

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 狩野俊輔
Name

学位論文題目： 食品素材中の機能成分のラットにおける吸収と体内動態に関する研究
Title of Dissertation

学位論文要約： Dissertation Summary

本論文の1章では研究の背景と目的について述べた。近年、食品に含まれる三次機能を有する機能性成分を利用して健康維持や生活習慣病予防に繋げる研究が広く行われており、多種多様な食品中の機能成分が見出された結果、より直接的な疾病予防や治療に有効な機能が見出されている。これまで行われてきた機能性成分の活性評価は試験管内生化学的活性試験や培養細胞試験などによって、その機能が検証されてきた。そのため、実際に摂取した後にその機能が生体内で発現するかどうかははっきりとしていないものも少なくない。また、その成分が活性評価通りの機能を生体内で発現するためには、摂取した成分がそのままの形で体内に活性発現に必要な成分量が吸収されるか、より機能性の高い代謝物に代謝されるなどした後に体内に分布し、細胞にまで到達することが必要である。そのため、機能成分の体内での存在形態を明らかにし、その存在形態での機能評価を行うことが、機能を科学的に実証するために必要不可欠となると考えられる。食品機能成分の吸収や体内動態についてこれまで多くの研究がなされているが、人での体内動態研究では制限が多く存在するため直接体内存在量を定量することが難しい。そのため、経口摂取後の尿中・糞便中排泄量や循環血中濃度から吸収や体内動態を評価する方法が主流となっている。

従来の尿中・糞便中排泄量や循環血中濃度から機能成分の吸収を評価する方法では消化管内や吸収過程における代謝に加えて、消化管吸収後の肝代謝（初回通過効果）や全身循環中での代謝を受けた後の評価となるため、消化管吸収直後の形態や消化管代謝、肝代謝及び全身循環中での代謝を詳細かつ個別に検討する事が難しい。

加えて、排泄物での評価だけでは、代謝中間体などがどの程度体内にとどまり、機能を発揮する化合物が存在しそのまま排泄されるのか、または代謝されて排泄されているのかなど、体内での存在形態や滞留時間などが明らかにできないため、真に体内において活性に強く影響を及ぼす化合物を特定することができない。これらの課題をカバーし、吸収や体内動態のより良い評価を実現するためには、門脈カニューレション法を用いた詳細な消化管吸収の検討、頸部静脈留置カニューレション法を用いた同一個体のラットからの自由運動下における採血法及び、無麻酔下における消化管吸収の評価が有効な手段となる。

さらに、従来の食品機能成分の吸収と体内動態の評価法では実験動物を使用している薬物動態学を基盤とした詳細な基礎検討はあまりなされていない。体内動態の一連の流れを明らかにする為には、静脈内投与後の体内動態を検討し、代謝経路を明らかにしたうえで経口投与時の活性物質の体内動態と比較することが必要不可欠であると考えられる。

そのため、食品中機能性成分の肝代謝、消化管代謝といった代謝経路、吸収形態、排泄形態、吸収率、回収率などの体内動態の知見に加えて代謝物の血中存在形態や体内分布にまで至る包括的な体内動態の基礎的知見を得るために、静脈内投与実験を基盤として経口投与実験や門脈採血実験、尿・胆汁回収実験等の実験を同一手法、同一条件下で組み合わせて行い、結果を比較検討することにより詳細な吸収と体内動態について包括的に評価する手法が有用であると考えている(Fig. 1)。

そこで、本研究では食品中機能性成分のラットへの静脈内投与と経口投与実験を行い、循環血中の機能成分及びその代謝物の血中濃度を調べることで吸収と主に肝代謝について検討し、これらに加えて経口投与後に門脈採血を行い、詳細な消化管吸収過程の検討を行う。さらに、静脈内投与及び経口投与後に尿回収実験及び胆汁回収実験を行い、排泄形態についての検討を行う。これらの結果を比較検討することにより機能成分の血中における主要存在形態を明らかにする。これにより、生体内における機能成分の代謝経路が推察でき、詳細な吸収と体内動態について包括的な考察を可能にすると考えている。

本論文の第2章では、コリアンダーの機能成分の(E)-2-dodecenalのラットにおける吸収と体内動態

について検討を行った。本研究の前検討において、コリアンダー生葉から単離された(*E*)-2-alkenal類 ($C_{10}\sim C_{16}$)にはEpstein-Barrウイルス(EBV)早期抗原ゲノムを持つRaji細胞の変形抑制活性があることが明らかとなっており、この(*E*)-2-alkenal類のRaji細胞の変形抑制活性は炭素鎖の長さに相関し、 α,β -unsaturated aldehydeが構造中に存在することが必要不可欠であることが明らかになっている。また、Raji細胞変形抑制活性を有するには化合物が C_1 位のカルボニル基と C_2 位の不飽和二重結合を組み合わせて持つことが重要であると示唆されている。このコリアンダーの特徴的香気成分の一つである(*E*)-2-dodecenalの体内動態を明らかにすることにより、ラット体内における非極性物質の体内動態の基礎的知見を得ることが可能であると考えた。

(*E*)-2-dodecenal静脈内投与後、血中に導入された(*E*)-2-dodecenalは速やかに血中から消失し、その代謝物も検出されなかった(Fig. 2, Fig. 3)。この理由としては1)グルタチオンなどとの抱合体に変化、2)血中のタンパク質とのシッフ塩基結合、3)肝臓などの臓器に移行及び4)尿、胆汁または呼気への排泄などが考えられた。(*E*)-2-dodecenal 以外のピークについて、MSスペクトルを解析した結果、いずれのピークも(*E*)-2-dodecenalの代謝物に該当しない成分であった。

また、静脈内投与後の呼気中排泄量は投与量に対して1%未満であったことから、静脈内に導入された(*E*)-2-dodecenalの大部分は投与後3時間ではほとんど呼気中に排泄されず、体内に蓄積されるかまたはその他の代謝物に移行すること、尿または胆汁中に排泄されることが示唆された。加えて、この呼気中への排泄量の経時変化をモニターすると、排泄の二峰性が確認されていることから、(*E*)-2-dodecenalが血中のタンパク質やその他臓器にトラップされ、徐々にリリースされた結果、もしくは胆汁中に排泄された(*E*)-2-dodecenalが腸管循環により消化管から再吸収された結果であると考えられた。

また、(*E*)-2-dodecenal経口投与試験では門脈血中において(*E*)-2-dodecenal及びその代謝物は検出されなかったことから、経口摂取された(*E*)-2-dodecenalは消化管の選択的吸収によって吸収率が非常に低いか、もしくは消化管吸収が遅く、2時間程度ではほとんど吸収されない可能性が示唆された。経口投与後の胆汁の90%メタノール水溶液画分には、胆汁色素とは異なる3つのピークが検出された。この3つのピークの吸収スペクトルは(*E*)-2-dodecenalの吸収スペクトルと類似していることからラット体内で生成された(*E*)-2-dodecenalに由来する代謝物ではないかと考えられた。

(*E*)-2-dodecenalの経口摂取時における消化管吸収量は非常に低いことが示されたが、血中に導入された(*E*)-2-dodecenalの排泄経路として呼気中への排泄が明らかになった。経口投与では吸収が見られなかったが、呼気として1%でも排泄があるということは、新しい吸収経路としてハイカラ呼気として吸収・排泄する経路が考えられることから、Raji細胞変形抑制活性を有する(*E*)-2-dodecenalは摂取方法の最適化が必要とされるが、肺がん治療に有効である可能性が考えられた。

一方、第3章ではオリーブ含有機能成分(Fig. 4)のラットにおける吸収と体内動態について検討を行った。本章ではオリーブ含有機能成分の内、代表的なポリフェノールである3,4-DHPEA-EDA (oleuropein アグリコン)、hydroxytyrosol及びoleuropeinの体内動態を明らかにすることにより、ラット体内における極性物質の体内動態の基礎的知見を得ることが可能であると考えた。オリーブ含有の3つの機能成分の吸収と体内動態について、門脈、頸静脈及び胆管にカニューレを留置したラットを用いて、無麻酔下、自由運動下において包括的に評価することができた(Fig. 5, Fig. 6)。hydroxytyrosol (HT)は、経口摂取された場合、オリーブ含有の3つの機能成分の中で最も消化管吸収が良い物質であり、その消化管吸収率は13.06%であった。しかし、そのクリアランス速度も最も早い化合物であることが明らかになった。

3,4-DHPEA-EDAの消化管吸収量は算出されなかったが、3,4-DHPEA-EDA投与時において3,4-DHPEA-EDAから生成されたHTのクリアランス速度がHT投与時のHTのクリアランス速度と比べて遅いことから、投与された3,4-DHPEA-EDAは未変化、もしくは何らかの血中成分や臓器に補足された状態で体内に長期間残存し、HT、HVAOH及びHVAといった代謝物として放出されることが示唆された。

また、3,4-DHPEA-EDAの代謝経路として、3,4-DHPEA-EDAが加水分解されHTを生成し、HVAOH及びHVAへと段階的に代謝される経路、及び3,4-DHPEA-EDAが直接COMTによってメチル化され3-methoxy-4-hydroxyphenylethyl elenolate dialdehyde、その後加水分解によってHVAOHを生成しHVAへと段階的に代謝される経路の二つの異なる経路の存在が示唆された(Fig. 7)。

一方、oleuropein (Ole)は経口摂取された場合、消化管からの吸収はHTや3,4-DHPEA-EDAと比較して顕著に低い化合物であり、その消化管吸収率は0.48%であった。しかし、体内においてほとんど第一相反応を受けずに胆汁を介して排泄されることが示唆されていることから、Oleとしての生理活性の発現は多く期待できない。

オリーブ含有機能成分の排泄と吸収量の相対的な利用率を包括的に評価すると、3,4-DHPEA-EDA > HT >> Oleの順で長期間の生体内利用が期待できると考えられる。また、オリーブの3,4-DHPEA-EDAは抗アレルギー、抗発がんプロモーター活性成分として有効性が確認されているので、オリーブオイルの搾油残渣利用の拡大が図られ、地域農産物がさらなる有効利用されるための

(様式 5) (Style5)

道が提供できた。

これらの研究結果は肺がん治療や予防への新しい戦略として、香気成分を利用するにあたっての新たな知見を与えるものである。また、食品中の機能性成分を実際に摂取した際の機能発現を担保するための新たな知見を与えるものである。これらの知見により、食品機能成分の付加価値を高め、食を通じた生活習慣予防による我々の健康な社会生活の構築の一助になるものとする。

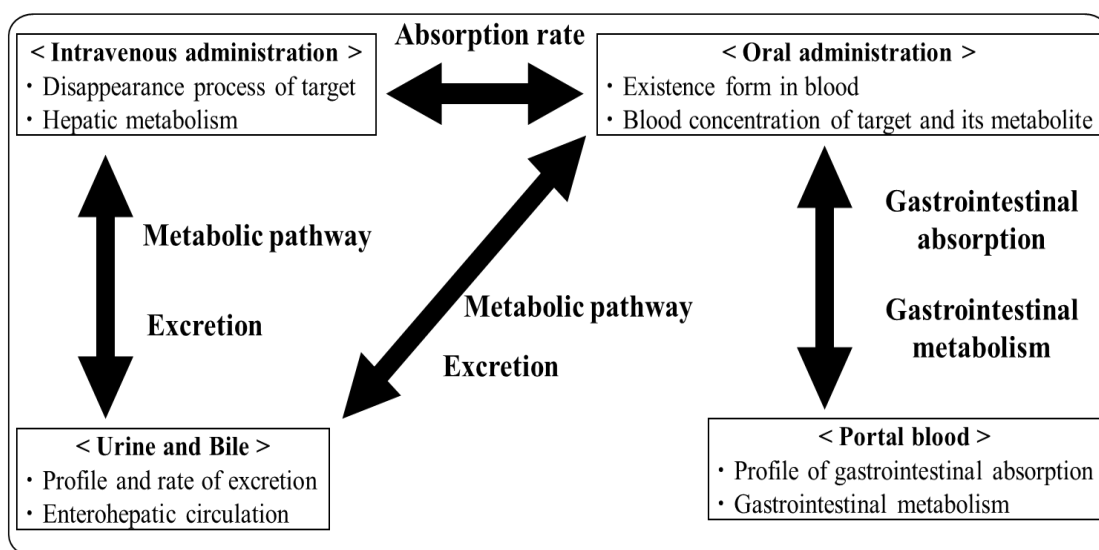


Fig. 1. Comprehensive understanding of absorption and biokinetics.

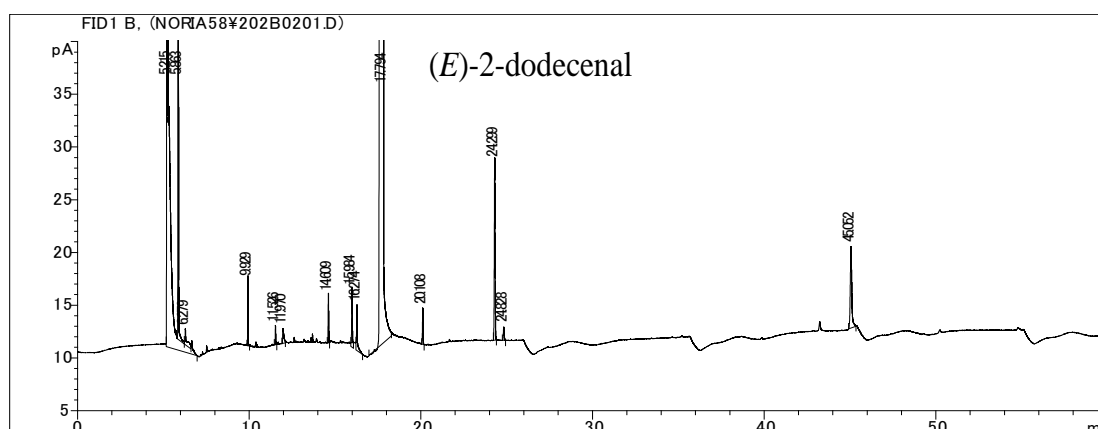


Fig. 2. Typical GC chromatogram of (*E*)-2-dodecenal in blood after intravenous administration of (*E*)-2-dodecenal.

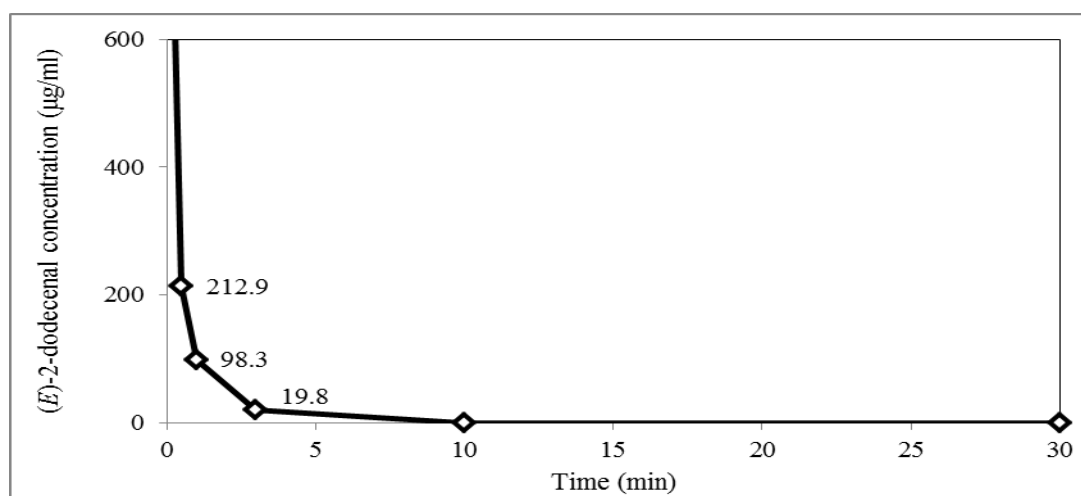


Fig. 3. Time course of blood concentration of (*E*)-2-dodecenal after intravenous administration of (*E*)-2-dodecenal. Values are means standard errors of three rats.

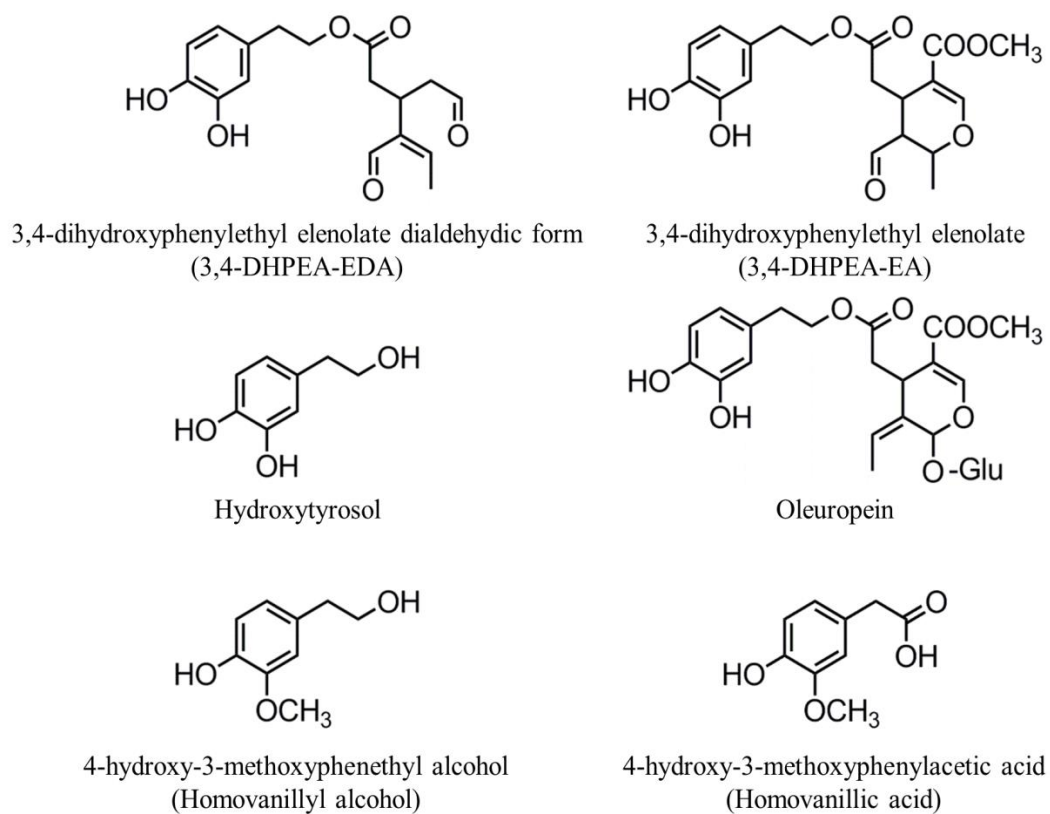


Fig. 4. Chemical structure of 3,4-DHPEA-EDA, hydroxytyrosol, oleuropein, and their major metabolites after administration to rats.

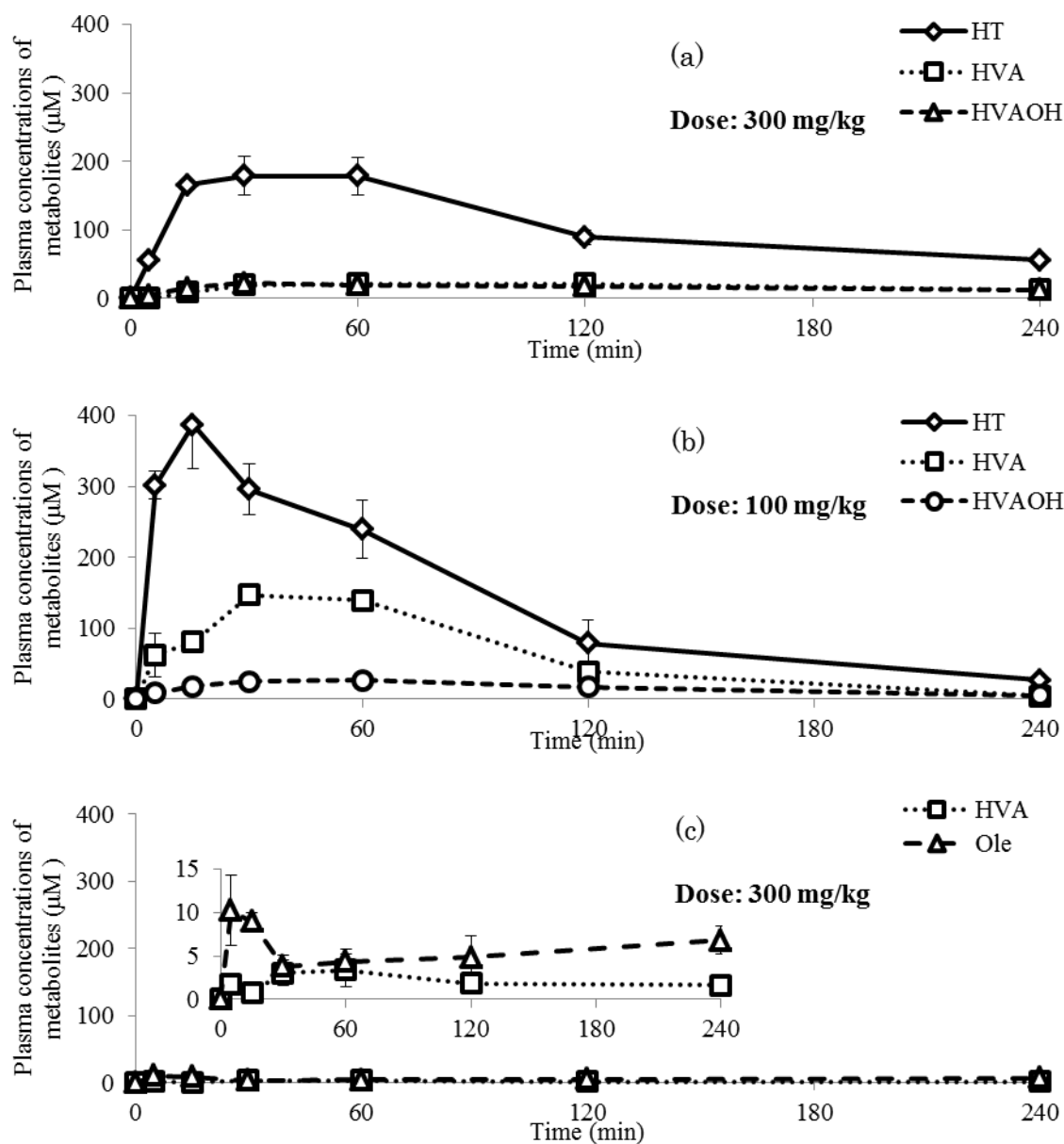


Fig. 5. Metabolites from 3,4-DHPEA-EDA (a), hydroxytyrosol (b), and oleuropein (c) in plasma from the portal vein over time after oral administration (300 mg/kg for 3,4-DHPEA-EDA, 100 mg/kg for HT, and 300 mg/kg for Ole). Values of means and SEM are from measurements performed in triplicate. Sampling times are described in the text. HT: hydroxytyrosol, Ole: oleuropein, HVA: homovanillic acid, HVAOH: homovanillyl alcohol, Ole: oleuropein

(様式 5) (Style5)

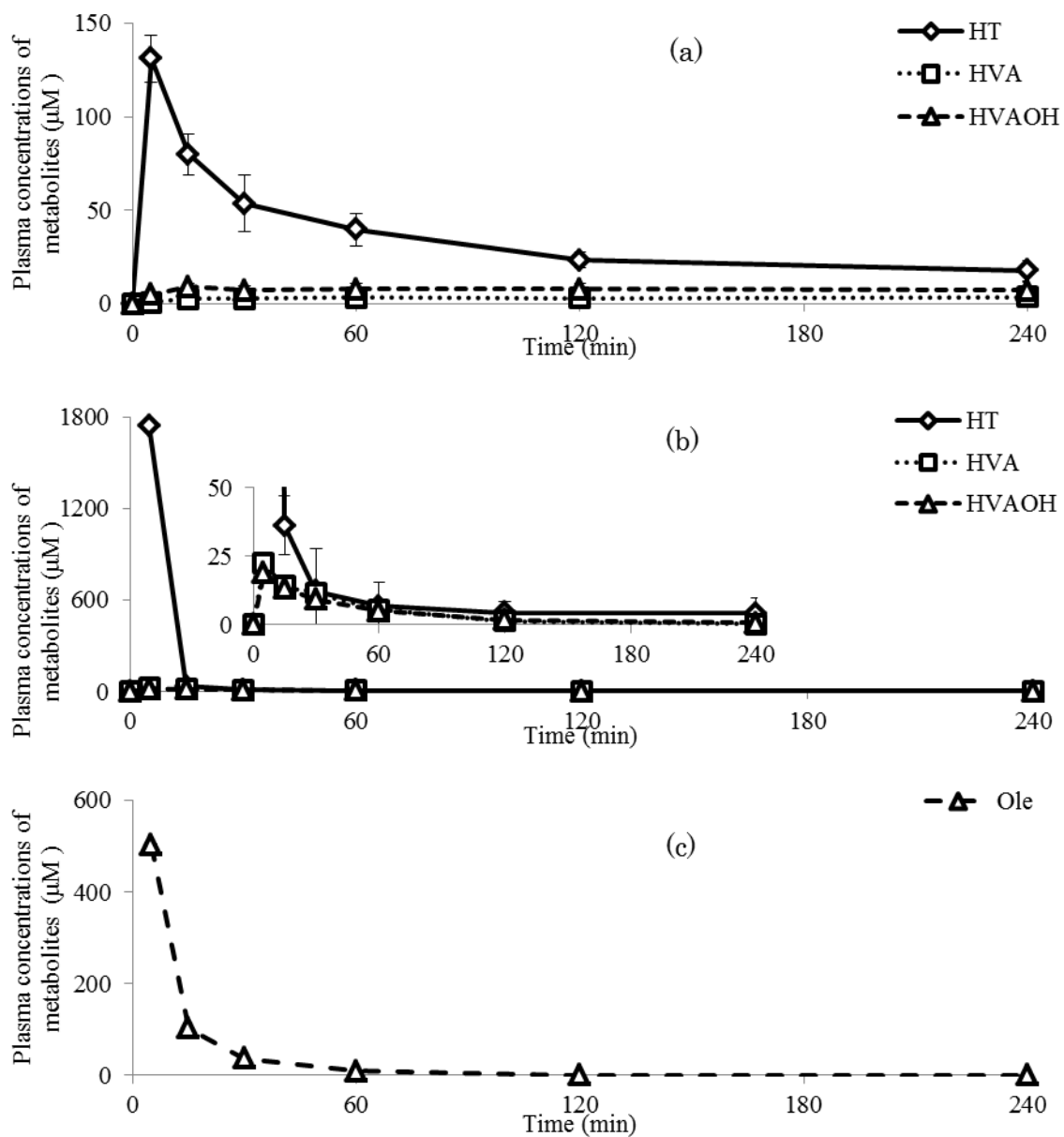


Fig. 6. Metabolites from 3,4-DHPEA-EDA (a), hydroxytyrosol (b), and oleuropein (c) in plasma from the jugular vein over time after intravenous administration. Values of means and SEM are from measurements performed in triplicate. Analytical times are described in the text. HT: hydroxytyrosol, Ole: oleuropein, HVA: homovanillic acid, HVAOH: homovanillyl alcohol

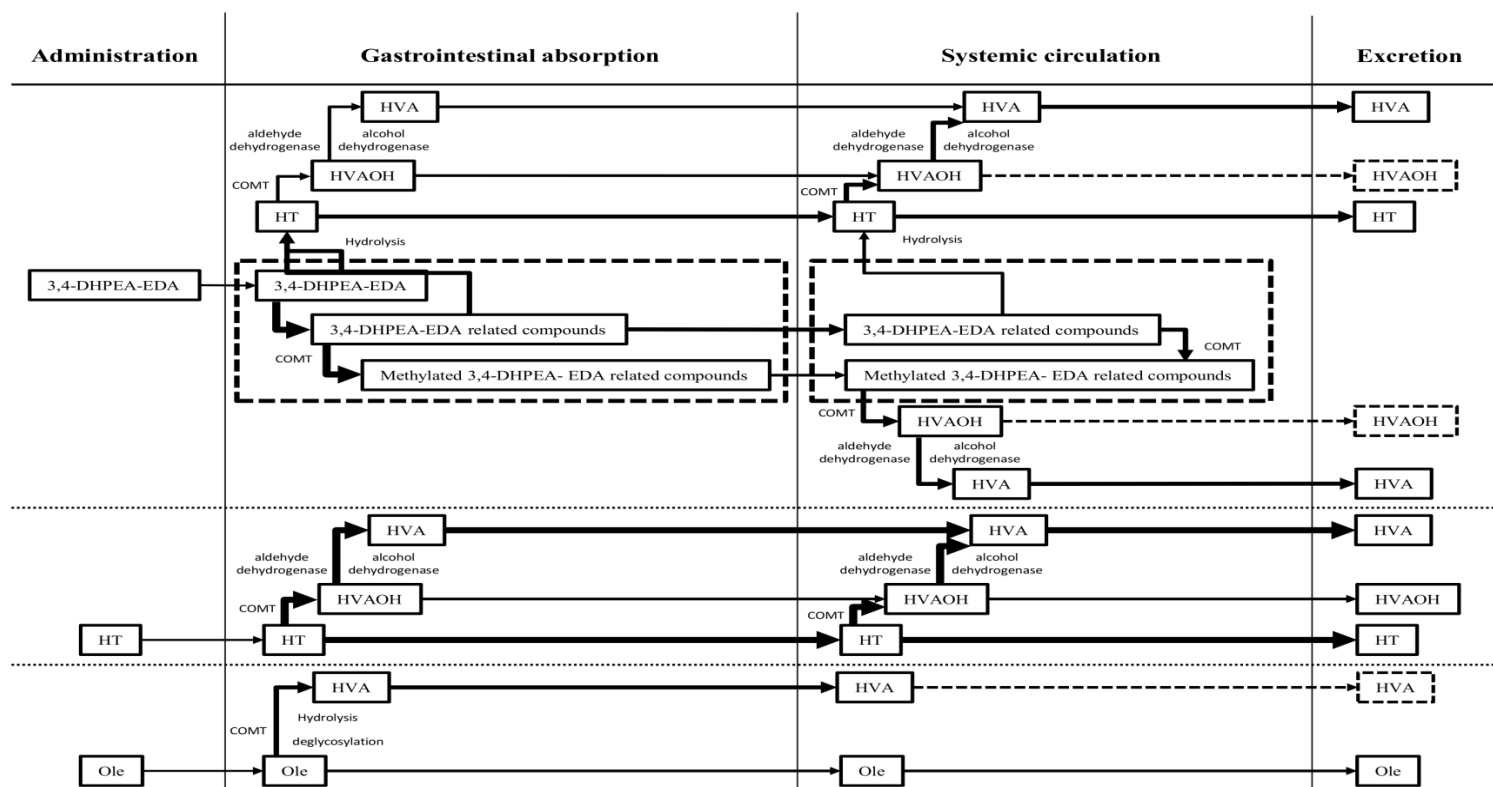


Fig. 7. The possible flow of chemical conversion of 3,4-DHPEA-EDA, hydroxytyrosol, and oleuropein after administration in rats. HT: hydroxytyrosol, HVA: homovanillic acid, HVAOH: homovanillyl alcohol