

# 樹木抽出成分の活性酸素消去および アンギオテンシン変換酵素阻害活性

(研究課題番号 08660202)

平成8年度～平成9年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成10年3月

静岡大学附属図書館



030850695 5

研究代表者 西田友昭

(静岡大学農学部助教授)

## は し が き

スギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)は、我が国の代表的な造林木であるが、現状では建築用材等に利用されているに過ぎず、森林の保全を図るには新たな用途開発を指向する必要がある。

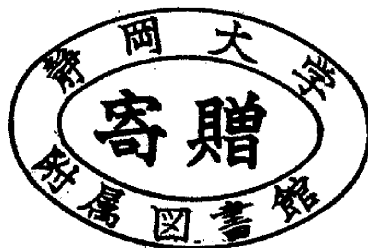
このような観点から、本研究ではスギ抽出成分の生理活性物質としての利用に着目し、生体内で発生する活性酸素が引き起こす種々の疾患(ガン、老化などの成人病)の予防に応用が期待される活性酸素消去活性(SOD様活性)および生活習慣病の中でも最大疾患といわれる高血圧症の予防と治療に応用しうるアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性について検討した。その結果、スギ心材エタノール抽出画分中のセキリン-CにSOD様活性が、外皮エタノール抽出画分中のカテキンおよびプロシアニジンB3にACE阻害活性が認められ、さらには多くのフラボノイド類にACE阻害活性を期待できることが判明した。

本研究成果がスギ有効利用の一助となることを期待するとともに、樹木抽出成分の生理活性についてさらなる研究がなされ、森林資源の有効利用が図られることを切に希望する。

### 研究組織

研究代表者 西田友昭(静岡大学農学部助教授)

研究分担者 堤 祐司(静岡大学農学部助教授)



## 研究経費

平成8年度 1,600千円

平成9年度 600千円

計 2,200千円

## 研究発表

### (1)口頭発表

宮野亜紀子, 堤 祐司, 西田友昭: スギ抽出成分の生理活性物質としての利用について, 第46回日本木材学会大会発表要旨集, p.423(1996).

# 目 次

1. 緒言	1
2. スギ抽出成分のSOD様活性とACE阻害活性	3
2.1 実験方法	3
2.1.1 スギ抽出物の調製	3
2.1.2 SOD様活性の測定	3
2.1.3 ACE阻害活性の測定	4
2.2 結果および考察	4
3. 心材エタノール抽出画分からのSOD様活性物質の単離と同定	11
3.1 実験方法	11
3.1.1 逆相HPLCによるSOD様活性物質の単離	11
3.1.2 GC-M Sおよび <sup>1</sup> H-NMR分析によるSOD様活性物質の同定	11
3.2 結果および考察	12
4. SOD様活性の発現に關与する構造	19
4.1 実験方法	19
4.2 結果および考察	19
5. 外皮エタノール抽出画分からのACE阻害活性物質の単離と同定	23

5.1 実験方法	23
5.1.1 逆相 HPLC による ACE 阻害活性物質の単離	23
5.1.2 GC-M S および $^1\text{H-NMR}$ 分析による ACE 阻害活性物質の同定	23
5.2 結果および考察	23
6. フラボノイド類の ACE 阻害活性とその活性発現に 与する構造	30
6.1 実験方法	30
6.2 結果および考察	30
7. 総括	33
8. 参考文献	34

## 1. 緒言

スギは、我が国における代表的な造林木である。しかし、安価な外国産材の利用が増加し、現在の材蓄積量は余剰状態となっている。また、スギの材部は建築用材として利用されているが、それ以外の根、葉、樹皮、枝などは利用されておらず、林地内などに放置または廃棄されているのが現状である。よって、これらを有効に利用することができれば、日本の森林保全や森林資源の持続的利用に貢献しうる。

植物の抽出成分は、これまで経験的に生薬、香料、染料など様々な方面で利用されてきたが、これらの中でも付加価値の高い医薬品への応用が期待される。天然物由来の成分は、合成医薬品に比べ副作用も低く、薬効についても含有成分の相乗効果により、単一成分の合成医薬品にはみられない効果を発揮する場合もあり天然物が見直されている。実際に多くの植物由来の成分が、人間に対して様々な生理活性を有することが報告されており、例えば、日本茶には血糖降下作用<sup>1)</sup>、ゴマには活性酸素消去作用、イチヨウ葉エキスには動脈硬化防止・抗酸化作用<sup>2)</sup>等の生理活性を有することが明らかとなっている。また、樹木に存在している多くの成分が抗菌性<sup>3)</sup>や殺蟻性<sup>4)</sup>等の生理活性を有しており、樹皮成分である桂皮アルデヒドには健胃作用が、またベルベリンには整腸作用<sup>5)</sup>があることも知られている。これらのように、植物成分の医薬品分野への応用は植物成分の高付加価値を図り、有効利用する典型的な例であり、スギの有効利用を模索する上でも例外ではない。

以上のような観点から、本研究ではスギの有効利用の一環として、

抽出成分の生理活性物質としての利用に着目し、生体内で発生する活性酸素が引き起こす種々の疾患（ガン、老化などの成人病）の予防に 응용が期待される活性酸素消去作用（SOD様活性）および生活習慣病の中でも最大疾患といわれる高血圧症の予防と治療に 응용しうるアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性について検索した。

## 2. スギ抽出物のSOD様活性とACE阻害活性

### 2.1 実験方法

#### 2.1.1 スギ抽出物の調製

静岡大学附属上阿多古演習林に生育する樹齢15年、樹高13mのスギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)を供試した。葉、根、外皮、内皮、辺材および心材の6部位に分別し、それぞれの部位の試料を粉碎した後、ヘキサン、クロロホルム、エタノールおよび熱水で逐次抽出した(Scheme 1)。得られた抽出物は減圧・乾固して-20℃で保存した。

#### 2.1.2 SOD様活性の測定

酸素存在下で、キサントニン(XA)、キサントニンオキシダーゼ(XOD)およびニトロブルーテトラゾリウム(NO<sub>2</sub>-TB)が共存すると、XAがXODに作用して尿酸とスーパーオキシドアニオンラジカル(O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>)を生成し、O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>によるNO<sub>2</sub>-TBの還元が生じてジホルマザンを形成する。この際、反応系にスーパーオキシドディスミューターゼ(SOD)あるいはSOD様活性を示す物質(抽出物)が存在すると、O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>の一部がH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>に不均化されるため、ジホルマザンの形成量が減少してくる(Scheme 2)。よって、この原理を利用した既法<sup>6-8)</sup>に従ってジホルマザン形成量の減少率(即ち、O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>の阻害率)を求め、抽出物1mgがウシ由来スーパーオキシドディスミューターゼ(SOD、和光純薬)の何ユニットに相当するのかで活性を表示した。なお、SOD様活性測定の際の反応液組成をTable 1に示す。

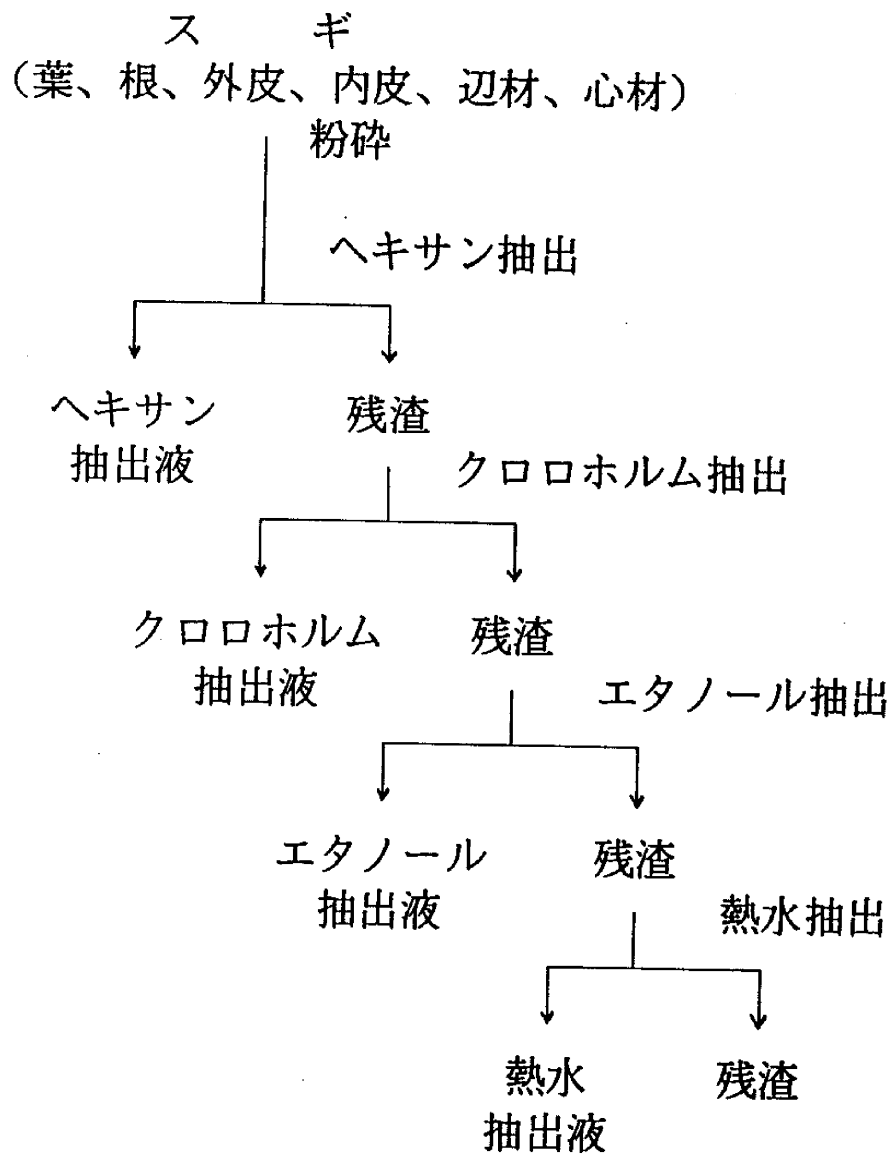


### 2.1.3 ACE阻害活性の測定

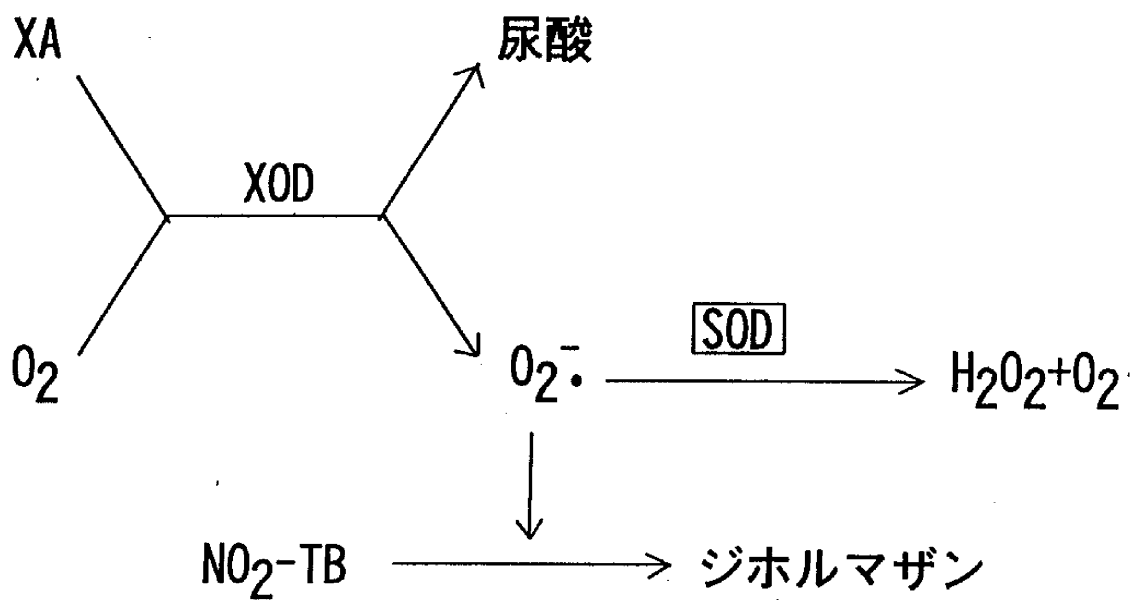
アンギオテンシノーゲンはレニンによって分解され、アンギオテンシンIになる。次いで、ACEの作用によってアンギオテンシンIのC末端部His-Leuが離脱し、血管壁収縮作用のあるアンギオテンシンIIへと変換される。一方、アンギオテンシンIと同様にC末端部にHis-Leuを有するヒプリル-ヒスチジル-ロイシン(Hip-His-Leu)にACEを作用させると、ヒスチジル-ロイシン(His-Leu)とヒプリル酸が生成してくるが(Scheme 3)、スギ抽出物がACEを阻害すればHip-His-LeuからのHis-Leu生成量が減少してくることになる。そこで、生成したHis-Leuに0-フタルアルデヒドを加えて蛍光誘導体とし、その蛍光強度(励起波長360nm、蛍光波長480nm)を測定するという既法<sup>9, 10)</sup>を用い、ACE活性を50%阻害するさいの抽出物濃度(IC<sub>50</sub>)を求めた。なお、Table 2にACE阻害活性を測定する際の反応液組成を示す。

### 2.2 結果および考察

各抽出画分のSOD様およびACE阻害活性をTable 3および4に示すが、最も高いSOD様活性は心材エタノール抽出画分に認められ、本画分はポジティブコントロールとして用いたアスコルビン酸の約7倍の活性を有していた。一方、ACE阻害活性については外皮エタノール抽出画分が最も高い活性を示した。そこで、心材エタノール抽出画分からSOD様活性物質を、外皮エタノール抽出画分からACE阻害活性物質を単離・精製することにした。



Scheme 1 試料の調製



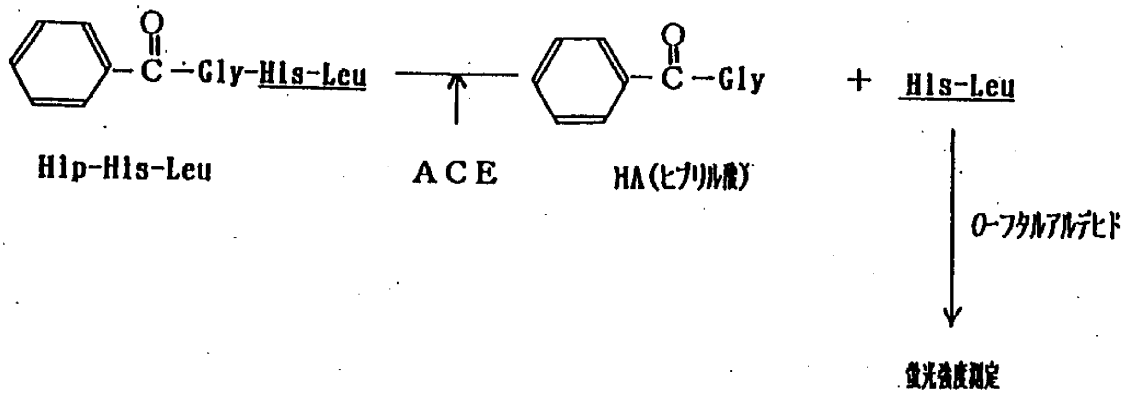
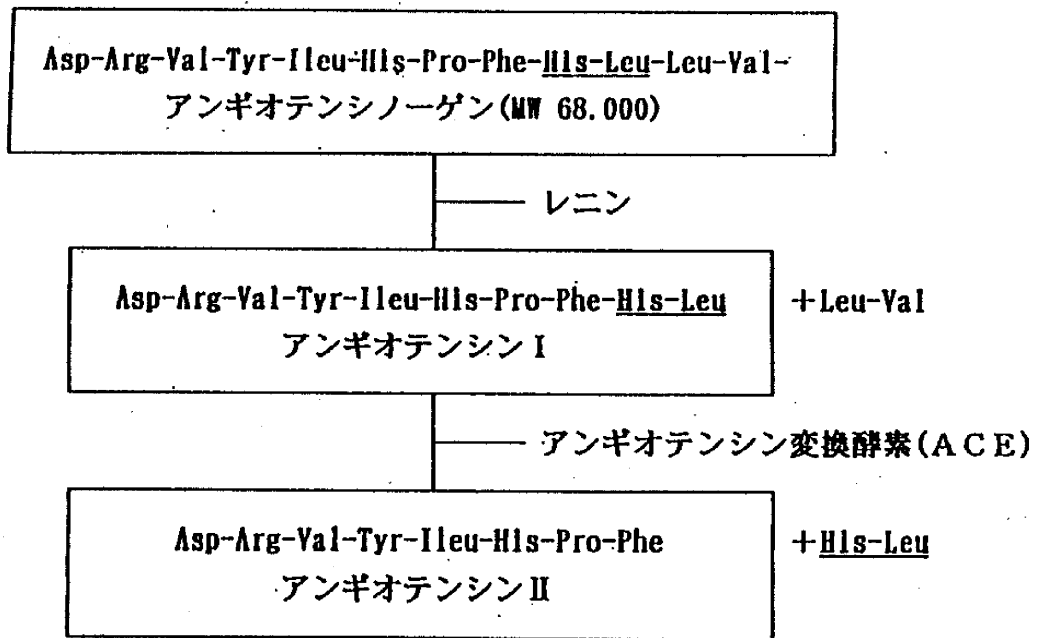
Scheme 2 SOD様活性の測定原理

Table 1 SOD様活性測定反応液組成

	A	B	C	D
試料(0.1 ml)	-	-	+	+
発色試薬(1.0 ml)	+	+	+	+
酵素(1.0 ml)	+	-	+	-
反応停止液(2.0 ml)	+	+	+	+

発色試薬： 0.1 Mリン酸緩衝液(pH 8.0)  
 キサンチン 0.40 mmol/l  
 ニトロブルーテトラゾリウム 0.24 mmol/l  
 酵素液： キサンチンオキシダーゼ 0.49 unit/ml  
 ブランク液： 0.1 M リン酸緩衝液(pH 8.0)  
 反応停止液： トリメチル硫酸ナトリウム 69 mmol/l

$$\text{スーパーオキシド阻害率} = (1 - (C - D / A - B)) * 100$$



Scheme 3 測定原理

Table 2 ACE阻害活性測定法

	A	B	C	D
試料溶液 (0.5 ml)	-	-	+	+
ACE溶液 (0.25 ml)	+	-	+	-
37℃ 3分間 pre-incubation				
基質溶液 (0.25 ml)	+	+	+	+
37℃ 30分間 incubation				
反応停止液 (0.25 ml)	+	+	+	+
蛍光試薬 (0.1 ml)	+	+	+	+
冷暗所 15分間 放置				
1.5M リン酸 (0.4 ml)	+	+	+	+
反応終了後、励起波長360nm、蛍光波長480nm における蛍光強度を測定する。				

ACE : 3.0mU/ ml

反応液 : 100mM HEPES緩衝液 pH 8.3, 300mM NaCl  
 5mM ヒプリルヒスチジルロイシン含有

反応停止液 : 0.1N NaOH

蛍光試薬 : 0.2% o-フルアルデヒド(メタノール)溶液

ブランク液 : ① 10%DMSO溶液

② 100mM HEPES緩衝液

$$\text{ACE 阻害率 (\%)} = \{ 1 - (C-D)/(A-B) \} \times 100$$

Table 3. SOD mimic activity for each extract prepared from sugi.

Extract	SOD mimic activities (Unit · SOD/mg)					
	Leaves	Roots	Outer bark	Inner bark	Sapwood	Heartwood
Hexane	30	8	25	29	12	14
Chloroform	33	6	22	26	12	46
Ehtanol	12	43	61	44	36	223
Hot water	9	77	113	25	68	41

Note: The activity for ascorbic acid is 33 Unit · SOD/mg.

Table 4. ACE inhibitory activities for each extract prepared from sugi.

Extract	ACE inhibitory activities (IC <sub>50</sub> (μg/ml))					
	Leaves	Roots	Outer bark	Inner bark	Sapwood	Heartwood
Hexane	155	190	150	39	+ <sup>b)</sup>	65
Chloroform	220	+ <sup>b)</sup>	+ <sup>b)</sup>	80	75	160
Ehtanol	180	25	16	43	85	32
Hot water	+ <sup>b)</sup>	nd. <sup>c)</sup>	nd. <sup>c)</sup>	nd. <sup>c)</sup>	nd. <sup>c)</sup>	165

b) Inhibition is less than at 250 μg/ml.

c) IC<sub>50</sub> was not determined because of the less solubility of the sample in the assay system.

### 3. 心材エタノール抽出画分からのSOD様活性物質の単離と 同定

#### 3.1 実験方法

##### 3.1.1 逆相HPLCによるSOD様活性物質の単離

心材エタノール抽出画分を逆相HPLCを用いて下記の条件で分析し、溶出曲線に従って分画した。

Table 5 HPLC分析条件

カラム	Wakosil-II 5C-18AR
溶離液	水-メタノール(7/3)溶液
流速	3.0 ml/min
測定波長	280nm

##### 3.1.2 ガスクロマトグラフ-マススペクトロメトリー(GC-MS)

およびプロトン核磁気共鳴スペクトロメトリー( $^1\text{H-NMR}$ )

分析によるSOD様活性物質の同定

HPLCで分画した画分の中で最も高いSOD様活性を示した画分(Fr. 2)をトリメチルシリル(TMS)化した後、GC-MS(カラム:OV-1, 0.52 mm X 30 m、カラム温度:150-300°C、昇温速度:5°C/分)分析に供した。また、誘導体化しないで重メタノール/重水素(1/1)に溶解させ、 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz)分析に供した。



### 3.2 結果および考察

心材エタノール抽出画分をHPLCで分析し、溶出曲線に従って7画分に分画した(Fig. 1)。それぞれの画分のSOD様活性を測定した結果、フラクション2(Fr. 2)が最も高い活性を示し、分画前の心材エタノール抽出画分と比べて活性は1.7倍向上し、アスコルビン酸(ポジティブコントロール)の約11倍の活性を有していた(Table 6)。なお、Fr. 2をGC分析したところ、ほぼ単一の成分から成り、ピーク面積から判定すると純度98%にまで精製されていた。よって、これ以上の精製を行わないで<sup>1</sup>H-NMRおよびGC-MS分析に供した。

Fr. 2を<sup>1</sup>H-NMR分析した結果(ケミカルシフト( $\delta$ ))3.37(1H, dd(double doublet), J(coupling constant)=7.8, 8.8 Hz), 3.45(1H, dd, J=6.8, 11.1 Hz), 3.63(1H, dd, J=3.7, 11.1 Hz), 3.89(1H, ddd(double double doublet), J=3.7, 6.8, 7.8 Hz), 6.22(1H, dd, J=8.8, 15.8 Hz), 6.32(1H, d(doublet), J=15.8 Hz), 6.64(1H, dd, J=1.8, 8.2 Hz), 6.68(2H, d, J=8.8 Hz), 6.71(1H, d, J=8.2 Hz), 6.78(1H, d, J=1.8 Hz), 7.18(2H, d, J=8.8 Hz))、Fr. 2はスギ心材中に含有される主要なノルリグナンであるセキリン-Cと推定された。

また、Fr. 2のTMS誘導体のGC-MSスペクトラムをFig. 2に示すが、m/z 662に分子イオンピークを有しており(m/z(相対強度, %): 662(M<sup>+</sup>, 1.3), 647(1.2), 572(3.4), 482(1.8), 457(100), 267(2.9), 205(18.8), 179(8.2), 147(12.0), 117(5.2), 73(63.7), 45(2.1))、セキリン-CのTMS誘導体であることを示唆した。

そこで、セキリン-C 標品と Fr. 2 の紫外吸収スペクトルを比較したが、両者のスペクトルは極めてよく一致しており (Fig. 3)、さらには、HPLC によるスパイクテストでも同一化合物であることが確認されたため、Fr. 2 をセキリン-C (Fig. 4) と同定するに至った。

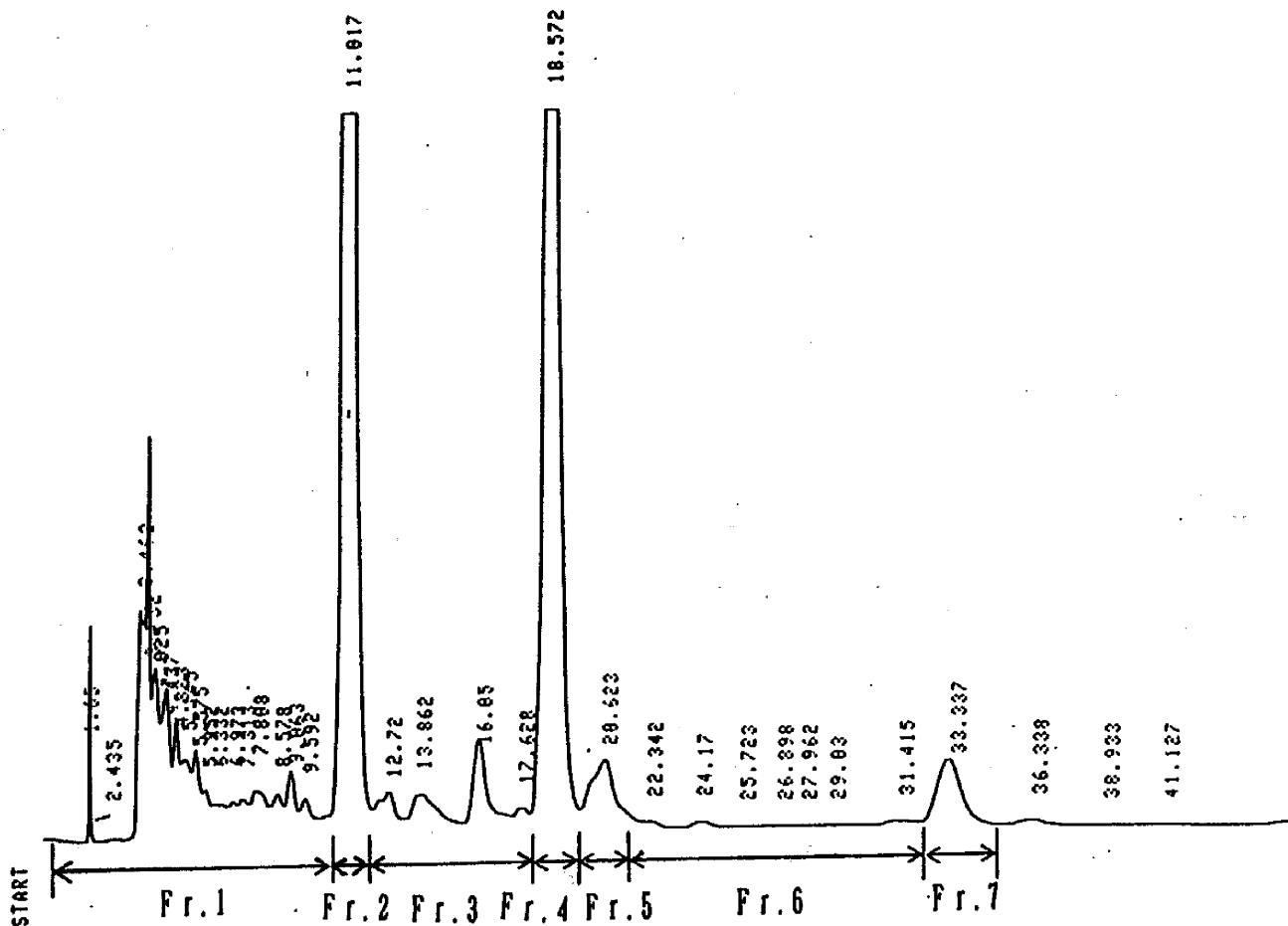


Fig. 1 逆相HPLCの溶出曲線

Table 6. SOD mimic activities of the fractions from the sugi heartwood ethanol extracts.

	SOD mimic activity (Unit · SOD/mg)	Relative activities <sup>a)</sup>
Fr. 1	76	34.1
Fr. 2	370	165.9
Fr. 3	127	57.0
Fr. 4	20	9.0
Fr. 5	1	0.4
Fr. 6	140	62.7
Fr. 7	26	11.7
Ethanol extracts	223	100.0
Ascorbic acid	33	14.8

a) Activity of ethanol extracts is expressed as 100%.

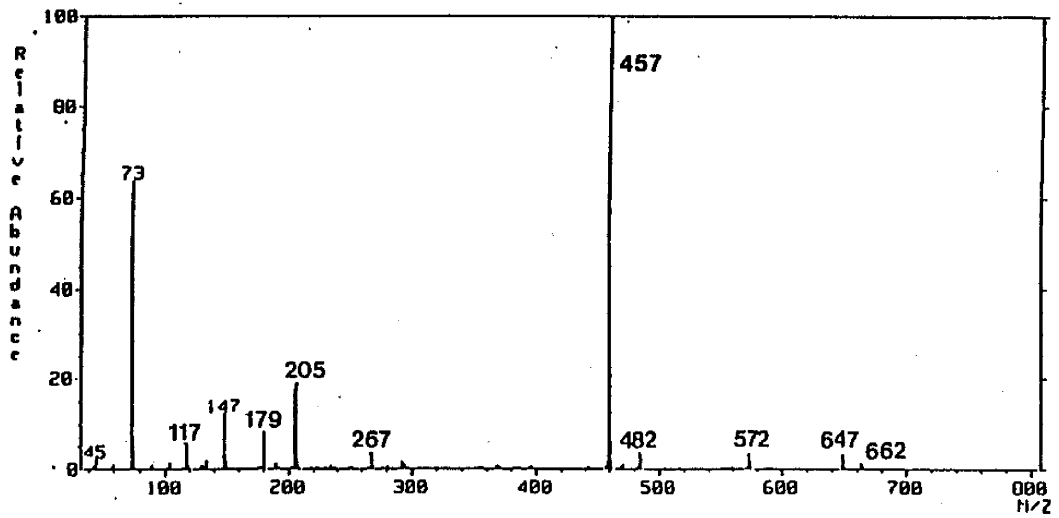
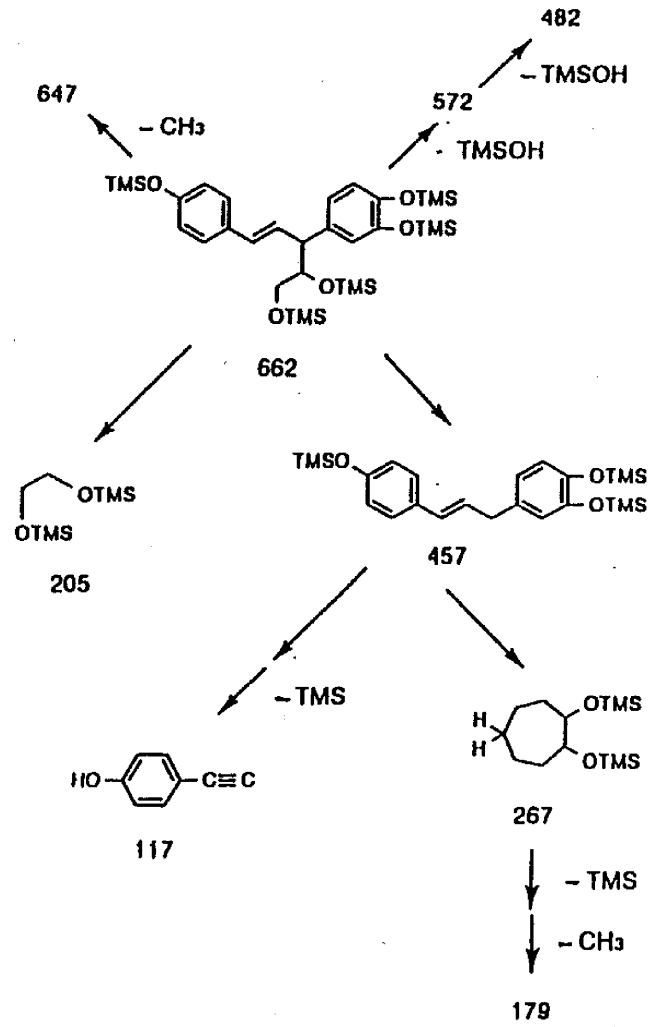


Fig. 2 Fr. 2のMS-スペクトラム

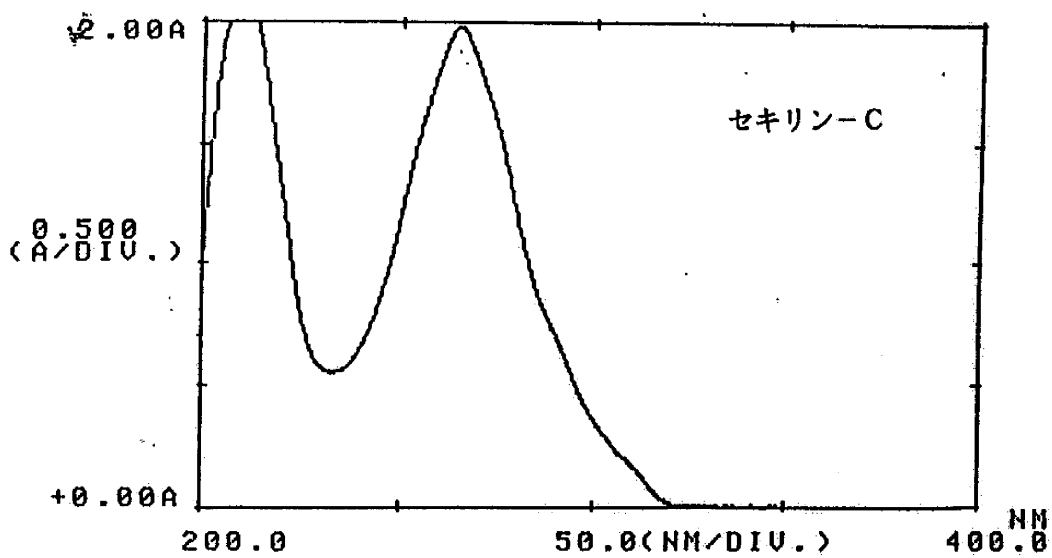
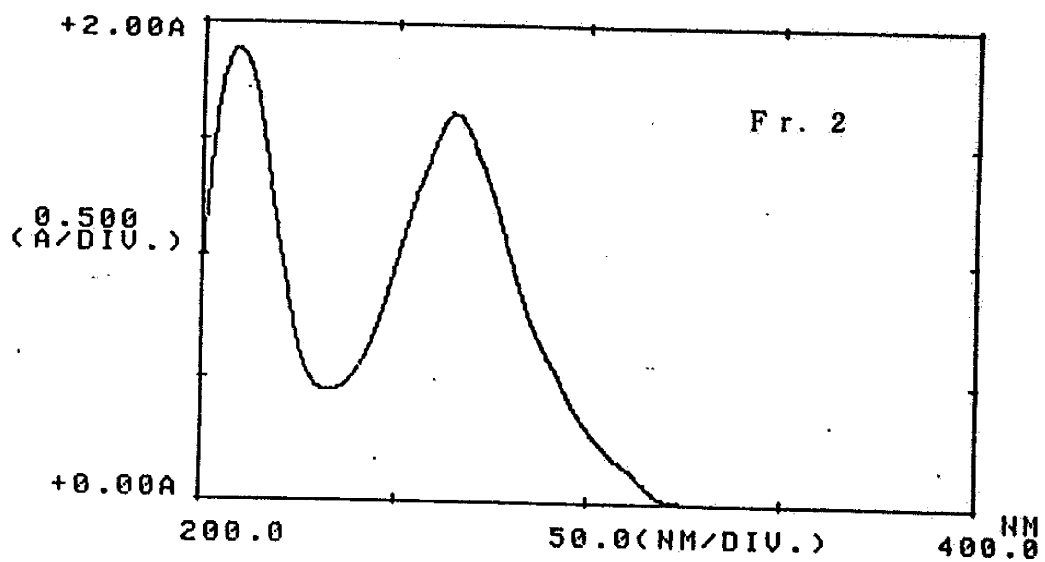


Fig. 3 Fr. 2 およびセキリン-CのUVスペクトラム

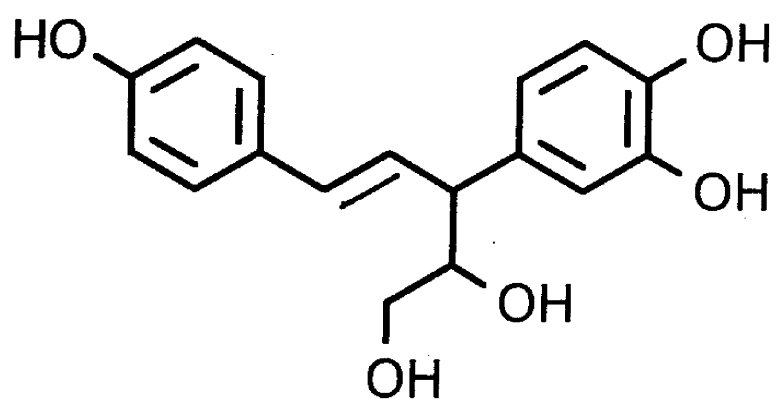


Fig. 4 The chemical structure of sequirin-C.

#### 4. SOD様活性の発現に關与する構造

前章において、セキリン-Cに高度なSOD様活性が認められたことから、セキリン-Cと類似あるいは共通する構造を有する6種の化合物を用いてSOD様活性の発現に必須となる構造を明らかにした。

##### 4.1 実験方法

セキリン-Cと同様にノルリグナン類に属するアガサレジノール、ヒドロキシスギレジノール、スギレジノールおよびセキリン-Cの一部を構成する共役型のフェニルプロパン構造を有する*p*-クマール酸、カフェ酸、フェルラ酸を供試し(Fig. 5)、2.1.2に準じてSOD様活性を測定した。なお、コントロールとしてセキリン-Cを用いた。

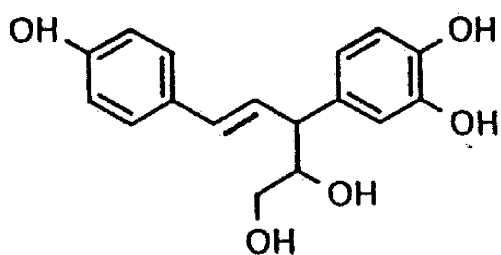
##### 4.2 結果および考察

供試した3種のノルリグナン類の中で、ヒドロキシスギレジノールはセキリン-Cに匹敵するSOD様活性を有しており、アガサレジノールとスギレジノールの活性は微弱であった。ヒドロキシスギレジノールとセキリン-Cは、B環上に2個のOH基がオルト位に配置しているという共通した特徴があり、ノルリグナン類のSOD様活性の発現にはこのような構造が重要な役割を果たしているものと判断された(Table 7)。

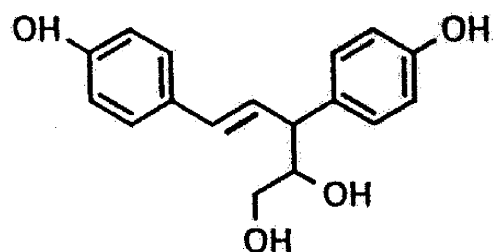
一方、セキリン-Cの一部を構成する共役型のフェニルプロパン類については、カフェ酸に比較的高い活性が認められた(Table 7)。



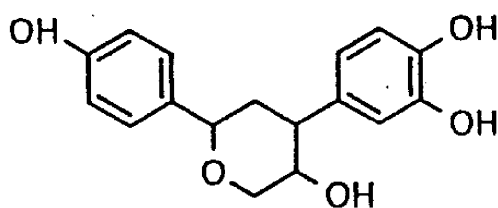
カフェ酸も芳香環上で2個のOH基がオルト位に配置しており、この結果からもオルト位に配置した2個のフェノール性OH基がSOD様活性の発現に重要であることが確認された。



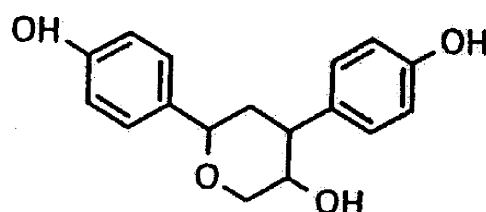
Sequirin-C



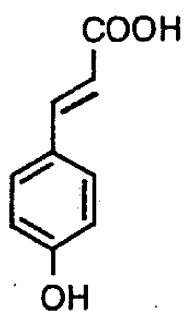
Agatharesinol



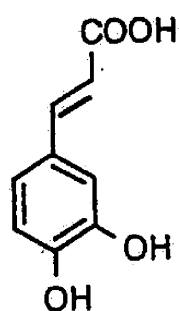
Hydroxysugiresinol



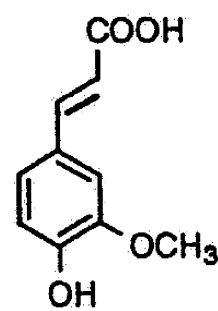
Sugiresinol



*p*-Coumaric acid



Caffeic acid



Ferulic acid

Fig. 5. Chemical structures of the authentic compounds subjected to the assay of SOD mimic activity.

**Table 7 SOD mimic activity for each authentic compound.**

	<b>Compound</b>	<b>SOD mimic activity (Unit · SOD/μg)</b>
	<b>Sequirin-C</b>	<b>370</b>
<b>Norlignans</b>	<b>Agatharesinol</b>	<b>week</b>
	<b>Hydroxysugiresinol</b>	<b>345</b>
	<b>Sugiresinol</b>	<b>week</b>
	<b><i>p</i>-Coumaric acid</b>	<b>11</b>
<b>Phenylpropanes</b>	<b>Cafferic acid</b>	<b>128</b>
	<b>Feruric acid</b>	<b>5</b>

## 5. 外皮エタノール抽出画分からのACE阻害活性物質の単離と同定

### 5.1 実験方法

#### 5.1.1 逆相HPLCによるACE阻害活性物質の単離

外皮エタノール抽出画分を逆相HPLCを用いて下記の条件で分析し、溶出曲線に従って分画した。

Table 8 HPLC分析条件

カラム	Wakosil-II 5C-18AR
溶離液	水-メタノール(90/10)溶液
流速	1.0 ml/min
検出	280nm 及び RI

#### 5.1.2 GC-MSおよび<sup>1</sup>H-NMR分析によるACE阻害活性物質の同定

HPLCで分画したFr. 6中の活性物質は、3.1.2に準じてGC-MSと<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz)分析によって同定した。なお、Fr. 2については<sup>1</sup>H-NMR(500 MHz)分析によって活性物質を同定した。

### 5.2 結果および考察

HPLCで外皮エタノール抽出画分を11フラクションに分画し(Fig. 6)、各画分の収率およびACE阻害活性を測定した(Table 9)。その結果、全画分の収率は外皮エタノール抽出画分の70%に達して

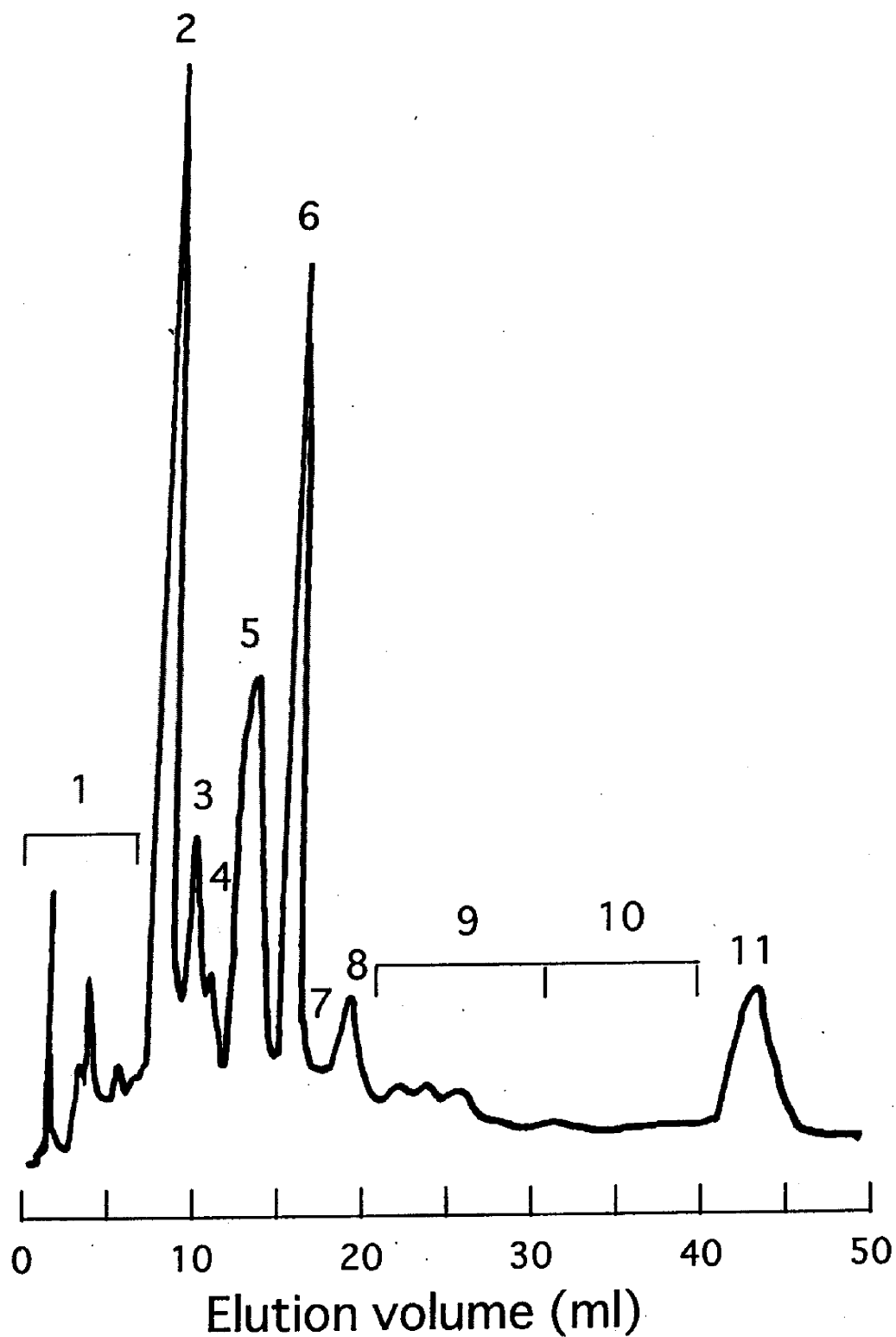
おり、大部分の画分が活性を有していた。しかしながら、いずれの画分も分画前の外皮エタノール抽出画分と比べて活性は同程度かそれ以下であり、分画を行っても活性の向上は認められなかった。このことは、外皮エタノール抽出画分中には多数のACE阻害活性物質が存在していることを示唆するが、Fr. 2と6については比較的ACE阻害活性と収率が高かったことから、HPLCによる精製を行って $^1\text{H-NMR}$ およびGC-MS分析に供した。

Fr. 6を $^1\text{H-NMR}$ 分析した結果(ケミカルシフト( $\delta$ ))2.40(1H, dd,  $J=16.0, 7.9$  Hz), 2.75(1H, dd,  $J=16.0, 5.5$  Hz), 3.87(1H, ddd,  $J=7.9, 7.7, 5.5$  Hz), 4.47(1H, d,  $J=7.7$  Hz), 5.76(1H, d,  $J=2.3$  Hz), 5.82(1H, d,  $J=2.3$  Hz), 6.61(1H, dd,  $J=8.3, 1.9$  Hz), 6.67(1H, d,  $J=8.3$  Hz), 6.73(1H, d,  $J=1.9$  Hz))、Fr. 6はカテキンと推定された。

さらには、Fr. 6およびカテキンのTMS誘導体のGC-MSスペクトラム( $m/z$ (相対強度, %)): 650( $M^+$ , 10.2), 368(92.7), 355(25.2), 309(10.4), 267(9.7), 249(2.1), 179(10.3), 147(5.8), 73(100)) (Fig. 7, 8)およびHPLCによる(+)-カテキンとのスパイクテストの結果から、Fr. 6を(+)-カテキンと同定した。

一方、Fr. 2については $^1\text{H-NMR}$ 分析を行い、プロシアニジンB3と推定された(ケミカルシフト( $\delta$ ))2.39(1H, dd,  $J=16.3, 8.1$  Hz), 2.66(1H, dd,  $J=16.3, 5.5$  Hz), 3.69(1H, ddd,  $J=8.1, 7.3, 5.5$  Hz), 4.15(1H, d,  $J=9.8$  Hz), 4.25(1H, dd,  $J=9.8, 7.9$  Hz), 4.31(1H, d,  $J=7.9$  Hz), 4.44(1H, d,  $J=7.3$  Hz), 5.68(1H, d,  $J=2.3$  Hz), 5.78(1H, d,  $J=2.3$  Hz), 5.97(1H, s(singlet)), 6.15(1H, dd,  $J=8.2, 2.0$  Hz), 6.36(1H, dd,  $J=8.2, 2.0$  Hz),

6.49 (1H, d, J=2.0 Hz), 6.568 (1H, d, J=8.2 Hz), 6.573 (1H,  
d, J=8.2 Hz), 6.64 (1H, d, J=2.0 Hz)) .



**Fig. 6.** Elution profile of the ethanol extract from outer bark.  
Note: Numbers in figure correspond to the fraction numbers.

Table 9. Determination of IC<sub>50</sub> for each crude fraction separated from the ethanol extract of Japanese cedar outer bark.

Fraction	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	Yield(%) <sup>a)</sup>
1	+b)	14.9
2	18	8.6
3	25	2.7
4	50	1.9
5	15	7.0
6	23	9.3
7	75	1.6
8	50	2.0
9	35	9.8
10	55	4.1
11	25	6.3

a) Yield is expressed as % on the crude ethanol extract.

b) Inhibition is less than 50% at 150 μg/ml.



MASS SPECTRUM

Data File: T

Sample: T

RT 36'21" EI (Pos.) GC 189.3c BP: m/z 369.0000 Int. 44.9990 Lv 0.00

Scan# (1456) - (1445, 1478) [coef. 1.00]

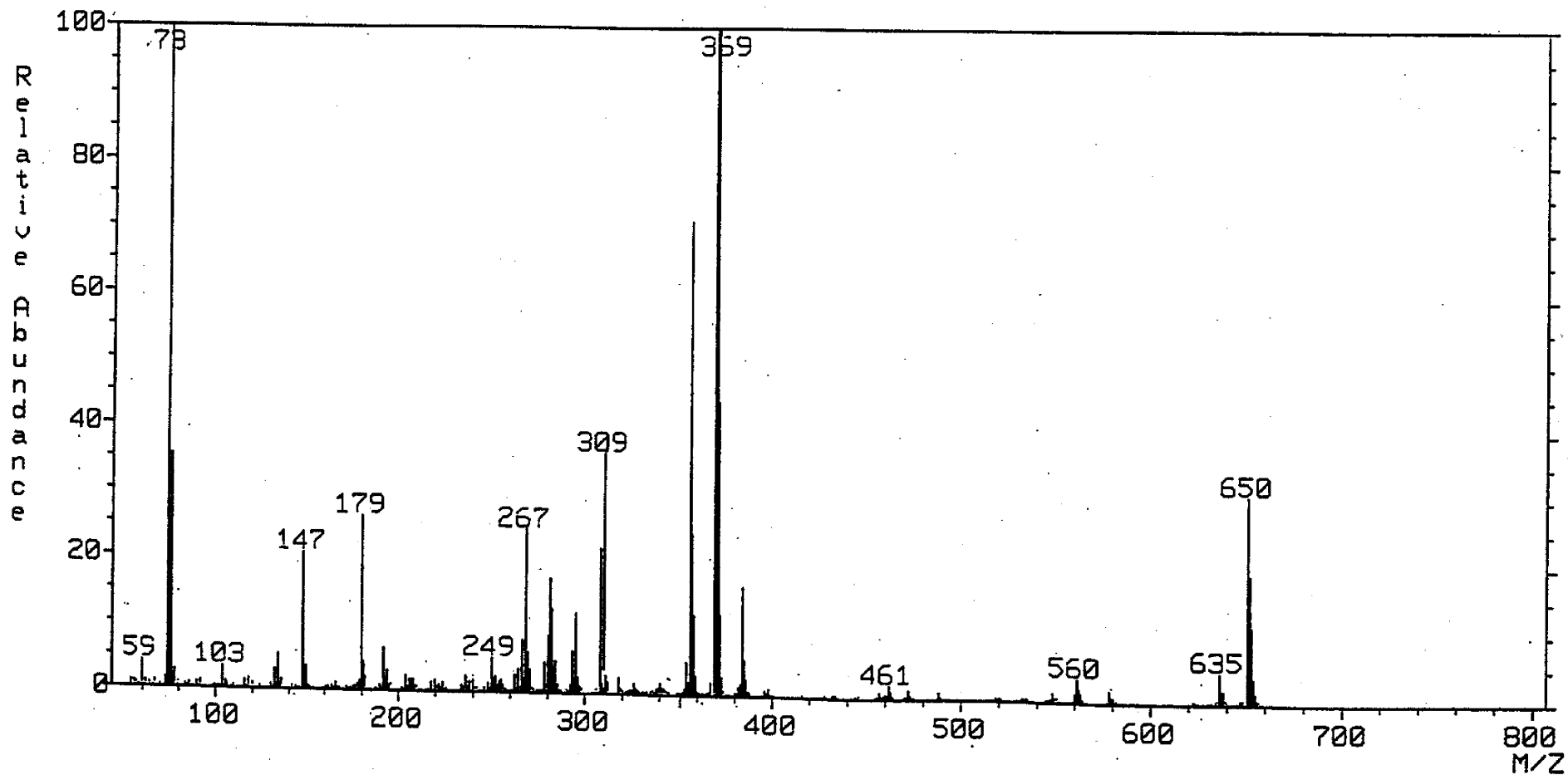


Fig. 7 フラクション6のGC-MSスペクトラム

MASS SPECTRUM

Data File: KA

Sample: Ka

RT 36'21" EI (Pos.) GC 189.3c BP: m/z 73.0000 Int. 253.5207 Lv 0.00

Scan# (1456) - (1445, 1480) [coef. 1.00]

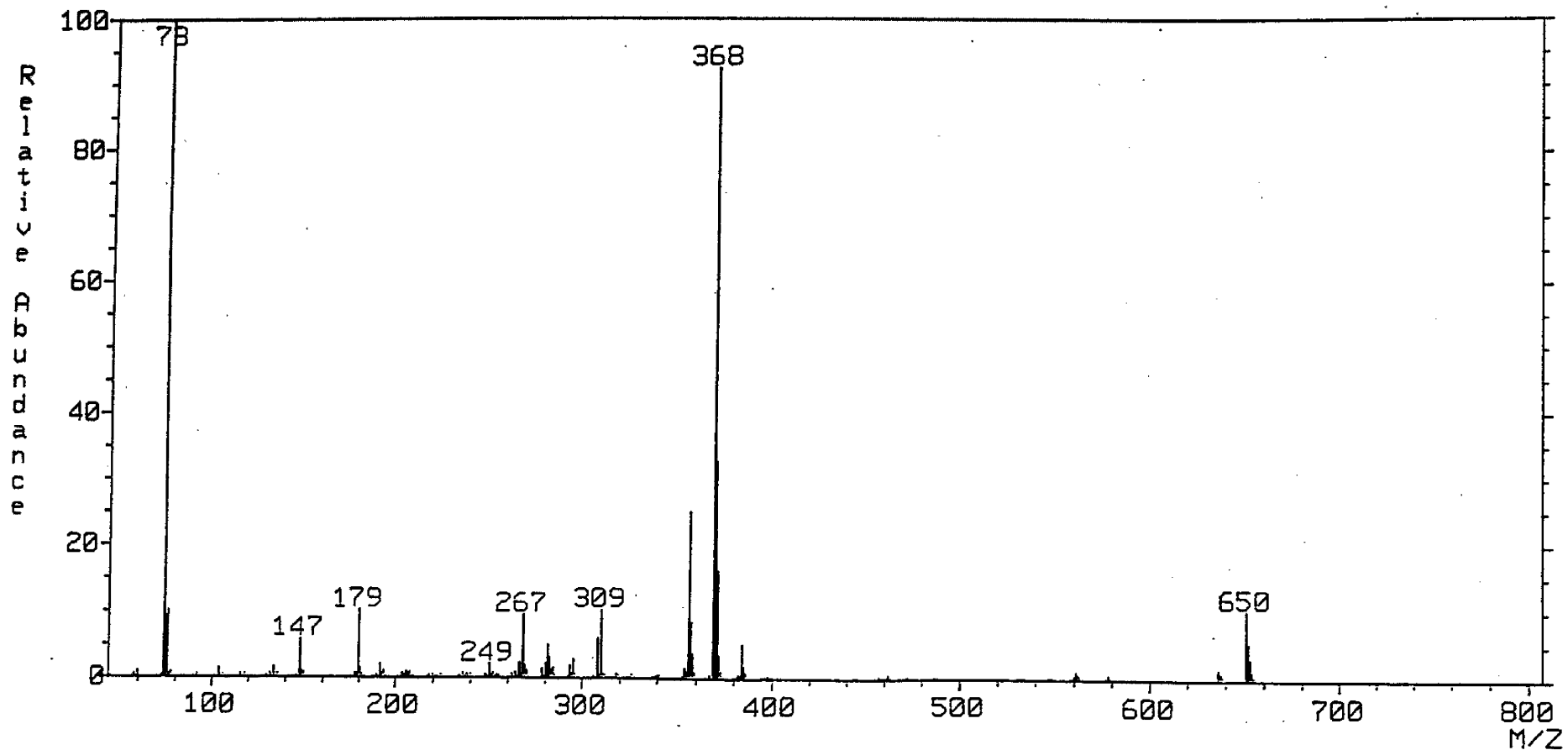


Fig. 8 CatechinのGC-M Sスペクトラム

## 6. フラボノイド類のACE阻害活性とその活性発現に關与する構造

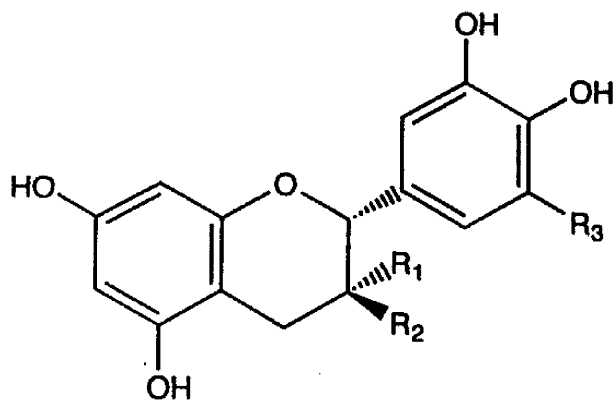
前章において、ACE阻害活性がカテキンとプロシアニジンB3に認められたことから、これらと類似した構造を有するフラボノイド類を用いてACE阻害活性の発現に必須となる構造を明らかにした。

### 6.1 実験方法

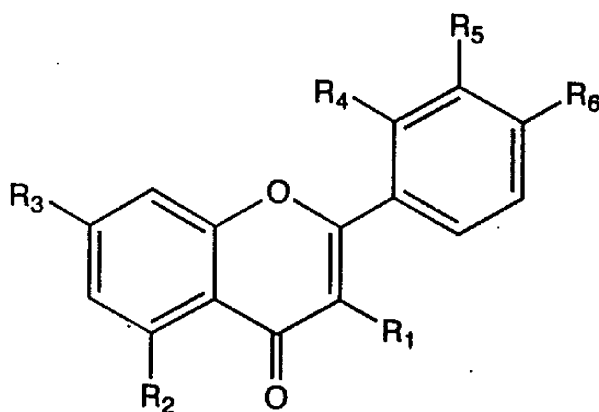
フラバン-3-オール類として(+)-カテキン、(-)-エピカテキンおよび(-)-エピガロカテキンを、フラボン類としてフラボン、3-ヒドロキシフラボン、3,7-ジヒドロキシフラボン、フィセチン、ケルセチンおよびモリンを供試し(Fig. 9)、2.1.3に準じてACE阻害活性を測定し、 $IC_{50}$ 値を求めた。

### 6.2 結果および考察

供試した9種の化合物の内、フラボンと3-ヒドロキシフラボンを除く化合物は、 $10\sim 38\mu\text{g/ml}$ の $IC_{50}$ 値を示し、ACE阻害活性が認められた(Table 10)。これらの化合物は、A環の7位にフェノール性OH基を有するという共通した特徴があり、フラボノイド類のACE阻害活性の発現には7位のフェノール性OH基とヘテロ環上の酸素が重要な役割を果たしていると判断された。



- (+)-Catechin:  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$   
 (-)-Epicatechin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=H$   
 (-)-Epigallocatechin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$



- Flavone:  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=H$ ,  $R_5=H$ ,  $R_6=H$   
 3-Hydroxyflavone:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=H$ ,  $R_4=H$ ,  $R_5=H$ ,  $R_6=H$   
 3,7-Dihydroxyflavone:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ ,  $R_4=H$ ,  $R_5=H$ ,  $R_6=H$   
 Fisetin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ ,  $R_4=H$ ,  $R_5=OH$ ,  $R_6=OH$   
 Quercetin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=OH$ ,  $R_4=H$ ,  $R_5=OH$ ,  $R_6=OH$   
 Morin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=OH$ ,  $R_4=H$ ,  $R_5=H$ ,  $R_6=OH$

**Fig. 9** Chemical structures of the authentic compounds subjected to the ACE inhibitory assay.

**Table 10** Determination of IC<sub>50</sub> for each authentic compound.

	Compound	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µM)
Flavan-3-ols	(+)-Catechin	16	55.2
	(-)-Epicatechin	16	53.4
	(-)-Epigallocatechin	38	122.5
Flavones	Flavone	+a)	+a)
	3-Hydroxyflavone	+a)	+a)
	3,7-Dihydroxyflavone	10	39.4
	Fisetin	22	73.4
	Quercetin	27	87.7
	Morin	25	81.1

a) Inhibition is less than 50% at 500 µg/ml.

## 7. 総括

スギは我が国における代表的な造林木であるが、建築用材等以外の用途に利用されておらず、しかも安価な外国産材の使用が高まっていることから、現在の材蓄積量は余剰状態になっている。以上の背景に基づき、本研究ではスギ有効利用の一環として抽出成分の利用に着目し、活性酸素の関与する種々の疾患（発ガン、老化等）の予防に応用が期待されるスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）様活性および高血圧症の治療と予防に応用が期待されるアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性について検討した。

本学上阿多古演習林に生育するスギ（樹齢15年）を外皮、内皮、心材、辺材、葉、根に分別し、それぞれをヘキサン、クロロホルム、エタノール、熱水で逐次抽出した24画分について各種生理活性を検索した結果、SOD様活性については心材エタノール抽出画分が、ACE阻害活性については外皮エタノール抽出画分が最も高い活性を示した。そこで、それぞれの画分に含有される活性物質を逆相HPLCを用いて単離・精製し、<sup>1</sup>H-NMRおよびGC-MS分析に供して活性物質の同定を行った。

その結果、スギ抽出物のSOD様活性物質はセキリン-Cであり、ACE阻害活性物質はカテキンとプロシアニジンB3であることを明らかにした。

## 8. 参考文献

- 1) 清水岑夫 ; 和田修治 ; 有澤宗之 ; 池谷賢次郎 ; 大角誠治 ; 矢野三郎 ; 森田直賢 : 薬学雑誌, 108, 964-965(1988).
- 2) 丹波靱負 ; 本山示 : 日本薬剤師会雑誌, 39, 17-39(1987).
- 3) M. Yatagai; N. Nakatani: Mokuzaï Gakkaishi, 40, 1355-1362 (1994) .
- 4) S. Ohara; K. Suzuki; T. Ohira: Mokuzaï Gakkaishi, 40, 1363-1374 (1994)
- 5) 今村博之 ; 岡本一 ; 他 4 名 : “木材利用の化学” , 共立出版, p.201 (1983) .
- 6) J. M. McCord; I. Fridovich: J. Biol. Chem., 244, 6049-6055(1969).
- 7) K. Motegi: Rinsyoukensakiki-Shiyaku (in Japanese), 9, 1071-1080(1986).
- 8) H. Okamura *et al.*: Phytochemistry, 33, 557-561(1993).
- 9) H. S. Cheung; D. W. Cushman: Biochim. Biophys. Acta, 293, 451-463(1973).
- 10) B-S. Tsai; M. J. Peach: J. Biol. Chem., 252, 4674-4681 (1977).