

博士論文

植物乳酸菌による生薬発酵で生ずる抗炎症性物質の
構造と機能に関する研究

2020 年

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

平成 28 年度入学

岡 本 知 子

【目次】

序章	1
第一章 植物乳酸菌を用いた発酵艾葉抽出物の抗炎症作用	
第一節 肝癌由来細胞株を用いた NASH モデル細胞の作成	4
第二節 NASH モデル細胞を用いての発酵生薬抽出物の抗炎症作用	6
第三節 異なる植物乳酸菌で発酵させた艾葉抽出物の抗炎症作用	8
第四節 植物乳酸菌の保有するβ-グルコシダーゼ遺伝子の解析	9
第五節 まとめと考察	12
第二章 抗炎症活性物質の精製と化学構造の決定	
第一節 発酵および未発酵艾葉抽出物から活性物質の抽出	13
第二節 HPLC を用いた発酵および未発酵艾葉抽出物の成分分析	16
第三節 発酵艾葉抽出物から活性物質の分離精製	18
第四節 活性物質の構造決定	22
第五節 各画分の HPLC 分析と活性評価	26
第六節 まとめと考察	29
総括	32
実験の部	34
1. 使用菌株	
2. 使用細胞	
3. 使用生薬	
4. 使用試薬	
5. 使用培地	
6. 第一章の実験	
7. 第二章の実験	
8. 統計解析	
参考文献	39
謝辞	44

[略語一覽]

^1H NMR	proton nuclear magnetic resonance
^{13}C NMR	carbon-13 nuclear magnetic resonance
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
CC	column chromatography
D-MEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FA	fatty acid
FBS	fetal bovine serum
GC-EI-MS	gas chromatography electron ionization mass spectrometry
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-EI-MS	high-resolution electrospray ionization mass spectrometry
IL	interleukin
LAB	lactic acid bacteria
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MeOH	methanol
MRS	de Man, Rogosa, and Sharpe
MS	mass spectrum
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
ODS	octadecylsilanized silica gel
ORF	open reading frame
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PBS	phosphate buffered saline
SQL	sesquiterpene lactone
TG	triglyceride
TLR	toll like receptor

[序章]

日本薬局方では、生薬を「動植物の薬用とする部分、細胞内容物、分泌物、抽出物または鉱物など」と定義されている。すなわち、生薬は、薬効成分を単一物質とせず用いる「未精製のクスリ」である。1-3世紀に中国で編纂された最古の薬物学の本「神農本草経」には、365種の生薬が収載され、その内訳は、植物薬が252種、動物薬が67種、鉱物薬が46種である。本書によれば、神農は自ら毒味により生薬の効能や安全性を確認してきたとされる。生薬を組み合わせて作られるのが、漢方薬である。漢方薬を扱う漢方医学は、5-6世紀ごろに中国医学を基に日本で発展した伝統医学を指す。特に古典医学書に基づく薬物療法を漢方医学と呼び、漢方薬は、「傷寒雑病論」(現在では、「傷寒論」及び「金匱要略」のことを指す)に記載されている。このように、生薬(漢方薬)は、ヒトへの投与によりその有効性や安全性が評価されてきた、歴史的にも高い品質の薬剤である。

生物活性を示すものを含め、種々の化合物を含む天然物において、活性物質の本体を明らかにすべく、分離探索研究が進められてきた。例えば、ケシからはモルヒネが単離され、タバコからはニコチン、コーヒーからカフェイン、ケジギタリスからはジゴキシニンと、生薬をはじめとする天然物からは数多くの生物活性物質が単離されてきた。したがって、生薬は新しい医薬品リード化合物の重要な供給源とみなされている [1,2]。しかしながら、それらの化合物の中には、元の植物から得られる生物活性物質の量が少ないことがしばしば認められる [3]。生薬の多くは植物に由来し、その生物活性物質の多くは植物二次代謝物である。植物二次代謝物は、そのアグリコンの水溶性と化学的安定性を改善するために、その植物中に配糖体として保存されている [4]。配糖体は、疎水性が低いため、アグリコンよりも生物学的利用率 (bioavailability) が低く、結果として弱い生物活性しか示さないことが多い。すなわち、植物二次代謝物が、その生物活性を最大限に示すためには、活性型 (アグリコン) への変換が重要であると言える [5]。

生薬(漢方薬)の研究を通じて、*in vivo* で薬効を示す生薬が、必ずしも *in vitro* では芳しい結果が得られないことが経験的に知られていた。例えば、大黄の成分である *sennoside* は、*anthrone* 二量体からなる配糖体である。そのため、比較的分子が大きく消化管上部では吸収されず、消化管下部に輸送される。その部位に生息する嫌気性細菌によって配糖体が加水分解され、アグリコンである *sennidin* となった後、二量体を繋いでいる炭素-炭素結合が還元的に開裂し、単量体の *rhein anthrone* に変換される [6]。これら一連の *sennoside* の *rhein anthrone* への変換には *Bifidobacterium (B.) sp. SEN*, *B. dentium*, *B. adolescentis* などによる配糖体の段階的加水分解、*Peptostreptococcus intermedius* などの細菌による二量体の開裂など、消化管に生息する腸内細菌の共働作用が必要であることが報告されている [7]。また、*Bifidobacterium sp.*からは、*sennoside* を加水分解するβ-グルコシダーゼが精製されている [8, 9]。分子の大きい *sennoside* は、他の腸内細菌の持つβ-グルコシダーゼでは加水分解されず、この *Bifidobacterium sp.*が特異的に産生するβ-グルコシダーゼによりアグリコンとなることができる。この報告は、

配糖体の加水分解反応において、 β -グルコシダーゼの基質認識が重要であることを強く示すものである。

他方、大豆の成分でフラボノイドの一種である daidzin は、腸内細菌により daidzein に変換される。さらに daidzein は、equol という生物活性の高い化合物に変換されることが報告されている [10, 11]。このように生薬などの植物中に含まれる成分は、真の活性物質ではなく、プロドラッグの形で存在することも多い。つまり、腸内細菌により変換された最終形態が生薬の薬理活性の本体である可能性も高く、天然由来の薬物と腸内細菌との密接な関係が明らかになってきた [12]。

腸内細菌は、植物二次代謝物を生物学的に活性化アグリコンに変換する意味において、大きな貢献を果たしている。腸内における微生物の変換反応には、脱グリコシル化、脱ヒドロキシ化、還元、C 環切断、および脱メチル化が含まれる [10]。特に、配糖体の加水分解は、薬用植物中の物質が腸内変換を受ける際における重要なステップである。グリコシド加水分解酵素ファミリーに分類される β -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) は、 β -グリコシル前駆体からアグリコンを切り離すのに重要である。この酵素は、動物、植物、真菌、酵母、細菌に広く分布していることが知られている [4]。したがって、 β -グルコシダーゼを保有する微生物による生薬の発酵は、生物活性物質をその前駆体から変換するための有用な方法である [13–18]。つまり、発酵技術は、植物二次代謝物の活性を、量的もしくは質的に改善するための魅力的なアプローチであると言える。

乳酸菌は、腸内細菌叢を構成する主要な微生物の一つである。杉山研究室では、果物、野菜、花、薬用植物から乳酸菌を探索分離し、これまでに、1,000 株を超える乳酸菌 (植物乳酸菌) から成るライブラリーを保有している。そして、これら植物乳酸菌の保健機能性を評価し、幾つかの乳酸菌株については全ゲノム配列を解読している [19–21]。

植物乳酸菌は、ヒトや動物などの消化管から分離された動物由来の乳酸菌 (動物乳酸菌) とは異なる特性を有している。一つは、植物乳酸菌は、胃酸や胆汁への耐性が動物乳酸菌より高く、経口摂取しても生菌状態のまま腸管に届きやすい。さらには、動物乳酸菌は、アミノ酸などに対する栄養要求性が高く、それら栄養素が不足した環境下での生育が困難であるのに対し、植物乳酸菌は、そのような環境においても良好に生育できる。

本研究に先立って行った予備実験の結果から、水で抽出した幾つかの生薬抽出液中で、植物乳酸菌 *Lactobacillus (Lb.) plantarum* SN13T は活発に増殖できる一方で、動物乳酸菌はその条件下ではほとんど増殖しないことが確認された。この違いに関しての理由の一つは、植物乳酸菌は、自己の産生する β -グルコシダーゼにより、生育に必要な糖源として、植物成分であるセロビオース (グルコース 2 分子が β -1, 4 結合したもの) や植物二次代謝物 (β -グルコシド) などを加水分解して得た糖を利用できるためと考えている。またもう一つの理由として、植物乳酸菌は、生薬抽出液中にしばしば検出される抗菌物質に対する耐性を有することが考えられる。このように、植物乳酸菌を生薬水抽出液中で培養した場合には、乳酸菌が増殖する過程で生成したアグリコンを得ることができる可能性がある。

本研究では、「植物乳酸菌を用いた発酵によって、生薬中の物質から新たな生物活性物質を

生成させる」という仮説を立て、それを検証することを目的とした。また、生薬の発酵プロセスにおいて重要な反応である配糖体加水分解酵素 β -グルコシダーゼに着目し、全ゲノム解析を行った情報に基づき、SN13T株の保有する β -グルコシダーゼ遺伝子を、他の植物乳酸菌のそれと比較した。

[第一章]

植物乳酸菌を用いた発酵艾葉抽出物の抗炎症作用

発酵生薬抽出物の生物活性は, Chavez-Tapia 等が報告した非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) モデル細胞を用いて, 抗炎症活性を評価することで行った [22]。このモデルでは, 脂肪酸 (fatty acids: FAs) を投与すると, HuH-7 細胞から遊離されるインターロイキン (interleukin: IL)-8 量が約 2 倍増加することが報告されている。よって発酵生薬抽出物の抗炎症活性を FA 処理した HuH-7 細胞培養液中に放出された IL-8 の量に対する阻害度で評価することとした。

内臓肥満に関連する疾患はメタボリックシンドロームに分類され, NASH もその一つである。NASH では, 栄養過剰により蓄積した遊離 FA が肝臓の TLR4/2 を活性化し, 続く NF- κ B カスケードの活性化を介し, 肝細胞からの IL-8 の分泌を促進する [23]。IL-8 は, 強力な好中球走化因子であり, また NASH 患者で増加することが報告されている [24, 25]。好中球浸潤は NASH の特徴の一つであり [26], 浸潤した好中球により炎症がさらに憎悪するため, NASH の発症と進行にかかわる重要な因子の一つである。加えて IL-8 シグナル伝達経路の阻害は, 動物モデルで肝臓の損傷を減らすことが報告されている [27, 28]。

本章では, まず NASH モデル細胞を文献 [22] に従い作製した。そして杉山研究室が保存する植物乳酸菌の一つであり, 幾つかの生薬水抽出液中で増殖性の高い *Lb. plantarum* SN13T で生薬抽出物を発酵させた。それらの発酵生薬抽出物に存在する抗炎症活性を上記 NASH モデル細胞の系を用いて測定した。その結果, 生薬の一つ「艾葉 (ガイヨウ)」の発酵抽出物が, 抗炎症活性を示すことが明らかになった。また, SN13T 株以外の全ゲノムを解読した 2 株を用い, それぞれ作製した発酵艾葉抽出物の効果を SN13T 株のそれと比較した。

第一節 肝癌由来細胞株を用いた NASH モデル細胞の作成

NASH モデル細胞は, Chavez-Tapia 等の報告に基づいて作製した [22]。肝癌由来細胞株 HuH-7 を 24 ウェルプレートに播種し, 24 時間後にパルミチン酸およびオレイン酸 (モル比 1 : 2) を 600 μ M の濃度で添加した。添加後さらに 24 時間培養し, トリグリセリド (TG) アッセイキットを用いて細胞内脂肪量を測定した。また, 細胞培養液中に放出された IL-8 量を ELISA 法により検出した。その結果, FA 処置群ではコントロール群と比較し, 有意に細胞内脂肪量 (Fig. 1) および細胞培養液中の IL-8 量 (Fig. 2) が有意に増加した。また FA 処理により毒性が出ないことを, Cell Counting Kit-8 (株式会社 同仁化学研究所) を用いた生細胞数の計測により確認した (Fig. 3)。以上の結果から, NASH モデル細胞の作製がなされたことが確認されたため, この細胞系を以後の実験に使用することとした。

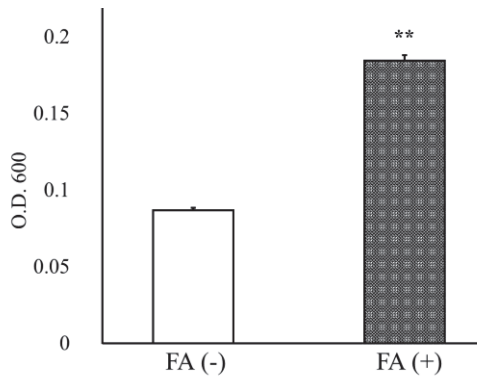


Fig. 1. Intracellular triglyceride.

HuH-7 cells were untreated or treated 600 μ M FAs for 24 hours, at a molar ratio of 1: 2 (palmitic and oleic acid, respectively). Increase of intracellular fat accumulation was determined by TG assay kit. Data expressed mean \pm standard deviation, n=3. **P < 0.01 vs FA (-). FA (-), untreated with FA; FA (+), treated with FA.

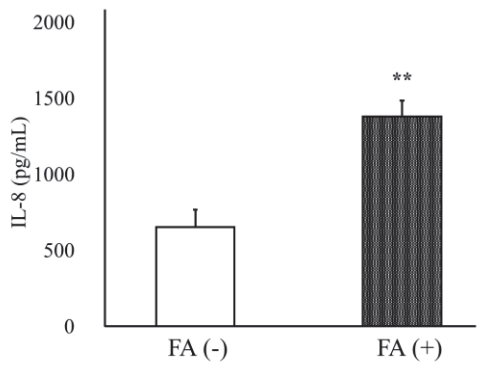


Fig. 2. IL-8 release from the HuH-7 cells.

Culture supernatants were harvested at 24 h after untreated or treated with FAs, and IL-8 levels were measured by ELISA. Data expressed mean \pm standard deviation, n=3. **P < 0.01 vs FA (-). FA (-), untreated with FA; FA (+), treated with FA.

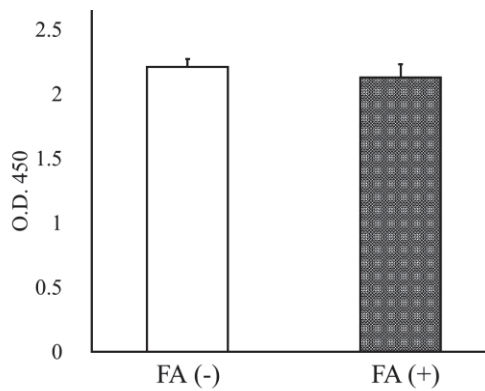


Fig. 3. Cell viability assay.

The effect of the FA on the viability of the HuH-7 cells. Cells were treated with FAs for 24 h and assessed with Cell Counting Kit-8. Cells treated with vehicle alone served as a control. Data expressed mean \pm standard deviation, n=3. FA (-), untreated with FA; FA (+), treated with FA.

第二節 NASH モデル細胞を用いての発酵生薬抽出物の抗炎症作用

SN13T 株が幾つかの生薬水抽出液中で良好に増殖できたため、この株を用いて Table 1 に示した生薬を発酵させ、発酵生薬抽出物を作製した。次に、NASH モデル細胞を用いて、発酵生薬抽出物における抗炎症活性をスクリーニングした。その結果、艾葉 (ガイヨウ) 発酵物において有意な抗炎症活性が確認された (Fig. 4)。

Table 1. Medicinal herbs used for screening.

Medicinal herbs	Origin	Family	Scientific name
艾葉 (gaiyo)	Leaf, Branch	キク科 (Compositae)	<i>Artemisia princeps</i> Pampanini
甘草 (kanzo)	Root	マメ科 (Leguminosae)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisher
桔梗 (kikyo)	Root	キキョウ科 (Campanulaceae)	<i>Platycodon grandiflorum</i> DC.
桂皮 (keihi)	Bark	クスノキ科 (Lauraceae)	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume
山梔子 (sannshishi)	Fruit	アカネ科 (Rubiaceae)	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis
蘇葉 (soyo)	Leaf, Branch	シソ科 (Labiatae)	<i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>acuta</i> Kudo
大棗 (taiso)	Fruit	クロウメモドキ科 (Rhamnaceae)	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>inermis</i> Rehder
陳皮 (tinpi)	Peer	ミカン科 (Rutaceae)	<i>Citrus unshiu</i> Markovich
人參 (ninzin)	Root	ウコギ科 (Araliaceae)	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
薄荷 (hakka)	Leaf, Branch	シソ科 (Labiatae)	<i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> Malinvaud

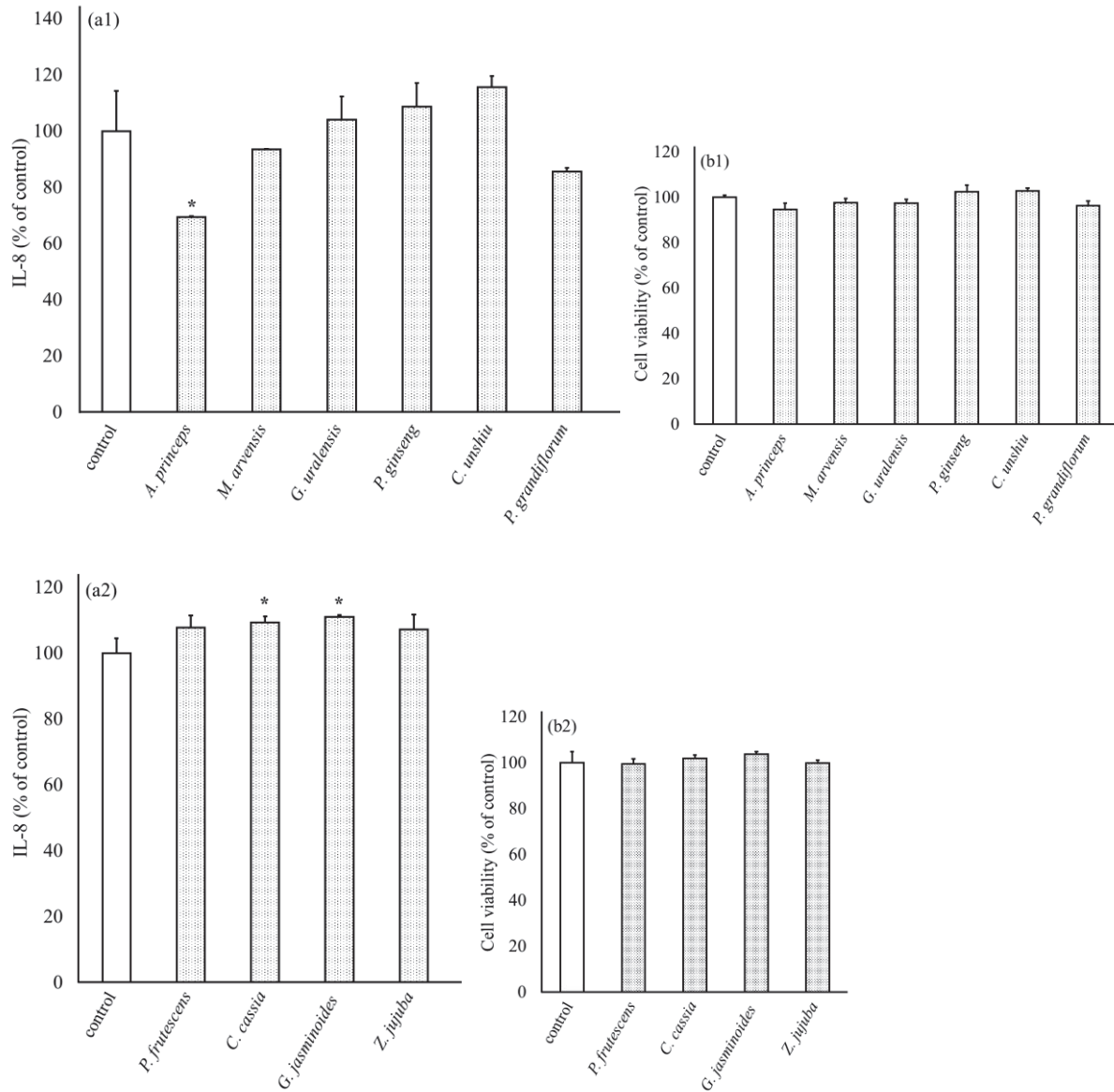


Fig 4. The inhibitory effect of the herb extract fermented with SN13T strain on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a1, a2) and cell viability assay after treatment (b1, b2).

The herb extracts were incubated for 24 h at 28°C with SN13T strain. The resulting samples were added to the HuH-7 cell culture medium at 50 µg/mL, along with FA treatment, except for *P. frutescens*, and *C. cassia* (20 µg/mL). The culture supernatant of the cells was collected 24 h after the treatment. The amounts of IL-8 were measured by the ELISA method. Data are expressed as the mean ± standard deviation, (n=2–3). **P < 0.01 vs. control.

第三節 異なる植物乳酸菌で発酵させた艾葉抽出物の抗炎症作用

NASH モデル細胞を用いた抗炎症活性スクリーニングにおいて、発酵艾葉抽出物に活性が認められたため、杉山研究室において全ゲノム解読がなされている植物乳酸菌株 (*Lb. plantarum* SN13T, *Lb. plantarum* SN35N, *Pediococcus (P.) pentosaceus* LP28) を選択し、各株で発酵させた艾葉抽出物の効果を未発酵の艾葉抽出物と比較した。各乳酸菌株を艾葉水抽出液に植菌し、28°Cで24時間静置培養した。遠心操作により、その培養液から菌体を除き、得られた上清を発酵サンプルとした。乳酸菌培養無しのサンプルも同時調製し、それを未発酵サンプルとした。培養後は、どの株の培養上清も同程度 pH が低下し、発酵がなされていることが確認された (Table 2)。

このようにして得られた発酵艾葉抽出物および未発酵艾葉抽出物の抗炎症活性を、HuH-7細胞を用いた NASH モデル細胞から遊離される IL-8 量を指標として検証した。未発酵の艾葉抽出物 (u-AP) は、FA 処理した HuH-7 細胞から遊離された IL-8 量を 50%に減少させた (Fig. 5a)。さらに、SN13T 株 (f-AP-13T) または SN35N 株 (f-AP-35N) で発酵した艾葉抽出物は、未発酵抽出物と比較して遊離 IL-8 量をさらに減少させた。加えて、SN13T 株で発酵させた艾葉抽出物の IL-8 抑制効果は、SN35N 株で発酵させた場合よりも高かった。他方、LP28 株で発酵させた艾葉抽出物 (f-AP-LP28) は、未発酵の艾葉抽出物とほぼ同じ程度に抑制された。

以上の結果から、特定の乳酸菌株によって発酵させた艾葉抽出物において抗炎症活性が増強することが明らかとなり、*Lb. plantarum* SN13T は、艾葉の抽出物を発酵させる上で、3つの菌株の中で最も適することが示された。なお、この実験で用いた各濃度の艾葉抽出物および FA は、HuH-7 細胞には細胞毒性を示さないことも、Cell Counting Kit-8 を用いた生細胞計測アッセイにより確認した (Fig. 5b)。

Table 2. pH of AP extract after fermentation with each LAB strain.

Strain	Control	SN13T	SN35N	LP28
Initial pH	6.0	6.0	6.0	6.0
Final pH	5.7	4.3	4.3	4.4

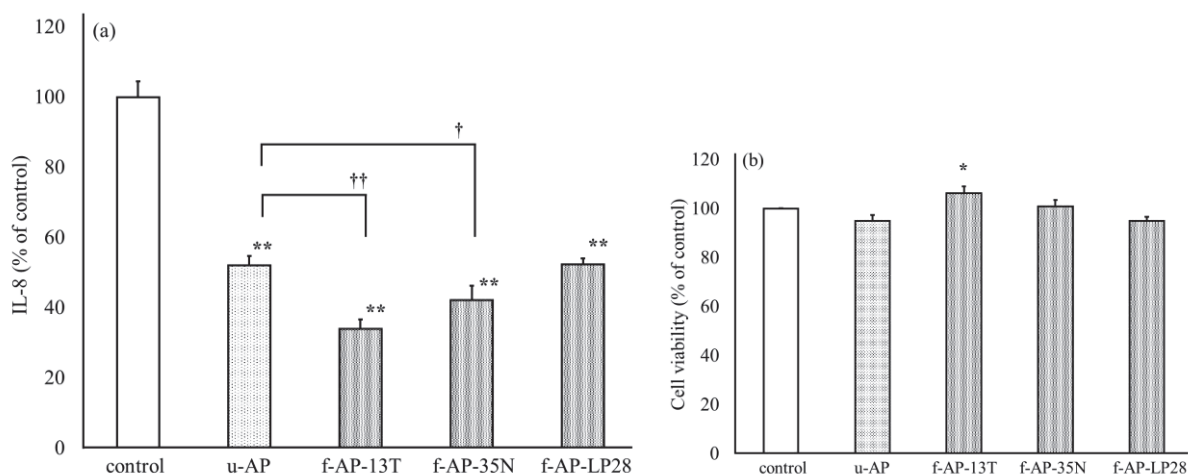


Fig. 5. The inhibitory effect of the AP extract fermented with each LAB strain on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

In this experiment, *Lb. plantarum* SN13T, *Lb. plantarum* SN35N, and *P. pentosaceus* LP28 were used. The AP extract was incubated for 24 h at 28°C with each strain, and the extract incubated without lactic acid bacterium was also prepared. The resulting sample was added to the HuH-7 cell culture medium at 45 µg/mL, along with FA treatment. The culture supernatant of the cells was collected 24 h after the treatment. The amounts of IL-8 were measured by the ELISA method. Data are expressed as the mean ± standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs. control. †P < 0.05 vs. u-AP. ††P < 0.01 vs. u-AP. u-AP, AP extract without fermentation; f-AP-13T, AP extract fermented with the SN13T strain; f-AP-35N, AP extract fermented with the SN35N strain; f-AP-LP28, AP extract fermented with the LP28 strain.

第四節 植物乳酸菌の保有するβ-グルコシダーゼ遺伝子の解析

前節の結果から, *Lb. plantarum* SN13T で発酵させた艾葉抽出物は, 顕著な抗炎症活性を示すことが明らかとなった。そこで, 前節で用いた *Lb. plantarum* SN13T, *Lb. plantarum* SN35N, および *P. pentosaceus* LP28 の 3 株において, それらのゲノム情報の違いが抗炎症活性の違いと関係しているのか考察することとした。これら 3 株の乳酸菌ゲノムの特徴について, Table 3 にまとめを示す。乳酸菌のゲノムサイズは一般的に約 1.8~3.4 Mb と報告されているが [29], SN13T 株のそれは 3.6 Mb と, 乳酸菌の中では大きなゲノム長を持つことが特徴である。

発酵における最も重要なプロセスはβ-グルコシダーゼによる配糖体加水分解である。そこで, 3 種類の乳酸菌株のβ-グルコシダーゼ遺伝子に着目し, 比較することとした [19-21]。

SN13T 株, SN35N 株, および LP28 株のゲノム上にある, β-グルコシダーゼ遺伝子と相同性のある open reading frame (ORF) を調査した結果, それぞれ 11 個, 8 個, 4 個の ORF が見つかった (Fig. 6)。このように, SN13T 株と SN35N 株のゲノムサイズは類似していた他, β-グルコシダーゼ遺伝子の gene organization もほぼ同じであった。

次に、これらの ORF から予測されるアミノ酸配列を基に、MEGA ソフトウェア ver. 6.0 の ClustalW プログラムを使用して、酵素の類似性を示す系統樹を作成した。Fig. 7 に示すように、LP28 株のβ-グルコシダーゼは、SN13T 株および SN35N 株の一部と類似性を示していた。つまり、SN13T 株および SN35N 株の保持するβ-グルコシダーゼは、LP28 株よりも多様である。これらのことから判断すると、LP28 株は、艾葉の二次代謝物を認識するβ-グルコシダーゼを持っていない可能性が示唆された。さらに SN13T 株は、他の 2 株には見られないβ-グルコシダーゼが存在しており、基質特異性や反応活性が異なる多様なβ-グルコシダーゼを保持する可能性が示唆された。

Table 3. Summary of features of LAB strains used in this study.

Species	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Strain	SN13T	SN35N	LP28
Genome size (bp)	3,612,790	3,267,626	1,774,865
CDSs	3398	3146	1683
Number of putative β-glucosidase encoding genes	11	8	4
Isolation origin	Banana leaf	Pear	Longan
Accession No.	AP019815	AP018405	DF970691

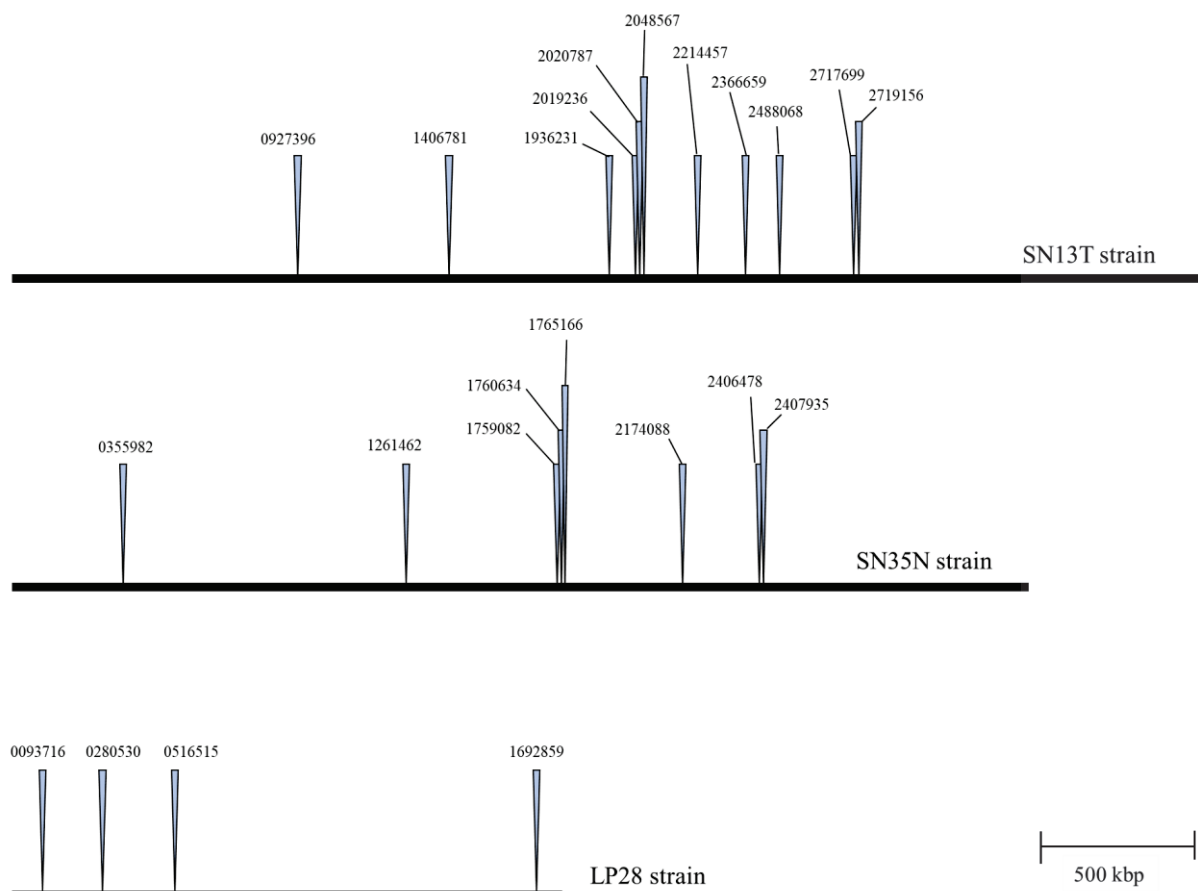


Fig. 6. Putative β-glucosidase gene locus of each LAB strain

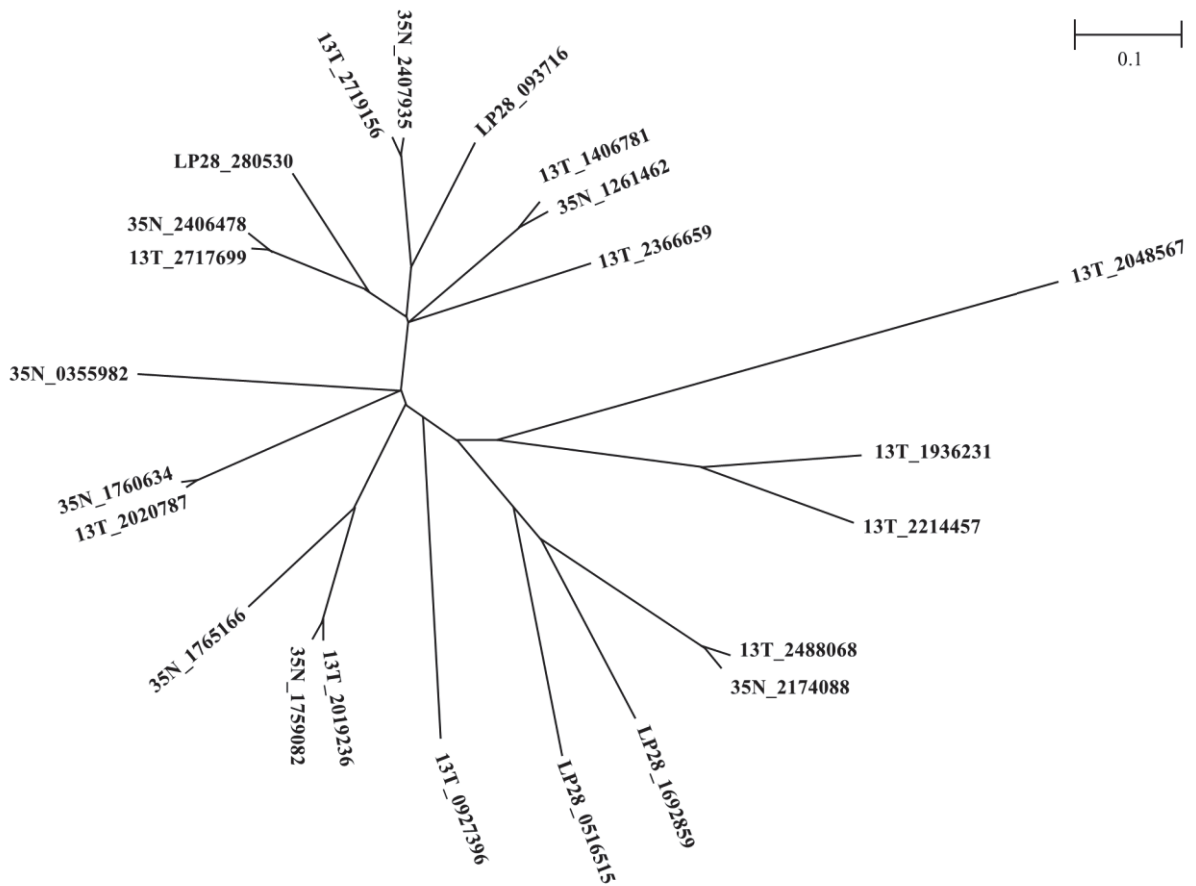


Fig. 7. Phylogenetic tree on the β -glucosidase.

The phylogenetic tree was drawn with the ClustalW program in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software ver. 6.0 using the unweighted pair group method with arithmetic (UPGMA). The top horizontal bars show a distance of 0.1 substitutions per site.

第五節 まとめと考察

第一章では、まず NASH モデル細胞を作製することで、抗炎症活性のスクリーニング系を確立し、本生物活性を示す発酵生薬抽出物の探索を行った。その結果、SN13T 株で発酵させた「艾葉」の発酵物に高い抗炎症活性を見出した。

次に、SN13T 株に加えて、全ゲノム解読が既になされている SN35N 株と LP28 株を用い、各乳酸菌株で発酵させた艾葉抽出物の抗炎症活性を未発酵の艾葉抽出物と比較するとともに、その活性の違いとゲノム上に存在する β -グルコシダーゼ遺伝子の特徴との関連性を調査した。配糖体加水分解酵素である β -グルコシダーゼ遺伝子と相同性を示す ORF を各株のゲノム情報を基に比較した結果、その数は、SN13T 株が 11 個と最も多く、SN35N 株は 8 個、LP28 株は 4 個であった。さらにそれらの ORF から予測されるアミノ酸配列を基に、酵素の類似性に関する系統樹を作成したところ、SN13T 株および SN35N 株は、LP28 株に比べ、多様な β -グルコシダーゼを持つことが示唆された。なお、これらの 3 株で発酵した艾葉抽出物に検出される HuH-7 細胞からの IL-8 遊離に対する阻害活性の強さは、 β -グルコシダーゼをコードする ORF の数に比例していた。すなわち、 β -グルコシダーゼ遺伝子の数と抗炎症性物質の生成量との間に比例関係があることが示唆された。

ところで、生薬の一つ「大黄 (ダイオウ)」に含まれる **sennoside** は、一部の腸内細菌によってしか加水分解されないことが報告されている [6-9]。つまり、微生物が持つ β -グルコシダーゼが植物二次代謝物を基質として認識ができるか否かが、活性物質が生成されるために重要である。したがって、SN13T 株のように多様な β -グルコシダーゼ遺伝子を持つと考えられる乳酸菌は、より多くの植物二次代謝物の基質認識ができる β -グルコシダーゼを保有する可能性が高い。すなわち、SN13T 株は、生薬の発酵に有用な乳酸菌株であると考えられる。

次章では、この艾葉発酵物の抗炎症作用の増強効果がどのように得られたのかを調べるために、発酵艾葉抽出物および未発酵艾葉抽出物から活性成分を抽出し、それらの成分分析を行った。また、発酵艾葉抽出物から活性物質の分離・精製と化学構造の決定を行った。

[第二章]

抗炎症活性物質の精製と化学構造の決定

艾葉の基原は、キク科 (Compositae) ヨモギ属の植物であり、ヨモギ (*Artemisia princeps* Pampanini) の葉と枝先部分が生薬として用いられる。ヨモギは東アジア地域に広く分布し、炎症や下痢、胃潰瘍、下腹部の冷えによる痛み・月経不順・月経痛・不妊などの治療に利用されている。艾葉には、フラボノイド (eupatilin および jaceosidin) [30, 31] や, caffeoylquinic acids [32] などのフェノール化合物が含まれており、これらは抗炎症作用などの広範な生物活性を持っている。さらに, *Artemisia* 属には、キク科植物でよく検出されるセスキテルペンラクトン (SQL) も含まれている [33]。艾葉からは、SQL に分類される yomogin が単離されており、本化合物は強い抗炎症活性を示すことが報告されている [34]。

生薬発酵物中にはさまざまな成分が含まれているため、目的とする化合物を分離・精製するために、適切な抽出溶媒を探す必要がある。本章では、まず、SN13T 株による発酵艾葉抽出物から活性成分を抽出するための適切な有機溶媒を探索した。次に、その抽出画分中に含まれる成分について、発酵および未発酵艾葉抽出物における違いを比較した。さらに、発酵艾葉抽出物から活性物質の分離・精製を行い、発酵により新たに生成した生物活性物質の同定と化学構造の決定を行った。

第一節 発酵および未発酵艾葉抽出物から活性物質の抽出

発酵および未発酵艾葉抽出物の pH を水酸化ナトリウム水溶液で 7.5 に調整したのち、酢酸エチルで抽出を行った。その後、水層と酢酸エチル層とに分け、酢酸エチル層を減圧濃縮し、その残渣を 90% (v/v) メタノールに懸濁させ、n-ヘキサンで抽出を行った。他方、水層はさらに n-ブタノールで抽出した (Fig. 8)。これらのすべての画分に対して抗炎症活性を評価した結果、発酵および未発酵ともに、90% (v/v) メタノール画分において濃度依存的な IL-8 抑制活性が観察された (Fig. 9a)。また、発酵艾葉抽出物から得られた 90% (v/v) メタノール画分は、未発酵艾葉抽出物の同画分と比較し、高い IL-8 抑制活性を有していた。なお、その他の画分には顕著な活性は見られなかった (Fig. 10–12)。

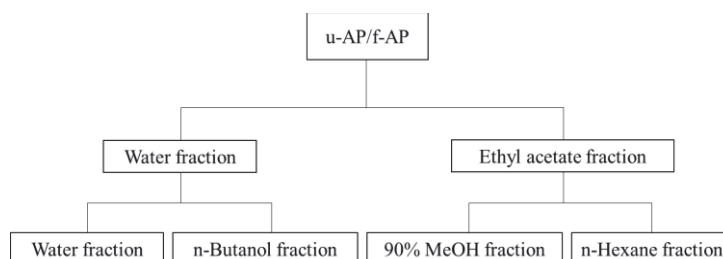


Fig. 8. Procedure for fractionation from herbal extracts.

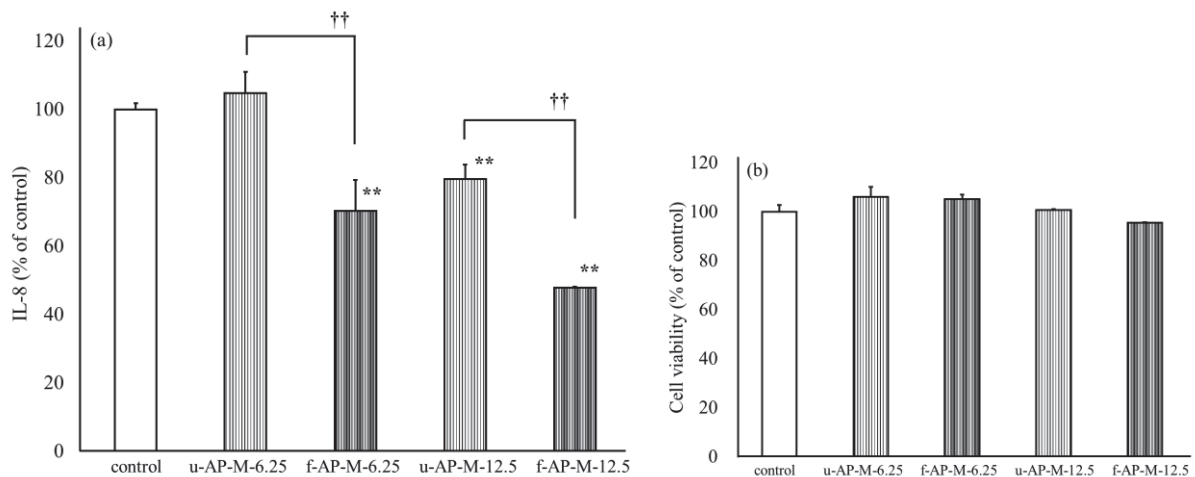


Fig. 9. The inhibitory effect of 90% (v/v) MeOH extract on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The 90% (v/v) MeOH extract was diluted and added to the HuH-7 cell culture at 6.25 or 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs control. ††P < 0.01 vs u-6.25/u-12.5. u-AP-M-6.25, 90% (v/v) MeOH extract from u-AP (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$); f-AP-M-6.25, 90% (v/v) MeOH extract from f-AP-13T (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$); u-AP-M-12.5, 90% (v/v) MeOH extract from u-AP (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); f-AP-M-12.5, 90% (v/v) MeOH extract from f-AP-13T (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

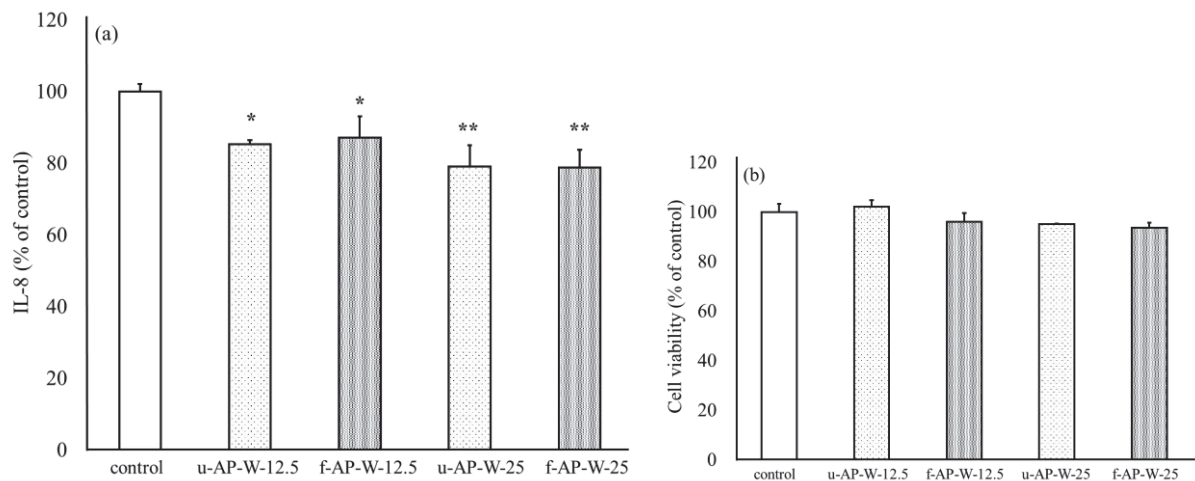


Fig. 10. The inhibitory effect of water extract on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The water extract was diluted and added to the HuH-7 cell culture at 12.5 or 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). *P < 0.05 vs control. **P < 0.01 vs control. u-AP-W-12.5, water extract from u-AP (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); f-AP-W-12.5, water extract from f-AP-13T (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); u-AP-W-25, water extract from u-AP (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$); f-AP-W-25, water extract from f-AP-13T (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

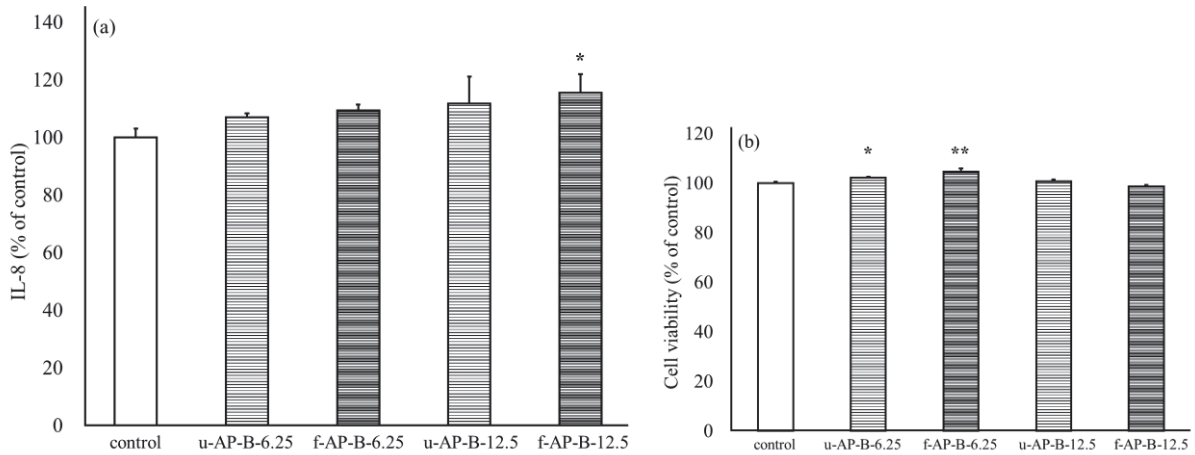


Fig. 11. The inhibitory effect of n-butanol extract on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The n-butanol extract was diluted and added to the HuH-7 cell culture at 6.25 or 12.5 $\mu\text{g/mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). *P < 0.05 vs control. **P < 0.01 vs control. u-AP-B-6.25, n-butanol extract from u-AP (6.25 $\mu\text{g/mL}$); f-AP-B-6.25, n-butanol extract from f-AP-13T (6.25 $\mu\text{g/mL}$); u-AP-B-12.5, n-butanol extract from u-AP (12.5 $\mu\text{g/mL}$); f-AP-B-12.5, n-butanol extract from f-AP-13T (12.5 $\mu\text{g/mL}$).

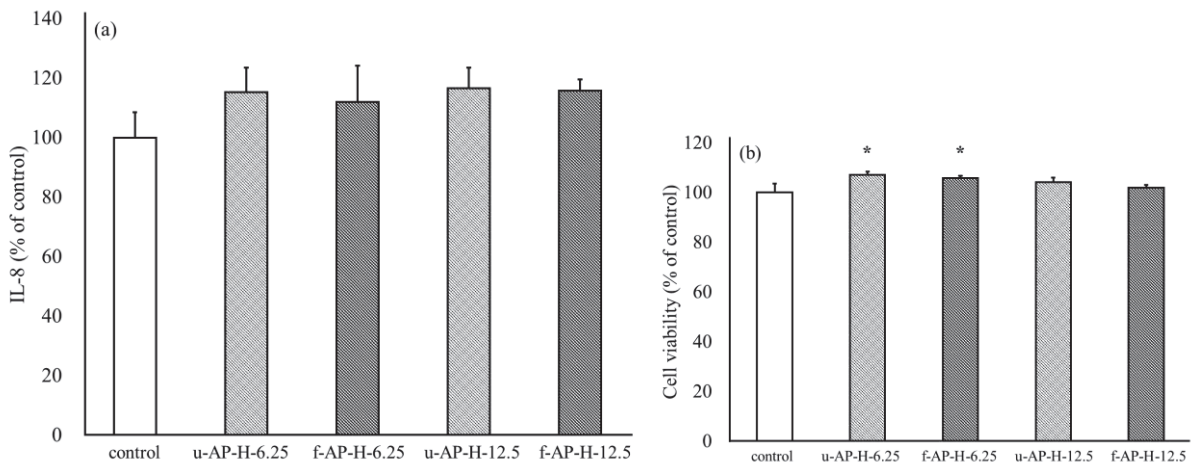


Fig. 12. The inhibitory effect of n-hexane extract on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The n-hexane extract was diluted and added to the HuH-7 cell culture at 6.25 or 12.5 $\mu\text{g/mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). *P < 0.05 vs control. u-AP-H-6.25, n-hexane extract from u-AP (6.25 $\mu\text{g/mL}$); f-AP-H-6.25, n-hexane extract from f-AP-13T (6.25 $\mu\text{g/mL}$); u-AP-H-12.5, n-hexane extract from u-AP (12.5 $\mu\text{g/mL}$); f-AP-H-12.5, n-hexane extract from f-AP-13T (12.5 $\mu\text{g/mL}$).

第二節 HPLC を用いた発酵および未発酵艾葉抽出物の成分分析

前節の結果から、発酵艾葉抽出物において、90% (v/v) メタノール画分でも水抽出物と同様、IL-8 抑制活性を示すことがわかった。そこで、この画分に含まれる成分を HPLC で解析することとした。

発酵艾葉抽出物の 90% (v/v) メタノール画分と未発酵艾葉抽出物の同画分とを、それぞれ同条件にて HPLC カラムにかけ、その溶出ピークについて比較した。その結果、発酵艾葉抽出物の 90% (v/v) メタノール画分では、明らかに保持時間約 17 分および 32 分の 2 つのピーク面積が増加していた。一方で、それらのピークは、未発酵艾葉抽出物からの同画分から、ほとんど検出されなかった (Fig. 13a, 13b)。したがって、これら 2 つのピークに由来する化合物が発酵により生成し、その結果として抗炎症活性が増強したものと考えられた。

加えて、SN35N 株および LP28 株で発酵させた艾葉抽出物からも同様の抽出操作を行い、90% (v/v) メタノール画分に対して成分解析を行った (Fig. 13c, 13d)。その結果、SN35N 株では、SN13T 株のものと同様に約 17 分および 32 分に 2 つの該当するピークが見られたが、それらは明らかに SN13T 株で確認されたピークよりも小さいことが分かった。一方で、LP28 株では、これら 2 つのピークは確認できなかった。これらの結果は、活性試験の結果と関連しており、活性の増強はこの 2 つのピークに由来する化合物である可能性が強く示唆された。

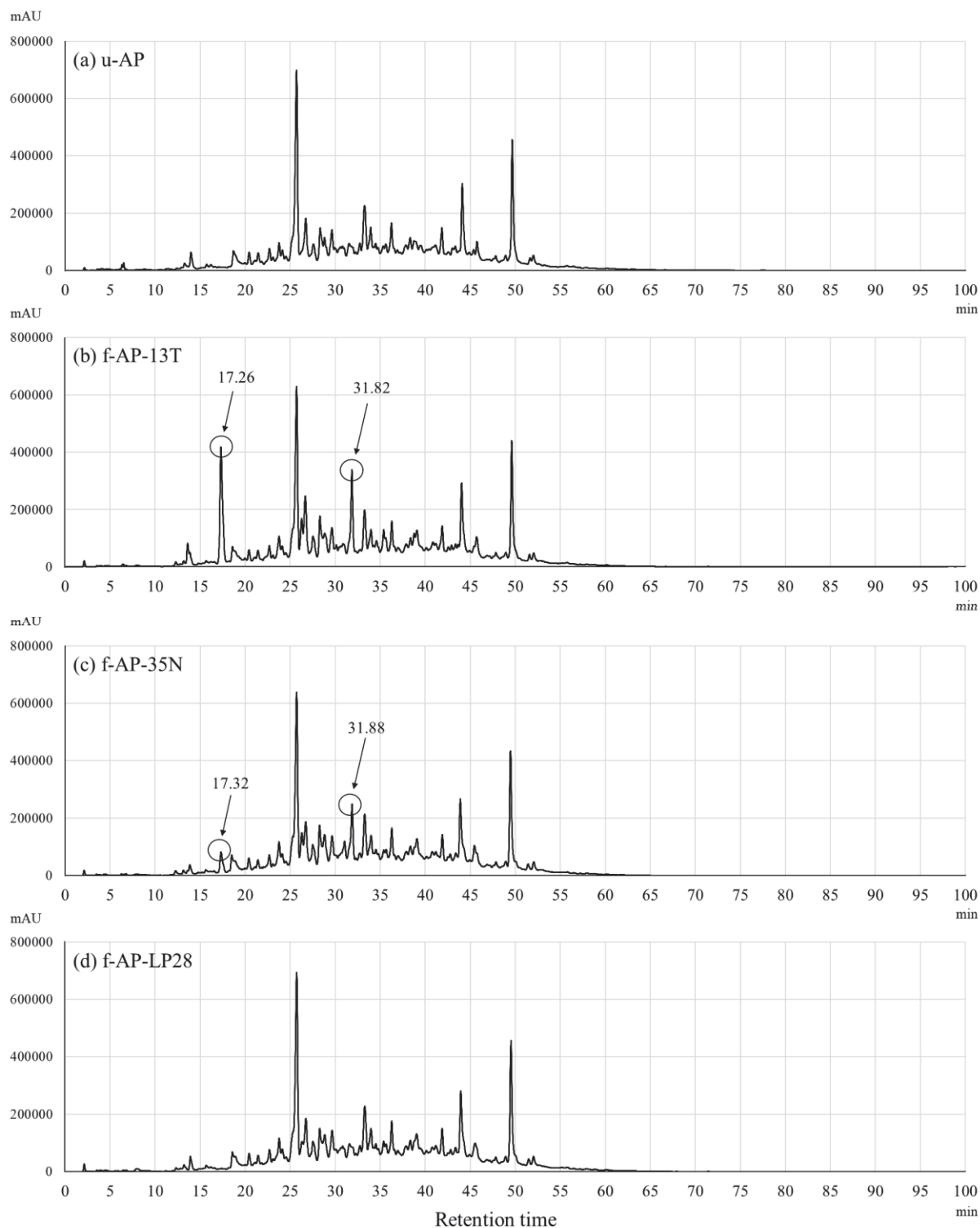


Fig. 13. Constituent analysis in 90% (v/v) MeOH extracts from the u-AP (a), f-AP-13T (b), f-AP-35N (c), f-AP-LP28 (d).

u-AP, 90% (v/v) MeOH extract from AP extract without fermentation; f-AP-13T, 90% (v/v) MeOH extract from AP extract fermented with the SN13T strain; f-AP-35N, 90% (v/v) MeOH extract from AP extract fermented with the SN35N strain; f-AP-LP28, 90% (v/v) MeOH extract from AP extract fermented with the LP28 strain.

第三節 発酵艾葉抽出物から活性物質の分離精製

発酵艾葉抽出物の 90% (v/v) メタノール画分に検出された 2 つの特異的なピーク (保持時間約 17 分, 32 分) に由来する化合物を同定すべく, さらなる精製を行った。SN13T 株で発酵させた 3,300 mL の艾葉抽出物から得られた 90% (v/v) メタノール画分約 2.1 g を用いて, シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い, 7 つのフラクション (f1-f7) を得た。これら 7 つの各画分の溶出物を用いて抗炎症活性を測定した結果, f2 画分にのみ顕著な生物活性が確認された (Fig. 14a)。

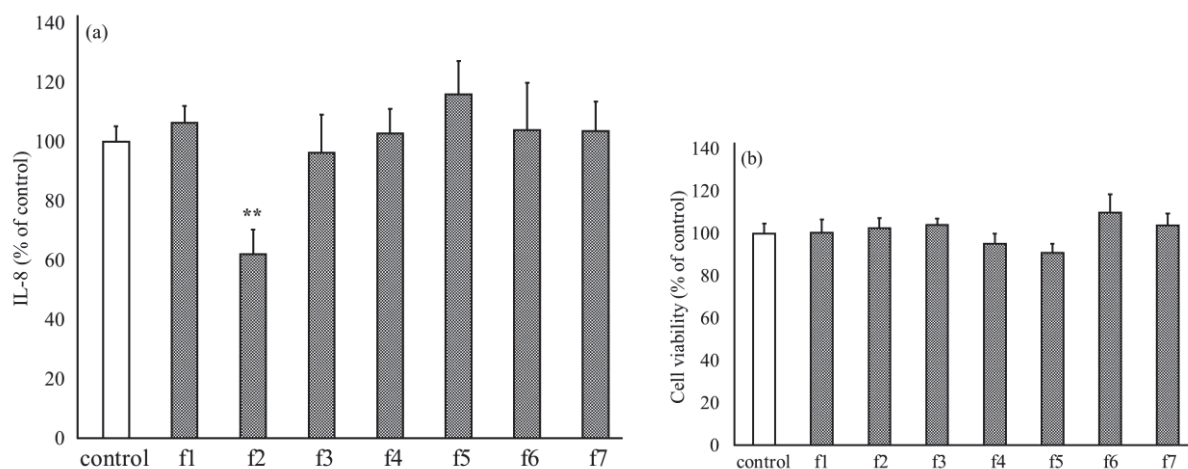


Fig. 14. The inhibitory effect of fractions after silica gel column chromatography on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The seven fractions were diluted and added to the HuH-7 cell culture at 6.25 $\mu\text{g/mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs control.

次に, f2 画分を用いて ODS カラムクロマトグラフィーにて分離・精製を行い, 全部で 15 の画分を得た (F1-1-F8)。各画分の溶出物を抗炎症アッセイに供した結果, 3 つの画分 (F1-1, F1-2, F2-2) において活性が認められた (Fig. 15a)。また, F5-1 以降のフラクションは, 収量が低かったため, 活性試験は実施しなかった。

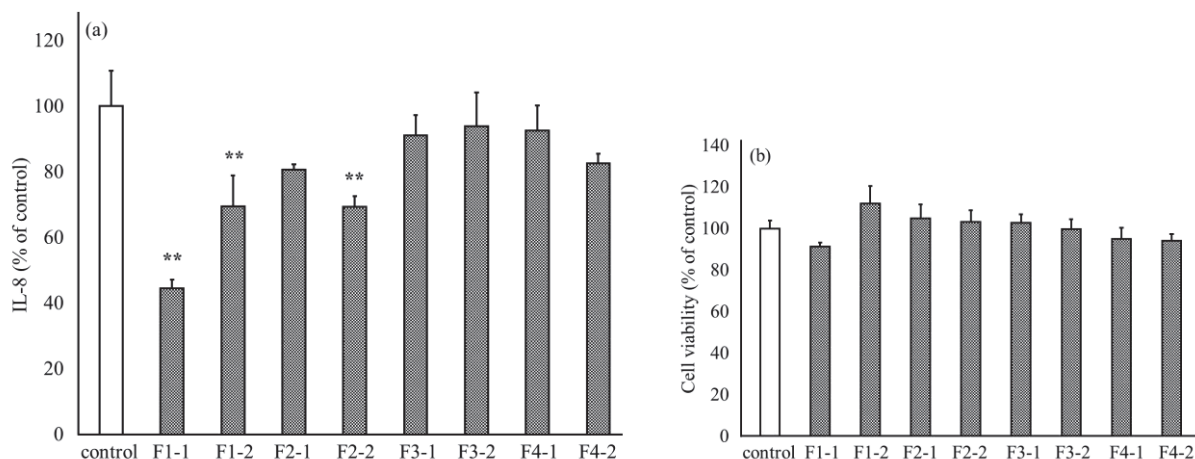


Fig. 15. The inhibitory effect of fractions after ODS column chromatography on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The eight fractions were diluted and added to the HuH-7 cell culture at 6.25 $\mu\text{g/mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs control.

次に、強い活性の認められた F1-1 画分 (83.7 mg) において、HPLC による分離・精製を行い、5 つの画分 (P1-P5) を得た。5 つの画分の溶出物の抗炎症活性を同様の方法で確認したところ、P1 および P4 において有意な活性が確認された (Fig. 16a)。

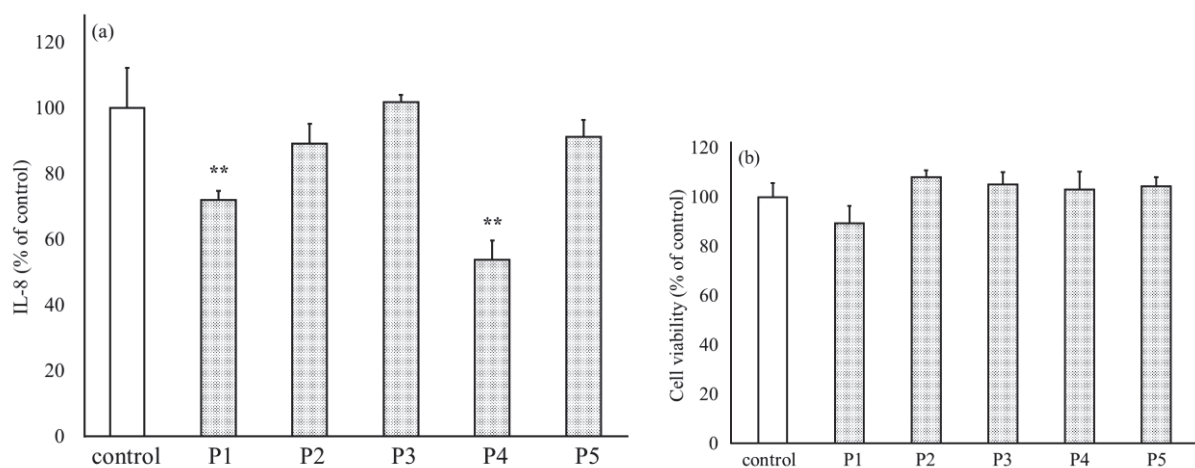


Fig. 16. The inhibitory effect of fractions after HPLC on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The five fractions were diluted and added to the HuH-7 cell culture at 6.25 $\mu\text{g/mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs control.

続いて、F1-2 フラクシオン (155 mg) に対しても同様に HPLC による分離・精製を行い、6つのフラクシオン (S1-S6) を得た。同様に抗炎症活性試験を行った結果、S1 および S6 において、有意な活性が確認された (Fig. 17a)。

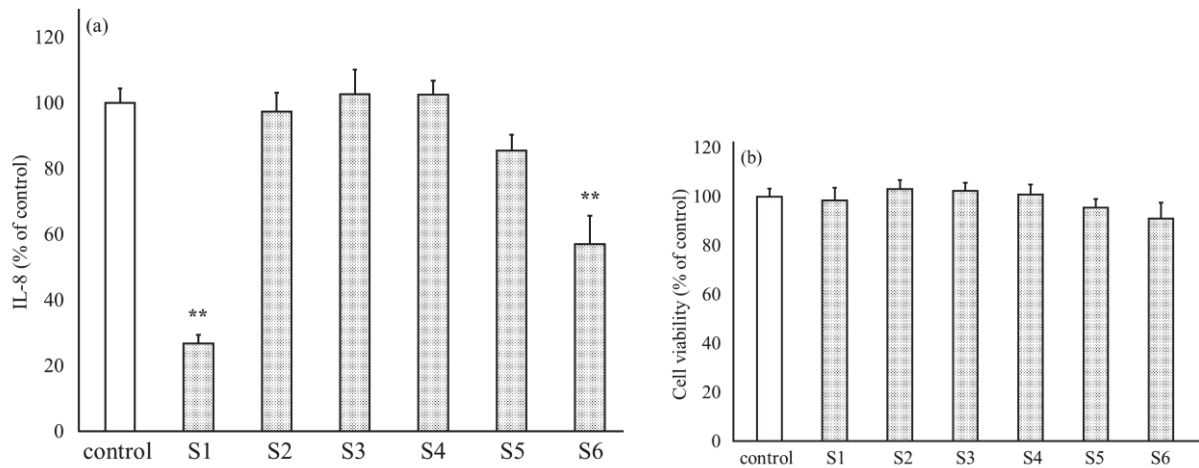


Fig. 17. The inhibitory effect of fractions after HPLC on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The six fractions were diluted and added to the HuH-7 cell culture at 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean \pm standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs control.

90% (v/v) メタノール画分からの、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー、そして HPLC による各精製段階におけるそれぞれの収量を表記した (Fig. 18)。

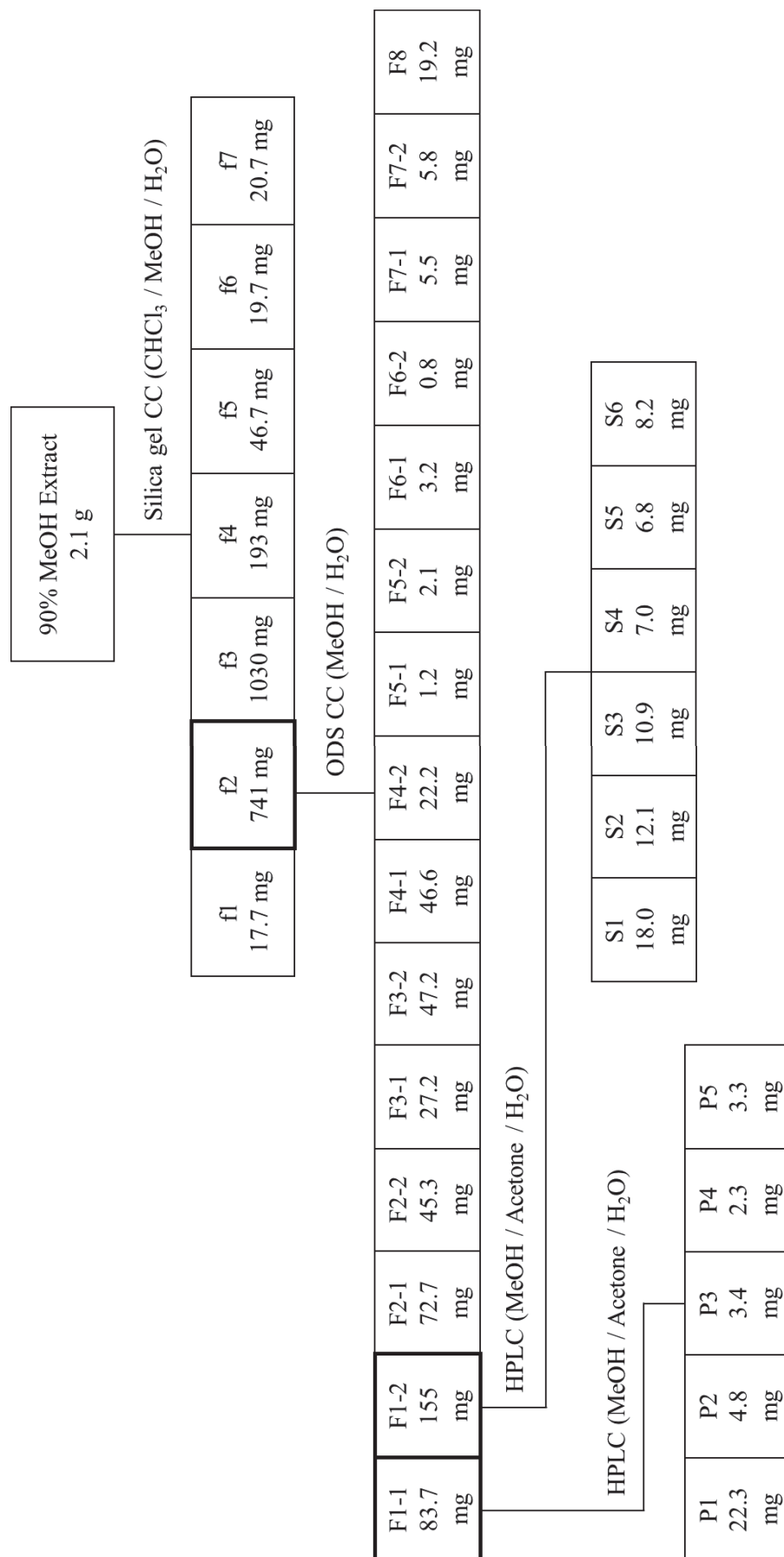
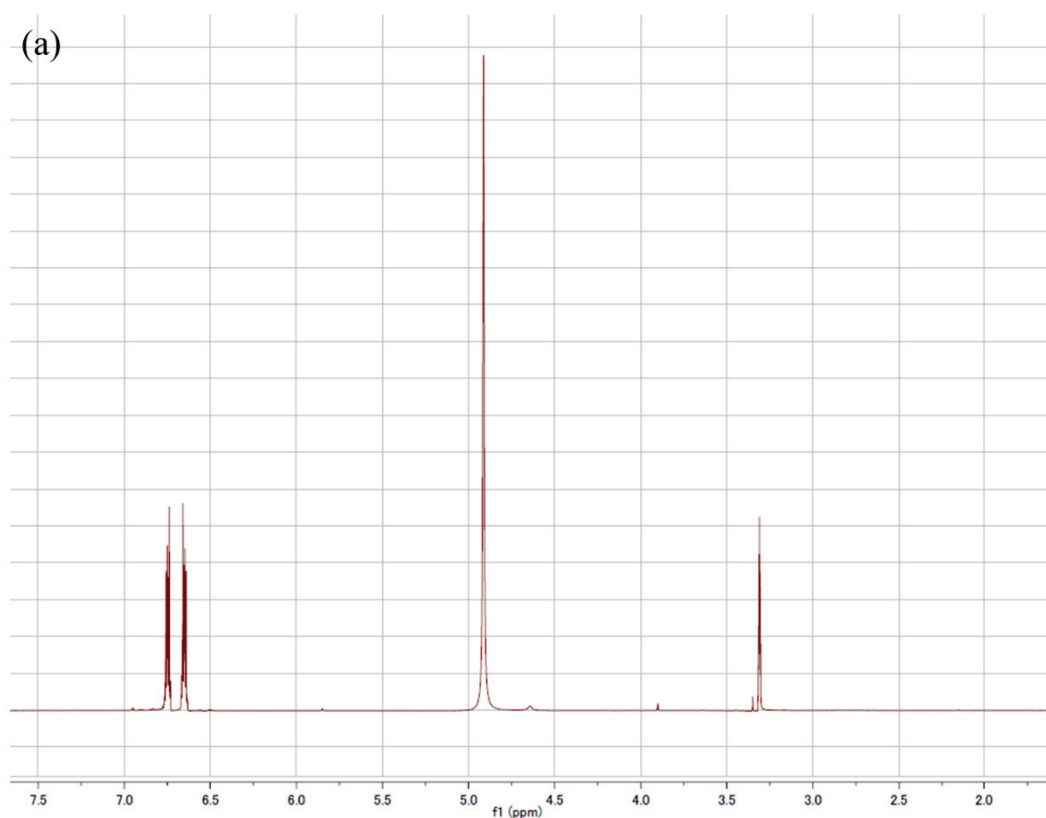


Fig. 18. Yield at each purification stage.

第四節 活性物質の構造決定

有意な抗炎症活性を示した4つの画分のうち、P1およびS1の構造解析を試みた。P1に含まれる化合物のMSスペクトルからは、 $C_6H_6O_2$ [M] の分子式が示唆された (m/z 110.0)。一方、S1では、 $C_{15}H_{18}O_4Na$ [M + Na] の分子式が示唆された (m/z 285.11)。

次に、両画分に含まれる化合物のNMRスペクトルを測定し、文献値 [35, 36] と比較した。それぞれのNMRスペクトル (Fig. 19, 21) と化学シフトの帰属結果を Fig. 20, 22 に示す。その結果、P1に含まれている化合物は catechol であり、S1に含まれている化合物は、secotanapartholide C であると同定された。Catechol はフェノール化合物であり、他方、secotanapartholide C は炭素 15 で構成され、ラクトン骨格を有することから SQL 誘導体に属する化合物である。残りの画分のうち、P4については、NMRスペクトルの結果から、S1と同じ secotanapartholide C であることが確認できた。また S6については、NMRスペクトルの結果から、混合物であることが確認され、この段階においては構造決定には至らなかった。



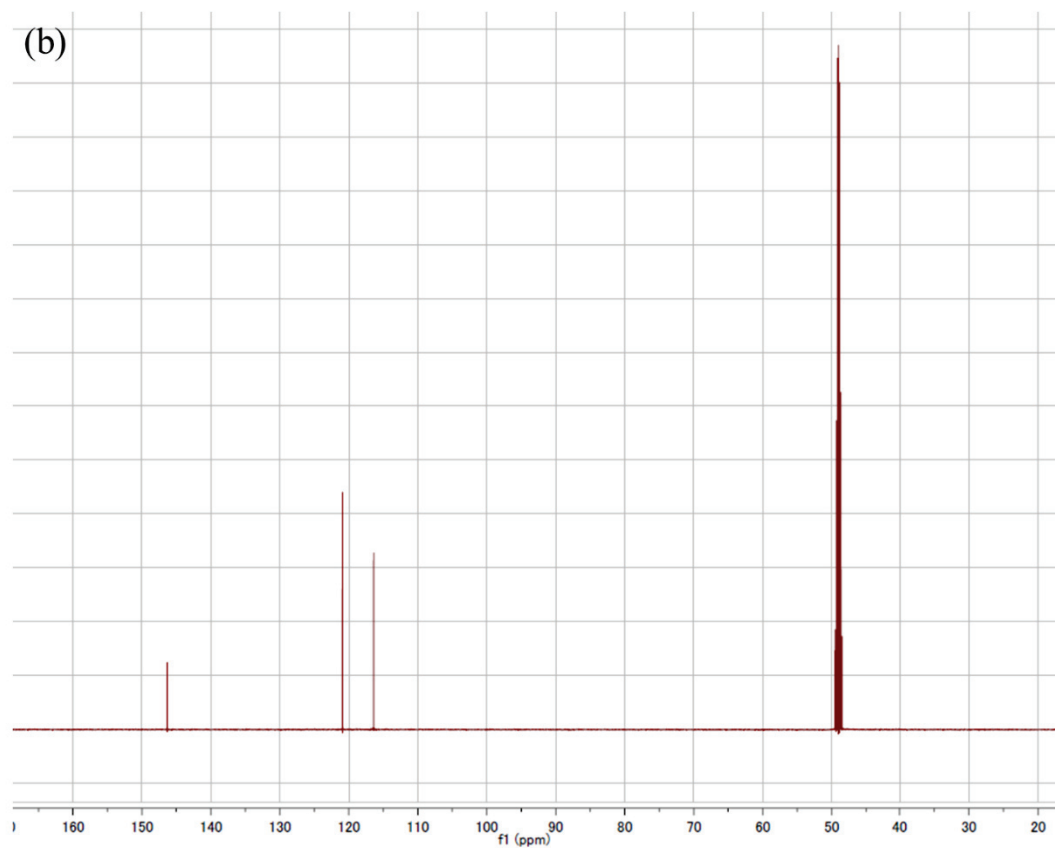
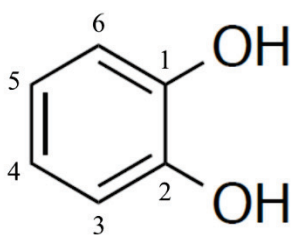
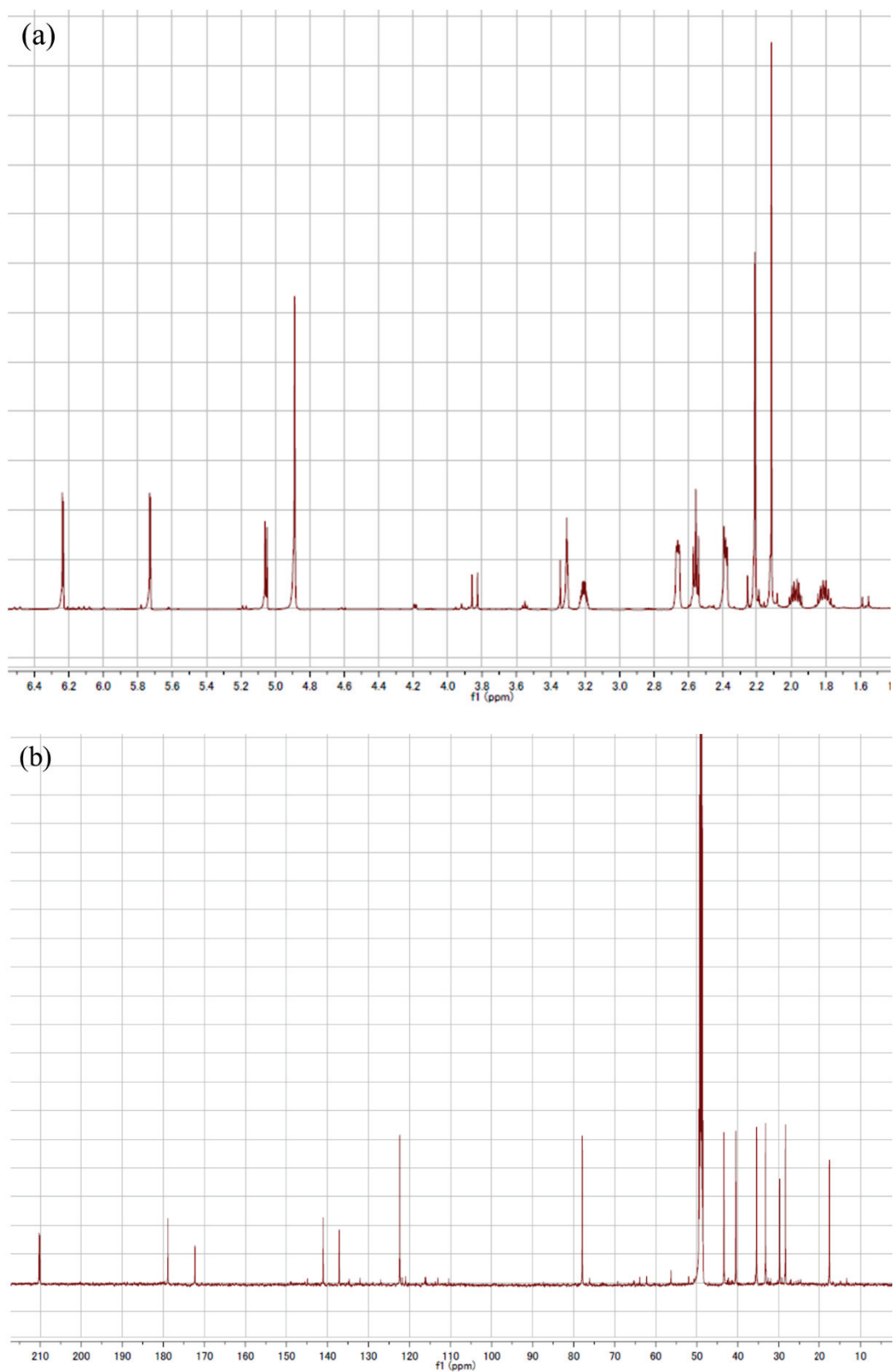


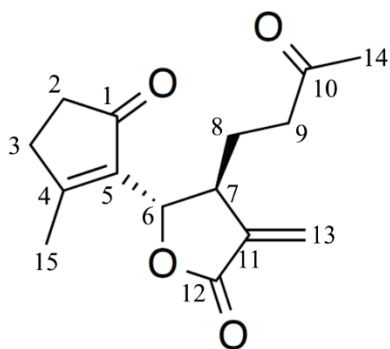
Fig. 19. ^1H NMR spectra (a) and ^{13}C NMR spectra (b) of catechol.



Position	^1H (J in Hz)	^{13}C
1, 2	----	146.32
3, 6	6.65 (m, 2 H)	116.40
4, 5	6.75 (m, 2 H)	120.92

Fig. 20. Chemical structure and ^1H and ^{13}C NMR data (500 and 125 MHz, Methanol- d_4) for catechol.





Position	^1H (J in Hz)	^{13}C
1	----	210.05
2	2.39 (m, 2 H)	35.43
3	2.67 (m, 2 H)	33.27
4	----	178.89
5	----	137.11
6	5.06 (d, $J = 5.6$ Hz, 1 H)	77.89
7	3.21 (m, 1 H)	43.39
8	1.82 (m, 1 H)	28.41
	1.98 (m, 1 H)	
9	2.56 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H)	40.51
10	----	210.27
11	----	141.03
12	----	172.28
13	5.73 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H)	122.39
	6.24 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H)	
14	2.12 (s, 3 H)	29.82
15	2.21 (s, 3 H)	17.49

Fig. 22. Chemical structure and ^1H and ^{13}C NMR data (500 and 125 MHz, Methanol- d_4) for seco-tanapartholide C.

第五節 各画分の HPLC 分析と活性評価

Catechol および seco-tanaparthalide C が、発酵艾葉抽出物の 90% (v/v) メタノール画分で特異的に確認されたピーク (保持時間約 17 分, 32 分) を持つ化合物と一致するか否か, HPLC により確認を行った。その結果, 精製した catechol および seco-tanaparthalide C の保持時間は, それぞれ約 17 分, 32 分であることを確認した (Fig. 23a, 24a)。さらに, これら 2 つの化合物の抗炎症活性を評価した結果, どちらも濃度依存的な抗炎症活性を示した (Fig. 26, 27)。Seco-tanaparthalide C に見られる不純物のピークは, P3 画分中で見られるピークと一致しており, また, この画分には活性は認められなかった (Fig. 16)。さらに, seco-tanaparthalide C を含む画分をさらに HPLC にて精製することで, 最終的に単一物質として取得できた (Fig. 25)。

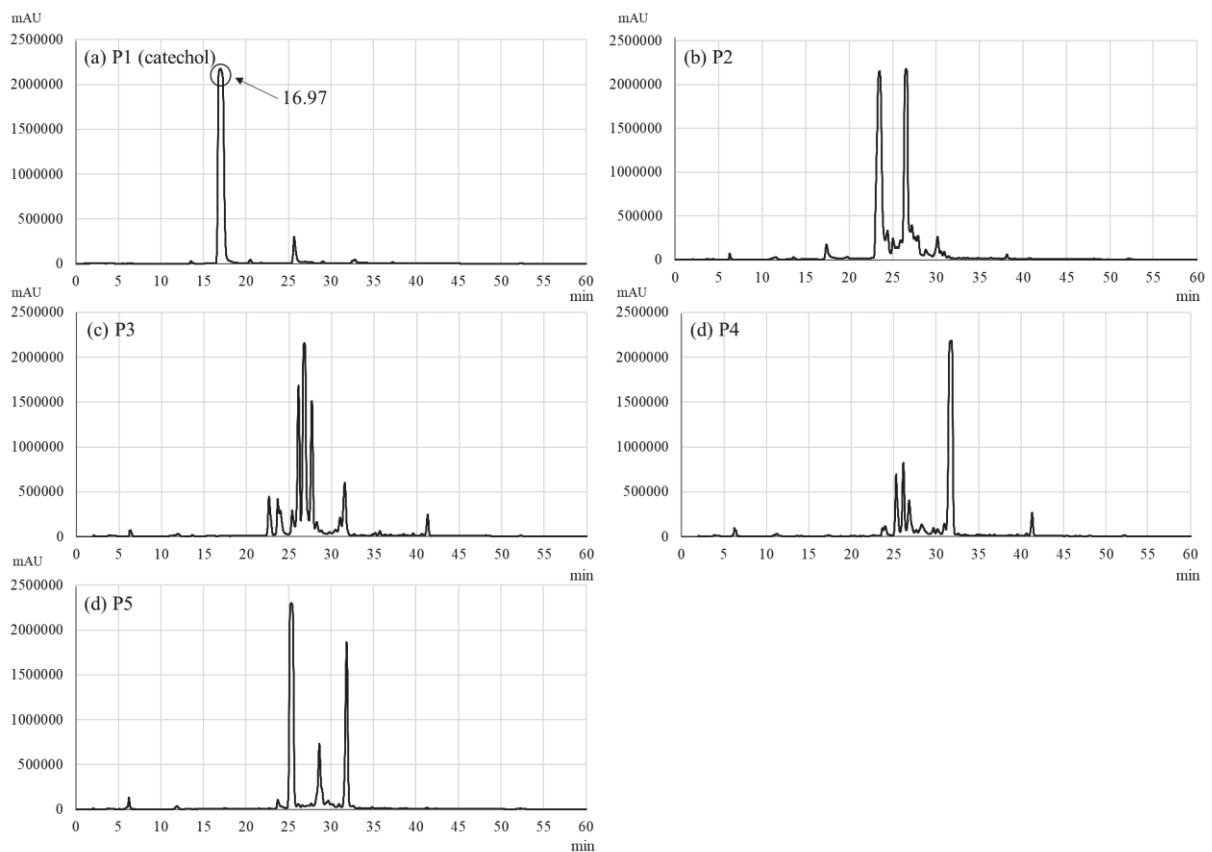


Fig. 23. HPLC chromatograms of the fractions from F1-1.

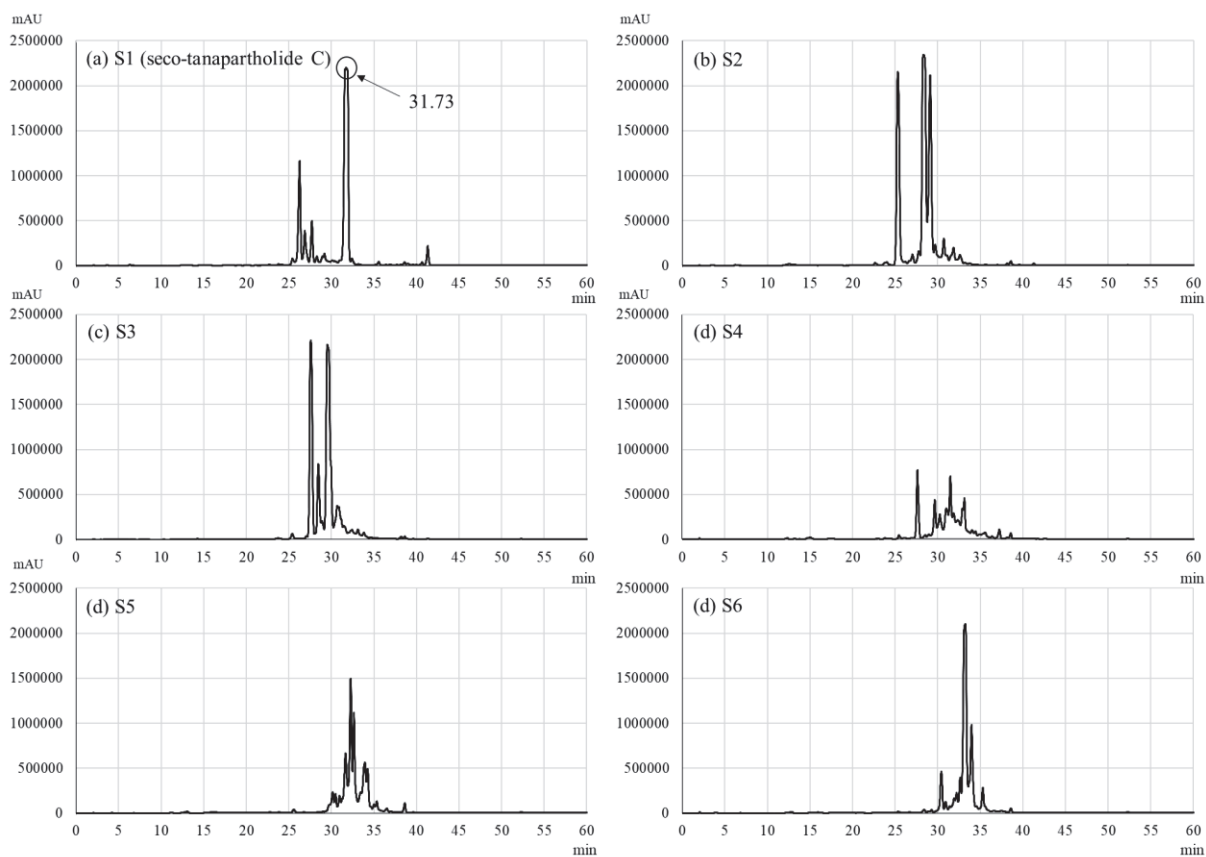


Fig. 24. HPLC chromatograms of the fractions from F1-2.

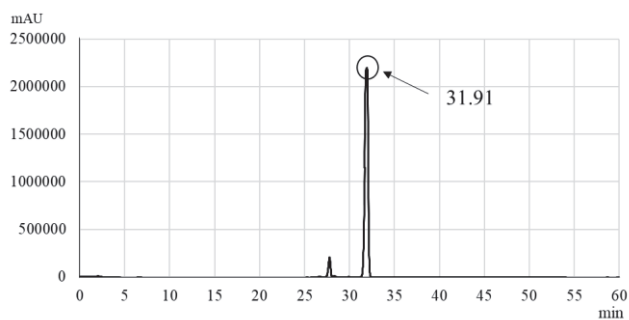


Fig. 25. HPLC chromatograms of the re-purified seco-tanapartholide C.

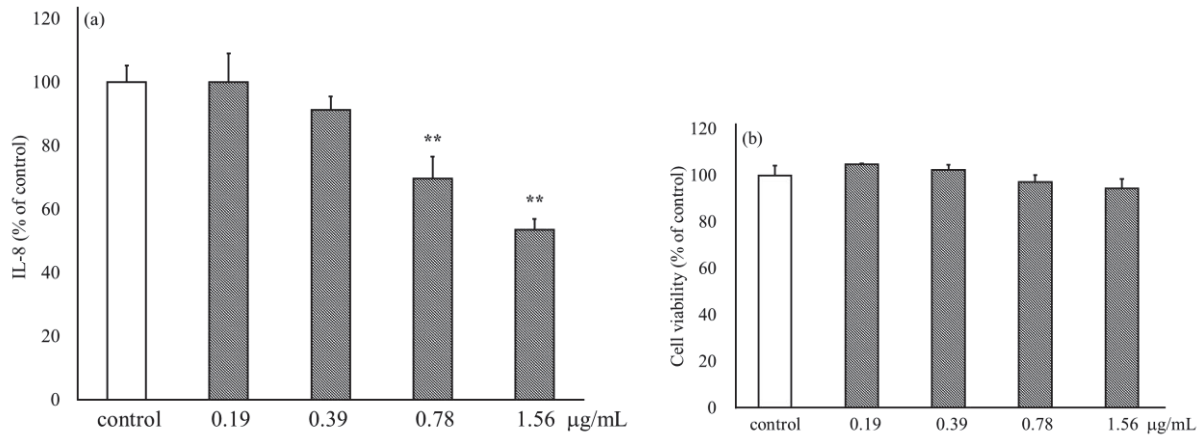


Fig. 26. The inhibitory effect of catechol on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The catechol was diluted and added to the HuH-7 cell culture between 0.19–1.56 µg/mL. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean ± standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs control.

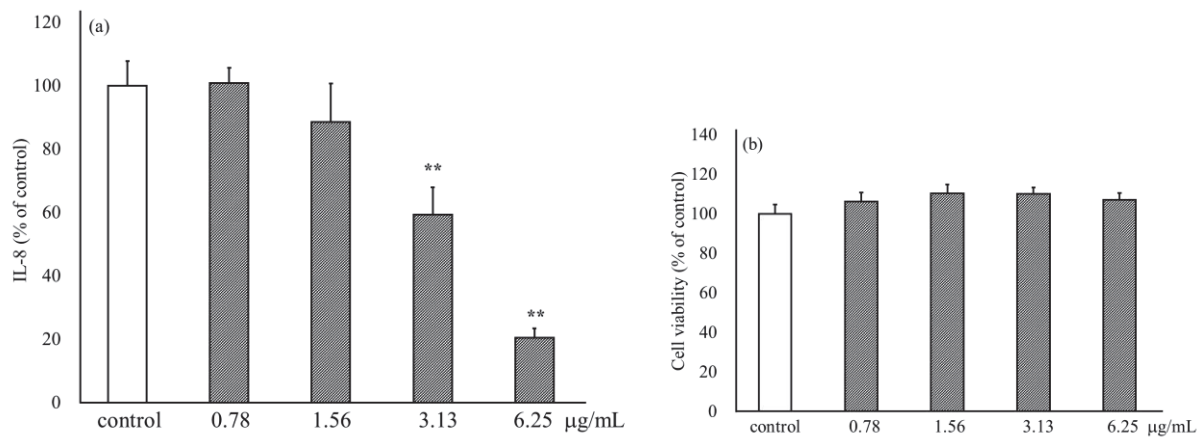


Fig. 27. The inhibitory effect of seco-tanaparholide C on the release of IL-8 from HuH-7 cells (a) and cell viability assay after treatment (b).

The seco-tanaparholide C was diluted and added to the HuH-7 cell culture between 0.78–6.25 µg/mL. The culture supernatant was obtained after 24 h cultivation to measure the amounts of IL-8 by the ELISA method. Data are expressed as the mean ± standard deviation, (n=3). **P < 0.01 vs control.

第六節 まとめと考察

第二章では、*Lb. plantarum* SN13T で発酵した艾葉抽出物の抗炎症活性が増加した要因を明らかにするために、活性物質を抽出するための有効な有機溶媒を検討した。

活性の確認された 90% (v/v) メタノール画分における成分を HPLC にて分析した結果、SN13T 株で発酵させた艾葉抽出物の 90% (v/v) メタノール画分は、明らかに未発酵艾葉抽出物の同画分よりピーク数が増加しており、発酵により新たな物質が生成されていることが示唆された (Fig. 13a, 13b)。

次に、発酵艾葉抽出物の 90% (v/v) メタノール画分からシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー、および ODS を担体とした HPLC を実施し、活性物質の精製を行った。最終的に、主要な 2 つの活性化合物は、catechol と seco-tanaparholide C と同定され (Fig. 20, 22)、これらの化合物は、発酵により新たに生成した化合物であること (Fig. 23, 24)、並びに、それぞれの化合物は、濃度依存的な抗炎症活性を示すことが確認された (Fig. 26, 27)。ちなみに、これらの化合物は 185 g の乾燥艾葉粉末からそれぞれ 22.3 mg および 18 mg の収量で得ることができた。

文献的には、seco-tanaparholide C が属する guaianolide 型 SQL が抗がん、抗炎症、抗酸化、抗菌効果を含む広範な薬理活性を持っていることが示されている [37]。抗マラリア薬として有名な artemisinin も SQL に分類される化合物であり、それらの誘導体の幾つかは、癌の治療薬として臨床試験に使用されている [38]。このように SQL は、医薬品のリード化合物につながる重要な薬理活性を有する。

加えて、guaianolide は、NF- κ B シグナル伝達経路の阻害により抗炎症効果を示すとの報告がある [37, 39]。NF- κ B は、炎症時に過剰に活性化され、炎症性サイトカインなどの種々の炎症関連物質の産生を制御する転写因子である [40]。Joshi-Barve 等により、*in vitro* NASH モデル細胞における IL-8 の発現は、NF- κ B によって媒介されることが報告されている [41]。SQL の薬理活性は、その構造中の α , β -不飽和カルボニル基による標的タンパク質中にあるチオール基のアルキル化に起因すると報告されている [42]。また、SQL によるアルキル化は、NF- κ B サブユニットの一つである p65 の DNA 結合領域 (Cystein 38) であるとの報告がなされており、SQL は、NF- κ B の直接的な抑制を介して抗炎症作用を発揮すると考えられている [43, 44]。

Seco-tanaparholide C はその構造中に 2 つの α , β -不飽和カルボニル基を持っており、それらが NF- κ B の阻害に起因する IL-8 の産生を抑制していることが示唆された (Fig. 28)。NF- κ B の恒常的な活性化は、慢性炎症や癌の特徴であるとされ [40]、そのシグナル伝達経路の抑制は、疾患の治療に有望であると考えられる。市販されている NF- κ B 阻害薬 (シクロスポリン、タクロリムスなどの免疫抑制剤やアスピリン、サリチル酸などの抗炎症剤) の多くは、NF- κ B を不活化している I κ B に作用するものであるのに対し [45]、SQL は NF- κ B に直接作用するという、既存の薬剤とは異なる新たな作用機序を有する点においても、非常に興味深い化合物群である。

一方、カテコールなどのフェノール化合物は、幾つかの慢性炎症性疾患を予防することが

できる、効果的な抗酸化物質である [46]。フェノール化合物からは、多くの薬理活性が見出されており、抗炎症作用もその一つである。カテコールは、直接的に NO ラジカルを除去し、さらには NF- κ B の抑制を介した iNOS の発現低下を引き起こすとの報告がなされており [47, 48], IL-8 の抑制作用は、NF- κ B の抑制に起因する可能性が示唆された。

フェノール類と SQL 類は、キク科の植物に豊富に含まれている [49]。特にフェノール類は、フェノール環 1 つで構成されるフェノール酸誘導体から、フラボノイドなどの化合物にも及び、既に数千種類を超える化合物が発見されている [50]。一方で、植物二次代謝物として認識されている SQL 類に関する報告は、5,000 以上ある [42]。これらは、多くの植物二次代謝物と同様に、配糖体として存在していることが知られており、SN13T 株により発酵させた艾葉抽出液に見出された catechol および seco-tanaparholide C は、その配糖体型から糖が加水分解された結果生じたものと推測される。しかしながら、seco-tanaparholide C には、糖が結合するヒドロキシル基を有していないため、配糖体加水分解後に脱ヒドロキシル化反応を受ける必要がある。ちなみに、脱ヒドロキシル化反応も腸内細菌が介在する反応の一つであり [10], SN13T 株による発酵過程において進行した可能性を考えている。

今回、SN13T 株による発酵で艾葉抽出物に生じた 2 つの化合物は、SN35N 株で発酵した艾葉抽出物ではわずかにしかみられず、さらに、LP28 株により発酵した場合にはほとんど検出できなかった (Fig. 13c, 13d)。Sennoside の加水分解をすることが可能な β -グルコシダーゼは、*Bifidobacterium* 属から見つかっており、その他の腸内細菌の β -グルコシダーゼでは加水分解できないことが知られている [6-9]。すなわち、LP28 株が保有する β -グルコシダーゼで、それらの前駆体を加水分解することができなかったため、catechol および seco-tanaparholide C が生成されなかったと推測している。

多様な β -グルコシダーゼを有する株は、さまざまな種類の植物二次代謝物の配糖体を加水分解する機能を有する可能性が高いと考えられ、したがって SN13T 株は生薬の発酵に適していることを、本研究を通じて示した。しかしながら、一般的に β -グルコシダーゼの基質特異性は広く [5]、どの β -グルコシダーゼが配糖体加水分解に関与したかを明らかにするためには、さらなる調査が必要である。

また、seco-tanaparholide C は以前 *Artemisia anomala* から単離されているとの報告があるが、それは 300 kg の原料からわずか 10 mg が得られたに過ぎず、極めて低収率であった [36]。加えて、別の *Artemisia austro-yunnanensis* (1.1-18.2 mg/3.9 kg) や *Artemisia princeps var. orientalis* (0.75-1.25 mg/5 kg) からの SQL の収率も、同様に低いことが報告されている [37, 51]。本研究において、185 g の艾葉末から 18 mg の seco-tanaparholide C を取得できたことは、これまでの報告に比べてはるかに高収率であった。

以上のことより、SN13T 株による生薬艾葉の発酵は、配糖体の加水分解反応を通じて前駆体から活性物質へと変換させることで、活性物質本体の量を増加させるに至ったと結論付けられる。

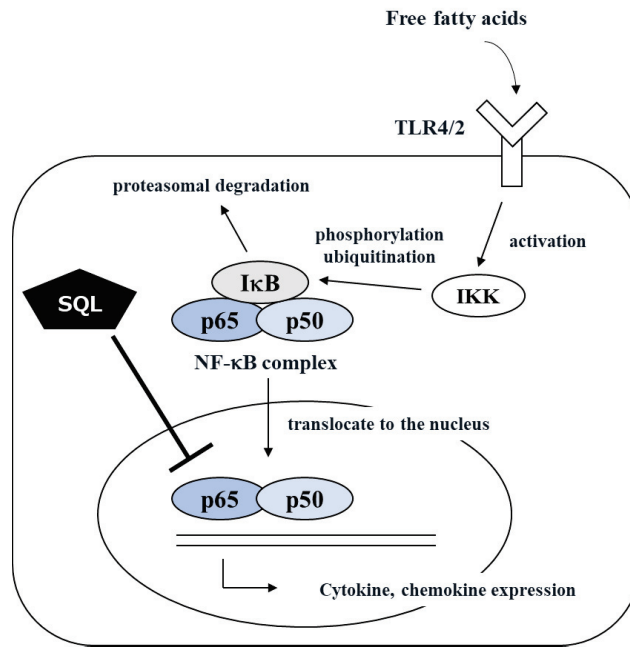


Fig. 28. The Mechanism of anti-inflammatory effect of SQL in NASH model.

[総括]

生薬などの薬用植物は、古くから疾病の予防や治療に用いられてきたが、科学技術の発達した今日においては、医薬品のリード化合物の供給源とみなされている。すなわち、はるか昔から今日まで、生薬の価値は揺るがないものである。しかしながら、過去数十年、製薬業界は主に創薬源として合成化合物のライブラリーに注目していた。それらは、製造と供給が比較的容易であり、確立されたハイスループットスクリーニングのプラットフォームとの間に良好な互換性を示すため、高い効率性を有することが、普及の理由として挙げられる。しかし、同時に、市場に出回る新薬の数は年々減少傾向にあり、最近では再び天然物からの創薬リード化合物に対する科学的関心が高まっていると言える。

漢方医療に使用される漢方薬 (生薬) は、太古の昔から経験的な使用によって、治療薬としての有効性が保証されてきたが、生薬に含まれる生物活性物質の本体とその薬理作用は、現在においてさえも依然として不明なものが多い。一方、天然物から単離される物質の *in vitro* での活性が、*in vivo* で得られる活性とリンクしないことも、経験的に知られるようになった。また、昨今の腸内細菌叢解析やメタボローム解析技術の発展した成果として、生薬に含まれる生物活性物質が、腸内細菌による変換を受けて活性化されるという知見が集まってきた。すなわち、植物由来の生物活性物質は、いわゆるプロドラッグであると捉えることができる。

植物の二次代謝物は、配糖体として植物細胞内に保存されている。配糖体は、糖が切断された「アグリコン」よりも疎水性が低いために、生物学的利用率が低く、結果として、配糖体そのものでは生物学的な活性は低くなる。薬用植物からの水溶性抽出物には、配糖体として、活性がマスクされた状態の化合物が大量に含まれており、真の活性体であるアグリコンの量は、ごくわずかである。私たちの祖先は、それらを腸内細菌によって活性体に変換するプロセスを知ること無しに生薬を用い、その薬効を享受していたのである。

このような背景の下で、腸内細菌で生薬を発酵させることで、生薬中の生物活性物質の量を増加させることができるとの報告がなされるようになった。つまり、 β -グルコシダーゼを持つ細菌による生薬の発酵は、前駆体である配糖体から活性物質本体 (アグリコン) を生成するのに有用な方法であると捉えられるようになった。

本研究を進める前に実施した予備実験では、*Lb. plantarum* SN13T を含む植物乳酸菌が、動物乳酸菌と比較して、生薬の水抽出物で活発に増殖することを見出した。この結果は、生薬の発酵に適する乳酸菌と適さない乳酸菌が存在するという明確な証拠となった。

本研究で使用した 3 株の植物乳酸菌は、全て艾葉抽出物中で増殖したが、LP28 株においては、その発酵液中に catechol および seco-tanaparthalide C の 2 つの活性物質の存在が確認できなかった。この結果と、sennoside で知られていた知見とを合わせて考えると、植物二次代謝物の配糖体を認識できる β -グルコシダーゼが、LP28 株には存在しないとの可能性が示唆された。2 つの活性物質を生成させる能力は、 β -グルコシダーゼ遺伝子と相同性を示す ORF の数と一致しており、より多くの種類の β -グルコシダーゼを持つ SN13T 株は、生薬の発酵微生物とし

て適していることが示唆された。

腸内細菌は、配糖体の加水分解だけでなく、脱ヒドロキシル化や脱メチル化、還元反応、C環の開裂などの反応に関与していることが報告されている。本研究で発酵艾葉抽出物より精製された *seco-tanaparholide C* は、配糖体加水分解反応を受けた後に、さらに脱ヒドロキシル化反応を受けて生成されていることが考えられた。大豆イソフラボンにおいては、配糖体加水分解後にさらに変換を受け、高活性の *equol* が生成することが知られている。イソフラボンアグリコンからの *equol* 生成は、脱ヒドロキシル化や還元反応によると推測されるが、 β -グルコシダーゼによる加水分解以後の反応は、消化管吸収後の活性に影響を与える可能性が考えられる。ヒドロキシル化や酸化反応は、肝臓での第一相薬物代謝反応であり、腸内細菌によるその逆向きの反応は、化合物の生体内での寿命を長く保つ可能性がある。

本研究成果を受け、今後は、得られた *seco-tanaparholide C* が *in vivo* で効果を示すか否かを検証する予定である。さらなる実験によって有効性が証明されれば、生薬の微生物発酵は、新たな創薬リード化合物を生成するための重要な技術のひとつであることを示すものとなると考える。このように、本研究成果は、植物乳酸菌と生薬とを組み合わせることで、資源が枯渇しつつある現代において、物質生産系を構築する新たな方法論の一つとなる研究であると考えられる。また、これらの生合成、代謝反応に関わる遺伝子群が明らかになれば、それらの遺伝子を利用、改変することで異種発現系や無細胞系をはじめとするさまざまな合成プラットフォームの確立が可能となる。

臨床現場においては、漢方薬（生薬）を処方する医師やそれを検討したいと考える医師が増えていることから、治療薬としての生薬の使用は今後も増加すると考えられる。近年では、腸内細菌叢と漢方薬の相互作用が明らかになりつつある中で、抗生物質の乱用、ストレス、食事の偏り、老化などが原因で腸内細菌叢が変動することがわかってきた。すなわち、患者の腸内細菌叢が上記の要因により変動すると、漢方薬の効き目もまた変動する可能性がある。言い換えれば、臨床現場で遭遇する「漢方薬が効かない」という現象は、腸内細菌叢の変動が要因となっている可能性がある。今やヒトの寿命は確実に延びており、さらに多様化したライフスタイルや慢性疾患の罹患者が増えてきたことから、漢方薬の使用方法を見直す時期に来ているのかも知れない。本研究を含めたこれらの一連の研究は、歴史的に多くの人の治療に貢献してきた生薬の薬効に関わる「責任化合物」の同定につながるとともに、また、腸内細菌叢の変動を伴う患者に処方する生薬の種類や使用方法においても、新たな知見が得られる可能性がある。

[実験の部]

1. 使用菌株

Lactobacillus plantarum SN13T

Lactobacillus plantarum SN35N

Pediococcus pentosaceus LP28

2. 使用細胞

ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 細胞は, JCRB Cell Bank より購入した。

3. 使用生薬

艾葉末, 甘草, 桔梗, 桂皮, 山梔子, 蘇葉, 大棗, 陳皮, 人參, 薄荷は, 小島漢方 (大阪, 日本) より購入した。

4. 使用試薬

IL-8 測定用 ELISA キットは PEPLOTECH Co., Ltd. (Rocky Hill, USA) より購入した。
パルミチン酸, オレイン酸, PBS, 0.5%トリプシン-5.3 mmol EDTA 溶液, Cell Counting Kit-8 (株式会社 同仁化学研究所), トリグリセライド E-テストワコー, ELISA 用 TMB 溶液は和光純薬株式会社 (大阪, 日本) より購入した。

5. 使用培地

(1) 乳酸菌

MRS 培地 (Becton, Dickinson and Company) を蒸留水に規定量溶解後, 118°C, 15 分, 高圧蒸気滅菌処理した。

(2) 細胞

10% FBS (biosera 社), 100 IU/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシン (富士フィルム 和光純薬株式会社) を含む D-MEM (low glucose) (富士フィルム 和光純薬株式会社) を用いた。

6. 第一章の実験

(1) HuH-7 細胞の培養

HuH-7 細胞の培養は 10% FBS, 100 IU/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシンを含む D-MEM 培地中で, 5% CO₂ 下, 95%空気の気相下, 37°Cで行った。細胞を 100 mm ディッシュに播種した後, 3 日間培養し, 70%程度のコンフルエントになったところで, 0.05%トリプシン-0.53 mmol/L EDTA・4Na (富士フィルム 和光純薬株式会社) 溶液で剥離することに

より継代を行った。継代時に一部の細胞を実験に供した。

(2) NASH モデル細胞の作製と薬剤処置

パルミチン酸およびオレイン酸の 0.1 M ストック溶液を DMSO に溶解することによって調製した。HuH-7 細胞を 10×10^4 cells/500 μ L/24 well plate の密度で播種し、24 時間培養した。その後モル比 1 : 2 のパルミチン酸 : オレイン酸混合溶液 (終濃度 : 600 μ M) および生薬抽出物を含む基本培養培地で交換し、24 時間曝露した。

(3) 乳酸菌の菌懸濁液の作成

MRS 培地に乳酸菌を植菌し、28°C で一晩静置培養を行った。その後、8,000 rpm, 3 min で菌体を回収した。0.85% NaCl 溶液にて菌体を懸濁させ、生薬の発酵に用いた。

(4) 各発酵生薬抽出物の作製

各生薬粉末 (5 g) を 100 mL 蒸留水に懸濁し、30 分間煮沸した。その後、室温に冷却し、懸濁液を 20°C で 15 分間 3,000 \times g で遠心した。得られた上清をペーパーフィルター (ADVANTEC 2) でろ過し、pH 6.0 に調整した。溶液を 100°C、10 分間で殺菌処理した後、室温まで冷却した。滅菌済みの 0.85% (w/v) NaCl 溶液または滅菌済み 0.85% (w/v) NaCl 溶液に懸濁した SN13T 株の菌体を各生薬の水抽出液に 1% (v/v) で添加し、溶液を 28°C で 24 時間インキュベートした。その後、3,000 \times g で 30 分間遠心分離して菌体を除去して得られた上清をその後のアッセイに使用した。

(5) Cell Counting Kit-8 による生細胞数の計測

HuH-7 細胞を 10×10^4 cells/500 μ L/24 well plate の密度で播種し、24 時間培養後、脂肪酸および発酵生薬抽出物を含む基本培養培地に交換した。さらに 24 時間後、培養上清を除き、Cell Counting Kit-8 (株式会社 同仁化学研究所) の試薬 WST-8 を含む D-MEM (FBS free) を添加し、1 時間反応させた。その後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

(6) ELISA 法による IL-8 量の測定

HuH-7 細胞を同様に脂肪酸および発酵生薬抽出物による処置を行った。処置 24 時間後に培養上清を回収し、これを ELISA のサンプルとした。サンプルは 10 倍希釈して用いた。Human IL-8 TMB ELISA Development Kit (PEPLOTECH Co., Ltd.) を用い、プロトコル通り行った。

(7) 細胞内トリグリセリド (TG) 量の測定

HuH-7 細胞を同様に脂肪酸および発酵生薬抽出物による処置を行った。処置 24 時間後に培養上清を除き、8%パラホルムアルデヒド 250 μ L 添加し、室温で 30 分置くことで細胞を

プレート底面に固定させた。次に液をアスピレートし、PBS で 2 回洗浄させた後で、トリグリセライド E-テストワコー (富士フィルム 和光純薬株式会社) を 250 μ L 添加し、37°C で 30 分反応させた。その後、マイクロプレートリーダーで 600 nm の吸光度を測定した。

(8) 系統樹の作成

SN13T 株 (13T_0927396, 13T_1406781, 13T_1936231, 13T_2019236, 13T_2020787, 13T_2048567, 13T_2214457, 13T_2366659, 13T_2488068, 13T_2717699, 13T_2719156), SN35N 株 (35N_0355982, 35N_1261462, 35N_1759082, 35N_1760634, 35N_1765166, 35N_2174088, 35N_2406478, 35N_2407935) および LP28 株 (LP28_0093716, LP28_0280530, LP28_0516515, LP28_1692859) のゲノム上にコードされた β -グルコシダーゼの予測アミノ酸配列を基に系統樹を作成した。系統樹は、MEGA ソフトウェア ver. 6.0 の ClustalW プログラムを用い、作成した。

7. 第二章の実験

(1) 艾葉の発酵抽出物および未発酵抽出物から活性成分の有機溶媒による抽出

艾葉の発酵抽出物および未発酵抽出物各 24 mL を pH 7.5 に調整したのち、酢酸エチルで 3 回抽出し、酢酸エチル層と水層に分けた。酢酸エチル層は、減圧除去後、90% (v/v) メタノールで懸濁し、n-ヘキサンで 3 回抽出した。一方、水層は n-ブタノールで 3 回抽出した。4 つの画分を 10 mg/mL に濃縮した。各画分から得られた抽出物の重量は以下の通りである。[未発酵艾葉抽出物: n-ヘキサン画分- 9.3 mg, 90% (v/v) メタノール画分- 11.4 mg, n-ブタノール画分- 72.9 mg, 水画分- 352.1 mg], [発酵艾葉抽出物: n-ヘキサン画分- 14.5 mg, 90% (v/v) メタノール画分- 15.2 mg, n-ブタノール画分- 60.9 mg, 水画分- 349.5 mg]。

(2) HPLC を用いた代謝物評価

艾葉発酵抽出物および未発酵抽出物から得た 90% (v/v) メタノール抽出物 (10 mg/mL) は、ODS C18 カラム (Hydrosphere C18, 5 μ m, Φ = 6 mm, L = 250 mm: YMC, 京都, 日本) を備えた HPLC (JASCO システム, JASCO Corporation) を使用して溶出した。カラム温度は 37°C で維持した。水で平衡化し、1.0 mL/min の流速において線形勾配法 (0%/0 min-100%/100 min アセトニトリル) で溶出した。UV 検出は、210 nm に設定した。サンプルの注入量は 10 μ L で行った。

(3) 活性物質精製用の艾葉発酵抽出物の作製

乾燥艾葉 (185 g) を 3,700 mL の蒸留水に懸濁し、30 分間煮沸した。その後、室温に冷却し、懸濁液を 20°C で 15 分間 3,000 \times g で遠心した。得られた上清 (3,300 mL) をペーパーフィルター (ADVANTEC 2) でろ過し、pH 6.0 に調整した。溶液を 100°C、10 分間で殺菌処理した後、室温まで冷却した。滅菌済み 0.85% (w/v) NaCl 溶液に懸濁した SN13T 株の菌体を艾葉の水抽出液に 1% (v/v) で添加し、溶液を 28°C で 24 時間インキュベートした。その後、

3,000×g で 30 分間遠心分離して菌体を除去して上清を得た。

(4) 艾葉発酵抽出物から活性物質の精製

[1] シリカゲルカラムクロマトグラフィー

艾葉発酵抽出物から活性化合物を分離するために、90% (v/v) メタノール抽出物 (2.1 g) をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー、ODS オープンカラムクロマトグラフィー、および HPLC で連続的に分画した。シリカゲル (E. Merck, Darmstadt, Germany) カラムクロマトグラフィーは、以下のようにカラム容量の 3 倍の溶媒でカラムを溶出した：クロロホルム-メタノール-水溶出システム [(100 : 0 : 0), (20 : 1 : 0), (10 : 1 : 0), (5 : 1 : 0), (7 : 3 : 1), (6 : 4 : 1), (0 : 100 : 0)]。得られた各画分の重量は以下のとおりであった。[(100 : 0 : 0) - 17.7 mg, (20 : 1 : 0) - 741 mg, (10 : 1 : 0) - 1030 mg, (5 : 1 : 0) - 193 mg, (7 : 3 : 1) - 46.7 mg, (6 : 4 : 1) - 19.7 mg, (0 : 100 : 0) - 20.7 mg]。活性な画分は (20 : 1 : 0) 溶出物から得られた。

[2] ODS カラムクロマトグラフィー

(20 : 1 : 0) の抽出物に対し、ODS (ナカライテスク, 京都, 日本) カラムを使用したクロマトグラフィーを行った。カラムは、以下のようにカラム体積の 3 倍の溶媒で溶出した：メタノール-水溶出システム [(3 : 7), (4 : 6), (5 : 5), (6 : 4), (7 : 3), (8 : 2), (9 : 1), (10 : 0)]。(10 : 0) の溶出を除き、それぞれの溶媒において前半で溶出した画分と後半で溶出した画分の 2 つに分けた。得られた各画分の重量は以下のとおりであった。[(3 : 7) - (83.7 mg, 155 mg), (4 : 6) - (72.7 mg, 45.3 mg), (5 : 5) - (27.2 mg, 47.2 mg), (6 : 4) - (46.6 mg, 22.2 mg), (7 : 3) - (1.2 mg, 2.1 mg), (8 : 2) - (3.2 mg, 0.8 mg), (9 : 1) - (5.5 mg, 5.8 mg), (10 : 1) - (19.2 mg)]。30% (v/v) メタノール溶出で 2 つの活性画分が得られた：前半で溶出した画分 (1-1, 83.7 mg) および後半で溶出した画分 (1-2, 155 mg)。

[3] HPLC

ODS カラム (Inertsil ODS-3, 3 μ m, Φ = 4.6 mm, L = 250 mm, GL Science, 東京, 日本) を用いた HPLC による精製を実施した。1-1 画分については、カラムを次のように溶出した。0.8 mL/min の速度で 3 溶媒系 (メタノール : アセトン : 水 = 1.5 : 0.8 : 7.7) で行った。溶出液を屈折率モニター RI-8020 (東ソー, 山口, 日本) で検出した。その結果、5 つの画分が得られ、その収量は溶出した順に 22.3 mg, 4.8 mg, 3.4 mg, 2.3 mg, 3.3 mg であった。1-2 画分については、3 溶媒系 (メタノール : アセトン : 水 = 2 : 1 : 7) でカラムを溶出した。6 つの画分が得られ、その収量は溶出した順に 18.0 mg, 12.1 mg, 10.9 mg, 7.0 mg, 6.8 mg, 8.2 mg であった。その他は、画分 1-1 と同じ条件で行った。

[4] Seco-tanaparholide C の HPLC 再分離

ODS カラム (COSMOSIL Cholester, 5 μ m, Φ = 4.6 mm, L = 250 mm, Nacalai tesque, 京都, 日

本) を用いた HPLC を実施した。0.8 mL/min の速度で 25%メタノールを溶媒に用いた。

(5) 構造決定

[1] 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

化学構造を以下の方法で決定した。¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルは、それぞれ 500 MHz および 125 MHz で JEOL JNM-LA500 分光計で取得した。

[2] 質量 (MS) 分析

MS スペクトルは, Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap XL (HR-ESI-MS) および JEOL JMS-T100GCV (GC-MS) で取得した。

8. 統計解析

得られたデータは、平均±標準偏差 (SD) (n=2-3) として表示した。グループ間の平均値の差は、一元配置分散分析と Tukey 検定を使用して評価した。P<0.05 を統計的に有意とした。

[参考文献]

1. Atanasov, A.G.; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temml, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, E.H.; Rollinger, J.M.; Schuster, D.; Breuss, J.M.; Bochkov, V.; Mihovilovic, M.D.; Kopp, B.; Bauer, R.; Dirsch, V.M.; Stuppner, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33, 1582–1614.
2. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 311–335.
3. Zhou, J.; Du, G.; Chen, J. Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, 25, 17–23.
4. Lee, N.K.; Paik, H.D. Bioconversion using lactic acid bacteria: Ginsenosides, gaba, and phenolic compounds. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 27, 869–877.
5. Michlmayr, H.; Kneifel, W. β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: Mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014, 352, 1–10.
6. Akao, T.; Che, Q.M.; Kobashi, K.; Yang, L.; Hattori, M.; Namba, T. Isolation of a human intestinal anaerobe, *Bifidobacterium* sp. strain SEN, capable of hydrolyzing sennosides to sennidins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 1041–1043.
7. Hattori, M. Intestinal Bacteria Play a Significant Role in the Medicinal Effects of Kampo Medicines. *腸内細菌学雑誌*, 2012, 26, 159–169.
8. Yang, L.; Akao, T.; Kobashi, K.; Hattori, M. A sennoside-hydrolyzing beta-glucosidase from *Bifidobacterium* sp. strain SEN is inducible. *Biol Pharm Bull.* 1996, 19, 701–704.
9. Yang, L.; Akao, T.; Kobashi, K.; Hattori, M. Purification and characterization of a novel sennoside-hydrolyzing beta-glucosidase from *Bifidobacterium* sp. strain SEN, a human intestinal anaerobe. *Biol Pharm Bull.* 1996, 19, 705–709.
10. Di Cagno, R.; Mazzacane, F.; Rizzello, C.G.; Vincentini, O.; Silano, M.; Giuliani, G.; De Angelis, M.; Gobbetti, M. Synthesis of isoflavone aglycones and equol in soy milks fermented by food-related lactic

- acid bacteria and their effect on human intestinal caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 10338–10346.
11. Raffi, F. The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol. *Metabolites* 2015, 5, 56–73.
 12. Chen, F.; Wen, Q.; Jiang, J.; Li, H.L.; Tan, Y.F.; Li, Y.H.; Zeng, N.K. Could the gut microbiota reconcile the oral bioavailability conundrum of traditional herbs? *J. Ethnopharmacol.* 2016, 179, 253–264.
 13. Amaretti, A.; Raimondi, S.; Leonardi, A.; Quartieri, A.; Rossi, M. Hydrolysis of the rutinose-conjugates flavonoids rutin and hesperidin by the gut microbiota and bifidobacteria. *Nutrients*, 2015, 7, 2788–2800.
 14. Tsuchihashi, R.; Kodera, M.; Sakamoto, S.; Nakajima, Y.; Yamazaki, T.; Niiho, Y.; Nohara, T.; Kinjo, J. Microbial transformation and bioactivation of isoflavones from Pueraria flowers by human intestinal bacterial strains. *J. Nat. Med.* 2009, 63, 254–260.
 15. Cheng, J.R.; Liu, X.M.; Chen, Z.Y.; Zhang, Y.S.; Zhang, Y.H. Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics. *Food Chem.* 2016, 213, 721–727.
 16. Tan, J.S.; Yeo, C.R.; Popovich, D.G. Fermentation of protopanaxadiol type ginsenosides (PD) with probiotic *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101, 5427–5437.
 17. Seong, J.S.; Xuan, S.H.; Park, S.H.; Lee, K.S.; Park, Y.M.; Park, S.N. Antioxidative and antiaging activities and component analysis of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts fermented with *Lactobacillus pentosus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 27, 1961–1970.
 18. Sheih, I.C.; Fang, T.J.; Wu, T.K.; Chang, C.H.; Chen, R.Y. Purification and properties of a novel phenolic antioxidant from radix astragali fermented by *Aspergillus oryzae* M29. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 6520–6525.
 19. Noda, M.; Danshiitsoodol, N.; Inoue, Y.; Okamoto, T.; Sultana, N.; Sugiyama, M. Antibiotic susceptibility of plant-derived lactic acid bacteria conferring health benefits to human. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2019, 72, 834–842.
 20. Noda, M.; Shiraga, M.; Kumagai, T.; Danshiitsoodol, N.; Sugiyama, M. Characterization of the SN35N strain-specific exopolysaccharide encoded in the whole circular genome of a plant-derived

- Lactobacillus plantarum*. *Biol Pharm Bull*. 2018, 41, 536–545.
21. Yasutake, T.; Kumagai, T.; Inoue, A.; Kobayashi, K.; Noda, M.; Orikiawa, A.; Matoba, Y.; Sugiyama, M. Characterization of the LP28 strain-specific exopolysaccharide biosynthetic gene cluster found in the whole circular genome of *Pediococcus pentosaceus*. *Biochem. Biophys. Rep.* 2016, 5, 266–271.
 22. Chavez-Tapia, N.C.; Rosso, N.; Tiribelli, C. Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2012, 12, 20. doi: 10.1186/1471-230X-12-20.
 23. Catrysse, L.; van Loo, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome. The Tissue-Specific Functions of NF- κ B. *Trends Cell Biol.* 2017, 27, 417–429.
 24. Kim, C.S.; Park, H.S.; Kawada, T.; Kim, J.H.; Lim, D.; Hubbard, N.E.; Kwon, B.S.; Erickson, K.L.; Yu, R. Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int. J. Obes.* 2006, 30, 1347–1355.
 25. Hill, D.B.; Marsano, L.S.; McClain, C.J. Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 1993, 18, 576–580.
 26. Gao, B.; Tsukamoto, H. Inflammation in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease: friend or foe? *Gastroenterology* 2016, 150, 1704–1709.
 27. Chang, B.; Xu, M.J.; Zhou, Z.; Cai, Y.; Li, M.; Wang, W.; Feng, D.; Bertola, A.; Wang, H.; Kunos, G.; Gao, B. Short- or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge synergistically induce acute liver injury in mice: An important role for CXCL1. *Hepatology* 2015, 62, 1070–1085.
 28. Bertola, A.; Park, O.; Gao, B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: A critical role for E-selectin. *Hepatology* 2013, 58, 1814–1823.
 29. Davidson, B.E.; Kordias, N.; Dobos, M.; Hillier, A.J. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996, 70, 161–183.
 30. Min, S.W.; Kim, N.J.; Baek, N.I.; Kim, D.H. Inhibitory effect of eupatilin and jaceosidin isolated from *Artemisia princeps* on carrageenan-induced inflammation in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2009, 125, 497–500.
 31. Kim, M.J.; Han, J.-M.; Jin, Y.-Y.; Baek, N.-I.; Bang, M.-H.; Chung, H.-G.; Choi, M.-S.; Lee, K.-T.; Sok,

- D.-E.; Jeong, T.-S. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of jaceosidin from *Artemisia princeps* Pampanini cv. Sajabal. *Arch. Pharm. Res.* 2008, 31, 429–437.
32. Lee, S.G.; Lee, H.; Nam, T.G.; Eom, S.H.; Heo, H.J.; Lee, C.Y.; Kim, D.-O. Neuroprotective Effect of Caffeoylquinic Acids from *Artemisia princeps* Pampanini against Oxidative Stress-Induced Toxicity in PC-12 Cells. *J. Food Sci.* 2011, 76, 250–256.
 33. Chadwick, M.; Trewin, H.; Gawthrop, F.; Wagstaff, C. Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 12780–12805.
 34. Ivanescu, B.; Miron, A.; Corciova, A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *J. Anal. Methods Chem.* 2015, doi: 10.1155/2015/247685.
 35. Liang, Y.F.; Li, X.; Wang, X.; Zou, M.; Tang, C.; Liang, Y.; Song, S.; Jiao, N. Conversion of simple cyclohexanones into catechols. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 12271–12277.
 36. Zan, K.; Chen, X.Q.; Fu, Q.; Shi, S.P.; Zhou, S.X.; Xiao, M.T.; Tu, P.F. 1, 10-Secoguaianolides from *Artemisia anomala* (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 2010, 38, 431–434.
 37. Liu, L.; Dai, W.; Xiang, C.; Chi, J.; Zhang, M. 1,10-Secoguaianolides from *Artemisia austro-yunnanensis* and their anti-inflammatory effects. *Molecules* 2018, 23, 1–14.
 38. Ghantous, A.; Gali-Muhtasib, H.; Vuorela, H.; Saliba, N.A.; Darwiche, N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discov Today.* 2010, 15, 668–678.
 39. Makiyi, E.F.; Frade, R.F.M.; Lebl, T.; Jaffray, E.G.; Cobb, S.E.; Harvey, A.L.; Slawin, A.M.Z.; Hay, R.T.; Westwood, N.J. Iso-seco-tanaparholides: Isolation, synthesis and biological evaluation. *European J. Org. Chem.* 2009, 5711–5715.
 40. Taniguchi, K.; Karin, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* 2018, 18, 309–324.
 41. Joshi-Barve, S.; Barve, S.S.; Amancherla, K.; Gobejishvili, L.; Hill, D.; Cave, M.; Hote, P.; McClain, C. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 2007, 46, 823–830.
 42. Chadwick, M.; Trewin, H.; Gawthrop, F.; Wagstaff, C. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants

- and People. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 12780–12805.
43. García-Piñeres, A.J.; Castro, V.; Mora, G.; Schmidt, T.J.; Strunck, E.; Pahl, H.L.; Merfort, I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B Plays a Crucial Role in DNA Binding Inhibition by Sesquiterpene Lactones. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 39713–39720.
 44. García-Piñeres, A.J.; Lindenmeyer, M.T.; Merfort, I. Role of cysteine residues of p65/NF- κ B on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. *Life Sci.* 2004, 75, 841–856.
 45. Higuchi, Y.; Kawakami, S.; Hashida, M. Development of Cell-selective Targeting Systems of NF κ B Decoy for Inflammation Therapy. *YAKUGAKU ZASSHI* 2008, 128, 209–218.
 46. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009, 2, 270–278.
 47. Fernando, I.P.S.; Nah, J.W.; Jeon, Y.J. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016, 48, 22–30.
 48. Kazłowska, K.; Hsu, T.; Hou, C.C.; Yang, W.C.; Tsai, G.J. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 128, 123–130.
 49. Heinrich, M.; Robles, M.; West, J.E.; Ortiz De Montellano, B.R.; Rodriguez, E. Ethnopharmacology of Mexican asteraceae (compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998, 38, 539–565.
 50. Valdés, L.; Cuervo, A.; Salazar, N.; Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; González, S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food Funct.* 2015, 6, 2424–2439.
 51. Cho, S.-H.; Na, Y.-E.; Ahn, Y.-J. Growth-inhibiting effects of seco-tanaparthenolides identified in *Artemisia princeps* var. *orientalis* whole plant on human intestinal bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 7–12.

[謝辞]

本研究を実施する機会を頂き、また本研究に際し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました、杉山 政則 教授に謹んで感謝致します。

本研究の実施にあたり、実験の御指導を賜り、有益な御助言、ならび多大な御協力を頂きました、山野 幸子 准教授に心より深く感謝致します。

本研究に関して、適切な御指導、御助言を頂きました、小池 透 教授、野田 正文 特任准教授に深く感謝致します。小池 透 教授には、研究環境作りに御協力頂き、大先輩として、多くの御激励を頂きました。

本研究の遂行にあたり、有益な御討論をして頂き、適切な御助言を頂きました、横大路 智治 准教授に深く感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を頂きました、松尾 裕彰 教授、古武 弥一郎 教授に深く感謝致します。また、松尾 裕彰 教授には、終始暖かい御支援を頂きました。

本論文の作成にあたり、適切な御助言を頂きました、東川 史子 特任准教授、Narandalai Danshiitsoodol 特任助教、Nasrin Sultana 博士、Rakhimuzzaman Md 博士、ならびに杉山研究室の皆様に感謝致します。

構造決定にあたり、御協力頂きました、広島国際大学 薬学部 岡本 典子 助教に感謝致します。

本研究に際し、暖かい御支援と適切な御助言を頂きました、熊谷 孝則 准教授、埜越 崇範 助教、山野 喜 助教に感謝致します。

本研究で用いた疾患に関する知識、病態の捉え方など幅広く御教授頂きました、広島大学 病院 総合診療科 田妻 進 元教授 (現 JA 尾道総合病院 病院長)、菅野 啓司 診療教授、岸川 暢介 講師、杉山 晶子 博士、ならびに総合診療科の皆様に感謝致します。

研究の機会を頂き、漢方薬への興味を持つきっかけを頂きました、飯塚 徳男 元教授、ならびに学部生 桐原 智子さん、橋本 勇紀 君、布垣 伊織 君、森田 亮平 君に感謝致します。

研究生生活において、精神的に支えてくれた、大学の同級生であり二十年来の親友、
原田 佳奈 助教に心より感謝致します。

最後に、暖かく見守って頂いた、薬学部長 高野 幹久 教授、副薬学部長 小澤 孝一郎 教授をはじめ、薬学部の先生方、薬学事務室 道山 深雪 様、松尾研究室の学生さん、病院薬剤部の皆様、薬学部同窓生、ならびに友人と家族に感謝致します。

2020年3月
岡本 知子