

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350115

研究課題名(和文)天然由来抗酸化物質の調理加工における機能性評価と生体内に及ぼす影響

研究課題名(英文) Biotransformation of naturally occurring polymethoxyflavones and the effect of cooking processing on their anti-oxidative activity.

研究代表者

太田 千穂(OHTA, CHIHO)

中村学園大学・栄養科学部・講師

研究者番号：80271435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：柑橘果皮由来のPMF類のうち、NBLとHeptaMFは調理加工を想定した実験で、かなり熱安定性を示した。次に、両化合物のヒトを含む動物を用いた体内動態を調べた結果、1) いずれも小腸からほぼ100%近く吸収されること、2) 脱メチル化反応が主な代謝経路でありCYP3AやCYP1Aが関与すること、3) 代謝物の数や生成量に種差があること、4) 抗酸化活性が、加熱処理および特定の代謝物の増加により増強されること、などが明らかとなった。また、Caco-2細胞を用いた取込み機構実験でNBLはトランスポーター(P-glycoproteinとMRP2)の弱い阻害剤であることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Naturally occurring polymethoxyflavones found in Kara mandarin (*Citrus reticulata* Blanco), NBL and HeptaMF, showed high stability for heat treatment at 100 degrees Celsius. More than 99.8% of both NBL and HeptaMF dosed was absorbed from the gastrointestinal tract in rats. The demethylation was a main pathway in the metabolism of both compounds by CYP3A and CYP1A enzymes. There was a species difference in metabolic pattern of both compounds. Anti-oxidative activity of extracts from the peel of Kara mandarin was increased by heat treatment at 100 degrees Celsius. Metabolites of HeptaMF had higher anti-oxidative activity than HeptaMF itself. NBL was a weak inhibitor of transporters such as P-glycoprotein and MRP2 in Caco-2 cells.

研究分野：複合領域

キーワード：ポリメトキシフラボン類 カラマンダリン果皮 熱安定性 抗酸化活性 生体内動態

1. 研究開始当初の背景

フラボノイド類は、野菜や果物類・柑橘類など植物界に広域に分布しており、多くの水酸基が置換されたポリフェノール型とメトキシ基で置換されたポリメトキシ型に分類できる。その生理作用として、抗酸化作用、抗炎症作用などが数多く見いだされており、生活習慣病予防に寄与する機能性成分「ファイトケミカル」として大変注目されている。しかしながら、フラボノイド類の生理作用が、親化合物によるのか、あるいは代謝物によるのか、という点はほとんど解明されていない。

我々は数種類のフェノール型およびポリメトキシ型フラボン(PMF)類の動物における生体内動態、すなわち、小腸からの吸収および尿中への排泄について調べたところ、ポリメトキシ型の方がより吸収効率が高かったことから、カラマンダリン果皮に比較的含有量が多いPMF類(ノビレチン(NBL)、ヘプタメトキシフラボン(HeptaMF)、ナツダイダイン(NTD))に着目した。

ところで、我々はフラボノイド類を毎日数10~数100 mg程度摂取しているとされているが、これらの植物成分は、一般に調理加工後に減少することが知られている。しかしながら、そのような調理加工後の減少が、どのようなメカニズムによるのかはほとんどわかっていない。そこで、(1)調理加工、特に加熱処理後の機能性成分の物理的変化を調べる。(2)PMF類の動物における生体内変化をさらに調べる。(3)PMF類の親化合物と代謝物の生理活性の強さを比較する。これらの検討結果より、調理加工の際、機能性成分を効率よく摂取するための最善の方法を考察する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、天然由来抗酸化物質として、柑橘類カラマンダリン果皮由来のPMF類の調理加工に伴う加熱による物理的変化、すなわち熱安定性を明らかにし、機能性評価を行うことと、生体内動態を調べ、代謝活性化を考慮した調理加工による影響評価を行うことである。本研究は、カラマンダリン果皮由来のPMF類、NBL、HeptaMF、NTDに

ついて(1)化学的作用(溶質、溶媒)に伴う物理的変化(主に熱)の影響について親化合物の挙動を明らかにすること、(2)ラットおよびヒト肝における生体内動態(酸化、脱メチル化)による生物活性の定量と代謝物を同定、およびヒト小腸上皮細胞モデルであるCaco-2細胞を用いた立体選択的な取り込み機構を調べ比較検討すること、(3)ラットにおける生体内動態(吸収、代謝、分布、排泄)を調べる。(4)PMF類の親化合物とその代謝物について抗酸化活性の強さを比較するとともに、抗酸化活性に及ぼす加熱の影響および機能性評価を行なう。

3. 研究の方法

(1) PMF類の分離精製

試料はフラベドおよびアルベドが混在した状態のカラマンダリン乾燥果皮を使用した。また、親化合物であるNBL、HeptaMF、NTDは、乾燥粉碎したカラマンダリン果皮を有機溶媒で抽出し、分取用カラムを用いて分離精製した。図1にはこれら3種類のHPLCによる溶出パターンを示す。

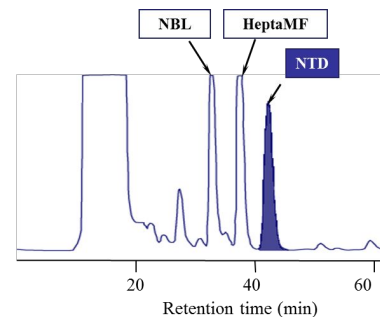


図1 HPLC クロマトグラム

(2) 生物活性試験

実験動物およびヒト肝

実験動物は、Wistar系の雄性ラットを用いた。薬物投与なしの未処理(Con)群とチトクロムP450(CYP)の誘導剤であるフェノバルビタール(PB)(20 mg/kg/day)、3-メチルコラントレン(MC)(80 mg/kg/day)またはデキサメタゾン(DEX)(100 mg/kg/day)を3日間腹腔内投与したものをそれぞれPB前処理群、MC前処理群およびDEX前処理群として、常法によりそれぞれの肝ミクロゾームを調製した。一方、ヒト肝ミクロゾームは、白人男性10名

または個人からなるものを BD Gentest 社より購入した。

代謝物の分析

0.2 mM の各 PMF をラット肝または市販ヒト肝ミクロゾーム、NADPH 生成系、HEPES 緩衝液 (pH 7.4) とともに好氣的に 37 °C で 20 分間インキュベートした。その後、冷メタノールで反応停止し、氷中で 30 分間放置後、遠心分離で得られた上清を HPLC および LC-MS で分析した。なお、それぞれの PMF による検量線を作成し定量した。

(3) ヒト小腸上皮細胞を用いた膜透過性試験

20 μM の各 PMF を Caco-2 細胞とともにインキュベートし、一定時間後、細胞内に取り込まれた親化合物または代謝物の透過量を HPLC で定量した。

(4) 動物における生体内動態

各 PMF 類を Wistar 系雄性ラットに 1 匹あたり 10 mg を単回経口投与した。その後 2 日間ずつ 4 日間の尿および糞を採取し、親化合物の吸収と代謝物の排泄を HPLC および LC-MS で定量した。

(5) PMF 類の熱安定性

精製した NBL および HeptaMF、またはカラマンダリン乾燥果皮を 80% エタノールまたは緩衝液 (pH 3.0、7.0、9.0) 抽出液を未加熱 (室温で 60 分間) あるいは加熱処理 (100 °C で 60 分間) 後、遠心分離し、得られた上清を HPLC および LC-MS で定量分析した。

(6) 抗酸化活性の測定

DPPH ラジカル消去活性

エタノールおよび各 pH 緩衝液抽出液を MES 緩衝液 (pH 6.0)、DPPH ラジカル溶液を添加後、室温で 20 分間反応後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

β-カロテン脱色法

エタノールおよび各 pH 緩衝液抽出液を 0.2 M リン酸緩衝液にリノール酸-β-カロテンエマルジョンを添加後、50 °C で 10 分間ごとに 60 分間までマイクロプレートリーダーで吸

光度を測定した。

なお、いずれの抗酸化活性の標準物質として Trolox を使用し、その検量線から活性を求めた。

4. 研究成果

(1) PMF 類の分離精製

柑橘類カラマンダリン果皮から PMF 類を抽出後、HPLC による精製を行い、NBL、HeptaMF および NTD をそれぞれ数 10 mg 得た。

(2) 生物活性試験

本研究では、NBL の C3 位にメトキシ基が置換した HeptaMF と水酸基が置換した NTD の両化合物についてラット肝による *in vitro* 代謝を調べ、NBL の代謝パターンと比較した。また、3 種類の酵素誘導剤、すなわち、PB、MC、DEX の影響についても検討した。HPLC と LC-MS による分析を行った。

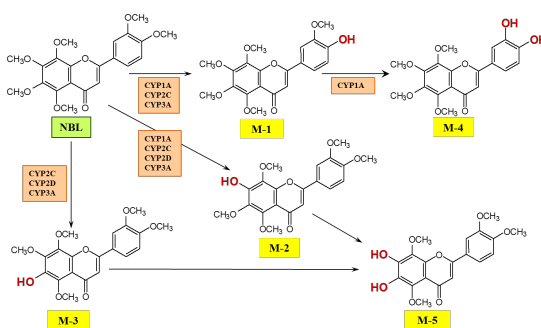


図 2 NBL の推定代謝経路

NBL のラット肝における *in vitro* 代謝については、3 種類の一脱メチル化体と 2 種類の二脱メチル化体が生成されること、さらに、これらの生成に代謝酵素 CYP1A と CYP3A が関与することを明らかにした。以上の結果から、図 2 に示すような代謝経路を推定し報告した (Koga *et al.*, 2007)。一方、ヒト肝による *in vitro* 代謝では、3 種類の一脱メチル化体 (7-OH-NBL > 4'-OH-NBL > 6-OH-NBL) のみが生成され、代謝酵素 CYP1A と CYP3A が関与することを報告した (Koga *et al.*, 2011)。

HeptaMF のラット肝による代謝では、主代謝物として 3 種類が生成され、これらはいずれも一脱メチル化体 (7-OH 体 > 4'-OH 体 > 6-OH 体) であること、さらに 2 種類の二脱メ

チル化体も生成されること、また、CYP3A と CYP1A が関与することを明らかにした。一方、ヒト肝では、4 種類の代謝物が生成され、主代謝物(一脱メチル化体)の生成には、CYP3A が強く関与することが明らかとなった。

NTD のラット肝による代謝では、4 種類の一脱メチル化体と 2 種類の二脱メチル化体が生成され、代謝酵素 CYP3A と CYP1A が関与することが明らかになった。一方、ヒト肝では、主代謝物として 2 種類の一脱メチル化体が生成された。

以上の結果より、HeptaMF および NTD は、NBL より代謝物の数が多いことが明らかとなった。また、NBL と同様に、CYP1A と CYP3A の関与が大きいことが示唆された。

(3) ヒト小腸上皮細胞を用いた膜透過性試験

Caco-2 細胞を用いて NBL の消化管における輸送機構について検討した。NBL の頂側膜側および側底膜側からの輸送は等しく、分泌指向性は認められなかった。また、トランスポーター(P-gp および MRP2)の阻害剤(ベラパミルおよびピンブラスチン)を用いて NBL の輸送を調べた結果、阻害は認められなかった。一方、NBL は、ピンブラスチンの頂側膜側からの輸送を 2.5 倍増加させ、側底膜側からの輸送を約 15%減少させた。これらの結果から NBL は両トランスポーターの弱い阻害剤ではあるが、それらの基質ではないことが示唆された。

(4) 動物における生体内動態

3 種類の PMF 類のうち、NBL および HeptaMF につき、ラットにおける in vivo 代謝を調べた。すなわち両化合物をそれぞれ経口で雄性ラットに単回投与し、投与後 2 日間ごとの糞および尿への代謝物の排泄を調べた。

NBL 投与ラットの糞中には、投与後 2 日間で NBL 未変化体(投与量の約 0.2%)と 4 種類の代謝物(投与量の 4.4%)が検出された。その主代謝物は 4'-OH-NBL と 3',4'-diOH-NBL であり、糞中代謝物の約 70%を占めていた。また、尿中には投与後 2 日間で NBL 未変化体(投与量の 0.2%)と 5 種類の代謝物(投与

量の 11.8%)が検出された。その主代謝物は 4'-OH-NBL で、全尿中代謝物の約 80%を占めていた。次に、抱合体の検索を試みた結果、NBL 投与ラットの糞尿中には確認されなかった。

HeptaMF 投与ラットの糞中代謝物の HPLC クロマトグラムを図 3 に示した。その結果、投与後 2 日間では HeptaMF 未変化体が投与量の約 0.2%、全代謝物(12 種類)は投与量の 1.3%が検出された。主代謝物は M5(一脱メチル化体)で、糞中代謝物の 33%を占めていた。結局、糞中への排泄は投与後 2 日間でほぼ終了することが明らかとなった。

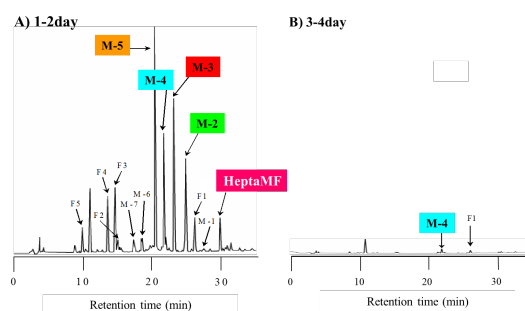


図 3 HeptaMF 投与後の糞中代謝物の HPLC クロマトグラム

次に、尿中代謝物を調べた。図 4 には HeptaMF 投与後の尿中代謝物の HPLC クロマトグラムを示した。投与後 2 日間で 9 種類の代謝物(投与量の 11.6%)が検出された。その主代謝物は 3 種類の一脱メチル化体(4'-OH 体(M2) > 7-OH 体(M3) > 6-OH 体(M4))で、尿中代謝物の約 8 割を占めていた。投与後 3~4 日間では尿中代謝物の M4(6-OH 体)のみが多く検出され、この代謝物は排泄速度が遅いことが示唆された。

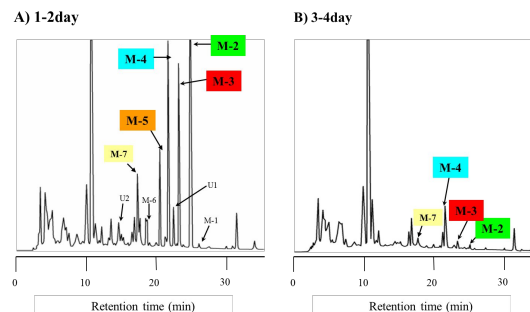


図 4 HeptaMF 投与後の尿中代謝物の HPLC クロマトグラム

次に、抱合体の検索を試みた結果、HeptaMF 投与後の糞中では代謝物 M1 が約 30 倍、7-OH 体(M-3)および M5 が 2 倍に、また、尿中では M1 のみが約 25 倍に増加した。この結果から、抱合体の存在が示唆された。

(5) PMF 類の熱安定性

カラマンダリン乾燥果皮を 80%エタノールまたは緩衝液 (pH 3.0、7.0、9.0) 抽出液を未加熱または 100 で 1 時間の加熱処理後の成分含量の変化を比較した。まず、80%エタノール抽出液と比較すると、加熱により pH 7.0 および pH 9.0 でそれぞれの未加熱の約 4 倍および約 1.5 倍に増加した。

次に、精製した NBL および HeptaMF を 80%エタノールまたは緩衝液 (pH 3.0、7.0、9.0) 抽出液を 100 で 1 時間の加熱処理した結果、熱による変化はなく、安定性が高いことが明らかとなった。

(6) 抗酸化活性の測定

カラマンダリン乾燥果皮を 80%エタノールまたは緩衝液 (pH 3.0、7.0、9.0) で抽出し、この溶液の抗酸化活性を未加熱または 100 で 1 時間の加熱処理後を調べて比較した。

DPPH ラジカル消去活性

80%エタノール抽出液では 42 $\mu\text{mol-TE/dry weight}$ であった。それぞれの pH 抽出液では、いずれにおいてもエタノール抽出液の 80%程度であった。加熱処理後も pH 3.0 および 7.0 では約 90%程度であった。また、pH での未加熱と加熱処理後を比較してみると、加熱によって、それぞれ未加熱の 1.1 から 1.2 倍に活性が高くなった。さらに、加熱処理後の pH 9.0 ではエタノール抽出液と同程度の活性の強さを示した。

β -カロテン退色法による抗酸化活性

80%エタノール抽出液では 21 $\mu\text{mol-TE/dry weight}$ であった。一方、それぞれの pH 抽出液の未加熱および加熱処理後では、すべての pH 抽出液においてエタノール抽出液と比べて半減していた。

カラマンダリン果皮においては水系よりエタノール系による抽出液の方が高い抗酸化活性を示すことが明らかとなった。また、

加熱処理することにより、活性が高まることから、加熱による影響を受けることが示唆された。

HeptaMF 代謝物の抗酸化活性

親化合物溶液とその代謝物生成混合溶液の抗酸化活性を調べたところ、DPPH ラジカル消去活性および β -カロテン退色法による活性ともに代謝物の増加に伴い、親化合物より高い活性を示すことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

太田千穂, 緒方 瞳, 山本健太, 原口浩一, 加藤善久, 遠藤哲也, 古賀信幸. 黒ショウガ成分 5,7,3',4'- Tetramethoxyflavone のラット肝ミクロゾームによる代謝. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要, 2016, **48**, 155-161. (査読有)

Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Endo T, Kimura O, Koga N. Distribution and excretion of 2,2',3,4',5,5'-heptachloro- biphenyl (CB187) and its metabolites in rats and guinea pigs. *Chemosphere*, 2015, **118**, 5-11. (査読有)

Kimura O, Ohta C, Koga N, Haraguchi K, Kato Y, Endo T. Carrier-mediated uptake of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 2014, **154**, 145-150. (査読有)

Yamamoto K, Yahada A, Sasaki K, Funakoshi-Yoshida A, Ohta C, Koga N, Ohta H. Detection of adulterated Shiikuwasha juice by sensory evaluation, colorimetric value and volatile components. *Food Science and Technology Research*, 2013, **19**(5), 843-848. (査読有)

太田千穂, 加藤善久, 原口浩一, 遠藤哲也, 古賀信幸. ラットおよびモルモットの腎および小腸におけるノビレチンの代謝. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要, 2013, **45**, 141-149. (査読有)

〔学会発表〕(計9件)

木村 治, 藤井由希子, 原口浩一, 太田千穂, 古賀信幸, 加藤善久, 遠藤哲也. Caco-2細胞におけるアリストロキア酸 I の膜透過に及ぼすケルセチンの影響, 日本薬学会第136年会, 2016年3月26-29日, 「パシフィコ横浜(横浜)」

山本健太, 太田千穂, 原口浩一, 遠藤哲也, 加藤善久, 古賀信幸. 黒ショウガ成分 3,5,7,4'-Tetramethoxyflavone の動物肝ミクロゾームおよびヒトチトクロム P450 による代謝, 平成27年度(公社)日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および(公社)日本食品科学工学会西日本支部合同大会, 2015年10月30,31日, 「ネストホテル那覇(沖縄)」

Ohta C, Kato Y, Haraguchi K, Endo T, Koga N. In vitro metabolism of nobiletin in the small intestine and kidney of rats and guinea pigs, 12th Asian Congress of Nutrition, 2015年5月14-18日, 「パシフィコ横浜(横浜)」

Yamamoto K, Ohta C, Ogata H, Endo T, Kimura O, Kato Y, Haraguchi K, Koga N. In vitro metabolism of kaempferol tetramethyl ether by rat liver microsomes, 12th Asian Congress of Nutrition 2015年5月14-18日, 「パシフィコ横浜(横浜)」

緒方 瞳, 太田千穂, 山本健太, 原口浩一, 遠藤哲也, 木村 治, 加藤善久, 古賀信幸. トリメチル化 apigenin および genistein のラット肝ミクロゾームによる代謝, 平成26年度 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会, 2014年10月11,12日「熊本県立大学(熊本)」

山本健太, 矢羽田 歩, 佐々木久美, 船越淳子, 太田千穂, 古賀信幸, シークワシャー果汁の真正評価に関する研究: 化学的指標の検討, 第57回(平成26年度)果汁技術研究発表会, 2014年9月19日, 「ヤクルトホール(東京)」

山本健太, 緒方 瞳, 太田千穂, 原口浩一, 遠藤哲也, 木村 治, 加藤善久, 古賀信幸. Kaempferol tetramethylether のラット肝ミクロゾームによる代謝, 第68回日本栄養・食糧学会大会, 2014年5月30日-6月1日「酪農学園大学(札幌)」

緒方 瞳, 太田千穂, 山本健太, 加藤善久, 原口浩一, 古賀信幸. テトラメトキシフラボノイド類のラット肝ミクロゾームによる代謝, 平成25年度 日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会, 2013年10月18,19日, 「九州大学(福岡)」

Ohta C, Kato Y, Haraguchi K, Koga N. In vitro metabolism of diosmetin and hesperetin by rat liver microsomes, 20th International Congress of Nutrition, 2013年9月15-20日, 「Granada(スペイン)」

〔その他〕

ホームページ等

<http://soran.nakamura-u.ac.jp/profile/jj.peJGJRCKctIjwPzFM05thg==.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 千穂 (OHTA, Chiho)
中村学園大学・栄養科学部・講師
研究者番号: 80271435

(2) 研究分担者

古賀 信幸 (KOGA, Nobuyuki)
中村学園大学・栄養科学部・教授
研究者番号: 80136514

(3) 連携研究者

山本 健太 (YAMAMOTO, Kenta)
中村学園大学・栄養科学部・助手
研究者番号: 50709582

(4) 研究協力者

緒方 瞳 (OGATA, Hitomi)