

タデアイに含まれるフラボノール配糖体の分析と
3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボン配糖体
及びそれらのアグリコンの抗炎症作用

Analysis of flavonol *O*-glycosides in *Polygonum tinctorium* Lour. and anti-inflammatory effects of 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-*O*-glycosides and their aglycone

中井翔太

2020

索引

第 1 章	全体の序論	1
1-1	タデアイ (<i>Polygonum tinctorium</i> Lour.) とは	1
1-2	タデアイの生理活性物質	2
1-3	タデアイに含まれる主要ポリフェノール	4
1-4	タデアイと抗炎症作用	5
1-5	タデアイの生育段階と機能性	6
1-6	文献	8
第 2 章	タデアイに含まれるフラボノール類の抗炎症作用	13
2-1	序論	13
2-2	実験材料と実験方法	14
2-2-1	実験材料と実験機器	14
2-2-2	タデアイ由来ポリフェノールの抽出および 精製法	15
2-2-3	3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (TMF) 配糖体の 単離および TMF の調製法	16
2-2-4	フラボノール配糖体の UPLC-ESI-TOF/MS ^E 分析	18
2-2-5	総ポリフェノール量の測定, フラボノール配糖体 およびトリプタンスリンの分析と定量	18
2-2-6	マウスマクロファージ様細胞 (RAW264) の培養	19
2-2-7	一酸化窒素 (NO) 産生抑制能の測定	20
2-2-8	プロスタグランジン E ₂ (PGE ₂) 産生抑制能の 測定	20
2-2-9	TMF 配糖体の体内吸収	20
2-2-10	Hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) 法 による抗酸化性測定	21
2-2-11	統計処理	21

2-3	結果	22
2-3-1	タデアイ葉と茎の抽出物における 一酸化窒素(NO)産生抑制能	22
2-3-2	タデアイ葉由来フラボノール化合物と トリプタンスリンのNOおよびPGE ₂ 産生抑制能	27
2-3-3	タデアイ葉主要フラボノール配糖体の体内吸収	30
2-3-4	タデアイ葉主要フラボノール配糖体の抗酸化性	35
2-4	考察	36
2-5	文献	38
第3章	タデアイの各生育段階でのフラボール配糖体の構造解析 および定量	43
3-1	序論	43
3-2	実験材料と実験方法	44
3-2-1	実験材料と実験機器	44
3-2-2	タデアイ由来ポリフェノールの抽出および 精製法	45
3-2-3	フラボノール配糖体のUPLC-ESI-TOF/MS ^E 分析	46
3-2-4	タデアイ種子抽出物のアルカリ分解	47
3-2-5	HPLCによるフラボノール配糖体の定量分析	47
3-2-6	総ポリフェノール量および抗酸化性の測定	48
3-2-7	統計処理	48
3-3	結果	49
3-3-1	タデアイ種子, スプラウト, 葉茎の フラボノール配糖体の成分分析	49
3-3-2	タデアイ種子, スプラウト, 葉茎の フラボノール配糖体の定量分析	56
3-3-3	タデアイ種子, スプラウト, 葉茎の 総ポリフェノール量と抗酸化性	61

3 - 4	考察	64
3 - 5	文献	66
第 4 章	結論	69
4 - 1	要約（日本語）	69
4 - 2	要約（英語）	72
4 - 3	謝辞	74
4 - 4	原著論文	75

第 1 章 全体の序論

1-1 タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) とは

タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) は、東南アジア原産の一年生植物で、古くから藍染めの染料原料として用いられている。タデアイは3月から4月に種を播き、7月には草丈 40～70 cm に生育する。8月中旬から紅色の小花が穂状に開花し、後に赤褐色小粒状で光沢のある種子をつける¹⁾。藍染めには開花前のタデアイ葉と茎が利用され、伝統的に藍染めが盛んな徳島県や島根県では、7月にタデアイの葉と茎の刈り取りを行う。生育した開花前のタデアイ写真を図 1-1 に示す。



図 1-1 生育した開花前のタデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) 写真

徳島県などの日本の一部の地域では、タデアイは刺身のつまやタデアイ酢などの食品原料としても利用されている²⁾。また一方で、タデアイには薬用植物としての一面があり、中国では大青葉 (タイセイヨウ) という名前で、脳炎、流行性感冒、急性伝染性肝炎、

細菌性下痢，急性胃腸炎，急性肺炎などの多くの急性の病気やハチ刺されなどに二千年以上前から用いられてきた²⁾。韓国ではタデアイは Naju Jjok と呼ばれる伝統的な薬の原料であり，解熱および解毒目的で使用されている³⁾。

1-2 タデアイの生理活性物質

タデアイの生理活性物質については，含窒素化合物のトリプタンスリンが抗癌作用⁴⁾⁵⁾，ヘリコバクター・ピロリに対する抗菌作用⁶⁾，抗炎症作用⁷⁾⁸⁾を示すことが報告されている。タデアイ葉からつくられる青色色素として知られる含窒素化合物のインディゴは，腸管バリア能を高めることで抗大腸炎作用を示し⁹⁾¹⁰⁾，同じく青色色素の一つとして知られる含窒素化合物のインディルピンは抗アレルギー作用¹¹⁾および抗炎症作用を示す¹²⁾。また，タデアイに含まれるフェノール酸の没食子酸，カフェイン酸は抗酸化能を示すことが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。一方で，ポリフェノールの一種で，フラボンを基本骨格とする有機化合物のフラボノイド化合物もタデアイの機能性物質として報告されている。タデアイに含まれるフラボノールのケルセチンは抗酸化作用¹⁶⁾および抗炎症作用¹⁷⁾を示し，6-メトキシケンペロール，ケンペロールおよび3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンは抗菌作用¹⁸⁾を示す。3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボンは他にも抗血液凝固作用¹⁹⁾をことが報告されている。表 1-1 に，これまでに報告されているタデアイの生理活性物質について記載する。

表 1-1 タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) の生理活性物質

物質名	生理機能
< 含窒素化合物 >	
トリプタンスリン	抗癌作用 ⁴⁾⁵⁾ , 抗菌作用 ⁶⁾ , 抗炎症作用 ⁷⁾⁸⁾
インディゴ	抗大腸炎作用 ⁹⁾¹⁰⁾
インディルビン	抗アレルギー作用 ¹¹⁾ 抗炎症作用 ¹²⁾
< フェノール酸 >	
没食子酸	抗酸化作用 ¹³⁾¹⁴⁾
カフェイン酸	抗酸化作用 ¹³⁾¹⁴⁾
< フラボノイド化合物 >	
ケンペロール	抗菌作用 ¹⁸⁾
6-メトキシケンペロール	抗菌作用 ¹⁸⁾
ケルセチン	抗酸化作用 ¹⁶⁾ , 抗炎症作用 ¹⁷⁾
3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7- メチレンジオキシフラボン	抗菌作用 ¹⁸⁾ , 抗血液凝固作用 ¹⁹⁾

タデアイの生理機能のうち、フェノール酸やフラボノイド化合物が示す抗酸化性は様々な疾病予防に重要な機能と考えられており、近年注目されている研究項目の一つである。ビタミンやポリフェノールを多く含む野菜や果物類はこの抗酸化性が比較的高いとされており、様々な研究がされている。以前に我々の研究室では、タデアイと一般野菜のハウレンソウ、キュウリ、レタスのAWA(アセトン:水:酢酸, 70:29.5:0.5)抽出液を用いて親水性酸素ラジカル吸収能(H-ORAC)および2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去活性による抗酸化性を評価および比較した。その結果、一般野菜の中で最も抗酸化性の高かったハウレンソウと比較して、タ

デアイの抗酸化性は，H-ORACが12倍，DPPHラジカル消去活性が56倍高いことが明らかとなった²⁰⁾．さらに，フォーリン-チオカルト法を用いて，タデアイに含まれる総ポリフェノール含有量を調べたところ，タデアイにはハウレンソウの15倍以上のポリフェノールが含まれていることが明らかとなり²⁰⁾，タデアイの高い抗酸化性はポリフェノールの寄与が大きいと考えられた．

1-3 タデアイに含まれる主要ポリフェノール

以前に我々の研究室で，タデアイの葉茎からポリフェノール類を抽出および精製し，超高速液体クロマトグラフィーエレクトロスプレー方式イオン化飛行時間型質量分析計(UPLC-ESI-TOF/MS^E)にて分析したところ，カフェイン酸，クロロゲン酸，ケンペロール，ケルセチン，ケルセチン-3-O-グルクロニドが検出されたが，未同定の物質もいくつか確認された²¹⁾．これらの物質の構造をUPLC-ESI-TOF/MS^E，¹³C-核磁気共鳴スペクトル(NMR)，¹H-NMR，DEPT，2D-NMR(C-H COSY, HMBC)，赤外吸収スペクトル(FT-IR)などを用いて分析をした結果，11のフラボノール配糖体の構造が明らかとなった．このうち，主要な物質は，フラボノイド化合物の3,5,4'-トリヒドロキシ-6,7-メチレンジオキシフラボン(3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone, 以後 TMF と表記)をアグリコンとして有するフラボノール配糖体であることを確認した²²⁾．これらのうち，3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]，3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(acetyl)-β-D-glucopyranoside]，3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-O-(acetyl)-β-D-glucuronide]は過去に報告された事の無い新規物質であった²²⁾．3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]はタデアイ葉80%メタノール抽出物中に最も多く含まれており，3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル(HMG)酸を側鎖として有する化合物で

ある。過去の報告で HMG 基を有するフラボノール配糖体は、コレステロールの合成に関わる律速酵素の HMG-CoA 還元酵素を阻害し、血中コレステロールを低下させると報告されている。さらに、フラボノイド化合物のダイゼイン²³⁾、ナリングニン²⁴⁾、ルチン²⁵⁾などは HMG-CoA 還元酵素阻害活性を持ち、コレステロールの低下作用を示すことが確認されている。これらのことから、過去に我々の研究室で、タデアイに含まれる TMF をアグリコンとする配糖体 (TMF 配糖体) の HMG-CoA 還元酵素阻害活性を調べたところ、TMF 配糖体は高脂血症治療薬のロバスタチンとほぼ同等レベルの阻害活性を示すことが明らかとされた²²⁾。TMF 配糖体は、タデアイ葉 80%メタノール抽出物中に豊富に含まれているフラボノール配糖体であり、コレステロール合成阻害活性の他にも機能性を有することが期待される。

1-4 タデアイと抗炎症作用

徳島県薬草図鑑によると、タデアイの生葉汁は塗布することで火傷、口内炎、唇のあれ、腫物、ハチやその他毒虫の刺し傷に効果があるとされており¹⁾、タデアイ葉には抗炎症作用を示す生理活性物質が存在していると推察される。タデアイの抗炎症作用については、含窒素化合物のトリプタンスリンや、青色色素のインディゴおよびインディルビンで既に報告されている。タデアイの酢酸エチル抽出物に含まれるトリプタンスリンは、マウスマクロファージ様細胞の一酸化窒素 (NO) 産生およびプロスタグランジン (PG) E₂ 産生を抑制することが報告されている⁷⁾。さらに、デキストラン硫酸ナトリウム投与にて炎症性腸疾患を誘発させたマウスに対し、トリプタンスリンは炎症性腸疾患の症状を緩和させることが報告されている⁷⁾²⁶⁾。また、青色色素のインディゴおよびインディルビンも炎症を緩和することが報告されている⁹⁾¹²⁾。青色色素のインディゴおよびインディルビンは、タデアイ生葉にほとんど含まれておら

ず、インディカンという無色の前駆体として存在している。タデアイの葉中のインディカンは、 β -グルコシダーゼにより加水分解されてインドキシルとなり、インドキシルがさらに酸化されることでインドキシル二量体のインディゴまたはインディルビンが生じることが知られている¹⁰⁾。一方で、これまでに我々の研究室では、タデアイ葉にケルセチンやケンペロール、TMFをアグリコンとするTMF配糖体などのフラボノール化合物が多く含まれていることを確認している²¹⁾²²⁾。フラボノールのケルセチンおよびケルセチン配糖体のクエルシトリンは、シクロオキシゲナーゼおよびリポキシゲナーゼ経路を調整することにより抗炎症作用を発揮することが報告されている²⁷⁾²⁸⁾。ケンペロールは炎症性メディエーターの tumor necrosis factor- α 活性やインターロイキン 1 β およびインターロイキン 8 発現の抑制、そしてこれらメディエーターの活性を促進する nuclear factor kappa β 活性を抑制することで炎症を抑制すると報告されている²⁹⁾。このようにフラボノールの抗炎症作用についてはすでに多くの報告がされており、タデアイの抗炎症作用にもフラボノールが深く関与している可能性がある。以前に、タデアイ由来の抗炎症物質として、トリプタンスリン⁷⁾²⁶⁾、インディゴ⁹⁾、インディルビン¹²⁾などが報告されているが、TMF配糖体などのフラボノールも、タデアイの抗炎症作用に関与している可能性がある。また、これまでに Ishihara らは、タデアイ地上部(葉と茎)の抽出物を用いてタデアイの抗炎症作用を検討しているが¹⁵⁾、抗炎症作用を有する物質がタデアイの葉と茎のどちらに含まれているかは未だ不明である。そこで、今回の研究では、タデアイ地上部を葉と茎に分け、それぞれの抽出物について、抗炎症作用をスクリーニングした。

1-5 タデアイの生育段階と機能性

タデアイの抗炎症作用については、地上部(葉茎)の抽出物¹⁵⁾

あるいはトリプタンスリン⁷⁾²⁶⁾などの物質についての報告がある一方で、藍実（ランジツ）と呼ばれるタデアイ種子も古くから民間薬的に利用されている。タデアイの葉と種子は、1日に5～10g煎じて服用すると、解毒および解熱剤として効果があると徳島県薬草図鑑に記載されており¹⁾、タデアイ種子にも生理活性を示す物質が存在していると考えられる。これまでに我々の研究室で、タデアイ葉にはフラボノールのTMFをアグリコンとするTMF配糖体が豊富に存在することが分かっている²²⁾。TMFおよびTMF配糖体は、タデアイ葉に特徴的に含まれている物質群であるが、これらが、種子にも含まれているのか、あるいは生育過程で生合成されているのかは不明である。Jangらは、タデアイの種子、未熟な葉、成熟した葉の水抽出物について抗酸化能やMTTアッセイを用いて抗増殖活性を測定しているが、詳細な成分の分析は行っていない³⁰⁾。また、タデアイの種子およびスプラウトのフラボノールを詳細に調査した報告は我々の知る限りまだない。種子、スプラウト、成熟した葉茎といった各生育段階のタデアイに含まれるフラボノール化合物を調査し、さらに各生育段階におけるタデアイ抽出物の機能性を評価することで、古くから薬用植物として利用されてきたタデアイの薬理的機能解明の一助となると考えられる。

以上より本研究では、薬用植物であり食経験もあるタデアイの機能性を明らかにする目的で、(1) タデアイ葉または茎におけるTMF配糖体などフラボノール配糖体の局在と定量、およびこれら化合物の抗炎症作用への寄与について、(2) 各生育段階のタデアイに含まれるフラボノール配糖体の構造解析と各生育段階におけるタデアイ抽出物の機能性について検討を行った。本論文の2章では、タデアイに含まれるフラボノール化合物の抗炎症作用について記述する。第3章では各生育段階のタデアイ中フラボノール配糖体の構造解析と定量、および各生育段階での抗酸化能について記述した。

1 - 6 文 献

- [1] 村上光太郎, 徳島県薬草図鑑 <上>, 徳島新聞社. (1985) 132-133.
- [2] 岩城完三, 栗本雅司, 藍 -医色同源-, 日本文教 (2001)
- [3] N.R. Han, S.W. Kang, P.D. Moon, J.B. Jang, H.M. Kim, H.J. Jeong. Genuine traditional Korean medicine, Naju Jjok (*Chung-Dae, Polygonum tinctorium*) improves 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesional skin. *Phytomedicine*. 21 (2014) 453-60.
- [4] S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M.J. Micallef, K. Hino, M. Taniguchi, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors by a crudeethyl acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour. *Anticancer Res*. 21 (2001) 3295-3300.
- [5] M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M. Ikeda, K. Hino, M. Kurimoto. The natural plant product tryptanthrin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int. Immunopharmacol*. 2 (2002) 565- 578.
- [6] T. Hashimoto, H. Aga, H. Chaen, S. Fukuda, M. Kurimoto. Isolation and identification of anti-helicobacter pylori compounds from *Polygonum tinctorium* Lour. *Nat. Med*. 53 (1999) 27-31.
- [7] T. Ishihara, K. Koho, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto, Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E₂ synthesis by murine macrophages, *Eur. J. Pharmacol*. 407 (2000) 197-204.
- [8] Wang, Z., Wu, X., Wang, C.L., Wang, L., Sun, C., Zhang, D.B., Liu, J.L., Liang, Y.N., Tang, D.X., Tang, Z.S. Tryptanthrin Protects Mice against Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis

through Inhibition of TNF- α /NF- κ B and IL-6/STAT3 Pathways. *Molecules*. (2018) pii: E1062.
doi: 10.3390/molecules23051062.

- [9] Kawai, S., Iijima, H., Shinzaki, S., Hiyama, S., Yamaguchi, T., Araki, M., Iwatani, S., Shiraishi, E., Mukai, A., Inoue, T., Hayashi, Y., Tsujii, M., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., Takehara, T. Indigo Naturalis ameliorates murine dextran sodium sulfate-induced colitis via aryl hydrocarbon receptor activation. *J. Gastroenterol*, 52 (2017) 904-919.
- [10] Minami, Y., Kanafuji, T., Miura, K. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Polygonum tinctorium*, which catalyzes preferentially hydrolysis of indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (1996) 147-149.
- [11] T. Kunikata, T. Takefuji, H. Aga, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity, *Eur. J. Pharmacol.* 410 (2000) 93-100.
- [12] Lai, J.L., Liu, Y.H., Liu, C., Qi, M.P., Liu, R.N., Zhu, X.F., Zhou, Q.G., Chen, Y.Y., Guo, A.Z., Hu, C.M. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*. 40 (2017) 1-12.
- [13] H.G. Jang, B.G. Heo, Y.S. Park, J. Namiesnik, D. Barasch, E. Katrich, K. Vearasilp, S. Trakhtenberg, S. Gorinstein. Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait) plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167 (2012) 1986-2004.
- [14] T. Kimoto, S. Koya, K. Hino, Y. Yamamoto, H. Aga, T. Hashimoto, N. Masaki, T. Hanaya, M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Arai, M. Ikeda, S. Fukuda, M. Kurimoto. Protection by Indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.) against renal oxidative damage in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Nat. Med.* 53 (1999) 291-296

- [15] T. Ishihara, T. Okura, K. Kohno, T. Tanimoto, H. Ikegami, M. Kurimoto. *Polygonum tinctorium* extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. *J. Ethnopharmacol.* 72 (2000) 141-50.
- [16] Morand, C., Crespy, V., Manach, C., Besson, C., Demigné, C., Rémésy, C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am. J. Physiol.* 275 (1998) 212-219.
- [17] Zhang, Z.J., Cheang, L.C., Wang, M.W., Lee, S.M. Quercetin exerts a neuroprotective effect through inhibition of the iNOS/NO system and pro-inflammation gene expression in PC12 cells and in zebrafish. *Int. J. Mol. Med.* 27 (2011) 195-203.
- [18] T. Hashimoto, H. Aga, H. Chaen, S. Fukuda, M. Kurimoto. Isolation and identification of anti-helicobacter pylori compounds from *Polygonum tinctorium* Lour. *Nat. Med.* 53 (1999) 27-31.
- [19] H. Kohda, A. Niwa, Y. Nakamoto, O. Takeda. Flavonoid glucosides from *Polygonum tinctorium*. *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 523-524.
- [20] 石原朋恵, 木村英人, 圓岡真帆子, 小川智史, 明渡絵里朱, 中村優子, 梅林志浩, 秋廣高志, 横田一成. 親水性酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) 法と,1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去法によるタデアイの抗酸化能評価. 日本食品科学工学会第 61 回大会 (2014).
- [21] H. Kimura, T. Ishihara, M. Michida, S. Ogawa, T. Akihiro, K. Yokota. Identification and quantitative analysis of polyphenolic compounds from indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour). *Nat. prod. Res.* 7 (2014) 492-495.
- [22] H. Kimura, S. Tokuyama, T. Ishihara, S. Ogawa, K. Yokota. Identification of new flavonol O-glycosides from indigo (*Polygonum tinctorium* Lour) leaves and their inhibitory activity

- against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 108 (2015) 102-112.
- [23] Kim, H.J., Lee, D.H., Hwang, Y.Y., Lee, K.S., Lee, J.S. Characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor from *Pueraria thunbergiana*. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5882-5888.
- [24] Bok, S-H., Shin, W. Y., Bae, K-H., Jeong, T-S., Kwon, Y-K., Park, Y. B., Choi, M-S. Effects of naringenin and lovastatin on plasma and hepatic lipids in high-fat and high-cholesterol fed rats. *Nutrition Research.* 20 (2000) 1007-1015.
- [25] Falé, P.L., Ferreira, C., Maruzzella, F., Helena Florêncio, M., Frazão, F.N., Serralheiro, M.L. Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. *J. Ethnopharmacol.* 150 (2013) 718-723.
- [26] M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M. Ikeda, K. Hino, M. Kurimoto. The natural plant product tryptanthrin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice, *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 565- 578.
- [27] G.D. Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Capasso. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life. Sci.* 65 (2000) 357-353.
- [28] J.V. Formica, W. Regelson. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food. Chem. Toxicol.* 33 (1995) 1061-1080.
- [29] J.M. Calderon-Montaña, E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, M. Lopez-Lazaro. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini. Rev. Med. Chem.* 11 (2011) 298-344.
- [30] H.G. Jang, B.G. Heo, Y.S. Park, J. Namiesnik, D. Barasch, E. Katrich, K. Veerasilp, S. Trakhtenberg, S. Gorinstein. Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the

seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait) plant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167 (2012) 1986-2004.

第 2 章 タデアイに含まれるフラボノール類の抗炎症作用

2-1 序論

タデアイは古くから薬用植物として、解毒、解熱、消炎などの目的で利用されてきた¹⁾。日本の一部の地方では、タデアイは食品原料としても利用されている。タデアイの機能性物質については、抗酸化物質²⁾³⁾として没食子酸やカフェイン酸、抗アレルギー作用⁴⁾を示すインディルビン、ヘリコバクター・ピロリに対する抗菌作用⁵⁾を示すトリプタンスリン、6-メトキシケンペロール、ケンペロールおよび TMF、抗血液凝固作用⁶⁾を示す物質として TMF、抗癌作用⁷⁾を示す物質としてトリプタンスリンが報告されている。徳島県薬草図鑑には、タデアイの生葉汁は塗布することで火傷、口内炎、唇のあれ、腫物、ハチやその他毒虫の刺し傷に効果があると記載されており⁸⁾、タデアイ葉には抗炎症作用を示す生理活性物質が存在していると推察される。タデアイの抗炎症物質については、タデアイの酢酸エチル抽出物に含まれる含窒素化合物のトリプタンスリン⁹⁾¹⁰⁾や、青色色素のインディゴ¹¹⁾およびインディルビン¹²⁾などが既に報告されている。青色色素のインディゴおよびインディルビンは、インディカンという無色の前駆体として葉に存在しており、インディカンが加水分解後さらに酸化されることでインディゴまたはインディルビンが生じるため、タデアイ生葉中にはほとんど含まれていない¹³⁾。一方で、これまでに我々の研究室では、タデアイ葉にケルセチンやケンペロール、TMF をアグリコンとする TMF 配糖体などのフラボノール化合物が多く含まれていることを確認している¹⁴⁾。フラボノールの抗炎症作用については、ケルセチン¹⁵⁾¹⁶⁾、ケンペロール¹⁷⁾などで多くの報告がされている。そのため、タデアイの抗炎症作用に TMF 配糖体などのフラボノール化合物も大きく関与している可能性が高いが詳細は明らかでない。

フラボノール配糖体は，経口摂取後，体内でアグリコンと糖に分解され，アグリコンが腸管で吸収されて血中に取り込まれることが知られている¹⁸⁾¹⁹⁾．ケルセチンなどのフラボノールは，体内に吸収された後，肝臓でグルクロン酸や硫酸と抱合することが報告されており²⁰⁻²²⁾，血中にて抱合体となったフラボノールは，好中球やマクロファージの細胞表面タンパク質に結合し，脱抱合されることが報告されている²³⁻²⁵⁾．この脱抱合化は，炎症性刺激により増強されるため²⁴⁾，血中に吸収されたフラボノールは炎症部位において，抗炎症作用を発揮すると推察される．タデアイに含まれるフラボノール配糖体のうち，ケルセチンやケンペロールの配糖体については既に体内吸収の報告がされているが，タデアイ葉に主要に存在する TMF 配糖体についての報告はない．

これらのことから，TMF 配糖体などのフラボノール化合物のタデアイにおける局在と含有量，およびこれら化合物の抗炎症能および体内吸収について調べることは，タデアイの抗炎症作用の解明において有用であると考えられる．本章では，葉と茎における抗炎症性物質の局在を調べ，タデアイに多く含まれている TMF およびその配糖体を定量するとともに，NO 産生抑制、PGE₂ 産生抑制作用を指標としてタデアイの抗炎症作用に寄与している物質を明らかにした．

2-2 実験材料と実験方法

2-2-1 実験材料と実験機器

タデアイの種子はタキイ種苗(株)(京都)から購入した．quercetin-3-O-β-D-glucuronide，トリプタンスリン，6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(Trolox®)，リポポリサッカリド(LPS, *Escherichia coli* 127:B8 由来)，フルオレセインナトリウム，HPLC 用アセ

トニトリルは Sigma (St. Louis, MO, USA) から得た。kaempferol-3-O-D-glucopyranoside (astragalín), イソラムネチン, isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside は EXTRASYNTHÈSE (Lyon, France) 製のものを用いた。ケルセチン, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, ケンペロール, 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH), Eagle's minimal essential medium (MEM), ペニシリンストレプトマイシン溶液 (× 100), MEM non-essential amino acids 溶液 (× 100), Dulbecco's phosphate-buffered saline without Ca²⁺ and MG²⁺ ions (D-PBS (-)) (× 100), トリプシン, polyoxyethylene (10) octylphenyl ether およびその他試薬は, 富士フィルム和光純薬工業 (大阪) から得た。Fetal bovine serum (FBS) は Biowest (Nuaille, France) から得た。プロスタグランジン E₂ EIA Kit (No. 514010) は Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA) 製のものを用いた。Pierce BCA protein assay kit および Nunc cell culture Petri dishes は, Thermo FisherScientific (Waltham, MA, USA) から得た。96 穴マイクロプレートは Corning (Corning, NY, USA) 製のものを用いた。DIAION HP-20 は三菱ケミカルアクア・ソリューションズ (旧社名, 日本錬水) (東京) より得た。Chromatorex ODS 1024T は富士シリシア (春日井) より得た。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析には Shimadzu (京都) 製の LC-2010A と Chromatopac C-R8A を使用した。UPLC-ESI-TOF/MS^E には Waters Corporation (Milford, MA, USA) の ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) システムと SYNAPT G2 HDMS システムを使用した。超音波破碎機は, ブランソン超音波洗浄機 (日本エマソン製, 神奈川県) を用いた。凍結乾燥機は, TOKYO RIKAKIKAI (東京) 製の FDU-1110 を用いた。マイクロプレートリーダーは Thermo FisherScientific (Waltham, MA, USA) の Multiskan GO を用いた。蛍光マイクロプレートリーダーは TECAN (川崎) 製の infinite F 200 を用いた。

2-2-2 タデアイ由来ポリフェノールの抽出および精製法

タデアイは収穫後, すぐに葉と茎に分割し, 凍結乾燥を行ってミ

ルで粉末化した。この粉末各 0.5 g を三角フラスコにとり，80 % メタノールを 100 ml 加えて，室温にてマグネチックスターラーで 1 時間攪拌して抽出した。抽出後，各抽出液をアドバンテック No.2 濾紙で濾過した。その後，ロータリーエバポレーターを用いて 40 °C で減圧乾固し，タデアイ葉と茎の 80%メタノール抽出物を得た。その後，各抽出物は，糖類やタンパク質を取り除くため，DIAION HP-20 カラム（長さ 200 × 内径 10 mm）に通し，蒸留水 30 ml で洗浄後，メタノール 30 ml で溶出した。この溶出物をロータリーエバポレーターを用いて 40 °C で減圧乾固し，タデアイ葉と茎の精製物を得た。

タデアイ抽出物およびフラボノール化合物の酸加水分解は以下の方法で行った。タデアイの 80 %メタノール抽出物を DIAION HP-20 カラムにかけ 100 %メタノールで溶出したフラクション 10 mg またはフラボノール配糖体 10 mg を，メタノール 2.5 ml に溶解し，2.4 M の塩酸水溶液 2.5 ml を加え，90 °C で 2 時間，加熱還流を行った。反応後，1.2 M の水酸化ナトリウム液を加えて中性に調整し，エバポレーターを用いて 40 °C で減圧乾固した。その後，乾燥物は水で溶解し，DIAION HP-20 カラム（長さ 200 × 内径 10 mm）に通して，蒸留水 30 ml で洗浄後，メタノール 30 ml で溶出した。この溶出物をロータリーエバポレーターを用いて 40 °C で減圧乾固し，タデアイ抽出物およびフラボノール配糖体の酸加水分解物を得た。

2 - 2 - 3 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (TMF) 配糖体の単離および TMF の調製法

これまでに我々の研究室で検討し，論文で報告されている通りに行った¹⁴⁾。タデアイの葉 20.9 g を 5 mm 角に裁断したものに，80%メタノール 1 L を加え 2 時間加熱還流を行った。ADVANTEC No.2 濾紙を用いて濾過後，濾液をロータリーエバポレーターを用いて 40 °C で減圧乾固し，抽出物を 1.45 g 得た。この抽出物を 30 %メタノールに

溶解して DIAION HP-20 カラム (270 × 30 mm i.d.) に注入した後, 30%, 50%, 70%, 100%メタノール各 400 ml で溶出した. 40 °C で減圧乾固した 100%メタノール溶出区 (307 mg) を 30%メタノールに溶解後, さらに Chromatorex ODS 1024T (210 × 30 mm, i.d.) に注入し, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 70%, 100%メタノール各 250 ml で溶出した. 55%および 60%メタノール溶出区を減圧乾固し, それぞれ 35.7 mg, 104.3 mg の精製物を得た. quercerin-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside], kaempferol-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside] は 40%および 50%メタノール溶出区から, 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-(acetyl)-β-D-glucopyranoside] は 55%メタノール溶出区から, 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside, 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside], 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-(acetyl)-β-D-glucuronide] は 60%メタノール溶出区から HPLC を用いて精製した. また, 55%および 60%メタノール溶出フラクションを減圧乾固し, 得られたサンプルを TMF 配糖体フラクションとした. HPLC でのカラムは YMC (京都) の ODS-AM (150 × 6.0 mm i.d., 粒径 3 μm) を用いた. カラム温度は 40 °C, 流速は 1.0 ml/min に設定した. 移動相は, 0.1%ギ酸/アセトニトリルが 75:25 (v/v) の溶液を用いてイソクラティック溶出した. 検出は, 340 nm の吸収をモニターした. この結果, 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside, 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-(acetyl)-β-D-glucopyranoside], 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside], 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-(acetyl)-β-D-glucuronide] はそれぞれ 7.9, 26.0, 5.9, 6.0 mg 得られた. また, TMF 配糖体アグリコンの TMF の調整は, これまでに我々の研究室で検討された手法¹⁴⁾の通りに行った. 豊富に TMF 配糖体を含む精製物へ 100%メタノールと 2.4 M の塩酸を加えて 2 時間 90 °C して, 蒸留水で希釈後にオルテックカラムへ注入して 20%メタノールで洗浄後, 100%メタノール溶出画分を回収し, 得られた溶出画分内にて再結晶化させる事で TMF を調製した.

2-2-4 フラボノール配糖体の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析

UPLC-ESI-TOF/MS^Eによる分析は以前に我々の研究室で報告した方法と同様に行った¹⁴⁾ UPLC-ESI-TOF/MS^Eは Waters Corporation (Milford, MA, USA) の ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) システムと SYNAPT G2 HDMS システムを使用した。UPLC カラムは Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 × 2.1 mm i.d., 粒径 1.7 μm) を使用した。カラム温度は 40 °C, 流速は 0.3 ml/min, 検出は photodiode array (PDA) detector を用いて 340 nm で行った。移動相は, 10 分で 0.1%ギ酸 / アセトニトリル 90 : 10 (v/v) から 50 : 50 (v/v) の直線濃度勾配で溶出した。MS^Eは negative mode で測定し, 以下の条件で行った。測定感度は sensitive mode あるいは high resolution mode で測定した。

電圧 : キャピラリー 2.5 kV, サンプリングコーン 50V,
Extraction Cone 4.0 V

温度 : ソース 150 °C, Desolvation 500 °C

ガス流速 : コーンガス 50L/h Desolvation ガス 1000 L/h

スキャンタイム : 0.5 秒

Collision energy: Function 1, [Low energy] Trap collision energy ON 6 V

Transfer collision energy OFF

Function 2, [High energy] Ramp trap collision energy ON 6-45 V

Ramp transfer collision energy OFF

2-2-5 総ポリフェノール量の測定, フラボノール配糖体およびトリプタンスリンの分析と定量

総ポリフェノール量はフォーリンチオカルト法²⁶⁾により測定し, 乾燥重量 1 g あたりの没食子酸換算量 (mg GAE/g DW) で示した。

フラボノール配糖体の HPLC 分析および定量には, Shimadzu (京都)

製の LC-2010A と Chromatopac C-R8A を使用し，カラムは Phenomenex (Torrance, CA, USA) 製の Kinetex C₁₈ カラム (150 × 4.6 mm i.d, 粒径 5 μm) を用いた．流速は 0.8 ml/min、検出波長は 340 nm に設定した．移動相は，40 分で 0.1%ギ酸水溶液／アセトニトリル 95 : 5 (v/v) から 60 : 40 (v/v) の直線濃度勾配で溶出した．また，タデアイ葉の水およびメタノール抽出物に含まれる TMF 配糖体の定量は，各単離物の定量値より算出した．

トリプタンスリンの定量は，タデアイ葉および茎の抽出物を 50 %アセトニトリル水溶液 (v/v) に溶解し，トリプタンスリンを HPLC で定量した．カラムは東ソー(東京)の TSK-gel Octyl-80 Ts (150 × 4.6 mm i.d.) を使用した．溶出は 50 %アセトニトリル水溶液 (v/v) でイソクラティックで溶出した．カラム温度は 40 °C，流速は 0.5 ml/min に設定した．検出は 250 nm で行った．

2-2-6 マウスマクロファージ様細胞 (RAW264) の培養

マウスマクロファージ様細胞 (RAW264) を理化学研究所 (埼玉) より購入した．RAW264 は，10% fatal calf serum および 1% ペニシリンストレプトマイシン溶液，1% MEM non-essential amino acids 溶液を加えた Eagle's MEM を使用し，95% atmosphere，5% CO₂，37 °C の条件下で培養した．細胞解凍後 2 週間の予備培養を経て，D-PBS (-) に溶解した 0.25 % トリプシンにて RAW 264 を剥離し，96 穴マイクロプレートに 5 × 10⁵ cells/ml の濃度で 100 μl 播種した．細胞を播種して 1 時間後，マイクロプレートへの細胞の接着を確認し，LPS を最終濃度 1 μg/ml になるよう添加し，95% atmosphere，5% CO₂，37 °C の条件下で 24 時間インキュベートした．タデアイ精製物または酸加水分解物を添加する際は，LPS 添加と同時に行った．24 時間培養後，培養上清を回収し，D-PBS (-) で 2 回洗浄後，1 % polyoxyethylene (10) octylphenyl Ether 50 μl を各 well に添加して 10 分間振盪させ細胞溶解液を得た．細胞溶解液中のタンパク

質量は Preice™ BCA protein assay kit を用いて，波長 562 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した．

2-2-7 一酸化窒素 (NO) 産生抑制能の測定

培養終了後の培養上清を 50 μ l 回収し，NO 濃度測定に使用した．NO 濃度はグリース法により求めた²⁷⁾．測定した NO 濃度はタンパク質 1 mg あたりの量に換算した．

2-2-8 プロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生抑制能の測定

培養終了後の培養上清を 20 μ l 回収し，PGE₂ 濃度測定に使用した．PGE₂ 濃度は PGE₂ EIA Kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA) にて測定した．測定した PGE₂ 濃度はタンパク質 1 mg あたりの量に換算した．

2-2-9 TMF 配糖体の体内吸収

Japan SLC (静岡) より 10 週齢の ICR マウス雌を購入した．予備飼育期間としてマウスにオリエンタル酵母(東京)の MF 試料を 1 週間与え，その後，試験開始の 16 時間前より絶食処理を行った．絶食処理後，10%プロピレングリコール水溶液に 0.2% (w/v) TMF 配糖体フラクションを溶解したサンプルを 10 ml/ kg body weight の量で ICR マウスに経口投与した．また，試験のコントロール区として 10%プロピレングリコール水溶液を別の ICR マウスに経口投与した．経口投与して 1 時間後，70%エタノールで消毒したマウス尾静脈より血液 100 μ l を PCR 用エッペンチューブへ回収した．採血後の血液は 1500 \times g で 10 分間室温にて遠心分離し，上清を回収して 0.1 倍量の 0.58 M 酢酸を加え，-80 $^{\circ}$ C で保管した．保管したサンプルは，解凍後，7.5 倍量のアセトンを加え，ボルテックスで良く混合し，9800 \times g で 30 分

間遠心分離した。遠心分離後の上清を回収し、窒素乾固した後に、50% アセトニトリル 50 μ l にて血漿中成分を抽出した。抽出したサンプルは 0.22 μ m 孔シリンジフィルター（島津ジーエルシー，東京）にて処理し，UPLC-ESI-TOF/MS^Eにて分析した。

本試験の動物実験は，動物実験委員会で審査および承認され，学長に許可された実験であり，島根大学キャンパス動物実験専門委員会規則に基づいて実施した。

2 - 2 - 10 Hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) 法による抗酸化性測定

Hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) の測定は，Watanabe らの方法²⁸⁾ に準じて行った。96 well マイクロプレートを用い，測定試料 20 μ l，75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 94.5 nM フルオレセイン溶液 (pH 7.0) 200 μ l を加え，37 $^{\circ}$ C に保った蛍光マイクロプレートリーダー infinite F 200 (TECAN 製，川崎) を用いて，フルオレセインの蛍光強度を励起波長 485 nm，測定波長 535 nm で測定した。10 分後，75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 31.7 μ M の AAPH 溶液 75 μ l を加え，振盪攪拌後，添加 2 分後から 2 分間隔で 90 分間，蛍光強度の経時変化を測定した。蛍光強度を経時的に記録したグラフの曲線下面積を算出し，H-ORAC 値は 1 mol あたりの Trolox 相当量 (mol TE/mol) として表した。

2 - 2 - 11 統計処理

データは平均 \pm 標準誤差で示した。2 群の比較には Student's *t* 検定を用いた。NO 産生および PGE₂ 産生の IC₅₀ 値，H-ORAC 測定値の実験結果の統計処理には，one-way analysis of variance (ANOVA) 解析後 Tukey 法による検定を行い，*p* < 0.05 の場合に有意であるとした。

2-3 結果

2-3-1 タデアイ葉と茎の抽出物における一酸化窒素(NO)産生抑制能

これまでに、Ishiharaらはタデアイの地上部（葉と茎）の水、メタノールおよび酢酸エチル抽出物におけるNO産生抑制能を確認しているが、抗炎症性物質が葉と茎のどちらに含まれているかは検討していない²⁹⁾。今回、NO産生抑制能を有する物質が、タデアイの葉と茎のいずれに含まれているのかを明らかにするために葉と茎を分け、各抽出物のNO産生抑制能を確認した（図2-1）。タデアイの80%メタノール抽出物には、多くのフラボノール配糖体が含まれていることを、既に我々の研究室では確認している¹⁴⁾。過去の研究で、様々なフラボノイド化合物のPGE₂産生抑制能をラット腹腔マクロファージ細胞を用いて調べた報告がある³⁰⁾。この研究では、ケルセチン配糖体のルチンやクエルシトリンはPGE₂産生を抑制しないが、アグリコンのケルセチンはPGE₂を抑制することが示されている。フラボノール配糖体は、フラボン骨格3位のヒドロキシ基と、グルコースやラムノースなどの糖部のヒドロキシ基が脱水縮合されグリコシド結合した化合物である。フラボノール配糖体を酸性条件下で水と反応させると、グリコシド結合部が加水分解されアグリコンと糖部に分かれる。今回、タデアイ葉と茎の抽出物をDIAION HP-20カラムで精製した標品と、この標品を酸加水分解し、フラボノール配糖体をアグリコンと糖に分解した酸加水分解物のNO産生抑制能についても確認した（図2-1）。

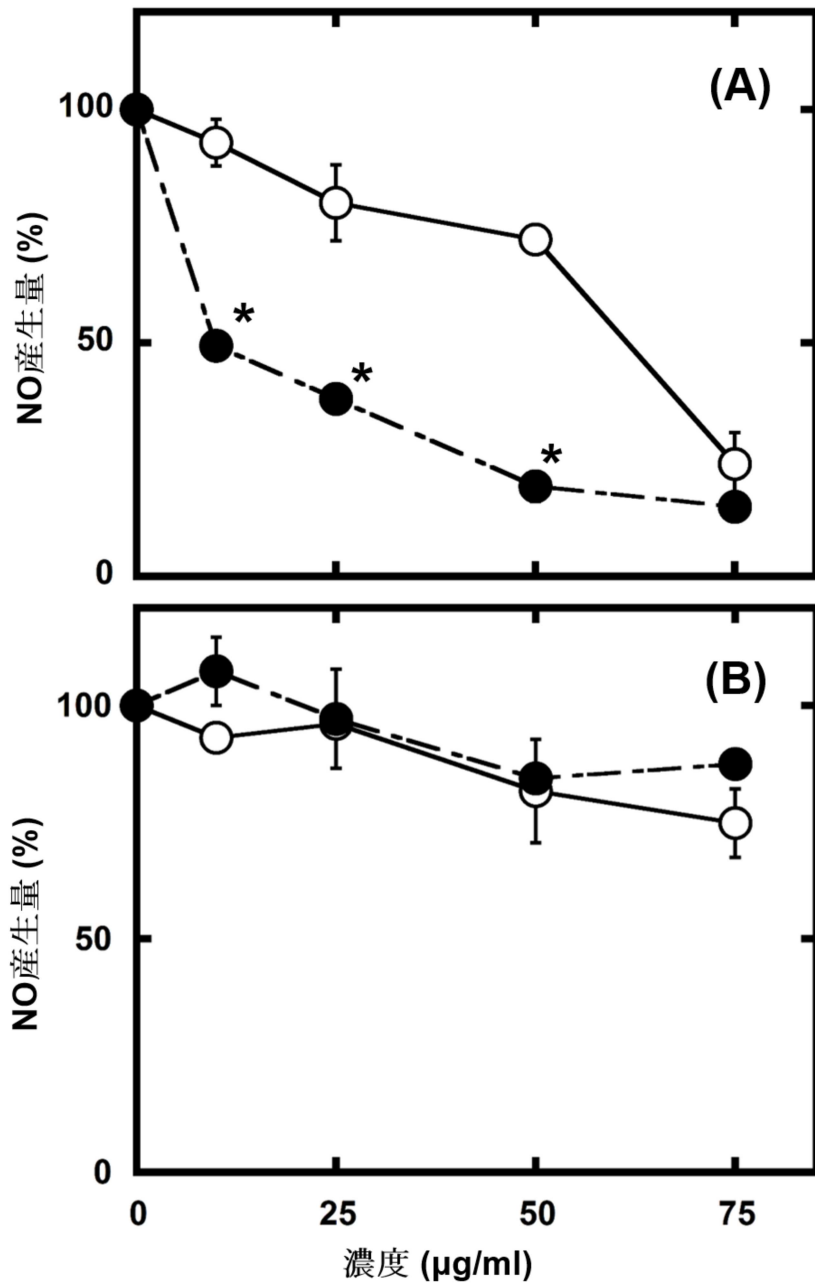


図 2-1 マウスマクロファージ様細胞 (RAW264) におけるタゲアイ葉 (A) および茎 (B) 由来の抽出物を DIAION HP-20 カラムで精製した標品とそれらの酸加水分解物の NO 産生抑制能

RAW264 は 2.5×10^5 cells/ml の濃度で 100 µl を 96 穴プレートに播種し、リポポリサッカリド (LPS) を最終濃度 1 µg/ml になるよう添加して 24 時間培養した。タゲアイ抽出物を DIAION HP-20 カラムで精製した標品またはそれらの酸加水分解物を添加する際は、LPS 添加と同時に

行った。

○，タデアイ葉または茎の抽出物を DIAION HP-20 カラムで精製した標品；●タデアイ葉または茎の DIAION HP-20 カラムで精製した標品の酸加水分解物

葉と茎の 80%メタノール抽出物の NO 産生抑制能を測定したところ，どちらの抽出物も RAW264 の NO 産生を抑制しなかった。そこで糖類，タンパク質などの夾雑物を取り除く目的で DIAION HP-20 カラムで精製した。この精製した標品を用いて NO 産生能を調べたところ，葉の精製標品で NO 産生抑制能が確認された（図 2-1）。さらに，葉の精製標品の酸加水分解物は酸加水分解前の標品に比べて，強い NO 産生抑制能を示した。一方，茎では，酸加水分解物でも NO 産生抑制能は確認されなかった。

以前に我々はタデアイ葉には多くのフラボノール配糖体が含まれている事を報告した¹⁴⁾。葉の精製標品で NO 産生が抑制されるのは，フラボノール配糖体，あるいはトリプタンスリンの抗炎症作用によるものと推測された。さらに葉の精製標品の酸加水分解で，NO 産生抑制能が強くなった理由として，フラボノール配糖体が NO 産生抑制能の高いアグリコンとなったためと推測された。そこで，タデアイ葉と茎の成分を分析する目的で，葉および茎の各 80%メタノール抽出物を UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析した。分析結果を図 2-2 に示す。

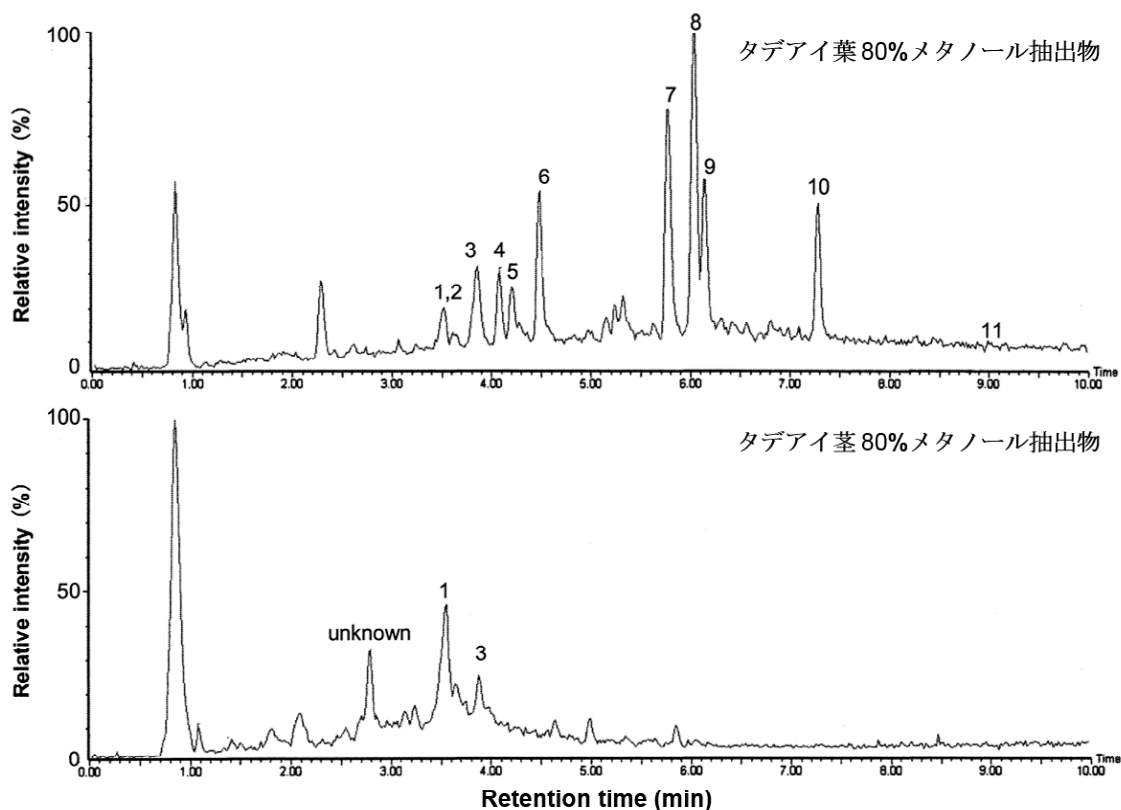


図 2-2 タデアイ葉または茎 80%メタノール抽出物の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析結果

タデアイ葉からは 11 のフラボノール配糖体を確認できた。私たちの研究室では以前に、タデアイ葉から新規物質をふくむ 11 種類のフラボノールを同定しており、今回確認できたフラボノール配糖体と同一であることを確認した¹⁴⁾。それぞれの物質名を以下に記す。

(1) quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide, (2) quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, (3) quercetin-3-*O*-[6''-*O*-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside], (4) kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (astragalol), (5) isorhamnetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, (6) kaempferol-3-*O*-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside], (7) 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-*O*- β -D-glucopyranoside, (8) 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-*O*-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside], (9) 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-*O*-[6''-(acetyl)- β -D-glucopyranoside], (10) 3,5,4'-

trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2''-(acetyl)- β -D-glucuronide] , (11) 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone . タデアイ茎からは , ケルセチンをアグリコンとするフラボノール配糖体の quercetin-3-O- β -D-glucuronide と quercetin-3-O-[6''-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside] を確認できたが , 他のフラボノール配糖体は確認できなかった . 抽出物中の総ポリフェノール量を測定したところ , 葉では 76.4 mgGAE/gDW , 茎では 191.4 mgGAE/gDW 含まれており , 茎の方がポリフェノール量としては多いものの , NO 産生能は確認できなかった . 抗炎症作用を示すと報告のあるトリプタンスリンを HPLC で定量したところ , 葉に 2.3 mg/gDW 検出された .

フラボノール配糖体は体内でアグリコンと糖に分解され , アグリコンが抗炎症作用を示すと報告されている²⁴⁾ . そこで , タデアイ葉と茎抽出物の DIAION HP-20 精製物を酸加水分解し , アグリコンを含む酸加水分解サンプルの NO 産生抑制能を測定した (図 2-1) . その結果 , タデアイ葉は酸加水分解する前のサンプルより強い NO 産生抑制能を示した . タデアイ葉の 80%メタノール抽出物の酸加水分解物を UPLC-ESI-TOF/MS^E で分析したところ , タデアイ葉に含まれるフラボノール配糖体のアグリコンであるケルセチン , ケンペロール , イソラムネチン , TMF が検出され , フラボノール配糖体はほとんど確認されなくなった (図 2-3) . タデアイ葉抽出物が , 酸加水分解物で NO 産生抑制能が強くなったのは , これらのアグリコンが抗炎症作用を発揮したためだと推察される . 以上の結果より , タデアイの抗炎症作用を示す物質は葉に局在し , フラボノールおよびトリプタンスリンがその機能を担っていると推定された .

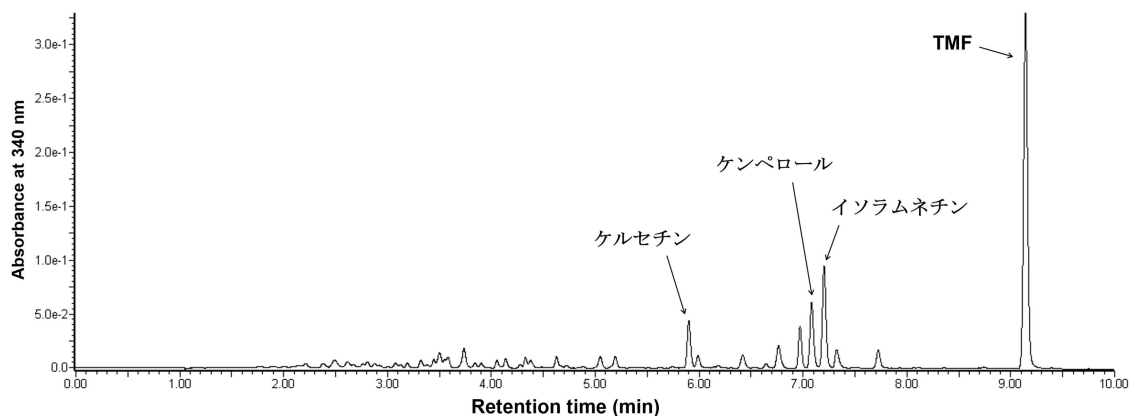


図 2-3 タデアイ葉 80%メタノール抽出物の酸加水分解後の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析結果

2-3-2 タデアイ葉由来フラボノール化合物とトリプタンスリンの NO および PGE₂ 産生抑制能

タデアイの抗炎症作用を示す物質は葉に局在している事が分かったため、葉に含まれているフラボノール化合物とトリプタンスリンの抗炎症能を網羅的に調べることにした。我々は、これまでにタデアイ葉から新規物質をふくむ 11 種類のフラボノール配糖体を同定している¹⁴⁾。またタデアイにはフェノール酸のカフェイン酸、クロロゲン酸が含まれていることを報告している³¹⁾。そのため、これらのフラボノール配糖体およびフェノール酸、トリプタンスリンについて NO 産生抑制能と PGE₂ 産生抑制能を測定した。Ishikawa-Takano らによれば、フラボノールの配糖体は、アグリコンと比べると PGE₂ 産生抑制能が低かったと報告されている³⁰⁾。また、フラボノール配糖体は、体内でアグリコンと糖に分解されて吸収されることから¹⁸⁾¹⁹⁾、タデアイ由来のフラボノール配糖体のアグリコンについても同様に試験を行った (表 2-1)。

表 2-1 RAW264 におけるタデアイの抗炎症性物質の NO および PGE₂ 産生抑制の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) 値

物質名	NO 産生 IC ₅₀ (μM)	PGE ₂ 産生 IC ₅₀ (μM)
quercetin-3-O-β-D-glucuronide	64.8 ^b ± 6.1	97.7 ^c ± 2.8
quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside	>200	>200
quercetin-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	>200	139.9 ^b ± 10.4
kaempferol-3-O-D-glucopyranoside	>200	183.1 ^a ± 4.7
isorhamnetin-3-O-D-glucopyranoside	>200	>200
kaempferol-3-O-[6"-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	>200	>200
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside	>200	>200
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	>200	>200
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(acetyl)-β-D-glucopyranoside]	>200	>200
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-O-(acetyl)-β-D-glucuronide]	158.7 ^a ± 1.8	83.8 ^c ± 4.9
TMF	18.8 ^{c,d} ± 0.9	16.7 ^d ± 1.1
ケルセチン	13.2 ^{c,d} ± 2.1	11.8 ^d ± 1.3
ケンペロール	29.5 ^c ± 1.7	3.9 ^d ± 0.8
イソラムネチン	23.5 ^{c,d} ± 3.2	6.1 ^d ± 1.2
カフェイン酸	>200	>200
クロロゲン酸	>200	>200
トリプタンスリン	3.9 ^d ± 0.2	1.1 ^d ± 0.3

データは平均 ± 標準誤差 (n=3) で示した。a, b, c, d は、異なる文字間で有意差が 5% 以下であることを示す。

NO 産生抑制能と PGE₂ 産生抑制能を測定した結果，フラボノール配糖体はいずれも NO 産生抑制能および PGE₂ 産生抑制能はアグリコンに比べて低かった．過去の報告でタデアイの抗炎症物質はトリプタンスリン⁹⁾¹⁰⁾，インディゴ¹¹⁾，インディルビン¹²⁾であると報告されている．一方で我々は，主要なポリフェノールとして TMF をアグリコンに有するフラボノール配糖体が含まれていることを報告した¹⁴⁾．フラボノール配糖体の中で NO 産生抑制能が確認できたのは糖部がグルクロン酸である quercetin-3-O-β-D-glucuronide と 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2''-(acetyl)-β-D-glucuronide]であった．過去の報告で，マクロファージ細胞である RAW264 は LPS で刺激すると，β-グルクロニダーゼを分泌し，その結果，quercetin-3-O-β-D-glucuronide は脱抱合されケルセチンの状態で細胞に取り込まれることが明らかとなっている²⁴⁾．このことから quercetin-3-O-β-D-glucuronide と 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2''-(acetyl)-β-D-glucuronide] は，LPS 刺激を受けた RAW264 細胞が分泌した β-グルクロニダーゼによって分解され，細胞内にアグリコンが取り込まれたために抗炎症作用を示したのではないかと考えられる．フラボノール配糖体は通常，腸でアグリコンと糖に分解されてから吸収されグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体として，生体内の様々な臓器に運ばれてから，再度脱抱合され抗炎症作用などの機能を果たしていると考えられる^{18-42,44)}．したがって，フラボノール配糖体のアグリコンの抗炎症活性を把握することが重要であると推察される．タデアイ葉の主要なフラボノール配糖体のアグリコンである TMF の NO 産生抑制能はケルセチンよりやや弱いがケンペロールやイソラムネチンよりも強い活性を示した．一方，PGE₂ 産生抑制能は，ケルセチン，ケンペロール，そしてイソラムネチンよりも低かった．トリプタンスリンの NO 産生の 50 % 阻害濃度が 3.9 ± 0.2 μM に対し，TMF では 18.8 ± 0.9 μM であった．一方，トリプタンスリンの PGE₂ 産生の 50 % 阻害濃度が，1.1 ± 0.3 μM に対し，TMF では 16.7 ± 1.1 μM であった．この結果から，過去の報告の通りトリ

プタンスリンは抗炎症物質として有効であることが示された。

2-3-3 タデアイ葉主要フラボノール配糖体の体内吸収

フラボノール配糖体の抗炎症作用は、アグリコンと比べて低いことが分かり、この結果は Ishikawa-Takano らの結果と一致した³⁰⁾。一方で、これまでに記述した通り、フラボノール配糖体は、経口摂取後、体内でアグリコンと糖に分解され、アグリコンが腸で吸収される¹⁸⁾¹⁹⁾。また、体内に吸収されたアグリコンは、肝臓でグルクロン酸や硫酸と抱合するが、炎症性刺激により脱抱合化が促進され、アグリコンとなり抗炎症作用を示すことが報告されている²⁴⁾。タデアイ葉には TMF 配糖体が豊富に含まれているが、これらの体内吸収については不明である。そこで、TMF 配糖体の体内吸収を調べるため、DIAION HP-20 および Chromatorex ODS カラムを用いて、タデアイ葉 80%メタノール抽出物より、4つの TMF 配糖体を含むフラクションの精製を行った。精製したタデアイ葉由来 TMF 配糖体フラクションを UPLC-ESI-TOF/MS^E で分析した結果を図 2-4 に示す。

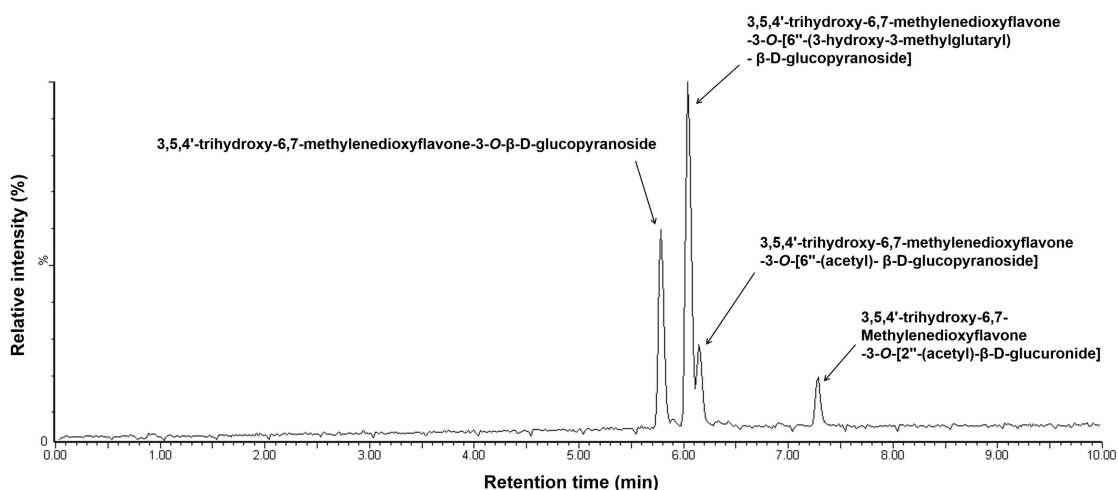


図 2-4 TMF 配糖体フラクションの UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析結果

タデアイ葉由来 TMF 配糖体フラクションを分析したところ、
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside, 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside], 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6''-(acetyl)-β-D-glucopyranoside], 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2''-(acetyl)-β-D-glucuronide] のみが検出された。また、TMF 配糖体以外のフラボノール配糖体は精製過程で除去されたことにより検出されなかった。この TMF 配糖体フラクションを用いて、TMF 配糖体の体内吸収について調べるため、ICR マウスに TMF 配糖体フラクション溶解液を経口投与し、一時間後の血中成分を UPLC-ESI-TOF/MS^Fにて分析した(図 2-5)。

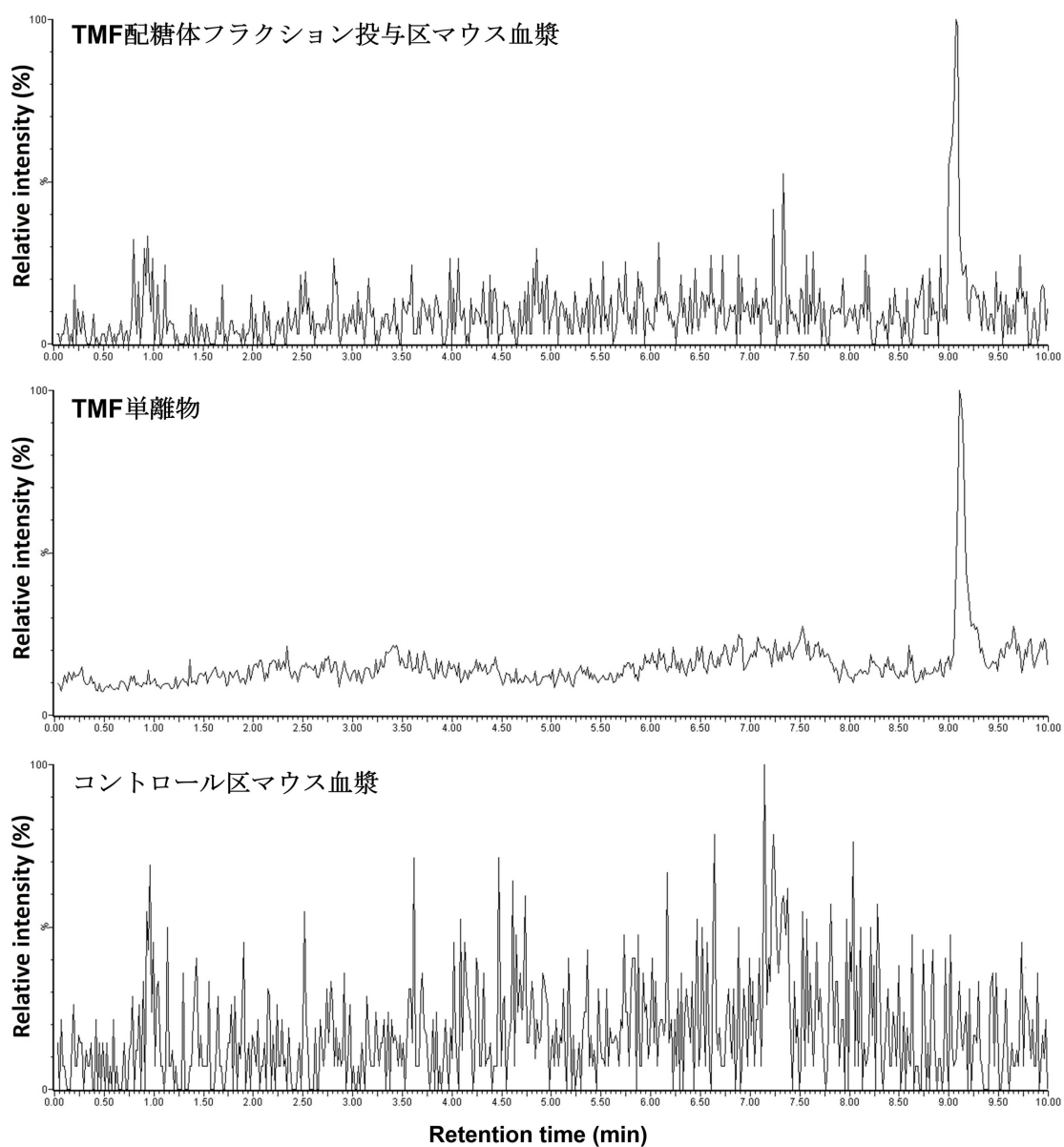


図 2-5 ICR マウス血漿のアセトン抽出物の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析結果
 TMF を反映する m/z 313 をターゲットイオンとして，TMF 配糖体フラクション投与区と，水を投与したコントロール区の ICR マウス血漿中成分を分析した．また，TMF 配糖体フラクションを酸加水分解し，アグリコンの TMF を再結晶化して得た TMF 単離物も同様に分析した．

TMF 配糖体フラクションをマウスに経口投与し，1時間後の血中成分を UPLC-ESI-TOF/MS^Eにて分析したところ，リテンションタイム 9.1分時に TMF を反映する m/z 313 の物質のピークが確認された．このピークは TMF 単離物のピークと一致したことから，TMF 配糖体フラクション中の配糖体は，アグリコンの状態では血中に存在していたと考えられる．フラボノール配糖体は，腸内において，ケルセチン配糖体は腸内細菌や β -グルコシダーゼ，*lactase phloridizin hydrolase* によりアグリコンと糖鎖部位に分解される¹⁸⁾¹⁹⁾．分解後のアグリコンは腸管にて吸収され，吸収されたアグリコンは肝臓にて *glucuronosyltransferase* または *sulfotransferase* によりグルクロン酸抱合または硫酸抱合され血中に存在することが報告されている²⁰⁻²²⁾．本実験では TMF 単体が血漿中から検出されたため，肝臓にてグルクロン酸や硫酸で抱合される前の TMF を血中から回収したと考えられる．

TMF 配糖体が体内にアグリコンとして吸収されていることから，他のフラボノールと同様に，アグリコンが抗炎症作用を発揮することが考えられる．表 2-1 より，トリプタンスリンはタデアイ成分の中では最も抗炎症作用が強く，TMF と比較して NO 産生抑制能は 4.8 倍，PGE₂ 産生能は 15.2 倍である．ここで，タデアイ葉 80%メタノール抽出物中に含まれる TMF 配糖体およびトリプタンスリンの定量値を表 2-2 に示す．

表 2-2 タデアイ葉 80%メタノール抽出物の乾燥重量中における TMF 配糖体およびトリプタンスリンの定量値

物質名	mg/g DW
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside	10.8 (7.1)
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6''-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	46.0 (23.3)
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6''-O-(acetyl)-β-D-glucopyranoside]	26.0 (15.8)
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2''-O-(acetyl)-β-D-glucuronide]	32.7 (19.3)
トリプタンスリン	2.3

タデアイ葉 80%メタノール抽出物の乾燥重量 1 g あたりに含まれる各化合物の定量値を示す。括弧内の数値は、80%メタノール抽出物における TMF 配糖体量のうち、アグリコンである TMF 相当量を表している。TMF 相当量は、TMF 配糖体と TMF の分子量より求めた計算値で示した。

表 2-2 より、葉の 80%メタノール抽出物における TMF 配糖体の合計値はトリプタンスリンの約 50 倍であるため、これらの配糖体がアグリコンに変換されると考えると、タデアイの有する抗炎症作用はトリプタンスリンよりも TMF が大きく貢献していると考えられる。本試験より、TMF 配糖体は体内で分解されてアグリコンとして血中に存在することが示唆されることから、タデアイ葉に特徴的に含まれている配糖体のアグリコンの TMF はタデアイの主要な抗炎症物質だと考えられる。

2-3-4 タデアイ葉主要フラボノール配糖体の抗酸化性

炎症は酸化ストレスによって引き起こされることから、抗酸化性と抗炎症作用には深い関連がある。実際に、炎症を含む多くの非感染性疾患の特徴として、加齢とともに有病率が上昇することから、老化などの関連が強く示唆されてきている。老化、がん、生活習慣病などの予防には、体内で増えた活性酸素の除去が重要とされている。フラボノール化合物の共通の機能として抗酸化性があげられるが、タデアイ葉の主要な TMF 配糖体についての抗酸化性についての報告はない。そこで、これらの抗酸化性を H-ORAC 法にて評価し、すでに報告のあるケルセチンおよびケンペロールと比較した(表 2-3)。

表 2-3 TMF 配糖体および TMF, ケルセチン, ケンペロールのトロックス換算 (mol TE/mol) での H-ORAC 値

物質名	H-ORAC (mol TE/mol)
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside	6.03 ^{b,c} ± 0.06
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	6.50 ^e ± 0.15
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(acetyl)-β-D-glucopyranoside]	5.67 ^{b,c} ± 0.08
3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-O-(acetyl)-β-D-glucuronide]	5.37 ^{b,c} ± 0.15
TMF	2.22 ^d ± 0.38
ケルセチン	11.34 ^a ± 0.30
ケンペロール	3.64 ^{e,d} ± 0.61

データは平均 ± 標準誤差 (n=3) で示した。a, b, c, d は、異なる文字間で有意差が 5% 以下である事を示す。

TMF 配糖体の抗酸化性はケルセチンと比べると低かったが，ケンペロールよりも高い値を示した．また，抗炎症作用とは逆に，TMF 配糖体はアグリコンの TMF やケンペロールよりも高い抗酸化性を示した．TMF 配糖体はタデアイ葉の主要なフラボノール配糖体であるため，タデアイ葉の抗酸化性に大きく貢献すると推察される．

2-4 考察

抗炎症作用を有する物質が，タデアイの葉と茎のいずれに含まれているのかを調べるため，タデアイ葉と茎の 80%メタノール抽出物を DIAION HP-20 で精製し夾雑物を取り除いたサンプルの NO 産生抑制能を測定したところ，タデアイ葉のみに NO 産生抑制能が確認された(図 2-1)．そこで，タデアイの葉と茎の 80%メタノール抽出物を UPLC-ESI-TOF/MS^f で分析したところ，タデアイ葉には，これまでに私たちの研究室で同定している 11 のフラボノール配糖体が確認されたが¹⁴⁾，タデアイ茎からは，11 のフラボノール配糖体のうち，*quercetin-3-O-β-D-glucuronide* と *quercetin-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]* しか検出されなかった．さらにタデアイ葉からは，抗炎症作用を示すと報告のあるトリプタンスリンが 2.3 mg/gDW 検出された(表 2-2)．これらのことから，タデアイの抗炎症作用を示す物質は葉に局在し，フラボノール化合物およびトリプタンスリンがその機能を担っていると推定される．続いて，タデアイ葉に含まれているフラボノール配糖体およびこれらの配糖体のアグリコン，フェノール酸，トリプタンスリンについて NO および PGE₂ 産生抑制能を測定した(表 2-1)．その結果，トリプタンスリンは過去の報告の通り¹⁰⁾，高い NO および PGE₂ 産生抑制能が確認された．フラボノール配糖体については，グルクロニドを糖鎖にもつ *quercetin-3-O-β-D-glucuronide* と *3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-(acetyl)-β-D-glucuronide]* 以外は活性が見られなかった．しかしながら，アグリコ

ンとなるケルセチン，ケンペロール，イソラムネチン，そして TMF には顕著な NO および PGE₂ 産生抑制能がみられた．酸加水分解したタデアイ葉 80%メタノール抽出物が，高い NO 産生抑制能を示したのは，フラボノール配糖体が分解されてアグリコンになったからだと考えられる(図 2-1)．また，タデアイ葉 80%メタノール抽出物の酸加水分解物を UPLC-ESI-TOF/MS^E で分析したところ，TMF が主要なアグリコンであることが確認された(図 2-3)．フラボノール配糖体は，消化器官で分解され，アグリコンとして体内に取り込まれることが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾．このため，タデアイ葉に多く含まれるフラボノール配糖体も，体内で分解されてアグリコンの状態になることで抗炎症作用を示すことが期待される．そこで，DIAION HP-20 および Chromatorex ODS カラムを用いて，タデアイ葉 80%メタノール抽出物より，TMF 配糖体を豊富に含むフラクションの精製を行った(図 2-4)．TMF 配糖体フラクションを ICR マウスに経口投与し，1 時間後の血漿中の成分を分析したところ，アグリコンの TMF が検出された(図 2-5)．この結果より，TMF 配糖体フラクション中の配糖体は，アグリコンの状態で血中に存在していたと考えられる．腸管で吸収されたアグリコンは，肝臓にて glucuronosyltransferase または sulfotransferase によりグルクロン酸抱合または硫酸抱合され血中に存在することが報告されている²⁰⁻²²⁾．本実験では TMF のグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体は検出されなかったため，肝臓にてグルクロン酸や硫酸で抱合される前の TMF を血中から回収したと考えられる．TMF 配糖体が体内にアグリコンとして吸収されていることから，アグリコンの TMF が体内で抗炎症作用を発揮することが考えられる．表 2-1 より，トリプタンスリンはタデアイ成分の中では最も抗炎症作用が強く，TMF と比較して NO 産生抑制能は 4.8 倍，PGE₂ 産生能は 15.2 倍である．一方で，表 2-2 より，葉の 80%メタノール抽出物における TMF 配糖体の合計値はトリプタンスリンの約 50 倍，アグリコンの TMF 換算合計値と比べて約 28 倍であった．これらのことから，タデアイの

有する抗炎症作用はトリプタンスリンよりも TMF が大きく貢献していると考えられる。

以上より，タデアイの抗炎症物質については，トリプタンスリン⁹⁾¹⁰⁾や，青色色素のインディゴ¹¹⁾およびインディルビン¹²⁾などの報告がこれまでにされている。しかし，タデアイ生葉にはインディゴ，インディルビンはほとんど存在せず，現在のところ，トリプタンスリンが抗炎症作用の活性本体と推定されている。しかしながら，今回の研究で量的面から推察して，TMF配糖体が実質的な抗炎症物質であることが推察された。

2-5 文献

- [1] K. Iwaki, M. Kurimoto, Cancer preventive effects of the indigo plant, *Polygonum tinctorium*. *Recent Res. Devel. Cancer*. 4 (2002) 429-437.
- [2] H.G. Jang, B.G. Heo, Y.S. Park, J. Namiesnik, D. Barasch, E. Katrich, K. Vearasilp, S. Trakhtenberg, S. Gorinstein. Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait) plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167 (2012) 1986-2004.
- [3] T. Kimoto, S. Koya, K. Hino, Y. Yamamoto, H. Aga, T. Hashimoto, N. Masaki, T. Hanaya, M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Arai, M. Ikeda, S. Fukuda, M. Kurimoto. Protection by Indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.) against renal oxidative damage in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Nat. Med.* 53 (1999) 291-296.
- [4] T. Kunikata, T. Takefuji, H. Aga, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. Indirbin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *Eur. J. Pharmacol.* 410 (2000) 93-100.

- [5] T. Hashimoto, H. Aga, H. Chaen, S. Fukuda, M. Kurimoto. Isolation and identification of anti-helicobacter pylori compounds from *Polygonum tinctorium* Lour. *Nat. Med.* 53 (1999) 27-31.
- [6] H. Kohda, A. Niwa, Y. Nakamoto, O. Takeda. Flavonoid glucosides from *Polygonum tinctorium*. *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 523-524.
- [7] S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M.J. Micallef, K. Hino, M. Taniguchi, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors by a crudeethyl acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour. *Anticancer Res.* 21 (2001) 3295-3300.
- [8] 村上光太郎, 徳島県薬草図鑑 < 上 >, 徳島新聞社. (1985) 132-133.
- [8] M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M. Ikeda, K. Hino, M. Kurimoto. The natural plant product tryptanthrin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 565-578.
- [10] T. Ishihara, K. Koho, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E₂ synthesis by murine macrophages, *Eur. J. Pharmacol.* 407 (2000) 197-204.
- [11] Kawai, S., Iijima, H., Shinzaki, S., Hiyama, S., Yamaguchi, T., Araki, M., Iwatani, S., Shiraishi, E., Mukai, A., Inoue, T., Hayashi, Y., Tsujii, M., Motooka, D., Nakamura, S., Iida, T., Takehara, T. Indigo Naturalis ameliorates murine dextran sodium sulfate-induced colitis via aryl hydrocarbon receptor activation. *J. Gastroenterol.* 52 (2017) 904-919.
- [12] Lai, J.L., Liu, Y.H., Liu, C., Qi, M.P., Liu, R.N., Zhu, X.F., Zhou, Q.G., Chen, Y.Y., Guo, A.Z., Hu, C.M. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation.* 40 (2017) 1-12.

- [13] Minami, Y., Kanafuji, T., Miura, K. Purification and characterization of a β -glucosidase from *Polygonum tinctorium*, which catalyzes preferentially hydrolysis of indican. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (1996) 147-149.
- [14] H. Kimura, S. Tokuyama, T. Ishihara, S. Ogawa, K. Yokota, Identification of new flavonol *O*-glycosides from indigo (*Polygonum tinctorium* Lour) leaves and their inhibitory activity against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 108 (2015) 102-112.
- [15] G.D. Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo, F. Capasso. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65 (2000) 357-353.
- [16] J.V. Formica, W. Regelson. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 1061-1080.
- [17] J.M. Calderon-Montaña, E.Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, M. Lopez-Lazaro. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini. Rev. Med. Chem.* 11 (2011) 298-344.
- [18] Mullen, W., Edwards, C.A., Crozier, A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions, *Br. J. Nutr.* 96 (2006) 107-116.
- [19] Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W. Morgan, M.R. Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 468 (2000) 166-170
- [20] van der Woude, H., Boersma, M.G., Vervoort, J., Rietjens, I.M., Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1520-1530.

- [21] Zhang, Y., Ouyang, L., Mai, X., Wang, H., Liu, S., Zeng, H., Chen, T., Li, J. Use of UHPLC-QTOF-MS/MS with combination of in silico approach for distributions and metabolites profile of flavonoids after oral administration of Niu Huang Shangqing tablets in rats. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* (2019) 1114-1115:55-70.
- [22] Mullen, W., Crozier, A. HPLC-MS2 Metabolite Profiling of Quercetin Methyl, Glucuronyl, Glucosyl and Sulpho-Conjugates in Plasma and Urine after the Ingestion of Onions by Human Volunteers. *J. Oil Palm. Res. Special Issue* (2006) 65-80
- [23] Shimoi, K., Nakayama, T. Glucuronidase deconjugation in inflammation. *Methods Enzymol.* 400 (2005) 263-272.
- [24] Ishisaka, A., Kawabata, K., Miki, S., Shiba, Y., Minekawa, S., Nishikawa, T., Mukai, R., Terao, J., Kawai, Y. Mitochondrial dysfunction leads to deconjugation of quercetin glucuronides in inflammatory macrophages. *PLoS One*, 8 (2013) e80843
- [25] Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Santos-Buelga, C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.* 92 (2012) 1822-1825.
- [26] Julkunen-Tiitto, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics., *J. Agric. Food Chem.* 53 (1985) 213-217.
- [27] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 126 (1982) 131-138 .
- [28] J. Watanabe, T. Oki, J. Takebayashi, Y. Takano-Ishikawa, Extraction efficiency of hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid

extraction and manual extraction, *J. Food Sci*, 79 (2014) 1665-1671 .

- [29] T. Ishihara, T. Okura, K. Kohno, T. Tanimoto, H. Ikegami, M. Kurimoto. *Polygonum tinctorium* extract suppresses nitric oxide production by activated macrophages through inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. *J. Ethnopharmacol.* ,72 (2000) 141-150.
- [30] Y. Takano-Ishikawa, M. Goto, K. Yamaki. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E₂ production in rat peritoneal macrophages: Comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, 13 (2006) 310-317.
- [31] H. Kimura, T. Ishihara, M. Michida, S. Ogawa, T. Akihiro, K. Yokota, Identification and quantitative analysis of polyphenolic compounds from indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour). *Nat. Prod. Res.* 7 (2014) 492-495.

第3章 タデアイの各生育段階でのフラボール配糖体の構造解析および定量

3-1 序論

タデアイは日本で古くから薬用植物として、解毒、解熱、消炎などの目的で利用されてきた¹⁾。その一方で日本の一部の地方では、タデアイはタデ酢などの食品原料としても利用されている。徳島県薬草図鑑によると、タデアイの生葉汁は塗布することで火傷、口内炎、唇のあれ、腫物、ハチやその他毒虫の刺し傷に効果があるとされている²⁾。また、韓国では、タデアイは *Naju Jjok* と呼ばれる伝統的な薬の原料であり、解熱、解毒目的で使用されている³⁾。タデアイの機能性物質については、抗酸化物質として没食子酸やカフェイン酸⁴⁾、抗アレルギー作用を示すインディルビン⁵⁾、ヘリコバクター・ピロリに対する抗菌作用⁶⁾を示すトリプタンスリン、6-メトキシケンペロール、ケンペロールおよび TMF、抗血液凝固作用⁷⁾を示す物質として TMF、抗癌作用⁸⁾および抗炎症作用⁹⁾を示す物質としてトリプタンスリンが報告されている。これまでに我々の研究室では、タデアイ葉に、ケルセチン、ケンペロール、イソラムネチン、そして TMF をアグリコンとする 11 のフラボノール配糖体が存在することを確認している¹⁰⁾¹¹⁾。さらに、TMF 配糖体およびこれらのアグリコンがコレステロールの生合成に関わる HMG-CoA レダクターゼを阻害することを明らかにした¹⁰⁾。また、第2章では、タデアイ葉中の TMF 配糖体は体内で分解されてアグリコンの TMF となり抗炎症作用を示すことが示唆された。

タデアイの葉が薬用部位として利用されてきた一方で、藍実（ランジツ）と呼ばれるタデアイ種子も古くから薬用部位として利用されている²⁾。タデアイの葉と種子は、1日に5～10g煎じて服用すると、解毒および解熱剤として効果があると徳島県薬草図鑑に記載

されており²⁾、タデアイ種子にも生理活性を示す物質が存在していると考えられる。これまでに我々の研究室で、タデアイ葉にはフラボノールの TMF をアグリコンとする TMF 配糖体が豊富に存在することが分かっている¹⁰⁾。TMF および TMF 配糖体は、タデアイ葉に特徴的に含まれている物質群であるが、これらが、種子にも含まれているのか、あるいは生育過程で生合成されているのかは不明である。Jang らは、タデアイの種子、未熟な葉、成熟した葉の水抽出物について抗酸化能や MTT アッセイを用いて抗増殖活性を測定しているが、詳細な成分の分析は行っていない¹²⁾。また、タデアイの種子およびスプラウトのフラボノールについて詳細に調査した報告は我々の知る限りまだない。種子、スプラウト、成熟した葉茎といった各生育段階のタデアイに含まれるフラボノール化合物を調査し、さらに各生育段階におけるタデアイ抽出物の機能性を評価することで、古くから薬用植物として利用されてきたタデアイの薬理的機能解明の一助となると考えられる。そこで本章では、各生育段階のタデアイに含まれるフラボノール配糖体の構造解析と各生育段階におけるタデアイ抽出物の抗酸化性について検討を行った。

3-2 実験材料と実験方法

3-2-1 実験材料および実験機器

タデアイの種子はタキイ種苗(株)(京都)から2016年または2017年にそれぞれ購入した。Quercetin-3-O- β -D-glucuronide, quercetin-3-O- α -L-rhamnoside, kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside, 2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル(DPPH), 6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(Trolox®), フルオレセインナトリウム, Folin-Ciocalteu reagent, HPLC用アセトニトリルはSigma(St. Louis, MO, USA)から得た。Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (astragalín), isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside は EXTRASYNTHÈSE

(Lyon, France) 製のものを用いた。ケルセチン, ケンペロール, ヘスペレチン, 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) およびその他試薬は, 富士フィルム和光純薬工業 (大阪) から得た。DIAION HP-20 は三菱ケミカルアクア・ソリューションズ (旧社名, 日本錬水) (東京) より得た。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析には Shimadzu (京都) 製の LC-2010A と Chromatopac C-R8A を使用した。UPLC-ESI-TOF/MS^E には Waters Corporation (Milford, MA, USA) の ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) システムと SYNAPT G2 HDMS システムを使用した。超音波破碎機は, ブランソン超音波洗浄機 (日本エマソン製, 神奈川県) を用いた。凍結乾燥機は, TOKYO RIKAKIKAI (東京) 製の FDU-1110 を用いた。マイクロプレートリーダーは Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) の Multiskan GO を用いた。蛍光マイクロプレートリーダーは TECAN (川崎) 製 infinite F 200 を用いた。

3-2-2 タデアイ由来ポリフェノールの抽出および精製法

タデアイの種子 (voucher number,;16001) 5.8 g を乳鉢で摩砕後, 80%メタノール 100 ml を加え, 超音波洗浄機を用いて 20 °C, 20 分間ソニケーションした。ADVANTEC No.2 濾紙を用いてろ過後, 濾液をロータリーエバポレーターを用いて 40 °C で減圧濃縮した。この抽出物を蒸留水に溶解して DIAION HP-20 カラム (200 × 30 mm i.d.) に注入した後, 蒸留水 500 ml で洗浄し, メタノール 400 ml で溶出した。この溶出液をエバポレーターで減圧乾固後, 一晚真空デシケーターにて乾燥させ, 42.1 mg の抽出物を得た。タデアイのスプラウト (voucher number,;16002) は, 2016 年 4 月 2 日に播種した後, 4 月 18 日に収穫したものの 1.4 g を用いて, 同様の方法で抽出し 30 mg の抽出物を得た。また 7 月 20 日に収穫したタデアイの葉茎 (voucher number,;16003) 16.8 g から, 同様の方法で抽出を行い, 600 mg の抽出物を得た。これらのサンプル

ルを UPLC-ESI-TOF/MS^E で分析に用いた。2017 年のサンプルは、種子 (voucher number,;17001) を 2017 年 3 月 29 日に播種した後、スプラウト (voucher number,;17002) を 4 月 14 日に収穫した。また、タデアイの葉茎 (voucher number,;17003) は 7 月 3 日に収穫し、前述と同様の方法で抽出を行った。

3-2-3 フラボノール配糖体の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析

UPLC-ESI-TOF/MS^E による分析は、以前に我々の研究室で報告した方法と同様に行った¹⁰⁾ UPLC-ESI-TOF/MS^E は Waters Corporation (Milford, MA, USA) の ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) システムと SYNAPT G2 HDMS システムを使用した。UPLC カラムは Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 × 2.1 mm i.d., 粒径 1.7 μm) を使用した。カラム温度は 40 °C, 流速は 0.3 ml/min, 検出は photodiode array (PDA) detector を用いて 340 nm で行った。移動相は、10 分で 0.1% ギ酸 / アセトニトリル 90 : 10 (v/v) から 50 : 50 (v/v) の直線濃度勾配で溶出した。MS^E は negative mode で測定し、以下の条件で行った。測定感度は sensitive mode あるいは high resolution mode で測定した。

電圧 : キャピラリー 2.5 kV, サンプリグコーン 50V,

Extraction Cone 4.0 V

温度 : ソース 150 °C, Desolvation 500 °C

ガス流速 : コーンガス 50L/h Desolvation ガス 1000 L/h

スキャンタイム : 0.5 秒

Collision energy: Function 1, [Low energy] Trap collision energy ON 6 V

Transfer collision energy OFF

Function 2, [High energy] Ramp trap collision energy ON 6-45 V

Ramp transfer collision energy OFF

3-2-4 タデアイ種子抽出物のアルカリ分解

タデアイ種子の抽出物 1.0 mg を， 50%メタノール 0.5 ml に溶解し， 20%水酸化カリウム水溶液 0.5 ml を加え， 一晚室温にて反応させた． 塩酸で中和後， Grace 社 (Columbia, Maryland, USA) 製 Alltec C₁₈ Maxiclean cartridge カラムに注入後， 蒸留水 5 ml で洗浄し， メタノール 5 ml で溶出した． このメタノール溶出画分を UPLC-ESI-TOF/MS^Eにより分析した．

3-2-5 HPLC によるフラボノール配糖体の定量分析

タデアイ種子， スプラウト， 葉茎の各凍結乾燥物を乳鉢で摩砕後， 種子摩砕物の場合は 900 mg， スプラウトと葉茎は各 100 mg を 15 ml 容のファルコンチューブに入れ， 80 %メタノール 10 ml と内部標準として DMSO に溶解した 1.0 mg/ml ヘスペレチン溶液を 200 μ l 加えた． 30 秒間ボルテックスした後， ブランソン超音波洗浄機を用いて水温 20 $^{\circ}$ C で 20 分間ソニケーションし抽出した． この抽出物を， 遠心分離機を用いて 3000 rpm， 5 分間遠心処理した． 上清を回収後， 再度， 80 %メタノール 10 ml を加え同様の抽出を行った． 回収した上清を Kiriya No.4 濾紙を用いて吸引濾過した後， 80 %メタノールで 20 ml にフィルアップした． このうち 1.0 ml を取り， 窒素ガスで乾固後， HPLC の移動相である 0.1 %ギ酸水溶液 / アセトニトリル (95:5, v/v) 1 ml で溶解した． このサンプルを孔径 0.22 μ m のメンブレンフィルター (Shimadzu GLC, 東京) で濾過後， HPLC に供した． カラムは YMC (京都) 製の ODS-AM カラム (150 \times 3.0 mm i.d, 粒径 5 μ m) を用いた． 流速は 0.4 ml/min, 検出波長は 340 nm に設定した． 移動相は， 40 分で 0.1%ギ酸水溶液 / アセトニトリル 95 : 5 (v/v) から 60 : 40 (v/v) の直線濃度勾配で溶出した． 各フラボノール配糖体の定量値は， 試料の乾燥重量あたりのヘスペレチン相当量 (μ g HesE/gDW) として示した．

3-2-6 総ポリフェノール量および抗酸化性の測定

総ポリフェノール量はフォーリンチオカルト法¹³⁾により測定し、乾燥重量 1 g あたりの没食子酸換算量 (mg GAE/g DW) で示した。

Hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) の測定は、以前に我々の研究室で報告した方法と同様¹⁴⁾に、Watanabe らの方法¹⁵⁾に準じて行った。96 well マイクロプレートを用い、測定試料 20 μ l、75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 94.5 nM フルオレセイン溶液 (pH 7.0) 200 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C に保った蛍光マイクロプレートリーダー infinite F 200 (TECAN 製、川崎) を用いて、フルオレセインの蛍光強度を励起波長 485 nm、測定波長 535 nm で測定した。10 分後、75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 31.7 μ M の AAPH 溶液 75 μ l を加え、振盪攪拌後、添加 2 分後から 2 分間隔で 90 分間、蛍光強度の経時変化を測定した。蛍光強度を経時的に記録したグラフの曲線下面積を算出し、H-ORAC 値は 1 mol あたりの Trolox 相当量 (mol TE/mol) として表した。

タデアイ種子、スプラウト、葉茎の 2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去能の測定は過去に報告のある方法を一部改変して行った¹⁶⁾¹⁷⁾。50%メタノールに溶解させた 400 μ M DPPH 30 μ l、200 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) 30 μ l および 50%メタノール 30 μ l、50%メタノールに溶解させた試料もしくは Trolox 30 μ l を 96 穴プレートに分注した後、20 分間室温暗所で反応させた。反応後、Thermo Fisher Scientific K.K. (神奈川) の Multiskan GO マイクロプレートリーダーで 520 nm の吸光度を測定し、試料乾燥重量 1 g あたりの Trolox 換算量 (μ mol TE/g DW) を算出した。

3-2-7 統計処理

データは平均 \pm 標準誤差で示した。実験結果の統計処理には、one-way analysis of variance (ANOVA) 解析後 Tukey 法による検定を行い、 $p <$

0.05 の場合に有意であるとした。

3-3 結果

3-3-1 タデアイ種子，スプラウト，葉茎のフラボノール配糖体の成分分析

我々の研究室では既にタデアイ葉または茎の 80%メタノール抽出物中のフラボノール配糖体について同定している¹⁰⁾。また，第 2 章でも記述したとおり，タデアイ茎にはほとんどフラボノール配糖体が見られなかったが，タデアイ葉には多くの TMF 配糖体が含まれていることが明らかとなっている。しかし，タデアイの生育段階を通じて TMF 配糖体が存在しているかは不明である。そこで，タデアイ種子，スプラウト，葉茎の 80 %メタノール抽出物のフラボノール配糖体を分析した。タデアイ種子，スプラウト，葉茎の 80 %メタノール抽出物のフラボノール配糖体を UPLC-ESI-TOF/MS^E で分析した結果を図 3-1，表 3-1，3-2 に示す。また，分析結果より，同定されたフラボノール配糖体の構造式を図 3-2 に示す。

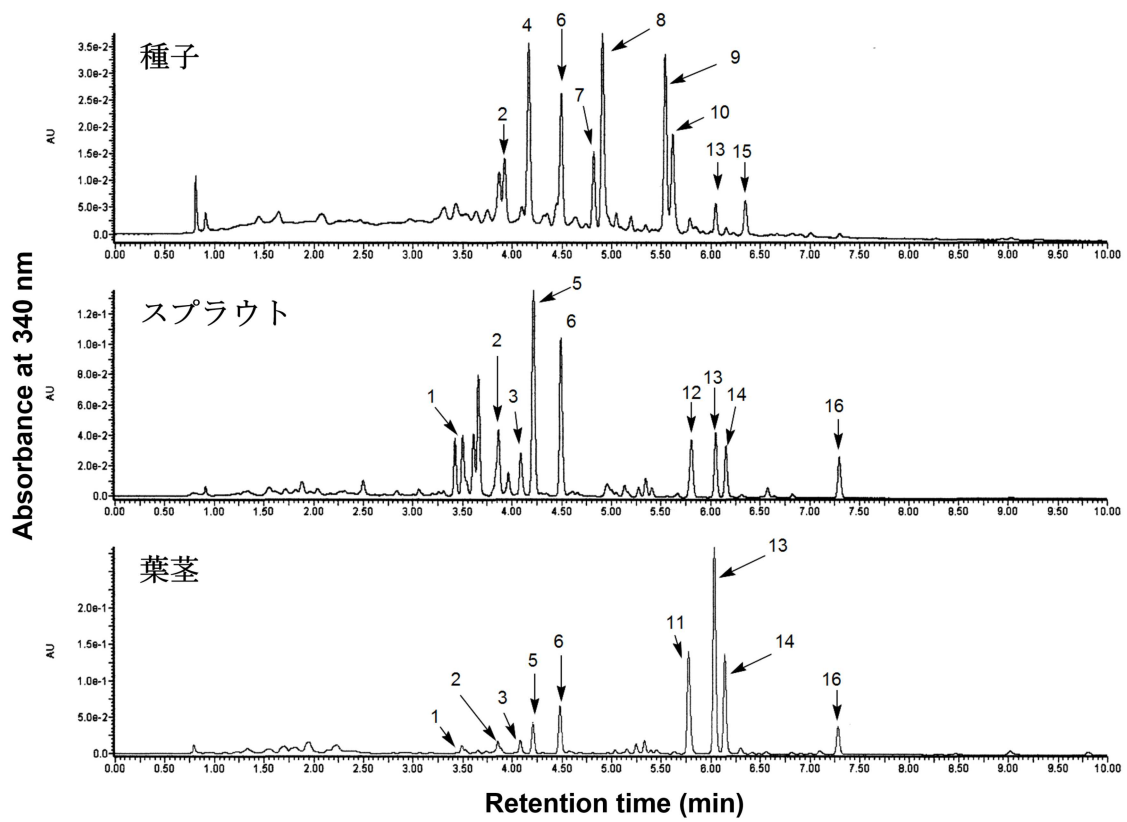


図 3-1 タデアイ種子，スプラウト，葉茎の 80%メタノール抽出物の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析結果

表 3-1 タデアイフラボノール配糖体の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析結果

ピーク No., 物質名	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	<i>m/z</i> product ion
1 Quercetin-3- <i>O</i> -β-D-glucuronide	477.06	301.04 [M-H-GluA]
2 Quercetin-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	607.13	301.03 [M-H-HMG-Glu]
3 Kaempferol-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	447.05	285.02 [M-H-Glu]
4 Quercetin-3- <i>O</i> -α-L-rhamnoside	447.10	301.03 [M-H-Rha]
5 Isorhamnetin-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	477.06	315.03 [M-H-Glu]
6 Kaempferol-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	591.09	447.06 [M-H-HMG] 285.02 [M-H-HMG-Glu]
7 Kaempferol-3- <i>O</i> -α-L-rhamnoside	431.10	285.04 [M-H-Rha]
8 Quercetin-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)-α-L-rhamnoside]	489.10	447.1 [M-H-acetyl] 301.03 [M-H-acetyl-Rha]
9 Quercetin-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)-α-L-rhamnoside]	489.10	447.1 [M-H-acetyl] 301.03 [M-H-acetyl-Rha]
10 Kaempferol-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)-α-L-rhamnoside]	473.10	285.04 [M-H-acetyl-Rha]
11 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside	475.10	313.03 [M-H-Glu]
12 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -β-D-glucuronide	489.07	313.03 [M-H-GluA]
13 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	619.13	475.08 [M-H-HMG] 313.03 [M-H-HMG-Glu]
14 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(acetyl)-β-D-glucopyranoside]	517.09	475.08 [M-H-acetyl] 313.04 [M-H-acetyl-Glu]
15 Kaempferol-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)-α-L-rhamnoside]	473.10	285.04 [M-H-acetyl-Rha]
16 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -[2"- <i>O</i> -(acetyl)-β-D-glucuronide]	531.07	313.03 [M-H-CH ₃ COOH-GluA]

略語 : Glu, glucose; Rha, rhamnose; GluA, glucuronic acid; HMG, 3-hydroxy-3-methylglutary;

X, binding site unknown. 図 3-1 に記載の番号をピーク No. として示す.

表 3-2 タデアイフラボノール配糖体の UV スペクトル分析結果

ピーク No., 物質名	Wavelength for UV maximum (nm)
1 Quercetin-3- <i>O</i> - β -D-glucuronide	255, 265sh, 351
2 Quercetin-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside]	254, 265sh, 351
3 Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	265, 344
4 Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	254, 265sh, 348
5 Isorhamnetin-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	269, 337
6 Kaempferol-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside]	265, 347
7 Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnoside	265, 344
8 Quercetin-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)- α -L-rhamnoside]	253, 265sh, 347
9 Quercetin-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)- α -L-rhamnoside]	254, 265sh, 347
10 Kaempferol-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)- α -L-rhamnoside]	264, 339
11 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	277, 339
12 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> - β -D-glucuronide	277, 340
13 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside]	277, 340
14 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -[6"- <i>O</i> -(acetyl)- β -D-glucopyranoside]	277, 340
15 Kaempferol-3- <i>O</i> -[x"- <i>O</i> -(acetyl)- α -L-rhamnoside]	264, 344
16 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3- <i>O</i> -[2"- <i>O</i> -(acetyl)- β -D-glucuronide]	264, 344

略語 : X, binding site unknown; sh, shoulder. 図 3-1 に記載の番号をピーク No. として示す.

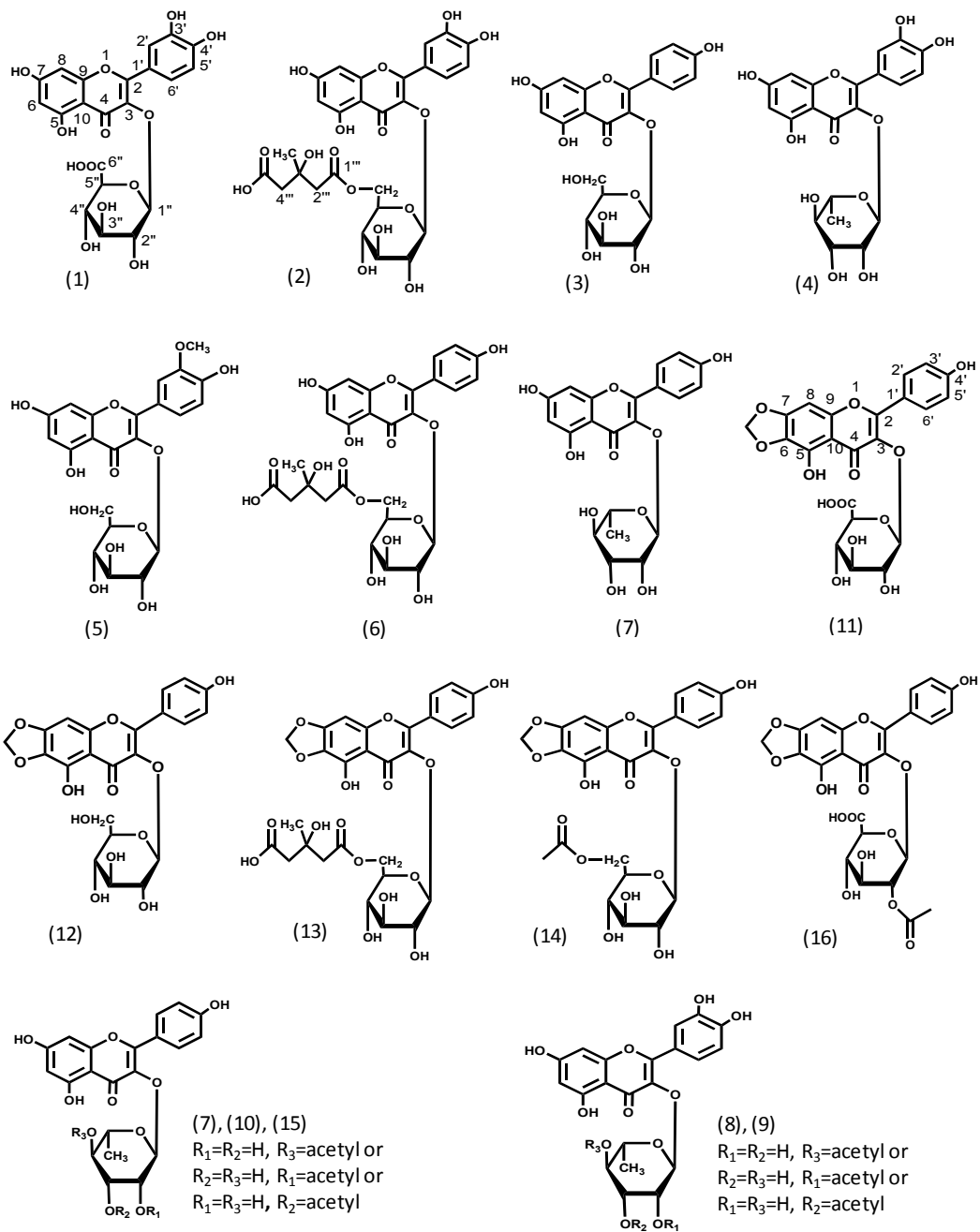


図 3-2 タデアイ種子，スプラウト，葉茎のフラボノール配糖体の構造式

構造式に付随の番号は，図 3-1 に記載の番号を示す。

タデアイ種子，スプラウト，葉茎からはそれぞれ合わせて 16 のフラボノール配糖体が確認された．また，2016 年および 2017 年に収穫したものを比較すると，構成成分は同じであった．ケルセチンおよびケンペロールのラムノースを糖鎖とする配糖体は，タデアイ種子からのみ確認された．そこで，タデアイ種子 80%メタノール抽出物をアルカリ加水分解し，側鎖部位を糖部から切り離した際の分析結果を図 3-3 に示す．

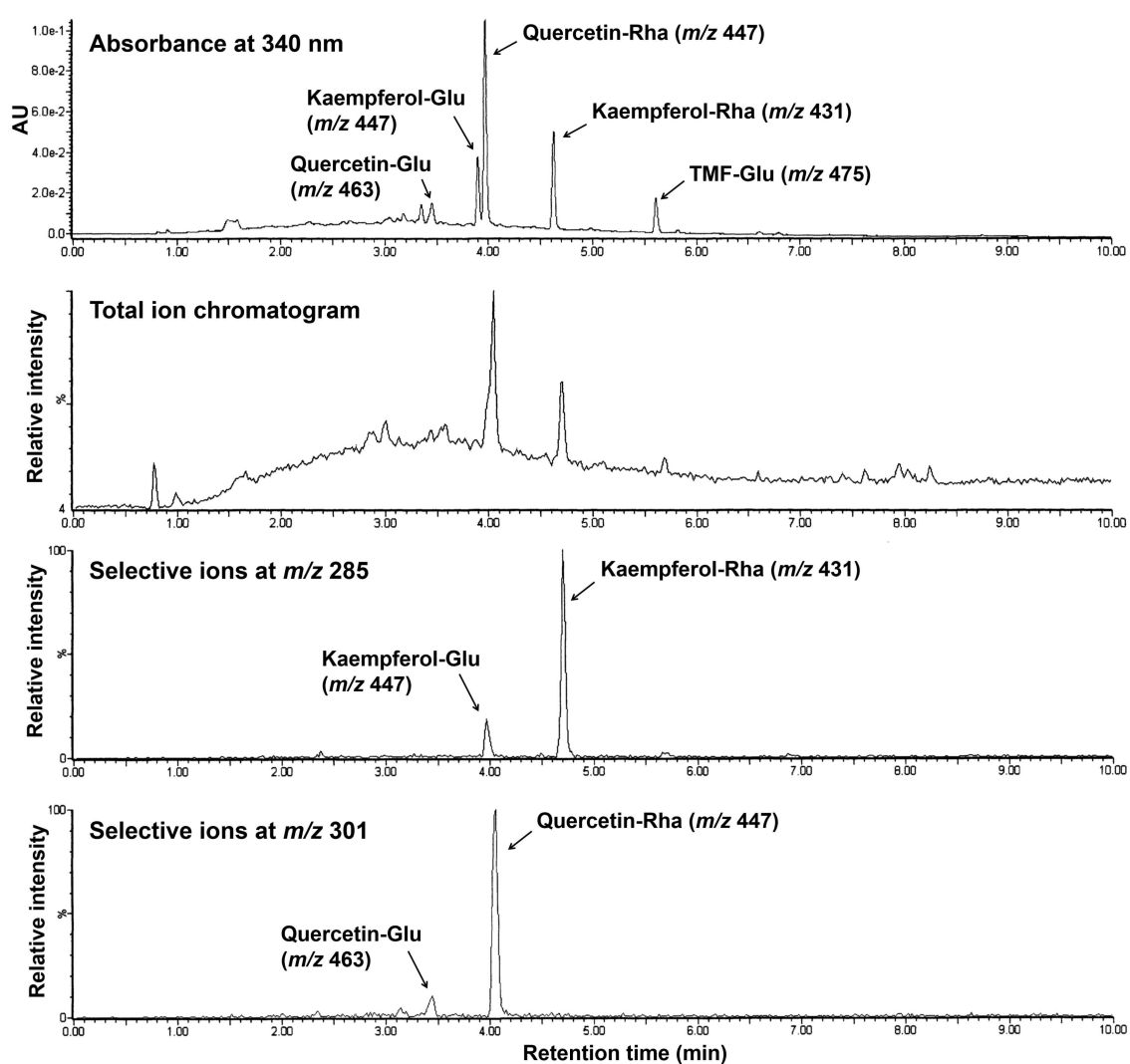


図 3-3 タデアイ種子 80%メタノール抽出物のアルカリ加水分解後のフラボノール配糖体の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析結果

略語 : Quercetin-Glu, Quercetin-3-O-β-D-glucuronide; Kaempferol-Glu, Kaempferol-3-O-D-glucopyranoside; Quercetin-Rha, Quercetin-3-O-α-L-rhamnoside; Kaempferol-Rha, Kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside; TMF-Glu, 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside

タデアイ種子の 80 %メタノール抽出物をアルカリ分解すると、化合物 No. 8, 9, 10, 15 のケルセチンおよびケンペロールのアセチルラムノース配糖体のピークが消失し、化合物 No. 4, 7 の quercetin-3-O-α-L-rhamnoside および kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside のピークが増加した。これらのピークは、試薬のそれぞれのピークと一致した。種子ではケルセチンおよびケンペロールのアセチルラムノース配糖体が主成分であるが、生育段階がスプラウトになると、これらの配糖体は確認されず、isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-[6''(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside が主成分となり、また、TMF をアグリコンとして持つ配糖体 (化合物 No. 11-14, 16) が確認された。化合物 No. 12 の 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucuronide は、スプラウトにのみ検出された。化合物 No. 11 と 12 の UPLC の photo diode array での UV スペクトルを比較したところ、ともに吸収極大波長は 277, 340 nm であった。化合物 No. 12 についての報告は、我々の知る限りまだない。さらに、成熟した葉茎では化合物 No. 11, 13, 14 が主要なフラボノール配糖体であった。第 2 章で示した通り、タデアイ茎からは quercetin-3-O-β-D-glucuronide と quercetin-3-O-[6''-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside] の 2 つしか確認されず、TMF 配糖体は含まれていないことを明らかにしている。したがって、これらの主要なフラボノール配糖体は葉で生合成されていると考えられる。種子、スプラウトおよび葉茎の生育段階において、すべてに検出されたのは化合物 No. 2, 6, 13 でありいずれも糖部に 3-hydroxy-3-methylglutaryl 基を有するものであった。

3-3-2 タデアイ種子，スプラウト，葉茎のフラボノール配糖体の定量分析

タデアイ種子，スプラウト，葉茎よりそれぞれ合わせて16のフラボノール配糖体が同定されたため，続けてHPLCによる定量分析を行った．定量分析に用いたHPLC分析結果を図3-4に示す．そして，タデアイ種子，スプラウト，葉茎のフラボノール配糖体の定量値を表3-3，3-4，3-5に示す．

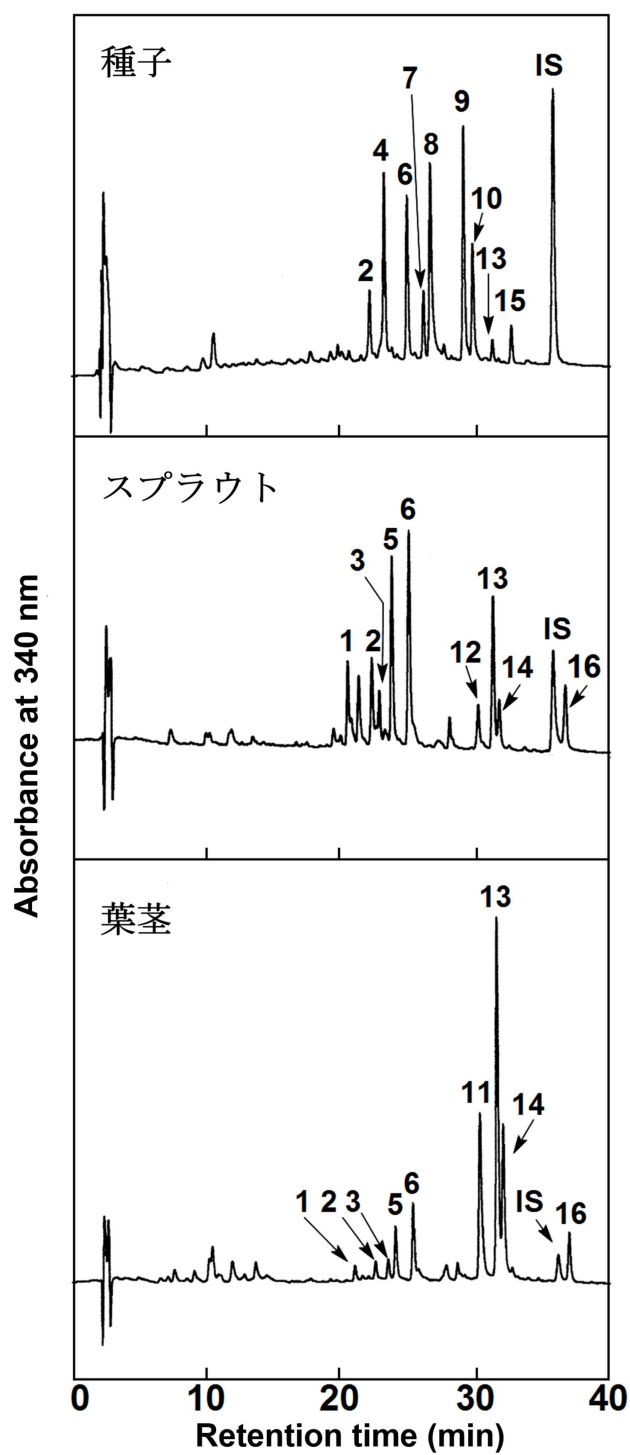


図 3-4 2016 年度生育タデアイ種子，スプラウト，葉茎の 80%メタノール抽出物のフラボノール配糖体の定量的 HPLC 分析結果

略語：IS, internal standard (内部標準で用いたヘスペレチン)

表 3-3 タデアイ種子のフラボノール配糖体定量値

ピーク No., 物質名	定量値 (mg HesE/g DW)	
	2016	2017
1 Quercetin-3-O-β-D-glucuronide	N.D.	N.D.
2 Quercetin-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	0.0454 ± 0.0064	0.0286 ± 0.0008
3 Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	N.D.	N.D.
4 Quercetin-3-O-α-L-rhamnoside	0.129 ± 0.008	0.0922 ± 0.0005
5 Isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside	N.D.	N.D.
6 Kaempferol-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	0.0960 ± 0.0067	0.0541 ± 0.0013
7 Kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside	0.0415 ± 0.0023	0.0295 ± 0.0005
8 Quercetin-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	0.152 ± 0.021	0.0838 ± 0.0014
9 Quercetin-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	0.131 ± 0.015	0.0747 ± 0.0030
10 Kaempferol-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	0.0742 ± 0.0058	0.0444 ± 0.0020
11 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside	N.D.	N.D.
12 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucuronide	N.D.	N.D.
13 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	0.0143 ± 0.0012	0.00934 ± 0.00015
14 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(acetyl)-β-D-glucopyranoside]	N.D.	N.D.
15 Kaempferol-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	0.0233 ± 0.0013	0.0155 ± 0.0003
16 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-O-(acetyl)-β-D-glucuronide]	N.D.	N.D.

略語 : X, binding site unknown; N.D., not detectable. 図 3-1 に記載の番号をピーク No. として示す。データは平均 ± 標準誤差 (n=3) で示した。

表 3-4 タデアイスプラウトのフラボノール配糖体定量値

ピーク No., 物質名	定量値 (mg HesE/g DW)	
	2016	2017
1 Quercetin-3-O-β-D-glucuronide	0.501 ± 0.061	1.49 ± 0.03
2 Quercetin-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	1.41 ± 0.14	2.01 ± 0.07
3 Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	0.349 ± 0.075	1.38 ± 0.12
4 Quercetin-3-O-α-L-rhamnoside	N.D.	N.D.
5 Isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside	2.79 ± 0.33	8.01 ± 0.23
6 Kaempferol-3-O-[6"-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	3.83 ± 0.35	5.71 ± 0.16
7 Kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside	N.D.	N.D.
8 Quercetin-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
9 Quercetin-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
10 Kaempferol-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
11 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside	N.D.	N.D.
12 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucuronide	0.897 ± 0.104	1.50 ± 0.03
13 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	2.52 ± 0.27	2.69 ± 0.02
14 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(acetyl)-β-D-glucopyranoside]	0.884 ± 0.086	0.902 ± 0.016
15 Kaempferol-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
16 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-O-(acetyl)-β-D-glucuronide]	1.36 ± 0.14	1.57 ± 0.03

略語 : X, binding site unknown; N.D., not detectable. 図 3-1 に記載の番号をピーク No. として示す。データは平均 ± 標準誤差 (n=3) で示した。

表 3-5 タデアイ葉茎のフラボノール配糖体定量値

ピーク No., 物質名	定量値 (mg HesE/g DW)	
	2016	2017
1 Quercetin-3-O-β-D-glucuronide	1.76 ± 0.03	1.91 ± 0.02
2 Quercetin-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	1.70 ± 0.04	2.57 ± 0.07
3 Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside	1.78 ± 0.04	1.20 ± 0.01
4 Quercetin-3-O-α-L-rhamnoside	N.D.	N.D.
5 Isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside	4.16 ± 0.09	4.01 ± 0.03
6 Kaempferol-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	6.62 ± 0.61	7.19 ± 0.06
7 Kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside	N.D.	N.D.
8 Quercetin-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
9 Quercetin-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
10 Kaempferol-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
11 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucopyranoside	14.6 ± 0.8	9.04 ± 0.20
12 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucuronide	N.D.	N.D.
13 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside]	27.4 ± 1.3	20.7 ± 0.3
14 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[6"-O-(acetyl)-β-D-glucopyranoside]	15.1 ± 0.6	15.4 ± 0.3
15 Kaempferol-3-O-[x"-O-(acetyl)-α-L-rhamnoside]	N.D.	N.D.
16 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-[2"-O-(acetyl)-β-D-glucuronide]	4.60 ± 0.11	5.10 ± 0.08

略語 : X, binding site unknown; N.D., not detectable. 図 3-1 に記載の番号をピーク No. として示す。データは平均 ± 標準誤差 (n=3) で示した。

2年分のタデアイ種子，スプラウト及び葉茎の各80%メタノール抽出物中のフラボノール配糖体をHPLCで定量したところ，2016年および2017年とで成分の定量値は同様の傾向を示した．化合物No. 13，14はタデアイが生育するにつれ増加し，これらはスプラウト時と比べて葉茎で10倍以上の量となった．葉茎中のフラボノール配糖体におけるTMF配糖体の割合は，2016年では79.4%，2017年では74.9%であった．以前に，我々の研究グループでは，化合物No. 11，13，14，15及びそれらのアグリコンであるTMFがコレステロールの生合成に関わる酵素のHMG-CoAレダクターゼを阻害することを明らかにした¹⁰⁾．さらに，第2章で述べた通り，LPS刺激したRAW264細胞を用いた試験で，TMFがNOおよびPGE₂産生を抑制し，抗炎症作用を示すことを明らかにしている．これらのことより，TMF配糖体が生育したタデアイの主要なフラボノイドであり，これらがタデアイの機能に関わっている可能性が示唆された．

3-3-3 タデアイ種子，スプラウト，葉茎の総ポリフェノール量と抗酸化性

以前に我々の研究室で，タデアイと一般野菜のほうれん草，キュウリ，レタスのAWA抽出液を用いてH-ORACおよびDPPHラジカル消去活性による抗酸化性を評価および比較したところ，一般野菜の中で最も抗酸化性の高かったほうれん草と比較して，タデアイの抗酸化性はH-ORACが12倍，DPPHラジカル消去活性が56倍高いことが明らかとなった¹⁸⁾．さらに，フォーリン-チオカルト法を用いて，タデアイに含まれる総ポリフェノール含有量を調べたところ，タデアイにはハウレンソウの15倍以上のポリフェノールが含まれていることが明らかとなり¹⁸⁾，タデアイの高い抗酸化性はポリフェノールの寄与が大きいと推察される．第2章で，タデアイ葉に多く含まれるTMF配糖体については抗酸化性を確認しているが，これまでの実験結果より，タデアイ種子やスプラウト，そして葉茎で主要となるフ

ラボノール配糖体が異なることが明らかとなっている。タデアイの種子や葉は、解毒、解熱、消炎に有効であるとされているが²⁾、タデアイの各生育段階において、最も機能性を有する段階がいつなのかは明確ではない。そこで、タデアイ種子、スプラウト、葉茎の総ポリフェノール量と抗酸化性を評価した(図 3-5)。

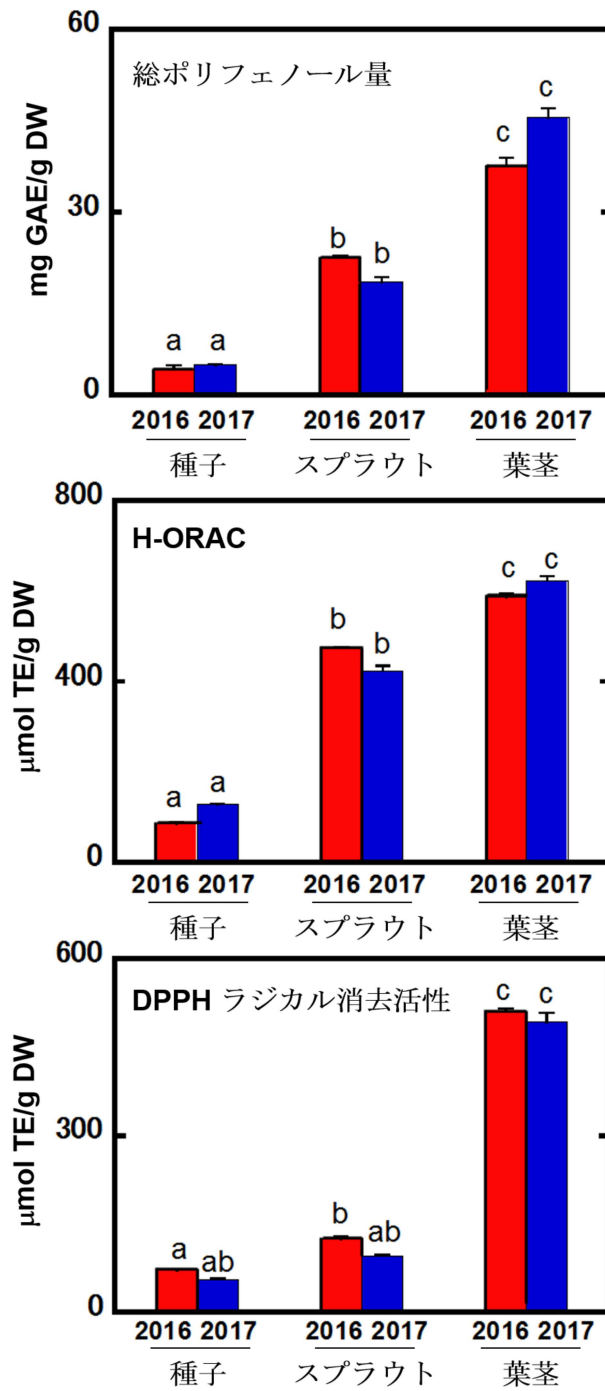


図 3-5 2016 年度および 2017 年度のタゲアイ種子，スプラウト，葉茎の総ポリフェノール量および H-ORAC，DPPH ラジカル消去活性測定結果

タデアイ種子，スプラウト，葉茎の総ポリフェノール量と抗酸化性を評価した結果，2016年および2017年収穫分のいずれも葉茎の総ポリフェノール量が多く，強い抗酸化性を示した．このことから，抗酸化物質のソースとしては生育した葉茎を利用するのが適切と考えられる．

3-4 考察

我々の研究室では既にタデアイ葉または茎の80%メタノール抽出物中のフラボノール配糖体を同定しており，その結果，タデアイ葉には多くのTMF配糖体が含まれていることが分かっている¹⁰⁾．しかし，タデアイの生育段階を通じてTMF配糖体が存在しているかは不明である．タデアイ種子，スプラウト，葉茎の80%メタノール抽出物のフラボノール配糖体をUPLC-ESI-TOF/MS^Eで分析したところ，タデアイ種子，スプラウト，葉茎からはそれぞれ合わせて16のフラボノール配糖体が確認された(図3-1，3-2，表3-1，3-2)．2016年および2017年に収穫したタデアイで構成成分に違いは見られなかった．各生育段階のうちタデアイ種子からのみ，ケルセチンおよびケンペロールのラムノースを糖鎖とする配糖体が確認された．さらに，タデアイ種子の80%メタノール抽出物をアルカリ分解すると，化合物No.8，9，10，15のケルセチンおよびケンペロールのアセチルラムノース配糖体のピークが消失し，化合物No.4，7の *quercetin-3-O- α -L-rhamnoside* および *kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside* のピークが増加することが確認できた(図3-3)．また，タデアイ種子ではケルセチンおよびケンペロールのアセチルラムノース配糖体が主成分であるが，生育段階がスプラウトになると，これらの配糖体は確認されず，*isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside* および *kaempferol-3-O-[6''(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-glucopyranoside* が主成分となり，また，TMFをアグリコンとして持つ配糖体(化合物No.11-14,16)が確認された．これらのTMF配糖体のうち，化合物No.12の3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-

3-O-β-D-glucuronide はスプラウトにのみ検出された。化合物 No. 11 と 12 の UPLC の photo diode array での UV スペクトルを比較したところ、ともに吸収極大波長は 277, 340 nm であった。化合物 No. 12 についての報告は、我々の知る限りまだない。さらに、成熟した葉茎では化合物 No. 11, 13, 14 が主要なフラボノール配糖体であった。第 2 章で示した通り、タデアイ茎からは quercetin-3-O-β-D-glucuronide と quercetin-3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside] の 2 つしか確認されず、TMF 配糖体は含まれていないことを確認している。したがって、これらの主要なフラボノール配糖体は葉で生合成されていると考えられる。タデアイ種子、スプラウト、葉茎の 80 % メタノール抽出物中のフラボノール配糖体を定量したところ(表 3-3, 3-4, 3-5)、化合物 No. 13, 14 はスプラウト時と比べて葉茎で 10 倍以上の量となることが明らかとなった。葉茎中のフラボノール配糖体における TMF 配糖体の割合は、2016 年では 79.4 %、2017 年では 74.9 % であった。以前に、我々の研究グループでは、化合物 No. 11, 13, 14, 15 及びそれらのアグリコンである TMF がコレステロールの生合成に関わる酵素の HMG-CoA レダクターゼを阻害することを明らかにした¹⁰⁾。さらに、第 2 章で述べた通り、LPS 刺激した RAW264 細胞を用いた試験で、TMF が NO および PGE₂ 産生を抑制し、抗炎症作用を示すことを明らかにしている。これらのことより、TMF 配糖体は生育したタデアイの主要なフラボノイドであり、これらがタデアイの機能に関わっている可能性が示唆される。さらに今回、タデアイ種子、スプラウト、葉茎の総ポリフェノール量と抗酸化性を評価した結果、2016 年および 2017 年収穫分のいずれも、TMF 配糖体を豊富に含む葉茎の総ポリフェノール量が最も多く、強い抗酸化性を示すことを確認した(図 3-5)。タデアイの種子および葉は古くから薬用植物として利用されてきたが²⁾、今回の結果より、抗酸化物質のソースとしては TMF 配糖体を豊富に含む生育した葉茎を利用するのが適切と考えられる。

3 - 5 文 献

- [1] K. Iwaki, M. Kurimoto, Cancer preventive effects of the indigo plant, *Polygonum tinctorium*. *Recent Res. Devel. Cancer*. 4 (2002) 429-437.
- [2] 村上光太郎, 徳島県薬草図鑑 < 上 >, 徳島新聞社, (1985) 132-133.
- [3] N.R. Han, S.W. Kang, P.D. Moon, J.B. Jang, H.M. Kim, H.J. Jeong. Genuine traditional Korean medicine, Naju Jjok (Chung-Dae, *Polygonum tinctorium*) improves 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like lesional skin. *Phytomedicine*. 21 (2014) 453-60.
- [4] T. Kimoto, S. Koya, K. Hino, Y. Yamamoto, H. Aga, T. Hashimoto, N. Masaki, T. Hanaya, M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Arai, M. Ikeda, S. Fukuda, M. Kurimoto. Protection by Indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.) against renal oxidative damage in mice treated with ferric nitrilotriacetate. *Nat. Med.* 53 (1999) 291-296.
- [5] T. Kunikata, T. Takefuji, H. Aga, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. *Eur. J. Pharmacol.* 410 (2000) 93-100.
- [6] T. Hashimoto, H. Aga, H. Chaen, S. Fukuda, M. Kurimoto. Isolation and identification of anti-helicobacter pylori compounds from *Polygonum tinctorium* Lour. *Nat. Med.* 53 (1999) 27-31.
- [7] H. Kohda, A. Niwa, Y. Nakamoto, O. Takeda. Flavonoid glucosides from *Polygonum tinctorium*. *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 523-524.
- [8] S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M.J. Micallef, K. Hino, M. Taniguchi, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto. Prevention of azoxymethane-induced intestinal tumors by a crude ethyl

acetate-extract and tryptanthrin extracted from *Polygonum tinctorium* Lour. *Anticancer Res.* 21 (2001) 3295-3300.

- [9] M.J. Micallef, K. Iwaki, T. Ishihara, S. Ushio, M. Aga, T. Kunikata, S. Koya-Miyata, T. Kimoto, M. Ikeda, K. Hino, M. Kurimoto. The natural plant product tryptanthrin ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2 (2002) 565-578.
- [10] H. Kimura, S. Tokuyama, T. Ishihara, S. Ogawa, K. Yokota, Identification of new flavonol *O*-glycosides from indigo (*Polygonum tinctorium* Lour) leaves and their inhibitory activity against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 108 (2015) 102-112.
- [11] H. Kimura, T. Ishihara, M. Michida, S. Ogawa, T. Akihiro, K. Yokota. Identification and quantitative analysis of polyphenolic compounds from indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour). *Nat. prod. Res.* 7 (2014) 492-495.
- [12] H.G. Jang, B.G. Heo, Y.S. Park, J. Namiesnik, D. Barasch, E. Katrich, K. Vearasilp, S. Trakhtenberg, S. Gorinstein. Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait) plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167 (2012) 1986-2004.
- [13] R. Julkunen-Tiitto. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 33 (1985) 213-217.
- [14] H. Kimura, S. Ogawa, T. Ishihara, M. Maruoka, S. Tokuyama-Nakai, M. Jisaka, K. Yokota. Antioxidant activities and structural characterization of flavonol *O*-glycosides from seeds of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME). *Food Chem.* 228 (2017) 348-355.
- [15] J. Watanabe, T. Oki, J. Takebayashi, Y. Takano-Ishikawa, Extraction efficiency of hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid

extraction and manual extraction. *J Food Sci.* 79 (2014) 1665-1671.

- [16] S. Ogawa, H. Kimura, A. Niimi, T. Katsube, M. Jisaka, K. Yokota. Fractionation and structural characterization of polyphenolic antioxidants from seed shells of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME). *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 12046-12051.
- [17] Takahata, T., Ohnishi-Kameyama, M., Furuta, S., Takahashi, M., Suda, I. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5843-5847.
- [18] 石原朋恵, 木村英人, 圓岡真帆子, 小川智史, 明渡絵里朱, 中村優子, 梅林志浩, 秋廣高志, 横田一成. 親水性酸素ラジカル吸収能 (H-ORAC) 法と, 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去法によるタデアイの抗酸化能評価. 日本食品科学工学会 第 61 回大会 (2014).

第 4 章 結論

4-1 要約（日本語）

タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) は、東南アジア原産の一年生植物で、藍染めの染料原料として利用されてきた。また、徳島県などの日本の一部の地域では、タデアイは刺身のつまやタデ酢などの食品原料としても利用されている。また一方で、タデアイには薬用植物としての一面があり、中国や韓国では古くより解毒・解熱・消炎などの目的で用いられてきた。以前に我々の研究室で、タデアイ葉からポリフェノール酸を抽出および精製し、UPLC-ESI-TOF/MS^Eにて分析したところ、タデアイ葉には 11 のフラボノール配糖体が含まれていることが分かった。これらの物質の構造を UPLC-ESI-TOF/MS^E, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, DEPT, 2D-NMR (C-H COSY, HMBC), FT-IR などを用いて分析を行い、構造を明らかにしたところ、3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (TMF) をアグリコンとする配糖体がタデアイ葉の主要なフラボノール配糖体であることを明らかとした。タデアイ葉に含まれる TMF 配糖体は 4 つが確認され、そのうちの 3 つは新規物質であった。ケルセチンなどのフラボノールの生理活性機能についてはこれまでに多く報告されており、TMF および TMF 配糖体も他のフラボノールと同様に生理活性機能を有しタデアイの効能に貢献していることが期待されるが、その詳細は明らかで無い。

徳島県薬草図鑑によると、タデアイの生葉汁は塗布することで火傷、口内炎、唇のあれ、腫物、ハチやその他毒虫の刺し傷に効果があるとされており、タデアイ葉には抗炎症作用を示す生理活性物質が存在していると推察される。タデアイの抗炎症作用については、トリプタンスリンや、青色色素のインディゴおよびインディルビンが活性本体であると既に報告されているが、このうちインディゴとインディルビンはタデアイ生葉にほとんど含まれておらず、タデアイ葉に豊富に含まれているフラボノール類も抗炎症能に寄与するこ

とが期待される。タデアイ葉と茎の 80%メタノール抽出物の一酸化窒素 (NO) 産生抑制能を測定したところ、葉のみに NO 産生抑制能が確認された。タデアイの葉と茎の 80%メタノール抽出物を UPLC-ESI-TOF/MS^E で分析したところ、タデアイ葉からは、過去の実験結果と同様に 11 のフラボノール配糖体が確認されたが、タデアイ茎からは 11 のフラボノール配糖体のうち、2 つしか検出されなかった。これらのことから、タデアイの抗炎症作用は茎でなく葉によるものと考えられる。続いて、タデアイ葉に含まれているフラボノール配糖体およびこれらの配糖体のアグリコン、そしてトリプタンスリンについて、NO およびプロスタグランジン (PG)E₂ 産生抑制能を測定したところ、フラボノール配糖体ではほとんど活性が見られなかったが、これらのアグリコンは NO および PGE₂ 産生を抑制した。フラボノール配糖体は消化器官で分解され、アグリコンとして体内に取り込まれることが報告されており、TMF 配糖体についても調べたところ、TMF 配糖体を豊富に含む精製物を経口投与したマウス血中から TMF が検出された。これらのことから、TMF 配糖体は体内にアグリコンとして吸収されることで抗炎症作用を発揮すると考えられる。トリプタンスリンはタデアイ葉の成分中で最も抗炎症作用が強く、TMF と比較して NO 産生抑制能は 4.8 倍、PGE₂ 産生抑制能は 15.2 倍であった一方で、葉の 80%メタノール抽出物での TMF 配糖体の定量値はトリプタンスリンの約 50 倍、アグリコンの TMF 換算量と比べて約 28 倍であった。タデアイの抗炎症作用については、トリプタンスリンや青色色素のインディゴおよびインディルビンが活性本体であるところまで報告されてきたが、タデアイ葉における含有量についての検討を加えると、TMF がタデアイの主要な抗炎症物質であると考えられる。

タデアイ葉が薬用部位として利用されてきた一方で、タデアイ種子も古くから薬用部位として利用されている。タデアイの葉と種子は煎じて服用すると、解毒および解熱剤として効果があると徳島県薬草図鑑に記載されており、タデアイ種子にも生理活性を示す物質

が存在していると考えられる。TMF および TMF 配糖体は、タデアイ葉に特徴的に含まれている物質群であるが、これらが種子にも含まれているのか、あるいは生育過程で生合成されているのかは不明である。そこで今回、タデアイ種子、スプラウト、葉茎の 80 %メタノール抽出物を UPLC-ESI-TOF/MS^E で分析したところ、タデアイ種子からのみ、ラムノースを糖鎖とする配糖体が確認された。さらに、スプラウトのみにこれまでに報告されたことのない 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone-3-O-β-D-glucuronide が検出された。また、生育年度の異なるタデアイ間で構成成分に変化は見られなかった。タデアイの各生育段階における主成分に注目すると、タデアイ種子ではケルセチンおよびケンペロールのアセチルラムノース配糖体が主成分であるが、生育段階がスプラウトになると isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside および kaempferol-3-O-[6''(3-hydroxy-3-methylglutaryl)-β-D-glucopyranoside] が主成分となり、成熟した葉茎では TMF 配糖体が主要なフラボノール配糖体となることが分かった。タデアイ種子、スプラウト、葉茎の総ポリフェノール量と抗酸化性を評価したところ、葉茎の総ポリフェノール量が最も多く、抗酸化性も最も高かった。葉茎中のフラボノール配糖体における TMF 配糖体の割合は、2016 年収穫物では 79.4 %、2017 年収穫物では 74.9 %であるため、葉茎の抗酸化性には TMF 配糖体が大きく貢献していると考えられる。これらの結果より、古くからタデアイの種子および葉は薬用植物として利用されてきたが、抗酸化物質のソースとしては TMF 配糖体を豊富に含む生育した葉茎を利用するのが適切だと考えられる。

4 - 2 要約 (英語)

Polygonum tinctorium Lour. (indigo plant) has been regarded as a useful medicinal plant for traditional herbal medicine. The polyphenolic fraction of indigo leaves exhibited anti-inflammatory activities as determined by the suppressed synthesis of nitric oxide (NO) in cultured RAW264 macrophage cells. The acid hydrolysate of the fraction showed much more potent effect than the unhydrolyzed one. In sharp contrast, those fractions of indigo stems had almost no effect. 3,5,4'-Trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (TMF)-*O*-glycosides and tryptanthrin were detected exclusively in the extracts of the leaves. The isolated flavonol species were furthermore tested for their anti-inflammatory activities against the synthesis of NO and prostaglandin E₂ in the cultured macrophage cells. More potent anti-inflammatory effects were recognized with different aglycones of flavonols than their flavonol *O*-glycosides. Although the inhibitory effects of TMF were less effective than those of tryptanthrin, the levels of flavonol *O*-glycosides with TMF were much more abundant than those of tryptanthrin in the leaves. Oral administration of the fraction containing flavonol *O*-glycosides with TMF into mice revealed the detection of free TMF in the blood circulation, indicating that the aglycone moiety can be cleaved by digestive enzymes and absorbed in the gut. Alternatively, the assay of hydrophilic oxygen radical absorbance capacity revealed that the isolated species of flavonol *O*-glycosides with TMF and their aglycone had appreciable antioxidant activities. Taken together, our findings suggest that the predominant flavonol *O*-glycosides with TMF as an aglycone could be promising natural agents for the application to herbal medicine, nutraceuticals, and food additives.

We have recently shown that flavonol *O*-glycosides with TMF are predominant flavonoids in indigo leaves. However, no study has been performed regarding changes in the levels of flavonoid species during the germination and growth of indigo plant. Here, we attempted to determine the individual constituents of flavonol *O*-glycosides and the changes in their contents of the seeds, sprouts, and aerial parts. These results revealed that only the seeds predominantly contained flavonol *O*-(acetyl)- rhamnosides with quercetin or kaempferol as an aglycone. During the development of the sprouts and aerial parts, flavonol *O*-glycosides with TMF as an aglycone became mainly detectable and accounted for 79.4% and 74.9% of total flavonol *O*-glycosides from the extracts of aerial parts harvested in 2016 and 2017, respectively. Of the plant organs tested, the

aerial parts exhibited the highest antioxidant activities concomitant with greatly increased levels of total polyphenols. Thus, we were able to conduct the identification and quantification of flavonol *O*-glycosides from the seeds, sprouts, and aerial parts of indigo plant and to evaluate antioxidant activities of their extracts. Taken together, our findings clearly provide the evidence that the aerial parts of indigo plant are a rich source of flavonol *O*-glycosides with TMF and exhibit much higher antioxidant activities, indicating the usefulness for the application to food and nutraceutical purposes.

4-3 謝辞

本研究を行うにあたり，研究全般にわたりご指導，ご鞭撻を賜りました島根大学生物資源科学部生命工学科（鳥取大学大学院連合農学研究科）の横田一成教授と地阪光生准教授に心から感謝いたします。

本研究を行うにあたり，研究全般にわたりご指導，ご鞭撻を賜りました寿製菓株式会社研究開発部の木村英人博士に心から感謝いたします。

タデアイフラボノール配糖体の UPLC-ESI-TOF/MS^E 分析の際，ご指導いただきました島根大学生物資源科学部生命工学科の秋廣高志助教，鳥取県産業技術センターの梅林志浩上席研究員に心より感謝いたします。

タデアイフラボノール配糖体の NMR 分析の際，ご指導いただきました島根大学生物資源科学部生命工学科の吉清恵介准教授に心より感謝いたします。

タデアイの抗炎症能および抗酸化能を調べる際，ご指導いただきました鳥取県産業技術センターの杉本優子上席研究員，羽野抄希技術スタッフに心より感謝いたします。

実験をすすめる上で貴重なご助言をいただきました島根大学生物資源科学部生命工学科の室田佳恵子教授，清水英寿准教授，西村浩二助教に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり，実験の扶助をいただきました寿製菓株式会社の石原朋恵博士と平林侑研究員ならびに小川智史博士に深く感謝いたします。

社会人入学を承諾いただきました寿製菓株式会社の山内博次会長，城内正行社長，ならびに役員の皆様に心より感謝いたします。

業務多忙の中，研究活動を支えてくださった寿製菓株式会社研究開発部のスタッフの皆様に深く感謝いたします。

4 - 4 原著論文

第 2 章

- [1] Tokuyama-Nakai, S., Kimura, H., Ishihara, T., Jisaka, M. and Yokota, K.
In Vitro Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of 3,5,4'-Trihydroxy-6,7-Methylenedioxyflavone-*O*-Glycosides and Their Aglycone from Leaves of *Polygonum tinctorium* Lour.
Applied Biochemistry and Biotechnology 184(2): 414-431
DOI: 10.1007/s12010-017-2555-8.
2018. 2

第 3 章

- [2] Tokuyama-Nakai, S., Kimura, H., Hirabayashi, Y., Ishihara, T., Jisaka, M. and Yokota, K.
Constituents of flavonol *O*-glycosides and antioxidant activities of extracts from seeds, sprouts, and aerial parts of *Polygonum tinctorium* Lour.
Heliyon. 5(3): e01317.
DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01317.
2019. 3