

平成 21年 6月 16日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580152

研究課題名（和文） 生体内に生じるアントシアニンの機能性代謝物の探索

研究課題名（英文） Search for the functional metabolites derived from anthocyanin *in vivo*

研究代表者

波田野 義比古（HATANO YOSHIHIKO）

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

80113025

研究成果の概要： 我々のこれまでのアントシアニンの吸収・代謝・臓器分布の研究から、その生理機能に無色の代謝物が寄与していることが強く示唆される。生体での無色代謝物の探索の基礎として生理的条件下でアントシアニンの分解と退色産物を経時的に追った。試みた5種のアントシアニン全てで、中間生成物としてレトロカルコンを LC - タンデム MS 分析により初めて明瞭に捉える事に成功した。レトロカルコンの生成は 5~10 時間で最大となり、その後さらに分解が進む。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品・アントシアニン・機能性代謝物・レトロカルコン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病やアルツハイマー病、脳卒中などの疾病や肥満などに対する食生活による予防戦略が重要視されるようになってきた。一方、食品の三次機能に着目した種々の機能性成分の単離や機能解明の研究が活発に行われている。

とりわけポリフェノール類の研究は国内外で広く実施されており、その体内動態についても実験動物だけでなく、ヒト介入実験で

も詳細な検討がなされている。得られている知見では、ポリフェノールは投与したままの形で血中に見出されるが、一般に吸収率は低く、体内の代謝物を勘案してもその機能発現については不明な点が多い。

アントシアニンは鮮やかな色調を呈するポリフェノールの一種で、生活習慣病の予防に関わる種々の機能性が報告されており、二次機能と三次機能を併せ持つ機能性食品因子として注目されていた。アントシアニンの

生体内吸収や代謝などの体内動態研究も急速に進展中であった。(文献1-3)

しかしながら、報告されているアントシアニンの生体内での機能性は、我々や他の研究グループが報告してきたアントシアニンの血中濃度や臓器分布量では説明しきれない事がしだいに明らかとなってきた。

また、アントシアニンは化学的に不安定で、生体内環境下で、容易に分解や構造変換が起こることが予測される。一方、我々はアントシアニンの経口投与後4時間以降では、実験動物の腸管内のアントシアニンのほとんどが退色している事を確認した。

以上の事から経口摂取したアントシアニンが血中および、腸管内で構造変換を受けて生じた無色の代謝物が生体内の機能発現に寄与している事が強く示唆された。

それまでにアントシアニンの無色代謝物としてプロトカテキ酸が報告されていた(文献4,5)が、我々の実験からは生体内でのプロトカテキ酸のアントシアニンの代謝物としての生成は否定され、血清サンプル保存中のアーティファクトである事が明らかとなった(文献6)。

従来、アントシアニンのアグリコン構造を保持した有色の代謝物については多くの報告があったが、無色代謝物に関する詳細な報告は無く、新たに無色代謝物を探索する事が、アントシアニンの機能性を解明する上で、極めて重要となっていた。

## 参考文献

1. Ichiyanagi, T., et al., J. Agric. Food Chemistry, 54, 6578-6587, 2006.
2. Ichiyanagi, T., et al., J. Agric. Food Chemistry, 53, 145-150, 2005.
3. Ichiyanagi, T., et al., Free Radical Biology and Medicine, 36, 930-937, 2004.
4. Tuda, T., et al. FEBS Letter, 449 179-182, 1999.
5. Vitaglione, et al., Journal of Nutrition, 137, 2043-2048.
6. Ichiyanagi, T., et al., Food Chemistry, 105, 1032-1039, 2007.

## 2. 研究の目的

(1) 動物実験に供するのに必要な量の各種精製アントシアニンを確認するための、ビルベリーエキスの酵素処理法をはじめとする各種アントシアニンの大量精製法を確立する。

(2) 種々の精製アントシアニンの *in vitro* での分解過程を経時的に追跡し、生成

する無色の分解産物の単離と同定を行う。

(3) 実験動物に対するアントシアニン投与による血中の脂質過酸化物生成抑制能を指標として、*in vivo* でのアントシアニンの機能性が、インタクトのアントシアニンとそのアグリコン構造を保持した代謝物の血中濃度で説明できるかを検討する。

(4) 実験動物の生体内環境において構造変換を受けたアントシアニンの無色代謝物のスクリーニング・同定を行い、その体内動態を明らかにする。

(5) (1)~(4)の目的を遂行することで、アントシアニンの無色代謝物の実験動物における体内動態と、その機能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 先ず、本研究の推進に必要なアントシアニン(デルフィニジン、シアニジン、ペツニジン、ペオニジン、マルビジンのグルコース配糖体)を、ビルベリーエキスから酵素(-ガラクトシダーゼ)処理、カラムクロマト、分取HPLCにより大量に精製する。

(2) *in vitro* の生理的条件下(pH 7.4, 37)でアントシアニンの分解過程と分解産物を、UV-VIS スペクトルと HPLC - フォトダイオードアレイ検出器で経時的に追跡する。

(3) (2)の分解反応で生じるアントシアニンの無色の反応中間体および最終分解産物を、HPLC で分離して MS と NMR でその構造を決定する。

(4) *in vivo* におけるアントシアニンの無色代謝物の機能性を評価するため、頸静脈カテーテルを挿入したラットに、精製アントシアニンを経口投与して経時的に採血を行い、アントシアニン(とそのアグリコン構造を保持した代謝物)と脂質過酸化物量の血中濃度を測定する。脂質過酸化物の定量は血清にラジカル開始剤を添加し、生成するマロンジアルデヒドを HPLC で測定する。

(5) (4)で得られた結果を用いて、脂質過酸化物生成抑制能がアグリコン構造を保持したアントシアニンの血中濃度だけで説明できるか検討し、生体内の機能性退色代謝物の存在を評価する。

(6) アントシアニン投与後の動物血液中の無色代謝物のスクリーニングと同定を、HPLC、MS、NMRで行い、経時的測定により無色代謝物の体内動態を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) ビルベリーエキスは5種のアグリコンそれぞれにグルコース、ガラクトース、アラビノースが結合した15種のアントシアニンを含んでいるが、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ処理によりガラクトース配糖体が加水分解され、次いで酸加水分解によりアラビノース配糖体が加水分解され、生じたアグリコンは酢酸エチル抽出で除去される。酢酸エチル抽出後の反応液をHP-20カラムにかけ、デルフィニジン、シアニジン、ペツニジン、ペオニジン、マルピジンのグルコース配糖体の混合物を得た。これをMCICラムで各アントシアニンに富む画分に分画し、最終的に分取HPLCで純度98%以上の5種のアントシアニンを得た。

このようにして、高純度の上記5種のアントシアニン(グルコース配糖体)の、精製標品をグラムオーダーで得る比較簡便な方法を確立した。

また、アントシアニンの大量精製法の一つとして、安価で市販されているフラボノール配糖体であるルチンのケトン基を金属Mgで還元し、シアニジン配糖体に変換する方法を確立した。この還元反応はバッチ法ではうまく進行しないが、Mg粉末を充てんしたカラムにルチン溶液を通過させる事で円滑に進行し、容易にシアニジン配糖体を大量に得ることができた。

さらにビルベリーエキス以外の食品素材からのアシル化アントシアニンを含めたアントシアニン類の精製法の確立も進めている。

(2) 経口投与後4時間以降では、ラット腸管内のアントシアニンがほとんど退色している事を確認した。また、シアニジン3グルコシドの静脈投与後、尿および胆汁中へのシアニジン3グルコシドとそのアグリコン構造を保持した代謝物の回収率は30%程度である(前掲論文1)。これらの事実は、経口摂取したアントシアニンが腸管および血中で無色代謝物に変換され、それが生体内での機能発現に寄与していることを強く示唆する。

腸管でのシアニジン3グルコシドの糖部分の加水分解の可能性を検討するため、シアニジン3グルコシドをラット腸管ホモジネ

ートおよび $\alpha$ -グルコシダーゼと反応させたところ、4時間の反応で加水分解されるシアニジン3グルコシドは僅か10%にも満たないことから、アントシアニンは消化管内で配糖体のまま退色すると考えられる。そこで、生体内で産生される無色代謝物の知見を得るために *in vitro* でのアントシアニンの分解を検討した。

(3)(1)で得られた5種の精製アントシアニン(デルフィニジン、シアニジン、ペツニジン、ペオニジン、マルピジンの3-グルコシド)の *in vitro* での生理的条件下(pH 7.4)での分解過程と分解産物をUV-VISスペクトルとHPLC-フォトダイオードアレイ検出器で追跡した。

いずれのアントシアニンも一次反動的に分解退色し、それに伴い350nm付近に吸収極大を持つ、退色産物と考えられる液クロピークが現れる。このピークは各アントシアニンの安定性を反映し、5~10時間で極大となり、その後は減少していくので分解過程の中間退色産物と考えられる。

この中間退色産物を同定するために、LC-タンデムMS分析を行った。いずれのアントシアニンでも、アグリコンのレトロカルコン配糖体に対応するプロトン付加分子ピークが明瞭に検出された。従来アントシアニンの分解過程で生じるとされていたが、非アシル化アントシアニンについては報告が無かったレトロカルコンを、初めて具体的かつ明確にとらえることができた。

このレトロカルコンは酸性条件化で、一部が元のアグリコン構造に戻ることも明らかになった。

(4) アントシアニンの分解反応の進行に伴い、反応中間体であるレトロカルコン配糖体が減少し、それと同時に無色の最終分解産物のもとと考えられる幾つかのHPLCピーク現れる。

現在のところ、これらの最終分解産物の単離やHPLCでの分析条件は確立できていないが、TLC上に蛍光を発する物質を検出しており、その蛍光色から比較的共役系の大きくない(ベンゼン環1~2)化合物であると推測される。

現在これらの無色の最終分解産物の単離を進めており、近いうちにMSとNMRによる化合物の同定とHPLC分析条件の確立が可能な状況である。

*in vitro* での無色分解産物の単離・同定により、生体内で生成する退色代謝物の対照標品得られることになり、*in vivo* での研究の進展が期待される。

(5) *in vivo* の系では、アントシアニンを

経口投与したラット血中のインタクトのアントシアニンおよび、アグリコン構造を保持した代謝物のHPLCによる分析法を既に確立し、それらの体内動態について幾つかの論文として雑誌に報告してきた。

しかしながら、レトロカルコンを含めた無色代謝物のHPLC分析は、アントシアニン投与後のラット血清中の、インタクトノアントシアニンとアグリコン構造を保持した代謝物に妨害されるので、これまでの代謝物研究で用いてきた血清前処理法では実施不可能である。このため、アントシアニンの無色代謝物の分離、同定、体内動態などについては、これまでのところ知見が得られていない。

現在、アントシアニンと有色代謝物を的確に除去できる血清前処理法の開発とHPLCカラムの選択やカラムスイッチング法の導入など、無色代謝物の分析法の確立を進めている。

(6) 血中アントシアニンによる血中脂質過酸化生成抑制については、現時点では十分なデータが得られておらず、過酸化脂質の定量法の確立を進めている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1件)

一柳孝司、波田野義比古、他3名

Identification of colorless products from Anthocyanins incubated under physiological environment 3rd International Conference on Polyphenols and Health

2007年11月26日(京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

波田野 義比古(YOSHIHIKO HATANO)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授  
80113025

### (2) 研究分担者

一柳 孝司(TAKASHI ITIYANAGI)  
新潟薬科大学・薬学部・准教授  
00288226