

3,7,3',4'-Tetramethoxyflavone のラット、モルモット およびヒト肝ミクロゾームによる代謝

太田 千穂¹⁾ 山本 健太¹⁾ 徳富 美沙紀¹⁾
加藤 善久²⁾ 古賀 信幸¹⁾

In vitro Metabolism of 3,7,3',4'-Tetramethoxyflavone by Rat, Guinea Pig and Human Liver Microsomes

Chiho Ohta¹⁾ Kenta Yamamoto¹⁾ Misaki Tokutomi¹⁾
Yoshihisa Kato²⁾ Nobuyuki Koga¹⁾
(2018年11月22日受理)

はじめに

植物成分のフラボン類は、フラボン骨格の3位、5～8位、3'位および4'位に水酸基あるいはメトキシ基が1～7個置換した化合物である。例えば、水酸基だけが置換したポリフェノール型フラボンの apigenin、luteolin、quercetin などは、野菜や果物に多く含まれ、従来から、抗酸化作用、抗炎症作用、抗がん作用などの生理活性を有することが知られている^{1,2)}。一方、すべてメトキシ基で置換されたポリメトキシ型フラボン (PMF) の nobiletin、tangeretin、5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (Luteolin tetramethyl ether, 以下 LTM と略す) などは、柑橘果皮あるいは黒ショウガ根茎に多く含まれており、抗炎症作用^{3,6)}、細胞増殖抑制作用^{7,8)}、抗アレルギー作用⁹⁾、脳機能改善作用^{10,11)} などを有することから、最近「フィトケミカル」として注目されている。また、diosmetin や natsudaidain などのように水酸基とメトキシ基が混在した混合型フラボンも知られている。これらの事実から、どのような型のフラボンが、上記のような生理作用の活性本態であるか、興味を持たれる。

PMF 類は、経口的に摂取されると、小腸から吸収され、肝臓で代謝酵素のチトクロム P450 (CYP) により、メトキシ基が酸化的に脱メチル化されたり、また、フラボン骨格の A 環あるいは B 環が水酸化されることが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。当研究室でも、柑橘果皮成分 nobiletin につき、ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べた結果、代謝物として一脱メチル化体が3種類 (7-, 6- および 4'-脱メチル化体) と、二脱メチル化体が2種類 (3',4'- および 6,7- 二脱メチル

化体) 生成されることを明らかにした¹⁵⁾。さらに、ヒト CYP 分子種を用いて検討したところ、A 環メトキシ基の脱メチル化には CYP3A 酵素が、一方、B 環メトキシ基の脱メチル化には CYP1A 酵素が主に関与することも明らかにした¹⁶⁾。最近では、黒ショウガ根茎成分の1つである LTM のラット肝 Ms による代謝を調べ、8種類の代謝物、すなわち、1種類の一水酸化体、2種類の一脱メチル化体、2種類の二脱メチル化体、2種類の一脱メチル化・一水酸化体、さらに1種類の三脱メチル化体の生成を報告した¹⁷⁾。また、これらの中には、A 環5位の脱メチル化を受けた代謝物が3種類あることから、A 環5位の脱メチル化反応も代謝経路の1つとして重要であることが示唆された。

そこで、本研究では、A 環5位に置換基のないフラボン類について、その代謝パターンを明らかにするため、メトキシ基の数が前述の LTM と同じである 3,7,3',4'-tetramethoxyflavone (Fisetin tetramethyl ether, 以下 FTM と略す) につきラット、モルモットおよびヒト肝 Ms による *in vitro* 代謝を調べた。また、代謝に関与する CYP 分子種を推定するために、phenobarbital (PB)、3-methylcholanthrene (MC) および dexamethasone (DEX) を前処理したラット肝 Ms でも同様に調べた。なお、FTM は、マメ科の *Pongamia pinnata* の樹皮から検出されている¹⁸⁾。

実験方法

1. 試薬およびヒト肝ミクロゾーム

Fisetin はフナコシより購入した。NADP および

glucose-6-phosphate (G-6-P) はオリエンタル酵母より、また、G-6-P 脱水素酵素 (G-6-PD) は和光純薬より購入した。PB (Na 塩)、MC および DEX は、和光純薬より、また、ウシ血清アルブミンは、Sigma-Aldrich 社より購入した。さらに、他の試薬および有機溶媒も和光純薬より購入した。ヒト肝 Ms は、白人種の150名分を混合したもので、BD Biosciences 社より購入した。

2. FTM の合成

FTM は、fisetin をメチル化して合成した。すなわち、fisetin 500 mg を、炭酸カリウム18.4 g、ジメチル硫酸 6.4 mL およびアセトン100 mL とともに、300 mL のナスコルに加え、還流冷却器を付けた後、40℃で25時間反応させた。質量分析計付高速液体クロマトグラフ (LC-MS) による分析結果、約5時間後には、すべてのfisetin がFTM に変換していた。得られたFTM は100% アセトニトリルで溶解して、Bond Elute (Si, 10 g, 60 mL, Agilent Technologies 製) に付した後、100%アセトニトリルで溶出した。この画分を、さらに分取用高速液体クロマトグラフ (HPLC) で精製した。その分析条件は、以下の通りである。分析機器、LC-10AT (島津製)；カラム、Inertsil ODS-HL (10 × 250 mm、5 μm 粒径、GL Sciences 製)；移動相、60%アセトニトリル-0.1%ギ酸；流速、5.0 mL/min；検出波長、340 nm。最終的に、FTM が450 mg 得られ、純度は99.5%であった。

3. 動物肝 Ms の調製

Wistar 系雄性ラット (体重約200 g) および Hartley 系雄性モルモット (体重約300 g) は、それぞれ12匹を九動より購入し、1群4匹として、未処理群、PB 前処理群、MC 前処理群およびDEX 前処理群の4群に分けた。PB は生理食塩水に溶解し80 mg/kg の用量を、MC はコーン油に溶解し20 mg/kg の用量を、DEX はコーン油に溶解し100 mg/kg の用量をそれぞれ1日1回、3日間腹腔内投与した。ラットおよびモルモットは最終投与日の翌日に屠殺し、直ちに肝臓を摘出後、常法により肝 Ms を調製した¹⁵⁾。なお、本研究は中村学園大学の実験動物委員会の承認を得た後、「中村学園大学における動物実験のための指針」に従い、行った。

4. 代謝物の分析

0.2 mM FTM、NADPH 生成系 (0.33 mM NADP、5 mM G-6-P、G-6-PD 1.0 unit)、6 mM MgCl₂ および肝 Ms (1 mg protein) を100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに合計1 mL として、37℃で20分間インキュベート後、冷メタノール 3 mL 添加により反応を停止した。

水中にて30分間放置した後、3,000 rpm で10分間遠心分離を行い、上清を HPLC および LC-MS に付した。代謝物の定量は、基質であるFTMの検量線を用いて行った。なお、HPLCの分析条件は次の通りである。分析機器、LC-10AT (島津製)；カラム、Mightysil RP-18 (250 × 4.6 mm i.d.、5 μm 粒径、Merck 製)；移動相、A液0.1%ギ酸、B液100%アセトニトリル、B液20-60% (10 min) - 60% (8 min) - 100% (5 min)；流速、1.0 mL/min；検出波長、340 nm。また、LC-MSの分析条件は次の通りである。分析機器、LCMS-8030 (島津製)；カラム、Shim-pack XR-ODS II (150 × 2.0 mm、2.2 μm 粒径、島津製)；カラム温度、40℃；移動相、A液0.1%ギ酸、B液100%アセトニトリル、B液20-60% (5 min) - 60% (4 min) - 100% (5 min)；流速、0.2 mL/min。

5. その他

ラット肝 Ms のタンパク定量は、Lowry¹⁹⁾の方法に従って行った。なお、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

実験結果

1. ラット肝 Ms による代謝

FTM をラット肝 Ms および NADPH 生成系とともに、37℃で20分間反応させた。また、代謝に参与する CYP 分子種を明らかにするため、ラット肝 Ms は3種類の CYP 誘導剤前処理ラットから調製したものをを用いた。Fig. 1に、生成されたFTM代謝物のHPLCクロマトグラムを示す。

FTM は保持時間17.20 min に検出された。代謝物と思われるピークは、未処理 Ms で4種類、PB 前処理 Ms で5種類、MC 前処理 Ms で6種類、さらにDEX 前処理 Ms では5種類検出された。これらの代謝物はいずれもFTMより早く溶出され、FTMから前方へと、M1 (保持時間15.15 min)、M2 (13.76 min)、M3 (13.27 min)、M4 (12.48 min)、M5 (12.04 min)、M6 (10.41 min) と命名した。

次に、各代謝物の生成活性をFTMの検量線を用いて計算した (Fig. 2)。未処理 Ms では代謝物 M1、M2、M3、M5が検出され、このうち、主代謝物はM1であり、2.33 nmol/min/mg protein であった。次に、M5、M2およびM3が続き、それぞれ0.25、0.09および0.03 nmol/min/mg protein であった。また、PB 前処理 Ms では、新たにM6の生成がみられた (0.03 nmol/min/mg protein)。主代謝物 M1は、未処理と同程度の生成活性であったが、M2は未処理の4.2倍、M3は10.7倍、

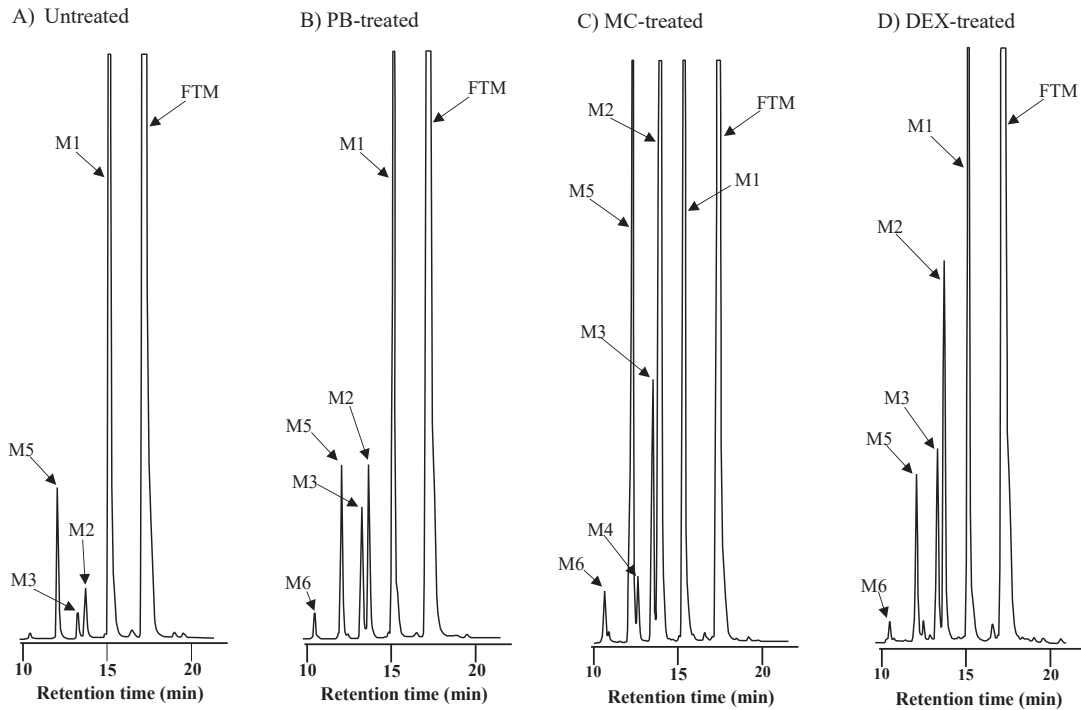


Fig. 1 HPLC chromatograms of FTM and its metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B), MC-treated (C) and DEX-treated (D) rats.

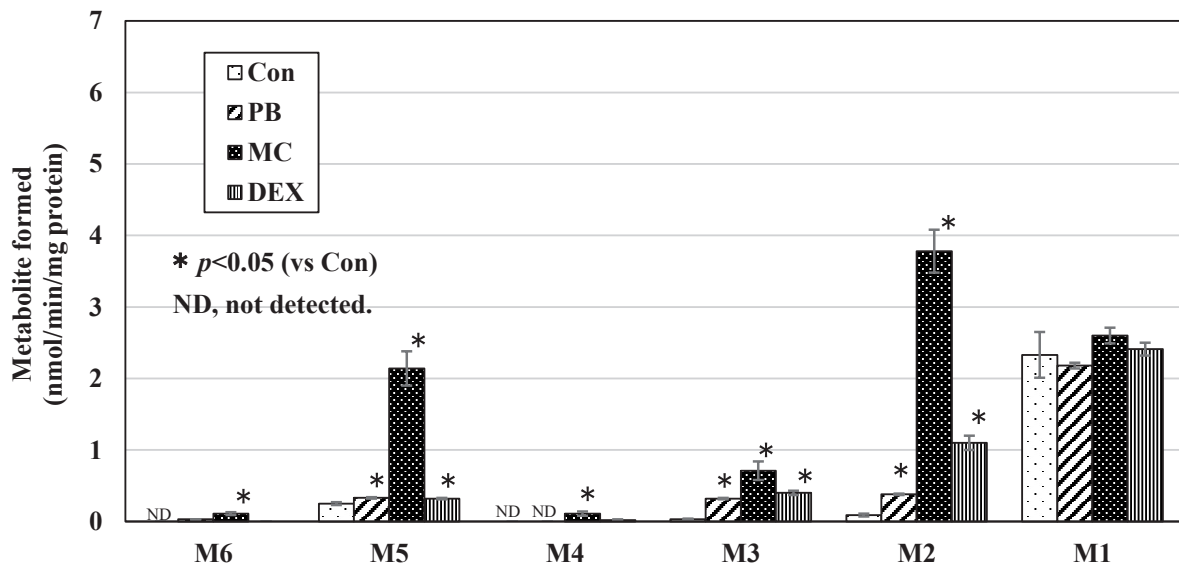


Fig. 2 Effect of CYP inducers on FTM metabolism by rat liver microsomes.

Con represents liver microsomes of untreated rats.

Each bar represents mean \pm S.D. of four rats.

*Significantly different from untreated rats, $p < 0.05$.

M5は1.3倍といずれも有意に増加した。一方、MC前処理Msでは、M2が最も多く、M1、M5、M3と続いた。また、それらの活性はM1のみが未処理と同程度であったのを除き、M2～M6のいずれも未処理と比べ顕著に増加した。特に、M2は未処理の42倍、M5は9倍、M3は24倍であった。また、新たに、M4が検出された

(0.11 nmol/min/mg protein)。さらに、DEX前処理Msでは、PB前処理Msの結果とよく類似していたが、M2の生成は、PB前処理Msの3倍であった。

2. モルモット肝 Ms による代謝

ラットと同様に、4種類の肝Msを用いて検討した。

Fig. 3に、FTM代謝物のHPLCクロマトグラムを示す。代謝物と思われるピークが新たに、M6a（保持時間10.73 min）とM7（保持時間9.11 min）が検出された。未処理Ms、PBおよびDEX前処理Msでは6種類、MC前処理Msでは7種類が生成された。次に、FTMの検量線から各代謝物の生成活性を算出した。Fig. 4に示すように、未処理Msでは、M2が主代謝物（3.35 nmol/min/mg protein）で、次いでM5、M4、M1の順であっ

た。PB前処理Msでは、M2が未処理の1.7倍、M4は12倍と著しく増加したが、M5とM1は未処理と同程度であった。なお、モルモット特有のM6aは、未処理の14倍に増加した。次にMC前処理Msでは、M2、M5、M4が多く生成されたが、M2は未処理と同程度、M5とM4はいずれも2.5倍の増加であった。しかし、M1は未処理の71%に有意に減少した。さらに、DEX前処理Msでは、未処理Msの結果とよく似ていたが、M2とM5

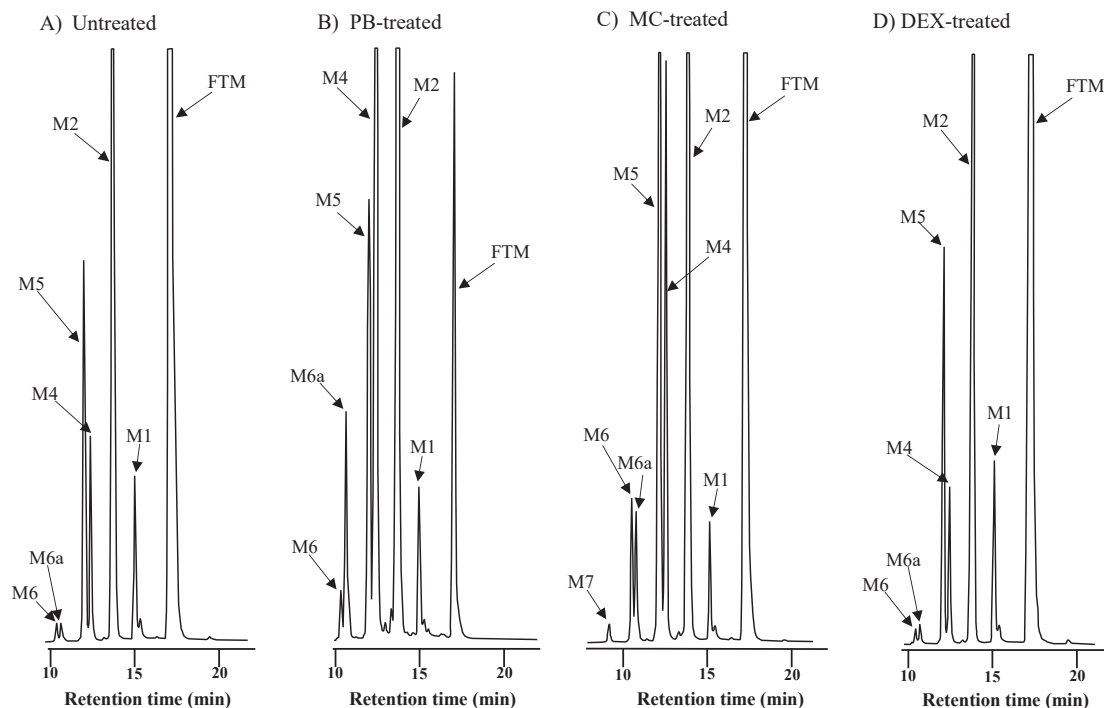


Fig. 3 HPLC chromatograms of FTM and its metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B), MC-treated (C) and DEX-treated (D) guinea pigs.

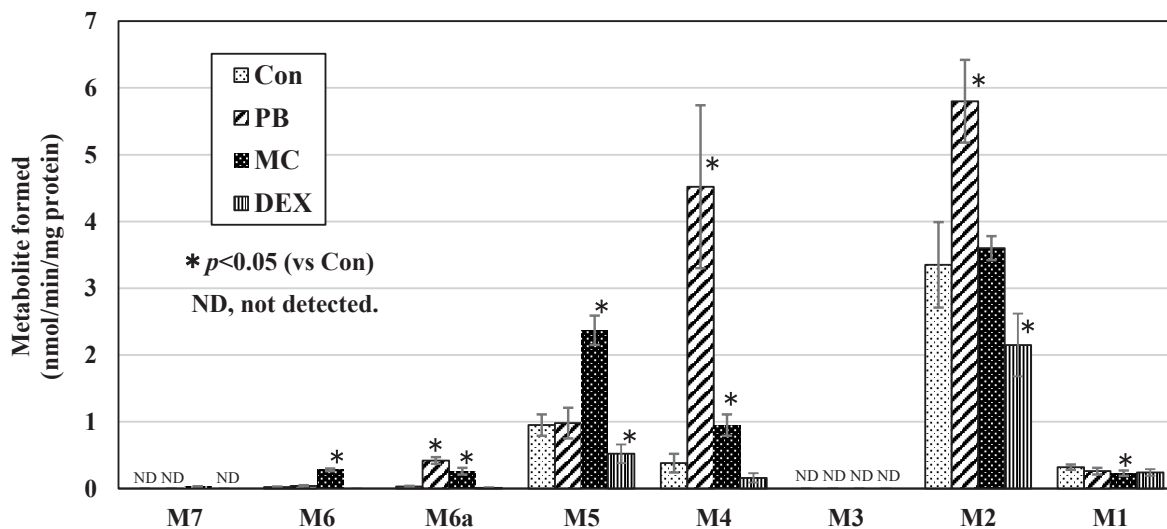


Fig. 4 Effect of CYP inducers on FTM metabolism by guinea pig liver microsomes.

Con represents liver microsomes of untreated guinea pigs.

Each bar represents mean \pm S.D. of four guinea pigs.

*Significantly different from untreated guinea pigs, $p < 0.05$.

で、いずれも未処理の64%と55%に減少した。なお、モルモットでは4種類の肝 Ms 全てにおいて、ラットで観察された M3 が全く検出されなかった。

3. ヒト肝 Ms による代謝

白人種150名のプールド Ms を用いて検討した。ヒト肝 Ms では、代謝物が5種類、すなわち M1~M5 が検出され、主代謝物は M1 と M2 であった (Fig. 5)。次に、FTM 検量線を用いて定量した結果、M1 および M2 の生成活性は、それぞれ0.15 および 0.20 nmol/min/mg protein であった (Fig. 6)。なお、M3、M4 および M5 は痕跡程度であった。

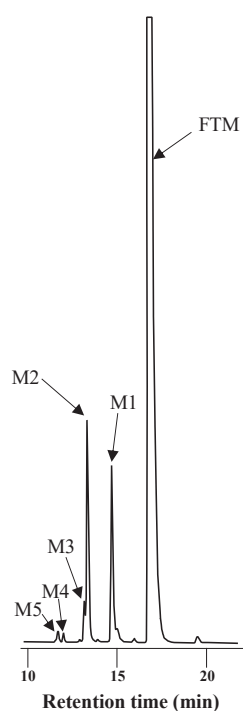


Fig. 5 HPLC chromatogram of FTM and its metabolites formed by human liver microsomes.

4. 代謝物の化学構造

FTM 代謝物の分子量を明らかにするため、代謝抽出液を LC-MS にて分析した。代謝抽出液としては、PB、MC および DEX 前処理ラット肝 Ms で代謝したものをを用いた。なお、モルモット特有の代謝物である M6a と M7 の場合、MC 前処理モルモット肝 Ms のものをを用いた。Table 1 にその結果を示す。

LC-MS の結果、M1 は m/z 329 $[M+H-14]^+$ であることから一脱メチル化体、M2 は m/z 359 $[M+H+16]^+$ であることから一水酸化体、以下同様に、M3 は二脱メチル化体 (m/z 315 $[M+H-28]^+$)、M4 と M5 は一脱メチル化・一水酸化体 (m/z 345 $[M+H+2]^+$)、さらに M6 は三脱メチル化体 (m/z 301 $[M+H-42]^+$) と推定された。また、FTM は、保持時間 9.52 min に、 m/z 343 $[M+H]^+$ として検出された。なお、モルモット特有の M6a と M7 は、今回特定できなかった。

Table 1 LC-MS data of FTM and its metabolites formed by rat and guinea pig liver microsomes

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (m/z)	Metabolic pattern
M7	4.93	N.D.	
M6	5.56	301 $[M+H-42]^+$	Tri-demethylation
M6a	5.74	N.D.	
M5	6.41	345 $[M+H+2]^+$	Hydroxylation and mono-demethylation
M4	6.65	345 $[M+H+2]^+$	Hydroxylation and mono-demethylation
M3	7.08	315 $[M+H-28]^+$	Di-demethylation
M2	7.35	359 $[M+H+16]^+$	Hydroxylation
M1	8.13	329 $[M+H-14]^+$	Mono-demethylation
FTM	9.52	343 $[M+H]^+$	

N.D., not detected.

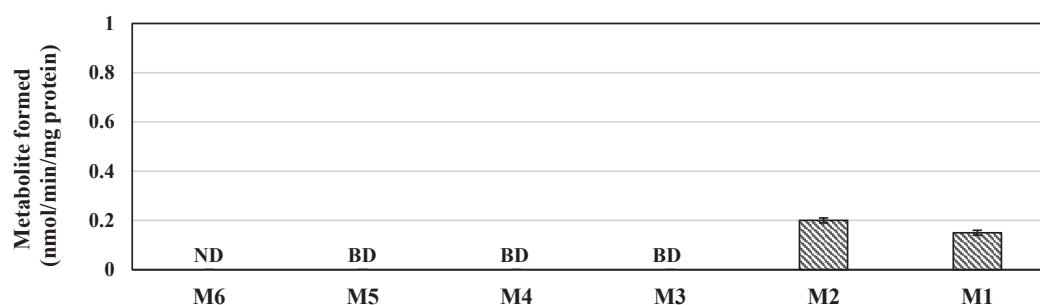


Fig. 6 Metabolism of FTM by human liver microsomes.

Each bar represents mean \pm S.D. of triplicate determinations. ND, not detected. BD, below detection limit.

考 察

今回、ラット、モルモットおよびヒト肝 Ms による FTM 代謝を調べ、比較した。ラットとモルモットでは FTM 代謝に及ぼす CYP 誘導体前処理の効果も調べた。その結果、ラット肝では代謝物として 6 種類 (M1~M6) が、またモルモット肝では新たな 2 種類を加えた 7 種類 (M1, M2, M4~M6, M6a, M7) が、さらにヒト肝では 5 種類 (M1~M5) が検出された。LC-MS の結果より、M1 は一脱メチル化体、M2 は一水酸化体、M3 は二脱メチル化体、M4 と M5 は一脱メチル化・一水酸化体、M6 は三脱メチル化体であることが明らかになった。なお、M6a と M7 は今回明らかにできなかった。

前述のラット肝 Ms による LTM 代謝では、11 種類の代謝物が生成されたが、そのうち、3 つの代謝物が基質より遅れて溶出された¹⁷⁾。最近、PMF 類の 5-水酸化体を、逆相系 HPLC で分析すると、5-メトキシ基をもつ化合物より、遅く溶出されることが報告されている^{20,21)}。しかしながら、本研究において FTM 代謝物はいずれも FTM より早く溶出された。このことから、FTM 代謝において 5-水酸化体は生成されていないと考えられる。

次に、M1 の脱メチル化の位置であるが、A 環 7 位あるいは B 環 4' 位が考えられる。当研究室ではこれまで 4' 位の脱メチル化が、MC 前処理により顕著に促進されること^{15,16)} を報告しているが、本研究において、M1 は MC 前処理の影響を全く受けなかった。さらに、M1 は

未処理ラットにおいて主代謝物であったことを考えると、M1 は 4'-脱メチル化体ではなく、A 環 7-脱メチル化体であることが示唆された。実際、Burapan らは、ヒト大腸菌を用いて PMF の脱メチル化反応を検討したところ、7 位 > 4' 位 \geq 3' 位 > 5 位 > 3 位の順に起こりやすいことを報告している²²⁾。

さらに、M2 (一水酸化体) の水酸化の位置であるが、M2 の HPLC における保持時間は基質 FTM より早かった。この事実から、M2 は 5-水酸化体ではなく、6-水酸化体であると推定された。また、ラットとモルモットでは M6 が生成されたことから、代謝反応が 3 段階で連続的に起こっていることが示唆された。Fig. 7 に、FTM の推定代謝経路を示した。

ラット、モルモットおよびヒト肝 Ms による FTM 代謝において、大きな種差が見られた。まず、M1 と M2 の生成量に大きな差があった。すなわち、M1 は未処理ラット肝 Ms で最も多い代謝物 (2 nmol/min/mg protein) であるが、未処理モルモットではラットの 10% 程度であった。一方、M2 は未処理モルモット肝 Ms で最も多い代謝物 (3.4 nmol/min/mg protein) であるが、未処理ラットではその 3% と著しく低かった。これらの結果から、ラットでは脱メチル化活性が強いこと、逆にモルモットでは水酸化活性が強いことが示唆された。また、一脱メチル化・一水酸化体の M4 および M5 をみると、M5 の生成量と CYP 誘導剤の効果が両動物で類似していたのに対し、M4 の生成量は両動物で大きく異なった。さらに全代謝物の総量を比べると、モルモット > ラット >> ヒトであった。一方、FTM 代

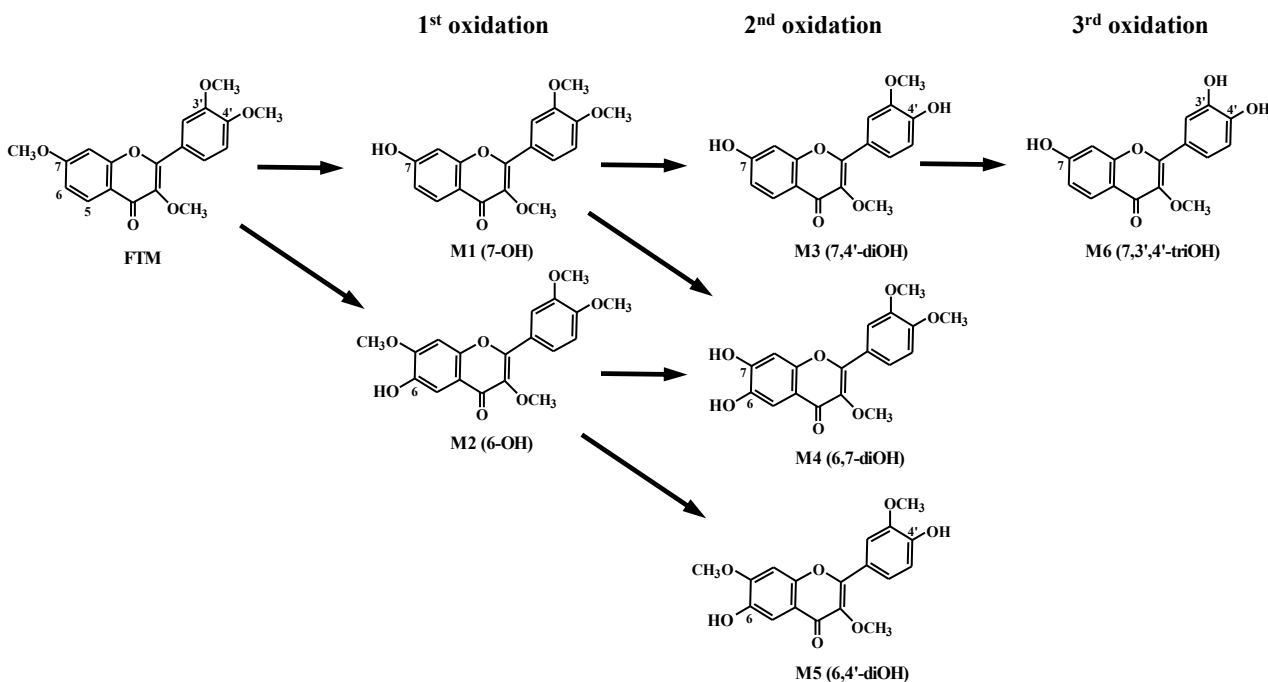


Fig. 7 Postulated metabolic pathways of FTM in rat, guinea pig and human liver.

謝に及ぼす CYP 誘導剤の影響を比べると、ラットでは MC 前処理により、未処理の3.5倍に促進されるのに対し、モルモットでは PB 前処理により、未処理の2.4倍に促進された。これらの事実は、代謝に関与する CYP 分子種が両動物間で大きく異なることを示唆している。これまでに、PMF 代謝では、MC 誘導性の CYP1A 酵素 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) と DEX 誘導性の CYP3A 酵素 (CYP3A1, CYP3A4) の関与が報告されている^{13,15,16)}。本研究のモルモットの場合、PB 誘導性の CYP2B 酵素、特に、CYP2B18²³⁾ の関与が大きいこと、また DEX 前処理により多くの代謝物が半減したことから、CYP3A 酵素の関与が逆に、かなり低いことが示唆された。

最近、PMF 類の代謝物、特に水酸基を 1～3 個有するものの中には、親化合物より強い生理活性を有するものが見つかっている。例えば、PMF 類の5-水酸化体が抗がん作用を有したり^{24,25)}、nobiletin の3',4'-二脱メチル化体が抗炎症作用を有したり²⁶⁾、さらに、代謝物としては未検出であるが nobiletin の5,6'-二脱メチル化体や5,6,4'-三脱メチル化体が抗アレルギー作用を有することが報告されている²⁷⁾。本研究では、今回代謝物として、M4 (一水酸化・一脱メチル化体) や M6 (三脱メチル化体) の生成を確認しており、PMF 代謝物が生理活性に大きく関与する可能性が期待される。

総括

1. ラット、モルモットおよびヒト肝ミクロゾームによる3,7,3',4'-Tetramethoxyflavone (FTM) の代謝を調べた。
 2. 未処理ラットでは4種類の代謝物が検出され、M1 (一脱メチル化体) が主代謝物であった。また、未処理モルモットでも4種類の代謝物が検出されたが、M2 (一水酸化体) が主代謝物であった。一方、ヒトでは M1 と M2 が主代謝物で同程度であった。なお、代謝物総量は、モルモット > ラット >> ヒトの順であった。
 3. CYP 誘導剤前処理の効果を調べたところ、ラットでは MC 前処理で、M2、M5 (一脱メチル化・一水酸化体)、M3 (二脱メチル化体) が顕著に増加した。一方、モルモットでは PB 前処理の方がより効果的であり、M2、M4 (一脱メチル化・一水酸化体)、M6a が増加した。
- 以上の結果から、FTM の代謝は、ラット、モルモットおよびヒト肝において、脱メチル化反応と水酸化反応で進行したが、代謝パターンに大きな種差が見られた。

謝辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費補助金 (食の安全確保推進研究事業、H30-食品-指定-005 古賀信幸) の助成を受けたものである。ここに記して謝意を表します。また、FTM 代謝物の分析にご協力いただいた平石彩さんに感謝します。

文献

- 1) Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* **96**(2-3): 67-202.
- 2) 十一元晴. 2005. キンキツ類の化学成分とがん予防物質に関する研究. *薬学雑誌* **125**(3): 231-254.
- 3) Lin N, Sato T, Takayama Y, Mimaki Y, Sashida Y, Yano M, Ito A. 2003. Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, on human synovial fibroblasts and mouse macrophages. *Biochemical Pharmacology* **65**(12): 2065-2071.
- 4) Tanaka S, Sato T, Akimoto N, Yano M, Ito A. 2004. Prevention of UVB-induced photoinflammation and photoaging by a polymethoxy flavonoid, nobiletin, in human keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical Pharmacology* **68**(3): 433-439.
- 5) Sae-wong C, Tansakul P, Tewtrakul S. 2009. Anti-inflammatory mechanism of *Kaempferia parviflora* in murine macrophage cells (RAW 264.7) and in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* **124**(3): 576-580.
- 6) Horigome S, Yoshida I, Tsuda A, Harada T, Yamaguchi A, Yamazaki K, Inohana S, Isagawa S, Kibune N, Satoyama T, Katsuda S, Suzuki S, Watai M, Hirose N, Mitsue T, Shirakawa H, Komai M. 2014. Identification and evaluation of anti-inflammatory compounds from *Kaempferia parviflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **78**(5): 851-860.
- 7) Yoshimizu N, Otani Y, Saikawa Y, Kubota T, Yoshida M, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Fujii M, Yano M, Sato T, Ito A, Kitajima M. 2004. Anti-tumour effects of nobiletin, a citrus flavonoid, on gastric cancer include: antiproliferative effects, induction of apoptosis and cell cycle deregulation. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **20** (Suppl. 1): 95-101.
- 8) Yenjai C, Prasanphen K, Daodee S, Wongpanich V, Kittakoop P. 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia* **75**(1): 89-92.
- 9) Tewtrakul S, Subhadhirasakul S, Kummee S. 2008. Anti-

- allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology* **116**(1): 191-193.
- 10) Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. 2008. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **326**(3): 739-744.
- 11) 大泉 康. 2015. 認知症の予防・治療技術開発の新しい戦略—天然物を用いたアプローチ—. *薬学雑誌* **135**(3): 449-464.
- 12) Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO. 1998. In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* **28**(4): 389-401.
- 13) Breinholt VM, Offord EA, Brouwe C, Nielsen SE, Brøsen K, Friedberg T. 2002. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food and Chemical Toxicology* **40**(5): 609-616.
- 14) Xiao J, Högger P. 2013. Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes. *Current Drug Metabolism* **14**(4): 381-391.
- 15) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M, Ohta H. 2007. Comparative study on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, guinea pigs and hamsters and rat cytochrome P450. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **30**(12): 2317-2323.
- 16) Koga N, Ohta C, Kato Y, Haraguchi K, Endo T, Ogawa K, Ohta H, Yano M. 2011. In vitro metabolism of nobiletin, a polymethoxy-flavonoid, by human liver microsomes and cytochrome P450. *Xenobiotica* **41**(11): 927-933.
- 17) 太田千穂、緒方 瞳、山本健太、原口浩一、加藤善久、遠藤哲也、古賀信幸. 2016. 黒ショウガ成分 5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone のラット肝ミクロゾームによる代謝. *中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要* **48**: 155-161.
- 18) Yin H, Zhang S, Wu J. 2004. Study on flavonoids from stem bark of *Pongamia pinnata*. *Zhong Yao Cai* **27**(7): 493-495.
- 19) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**(1): 265-275.
- 20) Zheng J, Fang X, Cao Y, Xiao H, He L. 2013. Monitoring the chemical production of citrus-derived bioactive 5-demethylnobiletin using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**(34): 8079-8083.
- 21) Mekjaruskul C, Jay M, Sripanidkulchai B. 2012. Pharmacokinetics, bioavailability, tissue distribution, excretion, and metabolite identification of methoxyflavones in *Kaempferia parviflora* extract in rats. *Drug Metabolism and Disposition* **40**(12): 2342-2353.
- 22) Burapan S, Kim M, Ham J. 2017. Demethylation of polymethoxyflavones by human gut bacterium, *Blautia* sp. MRG-PMF1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**(8): 1620-1629.
- 23) Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H. 1998. Guinea pig liver cytochrome P450 responsible for 3-hydroxylation of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **60**: 898-903.
- 24) Li S, Pan MH, Lai CS, Lo CY, Dushenkov S, Ho CT. 2007. Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **15**(10): 3381-3389.
- 25) Qiu P, Dong P, Guan H, Li S, Ho CT, Pan MH, McClements DJ, Xiao H. 2010. Inhibitory effects of 5-hydroxy polymethoxyflavones on colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research* **54**(Suppl. 2): S244-252.
- 26) Lai CS, Li S, Chai CY, Lo CY, Dushenkov S, Ho CT, Pan MH, Wang YJ. 2008. Anti-inflammatory and antitumor promotional effects of a novel urinary metabolite, 3',4'-didemethylnobiletin, derived from nobiletin. *Carcinogenesis* **29**(12): 2415-2424.
- 27) Sato A, Tamura H. 2015. High antiallergic activity of 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-trimethoxyflavone and 5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone from eau de cologne mint (*Mentha × piperita citrata*). *Fitoterapia* **102**: 74-83.