

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450196

研究課題名(和文)フラボノイドの胆汁排出における生理的意義の検索

研究課題名(英文)Physiological function of flavonoid metabolites in bile

研究代表者

橋本 直人 (Hashimoto, Naoto)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：20414758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：農作物に豊富に含まれるアントシアニンやケルセチンといったフラボノイドは、吸収後、速やかに胆汁から排出される。胆汁中には、様々な脂質が含まれているが、胆汁中のフラボノイド代謝物が胆汁の組成に与える影響は十分わかっていなかった。そこで、胆汁中フラボノイド代謝物の役割をラットおよびマウスで検討した。アントシアニン摂取により、短期的に胆汁中に中性脂肪が排出され、肝臓中の中性脂肪も減少した。一方、ケルセチン摂取により、中性脂肪以外の胆汁中の脂質が全般的に減少した。次に、アントシアニンを豊富に含む黒大豆成分を胆石形成ラットに投与したところ、胆石症の発症率が減少する傾向がみられた。

研究成果の概要(英文)：Flavonoids are rich in fruits and vegetables. Flavonoids after absorption into the body are metabolized and mainly excreted via bile which abundantly contains various lipids. However, influence of biliary flavonoid metabolites on the biliary lipid profiles are not well-studied. In this study, we investigated the influence of flavonoids on biliary composition in rats and mice. In rats given one-shot administration of anthocyanin, biliary triglyceride (TG) increased and hepatic TG content subsequently decreased, whereas in rats given quercetin, biliary lipids except but TG were totally reduced. A black soybean seed coat extract, which abundantly contains anthocyanin, lowered excretion of cholesterol into bile and tended to prevent gallstone formation.

研究分野：食品栄養学

キーワード：アントシアニン 中性脂肪 胆汁 胆石 ラット コレステロール

### 1. 研究開始当初の背景

農作物に豊富に含まれるフラボノイドは、これまでの研究では生体内、特に血液中にはほとんど検出されないということが報告されていることから、フラボノイドの生体内での生理活性に疑義が生じていた。我々の先行研究においても、高濃度のアントシアニンを投与したラットにおいて、血中ではほとんど検出されなかった。しかし、胆汁中にはその代謝物が高濃度存在し、一時的に生体内に存在することを確認した。この時、フラボノイドを単に胆汁中に廃棄するだけであれば、小腸からの吸収を抑制した方が代謝に必要なエネルギーを抑制できる。そのため、肝臓まで引き入れたことに生理的意義が存在する可能性があると考えた。しかし、フラボノイドの胆汁排出という現象に着目した研究は少なく、その生理的意義はよくわかっていない。(1)そこで、コレステロール (Chol)、胆汁酸 (BA)、リン脂質 (PL) 等の脂質を豊富に含む胆汁の中に高濃度にフラボノイド代謝物が存在するという点に着目し、フラボノイドが胆汁中の脂質組成に何らかの影響を与えるという仮説を立てた。

(2)フラボノイド代謝とは、フラボノイドに親水基および疎水基を抱合させて両親媒性を持たせ、体外排出を促進させる反応と考えられている。一方、胆汁中には BA や PL といった両親媒性の脂質が高濃度に存在し、胆汁中 Chol の可溶化を促進しており、このバランスが崩れると胆石症を発症することが知られている。そこで、胆汁中のフラボノイド代謝物はこれらの両親媒性脂質が有する Chol 可溶化能を補償し、胆石症に対し抑制的に作用するという仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

(1)胆汁中に排出されるフラボノイド代謝物濃度と各脂質濃度を継時的に測定し、胆汁中のフラボノイド代謝物排出と脂質分泌の関連性を評価する。

(2)胆汁中の脂質組成の不均衡によって引き起こされる胆石症に対して、フラボノイド摂取が与える影響を評価する。

### 3. 研究の方法

(1)麻酔下の Wistar ラット (雄性、6 週令) に、胆管および十二指腸にカテーテルを留置し、3 mM のフラボノイド溶液 (農作物中に豊富に含まれるケルセチン (Q) およびアントシアニンの一種である cyanidin-3-glucoside (C3G)) または溶媒 (対照) を十二指腸に直接投与し、投与前および投与後 0~120 分まで連続的に胆汁を採取した (各群 6-7 匹)。胆汁採取後、肝臓を採取した。胆汁中の各フラボノイド代謝物は HPLC で分離定量した。胆汁および肝臓中の脂質 (Chol、TBA、PL、TG) は市販のキットを

用いて測定した。

胆汁中のフラボノイド代謝物の脱抱合反応は、微生物由来の  $\beta$ -グルクロニダーゼおよびサルファターゼを用いて行い、HPLC の標準物質となるフラボノイドの試験管内合成は、Bolling らの方法<sup>[1]</sup>を参考にした。

また、動物実験の結果を補強するために、肝臓のモデル細胞の一つである HepG2 細胞に、C3G および Q を 48 時間作用させて、細胞内の脂質含量を測定した。また、TG の原料である脂肪酸の合成酵素の細胞内含量についてもイムノプロット法により測定した。

(2) 32 匹の ICR マウス (雄性、6 週令) を 4 群に分け、正常食 (対照、AIN-93G 組成飼料)、胆石形成食 (LG、0.6% Chol および 0.2% コール酸ナトリウムを AIN-93G に添加した飼料) および LG 食にアントシアニン製剤 (黒大豆種皮抽出物、BE) またはケルセチン (Q) を 0.2% となるように添加した食餌を 4 週間摂取させた。麻酔下で血液採取後、放血死させ、胆のう、肝臓を採取した。

それぞれのサンプルの Chol、TBA、PL および TG 濃度を上記キットを用いて測定した。また、胆汁を顕微鏡下で観察して結晶が確認出来た場合、胆石形成動物とカウントした。胆汁中の Chol、TBA、PL 濃度から Chol の結晶化の指標であるコレステロール飽和度 (CSI) を算出した<sup>[2]</sup>。

さらに、肝臓の一部分から mRNA を抽出し、脂質代謝に関連するタンパク質の mRNA 量をリアルタイム PCR により定量した。

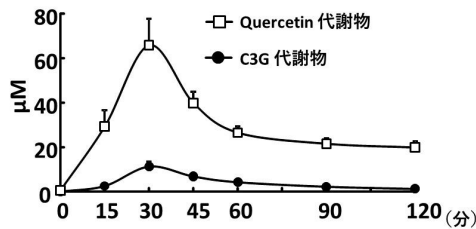
AIN-76 組成飼料に 1.8% Chol および 0.6% コール酸ナトリウムを添加した胆石形成食を 4 週間で与えた Wistar ラット (雄性、6 週令、6 匹) を、麻酔下で胆管カテーテルを留置し、胆汁を 1 時間採取した。胆汁は遠心分離後、ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンでろ過滅菌した。下記の方法でフラボノイド代謝物を塗布したマイクロプレートのウェルに、ろ過滅菌した胆汁を無菌的に分注した後、フィルムで密閉し、CO<sub>2</sub> インキュベーター中に保持し、顕微鏡下で、Chol の結晶の有無を 2 日間観察し、フラボノイド代謝物の Chol 結晶化阻害能を評価した。マイクロプレートに塗布したフラボノイド代謝物として、メチル化 C3G およびメチル化 Q をさらにグルクロン酸抱合体にしたものを試験管内で人工的に合成した<sup>[1]</sup>。胆石形成に抑制的に作用すると考えられている胆汁酸 (コール酸ナトリウム) をポジティブコントロールとして、各フラボノイド代謝物、または代謝前のフラボノイドを滅菌ろ過し、マイクロプレートのウェルに分注し、凍結乾燥により乾固して試験プレートを調製した (胆汁分注時の終濃度で 100  $\mu\text{M}$ )。

また、胆汁のみを分注して、Chol の結晶を生成させたサンプルに Q および C3G 代謝物を添加し、Chol の結晶の再可溶性の有無についても評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 胆汁中の C3G の代謝物は、メチル化された C3G のみであり、一方、Q の主要な代謝物は、脱抱合反応の結果から Q およびメチル化 Q の硫酸抱合体あるいはグルクロン酸抱合体であることが示唆された。また、胆汁中には C3G および Q そのものは検出されなかった。胆汁中のフラボノイド代謝物は投与後 30 分でピークとなり、その後、120 分までは胆汁への排出が確認された。しかし、Q 代謝物の濃度は C3G 代謝物の濃度の 6~10 倍となり、フラボノイドの種類により排出速度に差が見られた (図 1a)。胆汁中のフラボノイド代謝物の排出量は、Q 代謝物で最大約 65  $\mu\text{M}$ 、C3G でも約 10  $\mu\text{M}$  であった。

(A) 胆汁中フラボノイド代謝物



(B) 胆汁中中性脂肪排出量

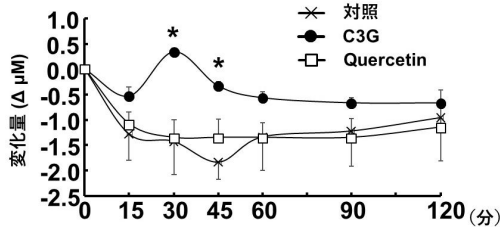


図1 フラボノイド投与による胆汁組成の経時的変化  
数値は平均±標準誤差 (n=6-7)  
\*同一時間の対照と比較して有意な差 ( $P < 0.05$ )

C3G 投与による脂質の胆汁排出に関しては、中性脂肪の胆汁排出量の一時的な亢進が見られた (図 1b)。また、胆汁採取後の肝臓中の中性脂肪含量が、対照区のものより有意に低下していた。さらに HepG2 細胞を用いた実験では、C3G 処理した細胞においてのみ、細胞内中性脂肪量が対照よりも有意に低下していたが、細胞内の脂肪酸合成酵素量には変化が見られなかったことから、C3G 処理した HepG2 細胞においても中性脂肪の合成低下ではなく、排出が促進された可能性がある。以上のことをまとめると、C3G 投与による胆汁中への中性脂肪排出が肝臓中脂質含量低下に寄与していることが示唆された。この結果は、胆汁中への排出量の多いケルセチンでは見られなかったことから、C3G に特徴的な作用であると考えられる。

一方、ケルセチン投与ラットでは、胆汁中の主要な脂質である Chol、TBA、PL が投与後 15 分以降、対照と比較して有意に低下あるいは低下する傾向が見られた。肝臓におけ

る TBA の胆汁排出輸送体である MRP2 は、胆汁酸抱合体におけるグルクロン酸および硫酸残基を認識して排出するということが報告されている<sup>[3]</sup>。このことから、グルクロン酸および硫酸抱合体が主体である Q 代謝物は、MRP2 を介して胆汁への排出が促進されたため、C3G 代謝物よりも排出量が多くなったと考えられ、一方、Q 代謝物が胆汁酸と競合した結果、胆汁中への TBA 排出が抑制された可能性がある。

(2) この実験で用いた、BE 製剤のフラボノイド組成は、総アントシアニン含量が 67mg/g、カテキン類の重合体であるプロシアニジン類が 406mg/g であった。

胆石形成食摂取により、胆のう重量および肝重量が対照動物と比較して有意に増加したが、統計的な有意差は見られなかったものの、胆のう重量に関しては LG 群と比較し、BE 群および Q 群で 24% 程度減少した。

胆石の発症率は、LG 群と比較して BE 群ではおよそ 1/3 となった (表 1)。胆汁中の脂質濃度に関して、Chol 濃度は LG 群で対照と比較して約 5.7 倍、Q 群で 5.5 倍であったのに対し、BE 群では約 4.4 倍であった (表 1)。また、胆汁中 PL 濃度は、LG 群、BE 群、Q 群で対照と比較して約 2 倍であったが、胆汁中 TBA 濃度は食餌による違いは見られなかった。これらの数値を基に CSI を算出したところ、対照では 64% であったのに対し、LG 群および Q 群では約 200%、BE 群では約 180% と、わずかだが改善される傾向が見られた (表 1)。以上のことから、LG 食摂取による胆石形成は主に胆汁中への Chol 排出の促進が原因であることが示唆された。

表 1 食餌成分の違いによる胆石発症因子の変化

	発症率 (%)	Chol <sup>①</sup> (mM)	CSI (%)	Abcg5 mRNA
対照	0	1.57±0.21	64±8	1.00±0.1
LG	43	8.91±1.29*	202±31*	2.08±0.29*
Q	38	8.56±0.85*	205±22*	1.75±0.31
BE	13	6.99±0.57*	176±18*	1.72±0.27

数値は平均±標準誤差 (n=8)

①胆汁中コレステロール濃度

\*対照と比較して有意な差 ( $P < 0.05$ )

そこで、肝臓に発現している各種脂質の輸送担体の mRNA 量を測定したところ、肝臓から胆汁に Chol を排出する輸送担体である Abcg5 の mRNA が LG 群で対照と比較して有意に増加していたのに対し、Q 群および BE 群では増加傾向はあったものの、対照との有意な差は認められなかった (表 1)。この時、胆汁中の Chol 濃度と Abcg5 mRNA 発現量の間には有意な正の相関 ( $r = 0.464$ ,  $P < 0.01$ ) が見られたことから、胆汁中への Chol 排出に ABCG5 発現が関与している事が示唆された。当初の仮説では、両親媒性を持った

フラボノイド代謝物がコレステロールの可溶性を増加させることにより胆石症の発症を抑制すると考えていたが、結果として、肝臓における脂質代謝を改善することで胆汁中の Chol 結晶化の抑制に影響したと考えられる。

次に、LG 食摂取マウスでは顕著な脂肪肝が見られたことから、肝臓中の脂肪含量を測定したところ、総脂質量で LG 群、Q 群、BE 群で有意に増加していたものの、肝臓中の過酸化脂質濃度について 4 群間で差は見られなかった。また、4 週目の血漿中の中性脂肪濃度は、対照と比較して、LG 群で 48%、Q 群で 57%、BE 群で 56% まで低下していたことから、LG 食の摂取により中性脂肪排出が抑制され、単純脂肪肝が引き起こされたことが示唆された。

そこで、肝臓中の脂肪酸代謝関連タンパク質の mRNA 発現量を測定したところ、脂肪酸合成酵素、脂肪酸酸化酵素の mRNA 量に群間の差は見られなかったが（ただし、脂肪酸合成酵素に関しては、BE 群で他の 3 群より高値となる傾向が見られた）、肝臓において TG を切り出す *Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3* (*Pnpla3*) および肝臓から TG を搬出する *Microsomal TG transfer protein* (*Mttp*) の mRNA 発現量が、LG 群、Q 群、BE 群で有意に低下していた。以上のことを総合すると LG 食は肝臓中の PNPLA3 および MTP 発現を抑制したことで、肝臓から血液への TG の移行が阻害され、脂肪肝を引き起こしたと考えられる。

また、この実験における TG 代謝に関しては、先の実験 ((1)) とは投与量や条件が異なることから単純比較はできないが、(1) では、C3G 摂取により肝臓から中性脂肪排出が促進され、肝臓の TG 量が減少すると考えられたが、長期的に摂取した場合、肝臓における脂肪酸合成が補償的に亢進した可能性がある。

コレステロール高含有胆汁の試験管内胆石形成 (Chol 結晶化) 試験については、コール酸、Q および C3G のみを塗布したウェルでは 1 日目の段階で針状の結晶が確認されたが、Q 代謝物および C3G 代謝物を塗布したウェルではコレステロールの結晶は見られなかった (図 2)。この結果は 2 日目でも変わらず、Q および C3G 代謝物の存在下では結晶化は見られなかった。しかし、一度形成された Chol 結晶に対しては、どちらの代謝物も再可溶性は示さなかった。以上のことから、フラボノイド代謝物は少なくとも胆石形成を抑制する特性を有する可能性がある。しかし、プレートへの塗布に用いたフラボノイド代謝物を合成する際に、抱合反応に用いる基質や肝臓から得られたミクロソームおよび細胞質を添加したが、コール酸ナトリウム、C3G、Q には、それらの成分は含まれていな

いことから、そういった成分が結晶化を抑制した可能性は排除できない。しかし、何らかの生体成分が胆石形成に抑制的に作用していたとしても、その生体成分を同定することができれば胆石症の発症予防に大きく貢献することから、いずれの場合でも、今後の詳細な研究が望まれる。

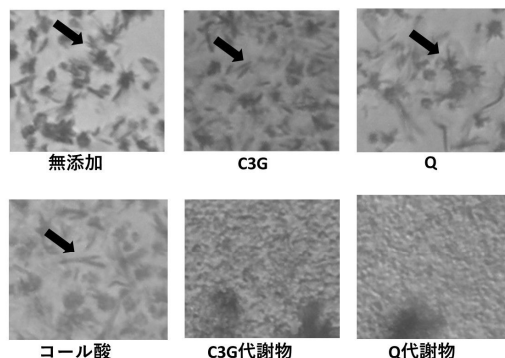


図2 コレステロール高含有胆汁の試験管内結晶化に対するフラボノイド代謝物の影響  
写真はインキュベート1日目の画像 (n=3)  
矢印は胆汁中に見られた針状結晶

本研究を総括すると、摂取したフラボノイドは、胆汁中の脂質組成に影響を与えたが、フラボノイドの種類によりその反応は異なることが示唆された。仮説では、フラボノイド代謝物が有する両親媒性が胆汁中の脂質組成に影響すると考えていたが、動物実験では、十分にそれを示すことは出来ず、むしろ、フラボノイドによる脂質代謝調節作用が示唆された。しかし、代謝の可能性を排除した試験管内での Chol 結晶化試験では、代謝物の存在下で Chol 結晶化が抑制されたことから、フラボノイド代謝物自体が胆汁・胆石形成に何らかの影響を及ぼす可能性はまだ残っており、今後の研究で解明していく必要がある。

#### 引用文献

- [1] Bolling, BW, *J Nutr Biochem* (2010) 21, 498–503
- [2] Carey, MC, *J Lipid Res* (1978) 19, 945–55
- [3] Zamek-Gliszczyński, MJ, *Drug. Metab. Dispos* (2011) 39, 1794–800

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Han Kyu-Ho, Hashimoto Naoto, Fukushima Michihiro.

Relationships among alcoholic liver disease, antioxidants, and antioxidant enzymes.

*World J Gastroenterol* (2016) 22: 37-49

(査読あり)

doi: 10.3748/wjg.v22.i1.37.

Hashimoto Naoto, Oki Tomoyuki, Sasaki Kazunori, Suda Ikuo, Okuno Sigenori.

Black Soybean Seed Coat Extract Prevents Hydrogen Peroxide-Mediated Cell Death

via Extracellular Signal-Related Kinase  
Signalling in HepG2 Cells.  
*J Nutr Sci Vitaminol* (2015) 61: 275-9  
(査読あり)  
doi: 10.3177/jnsv.61.275.

〔学会発表〕(計 5件)

橋本直人、韓圭鎬、福島道広  
有色馬鈴薯アントシアニン画分による  
C-1300N18 神経芽細胞腫細胞の間接的な活  
性化  
第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016 年 5  
月 14 日)  
武庫川女子大 (兵庫県・尼崎市)

橋本直人、韓圭鎬、福島道広  
Preventive effect of flavonoid ingestion on  
gallstone formation in mice  
BMB 2015 (2015 年 12 月 2 日)  
神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

橋本直人、韓圭鎬、佐々木一憲、奥野成倫、  
福島道広  
Relation of quercetin metabolism and lipid  
excretion into bile juice in rats  
第 69 回日本栄養・食糧学会大会 (ACN 2015)  
(2015 年 5 月 17 日)  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

橋本直人、沖智之、佐々木一憲、奥野成倫  
ラットの胆汁脂質組成に及ぼすフラボノイ  
ド投与の影響  
第 68 回日本栄養・食糧学会大会 (2014 年 6  
月 1 日)  
酪農学園大学 (北海道・江別市)

橋本直人、沖智之、須田郁夫、佐々木一憲、  
奥野成倫  
黒大豆種皮抽出物による肝細胞酸化障害抑  
制機構の解析  
第 86 回日本生化学会大会 (2013 年 9 月 12  
日)  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 直人 (Hashimoto, Naoto)  
(国研) 農研機構・食品研究部門・上級研  
究員  
研究者番号: 20414758

### (2) 研究分担者

韓 圭鎬 (Han, Kyu-Ho)  
帯広畜産大学・畜産学科・准教授  
研究者番号: 50553450  
(2014 年度から連携研究者)