

信州大学審査学位論文

「抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジン オリゴマーに関する研究」

KAWAHARA SEIICHI

令和2年3月

信州大学大学院総合工学系研究科
専攻 生物・食料科学
学籍番号 14ST502D
氏名 河原 誠一

目次

略語表	3
第1章 序論	4
1-1 研究の背景	5
1-2 ポリフェノール研究の背景	7
1-3 研究の目的	12
第2章 実験	15
2-1 抽出及び分画	16
2-1-1 ブドウ梗由来抽出物（抽出物A、GSE）の調製および分画	16
2-1-2 その他ブドウの皮、種、枝からの抽出及び分画	20
2-1-3 アズキの flavan-3-ols oligomer の分画	21
2-2 ヒト前立腺癌細胞へのプロアントシアニジンオリゴマー含有粗精製物添加試験	23
2-2-1 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培養	23
2-2-2 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 へのブドウ梗抽出物添加試験	23
2-2-3 FABP5 遺伝子発現抑制試験（ブドウの皮、種、枝）	29
2-2-4 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 への小豆抽出物添加試験	30
2-3 動物へのプロアントシアニジンオリゴマー含有粗精製物投与試験	31
2-3-1 ラットにおける単回経口投与毒性試験	31
2-3-2 細菌を用いる復帰突然変異試験	31
2-3-3 担癌マウスへのブドウ梗抽出物の混餌投与試験	32
2-3-4 蛍光標識担癌マウスへの小豆抽出物経口投与試験	40
2-4 活性分子の精製と同定	41
2-5 Flavan-3-ols 高重合体画分の酸加水分解反応	42
2-6 実験に使用した機器および分析条件	42
第3章 結果	46
3-0 ブドウ梗由来抽出物の研究のきっかけとなる実験	47
3-1 ブドウの分画と生理活性	50
3-1-1 ブドウ梗由来抽出物の分画と細胞試験	50

3-1-2 動物へのブドウ梗由来抽出物投与試験	60
3-1-3 ブドウ梗由来抽出物の活性成分の精製と同定	65
3-1-4 ブドウの品種違い、梗以外の部位による FABP5 発現活性抑制の確認	85
3-2 小豆の分画と生理活性	88
3-2-1 小豆抽出物の分画と細胞試験	88
3-2-2 蛍光標識担癌マウスへの小豆抽出物経口投与試験	95
3-2-3 小豆抽出物の活性成分の精製と同定	97
3-3 Flavan-3-ols 高重合体画分の酸加水分解反応	104
 第4章 考察	105
4-1 ポリフェノール化合物の分離精製方法の開発	106
4-2 プロアントシアニジンオリゴマーの単離および分析	110
4-3 プロアントシアニジンオリゴマーの生理活性と立体化学	118
4-4 プロアントシアニジンオリゴマーの体内動態についての課題	122
結論	125
Summary	126
 引用・参考文献	127
 謝辞	135

略語表

AcOEt	ethyl acetate �酢酸エチル
APG	angiosperm Phylogeny Group 植物分類体系
CSTHWXM	ブドウシステム熱水抽出物を XAD 処理したメタノール画分濃縮物
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	electrospray ionization
EGCG	epigallocatechin gallate
EtOH	ethanol エタノール
FABP	fatty acid-binding protein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSE	grape stem extract
GFP	green fluorescent protein
HPLC	high performance liquid chromatography
INRA	フランス国立農学研究所 (France National Institute for Agricultural Research)
IL	Interleukin
LC/MS	liquid chromatography/mass spectrometry
MeOH	methanol メタノール
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
MTT	3-(4, 5-di-methylthiazol-2-yl)-2, diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazol
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PC-3M	ヒト前立腺癌細胞
PDA	photo diode array
RTPCR	real time PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
STAT	シグナル伝達性転写因子 (signal transducer and activator of transcription)
TLC	thin layer chromatography
TOF	time-of-flight
XAD	デュポン社の登録商標 Amberlite XAD-

第1章 序論

1-1 研究の背景

平成 23 年の総務省の統計によると食品の廃棄は年間 1,900 万 t 排出されている。一方、加工食品を製造する際の農作物の食に適さない部分(非食部)の廃棄も 1,400 万 t となっている。農業あるいは加工食品会社の盛んな長野県においても排出量が多い。

長野県は近年、温暖化の影響からワイン用ブドウの産地に適してきたおり、栽培者、醸造者の増加、県の施策としてワインの産地として広がりつつある。国税庁の調べによるテーブルワインと甘味葡萄酒消費量の推移を見ると、1975 年からテーブルワインが逆転している。高度成長によってもたらされたライフスタイルにこの酒が登場する機会がなくなってしまったと言える。国内では甘味葡萄酒の品種を栽培し続けており、香りを主張し過ぎる品種では食事と合わない。そこで、麻井は、赤ぶどうとしてメルロ、白ぶどうとしてシャルドネを塩尻で導入した。タイミングよく、1999 年にはフレンチパラドックスにより赤ワインブームになった。現在、ワインがブームだけに終わらない状況となりつつある¹⁾。

日本国内のワイン使用原料の生産量はおよそ 22,000 t (平成 29 年 11 月国税庁調べ) であり、ブドウの搾汁残渣は 5,500 t 程度 (搾汁率 25% で計算) と推察される。ただ、残渣の利活用は小規模で肥料、畜産業の餌として僅かに利用されているだけである。世界的に見ると残渣の利用は様々であり、酒石酸の回収、グレープシードオイルの搾油など大量生産だからできることである。

一方、ブドウに多く含まれるポリフェノールに注目した健康食品素材も主要というわけではないが、存在する。健康志向という意味で疫学的には確かに効果があり^{2, 3)}、世界的なニーズはあるもののなかなか産業として成り立っていないのが現状である。ポリフェノールという切り口ではかなり多くの研究がなされている分野であるが決定的というべき大きな解明がなされていない。このことも健康食品などの利用がそれほど広がっていない理由の一つであると考えられる。

本研究ではブドウ残渣の利活用として健康長寿を目指している。一方、国内の食生活が欧米化していることで、前立腺癌や乳がんの患癌率が増加していることが統計的にわかっている（国立研究開発法人 国立がん研究センターHP の統計資料）。そこで、前立腺癌細胞の抗腫瘍活性および悪性化した、すなわち転移能を獲得した癌細胞で高発現している遺伝子 FABP5(fatty acid binding protein 5)の発現抑制活性を指標として研究を進めた。FABP5 遺伝子は水に不溶な多価不飽和脂肪酸と結合し、可溶化、伝達の役割がある。構造は helix-turn-helix と 10 本の β -バレル構造からなる分子量 14~15 kDa のタンパク質である（図 1）。FABP ファミリーには 9 種のアイソフォームがあり組織特異的に発現するが機能の詳細は明らかになっていない。

Fatty acid-binding protein : FABP

- 14-15 kDa intracellular low molecular protein.
- FABPs are involved in the uptake and transport of fatty acids.
- FABPs family share a remarkably similar three-dimensional structure comprised of a helix-turn-helix and ten β -sheets that form a ligand binding pocket.
- Human FABPs form a group of nine distinct protein types (FABP1-9).



Crystal structure of palmitic acid-bound FABP5

悪性化したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 に FABP5 遺伝子は高発現している。転移能と密接に関係している。

図 1 パルミチン酸と結合した FABP5 の結晶構造

本研究で用いるブドウの残渣はシャルドネという白ワイン用品種である。世界で最も親しまれているテーブルワインで用いられ、シャンパーニュ地方、バーガンディー地域で栽培され、いわゆるシャンパンやシャブリの品種である。また、ピノノアールの突然変異と言っていたが最近、単独の品種であることがわかっている⁴⁾。植物分類学的位置づけを図2に示す⁵⁾。

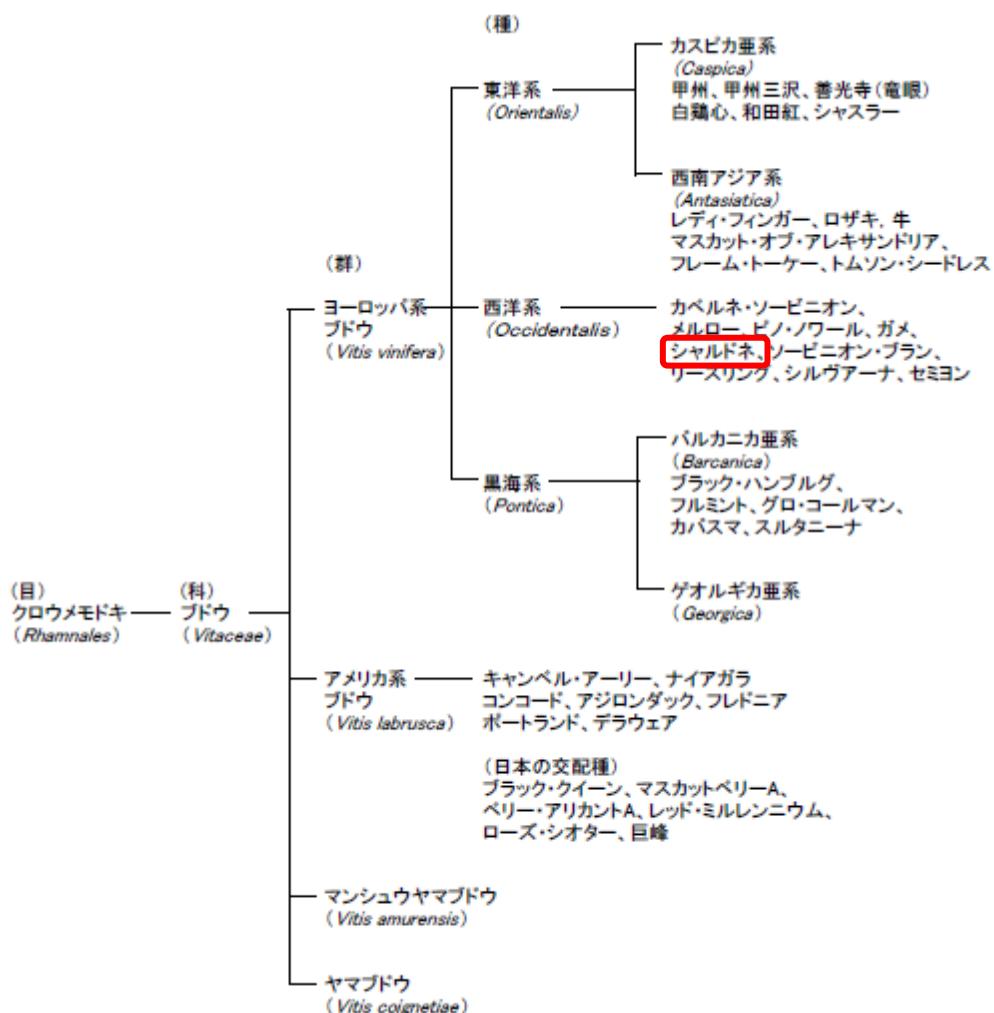


図2 シャルドネの植物分類学的位置づけ

(ワイン造りのはなし 栽培と醸造 (はなしシリーズ) 関根彰 著
(1999年) 技報同出版) から引用

一方、ブドウ果実自身のライフサイクルは、ブドウ果実の適熟に伴い、成長期から熟成期に入る。このタイミングをVeraisonという。種子形成が完了し、栄

養の流れが種子から果肉形成に切り替わり、ぶどう顆粒内ではアミノ酸の蓄積、香味成分の合成が始まる。種子のタンニン含量も未熟期に比べて減少し、収斂味もなくなる。果皮のタンニン量は増加するが味としては丸みをおびる。

1-2 ポリフェノール研究の背景

ポリフェノールの分類と化学構造

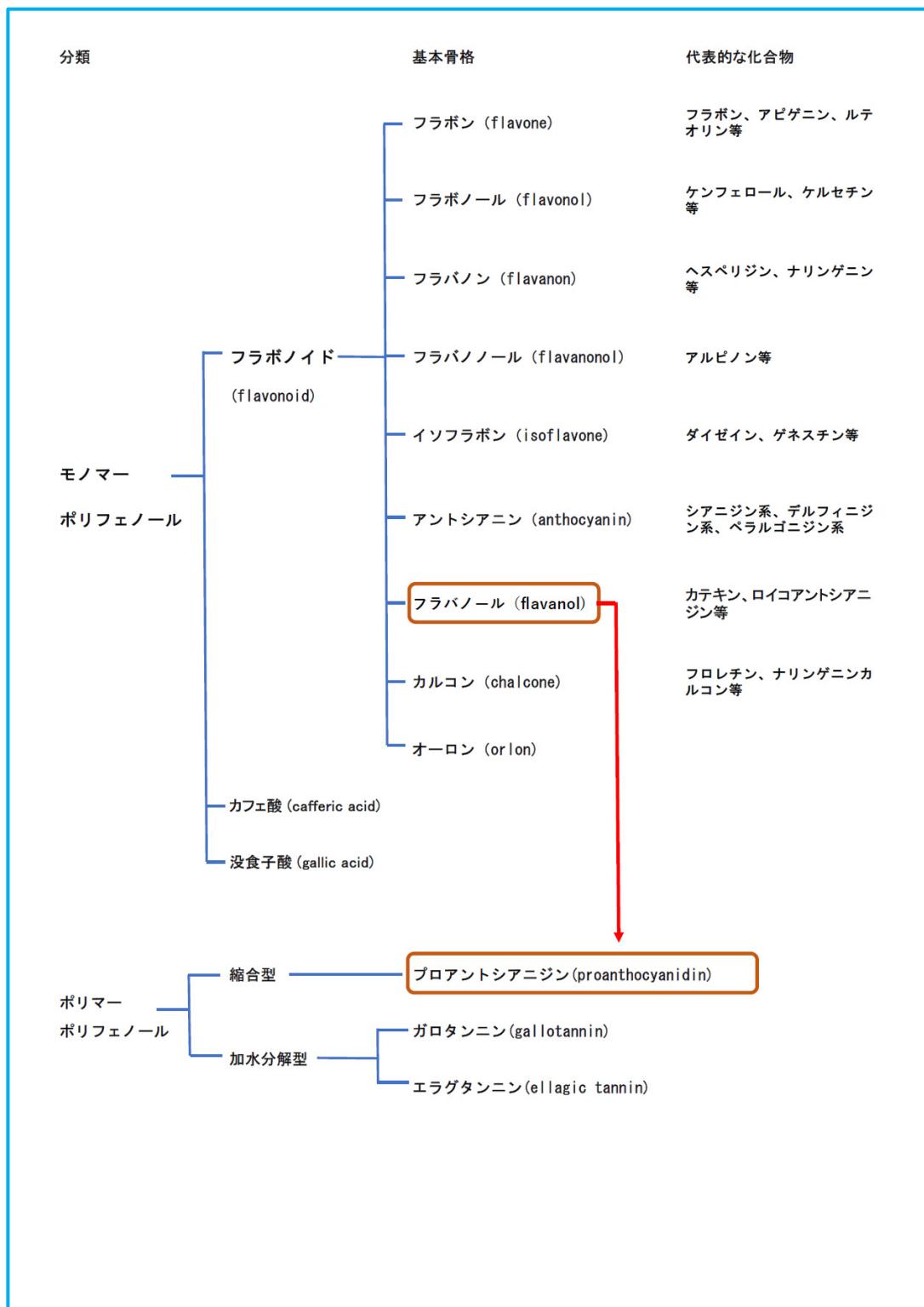
ポリフェノールは植物に含まれる 2 次代謝産物で、植物にとっては防御的役割が多い。ポリフェノールとはベンゼン環に複数の水酸基が結合した化合物の総称である。天然物としてのポリフェノールはフラボノイド類、カフェ酸などのモノマーから本研究のテーマでもある C-C bond の縮合型タンニンであるプロアントシアニジンのようなポリマーも含まれる。

基本骨格によるポリフェノールの分類とプロアントシアニジンの位置づけを表 1 に示す。

本論文での定義

定義によるとプロアントシアニジンというだけで flavan-3-ol の重合体を意味するが、本研究では 2 量体や 3 量体ではなくそれ以上の重合体であるという意味でオリゴマーという。また、基本構造は flavan-3-ol であるため、重合体を flavan-3-ols oligomer あるいは重合体と呼ぶことがある。

表1 ポリフェノールの分類



(1) ポリフェノールの機能

Nakamura ら⁶⁾は果実や野菜の食品残渣に注目し、30 もの残渣の抽出方法を検討し、ブドウの種や未熟なプルーン、そばがらに顕著な抗酸化活性があることを見出しており、このような残渣が医薬品や食品産業に利用できるようになれば経済、環境への貢献が出来ると述べている。

Whelton らは、果実や野菜を多く摂取する人は心血管疾患が抑えられるという疫学データを報告している。特に果実にその効果があると考えられている²⁾。ポリフェノールという大きな括りでの機能は多岐にわたる。

(2) Flavan-3-ol の機能

Flavan-3-ol 類では epigallocatechin gallate (EGCG) がよく知られている。食品に含まれるケルセチンが EGCG の存在により前立腺がんの幹細胞に対する阻害、侵入、転移、腸間膜移動の相乗的に阻害することができる事が報告されている⁷⁾。

(3) Flavan-3-ol oligomer の機能

Flavan-3-ol のオリゴマーに特定した機能の報告例は少ない。カカオから精製したエピカテキンの 5 量体以上の重合物が乳がんの細胞増殖を阻害、細胞周期の G₀/G₁ 期を停止させると Kozikowski らは報告している⁸⁾。さらに TiCl₄ を用いて合成した標準品でも同様の効果を確認している⁸⁾。また、Shoji らはリンゴの Procyanidin 3~5 量体を含むフラクションが B16 マウスマラノーマ細胞のメラニン生成抑制、5 量体以上の高重合体を含むフラクションにアポトーシスを誘導する強い抗腫瘍活性を見出している^{9, 10)}。

(4) ブドウ成分の機能

ブドウやワインは非常に注目されており、リンゴや茶、カカオとならんで多くのポリフェノールの研究論文がある。また、ブドウの抽出部位も様々で、皮や種、葉、枝、梗（ステム）と様々である。皮や種、ワインに関する論文は多い。

ブドウの種の抽出物の gallic acid、catechin、epicatechin、それらのオリゴマー、gallic acid のエステル類を含んだ高分子タンニンにはヒト前立腺癌細胞株 DU145 のアポトーシス活性があり、抽出物中の最も活性の高いフラクションには procyanidin B2-3, 3'-di-0-gallate が含まれることが報告されている¹¹⁾。

ブドウのアントシアニンは熟成に深く関わっており、その生合成は気象、天候によって左右される。ポリフェノールの 65% は種にあるが、22% は梗にあり、皮より多い。加工原料としてのブドウの梗は廃棄される。一般的には残渣のポリ

ュームは搾汁率の関係から皮や種がほとんどを占めるように思われるが、ワイナリーでは除梗破碎機を用いるため、梗が皮や種と区別して得られることは実際に携わった者以外あまり意識されていない。ポリフェノール含量が比較的多いにも関わらず、梗の研究が少ないのでこのような理由も一つとして考えられる。

INRA の Michel Mountounet らはブドウ梗のフェノール性化合物に注目し、これらの化合物が皮と種の媒介している位置づけにして、それぞれの定性的分析、赤ブドウ、白ブドウの比較、品種の比較を行ったが、赤、白、品種の違いによる差はほとんどないこと、特に quercetin 3-glucoside が多く、astilbin (dihydroquercetin 3-rhamnoside) が主要成分であると述べている¹²⁾。

ギリシャ産 *Vitis vinifera* 種のステムの塩酸酸性含水メタノール抽出物にはポリフェノールが多く含まれており、乳がん (MCF-7 and MDA-MB-23)、大腸がん (HT29)、腎臓がん (786-0 and Caki-1)、甲状腺がん (K1) の細胞に 72 時間暴露したところ、細胞周期を阻害し、この抽出物の IC₅₀ は 120～400 µg/mL であった¹³⁾。

Vitis amurensis の根やステムは韓国や日本でがんや様々な疾患の処置として伝統的な薬として用いられてきた。この研究¹⁴⁾ では葉とステムのメタノール抽出物に神経毒性を有する Amyloid β protein(25-35) を阻害する効果があり、amurensin G, γ-2-viniferin, trans-ε-viniferin といった resveratrol のオリゴマーが分離されている¹⁴⁾。フランスのボルドー大学 Waffo-Teguo ら¹⁵⁾ も *Vitis vinifera* (Chardonnay) のステムから同様の Aβ 凝集阻害活性物質として (E)-resveratrol、(+)-ampelopsin A、(+)-ε-(E)-viniferin、(E)-piceatannol、(E)-vitisin C を単離している。

ステムには抗酸化物質として主に stilbenoid、flavon-3-ol の配糖体、flavan-3-ol のオリゴマーが含まれているという文献が数例あるだけである¹⁶⁻¹⁸⁾。

(5) ブドウの葉について

ヨーロッパでは伝統薬としてハーブを用いるが、ブドウの葉もその一つである。赤ブドウ葉エキスは経口摂取により下肢のむくみ軽減に効くとされる¹⁹⁻²¹⁾。この研究は FRUTAROM Switzerland 社のブドウ葉乾燥エキス製剤の評価を行ったもので詳細な抽出条件は明らかにされていない。

(6) ブドウの flavan-3-ol oligomer の機能

ブドウは世界中で栽培され、アルコール飲料であるワインは古くから醸造されてきた。搾りかすは多くの機能が残っていると一般的にも考えられるためその利用を考える研究者は多く、古くから検討してきた。黒（赤）ブドウが原種

であり、変異種として白ブドウがある。赤、白それぞれ特徴的なフラボノイドが含まれているがいずれもプロアントシアニジンオリゴマーを多く含む²²⁾。Corder らは赤ワインが心臓病の原因となる血管内表面の endothelin-1 (ET-1) の合成を抑制し、その中には procyanidin trimer gallate, procyanidin tetramer, procyanidin pentamer gallate が含まれていることを解明している^{23, 24)}。

(7) 小豆ポリフェノールの機能（マメ科植物のポリフェノール）

プロシアニジンオリゴマーに活性があることから、植物の代謝経路として植物に普遍的な物質であると考えられた。そこで、国内の植物で調査を進めたところ、小豆に多くのプロアントシアニジンが含まれており、ヒトの健康に関する情報が得られていることがわかった。小豆 *Vigna angularis* はマメ科 (Fabaceae) のササゲ属 (vigna) である。日本での小豆の歴史は縄文時代から古墳時代前期に遺跡から炭化種子が発見され、奈良時代初期の「古事記」に初めてその名が登場し、古来、人々の生活と密接にかかわっている。国内の主な産地は北海道で、江戸時代の砂糖とともに和菓子に用いられるようになってきた。今も日本人に親しまれている。小豆は「しょうず」と呼ばれていたが江戸時代に赤色を意味する小豆は溶けるという意味で他のマメに比べ早く柔らかくなることからアズキと呼ばれるようになった（公益財団法人日本豆類協会 HP より引用）。

小豆は高タンパク低脂質であり、無機質やビタミン、ミネラル、食物繊維等を多く含む栄養価の高い食品として幅広い世代に食されている。

赤小豆（小豆及びしま蔓小豆）抽出物として特定の構造を有する化合物が IL-6 によって誘導される STAT3 の転写活性抑制効果を有することが開示されており、炎症性疾患、自己免疫疾患、がん疾患等の TLR 及び IL-6 媒介性疾患の予防または治療に有用であることが報告されている²⁵⁾。

また、小豆の熱水抽出物がラットの好塩基球性白血病細胞に抗原刺激による脱顆粒を抑制し、マウスにおける受動皮膚アナフィラキシー反応も抑制したことが開示されている²⁶⁾。

さらに、ハッショウ豆、紫花豆、小豆等の豆科植物の抽出物が免疫機能増強活性や癌細胞に対するアポトーシス誘導能を有することが開示されており、文献²⁸⁾においても、小豆熱水抽出物の逆相吸着剤を用いた分画の 40%エタノール溶出画分にヒト胃がん細胞のアポトーシス誘導能があることが記載されている²⁷⁾。同様に、小豆熱水抽出物の 40%エタノール溶出画分がマウスのメラノーマ細胞の付着、浸潤および転移を抑制した²⁹⁾。

また、古市らは、小豆の熱水抽出物が、ヒト胃がん細胞に対するアポトーシス誘導やマウス B16 メラノーマ細胞の転移抑制、ラット好塩基性白血病細胞 RBL-2H3 における抗原刺激による脱顆粒、皮膚過敏症などに関与し、カテキンの A 環

7 位水酸基に糖が結合した化合物がそれらの活性分子であることが報告されている³⁰⁾。

このように、小豆成分の有する種々の生理活性が報告されているが、活性画分中のプロアントシアニジンに関する有用な研究はない。

(8) Flavan-3-ols oligomers の分離方法

植物由来のポリフェノールに関する研究は、生理活性を有する全ポリフェノールの抽出に着目したものが多く、各研究者は、植物に含まれるポリフェノール構成成分を予想して分離を試みている。例えばカカオでは液体窒素で冷却しながらミルで粉末にし、ヘキサンを最初に使用し、脂質など除去したのち、含水アセトン、含水メタノールで順次抽出を試みている³¹⁾。一方、同じカカオからのprocyanidin の精製で、Winterhalter らは交流分配法を用いている³²⁾。リンゴの場合は熱水抽出、ワインの場合、減圧下アルコールを留去し、その後の精製に供している。抽出後の精製は分子篩クロマトグラフィー（分子量分画）や順相シリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなど利用した方法などさまざまであるが、純粋な化合物まで精製したものは見当たらない。低分子のポリフェノールであれば NMR の測定も可能であるが、ほとんどの場合、LC-TOFMS 解析による報告である³³⁻³⁵⁾。

以上のように、ブドウの梗についての研究は少ないと、プロアントシアニジンオリゴマーの機能や単離精製法、合成法に関する研究は重要であるにもかかわらず、ほとんど進んでいないことがわかる。本研究では、ブドウの残渣(梗)と小豆中に含まれる抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーの同定とその性状について述べる。

1-3 研究の目的

ブドウのポリフェノールに関する研究は、世界中で行われているが、構造決定されたポリフェノール化合物が特定の生理活性を持つという報告は少ない。一方、種々のポリフェノールからなる粗抽出物に、様々な生理活性があることを報告している研究が多い。このように、これまでのポリフェノールの研究において、活性分子の同定が難しかった理由は、天然物（植物や食品など）由来ポリフェノール化合物の精製と構造決定が困難であったことが一つの要因と考えられる。

したがって、本研究ではほとんど研究が進んでいない天然物（植物や食品など）由来ポリフェノール化合物の精製法の確立と活性分子の構造決定を目的とした。特に、これまで未開拓の分野であった抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーに着目し、この化合物の精製法の確立とその作用機構の解明を目的とした。

次に、本研究で確立した精製法の汎用性を検証するために、ブドウ以外の植物（小豆）を用いて、抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーの精製を試みた。立体構造の複雑性からモデル化合物を合成し、構造活性相関についても検討した。また、プロアントシアニジンオリゴマーのような高分子化合物は経口摂取しても胃や腸で吸収されず、低分子化された分解物が生理活性を示す可能性もあるため、プロアントシアニジンオリゴマーの細胞内及び体内動態の解析も試みた。

第2章. 実験

2-1 抽出および分画

2-1-1 ブドウ梗由来抽出物（抽出物 A、GSE）の調製および分画

除梗破碎機（A-8）（BAUCH社製）で分離されたブドウ（シャルドネ *Vitis vinifera*）のStem（梗）を水で洗浄し、水切りした後、ステンレスはさみで3cm程度にカットした。カットした梗をステンレスのバットに入れ、精製水を4L加えた。ガスコンロで加熱し、90°C以上に達した後、1時間沸騰を保ち熱水抽出を行った。

熱水抽出終了後、大型ブフナーロートにて熱時濾過（アドバンテック No.2）した。得られた濾過液を熱水抽出物（A）とし、室温まで冷却した。

（1）ブドウ梗由来抽出物（抽出物 B～K）の分離分画

2-1-1と同様の方法により、ブドウ梗由来抽出物（抽出物 A）を得て、これを次の工程1～5により、分画した。

工程1：

1kgのブドウ梗由来抽出物（抽出物 A）をそのまま1.5LのAmberlite XAD（登録商標）-1180Nに吸着させた。Amberlite XAD（登録商標）-1180Nは、あらかじめ、洗浄し、オープンガラスカラム（φ6cm×55cm）に入れ、精製水で十分置換した物を用いた。

溶出溶媒として（1）精製水、（2）100%酢酸エチルまたは（3）100%メタノール（各3L）を用い、順次溶出させ、それぞれの溶出液をバス温42°C、減圧下エバポレーターで濃縮することで、（1）精製水溶出物 97.3g、（2）100%酢酸エチル溶出物（以下、抽出物 Bと示すことがある。）3.6gおよび（3）100%メタノール溶出物（以下、抽出物 Cと示すことがある。）3.1gを得た。

工程2：

上記工程1で得たメタノール溶出物（抽出物 C）11.2gを精製水100mLに混濁した。これをさらに1.5LのXAD（登録商標）-1180Nに吸着させた。

溶出溶媒として（1）精製水、（2）100%酢酸エチル、（3）酢酸エチルとメタノールを容積比9:1で混合した溶液（以下、酢酸エチル／メタノール溶液と示す場合がある）または（4）100%メタノール（各3L）を用い、順次溶出させ、それぞれバス温42°Cで減圧下、溶出液をエバポレーターで濃縮することで、（1）精製水溶出物1g、（2）100%酢酸エチル溶出物1.4g、（3）酢酸エチル／メタノール溶液溶出物（以下、抽出物 Dと示すことがある。）1.8gまたは（4）100%メタノール溶出物（以下、抽出物 Eと示すことがある。）6gを得た。

工程 3-1 :

上記工程 2 で得た酢酸エチル／メタノール溶液溶出物（抽出物 D）4 g を精製水 50 mL に混濁した。これをさらに 1.5 L の XAD（登録商標）-1180N に吸着させた。

溶出溶媒として、(1) 酢酸エチルとアセトンを容積比 9:1 で混合した溶液（以下、酢酸エチル／アセトン溶液と示す場合がある）、(2) 酢酸エチルとエタノールを容積比 9:1 で混合した溶液（以下、酢酸エチル／エタノール溶液と示す場合がある）、または (3) 酢酸エチルとメタノールを容積比 9:1 で混合した溶液（以下、酢酸エチル／メタノール溶液（以下、XA3、抽出物 F と示すことがある）、または (4) 100%メタノール（各 3 L）を用い、順次溶出させ、それぞれの溶出液をバス温 42°C で減圧下、エバポレーターで、濃縮することで、(1) 酢酸エチル／アセトン溶液溶出物 800 mg、(2) 酢酸エチル／エタノール溶液溶出物 1.6 g、(3) 酢酸エチル／メタノール溶液溶出物 800 mg または (4) メタノール溶出物 200 mg を得た。

工程 3-2 :

上記工程 2 で得たメタノール溶出物（抽出物 E）6 g を精製水 100 mL に混濁した。これをさらに 1.5 L の Amberlite XAD（登録商標）-1180N に吸着させた。

溶出溶媒として、(1) 精製水、(2) 100%酢酸エチル、(3) 酢酸エチル／アセトン溶液、(4) 酢酸エチル／エタノール溶液、(5) 酢酸エチル／メタノール溶液または (6) 100%メタノール（各 3L）を用い、順次溶出させ、それぞれの溶出液をバス温 42°C で減圧下、エバポレーターで、濃縮することで、(1) 精製水溶出物 0 g (2) 酢酸エチル溶出物 2 g、(3) 酢酸エチル／アセトン溶液溶出物 600 mg、(4) 酢酸エチル／エタノール溶液溶出物 1.2 g、(5) 酢酸エチル／メタノール溶液溶出物 200 mg、または (6) メタノール溶出物（以下、XM6、抽出物 G と示すことがある）1.6 g を得た。

工程 4 :

上記工程 3-2 で得たメタノール溶出物（XM6、抽出物 G）6 g に精製水を加え溶解させた。溶解しなかった物を桐山ロート（濾紙 No. 6）で濾過し、精製水で洗浄し水不溶部として得た。

また、得られた溶液は 40°C 以下でエバポレーターにて減圧濃縮し、水可溶部として得た。この水可溶部 4.4 g を 500 mL の Amberlite XAD（登録商標）-7HP に吸着させた。Amberlite XAD（登録商標）-7HP は、あらかじめ、洗浄し、オーブンガラスカラム（ ϕ 6 cm × 55 cm）に入れ、精製水で十分置換したものを用了。

溶出溶媒として、(1) 精製水 2 L、(2) 10%エタノール水溶液 1 L、(3) 20%エタノール水溶液 1 L、(4) 30%エタノール水溶液 1 L、(5) 50%エタノール水溶液 1 L または (6) 100%メタノール 1.5 L を用い、順次溶出させ、それぞれの溶出液をバス温 42°C、減圧下、エバポレーターにて濃縮することで、(1) 精製水溶出物 (以下、抽出物 H と示すことがある) 1 g、(2) 10%エタノール溶出物 20 mg、(3) 20%エタノール溶出物 10 mg、(4) 30%エタノール溶出物 10 mg、(5) 50%エタノール溶出物 800 mg または (6) 100%メタノール溶出物 10 mg を得た。

工程 5 :

上記工程 4 で得た精製水溶出物 (抽出物 H) 500 mg を精製水 3.5 mL に溶解した。Sephadex LH-20 25 g を精製水で十分湿潤させ、ガラスカラムに充填したものにこれをベットした。

溶出溶媒として、(1) 精製水 300 mL、(2) 50%メタノール水溶液 300 mL、(3) 50%エタノール水溶液 150 mL、(4) 100%イソプロピルアルコール 150 mL を用い、順次溶出させ、それぞれの溶出液をバス温 42°C で減圧下、エバポレーターで濃縮することで、(1) 精製水溶出物 (以下、LH1, 抽出物 I と示すことがある) 187 mg、(2) 50%メタノール溶出物 (LH2) 50 mg、(3) 50%エタノール溶出物 (以下、LH3, 抽出物 J と示すことがある) 85 mg または (4) イソプロピルアルコール溶出物 (以下、LH4, 抽出物 K と示すことがある) 71 mg を得た。

(2) ブドウ梗由来抽出物 (抽出物 L~N) の分画

活性物質探索のため工程 1 と同様に、ブドウの梗の熱水抽出物 (抽出物 A) を Amberlite XAD (登録商標) -1180N に吸着させ、メタノールで溶出したメタノール溶出物 (抽出物 C) を次の工程 1 および 2 により、分離精製した。分離精製のスキームは結果の部の図 12 に示した。

工程 1 :

メタノール溶出物 (抽出物 C) 1.27 g を精製水 3 mL に溶解した。Sephadex LH-20、25 g を精製水で十分湿潤させ、ガラスカラムに充填したものにこれをベットした。

溶出溶媒として (1) 精製水 200 mL、(2) 50%エタノール水溶液 300 mL、(3) 50%イソプロピルアルコール水溶液 200 mL、(4) 30%アセトン水溶液 100 mL、(5) 40%アセトン水溶液 700 mL、(6) 50%アセトン水溶液 550 mL または (7) 60%アセトン水溶液 200 mL を用い、順次溶出させ、それぞれ溶出液をエバポレーターで、42°C で減圧下濃縮することで、(1) 精製水溶出物 418 mg、(2) 50%エタノール溶出物 72 mg、(3) 50%イソプロピルアルコール溶出物 0 g、(4) 30%アセトン溶出物 0 g、(5) 40%アセトン溶出物 46 mg、(6) 50%アセトン溶出物 (以

下、抽出物 L と示すことがある) 557 mg、(7) 60%アセトン溶出物 19 mg を得た。

工程 2 :

上記工程 1 で得た 50%アセトン溶出物 (抽出物 L) 223 mg を精製水 1 mL に溶解した。Amberlite XAD (登録商標) -1600N に吸着させた。Amberlite XAD (登録商標) -1600N は、あらかじめ、洗浄し、オープンガラスカラム (ϕ 3 cm × 30 cm) に 80 mL 入れ、精製水で十分置換したものを用いた。

溶出溶媒として、(1) 精製水 300 mL、(2) 20%メタノール 200 mL、(3) 40%メタノール 300 mL、(4) 60%メタノール 300 mL、(5) 100%メタノール 200 mL を用い、順次溶出させ、それぞれ溶出液をエバポレーターにて 42°C で減圧下濃縮することで、(1) 精製水溶出物 3 mg、(2) 20%メタノール溶出物 1 mg、(3) 40%メタノール溶出物 (以下、抽出物 M と示すことがある) 108 mg、(4) 60%メタノール溶出物 (以下、抽出物 N と示すことがある) 107 mg、(5) 100%メタノール溶出物 4 mg を得た。

(3) ブドウ梗由来抽出物 (抽出物 O、P) の分画

メタノール溶出物 (抽出物 C) 1.47 g を精製水 3 mL に溶解した。Sephadex LH-20、25 g を精製水で十分湿潤させ、ガラスカラムに充填したものにこれをベットした。

溶出溶媒として (1) 精製水 200 mL、(2) 40%エタノール水溶液 300 mL、(3) (4) 30%アセトン水溶液 100 mL、(5) 40%アセトン水溶液 700 mL、(6) 60%アセトン水溶液 200 mL を用い、順次溶出させ、それぞれ溶出液をエバポレーターで、42°C で減圧下濃縮することで、(1) 精製水溶出物 0mg (2) 40%エタノール水溶液 372 mg、(3) 30%アセトン水溶液 83 mg、(4) 40%アセトン水溶液 384 mg、(5) 60%アセトン水溶液 809mg (抽出物 O) を得た。抽出物 C からの分画方法を再度、繰り返し、合計 1.54 g を得た。

60%アセトン溶出物 (抽出物 O) 1.25 g をさらにあらかじめ準備した Toyopearl HW40F 100 mL にベットした。(1) 精製水 200 mL、(2) 40%エタノール水溶液 300 mL、(3) (4) 30%アセトン水溶液 100 mL、(5) 40%アセトン水溶液 700 mL、(6) 60%アセトン水溶液 200 mL を順次溶出した。

それぞれ溶出液をエバポレーターで、42°C で減圧下濃縮することで、(1) 精製水溶出物 0mg、(2) 40%エタノール水溶液 345 mg、(3) 30%アセトン水溶液 54mg、(4) 40%アセトン水溶液 ① 94 mg、② 161mg、③ 88mg、(5) 60%アセトン水溶液 574 mg (抽出物 P) を得た。

(4) 凍結梗の常温 (25°C) アセトン抽出試験及び分画 (抽出物 S)

収穫当日、房から実を素早く除去し、梗 52.8 g を水で洗浄し、水切りした後、液体窒素を入れた乳鉢で凍結させてすりつぶし、粉碎した。

粉碎した梗を 60%アセトン溶液 500 mL に浸漬した。これを 25°Cにて 2 時間静置した後、濾紙（アドバンテック N0. 2）にて濾過した後、残渣に対し 60%アセトン溶液 500 mL を加えて、更に同様の操作を行なった。濾過によって得られたろ過液をエバポレーターにて 40°C以下で濃縮乾固し、アセトン抽出物を 4.2 g 得た。

濾過により得られた残渣は、精製水 100 mL を加えて加熱し、一時間沸騰を保ち熱水抽出を行った。熱水抽出終了後、大型ブナーロートにて熱時濾過（アドバンテック N0. 2）し、得られた濾過液を 40°C以下で濃縮乾固し、熱水抽出物を 576 mg 得た。

アセトン抽出物を精製水 100 mL に溶解した。この内 75 mL をとり、100%酢酸エチルを加えて分液した。このうち、酢酸エチル層は、硫酸ナトリウム十水和物（芒硝）にて乾燥した後、40°C以下で濃縮乾固し、153 mg を得た。

水層は、水層中の酢酸エチルをエバポレーターで除去した後、そのまま 1.5L の Amberlite XAD (登録商標) -1180N に吸着させた。この Amberlite XAD (登録商標) -1180N は、あらかじめ、洗浄し、オーブンガラスカラム (ϕ 6cm×55 cm) に入れ、精製水で十分置換した物であった。

(1) 精製水 300 mL、(2) 100%酢酸エチル 300 mL、(3) 100%メタノール 300 mL を溶出溶媒として順次溶出させた。このうち、100%酢酸エチルと 100%メタノールにて溶出した溶出液について、それぞれエバポレーターで、42°Cで減圧下濃縮することで、(1) 100%酢酸エチル溶出物 374 mg、(2) 100%メタノール溶出物（以下、抽出物 S と示すことがある）448 mg を得た。

2-1-2 その他ブドウの皮、種、枝からの抽出及び分画

シャルドネ以外の品種、皮、種あるいは枝についても同様の方法で抽出及び粗精製を行いバイオアッセイに供した。

1. ブドウ残渣（皮と種）由来抽出物の調製

1) 除梗破碎機 (A-8) (BAUCH 社製) で分離されたブドウ（シャルドネ *Vitis vinifera*）の残渣（皮と種）を水で洗浄した。この残渣 1 kg をステンレスのバットに入れ、精製水を 4 L 加えた。上部開口部をアルミホイルで覆い、これをガスコンロで加熱し、91°C以上に達した後、1 時間沸騰を保ち熱水抽出を行った。

2) 前記 1) の熱水抽出終了後、大型ブナーロートにて熱時濾過（アドバンテック N0. 2）した。得られた濾過液をブドウ残渣（皮と種）由来抽出物とし、室温まで冷却した。

2. ブドウの枝由来抽出物の調製

収穫同時期、剪定し、水で洗浄したシャルドネの枝 50 g を 10 cm 程度にカットし、1 L の三角フラスコに 400 mL の精製水と共に入れ、口にアルミホイルをした。その後、この三角フラスコを、お湯をはったステンレスのバットに入れ、ガスコンロで沸騰させた。40 分沸騰後、冷却し綿濾過した。

この濾液を Amberlite XAD (登録商標) -1180N 180 mL に吸着させ、非吸着物を精製水 300 mL で除去した後、酢酸エチル 300 mL、または 100%メタノール 300 mL で順次溶出させて得た酢酸エチル溶出物 70.8 mg、および (2) 100%メタノール溶出物 55.1 mg をそれぞれ試料とした。

これらの溶出物をそれぞれ 60%エタノールに溶解し 0.01 mg/mL とした。これをヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培地に対し濃度が 1% (100 µg/mL) となるようにそれぞれ添加した。

2-1-3 アズキの flavan-3-ols oligomer の分画

(1) 小豆抽出物 A の分画

小豆 500 g を常温下、精製水（常温）2 L に一昼夜浸した後、濾過により小豆を除き小豆抽出液を 1400 mL 得た。この小豆抽出液の一部(100 mL)をエバポレーターにて減圧下、バス温度 45°C で濃縮して濃縮物（小豆抽出物 A）1 g を得た。

濾過により得られた小豆の残渣に 40%エタノール 2 L を加え、室温で 36 時間静置した後、綿濾過し、得られた濾過液をエバポレーターにて減圧下、バス温度 45°C で濃縮し、(抽出物 a) 22 g を得た。

(2) 小豆抽出物 B の分画

(1)の小豆抽出液の残り 1300 mL を綿濾過し、ガラスカラム (φ 6 cm × 100 cm) に充填した Amberlite XAD (登録商標) -1180N (1.5 L) に吸着させた。Amberlite XAD (登録商標) -1180N (1.5 L) は、充填前に、あらかじめ洗浄し、精製水に置換したものである。

この非吸着物を精製水 4.5 L で洗浄し、次いで吸着物を酢酸エチル 4.5 L、メタノール 4.5 L で順次溶出した。得られた溶出液をそれぞれエバポレーターにて減圧下、バス温度 45°C で濃縮して濃縮物を得た。このうち、酢酸エチルで溶出し濃縮したもの (1.8 g)、メタノールで溶出して得た濃縮物を小豆抽出物 B (400 mg) とした。

(3) 小豆抽出物 C~F の分画

1) 小豆 2 kg を常温下、精製水（常温）4 L に一昼夜浸した後、濾過により小豆を除き小豆抽出液を得た。この小豆抽出液を綿濾過し、ガラスカラム（φ 6 cm × 100 cm）に充填した Amberlite XAD（登録商標）-1180N（1.5 L）に吸着させた。Amberlite XAD（登録商標）-1180N（1.5 L）は、充填前に、あらかじめ洗浄し、精製水に置換したものである。

この非吸着物を精製水 4.5 L で洗浄し、次いで吸着物を酢酸エチル 4.5 L、メタノール 4.5 L で順次溶出した。得られた溶出液をそれぞれエバポレーターにて減圧下、バス温 45°C で濃縮して酢酸エチル画分およびメタノール画分の濃縮物をそれぞれ 6.2 g、1.8 g 得た。

2) 上記 1) の操作を繰り返し、サンプルを集めた。上記 1) で得た濃縮物（酢酸エチル画分 5 g、メタノール画分 2.4 g）それぞれをあらかじめ 20%エタノールに置換した Toyopearl HW40F（200 mL）に供し、800 mL の 20%エタノール、60%エタノールおよび 60%アセトンで順次溶出した。

得られた溶出液をそれぞれエバポレーターにて減圧下、バス温 45°C で濃縮して、酢酸エチル画分から 20%エタノール溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 b）1g、60%エタノール溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 C）2.5 g および 60%アセトン溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 D）1.9 g を得た。また、メタノール画分から 20%エタノールの溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 c）600 mg、60%エタノールの濃縮物（小豆抽出物 E）900 mg および 60%アセトンの溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 F）1.1 g を得た。

(4) 小豆抽出物 G~K の分画

上記(3)において得た小豆抽出物 F の一部（700 mg）を 3 倍量の 10%メタノールに溶かした溶液を Sepacore C18（80 g）に吸着させた。

吸着物を 10%メタノール 600 mL、20%メタノール 500 mL、30%メタノール 500 mL、40%メタノール 500 mL および 100%アセトニトリル 500 mL で順次溶出した。得られた溶出液をそれぞれエバポレーターにて減圧下、バス温 45°C で濃縮して、10%メタノール溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 G）80 mg、20%メタノール溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 H）200 mg、30%メタノール溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 I）300 mg、40%メタノール溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 J）100 mg および 100%アセトン溶出画分の濃縮物（小豆抽出物 K）20 mg を得た。

(5) 小豆抽出物 L の分画

小豆 1.5 kg を精製水 4 L に一昼夜浸した後、加熱し沸騰させ、これを 30 分間加熱した後、熱時濾過した。得られた濾過液を冷却した後、綿濾過し、ガラス

カラム (ϕ 6 cm × 100 cm) に充填した Amberlite XAD (登録商標) -1180N (1.5 L) に吸着させた。Amberlite XAD (登録商標) -1180N (1.5 L) は、充填前に、あらかじめ洗浄し、精製水に置換したものである。

この吸着物を酢酸エチル 4.5 L、メタノール 4.5 L で順次溶出し、得られた溶出液をそれぞれエバポレーターにて減圧下、バス温 45°C で濃縮し濃縮物を得た。このうち酢酸エチルで溶出して得た濃縮物 (10 g) を抽出物 d、メタノールで溶出して得た濃縮物 (3 g) を小豆抽出物 L とした。

(6) 小豆抽出物 M、N の分画

上記(1)にて得た小豆抽出物 C を、あらかじめ 20%エタノールに置換した Toyopearl HW40F 200 mL に供し、次ぎの溶液で順次溶出し、得られた溶出液をそれぞれエバポレーターにて減圧下、バス温 45°C で濃縮し濃縮物を得た。

まず、800 mL の 20%エタノールで溶出し、その溶出画分の濃縮物 800 mg (小豆粗抽出物 e) を得た。次に 60%エタノール 800 mL で溶出し、その溶出画分の濃縮物 700 mg (小豆抽出物 M) を得て、さらに 60%アセトン 800 mL で溶出し、その溶出画分の濃縮物 800 mg (小豆抽出物 N) を得た。

2-2 ヒト前立腺癌細胞へのプロアントシアニジンオリゴマー含有粗精製物添加試験

2-2-1 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培養

ヒト前立腺癌細胞として財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より入手したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を、FBS (MP Biomedicals 社製) を 10%添加した RPMI 培地 (SIGMA 社製) を用いて培養した。

2-2-2 ブドウ梗抽出物添加によるヒト前立腺癌細胞株 PC-3 試験

(1) 細胞増殖抑制試験

2-1-1 で調製したブドウ梗由来抽出物 (抽出物 A や粗精製物を用い、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における細胞増殖抑制活性を調べた。

1) 細胞増殖数

2-2-1 で培養したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を 12 well プレート (NUNC (商標登録 MULTIDISH) で各 well が 8 割になるまで培養した。これに、上記 2-2-1 で調製したブドウ梗由来抽出物 (抽出物 A) を 1% w/v になるように添加し、またコントロールは抽出物が入っていない溶液を添加、培養し、培養開始 6 時間後、

12 時間後、24 時間後、36 時間後、48 時間後または 72 時間後の細胞数を、血球計算版を用いて測定した。

2) 細胞増殖率

1) において、細胞の増殖数に差が出始めた培養開始24時間後以降の細胞増殖能をMTT assayで確認した。

即ち、上記1)で培養したヒト前立腺癌細胞株PC-3に上記1)で調製したブドウ梗由来抽出物(抽出物A)を1%w/vになるように添加して培養し、24時間、36時間、48時間または72時間経過した段階で、MTT溶液を添加し、4時間呈色反応を行った。その後、培地を除去し、細胞可溶化溶液を添加してピペッティング後、マイクロプレートリーダーで570 nmの吸光度値を測定した。

(2) FABP5 遺伝子発現抑制試験

上記 2-1-1 で調製したブドウ梗由来抽出物(抽出物 A)を用い、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現抑制活性(濃度依存性・時間依存性)を調べた。

1) 濃度依存性

(1) 試料の調製

上記 2-2-1 1) で培養したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を 12 well プレート(NUNC(商標登録 MULTIDISH))で培養した。これに、上記 2-1-1 で調製したブドウ梗由来抽出物(抽出物 A)を、0.01 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL の濃度になるように添加して 36 時間培養した。

培養後、培地を除去、PBS で洗浄後、TRIzol を 500 mL 添加してピペッティングし、RNA を回収した。

回収した RNA に 100 mL クロロホルムを添加し混合して室温で 2~3 分置いた後、遠心分離(13,000 rpm、15 分間、4°C)し、上清を回収した。この上清に同量のイソプロパノールを添加し転倒混和して室温で 10 分間置いた後、遠心分離(13,000 rpm、15 分間、4°C)し、上清をデカンテーションした。

これに 70%エタノールを添加してペレットを洗浄した後、遠心分離(13,000 rpm、5 分間、4°C)し、上清をデカンテーションし、室温でペレットを乾燥した後、DECP 水を 20 μL 添加して溶解したものを試料とした。

(2) RT-PCR

ReverTra Ace(登録商標)キット(TOYOBO 社製)および2×GoTaq(登録商標)Green Master Mix(Promega 社製)を用いて、RT-PCRを行った。

まず、上記(1)で調製した試料をDEPC水で250 ng/μLに希釈した。これを用い

て表1の組成としたものを、サーマルサイクラーで工程1～3処理し(工程1: 30℃、10分間、工程2: 42℃、60分間、工程3: 95℃、5分間)、cDNA (complementary DNA) を合成した。

表1 DNA合成における試薬、試料の組成

		(μL)
5×RT Buffer		4
2.5 mM dNTP		8
Oligo (dT)		1
N-F H ₂ O		2
RNase inhibitor		0.5
RTase		0.5
試料 (250 ng/ μL)		4
Total		20

合成したcDNAを錆型とし、表2に示したFABP5遺伝子を増幅するプライマー（配列表配列番号1、2）および、内因性コントロールとしてβ-actin遺伝子を増幅するプライマー（配列表配列番号3、4）、r RNA 18 sを増幅するプライマー（配列表配列番号5、6）を用いて表3の組成としたものを、サーマルサイクラーで工程1～3で処理し（工程1. 95℃、5分間、工程2. 1) 95℃、30秒間、2) 59℃、40秒間、3) 72℃、1分間の1)～3)を25サイクル、工程3. 72℃、5分間）、DNAを増幅した。

増幅したDNAをアガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色してUV照射することにより、FABP5遺伝子の発現の有無および程度を調べた。

表2 増幅するプライマー

増幅対象	配列番号	プライマー 3' → 5'
FABP5 遺伝子	1	AAGGAGCTAGGAGTGGGAAT
	2	T CATGACACACTCCACCACT
β-actin 遺伝子	3	AGGTCAATCACCATTTGGCAAT
	4	ACTCGTCATACTCCTGCTTG
rRNA 18 s	5	AAACGGCTACCACATCCAAG
	6	CCTCCAATGGATCCTCGTTA

表3 増幅プライマーの試薬組成

(μL)	
Master mix	10
N-F H ₂ O	8
Primer	1
cDNA	1
Total	20

また、細胞形態を電子顕微鏡にて観察した。

2) 時間依存性

上記2-2-2 1)で培養したヒト前立腺癌細胞株PC-3を12 wellプレート(NUNC(商標登録 MULTIDISH))へ分注し、各wellが8割になるまで培養した。これに、上記2-1-1で調製したブドウ梗由来抽出物(抽出物A)を、0.1 mg/mL、0.2 mg/mLの濃度で添加して6、12、24、36、48、60または72時間培養した。

培養後、上記2-2-2 1)濃度依存性の試験と同様に細胞ヒト前立腺癌細胞株PC-3からRNAを回収し、RT-PCRを行い、FABP5遺伝子の発現の有無および程度を調べた。

(3) FABP5遺伝子発現抑制試験 メタノール溶出物(ブドウ梗由来抽出物C)

前記2-1-1で調製した非吸着物画分、100%酢酸エチル溶出物(ブドウ梗由来抽出物B)および100%メタノール溶出物(ブドウ梗由来抽出物C)を用い、上記2-1-1と同様にヒト前立腺癌細胞株PC-3におけるFABP5遺伝子の発現抑制活性を調べた。

即ち、上記2-2-1 1)で培養したヒト前立腺癌細胞株PC-3を12 wellプレート(NUNC(商標登録 MULTIDISH))で各wellが8割になるまで培養した。これに、上記2-1-1で調製した非吸着物画分、100%酢酸エチル溶出物(ブドウ梗由来抽出物B)または100%メタノール溶出物(ブドウ梗由来抽出物C)を1%w/vになるようにそれぞれ添加して、72時間培養した。

培養後、培地を除去し、PBSで洗浄した後、TRIzolを500 mL添加してピペッティングし、回収したRNAを用いて上記2-2-3と同様にヒト前立腺癌細胞株PC-3におけるFABP5遺伝子の発現抑制活性を調べた。

(4) FABP5遺伝子発現抑制試験 ブドウ梗由来抽出物(抽出物I)

上記2-1-1で調製したブドウ梗由来抽出物(抽出物I)を用い、2-2-2と同様の方法でヒト前立腺癌細胞株PC-3におけるFABP5遺伝子の発現抑制活性(時間依存性)を調べた。ブドウ梗由来抽出物(抽出物I)は、PBSで濃度を10 mg/mLに調製したものを試料として用い、0.03 mL添加して培養し、培養開始6時間

後、12 時間後、24 時間後、36 時間後、48 時間後または 72 時間後の FABP5 遺伝子発現を調べた。

(5) FABP5 遺伝子発現抑制試験 ブドウ梗由来抽出物（抽出物 J、LH3、抽出物 K LH4）

前記 2-1-1 で調製した (1) 精製水溶出物、(2) 50%メタノール溶出物、(3) ブドウ梗由来抽出物（抽出物 J）または (4) ブドウ梗由来抽出物（抽出物 K）を用い、前記 2-2-2 と同様の方法でヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現抑制活性（時間依存性）を調べた。

(1) 精製水溶出物(抽出物 I、LH1,)、(2) 50%メタノール溶出物 (LH2)、(3) ブドウ梗由来抽出物 (LH3, 抽出物 J) または (4) ブドウ梗由来抽出物 (LH4, 抽出物 K) は、いずれも PBS で濃度を 10 mg/mL に調製したものを試料として用い、0.03 mL 添加して培養し、培養開始 48 時間後の FABP5 遺伝子発現を調べた。

(6) FABP5 タンパク質発現抑制試験（ブドウ抽出物 G）

上記 2-1-1 で調製した (3) 酢酸エチル／メタノール溶液溶出物および上記 2-1-2 で調製した (6) メタノール溶出物（抽出物 G）を用い、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 タンパク質への影響を調べた。 (3) 酢酸エチル／メタノール溶液溶出物または (6) メタノール溶出物（抽出物 G）は PBS で濃度を 10 mg/mL に調製したものを試料としてそれぞれ用いた。

1) 泳動試料の作製

上記 2-2-1 と同様の方法で、上記試料を 0.03 mL 添加してヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を 48 時間培養した後、培地を除去し、PBS で二回洗浄した。これに cold PBS (-) を加え、cell scraper ではがしたヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を 50 mL tube に回収した。これを遠心分離 (room temp.、2,000 rpm、1.5 min) し、上清を捨て、さらに cold PBS (-) 1.2 mL 程度を加えて懸濁し、1.5 mL tube に移した。これをさらに遠心分離 (4°C、3,000 rpm、3 min) し、PBS (-) を完全に除いた後、buffer (組成 : 1M Tris-HCl (pH 7.5) 2 mL、5 M NaCl 1.2 mL、0.5 M EDTA 80 μL、10% NP-40 4 mL、プロテアーゼ阻害剤 (Nacarai tesque 製) 400 μL を精製水で 40 mL とした) 200 μL、プロテアーゼ阻害剤 (Nacarai tesque 製) 2 μL を加えてボルテックスし、15 分間氷上に置いた。これを遠心分離 (4°C、15,000 rpm、10 min) し、上清を回収してライセートとした。

このライセートのタンパク質濃度を Quick start プロテインアッセイ法により測定し、タンパク質濃度が一番低かった試料に濃度を合わせて泳動用試料を作製した。泳動用試料のタンパク質濃度は、1.8 mg/mL であった。

2) SDS-PAGE

次の (1) ~ (3) の工程により、SDS-PAGE を行った。

- (1) 上記 1) で調製した泳動用試料 20 μL と 5×sample buffer を混合した後、block incubater で 90°C、5 分間加熱処理した。
- (2) ゲルを泳動槽にセットし、加熱処理した sample を 25 μL ずつ、マーカー (prestained marker) を 2 μL ずつ各 well の中に入れた。
- (3) 泳動ははじめ 60~70 V で行い、separating gel 以降は 100~150 V で 1.5 ~2 時間行った。

3) ウエスタンプロット

上記 2) で SDS-PAGE を行って分離したタンパク質をセミドライ法によりニトロセルロース膜にブロッティングし、このニトロセルロース膜に、目的のタンパク質特異的に結合する抗体を反応させて、Chemiluminescence により FABP5 タンパク質を検出した。

- 即ち、次の (1) ~ (7) の工程により、ウェスタンプロットを行った。
- (1) SDS-PAGE を行って分離したタンパク質をセミドライ法によりニトロセルロース膜にブロッティングした (140 mA、40 min)。
 - (2) 上記 (1) のニトロセルロース膜を Blocking buffer [組成 : 1M Tris-HCl (pH 7.5) 2.5 mL、5 N NaCl 1.5 mL、Skim milk 2.5 g を精製水で 50 mL にした] に入れて、1 時間以上、room temp. で振とうすることによりブロッキングした。
 - (3) 上記 (2) のニトロセルロース膜に一次抗体反応液 [組成 : 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 250 μL 、5 N NaCl 150 μL 、10% Tween 20 25 μL 、Skim milk 0.25 g、一次抗体 (抗 FABP5 抗体) 10 μL (1/100)、抗 β -actin 抗体 (抗ヒト β -actin 抗体 #4967、Cell Signaling Technology 社 0.5 μL (1/1000) を精製水で 5 mL にした] を加え、over night、4°C で抗原抗体反応を行った。
 - (4) 上記 (3) のニトロセルロース膜を洗浄液 [組成 : 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 250 μL 、5 N NaCl 150 μL 、10% Tween 20 25 μL を精製水で 50 mL にした] で 15 min、3 回洗浄した。
 - (5) 上記 (4) のニトロセルロース膜に二次抗体反応液 [組成 : 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 250 μL 、5 N NaCl 150 μL 、10% Tween 20 25 μL 、Skim milk 0.25 g、二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG. HRP (Stressgen 社製) 5 μL を精製水で 5 mL にした] を加え、1 h 以上、room temp. で振とうし、抗原抗体反応を行った。
 - (6) 上記 (5) のニトロセルロース膜を上記 (4) と同様に洗浄した。
 - (7) Detection Reagent1 Peroxide Solution および Detection Reagent2 Luminol Enhancer Solution [いずれも Pierce (登録商標) Western Blotting

Substrate Thermo SCIENTIFIC 社製] の混合液を上記 (6) のニトロセルロース膜にかけ、Chemiluminescence によりタンパク質を検出した。

上記 3.3) ウェスタンプロット (3) の工程において使用した一次抗体 (抗 FABP5 抗体) は、参考文献³⁶⁾に基づき作製したものである。

即ち、ヒト FABP5 の N 末端側 13 残基からなる、配列表配列番号 7 に示される合成ペプチドをキャリアータンパク質と結合させてウサギに免疫し、8 週間後に血清を採取して抗 FABP5 抗体を得た。

(7) FABP5 遺伝子発現抑制試験 (ブドウ抽出物 G)

前記 2-2-2 と同様に、上記 2-1-1 で調製した (3) 酢酸エチル／メタノール溶液溶出物および上記 2-1-1 で調製した (6) メタノール溶出物 (抽出物 G) を添加して、48 時間培養したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 から、前記 2-2-2 と同様の方法で mRNA を回収し、RT-PCR によって、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子発現への影響を調べた。

(8) FABP5 遺伝子発現抑制試験 (ブドウ梗由来抽出物 L～N)

前記 2-1-1 で調整したブドウ梗由来抽出物 (抽出物 L, M, N) を用いて、前記 2-2-2 と同様の方法でヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現への影響を確認した。

(9) FABP5 遺伝子発現抑制試験 (ブドウ梗由来抽出物 P)

前記 2-1-1(3) で調整したブドウ梗由来抽出物 (抽出物 P) を用いて、前記 2-2-2 と同様の方法でヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現への影響を確認した。

(10) FABP5 遺伝子発現抑制試験 (ブドウ梗凍結アセトン抽出物 S)

ブドウ梗由来抽出物 (抽出物 S) について、2-2-2 と同様の方法でヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現への影響を確認した。

2-2-3 FABP5 遺伝子発現抑制試験 (ブドウの皮、種、枝)

前記 2-1-2 で調製したブドウ残渣 (皮と種) 由来抽出物と、前記 2-1-1 と同様の方法で調製したブドウ梗由来抽出物 (抽出物 A) について、前記 2-2-2 と同様の方法で培養したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現抑制活性 (濃度依存性) を調べた。

この試験では、ブドウ残渣（皮と種）由来抽出物が 0.5 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL、または 1.5 mg/mL の濃度になるようにそれぞれヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培地に添加した。また、ブドウ梗由来抽出物(抽出物 A)が 0.06 mg/mL、0.12 mg/mL、0.6 mg/mL となるように、それぞれヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培地に添加した。これらを 36 時間培養した後、前記 2-2-2 と同様の方法で、FABP5 遺伝子の発現の有無および程度を調べた。

2-2-4 ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 への小豆抽出物添加試験

(1) 癌細胞増殖抑制試験

ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を 96 well プレート [NUNC (登録商標) MULTIDISH] で各 well が 8 割になるまで培養した。目視により細胞がだいたい 1.5 倍に増殖した段階で、各 well に 60%エタノールに溶解した小豆抽出物 A～I、GSE および小豆抽出物 a～e をそれぞれ 0w/v%、0.5w/v%、1.0w/v%、1.5w/v% または 3w/v% となるように添加した。48 時間経過した段階で、MTT 溶液を 10 μL ずつ添加し、4 時間呈色反応 (37.0°C、CO₂ 5%) を行った。その後、培地を除去し、細胞可溶化溶液を 100 μL 添加してピペッティングした後、マイクロプレートリーダーで 570 nm の吸光度値を測定した。

(2) FABP5 遺伝子発現抑制試験

(2)-1 試料の調製

ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を 12 well プレート [NUNC (登録商標) MULTIDISH] に播種し、各 well が 8 割になるまで培養した。この各ウェルに 60%エタノールに溶解した小豆抽出物 A～N、小豆抽出物 a～e または GSE をそれぞれ 1.0w/v% の濃度になるように添加して培養した。

培養後、培地を除去、PBS で洗浄後、TRIzol を 500 mL 添加してピペッティングし、RNA を回収した。

回収した RNA に 100 mL クロロホルムを添加し混合して室温で 2～3 分間置いた後、遠心分離 (13,000 rpm、15 分間、4°C) し、上清を回収した。この上清に同量のイソプロパノールを添加し転倒混和して室温で 10 分間置いた後、遠心分離 (13,000 rpm、15 分間、4°C) し、上清をデカンテーションした。

これに 70%エタノールを添加してペレットを洗浄した後、遠心分離 (13,000 rpm、5 分間、4°C) し、上清をデカンテーションし、室温でペレットを乾燥した後、DEPC 水を 20 μL 添加して溶解したものを試料とした。

(2)-2 RT-PCR

2-2-3 (2) と全く同じ方法で行った。

2-3 動物へのプロアントシアニジンオリゴマー含有粗精製物の投与試験

2-3-1 ラットにおける単回経口投与毒性試験

株式会社 イナリサーチに委託した。

ブドウのステム熱水抽出物の Amberlite XAD-1180N 処理におけるメタノール溶出画分濃縮物（以下、抽出物 C と略）の 2,000 mg/kg を 1 群雌雄各 5 匹の Cr1:CD (SD) ラットに単回経口投与し、その毒性を検討した。対照群（雌雄各 5 匹）には注射用水を同様の方法で投与した。

遵守する基準及び参考するガイドライン

GLP

毒性試験ガイドライン

「医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」
(1989 年 9 月 11 日付薬審 1 第 24 号)

「単回及び反復投与毒性試験のガイドラインの改正について」(1993 年 8 月 10 日付薬新薬第 88 号)

2-3-2 細菌を用いる復帰突然変異試験

株式会社 イナリサーチに委託した。

ブドウのステム熱水抽出物の Amberlite XAD-1180N 処理におけるメタノール溶出画分濃縮物（抽出物 C）の遺伝子突然変異誘発性について細菌を用いて検討した。

塩基対置換型の遺伝子突然変異を検出する *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, 及び *Escherichia coli* WP2uvrA の 3 菌株と、フレームシフト型の遺伝子突然変異を検出する *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA1537 の 2 菌株を使用し、プレインキュベーション法により試験を実施した。用量設定試験及び本試験とも代謝活性化系存在下（以下、代謝活性化法と略）及び非存在下（以下、直接法）の条件で試験を実施した。

抽出物 C の用量は、用量設定試験では直接法及び代謝活性化法とも公比 3 で 7 ~5,000 µg/plate の 7 用量で実施した。本試験では、直接法では公比 2 で TA100, TA1535, WP2uvrA 及び TA1537 は 19.5~1250 µg/plate の 7 用量、TA98 で 4.9~312.5 µg/plate の 7 用量を、代謝活性化法ではいずれの菌株も公比 2 で 156.3 ~5,000 µg/plate の 6 用量で実施した。

遵守する基準及び参照するガイドライン

GLP

ガイドライン

「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(1999年11月1日付医薬審1604号)

2-3-3 担癌マウスへのブドウ抽出物の混餌投与試験

担癌マウスにおける抽出物Cの抗腫瘍効果試験

Day 1に培養したPC-3M(ヒト前立腺癌細胞)を18匹のICR nu/nuマウス(6週令、雄)の右脇腹皮下に1匹当たり 5.0×10^6 cells移植し、抽出物Cを混餌飼料としてマウスに6週間(day 43まで)摂取させる。経時的(1回/週)に体重測定及び皮膚表面隆起の大きさ(長径、短径及び厚み)をノギスで測定して腫瘍体積を概算した。

混餌飼料投与終了後(day 43)マウス全数において、腫瘍及び4臓器(両肺、肝臓、腎臓(右)、大腿骨(右))を摘出し、重量測定後、ホルマリン固定/保存した。

細胞培養

(1) 培地: RPMI 1640 + 10%FBS + 1%P/S

1) FBS(Fetal Bovine Serum の略): ウシ胎児血清

FBSは非効化済み(56°Cの温浴で30分間加熱し、フィルター(0.2 μm)を通したもの)

2) P/S(Penicillin-Streptomycin の略)

(2) 培養器: φ100 mm dish, 225cm² T-flaskなど

(3) 培養機: CO₂インキュベーター(37°C、5%CO₂、水蒸気飽和)

(4) 培養手順: 1)凍結細胞PC-3Mを1バイアル指定培地で起眠し、生細胞率が上昇するように維持する。細胞の状態により起眠するバイアル数を増やすことも考慮に入れた。

1) マイコプラズマ検査の結果が陰性であることを確認した後、培養スケールを上げ、移植当日に対数増殖期の細胞を必要量(目標値: 1.2×10^8 cells/total以上)を確保した。

2) マイコプラズマ検査の結果が陽性の場合はマイコプラズマ除去を行った。

細胞のマイコプラズマ検査

(1) 検査開始及び結果: 1) 細胞起眠日より1週間後(day -21)

2) 移植日 (day 1) の細胞濃度調整前

- (2) 検査対象： 培養上清
- (3) 検査方法： 小スケールで 5 日間以上培養した細胞がコンフルエントになった時点での細胞懸濁液を回収し、遠心分離 (1,000 rpm、室温、5 分間) により培養上清を回収後、得られた培養上清を MycoAlert 法でマイコプラズマ感染の有無をキット [MycoAlert[®] Mycoplasma Detection Kit] で検査した。

動物

- (1) 種、系統： マウス、Crlj:CD-Foxn1^{nu} (nu/nu)
- (2) 性別、週齢、動物数： 雄、5 週齢 (入荷時の週齢)、18 匹
- (3) 動物の供給源： 日本チャールス・リバー株式会社
- (4) 訓化飼育： 入手日を含め 7 日間とする。
- (5) 識別方法：
 - 【群分け前】
動物入荷後任意に識別 No. を付与し、尾への赤油性マジックによるマーキングを行った。
 - 【群分け後】
個体 No. を付与し、尾への黒油性マジックによるマーキングを行った。
- (6) ケージカード：
 - 【群分け前】
受託番号、系統、性別、識別 No.
 - 【群分け後】
受託番号、系統、性別、群、個体 No.、投与物質名

飼育室環境

- (1) 温湿度： 許容温度：18~28°C、許容湿度：30~80%
- (2) 換気回数： 10~15 回/時間
- (3) 照明サイクル： 12 時間 (7~19 時) 点灯、12 時間 (19~7 時) 消灯
- (4) 飼育ラック： クリーンラック
- (5) 飼育密度： 最大 5 匹/ケージ (ポリプロピレン製ケージ)

飼料

- (1) 種類：
 - 1) 訓化期間及び群分け後の対照群：
CRF-1 粉末飼料
 - 2) 群分け後の抽出物 C 群：
抽出物 C 5 w/w% CRF-1 粉末混餌飼料
- (2) 製造元： オリエンタル酵母工業株式会社

- (3) 納餌方法： 納餌器による納餌（自由摂取）
- (4) 混餌投与： day 1 より開始する。また、day 8、15、22、29、36 で新規に作製した混餌飼料を納餌する。

混餌飼料調製

Day-1、7、14、21、28、35 で計 7 回実施する。

1 回当たり（7 日間分）の混餌調整方法を示す。使用する CRF-1 粉末の量は、動物の摂取量に合わせて適宜調節する（被験素材もそれに正比例させる。）

- (1) 容積 2 L 以上のポリプロピレン製容器〔半透明広口ビン、NALGEN 社製、以下 PP 容器と略す〕に CRF-1 粉末資料を約 200 g 入れた。
- (2) 被験素材を所定量(20 g)ひょう量し、同 PP 容器に入れた。
この時、投与物質を秤量しながら、投与物質が均一に微粒子状になっていることを確認する。微粒子状になっていない場合は乳鉢で粉碎した。
- (3) CRF-1 粉末飼料及び被験素材が PP 容器で回転・混合するように 3 分間以上、激しく振盪した。
- (4) 混合飼料の色調が均一になっていることを目視確認する。均一になったことを確認後、10 分間以上静置した。
- (5) CRF-1 粉末飼料を PP 容器に追加し、内容物の全量を 400 g とした。
- (6) 追加した CRF-1 粉末飼料及び混合飼料が PP 容器内で回転・混合するように 3 分間以上、激しく振盪した。
- (7) 混合飼料の色調が均一になっていることを目視確認する。均一になったことを確認後、飼育室に静置した。

飲料水

- (1) 種類： 流水殺菌装置（フィルター、紫外線照射による除菌）を通した伊那市営上水道
- (2) 納水方法： 納水瓶による納水（自由摂取）

床敷

- (1) 名称： 床敷プレナ
- (2) 製造元： 千葉アニマル資材株式会社

群分け

- (1) 群分け日： day 1 の細胞移植前
- (2) 群分け方法： 1) 机上にて全動物を体重値の小さい順番に並べた識別 No. の固体に以下の通りの個体 No. を付与した。
個体 No. 001⇒101⇒102⇒002⇒003・・・⇒007⇒107

⇒108⇒008

- 2) 移植日に（投与開始日に）、一般状態に異常がない動物を選抜した。体重の中央値（メジアン）から遠い動物を除外し、供試動物 16 匹を選抜した。
- 体重値に基づいて、各群の体重値が平均となるように群構成の通り、対照群及び投与群の 2 群（8 匹/群）に配分した。（表 4）

表 4 群構成

群	混餌濃度	体重・腫瘍径 測定	腫瘍・臓器摘出/重量測定/ホルマリン固定	個体 No.	引数
対照	0 w/w%	Day 1、8、15、22、29、36、43	Day 43	001～008	8
抽出物 C	5w/w%	Day 1、8、15、22、29、36、43	Day 43	101～108	8

細胞移植

- (1) 移植細胞株 : PC-3M
- (2) 移植細胞数 : 5.0×10^6 cells/0.2 mL/匹
- (3) 移植部位 : 右側脇腹皮下（前後肢の間）
- (4) 細胞濃度調整:
- 1) 7 項「細胞のマイコプラズマ検査」の検査結果が陰性の場合、そのまま試験を実施、陽性の場合は関係者と協議の上、以後の対応を決定した。
 - 2) 細胞調整時に使用するピペット及びコニカルチューブは十分冷えているものを使用した。
 - 3) 細胞懸濁液を遠心分離(1,000 rpm、4°C、5 分間)後、培養上清を除去し、PBS(-)で 1 回洗浄後 PBS (-)で 2.5×10^7 cells/mL に懸濁し、氷冷下で保った。
- (5) 移植方法:
- 1) 移植に使用する針及びシリンジ（いずれもポリプロピレン製ディスポーザブル製品を使用）は十分冷えているものを使用した。
 - 2) 細胞懸濁液を採取する前に穏やかに振とう混和した。
 - 3) 26G の針を取り付けたツベルクリン 1 mL シリンジで氷冷下に保たれた細胞懸濁液を吸い上げ、内筒を押し切つ

た状態で、注射針内およびシリンジ内のエアを抜くとともにシリンジ内および注射針内に隙間なく、細胞懸濁液を充満し、0.2 mL 細胞液を充填した。

4) 移植部位とその周辺の皮膚を消毒用エタノール綿で拭いた後、投与部位をピンセットで軽く摘まみ上げる。注射針を刺し入れ、移植空間を確認後、ピストンを押して細胞懸濁液を注入する。注入後、細胞懸濁液が漏れないように注射箇所を乾綿で軽く押さえながら、ゆっくり引き抜いた。

(6) 移植匹数： 18 匹

(7) 移植順番： No. 001⇒101⇒002⇒102⇒・・・⇒008⇒108

(8) 移植後の細胞残余： 廃棄する。

体重測定

(1) 測定日： day 1、day 8、day 15、day 22、day 29、day 36、day 43

(2) 測定方法： 電子天秤に乗せた計量皿にマウスをのせ、計量値を電子天秤と接続したプリンターより印字した。

(3) 体重値の桁： 0.01 g (集計値は小数 3 位を四捨五入し、少数 2 位まで算出した。

腫瘍径測定

(1) 測定日： day 1、day 8、day 15、day 22、day 29、day 36、day 43

(2) 測定方法： 細胞移植部位を目視及び触診により観察し、腫瘍の長径 (L)、短径 (S) 及び厚み (H) をノギスで測定した。

(3) 腫瘍体積の計算式： 以下の 2 種類 (①・②) の計算式を用いて、それぞれ方法が異なる計算における腫瘍体積を算出した。

$$\text{① 腫瘍体積} [\text{mm}^3] = L [\text{mm}] \times S [\text{mm}]^2 \times 0.5$$

$$\text{② 腫瘍体積} [\text{mm}^3] = L [\text{mm}] \times S [\text{mm}] \times H [\text{mm}] \times 0.5236$$

(4) 長径・短径・厚みの桁： 0.01 mm まで読み取った。

(5) 腫瘍体積の桁： 0.01 mm³ (集計値は少数 3 位を四捨五入し、少数 2 位まで算出する。)

(6) day 1 における留意： 移植前に移植部位に隆起がみられるか否かを確認する。隆起がみられない場合、L, S, H いずれも 0.00 [mm] と記録する。

安楽死処理

群分け時における除外動物あるいは試験終日日 (day 43) の腫瘍および臓器摘出における動物については、ジエチルエーテル麻酔下にて後大静脈・下行大動脈よりの放血安楽死」処置を行った。

腫瘍及び臓器摘出・重量測定・ホルマリン固定

- (1) 腫瘍及び臓器摘出： 各個体につき、腫瘍及び4臓器(両肺、肝臓、腎臓(右)、大腿骨(右))を摘出した。
- (2) 重量測定：
 - 1) 摘出した腫瘍及び4臓器を個体ごとに電子天秤で測定し、表示された数値を記録書に記載した。
 - 2) 測定重量値の桁は 0.1 mgまで読み取った (集計値は少数3位を四捨五入し、少数2位まで算出した。)
- (3) ホルマリン固定： 重量測定した腫瘍及び臓器は各々生理食塩液で洗浄し、水気を切ってから腫瘍及び臓器中央部に剖面を入れた後 (大腿骨(右)は除く)、10%中性緩衝ホルマリンで固定する。

一般状態

- (1) 飼育期間中に、マウスにファイティングやファイティングによる怪我が確認された場合、個別飼育に変更する。
- (2) 飼育期間中、死亡動物を発見した場合、または動物の状態が悪化し回復の見込みがないと判断した場合 (人道的エンドポイント)、動物福祉規定により安楽死など適切な処置をとり、この時点で死亡とみなす。

死亡動物の取り扱い

- ・腫瘍径測定日でない場合、死亡発見時点の腫瘍径を測定する。剖検は行わない。

最終観察後の動物の処置

- ・最終観察日に安楽死処置を行った。

動物福祉

当試験計画は、動物の愛護及び管理に関する法律 (1973.10.01 制定、2006.06.01 改定)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (2006.04.28 制定)、動物の処分方法に関する指針 (1995.07.04 制定、2000.12.01 改正) 並びに社団法人日本実験動物協会の実験動物福祉憲章に基づき制定された動物福祉規定 (2001.07.01 制定、2009.05.01 改定) に従って適切に実施され

ることを、試験施設の動物福祉委員会において審査し、2011年3月14日に通期の承認を受けた（北山ラベス株式会社）。

実験計画の変更

2012年3月7日

変更内容：抽出物C 5 w/w%CRF-1 粉末混餌飼料をDay 18～最終日まで抽出物C 2.5 w/w%CRF-1 粉末混餌飼料に変更

変更理由：2週間経過後、担癌マウスの体重が対照区より5g減ったため。

実験結果

Day 1に培養したPC-3M（ヒト前立腺癌細胞）を18匹のICRヌードマウス（6週齢、雄）の右脇皮下に1匹当たり 5.0×10^6 cells移植し、抽出物Cを混餌飼料としてマウスに6週間（day 43まで）摂取させた。

経時的（1回/週）に体重測定値及び腫瘍径測定値（長径&短径&厚み）を採取した。腫瘍体積については、腫瘍径測定値より概算した。

Day43の体重測定、腫瘍径測定及び混餌投与終了後、マウス全数において、インフルラン麻酔下にて後大静脈・下行大動脈の放血安楽死処置後、腫瘍及び4臓器（両肺、肝臓、腎臓（右）、大腿骨（右）を摘出し、重量測定後、ホルマリン固定/保存した。

本作業は全て、飼育室にて実施した。

試験系の概略を下記に示す。

マウス	Cr1j:CD1- <i>Foxn1</i> ^{nu} (nu/nu) ♂
腫瘍細胞	PC-3M（ヒト前立腺癌細胞）信州大学農学部藤井研究室提供
移植週齢	6週齢
移植部位	右側脇腹皮下

群構成	混餌濃度	体重/腫瘍径 全7時点	摘出	個体 No.
対照	0w/w%	D 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43	D 43	001 ~ 008
抽出物 C	5w/w%	D 1, 8, 15		
	2.5w/w%	D 17 以降より混餌濃度変更、 22, 29, 36, 43	D 43	101 ~ 108

D43 摘出臓器	重量
腫瘍	○
両肺	○
肝臓	○
腎臓 (右)	○
大腿骨 (右)	○

移植日	D 1	2012. 3. 12
摘出日	D 43	2012. 4. 12

腫瘍径 (mm)	
長径	L
短径	S
厚さ	H

体積(mm^3)計算法 I	: $L \times S \times S \times 0.5$
体積(mm^3)計算法 II	: $L \times S \times H \times 0.5236$

2-3-4 蛍光標識担癌マウスへの小豆抽出物経口投与試験

AntiCancer Japan 株式会社に委託した。

2-1-3 で調製した小豆抽出物 B を用い、マウスにおける癌の増殖抑制効果を調べた。

なお、全ての動物試験は Animal Care and Use Committee (IACUC)-protocol に準拠し、National Institute of Health Guide for the Care and Use of Animal under Assurance Number A3871-1 に従って行った。

1. ヒト前立腺癌皮下移植マウスモデルの作製

1) マウスの飼育

4-6 週齢ヌードマウス (BALB/c nu/nu) 雄 10 匹を 1 グループとして 2 群用意した。

まず、オートクレーブ滅菌 (121°C、20 min) した床敷きを敷いたケージ (イノケージ) にマウスを 3 匹/ケージまたは 2 匹/ケージで飼育した。HEPA フィルター濾過空気の下で、オートクレーブ済固体飼料とオートクレーブ滅菌 (121°C、20 min) した Milli-Q 水に 100 ppm ampicillin を添加した飲料水を与え、週 2 回の床敷交換を行った。マウスの個体識別は ear-mark で行った。

2) ヒト前立腺がん皮下移植マウスモデルの作製

ヒト前立腺がん細胞 PC-3-GFP を、10%FBS を含む RPMI-1640 培地で 75cm² Flask を使用して培養した。サブコンフルエントに達した PC-3-GFP を回収し、 5×10^6 cells/ml となるように RPMI-1640 培地で懸濁し、混合細胞懸濁液を調製した。

イソフルランで麻酔したマウスに対して、背部皮下に 29G 針でこの混合細胞懸濁液を背部左側に PC-3-GFP が 5×10^5 cells となるよう移植し、また、背部右側に PC-3-GFP が 5×10^5 cells となるよう移植した。

2. 癌の増殖抑制試験

1) 試薬の調製

混合小豆抽出物を 20 mg/mL になるように飲料水 (Milli-Q 水) に溶解し、試薬とした。

2) 試験方法

(1) 上記 1) にて調製した試薬 10 mL を飲料水 (Milli-Q 水) に添加し、10 匹のマウス (試験群) に毎日投与した。比較として試薬を添加せず、飲料水のみを 10 匹のマウス (コントロール群) に投与した。

(2) 各群のマウスについて、皮下移植日より次の i) ~ i i i) の項目についてモニタリングを行い、癌の増殖抑制に対する効果を調べた。

i) 一般状態

目視による観察を毎週 5 日間連続して行った。

i i) 体重測定

各マウスの体重を毎週 5 日間連続して電子天秤で測定し、記録した。

i i i) In vivo 蛍光イメージング

皮下移植実施日より試験終了まで、蛍光イメージヤーFlourVivo 100 (indecBiosystems) を用いて、週一回の頻度で GFP 蛍光シグナルを撮影した。

2-4 活性成分の精製と同定

ブドウ梗の活性成分の精製と分析

分離、精製

バイオアッセイにおいて有意な生理活性を示した抽出物 P の画分は HPLC の分析条件を検討したところ、下記(Analytical condition B)の条件で 2 つのピークに分離した。分取用カラムとして抽出物 P の 10%含水メタノール溶液 200 μL を ODS-3 (φ 14 mm × 250 mm、粒形 5 μm) カラムに注入し流速 8 mL で分取を行った。ピークの初流、後流を除きメイン部分を分取し、8 回繰り返し、それぞれ 30 mg、15 mg を得た。さらに分析用カラムを用いて、分析同様の条件にて、繰り返し分取を行い、ピークの初流、後流を取り除きメインのピークだけを分取した。

純度の確認

得られた画分を減圧濃縮し、再度純度を HPLC にて確認した。Detector は photodiode array により 210 nm から 450 nm までを検知し確認した。また、分取で得たこの画分はタイプの異なる HILIC カラム、フェニルカラムにて確認した。また、モノマーの混入がないか、TLC(CHCl₃:MeOH:0.1%Acetic acid/70:29:1) にて分析を行い、Rf 値の高いところにヨウ素発色がないかを確認した。そのうえで、分析機器、条件は下記の通り LC-ESI-TOFMS にて分析を行い、分子イオン等の情報から分子構造を推定した。

小豆活性成分の単離、精製

小豆常温抽出物 B より Toyopearl HW40F にて分画した 60%acetone 溶出画分(抽出物 F)に FABP5 遺伝子発現の抑制活性が強く観測されたことから成分を特定するため、分取用中圧クロマトグラフィーを用いて分画を実施した。2-1-6-3 により得た抽出物 F を 2-1-6-4 の通り 700 mg を含水メタノール溶液とし、ODS カラムの担体 80 g に注入しクロマトグラフィーを実施した。生理活性を有したのは F3 および F4 であったため、それぞれ HPLC および LC/MS により分析を行った。

2-5 Flavan-3-ols 高重合体画分の酸加水分解反応

- (1) Amberlite XAD-1180N 処理 MeOH 画分 100 mg、1 N 塩酸 2 mL を耐圧キャップ付きガラスチューブに入れ密閉し、40°Cに加温(ヒト生体内胃液を想定)し、15 時間反応し、HPLC にて確認した。
- (2) Amberlite XAD-1180N 処理 MeOH 画分から Toyopearl HW40F 処理における F3 を 100 mg、1 N 塩酸 5 mL をナスフラスコに入れ、ジムロー菅をつけて reflux し、加水分解を行った。

2-6 実験に使用した機器および測定条件

Analytical instruments
LC GL-7400 (GL サイエンス社製)
PDA detector: GL-7452A
Pump: GL-7410
Column oven: GL-7432

分析用

column: Inertsustain C18 ϕ 4.6 mm × 250 mm (GL サイエンス社製)
Inertsil ODS-3 ϕ 4.6 mm × 250 mm (GL サイエンス社製) (分取でも使用)
Inertsil HILIC ϕ 4.6 mm × 250 mm (GL サイエンス社製)
Inertsil ODS-P ϕ 4.6 mm × 250 mm (GL サイエンス社製)
Inertsil Ph-3 ϕ 4.6 mm × 250 mm (GL サイエンス社製)
YMC-Triart C18 ϕ 4.6 mm × 250 mm (YMC 社製)
Inertsil ODS-swift ϕ 4.6 mm × 250 mm (GL サイエンス社製)
J-Pak Vario PFP ϕ 4.6 mm × 250 mm (JASCO 社製)

分取用

column: Inertsil ODS-3 $\phi 4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$ (GL サイエンス社製)

Flash chromatography :Buch 製

Pump module C-601

Pump controller C-610

Column: sepacore C18 particle size: 40–63 μm , 80 g

表 5 分析用溶出液組成 Analytical condition A (v/v%)

時 間 (min)	メタノール	0.1%酢酸
0	5	95
5	25	75
14	25	75
18	95	5
25	100	0
38	100	0

カラムオーブン 40°C

流速 0.8 mL/min

ODS-3 $\phi 4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$

表 6 分析用溶出液組成 Analytical condition B (v/v%)

時 間 (min)	メタノール	0.1%酢酸
0	5	95
4	5	95
9	30	70
18	30	70
26	95	5
33	100	0
46	100	0

カラムオーブン 40°C

流速 0.8 mL/min

Inertsustain C18 $\phi 4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$

表7 分析用溶出液組成 Analytical condition C (v/v%)

時 間 (min)	メタノール	0.1%酢酸
0	5	95
4	5	95
9	25	75
18	25	75
22	95	5
29	100	0
42	100	0

カラムオーブン 40°C

流速 0.8 mL/min

Inertsustain C18 ϕ 4.6 mm × 250 mm

分取条件

表8 溶出液組成 (v/v%)

時 間 (min)	メタノール	精製水
5	5	95
14	25	75
18	25	75
25	95	5
38	100	0
40	100	0

カラムオーブン 40°C

流速 8 mL/min

ODS-3 ϕ 14 mm × 250 mm

LC/MS 分析および LCMS/MS 分析

前記 2-1 及び 2-4 において得た各粗精製物、単離した成分について、表 9、10 に示した条件によって、それぞれ LC/MS 分析を行った。また、得られた結果より精密分子量を計算し、校正をした LCMS/MS 分析を行った。

Acquity UPLC (Waters),

Xevo QToF MS (Waters)

表 9 MS 測定機の分析の条件

装置	Xevo (登録商標) QTOF (Waters 製)
キャピラリー電圧	ポジティブ 0.5 kV
イオン化法	ESI
ネブライザーガス	窒素 250°C
スキャン	100～5000 m/z
Ion source temp	100°C
Desolvation temp	250°C
Desolvation gas flow rate	700 L/hr

表 10 LC 分析の条件

装置	ACQUITY UPLC (Waters 製)
カラム	InertSustain C18 3 μm φ 4.6 mm × 250 mm
カラム温度	40°C
グラジェント	
溶離液	A 液 : 0.1% ギ酸 B 液 : 0.1% ギ酸アセトニトリル
B 液	10%→10 分 10%保持→50 分 50%→60 分 100%→100%保持
流量	0.5 mL/min
流入量	7.5 μL
検出	UV280 nm (PDA)

第3章 結果

3-0 ブドウ梗由来粗抽出物の研究のきっかけとなる実験

平成 21 年信州大学農学部松永の卒業論文において様々な食品をスクリーニングしたところブドウの梗熱水抽出物に転移原因遺伝子 FABP5 を抑制する効果が確認された。

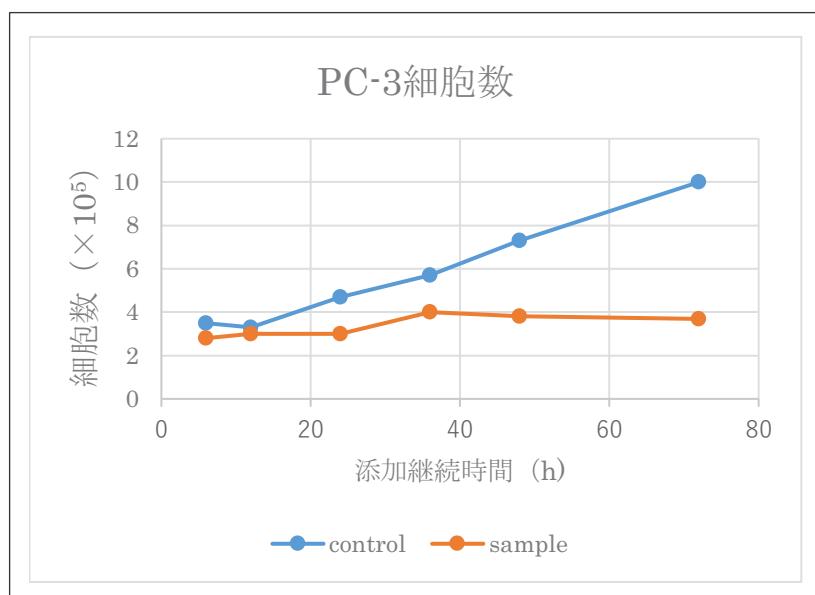


図 1-A ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 にブドウ梗熱水抽出物を添加 (1 mg/mL) (平成 21 年度信州大学農学部 松永智里の卒業論文 p23 より引用)

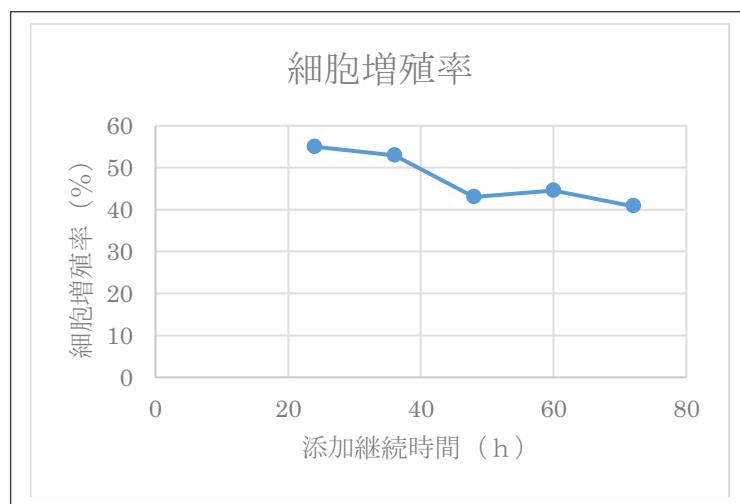


図 1-B ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 にブドウ梗熱水抽出物添加による細胞増殖率 (平成 21 年信州大学農学部 松永智里の卒業論文 p23 より引用)

図1-Aに示したように、コントロールでは経時的に細胞が増殖するのに対し、ブドウ梗由来抽出物（抽出濃縮物A）を添加したものはヒト前立腺癌細胞株PC-3の増殖が抑制されることが確認された。

図1-Bに示したように、経時的に細胞の増殖が抑制され、培養開始後48時間では、細胞増殖が約6割抑制されていることが確認できた。

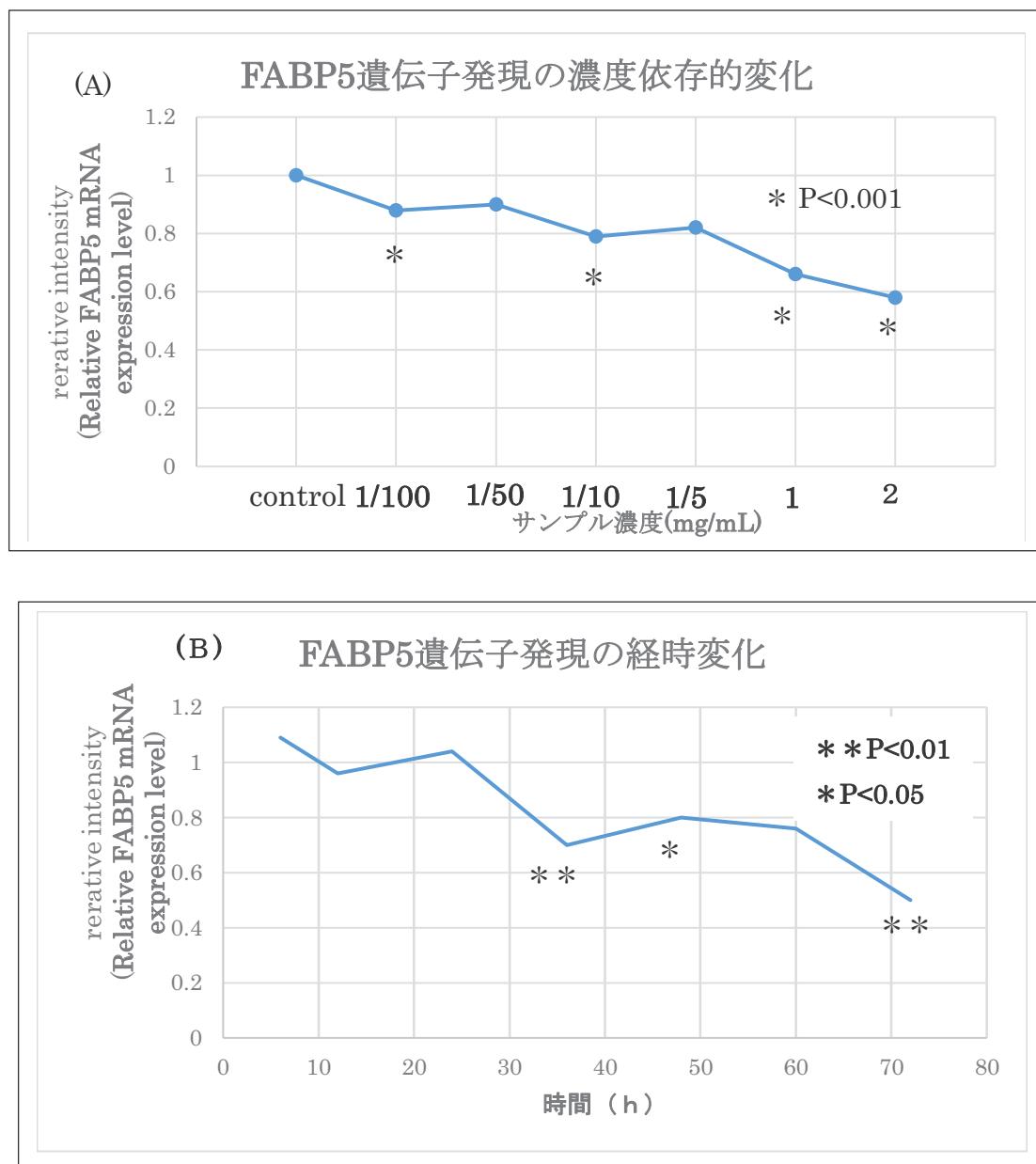


図2 ブドウ梗由来抽出物（抽出物A）の添加濃度(A)および時間(B)依存的に前立腺癌細胞PC-3株においてFABP5遺伝子の発現（平成21年信州大学農学部 松永智里の卒業論文p22より引用）

図2 (A) に示したように、ブドウ梗由来抽出物（抽出物A）の添加濃度依存的に前立腺癌細胞株PC-3においてFABP5遺伝子の発現レベルが低下することが確認された。

図2 (B) に示したように、ブドウ梗由来抽出物（抽出物A）添加後時間依存的に前立腺癌細胞株PC-3においてFABP5遺伝子の発現レベルが低下することが示され、特に培養開始36時間後および72時間後で顕著にFABP5遺伝子の発現レベルが低下することが確認された。

また、細胞形態を観察したところ、図3に示したように、ブドウ梗由来抽出物（抽出物A）を添加した細胞はいずれもヒト前立腺癌細胞株PC-3が示す角ばった形態から丸い形態に変化していることが確認された。図3には一例として、2mg/mLブドウ梗由来抽出物（抽出物A）を添加した場合の電子顕微鏡写真を示した。これは正常前立腺細胞モデルであるRWPE-1の細胞形態と同様であった。

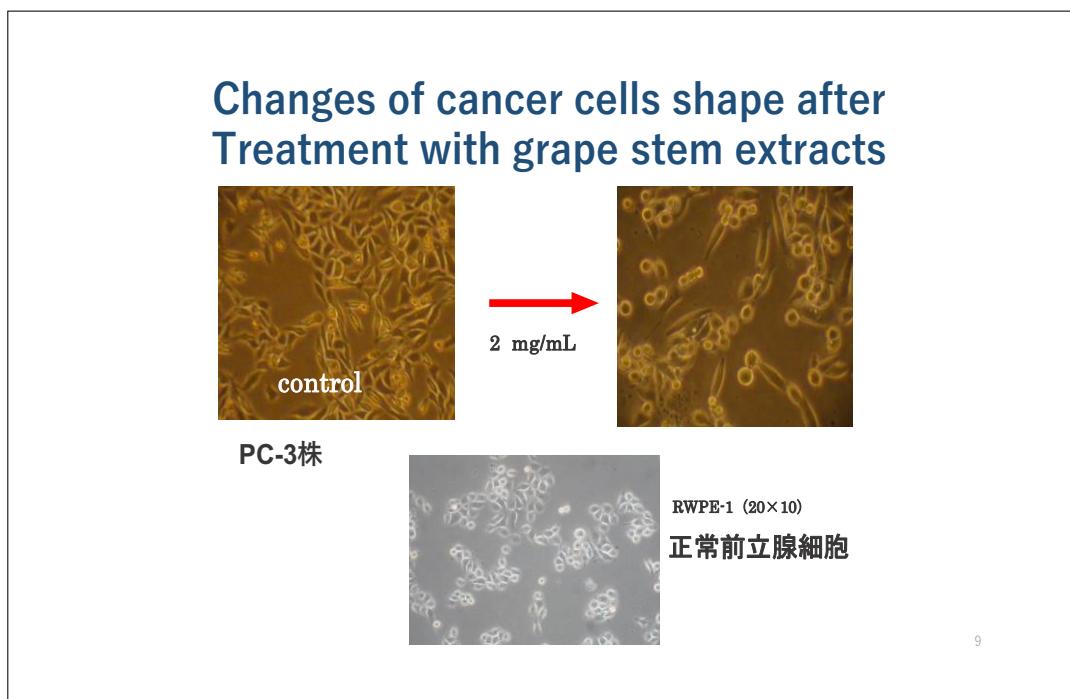


図3 前立腺癌細胞株PC-3へのブドウ梗由来抽出物添加による細胞形態の変化

3-1 ブドウの分画と生理活性

3-1-1 ブドウ梗由来抽出物の分画と細胞試験

A. ブドウ梗由来抽出物（抽出物 A、GSE）の調製

3-0のことからブドウの梗に含まれる活性分子の追求をすることになった。本活性分子の分画については、活性がある分子は何かという基本的な考えに基づいて分画したものであり、あらかじめ、プロアントシアニジンを推定した精製は行っていない。従って抽出から活性分子の精製に至る過程で、工程ごとに活性試験を行い、活性がどの画分にあるかを追求した結果に得られたものが精製された分子である。

熱水抽出物に抗腫瘍活性及び、FABP5 の発現抑制活性が得られたことから、次の分画として、ブドウ梗中に含まれる成分のうち、生理活性物質が水溶性、脂溶性、その中間的性質なのかを見極めるため、オルガノ社製の Amberlite XAD-1180N を用いて分画を行った（図 4 分画 I – 工程 1 抽出物 A, B, C）。

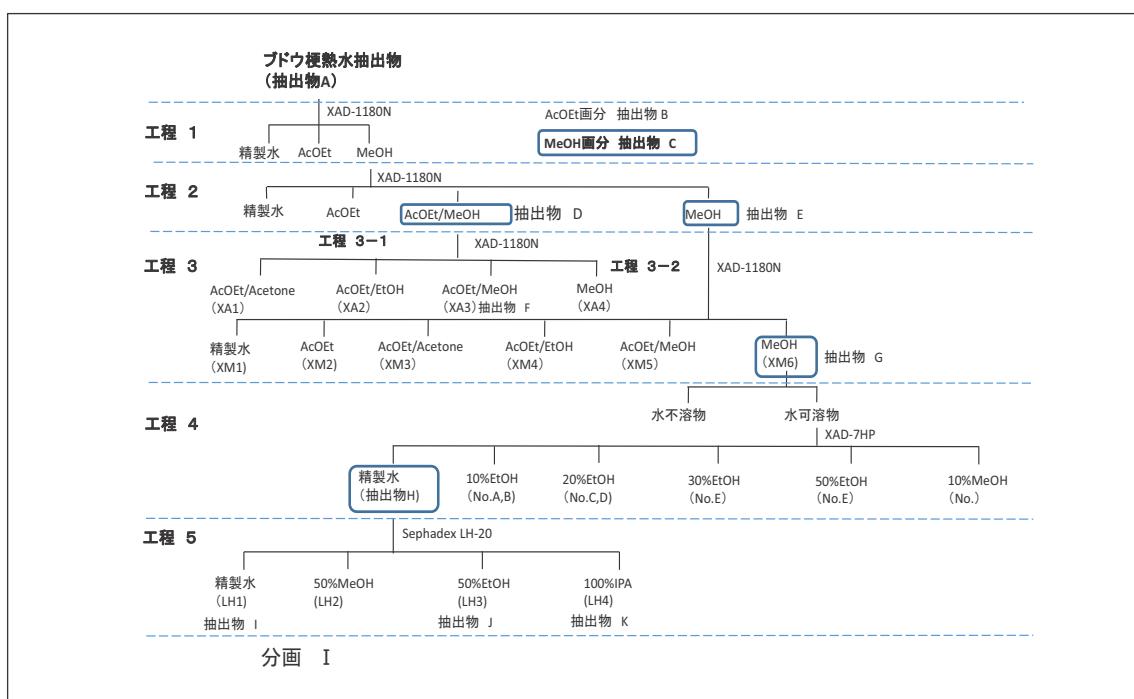


図 4 ブドウ梗熱水抽出物 A より Amberlite XAD を用いた活性分画 I (工程 1~5、抽出物 A~K)

この樹脂はポリスチレンで多孔性の合成吸着剤で吸着面積は広い。電子親和力を利用し、吸着、非吸着、さらに移動層への溶解性とのバランスで吸着したものを溶出することができる。

この樹脂のもうひとつの特徴として、水溶液あるいは水に低濃度で混合されている脂溶性物質、たとえば大量の水に溶け込んでいる香気成分を回収するのに優れている。従って一般的には水溶液を吸着させ、全く吸着されないものを流去後、低いアルコール濃度から徐々に高い濃度にして溶出させる。ただし、この溶媒のグラジエント方法では大雑把に成分を分けたい場合、いたずらに画分を増やし、活性物質が濃縮されない。また、水分の多い画分も多くできるため濃縮に時間がかかる。

そこで、我々は Schreier らの方法を参考に、非吸着物を流去後、有機性の強い溶剤を先に流し、ついで水溶性の有機溶剤を流し、それぞれを溶出させた。この手法は 1980 年から 1990 年代にかけて Schreier、Winterhalter らが果実の香気成分の前駆体は配糖体で存在するとし、その分離手段として勢力的に用いている³⁷⁻³⁹⁾。

我々はこの理論を応用することで生理活性と化学成分のおおざっぱな分類、例えは極性や親和性程度で関係性を見出し、徐々に活性成分を絞り込む計画で XAD を用いた。植物体の熱水抽出物において予想される抽出成分は、糖類、多糖類、アミノ酸、タンパク質、配糖体、脂質、ポリフェノール類、テルペン類、有機酸類、アルカロイド、ステロイド、核酸、リンを含んだ化合物など予想されるが、この分画では少なくとも完全な水溶性物質と全く水に溶けない物質、その中間的性質をもつ物質に分けることができる。

分画 I – 工程 1 の非吸着の水溶出画分、酢酸エチル溶出画分、メタノール溶出画分の生理活性をみたところ、非吸着画分と 100% 酢酸エチル溶出物の画分を添加したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 において、FABP5 遺伝子の発現レベルに大きな変化はなかったが、メタノール溶出物（抽出物 C）を添加したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 においては FABP5 の遺伝子の発現レベルの抑制が見られた（図 5）。

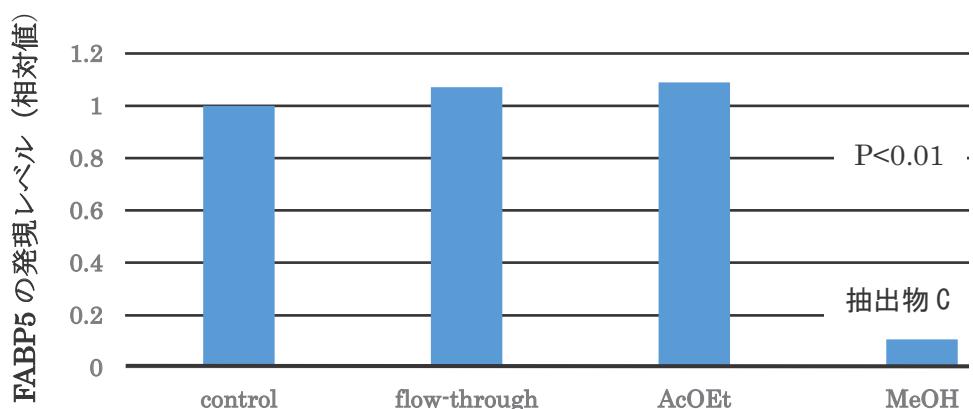


図 5 Amberlite XAD-1180N により分画した画分の FABP5 遺伝子の発現
(平成 21 年度信州大学農学部 松永智里の卒業論文 p24 より引用)

非吸着画分（flow through）に含まれる少なくとも糖類や、有機酸、一部アミノ酸には活性がないことが分かる。酢酸エチル溶出画分、メタノール溶出画分には抗腫瘍活性があり、FABP5 遺伝子の発現抑制活性はメタノール溶出画分にのみある。ここで注目すべきは抗腫瘍活性と FABP5 遺伝子の発現抑制活性の画分を分離することができたことである。TLC 展開後、ニンヒドリン反応を行ってもいずれの画分においても反応しない。

熱水抽出物の HPLC および LC/MS により標準品と保持時間が一致した成分を図 6 に示す。

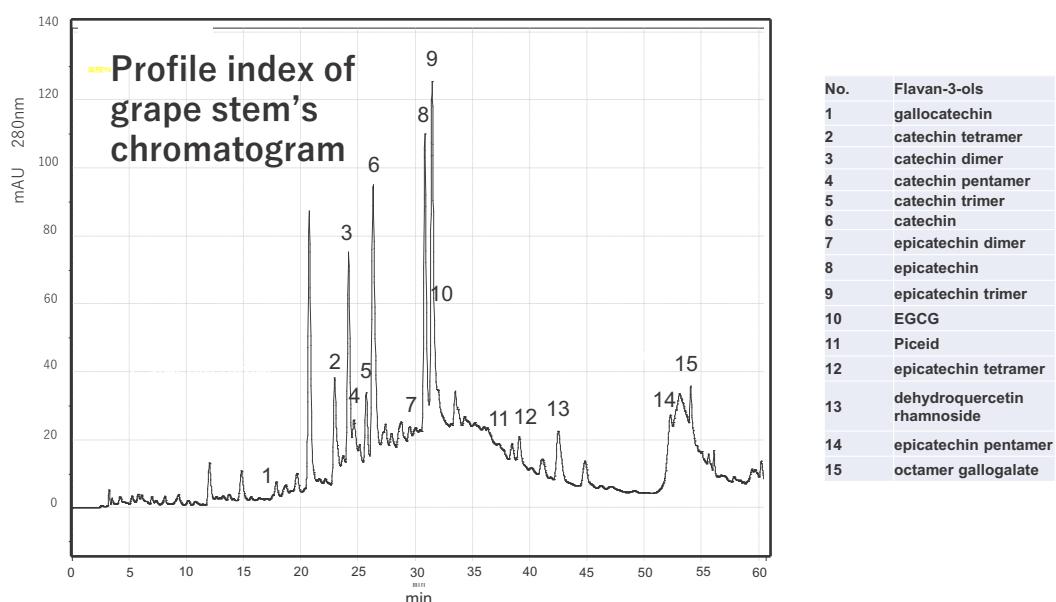


図 6 grape stem の熱水抽出物の HPLC クロマトグラムおよび標準品、質量分析などで帰属した成分 (Analytical condition A)

B. ブドウ梗由来抽出物（抽出物 C～K）の分離分画

FABP5 遺伝子発現抑制試験 メタノール溶出物（抽出物 C）
引き続き活性のあった MeOH 画分（抽出物 C）を図 4 分画 I – 工程 2において、再度、Amberlite XAD-1180N を用いて溶出溶媒を変えて分画を行った。工程 1 でメタノール画分に FABP5 遺伝子の抑制活性があったことからメタノール画分のうち、さらに親油性のより高いものと水溶性に近いものを区別するため酢酸エチル・メタノールの混合溶媒を用いた。

また、同様の方法によって確認したところ、図 4において、工程 1 で分離精製されたブドウ梗由来抽出物（抽出物 C）、工程 2 で分離精製されたブドウ梗由来抽出物（抽出物 D、抽出物 E）、工程 4 で分離精製されたブドウ梗由来抽出物（抽出物 H）の添加によっても、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3において、FABP5 遺伝子の発現が抑制されることが確認された。

FABP5 タンパク質発現抑制試験（XA3、ブドウ梗由来粗抽出物 G）

図 7 に示されたように、工程 3-1 で調製した（3）酢酸エチル／メタノール溶液溶出物および上記 1. 工程 3-2 で調製したブドウ梗由来抽出物（XA3、抽出物 G）の添加によって FABP5 タンパク質の発現が顕著に抑制されることが確認された。

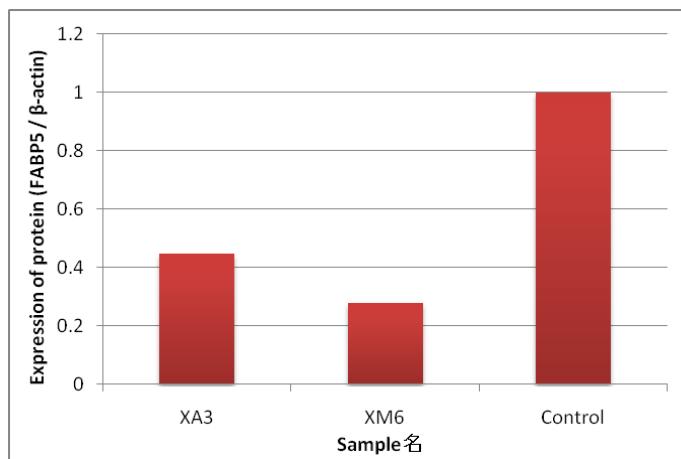


図 7 ブドウ梗由来抽出物（XA3、抽出物 G）添加による FABP5 タンパク質の発現（平成 22 年度信州大学農学部 近藤善香の卒業論文 p42 より引用）

FABP5 遺伝子発現抑制試験 (XM6、ブドウ梗由来抽出物 G)

図4 工程3-1で調製した(3)酢酸エチル／メタノール溶液溶出物および図4の工程3-2で調製した(6)メタノール溶出物(XM6, 抽出物G)によって、FABP5遺伝子の発現が抑制されていることが確認された(図8)。

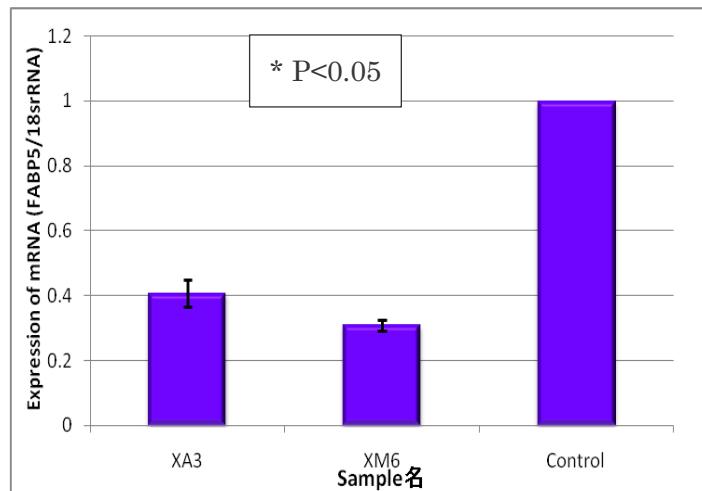


図8 XM6、ブドウ梗由来抽出物 G の FABP5 遺伝子の発現

(平成22年度信州大学農学部 近藤善香の卒業論文 p42より引用)

ウェスタンプロット法により検出した FABP5 タンパク質のバンドを Image J (アメリカ国立衛生研究所 (NIH) のフリーソフト) により定量解析するとともに (図 7)、FABP5 遺伝子の発現量も定量解析したところ (図 8)、mRNA とタンパク質レベルでいとも発現抑制量はほぼ同等であった。

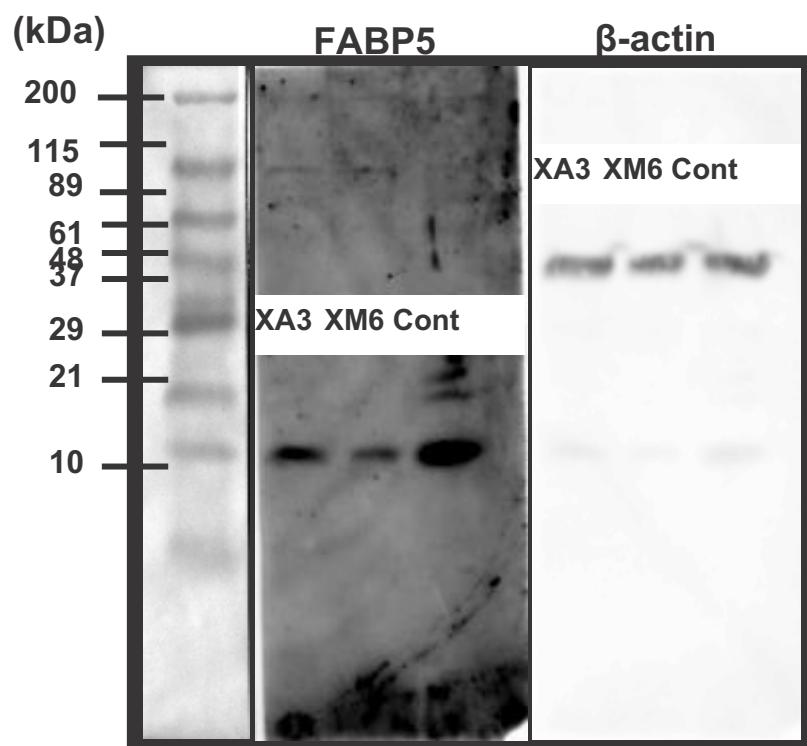


図 9 ウェスタンプロット解析結果（平成 22 年度信州大学農学部 近藤善香 卒業論文 p41 より引用）

ブドウ梗由来抽出物（抽出物 J）の添加による FABP5 遺伝子の経時発現量

図 10 に示されたように、培養開始 6 時間後から FABP5 遺伝子の発現量が約 30%抑制されはじめ、培養開始 72 時間後には約 50%まで FABP5 遺伝子の発現量が抑制された。ブドウ梗由来抽出物（抽出物 J）の添加によって FABP5 遺伝子の発現量が時間依存的に抑制されることが確認された。

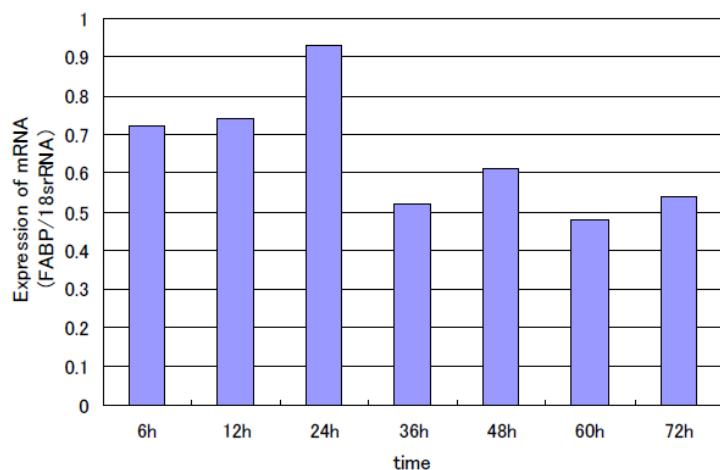


図 10 抽出物 J 添加による FABP5 遺伝子発現(平成 22 年度信州大学 農学部 近藤善香 卒業論文より引用)

図 11 のように、(2) 50%メタノール溶出物を除く全ての試料において FABP5 遺伝子の発現が 50%以上抑制され、特に (3) ブドウ梗由来抽出物（抽出物 J）または (4) ブドウ梗由来抽出物（抽出物 K）はコントロールに比べて FABP5 遺伝子の発現量が 80%程度と顕著に抑制された。

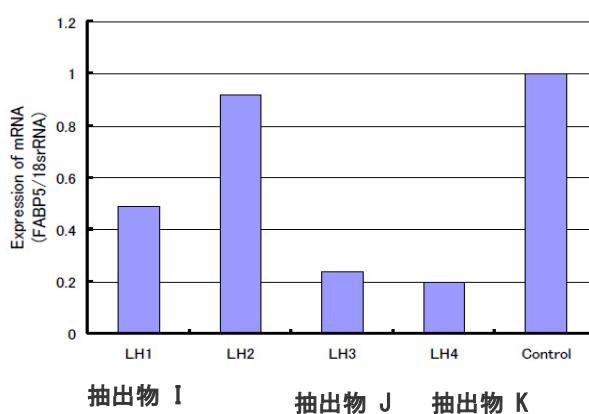
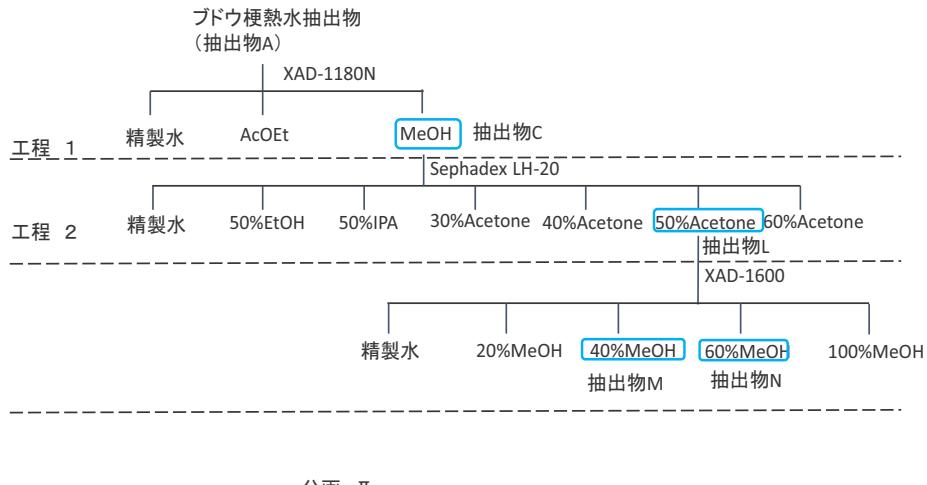


図 11 抽出物 I, J, K 添加による FABP5 遺伝子発現 (平成 22 年度信州大学農学部 近藤善香 卒業論文より引用)

C. ブドウ梗由来抽出物（抽出物 L～N）の分画



分画 II

図 12 抽出物 C の Sephadex LH-20、Amberlite XAD-1600 による分画（抽出物 L～N）

ブドウ梗由来抽出物（抽出物 L、M、N）を用いて、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現への影響を確認したところ、いずれも FABP5 遺伝子の発現を抑制することが確認できた。

D. 凍結梗の常温（25°C）アセトン抽出試験及び分画（抽出物 S）

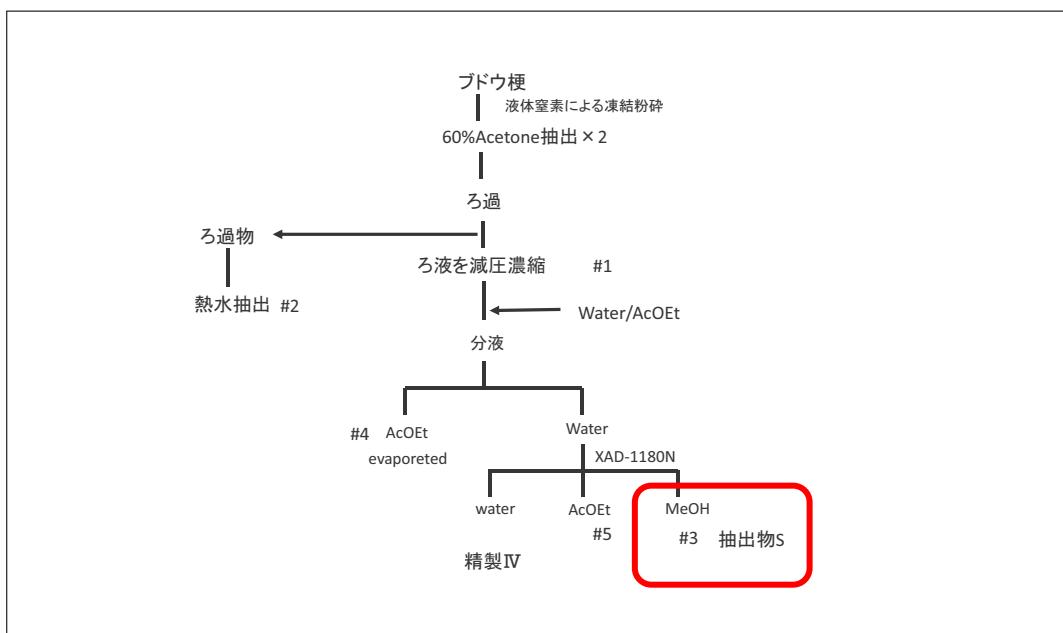


図 13 凍結梗の常温（25°C）アセトン抽出による分画（抽出物 S）

外傷によるファイトアレキシンなどの生成を防ぎ、できる限り本来存在していた成分を抽出するために液体窒素で凍結した梗を粉碎、速やかにアセトン水溶液で抽出を行った。ブドウ梗由来抽出物（抽出物 S）について、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現への影響を確認したところ、FABP5 遺伝子の発現を抑制することができた(図 14 #3)。

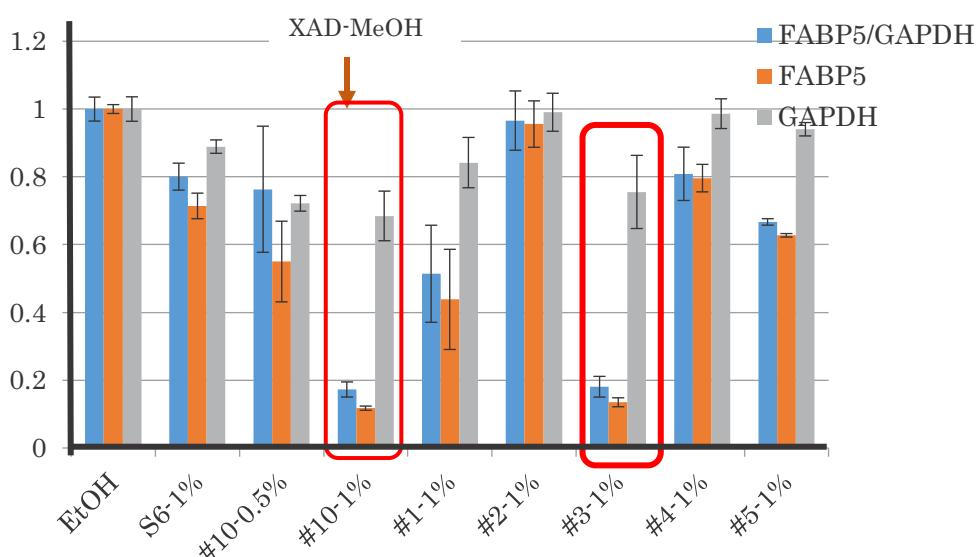


図 14 XAD-MeOH 画分および分画#3（抽出物 S）の FABP5 遺伝子発現

E. ブドウの皮、種、枝由来抽出物の分離分画

図 15、16 に示したように、ブドウ残渣（皮と種）由来抽出物を添加した場合には、1.5 mg/mL という高濃度を添加した場合にも、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 における FABP5 遺伝子の発現レベルがあまり低下しないことが確認できた（図 15）。

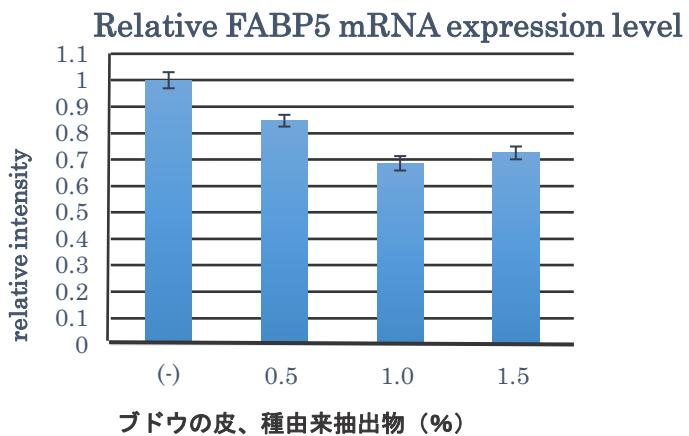


図 15 ブドウ皮種由来抽出物の添加における FABP5 遺伝子の発現

一方、ブドウ梗由来抽出物（抽出物 A）を添加した場合には、0.12 mg/mL という低濃度を添加した場合でも、FABP5 遺伝子の発現レベルが低下することが確認できた。さらにこのブドウ梗由来抽出物（抽出物 A）の添加濃度依存的にヒト前立腺癌細胞株 PC-3 において FABP5 遺伝子の発現レベルが低下することも確認できた（図 16）。

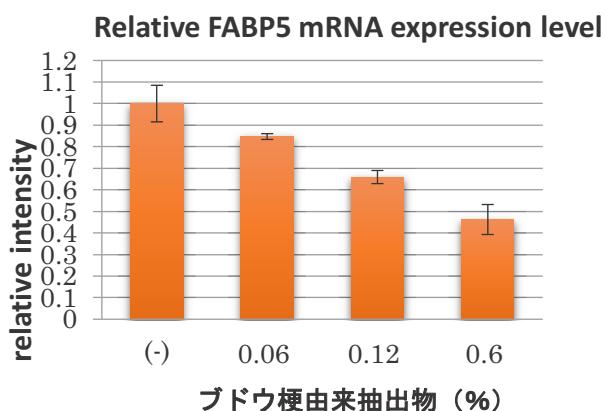


図 16 ブドウ梗由来抽出物（抽出物 A）の添加における FABP5 遺伝子の発現

従って、この結果より、FABP5 遺伝子の発現を抑制する効果は、ブドウの種や皮を由来とする抽出物は有さず、ブドウの梗を由来とする抽出物が特異的に有するものであることが確認できた。

3-1-2 ブドウ梗由来抽出物の動物試験

ラットにおける単回経口投与毒性試験

ブドウのステム熱水抽出物の Amberlite XAD-1180N 処理におけるメタノール溶出画分濃縮物（以下、抽出物 C と略）の 2,000 mg/kg を 1 群雌雄各 5 匹の Cr1:CD (SD) ラットに単回経口投与し、その毒性を検討したところ、観察期間中、被験物質群の雌雄各 1 例で、泥状便または軟便が一過性に認められた。

体重及び剖検では、いずれの動物にも被験物質投与の影響は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下において XAD 処理のメタノール画分である抽出物 C を 2,000 mg/kg の用量で経口投与した場合、便性上の変化を示すが比較的速やかに回復することが確認できた。

細菌を用いる復帰突然変異試験

ブドウのステム熱水抽出物の Amberlite XAD-1180N 処理におけるメタノール溶出画分濃縮物（抽出物 C）の遺伝子突然変異誘発性について細菌を用いて塩基対置換型の遺伝子突然変異を検出する *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, 及び *Escherichia coli* WP2uvrA の 3 菌株と、フレームシフト型の遺伝子突然変異を検出する *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA1537 の 2 菌株を使用し、プレインキュベーション法により試験を実施した。用量設定試験及び本試験とも代謝活性化系存在下（以下、代謝活性化法と略）及び非存在下（以下、直接法）の条件で試験を実施した。

その結果、用量設定試験及び本試験とも、代謝活性化の有無に関わらず、いずれの菌株においても陰性対照群復帰変異コロニー数に対して用量依存性のある 2 倍以上の増加は見られず、再現性のある結果が得られた。

以上の結果から、本実験条件下では、用いた 5 菌株に対して抽出物 C に遺伝子突然変異誘発作用はないものと判断された。

担癌マウスにおける抽出物 C の抗腫瘍効果試験

Day 1 に培養した PC-3M(ヒト前立腺癌細胞)を 18 匹の ICR nu/nu マウス（6 週令、雄）の右脇腹皮下に 1 匹当たり 5.0×10^6 cells 移植し、抽出物 C を混餌飼料としてマウスに 6 週間 (day 43 まで) 摂取させた。試験概要と経時的（1 回/週）に体重測定及び皮膚表面隆起の大きさ（長径、短径及び厚み）をノギスで測

定して腫瘍体積を概算した結果を図 17～19 に示す。

また、混餌飼料投与終了後 (day 43) マウス全数において、腫瘍及び 4 腸器（両肺、肝臓、腎臓（右）、大腿骨（右））を摘出し、重量測定後、ホルマリン固定/保存した。

試験概要

担癌マウスにおける CSTHWXM(抽出物 C)の抗腫瘍効果試験

マウス	Crlj;CD1-Foxn1nu(nu/nu) ♂
腫瘍細胞	PC-3M(ヒト前立腺細胞) 試験委託者提供
移植週齢	6 週齢
移植部位	右側脇腹皮下

群構成	混餌濃度	体重/腫瘍径 全7時点	摘出	個体 No.
対照	0	D 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43	D 43	001～008
CSTHWXM	5 w/w%	D 1, 8, 15	D 43	101～108
CSTHWXM	2.5 w/w%	D 18 以降より混餌濃度変更, 22, 29, 36, 43	D 43	101～108

D43 摘出臓器	重量
腫瘍	○
両肺	○
肝臓	○
腎臓(右)	○
大腿骨(左)	○

移植日	D1	Feb-21.'12
摘出日	D43	Apr-3.'12

腫瘍径(mm)	
長径	L
短径	S
厚さ	H
体積(mm ³)計算法 I	: L × S × S × 0.5
体積(mm ³)計算法 II	: L × S × H × 0.5236

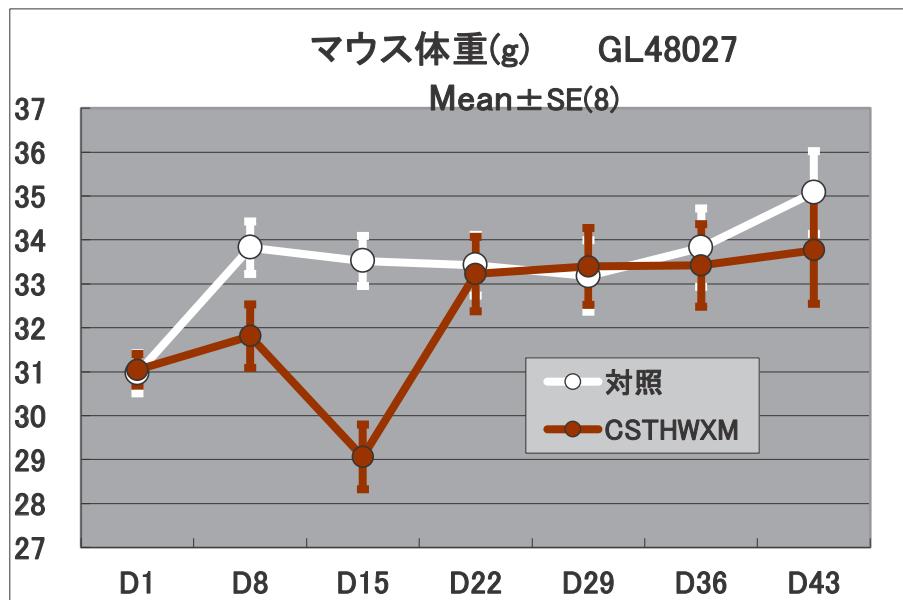


図 17 CSTHWXM(抽出物 C)混餌投与によるマウス体重の変化

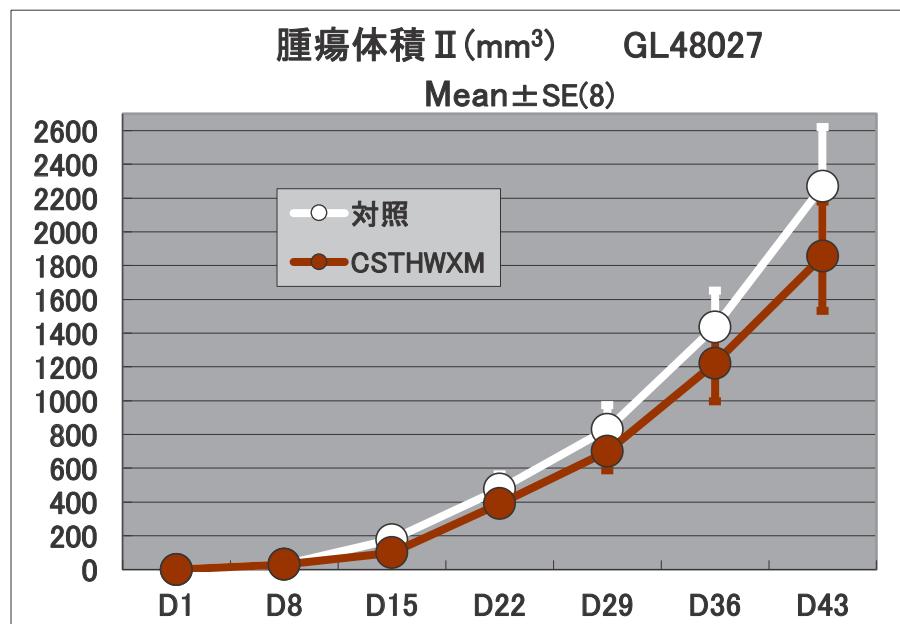
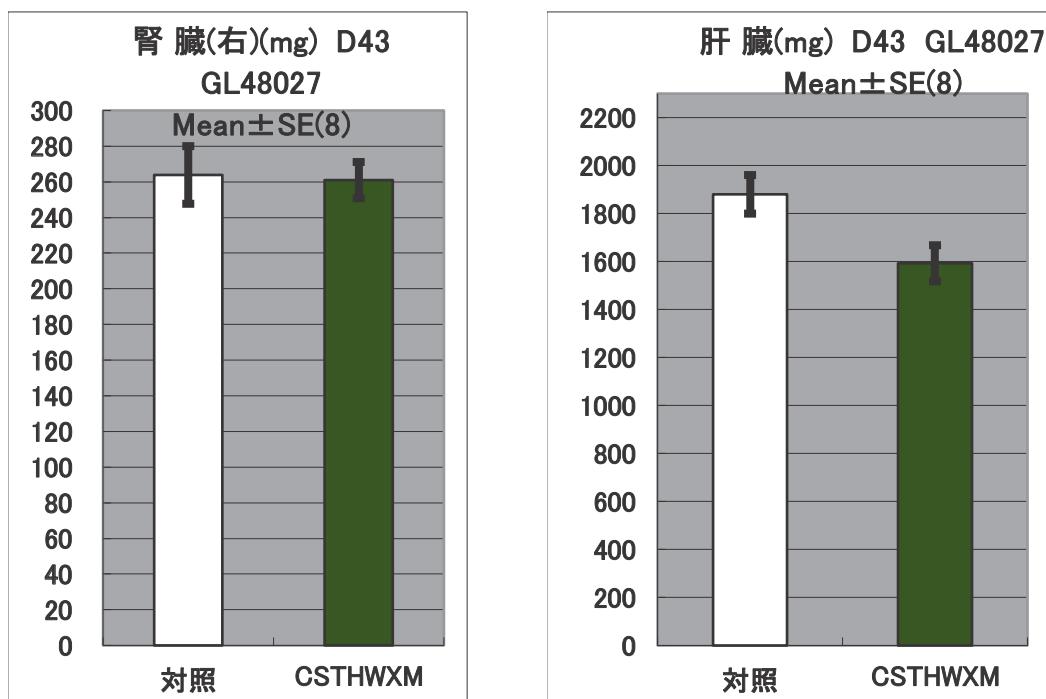
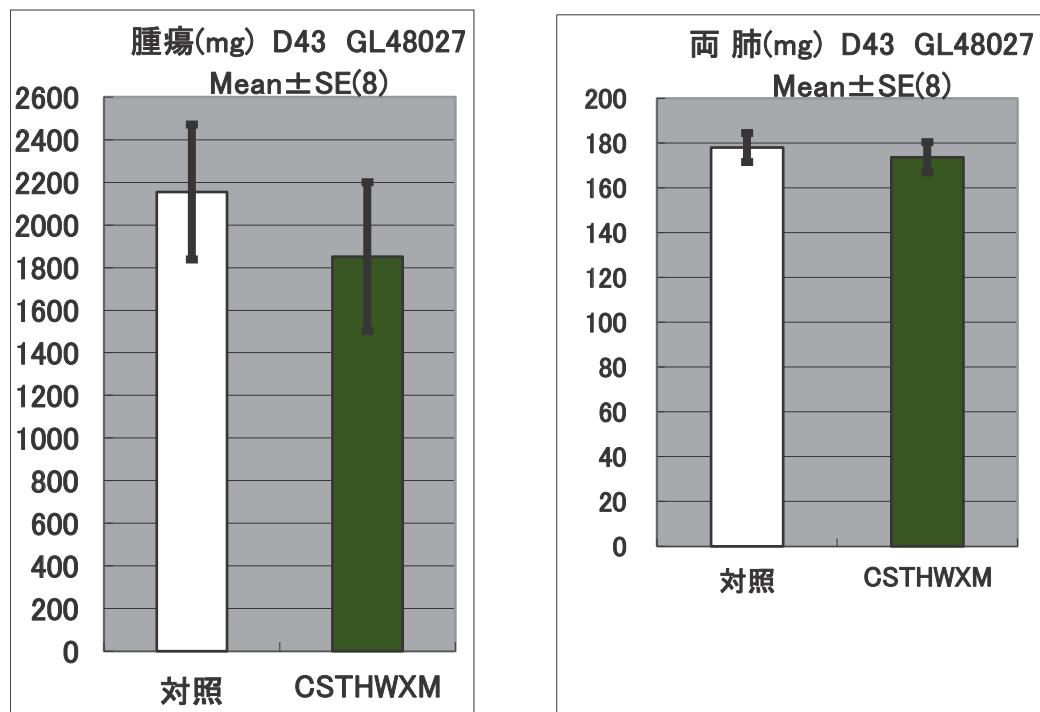


図 18 CSTHWXM(抽出物 C)混餌投与によるマウス腫瘍体積の変化



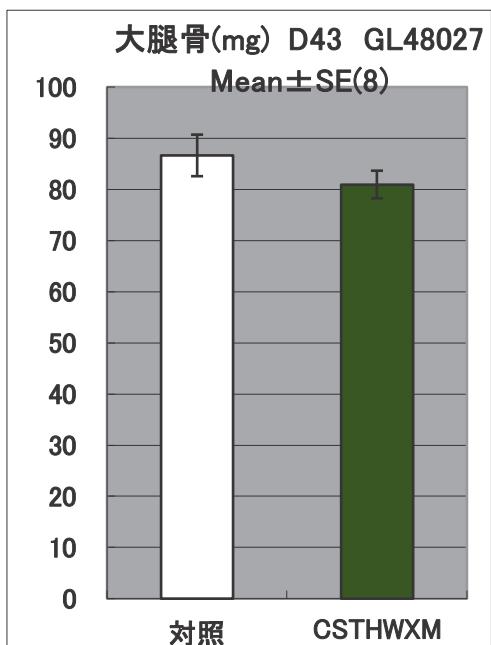


図 19 CSTHWXM(抽出物 C)混餌投与によるマウスの腫瘍および各臓器重量の変化

図 17 のマウスの体重について 5%の混餌濃度では顕著な体重の減少が見られたので 15 日経過後、2.5%の混餌濃度に変更した。43 日まで投与し、体重は回復した。

図 18 の腫瘍の体積はおよそ 20%減少したが、図 19 の各臓器の重量について 15%～20%の減少が見られ、投与濃度が濃すぎ、毒性側に働いた可能性が示唆された。

3-1-3 ブドウ梗由来粗抽出物の活性成分の精製と同定

LH3(抽出物 J)、LH4(抽出物 K)において FABP5 遺伝子の発現抑制があったことから HPLC により分析を行った。

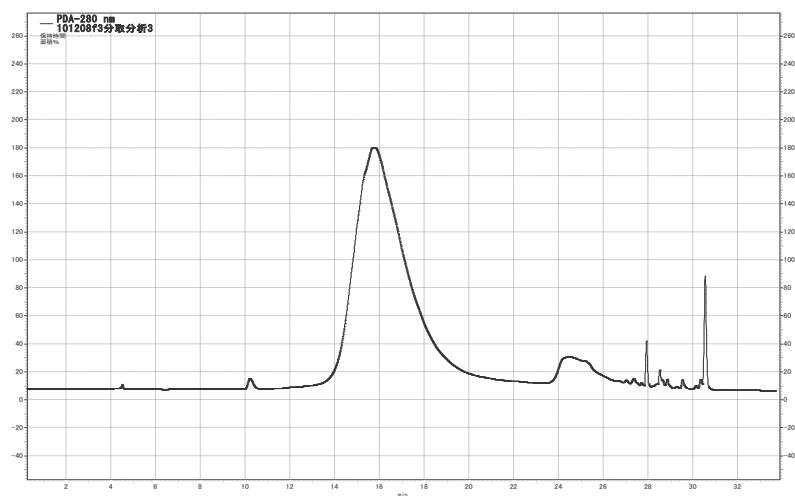


図 20-A LH3(抽出物 J)の 280 nm のクロマトグラム

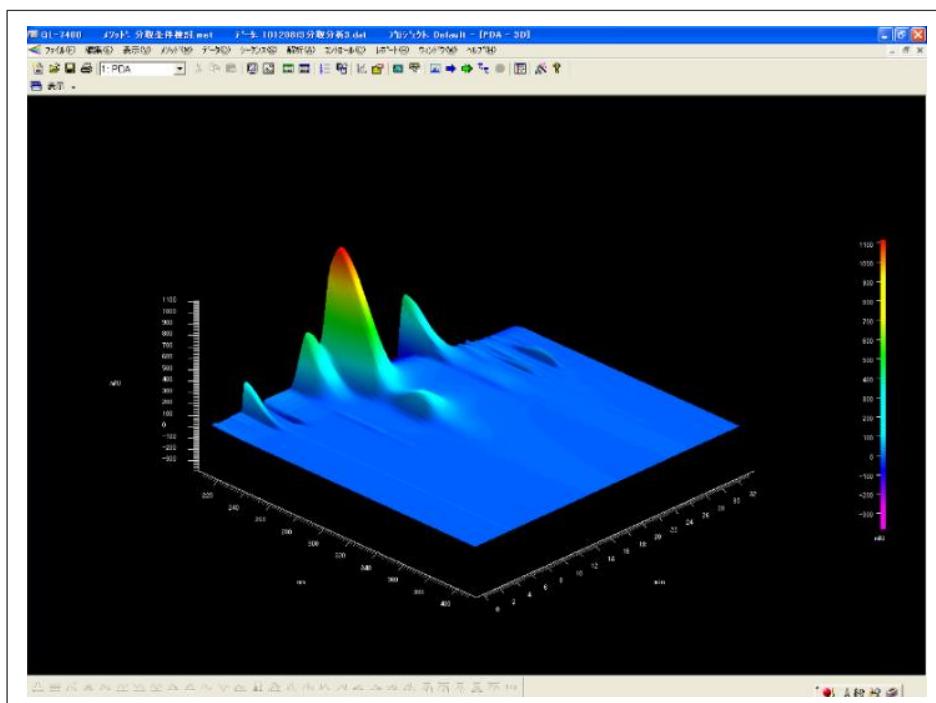


図 20-B LH3(抽出物 J)の 280 nm におけるクロマトグラム及び PDA による 210 ~410 nm の 3D クロマトグラム (Analytical condition C)

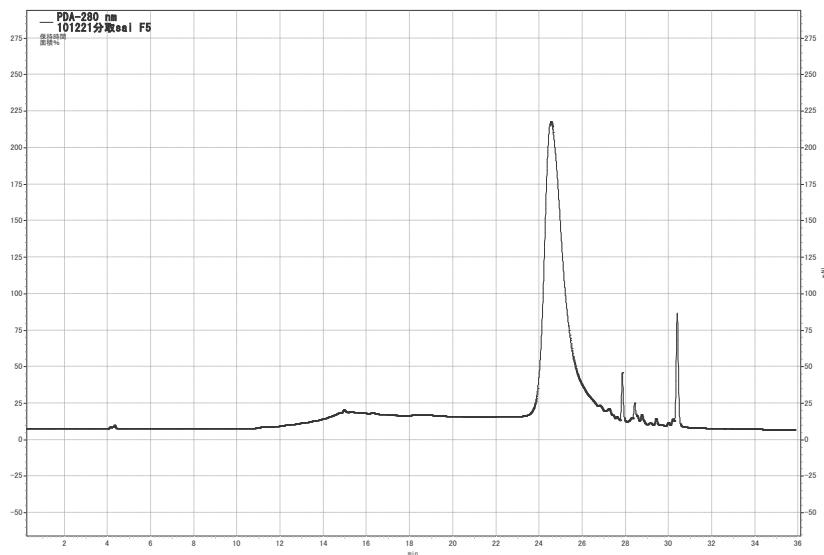


図 21-A LH4(抽出物 K)の 280 nm におけるクロマトグラム

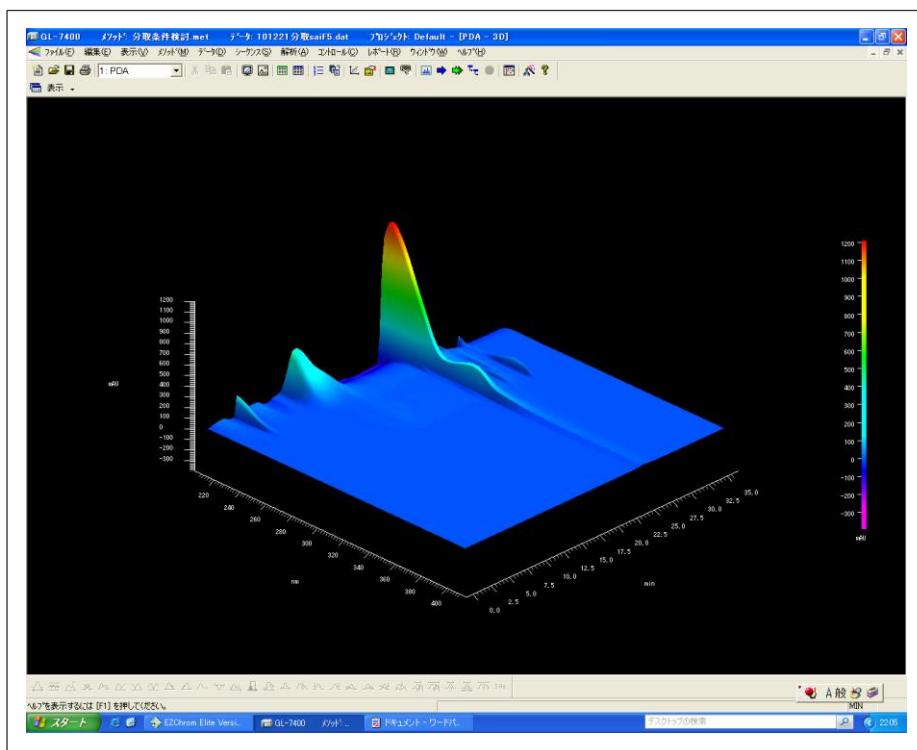


図 21-B LH4(抽出物 K)の PDA による 210~410 nm の 3D クロマトグラム
(Analytical condition C)

生理活性のあった抽出物 J、K のクロマトグラムを図 20、21 に示す。いずれも ブロードなピークを示しており、主要成分以外にも化合物が混在しているが 3D クロマトグラムから主要成分は 280 nm の最大吸収波長を示した。

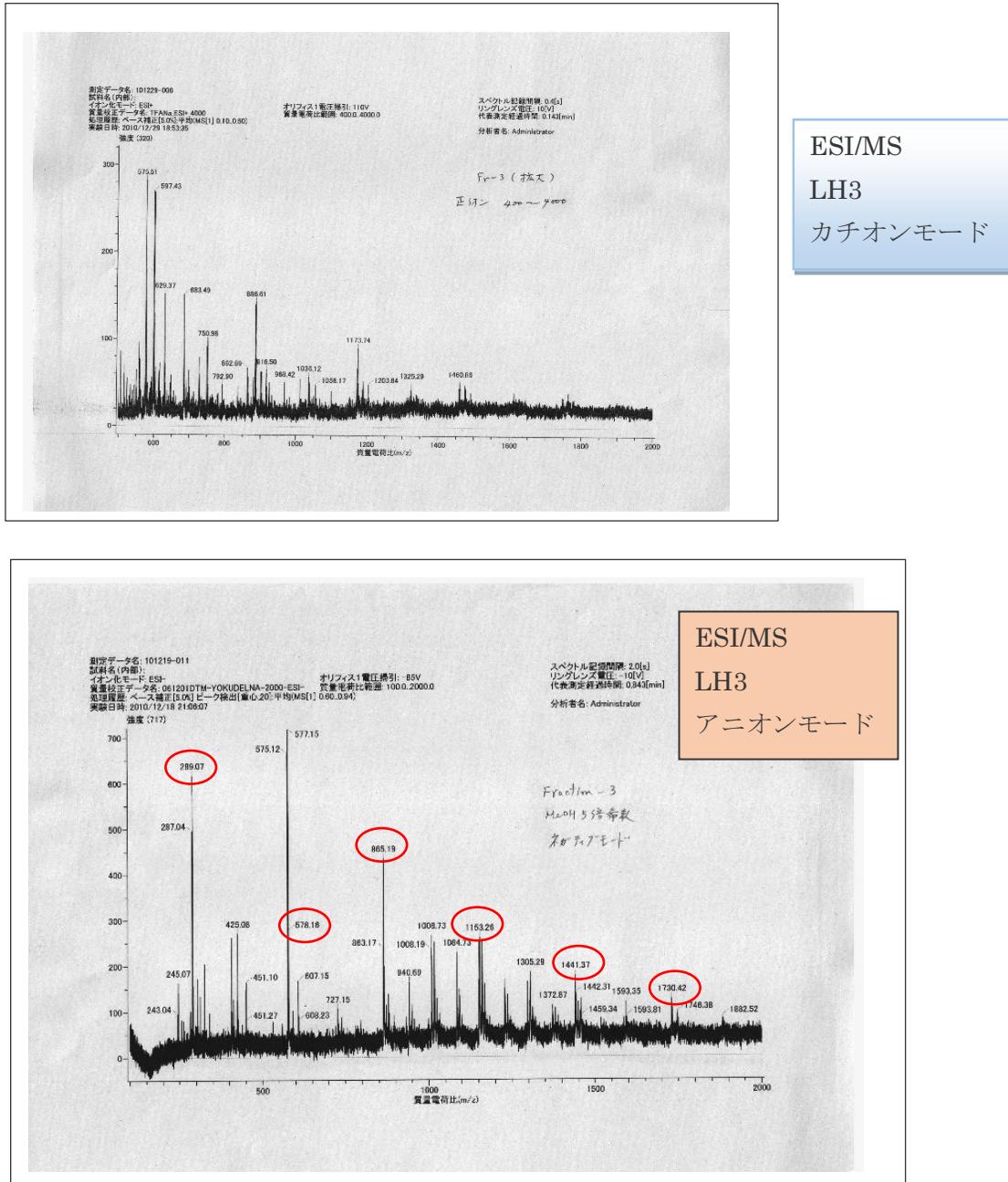


図 22-A LH3(抽出物 J)の ESI/MS

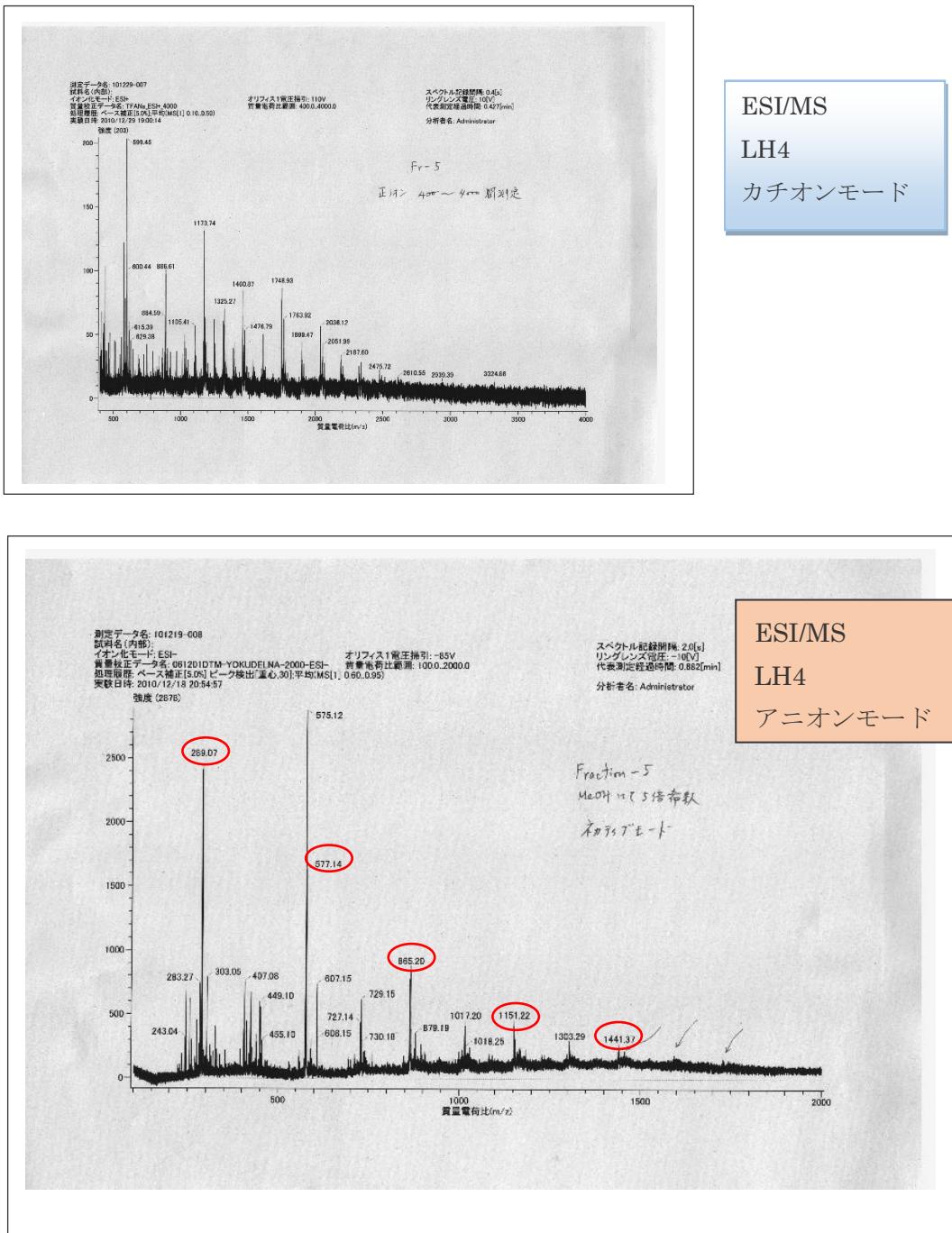


図 22-B LH4(抽出物 K)のESI/MS

上記図 22-A、B の ESI/MS の結果、分子イオンまたはフラグメントイオンを見ると m/z 290 ピークの繰り返しが一部、観測されたことから (+)-catechin または (-)-epicatechin の重合体が構造式に含まれていることが示唆された。活性画分にはこのような重合体が含まれていることが推定された。

また、分子量が 2,000 あるいは 3,000 である可能性が示唆されたため、活性分子の単離にはサイズクロマトグラフィー及び物性の特徴から ODS (C18) での分画が必要と考え図 23 のような単離精製から精度の高い分画計画を検討、実施した。

Sephadex や Toyopearl のようなサイズクロマトグラフィーにおいては一般的には最終段階の単離精製に使用されるのが一般的ではあるが活性のある化合物は一つとは限らないこと、精製物があまりに多いと生理活性試験の検体数がむやみに増えるため、ある程度まとまった分子量ごとで活性分子を集めることを第一に考え、溶出溶媒の種類や混合比を変更しながら、圧力をかけたフラッシュクロマトグラフィーを行った。

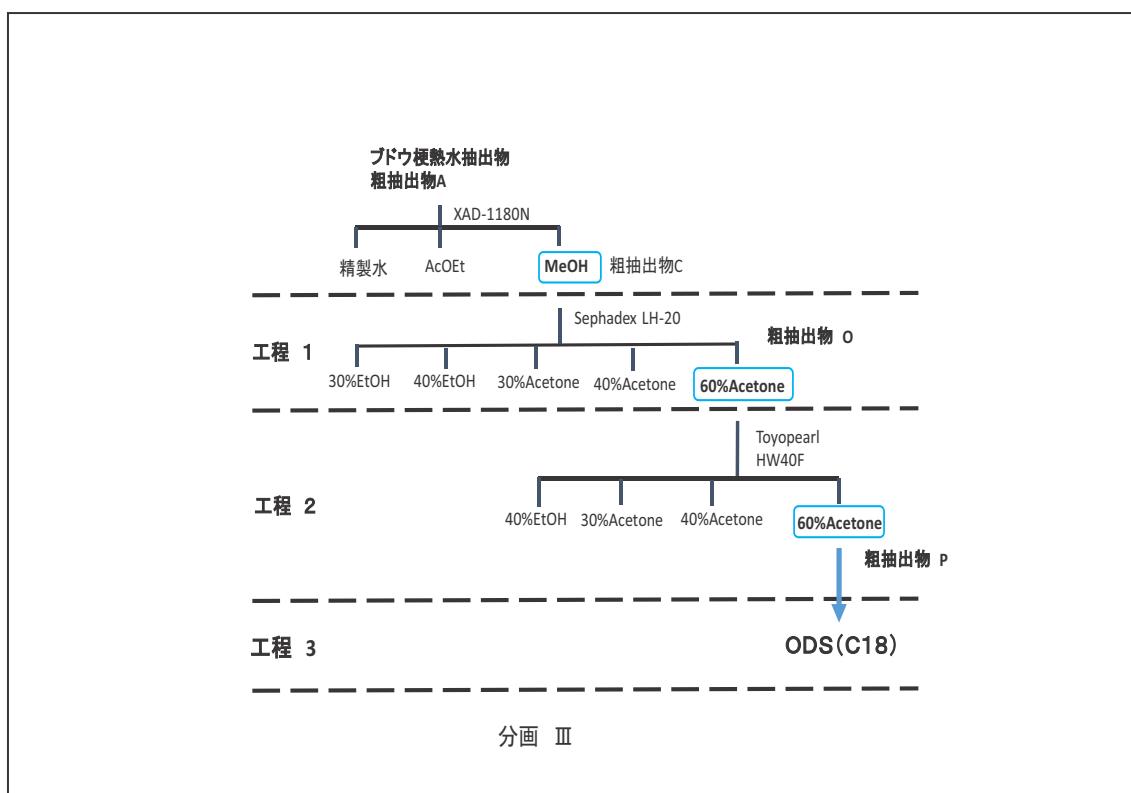


図 23 活性分子の単離精製フロー

Toyopearl HW40F にて分離した画分の FABP5 遺伝子の発現抑制活性を図 24 に示す。60% acetone 溶出画分である抽出物 P に抑制活性を確認した。

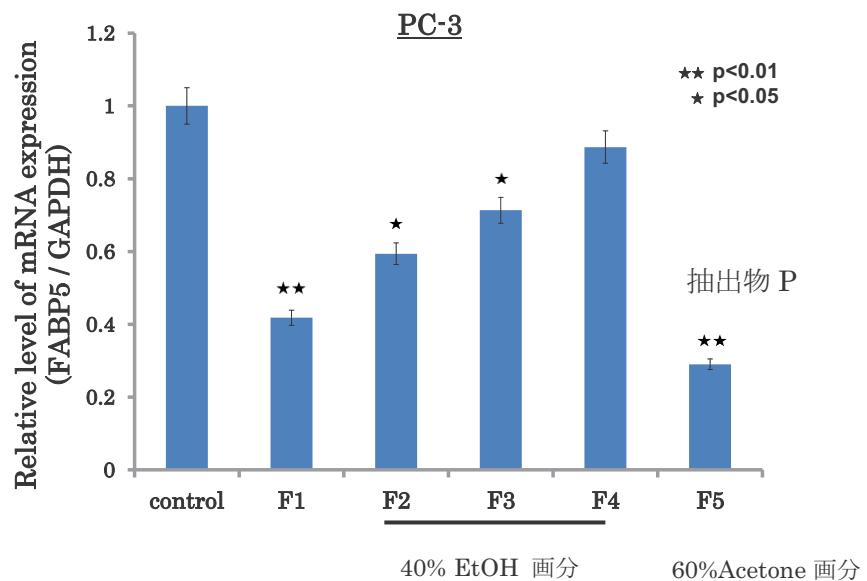


図 24 Toyopearl HW40F で分離された画分の FABP5 遺伝子の発現

Toyopearl HW40F で分離された抽出物 P のクロマトグラムを次に示す。

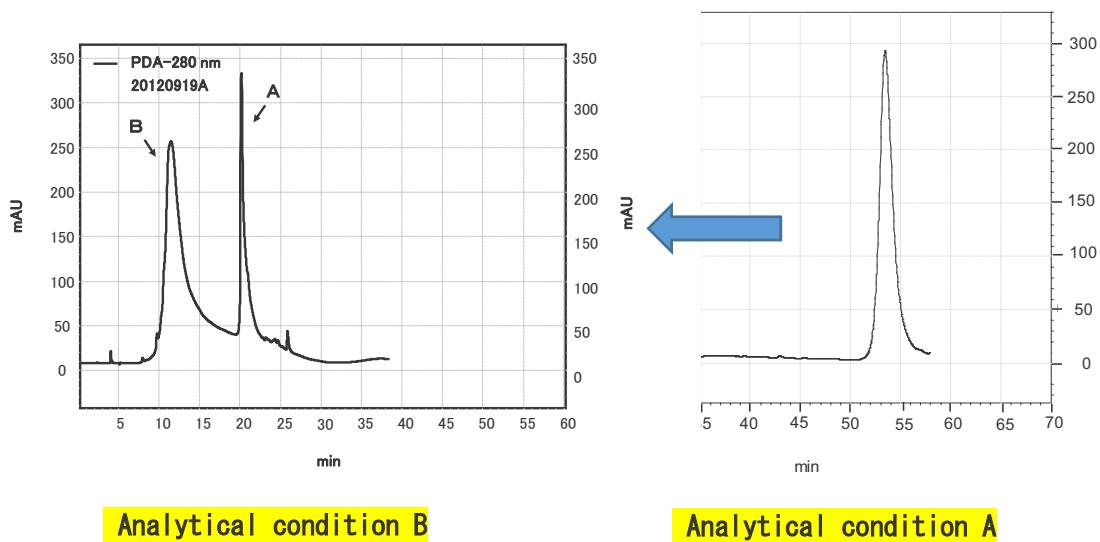


図 25 Toyopearl HW40F で分離された抽出物 P のクロマトグラム

化合物 A、B の分離精製

1) HPLC

抽出物 P (60%アセトン溶出物) を、表 2 に示す条件にて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけ、図 25 のクロマトグラムのうちピーク A の画分およびピーク B の画分をそれぞれ Inertsil ODS-3 ($\phi 14\text{ mm} \times 250\text{ mm}$) 分取用カラム、($\phi 4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$) 分析用カラム (GL サイエンス社) にて繰り返し分取した。

なお、分取して得られた画分について、抽出物 P (60%acetone 溶出物) の測定と同じ条件 (表 2) にて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分析したところ、図 26 (ピーク A) および図 27-A (ピーク B) のチャートに示されるように、それぞれ純度の高いピークであることが確認できた。

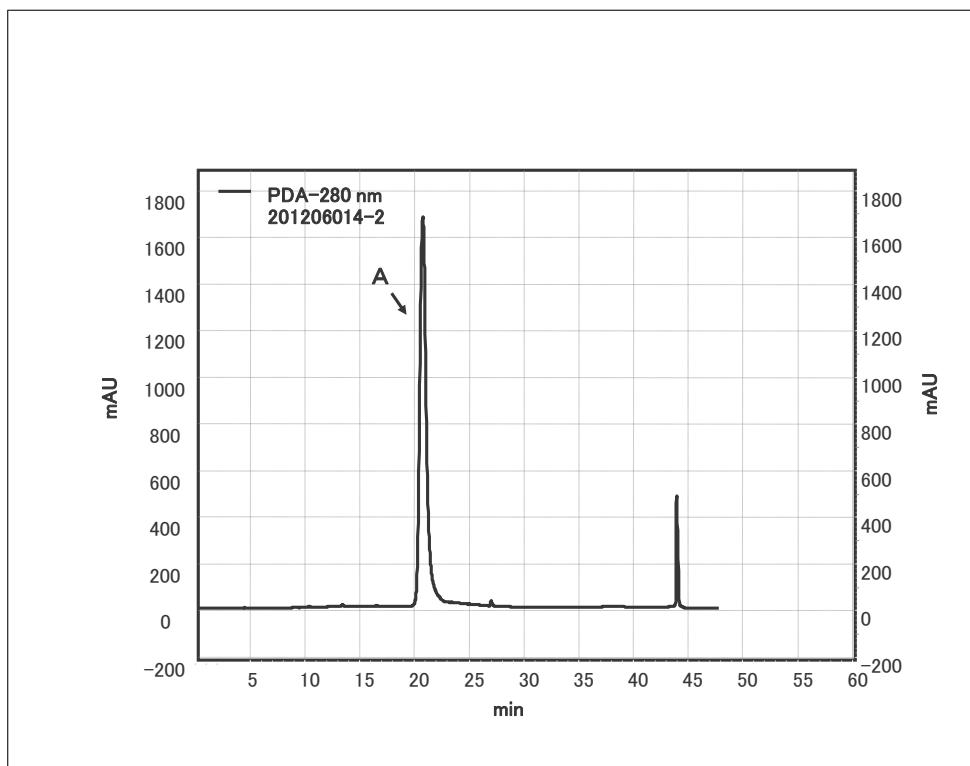


図 26 単離された化合物 A (Analytical condition B)

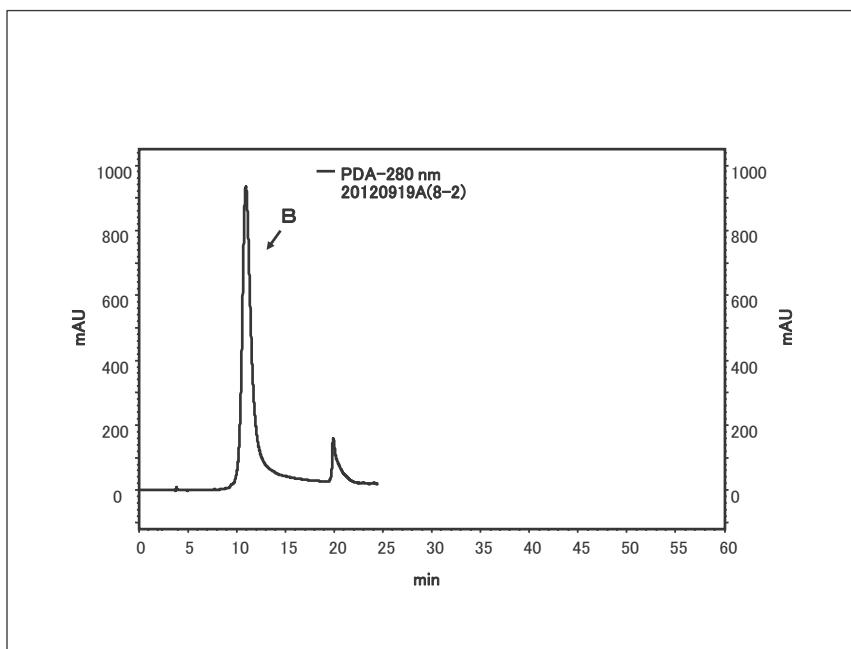


図 27-A 単離された化合物 B (Analytical condition B)

これらの物質はいずれも UV 最大吸収波長が 280 nm であり、flavanol 類の UV 最大吸収波長と一致した。しかし、前記の分取カラムによる HPLC において、標準品である catechin、epicatechin、EGCG、procyanidin B3 等の既知の catechin 類や、catechin の 3 量体程度の catechin の低分子オリゴマーと比べて保持時間が長かった。(図 27-B)

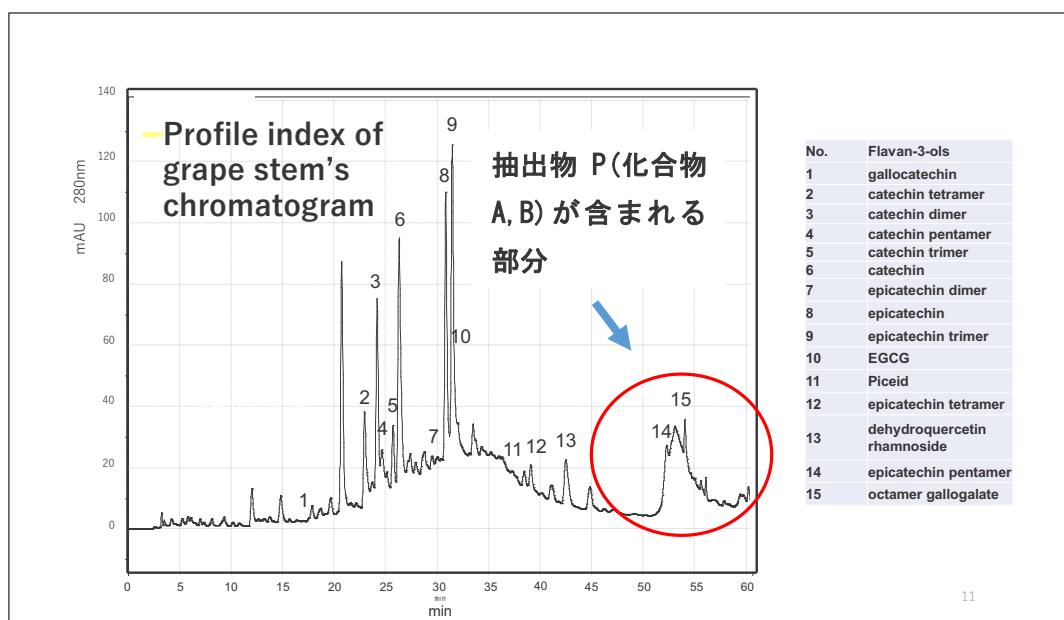


図 27-B (図 6) 梗抽出物の HPLC クロマトグラムにおける化合物 A、B が含まれるピーク (Analytical condition A)

表 1 化合物 A, B を単離するための HPLC 分析条件(分取用)(Analytical condition B)

溶出液組成		(v/v%)
時間	メタノール	精製水
0~5	5	95
5~14	25	75
14~18	25	75
18~25	95	5
25~38	100	0
38	100	0

カラムオーブン 40°C

流速 0.8 mL/min、8 mL/min

Inertsil ODS-3 ϕ 4.6 mm × 250 mm、 ϕ 14 mm × 250 mm

表 2 化合物 A, B を単離するための HPLC 分析条件(Aalytical condition B)

溶出液組成		(v/v%)
時間	メタノール	0.1%酢酸
0~5	5	95
5~14	25	75
14~18	25	75
18~25	95	5
25~38	100	0
38	100	0

カラムオーブン 40°C

流速 0.8 mL/min

Inertsil ODS-3 ϕ 4.6 mm × 250 mm

表3 HPLC Analytical condition A~D

Analytical condition of HPLC					
Analytical condition A mobile phase (v/v%)			Analytical condition B mobile phase (v/v%)		
time(min)	acetonitrile	0.2%acetic acid	time(min)	methanol	0.1% acetic acid
0	0	100	0	5	95
10	6	94	5	25	75
30	20	80	14	25	75
45	20	80	18	95	5
60	100	0	25	100	0
			38	100	0

Column oven 40°C
Flow rate 0.8ml/min
Inertsustain C18 etc.
Φ4.6×250mm
Particle 5μ

Analytical condition C mobile phase (v/v%)			Analytical condition D mobile phase (v/v%)		
time(min)	methanol	0.1% acetic acid	time(min)	methanol	0.1% acetic acid
0	5	95	0	5	95
4	5	95	4	5	95
9	30	70	9	25	75
18	30	70	18	25	75
26	95	5	22	95	5
33	100	0	29	100	0
46	100	0	42	100	0

2) LC/MS 分析および LCMS/MS 分析

前記1)において得た各成分について、表5に示した条件によって、それぞれLCMS/MS分析を行った。また、得られた結果より精密分子量を計算し、表4に示した条件によって、校正をしたLCMS/MS分析を行った。

表4 MS測定機の分析の条件

装置	Xevo (登録商標) QTOF (Waters 製)
キャピラリー電圧	ポジティブ 0.5kV
イオン化法	ESI
ネブライザーガス	窒素 250°C
スキヤン	100～5000 m/z
Ion source temp.	100°C
Desolvation temp.	250°C
Desolvation gas flow rate	700 L/hr

表 5 LC 分析の条件

装置	ACQITY UPLC (Waters 製)
カラム	Inertsustain C18 3 μm $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$
カラム温度	40°C
グラジェント	
溶離液	A 液 : 0.1% ギ酸 B 液 : 0.1% ギ酸アセトニトリル
B 液	10% → 10 分 10% 保持 → 50 分 50% → 60 分 100% → 100% 保持
流量	0.5 mL /min
流入量	7.5 μL
検出	UV280 nm (PDA)

3) ピーク A 由来成分

前記 1) の HPLC によって分取されたピーカ A 由来の成分について LC/MS 分析により図 28 のチャートが得られた。

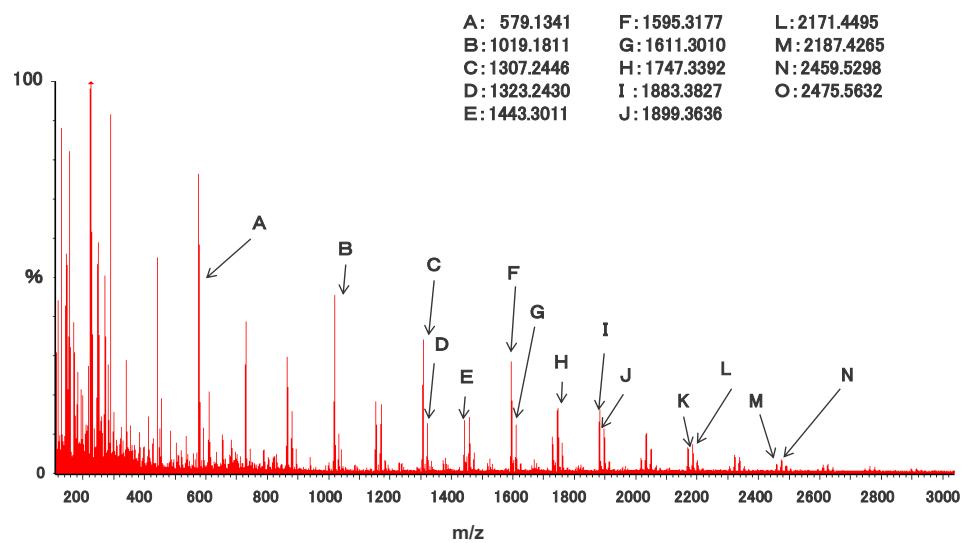


図 28 ピーク A の質量分析

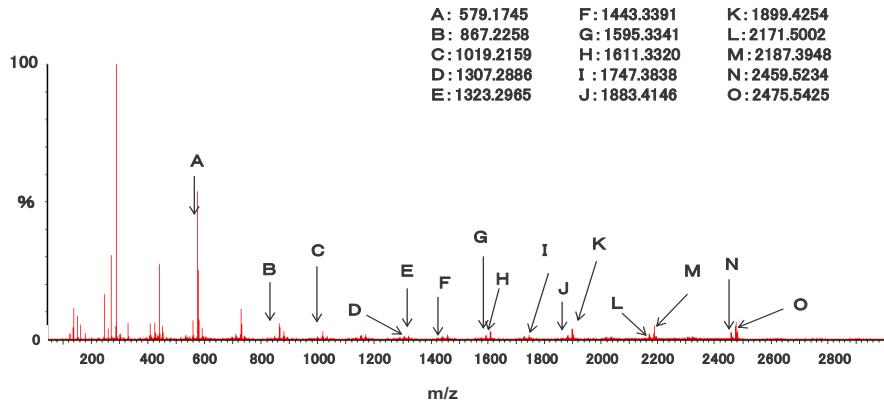


図 29 ピーク A の MS/MS

図 28 に示された 2475、2187、1899、1611、1323、867、579 等のフラグメントイオンから、ピーク A 由来の成分は、カテキンまたはエピカテキンの重合体であることが示唆された。さらに、1323、1611、1899、2187、2475 のフラグメントイオンから、(エピ) ガロカテキン、ガロイル基を有することも示唆された。

これらの結果から、化合物の候補として、(エピ) ガロカテキンが 1 分子、(エピ) カテキンが 7 分子、ガロイル基をひとつ持つ候補化合物 A-1 と、これと分子量が近似する、(エピ) カテキン 7 分子に 3 分子のガロイル基を持つ候補化合物 A-2 が推定された。

候補化合物 A-1 : $C_{127}H_{102}O_{53}$ 分子量 : 2474.5286 ($M+H$)⁺ 2475.5364

候補化合物 A-2 : $C_{128}H_{98}O_{54}$ 分子量 : 2474.4922 ($M+H$)⁺ 2475.5000

LCMS/MS 分析を行った結果、図 29 に示された実測値が 2475.5425 であり誤差範囲が 3 ppm 以下に収まること、および、モノガレートを示す 2459.5298 が観察されたことから、ピーク A 由来の成分は、前記の候補化合物のうち、ガロカテキンまたはエピガロカテキンを 1 分子、カテキンまたはエピカテキンを 7 分子、およびガロイル基をひとつ持つ候補化合物 A-1 であると推定できた。

MS/MS においてコリジョンエネルギーを変えたフラグメントチャートを示す(図 30)。

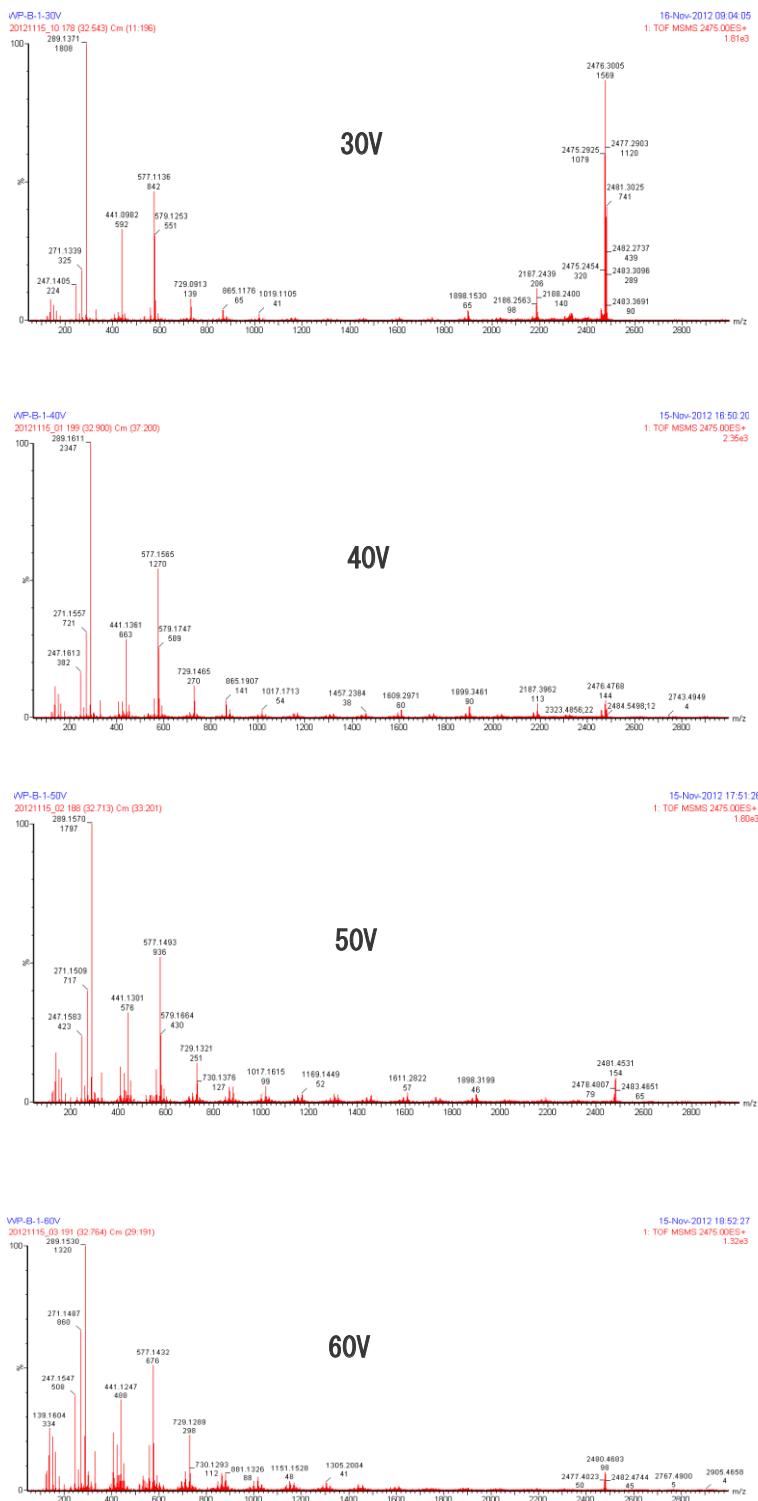


図 30 分子量 2475 の MS/MS における
コリジョンエネルギーの変化による開裂

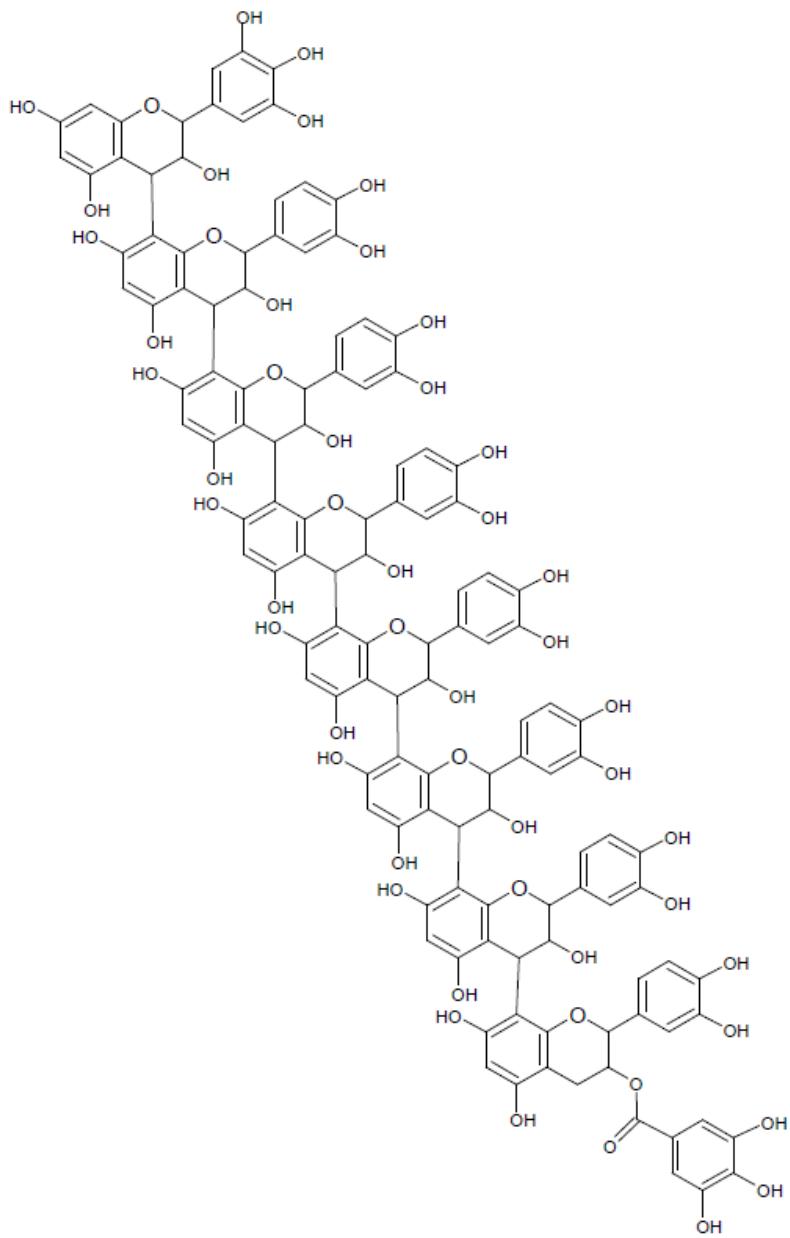


図 31 ピーク A の MS/MS より推定された構造式（示性式）

この候補化合物 A-1 は、図 31 で示される新規な化合物であり、以下の理化学的性質を示すものであった。

<理化学的性質>

- (1) $[M+H]^+$: 2475.5425 (実測値)
- (2) 分子式 : $C_{127}H_{102}O_{53}$
- (3) 溶解性: 水溶性であるがメタノールに溶解性が高く、ヘキサン、エーテル、クロロホルム等の極性の弱い溶媒にはほとんど溶けない
- (4) 紫外吸収スペクトル: λ_{max} 280 nm
- (5) 施光度: $[\alpha]^{20}_D = +121.43^\circ$ (c 0.00028 methanol)

4) ピーク B 由来成分

前記 1) の HPLC によって分取されたピーク B 由来の成分について LC/MS 分析により図 32 のチャートが得られた。

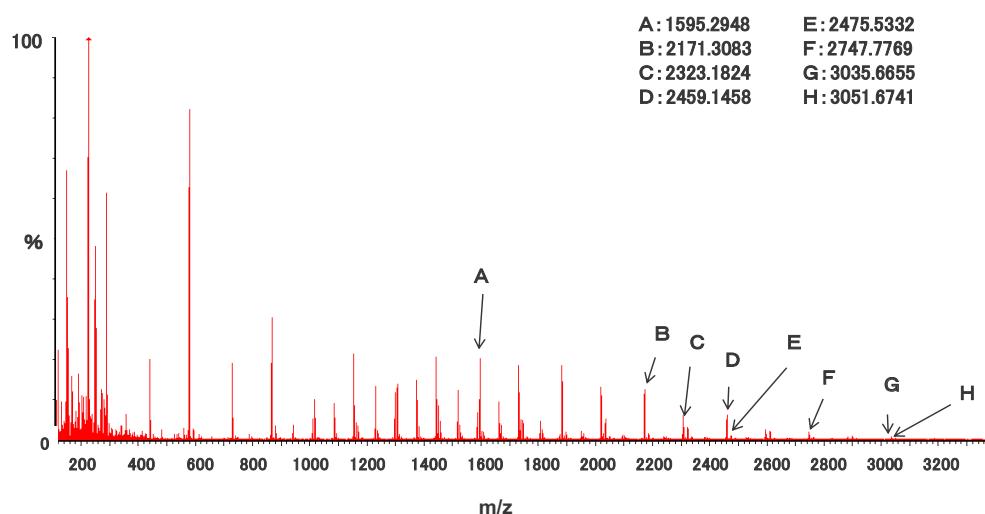


図 32 ピーク B の質量分析

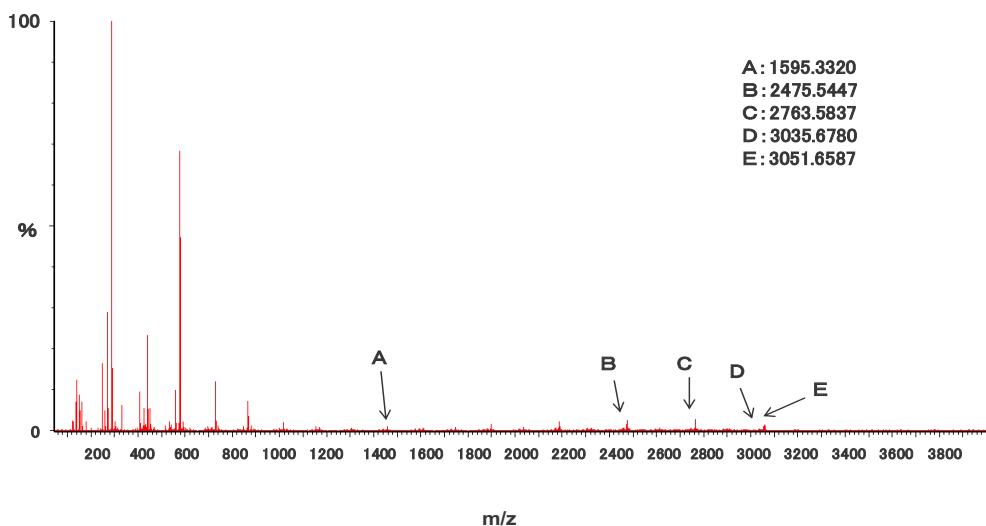


図 33 ピーク B の MS/MS

図 32 に示された 3051、3035、2475、1595 等のデータから、ピーク B 由来の成分も、カテキンまたはエピカテキンの重合体であることが示唆された。さらに、2475、3035 のデータから、(エピ) ガロカテキン、ガロイル基を有することも示唆された。

これらの結果から、化合物の候補として、(エピ) ガロカテキンが 1 分子、(エピ) カテキンが 9 分子、ガロイル基をひとつ持つ候補化合物 B-1 と、これと分子量が近似する、(エピ) カテキンが 9 分子、ガロイル基を 3 つ持つ候補化合物 B-2 が推定された。

候補化合物 B-1 : $C_{157}H_{126}O_{65}$ 分子量 : 3050.6554 (同位体の分子量)

候補化合物 B-2 : $C_{156}H_{122}O_{66}$ 分子量 : 3050.6190 (同位体の分子量)

LCMS/MS 分析を行った結果、図 33 に示された実測値が 3051.6587 であり誤差範囲が 3 ppm 以下に収まること、および、モノガレートを示す 3035.6780 が観察されたことから、ピーク B 由来の成分は、前記の候補化合物のうち、ガロカテキンまたはエピガロカテキンを 1 分子、カテキンまたはエピカテキンを 9 分子、およびガロイル基をひとつ持つ候補化合物 B-1 であると推定できた。

8 量体同様 MS/MS においてコリジョンエネルギーを変えたフラグメントチャートを示す (図 34)。

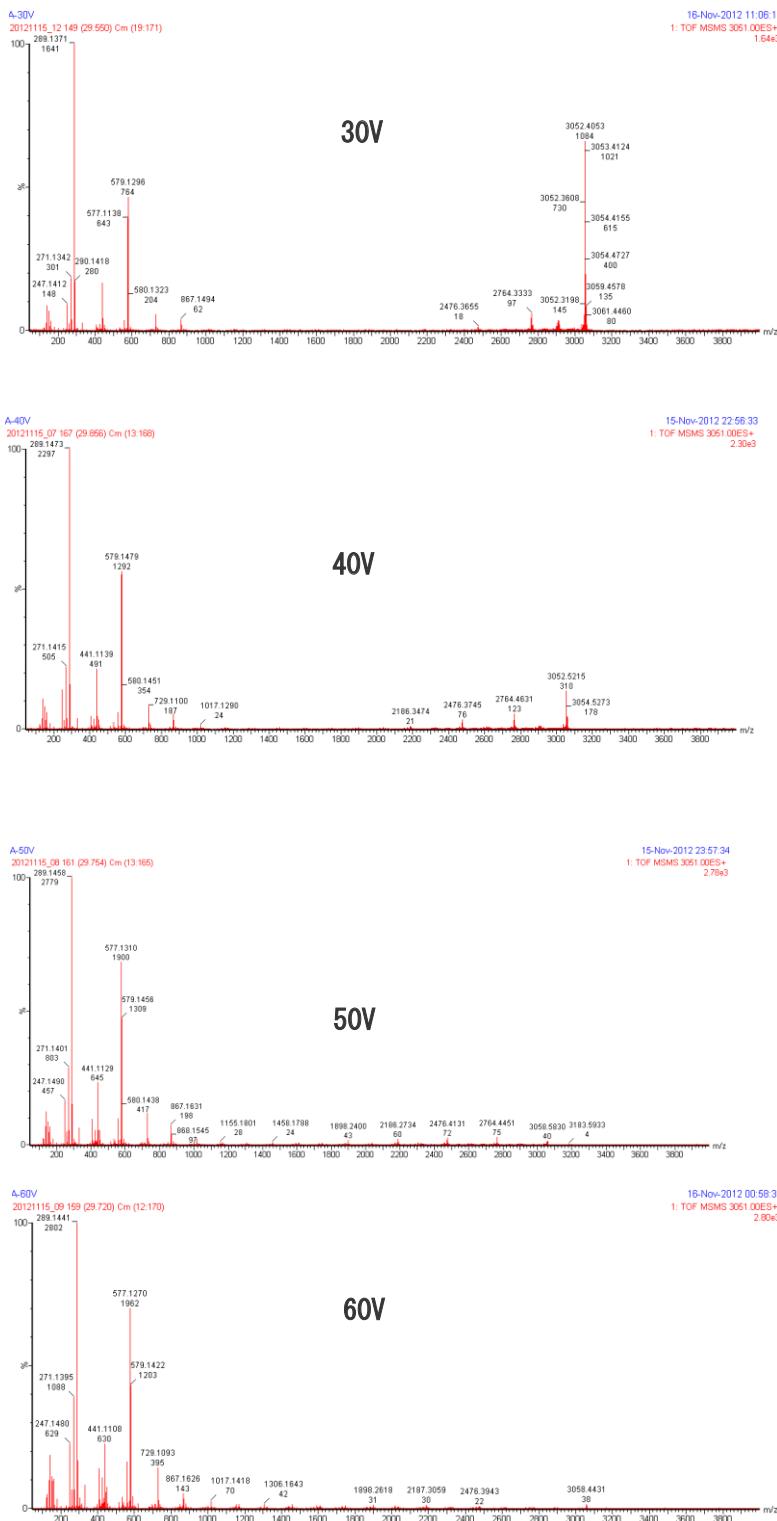


図 34 分子量 3050 の MS/MS における
コリジョンエネルギーの変化による開裂

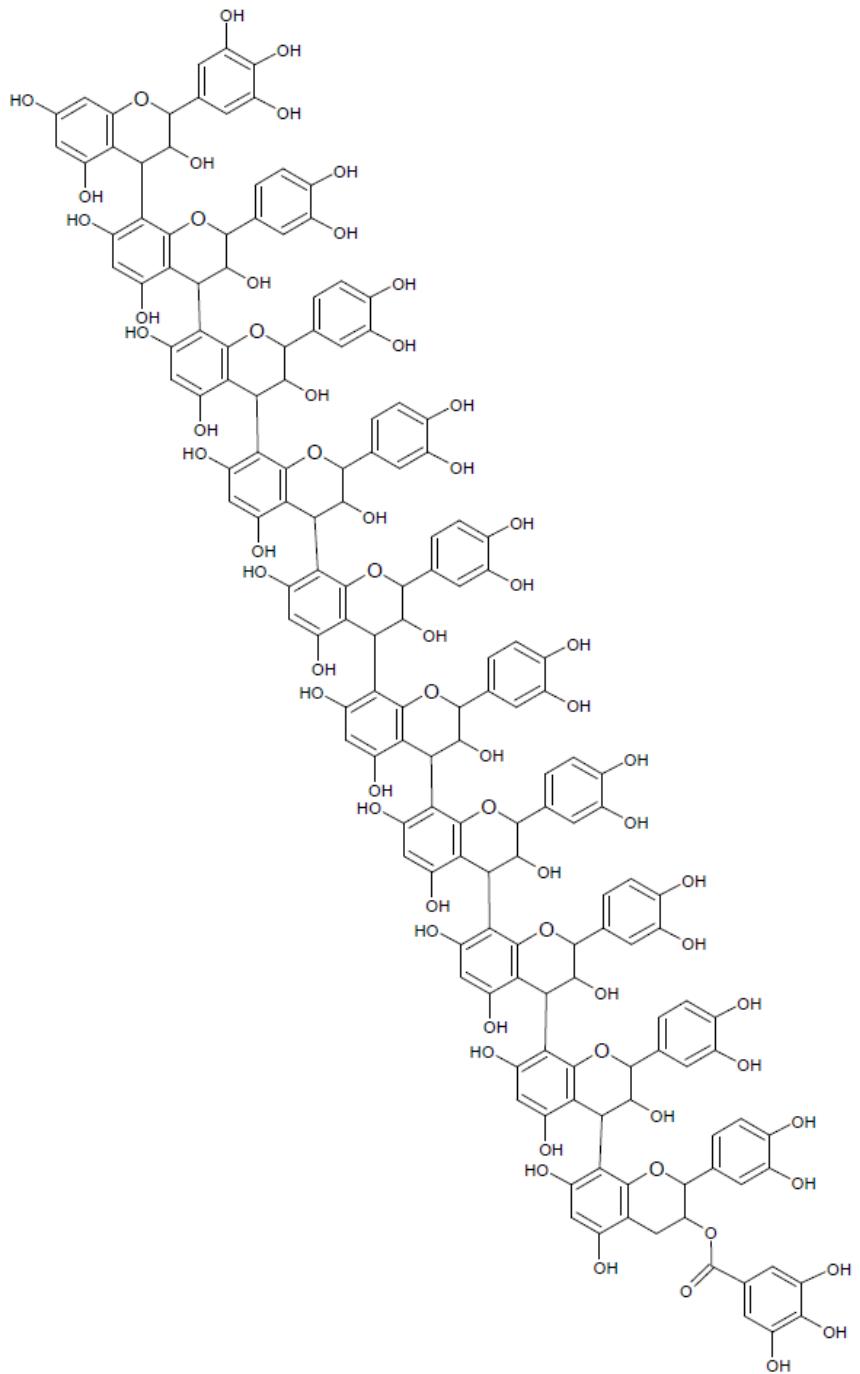


図 35 ピーク B の MS/MS より推定された構造式（示性式）

この候補化合物 B-1 は、図 35 (p83) で示される新規な化合物であり、以下の理化学的性質を示すものであった。

<理化学的性質>

- (1) $[M+H]^+$: 3051.6587 (実測値)
- (2) 分子式 : $C_{157}H_{126}O_{65}$
- (3) 溶解性: 水溶性であるがメタノールに溶解性が高く、ヘキサン、エーテル、クロロホルム等の極性の弱い溶媒にはほとんど溶けない
- (4) 紫外吸収スペクトル : λ_{max} 280 nm

酢酸エチル画分には catechin、epicatechin、などの flavan-3-ol 類のモノマーなどの低分子が観測されるのに対し、メタノール画分はペントマー以上の高分子のみが観測された。しかしながら、クロマトグラムを見るとブロードなピークが見られ、特にメタノール画分は低分子の flavan-3-ol は検出されず、ブロードピークとなり、高分子の化合物が予想された。

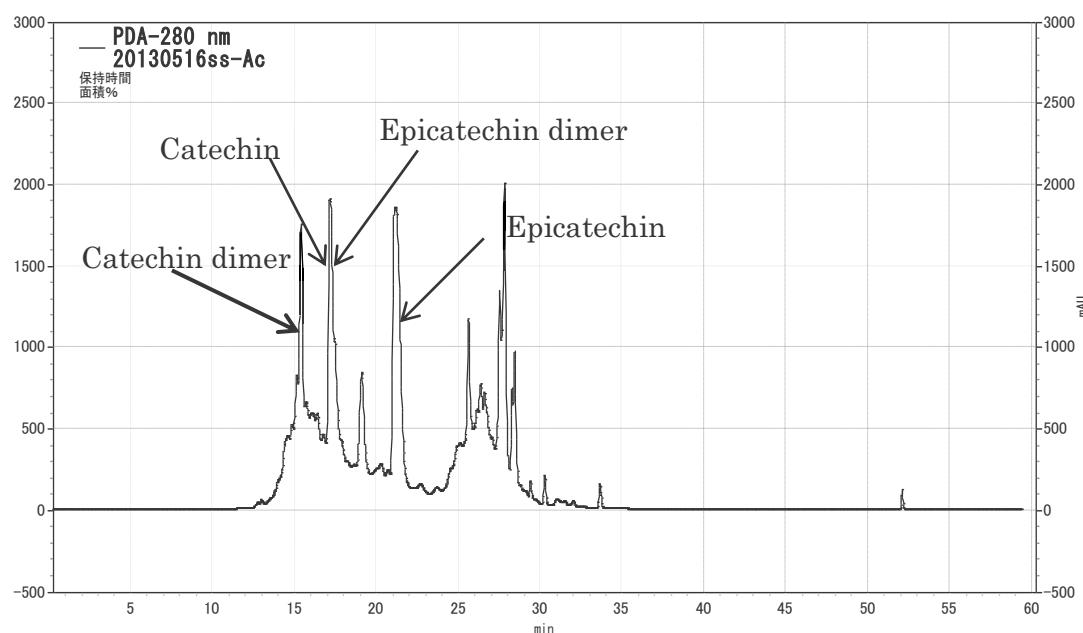


図 36 XAD 処理における酢酸エチル画分のクロマトグラム (280 nm)
(Analytical condition C)

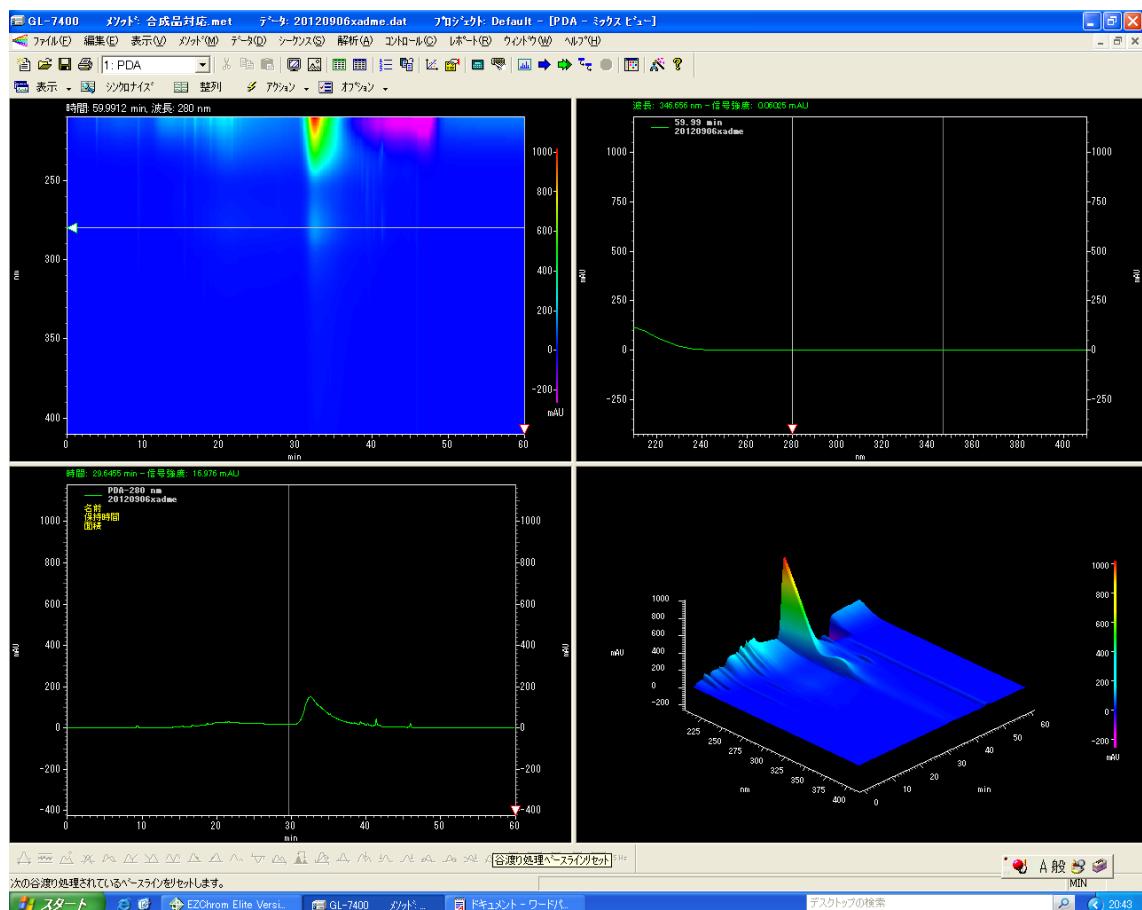
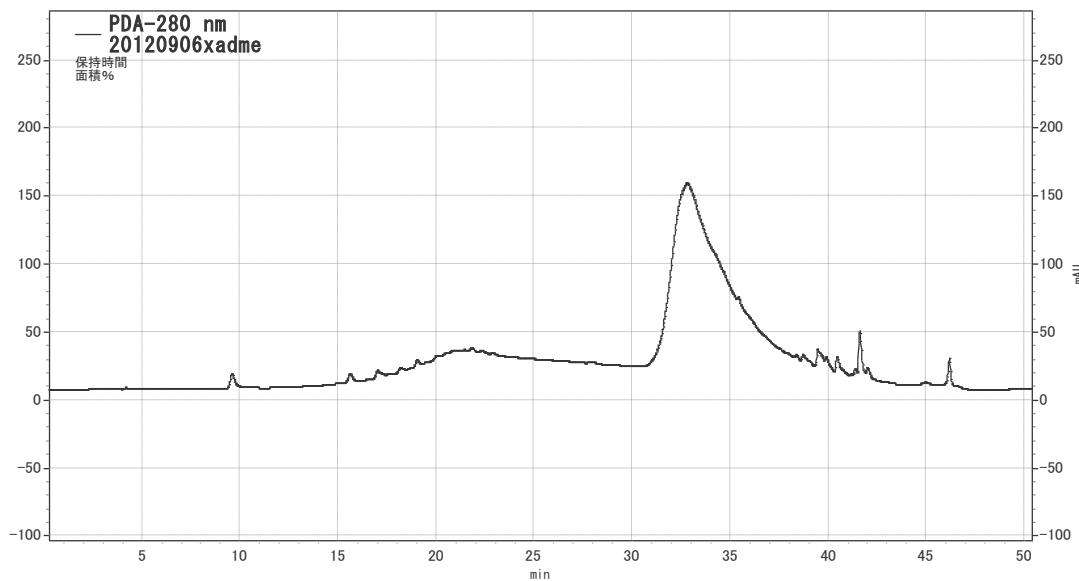


図 37 XAD 処理におけるメタノール画分のクロマトグラムおよび PDA による 210–410 nm の 3D クロマトグラム (Analytical condition D)

高分子と低分子という観点から、次の精製手段として、サイズクロマトグラフィーを利用するにした。やはりこの分画においても活性がどんな分類の成分であるのかを中心に考え、あまり細かな分画は行わないという方針で移動層を検討した。

その結果、活性の集中する画分を得た。LC-TOFMS で分析し、5 量体以上のプロアントシアニジンオリゴマーを検出することができた。

以上のことから結果として XAD を用いることで低分子のプロアントシアニジンと高分子のプロアントシアニジンを分画することに成功した。

3-1-4 ブドウの品種違い、梗以外の部位による FABP5 発現活性抑制の確認

梗について、シャルドネ以外のブドウで活性があるのかという疑問があり、植物分類学上、系統の異なる品種について同様の抽出方法で得た抽出物を LC 分析し、生理活性試験を行った。

また、梗以外の部位についても FABP5 の発現抑制活性があるのか確認を行った。

1) 品種、系統の異なるマスカットベリーA 種（梗）による FABP5 遺伝子発現活性抑制の確認

マスカットベリーA はマスカット・ハンブルグ種（ビニフェラ系）とベリー種（ラブラスカ系）の交配品種で黒ブドウである。

ベリーA 由来の梗を使用して、シャルドネ同様熱水抽出して得た、マスカットベリーA 由来のブドウ梗由来抽出物（図 38）を工程 1 と同様の方法により、これをそのまま XAD（登録商標）-1180N に吸着させ、精製水で非吸着物（図 38 B）を洗浄後、100%酢酸エチル、または 100%メタノールで順次溶出させて得た 100%酢酸エチル溶出物（図 38、C）、および 100%メタノール溶出物（図 38、D）をそれぞれ試料とした。

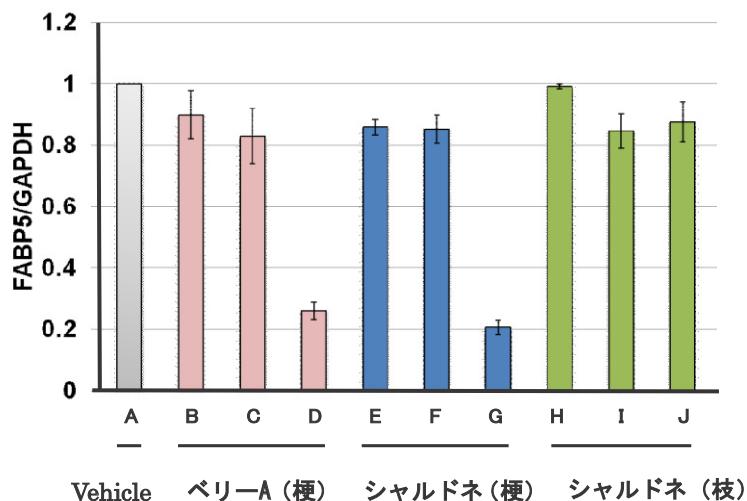


図 38 ブドウの品種違い、枝の抽出物における FABP5 遺伝子発現

これらの溶出物をそれぞれ 60%エタノールに溶解し 0.01 mg/mL とした。これをヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培地に対し濃度が 1% (100 µg/mL) となるようにそれぞれ添加した。

その結果、図 38 に示す通り、マスカットベリーA の梗においても XAD 処理のメタノール画分に FABP5 の発現抑制活性が確認できた。

2) シャルドネ (梗)

実験と同様の方法によって得た、シャルドネ由来のブドウ梗由来抽出物 (抽出物 A) と、分画工程 1 と同様の方法により、これをそのまま Amberlite XAD-1180N に吸着させ、精製水で非吸着物 (図 38、E) を洗浄後、100%酢酸エチル、または 100% メタノールで順次溶出させて得た 100%酢酸エチル溶出物 (図 38、F) 、および 100%メタノール溶出物 (図 38、G) をそれぞれ試料とした。

これらの溶出物をそれぞれ 60%エタノールに溶解し 0.01 mg/mL とした。これをヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培地に対し濃度が 1% (100 µg/mL) となるようにそれぞれ添加した。

マスカットベリーA や枝の比較対象としてシャルドネの梗においても再現性も含め試験を実施したが、やはり梗には FABP5 発現抑制活性があることが確認できた。

3) シャルドネ（枝）による FABP5 遺伝子発現活性抑制の確認

剪定し、水で洗浄したシャルドネの枝 50 g を 10 cm 程度にカットし、1 L の三角フラスコに 400 mL の精製水と共に入れ、口にアルミホイルをした。その後、この三角フラスコを、お湯をはったステンレスのバットに入れ、ガスコンロで沸騰させた。40 分沸騰後、冷却し綿濾過した。

この濾液を Amberlite XAD-1180N 160 mL に吸着させ、非吸着物(図 38 H)を精製水 300 mL で除去した後、酢酸エチル 300 mL、または 100%メタノール 300 mL で順次溶出させて得た酢酸エチル溶出物 70.8 mg (図 38、I)、および 100%メタノール溶出物 55.1 mg (図 38、J) をそれぞれ試料とした。

これらの溶出物をそれぞれ 60%エタノールに溶解し 0.01 mg/mL とした。これをヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の培地に対し濃度が 1% (100 µg/mL) となるようにそれぞれ添加した。

その結果、梗と同様の抽出処理、XAD 処理を行った画分に FABP5 遺伝子発現抑制活性は確認できなかった。

3-2 小豆の分画と生理活性

3-2-1 小豆抽出物の分画と細胞試験

小豆の生理活性試験に供するサンプルの調整は網羅的にスクリーニングすることを考え、水抽出、熱水抽出、水抽出後の残渣のアルコール抽出を試みた。

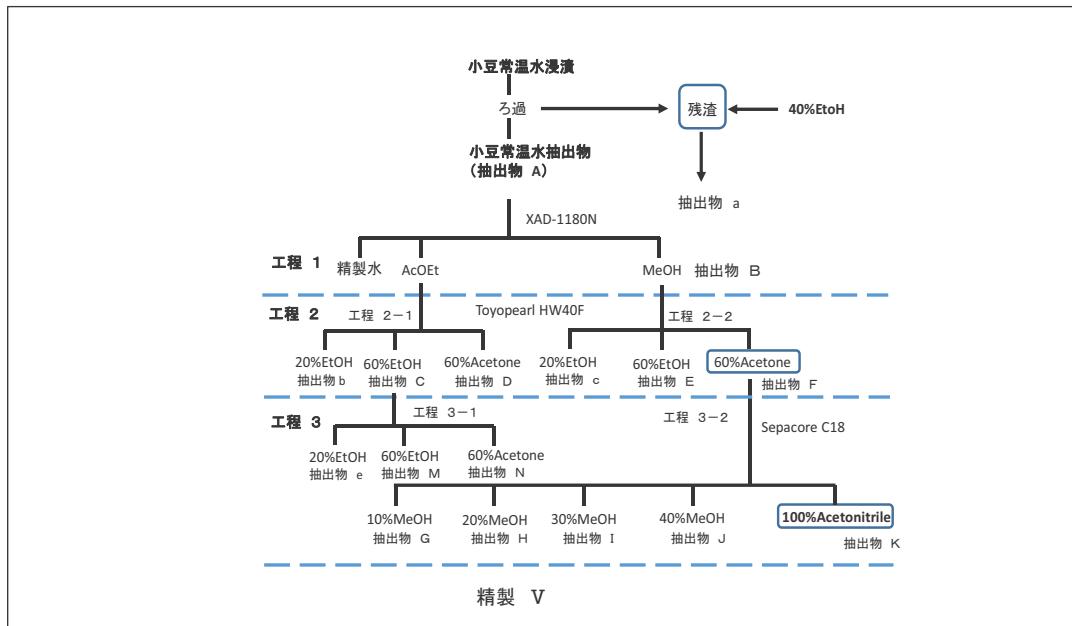


図 39 小豆の抗腫瘍活性および FABP5 遺伝子発現抑制活性の探索を目的とした分画フロー（精製 V）

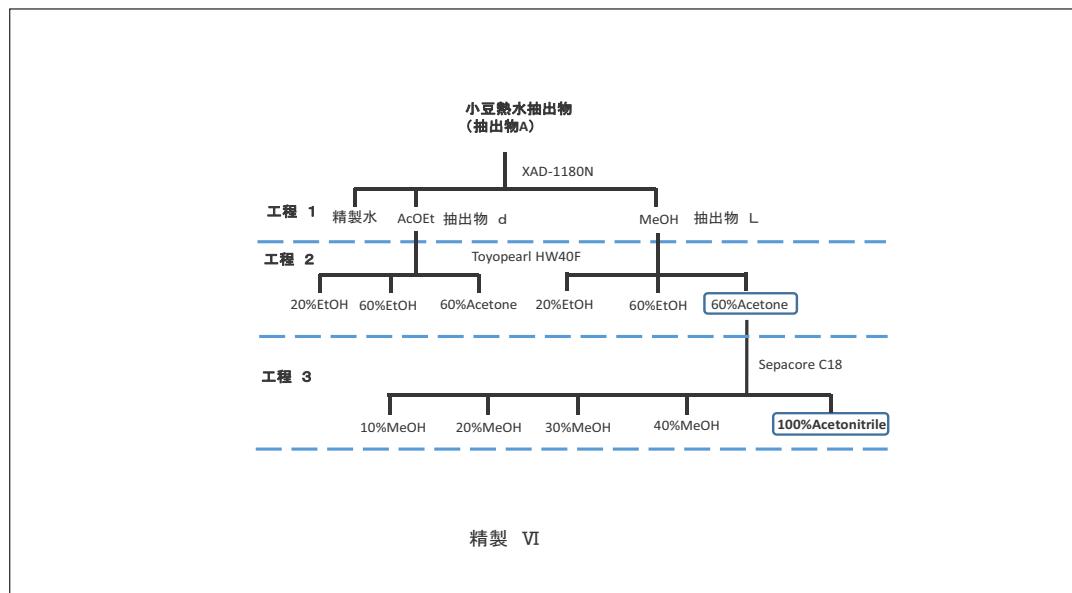


図 40 小豆の抗腫瘍活性および FABP5 遺伝子発現抑制活性の探索を目的とした分画フロー（精製VI）

(1) 癌細胞の増殖抑制試験

図 41～43 に示すように、小豆抽出物 A～N を添加した場合、GSE を添加した場合と同様に、濃度依存的にヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の増殖が抑制されることが確認できた。一方、抽出物 a～e を添加した場合には、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の増殖抑制は確認できなかった。

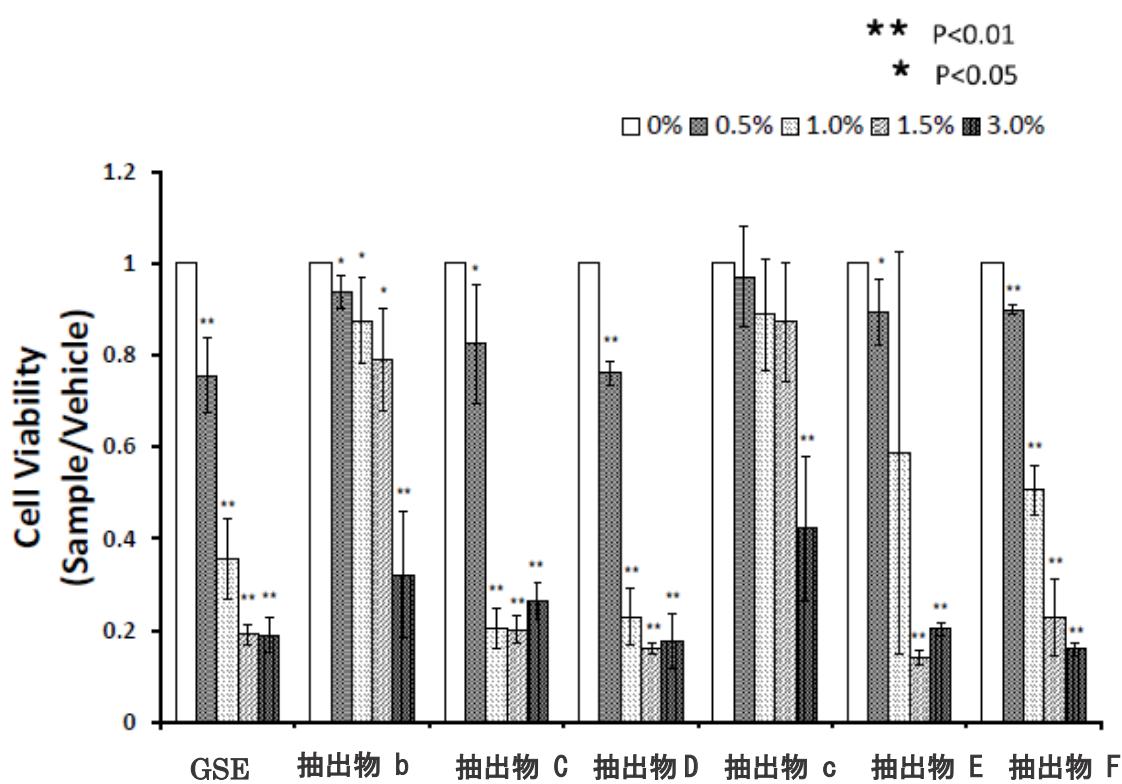


図 41 小豆分画物のヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の増殖抑制試験(1) (特願
2016-040945 から引用)

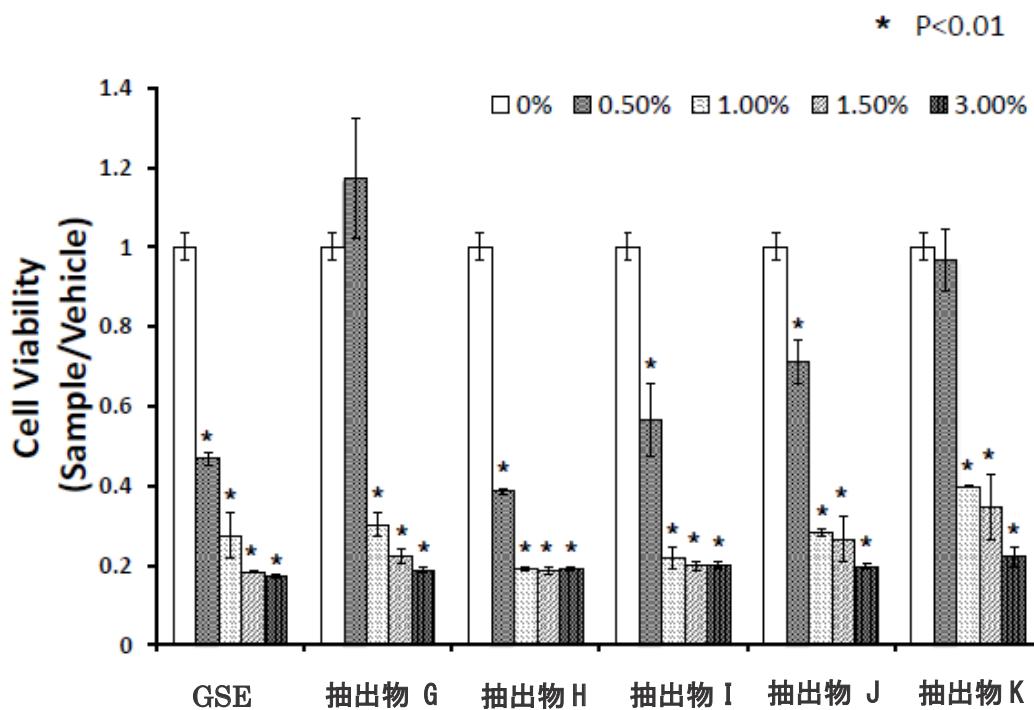


図 42 小豆分画物のヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の増殖抑制試験(2)
(特願 2016-040945 から引用)

★ P<0.05

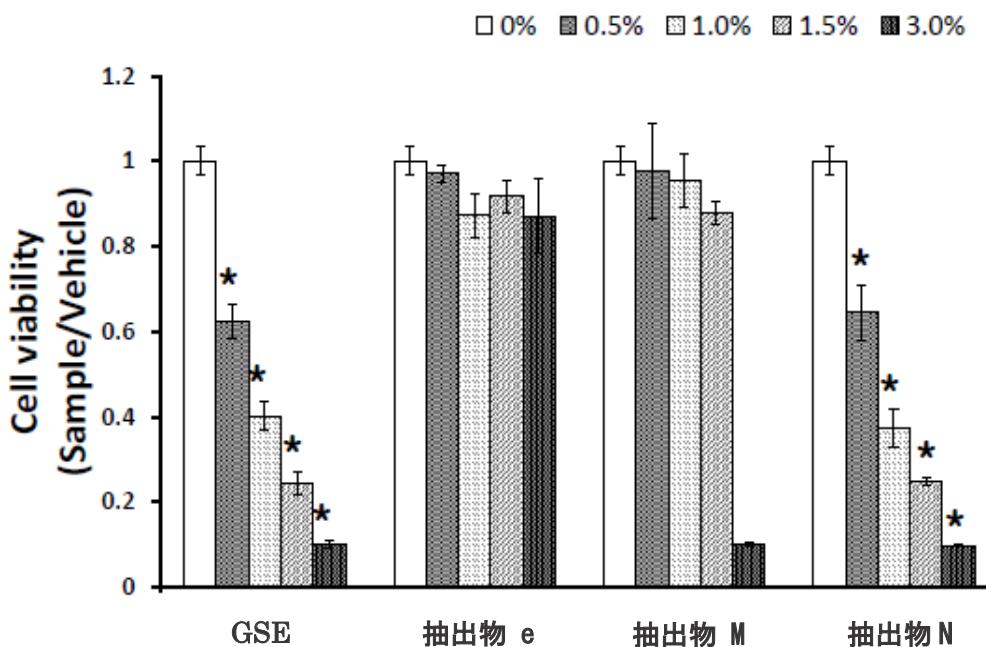


図 43 小豆分画物のヒト前立腺癌細胞株 PC-3 の増殖抑制試験(3) (特願
2016-040945 から引用)

小豆抽出物 C～F、小豆抽出物 b、c を用いた場合の結果を図 41 に示し、小豆抽出物 G～K を用いた結果を図 42 に示した。また、小豆抽出物 M,N および小豆抽出物 e を用いた結果を図 43 に示した。

(2) FABP5 遺伝子発現抑制試験

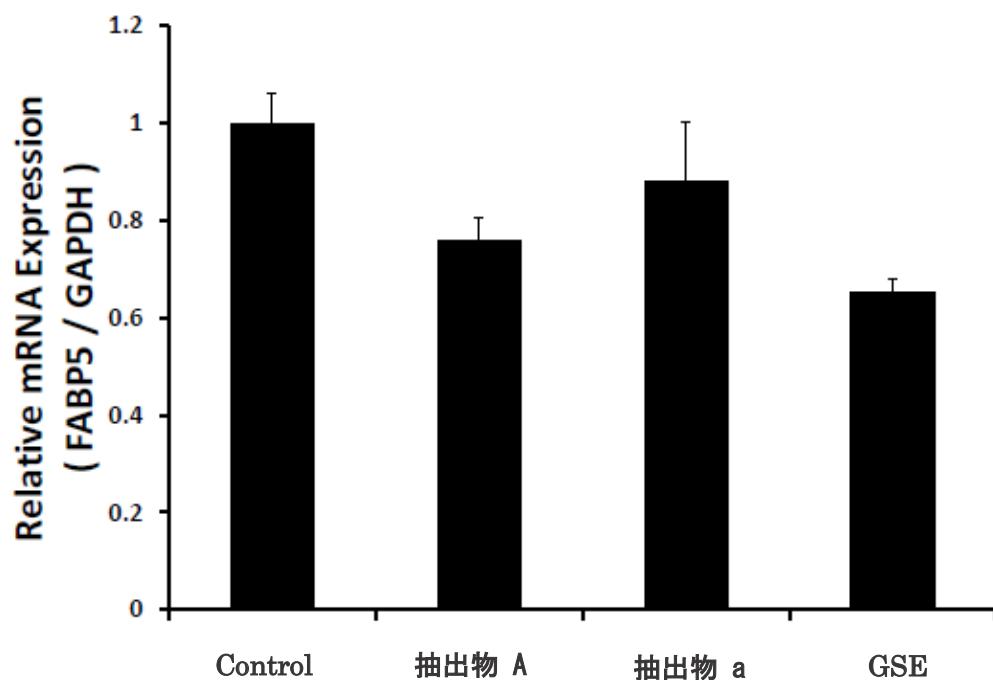


図 44 小豆抽出物 A の FABP5 遺伝子抑制活性（特願 2016-040945 から引用）

図 44 に示されるように、小豆抽出物 A はポジティブコントロールである GSE と同等の FABP5 遺伝子の発現抑制活性を示したが、小豆抽出物 a にはこのような活性は確認できなかった。

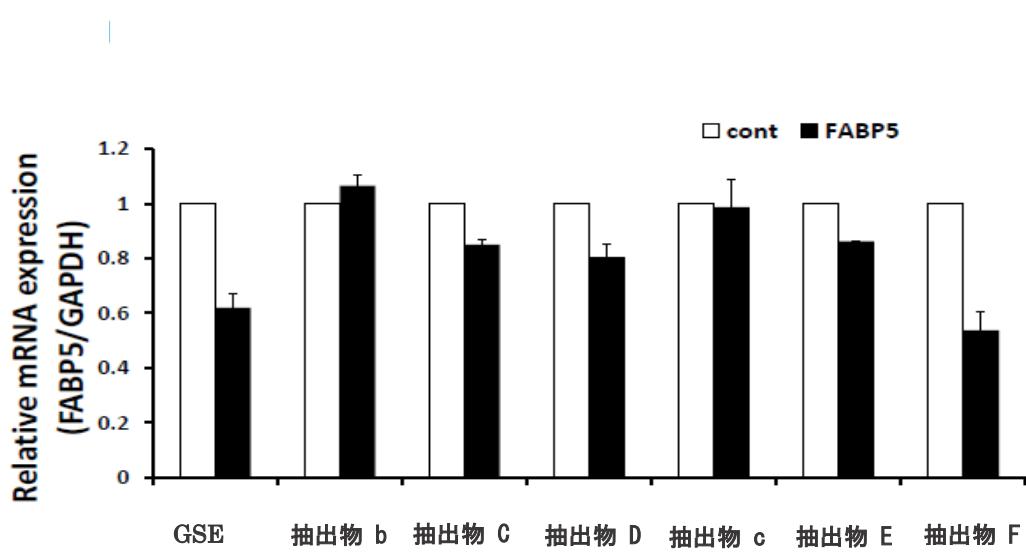


図 45-A 小豆抽出物各分画の FABP5 遺伝子抑制活性試験（特願 2016-040945 から引用）

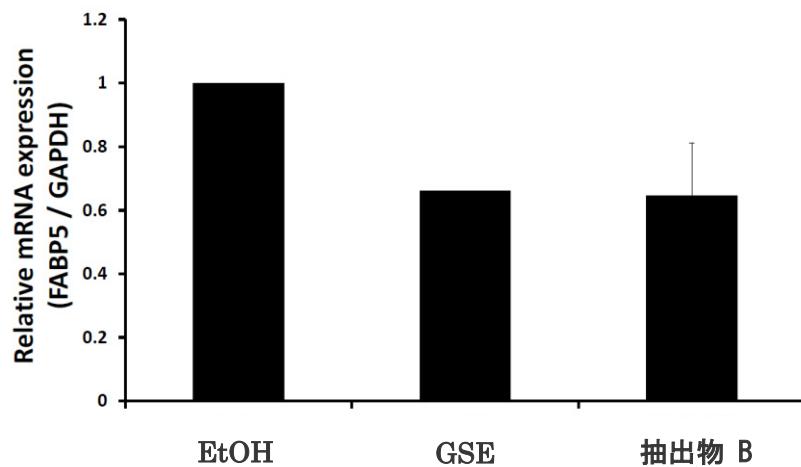


図 45-B 小豆抽出物各分画の FABP5 遺伝子抑制活性試験（特願 2016-040945 から引用）

また、図 45-A、B に示されるように、小豆抽出物 B、C～F も GSE と同等の FABP5 遺伝子の発現抑制活性を示した。従って、これらの結果より、小豆抽出物 A～F はいずれも癌細胞の転移抑制効果を有することが示唆された。

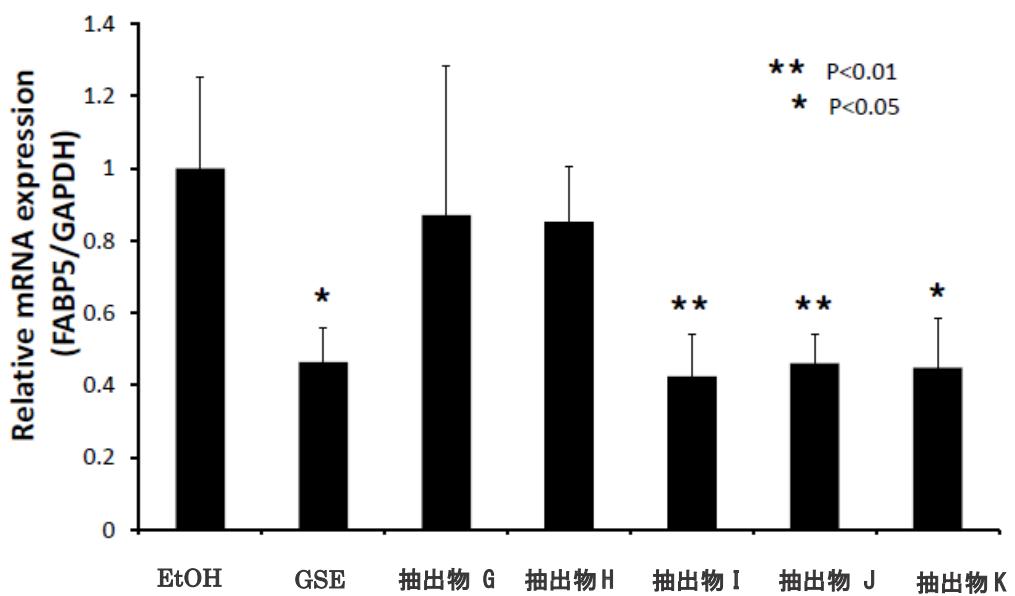


図 46 小豆抽出物各分画の FABP5 遺伝子抑制活性試験(2) (特願 2016-040945 から引用)

図 46 に小豆抽出物 G～K を用いた場合の結果を示した。小豆抽出物 I～K はいずれも GSE と同等の FABP5 遺伝子の発現抑制活性を示したが、小豆抽出物 G、H は FABP5 遺伝子の発現抑制活性を示さなかった。この結果および 3-2-1 がん細胞抑制試験の結果より、小豆抽出物 I～K は癌細胞の増殖抑制効果も転移抑制効果も有するが、小豆抽出物 G、H は癌細胞の転移抑制効果は有さず、増殖抑制効果を有するものであると示唆された。

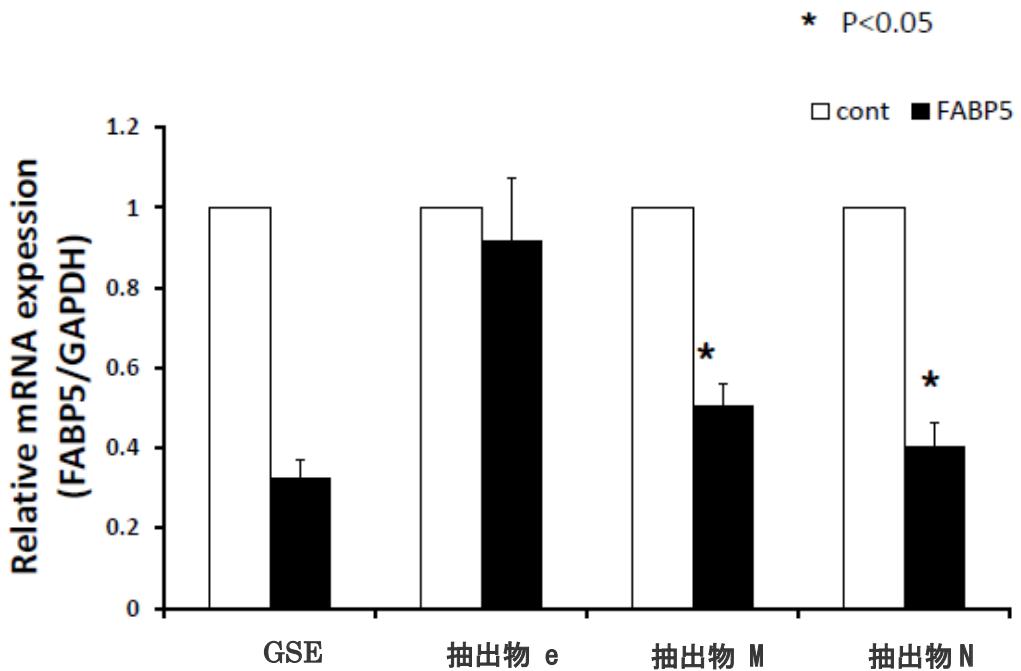


図 47 小豆抽出物各分画の FABP5 遺伝子抑制活性試験(3) (特願
2016-040945 から引用)

図 47 に示されるように、小豆粗抽出物 M、N はいずれも GSE と同等の FABP5 遺伝子の発現抑制活性を示し、癌細胞の転移抑制効果を有することが示唆された。

また、小豆粗抽出物 L および小豆抽出物 d を用いた場合においても、小豆抽出物 L が FABP5 遺伝子の発現抑制活性を示し、転移抑制効果も有することが示唆された。

3-2-2 蛍光標識担癌マウスへの小豆抽出物の経口投与試験

小豆抽出物 B を用いて経口投与試験を実施した。

癌の増殖抑制試験

投与開始日の翌日を 1 日目として 28 日経過後、GFP で蛍光標識した移植癌細胞の面積を測定した。

その結果、図 48 および図 49 に示すように、コントロール群（図 48、A、C、E および G）は癌細胞の移植後、GFP で検出される癌の面積が増加するのに対して、試験群（図 47、B、D、F および H）では癌の面積が減少しており、最終的に試験群のマウスではコントロール群のマウスに比べて 35.5% の癌の面積の減少が確認できた。また、図 50 に示したように、がんの重量が 50% 阻害された。

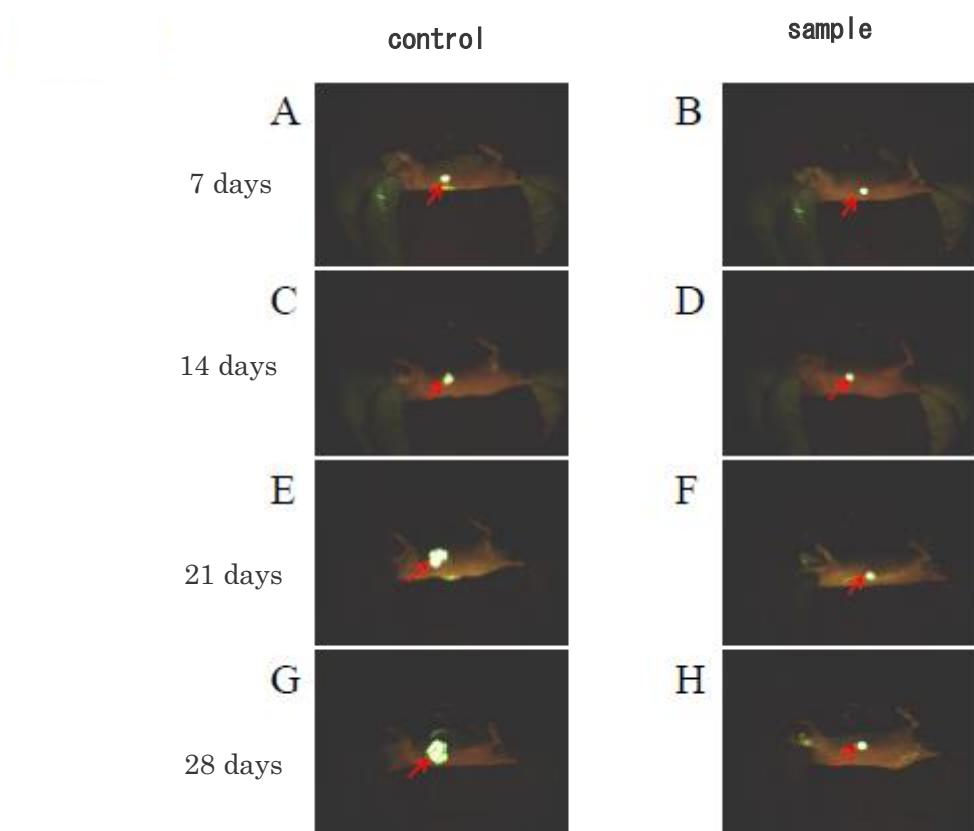


図 48 GFP で蛍光標識したヒト前立腺癌細胞株 PC-3 をマウスに移植した様子
(特願 2016-040945 から引用)

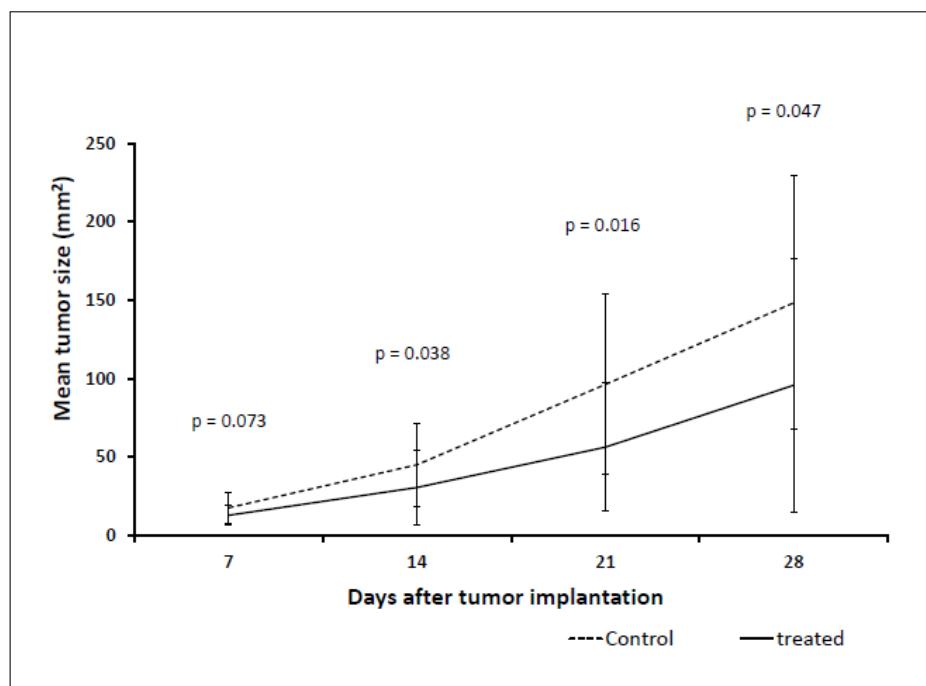


図 49 GFP で検出される癌の面積 (特願 2016-040945 から引用)

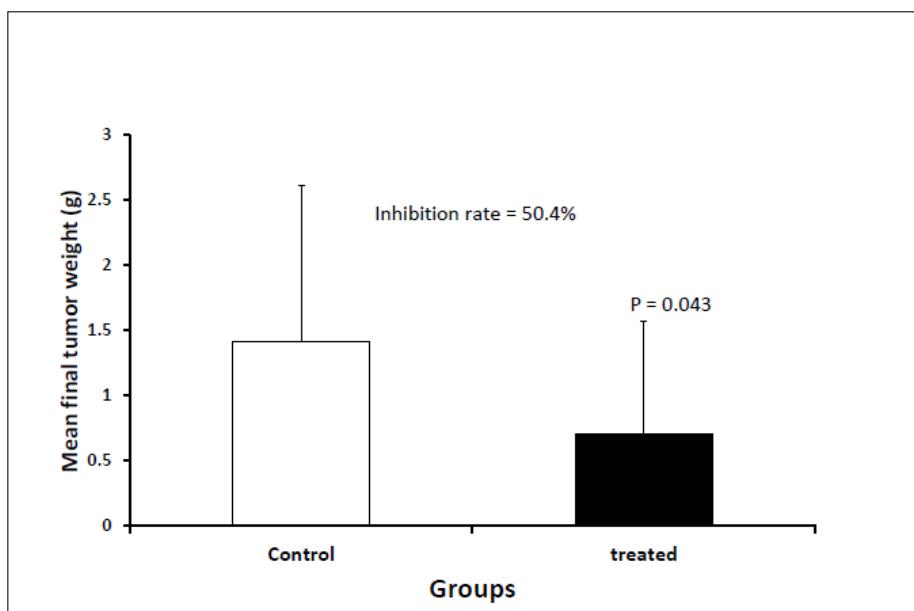


図 50 GFP で蛍光標識した担がんマウスのがんの重量(特願 2016-040945 引用)

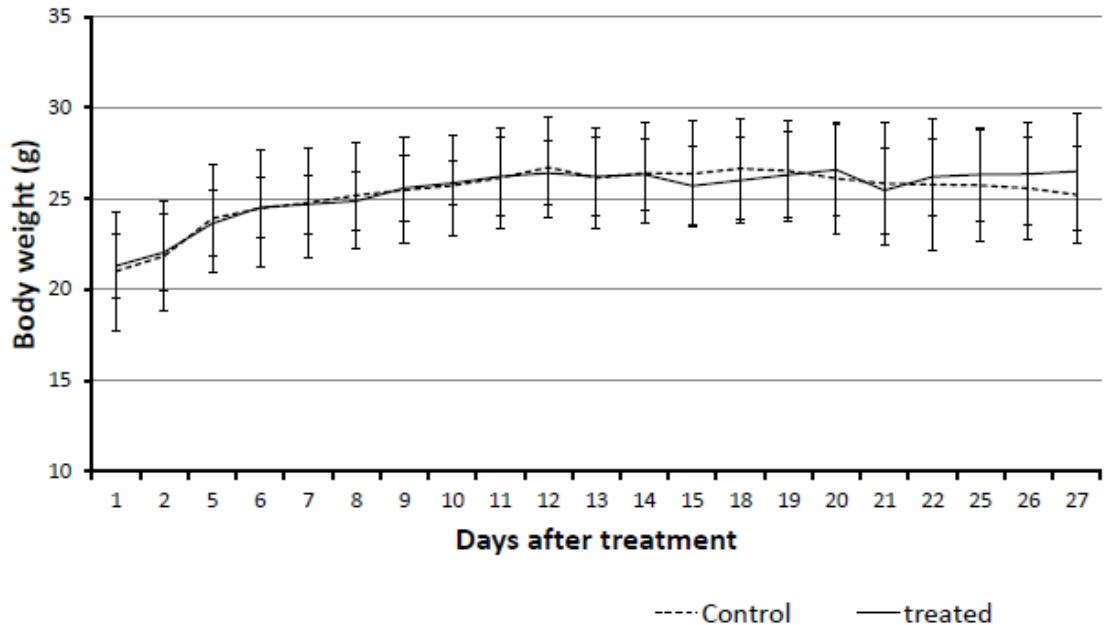


図 51 マウスの体重の変化（特願 2016-040945 から引用）

これらのマウスの体重には有意な差は見られなかった（図 51）。したがって、この結果より、小豆の水抽出物が癌の増殖抑制に有効であることが確認できた。

3-2-3 小豆粗抽出物の活性成分の精製と同定

各分画の細胞試験の結果、マウスによるがん抑制効果の結果を踏まえ、その活性分子は何か、何が含まれているのかを追求するため活性画分のさらなる精製を行った。

これまでに構築した精製手法をもとに Amberlite XAD-1180N で処理したメタノール画分を Toyopearl HW40F ついで sepacore C18、HPLC 分析用カラムによる分取により精製し、LC-TOFMS にて分析することを精製ごとに行った。

精製過程の HPLC のクロマトグラムを精製の流れに従って示した。

また、真壁らが合成したカテキン類の各種重合体（引用文献：Scientific Reports, 7, 7791 DOI:10.1038/s41598-017-08059-x 2017）を用い天然から精製したサンプルと LC の保持時間、質量分析のデータを比較することで天然物のエピカテキン重合体を各種同定することができた。

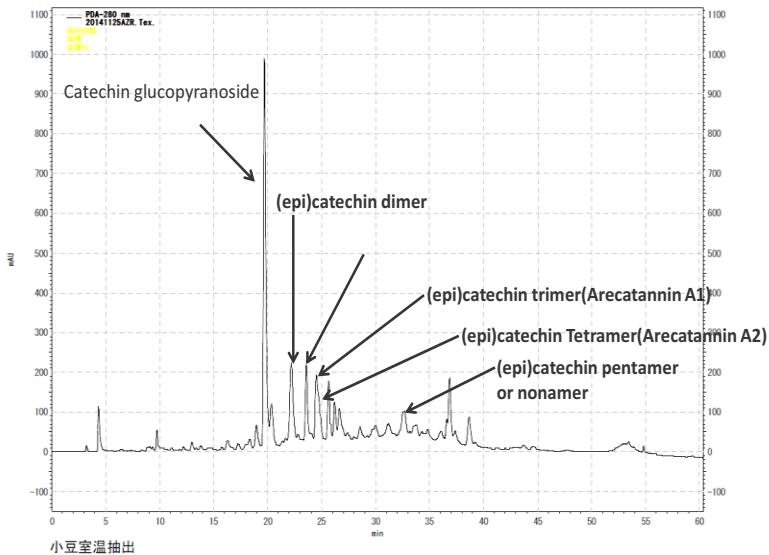


図 52 小豆の常温抽出物の LC のクロマトグラム及び合成品との比較により同定できたプロアントシアニジン (Analytical condition A)

次いで常温抽出物を Amberlite XAD-1180N にて処理し、酢酸エチル画分、メタノール画分に分けた。

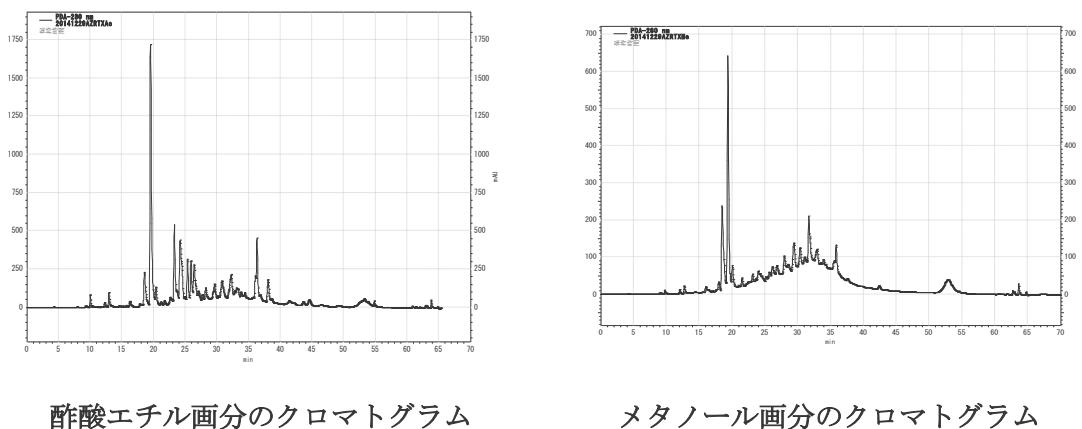


図 53 小豆常温抽出物の Amberlite XAD-1180N 処理による各クロマトグラム (Analytical condition A)

メタノール画分に生理活性があったことからさらに Toyopearl HW40F にて分離を進めた結果、図 54 のクロマトグラムとなった。

Toyopearl HW40F で処理した F3 の画分に生理活性が見られたことからさらに詳細なカラムクロマトグラフィー(Inertsil ODS-swift column)を行い、5つの画分に分離したところ、F3、F4 に抗腫瘍活性が見られた(図 55)ことから成分を特定するため分析用のカラムを用いて HPLC にて分離精製を行った。得られた画分を LC/MS にて分析を行った。分離できた画分はさらにマスクロマトグラフィーにて分析も行った。その結果を図 55 に示す。F2 では arecatannin A2 が検出されたが生理活性はなかった。

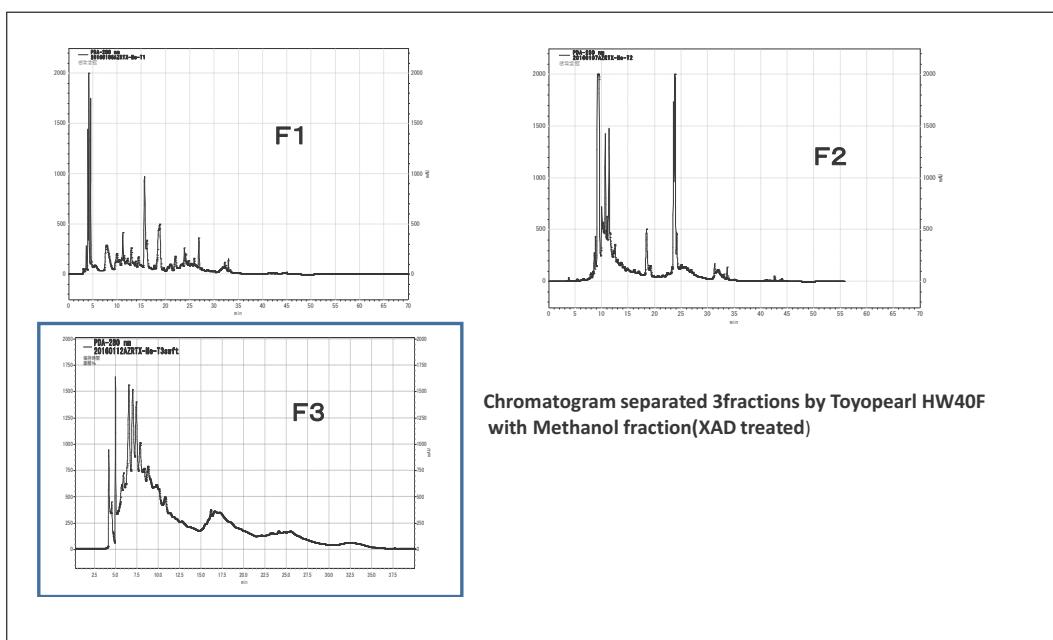
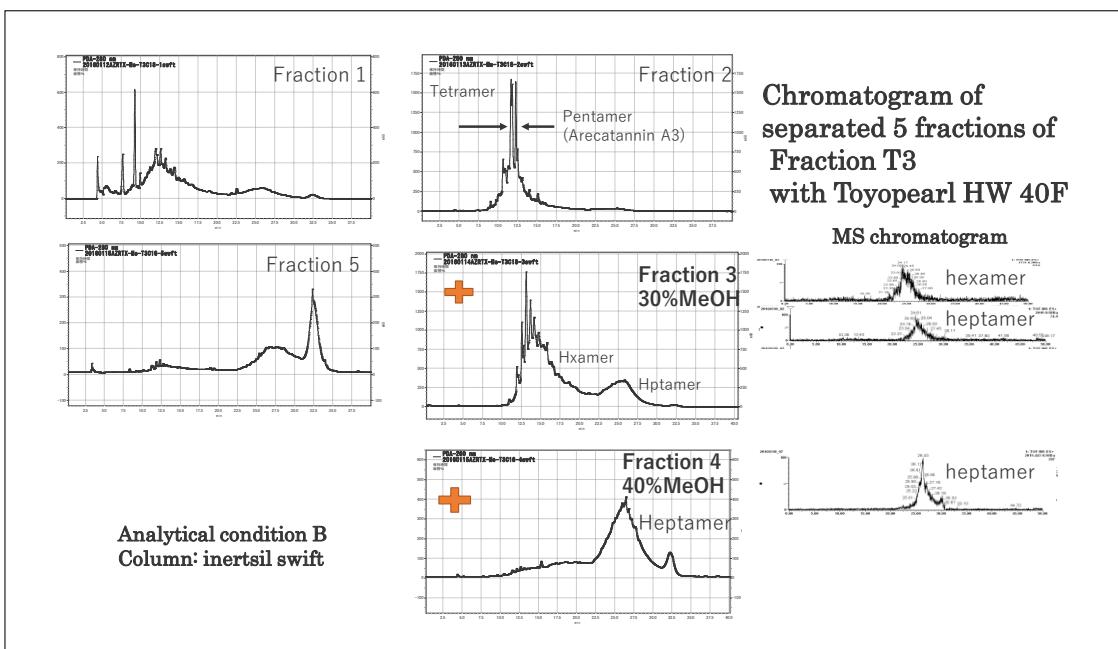


図 54 Toyopearl HW40F にて分離を進めたクロマトグラム(Aalytical condition B)



**図 55 Inertsil ODS swift column を用いたクロマトグラム
(Analytical condition C)**

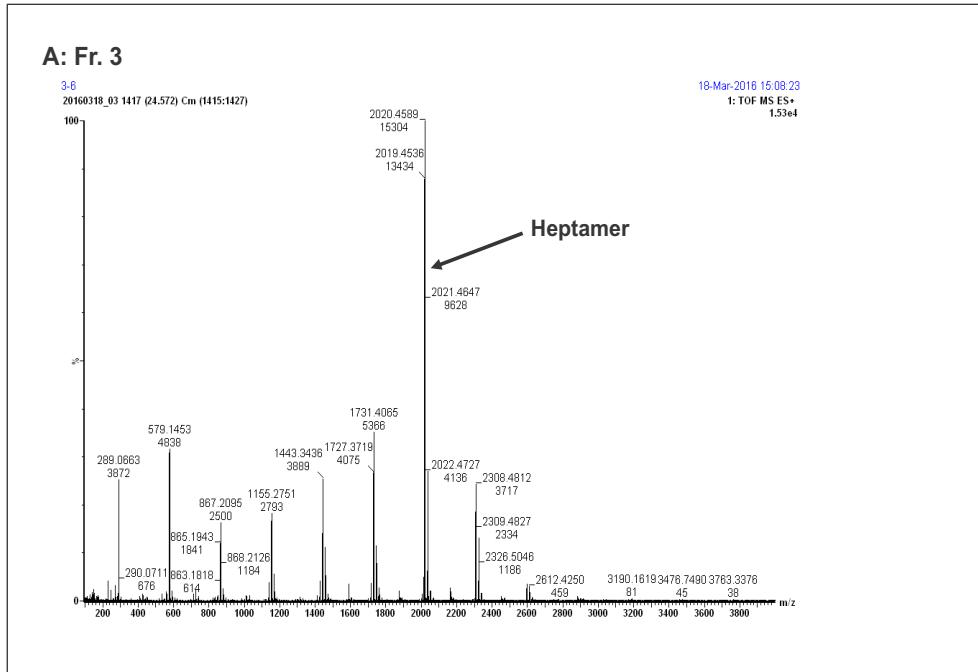


図 56 Fraction 3 の LC-ESI-TOFMS

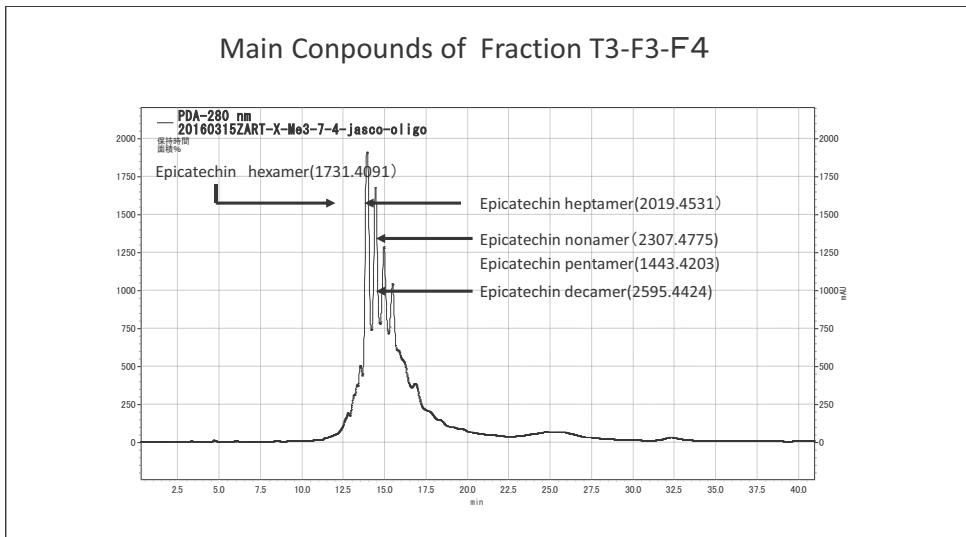


図 57 図 55 の F3 をさらに分画し、J-Pak Vario PFP column を用いて分析したクロマトグラム (Analytical condition B)

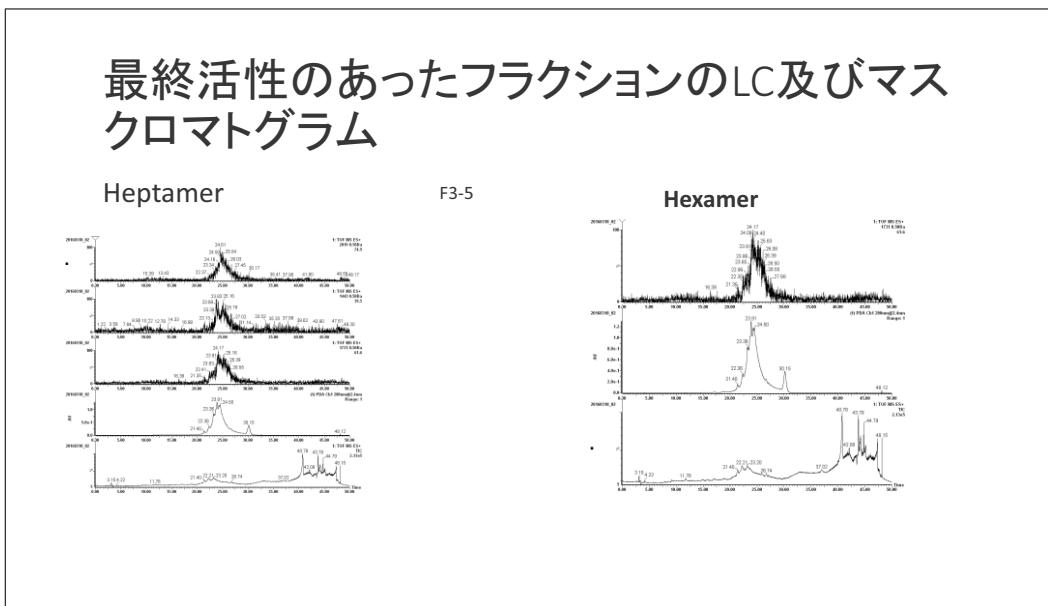


図 58 活性フラクション F3 のマスクロマトグラム

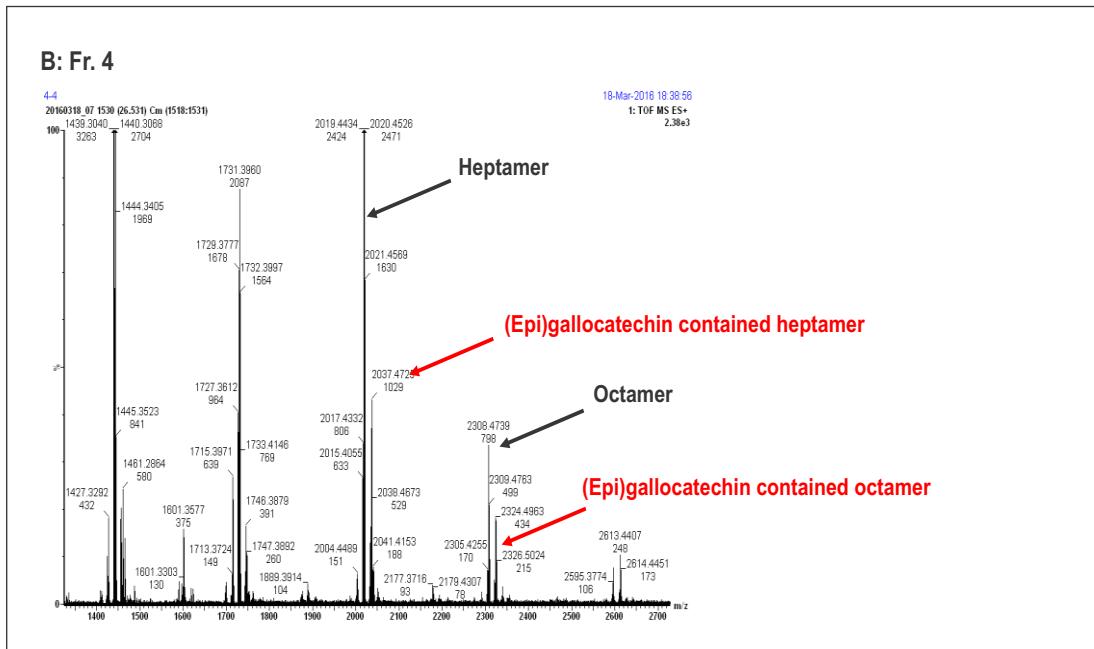


図 59 Fraction 4 の LC-ESI-TOFMS

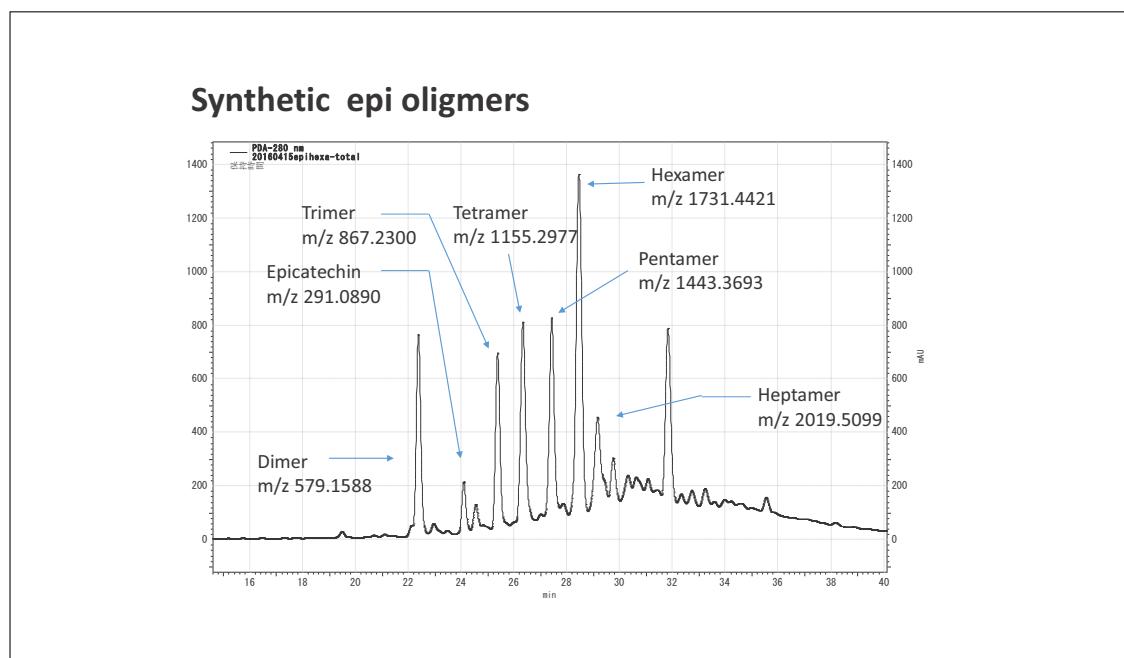


図 60 真壁らが合成した epicatechin oligomer のカラムクロマトグラム
(Analytical condition B)

図 55 の Fruction 3 については主要成分以外にもシャープなピークが見られ、それぞれについて図 57 のように LC-ESI-TOFMS により pentamer、hexamer、heptamer、nonamer、decamer を観測することができた。主要成分はマスクロマトグラフィーにより hexamer、heptamer であることが確認できた。

また、Fraction 4 については LC-ESI-TOFMS 及びマスクロマトグラフィーにより主要成分が heptamer であることが確認できたが、allocatechin の heptamer、octamer、allocatechin の octamer も観測することができたのでマイナーアイコンとして含まれていることがわかった。

Fraction 3 及び 4 は図 61, 62 のようにヒト前立腺癌細胞株 PC-3 に対する抗腫瘍活性および転移能を持った悪性化した癌細胞で高発現している FABP5 遺伝子の発現抑制活性を有していた。

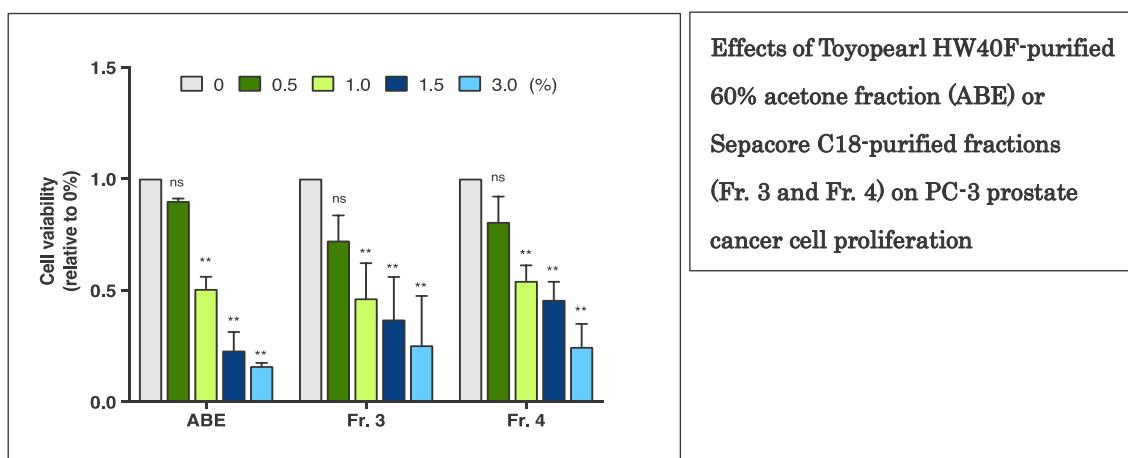


図 61 小豆の水抽出物および最終的に活性のあった画分 Fr. 3、Fr. 4 の抗腫瘍活性 (Heliyon, 5, e02610, (2019) より引用)

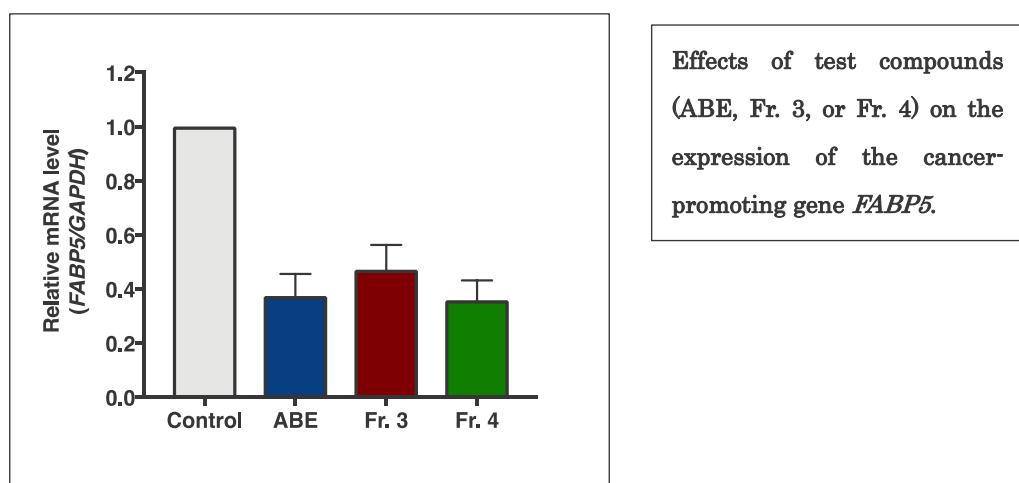


図 62 小豆の水抽出物および最終的に活性のあった画分 Fr. 3、Fr. 4 の FABP5 遺伝子の発現抑制活性 (Heliyon, 5, e02610, (2019) より引用)

3-3 Flavan-3-ols 高重合体画分の酸加水分解反応

胃液による酸加水分解とヒトの最高体温を想定し、塩酸で pH 1 とし、40°C で反応を行った。

加水分解反応(1)の結果

HPLC のクロマトグラムを図 63 に示す。低分子領域にピークがほとんど見られないこと、ブロードなピークがそのまま残っていることからほとんど反応した様子は見えなかった。

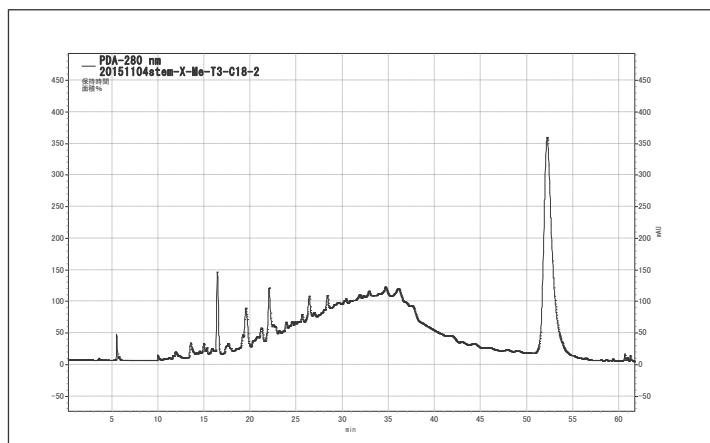


図 63 プロアントシアニジン高重合体画分の酸加水分解反応 15 時間後のクロマトグラム(1) (Analytical condition A)

加水分解反応(2)の結果

HPLC のクロマトグラムを図 64 に示す。低分子領域にピークがほとんど見られないこと、高重合体のピークがそのまま残っていることからほとんど反応した様子は見えなかった。

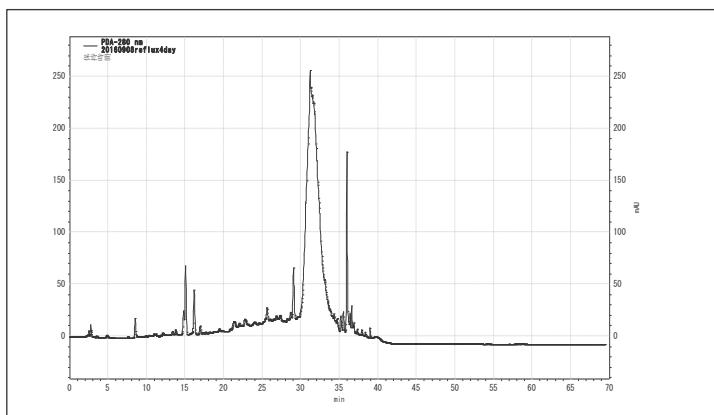


図 64 プロアントシアニジン高重合体画分の酸加水分解反応 4 日(96 時間)後のクロマトグラム(2) (Analytical condition B)

第4章 考察

4-1 ポリフェノール化合物の分離精製法の開発

これまで、天然物（植物など）由来ポリフェノール化合物の重合度（高重合体、モノマー及びオリゴマー）依存的な精製法は開発されていなかった。本研究では、従来困難であった高重合度のポリフェノール化合物の精製法を開発し、抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーを濃縮することに成功した。以下、その精製法について記載する。

Sephadex や Toyopearl 分子篩クロマトグラフィーは、分子量に基づいた分画は可能であることから、生理活性分子の単離精製によく用いられる。一方、本研究では、活性分子が一つではない可能性を考慮すると精密な分画より大まかに分画する方が重要である。その点、ポリスチレン系多孔性合成吸着剤である Amberlite XAD は、分子内的一部の官能基だけではなく分子全体としての性質の違いによって分画することが可能なため、最初にこのクロマトグラフィーを用いた。Amberlite XAD を用いる手法は、天然物の精製では配糖体を分離する際によく使われる手法³⁷⁾であるが、その利点は水に溶けている、あるいは懸濁している有機物質の親和性を利用して吸着させることができることである。有機溶媒での分液抽出という手法もあるが、未知化合物を分ける場合、数種の溶媒を変え混合溶媒を試さなければならない。特に配糖体の場合、水層にも有機層にも解ける、あるいはいずれかに偏って溶けやすい物質もあることが予想される。この点、Amberlite XAD の特性上、親和性の全くない糖類や多くのアミノ酸などは吸着しないので除去することができ、一方で疎水性のテルペソ、油脂などは吸着しやすい。配糖体の分子全体の親和性で疎水性が強ければ吸着力も強く、一方、親水性が強ければ吸着力は弱い。吸着力の強弱を利用して溶出溶媒の種類を変えるとそれぞれの強弱で物質を集めることができる。したがって、水や熱水で抽出した液体を濃縮することなくそのまま樹脂で分画することで、大量の水を濃縮する必要がなく、手間と熱による副産物の生成も少ない。

溶出法も工夫が必要である。溶出溶媒は樹脂との親和力を溶解力、親和力が上回ると溶出する性質がある。例えばテルペソ類のように親油性の高いものは、水や低濃度のアルコールでは溶出しないが高級アルコールや石油系の溶媒では溶出される。一方、テルペソ類でも糖が一つ結合した配糖体では溶けにくいため、溶出しない³⁸⁻⁴⁰⁾。目的化合物に応じて何を除去して、何を取りたいのかで使用する溶出溶媒は異なる。植物は水分が多く、物質の移動も分子内に水溶性の部分がないと移動できないことを考えると熱水抽出は都合がよい。香料の抽出では昔から熱水抽出が用いられ、テルペソ類も熱水で抽出しながら蒸留を同時に行う。

過熱による副産物の生成がなかったかどうかを確認するため、低温での破碎、抽出を 40%のアセトン水溶液中で行い、濃縮処理を含め全ての操作を 40°C 以下

で行ったが、熱水抽出の場合と同様に目的の flavanol 類が得られ、生理活性についても同様の活性が確認できた。このように、熱水抽出物と Amberlite XAD の組み合わせは都合がよいため、本研究では熱水抽出物の最初の分画に Amberlite XAD クロマトグラフィーを用いた。

また、溶出溶媒を酢酸エチルとメタノールを用いて溶出し、それぞれの分画の質量分析の結果、高重合度のポリフェノール類がメタノール溶出画分に濃縮されていることが分かった。このことからモノマーや重合度の低いオリゴマーとは平面構造は似ているが、立体構造の違いから重合度により物性や生理活性が大きく異なっていることが分かった。重合度に依存して、複雑な立体構造を形成していることが示唆された(図 1A、B 参照)。

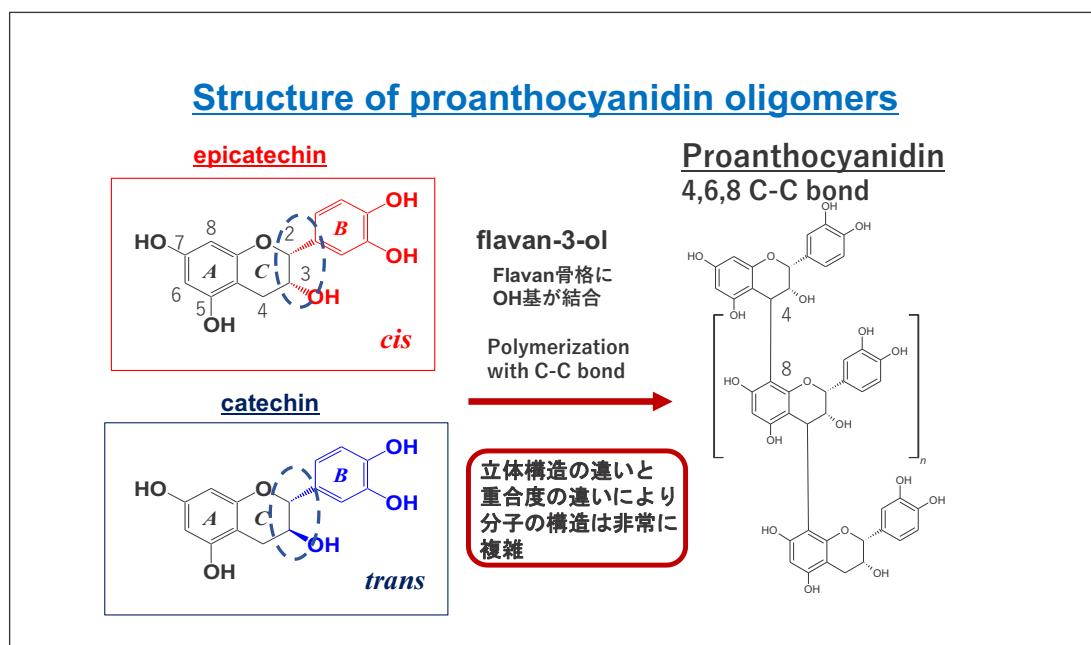
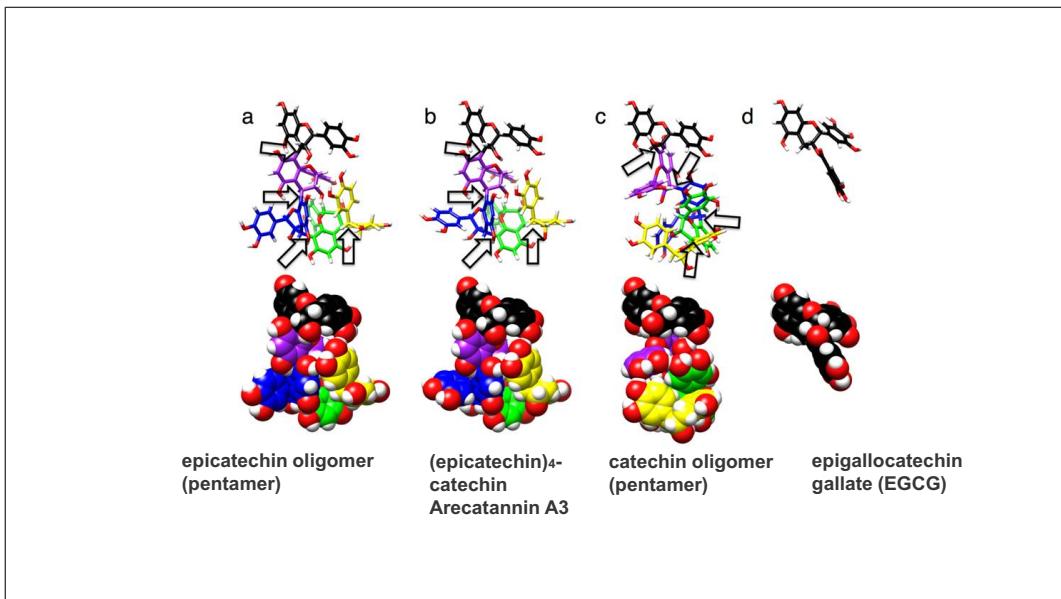


図 1-A プロアントシアニジンの構造



**図 1-B. 非経験的分子軌道計算によるエピカテキンとカテキン
5 量体の最安定構造 (文献 Sci. Rep. 7:7791
DOI:10.1038/s41598-017-08059-x から引用)**

ブドウの梗から得られた活性画分はメタノール溶出画分である。生理活性を確認後、この溶出画分をさらに分画し、LC/MSにより分析したところ、多くのカテキンまたはエピカテキンの重合体を確認できた。一方、ブドウの枝や実、種には同様の抽出を行った画分に FABP5 遺伝子を抑制する活性はなかった。しかしながら、成分を分析してみるとカテキンあるいはエピカテキンの重合体が確認できたことから、ブドウの梗には特徴的な構造を持つ活性分子の存在が示唆される。今回、梗の分画、精製段階で最終的に確認できたガロ基、ガレート基の存在する 8 量体、10 量体あるいはその重合度違いの化合物は枝や皮、種では確認できていない。

小豆は常温の水で内部のでんぶんが水を吸って膨張するため表皮の細胞が破壊される。そのため表皮に含まれるポリフェノール類が溶出する。逆に熱水で抽出した場合、でんぶんが複雑な挙動を示すため、濾過などの物理的処理ができないため、分離精製が難しかった。

小豆の皮にはアントシアニジンが含まれており、flavan-3-ol 類の代謝が存在する部位である。

抽出水溶液をそのまま Amberlite XAD-1180N に供し、ブドウと同様、メタノール画分に flavan-3-ol 類の重合体を多数確認した。このことは植物体から 2 次代謝物であるシキミ酸経路の物質のうち、5 量体を境目として重合度の低いもの、高いものに効率よく大別、分離することができるこことを意味し、産業を意識した分離手法としても重要である。

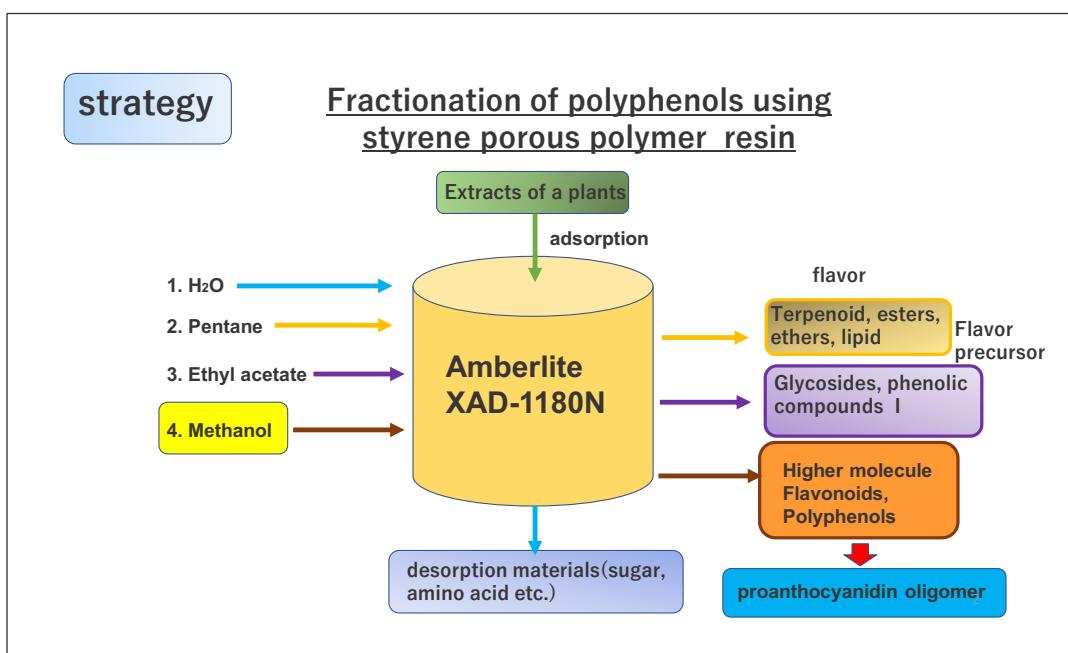


図 2 Amberlite XAD-1180N を用いたポリフェノール化合物の分離及び
プロアントシアニジンオリゴマーの濃縮

4-2 プロアントシアンジンオリゴマーの単離および分析

Flavan-3-ol の高重合体は分子量も大きく、水酸基を多数持つことから液体クロマトグラフィーで分析した。Amberlite XAD-1180N より得られた高重合体濃縮物は HPLC により分析するとシャープなピークにはならず、ブロードであった。

おそらく活性画分には種々の分子量を持つ化合物が含まれている可能性が推定されたため、次に分子篩クロマトグラフィー (Sephadex LH-20、Toyopearl HW40F) を用いて精製した。溶出溶媒の極性条件を適宜変えながら活性画分を濃縮した。それぞれの画分を HPLC により分析すると、異なる溶媒条件の画分でも同じ保持時間を示すピークがあることがわかった。同じ保持時間であっても構造が異なる可能性が示唆された。クロマトグラフィーでの溶出は、リニアーグラジェント法ではなくステップワイズ法で行なった。その結果、ブロードなピークは、比較的シャープな 2 つのピークに分離した。

2 つのピークに分離できたため、分取用のクロマトグラフィーで活性画分を濃縮した。精製標品の純度を上げるために、分析用カラムを用いて数十マイクロミリリットル分取した。2 つの成分のうち他の成分 (Compound B) は LC/MS 解析できる程度しか回収できなかつたため、物理化学的解析をすることができなかつた。一方、十分量回収したもう一つの成分 (Compound A) については、NMR 解析の結果、カテキン類であることがケミカルシフトで分析できたが、高重合体であるためか、ケミカルシフトの分解能はよくなかった。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C}-^1\text{H COSY}$ 解析においても同様の結果であった。温度や溶媒の測定条件を変えても結果の改善はほとんど見られなかつた。

2013 年に共同研究者の菊池 淳先生(理化学研究所の環境代謝分析室)が測定したデータを下記(図 3-1~3)に示す。

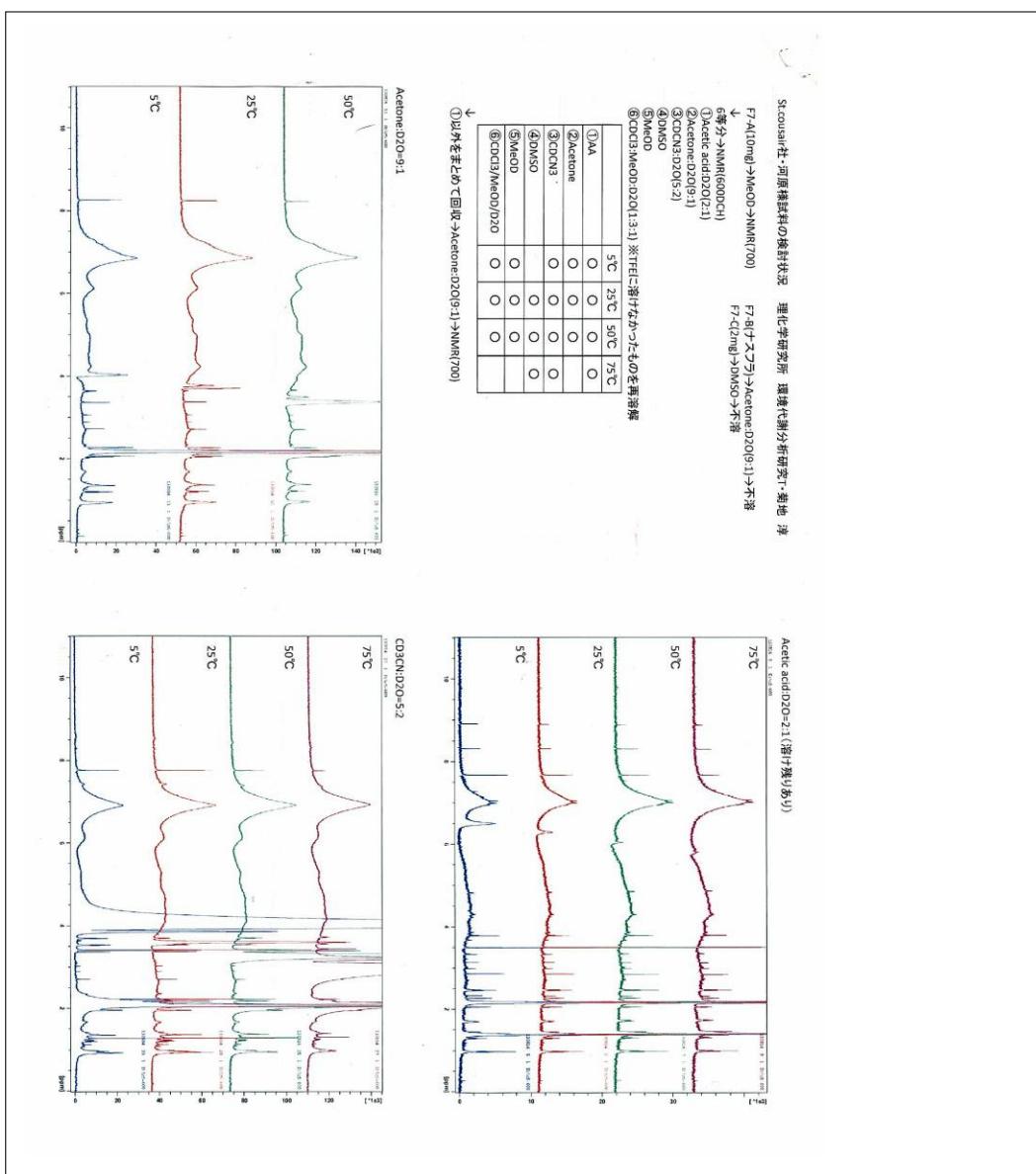


図 3-1 分離したプロアントシアニジンオリゴマーの種々の測定条件(温度、溶媒)の¹H-NMR

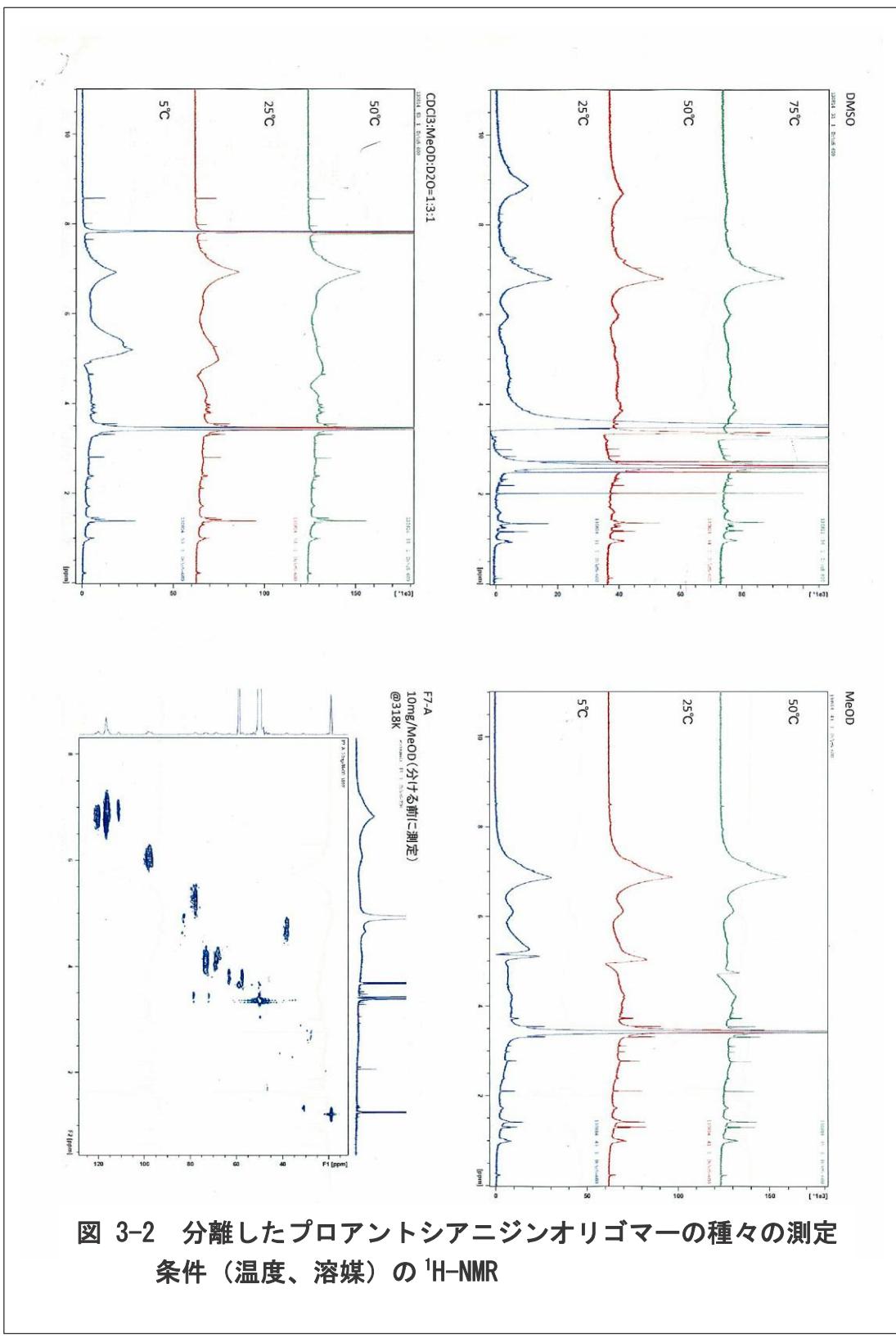
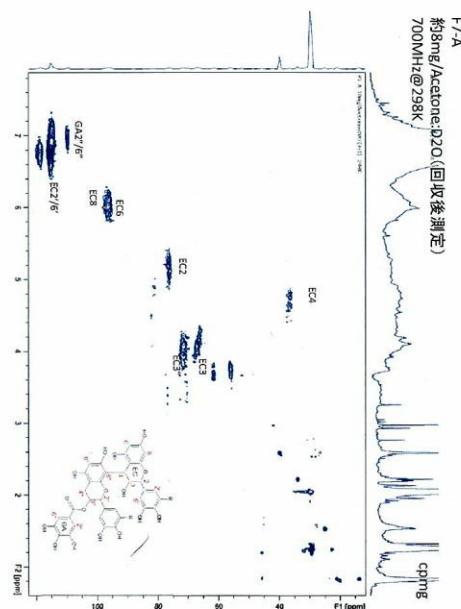
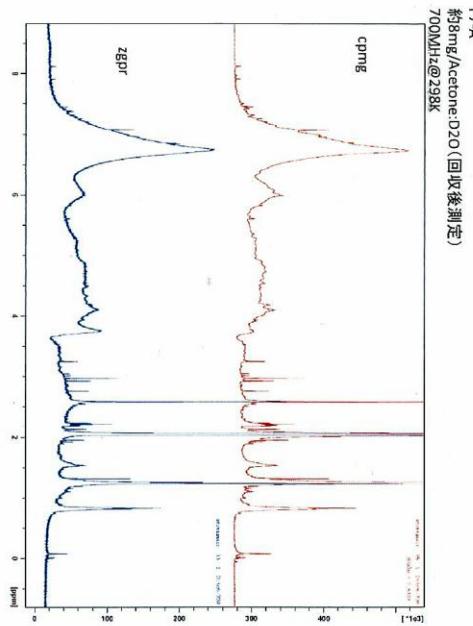
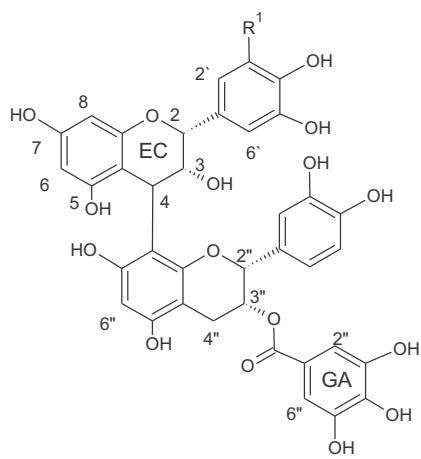


図 3-2 分離したプロアントシアニジンオリゴマーの種々の測定
条件（温度、溶媒）の ^1H -NMR

図 3-3 分離したプロアントシアニジンオリゴマーの種々の測定条件（温度、溶媒）の¹H-NMR,
¹³C-¹H COSY



上記の図 3-1～3-3 のデータからでは、活性分子の基本構造が、catechin または epicatechin の構造は有していることはわかるが、重合度についての情報は全く得られなかった。

下記図 4 は、epicatechin pentamer(信州大学農学部真壁教授らが合成、文献、Sci. Rep. 7:7791 DOI:10.1038/s41598-017-08059-x から引用)の¹H-NMR であるがケミカルシフトはブロードながらみられるが、カップリング定数は不明である。

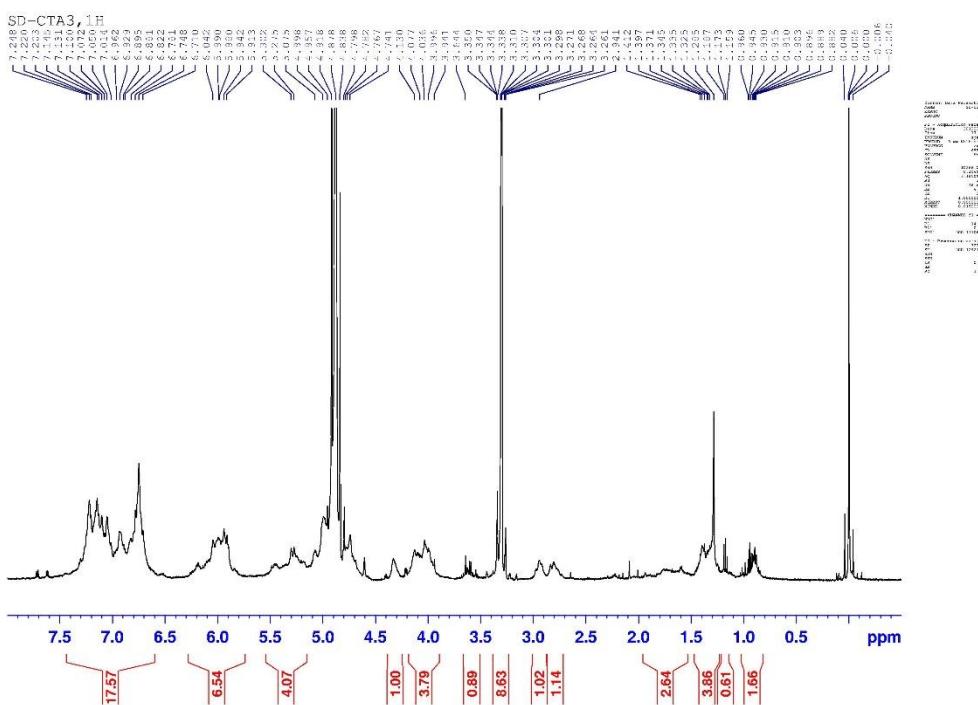


図 4 合成した epicatechin pentamer の¹H-NMR

以上のことから、LC-TOFMS での情報だけが重合度を示す手段であることがわかった。文献³⁵⁾では陰イオンモードでの分析が報告されている事例が多くだったので同モードでの分析を行ったが解析困難な結果であった。そこで、陽イオンモードに切り替えて分析したところ、catechin 分子量の M+1 の単位で重合を示すピークが観測された。さらに、分子イオン M+1 と思われるピークを MS/MS 分析し、コリジョンエネルギーの強さを順次変更したところ、エネルギーを強くするごとに分解が進む様子が観測され、確かに重合体であることが確認できた。

以上の結果から、本研究では、これまで困難であった種々の植物由来プロアンチアニジン高重合体の単離精製と質量分析による精製標品の推定構造の決定を可能にした。

プロアントシアニジンオリゴマーの立体構造で重要なことは、基本単位(flavan-3-ol)の構造である。C環の2,3の立体構造が *cis*型か *trans*型かにより、基本単位の構造が epicatechin あるいは catechin と異なっており、分子全体の構造も大きく異なることが示唆された(図13)。そこで、チオリシスによる開裂反応を行い、反応物を HPLC や質量分析で分析することで基本単位の構造が epicatechin か catechin かを解析した。チオリシスによる開裂反応の反応機構を図5に示す。

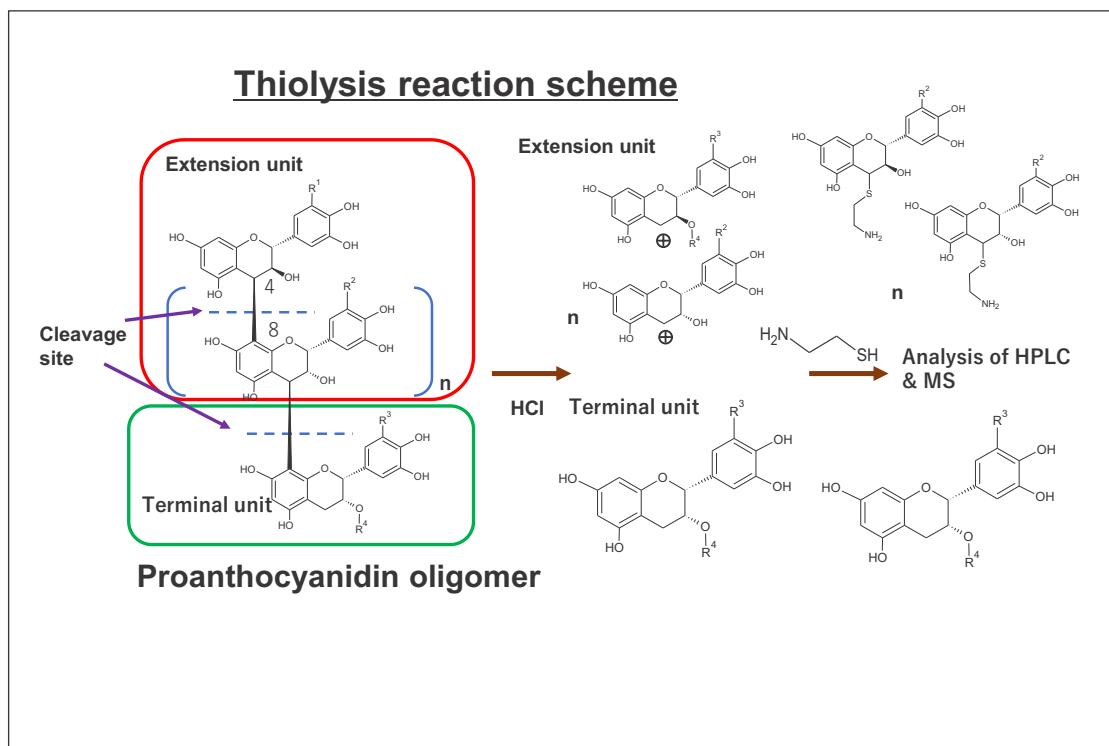


図5 プロアントシアニジンオリゴマーにおけるチオリシスの反応機構

プロアントシアニジンオリゴマーの構造は terminal unit 及び extension unit に区別され塩酸で開裂時、terminal unit はそのままであるが extension unit は C 環 4 位が electrophile となりチオエーテルと反応する。これにより terminal unit と extension unit は HPLC 上区別が可能となる。また、チオエーテル化した epicatechin、catechin の区別も HPLC 上可能となる。さらに LC/MS を測定することで生成した化合物が同定可能となる。

以上の方法を利用してブドウから精製した化合物、並びに、小豆より精製した活性画分についてチオリシスを行った。

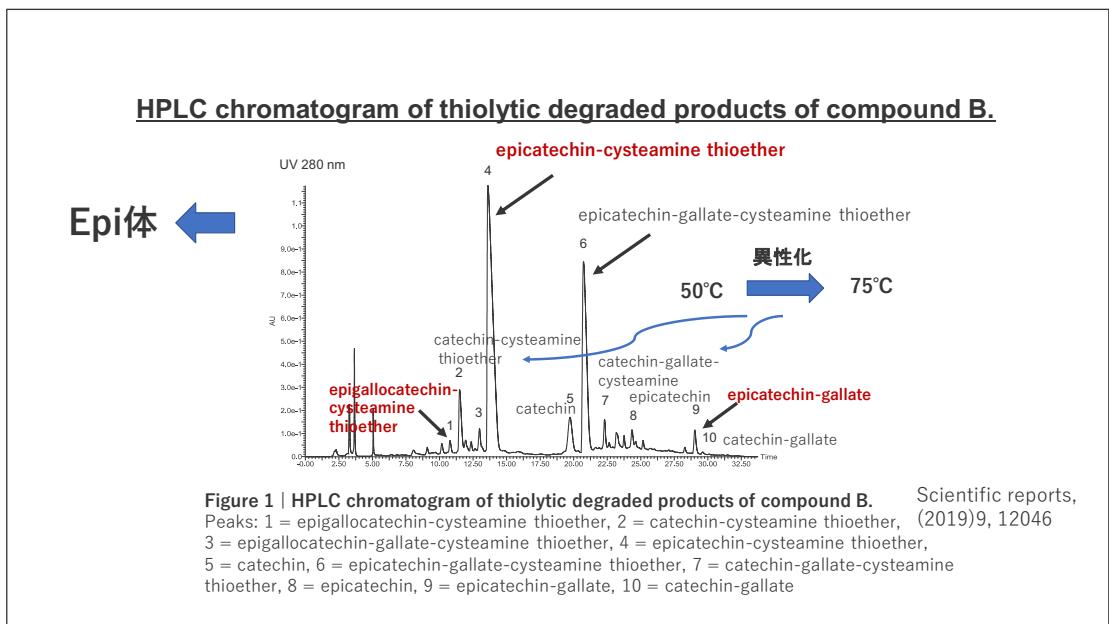


図6 ブドウ梗抽出物より精製した抗腫瘍活性成分のチオリシス後のHPLCクロマトグラム (Scientific Reports, (2019) 9, 12046 引用)

図6では主要成分として epicatechin の thioether のピーク、また、epigallocatechin の thioether、epicatechin gallate のピークが観測され以上の結果からプロアントシアニジンオリゴマーの基本単位は epicatechin であることを決定した。一方、catechin、catechin 誘導体が検出されているのは反応温度を 50°C から 75°C に上げた際の副反応（異性化）と考えている。

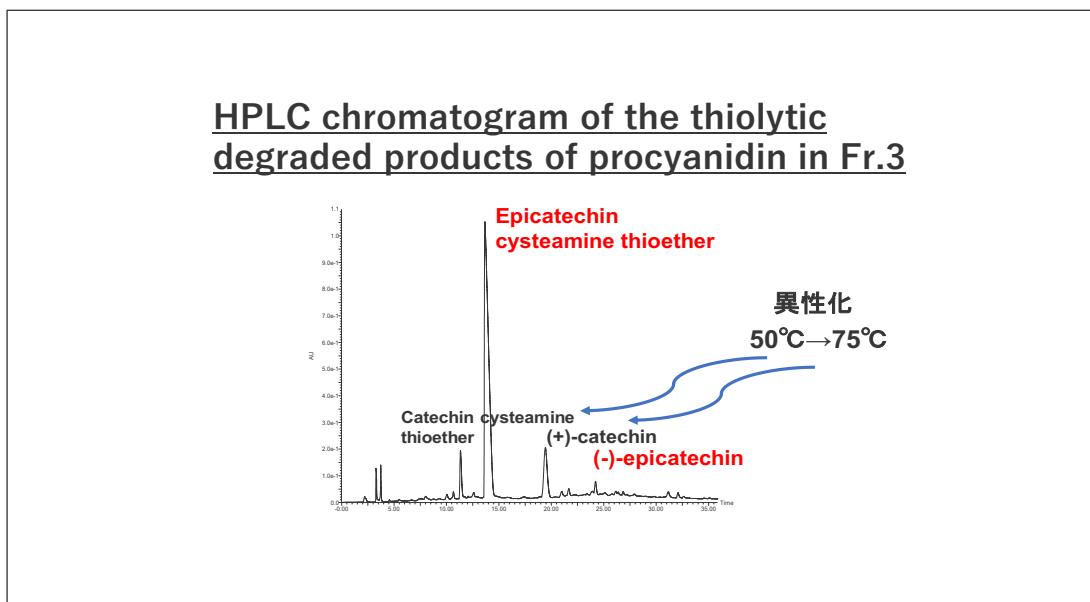


図7 小豆より精製した抗腫瘍活性成分のチオリシス後のHPLCクロマトグラム(Heliyon 5 (2019) e02610 より引用)

チオリシスで使用した小豆の抗腫瘍活性画分は Toyopearl HW40F 処理後、さらに C18 カラムにより分画し、活性のあった画分 (Fr. 3) を用いており、図 60 (p103) に示した合成した epicatechin oligomer と HPLC の保持時間が一致、既知のアレカタンニンは含まれていない。チオリシスの結果もブドウと同様、HPLC の主要成分が epicatechin のチオエーテルであったことから抗腫瘍活性を有するプロアントシアニジンオリゴマーの基本単位を epicatechin であると決定した。(図 7)

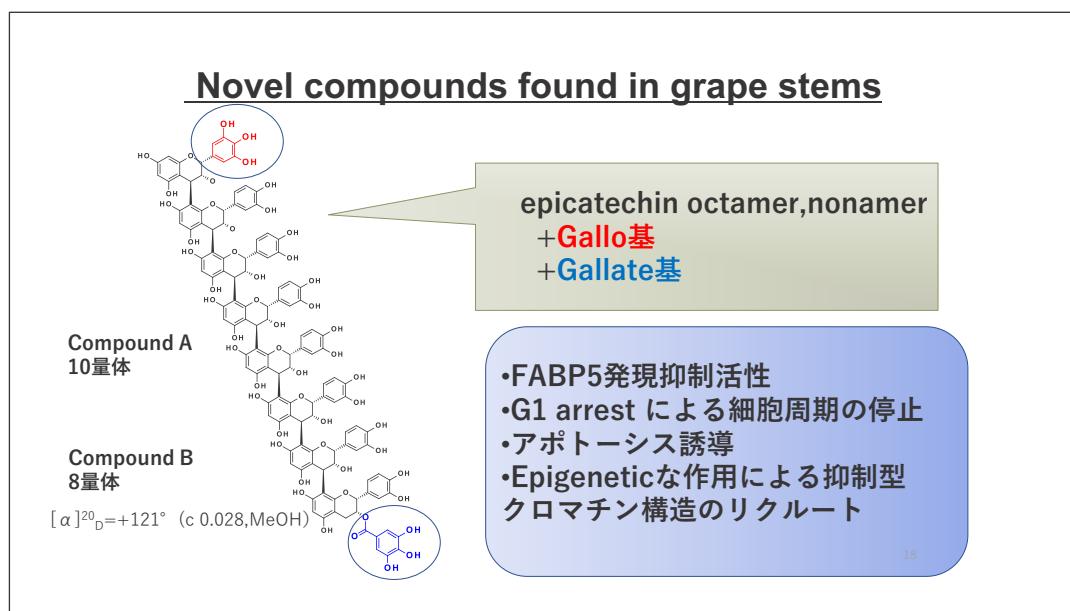


図 8 推定構造が決定されたブドウ由来抗腫瘍活性物質

精製し推定構造を決定した新規プロアントシアニジンオリゴマーは、下記の生理活性についてすでに藤井研究室で研究がなされている (図 8)。

- FABP5 発現抑制活性
- G1 arrest による細胞周期の停止
- アポトーシス誘導
- Epigenetic な作用による抑制型クロマチン構造のリクルート

小豆由来の抗腫瘍活性物質は単離には至っていないが epicatechin の hexamer 及び heptamer が主要成分であることがわかった。

4-3 プロシアニジンオリゴマーの生理活性と立体化学

ポリフェノール類はブドウの各部位に存在しているが、FABP5 遺伝子の発現抑制活性は梗由来抽出物にのみ存在した。

上記 4-1 の図 1-B の通り、catechin、epicatechin の重合体のそれぞれの立体構造を比較してみると全く物性や生理作用が異なることが示唆された。また、分子の置かれた環境の違い、変化により立体構造も変化するのではないかと推察される。

一方、小豆においても水抽出物をブドウの梗と同様 Amberlite XAD 処理を行い、バイオアッセイを行ったところ、ブドウの梗と同様、メタノール画分に FABP5 遺伝子の発現抑制活性があった。

Amberlite XAD 樹脂処理後のメタノール画分には高重合体が濃縮されたが、この画分をさらに精製しても、抗腫瘍活性（FABP5 遺伝子の発現抑制活性）の比活性は増強しなかった。したがって、本精製法では精製過程で比活性の上昇が見られなかったことから、今後最適な精製法を開発する必要がある。

次に、プロアントシアニジンの構造ユニット (catechin か epicatechin) の立体構造および重合度の違いが抗腫瘍活性 (FABP5 遺伝子の発現抑制活性) の差に関係があるかどうかを検証するために、種々の立体異性体を有機合成で創製し、構造活性相関を解析した。合成法については真壁らが C 環 4 位をエトキシエチルなどで electrophile とし、種々のルイス酸を駆使し常温で収率よく重合体を合成することに成功している^{41, 42)} (図 9)。

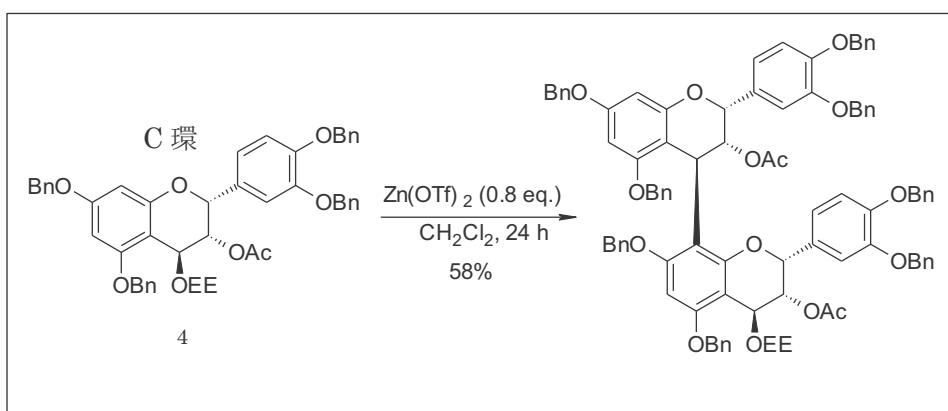


図 9 プロアントシアニジンオリゴマーの合成方法 (Scientific Reports 7:7791 DOI:10.1038/s41598-017-08059-x)

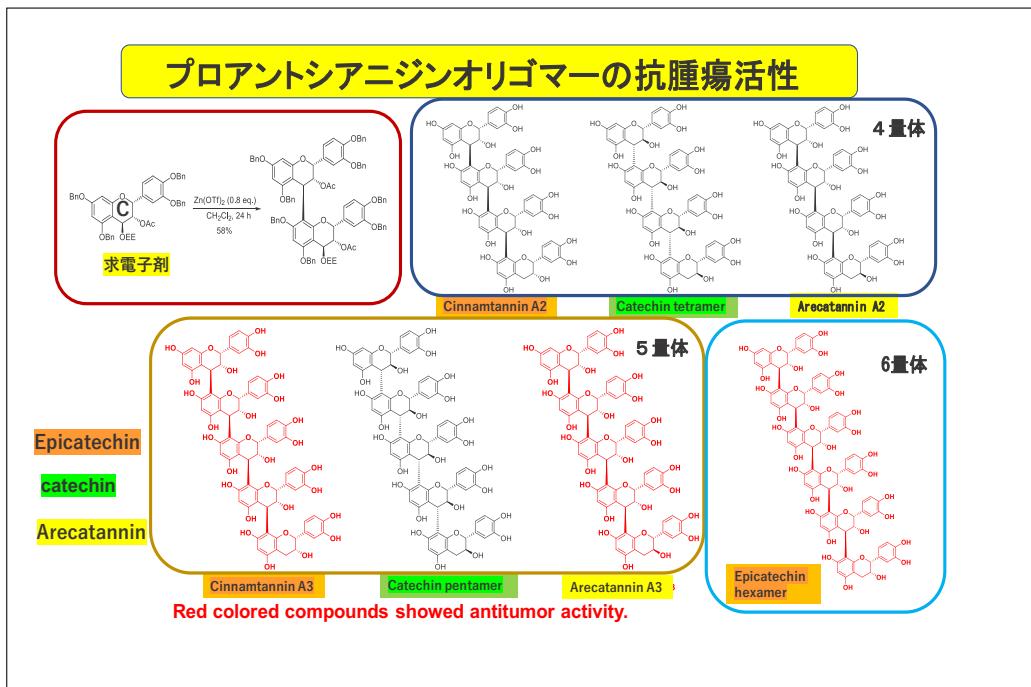


図 10 合成したプロアントシアニジンオリゴマー

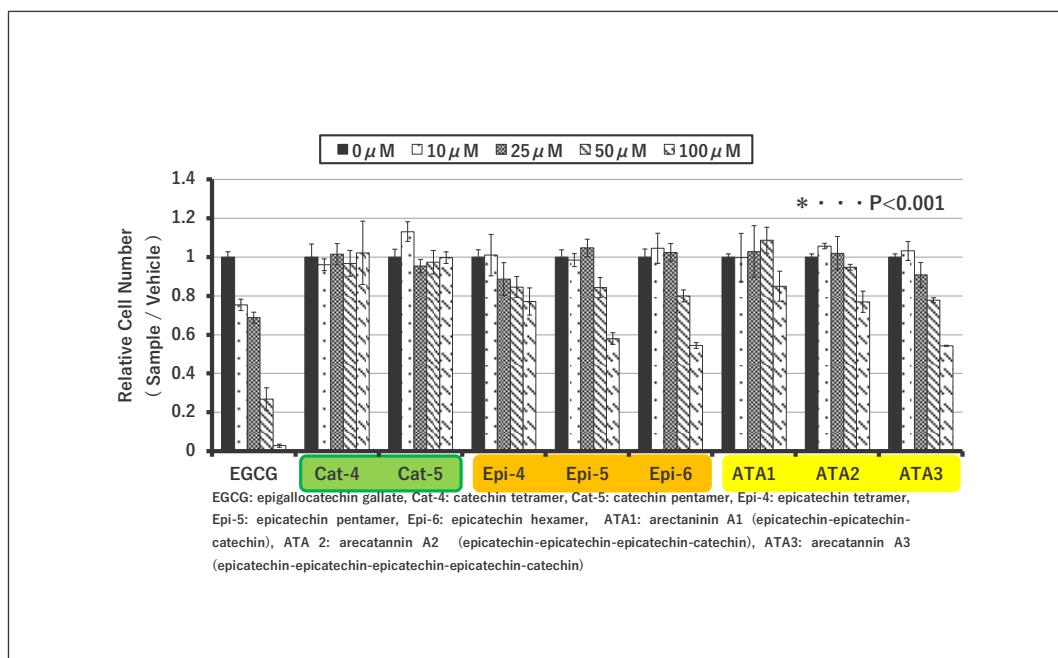


図 11 合成したプロアントシアニジンオリゴマーのヒト前立腺がん細胞株 PC-3 に対する細胞毒性 (Scientific Reports 7:7791 DOI:10.1038/s41598-017-08059-x)

図 10 に合成した重合体の示性式、および図 11 にはその抗腫瘍活性について示す。プロアントシアニジンの C 環 2,3 位の *cis*, *trans* の違いにより抗腫瘍活性が異なり、4 量体、5 量体を比較した場合、*trans* 体の catechin では活性が見られない。一方、*cis* 体の epicatechin は EGCG ほどではないが抗腫瘍活性が見られる。また、epicatechin のオリゴマーの末端が catechin の arecatannin はその中間的活性を示している。

一方、FABP5 遺伝子の発現抑制活性を図 12 に示す。

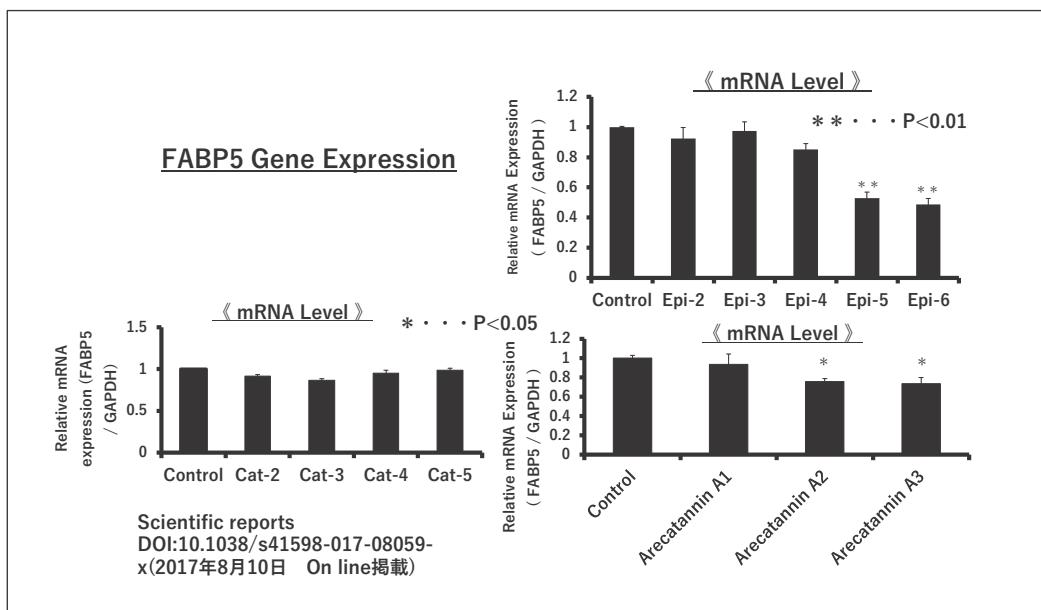


図 12 合成したプロアントシアニジンオリゴマーの FABP5 遺伝子の発現抑制活性 (Scientific Reports 7:7791 DOI:10.1038/s41598-017-08059-x 引用)

Catechin のオリゴマーは明らかに FABP5 遺伝子の発現抑制活性を示さないが Epicatechin は 5 量体以上で強い抑制活性を示す(図 12)。

本研究で世界に先駆け、発見した新規プロシアニジンオリゴマーは、チオリシスにより合成した標準品の HPLC における保持時間ならびに質量分析の結果から epigallocatechin-(epicatechin)₇ gallate であると推定できた。また、小豆から得られた抗腫瘍活性を有する画分も epicatechin を基本骨格とした heptamer を主要成分として含有していたことが明らかとなった。

Cis 体である epicatechin のオリゴマーが FABP5 遺伝子の発現抑制活性を有することは合成物、天然物共に同様の結果を示した。この結果から、抗腫瘍活性とがんの転移に密接な関係のある FABP5 遺伝子の発現抑制の反応機構は別であり、epicatechin のオリゴマーの立体選択性による活性が示唆された。

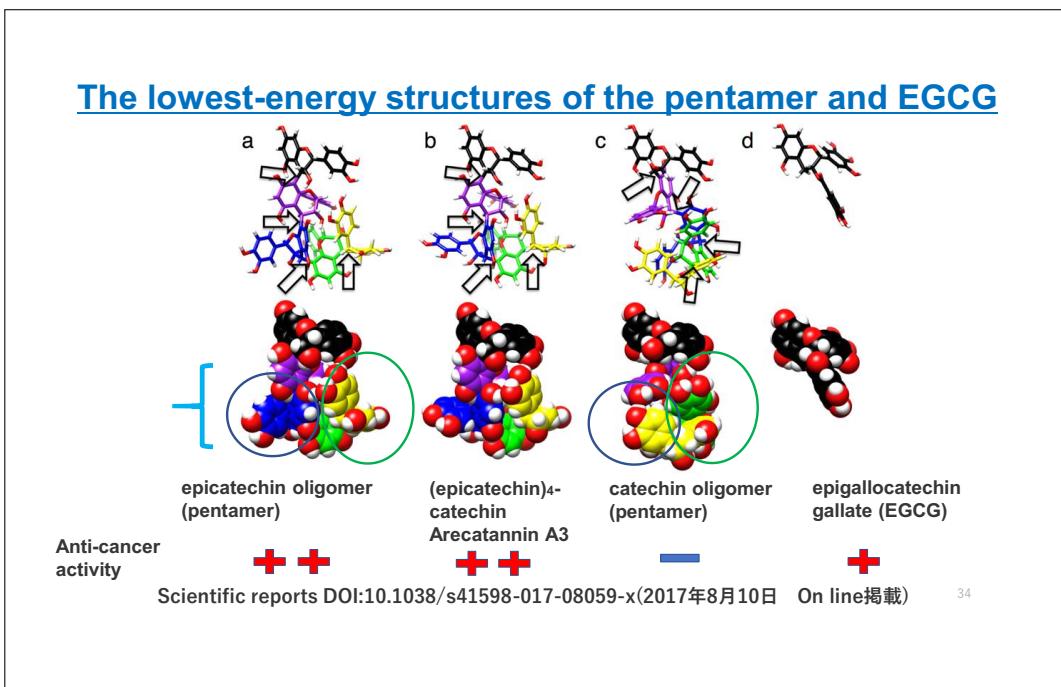


図 13 非経験的分子軌道計算によるエピカテキンとカテキン
5 量体の最安定構造 (文献 Sci. Rep. 7: 7791
DOI:10.1038/s41598-017-08059-x から引用) と推定
ファーマコフォア

図 13 に示したのは図 1-B と同様の epicatechin、arecatannin A3、catechin、epigallocatechin gallate(EGCG) の 5 量体安定構造であるが、構造を比較すると分子の頭部（上部）はそれぞれよく似た構造である。しかしながら下部のブルー及びグリーンの丸で示した部分は明らかに立体構造が異なる。図 12 で EGCG を対象にしていないのは FABP5 の発現抑制活性を全く示さないためである。FABP5 の遺伝子発現には立体構造の内、下部が重要であることが示唆される。

活性に関与するターゲットタンパク質が何らかの形で構造にフィットするかしないかで活性の有無を左右していることが示唆された。これまで、ポリフェノールの生理活性といえば、ごく一部の明らかになったフラボノイドを除いて、抗酸化活性あるいはフリーラジカル消去能といった個別の遺伝子やたんぱく質をターゲットとしないひとまとめの表現で済まされていたが、本研究では個別の機能を持ったターゲットタンパク質との相互作用により活性の有無が左右されることを明らかにした。

4-4 プロアントシアニジンオリゴマーの体内動態についての課題

次に、マウスへの混餌投与試験の結果は濃度も重要であることを意味しており、ブドウ梗抽出物では 5% (w/v) 濃度での試験を行ったがマウスは見かけ上健康であるにも関わらず、体重の減少があったため、濃度を 2.5% に変更したが、結果として肝臓重量の減少が見られた。一方、小豆抽出物での実験では、2% (w/v) の飲料水を 4 週間投与した結果、がん細胞の顕著な縮小が確認できた。ブドウ梗抽出物の投与では単回投与では問題がなくとも反復投与では肝臓に負担をかけた可能性が高い。

一方、がん細胞に対してブドウ、小豆のいずれのプロアントシアニジンオリゴマー含有抽出物の投与においても *in vitro* だけではなく *in vivo* においても活性が見られたことは確かにオリゴマーが関与していることは間違いない。

また、この高重合体は 1 N の塩酸で加熱してもクロマトグラムに変化が見られないことから分解などが起こっていないことが示唆される。このことはヒトが口から食料として摂取した場合であっても胃酸による影響を受けない可能性を示している。

体内動態は様々な推定メカニズムが報告されている⁴⁴⁾。例えば 2 量体であるプロシアニジンは胃酸 (pH 2) で单量体に分解され、その後小腸上皮でグルクロン酸、肝臓でグルクロン酸抱合、硫酸抱合が、さらにメチル化されることも報告されている⁴⁵⁾。実際には様々な栄養を同時に摂取しているので pH 5 程度にはなるため、分解されずに腸に移行することも十分に考えられると述べている。また、カカオには epicatechin が含まれており、ココアとチョコレートで吸収量を比べた場合、チョコレートで摂取したほうが吸収率はよく、油分が吸収を促進しているのではないかと報告されている⁴³⁾。さらに、ヒトの便における *in vitro* での培養研究では腸内細菌叢により (+)-catechin が (+)-epicatechin に速やかに変換されるという報告もある⁴⁵⁾。一方、2010 年には Stoupi らが ¹⁴C でラベルした procyanidin B2 を用いてオスのラットに静脈注射と経口投与し、血中、尿、排せつ物の放射線を測定し、40% が排せつ物に残っていることを確認している⁴⁶⁾。

このような知見をもとに推察すると、胃では十分分解されないものもあり、重合体の構造を維持した状態で腸管上皮に接触する可能性は十分ある。また腸内では細菌叢が catechin をエピ化している報告から、epicatechin が重要な働きをつかさどっているのではないかと考えている。Monagas ら⁴⁵⁾ は monomer、dimer は小腸で吸収され肝臓で代謝されるが、それ以上の polymer は大腸で腸内細菌叢により分解、吸収され肝臓で代謝されると述べている。このように、大腸まで polymer が移行するという説もみられる⁴⁷⁾。腸内細菌の種類によってモノマー化した flavan-3-ol の C 環開裂の代謝ができるもの、できないものの

区別があり⁴⁸⁾、C環の開裂速度が catechin と epicatechin を比べると catechin のほうが 5 倍以上、速いものがある⁴⁹⁾。dimer である procyanidin B3、trimer である procyanidin C2(いずれも catechin oligomer)をラットに混餌投与した場合の尿中への代謝物でフェノリックな化合物をモニタリングした文献があるが monomer 投与と比較すると特に trimer は検出されない成分やわずかにしか検出されない成分が多い。このデータから trimer は少なくとも monomer に一旦代謝されるということは少ないとと思われる⁵⁰⁾。また、Suathira らの報告によると反芻動物に存在するいくつかの腸内細菌で分子量 3000 程度を低分子量、中分子量 12200、大分子量 36500 程度を目安として、ポリフェノールを与えた場合の数種の細菌の活性を見ているが投与後 10 時間以内で、活性に差があり、大分子量の方がむしろ、抗菌活性が弱い⁵¹⁾。

以上の参考文献と本研究の実験結果を考慮すると、腸内細菌叢にとって、catechin より epicatechin のほうの都合がよく、プロアントシアニジン(flavan-3-ol 重合体) はそのまま大腸まで移行しているものもあり、少なくとも単量体と同じような代謝は行われておらず、むしろタンパク質などと相互作用して存在しているのではないかと考えられる(図 14)。

しかしながら、いずれの報告もプロアントシアニジン (flavan-3-ol の高重合体) を HPLC でとらえて、あるいは標準品と比較して報告しているものはない。この高重合体は重要であり、本研究の目的である体内動態と抗腫瘍活性のメカニズムの解明にはブラックボックスとなっている胃から腸に至るプロアントシアニジン (flavan-3-ol 高重合体) の移行、腸内細菌叢との相互作用を解明する必要があり、まずはプロアントシアニジン (flavan-3-ol の高重合体) を検出できる方法を構築できた。

次のステップとして 5 量体以上のプロアントシアニジンを投与して、腸内で検出することであり、また高重合体だけを投与し代謝産物を分析することで高重合体由来の代謝であることが証明される。腸内細菌叢とがん細胞、高重合体の 3 者の関係を解明することが、将来がんの予防法の開発に貢献する可能性が期待される。

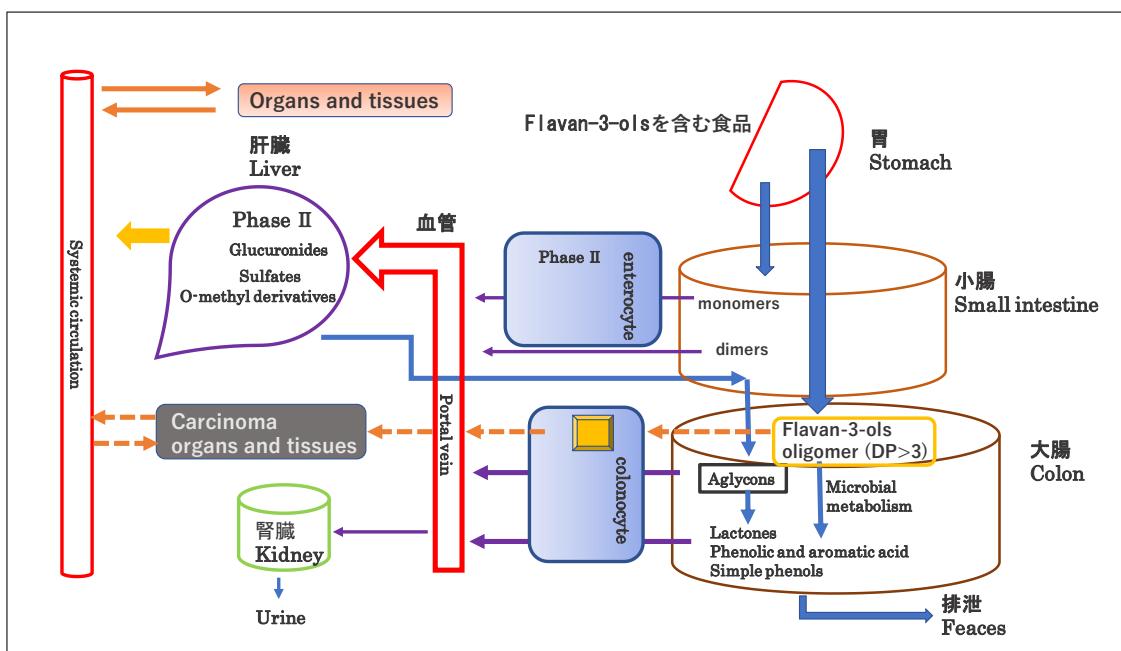


図 14 プロアントシアニジンオリゴマーの体内動態モデル(仮説)
 (Jeremy P. E. Spencer, Alan Crozier, Flavonoids and Related Compounds Bioavailability and Function, CRC Press, (2012) を改変)

結論

本研究では、ブドウ搾汁残渣の有効活用法を探索する過程で、ブドウの梗（スティム）熱水抽出物にヒト前立腺がん細胞株 PC-3 の増殖を抑制し、さらに悪性化したがんに高発現している転移促進遺伝子 FABP5 を抑制することで転移を抑える可能性が見出された。したがって、本研究では、活性画分（flavan-3-ols オリゴマー）の新規な精製法を開発することによって、活性画分の濃縮に成功した。また、ESI-TOFMS による構造解析から、主要活性分子はガロ基とガレート基を 1 つずつもつ 8 量体のプロアントシアニジンオリゴマーであることが推定できた。以下に、その要点を記載する。

1. ブドウ梗と小豆皮の抽出物に、ヒト前立癌細胞の増殖と転移促進遺伝子 FABP5 の発現を抑制する新規化合物が含まれていることを明らかにした。
2. ブドウ梗及び小豆皮抽出物の精製に、多孔性合成吸着剤 Amberlite XAD-1180N を用いることで flavan-3-ol の高重合体を濃縮することができた。上記の活性分子は flavan-3-ol の 5 量体以上のエピ型高重合体であった。主要な活性分子は、ブドウでは、プロアントシアニジン 8 量体と 10 量体で、ガロ基とガレート基を 1 つずつ持っていた。いずれも新規化合物であった。これらの官能基は、小豆では両官能基を満たした化合物を確認できていないが、活性発現に重要である可能性が示唆された。
3. プロアントシアニジンオリゴマーの立体化学において epicatechin の 5 量体以上にヒト前立腺がん細胞株 PC-3 の増殖を抑制し、さらに転移促進遺伝子 FABP5 を抑制活性があることを見出した。
4. 上記の活性分子（プロアントシアニジンオリゴマー）は、*in vitro* と *in vivo* で抗腫瘍活性を示すが、これらの化合物の細胞内及び体内動態については不明である。特に、今後 flavan-3-ol 高重合体（プロアントシアニジンオリゴマー）の消化吸収から腸においての作用、細菌叢とのかかわりの解明が重要な研究課題である。

Summary

- In the present study, I estimated the novel anti-cancer compounds as epigallocatechin-(epicatechin)7 gallate from the grape stem extracts using ESI-TOFMS analysis.
- I achieved concentration and separation of proanthocyanidins oligomers from grape stem and adzuki beans using new methods (Amberlite XAD, Toyopearl, ODS chromatography).
- In proanthocyanidins oligomers stereochemistry I discovered that the pentamer and more degree of epicatechin derivatives showed significant anti-cancer activities for suppression in PC-3 prostate cancer cells and in particular, these compounds suppressed expression of cancer-promoting gene fatty acid-binding protein 5 (FABP5). On the other hand, compounds with less oligomer than tetramer and the catechin pentamer did not have any activities.
- I revealed that there are activities of suppressed expression of cancer-promoting gene fatty acid-binding protein 5 (FABP5) both *in vitro* and *in vivo* with proanthocyanidins oligomers.

引用・参考文献

- 1) 麻井宇介、ワインづくりの思想、117-132, (2001)
- 2) Lydia A Bazzano, Jiang He, Lorraine G Ogden, Catherine M Loa, Suma Vupputuri, Leann Myers, and Paul K Whelton, Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study, Am. J. Clin. Nutr, 76; 93-99, (2002)
- 3) Hsin-Chia Hung, Kaumudi J. Joshipura, Rui Jiang, Frank B. Hu, David Hunter, Stephanie A. Smith-Warner, Graham A. Colditz, Bernard Rosner, Donna Spiegelman, Walter C. Willett, Fruit and Vegetable Intake and Risk of Chronic Disease, Journal of the National Cancer Institute, 96, 21, November, 3, (2004)
- 4) Jancis Robinson, 「Jancis Robinson's Guide to Wine Grapes」,63-70, (1998) 日本語版
- 5) 関根彰、「ワイン造りのはなし」, 59-61, (1999)
- 6) Faisal Kabir, Wei Wei Tow, Yasunori Hamauzu, Shigeru Katayama, Sachi Tanaka, Soichiro Nakamura, Antioxidant and cytoprotective activities of extracts prepared from fruit and vegetable wastes and by-products., Food Chemistry 167, 358-362, (2015)
- 7) Su-Ni Tang, Chandan Singh, Dara Nall, Daniel Meeker, Sharmila Shanker, Rakesh K Srivastava, The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition ,Journal of Molecular Signaling, 5, 14, (2010)
- 8) Alan P. Kozikowski, Werner Tückmantel, Gesine Böttcher and Leo J. Romanczyk. Jr, Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. Synthesis of Trimeric, Tetrameric, Pentameric, and Higher Oligomeric Epicatechin-Derived Procyanidins Having All-4 β ,8-Interflavan Connectivity and Their Inhibition of Cancer Cell Growth through Cell Cycle Arrest, J. Org. Chem. ,68, 1641-1658, (2003)
- 9) Toshihiko Shoji, Saeko Masumoto, Nina Moriichi, Masuko Kobori, Tomomasa Kanda,

Hiroshi Shinmoto, and Tojiro Tsushida, Procyanidin Trimers to Pentamers Fractionated from Apple inhibit Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cells., J. Agric. Food Chem. , 53, 6105-6111, (2005)

- 10) Tomisato Miura, Mitsuru chiba, Kosuke Kasai, Hiroyuki Nozaka, Toshiya Nakamura, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Yasuyuki Ohtake, and Tastusuke Sato, Apple procyanidin induce Tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3, Carcinogenesis, 29, 3, 585-593, (2008)
- 11) Chapla Agarwal, Ravikan Veluri, Manjinder Kaur, Shen-Chieh Chou, John A. Thompson and Rajesh Agarwal, Fractionation of high molecular weight tannins in grape seed extract and identification of procyanidin B2-3,3'-di-O-gallate as a major active constituent causing growth inhibition and apoptotic death of DU145 human prostate carcinoma cells, Carcinogenesis, 28, 7, 1478-1484, (2007)
- 12) Jean-Marc Souquet, Benot Labarbe, Christine Le Guernev, Vronique Cheynier and Michel Mountounet, Phenolic Composition of Grape Stems., J. Agric. Food Chem. , 48, 1076-1080, (2000)
- 13) Despina Sahpazidou, George D. Geromichalos, Dimitros Stagos, Anna Apostolou, Serkos A. Haroutounian, Aristidis M. Tsatsakis, George N. Tzanakakis, A. Wallace Hayes, Dimitrios Kouretas, Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal, and thyroid cancer cells, Toxicology Letters, 230, Issue2, 218-224, (2014)
- 14) Ha Yeon Jeong, Joo Youn Kim, Hong Kyu Lee, Do Thi Ha, Kyung-Sik Song, KiHwan Bae and Yeon Hee Seong, Leaf and Stem of *Vitis amrensis* and Its Active Components Protect against Amyloid β Protein (25-35)-induced Neurotoxicity, Arch. Pharm. Res., 33, 10, 1655-1664, (2010)
- 15) N. Zga, Y. Papastamoulis, A. Toribio, T. Richard, J. C. Delaunay, P. Jeandet, J. H. Renault, J. P. Monti, J. M. Mérillon, P.Waffo-Téguo, Preparative purification of antiamyloidogenic stilbenoids from *Vitis vinifera*(Chardonnay)stem by centrifugal partition chromatography, Journal of Chromatography B, 877 , 1000-1004, (2009)
- 16) Tõnu Püssa, Janar Floren, Paul Kuldkepp and Ain Raal, Survey of Grapevine *Vitis*

vinifera Stem Polyphenols by Liquid Chromatography – Diode Array Detection – Tandem Mass Spectrometry, J. Agric. Food Chem. , 54, 7488-7494, (2006)

- 17) Evangelia Karvela, Dimitris P. Makris, Nick Kalogeropoulos, Vaios T. Karathanos, Deployment response surface methodology to optimize recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols, Talanta, 79, 1311-1321, (2009)
- 18) Dimitris P Makris, George Boskou, Nikolaos K. Andrikopoulos, Panagiotis Kefalas, Characterization of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera cv. Rodtis*) stem by liquid chromatography-mass spectrometry, Eur Food Res Technol , 226, 1075-1079, (2008)
- 19) 風間 亜紀、藤居文隆、橋本 俊嗣、Marian Verbruggen、鈴木 直子、市川 周平、山本和雄、毛利 公則 赤ぶどう葉乾燥エキス含有製剤の経口摂取による下肢のむくみ軽減効果 応用薬理 Pharmacometrics, 83 (1/2), 1-7, (2012)
- 20) 須藤 元喜、千葉 亜弥、上野 加奈子、 矢田 幸博、 赤滝 久美、三田 勝己、勤労女性における下肢のむくみと疲労に関する研究 日本女性心身医学会雑誌 J. Jp. Soc. Psychosom. Obstet Gynecol, 15, 1, 175–182, (2009)
- 21) 武馬 吉則ら 女性下肢部皮膚の加齢変化 J. Soc. Chem. Jpn, 34, (3), 283-290, (2000)
- 22) Emile Peynaud, Knowing and Making Wine p71, 1984 by John Wiley & Sons, Inc.
- 23) R. Corder, W. Mullen, N.Q.Khan, S.C. Marks, E.G. Wood, M.J. Carrier, A. Crozier, Red wine procyanidins and vascular health, Nature, 444, 30, November, 566, (2006)
- 24) Paul W. Caton, Mark R. Pothecary, Delphine M. Lees, Noorafza Q. Khan, Elizabeth G. Wood, Toshihiko Shoji, Tomomasa Kanda, Gurvinder Rull, and Roger Corder, Regulation of Vascular Endothelial Function by procyanidin-Rich Foods and Beverages, J. Agric. Food Chem. , 58, 4008-4013, (2010)
- 25) 特表2014-516939号公報
- 26) Tomohiro Itho, Yumiko Hori, Toshiyuki Atsumi, Kanzuo Toriizuka, Masahiro

Nakamura, Takeshi Maeyama, Masashi Ando, Yasuyuki Tsukamasa, Yoshiteru Ida, and Yukio Furuichi, Hot Water Extract of Adzuki(*Vigna angularis*) Suppresses Antigen-Stimulated Degranulation in Rat Basophilic Leukemia RBL-2H3 cells and Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction in Mice, Phytotherapy Research, 26, 1003-1011, (2012)

27) 特開2008-81478号公報

28) 伊藤 智広、伊藤 裕子、樋廻 博重、勝崎 裕隆、今井 邦雄、古市 幸生、小宮 孝志、小豆熱水抽出物（アズキ煮汁）中に含まれるヒト胃がん細胞に対するアポトーシス誘導物質の同定、日本栄養・食糧学会誌、第58巻、第5号 281-287, (2005)

29) Tomohiro Itoh, Hayato Umekawa, and Yukio Furuichi, Potential Ability of Hot Water Adzuki (*Vigna angularis*) Extracts to Inhibit the Adhesion, Invasion, and Metastasis of urine B16 Melanoma Cells, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69 (3), 448-454, (2005)

30) Tomohiro Itoh, Yumiko Hori, Toshiyuki Atsumi, Kazuo Toriizuka, Masahiro Nakamura, Takeshi Maeyama, Masashi Ando, Yasuyuki Tsukamasa, Yoshiteru Ida and Yukio Furuichi, Hot Water Extract of Adzuki (*Vigna angularis*) Supperesses Antigen-Stimulated Degranulation in Rat Basophilic Leukemia RBL-2H3 Cells and Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction in Mice, Phytother. Res. 26, 1003-1011, (2012)

31) John F.Hammerstone, Sheryl A.Lazarus, Alyson E.Mitchell, Robert Rucker, and Harold H. Schmits, Identification of Procyanidin in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, J. Agric. Food. Chem. , 47, 490-496, (1999)

32) Tuba Esatbeyoglu, Victor Wray, Peter Winterhalter, Isolation of dimeric, trimeric, tetrameric, and Pentameric procyanidins from unroasted cocoa beans (*Theobroma cacao L.*) using countercurrent chromatography Food Chemistry 179 , 278-289, (2015)

33) Hiroshi Sugiyama, Yoko Akazome, Toshihiko Shoji, Atuko Yamaguchi, Masaaki Yasue, Tomomasa Kanda, and Yasuyuki Ohtake, Oligomeric Procyanidins in Apple Polyphenol Are main Active Components for Inhibition of Lipase and Triglyceride Absorption, J. Agric. Food Chem. ,55, 4604-4609, (2007)

- 34) Toshihiko Shoji, Saeko Masumoto, Nina Moriichi, Hiroshi Akiyama, Tomomasa Kanda, Yasuyuki Otake, and Yukihiro Goda, Apple Procyanidin Oligomers Absorption in Rats after Oral Administration: Analysis of Procyanidins in Plasma Using the Porter Method and High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* ,54, 884-892, (2006)
- 35) Hélène Fulcrand, Sophie Remy, Jean-Marc Souquet, Véronique Cheynier, and Michel Mountounet, Study of Wine Tannin Oligomers by On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* ,47,1023-1028, (1999)
- 36) R. Watanabe, H. Fujii, A. Yamamoto, T. Hashimoto, K. Kameda, M. Ito, and T. Ono, Immunohistochemical distribution of cutaneous fatty acid-binding protein in human skin, *J. Dermatol. Sci.* 16, 17-22 (1997)
- 37) Wilfried Schwab, and Peter Schreier, Glycoside Conjugates of Aliphatic Alcohols from Apple Fruit(*Malus Sylvestris Mill cult. Janathan*), *J. Agric. Food Chem.* , 38, 757-763,(1999)
- 38) Gerhard Krammer, Peter Winterhalter, Melanie Schwab, and Peter Schreier, Glycosidically Bound Aroma Compounds in the Fruits of Prunus Species: Apricot(*P. armeniaca,L*), Peach(*P. persica,L*), Yellow Plum(*P.domestica, L*. ssp. *Syriaca*), *J. Agric. Food Chem*,39, 778-781, (1991)
- 39) Wilfried Schwab and Peter Schreier, Vomifoliol 1-O- β -D-xylopyranosyl-6- β -D-Glucopyranoside A Disaccharide Glycoside from Apple Fruit, *Phytochemistry*, 29, 1, 161-164, (1990)
- 40) Deborah D. Roberts, Alex P. Mordehai, and Terry E. Acree, Detection and Partial Characterization of Eight β -Damascenone Precursors in Apples(*Malus domestica Borkh. Cv. Empire*), *J. Agric. Food chem.*, 42, 345-349, (1994)
- 41) Manato Suda, Kohki Takanashi, Miyuki Katoh, Kiriko Matsumoto, Koichiro Kawaguchi, Sei-ichi Kawahara, Hiroshi Fujii, Hidefumi Makabe, Synthesis of Areca-tannin A1 from Dimeric Epicatechin Electrophile, *Natural Product Communications*, 10, 6, 959-962, (2015)

- 42) Mikihiro Ichikawa, Kohki Takanashi, Manato Suda, Yasunao Hattri, Sei-ichi Kawahara, Hiroshi Fujii, Hidefumi Makabe, Concise Synthesis of Cinnamtannin A2 from Dimeric Epicatechin Electrophile and Nucleophile Prepared by Zn(OTf)₂-Mediated Self-Condensation, *Synthesis*, 48, 1525-1532, (2016)
- 43) 夏目みどり カカオポリフェノールの包括的研究 カカオは神様の食べ物? 化学と生物, 7, 490-495, (2019)
- 44) M.Natsume, N.osakabe, Myamagishi, T.Takizawa, T.Nakamura, H.miyatake, H.Hatano, & T. Yoshida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 2581, (2000)
- 45) Maria Monagas, Mireia Urpi-Sarda, Fernando Sánchez-Patán Rafael Llorach, Innacio Garrido, Carmen Gómez-Cordovés, Cristina Andres-Lacueva and Begoña Bartolomé, Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.*, 1, 233-253, (2010)
- 46) Stavroula Stoupi, Gary Williamson, Florian Viton, Denis Barron, Laurence J. King, Jonathan E. Brown, and Michael N. Clifford, In Vivo Bioavailability, Absorption, Excretion, and Pharmacokinetics of [¹⁴C]Procyanidin B2 in Male Rats, *Drug Metabolism and Disposition*, DMD 38:287-291, 2010
- 47) Li-Quan Wang, Meselhy Ragab Meselhy, Yan Li, Norio Nakamura, Byung-Sun Min, Guo-Wei Qin, and Masao Hattori, The Heterocyclic Ring Fission and Dehydroxylation of Catechins and Related Compounds by *Eubacterium* sp. Strain SDG-2, Human Intestinal Bacterium, *Chem. Pharm. Bull.* 49(12)1640-1643(2001)
- 48) Jong-Sik Jin and Masao Hattori, Isolation and Characterization of a Human Intestinal Bacterium *Eggerthella* sp. CAT-1 Capable of Cleaving the C-Ring of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin, Followed by *p*-Dehydroxylation of the B-Ring., *Biol. Pharm. Bull.*, 35, (12), 2252-2256, (2012)
- 49) M.Kutschera, W. Engst, M. Blaut, and A. Braune, Isolation of catechin-converting human intestinal bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 111, 165-175, (2011)
- 50) Marie-Paule Gonthier, Jennifer L. Donovan, Odile Texier, Catherine Felgines,

Christian Remesy, and Augustin Scalbert, Metabolism of Dietary Pricyanidins In Rats, Free Radical Biology & Medicine, 35, 8, 837-844, (2003)

- 51) Suathira Sivakumaran, Abdul L. Molan, Lucy P. Meagher, Burkard Kolb, Lan Yeap Foo, Geoffrey A. Lane, Graeme A. Attwood, Karl Fraser, Michael Tavendale, Variation in antimicrobial action of proanthocyanidens from *Dorycnium rectum* Against rumen bacteria, Phtochemistry , 65, 2485-2497, (2004)
- 52) Jeremy P. E. Spencer, Alan Crozier, Flavonoids and Related Compounds Bioavailability and Function, CRC Press, (2012)

引用文献

- ・平成 21 年度 信州大学農学部 松永智里 卒業論文 FABP5 遺伝子を標的にした癌転移抑制分子の探索に関する研究
- ・平成 22 年度 信州大学農学部 近藤善香 卒業論文 転移原因遺伝子 FABP5 を標的にした抗腫瘍性分子の探索に関する研究
- ・Kohki Takanashi, Manato Suda, Kiriko Matsumoto, Chisato Ishihara, Kazuya Toda, Koichiro Kawaguchi, Shogo Senga, Narumi Kobayashi, Mikihiro Ichikawa, Miyuki Katoh, Yasunao Hattori, Sei-ichi Kawahara, Koji Umezawa, Hiroshi Fujii, Hidefumi Makabe, Epicatechin oligomers longer than trimer have anti-cancer activities, but not the catechin counterparts, Scientific Reports, 7, 7791, DOI:10.1038/s41598-017-08059-x, (2017)
- ・Sei-ichi Kawahara, Kazuya Toda, Kiriko Matsumoto, Chisato Ishihara, Shuhei Nonobe, Chisato Matsunaga, Yoshika K. Gomi, Shogo Senga, Koichiro Kawaguchi, Ayaka Yamamoto, Jutalak Suwannachot, Reiko Noda, Shuhei Kobayashi, Yasunori Hamauzu, Hidefumi Makabe, Hiroshi Fujii, Isolation and characterization of a novel oligomeric proanthocyanidin with significant anti-cancer activities from grape stems(*Vitis vinifera*), Scientific Reports, 9,12046, DOI:10.1038/s41598-019-48603-5, (2019)
- ・Sei-ichi Kawahara, chisato Ishihara, Kiriko Matsumoto, Shogo Senga, Koichiro Kawaguchi, Ayaka Yamamoto, Jutalak Suwannachot, Yasunori Hamauzu, Hedefumi Makabe, Hiroshi Fujii, Identification and characterization of oligomeric

proanthocyanidins with significant anti-cancer activity in adzuki beans (*Vigna angularis*), *Heliyon*, 5, e02610, (2019)

- 特願 2016-04045、「小豆抽出物」、出願人 国立大学法人信州大学、株式会社 サンクゼール

再公表特許 WO2013/081046、「ブドウ梗抽出物」、出願人 国立大学法人信州大学、

謝辞

本研究は2010年の春、信州大学農学部藤井博教授からブドウの梗の熱水抽出物にがんの転移を抑制する可能性があるという報告を受けてスタートしました。その前年、同大学濱渦康範准教授にシャルドネの搾汁残渣として、皮種の残渣と梗（ステム）の残渣のサンプルをお渡ししたことがきっかけとなり、また最新の共著論文ではチオリシスをやっていただき、採択の決め手となったと思います。様々な可能性をテストしていただいた信州大学農学部には大変感謝しております。

その後、活性成分の同定のアドバイス、類縁化合物の合成にご尽力をいただきました、真壁秀文教授には多くの共著論文を出していただき、天然有機化合物討論会では発表の機会を与えていただきました。梅澤公二助教授には重合体の立体構造を推定いただきました。また、藤井博教授には本研究の切欠をいただき、研究開始の当初から、多くの議論を重ね、様々なトライをし、分子生物学の領域に留まらず、ご指導いただき大変お世話になりました。

長野県工業技術総合センターの唐沢秀明氏、山崎慎也氏にはLC-TOFMS、LC/MSでは大変お世話になり、時間外にもかかわらず、遅くまでお付き合いいただきました。

元京都大学化学研究所（慶應大学先端生命研究所、奈良先端技術大学教授）の西岡孝明先生にはご多忙にも関わらず、MSの適切なご指導、研究の進め方において多くのご支援をいただきました。理化学研究所の菊池淳先生にはNMRにおいて構造推定にお力添えをいただきました。電気通信大学の平野誉教授には活性分子の構造決定で思案していた際、ESIMSで分析いただき、大きなヒントをいただきました。このヒントがなければ構造を推定することができませんでした。

本研究を進めるにあたり、補助金の申請書の書き方をご教授いただいた信州大学工学部の白川達男特任教授のご指導いただきました。

また、数年にわたり卒業されていった歴代の藤井研究室、真壁研究室の学生、他にも多くの研究者の方からご指導いただき、ほんとうに感謝しています。

本研究テーマを相談した際、「このテーマは非常に興味深く、誰もまだ成し遂げていない」と博士課程を薦めてくださいました近畿大学農学部 松田一彦教授、京都大学化学研究所 故 平竹潤教授には背中を押していただきました。

信州大学農学部副学部長福田正樹教授にはこの論文を最後まで丁寧に、そして大切に見てくださいました。

最後に、株式会社 サンクゼール 代表取締役社長 久世良太氏、代表取締役会長 久世良三氏、久世まゆみ相談役には、いつ、ものになるのかわからない本研究を社会貢献のためと寛大に認めていただき、また応援していただいたことに大変感謝いたします。

