環境科学専攻
(岩手大学)

藤原由美子

目次

序論	1
第一章 成虫体抽出物からの脳機能向上作用の探索	7
材料と方法	9
1. 供試試料	
2. 遊離アミノ酸分析	
3. 成虫体からの抽出	
4. ハチミツの調整	
5. 実験動物	
6. 投与薬物の調整	
7. ステップスルー型受動的回避実験	
8. モリス水迷路実験	
9. 統計解析	
結果	22
1. 遊離アミノ酸分析	
2. 実験動物	
3. ステップスルー型受動的回避実験	
4. モリス水迷路実験	
考察	32
1. 遊離アミノ酸分析	
2. ステップスルー型受動的回避実験とモリス水迷路実験	
摘要	37
第二章 巣からの生理活性物質の解析	38
材料と方法	40
1. 供試試料	
2. 顕微鏡による観察	
3. 溶媒抽出	
4. 生物検定	
5. 細胞増殖抑制活性物質の精製	
6. 核磁気共鳴スペクトルによる構造解析	
7. 活性物質の合成	

8. アポトーシスの検出

結果	50
1. 外被と巢盤, 唾液腺の顕微鏡観察	
2. 粗抽出物の収量と収率	
3. 粗抽出物による生物検定	
4. 細胞増殖抑制活性物質の精製	
5. 構造解析	
6. 合成品による生物検定	
7. アポトーシス/ネクローシスの検討	
考察	77
摘要	82
総合考察	83
引用文献	90
補遺	109

序 論

地球の生物の中で最多の150万種ともいわれる昆虫は、約4億4600万年前の古生代シルル紀に出現したと考えられており、大きな気候変動などの環境変化に巧みに適応してきた。これに対し人類の出現は、新生代第四紀洪積世の初めであり、50～100万年前のこととされている。原始時代の人間にとって、生きることは食料を確保することであり、したがって昆虫とのかかわりも食料としての利用だったと推測される（三橋, 1997）。糞石などの研究から身近に存在する昆虫は、貴重なタンパク質源として食料にされていたことが解明されている。また、膜翅目を中心とした昆虫による花粉媒介で結実した果実や、旧石器時代（BC7000 ころ）のスペインの洞窟壁画に描かれたような野生ミツバチの巣から採れたハチミツは、人間にとって初めての甘味のある糖分となったであろうと推測される。

時代が進み、文明が発達するにつれ、カイコ、ミツバチなどの有用昆虫や、一部地域での昆虫食、薬用、鑑賞用昆虫などを除いて、昆虫が人間のために利用されることはほとんどなくなり、むしろ農作物を食い荒らしたり、吸血・刺咬により病気を媒介するなど、人間の生活を脅かす存在として、物理的のみならず、心理的にも排除されるようになった。

近年、昆虫はその種の多様性と、卓越した環境適応能力により、改めて注目され、残された地球の未利用資源であるとの認識が高まってきた。そしてわが国において、昆虫テクノロジーという新しい分野が生み出され、農業分野をはじめ生命科学、医学、薬学、工学、心理学の分野にまで、その機能利用が広がっている（鈴木, 2005；鈴木ら, 2006）。

人間の生活や生命に危害を加える生物にはクマ、毒ヘビ、サメなどが存在するが、現在の日本において、人間にとって最も危険な生物は、国内に7種類存在する社会性昆虫のスズメバチ属（*Vespa mandarinia*, *ducalis*, *analis*,

crabro, *dybowskii*, *simillima* and *affinis*) である。彼らは巣を防衛する本能が強く、一定の距離以上に近づくものを襲って毒針で刺す。その強力な毒成分は、主にヒスタミン、セロトニンなどのアミン類、ペプチド(マストパラン、マンダラトキシンなど)、タンパク質(ホスホリパーゼ、プロテアーゼ)などの混合成分からなり(Abe *et al.*, 1982; Nakajima *et al.*, 1985; Nakajima, 1986)、刺された人の体質によってはアナフィラキシーショックを起こし、厚生労働省人口動態統計によると、毎年30~40人の死亡が報告されている。

またスズメバチは、特にセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) に甚大な被害を与える天敵として養蜂家に恐れられている。セイヨウミツバチは、明治初期にヨーロッパから移入されたが、その集蜜能力の高さ、逃去しないなどの飼育上の扱いやすさから、在来種であるニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) による細々とした養蜂に取って代わった。しかし、秋期に襲来するオオスズメバチ (*Vespa mandarinia*) に対して、集団ですばやくボール状に取り囲み、胸部筋肉による発熱で蒸殺する行動をとるニホンミツバチとは異なり、セイヨウミツバチは効果的な防御行動をとることができず、狙われたコロニーは全滅する(Ono *et al.*, 1995)。キイロスズメバチ (*Vespa simillima*) は、セイヨウミツバチのコロニーを全滅させることはないが、巣の入り口近くを絶えずホバリングして、越冬に備えるための花蜜や花粉を採集して帰巣するセイヨウミツバチの働蜂を多数獲っていく。秋期のスズメバチ属のコロニーでは新女王蜂、雄蜂の幼虫が数多く産出され、それらを育てるために多量の昆虫類が必要であり、セイヨウミツバチを簡単に狩ることができる養蜂場は、スズメバチにとって都合の良い餌場となっている。

一方、スズメバチ類は自然界において食物連鎖の上位に位置し、農作物を食い荒らす害虫も狩るなど、生態系のバランスを維持する益虫としての一面もある。また、「繁栄」や「団結」の象徴として、その巣を飾る風習も多くの地域で見られる。特に長野県や岐阜県を中心とした山間部などでは、その幼

虫、蛹が佃煮やさまざまな調理方法で食され、成虫も焼酎やハチミツに漬けて込まれて、伝統的な滋養強壯食品として利用されてきた（松浦, 2002）。そのような地域では、巣が最も成長しスズメバチが攻撃的になる9月から10月に、自らの手でスズメバチ（特にクロスズメバチ *Vespula* 属）の巣を探し捕獲するのを無上の楽しみにしている人々がいる。彼らは採った巣の大きさや重さを競ったり、料理して食べるだけでなく、将来にわたっての共生を考えて、人工的にクロスズメバチの女王蜂を越冬させるなど、飼育法の確立にも努めている。人間とスズメバチとのかかわりがその土地の郷土文化の一端となっている（野中, 2005）。

本研究のキイロスズメバチ (*Vespa simillima*) は女王蜂、雄蜂、働蜂の三つのカーストからなる社会性昆虫であり、成虫の体長は 2~3cm と小型であるが、その巣は直径 80cm ほどの大きさになることもあり、性質は攻撃的である。近年、特に都市部やその周辺で増加し、刺傷事故が問題となっている。キイロスズメバチが増えた原因として、里山の生態系の頂点に立つ天敵のオオスズメバチが減少したことがあげられる。オオスズメバチは、土の中などの閉鎖空間に営巣する種であるが、山地や森林が切り開かれ住宅地などになった結果、営巣する場所を確保しにくくなった。一方、キイロスズメバチは、閉鎖空間、開放空間のどちらにも営巣し、人家の軒下や屋根裏、雨戸の戸袋の中、換気口、床下などもよく利用する。また、巣が狭くなると引越しをする性質を持っているなど、環境に適応する能力がとても高い（松浦, 2005）。

このような背景において、藤原養蜂場（岩手県 盛岡市）は、約 25 年前から市役所や保健所、個人宅から依頼を受けてスズメバチの駆除を行ってきた。駆除の対象となるスズメバチのほとんどは、人家に接する場所に営巣されたキイロスズメバチの巣である。最初の頃は、薬剤で駆除し処分していたが、次第にその有効利用を考え、生け捕りにできた時は、巣（外被と巣盤）、幼虫、蛹、繭、成虫に分け、商品開発を試みてきた。その結果、養蜂家が伝統的に

ってきた成虫をハチミツに漬け込んだ商品、ハチミツによって自然抽出された成虫のエキスを材料とした天然タイプの飲料剤、幼虫・蛹・成虫を混合して粉末化した商品、巣を粉末化した商品の4点を開発、販売している。飲料剤については、ヒトに対して運動生理学的視点からの検証がなされた。その結果、運動による糖質代謝と脂質代謝を高め、筋細胞の損傷や代謝障害を軽減させるとともに、中枢神経系に関与する芳香族アミノ酸に影響を与える可能性が示唆された(岩本ら, 2008)。この飲料剤は、さまざまな分野の運動選手を中心に使用されている(朝日新聞参照, 1994)。また、スズメバチ類は蚕と同様に、幼虫から蛹への変態期でタンパク質の糸を吐いて繭を作るが、この繭タンパク質を抽出精製し、粉末状の精製ホーネットシルクを得た(独立行政法人農業生物資源研究所との共同研究)。これがハロゲン化有機溶媒に可溶であることを見出し、フィルム状、スポンジ状、繊維状などの形状に成型する方法を確立した。繭のアミノ酸組成を調べたところ、蚕の絹タンパク質と比べてグリシンが $\frac{1}{4}$ 以下と少なく、アルギニン、スレオニン、グルタミン酸が5倍ほど多く含まれる構成であること、さらにNMRによる解析の結果、 α ヘリックスと β シート構造が共存していることが示唆された(Kameda *et al.*, 2005)。スズメバチの繭を有用生体素材として利用しようとする試みは初めてである(特許出願公開番号 2006-45076)。

スズメバチ由来の商品としてはその他に、成虫と幼虫間の栄養交換と呼ばれる行動の研究から生まれた合成飲料剤が、大手企業から販売されている。この研究では、幼虫が唾液腺から分泌する栄養液のアミノ酸分析がなされ、プロリン、トレオニン、グリシン、アラニン、チロシンのような遊離アミノ酸が大量に存在すること、しかも同時に全ての必須アミノ酸も含むことが明らかにされた(Abe *et al.*, 1991; 阿部, 1995)。この結果からアミノ酸混合液を合成し、動物実験を行ったところ、運動後の乳酸値が減少するなどの運動機能の改善が実証された(Abe *et al.*, 1995)。昆虫で発見された新しい生理機

能を科学的に検証し、人間活動に役立てようとする良い例となっている。

中国で最古の薬物書とされている後漢時代の「神農本草経」や、唐時代の「新修本草」、宋時代の「証類本草」、明時代の「本草綱目」には、スズメバチ類やアシナガバチ類の巣である「露蜂房」の記述があり、鼻炎、中耳炎、歯痛、感染性および化膿性の皮膚疾患、皮膚の掻痒、乳腺炎、呼吸器疾患など、さまざまな症状に使用されてきた。また、スズメバチの幼虫は、霜焼け、魚の目などに潰して塗布したり、強壯剤として使用され、成虫は面疔などの腫れ物に用いられてきたと記述されている (Namuba *et al.*, 1988)。韓国においてもスズメバチ類やアシナガバチ類の巣が伝統薬として利用されており (Pemberton, 1999)、わが国でも漢方薬の一つの生薬として、鼈甲煎丸や、催乳方などの方剤として現在も用いられている。しかし、これらの利用は経験則に基づいたもので、活性成分などの研究はほとんど報告されていない。

現在わが国は、世界第一位の長寿国であるが、高齢化にともない悪性腫瘍や認知症、代謝症候群の患者が増加し、一個人にとっても、また家庭や社会全体としても大きな問題となっている。これらの疾患は、食生活を中心とする長期間の不適切な生活習慣により引き起こされることが多い。急性疾患や感染症に大きな成功を収めてきた西洋医学は、現在のところ生活習慣病を克服するにはいたっていない。このような中で、西洋医学以外のさまざまな医療を行う代替医療が注目されている。漢方薬や健康食品もその範疇に含まれ、毎日摂取する方剤や食品から生活習慣病などを治療、予防する目的をもって、科学的な根拠が示されているものはまだ数少ないのが現状である。

本研究は、駆除したキイロスズメバチの有効利用と、キイロスズメバチ由来の健康食品に科学的な付加価値を付けること、さらにキイロスズメバチの生物薬剤としての可能性を見出すことを目的とし、第一章では成虫体の抽出物から、記憶・学習向上機能と抗認知機能の探索を、第二章では巣抽出物からの機能性成分の単離とその構造解析を試みた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇篤なる御指導と御校閲を賜った岩手大学農業生命科学科応用昆虫学研究室教授・鈴木幸一博士、講師・安 嬰博士、ならびに御助言と御校閲を賜った岩手大学農学部教授・吉川信幸博士、山形大学農学部教授・後藤三千代博士、帯広畜産大学畜産学部准教授・倉持勝久博士、大阪市立大学大学院理学研究科准教授・品田哲郎博士、岩手大学農学部准教授・小藤田久義博士に深甚なる感謝の意を表します。さらに実験において多大なるご指導を賜った岩手大学農学部獣医学科名誉教授・小林晴男博士、前岩手医科大学歯学部講師・矢後素子博士、岩手大学応用昆虫学研究室博士研究員・楊 平博士に甚大なる感謝の意を表します。また公私にかかわらず、お世話になった応用昆虫学研究室諸氏に心から感謝申し上げます。

最後に、常に私を支えてくれた家族全員に感謝いたします。

第一章 成虫体抽出物からの脳機能向上作用の探索

高齢化社会が到来したわが国におけるある健康意識調査によると、60才以上の男女が日頃気にしている体調の第一位は、脳機能についてであるという。もし毎日の“食べる”ことから記憶・学習を向上させる成分、抗認知効果のある成分を摂取できれば、高齢者に多い脳の病気の予防や、脳機能の活性化に役立つと期待される。しかし、脳には血液脳関門が存在し血中物質の脳内移行を制限しており、栄養学的に脳機能に良いと思われている成分も容易に通過できない (Egleton and Davis, 2005)。

現在、社会問題になりつつあるアルツハイマー型痴呆では、早期から前頭葉のグルコース代謝低下が PET (positron emission tomography) により認められている (Ishii *et al.*, 1997)。また、記憶に深く関係する海馬や、理解、言語、記憶などの思考回路を司る大脳皮質の特定領域、なかでもアセチルコリンを神経伝達物質として神経終末から放出するコリン作動性ニューロンでその変性、脱落が顕著であるが (Zeisel *et al.*, 1981; Coyle *et al.*, 1983)、現在、根本的な治療法はない。

一方、記憶・学習のメカニズムは、海馬においてグルタミン酸作動性シナプス伝達の長期増強 (LTP, long term potentiation) が引き起こされること (Bliss and Lomo, 1973) が基本であると考えられている。学習によって獲得された情報は海馬が中心となり、タンパク質合成に依存しない短期記憶から、タンパク質合成を要する長期記憶へと固定化され、最終的には大脳皮質に貯蔵されることが、さまざまな研究から示唆されている (Bontempi *et al.*, 1999)。

これまでに抗認知などの脳機能の向上作用を示す天然物として、当帰芍薬散 (Hiramatsu *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 1996)、イチョウ (Stackman *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2002)、チョウセンニンジン (Yamaguchi *et al.*, 1996; Jin

et al., 1999) , ガラナ (*Espinola et al.*, 1997) などが報告されている。これらの脳機能向上作用のメカニズムとしては、摂取することによってアセチルコリン合成酵素の活性が上昇し、コリン作動性神経系が賦活する作用や、摂取物中に存在するサポニン、タンニン、フラボノイドなどの抗酸化活性による脳保護作用が示唆されている。

昆虫関連物質では、カイコのシルクパウダーをマウスに経口投与し行動実験を行った結果、一定の抗認知作用が認められている。その要因としてシルクパウダーに約 10%含まれているチロシンが、カテコールアミンの脳内濃度を高めていると推測されている (大内ら、2001) 。また、カイコ繭のフィブロイン中に存在する特定のアミノ酸やペプチドに脳機能改善効果があるという報告や (Lee and Kim, 2005) , 水抽出プロポリスを投与したラットの海馬の歯状回で、アセチルコリンを合成する酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼの陽性度が高まる (鈴木ら、2002) という報告がある。

また、スズメバチと同じ膜翅目に属するセイヨウミツバチの毒成分の中に、アミノ酸 22 残基の MCD ペプチド (mast cell destroying) があり、これがラット海馬の LTP の発現に関与していることが報告されている (Cherubini *et al.*, 1987) 。スズメバチからは、運動機能を改善する生理機能がすでに見出されているが (阿部, 1995) , さらに新しい機能を探索するために、キイロスズメバチ成虫体の抽出物をマウスに経口投与し、(1)記憶・学習向上作用と、(2)抗認知作用の探索を試みた。

材料と方法

1. 供試試料

キイロスズメバチ成虫の働蜂 (Fig. 1) は, 2001年8月と2002年9月に盛岡市巣子地区, 岩手大学農学部附属植物園内で, 藤倉喜久治氏 (滝沢村在住) によって捕獲された巣より入手した. 巣全体を -20°C で冷凍後, 外被を取り去り手早く働蜂を選択し, 合計約500匹を -80°C で保存し以後の実験に使用した.

2. 遊離アミノ酸分析

昆虫卵からの遊離アミノ酸画分の抽出法 (Suzuki *et al.*, 1984) に従って, キイロスズメバチ成虫 (働蜂) を3%スルホサリチル酸で磨碎, 遠心し, 上清を濃度調整してアミノ酸アナライザー (JLC-500/V 日本電子社製) にて測定した. 標準アミノ酸混合液の解析結果との面積比より, 濃度を算出した.

3. 成虫体からの抽出

(1) 酸メタノール抽出法

Fig. 2 に酸メタノール抽出法を示した (Tanaka *et al.*, 2003). -80°C で保存していた約180匹のキイロスズメバチ成虫 (働蜂), 約70gを予め冷却しておいた乳鉢に移し, 冷酸メタノール溶液 (メタノール:水:酢酸=90:9:1) を成虫の5~10倍容加え磨碎した. 磨碎物を 0°C , 10,000gで30分間冷却遠心機で遠心分離し, 上清をフラスコに移して沈殿物に酸メタノール溶液を加え, さらに磨碎し, 前述と同様の操作を3回繰り返した. 得られた上清を遠心エバポレーターで濃縮し, 10分間の熱処理を行った後, 遠心分離した (0°C , 10,000g, 20分間). 上清を計量しながらその4倍量の冷アセトンを加え, 一晚スターラーで攪拌した. 遠心分離 (0°C , 10,000g, 30分間) 後, 上清を取り

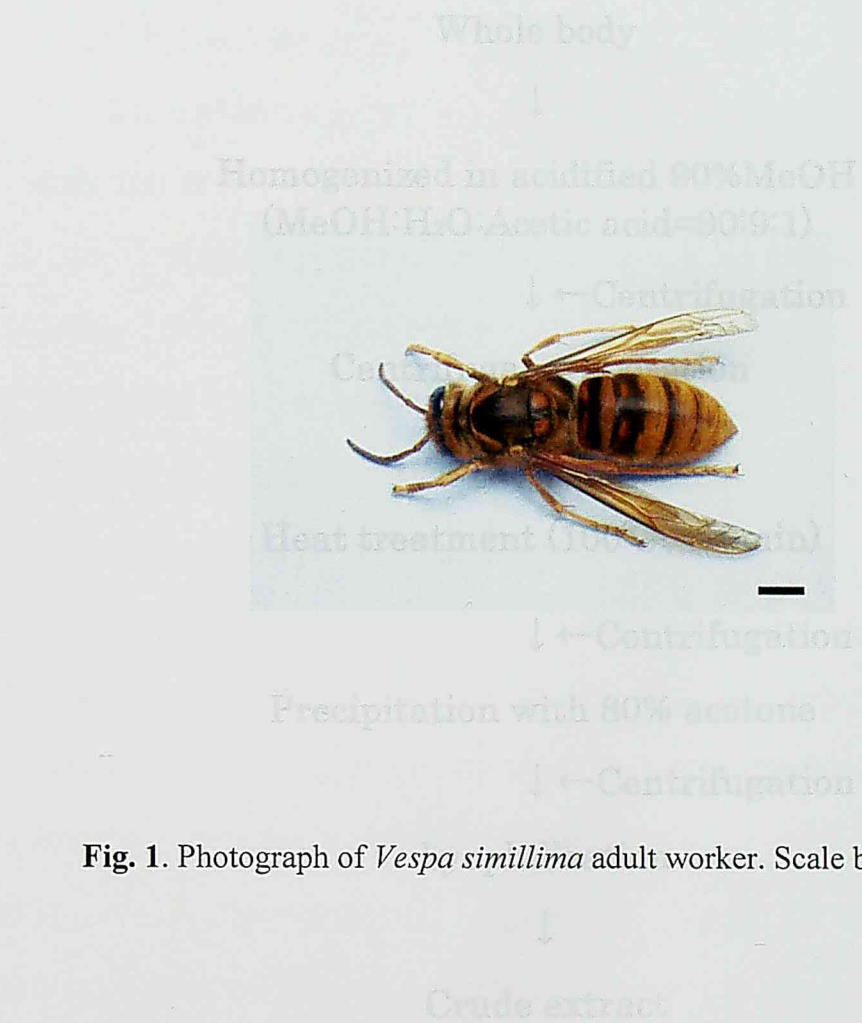


Fig. 1. Photograph of *Vespa simillima* adult worker. Scale bar=3mm.

Fig. 2. Preparation of acid-methanol extract from *Vespa simillima* (whole body)

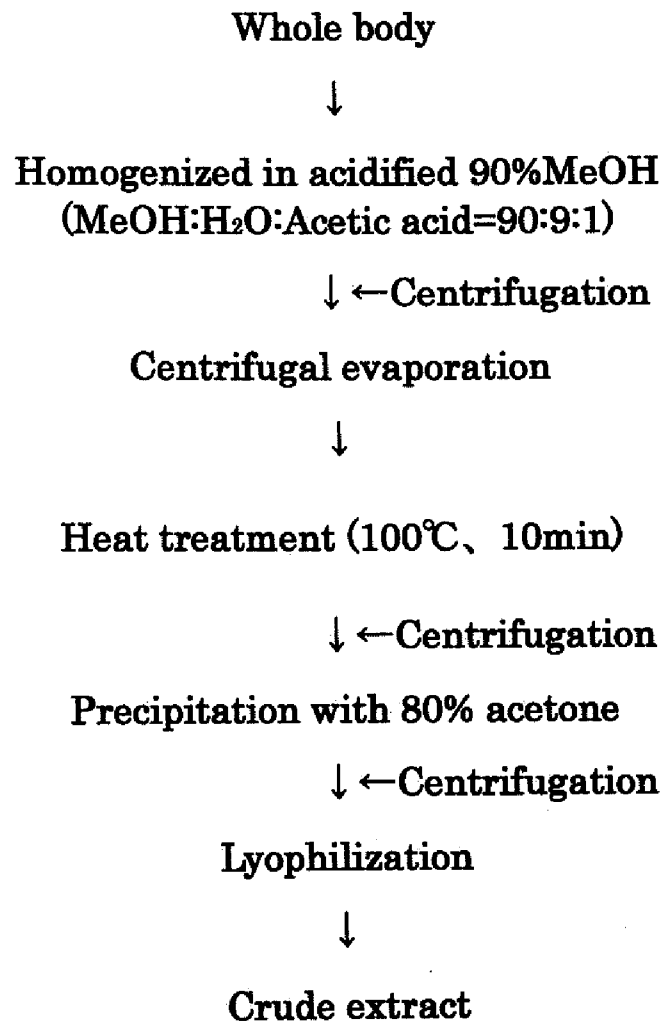


Fig. 2. Preparation of acid-methanol extract from *Vespa simillima* (whole body)

除き、沈殿を蒸留水に溶かして回収、凍結乾燥し、最終的に約 2.4g の酸メタノール抽出物(以下, AE)を得た。この抽出を実験期間中、繰り返し行った。タンパク質除去や酵素失活により, AE は主に遊離アミノ酸からポリペプチドを含むと考えられる。

(2) 2%NaCl 抽出法

Fig. 3 に 2%NaCl 抽出法を示した (Naya *et al.*, 1994)。-80°C で保存していた約 100 匹のキイロスズメバチ成虫(働蜂)を凍結乾燥した後、予め冷却しておいた乳鉢に入れ磨砕し、冷アセトンを入れ 30 分間攪拌した。次に 0°C, 10,000g で 20 分間、冷却遠心機で遠心分離し、上清を取り除き沈殿物を 25°C で風乾してアセトン粉末を得た。200ml の冷エタノールをアセトン粉末に加え、同様に遠心分離して上清を取り除き、沈殿物を風乾した。沈殿物に 100ml の冷 2%NaCl を加え、保冷室で一晩攪拌した後、遠心分離 (0°C, 10,000g, 20 分間) し、沈殿を除去して上清を得た。その上清を Toyo 濾紙 No.2 で濾過し、その濾液を透析膜 (スペクトラ/ポア CE, MWCO:500, スペクトラム社製) に注入し、蒸留水中で一晩透析して無機塩類を除去し、凍結乾燥して約 650mg の 2%NaCl 抽出物(以下, NE)を得た。この抽出を実験期間中、繰り返し行った。抽出過程において脂肪体と、透析膜 (スペクトラ/ポア CE, MWCO:500, スペクトラム社製) の使用による分子量約 500 以下ペプチドを除去することにより, NE は主にペプチドから比較的高分子タンパク質を含むと考えられる。

4. ハチミツの調製

本研究ではキイロスズメバチ抽出物の他に、同じく膜翅目昆虫に属するセイヨウミツバチによりニセアカシアの花から採集されたハチミツ (藤原養蜂場提供, 以下 アカシアのハチミツ) を使用した。成分構成は、グルコース約 31%, フルクトース約 43%, 水分約 21% (食品総合研究所, 1973) で、その他

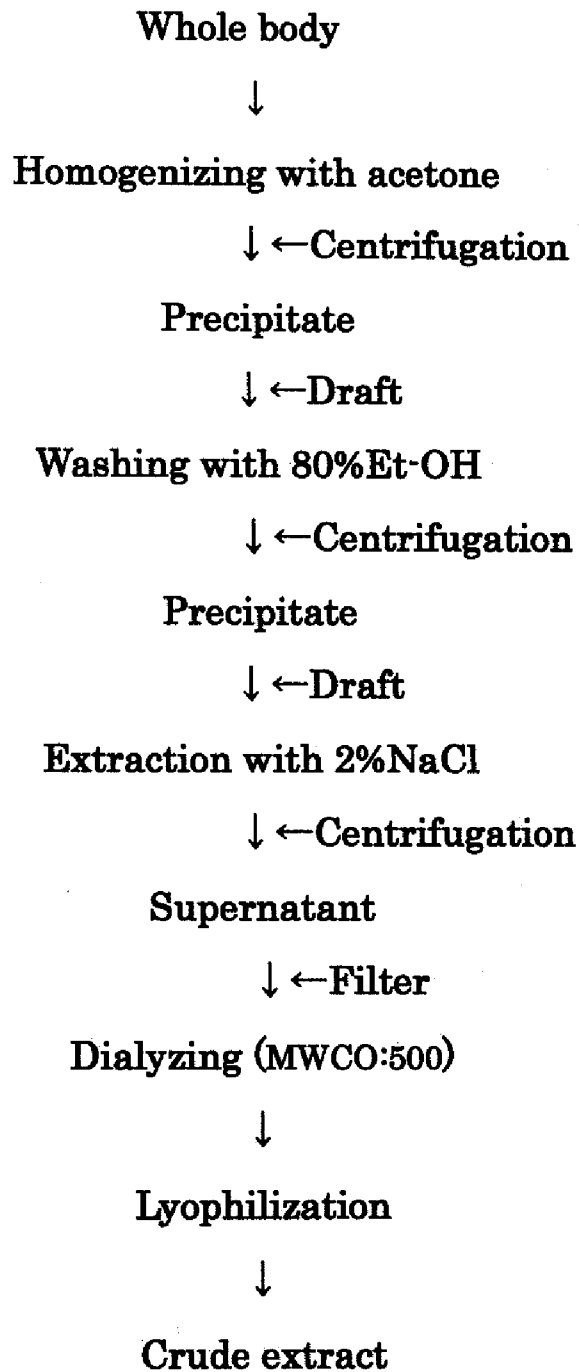


Fig. 3. Preparation of 2%NaCl extract from *Vespa simillima* (whole body)

に微量のビタミン、ミネラル、有機酸などが含まれる。アカシアのハチミツの 0.5%溶液（以下、HO）を作製し、実験に用いた。

5. 実験動物

ICR 系マウス（雌性 5 週齢）を日本 SLC 社より購入し、1 ケージ 6~7 匹で飼育を行った。餌は固形飼料（MEQ, オリエンタル酵母社製）を与え、室温は 23~25°C で、12 時間明条件、12 時間暗条件の環境下で飼育した。実験のスケジュールを Fig. 4 に示した。マウスを 4 群に分け、2%NaCl 抽出物（NE）は 1 日 1 匹当たり約 2 mg, また酸メタノール抽出物（AE）は 1 日 1 匹当たり約 3mg になるように水溶液の量を調製し、実験終了まで自由摂取させた。他の 2 群にはアカシアのハチミツ 0.5%溶液（HO）と、水（対照区 CO）を実験終了まで自由摂取させた。飲料と餌の摂取量は飼育開始から実験終了まで 2 日に 1 回測定した。マウスの体重は飼育開始時と 2 回の注射時に 1 匹ずつ測定し、さらに 2 日に 1 回ケージごとに測定した。マウスの個体識別にはピクリン酸溶液を背中に塗布して行った。飼育開始から 24 日後にステップスルー型受動的回避実験を 2 日間行い、その 7 日後からモリス水迷路実験を 9 日間行った。モリス水迷路の訓練試行を始める 2 日前に、マウスの背中全体を市販の毛染めで黒く染め、画像解析用ビデオカメラで検出できるようにした。

6. 投与薬物の調製

一時的な痴呆を起こさせる薬物として、ステップスルー型受動的回避実験には、ムスカリン性アセチルコリン受容体の阻害剤である scopolamine-HCl（SIGMA 社製）を体重 1 kg あたり 0.5mg（Hiramashu *et al.*, 1998）, モリス水迷路実験には、グルタミン酸 NMDA 型受容体阻害剤である MK-801((+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-

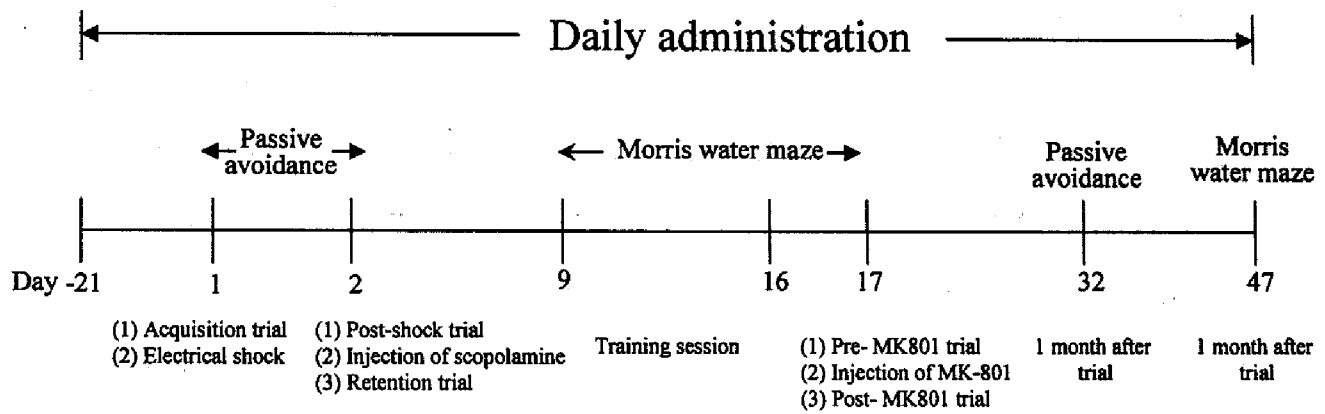


Fig. 4. Experimental schedules for memory registration in a passive avoidance task and a Morris water maze in mice.

imine (Tocris Cookson 社製) を予備実験により体重 1kg あたり 0.25mg 使用した。それぞれを生理食塩水で濃度調整し、ステップスルー型受動的回避実験では皮下注射, モリス水迷路実験では腹腔内注射した。

7. ステップスルー型受動的回避実験

(1) 装置

Fig. 5 にステップスルー型受動的回避実験装置を示した (Mcgaugh and Landfield, 1970) . ステップスルー型受動的回避実験法は, マウスやラットなどが暗い場所を好む習性を利用したもので, 暗室へ進入することによって与えられた電気刺激による嫌悪体験を記憶した動物が, 再び同じ環境下に置かれると暗室に入ろうとしないことを利用する。

装置は白色光 (15W) で照明した明室 (幅 19cm, 奥行き 19.5cm, 高さ 17.5cm) と, 床に電気の通るグリットを取り付けた暗室 (明室と同じ) からなる。2室の間は可動式のギロチンドアで仕切られており, 自由に開閉できる。

(2) 手順

実験を行う前に, ギロチンドアを開けた状態で明室にマウスを入れ, 暗室に入るまでの反応潜時を測定した。その潜時が 60 秒以上のマウスは正常ではない可能性があり実験には使用できないが, そのようなマウスはいなかった。

実験 1 日目は, ギロチンドアを閉めている明室にマウスを入れ, 30 秒後にドアを開け, 暗室に入るまでの反応潜時を測定し (以下, 獲得試行 acquisition trial とする), 入ったらドアを閉め電気刺激 (0.5mA, 4sec) を与えた。なおマウスの後ろ足が完全に入った時点で暗室に進入したものとして測定した。

実験 2 日目 (24 時間後) に, ドアを閉めている明室にマウスを入れ, 30 秒後にドアを開け, 暗室に入るまでの反応潜時 (最長 180 秒まで 以下同様)

を測定した (以下、投与前試行, *post-shock trial* とする)。次に、体重1kgあたり0.5mgの *selegiline* を皮下注射し、35分後にドアを開けている状態にマウスを入れ、30秒後にドアを再び閉鎖に入らまでの反応時間を測定した (以下、投与後初生試行, *retention trial* とする)。

1ヶ月後、再び *post-shock trial* と同じ試行を行い、反応時間を測定した (以下、1ヶ月後再生試行, *1 month after* とする)。

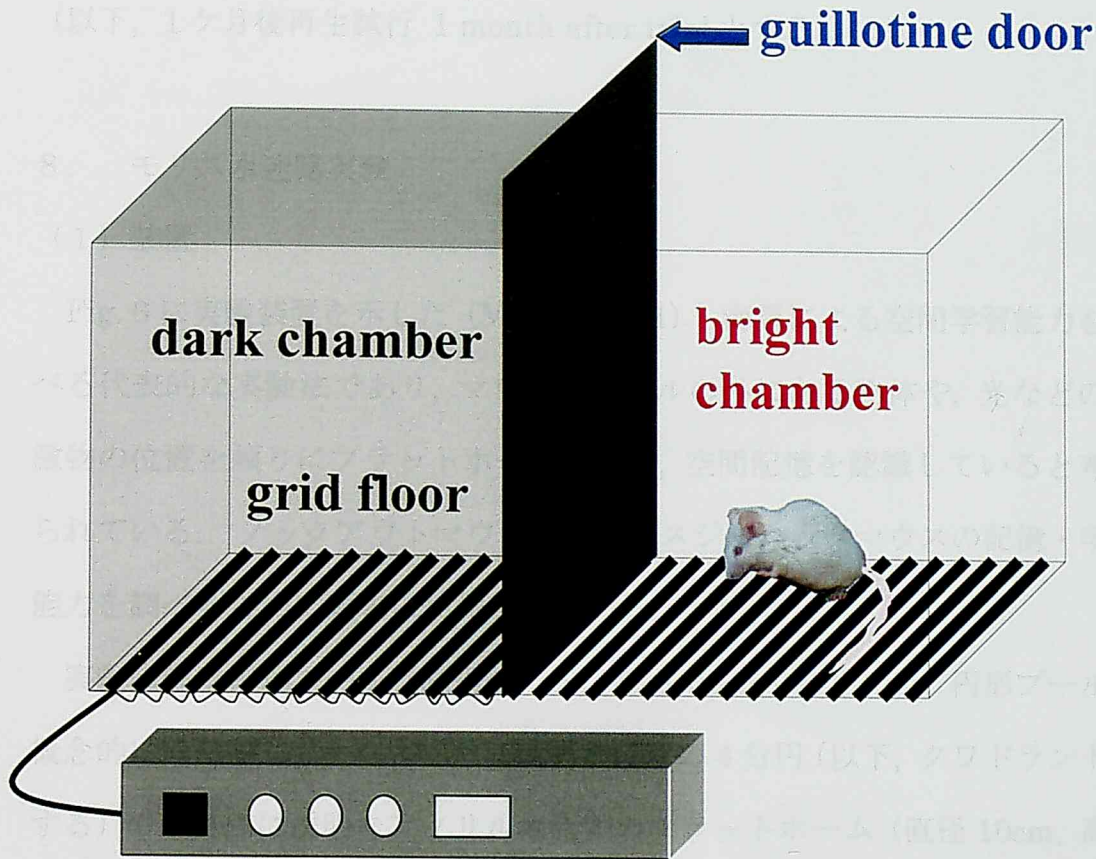


Fig. 5. Step-through passive avoidance apparatus. It consists of a bright compartment (19×19.5×17.5 cm) illuminated by fluorescent light (15 W) and a dark compartment (the same size as the bright one) with electrified grid floor. The two compartments are divided by a movable guillotine door, which could be opened and closed freely.

体とそれらの位置関係を常に同じ状態に保った。プールの中央上、水深から100cmの高さにカメラを取り付け、1秒間に3フレームずつ画像を取り込んだ。この実験の解析には、NIH Image (米国 National Institutes of Health で作製されたフリーウェア) をもとに作られた Image XX2.2x (Gen. & Co., Ltd.) を使用した。

を測定した（以下、投与前試行 *post-shock trial* とする）。次に、体重 1 kg あたり 0.5mg の *scopolamine* を皮下注射し、15 分後にドアを閉めている明室にマウスを入れ、30 秒後にドアを開け暗室に入るまでの反応潜時を測定した（以下、投与後再生試行 *retention trial* とする）。

1 ヶ月後、再び *post-shock trial* と同じ試行を行い、反応潜時を測定した（以下、1 ヶ月後再生試行 *1 month after trial* とする）。

8. モリス水迷路実験

(1) 装置

Fig. 6 に実験装置を示した (Morris, 1981)。海馬による空間学習能力を調べる代表的な実験法であり、マウスはプールの外にある物体や、光などの刺激物の位置を頼りにプラットフォームを探し、空間記憶を認識していると考えられている。ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの記憶・学習能力を調べるために頻繁に使用されている。

実験設備は円形プール（直径 100cm、深さ 30cm）を用いた。円形プールを概念的に 4 分割し、マウスごとに定めた任意の 4 分円（以下、クワドラントとする）の中央部に透明なアクリル樹脂製のプラットフォーム（直径 10cm、高さ 19cm）を水面下 1cm に設置した。室温・水温ともに常に $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ち、泳いでいるマウスから水面下のプラットフォームが見えないように、白色のポスターカラーで水を濁らせた。さらに泳ぐマウスから実験者が見えないように、プールは高さ 80cm の台の上に設置した。実験期間中、実験室の中にある物体とそれらの位置関係を常に同じ状態に保った。プールの中心上、水面から 100cm の高さにカメラを取り付け、1 秒間に 2 フレームずつ画像を取り込んだ。この実験の解析には、NIH Image（米国 National Institutes of Health で作製されたフリーウェア）をもとに作られた Image XX2.xx (O'Hara & Co., Ltd.) を使用した。

(2) 手順

訓練試行は毎日昼寝同時刻から開始し、1匹のマウスにつき1日4試行、8日間を合計する試行を行った。同一試行日の4試行は、時間をあけて連続して行われ、4日目と5日目の間に1日休みを入れた。マウスごとに学習位置にプラットフォームを設置し、マウスがプラットフォームの4つのスタート地点のうちプラットフォームが存在しないクオADRANTに移動することを学習させた。

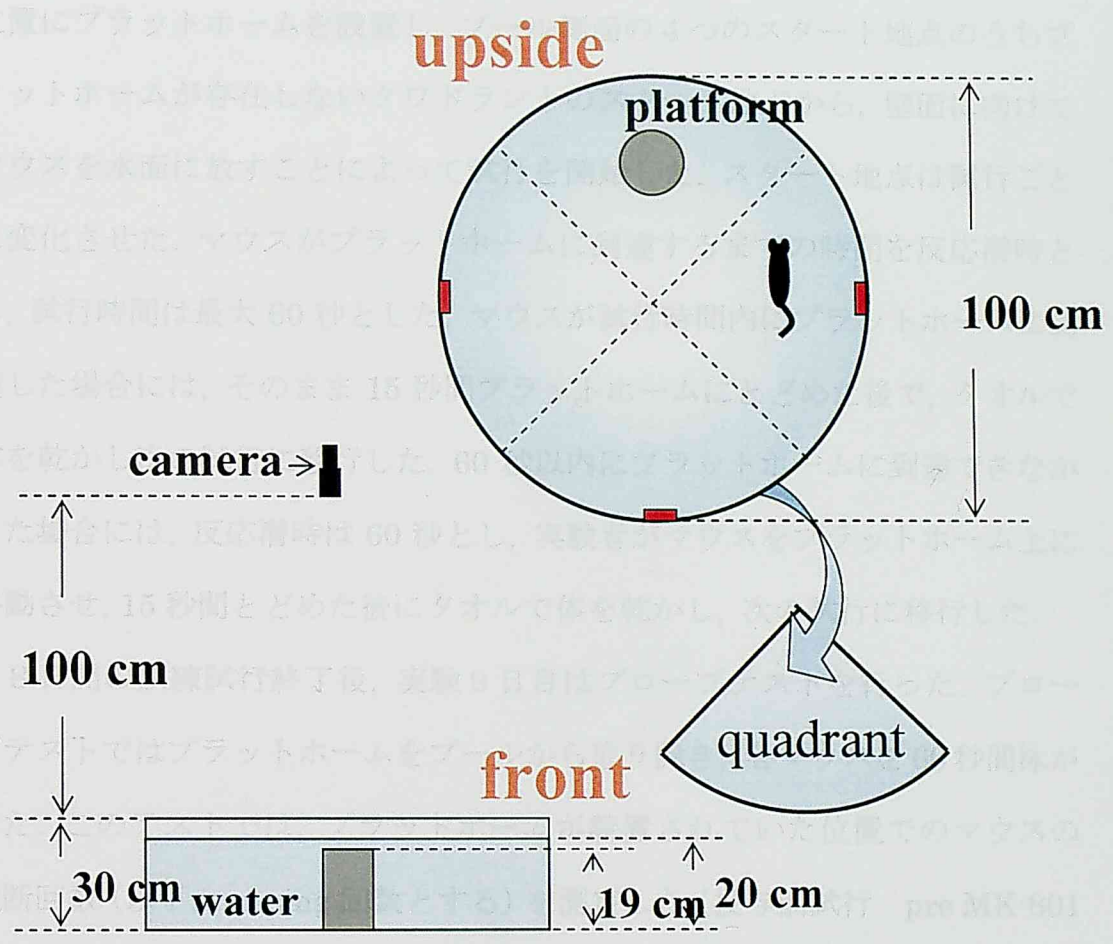


Fig. 6. Morris water maze. It consists of a circular pool (100 cm in diameter, 30 cm in depth) set on a stand 80 cm in height. A clear acryl resin platform (10 cm in diameter, 19 cm in height) is situated 1 cm below the water surface at the center of a quadrant prepared by dividing the pool conceptually into four equal parts. The room and water temperatures were maintained at $25\pm 1^\circ\text{C}$, and the pool was made opaque by the addition of white poster color. Objects in the laboratory and their mutual locations were always maintained during the experiment. A camera was installed above the center of the pool at a height of 100 cm from the water surface.

9. 統計処理

2つの行動実験のどちらも、分散分析(ANOVA)で有意差が認められた場合に、post hoc検定のDunnnett法を用いた。Dunnnett法は、各実験に対して有意

(2) 手順

訓練試行は毎日ほぼ同時刻から開始し、1匹のマウスにつき1日4試行、8日間で合計32試行を行った。同一訓練日の4試行は、時間をあけず連続して行った。4日目と5日目の間に1日休みを入れた。マウスごとに定めた位置にプラットホームを設置し、プール側面の4つのスタート地点のうちプラットホームが存在しないクワドラントのスタート地点から、壁面に向けてマウスを水面に放すことによって試行を開始した。スタート地点は試行ごとに変化させた。マウスがプラットホームに到達するまでの時間を反応潜時とし、試行時間は最大60秒とした。マウスが試行時間内にプラットホームに到達した場合には、そのまま15秒間プラットホームにとどめた後で、タオルで体を乾かし次の試行に移行した。60秒以内にプラットホームに到達できなかった場合には、反応潜時は60秒とし、実験者がマウスをプラットホーム上に移動させ、15秒間とどめた後にタオルで体を乾かし、次の試行に移行した。

8日間の訓練試行終了後、実験9日目はプローブテストを行った。プローブテストではプラットホームをプールから取り除き、各マウスを60秒間泳がせた。このテストでは、プラットホームが設置されていた位置でのマウスの横断回数(以下、crossing回数とする)を測定した(投与前試行 pre MK-801 trial)。その後、体重1kgあたり0.25mgのMK-801を腹腔内注射し15分後にもう一度プローブテストを行い、crossing回数を測定した(投与後試行)。pre MK-801 trialとpost MK-801 trialでの水泳速度も測定した。

1ヶ月後、訓練試行と同様に各マウスを4試行(1試行につき60秒間)泳がせて、反応潜時を測定した(1ヶ月後再生試行 1 month after trial)。

9. 統計処理

2つの行動実験のどちらも、分散分析(ANOVA)で有意差が認められた場合に、post hoc検定のDunnett法を用いた。Dunnett法は、対照区に対して有意

差が認められるかどうかを調べる検定法である。(受動的回避実験における同群内の各試行間の検定については、post-shock trial を対照区とし、その他の行動実験の各検定においては、水群を対照区とした)。プローブテストにおける MK-801 投与前後の同じ群内での crossing 回数の検定は、 t 検定を行った。マウスの飲料と餌の摂取量を比較する検定とマウスの体重変化の検定、プローブテストでの水泳速度の検定では、分散分析 (ANOVA) 後、post hoc 検定の **Tukey-Kramer** 法を用いた。

結 果

1. 遊離アミノ酸分析

キイロスズメバチ成虫（働蜂）の遊離アミノ酸の分析結果を Table 1. と Fig. 7 に示した. 今回の分析によりキイロスズメバチ成虫体（働蜂）には, タウリンが一番多く含まれ, 次いでグルタミン, アラニンが多いことがわかった.

2. 実験動物

1匹1日当たりの飲料と餌の平均摂取量の変化を Fig. 8 に示した. 飲料, 餌の摂取量ともに4群間では有意な差は認められなかった. 4群間の体重にも有意な差が認められなかった (Fig. 9) .

3. ステップスルー型受動的回避実験

ステップスルー型受動的回避実験の結果を Fig. 10 に示した.

各群のマウスの個体数は, コントロール群 (以下, CO 群) 33 匹, 酸メタノール抽出群 (以下, AE 群) 23 匹, 2%NaCl 群 (以下, NE 群) 32 匹, アカシアのハチミツ 0.5%溶液群 (以下, HO 群) 32 匹である. 実験 2 日目の post-shock trial において明室に入れられたマウスは, 前日の電気刺激を覚えているため, 毛を逆立てたり, 脱糞, 挙尾, 不動など緊張した様子を示した. post-shock trial の最大値 180 秒に達したマウスは, CO 群が 25 匹 (約 76%) , AE 群が 13 匹 (約 57%) , NE 群が 28 匹 (約 88%) , HO 群が 31 匹 (約 97%) であった. post-shock trial における 4 群間の検定では, HO 群 (平均反応潜時 178.2 秒) に 5%水準での有意差が認められた. NE 群 (同 170.6 秒) に有意差は認められなかったが, 平均反応潜時は HO 群とほぼ同じであった.

scopolamine を皮下注射して行った retention trial では, 一時的な痴呆状態のためマウスは明室内を盛んに動き回り, 4 群とも平均反応潜時が約 90~120

Table 1. Amino acids content of adult hornets (worker)

amino acids	Amino acids content (μ moles/g)
Phosphoserine	0.171 ± 0.044
Taurine	8.99 ± 0.104
Aspartic acid	0.457 ± 0.122
Threonine	0.566 ± 0.132
Serine	0.298 ± 0.118
Glutamic acid	0.401 ± 0.110
Glutamine	6.584 ± 1.412
Glycine	0.723 ± 0.141
Alanine	3.486 ± 0.797
Valine	0.540 ± 0.117
Isoleucine	0.238 ± 0.123
Leucine	0.241 ± 0.190
Tyrosine	0.254 ± 0.051
NH ₃	1.954 ± 0.529
Ornithine	0.529 ± 0.631
Histidine	0.753 ± 0.110
Carnitine	0.702 ± 0.174
Arginine	1.324 ± 0.554
Proline	2.367 ± 1.335

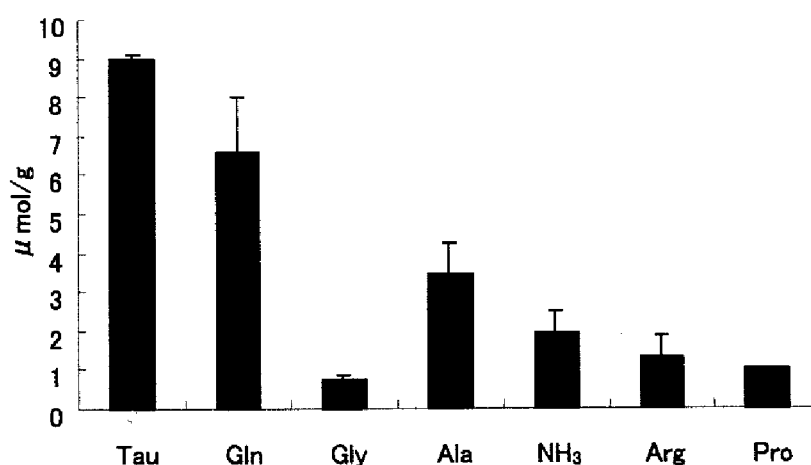


Fig. 7. Distribution of free amino acids in adult hornets. Tau, Taurine; Gln, Glutamine; Gly, Glycine; Ala, Alanine; NH₃, Ammonia; Arg, Arginine; Pro, Proline.

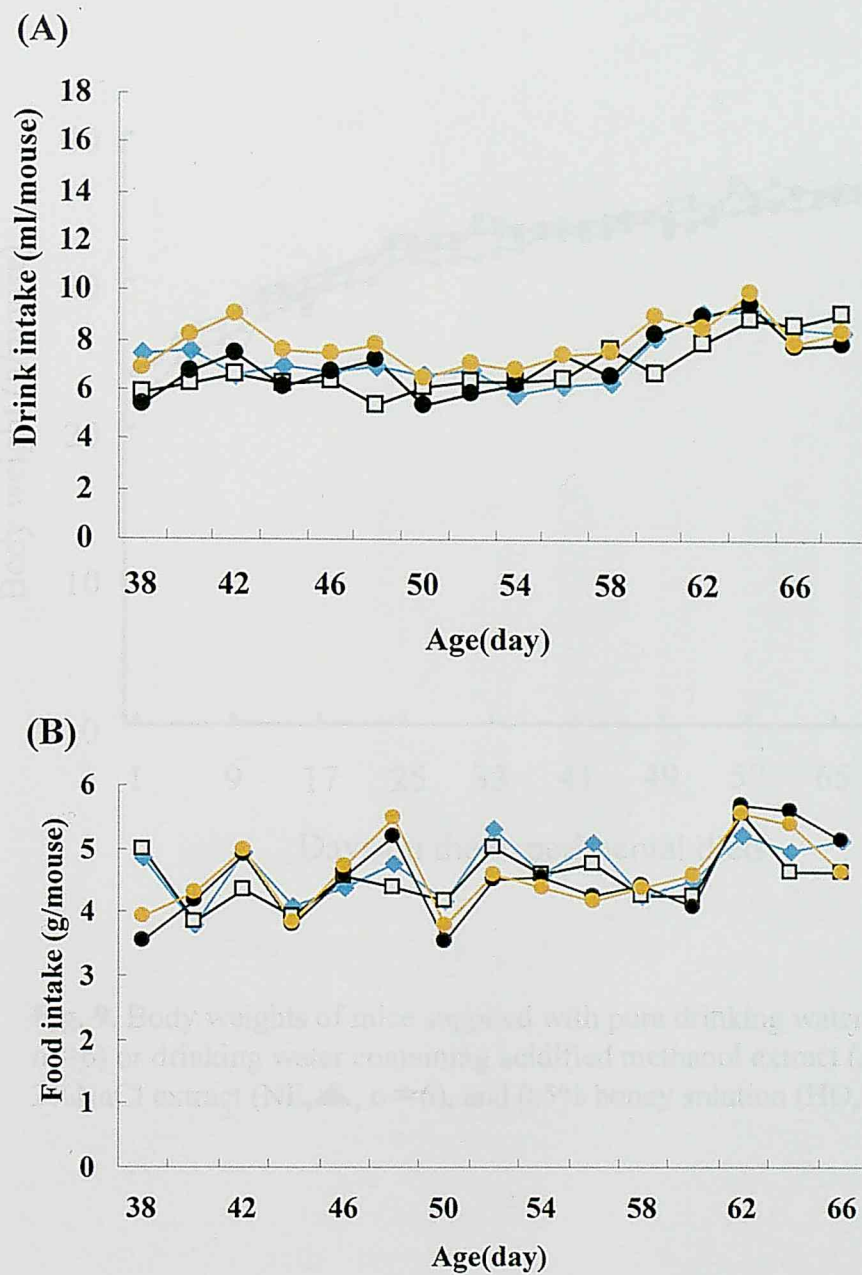


Fig. 8. Daily drink intake (A) and food intake (B) in 4 groups per mouse between 38 and 70 days of ages. Consumption was measured every other day. Control, ◇, (n=12), acidified methanol extract, □, (n=12), 2%NaCl extract, ●, (n=14), 0.5%honey solution, ●, (n=14).

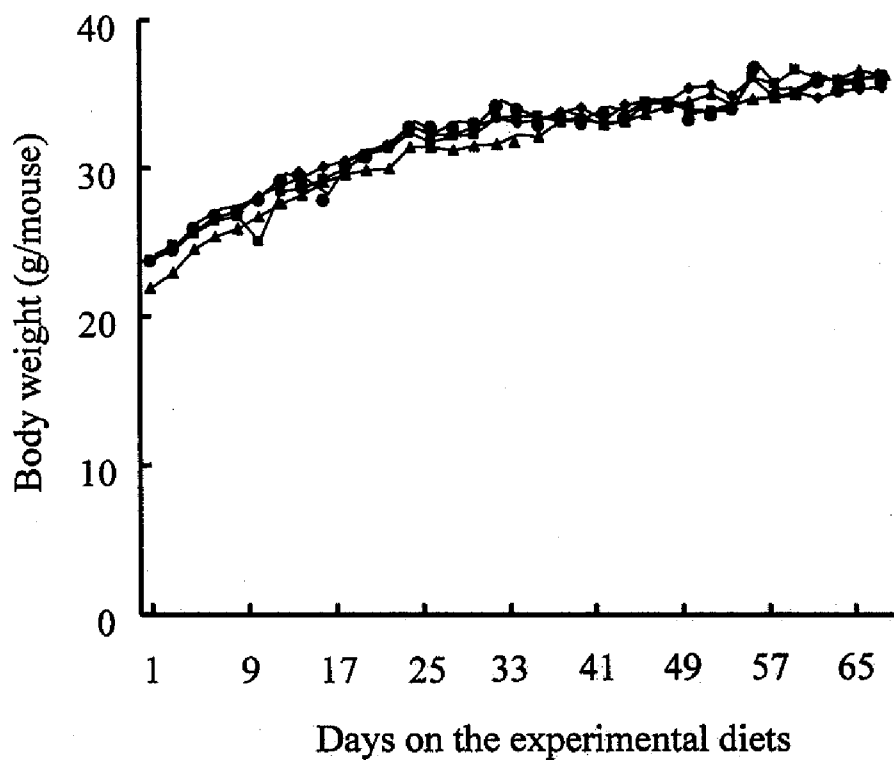


Fig. 9. Body weights of mice supplied with pure drinking water (control, \blacklozenge , $n=6$) or drinking water containing acidified methanol extract (AE, \blacksquare , $n=6$), 2%NaCl extract (NE, \blacktriangle , $n=6$), and 0.5% honey solution (HO, \bullet , $n=6$).

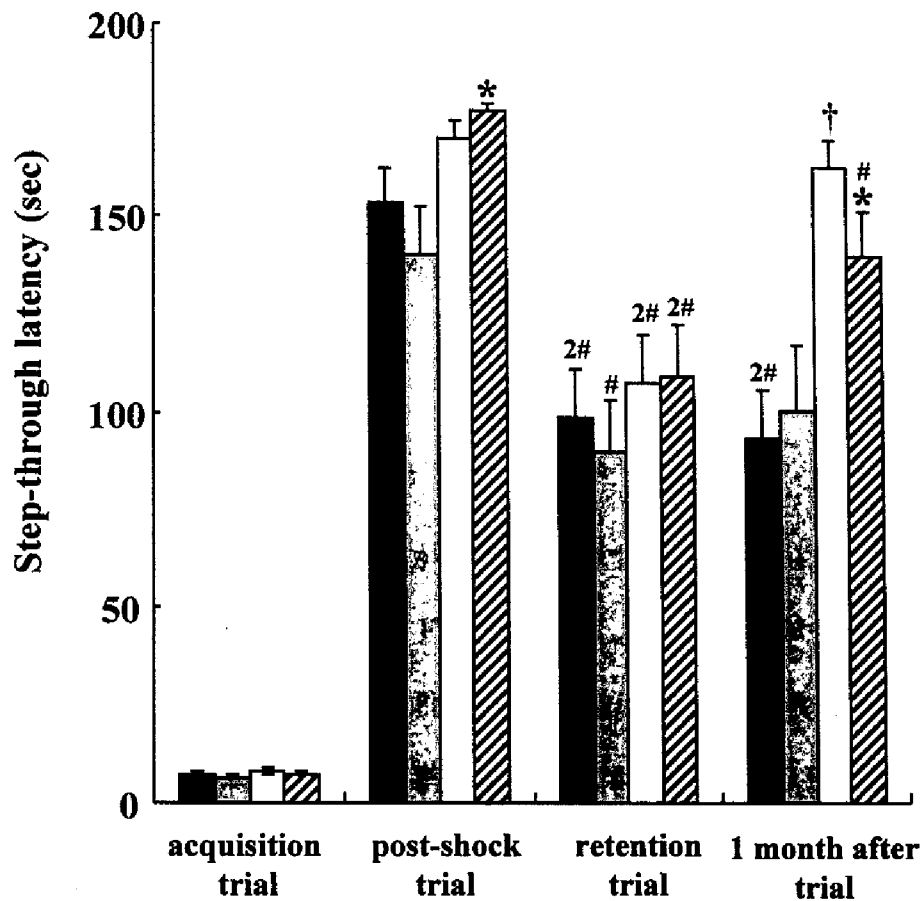


Fig. 10. The effect of *Vespa* extracts on memory registration in a passive avoidance task. Mice were maintained orally with four sample preparations (Control, ■, n=33; acidified methanol extract, ▨, n=23; 2% NaCl extract, □, n=32; 0.5% honey solution, ▩, n=32). The latency time of the post-shock trial and retention trial was measured and analyzed 1 month after the first trial. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$, †, $P < 0.01$ versus the control group and #, $P < 0.05$, 2# $P < 0.01$ versus the post-shock trial in each group (ANOVA followed by Dunnett test).

秒で暗室に入った。4群間での有意差は認められなかった。各群の post-shock trial に対する retention trial の反応潜時では、AE 群において 5%水準で、そのほかの 3群では 1%水準での有意差が認められた。post-shock trial を行ってから 1ヶ月経過した時点で、1 month after trial を行った。NE 群の 1 month after trial の反応潜時は、post-shock trial と比較してほとんど低下しておらず、4群間の検定で 1%水準での有意差が認められた。同じく HO 群は、5%水準での有意差が認められた。各群の post-shock trial に対する 1 month after trial の反応潜時は、CO 群で 1%水準の、HO 群で 5%水準の有意差が認められた。

4. モリス水迷路実験

モリス水迷路実験で、マウスが避難場所のプラットホームに到達するまでの各群の平均反応潜時の推移を Fig. 11 に示した。1日 4試行の平均反応潜時を各マウスごとに求め、さらに群ごとに平均反応潜時を求めた。各群のマウスの個体数は、CO 群 27 匹、AE 群 23 匹、NE 群 32 匹、HO 群 31 匹である。

訓練試行 1 日目は、全マウス 115 匹中の 77 匹（約 67%）が 4 試行のうち 1 試行も 60 秒以内にプラットホームに到達できなかった。しかし、訓練を重ねるにしたがって、どの群も徐々に反応潜時が短くなった。同一訓練日で 4 群を比較したところ、6 日目に HO 群に 5%水準での有意差が認められた。

8 日間の訓練が終了した翌日、プラットホームを取り除き、各マウスを 1 分間泳がせるプローブテストを行った。MK-801 を投与される前のマウスは、どの群もあるべきプラットホームがなくてもその周辺を懸命に探す行動がみられた。しかし、一時的な痴呆を起こさせる MK-801 を投与されると、投与前とは違う不正確な軌跡を描いて泳いだ。

プローブテストの pre-MK-801 trial と post-MK-801 trial における水泳速度の測定結果を Fig. 12 に示した。pre-MK-801 trial では、4群いずれも平均速

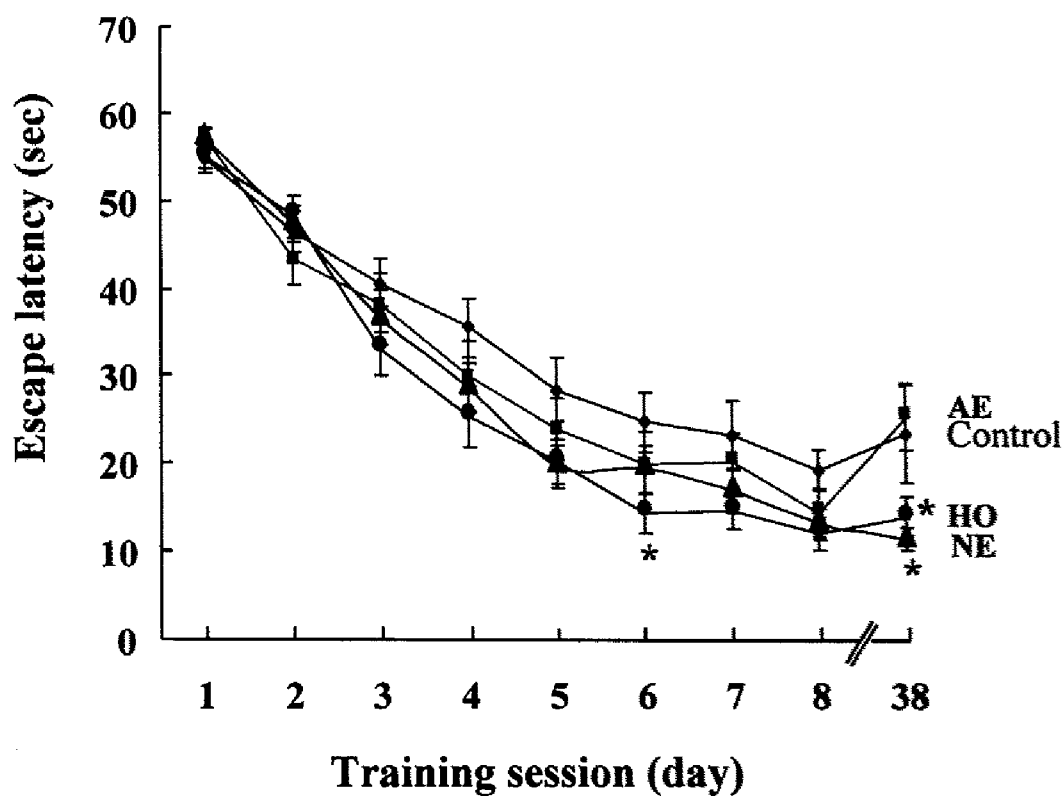


Fig. 11. The effect of *Vespa* extracts on performance in a Morris water maze. Mice were maintained orally with four sample preparations (control, \blacklozenge , $n=27$; acidified methanol extract (AE), \blacksquare , $n=23$; 2% NaCl extract (NE), \blacktriangle , $n=32$; 0.5% honey solution (HO), \bullet , $n=31$). The latency time for escaping onto the platform was measured for 8 consecutive days and then 1 month after the first trial (in this case, control, $n=11$; AE, $n=11$; NE, $n=13$; HO, $n=12$). Data are expressed as the mean \pm S.E.M. *, $P < 0.05$ versus the control group for each day (ANOVA followed by Dunnett test, and also on day 38, ANOVA followed by Dunnett test).

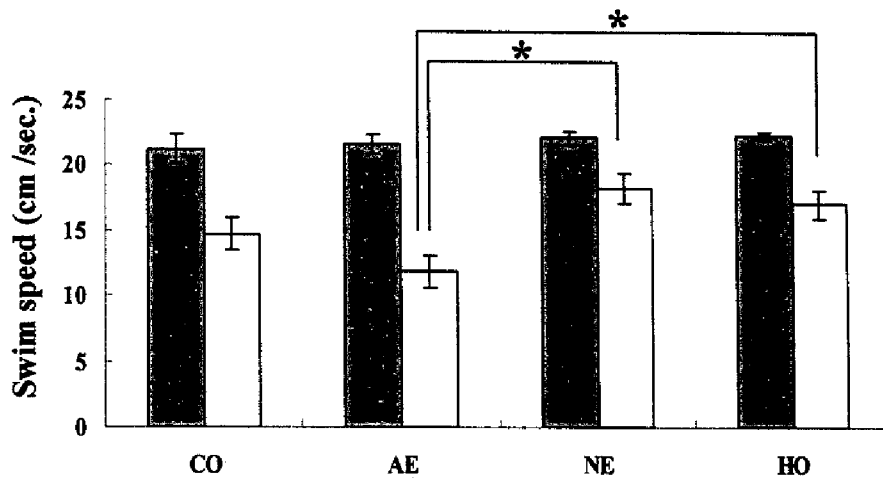


Fig. 12. The average speed of swimming in the probe test. The left bar of each group (■) is pre-MK801 and the right one (□) post-MK801. CO (control, n=27), AE (acidified methanol extract, n=23), NE (2% NaCl extract, n=32), HO (0.5% honey solution, n=31). Data are expressed as mean \pm S.E.M. * indicates significant difference by Tukey-Kramer test, $P < 0.05$.

度が 21.3~23.7cm/sec.で有意な差はなかった. post-MK-801 trial では, AE 群と NE 群, HO 群の間にそれぞれ 5%水準で有意な差が認められた (Tuker-Kramer test) .

プラットホームを横切った回数(crossing 回数)を Fig. 13 に示した. pre MK-801trial では 4 群全てで crossing 回数が, 平均 4 回以上であり, 一番多い NE 群では平均 6.5 回にも及んだ. post MK-801trial の 4 群間の検定では, NE 群が平均約 4 回で, 1%水準で有意差が認められ, その他の 3 群は平均 2 回前後にまで下がった. pre MK-801trial と post-MK-801 trial 間の検定では, NE 群に 5 %水準での有意差が, 他の 4 群は 0.1%水準での有意差が認められた (*t*検定) .

ステップスルー型受動的回避実験と同様に, モリス水迷路実験においても 1 month after trial を行った(Fig. 11 の day 38). CO 群 (n=11) の平均反応潜時は, 23.5 秒, AE 群 (n=11) は 25.5 秒, NE 群 (n=13) は 11.5 秒, HO 群 (n=12) は 14.1 秒であった. NE 群の 11.5 秒は, 訓練試行最終日の 13.3 秒よりさらに短縮されている. 4 群間における検定で, NE 群と HO 群に 5%水準での有意差が認められた.

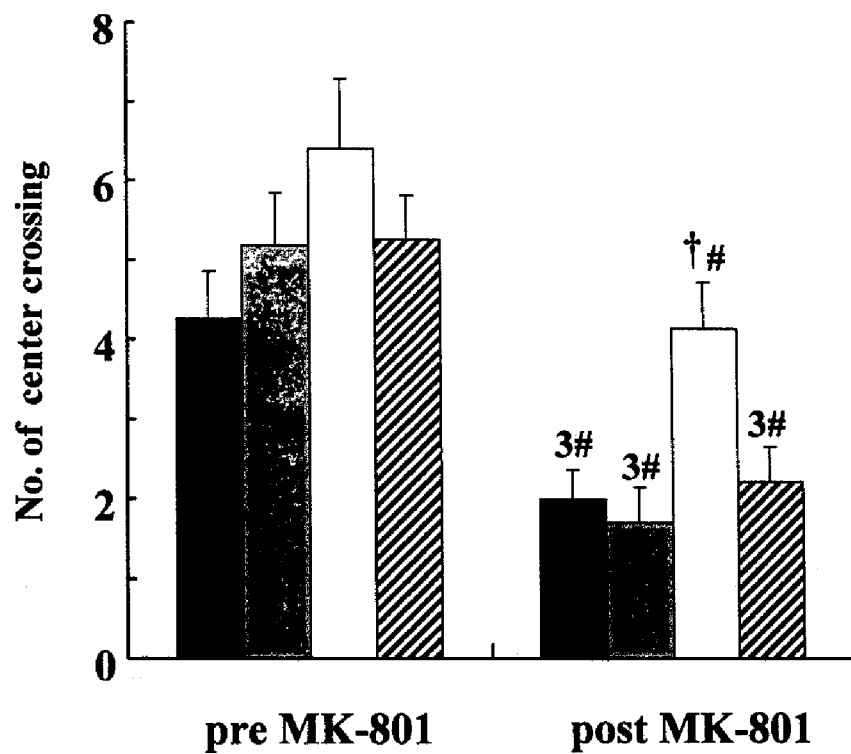


Fig. 13. The probe test. The number of crossings the former platform quadrant was recorded by a camera installed above the center of the pool. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. †, $P < 0.01$ versus the control group (ANOVA followed by Dunnett test), and #, $P < 0.05$, 3#, $P < 0.001$ versus the pre MK-801 trial in each group (Student's t -test).

考 察

1. 遊離アミノ酸分析

今回分析されたキイロスズメバチ成虫体（働蜂）の遊離アミノ酸組成においては、タウリン、グルタミン、アラニンが多かった。タウリンがこのように多い遊離アミノ酸組成は昆虫では珍しく、特徴的であると思われる（Table 1、Fig. 7）。

タウリンは、メチオニンからシステインを経て生合成される含硫アミノ酸であり、昆虫の脳においては全遊離アミノ酸の約 16%を占め、グルタミン酸（20%）に次ぐ量で存在する（Bicker, 1991）。感覚情報を中枢に伝えて、これを統合する系において修飾的な働きをする抑制性物質であることが示唆されている。さらにタウリンには、交感神経を抑制して血圧を下げ、脳卒中の発症頻度を下げる効果があることが、脳卒中・心血管疾患を頻発するラットを使った実験で証明されている（家森, 1997）。

行動実験でマウスに経口投与したスズメバチ酸メタノール抽出物には、本実験で分析された遊離アミノ酸組成が含まれていると推察される。

キイロスズメバチと同じ膜翅目昆虫であるセイヨウミツバチ（雄蜂）の羽化 3 日前の蛹を分析したデータ（日本食品分析センター, 1994）によると蛹 100g 中、約 42g がアミノ酸（必須アミノ酸を全て含む）の形で存在している。

今回のキイロスズメバチは、成虫の働蜂だけのアミノ酸分析であったが、今後は、女王蜂や雄蜂、蛹や幼虫のアミノ酸分析も行って比較し、有効利用に役立てたいと考える。

2. ステップスルー型受動的回避実験とモリス水迷路実験

ある情報が記憶として確立するまでには、獲得・保持・再生という 3 つの過程を経なければならず、これらのうち一つでも障害を受ければ、記憶・学習

障害が発生することになる。本研究では、二つの行動実験のいずれも記憶の再生の過程において薬物で障害を起こさせ、試行を行った (retention trial) 。ステップスルー型受動回避実験では、一時的な痴呆を起こさせる薬物として scopolamine-HCl を使用した。アセチルコリン受容体にはニコチン、及びムスカリンに結合する二つのタイプが存在する。scopolamine は、投与することによりアセチルコリンが受容体に伝達しなくなる。アルツハイマー型痴呆の原因の一つがコリン作動性ニューロンの脱落であるから、マウスへの scopolamine 投与によって一時的にアルツハイマー型痴呆と似た状態になるのではないかと考えられる。scopolamine 投与後の retention trial では、各群内で投与前試行と比較するとすべての群で有意な差が認められた。このことは、どの群にも scopolamine に対する抗認知効果はなかったことを示している。

一方、水迷路実験のプローブテストでは、一時的な痴呆を起こさせる薬物として MK-801 を使用した。海馬をはじめ脳の中で最もよく使われている神経伝達物質はグルタミン酸で、記憶や学習などの高次機能に重要な役割を果たしている (Watkins and Jane, 2006) が、MK-801 は、グルタミン酸の NMDA 型受容体の阻害剤である (Coan *et al.*, 1987) 。NE 群は、MK-801 投与後も 4 群間において crossing 回数が有意に多く、また、MK-801 投与前のコントロール群と同等であり、一定の抗認知作用が認められた (Fig. 13)。

覚えたことは長期間、保持することができ、さらに再生できてこそ記憶としての意味があると考えられる。そこで、二つの行動実験において1ヶ月後の記憶能がどう変化したかを測定した。その結果、ステップスルー型受動的回避実験の 1 month after trial の反応潜時は、1日後の反応潜時と同等で記憶がよく保持されており (Fig. 10) , モリス水迷路実験の 1 month after trial の反応潜時は、訓練最終日の反応潜時をさらに短縮した (Fig. 11) 。ラットを使った水迷路実験において、学習能力と海馬の LTP の大きさには正の相関関係

があり、記憶力のよい個体ほど LTP が起きやすく、逆に記憶力のよくない個体は小さな LTP しか生じないことが報告されている (Kleschevnikov and Marchbanks, 1993). NE を摂取することと、LTP を引き起こすことが関係しているとすれば興味深い。

以上、二つの行動実験の結果から、NE を投与されたマウスにおいて、特に 1 month after trial における長期記憶能の向上効果と、グルタミン酸受容体阻害剤である MK-801 に対する一定の抗認知効果が認められることが示された。一方、AE 群は全ての試行においてコントロール群と同程度で、記憶・学習の向上効果や抗認知効果は認められなかった。

今回の実験でマウスに摂取させたスズメバチ成虫体の NE 抽出物は主にペプチドから高分子タンパク質を含んでおり、一方 AE 抽出物は、熱処理を行ったことからタンパク質は失活し、遊離アミノ酸からポリペプチドを含むと考えられる。これらはいずれも摂取後消化され、アミノ酸やオリゴペプチドに分解、吸収され血液を通して全身の組織で利用される。

食餌タンパク質の質的变化により、脳のタンパク質代謝にどのような影響があるかをラットで調べた実験がある (Yokogoshi *et al.*, 1992). その中で、栄養価の異なるカゼイン、小麦グルテン、ゼラチンを用いたところ、栄養価の低い食餌タンパク質 (ゼラチン) では、大脳皮質、海馬、小脳などでの脳内タンパク質合成能と合成速度は低下しており、一方、必須アミノ酸が全て含まれ、かつその必要量が満たされている良質のタンパク質 (カゼイン) を摂取させた場合には、それらは増加していた。本研究で使用したマウスには、アミノ酸がバランスよく配合された固形飼料を与えている。4 群間の餌量には有意な差はなく、どのマウスも毎日約 1g のアミノ酸バランスのとれたタンパク質を摂取していることになり、体の機能をはじめ、脳のタンパク質代謝回転などにも問題はないと推察される。この餌からのタンパク質に加えて、酸メタ群のマウスは約 3mg の抽出物 (遊離アミノ酸からポリペプチドを含む)

を、NE 群のマウスは約 2mg の抽出物（ペプチドから高分子タンパク質を含む）を毎日摂取しているが、この量では餌由来のアミノ酸バランスを変化させる可能性は少ないと考えられる。さらに、NE 中の Na 含量を原子吸光分析法により測定したところ、60 μ g/mg であり、マウスが一日分の餌から摂取する約 12mg の Na 量と比較して問題のない量と判断した（データ省略）。すなわち、二つの行動実験における AE 群と NE 群の結果の明らかな違いは、NE 中に存在が予想される生理活性ペプチドによる可能性が高いと考えられる。

食品タンパク質の消化によって、神経系、免疫系、内分泌系などに作用する潜在的な生理活性ペプチドが派生することが報告されている。例えば、カゼイン、乳清タンパク質、血液タンパク質、植物タンパク質の消化物にも血液・脳関門を通過し得るオピオイドペプチドが存在することが発見され、外因性オピオイドペプチド、exorphin と総称されている (Yoshikawa and Chiba, 1992; Zioudrou *et al.*, 1979)。その中には、小麦から単離されマウスの学習を促進するペプチド、gulten exorphin A5 (Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr) があり、ステップスルー型受動的回避実験において有意に反応潜時を高めたことが報告されている (Takahashi, *et al.*, 2000)。

今回の実験では、対照区の水、2 種類のスズメバチ抽出物の他に、同じ膜翅目昆虫のセイヨウミツバチの生産物であるアカシアのハチミツ 0.5% 溶液 (HO) を用いた。HO には、各指標において記憶・学習の向上効果がみられた。アカシアのハチミツには、グルコースが約 30%、フルクトースが約 40% 含まれている。グルコースは、脳の唯一のエネルギー源であり、記憶・学習の向上に効果があるという知見 (Benton *et al.*, 1994 など) が多数出されており、今回の実験結果もそれらを支持するものである。PET (positron emission tomography) によって、グルコース代謝が活発な部分が脳の活性化しているところであり、またアルツハイマー症の患者では、グルコースの取り込みが大脳皮質などで大きく低下していることが解析されている (Ishii *et al.*,

1997) . マウスがグルコースを取り続けることで脳が常に活性化していることが示唆される. また, グルコース摂取による血糖の上昇, インスリン分泌の亢進が、餌由来の血中トリプトファン比の増加を引き起こし、脳内へのトリプトファンの取り込みを増やし、最終的に脳内セロトニンが増加して記憶・学習向上に効果を与えた可能性も考えられる.

脳の高次機能は非常に複雑であり、さまざまな系の相互作用で成り立っている. 最近ではマウスの脳の中で、長期増強を誘発しやすくするために NMDA 受容体を増やしたり (Tang *et al.*, 1999) , 分子モーターの 1 種であるカイネシン スーパーファミリー プロテイン (KIFs) を増やした結果, 記憶・学習能力が向上したとの知見が報告された(Wong *et al.*, 2002). 脳の中には、酵素, 受容体, イオンチャンネル, 輸送体, 神経栄養因子など多種多様なタンパク質や、脳内モルヒネをはじめ 100 種類以上のペプチドが存在して機能しており、記憶・学習の向上にもそれらが複雑に関わっていることが解明されつつある. また、脳以外の経路としてペプチドがホルモン系に作用して、記憶・学習の向上に影響を与える可能性も考えられる.

本研究では、キイロスズメバチ 2%NaCl 抽出物に脳機能向上効果を見い出すことができたが、その作用機序は不明であり、突出したタウリン含量も考慮しつつ、特異的なアミノ酸代謝—ペプチド/タンパク質プールから、記憶・学習の向上に機能する物質の同定が極めて重要になる. さらに、機能的な物質の同定後はマウスの海馬に発現しているアセチルコリン合成酵素の活性変化を免疫組織化学の手法で調べる実験などを試みたい. また、放射状迷路や T 字迷路など、より多くの行動実験を追加し、脳機能向上作用をさらに解析する必要があると考える.

摘要

本研究では、キイロスズメバチ (*Vespa simillima*) の成虫 (働蜂) の遊離アミノ酸を分析したうえで、酸メタノール抽出法と 2%NaCl 抽出法により抽出物を調製してマウスに経口投与し、二つの行動実験を行って、(1) 記憶・学習向上効果、(2) 抗認知効果がみられるかどうかを解析した。

酸メタノール抽出法では、主に遊離アミノ酸からポリペプチドまでが抽出され、2%NaCl 抽出法では、主にペプチドから比較的高分子タンパク質までが抽出されていると考えられる。

マウスやラットを用いて学習や記憶を評価するための実験法には、多くの種類があるが、本研究ではステップスルー型受動的回避実験法とモリス水迷路実験法を行った。

1. キイロスズメバチの成虫 (働蜂) の遊離アミノ酸組成は、タウリン、グルタミン、アラニンなどが多いことが示唆された。昆虫体のアミノ酸組成でタウリンが多いものは珍しく、特徴的である。

2. 二つの行動実験の結果から、2%NaCl 抽出法によるキイロスズメバチの成虫 (働蜂) の抽出物を摂取することにより、特に長期的な記憶能を向上させ、またグルタミン酸受容体阻害剤 (MK-801) による一時的な痴呆を抑える一定の効果があることが示唆された。

一方、酸メタノール抽出法による抽出物を摂取したマウス群は、すべての試行において対照群と同様の結果であり、効果が認められなかった。

第二章 巣からの生理活性物質の解析

キイロスズメバチの巣は、働蜂が樹皮や朽木を齧りとって唾液と混ぜ、直径 5mm ほどのパルプ状にした材料を大顎で引き伸ばして造られる。現在使われている紙（洋紙）は、スズメバチが朽木や樹皮から巣を造るのを見たフランスやドイツの研究者によって発明された（町田, 1981）（McGovern *et al.*, 1988）。巣材として用いられる樹種は、スギ、マツ、ヒノキなどが多く（松浦・山根, 1984）、樹種や朽木と樹皮の割合によって色合い、模様が異なる。巣の構造は、保温の役割を果たす外側の外被と、内側の縦にいく層にも重なる育児のための巣盤からなっている。巣盤は、外被を内側から齧り取って、さらに唾液を混ぜて造られている。

漢方の一つの生薬として伝統的に使用されてきた露蜂房の基源は、中国の本草書によるとスズメバチ亜科、アシナガバチ亜科とされている。現代になり薬理学的作用が研究され、露蜂房から抽出された蜂房油と称される脂肪様物質に、ミミズを殺し、ウサギ、ネコには急性の腎障害を引き起こす作用があることが示された（小原, 1928）。また、山蜂（おそらくキイロスズメバチであると推察される）の露蜂房のアルコール、エーテル、アセトン抽出物には、血液凝固作用の促進、心臓の運動作用の増強、血圧低下作用、利尿作用があり、なかでもアセトン抽出物に強い作用があることが、ウサギを使用した実験で示された（吉村, 1946）（洪, 1960）。さらに、エタノール抽出物に虫歯の原因となる *Streptococcus mutans* が産する酸を抑制する作用（Jin *et al.*, 2006）や、露蜂房中の蛋白成分にヒトの白血病細胞（K562）の増殖を抑制する作用（Jing and Xin, 2005）があることが報告されている。しかし、種の異なる露蜂房がそれぞれ不統一のまま使用され、低分子の物質レベルでの活性成分研究は、報告されていない。

本研究では、種を限定してキイロスズメバチの巣を使用し、実験を行った。

巢盤には卵, 幼虫, 蛹, 繭, 糞が存在し, 活性成分の由来を同定するのが困難であることが予想されたので, 外被のみを使用した. キイロスズメバチの巢の外被と唾液腺を検鏡したのち, 逐次抽出を行い, 機能性成分の単離を試みた.

材料と方法

1. 供試試料

キイロスズメバチの巣は、1回目の抽出のために1個（2003年9月に盛岡市新庄地区で藤原養蜂場社員が採取）、2回目の抽出のために3個（2004年9月に盛岡市門地区で、実験者が1個採取、盛岡市内で藤原養蜂場の社員が2個採取）を使用した。捕獲した巣全体を -20°C で冷凍保存し、実験開始にあたって幼虫、蛹が入っている巣盤と成虫を取り除き外被のみの状態にしたのち、ミル {Wonder Blender WB-1, 大阪ケミカル (株)} で粉碎し使用した。成虫（働蜂）唾液腺の顕微鏡観察のためには、養蜂場に飛来した個体を網で捕獲し、1時間ほど冷蔵した後に使用した。

2. 顕微鏡による観察

(1) 外被と巣盤の観察

外被と、巣盤の一部をそれぞれ約1cm四方に切り取り、実体顕微鏡 (SMZ 1500、Nikon 社製) と、走査型電子顕微鏡 (S-4700 日立社製) で観察した。走査型電子顕微鏡で観察するに当たって、真空中で四酸化オスミウムによる蒸着を行い、試料表面をコーティングした。

(2) 唾液腺の観察

キイロスズメバチの成虫（働蜂）を0.75%の生理食塩水で満たした解剖皿中で解剖し、唾液腺を取り出して、実体顕微鏡で観察した。さらに、唾液腺を2.5% Glutaraldehyde-0.1M Phosphate Buffer に浸漬し、真空中で四酸化オスミウムによる蒸着を行って、試料表面をコーティングし、走査型電子顕微鏡で観察した。

3. 溶媒抽出

(1) 逐次抽出

粉碎試料の水分含量を秤量瓶で測定し、10%前後であることを確認したのち、抽出作業を開始した。逐次抽出は、Fig. 14 に示したスキームによって行った。試料 102g (乾燥重量) に対して 5 倍容 (500ml) の *n*-ヘキサンを用いて室温で 24 時間静置抽出を行った。その後、減圧濾過で残渣を取り除き、濾液を回収した。この作業を再度繰り返し、それぞれの濾液を合わせて *n*-ヘキサン抽出液とした。残渣は風乾したのち、酢酸エチル、70%アセトン、水の順に同様の操作で抽出を行い、それぞれ酢酸エチル抽出液、70%アセトン抽出液、水抽出液とした。2回目の抽出は、試料 470g を使用して同様の抽出作業を行った。この 2 回目の抽出作業は、*n*-ヘキサン抽出と酢酸エチル抽出で終了した。

(2) 抽出液の濃縮と定量

n-ヘキサン抽出液、酢酸エチル抽出液、70%アセトン抽出液は、ロータリーエバポレーター (EYELAN-1000, 東京理化器械) で、できる限り濃縮し、さらに窒素濃縮を行った。その後アスピレーター (EYELA A-3S, 東京理化器械) による減圧乾燥後、凍結乾燥機 (EYELA FDU810, 東京理化器械) で凍結乾燥した。水抽出液はそのまま凍結乾燥した。濃縮したそれぞれの粗抽出物の重量を測定し、収量と収率を算出した。

4. 生物検定

(1) 細胞増殖抑制活性試験

1) 細胞と培地組成

細胞にはラット肝ガン細胞 (dRLh 84) を用い、培地には 10%ウシ新生児血 (NBS), 4mM グルタミン, 50U/ml ペニシリン, 50 μ g/ml ストレプトマイシン, 100 μ g/ml カナマイシンを含むダルベッコ変法イーグ

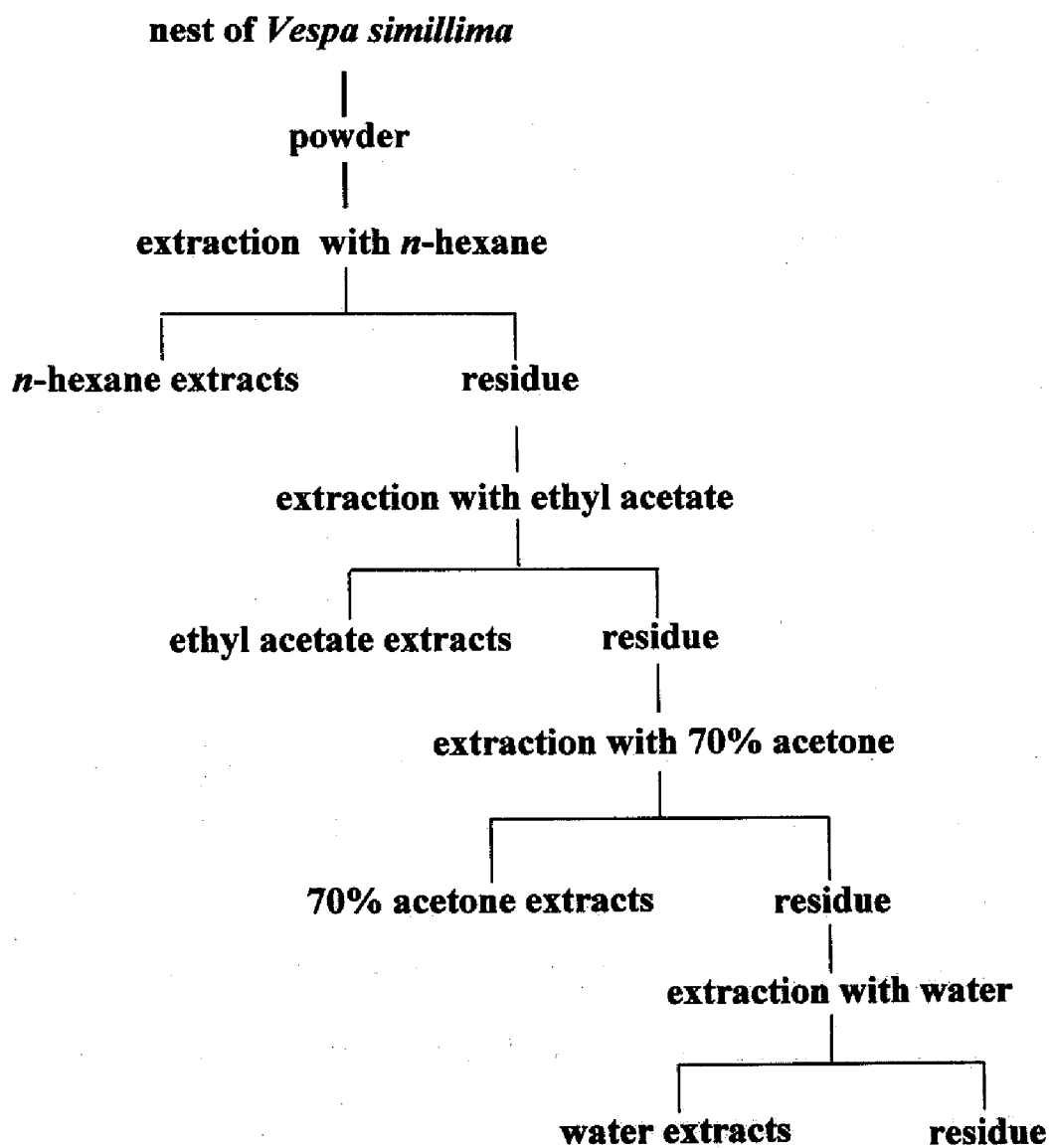


Fig. 14. procedure of successive extraction from nest of *Vespa simillima*.

ル培地 (DMEM, 日本製薬社) を使用した。培養は 5%CO₂ 存在下, 37°C 湿潤条件で培養した。

2) MTT 法

細胞増殖抑制活性試験には, MTT 法 (Oka *et al.*, 1992) を用いた。MTT {3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide} は, 細胞内脱水素酵素より還元され, ホルマザンを生成する。生細胞数と生成するホルマザンの量は, 直線的な比例関係にある。ホルマザンは 550nm から 600nm に極大吸収波長を持ち, その付近の吸光度を測定することで, 生細胞数を計測することができる。細胞は組織培養用ディッシュ (100×20mm) で培養した。対数増殖期に培養液を取り除き, PBS(-) [phosphate-buffered saline(-)] (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 2mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.5mM KH₂PO₄) で洗浄した。その後, 2.5% トリプシン溶液で細胞を浮遊させ, 細胞数が 6×10⁴cells/ml となるように培地で希釈した。この希釈液を 96 穴マイクロプレートの各 well に 200 μl ずつ入れ 24 時間培養した後, 検定濃度に調整したサンプル 1 μl を添加し, さらに 48 時間培養した。その後 0.55mg/ml の MTT を含む新しい培地 100 μl に入れ替え, 4 時間培養した。4 時間後, MTT を含む培地を取り除き, Dimethyl sulfoxide(DMSO)を各 well に 200 μl ずつ加えてホルマザンを溶解した。各 well の吸光度 (590nm,620nm) は, マイクロプレートリーダー (Immuno-Mini NJ-2300, 日本インターメッド社) で測定し, 細胞増殖抑制活性を検定した。

(2) 免疫活性試験

1) 実験動物と培地組成

実験動物には, ICR 系マウス (雌, 日本 SLC) を使用した。培地は 10% ウシ胎児血清 (FBS), 2mM グルタミン, 50 μM 2-メルカプトエタノー

ル, 100U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地 (日水製薬社) を使用した. 培養は 5% CO₂ 存在下, 37°C 湿潤条件で培養した.

2) リンパ球浮遊液の調整

リンパ球浮遊液の調整は, 藤原・淀井 (1996) の方法を用いた. ジエチルエーテルで麻酔したマウスを頸椎脱臼させ, 腹部を解剖し脾臓を摘出した. 100mm ディッシュに PBS(-) を適量入れ, その中で脾臓をすりつぶし, セルストレイナー (孔径 100 μ m, FALCON) で濾過した. 細胞の入った濾液を遠心分離 (1,100 rpm, 10 min) してリンパ球を沈殿させた. 上清を捨て, 赤血球除去のため溶血バッファー (1.7 mM Tris-HCl, pH 7.65, 0.14 M NH₄Cl) を 5ml 加えて, 5 分間インキュベートした. その後, 遠心分離し上清を取り除いた. 赤血球除去操作は 2 回繰り返した. 次に溶血バッファーを取り除くために, PBS(-) をチューブに 30ml 加え遠心分離し, 上清を捨てた. この洗浄は 2 回繰り返した. その後, 沈殿に培地を 20ml 加え懸濁し, 組織培養用フラスコに移して 37°C で 2 時間インキュベートした. リンパ球以外の細胞をフラスコに付着させ, リンパ球浮遊液を取り, 0.4% トリパンプルー溶液で染色し, ビュルケルチュルク血球計算盤で細胞数を計測した. リンパ球は, 5×10^6 cells/ml になるように培地で調整した.

3) 免疫活性の測定

サンプルが水画分の場合は, リンパ球浮遊液をマイクロプレートの各 well に 100 μ l ずつ添加し, MQ に溶かして検定濃度に調整した試料 11 μ l をそれぞれ添加した. サンプルが有機溶媒画分の場合は, リンパ球浮遊液を各 well に 200 μ l ずつ添加し, Dimethyl sulfoxide に溶かして検定濃度に調整した試料 1 μ l をそれぞれ添加した. 37°C で 48 時間インキュベートした後, 免疫細胞の代謝活性を測るため, 還元型発色試薬

WST-12-(4-Iodoophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2*H*-tetrazolium, monosodium salt] (和光純薬) と 1-Methoxy PMS [1-Methoxy-5methylphenazinium methylsulfate] (和光純薬), PBS (-)からなる WST-1 溶液を加え, さらに 4 時間培養した. 各 well の吸光度 (405nm) はマイクロプレートリーダー(Immuno Mini NJ-2300 ; Nalge Nunc International, Tokyo, Japan) で測定し, 免疫活性を検定した.

5. 細胞増殖抑制活性物質の精製

(1) シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画

順相カラムクロマトグラフィー担体であるシリカゲル (ワコーゲル C-300, 和光純薬工業) 35.0g をフィルター濾過した *n*-ヘキサンで一晩膨潤させ, その懸濁液をオープンカラム用のカラムに充填した. *n*-ヘキサン粗抽出物 1.0172g を *n*-ヘキサンで溶解し, 湿式法でチャージした. *n*-ヘキサン, *n*-ヘキサン/ジクロロメタン (3/1, v/v), ジクロロメタン, ジクロロメタン/酢酸エチル (3/1, v/v), ジクロロメタン/酢酸エチル (1/1, v/v), ジクロロメタン/酢酸エチル (1/3, v/v), 酢酸エチルの順にそれぞれ 400ml, 引き続きメタノール 200ml を流して 8 画分に分離し, 得られた各溶出液を三角フラスコに回収した. 回収した各画分をロータリーエバポレーターによる濃縮, 窒素濃縮, アスピレーターによる減圧乾燥, 凍結乾燥を行った後, 収量, 収率を算出した. 次に順相のシリカゲルプレートであるシリカ 70 (和光純薬工業) を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) で精製度を確認し, 生物検定に供した.

(2) 順相高速液体クロマトグラフィー (NP-HPLC) による分離 (1 回目)

順相クロマトグラフィー用充填カラムである TSKgel Silica 150

(21.5 mm×300 mm, 東ソー) を用い, シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られた活性画分を HPLC システム (DGU-4A, LC-6A, SPD-6A, SCL-6B, C-R6A, 島津製作所) で分離した. 溶離液には *n*-ヘキサン/酢酸エチル (95/5, v/v) を用い, 同溶離液で平衡化したカラムに, 同溶離液で溶解させた活性画分 478mg をフィルター (Millex-LG 0.2 μm, MILLPORE) で濾過し, 数十回に分けてインジェクションした. 流速は 6.0 ml/min で, 酢酸エチルでグラジエントをかけて溶出し, チャート図の波形を確認しながらピーク分取した. 検出は紫外分光光度計検出器を用い, 波長 254nm で測定しインテグレーターで記録した. 分離した画分をロータリーエバポレーターで濃縮し, 窒素濃縮, 減圧乾燥, 凍結乾燥を行い, 重量を測定して収量, 収率を算出した. さらに, TLC で精製度を確認し, 生物検定に供した.

(3) 順相高速液体クロマトグラフィー (NP-HPLC) による分離 (2 回目)

1 回目のクロマトグラフィーによって得られた活性画分を順相クロマトグラフィー用充填カラムである TSKgel Silica 60 (4.6 mm×250 mm, 東ソー) を用い, 分離した. 溶離液には *n*-ヘキサン/酢酸エチル (95/5, v/v) を用い, 同溶離液で平衡化したカラムに, *n*-ヘキサン/酢酸エチル (4/1, v/v) で溶解した活性画分 38 mg を 103 回に分けてインジェクションした. 流速は 1.0 ml/min で, 酢酸エチルでグラジエントをかけて溶出し, チャート図の波形を確認しながらピーク分取した. 検出は紫外分光光度計検出器を用い, 波長 254nm で測定しインテグレーターで記録した. 分離した画分をロータリーエバポレーターで濃縮し, 窒素濃縮, 減圧乾燥, 凍結乾燥を行い, 重量を測定して収量, 収率を算出した. さらに, TLC で精製度を確認し, 生物検定に供した.

6. 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルによる構造解析

2 回目の順相高速液体クロマトグラフィーにより分離された活性画分の構造解析のため、大阪市立大学大学院分子変換学研究室・准教授 品田哲郎博士に、各種 NMR スペクトルの測定を依頼した。¹H-NMR スペクトルは、Bruker 社製, Avance 型 (600MHz) , ¹³C-NMR スペクトルは, Bruker 社製, Avance 型 (150MHz) を使用して解析した。さらに二次元 NMR スペクトル (NOESY, COSY, HMBC, HMQC) を行った。溶媒には重クロロホルム (CDCl₃) と重ベンゼン (C₆D₆) を用い、ケミカルシフト決定のための内部標準物質として、テトラメチルシラン (TMS) を用いた。さらに、高分解能マスマスペクトル (HRMS) は、日本電子社製, JMS-AX500, 赤外分光スペクトル (FTIR) は, JASCO 社製, FT/IR-4200 を使用して解析した。

HRMS(EI) calcd for C₂₀H₂₈O₃ 316.2038, found [M]⁺316.2027.

FTIR (neat) 2963, 2926, 2869, 1716, 1642 cm⁻¹

¹H-NMR (600 MHz, C₆D₆) δ 0.63 (3H, s, Me-19), 0.69 (3H, s, Me-18), 0.76 (3H, s, Me-20), 0.83 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-16 or 17), 0.85 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, Me-16 or 17), 1.0-1.5 (4H, m, 2xCH₂- 2 and 3), 1.65 (1H, dd, *J* = 17.7, 4.9 Hz, H-6), 1.88 (1H, dd, *J* = 17.7, 4.9 Hz, H-6), 2.25 (1H, m, H-1), 2.53 (1H, m, H-1), 2.87 (1H, sept, *J* = 6.8 Hz, H-15), 3.00 (1H, t, *J* = 4.9 Hz, H-5), 6.35 (1H, s, H-14), 6.43 (1H, s, H-11), 9.19 (1H, s, H-7).

¹³C-NMR (150 MHz, C₆D₆) δ 19.1 (C-20), 20.1 (C-19), 20.9 (C-17), 21.0 (C-16), 23.0 (C-2), 26.5 (C-15), 33.8 (C-18), 33.9 (C-4), 36.1 (C-1), 40.6 (C-3), 42.1 (C-5), 42.6 (C-6), 43.4 (C-10), 133.3 (C-14), 134.9 (C-11), 152.6 (C-9), 154.1 (C-13), 187.6 (C-12), 188.0 (C-8), 200.4 (C-7).

[α]_D²² +30.45 (*c* = 0.3, CHCl₃)

7. 活性物質の合成

スギ (*Cryptomeria japonica*) の樹皮から得られた ferruginol を出発物質として, Chen らの方法により酸化反応させた. その結果, 20mg の ferruginol から 9.5mg の合成品 7,8-*seco*-*para*-ferruginone (SPF) が白い粉末として得られた. ¹H-NMR による合成品の解析データは, Chen らによるデータと, 本実験で得られた F3-15-2 画分のデータに一致した.

8. アポトーシスの検出

n-ヘキサン粗抽出物と構造決定された 7,8-*seco*-*para*-ferruginone の合成品を用いて, 細胞増殖抑制活性がアポトーシスかどうかを実験した.

(1) 細胞の形態観察

サンプル添加 24 時間後, 48 時間後のラット肝ガン細胞の形態を倒立顕微鏡 (MFA 20100 Nikon 社製) で観察した.

(2) 蛍光染色によるクロマチンの観察

クロマチン凝縮はアポトーシスに伴う最も特徴的な形態変化の一つである. 大山 (1995) の方法に従い, 以下の手順でクロマチンの観察を行った.

サンプル添加後 24 時間の細胞をトリプシンで剥離し, 培地と共に 50ml のコニカルチューブへ移し, 200×*g* で 10 分間遠心分離し, 上清を除去した. その後, PBS(-) に浮遊させ再度遠心, 上清を除去した. さらに 1% グルタルアルデヒド溶液を加え, 細胞を浮遊させ一晩固定した. 固定した細胞を低速遠心後, 沈殿を PBS(-) に浮遊させた. DNA に特異的に結合する蛍光色素 0.1mM ヘキスト 33342 溶液 (Sigma, St. Louis, MO) を用いて染色を行った. その細胞を含む染色液一滴をスライドグラスに載せカバーグラスをかけ, 蛍光顕微鏡 (Leica DMLB ライカ社製) の U 領域 (波長 461nm) で観察した.

(3) 電気泳動による DNA 断片化の検出

1) DNA の調整

サンプル添加後 24 時間の細胞 (約 $5\sim 10\times 10^6$ 個以上) をポリスマンで剥離し, 50ml のコニカルチューブへ移し, 3,000 rpm, 5 分間遠心し細胞を回収した. 細胞ペレットに細胞融解バッファー (10mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, pH8.0, 150mM NaCl) を加え, DNA断片を抽出した. その後, 16,000 rpm で 20 分間遠心分離し, DNA断片を含む上清に RNaseA を加え酵素分解した. 37°C で 1 時間インキュベートした後に, プロテアーゼ K 溶液を加え, 再度 37°C で 1 時間インキュベートした. さらに, 5M NaCl とイソプロパノールを加え, -20°C で一晩置いた. 翌日, 16,000 rpm, 20 分間の遠心分離を 2 回行い, 上清を除去して TE 溶液 (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA, pH 8.0) に溶解した. 分光光度計 (NanoDrop ND-1000, スクラム) を用いて DNA を定量後, 以下のアガロースゲル電気泳動を行った.

2) アガロースゲル電気泳動

1×TAE バッファー (40 mM Tris, 40mM CH_3COOH , 1mM EDTA) に終濃度 2%になるように, 電気泳動用アガロースを電子レンジで溶解した. エチジウムブロマイド ($0.1\mu\text{g/ml}$) を添加した後, コームをセットしたゲル型トレイに流し込み, 室温に放置して固化させた. 固化したゲルを 1×TAE バッファーで満たしたサブマリン電気泳動装置にセットし, DNA 試料と 6×ローディングバッファーを混合した DNA 試料を各 well に添加した. 100V で通電し, ブロモフェノールブルーが 7 割程度移動したところで泳動を終了した. その後, ゲルを UV トランスイルミネーター (312nm) で可視化させバンドを観察した.

結 果

1. 外被と巣盤, 唾液腺の顕微鏡観察

外被と巣盤の実体顕微鏡写真と, 走査型電子顕微鏡写真をそれぞれ示した (Fig. 15). 実体顕微鏡による観察から, 巣盤は外被より巣材が細かく噛み砕かれていることが観察された {Fig. 15, (B)}. また唾液は, 外被より巣盤に多く存在することが観察された {Fig. 15, (D)}.

唾液腺の実体顕微鏡写真 {Fig. 15, (E)} と, 走査型電子顕微鏡写真 {Fig. 15, (F)} をそれぞれ示した. 胸部下側の唾液腺の他に, 胸部の羽の付け根に大きな 1 対の唾液腺様の器官が存在した.

2. 粗抽出物の収量と収率

キロスズメバチの巣 (外被) 102g (1 回目の抽出) と 470g (2 回目の抽出) (Fig. 16) をそれぞれ, *n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 70%アセトン, 水で逐次抽出した. その結果, 102g から得られた各粗抽出物の収量は, *n*-ヘキサン粗抽出物 0.27g, 酢酸エチル粗抽出物 1.37g, 70%アセトン粗抽出物 2.62g, 水粗抽出物 0.98g であった. また, 470g からは, *n*-ヘキサン粗抽出物 5.43g, 酢酸エチル粗抽出物 6.37g であった (Table 2). 2 回目の抽出は, 酢酸エチルまでで終了とした (Table 3).

3. 粗抽出物による生物検定

1 回目の抽出で得られた *n*-ヘキサン, 酢酸エチル, 70%アセトン, 水の各粗抽出物を用いて, ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性を調べた. その結果, *n*-ヘキサンと酢酸エチルの各粗抽出物に比較的高い活性が確認され, IC₅₀ 値は, それぞれ約 40 μ g/ml, 60 μ g/ml であった (Fig. 17). また, 2 回目の抽出で得られた *n*-ヘキサン, 酢酸エチルの各粗抽出物による増殖抑制活性試

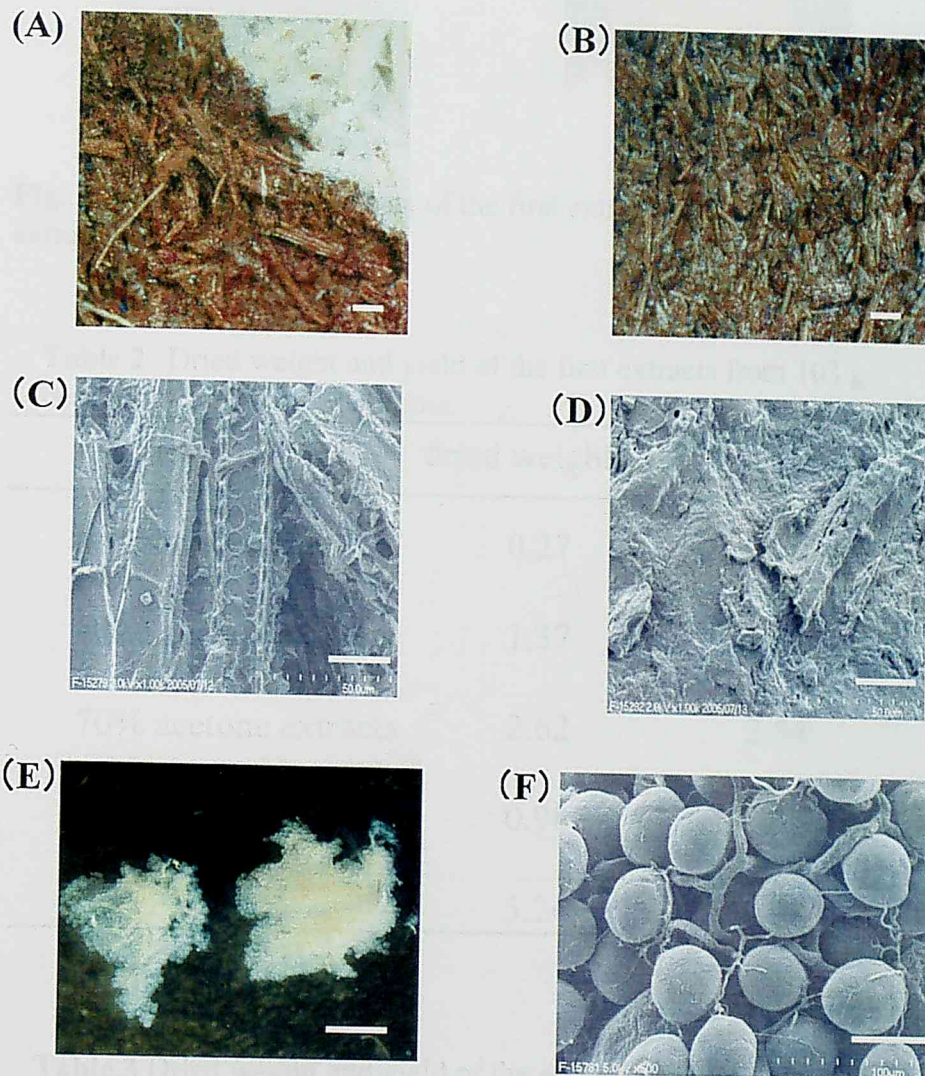


Fig. 15. Photographs of *Vespa simillima* nest. (A) Photograph of the envelope nest by stereo microscope. Scale bar=1mm. (B) Photograph of the comb nest of by stereo microscope. Scale bar=1mm. (C) Photograph of the envelope nest by scanning electron microscope. Scale bar=250 μ m. (D) Photograph of the comb nest by scanning electron microscope. Scale bar=250 μ m. (E) Photograph of salivary glands of worker by stereo microscope. Scale bar=3mm. (F) Photograph of salivary glands of worker by scanning electron microscope. Scale bar=500 μ m.

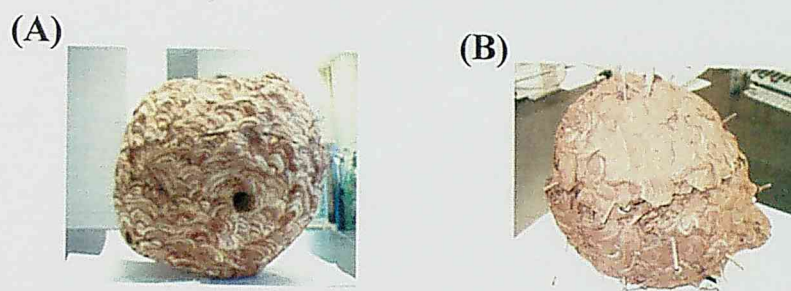


Fig. 16. Photograph of the nest of the first extraction (A), and the second extraction (B).

Table 2 Dried weight and yield of the first extracts from 103 g nest powder of *Vespa simillima*.

extract	dried weight (g)	yield (%)
<i>n</i> -hexane extracts	0.27	0.26
ethyl acetate extracts	1.37	1.33
70% acetone extracts	2.62	2.54
water extracts	0.98	0.95
total	5.24	5.08

Fig. 17. Anti-tumor effect of each extract from the first extraction of *Vespa simillima* nest against dRL684 cells.

Table 3 Dried weight and yield of the second extracts from 470 g nest powder of *Vespa simillima*.

extract	dried weight (g)	yield (%)
<i>n</i> -hexane extracts	5.43	1.16
ethyl acetate extracts	6.37	1.36
total	11.80	2.52

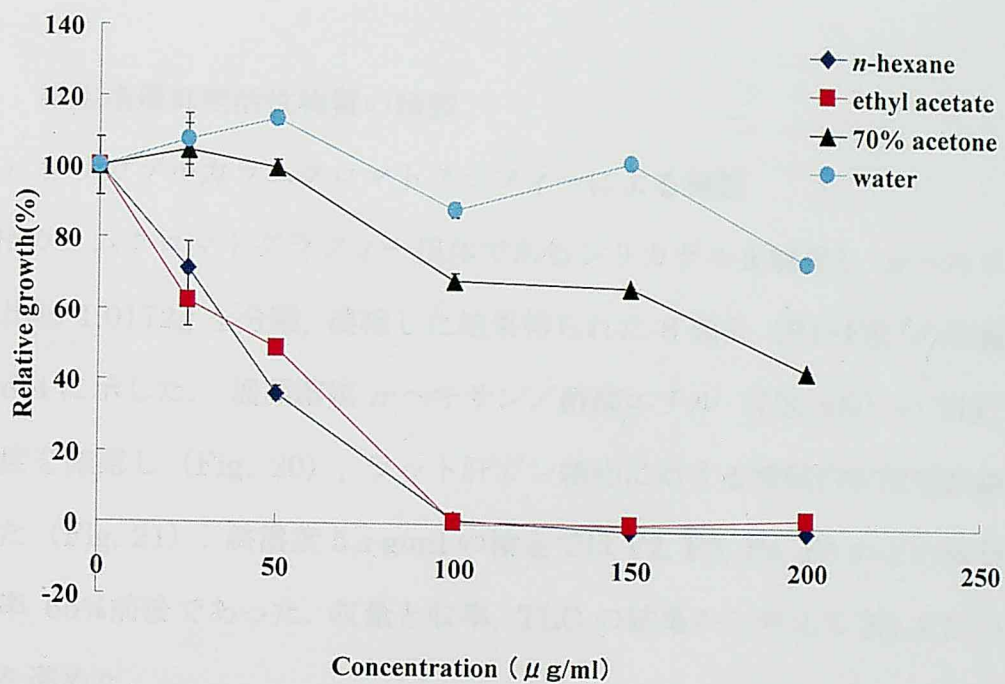


Fig. 17. Anti-tumor effect of each extract from the first extraction of *Vespa simillima* nest against dRLh84 cells.

験では、1回目の粗抽出物より抑制活性が上がり、IC₅₀値は、それぞれ約 18 μ g/ml, 22 μ g/ml となった(Fig. 18). 1回目の各粗抽出物を用いてマウス脾臓リンパ球に対する免疫活性試験を行った結果、水粗抽出物に比較的高い活性が確認された (Fig. 19). 以上より、一番高い活性が確認された2回目の抽出による *n*-ヘキサン粗抽出物を用いて、ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性を指標とした精製を行うことにした。

4. 細胞増殖抑制活性物質の精製

(1) シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製

順相カラムクロマトグラフィー担体であるシリカゲルを使用し、*n*-ヘキサン粗抽出物 1.0172g を分離、濃縮した結果得られた 8 画分 (F1~F8) の収量を Table 4 に示した。展開溶媒 *n*-ヘキサン/酢酸エチル (7/3, v/v) の TLC で精製度を確認し (Fig. 20), ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性試験を行った (Fig. 21)。終濃度 5 μ g/ml の検定では F2, F3, F4, F5 のどの画分も抑制率 65%前後であった。収量と収率, TLC の結果から考えて F3 を用いて精製を進めた。

(2) 順相高速液体クロマトグラフィー (NP-HPLC) による分離 (1回目)

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製された活性画分 (F3) 478mg を順相カラムを用いた HPLC システムで精製した。溶出は、*n*-ヘキサンと酢酸エチルを用いたバイナリーグラジェントで行い、チャートの波形を確認しながらピークごとに分取し、27 画分 (F3-1~F3-27) に分けた (Fig. 22)。その各溶出物を濃縮して得られた収量を Table 5 に示した。展開溶媒 *n*-ヘキサン/酢酸エチル (7/3, v/v) の TLC で精製度を確認し (Fig. 23), ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性試験を行った。終濃度 5 μ g/ml における検定で、F3-15 に比較的高い活性 (抑制率約 33%) が確認されたので (Fig. 24), この画分で次のステップの精製を行うことにした。

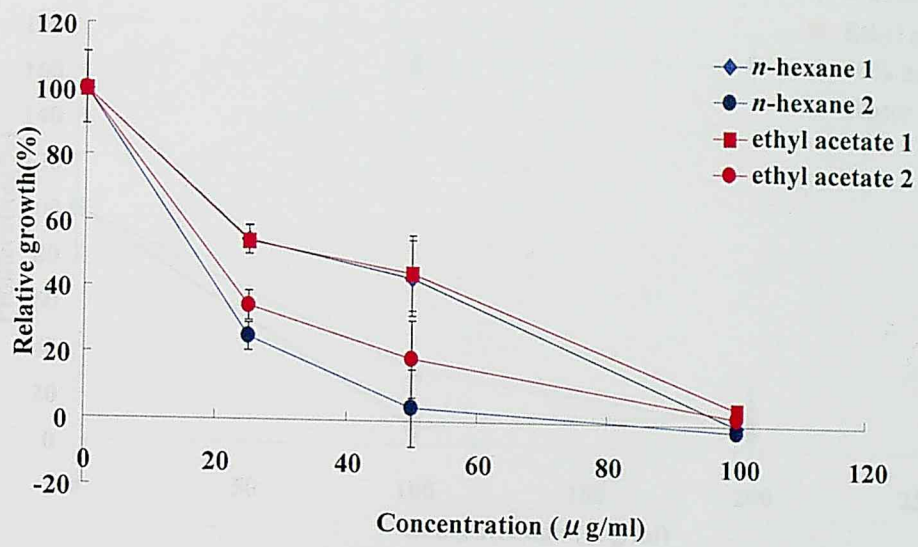


Fig. 18. Anti-tumor effect of *n*-hexane extracts and ethyl acetate extracts from the first and the second extraction.

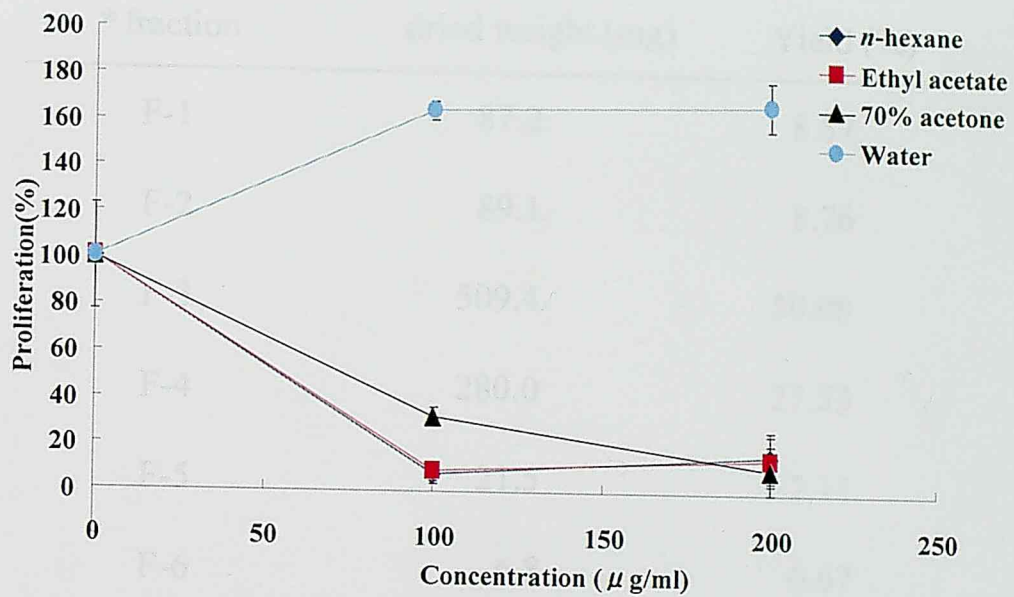


Fig. 19. A relationship between cell growth effect against lymphocytes of mouse spleen and concentrations of each extract from *Vespa simillima* nest of the first extraction.

Table 4 Dried weight and yield of each fraction separated by a silicagel column chromatography.

* fraction	dried weight (mg)	Yield (%)
F-1	87.2	8.57
F-2	89.1	8.76
F-3	509.4	50.08
F-4	280.0	27.53
F-5	21.5	2.11
F-6	6.8	0.67
F-7	3.5	0.34
F-8	16.9	1.67
total	1014.4	99.73

*F-1, eluted by *n*-hexane; F-2, eluted by *n*-hexane/dichloromethane=3/1(v/v); F-3, eluted by dichloromethane; F-4, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=3/1(v/v); F-5, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=1/1(v/v); F-6, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=1/3(v/v); F-7, eluted by ethyl acetate; F-8, eluted by methanol.

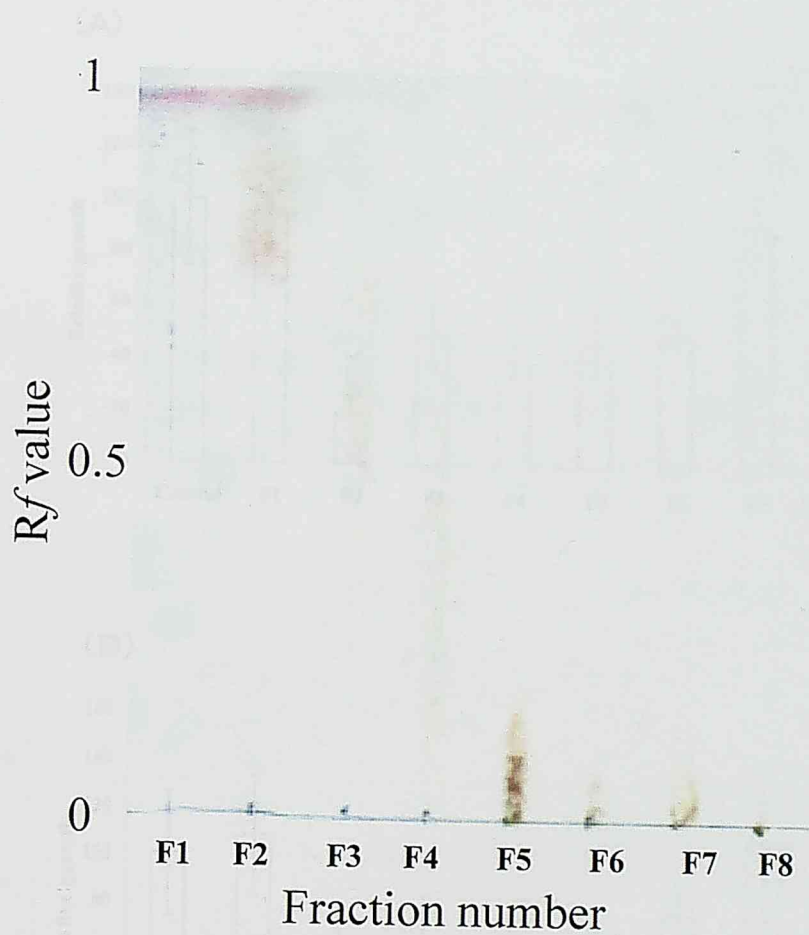


Fig. 20. TLC of the several fractions separated by a silicagel column chromatography. F-1, eluted by *n*-hexane; F-2, eluted by *n*-hexane/dichloromethane=3/1(v/v); F-3, eluted by dichloromethane; F-4, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=3/1(v/v); F-5, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=1/1(v/v); F-6, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=1/3(v/v); F-7, eluted by ethyl acetate; F-8, eluted by methanol. The solvent consisted of *n*-hexane/ethyl acetate=7/3(v/v). TLC plate was silicagel plate and was visualized by spraying sulfuric acid and charring them at 100°C.

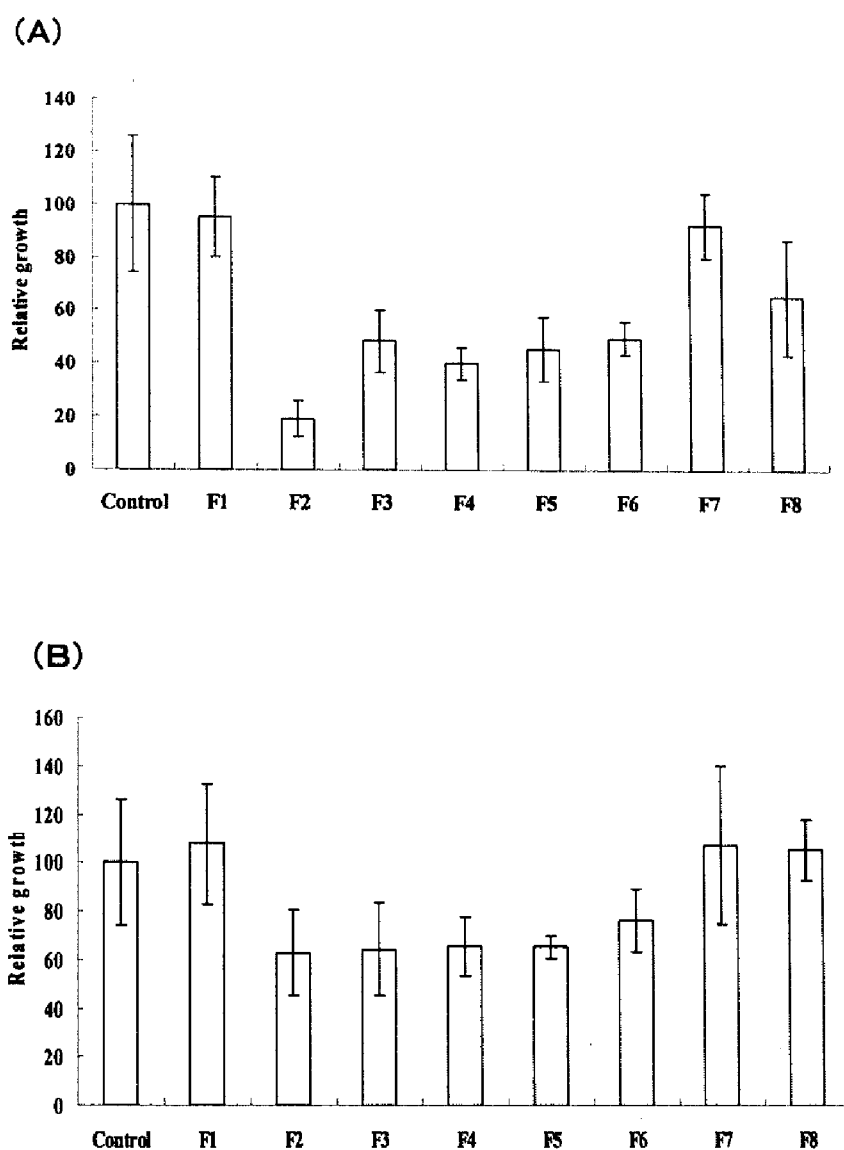


Fig. 21. Anti-tumor effect of each fraction eluted by a silicagel column chromatography against dRLh84 cells. F-1, eluted by *n*-hexane; F-2, eluted by *n*-hexane/dichloromethane=3/1(v/v);F-3, eluted by dichloromethane; F-4, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=3/1(v/v); F-5, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=1/1(v/v); F-6, eluted by dichloromethane/ethyl acetate=1/3 (v/v); F-7, eluted by ethyl acetate; F-8, eluted by methanol. Concentrations of (A) and (B) were 10 μ g/ml and 5 μ g/ml, respectively.

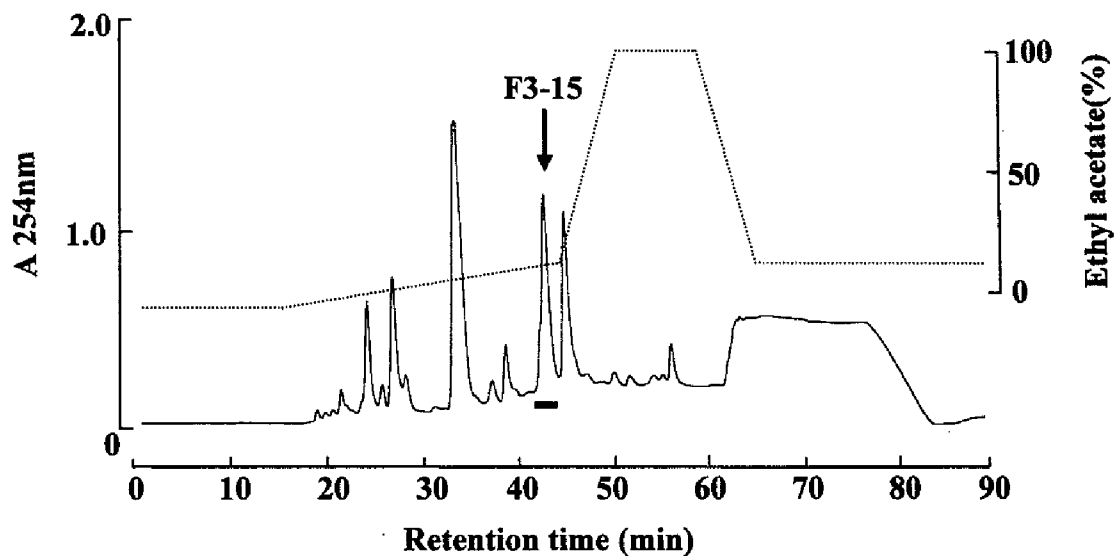


Fig. 22. The first NP-HPLC elution profile of *n*-hexane extracts. A sample fractionated by the silicagel column chromatography (F3) was applied to another silica gel column chromatography on a TSKgel Silica 150 (21.5mm I.D.×300) column. The sample was eluted with stepwise and linear gradient from 5 to 100% ethyl acetate (dot line). Fractions were monitored by UV at 254 nm and collected at a flow rate of 6.0 ml/min. The arrow head shows anti-tumor activity.

Table 5 Dried weight and yield of each fraction separated by the first NP-HPLC.

*fraction	dried weight (mg)	yield (%)	% of <i>n</i> -hexane ex.
F3-1	9.8	2.18	0.963
F3-2	1.5	0.33	0.147
F3-3	1.4	0.31	0.138
F3-4	1.7	0.38	0.167
F3-5	6.2	1.38	0.610
F3-6	10.7	2.38	1.052
F3-7	4.4	0.98	0.433
F3-8	15.9	3.53	1.563
F3-9	24.6	5.46	2.418
F3-10	10.3	2.29	1.013
F3-11	50.4	11.20	4.955
F3-12	13.0	2.89	1.278
F3-13	11.6	2.58	1.140
F3-14	6.6	1.47	0.649
F3-15	38.7	8.59	3.805
F3-16	22.6	5.02	2.222
F3-17	12.2	2.71	1.200
F3-18	11.4	2.53	1.121
F3-19	8.3	1.84	0.816
F3-20	12.2	2.71	1.200
F3-21	20.2	4.48	1.986
F3-22	25.6	5.68	2.517
F3-23	40.1	8.90	3.942
F3-24	25.7	5.71	2.527
F3-25	10.8	2.40	1.062
F3-26	16.6	3.69	1.632
F3-27	1.7	0.38	0.167
total	414.2	92.00	40.723

* Each fraction was collected by each peak watching the monitor.

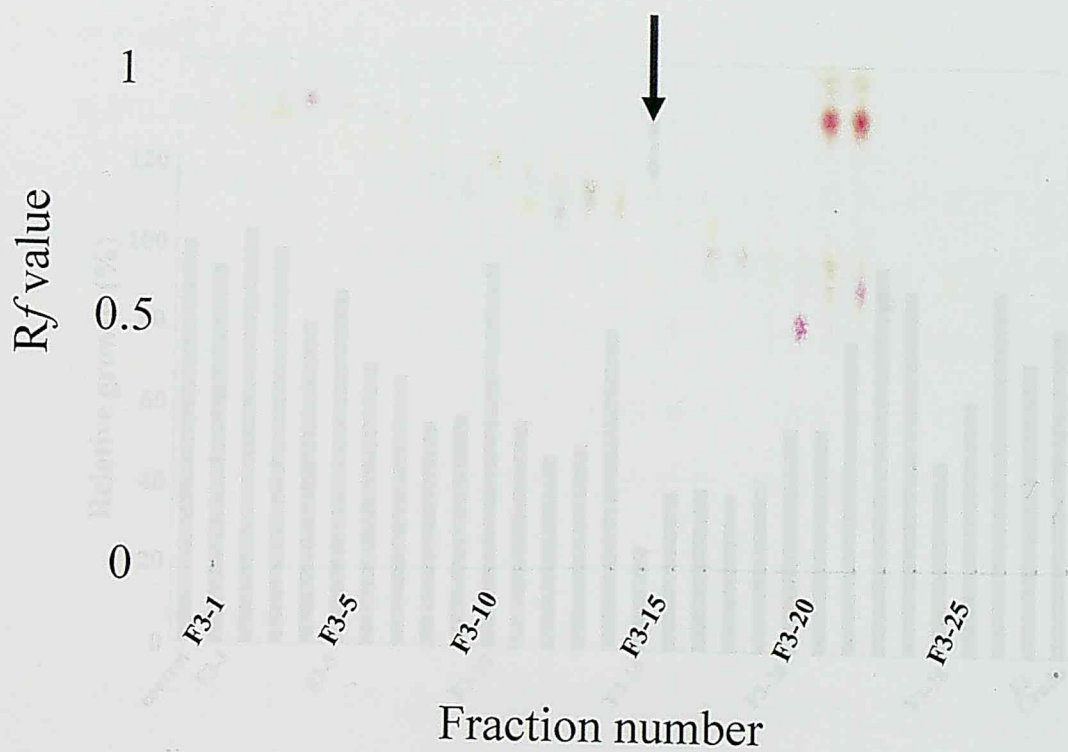


Fig. 23. TLC of the 27 fractions eluted by the first NP-HPLC. The solvent consisted of *n*-hexane/ethyl acetate=7/3(v/v). TLC plate was silicagel plate and was visualized by spraying sulfuric acid and charring them at 100°C. The arrow indicates active fraction.

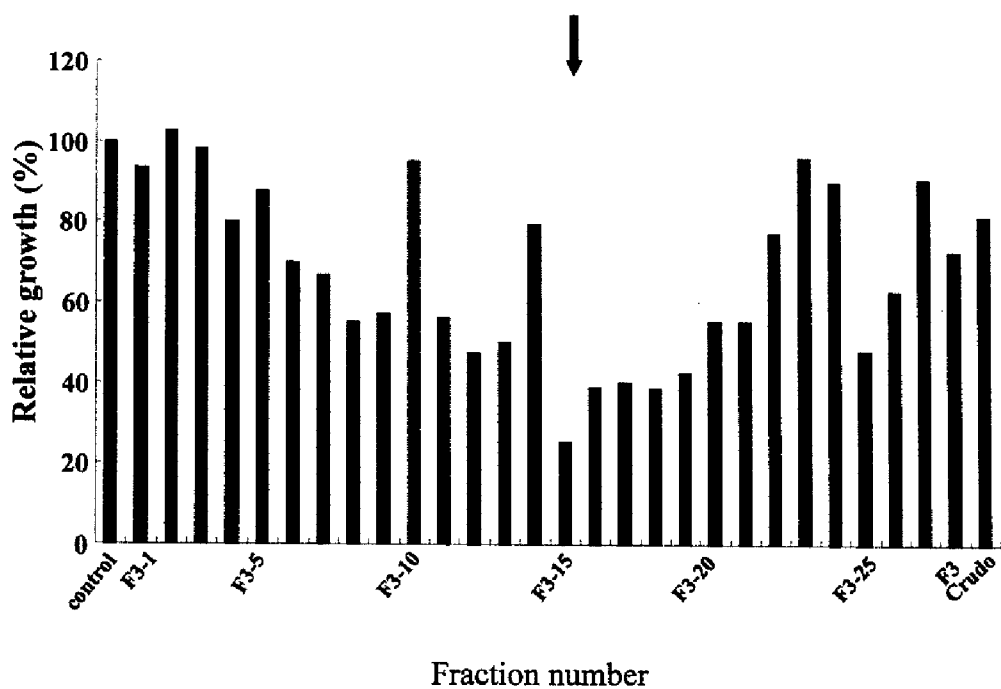


Fig. 24. Anti-tumor effect of each fraction eluted by the first NP-HPLC against dRLh84cell. Concentration of each fraction was 5 μ g/ml. The arrow indicates active fraction.

(3) 順相高速液体クロマトグラフィー (NP-HPLC) による分離 (2回目)

1回目の順相高速液体クロマトグラフィーで精製された活性画分 (F3-15) 38.4mg を順相カラムを用いた HPLC システムで再度精製した. 溶出は, *n*-ヘキサンと酢酸エチルを用いたバイナリーグラジェントで行い, チャートの波形を確認しながら 5つの画分 (F3-15-1~F3-15-5) に分けた (Fig. 25). その各溶出物を濃縮して得られた収量を Table 6 に示した. 5つの画分についてラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性試験を行った結果, 終濃度 5 μ g/ml における検定で, F3-15-2 に比較的高い活性 (抑制率約 33%) が確認され, IC₅₀ 値は, 約 3.7 μ g/ml であった (Fig. 26). また, F3-15-2 が針状に結晶化していたことと, 展開溶媒 *n*-ヘキサン/酢酸エチル (8/2, v/v) の TLC でスポット状に見えたことから (Fig. 27), この時点で構造解析を依頼した.

5. 構造解析

活性画分である F3-15-2 の構造解析のため, 各種スペクトルの測定を行った. 高分解能マスマスペクトルにて, 分子量を測定したところ, セコアビエタン型ジテルペンの 7,8-*seco*-*para*-ferruginone と同じ分子量 (316.2038) が得られた (Fig. 28). F3-15-2 の純度は約 90% であった (データ省略). 重クロロホルムを使用して測定した ¹H-NMR データ {Fig. 29, (A)} と, ¹³C-NMR データ (Fig. 30) が文献値 (Chen, *et al.*, 2002) と一致した. さらに, 重ベンゼンを使用して測定した 1次元, および 2次元 NMR データから, 構造をより確かなものとした (巻末に添付, Supp. 1~4). また, IR スペクトルからキノン, およびアルデヒド由来のカルボニル基の存在が確認できた (データ省略). 以上の NMR データをまとめて Fig. 31 に示した. 文献により, ferruginol (20mg) を出発物質として 7,8-*seco*-*para*-ferruginone (9.5mg) を合成し, ¹H-NMR スペクトルを測定した {Fig. 29, (B)}.

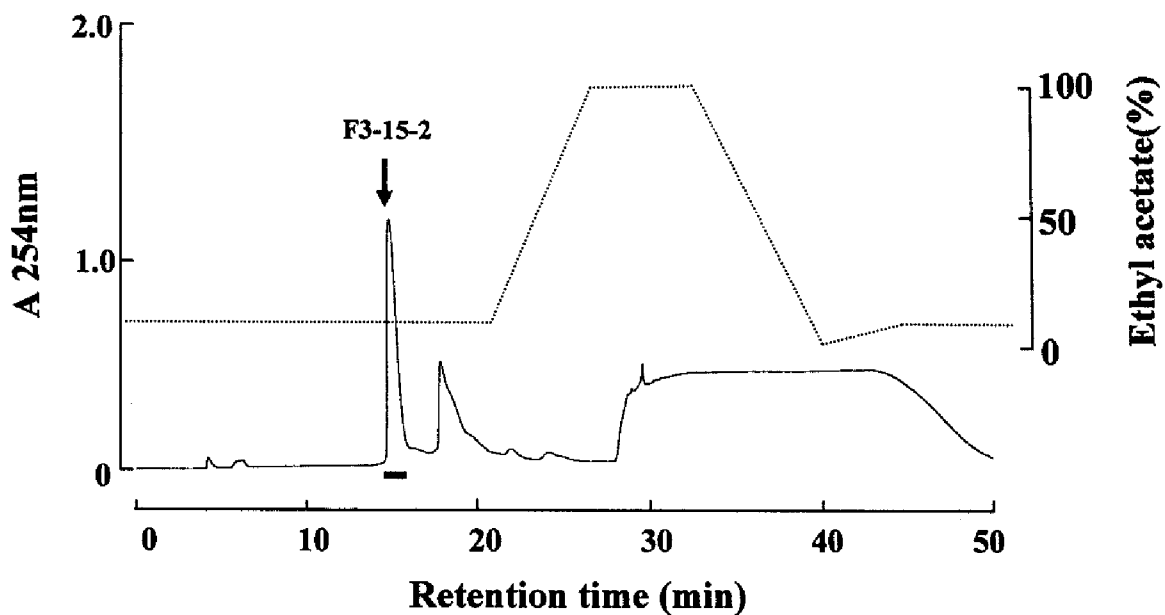


Fig. 25. The second NP-HPLC elution profile of *n*-hexane extracts. A sample fractionated by the silicagel column chromatography (F3-15) was applied to another silica gel column chromatography on a TSKgel Silica-60 (4.6 mm I.D. × 250) column. The sample was eluted with stepwise and linear gradient from 5 to 100% ethyl acetate (dot line). Fractions were monitored by UV at 254 nm and collected at a flow rate of 1.0 ml/min. The arrow head shows anti-tumor activity.

Table 6 Dried weight and yield of each fraction eluted by the second NP-HPLC.

*fraction	dried weight (mg)	yield (%)	% of <i>n</i> -hexane ex.
F3-15-1	2.63	7.97	0.259
F3-15-2	5.01	15.18	0.493
F3-15-3	9.93	30.09	0.976
F3-15-4	1.90	5.76	0.187
F3-15-5	6.66	20.18	0.655
total	26.13	79.18	2.570

* Each fraction was collected by monitoring each peak

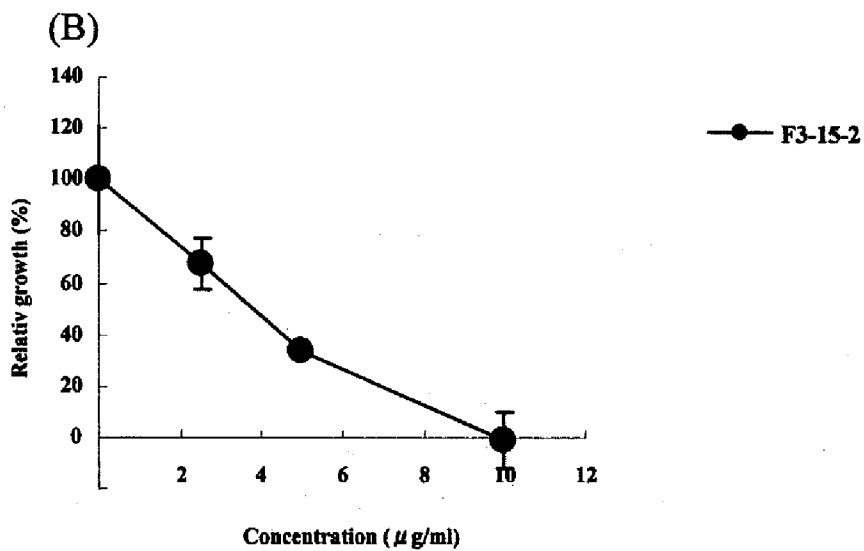
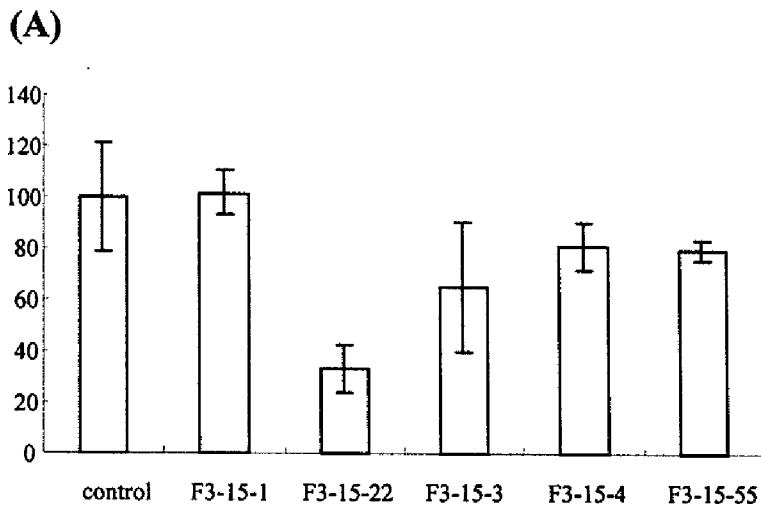


Fig. 26. (A) Anti-tumor effect of each fraction eluted by the second NP-HPLC against dRLh84cell. Concentration of each fraction was $5 \mu\text{g/ml}$. (B) Dose-dependent anti-tumor effect of F3-15-2.

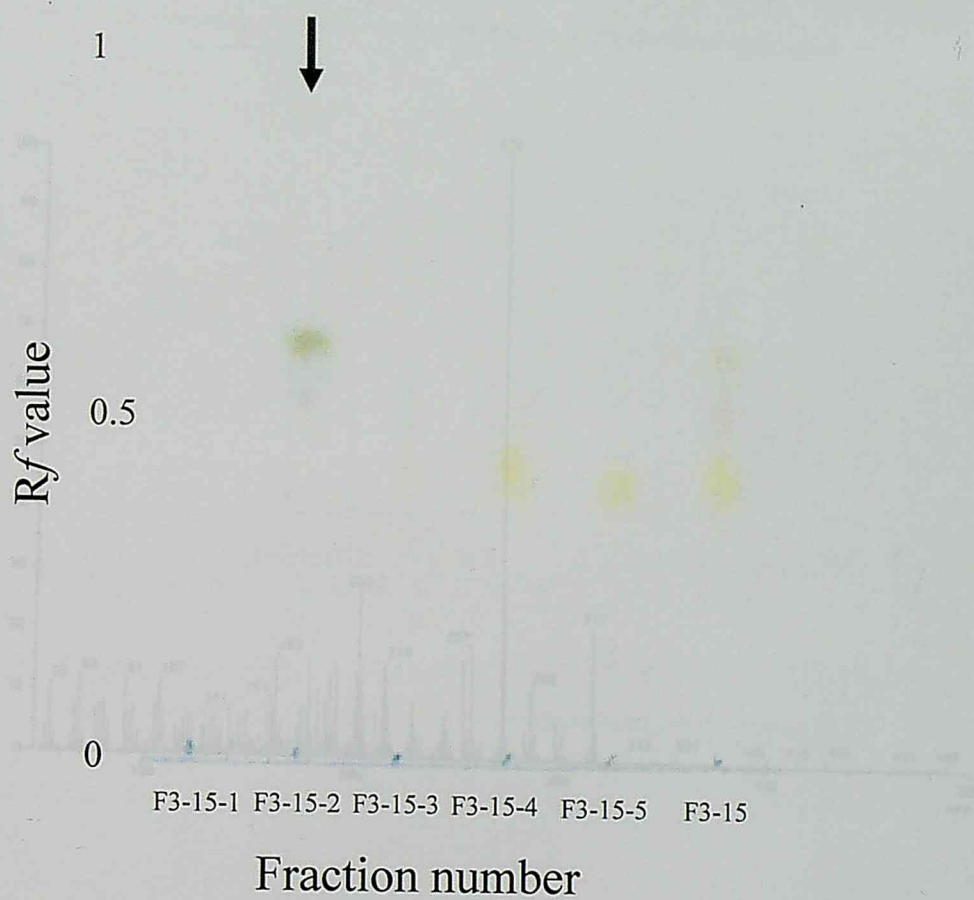


Fig. 27. TLC of the 5 fractions eluted by the second NP-HPLC. The solvent consisted of *n*-hexane/ethyl acetate=8/2(v/v). TLC plate was silicagel plate and visualized by spraying sulfuric acid and charring them at 100°C. The arrow indicates active fraction.

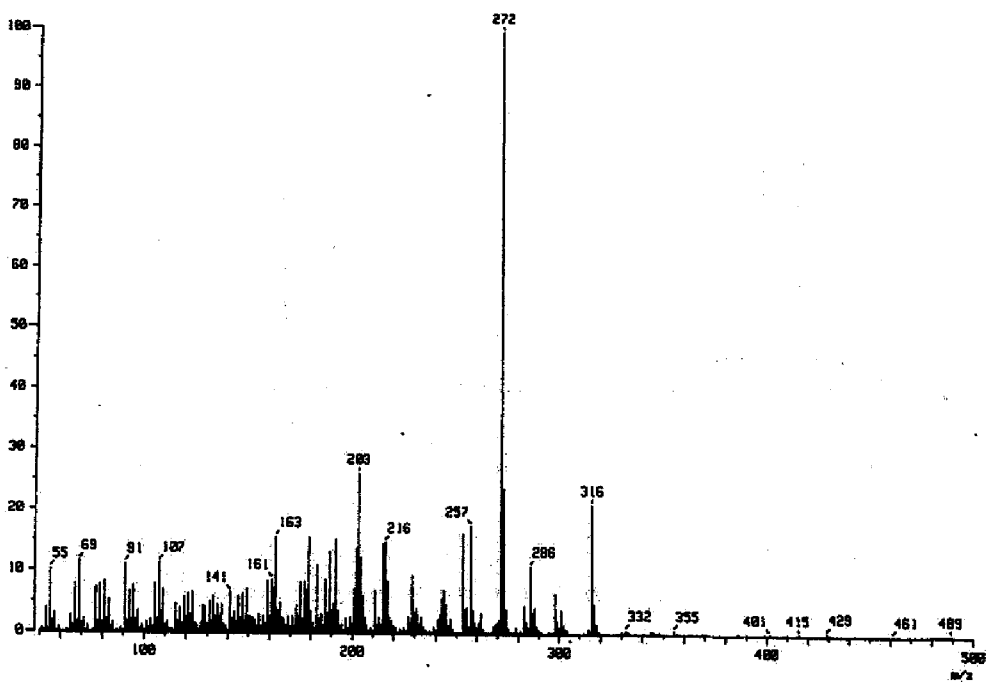


Fig. 28. Mass spectrum analysis of a compound purified from nest of *Vespa simillima*.

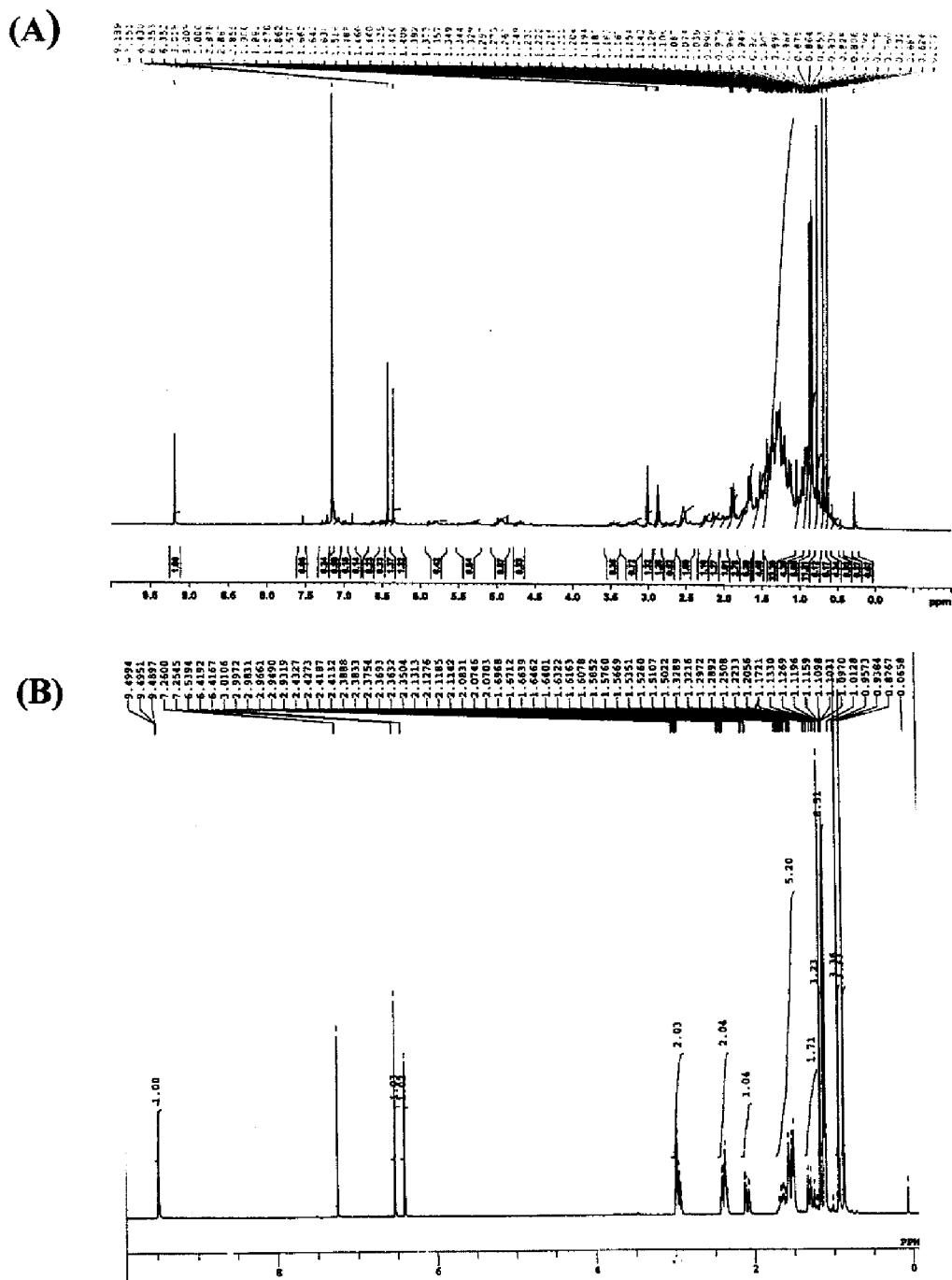


Fig. 29. ^1H -NMR spectrum of a compound purified from nest of *Vespa simillima* (A) and synthetic 7,8-*seco-para*-ferruginone (B).

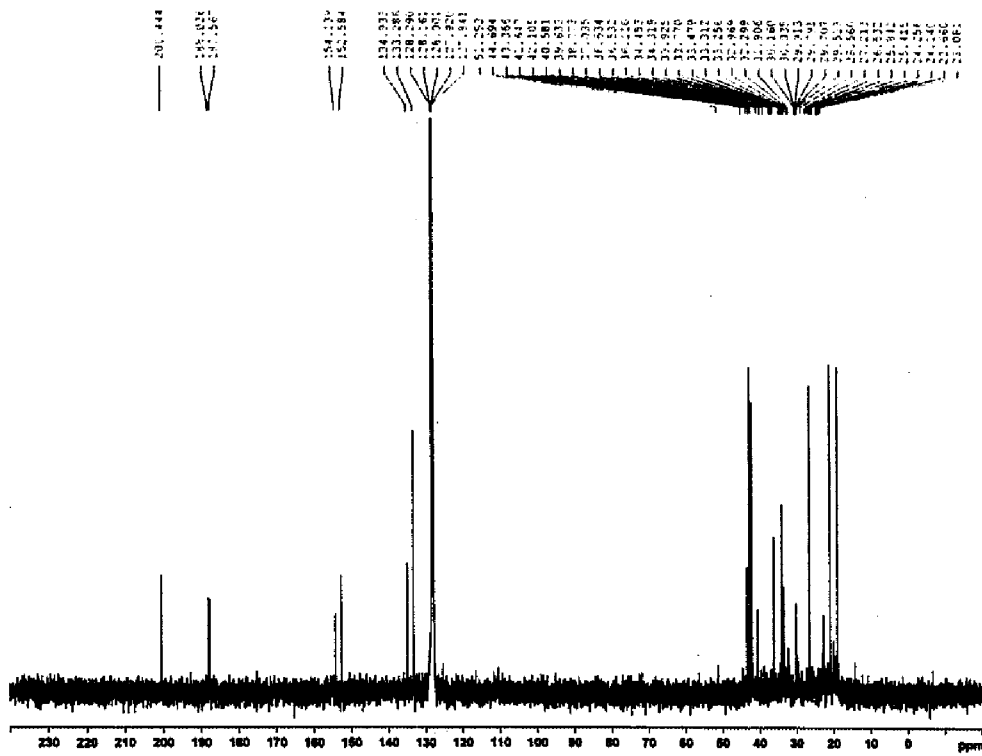
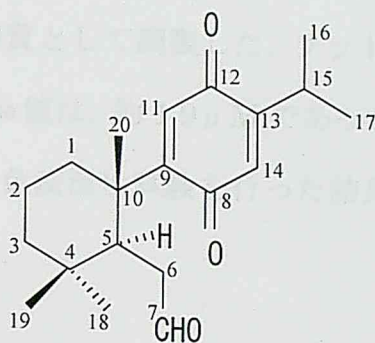


Fig. 30. ^{13}C -NMR spectrum of a compound purified from nest of *Vespa simillima*.

(A)



(B)

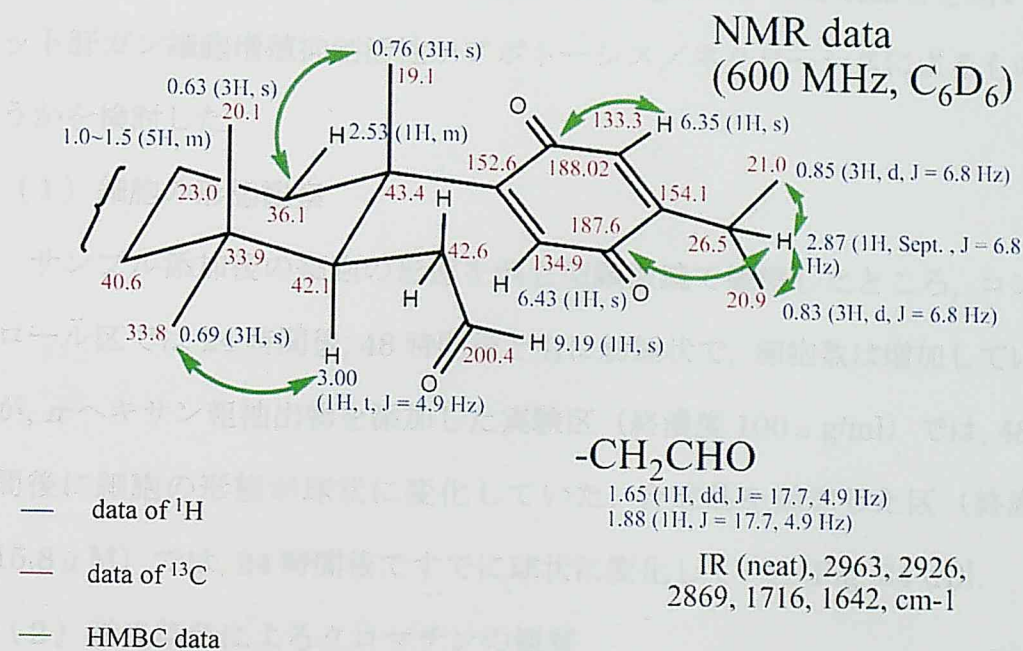


Fig. 31. (A) Structure of 7,8-seco-para-ferruginone. (B) 7,8-seco-para-ferruginone decided by various kinds of NMR analysis.

6. 合成品による生物検定

各種 NMR により構造決定された 7,8-*seco*-*para*-ferruginone の合成品を用いて、生物検定を行った。合成品は、文献 (Chen *et al.*, 2002) により ferruginol を出発物質として調製した。ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性試験の結果、IC₅₀ 値は、約 1.9 μ M であった (Fig. 32)。また、マウス脾臓リンパ球を用いた免疫活性試験を行った結果、顕著な抑制活性は認められなかった (Fig. 33)。

7. アポトーシス/ネクローシスの検討

n-ヘキサン粗抽出物と、7,8-*seco*-*para*-ferruginone の合成品とを用いて、ラット肝ガン細胞増殖抑制活性がアポトーシス/ネクローシスによるものかどうかを検討した。

(1) 細胞の形態観察

サンプル添加後の細胞の形態を倒立型顕微鏡で観察したところ、コントロール区では 24 時間後、48 時間後ともに紡錘状で、細胞数は増加していたが、*n*-ヘキサン粗抽出物を添加した実験区 (終濃度 100 μ g/ml) では、48 時間後に細胞の形態が球状に変化していた。合成品を添加した区 (終濃度 15.8 μ M) では、24 時間後ですでに球状に変化していた (Fig. 34 (A))。

(2) 蛍光染色によるクロマチンの観察

ヘキスト 33342 を用いて、ラット肝ガン細胞内のクロマチンの変化をサンプル添加 12 時間後、24 時間後、48 時間後に観察した。その結果、コントロール区では正常な網目状をしたクロマチン DNA の構造がみられたが、*n*-ヘキサン粗抽出物区 (終濃度 100 μ g/ml) では 24 時間後以降、合成品を添加した区 (終濃度 31.6 μ M) では 12 時間後以降に、アポトーシスに特徴的なクロマチン凝集が散発しているのがみられた (Fig. 34 (B))。特に、合成品区の 24 時間後は、クロマチン凝集が頻発しているが観察された。

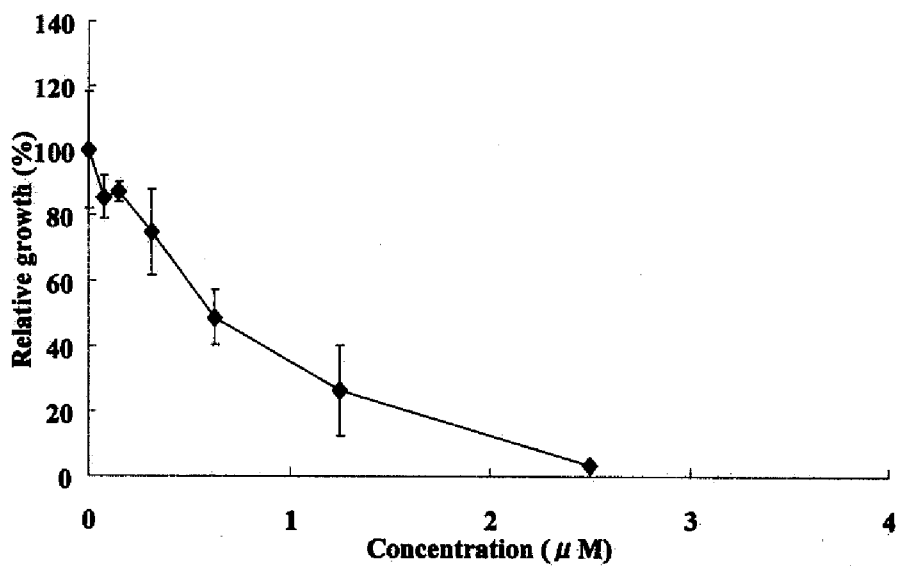


Fig. 32. Dose-dependent anti-tumor effect of synthetic 7,8-*seco-para*-ferruginone against dRLh84 cells.

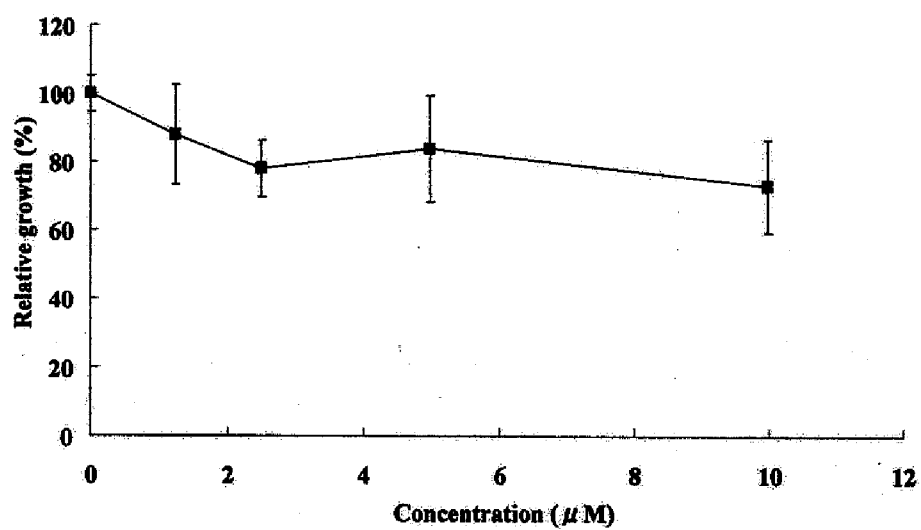


Fig. 33. Dose-dependent cell growth suppressive effects of synthetic 7,8-*seco-para*-ferruginone against mouse spleen lymphocytes.

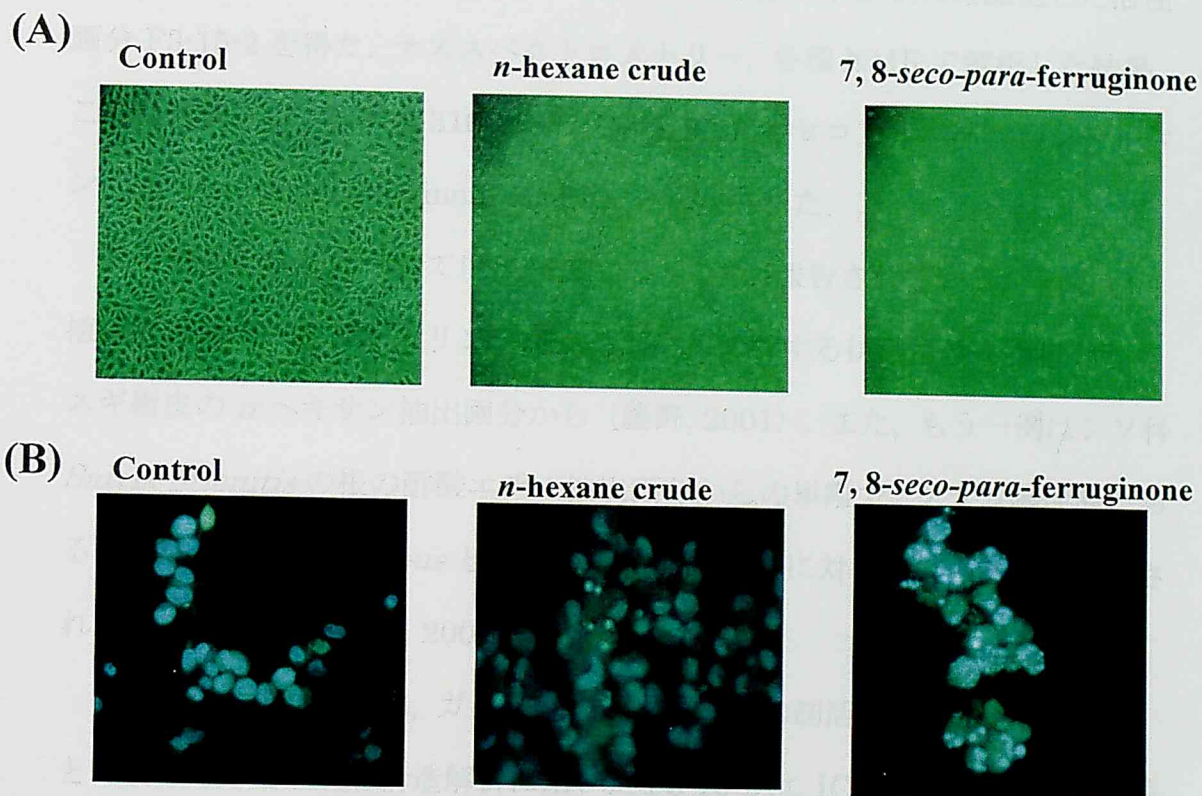


Fig. 34. Cell morphological analysis. (A) Phase-contrast micrographs of dRLh84 cells treated with *n*-hexane fraction or synthetic 7, 8-*seco-para*-ferruginone. Growing cells were treated with DMSO as control, 100 μ g/ml *n*-hexane crude fraction for 48 hours and 15.8 μ M synthetic 7, 8-*seco-para*-ferruginone for 24 hours. (B) Morphological analysis of dRLh84 cells. The cells were treated with 100 μ g/ml *n*-hexane crude fraction or 31.6 μ M synthetic 7, 8-*seco-para*-ferruginone, and the controls with DMSO for 24 hours, then harvested. Cell nuclei were stained with Hoechst 33342 and visualized by fluorescence microscopy.

考 察

キロスズメバチの巣（外被）の *n*-ヘキサン粗抽出画分を、ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性を指標として分離・精製した。カラムクロマトグラフィと2回の順相 HPLC システムによる精製で、針状に結晶化した活性画分 F3-15-2 を得た。マススペクトロメトリー、各種 NMR で解析した結果、この活性物質は、分子量 316.2038 (C₂₀H₂₈O₃) のセコアビエタン型ジテルペン、7,8-*seco*-*para*-ferruginone (SPF) と同定された。

この物質の単離については現在までに、二例が報告されている。一例は、植物病原菌の一種であるリンゴ斑点落葉病菌に対する抗菌活性を指標としてスギ樹皮の *n*-ヘキサン抽出画分から（藤野, 2001）、また、もう一例はシソ科 *Salvia prionitis* の根の酢酸エチル抽出画分からの単離で、グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* と *Micrococcus luteus* に対する抗菌活性が報告されている（Chen, *et al* 2002）。

本実験により SPF に、ガン細胞に対する増殖抑制活性機能が存在することが初めて示された。構造解析に用いた F3-15-2 は、IC₅₀ 値が約 3 μg/ml であったが、合成した SPF の IC₅₀ 値は、約 1.9 μM であった（Fig. 32）。活性が上がったのは、合成品の方が F3-15-2 より純度が上がったためと推測される。また、この物質はマウスの結腸ガン細胞に対しても増殖抑制活性を示し、その IC₅₀ 値は、約 2.2 μM であった（データ省略）。正常細胞への生物検定としてマウス脾臓リンパ球への作用を試験した結果、顕著な抑制活性を示さなかった（Fig. 33）。今後は、ヒトの各種ガン細胞の系や、各種正常細胞の系に対して検定を行い、細胞傷害性の選択性の有無を検討する必要がある。

SPF の細胞増殖抑制活性の作用機構が、アポトーシス/ネクローシスであるかどうかを調べるため、指標とされる核クロマチンの変化を観察したところ、*n*-ヘキサン粗抽出物区、合成品添加区ともにクロマチンの凝集が確認され

た(Fig. 34). 特に合成品区 (終濃度 $31.6 \mu\text{M}$) の 24 時間後では, 多くのクロマチン凝集が観察された. 一方, 本実験では, アポトーシス/ネクローシスの誘導で認められる DNA 断片化像は観察されていない (未発表) .

SPF は, 骨格にキノン構造と, 官能基修飾しやすいアルデヒドを有する化合物である{Fig. 31, (A)}. キノンには細胞傷害性が存在し, その機構として酸化還元サイクルにより生じた活性酸素種と酸化ストレスが, DNA 障害やアポトーシスを引き起こす (Kappus and Sies, 1981; Sun and Ross, 1996) . この性質を利用したキノン系抗ガン剤として, Mitomycin C や Adriamycin などがある (河相, 2005) . また, スギ樹皮の *n*-ヘキサン抽出画分から単離された *cryptoquinone* にも, マウスのリンパ腫細胞 (p388) に対する細胞傷害性が確認されている (Kofujita *et al.*, 2002) . キノン構造を有する SPF は, これらと同様の作用機構が存在する可能性が推察される. また, アルデヒド基が存在することにより, 構造改変の可能性も大きく, 今後の展開が期待できる.

本実験で, ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性は, 2 回目の抽出による粗抽出物の方が高く (Fig. 18), 精製にはこの 2 回目の *n*-ヘキサン粗抽出物を使用した. キイロスズメバチは一般に, マツ, スギ, ヒノキなどの樹皮や朽木部分を巣材として利用することが多いが, 巣材の選択は利用可能な樹種のうち, 比較的巣に近い場所に存在するものを使用する. したがって巣はコロニーごとに樹種や, 樹皮と朽木の割合が異なり, 抽出される成分も異なる. 通常, 樹皮には材部より多くの抽出成分が含まれていることが知られており, その構成成分は炭化水素, 脂肪酸, ワックス, テルペノイド, ステロイド, タンニン, フラボノイド, スチルベン, リグナン, キノン, クマリン, フェノール, アミノ酸など多岐に渡っている (今村ら, 1983) . 抽出成分は殺虫, 抗菌, 抗ガンなどの性質を有することから, 農薬や医薬, 香料, 防腐剤などとして利用されてきた. 例えば, 太平洋イチイ (*Taxus beryifolia*) の樹皮から単離されたタキソールは, 特に乳ガンと子宮ガンに効果があり, 微小管のタンパ

ク質重合を促進して過剰形成させる。さらに、染色体移動や細胞分裂を不可能にし、細胞をアポトーシスへと誘導すると考えられている(貴島, 1994)。2回目の抽出には、樹皮が多く使用されていると思われる色の濃い巣を選んで採取し実験に使用したので、増殖抑制活性が高くなったことが推察される。

巣を構築する材料のもう一方として、唾液腺から分泌される唾液がある。働蜂は、齧り取った巣材を噛み砕きながら唾液と混ぜ、直径5mmほどのパルプ状にして巣に持ち帰り、大顎で引き伸ばして外被を造っていく。唾液が膠のような役目を果たし、噛み砕かれた巣材を繋いでいるのが、実体顕微鏡と電子顕微鏡の観察で認められる(Fig. 15)。スズメバチとその近縁種での唾液の研究には、次のような報告がある。アシナガバチ亜科の *Polistes chinensis* では、唾液の乾燥重量中の70%がタンパク質で(Kudo *et al.*, 1998)、また、同じくアシナガバチ亜科の *Polistes metricus* や、スズメバチ亜科の *Dolichovespula maculata* の唾液中のアミノ酸分析では、アラニン、グリシン、セリンが主要アミノ酸である(Singer *et al.*, 1992; McGovern *et al.*, 1988)。さらに、スズメバチ亜科の *Vespula germanica* の巣に、唾液由来のノルアドレナリンが存在するという報告がある(Lecomte *et al.*, 1976)。今回の精製には、低極性の *n*-ヘキサンで抽出した画分を用いた。*n*-ヘキサン可溶部には、パラフィン類、高級脂肪酸とそのエステル類、テルペノイドなどが溶出してくることが予想される。セイヨウミツバチが産出するプロポリス中に動物由来の脂肪酸であるエイコサン酸、テトラコサン酸、ドコサン酸が含まれているという報告があるが(Palma and Malaspina, 1998)、キイロスズメバチにおいては未確認である。したがって本実験の *n*-ヘキサン画分には、現在までに解明されているような唾液中の成分は溶出しないと考えられる。

SPFは、アビエタン型ジテルペンの *ferruginol* が、活性酸素種の一つである一重項酸素によって、植物内で酸化されることにより生成する可能性が示唆されている(Chen *et al.*, 2002)。*ferruginol* は、スギ科、ヒノキ科、シソ科

などの植物に存在しており、本実験において SPF を合成する際の出発物質として使用した。ferruginol の生理活性に関しては、白色腐朽菌であるシイタケに対する阻害活性（河内ら, 1991）、抗酸化活性（鈴木, 2004）、そして黄色ブドウ球菌、枯草菌（Fukui *et al.*, 1978）、植物病原菌（小藤田ら, 2001）に対する抗菌活性が報告されている。

ferruginol は、乾燥スギ樹皮中においては、重量の 0.4~1% と比較的多量に含まれている（小藤田ら, 2001）。それに対し、SPF は、リンゴ斑点落葉病菌を指標とした単離の結果、スギ樹皮中の *n*-ヘキサン抽出物に対し、微量（約 0.01%）しか存在していない（藤野, 2001）。一方、本実験で、キイロスズメバチの巣からラット肝ガン細胞増殖抑制活性を指標として得られた SPF は、*n*-ヘキサン抽出物に対して約 0.5% の量が存在していた（Table 6）。検定の指標が異なること、巣の由来樹種が不明であることから、単純な比較はできず推測に過ぎないが、巣中に SPF が多く存在するのは、唾液による生化学的変換など、キイロスズメバチの関与による可能性も考えられ、興味深い。キイロスズメバチの造巣終期には幼虫、蛹、成虫で過密状態になり、伝染性の病原菌などが発生すれば、全滅する可能性がある。しかし、このような報告は現在までになく、巣に抗菌物質の存在する可能性が示唆されている（小野, 1997）。本実験で同定した SPF は、すでに *Staphylococcus aureus* と *Micrococcus luteus* に対する抗菌活性が確認されており、キイロスズメバチのコロニーの生存を高める抗菌物質の一つであることが示唆される。

現在までにスズメバチ類成虫の唾液中の酵素に関する報告はないが、ミツバチの成虫（働蜂）は、細菌の成長を抑制するためにハチミツの中にグルコースオキシダーゼを分泌することが知られている（White *et al.*, 1963）。また、草食性である *Helicoverpa zea* の幼虫の唾液に存在するグルコースオキシダーゼが、D-グルコースと酸素を、D-グルコン酸と過酸化水素に転化して、*Serratia marcescens* や *Pseudomonas aeruginosa* などの病原菌から身を守

ることが報告されている (Musser *et al.*, 2005) .

一般に動物の唾液中には、ペルオキシダーゼなどの酸化反応を触媒する酵素や、リゾチム、ラクトフェリンなどの抗菌タンパク質が存在している。キイロスズメバチ成虫の唾液中に、ペルオキシダーゼのような酸化酵素の存在が確認されれば、スギやヒノキの樹皮に含まれる ferruginol を自ら酸化し、キノン構造による細胞傷害性を発現させることによって、さらに強力な抗菌性を作り出している可能性も考えられる。データには示していないが、ferruginol のラット肝ガン細胞、マウス結腸ガン細胞に対する増殖抑制活性を調べたところ、IC₅₀ 値はそれぞれ約 10.5 μ M と約 15.3 μ M であり、SPF の方 (それぞれ約 1.9 μ M, 約 2.2 μ M) が、抑制活性が高かった。キイロスズメバチの介在を証明するためには、前述のような酸化酵素の存在を確認することや、実際に唾液と ferruginol を反応させる実験などが必要であろう。

本研究では、キイロスズメバチに限った実験であったが、それでも巣によって増殖抑制活性の強さが異なっていた (Fig. 18)。漢方薬の露蜂房として使用される種は、アシナガバチ亜科からスズメバチ亜科と幅広い。土の中のような閉鎖空間に巣を造るオオスズメバチ (*Vespa mandarinia*) やクロスズメバチ (*Vespula flaviceps*) の巣は、土壌細菌などからコロニーを守るため、さらに多くの抗菌物質が存在する可能性もある。スズメバチ亜科、アシナガバチ亜科の各種が、樹木をはじめとする植物をどのように利用し、自らの生存を高めているのかという観点からの研究をすることによって、より多くの恩恵を与えてくれる物質が得られると考える。

本実験で、初めて細胞増殖抑制機能をもつことが示された SPF は、スギ樹皮中に存在する ferruginol から、50%近い収率で合成が可能であり、バイオマス利用など農業分野への貢献が期待できる。さらに、各種ガン細胞や各種菌に対して検定し、細胞傷害性の選択性などを解析することで、医療分野への貢献も期待できると考える。

適 要

キイロスズメバチの巣（外被）の *n*-ヘキサン抽出物から、ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性を指標として活性物質の単離、同定を行った。シリカゲルクロマトグラフィーと、順相クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel Silica 150, TSKgel Silica 60 を使用した HPLC システムによる精製を行い、針状に結晶化した活性画分 F3-15-2 を得た。各種 NMR による構造解析の結果、この活性物質は、分子量 316.2038 (C₂₀H₂₈O₃) のセコアビエタン型ジテルペン、7,8-*seco*-*para*-ferruginone (SPF) と同定した。

ラット肝ガン細胞に対して合成品の SPF の増殖抑制活性を検討した結果、IC₅₀ 値は、1.9 μM であり、この物質に抗ガン活性機能が存在することを初めて示した。また、キイロスズメバチの巣から初めて物質を単離、同定した。この物質にはキノン構造が存在し、抗ガン活性機能はキノンの細胞毒性によるものと示唆される。

また、SPF の細胞増殖抑制機構の一つとして、アポトーシスに特徴的であるクロマチン凝集が認められた。

キイロスズメバチの巣はコロニーごとに、由来する樹種や、樹皮と朽木などの組成が異なり、細胞増殖抑制活性の程度も異なることが示された。本実験で同定された SPF は、すでに抗菌活性が確認されており、この物質がキイロスズメバチのコロニーにおいて、生体防御システムを担っている重要な要因の一つであると考えられる。

総 合 考 察

日本における養蜂では、セイヨウミツバチ、ニホンミツバチを飼育管理する。しかし、同時にミツバチの天敵であるスズメバチ属とのかかわり为了避免することはできない。最近では、都市化や住宅地の拡大に起因する一般市民とスズメバチの接触も増加し、養蜂家はその防除の一端を担っている。スズメバチのコロニーは、さまざまなタンパク質（成虫、幼虫、蛹、繭）と、樹木と分泌物で造られた巣から成り立っているが、古くから研究が進められているミツバチの生産物と比較すると、まだ利用価値が多く残された未利用資源といえる。

本研究では、わが国で最も多く駆除されるキロスズメバチの有効利用を目的に、成虫体（働蜂）の抽出物から記憶・学習向上機能と抗認知機能の探索を、巣抽出物から機能性成分の単離とその構造解析を試みた。

第一章では、成虫体の遊離アミノ酸分析を行ったうえで、酸メタノール抽出法と2%NaCl抽出法により、成虫体抽出物を調製してマウスに経口投与し、ステップスルー型受動的回避実験とモリス水迷路実験を行って、記憶・学習向上効果と、抗認知効果がみられるかどうかを解析した。その結果、2%NaCl抽出法によるキロスズメバチ成虫の抽出物をマウスに摂取させることにより、特に長期的な記憶能を向上させ、またグルタミン酸受容体阻害剤（MK-801）による一時的な痴呆を抑える一定の効果があることが示され、2%NaCl抽出物中に、脳機能を向上させるような生理活性ペプチドの存在が示唆された。セイヨウミツバチの毒成分の中に、アミノ酸22残基のMCDペプチド（mast cell destroying）があり、これがラット海馬のLTPの発現に関与しているという報告がある（Cherubini *et al.*, 1987）。キロスズメバチの毒成分中には、MCDペプチドと同様にヒスタミン遊離活性をもつアミノ酸14残基からなるマストパランが存在している（Nakajima, 1985）。マストパ

ランは、細胞膜を透過して直接 G タンパク質に結合し、活性化させる作用があり（向井・若松, 2001）, 細胞内情報伝達系を解析するうえでの一つのモデルとなっている。また最近, 薬物送達システム（ドラッグデリバリーシステム）の研究において, 受容体に依存しないメカニズムによって細胞に浸透する性質を持つ transportan が開発されたが, その 27 残基のアミノ酸配列の後半 14 残基は, マストパランの配列である（Pooga *et al.*, 1998）。本実験においては, 2%NaCl 抽出物中の分析を行っていないので, マストパランとの関連性の有無は現時点では全く不明であるが, キイロスズメバチの有効活用を考えると, 今後の展開が興味深い知見である。

第二章では, キイロスズメバチの巣（外被）からの機能性物質の探索を行った。その結果, *n*-ヘキサン抽出物からラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性を指標として活性物質を単離し, 分子量 316.2038 (C₂₀H₂₈O₃) のセコアピエタン型ジテルペン, 7,8-*seco*-*para*-ferruginone (SPF) と同定した。本研究により, キイロスズメバチの巣から初めて物質を単離, 同定し, この物質に抗ガン活性が存在することを初めて示した。

昆虫関連物質から見い出された抗ガン物質として, モンシロチョウ (*Pieris rapae crucivora*), およびオオモンシロチョウ (*Pieris brassicae*) の蛹から, 人間の胃ガン細胞の傷害性因子としてピエリシン-1 (Koyama *et al.*, 1996; Kono *et al.*, 1999), ピエリシン-2 (Matsushima-Hibiya *et al.*, 2003) が明らかになり, それらの傷害因子はアポトーシスを誘導することが示唆されている (Watanabe *et al.*, 1998)。センチクバエ (*Sarcophaga peregrina*) からは, 誘導性の抗菌物質、5-S-GAD が単離され (Leem *et al.*, 1996), 人間のガン細胞に対して選択的な細胞傷害作用を示す (Akiyama *et al.*, 2000)。

また, セイヨウミツバチのプロポリスから, アルテピリン C (Aga *et al.*, 1994) や, カフェ酸フェネチルエステル (Matsuno, 1994) が単離されてい

る。アルテピリン C は、通称グリーンプロポリスと呼ばれるブラジル南西部産プロポリスの特徴となっている物質であるが、その起源植物はキク科のアレクリン (*Baccharis dracunculifolia*) であり (Bankova *et al.*, 1999; Kumazawa *et al.*, 2003; 熊澤ら, 2004), カフェ酸フェネチルエステルは、ポプラ類の芽の滲出物を起源とするプロポリスに含まれる成分であることが報告されている (Popova *et al.*, 2003)。さらに、ハリナシバチ (*Melipona beecheii*) プロポリスの酢酸エチル抽出画分には、ラット肝ガン細胞に対する増殖抑制活性が存在し、その IC₅₀ 値は 10ng/ml である (高木, 2005)。

プロポリスは、働蜂が植物の芽の滲出物や、樹脂などから集めてくる膠状の物質である。セイヨウミツバチは、プロポリスを入り口や内壁に塗ったり、巣の補修に使用したりする。また、巣への侵入者に対して毒針で刺し殺した後、プロポリスで封入し腐敗による雑菌の繁殖を抑える。プロポリスには抗ガン活性の他にもさまざまな薬理効果が存在し、古くから民間治療薬として用いられてきた。その活性には抗菌活性、抗カビ活性、抗ウイルス活性

(Kuiumgiev *et al.*, 1999; Harish *et al.*, 1997), 抗炎症作用 (Dobrowolski *et al.*, 1991), 細胞傷害性 (Scambia *et al.*, 1994), 抗酸化活性 (Chopra *et al.*, 1995) などがある。しかし、由来する植物種や産地の違いでその成分組成、生理活性は異なり (Bankova *et al.*, 2000), さらに抽出法によっても異なってくる。これらのことは、漢方薬をはじめ天然物を扱う場合に常に問題となる点である。前述のアルテピリン C が含まれているプロポリスの起源植物が *Baccharis dracunculifolia* と同定されるまでには、市場において、未解明ゆえのさまざまな混乱があった。熊澤ら (2004) は、実際にミツバチが齧り取っていたこの植物の新芽と、その周辺に設置されていた巣箱より採集したプロポリスをエタノールで抽出し、HPLC システムで分析した。その結果、非常によく似た溶出パターンが得られ、*Baccharis dracunculifolia* が起源植物であることをミツバチの行動観察とともに、化学的にも証明したのである

(Kuma zawa *et al.*, 2004; 熊澤ら, 2004) . また, 光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡による観察を行い, プロポリス中に見られた植物断片と *Baccharis dracunculifolia* の芽の腺毛, 上皮の断片は明らかに同じであることが確認された (Bastos *et al.*, 2000) . このように, 常に同じ成分が含有され, 品質が保証されるためには, 行動観察, 顕微鏡観察, 植物とプロポリス両方の化学分析が不可欠であると考えられる.

プロポリスと異なり, スズメバチ亜科, アシナガバチ亜科の巣の化学分析や, 生理活性については今までにほとんど調査されていない. 藤原養蜂場において, すでにスズメバチ類の巣を粉末化した健康食品が開発されているが, プロポリスと同様の問題点が存在すると考えられる. そこで, キイロスズメバチの巣の起源植物を同定するため, 予備実験的に行動観察を試みた. 観察するにあたってスズメバチの場合はミツバチと異なり, 巣の場所を探さなくてはならないが, 偶然, 開けた場所に巣を見つけることができた {Fig. 35, (A)} . 巣から直線距離約 20m の位置に 1 本のアカマツの木があり {Fig. 35, (B)} , その枝の朽ちた部分を数匹の働蜂が常時齧り取っていたので {Fig. 35, (C)} , 数日間観察を続け, 巣材はアカマツであることを確定した. アカマツからは, モノテルペンの精油成分 (テレピン油) と, その残留物であるジテルペンのロジンが生産され, 溶剤や塗料として使われている. また, 材由来のテルペン類に殺ダニ活性の報告がある (Macchioni *et al.*, 2002) . アカマツを巣材とする巣は, 全体的に白色であることが確認された {Fig. 35, (D)} . 今後は, 齧りとられていたアカマツの朽ちた枝部分と巣の両方をそれぞれエタノールなどで抽出し, HPLC による化学分析を試みたい.

本実験でキイロスズメバチの巣から同定された SPF には, ラット肝ガン細胞やマウス結腸ガン細胞に対する増殖抑制活性のほか, グラム陽性菌である *Staphylococcus aureus* と *Micrococcus luteus* に対する抗菌活性が存在する (Chen *et al.*, 2002) . また, *Vespula flaviceps* (クロスズメバチ) の露蜂房

と、セイヨウミツバチのプロポリスの抗菌作用を)と比較調査した報告があり、プロポリスに比べるとやや弱い。興味関心も抗菌作用が弱くなる

(Matsushige *et al.*, 1995; 松嶋ら, 1996) と松嶋らは、文献で長年月の比較・本来的調査もあわせて行ったが、西洋で古くから使用されてきたプロポリスが中国では使用されずにきた点に疑問を持った。しかし、中国産のセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) が、プロポリスを生産しない性質であること

(A)



(B)



(C)



(D)



Fig. 35. An open nest of *Vespa simillima* and the environment. (A), the observed nest. (B), *Pinus densiflora* was used with the material of the nest and distant about 20m from the nest. (C), a worker collecting nest material from *Pinus densiflora*. (D), Some workers were making envelope with *Pinus densiflora*.

と、セイヨウミツバチのプロポリスの抗酸化作用を比較調査した報告があり、プロポリスに比べるとやや弱いですが、露蜂房にも抗酸化作用が存在する

(Matsushige *et al.*, 1995; 松繁ら, 1996) . 松繁らは、文献で露蜂房の比較本草学的調査もあわせて行ったが、西洋で古くから使用されてきたプロポリスが、中国では使用されずにきた点に疑問を持った。しかし、中国在来種のトウヨウミツバチ (*Apis cerana*) が、プロポリスを生産しない性質であることを知り、中国では露蜂房 (スズメバチ亜科, アシナガバチ亜科の巣) に、プロポリスと同様の効果を見出し、今日まで使用してきたのではないかと考察している (松繁ら, 1996) . 前述のように、キイロスズメバチの造巢中期から終期にかけては幼虫, 蛹, 成虫で過密状態になり、伝染性の病原菌などが発生すれば、全滅する可能性がある。しかし、このような報告は現在までになく、巣に抗菌物質の存在する可能性が考えられる。本実験で同定された SPF は、キイロスズメバチのコロニーの生存を高める生体防御物質の一つであることが示唆された。スズメバチの生態や行動もあわせて考えると、巣はスズメバチにとって、セイヨウミツバチのプロポリスと同じ意味をもつものであるといえるであろう。

キイロスズメバチは、スズメバチ亜科の中で、最も食性が広く、閉鎖空間にも開放空間にも巣を造る適応力があるため、人間とのかかわりが多く、そのことが多くの死傷事故を起こす原因となっている。

現在、気候は温暖化傾向にあるが、暖冬は、新女王蜂の越冬期の生存確率を高め、その後の造巢率も高める可能性が予想される。一方、わが国においてアレルギー体質の人が増えてきている (厚生労働省アレルギー対策検討会, 2005)。以上のような事情から、スズメバチ類と人間の接触、事故がさらに増える可能性が懸念される。そのような事態を極力避けるため、スズメバチ類の生態を学校教育現場などでとりあげ、問題点や危険回避の方法を指導するとともに、生態系において重要な役割を果たしている存在であることも伝え

ていく必要がある。スズメバチ類については、その性質や取り扱いが危険であるために、研究者の数も少なく、まだ未解明の部分が多く残されていると思われる。

今後も、人間とのかかわりが特に重大なキイロスズメバチの防除、行動・生態の調査とその啓蒙、人のQOL (Quality of Life) 向上のための有効利用と商品開発を進めていくことが重要である。そして、環境科学・生理学・分子生物学・生物有機化学などの科学的な解析を、キイロスズメバチの研究において総合的に展開することが新しい使命であり、意義のあることであると考えられる。

引用文献

Abe, T., Kawai, N. and Niwa, A. (1982)

Purification and properties of a presynaptically acting neurotoxin, Mandaratoxin, from Hornet (*Vespa mandarinia*). *Biochemistry*, 21, 1693-1697.

Abe, T., Tanaka, Y., Miyazaki, H. and Kawasaki, Y. (1991)

Comparative study of the composition of hornet larval saliva, its effect on behaviour and role of trophallaxis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99 c, 79-84.

Abe, T., Takiguchi, Y., Tamura, M., Shimura, J. and Yamazaki, K. (1995)

Effects of Vespa Amino Acid Mixture (VAAM) isolated from hornet larval saliva and modified VAAM nutrients on endurance exercise in swimming mice; improvement in performance and changes of blood lactate and glucose. *Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med.*, 44, 225-238.

阿部 岳 (1995)

スズメバチ栄養液の運動への作用. ミツバチ科学, 16 : 1-8.

Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Nakajima, S. (1994)

Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 (5), 945-946.

Akiyama, N., Hijikata, M., Kobayashi, A., Yamori, T., Turuo, T. and Natori, S. (2000)

Anti-tumor effect of *N*β-5-*S*-glutathionyl-dihydroxyphenyl-alanine (5-*S*-GAD), a novel anti-bacterial substance from an insect. *Anticancer Res.*, 20, 357-362.

朝日新聞 (1994)

藤原養蜂場のスズメバチの蜂蜜漬け. 9月16日付.

Bankova, V., Boudourova-Krasteva, G., Sforcin, J.M., Frete, X., Kujumgiev, A., Maimori-Rodella, R. and Popov, S. (1999)

Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Z. Naturforsch.*, 54 c, 401-405.

Bankova, V.S., Castro, S.L. and Marcucci, M.C. (2000)

Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.

Bastos, E.M.A.F., Oliveira, V.D.C. and Soares, A.E.E. (2000)

ブラジル・ミナスジェライス産グリーンプロポリスの顕微鏡分析. ミツバチ科学, 21 (4), 179-180.

Benton, D., Owens, D.S. and Parker, P.Y. (1994)

Blood glucose influences memory and attention in young adults. *Neuropsychologia*, 32, 595-607.

Bicker, G (1991)

Taurine-like immunoreactivity in photoreceptor cells and mushroom bodies : a comparison of the chemical architecture of insect nervous systems. *Brain Res.*,560 (1-2) ,201-206.

Bliss, T.V. and Lømo T. (1973)

Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, 232, 331-356.

Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C. and Jaffard, R. (1999)

Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*, 400, 671-675.

Chen, X., Ding, J., Ye, Y.M. and Zhang, J.S. (2002)

Bioactive abietane and *sec*-abietane diterpenoids from *Salvia prionitis*. *J. Nat. Prod.*, 65, 1016-1020.

Cherubini, E., Ari, Y.B., Gho, M., Bidard, J.N. and Lazdunski, M. (1987)

Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus induced by a bee venom peptide. *Nature*, 328, 70-73.

Coan, E.J., Saywood, W. and Collingridge, G.L. (1987)

MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* , 80, 111-114.

- Chopra, S., Pillai, K.K., Husain, S.Z. and Giri, D.K. (1995)
Propolis protects against Doxorubisin-induced myocardopathy in rats.
Exp. Mol. Pathol., 62, 190-198.
- Coyle, J.T., Price, D.L. and DeLong, M.R. (1983)
Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation.
Science, 219, 1184-1190.
- Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S. and Singh, H.K. (2002)
A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba* ; anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacol. biochem. behav.*, 73, 893-900.
- Dobrowolski, J.W., Vohara, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H. and Dandiya, P.C. (1991)
Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol.*, 35, 77-82.
- Egleton, R.D. and Davis, T.P. (2005)
Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier.
NeuroRx. 2, 44-53.
- Espinola, E.B., Dias, R.F., Mattei, R. and Carlini, E.A. (1997)
Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *J Ethnopharmacol.*, 55, 223-229.

藤原大美・淀井淳司 (1996)

免疫研究法ハンドブック (改定 2 版) . pp.3-20, 中外医学社, 東京.

藤野陽治 (2001)

スギ樹皮の抗菌性およびその関連化合物. p. 221, 岩手大学大学院農学研究科応用生物学専攻木材化学研究室修士論文.

Fukui, H., Koshimizu, K. and Egawa, H. (1978)

A new diterpene with antimicrobial activity from *Chamaecyparis pisifera* Endle. *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1419-1423.

Harish, Z., Rubinsten, A., Golodner, M., Elimaliah, M. and Mizrachi, Y.

(1997)

Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exptl. Clin. Res.* XXIII, 2, 89-96.

Hiramatsu, M., Murasawa, H., Nabeshima, T. and Kameyama, T. (1998)

Effects of U-50, 488H on scopolamine-, mecamylamine- and dizocilpine-induced learning and memory impairment in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284** (3), 858-867.

Hiramatsu, M., Komatsu, M., Yuzurihara, T., Saitoh, K., Ishige, A. and

Komatsu, Y. (1999)

Enhanced cholinergic function in aged rats treated with TJ-23. *J. Anti-aging Med.*, **2** (1), 51-57.

今村博之, 安江保民, 岡本一, 横田徳朗, 後藤輝男, 善本知孝 (1983)

木材利用の化学. p.422, 共立出版, 東京.

Ishii, K., Sasaki, M., Kitagaki, H., Yamaji, S., Sakamoto, S., Matsuda, K.
and Mori, E. (1997)

Reduction of cerebellar glucose metabolism in advanced Alzheimer's
disease. *J. Nucl. Med.*, 38, 925-928.

岩本もりえ, 柏木朋也, 南和弘, 檜村修生, 岡田早苗 (2008)

スズメバチ成虫成分含有ハチミツ飲料による運動時の呼吸循環機能や遅発
性筋痛への改善効果. 日本食品保蔵科学会誌 (掲載予定).

Jin, S.H., Park, J.K., Nam, K.Y., Park, S.N. and Jung, N.P. (1999)

Korean red ginseng saponins with low ratios of protopanaxadiol and
protopanaxatriol saponin improve scopolamine-induced learning
disability and spatial working memory in mice. *J Ethnopharmacol.*, 66,
123-129.

Jin, X., Yuan, L., Yu, L.Z., Ji, Y. L., Ling, Y. and Xue, D. Z. (2006)

Effects of *Nidus Vespae* extract and chemical fractions on the growth and
acidogenicity of oral microorganisms. *Archi. Oral Biol.*, 51, 804-813.

Jing, X. and Xin, X. (2005)

Experimental study of the anti-leukemia effect of protein from *Nidus*
Vespae in vitro. *Prac. Clin. Med.*, 6 (12), 6-9.

Kameda, T., Kojima, K., Miyazawa, M. and Fujiwara, S. (2005)

Film formation and structural characterization of silk of the hornet
Vespa simillima xanthoptera Cameron. *Z. Naturforsch.*, 60 c, 906-914.

Kappus, H. and Sies, H. (1981)

Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and
lipid peroxidation. *Experientia*, 37, 1233-1241.

河相開流 (2005)

5-Fluorouracil の抗腫瘍効果における活性酸素の役割. 埼玉医科大学雑誌,
32 (2), 35-42.

河内進策, 目黒貞利、稲田聡子 (1991)

スギ木粉によるシイタケの栽培—フェルギノールによるシイタケ菌糸成長
阻害. 木材学会誌, 37, 971-975.

貴島静正 (1994)

ポピュラーサイエンス がんの新しい治療薬(I), pp.1-204, 裳華堂, 東京.

Kleschevnikov, A.M. and Marchbanks, R.M. (1993)

Behavioral parameters of the spatial memory correlate with the
potentiation of the population spike, but not with the population
excitatory postsynaptic potential, of the CA1 region in rat hippocampal
slices. *Neurosci. Lett.*, 152, 125-128.

小藤田久義、藤野陽治、佐々木達也、長谷部真、太田路一、鈴木幸一 (2001)
スギ樹皮の抗菌活性とその関連成分. 木材学会誌, 47 (6), 479-486.

Kofujita, H., Ota, M., Takahashi, K., Kawai, Y. and Hayashi, Y. (2002)
A diterpene quinone from the bark of *Cryptomeria japonica*. *Phytochem.*,
61, 895-898.

Kono, T., Watanabe, M., Koyama, K., Kishimoto, T., Fukushima, S.,
Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (1999)
Cytotoxic activity of pierisin, from the cabbage butterfly, *Pieris rapae*, in
various human cancer cell lines. *Cancer Lett.*, 137, 75-81.

厚生労働省アレルギー対策検討会 (2005)
アレルギー対策検討会報告書(案). p.12

洪哲英 (1960)
露蜂房成分の血管, 心運動に及ぼす作用. 大阪医科大学雑誌, 20, 739-741.

Koyama, K., Wakabayashi, K., Masutani, M., Koiwai, K., Watanabe, M., Yamazaki,
S., Kono, T., Miki, K. and Sugimura, T. (1996)
Presence in *Pieris rapae* of cytotoxic activity against human carcinoma
cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, 87, 1259-1262.

Kudo, K., Yamane, S. and Yamamoto, H. (1998)

Physiological ecology of nest construction and protein flow in pre-emaergence colonies of *Polistes chinensis* (Hymenoptera Vespidae): effects of rainfall and microclimates. *Ethology Ecology & Evolution*, 10, 171-183.

Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu., Bankova, V., Christv, R. and Popov, S. (1999)

Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.*, 64, 235-240.

Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T. and Nakayama, T. (2003)

Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.*, 51 (6), 740-742.

熊澤茂則, 米田昌浩, 中山勉 (2004)

ブラジル産プロポリスに含まれる成分と起源植物. *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, 209 (2), 132-140.

Lecomte, J., Bourdon, V., Damas, J., Leclercq, M. and Leclercq, J. (1976)

Présence de noradrénaline conjuguée dans les parois du nid de *Vespa germanica* Linné. *Société Belge de Biologie*, 31, 212-215. (in French)

Lee, M.Y. and Kim, S.S. (2005)

Physiological role of fibroin. Proceedings of 5th Asia-Pacific congress of Entomology. pp.63, Jeju, Korea.

Leem, J.Y., Nishimura, C., Kurata, S., Shimada, I., Kobayashi, A. and Natori, S. (1996)

Purification and Characterization of *N*- β -Alanyl-5-*S*-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). *J Biol. Chem.*, 271 (23), 13573-13577.

Macchioni, F., Cioni, P.L., Flamini, G., Morelli, I., Perrucci, S., Franceschi, A., Macchioni, G. and Ceccarini, L. (2002)

Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4586-4588.

町田誠之 (1981)

紙の科学—トイレットペーパーから情報処理まで. p.214, 講談社, 東京.

Matsuno, T. (1994)

A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Z. Naturforsch.*, 50 c, 93-97.

Matsushige, K., Kusumoto, I.T., Yamamoto, Y., Kadota, S. and Namba, T.
(1995)

Quality evaluation of propolis. 1. a comparative study on radical scavenging effects of propolis and *Vespaes Nidus*(露蜂房). *J. Trad. Med.*, 12, 45-53.

松繁克道, 門田重利, 難波恒雄 (1996)

アピセラピーとしてのプロポリスと漢薬露蜂房の比較本草学的考察. 薬史学雑誌, 31 (2), 183-199.

Matsushima-Hibiya, Y., Watanabe, M., Hidari, K.I.J., Miyamoto, D., Suzuki, Y., Kasama, T., Kanazawa, T., Koyama, K., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2003)

Identification of glycosphingolipid receptors for pierisin-1, a guanine-specific ADP-ribosylating toxin from the cabbage butterfly. , *J. Biol. Chem.*, 278 (11), 9972-9978.

松浦誠 (2002)

スズメバチを食べるー昆虫食文化を訪ねて. p. 322, 北海道大学図書刊行会, 札幌.

松浦誠 (2005)

都市における社会性ハチ類の生態と防除. ミツバチ科学, 別刷資料, 11, p. 92.

松浦誠・山根正気 (1984)

スズメバチ類の比較行動学. p. 428, 北海道大学図書刊行会, 札幌.

McGaugh, J.L. and Landfield, P.W. (1970)

Delayed development of amnesia following electroconvulsive shock.
Physiology and Behavior., 5, 1109-1113.

McGovern, J.N., Jeanne, R.L. and Effland, M.J. (1988)

The nature of wasp nest paper. *Tech. Assoc. Pulp. Pap. Ind. J.*, 71,
133-139.

三橋 淳 (1997)

虫の栄養. In: 虫を食べる人びと. pp. 271-282, 平凡社, 東京.

Morris, R.G.M. (1981)

Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. & Motiv.*, 12, 239-260.

向井秀仁, 若松馨 (2001)

G 蛋白質アクチベーターとしてのスズメバチ毒, マストパラン. 蛋白質 核酸 酵素, 46 (4), 423-428.

Musser, R.O., Kwon, H.S., Williams, S.A., White, C.J., Romano, M.A., Holt, S.M.,

Bradbury, S., Brown, J.K. and Felton, G.W. (2005)

Evidence that caterpillar labial saliva suppresses infectivity of potential bacterial pathogens. *Arch. insect biochem. physiol.*, 58, 138-144.

Nakajima, T., Yasuhara, T., Uzu, S., Wakamatsu, K., Miyazawa, T.,
Fukuda, K. and Tsukamoto, Y. (1985)

Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and
their physico-chemical properties. *Peptides*, 6, Suppl., 3, 425-430.

Nakajima, T. (1986)

Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In *Venoms of the
Hymenoptera* (Piek, T. eds.) pp. 309-327. Academic Press, London.

Namba, T., Ma, Y.H. and Inagaki, K. (1988)

Insect-derived crude drugs in the Chinese Song dynasty. *J
Ethnopharmacol.*, 24, 247-285.

Naya, S., Sagisaka, A., and Suzuki, K. (1994)

Identification of a maturation factor inducing post-diapause development
in pharate first-instar larvae of the Wild Silkmoth, *Antheraea yamamai*.
Int. J. Wild Silkmoth & Silk 1, 195-200.

野中健一 (2005)

民族昆虫学—昆虫食の自然誌. p. 202, 東京大学出版会, 東京.

小原隆造 (1928)

蜂房ノ有毒成分, 蜂房油の研究. 日薬物誌, 7, 254-257.

Oka, M., Maeda, S., Koga, N., Kato, K. and Saito, T. (1992)

A modified colorimetric MTT assay adapted for primary cultured hepatocytes: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (9), 1472-1473.

Ono, M., Igarashi, T., Ohno, E. and Sasaki, M. (1995)

Unusual thermal defence by a honeybee against mass attack by hornets. *Nature*, 377, 334-336.

小野正人 (1997)

スズメバチの科学. p. 174, 海游社, 東京.

大内順子, 藤原由美子, 小林晴男, 鈴木幸一 (2001)

カイコシルクパウダーによるマウスの抗痴呆効果作用の解析. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告, 26, 30.

大山ハルミ (1995)

新アポトーシス実験法. pp. 53-56, 羊土社, 東京.

Palma, M.S. and Malaspina, O. (1998)

プロポリスの組成と生理活性に関与する物質の構造と活性. ミツバチ科学, 19 (2), 61-67.

Pemberton, R.W. (1999)

Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 65, 207-216.

Pooga, M., Hallbrink, M., Zorko, M. and Langel, U. (1998)

Cell penetration by transportan. *The FASEB Journal*, **12**, 67-77.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Damyanova, B.,
Sabatini, A.G., Marcazzan, G.L. and Bogdanov, S. (2003)

「ポプラ型」プロポリスの生理活性物質の規格分析. *ミツバチ科学*, **24** (2),
61-66.

Scambia, G., Ranelletti, F.O., Panici, P.B., Vincenzo, R., Bonanno, G.,
Ferrandina, G., Piantelli, M., Bussa, S., Rumi, C., Cianfriglia, M. and
Mancuso, S. (1994)

Quercetin potentiates the effect of Adriamycin in a multidrug-resistant
MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target.
Cancer Chemother. Pharmacol., **34**, 459-467.

Singer, T.L., Espelie, K.E. and Himmelsbach, D.S. (1992)

Ultrastructural and chemical examination of paper and pedicel from
laboratory and field nests of the social wasp *Polistes metricus*. *J. Chem.*
Ecol., **18** (1), 77-86.

Stackman, R.W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, J.N. and Quinn, J.F.
(2003)

Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse
model of Alzheimer's disease by chronic *Ginkgo biloba* treatment. *Exp.*
Neurol., **184**, 510-520.

Sun, X. and Ross, D. (1996)

Quinone-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via DT-diaphorase mediated bioactivation. *Chem. Biol. Interact.*, 100, 267-276.

鈴木郁功, 渡邊賢二, 光本教秀, 朴相来, 尹水弘 (2002)

水抽出プロポリス投与ラットの水迷路学習能. *医学と生物*, 145 (3), 39-44.

Suzuki, K., Hosaka, M. and Miya, K. (1984)

The amino acid pool of *Bombyx mori* eggs during diapause. *Insect Biochem.*, 14, 557-561.

鈴木幸一 (2005)

昆虫テクノロジーの総論－研究開発動向－. In: 昆虫テクノロジー研究とその産業利用. pp.3-12, シーエムシー出版, 東京.

鈴木幸一, 山本圭一郎, 満月眞寿, 大内順子 (2006)

地域と QOL 向上のための昆虫バイオテクノロジー. 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー, 75 (2), 97-102.

鈴木直栄 (2004)

スギ樹皮フェルギノールの分離および利用に関する研究. p. 80, 岩手大学大学院農学研究科応用生物学専攻木材化学研究室修士論文.

高木史彦 (2005)

ハリナシミツバチプロポリスからの新規生理活性物質の探索. p. 66, 岩手大学大学院農学研究科応用生物学専攻応用昆虫学研究室修士論文.

Takahashi, M., Fukunaga, H., Kaneto, H., Fukudome, S. and Yoshikawa, M. (2000)

Behavioral and pharmacological studies on gluten exorphin A5, a newly isolated bioactive food protein fragment, in mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, **84**, 259-265.

Tanaka, H., Sato, K., Saito, Y., Yamashita, T., Agoh, M., Okunishi, J., Tachikawa, E., and Suzuki, K. (2003)

Insect diapause-specific peptide from the leaf beetle has consensus with a putative iridovirus peptide. *Peptides*, **24**, 1327-1333.

Tang, Y., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zuo, M., Liu, G. and Tsien, J. (1999)

Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, **401**, 63-69.

Ueda, Y., Komatsu, M. and Hiramatsu, M. (1996)

Free radical scavenging activity of the Japanese herbal medicine Toki-Shakuyaku-San (TJ-23) and its effect on superoxide dismutase activity, lipid peroxides, glutamate, and monoamine metabolites in aged rat brain. *Neurochem. Res.*, **21** (8), 909-914.

Yamaguchi, Y., Higashi, M. and Kobayashi, H. (1996)

Effects of ginsenosides on impaired performance caused by scopolamine in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 312, 149-151.

家森 幸男 (1998)

長寿と食事. In: 現代の医食同源, pp.43-89, 学会センター関西, 大阪.

Yokogoshi, H., Hayase, K. and Yoshida, A. (1992)

The quality and quantity of dietary protein affect brain protein synthesis in rats. *J. Nutr.*, 122, 2210-2217.

Yoshikawa, M. and Chiba, H. (1992)

Biologically active peptides derived from food and blood proteins. In *Frontiers and new horizons in amino acid research* (Takai, K. ed.) pp.403-409. Elsevier, Amsterdam.

吉村一雄 (1946)

露蜂房の薬理学的研究. 第十九回日本薬学会記事, 7-8.

Watanabe, M., Kono, T., Koyama, K., Sugimura, T. and Wakabayashi, K.

(1998)

Purification of pierisin, an inducer of apoptosis in human gastric carcinoma cells, from cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 556-561.

Watkins, J.C. and Jane, D.E. (2006)

The glutamate story. *Br. J. Pharmacol.*, 147, 100-108.

White, J.W., Subers, M.H. and Schepartz, A.I. (1963)

The identification of inhibine, antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide, and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochem. Biophys. Acta.*, 73, 57-70.

Wong, R.W., Setou, M., Teng, J., Takei, Y. and Hirokawa, N. (2002)

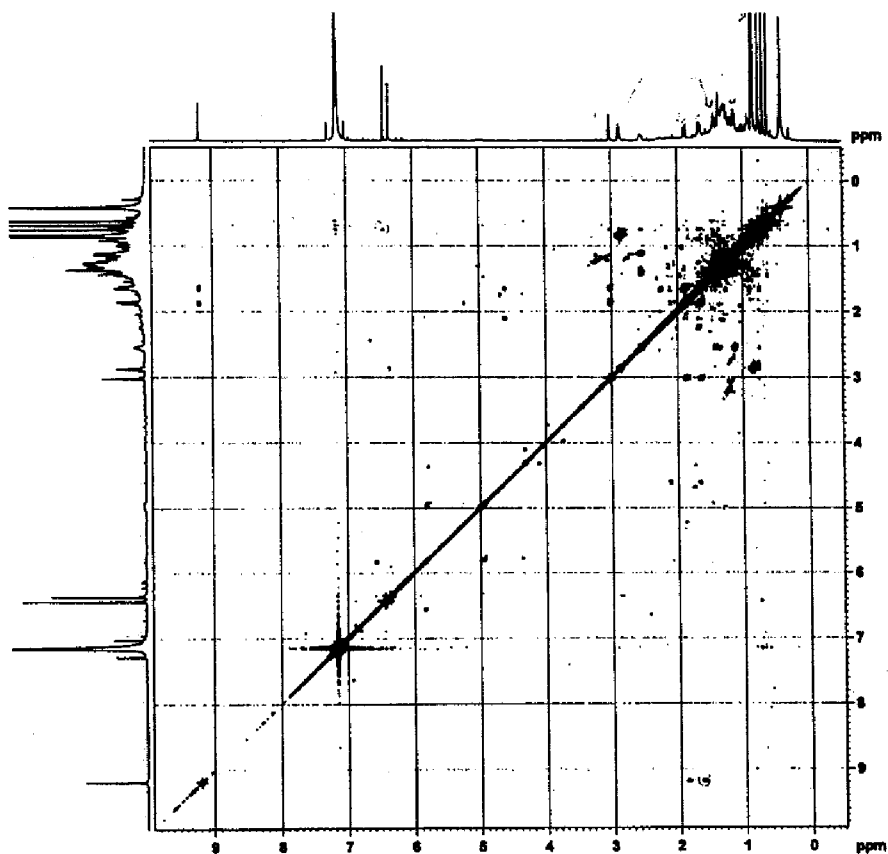
Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 14500-14505.

Zeisel, S., Reinstein, D., Corkin, S., Growden, J. and Wurtman, R. (1981)

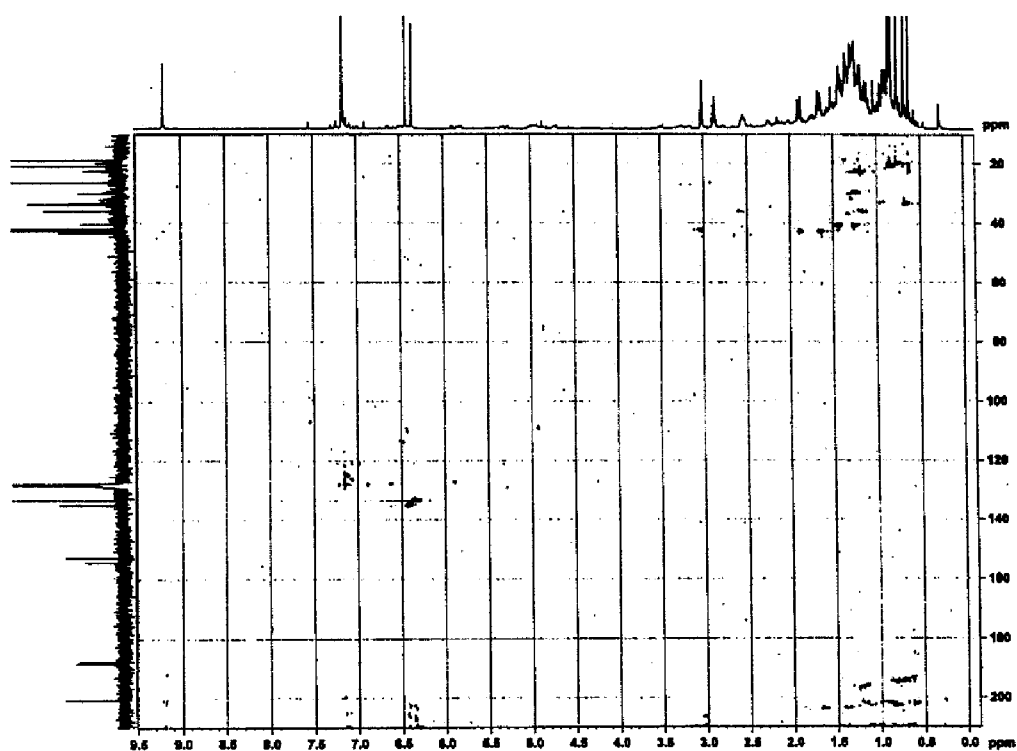
Cholinergic neurons and memory. *Nature*, 293, 187-188.

Zioudrou, C., Streaty, R.A. and Klee, W.A. (1979)

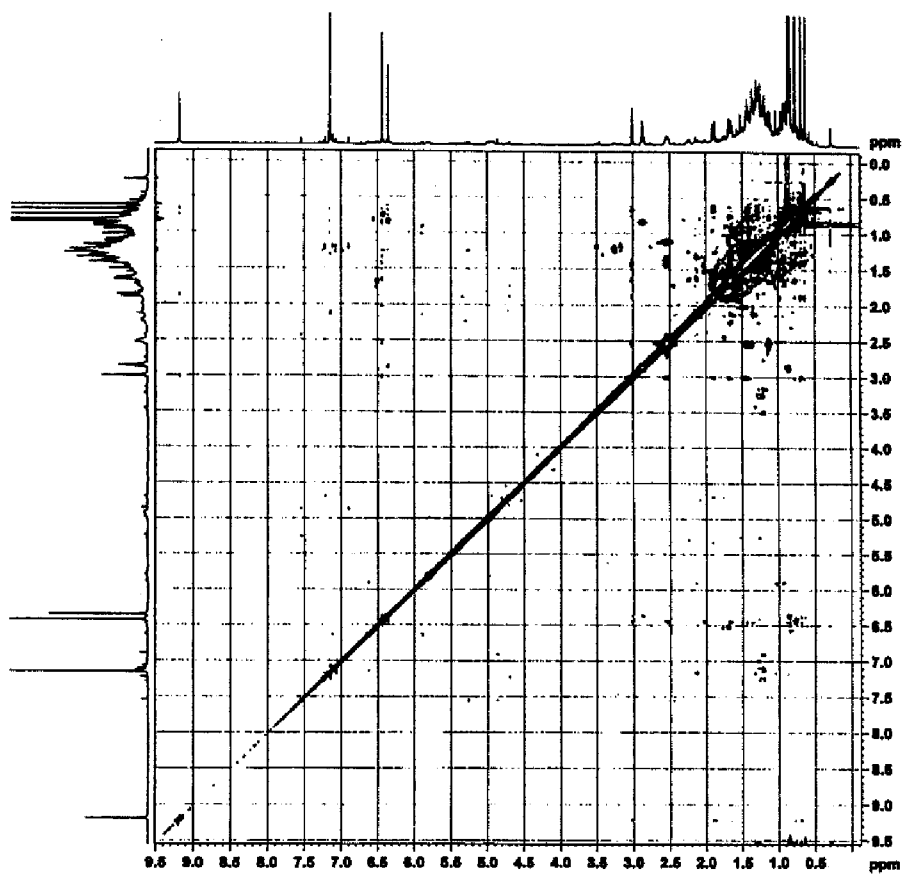
Opioid peptides derived from food proteins. *J. Biol. Chem.*, 254 (7), 2446-2449.



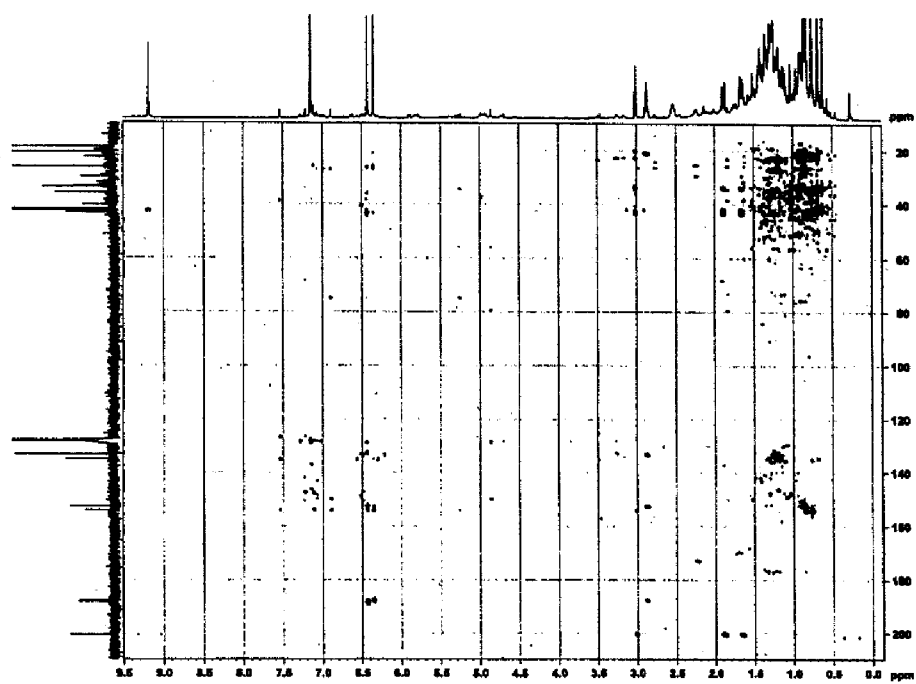
Supp. 1. COSY analysis of a compound from the nests of *Vespa simillima*.



Supp. 2. HMQC analysis of a compound purified from the nests of *Vespa simillima*.



Supp. 3. NOESY analysis of a compound purified from the nests of *Vespa simillima*.



Supp. 4. HMBC analysis of a compound purified from the nests of *Vespa simillima*.