

柑橘果皮成分3,5,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone の ラット肝ミクロゾームによる代謝

山本 健太 太田 千穂 徳富 美沙紀 古賀 信幸

In vitro Metabolism of 3,5,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone by Rat Liver Microsomes

Kenta Yamamoto Chiho Ohta Misaki Tokutomi Nobuyuki Koga

(2018年11月22日受理)

はじめに

フラボノイド類は果物、野菜および穀物に広く分布しており、A環、C環およびB環から構成されるC₆-C₃-C₆構造を有する化合物である。その中にはフラボン骨格に、多くの水酸基が置換されたポリフェノール型 (apigenin, kaempferol, quercetin など) と多くのメトキシ基が置換されたポリメトキシ型 (nobiletin, tangeretin など) があるが、メトキシ基と水酸基の両方が置換されたものも存在する。ポリフェノール型フラボンは、抗酸化作用¹⁾、抗炎症作用^{2,3)}、抗がん作用⁴⁻⁶⁾ など多くの生理作用を有することが明らかとなっている。一方、ポリメトキシ型フラボン (PMF) はポリフェノール型フラボンよりも生体内利用率が高い⁷⁾、機能性成分として注目を集めている。例えば、沖縄の特産柑橘であるシークワシャー果皮に豊富に含まれる nobiletin は、抗がん作用^{2,6)}、胃がんに対する抗転移作用⁸⁾、劇症肝炎の抑制⁹⁾、記憶改善作用¹⁰⁾ が報告されており、有名な機能性成分の一つとなっている。

Gossypetin (3,5,7,8,3',4'-hexahydroxyflavone) は、ハイビスカスティーの原料になるローゼル (*Hibiscus sabdariffa* L.) に含まれており¹¹⁾、抗酸化作用^{12,13)}、ヒト免疫不全症ウイルス1型 (HIV-1) の逆転写酵素の抑制¹⁴⁾、パーキンソン病の原因タンパクである α -シヌクレインの線維化の抑制¹⁵⁾ などが報告されている。一方、gossypetin の水酸基がすべてメトキシ基に置換された化合物の gossypetin hexamethyl ether (3,5,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone, 以下 GHM と略す, Fig. 1) は、柑橘果皮に含まれている¹⁶⁾。この GHM の生理機能に関する研究はまだ少なく、Epstein-Barr ウイルス早期抗原の活性化を抑制することが報告されている¹⁷⁾ のみである。

PMF 類の代謝に関しては、1998年 Nielsen らは柑橘果皮成分である tangeretin のラット肝ミクロゾーム (Ms) による代謝を調べ、水酸化反応と酸化的脱メチル化反応が起こることを明らかにした¹⁸⁾。Breinholt らは、tangeretin のヒト肝 Ms での代謝を調べ、ヒト肝でも同様に酸化的脱メチル化反応が起こることを明らかにした¹⁹⁾。これまで当研究室でも、柑橘果皮成分である nobiletin の代謝を動物肝 Ms、ヒト肝 Ms およびヒトチトクロム P450 (CYP) 分子種で行い、3種類の一脱メチル化体 (4'-, 7- および 6-OH 体) と2種類の二脱メチル化体 (3',4'- および 6,7-diOH 体) が代謝物として生成されること、また、CYP 分子種のうち、CYP3A 酵素が A 環のメトキシ基の脱メチル化に、CYP1A1, CYP1A2 および CYP1B1 が B 環のメトキシ基の脱メチル化に関与することを明らかにした^{20,21)}。さらに、黒ショウガ成分の 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (tetraMF) のラット肝 Ms による代謝をみたところ、代謝物として5位、7位および4'位の脱メチル化体と6位の水酸化体が生成されることを報告した²²⁾。

近年、代謝物にも生理活性のあることが報告されている²³⁾ ことから、代謝パターンを解明することは重要

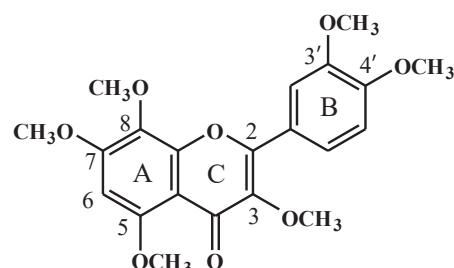


Fig. 1 Chemical structure of gossypetin hexamethyl ether (GHM, 3,5,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone).

であると考えられる。そこで、本研究ではGHMのラット肝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、CYP誘導剤の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。

実験方法

1. 試薬

Gossypetinはフナコシ(株)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(株)より購入した。また、G-6-P脱水素酵素(G-6-PD), PB (Na塩), MCおよびDEXは和光純薬(株)より購入した。その他の試薬は、和光純薬(株)の特級または高速液体クロマトグラフ(HPLC)用を使用した。

2. GHMの合成

GHMの合成はgossypetin 48 mgをアセトン20 mL, 炭酸カリウム3.68 gおよびジメチル硫酸1.28 mLとともに、40℃で300 min反応させて合成した。メチル化の状況を確認するため、一定時間ごとに反応液50 μ Lを採取した。次に、アセトンを飛ばし、水を加えた後、生成物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層は濃縮乾固し、アセトニトリルに溶解後、HPLCおよび質量分析計付HPLC(LC-MS)に付した。HPLCの分析条件は次の通りである。分析機器、LC-20AB(島津製作所製);カラム, Mightysil RP-18 (250 \times 4.6 mm i.d., 5 μ m 粒径);移動相, A液0.1%ギ酸, B液100%アセトニトリル, B液濃度20% - 60% (10 min) - 60% (8 min) - 100% (7 min) - 20% (5 min);流速, 1.0 mL/min;検出波長, 340 nm。LC-MSの分析条件は次の通りである。分析機器, LCMS-8030(島津製作所製);カラム, Shim-pack XR-ODS II (150 \times 2.0 mm i.d., 2.2 μ m 粒径);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液濃度20% - 60% (5 min) - 60% (4 min) - 100% (4 min) - 20% (7 min);流速, 0.2 mL/min。メチル化反応終了後、アセトンを飛ばし、水を加えた後、分液ロートを用いて生成物を酢酸エチルで抽出した。次に、酢酸エチル層を濃縮し、Bond Elut SIカラム(Si 10 g, 30 \times 50 mm, Agilent製)にかけ、酢酸エチルで溶出した後、HPLCで精製を行った。分取用HPLCの条件は、次の通りである。分析機器, LC-10ADvp(島津製作所製);カラム, Mightysil RP-18 GP (250 \times 20 mm i.d., 5 μ m 粒径);移動相, 60% アセトニトリル - 0.1%ギ酸;流速, 4.0 mL/min;検出波長, 340 nm。

3. ラット肝マイクロゾームの調製

Wistar系の雄性ラット(体重約200 g, 実験開始時6週齢)は、九動(株)より購入した。ラットは、1群4匹ずつ、未処理群, PB前処理群, MC前処理群, 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/dayの用量で、MCはコーン油に溶解し20 mg/kg/dayの用量で、DEXはコーン油に溶解し100 mg/kg/dayの用量で、それぞれ3日間連続腹腔内投与した。ラットは最終投与日の翌日屠殺し、直ちに肝臓を摘出後、常法²⁰⁾により肝Msを調製した。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(含む短期大学部)動物実験に関する規程」に従って行った。

4. 代謝物の分析

ラット肝MsによるGHMの代謝は既報²⁰⁾に準じて行った。すなわち、dimethylsulfoxideに溶解した0.2 mM GHMをNADPH生成系(0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1.0 unit), 6 mM MgCl₂, ラット肝Ms (1 mg protein) および100 mM HEPES緩衝液(pH 7.4)とともに合計1 mLとし、37℃で20 minインキュベートした。その後、冷メタノール3 mLで反応停止し、遠心分離(3000 rpm, 15 min)後、上清をHPLCおよびLC-MSに付した。分析条件は、前述の2.と同様である。代謝物の定量は、GHMの検量線を用いて行った。

5. その他

ラット肝Msのタンパク量は、Lowryらの方法に従い定量した²⁴⁾。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。統計処理は、Student's t-testにより危険率5%以下($p < 0.05$)で有意差ありと判断した。

結 果

1. GHMの合成

GHMは、gossypetinをアセトンに溶解し、炭酸カリウムおよびジメチル硫酸とともに40℃で300 min反応させて合成した。Fig. 2には、メチル化の経時変化を示す。LC-MSの結果、gossypetinは保持時間5.51 minに検出され、分子量は m/z 319 [M+H]⁺であった。時間経過とともに、 m/z 333 [M+H+14]⁺, 347 [M+H+28]⁺, 361 [M+H+42]⁺, 375 [M+H+56]⁺, 389 [M+H+70]⁺ および403 [M+H+84]⁺のピークが検出され、最終的に270 minでほとんどがGHM(m/z 403)に変化し、その保持時間は7.94 minであった。合成されたGHMは、HPLCにより分離精製し、さらにアセトニトリルで再結晶した。その結果、純度99.9%の黄色針状結晶(HPLC

による) が得られた。その収量は36.3 mgで、収率は60.2%であった。

2. ラット肝 Ms による代謝

GHMをラット肝 Ms および NADPH 生成系とともに、37℃で好氣的に20 min 反応させた。Fig. 3に生成されたGHM代謝物のHPLCクロマトグラムを示す。

GHMは保持時間14.56 minに検出されたが、その代

謝物と思われるピークが、未処理 Ms で5種類、PB前処理 Ms で7種類、MC前処理 Ms で9種類およびDEX前処理 Ms で8種類検出された。基質のGHMよりも早く溶出された6種類のピークをGHMに近い順から、それぞれM1(保持時間14.15 min), M2(13.79 min), M3(12.78 min), M4(12.50 min), M5(11.22 min) およびM6(10.87 min)とした。一方、遅く溶出されたピークをBM1(15.79 min), BM2(16.08 min)お

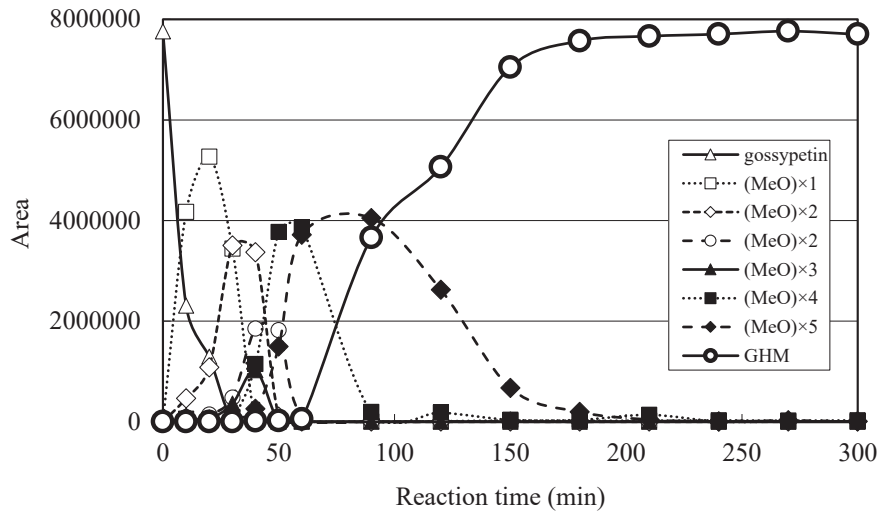


Fig. 2 Time course of methylation of gossypetin by dimethyl sulfate.

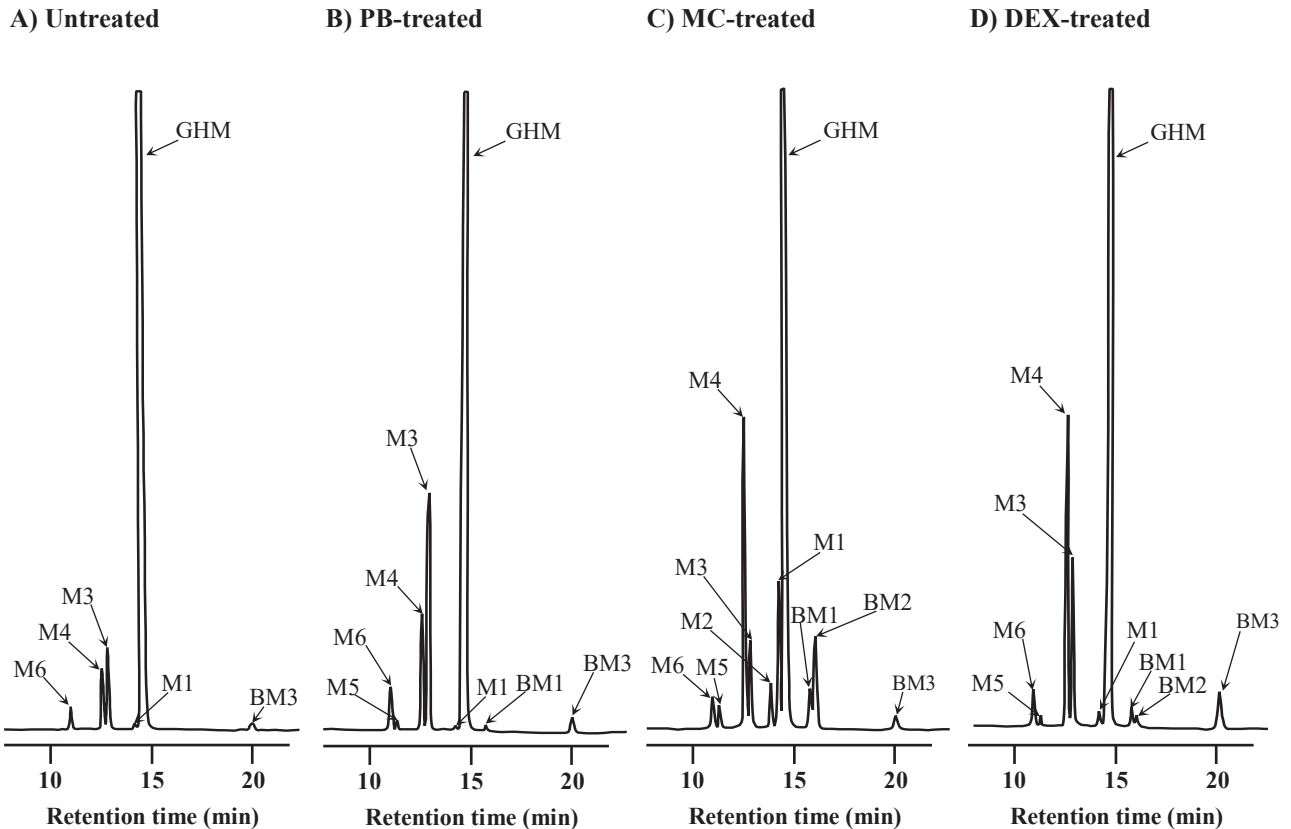


Fig. 3 HPLC chromatograms of GHM and its metabolites formed by liver microsomes of untreated (A), PB-treated (B), MC-treated (C) and DEX-treated (D) rats.

よび BM3 (20.17 min) とした。

各代謝物の定量は GHM の検量線を用いて行った。その結果を Fig. 4 に示す。未処理 Ms では、M3 が主代謝物であり、その生成活性は 0.14 nmol/min/mg protein であった。次いで、M4, M6, BM3 および M1 が、それぞれ 0.08, 0.04, 0.01 および 0.01 nmol/min/mg protein であった。また、PB 前処理 Ms では、未処理 Ms と同様に M3 が最も多く生成され、未処理 Ms の 2.6 倍であった (0.35 nmol/min/mg protein)。さらに、M1, M4, M6 および BM3 も未処理 Ms のそれぞれ、1.5 倍、2.1 倍、2.1 倍および 4.5 倍に増加した。なお、新たに M5 および BM1 が生成され、その生成活性はそれぞれ、0.02 および 0.01 nmol/min/mg protein であった。一方、MC 前処理 Ms では、M4 が最も多く、未処理 Ms の 5.7 倍に増加した (0.45 nmol/min/mg protein)。また、新たに BM2 および M2 が検出され、それぞれ 0.16 および 0.08 nmol/min/mg protein であった。なお、M4 以外では M1, BM3 および M6 が未処理 Ms のそれぞれ 18.4 倍、4.0 倍および 1.7 倍と顕著に増加した。さらに、DEX 前処理 Ms では、M4 が最も多く、未処理 Ms の 6.0 倍に増加した (0.48 nmol/min/mg protein)。また、M3 が未処理 Ms の 1.8 倍、BM3 が 10.3 倍、M1 が 2.4 倍にそれぞれ増加した。

3. 代謝物の化学構造

GHM 代謝物の化学構造を明らかにするため、GHM 代謝反応液を LC-MS/MS にて分析した。その結果を Table 1 に示す。GHM は、 m/z 403 [M+H]⁺ として検出されたが、M4, M3 および BM3 は m/z 389 [M+H-14]⁺ である

ことから一脱メチル化体、M6, M5, BM1 および BM2 は m/z 375 [M+H-28]⁺ であることから二脱メチル化体、M2 は m/z 361 [M+H-42]⁺ であることから三脱メチル化体であることが明らかとなった。また、M1 は m/z 405 [M+H+2]⁺ であることから一脱メチル化・一水酸化体であった。

次に、上記の反応が起こった位置の情報を得るために LC-MS/MS によるプロダクトイオンキャンを行った。Ma らは、フラボノイド類を LC-MS/MS で分析すると、逆ディールス・アルダー開裂により A 環由来と B 環由来のフラグメントイオンが検出されることを報告した²⁵⁾。Fig. 5 および Table 1 に GHM および代謝物の結果を示す。GHM からは比較的強いフラグメントイオン m/z 165 が検出された。代謝物 M4, M1, BM1 および BM3 のいずれからもフラグメントイオン m/z 165 が検出されたことから、B 環に全く変化がないことが示された。次に、M6, M3, M2 および BM2 では、フラグメントイオン m/z 151 が検出されたことから、B 環の一脱メチル化が示唆された。また、M5 からはフラグメントイオン m/z 137 が検出されたことから、M5 は B 環の二脱メチル化体であることが示された。

考 察

今回、CYP 誘導剤前処理ラット肝 Ms による GHM の代謝を調べた。LC-MS/MS の結果から推定した GHM の代謝経路を Fig. 6 に示す。GHM はラット肝 Ms により 3 種類の一脱メチル化体 (M4, M3, BM3)、4 種類の二脱メチル化体 (M6, M5, BM1, BM2)、1 種類の三

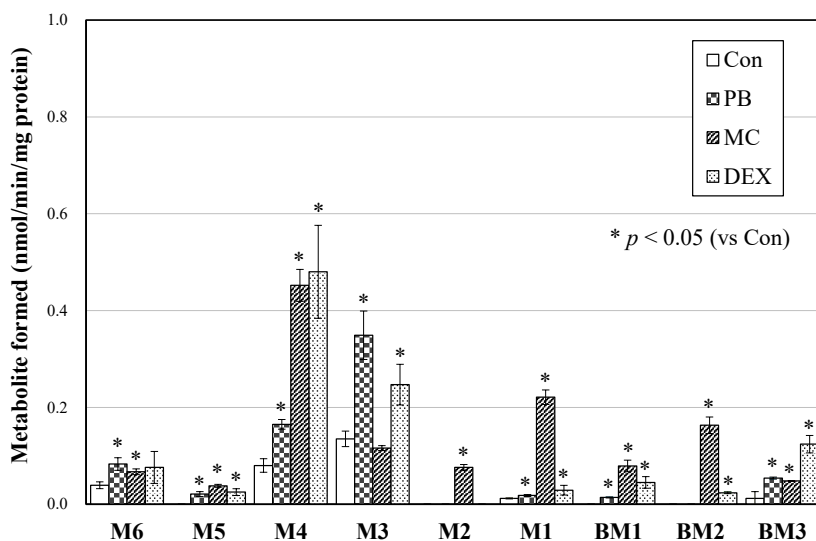


Fig. 4 Effect of CYP inducers on GHM metabolism by rat liver microsomes. Con represents liver microsomes of untreated rats. Each bar represents mean \pm S.D. of four rats. *Significantly different from rats, $p < 0.05$.

Table 1 LC-MS/MS data of GHM and its metabolites formed by rat liver microsomes

Compound	Retention time (min)	Molecular weight (<i>m/z</i>)	Metabolic pattern	B-ring fragment ion (<i>m/z</i>)			Postulated structure
				165	151	137	
M6	5.97	375 [M+H-28] ⁺	Di-demethylation		○		7,4'-diOH
M5	6.07	375 [M+H-28] ⁺	Di-demethylation			○	3',4'-diOH
M4	6.84	389 [M+H-14] ⁺	Mono-demethylation	○			7-OH
M3	7.04	389 [M+H-14] ⁺	Mono-demethylation		○		4'-OH
M2	7.68	361 [M+H-42] ⁺	Tri-demethylation		○		5,7,4'-triOH
M1	8.03	405 [M+H+2] ⁺	Hydroxylation and mono-demethylation	○			5,6-diOH
GHM	8.04	403 [M+H] ⁺		○			
BM1	8.82	375 [M+H-28] ⁺	Di-demethylation	○			5,7-diOH
BM2	9.41	375 [M+H-28] ⁺	Di-demethylation		○		5,4'-diOH
BM3	11.76	389 [M+H-14] ⁺	Mono-demethylation	○			5-OH

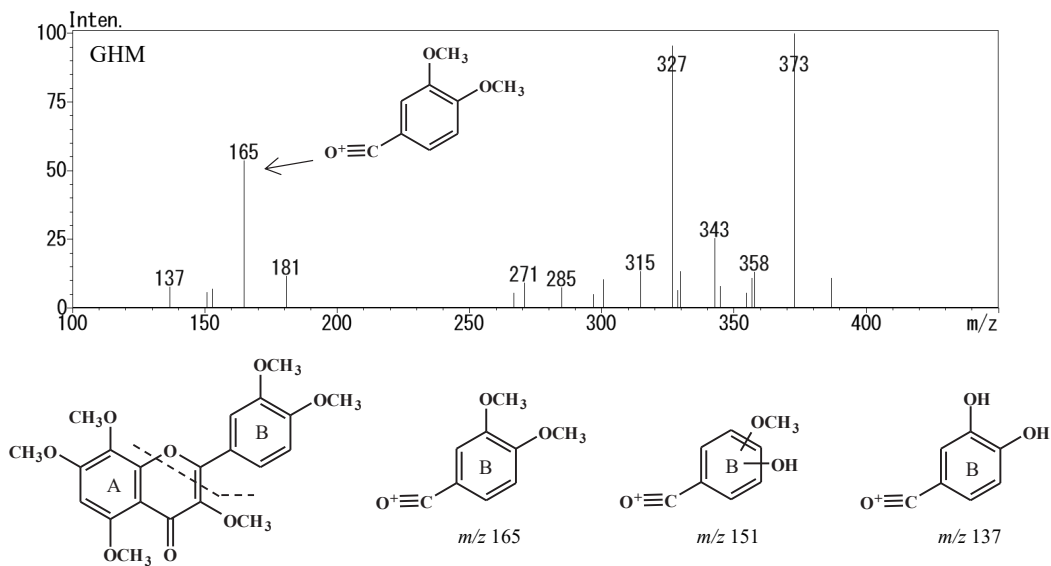


Fig. 5 The MS/MS pattern of GHM and the retro Diels-Alder fragmentation at the C-ring of GHM and its metabolites under collision-induced dissociation.

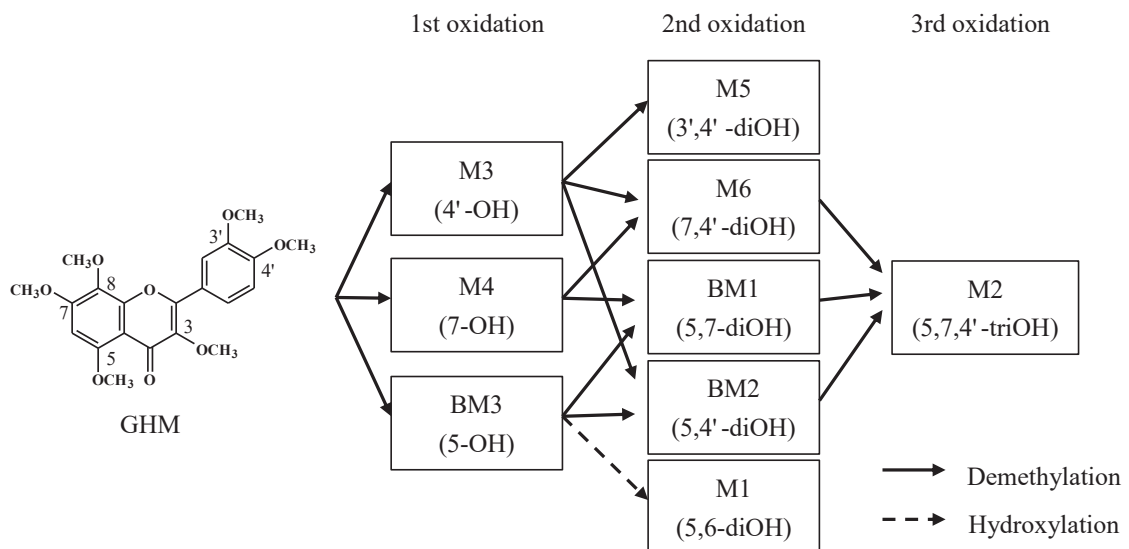


Fig. 6 Postulated metabolic pathways of GHM in rat liver.

脱メチル化体 (M2) および 1 種類の一脱メチル化・一水酸化体 (M1) に代謝されることが明らかになった。これらの結果から、GHM の代謝反応は 3 段階で連続的に起こることが示唆された。

BM3, M4 および M3 は、 m/z 389 [M+H-14]⁺ を有することから一脱メチル化体であった。また、BM3 と M4 では B 環由来のフラグメントイオン m/z 165 が、M3 では m/z 151 が検出された。Ma らは、kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone) の 4 つの水酸基のうち、1~2 個がメトキシ基に置換されたものを LC-MS/MS で分析したところ、3 位にメトキシ基が存在すると、逆ディールス・アルダー開裂が抑制され、A 環由来のフラグメントイオン (m/z 153 または m/z 167) が極めて小さくなることを報告した²⁷⁾。今回、すべての代謝物で A 環由来のフラグメントイオンが検出されなかったことから、いずれの代謝物も 3 位のメトキシ基は脱メチル化されていないことが示唆された。次に、BM3 は母化合物の GHM よりも HPLC においてかなり遅れて溶出された。一般に、脱メチル化されると極性が高くなることから、基質よりも早く溶出される^{20,21)} が、最近、PMF 類の A 環 5 位の水酸化体は、そのメトキシ体よりも遅く検出されることが報告された²⁶⁾。これらのことから、BM3 は 5-OH-3,7,8,3',4'-pentaMF であると推定された。A 環に複数のメトキシ基をもつ nobiletin (5,6,7,8,3',4'-hexaMF) および tangeretin (5,6,7,8,4'-pentaMF) では、A 環 6 位または 7 位が脱メチル化された代謝物が生成される^{19,21)} ことから、M4 は 7-OH-3,5,8,3',4'-pentaMF であると考えられた。また、B 環の置換位置が全く同じである nobiletin および sinensetin (5,6,7,3',4'-pentaMF) では、B 環の代謝は、まず 4' 位の脱メチル化から起こり、次いで 3' 位が脱メチル化される^{20,21,28)}。このことから、M3 は 4'-OH-3,5,7,8,3'-pentaMF であると推定された。

次に、BM1 および BM2 は二脱メチル化体であるが、HPLC において母化合物 GHM より遅く溶出された。このことから、両者とも二脱メチル化のうち一つは、A 環 5 位が脱メチル化されていることが示唆された。また、B 環由来のフラグメントイオンがそれぞれ m/z 165 および m/z 151 であったことから、BM1 は B 環の脱メチル化が起こっていないこと、BM2 は A 環と B 環から一つずつ脱メチル化されていることが考えられる。これらの事実より、BM1 は 5,7-diOH-3,8,3',4'-tetraMF、BM2 は 5,4'-diOH-3,7,8,3'-tetraMF であることが示唆された。一方、M6 および M5 も二脱メチル化体であったが、B 環由来のフラグメントイオンはそれぞれ m/z 151 および m/z 137 であった。なお、 m/z 137 は B 環が二脱メチル化されたことを示している。以上のことから、M6

は 7,4'-diOH-3,5,8,3'-tetraMF であり、M5 は 3',4'-diOH-3,5,7,8-tetraMF であると推定された。さらに、M2 は三脱メチル化体であるが、B 環由来のフラグメントイオンが m/z 151 であり、B 環が一脱メチル化されていること、加えて A 環 8 位の脱メチル化はほとんど報告がない²⁹⁾ ことを考えると、5,7,4'-triOH-3,8,3'-triMF であると推定された。さらに、M1 (一脱メチル化・一水酸化体) の LC-MS/MS の結果、B 環由来のフラグメントイオン m/z 165 が検出された。この事実は、脱メチル化と水酸化が A 環でのみ起こっていることを示している。これまでに、フラボノイド類の水酸化反応は A 環 6 位および B 環 3' 位に起こることが報告されている^{18,19,29)}。本研究の GHM は、すでに 3' 位がメトキシ基で置換されており、6 位水酸化しか考えられない。また M1 は M2~M6 の代謝物に比べ、遅く溶出されたことから、M1 は 5-脱メチル化・6-水酸化体、すなわち 5,6-diOH-3,8,3',4'-tetraMF であると推定された。

CYP 誘導剤の前処理の効果を見ると、MC 前処理で最も変動が大きかった。すなわち、M4 (7-OH 体)、M1 (5,6-diOH 体)、BM2 (5,4'-diOH 体)、BM1 (5,7-diOH 体)、M2 (5,7,4'-triOH 体) および M5 (3',4'-diOH 体) が著しく増加した。以上のことから、これらの生成には MC 誘導性 CYP1A 酵素が関与すること、また、推定された代謝物の構造から、5 位、7 位および 4' 位脱メチル化とともに 6 位水酸化も強く触媒することが示唆された。PB 前処理では M3 (4'-OH 体)、M4、M6 (7,4'-diOH 体) および BM3 (5-OH 体) が 2~5 倍に増加したことから、PB 誘導性の CYP2B 酵素の関与が示唆された。DEX 前処理では M4、M3、BM3 および BM1 が有意に増加したことから、これらの生成には DEX 誘導性 CYP3A 酵素の関与が示唆された。以上のことから、GHM の代謝には、CYP1A 酵素、CYP2B 酵素および CYP3A 酵素が関与することが示唆された。

総 括

1. 3,5,7,8,3',4'-Hexamethoxyflavone (gossypetin hexamethyl ether, GHM) のラット肝 Ms による代謝を調べた。また、CYP 誘導剤前処理による効果も調べた。
2. GHM 代謝物として、合計 9 種類が検出された。LC-MS の結果、分子量より、3 種類の一脱メチル化体 (M4, M3, BM3)、4 種類の二脱メチル化体 (M6, M5, BM1, BM2)、1 種類の三脱メチル化体 (M2)、1 種類の一脱メチル化・一水酸化体 (M1) が明らかになった。
3. 未処理ラット肝 Ms では、M3, M4 および M6 が主

代謝物であったが、PB 前処理により、M3（未処理の2.6倍）、M4（2.1倍）、M6（2.1倍）および BM3（4.5倍）が有意に増加した。MC 前処理では、M4（5.7倍）、M1（18.4倍）、M6（1.7倍）、BM3（4.0倍）および BM1が有意に増加し、M2および BM2が新たに生成された。DEX 前処理では、M4（6.0倍）、M3（1.8倍）、BM3（10.3倍）、M1（2.4倍）および BM1が有意に増加した。

以上の結果から、GHM の代謝には、CYP1A 酵素、CYP2B 酵素および CYP3A 酵素が関与することが示唆された。

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、GHM 代謝物の分析にご協力いただきました伊東詩織さんと森麻沙枝さんに感謝致します。

Abstract

In vitro metabolism of gossypetin hexamethyl ether (GHM, 3,5,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone), a flavonoid present in the peels of *Citrus miaraya*, was examined using rat liver microsomes (Ms) and effects of three cytochrome P450 (CYP) inducers, phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC) and dexamethasone (DEX), on GHM metabolism was also examined. Five, seven, nine and eight metabolites were produced by liver Ms from untreated, PB-treated, MC-treated and DEX-treated rats, respectively. They consisted of three mono-demethylated (M4, M3 and BM3), four di-demethylated (M6, M5, BM1 and BM2), one tri-demethylated (M2) and one hydroxy-mono-demethylated metabolites (M1). M3, M4 and M6 were main metabolites in the liver Ms of untreated and PB-treated rats. PB treatment increased M3, M4, M6 and BM3 significantly. MC treatment increased M4, M1, M6, BM1 and BM3, and also produced M2 and BM2 newly. DEX treatment increased M4, M3, BM3, M1 and BM1. These results suggest that CYP1A, CYP2B and CYP3A enzymes induced by MC-, PB- and DEX-treatments are most important in GHM metabolism.

文 献

- 1) Formica JV, Regelson W. 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 33 (12): 1061-1080.
- 2) Murakami A, Nakamura Y, Torikai K, Tanaka T, Koshiba T, Koshimizu K, Kuwahara S, Takahashi Y, Ogawa K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Mimaki Y, Sashida Y, Kitanaka S, Ohigashi H. 2000. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice. *Cancer Research* 60 (18): 5059-5066.
- 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) Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation. *Anticancer Research* 19 (2A): 1261-1269.
- 5) Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63 (5): 896-899.
- 6) Kohno H, Yoshitani S, Tsukio Y, Murakami A, Koshimizu K, Yano M, Tokuda H, Nishino H, Ohigashi H, Tanaka T. 2001. Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Life Sciences* 69 (8): 901-913.
- 7) Wen X, Walle T. 2006. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug Metabolism and Disposition* 34 (10): 1786-1792.
- 8) Minagawa A, Otani Y, Kubota T, Wada N, Furukawa T, Kumai K, Kameyama K, Okada Y, Sato T, Ito A, Kitajima M. 2001. The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice. *Japanese Journal of Cancer Research* 92 (12): 1322-1328.
- 9) Akachi T, Shiina Y, Ohishi Y, Kawaguchi T, Kawagishi H, Morita T, Mori M, Sugiyama K. 2010. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha (*Citrus depressa*) against D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 56 (1): 60-67.
- 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. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326 (3): 739-744.
- 11) Salah AM, Gathumbi J, Vierling W. 2002. Inhibition of intestinal motility by methanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* L.(Malvaceae) in rats. *Phytotherapy Research* 16 (3): 283-285.
- 12) Pandurangan N, Bose C, Banerji A. 2011. Synthesis and antioxidant activities of seabuckthorn flavone-3-ols and analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (18): 5328-5330.
- 13) Khan A, Manna K, Bose C, Sinha M, Das DK, Kesh SB, Chakrabarty A, Banerji A, Dey S. 2013. Gossypetin, a naturally occurring hexahydroxy flavone, ameliorates gamma radiation-mediated DNA damage. *International Journal of Radiation Biology* 89 (11): 965-975.
- 14) Hisayoshi T, Shinomura M, Konishi A, Tanaka J, Shimoda H, Hata K, Takahashi S, Yasukawa K. 2014. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase activity by *Brasenia schreberi* (Junsai) components. *Journal of Biological Macromolecules* 14 (1): 59-65.
- 15) Meng X, Munishkina LA, Fink AL, Uversky VN. 2010. Effects of various flavonoids on the α -synuclein fibrillation process. *Parkinson's Disease* 2010: 650794.
- 16) Uckoo RM, Jayaprakasha GK, Vikram A, Patil BS. 2015. Polymethoxyflavones isolated from the peel of *Miaray Mandarin* (*Citrus miaray*) have biofilm inhibitory activity in *Vibrio harveyi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (32): 7180-7189.
- 17) Iwase Y, Takemura Y, Ju-ichi M, Ito C, Furukawa H, Kawaii S, Yano M, Mou XY, Takayasu J, Tokuda H, Nishino H. (2000). Inhibitory effect of flavonoids from Citrus plants on Epstein-Barr virus activation and two-stage carcinogenesis of skin tumors. *Cancer Letters* 154 (1): 101-105.
- 18) 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.
- 19) Breinholt VM, Rasmussen SE, Brøsen K, Friedberg TH. 2003. *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. *Pharmacology and Toxicology* 93 (1): 14-22.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1): 265-275.
- 25) Ma YL, Li QM, Van den Heuvel H, Claeys M. 1997. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11 (12): 1357-1364.
- 26) Lin YS, Li S, Ho CT, Lo CY. 2012. Simultaneous analysis of six polymethoxyflavones and six 5-hydroxy-polymethoxyflavones by high performance liquid chromatography combined with linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (49): 12082-12087.
- 27) Ma C, Lv H, Zhang X, Chen Z, Shi J, Lu M, Lin Z. 2013. Identification of regioisomers of methylated kaempferol and quercetin by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight (UHPLC-QTOF) tandem mass spectrometry combined with diagnostic fragmentation pattern analysis. *Analytica Chimica Acta* 795: 15-24.
- 28) 俵岡樹子, 松尾美樹, 太田千穂, 山口恵美, 太田英明, 古賀信幸. 2007. Pentamethoxyflavone 類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 39: 273-278.
- 29) Xiao J, Hogger P. 2013. Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes. *Current Drug Metabolism* 14 (4): 381-391.