

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580151  
 研究課題名（和文）ベニバナ種子由来セロトニン誘導体の体内動態と生体内酸化ストレス防御作用の解明  
 研究課題名（英文）Biological fate and antioxidant activity of serotonin derivatives from safflower seed  
 研究代表者  
 一柳 孝司（ICHIYANAGI TAKASHI）  
 新潟薬科大学薬学部・准教授  
 研究者番号：00288226

研究成果の概要：本研究は生活習慣病発症要因の一つである食品を有効に利用するという考えの下、ベニバナ種子に含まれる成分を対象として、特にこれらの成分を口から摂取した場合の体の中での振舞いについて検討を行った。その結果、ベニバナ種子の成分が口から摂取したままの形で、血液中に見出されるとともに、代謝物（投与した成分の形が変化したもの）が大量に見出された。このことから、ベニバナ種子を摂取した場合、ベニバナの成分と共にその代謝物が病気の予防に貢献する可能性が示された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：食品機能学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：機能食品、酸化ストレス、体内動態

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病、脂質異常症をはじめとする生活習慣病罹患率は増加の一途を辿っており、大きな社会現象となっている。これ等の疾病に罹患した場合、医薬品による治療が行われるが、何れの疾患も単独で発症する場合は稀であり、一般に複数の疾患が同時に進行し、複雑な病状を呈することが多い。その為、各々の疾病に対して複数の薬剤による治療が必要となるが、これは薬剤による副作用の増加や、薬物間の相互作用によるリスクが懸念されるため、

薬物投与と管理に関して多大な注意と労力を払う必要がある。一方、高齢化社会の到来に伴い、アルツハイマー病や脳卒中など脳疾患に罹患した場合、後遺症による老後のQOL低下は免れず、脳疾患罹患率増加についても今後、更に重要な問題となり得る。そこで、脳疾患を含めた生活習慣病をはじめとする難治性疾病に対する予防が大きな社会的要請となっている。

## 2. 研究の目的

生活習慣病はその用語より明らかなように、生活習慣、とりわけ食生活が大きなポイントを占める。食品は栄養素としての一次機能、嗜好性としての二次機能のほか、含有される有効成分による生体調節機能、即ち、三次機能が知られている。カロリー制限などの食事療法に加え、食品に含有される機能性成分による各種難治性疾患の予防戦略は、日常接する食品を積極的に利用する有効な方法である。一方、近年、果汁搾汁後のブドウ種子や、ピーナッツの薄皮より抽出したプロシアニジンの健康食品への応用が為されおり、食品加工の際に生成する種々の食品残渣が未利用資源として注目されている。この様に、未利用資源を難治性疾患の予防に利用することは非常に環境配慮にも非常に有効な手法といえる。この様な観点から私はベニバナ種子残渣に含まれる機能性成分に着目した。ベニバナの種子残渣はベニバナ油を搾汁した後に生じる未利用資源である。ベニバナの花弁は古来より生薬として用いられており、花弁に含まれる成分の抗酸化作用をはじめとする機能性に関する報告は数多く為されている。しかし、ベニバナ種子およびその残渣の機能についての報告はほとんど為されておらず、apoE欠損マウスに対する動脈硬化抑制作用が報告されたのみである。同報告ではベニバナ種子残渣および、これに含まれる主要成分である2種類のセロトニン誘導体をそれぞれ長期投与することにより、apoE欠損マウスの動脈硬化指標が有意に抑制される事が示されており、このことから、残渣に含まれるセロトニンのヒドロキシ桂皮酸誘導体とその活性本体であると報告されている。しかし、セロトニン誘導体の動脈硬化抑制作用以外の機能性に関する報告や生体内抗酸化作用、更にはセロトニン誘導体の吸収や代謝等の体内動態の研究報告は皆無である。そこで本研究は2種類のセロトニン誘導体 (p-coumaroyl-serotonin(CS)および、feruoyl-serotonin (FS)) の生体内における機能発現機構に関して、生体内吸収と代謝の解明を基に評価する事を主旨とした。

### 3. 研究の方法

(1) ラジカル消去能を指標としたベニバナ種子中の抗酸化成分の同定

搾汁後のベニバナ種子残渣をメタノール抽出し、得られたエキスをMCIカラムクロマトグラフィーによりメタノールによるグラジェント溶出を行い、各フラクションについて1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性を評価した。又、分画後に得られたフラクションの成分分析は後述する

HPLCにより実施した。

(2) セロトニン誘導体の生体内吸収の検討  
ベニバナ種子に含まれる2種類のセロトニン誘導体 (CSおよび、FS) について、単回静脈内投与 (5 mg/kg体重) および、経口投与 (100 mg/kg体重) を行い、同化合物の生体内吸収および、代謝・排泄について検討を加える手法を採用した。生体試料中の同化合物群の定量はUV-HPLCを利用した。採血は頸部静脈にカテーテルを施したラットに各種セロトニン誘導体標準品を静脈内および経口投与して、その血中動態を観察した。一方、検討の段階で各種セロトニン誘導体が投与したままの形で血中に存在しない場合は、生成した代謝物についてスクリーニングを加えるために、適宜HPLCの分析条件を調整した。更に、頸部静脈カテーテルと胆管カテーテルを施したラットにセロトニン誘導体を静脈内および、経口投与する事により、尿中、胆汁中へのセロトニン誘導体および、その代謝物の排泄と回収率について検討を行い、バイオアベイラビリティの算出を行う事により、他のポリフェノール類との吸収率の比較を実施した。

(3) セロトニン誘導体の生体内代謝の検討  
各種セロトニン誘導体の実験動物への投与後に生成した代謝物については、その存在を明らかにする為に、HPLCによる検討を行った。又、一般にグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体は多くのポリフェノール類の生体内代謝物として見出されているため、血清試料および、尿、胆汁試料に対して -glucuronidase および、sulfatase 処理を行い、これらの抱合代謝物の存在予測と生成量に関する知見を得た。しかし、生体内での存在形態が主に代謝物であった場合、代謝物の化学構造の決定(修飾位置の決定)はin vivo、in vitroを問わず、その後の同化合物の機能性研究にとって重要な点である。本研究では、生成した代謝物について酵素処理を行わず、代謝物のまま検出を行う分析条件を確立した。一方、代謝物の単離は尿および、胆汁中での同代謝物の生成を確認後、オープンカラムおよび、セミ分取HPLCによる精製を行った。単離した種々の代謝物についてその構造を質量分析および、核磁気共鳴法などの機器分析により検討した。更にセロトニン誘導体の経口投与後、経時的にラットより臓器を摘出し、各種臓器中における存在様式を検討する。対象臓器としては肝臓、腎臓、肺、脾臓などの種々の末梢臓器のほか、既に抗動脈硬化作

用が報告されていることから、心臓および、大動脈などの血管組織への分布についても見当を加えた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ベニバナ種子中の主要抗酸化成分の同定

本研究ではベニバナ油搾油後のベニバナ種子残渣について、機能性食品としての可能性を体内動態の観点からの解明を試みた。まず、ベニバナ種子は良好なラジカル消去作用を有したため、ベニバナ種子のメタノール抽出物に対してカラムクロマトグラフィーによる分画を行い、成分の特定を実施した結果、2種類のセロトニン誘導体 p-coumaroyl-serotonin(CS) および feruoyl-serotonin (FS) が同定された (IC50:CS=17.8  $\mu$ M、FS=18.7  $\mu$ M)。これまでの報告で、マウスにおけるベニバナ種子残渣とセロトニン誘導体の混餌投与試験により、動脈硬化抑制作用を示すことが報告されている。そのため、ベニバナ種子残渣を摂取した場合に得られる生体内での機能は上述の2種類のセロトニン誘導体であることが示唆されている。本研究の結果は、これらの成分がベニバナ種子残渣中の抗酸化成分の主体であることを生体外においても明らかにすることが出来た。

##### (2) セロトニン誘導体の生体内吸収の検討

ベニバナ種子に含まれる2種類のセロトニン誘導体は生体内外において抗酸化活性の主体であることが実証されたが、これらの成分の生体内における機能発現機構については全く解明されていないため、セロトニン誘導体の消化管吸収の解明や、血中濃度の評価は重要な課題である。まず、ラット血漿中におけるセロトニン誘導体の安定性について評価を行ったところ、37℃における経時分解は観察されず、血中において安定であることが示された。そこで、次に生体内にセロトニン誘導体を投与した場合の吸収と、血中濃度推移の評価を頸部静脈カテーテルを施したラットを用いて検討した。その結果、CS、FS は共に経口投与後 (100 mg/kg 体重)、血中にインタクトの形で検出されることが明らかとなった。何れの誘導体も経口投与後 5 分で血中に見出され、投与後 30 分で最高血中濃度 (CS=40  $\mu$ M、FS=90  $\mu$ M) に達した。その後、経時に減少し、投与後 12 時間では血中に見出されなかった。これまでに報告されているフラボノイドの体内動態に関する研究との比較から、セロトニン誘導体経口投与後の血中濃度は一般のポリフェノール類と比較して、高値であることが明らかとなった。

一方、CS および、FS をそれぞれ静脈内投

与した場合、これらの誘導体は何れも 2 コンパートメントモデルに従って、血中より消失することが明らかとなった。このことから、投与されたセロトニン誘導体の一部は臓器に移行することが示唆された。

##### (3) セロトニン誘導体の生体内代謝の検討

一般に、ポリフェノール成分を経口摂取した場合にはグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体などの代謝物が多量に見出される。本研究では一般のフラボノイドよりも高濃度のセロトニン誘導体を血中に見出したが、代謝物の生成の有無についても検討を行った。即ち、セロトニン誘導体経口投与後 (100 mg/kg) の血漿をグルクロニダーゼ処理することにより CS のグルクロン酸抱合体生成量について検討を加えた。その結果、CS の血漿中濃度が 5-6 倍増加したため、グルクロン酸抱合体が血中における主要な代謝物であることが示唆された。そこで、グルクロン酸抱合体を分離可能な分析条件を確立し再度、分析を実施したところ、CS および FS 投与後の血漿中に、代謝物と思われる新規ピーク (代謝物 X および、代謝物 Y) を検出した。CS 投与後の血漿をグルクロニダーゼ処理したところ、反応時間および、グルクロニダーゼ添加量依存的な代謝物 Y のピーク減少に伴い、CS の増加が観察されたため、代謝物 Y は CS のグルクロン酸抱合体と推察された。一方、代謝物 X の生成量はピークエリアで比較した場合、血中に検出される CS の 10 倍以上の濃度で存在することが明らかとなった。しかし、グルクロニダーゼ処理による代謝物 X の減少は 30% 程度であったため、代謝物 X はグルクロン酸抱合体 (X1) と他の代謝物 (X2) の混合物であることが示唆された。一方、FS についても CS と同様の結果を得た。

今回評価した、セロトニン誘導体および、その代謝物の生体内存在率から、セロトニン誘導体の一部は肝臓などの各種臓器に分布することが示唆された。そこで、脳、肝臓、腎臓、そして、セロトニン誘導体に動脈硬化抑制作用が見出されていることから、中心静脈をラットより採取して、これらの各種臓器におけるセロトニン誘導体の分布に関して検討を行ったところ、中心静脈において、CS および、FS が投与したままの形で分布することが明らかとなった。又、中心動脈以外の臓器では、臓器由来の成分の妨害により、分析が困難であったことから、今後、新たな抽出法および、試料処理方法の開発が必要である。

本研究より得られたセロトニン誘導体の消化管吸収、代謝および、中心静脈における分布などの結果は、ペニバナ種子由来セロトニン誘導体の体内動態について新たな知見を与えると共に、生体内でのこれらの成分の機能発現機構を解明するためには、今回見出された主要な代謝物の構造決定が不可欠であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Katsutoshi Tanno, Takashi Ichiyangi, Yasumasa Ikeshiro and Yoshihiko Hatano  
Pharmacokinetic behavior of serotonin derivatives, major antioxidants in safflower seed., Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, 41, page 94, 2007.

[学会発表](計1件)

Katsutoshi Tanno, Takashi Ichiyangi, Yasumasa Ikeshiro and Yoshihiko Hatano  
Pharmacokinetic behavior of serotonin derivatives, major antioxidants in safflower seed.  
International Conference on Food Factors for Health Promotion  
2007年11月29日  
京都国際会議場

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

一柳 孝司 (ICHIYANGI TAKASHI)

新潟薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号 00288226