

可溶化ヘスペリジンによるリウマチモデルマウスの症状改善作用

米谷俊^{a),b),c)}・川口基一郎^{d)}・熊沢義雄^{e),f)}

a) 近畿大学農学部食品栄養学科

b) 近畿大学アグリ技術革新研究所

c) 近畿大学アンチエイジングセンター

d) いわき明星大学名誉教授

e) 株式会社 Vino Science Japan

f) 北里大学 元教授

Effect of hesperidin solubilized with its glucoside on improvement of rheumatoid arthritis in mice.

Takashi Kometani^{a),b),c)}, Kiichirou Kawaguchi^{d)}, Yoshio Kumazawa^{e),f)}

*a) Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Agriculture, Kindai University, 3327-204
Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

*b) Agricultural Technology and Innovation Research Institute, Kindai University, 3327-204
Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

c) Anti-Aging Center, Kindai University, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka, Osaka 577-8502, Japan

*d) professor emeritus, Iwaki Meisei University, 5-5-1 Iino, Chuo-dai, Iwaki, Fukushima 970-8551,
Japan*

e) Vino Science Japan Co. Ltd., 1-1, Minamiwatadacho, Kawasaki, 210-0855, Japan

*f) Former professor, Kitazato University, 1-15-1, Kitazato, Minami, Sagami, Kanagawa
252-0373, Japan*

Synopsis

Since the functionalities of foods were first advocated from Japan in the 1980s, enormous research has been carried out for about 40 years. As a result, a great deal of research results have been obtained, and many have been put into practical use by utilizing the system of functional foods with health claim. However, the discovery of a novel bioactive substance from nature is considered

to have been reaching its limit. The purpose of this study was to examine whether a novel solubilized compound, which has not been utilized due to their low solubility and poor bioavailability, could be available.

α -Glucosylhesperidin (enzymatically glucosylated hesperidin; Hsp-G) has a micelle-like structure in an aqueous solution, and may be solubilized by incorporating a poorly soluble compound into its hydrophobic central part. Therefore, hesperidin (Hsp), which is hardly soluble in water, was solubilized with Hsp-G and orally administered to mouse models of rheumatoid arthritis. As a result, Hsp solubilized with Hsp-G was able to improve rheumatic symptoms even at a concentration at which no physiological activity was exhibited by Hsp or Hsp-G alone. Thus, bioactive substances solubilized with Hsp-G may be a practical applicability such as diet supplement in the future.

Keywords: α -glucosylhesperidin, hesperidin, rheumatoid arthritis, solubilization, transglycosylation

1. 緒 言

アミラーゼなどの糖質関連酵素の産業的利用に関する研究は、日本の優れた食品加工技術のひとつとして、数多くの機能性オリゴ糖などを生み出し、日本の機能性食品の発展に大きく貢献してきた¹⁾。筆者らは、糖質関連酵素の反応を3つの糖転移反応に分類し、それぞれの特徴を生かして利用してきた。① transglycosylation to H₂O (水への糖転移反応、Hydrolysis; 加水分解反応)、② intramolecular transglycosylation (分子内糖転移反応)、③ intermolecular trans-glycosylation (分子間糖転移反応)の3つである (Fig.1)。

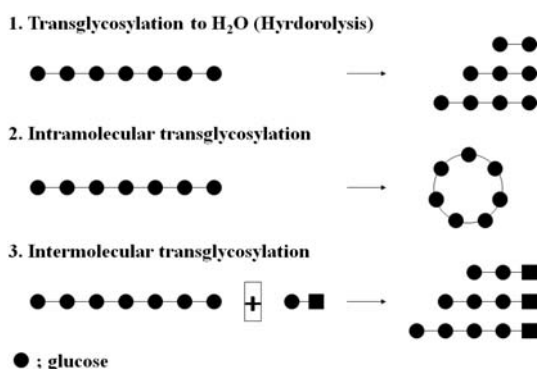


Fig.1 Classification of reaction in amylase-related enzymes.

● ; glucose

①の例として、無味であるでんぷんを α -アミラーゼや β -アミラーゼなどを用いて加水分解し、甘味を持つマルトオリゴ糖、水飴やマルトースを生成し、甘味料として利用している。また、②では、でんぷんにサイクロデキストリン合成酵素 (CGTase) を作用させ、 α -サイクロデキストリン (CD)、 β -CD、 γ -CD を生成する。これら CD は、それぞれグルコースが 6、7、8 分子結合し環状構造をとったもので、分子の外側が親水

性、内側の空隙は疎水性であるため、水に難溶性の化合物を空隙内部に包接することにより可溶化できる。そのため、CD は、可溶化剤として広く利用されている。③では、糖転移型アミラーゼや CGTase などを用いて、さまざまな機能性オリゴ糖が生成されている。例えば、スクロースとラクトースに β -フルクトフラノシダーゼを作用させて、乳果オリゴ糖 (ラクトスクロース; 難消化性オリゴ糖) を生成し、食品素材として利用されている。また、分子間糖転移反応を用いると、水に難溶性の化合物に糖を付加し、溶解性や安定性を改善できる。その実施例として、糖を付加することにより、フラボノイド類のルチンやヘスペリジンの溶解性を向上させること、アスコルビン酸の酸化安定性を向上させることが挙げられるが、そのいずれもが産業利用されている。

筆者らは、これまでに CGTase を用いて、水に難溶性のヘスペリジン (Hsp) にグルコースを転移した α -グルコシルヘスペリジン (Hsp-G; Fig.2) を合成し、その利用について検討している^{2,3)}。

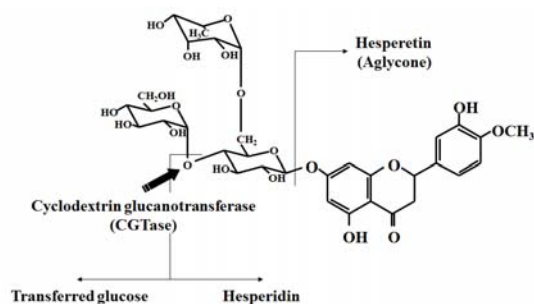


Fig.2 Chemical structure of α -glucosyl-hesperidin.

これまでの研究で、Hsp-G は、実験動物に摂取させると、発がん抑制作用 (口腔がん、大腸がん)、血圧上昇抑制作用、骨粗鬆症予防作用があることが明らかにされている³⁾。

また、ヒトボランティア試験では、Hsp-Gの摂取は、血清中性脂質低下作用、血流改善作用（冷え性改善、肌状態改善）、リウマチ症状改善作用などを示すことも明らかにされている³⁾。一方で、Hsp-Gは、さまざまな水に難溶性の化合物を可溶化できることも見出されているため、医薬品や栄養成分の可溶化剤としての利用についても研究されつつある^{4,5)}。例えば、コレステロールの胆汁中への異化排泄促進作用を持つ脂質異常症の治療薬であるプロブコールは、Hsp-Gにより可溶化され、可溶化処理をしないものに比べ、生体吸収性が約10倍向上する^{4,6)}。また、Hsp-Gを含む数種の配糖体が水に難溶性のケルセチンを可溶化できることなど⁵⁾も報告されている（Fig.3）。

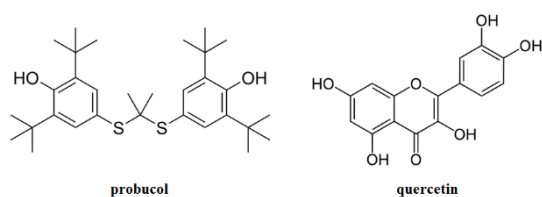


Fig.3 Chemical structures of quercetin and probucol.

このようにHsp-G自身あるいはHsp-Gにより可溶化された化合物については、多様な研究が行われている。また、Hsp自身についても古くから研究されており、発がん抑制作用、抗炎症作用、血圧低下作用、血清コレステロール低下作用などをはじめ、さまざまな生理活性作用が報告されており⁷⁾、さらなる産業利用が期待されているが、Hsp自身も水に難溶性であることが、その実用化を制限していることは否めない。そこで、本研究では、Hsp-Gにより可溶化されたHspの抗炎症作用を例にとり、本可溶化法の利用について検討した。

2. 材料および方法

酵素および試薬

糖転移酵素は、土壌よりpH 10でも生育する微生物として見出した*Bacillus sp. A2-5a*株から得られたアルカリ耐性のサイクロデキストリン合成酵素（CGTase）を用いた⁸⁾。また、すべての試薬は、分析レベルのものを用いた。

α -グルコシルヘスペリジンの調製

α -グルコシルヘスペリジン（Hsp-G）は、既に報告した方法に若干の変更を加えて調製した^{9,10)}。0.25%ヘスペリジン（Hsp）、5%澱粉、4 units/mLのCGTaseを含む反応液（ヘスペリジンの溶解性を維持するためにpH 10に調整）を40°Cで16時間反応させた。pHを中性に調整した後に、1 units/mLのグルコアミラーゼで処理し、その後、疎水吸着樹脂であるAmberlite XAD-16を用いて精製した。得られたHsp-Gの純度は、95%以上であった。

可溶化ヘスペリジンの調製

水に難溶性のHspを可溶化するために、HspとHsp-Gを重量比で1:1（モル比では5:4）となるように混合した。Hspは水には難溶性であるが、アルカリには極めてよく溶解するため、1 M NaOHに溶解し、10 mg/mL Hsp溶液とした。Hsp-GはH₂Oに溶解し、同様に10 mg/mL Hsp-G溶液とした。これを1:1（v/v）で混合し、pH 7に調整してHsp-Gによる可溶化Hsp（Hsp/Hsp-G）とした。

コラーゲンで感作したリウマチモデルマウスへの α -グルコシルヘスペリジンの経口投与

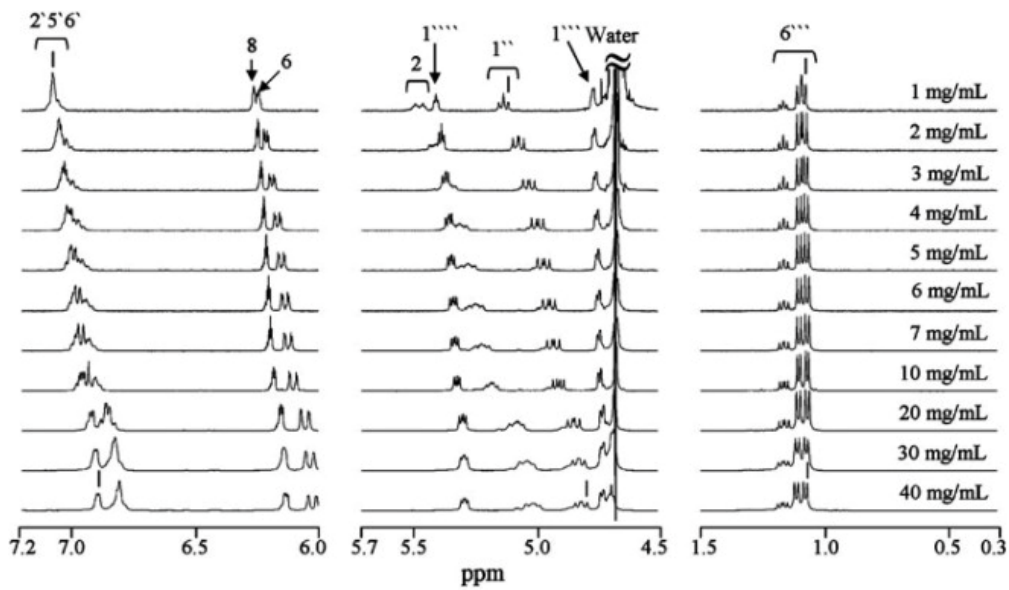
9週齢のDBA/1Jマウスを鶏由来のtype II コラーゲンで感作し (priming)、21日後にもう一度感作した (boosting)¹⁰⁾。試験1では、Hsp-Gは、21日目から3回/週のペースで、15 mg/kg、50 mg/kg、150 mg/kg体重を経口投与した。また、試験2では、同様に21日目から3回/週のペースで、Hsp単独では100 mg/kg体重を、可溶化Hsp (Hsp/Hsp-G; HspとHsp-Gのモル比5:4の混合物) は、10 mg/kg、50 mg/kg体重を経口投与した。試験1、2共に、control群には、同量のH₂Oを同じ日程で経口投与した。症状の評価 (clinical score) は、本研究に関与しない研究員により、四肢の障害の程度をそれぞれ0; 変化なし、1; 赤みが見られた、2; やや腫れている、3; 腫れている、4; かなり腫れている、5; 関節が機能していない、という指標で評価した¹⁰⁾。それぞれのマウスの clinical scoreは、四肢のscoreの合計で表した。

3. 結果および考察

可溶化ヘスペリジンの性状

可溶化Hsp (Hsp/Hsp-G) は、4°Cで4週間安定に溶液状態を保持できていた。Hsp-G (monoglucosideだけでなく oligoglucosideを含むもの) は、既にもかん缶詰中のHspの結晶化を防止する目的で実用化されているように、缶詰を常温で保存し、3年間以上にわたり、Hspの結晶化を防止し可溶化状態を保持できることが明らかになっている^{11,12)}。また、NMR分析により、Hsp-Gがある一定濃度では、aglycone部分 (hesperetin; Hspt) 同士が相互作用を示すが、糖部分 (rhamnosyl-glucose部分と転移により付加されたglucose部分、特に後者) ではほとんど相互作用が観察されないこと (Fig.4A) から、aglycone部分を核として、糖部分を表面に配置したミセル様構造をとると推定されている¹³⁾ (Fig.4B)。このことから、可溶化Hspの構造は、Hsp-Gの形成するミセル様構造のaglycone部分が疎水性であり、かつ構造が極めて類似しているHspがこの疎水性の核部分に取り込まれていると考えられる。本研究では、Hsp濃度は缶詰の場合より高いが、このような形で可溶化されているものと推定でき、長期間の保存に耐えることができたと考えられた。

A



B

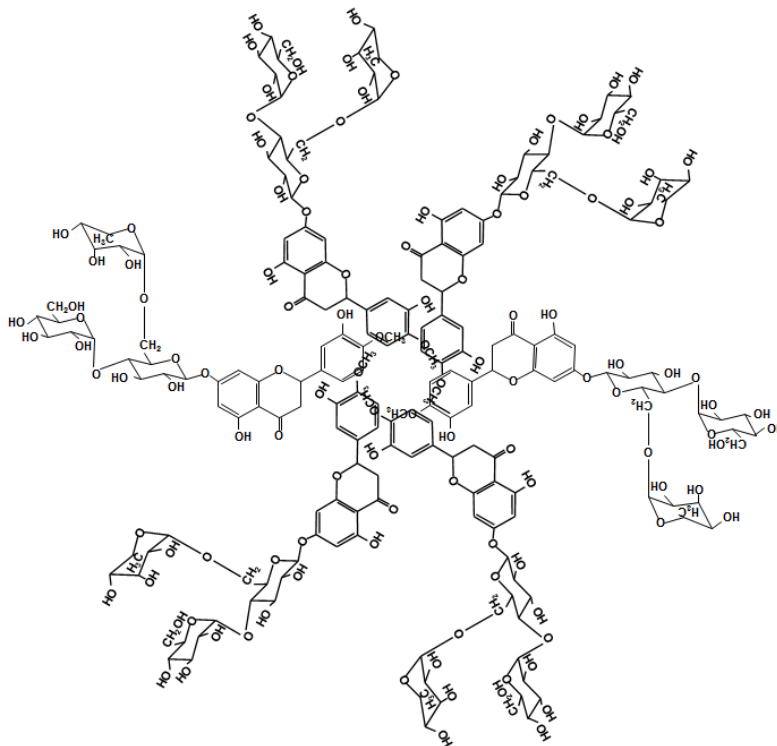


Fig.4 Micelle-like structure of α -glucosylhesperidin in an aqueous condition.

A; ^1H NMR spectra of proton signals in α -glucosylhesperidin at different concentrations ranging from 1 to 40 mg/mL recorded in D_2O at 37°C . The concentrations are given on the right hand side of the spectra.

B; Schematic representation based on NMR constraints depicting micelle-like structure of α -glucosylhesperidin.

コラーゲンで感作したリウマチモデルマウスへの α -グルコシルヘスペリジンの経口投与の影響

コラーゲンで感作したリウマチモデルマウスのcontrol群 (H₂Oを経口投与) は、Fig.5に示したように足全体が腫れあがり、四肢共に同程度の症状を示した (clinical score =12)。一方、Hsp-Gを経口投与した群 (Hsp-G群) は、四肢に赤みが見られる程度で、症状はかなり軽減されていた (clinical score=4)。

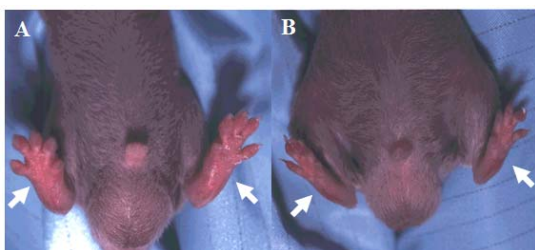


Fig.5 Effect of oral administration of Hsp-G on inflammatory conditions of collagen-induced arthritis in mice.

All photographs were shown inflammatory conditions of collagen-induced arthritis in mice at 50 days after the first immunization.

A (Control); Mice induced arthritis with Type II collagen from chicken were administered with H₂O.

B (Hsp-G); Mice induced arthritis with Type II collagen from chicken were administered with Hsp-G.

Fig.6に示したように、control群では、boosting後7日目ごろから (実験開始当初からでは約30日後)、四肢の腫れが観察され始めた。Hsp-G群では、control群に比べて、15 mg/kg体重 投与群では42日目に、50 mg/kg体重 投与群では47日、49日目に、clinical scoreは有意に ($p < 0.05$) 低下した。また、その他の期間でも低値を示していた。150 mg/kgでは、clinical scoreは42日目以降56日目まで有意に

($p < 0.05$) 低値を示し、症状を改善する作用を示した。

Hsp-Gは、動物あるいはヒトに経口投与した時に、元のHspを単独で投与した時に比べて、生体吸収性が改善され、AUC (Area under the curve) で約3倍に吸収性が向上していた¹⁰⁾。これまでにHspを150 mg/kg経口投与した同様のリウマチモデルマウスでは、有意にclinical scoreが改善すること、50 mg/kgでは十分にその作用が発揮できないことを報告してきた¹⁴⁾が、糖付加により生体吸収性が改善したHsp-Gでは、その作用が向上することが明らかとなった。

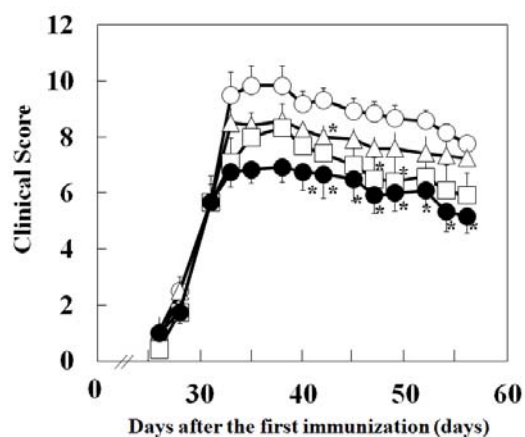


Fig.6 Dose dependency of effects of Hsp-G on collagen-induced arthritis in mice.

Mice induced arthritis with Type II collagen from chicken were administered with H₂O as control group (○) and they were administered with 15 mg/kg (△), 50 mg/kg (□), 150 mg/kg body weight (●) of Hsp-G as Hsp-G groups. n = 6, mean ± SD, *; $p < 0.05$ vs control (Bonferroni)

さらに、Fig.7で示したように、Hsp単独では多量に (100 mg/kg体重) 経口投与したところ、control群に対してclinical scoreは、control群に対して低値を示したが、有意な差は確認されなかった。一方、可溶性Hsp (Hsp/Hsp-G)

経口投与（可溶化Hsp群）では、10mg/kgでは同様に低値を示したが、有意差は認められなかった。Hsp/Hsp-Gの投与濃度を50 mg/kgにあげると、経口投与後、clinical scoreは、47日目、49日目、56日目で有意に（ $p < 0.05$ ）低値を示し、症状が改善された。

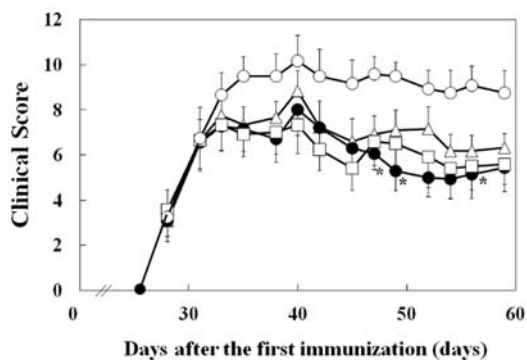


Fig.7 Effects of solubilized hesperidin (Hsp/Hsp-G) on collagen-induced arthritis in mice.

Mice induced arthritis with Type II collagen from chicken were administered with H₂O as control group (○). They were administered with 100 mg/kg body weight of Hsp as a Hsp group (△), and were administered with 10 mg/kg (□) and 50 mg/kg body weight of Hsp/Hsp-G as solubilized Hsp groups (●). n = 6-7, mean ± SD, *; $p < 0.05$ vs control (Bonferroni)

Hspの溶解性は20 µg/mLであり、Hsp-Gのそれは約300倍の6 mg/mLである⁹⁾（目視的に透明な溶液状態であれば、10 mg/mL以上の濃度の溶液を作製することも十分可能である）。したがって、Hsp単独で100 mg/kg体重を経口投与した際には、溶解度が飽和濃度を超えるためsuspension状態であったが、Hsp-Gは150 mg/kg体重の際にも溶液状態で投与できた。また、可溶化Hsp（Hsp/Hsp-G）は、Hsp-Gの可溶化作用によりHsp取り込んで可溶化し、生体吸収性を向上させ

も溶液状態で投与できた。

これまでの研究では、Caco-2細胞を用いて、HspとHsp-Gの混合物（25%Hspと75%Hsp-G；monoglucosideだけでなく oligoglucosideを含む）を用いてその吸収性を確認したところ、tight junctionを介して吸収されていることが確認されている。この時、Hsp-Gの可溶化作用により、水に難溶性のHspであっても可溶化されて細胞内に吸収されることも確認されている¹⁵⁾。今回の場合は、Hsp/Hsp-G 50 mg/kg投与群では、HspおよびHsp-Gそれぞれ25 mg/Kg投与に相当するため、Hspのみ、Hsp-Gのみでは、症状改善作用を発揮できないレベルにあると考えられるが、共に生体吸収され、十分に生理効果が発揮できたと考えられた。

結論として、Hsp-Gは一定濃度に達すれば、それ自身がミセル様構造をとり、大幅に溶解性が向上する。そこで、Hsp単独では生理作用を発揮できない濃度の50 mg/kg以下であっても、リウマチモデルマウスの症状を改善することが明らかとなった。Hsp-Gは、血中ではグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体となり、Hsp-Gとしては検出されず、Hspのaglyconeであるヘスペレチン（Hsp）として作用していると推定されるため、Hsp-Gによる可溶化とそれによる生体吸収性の向上がこの生理効果を生み出していると考えられる。また、可溶化されたHsp（Hsp/Hsp-G）は、50 mg/kgの経口投与でリウマチモデルマウスの症状を改善し、その物質としての内訳は、25 mg/kg Hspと25 mg/kg Hsp-Gの混合物であり、それぞれの単独投与では、症状改善作用を発揮できない濃度である。この結果は、Hsp-Gがそれ自身のミセル様構造の核部分にHspをることにより、生体内での活性本体である

Hsptの濃度を50 mg/kg Hsp-G程度に向上させたためであると考えられた。

今後、Hsp-Gの利用拡大には、①Hsp-Gにより可溶化できる化合物の探索およびその拡大（現在報告されているもの；ヘスペリジンやケルセチンのようなフラボノイド類およびプロブコールのような医薬品）、②活用できる生理活性作用の拡大（現在は、リウマチモデルマウスの症状改善作用）が必要になってくる。従来の食品機能の研究では、天然の生理活性物質を探索し、それを活用するものが大半であったが、1980年代に食品の第3の機能「体調調節機能」が世界に先駆けて農芸化学分野から提唱されて以来、40年にわたり莫大な研究が実施され、多大は研究成果が出ており、自然界からの新規な生理活性物質の発見は限界近くに来ているとの感もある。今後は、これまで発見されながら、溶解性や生体吸収性などさまざまな問題があり、実用化には至っていない生理活性物質を本研究のような考え方、技術を用いて利用していくという発想が必要な時期となっていると考える。

4. 要約

食品の機能性は、1980年代に日本が世界に先駆けて提唱して以来、約40年間にわたって膨大な研究が行われてきた。その結果、多様な研究成果が得られており、多くのものが保健機能食品の制度を活用して実用化されている。しかし、自然界からの新規な生物活性物質の発見は、限界に達しつつあると考えられている。そのため、これまで発見されながら、溶解性や生体吸収性などに問題があり、実用化には至っていない生理活性物質を可溶化し、生体吸収性を向上させて利用していくことを考えた。

α -glucosylhesperidin (Hsp-G) は、水溶液中でミセル様構造をとり、その疎水性の中心部に難溶性の化合物を取り込み、可溶化できる可能性がある。そこで、水に難溶性の hesperidin (Hsp) を Hsp-G で可溶化し、リウマチモデルマウスに経口投与したところ、Hsp または Hsp-G 単独では生理活性を発現しない濃度であっても、Hsp-G で可溶化した Hsp は、リウマチ症状を改善できた。今後は、Hsp-G により可溶化された生理活性物質の利用が期待できる。

5. 引用文献

- 1) 工業用糖質酵素ハンドブック (1999) (岡田茂孝、北畑寿美雄；監修) 講談社サイエンスティフィク
- 2) 米谷俊 (2010) 機能性配糖体の合成 - 糖転移ヘスペリジン、「酵素利用技術体系」(小宮山眞監修)、p.734-740、(株) エヌ・ティー・エス
- 3) 米谷俊 (2013) 糖転移ヘスペリジンの機能性と食品への応用、「機能性糖質素材の開発と食品への応用Ⅱ」、(井上國世編)、p.52-60、CMC 出版
- 4) Uchiyama H, Tozuka Y, Imono M, Takeuchi H. (2010) Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: Dramatic improvement in drug dissolution and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **76**: 238-244.
- 5) Fujimori M, Kadota K, Shimono K, Shirakawa Y, Sato H, Tozuka Y. (2015) Enhanced solubility of quercetin by forming composite particles with transglycosylated materials. *Journal of Food Engineering*. **149**, 248-254.

- 6) 戸塚裕一、内山博雅、竹内洋文、飯田純久、米谷俊 (発明者)、特許5653602号「高吸収性薬剤組成物およびその製造方法」、(2014.11.28.登録)
- 7) Garg A, Garg S, Zaneveld L.J.D, Singla A.K. (2001) Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.*, **15**, 655-669.
- 8) Kometani K, Terada Y, Nishimura T, Takii H, Shigetaka Okada S. (1994) Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species and transglycosylation at alkaline pHs. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, **58**, 517-520.
- 9) Kometani K, Terada Y, Nishimura T, Takii H, Shigetaka Okada S. (1994) Transglycosylation to hesperidin by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, **58**, 1990-1994(1994).
- 10) Kometani T, Fukuda T, Kakuma T, Kawaguchi K, Tamura W, Kumazawa Y, Nagata K. (2008) Effects of α -glucosyl-hesperidin, a bioactive food material, on collagen-induced arthritis in mice and rheumatoid arthritis in humans. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **30**, 117-134.
- 11) Terada Y, Kometani T, Nishimura T, Takii H, Okada S. (1995) Prevention of hesperidin crystal formation in canned mandarin orange syrup and clarified orange juice by hesperidin glycosides. *Food Science and Technology International, Tokyo*, **1**, 29-33.
- 12) 西村隆久、米谷俊、岡田茂孝、小林善則、福本俊一. (1998) ヘスペリジン配糖体によるヘスペリジンの沈殿抑制. *日食誌*, **45**, 186-191.
- 13) Zhang J, Tozuka Y, Uchiyama H, Higashi K, Moribe K, Takeuchi H, Yamamoto K. (2011) NMR investigation of a novel excipient, α -glucosylhesperidin, as a suitable solubilizing agent for poorly water-soluble drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **100**, 4421-4431.
- 14) Kawaguchi K, Maruyama H, Kometani T, Kumazawa Y. (2006) Suppression of collagen-induced arthritis by oral administration of the citrus flavonoid hesperidin. *Planta Medica*, **72**, 477-479.
- 15) Kim M, Kometani T, Okada S, Shimizu M. (1999) Permeation of hesperidin glycosides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, **63**, 2183-2188.