

総 説

酸化ストレスと食品抗酸化物質

寺尾 純二

徳島大学医学部栄養学科食品学講座

(平成12年1月19日受付)

食品由来の酸化ストレス防御物質として注目されているフラボノイド類について、その抗酸化活性と構造相関およびバイオアベイラビリティに関わる吸収代謝の経路を検討した。植物性食品に広く含まれているケルセチンは血漿中でグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体として存在すること、少なくともその一部は抗酸化活性を有することをラットを用いた実験で明らかにした。

1. はじめに

酸化ストレスとは生体の酸化 抗酸化平衡 (prooxidant-antioxidant balance) が乱れて酸化側に傾くことをいう¹⁾。生体内で発生する様々な活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) は食細胞の殺菌作用や細胞のレドックス制御などに働くが、酸化ストレス状態になると自らの組織や体液成分を攻撃する。このような酸化的障害が生活習慣病といわれる様々な疾病の発生や進行に関与することが明らかになってきた。一方、酸化ストレスを抑えるための生体内抗酸化システム (Fig. 1) には、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) などの抗

酸化酵素群や金属イオン結合タンパク質群とともに、ビタミンEやビタミンCをはじめとする低分子の抗酸化物質群が含まれる。ビタミンEやビタミンCは食品中の代表的な抗酸化物質であるが、私達が日常摂取する食品にはこれら以外にもカロテノイド類やフラボノイド類など様々な抗酸化物質が存在することが知られている。したがって、疾患予防・健康維持の観点から食品抗酸化物質を食生活に活用することが望まれる。そのためには、生体内抗酸化システムにおける食品抗酸化物質の役割を解明するとともに、食品として摂取した場合の有効性 (バイオアベイラビリティ) を実証する必要がある。われわれの研究室では日常摂取する植物性食品に含まれる成分としてカロテノイド類、フラボノイド類およびフィチン酸を主な研究対象として、これらの課題にチャレンジしている。その中からフラボノイド類に関する最近の研究成果を報告する。

2. 食品抗酸化物質の分類と反応機構

食品に含まれる抗酸化物質は抗酸化機構の面から①フリーラジカル捕捉剤、②一重項酸素消去剤 ③金属キレート剤に分類できる。ビタミンEやビタミンCが主にフリーラジカル捕捉剤として機能するのに対して、カロテノイドは一重項酸素消去剤として働くと考えられる。カロテノイドにもフリーラジカル捕捉活性はあるが、生体内で十分な活性を発揮するかどうかは不明である。一方、フラボノイド類の抗酸化作用はフリーラジカル捕捉と金属キレートの両方で説明される。しかし、溶液中でのフリーラジカル捕捉活性はビタミンEの1/10ないしそれ以下である²⁾。さて、ビタミンCが水溶性であるのに対してビタミンEやカロテノイド類は脂溶性である。したがって、酸化的障害の場として細胞膜やオルガネラ膜あるいは血漿リポタンパクを考えた場合、ビタミ

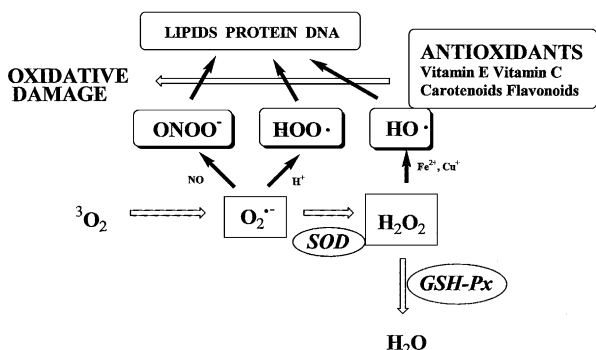


Fig. 1 生体内での活性酸素生成と食品抗酸化物質の役割

ンCは細胞質や血漿中に存在し、水相で発生するラジカル種を捕捉消去すると考えられる (Fig. 2)。脂溶性のビタミンEやカロテノイドは膜脂質二重層やリポタンパク内部に存在し、ラジカル連鎖反応の切断や一重項酸素の消去に関与する。しかし、フラボノイドはビタミンEほど脂溶性は高くないので、ビタミンEとは異なる位置で抗酸化作用を発揮するはずである。*In vitro*で生体膜や血漿リポタンパク質を酸化させると、フラボノイドは強い抗酸化活性を示すことが多い³⁾。これは、極性の高いフラボノイドは界面に存在しやすいために、脂質層内部に埋め込まれるビタミンEよりも界面において効果的に抗酸化活性を発揮するためであると考えられる⁴⁾。

3. フラボノイド類の抗酸化に関する構造活性相関

フラボノイドはジフェニルプロパン構造 ($C_6-C_3-C_6$) をもつフェノール化合物の総称であり、4,000種以上の存在が知られている。野菜や果実など植物性食品に広く存在するが、その多くは糖が結合した配糖体 (グリコシド) であり、遊離の化合物 (アグリコン) で存在することは少ない。フラボノイドはA環とB環で挟まれたC環の部分の構造から、カルコン類、フラボン類、フラバノン類、フラバノール類、フラボノール類、アントシアニン類に分類できる。いずれにおいても、ラジカル捕捉活性あるいはキレート作用を発揮するのに最も重要な部分構造はB環の *o*-ジヒドロキシ構造 (カテコール構造)

であるといわれている⁵⁾。われわれは、代表的なフラボノールであるケルセチン (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) について、そのメチル化体や配糖体などの各種誘導体の抗酸化活性を溶液⁶⁾ やリポソーム膜⁶⁾ および血漿リポタンパク質^{7,8)} などの系で検討した。その結果、4'-位が置換された誘導体ではほとんど活性を失うことから、B環の *o*-ジヒドロキシ構造の重要性が確認された (Fig. 3)。一方、3-位が置換されるとラジカルとの反応性が減少するために、ラジカル捕捉活性がやや弱まることわかった。

4. フラボノイドの生体吸収

フラボノイドの吸収には胆汁酸ミセルへの溶解性が重要であり、配糖体は水溶性のためにミセル化されず、小腸では吸収されにくい。ところが、大腸では腸内細菌の

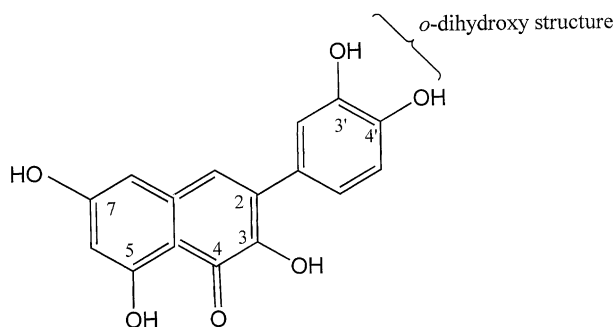


Fig. 3 ケルセチンの構造と抗酸化活性部位

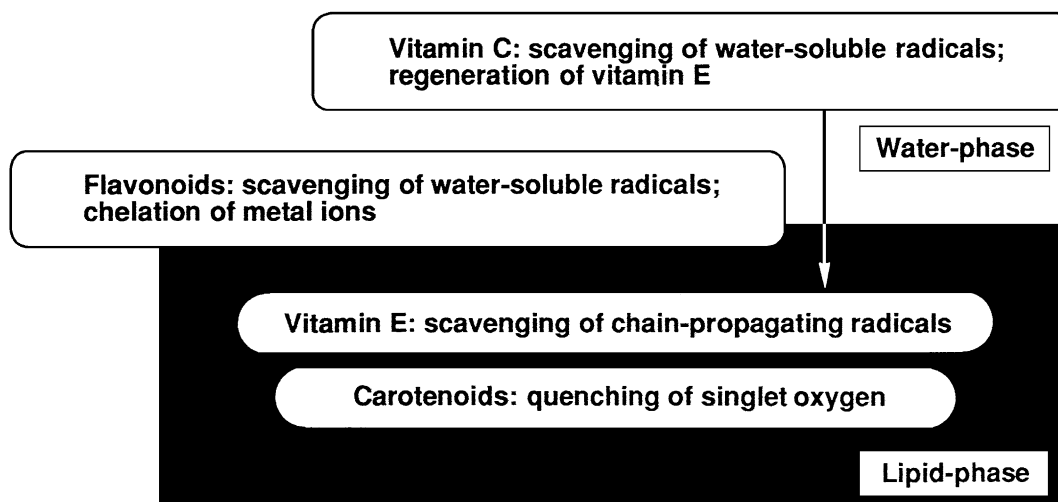


Fig. 2 食品抗酸化物質の抗酸化機構

もつβ グリコシダーゼにより加水分解され、アグリコンとなって脂溶性が高まるために吸収されるといわれる⁹⁾。事実ラットではケルセチンよりもその配糖体であるルチンの吸収は遅いことが示されている¹⁰⁾。しかし、ヒトではアグリコンよりもその配糖体の方が吸収されやすいとの考えがある¹¹⁾。通常の食事をしたヒトの血漿には0.5~1.6μMのフラボノイド配糖体が存在するという報告もある¹²⁾。そこでわれわれは、ごく普通の食品から摂取したフラボノイドの生体への吸収・蓄積量を明らかにすることを試みた¹³⁾。すなわち、ヒトボランティア7名を用いてケルセチン配糖体（主にケルセチン4'-グルコシドと3,4'-グルコシド）に富むタマネギの1週間連続摂取実験を行った（260~360g/day；68~94mgケルセチン相当量/day）。その結果、10時間絶食後において、抱合体加水分解酵素で処理した血漿には0.08~1.87μM（平均0.63±0.72μM）のケルセチンが存在することがわかった。したがって、ケルセチンに富む食事によりヒト血漿には0.1~1.0μM程度のケルセチンが蓄積すると結論した。さらに、ヒト血漿中のケルセチンは遊離型アグリコンや配糖体ではなく、代謝物である抱合体として蓄積することも明らかとなった。

5. フラボノイドの代謝変換経路

腸管から吸収されたフラボノイドは門脈あるいはリンパに移行し、肝臓でメチル化、水酸化などの変換反応とともに、硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体化反応を受けるとされている。ケルセチン、カテキン類、イソフラボン類では、ラットやヒトの血漿あるいは尿中にこれらの代謝物が存在することがすでに報告されている¹⁴⁾。抱合体の一部は肝臓から胆汁にも移行し、さらに十二指腸に排泄された代謝物は、大腸の細菌叢で加水分解や開裂反応を受けて、一部がさらに再吸収される（腸肝循環）。したがって、摂取したフラボノイドの相当量は腸肝循環により代謝物や分解物として血流に存在しうる。われわれは(-)エピカテキンを用いて、ラット各臓器での代謝酵素活性を測定し、メチル化酵素や硫酸抱合体化酵素の活性が肝臓で強いものに対して、グルクロン酸抱合体化酵素（UDP-glucuronyl transferase）活性は小腸や大腸で強いことを認めた¹⁵⁾。したがって、通常摂取されたフラボノイドはまず小腸や大腸粘膜においてグルクロン酸抱合体へ代謝されたのち、肝臓に輸送されると思われる。次にわれわれはヒト結腸がん由来の培養細胞株であ

るCaco 2細胞を用いたケルセチンの代謝吸収実験を行い、ケルセチンが細胞にとりこまれると同時に抱合体化をうけることを確認した¹⁵⁾。また、ケルセチンアグリコンに比べてその配糖体では細胞にとりこまれにくいことも認めている。したがって、食品から摂取したフラボノイドの大部分は、腸管吸収の過程において、糖が遊離した後代謝変換されて生体内へ移行すると思われる（Fig. 4）。

6. フラボノイド代謝物の抗酸化作用

食品として摂取されたフラボノイドの多くが吸収の過程で代謝され、抱合体などの代謝物として血漿中に存在することが明らかになってきた。したがって、フラボノイドの生体内酸化ストレス防御機能を明らかにするためには、吸収後の代謝物の活性を評価する必要がある。そこで、われわれはケルセチン（10mg/kgおよび50mg/kg体重）を投与したラットから血漿を採取し、代謝物の蓄積量と血漿抗酸化活性の変動を測定した¹⁶⁾。その結果、投与1時間および6時間後のラット血漿の銅イオン誘導脂質過酸化反応において、明らかにケルセチン投与量に依存した抗酸化活性の上昇がみられた。これらの血漿にケルセチンは存在せず、ケルセチンおよびイソラムネチン（3'-O-メチルケルセチン）の抱合体がケルセチン摂取量に応じて蓄積した。したがって、これら抱合体の少なくとも一部が血漿抗酸化活性の上昇に寄与したことが明らかである。また、同様の実験結果は(-)エピカテキンでも得られた¹⁸⁾。さらに、ケルセチン代謝物画分はヒト血漿リポタンパク質の銅イオン誘導酸化反応を抑制する作用があることを確認した⁸⁾。したがって、食品

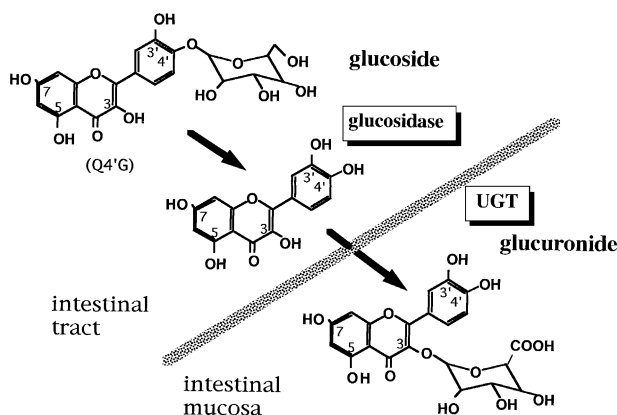


Fig. 4 消化管におけるケルセチン配糖体の吸収と代謝機構

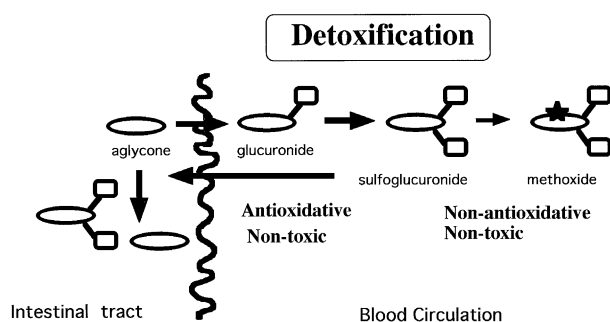


Fig. 5 フラボノイドの代謝変換と抗酸化活性

から摂取したフラボノイドによる生体内抗酸化システムへの寄与はその代謝物によるところが大きいであろう。上述の抗酸化に関する構造活性相関から考えると、B環の*o*-ジヒドロキシ構造が未変化のままの数種の抱合体が寄与すると推測される。現在、血漿中のケルセチン代謝物を構造解析中であるが、少なくとも2種類の*o*-ジヒドロキシ構造を有するグルクロン酸抱合体が存在することを認めている。

7. まとめ

フラボノイドは界面でのフリーラジカル捕捉作用や金属イオンキレート作用などユニークな活性をもつことから、酸化ストレスに対する防御機能が強く期待される物質である。食品成分として摂取された場合、その多くは代謝物に変換され最終的にはその活性が失われるであろう。しかし全ての活性が失われるのではなく、一部の抱合体は生体内で抗酸化機能を発揮すると思われる。抗酸化物質 (antioxidant) は酸化促進物質 (prooxidant) にもなりうる両刃の剣である。生体にとって抱合体化反応は生体異物の解毒過程であるが、フラボノイドの場合には活性を制御しつつ抗酸化物質として有効利用するための反応になると推測される (Fig. 5)。

文 献

- 1) Sies, H.: Oxidative Stress -Oxidants and Antioxidants. Academic Press, London, 1991
- 2) Terao, J., Piskula, M., and Yao, Q.: Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. Arch. Biochem. Biophys., 308 : 278-284, 1994
- 3) Terao, J., and Piskula, M.: Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In: Flavonoids in Health and Disease. (Rice-Evans, C.A., and Packer L. eds), Marcell Dekker Inc. New York, pp 279-293, 1998
- 4) Terao, J., and Piskula, M.: Flavonoids and membrane lipid peroxidation. Nutrition, 19 : 790-791, 1999
- 5) Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol. Med., 20 : 933-956, 1996
- 6) Ioku, K., Tsushida, T., Takei, Y., Nakatani, N., and Terao, J.: Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta, 1234 : 99-104, 1997
- 7) Da Silva, E., Tsushida, T., and Terao, J.: Inhibition of mammalian 15 lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. Arch. Biochem. Biophys., 349 : 313-320, 1998
- 8) Yamamoto, N., Moon, J.H., Tsushida, T., Nagao, A., and Terao, J.: Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. Arch. Biochem. Biophys., 15 : 347-354, 1999
- 9) Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H. and Winter, J.: Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from human. Biochem. J., 248 : 953-956, 1987
- 10) Manach, C., Morand C., Taxier, P., Agullo, G., et al.: Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin and quercetin. J. Nutr., 125 : 1911-1922, 1995
- 11) Hollman, P.C.H., Vries, J.H.M., and Van Leennen, S. D.: Absorption of Dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am. J. Clin. Nutr., 62 : 1276-1282, 1995
- 12) Paganga, G., and Rice-Evans, C.A.: The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. FEBS Lett., 401 : 78-82, 1997
- 13) Moon, J-H., Nakata, R., Oshima, S., Inakuma, T., and Terao, J.: Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after short-term ingestion of onion in women. Am. J. Physiol. (in press)

- 14) Terao, J. : Dietary flavonoids as plasma antioxidants on lipid peroxidation : Significance of metabolic conversion. *In* : Antioxidant Food Supplements in Human Health. (Packer, L., Hiramatsu, M., and Yoshikawa T., eds), Academic Press, San Diego, pp 255-268, 1999
- 15) Piskula, M., and Terao, J. : Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, 128 : 1172-1178, 1998
- 16) Murota, K., Shimizu, S., Kitayama, M., and Terao, J. : Absorption and metabolism of quercetin and its glucosides in Caco 2 cells. Abstracts of 2nd ICoFF Conference, pp 109, 1999
- 17) Da Silva, E.L., Piskula, M., Yamamoto, N., Moon, J-H, and Terao, J. : Quercetin metabolites inhibit copper-ion induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett.*, 430 : 405-408, 1998
- 18) Da Silva, E.L., Piskula, M., and Terao, J. : Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radical Biol. Med.*, 24 : 1209-1216, 1998

Function of dietary antioxidants on the protection against oxidative stress

Junji Terao

Department of Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

Daily foods contain a variety of minor components which possess antioxidative activity, such as vitamin E and vitamin C. On the other hand, it has been well known that reactive oxygen species (ROS) generating in the body cause oxidative damages in the tissues and fluids, resulting in the generation and progress of life style-related diseases. Therefore, it should be expected that dietary antioxidants are well introduced to individual food-style from the viewpoint of disease prevention and health promotion. However, there are two important subjects to be clarified, that is, the mechanism by which they exert the antioxidant activity *in vivo*, and the site at which they act as antioxidants *in vivo*. We are interested in common components present in foodstuffs, in particular, carotenoids, flavonoids and phytic acid, and are challenging to solve these subjects by use of carotenoids and flavonoids. Here we will discuss the result of our recent studies on dietary flavonoids. We have claimed that flavonoids are interfacial antioxidants whose activities appear at the interface between lipid-phase and water-phase. Nevertheless, little is known on the absorption and metabolism of flavonoids from diet. We recently investigated the absorption and metabolic pathway of quercetin, a representative flavonoid in plant foods, using rats, humans and cultured cell derived from human digestive tract. The result shows that a part of quercetin is absorbed from digestive tract and exclusively accumulates as conjugated metabolites in blood plasma. The antioxidative activity of quercetin exhibited in blood plasma is likely to be originated from conjugated metabolites. It is therefore implied that metabolic products largely contribute to the physiological function of flavonoids, when flavonoids are ingested from daily foods.

Key words : Antioxidants, flavonoids, lipid peroxidation, glucuronyl conjugates, quercetin