

2018 年度 課程博士学位論文

Lawsonia inermis の部位別 lawsonone 含有量の比較
および有効利用に向けた花部および枝部の
神経細胞様分化促進作用物質の探索

尾田 好美

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Yoshimi Oda, Souichi Nakashima, Erina Kondo, Seikou Nakamura, Mamiko Yano, Chisa Kubota, Yusuke Masumoto, Minami Hirao, Yuki Ogawa, Hisashi Matsuda. Comparison of lawsone contents among *Lawsonia inermis* plant parts and neurite outgrowth accelerators from branches. *J. Nat. Med.* **2018**, 72, 890–896. [第一章および第二章]
- 2) Souichi Nakashima, Yoshimi Oda, Seikou Nakamura, Jiang Liu, Koko Onishi, Miki Kawabata, Hisako Miki, Yugo Himuro, Masayuki Yoshikawa, Hisashi Matsuda. Inhibitors of melanogenesis in B16 melanoma 4A5 cells from flower buds of *Lawsonia inermis* (Henna). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 2702–2706. [第二章]
- 3) Yoshimi Oda, Souichi Nakashima, Seikou Nakamura, Mamiko Yano, Masanori Akiyama, Kayo Imai, Tomohito Kimura, Akiko Nakata, Miyuki Tani, Hisashi Matsuda. New potent accelerator of neurite outgrowth from *Lawsonia inermis* flower under non-fasting condition. *J. Nat. Med.* **2016**, 70, 384–390. [第二章]

目次

序章.....	1
本論.....	4
第一章 <i>Lawsonia inermis</i> 部位別 lawsone 含有量の比較.....	4
第一節 <i>Lawsonia inermis</i> および特徴成分 lawsone.....	4
第二節 花部, 葉部および枝部の lawsone 含有量.....	9
第一項 定量条件の検討.....	9
第二項 LC-MS を用いた部位別 lawsone 含有量測定.....	14
第二章 <i>Lawsonia inermis</i> 花部および枝部の神経突起伸長促進作用.....	18
第一節 実験条件の検討.....	20
第二節 抽出エキスの神経突起伸長促進作用.....	22
第一項 花部抽出エキスおよび各可溶性画分の神経突起伸長促進作用.....	22
第二項 枝部抽出エキスおよび各可溶性画分の神経突起伸長促進作用.....	23
第三節 含有成分の探索.....	24
第一項 花部含有成分の単離.....	24
第二項 新規成分 inermioside A の構造決定.....	27
第三項 枝部含有成分の単離.....	30
第四項 花部および枝部含有成分についての比較考察.....	33
第四節 単離成分の神経突起伸長促進作用.....	36
第一項 花部単離成分の神経突起伸長促進作用.....	36
第二項 枝部単離成分の神経突起伸長促進作用.....	38
第五節 Quercetin の作用様式.....	40
結論.....	43
謝辞.....	44

実験の部.....	45
第一章の実験.....	47
第二節の実験.....	47
第二章の実験.....	49
第一節, 第二節および第四節の実験.....	49
第三節の実験.....	50
第五節の実験.....	62
引用文献.....	63

序章

アーユルヴェーダ医学や中医学などの伝統医学，民間療法および日本薬局方に収載されている生薬に用いられる薬用植物には薬用としての使用部位，すなわち薬用部位が定められている．例えば，薬用植物であるケシ，カンゾウ，オタネニンジンおよびショウガの薬用部位は順に，未熟果実に傷をつけて出てくる乳汁を乾燥させたもの，根およびストロン，細根を除いた根および根茎である (Figure 1).^{1,2} それぞれの薬用植物に薬用部位は定められているが，植物として考えると，薬用部位に定められている部位以外にも花部や葉部といった他の部位が存在する．そして，薬用部位として使用されている部位と不使用となっている部位の違いは，薬効成分の含有量の差や伝統的な利用に基づいていると考えられる．



ケシ



ウラルカンゾウ



オタネニンジン



ショウガ

Figure 1. 薬用植物の一例

植物の中には医薬品として使用される部位と食品として使用される部位の両方を有する薬用植物がある．これらは，部位により薬効成分の含有量に差があるため使い分けられていると考えられ，その薬用植物の一つとしてケシが挙げられる．ケシ (*Papaver somniferum* L.) はアヘン末，アヘン散などの基原植物として日本薬局方に収載され，未成熟の果実を傷つけて得られる乳液，すなわち「生アヘン」からモルヒネ，コデイン，パパベリンおよびノスカピンなどのアヘンアルカロイドを得ることができる (Figure 2). 得られたモルヒネやコデインなどのアヘンアルカロイドは鎮痛作用や鎮咳作用を有する医薬品として使用されている.³ 一方で，同じ植物から得られるケシの種子，すなわちポピーシードは日本をはじめ多くの国で食品として使用され，日本での原材料名は「けしの実」とされている (Figure 3A). けしの実は発芽防止処理されたケシの種子で，アヘンアルカロイドをほとんど含んでいないとされている．ケシの種子の含有成分はリノール酸，オレイン酸，パルミチン酸などの脂肪酸 (Figure 3B) やチアミン，トコフェロールなどのビタミン類 (Figure 3C) が報告されている.⁴ また食品としての用途にはスパイスや，パンおよびお菓子の材料などがある．このように同じ植物であっても部位により成分およびその含有量が異なり，それに伴い利用方法も変化する．

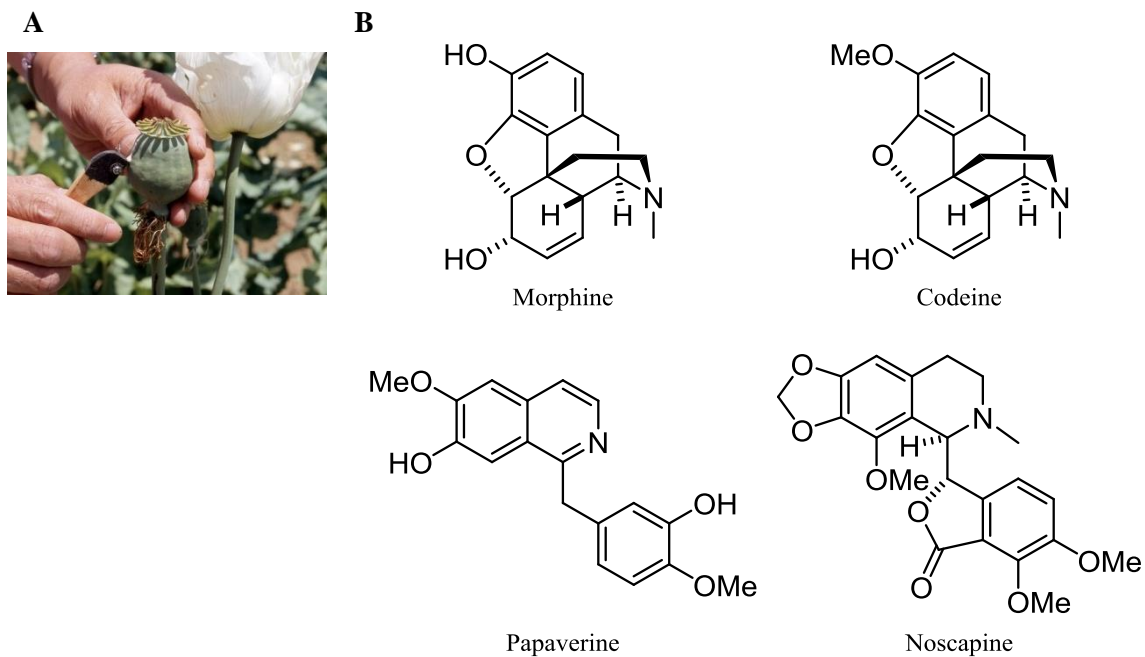


Figure 2. 生アヘン (A) から得られるアヘンアルカロイド (B)

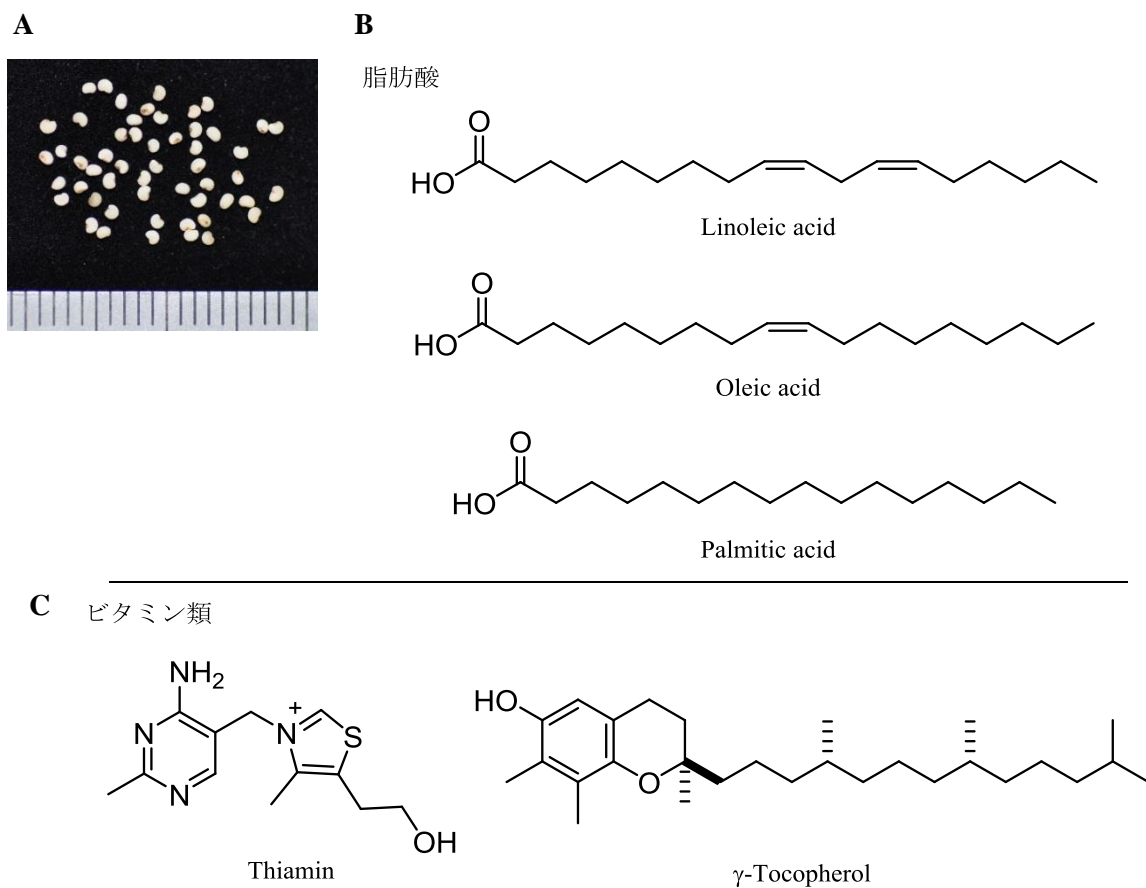


Figure 3. ケシの種子 (A) の含有成分の化学構造 (B, C)

最初に示したように薬用植物にはそれぞれ薬用部位が定められた上で利用されている。また薬用部位として定められていない部位であっても、ケシのように食品として使用される部位も存在する。このように使用されている部位がある反面、不使用となっている部位は様々な薬用植物に存在する。そこで、これまでほとんど研究されていない未利用部位に新たな機能性を見出すことができれば、その植物の有用性を高められる。さらに、使用部位の有効成分と異なる含有成分が未利用部位の有効成分となれば、新たなシード化合物の発見も期待できると考えられる。

本論では、日本やインドをはじめ多くの国で葉部が外用薬や染色剤として使用されている *Lawsonia inermis* の葉部以外の部位、すなわち葉部収穫の際に同時に得られるにもかかわらず、廃棄され未利用となっている花部および枝部の有効利用に向けた研究内容について報告する。

本論

第一章 *Lawsonia inermis* 部位別 lawsone 含有量の比較

第一節 *Lawsonia inermis* および特徴成分 lawsone

Lawsonia inermis L. は日本、インド、中国およびエジプトなど多くの国で栽培されるミソハギ科シコウカ属に分類される植物である (Figure 4). *L. inermis* の和名は指甲花, 英名は henna と言い, 一般的には“ヘンナ, ヘナ”の名称で呼ばれている. *L. inermis* は常緑低木であり, その形態的特徴は, 樹高 3~6 m, 茎は円柱形をしており, 分枝は密で, 枝は平滑である. 葉は対生につき (対生葉序), その柄は短く, 楕円形あるいは長楕円形をしており, 大きさは 1.5~5.5 cm × 1~2 cm である. 開花期は 5~8 月であり, 花のつき方は繖房状の円すい花序の頂生である. 花の香りは強く, その色は深紅色あるいは白色であり, 大きさは直径 8~10 mm である. がくの長さは 2~2.5 mm であり, 4 深裂し, さく果は直径 5~7 mm の球形をしており, 種子は多数存在する.^{5,6}



Figure 4. *Lawsonia inermis* L.

L. inermis の歴史は古く, メソポタミア文明の時代から栽培され, 染料, 薬および防腐剤などとして使用されてきたとされている. 古代エジプトでは *L. inermis* で染めた布を用いてミイラを包むことや, クレオパトラをはじめ, 多くの女性が手足の爪や髪の毛を染めることなどに使用していたという話が伝えられている. またインドでは, ヒンズー教の美と豊饒と幸運の女神とされるラクシュミー (仏教では吉祥天といわれている) が *L. inermis* を好んで使用していたと伝えられていることから, 幸運の植物とされ, 儀式や婚礼の際にタトゥーとして用いられている. *L. inermis* を用いて肌に模様を描くことをヒンディー語でメヘンディと言い, 色が濃く, 色持ちが良いほど結婚生活がうまくいくと言われている. 現在では, ヘナタトゥーとして儀式や婚礼の場以外でもカジュアルに使用されている (Figure 5).



Figure 5. ヘナタトゥー

アーユルヴェーダ医学や中医学では, *L. inermis* 葉部が薬用部位とされており, 頭痛, 創傷の治療, 収斂, 清熱薬などとして外用されてきた. また, 日本でもヘアカラーやヘアトリートメントとして広く使用されている. *L. inermis* 葉部には lawsone, 2-methoxy-3-methyl-1,4-

naphthoquinone, 1,2-dihydroxy-4-glucosyloxy-naphthalene, 1,2,4-trihydroxynaphthalene 1-*O*- β -D-glucopyranoside および lawsoniaside をはじめとするナフトキノン, lalioside および 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside をはじめとするアセトフェノン, apigenin, luteolin, luteolin 7-*O*- β -D-glucopyranoside, luteolin 3'-*O*- β -D-glucopyranoside, cosmosiin, apiin および isoscutellarin をはじめとするフラボノイド, *p*-coumaric acid, lawsoniaside B および syringinoside をはじめとするフェニルプロパノイド, daphneside および daphnorin をはじめとするクマリン, agrimonolide 6-*O*- β -D-glucopyranoside をはじめとするイソクマリン, (+)-syringaresinol *O*- β -D-glucopyranoside, (+)-pinoresinol di-*O*- β -D-glucopyranoside および syringaresinol di-*O*- β -D-glucopyranoside をはじめとするリグナン, その他にも lawsoniaside A および β -sitosterol glucopyranoside という多くの化合物を含有していることが報告されている (Figure 6).⁷⁻¹⁰ さらに, *L. inermis* 葉部抽出エキスには, 抗菌作用, 抗酸化作用, 抗痙攣作用および肝保護作用などがあることが報告されている.^{8,11-13}

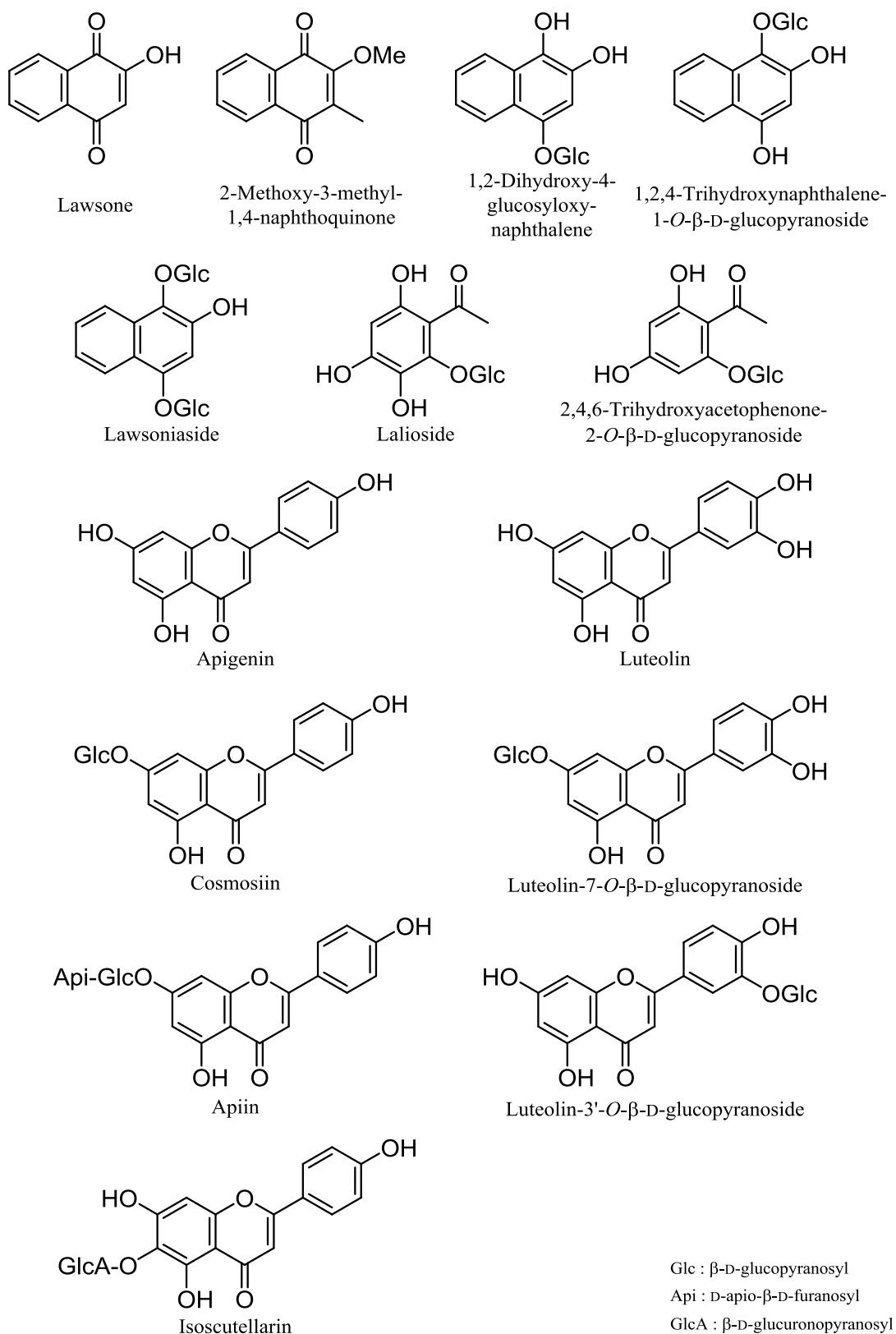
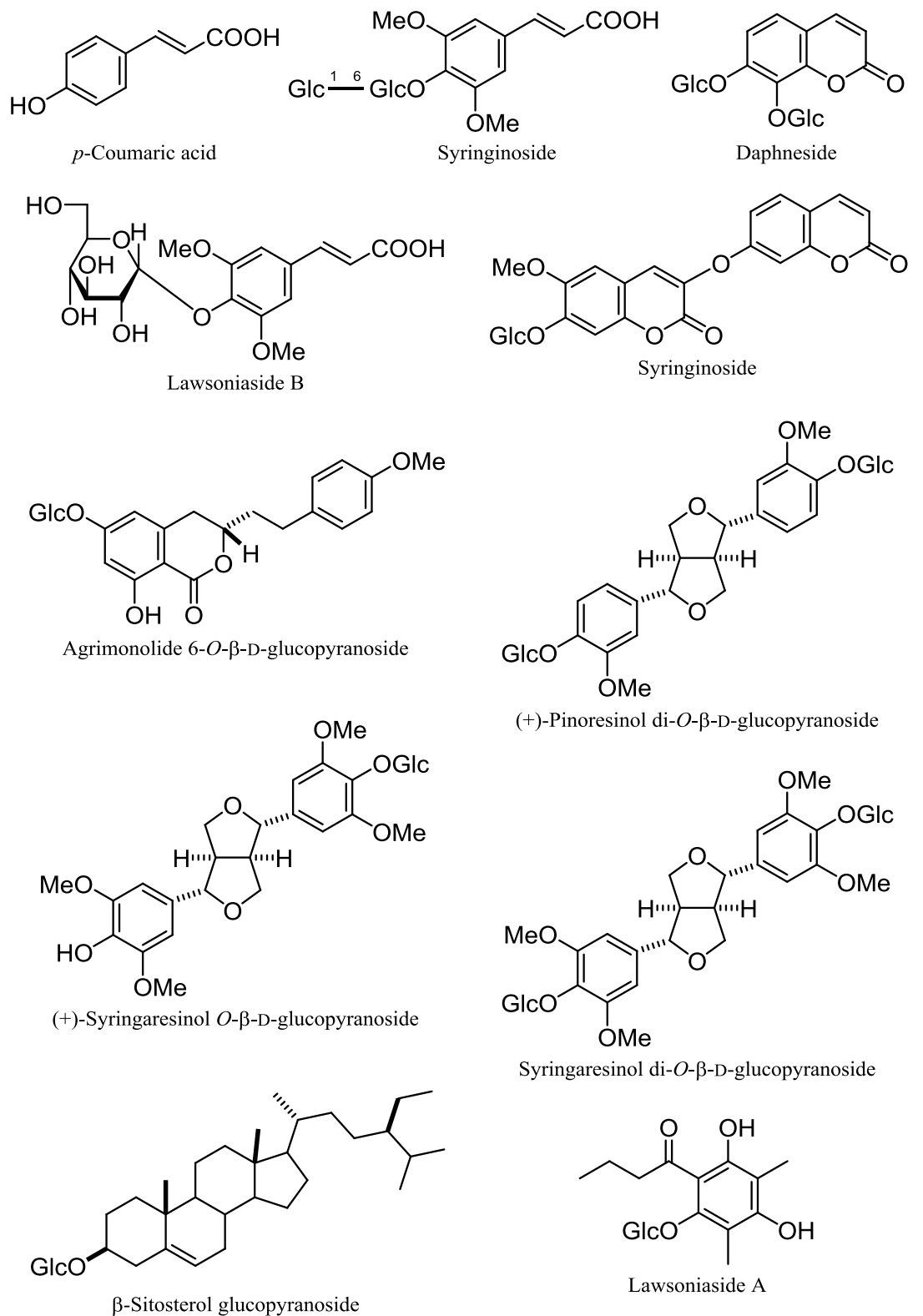


Figure 6a. *L. inermis* 葉部含有化合物の化学構造



Glc : β -D-glucopyranosyl

Figure 6b. *L. inermis* 葉部含有化合物の化学構造

L. inermis 葉部の特徴成分として lawsone と呼ばれる 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone が知られている。高い反応性を有するキノンである lawsone は、髪の毛や肌のタンパク質中の求核性のアミノ基およびチオール基と付加反応し、共有結合を作ることにより、オレンジ色を呈すると考えられている。¹⁴⁻¹⁹ そのため、lawsone が染色作用を示す主要成分とされており、葉部は染色剤としても有名である (Figure 7)。さらに lawsone は抗酸化作用、抗真菌作用およびチロシナーゼ活性阻害作用などを示すことが報告されている。²⁰⁻²³

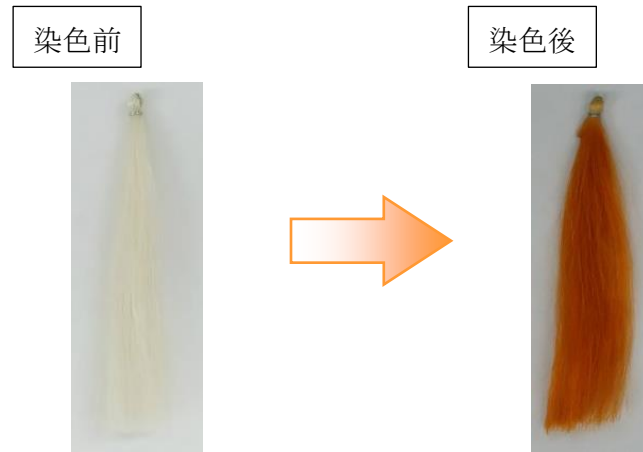


Figure 7. ヤクの毛を使用した染色試験での色調の変化

第二節 花部、葉部および枝部の lawsone 含有量

第一項 定量条件の検討

L. inermis 葉部のみの利用量は、日本国内で年間 800 t 以上であり、2014 年度に日本国内で用された生薬の種類と総使用量が 266 品目で 25,000 t であることと比較すると、比較的利用量の多い素材であることがわかる。²⁴ また、多くの国で栽培されていることから資源は豊富であると推察され、葉部については十分に利用方法が確立されていると考えられる。しかしながら、葉部収穫の際に同時に得られるにも関わらず、その枝部については有用な利用方法が明らかにされていない。また、花部についてもわずかに香水で使用されているのみである。さらに、花部および枝部の含有成分および生体機能性に関する報告はほとんどされていない。すなわち、花部および枝部は新規有効成分探索の研究素材となり得る。また、染色作用を示す主要成分である lawsone (1) が *L. inermis* のどの部位に、どのくらいの量を含有されているのかも明らかにされていない (Figure 8)。花部および枝部に葉部と同程度の lawsone 含有量があることが明らかとなれば、花部および枝部の染色剤としての利用が可能となる。一方、花部および枝部の lawsone 含有量が葉部よりも少なく、染色効果をほとんど示すことのない素材であることが明らかとなれば、葉部とは異なる機能性を示す研究素材となり得る。そこで、*L. inermis* 花部、葉部および枝部に含有される lawsone の量を測定し、部位別含有量を明らかにすることとした。

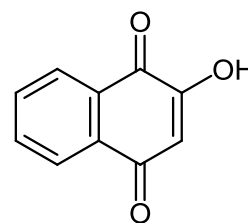


Figure 8. Lawsone (1)

L. inermis の乾燥花部 (2.0 kg)、乾燥葉部 (10.0 kg) および乾燥枝部 (7.0 kg) をメタノールにて 3 回熱時 (80 °C) 抽出し、減圧下溶媒留去後、花部メタノール抽出エキス (636.5 g, 収率 31.8%)、葉部メタノール抽出エキス (3522.7 g, 収率 35.2%) および枝部メタノール抽出エキス (418.3 g, 収率 6.0%) を得た。

L. inermis 花部、葉部および枝部に含有される lawsone の量を明らかにする目的で、最初に HPLC を用いて測定した。UV-VIS 検出器の検出波長を決定するために、lawsone (1) の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ (SH-1000, コロナ電気株式会社, 茨城), 248 および 283 nm 付近に吸収極大が認められたため、これらの波長を検出波長の候補とした (Figure 9)。

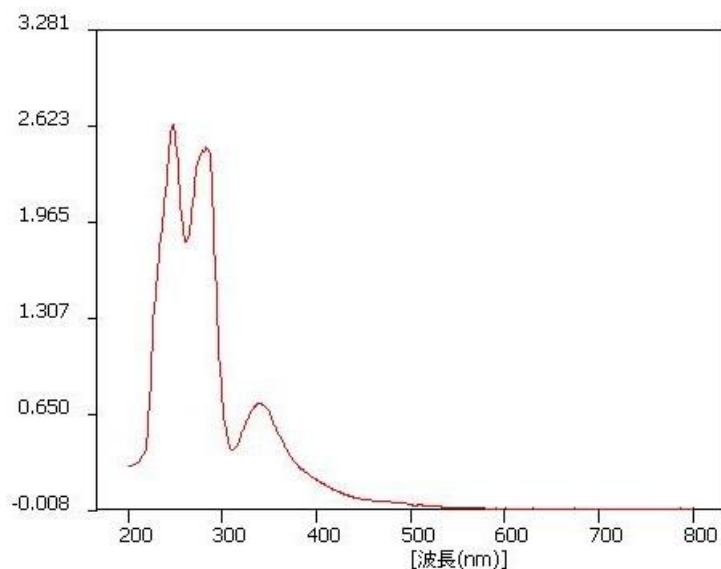
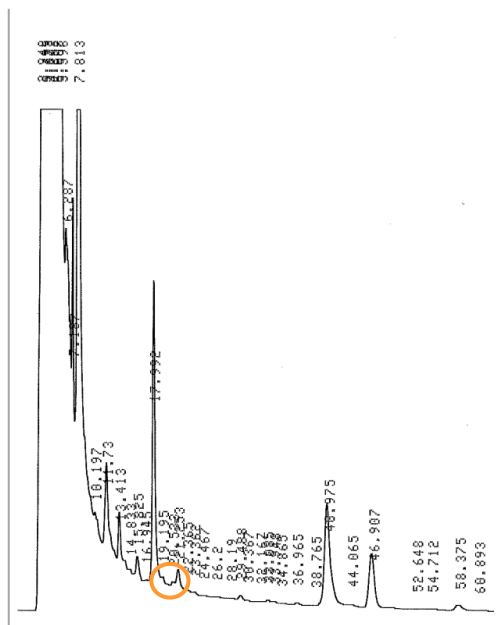
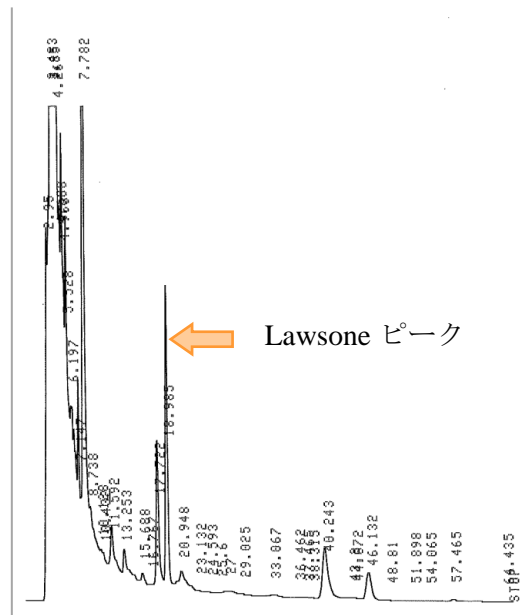


Figure 9. Lawsone (**1**) の紫外可視吸収スペクトル

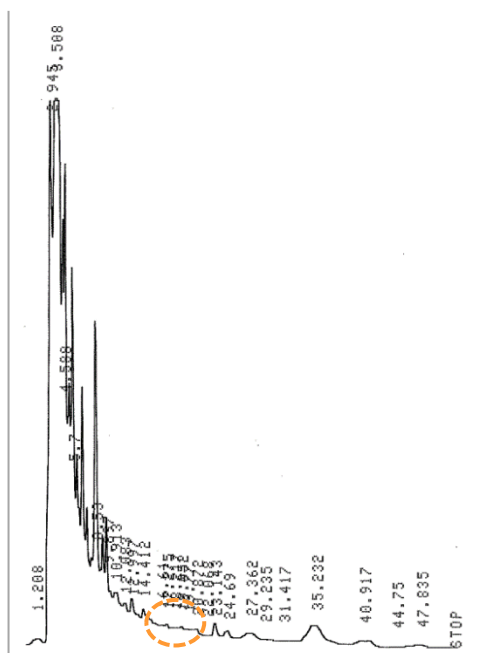
分析カラムには第一選択として、分析に汎用される YMC-Pack ODS-A (4.6 × 250 mm, i.d.) を用い、メタノール、アセトニトリルおよび水の混合率を変えた様々な移動相で検討したところ、lawsone (**1**) は中性条件の移動相ではカラムに保持されず数分間ですべて溶出する結果となった。すなわち、中性条件では lawsone (**1**) はイオン化状態で存在していると考えられた。そこで、酢酸を用いた pH 3.0 の酸性条件で検討したところ、lawsone (**1**) のピークを検出することができた。さらに耐酸性に優れ、酸性化合物の分析に最適とされるカラムの一つである COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (4.6 × 250 mm, i.d.) を含め、移動相およびカラムの組み合わせを変えながら検討した結果、花部、葉部および枝部メタノール抽出エキス含有成分の検出ピークと lawsone 検出ピークができる限り重ならない条件として、YMC-Pack ODS-A カラムを使用し、移動相がアセトニトリル：水 = 22：78 (酢酸を用いて pH 3.0 に調製) の条件を見出した。また検出波長については、248 および 283 nm で測定した結果の間で大きな変化はなかったため、ナフトキノンの吸収極大と考えられた 283 nm を検出波長とした。しかしながら、花部および枝部メタノール抽出エキスについては、lawsone 検出ピークと考えられるピークが非常に小さく、HPLC-UV/VIS 検出器を用いた条件では他のピークと明確に区別し、ピーク面積を測定することができず、lawsone 含有の有無および含有量を求めることができなかった (Figure 10)。そこで、LC-MS を用いて測定することとした。



花部エキス



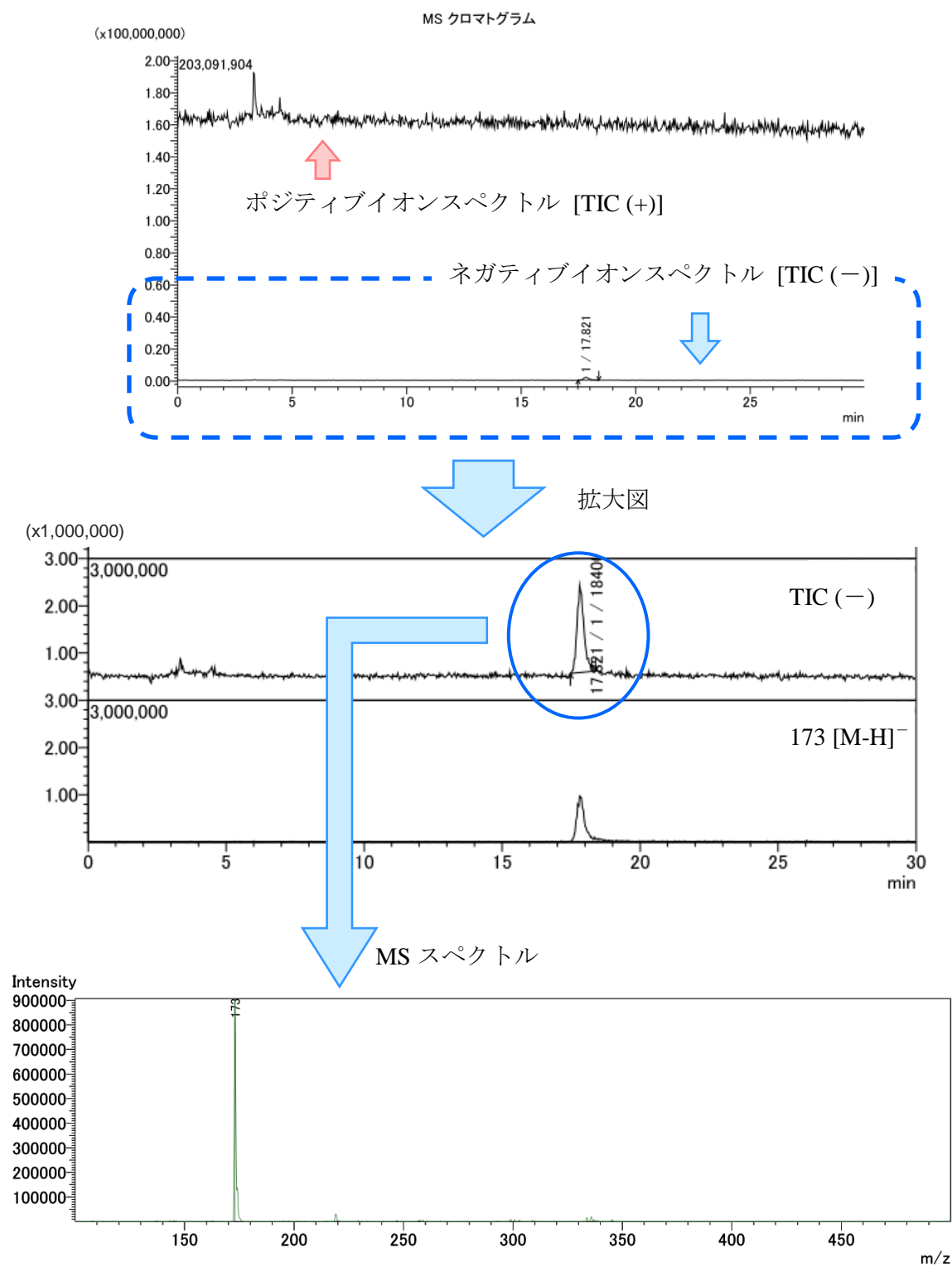
花部エキス : Lawsone = 1 : 1 の混液



枝部エキス

Figure 10. HPLC スペクトル結果

LC-MS を用いる場合の LC 条件は、HPLC を用いて検討した結果を基に、検出波長は 283 nm、分析カラムは YMC-Pack ODS-A、移動相はアセトニトリル：水 = 22：78 (ギ酸を用いて pH 3.0 に調製) の条件とした。続いて、MS 条件を設定するため、LCMS-8400 を用いて、lawsone (**1**) の MS スペクトルをスキャンモードで測定し、検出されるポジティブイオンおよびネガティブイオンの m/z を求めた。その結果、ポジティブイオンはノイズが大きく、明確なピークを認めることができなかった。一方、ネガティブイオンは lawsone 保持時間に明確なピークが認められ、そのピークの MS スペクトルはほぼ $173 [M-H]^-$ のみであった (Figure 11)。すなわち、lawsone (**1**) の分子量 (174) から水素イオンを一つ失った $173 [M-H]^-$ ピークが最も大きなピークとして検出されたと考えられた。そこで、 $173 [M-H]^-$ を選択的に検出する方法 (SIM：選択的イオン検出法) にて花部、葉部および枝部メタノール抽出エキス中の lawsone 含有量を測定することとした。また、条件検討時は短時間であったため、カラムオーブンを使用していなかったが、サンプル等の測定は連続して行い、長時間となることから、より一定の条件となるようカラムオーブンの温度を 40 °C に設定し、測定を行うこととした。



<i>m/z</i>	173
絶対強度	903734
相対強度	100.00

TIC : Total Ion Chromatogram

Figure 11. Lawsone (1) スキャンモードスペクトル

第二項 LC-MS を用いた部位別 lawsone 含有量測定

はじめに検量線を求める目的で、0.02, 0.04, 0.06, 0.08 および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ に調製した lawsone 溶液について、LCMS-8400 を用いて選択的イオン検出法 (SIM) にて測定した (Figure 12). 各濃度におけるピーク面積の平均値を用いて検量線を求めたところ、 $y = 2.93 \times 10^6 x - 1.08 \times 10^2$ ($R^2 = 0.998$) の優れた直線性を示す回帰式を得ることができ、検出限界 (LOD : limit of detection) および 定量下限 (LOQ : limit of quantitation) を求めたところ、順に 0.001 および 0.003 $\mu\text{g/mL}$ であった. また、各測定時の添加回収率を求めたところ、いずれにおいても 100% 近い回収率を得られたため、LC-MS での測定とした (Table 1, Figure 13).

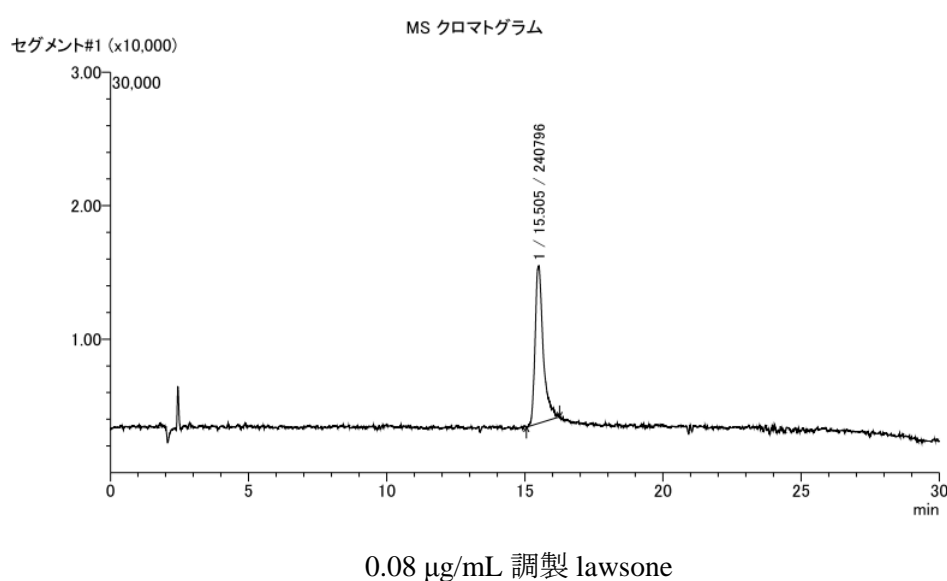


Figure 12. Lawsone (1) の LC-MS スペクトル

Table 1. Lawsone の LC-MS スペクトル結果

サンプル濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
平均ピーク面積	58794	113286	177596	240300	288186
R. S. D. (%)	1.5	3.0	0.6	2.0	4.2
平均検出時間 (min)	15.47	15.47	15.46	15.48	15.50
R. S. D. (%)	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
平均添加回収率 (%)	100.5	96.8	101.1	102.6	98.4

R. S. D. (relative standard deviation, 相対標準偏差)

$n = 4$

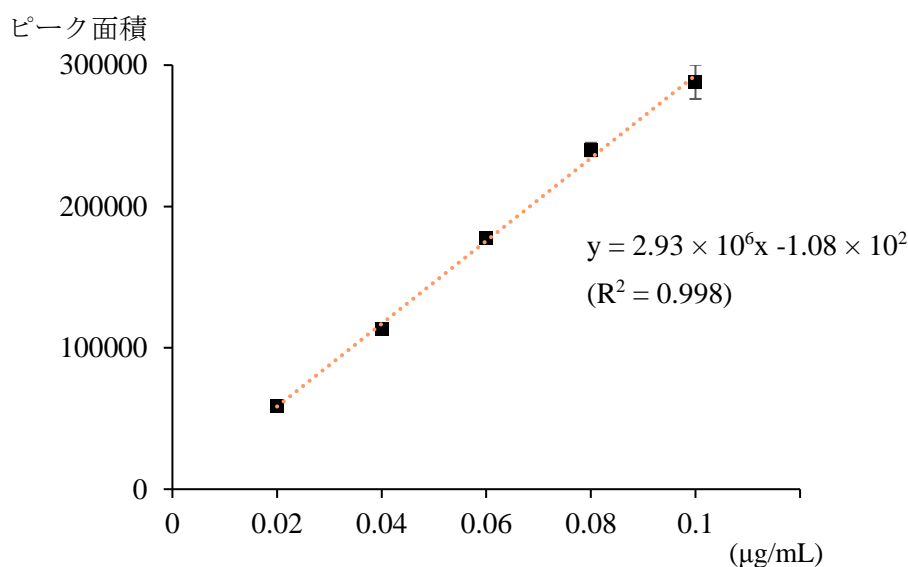


Figure 13. Lawsonsone 検量線

次に *L. inermis* 花部、葉部および枝部メタノール抽出エキスを 0.6, 0.15 および 15 mg/mL に調製し, lawsonsone (**1**) と同様の方法で測定した (Figure 14). その結果, エキス 1 g 当たりに対して, 花部メタノール抽出エキスには 116.9 μg, 葉部メタノール抽出エキスには 486.2 μg および枝部メタノール抽出エキスには 5.4 μg の lawsonsone (**1**) が含まれることが明らかとなった (Table 2, Figure 15). すなわち, 葉部メタノール抽出エキス中の lawsonsone 含有量が最も高く, 葉部に集約していることを初めて明らかにした. さらに各部位のエキス収率 (花部 : 31.8%, 葉部 : 35.2%, 枝部 : 6.0%) を考慮すると, 花部は葉部の約 1/5, 枝部は葉部の約 1/500 の lawsonsone 含有量であることがわかった. また, 花部メタノール抽出エキスおよび枝部メタノール抽出エキスを用いて染色試験を行ったところ, 染色効果は認められなかった (Figure 16). 以上のことから, *L. inermis* の花部および枝部は染色効果の少ない素材であることが明らかとなった. すなわち, 花部および枝部は, 葉部の確立された利用法である染色剤とは異なる, 新たな利用法の可能性がある素材と考えられた.

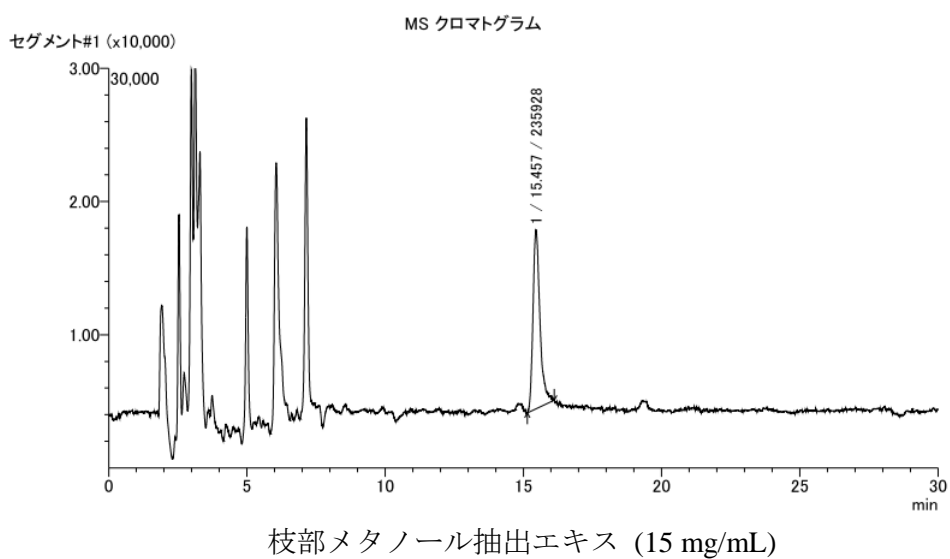
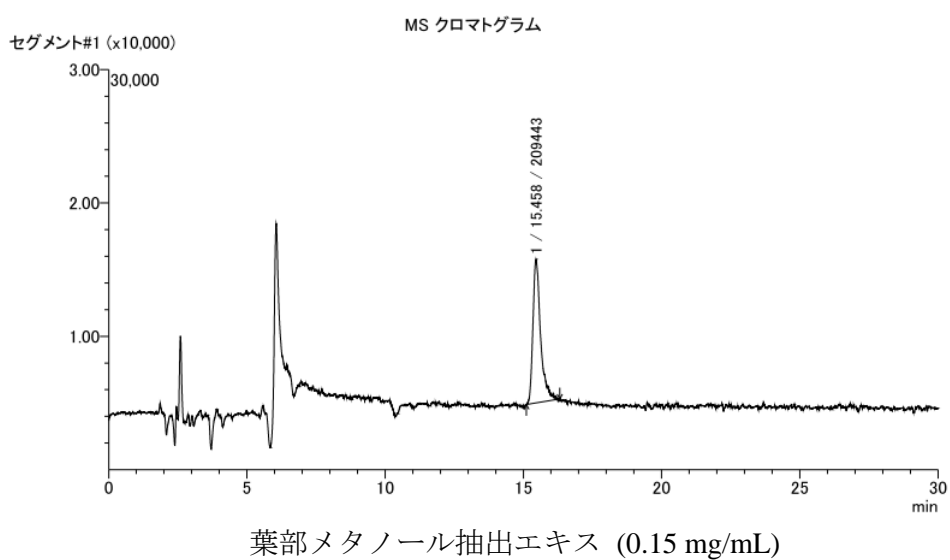
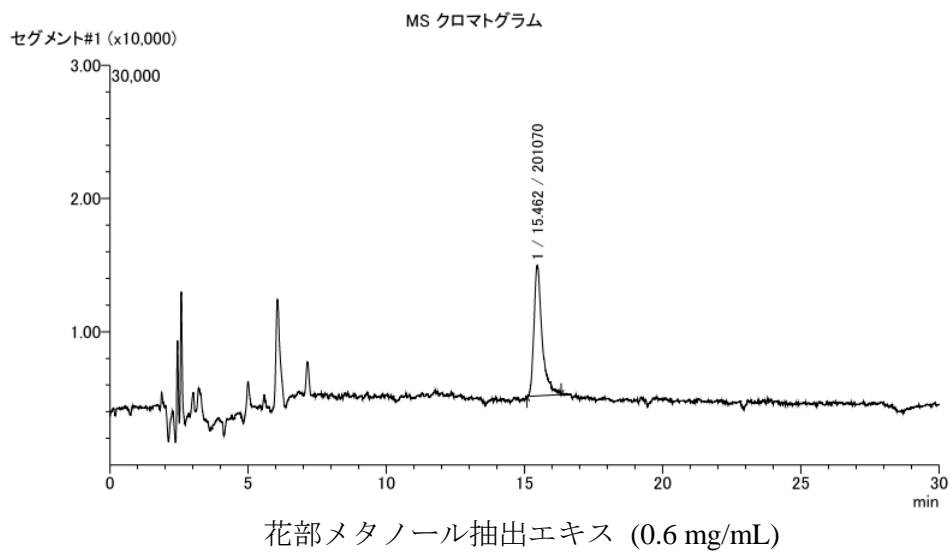


Figure 14. 各部位メタノール抽出エキスの LC-MS スペクトル

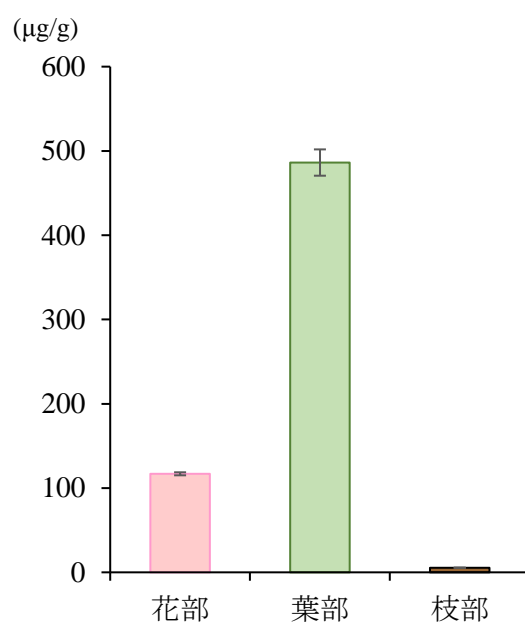
Table 2. 部位別エキス収率および lawsone 含有量

	エキス収率 (%)	収量 (μg/g)	R. S. D.
花部	31.8	116.9	1.5
葉部	35.2	486.2	3.2
枝部	6.0	5.4	3.9

R. S. D. (relative standard deviation, 相対標準偏差)

$n = 4$

[*J. Nat. Med.* (2018), Table 1 より引用]

**Figure 15.** 部位別 lawsone 含有量**Figure 16.** ヤクの毛を使用した染色試験の結果

第二章 *Lawsonia inermis* 花部および枝部の神経突起伸長促進作用

内閣府の調査結果から日本全国の 65 歳以上の認知症患者は 462 万人と推定 (2014 年) されており, その予備軍を含めると 800 万人にもなると言われている.²⁵ すなわち, 予備軍にあたる軽度認知障害 (MCI: Mild Cognitive Impairment) の人数は約 400 万人と考えられている. MCI とは, 認知症の前段階で, 記憶障害が主体で全般的な認知機能は保たれている状態とされ, MCI から認知症への進行は年間 10~15% と報告されている.²⁶ また, 内閣府の調査結果から高齢者の認知症患者は今後も増加すると予想されており, 2012 年に約 7 人に 1 人であった有病率が, 2025 年には約 5 人に 1 人になると推計されている (Figure 17).²⁵ また, 日本だけでなく世界中で認知症患者数は増加しており, 世界アルツハイマー病レポート 2015 では世界の認知症人口は 2015 年に 4,680 万人, 2030 年までに 7,470 万人に増加し, さらに 2050 年には 1 億 3,150 万人にも達すると予測されている.²⁷

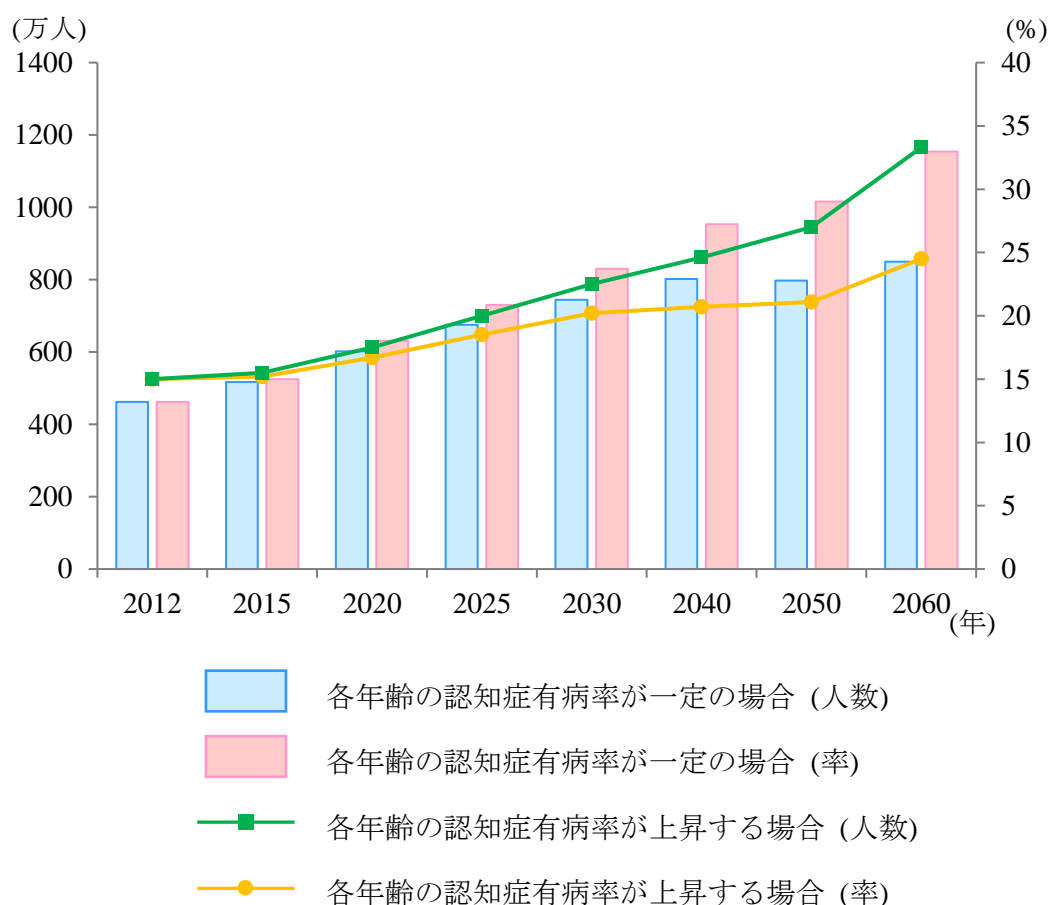


Figure 17. 65 歳以上の認知症患者の推定者と推定有病率
(平成 29 年版高齢社会白書より引用)

認知症は、その特徴などからアルツハイマー型、脳血管性、レビー小体型、前頭側頭型などに分類されている。その中でもアルツハイマー型認知症に分類される患者は最も多く、約 60%を占めているとされている (Figure 18).²⁸

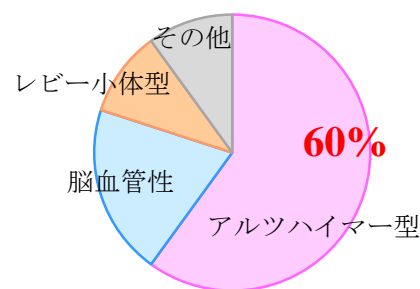


Figure 18. 認知症の分類別割合
(知って安心認知症より引用)

現在、認知症治療薬としてドネペジルをはじめ、ガランタミン、リバスチグミンおよびメマンチンの4種類が臨床で用いられている。ドネペジル、ガランタミンおよびリバスチグミンは、アセチルコリン (ACh) を分解する酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) を阻害することにより脳内 ACh 量を増加させ、脳内コリン作動性神経系を賦活化することにより、認知機能の改善を示している。すなわち、アルツハイマー型認知症患者の病態変化として、脳内のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 活性が著しく低下し、コリン作動性神経障害が生じているということが明らかにされたことから、開発された治療薬である。^{29,30} また、メマンチンはグルタミン酸受容体の一つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体に対して非競合的に拮抗することでグルタミン酸による神経細胞毒性を抑制し、認知機能の改善を示している。³¹ すなわち、アルツハイマー型認知症患者の脳内ではグルタミン酸神経系の異常興奮が生じており、それに伴い NMDA 受容体の活性が亢進され、神経細胞死が導かれる。そこで、NMDA 受容体に拮抗することにより神経細胞死を抑制するメマンチンが脳神経保護薬として使用されている。³² これらの治療薬はいずれも認知機能の改善が認められるため、アルツハイマー型認知症患者にとっては必要な薬ではあるが、いずれも対症療法的治療薬であり、今後は根本治療のための薬が期待される。

現在では、AChE や NMDA 受容体をターゲットとした研究の他にも様々な研究が行われ、その中でも特に、アミロイド β ($A\beta$) 蛋白質やタウ蛋白質をターゲットとした研究が数多く行われている。その理由としては、アルツハイマー型認知症の神経病理学的な特徴の一つである老人斑や神経原線維変化の主要構成成分として、 $A\beta$ 蛋白質および高度にリン酸化されたタウ蛋白質が同定されており、アミロイド仮説の修正版とも言える「 $A\beta$ オリゴマー仮説」が支持されているからと考えられる。 $A\beta$ はアミロイド前駆体タンパク (amyloid precursor protein : APP) から β セクレターゼおよび γ セクレターゼの作用によって生成され、 $A\beta$ が凝集し、二分子から数十分子結合した $A\beta$ オリゴマーが生成され、神経毒性を促すと考えられている。^{33,34} そこで、 $A\beta$ の凝集抑制作用や β および γ セクレターゼの阻害作用など、多くの研究が行われている。一方で、アルツハイマー型認知症患者の脳内では神経細胞死が生じている。神経細胞死が生じると神経回路が失われるため、新たな回路を形成することができれば機能の維持につながる。そこで、神経突起伸長を促す物質を見出すことができれば、新たなシナプスの形成、さらには失われた神経回路の補填にもつながるシード化合物になると考え、PC12 細胞を用いた神経突起伸長促進作用について検討した。

第一節 実験条件の検討

PC12 細胞はラット副腎髄質由来褐色細胞腫で、通常の培養状態では丸みを帯びた形状の細胞であり、神経成長因子である NGF などの刺激により樹状突起を形成する交感神経細胞様に変化する (Figure 19).³⁵ このため SH-SY5Y 細胞などの神経細胞や、実験動物から採取した初代培養の神経細胞とは異なり、形状の変化から突起伸長の度合を判断しやすいと考え、神経細胞のモデルとして多くの実験で汎用されている PC12 細胞を用いることとした。

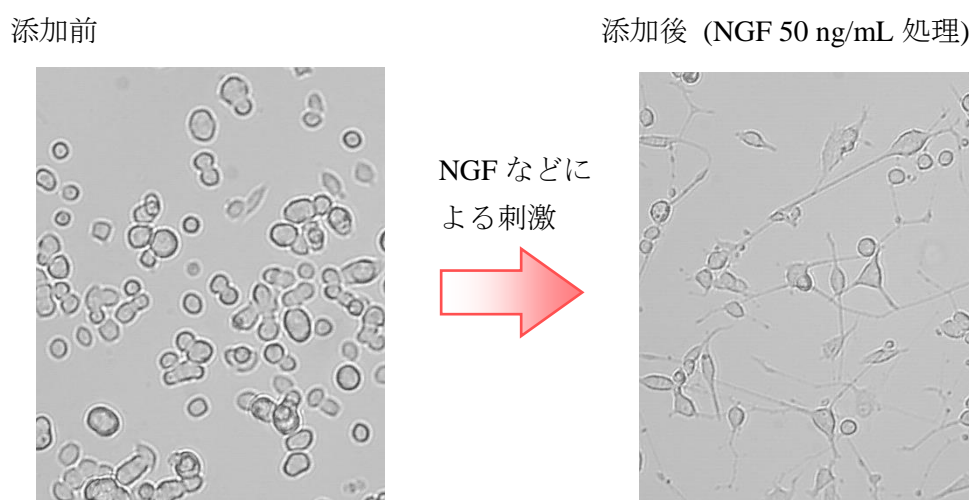


Figure 19. PC12 細胞の形状変化

これまでに報告されている論文等では、PC12 細胞を通常培養する時の血清条件と突起伸長実験を実施する時の血清条件を大きく変化させている。すなわち、5% fetal bovine serum (FBS) および 10% horse serum (HS) の血清条件で培養し、突起伸長実験の際は 0.5%FBS および 1%HS,³⁶ あるいは 1%HS³⁷ のみの血清条件へと変化させる場合や、5%FBS および 5%HS の血清条件で培養し、1%HS へと変化させて突起伸長実験を実施する場合^{38,39} などである。このように十分な血清を含有する培養液から、低濃度の血清しか含有しない培養液へと大きく変化させて突起伸長実験を実施する理由として、細胞周期が停止され、神経突起伸長が誘導されるためであると考えられる。しかしながら、培養条件の極端な変化は通常生体内では起こり難いと考えられたことから、通常の培養条件と実験条件の間に血清量の変化が無い条件にて検討することとした。すなわち、10%FBS および 5%HS という十分な量の血清に加え、4 mM グルタミンを添加した RPMI-1640 培地を用いて培養および神経突起伸長実験を行った。

また多くの報告では NGF を 50 あるいは 100 ng/mL 添加し, PC12 細胞の神経突起伸長を誘導している.^{36,37,39,40} しかしながら, 正常なヒトの血清中および脳内の NGF 濃度は 50 ng/mL よりも非常に低い濃度であり, アルツハイマー型認知症患者の血清中および脳内の NGF 濃度も正常なヒトと変わらない濃度であることが報告されている.⁴¹ そこで, より生体内の状態に近づけるため, PC12 細胞が NGF の刺激により突起伸長したと判断できる濃度を見出し, 実験を行った. すなわち, NGF 添加濃度を 1~2 ng/mL とし, 48 時間培養後のコントロールに対する神経突起伸長を認めた細胞数の割合を算出した.

また, 第一章で部位別の含有量を測定した葉部の染色作用を示す主要成分である lawsone について, PC12 細胞を用いた NGF 誘発神経突起伸長促進作用について検討したところ, 10 μ M 処理で 1.32 倍とわずかな作用しか示さなかった. したがって, 神経突起伸長促進作用物質を見出すためには lawsone 以外の化合物について検討する必要がある. また, 花部および枝部の新たな機能性を見出すことができれば, 有効利用につながる. そこで, lawsone 以外の含有成分も多数存在することが示唆された花部および枝部について神経突起伸長促進作用を検討した.

第二節 抽出エキスの神経突起伸長促進作用

第一項 花部抽出エキスおよび各可溶性画分の神経突起伸長促進作用

第一章で使用した残りの花部メタノール抽出エキスのうち 200.0 g を酢酸エチルおよび水を用いて分配抽出し、次いで得られた水可溶性画分を 1-ブタノールを用いてさらに分配抽出し、酢酸エチル可溶性画分 (86.9 g, 収率 13.8%), 1-ブタノール可溶性画分 (77.0 g, 収率 12.3%) および水可溶性画分 (36.2 g, 収率 5.7%) を得た。

得られたメタノール抽出エキス、酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分について PC12 細胞を用いた NGF 誘発神経突起伸長促進作用について検討した。

Table 3. 花部メタノール抽出エキスおよび各可溶性画分の神経突起伸長促進作用

Sample	Ratio versus control			
	Control	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
MeOH extract	1.00 \pm 0.14	1.15 \pm 0.10	1.35 \pm 0.05	0.37 \pm 0.20*
EtOAc fraction	1.00 \pm 0.14	1.18 \pm 0.24	1.89 \pm 0.07*	0.91 \pm 0.22
1-BuOH fraction	1.00 \pm 0.05	1.10 \pm 0.10	0.96 \pm 0.12	1.41 \pm 0.09*

Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4-12$).

Significantly different from the control group * $p < 0.05$.

[*J. Nat. Med.* (2016), Table 1 より引用]

その結果, Table 3 に示すようにメタノール抽出エキスには神経突起伸長を促進させる傾向が認められ, 酢酸エチル可溶性画分については特に 10 $\mu\text{g/mL}$ 処理で対照群の 1.89 倍と作用の集約が認められた。また, 1-ブタノール可溶性画分については 100 $\mu\text{g/mL}$ と高濃度ではあるが, 対照群の 1.41 倍と有意な作用が認められた。

WST-8 法を用いて細胞毒性について検討したところ, メタノール抽出エキス, 酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分は 100 $\mu\text{g/mL}$ 処理で, 順に, 78.3%, 70.1%, 82.2% の細胞生存率であった。

第二項 枝部抽出エキスおよび各可溶性画分の神経突起伸長促進作用

第一章で使用した残りの枝部メタノール抽出エキスのうち 300.0 g を酢酸エチルおよび水を用いて分配抽出し、次いで得られた水可溶性画分を 1-ブタノールを用いてさらに分配抽出し、酢酸エチル可溶性画分 (57.3 g, 収率 1.1%), 1-ブタノール可溶性画分 (60.3 g, 収率 1.2%) および水可溶性画分 (182.4 g, 収率 3.7%) を得た。

得られたメタノール抽出エキス、酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分について、第一項と同様に PC12 細胞を用いた NGF 誘発神経突起伸長促進作用について検討した。

Table 4. 枝部メタノール抽出エキスおよび各可溶性画分の神経突起伸長促進作用

Sample	Ratio versus control			
	Control	0.1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$
MeOH extract	1.00 \pm 0.19	1.17 \pm 0.22	1.18 \pm 0.16	1.27 \pm 0.18
EtOAc fraction	1.00 \pm 0.13	1.03 \pm 0.17	0.97 \pm 0.16	1.09 \pm 0.19
1-BuOH fraction	1.00 \pm 0.13	1.08 \pm 0.11	1.05 \pm 0.14	1.07 \pm 0.19

Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4$).

[*J. Nat. Med.* (2018), Table 2 より引用]

その結果, Table 4 に示すようにメタノール抽出エキスでわずかに神経突起伸長を促進させる傾向が認められた (10 $\mu\text{g/mL}$ における p 値=0.12). しかしながら, 酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分のいずれにおいても作用の集約は認められなかった。

また, メタノール抽出エキス, 酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分について, 10 $\mu\text{g/mL}$ 処理での細胞生存率は順に, 103.5%, 108.1%, 90.8%であった。したがって, 神経突起伸長作用に対して, 細胞の増殖抑制などによる影響は認められなかったと考えられる。

第三節 含有成分の探索

第一項 花部含有成分の単離

花部酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分に有意な神経突起伸長促進作用が認められたことから、花部作用成分の解明および含有成分の探索を目的として、得られた酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分を順相シリカゲル、逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて繰り返し分離・精製し、1 種の新規アセトフェノン配糖体 inermioside A (**2**, 19.1 mg, 0.0065%) を単離・構造決定した。また、3 種の既知アセトフェノン配糖体 lalioside (**3**, 75.8 mg, 0.021%),⁹ 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**, 241.0 mg, 0.079%),⁴² polygoacetophenoside (**5**, 14.6 mg, 0.0033%),⁴³ 10 種の既知フラボノイド (\pm)-eriodictyol (**6**, 1.0 mg, 0.042%),⁴⁴ luteolin (**7**, 9.5 mg, 0.25%),⁴⁵ luteolin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**8**, 61.9 mg, 0.15%),⁴⁶ diosmetin 3'-*O*- β -D-glucopyranoside (**9**, 1.1 mg, 0.013%),⁴⁷ moldavoside (**10**, 3.0 mg, 0.00063%),⁴⁸ luteoloside (**11**, 2.6 mg, 0.032%),⁴⁹ quercetin (**12**, 2.4 mg, 0.10%),⁵⁰ spiraeoside (**13**, 3.0 mg, 0.037%),⁵¹ quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**, 24.1 mg, 0.084%)⁵² および 4'-*O*-methylquercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**15**, 6.3 mg, 0.077%)⁵³ を単離・同定した (Chart 1, Figure 20)。

新規アセトフェノン配糖体 inermioside A (**2**)をはじめ、既知化合物 (\pm)-eriodictyol (**6**), diosmetin 3'-*O*- β -D-glucopyranoside (**9**), spiraeoside (**13**), quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**) および 4'-*O*-methylquercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**15**) は、本植物からの単離は初めての報告である。また、単離収率から luteolin (**7**), luteolin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**8**) および quercetin (**12**) が花部に比較的多く含まれる成分と考えられた。

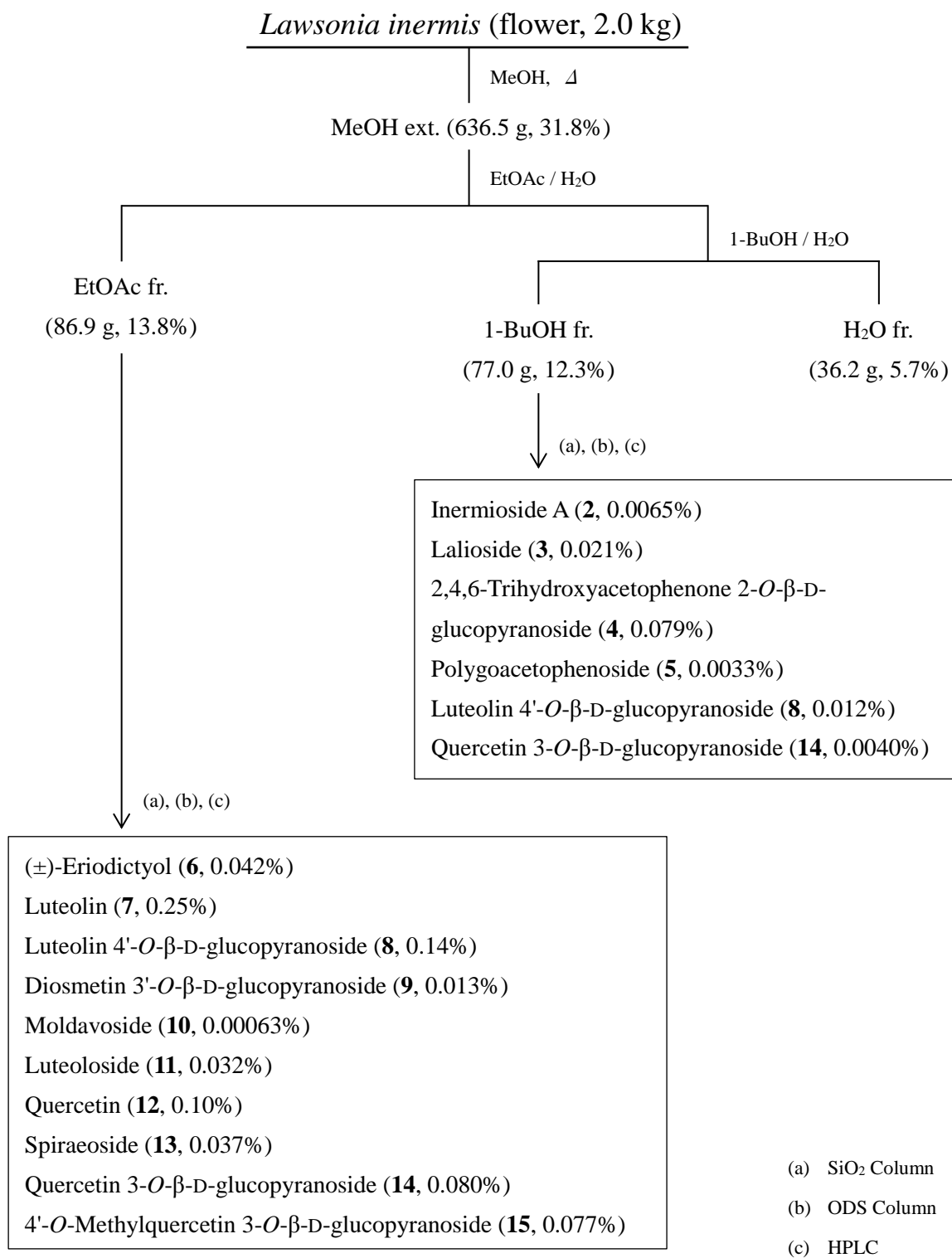


Chart 1. 花部成分単離

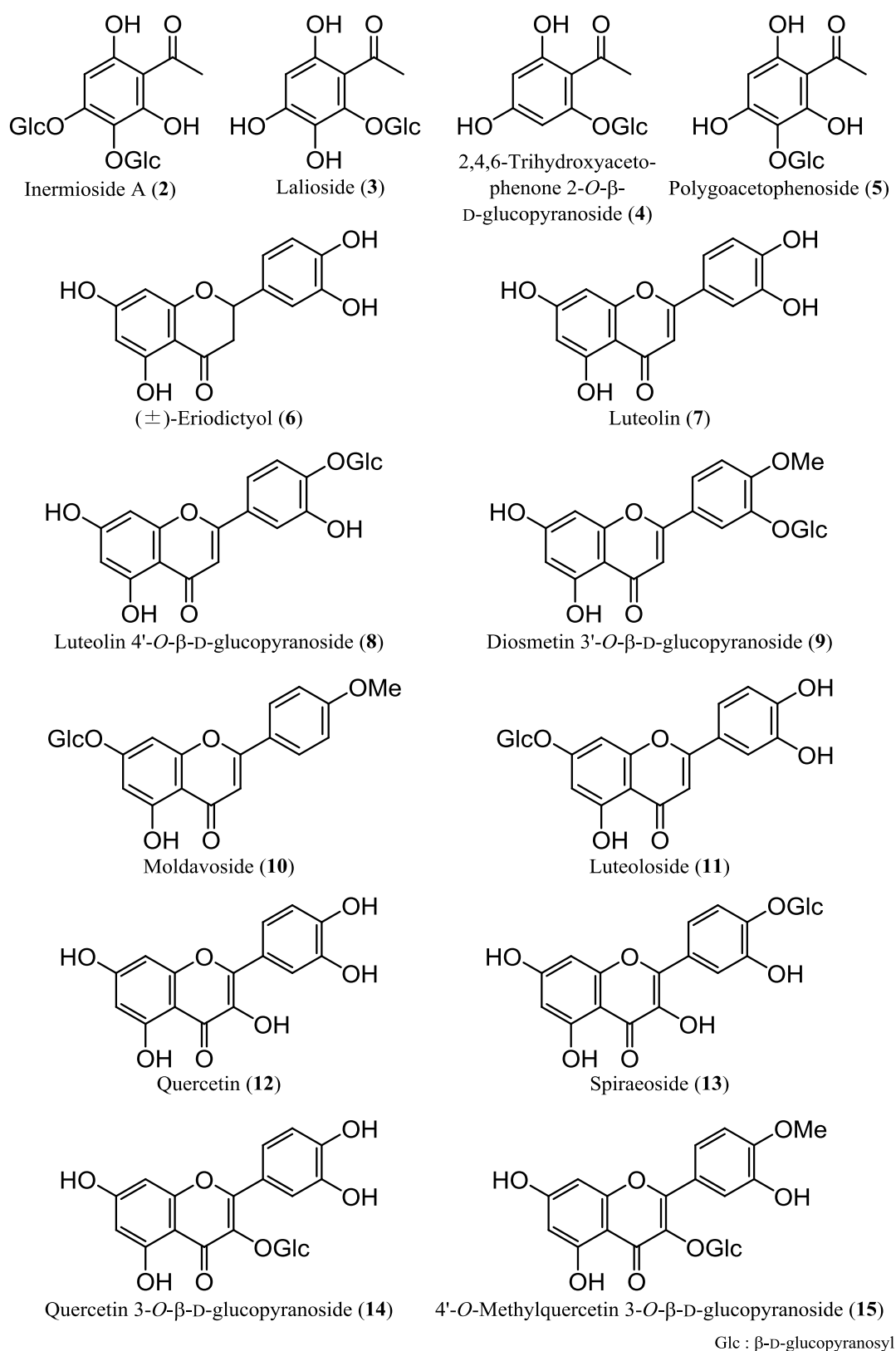


Figure 20. 花部単離化合物の化学構造

[*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Fig. 1 および *J. Nat. Med.* (2016), Fig. 1 より引用]

第二項 新規成分 inermioside A の構造決定

Inermioside A (**2**) は負の旋光性 ($[\alpha]_D^{30} -43.2^\circ$ in EtOH) を示す淡黄色非結晶性粉末として得られた. Positive-ion FAB-MS の測定を行ったところ, 擬似分子イオンピークが m/z 531 $[M+Na]^+$ に観測され, 高分解能 FAB-MS により **2** は分子式 $C_{20}H_{28}O_{15}$ を有する化合物であることが明らかになった. また赤外吸収 (IR) スペクトルにおいて水酸基 (3400 cm^{-1}), カルボニル基 (1710 cm^{-1}), 芳香環 (1626 cm^{-1}) およびエーテル結合 (1073 cm^{-1}) の存在を示唆する吸収が認められた. 化合物 **2** の水素核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) スペクトルおよび炭素核磁気共鳴 ($^{13}\text{C-NMR}$) スペクトルから, 1 つの 5 置換ベンゼン誘導体 [δ 6.27 (1H, s, H-5)] であり, 置換基としてカルボニル基 [δ_C 205.39 (-CO-)], さらに 1 つのメチル基 [δ 2.66 (3H, s, -COCH₃)] および 2 つの D-glucose [δ 4.66 (1H, d, $J = 7.6$, H-1'), δ 4.95 (1H, d, $J = 7.6$, H-1'')] の存在が示唆された (Table 5).

Table 5. Inermioside A (**2**) の $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) および $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz) 測定データ

Position	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	107.0	
2	155.7	
3	128.2	
4	157.7	
5	96.0	6.27 (1H, s)
6	162.8	
1'	107.2	4.66 (1H, d, $J = 7.6$)
2'	75.4	3.50 (1H, m)
3'	77.7	3.42 (1H, m)
4'	70.9	3.42 (1H, m)
5'	78.5	3.43 (1H, m)
6'	62.1	3.73 (1H, m), 3.83 (1H, d, $J = 12.4$)
1''	102.0	4.95 (1H, d, $J = 7.6$)
2''	74.6	3.54 (1H, m)
3''	77.5	3.52 (1H, m)
4''	71.1	3.48 (1H, m)
5''	78.4	3.46 (1H, m)
6''	62.3	3.72 (1H, m), 3.89 (1H, d, $J = 11.6$)
-CO-	205.4	
CH ₃	33.1	2.66 (3H, s)

(測定溶媒 : CD₃OD)

[J. Nat. Med. (2016), Table 2 より引用]

次に、Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy (DQF-COSY), Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) および Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) スペクトルの詳細な解析から、Figure 21 に示すような相関が明らかになった。すなわち、メチル基 [δ 2.66 (3H, s, -COCH₃)] とカルボニル基 [δ_c 205.39 (-CO-)] および C-1 の間に HMBC 相関がみられ、さらに H-1' と C-3, H-1' と C-4 の間に HMBC 相関がみられ、H-5 と C-1, C-3, C-4 および C-6 の間に HMBC 相関がみられたことから、C-2 に結合する官能基は水酸基であると決定した。また、C-2, C-3, C-4 および C-6 の ¹³C-NMR スペクトルデータより C-3

のみが高磁場側へシフトしていることから C-3 は水酸基に挟まれた位置に結合することが考えられた。以上のことから、C-1 および C-3 に結合する官能基はカルボニル基あるいは H-1' を有する *O*-D-glucose、C-4 および C-6 に結合する官能基は水酸基あるいは H-1'' を有する *O*-D-glucose であると推定した (Figure 22)。

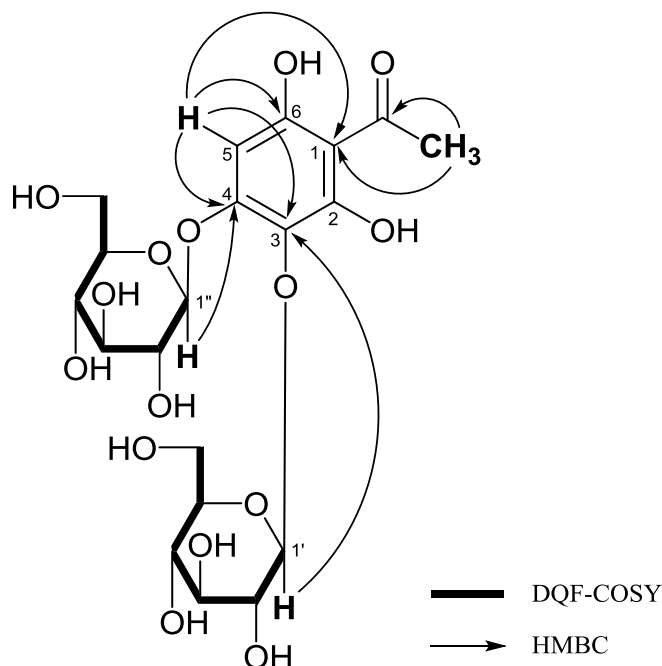


Figure 21. Inermioside A (**2**) の DQF および HMBC 相関
[*J. Nat. Med.* (2016), Fig. 2 より引用]

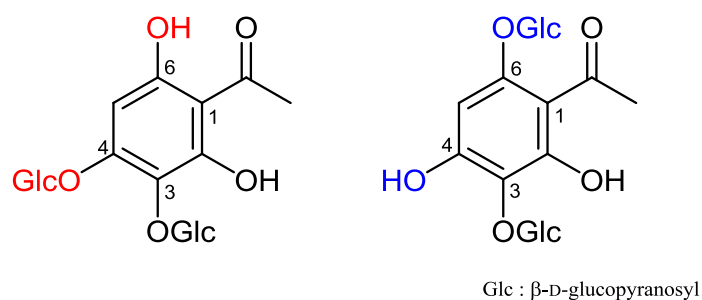


Figure 22. Inermioside A の推定構造

そこで、置換基の位置を決定する目的で Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) を測定したところ、化合物 **2** は H-5 と H-1'' の間にのみ相関が観測された。また既知化合物である lalioside (**3**) の NOE 相関がメチル基の水素と H-1' の間に観測され、2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*-β-D-glucopyranoside (**4**) の NOE 相関が H-1' とメチル基の水素および H-3 の間にそれぞれ観測され、アグリコンの一部である acetophenone の NOE 相関がメチル基の水素と H-2 および H-6 の間にそれぞれ観測された。一方、polygoacetophenoside (**5**) の H-5

および H-1'からはいずれの相関も観測されず、さらに lalioside (3) および 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-O-β-D-glucopyranoside (4) の H-5 からの相関も観測されなかった。このような結果から、ベンゼン環の置換基が隣接する場合に NOE 相関が観測され、水酸基等を挟むと観測されないことがわかった。さらに化合物 2 と polygoacetophenoside (5) の ^1H -および ^{13}C -NMR スペクトルは、よい一致を示し、その他の関連化合物⁵⁴⁻⁵⁹の ^1H -および ^{13}C -NMR スペクトルとの比較から、カルボニル基および 2 つの D-glucose の結合位置を決定した (Figure 23).

構成糖の絶対立体配置を含めた同定は、5% aqueous H_2SO_4 -1,4-dioxane (1 : 1) による酸加水分解後, tolylthiocarbamoyl thiazolidine へと誘導し, D-glucose および L-glucose と HPLC 保持時間を比較することで行い,⁶⁰ D-glucose であると決定した。

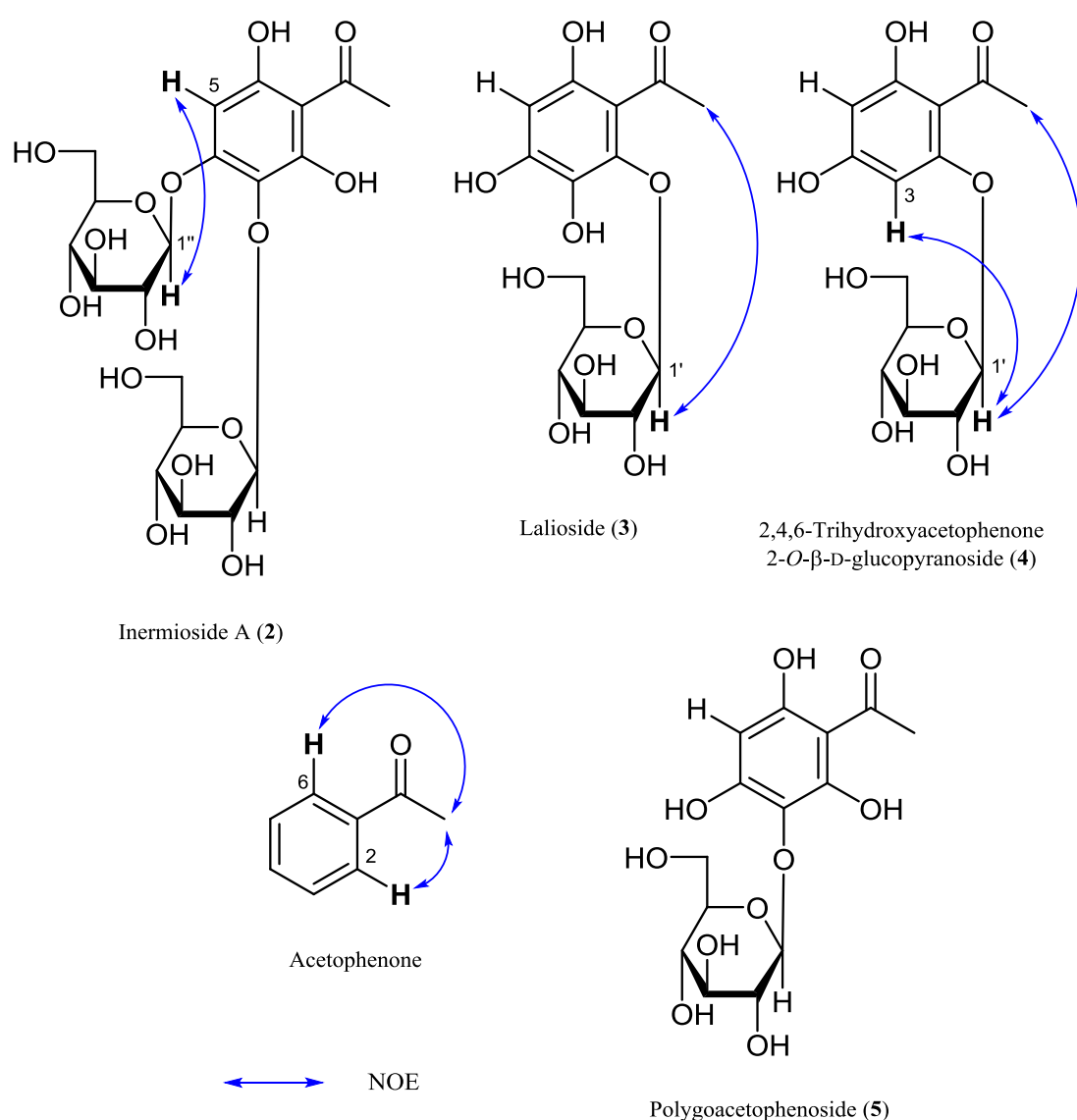


Figure 23. Inermioside A (2) および関連化合物の NOE 相関

第三項 枝部含有成分の単離

枝部メタノール抽出エキスを神経突起伸長を促進させる傾向 (10 $\mu\text{g/mL}$ における p 値 = 0.12) が認められたことから、含有成分の中に促進作用を示す化合物が存在する可能性を考え、その作用成分の解明および枝部含有成分の探索を目的として、得られた酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分を順相シリカゲル、逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて繰り返し分離・精製を行った。その結果、9 種の既知化合物、すなわち 3 種のフェニルプロパノイド 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**, 5.4 mg, 0.00012%),⁶¹ (+)-lyoniresinol (**17**, 19.8 mg, 0.00045%)⁶²⁻⁶⁴ および butylconiferin (**18**, 5.6 mg, 0.00014%),⁶⁵ 2 種のフェノール類 4-hydroxy-2-methoxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**19**, 60.0 mg, 0.0014%)⁶⁶ および 4-hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**20**, 39.8 mg, 0.00096%),⁶⁶ 1 種のアセトフェノン配糖体 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**, 21.3 mg, 0.00051%),⁴² 3 種のフラボノイド配糖体 quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**, 35.3 mg, 0.00085%),⁵² quercetin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (**21**, 10.8 mg, 0.00026%)^{67,68} および myricetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**22**, 5.8 mg, 0.00014%)⁶⁹ を単離・同定した (Chart 2, Figure 24)。

2-[4-(3-Hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**), (+)-lyoniresinol (**17**), butylconiferin (**18**), 4-hydroxy-2-methoxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**19**), 4-hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**20**), quercetin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (**21**) および myricetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**22**) は本植物からの単離は初めての報告である。

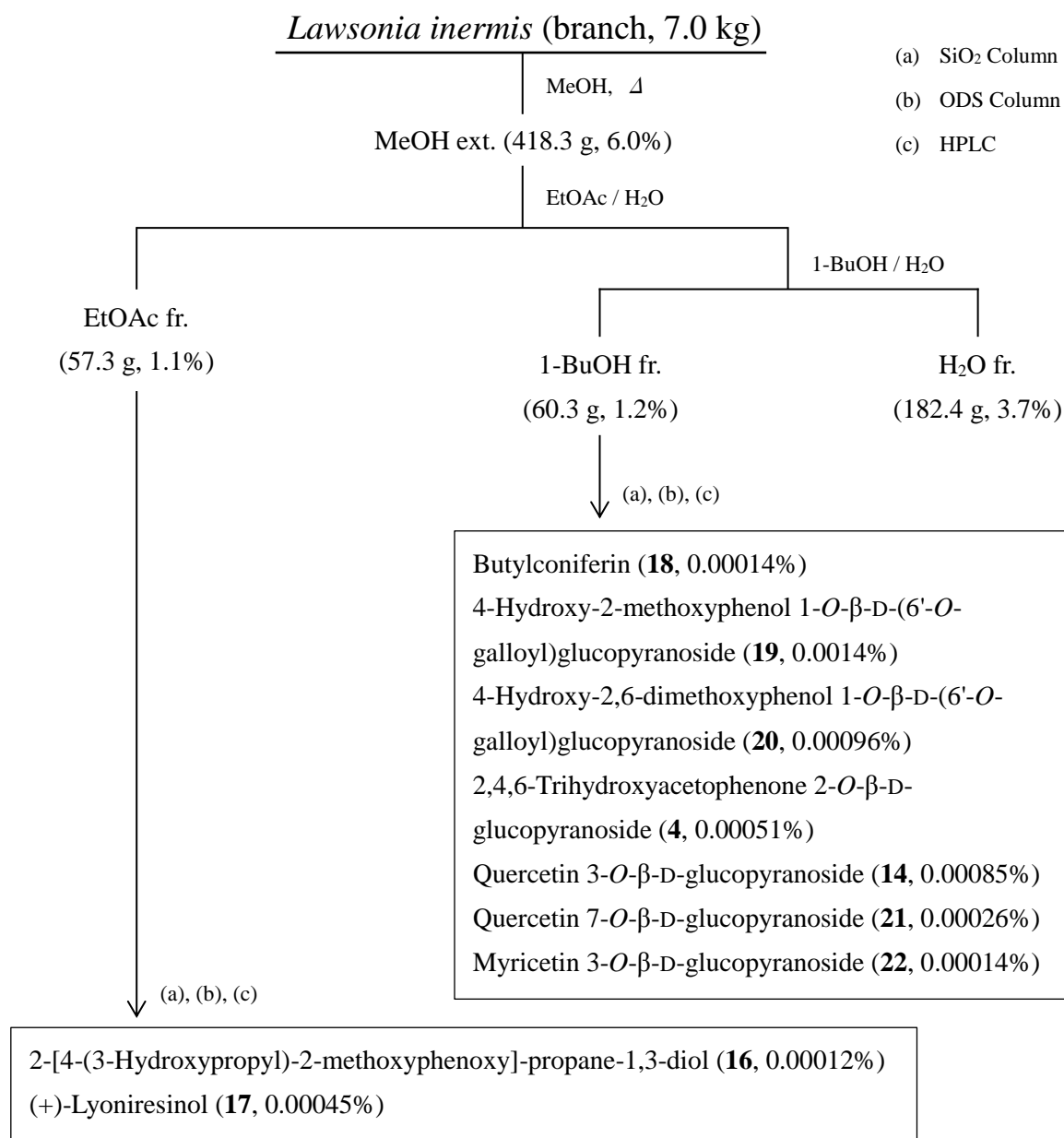
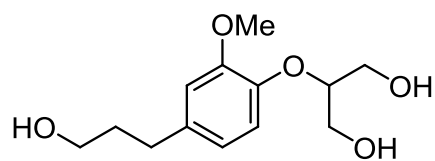
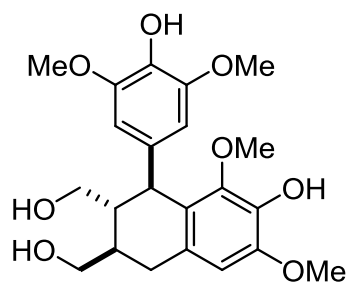


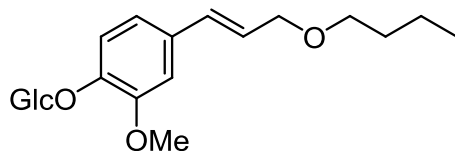
Chart 2. 枝部成分単離



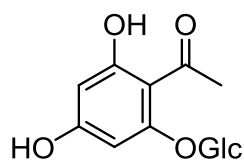
2-[4-(3-Hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**)



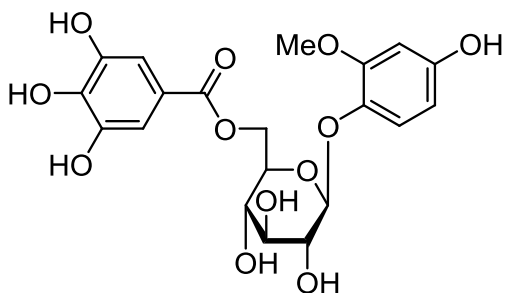
(+)-Lyoniresinol (**17**)



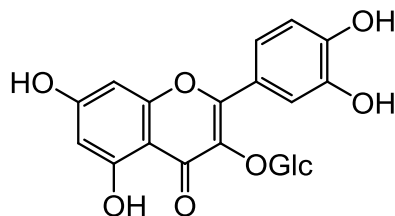
Butylconiferin (**18**)



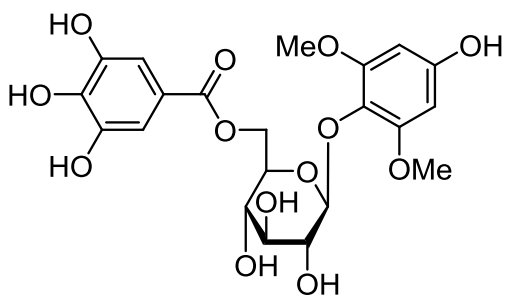
2,4,6-Trihydroxyacetophenone-2-O-beta-D-glucopyranoside (**4**)*



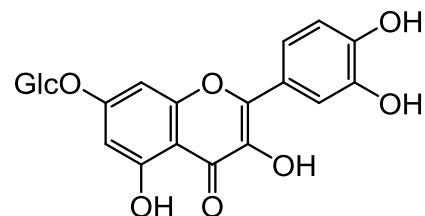
4-Hydroxy-2-methoxyphenol 1-O-beta-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside (**19**)



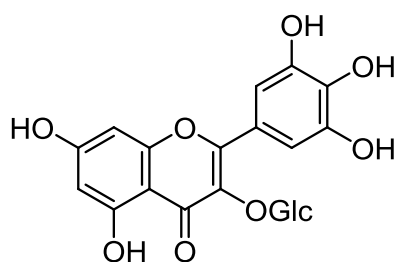
Quercetin 3-O-beta-D-glucopyranoside (**14**)*



4-Hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1-O-beta-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside (**20**)



Quercetin 7-O-beta-D-glucopyranoside (**21**)



Myricetin 3-O-beta-D-glucopyranoside (**22**)

* 花部との共通成分

Glc : beta-D-glucopyranosyl

Figure 24. 枝部単離化合物の化学構造

[*J. Nat. Med.* (2018), Fig. 1 より引用]

第四項 花部および枝部含有成分についての比較考察

第一項より、本植物の花部フラボノイド含有量は非常に多いことが明らかとなった。単離収率より考察すると, luteolin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**8**, 0.15%) などのフラボノイド配糖体よりも, それらのアグリコンである luteolin (**7**, 0.25%) および quercetin (**12**, 0.10%) の花部に対する総含有率は高く, このことが花部の特徴であると考えられた。

第三項より, 枝部から単離したフラボノイド配糖体の単離収率は花部に比べて低く, アグリコンである quercetin および myricetin を枝部から得られなかったことを考慮すると, 枝部のフラボノイド含有量は少ないと推察される。また, 花部および葉部からは得られていない 4-hydroxy-2-methoxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**19**) および 4-hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**20**) は枝部の特徴成分であると考えられた。

上記の考察を確認する目的で花部, 葉部および枝部の luteolin (**7**) および quercetin (**12**) の含有量について LC-MS を用いて測定したところ, Table 6 に示すような結果が得られた。

Table 6. 部位別 luteolin および quercetin 含有量

	エキス収率 (%)	収量 (mg/g)	R. S. D.
Luteolin			
花部	31.8	7.17	0.1
葉部	35.2	0.135	0.3
枝部	6.0	0.088	0.4
Quercetin			
花部	31.8	0.933	3.0
葉部	35.2	0.0114	0.9
枝部	6.0	0.070	3.4

R. S. D. (relative standard deviation, 相対標準偏差)

$n = 4$

[*J. Nat. Med.* (2018), Table 1 より引用]

また, luteolin は葉部からも単離報告されており, その報告から求められる単離収率は花部よりも低かった.^{7,9} その他のフラボノイドおよびフラボノイド配糖体についても単離収率を求めたところ, 総合的に花部の含有量が最も多く, 続いて葉部, 枝部の順に少なくなることが示唆された.^{7,9}

花部, 葉部および枝部のいずれの部位からも得られているアセトフェノン配糖体は, 各成分の部位別含有量に差はあると考えられるが, 植物全体に含有している成分の一つであると

言える。また、葉部から単離報告されている lalioside の単離収率を求めたところ,⁹ 花部よりも非常に高いことが明らかとなった。さらに定性分析ではあるが, polygoacetophenoside について HPLC を用いて検討したところ, 葉部のみに明確なピークが求められる結果であった (Figure 25)。以上のことから, アセトフェノン配糖体含有量は葉部が最も多いと考えられ, 第一項および第三項の結果より, 花部の含有量が次に多く, 枝部が最も少ないということが示唆された (Figure 26)。

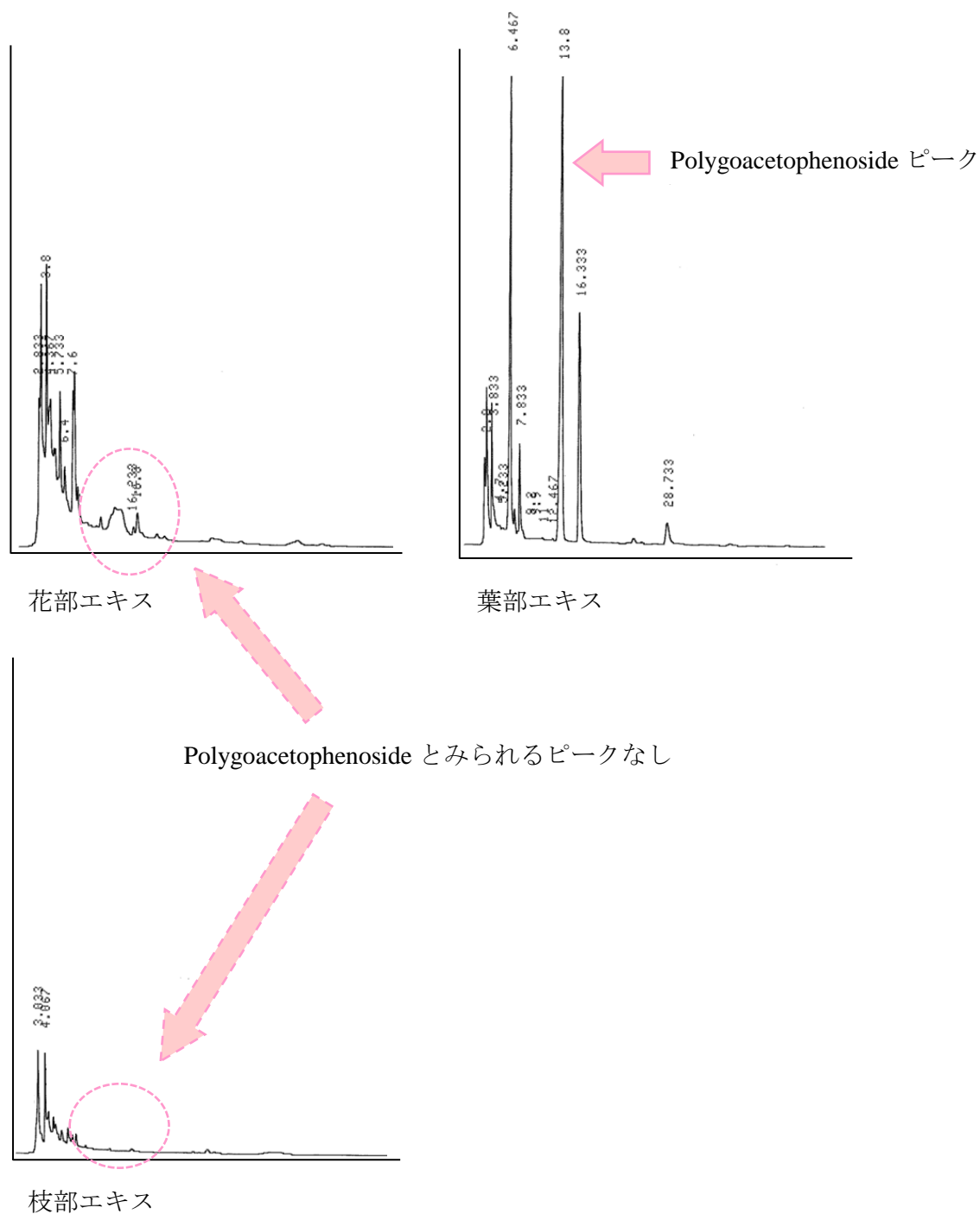


Figure 25. Polygoacetophenoside の定性分析結果

フラボノイド含有量の比較



アセトフェノン配糖体含有量の比較



Figure 26. 部位別含有量の比較

第四節 単離成分の神経突起伸長促進作用

第一項 花部単離成分の神経突起伸長促進作用

有意な神経突起伸長促進作用を示した花部酢酸エチル可溶性画分および 1-ブタノール可溶性画分の作用成分を解明する目的で, *L. inermis* 花部より単離した 1 種の新規アセトフェノン配糖体 inermioside A (**2**), 3 種の既知アセトフェノン配糖体 lalioside (**3**), 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**) および polygoacetophenoside (**5**), 6 種の既知フラボノイド (\pm)-eriodictyol (**6**), luteolin (**7**), luteolin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**8**), quercetin (**12**), spiraeoside (**13**) および quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**) の 10 種の化合物について, PC12 細胞を用いた NGF 誘発神経突起伸長作用について検討した.

Table 7. 花部単離化合物および donepezil の神経突起伸長促進作用

Sample	Ratio versus control			
	Control	1 μ M	10 μ M	100 μ M
2	1.00 \pm 0.07	1.87 \pm 0.30**	1.80 \pm 0.16*	1.87 \pm 0.15**
3	1.00 \pm 0.36	1.16 \pm 0.12	1.23 \pm 0.22	1.97 \pm 0.26*
4	1.00 \pm 0.10	1.13 \pm 0.13	0.93 \pm 0.22	1.03 \pm 0.13
5	1.00 \pm 0.14	1.00 \pm 0.15	1.03 \pm 0.09	1.12 \pm 0.05
6	1.00 \pm 0.32	0.66 \pm 0.10	1.10 \pm 0.14	0.31 \pm 0.06*
7	1.00 \pm 0.11	1.17 \pm 0.10	1.15 \pm 0.10	0.25 \pm 0.28*
8	1.00 \pm 0.08	0.73 \pm 0.24	0.78 \pm 0.08	1.30 \pm 0.25
12	1.00 \pm 0.22	1.47 \pm 0.37	2.16 \pm 0.35*	2.36 \pm 0.39*
13	1.00 \pm 0.15	0.98 \pm 0.20	0.96 \pm 0.07	1.44 \pm 0.20
14	1.00 \pm 0.07	1.11 \pm 0.11	1.04 \pm 0.25	1.27 \pm 0.16
Donepezil	1.00 \pm 0.09	1.23 \pm 0.16	1.89 \pm 0.28*	2.42 \pm 0.70*

Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4-12$).

Significantly different from the control group * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[*J. Nat. Med.* (2016), Table 3 より引用]

Donepezil はこれまでに神経突起伸長促進作用が報告されていることから, 今回比較対照物質として用いることにした.³⁷ その結果, Table 7 に示すように donepezil は, 1 μ M 処理で 1.23 倍, 10 μ M 処理で 1.89 倍, 100 μ M 処理で 2.42 倍の作用を示した. 花部単離化合物である新規アセトフェノン配糖体 inermioside A (**2**) は donepezil と同等程度の作用が認められ, 1 μ M 処理で 1.87 倍, 10 μ M 処理で 1.80 倍, 100 μ M 処理で 1.87 倍の作用を示し, 追加で実施した低濃度域での試験では 0.01 μ M 処理で 0.86 倍, 0.1 μ M 処理で 1.53 倍と濃度依存性が確認された. ま

た、同じく花部単離化合物である既知フラボノイド quercetin (12) については donepezil より強い作用を示し、1 μM 処理で 1.47 倍、10 μM 処理で 2.16 倍、100 μM 処理で 2.36 倍の作用を示した。さらに quercetin (12) 処理において、形態学的ならびに WST-8 法による細胞毒性は認められなかった (Table 8)。

Table 8. 化合物 12 の細胞毒性

Sample	Viability (%)			
	Control	1 μM	10 μM	100 μM
12	100.0 \pm 2.3	105.3 \pm 3.2	118.3 \pm 5.4**	132.0 \pm 4.5**

Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4$).

Significantly different from the control group ** $p < 0.01$.

Quercetin についてはこれまでに PC12 細胞を用いた神経突起伸長促進作用が報告されている。^{70,71} またその作用メカニズムとして、神経突起伸長に必須であるとされている $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体 ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter isoform 1: NKCC1) のタンパク発現量への影響を与えずに、NKCC1 の活性を quercetin が亢進することにより、細胞内への Cl^- の流入が増加し、神経突起伸長が促進されるということが報告されている。⁷⁰ すなわち、細胞内への Cl^- の流入が増加することにより、tubulin の GTPase 活性が抑制され、微小管の伸長が促進されることにより神経突起伸長が促進される (Figure 27).^{72,73} しかしながら、今回の実験条件とは NGF の濃度が大きく異なる。すなわち、報告されている論文の NGF 濃度は 50 ng/mL と高濃度であるが、今回 1 ng/mL の NGF 添加濃度でも同様の作用が認められたことから、NGF が低濃度でも quercetin は作用を示すことが明らかとなった。このことから、NGF 濃度の低い生体内でも quercetin が作用する可能性が高いと考えられる。

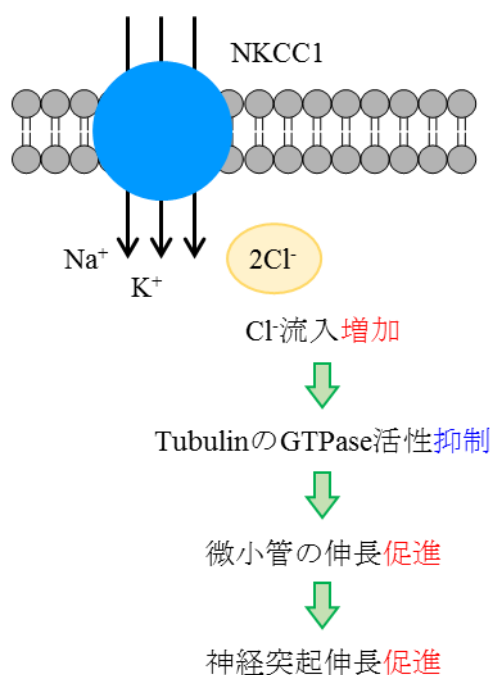


Figure 27. Cl^- の流入による神経突起伸長作用様式

第二項 枝部単離成分の神経突起伸長促進作用

枝部メタノール抽出エキスを神経突起伸長を促進させる傾向 (10 $\mu\text{g/mL}$ における p 値 = 0.12) が認められたことから、含有成分の中に促進作用を示す化合物が存在する可能性を考え、3種のフェニルプロパノイド 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**), (+)-lyoniresinol (**17**) および butylconiferin (**18**), 2種のフェノール類 4-hydroxy-2-methoxyphenol 1- O - β -D-(6'- O -galloyl)glucopyranoside (**19**) および 4-hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1- O - β -D-(6'- O -galloyl)glucopyranoside (**20**), 2種のフラボノイド配糖体 quercetin 7- O - β -D-glucopyranoside (**21**) および myricetin 3- O - β -D-glucopyranoside (**22**) の 7種の化合物について、PC12 細胞を用いた NGF 誘発による神経突起伸長作用について検討した (Table 9).

Table 9. 枝部単離化合物および donepezil の神経突起伸長促進作用

Sample	Ratio versus control			
	Control	0.1 μM	1 μM	10 μM
16	1.00 \pm 0.11	1.24 \pm 0.15	1.76 \pm 0.10**	1.42 \pm 0.09
17	1.00 \pm 0.30	1.49 \pm 0.37	1.69 \pm 0.14	1.44 \pm 0.10
18	1.00 \pm 0.08	1.26 \pm 0.10	0.96 \pm 0.33	1.54 \pm 0.05
19	1.00 \pm 0.20	1.07 \pm 0.13	1.04 \pm 0.18	0.97 \pm 0.15
20	1.00 \pm 0.13	1.48 \pm 0.24	1.71 \pm 0.19	1.46 \pm 0.27
21	1.00 \pm 0.10	1.12 \pm 0.10	1.53 \pm 0.27	1.95 \pm 0.23**
22	1.00 \pm 0.06	1.46 \pm 0.12	1.53 \pm 0.35	1.80 \pm 0.39
	Ratio versus control			
	Control	1 μM	10 μM	100 μM
Donepezil	1.00 \pm 0.17	0.99 \pm 0.16	1.15 \pm 0.06	1.65 \pm 0.18*

Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4$).

Significantly different from the control group * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

[J. Nat. Med. (2018), Table 3 より引用]

比較対照物質には第一項と同様 donepezil を使用し、Table 9 に示すように 1 μM 処理で 0.99 倍、10 μM 処理で 1.15 倍、100 μM 処理で 1.65 倍という結果が得られた。枝部単離化合物であるフェニルプロパノイド 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**) およびフラボノイド配糖体 quercetin 7- O - β -D-glucopyranoside (**21**) に donepezil と同等程度の神経突起伸長促進作用が認められた。すなわち、2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**) は 0.1 μM 処理で 1.24 倍、1 μM 処理で 1.76 倍、10 μM 処理で 1.42 倍の作用を示し、quercetin 7- O - β -D-glucopyranoside (**21**) は 0.1 μM 処理で 1.12 倍、1 μM 処理で 1.53 倍、10 μM 処理で 1.95 倍の作用を示した。また、2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol

(**16**) および quercetin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (**21**) 処理においても形態学的ならびに WST-8 法による細胞毒性は認められなかった (Table 10).

2-[4-(3-Hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**) のような 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanol 誘導体が, PC12 細胞を用いた神経突起伸長促進作用を示したのは今回が初めての報告である.

Table 10. 化合物 **16** および **21** の細胞毒性

Sample	Viability (%)			
	Control	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
16	100.0 \pm 1.2	102.4 \pm 4.5	108.7 \pm 3.7	97.7 \pm 1.8
21	100.0 \pm 1.2	122.7 \pm 12.9*	93.7 \pm 2.3	106.5 \pm 2.2

Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4$).

Significantly different from the control group * $p < 0.05$.

フェニルプロパノイド (+)-lyoniresinol (**17**), フェノール類 4-hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*- β -D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**20**) およびフラボノイド配糖体 myricetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**22**) については神経突起伸長を促進させる傾向がみられた.

第五節 Quercetin の作用様式

神経突起伸長の作用様式として、神経成長因子である NGF がチロシンキナーゼ受容体である tropomyosin receptor kinase A (TrkA) に結合することによって phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K) がリン酸化され、さらに phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) がリン酸化され、Vav2 / Vav3 へのリン酸化が生じ、そして RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac1) / cell division cycle 42 (Cdc42) がリン酸化され刺激が伝わり、神経突起の伸長が生じることが報告されている (Figure 28).⁷⁴ その他にも PIP3 から protein kinase B (AKT) を介する経路や mitogen activated protein kinase (MAPK, MEK) および extracellular signal-regulated kinase (ERK) を介する経路が活性化されることにより神経突起の伸長が生じることとも報告されている。^{37,38,75-77} 本研究で最も強い伸長促進作用を示した quercetin の作用様式を検討する目的で、TrkA をコードする遺伝子である neurotrophic tyrosine kinase 1 (Ntrk1), Rho ファミリーGTPase のグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Vav3 および細胞骨格に参与する Rho ファミリーの低分子量 G タンパク質である Rac1 の mRNA 発現への影響について解析した。

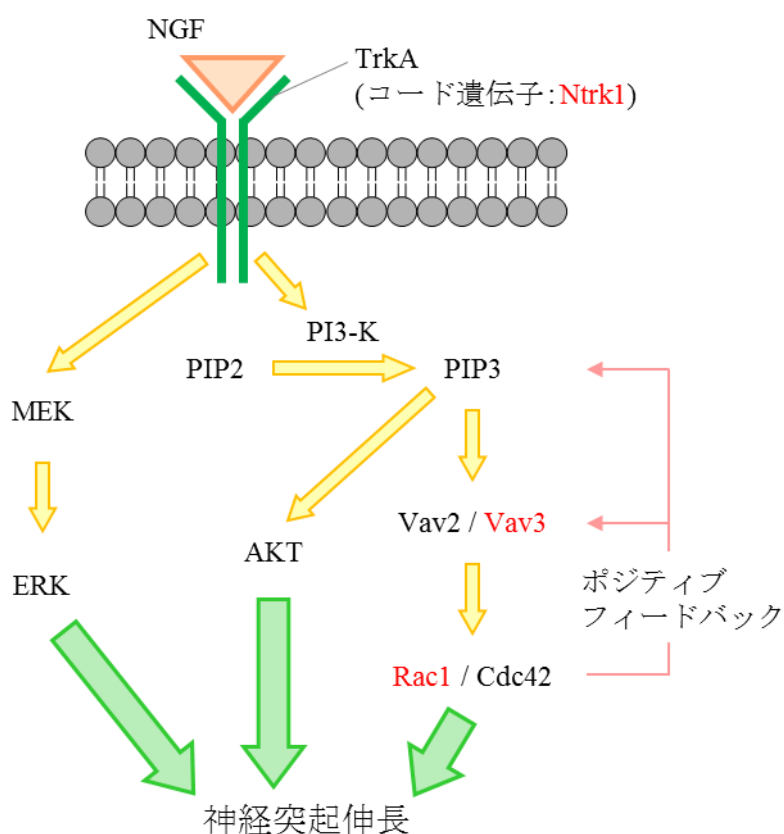


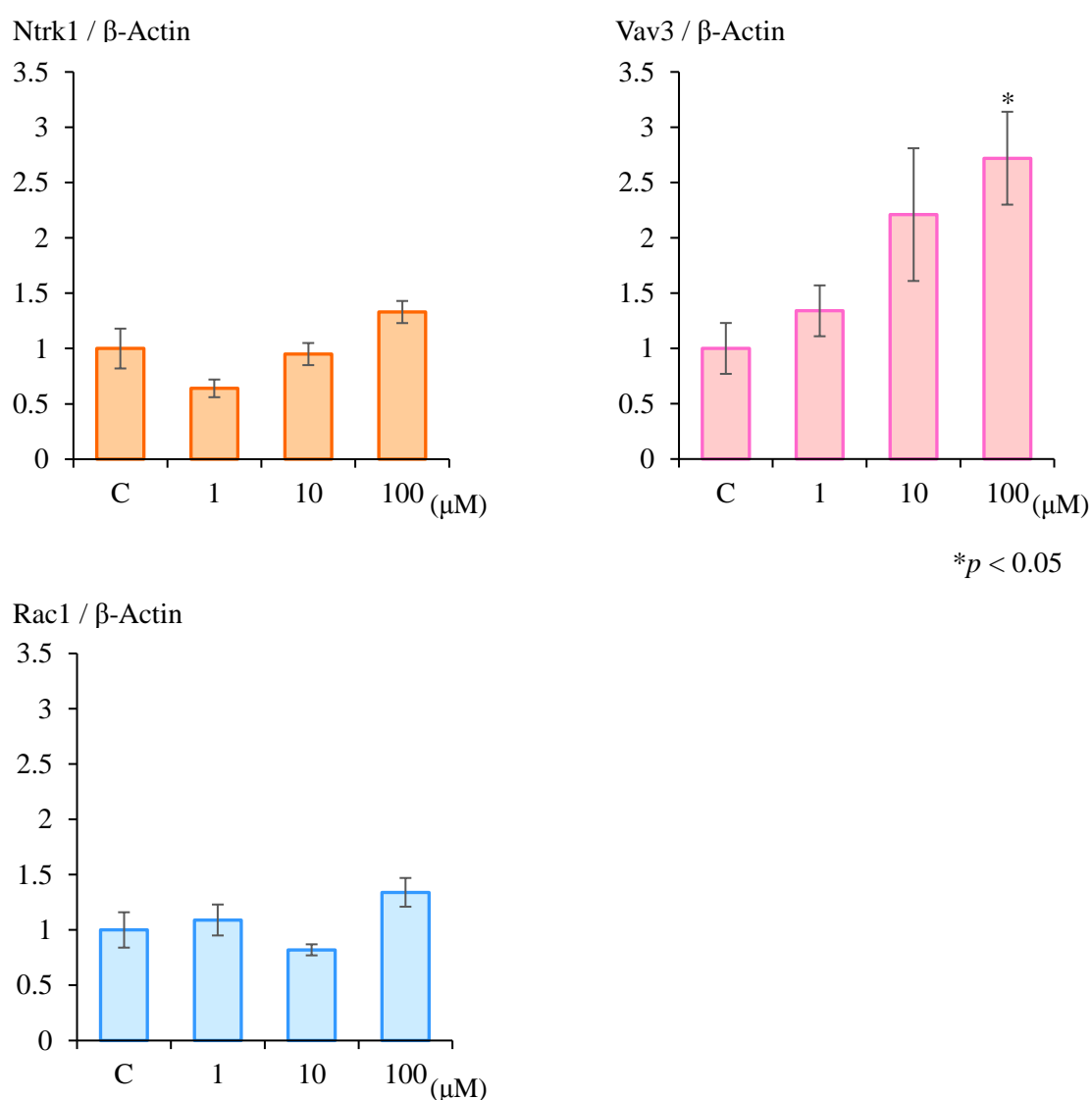
Figure 28. 神経突起伸長の作用様式の一例

Table 11. Quercetin による Ntrk1, Vav3 および Rac1 の mRNA 発現量への影響

	Expression ratio			
	Control	1 μ M	10 μ M	100 μ M
Ntrk1	1.00 \pm 0.18	0.64 \pm 0.08	0.95 \pm 0.10	1.33 \pm 0.10
Vav3	1.00 \pm 0.23	1.34 \pm 0.23	2.21 \pm 0.60	2.72 \pm 0.42*
Rac1	1.00 \pm 0.16	1.09 \pm 0.14	0.82 \pm 0.05	1.34 \pm 0.13

Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4$).

Significantly different from the control group * $p < 0.05$.

**Figure 29.** Quercetin による Ntrk1, Vav3 および Rac1 の mRNA 発現量への影響

[*J. Nat. Med.* (2016), Fig. 3 より引用]

その結果, quercetin は Ntrk1 および Rac1 の mRNA 発現にはほとんど影響を与えなかったものの, Vav3 の mRNA 発現量については神経突起伸長促進作用が認められた 10 μ M 処理から増加傾向を示し, 100 μ M 処理では有意に増加させることが明らかとなった (Table 11, Figure 29). すなわち, quercetin の神経突起伸長促進作用メカニズムの一つとして, Vav3 の mRNA 発現を介した経路が関与することを明らかにした. なお, Vav3 の mRNA 発現量を増加させる低分子化合物としては初めての報告である.

Vav3 の mRNA 発現量が増加していたが, その下流に存在する Rac1 の mRNA 発現量が増加していなかったということから, Rac1 タンパクの増減には影響していないのではないかと考えられる. すなわち, Vav3 の mRNA 発現量が増加したことにより, Vav3 タンパク量も増加したと推察し, さらに増加した Vav3 タンパクによって Rac1 タンパクの活性が亢進されたことにより神経突起伸長が促進されたと考察している.

また, quercetin については, *in vivo* にてアルツハイマー型認知症をモデルとしたマウスの脳内のアミロイド β 量の減少, 空間学習能力や記憶力を改善するという報告⁷⁸ およびラットの脳内へ移行するという報告^{79,80} などがある. 今回の結果と合わせて考えると, quercetin は認知症を含む神経変性疾患で失われた神経細胞の機能を補填するような有望なシード化合物と考えられる.

第四節で 2 種の配糖体成分が神経突起伸長促進作用を示すことが明らかとなった. 配糖体について同様の作用を報告している論文は少ないが, イリドイド配糖体 picroside I および II は MAPkinase を介する経路を活性化させることにより神経突起伸長を示すことが報告されている.⁸¹ したがって, 配糖体構造を有する低分子化合物の中には細胞内に吸収され, 作用を示す物質もあると考えられる. また, サポニン spicatoside A は, NGF と同様に TrkA を活性化させる作用が報告されていることから,⁸² 配糖体が細胞膜に存在するレセプターおよびトランスポーターを介して神経突起伸長を促進させる可能性も考えられる (Figure 30). 以上のように配糖体であっても神経突起伸長促進作用を示す可能性はあり, その作用様式も様々な経路が考えられる.

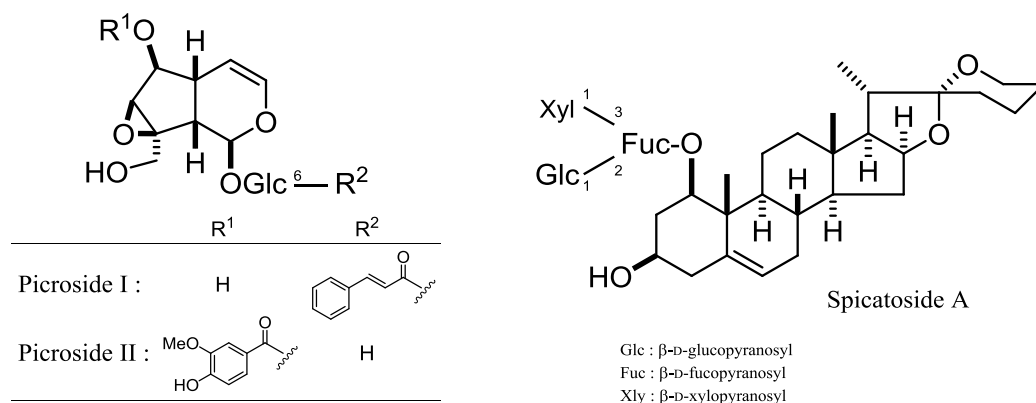


Figure 30. Picroside I, II および spicatoside A の化学構造

結論

L. inermis 葉部の特徴成分であり、染色作用を示す主要成分とされている lawsone (1) について、LC-MS を用いて *L. inermis* 花部、葉部および枝部の部位別含有量を測定した結果、lawsone (1) が葉部に集約し、花部および枝部の含有量はわずかであることを初めて明らかにした。すなわち、花部および枝部は染色効果をほとんど示さずに利用できる素材であることが判明した。

L. inermis 花部より新規アセトフェノン配糖体 inermioside A (2)をはじめ、既知化合物 (±)-eriodictyol (6), diosmetin 3'-*O*-β-D-glucopyranoside (9), spiraeoside (13), quercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (14) および 4'-*O*-methylquercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (15) を、また枝部より 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (16), (+)-lyoniresinol (17), butylconiferin (18), 4-hydroxy-2-methoxyphenol 1-*O*-β-D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (19), 4-hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*-β-D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (20), quercetin 7-*O*-β-D-glucopyranoside (21) および myricetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (22) を初めて単離し、報告した。

培養条件と実験条件の間で血清量の変化が無い条件にて、PC12 細胞を用いた NGF 誘発神経突起伸長作用を検討したところ、*L. inermis* 花部および枝部メタノール抽出エキスに作用傾向が認められ、特に花部酢酸エチル可溶性画分に有意な伸長促進作用を見出した。

また、新規化合物 inermioside A (2) や、既知化合物 quercetin (12), 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (16) および quercetin 7-*O*-β-D-glucopyranoside (21) に有意な神経突起伸長促進作用を見出した。これらは認知症を含む神経変性疾患で失われた神経細胞の機能を補填するような有望なリード化合物と考えられた。

今回の研究は、葉部収穫の際に同時に得られるにも関わらず、これまで未利用とされてきた *L. inermis* 花部および枝部の有効利用につながる研究を目的としてきた。その結果、上記に示すような結果が得られたことは、*L. inermis* 花部および枝部の価値を高め、有効利用につながる有意義な研究成果が得られたと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えていただくとともに、御懇意なる御指導と御高配を賜りました京都薬科大学 生薬学分野 松田久司教授に心から感謝の意を表します。また、本研究を遂行するに際し、御助言・御討論くださいました中村誠宏准教授、そして多くの御指導・御協力くださいました中嶋聡一助教に深謝いたします。

本論文の作成にあたり、御助言を賜りました京都薬科大学 公衆衛生学分野 渡辺徹志教授、ならびに統合薬科学系 高田和幸教授に深く感謝致します。

FAB-MS および EI-MS の測定に御便宜頂きました本学共同利用機器センター 織田佳代子講師 (当時)、照屋千香子技術専門職員 (当時)、LC-MS 測定に関して御指導いただきました本学公衆衛生学分野 長谷井友尋講師 (当時)、松本崇宏助教、植物の情報収集に関して御協力くださいました本学薬用植物園 月岡淳子助教に深く感謝申し上げます。

実験に御協力頂きました劉江博士、矢野真実子学士、河端未来学士、秋山真範学士、木村智仁学士、今井佳代学士、中田晶子学士、小川裕樹学士、前川友希学士、谷美有紀学士、近藤恵里奈学士、柴田かおり氏、中村結有氏、久保田知沙氏、増本優介氏、平尾みなみ氏らをはじめとする京都薬科大学生薬学分野職員、博士、修士、学士ならびに学生諸氏の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究に様々な御助言を賜りました京都薬科大学 吉川雅之名誉教授に深く感謝申し上げます。

本研究の機会をいただき、貴重な御支援をいただきました株式会社エヌ・ティー・エイチ 上野淳子代表取締役社長をはじめとする同社員ならびに関係者の皆様に心より感謝致します。

最後に、常に温かく見守り、支え励まして下さった家族に心から感謝致します。

実験の部

高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) については、高速液体クロマトグラフは Nexera UHPLC システムを、トリプル四重極型質量分析計は Shimadzu LCMS-8040 (株式会社 島津製作所, 京都) を用いて測定した。なお, Nexera UHPLC システムについては、システムコントローラーは Shimadzu CBM-20A (株式会社 島津製作所) を、ポンプは Shimadzu LC-20A (株式会社 島津製作所) を、紫外可視分光光度計検出器 (UV) は Shimadzu SPD-20A (株式会社 島津製作所) を、オートサンプラーは Shimadzu SIL-20AC (株式会社 島津製作所) を、カラムヒーターは Shimadzu CTO-20AC (株式会社 島津製作所) を、デガッサーは Shimadzu DGU-20A3R (株式会社 島津製作所) を用いた。

旋光度は、Horiba high sensitive SEPA-300 digital polarimeter ($l = 5$ cm) (株式会社 堀場製作所, 京都) および JASCO P2200 polarimeter ($l = 5$ cm) (日本分光株式会社, 東京) を用いて測定した。

赤外吸収スペクトル (IR) は、Shimadzu FT2R-8100 spectrometer (株式会社 島津製作所) を用いて測定した。

高分解能質量分析 (High resolution FAB-MS, EI-MS) および質量分析 (FAB-MS, EI-MS) は、JEOL JMS-SX 102A (日本電子株式会社, 東京) および JEOL JMS-GCMATE 型質量分析装置 (日本電子株式会社) を用いて測定した。

水素核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR), 炭素 ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル (^{13}C -NMR), Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy (DQF-COSY) スペクトル, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) スペクトル, Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) スペクトルおよび Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY) は、JNM-ECA 600 (600 MHz) (日本電子株式会社) を用いて測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) については、ポンプは Shimadzu LC-6AD (株式会社 島津製作所) および Shimadzu LC-20A (株式会社 島津製作所) を、示差屈折計検出器 (RI) は、Shimadzu RID-10A (株式会社 島津製作所) を、紫外可視分光光度計検出器 (UV) は Shimadzu SPD-10Avp (株式会社 島津製作所) および Shimadzu SPD-20A (株式会社 島津製作所) を用いた。カラムは、YMC-Pack ODS-A (4.6×250 mm, i.d., 20×250 mm, i.d.) (株式会社 ワイエムシイ, 京都), COSMOSIL 5C₁₈-PAQ (4.6×250 mm, i.d., 20×250 mm, i.d.) (ナカライテスク株式会社, 京都) および COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (4.6×250 mm, i.d., 10×250 mm, i.d., 20×250 mm, i.d.) (ナカライテスク株式会社) を分析および分離の目的で用いた。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーの吸着剤は、順相系はシリカゲル Silica Gel BW-200 (150-350 mesh) (富士シリシア化学株式会社, 愛知), 逆相系はクロマトレックス ODS DM1020T (100-200 mesh) (富士シリシア化学株式会社) および COSMOSIL 140C₁₈-OPN (140 μm) (ナカライテスク株式会社) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) には, Silica Gel 60F₂₅₄ (順相) (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Germany), 60 RP-18 F₂₅₄S (逆相) (Merck KGaA) を使用し, スポットの検出には, UV (254 nm) および 1% Ce(SO₄)₂/10% H₂SO₄ 水溶液を噴霧し, 加熱時の呈色により行った.

試薬は特に明記しないものは, 富士フイルム和光純薬株式会社製試薬 (特級) を使用した.

細胞培養は MCO-18AIC (パナソニック株式会社, 大阪) CO₂ インキュベーターを使用し, 37 °C, 5% CO₂, 95% R.H. 雰囲気下で行った.

実験で得られた数値は平均値±標準誤差で表記し, 対照群との平均値の有意差の検定には Dunnett の方法を使用し, *p* 値が 0.01, 0.05 以下のものを有意とみなした.

第一章の実験

第二節の実験

エキスの作製

Lawsonia inermis の乾燥花部 (2.0 kg), 乾燥葉部 (10.0 kg) および乾燥枝部 (7.0 kg) をそれぞれメタノール (MeOH) (ナカライテスク株式会社) で熱時 (80 °C) 抽出した. 各部位別抽出液を濾過し, 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を 3 回行った. 各部位別メタノール抽出液を合わせて減圧下溶媒留去し, 花部メタノール抽出エキス (636.5 g, 収率 31.8%), 葉部メタノール抽出エキス (3522.7 g, 収率 35.2%) および枝部メタノール抽出エキス (418.3 g, 収率 6.0%) を得た.

移動相および標準品の調製

測定時の移動相として 22 : 78 = アセトニトリル (LC-MS grade) (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) : 水を混合し, ギ酸 (LC-MS grade) (富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて pH 3.0 に調製した. 作製した移動相を用いて lawsone (Merck KGaA) を 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 および 0.1 µg/mL に調製し, 0.45 µm フィルター (ナカライテスク株式会社) を用いて濾過した後, 標準品として使用した.

サンプルの調製

Lawsone 含有量測定のために, 花部メタノール抽出エキス, 葉部メタノール抽出エキスおよび枝部メタノール抽出エキスを, 測定時の移動相である 22%アセトニトリル溶液 (pH 3.0) を用いて, 0.6, 0.15, 15 mg/mL に調製し, 0.45 µm フィルターを用いて濾過した後, サンプル溶液として使用した.

分析条件

各濃度に調製した lawsone, 花部メタノール抽出エキス, 葉部メタノール抽出エキスおよび枝部メタノール抽出エキスは LC 測定条件および MS 測定条件に示す方法で測定した.

LC 測定条件

カラム	YMC-Pack ODS-A (4.6 × 250 mm, i.d.)
移動相	22 : 78 = CH ₃ CN : H ₂ O (pH 3.0)
流速	1.0 mL/min
検出波長	283 nm
カラムオープン温度	40 °C
サンプル注入量	10 µL

MS 測定条件：選択的イオン検出法 (SIM)

測定イオン	173 [M-H] ⁻
Nebulizer gas	3 L/min
Drying gas	15 L/min
Desolvation line (DL) 温度	250 °C
Heat block (HB) 温度	400 °C

検量線

標準品として調製した各濃度の lawsone から得られたピーク面積を基に検量線を求めた.

検量線の回帰式	$y = 2.93 \times 10^6 x - 1.08 \times 10^2$ ($R^2 = 0.998$)
検出限界 (LOD)	0.001 µg/mL
定量下限 (LOQ)	0.003 µg/mL

第二章の実験

第一節、第二節および第四節の実験

細胞培養

JCRB 細胞バンクより分譲されたラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞 (JCRB0733) を 10% ウシ胎児血清 (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5% ウマ血清 (HS) (Thermo Fisher Scientific), 4 mM L-glutamine, 100 units/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 培地 (Merck KGaA) で培養 (5% CO₂, 37 °C) した.

神経突起伸長

Collagen Type I coated Microplate 24 well (AGC テクノグラス株式会社, 静岡) に PC12 細胞 1.0×10^5 cells/400 µL/well を播種し, 24 時間培養後, 被験物質および NGF (Rat beta-NGF Mab, 終濃度 1 および 2 ng/mL, 50 ng/mL) (R&D SYSTEMS, Inc., Minneapolis, MN, USA) を添加した. さらに 48 時間培養後, 検鏡および写真撮影をおこない (オリンパス株式会社, 東京), 全細胞数および細胞の直径以上の突起伸長を認めた細胞数をカウントし, その割合を算出した. 被験物質は DMSO (東京化成工業株式会社, 東京) に溶解し, 培地添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

比較対照物質として donepezil (東京化成工業株式会社) を使用した.

細胞毒性

96 well マイクロプレート (Thermo Fisher Scientific) に PC12 細胞 2.5×10^4 cells/100 µL/well を播種し, 24 時間培養後, 被験物質および NGF (Rat beta-NGF Mab, 終濃度 1 および 2 ng/mL, 50 ng/mL) (R&D SYSTEMS, Inc.) を添加した. さらに 45 時間培養後, WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] (株式会社 同仁化学研究所, 熊本) を 10 µL ずつ添加した. 3 時間培養後, 生成した WST-8 ホルマザンの吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000, コロナ電気株式会社, 茨城) にて測定した (測定波長 : 450 nm, 参照波長 : 655 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

第三節 第一項の実験

花部含有成分の抽出単離

Lawsonia inermis の乾燥花部 (2.0 kg) をメタノール (MeOH) (ナカライテスク株式会社) で熱時 (80 °C) 抽出した. 抽出液を濾過し, 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を 3 回行った. メタノール抽出液を合わせて減圧下溶媒留去し, 花部メタノール抽出エキスを (636.5 g, 収率 31.8%) を得た.

得られたメタノール抽出エキスのうち 200.0 g を酢酸エチル (EtOAc) (ナカライテスク株式会社) と水 (H₂O) で分配抽出後, 得られた水可溶性画分を 1-ブタノール (1-BuOH) (ナカライテスク株式会社) でさらに分配抽出し, 各可溶性画分を減圧下溶媒留去して, 酢酸エチル可溶性画分 (86.9 g, 収率 13.8%), 1-ブタノール可溶性画分 (77.0 g, 収率 12.3%) および水可溶性画分 (36.2 g, 収率 5.7%) を得た.

得られた酢酸エチル可溶性画分 (80.5 g) を順相 silica-gel column chromatography [4.2 kg, Hexane (ナカライテスク株式会社) : EtOAc = (10 : 1) → (2 : 1) → (1 : 2) → CHCl₃ : MeOH = (10 : 1) → CHCl₃ (ナカライテスク株式会社) : MeOH : H₂O = (65 : 35 : 10) → MeOH] で分画し, Fr. EA1 (3.1 g), Fr. EA2 (2.0 g), Fr. EA3 (0.7 g), Fr. EA4 (0.2 g), Fr. EA5 (2.1 g), Fr. EA6 (1.5 g), Fr. EA7 (2.6 g), Fr. EA8 (0.2 g), Fr. EA9 (5.5 g), Fr. EA10 (0.5 g), Fr. EA11 (6.1 g), Fr. EA12 (1.1 g), Fr. EA13 (3.9 g), Fr. EA14 (27.2 g), Fr. EA15 (3.8 g) および Fr. EA16 (19.4 g) を得た.

Fr. EA7 (10.5 mg) を HPLC [column; YMC-Pack ODS-A, eluent; MeOH : H₂O = (55 : 45)] を用いて分離精製し, luteolin (**7**, 5.8 mg, 0.24%), (±)-eriodictyol (**6**, 1.0 mg, 0.042%) および quercetin (**12**, 2.4 mg, 0.10%) を単離した.

Fr. EA11 (1.1 g) のメタノール可溶部を HPLC [column; YMC-Pack ODS-A, eluent; MeOH : H₂O = (60 : 40)] を用いて分離精製し, luteolin (**7**, 3.7 mg, 0.0037%) を単離した.

Fr. EA14 (27.2 g) を逆相 ODS column chromatography [900 g, MeOH : H₂O = (20 : 80) → (40 : 60) → (60 : 40) → (80 : 20) → MeOH] にて分画し, Fr. EA14-1 (18.1 g), Fr. EA14-2 (2.6 g), Fr. EA14-3 (2.4 g), Fr. EA14-4 (0.7 g), Fr. EA14-5 (0.9 g), Fr. EA14-6 (0.2 g) および Fr. EA14-7 (0.9 g) を得た.

Fr. EA14-3 (34.3 mg) を HPLC [column; YMC-Pack ODS-A, eluent; MeOH : H₂O = (45 : 55)] を用いて分離精製し, luteoloside (**11**, 2.6 mg, 0.032%), quercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**14**, 6.6 mg, 0.080%), spiraeoside (**13**, 3.0 mg, 0.037%), luteolin 4'-*O*-β-D-glucopyranoside (**8**, 11.4 mg, 0.14%), diosmetin 3'-*O*-β-D-glucopyranoside (**9**, 1.1 mg, 0.013%) および 4'-*O*-methylquercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**15**, 6.3 mg, 0.077%) を単離した.

Fr. EA14-5 (0.7 g) を HPLC [column; YMC-Pack ODS-A, eluent; MeOH : H₂O = (50 : 50)] を用いて分離精製し, moldavoside (**10**, 3.0 mg, 0.00063%) を単離した.

得られた 1-ブタノール可溶性画分 (75.0 g) を順相 silica-gel column chromatography [375 g, $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = (10 : 3 : 1) \rightarrow (7 : 3 : 1) \rightarrow (6 : 4 : 1) \rightarrow (5 : 5 : 1) \rightarrow \text{MeOH}$] で分画し, Fr. B1 (2.7 g), Fr. B2 (11.0 g) および Fr. B3 (61.3 g) を得た.

Fr. B2 (8.0 g) を逆相 ODS column chromatography [800 g, $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = (20 : 80) \rightarrow (30 : 70) \rightarrow (40 : 60) \rightarrow \text{MeOH}$] にて分画し, Fr. B2-1 (1299.4 mg), Fr. B2-2 (271.0 mg), Fr. B2-3 (878.9 mg), Fr. B2-4 (270.6 mg), Fr. B2-5 (571.9 mg), Fr. B2-6 (133.4 mg), Fr. B2-7 (95.2 mg), Fr. B2-8 (67.7 mg), Fr. B2-9 (65.8 mg), Fr. B2-10 (78.6 mg), Fr. B2-11 (294.1 mg), Fr. B2-12 (154.5 mg), Fr. B2-13 (98.9 mg), Fr. B2-14 (85.1 mg), Fr. B2-15 (94.9 mg), Fr. B2-16 (445.2 mg), Fr. B2-17 (561.8 mg), Fr. B2-18 (638.1 mg), Fr. B2-19 (278.2 mg), Fr. B2-20 (65.1 mg), Fr. B2-21 (50.2 mg), Fr. B2-22 (38.5 mg), Fr. B2-23 (43.0 mg) および Fr. B2-24 (1419.9 mg) を得た.

Fr. B2-2 (268.7 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; CH_3CN (ナカライテスク株式会社) : $\text{H}_2\text{O} = (10 : 90)$] を用いて分離精製し, lalioside (**3**, 49.5 mg, 0.011%), 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**, 12.4 mg, 0.0028%) を単離した.

Fr. B2-4 (267.6 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = (10 : 90)$] を用いて分離精製し, 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*- β -D-glucopyranoside (**4**, 48.5 mg, 0.011%) を単離した.

Fr. B2-11 (291.4 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = (20 : 80)$] を用いて分離精製し, polygoacetophenoside (**5**, 14.6 mg, 0.0033%) を単離した.

Fr. B2-17 (554.0 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; $\text{MeOH} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = (5 : 20 : 75)$] を用いて分離精製し, quercetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside (**14**, 17.5 mg, 0.0040%) および luteolin 4'-*O*- β -D-glucopyranoside (**8**, 50.5 mg, 0.012%) を単離した.

Fr. B3 (30.0 g) を逆相 ODS column chromatography [3.0 kg, $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = (20 : 80) \rightarrow (30 : 70) \rightarrow (40 : 60) \rightarrow (60 : 40) \rightarrow \text{MeOH}$] にて分画し, Fr. B3-1 (7037.0 mg), Fr. B3-2 (1168.4 mg), Fr. B3-3 (960.5 mg), Fr. B3-4 (810.5 mg), Fr. B3-5 (1678.8 mg), Fr. B3-6 (479.9 mg), Fr. B3-7 (359.9 mg), Fr. B3-8 (450.5 mg), Fr. B3-9 (220.8 mg), Fr. B3-10 (1116.3 mg), Fr. B3-11 (1244.0 mg), Fr. B3-12 (959.0 mg), Fr. B3-13 (835.0 mg), Fr. B3-14 (690.3 mg), Fr. B3-15 (2326.8 mg), Fr. B3-16 (1731.1 mg), Fr. B3-17 (834.5 mg), Fr. B3-18 (484.2 mg), Fr. B3-19 (419.1 mg), Fr. B3-20 (2363.4 mg), Fr. B3-21 (752.7 mg), Fr. B3-22 (244.5 mg), Fr. B3-23 (119.2 mg), Fr. B3-24 (112.0 mg), Fr. B3-25 (1426.5 mg), Fr. B3-26 (774.6 mg), Fr. B3-27 (251.2 mg) および Fr. B3-28 (149.3 mg) を得た.

Fr. B3-5 (1.5 g) を順相 silica-gel column chromatography [150 g, $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = (10 : 3 : 1) \rightarrow (7 : 3 : 1) \rightarrow (6 : 4 : 1) \rightarrow (5 : 5 : 1) \rightarrow \text{MeOH}$] で分画し, Fr. B3-5-1 (5.0 mg), Fr. B3-5-2 (3.2 mg), Fr. B3-5-3 (7.6 mg), Fr. B3-5-4 (19.7 mg), Fr. B3-5-5 (15.1 mg), Fr. B3-5-6 (14.3 mg), Fr. B3-5-7 (15.0 mg), Fr. B3-5-8 (12.0 mg), Fr. B3-5-9 (11.6 mg), Fr. B3-5-10 (104.2 mg), Fr. B3-5-11 (102.3 mg), Fr. B3-5-12 (42.2 mg), Fr. B3-5-13 (24.8 mg), Fr. B3-5-14 (42.0 mg), Fr. B3-5-15 (22.4 mg), Fr. B3-5-16 (8.8 mg), Fr. B3-5-17 (5.4 mg), Fr. B3-5-18 (6.2 mg), Fr. B3-5-19 (87.5 mg), Fr. B3-5-20 (48.5 mg), Fr. B3-5-21 (39.2 mg), Fr. B3-5-22 (55.5 mg), Fr. B3-5-23 (150.6 mg), Fr. B3-5-24 (57.4 mg), Fr. B3-5-25 (44.1 mg), Fr. B3-5-26 (65.8 mg), Fr. B3-5-27 (126.4 mg), Fr. B3-5-28 (30.1 mg), Fr. B3-5-29 (52.1 mg) および Fr. B3-5-30 (281.0 mg) を得た.

Fr. B3-5-10 (102.4 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; CH₃CN : H₂O = (15 : 85)] を用いて分離精製し, 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*-β-D-glucopyranoside (**4**, 73.9 mg, 0.028%) を単離した.

Fr. B3-5-11 (100.5 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; CH₃CN : H₂O = (10 : 90)] を用いて分離精製し, lalioside (**3**, 26.3 mg, 0.010%), 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*-β-D-glucopyranoside (**4**, 31.3 mg, 0.012%) を単離した.

Fr. B3-6 (476.1 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; CH₃CN : H₂O = (10 : 90)] を用いて分離精製し, inermioside A (**2**, 11.6 mg, 0.0039%), 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*-β-D-glucopyranoside (**4**, 46.7 mg, 0.016%) を単離した.

Fr. B3-7 (347.3 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-PAQ, eluent; CH₃CN : H₂O = (10 : 90)] を用いて分離精製し, inermioside A (**2**, 7.5 mg, 0.0026%), 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*-β-D-glucopyranoside (**4**, 28.2 mg, 0.0098%) を単離した.

第三節 第二項の実験

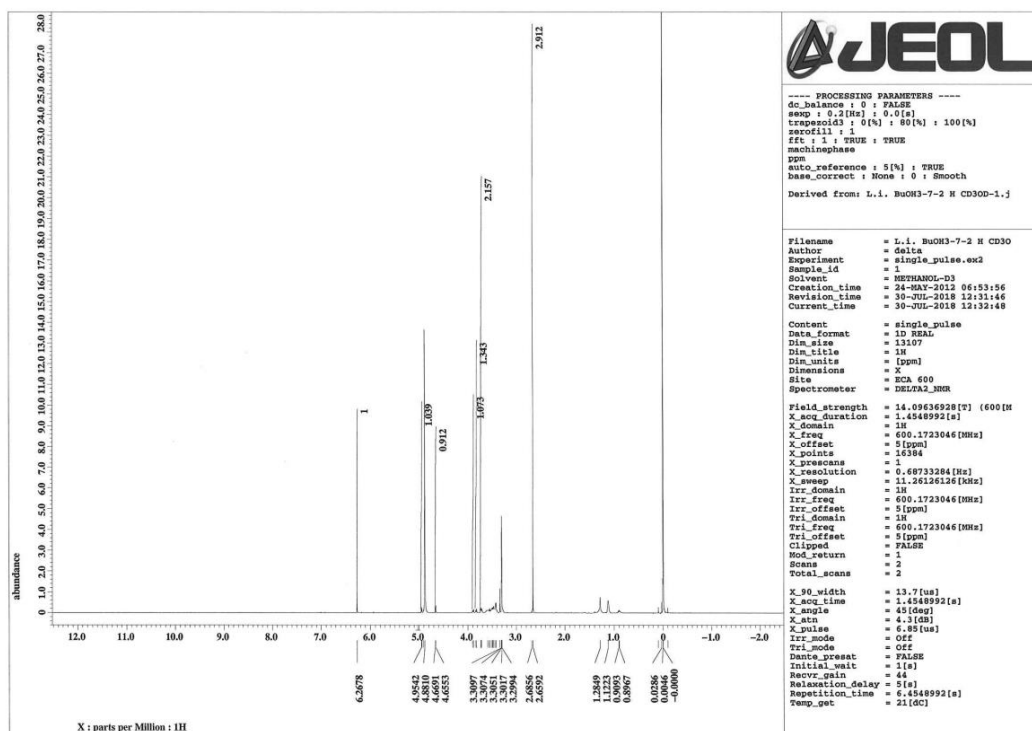
Inermioside A (2) の構造解析

Inermioside A (2): 淡黄色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{30} -43.2^\circ$ ($c = 0.2$, EtOH); IR (KBr): ν_{\max} 3400, 1710, 1626, 1073 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4 , 600 MHz) および $^{13}\text{C-NMR}$ (methanol- d_4 , 150 MHz): Table 5 に記載; positive-ion FAB-MS: m/z 531 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; High-resolution positive-ion FAB-MS: m/z 531.1329 (Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{15}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: m/z 531.1326).

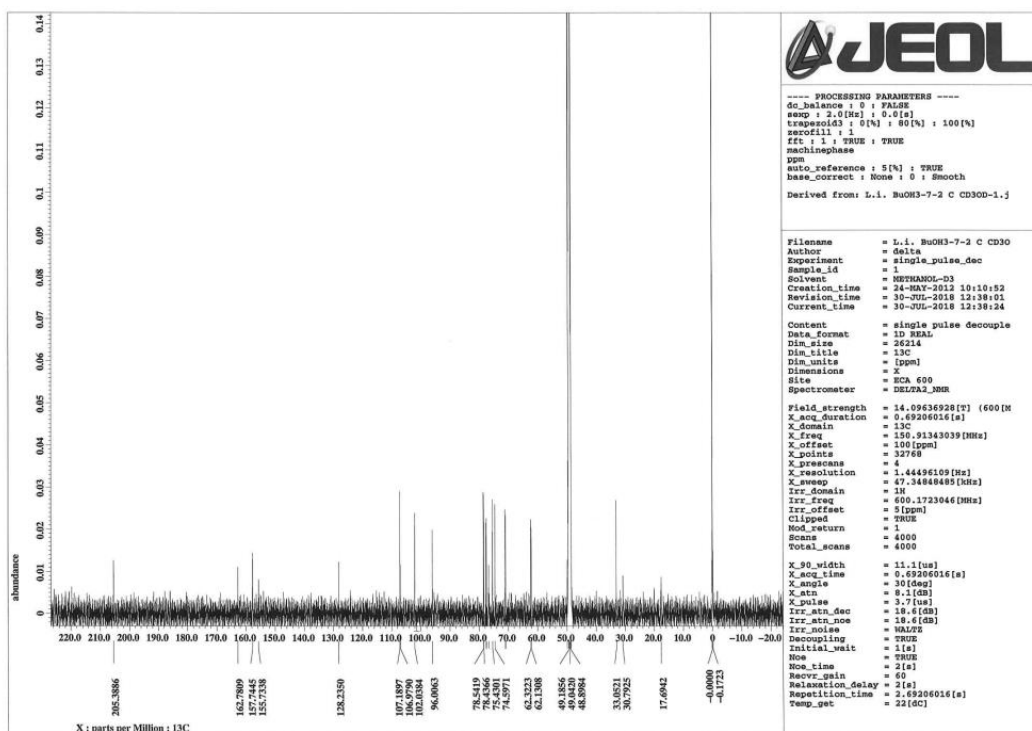
Inermioside A (2) の構成糖の同定

Inermioside A (2, 1.0 mg) をとり, 5% aqueous H_2SO_4 -1,4-dioxane (1 : 1, v/v, 1.0 mL) に溶解し, 90 °C で 3 時間反応させた. その後, 酢酸エチルを加え, 軽く振り静置し, 二層に分離した酢酸エチル層を取り除き, 同様の操作を 5 回繰り返した. さらに炭酸水素ナトリウム溶液を加え, pH 7–8 に調節し, 減圧下溶媒留去した. 得られた生成物を L-cystein methyl ester hydrochloride の pyridine 溶液 (5.0 mg/mL, 0.1 mL) に溶解し, 60 °C で 1 時間反応させた. その後, *o*-torylisothiocyanate の pyridine 溶液 (5.0 mg/mL, 0.1 mL) を加え, さらに 60 °C で 1 時間反応させ, 構成糖をジアステレオマー誘導体化した. 反応液を HPLC [column: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (ナカライテスク株式会社), 4.6 × 250 mm, i.d.; mobile phase: CH_3CN : aqueous H_3PO_4 = (18 : 82, v/v, pH 2.5); detection: UV (250 nm); flow rate: 0.8 mL/min; column temperature: 35 °C] で分析し, 単糖標品との保持時間 (t_R) の比較 [L-glucose (t_R 46.4 min) および D-glucose (t_R 51.6 min)] により, 絶対立体配置を含めた構成糖の同定を行った.

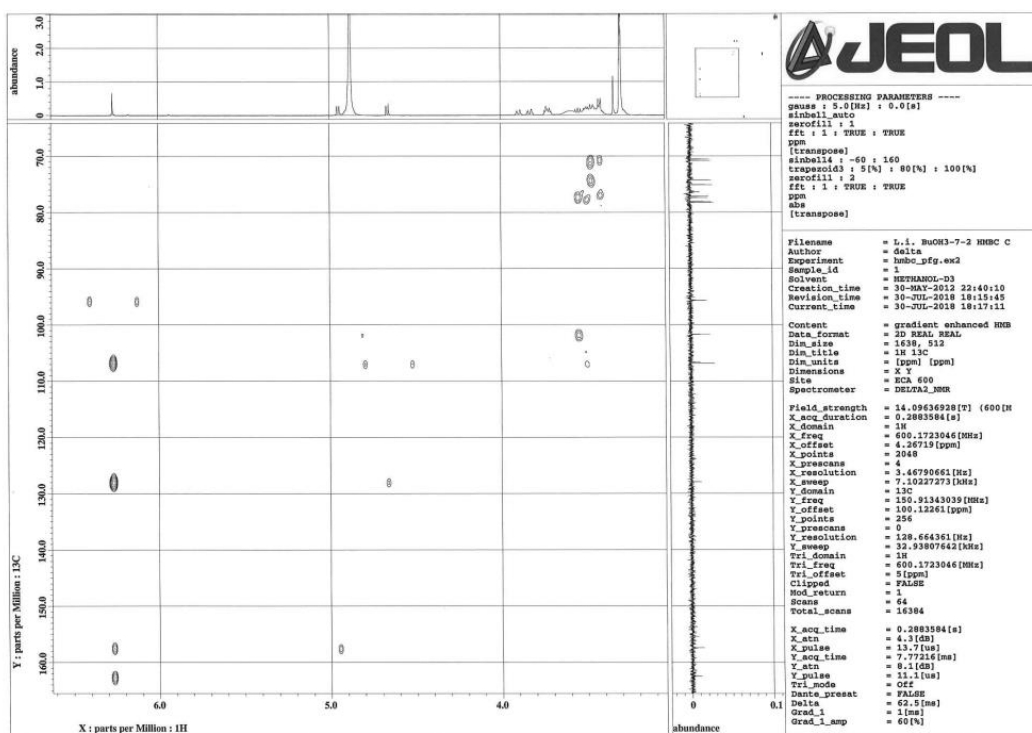
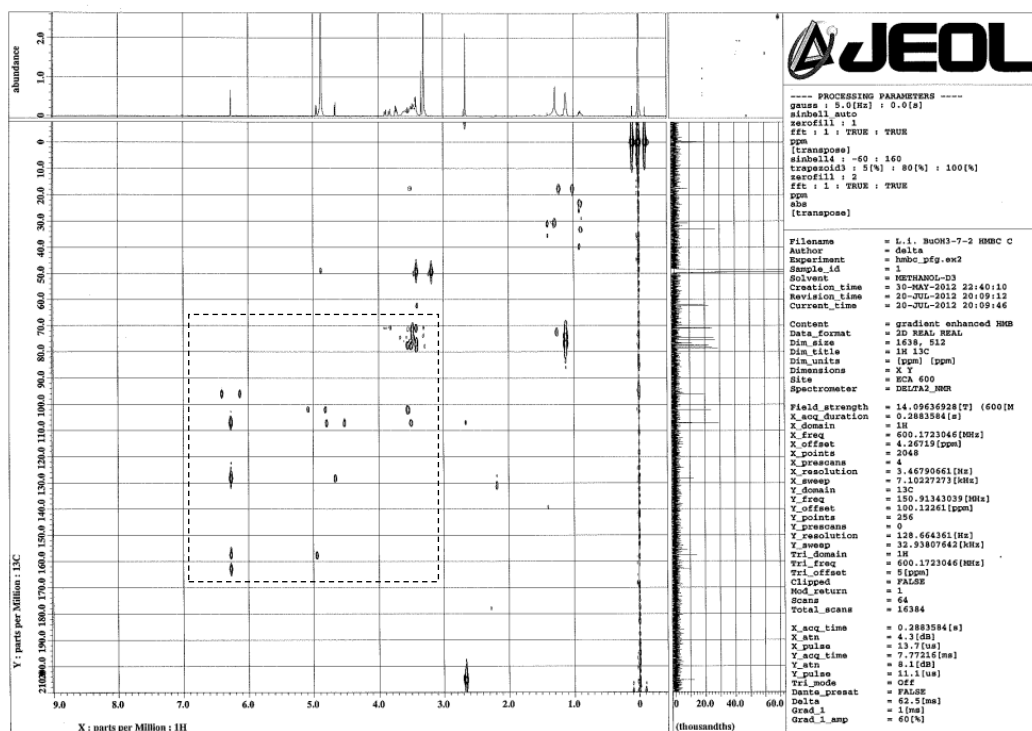
Inermioside A (2) の構造決定に関するスペクトルデータ



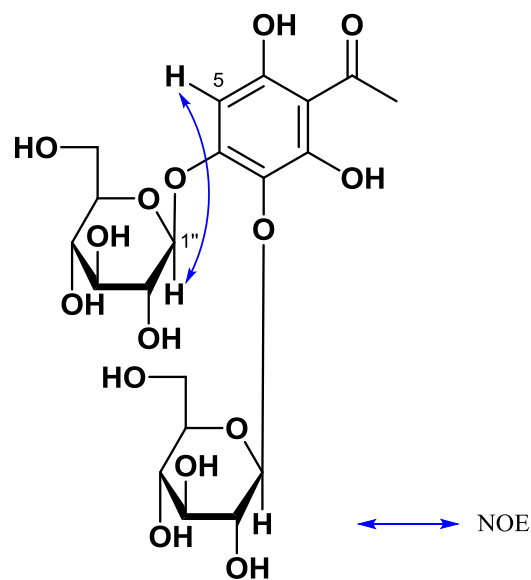
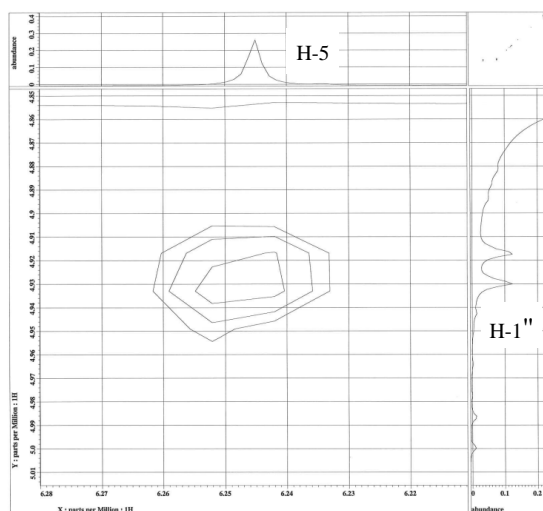
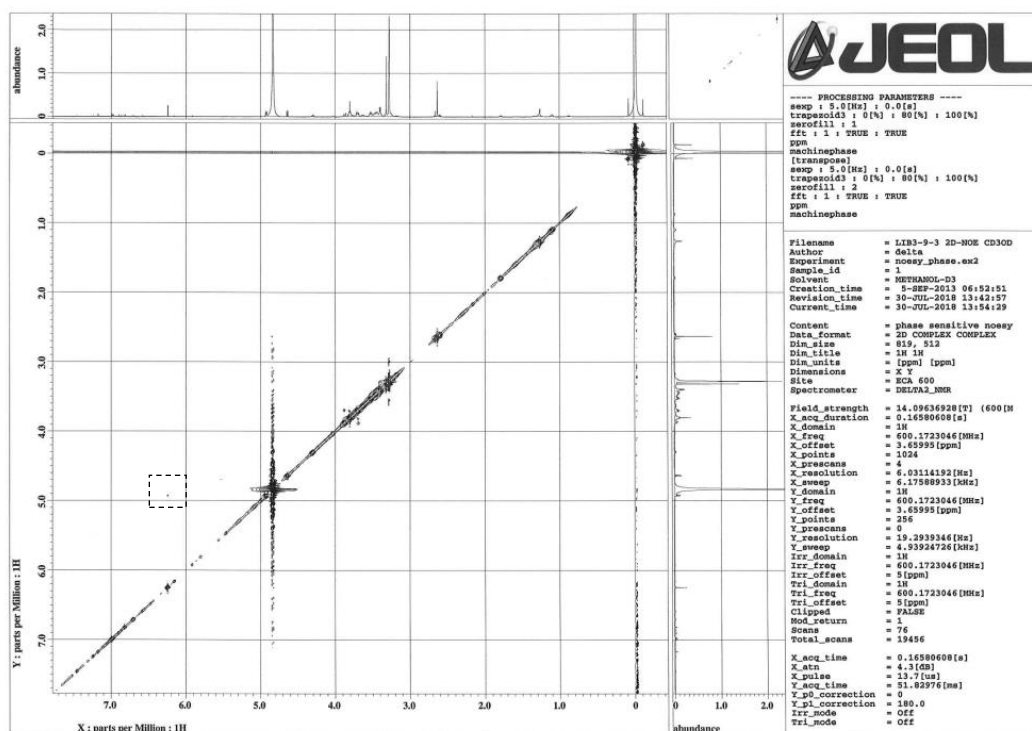
Inermioside A (2) の ^1H -NMR (600 MHz) データ (測定溶媒 : CD_3OD)



Inermioside A (2) の ^{13}C -NMR (150 MHz) データ (測定溶媒 : CD_3OD)



Inermioside A (2) の HMBC データ (測定溶媒 : CD₃OD)



Inermioside A (2)

Inermioside A (2) の NOE データ (測定溶媒 : CD₃OD)

第三節 第三項の実験

枝部含有成分の抽出単離

Lawsonia inermis の乾燥枝部 (7.0 kg) をメタノール (MeOH) (ナカライテスク株式会社) で熱時 (80 °C) 抽出した. 抽出液を濾過し, 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を 3 回行った. メタノール抽出液を合わせて減圧下溶媒留去し, 枝部メタノール抽出エキスを (418.3 g, 収率 6.0%) を得た.

得られたメタノール抽出エキスのうち 300.0 g を酢酸エチル (EtOAc) (ナカライテスク株式会社) と水 (H₂O) で分配抽出後, 得られた水可溶性画分を 1-ブタノール (1-BuOH) (ナカライテスク株式会社) でさらに分配抽出し, 各移行部を減圧下溶媒留去して, 酢酸エチル可溶性画分 (57.3 g, 収率 1.1%), 1-ブタノール可溶性画分 (60.3 g, 収率 1.2%) および水可溶性画分 (182.4 g, 収率 3.6%) を得た.

得られた酢酸エチル可溶性画分 (50.0 g) を順相 silica-gel column chromatography [1.5 kg, Hexane (ナカライテスク株式会社) : EtOAc = (10 : 1) → (7 : 1) → (5 : 1) → (3 : 1) → EtOAc → CHCl₃ (ナカライテスク株式会社) : MeOH = (30 : 1) → (20 : 1) → (10 : 1) → (5 : 1) → (1 : 1) → MeOH] で分画し, Fr. EA1 (1.5 g), Fr. EA2 (1.2 g), Fr. EA3 (0.6 g), Fr. EA4 (0.8 g), Fr. EA5 (2.3 g), Fr. EA6 (4.5 g), Fr. EA7 (0.8 g), Fr. EA8 (5.7 g), Fr. EA9 (2.4 g), Fr. EA10 (2.7 g), Fr. EA11 (5.1 g), Fr. EA12 (8.4 g), Fr. EA13 (1.2 g), Fr. EA14 (1.1 g), Fr. EA15 (2.2 g), Fr. EA16 (5.5 g), Fr. EA17 (2.7 g) および Fr. EA18 (1.2 g) を得た.

Fr. EA15 (2.2 g) を逆相 ODS column chromatography [130.8 g, MeOH : H₂O = (40 : 60) → (50 : 50) → (60 : 40) → (70 : 30) → (80 : 20) → (90 : 10) → MeOH] にて分画し, Fr. EA15-1 (12.9 mg), Fr. EA15-2 (69.4 mg), Fr. EA15-3 (131.9 mg), Fr. EA15-4 (229.6 mg), Fr. EA15-5 (247.4 mg), Fr. EA15-6 (175.1 mg), Fr. EA15-7 (150.7 mg), Fr. EA15-8 (165.3 mg), Fr. EA15-9 (16.8 mg), Fr. EA15-10 (47.4 mg), Fr. EA15-11 (47.3 mg), Fr. EA15-12 (47.9 mg), Fr. EA15-13 (60.8 mg), Fr. EA15-14 (200.0 mg), Fr. EA15-15 (420.0 mg) および Fr. EA15-16 (157.6 mg) を得た.

Fr. EA15-3 (131.9 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (25 : 75)] を用いて分離精製し, 2-[4-(3-hydroxypropyl)-2-methoxyphenoxy]-propane-1,3-diol (**16**, 5.4 mg, 0.00012%), (+)-lyoniresinol (**17**, 19.8 mg, 0.00045%) を単離した.

得られた 1-ブタノール可溶性画分 (50.0 g) を順相 silica-gel column chromatography [1.5 kg, CHCl₃ : MeOH : H₂O = (30 : 3 : 1) → (10 : 3 : 1) → (7 : 3 : 1) → (6 : 4 : 1) → (5 : 5 : 1) → MeOH] で分画し, Fr. B1 (2.8 g), Fr. B2 (1.0 g), Fr. B3 (2.4 g), Fr. B4 (1.5 g), Fr. B5 (3.0 g), Fr. B6 (3.0 g), Fr. B7 (15.8 g), Fr. B8 (10.5 g), Fr. B9 (5.8 g) および Fr. B10 (4.1 g) を得た.

Fr. B3 (2.4 g) を逆相 ODS column chromatography [117.5 g, MeOH : H₂O = (30 : 70) → (40 : 60) → (50 : 50) → (60 : 40) → (70 : 30) → (80 : 20) → MeOH] にて分画し, Fr. B3-1 (685.2 mg), Fr. B3-2 (322.9 mg), Fr. B3-3 (226.4 mg), Fr. B3-4 (55.0 mg), Fr. B3-5 (127.4 mg), Fr. B3-6 (120.9 mg),

Fr. B3-7 (110.7 mg), Fr. B3-8 (76.8 mg), Fr. B3-9 (74.0 mg), Fr. B3-10 (42.5 mg), Fr. B3-11 (41.6 mg), Fr. B3-12 (22.3 mg) および Fr. B3-13 (444.5 mg) を得た.

Fr. B3-8 (76.8 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (50 : 50)] を用いて分離精製し, butylconiferin (**18**, 5.6 mg, 0.00014%) を単離した.

Fr. B5 (3.0 g) を逆相 ODS column chromatography [150.0 g, MeOH : H₂O = (30 : 70) → (40 : 60) → (50 : 50) → (60 : 40) → (70 : 30) → (80 : 20) → MeOH] にて分画し, Fr. B5-1 (984.0 mg), Fr. B5-2 (314.9 mg), Fr. B5-3 (209.3 mg), Fr. B5-4 (334.3 mg), Fr. B5-5 (164.9 mg), Fr. B5-6 (226.6 mg), Fr. B5-7 (106.5 mg), Fr. B5-8 (50.6 mg), Fr. B5-9 (86.5 mg), Fr. B5-10 (33.0 mg), Fr. B5-11 (23.6 mg), Fr. B5-12 (36.3 mg), Fr. B5-13 (28.4 mg), Fr. B5-14 (18.2 mg), Fr. B5-15 (21.8 mg) および Fr. B5-16 (401.2 mg) を得た.

Fr. B5-2 (314.9 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (20 : 80)] を用いて分離精製し, 2,4,6-trihydroxyacetophenone 2-*O*-β-D-glucopyranoside (**4**, 21.3 mg, 0.00051%) を単離した.

Fr. B5-5 (164.9 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (40 : 60)] を用いて分離精製し, quercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**14**, 4.7 mg, 0.00011%) を単離した.

Fr. B5-6 (226.6 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (40 : 60)] を用いて分離精製し, quercetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**14**, 30.6 mg, 0.00074%) を単離した.

Fr. B6 (3.0 g) を逆相 ODS column chromatography [150.0 g, MeOH : H₂O = (20 : 80) → (30 : 70) → (40 : 60) → (50 : 50) → (60 : 40) → (70 : 30) → (80 : 20) → MeOH] にて分画し, Fr. B6-1 (631.3 mg), Fr. B6-2 (853.2 mg), Fr. B6-3 (259.5 mg), Fr. B6-4 (126.5 mg), Fr. B6-5 (92.6 mg), Fr. B6-6 (123.3 mg), Fr. B6-7 (123.6 mg), Fr. B6-8 (70.5 mg), Fr. B6-9 (71.3 mg), Fr. B6-10 (36.1 mg), Fr. B6-11 (72.1 mg), Fr. B6-12 (41.2 mg) および Fr. B6-13 (528.7 mg) を得た.

Fr. B6-3 (259.5 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (20 : 80)] を用いて分離精製し, 4-hydroxy-2-methoxyphenol 1-*O*-β-D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**19**, 60.0 mg, 0.0014%) および 4-hydroxy-2,6-dimethoxyphenol 1-*O*-β-D-(6'-*O*-galloyl)glucopyranoside (**20**, 39.8 mg, 0.00096%) を単離した.

Fr. B6-6 (123.3 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (28 : 72)] を用いて分離精製し, myricetin 3-*O*-β-D-glucopyranoside (**22**, 5.8 mg, 0.00014%) を単離した.

Fr. B6-7 (123.6 mg) を HPLC [column; COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, eluent; MeOH : H₂O = (35 : 65)] を用いて分離精製し, quercetin 7-*O*-β-D-glucopyranoside (**21**, 10.8 mg, 0.00026%) を単離した.

第三節 第四項の実験

移動相および標準品の調製

測定時の移動相として 30 : 70 = アセトニトリル (LC-MS grade) (富士フイルム和光純薬株式会社) : 水を混合し、ギ酸 (LC-MS grade) (富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて pH 3.0 に調製した。作製した移動相を用いて luteolin を 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 および 0.05 µg/mL に, quercetin を 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 および 0.1 µg/mL に調製し, 0.45 µm フィルター (ナカライテスク株式会社) を用いて濾過した後, 標準品として使用した。

サンプルの調製

Luteolin および quercetin 含有量測定のために, 花部メタノール抽出エキスを, 葉部メタノール抽出エキスおよび枝部メタノール抽出エキスを, 測定時の移動相である 30%アセトニトリル溶液 (pH 3.0) を用いて, luteolin 測定時は 0.005, 0.2, 0.2 mg/mL に, quercetin 測定時は 0.05, 8, 0.5 mg/mL に調製し, 0.45 µm フィルターを用いて濾過した後, サンプル溶液として使用した。

分析条件

各濃度に調製した luteolin, quercetin, 花部メタノール抽出エキス, 葉部メタノール抽出エキスおよび枝部メタノール抽出エキスは LC 測定条件および MS 測定条件に示す方法で測定した。

LC 測定条件

カラム	YMC-Pack ODS-A (4.6 × 250 mm, i.d.)
移動相	30 : 70 = CH ₃ CN : H ₂ O (pH 3.0)
流速	1.0 mL/min
検出波長	254 nm
カラムオーブン温度	40 °C
サンプル注入量	10 µL

MS 測定条件 : 選択的イオン検出法 (SIM)

サンプル	Luteolin	Quercetin
測定イオン	285 [M-H] ⁻	301 [M-H] ⁻
Nebulizer gas	3 L/min	
Drying gas	15 L/min	
Desolvation line (DL) 温度	250 °C	
Heat block (HB) 温度	400 °C	

検量線

標準品として調製した各濃度の luteolin および quercetin から得られたピーク面積を基に検量線を求めた.

Luteolin の検量線

平均検出時間 (min)	9.9
検量線の回帰式	$y = 3.70 \times 10^7 x - 4.71 \times 10^3$ ($R^2 = 1.000$)
検出限界 (LOD)	0.001 $\mu\text{g/mL}$
定量下限 (LOQ)	0.002 $\mu\text{g/mL}$

Quercetin の検量線

平均検出時間 (min)	10.1
検量線の回帰式	$y = 1.57 \times 10^7 x - 3.07 \times 10^3$ ($R^2 = 1.000$)
検出限界 (LOD)	0.001 $\mu\text{g/mL}$
定量下限 (LOQ)	0.004 $\mu\text{g/mL}$

Polygoacetophenoside の定性分析条件

カラム	YMC-Pack ODS-A (4.6 \times 250 mm, i.d.)
移動相	15 : 85 = CH ₃ CN : H ₂ O
流速	1.0 mL/min
検出波長	283 nm
サンプル濃度	15 mg/mL
サンプル注入量	10 μL

第五節の実験

real-time PCR

Collagen Type I coated Microplate 6 well (AGC テクノグラス株式会社) に PC12 細胞を 5.0×10^5 cells/2 mL/well を播種し, 24 時間培養後, 被験物質および NGF (Rat beta-NGF Mab, 終濃度 1 ng/mL, 50 ng/mL) (R&D SYSTEMS, Inc.) を添加した. さらに 48 時間培養後, Pure Link™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて総 RNA を抽出し, 260 および 280 nm の吸光度から濃度と純度を測定した. 50 ng の RNA から Rever Tra Ace® qPCR RT Kit (東洋紡株式会社, 大阪) を用いて作成された cDNA に各プライマーと THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (東洋紡株式会社) を添加し, LightCycler® Nano (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京) 内で PCR 反応を行った. 変性 (95 °C, 2 分) 後, 次のサイクルを 40 サイクル行った. 変性 (95 °C, 30 秒), アニーリング (58 °C, 30 秒), 伸長 (72 °C, 30 秒)

各々の遺伝子産物量は β -actin mRNA を指標とした相対量で評価を行った.

Gene		Primer Sequence
Ntrk1	Sense	5'-GTCTGGTGGGTCAGGGACTA-3'
	Antisense	5'-GGGTTGCTTTCCATAGGTGA-3'
Vav3	Sense	5'-CAACCTGAGACCCCAGATGT-3'
	Antisense	5'-TCGGGATAGGCGAGATAATG-3'
Rac1	Sense	5'-TCATCCTAGTGGGGACGAAG-3'
	Antisense	5'-CAGCAGGCATTTTCTCTTCC-3'
β -Actin	Sense	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'
	Antisense	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'

引用文献

- 1) 第十七改正日本薬局方, 厚生労働省: 東京, 2016.
- 2) スタンダード薬学シリーズII 3, 東京化学同人: 東京, 2017.
- 3) Yadav, H. K.; Shukla, S.; Singh, S. P. Genetic variability and interrelationship among opium and its alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Euphytica* **2006**, *150*, 207–214.
- 4) Nergiz, C.; Ötles, S. The proximate composition and some minor constituents of poppy seeds. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, *66*, 117–120.
- 5) Okada, M.; Wada, H.; Terabayashi, S.; Kondou, K. *Newly revised illustrated medicinal plants of the world*. Hokuryukan: Tokyo, 2002.
- 6) Ashnagar, A.; Shiri, A. Isolation and characterization of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) from the powdered leaves of henna plant marketed in Ahwaz city of Iran. *Int. J. ChemTech Res.* **2011**, *3*, 1941–1944.
- 7) Mikhaeil, B. R.; Badria, F. A.; Maatooq, G. T.; Amer M. M. A. Antioxidant and immunomodulatory constituents Henna leaves. *Z. Naturforsch.* **2004**, *59c*, 468–476.
- 8) Hsouna, A. B.; Trigui, M.; Culioli, G.; Blache, Y.; Haoua, S. Antioxidant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. *Food Chem.* **2001**, *125*, 193–200.
- 9) Takeda, Y.; Fatope, M. O. New phenolic glucosides from *Lawsonia inermis*. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 725–729.
- 10) Cuong, N. X.; Nhiem, N. X.; Thao, N. P.; Nam, N. H.; Dat, N. T.; Anh, H. L. T.; Huong, L. M.; Kiem, P. V.; Minh, C. V.; Won, J.; Chung, W.; Kim, Y. H. Inhibitors of osteoclastogenesis from *Lawsonia inermis* leaves. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4782–4784.
- 11) Saadabi, A. M. A. Evaluation of *Lawsonia inermis* Linn. (Sudanese Henna) leaf extracts as an antimicrobial agent. *Res. J. Biol. Sci.* **2007**, *2*, 419–423.
- 12) Saikia, A.; Purkayastha, A.; Tigga, R.; Roy, D. Anticonvulsant activity of the methanolic extract of *Lawsonia inermis* leaves in albino rats. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2016**, *7*, 3068–3072.
- 13) Mohamed, M. A.; Eldin, I. M. T.; Mohammed, A. H.; Hassan, H. M. Effects of *Lawsonia inermis* L. (Henna) leaves' methanolic extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *J. Intercult. Ethnopharmacol.* **2016**, *5*, 22–26.
- 14) Kishikawa, N.; Kuroda, N. Chemiluminescence assay for the investigation of reactive oxygen species generator. *Yakugaku zasshi* **2015**, *135*, 191–196.
- 15) Honda, S.; Masuda, T. Polyphenols: functional chemicals based on their chemical reactions, from antioxidation to inter-substance reactions. *化学と生物* **2015**, *53*, 442–448.
- 16) Hatanaka, C.; Omura H.; Nomura, D. Studies on the indophenol reducing substances in the reaction system of *p*-benzoquinone and amino acid. *日本農芸化学会誌* **1972**, *46*, 341–347.

- 17) Zheng, J.; Hammock, B. D. Development of polyclonal antibodies for detection of protein modification by 1,2-naphthoquinone. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 904–909.
- 18) Cao, K.; Stack, D. E.; Ramanathan, R.; Gross, M. L.; Rogan, E. G.; Cavalieri, E. L. Synthesis and structure elucidation of estrogen quinones conjugated with cysteine, *N*-acetylcysteine, and glutathione. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 909–916.
- 19) Elgawish, M. S.; Shimomai, C.; Kishikawa, N.; Ohyama, K.; Wada, M.; Kuroda, N. Development and validation of the first assay method coupling liquid chromatography with chemiluminescence for the simultaneous determination of menadione and its thioether conjugates in rat plasma. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1409–1417.
- 20) Saeed, S. M. G.; Sayeed, S. A.; Ashraf, S.; Naz, S.; Siddiqi, R.; Ali, R.; Mesaik, M. A. A new method for the isolation and purification of lawsone from *Lawsonia inermis* and its ROS inhibitory activity. *Pak. J. Bot.* **2013**, *45*, 1431–1436.
- 21) Sauriasari, R.; Wang, D.; Takemura, Y.; Tsutsui, K.; Masuoka, N.; Sano, K.; Horita, M.; Wang, B.; Ogino, K. Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*. *Toxicology* **2007**, *235*, 103–111.
- 22) Nadjib, R.; Zahia, B.; Kebir, B.; Mohammed, B.; Noureddine, C. Antifungal activity of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Pharm. Biol.* **2013**, *51*, 131–135.
- 23) Lee, S.; Chen, Y.; Lin, C.; Chen, K. Hair dyes resorcinol and lawsone reduce production of melanin in melanoma cells by tyrosinase activity inhibition and decreasing tyrosinase and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 1495–1508.
- 24) 原料生薬使用量等調査報告書 (4), 日本漢方生薬製剤協会: 東京, 2016.
- 25) 第一章 高齢化の状況. 平成 29 年版高齢社会白書, 内閣府: 東京, 2017.
- 26) Mizuno, T. Early diagnosis of dementia and protection. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* **2010**, *119*, 425–436.
- 27) Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Ali, G.; Wu, Y.; Prina, M. *World Alzheimer Report 2015*, Alzheimer's disease international: London, 2015.
- 28) 知って安心認知症, 東京都福祉保健局: 東京, 2017.
- 29) Ogura, H.; Kosasa, T.; Araki, S.; Yamanishi, Y. Pharmacological properties of donepezil hydrochloride (Aricept®), a drug for Alzheimer's disease. *Folia Pharmacol. Jpn.* **2000**, *115*, 45–51.
- 30) Yamanishi, Y.; Ueno, M.; Ogura, H. Basic research for Alzheimer's disease drugs. *Folia Pharmacol. Jpn.* **2007**, *130*, 489–493.
- 31) Chen, H. V.; Pellegrini, J. W.; Aggarwai S. K.; Lei, S. Z.; Warach, S.; Jensen, F. E.; Lipton, S. A. Open-channel block of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: Therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 4427–4436.
- 32) Wang, R.; Reddy, H. P. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, *57*, 1041–1048.
- 33) Tokuda, T. Hypothesis of pathogenic mechanisms for the development of Alzheimer's disease: its paradigm shift. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.* **2016**, *125*, 797–804.

- 34) Tamaoka, A. Pathogenesis of Alzheimer's disease with special reference to amyloid β protein. *Nihon Ika Daigaku Igakkai Zasshi* **2012**, 8, 285–290.
- 35) Greene, L. A.; Tischler, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, 73, 2424–2428.
- 36) Chen, P.; Wu, M.; Chang, H.; Tai, M.; Ho, C.; Yen, J. Up-regulation of miR-34a expression in response to the luteolin-induced neurite outgrowth of PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 4148–4159.
- 37) Oda, T.; Kume, T.; Katsuki, H.; Niidome, T.; Sugimoto, H.; Akaike, A. Donepezil potentiates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, 104, 349–354.
- 38) Kudo, T.; Kanetaka, H.; Mizuno, K.; Ryu, Y.; Miyamoto, Y.; Nunome, S.; Zhang, Y.; Kano, M.; Shimizu, Y.; Hayashi, H. Dorsomorphin stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of a protein kinase A-dependent MEK-ERK1/2 signaling pathway. *Genes Cells* **2011**, 16, 1121–1132.
- 39) Kudo, T.; Kanetaka, H.; Shimizu, Y.; Abe, T.; Mori, H.; Mori, K.; Suzuki, E.; Takagi, T.; Izumi, S. Induction of neuritogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling. *Cell Struct. Funct.* **2013**, 38, 15–20.
- 40) Bork, K.; Wurm, F.; Haller, H.; Strauss, C.; Scheller, C.; Gnanapragassam, V. S.; Horstkorte, R. Neuroprotective and neuroregenerative effects of nimodipine in a model system of neuronal differentiation and neurite outgrowth. *Molecules* **2015**, 20, 1003–1013.
- 41) Murase, K.; Nabeshima, T.; Robitaille, Y.; Quirion, R.; Ogawa, M.; Hayashi, K. NGF level is not decreased in the serum, brain-spinal fluid, hippocampus, or parietal cortex of individuals with Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 193, 198–203.
- 42) Lee, K. R.; Hong, S. W.; Kwak, J. H.; Pyo, S.; Jee, O. P. Phenolic constituents from the aerial parts of *Artemisia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.* **1996**, 19, 231–234.
- 43) Yoshizaki, M.; Fujino, H.; Arise, A.; Ohmura, K.; Arisawa, M.; Morita, N. Polygoacetophenoside, A new acetophenone glucoside from *Polygonum multiflorum*. *Planta Med.* **1987**, 53, 273–275.
- 44) Zhang, X.; Hung T. M.; Phuong, P. T.; Ngoc, T. M.; Min, B.; Song, K.; Seong Y. H.; Bae, K. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, 29, 1102–1108.
- 45) Flamini, G.; Antognoli, E.; Morelli, I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry* **2001**, 57, 559–564.
- 46) Kellam, S. J.; Mitchell, K. A.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G.; Walker, J. R. L. Luteolin and 6-hydroxyluteolin glycosides from *Hebe stricta*. *Phytochemistry* **1993**, 33, 867–869.
- 47) Kitanaka, S.; Takido, M. Studies on the constituents of purgative crude drugs. XXIX. Studies on the constituents of the leaves of *Cassia torosa* Cav. III. The structures of two new flavone glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 249–251.

- 48) Li, Y.; Li, J.; Wang, N.; Yao, X. Flavonoids and a new polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd. *Molecules* **2008**, *13*, 1931–1941.
- 49) Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; LaVoie, E. J.; Huang, T.; Ho, C. Antioxidative phenolic compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4869–4873.
- 50) Krasnov, E. A.; Raldugin, V. A.; Shilova, I. V.; Avdeeva, E. Y. Phenolic compounds from *Filipendula ulmaria*. *Chem. Nat. Compd.* **2006**, *42*, 148–151.
- 51) Kajjout, M.; Rolando, C. Regiospecific synthesis of quercetin *O*- β -D-glucosylated and *O*- β -D-glucuronidated isomers. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4731–4741.
- 52) Slimestad, R.; Andersen, Ø. M.; Francis, G. W.; Marston, A.; Hostettmann, K. Syringetin 3-*O*-(6''-acetyl)- β -glucopyranoside and other flavonols from needles of norway spruce, *Picea abies*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1537–1542.
- 53) Fico, G.; Rodondi, G.; Flamini, G.; Passarella, D.; Tomé, F. Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian *Primula* species. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1683–1691.
- 54) Obara, H.; Onodera, J.; Kurihara, Y.; Yamamoto, F. Synthesis of 2',3',4,4',6'-pentahydroxychalcone, an aglycone of carthamin, and its isomerization into 4',5,6,7- and 4',5,7,8-tetrahydroxyflavanone, carthamidin and isocarthamidin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 3627–3630.
- 55) Obara, H.; Onodera, J.; Abe, S. The synthesis of 3'-methoxy-2',4,4',6'- and 2'-methoxy-3',4,4',6'-tetrahydroxychalcone and some quinochalcones and a comparison of them with carthamin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 2596–2599.
- 56) Iinuma, M.; Tanaka, T.; Iwashima, K.; Matsuura, S. Synthesis of flavones by the use of isopropyl as a protective group. *Yakugaku zasshi* **1984**, *104*, 691–694.
- 57) Adams, C. J.; Main, L. Synthesis of 2'-hydroxychalcone epoxides. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4959–4978.
- 58) Brown, G. D. Two new compounds from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1756–1760.
- 59) Deodhar, M.; Black, D. S.; Kumar, N. Acid catalyzed stereoselective rearrangement and dimerization of flavenes: synthesis of dependensin. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5227–5235.
- 60) Tanaka, T.; Nakashima, T.; Ueda, T.; Tomii, K.; Kouno, I. Facile discrimination of aldose enantiomers by reversed-phase HPLC. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 899–901.
- 61) Marino, S. D.; Gala, F.; Zollo, F.; Vitalini, S.; Fico, G.; Visioli, F.; Iorizzi, M. Identification of minor secondary metabolites from the latex of *Croton lechleri* (Muell-Arg) and evaluation of their antioxidant activity. *Molecules* **2008**, *13*, 1219–1229.
- 62) Li, L.; Seeram, N. P. Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11673–11679.
- 63) Fu, L.; Huang, X.; Lai, Z.; Hu, Y.; Liu, H.; Cai, X. A new 3-benzylchroman derivative from Sappan lignum (*Caesalpinia sappan*). *Molecules* **2008**, *13*, 1923–1930.
- 64) Chen, T.; Huang, Y.; Lin, J.; Liau, B.; Wang, S.; Wu, Y.; Jong, T. Cytotoxic lignan esters from *Cinnamomum osmophloeum*. *Planta Med.* **2010**, *76*, 613–619.

- 65) Dai, Z.; Wang, G.; Lin, R. Chemical constituents of *Balanophora simaoensis* (III). *Chin. Trad. Herb. Drugs* **2006**, *37*, 1608–1610.
- 66) Saijo, R.; Nonaka, G.; Nishioka, I. Phenol glucoside gallates from *Mallotus japonicus*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2443–2446.
- 67) Markham, K. R.; Ternai, B.; Stanley, R.; Geiger, H.; Mabry, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1389–1397.
- 68) Alluis, B.; Dangles, O. Quercetin (=2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one) glycosides and sulfates: chemical synthesis, complexation, and antioxidant properties. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1133–1156.
- 69) Kazuma, K.; Noda, N.; Suzuki, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 229–237.
- 70) Nakajima, K.; Niisato, N.; Marunaka, Y. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. *Cell. Physiol. Biochem.* **2001**, *28*, 147–156.
- 71) Jeong, M. H.; Kim, J. S.; Zou, Y.; Yoon, C. S.; Lim, H.W.; Ahn, J.; Lee, H. Y. Enhancement of pheochromocytoma nerve cell growth by consecutive fractionization of *Angelica gigas* Nakai extracts. *Cytotechnology* **2010**, *62*, 461–472.
- 72) Nakajima, K.; Miyazaki, H.; Niisato, N.; Marunaka, Y. Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *359*, 604–610.
- 73) Nakajima, K.; Niisato, N.; Marunaka, Y. Enhancement of tubulin polymerization by Cl⁻-induced blockade of intrinsic GTPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *425*, 225–229.
- 74) Aoki, K.; Nakamura, T.; Fujikawa, K.; Matsuda, M. Local phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation recruits Vav2 and Vav3 to activate Rac1/Cdc42 and initiate neurite outgrowth in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 2207–2217.
- 75) Kim, Y.; Seger, R.; CV, S. B.; Hwang, S.; Yoo, Y. S. A positive role of the PI3-K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Mol. Cells* **2004**, *18*, 353–359.
- 76) Wu, S.; Xia, F.; Lin, X.; Duan, K.; Wang, F.; Lu, Q.; Cao, H.; Qian, Y.; Shi, M. Ginsenoside-Rd promotes neurite outgrowth of PC12 cells through MAPK/ERK- and PI3K/AKT-dependent pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 177.
- 77) Zhang, C.; Cao, C.; Kubo, M.; Harada K.; Yan, X.; Fukuyama, Y.; Gao, J. Chemical constituents from *Hericium erinaceus* promote neuronal survival and potentiate neurite outgrowth via the TrkA/Erk1/2 pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1659.
- 78) Sabogal-Guáqueta, A. M.; Muñoz-Manco, J. I.; Ramírez-Pineda, J. R.; Lamprea-Rodriguez, M.; Osorio, E.; Cardona-Gómez, G. P. The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology* **2015**, *93*, 134–145.

- 79) Ferri, P.; Angelino, D.; Gennari, L.; Benedetti, S.; Ambrogini, P.; Grande, P. D.; Ninfali, P. Enhancement of flavonoid ability to cross the blood–brain barrier of rats by co-administration with α -tocopherol. *Food Funct.* **2015**, *6*, 394–400.
- 80) Ishisaka, A.; Ichikawa, S.; Sakakibara, H.; Piskula, M. K.; Nakamura, T.; Kato, Y.; Ito, M.; Miyamoto, K.; Tsuji, A.; Kawai, Y.; Terao, J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Bio. Med.* **2011**, *51*, 1329–1336.
- 81) Li, P.; Matsunaga, K.; Yamakuni, T.; Ohizumi, Y. Potentiation of nerve growth factor-action by picosides I and II, natural iridoids, in PC12D cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *406*, 203–208.
- 82) Hur, J.; Lee, P.; Moon, E.; Kang, I.; Kim, S.; Oh, M. S.; Kim, S. Y. Neurite outgrowth induced by spicatoside A, a steroidal saponin, via the tyrosine kinase A receptor pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *620*, 9–15.