HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	難消化性二糖によるケルセチン配糖体吸収促進機構の解明と血中ケルセチン抱合体の網羅的解析
Author(s)	田中, 誠也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13598号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13598
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/76858
Type	doctoral thesis
File Information	Seiya_Tanaka.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

難消化性二糖によるケルセチン配糖体吸収促進機構の解明と

血中ケルセチン抱合体の網羅的解析

北海道大学　大学院農学院

応用生物科学専攻　　博士後期課程

田中　誠也

略語一覧

αG-rutin (α-glucosyl rutin)
catechol-*O*-methyltransferase (COMT)
DFAⅢ（difructose anhydride Ⅲ）
ESI (electrospray ionizaition)
hCBG (human cytosolic β-glucosidase)
LC/MS (liquid chromatography mass spectrometry)
LPH (lactase phlorizine hydrolase)
MRP-2 (multidrug resistance associated-protein 2)
MQGS (methylquercetin glucuronide sulfate)
PAPS (adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate)
Q3GM (quercetin-3-*O*-glucoside mixture)
Q3G (quercetin-3-*O*-glucoside)
Q3G2 (quercetin-3-*O*-diglucoside)
Q3G3 (quercetin-3-*O*-triglucoside)
Q3G4 (quercetin-3-*O*-tetraglucoside)
Q3G5 (quercetin-3-*O*-pentaglucoside)
Q3G6 (quercetin-3-*O*-hexaglucoside)
Q3G7 (quercetin-3-*O*-heptaglucoside)
Q3G8 (quercetin-3-*O*-octaglucoside)
QGS (quercetin glucuronide sulfate)
SAM (*S*-(5'-adenosyl)-L-methionine)
SGLT1 (sodium dependent glucose transporter 1)
SIM (selected ion monitoring)
SRM (selected reaction monitoring)
SULT (sulfotransferase)
TJ (tight junction)
UDPGA (uridine 5′-diphosphoglucuronic acid)
UGT (UDP-glucuronosyltransferase)

目次

第 1 章　 序論 5
フラボノイドとは 6
ケルセチンとは 6
ケルセチンの吸収機構 7
難消化性糖質とケルセチン 7
ケルセチンの吸収促進機構 9
ケルセチン代謝物 9
本研究の目的 16
第 2 章 実験に関する一般事項 17
【試料および試薬】 18
【実験動物および飼育方法】 18
【LC/MS/MS によるケルセチン関連物酵素処理測定法】 22
【LC/MS/MS による抱合体直接測定法】 24
第 3 章 難消化性二糖によるケルセチン配糖体吸収促進機構 27
実験 3-1 難消化性二糖 melibiose によるケルセチン配糖体吸収促進作用 28
【背景と目的】 28
【方法】 28
【結果】 33
【考察】 34
実験 3-2 二糖によるケルセチン配糖体分解への影響 42
【背景と目的】 42
【方法】 42
【結果と考察】 45
第 4 章 ケルセチン抱合化反応における腸の寄与とその組織特異性解析 50
実験 4-1 *in vivo* 覚醒下ラットの門脈と中心静脈血同時採取法による ケルセチン抱合体の吸収動態 51
【背景と目的】 51
【方法】 51
【結果】 55
【考察】 56
実験 4-2 *in vitro* 各臓器の S9 protein による抱合化活性評価 68
【背景と目的】 68
【方法】 68
【結果】 69

【考察】 70
第 5 章 ケルセチン配糖体摂食ラットにおける 血中ケルセチン抱合体の網羅的解析 73
実験 5-1 多抱合体標準品作製 74
【背景と目的】 74
【方法】 74
【結果と考察】 76
実験 5-2 ケルセチン配糖体摂取ラットの血中ケルセチン関連物の網羅的解析 85
【背景と目的】 85
【方法】 85
【結果】 86
【考察】 87
総括 97
参考文献 100

第１章

序論

フラボノイドとは

フラボノイドとは、ポリフェノール化合物の一種であり、植物中に広く分布し、4,000 種以上の存在が確認されている[1]。タマネギの黄色の色素や、ナス、シソ、イチゴ、ブドウ、赤ワインなどの赤色や紫色の色素はいずれもフラボノイドである。ヒトは、野菜、果物、豆類、いも類、緑茶や紅茶などの植物性食品から、一日に数十～数百 mg のフラボノイドを摂取していると見積もられている。近年、食品成分が持つ疾病予防機能への関心が高まっており、フラボノイドの生理機能が注目を集めている。フラボノイドは植物が生産する二次代謝産物のうちで、2 つのベンゼン環が炭素原子 3 個を介して結合した基本骨格（C6-C3-C6）を持つフェノール化合物の総称である(Figure 1-1 A)。A 環と B 環に挟まれた中央のピラン環（C 環）の置換基の違いによって、フラボン、フラボノール、フラバノン、フラバノール（カテキン)、アントシアニジン、イソフラボンなどに分類される(Figure 1-1 B)。天然には、カテキン類以外のフラボノイドの多くは、水酸基に糖が結合した配糖体（グリコシド）として存在し、糖が結合していない遊離の状態（アグリコン）で存在することは少ない。結合糖として、最も一般的なグルコースのほか、ガラクトース、ラムノースなどが主要糖である。これまで、*in vitro* の試験においてフラボノイドは強い抗酸化性を示すことから、フラボノイドの抗酸化能が様々な疾病予防に関連することが数多く報告されてきた。しかし、*in vivo* の試験おいて、フラボノイドの抗酸化能による疾病予防を直接的に示す報告はない。フラボノイドの吸収率は非常に低く、また、吸収されたフラボノイドは体内で代謝され、構造が変化することから、体内でフラボノイドが抗酸化能を発揮することは難しいことが指摘されてきている。

ケルセチンとは

ケルセチン（3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone）の構造式を Figure 1-2 に示した。ケルセチンは食品中に豊富に含まれるフラボノイドの一種であり、自然界では主に配糖体として存在する[2–4]。玉ねぎには quercetin-4'-*O*-glucoside の形で、リンゴには quercetin-3-*O*-glucoside (Q3G)の形で豊富に含まれている。ケルセチンの生理作用はこれまで多く報告されており、主なものとしては、抗ガン作用、耐糖能改善作用、血管拡張作用（抗動脈硬化改善作用）などが良く知られている。[5–8]。

上記のような多数の生理作用をもつ quercetin やその配糖体である Q3G の溶解度はそれぞれ 50, 206 μmol/L であり、極めて水に難溶性であり、食品や飲料に添加しづらい。そこで Q3G に酵素によりグルコースを 1-7 分子結合させることで、水溶性を高めた quercetin-3-*O*-glucoside mixture (Q3GM)が開発された[9]。最近ではこの水溶性ケルセチン配糖体 Q3GM を主成分にした特定保健用食品も開発されている。これはケルセチン配糖体の体脂肪低減効果をうたった商品である。その機構は、ホルモン感受性リパーゼ活性化による蓄積脂肪の分解と脂肪燃焼の促進によるものと考えられている[10]。Q3G と Q3GM の構造式を Figure1-3 に示した。

本論文におけるケルセチンの表記法は下記で統一した。一般的な名称を表す際にはケルセチン、糖が結合していない状態（アグリコン）で化合物そのものを表す際には quercetin と区別し、モノグルコシドは Q3G、水溶性ケルセチン配糖体は Q3GM と表記した。

ケルセチンの吸収機構

ケルセチン配糖体である Q3G は調理段階で分解されず[11]、胃でも消化されず[12]、小腸に配糖体のまま届き小腸で一部糖加水分解される。小腸の吸収機構としては大きく分けて二つが存在する。一つが細胞内経路でもう一つが細胞間経路（tight junction）である。細胞間経路では、ケルセチン配糖体が糖加水分解を受けずに吸収されるため、血中に Q3G のような配糖体の形で出現する。逆に細胞内経路で吸収されたケルセチンは、血中にアグリコンや抱合体の形態で放出される。よって血中のケルセチンの形態を調べることで、吸収経路を推測することが可能である。

ケルセチンの細胞内吸収経路としては 2 つが報告されている。まず 1 つ目が、小腸刷子縁膜に存在するラクターゼ・フロリジン加水分解酵素（lactase phlorizin hydrolase, LPH; EC 3.2.1.108）によりアグリコンへと分解される[13,14]。加水分解されたケルセチンアグリコンは腸上皮細胞の脂質二重層を単純拡散で通過し、吸収される。もう一つは、ケルセチン配糖体、特にグルコース配糖体(glucoside)が、腸上皮細胞膜上の sodium dependent glucose transporter 1 (SGLT1)を介して配糖体のまま細胞内に取り込まれた後[15,16]、細胞内の β-glucosidase によりアグリコンへと分解される[11]。

細胞間経路の吸収は、腸上皮細胞間の結合である tight junction を介する経路である。過去の研究で水溶性ケルセチン配糖体の一種である α-glucosyl-rutin (αG-rutin)が細胞間経路を介して配糖体のまま吸収されることが報告されている[17]。この αG-rutin は、そばの中でも韃靼そばに多く含まれるフラボノイドであるルチンに、グルコースを付加させることで水溶性を約 1000 倍高めた化合物である。αG-rutin を投与後、門脈血中でインタクトな形で検出されたため、αG-rutin は細胞間経路を介して吸収されることが示された。ケルセチン配糖体の吸収機構の概略を Figure 1-4 に示した。

難消化性糖質とケルセチン

難消化性糖質とは、ヒトの消化酵素で消化されない食品成分であり、近年では多くの研究がなされ、難消化性糖質の生理作用が多数報告されている。これに伴い、難消化性糖質を有効成分とする特定保健用食品も多い。難消化性糖質のうち、その糖の重合度が 2～10 のものをオリゴ糖、重合度が 10～100 のものをメガロ糖、100 以上のものを食物繊維（多糖）と呼ぶ。食物繊維や難消化性オリゴ糖を摂取すると、胃や小腸では分解されずにそのままの形で通過する。そのため、胃や小腸の上部消化管では、難消化性糖類の有する保水性や粘性、吸着性が生理機能の本体になることが多く、栄養素の胃排出遅延や、腸内容物の栄養素の拡散や移動を制限する。代表的な機能として、糖質の消化、吸収を緩慢にし、血中グルコース、

インスリン濃度の上昇を抑制する作用や、胆汁酸の排出を促進し、血中コレステロール濃度を低下する作用などがよく知られている。大腸に流入した難消化性糖質の一部は、腸内細菌により資化され、短鎖脂肪酸などの有機酸へと変換される。短鎖脂肪酸の生理機能は、大腸上皮細胞のエネルギー源となること、大腸における水やナトリウム吸収の促進、粘液分泌の促進、大腸運動の刺激、これコレステロール合成抑制作用など、多くが知られている。また、短鎖脂肪酸生成により腸内 pH の低下がおこると、病原菌の繁殖を抑え、また二次胆汁酸の生成抑制や酪酸の作用により、大腸がんの発症リスク低減につながると考えられている[18]。

以下、本研究で用いた二糖類をいくつか取り上げ概説する。それぞれの二糖類の構造を Figure 1-5 に示した。難消化性二糖である difructose anhydride Ⅲ（DFA Ⅲ）はチコリの根などから抽出した多糖であるイヌリンを原料として作られ、2 分子の fructose が 2 つのグリコシド結合により環状構造を持つオリゴ糖である。当研究室の研究で、DFA Ⅲは様々な生理作用を発揮することが報告されている。DFA Ⅲを摂取することによりミネラル吸収が促進され、卵巣摘出ラットにおいてカルシウム吸収障害を回復させること、摂取した DFA Ⅲがタイトジャンクションに作用し、上皮細胞間経路を介したカルシウムの腸管吸収を増加することが明らかにされている[19]。当研究室の松川、伊藤らにより DFAⅢとケルセチンの研究が行われている。DFAⅢは *in vitro*, *in situ* 試験により、TJ を広げることにより高濃度のケルセチン配糖体の吸収を促進することが示されている[20]。

Melibiose は、galactose と glucose がα-1,6 結合した難消化性二糖であり、蜂蜜や大豆に微量に含まれる。当研究室の研究で melibiose が TJ を広げ物質の吸収を促進させるという報告もある[19]。また、melibiose に frucose が結合した raffinose については多く研究されており、摂取すると善玉菌であるビフィズス菌の増殖を促進する作用があることが報告されている。しかし raffinose を摂取すると胃液によって melibiose に分解されるという報告もあり、melibiose として生理作用を発揮している可能性もある[21]。

Cellobiose は glucose がβ-1,4 結合した難消化性二糖である。Cellulose の二糖単位が cellobiose である。自然界では蜂蜜やトウモロコシの茎に存在し、日本酒などにも微量に含まれる。現在、腸内細菌によるセルロースの資化が注目されているが、cellobiose 自体の生理機能やその特徴について報告された論文は少ない。Cellobiose は水への溶解度が 14% (w/v)で、ショ糖の約 1/5 である。難消化性オリゴ糖の中で非常に吸湿性が少ない。そのため扱いやすいのが特徴で、温度や pH にも安定である。特徴としては大腸発酵により酪酸を多く生成する。また、潰瘍性大腸炎の軽減、便秘改善などの効果も報告されている。β-1,4 結合であることから、体内の β-glucosidase によって分解される。LPH がその酵素としての作用を有することも報告されている[22]。

Lactose は galactose と glucose がβ-1,4 結合した難消化性二糖であり、lactose 不耐症（乳糖不耐症）としてよく知られている。これは成人ではβ-ガラクトシダーゼがほとんど存在しないことが原因であるされている。ラットやヒトにおいては LPH が lactose の基質となるとも知られている。

当研究室においては、イソマルトメガロ糖の研究が行われている。メガロ糖は前述したとおり、その重合度が 10-100 の難消化性糖質であり、これまでの研究で、直鎖イソマルトメガロ糖、環状イソマルトメガロ糖の両方がケルセチンの吸収を促進することが見いだされた[23]。直鎖イソマルトメガロ糖の大きな特徴の一つが、フラボノイドの可溶化促進作用である。これは α-1.6 結合のフレキシブルさによってさまざまな分子の疎水領域と相互作用することが可能であり、これによりケルセチンなどの可溶化を促進すると考えられている。

ケルセチンの吸収促進機構

これまでにケルセチンの吸収促進機構としては主に 3 つが提唱されている。一つは最も広く知られている可溶化の促進である。ケルセチンと Q3G の溶解度はそれぞれ 25 μmol/L [24], 206 μmol/L[25]とされており、極めて水に難溶性である。管腔内でも大半が不溶化して吸収率が悪い。そのためケルセチンの可溶化を促進すると吸収率が向上すると考えられる。当研究室の過去の研究より、直鎖イソマルトメガロ糖がケルセチンの可溶化を促進させることで、ケルセチン配糖体の吸収が促進することが報告された[23]。またこの可溶化による吸収促進は、薬物動態の分野においても注目され、drug delivery system(DDS)として広く研究されている。またサイクロデキストリンによる包接作用も可溶化を促進することが知られている。

二つ目は細胞間経路の吸収促進である。前述のとおり DFAIII が腸上皮細胞間経路であるタイトジャンクションを広げることで、ケルセチン配糖体の吸収を促進させることが明らかになっている[20]。

三つ目は、難消化性糖質によるアグリコン分解抑制作用である。当研究室の松川らは、難消化性二糖の DFAIII やフラクトオリゴ糖が、大腸において腸内菌によるケルセチンアグリコンの分解を抑制（ケルセチンの開環反応など）することで、ケルセチンの生体利用性を向上させることを明らかにしている[26]。

ケルセチン代謝物

吸収されたケルセチンは体内で薬物代謝の第二相反応である“抱合化”を受ける。ケルセチンのようなフラボノールは初めから水酸基を多数持つため、第一相反応のシトクロム P450 (CYP)による水酸化は受けない。抱合化は主に肝臓や小腸において UDP-glucuronosyltransferase (UGT)、phenol sulfotransferase (SULT)により触媒される[27,28]。また主に肝臓において B 環のカテコール構造の部分において catechol-*O*-methyltransferase (COMT)によりメチル化反応が起こる[29]。これら抱合化とメチル化により血中ではおもに抱合体やメチル化体として存在する。またケルセチンは水酸基が 5 個あるため多数の異性体が存在する。なお抱合化・メチル化部位としては 7-, 3-, 4'-, 3'-OH で起こる[30]。

これまでケルセチンの生理作用の研究において、ケルセチンアグリコンや配糖体そのも

のの作用が *in vitro* 試験により評価されてきた。一方、最近ケルセチン抱合体自体が体内で生理作用を持つことが報告されている[31]。さらにグルクロン酸や硫酸のような抱合体の種類や抱合化部位によっても生理作用が異なることが報告されている。例えばキサンチンオキシダーゼに対する阻害定数 K_i は quercetin-3-*O*-sulfate, quercetin-3-*O*-glucuronide, 7-*O*-glucuronide, 4'-*O*-glucuronide, 3'-*O*-glucuronide が 78, 160, 100, 0.25, 1.4 μmol/L とそれぞれ大きく異なる[28]。従って、どの位置がどの官能基で抱合化されたケルセチン代謝物が体内に存在するかが、ケルセチンの生理作用発揮には重要であることが明らかとなってきた。

これまでケルセチン代謝物の測定は、β-glucuronidase や sulfatase を用いて、抱合体を quercetin や methylquercetin へと分解して、これらアグリコンなどの分解物を測定する手法（酵素処理法）が用いられてきた[13,23,32]。この手法では定量時に quercetin と methylquercetin のみの標準品を用意すればいいこと、分析に高感度な装置がなくとも、HPLC で検出可能であることから、血中濃度の総量を知りたいときには適している。しかし、血中のケルセチン抱合体の種類や抱合化部位など、詳細の情報は得られない。そのため酵素処理せずに、直接ケルセチン抱合体を定量する手法が開発されている。そのためには、各抱合体の標準品が必須となる。

ケルセチン抱合体の標準品作製は化学合成では非常に難しい。その理由は多数ある水酸基に選択的にグルクロン酸や硫酸を導入することが難しいからである。そのため、富山県立大学の生城先生らのグループは、酵母菌にヒトやラットの UGT や SULT の遺伝子を導入して、酵母菌体内で抱合体を作らせることに成功した[33–35]。本研究においては生城先生らのグループより提供をうけた標準品を用いて、各種抱合体の個別定量を行った。また測定には生体内の微量成分分析に最適な Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS を使用し、さらに抱合体の位置異性体の分離が良好な Phenyl-hexyl カラムを用いて分析を行った。

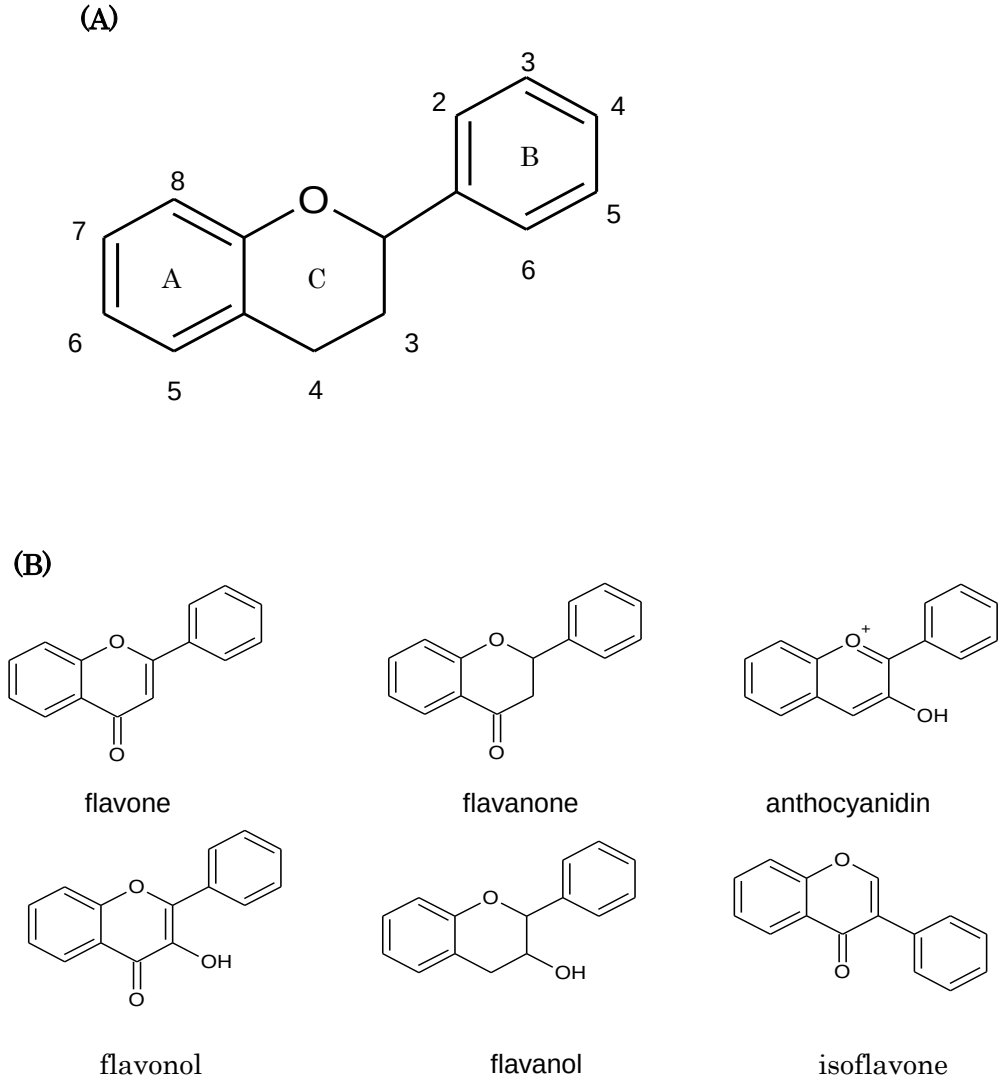


Figure 1-1

(A) The basic structure of flavonoids. (B) The structures of flavone, flavanone, anthocyanidine, flavonol, flavanol, and isoflavone.

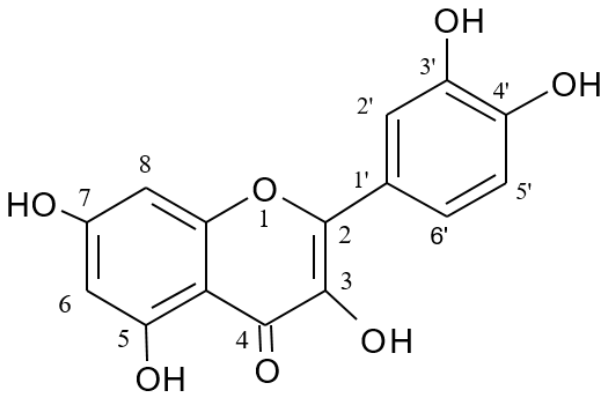
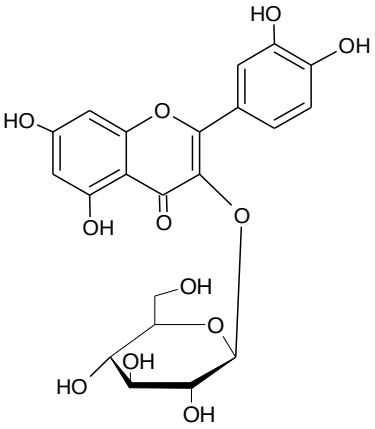
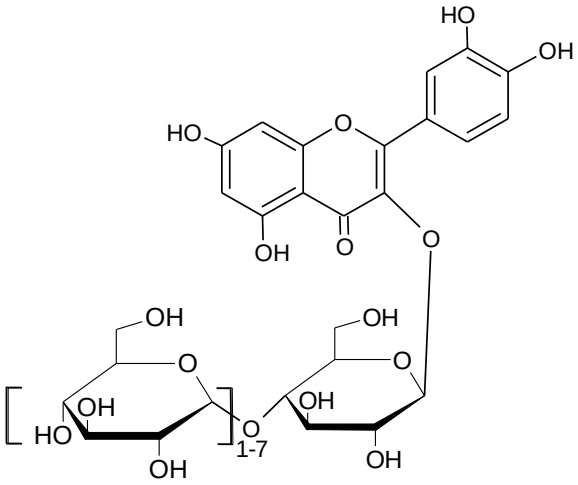


Figure 1-2.
Structure of quercetin.



Quercetin-3-*O*-glucoside (Q3G)



Quercetin-3-*O*-glucoside mixture
(Q3GM)

Figure 1-3.
Structures of quercetin-3-*O*-glucoside (Q3G) and quercetin-3-*O*-glucoside mixture (Q3GM).

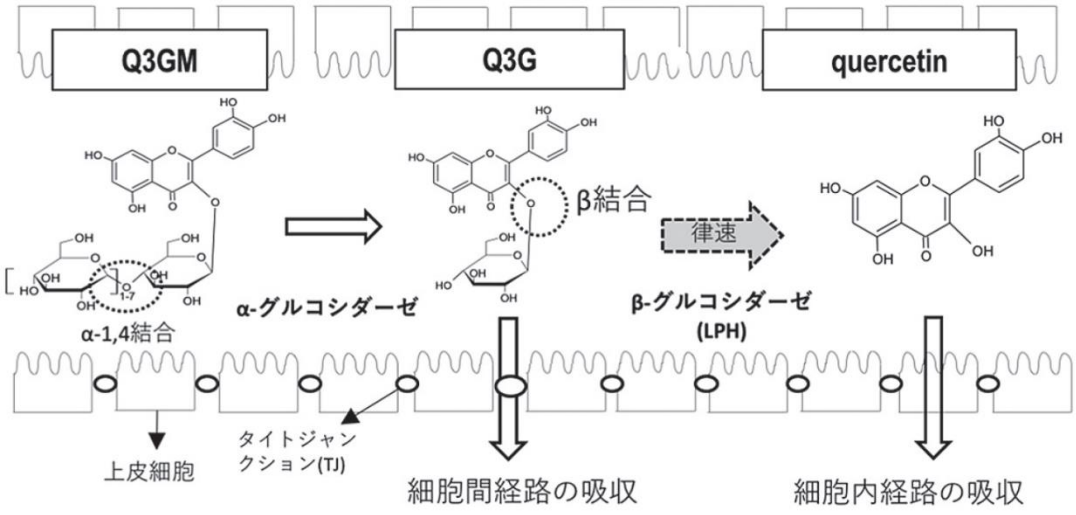
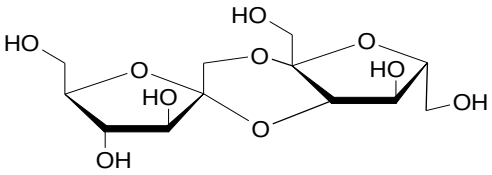
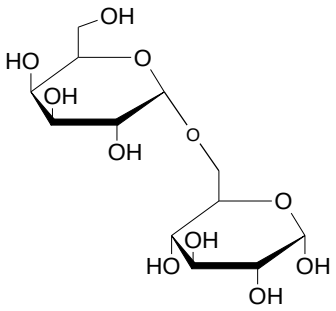


Figure 1-4.

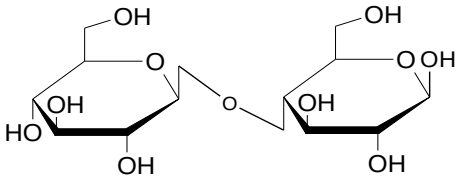
Schematic presentation of Q3GM absorption mechanism.



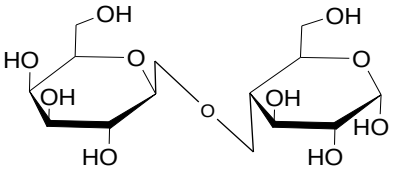
Difructose anhydride III



Melibiose



Cellobiose



Lactose

Figure 1-5.
Structures of difructose anhydride III (DFA III), melibiose, cellobiose, and lactose

本研究の目的

本研究は、フラボノイド配糖体の吸収・代謝を調べるため、①難消化性二糖による新たなケルセチン吸収促進機構の解明 ②吸収された後の抱合化反応の組織による違いや抱合体の位置選択性の解明 ③ケルセチン摂食後の血中ケルセチン代謝物の網羅的解析、を目的に *in vitro, in vivo* 試験を実施した。目的①で用いた難消化性二糖は、glucose と galactose が α-1,6 結合した melibiose、ケルセチン配糖体は、水溶性が高く飲料にも応用されている水溶性ケルセチン配糖体（酵素処理イソクエルシトリン, quercetin-3-*O*-glucoside mixture, Q3GM）を用いた。これはケルセチンに β 結合でグルコースが 1 分子結合した Q3G に、さらにグルコースを 1 から 7 個付加させ水溶性を高めた化合物である。また血中ケルセチン抱合体の網羅的分析にはケルセチン骨格に特異的な吸収波長である 370 nm による UV 検出と、高感度な LC/MS/MS を併用することで詳細な解析を可能とした。

第 2 章

実験に関する一般事項

【試料および試薬】

Quercetin はシグマアルドリッチ株式会社から購入した。Q3GM は三栄源エフ・エフ・アイ株式会社よりご供与いただいた。Melibiose は日本甜菜製糖株式会社より、cellobiose は日本製紙ケミカル株式会社よりご供与いただいた。その他の試薬に関しては市販の特級グレードを使用した。その他のものについては各章でそれぞれ記載した。

【実験動物および飼育方法】

①実験動物

Wistar / ST 系雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を使用した。

②飼育方法

ラットは、1 匹ずつステンレス製の網ケージに入れ、室温 22±1°C、湿度 50±5%の飼育室で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。飼育期間中の飼料と水は自由摂取とし、飼料は毎日新しいものを与え、飲料水は 2 日に一度交換した。基本飼料で 7 日間予備飼育後、実験に使用した。

③基本飼料（AIN-93G diet）の組成

ラットの基本飼料は、基本組成は Table 2-1 に示した。ビタミン組成、ミネラル組成は AIN-93G [36] に従って作成し、それぞれ Table 2-2 及び Table 2-3 に示した。

④動物実験とガイドライン遵守

すべてのラット実験は、北大動物実験委員会によるガイドラインを遵守し、倫理的に問題がないよう実施した。

Table 2.1　　Composition of AIN-93G-Basal diet

	g/kg diet
Corn starch *1	397.5
Casein *2	200
Dextrin *3	132
Sucrose *4	100
Soybean oil	70
Cellulose (Crystallized cellulose) *5	50
Mineral mixure (AIN-93G) *6	35
Vitamin mixture (AIN-93G) *6	10
L-Cystine	3
Choline bitartrate	2.5
Total	1000

*1　α-Corn starch (Amylalpha ; Chuou-Syokuryou Co., Ltd., Inazawa, Aichi, Japan)

*2 Casein (NZMP Acid Casein ; Fonterra. Ltd., Auckland, New Zealand)

*3 Dextrin (TK-16 ; Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., Itami, Osaka, Japan)

*4 Sucrose (Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd., Japan)

*5 Crystallized cellulose (CEOLUS PH102 ; Asahi Chemical Industry, Tokyo, Japan)

*6 The mineral and vitamin mixtures were prepared according to the AIN-93G formulation.

Table 2.2 Composition of AIN-93G vitamine mixture

		g/kg
D-Biotin	V.H.	0.020
Folic acid	葉酸	0.200
All *trans*-retinol palmitate	V.A	0.229
Cholecalciferol	V.D3	0.250
Thiamin hydrochloride	V.B1	0.600
Riboflavin	V.B2	0.600
Pyridoxine hydrochloride	V.B6	0.700
Ca pantothenate	パントテン酸	1.600
Cyanocobalamin [*1]	V.B12	2.500
Nicotinic acid	Niacin	3.000
Phylloquinone	V.K1	7.500
All-*rac*-α-tocopheryl acetate	V.E	75.000
Sucrose		907.801
Total		1000.000

[*1] 0.1% Cyanocobalamin in sucrose

Table 2.3 Composition of AIN-93G mineral mixture

	g/kg
Essential mineral element	
Calcium carbonate, anhydrous ($CaCO_3$)	357
Potassium phosphate, monobasic (KH_2PO_4)	196
Potassium citrate, tri-potassium ($K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	70.78
Sodium chloride (NaCl)	74
Potassium sulfate (K_2SO_4)	46.6
Magnesium oxide (MgO)	24
Ferric citrate ($FeC_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$)	6.06
Zinc carbonate ($ZnCO_3$)	1.65
Magnesium carbonate ($MnCO_3 \cdot nH_2O$)	0.63
Cupric carbonate (Cu)	0.3
Potassium iodate (KIO_3)	0.01
Sodium selenate, anhydrous (Na_2SeO_4)	0.01025
Ammonium paramolybdate, 4 hydrate (Mo)	0.00795
Potentially beneficial mineral element	
Sodium meta-silicate, 9 hydrate	1.45
Chromiu potassium sulfate, 12 hydrate	0.275
Lithium chloride	0.0174
Boric acid	0.0815
Sodium fluoride	0.0635
Nickel carbonate	0.0318
Ammonium vanadate	0.0066
Sucrose	221.026
Total	1000.000

【LC/MS/MS によるケルセチン関連物酵素処理測定法】

第 3 章においては、ケルセチンの吸収動態を探ることを目的としたため、ケルセチンの分析は、簡便に吸収総量を測定可能な以下の酵素処理測定法を用いた。酵素として、脱抱合酵素である β-glucuronidase, sulfatase を用いた。詳細は第 3 章の方法に記載した。装置は、ACCELA / TSQ QUANTUM ACCESS MAX (Thermo Fisher Scientific)を使用した。LC 条件は、カラムに Acquity BEH C18　(2.0×100 mm, 1.7 µm, Waters)を用い、カラムオーブンの温度は 40°C とした。移動相として A 液（water：methanol：formic acid, 70:30:0.1）と B 液(methanol：formic acid, 100:0.1)を用いた。流速: 0.2 mL / min で溶出を行い、グラジエントプログラムは直線的な濃度勾配で、移動相 A/B: 0 min-80/20; 8 min-20/80; 10min-80/20 とした。ESI-MS の分析では、Spray Voltage 3000 V、Vaporizer Temperature 450°C、Sheath Gas Pressure 50、Aux Gas Pressure 15、Capillary Temperature 220°C の条件で、ポジティブイオンクロマトの SIM モードを用いて分析を行った。ケルセチン配糖体(Q3GM)の分析時には Table 2.4 に記載された *m/z* をモニターし選択的に検出した。また、各化合物の標品を用いて SRM モードで分析し、それぞれのイオンピークの面積から検量線を作成し、ケルセチンの［M+H］+とその代謝関連化合物の定量に用いた。なお Q3GM、ケルセチン、メチルケルセチンそれぞれの標準品を使用した。また内部標準として naringenin(Chromadex)を使用した。

Table 2.4　Transition of LC/MS/MS (deconjugation analysis)

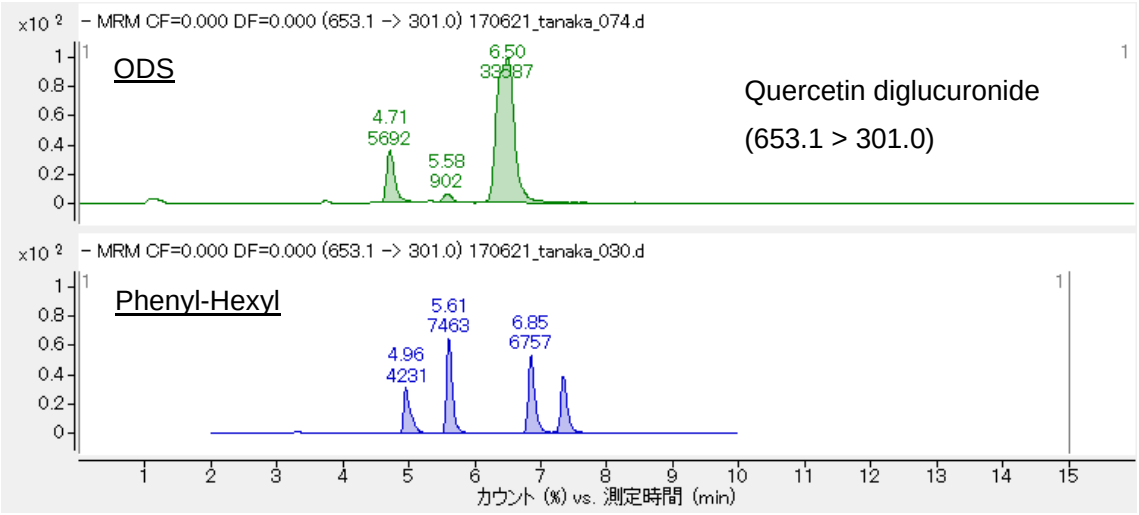
		m/z		
	Compound name	Parent	Product	Polarity
1	Naringenin	273	273	+
2	Quercetin	303	303	+
3	Quercetin sulfate	381	301	-
4	Quercetin disulfate	461	301	-
5	Quercetin glucuronide sulfate	557	301	-
6	Methylquercetin sulfate	395	315	-
7	Methylquercetin glucuronide sulfate	571	315	-
8	Quercetin diglucuronide sulfate	733	301	-
9	Q3G	465	303	+
10	Q3G2	627	303	+
11	Q3G3	789	303	+
12	Q3G4	951	303	+
13	Q3G5	1113	303	+
14	Q3G6	1275	303	+
15	Q3G7	1437	303	+
16	Q3G8	1599	303	+
17	Methylquercetin	317	317	+
18	Quercetin glucuronide	479	303	+
19	Quercetin diglucuronide	655	303	+
20	Methylquercetin glucuronide	493	317	+
21	Methylquercetin diglucuronide	669	317	+

【LC/MS/MS による抱合体直接測定法】

本分析法はケルセチン抱合体を酵素処理せずに intact なケルセチン代謝物を測定するものである。前述の LC/MS/MS によるケルセチン関連物酵素処理測定法は、脱抱合酵素(β-glucuronidase, sulfatase)を用いて、試料中のケルセチン抱合体を quercetin や methylquercetin に分解して総量を算出するものであるが、本法では脱抱合処理をせずに直接ケルセチン抱合体を分析する。この方法により試料中の抱合体の種類や位置異性体を個別に定量することが可能となる。

装置は LC に 1290 Infinity II LC システム(Agilent technologies)と MS に Agilent 6495 トリプル四重極 LC-MS を用いた。分析カラムは良好に異性体が分離する Zorbax Eclipse Plus RRHD Phenyl-hexyl 3.0×100 mm, 1.8 µm (Agilent technologies)を使用し、カラム温度は 30°C とした。分析カラムについては以前はオクタデシルシリカ（ODS）カラムが汎用的に使用されているが、よりポリフェノールの平面構造を認識できる、本カラムを選択した。Figure 2-1 に ODS カラムと Phenyl-hexyl カラムの比較を掲載した。移動相は A: 0.1%ギ酸水溶液、B: 0.1%ギ酸およびメタノールを用いた。グラジエントは 0–3 min: 20→40% B; 3–13 min: 40→60% B; 13–13.1 min: 60→95% B; 13.1–15 min: 95% B で行った。MS の条件は、イオン源にエレクトスプレーイオン源(ESI)を用い、Positive モードと Negative モードの同時取り込みを行い、選択性が高く定量分析に最適な Selected reaction monitoring (SRM)モードを用いた。各イオン化パラメータは Table 2-5 に示した。

(A)



(B)

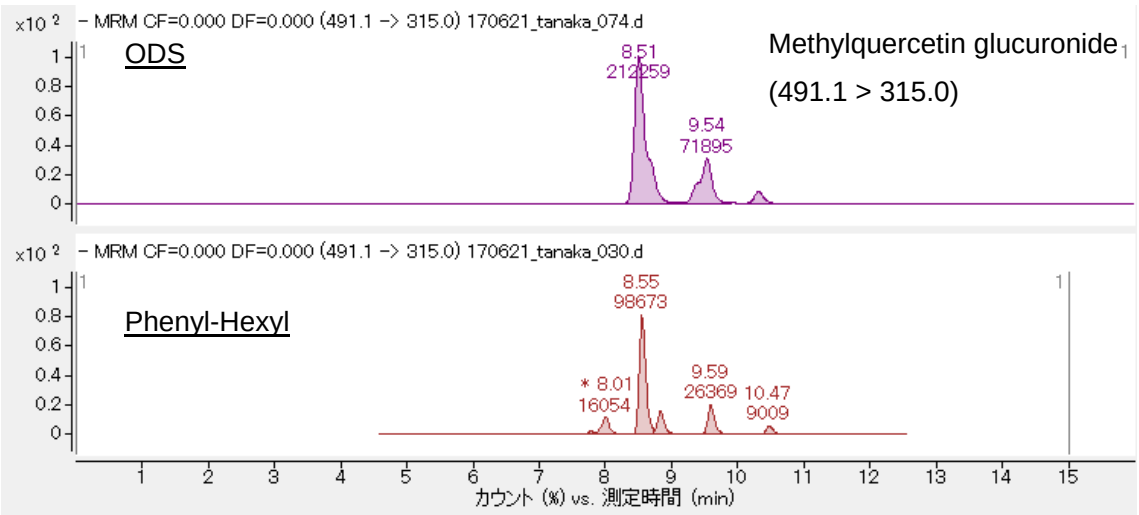


Figure 2-1

The MRM chromatograms of quercetin diglucuronide(A) and methylquercetin glucuronide (B). The upper chromatograms of A and B panels were obtained by using ODS column (Inertsustain AQ-C18, 2.1 × 100 mm, 3 µm). The lower chromatograms of A and B were obtained by using Phenyl-hexyl column (Zorbax Eclipse plus RRHD Phenyl-hexyl 3.0× 100 mm, 1.8 µm).

Table 2.5　Transition of LC/MS/MS (direct analysis)

	Compound name	Abbreviation	Precursor ion	Product ion	Collision Energy
1	Quercetin	Q	301	151	25
2	Methylquercetin	MQ	315	300	17
3	Quercetin-4'-*O*-sulfate	Q-4'S	381	301	17
4	Quercetin-3'-*O*-sulfate	Q-3'S	381	301	17
5	Isorhamnetin-7 or 4'-*O*-sulfate	IRS	395	315	17
6	Quercetin-3-*O*-glucoside	Q3G	463	301	28
7	Quercetin-3-*O*-glucuronide	Q-3gln	477	301	25
8	Quercetin-7-*O*-glucuronide	Q-7gln	477	301	25
9	Quercetin-4'-*O*-glucuronide	Q-4'gln	477	301	25
10	Quercetin-3'-*O*-glucuronide	Q-3'gln	477	301	25
11	Isorhamnetin-3-*O*-glucuronide	IR-3G	491	315	25
12	Isorhamnetin-7-*O*-glucuronide	IR-7G	491	315	25
13	Isorhamnetin-4'-*O*-glucuronide	IR-4'G	491	315	25
14	Tamarixetin-*O*-glucuronide (1)	TmG(1)	491	315	25
15	Tamarixetin-*O*-glucuronide (2)	TmG(2)	491	315	25
16	Tamarixetin-*O*-glucuronide (3)	TmG(3)	491	315	25
17	Quercetin glucuronide sulfate	QGS	557	301	17
18	Methylquercetin glucuronide sulfate	MQGS	571	315	17
19	Quercetin-diglucuronide(1)	QdiG(1)	653	301	25
20	Quercetin-diglucuronide(2)	QdiG(2)	653	301	25
21	Quercetin-diglucuronide(3)	QdiG(3)	653	301	25
22	Quercetin-7-4’/3’-diglucuruonide	QdiG(7-3’/4’)	653	301	25
23	Quercetin-diglucuronide(4)	QdiG(4)	653	301	25
IS	Naringenin	IS	271	151	17

第 3 章

難消化性二糖によるケルセチン配糖体吸収促進機構

実験 3-1 難消化性二糖 melibiose によるケルセチン配糖体吸収促進作用

【背景と目的】

当研究室の研究で難消化性二糖の一種 DFAIII がケルセチンの吸収を促進することが示されており[20]、ここでは他の難消化性二糖として自然界に存在する melibiose がケルセチン配糖体の吸収を促進させるか検討することを目的とした。Melibiose はグルコースとガラクトースが α-1,6 結合した二糖である。本試験では、ケルセチンの主要な吸収部位である小腸における吸収を詳細に探るため、*in situ* 小腸結紮ループ吸収試験を実施した。

【方法】

実験動物

7 週齢の Wistar / ST 系雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を 18 匹用いた。ラットは、1 匹ずつステンレス製の網ケージに入れ、室温 22±1°C、湿度 50±5%の飼育室で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。飼育期間中の飼料と水は自由摂取とし、飼料は毎日新しいものを与え、飲料水は 2 日おきに一度交換した。AIN-93G で 7 日間予備飼育後、実験に使用した。

実験器具・材料

縫合には硬質 No.4 の抱合糸（株式会社夏目製作所）を用いた。投与用シリンジ 2.5mL と腸洗浄用シリンジ 10 mL には、腸を傷つけないために、先を削った 18G の針にシリコンチューブ No. 0（カネカ株式会社）を取り付けたものを用いた。麻酔にはマイショット（ニプロ）を用い、腹部大動脈採血には 22G の針と 5 mL のシリンジを用いた。カテーテル採血には針先を削った 22G の針と 1 mL のシリンジを用いた。採血用針はあらかじめヘパリン生食(1000 IU)（大塚製薬工場）で処理したものを用いた。

カテーテルの作成

門脈カテーテルは、ポリエチレンチューブ SP28（ID:0.20 mm, OD: 0.40 mm、株式会社夏目製作所）の先端を斜めに 1.5 cm の長さに切ったものを、15 cm に切った医療用シリコンチューブ No.00（ID: 0.5 mm, OD: 1.0 mm、シラスコン、株式会社カネカメディックス）の先端に挿入し作成した。ヘパリンナトリウム(1000 IU / mL, 味の素製薬株式会社) を市販の生理食塩水（日本薬局方、生理食塩液、大塚生食注）を用いて 25 倍希釈し体内維持用のヘパリン溶液を作製し、1 mL シリンジに満たした後、先を削った 22G の針を取り付け、針の先端にカテーテルを取り付けた。実験前にはカテーテルの先端までヘパリン溶液を満たした。

***In situ* 空腸結紮ループの作成、門脈カテーテル留置および採血と小腸の摘出**

試験前日の 18 時に絶食させたラットにケタミン（80 mg/kg BW, 第一三共株式会社）・キ

シラジン麻酔液（12 mg/kg BW, MP Biomedicals）を腹腔内投与した後、 アクリル板に、ラットを布テープで固定した。ラットの腹部の毛を石鹸水で湿らせ、カミソリで剃毛し、70%エタノールを噴霧した。手術用ハサミで正中線に沿って皮膚を切り、皮膚と腹筋の間にハサミを入れ、皮膚と腹筋を剥離後、腹筋を正中線に沿って切り開いた。門脈にカテーテルを留置するため、約 2 × 4 cm のガーゼを用いて、腸全体を右側に寄せ、腸を固定した。また門脈が見えやすいように、ガーゼを用いて肝臓を胸骨のほうに引っ張り上げた。瞬間接着剤（業務用 3000 ハイスピード(61-2810-45)、セメダイン株式会社）は液が出てくるかを確認して、左手で持てるようにラット左側に静かに置いた。その後開胸器（レトラクター）で門脈を見やすいようにし、左手に針先を半分曲げた 18G の支持棒を使って門脈を引っ張り、右手にはピンセットでカテーテルを持ち、肝臓に入る直前の門脈に挿入した。カテーテルが血管に刺さったのを確認したら、左手をシリンジに持ち替えて、血が入っているのを確認した。血がうまく入ってきた場合は、左手ですぐに瞬間接着剤を用いてカテーテルの挿入部を固定した。この際カテーテルの角度が門脈に対して急になりすぎないように注意した。カテーテル留置後、カテーテルが抜けないように留意しながら、ガーゼを取り出し、腸を手術前の状態に戻した。

空腸結紮ループの作成は、綿棒を使ってトライツ靭帯を探し、靭帯の下 3 cm を結紮し、そこから 15 cm のシリコンチューブを腸に添わせて計測し、そこからさらに 2 cm 下を結紮し、結紮部位の十二指腸側に切れ目を入れた。そして、ループ上部の結紮部位の盲腸側に切れ目をいれて、洗浄用のルートを作成した。10 mL シリンジを用いて、37°C に保温した生理食塩水 10 mL を注入し、小腸内容物を洗い流した。空気は入れないようにした。絶食をしていない場合は小腸内容物が管腔内に多量に残存しているため、生食 10 mL と空気 2 mL を入れることで内容物を残さず洗い流すことが行われるが、今回は長時間絶食によりその必要がなく、より生理的な条件にするため管腔内に空気を入れることは避けた。その後ループ下側の切れ目の 1 cm 上を糸で二回結紮した。さらにループ上部も穴の開いている部分から盲腸側のすぐ下を軽く一回結紮した。投与する試験溶液は、前日の夜に control 群として Q3GM 10 mmol/L に NaCl 145 mmol/L、melibiose 群として Q3GM 10 mmol/L に melibiose 100 mmol/L と NaCl 95mmol/L となるように必要量を量りとっておき、当日の朝脱塩水に溶解させた。この際 Q3GM の濃度が各群で一定になるように、Q3GM 10 mmol/L を先に大量に作成し、その溶液を用い、あらかじめ量り採っておいた control 群と melibiose 群の NaCl や melibiose を溶解させる方法をとった。Q3GM 10 mmol.L の溶液を使って、NaCl や melibiose をや溶解の際には超音波洗浄機を 5 分間かけて、完全に溶解させるように留意した。

用意した試験溶液はあらかじめインキュベーターで 37°C に加温し、シリコンチューブで保護した 18G の針と 2 mL シリンジを用い、空腸ループに 1.5 mL 投与した。採血は門脈カテーテルから試料投与前 0, 投与後 15, 30, 60 分後に各 500 μL 採取した。60 分後に腹部大動脈より、22G の針と 5 ml のシリンジを用い 1 mL 以上採血した。放血致死後、空腸ル

ープを取り出し、アルミホイルで包み、－20°C で保存した。得られた血液は 10 分、4°C、2,300 g で遠心分離して血漿を回収し、－30°C で保存した。実験の概略図を Figure 3-1-1 に示した。

<u>血漿の処理</u>

血漿は室温で解凍した後、酵素処理群と無処理群にそれぞれ 100 µL ずつ分注した。その両者に、0.58 M の酢酸を 10 µL 添加して pH 4.9 に調整し、酵素処理群には sulfatase（from *Helix pomatia*, Sigma G-9751, 100,000 U / mL, ß-glucronidase and 2,000U / mL sulfatase）を 20 µL 添加した。添加する前には硫安沈殿が再溶解するようによく混合してから実験に使用した。本酵素単品では硫酸抱合体が十分に分解されず、sulfatase の活性を補うため、超純水で 2 倍希釈した sulfatase (from *Aerobacter aerogenes* 600 U/mL Sigma S-1629)を 10 µL 添加した。最終的に ß-glucronidase は 2,000 U、sulfatase は 43 U を添加した。ß-glucronidase の 1 unit は pH 5.0、37°C で 1 時間反応させ、フェノールフタレイングルクロン酸抱合体からフェノールフタレイン 1 µg を生成させる活性と定義された。また、sulfatase は同条件で 1 µmol/L の *p*-ニトロカテコール硫酸抱合体を加水分解する活性と定義された。その後、酵素処理群、無処理群ともに 120 分間、37°C でインキュベートした。インキュベート後、internal standard (IS) として naringenin (ChromaDex) を溶解させたメタノールを 100 µL 添加して 100°C で 1 分間加熱し、酵素反応を止めた。その後、9,300 g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。さらに沈殿物にメタノールを 100 µL 添加し、マイクロホモジナイザーで 20 秒間ホモジナイズ後、9,300 g で 5 分間遠心分離して上清を回収した。そしてこの操作を 2 回繰り返した。すべての上清を合わせた後、有機溶媒比率を下げるために超純水を 200 µL 添加した。固相抽出として 1 cc (10 mg)の OASIS HLB カートリッジ(Waters Co.)を用い、メタノール 1 mL, 超純水 1 mL でコンディショニング後、サンプルを全量アプライし、1 mL の超純水で洗浄し、1 mL のメタノールでケルセチン配糖体とその関連化合物を溶出した。溶出液は遠心濃縮機(VC-96N, VA-250F TAITEC) を用いて乾固させ、-30°C で保存した。LC/MS/MS 分析時には 100 µL の 50% メタノールに溶解後、適宜希釈した。

<u>小腸内容物の処理</u>

小腸結紮ループは室温で半解凍し、スクイーズ法により内容物と小腸上皮粘膜組織を同時に全て回収した。それら小腸内容物は氷冷下の超純水で 10 mL に定容し、氷冷しながらポッターホモジナイザー（40 mL 用）でホモジナイズ（1,200 rpm，1 分）した。各個体のホモジネートは 100 µL ずつ分注し、それぞれ IS（naringenin）を溶解させたメタノールを 100 µL 添加し、振とう機で 5 分ボルテックスした後、100°C 3 分間加熱し、9,300 g で 5 分間遠心分離後、上清を回収した。さらに沈殿物にメタノールを 100 µL 添加し、マイクロホモジナイザーで 20 秒間ホモジナイズ後、9,300 g で 5 分間遠心分離して上清を回収し、

この操作を 2 回繰り返した。すべて合わせた上清に超純水を 200 µL 添加し OASIS HLB カートリッジ 3 cc (60 mg)を用い、血漿と同様に処理して、希釈して LC/MS/MS 分析に供した。

LC/MS/MS 測定

測定は第 2 章で記載した LC/MS/MS によるケルセチン関連物酵素処理測定法を用いた。

統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。統計処理は Two-way repeated measure ANOVA を実施し、有意な差が見られた場合は、Tukey-Kramer 検定を実施し、5%の有意水準とした。解析には JMP 12.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC)を用いた。

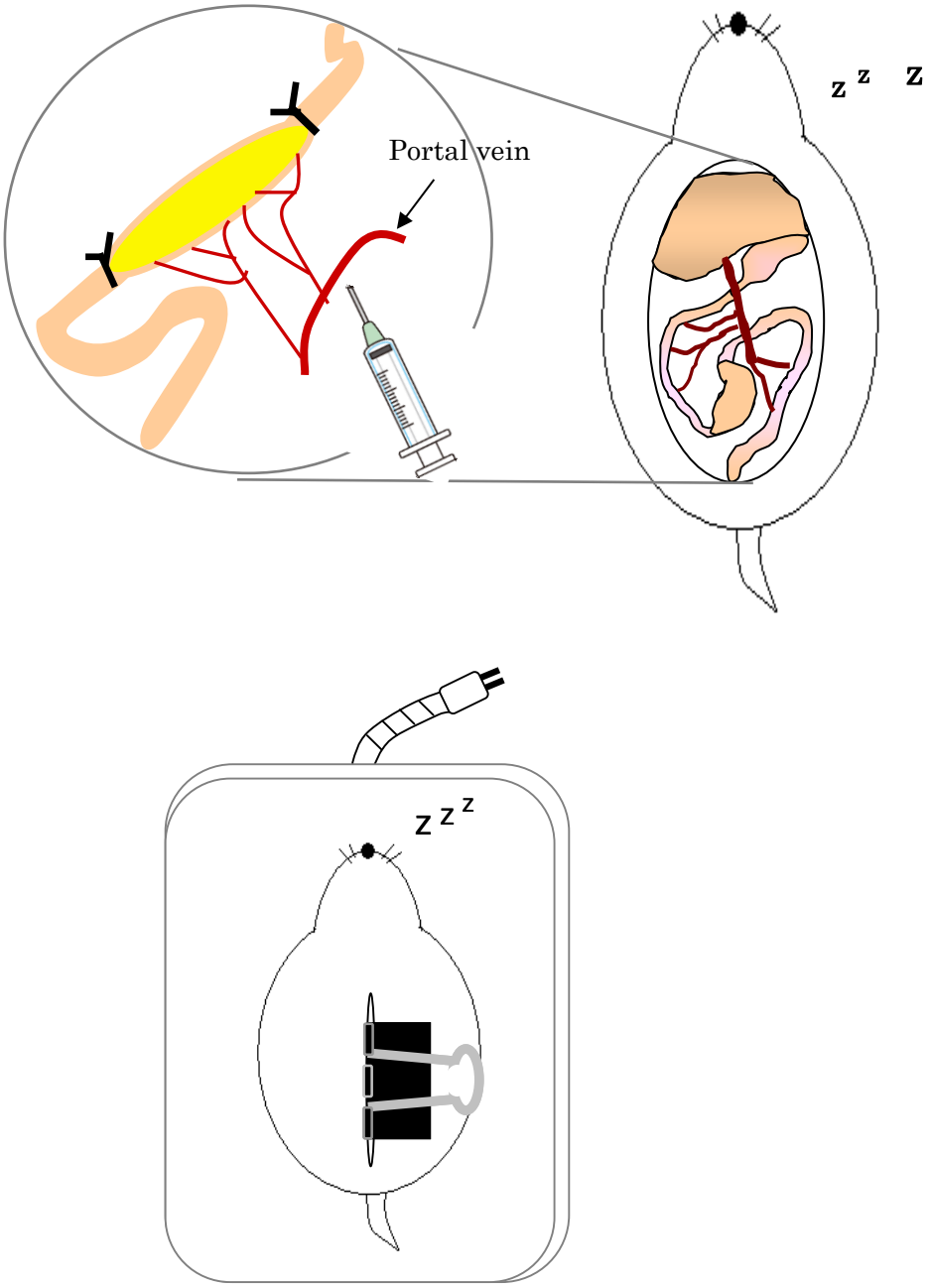


Figure 3-1-1. Schematic presentation of *in situ* ligated intestinal loop test.

【結果】

水溶性ケルセチン配糖体 Q3GM を空腸結紮ループに投与後、門脈血中には quercetin aglycone、methylquercetin、quercetin-3-*O*-glucoside (Q3G)、ケルセチン抱合体、メチルケルセチン抱合体が検出された(Figure 3-1-2)。Q3G にさらにグルコースが付加した Q3G2-Q3G8 は血中で検出されなかった。Quercetin とケルセチン抱合体の濃度が最も高く、メチルケルセチン抱合体も比較的高濃度であった。Methylquercetin と Q3G はわずかであった。

難消化性二糖 melibiose 添加群では、Q3GM 投与後 15 分から 60 分にかけて、control 群と比較して quercetin の門脈血中濃度が有意に上昇した(Figure 3-1-2 A)。また両群において Q3G の血中濃度は低値を示した(Figure 3-1-2B)。ケルセチン抱合体とメチルケルセチン抱合体の濃度は 60 分まで経時的に増大した(Figure 3-1-2 C,E)。投与後 60 分で、methylquercetin、ケルセチン抱合体、メチルケルセチン抱合体は control 群と比較して melibiose 添加群で有意に高値を示した(Figure 3-1-2 C,D,E)。Figure 3-1-3 に門脈血中の total quercetin 濃度を示した。Total quercetin は quercetin, methylquercetin, quercetin-3-*O*-glucoside (Q3G), ケルセチン抱合体、メチルケルセチン抱合体の合計で算出された。門脈血中濃度は、経時的に上昇し、投与 30 分以降で melibiose 添加群でコントロール群に比べて有意に高い値となった。60 分後は、control 群で 40.94 ± 3.7 μmol/L、melibiose 添加群で 66.7± 4.9 μmol/L となった(Figure 3-1-3)。Melibiose 添加による total quercetin の変動は、ケルセチン抱合体およびメチルケルセチン抱合体の変動が反映されていた。また投与 60 分後に解剖を行い、腹部大動脈血を採取したところ、total quercetin, ケルセチン抱合体、メチルケルセチン抱合体のすべてにおいて melibiose 添加群で有意に血中濃度が上昇した(Figure 3-1-4 A,B,C)。

60 分後に放血致死後、残存結紮ループ中の内容物を測定したところ、quercetin と Q3G が主要な構成物であり、Q3G2 とケルセチン抱合体がわずかに検出された。しかし Q3G3-Q3G8 は検出されなかった。また残存 Q3G の濃度は control 群と比較して melibiose 添加群で約 1/2 低値を示した。また total quercetin も melibiose 添加で有意に低かった(Figure 3-1-5)。投与した Q3GM 量と 60 分後にループ内に残存したケルセチン関連物量から吸収率を算出したところ、melibiose 添加で有意に上昇し、吸収促進作用が示された(Figure 3-1-6)。

【考察】

本試験においても、第 1 章序論(ケルセチンとは)で記載したとおり、ケルセチンの表記法は下記で統一した。一般的な名称を表す際にはケルセチン、糖が結合していない状態（アグリコン）で化合物そのものを表す際には quercetin または quercetin aglycone とし、ケルセチンモノグルコシドは Q3G、水溶性ケルセチン配糖体は Q3GM と表記した。

本研究では、難消化性二糖の melibiose 添加により、水溶性ケルセチン配糖体投与後の門脈血中ケルセチン関連物の血中濃度が、control 群と比較して大きく上昇した。この結果は、melibiose がケルセチンの吸収を促進したことを示している。過去の研究においても、難消化性二糖の一種 DFA III により、小腸上皮細胞間のタイトジャンクションを介した細胞間経路のケルセチン吸収が増大させることが明らかにされている[20]。このことは配糖体である Q3G が DFA III 添加群で有意に血中濃度が上昇したことにより明らかとなった。しかし melibiose は門脈血中の Q3G 濃度を上昇させず、control と melibiose 添加群ともに Q3G 濃度は低値であった。これらの結果は、melibiose が細胞間経路の Q3G の吸収促進には寄与しなかったことを示している。一方、quercetin やケルセチン抱合体が melibiose 添加により control 群と比較して有意に増大した。これらは、melibiose が細胞内経路の吸収を促進させたことを示唆している。

門脈血中 quercetin aglycone 濃度は投与後 30 分に melibiose 添加群でピークに達したが、ケルセチン抱合体やメチルケルセチン抱合体は 60 分まで経時的に増大していた。一般にアグリコンとしては、血中に多くは放出されないが、腸上皮細胞において quercetin aglycone の吸収率が抱合化率を上回ってしまったため、門脈血中に quercetin aglycone が大量に放出されたものと考えられる。

過去の研究により、本試験で用いた水溶性ケルセチン配糖体 Q3GM は下記の二つのステップで quercetin に加水分解されると考えれている。

1) 小腸上皮細胞に高発現する α-glucosidase、マルターゼ-グルコアミラーゼにより Q3GM の α-1,4 グルコシド結合が切断され、Q3G に変換される[25]。本研究においても Q3GM は即座に Q3G へと分解され、melibiose 添加による影響は見られなかった。Q3G に glucose が数分子結合している Q3G2-Q3G8 は血中では検出されなかった。これは過去の研究と一致した[25]。

2) Q3G は β-glucosidase の一種であるラクターゼ・フロリジン水解酵素（LPH）によりアグリコンへと加水分解される[13,14,37]。これがケルセチン配糖体吸収の律速段階とされている[11]。

今回の実験では腸の結紮ループに残存した Q3G 量が、melibiose 添加群では control 群と比較して、約半量であることが明らかとなった。一方 quercetin 量は両群で差が見られなかった。これは melibiose が Q3G から quercetin への加水分解を促進していることを強く示唆している。β-glucosidase は小腸刷子縁膜だけでなく、細胞内にも存在する。ヒトの細胞質 β-glucosidase（hCBG）はイソフラボン・フラボノール・フラボン・フラバノンの配

糖体が基質となるが、4'-と 7-位の配糖体に高い活性を示し、Q3G のような 3 位のフラボノイド配糖体は基質としないと報告されている[38]。また、細胞内経路の吸収においては Q3G は刷子縁膜の脂質二重層を通過できないと考えられており、Q3G から quercetin への加水分解が吸収促進の鍵となっている[39]。以上より melibiose によるケルセチン吸収促進には、LPH による Q3G から quercetin への加水分解の促進が密接に関わっていると考えられた。

Quercetin の吸収促進機構として、当研究室の過去の研究でイソマルトメガロ糖によるケルセチンの可溶化促進が明らかとなっている[23]。筆者らの過去の *in situ* 結紮ループを用いた研究において、可溶化 Q3G は melibiose 添加により有意に増大した(data not shown)。しかしこの作用はイソマルトメガロ糖と比較すると非常に弱く、melibiose による Q3GM 吸収促進効果は可溶化促進とは異なる機構で起こっていると考えられた。

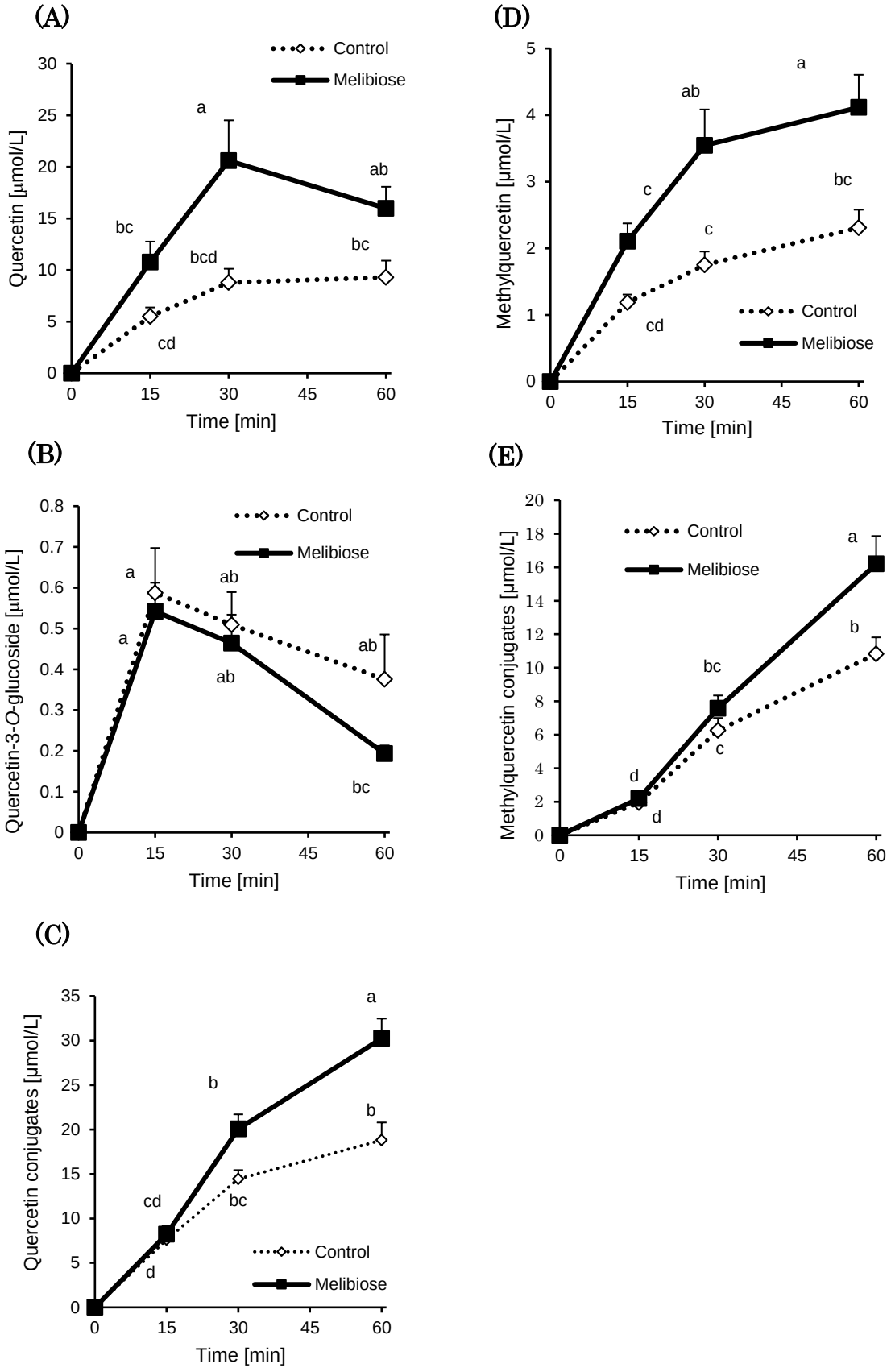

(A)
Control
Melibiose
Quercetin [μmol/L]
Time [min]
(D)
Methylquercetin [μmol/L]
Time [min]
(B)
Quercetin-3-O-glucoside [μmol/L]
Time [min]
(E)
Methylquercetin conjugates [μmol/L]
Time [min]
(C)
Quercetin conjugates [μmol/L]
Time [min]

Figure 3-1-2.

Portal blood plasma concentrations of quercetin aglycone (A), methylquercetin (B), quercetin-3-*O*-glucoside (C), quercetin conjugates (D) and methylquercetin conjugates (E) after instillation of test solution into a rat intestinal loop. Test solution included 10 mmol/L Q3GM with or without 100 mmol/L melibiose. Values are expressed as means ± SEM shown by vertical bars. n = 7-8. Two-way ANOVA *P* values were (A) <0.0001, <0.0001, and 0.0413; (B) <0.0001, <0.0001, and 0.0318; (C) <0.0001, 0.19, and 0.55; (D) <0.0001, <0.0001, and 0.0005; (E) <0.0001, 0.0060, and 0.0101 for time point, saccharides and saccharides x time, respectively. Means not sharing a common letter differ significantly (Tukey-Kramer's test, $P<0.05$).

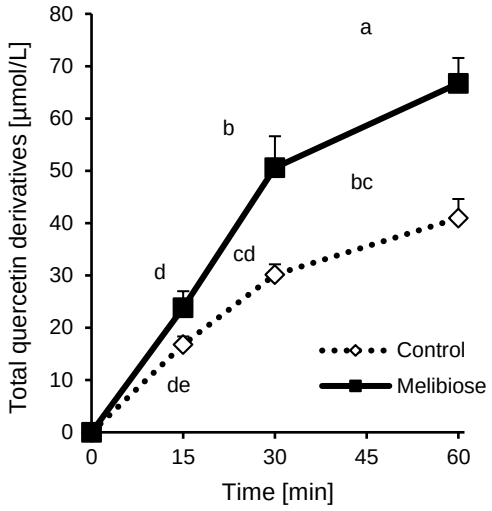


Figure 3-1-3.

Portal blood plasma concentrations of total quercetin, which is the sum of quercetin aglycone, methylquercetin, Q3G, quercetin conjugates, and methylquercetin conjugates after injection of test solution in a rat intestinal loop. Test solution included 10 mmol/L Q3GM with or without 100 mmol/L melibiose. Values are means ± SEM shown by vertical bars. n = 7-8. Two-way ANOVA *P* values were < 0.0001, < 0.0001, and 0.0041 for time, saccharides and saccharides x time, respectively. Means not sharing a common letter differ significantly (Tukey-Kramer's test, $P<0.05$).

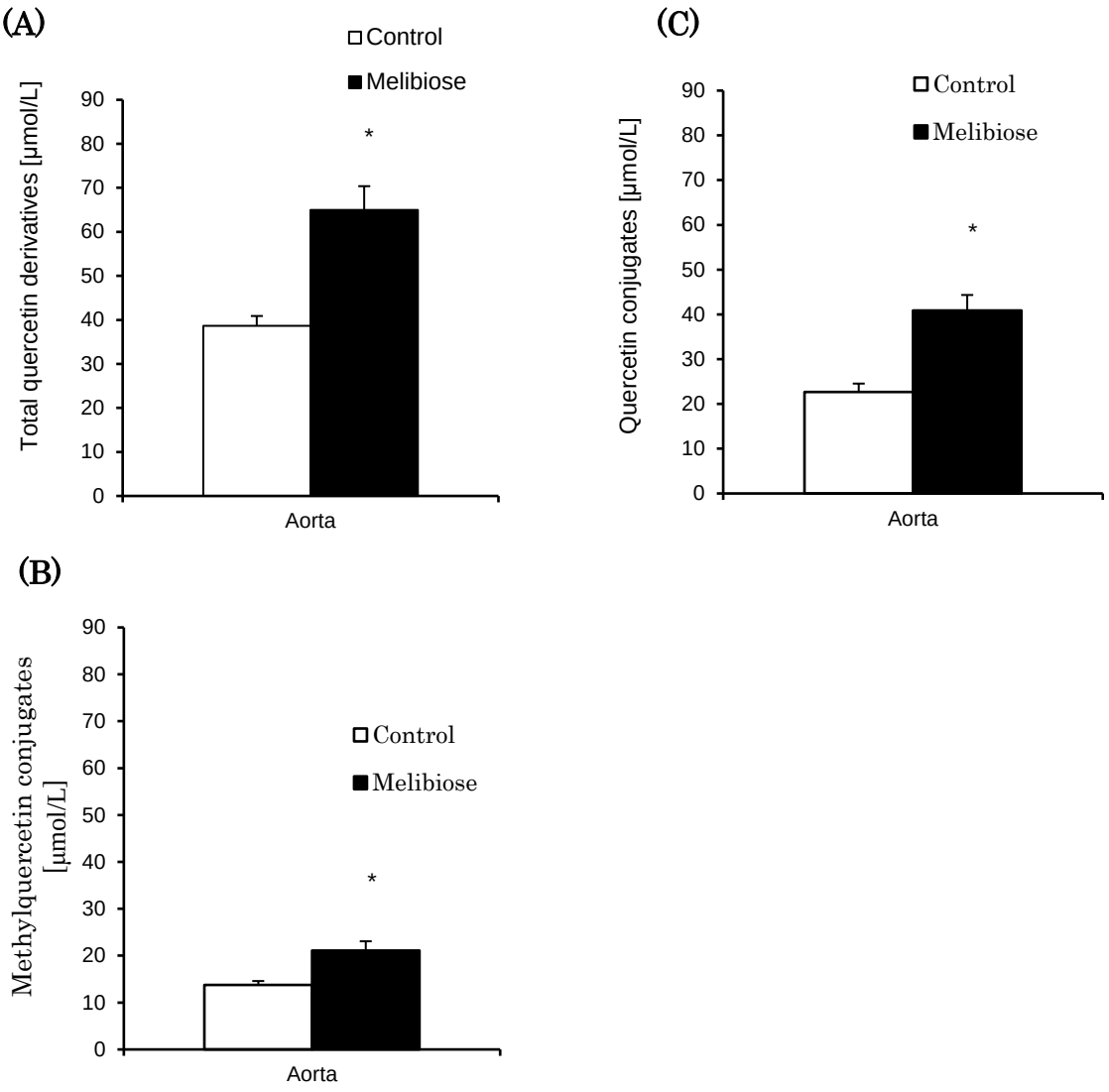


Figure 3-1-4.

The plasma concentrations in abdominal aorta of quercetin conjugates (A), methylquercetin conjugates (B), and total quercetin derivatives (C), which were the sum of the quercetin aglycone, methyl quercetin, Q3G, quercetin conjugates, and methylquercetin conjugates after injection of test solution in a rat intestinal loop. Test solution included 10 mmol/L Q3GM with or without 100 mmol/L melibiose. Values are expressed as means ± SEM shown by vertical bars. n = 7-8. Asterisk (*) indicates significant difference compared to control group, $P < 0.05$.

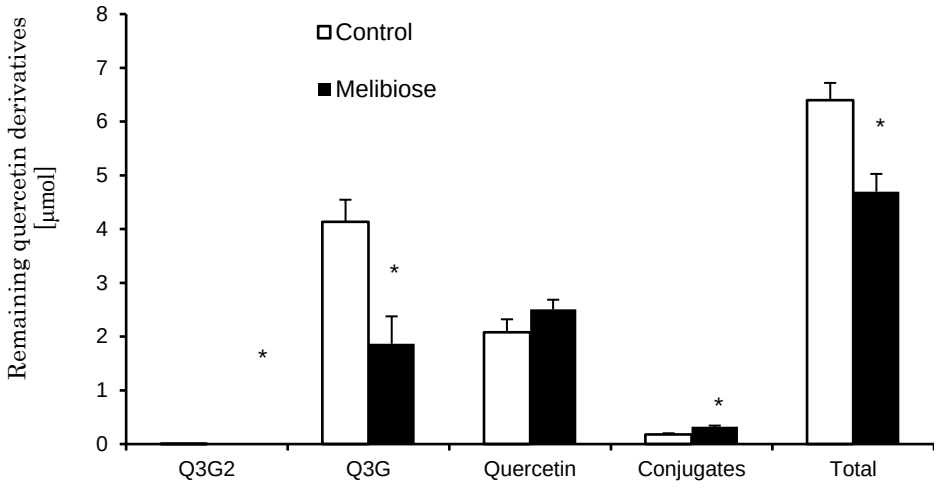


Figure 3-1-5.

Luminal amounts of Q3G2, Q3G, quercetin, conjugates and total (sum of individual contents) remained in a rat intestinal loop after injection of 10 mmol/L Q3GM mixture with or without 100 mmol/L melibiose. Values are expressed as means ± SEM shown by vertical bars. n = 7-8. Asterisk (*) indicates significant difference compared to control group, $P < 0.05$.

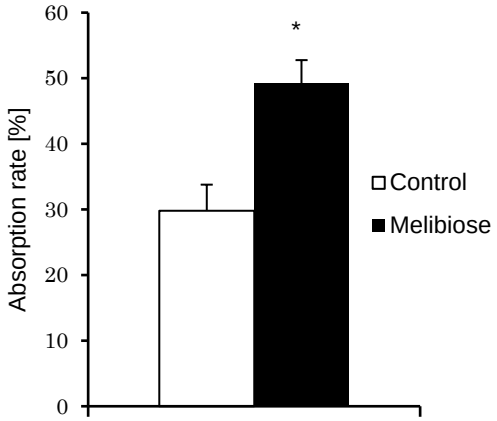


Figure 3-1-6.

Absorption rate of instilled Q3GM in the ligated intestinal loop. Rats were instilled with 1.5 mL of Q3GM (15 μmol/rat) with or without 100 mmol/L melibiose. Values are expressed as means ± SEM shown by vertical bars. n = 7-8. Asterisk (*) indicates significant difference compared to control group, $P < 0.05$.

実験 3-2 二糖によるケルセチン配糖体分解への影響

【背景と目的】

実験 3-1 で melibiose がケルセチンの吸収を促進させること、またその際に Q3G から quercetin への分解が促進されていることが示唆された。そこで本研究では、melibiose を含む二糖類が Q3G から quercetin への分解に与える影響を調べるため、*in vitro* 試験を行った。本試験では管腔内の膜消化による加水分解反応を模倣するため、酵素源として小腸粘膜ホモジネートを用いた。

in vitro の試験において酵素の活性を調べる手法としては、ミカエリスメンテンの式に当てはめ、酵素反応速度論的に酵素と基質の V_{max} や K_m を算出する手法がある。しかし、今回の場合は基質の Q3GM は Q3GM ⇒ Q3G ⇒ quercetin へと二段階の反応により分解されることから、単純に K_m や V_{max} を算出することはできない。これは Q3G を基質にすることで解決するが、Q3G は水への溶解度が 50 μmol/L と低く、K_m や V_{max} を算出することができない。従って、本研究では Q3GM を基質として、中間産物の Q3G と最終生成物 quercetin 量をモニターすることとした。易水溶性 Q3GM から Q3G への α 結合の加水分解は急速に進むため、一定時間反応させた場合は、概ね Q3GM から Q3G への分解は結果にほぼ影響しないと考えられる。

あらかじめ予備試験を行い、適切な粘膜ホモジネート濃度、および基質濃度を決定した。二糖として melibiose と同じ α-1,6 結合をもつグルコース 2 分子からなる isomaltose、グルコース 2 分子が α-1,1 結合した trehalose、グルコース 2 分子が β-1,4 結合した cellobiose、ガラクトースとグルコース 2 分子が結合した lactose、TJ による吸収促進作用が報告されている DFAIII を用いた。

本実験の目的は、二糖類がケルセチン配糖体の分解に与える影響を調べることである。

【方法】

<u>小腸粘膜ホモジネート（酵素）の作製</u>

Wistar / ST 雄性ラットの空腸もしくは回腸の内容物を生理食塩水で洗浄後、冷凍保存した。予備実験により、試験当日にラットから粘膜を採取して作成した粘膜ホモジネートと、一度冷凍した小腸からスクイーズ法により作製した粘膜ホモジネートでは分解速度に顕著な違いがないことを確認しており(data not shown)、本実験では冷凍した腸からスクイーズ法により粘膜ホモジネートを作製した。ラット小腸粘膜の重量は約 0.05 g / cm であった。生理食塩水を用いて 20%（w/v） の粘膜ホモジネートを大量に作製し、分注した状態で-80°C で冷凍し、ストック酵素とした。毎回の実験では生理食塩水で希釈し、5%粘膜ホモジネートを作製した。

<u>基質の調製</u>

Q3GM は 8 mmol/L の溶液を作製し、そこから 400, 800, 1000, 160 2000, 4000 μmol/L となるように希釈した。6 つの二糖類（Figure 3-2-1）は 400 mmol/L となるように溶解し、

Q3GM と二糖類を混合し、二糖類 200 mmol/L を含む Q3GM 200, 400, 500, 800, 1000, 2000 μmol/L 溶液を作製した。これらは浸透圧が 300 mOsm/L となるように NaCl で調整した。また 6 種の 2 糖類の影響を調べる試験では基質 Q3GM の濃度を 1000 μmol/L に固定して実験を行った。

反応試験

あらかじめ 1.5 mL チューブに 100 μL 基質を分注しておき、酵素は使用量を 15 mL チューブに分注し、それぞれ 37°C で 2 分間プレインキュベートした。振とう速度は 130 rpm とした。その後 5%粘膜ホモジネートを 20 秒間隔で 100 μL ずつ添加することで反応を開始した。反応時間は実験によって変更した。Figure 3-2-2 の試験では、15, 30, 60, 120 分としたが、そのほかの試験の反応時間は 5 分間とした。その後、100°C で 3 分加熱することで反応停止した。

統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。統計処理は Tukey Kramer's test を実施し、有意水準は 5%とした。

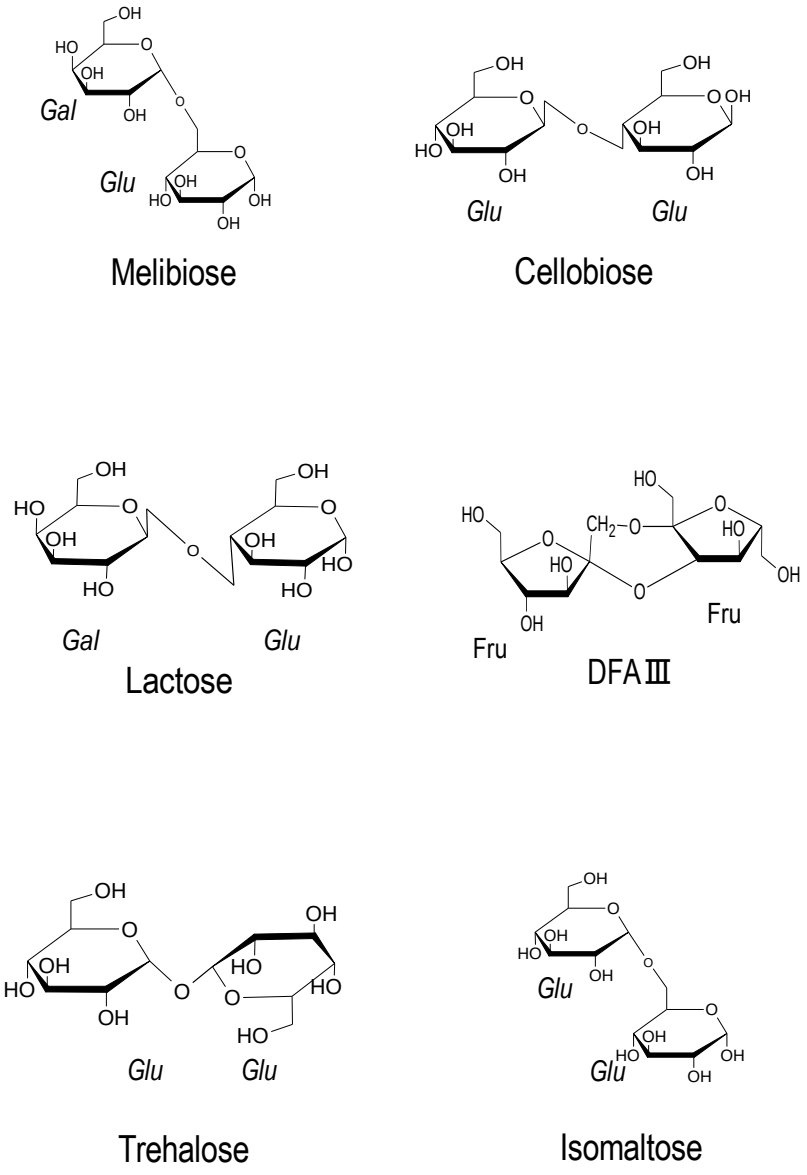


Figure 3-2-1. Compound structures of melibiose, cellobiose, lactose, DFAⅢ, trehalose and isomaltose.

【結果と考察】

まず小腸粘膜ホモジネートにより、基質として水溶性ケルセチン配糖体（Q3GM）を用いて、加水分解反応を行い、反応液を LC/MS/MS で測定してその反応物濃度を算出した。グルコースが複数結合した Q3G2-Q3G8 は反応開始後 15 分でほぼすべてが Q3G に分解され、melibiose 添加による違いは見られなかった(Figure 3-2-2A)。また、Q3G は Q3GM に元々含有しているが、その量は反応開始 15 分後に上昇し、それ以降は経時的に減少した。また、melibiose 添加により、その濃度は control 群に対し低値を示した (Figure-3-2-2B)。さらに最終生成物である quercetin は melibiose 添加により control 群と比較して増大した(Figure 3-2-2C)。これらの結果より、Q3GM が小腸粘膜ホモジネート中の α-glucosidase により、ただちに Q3G へと分解された後、LPH (β-glucosidase)により quercetin へと分解される過程において、melibiose 添加により LPH によるこの分解が促進されていることが示された。また基質濃度と分解速度をプロットしたところ、melibiose, isomaltose 添加群が全く同様の傾向を示し、この 2 群でいわゆる V_{max} に相当する最大反応速度が明らかに上昇していた。このことから melibiose, isomaltose は β-glucosidase の活性を上昇させることが明らかとなった(Figure 3-2-3A)。

次にこの作用が melibiose 特異的に起こるかどうかを調べるため、6 種類の二糖類による Q3G 分解活性を検討した。その結果、同じ α-1,6 結合をもつ melibiose と isomaltose が有意に Q3G 分解速度を亢進した。また DFAIII や trehalose は変化しなかった。逆に cellobiose と lactose は有意に減少した(Figure 3-2-3B)。これは cellobiose と lactose が LPH の基質であること、ならびに Q3G の分解が LPH によることを示している [22,40,41]。

Q3G から quercetin への分解活性亢進には α-1,6 結合の存在が重要であることが示唆されたため、3 糖類についても検討したところ、α-1,6 結合の 3 糖である isomaltotriose では活性が上昇したが、melibiose に fructose が α-1,2 結合した raffinose では上昇しなかった (Figure 3-2-3C)。また isomaltotriose と melibiose の分解促進活性を比較したところ、melibiose がわずかに強かった。このことから、LPH の活性促進には α-1,6 結合が重要であり、3 糖よりも 2 糖の促進作用が強く、その結合糖も重要であることが示された。

Melibiose が Q3G から quercetin への LPH による分解活性を促進する機構として 3 つの仮説を立てた。1) melibiose と LPH が相互作用し、Q3G の加水分解を促進する。例えば酵素に対するアロステリック作用のように melibiose が酵素のある部位に結合することで LPH の活性が促進されるという説である。しかしこれをサポートする報告はなされていない。2) Q3G と melibiose が相互作用することで、Q3G が LPH により結合しやすくなるという説である。しかしこれもサポートする文献はない。3) LPH のサブサイト理論である。LPH は広範囲の特異性がある β-glucosidase で、2 つの活性部位を持つ。1 つはラクターゼ部位で、lactose だけでなく cellobiose, cellotriose, cellotetrose,cellulose も加水分解する。もう 1 つがフロリジン加水分解部位であり、galactosyl-, or glucosyl-β-

ceramide のような大きな疎水的なアルキル側鎖をもつ β-glucoside を加水分解する[42]。LPH の遺伝子配列は明らかにされており、二つの活性部位は同一のポリペプチド鎖上に存在することがわかっている[43]。Q3G は LPH のラクターゼ部位とフロリジン加水分解部位の両方で分解される。これはフロリジン加水分解部位を不活化しても Q3G の加水分解活性が消えなかったことで明らかになった[14]。過去の研究で、glycosidase による糖鎖の加水分解メカニズムにおいてサブサイト理論が提唱されている[44]。LPH はサブサイト構造をもつことが明らかになっている[45]。LPH のサブサイトの個数は明らかにされていないが、*Spodoptera frugiperda* から精製された β-glucosidase (*Mr* 47000)は LPH のように 2 つの活性部位を持ち、N-末端配列が LPH と高い相同性を有する[46]。またこの酵素のセロビアーゼ部位（*Mr* 47,000）はグルコース残基が結合する 4 つのサブサイトを持つことが、セロデキストリン切断データから推測できる。これらにより、LPH のラクターゼ（セロビアーゼ）部位が 4 つのサブサイトを持つ可能性がある(Figure 3-2-4)。サブサイトは-n から+n で表され、-n が非還元末端、+n が還元末端とラベルされる。個々のグリコシダーゼにより異なるサブサイト構造を持つ[44]。切断部位が-1 と+1 の間であり、基質がサブサイトの-1 と+1 に結合する比率が、グルコシド結合加水分解の律速段階となる。二糖と三糖はサブサイト-1 と+1 だけでなく、+2 や+3 にも結合する。そこで melibiose が触媒部位よりも非触媒部位への高い親和性を示すことを想定した。本研究において α-1,6 結合をもつ melibiose と isomaltose が β-glucosidase の活性を促進した。これは α-1,6 結合は他のグリコシド結合よりも柔軟性があるため[47]、切断部位の-1,+1 よりも+2, +3 のサブサイトに高い結合親和性をもつためかもしれない。筆者らは melibiose がサブサイト+2, +3 を占有することで、基質である Q3G が触媒部位の-1 と+1 への結合を増大させ、Q3G の加水分解活性を促進させると考えた。また melibiose に fructose が結合した raffinose は Q3G の加水分解を促進させなかったが、これはフルクトース部分がサブサイトの結合を妨げた結果と考えられた。一方、isomaltotriose は Q3G の分解を促進させた。柔軟な α-1,6 結合の 3 番目の糖は、触媒部位への Q3G の結合を妨げにくいのかもしれない。melibiose がどのように Q3G の加水分解を促進させたかを説明するにはさらなる研究が必要である。

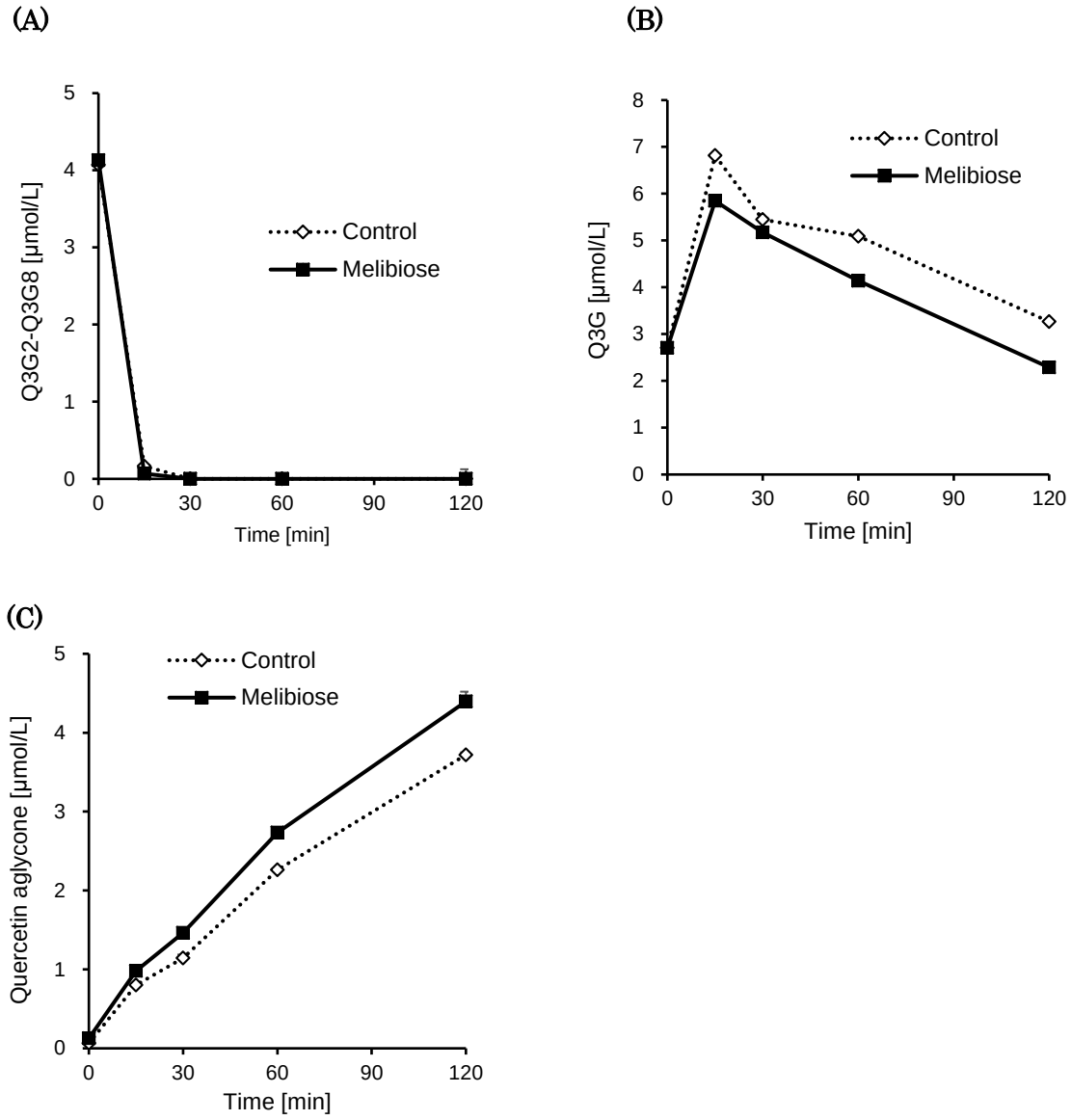


Figure 3-2-2.

Hydrolysis of Q3GM by a homogenate of rat small intestinal mucosa with or without melibiose at 100 mmol/L. Each sample was incubated with the homogenate at 37°C. The reactant concentrations of Q3G2-Q3G8 (A), Q3G (B), and quercetin aglycone (C) were measured. Q3G2-Q3G8 is sum of Q3G2, Q3G3, Q3G4, Q3G5, Q3G6, Q3G7, and Q3G8. Values are expressed as means ± SEM shown by vertical bars. The reactions performed in quadruple or fivefold.

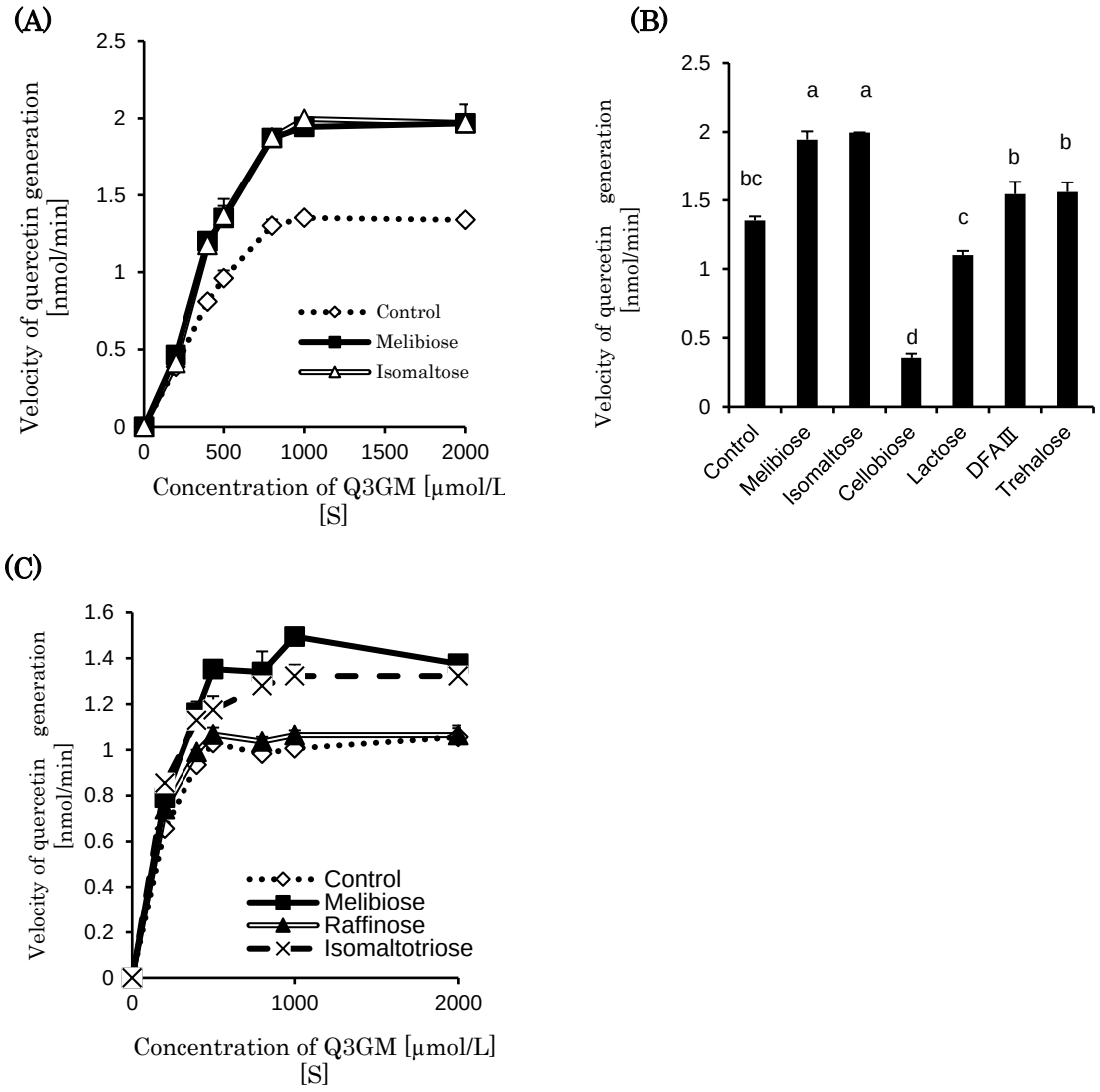
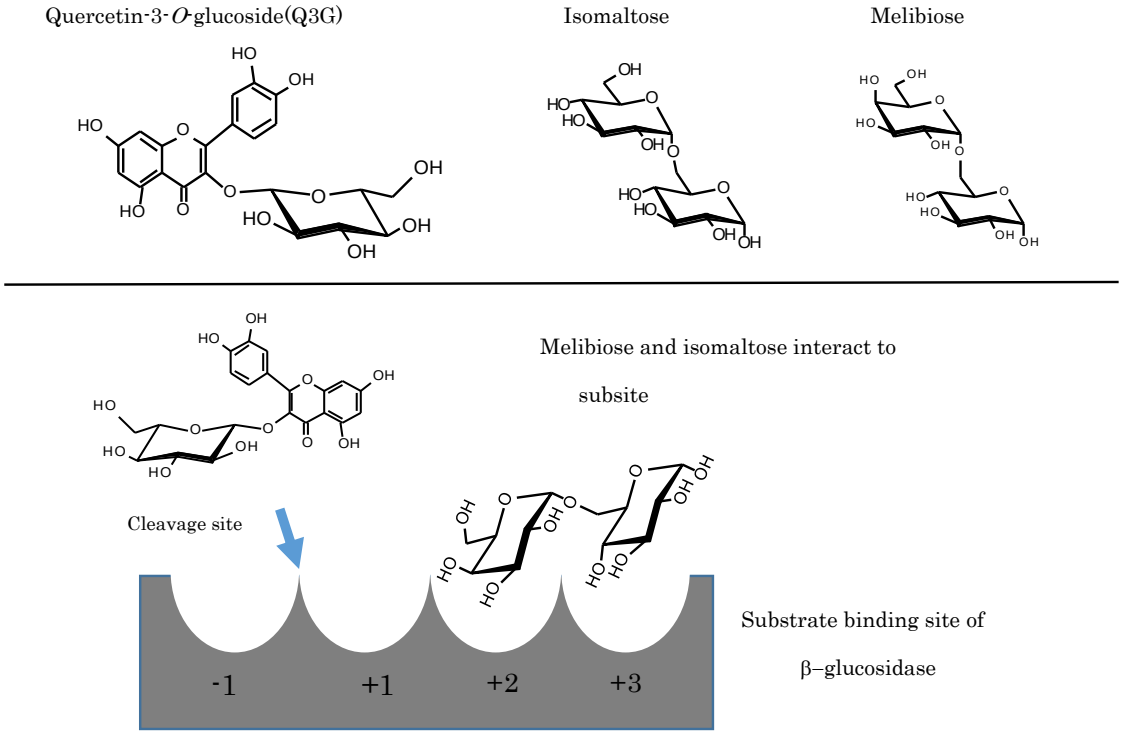


Figure 3-2-3.

Q3GM hydrolysis by the homogenetate of rat small intestinal mucosa with or without saccharides. Figure A shows the *s-v* plot of Q3GM hydrolysis by the homogenate. B shows the rate of quercetin generation from Q3GM at 1000 μmol/L by the mucosal homogenete with NaCl 50 mmol/L (control), melibiose, isomaltose, cellobiose, lactose, DFAIII and trehalose. C shows the s-v plot of Q3GM hydrolysis by the homogenate of rat small intestinal mucosa. Values are expressed as means ± SEM shown by vertical bars. The reactions performed in triplicate or duplicate (Outlier was excluded).



Subsites +2 and + 3 have already been occupied by disaccharides.

→ Probability of Q3G binding to a catalytic site will be increased.

Figure 3-2-4.

Schematic presentation of the substrate-binding subsites.

第 4 章

ケルセチン抱合化反応における腸の寄与と

その組織特異性解析

実験 4-1 *in vivo* 覚醒下ラットの門脈と中心静脈血同時採取法による ケルセチン抱合体の吸収動態

【背景と目的】

ケルセチンが体内に吸収されると、小腸・肝臓・腎臓などの各組織において薬物代謝の第二相反応により抱合化をうけ、血中では主に抱合体として存在する。最近の報告で、血中のケルセチン抱合体自身が生理作用を持つこと、抱合化部位と抱合化の種類（グルクロン酸や硫酸）によってもその活性が異なることが報告されている[28]。各ケルセチン抱合体が体内のどの部位で抱合化されているかを調べることは、ケルセチンの吸収・代謝を知る上で極めて重要である。

本試験ではケルセチンの吸収部位であり、かつ抱合化部位である腸に焦点をあて、腸における抱合化の寄与と抱合化の位置選択性を調べることを目的とした。第 3 章実験 3-1 の *in situ* 結紮ループ試験で、Q3GM の小腸における吸収を評価しているが、*in situ* 法は吸収量や吸収部位を調べられる一方、麻酔下で小腸を結紮しているため、より生理的条件での試験が望ましい。そこで本試験では、頸静脈と門脈にカテーテルを留置することで、無拘束、非麻酔下における吸収と、腸における抱合化反応を調べることとした。中心静脈と門脈血の同時採血法は、過去の研究を参考にした[48]。覚醒下のラットにケルセチン配糖体を経口投与後、経時的に中心静脈と門脈血を同時採血し、その両者の血中濃度の差 Porto-venous difference (P-V difference)を算出することで、腸における抱合化反応と吸収を評価した。実験概要を Figure 4-1-1 に示した。

【方法】

<u>実験動物</u>

8 週齢の Wistar / ST 系雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を 10 匹用いた。ラットは、1 匹ずつステンレス製の網ケージに入れ、室温 22±1°C、湿度 50±5%の飼育室で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。飼育期間中の飼料と水は自由摂取とし、飼料は毎日新しいものを与え、飲料水は 2 日おきに一度交換した。AIN-93G で 7 日間予備飼育後、実験に使用した。

<u>カテーテルの作成</u>

門脈カテーテルの作成は実験 3-1 と同様の手法で作成した。中心静脈採血用の頸静脈カテーテルは、15 cm に切った医療用チューブ No.00（ID: 0.5 mm, OD: 1.0 mm、シラスコン、株式会社カネカメディックス）の先端を斜めに切り、先端から 3cm の部分にシリコンボンド（3D-MATE、株式会社ヂャンテイ）で球（ストッパー）を作った。これは、カテーテルを頸静脈に挿入した後に球の上と血管を糸で結ぶことによってカテーテルが頸静脈から抜けることを防ぐ役割がある。ヘパリンナトリウム（1000 IU/mL、味の素製薬株式会社）を市販の生理食塩水（日本薬局方、生理食塩水、大塚生食注）を用いて 25 倍希釈し体内維持用のヘパリン溶液を作製し、1 mL シリンジに満たした後、先を削った 22 G の針を取り

付け、針の先端にカテーテルを取り付けた。実験前にはカテーテルの先端までヘパリン溶液を満たした。

実験道具

縫合には硬質 No.2 の抱合糸（株式会社夏目製作所）を用いた。経口投与は 2.5 mL のシリンジに栄養カテーテル（アトムメディカル株式会社）を装着し用いた。手術と屠殺の際の麻酔にはマイショット（ニプロ株式会社）を用いた。頸静脈・門脈カテーテル採血には先を削った 22 G の針と 1 mL のシリンジを、腹部大動脈採血には 23 G の針と 5 mL のシリンジを使った。採血用の針とシリンジには生食で 1000 IU に調製したヘパリンを処理した。ガーゼと綿棒はあらかじめ滅菌処理したものを用いた。

アンテナの作成

5 mL シリンジの先をプラスチック専用ののこぎりで切断し、熱した 18 G の針を用いてミヘル縫合針（2.0 x 10 mm, 株式会社夏目製作所）を留めるための穴を 3 ヵ所あけた。この際、穴はなるべく大きめに、かつ穴の配置が均等になるように注意した。アンテナは各ラットにつき 2 個（門脈と頸静脈カテーテル用）使用した。挿入後に区別するため、門脈は赤色、頸静脈は青色にマジックで色塗りしラベリングした。

頸静脈（中心静脈）、門脈カテーテル留置手術

① 麻酔薬としてソムノペンチル（共立製薬株式会社、 80 mg/kg BW）を腹腔内投与し、ラットの背側の耳の下から約 7 cm 下部と、左右どちらかの鎖骨の上側を約 2 cm と、ラット腹側の胸骨下から 6 cm 毛剃りし、プラスチック板に張り付けた。
② 毛剃りした鎖骨の上部右側の皮膚を切開し、ピンセット用いて脂肪を左右に割いて頸静脈を露出させた。
③ ピンセットで糸を挟んだ状態で頸静脈の下側の脂肪に穴を開け、No.2 の縫合糸を通した。糸の両端を鉗子で挟み、糸を上に引っ張ることで、頸静脈に張りがでるようにした。またラットの前歯にタコ糸をひっかけてタコ糸を頭の上で固定することで上顎をあげカテーテルが挿入しやすいように留意した。
④ 18 G の針で頸静脈に穴をあけ、即座にその穴からカテーテルを挿入した。
※注意事項
この時 18G の針で頸静脈血管を貫通させないよう気を付けた。貫通してしまうと出血だけでなく、後日採血ができなくなる原因となる。そのため針は血管と並行にすること、針挿入時は血管を引っ張りすぎないこと、挿入するのは針先端の穴の開いた部分の約 1/3 を差し込み深く入りすぎないように留意した。また頸静脈は脂肪剥離後に徐々に細くなるため、作業は迅速に行った。
⑤ 挿入した頸静脈カテーテルを心臓側に 2 cm ほど進め、中心静脈に到達するようにさせ、

シリンジを引いて血が出るかを確認した。その後 No.0 のシラスコンチューブで作成したプロテクターを使って筋肉とカテーテルを固定した。この際予備的に接着剤（セメダイン株式会社）を使用した。

⑥ 続いて第 3 章実験 3-1 で記載した通り、門脈カテーテルを挿入した。

⑦ 腹の切開部分を No.4 の縫合糸で縫合した。

⑧ ラットを横向きにし、留置針（サーフロー留置針 16 G 2 1/2）を用いて、2 本のカテーテルの皮下通しを行った。その後、ラットの耳の後ろでミヘル縫合針を用いて 2 本のアンテナを固定した。頭側を中心静脈（青色）、尾側を門脈（赤色）と色分けした。

⑨ ラットの縫合後の腹にシノミンをふりかけ、ミヘル縫合針（2.0 x 10 mm, 株式会社夏目製作所）を用いて腹部の皮膚を 6,7 か所で皮膚を閉じた。

⑩ 頸静脈と門脈の 2 本のカテ―テルをアンテナからは 5 cm 程度出るくらいで切断しアンテナ内に折り曲げて固定した。この時カテーテルが詰まらないようにヘパリン生食でカテーテル内を満たした。

⑪ 最後にサルファ剤（マイシリンゾル、明治製菓株式会社）を右足に 20 μL 程度筋肉注射した。

<u>カテーテルメンテナンス</u>

カテーテルが詰まるのを防ぐために、手術の翌日から毎日朝と晩の 2 回カテーテルのメンテナンスを行った。メンテナンスはカテーテルにヘパリンを入れたシリンジを装着し、引いて血が出るのを確認してから、ヘパリン投入用のシリンジに差し替えヘパリンナトリウム（1000 IU/mL、味の素製薬株式会社）を原液のまま充填した。

<u>水溶性ケルセチン配糖体 Q3GM 経口投与試験</u>

頸静脈・門脈カテーテル留置術後、2 日間回復させ、前日の 18 時に絶食させたラットに水溶性ケルセチン配糖体(Q3GM) 100 mmol/L を 5 mL/kg BW となるようにフィーディングチューブを使って経口投与した。Q3GM の溶媒には超純水を用いた。投与前 0 分と投与後 30, 60, 120, 180, 240 分後に中心静脈と門脈から 150 μL 採血した。240 分後にソムノペンチル麻酔下にて開腹し、腹部大動脈から採血後に放血致死させた。得られた血液は遠心分離（4 °C, 10 min, 2300 *g*)し、得られた血漿を-80 °C で保存した。

<u>血漿の処理</u>

血液の処理は第 3 章の実験 3-1 で記載した方法を参考に改変した。各血漿サンプルを脱抱合化酵素処理と無処理群に分けた。血漿 20 μL に超純水 80 μL を加え 0.58 mol/L の酢酸を 10 μL 添加した。脱抱合酵素は第 3 章と同量を添加した。血漿中のケルセチン関連物の抽出操作後、第 3 章では OASIS HLB のカートリッジを用いて固相抽出を行い、塩類や水溶性夾雑物を除去したが、抱合体の種類によってはカートリッジに吸着する懸念があるた

め、本実験では実施しなかった。全上清を遠心濃縮機で濃縮後、メタノールに再溶解させて LC/MS/MS に供した。

血中ケルセチン関連物の測定

血漿中のケルセチン関連物の測定は第 2 章に記載した「LC/MS/MS による抱合体直接測定法」を用いた。本試験では特に単抱合体に着目したため、酵素処理は実施しなかった。

統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。統計処理は Tukey-Kramer's test を実施した。有意水準は 5%とした。また統計処理ソフトには JMP 12.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC) を用いた。

【結果】

Q3GM の経口投与後に血中で検出されたのは、quercetin、methylquercetin, Q3G, quercetin glucuronide, quercetin sulfate であった。Quercetin の構造式を Figure 4-1-2 A に示し、門脈血中の各ケルセチン代謝物の MRM クロマトグラムを Figure 4-1-2 B に示した。クロマトグラム上に記載された 271>151 のような表記は、分析時のトランジション（Precursor ion と Product ion の組み合わせ）を示している。硫酸抱合体(381->301)のクロマトグラムには 3 種のピークが検出され、それぞれ 7- or 3-, 4'-, 3'-sulfate と同定した。またグルクロン酸抱合体(477->301)のクロマトグラムには 4 種のピークが検出され、3-, 7-, 4'-, 3'-glucuronide と同定した。3-glucuronide の前に未同定ピークが検出された。これらは Figure 4-1-3 に示したような標準品分析をもとに定量を行った。

Figure 4-1-4 A に示した total quercetin 濃度は、quercetin、methylquercetin, Q3G, quercetin glucuronide, quercetin sulfate の合計値を表しており、その濃度はモニターした 30-240 min のすべてにおいて中心静脈血より門脈血濃度のほうが高値を示した。門脈血中濃度から中心静脈血中濃度を差し引いた porto-venous difference (P-V difference)は腸におけるケルセチンの吸収強度を示すが、30-60 分で上昇したが、その後 240 分にかけて減少傾向にあった(Figure 4-1-4B)。

Figure 4-1-5 A に示した quercetin aglycone は門脈血中で 30-60 分に高濃度で存在したが、体循環血である中心静脈血中では低値を示した。Methylquercetin は門脈血と中心静脈血中濃度に大きな差が見られなかった(Figure 4-1-5 B)。また、タイトジャンクション経由の吸収の指標である配糖体の Q3G 門脈血中濃度は 1 μmol/L 以下であった（データ非掲載）。Quercetin aglycone と methylquercetin の P-V difference を Figure 4-1-5 C,D に示した。Quercetin aglycone は 30-60 分という早期で腸における吸収が高かったが、methylquercetin は quercetin と比較すると低値を示し、経時的な濃度変化はほとんどなかった。Figure 4-1-6 A, B に示した、グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の各異性体の合計の血中濃度のグラフは、そのグラフの形状は異なるものの、濃度はほぼ同等であった。また、グルクロン酸抱合体の中心静脈血中濃度は、門脈に比べて低かった。腸におけるグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の吸収強度のグラフを Figure 4-1-6 C,D に示した。グルクロン酸抱合体の P-V difference は投与直後の 30 分で極大吸収となり、その後減少した。一方、硫酸抱合体は 30-240 分では大きな変動は見られなかった。またその濃度はグルクロン酸抱合体が顕著に高かった。このことは腸ではグルクロン酸抱合体が主要な抱合化反応であることを示唆している。Quercetin aglycone (Figure 4-1-5 C), methylquercetin (Figure 4-1-5-D), グルクロン酸抱合体(Figure 4-1-6 C)、硫酸抱合体(Figure 4-1-6 D)に示した各 P-V difference から各代謝物の腸の吸収強度の AUC を算出し、total quercetin の P-V difference (Figure 4-1-4 B)の AUC を除算することで、腸において吸収された各代謝物の比率を算出し、Figure 4-1-7 に示した。その結果、quercetin が全体の 52%、グルクロン酸抱合体が 28%であり、methylquercetin と硫酸抱合体の比率は比較的低値であった。

各抱合体の位置異性体についても分離定量を行った。Figure 4-1-8 にはグルクロン酸と硫酸抱合体の各異性体の門脈・中心静脈血中濃度、P-V difference を示した。また比較のためにすべてのグラフの縦軸スケールを統一した。Figure 4-1-8 A に示した門脈血中各グルクロン酸抱合体は、低値を示した 4'-glucuronide を除く 3 成分で、Q3GM 投与後 30 分で吸収ピークとなり、60 分以降は徐々に減少した。位置選択性については 7->3'->3->4'-の順となった。Figure 4-1-8 B に示した中心静脈血中各グルクロン酸抱合体濃度は、門脈血中濃度と比較するとその濃度が低くく、3'-glucuronide が高値を示した。これは 3'-glucuronide が腸以外の部位でより多く抱合化することを示唆した。Figure 4-1-8 C に各グルクロン酸抱合体の P-V difference を示した。そのグラフ形態は門脈血中濃度とほぼ一致しており、7-*O*-glucuronide が他の 3 種より顕著に高かった。Figure 4-1-8 D に門脈血中各硫酸抱合体の濃度を示した。投与後 30 分で 3' -sulfate が最も高値を示したが、120 分以降は 4'-sulfate が逆転した。またその傾向は、Figure 4-1-8 E に示した中心静脈血中濃度とほぼ同様であった。Figure 4-1-8 F に示した各硫酸抱合体の P-V difference は、中心静脈血のそれよりも低値であった。門脈血・中心静脈血中の各グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体は、投与後 30-60 分が極大吸収であったが、4'-sulfate のみが他とは異なる傾向を示し、投与後徐々に増大し、240 分まで高値を示していた。

グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の位置異性体比の変動と投与後の経過時間の関係を調べるため、投与後 30 分と 240 分の各抱合体の位置異性体の比率を算出した（Figure-4-1-9）。Figure 4-1-9 A のグルクロン酸抱合体は、30 分と 240 分で差は見られず、7-glucuruonide が全グルクロン酸抱合体のうち 60%を占め、7->3'->3->4'-となった。またその比率は 30 分と 240 分で変化しなかった。一方、Figure 4-1-9 B に示した硫酸抱合体は、投与 30 分後では 3'-sulfate が全体の 60%を占めたが、240 分後には 4'-sulfate が最も高値となった。

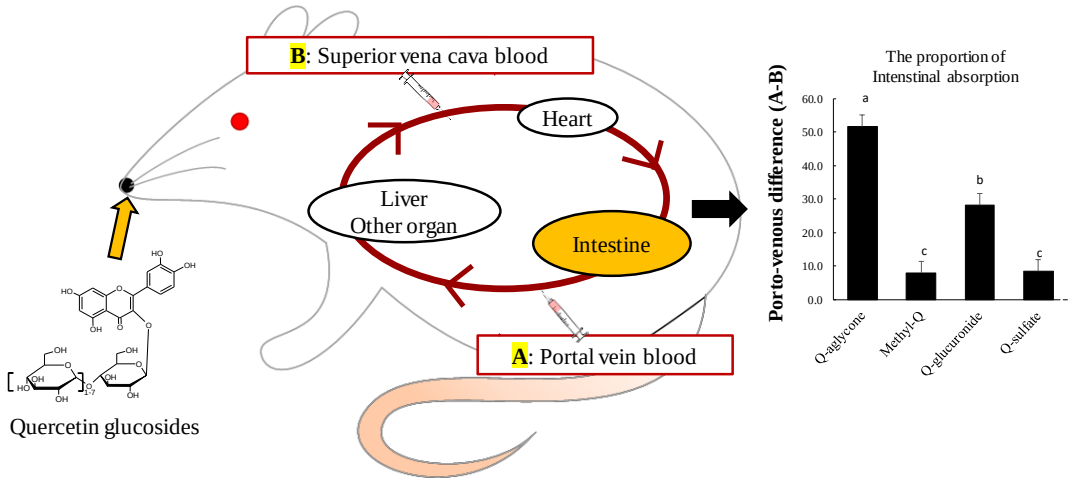
【考察】

Q3GM を経口投与した際、門脈血中には quercetin aglycone が多量に検出されたが、頸静脈中では門脈血中の 1/10 程度の 2 μmol/L であった。このことは小腸からの吸収が増大したために、門脈血中にアグリコンとして放出されたが、肝臓などで直ちに抱合化されたことを示している。ケルセチンの場合、アグリコンのほうが生理活性は強いという報告がある一方[28]、アグリコンが体循環血に回ることで毒性を示すという報告もある[49]。本試験では、門脈血中でのみアグリコン濃度が高く、腸や肝臓で生理作用を発揮した後、肝臓でほとんどが抱合化により無毒化されて、体循環血に放出されると思われる。

Methylquercetin の P-V difference がわずかに存在したことから、小腸においてもメチルトランスフェラーゼが発現していることが示唆された。またケルセチン配糖体である Q3G の血中濃度は極めて低く、Q3GM は小腸上皮細胞間のタイトジャンクションによる吸収経路の寄与は小さく、ほとんどが細胞内経路の吸収であることが示された。またこの結果は第 3 章実験 3-1 の結果と一致した。

グルクロン酸抱合体は投与後 30-60 分という早期に吸収極大があり腸の吸収強度を表す P-V difference が門脈血中濃度の半分を占めていた。このことはグルクロン酸抱合化が急速な反応過程であること、腸には強いグルクロン酸抱合化活性があることを示しており、Crespy らの結果と一致している[50]。一方、硫酸抱合体は門脈血と中心静脈血濃度の差が小さかった。このことは、硫酸抱合化は腸における寄与が小さく、ほとんどが肝臓等の他の組織で行われていることを示している。

さらに本実験では抱合体の種類のみでなく、位置異性体についても評価を行った。グルクロン酸抱合体の位置選択性に関しては、門脈と頸静脈でほぼ同様の血中プロファイルとなり、肝臓と小腸における位置選択性は違いがないことが示唆された。また、投与 30 分と 240 分でもそのプロファイルに違いは見られなった。一方、主に肝臓で生成される硫酸抱合体は、投与直後が 3'->4'-であったのに対し 120 分以降は 4'->3'-と抱合化部位の変遷が認められた。これは 3'-sulfate は投与後すぐに生成されるが、半減期が短いことが示唆された。考えうる原因としては以下が考えられる。１）組織に 3'-sulfate が選択的に取り込まれる。２）3'-sulfate がそのほかの単抱合体と比較すると多抱合化を受けやすい。(抱合化酵素との親和性が高い) ３）3'-sulfate が胆汁や尿に排泄されやすい。(4'-sulfate が排泄されにくい) ４）細胞内で脱抱合されやすい。５）MRP-2 のような排泄トランスポーターで管腔内に排泄された。以上のように種々の原因が考えられるため、さらなる研究が必要である。



The concentration difference (A-B) = Porto-venous difference
= Intensity of intestinal absorption and metabolism

⇒ Glucuronidation > Sulfation and Methylation

Figure 4-1-1.

Schematic presentation of the P-V difference.

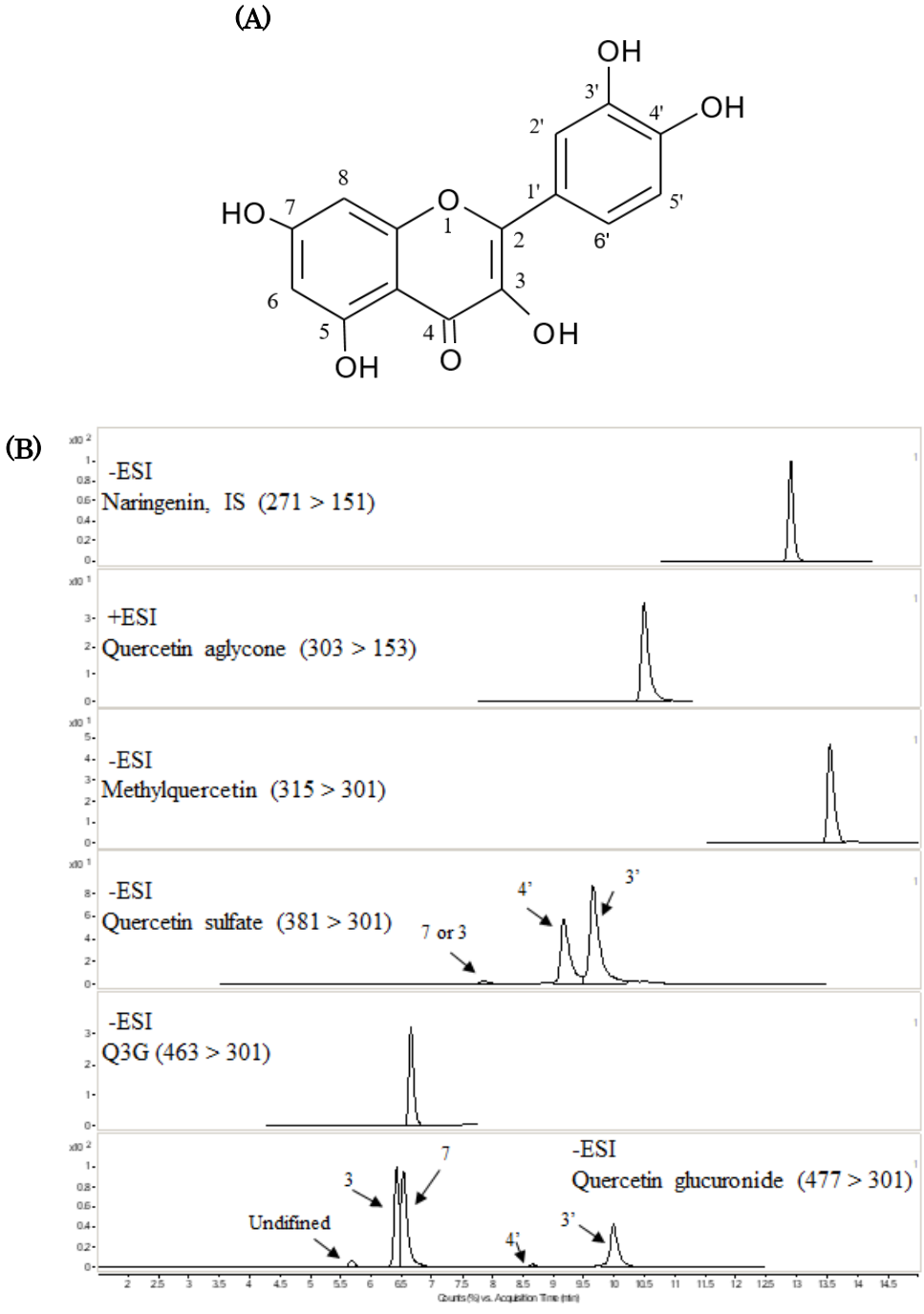


Figure 4-1-2.

(A) Structure of quercetin

(B) LC/MS/MS MRM chromatograms in portal vein plasma.

Numbers in the chromatograms represent different regioisomers of quercetin conjugates.

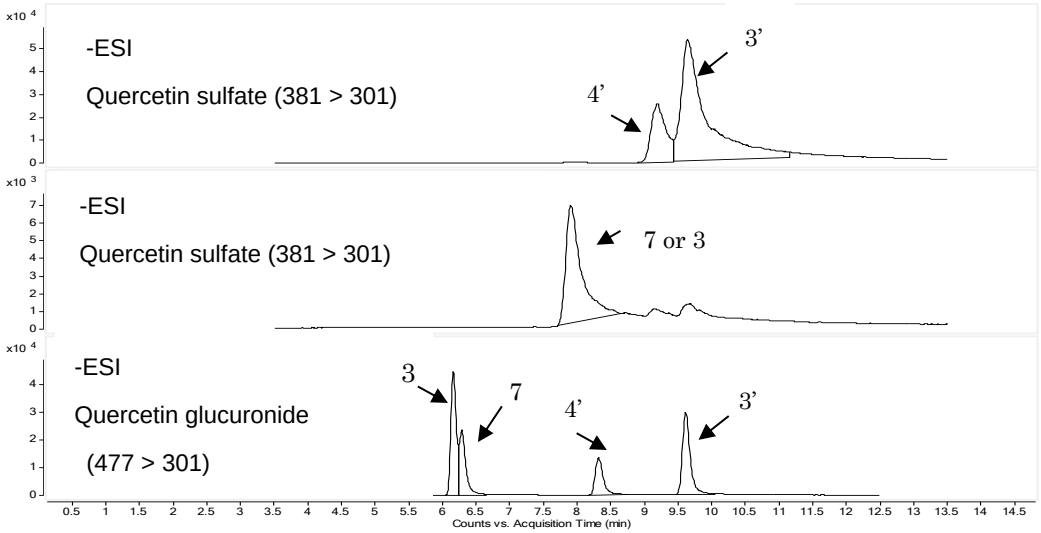


Figure 4-1-3.
Representative MRM chromatograms of LC/MS/MS in standard mixture (0.5 mmol/L).
Numbers in the chromatograms show different regioisomers of quercetin conjugates.

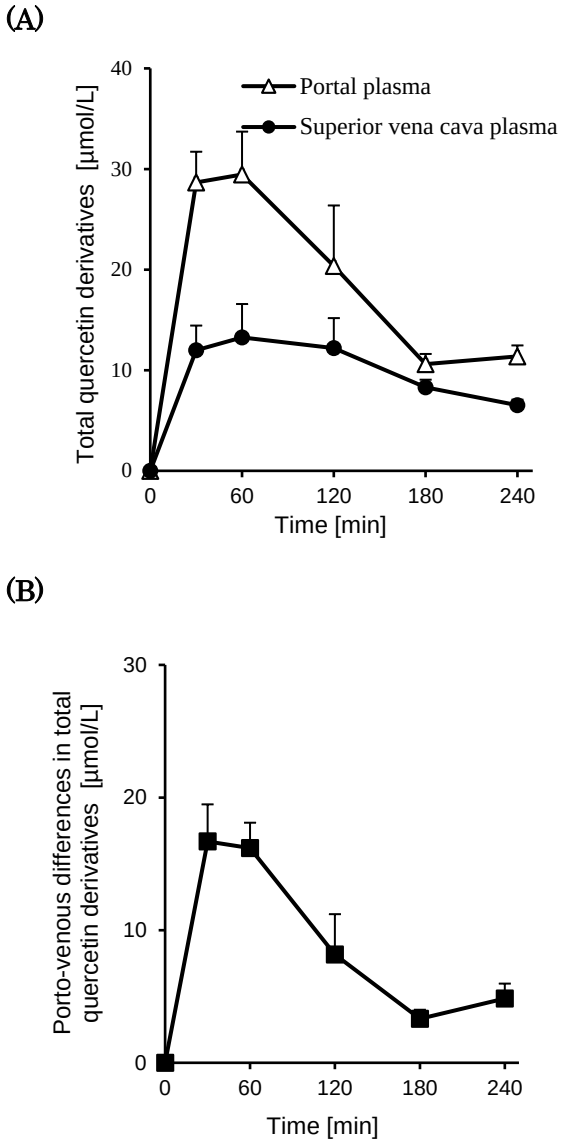


Figure 4-1-4.

Changes in concentrations of total quercetin in portal and superior vena cava blood plasma (A), and their differences (Porto-venous differences, B)

Total quercetin is the sum of quercetin aglycone, methylquercetin, quercetin glucuronides, and quercetin sulfates. Porto-venous differences show intestinal intensities for quercetin absorption and intestinal mechanisms for conjugation and methylation of quercetin.

Notes: Portal and superior vena cava blood was collected before (that is, at 0 min), and at 30, 60, 120, 180, and 240 min after the administration of Q3GM solution (5 mL/kg BW, 100 mmol/L). Values are represented as mean ± SEM shown by vertical bars. n = 5.

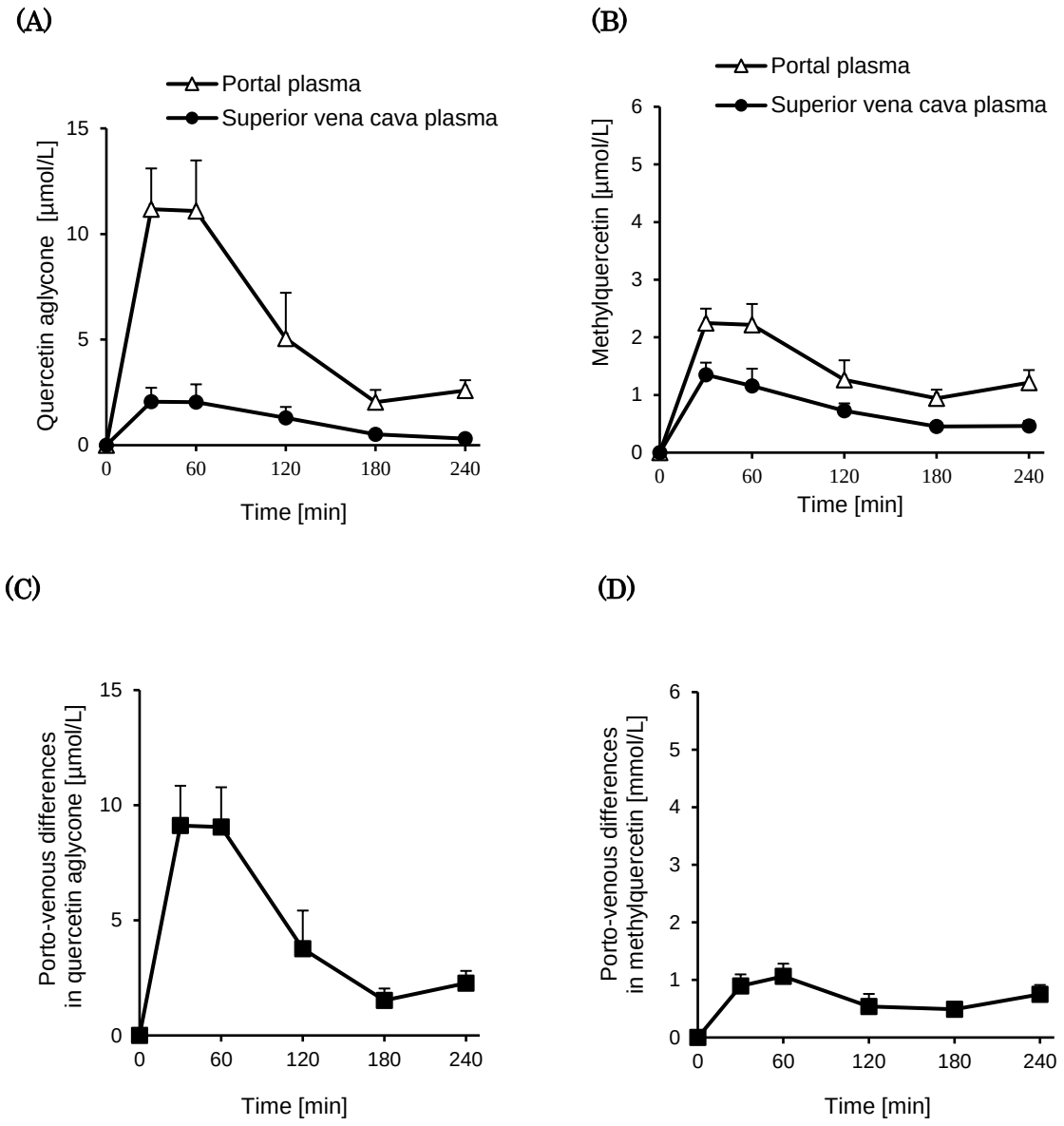


Figure 4-1-5.

Changes in concentrations of quercetin aglycone and methylquercetin in portal and superior vena cava blood plasma and their differences. The portal and superior vena cava plasma concentration of quercetin aglycone (A) and methylquercetin (B) after an administration of Q3GM. Porto-venous differences in quercetin aglycone (C) and methylquercetin (D) evaluated by subtracting their respective concentrations in superior vena cava plasma from that in portal vein plasma.

Notes: Portal and superior vena cava blood was collected before (that is, at 0 min), and at 30, 60, 120, 180, and 240 min after the administration of Q3GM solution (5 mL/kg BW, 100 mmol/L). Values are represented as mean ± SEM shown by vertical bars. n = 5.

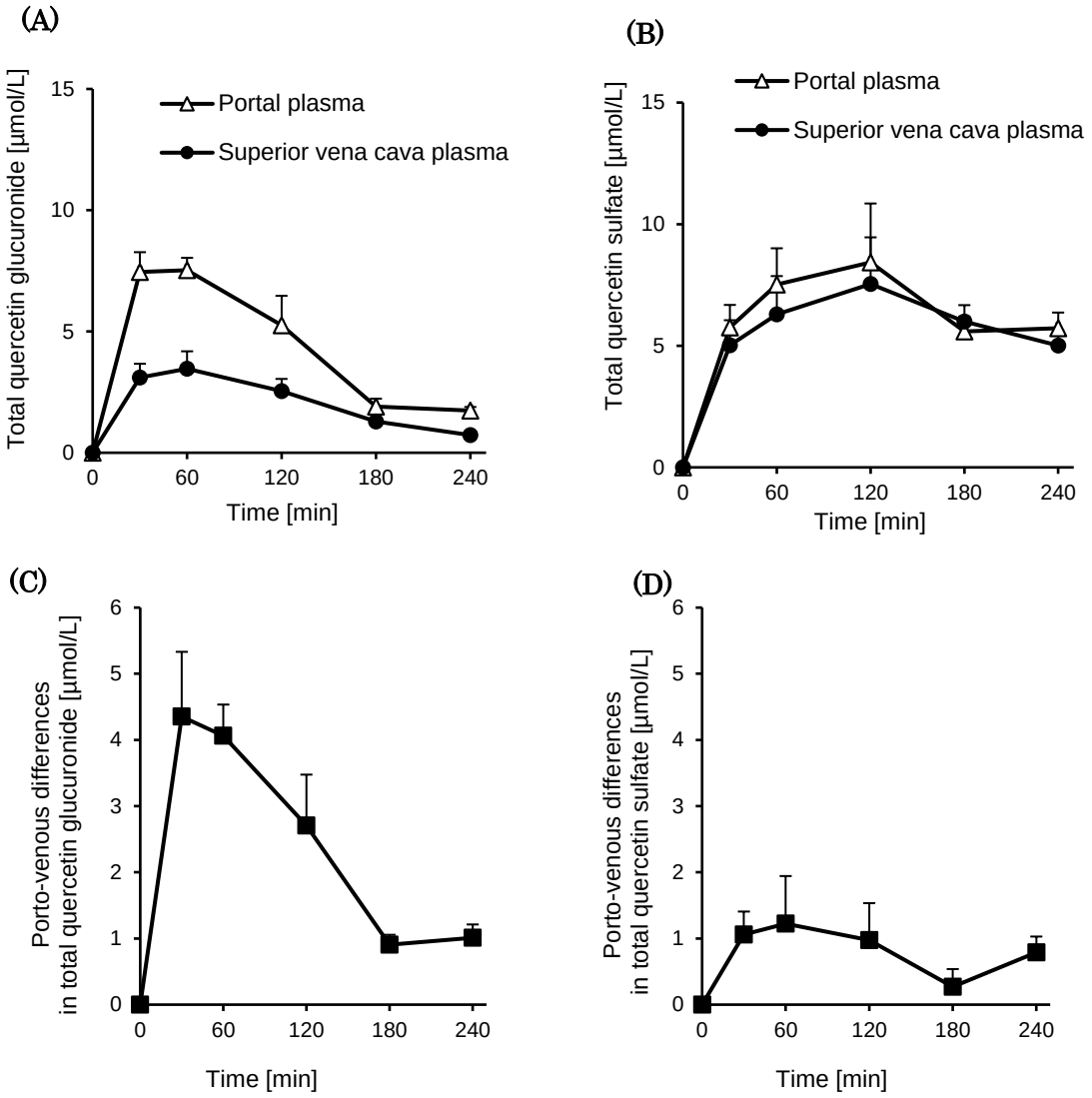


Figure 4-1-6.

Changes in concentrations of quercetin glucuronides and quercetin sulfates in portal and superior vena cava blood plasma, and their differences. The portal and superior vena cava blood plasma concentrations of quercetin glucuronide, (which are a sum of concentrations of all its regioisomers, A). The portal and superior vena cava plasma concentrations of quercetin sulfate, (which are a sum of concentrations of all its regioisomers, B). Porto-venous differences in quercetin glucuronide C) and quercetin sulfate D) evaluated by subtracting the respective concentrations in superior vena cava plasma from that in the portal vein plasma.

Notes: Portal and superior vena cava blood was collected before (that is, at 0 min), and at 30, 60, 120, 180, and 240 min after the administration of Q3GM solution (5 mL/kg BW, 100 mmol/L). Values are represented as mean ± SEM shown by vertical bars. n = 5.

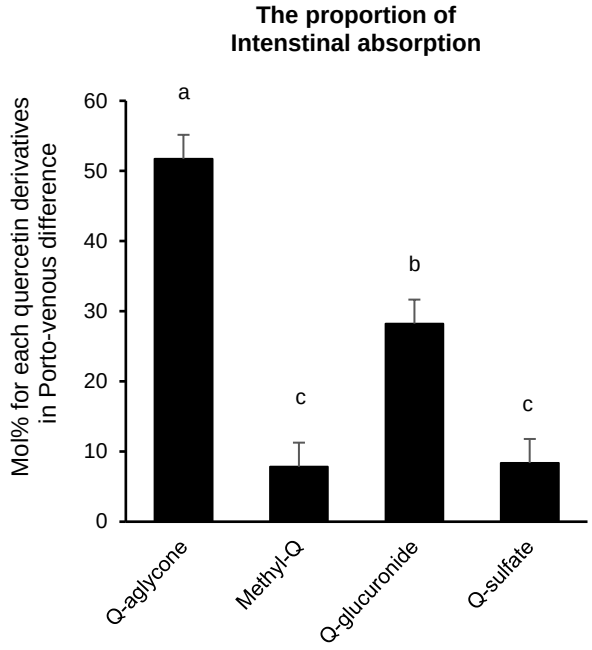


Figure 4-1-7.

Intestinal metabolic rate for total quercetin derivatives.

Notes: Portal and superior vena cava blood was collected before (that is, at 0 min), and at 30, 60, 120, 180, and 240 min after the administration of Q3GM solution (5 mL/kg BW, 100 mmol/L). The intestinal metabolic rate was calculated as follows. First, area under the curve (AUC) of porto-venous differences in the concentrations of total quercetin derivatives (Fig.4-1-4B), quercetin aglycone (Fig.4-1-5C), methylquercetin (Fig.4-1-5D), quercetin glucuronide (Fig.4-1-6C), and quercetin sulfate (Fig.4-1-6D) were examined. AUC of porto-venous difference in the concentrations of each metabolite was divided by the AUC of the total quercetin derivatives. Values are represented as mean ± SEM shown by vertical bars. n = 5. Means not sharing a common letter differ significantly (Tukey-Kramer’s test, $P < 0.05$).

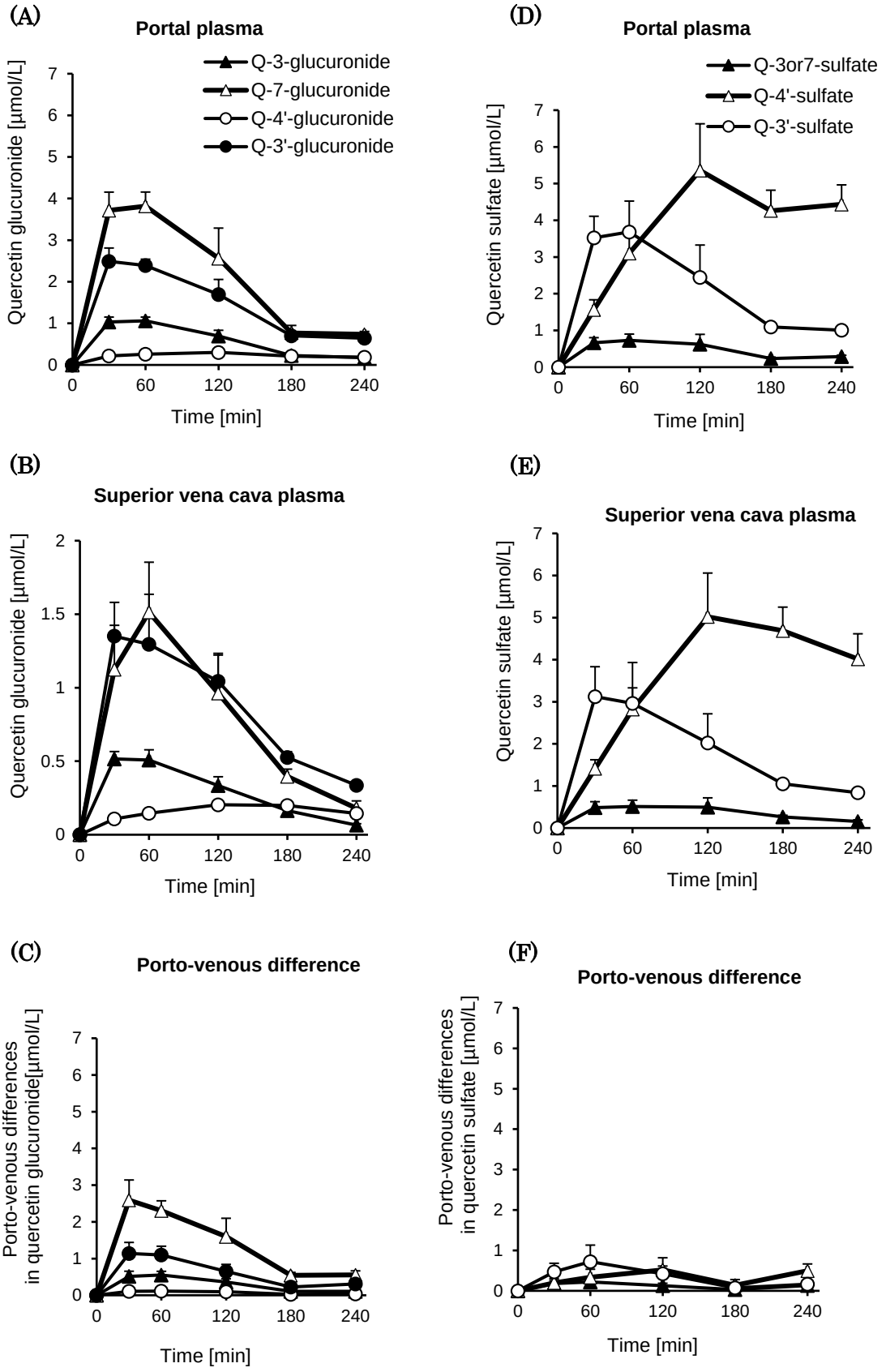

(A)
Portal plasma
Q-3-glucuronide
Q-7-glucuronide
Q-4'-glucuronide
Q-3'-glucuronide
Quercetin glucuronide [μmol/L]
Time [min]
(D)
Portal plasma
Q-3or7-sulfate
Q-4'-sulfate
Q-3'-sulfate
Quercetin sulfate [μmol/L]
Time [min]
(B)
Superior vena cava plasma
Quercetin glucuronide [μmol/L]
Time [min]
(E)
Superior vena cava plasma
Quercetin sulfate [μmol/L]
Time [min]
(C)
Porto-venous difference
Porto-venous differences in quercetin glucuronide[μmol/L]
Time [min]
(F)
Porto-venous difference
Porto-venous differences in quercetin sulfate [μmol/L]
Time [min]

Figure 4-1-8.
Changes in concentrations of regioselective quercetin glucuronide and quercetin sulfate in portal and superior vena cava plasma, and their differences.

Concentrations of regioselective quercetin glucuronide (A) and quercetin sulfate (B) in portal plasma. Concentrations of regioselective quercetin glucuronide (C) and quercetin sulfate (D) in superior vena cava plasma. Porto-venous differences in regioselective quercetin glucuronide (E) and quercetin sulfate (F) are obtained by subtracting the respective concentrations in superior vena cava plasma from those in portal vein plasma.

Notes: Portal and superior vena cava blood was collected before (that is, at 0 min), and at 30, 60, 120, 180, and 240 min after the administration of Q3GM solution (5 mL/kg BW, 100 mmol/L). Values are represented as mean ± SEM shown by vertical bars. n = 5.

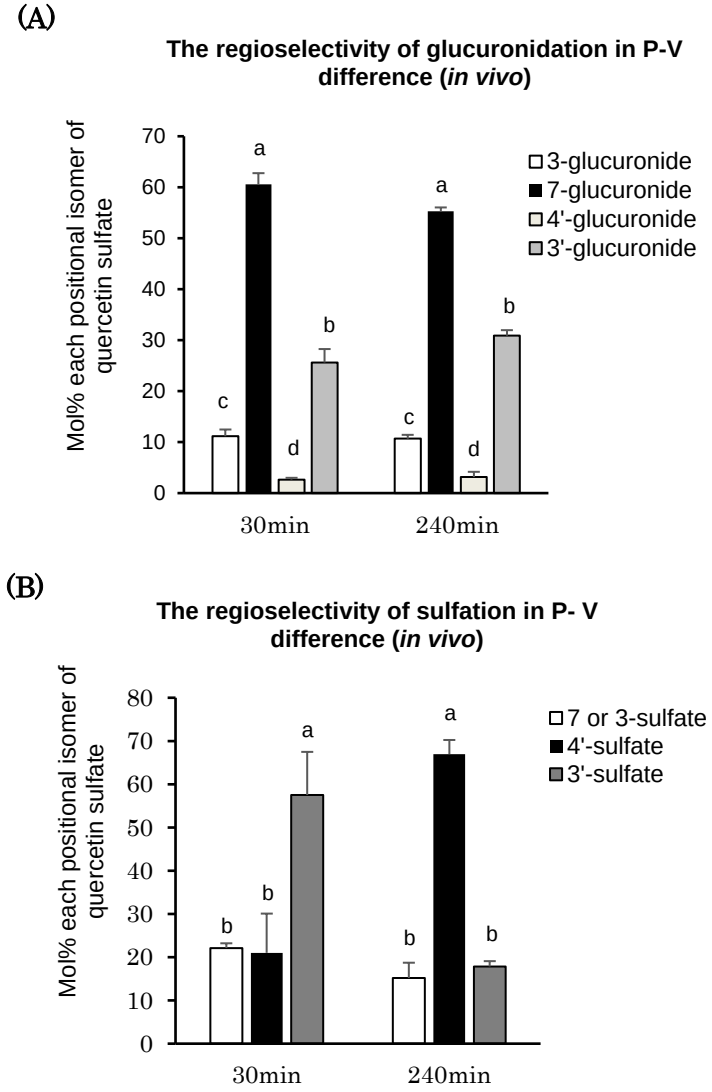


Figure 4-1-9.

Proportion of each positional isomer of quercetin glucuronide (A) and quercetin sulfate (B) in the intestine at 30 or 240 min after Q3GM administration.

Notes: Portal and superior vena cava blood was collected before (that is, at 0 min) and at 30, 60, 120, 180, and 240 min after an administration of Q3GM solution (5 mL/kg BW, 100 mmol/L). Values are represented as mean ± SEM shown by vertical bars. n = 5. Means not sharing a common letter differ significantly (Tukey-Kramer' s test, $P < 0.05$).

実験 4-2 *in vitro* 各臓器の S9 protein による抱合化活性評価

【背景と目的】

実験 4-1 で *in vivo* における各抱合体の位置選択性と抱合化活性を評価した。ここでは実際に抱合化組織である小腸・肝臓・腎臓における抱合化を、抱合化酵素が存在する S9 画分を用いた *in vitro* 試験により評価することとした。*In vivo* では、多抱合化や様々な組織による抱合化の影響を受けるが、本試験では各臓器の抱合化酵素の選択性や活性を評価することができる。過去の研究で抱合化酵素源としてミクロソーム画分を用いたこともあったが、グルクロン酸抱合化を触媒する UGT はミクロソーム画分、硫酸抱合化を触媒する酵素はリソソーム画分に多く存在するため､本試験では両者を含む S9 画分を用いることとした。最後に実験 4-1 の *in vivo* 試験結果と本 *in vitro* 試験の結果を比較して、抱合化活性について考察した。

【方法】

<u>実験動物</u>

7 週齢の Wistar/ST 雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を 3 匹用いた。ラットは、1 匹ずつステンレス製の網ゲージに入れ、室温 22 ± 1°C、湿度 50 ± 5%の飼育室で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。飼育期間中の飼料と水は自由摂取とし、飼料は毎日新しいものを与え、飲料水は 2 日に一度交換した。AIN-93G で 3 日間予備飼育後に解剖を行い、脱血した肝臓、腎臓を採取して液体窒素で保存した。小腸については、採取後すぐに腸細胞を回収する操作に着手した。

<u>ホモジネート用緩衝液調製</u>

肝臓と腎臓のホモジネート用に、50 mmol/L の Tris-HCl (pH7.4)、150 mmol/L の KCl、2 mmol/L の EDTA を含むホモジネート緩衝液を調製した[51]。

小腸ホモジネートは腸細胞を露出するための試薬として、x10 PBS(-)、15 mmol/L の EDTA、還元剤のジチオトレイトール(dithiothreitol, DTT) 0.5 mmol/L、200 倍希釈等量のプロテアーゼ阻害カクテル（03969-21、ナカライテスク株式会社）をそれぞれ含有する細胞溶出緩衝液を作製した。さらに腸細胞の洗浄用として、250 mmol/L のスクロース溶液、0.5 mmol/L EDTA、200 倍希釈プロテアーゼ阻害剤カクテルをそれぞれ含むリンス用調製液を作製した。またホモジナイズ用緩衝液は Tris-HCl (pH 7.4) 50 mmol/L、150 mmol/L KCl、1 mmol/L EDTA、20% Glycerol、0.1 mmol/L DTT、100 倍希釈阻害剤カクテルを含むよう調製した。阻害剤カクテル、DTT は使用直前に混合した。

<u>肝臓と腎臓の S9 画分作製</u>

肝臓と腎組織は細かく刻み、ポッターホモジナイザーに移した。その後肝臓は重量比で 3 倍量のホモジネートバッファー、腎臓は 2 倍量のホモジネートバッファーを添加した。その後組織破砕用の電動ホモジナイザー（ULTRA-TURRAX、IKA、T10 basic）でより細かくしたのち、ポッターホモジナイザーでホモジネートを作製した。その後 12,000g, 20 min

4°C で遠心分離により、核、ミトコンドリアを除去して、上清の S9 画分を回収した。

小腸の S9 画分作製

Andrew らの調製法を参考にした[51,52]。ラット解剖時に、速やかに小腸を採取し、生理食塩水で内容物を丁寧に洗浄後、3－5 cm 程度に切断した。その後腸管を傷つけないように留意しながら切り開き、柔毛を露出させ、1 匹あたり 20 mL の溶出用緩衝液に浸した。保冷剤と氷上で 60 分振とうさせた後、溶離された上皮細胞を含む溶液を回収した。この作業を 3 回繰り返し、上皮細胞を回収した。回収した溶離緩衝液をまとめて、3,000 g, 5 min, 4°C で遠心分離して上清を除いた。沈殿にリンス用緩衝液 20 mL を加え、細胞を懸濁させた。その後 3,000 g 15 min, 4°C で遠心して上清を除いた。細胞ペレットを計量して、ホモジナイズ緩衝液を 1-3 mL/g となるように添加し、ホモジナイズした。その後、5000 *g*, 5 min ,4°C で遠心分離して、核、ミトコンドリアを除去し、上澄み液がクリアーな場合は再度細胞破砕を繰り返した。上澄み液を 12000 *g*, 15 min, 4°C で遠心して、上清を S9 画分とした。

BCA タンパク質濃度測定

作製した肝臓、腎臓、小腸の S9 画分は BCA キット(Thermo fisher)によりタンパク質濃度を測定した。肝臓、腎臓、小腸は 55, 65, 13 mg/mL と算出されたため、抱合化反応時は各組織のタンパク質濃度が 4.8 mg/L となるように調製して実験に使用した。

抱合化反応

各抱合化の補酵素を 15 mmol/L となるようにホモジネート緩衝液で希釈した。補酵素としては、グルクロン酸抱合化に Uridine 5′-diphosphoglucuronic acid trisodium salt (UDPGA)、硫酸抱合化に Adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate lithium (PAPS)、メチル化に S-(5'-adenosyl)-L-methionine (SAM)を使用した。あらかじめ各組織のホモジネート 400 µL に補酵素溶液 100 µL を添加し、5 分間 37°C でプレインキュベートした。そこに 50%DMSO で 12.5 mmol/L となるように溶解させた quercetin 溶液を 2 µL を添加して反応を開始した。60 分後に氷冷したメタノールを 500 µL 添加して反応を停止させた。反応時の終濃度はケルセチン 50 µmol/L、各組織のタンパク質 3.6 mg/mL、補酵素 3 mmol/L と設定した。反応停止後に遠心分離し、上清中のケルセチン関連物を LC/MS/MS で測定した。

【結果】

各組織のグルクロン酸抱合化の位置選択性を Figure 4-2-1 A に示した。グルクロン酸抱合体は 7-*O*-と 3'-*O*-がともに 30%以上を占めた。3-*O*-と 4'-*O*-は 20%以下とわずかであった。またその位置選択性は各臓器によって差異は見られなかった。Figure 4-2-1 B に硫酸抱合化の位置選択性を示した。硫酸抱合は、組織によって選択性が異なり、小腸上皮細胞は 3'-sulfate の活性が高く、4'-sulfate は検出されなかった。肝臓も小腸とほぼ同様の傾向を示したが、4'-sulfate がわずかに生成された。腎臓では、肝臓と小腸上皮細胞とは大きく異なり、7- or 3-sulfate が 70%以上を占め、続いて 3'-sulfate, 4'-sulfate の順で活性が確認された。

【考察】

抱合化反応は各組織に発現しているグルクロン酸抱合化酵素である UDP-glucuronosyltransferases (UGT)や硫酸転移酵素 sulfotransferases (SULT)、メチル基転移酵素 catechol-*O*-methyltransferase (COMT) により触媒され、その酵素の発現量に依存すると考えられる。グルクロン酸転移酵素はヒトやラットには UGT1 と UGT2 ファミリーが存在する。主にヒトについて多くの研究が実施されており、UGT1A9 は 7-*O*-glucuronide の活性が高く、UGT1A1 や UGT1A8 は 3'-*O*-glucuronide の抱合化活性が高いと報告されている[53]。すなわち、各組織に発現している UGT のアイソフォームの違いにより位置選択性が生まれていると考えられる。ラットにおける位置選択性の報告は少ないが、ラットの各組織における UGTmRNA の発現量を観察した研究では、肝臓では UGT1A5 が消化管では UGT1A2, UGT1A3, UGT1A7 が多く発現していることが報告されている[54]。組織によって発現している酵素が異なることが、位置選択性の違いに寄与していると推測される。

本試験では *in vitro* で UGT や SULT を含む S9 画分を小腸上皮細胞、肝臓、腎臓の各組織から作製してそのグルクロン酸と硫酸抱合化の位置選択性を確認した。グルクロン酸抱合化については 7 位と 3'位の抱合化活性が比較的高くほぼ同等であった。また、組織による違いは見られなかった。この結果は過去の *in vitro* 試験の結果と一致した[53]。一方、実験 4-1 の *in vivo* 試験では腸における抱合化活性は 3'-位より 7 位のほうが 2 倍程度高く、*in vitro* の結果とは一致しなかった。この理由としては以下の二つが考えられる。1) 7-*O*-glucuronide は *in vivo* の場合さらに他のヒドロキシ基において抱合化反応（多抱合化）が起きやすい。2) 7-*O*-glucuronide は生成されると即座に尿や胆汁中に排泄される、という可能性がある。1)についてであるが、ケルセチンは二か所以上で抱合化され血中では多抱合体も存在することが報告されており、7-*O*-glucuronide がその基質となりやすい可能性がある。多抱合体の例としては、diglucuronide や glucuronide sulfate、methylquercetin glucuronide sulfate などが報告されている[55]。2)については、これまで排泄トランスポーターと抱合体の親和性が位置異性体で異なるかどうかはまだ調べられていないため、さらなる研究が必要である。

硫酸抱合の各組織における位置選択性は、小腸上皮細胞においては 3'-sulfate が大勢を占め、4'-sulfate は検出されなかった。4'-sulfate の抱合化活性は肝臓と腎臓で観察されたが、どちらも他の部位と比較すると小さかった。*In vivo* 試験おいて明らかになった 3'-から 4'-sulfate への抱合化部位の変遷は、小腸上皮細胞以外の組織の抱合化が関与していると示唆された。しかし 4'-sulfate が投与後 120 分以降に主要な代謝物となる理由は説明できない。考えうる原因としては、血中の 4'-sulfate が他の位置と比較すると尿や胆汁中に排泄されづらいことである。今後排泄トランスポーターと抱合体の位置異性体との親和性を調べる必要がある。

本章では、ケルセチン配糖体単回投与後の短時間の観察であるため、単抱合体についての

み扱ってきた。過去の研究で、ケルセチンを長期間摂取すると代謝物として多抱合体が存在することが報告されている[56,57]。本研究においても酵素処理により total quercetin を間接的に定量し、その P-V differecence を算出したが、多抱合体は腸で吸収量全体の 20%弱存在することが示唆された。このことは、Q3GM 単回投与後の小腸においては、多抱合体の生成がわずかであるものの、今後はこれら多抱合体を含めた研究が必要であることが明らかとなった。

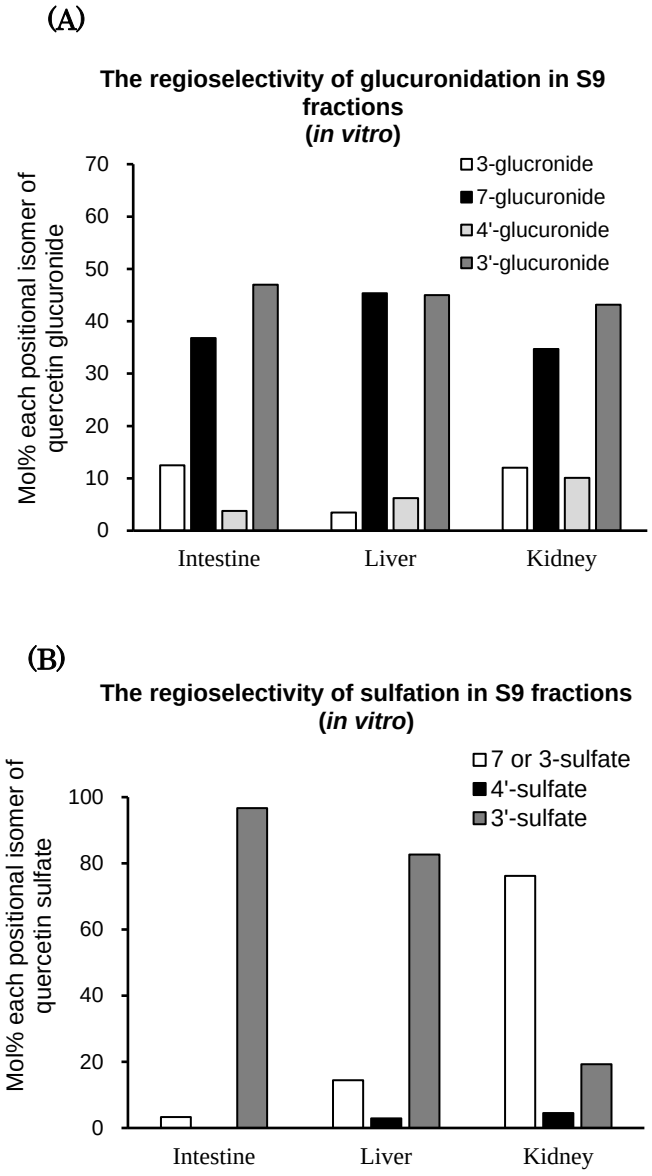


Figure 4-2-1.

Proportion of each positional isomer of quercetin glucuronide (A) and quercetin sulfate (B) in the S9 protein in the intestine, liver and kidney of rats.

Notes: Quercetin aglycone (50 mmol/L) was incubated with S9 fraction prepared from the small intestine, liver, and kidney with UDPGA (A) and PAPS (B) at 37° C for 60 min. The reaction was terminated by adding ice-cold methanol, centrifuged at 9000g for 5 min., and the supernatant was analyzed with LC/MS/MS. Values are represented as average of duplicated experiments.

第 5 章

ケルセチン配糖体摂食ラットにおける

血中ケルセチン抱合体の網羅的解析

実験 5-1 多抱合体標準品作製

【背景と目的】

これまでケルセチン関連物の測定は、その代謝物の種類が多いことやそれぞれの血中濃度が低く測定が困難なため、抱合体を酵素処理で脱抱合し quercetin aglycone と methylquercetin を測定する“酵素処理法”が用いられてきた。しかし最近の研究で抱合体そのものが生理作用をもつこと、抱合化部位により生理作用の強弱があることが報告されており、各抱合体を別々に測定することが求められている。

またケルセチンを摂食した場合、血中ではほとんどが抱合体として存在すると報告されており、さらに当研究室においてもケルセチンの単抱合体の標準品を用いて直接分析を行ってきたが、“酵素処理法”と脱抱合処理なしで直接抱合体を分析する“直接法”の定量結果が合致せず、ケルセチン抱合体は一か所のみならず、複数箇所で抱合化され、血中ではその多抱合体が豊富に存在することが示唆された。以上より、本試験ではケルセチンの多抱合体を直接定量するための、標準品作製を目的とした。

【方法】

<u>ケルセチン摂食ラットの血液採取</u>

ケルセチン多抱合体の粗精製物を得るため、0.5%ケルセチンまたは 0.24% Q3GM を 5 日間以上摂食したさせたラットの腹部大動脈血を採取し、4℃ で 5 分、2,700 g で遠心し、血漿を採取後、さらに血漿の 3 倍量のメタノールを添加して除タンパク処理を行った。その後、上清を遠心濃縮器で 4-5 倍濃縮し、濃縮液を 0.2 μm の遠心フィルターを通して、全量を分取 LC に供した。

当初は上記方法で大量分取を実施する予定であったが、血漿の濃縮液が多量の脂質を含有しており、分取カラムに、高濃度の脂質が汚れとして吸着し、カラムの早期劣化につながる可能性が示唆されたため、一部修正した以下の手法を用いた。血漿濃縮液の脂質除去を目的として、Agilent Captiva EMR-Lipid という前処理カートリッジを用いた。これは、脂質特異的な長鎖脂肪酸部位を認識して、脂質関連物質のみを吸着させ、それ以外のもの（ケルセチン関連物）は素通りさせることができるものである。ケルセチン代謝物を含む血漿 12 mL にメタノールを 36 mL 添加し、遠心分離後の上清を遠心濃縮により 7 mL に濃縮した。ここに水 2 mL、アセトニトリル 1 mL を添加し、EMR Lipid の推奨の有機溶媒 80%とした。10 mL の試料を、3 mL カートリッジタイプの EMR Lipid を 4 本使用し、2,000 rpm で遠心させて通過液を回収した。続いて 100%アセトニトリル 2 mL でカートリッジから溶出しなかったケルセチン関連物をすべて溶出させた。すべての回収液を遠心濃縮し、濃縮液を 50%メタノールに再溶解させ、2.5 mL の血漿濃縮液を得た。

<u>分取 HPLC</u>

フラクションコレクタを搭載した Agilent 1260 InfinityII LC システムにて濃縮した血漿を分取した。ポンプには 4 液グラジエントが可能なクォータナリポンプを使用した。移動相は A 液 ： 超純水、B 液: メタノール、C 液: 5%ギ酸、D 液: 2-プロパノールを用い、グラ

ジエント分析を用いた。グラジエントは Table5-1-1 に記載した。分析カラムは UV 370 nm における主要な 2 ピークを分離するために Sunrise C28 (4.6 x 150 mm, 3 μm, ChromanNik Technologies)を使用し、カラム温度は 30°C で実施した。フラクションコレクタを用いて主要な 2 ピークを自動で分画し、分画液をプール後濃縮乾固した。分析に 2-プロパノールを使用した理由としては、EMR-Lipid の前処理のみでは脂溶性物質がとり切れておらず、繰り返しの分取操作によりカラムに汚れが蓄積し、保持時間がずれるのを防ぐためである。また 5%という高濃度のギ酸を使用した理由は、ターゲット化合物が装置内の金属イオンなどと反応し、テーリングしやすい化合物であるため、吸着を抑えるために使用した。

多抱合体分画液の抱合化部位の特定と濃度算出

各ピークの分画液は遠心濃縮後に、分析用の LC-UV-/MS/MS にてピーク純度を確認した。分画液に対して、抱合化位置とその濃度を算出するため、さらに下記のように脱抱合処理を実施した。0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液（pH 4.5）95 μL に分画液であるケルセチン多抱合体を 5 μL 添加し、そこに脱抱合酵素を添加した。抱合化部位を特定するために、下記の 4 群で試験を行った（duplicate）。

① Control：酵素無添加
② glucuronidase 750 units: β-glcucuronidase IX-A From *Escherichia coli* (Sigma G7396)
③ sulfatase 9 units:sulfatase from *Aerobacter aerogenes* (Sigma S1629)
④ glucuronidase 1500 units + sulfatase 30 units：sulfatase H-2 from *Helix pomatia* (Sigma G9751)+ sulfatase from *Aerobacter aerogenes* (Sigma S1629)

反応液を 37°C で 2 時間インキュベートし、100 μL の内部標準液（naringenin 1 μmol/L、メタノールに溶解）を添加し、5 分間ホモジナイズした。その後 100°C で 3 分煮沸させ遠心上清をさらに濃縮乾固した。乾固した試料は 100 μL のメタノールに溶解させ、LC/MS/MS で測定した。分解して生成されると予想される各単抱合体の標準品と比較することにより多抱合体の抱合化部位を特定し、さらに④の glucuronidase + sulfatase 群の quercetin aglycone と methylquercetin の生成量を定量することで、多抱合体の濃度を算出した。

多抱合体の構造決定

分画精製した多抱合体の標準品は、その抱合化部位を確定させるため、Bruker AMX-500 により ^{1}H-NMR スペクトルを採取した。溶媒は DMSO-d6 を用いた。得られたケミカルシフトを過去の論文と比較してその抱合化部位を特定した。

多抱合体標準品を用いた検量線

作製した多抱合体の標準品は、第 2 章で記載した LC/MS/MS による抱合体直接法で分析

し、検量線を作製した。尚、本分析も内部標準 (IS)として naringenin を使用し、IS との相対強度(relative response)と血中濃度で検量線を作成した。

【結果と考察】

ケルセチン配糖体摂食ラットの血漿を濃縮して UV 検出器で分析したところ、2 つの主要なピークが検出され(Figure 5-1-1)、LC/MS のネガティブイオンモードで、各ピークのマススペクトルを採取したところ、Peak 1 の *m/z* が 557 (Figure 5-1-1 A)、Peak 2 の *m/z* が 571 (Figure 5-1-1 B)と検出された。続いてこれら二つのピークをフラクションコレクタを搭載した HPLC で分画した。分取時は注入量を 50-80 µL と大量に注入したため、カラム過負荷でピーク割れを起こすこともあったが、ターゲット自体の分離が損なわれていなかったため、そのまま実施した。分取時のクロマトグラムと分画液の一例を Figure 5-1-2 に示した。分析スケールで分取したため、50 回以上の繰り返しにより得られた、分画液をプールし、遠心濃縮で溶媒を除去した。

分取精製した 2 つのピークは再分析を行い、それぞれ良好な純度(約 90% 以上)で分取できていることを確認した。また分取前の Scan 分析で得られた *m/z* から Peak 1 は quercetin glucuronide sulfate (QGS), Peak 2 が methylquercetin glucuronide sulfate (MQGS)と予想されたため、MRM 分析によりピーク化合物の同定を試みた(Figure 5-1-3 A, 5-1-4 A)。その後 Peak 1 と Peak 2 に該当する分画液を glucuronidase, sulfatase, glucuronidase + sulfatase の 3 種類で処理を実施し、各単抱合体標準品と比較した。Peak 1 の QGS を glucuronidase 処理したところ quercetin-4'-sulfate が検出された(Figure 5-1-3 B)。 同様に sulfatase 処理したところ、quercetin-7-glucuronide が検出された(Figure 5-1-3 C)。また glucuronidase+sulfatase 処理により quercetin aglycone が検出された(Figure 5-1-3 D)。以上より QGS は quercetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate と同定した(Figure 5-1-3 E)。同様に MQGS についても酵素処理したところ、MQGS は isorhamnetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate と同定された (Figure 5-1-4 B, C, D, E)。Peak1, Peak2 の酵素処理後の反応液には異性体が検出されなかったことから、両ピークともに異性体は存在しないことが示された。

また Peak 2 の MQGS については容量的にも十分に採取できたため、^{1}HNMR で構造決定を行った。Isorhamnetin, isorhamnetin-4'-*O*-sulfate, isorhamnetin-7-O-glucuronide のケミカルシフトと比較したところ、MQGS の抱合化部位はグルクロン酸抱合が 7 位、硫酸抱合が 4'位にあると示された (Table 5-1-2)。

さらに glucuronidase+sulfatase 処理後の反応液中の quercetin, methylquercetin を定量することで、QGS と MQGS の濃度を算出した。最後に得られた標準品で検量線を作成し、直線性が得られることを確認した(Figure 5-1-5)。

本試験で、ケルセチン摂食ラットの血漿を UV 検出器で 370 nm の吸収波長というフラボノイドに特異的な吸収波長で測定したところ、主要なピークが 2 つ存在し、それらが QGS

と MQGS のような多抱合体であることが明らかになった。これは 5 日間程度ケルセチンを摂取し続けたラット血漿の主要な代謝物が、多抱合体であり、そのほかの単抱合体やメチル単抱合体がマイナー化合物であることを示した。以上より、摂食試験後の血漿中ケルセチン代謝物の定量には、QGS や MQGS の多抱合体のモニターが重要であることが示された。

Table 5-1-1. The gradient profile of preparative HPLC.

Time (min)	%A	%B	%C	%D	mL/min
0	60	30	10	0	0.7
30	20	70	10	0	0.7
41	0	30	0	70	0.4
50	0	30	0	70	0.4
51	60	30	10	0	0.4
55	60	30	10	0	0.7
65	60	30	10	0	0.7

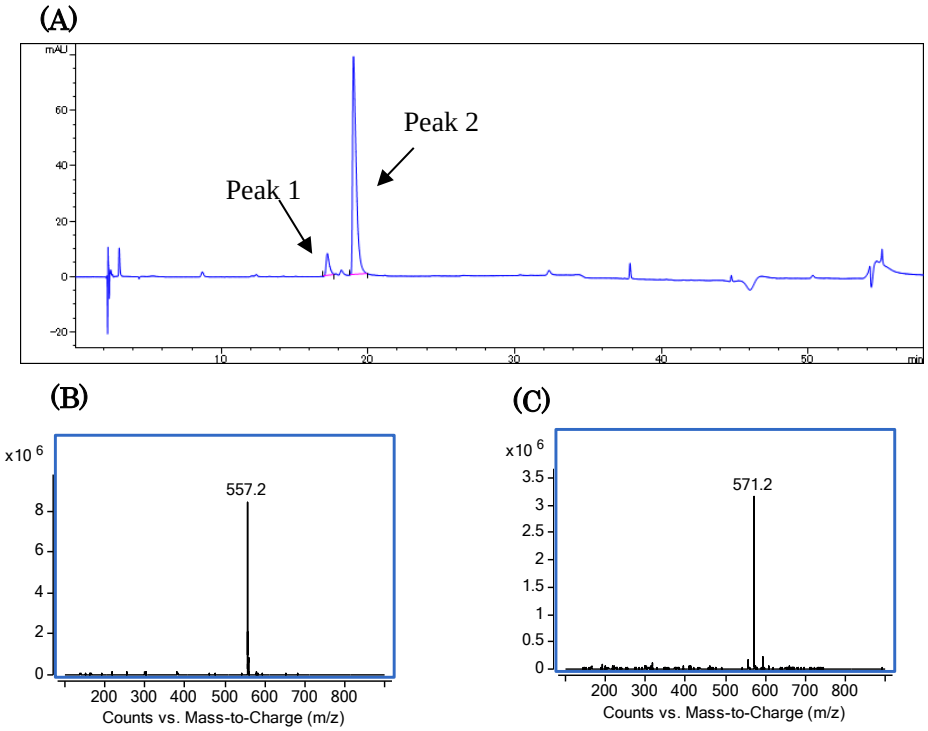
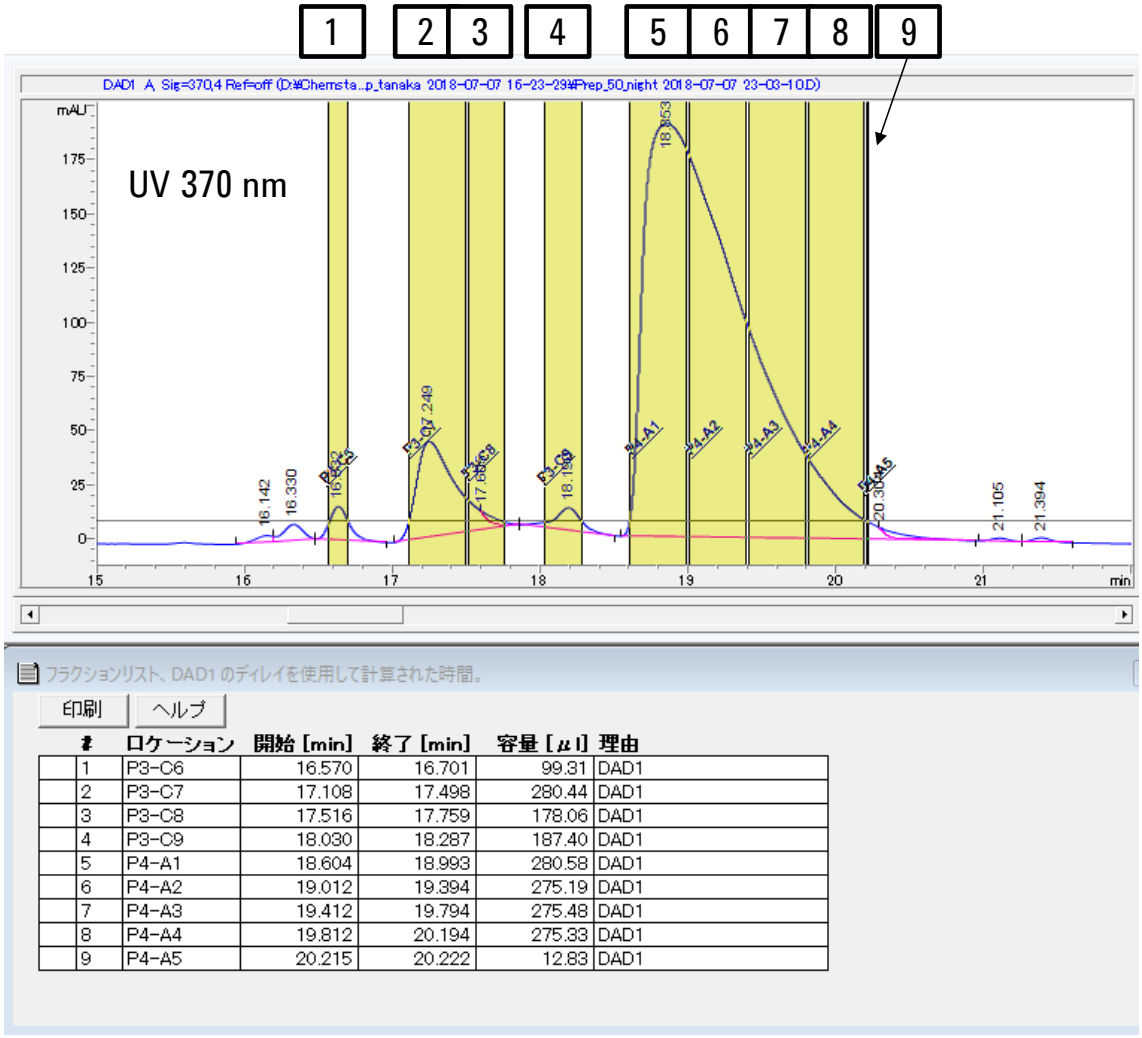


Figure 5-1-1.
(A) UV chromatogram recorded at 370 nm showing the profile of plasma sample in quercetin glucosides fed rats, (B) mass spectrum of Peak 1 in negative ion mode, (C) mass spectrum of Peak 2 in negative ion mode



フラクションリスト、DAD1 のディレイを使用して計算された時間。

印刷　ヘルプ

#	ロケーション	開始 [min]	終了 [min]	容量 [μl]	理由
1	P3-C6	16.570	16.701	99.31	DAD1
2	P3-C7	17.108	17.498	280.44	DAD1
3	P3-C8	17.516	17.759	178.06	DAD1
4	P3-C9	18.030	18.287	187.40	DAD1
5	P4-A1	18.604	18.993	280.58	DAD1
6	P4-A2	19.012	19.394	275.19	DAD1
7	P4-A3	19.412	19.794	275.48	DAD1
8	P4-A4	19.812	20.194	275.33	DAD1
9	P4-A5	20.215	20.222	12.83	DAD1

Figure 5-1-2.

The review of results from preparative HPLC with fraction collector. Fraction 2 and 3 are derived from peak 1. Fraction 5, 6, 7, and 8 are derived from Peak 2. This analysis was performed 50 times or more and each fraction was pooled.

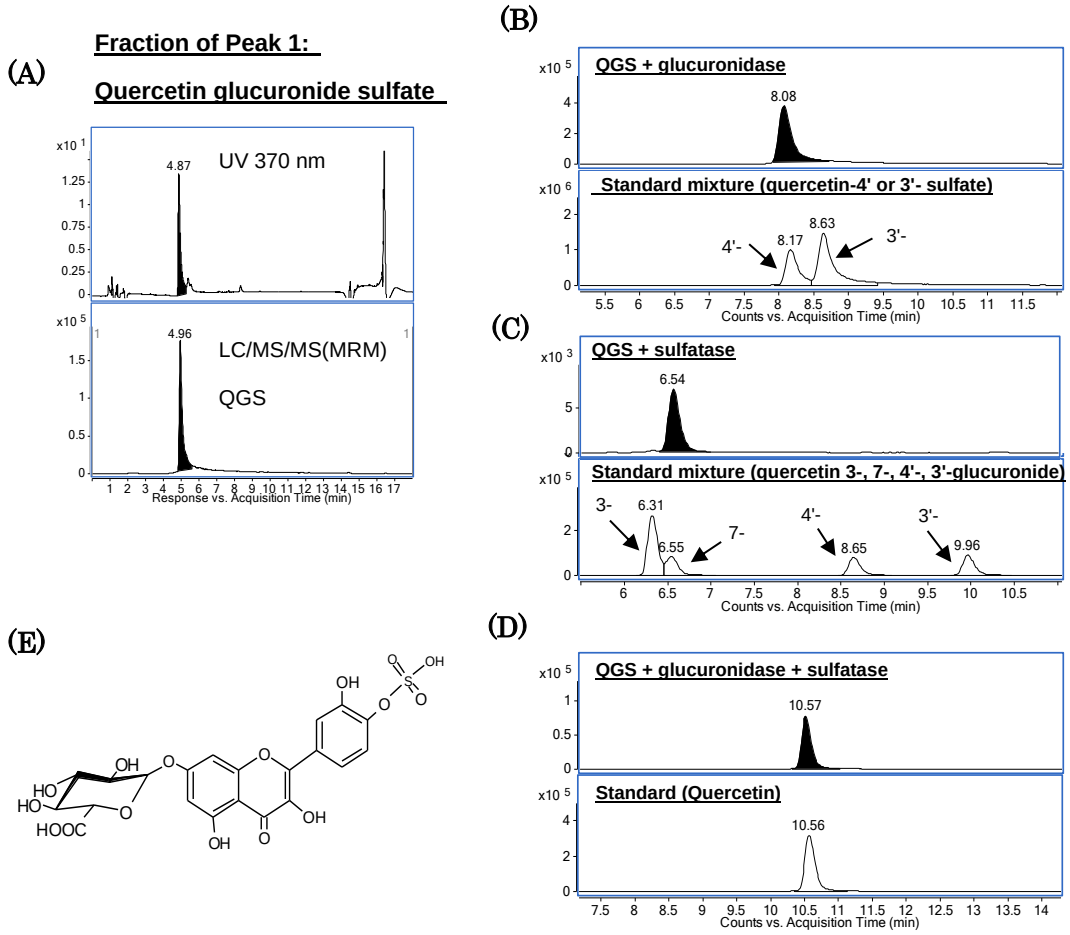


Figure 5-1-3.

Identification of Peak 1 before and after deconjugation treatment. (A) UV 370 nm and MRM (quercetin glucuronide sulfate) chromatograms before deconjugation. (B),(C),and (D) The upper black MRM chromatograms represent the sample after treatment with sulfatase, glucuronidase and sulfatase and glucuronidase respectively. The lower white MRM chromatograms represent the standard mixture of quercetin glucuronide, quercetin sulfate and quercetin, respectively. (E) represents the chemical structure of peak 1 that is quercetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate.

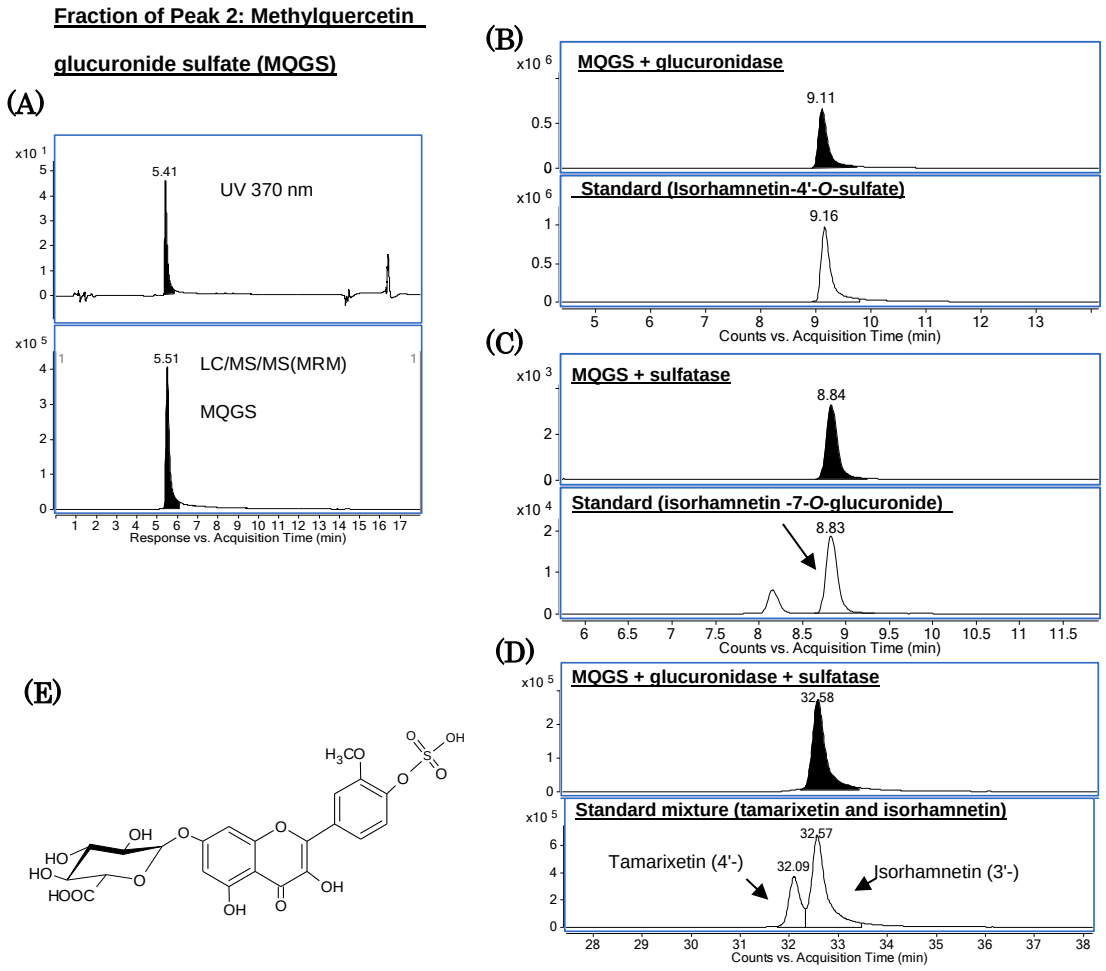


Figure 5-1-4.

Identification of Peak 2 before and after deconjugation treatment. (A) UV 370 nm and MRM (methylquercetin glucuronide sulfate) chromatograms before deconjugation. (B),(C), and (D) The upper black MRM chromatograms represent after treatment with sulfatase, glucuronidase and sulfatase + glucuronidase respectively. The lower white MRM chromatograms represent the standard of isorhamnetin-4'-*O*-sulfate, isorhamnetin-7-*O*-glucuronide and methylquercetin, respectively. (E) represents the chemical structure of peak 2 that is isorhamnetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate.

Table 5-1-2

The comparison of ^{1}H-NMR chemical shift value of MQGS, isorhamnetin, IR-7G, and IR-4'G

	C6-H		C8-H		C5′-H		C2′-H		C6′-H	
	δ(ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)		δ (ppm)	
Isorhamentin [35]	6.20		6.48		6.94		7.76		7.69	
MQGS	6.42	(+0.22)	6.84	(+0.36)	7.62	(+0.68)	7.79	(+0.03)	7.73	(+0.04)
IR-7S [35]	6.46	(+0.26)	6.86	(+0.40)	6.96	(+0.02)	7.79	(+0.03)	7.72	(+0.03)
IR-4′S [53]	6.19	(-0.01)	6.45	(-0.03)	7.63	(+0.69)	7.75	(-0.01)	7.68	(-0.01)

^{1}H-NMR spectra of isorhamnetin and glucuronides were recorded on a Bruker AMX-500 (500 MHz) in DMSO-d6. Chemical shifts are reported in d values (ppm). The ppm shift of the protons in the glucuronides compared to the same protons in quercetin are represented in blackets. [35] and [53] represent the reference numbers, and the chemical shifts of MQGS were compared with those of IR-7S and IR-4'S.

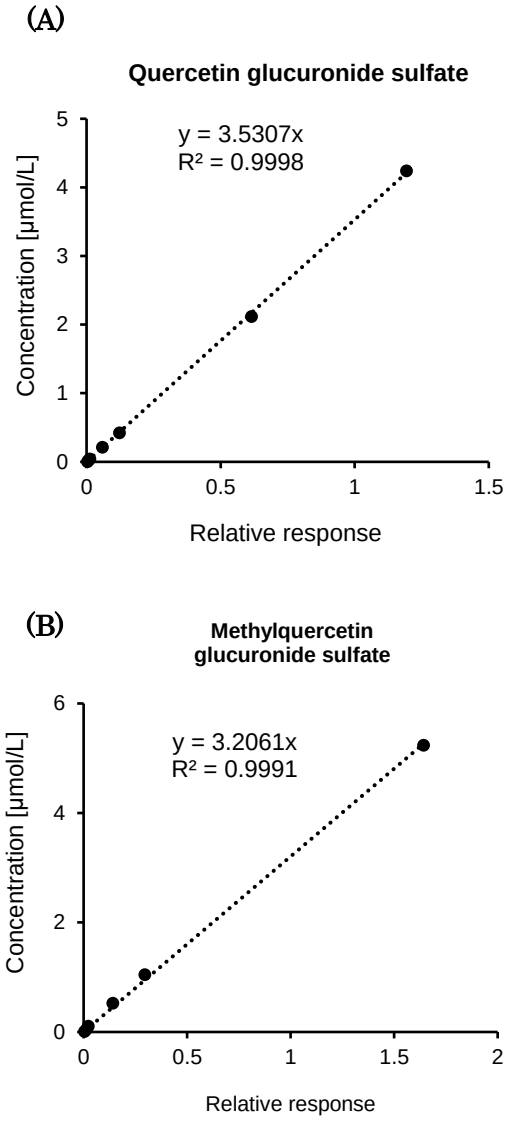


Figure 5-1-5.
Calibration curves for quercetin-7-*O*-glucuornide-4′-*O*-sulfate (QGS) and isorhamnetin-7-*O*-glucuornide-4′-*O*-sulfate (MQGS).

実験 5-2 ケルセチン配糖体摂取ラットの血中ケルセチン関連物の網羅的解析

【背景と目的】

第 4 章の実験 4-1 では、Q3GM の単回経口投与後、240 分までは単抱合体が主要な代謝物であることを明らかにした。しかし、過去の研究でケルセチンの代謝物として多抱合体が多量に存在しているという報告もある[56]。さらに実験 5-1 でケルセチン含有食を 5 日間以上摂取した後の血漿を UV370 nm で測定したところ、多抱合体が主要な代謝物であることが明らかになった。本研究ではこれら多抱合体を含めた抱合体の網羅的測定を行った。また、その網羅性の確認のため、これまで広く用いられてきた酵素処理法との総ケルセチン代謝物(total quercetin)としての定量値の比較を行った。さらに、Q3GM を摂食後、Day1, 3, 12 における各抱合体の比率や位置選択性も検討した。

【方法】

<u>ケルセチン配糖体摂食試験用ラット</u>

7 週齢の Wistar/ST 雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を 10 匹用いた。ラットは、1 匹ずつステンレス製の網ゲージに入れ、室温 22 ± 1°C、湿度 50 ± 5%の飼育室で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。飼育期間中の飼料と水は自由摂取とし、飼料は毎日新しいものを与え、飲料水は 2 日に一度交換した。AIN-93G で 3 日間予備飼育後、ケルセチン配糖体を含む試験食を摂取させた。試験食として、AIN-93G に Q3GM を 0.24%添加したものを与え（アグリコン等量は 0.1%）、摂食開始後 1, 3, 12 日目に尾静脈より 400 μL 採血した。尚、試験当日の 10 時に絶食し、12 時に採血した。これは摂食直後には高濃度でケルセチンが存在するため、それを防ぐためである。採取した血液は遠心分離（4 °C, 10 min, 2300 *g*)により、血漿を採取し、-80 °C で保存した。

<u>血漿中のケルセチン代謝物の抽出</u>

採取した血漿サンプルを 75 μL ずつ酵素処理と無処理群の 2 群に分け、全サンプルに 0.58 mol/L の酢酸を 7.5 μL 添加した。第 3 章実験 3－1 で使用した脱抱合酵素を用い、β-glucuronidase を 1150 U, sulfatase を 23 U となるように添加した。その後の抽出操作は実験 4-1 と同様に行った。さらに“直接法”においては、血漿中の主要な代謝物である MQGS と QGS を、“酵素処理法”についてはその分析対象である quercetin と methylquercetin に関して、尾静脈血を用いて添加回収試験を行った。添加回収試験とは、血漿に既知濃度の標準品を添加し、添加した標準品を損失なく回収できているかを調べるものである。これにより、多成分分析を実施する際の、前処理から測定までの個別代謝物の定量性が確認できる。12 日目の尾静脈血漿 60 μL に上記 4 種の混合標準品 15 μL を添加し、同様に抽出操作を行った。混合標準を添加する際の有機溶媒終濃度は 30%以下であり、血漿と混合した際には、6%以下となり、抽出効率に影響しないように留意した。

【結果】

本分析に用いた各化合物の測定パラメータ、検量線の傾きを Table 5-2-1 に示した。実験 5-1 の Figure 5-1-5 で示した多抱合体検量線と同様に、縦軸を濃度、横軸を IS との相対強度で作成した。Q3GM 摂食ラットの尾静脈血中ケルセチン代謝物の各クロマトグラムを Figure 5-2-1 に示した。血漿中には 23 種のケルセチン代謝物ピークが検出され、このうち QGS や MQGS の多抱合体や各抱合体の位置異性体を含む 16 種は標準品を用いて定量した。また、Figure 5-2-1 B に示すように、quercetin diglucuronide の MRM クロマトグラムには 5 種のピークが確認され、RT 6.89 のピークが 7-/3′, 7-/4′-diglucuronide であると同定されたが、他の 4 種は異性体であると推測された。Quercetin glucuronide ではその抱合化部位(3-, 7-, 4′-, 3′-)の各異性体 4 種が検出された(Figure 5-2-1 C)。Figure 5-2-1 D に示すように、methylquercetin glucuronide の MRM クロマトグラムには 6 種のピークが検出された。methylquercetin はそのメチル化の位置により 3′-methylquercetin(isorhamnetin)と 4′-methylquercetin (tamarixetin)が存在する。本分析法では標準品により isorhamnetin glucuronide 3 種が同定されており、残りの 3 種のピークは tamarixetin glucuronide(tamarixetin-7-,3-,3′-glucuronide)であると推測された。

本試験で用いたケルセチン抱合体の網羅的測定法（直接法）の妥当性を検証するため、多数のケルセチン抱合体の標準品を用いた本分析法と、過去の研究で total quercetin 濃度の算出に使用されてきた酵素処理法の結果を比較した。2 つの方法における血中 total quercetin 濃度を Figure 5-2-2 に示した。摂食開始 1，3，12 日目において両方法の測定値はほぼ一致し、本分析法で用いた網羅的測定法（直接法）の妥当性が示された。上記の定量値算出には、各主要なターゲット化合物の添加回収率も含めて換算した。Quercectin, methylquercetin, QGS, MQGS の添加回収率は 93.7, 95.4, 47.6, 81.1%であった。また、直接法においては LC/MS を用いた定量で問題となるイオンサプレッション効果の回収率を算出した。その結果、各化合物の回収率は 80-120%以内となり、定量値算出に大きな影響がないことが示された。

ケルセチン配糖体摂食後の血中の各抱合体種類別の濃度を Figure 5-2-3 A に示した。これは各ケルセチン抱合体の位置異性体の合計値より算出された。主要な代謝物は QGS と MQGS であり、QGS の血中濃度は Day 1, 3, 12 で 1.1, 3.7, 3.8 μmol/L、MQGS の血中濃度は 4.2, 12.5, 13.1 μmol/L となった。マイナー成分では、quercetin sulfate (QS)は 12 日間で徐々に上昇したが、quercetin diglucuronide (QdiG)は逆に減少した。Figure 5-2-3 B に total quercetin に対する各代謝物の比率を示した。QGS と MQGS の合計の比率は Day 1, 3, 12 で 87.2, 87.6, 85.6%と大勢を占めた。また摂取期間でほとんど差が見られなかった。全化合物の各異性体それぞれの定量結果は Figure 5-2-4 A に示した。Figure 5-2-4 B は、低濃度側の拡大図である。また、実際の定量値は Table 5-2-2 に示した。

ケルセチン単抱合体の位置選択性について確認したところ、試験期間の 12 日間ではグルクロン酸抱合体(Figure 5-2-5 A)、硫酸抱合体(Figure 5-2-5 B)ともに変化しなかった。グル

クロン酸抱合体の各異性体の強度比は 4′- > 7- > 3- > 3′-であり、Day 1 から Day3 にかけて 4′-glucuronide が有意に減少した。硫酸抱合体は 4′-sulfate が他よりも顕著に高く、続いて 3′-sulfate が検出、7-sulfate はほとんど検出されなかった。この現象は、Q3GM 摂食後、経時的に 4′-sulfate が増大する実験 4-1 の結果と一致していた。また、Figure 5-2-6 に total quercetin に対する quercetin, methylquercetin, グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、ヘテロ抱合体の比率を示した。ケルセチン抱合体(Figure 5-2-6 A)については、Day1 から Day12 にかけて QGS の比率が常に 20%程度で維持されていたが、グルクロン酸抱合体は徐々に減少、硫酸抱合体が 12 日目にかけて増大した。メチルケルセチン抱合体(Figure 5-2-6 B)はヘテロ抱合体である MQGS が最も高く total quercetin の 60%以上を占め、Day1 から Day12 にかけて比率は変化しなかった。単抱合体である methylquercetin glucoronide や methylquercetin sulfate の比率は極めて低く、全体として有意な差は見られなかった。

【考察】

本法で同定されたケルセチン抱合体 16 種はそれぞれ個別の標準品により定量しており、そのイオン化効率が明らかになった。また、位置異性体においてはその抱合化部位によってわずかにイオン化効率が異なることが示された。LC/MS/MS のイオン化効率は、移動相の pH、塩濃度、用いた有機溶媒によって容易に変化するが、同一メーカーの装置・同一分析条件では非常に参考となる。本法では、何度か同じ分析を繰り返してイオン化効率の再現性を確認した。その結果、全体の数値の上下はあるが、その分子種間でのイオン化効率の比率はほとんど変化しないことが確認された。

第 4 章実験 4-1 でケルセチン配糖体を単回経口投与後、数時間後の血漿では硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体のような単抱合体が主要な代謝物であることが示された。しかし、ケルセチンの長期摂取では、diglucuronide やグルクロン酸と硫酸のヘテロ抱合体が主要な代謝物であると報告されている[27,28,56,57]。本試験では、血中のケルセチン代謝物を網羅的に測定し、これまで明らかにされていなかった多抱合体の抱合化部位も含めて明らかにした。ケルセチン配糖体摂取後の主要な代謝物は、quercetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate (QGS)と isorhamnetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate (MQGS)であり、そのほかの代謝物は少量であった。またこれら二つの主要な代謝物はその抱合化部位が極めて限定的であり、その抱合化部位はグルクロン酸抱合が 7-OH、硫酸抱合が 4'-OH であった。なぜこのように限定的な部位でのみ抱合化されるのか？その要因として 2 つの仮説を提唱する。

１）グルクロン酸と硫酸抱合は限られた位置でのみ起こる可能性。

2）これら QGS と MQGS の尿や胆汁への排泄率が極めて低く、これらの代謝物が血中に蓄積される可能性。

1）については UGT や SULT、COMT のような抱合化やメチル化酵素の位置選択性が関わると考えられる。実験 4-1 において、小腸では主にグルクロン酸抱合が起こることが示され、その抱合化部位は 3-, 7-, 4'-, 3'-であり、これは UGT1A1 や UGT1A9 のような抱合化

酵素の位置選択性に依存する。硫酸抱合やメチル化は SULT や COMT により触媒されるが、ほとんどが 3'-, 4'-OH で起こる。よって、小腸で最初にグルクロン酸抱合された場合、7-*O*-glucuronide のみが 4'-OH を抱合化する SULT の基質となり、7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate が生成する可能性がある。今後各抱合体を基質に *in vitro* 試験を実施して検証するなど、さらなる研究が必要がある。

2）についてはケルセチン抱合体によって、排出が違う可能性がある。実験 4-1 で投与直後は 3'-sulfate が 4'-sulfate よりも高値であったが、経時的に 4'-sulfate の濃度が上昇した。これは 3'-sulfate が排泄されやすいことを示唆した。このように抱合体の位置や種類によって排泄トランスポーター（p-glycoprotein や multidrug resistance associated-protein 2, MRP2）との親和性が異なることが考えられる[58]。

ケルセチンの摂食期間がケルセチン抱合体の組成や位置選択性に与える影響も確認した。血中のケルセチン代謝物に対する各抱合体の比率は、QGS や MQGS が最も高く、その比率は Day1 から Day12 でほぼ変化しなかった。このことは、摂取後 1 日目からすぐに多抱合体が生成され、2 週間ではほぼ変化しないことを示した。その他 quercetin sulfate は経日的に増加した一方、quercetin diglucuronide は減少した。各抱合体の位置選択性も確認したところ quercetin glucuronide は Day3 から Day12 にかけてわずかに 7-*O*-glucuronide の組成が減少していたが、これは多抱合体への生成が進行しているためと推測される。また、硫酸抱合の位置選択性はほぼ変化しなかった。さらに各抱合体をグルクロン酸抱合体・硫酸抱合体・ヘテロ抱合体の 3 種に区分し、その比率を比較したところ、ヘテロ抱合体の比率はほぼ変化しなかったのに対し、グルクロン酸抱合が徐々に減少、硫酸抱合が上昇し、12 日目で両者が逆転して硫酸＞グルクロン酸となった。ケルセチン代謝物の血中濃度は、各抱合体の ADME（吸収、寄与、代謝、排泄）が関与しており、一概にその原因を特定するのは難しく、排泄トランスポーターの親和性などさらなる研究が必要である。

本分析法(直接法)で得られた個別代謝物積算値と、従来の酵素処理法で算出された全代謝物の総量値を比較したところ、これらの値は良く一致し、本法の直接分析（個別分析）においての網羅性が確認された。算出された血中濃度はほぼ同等であった。主要な代謝物である Q, MQ, QGS, MQGS について添加回収試験を実施したところ、Q, MQ については良好の結果であったが、QGS の回収率が 41%となった。これはタンパク質との強固な吸着が原因である可能性がある。QGS や QS については pH や熱に弱いことがわかっており、強酸条件での抽出操作は難しいと思われるため、QGS 低回収率改善には、今後さらなる検討が必要である。

本研究によりケルセチン配糖体摂取後の血中ケルセチン代謝物の直接分析が可能となり、これまで明らかではなかった多抱合体を含めた血中フラボノイドの代謝物の組成を明らかにした初めての論文である。ケルセチンのみではなく hesperetin や isoflavone も同様に抱合体が血中の主要な代謝物であると報告されているため、今後はそのほかのフラボノイドへの適用も期待される。

Table 5-2-1.

LC/MS/MS parameter of Q-conjugates

	Compound name	Abbreviation	Precursor ion	Product ion	Collision Energy	Retention time	Slope of calibration	R^2
1	Quercetin	Q	301	151	25	10.23	1.8887	0.9998
2	Methylquercetin	MeQ	315	300	17	13.38	0.4341	0.9999
3	Quercetin-4'-*O*-sulfate	Q-4'S	381	301	17	9.29	2.6363	0.9988
4	Quercetin-3'-*O*-sulfate	Q-3'S	381	301	17	9.69	0.9731	0.9970
5	Isorhamnetin-7 or 4'-*O*-sulfate	IRS	395	315	17	10.29	0.1140	0.9962
6	Quercetin-3-*O*-glucoside	Q3G	463	301	28	6.42	2.2306	0.9994
7	Quercetin-3-*O*-glucuronide	Q-3gln	477	301	25	6.22	0.7524	0.9999
8	Quercetin-7-*O*-glucuronide	Q-7gln	477	301	25	6.33	1.4045	0.9996
9	Quercetin-4'-*O*-glucuronide	Q-4'gln	477	301	25	8.41	2.3887	0.9996
10	Quercetin-3'-*O*-glucuronide	Q-3'gln	477	301	25	9.74	1.3363	0.9997
11	Isorhamnetin-3-*O*-glucuronide	IR-3G	491	315	25	8.03	0.5241	0.9930
12	Isorhamnetin-7-*O*-glucuronide	IR-7G	491	315	25	8.60	4.4466	1.0000
13	Isorhamnetin-4'-*O*-glucuronide	IR-4'G	491	315	25	9.65	0.7717	0.9994
14	Tamarixetin-*O*-glucuronide (1)	TmG(1)	491	315	25	7.83	*0.5241	-
15	Tamarixetin-*O*-glucuronide (2)	TmG(2)	491	315	25	8.86	*4.4466	-
16	Tamarixetin-*O*-glucuronide (3)	TmG(3)	491	315	25	10.53	*0.7717	-
17	Quercetin glucuronide sulfate	QGS	557	301	17	5.54	3.5307	0.9998
18	Methylquercetin glucuronide sulfate	MeQGS	571	315	17	6.24	3.2061	0.9991
19	Quercetin-diglucuronide(1)	QdiG(1)	653	301	25	4.96	*4.1255	-
20	Quercetin-diglucuronide(2)	QdiG(2)	653	301	25	5.08	*4.1255	-
21	Quercetin-diglucuronide(3)	QdiG(3)	653	301	25	5.64	*4.1255	-
22	Quercetin-7-4'/3'-diglucuruonide	QdiG(7-3'/4')	653	301	25	6.89	4.1255	1.0000
23	Quercetin-diglucuronide(4)	QdiG(4)	653	301	25	7.35	*4.1255	-
IS	Naringenin	IS	271	151	17	12.64	-	-

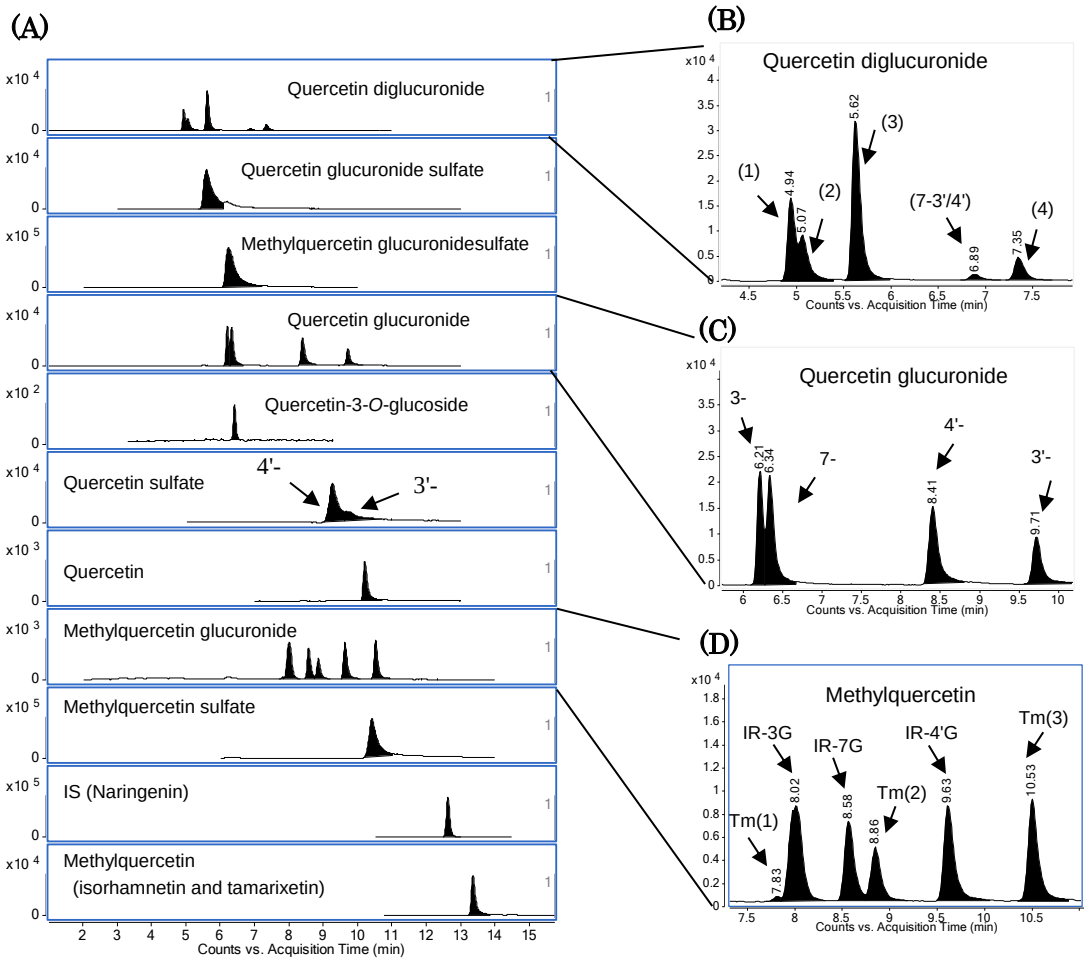


Figure 5-2-1.

The typical MRM chromatograms of quercetin metabolites in rat plasma.

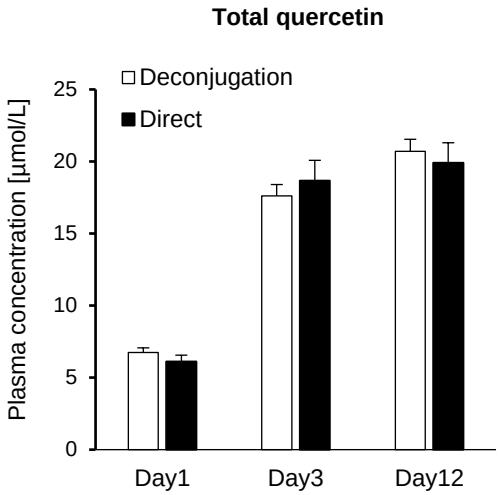


Figure 5-2-2.

The comparison of total quercetin concentration by deconjugation method and direct method in plasma. Total quercetin in deconjugation analysis is the sum of quercetin and methylquercetin after deconjugation. Total quercetin in direct analysis is the sum of 23 Q-metabolites detected by LC/MS/MS analysis using standard compound of each quercetin metabolite. Values are expressed as mean ±SEM shown by vertical bars, n=10. No significant difference observed between deconjugation and direct method (Student's *t*-test, $P<0.05$).

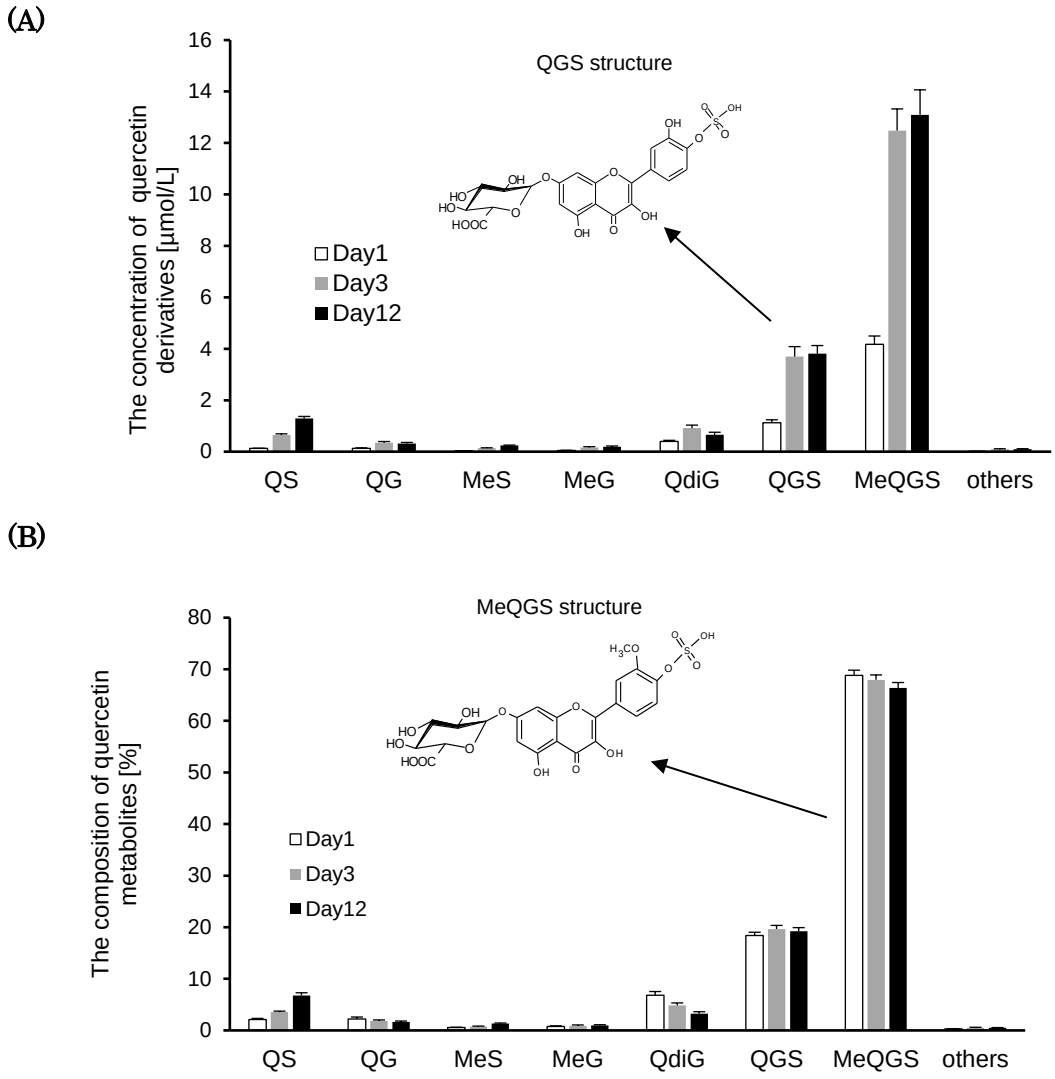


Figure 5-2-3.

The profile of each quercetin metabolite in rat plasma. (A) The concentration of each quercetin conjugate (sum of regioisomers except for QGS and MQGS). (B) The ratio of each quercetin conjugate to the total quercetin concentration in plasma. QS; quercetin sulfate, QG; quercetin glucuronide, MeS; methylquercetin sulfate, MeG; methylquercetin glucuronide, QdiG; quercetin diglucuronide, QGS; quercetin-7-*O*-glucuornide-4′-*O*-sulfate, MQGS; isorhamnetin-7-*O*-glucuornide-4′-*O*-sulfate, Others; quercetin, methylquercetin and Q3G. Values are expressed as mean ±SEM shown by vertical bars, n=10.

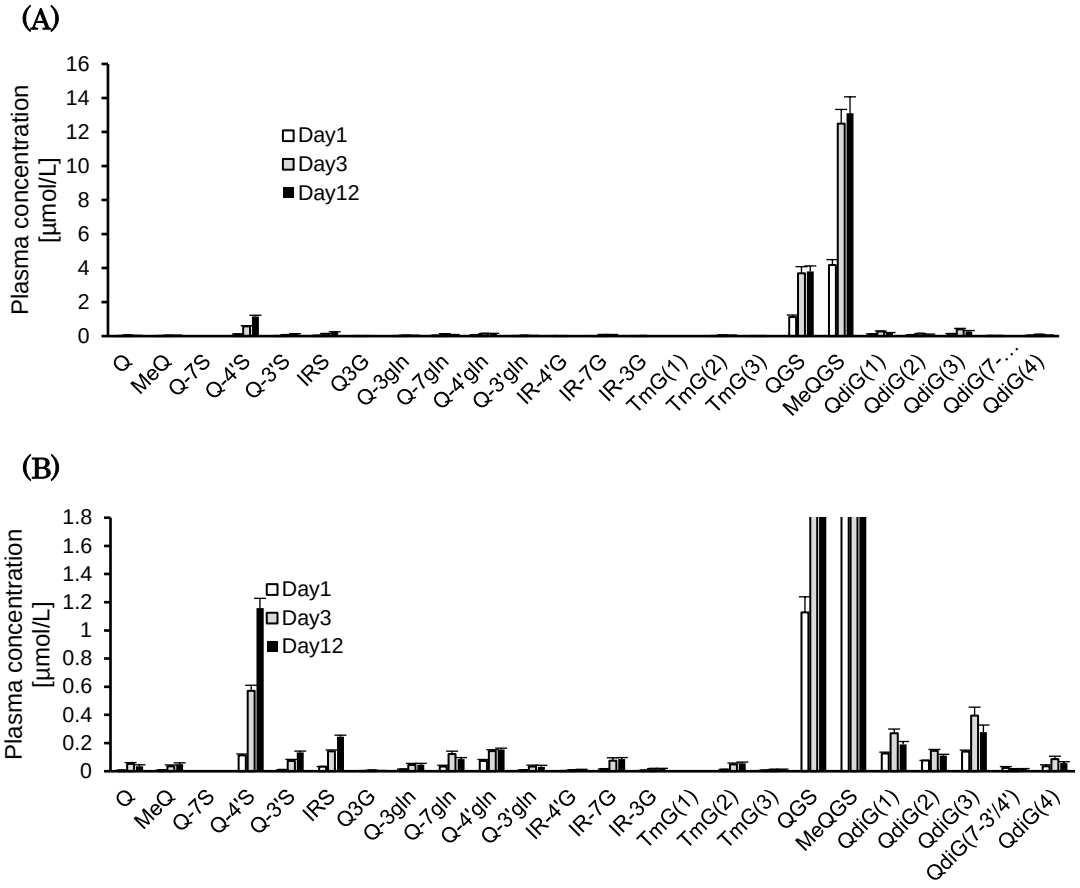


Figure 5-2-4.

(A) Plasma concentration of each quercetin conjugates. (B) is a magnified graph of (A). Q; quercetin, MeQ; methylquercetin, Q-7S; quercetin-7-*O*-sulfate, Q-4′S; quercetin-4′-*O*-sulfate, Q-3′S; quercetin-3′-*O*-sulfate, IRS; isorhamnetin sulfate, Q3G; quercetin-3-*O*-glucoside, Q-3gln; quercetin-3-*O*-glucuronide, Q-7gln; quercetin-7-*O*-glucuronide, Q-4′gln; quercetin-4′-glucuronide, Q-3′gln; quercetin-3′-*O*-glucuronide, IR-4′G; isorhamnetin-4′-*O*-glucuronide, IR-7G; isorhamnetin-7-*O*-glucuronide, IR-3G; isorhamentin-3-*O*-glucuronide, TmG(1),(2), (3); tamarixetin-glucuronide positional isomer (1),(2),(3), QGS; quercetin-7-*O*-glucuornide-4′-*O*-sulfate, MQGS; isorhamnetin-7-*O*-glucuornide-4′-*O*-sulfate, QdiG(1)(2)(3)(4) ; quercetin diglucuronide positional isomer (1)(2)(3)(4) and QdiG(7-3′/4′); quercetin 7-3′ or 7-4′-diglucuronide. Values are expressed as mean ±SEM shown by vertical bars, n=10.

Table 5-2-2.

The plasma concentrations of all compounds.

		Day1		Day3		Dya12	
Compound name	Abbreviation	Mean [μmol/L]	SEM	Mean [μmol/L]	SEM	Mean [μmol/L]	SEM
Quercetin	Q	0.006	0.002	0.051	0.012	0.036	0.007
Methylquercetin	MeQ	0.008	0.002	0.035	0.006	0.050	0.010
Quercetin-7-*O*-sulfate	Q-7S	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Quercetin-4'-*O*-sulfate	Q-4'S	0.112	0.008	0.571	0.042	1.157	0.074
Quercetin-3'-*O*-sulfate	Q-3'S	0.011	0.002	0.074	0.009	0.133	0.014
Isorhamnetin-4'-*O*-sulfate	IRS	0.033	0.003	0.141	0.008	0.246	0.008
Quercetin-3-*O*-glucoside	Q3G	0.003	0.001	0.007	0.003	0.006	0.001
Quercetin-3-*O*-glucuronide	Q-3gln	0.014	0.002	0.045	0.009	0.046	0.008
Quercetin-7-*O*-glucuronide	Q-7gln	0.032	0.009	0.123	0.021	0.087	0.015
Quercetin-4'-*O*-glucuronide	Q-4'gln	0.074	0.010	0.143	0.013	0.154	0.015
Quercetin-3'-*O*-glucuronide	Q-3'gln	0.009	0.002	0.033	0.006	0.032	0.007
Isorhamnetin-4'-*O*-glucuronide	IR-4'G	0.004	0.000	0.009	0.001	0.014	0.003
Isorhamnetin-7-*O*-glucuronide	IR-7G	0.016	0.004	0.076	0.015	0.087	0.015
Isorhamnetin-3-*O*-glucuronide	IR-3G	0.006	0.001	0.019	0.003	0.021	0.003
Tamarixetin-*O*-glucuronide (1)	TmG(1)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tamarixetin-*O*-glucuronide (2)	TmG(2)	0.013	0.003	0.048	0.012	0.055	0.011
Tamarixetin-*O*-glucuronide (3)	TmG(3)	0.007	0.001	0.012	0.001	0.015	0.003
Quercetin glucruonide sulfate	QGS	1.128	0.106	3.694	0.386	3.806	0.323
Methylquercetin glucuronide sulfate	MeQGS	4.177	0.322	12.484	0.844	13.096	0.974
Quercetin-diglucuruonide(1)	QdiG(1)	0.125	0.011	0.269	0.028	0.191	0.024
Quercetin-diglucuruonide(2)	QdiG(2)	0.077	0.004	0.145	0.014	0.110	0.015
Quercetin-diglucuruonide(3)	QdiG(3)	0.140	0.011	0.395	0.063	0.278	0.054
Quercetin-7-3'/4'-diglucuruonide	QdiG(7-3'/4')	0.023	0.014	0.017	0.002	0.019	0.002
Quercetin-diglucuruonide(4)	QdiG(4)	0.036	0.013	0.087	0.016	0.057	0.011

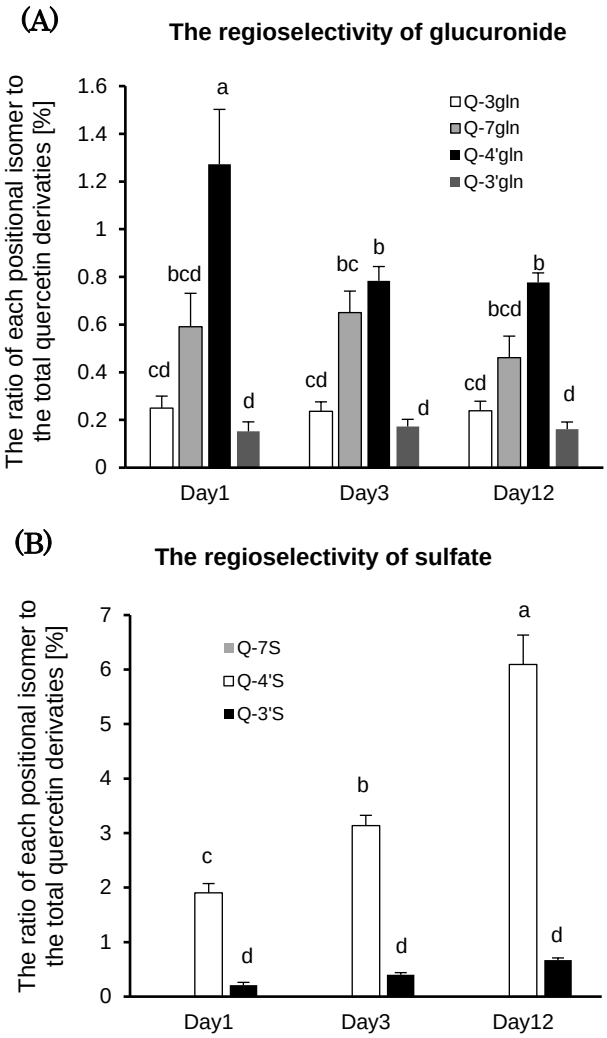


Figure 5-2-5.

The regioselectivity of quercetin monoglucuronide and quercetin mono-sulfate. (A) The ratio of each quercetin glucuronide to the total quercetin concentration in rat plasma. (B) The ratio of each quercetin sulfate to the total quercetin concentration in rat plasm. Values are expressed as mean ±SEM shown by vertical bars, n=10. Two-way ANOVA *P*-values were (A) were 0.0885, <0.0001, and 0.0153; (B) <0.0001, <0.0001, and <0.0001 for day, position, and day × position, respectively. Means not sharing a common letter differ significantly (Tukey-Kramer's test, $P < 0.05$).

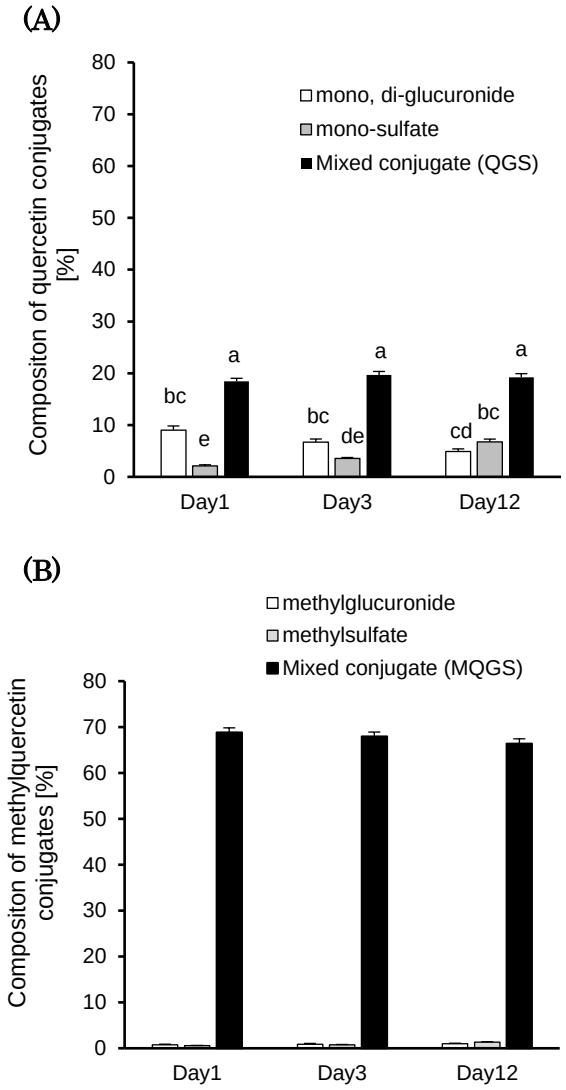


Figure 5-2-6.

(A) The compositions of quercetin glucuronide, sulfate, and glucuronide sulfate. (B) The compositions of methylquecetin glucuronide, methylquercetin sulfate and methylquercetin glucuronide sulfate. Values show percentages of each type of Q-conjugate (sum of regioisomers) against total quercetin derivatives detected in the plasma. Values are expressed as mean ±SEM shown by vertical bars, n=10. Two-way ANOVA *P*-values were (A) were 0.7136, <0.0001, and <0.0001; (B) 0.5766, <0.0001, and 0.0790 for day, conjugation type, and day × conjugation type, respectively. Means not sharing a common letter differ significantly (Tukey-Kramer's test, $P < 0.05$)

総括

本研究では、フラボノイドの一種ケルセチンの吸収動態と難消化性二糖 melibiose によるケルセチン配糖体吸収促進作用を調べるため、*in vivo, in vitro* 試験を行った。さらに体内に吸収された後の血中抱合体とその抱合体化生成部位を探るべく、各抱合体を網羅的に測定した。

ケルセチンの吸収促進作用は、当研究室の篠木、尾山らが、イソマルトメガロ糖による可溶化促進[23]、松川・松本らが難消化性二糖 DFAIII による細胞間経路の吸収促進を報告してきた[17,20]。本研究では DFAIII と同じ難消化性二糖の melibiose がケルセチン吸収に与える影響をが探ったところ、DFAIII とは異なる、配糖体分解促進という全く新しいメカニズムで吸収が促進された。Melibiose を添加することで、Q3G から quercetin への分解を触媒する LPH の活性が上昇することが示された。これまでオリゴ糖が酵素の活性に影響することはほとんど報告されておらず、このことは難消化性オリゴ糖の新たな生理作用として今後さらなる研究が必要である。またフラボノイド配糖体の吸収においてもこの配糖体分解という過程が、吸収の一つの律速段階であることが明白となったため、他のフラボノイドについても配糖体の分解活性が、バイオアベイラビリティに強く関わることが示唆された。さらに、フラボノイドだけでなく、薬物吸収においても配糖体を用いることで、吸収を制御することが可能かもしれない。

血中に吸収されたケルセチンは、体内ではほとんどが抱合体として存在すると考えられている。本研究においても、単回投与では一時的にアグリコンが門脈に検出されることがあったが、体循環血においてはほとんどが抱合体として存在することが確認された。一時的に門脈でアグリコンが検出される理由は、腸における抱合化速度に比べて、アグリコンの吸収速度が速いために発生し、その後肝臓で抱合化されために中心静脈や腹部大動脈のような体循環血中では抱合体として存在すると考えられた。

血中の主要なケルセチン代謝物には、グルクロン酸抱合・硫酸抱合・メチル化があるが、体内のどの部位で代謝されるか、また抱合体の種類や位置について詳細に研究した報告はほとんどない。本研究では、ラットにおいて Q3GM を経口投与し、門脈血と中心静脈血を同時に採血し、両者の濃度を比較することで、腸における吸収と抱合化をモニターすることが可能となった。腸ではグルクロン酸抱合が主要な反応であること、硫酸抱合やメチル化はマイナーであることが示された。また抱合体の位置選択性についも確認したところ、グルクロン酸抱合体は大きな差異はなかったが、硫酸抱合体は投与後 30 分では 3′-sulfate->4′-sulfate であったが、120 分後以降は 4′- >3′-と抱合化部位の変遷が確認された。

さらに最も生理的条件に近く、日常的なフラボノイドの吸収・代謝を研究する上で重要になるケルセチン配糖体の摂食試験を行い、摂取開始後、1 日目、3 日目、12 日目における血中ケルセチン代謝物を詳細に分析した。その結果、1 日目から血中の主要な代謝物は QGS と MQGS のような多抱合体であり、12 日目まで血中の Total quercetin 濃度に対する比率は変化せず、QGS が約 20%、MQGS が 70%と多抱合体が大勢を占めた。これまでにケルセチン摂取後は多抱合体が多量に存在することは報告されていたが、本研究では初めて多

抱合体の位置を同定し、さらに多抱合体の標準品を用いて絶対検量線で定量を行った。多抱合体は QGS (quercetin-7-*O*-glucuronide-4′-*O*-sulfate) と MQGS (Isorhamnetin-7-*O*-glucuronide-4′-*O*-sulfate)と同定され、グルクロン酸抱合が 7 位で、硫酸抱合が 4′-位に限定され、この代謝物が血中に多量に存在することが明らかになった。この理由は明らかではなく、今後さらなる研究が必要である。またケルセチン配糖体摂取後は上記の 2 化合物の血中濃度が圧倒的に高いことから、*in vivo, in vitro* 試験で両化合物の生理作用を明らかにすることが今後重要である。

ケルセチン抱合体が血中でほとんどが多抱合体として存在し、その抱合化部位も限定されているという事実は、ケルセチン代謝物の排泄機構に何かしら選択性があることが考えられる。ケルセチン抱合体の排泄については、二通り存在し、腸上皮細胞で抱合化されたのち、排泄トランスポータにより管腔内に逆輸送されて排泄されるもの、血中に移行したケルセチン抱合体が尿や胆汁に排泄されるものが存在する。尿への排泄に腎臓が深くかかわっている。今後は血漿と尿の比較や、管腔内に残存したケルセチンを分析することで、ケルセチン代謝物の排泄機構やトランスポータについても研究していく必要がある。

以上より、ケルセチン配糖体は難消化性二糖 melibiose により、配糖体の分解が促進され、吸収が促進されることが明らかになった。吸収されたケルセチンは腸ではおもにグルクロン酸抱合が起こり、肝臓でメチル化や硫酸抱合を受ける。ケルセチンの摂食試験では、血中のケルセチン代謝物は 80%以上が多抱合体として存在し、血中で長くとどまることが明らかになった。

参考文献

[1] H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa, H. Ashida, K. Kanazawa, Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 571–581.

[2] I. Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology, Nutrition Research 24 (2004) 851–874.

[3] J. Lee, A.E. Mitchell, Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans, J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 3874–3881.

[4] J. Lee, A.E. Mitchell, Quercetin and isorhamnetin glycosides in onion (*Allium cepa* L.): Varietal comparison, physical distribution, coproduct evaluation, and long-term storage stability, J. Agric. Food Chem. 59 (2011) 857–863.

[5] M.G. Hertog, P.C. Hollman, M.B. Katan, D. Kromhout, Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands, Nutr. Cancer 20 (1993) 21–29.

[6] G.R. Beecher, B.A. Warden, H. Merken, Analysis of tea polyphenols, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 220 (1999) 267–270.

[7] T. Hayek, B. Fuhrman, J. Vaya, M. Rosenblat, P. Belinky, R. Coleman, A. Elis, M. Aviram, Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17 (1997) 2744–52.

[8] J. V. Formica, W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, Food Chem. Toxicol. 33 (1995) 1061–1080.

[9] K. Emura, A. Yokomizo, T. Toyoshi, M. Moriwaki, Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats, J. Nutr. Sci. Vitaminol. 53 (2007) 68–74.

[10] 江川香, ほか, 肥満者に対するケルセチン配糖体（酵素処理イソクエルシトリン）配合緑茶飲料の体脂肪低減作用および安全性の検証, 薬理と治療. 40 (2012) 495–503.

[11] K. Németh, G.W. Plumb, J.G. Berrin, N. Juge, R. Jacob, H.Y. Naim, G. Williamson, D.M. Swallow, P. A. Kroon, Deglycosylation by small intestinal epithelial cell ß-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans, Eur. J. Nutr. 42 (2003) 29–42.

[12] V. Crespy, C. Morand, C. Besson, C. Manach, C. Demigne, C. Remesy, Quercetin, but

not its glycosides, is absorbed from the rat stomach, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 618–621.

[13] A.L.A. Sesink, I.C.W. Arts, M. Faassen-Peters, P.C.H. Hollman, Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase, J. Nutr. 133 (2003) 773–776.

[14] A.J. Day, F.J. Cañada, J.C. Díaz, P. a. Kroon, R. McLauchlan, C.B. Faulds, G.W. Plumb, M.R. Morgan, G. Williamson, Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase, FEBS Lett. 468 (2000) 166–170.

[15] S. Wolffram, M. Blöck, P. Ader, Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine, J. Nutr. 132 (2002) 630–635.

[16] J.M. Gee, M.S. DuPont, M.J.. Rhodes, I.T. Johnson, Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway, Free Radic. Biol. Med. 25 (1998) 19–25.

[17] M. Matsumoto, H. Chiji, H. Hara, Intestinal absorption and metabolism of a soluble flavonoid, α G-rutin , in portal cannulated rats, Free Radic. Res. 39 (2005) 1139–1146.

[18] A.K. Batta, G. Salen, H. Holubec, T.A. Brasitus, D. Alberts, D.L. Earnest, Enrichment of the more hydrophilic bile acid ursodeoxycholic acid in the fecal water-soluble fraction after feeding to rats with colon polyps, Cancer Res. 58 (1998) 1684–1687.

[19] H. Mineo, H. Hara, N. Shigematsu, Y. Okuhara, F. Tomita, Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions *in vitro*, J. Nutr. 132 (2002) 3394–3399.

[20] M. Matsumoto, N. Matsukawa, H. Chiji, H. Hara, Difructose anhydride III promotes absorption of the soluble flavonoid αG-rutin in rats, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 4202–4208.

[21] Y. Oki, K. Hashimoto, T. Matsumoto, T. Kubota, M. Emoto and K. Kibayashi, Production of vinegar from soybean oligosaccharides, *in vitro* and *in vivo* effects of the vinegar on human fecal microflora. N. Nogeikagaku, K. 66 (1992) 727–732.

[22] A. Rivera-Sagredo, F.J. Cañada, O. Nieto, J. Jimenez-Barbero, M. Martín-Lomas, Substrate specificity of small-intestinal lactase. Assessment of the role of the substrate hydroxyl groups, Eur. J. Biochem. 209 (1992) 415–22.

[23] A. Shinoki, W. Lang, C. Thawornkuno, H.-K. Kang, Y. Kumagai, M. Okuyama, H.

Mori, A. Kimura, S. Ishizuka, H. Hara, A novel mechanism for the promotion of quercetin glycoside absorption by megalo α-1,6-glucosaccharide in the rat small intestine, Food Chem. 136 (2013) 293–296.

[24] H. Li, X. Zhao, Y. Ma, G. Zhai, L. Li, H. Lou, Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles, J. Control. Release. 133 (2009) 238–244.

[25] T. Makino, R. Shimizu, M. Kanemaru, Y. Suzuki, M. Moriwaki, H. Mizukami, Enzymatically modified isoquercitrin, α-oligoglucosyl quercetin 3-*O*-glucoside, is absorbed more easily than other quercetin glycosides or aglycone after oral administration in rats, Biol. Pharm. Bull. 32 (2009) 2034–2040.

[26] N. Matsukawa, M. Matsumoto, H. Chiji, H. Hara, Oligosaccharide promotes bioavailability of a water-soluble flavonoid glycoside, alpha G-rutin, in rats, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 1498–505.

[27] C. Morand, V. Crespy, C. Manach, C. Besson, C. Demigné, C. Rémésy, Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties, Am. J. Physiol. 275 (1998) 212–219.

[28] A.J. Day, Y. Bao, M.R.A. Morgan, G. Williamson, Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity, Free Radic. Biol. Med. 29 (2000) 1234–1243.

[29] B. T. Zhu, E.L. Ezell, J.G. Liehr, Catechol-*O*-methyltransferase-catalyzed rapid *O*-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 292–299.

[30] H. Van Der Woude, M.G. Boersma, J. Vervoort, I.M.C.M. Rietjens, Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II *in vitro* model systems, Chem. Res. Toxicol. 17 (2004) 1520–1530.

[31] M. Yoshizumi, K. Tsuchiya, Y. Suzaki, K. Kirima, M. Kyaw, J.H. Moon, J. Terao, T. Tamaki, Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway, Biochem. Biophys. Res. Commun. 293 (2002) 1458–1465.

[32] S. Tanaka, A. Shinoki, H. Hara, Melibiose, a nondigestible disaccharide, promotes absorption of quercetin glycosides in rat small intestine, J. Agric. Food Chem. 64 (2016) 9335–9341.

[33] S. Ikushiro, M. Nishikawa, Y. Masuyama, T. Shouji, M. Fujii, M. Hamada, N. Nakajima, M. Finel, K. Yasuda, M. Kamakura, T. Sakaki, Biosynthesis of drug glucuronide metabolites in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Pharm. 13 (2016) 2274–2282.

[34] M. Nishikawa, Y. Masuyama, M. Nunome, K. Yasuda, T. Sakaki, S. Ikushiro, Whole-cell-dependent biosynthesis of sulfo-conjugate using human sulfotransferase expressing budding yeast, Appl. Microbiol. Biotechnol. 102 (2018) 723–732.

[35] T. Nakamura, C. Kinjo, Y. Nakamura, Y. Kato, M. Nishikawa, M. Hamada, N. Nakajima, S. Ikushiro, K. Murota, Lymphatic metabolites of quercetin after intestinal administration of quercetin-3-glucoside and its aglycone in rats, Arch. Biochem. Biophys. 645 (2018) 126–136.

[36] P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, J. Nutr. 123 (1993) 1939–1951.

[37] I.C.W. Arts, A.L. a Sesink, M. Faassen-Peters, P.C.H. Hollman, The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides, Br. J. Nutr. 91 (2004) 841–847.

[38] J.-G. Berrin, M. Czjzek, P. a Kroon, W.R. McLauchlan, A. Puigserver, G. Williamson, N. Juge, Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic β-glucosidase, Biochem. J. 373 (2003) 41–48.

[39] A.J. Day, J.M. Gee, M.S. DuPont, I.T. Johnson, G. Williamson, Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4-*O*-glucoside in the rat small intestine: The role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter, Biochem. Pharmacol. 65 (2003) 1199–1206.

[40] S. Ramaswamy, A.N. Radhakrishnan, Lactase-phlorizin hydrolase complex from monkey small intestine. Purification, properties and evidence for two catalytic sites, BBA - Enzymol. 403 (1975) 446–455.

[41] A.D. Mackey, G.N. Henderson, J.F. Gregory, Enzymatic hydrolysis of pyridoxine-5'-β-d-glucoside is catalyzed by intestinal lactase-phlorizin hydrolase, J. Biol. Chem. 277 (2002) 26858–26864.

[42] H. Sjostriim, Structure, biosynthesis and regulation of lactase-phlorizin hydrolase, Scand. J. Nutr. 45 (2001) 156–160.

[43] N. Mantei, M. Villa, T. Enzler, H. Wacker, W. Boll, P. James, W. Hunziker, G. Semenza, Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme, EMBO J. 7 (1988) 2705–13.

[44] G.J. Davies, K.S. Wilson, B. Henrissat, Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases, Biochem. J. 321 (1997) 557–559.

[45] S.R. Marana, Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases, IUBMB Life 58 (2006) 63–73.

[46] S.R. Marana, W.R. Terra, C. Ferreira, Purification and properties of a ß-glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda (Lepidoptera) larvae*, Insect Biochem. Mol. Biol. 30 (2000) 1139–1146.

[47] R.B. Best, G.E. Jackson, K.J. Naidoo, Molecular dynamics and NMR study of the {α(1 → 4)} and {α(1 → 6)} glycosidic linkages: maltose and isomaltose, J. Phys. Chem. B. 105 (2001) 4742–4751.

[48] H. Hara, R. Funabiki, M. Iwata, K. Yamazaki, Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions, J. Nutr. 114 (1984) 1122–1129.

[49] M. Harwood, B. Danielewska-Nikiel, J.F. Borzelleca, G.W. Flamm, G.M. Williams, T.C. Lines, A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties, Food Chem. Toxicol. 45 (2007) 2179–2205.

[50] V. Crespy, C. Morand, C. Manach, C. Besson, C. Demigne, C. Remesy, Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen, Am. J. Physiol. 277 (1999) 120–126.

[51] A. Parkinson, 実験方法シリーズ, ヒト肝臓と小腸からのミクロソーム調製 Drug Metab. Pharmacokinet. 21 (2006) 16–19.

[52] A. Parkinson, D.R. Mudra, C. Johnson, A. Dwyer, K.M. Carroll, The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes, Toxicol. Appl. Pharmacol. 199 (2004) 193–209.

[53] M.G. Boersma, H. Van der Woude, J. Bogaards, S. Boeren, J. Vervoort, N.H.P. Cnubben, M.L.P.S. Van Iersel, P.J. Van Bladeren, I.M.C.M. Rietjens, Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 662–670.

[54] M.K. Shelby, N.J. Cherrington, N.R. Vansell, C.D. Klaassen, Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family, Drug Metab. Dispos. 31 (2003) 326–333.

[55] J. Guo, L. Du, E. Shang, T. Li, Y. Liu, D. Qian, Y. Tang, J. Duan, Conjugated metabolites represent the major circulating forms of Abelmoschus manihot *in vivo* and show an altered pharmacokinetic profile in renal pathology, Pharm. Biol. 54 (2016) 595–603.

[56] R. Boonpawa, A. Spenkelink, I.M.C.M. Rietjens, A. Punt, A physiologically based kinetic (PBK) model describing plasma concentrations of quercetin and its metabolites in rats, Biochem. Pharmacol. 89 (2014) 287–299.

[57] W. Mullen, C.A. Edwards, A. Crozier, Absorption, excretion and metabolite profiling

of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions, Br. J. Nutr. 96 (2006) 107.

[58] K.A. O'Leary, A.J. Day, P.W. Needs, F.A. Mellon, N.M. O'Brien, G. Williamson, Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: The role of human β-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-*O*-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism, Biochem. Pharmacol. 65 (2003) 479–491.

参考論文

[1] Tanaka. S, Shinoki.A, Hara. H, Melibiose, a nondigestible disaccharide, promotes absorption of quercetin glycosides in rat small intestine. J. Agric. Food Chem. 64 (2016) 9335–9341

[2] Tanaka. S, Oyama. M, Nishikawa. M, Ikushiro. S., Hara. H, Simultaneous collection of the portal and superior vena cava blood in conscious rats defined that intestinal epithelium is the major site of glucuronidation, but not sulfation and methylation, of quercetin, Biosci. Biotechnol. Biochem. 82 (2018) 2118–2129.

[3] Tanaka. S, Aphichat. T, Nishikawa. M, Ikushiro. S., Hara. H, Comprehensive analyses of quercetin conjugates by LC/MS/MS revealed that isorhamnetin-7-*O*-glucuronide-4'-*O*-sulfate is a major metabolite in plasma of rats fed with quercetin glucosides, J. Agric. Food Chem. 67 (2019) 4240–4249.

謝辞

本論文の作成ならびに10年間の研究の御指導、ご助言、さらに主査として御校閲を賜りました、北海道大学大学院農学研究科食品栄養学研究室の原 博特任教授に深く感謝申し上げます。また本論文の副査、ならびに日頃の実験相談やご助言をいただきました分子酵素学研究室の木村 淳夫教授、食品栄養学研究室の比良 徹講師に厚く御礼申し上げます。 さらに抱合体の分析や日頃の実験を行うにあたり、多くのご指導、ご助言を頂きました、石塚 敏准教授に深く感謝申し上げます。
また抱合体の標準品作製や、抱合化反応について多くのご指導、ご助言をいただいた富山県立大学工学部生物工学科の生城 真一教授に厚く御礼申し上げます。
そして本研究を進めるにあたり、お世話になりました北海道大学大学院農学院食品栄養学研究室の皆様に改めて御礼申し上げます。
最後に本研究において犠牲となった多くのラットに心から感謝し、ご冥福をお祈りいたします。