

ジャンボリーキ鱗片から発生する泡成分の抗肝障害作用と サポニンの同定

内田あゆみ^{*,**§}, 陶 慧^{*}, 荻原 淳^{*}, 赤尾 真^{*},
熊谷日登美^{*}, 松藤 寛^{*}, 竹永章生^{*}, 櫻井英敏^{*}

^{*} 日本大学生物資源科学部

^{**} (株)わだまんサイエンス

Antihepatopathic Activity of Foam Components Produced from the Bulb of Jumbo Leek and Isolation of Its Active Saponin

Ayumi Uchida^{*,**§}, Kei Tao^{*}, Jun Ogihara^{*}, Makoto Akao^{*}, Hitomi Kumagai^{*},
Hiroshi Matsufuji^{*}, Fumio Takenaga^{*} and Hidetoshi Sakurai^{*}

^{*} Nihon University, College of Bioresource Sciences, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510

^{**} Wadaman Science Co., Ltd., 546 Karasuma-oike agaru, Nijoden-cho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-0845

In this study, we examined the effects of lyophilized powder of foam components (foam powder) obtained from the bulb of jumbo leek on liver disorders. Using a rat model, acute liver disorders were produced by D-galactosamine hydrochloride (GalN) administration to induce fulminant hepatitis and chronic liver disorders were induced by ethanol administration. These effects were then compared with those of freeze-dried powder of the whole bulb and curcumin. We also attempted to isolate and identify the saponin, the estimated active component in the leek. Both foam powder and freeze-dried powder decreased the induction of hepatocyte necrosis in GalN-induced acute liver disorders and prevented the occurrence of ethanol-induced chronic liver disorders in rats by inhibiting the absorption of alcohol from the stomach. From the freeze-dried whole-bulb powder, we isolated the known steroid saponin, karatavioside A (C₅₀H₈₀O₂₃, MW : 1048).
(Received Jul. 22, 2009 ; Accepted Sep. 14, 2009)

Keywords : jumbo leek, foam powder, saponin, alcohol absorption, karatavioside A

キーワード : ジャンボリーキ, 泡粉末, サポニン, アルコール吸収, カラタビオサイド A

ジャンボリーキ (大粒ニラネギ, *Allium ampeloprasum* L.)¹⁾ は, 他のネギ属植物とは異なり, 鱗片の脱皮洗浄, 磨砕および蒸留の段階で多量の泡を発生させる (写真 1)。既に著者らは, ジャンボリーキ鱗片凍結乾燥粉 (以下 鱗片末) がストレプトゾトシン負荷糖尿病モデルラットにおける肝障害を修復したり, また鎮痛剤アセトアミノフェン (AAP) によるラットの肝障害発生を抑制すること, そしてこの薬剤肝臓障害保護作用はイヌリン以外の成分が関与していることを報告した²⁾。これらの肝細胞壊死低減作用は, 泡成分に含まれるサポニンが肝臓機能に好影響を与えていると思われる³⁾ が詳細については不明である。

そこで本論では, ジャンボリーキ鱗片から得られた泡成分の凍結乾燥粉 (以下 泡粉末) と原料の鱗片末および肝障

害の予防成分として知られているクルクミン⁴⁾を用いて軽症肝炎の病態となる D-ガラクトサミン塩酸塩 (以下 GalN) により誘発される急性肝障害とエタノール (EtOH) によって誘発される慢性肝障害モデルラットに対する影響を調べた。また同時に, 関与成分として生鱗片からサポニンの単離・同定を試みた。その結果, ジャンボリーキの泡粉末は, GalN および EtOH のラットへの投与実験において, クルクミンと同様に急性肝障害時の肝細胞壊死を低減させる作用を示し, また胃からのアルコール吸収を抑制することにより慢性肝障害を予防していることが示唆された。そして, その成分として既知のステロイドサポニンである (25R)-spirost-5-ene-2 α , 3 β -diol-3-O- $\{O$ - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside $\}$, (C₅₀H₈₀O₂₃, MW : 1048), カラタビオサイド A の存在を明らかにしたので報告する。

^{*} 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866

^{**} 〒604-0845 京都市中京区烏丸御池上が二条殿町 546

[§] 連絡先 (Corresponding author), ayumi_u@mue.biglobe.ne.jp

実 験 方 法

1. 実験材料および試薬

検体は、長野県産ジャンボリーキ鱗片の泡粉末および鱗片末とクルクミンを用いた。泡粉末は、7月収穫のジャンボリーキ鱗片（生）1kgに純水1lを加えてミキサーで粉碎し、ガーゼでろ過、ろ液を加熱して、発生してくる泡を柄杓で回収し、冷却後凍結乾燥した（収率は1.5~3%）。また鱗片末は、ジャンボリーキ鱗片（生）を粉碎して凍結乾燥した。クルクミンは日研化成株式会社が秋ウコンから抽出した純度98%のものを提供して頂いた。

2. 肝障害モデルラットに対する泡粉末の抑制試験

動物試験は日本大学生物資源科学部動物試験実験指針に従い実施した。

(1) 実験動物および飼育条件

5週齢のWistar系SPF雄性ラット（日本クレア株式会社、東京）を一週間予備飼育した後、実験に使用した。ラットは、温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、光サイクルを12時間毎明暗という条件で金網製個別ゲージにて飼育を行った。食餌は、マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料CE-2（株式会社日本生物材料センター）を、飲料水は水道水とともに自由摂取させ、採血前18時間は絶食状態に保った。

(2) 肝障害ラットの作製および試験群

i) GalN誘発肝障害

GalNとしてD-ガラクトサミン塩酸塩（シグマアルドリッチ、東京）を用い、生理食塩水に溶解後、1mol/lのNaOHで中和、滅菌フィルターでろ過し、注射液を調製した。GalNは、700mg/kgを各群7頭のラットに1mlを腹腔内投与した。検体はGalN投与の夕刻（作製8時間後）、翌日の朝（作成24時間後）および夕刻（作製32時間後）の計3回胃ゾンデを用いて経口投与した。また、GalN投与15時間前に検体を与える実験群を設定した。ジャンボリーキの泡粉末および鱗片末とクルクミンは、生理食塩水に懸濁し、各群にそれぞれ1ml与えた。これに対し、コントロール（CT）群は生理食塩水のみを1ml与えた。さらに、GalN投与を0時間とし、0および48時間後にネブタール麻酔下で頸静脈より採血し、それぞれの血液サンプルは、血清分離（3000rpm、 4°C 、15min）後、各種酵素活性、脂質および血清タンパク質の測定に供した。なお、ネブタール麻酔は、25mgのペントバルビタール（和光純薬工業株式会社、大阪）を20mlのプロピレングリコールと5mlエタノールで溶解後、純水で50mlにfill upした。動物実験群として1群（CT群）は生理食塩水のみを投与、第2群（GalN-CT群）はGalN 700mg/kg投与、第3群 {GalN-泡粉末（30×3）} はGalN投与後に泡粉末30mg/kgを3回投与、第4群 {GalN-泡粉末（60×3）} はGalN投与後に泡粉末60mg/kgを3回投与、第5群 {GalN-泡



写真1 ジャンボリーキ鱗片の洗浄工程で発生する泡

粉末（60×4）はGalN投与前に泡粉末60mg/kgを1回投与し、GalN処理後に泡粉末60mg/kgを3回投与、6群 {GalN-鱗片末（60×3）} はGalN投与後に鱗片末60mg/kgを3回投与、第7群 {GalN-クルクミン（60×3）} はGalN投与後にクルクミン60mg/kgを3回投与した。

ii) EtOH誘発肝障害

アルコール性肝障害モデルラットの作製は、40%エタノール（EtOH）を1日に1ml、42日間投与し慢性的アルコール常飲状態にした。泡粉末と鱗片末は、15mg/kgになるようにそれぞれ40% EtOH 1mlに懸濁させ胃ゾンデを用いて投与した。CT群には生理食塩水のみ、EtOH-CT群には40% EtOHのみを投与した。試験42日目にネブタール麻酔下で頸静脈採血を行なった。各種血液サンプルは、血清分離（3000rpm、15min、 4°C ）後、各種酵素活性、脂質の測定に供した。また、毎日ラットの体重を測定した。

実験群は、下記のように1群を7頭として4群を設定した。第1群（CT）は生理食塩水1mlのみを投与、第2群（EtOH-CT）は40% EtOHを1ml/day投与、第3群 {EtOH-泡粉末（15）} は40% EtOH 1mlに懸濁した泡粉末15mg/kg/day投与、第4群 {EtOH-鱗片末（15）} は40% EtOH 1mlに懸濁した鱗片末15mg/kg/day投与とした。

(3) 血液生化学検査

測定は乾式臨床自動分析装置SPOUCHEM™ EZ（SP-4430、アークレイ株式会社、京都）を用いて、血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性、総ビリルビン（T-Bil）値、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（ γ -GTP）活性、Lactate dehydrogenase（LDH）、Alkaline phosphatase（ALP）活性等を測定した。測定キットとしては、スポットケム™ IIマルチ肝機能-2（アークレイ株式会社、京都）を用いた。

3. 胃のアルコール吸収抑制試験

5週齢のWistar系を一週間予備飼育し、40% EtOHの1mlを胃ゾンデを用いて投与し、飲酒状態にした。ジャン

ボリーキの泡粉末とクルクミンは、15 mg/kg になるようにそれぞれ 40% EtOH 1 ml に懸濁させ、胃ゾンデを用いて経口胃内投与した。CT 群には生理食塩水のみ、EtOH-CT 群には 40% EtOH のみ経口胃内投与した。EtOH 投与時間を 0 時間とし、1, 2 および 4 時間後にウレタン麻醉下で頸静脈より 0.5 ml 採血した。各種血液サンプルに、0.33 mol/l 過塩素酸を加え上清分離 (3000 rpm, 15 min, 4°C) 後、血中 EtOH 濃度の測定に供した。

動物実験群は、1 群 4 頭とし、下記の 4 群に分けて実施した。第 1 群 (CT) は生理食塩水 1 ml のみを投与、第 2 群 (EtOH-CT) は 40% EtOH を 1 ml 投与、第 3 群 {EtOH-泡粉末 (15)} は 40% EtOH 1 ml に懸濁した泡粉末 15 mg/kg 投与、第 4 群 {EtOH-クルクミン (15)} 群は 40% EtOH 1 ml に溶解したクルクミン 15 mg/kg 投与とした。血中アルコール濃度は、分光光度計 (UVmini 1240, 島津, 東京)、F-キットエタノール (J.K. インターナショナル, 東京) を用いた。測定方法は溶液 A {二リン酸カリウム溶液 100 ml, NAD 4 mg, aldehyde dehydrogenase (Al-DH) 0.8 U} 3 ml と 10 倍希釈した上清 0.1 ml を混和し、3 分静置後 340 nm の波長で吸光度を測定した。これを E_1 とした。その後、溶液 B {alcohol dehydrogenase (ADH) 7000 U} 0.05 ml と混和し、10 分間静置後 340 nm の波長で吸光度を測定した。これを E_2 とした。キットマニュアルに従い測定した値を、血中 EtOH 濃度 E [g/l] = 試料 ($E_2 - E_1$) - ブランク ($E_2 - E_1$) $\times 0.1152 \times 8.98 \times 10$ の計算式により測定した。

4. 統計処理

肝障害ラット群とジャンボリーキの泡粉末投与群および鱗片末投与群、並びにクルクミン投与群の結果は Dunnett の多重比較で統計解析し、 $p < 0.05$ を有意とした。

5. サポニンの分離

(1) 単離方法

泡粉末および鱗片末に含有するサポニンの有無は、試料をシリカゲルの薄層クロマトグラフィ (以下 TLC) にて展開 (クロロホルム/メタノール/水 = 10/10/1) し、発色剤 (0.5 ml アニスアルデヒド + 0.9 ml エタノール + 0.5 ml 硫酸) をスプレーして黄変するスポットにより確認した。サポニンの分取は、Mimaki らの方法により、60% から 100% メタノールにて抽出を試み、最終的には 100% メタノールで粗分画の分取を行った⁵⁾。すなわち、鱗片末 142 g にメタノール 3 l を加え抽出、ろ過、エバポレーションを繰り返して、粗分画サンプル溶液を得た。

次に、このサンプル溶液を、示差屈折計 (RI) を検出器として、HPLC にてサンプル溶液を精製した。カラムは DAISO-PAK SP-120-5-ODS-AP (ダイソー株式会社, 大阪, 5 ml, 4.6 mm \times 250 mm) を使用し 3 つのピークを確認し、さらに個々のフラクションを各々エバポレーターにかけ乾固し、A 群, B 群, C 群とした。さらに含量が多く、明確な 3 つのピークが確認された B 群のピークについて 65%

メタノールを加えて溶解し、ろ過後、HPLC-RI にて 3 つのフラクション (Fr. B-1, Fr. B-2, Fr. B-3) を得た。カラムへのサンプル注入量は 100 μ l, 流速は 0.5 ml/min, 移動相にはメタノール/水 = 75/25 を用いて分画・精製し、化合物 B-1 を 26 mg 得た。

(2) 化合物 B-1 のスペクトル分析

化合物 B-1 の同定は、UPLC-MS/MS, FAB-MS および NMR にて分析した。上記 Fr. B-1 をタンデム四重極型質量分析計 (日本ウォーターズ社製, Quattro Premier XE) を搭載した超高速液体クロマトグラフ (日本ウォーターズ社製, UPLCTM) に供した。LC の条件は、移動相: 0.1% ギ酸含有 75% メタノール, カラム: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m, 流速: 0.2 ml/min, カラム温度: 40°C, サンプル注入量: 2 μ l で行った。また、MS/MS 条件は、イオン化法: ESI ポジティブ, キャピラリー電圧: 3.5 kV, イオンソース: 120°C, 脱溶媒ガス: 400°C, コーン電圧: 40 V, コリジョン電圧: 40 V, 脱溶媒ガス: 800 l/h, コーンガス: 50 l/h, コリジョンガス: 0.3 ml/min にて分析した。さらに、単離した化合物 B-1 を FAB-MS (日本電子株式会社製, JMS-SX 102A) にて、直接導入法 (イオン化法: FAB ポジティブおよび FAB ネガティブ, マトリックス: グリセロール) で分析した。NMR は、試料を重メチルスルホキシド (DMSO- d_6) および重ピリジン (Pyridine- d_5) に溶解し、核磁気共鳴分析装置 (日本電子株式会社製, ECA-500) にて ¹H- および ¹³C-NMR スペクトルを測定した。各スペクトルのシグナルは種々の二次元 NMR 法により帰属させた。

実験結果および考察

1. GalN 誘発肝障害ラットに対するジャンボリーキ粉末の改善効果

GalN 誘発肝障害ラットの血液生化学検査結果を、表 1 に示した。GalN 投与の 48 時間後には、GalN-CT 群は CT 群に比べて AST 活性および ALT 活性が有意に上昇した。この上昇に対して、泡粉末投与群 (30 \times 3, 60 \times 3, 60 \times 4) は抑制効果を示した。泡粉末、鱗片末およびクルクミン投与群のいずれの群も有意な抑制効果を示したが、試料間での差は認められなかった。

γ -GTP 活性および T-Bil 値の変化は、GalN 投与の 48 時間後において、GalN-CT 群は CT 群に比べて有意に上昇した。この上昇に対して、泡粉末、鱗片末およびクルクミン投与群は有意に抑制効果が認められた。

泡粉末の投与量による差は、90, 180 および 240 mg で比較した場合、各群とも有意差があるものの、AST, ALT の結果では、容量依存傾向が観られた。また泡粉末、鱗片末を同量投与した 180 mg 投与群においては、鱗片末投与群の AST, ALT, T-Bil 値にわずかながら低下傾向が観られた。

表 1 GalN 誘発肝障害ラットに対するジャンボリーキ泡粉末の影響試験

実験群	AST	ALT	T-Bil	γ -GTP
	(IU/l)	(IU/l)	(mg/dl)	(IU/l)
CT	84.5 \pm 8.7	19.6 \pm 1.5	0.22 \pm 0.03	1.3 \pm 0.33
GalN-CT	447.0 \pm 88.0	348.7 \pm 87.5	1.50 \pm 0.43	4.8 \pm 0.25
GalN-泡粉末 (30 \times 3)	189.3 \pm 71.6**	62.7 \pm 27.5**	0.26 \pm 0.03**	3.7 \pm 0.20
GalN-泡粉末 (60 \times 3)	161.3 \pm 10.4**	38.1 \pm 15.1**	0.21 \pm 0.02**	2.8 \pm 0.58*
GalN-泡粉末 (60 \times 4)	172.8 \pm 21.1**	25.3 \pm 2.9**	0.34 \pm 0.03**	3.2 \pm 0.20*
GalN-鱗片末 (60 \times 3)	147.7 \pm 20.2**	36.0 \pm 9.3**	0.20 \pm 0.04**	3.0 \pm 0.58*
GalN-クルクミン (60 \times 3)	146.4 \pm 21.2**	20.6 \pm 2.6**	0.33 \pm 0.03**	3.0 \pm 0.33**

Dunnet の検定, * p <0.05, ** p <0.01 mean \pm SE, n =7

(CT 群) は生理食塩水のみを投与, (GalN-CT 群) は GalN 700 mg/kg 投与, GalN-泡粉末 (30 \times 3) は GalN 投与後に泡粉末 30 mg/kg を 3 回投与, GalN-泡粉末 (60 \times 3) は GalN 投与後に泡粉末 60 mg/kg を 3 回投与, GalN-泡粉末 (60 \times 4) は GalN 投与前に泡粉末 60 mg/kg を 1 回投与し, GalN 処理後に泡粉末 60 mg/kg を 3 回投与, GalN-鱗片末 (60 \times 3) は GalN 投与後に鱗片末 60 mg/kg を 3 回投与, GalN-クルクミン (60 \times 3) は GalN 投与後にクルクミン 60 mg/kg を 3 回投与した。

表 2 EtOH 誘発肝障害ラットに対するジャンボリーキ泡粉末の影響試験

実験群	AST	ALT	T-Bil	γ -GTP
	(IU/l)	(IU/l)	(mg/dl)	(IU/l)
CT	73.3 \pm 1.2	14.4 \pm 1.7	0.34 \pm 0.02	0.8 \pm 0.20
EtOH-CT	107.3 \pm 9.5	29.0 \pm 4.3	0.60 \pm 0.03	4.3 \pm 1.20
EtOH-泡粉末 (15)	66.5 \pm 14.0**	14.2 \pm 0.8*	0.40 \pm 0.07	1.8 \pm 0.17**
EtOH-鱗片末 (15)	74.8 \pm 8.7**	13.8 \pm 2.0*	0.46 \pm 0.04	1.8 \pm 0.20**

Dunnet の検定, * p <0.05, ** p <0.01 mean \pm SE, n =7

この原因としては、泡粉末、鱗片末においては、サポニン量は泡粉末が多いが、鱗片末に含有しているイオウ化合物が寄与していることが推察された⁶⁾。

クルクミンと、同量投与した泡粉末 (180 mg 投与群) を比較すると、クルクミンのほうが、AST, ALT の数値においては、軽減作用が強く観られたが、 γ -GTP においては、差が観られなかった。

以上の結果、ジャンボリーキの泡粉末は、GalN 誘発肝障害ラットの肝障害を抑制することが明らかになった。そして、この現象は既に著者が報告した鱗片末による AAP 負荷肝障害ラットの抑制効果²⁾ および Reddy らが報告したウコンのクルクミンによる鉄負荷肝障害ラットの抑制効果⁴⁾ と類似していた。

ガラクトサミン肝障害は以前からヒトウイルス性肝炎の類似の組織所見を呈することが知られているが、詳しい機序に関しては解明されていない。近年サイトカインの研究が進みガラクトサミン投与により、肝マクロファージである、クッパー (Kupffer) 細胞からの TNF- α の分泌が亢進するためではないかと考えられている⁷⁾。またガラクトサミン肝障害の発生には、エンドキシンが関与し、エンドキシンはマクロファージを活性化し、サイトカインの分泌に関与しているとの報告がある⁸⁾。

従って、ラットの肝障害においても、肝マクロファージである Kupffer 細胞の機能とそれによって生産される活性酸素が深く関わっており、今回のジャンボリーキ泡粉末や鱗片末の肝障害への軽減作用には、クルクミン⁴⁾ やサポニン⁹⁾ と同様に、その抗酸化性による活性マクロファージからの TNF- α 生産の抑制がその作用機序として推察された。

2. EtOH 誘発肝障害ラットに対するジャンボリーキ泡粉末の抑制効果

アルコール性肝障害を想定し、ラットに EtOH とジャンボリーキ鱗片末、泡粉末を投与した結果、両者に成長阻害要素がなく、体重はいずれの群も経日とともに増加し、各群間での差はほとんど認められず、各群ともに順調な成長が見られた。

EtOH 誘発肝障害ラットの血液生化学検査の結果を表 2 に示す。EtOH 投与により 42 日後には、EtOH-CT 群は CT 群に比べて正常値の範囲ではあるが、AST 活性および ALT 活性が有意に上昇した。この上昇に対して、泡粉末投与群および鱗片末投与群に有意な抑制効果が見られた。また、アルコール障害マーカーである γ -GTP 活性は 42 日後には、EtOH-CT 群は CT 群に比べ、有意に上昇した。この上昇に対して、泡粉末投与群および鱗片末投与群は有意に抑制した。T-Bil 値は、42 日後の EtOH-CT 群が正常値を

表 3 ジャンボリーキ泡粉末の血中 EtOH への影響試験

実験群	(mg/dl)			
	0 (h)	1 (h)	2 (h)	4 (h)
CT	0	0.0038±0.0020	0.0137±0.0060	0.0024±0.0020
EtOH-CT	0	1.993 ±0.078	2.204 ±0.235	1.797 ±0.296
EtOH-泡粉末 (15)	0	1.591 ±0.119	1.653 ±0.031*	1.066 ±0.027*
EtOH-クルクミン (15)	0	1.517 ±0.261	1.534 ±0.320*	0.996 ±0.259*

Dunnet の検定, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mean±SE, $n = 4$

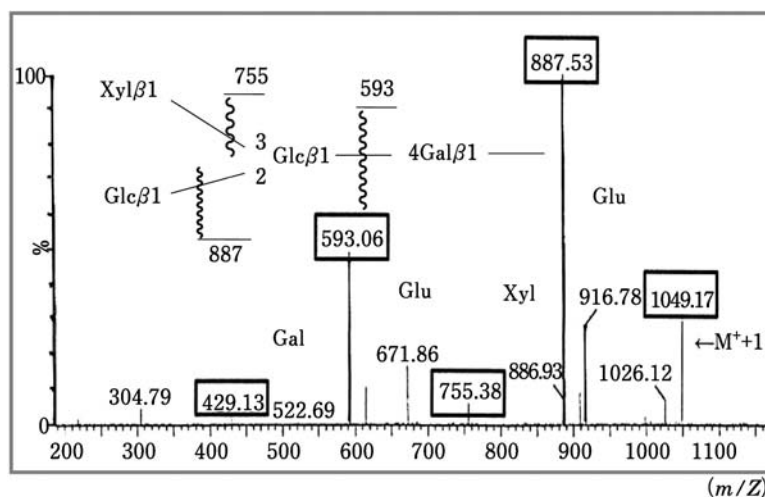


図 1 サポニン B-1 の UPLC-MS/MS スペクトル

超えて CT 群に比べ有意に上昇した。この上昇に対して、泡粉末と鱗片末群では有意差は認められなかったが、抑制傾向を示した。

これらの結果から、ジャンボリーキの泡粉末と鱗片末は慢性肝障害を想定したアルコール性肝障害に対して軽減作用があることが判明した。

3. ジャンボリーキ泡粉末の血中 EtOH への影響

EtOH 投与ラットにおける血中 EtOH 濃度の経時変化を表 3 に示す。泡粉末とクルクミンを用いた試験では、泡粉末投与群において、血中 EtOH 濃度が 1 時間後に EtOH-CT 群と比較して約 30%、2 時間後に約 27% と有意に低下し、4 時間後は約 40% の低下を示した。比較のために用いたクルクミンにも同様の傾向が確認された。クルクミンは肝臓の解毒効果の活性を高めることが報告されている¹⁰⁾。また EtOH 吸収抑制作用の機序は、緑茶サポニンでは EtOH の胃からの吸収遅延と消化管での吸収阻害作用として報告されている¹¹⁾。興味深いことに、トングリ由来のサポニンでは単離されたピーク毎にアルコール吸収抑制作用が異なる点が報告されている¹²⁾。

上記のことから、ジャンボリーキの泡粉末にはサポニンが含まれ、肝臓での EtOH の分解を促進するか、胃からの EtOH 吸収を阻害していることが推察された。そして、この作用がアルコール慢性肝障害を想定した EtOH の抗肝

障害作用となっていることが示唆された。

4. 単離したジャンボリーキサポニンの特性と構造

得られた粉末は白色で水、メタノール、ジメチルスルフォキシドに溶解し、起泡性を有した。

鱗片末 142 g から抽出された A, B, C 群のサポニン含量は 1.1 g であり、単離した B 群中の 3 つのピークは乾燥重量として各々 26 mg, 11 mg および 5 mg であった。

分取できたサポニンの総量は、ジャンボリーキ鱗片 (生) に換算すると 1.93 g/kg wet wt であった。Fr. B-1 を UPLC-MS/MS に供したところ、3.9 分に顕著な MS ピークが検出された。本ピークは m/z 1049 $[M+H]^+$ の擬似分子イオンピークを示し、MS/MS の結果、 m/z 887, 755, 593 および 429 にフラグメントイオンピークを示した。従って、本化合物は、図 1 に示すようにグルコース (Glc) で分岐した糖鎖構造を有することが示唆された。精製・単離した化合物 B-1 を FAB-MS に供したところ、ポジティブモードにおいて m/z 1049 $[M+H]^+$ およびネガティブモードで m/z 1047 $[M-H]^-$ の擬似分子イオンピークを示し、本化合物の質量数は 1048 ($C_{50}H_{80}O_{23}$) であり、UPLC-MS/MS の結果と一致した。

また、NMR の結果は以下の通りである。

¹H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 0.70 (s, 3H, Ag-H18), 0.71 (d, 3H, J=6.0 Hz, Ag-H27), 0.86 (m, 1H, Ag-

表 4 ジャンボリーキ鱗片から得られたサポニンの¹³C-NMR データ

Aglycon	Solvents	DMSO- <i>d</i> ₆ ¹⁾	Pyridine- <i>d</i> ₅	Position	Sugar	Solvents	DMSO- <i>d</i> ₆ ¹⁾	Pyridine- <i>d</i> ₅	Position
1		45.7	45.7	CH ₂	Gal'				
2		70.0	70.8	CH (OH)	1		101.8	103.4	CH (2O)
3		83.1	84.6	CH (O)	2		71.6	72.6	CH (OH)
4		37.1	37.7	CH ₂	3		74.1	75.5	CH (OH)
5		140.2	140.1	C (=CH)	4		79.3	79.3	CH (O)
6		121.7	121.9	CH (=C)	5		74.7	75.7	CH (O)
7		*32.0	**32.2	CH ₂	6		60.1	60.5	CH ₂ (OH)
8		31.0	31.1	CH	Glc''				
9		49.9	50.2	CH	1		103.0	104.7	CH (2O)
10		37.8	37.9	C	2		79.9	81.1	CH (O)
11		21.0	21.2	CH ₂	3		85.7	87.0	CH (O)
12		39.6	39.8	CH ₂	4		69.2	70.0	CH (OH)
13	DMSO- <i>d</i> ₆		40.5	C	5		76.5	77.6	CH (O)
14		56.2	56.5	CH	6		61.9	63.0	CH ₂ (OH)
15		*32.0	**32.2	CH ₂	Glc'''				
16		80.7	81.2	CH (O)	1		103.7	104.8	CH (2O)
17		62.3	62.9	CH	2		74.8	76.1	CH (OH)
18		16.5	16.3	CH ₃ (C)	3		76.7	78.1	CH (OH)
19		20.6	20.4	CH ₃ (C)	4		70.4	71.4	CH (OH)
20		41.6	42.0	CH (CH ₃)	5		77.1	78.4	CH (O)
21		15.2	15.0	CH ₃ (CH)	6		61.6	62.7	CH ₂ (OH)
22		108.9	109.3	C (2O)	Xyl''''				
23		31.5	31.8	CH ₂	1		103.9	105.0	CH (2O)
24		29.0	29.2	CH ₂	2		74.0	75.1	CH (OH)
25		30.3	30.6	CH (CH ₃)	3		77.3	78.7	CH (OH)
26		***66.5	66.9	CH ₂ (O)	4		69.3	70.4	CH (OH)
27		17.6	17.3	CH ₃ (CH)	5		***66.5	67.4	CH ₂ (O)

¹⁾ DMSO-*d*₆: dimethyl sulfoxide-*d*₆, (CD₃)₂SO

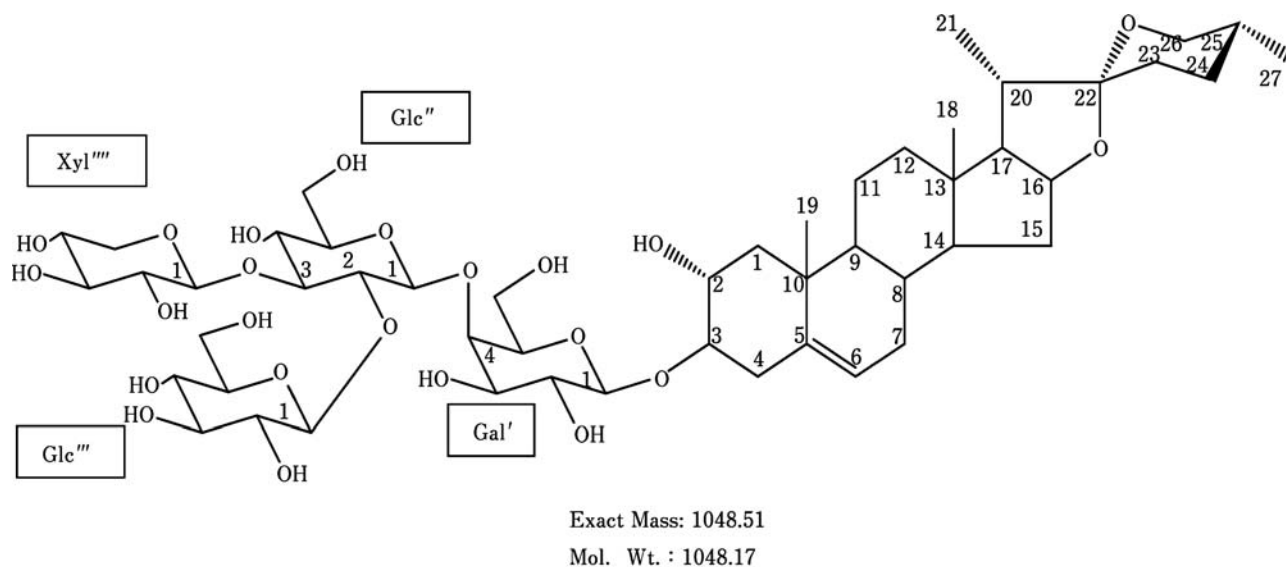
*, ** および *** は重複シグナルを示す. ¹³C-NMR の解析は, DEPT, HSQC, および HMBC で実施した.

H1a*), 0.88 (d, 3H, J=7.2 Hz, 0.90 (m, 1H, Ag-H9), 0.96 (s, 3H, Ag-H19), 1.07 (m, 1H, Ag-H14), 1.10 (m, 1H, Ag-H12a*), 1.14 (m, 1H, Ag-H15a*), 1.28 (m, 1H, Ag-H24a*), 1.37 (m, 1H, Ag-H11a*), 1.45 (m, 1H, Ag-H23a*), 1.47 (m, 1H, Ag-H11b*), 1.47 (m, 1H, Ag-H15b*), 1.50 (m, 1H, Ag-H8), 1.50 (m, 1H, Ag-H25), 1.51 (m, 1H, Ag-H7a*), 1.51 (m, 1H, Ag-H24b*), 1.60 (m, 1H, Ag-H23b*), 1.65 (m, 1H, Ag-H12b*), 1.66 (m, 1H, Ag-H17), 1.79 (brq, 1H, J=7.2 Hz, Ag-H20), 1.87 (m, 1H, Ag-H7b*), 1.91 (m, 1H, Ag-H1b*), 2.20 (brt, 1H, J=13 Hz, Ag-H3a*), 2.31 (dd, 1H, J=4.5, 13 Hz, Ag-H3b*), 2.94 (t, 1H, J=8.3, Gal'-H5), 3.02 (m, 1H, Gal'-3), 3.07 (m, 1H, Xyl''''-5a), 3.08 (m, 1H, Glc'''-5), 3.09 (m, 1H, Xyl''''-4), 3.10 (m, 1H, Glc'''-4), 3.11 (m, 1H, Glc'''-3), 3.12 (m, 1H, Xyl''''-3), 3.17 (m, 1H, Ag-H3), 3.17 (m, 1H, Ag-H26a*), 3.19 (m, 1H, Glc''-5), 3.24 (m, 1H, Ag-H2), 3.32 (m, 1H, Gal''-2), 3.33 (m, 1H, Glc''-6a*), 3.33 (m, 1H, Xyl''''-2), 3.36 (m, 1H, Xyl''''-5b), 3.38 (m, 1H, Gal'-6a*), 3.38 (m, 1H, Glc'''-2), 3.53 (d, 1H, J=7.8 Hz, Glc''-2), 3.53 (m, 1H, Glc''-4),

3.55 (m, 1H, Glc'''-6a*), 3.56 (q, 1H, J=8.5 Hz, Glc''-3), 3.68 (m, 1H, Gal'-6b*), 3.68 (m, 1H, Glc'''-6b*), 3.69 (m, 1H, Glc''-6b*), 3.73 (m, 1H, Ag-H26b*), 3.77 (m, 1H, Gal''-4), 4.19 (d, 1H, J=7.2 Hz, Gal''-1), 4.25 (q, 1H, J=7.2 Hz, Ag-H16), 4.40 (d, 1H, J=7.7 Hz, Glc'''-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8 Hz, Xyl''''-1), 4.68 (d, 1H, J=8.0 Hz, Glc''-1), 5.31 (d, 1H, J=4.0 Hz, Ag-H6). *絶対配置は決定していない. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆ および Pyridine-*d*₅) は表 4 に示す.

DMSO-*d*₆ 溶解時の¹³C-NMR 測定においては, 48 本のシグナルしか観察されなかったが, DEPT および HMQC 測定によりアグリコンの C13 メチレンカーボンが溶媒シグナルと重なっていること, およびアグリコンの C26 メチレンカーボンと Xyl ユニットの C5 メチレンカーボンとが完全に重なっていることが判明した. カタラビオサイド A の DMSO-*d*₆ での NMR データに関する報告はないが, 本試料をピリジン-*d*₅ に再溶解した際の NMR データは既報¹³⁾ と完全に一致した.

¹H-NMR, ¹³C-NMR および各種 2 次元 NMR 解析により, 本化合物は既知のステロイドサポニンである (25R)-spirost-



Karatavioside A : (25R)-spirost-5-ene-2 α ,3 β -diol 3-O- $\{$ O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside $\}$

図 2 サポニン B-1 の構造と名称

5-ene-2 α ,3 β -diol-3-O- $\{$ O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside $\}$ (カタラビオサイド A) であることが判明した (図 2)。本化合物はユリ科カタビエンセ (和名：眉はけニラ) に含有されていることが報告されている¹⁴⁾が、ジャンボリーキからは初めてである。

本試験では、ジャンボリーキの肝障害への影響を確認する目的と同時に、その関与成分を泡中のサポニンと想定し、研究を実施した。GalN および EtOH 誘発肝障害ラットへの抑制試験において、泡粉末と鱗片末の成分的な差は、サポニンであり、鱗片末 60 mg を 3 回投与した 180 mg 投与群では 1.44 mg/kg、泡粉末 30 mg を 3 回投与した 90 mg 投与群では約 3~6 mg/kg となる。

今回鱗片末 142 g から分取した総サポニン量の 1.1 g は、生のジャンボリーキでは 4 倍の 568 g に含有されているため、総サポニンの含有量では 0.193% と通常のニンニク¹⁵⁾の約 2 倍含有されている試算となった。しかし、製造工程中の洗浄において廃棄されている量から推察すると、鱗片末には 2 倍以上のサポニンが含有していることが推察された。

カイカサポニン、大豆サポニンおよびグリチルリチンは CCL₄ 投与ラットに対する肝障害軽減効果が報告されている。すなわち、カイカサポニンでは、50 μ g/ml、100 μ g/ml の投与により AST と ALT 活性の低下が認められている。しかし、逆に 500 μ g/ml と高い投与量においては毒性が指摘されている³⁾。ジャンボリーキ鱗片 (生汁) での急性毒性 (LD₅₀) は、ラットへの腹腔内投与において 18.03 g/kg、経

口投与では 22.5 g/kg と、ニンニクと比較して約 3 倍の安全性が確認されているが¹⁶⁾、今後は単離したサポニンの安全性に加えてサポニンの作用機序を、より明確にすることが課題となる。また分離したサポニン以外の B 群ならびに A 群からも 4 本のピークが確認されており、今後の新規・既知サポニンの単離・同定と併せて、未利用の廃棄原料であるところの、ジャンボリーキ鱗片の洗浄時に多量に発生する「泡液」の有効利用が期待される。

要 約

ジャンボリーキ鱗片から得られた泡粉末と比較のために鱗片末およびクルクミンを用いて GalN により誘発される急性肝障害および EtOH によって惹起される慢性肝障害モデルラットに対する影響を調べた。また同時に、推定関与成分として生鱗片からサポニンの単離・同定を試みた。その結果、ジャンボリーキの泡粉末および鱗片末は、GalN、および EtOH のラットへの投与実験において急性肝障害時の機能低下を抑制すること、またアルコール吸収を抑制することにより慢性肝障害を予防することを明らかにした。そして、その関与成分として既知のステロイドサポニンである (25R)-spirost-5-ene-2 α ,3 β -diol-3-O- $\{$ O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside $\}$, (C₅₀H₈₀O₂₃, MW : 1048), カタラビオサイド A の存在を提示した。

本研究の一部は、平成 19 年度日本大学生物資源科学部

総合研究助成金大型研究プロジェクトにより行われた。

文 献

- 1) Ariga, T., Kumagai, H., Yoshikawa, M., Kawakami, H., Seki, T., Sakurai, H., Hasegawa, I., Etoh, T., Sumiyoshi, H., Tsuneyoshi, T., Sumi, S. and Iwai, K., Garlic-like but Odorless Plant *Allium ampeloprasum* 'Mushuu-ninniku', *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **71** (3), 362-369 (2002).
- 2) 内田あゆみ, 陶 慧, 萩原 淳, 松藤 寛, 太田恵教, 櫻井英敏, ジャンボリーキが病態モデルラットへの血糖値および肝臓機能におよぼす影響について, *食科工*, **55**, 549-558 (2008).
- 3) Miyao, H., Arao, T., Udayama, M., Kinjo, J. and Nohara, T., Kaikasaponin III and Soyasaponin I, Major Triterpenesaponins of *Abrus cantoniensis*, Act on GOT and GPT : Influence on Transaminase Elevation of Rat Liver Cells Concomitantly Exposed to CCl₄ for One Hour., *Planta Med.*, **64** (1), 5-7 (1998).
- 4) Reddy, A.C.P. and Lokesh, B.R., Effect of Curcumin and Eugenol on Iron-induced Hepatic toxicity in Rats, *Toxicology*, **107**, 39-45 (1996).
- 5) Mimaki, Y., Kuroda, M. and Sashida, Y., Steroidal Saponins from the Bulbs of *Allium ampeloprasum*. *Natural Medicines*, **53** (3), 134-137 (1999).
- 6) 内田あゆみ, 萩原 淳, 熊谷日登美, 赤尾 真, 松藤 寛, 櫻井英敏, 関口一郎, ジャンボリーキのスルフィド生成に関わる成分の検索と同定, *日食工*, **56**, 280-285 (2009).
- 7) 荒木 崇, 小宮佐和子, 山内真義, 肝障害に対するグリシンの有効性に関する検討, *慈恵医大誌*, **118**, 91-99 (2003).
- 8) 井上典夫, 遠藤清次, 安部力哉, エンドトキシン肝障害における Kupffers 細胞の関与の検討, *日消外会誌*, **25** (9), 2301-2307 (1992).
- 9) Tran, Q.L., Adnyana, I.K., Tezuka, Y., Saiki, I., Kurashige, Y., Tran, Q.K. and Kobata, S., Hepatoprotective Effect of Majonoside, the Major Saponin from Vietnamese Ginseng (*Panax vietnamensis*). *Planta. Med.*, **68**, 402-406 (2002).
- 10) Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Tanaka, T., Toyokuni, S., Uchida, K. and Osawa, T., Curcumin and Especially Tetrahydrocurcumin Ameliorate Oxidative Stress-induced Renal Injury in Mice, *J. Nutr.*, **131**, 2090-2095 (2001).
- 11) Tsukamoto, S., Kanegae, T., Nagoya, T., Shimamura, M., Kato, T., Watanabe, S. and Kawaguchi, M., Effect of Seed Saponins of *Thea sinensis* L. (Ryokucha Saponin) on Alcohol Absorption and Metabolism. *Alcohol and Alcoholism*, **28**, 687-692 (1993).
- 12) Yoshikawa, M., Shimada, H., Morikawa, T., Yoshizumi, S., Matsumura, N., Murakami, T., Matsuda, H., Hori, K. and Yamahara, J., Medicinal Foodstuffs. VII on the Saponin Constituents with Glucose and Alcohol Absorption-Inhibitory Activity from a Food Garnish 'Tonburi', the Fruit of Japanese *Kochia scoparia* (L.) Schrad, *Kochia scoparia* : Structures of Scoparioside A, B and C, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1300-1305 (1997).
- 13) Macias, F.A., Guerra, J.O., Simonet, A.M. and Nogueiras, C.M., Characterization of the Fraction Components using 1D TOCSY and 1D ROESY Experiments. Four New Spirosane Saponins from *Agave brittoniana* Trel. spp. *Brachypus*, *Magn. Reson. Chem.*, **45**, 615-620 (2007).
- 14) Mimaki, Y., Kuroda, M., Fukasawa, T. and Sashida, Y., Steroidal Saponin from the Bulbs of *Allium karataviense*, *Chem. Pharm. Bull.*, **47** (6), 738-743 (1999).
- 15) Fenwick, D.E. and Oakenfull, D., Saponin Content of Food Plants and Some Prepared Foods, *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 186-191 (1983).
- 16) 内田あゆみ, 天然ニンニク様植物の生体防御機構の活性化作用, *Food Style*, **21** (2), 45-48 (1998).

(平成 21 年 7 月 22 日受付, 平成 21 年 9 月 14 日受理)