

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20119

研究課題名（和文）乳児期におけるフラボノイド摂取量と薬物代謝酵素活性の関連

研究課題名（英文）Association between flavonoid intake and drug-metabolizing enzyme activity in infants

研究代表者

石坂 朱里 (Ishisaka, Akari)

兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：30724463

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：フラボノイドは野菜や果物から日常的にヒトが摂取している食品成分である。妊娠・授乳期において母親が摂取したフラボノイドは子へ移行すると想定されたため、本研究では、その移行量や生理作用について究明した。フラボノイドの1種であるケルセチンを授乳期のマウスに摂取させたところ、乳汁からケルセチンとその代謝物が検出された。この乳汁を摂取した仔マウスの血液からもケルセチンとその代謝物が検出された。以上から、フラボノイドは乳汁を介して乳児に移行することが初めて明らかとなり、乳児生体内で生理活性を発現する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドの生体利用性や生理活性に関しては、すでに膨大なデータの蓄積があるが、乳汁中のフラボノイドについてはほとんど情報がなく、乳児への移行量や生理作用についても不明であった。本研究では、フラボノイドを摂取したマウスの乳汁にフラボノイドが存在することおよび乳仔マウスにフラボノイドが移行していることを初めて明らかにした。今後、フラボノイドの種類、投与量および投与期間を変更して詳細な解析を行うことで、フラボノイドの機能性について新たな知見が得られる可能性がある。将来的にフラボノイドの重要性が提唱できれば、野菜や果物の積極的な摂取の更なる推奨や、人工乳へのフラボノイド添加等の波及効果も期待される。

研究成果の概要（英文）：Flavonoids are consumed daily from fruits and vegetables. Flavonoids consumed by pregnant and lactating mothers are assumed to be transferred to their infants. In this study, we investigated the amount of flavonoids transferred and their physiological effects. Lactating mice consumed the flavonoid quercetin, and quercetin and its metabolites were detected in their milk. Quercetin and its metabolites were also detected in the blood of suckling mice that consume the milk. These results indicate that flavonoids are transferred to infants via milk for the first time, suggesting that flavonoids may have physiological activity in the infant.

研究分野：食品機能学

キーワード：フラボノイド 乳汁 薬物代謝 ビリルビン マウス 乳児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは、植物が生成するジフェニルプロパン構造を基本骨格とする化合物群である。フラボノイドを豊富に含む食品の摂取は、メタボリックシンドロームの危険因子を改善し、心血管疾患リスクを低減すると報告されている (Quinones et al., *Pharmacol. Res.*, 2013)。その一方で、サプリメントとしての過剰摂取による害作用の誘発が問題視されており (Mazzanti et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2009)、安全性を評価するうえでのフラボノイドの適切な摂取量に関する知見が社会的にも必要とされている。

フラボノイドはヒトにとっては生体異物であるため、摂取後は薬物代謝酵素による抱合化後に体外へ排泄される。抱合酵素の中でも UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) はその中心的役割を担っており、複数の分子種が存在する。そのうち、UGT1A1 および UGT1A7~10 については、フラボノイドを基質とすることが報告されている (Ikushiro et al., *Vitamins*, 2009)。また、興味深いことに、フラボノイドの中でも 5, 7 位に水酸基を有するクリシンやケルセチン等には、*in vitro* において UGT1A1 の発現誘導作用が認められていることから、フラボノイドは自身を代謝する抱合酵素の発現レベルの調節に関与すると推察される (Sugatani et al., *Biochem. Pharmacol.*, 2004)。一方、UGT1A1 は、ビリルビンの代謝に関わる分子種でもある。生体内におけるビリルビンの生合成は哺乳類で認められるが、特にヒトでは高ビリルビン血症 (新生児黄疸) が約 90% の新生児に発症しており、重症化すると脳内に侵入したビリルビンにより神経障害が生じる。この原因として肝臓および小腸でのビリルビンの代謝不全が報告されている (Fujiwara et al., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2018)。

近年、晩婚化や少子化が目立つ日本において、乳児期のケアは一時代前に比べると充実し、より注意が注がれている。特に、2009 年に世界保健機関 (WHO) が母乳栄養に関するガイドラインを発表したことから、日本や欧米諸国では母乳育児の啓発や支援が進んでいる。乳汁中には、必要な栄養素に加えて、生体防御機能を補うタンパク質、オリゴ糖、および多価不飽和脂肪酸等が含まれていることから、感染症やアレルギー等の発症を有意に減少させると報告されている (Ip et al., *Evid Rep Technol Assess*, 2007)。一方、乳汁中のフラボノイドに関する報告例は限られているが、これまでにケルセチン、カテキンおよびヘスペレチンなどが検出されており (Song et al., *Nutrition*, 2013; Romaszko et al., *Mol. Nutr. Food Res.*, 2014)、総フラボノイド濃度は μM オーダーになると概算されている。しかしながら、乳汁から乳児へのフラボノイド移行量および乳児におけるフラボノイドの生理作用については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、「乳児期におけるフラボノイド摂取量と薬物代謝酵素活性の関連」について究明することを目的とした。特に、乳児期に摂取したフラボノイドが UGT1A1 を活性化することで、ビリルビンの代謝を促進し、高ビリルビン血症の予防に寄与するか否かに着目し、ヒト肝臓由来細胞株 HepG2 および ICR マウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) ビリルビンの抱合化を促進するフラボノイドの探索

HepG2 細胞におけるビリルビンの抱合反応を指標として、フラボノイドによるビリルビン代謝促進作用を検討した。6 well プレートに播種した HepG2 細胞の培養上清に $25 \mu\text{M}$ となるよう各フラボノイドを添加した。フラボノイド添加培地は 24 時間毎に交換し、全 3 日間培養した。その後、FBS-free 培地で細胞を洗浄し、 $25 \mu\text{M}$ のビリルビンを添加して 6 時間培養後に培地を回収した。培地に含まれるビリルビンおよび抱合型ビリルビン (モノグルクロニドおよびジグルクロニド) を四重極飛行時間型質量分析装置 (LC-QTOF-MS) にて分析した。

(2) 乳仔マウスの薬物代謝機構に対するフラボノイドの影響

研究成果 (1) において、ビリルビン抱合化の促進作用が認められたフラボノイド 5 種のうち、食経験が豊富でバイオアベイラビリティに関する報告例が多いケルセチンをまず用いて動物実験を実施した。

マウスの飼育とサンプル採取方法

7 週齢の雌雄 ICR マウスに AIN-93G 飼料を 1 週間自由摂取させたのちに、引き続き AIN-93G を与えるコントロール群と 1%ケルセチン添加飼料群に分けて飼育した。飼育期間中は、マウスの体重および摂餌量を定期的に測定した。雌雄 2 対 1 の同居を行い、妊娠が認められた雌マウスは分娩予定日 5 日前から単飼育とした。分娩日を生後 0 日として、離乳直前の生後 12 日目に母仔マウスの解剖を行い、血液、膀胱尿、肝臓および小腸を採取した。血液は、抗凝固剤を添加して遠心分離することで血漿と血球画分に分けた。乳汁については、分娩後 8 日および 12 日 (解剖直前) に母仔を同ケージ内で仕切り板を用いて 4 時間隔離後、イソフルラン麻酔下でオ

キシトシン投与後にマウス用搾乳器を用いて採取した。生体試料採取後は、実験に用いるまで-80°Cで保存した。

生体試料中ケルセチンおよびケルセチン代謝物の定量

母仔マウスの血液試料(血漿および血球画分)について、それぞれにアスコルビン酸と酢酸を添加してよく混合した。血液中ケルセチンは、そのほとんどがグルクロン酸や硫酸、メチル基などが複数結合した代謝物として存在していることから、血液中の総ケルセチン濃度を定量するために脱抱合酵素(sulfatase H-1)を添加し、37°Cで30分間反応させた。並行して、脱抱合処理をしないサンプルも調製した。ルテオリン(内部標準)とアセトンを添加後によく混合し、遠心分離した。得られた上清を窒素気流下で乾固し、LC-QTOF-MS分析で用いる初期溶媒に再溶解した。尿試料についても同様に調製した。乳汁試料については、脂質割合が高いため事前にヘキサンで脱脂を行い、その後は上記同様に調製した。

ケルセチン代謝物のLC-QTOF-MS分析においては、標品が入手できたケルセチン-3-グルクロニド(Q3GA)、ケルセチン-3'-サルフェイト(Q3'S)、および3'メチル化ケルセチン(イソラムネチン, IRH)を、multiple reaction monitoring (MRM)モードにて分析を行い、予め作成した検量線に当てはめることで定量した。その他の代謝物については標品が入手困難であったため、精密質量測定による定性分析のみを行った。

肝・小腸ミクロソームにおける薬物代謝酵素発現量および酵素活性の解析

上記の実験で採取した母仔マウスの肝臓と小腸からミクロソーム画分を調製した。各ミクロソーム試料のUGT1A1タンパク質発現量について、ウェスタンブロッティングにより解析した。ローディングコントロールにはGAPDHを用いた。

酵素活性については、ミクロソーム試料へのビリルビンおよびウリジンニリン酸グルクロン酸(UDPGA)の添加により生じるビリルビングルクロン酸抱合体量を指標とした。試料溶液を37°Cで0, 10, 20, 30および60分間インキュベート後に有機溶媒を添加して酵素反応を停止後、遠心分離を行った。得られた上清に内部標準を加えて、LC-QTOF-MSにて分析した。

4. 研究成果

(1) ビリルビンの抱合化を促進するフラボノイドの探索

UGT1A1の酵素活性促進作用がすでに報告されているフラボノイド5種(クリシン、ジオスメチン、アピゲニン、バイカレインおよびケルセチン)のHepG2細胞への前処理によって、培養上清中のビリルビンモノグルクロニドおよびジグルクロニドの生成量が増加することが確認された。

(2) 母から乳仔へのフラボノイド移行

各生体試料のLC-QTOF-MS分析により、ケルセチンを摂取した母マウスの乳汁と、母仔マウスの血液および尿試料にケルセチン代謝物が存在することが初めて明らかとなった。ケルセチン代謝物のうち、Q3GAとQ3'S濃度を比較すると、乳汁および血液試料ではQ3'Sのほうが高濃度であった。興味深いことに、母マウスの血液に比べて乳汁中の総ケルセチン濃度が顕著に高かったことから、ケルセチンが乳汁中に蓄積されている可能性が示唆された。また、脱抱合処理をしていない血液試料からはケルセチンアグリコンがほとんど検出されなかった一方で、乳汁試料からはアグリコンが検出され、その濃度が顕著に高いことも明らかとなった。この理由として、乳汁中、あるいは血液から乳汁が生成する過程で、ケルセチン代謝物が脱抱合された可能性が考えられた。一般的に、アグリコンは代謝物に比べて強い生理活性を有することから、乳汁を摂取した乳児生体内においてケルセチンが何らかの機能性を発現する可能性が強く示唆された。

また、母仔の血液試料において、血漿だけでなく血球画分からもケルセチン代謝物が検出された。したがって、血液中のケルセチンを正確に定量する上で、これまで分析対象とされていなかった血球画分の分析も重要であることが示された。

(3) 肝・小腸ミクロソームにおけるUGT1A1発現量と酵素活性に対するケルセチンの影響

仔マウスが摂取したケルセチンが薬物代謝酵素活性を調節するか否かについて検討した。予想に反して、仔マウス肝・小腸ミクロソームにおいて、コントロール群とケルセチン群間で、UGT1A1タンパク質発現量およびビリルビン抱合体生成量に有意差は見られなかった。

以上をまとめると、本研究によって、乳仔期におけるフラボノイドの母仔伝播が初めて明らかになった。さらに、乳汁中のケルセチンアグリコン濃度が血液中に比べて顕著に高く算出されたことから、乳汁を摂取した仔マウスにおいてフラボノイドが何らかの生理活性を発現することが期待された。HepG2細胞を用いた検討では、フラボノイドがビリルビン代謝を促進することが確認された一方、仔マウスの肝・小腸ミクロソームを用いた検討においては、ビリルビン代謝に関わるUGT1A1のタンパク質発現量や酵素活性に対するケルセチン投与の影響は認められなかった。この一因として、マウスは一般的にヒトよりも代謝酵素の比活性が高いことが知られており、フラボノイド摂取による変動が起こりにくい可能性が示唆される。また、これまでにフラ

ボノイドの母子伝播について報告例がなかったことから、本研究では生体試料からフラボノイドを確実に検出するために過剰量のケルセチンを長期摂取させたが、今後はフラボノイドの種類や投与量および投与期間を変更して追試をすることで、薬物代謝機構に対するフラボノイドの異なる作用がみられるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上明、石坂朱里、吸原慧紀、河口詩歩、藤原なお
2. 発表標題 ホルミシスを介したポリフェノール類の新しい機能性発現機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原なお、向井理恵、村上明、石坂朱里
2. 発表標題 乳児の薬物代謝機構に対する母乳中フラボノイドの影響
3. 学会等名 2021年度日本フードファクター学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原なお、向井理恵、村上明、石坂朱里
2. 発表標題 乳汁中ケルセチンの摂取が新生仔マウスの薬物代謝機構に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤衣織、横田しなの、村留梨花、村上明、石坂朱里
2. 発表標題 血液試料におけるquercetin及び代謝物の定量方法
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	向井 理恵 (Mukai Rie)	徳島大学大学院・社会産業理工学研究部・准教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------