

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11113

研究課題名(和文) アントシアニン成分及びその代謝物の血液脳関門透過性の検討とその代謝機構解明

研究課題名(英文) Metabolic pathway and blood brain barrier permeability of anthocyanin component and its metabolites

研究代表者

松本 均 (MATSUMOTO, HITOSHI)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：00566292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：カシス、イチゴのアントシアニン(AC)濃縮エキスをラットに投与した。ACとその代謝物は尿中に多く検出され、血中、脳中では微量検出された。そこで血液脳関門(BBB)透過性をキットで評価した。結果、AC及びその代謝物はBBBを透過せず、Epigallocatechin, daidzein, Genistein, Equol, Nobiletinは高いBBB透過性を示した。RutinとFisetin, Resveratrol, Curcuminは低いBBB透過性を示した。この結果、ACは、BBBを透過せず、ACの脳機能改善効果は、ACが脳内で直接効果を持たず、血液循環改善などによる二次的効果と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト臨床試験などでアントシアニン(AC)の摂取が、認知機能低下の抑制効果があることが報告されている。また、そのメカニズムとして、神経細胞培養系にACを添加して、機能性を評価するin vitro試験が報告されている。しかし、ACの血液脳関門(BBB)の透過性については評価されていなかった。そこで、食品由来のACをラットに経口摂取させ、脳中のACと代謝物量を測定し、極微量検出した。また、キットを用いて透過性を評価したが、いずれも透過しなかった。よって、脳で検出されるACは、脳血管に吸着していて、脳には到達していないと判断された。AVの認知機能改善効果は、血流改善等による二次的な効果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cassis and strawberry anthocyanins (AC) were concentrated to prepare an extract powder of about 10% AC content. These extracts were administered to rats, and AC and its metabolites in blood, urine, and brain were quantitatively analyzed. AC and its metabolites were detected in urine, small amounts were detected in blood and brain, and it was confirmed that they were absorbed and transferred into the blood and excreted. Blood-brain barrier (BBB) permeability was evaluated with a BBB kit. As a result, AC and its metabolites did not permeate BBB, and Epigallocatechin was confirmed to permeate. Daidzein, Genistein, Equol, and Nobiletin showed high BBB permeability. Rutin, Fisetin, Resveratrol, and Curcumin showed low BBB permeability. Regarding AC, it does not permeate BBB, and the brain function improving effect of AC is not direct effect in brain by AC or metabolites, it is a secondary effect, for example, improving blood circulation.

研究分野：食品機能学

キーワード：Anthocyanin blood brain barrier nobiletin equol isoflavone

## 1. 研究開始時の背景

近年、ヒト臨床試験や動物実験により、食品中のアントシアニン(AC)の摂取が、認知機能の低下を抑制する効果があることが多数報告されている。また、そのメカニズム研究として、神経細胞培養系にACを添加して、その機能性を評価する *in vitro* 試験が報告されている。しかし、ACが、血液脳関門(Blood brain barrier, BBB)を通過することの確認はなされておらず、十分な機能性の解明ができていたとはいえなかった。また近年、ACを経口摂取した場合、消化吸收過程で、代謝物や分解物の報告がなされてきているが、これらの代謝物についても、脳への到達を確認する研究はなされていない。

そこで、食品由来のACを経口摂取した際に、ACあるいはその代謝物が、BBBを透過し、作用部位に到達することを確認しその代謝機構を解明することを本研究の目的とした。

## 2. 研究の目的

食品に含まれるACは、その抗酸化活性からアルツハイマー型などの認知症の予防効果が期待されている。本研究では、Fig. 1に示す、カシスとイチゴのAC5種を用いた。また、Fig. 2に示したAC代謝物である低分子フェノールが尿中、血中に検出されることが報告されている。

これら、アントシアニンとその代謝物のBBBの透過性は検討されておらず、ACの認知症予防効果の作用機序は証明できておらず、有効成分として特定できていない。

そこで、本研究では、アントシアニンおよびその代謝物である低分子フェノール類が、血液脳関門を通過し、脳へ到達することを証明することを目的とした。

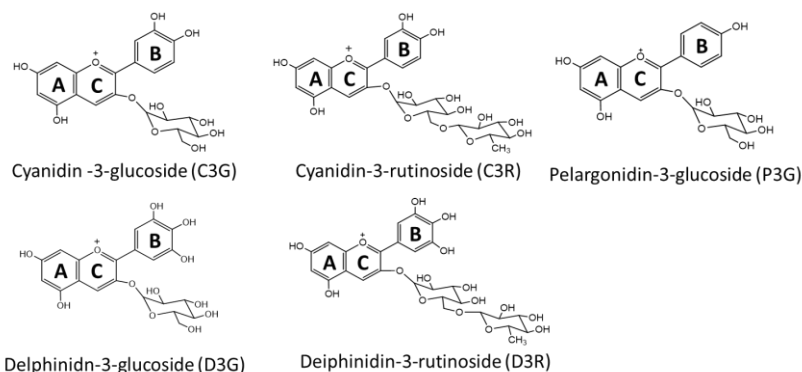


図. 1. カシス、イチゴに含まれるアントシアニンの構造

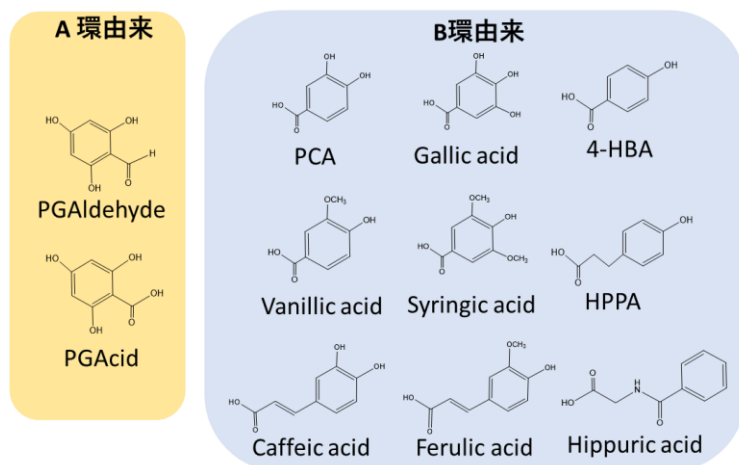


図2 アントシアニン経口摂取時のヒト体内で報告されている代謝物の構造

### 3. 研究の方法

(1) ラットに AC を経口投与した際の尿中、血中、脳中の AC とその代謝物の定量

市販のカシス抽出物 (AC10%) から、4 種の AC を g 単位で精製した。また、イチゴの濃縮果汁粉末から AC が 10% となるように、濃縮エキスを調製した。

上記 Fig. 1 の AC と Fig. 2 の代謝物と考えられる低分子フェノールについて、LCMS/MS を用いた低分子フェノール類の微量分析系の確立した。

雄性 Wistar Rat にカシスあるいはイチゴ AC 抽出物をそれぞれ経口投与し、投与前、投与後 0~4h, 4~8h, 8~24h に尿を回収し、尿中の AC およびフェノール酸を HPLC あるいは LC-MSMS で定量した。また、投与後 2, 18h における脳中の AC およびフェノール酸も LC-MSMS で分析した。

(2) AC およびその代謝物である低分子フェノール類の BBB 透過性の検討

Wistar Rat 由来の BBB キットを用いて AC およびフェノール酸の BBB 透過性を検討した。

### 4. 研究の成果

(1) ラットへカシス AC を経口投与試験

10% AC を含むカシスアントシアニンを、ラットの体重 100 g 当たり AC 10.1 mg に調製し経口投与した。AC10 投与後 4, 8, 24 時間後に尿を回収し、尿中の AC と代謝物量を測定した。尿中の AC 量を Table.1 に、代謝物量を Table.2 にまとめた。血中の AC 量、代謝物量を Table.3 に、脳中の AC 量、代謝物量を Table.4 にまとめた。既報のように、血中、尿中に AC が検出されたが、代謝物の方が AC よりも多く検出された。脳中の AC 量は、既報のように微量検出された。

表. 1. カシス投与時の尿中での アントシアニンの排泄量 (n=9, 平均 ± SD)

	尿中排泄量 (平均 ± SD nmol)			
	C3G	C3R	D3G	D3R
-6-0 h	0	0	0	0
0-4 h	2.44 ± 0.58	16.18 ± 4.97	3.53 ± 1.02	13.67 ± 3.72
4-8 h	0.50 ± 0.20	4.40 ± 2.09	0.91 ± 0.32	4.26 ± 2.06
8-24 h	0.43 ± 0.27	1.10 ± 0.44	0.48 ± 0.34	0.83 ± 0.31
0-24 h	3.37 ± 0.58	21.68 ± 3.68	4.92 ± 0.98	18.75 ± 2.79

表. 2 カシス投与時の尿中へのアントシアニン代謝物の排泄量 (n=9, 平均 ± SD)

平均 (nmol)	4-HBA	PCA	PGAldehyde	PGAcid	HPPA	Syringic acid	Gallic acid	Hippuric acid	Caffeic acid	Ferulic acid	Vanillic acid
-6-0 h	33.28 ± 10.13	0.83 ± 0.54	0.00 ± 0.00	0.32 ± 0.22	2.44 ± 1.43	0.00 ± 0.00	1.79 ± 0.46	156.50 ± 38.28	0.04 ± 0.06	0.09 ± 0.13	0.60 ± 0.41
0-4 h	77.50 ± 14.40	4.26 ± 1.24	0.37 ± 0.21	1.35 ± 0.78	11.22 ± 5.88	0.13 ± 0.05	3.25 ± 1.25	178.52 ± 61.71	4.42 ± 1.74	4.08 ± 9.76	11.68 ± 2.74
4-8 h	40.59 ± 8.21	2.33 ± 0.54	0.29 ± 0.17	2.07 ± 0.85	36.72 ± 9.80	0.14 ± 0.05	2.91 ± 0.98	233.82 ± 25.55	1.08 ± 0.77	7.19 ± 2.95	5.55 ± 1.34
8-24 h	161.46 ± 46.64	6.25 ± 2.90	0.20 ± 0.21	1.03 ± 0.58	29.95 ± 17.44	0.73 ± 0.25	10.17 ± 3.69	760.10 ± 247.09	0.63 ± 0.47	21.47 ± 8.52	14.32 ± 7.54
0-24 h	279.55 ± 52.47	12.85 ± 3.87	0.87 ± 0.53	4.45 ± 0.90	77.89 ± 22.11	1.00 ± 0.31	16.33 ± 4.64	1172.44 ± 268.28	6.13 ± 2.11	69.52 ± 14.17	31.54 ± 8.50

表.3 カシス投与後の血漿中のアントシアニンと代謝物の濃度(nmol/mL)

	C3G	C3R	D3G	D3R	Ferulic acid	4-HBA	HPPA	Hippuric acid
2時間	0.19	0.28	0.22	0.28	0.07	0.20	1.78	1.38
8時間	trace	trace	0.02	0.01	0.00	0.16	0.87	1.83

表.4 カシス投与後のラット脳中のアントシアニンと代謝物量 (n=3) (nmol/脳全体)

	2h	18h
C3R	0.01 ± 0.01	0.0 ± 0.0
Hippuric acid	0.4 ± 0.3	0.0 ± 0.0

(2) ラットヘイチゴACを経口投与試験

10%ACを含むカシスアントシアニンを、ラットの体重100 g当たりAC10.1mgに調製し経口投与した。AC10投与後4, 8, 24時間後に尿を回収し、尿中のACと代謝物量を測定した。尿中のAC量、代謝物量をTable.5にまとめた。脳中のAC量、代謝物量をTable.6にまとめた。カシスよりイチゴACが尿中、脳中にACが検出されたが、やはり微量ではあった。

図 5. イチゴ経口投与後のアントシアニンと代謝物の尿中排泄量(平均 ± SD; n = 8)

平均 (nmol)	P3G	4-HBA	PCA	PGAldehyde	PGAcid	HPPA	Syringic acid	Gallic acid	Hippuric acid	Caffeic acid	Ferulic acid	Vanillic acid
-6-0 h	0.00 ± 0.00	9.81 ± 0.20	7.15 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.37	0.00 ± 0.00	0.18 ± 0.11	163.76 ± 160.19	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.13	0.02 ± 0.06
0-4 h	187.04 ± 88.05	316.17 ± 102.99	3.74 ± 0.11	2.27 ± 0.97	8.80 ± 0.63	60.20 ± 26.53	0.18 ± 0.07	2.27 ± 0.45	678.27 ± 223.18	2.95 ± 0.64	16.31 ± 3.94	16.10 ± 5.81
4-8 h	101.55 ± 104.13	219.77 ± 145.81	2.90 ± 0.58	2.22 ± 0.97	7.37 ± 0.76	371.75 ± 56.76	0.24 ± 0.10	5.99 ± 0.80	599.61 ± 155.30	1.65 ± 0.99	10.33 ± 7.88	14.44 ± 10.93
8-24 h	23.21 ± 22.32	276.22 ± 97.00	16.86 ± 5.78	3.04 ± 0.56	2.25 ± 0.26	227.08 ± 22.14	1.15 ± 0.33	10.62 ± 8.22	689.47 ± 204.94	2.97 ± 0.04	149.68 ± 16.25	40.89 ± 18.95
0-24 h	311.80 ± 183.22	812.16 ± 266.81	23.51 ± 6.99	7.53 ± 0.17	18.42 ± 4.82	159.04 ± 71.22	1.56 ± 0.38	18.88 ± 11.11	1967.35 ± 402.88	7.58 ± 0.86	176.32 ± 23.69	71.43 ± 30.00

表. 6. イチゴ経口投与後の脳中のアントシアニンと代謝物量 (n = 3)

nmol/脳全体	P3G	HPPA	Hippuric acid	PCA	4-HBA	Vanillic acid
2 h	0.21 ± 0.30	9.01 ± 2.44	0.58 ± 0.59	0.06 ± 0.08	0.23 ± 0.32	0.01 ± 0.01
18 h	0.00 ± 0.00	7.66 ± 0.33	0.19 ± 0.15	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

### (3) ACおよびその代謝物のBBB透過性の検討

Caffeineをポジティブコントロールとして、ACと代謝物のBBBの透過性を評価し、Fig.3にまとめた。ACとその代謝物は、BBBの透過性が非常に低かった。既報にBBBの透過性があるとされるポリフェノール的一种であるEpigallocatechinは、透過性を示した。

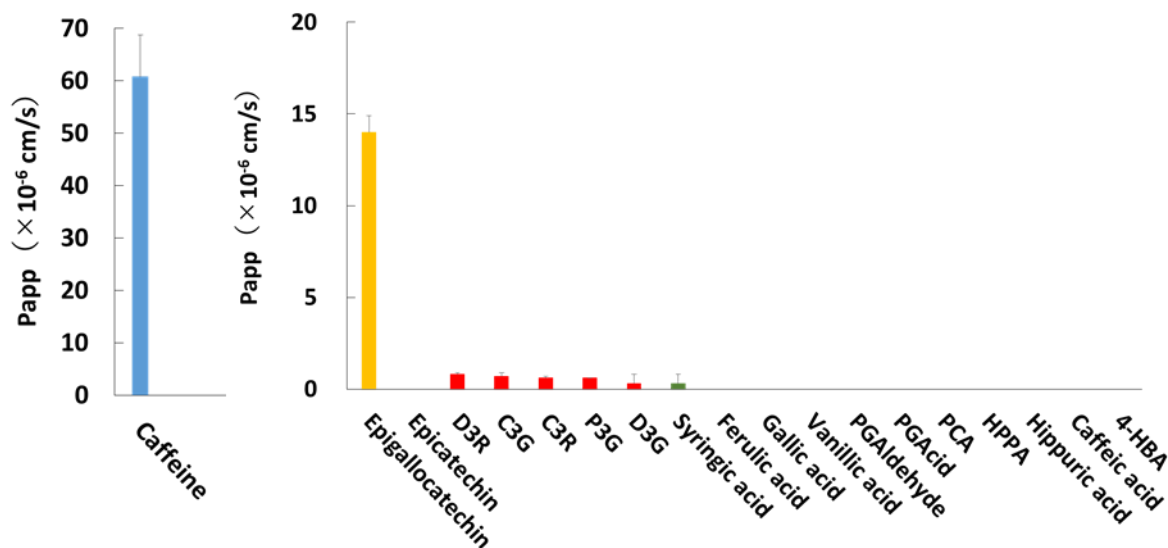


図. 3 アントシアニン、代謝物、カテキン類の血液脳関門透過性 (Caffeine; n = 21, others; n = 3)

### (4) ポリフェノール類のBBB透過性の検討

Caffeineをポジティブコントロールとして、ポリフェノール類のBBB透過性を評価し、Fig.4にまとめた。

Nobiletin、イソフラボン類のDaidzein, Genistein, Equolは、高い透過性となった。Flavonolでは、Kaempferolはやや高く、それ以外は低く、構造によって異なった。

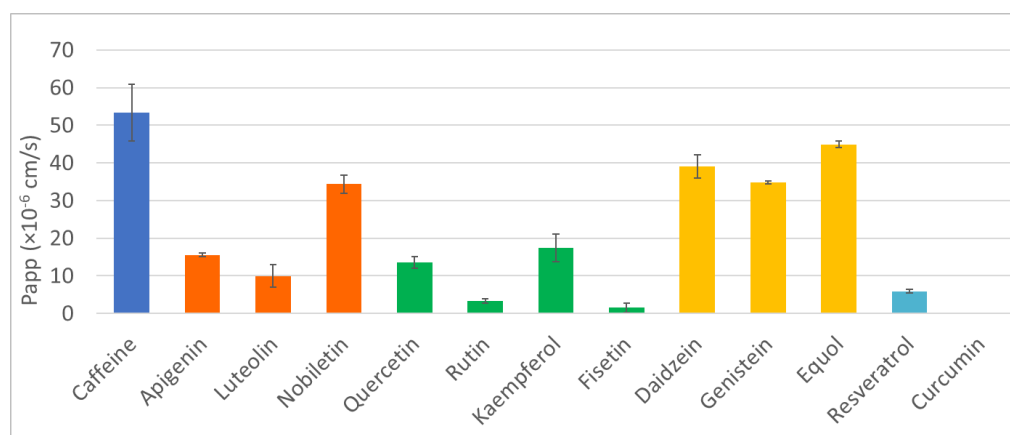


図. 4. ポリフェノール類の血液脳関門透過性 (Caffeine; n = 15, others; n = 3) 平均 $\pm$ SD

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuri Nomi, Keiko Iwasaki-Kurashige and Hitoshi Matsumoto	4. 巻 24
2. 論文標題 Therapeutic Effects of Anthocyanins for Vision and Eye Health	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3311-3328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24183311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嶋津伶那、宮口雨音、五十嵐大哉、能見祐理、松本均
2. 発表標題 アントシアニンおよびその代謝物の血液脳関門透過性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------