

## 強い内皮依存性血管弛緩作用をもつ 新たな赤ワインポリフェノールの特性

山崎理美, 岩田宏紀\*, 村田恵理, 片野由美, 石幡 明

山形大学医学部基礎看護学

\*山形大学医学部分子病態学

(平成23年5月7日受理)

### 要 旨

**【背景】** 赤ワインに含まれる多種類のポリフェノール化合物 (RWPCs) は強い血管弛緩作用を有する。RWPCs中の血管弛緩作用を有するポリフェノールはいくつか報告されているが、RWPCsにはそれら以外にも未知の成分が多数存在することが知られている。本研究では、血管弛緩作用を有する新たな赤ワインポリフェノールを探索し、その特性を検討することを目的に、RWPCsの比較的親水性の高い成分を分離・分画してから、(1)特に強い血管弛緩作用を有する分画を特定し、(2)分子量の測定と構造の推定を行い、(3)血管弛緩作用の濃度反応曲線を作成し、作用機序を調べた。

**【方法】** (1)RWPCsのうち比較的親水性の高い成分を、高速液体クロマトグラフィーにより分画した。(2)得られた各成分の血管弛緩作用は、ラット胸部大動脈を用いて検討した。(3)強い血管弛緩作用を惹起した分画について、MALDI-TOF型質量分析計を用いて質量分析を行い分子量決定と構造の推定を行った。(4)その分画の血管弛緩作用については濃度反応曲線を得るとともに、血管内皮細胞の除去、NO・過分極因子・プロスタサイクリンの阻害による影響を検討した。

**【結果】** RWPCsの主要な血管弛緩成分のひとつとして知られているレスベラトロールよりも低濃度から弛緩作用を惹起する分画が得られた。その弛緩作用は内皮除去により消失した。内皮細胞での作用機序を調べた結果、血管弛緩反応はNO合成酵素の阻害によりほぼ完全に抑制された。質量分析では3469Daの分子量が検出され、解析の結果、糖鎖を付加した配糖体であることが予測された。

**【結論】** 今回得られた分画の成分は、RWPCsが惹起する血管弛緩反応において主要な役割を果たしている成分の一つである可能性が示唆された。分子量3469Daのポリフェノールが現在データベースにないことから、新規物質である可能性が示された。

キーワード：赤ワインポリフェノール、血管弛緩作用、高速液体クロマトグラフィー、質量分析

## 緒 言

日本では死因の約3分の1が虚血性心疾患または脳血管疾患によるものであり、その対策が必要不可欠である<sup>1)</sup>。これらの循環器疾患の多くは動脈硬化が発症の基盤となっており、その成因として糖尿病、高血圧症、血中脂質異常症といった生活習慣病が重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。我が国では、動物性脂肪摂取量等が増加するなどの食生活の欧米化に伴い、生活習慣病が増加し循環器疾患による死亡率が増加している<sup>1)</sup>。

ところがフランスでは、動物性脂肪の摂取量が多いにも関わらず、他の欧米諸国と比べ、虚血性心疾患による死亡率が低いことが報告されている<sup>3)</sup>。この疫学的事実は、<sup>4)</sup>French paradox、と呼ばれ、その後の研究により、赤ワインの摂取量と虚血性心疾患による死亡率には負の相関があることが明らかになり、赤ワインに含まれる多種類のポリフェノール化合物 (Red Wine Polyphenolic Compounds; RWPCs) が冠血管疾患の予防に寄与していることが示唆された<sup>4)</sup>。

我々も赤ワインの循環器疾患の予防効果に着目し、RWPCsを単回投与した場合、摘出心臓の冠循環を改善させること<sup>5)</sup>、内皮依存性血管弛緩作用があること<sup>6)</sup>、<sup>7)</sup>を明らかにしてきた。また、RWPCsを3か月間投与した食餌性高コレステロール血症ラットの心臓では、冠循環改善効果が認められること<sup>8)</sup>、胸部大動脈では血管内皮細胞由来の一酸化窒素 (NO) 産生遊離機能を高めること、RWPCsの投与期間に従い血小板凝集能は低下すること<sup>9)</sup>を明らかにしており、これらが心血管保護効果に寄与している可能性があること<sup>10)</sup>を報告している。

しかしRWPCsでは強い血管弛緩反応が惹起されるのに対し<sup>7)</sup>、<sup>8)</sup>、<sup>11)</sup>、赤ワインに含まれているカテキン、タンニン、レスベラトロール、ケルセチン等の精製されたポリフェノールを用いた場合、RWPCsでみられる強い血管弛緩反応が

惹起されるのは、経口摂取では得られないほど高い濃度からであった<sup>11)</sup>–<sup>13)</sup>。赤ワイン中にはこれら以外の多様な成分もあり低濃度から血管弛緩反応が惹起されるポリフェノールも報告されているが<sup>11)</sup>、<sup>14)</sup>、<sup>15)</sup>、RWPCsにはワインの発酵・熟成時に産生される未知の成分や重合ポリフェノールも数多く存在することも知られており、これらの血管作用についてはほとんど報告がない。そのため、既知のポリフェノールに加え、未知のポリフェノールあるいは重合ポリフェノールもRWPCsの血管弛緩反応の一部を担っている可能性が予測されている。

そこで本研究では、RWPCs中の血管弛緩反応を惹起する未知のポリフェノールを探索し、その成分の特性を解析することを目的に、RWPCsの親水性成分について成分を分離し、血管弛緩反応を有する分画を探索した。その中で特に強い血管弛緩作用を有する分画について、分子量の測定と構造の推定を行い、血管弛緩作用の濃度反応曲線を作成しその作用機序を検討した。

## 対象と方法

### 1. RWPCs成分の分離・分画

従来当研究室で用いてきた赤ワイン (CASTILLO DE ARMOUR, Tinto, Spain) を凍結乾燥 (FRD-82M, IWAKI, Japan) し、アルコールを除去した後に蒸留水で1 g/mlに溶解したものをRWPCs原液とした。RWPCs原液を遠心 (12000rpm, 4℃、10分間) して沈殿物を除去後、上清中の疎水性成分をocthyl sepharose (Pharmacia fine chemicals, Sweden) に30分間吸着させることで、比較的疎水性の高い成分を除去した。RWPCs成分を含む上清300μlを、逆相高速液体クロマトグラフィー；reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) により分離し、それぞれの成分分画を回収 (分取) した。回収した成分分画はSpeedVac (AES 1000, Savant, USA) で乾燥し、trifluoroacetate (TFA) と acetonitrile (AcCN)

を除去した。高速液体クロマトグラフィーシステム (LC 2000 Plus、日本分光、大阪、Japan) を用いたRP-HPLCは、移動相には平衡化バッファーとしてA液 (0.1% TFA、水)、溶出バッファーとしてB液 (0.1% TFA、90% AcCN、水)を用いた。調整したRWPCs成分を平衡化されたカラム (ODS-120T、東ソー、東京、Japan) に導入・吸着させ、流速0.5ml/minで溶出した (溶出時間90分)。溶出にはB液の混合割合を12~25%のリニアグラジエントとした。カラムから溶出された成分は、diode array型可視・紫外多波長検出器 (MD-2010 Plus、日本分光、大阪、Japan) を用いて、200nm~600nmの光吸収を4 nm、0.4秒間隔で記録した。検出吸収波長は、330nm、280nm、360nmの3波長を用いた。光吸収特性は、コンピュータを用いてリアルタイムにモニターし、成分抽出時に各成分分画を分取した。

## 2. 摘出血管標本の作製

5~6か月齢の雄性Fischer 344ラットをエーテル麻酔下で頸椎脱臼後、速やかに胸部大動脈を摘出した。摘出した大動脈を冷却したKrebs-Henseleit (KH) 液 (NaCl 118、KCl 4.7、NaHCO<sub>3</sub> 24.9、MgSO<sub>4</sub> 1.2、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2、glucose 11.1、CaCl<sub>2</sub> 1.8 (mM)、pH 7.4) に浸し雑組織等を除去し、幅約2~3 mm、直径約2~2.5mmの血管標本を作製した。1個体から4~8本の血管標本を得た。ただし、実験例数 (n) は、実験動物1個体から得られたデータを1例 (n=1) と数えた。標本を混合ガス (95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) を通気したKH液 (37±0.1℃) で満たしたorgan bathに懸垂し、1gの静止張力を負荷し、15分間隔で新鮮な灌流液と交換しながら1時間安定させた。血管標本の収縮張力は等尺性張力トランスデューサー (7T-15-240、オリエンテック、東京) を用いて測定した。それぞれの血管標本の最大収縮力は66.7mM KCl液 (高濃度K<sup>+</sup>) で測定した。

内皮除去標本は、内皮細胞をペアンで軽く擦り除去して作製した。内皮細胞の有無は以下の

方法で確認した。すなわち、標本を1 μMのphenylephrine hydrochloride (PE) で前収縮させた後、1 μMのacetylcholine chloride (ACh) を投与し、40%以上の弛緩反応が見られたものを内皮細胞無傷標本、10%以下しか弛緩反応がみられなかったものを内皮細胞除去標本とした。

## 3. RWPCs成分の血管弛緩作用

一回のHPLC分離で得られた各成分分画を乾燥し、dimethylsulfoxide (DMSO) 10 μlに溶解後、生理食塩液90 μlで希釈した。各分画の血管弛緩反応の強さを以下の方法で検討した。まずPE (1 μM) で標本を前収縮させた後、RWPCsから分画されたそれぞれの成分を投与した。PEによる血管収縮力を100%とし、それぞれの標本での血管弛緩反応の大きさを求めた。各成分の弛緩反応の評価後、再度AChによる血管弛緩反応を測定して、内皮機能が維持されていることを確認した。なお、AChによる弛緩反応が40%以下だった場合は、実験中に内皮機能障害がおこったとみなして実験データから除外した。

内皮細胞での作用機序を調べる実験では、NO合成阻害薬のN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)、プロスタサイクリン合成阻害薬のdiclofenac、過分極因子を阻害するための30mM KClそれぞれ存在下で血管弛緩作用を測定した。各阻害物質はPEで前収縮させる10分前から処置した。

## 4. 質量分析

成分の分子量を測定し、分子構造を推定するため、matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight (MALDI-TOF) 型質量分析装置 (Autoflex, Bruker Daltonics, Germany) を用いて質量分析を行った。まず、RP-HPLCで分取した分画⑥の成分をマトリックスと混合しターゲットプレート上で乾燥後、質量分析装置に導入し、リニアおよびリフレクターモードにて測定した。マトリックスには *α*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)、sinapic acid (SA)、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) を、試料のイオン化にはN<sub>2</sub>パルスレー

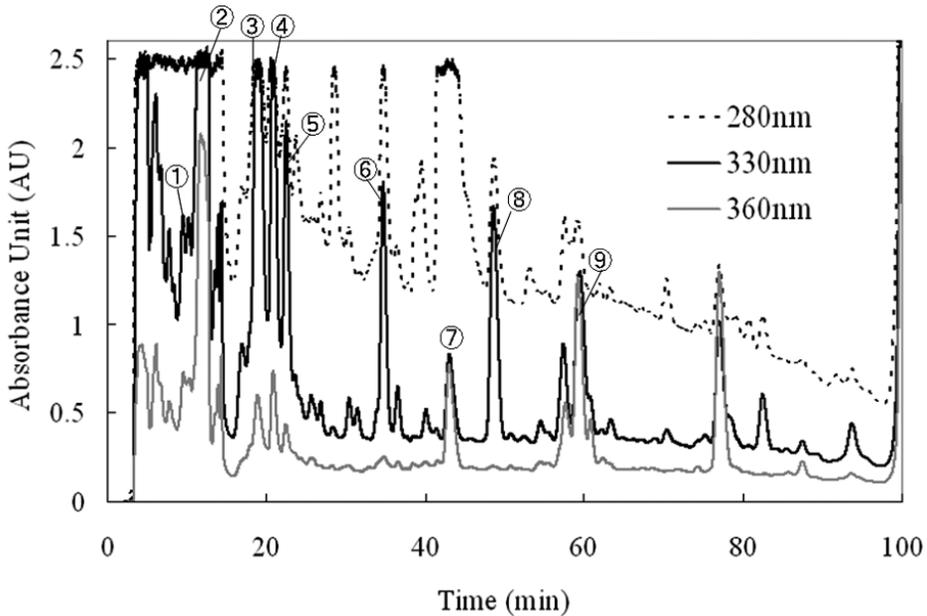


図1 RP-HPLCによるRWPCsの親水性成分の分離

ザーを用いた。各測定時にはキャリブレーターとして、各マトリックスおよびangiotensinII (1046.6Da)、adrenocorticotrophic hormone (ACTH, 2932.6Da) を用いて較正を行った。試料の測定は500ショット以上行い積算した。また、分子の内部エネルギーによる post source decay (PSD) 法を用いたMALDI-PSDスペクトルよりMS/MS解析(目的分子(親MS)から分解して得られる分解産物(子MS)との分子量の差から分子の構成成分を調べる)し、さらに詳細な分子構造を予測した。

### 5. 使用薬物

TFA、DMSO、angiotensin II、ACTHおよびAcCNは和光純薬から、PE、L-NAME、diclofenac、CHCA、SAおよびDHBはSigma chemical Co. (USA) から、AChは第一製薬からそれぞれ購入した。PE、ACh、L-NAMEおよびdiclofenacは生理食塩液を用いて溶解希釈した。66.7mM KClの組成(mM)は、NaCl 56.0、KCl 66.7、NaHCO<sub>3</sub> 24.9、MgSO<sub>4</sub> 1.2、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2、glucose 11.1、CaCl<sub>2</sub> 1.8であった。30mM KClの

組成(mM)は、NaCl 92.7、KCl 30.0、NaHCO<sub>3</sub> 24.9、MgSO<sub>4</sub> 1.2、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2、glucose 11.1、CaCl<sub>2</sub> 1.8であった。

### 6. 統計処理

得られたデータは、F検定による等分散の検定をおこない、等分散であれば通常のStudent's *t* 検定、不等分散であればWelch's *t* 検定を行った。それぞれの値はすべて平均値±標準誤差で表現した。危険率P<0.05をもって有意とした。

### 7. 倫理的配慮

本実験は、山形大学動物実験規程<sup>16)</sup>、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号)、実験動物の使用及び保管等に関する基準(昭和55年総理府告示第6号)を遵守して行った。

## 結 果

### 1. 高速液体クロマトグラフィーによるRWPCs成分の分離と血管弛緩作用を有する分画の探索

RWPCsの親水性成分の分画結果を図1に示

表1 分画①～⑨の血管弛緩率

Fraction No.	張力(%)*	実験例数 (n)	除外数
①	68.7 ± 10.9	3	1
②	42.6 ± 5.5	5	0
③	50.7 ± 4.7	5	2
④	61.0 ± 15.0	3	5
⑤	67.8 ± 10.0	3	1
⑥	54.9 ± 9.6	6	2
⑦	66.2 ± 10.1	7	0
⑧	46.2 ± 10.8	3	4
⑨	71.6 ± 12.8	4	3

**\*張力：PEによる前収縮(100%)に対する血管張力  
値は平均 ± 標準誤差**

す。得られた分画をそれぞれ分取し、血管弛緩作用を有する成分を調べた。その結果、弛緩作用を有する分画が9個得られた(図1)。

血管弛緩作用を示した9個の分画のうち、弛緩作用が強い成分を特定するため、それらの分画の血管弛緩作用を比較検討した(表1)。弛緩反応の大きさは、PEによる血管の前収縮の収縮力を100%として表した。表中の実験例数はデータとして用いたラットの個体数である。なお、除外数は、各実験の最後に、PEで前収縮させた標本で再度AChによる血管弛緩反応を測定した結果、内皮機能が実験中に障害されたとみなした個体数である。

9個の分画のうち、HPLCによる分離が最も良いうえに、弛緩反応が大きくかつ血管障害の発生が少なかった分画⑥(極大吸収は307nmと534nm)を選択し、質量分析と、その成分による血管弛緩作用機序について検討を行った。

## 2. 強い血管弛緩反応が見られた分画⑥の質量分析

MALDI-TOF型質量分析計により質量分析を

行った結果、3469.3Daの分子量関連イオンが検出された。またその付近に、その分子の分解産物と思われる3365.0Daのフラグメントイオンも検出された(図2)。分子量関連イオンとの質量の差は104Daであった。次に、MALDI-PSDを行った結果、1320.7、1188.7、1056.6Daのフラグメントを形成することが観察された。それらのフラグメントの質量の差は132Daずつで規則的であった(図3)。

## 3. 分画⑥の血管弛緩反応に関する濃度反応曲線と作用機序の検討

分画⑥の濃度と血管弛緩反応との関係を調べるため、濃度反応曲線を作成した。その結果、 $1 \times 10^{-6}$ Mから弛緩反応がみられ( $94.9 \pm 4.8\%$ )、 $3 \times 10^{-6}$ Mでは $76.5 \pm 7.3\%$ 、 $1 \times 10^{-5}$ Mでは $40.2 \pm 3.7\%$ まで弛緩した(n=6、図4)。

次に、血管弛緩反応への血管内皮細胞の関与について評価を行った。その結果、内皮除去標本では弛緩反応が消失した(n=3、図4)。

次に、内皮無傷標本においてNO合成阻害薬であるL-NAMEを処置した場合、分画⑥による

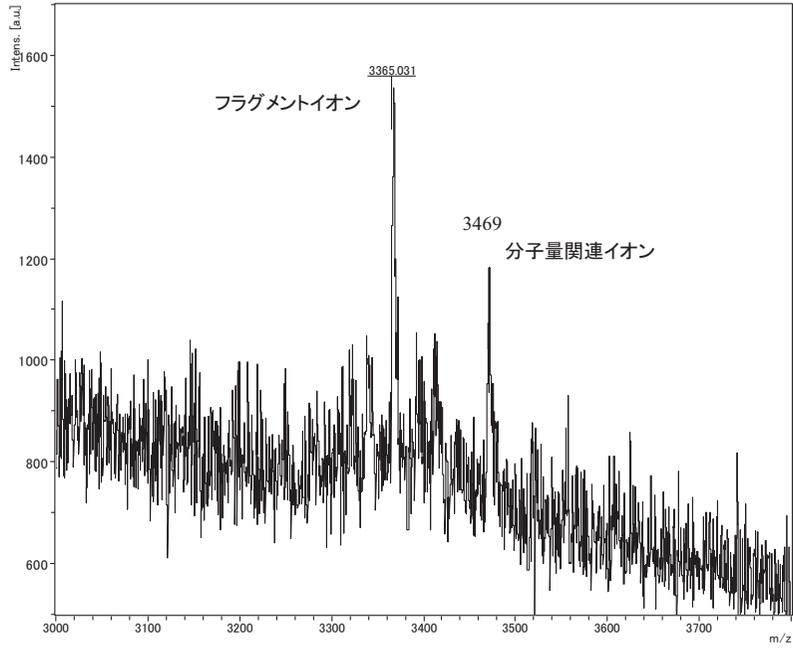


図2 分画⑥の分子量関連イオンとフラグメントイオンのMassスペクトル

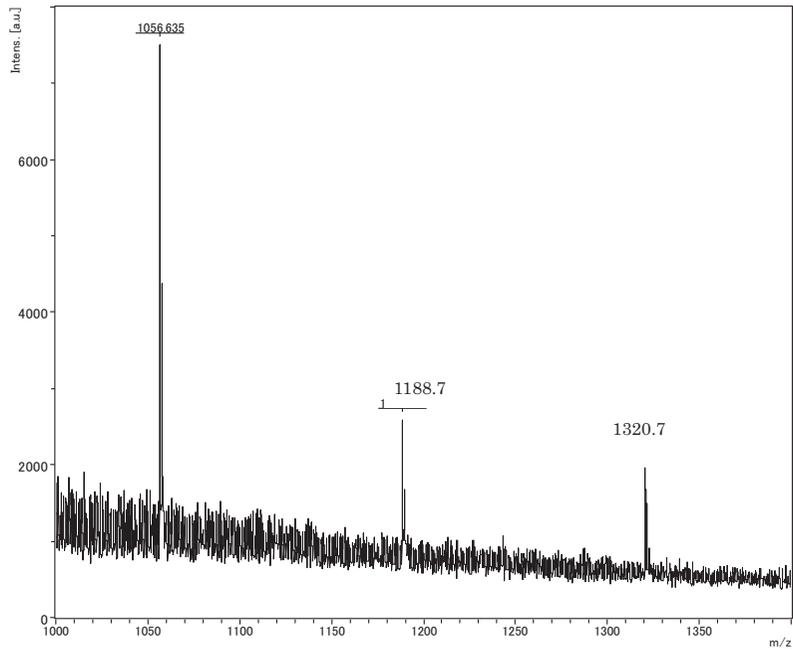


図3 分画⑥のMALDI-PSDスペクトル

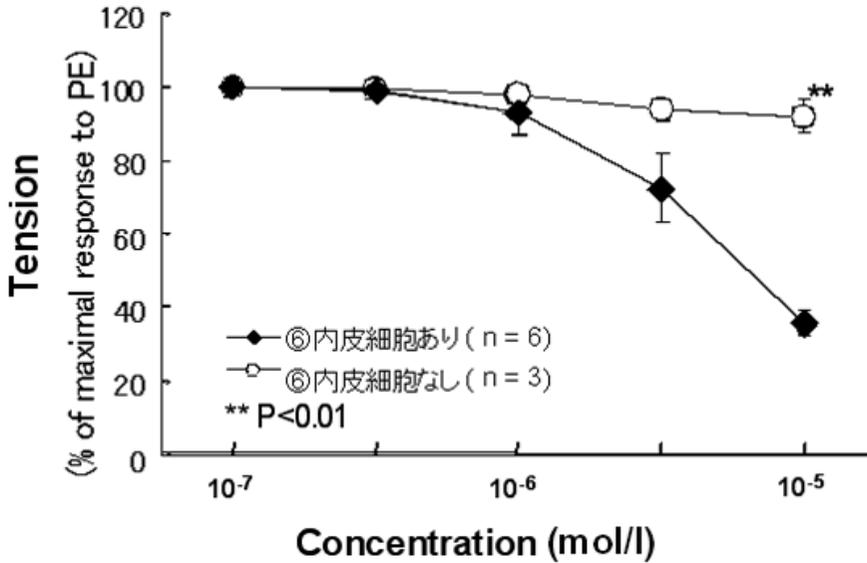


図4 分画⑥の内皮依存性血管弛緩反応

弛緩反応はほとんど消失した(図5)。過分極因子を阻害する30mM KClの存在下では、阻害薬を処理しないコントロール群に対し、弛緩反応が有意に抑制された (P<0.05、図5)。一方、プロスタサイクリン合成阻害薬であるdiclofenac処理では、血管弛緩反応はほとんど抑制されなかった(図5)。

### 考 察

今回用いたRWPCs成分の分画から、強い血管弛緩作用を示し、比較的分離が良く、実験中に血管障害がおきにくかったひとつの分画を選択し、質量分析を行った結果、その分子量は3469Daであり、132Daずつの規則的なフラグメントが検出されることが示された。その分画は強い内皮依存性血管弛緩作用を示し、その作用には主にNOが関与し、一部は過分極因子も関与することが示唆された。

#### RWPCsの質量分析法

RWPCsの分析は、液体クロマトグラフィー

質量分析(Liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS)に基づいて行われることが一般的である。質量分析には、多くの場合にエレクトロスプレーイオン化(Electrospray ionization; ESI)法が用られてきた。ESI法により赤ワインから1000Da以上の分子量を検出した例もあるが<sup>17)</sup>、ESI法は試料分子が多価イオンになりやすく、装置の分解能の限界から高分子の検出は一般的に難しい<sup>18)</sup>。これに対して、MALDI-TOF型質量分析は比較的均一に一価のイオンを生じることから高分子量の検出に最も適しているとされている<sup>19)</sup>。最近では、MALDI法を用いたRWPCs等のポリフェノール分析も試みられており、今回得られたような3000Da以上の高分子量ポリフェノールも複数報告されている<sup>20)-22)</sup>。本研究で高分子が検出された一つの要因としては、MALDI-TOF型質量分析計を用いたことも考えられる。

#### 分画⑥の分子構造

MALDI-TOF型質量分析計により検出された分画⑥の分子量は3469Daであり、データベースに

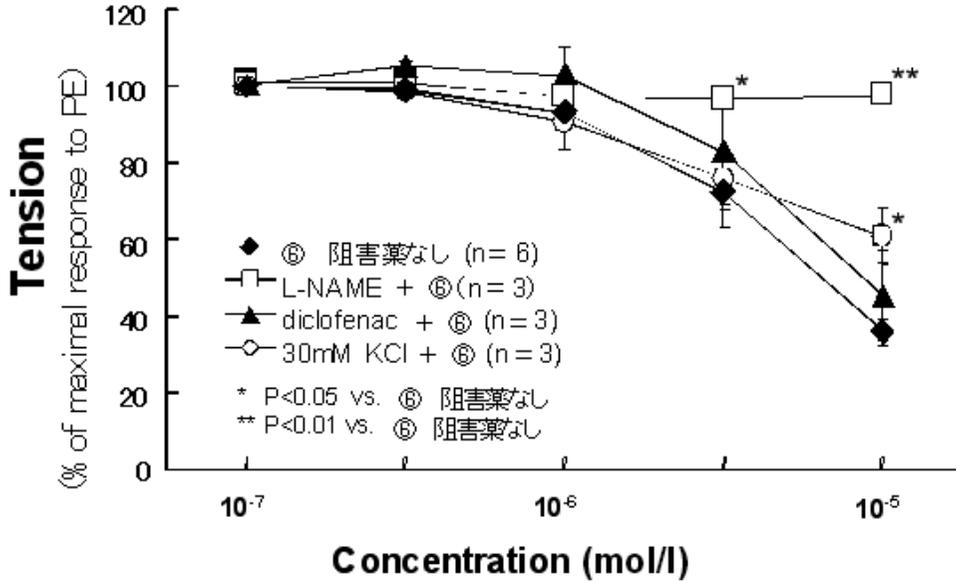


図5 分画⑥の血管弛緩作用に対する各種阻害薬の影響

同じ分子量のポリフェノールがないことから<sup>23)</sup>、この成分が新規物質である可能性が示唆された。RWPCsは、フラボノイドとノンフラボノイドの2種類に大別することができ、フラボノイドにはアントシアニン、カテキン、エピカテキン、ミリセチン、ケルセチンなどとその配糖体があり、ノンフラボノイドにはガリック酸、trans-レスベラトロール、cis-レスベラトロールなどとその配糖体が知られている<sup>24)</sup>。これらの物質はいずれも分子量が200から500Daが一般的である。通常分子は、分子量が大きくなるほど炭素原子の含有率が高くなり、成分は疎水性を示す傾向があるが、今回調べた成分は比較的親水性の高い成分である。分子量が大きいかにも関わらず分画⑥が親水性である要因として、親水性の高い糖鎖などを含有する可能性が高いことが予測される。分画⑥の分子構造の予測のため、MALDI-PSD法により質量分析を行ったところ、分子量の差が132Daずつの規則的な間隔でピークが検出された。この差から、分子量150Daの5炭糖であることが予測された。PSD時に水分

子が脱離するため、分子量は18小さくなり、132Daの分子量の差として検出される。このため、分画⑥のポリフェノールは5炭糖の糖鎖を複数付加した配糖体であることが示唆された。5炭糖のような単糖類は、有機化合物の疎水性の部分(炭化水素基(CH基))の割合に対して、親水性のOH基の割合が大きく、親水性が高まると考えられる。

一方、分子全体の質量分析では、分子量関連イオン3469Daの付近に、3365Daも検出されている。そのフラグメントから、末端に何らかの官能基を持つことが示唆された。光吸収をみると、分画⑥は307nmと534nmに極大吸収を有することから、ベンゼン環に官能基が結合した構造を有すること、また複数の共役二重結合を有する構造であることが予測された。他のポリフェノール類もフェノール性水酸基をもち、アグリコンによって吸収パターンは異なるものの、300~330nm付近に吸収を持つ成分が多いことや、配糖体では450~650nm付近に吸収を持つ成分が多いことから<sup>25)</sup>、分画⑥はポリフェノール

の配糖体である可能性が示唆された。分画⑥の分子量は、既知のポリフェノール単体よりはるかに大きく、いくつかのアグリコン（ポリフェノールの基礎骨格）の重合体である可能性が示唆された。佐藤らは、単体ポリフェノールに比べ重合体となったポリフェノールのほうが、赤ワインの抗動脈硬化作用により効果的であると報告している<sup>26)</sup>。このことから、赤ワインの分画⑥は、強力な内皮依存性血管弛緩作用に大きく影響している可能性が考えられる。

#### 分画⑥の血管作用と作用機序解析

レスベラトロールは、赤ワインポリフェノールによる血管弛緩作用の主要成分の一つとされているが、PEによる収縮を50%抑制するのに約100 $\mu$ M必要とされる<sup>13), 27)</sup>。今回得られた分画⑥成分は、約10 $\mu$ MでPEによる収縮を50%抑制した(図4)ことから、赤ワイン中の血管弛緩作用に関与する新たな主要成分の一つと考えられる。

分画⑥の作用機序解析のため、まず内皮細胞の関与を検討したところ、内皮を除去した場合に分画⑥の血管弛緩作用は消失した。このため、分画⑥の作用が内皮細胞依存性であることが明らかになった。また、内皮細胞における作用機序を検討したところ、NO合成阻害薬であるL-NAMEを処理した場合に血管弛緩作用がほとんど消失した。このため、この成分は主にNOの経路を介して血管弛緩反応を惹起していることが明らかになった。また、30mM KClを用いて過分極因子を阻害した場合、高濃度の $1 \times 10^{-5}$ Mにおいて、分画⑥の血管弛緩作用が有意に抑制されたことから、作用の一部が内皮依存性平滑筋過分極を介している可能性が示唆された。これに対して、diclofenacでは有意な弛緩抑制作用が見られなかったため、プロスタサイクリンの経路は介していないことが示唆された。

ポリフェノールによりNO産生が増加するメカニズムには複数の経路が考えられている。多くのポリフェノールは、phosphoinositide-3-kinase (PI-3-kinase)/Akt経路を介してeNOSのセリン残基をリン酸化しeNOS活性化をおこす<sup>28)</sup>

ことによってNO産生を増加させる。さらにレスベラトロール等の一部のポリフェノールは、内皮細胞のエストロゲン受容体を活性化しp38 MAP kinaseを活性化させてNOを産生する<sup>28), 29)</sup>ことも知られている。今回得られた分画⑥は、主に内皮由来NOを介して作用していることが明らかになったことから、これらのいずれかの機序を経て内皮細胞でのNO合成を増加させ血管弛緩反応を惹起している可能性が考えられる。

#### 結 語

赤ワインに含まれている新たな血管弛緩性ポリフェノール成分を分画し、その作用機序を明らかにした。成分の構造を決定し、生体における吸収・代謝・分布・排泄にわたる経路や作用機序が明らかになれば、健康を維持するうえで有用な知見になると思われる。

#### 謝 辞

本研究は、一部、文部科学省科研費補助金(基盤研究(C)20590087)により行われたものである。

#### 文 献

1. 国民衛生の動向. 厚生統計協会; 2008年第55巻 第9号: 79-83
2. 図説 血栓・止血・血管学 血栓症制圧のために. 一瀬白帝 編著; 2005年初版1刷: 71
3. Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H et al: Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *The Lancet*. 2000; 355: 675-678
4. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F: Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *The Lancet*. 1979; 313:

- 1017-1020
5. Katano Y, Takino T, Takahashi K, Ishihata A, Aita T, Murata E et al.: Aging and the effects of red wine polyphenols on coronary circulation in rats. *J Pharmacol. Sci.* 2004; 94 (suppl 1): 219
  6. 利美賀子, 石幡明, 曾田智美, 下田智子, 片野由美: 老化血管に対するポリフェノール含有赤ワイン凍結乾燥物の内皮依存性弛緩作用とその機序: 若齢血管との比較. *山形医学.* 2005; 23(1): 33-41
  7. 山崎理美, 三重堀亜矢: ポリフェノール含有赤ワインの内皮依存性弛緩作用とその機序: 加齢による変化. *山形大学医学部看護学科卒業論文;* 2008
  8. Katano Y, Ishihata A, Shimoda T, Kaga M, Murata E, Yamada A et al.: Effect of freeze-dried red wine on the coronary circulation of rats with cholesterol-rich diet. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100 (suppl 1): 228
  9. 小林優子, 山田晃子, 村田恵理, 伊藤恒賢, 石幡明, 片野由美: 食餌性高コレステロール血症ラットの血小板機能に対する赤ワインポリフェノール成分長期摂取の効果. *山形医学.* 2008; 26 (2): 61-68
  10. 山田晃子, 小林優子, 村田恵理, 石幡明, 片野由美: 食餌性高コレステロール血症ラットの血管機能に対するポリフェノール化合物含有赤ワイン凍結乾燥品(RWPC)の長期投与の影響 第2報. 第10回北日本看護学術集会 プログラム抄録集. 2006: 116
  11. Andriambelison E, Kleschyov A L, Muller B, Beretz A, Stoclet J C, Andriantsitohaina R: Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 120: 1053-58
  12. Kaga M, Saitoh Y, Honma Y, Ishihata A, and Katano Y: Vascular effects of polyphenolic substances in rat aorta. *J Pharmacol Sci.* 2004; 94 (suppl 1): 220
  13. Veronique L, Stephanie K, Josep V, Arnaud C, Sabrina A, Alicia M, Vila, Jean-Michel M, Bernard M: Relaxation induced by red wine polyphenolic compounds in rat pulmonary arteries: lack of inhibition by NO-synthase inhibitor. *Fund.Clin Pharm.* 2008; 22: 25-35
  14. Padilla E, Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Slowing K, Tejerina T: Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. *Eur. J. Pharmacol.* 2005; 517: 84-91
  15. Andriambelison E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A et al.: Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J. Nutr.* 1998; 128: 2324-33
  16. 「山形大学医学部動物実験規程」の解説. *山形大学医学部.* 2001: 1-2
  17. Helene F, Carine M, Sebastien P, Gerard M, Claire B, Jean-Paul M et al: Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochem.* 2008; 69: 3131-3138
  18. 齋藤和徳: フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計の原理と応用. *CENTER NEWS.* 2008; 99 (vol. 27, No.1): 1-4
  19. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T: Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988; 2: 151-3.
  20. Jess D. R, Christian G. K, Martha M. V: MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochem.* 2005; 66: 2248-63
  21. Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, Kanda T, Ohtake Y: Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J. Chromatogr. A.* 2006; 1102: 206-213
  22. Maria J, Jprge S, Esteban G, Maria J. N: Identification of polymeric procyanidins from pine bark by mass spectrometry. *Rapid Commun, Mass Spectrom.* 2009; 23: 4013-18
  23. 有機化合物のスペクトルデータベース(SDBS). 独立行政法人産業技術総合研究所. 2010.

- ([http://riodb01.libbase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=jp](http://riodb01.libbase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=jp))
24. Jianping S, Feng L, Yan B, Ping L, Changqing D: Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry / mass spectrometry libraries. *Molecules*. 2007; 12: 679-693
  25. Y.S. Oh, J.H. Lee, S.H. Yoon, C.H. Oh, D.-S. Choi, E. Choe, M.Y. Yung: Characterization and Quantification of Anthocyanins in Grape Juces Obtained from the Grapes Cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. *J.Food.Sci*. 2008; 73 (5): C378-89
  26. 佐藤充克：ワイン・ポリフェノールの生理的機能. *Food Style* 21. 2000 ; 4 : 78-82
  27. James W. E. R, Joe Q, Andrew S. L, Rebecca J. F: Chronic resveratrol enhances endothelium-dependent relaxation but does not alter eNOS levels in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Exp. Biol. Med*. 2007; 232: 814-822
  28. Valerie B. S-K, Cyril A, Jong-Hun K, Nelly E-S, Thierry C: Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. *Eur. J. Physiol*. 2010; 459: 853-862
  29. Matthieu C, Angela T, Maria C M, Didier R, Jean-Francois A, Ramarosan A: Estrogen Receptor Alpha as a Key Target of Red Wine Polyphenols Action on the Endothelium. *PLoS ONE*. 2010; 5 (1): 1-7

## **Characterization of a novel polyphenol with endothelium-dependent vasorelaxant effects**

**Satomi Yamazaki, Hiroki Iwata\*, Eri Murata, Yumi Katano  
and Akira Ishihata**

*Course of Theoretical Nursing, Yamagata University, School of Nursing*

*\*Department of Molecular Patho-Biochemistry and Patho-Biology,  
Yamagata University, School of Medicine*

### **ABSTRACT**

A variety of red wine polyphenolic compounds (RWPCs) induce vascular relaxation, but the structure of each polyphenol remains unclear. In this study, we isolated several components of polyphenols from red wine using RP-HPLC. The vasorelaxant effects of the fractions were screened with isolated rat aorta. A fraction with potent vasorelaxant effect was subjected to MALDI-TOF mass spectrometric analysis to identify the molecular structure, and the detected masses were searched in databases. The fraction induced vascular relaxation endothelium-dependently. The vasorelaxant effect was greater than that of resveratrol, one of the most potent vasorelaxant polyphenolic components in RWPCs. The vasorelaxation was inhibited by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester, a nitric oxide synthase inhibitor. The molecular weight of the fraction was 3469 Da, which has not been reported in a database of polyphenols. The mass spectrum suggested that the component would have oligomeric structures of polyphenolic aglycons and sugar chains. In conclusion, we isolated one of the polyphenols with potent endothelium-NO-dependent vasorelaxant effect in RWPCs.

**Key words :** red wine polyphenol, vasorelaxation, RP-HPLC, mass spectrometric analysis