

タイ天然薬物 *Piper chaba* の薬理活性成分の探索

山口 頂

## 目 次

緒 論	1
本 論	5
第一章     タイ産天然薬物 <i>Piper chaba</i> 含有成分の化学構造および胃粘膜保護作用	5
第一節     緒言	5
第二節 <i>Piper chaba</i> 含有成分の単離精製	5
第三節     新規酸アミド化合物 <b>piperchabamide</b> 類および新規フェニルプロパノイド配糖体 <b>piperchabaoside</b> 類の化学構造	8
第四節 <i>Piper chaba</i> 含有成分の胃粘膜保護作用の検討	17
第五節     小括	19
第二章 <i>Piper chaba</i> の肝保護作用成分	20
第一節     緒言	20
第二節 <i>Piper chaba</i> の肝保護作用成分の探索	20
第三節     Piperine のマウスにおける D-GalN/LPS による血清 TNF- $\alpha$ 濃度に及ぼす作用 および作用様式	28
第四節     小括	30
第三章 <i>Piper chaba</i> 含有成分の脂肪細胞分化誘導促進作用およびマウス血中移行	31
第一節     緒言	31
第二節     Piperlonguminine の PPAR $\gamma$ アゴニスト様作用	31
第三節     マウスにおける <i>Piper chaba</i> 含有成分の血中移行	34
第四節     小括	37
総 括	38
謝 辞	39
実験の部	40
第一章の実験	41
第二節の実験	41
第三節の実験	44
第四節の実験	48
第二章の実験	48
第二節の実験	48
第三節の実験	50
第三章の実験	51
第二節の実験	51
第三節の実験	53
引用文献	55
論文目録	61

## 緒 論

コショウ科 (Piperaceae) コショウ属 (*Piper*) 植物は、700 種以上が知られており、熱帯および亜熱帯地域に広く分布している。インド伝統医学であるアーユル・ヴェーダ医学において薬用として用いられていたことが記されており、またラテンアメリカや西インドにおいても伝統医療に利用されてきた。<sup>1)</sup> さらに、古代ギリシャ医学が起源とされているユナニー医学では歯肉などの痛みに対する処方や洗顔薬、健胃薬、強精薬とみなされる処方に配剤するなど健胃、強精、解熱を目的に用いられている。中国では、コショウ (*Piper nigrum*) やヒハツ (ナガコショウ、インドナガコショウ, *P. longum*) が唐時代初期に著された本草書「新修本草」に収載されており、また、日本の正倉院薬物にコショウとヒハツの根 (ヒツバツ) が収められており、同様の目的で薬用とされている。<sup>2)</sup> 一方、世界中では香辛料としても利用されており、黒胡椒、白胡椒の原料であるコショウ、同様の目的で用いられているナガコショウ、ジャワナガコショウ (ヒハツモドキ, *P. retrofractum* = *P. chaba*)、サプリメントに用いられている鎮静,<sup>3)</sup> 抗不安作用<sup>4)</sup>を有するカバ (*P. methysticum*)、ビンロウジと石灰とともに咀嚼性嗜好品として用いられているキンマ (*P. betle*) の葉などがスパイス・ハーブとして良く知られている。

コショウ属植物の含有成分として、piperine などの酸アミド類、精油成分のモノテルペン、セスキテルペン、フェニルプロパノイドなどが知られており、*P. nigrum* などの主要成分である piperine には、抗菌、防腐、殺虫、健胃、UDP-glucuronyl transferase 阻害、抗酸化、胃液分泌促進、胃粘膜保護、消化管輸送能促進など多様な生体機能が知られている。<sup>5,6)</sup> また、栄養素や薬物の吸収促進作用や、小腸や肝臓における薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP3A4, CYP2C9 など) を阻害することが報告されており、薬物相互作用について注意が必要とされている。<sup>5-7)</sup> Piperine の多様な生体機能はトウガラシに含まれる capsaicin と同様にバニロイド受容体 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1: TRPV1) の活性化を介しているとされている。TRPV1 の活性化には capsaicin よりも高濃度が必要とされるが、作用強度は capsaicin よりも強いとの報告もなされている。<sup>8)</sup> また、最近の報告では、piperine を含む数種の酸アミド類に、TRPV1 のみならずアンキリン受容体 (Transient receptor potential ankyrin 1: TRPA1) を活性化することが明らかになっている。<sup>9)</sup>

本研究ではタイ天然薬物の科学的解明研究や薬用食物の機能性成分の探索研究<sup>10-18)</sup>の一環としてタイ産コショウ科植物 *Piper chaba* HUNTER (syn. *P. retrofractum* VAHL.) の乾燥果穂部の 80%(v/v) 含水アセトンエキスを胃粘膜保護作用さらに肝保護作用が見出されたことから、*P. chaba* 果穂部に含有される化学成分の探索並びに活性成分の探索研究を実施するとともに、TRPV1 アゴニストとして知られる piperine (15)<sup>19,20)</sup>とその類縁体について脂肪細胞へ与える影響を研究した。さらに、*P. chaba* 果穂部に含有される主要成分について、薬物の有効性、安全性を検証する上で重要な情報の 1 つとなる血中濃度推移について研究した。

### *P. chaba* 含有成分の化学構造及び胃粘膜保護作用

*P. chaba* 果穂部より得た 80%(v/v) 含水アセトンエキスより、methyl piperate (12) を含む 4 種の既知芳香族化合物、piperine (15)、 $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine [= piperanine (19)], piperlonguminine (21), dehydropiperlonguminine (22), piperlonguminine (25), pipericide [= retrofractamide B (28)], guineensine (29), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-octadeca-2,4-dienamide (36), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,14*Z*)-eicosa-2,4,14-trienamide (40) を含む 29 種の既知酸アミド化合物、3 種の既知セスキテルペンおよび 2 種の既知フェニルプロパ



ノイド配糖体を単離・同定するとともに、6 種の新規酸アミド化合物である piperchabamide A (1) ~ F (6) および 2 種の新規フェニルプロパノイド配糖体 piperchabaoside A (7) および piperchabaoside B (8) を単離し、それらの化学構造を決定した (Fig. 1).

エタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜損傷ラットモデルを用い、*P. chaba* 含有成分 (12, 15, 19, 21, 22, 25, 28, 29, 36 および 40) の影響について検討を行った結果、15 にエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜保護作用が確認された ( $ED_{50}=24$  mg/kg および 13 mg/kg). また、21, 22, 28, 36 および 40 は 25 mg/kg 投与にてエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜障害モデルにおいて、抑制率 57.3~73.3% および 54.1~68.4% で胃粘膜損傷を有意に抑制した ( $p<0.01$ ). 一方、12, 19 および 25 (各 25 mg/kg 投与) はエタノール誘発胃粘膜障害に対して 50.9~56.4% で有意に抑制作用が認められた ( $p<0.01$ ). インドメタシン誘発モデルにおいて 12 には活性が認められなかったことから、酸アミド構造が活性発現に重要である可能性が考えられた.

#### *P. chaba* 含有成分の肝保護作用

*P. chaba* 果穂部より得た 80%(v/v) 含水アセトンエキスを D-ガラクトサミン(D-GalN)/リポ多糖 (LPS) 誘発急性肝障害モデルマウスに対する肝保護作用を見出した. そこで、マウス初代培養肝細胞を用いた D-GalN または D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死に与える *P. chaba* 含有成分の影響を評価した結果、piperoleine B (20), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-dodeca-2,4-dienamide (34) および 40 に強い抑制活性が認められた. 一方、D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死において 2, 4, 25, 28 および retrofractamide C (31) に抑制作用が認められた. 抑制作用が認められた酸アミド化合物より、酸アミド構造が活性発現に必須であること、側鎖部の炭素数と二重結合の有無などにより活性強度に影響を及ぼすことが推察された. 次に、LPS 刺激したマクロファージからの炎症性メディエーター産生に対する影響について、一酸化窒素(NO)産生能をマクロファージの活性化を指標に検討を行った結果、1, 3 および 7 に NO 産生抑制作用が認められた. 加えて、肝細胞の TNF- $\alpha$  に対する感受性に及ぼす影響について TNF- $\alpha$  高感受性株であるマウス繊維芽細胞 L929 細胞を用いた TNF- $\alpha$  誘発細胞死に対する抑制作用を検討し、1, 2, 3, 15, 20 および 40 に活性が認められた. 以上の結果より、*P. chaba* 果穂部に D-GalN 誘発肝細胞死抑制成分 (20, 34 および 40), LPS 誘発マクロファージ活性化抑制成分 (1, 3 および 7), D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死抑制成分 (2, 4, 25, 28, 31 など), TNF- $\alpha$  誘発細胞死抑制成分 (1, 2, 3, 15, 20 および 40) が含有されていることが推察された.

引き続き *P. chaba* の主要成分である 15 の肝障害抑制作用の作用機序について検討をおこなった. D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルは LPS によって活性化されたマクロファージ (クッパー細胞) から産生される TNF- $\alpha$  が D-GalN で障害を受けた肝細胞に作用することにより肝細胞死が誘発されることが報告されている. そこで、D-GalN/LPS 誘発時のマウス血清中 TNF- $\alpha$  濃度に及ぼす影響を検討したが、20 mg/kg 投与量においてもほとんど影響が認められなかった. また、LPS 刺激によるマウス腹腔マクロファージの NO 産生に対しても強い抑制活性を示さなかった. このことから、15 は *in vitro* および *in vivo* のいずれにおいてもマクロファージ (クッパー細胞) の活性化を抑制しないことが推察された. 一方、15 は D-GalN/TNF- $\alpha$  による肝細胞死抑制作用を示したが、D-GalN のみによる細胞死に対しては抑制作用を示さなかった. さらに、L929 細胞を用いた TNF- $\alpha$  誘発細胞死に対する作用を検討したところ、TNF- $\alpha$  による細胞死を濃度依存的 (10~100  $\mu$ M,  $IC_{50}=42$   $\mu$ M) に抑制することが明らかとなった. 以上のことから、D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルにおいて 15 は、TNF- $\alpha$  産生量には影響を与えず、D-GalN で障害を受けた肝細胞の TNF- $\alpha$  感受性



を低減し、TNF- $\alpha$  による肝細胞死を抑制することによって肝保護作用を発現させることが推察された。

#### *P. chaba* 含有成分の脂肪細胞への分化誘導促進作用およびマウス血中移行

Piperlongminine (25) および retrofractamide A (27) については 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化促進作用が報告されているが、25 の分化促進作用の詳細については明らかにされていない。そこで 25 について脂肪細胞への分化促進作用を検討した。その結果、濃度依存的に 3T3-L1 細胞中の中性脂質量を増加させ、培地中のアディポネクチン量、糖の取り込み量についても濃度依存的な促進作用が見られた。また、25 はアディポネクチン、PPAR $\gamma$ 2、糖輸送担体である GLUT4 および分化の指標マーカーである aP2 の mRNA の発現を増加させた。さらに、Nuclear Receptor Cofactor Assay を用いて PPAR $\gamma$  に対する受容体レベルでのアゴニスト活性を検討したところ、比較対照薬である troglitazone はアゴニスト活性 ( $EC_{50}=1.5 \mu M$ ) を示したことにに対し、25 はアゴニスト活性を示さなかった。以上の結果より 25 は直接的な PPAR $\gamma$  アゴニスト活性を有しないが、PPAR $\gamma$  アゴニスト様活性を示す新規シード化合物として有望であると思われる。

*P. chaba* 含有成分のマウス血中濃度を測定したところ、20 mg/kg 投与時の piperine (15) の血中濃度は  $C_{max}=0.77 \mu g/mL$  ( $2.7 \mu M$ ) であり、*in vitro* の D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死に有効な濃度 (3 ~ 30  $\mu M$ ) に対応することが確認されたと思われる。25、15 および retrofractamide A (27) の 20 mg/kg 投与における AUC はそれぞれ 9.1, 3.3 および 1.7  $\mu g \cdot h/mL$  であり、25 の血中濃度は、15 および 27 よりも高いことが認められた。さらに、15 の AUC は 80%(v/v) 含水アセトンエキスを投与時において単独投与時よりも増加し、エキス中の成分が 15 の血中濃度へ影響を与えることが明らかとなった。

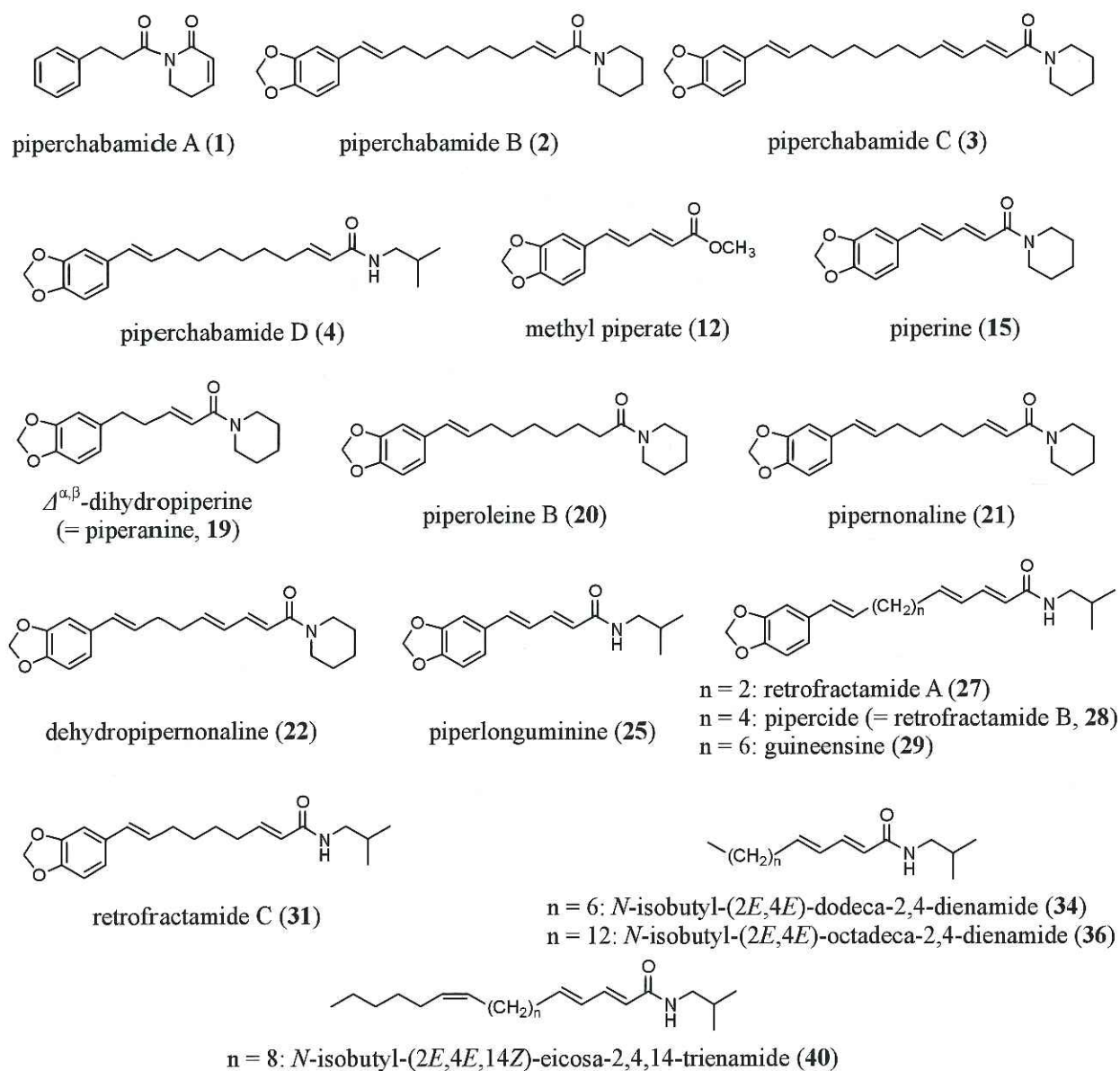


Fig. 1. Chemical structures of compounds from the fruit of *P. chaba*



## 第一章 タイ産天然薬物 *Piper chaba* 含有成分の化学構造および胃粘膜保護作用

### 第一節 緒言

コショウ科 (Piperaceae) の植物である *Piper chaba* HUNTER (syn. *P. retrofractum* VAHL.) は東南アジア地域に分布する木本性、蔓性植物である。タイにおいては“Dee Plee”と称され、その果実は、香辛料として使用されるほか、駆風薬、去痰薬、鎮咳薬、抗真菌薬、避妊薬、鎮静催眠薬、食欲増進薬等<sup>21)</sup>として用いられる、さらに健胃、強壮や抗炎症作用とみなされる薬効が伝承されている。

タイ天然薬物の科学的解明研究の一環として、本研究ではタイ産 *P. chaba* 果穂部の 80%(v/v) 含水アセトンエキスをエタノールおよびインドメタシン誘発性胃粘膜損傷保護作用 ( $ED_{50}=14$  mg/kg, 12 mg/kg) が見出されたことから、*P. chaba* 果穂部に含有される活性成分探索研究に着手した。

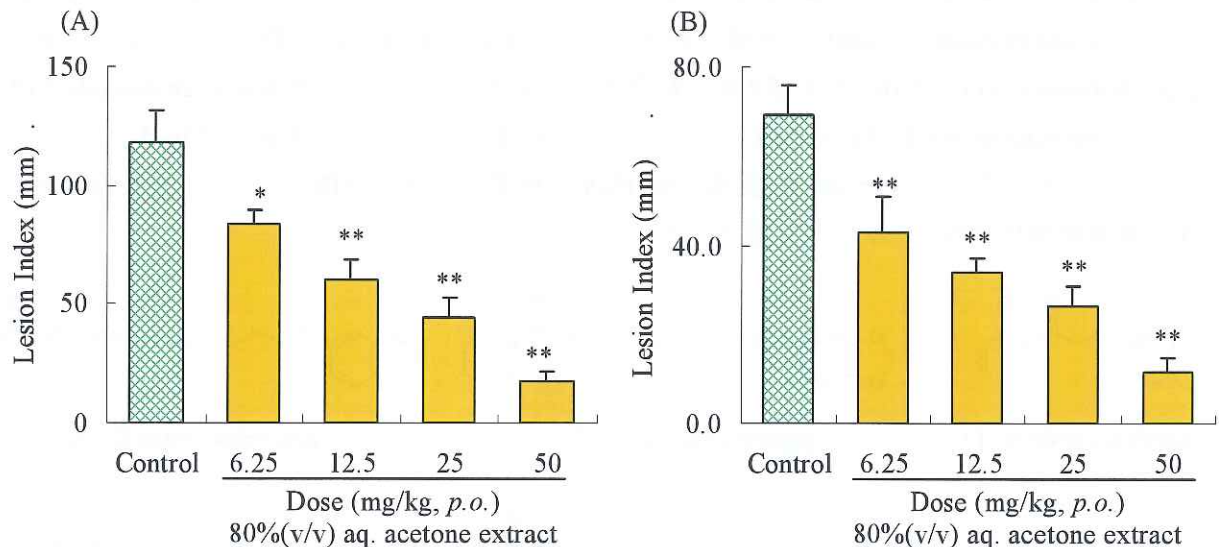


Fig. 2. Effect of 80%(v/v) aq. acetone extract from the fruit of *P. chaba* on ethanol- and indomethacin-induced gastric lesions in rats

(A) Ethanol-induced gastric lesion, (B) Indomethacin-induced gastric lesion, Each column represents the mean with S.E.M. (n=6-9). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

### 第二節 *Piper chaba* 含有成分の単離精製

タイ産 *P. chaba* 果穂部 (4.0 kg) を、80%(v/v) 含水アセトンで室温下にて抽出し、80%(v/v) 含水アセトンエキス (788 g, 生薬からの収率 19.7%) を得た。80%(v/v) 含水アセトンエキスを酢酸エチル(AcOEt)-水 (1 : 1, v/v) による分配抽出、水層は *n*-ブタノール(*n*-BuOH) (1 : 1, v/v) にてさらに分配抽出し、AcOEt 可溶部 (227 g, 9.7%), *n*-BuOH 可溶部 (50 g, 2.1%), 水可溶部 (164 g, 7.9%) を得た。AcOEt 可溶部、*n*-BuOH 可溶部を順相シリカゲル、逆相シリカゲルクロマトグラフィー、再結晶および逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて繰り返し分離精製することにより、4 種の既知芳香族化合物である、benzenepropanoic acid (9), piperonal (10) ,

3,4-methylenedioxycinnamaldehyde (11),<sup>46)</sup> および methyl piperate (12),<sup>31,40)</sup> 29 種の既知酸アミド化合物である, *N*-cinnamoylpiperidine (13),<sup>47)</sup> ilepcimide (14),<sup>48)</sup> piperine (15),<sup>30,31,49)</sup> isopiperine (16),<sup>49)</sup> isochavicine (17),<sup>49)</sup> chavicine (18),<sup>49)</sup>  $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine [= piperanine (19)],<sup>32,33)</sup> piperoleine B (20),<sup>30)</sup> piperlonguminaline (21),<sup>34)</sup> dehydropiperlonguminaline (22),<sup>35)</sup> piperundecalidine (23),<sup>34)</sup> fragaramide (24),<sup>50)</sup> piperlonguminine (25),<sup>31)</sup> 5,6-dihydropiperlonguminine (26),<sup>33,41)</sup> retrofractamide A (27),<sup>30,36,42)</sup> pipericide [= retrofractamide B (28)],<sup>30,34,36)</sup> guineensine (29),<sup>30,31,34,36)</sup> brachystamide B (30),<sup>43)</sup> retrofractamide C (31),<sup>42,51)</sup> dihydroguineensine (32),<sup>52)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienamide (33),<sup>44,53,54)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-dodeca-2,4-dienamide (34),<sup>45,53,54)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-tetradeca-2,4-dienamide (35),<sup>54)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-octadeca-2,4-dienamide (36),<sup>37,38,55)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-hexadeca-2,4-dienamide (37),<sup>55)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,8*Z*)-tetradeca-2,4,8-trienamide (38),<sup>56)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,12*Z*)-octadeca-2,4,12-trienamide (39),<sup>39)</sup> *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,14*Z*)-eicosa-2,4,14-trienamide (40)<sup>39)</sup> および piperic acid isopentyl amide (41),<sup>57)</sup> 3 種の既知セスキテルペンである 3,4-dihydroxybisabola-1,10-diene (42), 1-hydroxybisabola-2,10-dien-4-one (43) および 1,4-dihydroxy-bisabola-2,10-diene (44), 2 種の既知フェニルプロパノイド配糖体である rosin (45) および cinnamrutinose A (46) を単離・同定するとともに, 6 種の新規酸アミド化合物である piperchabamide A (1)~F (6) および 2 種の新規フェニルプロパノイド配糖体 piperchabaoside A (7) および piperchabaoside B (8) を単離し, それらの化学構造を決定した (Fig. 3~Fig. 5).

これらの既知化合物 (9~46) は質量分析 (MS), 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルをはじめとする各種物理化学的データにより同定した。

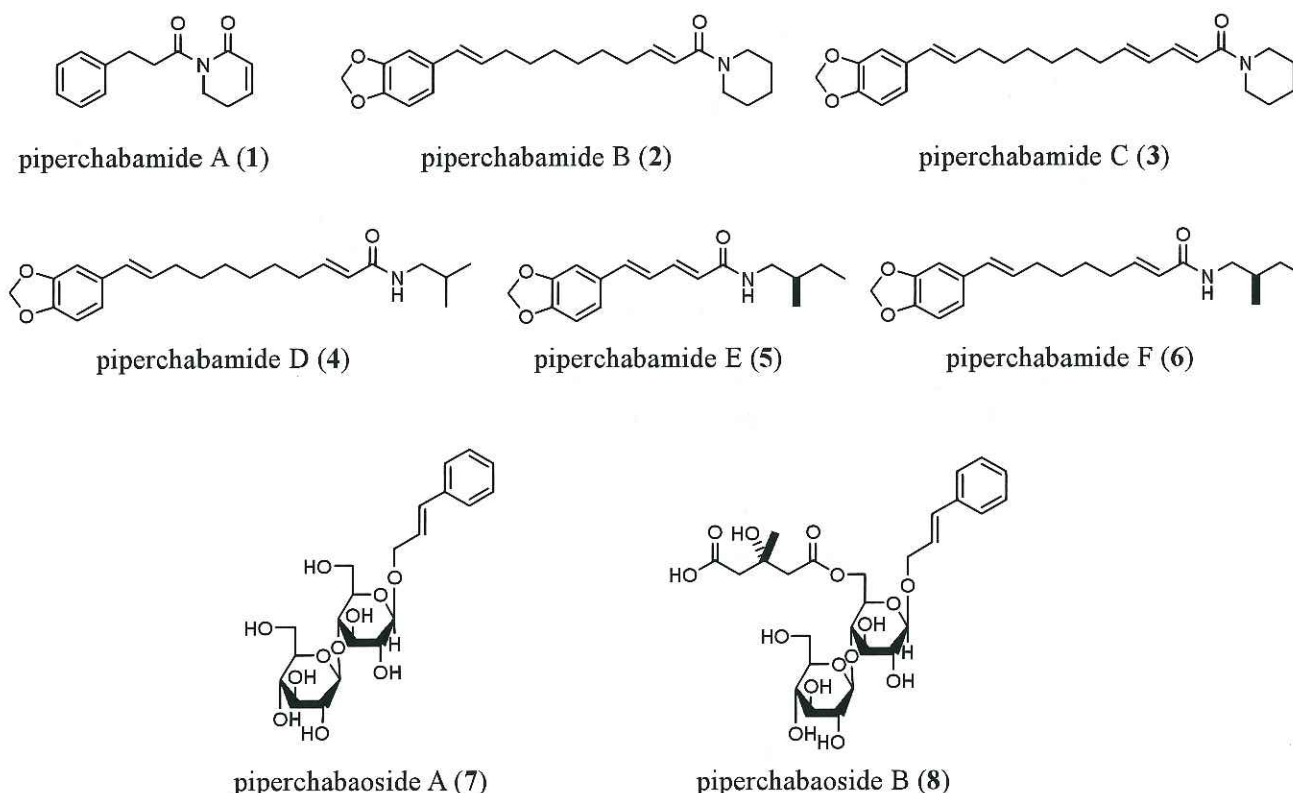


Fig. 3. Chemical structures of new compounds 1 - 8 from the fruit of *P. chaba*



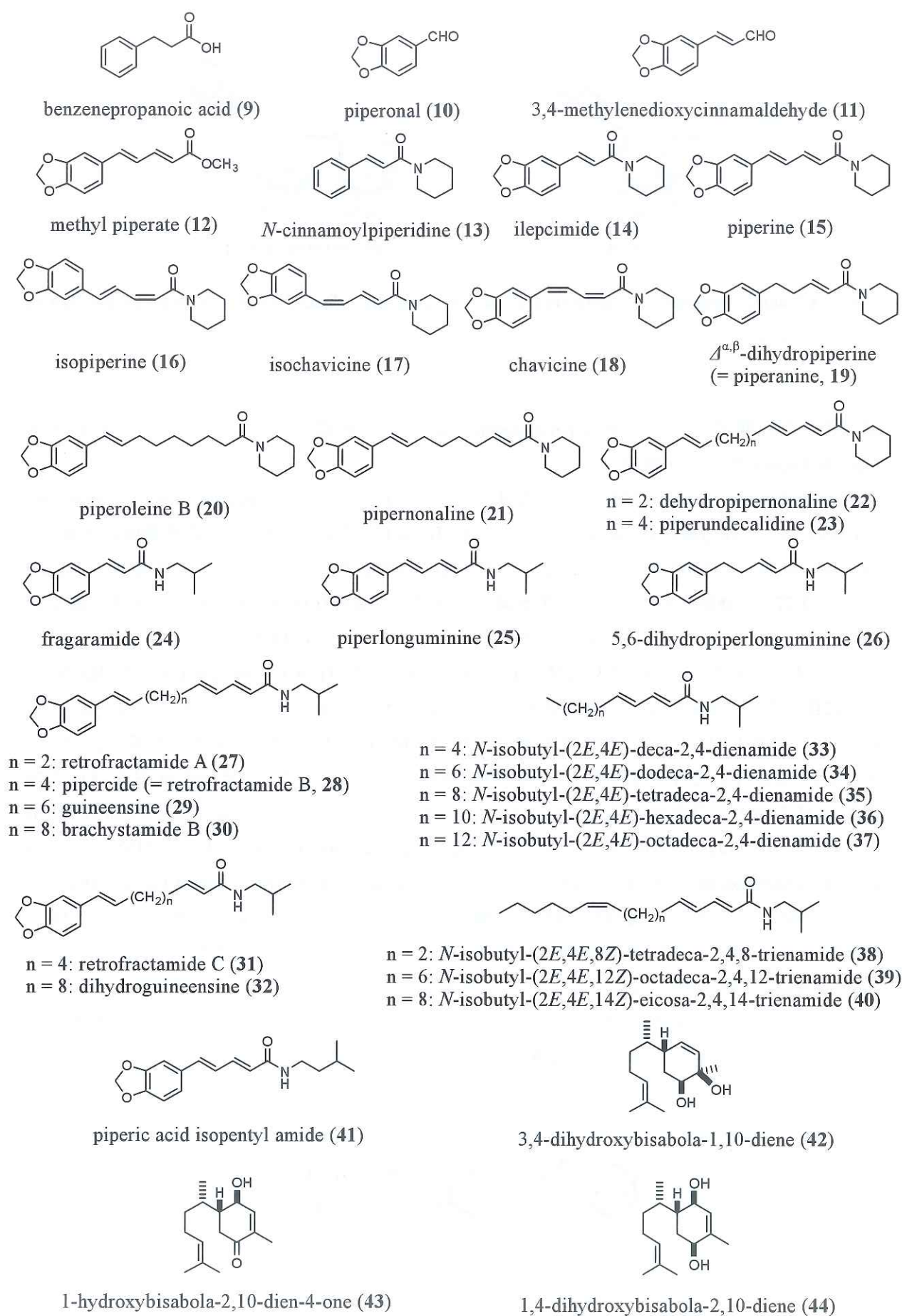


Fig. 4. Chemical structures of compounds 9 - 44 from the AcOEt-soluble fraction of the fluit of *P. chaba*

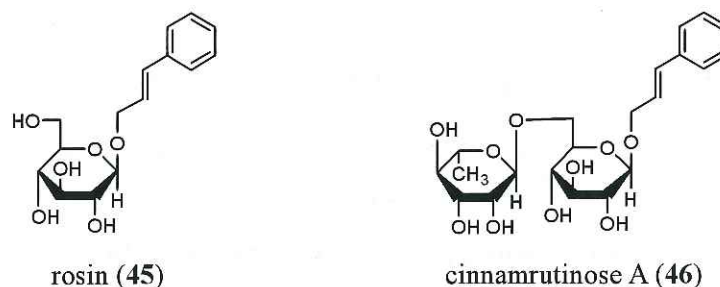


Fig. 5. Chemical structures of compound 45 and 46 from the *n*-BuOH-soluble fraction of the fluit of *P. chaba*

### 第三節 新規酸アミド化合物 piperchabamide 類および新規フェニルプロパノイド配糖体 piperchabaoside 類の化学構造

Piperchabamide A (1) は無色の油状物質として得られ, electron ionization mass spectrometry (EI-MS) および高分解能 EI-MS により分子式  $C_{14}H_{15}NO_2$  が明らかとなった. 赤外線吸収 (IR) スペクトルにおいて  $1693$  および  $1626\text{ cm}^{-1}$ , 紫外吸収 (UV) スペクトルにおいて吸収極大  $243\text{ nm}$  ( $\log \varepsilon = 3.72$ ) が確認されたことより芳香環と共役アミド基の存在が示唆された. 水素核磁気共鳴 ( $^1\text{H}$ -NMR) および炭素  $13$  核磁気共鳴 ( $^{13}\text{C}$ -NMR) スペクトル (Table 1 および実験の部) において, 4 つのメチレン [ $\delta = 2.37$  (2H, ddt,  $J = 1.6, 4.6, 6.7\text{ Hz}$ ,  $\text{H}_2\text{-4''}$ ),  $2.99$  (2H, t,  $J = 7.3\text{ Hz}$ ,  $\text{H}_2\text{-3}$ ),  $3.26$  (2H, t,  $J = 7.3\text{ Hz}$ ,  $\text{H}_2\text{-2}$ ),  $3.96$  (2H, t,  $J = 6.7\text{ Hz}$ ,  $\text{H}_2\text{-5''}$ )], *cis*-オレフィンプロトン対 [ $\delta = 5.98$  (1H, dt,  $J = 9.8, 1.6\text{ Hz}$ ,  $\text{H-2'}$ ),  $6.87$  (1H, dt,  $J = 9.8, 4.6\text{ Hz}$ ,  $\text{H-3'}$ )], 2 つのカルボニル基 [ $\delta_c = 165.3$  (C-1'),  $175.6$  (C-1)] を持つ芳香環 [ $\delta = 7.17$  (1H, br t,  $J = ca. 8\text{ Hz}$ ,  $\text{H-7}$ ),  $7.24$  (2H, m,  $\text{H-6, -8}$ ),  $7.26$  (2H, m,  $\text{H-5, -9}$ )] の存在が示唆された. 1 のジヒドロピリジノン構造は, distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT), さらに  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  correlated spectroscopy ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY),  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  correlated spectroscopy ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  COSY) および heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) の 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析より構築した. すなわち, Fig. 6 に太線で示した  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにおける部分構造の存在が示唆され, 矢印で示した HMBC スペクトルにおける long-range 相関 ( $\text{H-2}$  と  $\text{C-1}$ ,  $\text{H-3}$  と  $\text{C-4}$ ,  $\text{H-5'}$  と  $\text{C-1}$ ,  $\text{H-2'}$  と  $\text{-5'}$  と  $\text{C-1'}$ ) が確認された. さらに, Fig. 7 に示した EI-MS の特有のフラグメントイオンピークが確認された. 以上の物理化学的考察から, 1 は Fig. 6 に示した化学構造であることが明らかとなった.

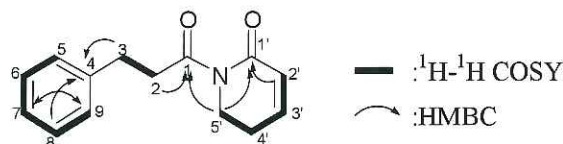


Fig. 6.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of 1



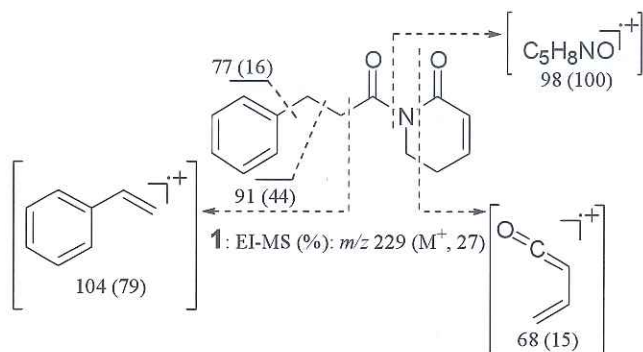


Fig. 7. EI-MS fragmentation patterns of **1**

Piperchabamide B (**2**) は無色の油状物質として得られ, EI-MS および高分解 EI-MS により分子式  $C_{23}H_{31}NO_3$  が明らかとなった. UV スペクトルにおいて吸収極大 260 nm ( $\log \varepsilon = 4.24$ ) および IR スペクトル (2928, 2855, 1655 および  $1614\text{ cm}^{-1}$ ) においてメチレン, 不飽和アミド基および芳香族の存在が示唆された.  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 1 および実験の部) において, ピペリジン環を含む 11 のメチレン [ $\delta = 1.34, 1.45$  (4H each, both m,  $H_2$ -5, -6, -7, -8),  $1.56$  (4H, m,  $H_2$ -2', -4'),  $1.65$  (2H, m,  $H_2$ -3'),  $2.15$  (2H, dt,  $J = 7.0, 6.8$  Hz,  $H_2$ -9),  $2.20$  (2H, dt,  $J = 7.0, 6.7$  Hz,  $H_2$ -4),  $3.48, 3.60$  (2H each, both br s,  $H_2$ -1', -5')], 3,4-メチレンジオキシフェニル基 [ $5.93$  (2H, s,  $H_2$ -18),  $6.73$  (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-16),  $6.75$  (1H, dd,  $J = 1.4, 8.2$  Hz, H-17),  $6.89$  (1H, d,  $J = 1.4$  Hz, H-13)], 2 つの *trans*-オレフィンプロトン対 [ $6.03$  (1H, dt,  $J = 15.6, 7.0$  Hz, H-10),  $6.24$  (1H, dt,  $J = 15.0, 1.5$  Hz, H-2),  $6.28$  (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-11),  $6.82$  (1H, dt,  $J = 15.0, 7.0$  Hz, H-3)] および共役アミド基 ( $\delta_c = 165.6$ ) を帰属した.  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルはメチレンのシグナルを除いて **21** と同様であった. Fig. 8 に太線で示した  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにおける部分構造, Fig. 8 に矢印で示した HMBC スペクトルの 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析より **2** の構造を構築した. 加えて, Fig. 9 に示した EI-MS におけるフラグメントイオンピークがその構造を支持している. 以上の物理化学的考察から, **2** は Fig. 8 に示した化学構造であることが明らかとなった.

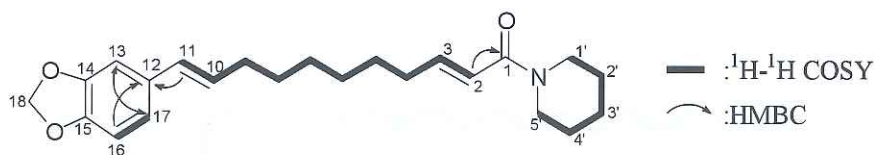


Fig. 8.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of **2**

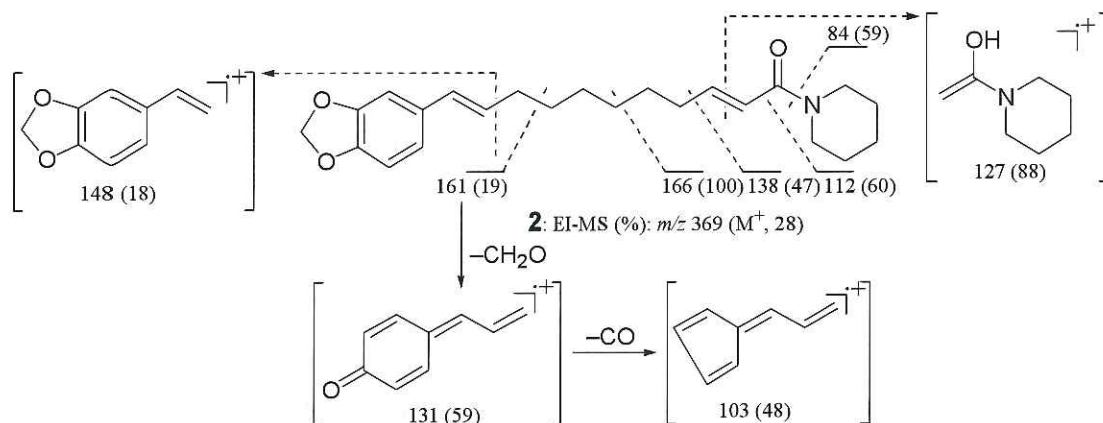


Fig. 9. EI-MS fragmentation patterns of **2**

Piperchabamide C (**3**) は無色の油状物質として得られ、EI-MS および高分解 EI-MS により分子式  $C_{25}H_{33}NO_3$  が明らかとなった。UV スペクトルにおいて吸収極大 265 nm ( $\log \varepsilon = 4.52$ ) および IR スペクトル (2928, 2855, 1655 および  $1622\text{ cm}^{-1}$ ) においてメチレン、不飽和アミド基および芳香族の存在が示唆された。**3** の  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 1 および実験の部) において、ピペリジン環を含む 11 のメチレン [ $\delta = 1.32, 1.43$  (4H each, both m,  $H_2$ -7, -8, -9, -10), 1.56 (4H, m,  $H_2$ -2', -4'), 1.63 (2H, m,  $H_2$ -3'), 2.15 (4H, m,  $H_2$ -6, -11), 3.48, 3.60 (2H each, both br s,  $H_2$ -1', -5')], 3,4-メチレンジオキシフェニル基 [ $\delta = 5.92$  (2H, s,  $H_2$ -20), 6.72 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-18), 6.75 (1H, dd,  $J = 1.6, 8.2$  Hz, H-19), 6.88 (1H, br s, H-15)], 3 つの *trans*-オレフィンプロトン対 [ $\delta = 6.04$  (2H, m, H-5, -12), 6.17 (1H, dd,  $J = 10.7, 15.0$  Hz, H-4), 6.24 (1H, d,  $J = 16.7$  Hz, H-2), 6.28 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-13), 7.22 (1H, dd,  $J = 10.7, 16.7$  Hz, H-3)] および共役アミド基 ( $\delta_c = 165.7$ ) を帰属した。 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおけるピペリジン部に帰属したシグナルは **2** と同様であった。一方で、アシル部 (C-1~C-20) 由来のプロトンおよびカーボンのシグナルは **29** と良く一致した。Fig. 10 に太線で示した  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにおける部分構造、矢印で示した HMBC スペクトルの 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析より **3** の構造を構築した。加えて、Fig. 11 に示した EI-MS におけるフラグメントイオンピークがその構造を支持している。以上の物理化学的考察から、**3** は Fig. 10 に示した化学構造であることが明らかとなった。

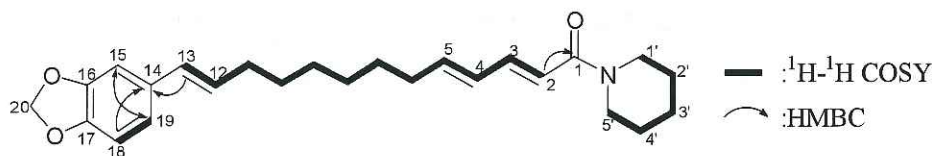


Fig. 10.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of **3**



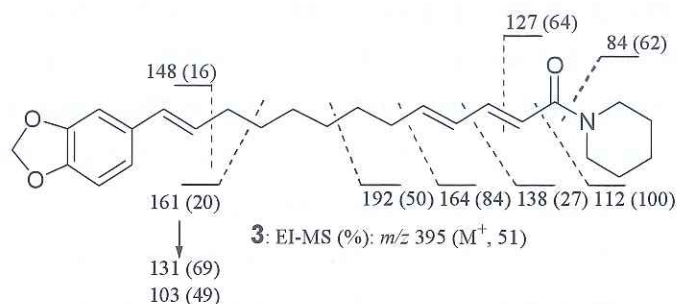


Fig. 11. EI-MS fragmentation patterns of 3

Piperchabamide D (**4**) は無色の油状物質として得られ、UV スペクトルにおいて吸収極大 261 nm ( $\log \epsilon = 4.12$ ) を示した。また、IR スペクトルにおいて 2924, 2853, 1668, 1626  $\text{cm}^{-1}$  が確認され、メチレン、不飽和アミド基および芳香族の存在が示唆された。EI-MS および高分解 EI-MS において確認された分子イオンピークより分子式  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}_3$  が明らかとなった。 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 1 および実験の部) において、6 つのメチレン [ $\delta = 1.33, 1.44$  (4H each, both m,  $\text{H}_2$ -5, -6, -7, -8), 2.15 (4H, m,  $\text{H}_2$ -4, -9)], *N*-イソブチル基 [ $\delta = 0.92$  (6H, d,  $J = 6.1$  Hz,  $\text{H}_3$ -3', -4'), 1.77 (1H, ddq,  $J = 7.0, 6.1$  Hz,  $\text{H}$ -2'), 3.14 (2H, dd,  $J = 7.0, 7.0$  Hz,  $\text{H}_2$ -1'), 5.56 (1H, br s, NH)], 3,4-メチレンジオキシフェニル基 [ $\delta = 5.94$  (2H, s,  $\text{H}_2$ -18), 6.73 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{H}$ -16), 6.75 (1H, br d,  $J = \text{ca. } 8$  Hz,  $\text{H}$ -17), 6.89 (1H, br s,  $\text{H}$ -13)], 2 つの *trans*-オレフィンプロトン対 [ $\delta = 5.76$  (1H, d,  $J = 15.7$  Hz,  $\text{H}$ -2), 6.04 (1H, dt,  $J = 15.6, 6.8$  Hz,  $\text{H}$ -10), 6.28 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz,  $\text{H}$ -11), 6.83 (1H, dt,  $J = 15.7, 7.0$  Hz,  $\text{H}$ -3)] および共役アミド基 ( $\delta_c = 166.2$ ) を帰属した。**4** の  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおいて帰属したプロトンおよびカーボンのシグナルは **2** と同様であった。また、*N*-イソブチル部においては **25**, **28**, **29**, **36** および **40** と良く一致していた。最終的に、各種 NMR データおよび EI-MS におけるフラグメントイオンピーク (Fig. 13) より、**4** は Fig. 12 に示した化学構造であることが明らかとなった。

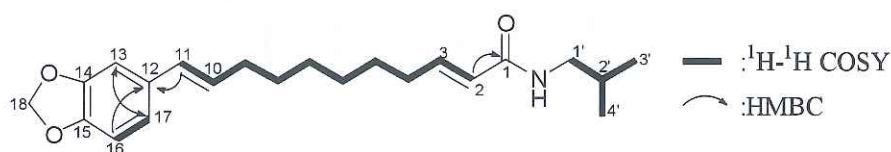


Fig. 12.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of 4

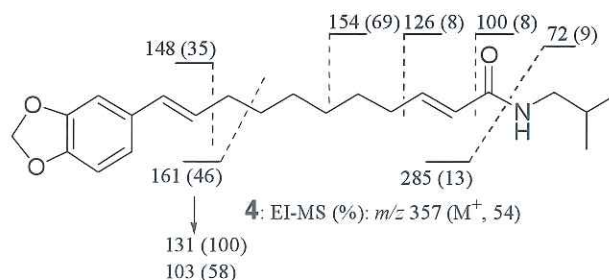


Fig. 13. EI-MS fragmentation patterns of 4

Piperchabamide E (**5**) は正の旋光度  $\{[\alpha]_D^{24} +18.7^\circ (c = 0.72, \text{CHCl}_3)\}$  を持つ無色の油状物質として得られた。IR スペクトルにおいてメチレン、不飽和アミド基および芳香族に起因する 2963, 1646, 1545, 1506, 1489, 1446, 1257, 1238  $\text{cm}^{-1}$  の吸収が確認された。EI-MS および高分解 EI-MS において確認された分子イオンピークより分子式  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$  を決定した。 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 2 および実験の部) において、2つのメチル  $[\delta = 0.91 (3\text{H}, \text{dd}, J = 6.9, 7.6 \text{ Hz}, \text{H}_2-4'), 0.91 (3\text{H}, \text{d}, J = 6.7 \text{ Hz}, \text{H}_2-5')]$ , 2つのメチレン  $[\delta = 1.17, 1.41 (1\text{H each, both m}, \text{H}-3'), 3.15, 3.29 (1\text{H each, both m}, \text{H}-1')]$ , メチン  $[\delta = 1.59 (1\text{H}, \text{m}, \text{H}-2')]$ , 3,4-メチレンジオキシフェニル基  $[\delta = 5.97 (2\text{H}, \text{s}, \text{H}_2-12), 6.75 (1\text{H}, \text{d}, J = 8.2 \text{ Hz}, \text{H}-10), 6.88 (1\text{H}, \text{dd}, J = 1.8, 8.2 \text{ Hz}, \text{H}-11), 6.96 (1\text{H}, \text{d}, J = 1.8 \text{ Hz}, \text{H}-7)]$ , 2つの *trans*-オレフィンプロトン対  $[\delta = 5.93 (1\text{H}, \text{d}, J = 15.0 \text{ Hz}, \text{H}-2), 6.65 (1\text{H}, \text{dd}, J = 10.7, 17.7 \text{ Hz}, \text{H}-4), 6.78 (1\text{H}, \text{d}, J = 17.7 \text{ Hz}, \text{H}-5), 7.35 (1\text{H}, \text{dd}, J = 10.7, 15.0 \text{ Hz}, \text{H}-3)]$  および共役アミド基 ( $\delta_c = 166.2$ ) を帰属した。**5** の平面構造は各種 NMR 解析および Fig. 14 に太線で示した  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにおける部分構造、矢印で示した HMBC スペクトルにおける long-range 相関 (H-2 と C-1, H-5 と C-6, H<sub>2</sub>-1' と C-1) を基に明らかにした。さらに、**5** を 6 M 塩酸にて酸加水分解し、<sup>22)</sup> HPLC 分析 (示差屈折率検出器および旋光度検出器) により (*R*)-2-メチルブチルアミン<sup>23)</sup> を同定した。以上の物理化学的考察から、**5** は Fig.15 に示した化学構造であることが明らかとなった。

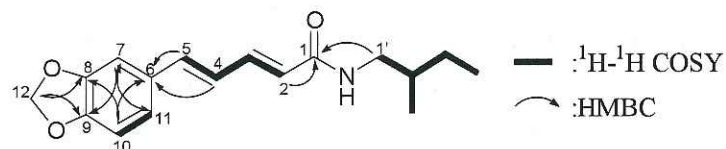


Fig. 14.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of **5**

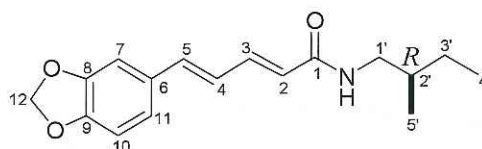


Fig. 15. Stereostructure of piperchabamide E (**5**)

Table 1.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data of piperchabamides A - D (1 - 4)

C-	1		2		3		4	
	$\delta_{\text{C}}$	$J_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{C}}$	$j_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{C}}$	$j_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{C}}$	$j_{\text{mod}}$
1	175.6	C	165.6	C	165.7	C	166.2	C
2	40.8	$\text{CH}_2$	120.3	CH	118.6	CH	123.6	CH
3	31.1	$\text{CH}_2$	145.9	CH	142.8	CH	144.7	CH
4	141.1	C	32.5	$\text{CH}_2$	128.9	CH	32.1	$\text{CH}_2$
5	128.4	CH	28.3 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$	142.5	CH	28.2 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$
6	128.6	CH	28.9 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$	32.9 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$	28.9 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$
7	126.0	CH	29.0 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$	28.8 <sup>b</sup>	$\text{CH}_2$	29.0 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$
8	128.6	CH	29.3 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$	29.0 <sup>b</sup>	$\text{CH}_2$	29.3 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$
9	128.4	CH	32.8	$\text{CH}_2$	29.0 <sup>b</sup>	$\text{CH}_2$	32.9	$\text{CH}_2$
10			129.3	CH	29.3 <sup>b</sup>	$\text{CH}_2$	129.3	CH
11			129.3	CH	32.9 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$	129.3	CH
12			132.4	C	129.3	CH	132.5	C
13			105.3	CH	129.3	CH	105.2	CH
14			147.9	C	132.5	C	147.9	C
15			146.5	C	105.4	CH	146.6	C
16			108.2	CH	147.9	C	108.0	CH
17			120.1	CH	146.5	C	120.2	CH
18			100.9	$\text{CH}_2$	108.2	CH	100.9	$\text{CH}_2$
19					120.2	CH		
20					100.9	$\text{CH}_2$		
1'	165.3	C	43.0 <sup>b</sup>	$\text{CH}_2$	43.2 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$	46.9	$\text{CH}_2$
2'	125.9	CH	25.5 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$	25.6 <sup>d</sup>	$\text{CH}_2$	28.6	CH
3'	145.1	CH	24.6	$\text{CH}_2$	24.7	$\text{CH}_2$	20.1	$\text{CH}_3$
4'	24.6	$\text{CH}_2$	26.6 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$	25.7 <sup>d</sup>	$\text{CH}_2$	20.1	$\text{CH}_3$
5'	41.0	$\text{CH}_2$	46.8 <sup>b</sup>	$\text{CH}_2$	46.9 <sup>c</sup>	$\text{CH}_2$		

<sup>a-d</sup> May be interchangeable within the same column.

Piperchabamide F (6) は正の旋光度  $\{[\alpha]_{\text{D}}^{27} +7.1^\circ (\text{c} = 0.27, \text{CHCl}_3)\}$  を持つ無色の油状物質として得られた。IR スペクトルにおいてメチレン、不飽和アミド基および芳香族に起因する 2924, 1626, 1561, 1509, 1491, 1258  $\text{cm}^{-1}$  の吸収が確認された。EI-MS および高分解 EI-MS において確認された分子イオンピークより分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_3$  を決定した。 $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 2 および実験の部) において、2つのメチル [ $\delta = 0.91$  (3H, dd,  $J = 6.6, 7.4$  Hz,  $\text{H}_3\text{-5}'$ ),  $0.92$  (3H, d,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{H}_3\text{-4}'$ )], 6つのメチレン [ $\delta = 1.16, 1.40$  (1H each, both m,  $\text{H}_2\text{-3}'$ ),  $1.49, 2.19$  (4H each, both m,  $\text{H}_2\text{-5, -6, -4, -7}$ ),  $3.13, 3.27$  (1H each, both m,  $\text{H}_2\text{-1}'$ )], メチン [ $\delta = 1.59$  (1H, m,  $\text{H-2}'$ )], 3,4-メチレンジオキシフェニル基 [ $\delta = 5.97$  (2H, s,  $\text{H}_2\text{-12}$ ),  $6.72$  (2H, br s,  $\text{H-14, -15}$ ),  $6.88$  (1H, br s,  $\text{H-11}$ )], 2つの *trans*-オレフィンプロトン対 [ $\delta = 5.75$  (1H, dd,  $J = 1.2, 15.4$  Hz,  $\text{H-2}$ ),  $6.00$  (1H, dt,  $J = 16.5, 6.7$  Hz,  $\text{H-8}$ ),  $6.29$  (1H, d,  $J = 16.5$  Hz,  $\text{H-9}$ ),  $6.81$  (1H, dt,  $J = 15.4, 7.1$  Hz,  $\text{H-3}$ )] および共役アミド基 ( $\delta_{\text{C}} = 165.8$ ) を帰属した。Fig. 16 において太線で示した  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトルにおける部分構造と、矢印で示した HMBC スペクトルにおいて  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  間に long-range 相関 ( $\text{H-2}$  と  $\text{C-1}$ ,  $\text{H-8, -9}$  と  $\text{C-10}$ ,  $\text{H}_2\text{-1}'$  と  $\text{C-1}$ ) が確認され、各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析



の結果, **6** の平面構造を構築した. さらに, **6** を 6 M 塩酸にて酸加水分解し, HPLC 分析 (示差屈折率検出器および旋光度検出器) を用いて (*R*)-2-メチルブチルアミンを同定した. 以上の物理化学的考察から, **6** は Fig. 17. に示した立体構造であることが明らかとなった.

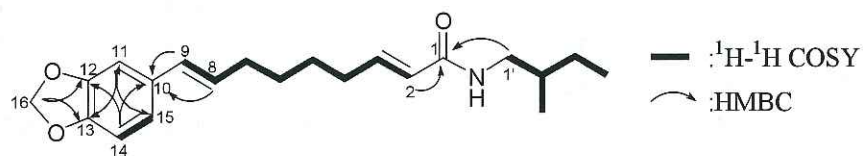


Fig. 16.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of **6**

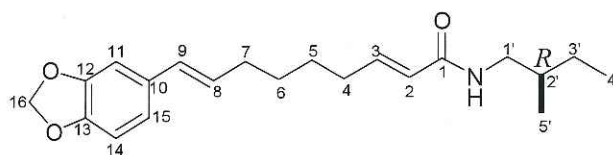


Fig. 17. Stereostructure of piperchabamide **F** (**6**)

Table 2.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) data of piperchabamides **E** (**5**) and **H** (**6**)

C-	<b>5</b>		<b>6</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	<i>jmod</i>	$\delta_{\text{C}}$	<i>jmod</i>
1	166.2	C	165.8	C
2	123.3	CH	123.5	CH
3	140.9	CH	144.2	CH
4	124.7	CH	31.8	$\text{CH}_2$
5	138.8	CH	27.7 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$
6	130.9	C	28.9 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$
7	105.7	CH	32.6	$\text{CH}_2$
8	148.2	C	128.6	CH
9	148.2	C	129.4	CH
10	108.5	CH	132.1	C
11	122.6	CH	105.2	CH
12	101.3	$\text{CH}_2$	147.7	C
13			146.3	C
14			108.0	CH
15			120.0	CH
16			100.8	$\text{CH}_2$
1'	45.3	$\text{CH}_2$	45.0	$\text{CH}_2$
2'	35.1	CH	34.9	CH
3'	27.1	$\text{CH}_2$	27.0	$\text{CH}_2$
4'	11.3	$\text{CH}_3$	11.3	$\text{CH}_3$
5'	17.2	$\text{CH}_3$	17.2	$\text{CH}_3$

<sup>a</sup> May be interchangeable

Piperchabaoside A (7) は負の旋光度  $\{[\alpha]_D^{23} -26.5^\circ (c = 2.40, \text{MeOH})\}$  を持つ白色の粉末として得られた。Positive-ion fast atom bombardment (以下 FAB)-MS および negative-ion FAB-MS において分子量関連イオンピーク  $m/z = 481 [M + \text{Na}]^+$  および  $m/z = 457 [M - \text{H}]^-$  が認められ、高分解能 FAB-MS より分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$  を有することが明らかとなった。また、IR スペクトル 3426, 1089, 1030  $\text{cm}^{-1}$  が観測されたことからヒドロキシ基およびエーテルの存在が示唆された。7 の 1.0 M 塩酸による酸加水分解により D-グルコースを同定した<sup>24)</sup>。7 の  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 3 および実験の部) において酸素を有するメチレン  $[\delta = 4.43, 4.68 (1\text{H each, both dd, } J = 5.8, 13.1 \text{ Hz, H}_2\text{-9})]$ , *trans*-オレフィンプロトン対  $[\delta = 6.45 (1\text{H, dt, } J = 16.2, 5.8 \text{ Hz, H-8}), 6.76 (1\text{H, d, } J = 16.2 \text{ Hz, H-7})]$  および一置換のベンゼン環  $[\delta = 7.22 (1\text{H, t, } J = 7.9 \text{ Hz, H-4}), 7.30 (2\text{H, dd, } J = 7.3, 7.9 \text{ Hz, H}_2\text{-3, -5}), 7.39 (2\text{H, d, } J = 7.3 \text{ Hz, H-2, -6})]$ , 2 つの  $\beta$ -D-グルコピラノシル部  $[\delta = 4.88 (1\text{H, d, } J = 7.6 \text{ Hz, H-1}'), 5.16 (1\text{H, d, } J = 7.9 \text{ Hz, H-1}'')]$  を帰属した。これらの結果は  $\beta$ -D-グルコピラノシル部を除いて rosin (45) のシグナルと類似していた。グルコシル結合は Fig. 19 に矢印で示した HMBC スペクトルにおける  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  間に long-range 相関 *inner*-Glc-1-proton  $[\delta = 4.88 (1\text{H, d, } J = 7.6 \text{ Hz, H-1}')]$  と 9-carbon ( $\delta_c = 69.8$ ), *terminal*-Glc-1-proton  $[\delta = 5.16 (1\text{H, d, } J = 7.9 \text{ Hz, H-1}'')]$  と *inner*-Glc-4-carbon ( $\delta_c = 81.2$ , C-4') を基に明らかにした。以上の物理化学的考察から、7 の化学構造は *trans*-cinnamyl alcohol *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside (7) であると決定した。

Piperchabaoside B (8) は負の旋光度  $\{[\alpha]_D^{26} -18.0^\circ (c = 3.21, \text{MeOH})\}$  を持つ白色の粉末として単離された。Positive-ion FAB-MS および negative-ion FAB-MS において分子量関連イオンピーク  $m/z = 625 [M + \text{Na}]^+$  および negative-ion FAB-MS:  $m/z = 601 [M - \text{H}]^-$  が認められ、高分解能 FAB-MS より分子式  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_{15}$  を有することが明らかとなった。また、IR スペクトル 3401, 1736, 1719, 1075, 1040  $\text{cm}^{-1}$  が観測されたことからヒドロキシ基、カルボニル基、エーテルの存在が示唆された。8 の  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Table 3 および実験の部) は、アシル部  $[\delta = 1.74 (3\text{H, s, H}_3\text{-6}'''), 3.13 (4\text{H, m, H}_2\text{-2}''', \text{-4}''')]$  を除いて 7 と類似していた。8 の 1.0% ナトリウムメトキシド (NaOMe)-MeOH による脱アシル化反応により、7 および (*S*)-3-hydroxy-3-methylglutaric acid monomethyl ester (8a) を得た [HPLC 分析 (示差屈折率検出器および旋光度検出器)] (Fig. 18).<sup>29)</sup> アシル残基とグルコシルの結合は、Fig. 19 に矢印で示した HMBC スペクトルにおける  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  間に long-range 相関 *inner*-Glc-1-proton  $[\delta = 4.86 (1\text{H, d, } J = 7.6 \text{ Hz, H-1}')]$  と 9-carbon ( $\delta_c = 69.9$ ), *terminal*-Glc-1-proton  $[\delta = 5.10 (1\text{H, d, } J = 7.9 \text{ Hz, H-1}'')]$  と *inner*-Glc-4-carbon ( $\delta_c = 81.6$ , C-4'), *inner*-Glc-6-protons  $[\delta = 4.49 (1\text{H, dd, } 6.1, 12.8 \text{ Hz}), 5.15 (1\text{H, br d, } J = \text{ca.} 13 \text{ Hz, H}_2\text{-6}')]$  と acyl ester carbonyl carbon ( $\delta_c = 171.6$ , C-1''') が観察されたことより明らかとなった。以上の物理化学的考察から、8 の化学構造は *trans*-cinnamyl alcohol *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-6-*O*-(*S*)-3-hydroxy-3-methylglutaroyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (8) であることが明らかとなった。

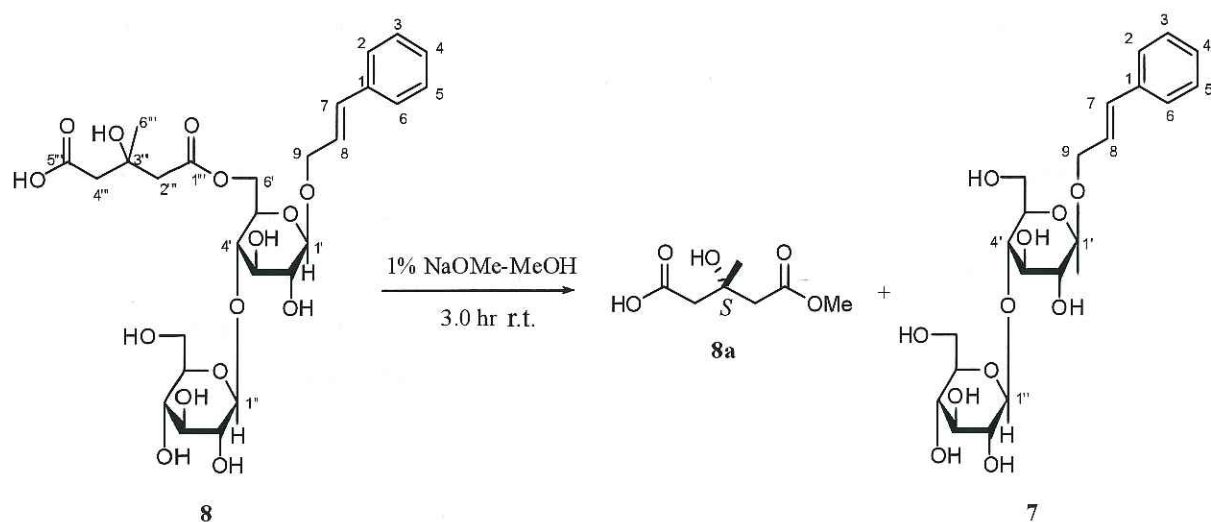


Fig. 18. Deacylation of **8**

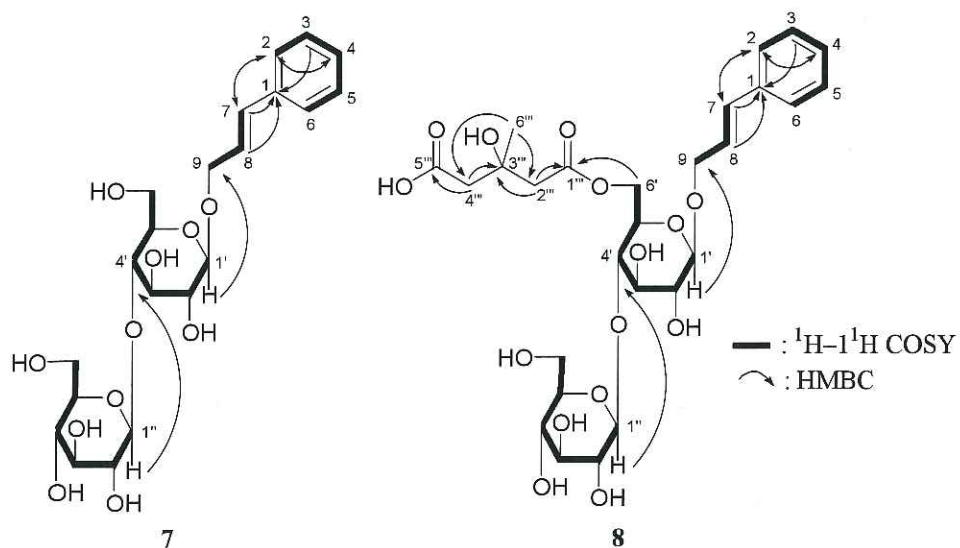


Fig. 19.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations of **7** and **8**



Table 3.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, pyridine- $d_5$ ) data of piperchabaosides A (7) and B (8)

C-	7		8	
	$\delta_{\text{C}}$	$j_{\text{mod}}$	$\delta_{\text{C}}$	$j_{\text{mod}}$
1	137.4	C	137.4	C
2,6	126.9	CH	126.9	CH
3,5	129.0	CH	128.9	CH
4	127.9	CH	127.9	CH
7	132.2	CH	132.4	CH
8	126.8	CH	126.9	CH
9	69.8	CH <sub>2</sub>	69.9	CH <sub>2</sub>
1'	103.6	CH	103.5	CH
2'	74.8	CH	74.5	CH
3'	76.8	CH	76.6	CH
4'	81.2	CH	81.6	CH
5'	76.5	CH	73.5	CH
6'	62.1	CH <sub>2</sub>	64.1	CH <sub>2</sub>
1''	104.9	CH	105.2	CH
2''	74.8	CH	74.9	CH
3''	78.4	CH	78.4	CH
4''	71.6	CH	71.9	CH
5''	78.2	CH	78.5	CH
6''	62.5	CH <sub>2</sub>	62.8	CH <sub>2</sub>
1'''			171.6	C
2'''			46.8	CH <sub>2</sub>
3'''			70.1	C
4'''			46.5	CH <sub>2</sub>
5'''			174.9	C
6'''			28.3	CH <sub>3</sub>

#### 第四節 *Piper chaba* 含有成分の胃粘膜保護作用の検討

*P. chaba* 果穂部より得た 80%(v/v) 含水アセトンエキスをエタノールおよびインドメタシン誘発ラット胃粘膜損傷モデルに対する抑制作用が確認された (エタノール誘発モデル:  $\text{ED}_{50}=14 \text{ mg/kg}$ , インドメタシン誘発モデル:  $12 \text{ mg/kg}$ ). その作用は抗潰瘍剤である *cetraxate hydrochloride* (エタノール誘発モデル:  $\text{ED}_{50}=96 \text{ mg/kg}$ , インドメタシン誘発モデル:  $97 \text{ mg/kg}$ ) よりも強いものであった. そこで, 80%(v/v) 含水アセトンエキスを AcOEt 可溶部および水可溶部に分画し, その活性を検討したところ, AcOEt 可溶部に活性が集約し (エタノール誘発モデル:  $\text{ED}_{50}=7.4 \text{ mg/kg}$ ), 水可溶部にその活性は認められなかった (Fig. 20).

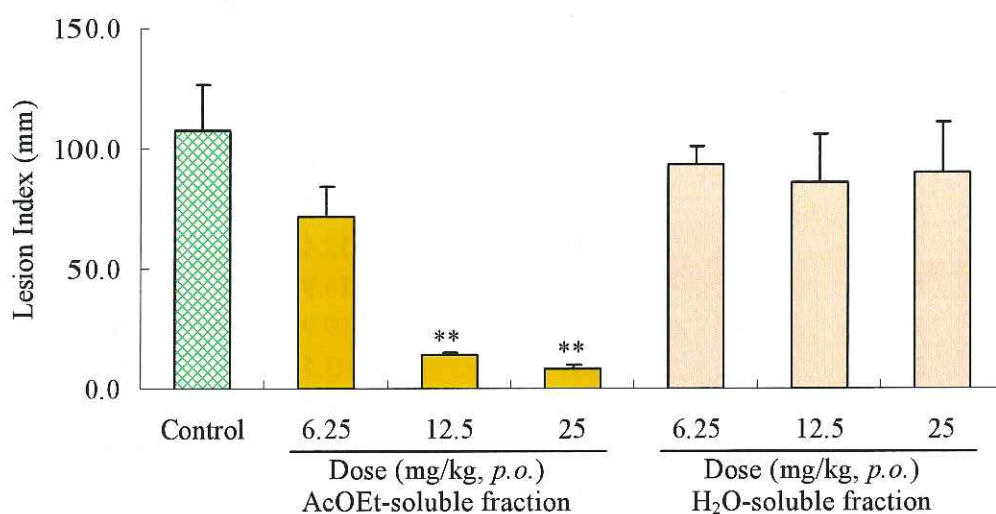


Fig. 20. Effects of the AcOEt- and H<sub>2</sub>O-soluble fractions from *P. chaba* on gastric lesions induced by ethanol in rats

Each column represents the mean with S.E.M. (n=5-7). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .

AcOEt 可溶部を各種クロマトグラフィーで分離、精製するとともに、*P. chaba* 含有成分の構造を明らかにし(第一章 第二節), 主な *P. chaba* 含有成分である methyl piperate (12), piperine (15),  $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine (19), piperlonguminine (21), dehydropiperlonguminine (22), piperlonguminine (25), retrofractamide B (28), guineensine (29), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-octadeca-2,4-dienamide (36) および *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,14*Z*)-eicosa-2,4,14-trienamide (40) のエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜保護作用を検討した。

その結果, Table 4 に示したように 15 にエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜保護作用が確認された (エタノール誘発モデル:ED<sub>50</sub>=24 mg/kg およびインドメタシン誘発モデル:13 mg/kg). 15 の胃粘膜保護作用は, トウガラシに含まれる酸アミド構造を有する capsaicin と同様に胃粘膜における TRPV1 刺激による活性化及び TRPV1 刺激以外のメカニズムが推定されている.<sup>19)</sup> また, 21, 22, 28, 36 および 40 は 25 mg/kg 投与にてエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜障害モデルにおいて, 抑制率 57.3~73.3%および 54.1~68.4%で胃粘膜損傷を有意に抑制した ( $p<0.01$ ). 一方, 12, 19 および 25 (各 25 mg/kg 投与) はエタノール誘発胃粘膜障害に対して 50.9~56.4%で有意に抑制作用が認められた ( $p<0.01$ ).

12 はエタノール誘発モデルにおいて胃粘膜保護作用が認められたが, インドメタシン誘発モデルにおいては抑制作用が認められなかった. エタノールによる胃粘膜損傷モデルは, 一酸化窒素や成長因子などによる胃粘膜関門の破綻<sup>58)</sup>や胃粘膜血流障害<sup>59)</sup>が原因の1つと考えられており, インドメタシンによる胃粘膜損傷モデルは, 内因性プロスタグランジンの産生低下による胃防御系の低下, 胃運動亢進などに起因していると考えられている.<sup>60)</sup> エタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜障害モデルとも様々な要因が複雑に関与していると考えられているが, その詳細については不明な部分も多い. エタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜損傷モデ

ルにおける *P. chaba* 含有成分の抑制作用は異なる作用様式であることが推測され, **12** はインドメタシン誘発モデルに対して抑制作用を示す化学構造を有していないことが考えられる. *P. chaba* 含有成分の化学構造の比較よりインドメタシン誘発モデルにおいて, 酸アミド構造が活性発現に重要である可能性が考えられた.

Table 4. Effects of the constituents (**12**, **15**, **19**, **21**, **22**, **25**, **28**, **29**, **36**, and **40**) from *P. chaba* on gastric lesions induced by ethanol or indomethacin in rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	n	Ethanol			n	Indmethacin		
			Length (mm)		Inhibition (%)		Length (mm)		Inhibition (%)
Control	—	9	122.6	± 11.3	—	9	77.1	± 6.7	—
Piperine ( <b>15</b> )	6.25	9	113.0	± 13.1	7.8	9	54.4	± 6.5*	29.4
	12.5	9	81.5	± 13.5*	33.5	9	37.9	± 5.5**	50.8
	25	9	54.8	± 6.3**	55.3	8	27.3	± 5.6**	64.6
	50	9	35.6	± 9.3**	71.0	5	1.2	± 0.3**	98.4
Control	—	6	118.6	± 16.2	—	6	89.5	± 9.8	—
Methyl piperate ( <b>12</b> )	25	6	54.1	± 7.4**	54.4	6	84.9	± 9.4	5.1
Piperanine ( <b>19</b> )	25	6	58.2	± 9.8**	50.9	6	62.8	± 10.1	29.8
Pipernonaline ( <b>21</b> )	25	6	31.7	± 11.8**	73.3	6	28.3	± 10.8**	68.4
Dehydropipernonaline ( <b>22</b> )	25	6	50.6	± 14.2**	57.3	6	34.1	± 11.0**	61.9
Piperlonguminine ( <b>25</b> )	25	5	51.7	± 9.7**	56.4	5	73.6	± 12.8	17.8
Retrofractamide B ( <b>28</b> )	25	6	39.9	± 13.3**	66.4	6	36.4	± 12.8**	59.3
Guineensin ( <b>29</b> )	25	6	78.6	± 13.0	33.7	6	54.3	± 9.8*	39.3
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-octadecadienamide ( <b>36</b> )	25	6	44.8	± 13.5**	62.2	6	41.1	± 7.4**	54.1
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> )-eicosatrienamide ( <b>40</b> )	25	6	31.9	± 9.6**	73.1	6	29.0	± 12.0**	67.6

Each value represents the mean±S.E.M. Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

## 第五節 小括

タイ産 *Piper chaba* HUNTER (syn. *Piper retrofractum* VAHL.) 果穂部の 80%(v/v) 含水アセトンエキスより, 4 種の既知芳香族化合物, 29 種の既知酸アミド化合物, 3 種の既知セスキテルペン, 2 種の既知フェニルプロパノイド配糖体を単離・同定するとともに, 6 種の新規酸アミド化合物である piperchabamide A (**1**)~F (**6**) および 2 種の新規フェニルプロパノイド配糖体 piperchabaoside A (**7**) および piperchabaoside B (**8**) を単離し, それらの化学構造を決定した.

また, 単離成分よりエタノールおよびインドメタシン誘発胃粘膜損傷抑制活性を有する成分を見出し, インドメタシン誘発性モデルにおいては酸アミド構造が活性発現に重要である可能性が考えられた.



## 第二章 *Piper chaba* の肝保護作用成分

### 第一節 緒言

C型肝炎ウイルスの感染およびアルコールの慢性的な摂取は、慢性肝炎、肝硬変さらには肝ガンの主な原因である。腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  は細胞のアポトーシスを誘導し臓器や組織の損傷を惹起することが知られており、肝臓において、肝毒素、虚血/再灌流障害、ウイルス性肝障害およびアルコールによる肝障害に関与している。<sup>61-63)</sup> そのため、TNF- $\alpha$  をターゲットとした抗炎症薬および肝保護薬の開発研究が実施されている。

D-ガラクトサミン(D-GalN)/リポ多糖(LPS)誘発肝障害モデルは免疫応答により惹起されている<sup>64)</sup>と考えられており、D-GalNにより肝細胞のTNF- $\alpha$ への感受性が増強され、LPSにより活性化されたマクロファージ(クッパー細胞)から産生されるTNF- $\alpha$ のような炎症性メディエーターが放出されることにより肝障害が引き起こることが明らかになっている。<sup>67)</sup> 特にTNF- $\alpha$ による肝細胞のアポトーシスはD-GalN/LPS誘発肝死モデルにおいて重要な役割を担っていることが報告されている。<sup>68)</sup>

これまでにD-GalN/LPS誘発モデルマウス、マウス初代培養肝細胞を用いたD-GalN誘発肝細胞死に与える影響を評価し、ケンボナシ(*Hovenia dulcis*)果実,<sup>69)</sup> 柴胡(*Bupleurum scorzonnerifolium*)根,<sup>57,71)</sup> 莪述(*Curcuma zedoaria*)根茎,<sup>72-74)</sup> ヒュウガトウキ(*Angelica furcijuga*)根,<sup>72,76)</sup> 白樺(*Betula platyphylla* var. *japonica*)樹皮,<sup>77)</sup> 青エンドウ(*Pisum sativum*)未熟種子,<sup>78)</sup> サラシア(*Salacia reticulata*),<sup>79)</sup> リンデン(*Tilia argentea*)花部,<sup>80)</sup> マリアハンド(*Anastatica hierochuntica*)全草,<sup>81)</sup> 三七人參(*Panax notoginseng*)花部,<sup>82)</sup> テイジーフラワー(*Cyperus longus*)全草,<sup>83)</sup> ヒルガオ科 *Erycibe expansa* 全草,<sup>10)</sup> 茶(*Camellia sinensis*)花部,<sup>84)</sup> 垂盆草(*Sedum sarmentosum*)全草,<sup>85,86)</sup> ベンケイソウ科 *Sinocrassula indica* 全草<sup>87)</sup>および花縮紗(*Hedychium coronarium*)花部<sup>88)</sup>などの天然薬物より肝保護成分が確認されている。*P. chaba*果穂部の80%(v/v)含水アセトン抽出エキスにおいてもD-GalN/LPS誘発急性肝障害モデルマウスに対する肝保護作用を見出したことから本研究に着手した。

### 第二節 *Piper chaba* の肝保護作用成分の探索

#### 第一項 D-GalN/LPS 誘発急性肝障害抑制作用

*P. chaba* 果穂部の80%(v/v)含水アセトン抽出エキスをD-GalN/LPS誘発急性肝障害モデルマウスに対する肝保護作用を、血清アスパラギン酸アミノ基転移酵素(sAST)およびアラニンアミノ基転移酵素(sALT)を指標に検討した。その結果、Fig. 21に示したとおり、25~100 mg/kgの経口投与においてsASTおよびsALTの上昇を用量依存的に抑制することが認められたことから、*P. chaba* 果穂部には肝保護作用を有する成分が含有されていることが示唆された。

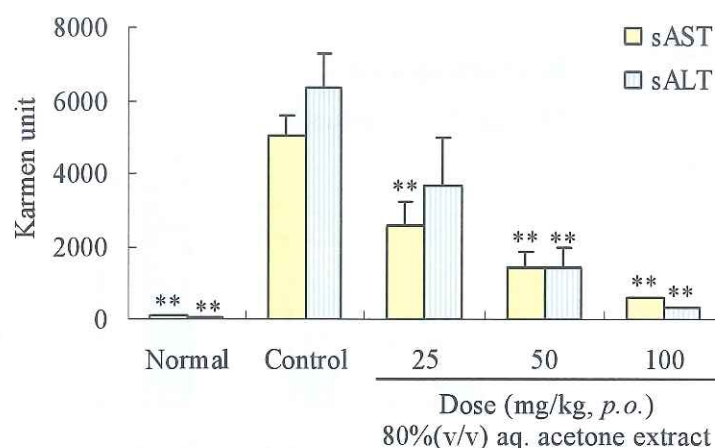


Fig. 21. Inhibitory effects of the 80%(v/v) aq. acetone extract from the fruit of *P. chaba* on D-GalN/LPS-induced liver injury in mice

Each column represents the mean with S.E.M. (n=7-9). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .

## 第二項 マウス初代培養肝細胞を用いた D-GalN または D-GalN/TNF- $\alpha$ 誘発肝細胞死抑制作用

D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルの発症機序は、まず、D-GalN が肝細胞内で代謝されることによりタンパク質および脂質代謝阻害、また RNA 合成能の低下を引き起こし、肝細胞での急性期タンパク質合成が阻害され、TNF- $\alpha$  への感受性が増大する。次に、LPS が間接的または直接的にマクロファージ (クッパー細胞) の活性化を促し、活性化したマクロファージより産生される TNF- $\alpha$  の作用により D-GalN で障害を受けた肝細胞に作用することにより肝細胞にアポトーシスが誘導されるためと考えられている。そこで、*P. chaba* 果穂部の 80%(v/v) 含水アセトンエキスおよび主な単離成分について、マウス初代培養肝細胞を用いた D-GalN または D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死抑制作用を 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) アッセイによる細胞生存率にて評価した。

80%(v/v) 含水アセトンエキスは、Fig. 22 に示したように D-GalN および D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死に対する抑制作用を示し、 $IC_{50}$  はそれぞれ 18  $\mu\text{g/mL}$  および 11  $\mu\text{g/mL}$  であった。また、単離成分においては、D-GalN 誘発肝細胞死に対して piperoleine B (**20**,  $IC_{50}=2.9 \mu\text{M}$ ), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-dodeca-2,4-dienamide (**34**,  $IC_{50}=9.3 \mu\text{M}$ ), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,14*Z*)-eicosa-2,4,14-trienamide (**40**,  $IC_{50}=6.4 \mu\text{M}$ ) に強い抑制作用が認められた。その作用は肝保護作用が知られているオオアザミ (*Silybum marianum*) の活性成分の 1 つである silybin ( $IC_{50}=39 \mu\text{M}$ )<sup>84-88,94-98</sup> よりも強いものであった (Table 5)。

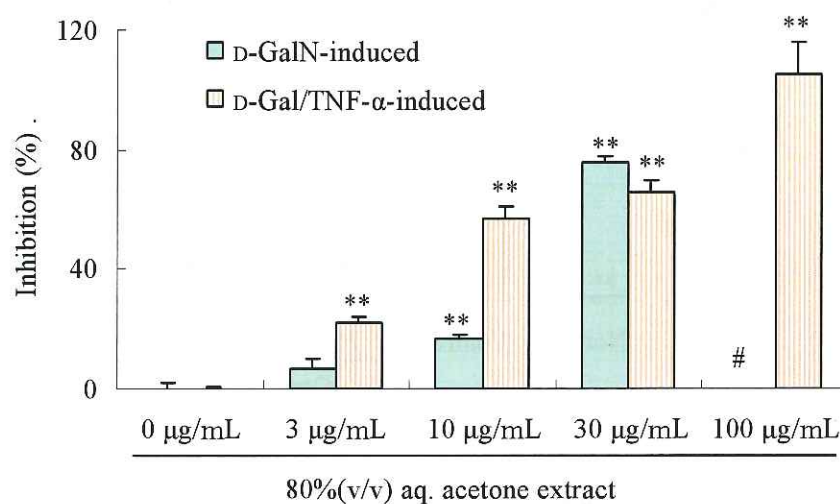


Fig. 22. Inhibitory effects of 80%(v/v) aqueous acetone extract from *P. chaba* on D-GalN or D-GalN/TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity in primary cultured mouse hepatocytes. Each column represents the mean with S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ . #Cytotoxic effect was observed.



Table 5. Inhibitory effects of chemical constituents from *P. chaba* on D-GalN-induced cytotoxicity in primary cultured mouse hepatocytes

	Inhibition (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
	0 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	
Piperonal (10)	0 $\pm$ 1	-3 $\pm$ 2	0 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	11 $\pm$ 1**	
Methyl piperate (12)	0 $\pm$ 0	-2 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3**	
Piperine (15)	0 $\pm$ 4	6 $\pm$ 6	9 $\pm$ 5	2 $\pm$ 3	-9 $\pm$ 2	
$\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine (= piperanine, 19)	0 $\pm$ 0	5 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2**	14 $\pm$ 3**	11 $\pm$ 2**	
Pipernonaline (21)	0 $\pm$ 2	-4 $\pm$ 3	-6 $\pm$ 2	-2 $\pm$ 2	-17 $\pm$ 3	
Piperundecalidine (23)	0 $\pm$ 0	-9 $\pm$ 2	-12 $\pm$ 2	-5 $\pm$ 0	-21 $\pm$ 2	
Piperlonguminine (25)	0 $\pm$ 0	7 $\pm$ 3	13 $\pm$ 3*	10 $\pm$ 3	-14 $\pm$ 2	
5,6-Dihydropiperlonguminine (26)	0 $\pm$ 0	-4 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	15 $\pm$ 4*	5 $\pm$ 3	
Retrofractamide A (27)	0 $\pm$ 3	3 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	
Pipercide (= retrofractamide B, 28)	0 $\pm$ 1	5 $\pm$ 8	-6 $\pm$ 5	-19 $\pm$ 3		
Guineensine (29)	0 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	6 $\pm$ 6	-20 $\pm$ 4#	
Brachystamide B (30)	0 $\pm$ 8	10 $\pm$ 6	18 $\pm$ 3	-17 $\pm$ 5	-22 $\pm$ 4#	
Retrofractamide C (31)	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 3	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 4	-18 $\pm$ 2	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-deca-2,4-dienamide (33)	0 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-dodeca-2,4-dienamide (34)	0 $\pm$ 3	17 $\pm$ 6	41 $\pm$ 14**	82 $\pm$ 6**	75 $\pm$ 9**	9.3
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-octadeca-2,4-dienamide (36)	0 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> )-eicosa-2,4,14-trienamide (40)	0 $\pm$ 0	32 $\pm$ 6**	53 $\pm$ 2**	66 $\pm$ 4**	89 $\pm$ 10**	6.4
Silybin	0 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	45 $\pm$ 9**	77 $\pm$ 6**	39

	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	
Piperoleine B (20)	0 $\pm$ 3	21 $\pm$ 4	64 $\pm$ 5**	73 $\pm$ 8**	92 $\pm$ 3**	2.9

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. # Cytotoxic effect was observed.

一方, D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死においては, brachystamide B (30) および 40 を除いてほとんどの酸アミド成分に 1~30  $\mu$ M にて有意な細胞死抑制作用が認められ, 特に piperchabamide B (2, 抑制率: 63%), piperlonguminine (25, 50%), retrofractamide C (31, 51%), piperchabamide D (4, 57%) および pipercide (= retrofractamide B, 28, 54%) は, 3  $\mu$ M にて 50% 以上の抑制作用が認められた(IC<sub>50</sub>=3  $\mu$ M). また, piperchabamide A (1, IC<sub>50</sub>=14  $\mu$ M), C (3, 6.7  $\mu$ M), E (5, 4.9  $\mu$ M),  $\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine (19, 17  $\mu$ M), piperoleine B (20, 17  $\mu$ M), piperundecalidine (23, 11  $\mu$ M) および 5,6-dihydropiperlonguminine (26, 8.2  $\mu$ M) に silybin (15  $\mu$ M)と同程度あるいはそれ以上の作用が認められた. これら含有酸アミド化合物と D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発細胞死抑制作用との構造活性相関について次の知見が示唆された. 酸アミド構造の存在は活性発現に必須であること (methyl piperate (12, 抑制率: 21%, 30  $\mu$ M)<piperine (15, 68%)). また, 芳香環と酸ア

ミド構造との間の側鎖部が 1,9-デカジエン構造を有する化合物 (piperchabamide B (2) および D (4)) が最も強い作用が認められ、側鎖部の炭素数と二重結合の有無などにより活性強度に影響を及ぼすことが示唆された。

Table 6. Inhibitory effects of chemical constituents from *P. chaba* on D-GalN/TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity in primary cultured mouse hepatocytes

	Inhibition (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	
Piperchabamide A (1)	0 $\pm$ 4		29 $\pm$ 1**	32 $\pm$ 2**	70 $\pm$ 7**	14
Piperchabamide B (2)	0 $\pm$ 2		63 $\pm$ 6**	74 $\pm$ 3**	78 $\pm$ 5**	<3
Piperchabamide C (3)	0 $\pm$ 3		42 $\pm$ 5**	52 $\pm$ 1**	68 $\pm$ 5**	6.7
Piperchabamide D (4)	0 $\pm$ 1		57 $\pm$ 3**	77 $\pm$ 3**	37 $\pm$ 4**	<3
Piperchabamide E (5)	0 $\pm$ 2		34 $\pm$ 2**	71 $\pm$ 2**	98 $\pm$ 6**	4.9
Piperonal (10)	0 $\pm$ 4		20 $\pm$ 1	23 $\pm$ 5**	39 $\pm$ 2**	
Methyl piperate (12)	0 $\pm$ 2		18 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2**	21 $\pm$ 5	
Piperine (15)	0 $\pm$ 3		23 $\pm$ 5**	46 $\pm$ 4**	68 $\pm$ 3**	12
$\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine (= piperanine, 19)	0 $\pm$ 2		31 $\pm$ 5*	50 $\pm$ 2**	53 $\pm$ 2**	17
Piperoline B (20)	0 $\pm$ 10	20 $\pm$ 3*	29 $\pm$ 3**	33 $\pm$ 1**	64 $\pm$ 7**	17
Pipernonaline (21)	0 $\pm$ 4		17 $\pm$ 6	31 $\pm$ 3**	48 $\pm$ 2**	> 30
Piperundecalidine (23)	0 $\pm$ 2	27 $\pm$ 6*	40 $\pm$ 3**	49 $\pm$ 8**	58 $\pm$ 5**	11
Piperlonguminine (25)	0 $\pm$ 6	27 $\pm$ 4	50 $\pm$ 6**	54 $\pm$ 6**	66 $\pm$ 3**	ca. 3
5,6-Dihydropiperlonguminine (26)	0 $\pm$ 6	34 $\pm$ 12	43 $\pm$ 9**	43 $\pm$ 5**	66 $\pm$ 6**	8.2
Retrofractamide A (27)	0 $\pm$ 3		32 $\pm$ 5**	35 $\pm$ 5**	60 $\pm$ 5**	21
Pipercide (= retrofractamide B, 28)	0 $\pm$ 3	32 $\pm$ 5	54 $\pm$ 4**	51 $\pm$ 3**	26 $\pm$ 2**,#	2.6
Guineensine (29)	0 $\pm$ 2		26 $\pm$ 2**	33 $\pm$ 3**	12 $\pm$ 1**,#	
Brachystamide B (30)	0 $\pm$ 3		22 $\pm$ 3**	11 $\pm$ 2*	-6 $\pm$ 2	
Retrofractamide C (31)	0 $\pm$ 3	30 $\pm$ 13	51 $\pm$ 2**	31 $\pm$ 6**	37 $\pm$ 2**	ca.3
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-deca-2,4-dienamide (33)	0 $\pm$ 7		19 $\pm$ 3	25 $\pm$ 3**	42 $\pm$ 3**	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-dodeca-2,4-dienamide (34)	0 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	21 $\pm$ 3**	31 $\pm$ 6**	44 $\pm$ 4**	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-octadeca-2,4-dienamide (36)	0 $\pm$ 5	15 $\pm$ 10	37 $\pm$ 2**	41 $\pm$ 1**	43 $\pm$ 5**	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> )-eicosa-2,4,14-trienamide (40)	0 $\pm$ 4	10 $\pm$ 5	3 $\pm$ 2	19 $\pm$ 12	27 $\pm$ 6**	
Silybin	0 $\pm$ 2	11 $\pm$ 9	19 $\pm$ 6	37 $\pm$ 5**	93 $\pm$ 4**	15

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p$ <0.05,

\*\* $p$ <0.01. # Cytotoxic effect was observed.

### 第三項 マウス腹腔内マクロファージを用いた LPS 刺激による一酸化窒素産生抑制作用

次に, LPS 刺激したマクロファージからの炎症性メディエーター産生に対する *P. chaba* 含有成分の作用について, マクロファージ活性化の指標の 1 つである一酸化窒素(NO)産生能について検討を行った.<sup>99,100)</sup> その結果, piperchabamide A (1, IC<sub>50</sub>=20  $\mu$ M) および C (3, IC<sub>50</sub>=42  $\mu$ M) に NO 産生抑制作用が認められた. その活性は NO 合成酵素阻害剤の *N*<sup>G</sup>-モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA, IC<sub>50</sub>=36  $\mu$ M) と同等, もしくはより強い活性を示した.

これら *in vitro* 試験で得られた知見から, *P. chaba* 果穂部より D-GalN 誘発肝細胞死抑制成分 (20, 34 および 40), LPS 誘発マクロファージ活性化抑制成分 (1 および 3), D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死抑制成分 (2, 4, 25, 28, 31 など) を見出した.

Table 7. Inhibitory effects of 80%(v/v) aqueous acetone extract from *P. chaba* and its chemical constituents on NO production in LPS-activated mouse peritoneal macrophages

	Inhibition (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
	0 $\mu$ g/mL	3 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL	30 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	
80%(v/v) aq. Acetone ext.	0 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	10 $\pm$ 3**	34 $\pm$ 2**	90 $\pm$ 1**	44
	0 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Piperchabamide A (1)	0 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	27 $\pm$ 1**	98 $\pm$ 1**	100 $\pm$ 1**,#	20
Piperchabamide B (2)	0 $\pm$ 5	5 $\pm$ 1	11 $\pm$ 3*	24 $\pm$ 1**	99 $\pm$ 1**,#	
Piperchabamide C (3)	0 $\pm$ 4	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2*	23 $\pm$ 1**	86 $\pm$ 1**	42
Piperchabamide D (4)	0 $\pm$ 4	-1 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	10 $\pm$ 2*	22 $\pm$ 1**	
Piperchabamide E (5)	0 $\pm$ 4	1 $\pm$ 4	6 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1**	46 $\pm$ 2**	
Piperonal (10)	0 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 4	7 $\pm$ 1	
Methyl piperate (12)	0 $\pm$ 3	2 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2	8 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2**	
Piperine (15)	0 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2	2 $\pm$ 3	11 $\pm$ 5	49 $\pm$ 4**	
$\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine (= piperanine, 19)	0 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 3	7 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1**	
Pipernonaline (21)	0 $\pm$ 3	-3 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	47 $\pm$ 1**	99 $\pm$ 1**,#	
Dehydropipernonaline (22)	0 $\pm$ 2	23 $\pm$ 4**	25 $\pm$ 5**	28 $\pm$ 7**	101 $\pm$ 1**,#	
Piperundecalidine (23)	0 $\pm$ 8	6 $\pm$ 10	3 $\pm$ 6	46 $\pm$ 3**	97 $\pm$ 1**,#	
5,6-Dihydropiprlonguminine (26)	0 $\pm$ 9	-13 $\pm$ 8	-1 $\pm$ 4	-4 $\pm$ 5	25 $\pm$ 3	
Retrofractamide A (27)	0 $\pm$ 5	4 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 3	-8 $\pm$ 4	-14 $\pm$ 7*	
L-NMMA	0 $\pm$ 3	1 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3**	43 $\pm$ 2**	71 $\pm$ 2**	36
CAPE	0 $\pm$ 2	6 $\pm$ 5	44 $\pm$ 3**	86 $\pm$ 1**	100 $\pm$ 1**,#	11

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p$ <0.05,

\*\* $p$ <0.01. # Cytotoxic effect was observed.



#### 第四項 L929 細胞を用いた TNF- $\alpha$ 誘発細胞死抑制作用

加えて、肝細胞の TNF- $\alpha$  に対する感受性に及ぼす *P. chaba* 含有成分の影響について明らかにする目的で、TNF- $\alpha$  高感受性細胞株であるマウス繊維芽細胞 L929 細胞を用いた TNF- $\alpha$  誘発細胞死抑制作用を検討した。<sup>101,102)</sup> Table 8 に示したように **1** ( $IC_{50}=13\ \mu M$ ), **15** ( $42\ \mu M$ ), **20** ( $64\ \mu M$ ), **2** ( $33\ \mu M$ ), **3** ( $42\ \mu M$ ) および **40** ( $25\ \mu M$ ) に活性が認められた。**1** の活性はウコン (*Curcuma longa*) 由来の肝障害抑制作用成分である curcumin ( $IC_{50}=20\ \mu M$ ) と同程度であった。

Table 8. Inhibitory effects of 80%(v/v) aqueous acetone extract from *P. chaba* and its chemical constituents on TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity in L929 cells

	Inhibition (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
	0 $\mu$ g/mL	3 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL	30 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL	
80%(v/v) aq. Acetone ext.	0 $\pm$ 1	8 $\pm$ 3	19 $\pm$ 1**	85 $\pm$ 2**		14

	Inhibition (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
	0 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	100 $\mu$ M	
Piperchabamide A (1)	0 $\pm$ 4	23 $\pm$ 5**	35 $\pm$ 3**	71 $\pm$ 1**	90 $\pm$ 5**	13
Piperchabamide B (2)	0 $\pm$ 4	4 $\pm$ 7	12 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3*	94 $\pm$ 4**	33
Piperchabamide C (3)	0 $\pm$ 4	-2 $\pm$ 3	2 $\pm$ 7	25 $\pm$ 4**	92 $\pm$ 5**	42
Piperchabamide D (4)	0 $\pm$ 4	8 $\pm$ 4	-3 $\pm$ 3	-23 $\pm$ 2	-20 $\pm$ 3	
Piperchabamide E (5)	0 $\pm$ 2	0 $\pm$ 5	-4 $\pm$ 2	-1 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3**	
Piperonal (10)	0 $\pm$ 4	1 $\pm$ 8	-4 $\pm$ 6	0 $\pm$ 8	10 $\pm$ 7	
Methyl piperate (12)	0 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2**	15 $\pm$ 3**	
Piperine (15)	0 $\pm$ 2	10 $\pm$ 3	17 $\pm$ 5**	22 $\pm$ 1**	82 $\pm$ 2**	42
$\Delta^{\alpha,\beta}$ -dihydropiperine (= piperanine, 19)	0 $\pm$ 1	12 $\pm$ 4	11 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	-1 $\pm$ 2	
Piperoline B (20)	0 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1**	25 $\pm$ 1**	66 $\pm$ 4**	64
Pipernonaline (21)	0 $\pm$ 3	8 $\pm$ 1	10 $\pm$ 3	-5 $\pm$ 1	-10 $\pm$ 2	
Piperundecalidine (23)	0 $\pm$ 1	5 $\pm$ 3	-1 $\pm$ 9	24 $\pm$ 1**	29 $\pm$ 3**	
Piperlonguminine (25)	0 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2**	25 $\pm$ 1**	23 $\pm$ 2**	
Pipercide (= retrofractamide B, 28)	0 $\pm$ 4	1 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2	1 $\pm$ 2	0 $\pm$ 3	
Guineensine (29)	0 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	-9 $\pm$ 7	-18 $\pm$ 2	
Brachystamide B (30)	0 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	-11 $\pm$ 1	-15 $\pm$ 1	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- deca-2,4-dienamide (33)	0 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1*	18 $\pm$ 2**	19 $\pm$ 3**	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- dodeca-2,4-dienamide (34)	0 $\pm$ 4	0 $\pm$ 5	-2 $\pm$ 5	-3 $\pm$ 4	34 $\pm$ 6**	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )- octadeca-2,4-dienamide (36)	0 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	-2 $\pm$ 1	-4 $\pm$ 3	-3 $\pm$ 2	
<i>N</i> -isobutyl-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>Z</i> )- eicosa-2,4,14-trienamide (40)	0 $\pm$ 3	14 $\pm$ 1**	32 $\pm$ 1**	45 $\pm$ 2**	82 $\pm$ 2**	25
Curcumin	0 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2**	47 $\pm$ 4**	52 $\pm$ 4**		20

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p$ <0.05,

\*\* $p$ <0.01. # Cytotoxic effect was observed.

### 第三節 Piperine のマウスにおける D-GalN/LPS による血清 TNF- $\alpha$ 濃度に及ぼす作用および作用様式

最後に *P. chaba* の主要成分である piperine (15) について、D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスに対する作用を検討したところ、Fig. 23 に示したように 5 mg/kg の経口投与にて有意な肝障害抑制作用が認められた。そこで、その作用機序について検討した。D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルは活性化されたマクロファージ (クッパー細胞) より TNF- $\alpha$  が過剰産生されることにより肝細胞障害が誘発されることから、D-GalN/LPS 誘発時のマウス血清中 TNF- $\alpha$  濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、hydrocortisone とは異なり D-GalN/LPS 誘発モデルで抑制作用を示した投与量においても血清中 TNF- $\alpha$  濃度にほとんど影響を与えなかった (Fig. 24)。また、LPS 刺激によるマウス腹腔マクロファージの NO 産生に対して強い抑制作用を示さなかった (Table 7)。このことから、15 は hydrocortisone と異なり、マクロファージ (クッパー細胞) の活性化を抑制しないことが推察された。一方、D-GalN/TNF- $\alpha$  による肝細胞死抑制作用を示したが (Fig. 25-(A))、D-GalN のみによる細胞死に対しては抑制活性を示さなかった (Fig. 25-(B))。加えて、TNF- $\alpha$  に感受性の高い L929 細胞を用いて TNF- $\alpha$  誘発細胞死に対する作用を検討したところ、TNF- $\alpha$  による細胞死を濃度依存的に抑制することが明らかとなった (Fig. 25-(C))。以上のことから、D-GalN/LPS 誘発肝死モデルにおいて 15 は、TNF- $\alpha$  産生量には影響を与えず、D-GalN で障害を受けた肝細胞の TNF- $\alpha$  感受性を低減し、TNF- $\alpha$  による肝細胞死を抑制することによる肝保護作用を発現させていることが推察された。

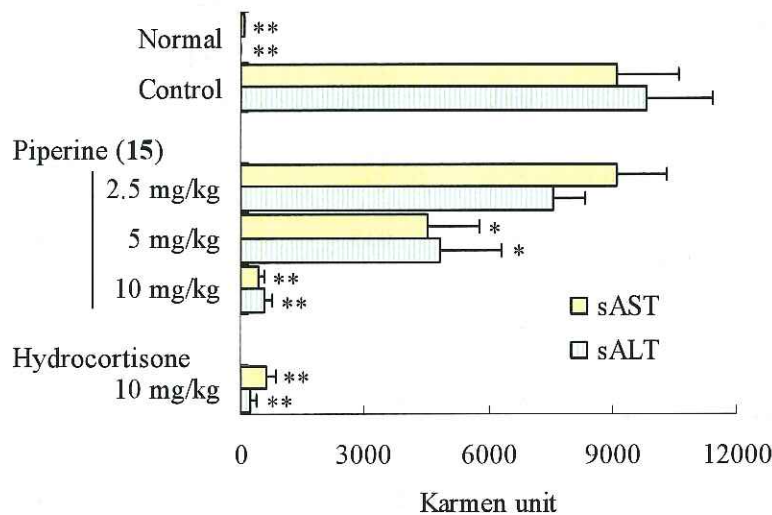


Fig. 23. Inhibitory effects of piperine (15) on D-GalN/LPS-induced liver injury in mice. Each column represents the mean with S.E.M. (n=4-8). Significantly different from the control group, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.



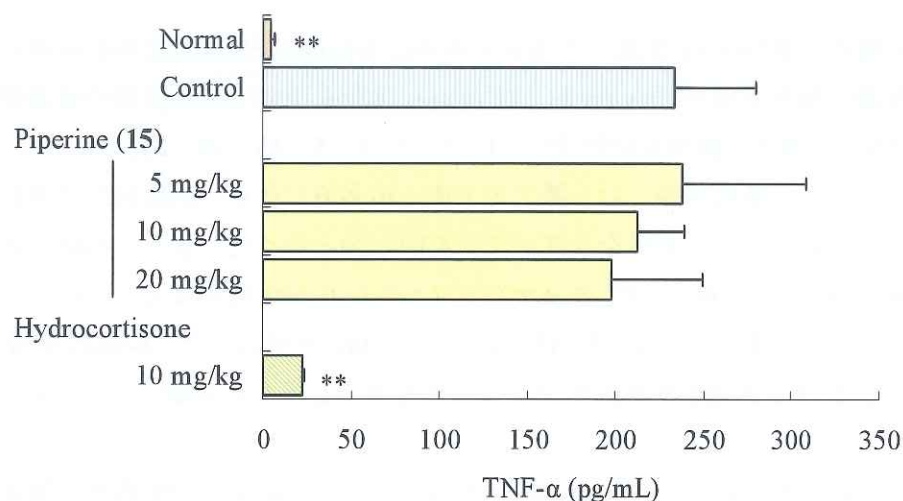


Fig. 24. Inhibitory effects of piperine (15) on the increase in serum TNF- $\alpha$  levels induced by D-GalN/LPS in mice

Each column represents the mean with S.E.M. (n=4-6). Significantly different from the control group, \*\* $p$ <0.01.

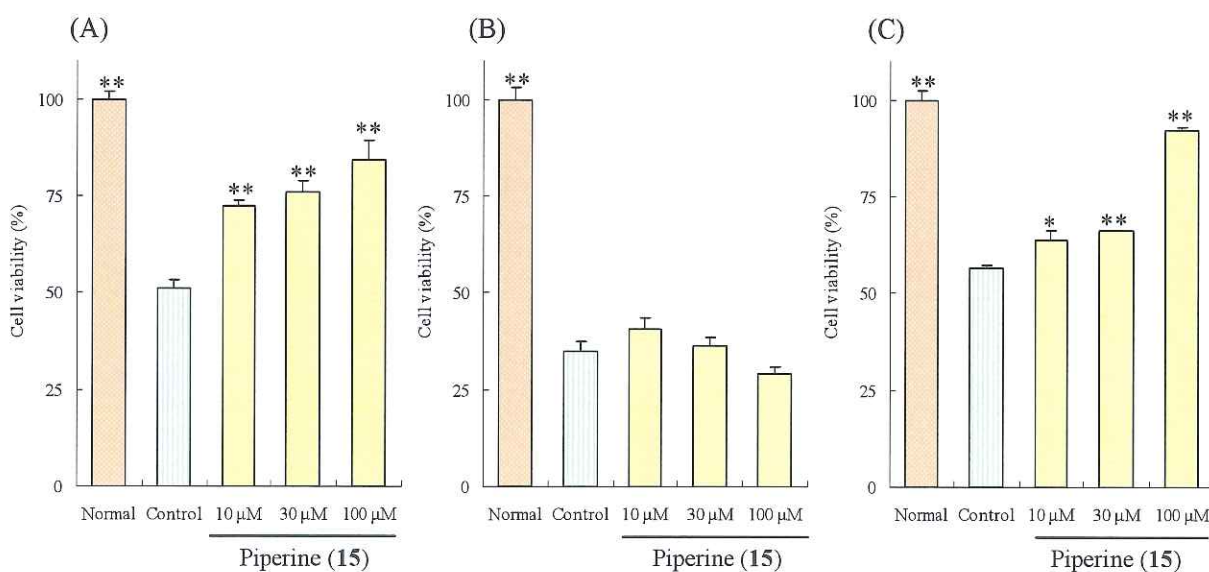


Fig. 25. Inhibitory effects of piperine (15) on D-GalN/TNF- $\alpha$  and D-GalN-induced cytotoxicity in primary cultured mouse hepatocytes and TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity in L929 cells

(A): D-GalN/TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity in primary cultured mouse hepatocytes, (B): D-GalN-induced cytotoxicity in primary cultured mouse hepatocytes, (C): TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity in L929 cells. Values represent the mean with S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

#### 第四節 小括

*P. chaba* 果穂部の 80%(v/v) 含水アセトンエキスを D-GalN/LPS 誘発急性肝障害モデルマウスに対する肝保護作用を見出し, *in vitro* および *in vivo* 試験を用いて活性成分の探索研究を実施した. D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死抑制成分 (1, 2, 3, 4, 5, 15, 19, 20, 23, 25, 26, 27, 28 および 31) を見出し, 活性発現には, 酸アミド構造が必須であり, 側鎖部の炭素数と二重結合の有無などにより活性強度に影響を及ぼすことが明らかとなった. また D-GalN 誘発肝細胞死抑制成分 (20, 34 および 40), LPS 誘発マクロファージ活性化抑制成分 (1 および 3), さらに TNF- $\alpha$  誘発細胞死抑制成分 (1, 2, 3, 15, 20 および 40) を見出した. D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死抑制成分と TNF- $\alpha$  誘発細胞死抑制成分の活性発現が必ずしも相関していないが, 各細胞の TNF- $\alpha$  への感受性のメカニズムが異なっていることが考えられる.

*P. chaba* の主要成分の 1 つである piperine (15) について, D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルの抑制メカニズムについて検討した結果, D-GalN で障害を受けた肝細胞の TNF- $\alpha$  感受性を低減し, TNF- $\alpha$  による肝細胞死を抑制することで肝保護作用を発現させていることが推察された.

### 第三章 *Piper chaba* 含有成分の脂肪細胞分化誘導促進作用およびマウス血中移行

#### 第一節 緒言

糖尿病は初期段階では痛みも自覚症状もないが、放置することで失明、人工透析、壊疽などの合併症が引き起こる。高脂肪食の過剰摂取、運動不足などによる肥満とそれに伴い肥大化した肥満細胞より分泌される TNF- $\alpha$ 、レジスチン、遊離脂肪などはインスリンの情報伝達を障害しインスリン抵抗性を惹起することで2型糖尿病を発症させる。インスリン抵抗性改善薬として知られている糖尿病治療薬の1つである pioglitazone などのチアゾリジン誘導体は、Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) の強力なアゴニストであり、PPAR $\gamma$  を介し肥大脂肪細胞のアポトーシス、小型脂肪細胞への分化、血中アディポネクチン濃度を上昇させることによりインスリン抵抗性を改善すると考えられている。<sup>107-110)</sup> これまで 3T3-L1 細胞は抗糖尿病 PPAR $\gamma$  アゴニストの探索研究に用いられてきた。<sup>111-116)</sup> すなわちチアゾリジン誘導体のような PPAR $\gamma$  アゴニストが脂肪前駆細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化を促進し、中性脂質の蓄積、アディポネクチンの産生を増加させることに着目し、天然薬物より抗糖尿病物質の探索について報告がなされている。<sup>114-116)</sup>

近年、辛味成分である allyl isothiocyanate, zingerone, curcumin などが、3T3-L1 細胞における TNF- $\alpha$  や NO といった炎症誘発性物質の産生を抑制し、単球走化性因子である MCP-1 の遊離を有意に抑制することが報告されている。<sup>117)</sup> また、TRPV1 アゴニストとしてよく知られている capsaicin は、3T3-L1 細胞の脂肪蓄積を妨げる一方、アディポネクチンの発現を促進すると報告されている。<sup>118,119)</sup> 一方、同様に piperine (15)<sup>19,20)</sup> を含有する *P. chaba* からは単離された piperlonguminine (25), retrofractamide A (27) および B (28) に脂肪細胞への分化誘導促進作用が見出されている。<sup>120)</sup> 本研究においては、詳細が明らかとなっていない 25 の脂肪細胞への分化誘導促進作用について検討するとともに、15, 25 および 27 の血中への移行について検討を行った。

#### 第二節 Piperlonguminine の PPAR $\gamma$ アゴニスト様作用

##### 第一項 中性脂質蓄積、糖取込みおよびアディポネクチン遊離に与える影響

3T3-L1 細胞を用い piperlonguminine (25) の脂肪細胞への分化誘導促進作用を検討した。3T3-L1 細胞内の中性脂質 (triglyceride (TG)) の蓄積を分化の指標として検討した結果、有意な TG 蓄積効果が認められた (Fig. 26)。

次に、PPAR $\gamma$  アゴニストは脂肪細胞へのグルコースの取込みを上昇させることが知られていることから、<sup>111)</sup> 25 による細胞への <sup>3</sup>H-2-deoxyglucose の取込み量を検討したところ、troglitazone と同様に濃度依存的な促進効果が認められた (Fig. 27(A))。しかし、troglitazone と同様にインスリン共存下ではその作用はほとんど認められなかった (Fig. 27(B))。

アディポネクチンは脂肪細胞が産生するホルモンであり、脂質代謝異常、インスリン抵抗の改善する。<sup>108)</sup> そこで、培養培地中に遊離されるアディポネクチン量への影響を検討した結果、troglitazone と同様に 25 では 10  $\mu$ M および 30  $\mu$ M の濃度でアディポネクチン濃度を有意に上昇させた (Fig. 28)。



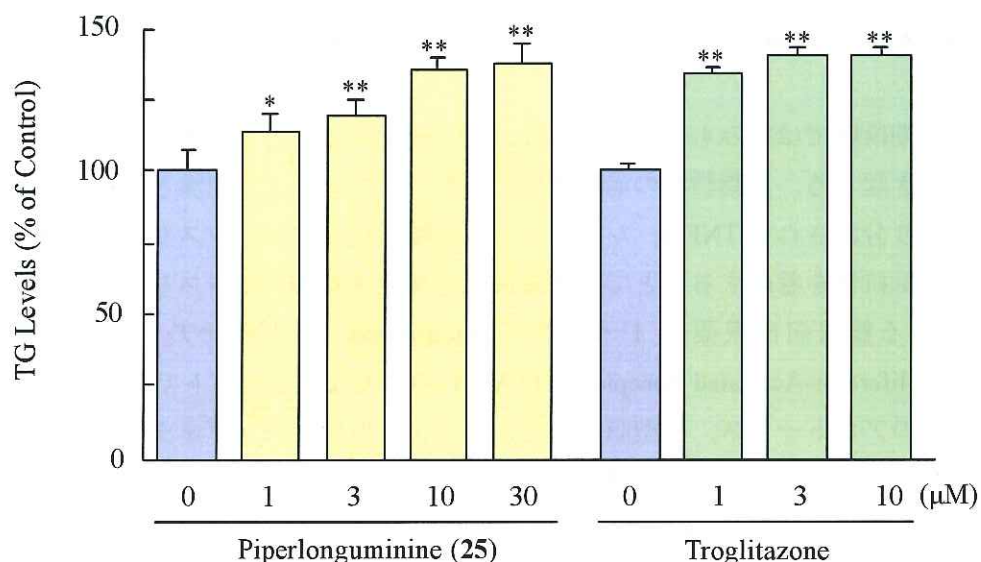


Fig. 26. Effects of piperlonguminine (25) and troglitazone on TG Levels in 3T3-L1 cells  
Values represent the means with S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

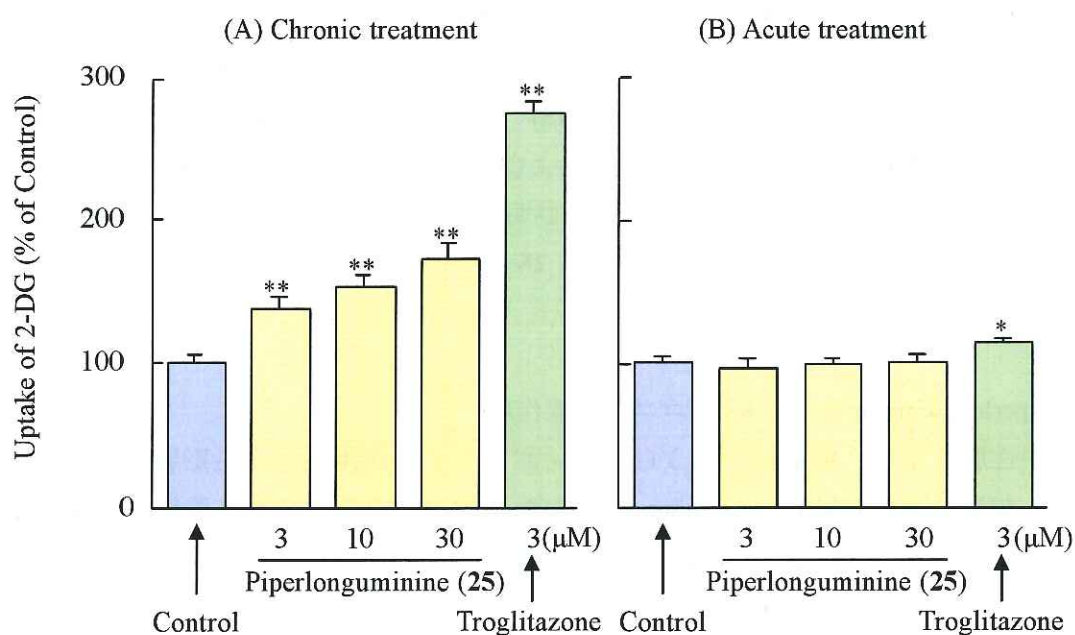


Fig. 27. Effects of piperlonguminine (25) and troglitazone on uptake of 2-deoxyglucose (2-DG) in 3T3-L1 cells

(A) Chronic treatment: The test compound dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the differentiation and maintenance media and buffer A.

(B) Acute treatment: The test compound dissolved in DMSO was added to buffer A.

Values represent the mean with S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

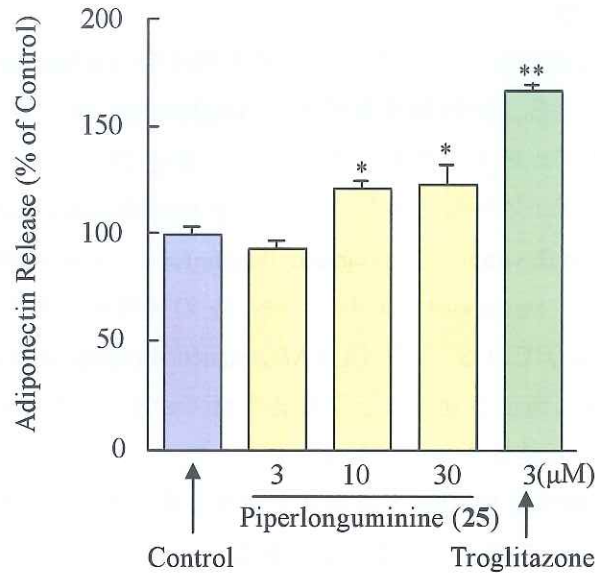


Fig. 28. Effects of piperlonguminine (25) and troglitazone on release of adiponectin into the medium. Adiponectin concentrations were measured in cultures at 8 days after the induction of cell differentiation.

Values represent the means with S.E.M. (n=4). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

## 第二項 アディポネクチン, GLUT4, fatty acid-binding protein (aP2) mRNA 発現

Piperlonguminine (25) の遺伝子発現に与える影響をアディポネクチン, GLUT4 および脂質生成マーカーである aP2 の mRNA 発現量を指標に検討した. Table 9 に示したとおり, troglitazone 処理と同様に 25 処理によりアディポネクチン, GLUT4 および aP2 の mRNA 発現量の増加が観察された. しかしながら, 25 処理は troglitazone 処理とは異なり PPAR $\gamma$ 2 mRNA の発現量の増加も認められた.

Table 9. Effects of piperlonguminine on expression of adiponectin, PPAR $\gamma$ 2, GLUT4, and aP2

	Ratio (target gene/ $\beta$ -actin mRNA)				
	Piperlonguminine				Troglitazone
	0 $\mu$ M	3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	30 $\mu$ M	3 $\mu$ M
Adiponectin	1.00 $\pm$ 0.09	1.36 $\pm$ 0.24	1.51 $\pm$ 0.13	1.71 $\pm$ 0.17*	2.75 $\pm$ 0.07**
PPAR $\gamma$ 2	1.00 $\pm$ 0.07	1.36 $\pm$ 0.17	1.50 $\pm$ 0.05**	1.53 $\pm$ 0.11**	0.93 $\pm$ 0.03
GLUT4	1.00 $\pm$ 0.04	2.06 $\pm$ 0.31**	3.32 $\pm$ 0.17**	4.24 $\pm$ 0.44**	6.55 $\pm$ 1.00**
aP2	1.00 $\pm$ 0.02	0.84 $\pm$ 0.04	1.21 $\pm$ 0.07	2.01 $\pm$ 0.07**	7.00 $\pm$ 0.13**

Values represent the mean $\pm$ S.E.M. (n=3). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

### 第三項 PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

Piperlonguminine (**25**) の受容体レベルでのアゴニスト活性を nuclear receptor cofactor assay system を用いて検討したところ、比較対照薬である troglitazone はアゴニスト活性を示した ( $EC_{50}=1.5 \mu M$ ) が、**25** はアゴニスト活性を示さなかった (Fig. 29).

これまでに **25** と同様のアゴニスト様活性を示した成分 (retrofractamide A (**27**), hydrangenol, hydrangeic acid および methoxyflavonol 類 (tetramethylkaempferol, pentamethylquercetin)) が報告されている.<sup>114-117,120)</sup> さらに, methoxyflavonols は PPAR $\gamma$  の発現量を維持し, インスリン感受性を促進する重要な役割を担っている<sup>121-123)</sup> CCAAT/enhancer-binding protein(C/EBP) $\alpha$ ,  $\beta$  および  $\delta$ <sup>116)</sup> の mRNA 発現量を有意に増加させることが確認されている. これらの知見は **25** の詳細な活性発現メカニズムの 1 つの可能性を示している.

以上のことから, **25** は直接的な PPAR $\gamma$  アゴニスト活性を有しないが PPAR $\gamma$  アゴニスト様活性を示す新規シード化合物として有望であると思われる.

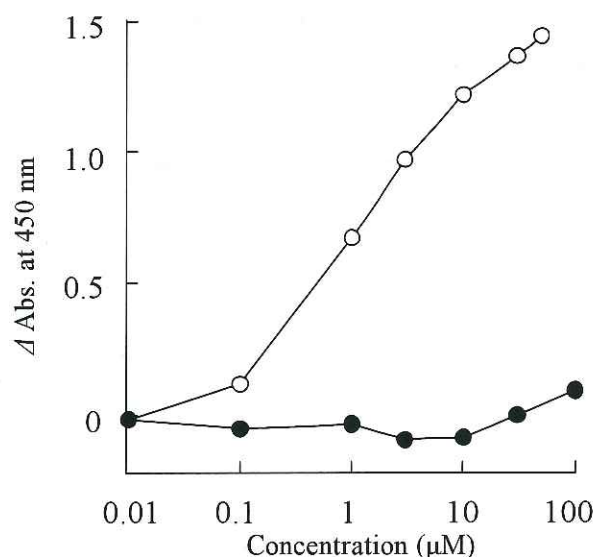


Fig. 29. Agonistic activity of piperlonguminine and troglitazone for PPAR $\gamma$  determined using a nuclear receptor cofactor assay system

●: piperlonguminine, ○: troglitazone

The experiment was performed in duplicate.

### 第三節 マウスにおける *Piper chaba* 含有成分の血中移行

薬物などの生理活性成分の血中濃度は *in vivo* におけるその成分の有効性を予想するために重要な情報の 1 つである. そこで, *P. chaba* の主なアミド成分のエキス中の含有率および piperlonguminine (**25**), piperine (**15**), retrofractamide A (**27**) のマウス血漿中濃度を LC/MS/MS にて分析し血中移行について検討した.

マウスに **25** を 10 および 20 mg/kg 経口投与した時の  $C_{max}$  はそれぞれ 0.71 および 1.97  $\mu g/mL$  (2.6 および 7.2  $\mu M$ ) であった. 10 および 20 mg/kg の **15** を経口投与した場合 0.38 および 0.77  $\mu g/mL$  (1.3 および 2.7  $\mu M$ ), **27** を 10 および 20 mg/kg 経口投与した場合 0.19 および 0.43  $\mu g/mL$



(0.58 および 1.3  $\mu\text{M}$ )であった。また、3 成分の  $T_{\text{max}}$  は 0.8~1.2 時間であった (Fig. 30 および Table 10)。25 の血漿中濃度は 15 および 27 よりも高かった。

15 は 3~30  $\mu\text{M}$  の濃度で D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死に対し阻害作用を示し、5 および 10 mg/kg 経口投与で D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルマウスにて肝保護作用を示した (第 2 章)。15 を 20 mg/kg 経口投与時における血漿中の  $C_{\text{max}}$ =0.77  $\mu\text{g/mL}$  (2.7  $\mu\text{M}$ )は D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死に対する阻害作用の有効濃度に対応しているように思われる。25 および 27 の 20 mg/kg 経口投与時の  $C_{\text{max}}$  はそれぞれ 7.2 および 1.3  $\mu\text{M}$  であった。3T3-L1 細胞の PPAR $\gamma$  アゴニスト様活性に対応する 25 の *in vivo* における有効濃度を得るためには 20 mg/kg/day 以上の反復投与が必要であると推察される。

15 が約 20%含有されている 80%(v/v) 含水アセトンエキスを 50 および 100 mg/kg の用量で経口投与した時、15 の AUC は単独で経口投与した場合 (10 および 20 mg/kg) よりも大きかった (Table 11)。この結果は抽出エキス中の他の含有成分が 15 の代謝を阻害していることを示唆している。他のアミド成分の AUC も 80%(v/v) 含水アセトンエキス投与時に単独投与時よりも増加している (Table 11)。15 は多くの医薬品のバイオアベラビリティと関連している cytochrome P450 (CYP) 3A4 および腸細胞に発現している P-glycoprotein を阻害し、<sup>124-126)</sup> いくつかの医薬品および食品中のポリフェノールの血漿中濃度を亢進することが報告されている。<sup>127-131)</sup> しかし、15 の AUC が 80%(v/v) 含水アセトンエキスの他の成分の影響で増加する事は知られていなかった。Piperoleine B (20), guineensine (29), retrofractamide A (27), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienamide (33), ilepcimide (14)などの *P. chaba* 含有成分に 15 と同等もしくはそれ以上の CYP3A4 阻害活性が確認されており、15 の代謝に影響している可能性が考えられる。<sup>132)</sup>

Table 10. Pharmacokinetic parameters of piperlonguminine (25), piperine (15), and retrofractamide A (27) administered *p.o.*

	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i> )	$C_{\text{max}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$T_{\text{max}}$ (h)	$\text{AUC}_{0-24\text{ h}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )
Piperlonguminine (25)	5	0.316	0.9	0.914
	10	0.708	1.2	2.510
	20	1.970	1.0	9.060
Piperine (15)	5	0.192	0.8	0.527
	10	0.377	0.8	1.620
	20	0.770	1.0	3.310
Retrofractamide A (27)	5	0.090	1.1	0.327
	10	0.191	0.9	0.765
	20	0.425	1.1	1.710

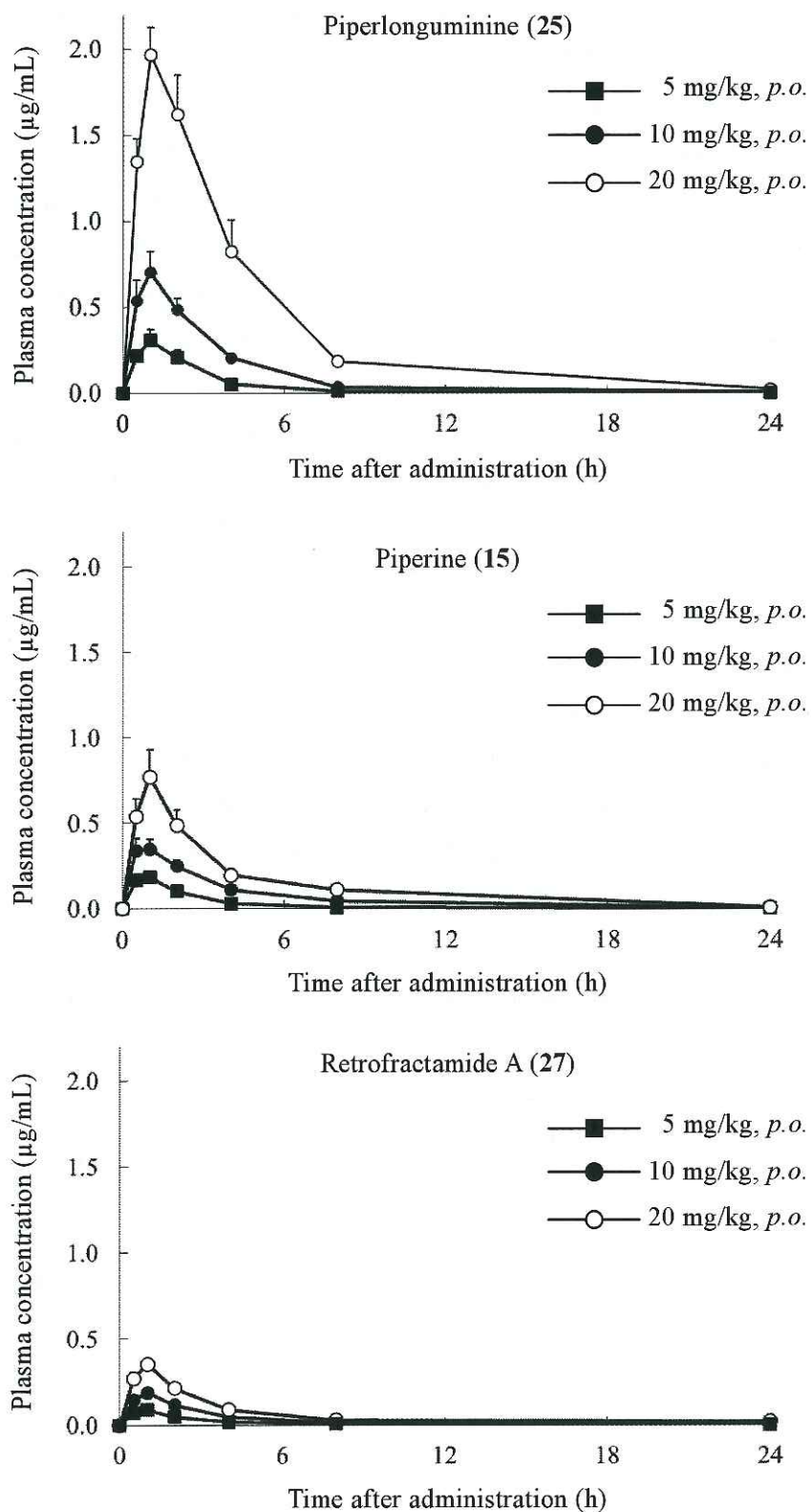


Fig. 30. Plasma levels of piperlonguminine (25), piperine (15), and retrofractamide A (27) after administration to mice

Each point represents the mean with S.E.M. (n=6).

Table 11. Pharmacokinetic parameters of principal amide constituents after administration of the extract *p.o.*

	% of extract <sup>a)</sup>	Dose (mg/kg) of extract	C <sub>max</sub> (μg/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-24 h</sub> (μg·h/mL)
Piperlonguminine (25)	1.6	50	0.072	1.4	0.305
		100	0.158	1.4	0.901
		200	0.369	1.4	2.930
Piperine (15)	20.7	50	0.402	1.0	2.220
		100	0.928	1.2	6.160
		200	2.270	1.7	20.700
Retrofractamide A (27)	0.078	50	0.002	0.8	0.006
		100	0.005	1.1	0.020
		200	0.010	0.9	0.061
Retrofractamide B (29)	0.38	50	0.008	0.8	0.051
		100	0.015	1.1	0.106
		200	0.037	0.9	0.294
Piperanine (19)	1.7	50	0.004	0.8	0.010
		100	0.009	0.8	0.037
		200	0.021	1.0	0.120
Pipernonaline (21)	3.6	50	0.177	1.3	1.230
		100	0.315	1.5	2.700
		200	0.818	1.3	8.190

a) Quantitative analysis of the 6 compounds in the extract was performed by LC-MS/MS. Briefly, 10 μL of the diluted methanol solution of the extract or the compound was mixed with 10 μL of the internal standard ticlopidine hydrochloride (50 ng/mL MeOH), 90 μL methanol, and 100 μL water. A 2 μL aliquot was injected into the LC.

#### 第四節 小括

Piperlonguminine (25) は 3T3-L1 細胞の細胞内 TG 量蓄積を促進し、培養培地中へのアディポネクチン遊離、糖の取り込みを促進した。また、アディポネクチン、GLUT4 および aP2 の mRNA 発現量を増加させ、PPAR $\gamma$ 2 の mRNA 発現量も増加させた。一方、troglitazone の活性とは対照的に PPAR $\gamma$  を直接活性化していないことが nuclear receptor cofactor assay より明らかとなった。

さらに、*P. chaba* 含有成分のマウス血中濃度を測定した。15 の肝保護作用を検証した *in vitro* 試験での有効濃度は、*in vivo* 試験での有効投与量の血中濃度に対応することが確認された。25 の血中濃度は、piperine (15) および retrofractamide A (27) よりも高かった。15 の AUC は 80%(v/v) 含水アセトンエキス投与時に単独投与時よりも増加しており、15 の血中濃度はエキス中の成分の影響を受けることが明らかとなった。



## 総 括

### 1. *P. chaba* 含有成分および胃粘膜保護作用活性成分

*P. chaba* 果穂部の 80%(v/v) 含水アセトンエキスを成分探索を行い、4 種の既知芳香族化合物、29 種の既知酸アミド化合物、3 種の既知セスキテルペンおよび 2 種の既知フェニルプロパノイド配糖体を単離・同定するとともに、6 種の新規酸アミド化合物および 2 種の新規フェニルプロパノイド配糖体を単離・構造決定した。得られた含有成分について胃粘膜障害抑制作用について検討し、エタノール誘発モデルにおいて、数種の酸アミドと芳香族化合物に抑制活性を見出し、インドメタシン誘発モデルにおいては、酸アミド構造が活性発現に重要である可能性が考えられた。

### 2. *P. chaba* の肝保護活性成分

*P. chaba* 果穂部の 80%(v/v) 含水アセトンエキスを肝保護作用を見出し、*P. chaba* より得た単離成分について *in vitro* および *in vivo* の各種試験を実施した。D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞障害モデルにおいては、酸アミド構造が活性発現に必須であり、側鎖部の炭素数と二重結合の有無などにより活性強度に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、D-GalN 誘発肝細胞障害抑制成分、LPS 誘発マクロファージ活性化抑制成分、D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞障害抑制成分、さらに TNF- $\alpha$  誘発細胞死抑制成分を見出した。

*P. chaba* の主要成分である piperine (15) について、D-GalN/LPS 誘発肝障害モデルでの抑制メカニズムについて検討した結果、D-GalN で障害を受けた肝細胞の TNF- $\alpha$  感受性を低減し、TNF- $\alpha$  による肝細胞障害を抑制することで肝保護作用を発現させていることが示唆された。

### 3. *P. chaba* 含有成分の脂肪細胞への分化促進作用およびマウス血中移行

*P. chaba* 含有成分である piperlonguminine (25) の脂肪細胞への分化促進作用を検証するために、3T3-L1 細胞を用いて各種試験を実施した。Piperlonguminine (25) は 3T3-L1 細胞の細胞内中性脂質 (TG) 量を濃度依存的に増加させ、培養培地中へのアディポネクチン遊離を促進し、糖の取り込みを濃度依存的に促進することが確認された。Troglitazone と同様にアディポネクチン、GLUT4 および aP2 の mRNA 発現を増加させた。一方、troglitazone とは異なり、PPAR $\gamma$ 2 mRNA の発現の増加も認められた。また、遺伝子発現パターンが troglitazone と異なることから Nuclear Receptor Cofactor Assay を用いて受容体レベルでのアゴニスト活性を検討したところ受容体レベルでのアゴニスト活性を示さなかった。以上の結果から、piperlonguminine (25) は抗糖尿病薬開発において、PPAR $\gamma$  に対する直接作用は認められないにもかかわらず、PPAR $\gamma$  アゴニスト様活性を示す新規シード化合物として有望と思われる。

次に、*P. chaba* 含有成分のマウス血中濃度を測定したところ、piperlonguminine (25) は、piperine (15) および retrofractamide A (27) よりも血中濃度が高かった。Piperine (15) の AUC は *P. chaba* 80%(v/v) 含水アセトンエキス投与時に単独投与時よりも増加し、エキス中の他成分の影響により血中濃度が変動することが明らかとなった。

## 謝 辞

本研究に際し、終始御指導を賜りました、吉川雅之教授に心から感謝の意を表します。

また、実験に際し、御助言、御討論下さいました京都薬科大学 生薬学教室 松田久司准教授、中村誠宏助教をはじめ、教室の方々に深謝致します。あわせて、種々有益な御指導、御討論を戴きました近畿大学 薬学総合研究所 森川敏生准教授、二宮清文講師に深く感謝致します。

また、EI-MS の測定に御便宜頂きました、津島美幸准教授、FAB-MS の測定に御便宜頂きました、織田佳代子講師に深謝致します。

最後に本研究にあたり種々の御配慮を賜りました株式会社 住化分析センター 医薬事業本部に感謝致します。

## 実験の部

各種スペクトルおよび物理的データ取得に次の装置を用いた。

紫外吸収スペクトル (UV) は、島津製作所製 Shimadzu UV-1600 を用いて測定した。

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

旋光度は、株式会社堀場製作所製 Horiba high sensitive SEPA-300 digital polarimeter ( $l=0.5$ ) を用いて測定した。

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

円二色性スペクトル (CD) は、日本分光円二色性分散計 J-720WI を用いて測定した。

水素核磁気共鳴 ( $^1\text{H-NMR}$ ) スペクトルおよび炭素 13 核磁気共鳴 ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) スペクトルは、日本電子株式会社製 JEOL EX-270 (270MHz) および JNM-LA500 (500MHz) を用いて測定し、tetramethylsilane (TMS) を内部標準として用いた。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 装置は、株式会社島津製作所製のポンプ Shimadzu LC-6AD および LC-10AS, 株式会社島津製作所製の示差屈折率検出器 Shimadzu RID-6A および昭和電気株式会社製 Shodex RI-71, 株式会社島津製作所製の UV 検出器は Shimadzu SPD-10A を用いた。その他に旋光度検出器は昭和電気株式会社製 OR-2 を用いた。

HPLC 用逆相系カラムは、株式会社ワイエムシー製 YMC-pack ODS-A (250×4.6 mm i.d.) および (250×20 mm i.d.) ナカライテスク株式会社製 Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II (250×4.6 mm i.d.) および (250×20 mm i.d.) を用いた。

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 BW-200 (富士シリシア化学株式会社, 150-300 メッシュ) および Silica gel 60N (関東化学株式会社, 63-210 メッシュ, 球状, 中性), 逆相系はクロマトレックス ODS DM1020T (富士シリシア化学株式会社, 100-200 メッシュ) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) には, silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck, 順相, 0.25 mm), silica gel 60F<sub>254</sub> HPTLC (Merck, 順相, 0.25 mm), RP-18 F<sub>254S</sub> (Merck, 逆相, 0.25 mm) および RP-18 WF<sub>254S</sub> HPTLC (Merck, 逆相, 0.25 mm) を使用し, スポットの検出は 1% Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> / 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液を噴霧し, 加熱時の呈色により行った。

実験動物は、株式会社紀和実験動物研究所 (和歌山県) より購入し, 室温 23±2°C, 実験動物用固形試料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社) により飼育した。マウスは ddY 系雄性マウス (体重 25~30 g) を, ラットは Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (体重 240~260 g) を用いた。

マウス 3T3-L1 細胞 (Cell No. IFO50416) は財団法人ヒューマンサイエンス振興財団ヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪府) より得た。

細胞の培養には NAPCO 6300 (NAPCO) CO<sub>2</sub> インキュベーターを使用し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下, 飽湿の状態で行った。

IC<sub>50</sub> 値の算出には, 縦軸に阻害率 (%) を, 横軸に log (conc.) をプロットし, グラフから算出した。

液体クロマトグラフタンデム質量分析 (LC/MS/MS) には AB Sciex Pte. Ltd. 製の API4000 を用い, HPLC には株式会社島津製作所製 LC-20A システム [prominence] (システムコントローラー: CMB-20A/20Alite, オートサンプラー: SIL-20A/20AC, ポンプ: LC-20AD, カラムオープン: CTO-20A/20AC, デガッサ: DGU-20A3/DGU-20A5) を用いた。



HPLC 用カラムは株式会社島津製作所製 Shim-pack XR-ODS (50 mm×3.0 mm i.d., 2.2 μm) を用いた。

LC/MS/SM 解析には Analyst 1.4.2 (AB Sciex Pte. Ltd.) を用いた。

試薬は特に明記しないものは和光純薬株式会社製 (試薬特級) を使用した。

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0.05以下を有意であるとみなした。

## 第一章の実験

### 第二節の実験

タイ産 *Piper chaba* HUNTER (syn. *Piper retrofractum* VAHL.) 果穂部 (4.0 kg) を、80%(v/v) 含水アセトンで室温下にて抽出した。抽出液を濾過し、残渣に 80%(v/v) 含水アセトンを加え、同様の操作を計 4 回行った。80%(v/v) 含水アセトン抽出液を合わせて減圧下溶媒留去し、80%(v/v) 含水アセトンエキス (788 g, 生薬からの収率 19.7%) を得た。

80%(v/v) 含水アセトンエキス (463 g) を AcOEt-水 (1:1, v/v) による分配抽出にて分画した。さらにその水層は *n*-BuOH (1:1, v/v) にて分配抽出にて分画した。得られた AcOEt 層, *n*-BuOH 層, 水層をそれぞれ減圧下溶媒留去し, AcOEt 可溶部 (227 g, 9.7%), *n*-BuOH 可溶部 (50 g, 2.1%), 水可溶部 (164 g, 7.9%) を得た。

AcOEt 可溶部 (118 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [3.0 kg, *n*-hexane→*n*-hexane:AcOEt (15:1→10:1→5:1→2:1→1:1, v/v)→MeOH] で分画し, Fr.1 (7.3 g), Fr.2 (4.0 g), Fr.3 (3.1 g), Fr.4 (22.0 g), Fr.5 (3.8 g), Fr.6 (1.8 g), Fr.7 (11.0 g), Fr.8 (41.1 g), Fr.9 (21.6 g) を得た。

Fr.2 (3.2 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [120 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30→90:10, v/v)→MeOH] で分離精製し, piperonal (**10**, 45.9 mg, 0.0047%), methyl piperate (**12**, 1.0 g, 0.11%) を得た。

Fr.3 (3.1 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [300 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40→70:30→80:20→90:10→95:5, v/v)→MeOH] で分画し, さらに逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (65:35, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, 3,4-methylenedioxcinnamaldehyde (**11**, 23 mg, 0.0019%) を得た。

Fr.4 (20.1 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [600 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40→70:30→80:20→90:10→95:5, v/v)→MeOH] で 8 画分に分画した [Fr.4-1 (1.2 g), Fr.4-2 (0.21 g), Fr.4-3 (0.29 g), Fr.4-4 (1.1 g), Fr.4-5 (7.3 g), Fr.4-6 (4.6 g), Fr.4-7 (3.9 g) および Fr.4-8 (1.5 g)]。Fr.4-1 (1.2 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (35:65, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, benzenepropanoic acid (**9**, 980 mg, 0.90%) を得た。Fr.4-2 (0.21 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, piperchabamide A (**1**, 27 mg, 0.0027%), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienamide (**33**, 27 mg, 0.0025%) および 1-hydroxybisabol-2,10-dien-4-one (**43**, 7.0 mg, 0.00065%) を得た。Fr.4-3 (0.29 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (65:35, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **33** (80 mg, 0.0074%), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-dodeca-2,4-dienamide (**34**, 37 mg, 0.0034%) および *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,8*Z*)-tetradeca-2,4,8-trienamide (**38**, 18 mg, 0.0017%) を得た。Fr.4-4 (1.1 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: MeOH/H<sub>2</sub>O (83:17, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-tetradeca-2,4-dienamide (**35**, 49 mg, 0.0044%) を得た。Fr.4-5 (0.91 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.),



solvent: MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-hexadeca-2,4-dienamide (**36**, 15 mg, 0.011%) を得た. Fr.4-6 (0.80 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*)-octadeca-2,4-dienamide (**37**, 185 mg, 0.091%), *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,12*Z*)-octadeca-2,4,12-trienamide (**39**, 12 mg, 0.0057%) および *N*-isobutyl-(2*E*,4*E*,14*Z*)-eicosa-2,4,14-trienamide (**40**, 362 mg, 0.18%) を得た. Fr.4-7 (0.91 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v), flow rate: 9.0 mL/min] で分離精製し, **37** (127 mg, 0.048%) を得た.

Fr.5 (3.8 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [200 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40→70:30→80:20→90:10, v/v)→MeOH] で4画分に分画した [Fr.5-1 (0.84 g), Fr.5-2 (0.36 g), Fr.5-3 (0.62 g), Fr.5-4 (1.3 g) および Fr.5-5 (0.37 g)]. Fr.5-1 (0.84 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (35:65, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **9** (489 mg, 0.040%) を得た. Fr.5-2 (0.34 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **33** (94 mg, 0.0085%) を得た. Fr.5-3 (0.62 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, piperchabamide F (**6**, 8.6 mg, 0.00071%), pipericide [= retrofractamide B (**28**, 100 mg, 0.0083%), piperchabamide D (**4**, 20 mg, 0.0016%) および guineensine (**29**, 292 mg, 0.024%) を得た. Fr.5-4 (1.3 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (75:25, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **29** (690 mg, 0.057%), dihydroguineensine (**32**, 18 mg, 0.0015%) および brachystamide B (**30**, 83 mg, 0.0069%) を得た.

Fr.6 (1.6 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [200 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40→70:30→80:20→90:10→95:5, v/v)→MeOH] で5画分に分画した [Fr.6-1 (0.14 g), Fr.6-2 (0.07 g), Fr.6-3 (0.80 g), Fr.6-4 (0.39 g) および Fr.6-5 (0.15 g)]. Fr.6-1 (0.14 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45:55, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, *N*-cinnamoylpiperidine (**13**, 17 mg, 0.0016%) を得た. Fr.6-2 (0.07 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45:55, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, 3,4-dihydroxybisabola-1,10-diene (**42**, 16 mg, 0.0015%) および 1,4-dihydroxybisabola-2,10-diene (**44**, 8.8 mg, 0.00079%) を得た. Fr.6-3 (0.80 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (67:33, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, piperoleine B (**20**, 47 mg, 0.0042%), dehydropipernonaline (**22**, 97 mg, 0.0088%), retrofractamide A (**27**, 36 mg, 0.0032%), **28** (322 mg, 0.029%), retrofractamide C (**31**, 103 mg, 0.0093%) および **4** (12 mg, 0.0011%) を得た. Fr.6-4 (0.39 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (67:33, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **20** (3 mg, 0.0002%), piperundecalidine (**23**, 30 mg, 0.0028%), **28** (94 mg, 0.0089%), **29** (58 mg, 0.0055%), piperchabamide B (**2**, 19 mg, 0.0018%), **4** (11 mg, 0.0010%) および piperchabamide C (**3**, 34 mg, 0.0032%) を得た.

Fr.7 (5.2 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [270 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40→70:30→80:20→90:10, v/v)→MeOH] で11画分に分画した [Fr.7-1 (0.17 g), Fr.7-2 (0.28 g), Fr.7-3 (0.27 g), Fr.7-4 (1.0 g), Fr.7-5 (0.09 g), Fr.7-6 (0.58 g), Fr.7-7 (2.7 g), Fr.7-8 (0.30 g), Fr.7-9 (0.090 g), Fr.7-10 (0.17 g) および Fr.7-11 (0.25 g)]. Fr.7-2 (0.28 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [43 g, *n*-hexane:AcOEt (5:1→2:1, v/v)→MeOH] で分画し, 更に AcOEt-*n*-ヘキサン下を用いて再結晶化を



行い, 5,6-dihydropiperlonguminine (**26**, 84 mg, 0.015%) を得た. Fr.7-4 (1.0 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45:55, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, piperchabamide E (**5**, 27 mg, 0.0046%), piperine (**15**, 43 mg, 0.0075%), isopiperine (**16**, 157 mg, 0.027%), isochavicine (**17**, 111 mg, 0.020%), chavicine (**18**, 24 mg, 0.0042%), piperlonguminine (**25**, 76 mg, 0.013%) および piperic acid isopentyl amide (**41**, 7 mg, 0.0011%) を得た. Fr.7-6 (0.58 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [80 g, *n*-hexane:AcOEt(4:1→1:1, v/v)→chloroform:MeOH(6:4, v/v)] で分画し, Fr.7-6-1 (7 mg), Fr.7-6-2 [49 mg = **22** (0.0085%)], Fr.7-6-3 (171 mg), Fr.7-6-4 (145 mg) および Fr.7-6-5 (116 mg) を得た. Fr.7-6-3 (171 mg) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45, v/v), flow rate: 9.0 mL/min] で分離精製し, **22** (81 mg, 0.014%) および **31** (56 mg, 0.097%) を得た. Fr.7-6-4 (145 mg) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), flow rate: 9.0 mL/min] で分離精製し, pipernonaline (**21**, 36 mg, 0.0062%), **22** (15 mg, 0.0027%), **27** (25 mg, 0.0043%) および **31** (51 mg, 0.0089%) を得た. Fr.7-7 (1.0 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (67:33, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **21** (874 mg, 0.40%), **22** (64 mg, 0.029%) および **31** (18 mg, 0.0081%) を得た. Fr.7-8 (0.30 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (67:33, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **20** (8 mg, 0.0016%), **21** (198 mg, 0.039%), **22** (7 mg, 0.0014%) および **28** (14 mg, 0.0027%) を得た. Fr.7-10 (0.17 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), flow rate: 9.0 mL/min] で分離精製し, **23** (79 mg, 0.014%), および **2** (13 mg, 0.0023%) を得た.

Fr.8 (40.4 g) は MeOH を用いて再結晶化を行い **15** (30.8 g, 2.64%) および母液画分 (10.2 g) を得た. 母液画分 (10.2 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [450 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40→90:10, v/v)→MeOH] で 9 画分に分画した [Fr.8-1 (0.29 g), Fr.8-2 (0.32 g), Fr.8-3 (6.6 g), Fr.8-4 (4.8 g), Fr.8-5 (0.39 g), Fr.8-6 (0.74 g), Fr.8-7 (0.17 g), Fr.8-8 (0.32 g) および Fr.8-9 (0.16 g)]. Fr.8-2 (0.32 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:60, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, fragaramide (**24**, 7 mg, 0.0006%) を得た. Fr.8-3 (2.2 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [500 g, *n*-hexane:AcOEt(4:1→3:1→2.5:1→1:1, v/v)→MeOH] で分画し, 更に逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (55:45, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, ilepcimide (**14**, 16 mg, 0.0048%),  $\Delta^{\alpha\beta}$ -dihydropiperine [= piperanine (**19**, 1268 mg, 0.36%) および **25** (424 mg, 0.12%) を得た. Fr.8-4 (0.88 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45:55, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **15** (484 mg, 0.22%), **16** (24 mg, 0.011%), **17** (32 mg, 0.015%), **19** (126 mg, 0.057%) および **25** (130 mg, 0.059%) を得た. Fr.8-5 (0.39 mg) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (45:55, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し **17** (39 mg, 0.0041%) を得た. Fr.8-6 (0.74 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), flow rate: 9.0 mL/min] で分離精製し, **21** (266 mg, 0.022%) および **22** (165 mg, 0.014%) を得た. Fr.8-7 (0.17 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v), flow rate: 8.0 mL/min] で分離精製し, **21** (27 mg, 0.0023%) を得た.

*n*-BuOH 可溶部 (41 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [1.5 kg, CHCl<sub>3</sub>-MeOH/H<sub>2</sub>O (30:3:1→15:3:1→10:3:1, Lower layer→6:4:1, v/v/v)→MeOH] で 6 画分に分画し



た [Fr.b1 (3.3 g), Fr.b2 (2.4 g), Fr.b3 (4.3 g), Fr.b4 (1.7 g), Fr.b5 (0.8 g) および Fr.b6 (25.7 g)].

Fr.b2 (2.4 g) を逆相シリカゲルクロマトグラフィー [120 g, H<sub>2</sub>O→MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80→40:60→80:20→90:10, v/v)→MeOH] で3画分に分画した [Fr.b2-1 (2.0 g), Fr.b2-2 (0.20 g) および Fr.b2-3 (0.073 g)]. Fr.b2-1 (2.0 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80, v/v), flow rate: 9.0 mL/min] で分離精製し, rosin (**45**, 13 mg, 0.0007%) を得た. Fr.b4 (1.7 g) を, 逆相シリカゲルクロマトグラフィー [150 g, MeOH/H<sub>2</sub>O (20:90→40:60→65:35→90:10, v/v)→MeOH] で3画分に分画した [Fr.b4-1 (0.067 g), Fr.b4-2 (0.57 g) および Fr.b4-3 (0.17 g)]. Fr.b4-2 (0.57 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: MeOH/H<sub>2</sub>O (10:90, v/v), flow rate: 9.0 mL/min] で分離精製し, piperchabaoside A (**7**, 54 mg, 0.0035%), piperchabaoside B (**8**, 35.5 mg, 0.0023%) および cinnamrutinose A (**46**, 36 mg, 0.0024%) を得た. Fr.b5 (0.8 g) を逆相 HPLC [column: YMC-Pack ODS (250×20 mm i.d.), solvent: MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v), flow rate: 7.0 mL/min] で分離精製し, **7** (177 mg, 0.0098%) を得た.

### 第三節の実験

#### piperchabamide A (**1**) : Colorless oil

##### High-resolution EI-MS

Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>) : 229.1103

Found : 229.1100

UV (EtOH): λ<sub>max</sub> (log ε) = 243 (3.7)

IR (Film): ν<sub>max</sub> = 1693, 1626, 1387, 1306, 1217, 1180, 1136, 1030, 819, 700 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ):

2.37 (2H, ddt, *J* = 1.6, 4.6, 6.7 Hz, H<sub>2</sub>-4'), 2.99 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H<sub>2</sub>-3), 3.26 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, H<sub>2</sub>-2), 3.96 (2H, t, *J* = 6.7 Hz, H<sub>2</sub>-5'), 5.98 (1H, dt, *J* = 9.8, 1.6 Hz, H-2'), 6.87 (1H, dt, *J* = 9.8, 4.6 Hz, H-3'), 7.17 (1H, br t, *J* = ca. 8 Hz, H-7), 7.24 (2H, m, H-6, -8), 7.26 (2H, m, H-5, -9)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>c</sub>): Table 1 に記載

EI-MS [*m/z*, rel. int.(%)] : 229 (M<sup>+</sup>, 27), 104 (79), 98 (100), 91 (44), 77 (16), 68 (15)

#### piperchabamide B (**2**) : Colorless oil

##### High-resolution EI-MS

Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>3</sub> (M<sup>+</sup>) : 369.2304

Found : 369.2300

UV (EtOH): λ<sub>max</sub> (log ε) = 260 (4.2), 269 (sh 4.2)

IR (Film): ν<sub>max</sub> = 2928, 2855, 1655, 1614, 1489, 1442, 1250, 1037, 964, 929 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ)

1.34, 1.45 (4H each, both m, H<sub>2</sub>-5, -6, -7, -8), 1.56 (4H, m, H<sub>2</sub>-2', -4'), 1.65 (2H, m, H<sub>2</sub>-3'), 2.15 (2H, dt, *J* = 7.0, 6.8 Hz, H<sub>2</sub>-9), 2.20 (2H, dt, *J* = 7.0, 6.7 Hz, H<sub>2</sub>-4), 3.48, 3.60 (2H each, both br s, H<sub>2</sub>-1', -5'), 5.93 (2H, s, H<sub>2</sub>-18), 6.03 (1H, dt, *J* = 15.6, 7.0 Hz, H-10), 6.24 (1H, dt, *J* = 15.0, 1.5 Hz, H-2), 6.28 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-11), 6.73 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-16), 6.75 (1H, dd, *J* = 1.4, 8.2 Hz, H-17), 6.82 (1H, dt, *J* = 15.0, 7.0 Hz, H-3), 6.89 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-13)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$ ): Table 1 に記載

EI-MS [ $m/z$ , rel. int.(%)] : 369 ( $\text{M}^+$ , 28), 166 (100), 161 (19), 148 (18), 138 (47), 131 (59), 127 (88), 112 (60), 103 (48), 84 (59)

piperchabamide C (3) : Colorless oil

High-resolution EI-MS

Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}_3$  ( $\text{M}^+$ ) : 395.2663

Found : 395.2663

UV (EtOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 265 (4.5)

IR (Film):  $\nu_{\text{max}}$  = 2928, 2855, 1651, 1622, 1599, 1489, 1444, 1250, 1037, 962, 929  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) :

1.32, 1.43 (4H each, both m,  $\text{H}_2$ -7, -8, -9, -10), 1.56 (4H, m,  $\text{H}_2$ -2', -4'), 1.63 (2H, m,  $\text{H}_2$ -3'), 2.15 (4H, m,  $\text{H}_2$ -6, -11), 3.48, 3.60 (2H each, both br s,  $\text{H}_2$ -1', -5'), 5.92 (2H, s,  $\text{H}_2$ -20), 6.04 (2H, m, H-5, -12), 6.17 (1H, dd,  $J$  = 10.7, 15.0 Hz, H-4), 6.24 (1H, d,  $J$  = 16.7 Hz, H-2), 6.28 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-13), 6.72 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H-18), 6.75 (1H, dd,  $J$  = 1.6, 8.2 Hz, H-19), 6.88 (1H, br s, H-15), 7.22 (1H, dd,  $J$  = 10.7, 16.7 Hz, H-3)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$ ): Table 1 に記載

EI-MS [ $m/z$ , rel. int.(%)] : 395 ( $\text{M}^+$ , 51), 192 (50), 164 (84), 161 (20), 148 (16), 138 (27), 131 (69), 127 (64), 112 (100), 103 (49), 84 (62)

piperchabamide D (4) : Colorless oil

High-resolution EI-MS

Calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_3$  ( $\text{M}^+$ ) : 357.2304

Found : 357.2304

UV (EtOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 261 (4.1), 269 (sh 4.1), 306 (3.8), 342 (3.0)

IR (KBr):  $\nu_{\text{max}}$  = 2924, 2853, 1668, 1626, 1560, 1508, 1491, 1257, 1043, 964, 924  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):

0.92 (6H, d,  $J$  = 6.1 Hz,  $\text{H}_2$ -3', -4'), 1.33, 1.44 (4H each, both m,  $\text{H}_2$ -5, -6, -7, -8), 1.77 (1H, ddq,  $J$  = 7.0, 6.1 Hz, H-2'), 2.15 (4H, m,  $\text{H}_2$ -4, -9), 3.14 (2H, dd,  $J$  = 7.0, 7.0 Hz,  $\text{H}_2$ -1'), 5.56 (1H, br s, NH), 5.76 (1H, d,  $J$  = 15.7 Hz, H-2), 5.94 (2H, s,  $\text{H}_2$ -18), 6.04 (1H, dt,  $J$  = 15.6, 6.8 Hz, H-10), 6.28 (1H, d,  $J$  = 15.6 Hz, H-11), 6.73 (1H, d,  $J$  = 7.9 Hz, H-16), 6.75 (1H, br d,  $J$  = ca. 8 Hz, H-17), 6.83 (1H, dt,  $J$  = 15.7, 7.0 Hz, H-3), 6.89 (1H, br s, H-13)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$ ): Table 1 に記載

EI-MS [ $m/z$ , rel. int.(%)] : 357 ( $\text{M}^+$ , 54), 285 (13), 161 (46), 154 (69), 148 (35), 131 (100), 126 (8), 103 (58), 100 (8), 72 (9)

piperchabamide E (5) : Colorless oil

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} +18.7^\circ$  ( $c$  = 0.72,  $\text{CHCl}_3$ )

High-resolution EI-MS

Calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_3$  ( $\text{M}^+$ ) : 287.1521

Found : 287.1523

UV (EtOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 241 (4.2), 252 (4.1), 308 (4.2), 338 (4.3)

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  = 2963, 1646, 1608, 1545, 1506, 1489, 1446, 1257, 1238, 1039, 991, 931  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):

0.91 (3H, dd,  $J$  = 6.9, 7.6 Hz,  $\text{H}_2\text{-4}'$ ), 0.91 (3H, d,  $J$  = 6.7 Hz,  $\text{H}_2\text{-5}'$ ), 1.17, 1.41 (1H each, both m,  $\text{H}_3\text{'}$ ), 1.59 (1H, m,  $\text{H}_2\text{'}$ ), 3.15, 3.29 (1H each, both m,  $\text{H}_1\text{'}$ ), 5.66 (1H, br s, CONH), 5.93 (1H, d,  $J$  = 15.0 Hz,  $\text{H}_2$ ), 5.97 (2H, s,  $\text{H}_2\text{-12}$ ), 6.65 (1H, dd,  $J$  = 10.7, 17.7 Hz,  $\text{H}_4$ ), 6.75 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz,  $\text{H}_10$ ), 6.78 (1H, d,  $J$  = 17.7 Hz,  $\text{H}_5$ ), 6.88 (1H, dd,  $J$  = 1.8, 8.2 Hz,  $\text{H}_11$ ), 6.96 (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz,  $\text{H}_7$ ), 7.35 (1H, dd,  $J$  = 10.7, 15.0 Hz,  $\text{H}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$ ): Table 2 に記載

EI-MS [ $m/z$ , rel. int.(%)] : 287 ( $\text{M}^+$ , 48), 201 (100)

piperchabamide F (6) : Colorless oil

$[\alpha]_{\text{D}}^{27} +7.1^\circ$  ( $c$  = 0.27,  $\text{CHCl}_3$ )

High-resolution EI-MS

Calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_3$  ( $\text{M}^+$ ) : 343.2147

Found : 343.2152

UV (EtOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 260 (4.1)

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  = 2924, 1626, 1561, 1509, 1491, 1258, 1043, 965, 924  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ):

0.91 (3H, dd,  $J$  = 6.6, 7.4 Hz,  $\text{H}_3\text{-5}'$ ), 0.92 (3H, d,  $J$  = 6.6 Hz,  $\text{H}_3\text{-4}'$ ), 1.16, 1.40 (1H each, both m,  $\text{H}_2\text{-3}'$ ), 1.49, 2.19 (4H each, both m,  $\text{H}_2\text{-5, -6, -4, -7}$ ), 3.13, 3.27 (1H each, both m,  $\text{H}_2\text{-1}'$ ), 1.59 (1H, m,  $\text{H}_2\text{'}$ ), 5.92 (2H, br s,  $\text{H}_2\text{-16}$ ), 6.72 (2H, br s,  $\text{H}_2\text{-14, -15}$ ), 6.88 (1H, br s,  $\text{H}_11$ ), 5.75 (1H, dd,  $J$  = 1.2, 15.4 Hz,  $\text{H}_2$ ), 6.00 (1H, dt,  $J$  = 16.5, 6.7 Hz,  $\text{H}_8$ ), 6.29 (1H, d,  $J$  = 16.5 Hz,  $\text{H}_9$ ), 6.81 (1H, dt,  $J$  = 15.4, 7.1 Hz,  $\text{H}_3$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_c$ ): Table 2 に記載

EI-MS [ $m/z$ , rel. int.(%)] : 343 ( $\text{M}^+$ , 41), 135 (100)

piperchabaoside A (7) : White powder

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} -26.5^\circ$  ( $c$  = 2.40, MeOH)

High-resolution positive-ion FAB-MS

Calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{11}\text{Na}$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  : 481.1686

Found : 481.1678

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 251 (4.5), 262 (sh 4.3)

IR (KBr):  $\nu_{\max}$  = 3426, 1089, 1030  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta$ ):

3.87 (1H, m,  $\text{H}_5\text{'}$ ), 3.99 (1H, m,  $\text{H}_3\text{'}$ ), 4.06 (1H, m,  $\text{H}_2\text{'}$ ), 4.09 (1H, m,  $\text{H}_2\text{'}$ ), 4.15 (1H, dd,  $J$  = 8.3, 8.5 Hz,  $\text{H}_4\text{'}$ ), 4.19 (1H, m,  $\text{H}_5\text{'}$ ), 4.24 (1H, m,  $\text{H}_3\text{'}$ ), 4.29, 4.49 (1H each, both m,  $\text{H}_2\text{-6''}$ ), 4.31 (1H, m,  $\text{H}_4\text{'}$ ), 4.43, 4.68 (1H each, both dd,  $J$  = 5.8, 13.1 Hz,  $\text{H}_2\text{-9}$ ), 4.44, 4.52 (1H each, both m,  $\text{H}_2\text{-6'}$ ), 4.88 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz,  $\text{H}_1\text{'}$ ), 5.16 (1H, d,  $J$  = 7.9 Hz,  $\text{H}_1\text{'}$ ), 6.45 (1H, dt,  $J$  = 16.2, 5.8 Hz,  $\text{H}_8$ ), 6.76 (1H, d,  $J$  = 16.2 Hz,  $\text{H}_7$ ), 7.22 (1H, t,  $J$  = 7.9 Hz,  $\text{H}_4$ ), 7.30 (2H, dd,  $J$  = 7.3, 7.9 Hz,  $\text{H}_2\text{-3, -5}$ ), 7.39 (2H, d,  $J$  = 7.3 Hz,  $\text{H}_2\text{-2, -6}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta_c$ ): Table 3 に記載



positive-ion FAB-MS ( $m/z$ ) : 481  $[M + Na]^+$

negative-ion FAB-MS ( $m/z$ ) : 457  $[M - H]^-$

piperchabaoside B (8) : White powder

$[\alpha]_D^{26} -18.0^\circ$  ( $c = 3.21$ , MeOH)

High-resolution positive-ion FAB-MS

Calcd for  $C_{27}H_{38}O_{15}Na$   $[M + Na]^+$  : 625.2108

Found : 625.2115

UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 251 (4.3), 262 (sh 4.0)

IR (KBr):  $\nu_{max} = 3401, 1736, 1719, 1075, 1040\text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta$ )

1.74 (3H, s, H<sub>3</sub>-6'''), 3.13 (4H, m, H<sub>2</sub>-2''', -4'''), 4.03 (2H, m, H-5', -2''), 4.08 (1H, m, H-5''), 4.09 (2H, m, H-2', -4''), 4.18 (2H, m, H-4', -3''), 4.21 (1H, m, H-3'), [4.24 (1H, m), 4.54 (1H, br d,  $J = ca.12$  Hz), H<sub>2</sub>-6''], 4.45, 4.72 (1H each, both dd,  $J = 6.1, 12.8$  Hz, H<sub>2</sub>-9), 4.86 (1H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-1'), 5.10 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-1''), [4.49 (1H, dd, 6.1, 12.8 Hz), 5.15 (1H, br d,  $J = ca.13$  Hz), H<sub>2</sub>-6'], 6.44 (1H, dt,  $J = 16.2, 6.1$  Hz, H-8), 6.77 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H-7), 7.21 (1H, t,  $J = 7.3$  Hz, H-4), 7.28 (2H, dd,  $J = 7.3, 7.9$  Hz, H-3, -5), 7.38 (2H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-2, -6)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, pyridine- $d_5$ ,  $\delta_c$ ): Table 3 に記載

positive-ion FAB-MS ( $m/z$ ) : 625  $[M + Na]^+$

negative-ion FAB-MS ( $m/z$ ) : 601  $[M - H]^-$

piperchabamide E (5) および piperchabamide F (6) の酸加水分解

5 (10 mg) または 6 (5 mg) の 6 M HCl (1.0 mL) 溶液を封管, 110°C 下で一晩加熱した。冷却後, 反応液に NaOH 溶液を添加しアルカリ性 (pH 10) に調整し, *n*-ヘキサン層の溶媒を減圧留去し組成生物を得た。組成生物を次に示した条件で HPLC 分析し, (*R*)-2-methylbutylamine [ $t_R$ : 9.1 min (positive)] を同定した [HPLC カラム, Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II, 4.6 mm i.d.×250 mm (ナカライテスク株式会社); 検出器, 示差屈折率検出器および旋光度検出器; 移動相, MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v); 流速 1.0 mL/min]。

piperchabaoside A (7) の酸加水分解

7 (3.0 mg) の 1 M HCl (0.1 mL) 溶液を 80°C 下で 3 時間加熱した。冷却後, 反応液を Amberlite IRA (OH<sup>-</sup> form) にて中和した。Amberlite IRA を濾別後, 溶媒を減圧留去し得られた粗生成物を Sep-pak C18 固相カラム (H<sub>2</sub>O→MeOH) にて分離し, H<sub>2</sub>O 溶出画分および MeOH 溶出画分を得た。H<sub>2</sub>O 溶出画分を次に示した条件で HPLC 分析した: HPLC カラム, Kaseisorb LC-NH<sub>2</sub>-60-5, 4.6 mm i.d.×250 mm (東京化成工業株式会社); 検出器, 旋光度検出器 [Shodex OR-2 (昭和電工株式会社)]; 移動相, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (75:25, v/v); 流速 0.8 mL/min; カラム温度, 室温。H<sub>2</sub>O 溶出画分中の D-グルコースは, 標準品の旋光度および保持時間との比較にて同定した [ $t_R$ : 13.9 min (D-グルコース, positive optical rotation)]。

#### piperchabaoside B (8) の脱アシル化

8 (20 mg) の 1.0% ナトリウムメトキシド-MeOH (3.0 mL) 溶液を室温下で 3 時間攪拌した。反応液を Dowex HCR-W2 ( $H^+$  form) にて中和した。Dowex HCR-W2 を濾別後、溶媒を減圧留去し得られた粗生成物を HPLC にて分離精製し、7 (12.0 mg) および (*S*)-3-hydroxy-3-methylglutaric acid monomethyl ester (8a, 1.6 mg) を得た [HPLC カラム, Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II, 4.6 mm i.d.×250 mm (ナカライテスク株式会社); 検出器, 示差屈折率検出器および旋光度検出器; 移動相, MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40, v/v); 流速 1.0 mL/min]。

### 第四節の実験

#### エタノール誘発胃粘膜損傷に対する保護作用

ラットは、実験開始 18~24 時間前から絶食させた。被験物質を経口投与した 1 時間後に、99.5% エタノールを経口投与した (1.5 mL/ラット)。エタノール投与 1 時間後にラットを頸椎脱臼により致死させ、胃を摘出し、胃内に 1.5%ホルマリン (10 mL) を注入して固定した。その後、胃を大彎に沿って切り開き、胃体部粘膜に発生した線状出血病変の長さ (mm) を測定し損傷係数とした。

なお、被験物質は 5%アラビアゴム末溶液に懸濁して用いた (5 mL/kg)。比較対照化合物として omeprazole および cetraxate hydrochloride を用い、エタノール投与 1 時間前に経口投与した。

#### インドメタシン誘発胃粘膜損傷に対する保護作用

インドメタシン誘発胃粘膜損傷は Wallace 等<sup>65)</sup>および Morise 等<sup>66)</sup>の方法を改良し実験を実施した。ラットは、実験開始 18~24 時間前から絶食させた。被験物質を経口投与した 1 時間後に、インドメタシン (20 mg/kg, 5% NaHCO<sub>3</sub> に溶解後、水および 0.2 M 塩酸を用い中和、調製した) を経口投与した (1.5 mL/ラット)。インドメタシン投与 4 時間後にラットを頸椎脱臼により致死させ、胃を摘出し、胃内に 1.5%ホルマリン (10 mL) を注入して固定した。その後、胃を大彎に沿って切り開き、胃体部粘膜に発生した損傷の長さ (mm) を測定し損傷係数とした。

なお、被験物質は 5%アラビアゴム末溶液に懸濁して用いた (5 mL/kg)。比較対照化合物として omeprazole および cetraxate hydrochloride を用い、インドメタシン投与 1 時間前に経口投与した。

### 第二章の実験

#### 第二節の実験

##### 第一項の実験

#### D-GalN/LPS 誘発急性肝障害抑制作用

Tiges 等<sup>67)</sup>の方法を改良し実験を実施した。ddY 系雄性マウスは、実験開始 20~24 時間前から絶食とした。被験物質を経口投与した 1 時間後に、肝障害を誘発するために生理食塩水に溶解した D-GalN (350 mg/kg) および *Salmonella enteritidis* 由来 LPS (10 µg/kg, SIGMA) を腹腔内に投与した。D-GalN/LPS 投与 10 時間後にエーテル麻酔下、眼窩静脈叢より採血し、血液サンプルを得た。得られた血液を遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) により血清を得た。得られた血清中 sAST および sALT は Reitman-Frankel 法 (S.TA-test Wako, 和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。ヒドロコルチゾンと比較対照化合物として用いた。被験物質は 5%(w/v) アラビアガム溶液に懸濁し 10 mL/kg の用量で経口投与した。コントロール群には溶媒を 10 mL/kg 経口投与した。

S.TA-test Wako は比色法により試料中の sAST または sALT 濃度を定量する。

AST 測定の場合、試料中の AST により、L-aspartic acid と  $\alpha$ -ketoglutaric acid から glutamic acid



および oxaloacetic acid が生成する。生成した oxaloacetic acid は oxalacetate carboxylase の作用により pyruvic acid に変化する。

ALT 測定の場合、試料中の ALT により L-alanin と  $\alpha$ -ketoglutaric acid から glutamic acid および pyruvic acid が生成する。

生成した pyruvic acid は thiamine pyrophosphate, flavin adenine dinucleotide の存在下, pyruvate oxidase の作用により酸化され、過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素、N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-m-toluidino sodium と 4-aminoantipyrine は peroxidase の作用により酸化縮合し、青紫色の色素を生成する。この青紫色の吸光度を測定することにより AST または ALT 活性値を求める。

## 第二項の実験

マウス初代培養肝細胞を用いた D-GalN または D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発肝細胞死抑制作用

被験物質のマウス初代培養肝細胞に対する肝保護作用は、MTT アッセイによる細胞生存率の判定により実施した。MTT アッセイは細胞内に取り込まれた MTT がミトコンドリアの脱水素酵素により還元され生じたホルマゼン色素を測定する比色定量法であり、色素量は代謝活性のある細胞数と相関する。

ddY 系雄性マウスよりコラゲナーゼ灌流法により肝細胞を調製した。Fetal bovine serum (FBS, 10%, Life Technologies), penicillin G (100 units/mL) および streptomycin (100  $\mu$ g/mL) 含有 William's E 培地に懸濁した肝細胞を 96 ウェル平板マイクロプレート (Nalge Nunc International) に  $4 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ L medium/well ずつ播種し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 4 時間プレインキュベートした。D-GalN 誘発細胞障害試験は、被験物質添加または未添加の D-GalN (2 mM) 含有培地 100  $\mu$ L と交換し 44 時間培養して実施した。D-GalN/TNF- $\alpha$  誘発細胞障害試験は、被験物質を含む、または含まない、D-GalN (2 mM) および TNF- $\alpha$  (40 ng/mL) 含有培地 100  $\mu$ L と交換し 20 時間培養して行った。培地を交換した後、MTT [5 mg/mL Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 不含リン酸緩衝化生理食塩水 {PBS(-)}] 溶液 10  $\mu$ L/well を添加し、4 時間培養した。その後、培地を除去し、生成したホルマゼンを 0.04 N HCl 含有 2-プロパノール (100  $\mu$ L) で溶解した後に、マイクロプレートリーダー (model 550, Bio-Rad Laboratories, Inc.) にて吸光度 (OD, 測定波長: 570 nm, 参照波長: 655 nm) を測定した。

なお、被験物質は DMSO に溶解し培地へ添加した (DMSO の終濃度 0.5%)。

Silybin を比較対照化合物として用いた (フナコシ株式会社)。

阻害率 (%) は次の計算式より求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = (\text{OD (sample)} - \text{OD (control)}) / (\text{OD (normal)} - \text{OD (control)}) \times 100$$

## 第三項の実験

マウス腹腔マクロファージを用いた LPS 刺激による一酸化窒素産生抑制作用

チオグリコレート (TGC) 誘発マウス腹腔マクロファージを用いた NO 産生試験を実施した。ddY 系雄性マウスに 4% (w/v) チオグリコレート培地 (日水製薬株式会社) 2 ml を腹腔内投与し、4 日後に頸椎脱臼により致死させ、腹部の体皮を剥離し、氷冷した PBS(-) 7 ml で腹腔内を洗浄し、洗浄液を回収した。回収した洗浄液を遠心分離 (1000 rpm, 10 min, 4°C) し、PBS(-) で 2 回洗浄した後に、5% FBS, penicillin G (100 units/mL) および streptomycin (100  $\mu$ g/mL) 含有 RPMI-1640 培地 (SIGMA) に懸濁した。次に、96 ウェル平底マイクロプレートに  $5 \times 10^5$  cells (100  $\mu$ L medium/well) ず



つ播種し、1 時間前培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) し、PBS(-) で洗浄し浮遊細胞を除去した。その後に、被験物質添加または未添加の 10 µg/mL LPS (*Salmonella enteritidis* 由来, SIGMA) を含む培地 200 µL で 20 時間培養した。培養上清中に蓄積した NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を NO として、Griess 法により定量した。すなわち、培養上清に同量の Griess 試薬 (1%スルファニルアミド/0.1% N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩/2.5%リン酸) を加えて混和し、10 分間室温で放置した後に、マイクロプレートリーダーにて吸光度 (測定波長; 570 nm, 参照波長; 655 nm) を測定し、培地で希釈した NaNO<sub>2</sub> をスタンダードとして培養上清に蓄積した NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を定量した。また、被験物質による細胞毒性については MTT アッセイを用い測定した。

なお、被験物質は DMSO に溶解し培地へ添加した (DMSO の終濃度 0.5%)。

L-NMMA (NOS阻害剤) およびカフェイン酸フェネチルエステル (CAPE, NF-κB活性阻害剤) を陽性対照化合物として用いた。

阻害率 (%) は次の計算式より求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = [(A-B)/(A-C)] \times 100$$

A-C: NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 濃度 (µg/mL または µM)

[A: LPS(+), 被験物質(-); B: LPS(+), 被験物質(+); C: LPS(-), 被験物質(-)]

#### 第四項の実験

L929 細胞を用いた TNF-α 誘発細胞死抑制作用

大日本製薬株式会社より購入した L929 細胞を 10% FBS, 1% Non-Essential Amino Acids (Invitrogen), penicillinG (100 units/mL) および streptomycin (100 µg/mL) 含有 Eagle's MEM (Sigma-Aldrich) にて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて培養した。細胞を 96 ウェルプレートに播種し [3×10<sup>4</sup> cells/well/100 µL MEM], 被験物質添加もしくは未添加の actinomycin D (0.5 µg/mL) および TNF-α (20 pg/mL) 含有培地にて 20 時間培養後、MTT アッセイを用いて細胞の生存率を評価した。

なお、被験物質は DMSO に溶解し培地へ添加した (DMSO の終濃度 0.5%)。

Curcumin を陽性対照化合物として用いた。

#### 第三節の実験

Piperine (15) のマウスにおける D-GalN/LPS による血清中 TNF-α 上昇抑制作用および活性作用様式

ddY 系雄性マウスを実験開始 20~24 時間前から絶食とした。被験物質を経口投与した 1 時間後に、肝障害を誘発するために生理食塩水に溶解した D-GalN (350 mg/kg) および LPS (10 µg/kg) を腹腔内に投与した。D-GalN/LPS 投与 1.5 時間後にエーテル麻酔下、眼窩静脈叢より採血し、得られた血液を遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) により血清を得た。血清中 TNF-α は、ELISA kit (GE Healthcare Sciences) を用いて測定した。

Hydrocortisone を陽性対照化合物として用いた。

TNF-α ELISA kit はサンドイッチ ELISA 法を用いた測定 kit である。マウス TNF-α に対する抗体が固相化されたプレートに試料を添加し、試料中の TNF-α を結合させる。次に biotin 標識した抗マウス TNF-α 抗体を添加し、試料中の TNF-α に結合させる。Streptavidin 標識した horseradish peroxidase (HRP) をさらに結合させ、HRP 発色基質である 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を

添加し発色させ定量する。

### 第三章の実験

Piperlonguminine は piperine のピペリジン環を KOH で塩基性加水分解を行い、イソブチルアミンを縮合させることで得た。Retrofractamide A は Strunz G.M.らの方法<sup>55)</sup>に従い piperonal より合成した(Fig. 31)。

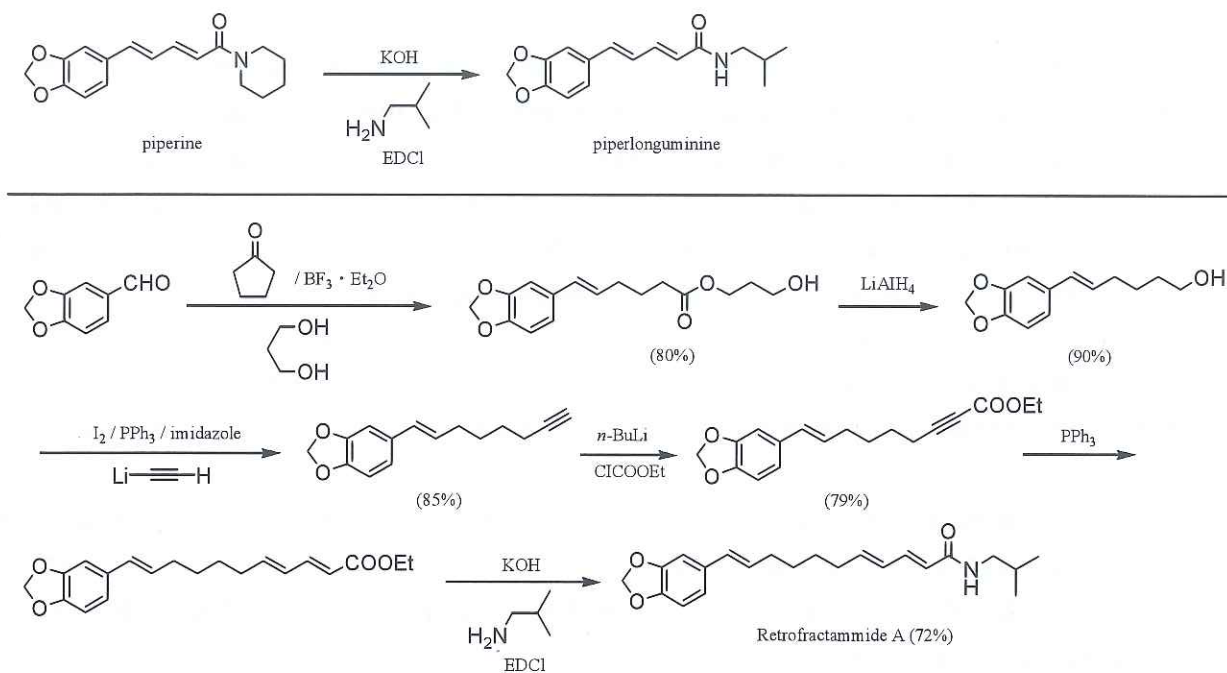


Fig. 31. Syntheses of piperlonguminine and retrofractamide A

### 第二節の実験

#### 第一項の実験

マウス繊維芽細胞 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化誘導

3T3-L1 細胞 ( $5 \times 10^4$  cells/150  $\mu$ L/well) を 48 well マルチプレート (スミロセルタイト C-1 プレート 48F, 住友ベークライト株式会社) に播種し, 10% FBS および 1% penicillin-streptomycin (10000 Units/mL penicillin, 10000  $\mu$ g/mL streptomycin, GIBCO) を含む DMEM (1000 mg/L glucose, SIGMA) 培地で 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した. 次に, 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthin (SIGMA), 5  $\mu$ g/mL insulin (Insulin solution, human, SIGMA) および被験物質を含む DMEM (4500 mg/L glucose, SIGMA) 培地 (differentiation medium) で培養し脂肪細胞へ分化誘導した.

播種から 4 日目および 6 日目に, 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, 5  $\mu$ g/mL insulin および被験物質を含む DMEM (4500 mg/L glucose, SIGMA) 培地 (maintain medium) に交換し培養した. 播種から 8 日目に培地を除き, 精製水 200  $\mu$ L を加えて細胞を超音波破碎し, 96 well アッセイプレート (IWAKI) に移したのち, 破碎液中の中性脂質を酵素法 (トリグリセライド E-テストワコー) で測定した.

Troglitazone を比較対照薬として用いた.

トリグリセライド E-テストワコーは比色法により試料中の triglyceride 濃度を定量する. Triglyceride は lipoprotein lipase によりグリセリンと脂肪酸に分解される. 生成したグリセリンは



adenosine triphosphate (ATP) 存在下で glycerol kinase によりリン酸化され、生成した glycerol-3-phosphate は glycerol-3-phosphate oxidase の作用により酸化され、過酸化水素を生じる。過酸化水素、*N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline sodium および 4-aminoantipyrine は peroxidase の作用により酸化縮合され、青色の色素を生成する。色素の吸光度を測定することにより定量する。

### 3T3-L1 細胞の糖取り込み促進作用

3T3-L1 細胞を分化誘導させ、播種から 8 日目の細胞を無血清培地で 4 時間培養した。その後、PBS で 3 回洗浄した。100 nM の insulin および被験物質を含む PBS で 20 分間インキュベーション後、1  $\mu$ Ci/mL の 2-deoxy-D-(2,6- $^3$ H) glucose (Amersham) を含む 0.1 mM の 2-deoxy-D-glucose を加えることによって糖の取り込みを開始させた。37°C, 10 分間インキュベーション後、冷 PBS で 3 回洗浄し、1 M NaOH (200  $\mu$ L/well) を加えて 2 時間インキュベーションすることにより細胞を溶解させて糖の取り込みを終了させた。得られた細胞溶解液を液体シンチレーションバイアルに移し、1 M HCl で中和した後、液体シンチレーションカウンター用カクテル (クリアゾル I, ナカライテスク株式会社) を 5 mL 加え、十分に混和したのち、液体シンチレーションカウンター (BECKMAN LS6500) にて放射活性を測定した。非特異的取り込みは 20  $\mu$ M cytochalasin B 存在下で測定した。

また、被験物質を短時間作用させた場合のグルコース取り込みは、3T3-L1 細胞 ( $5 \times 10^4$  cells/150  $\mu$ L/well) を 48 well マルチプレート (スミロニセルタイト C-1 プレート 48F) に播種し、被験物質非存在下で前述のように分化誘導させ、播種から 8 日目に同様の実験を行った。

Troglitazone を比較対照薬として用いた。

### 培溶液中アディポネクチン測定

3T3-L1 細胞を分化誘導させ、播種から 8 日目に培地中に遊離したアディポネクチンを Quantikine<sup>®</sup> Mouse Adiponectin/Acrp30 Immunoassay (R&D systems) を用いて測定した。

Troglitazone を比較対照薬として用いた。

Quantikine<sup>®</sup> Mouse Adiponectin/Acrp30 Immunoassay はサンドイッチ ELISA 法を用いた測定法である。マウスアディポネクチンに対する抗体が固相化されたプレートに試料を添加し、試料中のアディポネクチンを結合させる。次に biotin 標識した抗マウスアディポネクチン抗体を添加し、試料中のアディポネクチンに結合させる。Streptavidin 標識した HRP をさらに結合させ、HRP 発色基質である TMB を添加し発色させ定量する。

## 第二項の実験

### 3T3-L1 細胞中の遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には定量 RT-PCR 装置 (MiniOpticon, Bio-Rad) を用いた。3T3-L1 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/2 mL/well) を 6 well マルチプレート (細胞培養用マルチプレート 6F, 住友ベークライト株式会社) に播種し、前述のように脂肪細胞へ分化誘導させた。播種から 4 日目および 6 日目に、10% FBS, 1% Penicilin-Streptomycin, 5  $\mu$ g/mL insulin および被験物質を含む DMEM (4500 mg/L glucose) 培地 (maintain medium) に交換し培養した。播種から 8 日目に培地を除き、PBS で 3 回洗浄したのち、RNeasy<sup>™</sup> Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。その後 iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) を用いて mRNA から cDNA を合成した。Primer pair (Table 12) およ



び iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Bio-Rad) を用いてリアルタイム PCR を実施した (MiniOpticon Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad). データは  $\beta$ -actin mRNA との比率を求め、コントロール群との比率で表した.

PCR 反応条件は, 初期変性 95°C, 2 分後に変性 95°C, 30 秒, アニーリング 58°C, 30 秒および伸張 72°C, 30 秒のサイクルを 40 サイクル実施した. その後に融解曲線分析を実施した (65°C から 95°C, 0.2°C 毎).

Table 12. Primers sequences for mouse adiponectin, PPAR $\gamma$ 2, GLUT4, aP2, and  $\beta$ -actin

Adiponectin <sup>103)</sup>	sense	5'-AAGGACAAGGCCGTTCTCT-3'
	antisense	5'-TATGGGTAGTTGCAGTCAGTTGG-3'
PPAR $\gamma$ 2 <sup>105)</sup>	sense	5'-GGTGAAACTCTGGGAGATTC-3'
	antisense	5'-CAACCATTTGGGTCAGCTCTTG-3'
GLUT4 <sup>104)</sup>	sense	5'-CCTGAGAGCCCCAGATACCTCTAC-3'
	antisense	5'-GTCGTCCAGCTCGTTCTACTAAG-3'
aP2 <sup>105)</sup>	sense	5'-AACACCGAGATTCCTTCAA-3'
	antisense	5'-TCACGCCTTTCATAACACAT-3'
$\beta$ -actin <sup>106)</sup>	sense	5'-ATGGGTCAGAAGGACTCCTACG-3'
	antisense	5'-AGTGGTACGACCAGAGGCATAC-3'

### 第三項の実験

#### PPAR $\gamma$ アゴニスト活性

核内受容体コファクターアッセイシステム (EnBio RCAS for PPAR $\gamma$ , EnBio Tec Laboratories) を用いて評価した.

50  $\mu$ M troglitazone を用いて得られた結果を 100%として, EC<sub>50</sub> を算出した.

核内受容体コファクターアッセイシステムは, PPAR $\gamma$  がアゴニストと結合することで立体構造が変化しコアクチベーターとの複合体形成を検出する. 核内受容体結合領域をもつコアクチベーターをプレートに固相化し, そのプレート内で PPAR $\gamma$  と試料を反応させる. HRP 標識した検出抗体を反応させ, HRP 発色基質である TMB を添加し発色させリガンド作用を検出する.

### 第三節の実験

#### マウスにおける *P. chaba* 含有成分の血中移行

ddY 系雄性マウスを実験開始 20 時間前から絶食とした. 15, 25, 27 は各 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, *P. chaba* 80%(v/v) 含水アセトンエキ스는 50 mg/kg, 100 mg/mL, 200 mg/kg の用量で経口投与し, 0.5, 1, 2, 4, 8 および 24 時間後にエーテル麻酔下にて眼窩静脈叢より採血した. 得られた血液は, 10 unit/tube のヘパリンナトリウムにより処理し, 直ちに氷冷した. 遠心分離 (5000 rpm, 4°C, 5 分) により得られた血漿は使用するまで -80°C にて冷凍保存した.

なお, 被験物質は 5%アラビアゴム水溶液に懸濁させ投与した.

#### 血漿中 *P. chaba* 含有成分濃度の LC/MS/MS 法による定量

血漿中の *P. chaba* 含有成分濃度は LC/MS/MS により定量した. 血漿の前処理は除タンパク法を用いた. -80°C にて冷凍保存した血漿は室温にて融解し十分に混和後, 遠心分離 (2000 $\times$ g, 4°C,

1 分) した。遠心分離後上清を 10  $\mu$ L 分取し、メタノール 10  $\mu$ L, 内標準溶液 [I.S.:チクロピジン塩酸塩 (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL] 10  $\mu$ L を加え攪拌した。さらにメタノール 90  $\mu$ L を添加し十分に攪拌した後、遠心分離 (15000 $\times$ g, 4°C, 5 分) した。上清 100  $\mu$ L に超純水 100  $\mu$ L を添加し十分に混合し、注入試料とし LC-MS/MS に供した (注入量 2  $\mu$ L)。HPLC カラムに Shim-pack XR-ODS, 流速 0.5 mL/min, 移動相 A に 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液/ギ酸 (1000:1, v/v), 移動相 B に アセトにトリルを用いて溶出した。グラジエント条件は、移動相 B の初期設定 45%, 0.1 分に移動相 B 濃度を 90%とし、2 分間移動相 B 90%を維持し、その後初期設定値 (移動相 B 45%) に戻しカラムを再コンディショニングした。カラム温度は 40°C, 分析時間は 4 分にて実施した。MS/MS はイオン化法として Electrospray ionization (ESI), positive ion mode, selected reaction monitoring (SRM)にて測定した。各種パラメーターは, Turbo IonSpray voltage を 5000 V, Heated gas temperature を 500°C および Table 13 に示した各化合物の transition および collision energy にて測定した。

各化合物の定量は、ブランクマウス血漿に標準溶液および I.S.を添加し、血漿中の成分濃度を測定しピーク面積比 (各化合物のピーク面積値/I.S.のピーク面積値) より作成した標準曲線を用いて算出した。なお、検量線範囲は 0.5 – 500 ng/mL で実施した。

Table 13. Analytical conditions for mass spectrometry

	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Collision energy (V)
Piperlonguminine	274	135	30
Piperine	286	201	26
Retrofractamide A	328	131	33
Piperanine	288	135	35
Pipernonaline	342	229	22
Retrofractamide B	356	255	17
Internal Standard (Ticlopidine)	264	154	25



## 引用文献

- 1) Parmar V.S., Jain S.C., Bisht K.S., Jain R., Taneja P., Jha A., Tyagi O.D., Prasad A.K., Wengel J., Olsen C.E., Boll P.M., *Phytochemistry*, **46**, 597-673 (1997).
- 2) 吉川雅之, *食品と科学*, **48**, 25-27 (2006).
- 3) Gleitz J., Beile A., Peters T., *Neuropharmacology*, **34**, 1133-1138 (1995).
- 4) Voltz H.P., Kieser M., *Pharmacopsychiatry*, **30**, 1-5 (1997).
- 5) Srinivasan K., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **47**, 735-748 (2007).
- 6) Westerterp-Plantenga M., Diepvens K., Joosen A.M., Bérubé-Parent S., Tremblay A., *Physiol. Behav.*, **89**, 85-91 (2006).
- 7) 伊東秀之, *浦上財団研究報告書*, **16**, 165-171 (2008).
- 8) McNamara F.N., Randall A., Gunthorpe M.J., *Br. J. Pharmacol.*, **144**, 781-790 (2005).
- 9) Okumura Y., Narukawa M., Iwasaki Y., Ishikawa A., Matsuda H., Yoshikawa M., Watanabe T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1068-1072 (2010).
- 10) Matsuda H., Morikawa T., Xu F., Ninomiya K., Yoshikawa M., *Planta Med.*, **70**, 1201-1209 (2004).
- 11) Morikawa T., Ando S., Matsuda H., Kataoka S., Muraoka O., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 625-630 (2005).
- 12) Morikawa T., Xu F., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 1530-1534 (2006).
- 13) Yoshikawa M., Xu F., Morikawa T., Pongpiriyadacha Y., Nakamura S., Asao Y., Kumahara A., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 308-316 (2007).
- 14) Yoshikawa M., Morikawa T., Funakoshi K., Ochi M., Pongpiriyadacha Y., Matsuda H., *Heterocycles*, **75**, 1639-1650 (2008).
- 15) Morikawa T., Funakoshi K., Ninomiya K., Yasuda D., Miyagawa K., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 956-962 (2008).
- 16) Asao Y., Morikawa T., Xie Y., Okamoto M., Hamao M., Matsuda H., Muraoka O., Yuan D., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 198-203 (2009).
- 17) Matsuda H., Asao Y., Nakamura S., Hamao M., Sugimoto S., Hongo M., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 487-494 (2009).
- 18) Morikawa T., Xie Y., Asao Y., Okamoto M., Yamashita C., Muraoka O., Matsuda H., Pongpiriyadacha Y., Yuan D., Yoshikawa M., *Phytochemistry*, **70**, 1166-1172 (2009).
- 19) Matsuda H., Ochi M., Nagatomo A., Yoshikawa M., *Eur. J. Pharmacol.*, **561**, 172-181 (2007).
- 20) Zhang H., Matsuda H., Nakamura S., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 3272-3277 (2008).
- 21) Tewtrakul S., Hase K., Kadota S., Namba T., Komatsu K., Tanaka K., *J. Essent. Oil Res.*, **12**, 603-608 (2000).
- 22) Matsumoto T., Nishimura K., Takeya K., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 857-860 (2002).
- 23) Bazylak G., *Analyst*, **117**, 1429-1433 (1992).



- 24) Morikawa T., Li X., Nishida E., Ito Y., Matsuda H., Nakamura S., Muraoka O., Yoshikawa M., *J. Nat. Prod.*, **71**, 828-835 (2008).
- 25) Yoshikawa M., Li X., Nishida E., Nakamura S., Matsuda H., Muraoka O., Morikawa T., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 559-568 (2008).
- 26) Morikawa T., Wang L.-B., Nakamura S., Ninomiya K., Yokoyama E., Matsuda H., Muraoka O., Wu L.-J., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 361-367 (2009).
- 27) Wang L.-B., Morikawa T., Nakamura S., Ninomiya K., Matsuda H., Muraoka O., Wu L.-J., Yoshikawa M., *Heterocycles*, **78**, 1235-1242 (2009).
- 28) Morikawa T., Wang L.-B., Ninomiya K., Nakamura S., Matsuda H., Muraoka O., Wu L.-J., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 853-859 (2009).
- 29) Kawashima K., Mimaki Y., Sashida Y., *Phytochemistry*, **32**, 1267-1272 (1993).
- 30) Kikuchi F., Nakamura N., Tsuda Y., Kondo K., Yoshimura H., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2452-2465 (1988).
- 31) Narui T., Takeuchi M., Ishii R., Ishida T., Okuyama T., *Nat. Med.*, **49**, 438-441 (1995).
- 32) Addae-Mensah I., Torto F.G., Oppong I.V., Baxter I., Sanders J.K.M., *Phytochemistry*, **16**, 483-485 (1995).
- 33) Navickiene H.M.D., Alécio A.C., Kato M.J., Bolzani V.S., Young M.C.M., Cavaleiro A.J., Furlan M., *Phytochemistry*, **55**, 621-626 (2000).
- 34) Tabuneng W., Bando H., Amiya T., *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3562-3565 (1983).
- 35) Shoji N., Umeyama A., Saito N., Takemoto T., Kajiwara A., Ohizumi Y., *J. Pharm. Sci.*, **75**, 1188-1189 (1986).
- 36) Koul S.K., Taneja S.C., Agarwal V.K., Dhar K.L., *Phytochemistry*, **27**, 3523-3527 (1988).
- 37) Okogun J.I., Ekong D.E.U., *J. Chem. Soc. Phekin. Trans.*, **1**, 2195-2198 (1974).
- 38) Stöhr J.R., Xiao P.G., Bauer R., *Planta Med.*, **65**, 175-177 (1999).
- 39) Kikuzaki H., Kawabata M., Ishida E., Akazawa Y., Takei Y., Nakatani N., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1329-1333 (1993).
- 40) Kijjoa A., Pinto M.M.M., Tantisewie B., Herz W., *Planta Med.*, **55**, 193-194 (1989).
- 41) Dwuma-Badu D., Ayim J.S.K., Dabrz T.T., ElSohly H.N., ElSohly M.A., Knapp J.E., Slatkin D.J., Schiff P.L.Jr., *Phytochemistry*, **15**, 822-823 (1976).
- 42) Banerji A., Bandyopadhyay D., Sarkar M., et al., *Phytochemistry*, **24**, 279-284 (1985).
- 43) Banerji A., Das C., *Phytochemistry*, **28**, 3039-3042 (1989).
- 44) Yasuda I., Takeya K., Itokawa H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 564-566 (1981).
- 45) Bauer R., Remiger P., Wangner H., *Phytochemistry*, **28**, 505-508 (1989).
- 46) Takeya K., Ara Y., Tobinaga S., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1970-1976 (1995).
- 47) Nagao Y., Seno K., Kawabata K., Miyasaka T., Takao S., Fujita E., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2687-2699 (1984).
- 48) Koul S., Koul J., L. Taneja S., C. Dhar K.L., Jamwal D.S., Singh K., Reen R.K., Singh J., *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 251-268 (2000).

- 49) De Cleyne R., Verzele M., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **84**, 435-438 (1975).
- 50) Okorie D. A., *Phytochemistry*, **15**, 1799-1800 (1976).
- 51) Kaga H., Ahmed Z., Gotoh K., Orito K., *Synlett*, 607-608, (1994).
- 52) Das B., Kashinatham A., Venkataiah B., *Synth. Commun.*, **29**, 3799-3804 (1999).
- 53) Abarbri M., Parrain J.-L., Cintrat J.-C., Duchêne A., *Synthesis*, 82-86, (1996).
- 54) Abarbri M., Parrain J.-L., Duchêne A., *Synth. Commun.*, **28**, 239-249 (1998).
- 55) Strunz G. M., Finlay H.J., *Can. J. Chem.*, **74**, 419-432 (1996).
- 56) Greger H., Grenz M., Bohlmann F., *Phytochemistry*, **20**, 2759-2581 (1981).
- 57) Achenbach H., Fietz W., Wörth J., Waibel R., Portecop J., *Planta Med.*, **52**, 12-18 (1986).
- 58) Kelly D.G., Code C.F., Lechago J., Bugajski J., Schlegel J.F., *Dig. Dis. Sci.*, **24**, 424-441 (1979).
- 59) Pihan G., Majzoubi D., Haudenschild C., Trier J.S., Szabo S., *Gastroenterology*, **91**, 1415-1426 (1986).
- 60) Takeuchi K., Tanaka A., Hayashi Y., Yokota A., *Curr. Top. Med. Chem.*, **5**, 475-86 (2005).
- 61) Wang Y., Singh R., Lefkowitz J.H., Rigoli R.M., Czaja M.J., *J. Biol. Chem.*, **281**, 15258-15267 (2006).
- 62) Tilg H., Day C.P., *Nature Clinical Practice, Gastroenterology & Hepatology*, **4**, 24-34 (2007).
- 63) Seronello S., Sheikh M.Y., Choi J., *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 869-882 (2007).
- 64) Freudenberg M.A., Galanos C., *Infect. Immun.*, **59**, 2110-2115 (1991).
- 65) Wallace J. L., Keenan C. M., Granger D. N., *Am.J. Physiol.*, **259**, G462-G467 (1990).
- 66) Morise Z., Komatsu S., Fuseler J. W., Granger D. N., Perry M., Issekutz A. C., Grisham M. B., *Am. J. Physiol.*, **274**, G246-G252 (1998).
- 67) Tiegs G., Wolter M., Wendel A., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 627-631 (1989).
- 68) Josephs M.D., Bahjat F.R., Fukuzuka K., Ksontini R., Solorzano C.C., Edwards C.K.III, Tannahill C.L., Mackay S.L.D., Copeland E.M.III, Moldawer L.L., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **278**, R1196-R1201 (2000).
- 69) Yoshikawa M., Murakami T., Ueda T., Yoshizumi S., Ninomiya K., Murakami N., Matsuda H., Saito M., Fujii W., Tanaka T., Yamahara J., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 108-118 (1997).
- 70) Matsuda H., Murakami T., Ninomiya K., Inadzuki M., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 2193-2198 (1997).
- 71) Yoshikawa M., Murakami T., Hirano K., Inadzuki M., Ninomiya K., Matsuda H., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 7395-7398 (1997).
- 72) Matsuda H., Ninomiya K., Morikawa T., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 339-344 (1998).
- 73) Matsuda H., Morikawa T., Ninomiya K., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 909-916 (2001).
- 74) Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 627-631 (2002).
- 75) Matsuda H., Murakami T., Kageura T., Ninomiya K., Toguchida I., Nishida N., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2191-2196 (1998).



- 76) Yoshikawa M., Nishida N., Ninomiya K., Ohgushi T., Kubo M., Morikawa T., Matsuda H., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 456-463 (2006).
- 77) Matsuda H., Ishikado A., Nishida N., Ninomiya K., Fujiwara H., Kobayashi Y., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2939-2944 (1998).
- 78) Murakami T., Kohno K., Ninomiya K., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1003-1008 (2001).
- 79) Yoshikawa M., Ninomiya K., Shimoda H., Nishida N., Matsuda H., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 72-76 (2002).
- 80) Matsuda H., Ninomiya K., Shimoda H., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 707-712 (2002).
- 81) Yoshikawa M., Xu F., Morikawa T., Ninomiya K., Matsuda H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1045-1049 (2003).
- 82) Yoshikawa M., Morikawa T., Kashima Y., Ninomiya K., Matsuda H., *J. Nat. Prod.*, **66**, 922-927 (2003).
- 83) Xu F., Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M., *J. Nat. Prod.*, **67**, 569-576 (2004).
- 84) Li N., Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Li X., Yoshikawa M., *Heterocycles*, **71**, 1193-1201 (2007).
- 85) Ninomiya K., Morikawa T., Zhang Y., Nakamura S., Matsuda H., Muraoka O., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 1185-1191 (2007).
- 86) Zhang Y., Morikawa T., Nakamura S., Ninomiya K., Matsuda H., Muraoka O., Yoshikawa M., *Heterocycles*, **71**, 1565-1576 (2007).
- 87) Ninomiya K., Morikawa T., Xie H., Matsuda H., Yoshikawa M., *Heterocycles*, **75**, 1983-1995 (2008).
- 88) Nakamura S., Okazaki Y., Ninomiya K., Morikawa T., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1704-1709 (2008).
- 89) Castro V., Tamayo-Castillo G., Jakupovic J., *Phytochemistry*, **28**, 2415-2418 (1989).
- 90) Sy L.-K., Brown G. D., *Phytochemistry*, **45**, 537-544 (1997).
- 91) Zdero C., Bohlmann F., Scott R., *Phytochemistry*, **26**, 1999-2006 (1987).
- 92) Ohshiro M., Kuroyanagi M., Ueno A., *Phytochemistry*, **29**, 2201-2205 (1990).
- 93) Zapesochneya G. G., Kurkin V. A., *Chem. Nat. Compd.*, **18**, 685-688 (1982).
- 94) Yoshikawa M., Xu F., Morikawa T., Ninomiya K., Matsuda H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1045-1049 (2003).
- 95) Yoshikawa M., Morikawa T., Kashima Y., Ninomiya K., Matsuda H., *J. Nat. Prod.*, **66**, 922-927 (2003).
- 96) Xu F., Morikawa T., Matsuda H., Ninomiya K., Yoshikawa M., *J. Nat. Prod.*, **67**, 569-576 (2004).
- 97) Feher J., Deak G., Muzes G., Lang I., Niederland V., Nekam K., Karteszi M., *Orv. Hetil.*, **130**, 2723-2727 (1989).
- 98) Skottova N., Krecman V., *Physiol. Res.*, **47**, 1-7 (1998).
- 99) Matsuda H., Kiyohara S., Sugimoto, S., Ando S., Nakamura S., Yoshikawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**,



- 147-149 (2009).
- 100) Yoshikawa M, Morikawa T, Oominami H, Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 957-964 (2009).
  - 101) Humphreys D.T., Wilson M.R., *Cytokine*, **11**, 773-782 (1999).
  - 102) Uboldi A.D., Savage N., *Cytokine*, **19**, 250-258 (2002).
  - 103) Aoyagi T., Shimba S., Tezuka M., *J. Health Sci.*, **51**, 21-32 (2005).
  - 104) McClain D. A., Hazel M., Parler G., Cooksey R. C., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **288**, E973-E979 (2005).
  - 105) Kudo M., Sugawara A., Uruno A., Takeuchi K., Ito S., *Endocrinology*, **145**, 4948-4956 (2004).
  - 106) Ajuwon K.M., Spurlock M. E., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **288**, R1220-R1225 (2005).
  - 107) Iwaki M., Matsuda M., Maeda N., Funahashi T., Matsuzawa Y., Makishima M., Shimomura I., *Diabetes*, **52**, 1655-1663 (2003).
  - 108) Kadowaki T., Yamauchi T., *Endocr. Rev.*, **26**, 439-451 (2005).
  - 109) Parker J.C., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 1173-1197 (2002).
  - 110) Tsuchida A.; Yamauchi T.; Kadowaki T., *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 164-170 (2005).
  - 111) Tafuri S.R., *Endocrinol.*, **137**, 4706-4712 (1996).
  - 112) Han K.L., Jung M.H., Sohn J.H., Hwang J.K., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 110-113 (2006).
  - 113) Shang W., Yang Y., Jiang B., Jin H., Zhou L., Liu S., Chen M., *Life Sci.*, **80**, 618-625 (2007).
  - 114) Zhang H., Matsuda H., Kumahara A., Ito Y., Nakamura S., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 4972-4976 (2007).
  - 115) Hailong Zhang H., Matsuda H., Yamashita C., Nakamura S., Yoshikawa M., *Eur. J. Pharmacol.*, **606**, 255-261 (2009).
  - 116) Matsuda H., Kogami Y., Nakamura S., Sugiyama T., Ueno T., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2835-2841 (2011).
  - 117) Woo H.M., Kang J. H., Kawada T., Yoo H., Sung M.K., Yu R., *Life Sci.*, **80**, 926-931 (2007).
  - 118) Zhang L.L., Liu D.Y., Ma L.Q., Luo Z.D., Cao T.B., Zhong J., Yan Z.C., Wang L.J., Zhao Z.G., Zhu S.J., Schrader M., Thilo F., Zhu Z.M., Tepel M., *Circ. Res.*, **100**, 1063-1070 (2007).
  - 119) Hsu C.L., Yen G.C., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1730-1736 (2007).
  - 120) Zhang H., Matsuda H., Nakamura S., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 3272-3277 (2008).
  - 121) Wu Z., Rosen, E.D., Brun R., Hauser S., Adelmant G., Troy A.E., McKeon C., Darington G.J., Spiegelman B.M., *Mol. Cell*, **3**, 151-158 (1999).
  - 122) Porse B.T., Pederson T.A., Xu X., Lindberg B., Wewer U.M., Friis-Hansen L., Nerlov C., *Cell*, **107**, 247-258 (2001).
  - 123) Rosen E.D., Hsu C.H., Wang X., Sakai S., Freeman M.W., Gonzalez F.J., Spiegelman B.M., *Genes Dev.*, **16**, 22-26 (2002).
  - 124) Bhardwaj R.K., Glaeser H., Becquemont L., Klotz U., Gupta S.K., Foromm M.F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**, 645-650 (2002).

- 125) Han Y., Tan T.M.C., Lim L.Y., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **230**, 283-289 (2008).
- 126) Volak L.P., Ghirmai S., Cashman J.R., Court M.H., *Drug Metabo. Dispos.*, **36**, 1594-1605 (2008).
- 127) Atal C.K., Dubey R.K., Singh J., *Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 258-262 (1985).
- 128) Lambert J.D., Hong J., Kim D.H., Mishin V.M., Yang C.S., *J. Nutr.*, **134**, 1948-1952 (2004).
- 129) Pattanaik S., Hota D., Prabhakar S., Kharbanda P., Pandhi P., *Phytother. Res.*, **20**, 683-686 (2006).
- 130) Jin M.J., Han H.K., *J. Food Sci.*, **75**, H93-H96 (2010).
- 131) Johnson J.J., Nihal M., Siddiqui I.A., Scarlett C.O., Bailey H.H., Mukhtar H., Ahmad N., *Mol. Nutr. Food Res.*, **55**, 1-8 (2011).
- 132) Tsukamoto S., Tomise K., Miyakawa K., Cha B.-C., Abe T., Hamada T., Hirota H., Ohta T., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 2981-2985 (2002).

## 論文目録

- 1) Toshio Morikawa, Hisashi Matsuda, Itadaki Yamaguchi, Yutana Pongpiriyadacha, and Masayuki Yoshikawa : New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. *Planta Med.*, **70**, 152-159 (2004).
- 2) Hisashi Matsuda, Kiyofumi Ninomiya, Toshio Morikawa, Daisuke Yasuda, Itadaki Yamaguchi, and Masayuki Yoshikawa : Protective effects of amide constituents from the fruit of *Piper chaba* on D-galactosamine/TNF- $\alpha$ -induced cell death in mouse hepatocytes. *Bioorg Med Chem Lett.*, **18**, 2038-2042 (2008).
- 3) Hisashi Matsuda, Kiyofumi Ninomiya, Toshio Morikawa, Daisuke Yasuda, Itadaki Yamaguchi, and Masayuki Yoshikawa : Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: Structural requirements, mode of action, and new amides. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 7313-7323 (2009).
- 4) Toshio Morikawa, Itadaki Yamaguchi, Hisashi Matsuda, Masayuki Yoshikawa : A new amide, piperchabamide F, and two new phenylpropanoid glycosides, piperchabaosides A and B, from the fruit of *Piper chaba*. *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1292-1295 (2009).
- 5) Itadaki Yamaguchi, Hisashi Matsuda, Hailong Zhang, Makoto Hamao, Chihiro Yamashita, Yuichiro Kogami, Haruka Kon'I, Megumi Murata, Seikou Nakamura, Masayuki Yoshikawa : Adipogenic Effects of Piperlonguminine in 3T3-L1 Cells and Plasma Concentrations of Several Amide Constituents from *Piper chaba* Extracts after Treatment of Mice. *J. Nat. Med.*, in press

## 参考論文

- 1) Ken Tokuyasu, Masaru Mitsutomi, Itadaki Yamaguchi, Kiyoshi Hayashi, Yutaka Mori : Recognition of chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, **39**, 8837-8843 (2000).
- 2) Itadaki Yamaguchi, Seiji Kawamoto, Tsunehiro Aki, Seiko Shigeta, Osamu Suzuki, and Kazuhisa Ono : Identification of differentially expressed genes in atopic dermatitis-prone NC/Nga mouse. *Animal Cell Technology, Basic & Applied Aspects*, **12**, 379-383 (2002).



