

ブラジル産グリーンプロポリス成分の
吸収・代謝・排泄の解明

(Absorption, metabolism, and urine excretion of
components in Brazilian green propolis)

山家 雅之

2022

目次

第1章 序論

- 1-1 はじめに . . . 1
- 1-2 プロポリスとは . . . 2
- 1-3 世界のプロポリスとその成分特徴 . . . 2
- 1-4 プロポリスの有効性 . . . 3
- 1-5 ブラジル産グリーンプロポリスに含まれる成分の吸収と代謝 . . . 5

第2章 世界のプロポリス成分分析

- 2-1 はじめに . . . 13
- 2-2 材料と方法 . . . 13
 - 2-2-1 実験材料
 - 2-2-2 サンプル前処理方法
 - 2-2-3 分析条件
- 2-3 結果 . . . 14
 - 2-3-1 ルーマニア産プロポリスの含有成分
 - 2-3-2 ポーランド産プロポリスの含有成分
 - 2-3-3 環太平洋地域のプロポリスの含有成分
 - 2-3-4 ロシア産プロポリスの含有成分
 - 2-3-5 ブラジル産プロポリスの含有成分
- 2-4 考察 . . . 16

第3章 ヒトにおけるブラジル産グリーンプロポリス投与時の成分吸収および主要代謝物の同定

- 3-1 はじめに . . . 24
- 3-2 材料と方法 . . . 24
 - 3-2-1 実験材料
 - 3-2-2 試験デザイン
 - 3-2-3 血漿サンプルの前処理
 - 3-2-4 グルクロン酸抱合代謝物標準品の調製
 - 3-2-5 ヒト肝ミクロソームを用いた artepillin C および drupanin グルクロン酸抱合代謝物の合成
 - 3-2-6 LC-MS/MS 分析
 - 3-2-7 薬物動態および統計解析
- 3-3 結果 . . . 27
 - 3-3-1 BGP に含まれる主要成分量の定量

3-3-2	血漿サンプル前処理方法の検討	
3-3-3	BGP 投与後の桂皮酸誘導体およびフラボノイドの血中濃度変化	
3-3-4	差分解析による BGP 投与後の血中代謝物の特定	
3-3-5	出芽酵母による artepillin C および drupanin のグルクロン酸抱合体の合成と血中主要代謝物の同定	
3-3-6	主要代謝物の血中濃度変化	
3-4	考察	・・・ 30
第 4 章	ブラジル産グリーンプロポリスの主要な桂皮酸誘導体の吸収・代謝経路・尿排泄量の検討	
4-1	はじめに	・・・ 49
4-2	材料と方法	・・・ 49
4-2-1	実験材料	
4-2-2	動物および動物試験デザイン	
4-2-3	サンプル前処理	
4-2-4	LC-MS/MS 分析	
4-2-5	薬物動態解析	
4-2-6	統計解析	
4-3	結果	・・・ 51
4-3-1	BGP 投与時におけるラットでの BGP 主要桂皮酸誘導体の吸収とヒトとの比較	
4-3-2	BGP 主要桂皮酸誘導体の血中代謝物の特定	
4-3-3	BGP 主要桂皮酸誘導体投与後の血中代謝物濃度と尿中排泄量	
4-4	考察	・・・ 54
第 5 章	結論	・・・ 64
	引用文献	・・・ 68
	摘要 (Summary)	・・・ 77
	略語表	・・・ 81
	謝辞	・・・ 82
	学位論文の基礎となる投稿論文	・・・ 83

第1章 序論

1-1 はじめに

日本は、2007年から65歳以上の高齢者が、総人口の21%以上を占める超高齢化社会に突入しており、2030年には総人口の30%、2050年までには40%が高齢者で占める社会になることが予測されている。2020年の総務省の推計によると、65歳以上の人口は総人口の28.7%で、このうち75歳以上の人口は14.8%であるのに対し、15歳未満の人口は12.0%と少子高齢化の傾向は顕著となっている。これに伴う国民医療費の増大は大きな社会問題であり、厚生労働省の推計によれば、4人に1人が75歳以上となる2025年には、国民医療費は57.9兆円に上ると推定されている。そのような中で、健康寿命の延伸と病気に至る前の状態である未病の改善が重要な課題となっており、栄養・食品による予防医学の考え方にに基づき、自らの健康を自ら守り管理するセルフメディケーションの考え方が浸透しつつある。

食品成分には栄養面での機能（一次機能）、おいしさ面での機能（二次機能）、そして生体内で果たす生体調節あるいは生体防御面での機能（三次機能）がある。進展する超高齢化社会に伴う健康寿命の延伸に、この食品の三次機能を有効活用するため、食品の機能性を表示できる枠組みが構築されており、1991年に最終製品の個別認可型の特定保健用食品制度（トクホ）が、2001年にビタミンやミネラルに限り規格基準を満たした場合に、機能性表示を認める栄養機能食品制度が発足している。食品の機能を表示する上で、国からの認可が必要となるトクホは、最終製品での臨床試験が必須であり、認可のためのハードルが高い。そのため、制度発足から2022年4月現在までで、認可が下りている製品数は1,060件であり、2021年度の1年間では16件の承認にとどまっている。そこで、健康増進と健康産業の成長を名目に、事業者の責任において食品の機能性を表示できるようにした「機能性表示食品制度」が2015年4月に発足した。本制度では、必ずしも最終製品での臨床試験をする必要はなく、表示したい機能性とその関与成分（有効成分）のシステマティックレビュー（SR）により、機能性を表示することができる。また、健康食品やサプリメントだけでなく生鮮食品でも機能性を表示することが認められたため、制度発足から2022年4月までで届出数は5,400件を超え、2021年度では年間1,400件を超える届出がなされている（Figure 1-1）。これらの届出に関する資料は全て公開されており、人々が、自身の健康の維持・増進に役立つ食品を選択するための情報収集が、可能になったことの意義は大きい。また、制度発足時から、届出成分はトクホでも使用されている難消化性デキストリンやGABA、DHA、EPAを関与成分としてSRされたものが多かったが、2019年度から植物エキスや分泌物においても機能

性が謳えるようになった。これにより、古くから健康に良いとされてきた蜂産品（ローヤルゼリーやプロポリスなど）も、その有効性についてメカニズムや関与成分を明らかにし、情報発信をしていくことで、より一層人々の健康の維持・増進に貢献できるようになると期待される。

1-2 プロポリスとは

プロポリスは、ミツバチ (*Apis mellifera* L.) が巣の周辺植物の新芽や樹皮を採取し、自らが分泌する唾液やミツロウを混ぜ合わせて作る樹脂状の物質である (Figure 1-2)。プロポリスの語源はギリシャ語の「防御」を意味する“Pro”と「都市」を意味する“Polis”との複合語で、ミツバチの巣の防壁という意味である。その名が示すように、ミツバチはこのプロポリスを巣の補強や修繕に用いる他、巣内の雑菌の繁殖を抑えること等に利用しているとされている。プロポリスは古くは紀元前 300 年頃から伝統療法として用いられてきた歴史があり、抗菌、抗ウイルス、抗炎症作用等の活性が報告されている¹⁻³⁾。プロポリスはその高い抗菌、抗ウイルス、抗炎症作用から、17 世紀から 19 世紀頃には傷薬として利用され、第二次世界大戦においてはプロポリスを配合した軟膏が兵士の傷の治療に用いられたといわれている⁴⁾。また、弦楽器のニスとして利用されていたことでも有名である⁵⁾。欧州の一部の国では、現在でも医薬品としてプロポリスが用いられており、眼科、耳鼻咽喉科、歯科、消化器科、循環器科、泌尿器科、産婦人科、および皮膚科のそれぞれの領域においてプロポリス製剤が利用されている⁶⁾。日本では 1985 年に名古屋にて開催された第 30 回国際養蜂会議 (アピモンディア) にてプロポリスの有用性が発表されたことで関心が高まり、1991 年に国立予防衛生研究所 (現国立感染症研究所) からプロポリスの抗腫瘍作用に関する報告がなされたことを契機に研究が進められ⁷⁾、健康食品として一般的に知られるようになった。

1-3 世界のプロポリスとその成分特徴

プロポリスは一般的に樹脂が 50%、ミツロウが 30%、精油が 10%、花粉が 5%、その他成分が ~5% で構成される⁸⁾。しかし、ミツバチたちがプロポリスの原料として集めてくる植物 (起源植物) は生産される地域の植生により異なるため、一口にプロポリスと言っても起源植物の違いから、産地によりその含有成分も様々である。養蜂大国と言われるルーマニアで採取されるプロポリスは、ポプラの 1 種であるセイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*) やセイヨウトチノキ (*Aesculus hippocastanum*) が起源植物であることが報告されており⁹⁾、chrysin

や pinocembrin、galangin 等のフラボノイド類が主要な成分として含まれていることが報告されている¹⁰⁾。同じ欧州でも、ルーマニアの北部に位置するポーランドで生産されるプロポリスには、フラボノイド類に加え、*p-coumaric acid* や *caffeic acid*、およびそのエステル（特にベンジルエステル）が特徴的に含まれることが報告されており、このような成分を特徴的に含むプロポリスはヤマナラシ (*P. tremula* sect. *Leuce*) が起源植物であると考えられている¹¹⁾。

環太平洋地域は、温暖な気候から欧州諸国と比べ植生も大きく異なり、採取されるプロポリスの成分特徴も大きく異なる。沖縄県、台湾、およびハワイで採取されるプロポリスについては、トウダイグサ科のオオバギ (*Macaranga tanarius*) が起源植物であることが報告されており¹²⁻¹⁴⁾、*eriodictyol* を基本骨格にゲラニル基が付加した *nymphaeol* 類が特徴的な成分として同定されている¹²⁾。また、オーストラリア南部に位置するカンガルー島産のプロポリスは、島固有のカヤツリグサ科の植物 (*Lepidosperma* sp.) が起源植物であり、このプロポリスから、いくつかのプレニルヒドロキシスチルベンが新規化合物として同定されている¹⁵⁾。

日本において健康食品等で広く流通しているのは、ブラジル産のプロポリスであり、特にブラジル南東部に位置するミナスジェライス州で採取されたグリーンプロポリスが多く使われている。このブラジル産グリーンプロポリス (Brazilian green propolis; BGP) は、キク科の植物であるアレクリン (*Baccharis dracunculifolia*) が起源植物であると報告されており¹⁶⁾、桂皮酸誘導体、特に *artepillin C* や *drupanin*、*baccharin* 等のプレニル基が付加したものを多く含むことを特徴としている。また、これらの桂皮酸誘導体の他にも、*kaempferide* や *6-methoxykaempferide* 等のフラボノイド類、*chlorogenic acid* 等のカフェオイルキナ酸類も含まれることを先行研究で報告している (Figure 1-3)¹⁷⁾。同じブラジル国内であっても、ミナスジェライス州の北部に位置するバイーア州産のプロポリスは、シソ科のイガニグサ属の1種である *Hyptis divaricata* が起源植物とされ¹⁶⁾、メトキシ化されたフラボノイドを多く含んでいる¹⁸⁾。

1-4 プロポリスの有効性

上述の通り、プロポリスには様々な成分が含まれ、抗菌、抗酸化作用以外にも、ルーマニア産プロポリスでは紫外線 (UVB) からの皮膚の保護¹⁹⁾、ポーランド産プロポリスでは歯周病予防²⁰⁾、ハワイ産 (沖縄県産) では COX2、 α -グルコシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼの阻害活性²¹⁾、ブラジル・バイーア州産では抗糖化作用等が報告されており²²⁾、各プロポリスの成分特徴を反映しているものと思われる。

ブラジル・ミナスジェライス州産のグリーンプロポリス (BGP) には、運動時の疲労感の軽減や²³⁾、風邪や花粉症症状の低減^{24,25)}、抗肥満効果等が²⁶⁾、ヒトや動物試験にて報告されている。特に、近年ヒト試験にて、BGP の認知機能への有効性に関する研究が報告され、注目されている。浅間らは、60-79 歳の男女 68 名を対象にしたランダム化プラセボ対照二重盲検試験において、BGP の 24 週間の継続摂取により、情報処理能力や言語記憶がプラセボと比較して有意に改善したことを報告している²⁷⁾。また、Zhu らは標高 2,000 m と認知症が進行しやすい高地において、認知機能の尺度の一つである MMSE (Mini-Mental State Examination) スコアがプラセボ群では低下した一方で、BGP 摂取群ではスコアが維持されたことを報告している²⁸⁾。上述したとおり人口の高齢化が進む日本では、認知症患者が増加しており、2010 年時点において認知症患者は約 440 万人、軽度認知障害は約 380 万人と推定され²⁹⁾、認知症患者数は 2025 年には 650~700 万人、2040 年には 800~900 万人に達するとされている³⁰⁾。認知症による経済損失は 2014 年時点で年間約 14.5 兆円、2060 年には年間約 24 兆円と推定され、大きな社会問題となっている。根本的な治療薬が開発されていない現状では、予防医学的な観点からも BGP の認知機能への有用性がもたらす健康利益、経済利益は、今後ますます大きくなることが想像される。

また、2019 年末より世界的なパンデミックを引き起している新型コロナウイルス (COVID-19) に対しても BGP の治療効果が期待され、いくつかの臨床試験が実施されている。例えば、18 歳以上の PCR 検査で陽性と判定され、新型コロナウイルス感染と診断された患者を対象に、通常の治療に加えて BGP を 1 日あたり 400 mg および 800 mg 飲用させた結果、通常の治療のみでは入院期間が 12.6 日であったのに対し、BGP 併用摂取群では 400 mg 飲用で 3.03 日、800 mg 飲用で 3.88 日間入院期間が短くなったことが報告されている³¹⁾。加えて、別の臨床試験では、BGP を含む植物抽出物を新型コロナウイルス感染患者に投与することで、咳や息切れ、喉の痛み、熱、めまい、頭痛、腹痛などの症状が抑えられたことが報告されている³²⁾。

このような社会情勢を背景に、BGP の有効性に対するメカニズムや有効成分を解明し、情報発信をしていくことで BGP の信頼性を高めることが、人々の健康寿命延伸への貢献の意味からも、一層重要な課題になると考えられる。BGP の示す有効性について、そのメカニズムや有効成分は不明な点が多いが、BGP に特徴的な成分である artepillin C や drupanin、baccharin 等の桂皮酸誘導体、kaempferide 等のフラボノイドにもいくつかの機能性が報告されており、BGP の有効成分として期待されている (Table 1-1)。特に、BGP に最も多く含まれる桂皮酸誘導体である artepillin C については、機能性に関する研究が多く報告されており、抗菌、抗酸化、抗炎症作用に加え³³⁾、ペルオキシソーム増殖因子活性

化受容体 γ (PPAR γ) のアゴニスト活性や¹⁷⁾、ミトコンドリア脱共役タンパク質 (UCP1) の発現上昇と脂肪細胞のベージュ化誘導を介した、エネルギー代謝亢進作用等が報告されている³⁴⁾。PC12m3 細胞株において、artepillin C は p38/MAPK 経路の活性化を誘導し、神経成長因子単独処理と比べて artepillin C を併せて処理することで神経突起が 5~7 倍伸長することが報告されており、BGP の認知機能改善効果のメカニズムの一つであると考えられている³⁵⁾。また、新型コロナウイルス感染症の重症化を防ぐメカニズムの一つとして、artepillin C は p21 活性化キナーゼ (PAK1) を阻害することが報告されており³⁶⁾、新型コロナウイルスが PAK1 の活性化を介して引き起こす炎症や免疫応答抑制を防ぐことで、感染による重症化を防ぐと考えられている³⁷⁾。

1-5 ブラジル産グリーンプロポリスに含まれる成分の吸収と代謝

BGP 中の含有量が多い artepillin C は、BGP の有効性に対する寄与も大きいと考えられ、機能性に関する報告も多い。しかしながら、BGP は複数の成分からなる混合物であるため、artepillin C だけでなく様々な成分が BGP の有効性に寄与していると考えられる。加えて、経口投与された BGP 成分は、消化管や肝臓での吸収・代謝を経て機能を発揮すると考えられるため、BGP の有効性メカニズムや有効成分を明らかにするためには、各 BGP 成分の吸収・代謝を理解した上で、BGP の有効性に対する各成分の寄与を考えることが重要である。

食品の機能性成分として代表的なポリフェノールであるフラボノイドでは、吸収・代謝に関する研究が進められている (Figure 1-4)。経口投与されたフラボノイドは消化管を経て体内に取り込まれる際、消化管上皮に発現している UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGTs) やスルホトランスフェラーゼ (SULTs) によって、グルクロン酸あるいは硫酸が付加した抱合代謝物へと代謝される³⁸⁾。吸収された代謝物は、主に門脈を介して肝臓へと運ばれ、更なる代謝を受けた後、胆汁へと排泄されるか³⁸⁾、血液循環を介して末梢組織に到達し、最終的には尿中に排泄される³⁹⁾。タマネギ等に含まれる quercetin はヒト血漿中の代謝物として、主に quersetin-3'-sulfate および quercetin-3-glucuronide に代謝され、一部はカテコール基にメチル基が付加した isorhamnetin に代謝されることが知られている⁴⁰⁾。大豆イソフラボンである daidzein や genistein は 4'位および 7 位の水酸基でグルクロン酸や硫酸と結合し、代謝される⁴¹⁾。また、一部の daidzein は腸内細菌の働きで equol へと代謝され、機能性を発揮することも知られている⁴²⁾。

一方で、artepillin C をはじめとする桂皮酸誘導体等の BGP 成分の吸収・代謝に関する報告は少ない。ヒト小腸の培養細胞モデルとして用いられる Caco-2 細

胞を用いて **artepillin C** の細胞透過性と代謝性を検証した報告では、**artepillin C** は抱合体へ代謝されることなく、Caco-2 細胞の単層膜を透過することが報告されているが⁴³⁾、生体内での代謝は明らかにされていない。小西らのグループからは、**artepillin C** および *p*-coumaric acid の標準品を、ラットにそれぞれ単独投与した際の薬物動態学パラメーターが報告されており、その中で、酵素加水分解により血漿中の **artepillin C** および *p*-coumaric acid 濃度が増加することから、これらの化合物が抱合代謝を受ける可能性が示されている⁴⁴⁾。しかしながら、抱合体の種類や結合位置など詳細を明らかにするには至っておらず、桂皮酸誘導体が体内でどのような代謝を受けるかは不明なままである。また、フラボノイドでは、複数の成分を同時に摂取することで代謝パターンが変化する例が報告されている。タマネギと豆腐をそれぞれ単独で摂取した場合と、同時に摂取した場合で **quercetin** と大豆イソフラボンの血中代謝物のパターンが異なり、**quercetin** 単独では UGTs による代謝が優先されるが、イソフラボンが共存した際にはイソフラボンが優先して UGTs により代謝され、**quercetin** は SULTs の代謝が優先して行われたことが報告されている⁴⁵⁾。このことから、BGP のような複数の成分からなる混合物の吸収・代謝を理解するためには、単一化合物投与時の吸収・代謝だけでなく、混合物として BGP を摂取した際の各成分の吸収・代謝を比較することも重要であると考えられる。

そこで、本研究では **artepillin C** をはじめとする桂皮酸誘導体や、**kempferide** をはじめとするフラボノイド等の BGP 成分が生体内でどのように吸収・代謝されるかを明らかにすることを目的に、まず、ヒトにおいて BGP を投与した際の桂皮酸誘導体やフラボノイドの血中への取り込みと、主要な血中代謝物の同定を試みた。次いで、モデル生物としてラットを用いて、BGP の主要な桂皮酸誘導体 (**artepillin C**、**drupanin**、**baccharin** および *p*-coumaric acid) それぞれを投与した際の代謝物を検証し、生体内での桂皮酸誘導体の代謝経路を推定した。

Table 1-1. Pharmacological effects of Brazilian green propolis components in *in vitro* and *in vivo* studies.

Components	assay	model	dose	effect	references
	<i>in vitro</i>	3T3-L1 adipocytes	25 μ M	Anti-inflammatory	[46]
	<i>in vitro</i>	Raw 264.7 cells	25, 50, 100 μ M	Anti-inflammatory	[47]
	<i>in vitro</i>	HEK293	3, 10, 100 μ M	Anti-inflammatory	[48]
	<i>in vitro</i>	RGC-5 cells	20, 200 μ M	Antioxidant	[49]
	<i>in vitro</i>	Caco-2	20 μ M	Antioxidant	[43]
		HepG2			
		Staphylococcus aureus	166.6 mM (50 mg/mL)	Antibacterial	[50]
		Listeria monocytogenes			
	<i>in vitro</i>	Enterococcus faecalis			
		Staphylococcus saprophyticus			
Artepillin C	<i>in vitro</i>	Staphylococcus aureus	820 μ M (246.3 μ g/mL)	Antibacterial	[51]
	<i>in vitro</i>	Melanoma	13 μ M (38.9 μ g/mL)	Antitumor	[52]
		Colon cancer (SW480)	150 μ M	Antitumor	[53]
	<i>in vitro</i>	Gastric cancer (MKN1)			
		Leukemia (HL-60)			
	<i>in vitro</i>	PC12m3	10-50 μ M	Neuroprotection	[35]
	<i>in vitro</i>	HL-60 cells	23 μ M (7.0 μ g/mL)	Anti-allergy	[54]
	<i>in vivo</i>	Mice (UCP1 expression)	10 mg/kg	Anti-diabetes	[34]
		Colon cancer (SW480)	150 μ M	Antitumor	[53]
	<i>in vitro</i>	Gastric cancer (MKN1)			
		Leukemia (HL-60)			
Drupanin	<i>in vitro</i>	HL-60 cells	44 μ M (10.3 μ g/mL)	Anti-allergy	[54]
	<i>in vivo</i>	3T3-L1 adipocytes	4.8 μ M	RXR α agonist	[55]
		Colon cancer (SW480)	150 μ M	Antitumor	[53]
	<i>in vitro</i>	Gastric cancer (MKN1)			
		Leukemia (HL-60)			
Baccharin	<i>in vitro</i>	Prostate cancer (CRPC)	440 nM	Antitumor	[56]
	<i>in vitro</i>	HL-60 cells	12 μ M (4.4 μ g/mL)	Anti-allergy	[54]

<i>p</i> -Coumaric acid	<i>in vitro</i>	LDL peroxidation	27.4 μ M (45 μ g/mL)	Antioxidant	[57]
	<i>in vitro</i>	Colon cancer (HCT-15)	1.4 mM	Antitumor	[58]
Kaempferide	<i>in vitro</i>	HL-60 cells	6.6 μ M (2.0 μ g/mL)	Anti-allergy	[54]
	<i>in vitro</i>	Lung cancer (A549)	22.5 μ M	Antitumor	[59]

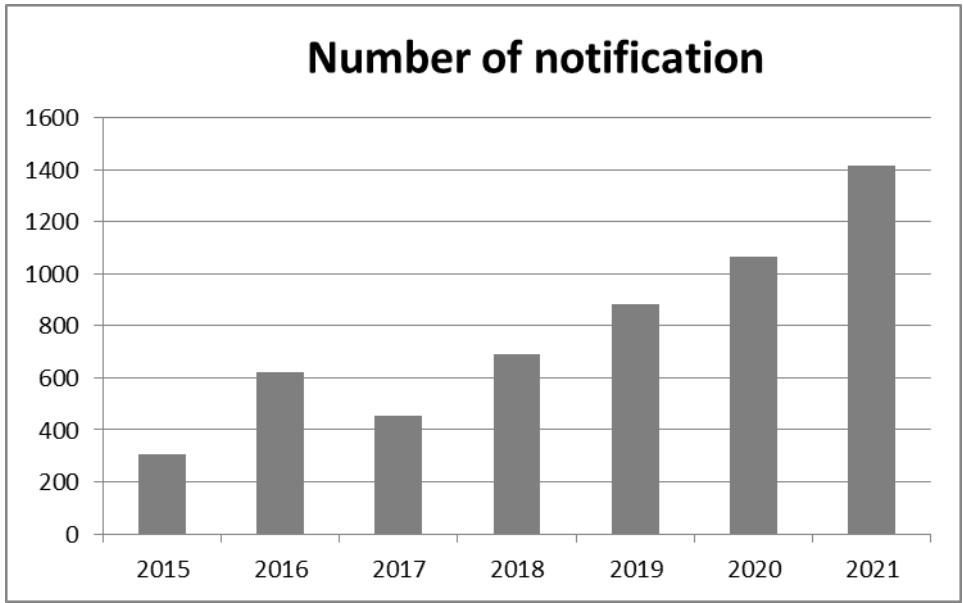


Figure 1-1. The annual number of notifications for foods with functional claims.

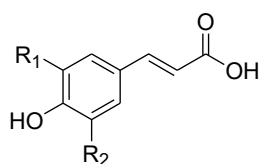
A



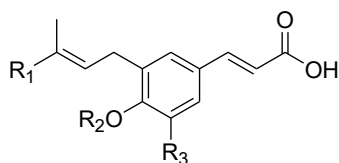
B



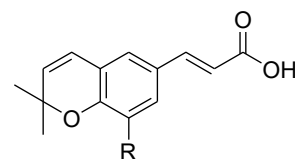
Figure 1-2. Honey bees producing propolis to fill the gaps in their nests (A). Brazilian green propolis collected from the nest (B).



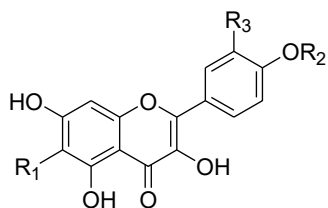
p-coumaric acid : $R_1=R_2=H$
 caffeic acid : $R_1=OH, R_2=H$
 drupanin : $R_1=CH_2CH=C(Me)_2, R_2=H$
 3,4-dihydroxy-5-prenyl-(*E*)-cinnamic acid :
 $R_1=CH_2CH=C(Me)_2, R_2=OH$
 drupanal : $R_1=CH_2CH=C(Me)CHO, R_2=H$



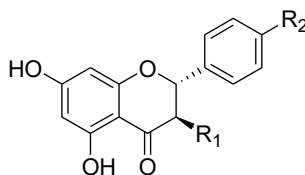
artepillin C :
 $R_1=Me, R_2=H, R_3=CH_2CH=C(Me)_2$
 capillartemisin A :
 $R_1=CH_2OH, R_2=H, R_3=CH_2CH=C(Me)_2$
 baccharin :
 $R_1=Me, R_2=CO(CH_2)_2Ph, R_3=H$



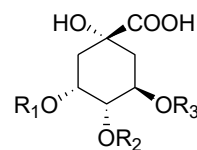
2,2-dimethylchromene-
 6-(*E*)-propenoic acid : $R=H$
 culifolin : $R=CH_2CH=C(Me)_2$



kaempferol : $R_1=R_2=R_3=H$
 kaempferide : $R_1=R_3=H, R_2=Me$
 betuletol : $R_1=OMe, R_2=Me, R_3=H$
 quercetin : $R_1=R_2=H, R_3=OH$



pinocembrin : $R_1=R_2=H$
 isosakuranetin : $R_1=H, R_2=OMe$
 dihydrokaempferide : $R_1=OH, R_2=OMe$



chlorogenic acid :
 $R_1=R_2=H, R_3=caffeoyl$
 3,5-dicaffeoylquinic acid :
 $R_1, R_3=caffeoyl, R_2=H$
 4,5-dicaffeoylquinic acid :
 $R_1=H, R_2=R_3=caffeoyl$

Figure 1-3. Chemical structures of representative compounds of Brazilian green propolis (BGP) ethanol extract ¹⁷.

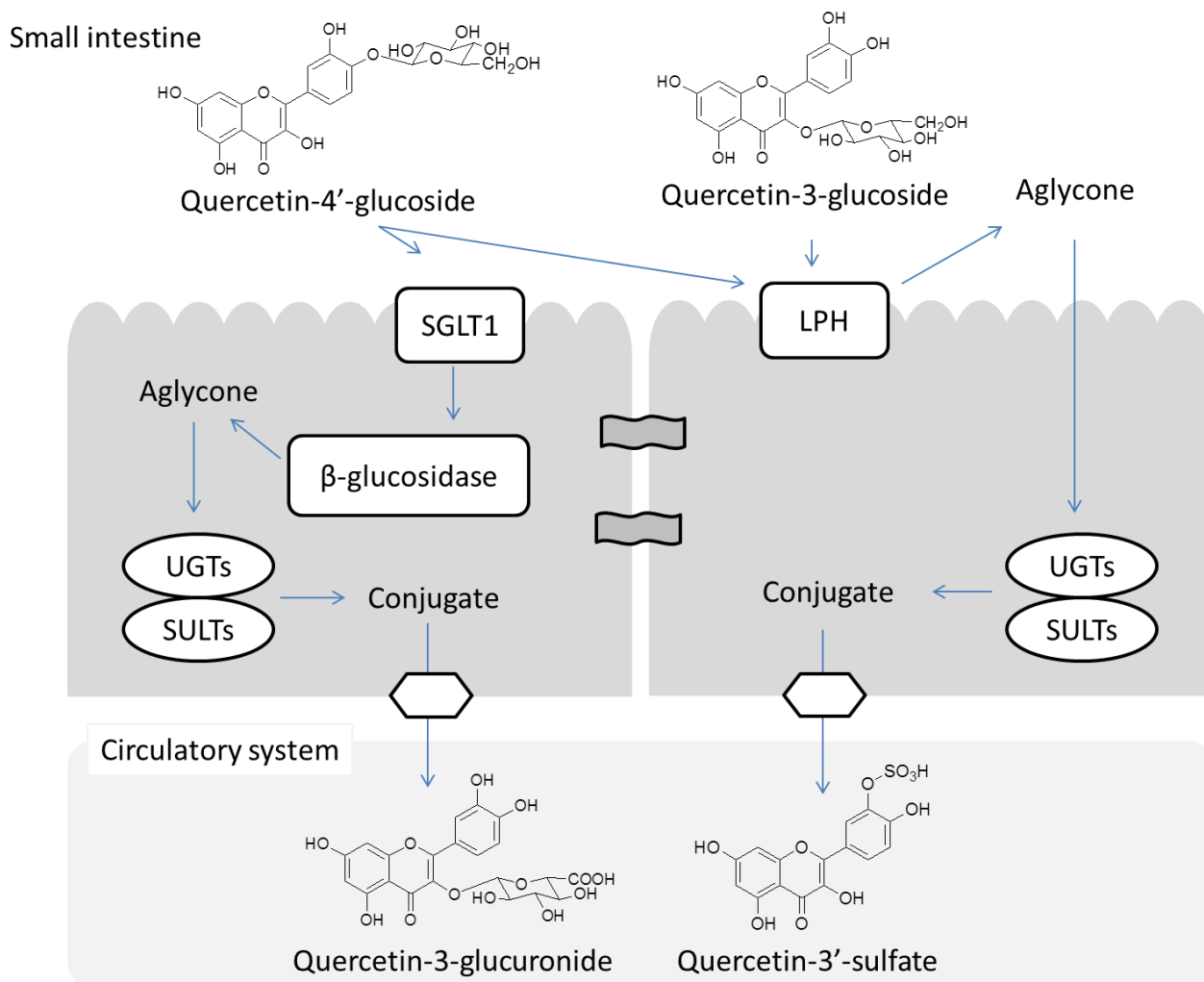


Figure 1-4. Putative metabolism of quercetin glycosides in the small intestine in humans³⁸). LPH, lactase-phlorizin hydrolase; SGLT1, sodium glucose co-transporter 1; SULTs, sulfotransferases; UGTs, UDP-glucuronosyltransferases.

第2章 世界のプロポリスの成分分析

2-1 はじめに

第1章で概説したように、プロポリスはミツバチが巣の周辺から集めてくる植物の新芽や樹皮を原料に作られる。そのため、一口にプロポリスと言っても産地の植生により、ミツバチが収集してくる植物（起源植物）が異なり、含有成分も異なってくる。そこで本章では、入手できた世界各地のプロポリスの含有成分について、標準品もしくは既報との比較により主要成分を特定することを目的に成分分析を実施した。

2-2 材料と方法

2-2-1 実験材料

分析に用いたルーマニア産、ブルガリア産、ハンガリー産、ウルグアイ産、ポーランド産、オーストラリア・カンガルー島産、ハワイ産、ロシア・バシキール地方産、ブラジル・バイア州産、およびブラジル・ミナスジェライス州産プロポリスは株式会社山田養蜂場から入手したものをを用いた。Table 2-1 には成分同定に用いた標準品と、その入手先を示す。

2-2-2 サンプル前処理方法

原塊の状態の各プロポリスをフードプロセッサーにて粉碎し、80%エタノールにて抽出、エバポレーターにて減圧濃縮を行い、各種プロポリスのエタノール抽出物粉末を得た。各エタノール抽出物粉末 100 mg を 10 mL の 80%エタノールにて再溶解し、それぞれ固形分 100 µg/mL の濃度になるよう希釈後、分析に供した。

2-2-3 分析条件

分析はオービトラップ MS システム (Q Exactive Focus, Thermo Scientific) および UPLC システム (UltiMate 3000, Thermo Scientific) を使用し、下記の条件で実行した。また、フォトダイオードアレイ検出器 (PDA ; 検出波長 280 nm) をタンデムに繋いだ、LC-PDA-MS/MS システムにて分析を行った。各標準品はメタノールもしくはアセトンで溶解し、1 µg/mL になるよう希釈後、分析に供した。

・ LC 条件

カラム : Acquity BEH C18 (Waters, 2.1 mm × 100 mm, i.d. 1.7 µm)

オーブン : 30°C

流速 : 0.3 mL/min

溶媒 : (A) 0.1%ギ酸, (B) Acetonitrile

溶出条件 : 5%B: 2 min, 5–95%B: 18 min, 95%B: 4.5 min, 95–5%B, 0.5 min, 5%B: 5 min (Total 30 min)

注入量 : 5 μ L

• MS 条件

イオン化法 : 加熱エレクトロスプレーイオン化法 (HESI)

検出方法 : Full MS scan / Data dependent MSMS scan

Spray voltage : 3.5 kv (positive) / 2.5 kv (negative)

Sheath gas rate : 50

Auxillary gas : 10

Heater temperature : 400°C

Capillary temperature : 250°C

Resolution : 70,000 (Full MS) / 17,500 (MS/MS)

Scan range : m/z 70-1,000

2-3 結果

2-3-1 ルーマニア産プロポリスの含有成分

第1章でも述べたように、ルーマニアで採取されるプロポリスは、**chrysin** や **pinocembrin** 等のフラボノイドを含むことを特徴としており、ポプラの1種であるセイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*) やセイヨウトチノキ (*Aesculus hippocastanum*) が起源植物であることが報告されている⁹⁾。今回入手したルーマニア産プロポリスを分析して得られたクロマトグラムを Figure 2-1 に示す。入手したルーマニア産プロポリスについても **chrysin** や **pinocembrin**、**galangin** が主要なフラボノイドとして検出された。また、**rhamnetin**、**pinobanksin** が標準品との比較により同定され、**caffeic acid**、***p*-coumaric acid**、**ferulic acid** 等の桂皮酸誘導体も確認できた。最も強いピーク強度で検出された化合物については、標準品での同定はできなかったが、精密質量 (m/z 315.0863 $[M+H]^+$) から、**3-O-acetylpinobanksin** と推定され、既報と同じく、セイヨウハコヤナギやセイヨウトチノキを起源植物としていいると考えられた。同様のクロマトグラムのパターンは、ルーマニアのすぐ南に位置するブルガリアや、北に位置するハンガリーで採取されたプロポリスについても確認できた。また、興味深いことに、南アメリカ大陸にあるウルグアイで採取されたプロポリスも、類似したクロマトグラムのパターンを示し、これらのプロポリスが共通の植物を起源としている

ことがわかった。

2-3-2 ポーランド産プロポリスの含有成分

ポーランド産プロポリスについても pinocembrin や pinobanksin、chrysin、galangin 等を多く含むプロポリスは、ルーマニア産と同様セイヨウハコヤナギやセイヨウトチノキが起源植物であると考えられている。一方、ポーランド南部で採取されるプロポリスにはフラボノイド類に加え、*p*-coumaric acid や caffeic acid、およびそのエステル（特にベンジルエステル）が特徴的に多く含まれ、ヤマナラシ (*P. tremula* sect. *Leuce*) が起源植物であると考えられている¹¹⁾。今回入手したポーランド産プロポリスを分析した結果、chrysin や pinocembrin に加え、caffeic acid や *p*-coumaric acid、およびそのベンジルエステルが標準品との比較により同定できた (Figure 2-2)。*p*-Coumaric acid と benzyl *p*-coumaric acid が主要なピークとして検出されていることから、今回入手したポーランド産プロポリスの起源植物はヤマナラシで、ポーランド南部で採取されたことがうかがえる。

2-3-3 環太平洋地域のプロポリスの含有成分

オーストラリア南部のカンガルー島で採取されたプロポリスは、島固有のキャツリグサ科の植物 (*Lepidosperma* sp.) が起源植物であることが確認されており、スチルベン骨格を基本として、メチル基やプレニル基が付加した化合物をもつことが報告されている¹⁵⁾。入手したプロポリスにおいても、報告されている化合物と同じ精密質量を有する化合物がいくつか検出され (Figure 2-3)、既報と同じ成分を有していることが推定される。しかし、質量分析だけでは分子組成が同じ化合物を見分けることや、メチル基やプレニル基などの置換基の位置を特定することは難しいため、正確な同定のためには成分を分離し、NMR 等で構造を解析する必要があると思われる。

沖縄県、台湾、およびハワイで採取されるプロポリスについては、eriodictyol または naringenin 等のフラバノンの基本骨格とし、プレニル基やゲラニル基が付加した nymphaeol 類が特徴的な成分として含まれ、トウダイグサ科のオオバギ (*Macaranga tanarius*) が起源植物であることが報告されている¹²⁻¹⁴⁾。Figure 2-4 に今回入手したハワイ産プロポリスの分析結果を示す。標準品を用いた成分特定には至らなかったが、得られたクロマトグラムの溶出時間とピーク強度、精密質量の結果を既報と比較することで、nymphaeol A、B、C 等の主要なピークについては、特定できたと思われる。

2-3-4 ロシア産プロポリスの含有成分

広大な国土を誇るロシアでは、採取された地域によってプロポリスの起源植物が異なってくる。ロシア北部で採取されるプロポリスの起源植物はシラカバ (*Betula verrucosa*) であるとされ、acacetin、apigenin、kaempferide が含まれることが報告されている⁶⁰⁾。一方、今回入手したロシア産プロポリスは、カザフスタンにほど近いバシキール地方で採取されたプロポリスである。このバシキール地方で採取されたプロポリスの起源植物について詳細は不明だが、成分については pinostrobin、sakuranetin、3-*O*-acetylpinobanksin、および apigenin-7,4'-dimethyl ester が含まれることが報告されており、ストローブマツ (*Pinus strobes*) が起源植物の一つである可能性が示唆されている⁶¹⁾。今回入手したロシア産プロポリスを分析した結果、acacetin や kaempferide に加え、sakuranetin や 3-*O*-acetylpinobanksin、naringenin-4',7-dimethyl ester、apigenin-7,4'-dimethyl ester 等が検出された (Figure 2-5)。起源植物については現地の植生を確認する必要があるが、今回入手したプロポリスはシラカバとストローブマツの両方を起源としているかもしれない。

2-3-5 ブラジル産プロポリスの含有成分

バイーア州はブラジル北東部に位置しており、そこで採取されるプロポリスはシソ科のイガニガクサ属の1種である *Hyptis divaricata* が起源植物であるとされる¹⁶⁾。このプロポリスからは、新規化合物として 2-phenoxychromene を含め、6-methoxyapigenin、3,6-dimethoxyapigenin、3-methoxyquercetin などのメトキシ化されたフラボノイドが含まれることが報告されている¹⁸⁾。入手したブラジル・バイーア州産プロポリスについても既報と同様に、6-methoxyapigenin、3,6-dimethoxyapigenin、3-methoxyquercetin が標準品との比較で特定できた (Figure 2-6)。

ブラジル南東部に位置するミナスジェライス州で採取されたグリーンプロポリスは、日本において健康食品等で広く使用され、多く流通している。このブラジル産グリーンプロポリス (Brazilian green propolis; BGP) は、キク科の植物であるアレクリン (*Baccharis dracunculifolia*) が起源植物であり¹⁶⁾、artepillin C や drupanin、baccharin 等のプレニル基が付加した特徴的な桂皮酸誘導体を多く含むことが知られている。先行研究においても新規化合物をはじめ、一部の含有成分について報告しており¹⁷⁾、本研究で用いた BGP においても artepillin C をはじめとするプレニル化した桂皮酸誘導体が多く検出された (Figure 2-7)。

2-4 考察

本研究により、世界各国で採取されたプロポリスについて、標準品や既報と

比較することで、主要な成分を特定することができた。本結果は、それぞれのプロポリスの有効性やそのメカニズムを明らかにしていく上で、基礎的な情報として活用できると考える。

国境を接しているルーマニア、ブルガリア、ハンガリーから入手したプロポリスは、得られたクロマトグラムパターンから、ヨーロッパで多く生産される典型的なポプラ型プロポリスであると思われる。また、ウルグアイ産プロポリスにおいても同様のクロマトグラムパターンが認められ、これらは同じ植物種を起源としていることが示唆された。これらのプロポリスには *3-O-acetylpinobanksin*、*chrysin*、*pinocembrin* 等のいくつかのフラボノイドが、主要成分として共通して含まれており、これらのフラボノイドに起因した生理活性を示す可能性がある⁶²⁾。一方で、今回入手したポーランド産プロポリスには、フラボノイドに加え、*benzyl p-coumaric acid* や *benzyl caffeic acid* が特徴的な成分として検出され、同じ欧州産でも異なる起源植物をもつことが示唆された。採取されたプロポリスの起源植物は、現地の植生等を確認する必要があるが、ルーマニアとウルグアイのように地理的に遠く離れた 2 か所で採取されたプロポリスの成分系が類似していた一方で、ルーマニアとポーランドのように同じ欧州であっても、採取されたプロポリスの成分系が異なり、起源植物が異なっていたことは興味深い。

環太平洋地域で採取されたプロポリス、特に、沖縄、ハワイ、台湾産のプロポリスについては *eriodictyol* を基本骨格にゲラニル基が付加した *nymphaeol* 類が特徴的な成分であることが知られており、入手したハワイ産プロポリスにおいても同様の特徴成分が含まれていた。*Nymphaeol* 類の生理活性として、カスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導することや⁶³⁾、*PAK1* の阻害⁶⁴⁾、*AMPK* の活性化を介した筋細胞への糖取り込み作用等が報告されており⁶⁵⁾、活性成分としても *Nymphaeol* 類が沖縄、ハワイ、台湾産のプロポリスを特徴づける上でも重要であるといえる。

ブラジル産プロポリスにおいては、同じブラジル国内であっても、採取された地域によって含有成分が異なっており、特に、ブラジル・ミナスジェライス州産のグリーンプロポリス (BGP) には、*artepillin C*、*drupanin*、*baccharin* 等の特徴的なプレニル化した桂皮酸誘導体が多く含まれていた。他の産地のプロポリスでも、*p-coumaric acid* や *caffeic acid*、*ferulic acid* 等の桂皮酸誘導体は検出されたが、プレニル化した桂皮酸誘導体は検出されなかったことから、このプレニル化した桂皮酸誘導体は BGP を特徴づける上で重要な化合物であるといえる。また、第 1 章で述べたように、BGP には認知機能に対する有効性や、新型コロナウイルス感染症への有効性がヒトにて確認されており、*artepillin C* が有効成分の一つとして注目されていることから、プレニル化した桂皮酸誘導体は活性成

分としても BGP を特徴づける上で重要であると考えられる。また、artepillin C や drupanin、baccharin 等は BGP の有効性に対して協力的に寄与していると考えられるため、生体内で発揮される BGP の有効性について、そのメカニズムや有効成分を明らかにするためには、BGP を摂取した際のそれらの成分の生体利用率や代謝を確認することが必要であると考えられる。

Table 2-1. Sources or references of the compounds used in this study.

Compounds	Sources or References
caffeic acid	Fujifilum Wako Pure Chemical Industries
<i>p</i> -coumaric acid	Sigma-Aldrich
ferulic acid	Cayman Chemical Company
artepillin C	Fujifilum Wako Pure Chemical Industries
drupanin	Prepared according to the procedures described in the previous report [54].
baccharin	Prepared according to the procedures described in the previous report [54].
culifolin	Prepared according to the procedures described in the previous report [54].
3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid	Isolation from BGP according to the previous report [17].
2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid	Isolation from BGP according to the previous report [17].
capillartemisin A	Isolation from BGP according to the previous report [17].
benzyl caffeic acid	Cosmo Bio Co.
benzyl <i>p</i> -coumaric acid	BioCrick Biotech Co.
chlorogenic acid	Sigma-Aldrich
pinobanksin	Funakoshi
rhamnetin	Funakoshi
chrysin	Sigma-Aldrich
pinocembrin	Sigma-Aldrich
galangin	Fujifilum Wako Pure Chemical Industries
3,6-dimethoxyapigenin	BioCrick Biotech Co.
6-methoxyapigenin	Sigma-Aldrich
3-methoxyquercetin	Toronto Research Chemicals
sakuranetin	Funakoshi
kaempferide	Fujifilum Wako Pure Chemical Industries
kaempferol	Fujifilum Wako Pure Chemical Industries
dihydrokaempferide	Isolation from BGP according to the previous report [17].
6-methoxykaempferide	Nacalai Tesque, Inc.
naringenin-4',7-dimethyl ester	Wuhan ChemFaces Biochemical Co.
apigenin-7,4'-dimethyl ester	Wuhan ChemFaces Biochemical Co.

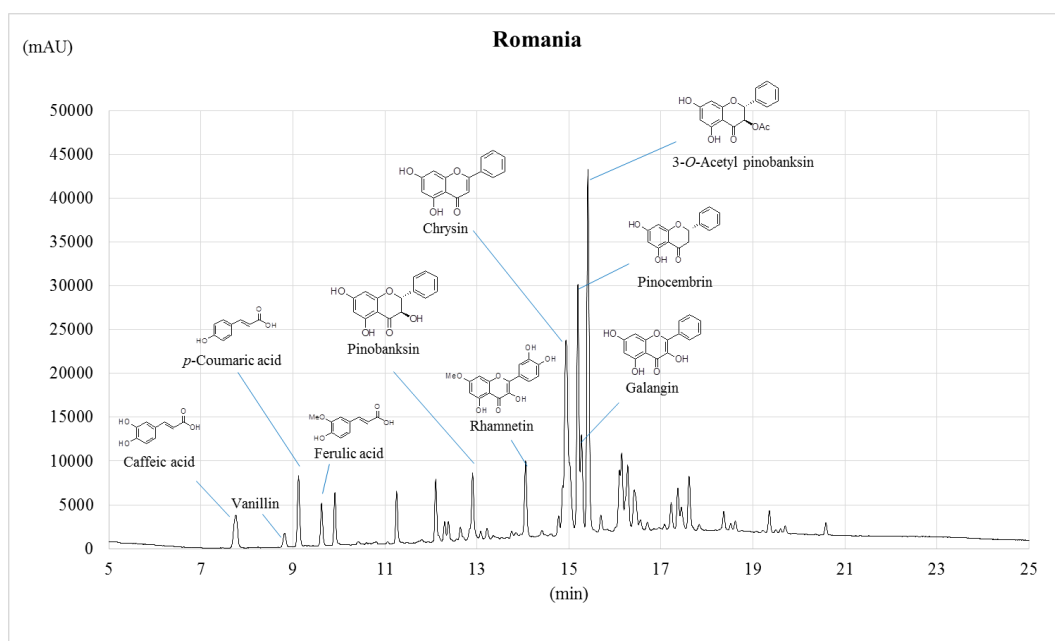


Figure 2-1. LC chromatogram of ethanol extract of Romanian propolis. The obtained propolis were extracted with 80% ethanol and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Detection was performed with a photodiode array detector (280 nm).

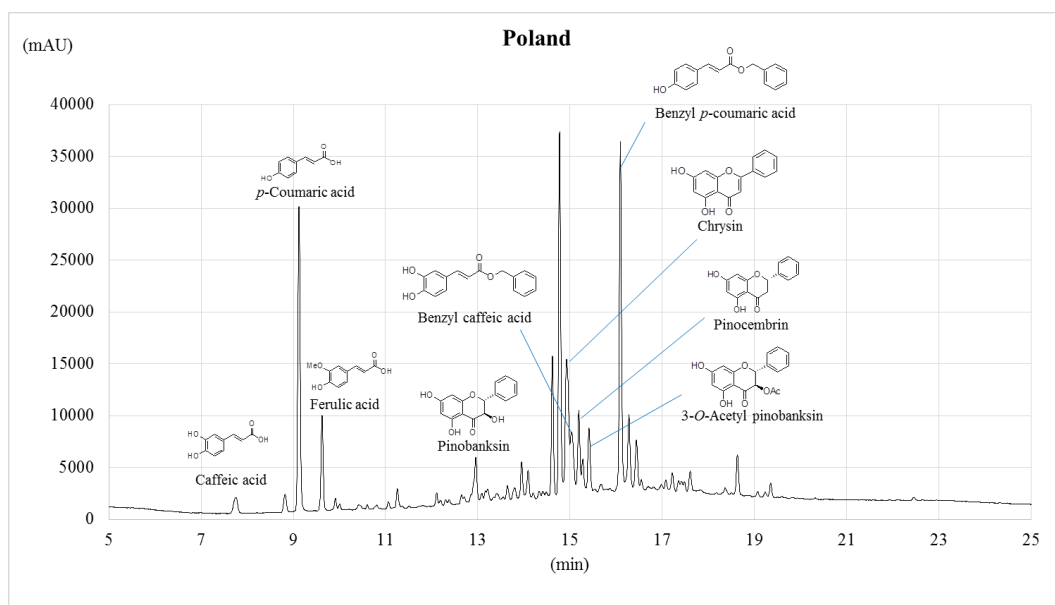


Figure 2-2. LC chromatogram of ethanol extract of Polish propolis. The obtained propolis were extracted with 80% ethanol and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Detection was performed with a photodiode array detector (280 nm).

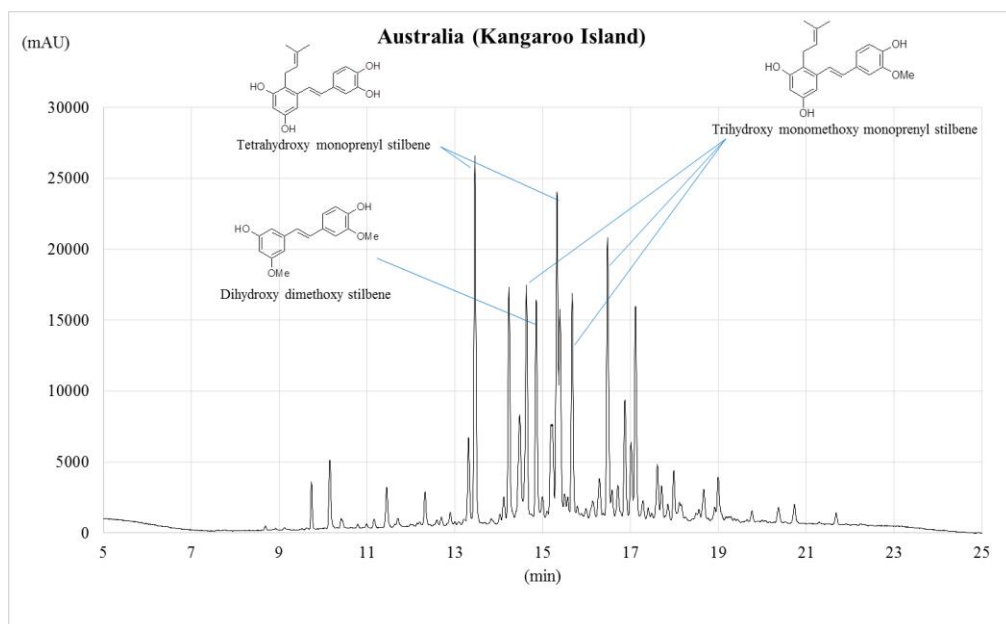


Figure 2-3. LC chromatogram of ethanol extract of Australian (Kangaroo Island) propolis. The obtained propolis were extracted with 80% ethanol and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Detection was performed with a photodiode array detector (280 nm). The illustrated chemical structures were speculative and the position of the functional group has not been identified.

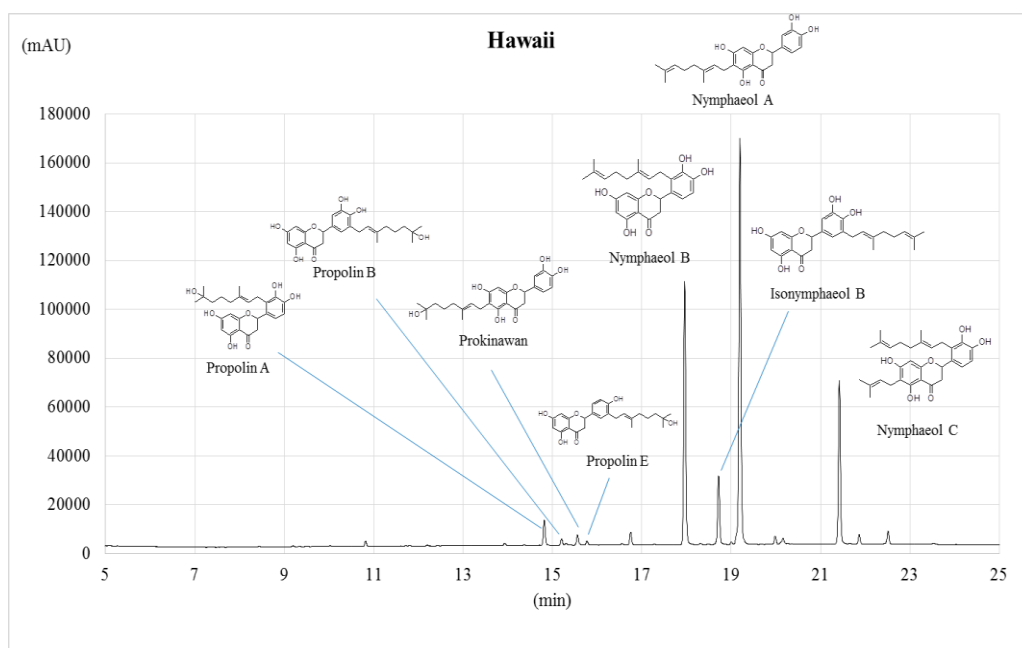


Figure 2-4. LC chromatogram of ethanol extract of Hawaiian propolis. The obtained propolis were extracted with 80% ethanol and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Detection was performed with a photodiode array detector (280 nm). The peak annotation was performed by comparing the chromatogram data in previous study ¹⁴).

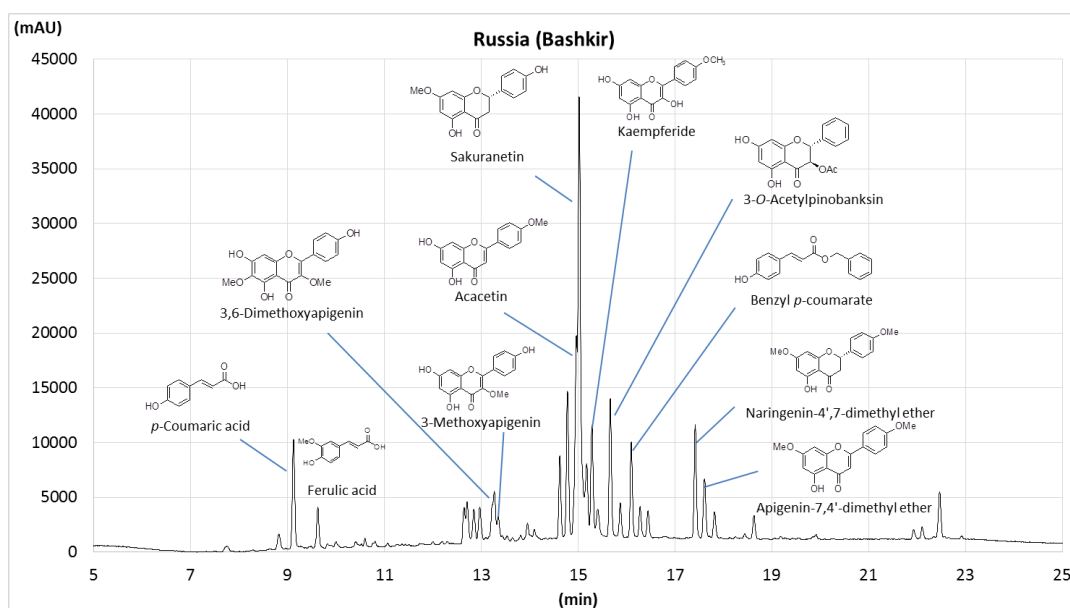


Figure 2-5. LC chromatogram of ethanol extract of Russian (Bashkir region) propolis. The obtained propolis were extracted with 80% ethanol and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Detection was performed with a photodiode array detector (280 nm).

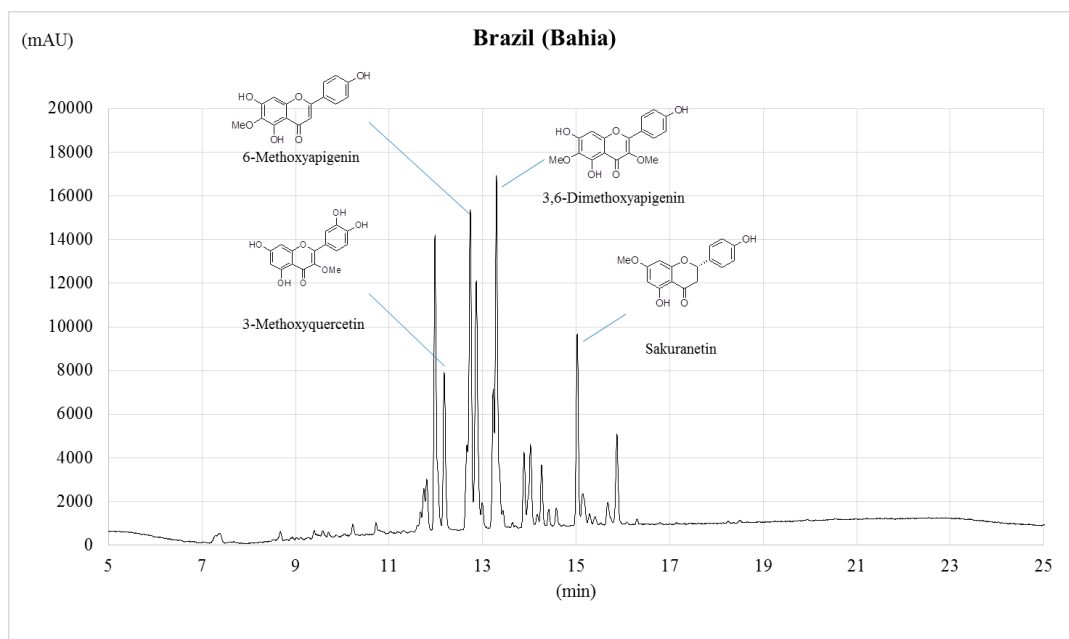


Figure 2-6. LC chromatogram of ethanol extract of Brazilian (Bahia state) propolis. The obtained propolis were extracted with 80% ethanol and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Detection was performed with a photodiode array detector (280 nm).

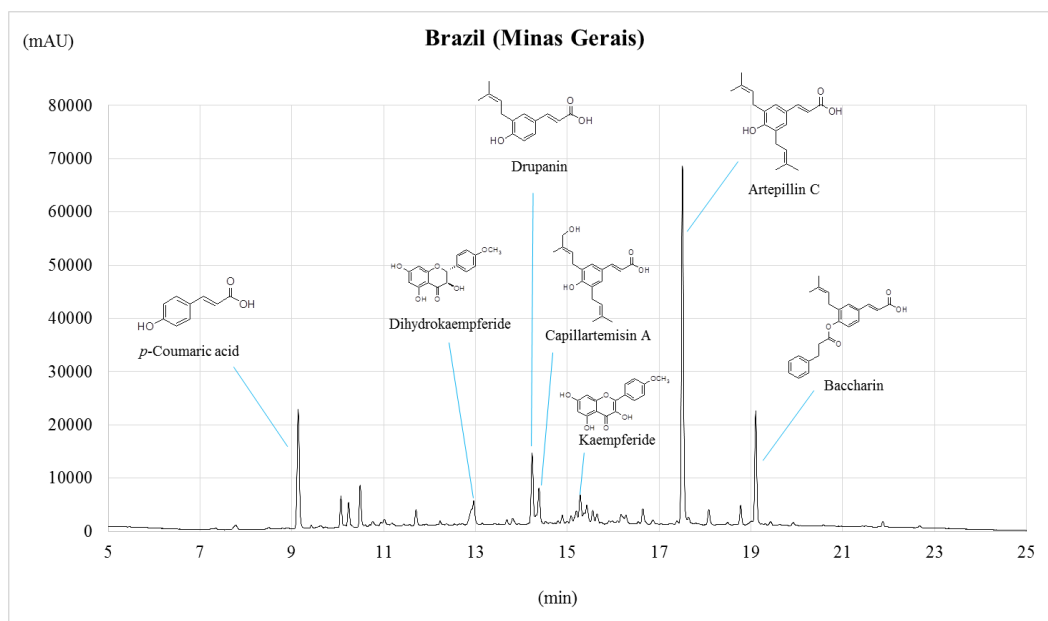


Figure 2-7. LC chromatogram of ethanol extract of Brazilian (Minas Gerais state) propolis. The obtained propolis were extracted with 80% ethanol and then analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). Detection was performed with a photodiode array detector (280 nm).

第3章 ヒトにおけるブラジル産グリーンプロポリス投与時の成分吸収および主要代謝物の同定

3-1 はじめに

ブラジル産グリーンプロポリス (BGP) には認知機能の改善等、様々な有効性がヒトにて確認されており、BGP に特徴的な *artepillin C* をはじめとする桂皮酸誘導体や *kaempferide* 等のフラボノイドが、その有効性に関与していると考えられている。これらの成分が、BGP の有効性にどの程度寄与しているかを理解するためには、それらが BGP 摂取時にどの程度吸収され、どのように代謝されるかを理解する必要がある。しかし、BGP 成分の吸収・代謝に関する報告は少なく、ラットにおいて単一成分として *artepillin C* と *p-coumaric acid* を投与した際の、血中濃度変化が報告されているのみである⁴⁴⁾。そこで、本章では主要な BGP 成分について、BGP 投与後の血中濃度変化と、血漿中の主要な代謝物をヒトにて確認した。

3-2 材料と方法

3-2-1 実験材料

試験食は BGP の原塊をエタノールにて抽出し、その抽出物を凍結乾燥することで作製した BGP 粉末 (Lot : LY-008) を、120 mg/球でソフトカプセルに充填した BGP カプセルを使用した。BGP カプセルは株式会社山田養蜂場にて製造された。また、標準品は Table 2-1 に示したものを使用した。ヒト肝ミクロソームは、Corning Life Sciences から、*Helix pomatia* 由来サルファターゼタイプ H-1 (10,000 ユニット/g 以上、および β グルクロニダーゼ 30,000 ユニット/g 以上を含む)、*Trichodema viride* 由来 *alamethicin*、および D-saccharic acid-1,4-lactone は Sigma-Aldrich から入手した。その他、溶媒類はすべて分析グレードを使用した。

3-2-2 試験デザイン

本試験はヘルシンキ宣言の倫理原則に従い、研究プロトコルは医療法人小金橋さくらクリニック倫理委員会によって承認され、大学医療病院情報ネットワーク (UMIN; #000032818) に登録されている。また、試験は小金橋さくらクリニックにて実施し、被験者には研究内容について十分な説明を行った上で、すべての被験者から書面による試験参加の同意を得ている。

臨床検査と、試験責任医師による問診に基づいて健康であると診断され、かつ以下の除外基準に合致しない 12 名のボランティア (男性 6 名 女性 6 名) を試験に組み入れた。①過度な喫煙 (>20 本/日)、飲酒 (ビール換算で > 500 mL/

日) をする者、②妊娠・授乳している者、③12 日以内に他の臨床試験へ参加した者、④試験開始数週間前から薬を服用している者、⑤既往歴（重大なアレルギー、喘息、糖尿病、胃、肝臓、心臓、腎臓、または血管の病気）がある者。

Table 3-1 に被験者の背景情報を示す。被験者には試験開始 1 週間前から試験完了まで、プロポリスやその他のサプリメント、またはプロポリスを含む食品や飲料を摂取しないように指示した。12 時間の絶食の後、200 mL の水と一緒に BGP カプセル 3 球 (BGP 粉末 360 mg) を投与した。BGP カプセルを投与してから 4 時間後と 12 時間後に、ポリフェノールを含まないコントロール食 (おにぎり 2 個、水 500 mL) を摂取させた。血液サンプルは BGP カプセル投与前および投与後 30 分、1、1.5、2、4、8、12、および 24 時間に採取した。採取した血液サンプルを 1,500 × g、4°C で 10 分間遠心分離し、得られた血漿は分析するまで -80°C で保存した。

3-2-3 血漿サンプルの前処理

LC-MS/MS による BGP 代謝物の分析を行うため、100 μL の血漿と 500 μL のメタノールを混合した後、10,000 × g で 10 分間、室温 (25 ± 2°C) にて遠心分離した。回収した上澄みを新しいエッペンチューブに移し、37°C 加温下にて窒素ガスにより乾固後、100 μL のメタノールに再溶解させ、脱抱合未処理サンプルとして分析に供した。

血漿中のグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の酵素加水分解は、上記手順にて乾固させたサンプルに、100 μL の超純水と、50 μL の酵素溶液 (100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.7、サルファターゼ 100 ユニット/mL) および 1.5 μL の 500 mM L-ascorbic acid 水溶液を加えた。混合物を 37°C で 1 時間インキュベート後、700 μL のメタノールを加え、反応を停止させた。反応液は 10,000 × g で 10 分間、室温にて遠心分離し、上澄みを回収、37°C 加温下にて窒素ガスにより乾固後、100 μL のメタノールを加え、脱抱合処理サンプルとして分析に供した。

3-2-4 グルクロン酸抱合代謝物標準品の調製

桂皮酸誘導体のグルクロン酸抱合代謝物 (artepillin C-4-O-β-D-glucuronide および drupanin-4-O-β-D-glucuronide) は、ウリジン二リン酸 (UDP) -グルコースデヒドロゲナーゼ (UGDH) と UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGTs) を共発現する出芽酵母と、親化合物をインキュベートし、酵素的に調製する既報の方法によって調製した⁶⁶⁾。哺乳類の UGT アイソフォームの中で、ヒト UGT1A7 およびサル UGT1A8 を発現した出芽酵母が、artepillin C-4-O-β-D-glucuronide および drupanin-4-O-β-D-glucuronide の生成効率がそれぞれ最も良かった。桂皮酸誘導体を UGT 発現酵母とインキュベートした後、反応混合物を遠心分離して、酵母

細胞を除去、C18樹脂 (Cosmosil 140C18-OPN, ナカライテスク) を充填したオープンカラム (2.5 × 30 cm) にアプライした。カラムを 200 mL の水で洗浄した後、各グルクロン酸抱合体を 15~25%のメタノール水溶液で溶出させた。合成したグルクロン酸抱合体は、Cosmosil 5C18-MS-II (20 × 250 mm, ナカライテスク) を用いて、分取 HPLC により精製した。UPLC での純度確認後、化学構造を MS と ¹H、¹³C、および 2D NMR 分析の組み合わせを使用して確認した。MNR スペクトルは Buker AVANCE NEO 500 を用いて取得した。

3-2-5 ヒト肝ミクロソームを用いた artemillin C および drupanin グルクロン酸抱合体代謝物の合成

ヒト肝ミクロソーム (最終濃度 2.0 mg/mL)、100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、0.25 mg/mL alamethicin、2 mM D-saccharic acid-1,4-lactone、10 mM L-ascorbic acid、および 200 μM の artemillin C もしくは drupanin を混合した反応液 90 μL を氷上で 2 分間プレインキュベートし、10 μL の 20 mM UDP-グルクロン酸 (UDPGA, 最終濃度 2 mM) を加え、37°C で 3 時間インキュベートした。反応後、50 μL の氷冷アセトニトリルを添加して各反応を停止させ、混合物を 13,000 × g で 15 分間 4°C にて遠心分離し、分析サンプルとして上清を得た。

3-2-6 LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS の分析条件は 2-2-3 記載の方法にて実施した。差分解析は Compound Discoverer ver. 3.1 ソフトウェア (Thermo Scientific) を使用した。本ソフトウェアで LC-MS/MS 分析により得られたクロマトグラムピークを質量情報 (> 5 ppm) と保持時間 (> 0.2 min) でアライメントし、検出された化合物リストを作成、BGP カプセル投与前と投与後を比較してピーク面積が統計学的有意 ($p < 0.05$, Student's *t* test) に 2 倍以上増加した化合物を BGP の代謝物として洗い出した。血漿中の桂皮酸誘導体とフラボノイドの定量は、ブランク血漿に 9 濃度 (1、5、10、50、100、250、500、1,000、および 2,000 ng/mL) の標準化合物を添加したものを検量線として使用した。

3-2-7 薬物動態および統計解析

データは平均 ± 標準偏差 (SD) で示した ($n = 12$)。得られた各血中代謝物の定量値は、Microsoft Excel ソフトウェア (ver. 14.0.7268.5000) にて解析した。各成分の最大血中濃度 (C_{max}) および C_{max} に到達するまでの時間 (t_{max}) はデータから直接決定した。投与前から最後のサンプリング時間までの血漿濃度-時間曲線下面積 (AUC, nM · h) は、線形台形公式を使用して計算した。統計解析は JMP for Windows ver. 5.1 (SAS Institute Japan) を使用した。

3-3 結果

3-3-1 BGP に含まれる主要成分量の定量

試験食に使用している BGP 粉末を 90%メタノールにて溶解させ、5 µg/mL の濃度になるように希釈後、BGP の主要な 14 化合物の含有率を LC-MS/MS にて分析した。その結果、主要 14 化合物の含有率の合計は、BGP 粉末重量の 24.7% に達した。また、桂皮酸誘導体の含有率の合計は、BGP 粉末重量の 20.6%であり、その内の約半分 (10.9%) が artepillin C であった (Table 3-2)。

3-3-2 血漿サンプル前処理方法の検討

血漿サンプルを脱抱合酵素で処理するにあたり、反応時間の検討を行った。被験者 1 名の BGP 投与後 1 時間の血漿を用いて、酵素溶液を添加直後、および添加後 30、60、90 分間 37°C でインキュベートし、脱抱合処理によりアグリコンとなった血漿中の各化合物を定量した。その結果、artepillin C や drupanin 等の桂皮酸誘導体は 60 分間の反応で、十分に脱抱合が完了していた。また、kaempferide や kaempferol は 90 分間反応させると分解する可能性が確認されたため (Figure 3-1)、以降の酵素反応時間は 60 分とし、実験を進めた。

3-3-3 BGP 投与後の桂皮酸誘導体およびフラボノイドの血中濃度変化

12 名の被験者に 360 mg の BGP 粉末を含む BGP カプセル (3 球) を投与し、投与後 24 時間までの血漿を採取、BGP の主要な 14 化合物について血中濃度を LC-MS/MS にて分析した。その結果を Figure 3-2 および Table 3-3 に示す。どの血漿サンプルにおいても baccharin と chlorogenic acid は検出されなかったが、8 つの桂皮酸誘導体と 4 つのフラボノイドの、合計 12 化合物が BGP 投与後の血漿で検出された。脱抱合処理した血漿において、12 化合物中 drupanin の C_{max} が最も高く、次いで C_{max} が高かったのは artepillin C で、その濃度はともに 1 µM を超えていた。また、脱抱合未処理の血漿で検出された artepillin C アグリコンおよび drupanin アグリコン (=抱合代謝を受けずに血中に吸収されたもの) の C_{max} は、脱抱合処理後の C_{max} と比較して、それぞれ 15% および 38% 程度であった。また、*p*-coumaric acid、capillartemisin A、3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid、caffeic acid、kaempferide、6-methoxykaempferide、dihydrokaempferide、および kaempferol は脱抱合処理後の血漿では検出されたが、未処理の血漿では検出されなかったことから、artepillin C、drupanin を含めたこれらの化合物は、体内でグルクロン酸抱合や硫酸抱合等の抱合代謝を受けると考えられる。一方で、culifolin および 2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid の血中濃度-時間曲線は脱抱合処理の有無に関わらず変化がなかった。これは、この 2 化合物がほとんど抱合代謝を受けることなく血液中に取り込まれることを示しており、抱合代謝酵素の基

質にならない化学構造を有していることが明らかになった。Baccharin および chlorogenic acid は脱抱合処理の有無に関わらず、どの血漿サンプルにおいても検出されなかった。Chlorogenic acid は腸内細菌等で caffeic acid や quinic acid に分解されることが報告されていることから⁶⁷⁾、baccharin についても同様に drupanin と 3-phenylpropionic acid に加水分解される可能性が示唆された。

3-3-4 差分解析による BGP 投与後の血中代謝物の特定

BGP 成分由来の代謝物を特定するために、差分解析を用いて、BGP 投与後の血漿中で増加した化合物の絞り込みを行った。BGP 投与前と投与 1 時間後の血漿を LC-MS/MS により分析し、得られたクロマトグラムを比較、投与 1 時間後の血漿で統計的に有意に 2 倍以上ピーク強度が増加した化合物を代謝物として絞り込んだ結果、20 化合物が BGP 成分の代謝物として検出された (Table 3-4)。検出された化合物のうち、No.1~5 は代謝されることなくアグリコンとして血液の中に取り込まれたものとして、標準品との比較により同定された。No. 6~11 は桂皮酸誘導体もしくはフラボノイドのグルクロン酸抱合体、No.12~15 は硫酸抱合体であることが、精密質量および MS/MS フラグメントから推定された。No.16~20 は artemillin C、drupanin、capillartemisin A、2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid、および culifolin それぞれのメチル化代謝物である可能性が得られた精密質量から考えられた。

3-3-5 出芽酵母による artemillin C および drupanin のグルクロン酸抱合体の合成と血中主要代謝物の同定

BGP 投与後の血漿中における主要な代謝物として、差分解析により見出された artemillin C および drupanin のグルクロン酸抱合体の結合位置を決定するため、artemillin C と drupanin の標準品にヒト肝ミクロソームと UDP-グルクロン酸を加え、それぞれ反応させた。反応液を LC-MS/MS に供し、artemillin C グルクロン酸抱合体 (m/z 475.19 [M-H]⁻) のマスクロマトグラムおよび drupanin グルクロン酸抱合体 (m/z 407.13 [M-H]⁻) のマスクロマトグラムを確認した結果、artemillin C グルクロン酸抱合体のマスクロマトグラムでは 13.1、15.2 分の保持時間に 2 つのピークが、drupanin グルクロン酸抱合体のマスクロマトグラムでは 11.1、12.6 分の保持時間に 2 つのピークがそれぞれ検出された (Figure 3-3A, Figure 3-4A)。主要な代謝物として血漿中で検出された artemillin C グルクロン酸抱合体、および drupanin グルクロン酸抱合体の保持時間は、それぞれ 13.1、11.1 分に対応していた (Fig. 3-3B, Fig. 3-4B)。出芽酵母を用いて、血漿中で検出された artemillin C グルクロン酸抱合体と、drupanin グルクロン酸抱合体の保持時間に対応するそれぞれの抱合体を合成し、オープンカラムおよび分取 HPLC にて精製後、MS/MS

フラグメントを確認したところ、それらの MS/MS フラグメントは血漿代謝物の MS/MS フラグメントと一致した (Fig. 3-3C,D and Fig. 3-4C,D)。出芽酵母で合成した artemisinin C グルクロン酸抱合体と drupanin グルクロン酸抱合体の構造を、 ^1H , ^{13}C , 2D NMR にて確認した。化学シフトは下記のようになり、それぞれ 4 位の水酸基にグルクロン酸が結合した artemisinin C-4-*O*- β -D-glucuronide と drupanin-4-*O*- β -D-glucuronide と確認できた (Figure 3-5~3-10)。

artemisinin C-4-*O*- β -D-glucuronide

^1H NMR (500 MHz, CD_2HOD ; $\delta = 3.31$) δ 1.74 (6H, s), 1.77 (6H, s), 3.42–3.54 (3H, m), 3.54–3.65 (5H, m), 4.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.27–5.32 (2H, m), 6.28 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 7.20 (2H, s), 7.55 (1H, d, $J = 15.9$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD ; $\delta = 49.0$) δ 18.1, 25.9, 29.6, 73.3, 75.4, 77.2, 77.5, 106.1, 118.2, 124.1, 128.5, 132.2, 133.8, 137.5, 146.2, 155.7, 170.7, 173.1.

drupanin-4-*O*- β -D-glucuronide

^1H NMR (500 MHz, CD_2HOD ; $\delta = 3.31$) δ 1.74 (3H, s), 1.76 (3H, s), 3.40 (1H, dd, $J = 15.7, 7.3$ Hz), 3.45 (1H, dd, $J = 15.7, 7.3$ Hz), 3.51 (1H, dd, $J = 9.1, 9.0$), 3.56 (1H, dd, $J = 9.0, 7.5$), 3.63 (1H, dd, $J = 9.7, 9.1$), 3.99 (1H, d, $J = 9.7$ Hz), 5.04 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 5.33–5.38 (1H, m), 6.32 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 7.12 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.41 (1H, d, $J = 8.5, 2.0$ Hz), 7.60 (1H, d, $J = 15.9$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD ; $\delta = 49.0$) δ 17.9, 25.9, 29.2, 72.9, 74.7, 76.6, 77.6, 102.4, 116.4, 117.3, 123.3, 128.4, 130.1, 130.3, 133.3, 133.9, 146.2, 158.4, 170.7, 172.3.

3-3-6 主要代謝物の血中濃度変化

得られた artemisinin C-4-*O*- β -D-glucuronide と drupanin-4-*O*- β -D-glucuronide の標準品を用いて、これら代謝物の血中濃度を確認した。その結果、脱抱合未処理の血漿において artemisinin C-4-*O*- β -D-glucuronide の C_{\max} および AUC は、それぞれ 1121 ± 399 nM および 5701 ± 2542 nM \cdot h であり、drupanin-4-*O*- β -D-glucuronide の C_{\max} および AUC は、それぞれ 2553 ± 563 nM および 8252 ± 1471 nM \cdot h であった。脱抱合処理後の血漿中の artemisinin C 濃度は、抱合代謝を受けた artemisinin C と、抱合代謝受けることなしに血中に取り込まれた artemisinin C の合計と考えられる。そのため、脱抱合処理後の血漿中の artemisinin C 濃度から、脱抱合未処理の血漿中の artemisinin C 濃度の差し引くことで、抱合代謝された artemisinin C 量を推定することができる。そこで、artemisinin C-4-*O*- β -D-glucuronide 標準品を用いて求めた血中濃度-時間曲線 (Figure 3-11, Black line) と、計算により推定された

artepillin C 抱合代謝物の血中濃度-時間曲線 (Fig. 3-11, Gray line) を比較したところ、どの時点においても統計的に有意な差はなかった。また、同様の結果が drupanin でも認められた。

3-4 考察

本研究により、ヒトにおいて BGP を経口投与した際の、BGP の主要な 14 化合物中 12 化合物 (8 つの桂皮酸誘導体と 4 つのフラボノイド) の経時的な血中濃度変化が明らかになった。また、artepillin C-4-*O*-β-D-glucuronide および drupanin-4-*O*-β-D-glucuronide が、BGP 投与後の主要な血中代謝物として同定された。

血漿中で検出できた 12 化合物のうち、10 化合物 (artepillin C、drupanin、*p*-coumaric acid、capillartemisin A、3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid、caffeic acid、kaempferide、6-methoxykaempferide、dihydrokaempferide および kaempferol) は脱抱合酵素で処理することにより、AUC が統計的に有意に増加することから、これらの化合物は何かしらの抱合体へ代謝されることが示された。これらの中で、主要な代謝物として artepillin C-4-*O*-β-D-glucuronide と drupanin-4-*O*-β-D-glucuronide が同定され、それらの C_{max} は、脱抱合処理した血漿中の artepillin C および drupanin の C_{max} の 89.3% と 88.2% にそれぞれ達した。また、脱抱合処理前後の artepillin C 濃度の差分から得られる、artepillin C 抱合代謝物濃度の推定値と、実測の artepillin C-4-*O*-β-D-glucuronide 濃度は近似しており、drupanin でも同様の結果が得られたことから (Fig. 3-11)、体内へ吸収された artepillin C と drupanin のほぼ全ては、フェノール部分の水酸基が抱合代謝を受けることが示唆された。一般的に、UGTs はフェノール性水酸基だけでなく、カルボキシル基がもつ-OH へのグルクロン酸転移も触媒することが知られている^{68,69}。実際に、ヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝では、artepillin C および drupanin とともに、特徴的な m/z 193 の MS/MS フラグメントを持つグルクロン酸抱合体が生成され、この m/z 193 の MS/MS フラグメントは、カルボキシル基にグルクロン酸が結合したアシルグルクロニドに特徴的なフラグメントであることが報告されている⁷⁰。アシルグルクロニドは不安定な反応性代謝物として細胞毒性を示すことが報告されているが⁷¹、体内に吸収された artepillin C と drupanin は、アシルグルクロニドよりも安定なフェノール性水酸基でのグルクロン酸抱合体へ代謝されるため、安全であると考えられる。

BGP 投与後の drupanin の C_{max} および AUC は artepillin C のそれと比べ、それぞれ 2.3 倍および 1.5 倍高値であった (Table 3-3)。一方で、BGP 投与後 24 時間時点の artepillin C の血中濃度 (193 ± 101 nM) は drupanin の血中濃度 (22 ± 22 nM)

よりも高値であった。これら結果は、artepillin C の吸収性は drupanin よりも低い
が、クリアランスは drupanin よりも遅い可能性を示しており、これは、drupanin
にプレニル基が付加した artepillin C の構造的な特徴によるものだと考えられる。
フラボノイドでは、8-prenylnaringenin の C_{max} と AUC が naringenin よりも有意に
低い一方で、投与後 24 時間時点の 8-prenylnaringenin の血中濃度は naringenin と
比べ高かったことが報告されている⁷²⁾。さらに、quercetin のプレニル化が筋管
細胞への取り込みを増加させ、長期摂取により組織へ蓄積されることが報告さ
れていることから⁷³⁾、プレニル基の付加は、化合物の吸収性と血液循環量を減
少させる一方で、組織への蓄積を促進すると考えられる。これまでの細胞研究
において、artepillin C の薬理活性として cys-ロイコトリエン遊離を抑制すること
や⁵⁴⁾、癌細胞の増殖を阻害することが報告されているが³⁶⁾、それらの 50%阻害
濃度 (IC50) は脱抱合処理後の血漿における artepillin C の C_{max} よりも、それぞ
れ 5.6 倍と 19.9 倍高い。標的組織への artepillin C の蓄積を確認することで、BGP
の継続的な摂取により、標的組織で生理活性を示す artepillin C の有効濃度に達
する可能性を検証できると考える。

本試験では artepillin C と drupanin に加えて、いくつかの桂皮酸誘導体とフラ
ボノイドが、BGP 投与後にグルクロン酸および硫酸抱合体へ代謝され、体内に
吸収されることを示した (Table 3-4)。これらの代謝物の機能と作用機序を明ら
かにすることで、BGP の有効性メカニズムの解明につながると考えられるが、
そのためには、代謝物の種類と抱合されている位置を特定する必要がある。例
えば、体内に吸収された quercetin はグルクロン酸抱合体または硫酸抱合体に代
謝される⁷⁴⁾。その中で quercetin-3-*O*-glucuronide は炎症部位でマクロファージ由
来の β -グルクロナダーゼによる脱共役により抗炎症活性を示すことが報告され
ている⁷⁵⁾。また、quercetin-3-*O*-sulfate は、quercetin アグリコンおよび
quercetin-4'-*O*-sulfate よりも強力に、3T3-L1 成熟脂肪細胞のトリアシルグリセロ
ール量を減少させることが報告されている⁷⁶⁾。フラボノイド同様に、桂皮酸誘
導体においても、抱合体の種類と結合位置が抱合代謝物の生理活性に影響を与
える可能性が考えられるため、個々の桂皮酸誘導体それぞれの代謝様式につい
て、更なる検証を進める必要がある。また、BGP 中の artepillin C および drupanin
量と BGP 投与後のそれぞれの血中への吸収量に相関がないこと、baccharin が
BGP 投与後の血中で検出されないことが明らかとなった。これは artepillin C や
baccharin の吸収性が低い可能性に加え、これらの成分が第 II 相代謝だけでなく、
別の化合物へ代謝されている可能性も考えられる。BGP 投与時の代謝物と、単
一成分として artepillin C や baccharin を投与した際に生じる代謝物を比較するこ
とで、個々の桂皮酸誘導体の吸収性と代謝様式を明らかにでき、BGP の有効性
メカニズムや有効成分の解明につながるともものとする。

Table 3-1. Clinical and demographic characteristics of study participants.

Group	<i>n</i>	Age	High (cm)	Weight (kg)	BMI (kg m ⁻²)
Female	6	30.0 ± 6.5	160.3 ± 4.1	52.3 ± 4.2	20.3 ± 0.9
Male	6	34.8 ± 9.5	173.7 ± 5.3	65.2 ± 5.0	21.6 ± 1.4

All values are means ± SD; BMI, body mass index.

Table 3-2. The major chemical compounds of Brazilian green propolis ethanol extract powder used in clinical trial.

Compounds	Type	Content (%)
artepillin C	cinnamic acid derivatives	10.90 ± 0.78
baccharin	cinnamic acid derivatives	3.12 ± 0.42
drupanin	cinnamic acid derivatives	2.06 ± 0.16
<i>p</i> -coumaric acid	cinnamic acid derivatives	1.82 ± 0.09
capillartemisin A	cinnamic acid derivatives	1.68 ± 0.13
2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid	cinnamic acid derivatives	0.32 ± 0.02
3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid	cinnamic acid derivatives	0.29 ± 0.02
culifolin	cinnamic acid derivatives	0.24 ± 0.01
caffeic acid	cinnamic acid derivatives	0.20 ± 0.03
kaempferide	flavonoids	1.83 ± 0.10
6-methoxykaempferide	flavonoids	1.14 ± 0.11
dihydrokaempferide	flavonoids	0.72 ± 0.02
kaempferol	flavonoids	0.13 ± 0.00
chlorogenic acid	caffeoylquinic acid	0.23 ± 0.02

All values are means ± SD; *n* = 3.

Table 3-3. Pharmacokinetic parameters of Brazilian green propolis components in human volunteers after consumption of BGP capsules.

Compounds	Enzymatic hydrolysis	C_{\max} (nM)		t_{\max} (h)		AUC _{0-24 h} (nM·h)	
		Ave	± SD	Ave	± SD	Ave	± SD
artepillin C	-	184	± 136	2.0	± 2.0	439	± 284
	+	1255	± 517	1.6	± 0.8	5583	± 2479 **
drupanin	-	1085	± 461	1.4	± 0.8	1591	± 824
	+	2893	± 711	1.5	± 0.8	8534	± 2013 **
<i>p</i> -coumaric acid	-	29	± 27	1.6	± 0.9	25	± 24
	+	134	± 42	1.5	± 0.8	293	± 120 **
capillartemisin A	-	48	± 24	1.4	± 0.8	124	± 67
	+	274	± 95	1.5	± 0.8	1238	± 540 **
2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid	-	467	± 118	1.6	± 0.8	1138	± 383
	+	400	± 112	1.7	± 0.8	1015	± 283
3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid	-	5	± 11	1.9	± 0.9	6	± 13
	+	246	± 58	1.8	± 1.0	1061	± 279 **
culifolin	-	252	± 58	2.1	± 0.9	1327	± 344
	+	243	± 48	2.4	± 1.2	1180	± 225
caffeic acid	-	n.d.		n.d.		n.d.	
	+	58	± 28	1.8	± 0.7	223	± 129
kaempferide	-	n.d.		n.d.		n.d.	
	+	84	± 30	1.7	± 0.8	421	± 189

6-methoxykaempferide	-	n.d.	n.d.	n.d.
	+	34 ± 7	2.0 ± 0.9	208 ± 63
dihydrokaempferide	-	n.d.	n.d.	n.d.
	+	45 ± 17	1.5 ± 0.8	81 ± 55
kaempferol	-	n.d.	n.d.	n.d.
	+	14 ± 7	2.0 ± 1.0	71 ± 36

All values are means ± SD ($n = 12$). C_{\max} , maximum plasma concentration; t_{\max} , time to reach C_{\max} ; AUC, area under the curve (0–24 h); n.d., not detected; The comparison of AUC 0-24 h values with and without enzymatic hydrolysis were analyzed by student's t test (** $p < 0.01$).

Table 3-4. List of plasma metabolites after oral administration of Brazilian green propolis capsules in human volunteers.

Metabolite No.	Putative Formula	Metabolite Putative Identification	RT (min)	Assignment	Detected Mass	Theoretical Mass	Mass difference (ppm)	Detect Peak Area		Ratio (1 h/Pre)	<i>p</i> -values (1 h vs Pre)
								Pre	1 h		
1	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	artepillin C *	17.62	[M-H] ⁻	300.1722	300.1725	-1.19	1.96×10 ⁵	6.02×10 ⁷	307.3	2.50×10 ⁻¹⁰
2	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	drupanin *	14.35	[M-H] ⁻	232.1096	232.1099	-1.33	2.35×10 ⁵	3.83×10 ⁸	1633.8	2.23×10 ⁻¹⁰
3	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	capillartemisin A *	14.50	[M-H] ⁻	316.1670	316.1675	-1.59	6.00×10 ⁴	1.16×10 ⁷	193.0	2.30×10 ⁻¹⁰
4	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid *	15.48	[M+H] ⁺	230.0942	230.0943	-0.45	1.44×10 ⁵	9.39×10 ⁷	649.9	2.23×10 ⁻¹⁰
5	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	culifolin *	19.53	[M+H] ⁺	298.1566	298.1569	-1.17	5.02×10 ⁵	2.14×10 ⁷	42.7	2.23×10 ⁻¹⁰
6	C ₂₅ H ₃₂ O ₉	artepillin C monoglucuronide #	13.07	[M-H] ⁻	476.2042	476.2046	-1.01	3.37×10 ⁵	2.07×10 ⁸	712.8	2.23×10 ⁻¹⁰
7	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	drupanin monoglucuronide #	11.09	[M-H] ⁻	408.1416	408.1420	-0.97	3.58×10 ⁵	3.41×10 ⁸	952.3	2.23×10 ⁻¹⁰
8	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₀	capillartemisin A monoglucuronide #	11.39	[M-H] ⁻	492.1991	492.1996	-0.89	1.10×10 ⁵	3.63×10 ⁷	329.5	2.23×10 ⁻¹⁰
9	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid monoglucuronide #	11.15	[M-H] ⁻	424.1367	424.1370	-0.66	8.25×10 ⁴	7.61×10 ⁶	92.2	2.23×10 ⁻¹⁰
10	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid monoglucuronide #	12.28	[M-H] ⁻	424.1367	424.1370	-0.54	2.62×10 ⁵	2.71×10 ⁷	103.7	2.23×10 ⁻¹⁰
11	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	kaempferide monoglucuronide #	11.50	[M-H] ⁻	476.0952	476.0955	-0.63	2.18×10 ⁵	1.59×10 ⁷	73.2	2.40×10 ⁻¹⁰
12	C ₁₄ H ₁₆ O ₆ S	drupanin monosulfate #	11.99	[M-H] ⁻	312.0665	312.0668	-0.96	8.59×10 ⁴	7.07×10 ⁶	82.3	2.23×10 ⁻¹⁰
13	C ₉ H ₈ O ₆ S	<i>p</i> -coumaric acid monosulfate #	7.80	[M-H] ⁻	244.0037	244.0042	-2.1	9.99×10 ⁴	2.30×10 ⁶	23.1	2.23×10 ⁻¹⁰
14	C ₉ H ₈ O ₇ S	caffeic acid monosulfate #	7.83	[M-H] ⁻	259.9986	259.9991	-1.78	1.63×10 ⁵	2.03×10 ⁶	12.5	2.24×10 ⁻¹⁰
15	C ₁₆ H ₁₂ O ₉ S	kaempferide monosulfate #	13.79	[M-H] ⁻	380.0197	380.0202	-1.33	5.51×10 ⁶	3.66×10 ⁷	6.7	5.50×10 ⁻¹⁰
16	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	methyl artemillin C #	15.65	[M+H] ⁺	314.1879	314.1882	-0.96	1.57×10 ⁵	5.34×10 ⁶	33.9	2.24×10 ⁻¹⁰
17	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	methyl drupanin #	16.98	[M-H] ⁻	246.1253	246.1256	-1.33	1.93×10 ⁵	2.27×10 ⁷	117.9	2.23×10 ⁻¹⁰

18	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	methyl capillartemisin A #	16.76	[M-H] ⁻	330.1829	330.1831	-0.78	3.74×10 ⁵	2.40×10 ⁸	640.0	2.23×10 ⁻¹⁰
19	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	methyl 2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid #	17.62	[M+H] ⁺	244.1097	244.1099	-1.08	1.37×10 ⁵	6.61×10 ⁶	48.1	7.05×10 ⁻⁹
20	C ₂₀ H ₂₄ O ₃	methyl culifolin #	16.76	[M+H] ⁺	312.1723	312.1725	-0.84	1.30×10 ⁵	1.15×10 ⁷	88.6	2.23×10 ⁻¹⁰

RT, retention time; [M - H]⁻, negatively charged molecular ion; [M + H]⁺, positively charged molecular ion. The mass difference was calculated by subtracting the detected mass from theoretical mass. *P* values were obtained by comparing pre dose and after BGP ingestion (student's *t* test). * Identified using standard sample. # Putative identified on the basis of their exact mass (5 ppm of accepted mass difference) and/or MS/MS fragments.

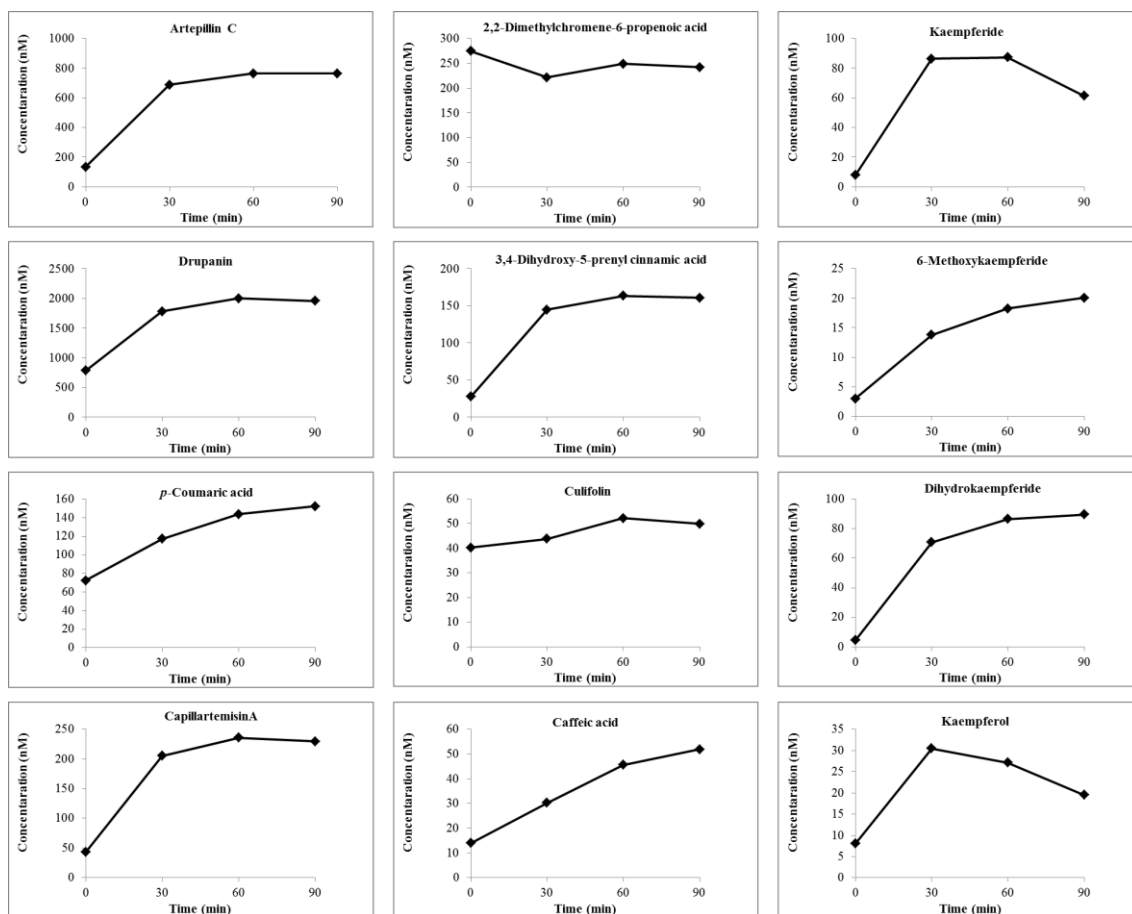


Figure 3-1. Time courses of plasma concentration of each composition during enzymatic hydrolysis reaction. The plasma sample collected from a volunteer at 1 h after BGP intake was mixed deconjugation enzyme and incubated at 37°C. After incubation at 0 (Immediately after the addition of enzyme), 30, 60, and 90 min, methanol was added to stop the reaction. These samples were prepared to LC-MS/MS analysis according to methods section.

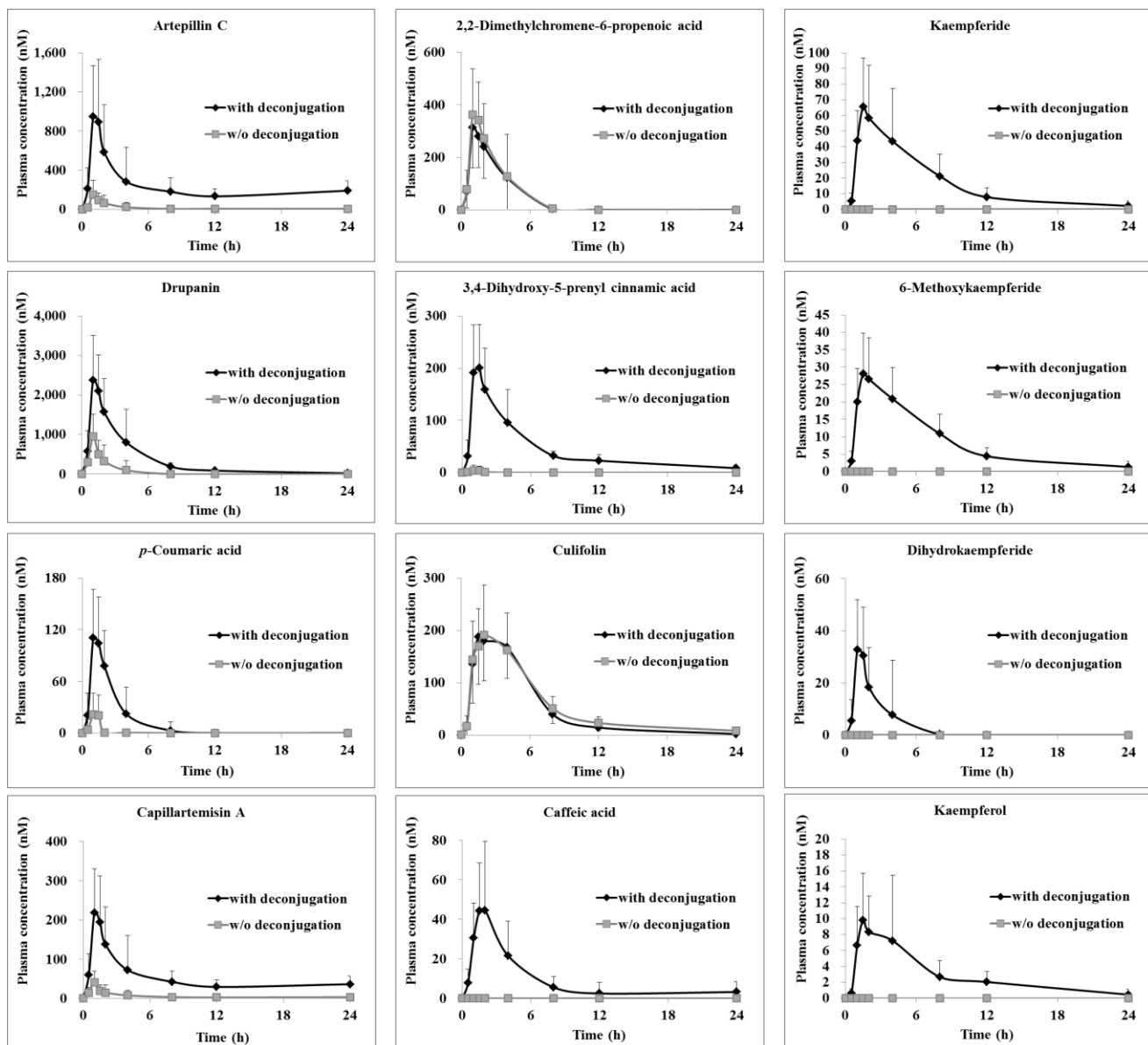


Figure 3-2. Plasma concentration-time profiles of 12 BGP components in human subjects (means \pm SD; $n = 12$) within 0–24 h after ingestion of BGP capsules. To confirm the presence of sulfates and glucuronides, the plasma samples were incubated with deconjugating enzyme. The plasma concentrations were analyzed by LC-MS/MS with (black) or without (gray) deconjugation.

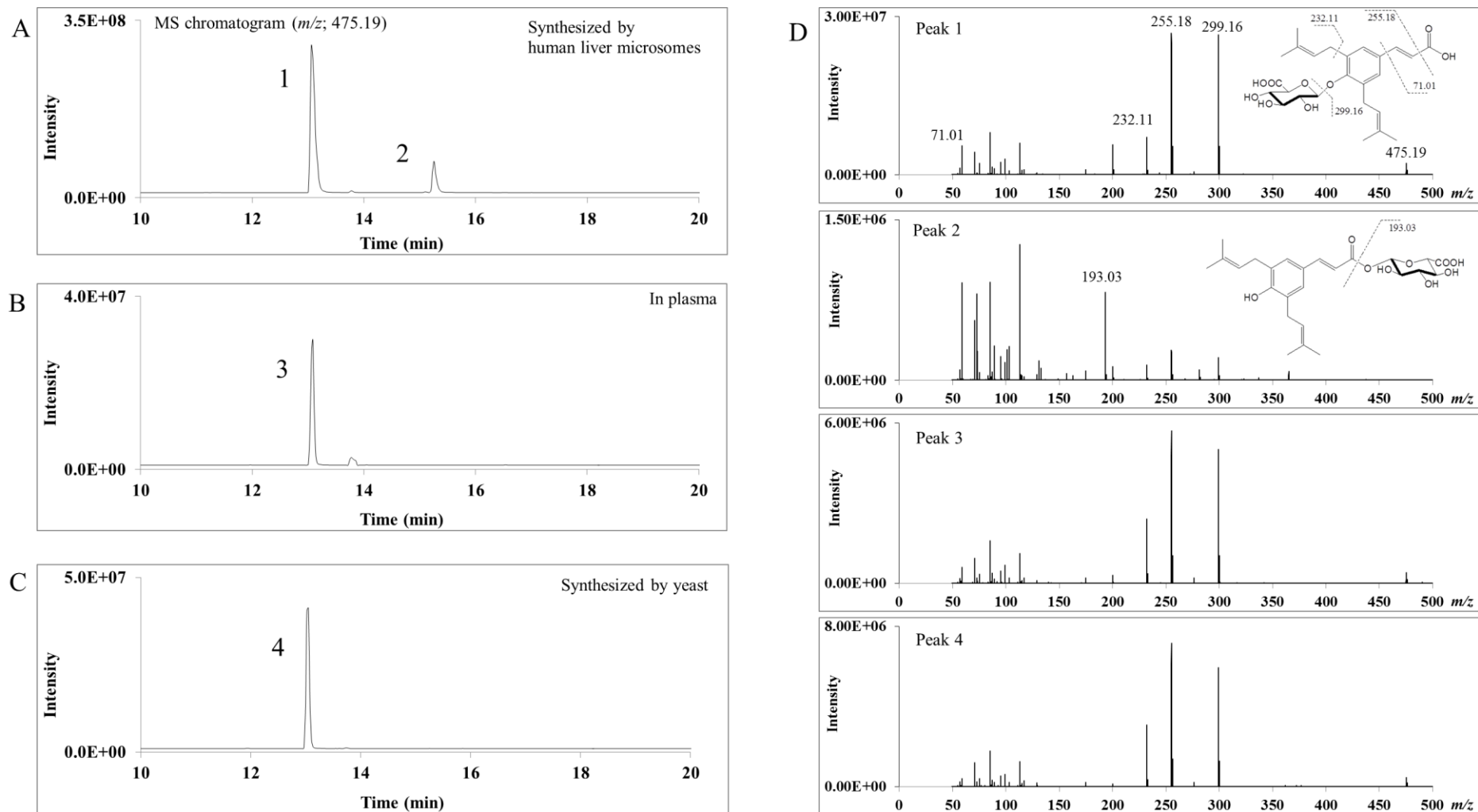


Figure 3-3. A comparison of LC retention time and MSMS fragment of biosynthesized standard with a metabolite in plasma. (A) MS chromatograms of artepillin C monoglucuronide (m/z ; 475.19) synthesized by human liver microsomes, (B) in plasma at 1 h after BGP intake and (C) produced by yeast cells. (D) The MSMS spectra of peak 1 to 4.

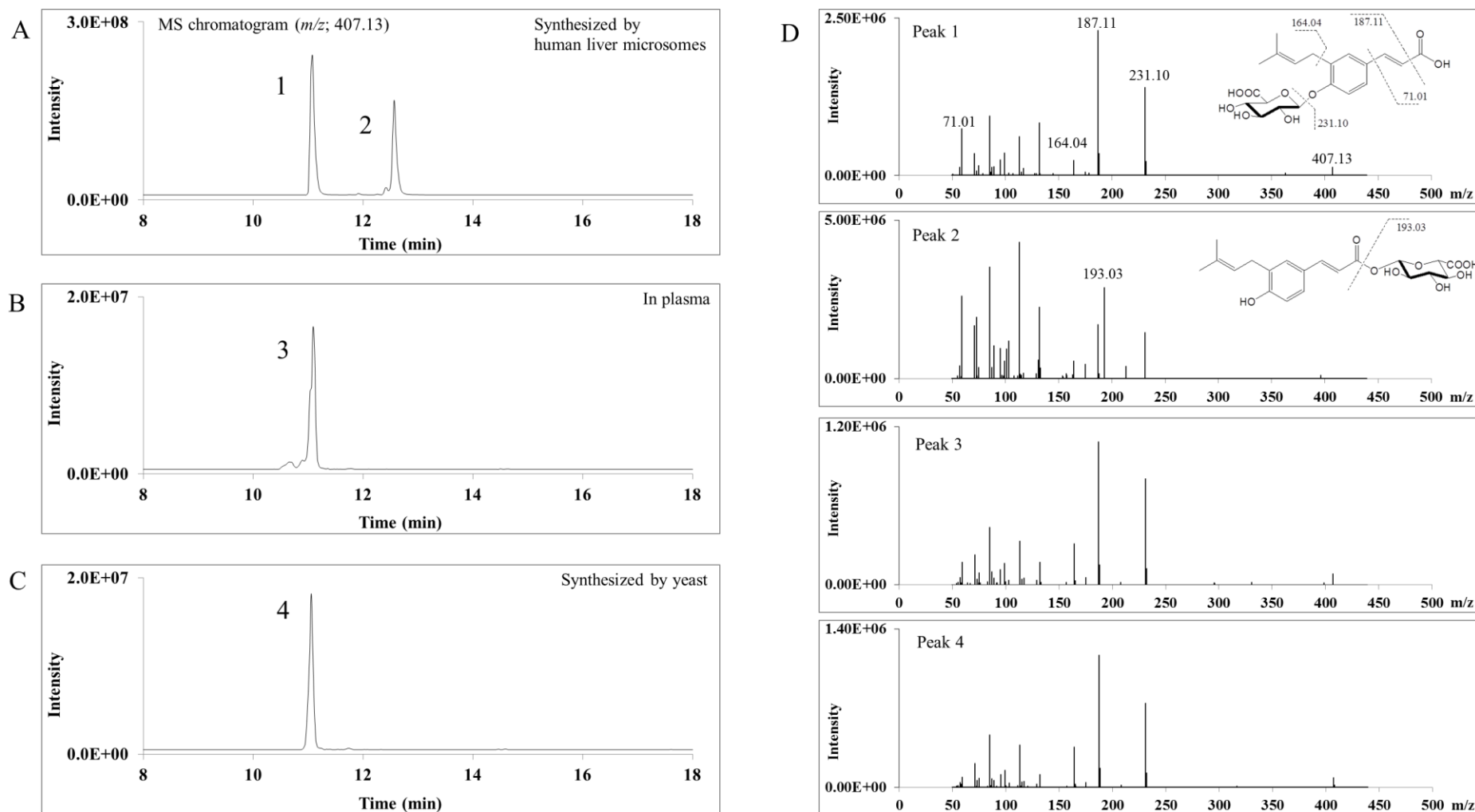


Figure 3-4. A comparison of LC retention time and MSMS fragment of biosynthesized standard with a metabolite in plasma. (A) MS chromatograms of drupanin monoglucuronide (m/z ; 407.13) synthesized by human liver microsomes, (B) in plasma at 1 h after BGP intake and (C) produced by yeast cells. (D) The MSMS spectra of peak 1 to 4.

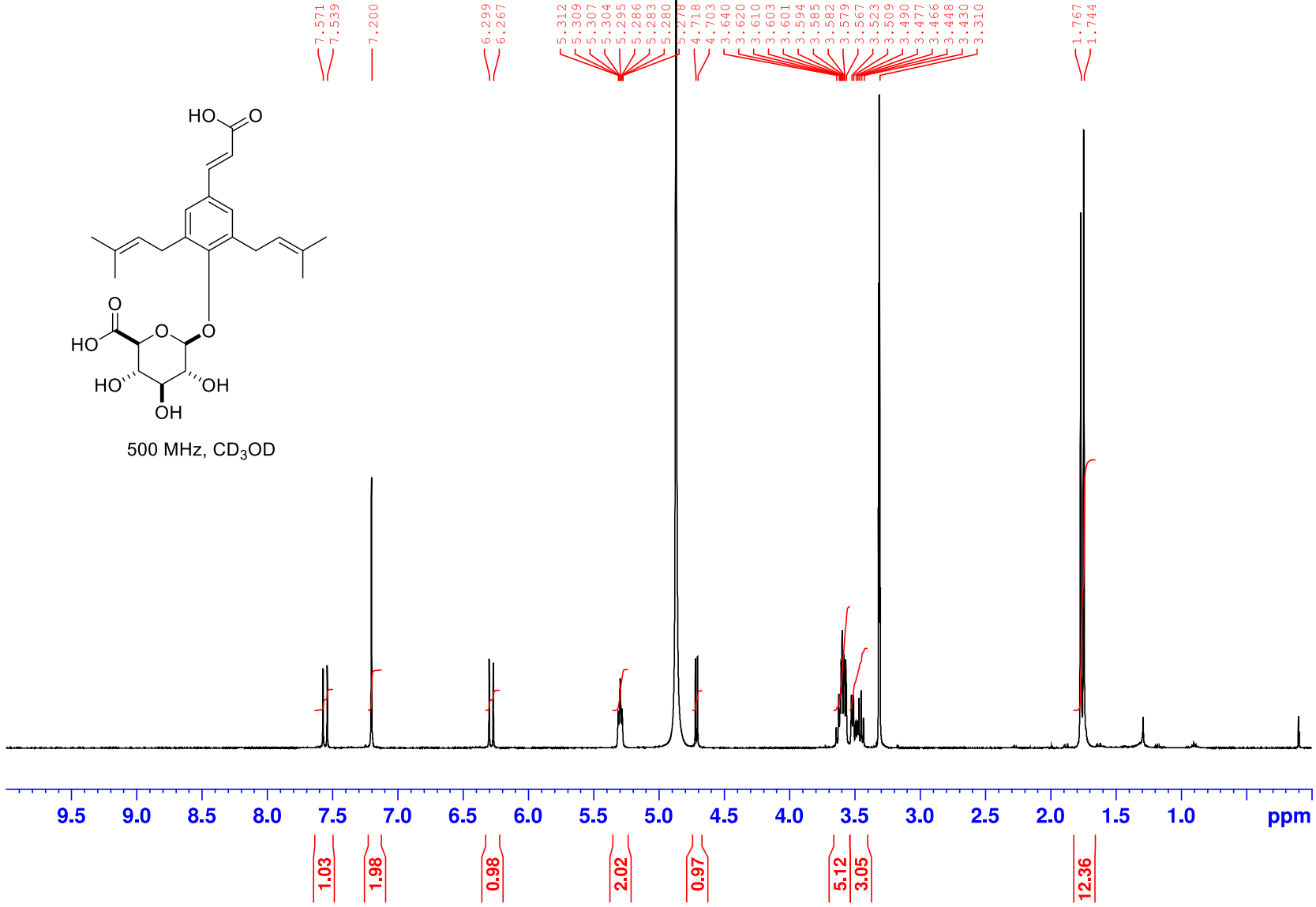


Figure 3-5. ¹H NMR spectrum of artepillin C-4-O-β-D-glucuronide

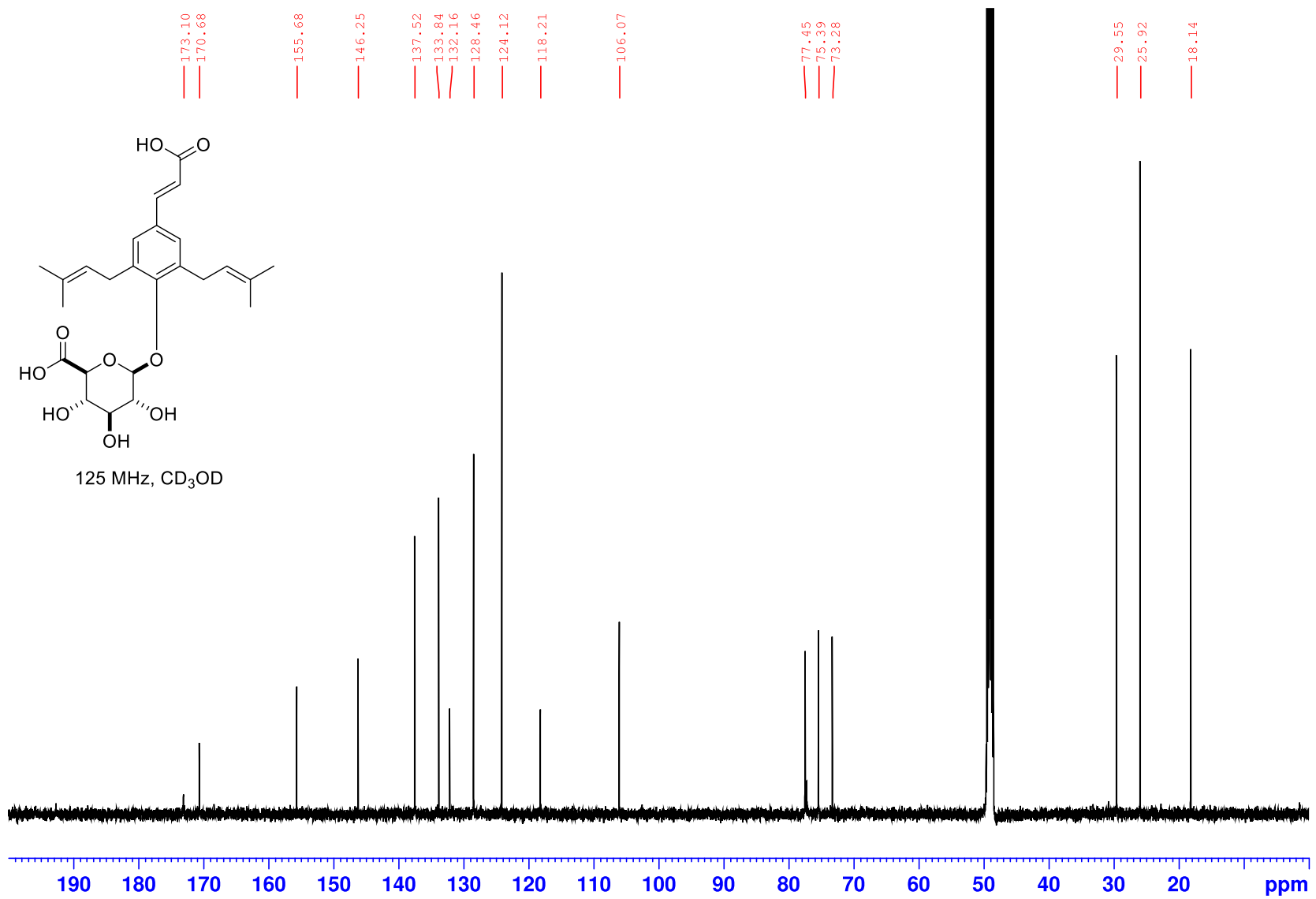


Figure 3-6. ¹³C NMR spectrum of artepillin C-4-O-β-D-glucuronide

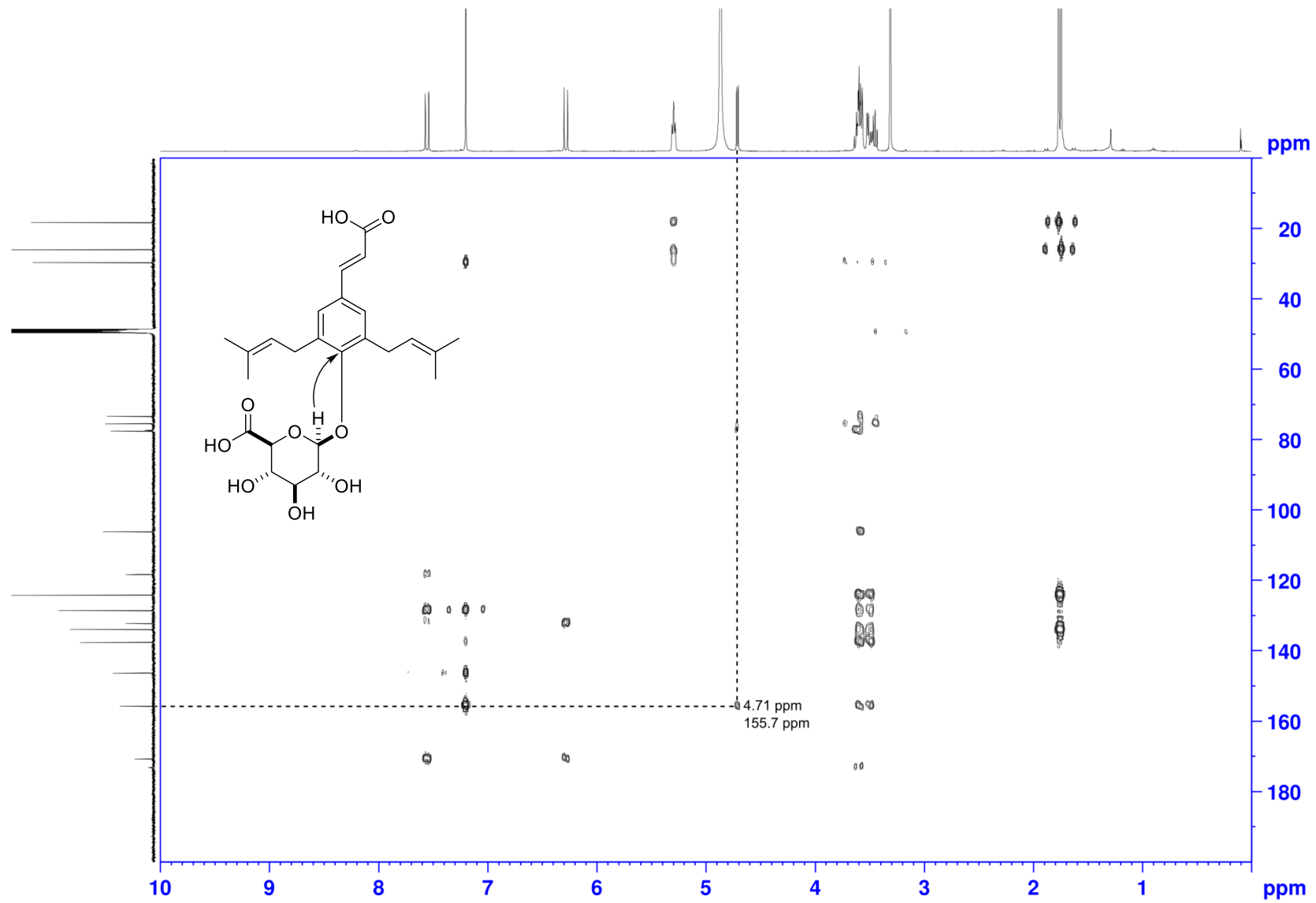


Figure 3-7. HMBC spectrum of artemipillin C-4-O-β-D-glucuronide

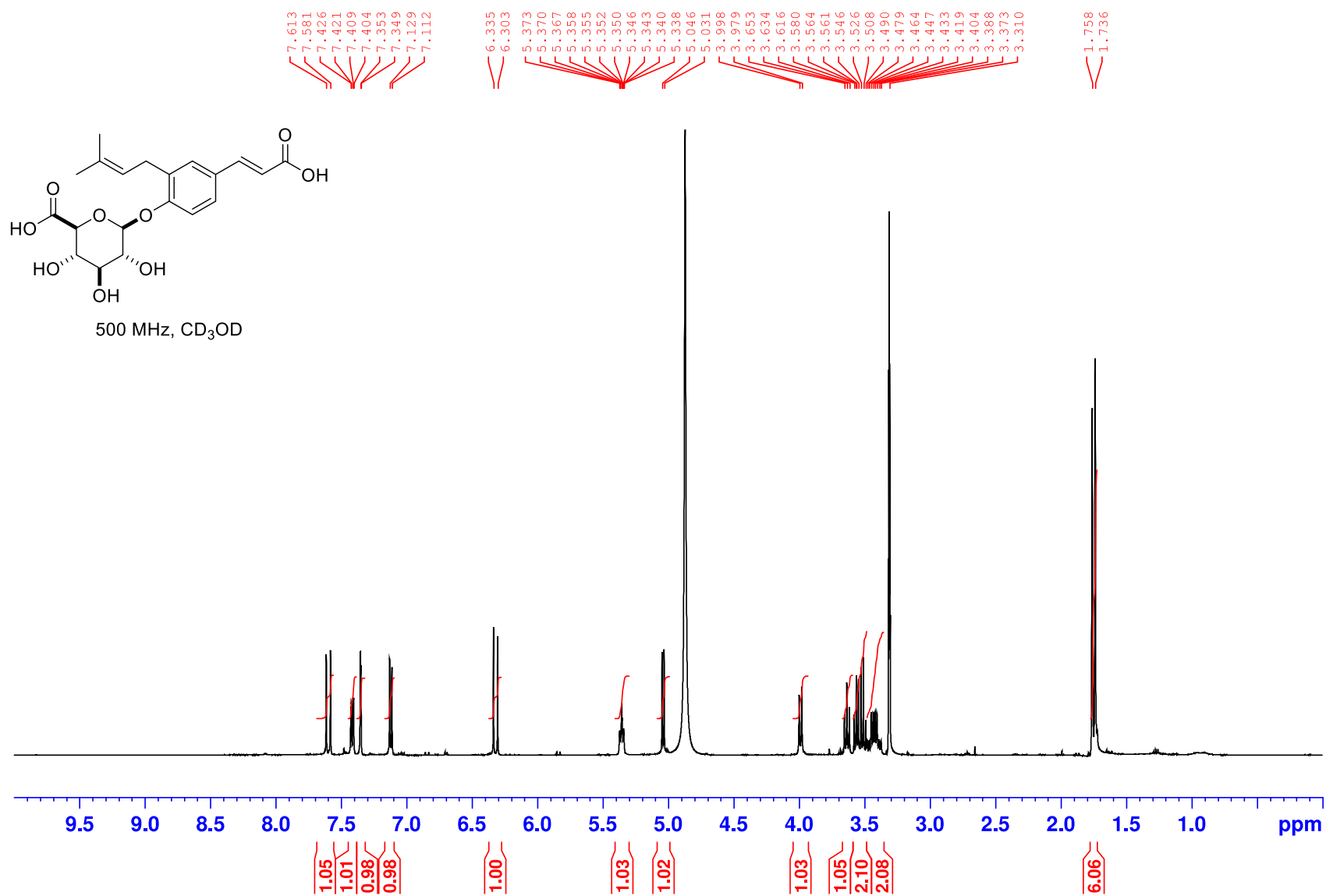


Figure 3-8. ¹H NMR spectrum of drupanin-4-O-β-D-glucuronide

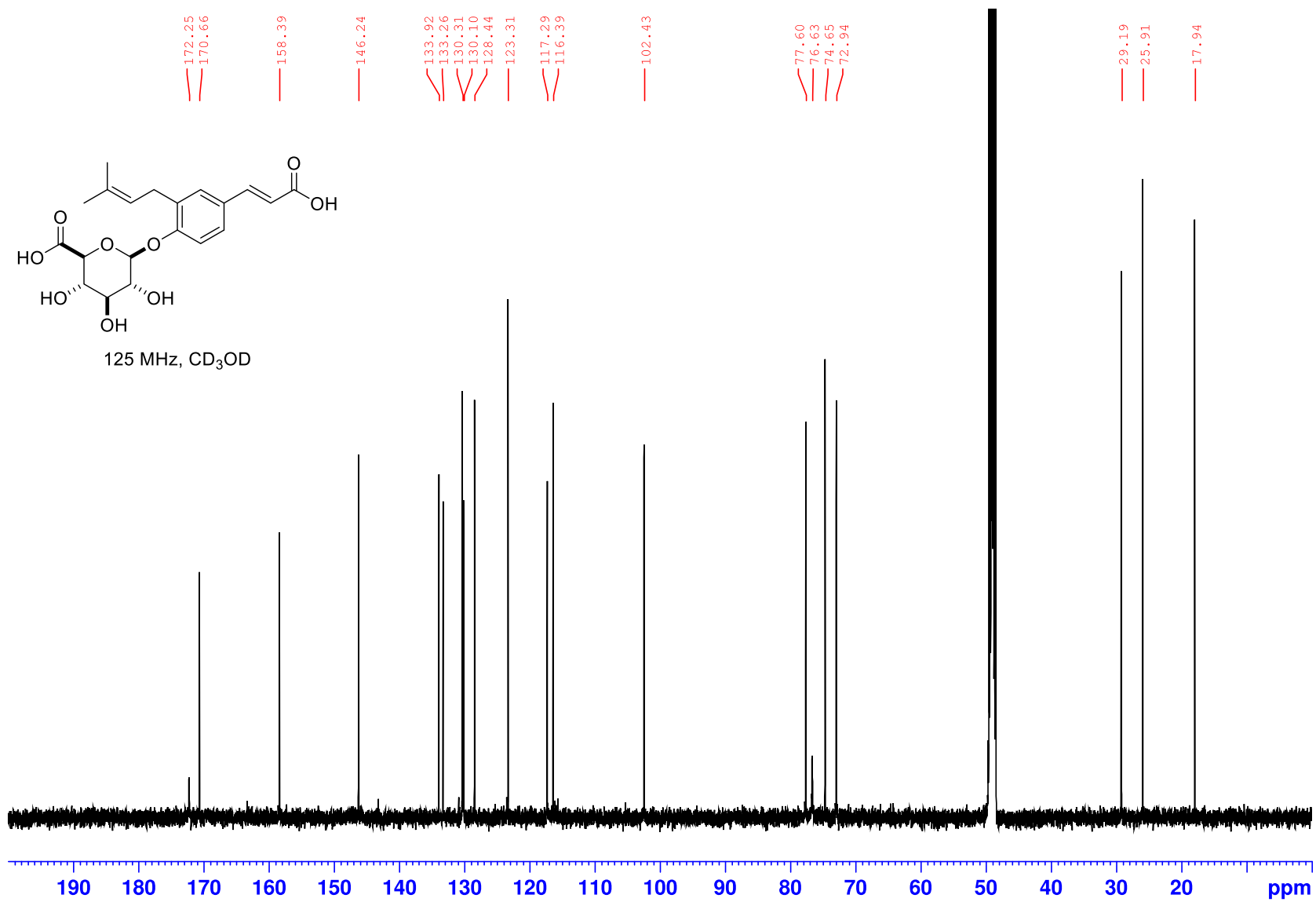


Figure 3-9. ¹³C NMR spectrum of drupanin-4-*O*-β-D-glucuronide

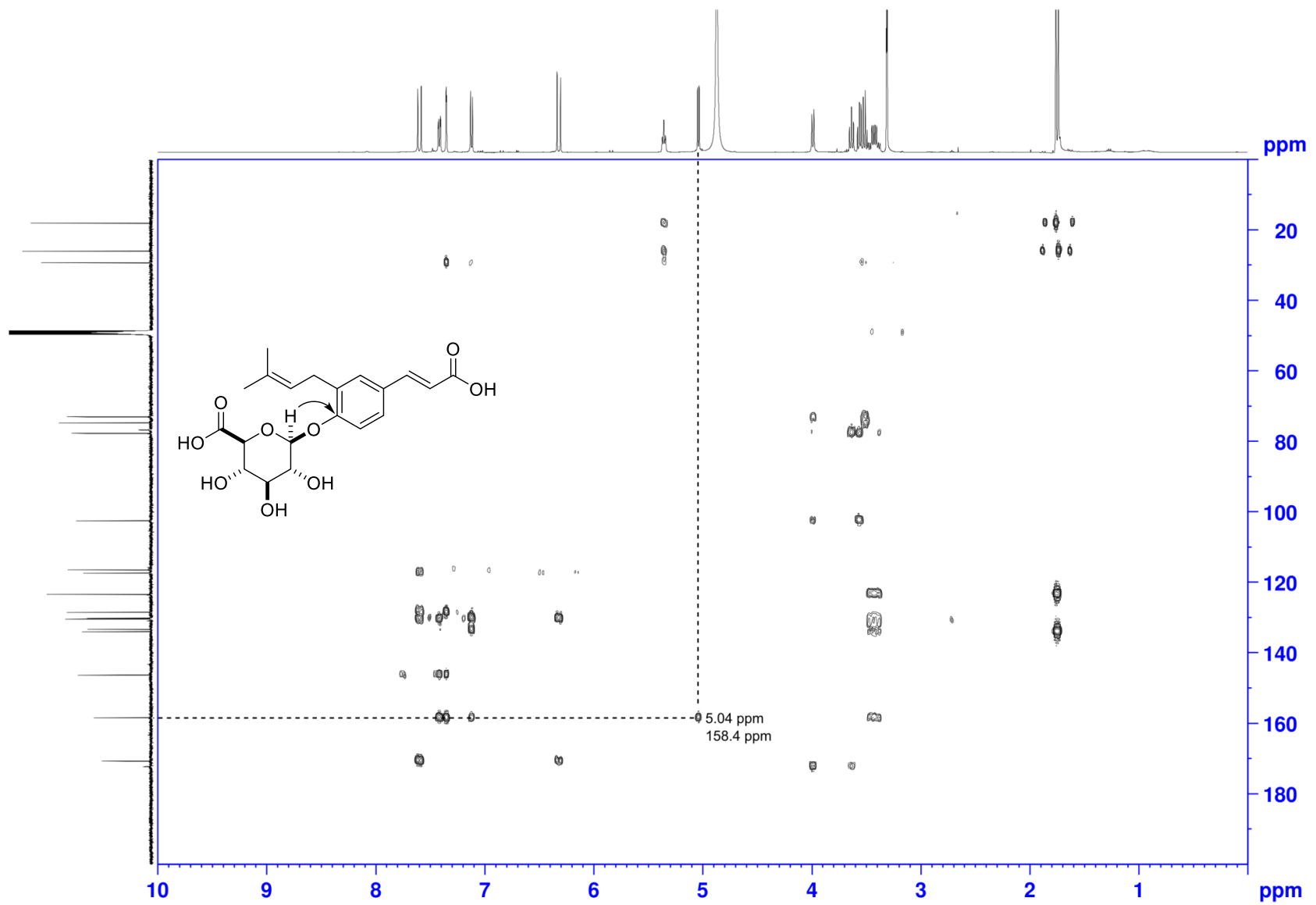


Figure 3-10. HMBC spectrum of drupanin-4-O-β-D-glucuronide

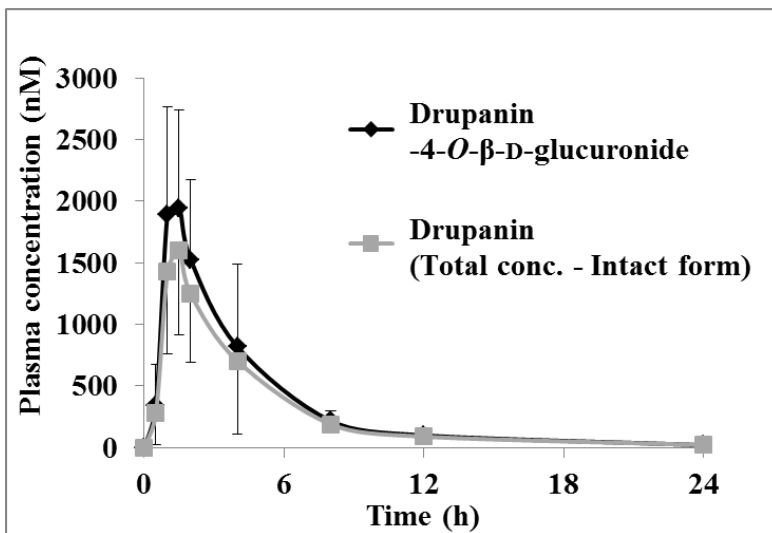
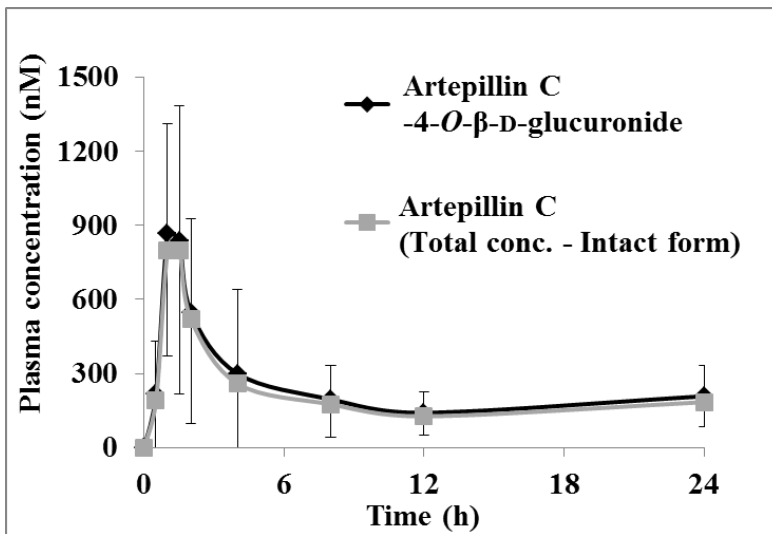


Figure 3-11. A comparison of plasma concentration of artepillin C-4-O-β-D-glucuronide or drupanin-4-O-β-D-glucuronide (black) with the values of subtraction the concentration of artepillin C or drupanin in intact plasma from their total plasma concentrations with deconjugation.

第4章 ブラジル産グリーンプロポリスの主要な桂皮酸誘導体の吸収・代謝経路・尿排泄量の検討

4-1 はじめに

桂皮酸誘導体は植物、果物、穀物および野菜等、様々な食品に広く含まれており⁷⁷⁾、*caffeic acid*、*ferulic acid*、*chlorogenic acid*等の桂皮酸誘導体には抗酸化、抗菌、肝保護作用や循環器保護作用等の有効性が報告されている⁷⁸⁻⁸¹⁾。ブラジル産グリーンプロポリス(BGP)にも *artepillin C* や *drupanin*、*baccharin*、*p-coumaric acid* 等の桂皮酸誘導体特徴的に含まれており、BGP のもつ様々な有効性に寄与していると考えられている。第3章で述べたヒトに BGP を投与した際の、BGP 成分の吸収・代謝を確認した試験において、*drupanin* の BGP 含有率は *artepillin C* の 1/5 程度であるのに対し、 C_{max} と AUC はそれぞれ 2.3 倍、1.5 倍高値になること、および *baccharin* が BGP 投与後のどの血漿サンプルにおいても検出されないことを見出している。これは、各成分の吸収性が異なる可能性に加え、別の成分へと代謝されている可能性が考えられる。それを検証するには、混合物としての BGP 投与だけでなく、単一成分として BGP の各成分を投与する必要があるが、単一成分での安全性が確認されていない BGP 成分をヒトに投与することは倫理的に難しい。そこで、本章ではモデル動物としてラットを使用し、BGP の主要な桂皮酸誘導体である、*artepillin C*、*drupanin*、*baccharin* および *p-coumaric acid* を投与した際の、各化合物の吸収性と代謝を明らかにすることを目的として試験を実施した。

4-2 材料と方法

4-2-1 実験材料

本試験に用いた BGP 粉末 (Lot : LY-008) はヒト試験で試験食に使用したものと同様のものを使用した。動物の投与に用いた標準品は Table 2-1 に、サルファターゼは 3-2-1 に記載のものを使用した。

4-2-2 動物および動物試験デザイン

本試験のプロトコルは島根大学動物試験倫理委員会の承認を得ており、島根大学の動物実験規則に従って実施された (承認番号 : MA31-5)。

Wistar/ST ラット (オス、6-7 週齢) は日本 SLC から購入し、室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、12 時間の明暗サイクル (8 : 00-20 : 00)、自由摂餌摂水の環境下で 1 週間順化飼育を行った。

10 時間以上絶食させたラット (25 g グルコース+ 4.97 g NaCl/L 溶液のみ自由

摂水にて投与) に、10%プロピレングリコールに溶解させた BGP 粉末を 300 mg/kg の投与量になるように経口ゾンデにて投与した (1 mL/匹)。Artepillin C、drupanin、baccharin、および *p*-coumaric acid は BGP の含有量に従い、BGP 粉末 300 mg/kg の投与量に合わせて、それぞれ経口ゾンデにて投与した。血液サンプルは投与 15 分前および投与後 30 分、1、1.5、2、3、6、9、24 時間に尾部末端静脈からヘパリンを塗布したヘマクリットチューブ (Thermo Scientific) を用いて採取した。採取した血液サンプルは室温 (23 ± 2°C) にて 4,000 rpm、5 分間遠心し、血漿に分離した。尿サンプルは投与前 15 時間および投与後 0-3、3-6、6-9、9-24 時間の尿をパルプシート (パルマス 3000、株式会社天然素材探索研究所) を用いて回収した。得られたサンプルは分析まで -20°C にて保管した。

4-2-3 サンプル前処理

LC-MS/MS による代謝物の分析を行うため、血漿は 3-2-3 記載の方法に従って前処理を行った。25 μL の血漿に 500 μL のメタノールを加え、脱タンパク後、上清を 37°C 加温下で窒素ガスにより乾固し、37°C で 1 時間サルファターゼ (50 ユニット/サンプル) にて処理した。サルファターゼによる脱抱合処理前後の血漿サンプルを LC-MS/MS に供した。

尿排泄量はパルプシートの凍結乾燥前後の重さを計量することで算出した。乾燥させたパルプシートを 2 mm 角に裁断し、パルプ 4 g あたり 50 mL の 50% メタノールにて尿中代謝物を抽出した。抽出液を濾過後、エバポレーターおよび凍結乾燥により乾固させ、2 mL の 50% メタノールに再溶解させた。再溶解したサンプルをエッペンチューブに尿量として 20 μL になる量を分注し、血漿サンプルと同様の手順でサルファターゼによる脱抱合処理を行った。

4-2-4 LC-MS/MS 分析

LC-MS/MS の分析条件は 2-2-3 記載の条件で実施した。また、血漿、尿サンプル中の代謝物定量、および差分解析による各桂皮酸誘導体代謝物の洗い出しも 3-2-6 記載の方法で実施した。ただし、差分解析については投与前および投与後 30 分時点の血漿を比較し、統計的に有意に 50 倍以上ピーク強度が異なるものを、投与化合物の代謝物として洗い出した。

4-2-5 薬物動態解析

3-2-7 記載の方法にて実施した。

4-2-6 統計解析

データは平均 ± 標準偏差 (SD) で示した ($n = 4$)。総計解析は JMP for Windows

ver. 5.1 (SAS Institute Japan) を使用した。脱抱合未処理の血漿中で検出された投与化合物のアグリコン、異化代謝物、抱合代謝物など 3 つ以上の代謝物間の AUC の比較は一元配置分散分析と Tukey-Kramer 法を用いた。脱抱合処理後の血漿および尿で検出された投与化合物とその異化代謝物間の AUC と尿中排泄量の比較、および drupanin 投与群と baccharin 投与群間の尿中代謝物の回収率の比較は、Student's *t*-検定にて行った。検定結果は $p \leq 0.05$ で有意とした。

4-3 結果

4-3-1 BGP 投与時におけるラットでの BGP 主要桂皮酸誘導体の吸収とヒトとの比較

ラットにおける BGP の主要な桂皮酸誘導体の吸収を確認し、ヒトと比較するため、ラットに BGP を投与後、24 時間までの血漿を採取、脱抱合酵素処理後、LC-MS/MS にて分析した。BGP の主要な桂皮酸誘導体として artepillin C、drupanin、baccharin、*p*-coumaric acid の C_{\max} と AUC を Table 4-1 に示す。これらの化合物の内、ラットでは *p*-coumaric acid の C_{\max} および AUC が最も高く、次いで、drupanin、artepillin C の順であった。第 3 章で得られたヒトの結果と比較すると、ヒトでは drupanin の C_{\max} と AUC が最も高く、次いで、artepillin C、*p*-coumaric acid の順であった。また、ヒトと同様にラットにおいても baccharin はどの血漿サンプルでも検出することはできなかった。これらの結果から、*p*-coumaric acid の吸収はヒトとラット間で種差がある可能性があるが、BGP の含有量に反して drupanin の C_{\max} や AUC が artepillin C よりも高値になる点、および baccharin がどの時点の血漿においても検出されない点はヒトとラットで共通していた。

4-3-2 BGP 主要桂皮酸誘導体の血中代謝物の特定

BGP の主要な桂皮酸誘導体である artepillin C、drupanin、baccharin、*p*-coumaric acid に由来する代謝物を特定するため、それぞれの標準品を単独投与し、採取した血漿サンプルについて脱抱合酵素による処理を行わず、LC-MS/MS に供した。Table 4-2 には各標準品単独投与前と投与 30 分後の血漿を分析した際のクロマトグラムを比較し、ピーク強度が投与後に統計的に有意に 50 倍以上増加した化合物を代謝物として示す。

Artepillin C 投与後において、7 化合物が artepillin C 投与 30 分後の血漿中で有意に増加した代謝物として検出された。それらの代謝物の内、artepillin C のアグリコン、artepillin C-4-*O*- β -D-glucuronide、および capillartemisin A (artepillin C の水酸化代謝物) が標準品との比較により同定された。また、capillartemisin A と同一の精密質量だが保持時間の異なる代謝物は、capillartemisin A の *cis* 異性体で

ある capillartemisin B と推定された。加えて、精密質量と MS/MS フラグメントからメチル化された artemillin C のグルクロン酸抱合体や capillartemisin A のグルクロン酸抱合体が暫定的に同定された。一方で、今回の解析では artemillin C の脱プレニル化体である drupanin やその抱合代謝物は検出されなかった。

Drupanin 投与後では、13 化合物が代謝物として検出され、drupanin アグリコン、drupanin-4-*O*-β-D-glucuronide、3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid (drupanin の水酸化代謝物) が標準品との比較により同定された。また、精密質量と MS/MS フラグメントから、drupanin の硫酸抱合体および 3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid の硫酸抱合体が暫定的に同定された。加えて、drupanin が還元もしくはメチル化された後、グルクロン酸抱合や硫酸抱合を受けたと推定される代謝物も併せて検出された。一方で、drupanin の脱プレニル化体である *p*-coumaric acid は検出されなかった。

Baccharin は BGP 投与時と同様に、どの血漿サンプル中でも検出されなかったが、14 化合物が baccharin 代謝物として検出された。その内 12 化合物が drupanin 代謝物と共通しており、drupanin アグリコン、drupanin-4-*O*-β-D-glucuronide、3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid が標準品との比較により同定された。加えて、baccharin 投与時にのみ検出された代謝物の一つ (推定組成式: C₉ H₁₀ O₃) が精密質量と MS/MS フラグメントから、3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid と推定された。これらの結果から、baccharin は体内へ吸収される際に drupanin へと加水分解された後、drupanin と同様の代謝を受けることが示唆され、ヒトおよびラットにおいて BGP 摂取後の血中 drupanin 濃度に、baccharin 由来の drupanin が寄与していることが明らかになった。

p-Coumaric acid 投与では、*p*-coumaric acid のアグリコンおよび、その硫酸抱合体が検出されたが、グルクロン酸抱合体は検出されなかった。また、メチル化された *p*-coumaric acid とその硫酸抱合体と推定される代謝物も検出された。

各標準品投与後の血漿において、artemillin C および capillartemisin A ではグルクロン酸抱合体が、*p*-coumaric acid では硫酸抱合体が、drupanin ではグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の両方が代謝物としてそれぞれ検出されたことから、桂皮酸誘導体と抱合代謝酵素との親和性に、基質となる化合物の極性が関係している可能性が示唆された。また、第 3 章において、BGP 投与後のヒト血漿でもこれらの代謝物が検出されていることから、これらの BGP 成分の抱合代謝経路はヒトとラットで類似していることが示唆された。

4-3-3 BGP 主要桂皮酸誘導体投与後の血中代謝物濃度と尿中排泄量

各桂皮酸誘導体の主要な代謝経路を推定するため、前項で標準品との比較により同定した代謝物について、血中濃度と尿中排泄量を定量した。

Artepillin C 投与後、脱抱合未処理の血漿において、artepillin C アグリコンおよび artepillin C-4-*O*-β-D-glucuronide の C_{\max} は、脱抱合処理後の血漿の、総 artepillin C (アグリコン+抱合体) の C_{\max} (951 ± 278 nM) に対して、それぞれ 52% および 44% に達した。さらに、脱抱合未処理の血漿中の artepillin C アグリコンと artepillin C-4-*O*-β-D-glucuronide の AUC は、それぞれ 1656 ± 702 、 1666 ± 287 nM・h であり、その合計は、脱抱合処理後の総 artepillin C の AUC (3771 ± 687 nM・h) の 88% に達した。この結果は、抱合代謝を受けた artepillin C のほとんど全てが 4 位の水酸基にグルクロン酸が結合するかたちで代謝されたことを示しており、第 3 章のヒトでの結果と一致していた。また、脱抱合処理後において、artepillin C の代謝物としての capillartemisin A の C_{\max} は 455 ± 152 nM であり、その AUC (6831 ± 1560 nM・h) は総 artepillin C の AUC と比較して有意に高かった ($p < 0.05$; Figure 4-1A)。尿においても、artepillin C および capillartemisin A が血漿中と同様に代謝物として検出され、それらの 24 時間までの尿中排泄量は、投与した artepillin C 量の 2.34% であり、その内の約 70% が capillartemisin A であった (Table 4-3)。また、artepillin C および capillartemisin A の排泄は投与後 9–24 時間にかけても認められ、24 時間までの capillartemisin A の尿排泄量は artepillin C の尿排泄量と比較して有意に高値であった ($p < 0.05$; Figure 4-2A)。これらの結果から、ラットの artepillin C 代謝において第 II 相抱合代謝よりも水酸化代謝が、より主要な代謝経路である可能性が示唆された。

Drupanin 投与後、脱抱合未処理の血漿における drupanin アグリコンおよび drupanin-4-*O*-β-D-glucuronide の C_{\max} は、脱抱合処理後の血漿における総 drupanin (アグリコン+抱合体) の C_{\max} (5469 ± 1662 nM) に対して、それぞれ 20% および 29% 程度であった。また、脱抱合未処理の血漿におけるそれらの AUC は、それぞれ 1532 ± 536 および 2227 ± 839 nM・h であり、その合計は脱抱合処理後の総 drupanin の AUC (7309 ± 2156 nM・h) の 51% 程度であった。第 3 章のヒトでの結果では、drupanin の主要な抱合代謝経路はグルクロン酸抱合であったのに対し、ラットでのこの結果は、硫酸抱合などのグルクロン酸抱合以外の抱合代謝物が約 50% を占めていることを示している。また、脱抱合処理後、drupanin の水酸化代謝物としての 3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid の AUC は、 293 ± 80 nM・h であり、総 drupanin の AUC と比較して有意に低かった ($p < 0.01$; Fig 4-1B)。Baccharin 投与後の脱抱合処理した血漿において、baccharin 代謝物としての drupanin の AUC は 6047 ± 982 nM・h であり、その内、グルクロン酸抱合体が占める割合は 46% と、アグリコンよりも有意に高値であった ($p < 0.05$; Fig 4-1C)。Drupanin 投与時および baccharin 投与時の尿においても、drupanin および 3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid が血漿と同様に検出され、24 時間までの drupanin の尿中排泄量は、投与した drupanin および baccharin 量のそれぞれ 29.9%

および 22.5%にそれぞれ達した (Table 4-3)。その回収率は drupanin 投与時の方が baccharin 投与時よりも有意に高値であったことから ($p < 0.05$)、吸収過程に加水分解が行われる baccharin よりも drupanin の吸収効率が低い可能性が示唆された。また、drupanin 投与時および baccharin 投与時のどちらにおいても、drupanin と 3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid の尿排泄は投与後 9 時間で完了していた (Fig. 4-2B and C)。

p-Coumaric acid 投与後、脱抱合未処理の血漿における *p*-coumaric acid アグリコンの C_{max} および AUC は、それぞれ 4981 ± 2185 nM および 4233 ± 1969 nM \cdot h であり、脱抱合処理後の血漿における総 *p*-coumaric acid の 44%および 42%にそれぞれ達した。差分解析で *p*-coumaric acid のグルクロン酸抱合体が検出されなかったことを考慮すると、血中に取り込まれた総 *p*-coumaric acid の約 60%が硫酸抱合体に代謝される可能性ある (Fig. 4-1D)。また、24 時間までの *p*-coumaric acid の尿中排泄量は投与量の 87%に達し (Table 4-3)、投与後少なくとも 3 時間でクリアランスが完了していた (Fig. 4-2D)。

4-4 考察

本研究により、BGP の主要な桂皮酸誘導体である artepillin C、drupanin、baccharin および *p*-coumaric acid の代謝経路をラットをモデルとして、明らかにすることができた (Figure 4-3)。生体内で artepillin C の capillartemisin A への代謝、および baccharin の drupanin への代謝を捉えたのは、知る限りにおいて初めてである。

Artepillin C 投与後の血漿において、capillartemisin A が artepillin C のグルクロン酸抱合体と同様に、artepillin C の代謝物として同定された (Table 4-2)。この結果は、artepillin C の極性と排泄率を高める代謝プロセスの一つとして、artepillin C のプレニル基が生体内で水酸化されたことを示している。ヒトおよびラットの肝ミクロソームを使用した *in vitro* 代謝では、artepillin C はチトクローム P450 (CYP2E1 および CYP2C9) によって capillartemisin A および B に代謝されることが報告されており⁸²⁾、ラットでの本結果と一致している。また、artepillin C 代謝物としての capillartemisin A の血中濃度-時間曲線は、投与後 30 分と 9 時間で 2 つのピークを有していた (Fig. 4-1A)。血中濃度-時間曲線に複数ピークを示すのは、腸肝循環によるものだと考えられている^{83,84)}。そのため、artepillin C もプレニル基の水酸化を受けた後、胆汁酸中に排泄されている可能性があり、capillartemisin A の AUC が artepillin C の AUC よりも有意に高値になった一つの要因と考えられる。また、この胆汁酸排泄が artepillin C と capillartemisin A のクリアランスが drupanin や *p*-coumaric acid と比べ遅くなった要因の一つであると

思われる。第 3 章におけるヒトの結果においても、artepillin C および capillartemisin A は BGP 投与後 24 時間時点の血漿中に存在し、他の桂皮酸誘導体よりもクリアランスが遅いことが確認されていることから、ヒトにおいても artemillin C の capillartemisin A への代謝と胆汁酸への排泄は行われていると思われる。

Drupanin および baccharin 投与後において、12 化合物がそれぞれの代謝物として共通して血漿中で検出されたが、2 化合物が baccharin 投与時の血漿でのみ検出された。その内の一つは 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid と推定され、baccharin の加水分解により生じた 3-phenylpropionic acid の水酸化代謝物であると考えられる。3-Phenylpropionic acid と構造が類似している桂皮酸 (3-phenylprop-2-enoic acid) においては、フェニル基の水酸化代謝が生じる可能性がラットで報告されており⁸⁵⁾、baccharin から生じた 3-phenylpropionic acid も同様にフェニル基が水酸化され、3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid へと代謝されたのであろう。この 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid には HT-29 細胞を用いた研究において、抗腫瘍や抗炎症作用を有することや⁸⁶⁾、ラットにおける抗酸化作用⁸⁷⁾、MAPK, p38, ERK1/2 経路を介した神経保護作用等が報告されていることから⁸⁸⁾、baccharin の加水分解により生じた drupanin や 3-phenylpropionic acid、およびそれらの代謝物が BGP のもつ生理活性の有効成分として寄与しているかもしれない。加えて、baccharin が drupanin と 3-phenylpropionic acid に加水分解されるという本結果は、ヒトおよびラットで共通してみられた BGP 投与時の血中 drupanin 濃度が、artepillin C よりも高値になる主な要因の一つであることを示していると考えられる。BGP をラットへ投与した際の、総 drupanin の AUC は $31.7\mu\text{M}\cdot\text{h}$ であり、総 artemillin C の AUC ($7.6\mu\text{M}\cdot\text{h}$) の 4.2 倍高値であった。一方、単一成分として drupanin および baccharin をそれぞれ投与後、脱抱合処理したの血漿中で検出された drupanin の AUC は、それぞれ $7.3\mu\text{M}\cdot\text{h}$ および $6.0\mu\text{M}\cdot\text{h}$ であり、その合計は artemillin C 単独投与時の artemillin C の AUC ($3.8\mu\text{M}\cdot\text{h}$) の 3.5 倍に達し、BGP 投与時の artemillin C と drupanin の AUC 比に近似した。実際には、BGP 中の微量成分が artemillin C や drupanin へ代謝される可能性や、成分単独よりも混合物としての BGP を摂取した方が各成分の吸収効率が高まる可能性等を考慮する必要はあるが、本研究の結果から、BGP 投与時の血中 drupanin 濃度のおよそ 40~50% は baccharin 由来の drupanin が占めていると思われる。

BGP 投与後の *p*-coumaric acid の吸収においては、ヒトとラットで種差がある可能性が示された (Table 4-1)。*p*-Coumaric acid は、Caco-2 細胞を使用した研究において、頂端側のモノカルボン酸トランスポーター (MCTs) によって細胞内に取り込まれることが報告されている⁸⁹⁾。一方で、artepillin C は、同じモデルを使用した研究において、主に受動拡散により細胞内に取り込まれることが報告

されている⁹⁰⁾。MCTsを含む有機陰イオン輸送体の遺伝子発現プロファイルは、マウス、ラット、およびヒトの腸で異なることが報告されていることから⁹¹⁾、これらの腸管トランスポーターの発現レベルの種間の差異が、トランスポーターを介して膜輸送される桂皮酸誘導体の吸収の種差に関与していると思われる。

差分解析を用いた桂皮酸誘導体由来の血中代謝物の探索において、**artepillin C** および **capillartemisin A** の硫酸抱合体は検出されず、グルクロン酸抱合体が検出された。一方、**Drupanin** はグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体が検出され、**p-coumaric acid** は硫酸抱合体のみが検出された。加えて、これらの桂皮酸誘導体のメチル化も認められた。第3章のBGP投与時のヒトの血中においても、**artepillin C**、**capillartemisin A**、および **drupanin** のグルクロン酸抱合体、**drupanin** および **p-coumaric acid** の硫酸抱合体が検出され、メチル化された桂皮酸誘導体もいくつか検出されたことから、BGPに含まれる桂皮酸誘導体の抱合代謝のパターンはヒトとラットで類似していると思われる。また、**artepillin C** の主要な抱合代謝経路がグルクロン酸抱合体であることもヒトとラットで共通していた。一方で、ヒトではグルクロン酸抱合体が **drupanin** の主な抱合代謝物であったが、ラットでは硫酸抱合等のグルクロン酸以外の抱合体に代謝された **drupanin** が50%を占めていた (Fig. 4-1B)。一般的にUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGTs) の基質はスルホトランスフェラーゼ (SULTs) と競合するとされるが⁹²⁾、化合物に対する親和性は動物種によって異なり、特に定義されていない。例えば、フラボノイドの一つである **genistein** はグルクロン酸抱合がヒトの主要な抱合代謝経路であり、硫酸抱合の割合はラットやサルよりも低いことが報告されている⁹³⁾。さらに、**genistein** グルクロン酸抱合体のエストロゲン受容体に対する親和性は **genistein** 硫酸抱合体よりも高いことが報告されている⁹⁴⁾。プレニル化した桂皮酸誘導体の抱合代謝物の活性については報告がなく、さらなる研究が必要であるが、ヒトと動物のBGP成分の吸収性や代謝プロファイルを比較することで、ヒトと動物におけるBGPの有効性について、その外挿を理解するための重要な情報が得られると考えられる。

本試験で明らかとなった、BGPに特徴的な桂皮酸誘導体の水酸化やエステル加水分解、および第II相抱合代謝を含む代謝経路 (Fig. 4-3) は、BGPだけでなく類似した桂皮酸誘導体やプレニル化合物を含む、植物や生薬、漢方等の天然物の吸収・代謝を理解する上でも有用な知見となり、それらの有効成分や有効性メカニズム解明にもつながると考えられる。

Table 4-1. C_{\max} and AUC of cinnamic acid derivatives in deconjugated plasma after Brazilian green propolis (BGP) ingestion in rats and humans.

Components	Rats ^a			Humans ^b		
	Dose ^c (mg/kg)	C_{\max} (μM)	AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)	Dose ^d (mg)	C_{\max} (μM)	AUC ($\mu\text{M}\cdot\text{h}$)
artepillin C	32.7	2.64 \pm 1.37	7.59 \pm 3.64	39.2	1.25 \pm 0.52	5.58 \pm 2.48
drupanin	6.2	16.30 \pm 3.62	31.72 \pm 6.88	7.4	2.89 \pm 0.71	8.53 \pm 2.01
baccharin	9.4	n.d.	n.d.	11.2	n.d.	n.d.
<i>p</i> -coumaric acid	5.5	27.88 \pm 4.58	33.94 \pm 12.79	6.6	0.13 \pm 0.04	0.29 \pm 0.12

a: Values are means \pm SD ($n = 4$). C_{\max} , maximum plasma concentration; AUC, area under the curve (0–24 h); n.d., not detected.

b: The data are reported in previous study (Chapter 3).

c: Equivalent to the BGP powder content of 300 mg/kg used in this study.

d: equivalent to the 360 mg BGP powder content used in a previous clinical study (Chapter 3).

Table 4-2. List of plasma metabolites after ingestion of cinnamic acid derivatives in rats.

Ingested compound (formula)	Detected mass	RT (min)	Putative formula	Transformation	Identified metabolite	Detect peak area				Ratio	<i>p</i> -values
						Pre	CV (%)	30 min	CV (%)		
artepillin C (C ₁₉ H ₂₄ O ₃)	300.1725	17.7	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	-	artepillin C *·§	1.7 × 10 ⁵	4.9	5.0 × 10 ⁷	48.3	301	<.00001
	476.2048	13.1	C ₂₅ H ₃₂ O ₉	glucuronidation	artepillin C-4- <i>O</i> -β-D-glucuronide *·§	1.8 × 10 ⁴	6.1	1.5 × 10 ⁷	78.5	812	<.00001
	316.1673	14.6	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	hydroxylation	capillartemis A *·§	2.2 × 10 ⁵	15.4	3.2 × 10 ⁷	57.0	147	<.0001
	316.1673	15.1	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	hydroxylation	capillartemis B	2.6 × 10 ⁴	38.4	2.0 × 10 ⁷	58.8	752	<.00001
	492.1998	11.4	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₀	hydroxylation, glucuronidation	capillartemis A (or B) glucuronide **·§	1.8 × 10 ⁴	8.2	5.2 × 10 ⁶	92.9	285	<.00001
	492.1999	11.7	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₀	hydroxylation, glucuronidation	capillartemis A (or B) glucuronide **·§	2.0 × 10 ⁴	10.2	3.2 × 10 ⁶	96.3	158	<.00001
	490.2205	15.7	C ₂₆ H ₃₄ O ₉	methylation, glucuronidation		2.1 × 10 ⁴	5.6	3.1 × 10 ⁶	62.5	150	<.00001
drupanin (C ₁₄ H ₁₆ O ₃)	232.1096	14.4	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	-	drupanin *·§	2.1 × 10 ⁵	4.8	1.6 × 10 ⁸	62.6	755	<.00001
	312.0662	12.0	C ₁₄ H ₁₆ O ₆ S	sulfation	drupanin sulfate **·§	4.1 × 10 ⁴	2.6	7.4 × 10 ⁸	22.2	17828	<.00001
	408.1413	11.1	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	glucuronidation	drupanin-4- <i>O</i> -β-D-glucuronide *·§	3.4 × 10 ⁴	4.2	4.1 × 10 ⁷	29.3	1204	<.00001
	246.1252	17.0	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	methylation	methyl drupanin §	1.7 × 10 ⁵	1.7	3.7 × 10 ⁷	32.0	214	<.00001
	326.0817	14.4	C ₁₅ H ₁₈ O ₆ S	methylation, sulfation		7.8 × 10 ⁴	18.2	9.3 × 10 ⁷	8.6	1199	<.00001
	422.1571	13.3	C ₂₁ H ₂₆ O ₉	methylation, glucuronidation		3.5 × 10 ⁴	3.4	2.2 × 10 ⁷	32.8	629	<.00001
	314.0818	12.0	C ₁₄ H ₁₈ O ₆ S	reduction, sulfation		3.9 × 10 ⁴	2.6	1.6 × 10 ⁷	25.3	405	<.00001
	410.1569	11.4	C ₂₀ H ₂₆ O ₉	reduction, glucuronidation		3.2 × 10 ⁴	1.6	1.8 × 10 ⁶	13.5	57	<.00001
	248.1046	13.9	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	hydroxylation	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid *	3.2 × 10 ⁴	3.8	2.7 × 10 ⁶	36.2	85	<.00001
	328.0610	9.5	C ₁₄ H ₁₆ O ₇ S	hydroxylation, sulfation	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid sulfate **	7.7 × 10 ⁴	8.2	1.5 × 10 ⁷	14.7	194	<.00001
	328.0610	12.7	C ₁₄ H ₁₆ O ₇ S	hydroxylation, sulfation	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid sulfate **	4.2 × 10 ⁴	4.2	8.6 × 10 ⁶	35.7	206	<.00001
	286.0505	11.4	C ₁₂ H ₁₄ O ₆ S			4.1 × 10 ⁴	4.8	4.2 × 10 ⁷	30.7	1033	<.00001
300.0661	11.6	C ₁₃ H ₁₆ O ₆ S			3.8 × 10 ⁴	2.9	1.1 × 10 ⁷	26.5	294	<.00001	

	232.1097	14.3	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	hydrolyzation	drupanin * [§]	1.6 × 10 ⁵	30.2	1.8 × 10 ⁸	60.5	1165	<.00001
	312.0664	12.0	C ₁₄ H ₁₆ O ₆ S	hydrolyzation, sulfation	drupanin sulfate ** [§]	2.9 × 10 ⁴	4.4	5.4 × 10 ⁸	38.6	18808	<.00001
	408.1416	11.1	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	hydrolyzation, glucuronidation	drupanin-4- <i>O</i> -β-D-glucuronide * [§]	1.0 × 10 ⁵	3.4	5.2 × 10 ⁷	49.6	510	<.00001
	246.1255	17.0	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	hydrolyzation, methylation	methyl drupanin [§]	1.4 × 10 ⁵	3.9	2.3 × 10 ⁷	78.4	166	<.00001
	326.0819	14.4	C ₁₅ H ₁₈ O ₆ S	hydrolyzation, methylation, sulfation		4.5 × 10 ⁴	19.1	4.1 × 10 ⁷	35.9	911	<.00001
	422.1575	13.3	C ₂₁ H ₂₆ O ₉	hydrolyzation, methylation, glucuronidation		1.2 × 10 ⁵	5.8	1.9 × 10 ⁷	53.5	167	<.00001
baccharin	314.0819	12.0	C ₁₄ H ₁₈ O ₆ S	hydrolyzation, reduction, sulfation		2.7 × 10 ⁴	2.4	1.3 × 10 ⁷	19.2	476	<.00001
(C ₂₃ H ₂₄ O ₄)	410.1572	11.4	C ₂₀ H ₂₆ O ₉	hydrolyzation, reduction, glucuronidation		2.2 × 10 ⁴	4.4	1.3 × 10 ⁶	42.4	60	<.00001
	248.1046	13.9	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	hydrolyzation, hydroxylation	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid *	1.1 × 10 ⁵	4.8	9.1 × 10 ⁶	20.1	85	<.00001
	328.0612	9.5	C ₁₄ H ₁₆ O ₇ S	hydrolyzation, hydroxylation, sulfation	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid sulfate **	4.2 × 10 ⁴	11.0	1.0 × 10 ⁷	40.3	250	<.00001
	328.0612	12.7	C ₁₄ H ₁₆ O ₇ S	hydrolyzation, hydroxylation, sulfation	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid sulfate **	4.1 × 10 ⁴	10.2	6.4 × 10 ⁶	41.5	154	<.00001
	286.0507	11.4	C ₁₂ H ₁₄ O ₆ S			2.8 × 10 ⁴	2.7	3.4 × 10 ⁷	20.2	1218	<.00001
	194.0939	11.6	C ₁₁ H ₁₄ O ₃			2.5 × 10 ⁴	5.7	3.7 × 10 ⁶	93.8	145	<.00001
	166.0626	9.0	C ₉ H ₁₀ O ₃	hydrolyzation, hydroxylation	3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid **	1.3 × 10 ⁵	50.5	9.2 × 10 ⁶	70.0	72	<.00001
	164.0471	9.3	C ₉ H ₈ O ₃	-	<i>p</i> -coumaric acid *	5.6 × 10 ⁵	16.7	1.9 × 10 ⁸	45.9	342	<.00001
<i>p</i> -coumaric acid	244.0035	7.5	C ₉ H ₈ O ₆ S	sulfation	<i>p</i> -coumaric acid sulfate ** [§]	2.9 × 10 ⁵	9.9	3.3 × 10 ⁸	31.6	1135	<.00001
(C ₉ H ₈ O ₃)	178.0628	12.4	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	methylation		1.8 × 10 ⁵	9.2	2.8 × 10 ⁷	15.5	158	<.00001
	258.0194	10.7	C ₁₀ H ₁₀ O ₆ S	methylation, sulfation		4.6 × 10 ⁴	8.0	7.7 × 10 ⁶	32.9	166	<.00001

RT, retention time. Hyphens indicate that the compounds were unchanged from the ingested components. *p*-values were obtained by comparing pre dose and after ingestion of each compound. * Identified by comparison with standard compounds. ** Putatively indicated from their exact mass and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) fragments. § Also detected in plasma after BGP ingestion in the previous clinical trial (Chapter 3).

Table 4-3. Amounts and yields of excretion in deconjugated urine for 24 h after ingestion of cinnamic acid derivatives in rats.

Ingestion	Detected components							
	artepillin C	drupanin	baccharin	<i>p</i> -coumaric acid	capillartemisin A	3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid		
artepillin C	(nmol/d)	171.1 ± 47.2	n.d.	n.d.	n.d.	413.3 ± 162.9		n.d.
	(%) ^a	0.68 ± 0.19	-	-	-	1.65	0.65	-
drupanin	(nmol/d)	n.d.	1941.7 ± 121.0	n.d.	n.d.	n.d.		47.1 ± 13.4
	(%) ^a	-	29.9 ± 1.9	-	-	-		0.72 ± 0.21
baccharin	(nmol/d)	n.d.	1487.3 ± 234.1	n.d.	n.d.	n.d.		36.2 ± 7.2
	(%) ^a	-	22.5 ± 3.5	-	-	-		0.55 ± 0.11
<i>p</i> -coumaric acid	(nmol/d)	n.d.	n.d.	n.d.	7208.5 ± 811.4		n.d.	n.d.
	(%) ^a	-	-	-	86.8 ± 9.8		-	-

Values are presented as the mean ± SD ($n = 4$). *a*, Percentage of excretion amount and ingestion (mol/mol); n.d., not detected. * $p < 0.05$.

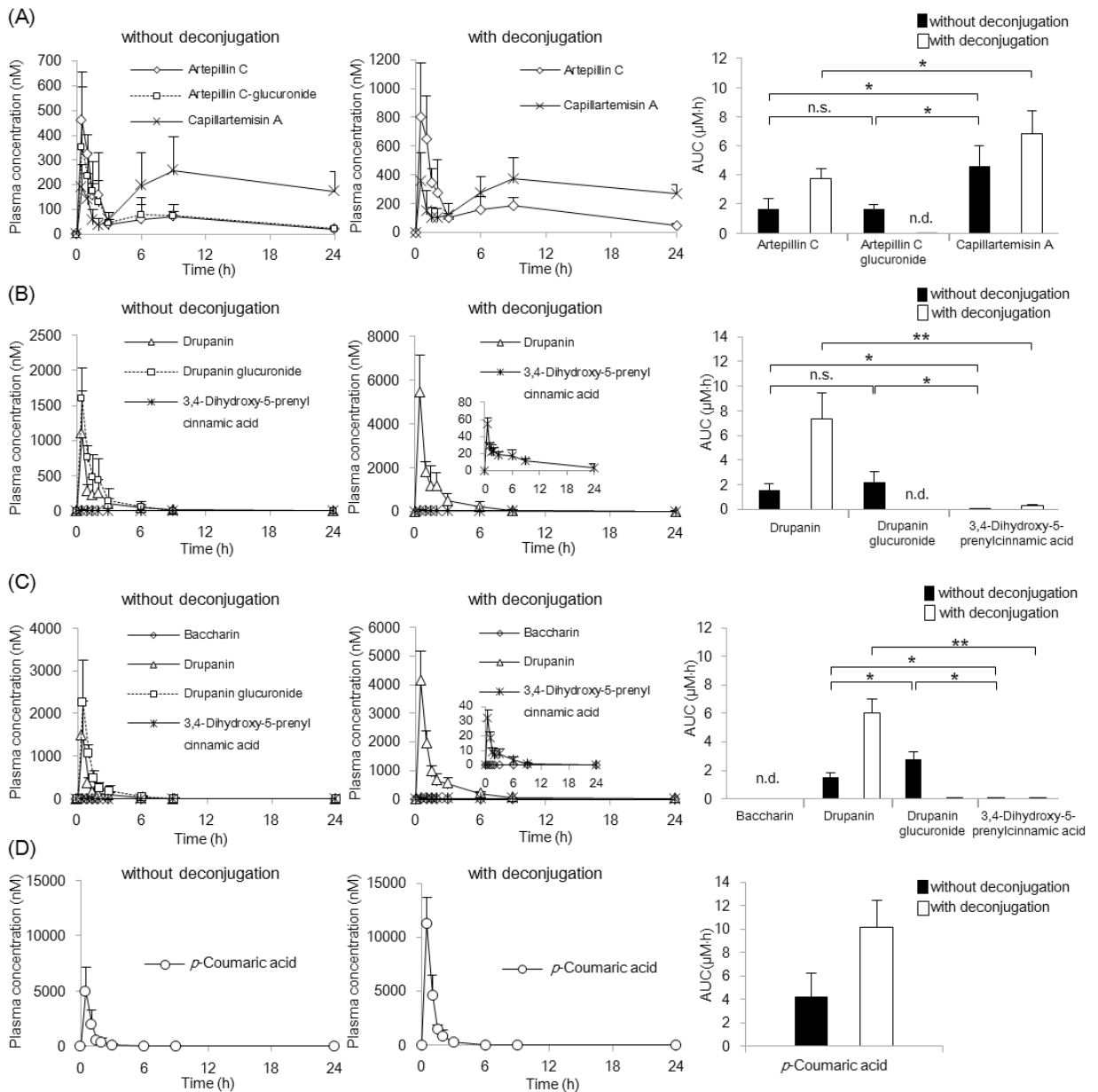


Figure 4-1. Plasma concentration time and area under the curve (AUC) of cinnamic acid derivative metabolites in rats (mean \pm SD; $n = 4$) within 0 h–24 h after ingestion of (A) artepillin C, (B) drupanin, (C) baccharin, (D) or *p*-coumaric acid. The plasma concentrations were analyzed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with and without deconjugation. The AUC was calculated according to the trapezoidal rule. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. n.d., not detected. n.s., not significant.

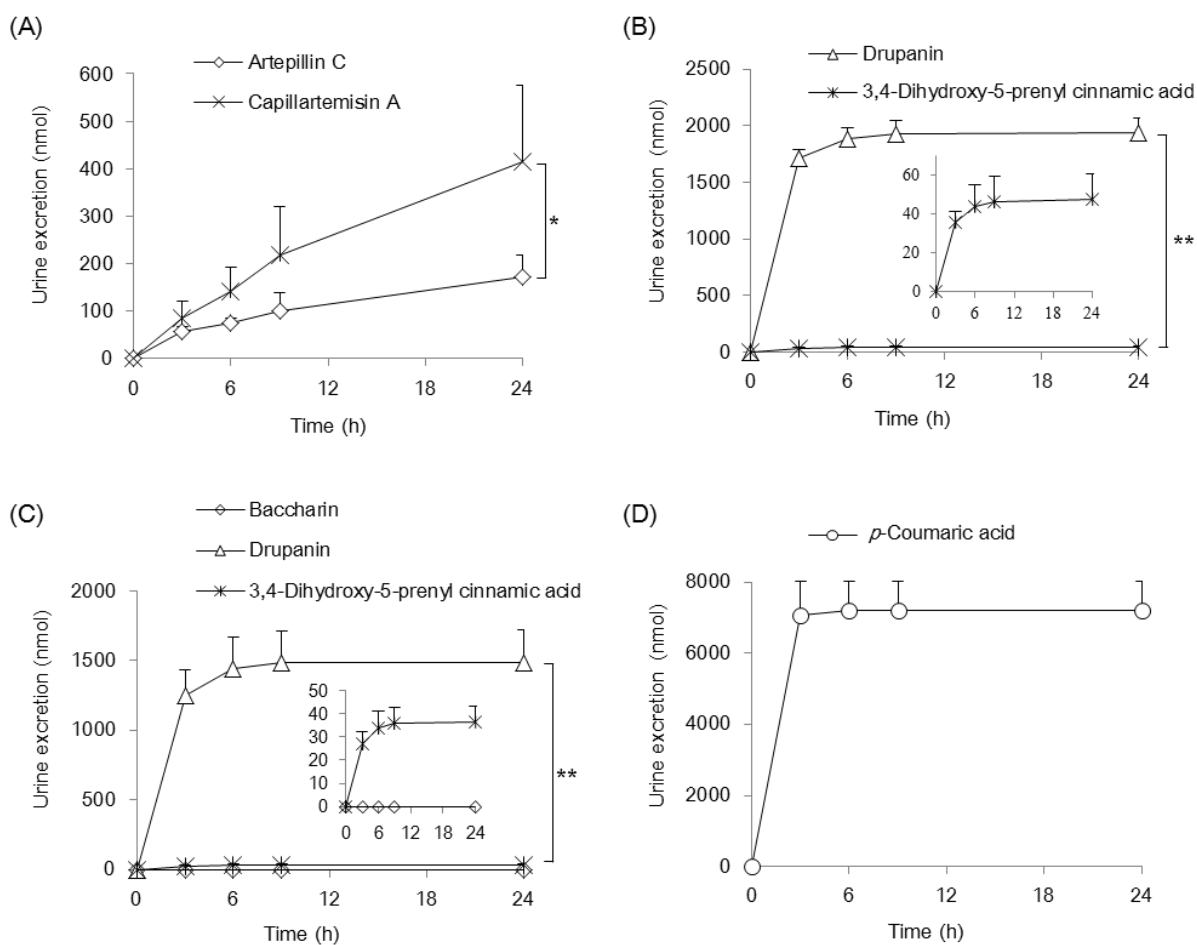


Figure 4-2. Total amount of urine excreted cinnamic acid derivatives in rats (mean \pm SD; $n = 4$) within 0 h–24 h after ingestion of (A) artepillin C, (B) drupanin, (C) baccharin, (D) or *p*-coumaric acid. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

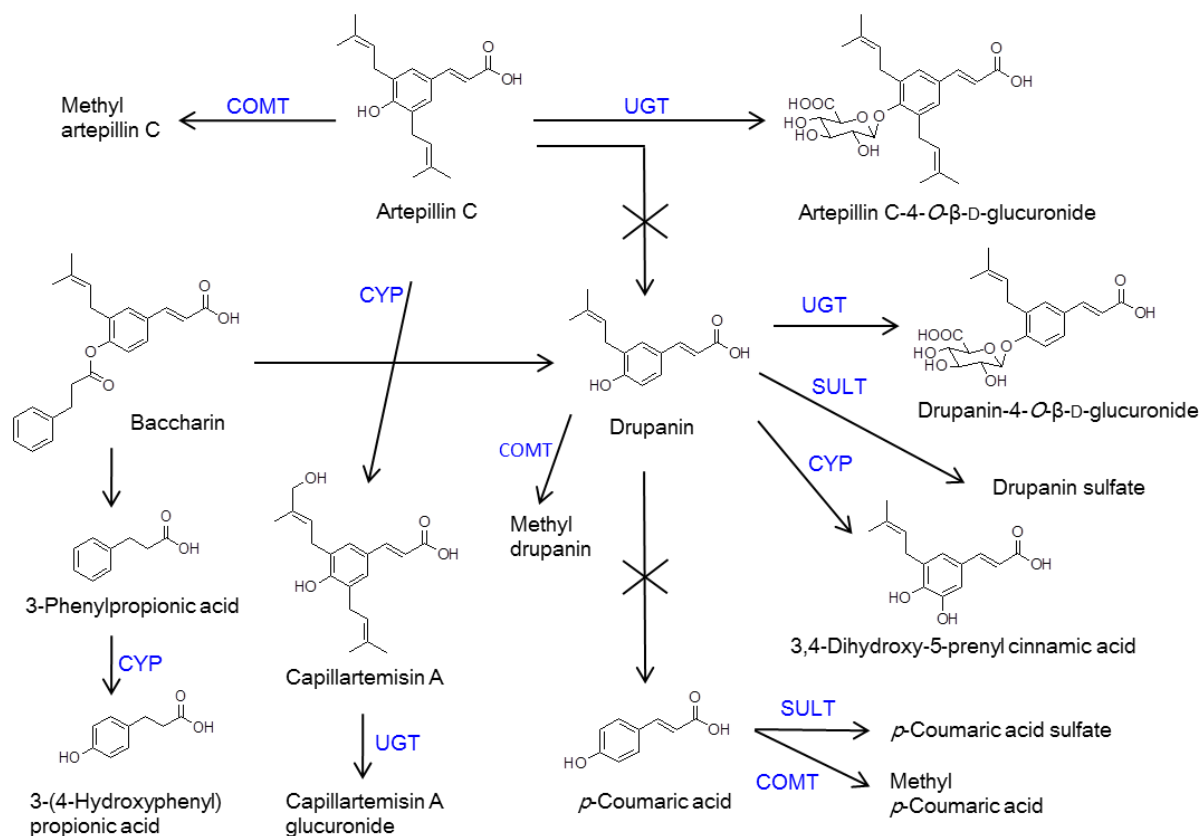


Figure 4-3. Proposed metabolic pathways of major cinnamic acid derivatives of Brazilian green propolis (BGP) in rats. The metabolic pathways found are indicated with arrows with the corresponding metabolic enzymes. The cross marked metabolic pathway was not found in this study. COMT, catechol-*O*-methyltransferase; CYP, cytochrome P450; SULT, sulfotransferase; UGT, UDP-glucuronosyltransferase.

第5章 結論

本研究では、ブラジル産グリーンプロポリス (BGP) に含まれる、桂皮酸誘導体およびフラボノイドの吸収・代謝を明らかにする目的で、BGP もしくは成分単独投与後の血漿中と尿中代謝物を解析した。

第3章で述べたヒト試験において、BGP に含まれる主要な 14 成分中 12 成分 (8 つの桂皮酸誘導体と 4 つのフラボノイド) が、BGP 投与後に血中へ吸収されることを明らかにすることができた。BGP 投与後における複数の BGP 成分の吸収に関するヒトでの報告は、知る限りにおいて初めてである。日常で摂取可能な用量の BGP をヒトへ投与した後の血漿中で、最も多く検出された BGP 成分は drupanin であり、脱抱合処理した血漿において、その C_{max} は $2.9 \mu\text{M}$ に達することが示された。BGP 中に最も多く含まれる桂皮酸誘導体である artepillin C の含有率 (10.9%) と比較すると、drupanin の含有率は 2.06% と約 1/5 程度であるのに対し、血漿における drupanin の C_{max} は、artepillin C の C_{max} の約 2.3 倍高値であった。このことから、artepillin C よりも drupanin の方が生体利用性が高く、BGP の有効性に対する寄与が大きい可能性が考えられる。今回ヒトにて確認できた血中成分濃度を元に、日常で摂取可能な用量の BGP 摂取により、生体内で到達し得る drupanin 濃度での機能性評価を行うことが、BGP の有効性メカニズム解明に重要であるといえる。また、脱抱合未処理の血漿中では artepillin C および drupanin は 4 位の水酸基がグルクロン酸にて抱合された artepillin C-4-O- β -D-glucuronide および drupanin-4-O- β -D-glucuronide にそれぞれ代謝されることを見出し、体内に吸収された artepillin C および drupanin の 80~90% がこのグルクロン酸抱合体へと代謝されることを明らかにした。体内に吸収された成分がどのように機能を発揮するかを明らかにするためには、実際に血漿中に存在する代謝物の構造を明確にすることが重要であり、ヒトにおける主要な代謝物の構造を解明できたことは、BGP の有効性メカニズム解明に向けた重要な成果と言える。一方で、クロメン骨格を有する culifolin や 2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid の血中濃度は、脱抱合処理の有無によって変化しなかったことから、これらは抱合代謝されることなしに血中に取り込まれることが示唆された。一般的に、抱合代謝は化合物の様々な活性を減弱することが知られている。前述の artepillin C の場合、脱抱合未処理の血漿における artepillin C アグリコン (抱合されることなしに取り込まれた artepillin C) の AUC は $439 \pm 284 \text{ nM} \cdot \text{h}$ であり、抱合体の AUC の 1/10 以下であったのに対し、culifolin および 2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid の AUC は、それぞれ 1327 ± 344 および $1138 \pm 383 \text{ nM} \cdot \text{h}$ であったことから、BGP の有効性メカニズム解明のためには、血漿中濃度が最も高かった drupanin と同様に未代謝物としての吸収性が

高い **culifolin** および **2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid** の機能性評価を進めることも重要だと思われる。本研究で明らかにした、実際にヒトが日常レベルで摂取可能な用量の **BGP** を摂取した際に、各 **BGP** 成分がどの程度吸収されるかという情報は、**BGP** の有効性に対する各成分の生体内での寄与を推察する上で重要な情報である。また、成分の機能性評価を目的とした *in vitro* 試験においても、評価濃度設定や評価対象化合物の検討に本結果は活用できると思われる。

ヒト試験より **BGP** の構成成分量と吸収量に相関がみられないことが明らかになったことから、第 4 章に述べた通りラットを用いて単一成分と **BGP** 投与時の各成分の吸収性と代謝物の比較を実施した。その結果、**BGP** の主要な桂皮酸誘導体は第 II 相代謝だけでなく、エステル加水分解や水酸化代謝を受けることが明らかとなった。**BGP** 中の含有量が最も多い桂皮酸誘導体である **artepillin C** を単一成分としてラットに投与したところ、グルクロン酸抱合体に加え、**capillartemisin A** (水酸化代謝物として) が代謝物として血漿中および尿中で検出され、その **AUC** や尿排泄量は投与化合物である **artepillin C** よりも有意に高値であった。このことは、**artepillin C** の **capillartemisin A** への水酸化代謝の占める割合が **artepillin C** の抱合代謝より大きいことを示しており、ラットにおいては **BGP** の有効性に対する **capillartemisin A** の寄与が大きい可能性を考慮に入れる必要があることを示している。また、**artepillin C** から代謝された **capillartemisin A** の経時的な血中濃度変化は、胆汁酸へと排泄され腸肝循環する化合物の特徴を示した。腸肝循環する化合物は体内の滞留時間が長くなり、反復投与により血中濃度が高まることが予測される⁹⁵⁾。そのため、反復投与により血中濃度が一定まで高まることで、**BGP** の有効性に対する寄与も大きくなる可能性も考えられ、反復投与時のデータの取得や、胆汁酸中代謝物の分析も進めることが、今後必要であると考えている。**BGP** 中の含有量が 2 番目に多い桂皮酸誘導体である **baccharin** の場合、単一成分としてラットに投与した後、どの時点の血漿および尿サンプルにおいても検出されず、代わりに、**drupanin** 単独投与時と共通した 12 代謝物と **3-phenylpropionic acid** の水酸化代謝物と思われる **3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid** が血漿で検出された。このことから、**baccharin** は吸収過程において **drupanin** と **3-phenylpropionic acid** に加水分解され、体内へ吸収されることが明らかとなった。ヒトに **BGP** を投与した際にも、**baccharin** は血漿中で検出されなかったことから、**baccharin** はヒトにおいても **drupanin** と **3-phenylpropionic acid** へ加水分解された後、体内へ吸収されていると考えられる。**Baccharin** 投与時に検出された **3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid** には、抗腫瘍や抗炎症、抗酸化、神経保護作用などの有効性が報告されており⁸⁶⁻⁸⁸⁾、**BGP** に含まれていない成分が代謝により生体内で生じ、**BGP** の有効性に寄与する可能性があることは興味深い。また、この **baccharin** から **drupanin** への加水分解が、**BGP**

摂取後の血中 drupanin 濃度が、artepillin C より高くなるというヒトとラットで共通して認められた特徴の、一つの要因であると思われる。加えて、単一成分として drupanin および baccharin を投与した際に、血漿中で検出された drupanin の AUC はそれぞれ 7.3、および 6.0 $\mu\text{M} \cdot \text{h}$ であり、その合計は 13.3 $\mu\text{M} \cdot \text{h}$ であったのに対し、BGP を投与した場合における drupanin の AUC は 31.7 $\mu\text{M} \cdot \text{h}$ と、混合物として投与した場合の方が drupanin の AUC は高値となった。これは上記のような他の BGP 成分から drupanin への異化代謝に加え、複数成分が混合していることで成分の溶解性が高まり、吸収性が高まった可能性が考えられ、単一成分と混合物を投与した際の吸収・代謝を比較することの重要性を示していると思われる。

一方、ヒトとラットでは、drupanin の抱合代謝物の割合が異なることが示された。ヒトでは、drupanin はグルクロン酸抱合が優先して行われるのに対し、ラットではグルクロン酸抱合体以外の抱合体へ代謝された割合が高く、主に硫酸抱合が優先して行われることが推察された。この結果は、動物とヒトとの外挿性を理解する上で重要な情報であると考えられる。フラボノイドでは抱合体の種類と結合位置により異なる活性強度を示す例が知られており⁹⁴⁾、作用機序や体内分布の一部には、体内での脱抱合反応の影響が考えられている⁷⁵⁾。本研究で BGP 成分の吸収性と、それぞれの成分における代謝物の構造を解明できたことで、実際に体内に存在する BGP 成分の抱合代謝物の生理活性評価や、BGP 成分の組織移行性等の検証が大きく進展することが期待でき、さらには、BGP の有効性に対する各成分の寄与や、ヒトと動物の外挿性、BGP の有効用量の解明につながると考えられる。

日本の高齢化社会の進行に伴う医療費の増大や、治療薬の開発されていない新型コロナウイルス感染症の蔓延等の社会情勢を背景に、それらの課題にアプローチできる BGP の重要性は、今後ますます大きくなると考えられる。しかし、BGP は天然物であり、採取する季節や年、保管条件や経年による劣化で品質が変化する^{96,97)}。そのため、期待される有効性を担保するための品質規格を設ける必要があるが、有効性メカニズムや有効成分について不明な点が多く、artepillin C 等の主要成分量による品質規格が行われているのが実際である。また、有効性メカニズムや有効成分の解明を目的とした、BGP 成分の機能性に関する研究においても、吸収・代謝による生体利用性や構造変化を考慮しない機能性研究がほとんどであり、研究が進んでいる artepillin C の機能性においても、アグリコンでかつ生体内では到達し得ないと思われる高濃度での評価が多い。本研究で、ヒトおよびラットから得られた BGP 成分、特に桂皮酸誘導体の吸収・代謝に関する知見は、BGP 中で含有量の多い artepillin C や baccharin よりも、drupanin や

culifolin、2,2-dimethylchromene-6-propenoic acid、capillartemisin Aの方が生体利用性が高く、BGPの有効性に対する寄与が大きい可能性を示唆しており、含有量だけでなく吸収・代謝を踏まえた上で、それぞれの成分の機能性評価を実施していくことの重要性を示していると考えられる。BGP成分およびその代謝物が、生体内で発揮し得る機能性の評価ができれば、BGPの有効性メカニズムや有効成分の解明、BGPに期待される有効性を担保する品質規格の実現につながるものと考えられる。また、それらの実現により、BGPに対する信頼性向上にもつながり、社会問題となっている高齢化社会の医療費の増大や、新型ウイルス感染症の治療や予防への更なる貢献につながることを期待される。

加えて、本研究の結果は、BGPだけでなく桂皮酸誘導体や類似したプレニル化合物を含む植物や生薬、漢方等の天然物の吸収・代謝を理解する上で有用な情報を提供するものとなった。また、複数成分が含まれる食品素材の機能性解明において、単一成分に対してのみならず、複雑形である実際の素材を用いた吸収・代謝試験を行うことの重要性が示すことができた。本研究で実施したように、食品成分の生体利用性や代謝による構造変化と併せて、ヒト-動物間や、混合物・単一成分投与時での吸収性・代謝性の違いを検証することで、実際にヒトがその食品を摂取した際に得られる健康利益の正しい理解につながり、今後の食品科学分野の発展と、食品の機能性が人々の健康寿命延伸に対してどのように貢献するかを理解につながることを期待される。

第2章でも述べたように、プロポリスには本研究で対象としたBGP以外にも、様々な植物を起源とするプロポリスが世界に存在し、含有している成分の特徴も様々である。これらのプロポリスにも抗糖化や紫外線からの皮膚の保護、歯周病予防、シクロオキシゲナーゼ2 (COX2) や α -グルコシダーゼの阻害活性等、成分特徴を反映していると思われる有効性が報告されている¹⁹⁻²²⁾。引き続き、BGPだけでなく、各国のプロポリスについても成分の吸収・代謝を明らかにし、蜂産品を通して人々の健康に貢献できるよう努めたい。

引用文献

1. Ghisalberti, E. L. Propolis: A Review. *Bee World*, **1979**, *60* (2), 59–84.
2. Bankova, V. S.; de Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **2000**, *31*(1), 3–15.
3. Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.*, **1998**, *36*(4), 347–363.
4. Ramos, A. F. N.; Miranda, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, **2007**, *13*(4), 697–710.
5. Fokt, H.; Pereira, A.; Ferreira, A. M.; Cunha, A.; Aguiar, C. A. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microbial. Biotechnol.*, **2010**, *1*, 481–493.
6. Mateescu, C. 薬剤としてのプロポリス. *ミツバチ科学*, **1999**, *20*(2), 53–63.
7. 松野哲也. プロポリスに含まれる生理活性物質-抗ガン物質の探索を中心に-. *ミツバチ科学*, **1992**, *13*(2), 49–54.
8. Huang, S.; Zhang, C. P.; Wang, K.; Li, G. Q.; Hu, F. L. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, **2014**, *19*(12), 19610–19632.
9. Marinescu, I. and Tamas, M. Poplar buds—a source of propolis. *Apiacta*, **1980**, *15*, 121–126.
10. Gatea, F.; Matei, A. O.; Teodor, E. D.; Radu, G. L. Antioxidant properties and polyphenols composition of some Romanian propolis samples. *Rev. Roum. Chim.*, **2015**, *60*(1), 65–74.
11. Popova, M.; Giannopoulou, E.; Skalicka-Woźniak, K.; Graikou, K.; Widelski, J.; Bankova, V.; Kalofonos, H.; Sivolapenko, G.; Gawel-Bęben, K.; Antosiewicz, B.; *et al.*, Characterization and biological evaluation of propolis from Poland. *Molecules*, **2017**, *22*(7), 1159.
12. Kumazawa, S.; Nakamura, J.; Murase, M.; Miyagawa, M.; Ahn, M. R.; Fukumoto, S. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften*, **2008**, *95*(8), 781–786.
13. Inui, S.; Hosoya, T.; Kumazawa, S. Hawaiian propolis: comparative analysis and botanical origin. *Nat. Prod. Commun.*, **2014**, *9*(2), 165–166.
14. Chen, C. N.; Wu, C. L.; Shy, H. S.; Lin, J. K. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*(4), 503–506.
15. Duke, C. C.; Tran, V. H.; Duke, R. K.; Abu-Mellal, A.; Plunkett, G. T.; King, D. I.; Hamid, K.; Wilson, K. L.; Barrett, R. L.; Bruhl, J. J. A sedge plant as the source of Kangaroo Island propolis rich in prenylated *p*-coumarate ester and stilbenes. *Phytochemistry*, **2017**, *134*, 87–97.

16. Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*(9), 2502–2506.
17. Tani, H.; Hikami, S.; Takahashi, S.; Kimura, Y.; Matsuura, N.; Nakamura, T.; Yamaga, M.; Koshino, H. Isolation, identification, and synthesis of a new prenylated cinnamic acid derivative from Brazilian green propolis and simultaneous quantification of bioactive components by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **2019**, *67*(44), 12303–12312.
18. Mitsui, T.; Hotta, S.; Tazawa, S.; Arai, Y.; Kato, K.; Ichihara, K. Chemical constituents of Brazilian propolis from the state of Bahia and their growth inhibitory activities against cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2018**, *82*(3), 417–421.
19. Bolfa, P.; Vidrighinescu, R.; Petruta, A.; Dezmirean, D.; Stan, L.; Vlase, L.; Damian, G.; Catoi, C.; Filip, A.; Clichici, S. Photoprotective effects of Romanian propolis on skin of mice exposed to UVB irradiation. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, *62*, 329–342.
20. Piekarz, T.; Mertas, A.; Wiatrak, K.; Rój, R.; Kownacki, P.; Śmieszek-Wilczewska, J.; Kopczyńska, E.; Wrzoł, M.; Cisowska, M.; Szliszka, E.; *et al.*, The influence of toothpaste containing Australian *Melaleuca alternifolia* oil and ethanolic extract of Polish propolis on oral hygiene and microbiome in patients requiring conservative procedures. *Molecules*, **2017**, *22*(11), 1957.
21. Shahinozzaman, M.; Taira, N.; Ishii, T.; Halim, M. A.; Hossain, M. A.; Tawata, S. Anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-Alzheimer's effects of prenylated flavonoids from Okinawa propolis: An investigation by experimental and computational studies. *Molecules*, **2018**, *23*(10), 2479.
22. de Almeida Xavier, J.; Valentim, I. B.; Camatari, F. O. S.; de Almeida, A. M. M.; Goulart, H. F.; de Souza Ferro, J. N.; de Oliveira Barreto, E.; Cavalcanti, B. C.; Bottoli, C. B. G.; Goulart, M. O. F. Polyphenol profile by UHPLC-MS/MS, anti-glycation, antioxidant and cytotoxic activities of several samples of propolis from the northeastern semi-arid region of Brazil. *Pharm. Biol.*, **2017**, *55*(1), 1884–1893.
23. Imai, H.; Era, S.; Hayashi, T.; Negawa, T.; Matsuyama, Y.; Okihara, K.; Nakatsuma, A.; Yamada, H. Effect of propolis supplementation on the redox state of human serum albumin during high-intensity kendo training. *Adv. Exerc. Sports Physiol.*, **2005**, *11*(3), 109–113.
24. Ohkuma, A.; Kanno, T.; Asama, T.; Doi-Takaki, S.; Kawaguchi, M.; Tatefuji, T.; Hashimoto, K. Effect of dietary supplement containing Brazilian propolis on the common cold. *Pharmacometrics*, **2010**, *79*(3-4), 43–48.

25. Takeuchi, H.; Kitano, H.; Okihara, K.; Hashimoto, K.; Enomoto, T. Efficacy and safety of propolis supplement on management of Japanese cedar pollinosis: A randomized double-blind, placebo-controlled trial in 2005. *Pharmacometrics*, **2009**, *75*(5-6), 103–108.
26. Koya-Miyata, S.; Arai, N.; Mizote, A.; Taniguchi, Y.; Ushio, S.; Iwaki, K.; Fukuda, S. Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **2009**, *32*(12), 2022–2028.
27. Asama, T.; Hiraoka, T.; Ohkuma, A.; Okumura, N.; Yamaki, A.; Urakami, K. Cognitive improvement and safety assessment of a dietary supplement containing propolis extract in elderly Japanese: A placebo-controlled, randomized, parallel-group, double-blind human clinical study. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2021**, *2021*, 6664217.
28. Zhu, A.; Wu, Z.; Zhong, X.; Ni, J.; Li, Y.; Meng, J.; Du, C.; Zhao, X.; Nakanishi, H.; Wu, S. Brazilian green propolis prevents cognitive decline into mild cognitive impairment in elderly people living at high altitude. *J Alzheimers Dis.*, **2018**, *63*(2), 551–560.
29. Nishizawa, M. Recent advances in dementia research. *Jap. J. Rehabil. Med.*, **2016**, *53*(2), 152–157.
30. Ninomiya, T. Study on estimation of the future of the elderly population with dementia in Japan, Health and Labor Science Research Grants, Special Health and Labor Sciences Research Project 2014 research report. **2015**.
31. Silveira, M. A. D.; Jong, D. D.; Berretta, A. A.; Galvão, E. B. D. S.; Ribeiro, J. C.; Cerqueira-Silva, T.; Amorim, T. C.; da Conceição, L. F. M. R.; Gomes, M. M. D.; Teixeira, M. B.; *et al.*, Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF[®]) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomed. Pharmacother.*, **2021**, *138*, 111526.
32. Kosari, M.; Nouredini, M.; Khamechi, S. P.; Najafi, A.; Ghaderi, A.; Sehat, M.; Banafshe, H. R. The effect of propolis plus *Hyoscyamus niger* L. methanolic extract on clinical symptoms in patients with acute respiratory syndrome suspected to COVID-19: A clinical trial. *Phytother. Res.*, **2021**, *35*(7), 4000–4006.
33. Beserra, F. P.; Gushiken, L. F. S.; Hussni, M. F.; Ribeiro, V. P.; Bonamin, F.; Jackson, C. J.; Pellizzon, C. H.; Bastos, J. K. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: A review on pharmacological aspects. *Phytother. Res.*, **2020**, *35*(5), 2274–2286.
34. Nishikawa, S.; Hydo, T.; Aoyama, H.; Miyata, R.; Kumazawa, S.; Tsuda, T. Artepillin C, a key component of Brazilian propolis, induces thermogenesis in

- inguinal white adipose tissue of mice through a creatine-metabolism-related thermogenic pathway. *J. Agric. Food Chem.*, **2020**, *68(4)*, 1007–1014.
35. Kano, Y.; Horie, N.; Doi, S.; Aramaki, F.; Maeda, H.; Hiragami, F.; Kawamura, K.; Motoda, H.; Koike, Y.; Akiyama, J.; *et al.*, Artepillin C derived from propolis induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via ERK and p38 MAPK pathways. *Neurochem. Res.*, **2008**, *33(9)*, 1795–1803.
 36. Takahashi, H.; Nguyen, B. C. Q.; Uto, Y.; Shahinozzaman, M.; Tawata, S.; Maruta, H. 1,2,3-Triazolyl esterization of PAK1-blocking propolis ingredients, artepillin C (ARC) and caffeic acid (CA), for boosting their anti-cancer/anti-PAK1 activities along with cell-permeability. *Drug Discov. Ther.*, **2017**, *11(2)*, 104–109.
 37. Berretta, A. A.; Silveira, M. A. D.; Capcha, J. M. C.; Jong, D. D. Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease: Running title: Propolis against SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Biomed. Pharmacother.*, **2020**, *131*, 110622.
 38. Murota, K.; Nakamura, Y.; Uehara, M. Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2018**, *82(4)*, 600–610.
 39. Crozier, A.; Rio, D. D.; Clifford, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol. Aspects Med.*, **2010**, *31(6)*, 446–467.
 40. Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A. 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.*, **2006**, *96(1)*, 107–116.
 41. Hosoda, K.; Furuta, T.; Ishii, K. Simultaneous determination of glucuronic acid and sulfuric acid conjugated metabolites of daidzein and genistein in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Analyt. Biomed. Life Sci.*, **2010**, *878(7–8)*, 628–636.
 42. Yuan, J. P.; Wang, J. H.; Liu, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2007**, *51(7)*, 765–781.
 43. Shimizu, K.; Ashida, H.; Matsuura, Y.; Kanazawa, K. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2004**, *424(2)*, 181–188.
 44. Konishi, Y.; Hitomi, Y.; Yoshida, M.; Yoshioka, E. Absorption and bioavailability of artepillin C in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53(26)*, 9928–9933.

45. Nakamura, T.; Murota, K.; Kumamoto, S.; Misumi, K.; Bando, N.; Ikushiro, S.; Takahashi, N.; Sekido, K.; Kato, Y.; *et al.*, Plasma metabolites of dietary flavonoids after combination meal consumption with onion and tofu in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2014**, *58*(2), 310–317.
46. Ikeda, R.; Yanagisawa, M.; Takahashi, N.; Kawada, T.; Kumazawa, S.; Yamaotsu, N.; Nakagome, I.; Hirono, S.; Tsuda, T. Brazilian propolis-derived components inhibit TNF- α -mediated downregulation of adiponectin expression via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Acta*, **2011**, *1810*(7), 695–703.
47. Szliszka, E.; Mertas, A.; Czuba, Z. P.; Król, W. Inhibition of inflammatory response by artemillin C in activated RAW264.7 macrophages. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, **2013**, *2013*, 735176.
48. Paulino, N.; Abreu, S. R. L.; Uto, Y.; Koyama, D.; Nagasawa, H.; Hori, H.; Dirsch, V. M.; Vollmar, A. M.; Scremin, A.; Bretz, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artemillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.*, **2008**, *587*(1-3), 293–301.
49. Nakajima, Y.; Shimazawa, M.; Mishima, S.; Hara, H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci.*, **2007**, *80*(4), 370–377.
50. Seibert, J. B.; Bautista-Silva, J. P.; Amparo, T. R.; Petit, A.; Pervier, P.; Almeida, J. C. D. S.; Azevedo, M. C.; Silveira, B. M.; Brandão, G. C.; de Souza, G. H. B.; *et al.*, Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chem.*, **2019**, *287*, 61–67.
51. Veiga, R. S.; De Mendonça, S.; Mendes, P. B.; Paulino, N.; Mimica, M. J.; Lagareiro Netto, A. A.; Lira, I. S.; López, B. G. C.; Negrão, V.; Marcucci, M. C. Artemillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J. Appl. Microbiol.*, **2017**, *122*(4), 911–920.
52. de Oliveira, P. F.; de Souza Lima, I. M.; de Azevedo Bentes Monteiro Neto, M.; Bastos, J. K.; da Silva Filho, A. A.; Tavares, D. C. Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of artemillin C in V79 cells by the comet and micronucleus assays. *Nutr. Cancer*, **2013**, *65*(7), 1098–1103.
53. Akao, Y.; Maruyama, H.; Matsumoto, K.; Ohguchi, K.; Nishizawa, K.; Sakamoto, T.; Araki, Y.; Mishima, S.; Nozawa, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol. Pharm. Bull.*, **2003**, *26*(7), 1057–1059.

54. Tani, H.; Hasumi, K.; Tatefuji, T.; Hashimoto, K.; Koshino, H.; Takahashi, S. Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18(1)*, 151–157.
55. Nakashima, K.; Murakami, T.; Tanabe, H.; Inoue, M. Identification of a naturally occurring retinoid X receptor agonist from Brazilian green propolis. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1840(10)*, 3034–3041.
56. Zang, T.; Verma, K.; Chen, M.; Jin, Y.; Trippier, P. C.; Penning, T. M. Screening baccharin analogs as selective inhibitors against type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3). *Chem. Biol. Interact.*, **2015**, *234*, 339–348.
57. Kiliç, I.; Yeşiloğlu, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of *p*-coumaric acid. *Spectrochim. Acta, A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2013**, *115*, 719–724.
58. Jaganathan, S. K.; Supriyanto, E.; Mandal, M. Events associated with apoptotic effect of *p*-coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World J. Gastroenterol.*, **2013**, *19(43)*, 7726–7734.
59. Li, H. L.; Li, S. M.; Luo, Y. H.; Xu, W. T.; Zhang, Y.; Zhang, T.; Zhang, D. J.; Jin, C. H. Kaempferide induces G0/G1 phase arrest and apoptosis via ROS-mediated signaling pathways in A549 human lung cancer cells. *Nat. Prod. Commun.*, **2020**, *15(7)*, 1–13.
60. Popova, M.; Trusheva, B.; Khismatullin, R.; Gavrilova, N.; Legotkina, G.; Lyapunov, J.; Bankova, V. The triple botanical origin of Russian propolis from the Perm region, its phenolic content and antimicrobial activity. *Natr. Prod. Commun.*, **2013**, *8(5)*, 617–620.
61. Zainullin, R. A.; Kunakova, R. V.; Gareev, V. F.; Galyautdinov, I. V.; Sadretdinova, Z. R.; Muslimov, Z. S.; Odinkov, V. N. Flavonoids and flavones from Bashkir propolis. *Chem. Natr. Compounds*, **2018**, *54(5)*, 975–977.
62. Kumar, S.; Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*, **2013**, *2013*, 162750.
63. Tsuchiya, I.; Hosoya, T.; Ushida, M.; Kunimasa, K.; Ohta, T.; Kumazawa, S. Nymphaeol-A isolated from Okinawan propolis suppresses angiogenesis and induces caspase-dependent apoptosis via inactivation of survival signals. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, *2013*, 826245.
64. Shahinozzaman, M.; Ishii, T.; Ahmed, S.; Halim, M. A.; Tawata, S. A computational approach to explore and identify potential herbal inhibitors for the p21-activated kinase 1 (PAK1). *Biomol. Struct. Dyn.*, **2020**, *38(12)*, 3514–3526.
65. Natsume, N.; Yonezawa, T.; Saito, Y.; Woo, J. T.; Teruya, T. Prenylflavonoids from

- fruit of *Macaranga tanarius* promote glucose uptake via AMPK activation in L6 myotubes. *J. Nat. Med.*, **2021**, *75(4)*, 813–823.
66. Ikushiro, S.; Nishikawa, M.; Masuyama, Y.; Shouji, T.; Fujii, M.; Hamada, M.; Nakajima, N.; Finel, M.; Yasuda, K.; Kamakura, M.; *et al.*, Biosynthesis of drug glucuronide metabolites in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharm.*, **2016**, *13(7)*, 2274–2282.
 67. Gonthier, M. P.; Verny, M. A.; Besson, C.; Rémésy, C.; Scalbert, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J. Nutr.*, **2003**, *133(6)*, 1853–1859.
 68. Mulder, G. J. Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1992**, *32*, 25–49.
 69. Tukey, R. H.; Strassburg, C. P. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2000**, *40*, 581–616.
 70. Uchihashi, S.; Fukumoto, H.; Onoda, M.; Hayakawa, H.; Ikushiro, S.; Sakaki, T. Metabolism of the c-Fos/activator protein-1 inhibitor T-5224 by multiple human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Drug Metab. Dispos.*, **2011**, *39(5)*, 803–813.
 71. Iwamura, A.; Nakajima, M.; Oda, S.; Yokoi, T. Toxicological potential of acyl glucuronides and its assessment. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2017**, *32(1)*, 2–11.
 72. Mukai, R.; Horikawa, H.; Fujikura, Y.; Kawamura, T.; Nemoto, H.; Nikawa, T.; Terao, J. Prevention of disuse muscle atrophy by dietary ingestion of 8-prenylnaringenin in denervated mice. *PLoS One*, **2012**, *7(9)*, e45048.
 73. Mukai, R.; Fujikura, Y.; Murota, K.; Uehara, M.; Minekawa, S.; Matsui, N.; Kawamura, T.; Nemoto, H.; Terao, J. Prenylation enhances quercetin uptake and reduces efflux in Caco-2 cells and enhances tissue accumulation in mice fed long-term. *J. Nutr.*, **2013**, *143(10)*, 1558–1564.
 74. Erlund, I.; Kosonen, T.; Alfthan, G.; Mäenpää, J.; Perttunen, K.; Kenraali, J.; Parantainen, J.; Aro, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2000**, *56(8)*, 545–553.
 75. Kawai, Y. Understanding metabolic conversions and molecular actions of flavonoids *in vivo*: toward new strategies for effective utilization of natural polyphenols in human health. *J. Med. Invest.*, **2018**, *65(3,4)*, 162–165.
 76. Eseberri, I.; Miranda, J.; Lasa, A.; Mosqueda-Solís, A.; González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Portillo, M. P. Effects of quercetin metabolites on triglyceride metabolism of 3T3-L1 preadipocytes and mature adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20(2)*, 264.

77. Chandra, S.; Roy, A.; Jana, M.; Pahan, K. Cinnamic acid activates PPAR α to stimulate lysosomal biogenesis and lower amyloid plaque pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Dis.*, **2019**, *124*, 379–395.
78. Girsang, E.; Lister, I. N. E.; Ginting, C. N.; Sholihah, I. A.; Raif, M. A.; Kunardi, S.; Million, H.; Widowati, W. Antioxidant and antiaging activity of rutin and caffeic acid. *Pharmaciana*, **2020**, *10(2)*, 147–156.
79. Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A. A.; Khan, G. J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; Modarresi-Ghazani, F.; *et al.*, Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. *Biomed. Pharmacother.*, **2018**, *97*, 67–74.
80. Ruwizhi, N.; Aderibigbe, B. A. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21(16)*, 5712.
81. Rychlicka, M.; Rot, A.; Gliszczyńska, A. Biological properties, health benefits and enzymatic modifications of dietary methoxylated derivatives of cinnamic acid. *Foods*, **2021**, *10(6)*, 1417.
82. Carrão, D. B.; de Albuquerque, N. C. P.; Marques, L. M. M.; Crotti, A. E. M.; Pilon, A. C.; Bolzani, V. D. S.; Berretta, A. A.; de Oliveira, A. R. M. *In vitro* metabolism of artemisin C by rat and human liver microsomes. *Planta Med.*, **2017**, *83(8)*, 737–745.
83. Ma, Y.; Li, P.; Chen, D.; Fang, T.; Li, H.; Su, W. LC/MS/MS quantitation assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma. *Int. J. Pharm.*, **2006**, *307(2)*, 292–299.
84. Wu, W.; Yan, R.; Yao, M.; Zhan, Y.; Wang, Y. Pharmacokinetics of anthraquinones in rat plasma after oral administration of a rhubarb extract. *Biomed. Chromatogr.*, **2014**, *28(4)*, 564–572.
85. Upadhyay, D.; Anandjiwala, S.; Padh, H.; Nivsarkar, M. *In vitro* - *in vivo* metabolism and pharmacokinetics of picroside I and II using LC-ESI-MS method. *Chem. Biol. Interact.*, **2016**, *254*, 83–92.
86. Sova, M.; Saso, L. Natural sources, pharmacokinetics, biological activities and health benefits of hydroxycinnamic acids and their metabolites. *Nutrients*, **2020**, *12(8)*, 2190.
87. Lee, M. K.; Park, E. M.; Bok, S. H.; Jung, U. J.; Kim, J. Y.; Park, Y. B.; Huh, T. L.; Kwon, O. S.; Choi, M. S. Two cinnamate derivatives produce similar alteration in mRNA expression and activity of antioxidant enzymes in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **2003**, *17(5)*, 255–262.
88. Esteban-Fernández, A.; Rendeiro, C.; Spencer, J. P. E.; Gígorro Del Coso, D.;

- González de Llano, M. D.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M. V. Neuroprotective effects of selected microbial-derived phenolic metabolites and aroma compounds from wine in human SH-SY5Y neuroblastoma cells and their putative mechanisms of action. *Front. Nutr.*, **2017**, *4*, 3.
89. Konishi, Y.; Kobayashi, S.; Shimizu, M. Transepithelial transport of *p*-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, *67(11)*, 2317–2324.
90. Konishi, Y. Transepithelial transport of artemillin C in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, *1713(2)*, 138–144.
91. Kim, H. R.; Park, S. W.; Cho, H. J.; Chae, K. A.; Sung, J. M.; Kim, J. S.; Landowski, C. P.; Sun, D.; El-Aty, A. M. A.; Amidon, G. L.; *et al.*, Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans. *Pharmacol. Res.*, **2007**, *56(3)*, 224–236.
92. Viskupičová, J.; Ondrejovič, M.; Šturdik, E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *J. Food Nutr. Res.*, **2008**, *47(4)*, 151–162.
93. Gu, L.; House, S. E.; Prior, R. L.; Fang, N.; Ronis, M. J. J.; Clarkson, T. B.; Wilson, M. E.; Badger, T. M. Metabolic phenotype of isoflavones differ among female rats, pigs, monkeys, and women. *J. Nutr.*, **2006**, *136(5)*, 1215–1221.
94. Kinjo, J.; Tsuchihashi, R.; Morito, K.; Hirose, T.; Aomori, T.; Nagao, T.; Okabe, H.; Nohara, T.; Masamune, Y. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, *27(2)*, 185–188.
95. Roberts, M. S.; Magnusson, B. M.; Burczynski, F. J.; Weiss, M. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.*, **2002**, *41(10)*, 751–790.
96. Teixeira, E. W.; Message, D.; Negri, G.; Salatino, A.; Stringheta, P. C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2010**, *7(3)*, 307–315.
97. Rocha, B. A.; Bueno, P. C. P.; de Oliveira Lima Leite Vaz, M. M.; Nascimento, A. P.; Ferreira, N. U.; de Padua Moreno, G.; Rodrigues, M. R.; de Mello Costa-Machado, A. R.; Barizon, E. A.; Campos, J. C. L.; *et al.*, Evaluation of a propolis water extract using a reliable RP-HPLC methodology and *in vitro* and *in vivo* efficacy and safety characterization. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, *2013*, 670451.

摘要

プロポリスはミツバチ (*Apis mellifera* L.) が様々な植物の新芽や樹皮を採取し作り出す樹脂状の物質で、生産される地域の植生によりその含有成分も様々である。ブラジル産グリーンプロポリス (BGP) はブラジル南東部で生産され、主な起源植物は *Baccharis dracunculifolia* であることが知られており、様々な有効性がヒトや動物で報告されている。BGP には起源植物を由来とする桂皮酸誘導体 (artepillin C、drupanin、baccharin および *p*-coumaric acid) やフラボノイド (kaempferide や 6-methoxykaempferide) が含まれることが知られ、BGP の有効性にこれらの成分が寄与すると期待されている。実際に、いくつかの国と地域で生産されたプロポリスを集め、その含有成分を比較したところ、artepillin C や drupanin、baccharin 等のプレニル化した桂皮酸誘導体は他の産地のプロポリスには含まれておらず、BGP の有効性はこのような成分特徴を反映しているものと思われる。

生体内で発揮される BGP の有効性に対する BGP に特徴的な成分の寄与を理解するためには、BGP 成分の吸収・代謝を理解する必要があるが、BGP 成分の吸収・代謝に関する報告は少ない。そこで、BGP 投与時の、主要な BGP 成分の吸収・代謝をヒトで検証した。その結果、BGP 投与後、12 成分 (8 つの桂皮酸誘導体と 4 つのフラボノイド) の薬物動態プロファイルが明らかになった。脱抱合処理後の血漿で、主な血中代謝物として検出された artepillin C および drupanin の C_{max} はともに 1 μ M を超えており、その内の約 90% がそれぞれ artepillin C-4-*O*- β -D-glucuronide と drupanin-4-*O*- β -D-glucuronide に代謝されることが明らかになった。

上記のヒト試験において、BGP 摂取後に血中に吸収された各桂皮酸誘導体の量が BGP 含有量に比例しないことが明らかになった。これは、各桂皮酸誘導体の体内への吸収速度が異なる可能性、およびいくつかの桂皮酸誘導体が他の化合物に代謝される可能性を示していると考えられる。そこで次に、BGP の主要な桂皮酸誘導体である artepillin C、drupanin、baccharin、および *p*-coumaric acid を単一成分として経口投与した際の代謝経路を、ラットをモデルとして調査することとした。その結果、artepillin C はグルクロン酸抱合体だけでなく、水酸化代謝物 (capillartemis A) に代謝された。Drupanin およびその 3-phenylpropionic acid エステルである baccharin 投与後において、drupanin の硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体、および drupanin の水酸化代謝物 (3,4-dihydroxy-5-prenyl cinnamic acid) が代謝物として共通して検出された。また、*p*-coumaric acid はグルクロン酸抱合体には代謝されずに、主に硫酸抱合体に代謝されることが明らかになった。

本研究により、ヒトおよびラットから得られたBGP成分、特に桂皮酸誘導体の吸収・代謝に関する知見は、BGP中の含有量だけでなく吸収・代謝を踏まえた上で、BGP成分それぞれの機能性評価を実施していくことの重要性を示していると考えられる。本研究でBGP成分の吸収性や代謝物の構造を明らかにできたことで、実際に体内に存在するBGP成分や、その抱合代謝物の生理活性評価、組織への移行性等の検証が大きく進展することが期待でき、BGPの有効性メカニズムや有効成分の解明につながるものと考えられる。

Summary

Propolis is a resinous substance collected by honey bees (*Apis mellifera* L) from leaf buds and cracks in the bark of various plants. The components of propolis vary from the production area because the botanical sources collected by honey bees are different depending on the vegetation of the regions.

Brazilian green propolis (BGP) produced in Southeastern Brazil has been consumed as a supplement and its main botanical source is *Baccharis dracunculifolia*. A multitude of pharmacological activities of BGP has been reported in animals and clinical studies. BGP has chemical compounds from botanical origin that are mainly cinnamic acid derivatives (artepillin C, baccharin, drupanin, and *p*-coumaric acid) and flavonoids (kaempferide and 6-methoxykaempferide). These components are expected to play an important role in the pharmacological activities of BGP. In fact, a comparison of the components in propolis collected from several countries and regions revealed that the prenylated cinnamic acid derivatives are characteristic components of BGP that reflect the effectiveness of BGP.

To understand the contribution of each BGP component to BGP pharmacological activities *in vivo*, it is important to clarify their pharmacokinetics and metabolism. However, there is little known about the pharmacokinetics and metabolism of BGP components after oral administration of BGP. The aim of the first study is to investigate the pharmacokinetics and metabolism of BGP components in humans. After BGP ingestion, the pharmacokinetic profiles of 12 compounds (8 cinnamic acid derivatives and 4 flavonoids) were revealed. The C_{\max} values of artepillin C and drupanin, which were detected mainly in plasma after ingestion of BGP, were over 1 μM , respectively, of which about 90% were found to be the phenolic glucuronide conjugate.

In the human pharmacokinetic study, it was found that the amount of each cinnamic acid derivative absorbed in the blood after BGP ingestion was not proportional to the BGP content. This finding indicated that each of the cinnamic acid derivatives could have a different absorption rate into the body, and/or some could be metabolized to other compounds. Therefore, the following study was performed to investigate the metabolic pathways after oral ingestion of artepillin C, drupanin, baccharin, and *p*-coumaric acid as a single component using rats as the model animal. Artepillin C metabolized to hydroxylated metabolites (capillartemisin A), as well as glucuronide. Drupanin sulfate, glucuronide, and hydroxylated form were detected in plasma both after ingestion of drupanin and its 3-phenylpropionic acid ester (baccharin). *p*-Coumaric acid underwent sulfation, but not glucuronidation.

The findings on the absorption and metabolism of BGP components, especially cinnamic acid derivatives, in humans and rats, suggested the importance of functional evaluation of each BGP component based on not only the content in BGP but also the absorption and metabolism. The achievement in this thesis would contribute to the significant advances in elucidating the pharmacological activity and organ distribution of BGP components and the determination of their metabolites, and would help elucidate the mechanism of BGP efficacy and the active components.

略語表

AUC	Area under the curve	血中濃度-時間曲線下面積
BGP	Brazilian green propolis	ブラジル産グリーンプロポリス
C_{\max}	Maximum plasma concentration	最大血中濃度
PDA	Photodiode array detector	フォトダイオードアレイ検出器
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
LC-MS/MS	Liquid chromatography -tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー タンデム質量分析法
MS	Mass spectrometry	質量分析法
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁気共鳴
SULTs	Sulfotransferase	スルホトランスフェラーゼ
t_{\max}	Time to reach C_{\max}	最高血中濃度到達時間
UGTs	UDP-glucuronosyltransferases	UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography	超高速液体クロマトグラフィー

謝辞

本研究の遂行や論文の作成等、研究活動全般において丁寧なご指導並びに、貴重なご助言頂きました島根大学生物資源科学部の室田佳恵子教授に心から感謝の意を表しますと共に、厚く御礼申し上げます。

副指導教官として、貴重なご助言賜りました島根大学生物資源科学部の川向誠教授、鳥取大学農学部石原亨教授にも深く感謝の意を表します。

また、富山県立大学工学部の生城真一教授、西川美宇助教、深谷圭介助教におきましては、代謝物の合成とその構造決定において多大なるお力添え頂きましたこと、心より感謝申し上げます。

最後に、本研究遂行にあたりご助力頂きました室田研究室の皆様、および社会人博士として挑戦することを後押し頂いた株式会社山田養蜂場みつばち健康科学研究所の皆様にも深く感謝致します。

学位論文の基礎となる投稿論文

基礎となる投稿論文

1. 題目 : Pharmacokinetics and metabolism of cinnamic acid derivatives and flavonoids after oral administration of Brazilian green propolis in humans

著者名 : Yamaga, M., Tani, H., Nishikawa, M., Fukaya, K., Ikushiro, S. and Murota, K.

学術雑誌名 巻・号・頁 : Food & Function 12(6) : 2520-2530.

(DOI: 10.1039/d0fo02541k)

発表年月 : 2021. 3

(第 3 章に記述)

2. 題目 : Metabolic pathways of cinnamic acid derivatives in Brazilian green propolis in rats

著者名 : Yamaga, M., Tani, H. and Murota, K.

学術雑誌名 巻・号・頁 : Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 86(8) : 1075-1084.

(DOI: 10.1093/bbb/zbac076)

発表年月 : 2022. 5

(第 4 章に記述)