

オリゴ糖による水溶性フラボノイド配糖体の 吸収促進とその作用機構の解析

学位論文内容の要旨

フラボノイドは、ポリフェノール化合物の一種であり、植物中に存在する。近年、食品成分が持つ疾病予防機能への関心が高まっており、フラボノイドの生理機能が注目を集めている。天然でフラボノイドは配糖体として主に存在するが、その吸収動態に関しては一定の見解が得られていない。本研究では、フラボノイド化合物の吸収動態を調べるために、ケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体を用いて、*in vitro*、*in situ*、*in vivo*の試験により吸収動態と吸収機構を調べることを目的とした。これらのフラボノイド配糖体は、本来溶解度は低いですが、食品に応用するため水溶性を高めたものが開発されており、本研究では実用的な観点と、ほとんど不明の水溶性フラボノイド吸収機構を探るという基礎的観点で、糖鎖付加により水溶性を高めたフラボノイド配糖体を用いた。一方、難消化性糖の一種である Difructose anhydride (DFA) III は、小腸での水溶性成分透過経路である上皮細胞間吸収を促進することが示されており、また大腸発酵により、イソフラボンの一種、ダイゼインから腸内菌によって変換されるエクオールを吸収を促進することが報告されている。フラボノイドの吸収率は数%と非常に低く、フラボノイドの生理作用を効率よく発揮させるためには、フラボノイドのバイオアベイラビリティを高めることが重要であると考えられる。従って、フラボノイドの吸収機構を探るとともに、フラボノイド吸収促進という新たなオリゴ糖の機能を解明することを目指し、本研究では、水溶性フラボノイド配糖体とともに DFAIII や発酵性の高いフラクトオリゴ糖 (FOS) を投与したときのフラボノイド配糖体吸収動態を解析した。

1. α -G-ルチン吸収へのオリゴ糖の作用

フラボノイド配糖体の吸収メカニズムを調べる一環として、易水溶性ケルセチン配糖体、 α -G-ルチンを用いた。門脈カテーテル留置ラット、*in situ*小腸結紮ループを用いてルチンにグルコースを付加し、水溶性を高めた α -G-ルチンの単回投与試験を行った。その結果、門脈、腸間膜静脈血中でインタクトな α -G-ルチンが検出され、DFAIIIの添加により増加したことから、 α -G-ルチンは細胞間経路を介して輸送されることが示唆された。 α -G-ルチンを長期摂取したときのオリゴ糖 (FOS、DFAIII) の α -G-ルチンの吸収動態に及ぼす効果を調べるために、ラットに α -G-ルチンとオリゴ糖を摂食させ、 α -G-ルチンとその代謝産物の血液中濃度、尿中、糞中への排泄量を調べた。 α -G-ルチンとともにオリゴ糖を摂取することによって、血中、尿中共にケルセチン代謝物の濃度は増加し、オリゴ糖摂取によってケルセチン配糖体の吸収が促進することが示された。一般に、吸収量が増加すると糞中排泄は減少す

る。しかし、オリゴ糖摂取によってケルセチン代謝物の糞中排泄は増加し、アグリコンの摂取量、尿、糞中排泄量からアグリコン分解量を算出した結果、オリゴ糖の摂取によってケルセチンの分解が抑制されることが示唆された。盲腸内でのケルセチンアグリコンの分解抑制が、吸収量が増加した機構の一つと考えられた。

2. 易水溶性ケルセチン-3-*O*- β -グルコシド (Q3GM) の吸収動態

α -G-ルチンとは糖鎖の異なる配糖体、Q3G にグルコースを 1~7 分子結合させ水溶性を高めたケルセチン配糖体 (Q3GM) を用い、各種試験を行った。*in situ* 小腸結紮ループの試験より、Q3G の吸収メカニズムを検討した。その結果、 α -G-ルチンとは異なり、配糖体よりむしろ抱合体濃度が腸間膜静脈血中で DFAIII によって増加し、腹部大動脈血中、小腸管腔内残存物分析から、Q3GM は管腔内で Q3G にまで分解後上皮細胞間ではなく小腸上皮細胞内に吸収されることが、DFAIII はこの過程を促進すること、細胞内でケルセチンに分解、抱合化され血中に移行することが示唆された。次に、オリゴ糖とともに Q3GM、Q3G を長期摂取したときの、両フラボノイド配糖体の吸収動態を検討した。Q3G、Q3GM はオリゴ糖とともに摂取することによって、 α -G-ルチンと同様、血中、尿中のケルセチン代謝物が増加し、糞中においてもケルセチン代謝物の排泄量、アグリコンの残存率が増加した。オリゴ糖によって大腸におけるアグリコン分解が抑制されたため吸収が増加したことは α -G-ルチンと同様であった。このことを直接証明するため、オリゴ糖を摂取した盲腸内容物 (腸内細菌) による Q3G、ケルセチン、ケルセチンメチル化物の分解を見た。その結果、配糖体、アグリコンともにオリゴ糖摂取盲腸内容物でその分解が大きく抑制された。これにより、ケルセチン配糖体の大腸内での分解抑制が、オリゴ糖摂取によるフラボノイド吸収の促進に寄与しており、この変化には盲腸内菌叢の変化が関わっていることが示唆された。この機構には、盲腸がフラボノイド吸収能をもつことが前提となるため、盲腸、小腸ループを用い *in situ* でケルセチン吸収を見た結果、盲腸は小腸よりも高い吸収能をもつこと示された。ケルセチン代謝物は、胆汁中に排泄されることが知られているが、定量的解析は行われていない。ケルセチンの吸収動態には胆汁分泌も大きく関わっている可能性があるため、胆管カテーテルを留置したラットを用いて胆汁中のケルセチン代謝物を経時的に測定した。ケルセチン代謝物の胆汁排出量は、ケルセチンの尿中排泄量 (正味の吸収量) よりも 2 倍高く、大量のケルセチン代謝物が腸肝循環していることが明らかになった。オリゴ糖による吸収促進への関与は今後の課題である。

3. 小腸結紮ループにおけるミリセチン配糖体の吸収動態

ケルセチンとはアグリコンが異なり、フラボノイドの中でも高い抗酸化性を発揮することが知られているミリセチン配糖体を用いて、Q3G と同様に *in situ* 小腸結紮ループにより腸間膜静脈への吸収試験を行った。その結果腸間膜静脈中の抱合体濃度が DFAIII によって大きく増加した。しかし、Q3G とは異なる点は配糖体が抱合化されたものが多く検出され、すなわちミリセチンは配糖体のまま細胞内に吸収され抱合化され血中に移行する、という特異な吸収動態を示した。

以上より、オリゴ糖はケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体の吸収をいくつかの異なる機構で促進することを明らかにした。すなわち、小腸においては上皮細胞間と細胞内吸収をともに促進、さらに大腸では腸内菌の変動を介してアグリコン分解を抑制し、フラボノイドの吸収効率を上げていた。い

ずれもこれまで知られていなかった新たなオリゴ糖の作用機構である。ケルセチンやミリセチンは様々な生理作用を発揮することが報告されている。本研究で用いたフラボノイド配糖体はすでに飲料や食品の添加物として用いられており、オリゴ糖と合わせて摂取するという新たな食品設計が提案される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 博
副 査 教 授 川 端 潤
副 査 准教授 石 塚 敏

学 位 論 文 題 名

オリゴ糖による水溶性フラボノイド配糖体の 吸収促進とその作用機構の解析

本論文は、170 頁からなる和論文であり、図 52 と表 18 を含み、参考論文 4 編が添えられている。

フラボノイドは、ポリフェノール化合物の一種であり、植物中に存在する。近年、食品成分が持つ疾病予防機能への関心が高まっており、フラボノイドの生理機能が注目を集めている。天然でフラボノイドは配糖体として主に存在するが、その吸収動態に関しては一定の見解が得られていない。本研究では、フラボノイド化合物の吸収動態を調べるために、ケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体を用いて、*in vitro*、*in situ*、*in vivo* の試験により吸収動態と吸収機構を調べることを目的とした。これらのフラボノイド配糖体は、本来溶解度は低いですが、食品に応用するため水溶性を高めたものが開発されており、本研究では実用的な観点と、ほとんど不明の水溶性フラボノイド吸収機構を探るという基礎的観点で、糖鎖付加により水溶性を高めたフラボノイド配糖体を用いた。一方、難消化性糖の一種である Difructose anhydride (DFA) III は、小腸での水溶性成分透過経路である上皮細胞間吸収を促進することが示されており、また大腸発酵により、イソフラボンの一種、ダイゼインから腸内菌によって変換されるエクオールの吸収を促進することが報告されている。フラボノイドの吸収率は数%と非常に低く、フラボノイドの生理作用を効率よく発揮させるためには、フラボノイドのバイオアベイラビリティを高めることが重要であると考えられる。従って、フラボノイドの吸収機構を探るとともに、フラボノイド吸収促進という新たなオリゴ糖の機能を解明することを目指し、本研究では、水溶性フラボノイド配糖体とともに DFAIII や発酵性の高いフラクトオリゴ糖 (FOS) を投与したときのフラボノイド配糖体吸収動態を解析した。これらについて、以下のような結果を得ている。

1. α -G-ルチン吸収へのオリゴ糖の作用

門脈カテーテル留置ラット、*in situ* 小腸結紮ループを用いてルチンにグルコースを付加

し、水溶性を高めた α -G-ルチンの単回投与試験を行った。その結果、門脈、腸間膜静脈血中でインタクトな α -G-ルチンが DFAIII の添加により増加したことから、 α -G-ルチンは細胞間経路を経て輸送されることが示唆された。次に、 α -G-ルチンを長期摂取した時のオリゴ糖 (FOS、DFAIII) の α -G-ルチンの吸収動態に及ぼす効果を調べた結果、 α -G-ルチンと共にオリゴ糖を摂取することによって、血中、尿中共にケルセチン代謝物の濃度は増加し、オリゴ糖摂取によってケルセチン配糖体の吸収が促進することが示された。一般に、吸収量が増加すると糞中排泄は減少する。しかし、オリゴ糖摂取によってケルセチン代謝物の糞中排泄は増加し、アグリコンの摂取量、尿、糞中排泄量からアグリコン分解量を算出した結果、オリゴ糖の摂取によってケルセチンの分解が抑制されることが示唆された。盲腸内でのケルセチンアグリコンの分解抑制が、吸収量が増加した機構の一つと考えられた。

2. 易水溶性ケルセチン-3-O- β -グルコシド (Q3GM) の吸収動態

α -G-ルチンとは糖鎖の異なる配糖体、Q3G にグルコースを 1~7 分子結合させ水溶性を高めたケルセチン配糖体 (Q3GM) を用い、各種試験を行った。*in situ* 小腸結紮ループの試験より Q3G は、 α -G-ルチンとは異なり、配糖体よりむしろ抱合体濃度が腸間膜静脈血中で DFAIII によって増加し、腹部大動脈血中、小腸管腔内残存物分析から、Q3GM は管腔内で Q3G にまで分解後上皮細胞間ではなく小腸上皮細胞内に吸収されることが、DFAIII はこの過程を促進すること、細胞内でケルセチンに分解、抱合化され血中に移行することが示唆された。次に、オリゴ糖とともに Q3GM、Q3G を長期摂取したときの、両フラボノイド配糖体の吸収動態を検討した結果、両配糖体の吸収は促進され、オリゴ糖によって大腸におけるアグリコン分解が抑制されたため吸収が増加したことは α -G-ルチンと同様であった。さらに、オリゴ糖を摂取盲腸内容物中で配糖体、アグリコンともにその分解が大きく抑制された。これにより、ケルセチン配糖体の大腸内での分解抑制が、オリゴ糖摂取によるフラボノイド吸収の促進に寄与しており、この変化には盲腸内菌叢の変化が関わっていることが示唆された。盲腸、小腸ループを用い *in situ* でケルセチン吸収を見た結果、実際に盲腸からケルセチンは吸収され、小腸よりも高い吸収能をもつことも示された。

3. 小腸結紮ループにおけるミリセチン配糖体の吸収動態

ケルセチンとはアグリコンが異なるミリセチン配糖体を用いて、Q3G と同様に *in situ* 小腸結紮ループにより腸間膜静脈への吸収試験を行った。その結果腸間膜静脈中の抱合体濃度が DFAIII によって大きく増加した。しかし、Q3G とは異なる点は配糖体が抱合化されたものが多く検出され、すなわちミリセチンは配糖体のまま細胞内に吸収され抱合化され血中に移行する、という特異な吸収動態を示した。

本論文は、オリゴ糖はケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体の吸収をいくつかの異なる機構で促進することを明らかにした。すなわち、小腸においては上皮細胞間と細胞内吸収とともに促進、さらに大腸では腸内菌の変動を介してアグリコン分解を抑制し、フラボノイドの吸収効率を上げていた。いずれもこれまで知られていなかった新たなオリゴ糖の作用機構である。ケルセチンやミリセチンは様々な生理作用を発揮することが報告されてお

り、本論文はオリゴ糖と合わせて摂取するという新たな食品設計を提案するものであり、高く評価できる。

よって、審査員一同は、松川典子が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。