



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1698号
学位記番号	第344号
氏名	張 伏子
授与年月日	平成31年3月25日
学位論文の題名	生薬キクカのPPAR γ アゴニスト作用とその活性成分の探索
論文審査担当者	主査： 樋口 恒彦 副査： 牧野 利明, 大澤 匡弘, 頭金 正博

名古屋市立大学学位論文

生薬キクカの PPAR γ アゴニスト作用と
その活性成分の探索

平成 30 年度 (2019 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科
創薬生命科学専攻生薬学分野
氏名 張 伏子

本論文は、2019年3月、名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 樋口 恒彦 教授
副査 牧野 利明 教授
副査 頭金 正博 教授
副査 大澤 匡弘 准教授

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報分を基礎とするものである。

1. Fuzi Zhang, Anna Iwaki, Kan'ichiro Ishiuchi, Akinori Sugiyama, Masahiro Ohsawa, Toshiaki Makino. Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonistic effect of *Chrysanthemum indicum* capitulum and its active ingredients. *Pharmacognosy Magazine* 14(56) 461–464 (2018).
2. Fuzi Zhang, Kan'ichiro Ishiuchi, Akinori Sugiyama, Masahiro Ohsawa, Toshiaki Makino. B-ring-homo-tonghaosu is isolated as the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist from *Chrysanthemum morifolium* capitulum. *Journal of Natural Medicines* 73(3) 497–503 (2019).

本論文の基礎となる研究は、牧野利明教授の指導の下に、名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

序論	4
本論	
第一章 <i>Chrysanthemum indicum</i> 由来のキクカの PPAR γ アゴニスト作用と その活性成分	5
第二章 各種キクカ国内市場品の PPAR γ アゴニスト作用と活性成分含量の比較	11
第三章 <i>C. morifolium</i> 由来のキクカの PPAR γ アゴニスト作用とその活性成分	13
考察	19
結論	23
実験方法	24
引用文献	29
謝辞	31

序論

生薬のキクカ（菊花、*Chrysanthemi Flos*）は、第17改正日本薬局方（2016年）¹⁾ではキク *Chrysanthemum morifolium* またはシマカンギク *C. indicum* の頭花を基原として規定している。一方、中国薬典2015年版²⁾では、前者を「菊花、*Chrysanthemi Flos*」で、薬能は「散風清熱，平肝明目，清熱解毒」、後者を「野菊花、*Chrysanthemi Indici Flos*」で、薬能は「清熱解毒，瀉火平肝」と規定している。すなわち、日本では同一とされる生薬を、中国では異なる生薬として使い分けることとなっている。

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) は、核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質であり、主に脂肪組織に分布して脂肪細胞分化などに関与している転写因子である。PPAR γ を活性化させる薬剤は、糖尿病や動脈硬化に対する有用性が期待され、すでにピオグリタゾンなどの薬剤が上市されている。また、PPAR γ の活性化は白色脂肪組織での脂肪蓄積を促進し肥満を助長する一方で、骨格筋や肝における中性脂肪の蓄積を抑制し、インスリン抵抗性を改善させることから、PPAR γ はインスリン抵抗性糖尿病改善薬を開発するための標的分子として知られている³⁾。

Yamamoto らは、*C. morifolium* 由来のキクカにおいて、3T3-L1 脂肪前駆細胞において PPAR γ の mRNA 発現を誘導することにより脂肪細胞への分化を促進し、グルコースの取り込みを増加させる作用を報告した⁴⁾が、その活性を担う化合物の同定はされていなかった。一方、日本で生薬として汎用されているのは、*C. indicum* 由来のキクカである。そこで本研究では、まずはじめに、*C. indicum* 由来のキクカの PPAR γ アゴニスト活性を評価し、また活性成分を同定し、得られた活性成分が創薬のためのリード化合物として利用できる可能性を期待した。基原や産地の異なる各種キクカにおいて、その PPAR γ アゴニスト活性や活性成分の含量を比較することにより、生活習慣病の予防に適した優良品種を選別するための基礎的な情報を得ることも目的とした。また、その結果、その成分が *C. morifolium* 由来のキクカに含まれていなかったため、そちらについても活性成分を同定することを目的として研究を行った。

本論

第一章 *C. indicum* 由来のキクカの PPAR γ アゴニスト作用とその活性成分

C. indicum 由来キクカ（浙江省産）を大晃生薬（名古屋）より購入した。キクカ 148 g を粉末とし、1.5 L のメタノールで室温で攪拌しながら一晩抽出し、ろ過後、残渣を同様に処理することで、メタノールエキス (MCI) 36.5 g を得た。PPAR γ アゴニスト活性は、PPAR γ を発現するエフェクタープラスミドである pCMV-SPORT6-PPAR γ と、PPAR 応答配列の 5 回繰返し配列の下流にホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子を導入したプラスミドである pGL4.2 PPRE5 \times 48 をリポフェクション法により細胞へ導入したルシフェラーゼレポーターアッセイにより行った (Fig. 1)。陽性コントロールとして、ピオグリタゾン 30 μ M を使用した。

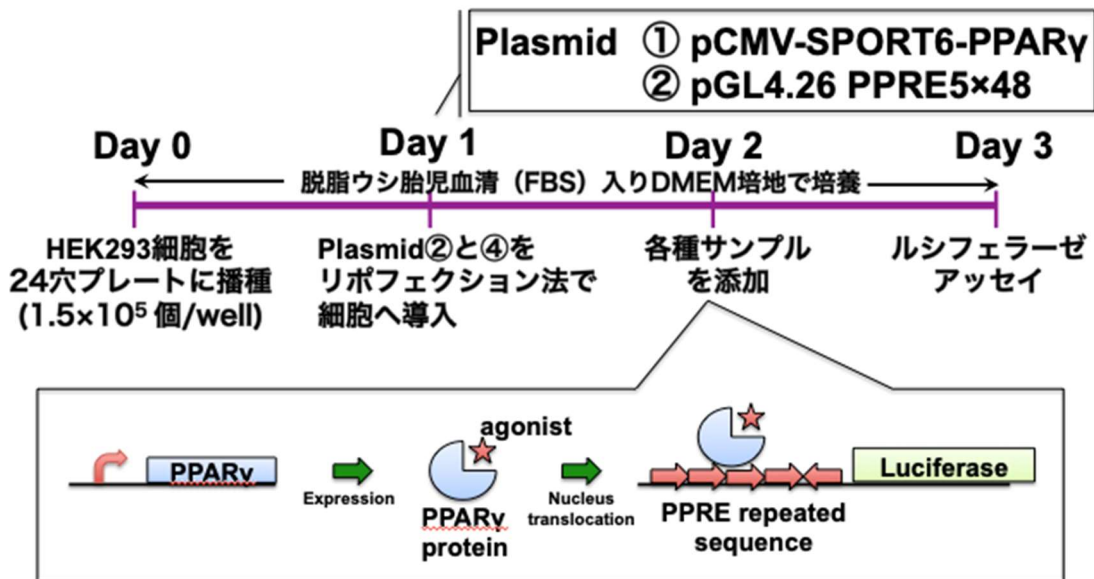


Fig. 1. PPAR- γ アゴニスト活性測定法の概要.

その結果、MCIは濃度依存的に有意な PPAR γ アゴニスト活性を示した (Fig. 2)。その活性は、濃度 100 μ g/ml のときに、陽性コントロールとして使用したピオグリタゾン 30 μ M とほぼ同じレベルとなった。

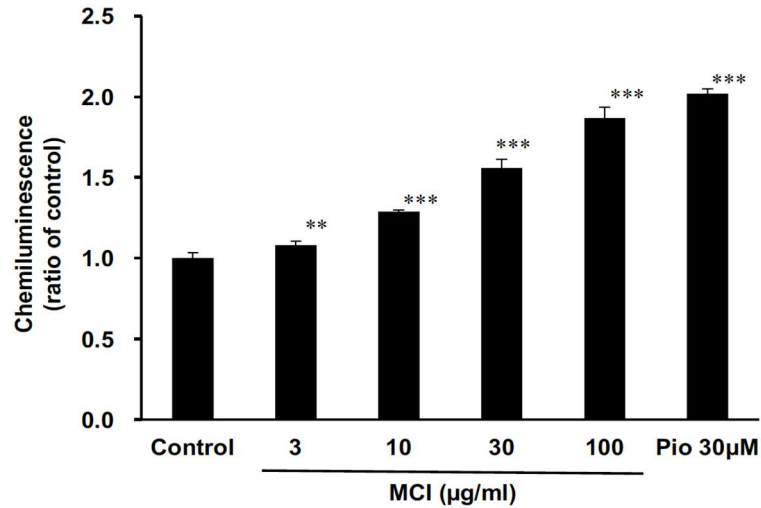


Fig. 2. *C. indicum* 由来キクカメタノールエキス (MCI) の PPAR γ アゴニスト活性. HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCI を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準誤差 ($n=4$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control 群。

続いて、MCI に含まれる活性成分を探索するために、分液操作により分画を行った。MCI 36.5 g を水に懸濁し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、水飽和 *n*-ブタノールで、順次分液し、ヘキサン画分 (5.7 g)、酢酸エチル画分 (8.6 g)、ブタノール画分 (8.0 g) および水画分 (14.0 g) に分画した (Fig. 3)。

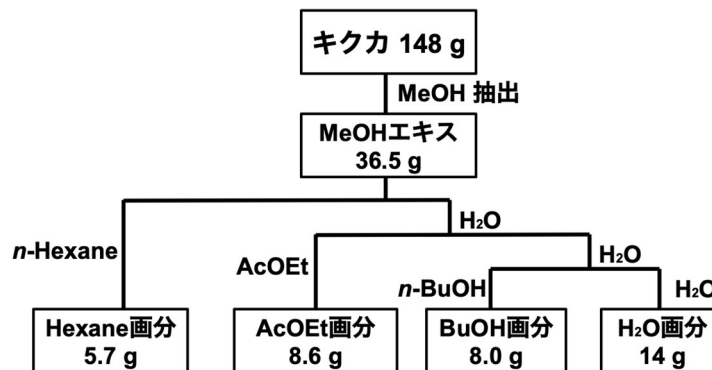


Fig. 3. *C. indicum* 由来キクカメタノールエキス (MCI) の分液操作方法と収量.

これら分画物で PPAR γ アゴニスト活性を評価したところ、ヘキサン画分と酢酸エチル画分への PPAR γ アゴニスト活性成分の移行を認めた (Fig. 4)。そこで、ヘキサン画分をターゲットとして、さらに分画を進めた。

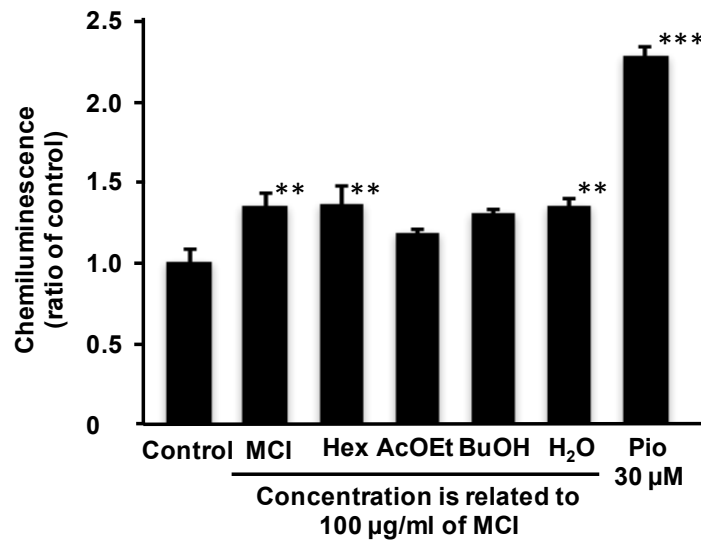


Fig. 4. *C. indicum* 由来キクカメタノールエキス (MCI) 分画物の PPAR γ アゴニスト活性 (1).

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCI 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control 群。

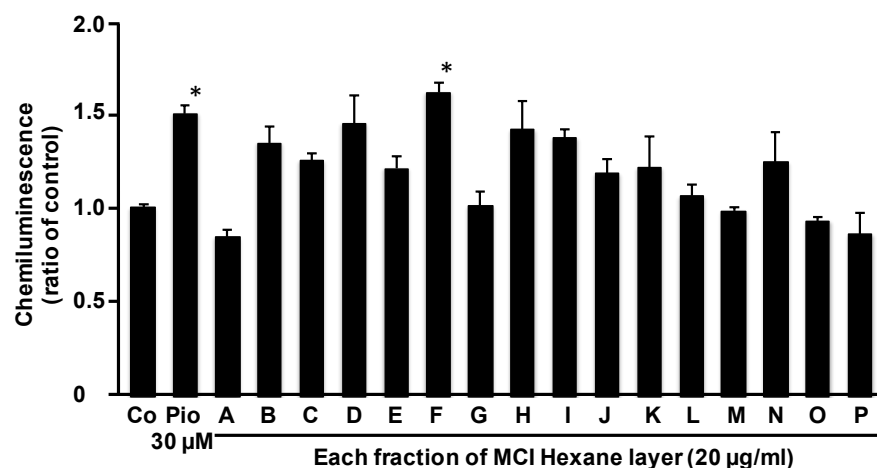


Fig. 5. *C. indicum* 由来キクカメタノールエキス (MCI) 分画物の PPAR γ アゴニスト活性 (2).

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCI 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群 (Co) に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。* $P < 0.05$ vs. control 群。

次に、ヘキサン画分 100 mg を分取 TLC (移動相、ヘキサン：酢酸エチル 9:1) で展開し、UV 吸収のパターンから、フラクション A から P まで分けた。そして、元のヘキサン画分 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に相当する濃度で、PPAR γ アゴニスト活性を測定したところ、 R_f 値 0.33 に相当する画分 F が最も高い活性を示した (Fig. 5)。

続いて、ヘキサン画分 (5.5 g) から、0.33 の R_f 値を指標にしたシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (移動相、ヘキサン：酢酸エチル 9:1) に供し、画分 F (0.24 g) を得た。さらに、画分 F をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (移動相、クロロホルム) に供し、画分 F1~F14 を得た。それぞれの画分の PPAR γ アゴニスト活性を評価したところ、画分 F3 に有意な活性を認めた (Fig. 6)。

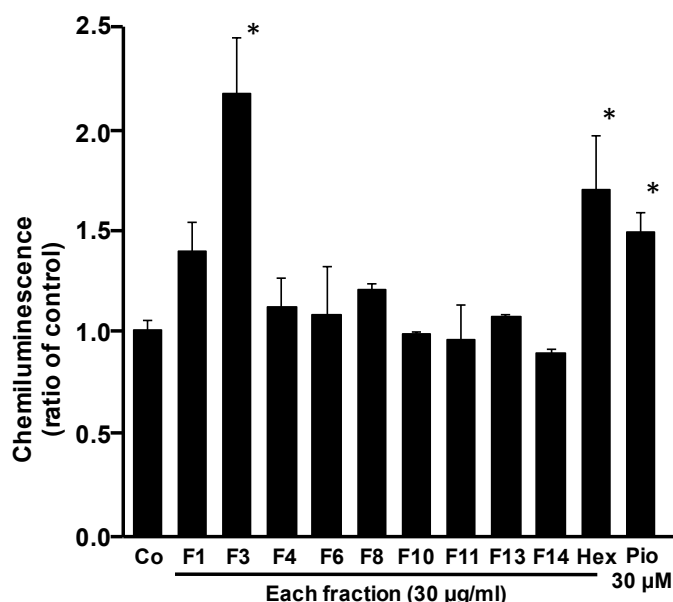


Fig. 6. *C. indicum* 由来キクカメタノールエキス (MCI) 分画物の PPAR γ アゴニスト活性 (3).

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCI 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μM を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群 (Co) に対する化学発光強度の割合を、平均±標準誤差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。* $P < 0.05$ vs. control 群。

さらに画分 F3 を、逆相 HPLC で分析したところ、200 nm に吸収極大を持つピーク 1 と、317 nm 付近に吸収極大を持つピーク 2 と 3 が検出された。そこで、画分 F3、10 mg から、分取 HPLC により、ピーク 1~3 を分離し、それぞれ F3-1、F3-2、F3-3 とした (Fig. 7)。

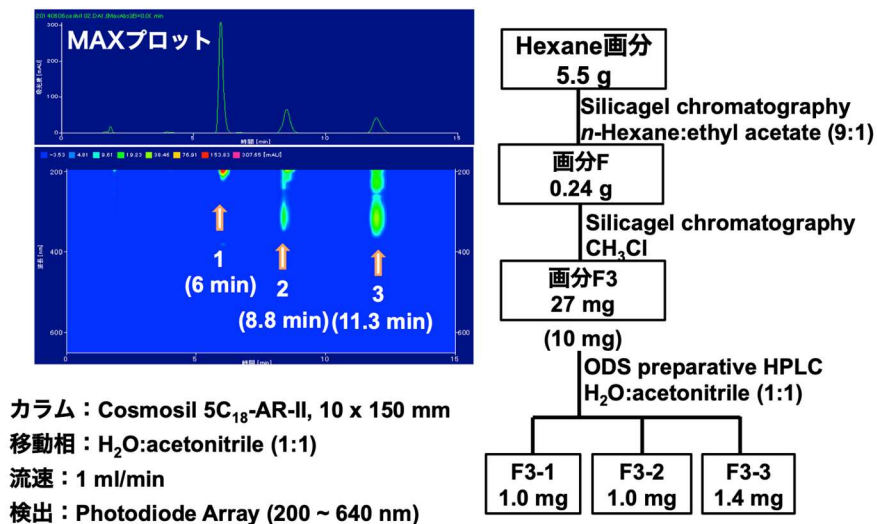


Fig. 7. *C. indicum* 由来キクカメタノールエキスヘキサン画分からの分画スキームと、画分 F3 のクロマトグラム.

画分 F3-1、F3-2 および F3-3 の PPAR γ アゴニスト活性を評価したところ、F3-3 に活性が認められた (Fig.8)。

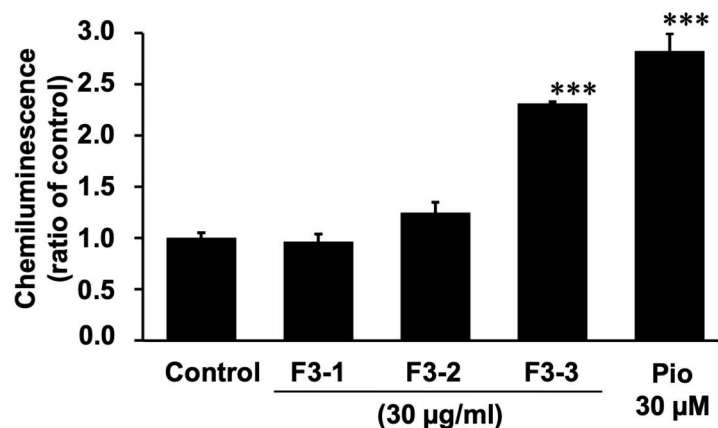


Fig. 8. *C. indicum* 由来キクカメタノールエキス (MCI) 分画物 F3-1、F3-2 および F3-3 の PPAR γ アゴニスト活性 (3).

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCI 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準偏差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。*** $P < 0.001$ vs. control 群。

F3-2 と F3-3 は、NMR の結果、比較的純度が高かったため、そのまま構造解析に移った。それぞれの HRMS の結果、分子式がどちらも C₁₃H₁₂O₂ と推定された。そして、¹H-および ¹³C-NMR スペクトルと、旋光度の結果から、両者は tonghaosu の異性体で、F3-3 が (*E*)-tonghaosu (1)、F3-2 が (*Z*)-tonghaosu (2) であった^{5,6} (Fig. 9)。

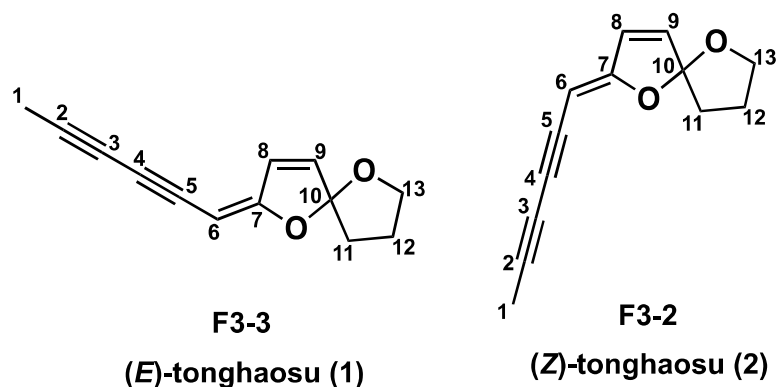


Fig. 9. (*E*)-tonghaosu (1)、(*Z*)-tonghaosu (2) の構造式。

1には、濃度依存的に有意な PPAR γ アゴニスト活性を認め、2は 500 μ M の濃度でも有意な活性を認めなかった (Fig. 10)。

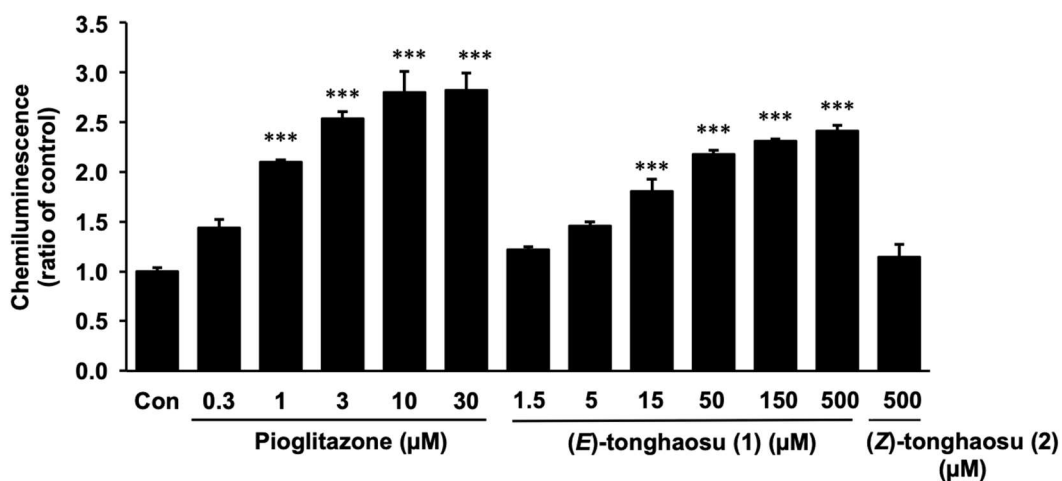


Fig. 10. (*E*)-tonghaosu (1)、(*Z*)-tonghaosu (2) の PPAR γ アゴニスト活性。
 HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCI 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾンを使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。*** $P < 0.001$ vs. control 群。

第二章 各種キクカ国内市場品の PPAR γ アゴニスト作用と活性成分含量の比較

前述したように日本薬局方¹⁾では、キクカは、*C. morifolium* または *C. indicum* の頭花と定義されており、市場品ではこの両種を基原植物とするキクカが流通している。また、生薬は天然由来であるために、メーカー別、ロットごとの差が生じる。

そこで本章では、キクカ市場品 13 種類を入手し、まずそれぞれの基原を同定した後、それぞれメタノールエキスを調製し、その (*E*)-tonghaosu (**1**) の含量を HPLC で定量した。その結果、キクカ市場品のうち、**1** は *C. indicum* 由来のキクカでのみ検出した。また、*C. indicum* 由来のキクカでも **1** を含まないサンプルが 3 検体あった。それ以外に、産地別、購入元別での関連は認められなかった (Table 1)。

Table 1. 各種キクカ市場品の由来及びそのメタノールエキス中の (*E*)-tonghaosu (**1**) 含量

Sample #	基原植物	産地	購入元	Lot No.	(<i>E</i>)-tonghaosu (1) (w/w %)
No. 1	<i>C. indicum</i>	広西チワン自治区	栃本天海堂	P020910431	n.d.
No. 2	<i>C. morifolium</i>	浙江省	栃本天海堂	1403C027001	n.d.
No. 3	<i>C. morifolium</i>	浙江省	栃本天海堂	1206C027002	n.d.
No. 4	<i>C. indicum</i>	広東省	栃本天海堂	1401C027001	n.d.
No. 5	<i>C. indicum</i>	安徽省	福田竜	3091302	0.026 \pm 0.008
No. 6	<i>C. indicum</i>	山西省	福田竜	3091201	n.d.
No. 7	<i>C. indicum</i>	広東省	前忠	3053767	0.18 \pm 0.03
No. 8	<i>C. indicum</i>	広東省	前忠	3054885	0.26 \pm 0.03
No. 9	<i>C. indicum</i>	広西チワン自治区	前忠	30591031	0.11 \pm 0.02
No. 10	<i>C. morifolium</i>	山西省	大晃生薬	4D08	n.d.
No. 11	<i>C. morifolium</i>	河南省	順天堂	M41212	n.d.
No. 12	<i>C. indicum</i>	台湾	銀豊貿易	-	0.25 \pm 0.01
No. 13	<i>C. indicum</i>	浙江省	大晃生薬	8F08	0.12 \pm 0.04

各種キクカ乾燥粉末をメタノールで抽出し、及び (*E*)-tonghaosu (**1**) 含量を HPLC で定量、(w/w) % で表記した。データは同ロットから 3 回の試料を調製し、平均 \pm 標準偏差で表記した。n.d., < 0.0001%

次いで、PPAR γ アゴニスト活性を評価し、それと **1** 含量との相関関係を検討した。検体番号 10 および 11 以外のすべてのキクカメタノールエキスにおいて、100 μ g/ml の濃度で有意な PPAR γ アゴニスト活性が認められた (Fig. 11)。また、各種キクカサンプル中の **1** 含量と PPAR γ アゴニスト活性との間に相関関係は認められなかった。

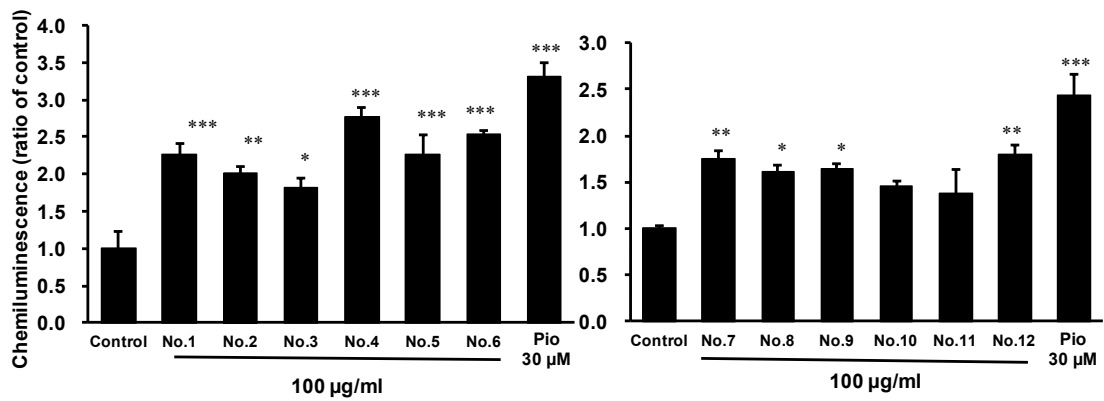


Fig. 11. 各種キクカサンプルのメタノールエキスの PPAR γ アゴニスト活性.

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、Table 1 に示す各種キクカサンプルメタノールエキスを含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均±標準誤差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control 群。

第三章 *C. morifolium* 由来のキクカの PPAR γ アゴニスト作用とその活性成分

前章の結果、(*E*)-tonghaosu (**1**)を含まないキクカ、特に *C. morifolium* 由来のキクカのメタノールエキスにおいても、PPAR γ アゴニスト活性を示した。このことから、*C. morifolium* 由来のキクカには、**1** 以外の活性成分を含むことが強く示唆された。

そこで、Table 1 でのサンプル No. 2 の *C. morifolium* 由来のキクカから、PPAR γ アゴニスト活性成分の単離を試みた。

C. morifolium 由来のキクカのメタノールエキスも、濃度依存的に有意な PPAR γ アゴニスト活性を示した (Fig. 12)。

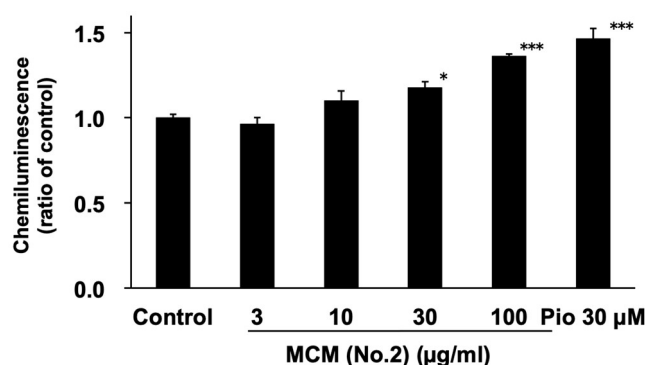


Fig. 12. *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキス (MCM) の PPAR γ アゴニスト活性.

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCM を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均±標準誤差 ($n=4$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。 $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ vs. control 群。

続いて、キクカメタノールエキスを水に懸濁し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、水飽和 *n*-ブタノールで、順次分液し、ヘキサン画分、酢酸エチル画分、ブタノール画分、および水画分に、それぞれ分液した (Fig. 13)。各画分の PPAR γ アゴニスト活性を評価したところ、ヘキサン画分と酢酸エチル画分に PPAR γ アゴニスト活性成分の移行を認めた (Fig. 14)。

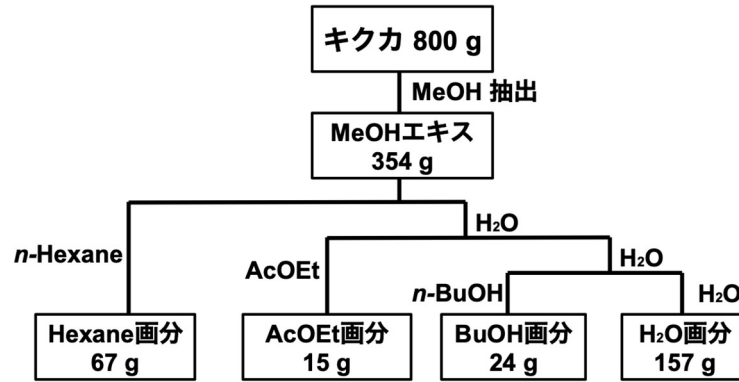


Fig. 13. *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキス (MCM) の分液操作方法と収量.

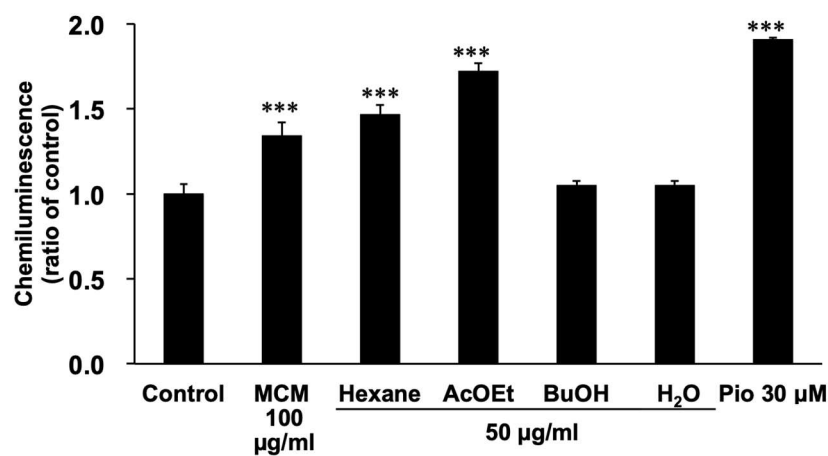


Fig. 14. *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキス (MCM) 分画物の PPAR γ アゴニスト活性 (1).

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCM 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準偏差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。*** $P < 0.001$ vs. control 群。

ヘキサン画分と酢酸エチル画分は、TLC の結果、重複しているスポットが多かったため、ヘキサン画分をさらに分画することとした。ヘキサン画分をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーに供し、画分 Hex1~7 に分画した。それぞれの画分の PPAR γ アゴニスト活性を評価したところ、活性成分は、画分 2、3、6、7 に移行した (Fig. 15)。

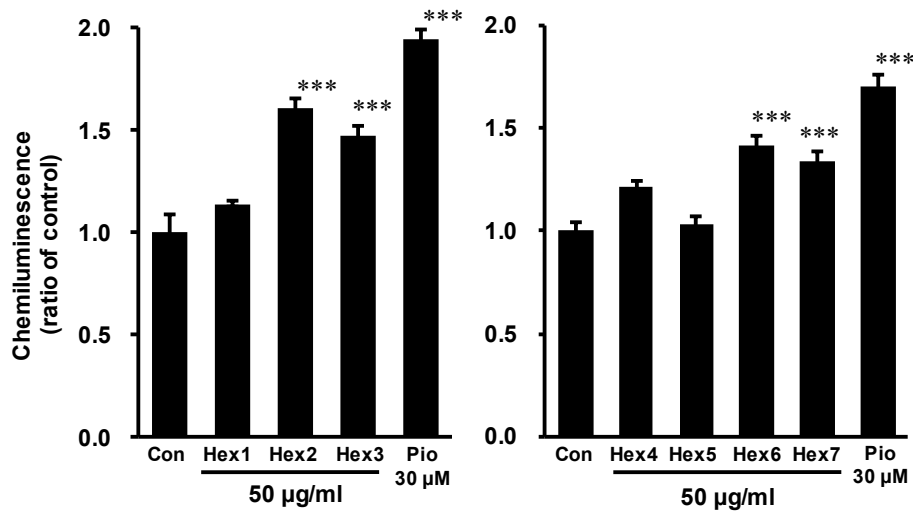


Fig. 15. *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキス (MCM) 分画物の PPAR γ アゴニスト活性 (2).

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCM 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群 (Con) に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。*** $P < 0.001$ vs. control 群。

最も強い活性を示した画分 2 について、さらにシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーで分画し、画分 H2-1 から H2-5 まで分けた。それぞれの画分の PPAR γ アゴニスト活性を評価したところ、活性成分は、画分 H2-2 に移行した (Fig. 16)。

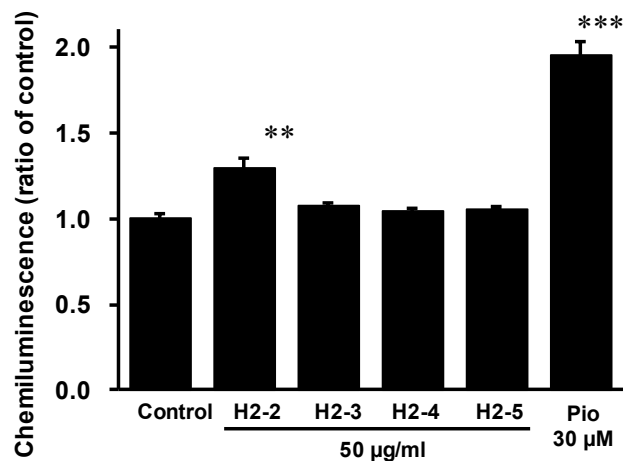


Fig. 16. *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキス (MCM) 分画物の PPAR γ アゴニスト活性 (3).

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、MCM 分画物を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) 30 μ M を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control 群。

引き続き、画分 H2-2 を分析 HPLC で分析したところ、3 つのピークを検出した。それぞれを H2-2-1~H2-2-3 と名付け、分取 HPLC により分離した (Fig. 17)。

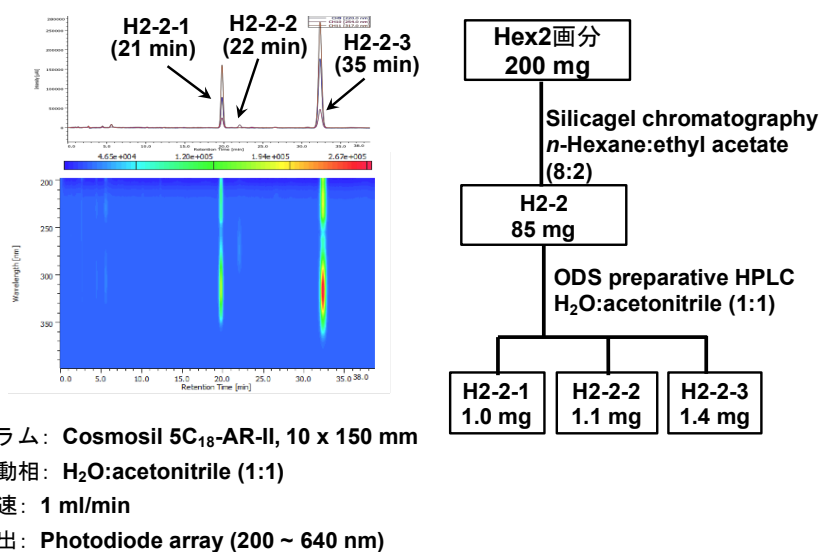


Fig. 17. *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキスヘキサン画分2からの分画スキームと、画分 H2-2 のクロマトグラム。

そのうち、H2-2-1 と H2-2-3 は、NMR 解析の結果、比較的純度が高かったため、そのまま構造解析に移り、H2-2-2 は、まだ純度が低かったため、構造解析はできなかった。H2-2-1 と H2-2-3 の HIMS の結果、分子式がどちらも C₁₄H₁₄O₂ と推定された。そして、¹H-および ¹³C-NMR スペクトルと、旋光度の結果から、それぞれ tonghaosu と類似化合物で、H2-2-3 が光学活性のある(-)-(E)-B-ring-homo-tonghaosu (3)、H2-2-1 がラセミ体の(±)-(Z)-B-ring-homo-tonghaosu (4) と同定できた (Fig. 18)。

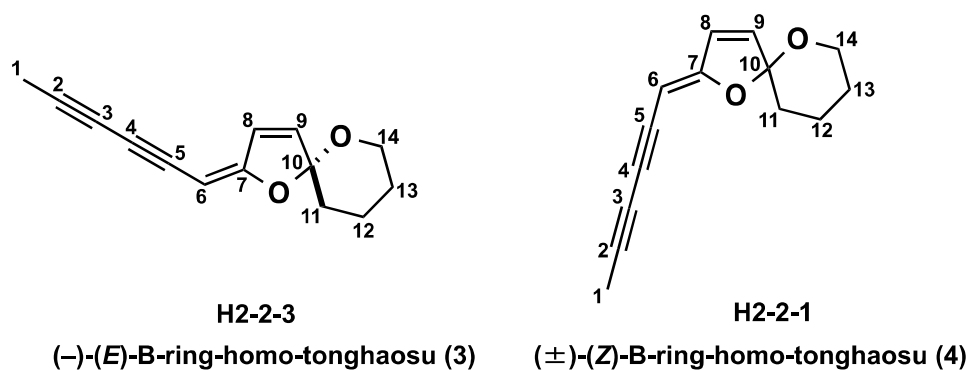


Fig. 18. (-)-(E)-B-ring-homo-tonghaosu (3) と(±)-(Z)-B-ring-homo-tonghaosu (4) の構造式。

続いて **3** および **4** の、PPAR γ アゴニスト活性を評価し、どちらも濃度依存的に有意な PPAR γ アゴニスト活性を示した (Fig. 19)。

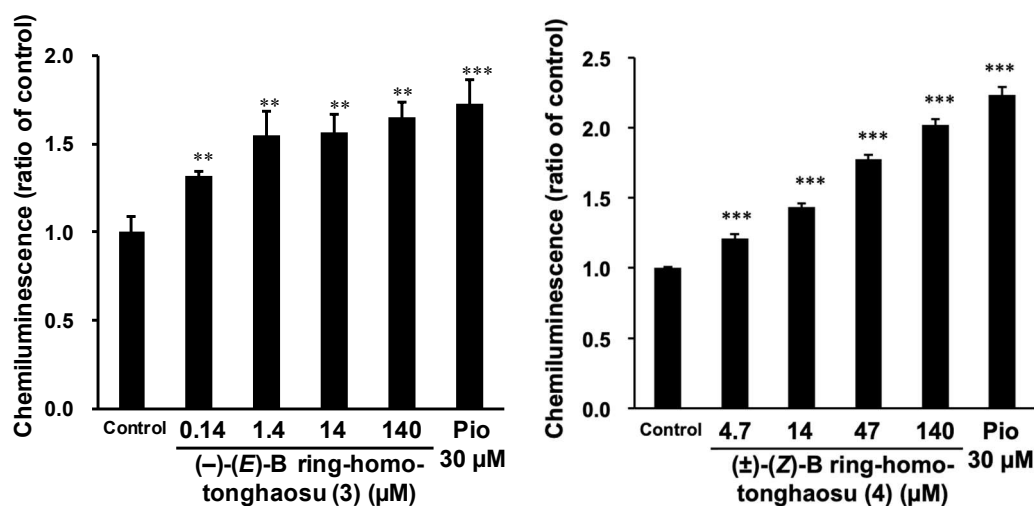


Fig. 19. (-)-(E)-B-ring-homo-tonghaosu (**3**)と(Z)-B-ring-homo-tonghaosu (**4**) の PPAR γ アゴニスト活性.

HEK293 細胞に PPAR γ 応答配列を含むレポータープラスミドを導入し、**3** または **4** を含んだ培地で 24 時間培養した。陽性コントロールとしてピオグリタゾン (Pio) を使用した。その後、細胞を溶解し、化学発光強度を測定した。データはサンプルを添加しなかった control 群に対する化学発光強度の割合を、平均 \pm 標準偏差 ($n=4$) で示した。Bonferroni の多重比較検定により統計処理した。*** $P < 0.001$ vs. control 群。

最後に、前章で示した 13 種類のキクカサンプルにおける、**2**、**3**、**4** の含量を HPLC で定量した。Tonghaosu は、*E* 体、*Z* 体ともに、*C. morifolium* 由来のキクカには含まれていなかった。B-ring-homo-tonghaosu は、tonghaosu よりも含量は少ないものの、両種由来のキクカにも含まれていた (Table 2)。

Table 2. 各種キクカ市場品のメタノールエキス中の各化合物含量.

		(Z)-tonghaosu (2 , w/w%)	(E)-B-ring-homo tonghaosu (3 , w/w%)	(Z)-B-ring-homo tonghaosu (4 , w/w%)
No. 1	<i>C. indicum</i>	n.d.	n.d.	n.d.
No. 2	<i>C. morifolium</i>	n.d.	0.011 ± 0.000	0.0011 ± 0.0001
No. 3	<i>C. morifolium</i>	n.d.	0.00068 ± 0.00003	0.0011 ± 0.0001
No. 4	<i>C. indicum</i>	n.d.	0.00065 ± 0.00001	n.d.
No. 5	<i>C. indicum</i>	0.008 ± 0.002	0.0033 ± 0.0000	0.0013 ± 0.0003
No. 6	<i>C. indicum</i>	n.d.	0.00084 ± 0.00009	0.00027 ± 0.00008
No. 7	<i>C. indicum</i>	0.048 ± 0.010	0.0075 ± 0.0005	0.0013 ± 0.0002
No. 8	<i>C. indicum</i>	0.090 ± 0.018	0.029 ± 0.004	0.0089 ± 0.0024
No. 9	<i>C. indicum</i>	0.028 ± 0.003	0.0079 ± 0.0001	0.0016 ± 0.0003
No. 10	<i>C. morifolium</i>	n.d.	n.d.	0.012 ± 0.017
No. 11	<i>C. morifolium</i>	n.d.	n.d.	n.d.
No. 12	<i>C. indicum</i>	0.050 ± 0.015	0.0082 ± 0.0020	0.0016 ± 0.0000
No. 13	<i>C. indicum</i>	0.063 ± 0.019	0.0032 ± 0.0001	0.0013 ± 0.0001

各サンプルは、Table 1 と同一である。データは (w/w) %で表記し、平均±標準偏差で表記した。

考察

キク *Chrysanthemum indicum* の頭花は、東アジアでは茶飲料や食材として使われている。これまで薬理作用として、抗炎症作用^{9,10)}、肝臓保護作用¹¹⁾、鎮痛作用¹²⁾、紫外線による皮膚老化予防作用¹³⁾、アトピー性皮膚炎改善作用¹⁴⁾、カドミウムによる聴神経障害保護作用¹⁵⁾、シスプラチンによる腎毒性保護作用¹⁶⁾、高脂肪食マウスにおける PPAR- α 促進作用と抗肥満作用^{17,18)}が報告されている。また、シマカンギク *C. morifolium* の頭花は、同様に東アジアで茶飲料や食材として使われる他、日本では刺身の装飾にも使用されている。これまで薬理作用として、抗炎症作用¹⁹⁾、抗 HIV 作用²⁰⁾、血管新生阻害作用²¹⁾、メラニン色素形成阻害作用²²⁾、培養脂肪細胞での PPAR- γ とグルコーストランスポーター発現促進作用⁴⁾、糖尿病モデルマウスでの血糖値抑制作用と白色脂肪組織での PPAR- γ 発現誘導作用²³⁾が報告されている。

日本薬局方¹⁾では、キクカは(菊花、*Chrysanthemi Flos*)はキク *Chrysanthemum morifolium* またはシマカンギク *C. indicum* の頭花を基原として規定しているが、国内で生薬として汎用されているのは後者のシマカンギク由来のものである。そこで本研究では、*C. morifolium* 由来のキクカでの PPAR γ mRNA 発現誘導作用の報告⁴⁾を受け、生薬として汎用される *C. indicum* の頭花の活性を評価し、その有効性を担う活性成分の同定を試みた。

本研究では、*C. indicum* 由来のキクカから、その PPAR γ アゴニスト活性を担う化合物として、(*E*)-tonghaosu (**1**) を単離同定した。有意な PPAR γ アゴニスト活性が認められたの**1**は、50 μ M の濃度で、1 μ M のピオグリタゾンと同程度の活性を示したことから、**1**はピオグリタゾンの約 50 分の 1 の PPAR リアゴニスト活性を持つことが推測された。また、キクカからは**1**の異性体である (*Z*)-tonghaosu (**2**) も同時に単離し、PPAR γ アゴニスト活性を評価したが、**2**は 100 μ g/ml = 500 μ M でも活性を認めなかった。このことから、PPAR γ アゴニスト活性を示すためには 6 位の炭素の立体配置が重要な役割を果たしているとは推定された。

Tonghaosu は、キク科ヨモギ属植物 *Artemisia assoana* から初めて報告され⁵⁾、その後、中国の研究者がキク科アラゲシュンギク *Glebionis segetum* (syn. *Chrysanthemum segetum*、中国語名「南茼蒿」) から、植物が昆虫に摂食される現象を忌避するために産する化合物として単離同定している⁶⁾。その化合物名にある "tonghao" は、中国語

で「茺蒿」と書き、キク科シュンギク *Glebionis coronaria* のことであり、東アジアでは葉茎を食用野菜として使用している。アラゲシュンギクの葉茎は、日本では食材としては使用されていないが、中国南方で食材として栽培、使用されている。Tonghaosu の薬理作用についての学術論文は見当たらないが、**1**、**2** ともにキク科カミツレ *Matricaria chamomilla* の花を原料にした化粧品に含まれている「美白成分」として特許が取得されている²⁵⁾。

生薬は天然由来医薬品であるためその品質におけるバラツキがあり、さらには同じ天然素材を原料とする食品と比較して高価となる一方で、一般人はその品質を正しく評価できないことから、偽物や粗悪品の流通を防ぎ、一定の品質を確保することが、薬学的に重要となる。今回、生薬キクカから初めて tonghaosu を単離したことから、キクカ市場品を複数ロット購入し、各サンプルに含まれる tonghaosu の含量と、そのエキスの PPAR γ アゴニスト活性を評価し、(E)-tonghaosu がキクカの品質を決定する指標成分として、あるいは薬効を決定する成分として使用できる可能性について検討した。

日本と台湾におけるキクカ市場品 13 種類を購入し、外部形態からそれらの基原植物を同定したのち、その乾燥粉末中に含まれる **1** の含量と、PPAR γ アゴニスト活性を評価した。その結果、**1** は *C. morifolium* 由来のキクカでは検出されず、*C. indicum* 由来のキクカ 9 サンプル中 6 サンプルにおいて 0.026~0.26 (w/w) % の割合で含まれていた。このことから、**1** は、*C. morifolium* では生合成されないことが推測され、キクカが粉末として得られて外部形態からその基原植物が同定できないときに **1** を検出することで少なくとも *C. indicum* 由来のキクカであると鑑別できる指標成分として利用できる可能性が推測された。キクカサンプル各エキスの PPAR γ アゴニスト活性は、*C. morifolium* 由来のキクカ 4 サンプル中 2 検体で 100 μ g/ml の濃度で有意な活性が認められなかったことから、*C. indicum* 由来のキクカのほうが *C. morifolium* 由来のキクカと比較して作用が強い傾向が推測された。しかし、**1** の含量とエキスの PPAR γ アゴニスト活性との間に相関関係は認められなかった。実際に、今回の *C. indicum* 由来のキクカエキスの水画分にも、10 μ g/ml の濃度で有意な PPAR γ アゴニスト活性が認められたことから、*C. indicum* 由来の **1** 以外にも PPAR γ アゴニスト活性を持つ化合物が十分に含まれている可能性が考えられた。また、**1** を含まない *C. morifolium* 由来

のキクカ4サンプル中2検体においてPPAR γ アゴニスト活性が認められたことから、*C. morifolium* 由来のサンプルにおいて **1** 以外に別の活性成分を含むことが強く示唆された。

そこで、*C. morifolium* 由来のキクカより、PPAR γ アゴニスト活性を持つ化合物の単離同定を目指した実験を行った結果、(-)-(E)-B-ring-homo-tonghaosu (**3**)と(±)-(Z)-B-ring-homo-tonghaosu (**4**)を単離、同定した。Tonghaosu の時とは異なり、B-ring-homo-tonghaosu では E 体、Z 体の両方とも濃度依存的に有意な PPAR γ アゴニスト活性を示したことから、tonghaosu の5員環が6員環に代わったことでPPAR γ リガンドとしての親和性が高まったことが推測された。E 体と Z 体との比較では、**3** は1.4 μ M の濃度でも、ピオグリタゾン 30 μ M とほぼ同じ活性を示していたのに対して、4.7 μ M の**4**では、有意差はあるものの、ピオグリタゾン 30 μ M と比べると活性はその5分の1程度しか示していなかった。**3**の用量反応曲線 (Fig. 19) から、最大効力は約1.4 μ M 以上で発現しており、**3**のEC₅₀値は0.14 μ M 付近と推定される。一方、**4**の用量反応曲線 (Fig. 19) では、最大効力は140 μ M よりも高い濃度で出現する可能性があり、EC₅₀値を求めることが出来ないが、140 μ M の濃度での活性の約50%の活性を示す濃度は14 μ M 付近であることから、EC₅₀値は14 μ M 以上であると推定される。このように推定されたEC₅₀値の比較から、tonghaosu の時と同様、B-ring-homo-tonghaosu は Z 体よりも E 体の方が高い活性を持つことが推測された。さらに、**3**はピオグリタゾンよりも強い活性を持つことが示唆され、PPAR γ アゴニストを創薬する際のリード化合物としての可能性が考えられた。

13種類のキクカ市場品に含まれる**2**、**3**と**4**を定量したところ、**2**は*C. morifolium* 由来のキクカには含まれていなかったことから、**1**とともに*C. indicum* 由来のキクカの鑑別に使用できる指標成分として利用できる可能性が推測された。また、**3**と**4**は、tonghaosu よりも含量は少ないものの、両種由来のキクカにも含まれていたことから、*Chrysanthemum* 属植物種に依存せずに生合成されている可能性が考えられた。また、各エキス中の**3**と**4**の含量とPPAR γ アゴニスト活性とは、**1**の時と同様、相関関係は認められなかった。今回の*C. morifolium* 由来のキクカの分画でも、画分Hex6や7に活性が認められ、またサンプルNo. 11のように*C. morifolium* 由来のキクカでも、**3**

と **4** を含まないサンプルもあったことから、まだ他に PPAR γ アゴニスト活性を持つ化合物が含まれていることが推測された。

Nishida らは、2018 年秋に "Kotobuki" とのブランド名を持つ *C. morifolium* 頭花のメタノールエキスにおける 3T3-L1 脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化誘導活性が、PPAR γ アンタゴニストである bisphenol A diglycidyl ether で打ち消されたこと、キクの頭花に含まれる既知成分であるフラボノイド配糖体 4 種をスクリーニングして、その活性成分として naringenin-7-*O*-glucoside を報告している²⁶⁾。本研究での *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキスの分画において、フラボノイド配糖体である naringenin-7-*O*-glucoside はブタノール画分へ移行していると推測される。Naringenin-7-*O*-glucoside は、3T3-L1 細胞に対して 100 μ M (= 43 μ g/ml) 以上の濃度で分化誘導活性を示していた²⁶⁾が、本研究での *C. morifolium* 由来キクカメタノールエキスのブタノール画分では、50 μ g/ml の濃度で有意な活性を示さなかった。このことから、naringenin-7-*O*-glucoside はキクカにおける含量が少なく、キクカ全体がもつ PPAR γ アゴニスト活性への寄与が少ないために、本研究ではキクカの活性成分として単離されなかったものと考えられた。

今回、キクカから得られた **1**、**2**、**4** はラセミ体であった一方で、**3** は光学活性を示した。**1** と **2** は互いに容易に変化することを確認している。これはまず水の付加によるスピロ環の開環に伴い生じたエノールが互変異性化を経て幾何異性体を生じ、さらに再度スピロ環を巻き直す際にラセミ化が起こると考えられた。一方、**3** と **4** については、**3** から **4** への異性化は **4** から **3** への異性化よりも起こりやすいことが確認された。さらにキクカ市場品において、**3** の含量が **4** よりも多いことを考慮すると、キク植物体内ではまず **3** が生合成され、**1** から **2** への異性化と同様に **3** から **4** が生じる際、ラセミ化も伴うため、結果として **4** はラセミ体として蓄積する可能性が考えられた。

結論

1. シマカンギク *C. indicum* 由来のキクカから PPAR γ アゴニスト活性成分として (*E*)-tonghaosu を、キク *C. morifolium* 由来のキクカから同活性成分として (*E*)-および(*Z*)-B-ring-homo-tonghaosu を単離同定した。
2. (*E*)-および(*Z*)-tonghaosu は、キクカの基原植物を推定するための指標成分として利用できる可能性が示唆された。
3. (-)-(*E*)-B-ring-homo-tonghaosu は、ピオグリタゾンよりも強い PPAR γ アゴニスト活性を持ち、PPAR γ アゴニストの創薬のためのリード化合物として利用できる可能性がある。

実験方法

【測定機器】

EIMS は JMS-SX102A (日本電子、東京)、ESITOFMS は JEOL JMS-T100LP AccuTOF LC-plus 4G (日本電子)、旋光度は JASCO P-2100 Polarimeter (日本分光、東京) を用いて分析した。NMR は Varian VNS500 (Agilent、Santa Clara、CA、USA) を用い、内部標準として残留している溶媒のシグナルを用いた。δ 値を ppm で示し、スピン結合定数は J 値 (Hz) で示した。開裂様式は s = singlet、d = doublet、t = triplet、m = multiplet、br = broad と略した。HPLC は、ポンプを PU-2080 Plus 型送液システム (日本分光)、検出器は MD-1510 型 UV 分光光度計検出器 (日本分光) を用いた。マイクロプレートリーダーは、ARVO MX 1420 multilabel counter (Perkin Elmer、Winter Street Waltham、MA、USA) を用いた。

【細胞培養】

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞の培養は、37°C、5% CO₂、95% air 条件下で行った。培地は 10% ウシ胎児血清 (FBS、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、penicillin-streptomycin mixed solution (ナカライテスク、京都)、を含む Dullbecco's Modified Eagle's medium (DMEM、ナカライテスク) を用いた。細胞が 9~10 割コンフルエントに達したところで、0.05% trypsin (Sigma-Aldrich)/0.02% EDTA-2Na を用いて継代を行った。

【PPAR γ アゴニスト活性の評価方法】

HEK293 細胞を 20 μ g/ml の poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングした 24 well プレートに 1.5×10^5 cell/well となるように播種し、10% FBS と 1% 抗生物質を含む培地で 24 時間培養した。別に FBS 25 ml に Cab-O-sil[®]M (Sigma) 0.5 g を加えて 4°C で一晩攪拌した後、0.45 μ m の滅菌用フィルターを通し、脱脂 FBS を調製した。PPAR γ response sequence を 5 回繰り返す配列を、pGL4.26 luciferase reporter vector (Promega、Madison、WI、USA) の HindIII サイトに挿入したレポータープラスミド pGL4.26 PPRE5 \times 48 を構築したものを、岩手医科大学薬学部医療薬科学講座衛生化学分野准教授の杉山晶規先生より供与していただいた。このプラスミドと

pCMV \oplus SPORT \oplus PPAR \oplus γ ベクター (Open Biosystems of Thermo Scientific、Waltham、MA、USA)、0.5 μ g ずつを、X \oplus tremeGENE transfection reagents (Roche Applied Science、Penzberg, Upper Bavaria、Germany) を用いたリポフェクション法により導入し、脱脂 FBS を 2% 含む DMEM 培地でさらに 24 時間培養した。その後、培地を吸引除去し、サンプルまたはピオグリタゾン (富士フィルム和光純薬、大阪) と脱脂 FBS を 10% 含む培地でさらに 24 時間インキュベートした。

その後、培地を吸引除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、0.15 M、pH 7.4) で洗浄後、lysis buffer (dithiothreitol 0.31 mg/ml、EDTA \cdot 2Na 0.81 mg/ml、10% glycerol、0.2% Triton X-100 を含む 0.2M リン酸緩衝液、pH 7.5) を 100 μ l を加え、細胞を溶解した。溶解液を遠心 (6,000 x g、2 分間) し、上清を 30 μ l を 96 well 白色プレートに移し、ルシフェラーゼ発光試薬 (コエンザイム A 三リチウム (オリエンタル酵母、東京) 86 μ g/ml、ATP \cdot Mg (オリエンタル酵母) 1.01 mg/ml、glycylglycine (ペプチド研究所、大阪) 3.3 mg/ml、EGTA 1.52 mg/ml、dithiothreitol 154 μ g/ml、lucifelin \cdot K (富士フィルム和光純薬) 24 μ g/ml を含む 15 mM リン酸緩衝液、pH 8.0) を 45 μ l 添加し、5 分後の発光量をマイクロプレートリーダーで測定した。

【キクカ】

Table 1 にある 13 種類のキクカを、栃本天海堂 (大阪)、福田竜 (大阪)、前忠 (奈良)、大晃生薬 (名古屋)、順天堂 (台北、台湾)、銀豊貿易 (上海、中国) から入手した。いずれのサンプルも第 17 改正日本薬局方に適合する商品である。

【*C. indicum* 由来キクカメタノールエキスの調製及び分画】

No. 13 のキクカ 148 g を粉末とし、1.5 l のメタノールで室温で一晩攪拌しながら抽出した。ろ過後、残渣を再度メタノールで抽出操作を 2 回繰り返す、全ろ液を合わせ、減圧留去後、凍結乾燥し、36.5 g のエキスを得た。このうち 36 g を水に懸濁し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、水飽和 *n*-ブタノールで、順次分液し、ヘキサン画分 (5.7 g)、酢酸エチル画分 (8.6 g)、ブタノール画分 (8.0 g) および水画分 (14.0 g) に分画した。

ヘキサン画分 100 mg を分取シリカゲル薄層クロマトグラフィー (2 mm、20 cm \times 20 cm、Merck Millipore、Billerica、MA、USA) にスポットし、*n*-ヘキサン：酢酸エチル (9:1) で展開、UV 吸収のパターンから、フラクション A から P まで分けた。別に、ヘキサン画分 (5.5 g) から、*n*-ヘキサン：酢酸エチル (9:1) で展開した TLC において *R_f* 値

0.33 を指標にしたシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-300E、富士フイルム和光純薬、35 mm × 350 mm、*n*-ヘキサン : 酢酸エチル 9:1) に供し、画分 F (0.24 g) を得た。さらに、画分 F をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (20 mm × 400 mm、クロロホルム) に供し、画分 F1~F14 を得た。F3 (10 mg) を分取 HPLC (Cosmosil 5C18ARII、10 mm × 150 mm、ナカライ、50%アセトニトリル、2 ml/min) で分画し、F3-1 (15 min、1.0 mg)、F3-2 (21 min、1.0 mg)、F3-3 (27 min、1.4 mg) を得た。¹H および ¹³C NMR の結果から、F3-3、F3-2 は比較的純度が高かったことから、それぞれ化合物 **1**、**2** として、構造解析した。

Compound **1**: colorless amorphous solid; $[\alpha]_D^{22}$ 0.1 (*c* 0.6, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃, 500MHz) 6.69 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, dd, *J* = 6.0, 2.0 Hz, H-9), 4.93 (1H, brs, H-6), 4.18 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 3.0 Hz, H-13a), 3.99 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 8.0 Hz, H-13b), 2.24 (1H, m, H-12a), 2.15 (1H, m, H-11a), 2.07 (1H, m, H-12b), 2.05 (1H, m, H-11b), 1.98 (3H, d, *J* = 1.0 Hz, H-1); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) 168.8 (C-7), 135.7 (C-9), 126.0 (C-8), 120.8 (C-10), 79.9 (C-6), 79.7 (C-2), 76.3 (C-4), 71.5 (C-5), 69.7 (C-13), 64.9 (C-3), 35.5 (C-11), 24.5 (C-12), 4.7 (C-1). EIMS *m/z* 200 [M]⁺; HREIMS *m/z* 200.0844 (M; calcd for C₁₃H₁₂O₂, 200.0837).

Compound **2**: colorless amorphous solid; $[\alpha]_D^{20}$ -1.4 (*c* 0.4, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃, 500MHz) 6.23 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-8), 6.15 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-9), 4.60 (1H, brs, H-6), 4.24 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 4.0 Hz, H-13a), 3.99 (1H, ddd, *J* = 8.0, 8.0, 8.0 Hz, H-13b), 2.33 (1H, m, H-12a), 2.23 (1H, m, H-11a), 2.06 (1H, m, H-12b), 2.05 (1H, m, H-11b), 1.99 (3H, brs, H-1); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) 167.1 (C-7), 135.2 (C-9), 127.5 (C-8), 121.0 (C-10), 80.6 (C-2), 78.9 (C-4), 78.8 (C-6), 70.7 (C-5), 69.7 (C-13), 65.2 (C-3), 35.6 (C-11), 24.5 (C-12), 4.8 (C-1). EIMS *m/z* 200 [M]⁺; HREIMS *m/z* 200.0828 (M; calcd for C₁₃H₁₂O₂, 200.0837).

以上のデータから、それらは tonghaosu の異性体で、F3-3 が (*E*)-tonghaosu (**1**)、F3-2 が (*Z*)-tonghaosu (**2**) であった^{5,6)}。

【*C. morifonium* 由来キクカメタノールエキスの調製及び分画】

No. 2 のキクカ 800 g を粉末とし、1.5 l のメタノールで室温で一晩攪拌しながら抽出した。ろ過後、残渣を再度メタノールで抽出操作を 2 回繰り返す、全ろ液を合わせ、減圧留去後、凍結乾燥し、354 g のエキスを得た。これを水に懸濁し、*n*-ヘキサン、

酢酸エチル、水飽和 *n*-ブタノールで、順次分液し、ヘキサン画分 (67 g)、酢酸エチル画分 (15 g)、ブタノール画分 (24 g) および水画分 (157 g) に分画した。

ヘキサン画分 7.0 g をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (20 mm × 200 mm、ヘキサン：酢酸エチル 8:2) に供し、画分 Hex1~7 (それぞれ 393、286、127、138、156、339 mg、1.25 g) を得た。Hex2 50 mg をシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー (20 mm × 200 mm、ヘキサン：酢酸エチル 8:2) に供し、画分 H2-1~5 (それぞれ 1.5、4.7、24、20、7.4 mg) を得た。画分 H2-2 の量が少なかったため、再度 Hex2 画分 200 mg から H2-2 を 85 mg 得て、分取 HPLC (Cosmosil 5C18ARII, 10 mm × 150 mm, 50%アセトニトリル, 2 ml/min) で分画し、H2-2-1 (2.1 mg)、H2-2-2 (2.1 mg)、H2-2-3 (1.4 mg) を得た。それらのうち、H2-2-3 と H2-2-1 は、NMR 解析の結果、比較的純度が高かったため、そのまま化合物 **3** および **4** として構造解析した。

Compound **3**: colorless amorphous solid; $[\alpha]_D^{20} -45$ (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (C₆D₆, 500MHz) 6.45 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-8), 5.70 (1H, dd, *J* = 5.5, 1.5 Hz, H-9), 5.13 (1H, brs, H-6), 3.80 (1H, ddd, *J* = 11.5, 11.5, 2.5 Hz, H-14a), 3.54 (1H, brd, *J* = 11.5 Hz, H-14b), 1.66 (1H, m), 1.43 (3H, d, 1.0 Hz, H-1), 1.21-1.38 (4H), 1.06 (1H, m); ¹³C-NMR (C₆D₆, 125 MHz) 170.5 (C-7), 139.0 (C-9), 124.8 (C-8), 113.0 (C-10), 80.1 (C-6), 79.7 (C-2), 77.6 (C-4), 72.3 (C-5), 66.2 (C-3), 63.9 (C-14), 32.6 (C-11), 24.5 (C-13), 19.4 (C-12), 4.1 (C-1). ESITOFMS *m/z* 237 [M+Na]⁺; HRESITOFMS *m/z* 237.0891 ([M+Na]⁺; calcd for C₁₄H₁₄O₂Na, 237.0892).

Compound **4**: colorless amorphous solid; $[\alpha]_D^{20} -1.2$ (*c* 1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (C₆D₆, 500MHz) 5.68 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-8), 5.50 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H-9), 4.47 (1H, brs, H-6), 3.94 (1H, ddd, *J* = 11.3, 11.3, 2.5 Hz, H-14a), 3.53 (1H, brd, *J* = 11.3 Hz, H-14b), 1.80 (1H, m), 1.37 (3H, d, 0.8 Hz, H-1), 1.24-1.36 (4H), 1.04 (1H, m); ¹³C-NMR (C₆D₆, 125 MHz) 168.6 (C-7), 138.2 (C-9), 126.3 (C-8), 113.1 (C-10), 80.7 (C-2), 79.9 (C-4), 79.2 (C-6), 71.7 (C-5), 66.5 (C-3), 63.9 (C-14), 32.7 (C-11), 24.6 (C-13), 19.2 (C-12), 4.1 (C-1). ESITOFMS *m/z* 237 [M+Na]⁺; HRESITOFMS *m/z* 237.0888 ([M+Na]⁺; calcd for C₁₄H₁₄O₂Na, 237.0892).

以上のデータから、それらは B-ring-homo-tonghaosu の異性体で、H2-2-3 が (-)-(E)-B-ring-homo-tonghaosu (**3**)、H2-2-1 が (±)-(Z)-B-ring-homo-tonghaosu (**4**) (**2**) であった^{7,8)}。

【各種キクカメタノールエキスの調製および **1**、**2** の定量】

各キクカサンプルを粉末とし、各サンプル1種につき5.0 g ずつ3検体、100 ml のメタノールで室温で30分間、超音波処理することにより抽出した。ろ過後、残渣を再度メタノールで抽出操作を2回繰り返す、全ろ液を合わせ、減圧留去後、凍結乾燥し、各エキスを得た。各エキス(50 µg)、化合物1~4(各20 ng, 0.10, 0.50, and 1.0 µg)を以下の条件のHPLCにより分析した：カラム Cosmosil 5C18-AR-II, 4.6 × 150 mm、ナカライ；移動相 50% アセトニトリル；流速 1.0 ml/min；溶出時間 2 (8.3 min)、1 (10.9 min)、4 (13.1 min)、3 (21.4 min)；検出 317 nm. 各化合物量によるピーク面積を最小二乗法による回帰直線を用いた絶対検量線法により、各サンプル中の各化合物の含量を定量した。データは元のキクカサンプル中の (w/w) %で表記した。

【統計処理】

統計処理は、一元配置分散分析 (ANOVA) と多重比較検定としてボンフェローニータネットの多重検定を採用した。危険率 5%未満を統計学的に有意とした。

引用文献

- 1) 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団. 第十七改正 日本薬局方. じほう、東京 (2016).
- 2) 国家药典委員会. 中华人民共和国药典(2015 年版). 中国医药科技出版社、北京 (2015).
- 3) Christensen P, El-Houri B, Development of an in vitro screening platform for the identification of partial PPAR γ agonists as a source for antidiabetic lead compounds. *Molecules*. 23, E2431 (2018).
- 4) Yamamoto J, Yamane T, Oishi Y, Shimizu M, Tadaishi M, Kobayashi-Hattori K. Chrysanthemum promotes adipocyte differentiation, adiponectin secretion and glucose uptake. *Am. J. Chin. Med.* 43: 255–267 (2015).
- 5) Martínez V, Barberá O, Sánchez-Parareda J, Alberto Marco J. Phenolic and acetylenic metabolites from *Artemisia assoana*. *Phytochem.* 26: 2619–2624 (1987).
- 6) 吴照华, 王军, 李金翠, 徐永珍, 于爱军, 冯祖儒, 沈钧, 吴毓林, 郭培福, 王延军. 茼蒿精油的拒食活性和化学组分. *天然产物研究与开发*. 6: 1–4 (1994).
- 7) Chen L, Yin B, Xu HH, Chiu MH, Wu YL, Study on tonghaosu and its analogs: Isolation, structure identification and synthesis of antifeedant B-ring-homo-tonghaosu. *Chin. J. Chem.* 22, 92–99 (2004).
- 8) Miyakoshi N, Aburano D, Mukai C, Total syntheses of naturally occurring diacetylenic spiroacetal enol ethers. *J. Org. Chem.* 70: 6045–6052 (2005).
- 9) Luyen BT, Tai BH, Thao NP, Cha JY, Lee HY, Lee YM, Kim YH. Anti-inflammatory components of *Chrysanthemum indicum* flowers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 266–269 (2015).
- 10) Yang WS, Kim D, Yi YS, Kim JH, Jeong HY, Hwang K, et al. AKT-targeted anti-inflammatory activity of the methanol extract of *Chrysanthemum indicum* var. *albescens*. *J. Ethnopharmacol* 201, 82-90 (2017).
- 11) Jeong SC, Kim SM, Jeong YT, Song CH. Hepatoprotective effect of water extract from *Chrysanthemum indicum* L. flower. *Chin. Med.* 8: 7 (2013).
- 12) Chen YF, Zhao MH, Yan M, Shi GB, Hou GX, Huang Y, Wang X, Zhao QC. Analgesic activity of the aqueous fraction from the ethanolic extract of *Chrysanthemum indicum* in mice. *Die Pharmazie* 66: 538–542 (2011).
- 13) Sun S, Jiang P, Su W, Xiang Y, Li J, Zeng L, Yang S. Wild chrysanthemum extract prevents UVB radiation-induced acute cell death and photoaging. *Cytotechnology* 68: 229-240 (2014).
- 14) Park S, Lee JB, Kang S. Topical Application of *Chrysanthemum indicum* L. Attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions by suppressing serum IgE levels, IFN- γ , and IL-4 in Nc/Nga Mice. *Evid. Complement. Alternat. Med.* 2012: 821967 (2012).

- 15) Kim SJ, Myung NY, Shin BG, Lee JH, So HS, Park RK, Um JY, Hong SH. Protective effect of a *Chrysanthemum indicum* containing formulation in cadmium-induced ototoxicity. *Am. J. Chin. Med.* 39: 587–600 (2011).
- 16) Kim TW, Kim YJ, Park SR, Seo CS, Ha H, Shin HK, Jung JY. *Chrysanthemum indicum* attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity both in vivo and in vitro. *Nat. Prod. Commun.* 10: 397-402 (2015).
- 17) Cha JY, Nepali S, Lee HY, Hwang SW, Choi SY, Yeon JM, Song BJ, Kim DK, Lee YM. *Chrysanthemum indicum* L. ethanol extract reduces high-fat diet-induced obesity in mice. *Exp. Ther. Med.* 15: 5070-5076 (2018).
- 18) Nepali S, Cha JY, Ki HH, Lee HY, Kim YH, Kim DK, Song BJ, Lee YM. *Chrysanthemum indicum* inhibits adipogenesis and activates the ampk pathway in high-fat-diet-induced obese mice. *Am. J. Chin. Med.* 46: 119–136 (2018).
- 19) Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K, Tamura T. Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochem.* 43: 1255-1260 (1996).
- 20) Lee JS, Kim HJ, Lee YS. A new anti-HIV flavonoid glucuronide from *Chrysanthemum morifolium*. *Planta Med.* 69: 859-861 (2003).
- 21) Zheng C, Dong Q, Du Z, Wang P, Ding K. Structural elucidation of a polysaccharide from *Chrysanthemum morifolium* flowers with anti-angiogenic activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 79: 674-680 (2015).
- 22) Gui M, Du J, Guo J, Xiao B, Yang W, Li M. Aqueous Extract of *Chrysanthemum morifolium* (Ju Hua) Enhances the antimelanogenic and antioxidative activities of the mixture of soy peptide and collagen peptide. *J. Tradit. Complement. Med.* 4: 171-176 (2014).
- 23) Yamamoto J, Tadaishi M, Yamane T, Oishi Y, Shimizu M, Kobayashi-Hattori K. Hot water extracts of edible *Chrysanthemum morifolium* Ramat. exert antidiabetic effects in obese diabetic KK-A(y) mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79: 1147-1154 (2015).
- 24) 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 科学出版社、北京 (2004).
- 25) 日本国特許庁. 公開特許公報 特開 2004-51611 (2004).
- 26) Nishina A, Sato D, Yamamoto J, Kobayashi-Hattori K, Hirai Y, Kimura H. Antidiabetic-like effects of naringenin-7-*O*-glucoside from edible *Chrysanthemum* "kotobuki" and naringenin by activation of the PI3K/Akt pathway and PPAR γ . *Chem. Biodivers.* (in press). Doi: doi: 10.1002/cbdv.201800434

謝辞

本研究を遂行するにあたり、幾多の有益な御助言、ご指導を賜りました、本学大学院薬学研究科生薬学分野 石内 勘一郎 講師と、神経薬理学分野 大澤 匡弘 准教授に深く感謝いたします。

PPAR γ アゴニスト活性評価のためのプラスミドを分与いただきました、岩手医科大学薬学部 杉山 晶規 准教授に感謝いたします。

PPAR γ アゴニスト活性を評価するにあたり、幾多の有益な御助言を賜りました本学大学院薬学研究科神経薬理学分野 岩城 杏奈 学士に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、幾多の有益な御助言を賜りました本学大学院薬学研究科生薬学分野 寺坂 和祥 講師に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、様々な御助言、御討論、御協力をして頂戴しました本学大学院薬学研究科生薬学分野の皆様には深く感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、終始詳細な御助言、御指導をして頂きました本学大学院薬学研究科生薬学分野 牧野 利明 教授に心より感謝いたします。