

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月4日現在

機関番号：33108

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580161

研究課題名（和文） セロトニン誘導体の生体内代謝と抗酸化作用発現機構の解明

研究課題名（英文） Metabolism and antioxidant activity of serotonin derivatives

研究代表者

一柳 孝司（TAKASHI ICHIYANAGI）

新潟工科大学・工学部・教授

研究者番号：00288226

研究成果の概要（和文）：生活習慣病の予防効果が報告されている2種類のセロトニン誘導体を摂取した場合に、どのような形と量で体内に存在し、体内での抗酸化作用に寄与するかを検討した。その結果、何れの成分も極少量であるが、血中で口から摂取した形のまま検出された。一方、体内ではセロトニン誘導体が代謝を受けた形で多量に存在することを明らかにした。体内の代謝物は数種類が存在し、これらの代謝物が生活習慣病を予防している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Biological fate of two serotonin derivatives which prevent life-style related diseases were examined to evaluate antioxidant activity in vivo. These compounds were detected in rat blood plasma in their intact forms after oral administration, although their plasma concentrations were low levels. In contrast, high amount of metabolites derived from original serotonin derivatives were also detected in blood plasma suggesting possibility that these metabolites contribute prevention of life-style related diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：食品化学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：抗酸化物質、体内動態、予防医学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や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、大きな社会問題となっている。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所謂、メタボリックシンドロームに陥る場合が多い。そのため、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、これは複数の薬剤による副作用や薬物間の相互作用によるリスクの飛躍的な増加を意味し、その管理に対して多大な労力をはらう必要がある。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の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、我が国における医療費の著しい増加も懸念されている。そこで、これ

等の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。生活習慣病の発症には、長期間に摂取する食品の種類が大きく影響する。一方、食品には栄養素としての一次機能の他に、嗜好性を意味する二次機能、生体調節機能などの三次機能が知られている。そこで、カロリー制限などの食事療法に加え、食品に含有される三次機能成分に着目した各種難治性疾患の予防戦略は、我々が日常摂取する食品を積極的に利用する方法として注目されている。これまでに動脈硬化などの生活習慣病の発症には酸化ストレスが強く関与することから、抗酸化物質の摂取と生活習慣病の予防効果について様々な観点から研究が推進されている。これらの研究の過程で、種々のポリフェノール成分が有効成分として食品より単離され、生体内での抗酸化作用を基盤とする疾病予防効果が明らかにされると共に、生体内吸収・代謝などのいわゆる、体内動態についても詳細な検討がなされてきた。その結果、エピカテキンをはじめとする多くのポリフェノール成分は体内において、投与したままの形ではなく、多くの場合、代謝物や分解物として体内に存在する事が明らかにされている。これ等の知見は、食品含有成分の生体内における機能発現には代謝物が関与することを意味し、このことから食品成分の体内における機能発現機構の解明には体内動態の解明が不可欠である。

2. 研究の目的

ベニバナ種子残渣はベニバナ油の搾汁後、大量に生じる未利用資源であり、2種類のセロトニンヒドロキシ桂皮酸誘導体を主要な抗酸化物質として含むことが報告されており、これらの成分を apoE 欠損マウスへの混餌投与した場合、動脈硬化抑制作用を示す事が明らかにされている。その為、ベニバナ種子および、含有セロトニン誘導体は生活習慣病予防効果を持つ機能性食品および、その活性因子として有望であるが、セロトニン誘導体の吸収、代謝に関する研究は皆無であり、*in vivo*での機能性を裏付ける体内動態についての報告はなされていない。本研究は、ベニバナ種子に含まれる2種類のセロトニン誘導体 (p-coumaroyl-serotonin(CS)および、feruoyl-serotonin (FS)) の生体内吸収と代謝について検討を行い、これらの成分の代謝物を含めた体内における存在型および、存在量を明らかにすることにより、生体内における抗酸化作用への寄与を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セロトニン誘導体の吸収量の検討

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 (1, 5 および、10mg/kg体重) および、経口投与 (20, 50および、100 mg/kg体重) を行い、同化合物の生体内吸収および、代謝・排泄様式について検討を加えた。生体試料中の同化合物群の定量はphotodiode array検出によるHPLC法を利用した。採血は頸部静脈にカテーテルを施したラットに対して、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経時的に採血を行い、その血中動態を観察した。

(2) 生体内に生じるセロトニン誘導体代謝物の検索

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、セロトニン誘導体投与後に得られた血漿試料および、尿、胆汁試料に対して各種加水分解酵素 (β -グルクロニダーゼおよび、サルファターゼ) による酵素処理を行い、生体試料に含まれるセロトニン誘導体代謝物を投与型のセロトニン誘導体に変換することにより、血中の抱合代謝物の存在量を評価した。

(3) 生体内に見出されるセロトニン誘導体の主要代謝物の単離・構造決定

経口投与後に生体内に生じたセロトニン誘導体の主要代謝物について、酵素処理を行わずに分析可能な条件を設定した。血中での存在が確認された代謝物について、ラットより尿および、胆汁を回収して、オープンカラムおよび、セミ分取 HPLC による単離・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セロトニン誘導体の存在様式について血漿と同様の分析方法により検討を加えた。

4. 研究成果

(1) 生体内におけるセロトニン誘導体の検出と吸収率の検討

CS、FS をそれぞれ経口投与した場合、何れも血中に投与したままの形で見出される事を明らかにした。血中に見出される CS および、FS の血中濃度は、投与量に比例することが明らかとなった。又、これらの成分の血中濃度推移は、二峰性を示したことから、セロトニン誘導体の主要な消化管吸収部位が2カ所存在する可能性が示唆された。投与量に対する CS および、FS の吸収量はこれまで報告が成されてきた他のポリフェノール類と比較して、同程度であることが明らかとなった。従来のポリフェノール類の吸収動態の評価は主に、血中濃度推移と尿中排泄量から吸

収量が見積もられてきた。しかし、経口投与後の対象成分の血中濃度推移からでは、経口投与量に対する吸収量は算出できず、更に尿中への排泄を吸収量として代用する場合、対象成分が腎臓など排泄臓器への分布や尿中排泄後に分解を受ける可能性があるため、正確な量の算出は不可能である。本研究では、セロトニン誘導体の投与量に対する吸収量を血中において評価するために、経口投与と共に静脈内投与を合わせて実施し、薬物動態で吸収率の指標として用いられるバイオアベイラビリティを算出した。その結果、各誘導体は何れもその吸収率が6%程度である事が明らかとなった。このことから、誘導体のヒドロキシ桂皮酸部分の構造が吸収量に大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(2) セロトニン誘導体代謝物の生成量の評価

セロトニン誘導体投与後の血しょうを各種酵素処理することにより投与型であるCSおよび、FSの濃度が著しく増加したことから、血中においてはこれらの誘導体の大部分が抱合代謝物として存在することを明らかにした。通常、医薬品の場合、代謝物についてはバイオアベイラビリティの様な吸収量の評価はなされないが、経口摂取が基盤となる食品成分では特に消化管内の代謝が盛んであるため、代謝物としての存在量の評価が重要である。そこで、本研究では血中における代謝物としての吸収量を評価するために、新たに血中存在量を定義した。抱合体の血中存在量を評価した結果、各誘導体共に投与量の30%程度が血中に存在することを明らかにした。今回、明らかにされた代謝物の生体内存在量は、これまでに見積もられてきたポリフェノール類の抱合体生成量よりも3倍程度高く、このことがインドール型ポリフェノールであるセロトニン誘導体の生体調節機能の発現に寄与しているものと推察される。

(3) セロトニン誘導体の臓器分布

セロトニン誘導体の臓器分布を検証するために、CS投与後の各種末梢臓器に対して酵素処理前後のホモジネート上清を分析した結果、酵素処理により特に腎臓におけるCSの増加が認められた。セロトニン誘導体の主な機能は抗動脈硬化作用であり、主に血管内での機能発現が知られているが、本研究の結果から、セロトニン誘導体は末梢臓器においても代謝型として存在することが示唆されたため、今後、各種臓器における代謝物の詳細な存在量の解明と、臓器保護作用の可能性について詳細な検討が望まれる。

血中においてセロトニン誘導体の主要な存在形態が抱合体であったことから、抱合体

を代謝物のまま検出可能なHPLC分離条件を設定し、その血中存在量をCS換算量として定量したところ、その血中存在量は投与したCSの5倍程度であることが明らかとなった。一方、抱合体よりも更に極性の高い代謝物がCSの8倍程度の高濃度で血中に存在する事が明らかとなった。代謝物が存在する血しょう試料をグルクロニダーゼ処理したところ、CS抱合体のピークは完全に消失したことから、生成量の少ない代謝物のピークはグルクロン酸抱合体であることが明らかとなった。しかし、存在量の高い代謝物は酵素処理によりそのピークの一部が消失したが、CSピークの増加が認められなかったことから、抱合化に加えて更に異なる代謝を受けた成分であることが示唆された。

抱合体その他の代謝物の生体内存在量から、これらの代謝物が生体内における機能発現に関与することが強く示唆されたため、その化学構造の決定を試みた。同代謝物を各種クロマトグラフィーにより尿・胆汁より単離・精製した結果、グルクロン酸抱合体のピークに関しては精製が可能であり、その吸収スペクトルはCSと類似のものであった。そこで、質量分析による構造情報の取得を試みたが、分子イオンピーク、フラグメントピークを得ることができなかった。しかし、分取した代謝物に対してグルクロニダーゼ処理を実施したところ、同ピークの減少に伴い、CSピークの増加が認められたため、グルクロン酸抱合体であることが強く示唆された。CSおよび、FSはフェノール性水酸基をそれぞれ2つずつ分子内に有していることから、今後、抱合化の位置を決定することが重要である。

一方、生成量の多い代謝物について通常的手法では分取操作の過程で、対象成分の分解が生じ、安定に単離することができなかった。また、同代謝物の分解に伴う、新規ピークの増加もクロマトグラム上に認められなかった。同代謝物は生体内における主要な存在形態であるため、セロトニン誘導体および、ベニバナ種子の機能性に強く関与することが期待される。今後、本研究で生体内における存在が明らかとなった多量のセロトニン誘導体代謝物の構造決定および、各種活性評価がセロトニン誘導体および、ベニバナ種子抽出物の生体内機能発現機構の研究に不可欠となるが、本研究における検討の結果、代謝物を生体試料から安定に単離する手法および、分析方法の確立が必須である。

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)

① 一柳孝司、機能性食品成分の体内利用率

の解明 - ポリフェノールを中心に -、食品と開発、査読無、45、3、2010、21-23

〔学会発表〕(計5件)

- ① 一柳孝司、カシスポリフェノールの機能性、第65回日本栄養・食糧学会、2011年5月14日、お茶の水大学
- ② 一柳孝司、食品成分の機能性評価：体内動態からのアプローチ、日本フードファクター学会ミニシンポジウム、2011年5月18日、東京ビッグサイト
- ③ 一柳孝司、アントシアニンの構造と生体内吸収・代謝の関係、第56回日本食品化学工学会、2009年9月11日、名城大学
- ④ 一柳孝司、カカオポリフェノールのバイオアベイラビリティと体内動態について、第14回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム、2009年9月18日、経団連会館
- ⑤ 狩野俊輔、市村豊仁、佐々木和恵、夏目みどり、一柳孝司、投与形態の違いによるラットにおける(-)-Epicatechinの吸収・代謝経路の検討、日本フードファクター学会学術集会、2009年11月15日、神戸大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一柳 孝司 (TAKASHI ICHIYANAGI)
新潟工科大学・工学部・教授
研究者番号：00288226

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：