

## 食用ダイオウが示す ヒアルロナン分解酵素阻害作用・SOD様作用

定森 耕平\*・藤木 成忠\*\*・播磨 章一\*\*\*・駒井 功一郎\*

(\*近畿大学大学院農学研究科応用生命化学専攻・\*\*株式会社ハリマ漢方製薬・\*\*\*近畿大学薬学総合研究所)

### yaluronidase inhibitory effect and SOD-like effect of rhubarb leafstalk

Kohei SADAMORI\*, Naritada FUJIKI\*\*, Syoichi HARIMA\*\*\*, Koichiro KOMAI\*

*\*Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kinki University,  
Nara 631-8505, Japan*

*\*\*Harima Kanpo Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka 532-0003, Japan*

*\*\*\*Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Osaka 577-8502, Japan*

#### Synopsis

This research examined hyaluronidase (HYAL) inhibitory effect and superoxide dismutase (SOD)-like effect observed to the rhubarb leafstalk.

Recently, natural products, more little side effects, have garnered much interest. Medicinal plants have valuable biological activities in human bodies, and the plants are exploited as functional foods, cosmetics and pharmaceutical agents. This study was performed with leafstalk of *Rheum undulatum* and *R. rhaponticum*.

The HYAL inhibition is involved in human skin aging and anti-inflammation, and SOD-like activity was evaluated for antioxidants in the human body.

There were HYAL inhibitory effect and SOD-like effect in 50%EtOH extract of the rhubarb leafstalk. This alcohol extract was fractionated, and finally we obtained 10 fractions. Anthraquinones such as emodin, aloe-emodin, chrysophanol, physcion, rhein and sennoside A, B were detected in these 10 fractions. Anthraquinones and 10 fractions were used for the HYAL inhibitory test and SOD-like test. As the result, it was suggested that rhein and sennoside A were closely related to the HYAL inhibitory effect. However, there were no anthraquinones which showed the strong for SOD-like effect.

## 緒言

ダイオウ属はタデ科の植物であり、この属に属する60種類以上の種を総じてダイオウ（ルバーブ、Rhubarb）と呼ぶ。その中でも薬用種の根茎は瀉下作用、抗炎症作用、抗酸化作用を示し<sup>1-5)</sup>、古くから薬用、食用として用いられている。ダイオウ属はアントラキノン類やsennoside A, B等といったアンスロン二量体を主要成分として含んでおり、このsennoside A, Bがダイオウの瀉下成分である<sup>1,2)</sup>。しかし、食用種は瀉下作用が弱く、薬用としては劣品とされており、生理作用について検討した研究報告も数が少ない。報告があるものも根茎としてであり、葉柄部の生理作用に着目した報告は近年においても無い<sup>1)</sup>。また、有効な生理作用を持つ根茎や食用として用いられる茎に比べ、葉柄部が利用される機会は少なく、未利用資源といえる。そこで本研究では、食用種であるカラダイオウ (*Rheum undulatum*) とマルバダイオウ (*R. rhaponticum*) の乾燥葉柄部を混合したもの (Fig. 1) を供試植物として、抗炎症作用及び抗酸化作用に着目し、ダイオウの主要成分であるアントラキノン類のこれらの作用への関与について検討し、未利用資源の有効利用についての知見を得ることを目的とした。

機能評価は、抗炎症作用をhyaluronidase (HYAL)



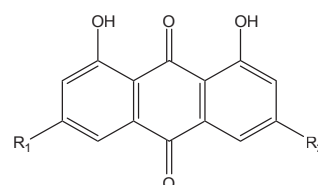
Fig. 1. Rhubarb plant and dried leafstalk.

阻害活性、抗酸化作用をsuperoxide dismutase (SOD) 様活性として試験を実施した。

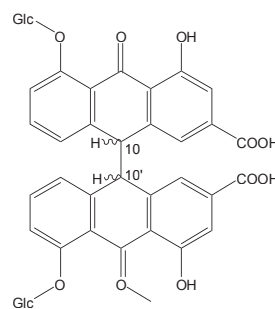
## 材料及び方法

### 1. 標準品

本研究では、ダイオウの主要成分である emodin、aloe-emodin、chrysophanol、physcion、rhein、



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Emodin	OH	CH <sub>3</sub>
Aloe-emodin	H	CH <sub>2</sub> OH
Chrysophanol	H	CH <sub>3</sub>
Physcion	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Rhein	H	COOH



	10-10'
Sennoside A	threo
Sennoside B	erythro

Fig. 2. Pharmacological activity components from Daio.

sennoside A、sennoside Bの標準品を供試化合物として用いた (Fig. 2)。

アントラキノン類は天然のキノン類の中で最も大きなグループであり、ポリケチド由来のエモジン型とシキミ酸を前駆物質とするアリザリン型に大別される。前述のアントラキノン類がエモジン型に属し、emodin、rheinには抗腫瘍作用<sup>6,7)</sup>及び抗菌作用<sup>8)</sup>、aloe-emodin、physcionには抗菌作用<sup>8)</sup>のみが報告されている。

アンスロン類はエモジン型アントラキノン類の前駆物質であり、アントラキノンからケトンを一つ除いた構造である。本研究で用いた sennoside A、sennoside Bは rheinanthroneの二量体である。ダイオウの瀉下成分である sennoside A、Bはプロドラッグとして機能しており、腸内細菌による代謝によって生じる rheinanthroneが活性本体である<sup>2)</sup>。

## 2. 食用ダイオウ葉柄部の抽出及び抽出物の分画

食用ダイオウ葉柄部 (200.0g) を50%エタノール (2.3 L) で3日間8℃にて抽出した。抽出液は桐山ロート用ろ紙を用いて吸引ろ過を行った。残渣は再度同量の50%エタノールを加え、同様の操作を行った。その後、2回の操作で得られた抽出液を合わせて減圧濃縮し、食用ダイオウ葉柄部50%エタノール抽出物 (61.2g, 収率30.6%) を得た。得られた抽出物 (57.0g) を用いて液液分配を行い、水画分 (48.8g)、酢酸エチル画分 (3.2g)、残渣画分 (1.6g) に分画した。更に、酢酸エチル画分 (3.0g) に対して、フラッシュカラムクロマトグラフィー (SNAP Cartridge KP-Sil 50g、[A]ヘキサン[B]酢酸エチル B conc. 10%-100%-100%、0分-16分-20分グラジエント→[C]クロロホルム[D]メタノール D conc. 20%-80%-80%、20分-36分-40分グラジエント) にて分画を行い、Fr. 1 (207.7mg : B conc. 10.0%-26.9%)、Fr. 2 (100.9mg : B conc. 26.9%-49.4%)、Fr. 3 (131.4mg : 49.4%-60.6%)、Fr. 4 (182.0mg : B conc. 60.6%-77.5%)、Fr. 5 (334.7mg : B conc. 77.5%-88.8%)、Fr. 6 (193.3 mg : B conc. 88.8%-97.2%)、Fr. 7 (275.4mg : B conc. 97.2%-100.0%)、Fr. 8 (883.6mg : D conc.

20.0%-50.0%)、Fr. 9 (219.5 : D conc. 50.0%-80.0%)、Fr. 10 (16.3mg : D conc. 80.0%) を得た。

## 3. HYAL 阻害活性試験<sup>9)</sup>

生体内で様々な分子量をとるヒアルロナン (ヒアルロン酸、HA) は、その分子量の差によって種々の生理機能を持つ。その機能の一つとして、高分子HAが血管新生抑制作用を示すことに対し、低分子HAは血管新生を促進し、炎症亢進作用を示すことが挙げられる<sup>10)</sup>。その為、HAを分解し、低分子化するHYALは炎症誘起剤といえ、炎症を抑える為にはHYALの働きを阻害することが重要になる。また、HAの重要な特性の一つに高い水合力と粘弾性を持ち、肌の保湿作用に大きく関わっていることが挙げられるが、この特性もHAが分解され低分子化されることで低下する。このことから、HYALの働きを阻害することで、肌の保湿作用を維持することにも繋がる。

本試験系では、Morgan-Elson法<sup>11,12)</sup>を応用した方法で行った。即ち、HAがHYAL (E.C. 3.2.1.35, SIGMA) によって分解されることで生成した *N*-acetylglucosamineが、発色試薬 *p*-dimethylaminobenzaldehyde (*p*-DAB, Wako) と反応することにより、紫色に呈色する。そこで、その吸収波長である585nmの吸光度を測定することにより、HYAL阻害活性を求めた。

Bufferには0.1M acetate buffer (pH 4.0) を用いた。HYALをbufferで終濃度400units/mLに調製し、HYAL solutionとした。また、HA sodium salt (ナカライテスク) をbufferにて終濃度0.4mg/mLに調製してHA solutionとし、compound 48/80 (SIGMA) をbufferにて終濃度0.1 mg/mLに調製し、comp. 48/80 solutionとした。Borate solutionはboric acid 4.95 gに蒸留水50 mLを加え、1N水酸化ナトリウムでpH 9.1に合わせた後、蒸留水を加えて100mLに調製し、*p*-DAB solutionは、*p*-DAB 10g、10N塩酸12.5mL、酢酸87.5mLを混合して調製し、使用直前に酢酸で10倍に希釈して用いた。

試料溶液200μLにHYAL solution 100μLを混合し、37℃で20分間インキュベートし、comp. 48/80

solutionを200 $\mu$ Lを加えた。更に20分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、HA solution 500 $\mu$ Lを加え、反応させた。40分間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、0.4N水酸化ナトリウムを200 $\mu$ L加え、氷上にて反応を停止させた。次にborate solutionを200 $\mu$ L加え、100 $^{\circ}$ Cで3分間反応させ氷上で反応停止した。反応溶液140 $\mu$ Lをp-DAB solution 600 $\mu$ Lに加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間反応させ、紫外・可視分光光度計で585nmにおける吸光度を測定した。試験時には、試料溶液を添加したもの (Sample・S)、試料溶液を添加しないもの (Control・C)、HYAL solution、comp. 48/80 solutionを添加しないもの (Sample-Blank・S-BL)、試料溶液とHYAL solution、comp. 48/80 solution共に添加しないもの (Control-Blank・C-BL) についても吸光度を測定し、C-BLを測定ブランクとした。尚、試料はbuffer (20%DMSO) で溶解し、試験に用いた。HYAL阻害活性値は式1に従い、controlを0%として算出した。試験は3回行い、その平均を1データとして表した。

HYAL阻害活性(%) =

$$[\{C - (S - S-BL)\} / C] \times 100 \text{ (式1)}$$

#### 4. SOD様活性試験<sup>13)</sup>

酸素から発生する活性酸素は適量であれば問題無いが、紫外線等様々な要因により過剰に発生すると、体内の細胞を無差別に酸化し、動脈硬化、腫瘍等、種々疾病の原因になる。その中でも、酸素から最初に発生し他の活性酸素の前駆体となるスーパーオキシドラジカルは特に重要である。スーパーオキシドラジカルは体内酵素SODによって消去されることから、そのSODと同様の働きをするSOD様活性物質は抗酸化作用を研究する上で重要視されている。

本研究では、株式会社同仁化学研究所のSOD Assay Kit-WSTを用いてSOD様活性を測定した。Xanthine及びxanthine oxidase (XOD) により発生したスーパーオキシドラジカルは発色試薬WST-1と反応し、高水溶性ホルマザンであるWST-1ホルマザンを生成し、黄色に発色する。そこで、そ

の極大吸収波長である450nmにて吸光度を測定することにより、SOD様活性値を求めた。

SOD Assay Kit-WST (株式会社同仁化学研究所) には以下の試薬が含まれる。

- WST solution (WST-1, Xanthine)
- Enzyme solution (XOD)
- Buffer solution
- Dilution buffer

WST solution 1mLとbuffer solution 19mLを混合し、WST working solutionとした。また、enzyme solution 15 $\mu$ Lをdilution buffer 2.5mLで希釈し、enzyme working solutionを調製した。

試料溶液20 $\mu$ LとWST working solution 200 $\mu$ Lを96穴マイクロプレートに添加し、プレートミキサーで1分間攪拌した。次に、enzyme working solution 20 $\mu$ Lを添加し、37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダーで450nmにおける吸光度を測定した。試験時には試料溶液を添加するもの (Sample・S)、試料溶液を添加しないもの (Control・C)、enzyme working solutionを添加しないもの (Sample-Blank・S-BL)、試料溶液、enzyme working solution共に添加しないもの (Control-Blank・C-BL) についても吸光度を測定した。尚、試料は蒸留水 (20%DMSO) で溶解し、試験に用いた。SOD様活性値は式2に従い、controlを0%として算出した。試験は3回行い、その平均を1データとして表した。

SOD様活性(%) =

$$[\{(C - C-BL) - (S - S-BL)\} / (C - C-BL)] \times 100 \text{ (式2)}$$

#### 5. 精製した10画分に含まれるアントラキノン類の定量

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、Fr. 1からFr. 10に含まれるアントラキノンの含有量を分析定量した。分析条件はカラム (Imtakt Unison UK-C18 4.6 $\times$ 150mm)、移動相 (A: 水、B: アセトニトリル、グラジエント0%-0%-100%-100%、0分-5分-65分-70分)、流速 (1mL/min)、カラム温度 (40 $^{\circ}$ C)、検出波長 (254

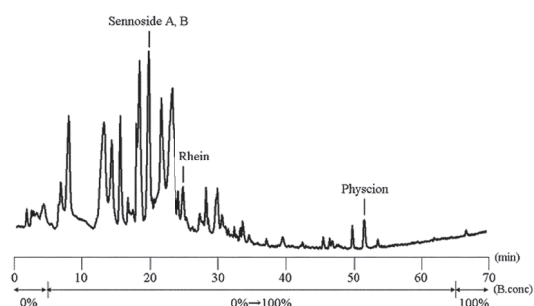


Fig. 3. HPLC pattern of Fr. 4 obtained from purification procedure of EtOAc soluble fraction.

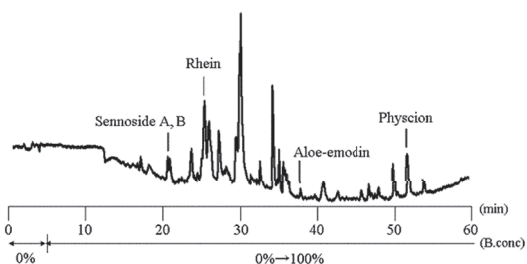


Fig. 4. HPLC pattern of Fr. 7 obtained from purification procedure of EtOAc soluble fraction.

nm)。

254nmにおけるピーク面積から各画分に対する成分の含有率 (w/w) を算出した (Fig. 3, 4)。

## 結果

### 1. 各画分のHYAL阻害作用及びSOD様作用

食用ダイオウ葉柄部50%エタノール抽出物

Table 1. HYAL inhibitory effects of 10 fractions obtained from rhubarb leafstalk

Sample	HYAL inhibitory activity (%)	
	5mg/mL	0.25mg/mL
50%EtOH extract	76.2	ND
Water fraction	29.8	ND
EtOAc fraction	99.2	47.4
Residue fraction	94.4	3.7
Fr. 1	ND	17.4
Fr. 2	ND	11.1
Fr. 3	ND	18.0
Fr. 4	ND	36.2
Fr. 5	ND	24.9
Fr. 6	ND	34.2
Fr. 7	ND	55.5
Fr. 8	ND	15.9
Fr. 9	ND	72.7
Fr. 10	ND	49.5

ND : No Data

Table 2. SOD-like effects of 10 fractions obtained from rhubarb leafstalk

Sample	SOD-like activity (%)	
	10µg/mL	
50%EtOH extract	36.8	
Water fraction	27.4	
EtOAc fraction	54.5	
Residue fraction	21.6	
Fr. 1	4.1	
Fr. 2	10.5	
Fr. 3	48.2	
Fr. 4	79.1	
Fr. 5	87.6	
Fr. 6	78.5	
Fr. 7	86.3	
Fr. 8	64.3	
Fr. 9	67.4	
Fr. 10	46.1	

はSOD様活性を示さなかったが、76.2%と高いHYAL阻害活性を示した。またFr. 1~Fr. 10に対しても同様に活性程度を評価したところ、活性成分が純化されたことで、Fr. 4、5、6及び7にSOD様活性が現れた (Table 1)。更にFr. 7及び9が高いHYAL阻害活性を示し、Fr. 4、6及び10にもHYAL阻害活性を見て取ることが出来た (Table 2)。

### 2. アントラキノン類のHYAL阻害作用及びSOD様作用

今回用いた7種のアントラキノン類はいずれもSOD様活性を示さなかったが、HYAL阻害作用においては、rheinで高い阻害活性を示し、senoside Aにも活性が確認された (Table 3)。

Table 3. HYAL inhibitory effects and SOD-like effects of authentic anthraquinones

Comp.	HYAL inhibitory activity (%)		
	1.25mM	30.0µM	12.5µM
Emodin	9.1	4.3	1.2
Aloe-emodin	23.2	0.1	0
Chrysophanol	11.7	0	0.5
Physcion	14.1	5.0	1.3
Rhein	74.4	7.7	3.5
Senoside A	44.6	1.4	1.6
Senoside B	16.8	1.9	0
(+)-Catechin*	54.9	ND	73.3

\* (+)-Catechin was used as a positive control  
ND: No Data

### 3. 精製した10画分中に含まれるアントラキノン含有量

HPLCにより存在が確認されたアントラキノンの含有量をTable 4に示した。

尚、sennoside A, Bは本分析条件下では同様の保持時間を示したので、それらの合計量で算出した。

Table 4. Anthraquinone contents in 10 fractions obtained from the 50%EtOH extract.

	Emo	Alo	Chr	Phy	Rhe	Sen A, B
Fr. 1	38.5	—	—	12.5	—	—
Fr. 2	77.1	—	—	4.9	—	—
Fr. 3	—	2.9	1.2	1.6	—	1.6
Fr. 4	—	—	—	1.3	1.5	10.5
Fr. 5	—	—	—	6.2	—	—
Fr. 6	—	—	—	9.1	—	4.2
Fr. 7	—	0.4	—	5.0	10.9	3.6
Fr. 8	—	—	—	1.5	3.4	—
Fr. 9	—	—	—	16.5	3.5	—
Fr. 10	—	—	—	19.5	—	—

(w/w, %)

Emo : Emodin Alo : Aloe-emodin  
Chr : Chrysophanol Phy : Physcion  
Rhe : Rhein Sen A, B : Sennoside A, B

### 考 察

本研究で用いた7種の化合物が、どれもSOD様活性を示さなかったことから、ダイオウ主要成分7種は食用ダイオウ葉柄部が示すSOD様作用には関与していないことが分かった。

HYAL阻害作用及び定量の結果に着目すると、活性を示した画分にはrhein及びsennoside Aを含む画分が多いことが確認出来る。Fr. 6にはsennoside A、Fr. 9にはrhein、Fr. 4, 7にはrheinとsennoside Aの両方が含まれている。これらを含みながらも活性が低い画分は含有量が少ないか、sennoside Aではなくsennoside Bが含有していると思われる。Rheinの含有率がFr. 8と同程度であるFr. 9が、Fr. 7よりも極端に高い活性を示したのは、Fr. 9に今回ターゲットにした化合物以外の活性成分が含まれている為と考えられる。更に、Fr. 4, 7, 8を比較すると、rheinを最も多く含むFr. 7が最も高いHYAL阻害活性を示している。また、その中でRheinの含有率が低いFr. 4の方がFr. 8よりも高い活性を示したが、これはFr. 4がsennoside Aを10画分の中で最も高い比率で含有

している為と思われる。

これらのことから、食用ダイオウ葉柄部が示すHYAL阻害作用にはrheinが関与しており、sennoside Aも関わっている可能性が考えられる。

また、関与の如何に拘らず、食用ダイオウ葉柄部は高いHYAL阻害作用を示しており、HYAL阻害活性物質としてrheinを含み、更なる活性成分の存在も示唆されたことから、化粧品原料としての高い効果が期待出来る。また、食用ダイオウ葉柄部が利用される機会が非常に少ないことから、未利用資源の利用という観点からも非常に有意な研究成果であると考えられる。

### 引用文献

- 1) 播磨 章一ら：薬用食品の開発 — 薬用・有用植物の機能性食品素材への応用 —、シーエムシー出版、215-225 (2007)
- 2) 高石 喜久ら：薬学生のための薬用植物学・生薬学テキスト、廣川書店、78-79、97-98、134-135 (2009)
- 3) T. YAMAGISHI *et al.*: New laxative constituents of rhubarb. Isolation and characterization of rheinosides A, B, C and D, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3132-3138 (1987)
- 4) M. K. MOON *et al.*: Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of rhubarb via a NO-cGMP pathway, *Life Sci.*, **78**, 1550-1557 (2006)
- 5) Y. CAI *et al.*: Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: Structure-radical scavenging activity relationships, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7884-7890 (2004)
- 6) N.-J. LEE *et al.*: Antimutagenicity and cytotoxicity of the constituents from the aerial parts of *Rumex acetosa*, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2158-2161 (2005)
- 7) R.H. CICHEWICZ *et al.*: Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies, *Life Sci.*, **74**, 1791-1799

- (2004)
- 8) Y.-M. KIM *et al.*: Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6096–6100 (2004)
  - 9) 前田 有美恵ら：抗炎症, 抗アレルギー剤及び漢方エキス製剤のhyaluronidase阻害作用、静岡県衛生環境センター報告、**30**, 41–45 (1987)
  - 10) K.S.GIRISH *et al.*: The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview, *Life Sci.*, **80**, 1921–1943 (2007)
  - 11) N. N. ARONSON *et al.*: Lysosomal hyaluronidase from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **242**, 437–440 (1967)
  - 12) J.L.REISSING *et al.*: A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars, *J. Biol. Chem.*, **217**, 959–966 (1955)
  - 13) 受田 浩之：酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の活性測定法, *Dojin News*, **96**, 1 (2000)