

Table 4
¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (pyridine-d₅) of **4**, **5**, and **4a**.

Position	4		5		4a	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	2.74 (d, 17.8) 3.07 (d, 17.8)	43.0	2.65 (d, 18.2) 2.69 (d, 18.2)	42.5	2.45 (d, 17.9) 2.69 (d, 17.9)	42.1
2		174.3		174.3		171.9
3		182.3		179.8		179.6
4		47.0		46.8		46.7
5	3.14 (dd, 3.2, 11.5)	49.0	2.96 (dd, 2.5, 12.3)	49.2	2.69 (m)	49.3
6	1.73 (2H, m)	22.2	1.54 (m) 1.62 (m)	21.9	1.48 (m) 1.55 (m)	21.7
7	1.52 (m) 1.91 (m)	33.0	1.49 (ddd, 2.8, 12.9, 13.0) 1.82 (m)	32.9	1.45 (m) 1.74 (m)	32.8
8		40.7		40.6		40.5
9	3.42 (dd, 6.4, 11.4)	39.6	3.34 (dd, 6.4, 11.4)	39.5	2.98 (m)	39.8
10		42.4		42.1		42.2
11	2.19 (ddd, 3.5, 11.4, 18.1) 2.38 (ddd, 3.5, 6.4, 18.1)	24.6	2.15 (ddd, 3.6, 11.4, 18.1) 2.32 (ddd, 3.6, 6.4, 18.1)	24.5	2.08 (m) 2.12 (m)	24.4
12	5.55 (dd, 3.5, 3.5)	128.0	5.60 (dd, 3.6, 3.6)	128.9	5.57 (dd, 3.9, 3.9)	128.6
13		139.0		139.0		139.1
14		43.0		43.0		42.9
15	1.27 (m) 2.43 (ddd, 4.4, 13.2, 14.0)	29.4	1.27 (m) 2.43 (ddd, 4.4, 13.2, 14.0)	29.4	1.26 (m) 2.40 (m)	29.3
16	1.99 (m) 3.01 (ddd, 4.4, 13.2, 13.2)	26.2	2.00 (m) 3.01 (ddd, 4.4, 13.2, 13.2)	26.3	2.00 (m) 3.02 (m)	26.3
17		48.7		48.7		48.8
18	2.94 (br s)	54.5	2.94 (br s)	54.5	2.94 (br s)	54.5
19		72.7		72.8		72.7
20	1.34 (m)	42.1	1.35 (m)	42.1	1.36 (m)	42.1
21	1.22 (m) 1.95 (m)	26.7	1.28 (m) 1.95 (m)	26.7	1.23 (m) 1.96 (m)	26.7
22	1.84 (m) 2.04 (m)	37.6	1.85 (m) 2.04 (m)	37.6	1.85 (m) 2.05 (m)	37.6
23	1.55 (3H, s)	27.5	1.39 (3H, s)	27.6	1.33 (3H, s)	27.5
24	1.59 (3H, s)	25.1	1.42 (3H, s)	24.7	1.34 (3H, s)	24.4
25	1.26 (3H, s)	19.6	1.13 (3H, s)	19.4	1.06 (3H, s)	19.2
26	1.27 (3H, s)	17.5	1.24 (3H, s)	17.4	1.20 (3H, s)	17.4
27	1.80 (3H, s)	24.2	1.78 (3H, s)	24.2	1.72 (3H, s)	24.1
28		177.0		177.0		177.0
29	1.30 (3H, s)	27.1	1.30 (3H, s)	27.1	1.34 (3H, s)	27.1
30	1.02 (3H, d, 6.6)	16.6	1.04 (3H, d, 6.6)	16.6	1.05 (3H, d, 6.6)	16.6
28-O-Glc						
1'	6.24 (d, 8.3)	95.9	6.26 (d, 8.2)	95.9	6.26 (d, 8.2)	95.9
2'	4.18 (dd, 8.3, 8.8)	74.1	4.19 (dd, 8.2, 8.6)	74.1	4.19 (dd, 8.2, 8.4)	74.1
3'	4.27 (dd, 8.8, 9.0)	79.0	4.27 (dd, 8.6, 8.8)	79.0	4.27 (dd, 8.4, 8.6)	79.0
4'	4.30 (dd, 9.0, 9.2)	71.4	4.31 (dd, 8.8, 9.2)	71.4	4.31 (dd, 8.6, 9.4)	71.4
5'	4.03 (ddd, 2.6, 4.6, 9.2)	79.1	4.03 (ddd, 2.6, 4.6, 9.2)	79.2	4.03 (m)	79.2
6'	4.36 (dd, 4.6, 12.0) 4.45 (dd, 2.6, 12.0)	62.5	4.37 (dd, 4.6, 12.0) 4.45 (dd, 2.6, 12.0)	62.5	4.36 (m) 4.45 (m)	62.5
2-COOCH ₃					3.54 (3H, s)	50.6
3-COOCH ₃			3.68 (3H, s)	51.8	3.62 (3H, s)	51.7

Experimental

General experimental procedures

The following instruments were used to obtain physical data: specific rotations, Horiba SEPA-300 digital polarimeter ($l = 5$ cm); UV spectra, Shimadzu UV-1600 spectrometer; IR spectra, Shimadzu FTIR-8100 spectrometer; ¹H NMR spectra, JNM-ECA600 (600 MHz) and JNM-ECS400 (400 MHz) spectrometers; ¹³C NMR spectra, JNM-ECA600 (150 MHz) and JNM-ECS400 (100 MHz) spectrometers with tetramethylsilane as an internal standard; FABMS and HRFABMS, JEOL JMS-SX 102A mass spectrometer; EIMS and HREIMS, JEOL JMS-GCMATE mass spectrometer; HPLC detector, Shimadzu RID-6A refractive index and SPD-10A UV-VIS detectors and Shodex OR-2 optical rotation detector; HPLC column, Cosmosil 5C₁₈-MS-II (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan, 4.6 mm i.d. × 250 mm and 20 mm i.d. × 250 mm) for analytical and preparative purposes, respectively, and Kaseisorb LC NH₂-60-5 (Tokyo Kasei Co., Ltd., Tokyo, Japan, 4.6 mm i.d. × 250 mm) for identification of sugar part.

The following experimental conditions were used for column chromatography (CC): highly porous synthetic resin, Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co., Tokyo, Japan); normal-phase silica gel CC, silica gel 60N (Kanto Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan; 63–210 mesh, spherical, neutral); reversed-phase ODS CC, Chromatorex ODS DM1020T (Fuji Silysia Chemical, Ltd., Aichi, Japan; 100–200 mesh); TLC, pre-coated TLC plates with silica gel 60F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany, 0.25 mm) (normal-phase) and silica gel RP-18 WF_{254S} (Merck, Darmstadt, Germany, 0.25 mm) (reversed-phase); reversed-phase HPTLC, pre-coated TLC plates with silica gel RP-18 WF_{254S} (Merck, Darmstadt, Germany, 0.25 mm); detection was carried out by spraying 1% Ce(SO₄)₂–10% aqueous H₂SO₄, followed by heating.

Plant material

Tuberous roots of *P. anserina* collected at Tibet Autonomous Region, China. The plant material was identified by one of the authors (M. Y.). A voucher specimen (20080109 Tibet-01) of this plant is on file in our laboratory.

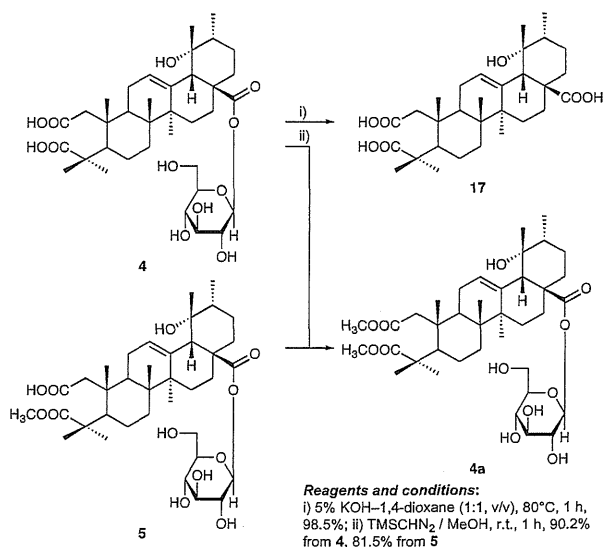


Fig. 3. Absolute stereostructures of 4 and 5.

Extraction and isolation

Dried tuberous roots of *P. anserina* (9.7 kg) were finely cut and extracted 3 times with MeOH (20 L) under conditions of reflux for 3 h. Evaporation of the solvent under reduced pressure provided a MeOH extract (2.23 kg, 23.0%). An aliquot (2.13 kg) was partitioned with EtOAc–H₂O (1:1, v/v) to furnish an EtOAc-soluble fraction (53.3 g, 0.58%) and an aqueous phase. The latter was subjected to Diaion HP-20 CC (3.0 kg, H₂O → MeOH, twice) to give H₂O-eluted (1990.0 g, 21.50%) and MeOH-eluted (67.3 g, 0.73%) fractions. An aliquot (43.3 g) of the EtOAc-soluble fraction was subjected to normal-phase silica gel CC [1.3 kg, hexane–acetone (10:1 → 2:1 → 2:5, v/v) → MeOH] to give 11 fractions [Fr. 1 (1.11 g), Fr. 2 (5.08 g), Fr. 3 (7.12 g), Fr. 4 (871.1 mg), Fr. 5 (702.2 mg), Fr. 6 (943.2 mg), Fr. 7 (465.5 mg), Fr. 8 (2.74 g), Fr. 9 (3.58 g), Fr. 10 (8.00 g), and Fr. 11 (8.79 g)]. Fraction 4 (871.1 mg) was subjected to reversed-phase ODS CC [26 g, MeOH–H₂O (70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH → acetone] to give five fractions [Fr. 4-1 (68.7 mg), Fr. 4-2 (113.1 mg), Fr. 4-3 (345.2 mg), Fr. 4-4 (142.6 mg), and Fr. 4-5 (142.9 mg)]. Fraction 4-2 (113.1 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] to give pomolic acid (**7**, 9.5 mg, 0.00013%), tormentic acid (**9**, 5.1 mg, 0.00007%), and 2-oxopomolic acid (**14**, 4.6 mg, 0.00006%). Fraction 5 (702.2 mg) was subjected to reversed-phase ODS CC [23 g, MeOH–H₂O (60:40 → 70:30 → 80:20 → 90:10, v/v) → MeOH → acetone] to give five fractions [Fr. 5-1 (101.5 mg), Fr. 5-2 (104.5 mg), Fr. 5-3 (217.8 mg), Fr. 5-4 (167.5 mg), and Fr. 5-5 (110.0 mg)]. Fraction 5-2 (104.5 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (70:30, v/v)] to give cacropiatic acid (**17**, 7.2 mg, 0.00010%). Fraction 5-3 (217.8 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (70:30, v/v)] to give euscaphic acid (**11**, 17.8 mg, 0.00024%), 2 α ,19 α -dihydroxy-3-oxours-12-en-28-oic acid (**13**, 57.2 mg, 0.00077%), and **17** (5.3 mg, 0.00007%). Fraction 5-4 (167.5 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] to give **7** (50.8 mg, 0.00068%), **11** (10.0 mg, 0.00013%), **13** (8.3 mg, 0.00011%), 2 α -hydroxyursolic acid (**16**, 15.0 mg, 0.00020%), maslinic acid (**18**, 21.6 mg, 0.00029%), and aliphatic acid (**21**, 3.2 mg, 0.00004%). Fraction 8 (2.74 g) was subjected to reversed-phase ODS CC [240 g, MeOH–H₂O (10:90 → 30:70 → 70:30, v/v) → MeOH → acetone] to give eight fractions [Fr. 8-1 (368.0 mg), Fr. 8-2 (331.2 mg), Fr. 8-3

Table 5
¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (pyridine-d₅) of **6**.

Position	δ_H	δ_C
1	1.36 (m)	48.1
	2.39 (dd, 4.4, 12.4)	
	4.24 (m)	
2	4.18 (d, 9.4)	69.2
3		78.4
4		43.6
5	1.75 (br d, ca. 11)	48.2
6	1.37 (m)	18.6
7	1.67 (m)	34.9
	1.32 (br d, ca. 13)	
8	1.54 (m)	41.9
9		51.1
10	1.71 (dd, 3.1, 12.7)	38.7
11	1.28 (m)	22.2
12	1.54 (m)	25.6
13	1.88 (m)	
	2.81 (m)	
14		139.0
15	1.04 (m)	44.9
16	2.10 (m)	27.7
17	1.61 (m)	33.2
18	2.25 (ddd, 3.2, 3.3, 13.4)	
19		49.4
20	2.48 (br d, ca. 14)	127.9
21	2.80 (br d, ca. 14)	36.4
22		38.4
23	1.41 (m)	32.0
	1.97 (br dd, ca. 13, 14)	
24	1.50 (br dd, ca. 13, 14)	35.7
25	2.56 (br d, ca. 14)	66.7
26	3.70 (d, 10.4)	
27	4.17 (d, 10.4)	14.2
28	1.04 (3H, s)	18.4
29	0.98 (3H, s)	18.1
30	1.14 (3H, s)	21.3
28-O-Glc	1.12 (3H, s)	175.9
1'	1.00 (3H, s)	20.3
2'	3.60 (2H, s)	73.4
3'	6.32 (d, 8.1)	96.2
4'	4.15 (dd, 8.1, 8.5)	74.3
5'	4.23 (m)	78.9
6'	4.24 (dd, 8.8, 9.2)	71.5
	4.00 (m)	79.2
	4.31 (dd, 4.8, 11.8)	62.5
	4.40 (dd, 2.4, 11.8)	

(240.0 mg), Fr. 8-4 (111.9 mg), Fr. 8-5 (550.1 mg), Fr. 8-6 (636.0 mg), Fr. 8-7 (297.2 mg), and Fr. 8-8 (168.7 mg)]. Fraction 8-1 (368.0 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (10:90, v/v)] to give gallic acid methyl ester (7.8 mg, 0.00010%) and (+)-gallo catehin (86.9 mg, 0.00116%). Fraction 8-3 (240.0 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (10:90, v/v)] to give (+)-catechin (37.2 mg, 0.00050%) and (+)-gallo catehin (20.0 mg, 0.00027%). Fraction 8-5 (550.1 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (50:50, v/v)] to give rosamutin (**10**, 112.3 mg, 0.00150%) and 24-deoxy-sericoside (**19**, 37.1 mg, 0.00050%). Fraction 8-6 (636.0 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (70:30, v/v)] to give **10** (203.3 mg, 0.00272%), kaji-ichigoside F1 (**12**, 143.9 mg, 0.00193%), and **19** (11.6 mg, 0.00016%). Fraction 9 (3.58 g) was subjected to reversed-phase ODS CC [130 g, MeOH–H₂O (50:50 → 70:30 → 80:20, v/v) → MeOH] to give six fractions [Fr. 9-1 (344.4 mg), Fr. 9-2 (111.1 mg), Fr. 9-3 (1.85 g), Fr. 9-4 (246.3 mg), Fr. 9-5 (61.6 mg), and Fr. 9-6 (360.2 mg)]. Fraction 9-1 (344.4 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (15:85, v/v)] to give

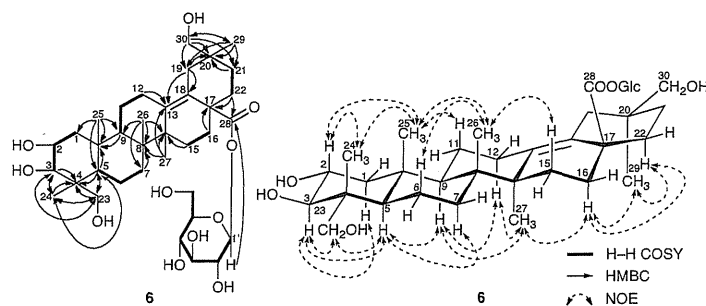


Fig. 4. Selected ^1H - ^1H COSY, HMBC, and NOESY correlations of **6**.

Table 6
Inhibitory effects of the methanol extract, its fractions, and constituents on D-GalN -induced cytotoxicity in primary cultured mouse hepatocytes.

	Inhibition (%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	0 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	
MeOH extract	0.0 \pm 2.4	4.5 \pm 1.1	6.2 \pm 2.1	5.3 \pm 3.1	16.2 \pm 2.4 ^b	
EtOAc-soluble fraction	0.0 \pm 6.6	36.8 \pm 6.4 ^b	69.7 \pm 6.0 ^b	93.3 \pm 4.2 ^b	91.9 \pm 5.6 ^b	4.9 \pm 1.1
MeOH-eluted fraction	0.0 \pm 2.0	9.3 \pm 1.5 ^a	19.4 \pm 1.9 ^b	25.6 \pm 1.7 ^b	51.6 \pm 2.6 ^b	95.1 \pm 7.7
H ₂ O-eluted fraction	0.0 \pm 1.3	2.2 \pm 2.1	-10.8 \pm 9.6	-9.2 \pm 7.0	-3.3 \pm 10.4	

	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μM)
	0 μM	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM	
Potentillanoside A (1)	0.0 \pm 3.7	18.5 \pm 2.0 ^a	25.0 \pm 1.9 ^b	38.5 \pm 3.3 ^b	65.6 \pm 8.6 ^b	46.7 \pm 9.0
Potentillanoside D (4)	0.0 \pm 0.6	0.1 \pm 1.2	-0.2 \pm 0.7	-0.9 \pm 0.6	-0.2 \pm 0.5	
Potentillanoside E (5)	0.0 \pm 1.2	3.3 \pm 0.5	5.5 \pm 1.0	6.9 \pm 0.6	14.6 \pm 1.5 ^b	
Pomolic acid (7)	0.0 \pm 2.4	2.2 \pm 4.1	-43.4 \pm 1.2 ^c	- ^c	- ^c	
28-O-Glc pomolic acid (8)	0.0 \pm 2.5	32.3 \pm 2.1 ^b	52.3 \pm 2.3 ^b	66.2 \pm 3.7 ^b	- ^c	9.5 \pm 1.3
Tormentenic acid (9)	0.0 \pm 0.7	9.2 \pm 3.5	2.6 \pm 1.6	2.7 \pm 0.7	-5.8 \pm 1.3	
Rosamutin (10)	0.0 \pm 1.5	15.8 \pm 0.6 ^b	21.9 \pm 1.7 ^b	42.4 \pm 4.7 ^b	95.3 \pm 3.3 ^b	35.5 \pm 9.8
Euscaphic acid (11)	0.0 \pm 3.3	15.4 \pm 3.5	11.0 \pm 2.8	5.9 \pm 2.1	3.8 \pm 11.0	
Kaji-ichigoside F1 (12)	0.0 \pm 3.3	39.1 \pm 2.4 ^b	45.3 \pm 1.0 ^b	56.9 \pm 3.8 ^b	51.1 \pm 10.0 ^b	14.1 \pm 2.6
13	0.0 \pm 1.7	-4.3 \pm 5.1	-12.0 \pm 3.4	-11.3 \pm 0.5	-7.2 \pm 4.4	
2-Oxopomolic acid 28-O-Glc (15)	0.0 \pm 0.9	1.6 \pm 0.7	4.0 \pm 0.8	7.1 \pm 1.0	19.1 \pm 2.5 ^b	
2 α -Hydroxyursolic acid (16)	0.0 \pm 2.0	14.3 \pm 2.9	11.7 \pm 4.0	- ^c	- ^c	
Cecropiacic acid (17)	0.0 \pm 1.1	-0.5 \pm 1.6	0.9 \pm 1.9	5.5 \pm 1.2	19.3 \pm 2.6 ^b	
Maslinic acid (18)	0.0 \pm 0.6	-9.2 \pm 3.2	-13.7 \pm 3.0	-9.3 \pm 2.0	- ^c	
24-Deoxy-sericoside (19)	0.0 \pm 3.0	11.1 \pm 1.1 ^a	24.5 \pm 0.7 ^b	25.2 \pm 4.2 ^b	15.6 \pm 1.5 ^b	
Gallic acid	0.0 \pm 1.2	10.8 \pm 1.8	14.2 \pm 2.8 ^a	26.0 \pm 5.6 ^b	35.9 \pm 7.5 ^b	
Gallic acid methyl ester	0.0 \pm 0.5	5.8 \pm 0.5	14.2 \pm 1.3 ^b	33.1 \pm 1.7 ^b	65.8 \pm 4.1 ^b	53.7 \pm 7.1
Ellagic acid	0.0 \pm 0.5	6.0 \pm 0.7	7.8 \pm 0.4	6.0 \pm 1.1	14.7 \pm 1.4 ^b	
Ellagic acid 4-O-Ara(f)	0.0 \pm 1.1	5.2 \pm 1.4	6.9 \pm 0.2	8.4 \pm 1.2	16.2 \pm 3.3 ^b	
(+)-Catechin	0.0 \pm 2.6	14.1 \pm 2.8 ^a	34.9 \pm 1.3 ^b	66.6 \pm 6.2 ^b	104.8 \pm 1.2 ^b	17.7 \pm 1.1
(+)-Gallocatechin	0.0 \pm 3.2	18.3 \pm 4.3 ^a	26.7 \pm 4.3 ^b	76.2 \pm 2.9 ^b	99.0 \pm 4.0 ^b	18.4 \pm 0.4
(+)-Catechin 7-O-Glc	0.0 \pm 4.6	13.0 \pm 2.8	19.1 \pm 2.5 ^b	34.2 \pm 4.0 ^b	64.5 \pm 4.3 ^b	55.4 \pm 5.6
Quercetin 3-O-GlcA	0.0 \pm 5.6	17.2 \pm 5.8	34.8 \pm 5.6 ^b	46.7 \pm 2.0 ^b	63.1 \pm 1.4 ^b	34.2 \pm 8.8
Quercetin 3-O-Xyl(1 \rightarrow 2)Glc	0.0 \pm 1.8	0.4 \pm 3.8	7.6 \pm 2.0	13.9 \pm 4.3 ^a	32.2 \pm 2.1 ^b	
6-O- <i>p</i> -Coumaroylsucrose	0.0 \pm 10.6	1.1 \pm 6.5	6.3 \pm 6.4	12.1 \pm 7.6	17.3 \pm 4.9	
6-O-Feruloylsucrose	0.0 \pm 0.4	2.8 \pm 0.9	4.5 \pm 1.1	10.9 \pm 0.5 ^b	26.1 \pm 2.4 ^b	
Silybin ^d	0.0 \pm 0.3	4.8 \pm 1.1	7.7 \pm 0.7	45.2 \pm 8.8 ^b	77.0 \pm 5.5 ^b	38.8 \pm 4.6

Each value represents the mean \pm S.E.M. ($N = 4$).

Significantly different from the control.

^a $p < 0.05$.

^b $p < 0.01$.

^c Cytotoxic effects were observed.

^d Commercial silybin was purchased from Funakoshi Co., Ltd. (Tokyo, Japan) (Morikawa et al., 2010a).

gallic acid (23.9 mg, 0.00032%), gallic acid methyl ester (5.5 mg, 0.00007%), (+)-catechin (6.3 mg, 0.00008%), and (+)-gallocatechin (81.7 mg, 0.00110%). Fraction 9-3 (530.0 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (55:45, v/v)] to give potentillanosides A (**1**, 273.9 mg, 0.01282%) and B (**2**, 14.3 mg, 0.00067%), **10** (46.1 mg, 0.00216%) and **12** (57.0 mg, 0.00267%). Fraction 9-4 (246.3 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (60:40, v/v)] to give potentillanoside C (**3**, 3.8 mg, 0.00005%), 28-O- β -D-glucopyranosyl pomolic acid (**8**, 24.6 mg, 0.00033%), **10**

(115.8 mg, 0.00155%), and **19** (14.6 mg, 0.00020%). Fraction 9-5 (61.6 mg) was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, MeOH-1% aqueous AcOH (70:30, v/v)] to give **10** (9.2 mg, 0.00012%) and **12** (10.8 mg, 0.00014%). Fraction 10 (8.00 g) was subjected to reversed-phase ODS CC [240 g, MeOH-H₂O (50:50 \rightarrow 60:40 \rightarrow 80:20, v/v) \rightarrow MeOH] to give seven fractions [Fr. 10-1 (967.4 mg), Fr. 10-2 (233.0 mg), Fr. 10-3 (195.8 mg), Fr. 10-4 (22.7 mg), Fr. 10-5 (5.97 g), Fr. 10-6 (308.1 mg), and Fr. 10-7 (191.1 mg)]. Fraction 10-3 (195.8 mg) was subjected to HPLC

Table 7
Inhibitory effects of the methanol extract, its fractions, and constituents on LPS-activated NO production in mouse peritoneal macrophages.

	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μg/mL)
	0 μg/mL	3 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	100 μg/mL	
MeOH extract	0.0 ± 2.3	9.7 ± 2.5	7.5 ± 2.9	11.2 ± 3.5	14.9 ± 2.8 ^b	
EtOAc-soluble fraction	0.0 ± 3.3	4.0 ± 1.1	11.4 ± 5.7	11.2 ± 5.5	58.2 ± 4.3 ^b	70.1 ± 3.8
MeOH-eluted fraction	0.0 ± 6.4	10.3 ± 7.3	32.6 ± 4.7 ^b	32.5 ± 3.2 ^b	41.4 ± 4.4 ^b	
H ₂ O-eluted fraction	0.0 ± 4.2	9.7 ± 5.3	−12.0 ± 13.0	−25.6 ± 19.3	−0.1 ± 4.3	

	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μM)
	0 μM	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM	
Potentillanoside A (1)	0.0 ± 3.1	2.5 ± 3.2	0.9 ± 2.8	5.1 ± 2.6	6.2 ± 1.1	
Potentillanoside D (4)	0.0 ± 3.0	−1.5 ± 1.6	1.2 ± 1.4	1.4 ± 2.7	12.2 ± 2.1	
Potentillanoside E (5)	0.0 ± 4.1	3.6 ± 1.6	4.7 ± 3.8	8.2 ± 0.6	17.6 ± 2.0 ^b	
Pomolic acid (7)	0.0 ± 3.0	2.9 ± 0.6	13.0 ± 2.0 ^b	45.2 ± 2.2 ^b	83.9 ± 1.6 ^{b,c}	33.1 ± 2.0
28-O-Glc pomolic acid (8)	0.0 ± 2.5	0.5 ± 6.6	−2.2 ± 4.9	13.1 ± 0.9	55.3 ± 2.4 ^b	91.9 ± 2.8
Tormentic acid (9)	0.0 ± 2.9	1.0 ± 1.6	1.9 ± 5.3	17.1 ± 1.6 ^b	82.7 ± 0.3 ^{b,c}	68.4 ± 2.2
Rosamutin (10)	0.0 ± 3.2	−1.3 ± 2.0	−3.1 ± 3.3	−7.7 ± 3.0	−0.1 ± 0.9	
Euscaphic acid (11)	0.0 ± 4.0	−3.2 ± 3.5	−6.4 ± 2.2	−4.0 ± 3.4	17.9 ± 0.8 ^b	
Kaji-ichigoside F1 (12)	0.0 ± 4.7	−0.5 ± 0.8	2.1 ± 2.1	0.8 ± 1.5	8.7 ± 2.6	
13	0.0 ± 2.2	3.6 ± 1.0	4.4 ± 1.3	9.6 ± 1.1	26.1 ± 0.5 ^b	
2-Oxopomolic acid 28-O-Glc (15)	0.0 ± 2.5	0.5 ± 2.2	4.5 ± 1.9	3.4 ± 2.8	10.9 ± 0.7 ^b	
2α-Hydroxyursolic acid (16)	0.0 ± 0.6	7.5 ± 0.4	−3.8 ± 1.8	51.8 ± 0.9 ^b	91.3 ± 1.1 ^{b,c}	21.1 ± 3.0
Cecropiadic acid (17)	0.0 ± 3.1	−0.5 ± 2.9	−2.6 ± 3.2	4.5 ± 3.1	21.0 ± 2.4 ^b	
Maslinic acid (18)	0.0 ± 6.2	−6.4 ± 3.0	2.5 ± 7.9	51.6 ± 2.5 ^b	100.0 ± 1.1 ^{b,c}	30.1 ± 2.7
24-Deoxy-sericoside (19)	0.0 ± 5.0	10.0 ± 10.4	8.9 ± 1.9	7.9 ± 3.4	15.3 ± 0.9 ^b	
Gallic acid	0.0 ± 2.5	−1.4 ± 1.2	−8.0 ± 2.0	−4.2 ± 2.5	17.1 ± 2.4 ^b	
Gallic acid methyl ester	0.0 ± 2.7	−1.5 ± 3.9	3.2 ± 2.2	12.8 ± 2.7 ^a	31.0 ± 1.6 ^b	
Ellagic acid	0.0 ± 2.7	6.5 ± 2.0	1.5 ± 2.3	−6.7 ± 1.7	8.5 ± 2.5	
Ellagic acid 4-O-Ara(f)	0.0 ± 2.9	3.6 ± 2.8	3.6 ± 2.2	1.9 ± 0.8	11.0 ± 1.4 ^a	
Ducheside B	0.0 ± 2.7	1.7 ± 1.8	−3.0 ± 1.8	0.8 ± 3.0	0.3 ± 1.6	
(+)-Catechin	0.0 ± 3.0	−5.9 ± 3.2	−3.6 ± 1.4	−0.3 ± 0.4	6.7 ± 1.6	
(+)-Gallocatechin	0.0 ± 2.9	0.4 ± 3.3	0.4 ± 1.9	0.4 ± 2.2	13.3 ± 0.9 ^b	
(+)-Catechin 7-O-Glc	0.0 ± 2.9	5.8 ± 1.3	4.6 ± 1.9	1.8 ± 0.7	4.5 ± 1.3	
Quercetin 3-O-GlcA	0.0 ± 0.4	3.5 ± 2.4	3.3 ± 2.1	0.4 ± 2.0	7.3 ± 2.9	
Quercetin 3-O-Xyl(1 → 2)Glc	0.0 ± 2.5	2.0 ± 1.0	0.3 ± 2.4	2.4 ± 2.8	7.4 ± 1.5	
6-O- <i>p</i> -Coumaroylsucrose	0.0 ± 2.0	4.6 ± 2.2	6.1 ± 2.3	7.9 ± 1.7	7.3 ± 2.3	
6-O-Feruloylsucrose	0.0 ± 3.1	−0.9 ± 4.0	4.0 ± 1.9	4.7 ± 2.2	9.0 ± 0.6	
l-NMMA ^d	0.0 ± 3.1	1.4 ± 2.8	19.9 ± 2.8 ^b	43.0 ± 2.1 ^b	70.9 ± 1.6 ^b	36.0 ± 2.9
CAPE ^d	0.0 ± 2.1	5.9 ± 5.2	44.4 ± 3.2 ^b	86.2 ± 1.1 ^b	99.6 ± 0.1 ^{b,c}	11.0 ± 2.1

Each value represents the mean ± S.E.M. (N = 4).

Significantly different from the control.

^a *p* < 0.05.

^b *p* < 0.01.

^c Cytotoxic effects were observed.

^d Commercial l-NMMA and CAPE were purchased from Sigma–Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA) (Morikawa et al., 2011).

[MeOH–1% aqueous AcOH (35:65, v/v)] to give ellagic acid (21.3 mg, 0.00029%). Fraction 10–5 (125.0 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (55:45, v/v)] to give **10** (79.8 mg, 0.05114%), **12** (5.9 mg, 0.00378%), and **19** (15.4 mg, 0.00987%).

The MeOH-eluted fraction (55.0 g) was subjected to normal-phase silica gel CC [2.0 kg, CHCl₃–MeOH–H₂O (15:3:0.3 → 10:3:0.4 → 6:4:1 → 5:5:1, v/v/v) → MeOH] to give eight fractions [Fr. 1 (20.44 g), Fr. 2 (8.47 g), Fr. 3 (2.21 g), Fr. 4 (4.05 g), Fr. 5 (3.49 g), Fr. 6 (5.49 g), Fr. 7 (3.11 g), and Fr. 8 (2.53 g)]. Fraction 1 (20.44 g) was subjected to reversed-phase ODS CC [620 g, MeOH–H₂O (60:40 → 70:30 → 75:25 → 90:10, v/v) → MeOH → acetone] to give 10 fractions [Fr. 1–1 (300.2 mg), Fr. 1–2 (104.9 mg), Fr. 1–3 (552.2 mg), Fr. 1–4 (118.8 mg), Fr. 1–5 (737.4 mg), Fr. 1–6 (492.1 mg), Fr. 1–7 (3.03 g), Fr. 1–8 (6.31 g), Fr. 1–9 (3.84 g), and Fr. 1–10 (2.14 g)]. Fraction 1–2 (104.9 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (55:45, v/v)] to give potentillanoside D (**4**, 28.8 mg, 0.00038%). Fraction 1–3 (552.2 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (60:40, v/v)] to give potentillanoside E (**5**, 44.6 mg, 0.00059%), **10** (216.5 mg, 0.00287%), 2-oxopomolic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (**15**, 36.8 mg, 0.00049%), and **17** (22.3 mg, 0.00030%). Fraction 1–4 (118.8 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (60:40, v/v)] to give **4** (5.9 mg,

0.00008%). Fraction 1–5 (737.4 mg) was recrystallized with MeOH to give **9** (553.2 mg, 0.00734%). Fraction 1–6 (492.1 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] to give **7** (141.3 mg, 0.00188%). Fraction 2 (8.47 g) was separated by reversed-phase ODS CC [255 g, MeOH–H₂O (10:90 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40, v/v) → MeOH → acetone] to give eight fractions [Fr. 2–1 (379.5 mg), Fr. 2–2 (581.0 mg), Fr. 2–3 (376.5 mg), Fr. 2–4 (123.6 mg), Fr. 2–5 (331.3 mg), Fr. 2–6 (204.5 mg), Fr. 2–7 (3.37 g), and Fr. 2–8 (2.21 g)]. Fraction 2–3 (376.5 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (20:80, v/v)] to give ducheside B (75.0 mg, 0.00100%). Fraction 2–5 (331.3 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (50:50, v/v)] to give **5** (58.4 mg, 0.00077%) and arjunglucoside I (**20**, 7.6 mg, 0.00010%). Fraction 2–6 (204.5 mg) was subjected to HPLC [MeOH–1% aqueous AcOH (55:45, v/v)] to give **5** (9.4 mg, 0.00012%), **10** (57.0 mg, 0.00076%), and **19** (11.4 mg, 0.00015%). Fraction 3 (2.21 g) was separated by reversed-phase ODS CC [70 g, MeOH–H₂O (10:90 → 30:70 → 40:60 → 60:40 → 90:10, v/v) → MeOH → acetone] to give eight fractions [Fr. 3–1 (230.4 mg), Fr. 3–2 (252.7 mg), Fr. 3–3 (42.4 mg), Fr. 3–4 (82.1 mg), Fr. 3–5 (114.0 mg), Fr. 3–6 (159.3 mg), Fr. 3–7 (381.1 mg), and Fr. 3–8 (268.7 mg)]. Fraction 3–1 (230.4 mg) was subjected to HPLC

Table 8
Inhibitory effects of the methanol extract, its fractions, and constituents on TNF- α -induced cytotoxicity in L929 cells.

	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ g/mL)
	0 μ g/mL	3 μ g/mL	10 μ g/mL	30 μ g/mL	100 μ g/mL	
MeOH extract	0.0 \pm 1.4	9.7 \pm 1.3	5.4 \pm 2.1	3.6 \pm 1.0	2.7 \pm 2.0	
EtOAc-soluble fraction	0.0 \pm 0.9	4.1 \pm 0.6	6.7 \pm 2.8	58.3 \pm 1.8 ^b	59.0 \pm 2.6 ^b	30.8 \pm 3.3
MeOH-eluted fraction	0.0 \pm 1.8	9.4 \pm 1.8	9.3 \pm 2.0	16.5 \pm 1.3 ^b	33.8 \pm 3.3 ^b	
H ₂ O-eluted fraction	0.0 \pm 1.4	2.9 \pm 1.0	2.9 \pm 1.3	2.3 \pm 1.1	0.2 \pm 0.7	

	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Potentillanoside A (1)	0.0 \pm 0.2	2.9 \pm 1.6	3.0 \pm 0.4	5.9 \pm 2.0	12.9 \pm 1.4 ^b	
Potentillanoside D (4)	0.0 \pm 1.0	1.0 \pm 0.4	1.3 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	3.0 \pm 0.7	
Potentillanoside E (5)	0.0 \pm 0.7	2.0 \pm 0.9	0.3 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3	3.4 \pm 0.4	
Pomolic acid (7)	0.0 \pm 0.6	0.5 \pm 1.7	-9.9 \pm 0.4	-11.3 \pm 0.4	-10.7 \pm 0.5	
28-O-Glc pomolic acid (8)	0.0 \pm 1.1	4.8 \pm 2.0	12.8 \pm 0.4 ^b	61.9 \pm 2.3 ^b	13.1 \pm 2.7 ^b	25.5 \pm 1.6
Tormentic acid (9)	0.0 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2	2.2 \pm 0.4	4.8 \pm 0.7	-3.8 \pm 0.6	
Rosamutin (10)	0.0 \pm 0.9	0.8 \pm 1.2	1.8 \pm 1.3	2.0 \pm 1.0	7.2 \pm 1.3	
Euscaphic acid (11)	0.0 \pm 0.5	0.6 \pm 0.7	6.5 \pm 1.3	8.2 \pm 1.7	12.9 \pm 1.2 ^b	
Kaji-ichigoside F1 (12)	0.0 \pm 0.3	1.3 \pm 0.5	1.7 \pm 0.4	2.3 \pm 1.6	7.1 \pm 1.1	
13	0.0 \pm 1.1	2.1 \pm 0.7	3.8 \pm 1.2	5.6 \pm 1.0	14.3 \pm 1.8 ^b	
2-Oxopomolic acid 28-O-Glc (15)	0.0 \pm 0.5	2.4 \pm 0.5	1.9 \pm 0.6	2.7 \pm 0.6	4.1 \pm 0.5	
2 α -Hydroxyursolic acid (16)	0.0 \pm 0.3	0.5 \pm 0.8	3.9 \pm 1.3	-7.6 \pm 0.4	-8.0 \pm 0.5	
Cecropiacic acid (17)	0.0 \pm 0.7	1.1 \pm 0.6	0.7 \pm 0.4	2.2 \pm 0.9	5.3 \pm 0.4	
Maslinic acid (18)	0.0 \pm 0.5	1.9 \pm 1.0	3.1 \pm 0.6	10.7 \pm 2.5	-8.6 \pm 0.1	
24-Deoxy-sericoside (19)	0.0 \pm 1.3	-1.0 \pm 0.9	3.7 \pm 0.7	3.1 \pm 0.9	5.9 \pm 1.4	
Gallic acid	0.0 \pm 0.9	2.1 \pm 1.4	0.2 \pm 1.6	2.8 \pm 0.5	-8.5 \pm 0.1	
Gallic acid methyl ester	0.0 \pm 1.4	-0.2 \pm 0.9	3.1 \pm 1.4	14.8 \pm 2.0 ^b	17.1 \pm 1.1 ^b	
Ellagic acid	0.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.2	13.7 \pm 1.5 ^b	21.8 \pm 2.7 ^b	6.7 \pm 0.3	
Ellagic acid 4-O-Ara(f)	0.0 \pm 0.2	2.1 \pm 0.5	2.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.4	0.1 \pm 0.8	
Ducheside B	0.0 \pm 0.2	1.8 \pm 0.5	0.9 \pm 0.6	2.5 \pm 0.9	2.1 \pm 0.8	
(+)-Catechin	0.0 \pm 1.1	2.1 \pm 0.5	3.4 \pm 0.4	4.6 \pm 0.9	13.4 \pm 1.9 ^b	
(+)-Gallocatechin	0.0 \pm 1.1	1.7 \pm 0.9	2.6 \pm 1.1	11.3 \pm 2.4	-6.9 \pm 0.1	
(+)-Catechin 7-O-Glc	0.0 \pm 0.5	3.6 \pm 0.9	4.4 \pm 0.6	6.9 \pm 0.8	10.2 \pm 0.7 ^a	
Quercetin 3-O-GlcA	0.0 \pm 1.3	0.8 \pm 0.6	-0.2 \pm 0.9	0.6 \pm 1.2	28.5 \pm 3.5 ^b	
Quercetin 3-O-Xyl(1 \rightarrow 2)Glc	0.0 \pm 0.6	0.0 \pm 1.2	3.7 \pm 0.5	2.9 \pm 0.7	4.0 \pm 0.6	
6-O-p-Coumaroylsucrose	0.0 \pm 0.4	2.5 \pm 0.5	2.6 \pm 1.6	3.5 \pm 0.5	1.8 \pm 0.5	
6-O-Feruloylsucrose	0.0 \pm 0.6	2.6 \pm 1.0	2.2 \pm 0.4	2.6 \pm 0.5	2.6 \pm 0.3	
Silybin ^c	0.0 \pm 2.6	5.3 \pm 2.8	22.0 \pm 3.8 ^b	48.0 \pm 4.1 ^b	50.8 \pm 3.9 ^b	60.4 \pm 3.8

Each value represents the mean \pm S.E.M. ($N = 4$).

Significantly different from the control.

^a $p < 0.05$.

^b $p < 0.01$.

^c Commercial silybin was purchased from Funakoshi Co., Ltd. (Tokyo, Japan) (Morikawa et al., 2010a).

[MeOH-1% aqueous AcOH (5:95, v/v)] to give (+)-gallocatechin (24.0 mg, 0.00032%). Fraction 4 (4.05 g) was subjected to reversed-phase ODS CC [125 g, MeOH-H₂O (20:80 \rightarrow 30:70 \rightarrow 40:60 \rightarrow 60:40 \rightarrow 95:5, v/v) \rightarrow MeOH \rightarrow acetone] to give seven fractions [Fr. 4-1 (238.5 mg), Fr. 4-2 (334.3 mg), Fr. 4-3 [= L-tryptophan (1.17 g, 0.0155%)], Fr. 4-4 (295.6 mg), Fr. 4-5 (334.9 mg), Fr. 4-6 (128.6 mg), and Fr. 4-7 (1.30 g)]. Fraction 4-4 (295.6 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (20:80, v/v)] to give 6-O-p-coumaroylsucrose (50.6 mg, 0.00067%) and 6-O-feruloylsucrose (8.2 mg, 0.00011%). Fraction 4-5 (334.9 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] to give quercetin 3-O-sambubioside (11.0 mg, 0.00015%). Fraction 4-6 (128.6 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] to give potentillanoside F (6, 18.3 mg, 0.00024%) and ellagic acid 4-O- α -L-arabinofuranoside (22.6 mg, 0.00030%). Fraction 5 (3.49 g) was separated by reversed-phase ODS CC [110 g, MeOH-H₂O (5:95 \rightarrow 20:80 \rightarrow 50:50 \rightarrow 80:20, v/v) \rightarrow MeOH \rightarrow acetone] to give eight fractions [Fr. 5-1 (210.8 mg), Fr. 5-2 (223.7 mg), Fr. 5-3 (523.8 mg), Fr. 5-4 (358.5 mg), Fr. 5-5 (275.2 mg), Fr. 5-6 (345.4 mg), Fr. 5-7 (402.2 mg), and Fr. 5-8 (448.5 mg)]. Fraction 5-3 (523.8 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (5:95, v/v)] to give (+)-catechin 7-O- β -D-glucopyranoside (114.3 mg, 0.00152%). Fraction 5-4 (358.5 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] to give ellagic acid 4-O- α -L-arabinofuranoside (10.4 mg, 0.00014%) and quercetin

3-O- β -D-glucuronopyranosiduronic acid (13.7 mg, 0.00018%). Fraction 5-5 (275.2 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] to give 6 (10.4 mg, 0.00014%), ellagic acid (24.3 mg, 0.00032%), ellagic acid 4-O- α -L-arabinofuranoside (14.5 mg, 0.00019%), and quercetin 3-O- β -D-xyllopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside-3'-O- β -D-glucopyranoside (10.5 mg, 0.00014%). Fraction 6 (5.49 g) was separated by reversed-phase ODS CC [180 g, MeOH-H₂O (10:90 \rightarrow 30:70 \rightarrow 50:50, v/v) \rightarrow MeOH \rightarrow acetone] to give seven fractions [Fr. 6-1 (2.36 g), Fr. 6-2 (490.0 mg), Fr. 6-3 (757.1 mg), Fr. 6-4 (409.5 mg), Fr. 6-5 (155.0 mg), Fr. 6-6 (1.03 g), and Fr. 6-7 (423.0 mg)]. Fraction 6-3 (500.0 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (35:65, v/v)] to give ellagic acid 4-O- α -L-arabinofuranoside (9.4 mg, 0.00019%). Fraction 6-4 (409.5 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] to give ellagic acid (10.0 mg, 0.00013%), and ellagic acid 4-O- α -L-arabinofuranoside (14.0 mg, 0.00019%). Fraction 6-5 (155.0 mg) was subjected to HPLC [MeOH-1% aqueous AcOH (35:65, v/v)] to give 6 (6.8 mg, 0.00009%), ellagic acid (5.0 mg, 0.00007%), and ellagic acid 4-O- α -L-arabinofuranoside (4.7 mg, 0.00006%).

Potentillanoside A (1 = 2 α ,19 α -dihydroxy-3-oxours-12-en-28-oic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester)

Amorphous powder, $[\alpha]_D^{26} + 20.4$ (c 1.14, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} - cm⁻¹: 3470, 1725, 1686, 1655, 1073; For ¹H and ¹³C NMR spectro-

Table 9
Inhibitory effects of potentillanoside A (**1**), pomolic acid (**7**), tormentic acid (**9**), rosamutin (**10**), and kaji-ichigoside F1 (**12**) on D-GalN/LPS-induced liver injuries in mice.

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	n	sAST		sALT	
			(Karmen Unit)	Inhibition (%)	(Karmen Unit)	Inhibition (%)
Normal (vehicle)	–	8	107 ± 9 ^b	–	20 ± 2 ^b	–
Control (D-GalN/LPS)	–	14	12579 ± 1795	–	7118 ± 1077	–
Potentillanoside A (1)	50	7	5670 ± 1817 ^a	55.0	3137 ± 1106 ^b	56.8
	100	8	2931 ± 959 ^b	76.8	1618 ± 568 ^b	78.4
Rosamutin (10)	50	6	9821 ± 2097	22.0	5434 ± 1163	24.0
	100	8	4386 ± 1339 ^a	65.2	2134 ± 684 ^b	71.1
Control (D-GalN/LPS)	–	12	10236 ± 1360	–	5595 ± 760	–
Pomolic acid (7)	50	7	6593 ± 1470	36.0	3998 ± 750	28.6
	100	8	6443 ± 1976	37.4	4338 ± 1477	22.5
Tormentic acid (9)	50	6	8505 ± 3212	17.1	5869 ± 2348	–4.9
	100	6	9733 ± 1710	5.0	5702 ± 1043	–1.9
Kaji-ichigoside F1 (12)	50	7	7365 ± 2434	28.3	4412 ± 1399	21.2
	100	8	4191 ± 681 ^a	59.7	2408 ± 449 ^a	57.2
Control (D-GalN/LPS)	–	10	6605 ± 1985	–	6033 ± 1647	–
Curcumin ^c	12.5	10	5024 ± 1189	24.0	4770 ± 1218	21.1
	25	10	3253 ± 981	50.9	3177 ± 979	47.8
	50	9	1916 ± 483 ^a	71.2	2220 ± 563 ^a	63.8

Each value represents the mean ± S.E.M.
Significantly different from the control.

^a $p < 0.05$.

^b $p < 0.01$.

^c Morikawa et al. (2002).

scopic data, see Tables 2 and 3; Positive-ion FABMS m/z : 671 [M+Na]⁺; HRFABMS m/z : 671.3767 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₆H₅₆O₁₀Na, 671.3771).

Potentillanoside B (2 = 3 α ,19 α -dihydroxy-2-oxours-12-en-28-oic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester)

Amorphous powder, $[\alpha]_D^{21} + 29.8$ (c 0.62, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3470, 1719, 1686, 1655, 1075; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 2 and 3; Positive-ion FABMS m/z : 671 [M+Na]⁺; HRFABMS m/z : 671.3764 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₆H₅₆O₁₀Na, 671.3771).

Potentillanoside C (3 = 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid 28-O-6-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl ester)

Amorphous powder, $[\alpha]_D^{21} + 12.8$ (c 0.13, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3470, 1721, 1686, 1655, 1076; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 2 and 3; Positive-ion FABMS m/z : 715 [M+Na]⁺; HRFABMS m/z : 715.4042 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₈H₆₀O₁₁Na, 715.4033).

Potentillanoside D (4 = 19 α -hydroxy-2,3-secours-12-en-2,3,28-trioic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester)

Amorphous powder, $[\alpha]_D^{28} + 22.6$ (c 0.15, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3470, 1725, 1655, 1075; ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 2 and 3; Positive-ion FABMS m/z : 703 [M+Na]⁺; HRFABMS m/z : 703.3676 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₆H₅₆O₁₂Na, 703.3669).

Potentillanoside E (5 = 19 α -hydroxy-2,3-secours-12-en-2,3,28-trioic acid 3-methyl-28-O- β -D-glucopyranosyl ester)

Amorphous powder, $[\alpha]_D^{29} + 22.2$ (c 0.13, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3470, 1720, 1655, 1075; For ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 2 and 3; Positive-ion FABMS m/z : 717 [M+Na]⁺; HRFABMS m/z : 717.3822 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₇H₅₈O₁₂Na, 717.3826).

Potentillanoside F (6 = 2 α ,3 β ,30-trihydroxy-olean-13-en-28-oic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester)

Amorphous powder, $[\alpha]_D^{24} + 46.9$ (c 0.10, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3400, 1725, 1655, 1073; ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data,

see Tables 2 and 3; Positive-ion FABMS m/z : 689 [M+Na]⁺; HRFABMS m/z : 689.3877 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₆H₅₈O₁₁Na, 689.3883).

NaBH₄ Reduction of potentillanosides A (1) and B (2)

To a solution of **1** (9.5 mg) in MeOH (1.0 mL) was added NaBH₄ (0.6 mg) and the mixture was stirred at 0 °C for 1 h. The reaction was quenched with acetone, and following removal of the solvent under reduced pressure gave a residue, which was purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, MeOH–1% aqueous AcOH (60:40, v/v)] to give rosamutin (**10**, 6.5 mg, 68.2%) and kaji-ichigoside F1 (**12**, 3.0 mg, 31.5%). In a similar manner, **12** (2.0 mg, 50.0%) and its 2-epimer (0.8 mg, 19.9%) were obtained from **2** (4.0 mg) using NaBH₄ (0.3 mg).

Acid hydrolysis of potentillanosides A (1), B (2), D (4), and F (6)

A solution of either **1**, **2**, **4** or **6** (each 2.0 mg) in 5% aqueous H₂SO₄–1,4-dioxane (1:1, v/v, 1.0 mL) was heated at 80 °C for 3 h. After being cooled, the reaction mixture was neutralized with Amberlite IRA-400 (OH⁻ form) and the resins were filtered. In each case removal of the solvent under reduced pressure gave a residue, which was partitioned in an EtOAc–H₂O (1:1, v/v) mixture to give an EtOAc-soluble fraction and an aqueous phase. The aqueous layer was subjected to HPLC analysis under following conditions: column, Kaseisorb LC NH₂-60-5, 4.6 mm i.d. × 250 mm (Tokyo Kasei Co., Ltd., Tokyo, Japan); detection, optical rotation [Shodex OR-2 (Showa Denko Co., Ltd., Tokyo, Japan); mobile phase, CH₃CN–H₂O (80:20, v/v); flow rate 1.0 mL/min]. Identification of D-glucose present in the aqueous layer was carried out by comparing the retention time and the optical rotation with the standard [*t*_R: 18.7 min (positive optical rotation)].

Deacetylation of potentillanoside C (3)

Solution of **3** (2.3 mg) in 0.5% NaOMe–MeOH (1.5 mL) was stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was neutralized with Dowex HCR-W2 (H⁺ form) and the resins were removed

by filtration. Evaporation of the solvent from the filtrate under reduced pressure gave a residue, which was purified by HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, MeOH–1% aqueous AcOH (60:40, v/v)] to give **10** (2.1 mg, 97.2%).

Alkaline hydrolysis of potentillanoside D (**4**)

A mixture of **4** (6.8 mg), 1,4-dioxane (1.0 mL) and 5% aqueous KOH (1.0 mL) was stirred at 80 °C for 1 h. After being cooled, the reaction mixture was neutralized with Dowex HCR W2 (H⁺ form), and the resins were removed by filtration. Removal of the solvent under reduced pressure gave a residue, which was partitioned in an EtOAc–H₂O (1:1, v/v) mixture to give an EtOAc-soluble fraction and an aqueous phase. The EtOAc-soluble fraction was subjected to HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, MeOH–1% aqueous AcOH (70:30, v/v)] to give cecropiacic acid (**17**, 5.1 mg, 98.5%).

Methylation of potentillanosides D (**4**) and E (**5**) with TMSCHN₂

A solution of **4** (3.3 mg) and trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂, 10% in hexane, ca. 0.2 mL) in MeOH (0.5 mL) was stirred at room temperature for 1 h. Removal of the solvent under reduced pressure gave **4a** (3.1 mg, 90.2%). In a similar manner, **5** (3.3 mg) was derived to **4a** (2.8 mg, 81.5%).

Compound **4a**

An amorphous powder, $[\alpha]_D^{25} + 7.2$ (c 0.32, MeOH); for ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data, see Tables 2 and 3; Positive-ion FABMS *m/z*: 731 [M+Na]⁺; HRFABMS *m/z*: 731.3979 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₈H₆₀O₁₂Na, 731.3982).

Bioassay

Reagents

LPS (from *Salmonella enteritidis*), minimum essential medium (MEM), and William's E medium were purchased from Sigma–Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA); fetal bovine serum (FBS) was from Life Technologies (Rockville, MD, USA); and other chemicals were from Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd. (Osaka, Japan). 96-Well microplates were purchased from Sumitomo Bakelite Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Animals

Male ddY mice were purchased from Kiwa Laboratory Animal Co., Ltd., (Wakayama, Japan). The animals were housed at a constant temperature of 23 ± 2 °C and were fed a standard laboratory chow (MF, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan). All the experiments were performed with conscious mice unless otherwise noted. The experimental protocol was approved by the Experimental Animal Research Committee of Kinki University.

Effects on D-GalN/LPS-induced liver injuries in mice

The method described by Tiegs et al. was modified and used for this study (Tiegs et al., 1989). Briefly, male ddY mice weighing about 25–30 g were fasted for 20 h before the experiment. D-GalN (350 mg/kg) and LPS (10 µg/kg) dissolved in saline were injected intraperitoneally to produce liver injuries. Each test sample was given orally 1 h before the D-GalN/LPS injection. Blood samples were collected from the infraorbital venous plexus 10 h after D-GalN/LPS injection. sAST and sALT levels were determined using Transaminase CII Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.). Hydrocortisone was used as a reference compound. Test samples were suspended with 5% arabic gum solution, and the suspension was administered orally at 10 mL/kg in each experiment, while the vehicle was given orally at 10 mL/kg in the corresponding control group.

Effects on cytotoxicity induced by D-GalN in primary cultured mouse hepatocytes

The hepatoprotective effects of the constituents were determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay using primary cultured mouse hepatocytes (Matsuda et al., 2009; Morikawa et al., 2010a). Hepatocytes were isolated from male ddY mice (30–35 g) by a collagenase perfusion method. A cell suspension at 4 × 10⁴ cells in 100 µL William's E medium containing FBS (10%), penicillin G (100 units/mL), and streptomycin (100 µg/mL) was inoculated in a 96-well microplate and pre-incubated for 4 h at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. After pre-incubation, 100 µL of fresh medium containing D-GalN (2 mM) with or without the test sample was added to the medium. After 44 h incubation, the medium was exchanged with 100 µL of fresh medium, and 10 µL of MTT [5 mg/mL in phosphate buffered saline (PBS(-))] solution was added to the medium. After 4 h incubation, the medium was removed, and 100 µL of isopropanol containing 0.04 M HCl was added to dissolve formazan produced in the cells. The optical density (O.D.) of the formazan solution was measured by microplate reader at 570 nm (reference: 655 nm). Inhibition (%) was obtained by following formula.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{[(\text{O.D. (sample)} - \text{O.D. (control)}) / (\text{O.D. (normal)} - \text{O.D. (control)})] \times 100}$$

Effects on production of NO in LPS-activated mouse peritoneal macrophages

Screening tests for NO production using TGC-induced mouse peritoneal macrophages were performed as described previously (Matsuda et al., 2009). Briefly, peritoneal exudate cells were collected from the peritoneal cavities (100 µL) of male ddY mice and were suspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, penicillin G (100 units/mL) and streptomycin (100 µg/mL), and pre-cultured in 96-well microplates (5 × 10⁵ cells/well) at 37 °C in 5% CO₂ in air for 1 h. Nonadherent cells were removed by washing with PBS(-), and the adherent cells (10 µg/mL) were cultured in 200 µL of a fresh medium containing LPS and various concentrations of test compounds for 20 h. NO productions in each well were assessed by measuring the accumulation of nitrite (NO₂⁻) in the culture medium using Griess reagent. Cytotoxicity was determined by the MTT colorimetric assay, after 20 h incubation with test compounds. Each test compound was dissolved in DMSO, and the solution was added to the medium (final DMSO concentration was 0.5%). N^G-Monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) were used as reference compounds. Inhibition (%) was calculated using the following formula (N = 4).

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{[(A - B) / (A - C)] \times 100}$$

A–C: NO₂⁻ concentration (µM) [A: LPS (+), sample (-); B: LPS (+), sample (+); C: LPS (-), sample (-)].

Inhibitory effects against TNF-α-induced cell death in L929 cells

L929 cells (RIKEN) were maintained in a Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma–Aldrich) containing 10% FBS, 1% MEM Non-Essential Amino acids (Invitrogen), penicillin G (100 units/mL), and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. Cells were inoculated in a 96-well tissue culture plate [5 × 10³ cells/well in 100 µL/well in MEM]. After 20 h incubation, 100 µL/well of medium containing TNF-α (2 ng/mL) and a test sample. After 44 h incubation, viability of the cells was assessed by the MTT colorimetric assay (*vide ante*) (Matsuda et al., 2009; Morikawa et al., 2010a). Each test compound was dissolved in DMSO, and the solution was added to the medium (final concentration in DMSO 0.5%).

Statistics

Values are expressed as means \pm S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test was used for statistical analysis. Probability (*p*) values less than 0.05 were considered significant.

Acknowledgement

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Numbers 24590037 and 24590153.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.002>.

References

- Abe, F., Yamauchi, T., 1987. Glycosides of 19 α -hydroxyoleanane-type triterpenoids from *Trachelospermum asiaticum* (Trachelospermum. IV). *Chem. Pharm. Bull.* 35, 1833–1838.
- Amimoto, K., Yoshikawa, K., Arihara, S., 1992. Triterpenoid saponins of aquifoliaceous plants. VIII. Ilexosides XXIX–XXXII from the leaves of *Ilex rotunda* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 3138–3141.
- Bokern, M., Heuer, S., Wray, V., Witte, L., Macek, T., Vanek, T., Strack, D., 1991. Ferulic acid conjugates and betacyanins from cell cultures of *Beta vulgaris*. *Phytochemistry* 30, 3261–3265.
- Chen, J.-R., Yang, Z.-Q., Hu, T.-J., Yan, Z.-T., Niu, T.-X., Wang, L., Cui, D.-A., Wang, M., 2010. Immunomodulatory activity *in vitro* and *in vivo* of polysaccharide from *Potentilla anserina*. *Fitoterapia* 81, 1117–1124.
- Chu, L., Wang, L., Zhang, Z., Gao, H., Huang, J., Sun, B., Wu, L., 2008. Studies on the chemical constituents of *Potentilla anserina* L. *Zhongguo Xiandai Zhongyao* 10, 10–12.
- D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Monaco, P., Pacifico, S., 2005. Radical-scavenging activities of new hydroxylated ursane triterpenes from cv. Annurca apples. *Chem. Biodivers.* 2, 953–958.
- Davis, A.L., Cai, Y., Davies, A.P., Lewis, J.R., 1996. ¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols. *Magn. Reson. Chem.* 34, 887–890.
- Fehér, J., Deák, G., Múzes, G., Láng, I., Niederland, V., Nékám, K., Kárteszi, M., 1989. Liver-protective action of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases. *Orv. Hetil.* 130, 2723–2727.
- Freudenberg, M.A., Galanos, C., 1991. Tumor necrosis factor- α mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in *D*-galactosamine-treated mice. *Infect. Immun.* 59, 2110–2115.
- Gouda, Y.G., Abdel-Baky, A.M., Mohamed, K.M., Darwish, F.M., Kasai, R., Yamasaki, K., 2006. Phenylpropanoid and phenylethanoid derivatives from *Kigelia pinnata* DC. fruits. *Nat. Prod. Res.* 20, 935–939.
- Guang-Yi, L., Gray, A.L., Waterman, P.G., 1989. Pentacyclic triterpenes from the fruits of *Rosa sterilis*. *J. Nat. Prod.* 52, 162–166.
- Hübner, G., Wray, V., Nahrstedt, A., 1999. Flavonol oligosaccharides from the seeds of *Aesculus hippocastanum*. *Planta Med.* 65, 636–642.
- Jia, Z.-J., Liu, X.-Q., Liu, Z.-M., 1993. Triterpenoids from *Sanguisorba alpina*. *Phytochemistry* 32, 155–159.
- Josephs, M.D., Bahjat, F.R., Fukuzuka, K., Ksontini, R., Solorzano, C.C., Edwards 3rd., C.K., Tannahill, C.L., MacKay, S.L., Copeland 3rd., E.M., Moldawer, L.L., 2000. Lipopolysaccharide and *D*-galactosamine-induced hepatic injury is mediated by TNF- α and not by Fas ligand. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1196–R1201.
- Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., 1986. Tannins and related compounds. XLV. Rhubarb. (5). Isolation and characterization of flavan-3-ol and procyanidin glucosides. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 3208–3222.
- Khac, D.D., Tran-Van, S., Martha, A., Lallemand, J.-Y., Fetizon, M., 1990. Ellagic compounds from *Diplolanax stachyanthus*. *Phytochemistry* 29, 251–256.
- Khalid, S.A., Yagi, S.M., Khristova, P., Duddeck, H., 1989. (+)-Catechin-5-galloyl ester as a novel natural polyphenol from the bark of *Acacia nilotica* of Sudanese origin. *Planta Med.* 55, 556–558.
- Kombal, R., Glasl, H., 1995. Flavan-3-ols and flavonoids from *Potentilla anserina*. *Planta Med.* 61, 484–485.
- Kourouki, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Mukasa, T., Tsuru, T., Momoi, M.Y., Momoi, T., 2000. Localization of active form of caspase-8 in mouse L929 cells induced by TNF treatment and polyglutamine aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 972–977.
- Kuang, H.-X., Kasai, R., Ohtani, K., Liu, Z.-S., Yuan, C.-S., Tanaka, O., 1989. Chemical constituents of pericarps of *Rosa davurica* Pall., a traditional Chinese medicine. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 2232–2233.
- Li, Q., Hui, J., Shang, D., Wu, L., Ma, X., 2003. Investigation of the chemical constituents of the roots of *Potentilla anserina* L. in Tibet. *Chin. Pharm. J.* 55, 179–184.
- Lontsi, D., Sondengam, B.L., Ayafor, J.F., Connolly, J.D., 1987. *Tetrahedron Lett.* 28, 6683–6686.
- Matsuda, H., Ninomiya, K., Morikawa, T., Yasuda, D., Yamaguchi, I., Yoshikawa, M., 2009. Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: structural requirements, mode of action, and new amide. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7313–7323.
- Möhle, B., Heller, W., Wellmann, E., 1985. UV-induced biosynthesis of quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide in dill cell cultures. *Phytochemistry* 24, 465–467.
- Morikawa, T., Imura, K., Miyake, S., Ninomiya, K., Matsuda, H., Yamashita, C., Muraoka, O., Hayakawa, T., Yoshikawa, M., 2012. Promoting the effect of chemical constituents from the flowers of *Poa cynosuroides* on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Nat. Med.* 66, 39–48.
- Morikawa, T., Matsuda, H., Ninomiya, K., Yoshikawa, M., 2002. Medicinal foodstuffs. XXIX. Potent protective effects of sesquiterpenes and curcumin from *Zedoariae* rhizome on liver injury induced by *D*-galactosamine/lipopolysaccharide or tumor necrosis factor- α . *Biol. Pharm. Bull.* 25, 627–631.
- Morikawa, T., Oominami, H., Matsuda, H., Yoshikawa, M., 2011. New terpenoids, olibanumols D–G, from traditional Egyptian medicine, olibanum, the gum-resin of *Boswellia carterii*. *J. Nat. Med.* 65, 129–134.
- Morikawa, T., Pan, Y., Ninomiya, K., Imura, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Yuan, D., Muraoka, O., 2010a. Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 1882–1890.
- Morikawa, T., Pan, Y., Ninomiya, K., Imura, K., Yuan, D., Yoshikawa, M., Hayakawa, T., Muraoka, O., 2010b. Iridoid and acyclic monoterpene glycosides, kankanosides L, M, N, O, and P from *Cistanche tubulosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 58, 1403–1407.
- Nawwar, M.A.M., Buddrus, J., Bauer, H., 1982. Dimeric phenolic constituents from the roots of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry* 21, 1755–1758.
- Nawwar, M.A.M., Hussein, S.A.M., Merfort, I., 1994. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. *Phytochemistry* 36, 793–798.
- Pan, Y., Morikawa, T., Ninomiya, K., Imura, K., Yuan, D., Yoshikawa, M., Muraoka, O., 2010. Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XXXVI. Four new acylated phenylethanoid oligoglycosides, kankanosides J₁, J₂, K₁, and K₂, from stems of *Cistanche tubulosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 58, 575–578.
- Schimmer, O., Lindenbaum, M., 1995. Tannins with antimutagenic properties in the herb of *Alchemilla* species and *Potentilla anserina*. *Planta Med.* 61, 141–145.
- Seto, T., Tanaka, T., Tanaka, O., Naruhashi, N., 1984. β -Glucosyl esters of 19 α -hydroxyursolic acid derivatives in leaves of *Rubus* species. *Phytochemistry* 23, 2829–2834.
- Skotková, N., Krecman, V., 1998. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug. *Physiol. Res.* 47, 1–7.
- Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Ito, H., Hatano, T., Sakagami, H., Tokuda, H., Nishino, H., Sugita, D., Shimura, S., Yoshida, T., 2002. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry* 59, 315–323.
- Tiegs, G., Wolter, M., Wendel, A., 1989. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 38, 627–631.
- Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., Yao, J., 2010. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydr. Polym.* 80, 84–93.
- Webby, R.F., 1991. A flavonol triglycoside from *Actinidia arguta* var. *giraldii*. *Phytochemistry* 30, 2443–2444.
- Xia, L., You, J., 2011. The determination of amino acids composition of the traditional food *Potentilla anserina* L. root by high-performance liquid chromatography via fluorescent determination and mass spectrometry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 1164–1170.
- Xie, H., Morikawa, T., Matsuda, H., Nakamura, S., Muraoka, O., Yoshikawa, M., 2006. Monoterpene constituents from *Cistanche tubulosa* – chemical structures of kankanosides A–E and kankanol-. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 669–675.
- Xie, Y., Morikawa, T., Ninomiya, K., Imura, K., Muraoka, O., Yuan, D., Yoshikawa, M., 2008. Medicinal flowers. XXIII. New taraxastane-type triterpene, punicanolic acid, with tumor necrosis factor- α inhibitory activity from the flowers of *Punica granatum*. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 1628–1631.
- Yagi, A., Okamura, N., Haraguchi, Y., Noda, K., Nishioka, I., 1978. Studies on the constituents of *Zizyphi fructus*. I. structure of three new *p*-coumaroylates of aliphatic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 26, 1798–1802.
- Ye, L., Yang, J.S., 1996. New ellagic glycosides and known triterpenoids from *Duchesnea indica* Focke. *Acta Pharm. Sin.* 31, 844–848.
- Yoshikawa, M., Matsuda, H., Morikawa, T., Xie, H., Nakamura, S., Muraoka, O., 2006. Phenylethanoid oligoglycosides and acylated oligosugars with vasorelaxant activity from *Cistanche tubulosa*. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 7468–7475.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., 2001. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3651–3655.
- Zhao, Y.-L., Cai, G.-M., Hong, X., Shan, L.-M., Xiao, X.-H., 2008. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserina* L. *Phytomedicine* 15, 253–258.
- Zhou, X.-H., Kasai, R., Ohtani, K., Tanaka, O., Nie, R.-L., Yang, C.-R., Zhou, J., Yamasaki, K., 1992. Oleanane and ursane glucosides from *Rubus* species. *Phytochemistry* 31, 3642–3644.

IV. 医薬品戦略相談対面助言申込書

(別添1)

独立行政法人医薬品医療機器総合機構審査等業務関係業務方法書実施細則(平成16年細則第4号)の様式第28号

医薬品戦略相談対面助言申込書

処 理 欄

担当分野	第一分野
被験薬の名称又は識別記号(成分記号)	KO12
予定される一般名称等(医薬品の成分名)	ペプチド
投与経路/剤形	点滴静注/注射剤
品質及び安定性等に関する情報	相談なし
予定される薬効分類	その他の組織細胞機能用医薬品(490)
予定される効能又は効果	難治性皮膚潰瘍治療
予定される治験の目的	健常人における安全性、忍容性の検討/第I相試験
手数料の区分	<input checked="" type="checkbox"/> 医薬品戦略相談 <input type="checkbox"/> 医薬品戦略相談(別に定める要件を満たす大学・研究機関、ベンチャー企業)
相談内容の概略	治験実施計画書の妥当性について助言をお願いしたい
相談内容の種類	①First-in-human試験
治験実施計画作成時に助言を得た専門家の氏名及び所属	大阪大学医学部附属病院 再生誘導医学寄付講座 玉井 克人
同一医薬品についての過去の対面助言(治験相談を含む)	なし
主要先進国における承認状況	海外における承認事例なし
添付資料一覧	相談事項要旨
本申込みの担当者氏名、所属及び連絡先(電話、ファクシミリ、メールアドレス)	氏名:松本 梓 所属:大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部未来医療センター 電話番号:06-6210-8289、ファクシミリ番号:06-6210-8301 メールアドレス:azusa-matsumoto@dmi.med.osaka-u.ac.jp
備 考	希少疾病用医薬品指定申請を検討中 自らが実施する治験 対面助言実施日時 日程調整の結果、平成27年2月23日14時から第一分野の対面助言実施予定

上記により対面助言を申込みます。

平成 27年 1月 6日

住 所 大阪府吹田市山田丘2-2

氏 名 〒565-0871 大阪大学医学部附属病院未来医療開発部

特任准教授 彦惣 俊吾

〒999999888

独立行政法人医薬品医療機器総合機構
審査センター長 殿



V. KOI2 : 対面助言相談事項要旨

KOI2 : 対面助言相談事項要旨

目次

1. 研究の経緯
2. 対象疾患について
3. 治験薬について
4. 薬理作用について
5. 安全性試験について
6. 吸収・分布・代謝・排泄
7. 医師主導治験の概要
8. 相談事項

1. 研究の経緯

生体内に存在する幹細胞を利用した医療としてすでに確立している造血幹細胞移植（骨髄移植等）に加えて、新しい先進医療として間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells; MSC) 移植治療の開発が進められつつある。骨髄 MSC を生体内損傷組織に移植する基礎研究から、骨髄 MSC は中胚葉由来組織である骨、軟骨、脂肪に加えて、外胚葉由来組織である神経や表皮にも分化できる多能性幹細胞としての性質を持つ可能性が示され、さらに種々の抗炎症分子、血管新生因子を放出して炎症を抑制的に制御しつつ組織再生を誘導することが明らかにされている。これらの基礎研究成果を基にして、心筋梗塞、脳梗塞、脊髄損傷や移植片対宿主反応 (GVHD) に罹患した患者に対する自家または他家骨髄由来培養 MSC の移植臨床研究が進められており、その有効性が示されつつある。

しかしながら、骨髄 MSC 移植を実施するためには GMP レベルでの細胞培養を保証する特殊な培養設備が必要であり、限られた医療機関でのみ実施可能な医療である。また、骨髄血採取は侵襲を伴う医療行為であり、特に他家移植の場合はドナーを得ることも容易ではない。また、十分量の MSC を得るためには数週間におよぶ細胞培養期間が必要であり、脳梗塞や心筋梗塞の急性期に対する迅速な移植は不可能である。これらの問題点を解決し、かつ骨髄 MSC の持つ多くの長所を生かした治療を可能にする新たな方法論の開発が必要である。

我々は、核内の遺伝子発現調節タンパクである high mobility group box 1 (HMGB1) が、重度の生体組織損傷時に血中に大量放出され、骨髄内 MSC を刺激して血中へ動員し、さらに損傷組織特異的に骨髄 MSC を集積させて、MSC の持つ抗炎症、血管新生能、多分化能により、損傷組織の再生を誘導するという、これまで全く知られていなかった「HMGB1

による骨髄 MSC の血中動員」という新しい再生誘導機構を発見した。具体的には、皮膚基底膜領域の接着分子遺伝子異常により生下時より全身皮膚が剥離して全身熱傷様の症状を呈する遺伝性皮膚難病「表皮水疱症」における剥離表皮の再生機序の解明を目的とする研究の過程で、剥離表皮内の壊死細胞から血中に放出される HMGB1 が骨髄中に存在する platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α) 陽性細胞を刺激して血中に動員し、剥離表皮部への集積を誘導していること、さらに剥離表皮部に集積した PDGFR α 陽性細胞は線維芽細胞や表皮細胞に分化して損傷皮膚の再生に強く寄与していることを、green fluorescent protein (GFP) トランスジェニック骨髄細胞を移植した表皮水疱症モデルマウスを用いることにより明らかにした。

さらに、HMGB1 により血中動員された PDGFR α 陽性 MSC の損傷部皮膚集積メカニズムを探索し、損傷皮膚内血管内皮細胞から産生されるケモカイン CXCL12 が、その受容体 CXCR4 を表面に持つ末梢循環 MSC を損傷部特異的に集積させていることを見出した (unpublished data)。そこで、CXCR4 阻害剤である AMD3100 を投与して表皮水疱症モデルマウス皮膚再生過程における骨髄由来 MSC の皮膚集積を阻害し、その影響を検討した。その結果、AMD3100 投与群では非投与群と比較して著しい皮膚再生障害が観察されたことから、HMGB1 により血中動員された MSC は表皮水疱症皮膚を始めとする損傷組織障害の修復に極めて重要な役割を担っていることが示された。

骨髄内 PDGFR α 陽性細胞は骨、軟骨、脂肪への分化能を持つ、いわゆる MSC としての性質を持つこと、さらに、PDGFR α 陽性 MSC には神経や上皮にも分化可能な多能性幹細胞としての性質を持つ細胞分画が含まれることが明らかになりつつある。即ち、HMGB1 投与により骨髄内 PDGFR α 陽性 MSC を末梢循環に動員し、損傷組織への集積を促進することで、間葉系のみならず上皮系、神経系組織損傷の再生を誘導する画期的な治療薬の開発が期待される。実際に、糖尿病モデルマウス (db/db マウス) 背部に全層皮膚欠損を作成した難治性皮膚潰瘍モデルマウスに対して組換え HMGB1 蛋白 10 μ g を連日 5 日間静脈内投与し、上皮化癒促進効果、瘢痕抑制効果、骨髄由来 MSC 集積効果について、生理食塩液投与群と比較検討した。その結果、HMGB1 蛋白投与群では潰瘍部皮膚に骨髄由来 MSC が集積し、上皮化促進効果、瘢痕抑制効果が確認された。

しかしながら、HMGB1 は分子内にエンドトキシンの 1 つである lipopolysaccharide (LPS) との結合ドメインを有すること、LPS と結合した HMGB1 は Toll-like receptor (TLR) を活性化して強い炎症反応を喚起することが知られている。このことは、HMGB1 蛋白を医薬品として開発する過程で求められる安全性保証にとり、大いに懸念材料となることが容易に予想される。そこで、HMGB1 の骨髄内 PDGFR α 陽性細胞活性化ドメインを探索し、TLR を刺激せずに PDGFR α 陽性細胞を血中に動員する HMGB1 ペプチド医薬の探索を進めた。具体的には、HMGB1 分子内の少しずつオーバーラップするさまざまなペプチド断片を合成し、それぞれのペプチドの PDGFR α 陽性骨髄 MSC 培養株に対する細胞遊走活性化能 (マイグレーション活性) の評価を試みた。その結果、我々は PDGFR α 陽性

細胞動員活性を有するペプチド断片の同定に成功し、そのなかから本開発候補物（開発コード KOI2）を選択した。当初の期待通り、KOI2 のアミノ酸配列は LPS 結合ドメインを含まず、より安全な医薬品の開発が可能になる。また、全長が約 200 アミノ酸からなる HMGB1 タンパク質に対し、KOI2 は分子量が 5 分の 1 程度のペプチドであり、化学的合成による製造が可能であるため、医薬品として製造する場面において、精製純度の向上、安定生産、コスト削減が期待されるようになった。

そこで我々は、難治性皮膚潰瘍に対する KOI2 の静脈内投与の有効性を検証した。具体的には、成皮弁形成によるラット末梢循環不全性皮膚潰瘍モデルに対する KOI2 投与の潰瘍上皮化促進効果を証明、さらに、表皮水疱症モデルマウス（VII 型コラーゲン低形成マウス）に対して尾静脈から KOI2 を投与し、生存率および体重増加率が改善されることを確認した。

これらの研究成果を背景として、現在我々は大阪大学早期探索的臨床試験拠点整備事業の重点研究として、末梢循環不全を伴う難治性皮膚潰瘍治療薬として KOI2 の医薬開発を進めている。具体的には、表皮水疱症、膠原病性潰瘍、糖尿病性潰瘍、動脈硬化性潰瘍など、先天的または後天的異常により癒痕、慢性炎症、免疫異常による末梢循環不全により生じる難治性皮膚潰瘍に対し、KOI2 の静脈内投与により潰瘍部及びその周囲に骨髄由来 MSC の集積を誘導し、MSC の持つ抗炎症作用、癒痕抑制作用、血管新生作用を利用して、機能的組織再生を誘導する。

特定の疾患メカニズムに作用する従来の医薬品と異なり、KOI2 は幅広い適応症が想定できる。実際に我々は KOI2 の投与により、皮膚潰瘍以外に、脳梗塞、心筋梗塞、脊髄損傷など、種々の損傷組織の治癒を促進することを、疾患モデル動物を用いた実験により見出している。

2. 対象疾患について

表皮水疱症は、皮膚基底膜領域の接着関連分子の遺伝的機能不全により、日常生活の軽微な外力で水疱・潰瘍を形成する遺伝性水疱性皮膚疾患の総称である。水疱形成部位により単純型（表皮内水疱）、接合部型（表皮・基底膜間水疱）、栄養障害型（基底膜直下の真皮内水疱）の 3 病型に分類される。

1994 年の厚生省稀少難治性皮膚疾患調査研究班の全国調査による表皮水疱症の推定患者数は 500~640 人である（接合部型：7%、栄養障害型：54%）。一方米国では国家水疱症登録制度があり、約 2000 人が登録されている。しかし、近年新たな表皮水疱症病型の存在が報告されつつあり、また 10 代以降に症状が顕在化する栄養障害型の特殊病型（痒疹型）も少なからず報告されており、日米共に、登録されていない症例が多数存在すると考えられる。

単純型表皮水疱症は表皮基底細胞の細胞骨格タンパクであるケラチン 5/14 の遺伝子異常により発症し、表皮基底細胞が断裂して表皮内に水疱・びらんを形成する。生命予後は良

好で、軽症型は経過と共に水疱形成部位が限局性となって軽快傾向を示すことも稀ではないが、重症型は全身皮膚の水疱形成が一生涯続き、さらに手掌・足底に著明な角化を生じて著しいQOLの低下を来す。ケラチン5/14遺伝子異常による単純型は基本的に優性遺伝形式をとる。一方、表皮基底細胞底面の細胞膜上に局在し、表皮基底細胞と基底膜間の接着構造であるヘミデスモゾーム構成タンパクで、ケラチン5/14と結合するプレクチンやBP230の遺伝子異常では、極めて稀な劣性遺伝形式をとる単純型表皮水疱症を発症する。特にプレクチン遺伝子異常では、経過中に筋ジストロフィー症状を合併する。

接合部型表皮水疱症は、ヘミデスモゾーム構成膜貫通タンパクである $\alpha 6 \beta 4$ インテグリン、XVII型コラーゲン(BP180)、基底膜構成タンパクであるラミニン332のいずれかの遺伝子異常により発症し、表皮-基底膜間が剥離して水疱、潰瘍を形成する。ラミニン332の欠損により発症するHerliz型は表皮水疱症の中でも最重症型であり、生後1年以内に殆どの症例が死亡する。 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンの欠損では、全身の水疱・潰瘍形成に加えて胃の幽門閉鎖を合併し(幽門閉鎖型)、やはり致死性となることが少なくない。一方XVII型コラーゲン欠損による病型(non-Herliz型)は生命予後こそ良いものの、頭頂部脱毛、著明な歯のエナメル質形成不全を合併し、QOLは著しく低い。いずれの病型も劣性遺伝形式をとる。

栄養障害型表皮水疱症は、基底膜と真皮間の接着構造である係留線維を構成するVII型コラーゲンの遺伝子異常により発症する。基底膜直下で真皮内に水疱・潰瘍を形成し、治癒後の著明な瘢痕形成と爪甲の変形・脱落を特徴とする。優性遺伝形式と劣性遺伝形式の両者があり、優性型は比較的軽症例が多く、劣性型は遺伝子変異の種類により軽症例から重症例まで臨床症状の幅が広い。最重症例では比較的早期に手指の棍棒状癒着、著明な食道狭窄、有棘細胞癌の合併を来し、生命予後が悪い事も少なくない。上述した病型のうち、接合部型、栄養障害型は厚生労働省の指定する特定疾患である。

表皮水疱症の根治的治療法は未だない。上述したように、症状の進行に伴い全身皮膚に水疱・潰瘍を形成して全身熱傷と同様の病態を呈する。重症接合部型では生後数ヵ月で殆どの症例が死亡し、重症劣性栄養障害型 劣性栄養障害型 劣性栄養障害型 は手指の棍棒状癒着、食道狭窄、皮膚有棘細胞癌を高率に合併する極めて重篤かつ悲惨な遺伝性皮膚疾患である。本症に対する根治的治療法開発のための本臨床研究は、難病に苦しむ患者さんを救うために、喫緊の課題である。

3. 治験薬について

KOI2はアミノ酸44残基からなるペプチドであり、分子量は約5000である。原薬は白色の塊状又は粉末の凍結乾燥品であり、 -20°C の保存で安定性試験実施中である。

製剤は凍結乾燥した原薬をバイアルに充填し、注射用蒸留水にて溶解後凍結保存し、用事に生理食塩水にて希釈し、静脈内へ点滴投与する。

4. 薬理作用について

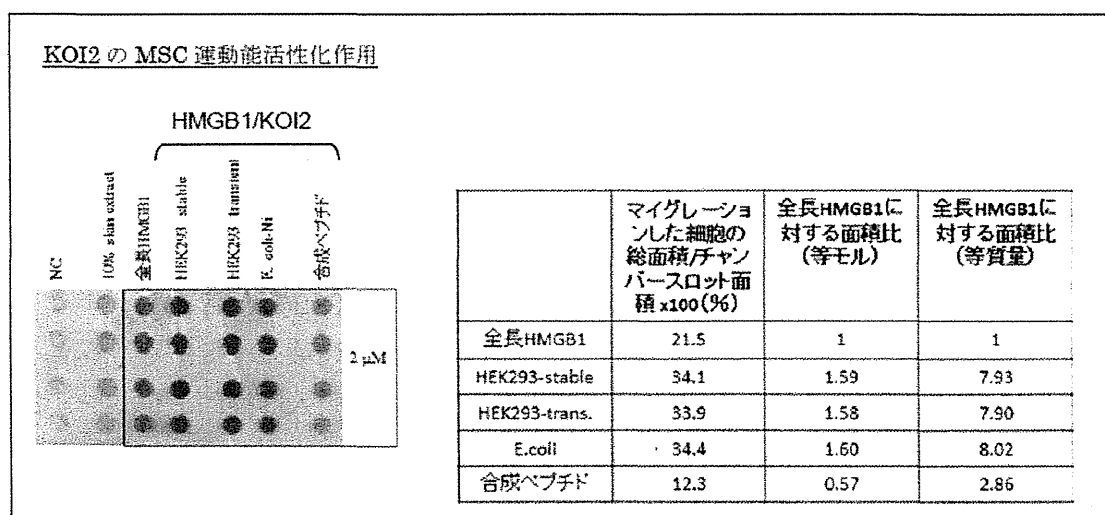
4.1. KOI2の骨髄MSCの運動能活性化作用

【方法】 HMGB1タンパクおよびKOI2の骨髄MSCに対する運動能活性化作用の検討をおこなった。

大阪大学にて樹立したマウスPDGFR α 陽性骨髄MSC株、MSC-1細胞 (Tamai *et al*, PNAS, 2011) をディッシュからトリプシンを使用して4°C、1200rpm、10分の遠心により回収した。ペレットをほぐし、細胞濃度が2.0~3.0 $\times 10^6$ 個/mlになるように、10% fetal bovine serum (FBS) 含Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) を加え混濁した。HMGB1タンパクおよびKOI2を10% FBS含D-MEMに希釈した。陰性コントロールとしてはphosphate buffered saline (PBS) を使用した。アクリル製ボイデンチャンバーを使用し、上層には3 $\times 10^6$ 個/mlに調製されたMSC-1細胞、下層には希釈したHMGB1タンパクもしくはKOI2を入れた。底板の上に8 μ m 孔のポリカーボネートメンブレン (Neuro Probe, Inc.) を載せて、さらに上板を載せてネジでしっかり止めた。チャンバーは37°C、5% CO₂のインキュベーター内で静置した。4時間後チャンバーのメンブレンを回収し、Diff-Quick (Sysmex) を用いて、膜の孔を通り抜け下層に向かってマイグレーションした細胞を染色により検出し、ケモタキシスチャンバーの孔の面積とマイグレーションした細胞の面積を、画像解析ソフトを用いて計測した。

【結果と考察】 等モルあたりではHMGB1に対して化学合成したKOI2は0.57倍の活性であったが、等質量あたりでは2.86倍の高い活性を示した (図1)。

図1. KOI2とHMGB1によるMSC運動能活性化



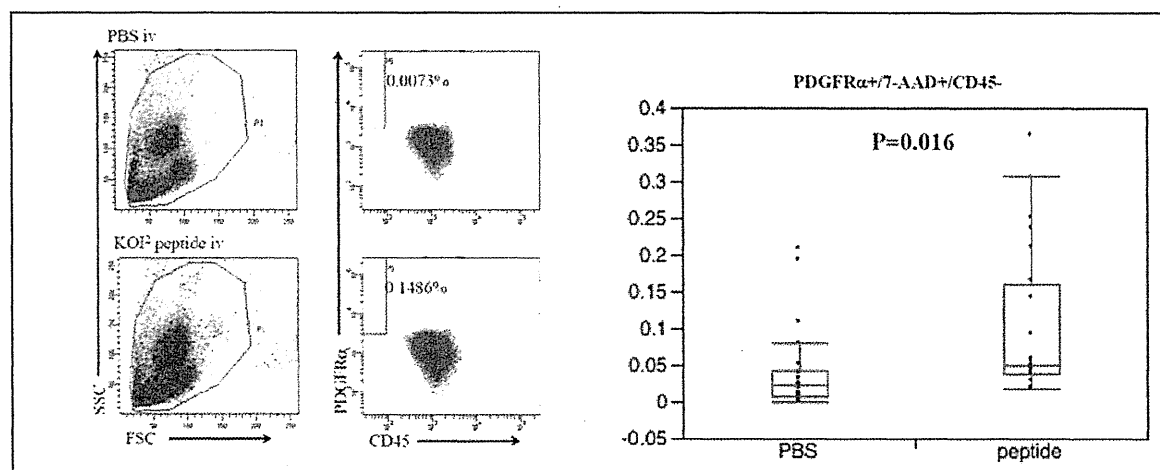
4.2. KOI2の骨髄MSC血中動員活性

【方法】 KOI2静脈投与による、マウス骨髄内PDGFR α 陽性MSCの末梢血動員活性を測定した。

C57BL/6系雌性マウス（8週齢）の尾静脈から10 µgのKOI2を0.2 ml の生理食塩液に希釈し30ゲージ針付きシリンジを用いて投与した。陰性コントロールには同量のPBS（Nacalai Tesque）を投与した。12時間後イソフルランによる全身麻酔下で左心室から末梢血液を採血した。3 mlのPBSを加えた後、Ficoll-Paque Plus（GE Healthcare）3 mlを重層した。遠心機を用い複数回の遠心操作を行い、沈殿した単核細胞を回収した。回収した単核細胞を丸底96 well プレートに、 1×10^6 個/100 µl（2% FBS 含PBS）で調製した。PE-mouse CD140a (PDGFR α)（BD Bioscience）もしくはFITC-mouse CD44（BD Bioscience）を、それぞれ単核細胞の入ったウェルに1 µlずつ加え遮光し20分間4°Cでインキュベートした。PBS 200 µlずつ加え、1500rpm、4°Cで10分間遠心を行った。上精を捨て再度PBS 200 µlずつ加え、1500rpm、4°Cで10分間遠心を行った。PBS 100 µlに細胞を懸濁後、1%パラホルムアルデヒド300 µlを加えた。なおイソタイプコントロール用抗体を使用して同様にコントロールを作製した。FACSCant™ IIを使用して上記で調製した細胞の解析を行った。

【結果と考察】 陰性コントロール群（生理食塩液投与群）と比較して、KOI2投与群では有意差（ $P=0.016$ ）を持って末梢血中のPDGFR α 陽性細胞の割合が増加した（図2）。

図2. KOI2の静脈内投与によるマウス血中PDGFR α 陽性細胞増加



4.3. 末梢循環不全性難治性皮膚潰瘍ラットモデルに対するKOI2の治療効果

【方法】 HMGB1タンパクおよびKOI2について、皮膚の阻血性壊死組織に対する治療効果を測定した。SD系雄性ラット（8週齢）をイソフルランによる吸入麻酔によって十分な麻酔を施行した後、背部に横3cm縦7cmの短冊状の皮膚切開を作製した。ただし、頭側の一边は切除せず、皮膚は皮下の組織から十分に遊離した。切開した3辺を周囲の皮膚と4号絹糸を用いて縫合し、テガダーム（スリーエム）を使用して保護し細菌感染を予防した。ラットにHMGB1タンパク（100 µg/回/日）、KOI2（50 µg/回/日）を、手術後6時間を初回として以後24時間ごとに計5回、薬剤をリン酸緩衝液で200 µlに希釈し尾静脈から投与した。陰性コントロールにはPBSを投与した。

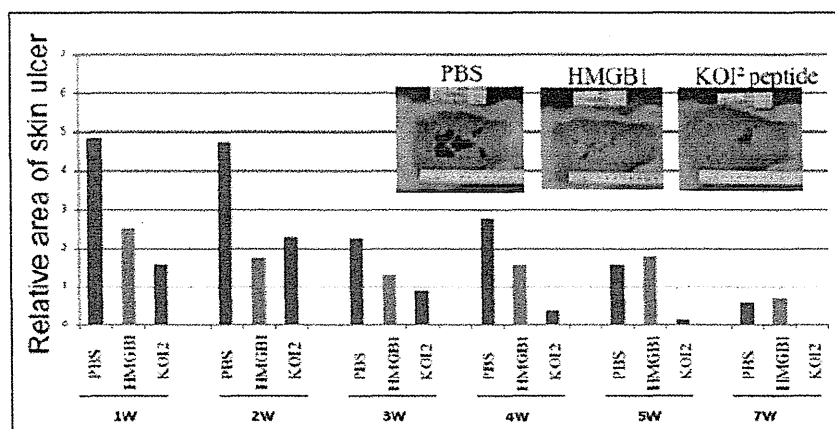
1週間後、テガダームを除去し1週ごとに創傷部位を観察した。壊死部分、潰瘍形成部分の面積を測定した。

【結果と考察】 手術1週後に陰性コントロール群では5匹中4匹に皮膚壊死が発生した。HMGB1投与群では5匹中3匹で皮膚壊死が発生した。KOI2投与群では5匹中1匹で皮膚壊死が発生した。手術7週後には陰性コントロール群では5匹中4匹において皮膚の強い拘縮が起きているのに対し、全長HMGB1投与群では5匹中3匹で、KOI2投与群では5匹中2匹で拘縮が認められた。

HMGB1投与群およびKOI2投与群で1週間後の壊死組織の縮小効果を認め、KOI2投与群ではより顕著な縮小効果が認められた。1週間後、2週間後、3週間後では創傷面積がいずれもネガティブコントロール群の半分の面積に縮小していた。3週間後以降はKOI2投与群が他の2群に比較してさらに創傷面積が縮小していた。7週間の治癒過程においても、KOI2投与群の方がより創傷面積が小さい傾向にあった。7週間後の創傷部分の拘縮においてもKOI2投与群がもっとも拘縮が軽度であった（図3）。

骨髄 MSC は低酸素状態における皮膚細胞の増殖を促進することが知られており、HMGB1 や KOI2 によって動員された骨髄 MSC が皮弁作製によって生じた低栄養、低酸素による皮膚壊死の拡大を抑制し、創傷治癒を促進したと予想された。この結果から、臨床では皮膚の疎血、外傷、手術による損傷の拡大などを抑制する KOI2 の薬理効果が期待される。

図 3. KOI2 投与による難治性皮膚潰瘍治癒促進効果



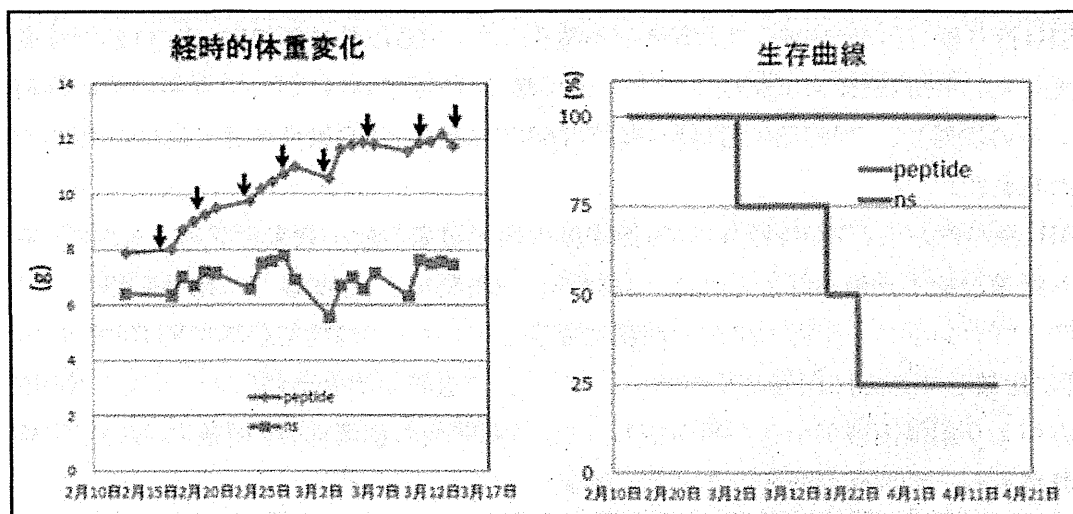
4.4.表皮水疱症モデルマウスに対するKOI2の治療効果

【方法】 KOI2 10 μ g/50 μ l生理食塩液を表皮水疱症モデルマウス（VII型コラーゲン低形成マウス）（n=4）の尾静脈から週2回、4週間（計8回）投与し、体重増加率および生存率の経時的变化について生理食塩液単独投与群（n=4）と比較した。

【結果と考察】 KOI2 投与群は明らかに体重増加率および生存率のいずれも生理食塩液投与群と比較して明らかな改善効果を示した（図4）。これらの治療効果発現メカニズムとしては、血中動員された骨髄 MSC が口腔内および食道粘膜の剥離部位に集積して再生を誘導し、

飲水および摂食行動が改善したためと考えられる。

図 4. KOI2 投与による表皮水疱症モデルマウス治療効果



5. 主な安全性試験について

5.1. 予備的一般毒性試験

5.1.1. KOI2 のラットにおける単回静脈内投与試験

CrI:CD (SD) 系雄性ラット (1 群 n=3) に KOI2 の 2 または 20 mg/kg を静脈内投与した。死亡動物はなく、薬剤投与に起因する変化を認めなかった。

5.1.2. KOI2 のサルにおける単回静脈内投与試験

カニクイザル (1 群雌雄各 1 匹) に KOI2 の 2、6 および 20 mg/kg を静脈内投与した。死亡動物は認めなかった。20 mg/kg 投与動物において投与直後に顔面紅潮が認められたが、数分後には回復した。20 mg/kg 投与した雄性サルにおいて体温の低下が認められた。血中ヒスタミンの上昇が用量依存的に認められており、顔面紅潮と体温低下は血中ヒスタミンの上昇によるものと考えられた。

5.1.3. KOI2 のラットにおける 5 日間反復静脈内投与毒性試験

CrI:CD (SD) 系雌性ラット (5 匹) に KOI2 の 25 mg/kg を毎日 1 回 5 日間反復尾静脈内に投与し、投与部位の変化を確認すると共に一般状態の観察や体重の測定、剖検を行ったその結果、投与期間中いずれの群にも死亡はみられなかった。また一般状態では投与部を含め、いずれの動物にも異常はみられず、剖検でも異常は認められなかった。

5.2. 反復投与試験 (対面助言資料として成績を提出する試験)

5.2.1. ラットを用いた 4 週間静脈内反復投与毒性試験 (回復試験を含む)

CrI: CD (SD) 系雌雄ラット (n=10) に KOI2 の 5、12 および 25 mg/kg を毎日 1 回静脈内に 4 週間投与したときの毒性変化を調べるとともに、4 週間の休薬期間を設け、その回

復性についても検討した。

5.2.2. サルを用いた4週間静脈内反復投与毒性試験（回復試験を含む）

雌雄カニクイザル（n=3）に KOI2 の 5、12 および 25 mg/kg を毎日 1 回静脈内に 4 週間投与したときの毒性変化を調べるとともに、4 週間の休薬期間を設け、その回復性についても検討した。なお、下記項目についても一般毒性試験の中に組み込んで実施している。

- ・安全性薬理試験：サルにおける in vivo 心・血管系、および呼吸系に及ぼす影響の検討。ラットにおける中枢神経系に及ぼす影響の検討。

- ・生殖発生毒性試験：サルとラットを用いた反復投与毒性試験の検討項目の中で、雄生殖器の評価を行う。

- ・免疫毒性試験：サルとラットを用いた反復投与毒性試験の検討項目の中で、免疫毒性の可能性を示す変化（兆候；血液学的変化、免疫系器官の重量変化および病理組織学的変化、血清グロブリン濃度の 変化等）について評価を行う。

6. 吸収・分布・代謝・排泄

6.1. 雄性ラット（各群3匹）への単回投与による予備的TK試験

CrI: CD (SD) 系雄性ラットにおける単回静脈内投与試験において、経時的に末梢血を採血して血漿中の残存KOI2を定量した。その結果、2 mg/kg濃度で投与したKOI2は、投与2分後で既に血中での検出感度以下であった。一方、20 mg/kg濃度で投与した場合は、投与5分後までは検出されたものの、15分後には検出感度以下であった。

6.2. カニクイザル（各群1匹）への単回投与による予備的TK試験

カニクイザルにおける単回静脈内投与試験において、経時的に末梢血を採血して血漿中の残存KOI2を定量した。その結果、2 mg/kg濃度で投与した場合には投与2分後まで検出されたものの、投与5分後で既に血中での検出感度以下であった。一方、6および20 mg/kg濃度で投与した場合は、投与5分後までは検出されたものの、15分後には検出感度以下であった。

以上の結果から、KOI2 は投与後血中から速やかに消失していること、また KOI2 が生理活性タンパクの部分ペプチドであることと合わせ考えると、反復投与毒性試験において TK 試験を行う意義が低いと考え、以後の TK 試験の実施は行っていない。

7. 医師主導治験の概要

7.1 第 I 相臨床治験：

試験概要を表 1 に示した。

健康成人における安全性および忍容性の検討を目的として、合計 24 例の健常人に被験薬を単回、及び 8 例の健常人に 7 日間反復静脈内点滴投与する。安全性、忍容性は自覚症状・