

プロポリスに含まれるフラボノイドの吸収・代謝

熊澤 茂則, 下位 香代子, 中山 勉

近年, わが国をはじめとする先進国では, 肥満, 高血圧, 癌, 動脈硬化, 心疾患, 糖尿病などの生活習慣病の増加が重要な社会問題となっている. 生活習慣病は, 日常の食生活に深く関連することから, 食品の機能を利用して疾病を治そう, 予防しようという考え方が広まり, 「機能性食品」という言葉も生まれた. また一方では, 健康ブームもあり, 食品中の機能性成分は種々の加工食品や飲料に利用され, サプリメントとしても汎用されるようになってきた. そのため, これらの食品中の機能性成分の生体内における効能や安全性を評価するためには, 成分の摂取量, 消化管からの吸収, 代謝, 血中動態, 代謝物の到達した臓器における生理活性を明らかにすることが重要である.

本稿では, 機能性成分として研究が進んでいる食品中のフラボノイド類に関して, 吸収・代謝についての最近の知見を紹介するとともに,

プロポリスに含まれるフラボノイドについても, 私たちの行った実験結果から, その吸収・代謝機構を解説する.

フラボノイドの吸収と代謝

フラボノイドとは, ベンゼン環 2 個 (A 環と B 環) を炭素元素 3 個がつなぐ化学構造を有するフェノール化合物の総称である. この基本的な構造に加え, さらに C 環の構造の違いや水酸基の結合の有無などで, フラバン, フラバノン, フラボン, フラバノール, フラバノール, フラボノールなどに分類することができる (図 1). フラボノイドは野菜, 果物, 穀類, 豆類, 茶, コーヒー, ココア, ワインなどに含まれ, 主に配糖体として存在している. それぞれの食品に含まれているフラボノイドの種類は, 食品の植物起源により異なる. 例えば, ケルセチン (quercetin) やケンフェロー

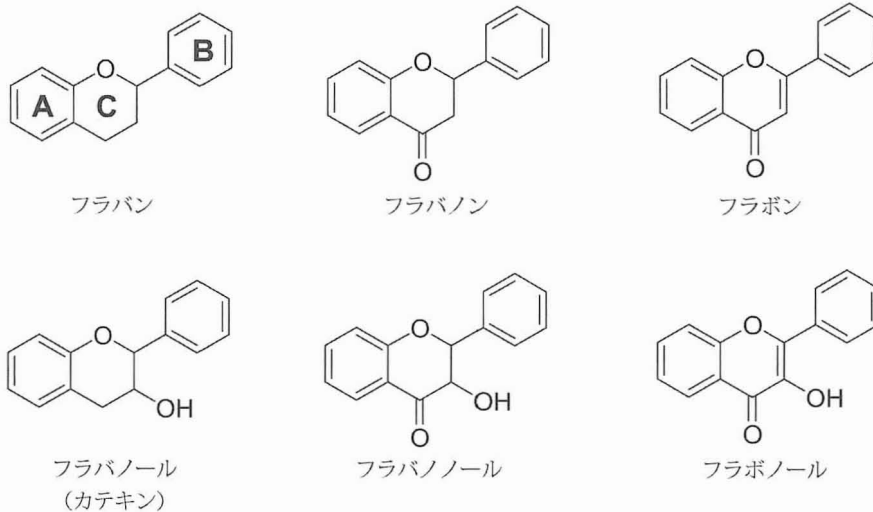


図 1 各フラボノイドの基本骨格

ル (kaempferol) などのフラボノール類, アピゲニン (apigenin) やルテオリン (luteolin) などのフラボン類は野菜や果物に比較的好く分布しており, ダイゼイン (daidzein) やゲニステイン (genistein) などのイソフラボン類は豆類に分布している. (-)-エピガロカテキンガレート ((-)-epigallocatechin gallate: EGCg) などのフラバノール類 (カテキン類) は茶に, ナリンゲニン (naringenin), エリオディクティオール (eriodictyol) などのフラバノン類は柑橘類に, シアニジン (cyanidin) などのアントシアニン類はブドウやベリー類に含まれている. 各食品中に含まれるフラボノイドの種類と含量は, 4年前より行われた文部科学省の研究プロジェクト「食品中の非栄養性機能物質の解析と体系化に関する研究」により, 「機能性食品因子データベース」としてもまとめられ, ホームページ (<http://www.life-science.jp/FFF/index.jsp>) に公開されている.

人間を含む哺乳動物においては, 摂取された食品は胃で消化された後, 腸管より成分が吸収される. そして, 吸収された成分は酵素によってグルクロン酸や硫酸が結合し, 抱合体となる.

以前は, フラボノイドはその多くが配糖体であるため, ほとんど体内に吸収されず, 遊離型 (アグリコン) のみが, わずかに腸管から吸収されると考えられていた. しかし, 最近の研究では, 配糖体も吸収されることがわかり, フラボノイドの分子量 (重合度), カテコール構造の有無, 結合している糖の位置や種類など, 化学構造や溶解性など化学的性質により吸収・代謝速度が多様であることが明らかになっている.

例えば, 図2には, フラボノイドの一種であるタマネギなどに多く含まれるケルセチンおよびその配糖体 (ルチン) の吸収・代謝に関する模式図を示した. すなわち, 胃で消化, 分解されたケルセチン (配糖体) は, 腸管からその成分が吸収されるが, その際, UDP-グルクロナルトランスフェラーゼによりグルクロン酸抱合体となる. さらに, 体内に取り込まれた成分は, 肝臓まで運ばれると, 肝臓でメチル化などの抱合体となり, その後腎臓から代謝される. 実際に, ケルセチン配糖体に富む食事をすると, ヒト血漿中には抱合体のみが検出されること (Manach et al., 1998), ケルセチン-3-グルコシド (quercetin-3-glucoside) やケルセチン-4'

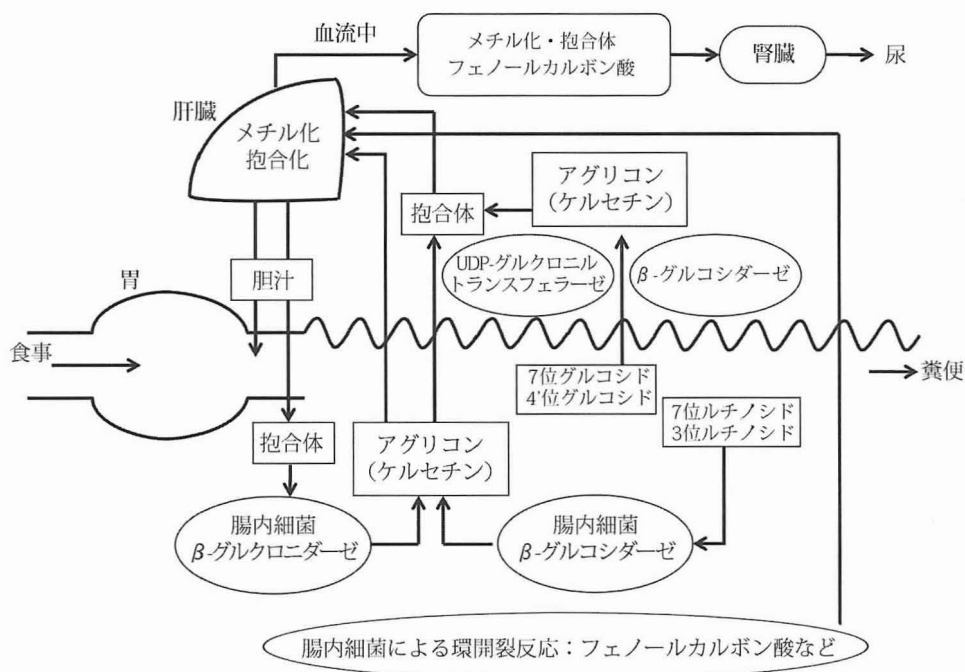


図2 ケルセチンおよびケルセチン配糖体の吸収・代謝

- グルコシド (quercetin-4'-glucoside) を摂取すると、ヒト血漿中には配糖体やアグリコンは存在せず抱合体が存在することが報告されている (Sesink et al., 2001)。

その他、緑茶を摂取したヒトの血清中に緑茶の主成分である EGCg が遊離型で検出され (Unno et al., 1996), EGCg は遊離型, グルクロン酸や硫酸の抱合体として血中に存在していることもわかった (Lee et al., 1995)。また, ラットを用いた実験により EGCg は小腸などの消化管粘膜をはじめ, 肝臓, 脳にも分布することが明らかにされた (宮澤ら, 2000)。一方, アントシアニン類のシアニジン-3-グルコシド (cyanidin-3-glucoside) は配糖体であるが, 血中には配糖体のままで存在し, アグリコンやその抱合体としては存在しないことも報告されている (Miyazawa et al., 1999)。これはアントシアニンが極性の高いイオン性分子であるため, 腸内細菌の有する β -glucosidase による加水分解を受けにくく, また, 抱合化される必要がないからだと考えられる。シアニジン-3-グルコシドの代謝物としては, 肝, 腎などの臓器中にメチル化体が検出されており, 血中にはシアニジン骨格が環開裂して生成したプロトカテキュ酸も検出されている (Tsuda et al., 1999)。このように, フラボノイドの腸管吸収は, その化学構造の種類の多さゆえに非常に多様であるが, 次第に明らかになりつつある。

プロポリスに含まれるフラボノイド

現在, 日本において健康食品の素材として利用されているプロポリスは, ミツバチが周辺の植物の芽や浸出物を集めて作った樹脂状物質である。プロポリスの主な成分は, 樹脂, ろう質, 花粉, その他ミネラル類などであるが, 実際の組成は原塊の採取地や蜂が利用する植物源に左右される。プロポリスは, 世界各地で民間伝承薬として利用されており, 近年, 抗菌作用, 抗ウイルス作用, 抗炎症作用, 抗腫瘍作用などの数多くの薬理学的効果が報告されている (Burdock, 1998)。

近年, プロポリスの成分分析, および起源植

物に関する研究が進み, プロポリスにはポプラを起源とするものと, バッカリス・ドラクンクリフォリア (*Baccharis dracunculifolia*) という植物を起源とするものに, 大きく2種類あることがわかってきた (熊澤ら, 2004)。ポプラを起源とするプロポリスは, ヨーロッパを中心に古くから利用されてきたタイプであり, フラボノイドを多く含むことが特徴である。一方, バッカリス・ドラクンクリフォリアを起源とするプロポリスは, ミナス・ジュライス州などのブラジル南西部で採取され, フラボノイドよりも桂皮酸誘導体やテルペノイドなどの成分を多く含む。なお, バッカリス・ドラクンクリフォリアは, ブラジルではアレクリンとも呼ばれている。

このように, プロポリスと言っても, ポプラ系のもので, バッカリス系のものとは, 含有成分がまったく異なるので, 注意が必要である。ポプラ起源のプロポリスは, ヨーロッパで産出されるものだけでなく, 中国, オセアニア, 南米のウルグアイやアルゼンチンなどで産するプロポリスも, このタイプに属する。図3には, ポプラ系プロポリスに含まれる主な成分を示した。以前, 日本においては「ケルセチンがプロポリスに含まれる代表的なフラボノイドである」との誤った情報が出回っていたが, 実際にはクリシン (chrysin), ガランギン (galangin), ピノセンブリン (pinocembrin) などがポプラ系プロポリスの代表的なフラボノイドであり, ピノバンクシン (pinobanksin) やその誘導体も多く含まれる (Kumazawa et al., 2004a)。

プロポリスに含まれる成分の体内動態

前述したように, 近年, 食品に含まれるフラボノイドの体内動態に関する研究は, 広く行われるようになってきた。ポプラ起源のプロポリスもフラボノイドを多く含む素材であるが, このようなプロポリスに含まれるクリシンやガランギンなどの特徴的なフラボノイドに関する体内動態研究は, あまり行われていない。また, プロポリスを摂取した場合, その中のどの成分が吸収されるのか, そしてどのように代謝され

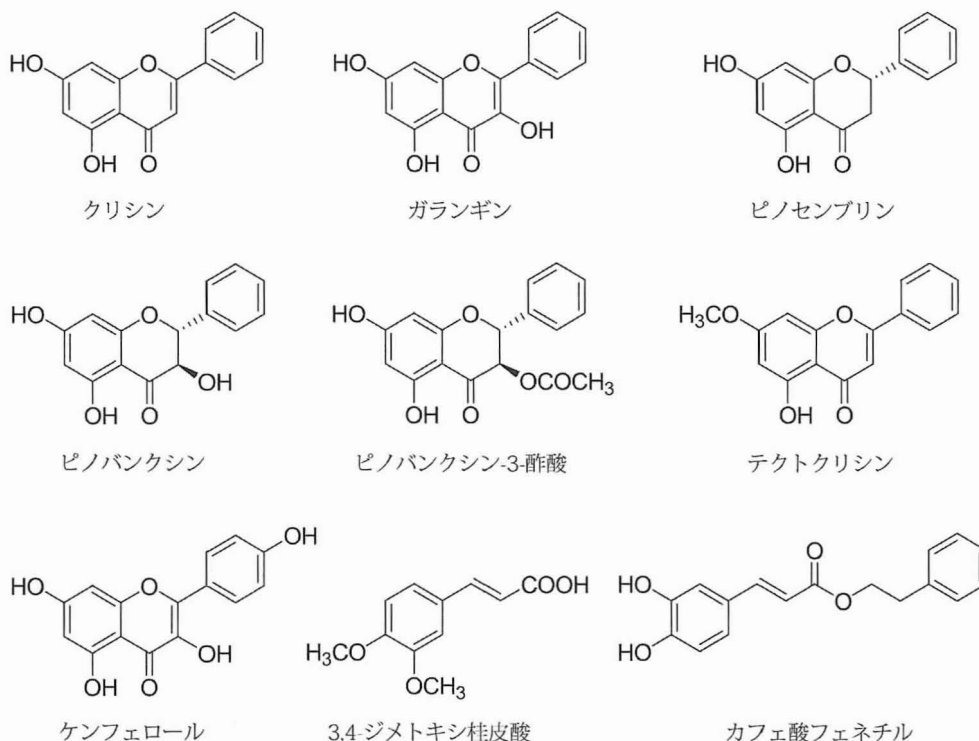


図3 ポプラ起源のプロポリスに含まれる主な成分

ていくのかは、ほとんどわかっていない。

そこで私たちは、すでに詳細な成分分析を実施したウルグアイ産のプロポリスを用いて (Kumazawa et al., 2002), このプロポリス中の成分の吸収・代謝を調べることにした。すなわち、ウルグアイ産プロポリスのエタノール抽出物をラットに経口投与し、一定時間後にラットの血液と24時間尿を回収し、血中と尿に含まれるプロポリス成分を分析した (Kumazawa et al., 2004b)。ケルセチンなどのフラボノイドは、体内に取り込まれると、硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体となるため、回収したラットの血液や尿は、 β -グルクロニダーゼ/サルファターゼ (β -glucuronidase/sulfatase) で酵素処理し、遊離のフラボノイドに変えることで分析を試みた。図4bは、ラットにプロポリスを投与し、1時間後に採取した血液を β -グルクロニダーゼ/サルファターゼで処理した血漿のHPLCクロマトグラムである。酵素処理前(図4a)では顕著なピークは見られなかったが、酵素処理を行うことで、図4bでA, B, Cとし

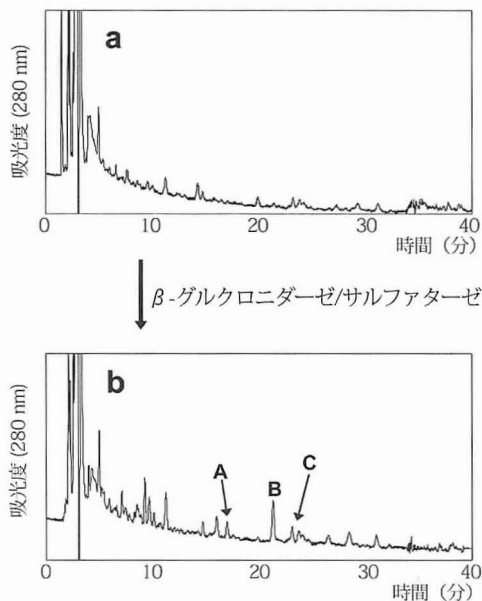


図4 ウルグアイ産プロポリスのエタノール抽出物投与1時間後のラット血漿のHPLCクロマトグラム

(a) 酵素未処理, (b) 酵素処理

て示した新たなピークの生成を確認した。これらのピークについては、多波長検出 (Photodiode array: PDA) および質量分析 (MS) を備えた HPLC により、それぞれ A: ピノバンクシン 5-メチルエーテル, B: ピノバンクシン, C: ケンフェロール であると同定できた。

図 5 は、プロポリス投与後 2 時間後に採取した血液を β -グルクロニダーゼ/サルファターゼで処理した血漿の HPLC クロマトグラムであるが、A~C のピーク以外にも、D~F のピークの生成を確認した。これらのピークも同様に、HPLC-PDA および LC/MS により、D: クリシン, E: ピノセンブリン, F: ガランギン (galangin) と同定した。なお、これらのピークは生成量が微量であったため、定量は困難であったが、LC/MS でその存在を確認するこ

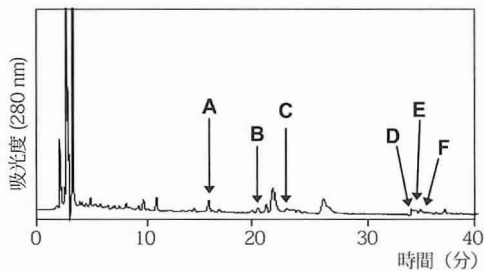


図 5 ウルグアイ産プロポリスのエタノール抽出物投与 2 時間後のラット血漿の HPLC クロマトグラム

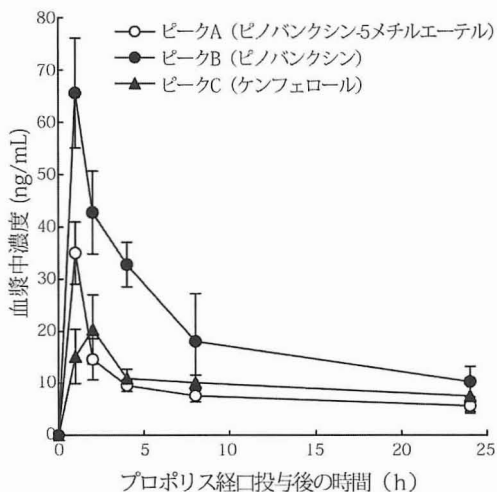


図 6 ウルグアイ産プロポリスのエタノール抽出物投与後の血漿中の成分の経時変化

とができた。

図 6 には、血漿中におけるピーク A~C の経時的な定量結果を示した。ピーク A (ピノバンクシン 5-メチルエーテル) とピーク B (ピノバンクシン) は投与後 1 時間後に、ピーク C (ケンフェロール) は投与後 2 時間後に最も高濃度で体内に存在し、その後時間とともに減少していくことが確認された。

24 時間尿についても、同様に β -グルクロニダーゼ/サルファターゼで酵素処理し、HPLC-PDA および LC/MS により分析を進めた。尿では、酵素処理していない試料でも、いくつかのフラボノイドの存在を検出することができた (図 7a)。このことは、これらのフラボノイドが、尿に排泄される際には、アグリコンのまま排泄されていることを示している。図 7b には、酵素処理をした血漿の HPLC クロマトグラムを示したが、新たにピーク C (ケンフェロール) の生成を確認することもできた。

表 1 には、尿中に含まれていたピーク A~E の各成分含量を示した。元のプロポリス中

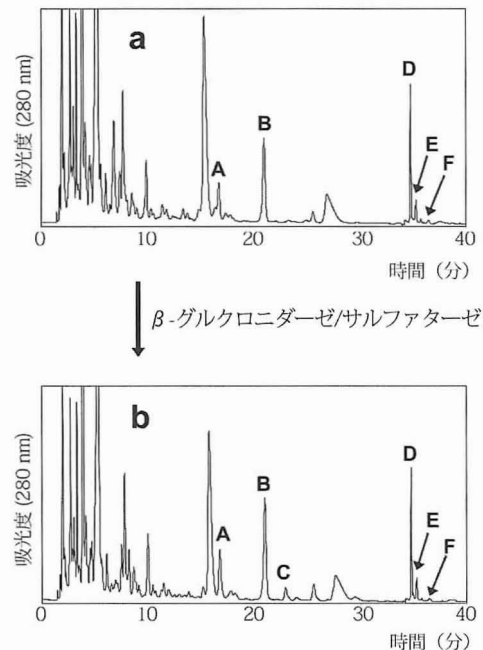


図 7 ウルグアイ産プロポリスのエタノール抽出物を投与したラットの 24 時間尿の HPLC クロマトグラム
(a) 酵素未処理, (b) 酵素処理

表1 ウルグアイ産プロポリスのエタノール抽出物中、およびプロポリスを投与したラットの24時間尿に含まれるピークA～Fの各成分含量

ピーク	プロポリスのエタノール抽出物中の含量 (g/mg)	尿 (g/24 時間尿)	
		酵素処理	酵素未処理
A ピノバンクシン5-メチルエーテル	22.16	3.89 ± 0.35	2.38 ± 0.45
B ピノバンクシン	9.94	5.94 ± 0.69	4.76 ± 0.58
C ケンフェロール	3.41	0.18 ± 0.01	検出されず
D クリシン	55.58	5.36 ± 0.41	4.72 ± 0.44
E ピノセンブリン	38.56	2.37 ± 0.06	2.12 ± 0.19
F ガランギン	16.98	1.49 ± 0.07	1.47 ± 0.06

のピノバンクシン（ピークB）の含量は9.94 g/mgであり、ピノバンクシン 5-メチルエーテルの含量22.16 g/mgよりも少ない。しかし、今回の尿中への排出量を見ると、ピノバンクシンの方がピノバンクシン 5-メチルエーテルよりも多いことが観察された。私たちは以前に、ウルグアイ産プロポリスには、多くのピノバンクシンの3位エステル誘導体が含まれていることを報告した (Kumazawa et al., 2002)。そのため、ピノバンクシンのエステル誘導体が体内に取り込まれたときにエステル結合が加水分解されて、ピノバンクシンの骨格が残るために、ピノバンクシンの含量が増えたためと考えられる。このことは、他のフラボノイドに関して元の含量と尿への排泄量を比較すると、尿への排出量が元の含量の5～10%であるのに対し、ピノバンクシンだけが突出して多いことから示唆される。

まとめ

今回、フラボノイドの吸収・代謝機構に関する最近の研究を紹介し、プロポリス中のフラボノイドについても私たちの研究例を解説した。現在、日本では、プロポリスを原料とした製品は、チンキ、顆粒、カプセルなどの健康食品だけでなく、飴やドリンクなどの食品へ添加したのも市場に出ている。このようにプロポリスは、日本においては薬として扱われているわけではないが、プロポリス中の成分の吸収・代謝、過剰摂取による生体への影響、他の食品成分や生体内成分との相互作用、摂取の推奨量の評価などを検討することは、プロポリスを適切に使

用していくためには、必要なことである。また、このことはプロポリスの機能科学的な解明にも、つながるものと思われる。

最近のプロポリスの成分化学的な研究により、プロポリスにはポプラを起源植物とするタイプと、バッカリス・ドラクンクリフォリアを起源植物とするタイプが存在することが明らかとなっている。今回、私たちはポプラ起源のプロポリスとしてウルグアイ産のプロポリスを用い、成分の吸収・代謝を調べ、プロポリス中のいくつかのフラボノイドが実際に体内に吸収されていることを初めて示すことができた。しかし、日本ではバッカリス・ドラクンクリフォリアを起源植物とするブラジル産プロポリスも多く消費されている。バッカリス系のプロポリスには、ポプラ系プロポリスには含まれない桂皮酸誘導体をはじめとする成分も多く含まれているため、今後バッカリス系のプロポリスについても成分の体内動態研究を行う必要がある。

これからもプロポリスの研究が進み、新たな生理活性も明らかになっていくことが予想される。また、プロポリスの種類もますます広がっていくことも考えられるが、それらを適切に使用し、健康被害を防ぐためにも、プロポリス中の成分の代謝動態をよく理解することは重要であろう。

謝辞

本稿で紹介した研究は、文部科学省の科学研究費および日本プロポリス協議会の援助を受けました。あわせてここに深謝します。

(熊澤, 中山: 〒422-8526 静岡市谷田 52-1 静岡県立大学食品栄養科学部, 下位: 同大学環境科学研究所)

引用文献

- Burdock, G. A. 1998. *Food Chem. Toxicol.* 36: 347-363.
- Kumazawa, S., T. Hamasaka and T. Nakayama. 2004a. *Food Chem.* 84: 329-339.
- Kumazawa, S., K. Shimoi, K. Hayashi, T. Ishii, T. Hamasaka and T. Nakayama. 2004b. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3083-3088.
- Kumazawa, S., K. Hayashi, K. Kajiya, T. Ishii, T. Hamasaka and T. Nakayama. 2002. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4777-4782.
- 熊澤茂則・米田昌浩・中山勉. 2004. *FFIジャーナル* 209: 132-140.
- Lee, M. J., Z. Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, D. A. Balentine and C. S. Yang. 1995. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 4: 393-399.
- Manach, C., C. Morand, V. Crespy, C. M. Demigne, O. Texier, F. Regeat and C. Remesy. 1998. *FEBS Lett.* 426: 331-336.
- 宮澤陽夫・仲川清隆・浅井明. 2000. *化学と生物* 38: 104-114.
- Miyazawa, T., K. Nakagawa, M. Kubo, K. Muraishi and K. Someya. 1999. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1083-1091.
- Sesink, A. L. A., K. A. O. Leary and P. C. H. Hollman. 2001. *J. Nutr.* 131: 1938-1941.
- Tsuda, T., F. Horio and T. Osawa. 1999. *FEBS Lett.* 449: 179-182.
- Unno, T., K. Kondo, H. Itakura and T. Takeo. 1996. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 2066-2068.
- SHIGENORI KUMAZAWA, KAYOKO SHIMOI* and TSUTOMU NAKAYAMA. Absorption and metabolism of flavonoids in propolis. *Honeybee Science* (2004) 25 (4): 152-158. School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka; *Institute for Environmental Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan.

Propolis is a resinous substance collected by honeybees from various plant sources. It is extensively used in food and beverages to improve health and prevent diseases such as heart disease, diabetes, and cancer. Propolis from Europe and China (poplar-type propolis) contains many kinds of flavonoids. Although an abundance of flavonoids in the diet is correlated with reduced heart disease, there are few studies on the absorption and metabolism of flavonoids in propolis. To investigate the absorption and metabolism of the components in propolis, we administered ethanol extracts of Uruguayan propolis (poplar-type propolis) orally to rats and analyzed their plasma and urine by HPLC with photo-diode array (PDA) and mass spectrometric (MS) detection. After deconjugation of the components by β -glucuronidase/sulfatase treatment of the specimen, several flavonoids were detected in plasma of rats orally administered propolis. Further these compounds were detected also in urine. These results suggest that flavonoids in propolis are metabolized and circulate in the body after oral administration of propolis.