

**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：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860086

研究課題名(和文)腸管内代謝実験モデル組み込み生物活性評価と天然素材からの肝保護物質の探索

研究課題名(英文)The research of intestinal metabolism experimental model built-in biological activity evaluation and liver protection substances from natural materials

研究代表者

土橋 良太(Tsuchihashi, Ryota)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：00369026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝保護活性を有すると思われる天然物より配糖体を多数分離し、それら化合物についてヒト由来腸内細菌株を用いた代謝研究をおこなった。また、それら天然物から得られた化合物、それらの代謝物に関して肝保護活性の評価を行った。分離してすべての配糖体は代謝を受けることが判明した。30種のヒト腸内細菌株をもちいた代謝実験をおこなったことにより、それぞれの代謝速度なども判明した。肝保護活性の測定の結果、rutinの最終代謝物のquercetin、eriocitrinの最終代謝物のeriodictyolに大幅な活性上昇が確認された。腸内細菌による代謝が、活性の賦活化に影響することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A lot of separating the glycosides from natural products that are likely to have hepatoprotective activity, was carried out metabolism studies using human-derived intestinal bacterial strain for those compounds. The compound obtained from their natural products, the evaluation of liver protective activity was carried out in terms of their metabolites. All glycoside isolated was found to undergo metabolism. By was carried out metabolism experiments using the 30 species of the human intestinal bacteria strain, it has also been found, such as each of the metabolic rate. As a result of the measurement of liver protective activity, significantly increased activity in the quercetin of the final metabolites of rutin and the eriodictyol of the final metabolites of eriocitrin was observed. Metabolism by intestinal bacteria has been suggested to affect the activation of activity.

研究分野：天然薬物学

キーワード：腸内細菌 薬物代謝 天然物 肝保護

## 1. 研究開始当初の背景

近年注目を浴びている機能性食品成分に、大豆中のダイズイソフラボンがある。世界中で数多くの研究がなされ、大豆イソフラボンの活性本体は、それらの腸管内代謝物である **equol** でないかと推測されている。大豆イソフラボンのヒト生体内での代謝及びそれらのエストロゲン活性を解明するため、ヒト尿中より以下に示す10種もの大豆イソフラボン由来代謝物を分離同定し、またそれらのエストロゲン活性も測定し非常に興味深い知見も得ている。それらの結果より、ダイズイソフラボンの生理活性を示すには、腸管内での腸内細菌による代謝が不可欠であることが判明した。現在までに、21世紀には国民病といわれる肝炎に着目し、天然素材からの肝保護物質の探索を行ってきた。その過程で、HepG2細胞を用いた **in vitro** 肝保護活性試験などを行ってきたが、**in vivo** 試験結果との不一致を経験し、生体内での代謝が活性の賦活化に重要ではないかと考えるようになった。さらに、天然薬物や機能性食品などが経口より摂取され、消化管内において代謝された後に、吸収されるものと考えられている。それゆえ、経口摂取時における生体内代謝を考える場合、消化管内でのそれら成分の代謝、特に腸内細菌での代謝による影響を考慮しなければならないと考えている。また、医薬品などの生体内代謝研究においては、肝臓での代謝（特に薬物代謝酵素など）に関しては比較的良好に研究されているが、第二の肝臓とも言われるほど代謝酵素に富んだ腸内細菌による代謝に関する研究は、特に不十分と言わざる終えない。さらには、天然薬物や機能性食品中の成分に関する詳細なヒト生体内での代謝の研究は、大豆イソフラボンや一部の生薬・天然薬物を除き、ほとんど研究が行われていないのが現状である。

それらのことから、腸管内薬物代謝実験モデルと **in vitro** の生物活性評価実験を組み

合わせることで、より迅速に、生体内での代謝が加味された天然薬物や機能性食品の肝保護活性の評価をでき肝炎治療薬の候補探索をできるのではないかと考え、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

- (1) 腸管内代謝実験モデルを組み込んだ肝保護活性評価試験を用いて伝承的に肝保護効果のある天然薬物や機能性食品の肝保護活性の解明。
- (2) 天然薬物や機能性食品に関しては、成分の分離精製を行い、この実験系を用いて活性解明。
- (3) 活性の認められた化合物に関しては、代謝の影響を考察するために、腸内細菌による代謝後の代謝物の分離精製、それらの構造決定を行い、腸内細菌による代謝と肝保護活性の活性相関を考察する。
- (4) 上記のように試験を行い、天然薬物や機能性食品の効果の評価及び探索を行い、肝炎治療薬のリード化合物を探索する。さらには、代謝物の構造解析から腸内細菌による代謝と活性の相関も明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 成分の分離・構造決定

肝保護活性を有すると思われる天然素材をメタノールを用いて抽出を行い、それらをシカゲル、ODS、ダイアイオンHP-20、Sephadex LH-20などのゲルによるオープンクロマト法に分離を行い、分離の効率化のためフラッシュクロマトシステム(CombiFlash Rf-75)も用いて分離を行った。単離した化合物に関しては、NMR及びMSスペクトル解析の結果に基づきそれぞれの化学構造を解析した。

(2) 腸内細菌株による代謝の解明

理化学研究所 微生物系統保存施設より入手した通性嫌気性菌 14 種、偏性嫌気性菌 14 種、好気性菌 2 種の合計 30 種の菌株を用いる。各腸内細菌株を、GAM 培地に播種し、37°C、嫌気状態で 24 時間、前培養した。次にその前培養液(100 μ L)を、サンプル(約 0.1mg)含む GAM 培地 (1.0mL)に加え、37°C、24 時間及び 72 時間、嫌気状態で培養する。その培養液を OASIS HLB 固相抽出カラムを用いて抽出し、その濃縮乾固したものを代謝実験サンプルとし、HPLC を用いて代謝を測定する。代謝が確認されたものに関しては、分離を行い構造を決定する。

(3) 肝保護活性評価

ヒト由来細胞である HepG2 細胞を用いて *in vitro* 肝保護活性試験をする。

①HepG2 細胞を 96 穴プレートに播種，CO2 インキュベーター内で 24 時間培養したものを試験に用いる

②各種代謝サンプルは連続的な希釈系を用い，適宜の濃度で添加する。

③その後、起炎剤として t-Bu000H 添加し、各サンプル濃度での吸光度を測定する。

④ 肝保護率は起炎剤および sample 非添加時の細胞数を reference，起炎剤添加での細胞数を control，さらに起炎剤および sample 添加時の細胞数を sample で表し，  
 $(\text{sample}-\text{control}) / (\text{reference}-\text{control}) \times 100$  で算出する。

4. 研究成果

(1) 肝保護活性を有すると思われる天然素材のレモン果皮、ダイダイ果皮、パセリ、そば、甘草のメタノールエキスを種々のオープンクロマト、フラッシュクロマトにより分離精製を行い、次の化合物を単離した。単離した化合物は、NMR 及び MS スペクトル解析に基づき、Eriocitrin, Apiin, Rutin, Liquiritin,

Liquiritin apioside, Isoliquiritin, Isoliquiririn apioside, Naringin, Neohesperidin, と同定した。

(2) 腸内細菌株 30 種を用いて上記の化合物の代謝の解析を行ったところ、上記すべての化合物で代謝物が確認された。代謝物の同定を行ったところ、糖部が代謝を受けた最終代謝物が得られた。(表 1)

	糖部	最終代謝物
Eriocitrin	Glc(6-1)Rham	Eriodictylo
Rutin	Glc(6-1)Rham	Quercetin
Naringin	Glc(2-1)Rham	Naringenin
Neohesperidin	Glc(2-1)Rham	Hesperetin
Apiin	Glc(2-1)Api	Apigenin
Liquiritin apioside	Glc(2-2)Api	Liquiritigenin
Isoliquiritin apioside	Glc(2-3)Api	Isoliquiritigenin
Liquiritin	Glc	Liquiritigenin
Isoliquiritin	Glc	Isoliquiritigenin
Glc ; glucose Rham ; rhamnose Api ; apiose		
(表1)		

菌株ごとの代謝を解析したところ、モノグリコシドの Liquiritin、Isoliquiritin は、すべての腸内細菌株ですみやかに最終代謝物への代謝が確認されたことから、ヒト腸内細菌叢の個人差による影響を受けにくいと考えられる。二糖の配糖体である Eriocitrin, Apiin, Rutin, Liquiritin apioside, Isoliquiririn apioside, Naringin, Neohesperidin は、限られた菌種でのみ代謝が確認され、さらには代謝の速度も遅かった。さらに糖部の末端糖の種類、末端糖の結合位置による代謝菌種の変化も確認された。これら二糖の配糖体化合物は代謝を受けにくいと考えられ、これらの化合物の代謝はヒト腸内細菌叢の個人差による影響を受けやすいと考えられる。

(3) ヒト由来細胞である HepG2 細胞を用いて *in vitro* 肝保護活性試験を行った結果、Rutin (EC<sub>50</sub> 200 μ M) の最終代謝物である Quercetin と、Eriocitrin (EC<sub>50</sub> 200 μ M) の最終代謝物である Eriodictyol にそれぞれ EC<sub>50</sub> 11.5 μ M、16.4 μ M の強い肝保護作用が確認された。

本研究により、腸内細菌による代謝が肝保護活性の発現に必要な事が示唆され、腸内細菌による代謝の重要性が示された。

## 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 2 件)

- ① 土橋良太、山本大貴、後藤直生、猪口智未、上野 菖、手島貴也、中野大輔、金城順英  
ヒト腸内細菌株による代謝研究(11)食品中に含まれる各種フラボノイド類の代謝研究 日本生薬学会第62回年会 2015年9月11日 岐阜
- ② 土橋 良太、福家 成美、手島 貴也、中野大輔、管 辰彦、稲葉 文利、細野 剛、金城順英 「王様のヨーグルト」種菌による豆乳成分の代謝に関する研究 日本薬学会第136年会 2016年3月28日 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土橋 良太 (Tsuchihashi Ryota)  
福岡大学・薬学部 助教  
研究者番号：00369026

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし