

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19217

研究課題名(和文)米特徴成分  $\gamma$ -オリザノールの吸収代謝解明から導く新ビタミン様成分の可能性創成研究課題名(英文) Possibility creation of new vitamin-like component derived from the elucidation of absorption metabolism of rice characteristic component  $\gamma$ -oryzanol

研究代表者

仲川 清隆 (Nakagawa, Kiyotaka)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：80361145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)： $\gamma$ -オリザノールの吸収代謝の解明を通して、 $\gamma$ -オリザノールのビタミン様活性に繋がり得る知見を得ようとした。そのために、血液や臓器といった生体サンプルの解析に必要な、 $\gamma$ -オリザノールの分析法(抽出法、精製法、LC-MS/MS条件)を構築した。次いで、構築した分析手法を用いて、 $\gamma$ -オリザノールを長期的に摂取したマウスでは血液や臓器に $\gamma$ -オリザノールが蓄積し、生理作用を発揮する可能性を見出した。さらに、 $\gamma$ -オリザノールが腸管吸収されることや吸収後に代謝されることを明らかにした。加えて、これまで米にのみ含まれていると考えられていた $\gamma$ -オリザノール分子種が大麦にも含まれることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定保健用食品をはじめとする機能性食品などの開発では、その食品成分の消化吸収代謝を理解することは非常に重要と考えられる。本研究成果は生体における $\gamma$ -オリザノールの吸収代謝機構の一端を明らかにした。さらには、 $\gamma$ -オリザノール生体や食品において常時存在することを示唆しており、 $\gamma$ -オリザノールがビタミン様活性を有する可能性を後押しする結果を得た。本研究によって健康増進にむけた $\gamma$ -オリザノールのさらなる活用が期待されることから、その社会的波及性は大きい。

研究成果の概要(英文)：We aimed to explore the potential vitamin-like activities of  $\gamma$ -oryzanol via elucidation of the mechanisms by which  $\gamma$ -oryzanol is absorbed and metabolized. Analytical methods (i.e., extraction, purification, and LC-MS/MS methods) to analyze  $\gamma$ -oryzanol from in vivo samples such as plasma and organs were developed. With the use of such methods, we analyzed the blood and organs of mice following a long-term feeding of  $\gamma$ -oryzanol and found the possibility that a part of  $\gamma$ -oryzanol accumulates in vivo to demonstrate bioactivity. Additionally, we demonstrated that  $\gamma$ -oryzanol is absorbed from the intestine and that a part of  $\gamma$ -oryzanol is metabolized after intestinal absorption. We also revealed that  $\gamma$ -oryzanol molecular species that were previously considered to be characteristic to rice were also contained in barley. These features may potentially enable considering  $\gamma$ -oryzanol as a vitamin-like compound.

研究分野：食品機能学

キーワード： $\gamma$ -オリザノール 吸収代謝 ビタミン様活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 食品成分の消化管からの吸収と体内での代謝の理解の重要性

食品機能性の研究が、国内外で積極的に行われている。しかし、たとえ試験管内 (*in vitro*) 試験で食品成分に生理機能が観察されても、その化学構造が生体内 (*in vivo*) では代謝を受けて構造変化しているケースは多い。したがって、食品成分の消化管からの吸収と体内での代謝の理解は重要である。これらの背景から、我々は、食品成分の生体内での機能評価において、「選択性が高く高感度な分析手法を開発し、吸収や体内での代謝と代謝型を考慮する」(図1) こうしたストラテジーで研究を展開してきた。特に、特定保健用食品をはじめとする機能性食品などの開発では、その食品成分の消化吸収代謝を理解することは非常に重要と考えられる。

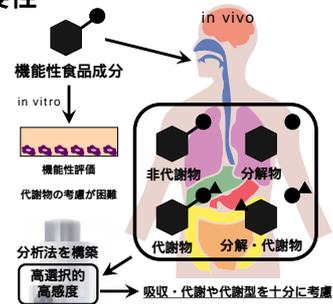


図1. 食品成分の生体内での機能評価に向けた研究ストラテジー

(2)  $\gamma$ -オリザノールの吸収と代謝：新たなビタミン様成分の可能性

上述の経緯から、我々は、カテキンなどの様々な食品成分について、化学発光検出器や質量分析装置 (MS、MS/MS) を活用して分析法を開発し、吸収代謝を評価して、生理作用発現との関係評価を進めてきた。こうした中で、最近、米の糠や胚芽に特徴的に含まれる  $\gamma$ -オリザノールをマウスに与えると、従来の学説 (体内で速やかに分解) とは異なり、 $\gamma$ -オリザノールはそのままの形で吸収され、体内に存在することを見出した (図2)。さらに、実は、マウスの市販固形食には  $\gamma$ -オリザノールが少なからず含まれ、故に、通常の市販固形食で飼育しているだけのマウス血中にも  $\gamma$ -オリザノールが存在することを見出しつつある。したがって、常時、 $\gamma$ -オリザノールは体内に存在していると言えます、 $\gamma$ -オリザノールには「ビタミン様物質」という概念は従来なかったものの、その確固たる活性・薬理作用 (食品機能成分や医療用医薬品として使用されている) を踏まえ、 $\gamma$ -オリザノールのビタミン様活性が想定される。

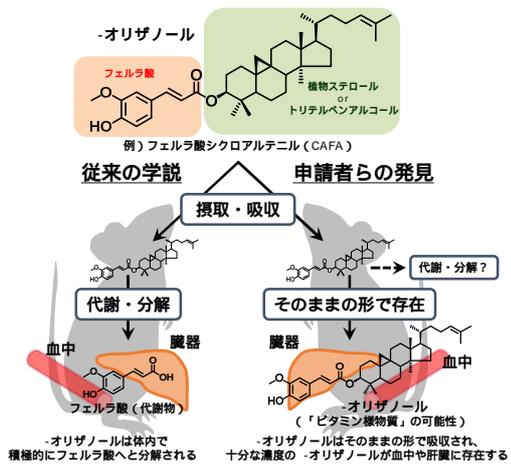


図2.  $\gamma$ -オリザノールの体内動態に関する新規発見と「新規ビタミン様物質」の可能性

2. 研究の目的

上記の我々の知見に基づき、本研究課題「米特徴成分  $\gamma$ -オリザノールの吸収代謝解明から導く新ビタミン様成分の可能性創成」では、 $\gamma$ -オリザノールの吸収代謝のさらなる解明を行い、 $\gamma$ -オリザノールのビタミン様活性に繋がり得る知見を得ようとした。そのために、本研究課題でははじめに、血液や臓器といった生体サンプルの解析に必要な、 $\gamma$ -オリザノールの分析法(抽出法、精製法、LC-MS/MS条件)の構築を行った。次いで、構築した分析手法を用いて、マウスの  $\gamma$ -オリザノール摂取と血液や臓器分布、およびその影響を検討した。吸収代謝の機構を深く知るために、胸管リンパカニューレーション試験による  $\gamma$ -オリザノールの腸管吸収機構の評価、 $\gamma$ -オリザノールの経口摂取時における血中  $\gamma$ -オリザノールおよび代謝物の評価、これらについても研究を実施した。さらに、ヒトが日常的に  $\gamma$ -オリザノールを摂取している可能性を検討すべく、種々の穀類における  $\gamma$ -オリザノール分子種を解析し、これまでに米にのみ含まれていると考えられていた  $\gamma$ -オリザノール分子種が大麦にも含まれている可能性を見出した。そこで、大麦における米特有  $\gamma$ -オリザノール分子種の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1)  $\gamma$ -オリザノールの分析法(抽出法、精製法、LC-MS/MS条件)の構築

様々な物質が混在し複雑なマトリックスからなる生体試料(血液や臓器、リンパ液等)から、 $\gamma$ -オリザノールを定量的に解析するための抽出方法や精製方法、LC-MS/MS分析条件の最適化を行った。ここでは、生体試料としてリンパ液を使用することを考慮し、リンパ液を生体試料モデルとし、リンパ液における  $\gamma$ -オリザノール分子種 (図3) の定量方法を検討した。

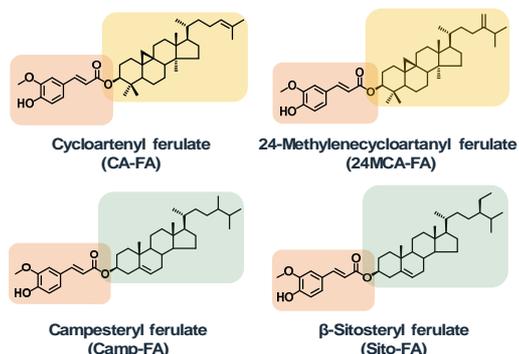


図3.  $\gamma$ -オリザノールの分子種

## (2) マウスの $\gamma$ -オリザノール摂取と血液や臓器分布、およびその影響

試験飼料として、こめ油 (RBO, 170 mg  $\gamma$ -オリザノール/100 g oil) RBO よりも  $\gamma$ -オリザノールを多含するこめ油 (HRBO, 1360 mg  $\gamma$ -オリザノール/100 g oil) とコントロールとして大豆油を使用した。AIN93G の組成を改変し、脂質源を 20% (w/w) 試験油 (RBO、HRBO、大豆油) に置き換え、コーンスターチを減らして高脂肪食を調製した (RBO 群、HRBO 群、HF 群)。これらの飼料および通常の AIN93G を C57BL/6J マウス (3 週齢、雄性) に与え 8 週間飼育し、LC-MS/MS で血液や臓器における  $\gamma$ -オリザノールを評価した。

## (3) 胸管リンパカニューレーション試験による $\gamma$ -オリザノールの腸管吸収機構の評価

$\gamma$ -オリザノールの経時的なリンパ吸収率を明らかにするために、ラットを用いた胸管リンパカニューレーション試験を実施した。SD ラットを 1 週間予備飼育し、麻酔下で胸管リンパカニューレーション手術を施した。一晩回復させた後、3 mL のエマルジョンに溶解した 1 mg の  $\gamma$ -オリザノール濃縮物 ( $\gamma$ -オリザノールとして約 700  $\mu$ g) を胃に直接投与し、経時的にリンパ液を回収した。リンパ液中の  $\gamma$ -オリザノールを LC-MS/MS を用いて定量した。

## (4) $\gamma$ -オリザノールの経口摂取時における血中 $\gamma$ -オリザノールおよび代謝物の評価

$\gamma$ -オリザノールを投与した際の  $\gamma$ -オリザノールと代謝物であるフェルラ酸の血中濃度にどの程度の違いがあるのか未だ明確でないため、 $\gamma$ -オリザノールを摂取した際の  $\gamma$ -オリザノールとフェルラ酸、さらにはフェルラ酸代謝物 (グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体) の血中プロファイルを明らかにしようとした。 $\gamma$ -オリザノールを単回投与 (300  $\mu$ mol/kg B.W.) した SD ラットから経時的に尾静脈採血し、血漿中の  $\gamma$ -オリザノールとフェルラ酸およびフェルラ酸代謝物を LC-MS/MS を用いて定量した。

## (5) 大麦における米特有 $\gamma$ -オリザノール分子種の同定

溶媒抽出にて大麦糠から総脂質を抽出した。得られた総脂質を固相抽出により精製し、 $\gamma$ -オリザノール画分を調製した。LC-MS/MS 分析により  $\gamma$ -オリザノール画分に含まれる  $\gamma$ -オリザノール分子種を評価した。加えて、従来、米にのみ含まれていると考えられていた  $\gamma$ -オリザノール分子種 (24-メチレンシクロアルタニル (24MCA-FA) (図 3)) と考えられる化合物を単離し、MS や NMR を駆使し、詳細な構造解析を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) $\gamma$ -オリザノールの分析法 (抽出法、精製法、LC-MS/MS 条件) の構築

一般的な脂質抽出方法である Folch 法と固相抽出法を組み合わせた方法を最適化し、リンパ液から  $\gamma$ -オリザノール分子種を高い回収率 (99.9-113.9%) で抽出することができた。加えて、特に生体試料の解析時において課題となる LC-MS/MS 分析時におけるマトリックス効果を評価した結果、 $\gamma$ -オリザノール分子種はいずれも良好なイオン化率 (92.0-100.3%) を示した (通常、イオン化率が 90-110% 程度であればマトリックス効果が生じていないと判断できる)。このように、抽出・精製法と分析法を最適化し、生体試料における  $\gamma$ -オリザノール分子種を高精度に解析するための一連の解析手法を構築した。

### (2) マウスの $\gamma$ -オリザノール摂取と血液や臓器分布、およびその影響

RBO 群では血漿や種々の臓器 (肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、脂肪組織、脳) から  $\gamma$ -オリザノールが検出され、これらは HRBO 群でより多く検出された。興味深いことに、脳からも  $\gamma$ -オリザノールがわずかに検出された。すなわち、日常的に摂取した  $\gamma$ -オリザノールは血液や臓器にそのままの形で蓄積することが明らかとなった (図 4)。したがって、これらの血液や臓器において、 $\gamma$ -オリザノールの生理作用が期待できると考えられた。実際に、血漿のトリアシルグリセロール濃度は、RBO 群に比べて HRBO 群で低値となり、 $\gamma$ -オリザノールの血液への移行が血漿のトリアシルグリセロール濃度低下に関与していることが示唆された。このことから、摂取した  $\gamma$ -オリザノールが生体に蓄積し、生理作用の発現に関与する可能性が示された。

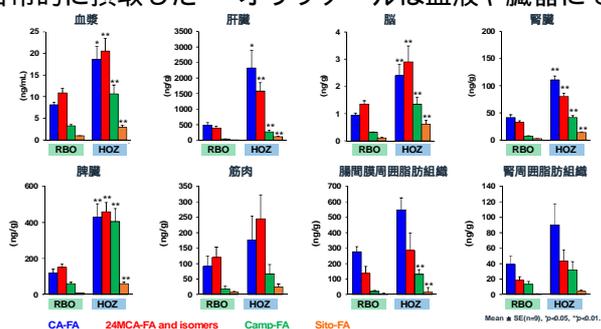


図 4.  $\gamma$ -オリザノール摂取による血液や臓器における蓄積

### (3) 胸管リンパカニューレーション試験による $\gamma$ -オリザノールの腸管吸収機構の評価

$\gamma$ -オリザノール濃縮物をラットに投与し、リンパ液中の  $\gamma$ -オリザノールを測定した。その結果、リンパ液中から  $\gamma$ -オリザノールが検出され、その濃度は投与後数時間で最大となり、その後徐々に減少した(図5)。投与した  $\gamma$ -オリザノールの胸管リンパへの吸収率は0.1-0.2%であった。本試験において、LC-MS/MSを用いて  $\gamma$ -オリザノールの腸管吸収を初めて直接評価することができ、摂取した  $\gamma$ -オリザノールの一部は腸管からそのままの形で吸収され、リンパ液中に存在することを明らかにした。

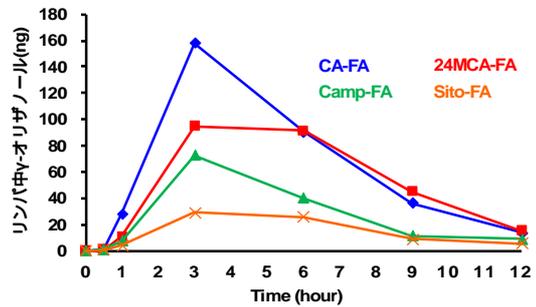


図5. リンパ液における  $\gamma$ -オリザノール濃度の経時的変化

### (4) $\gamma$ -オリザノールの経口摂取時における血中 $\gamma$ -オリザノールおよび代謝物の評価

の結果より、 $\gamma$ -オリザノールがそのままの形で生体に吸収されさらに蓄積することが明らかとなった。但し、これらの結果は  $\gamma$ -オリザノールが体内で代謝されることを否定するわけではない。 $\gamma$ -オリザノールを摂取した際の主な代謝物は、フェルラ酸であると考えられてきた一方で、その際の  $\gamma$ -オリザノールとフェルラ酸、さらにはフェルラ酸代謝物(グルクロン酸抱合体と硫酸抱合体)の量的関係については明らかでなかった。これを調べた結果、 $\gamma$ -オリザノールを投与したラットの血漿からは、そのままの形の  $\gamma$ -オリザノールとともに、フェルラ酸とフェルラ酸代謝物が検出され、これらの濃度は  $\gamma$ -オリザノール < フェルラ酸 < フェルラ酸代謝物の順となった(図6)。これらの結果は、 $\gamma$ -オリザノール摂取による生理機能発現には  $\gamma$ -オリザノールとともに、フェルラ酸、やフェルラ酸代謝物も重要であることを示唆した。

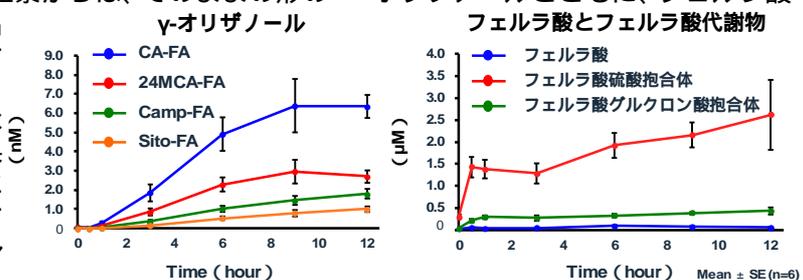


図6.  $\gamma$ -オリザノール摂取時における血中の  $\gamma$ -オリザノールとフェルラ酸、フェルラ酸代謝物濃度の経時的変化

### (5) 大麦における米特有 $\gamma$ -オリザノール分子種の同定

LC-MS/MS 分析を用い、大麦糠から単離した 24MCA-FA 様化合物と米から単離した 24MCA-FA 標品を比較したところ、ピークは同一の溶出時間を示し、このことから大麦には確かに 24MCA-FA が含まれていると推定された。さらに、これらの化合物を種々の NMR 解析( $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、COSY、HSQC、HMBC、NOESY)に供したところ、大麦由来 24MCA-FA 様化合物は 24MCA-FA 標品と一致し(図7) このことから、従来米にのみ特徴的に含まれていると考えられてきた  $\gamma$ -オリザノール分子種が大麦にも含まれることを証明した。このことは、米に加え、大麦や大麦に関連する加工食品からも  $\gamma$ -オリザノールを摂取していることを示し、すなわち、ヒトが日常的に  $\gamma$ -オリザノールを摂取している可能性を示唆した。

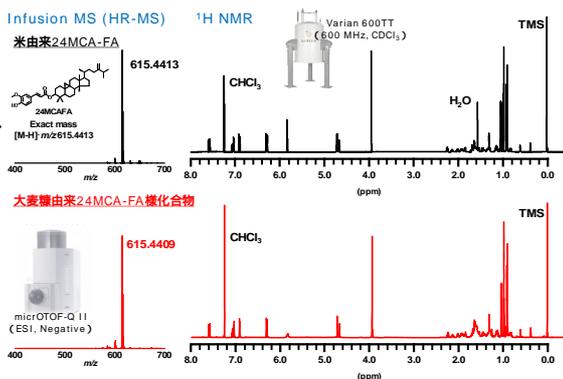


図7. 大麦に 24MCA-FA が存在することを証明

これらの研究成果は  $\gamma$ -オリザノールが生体や食品において常時存在することを示唆しており、 $\gamma$ -オリザノールがビタミン様活性を有する可能性を後押しするものである。そこで現在は、 $\gamma$ -オリザノール欠乏食を用いた長期的な摂食試験が必要であると考え、さらなる検証を進めている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Kobayashi Eri, Ito Junya, Shimizu Naoki, Kokumai Takumi, Kato Shunji, Sawada Kazue, Hashimoto Hiroyuki, Eitsuka Takahiro, Miyazawa Teruo, Nakagawa Kiyotaka. Evaluation of  $\gamma$ -oryzanol Accumulation and Lipid Metabolism in the Body of Mice Following Long-Term Administration of  $\gamma$ -oryzanol. *Nutrients*, 11, 104 (2019) (査読有り)
2. Kokumai Takumi, Ito Junya, Kobayashi Eri, Shimizu Naoki, Hashimoto Hiroyuki, Eitsuka Takahiro, Miyazawa Teruo, Nakagawa Kiyotaka. Comparison of blood profiles of  $\gamma$ -oryzanol and ferulic acid in rats after oral intake of  $\gamma$ -oryzanol. *Nutrients*,

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Kiyotaka Nakagawa. Absorption and Metabolic Fate of  $\gamma$ -Oryzanol. The 3rd International Symposium on Rice Science in Global Health (国際学会)(2018年)
2. 國米 匠, 伊藤 隼哉, 橋本 博之, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. LC-MS/MSを用いた  $\gamma$ -オリザノールの経口摂取時における血中フェルラ酸および代謝物の解析. 平成 30 年度 日本食品科学工学会 東北支部大会および市民フォーラム (2018年)
3. 國米 匠, 伊藤 隼哉, 橋本 博之, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. ラットへの  $\gamma$ -オリザノールの経口投与と血中フェルラ酸および代謝物の分析. 日本油化学会第 57 回年会 (2018年)
4. 仲川 清隆. 米と健康: お米に薬成分も含まれるのをご存じですか? Visionary 農芸化学 100 シンポジウム (2018年)
5. 伊藤 隼哉, Fan Xinyi, 橋本 博之, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. 米に特有と考えられていた  $\gamma$ -オリザノール分子種を大麦から検出. 日本食品科学工学会第 65 回大会 (2018年)
6. 伊藤 隼哉, 小林 エリ, 加藤 俊治, 澤田 一恵, 橋本 博之, 永塚 貴弘, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. マウスにおけるこめ油  $\gamma$ -オリザノールの体内分布: 生理作用発現との関係性. 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 (2018年)
7. 小林 エリ, 伊藤 隼哉, 澤田 一恵, 橋本 博之, 加藤 俊治, 永塚 貴弘, 池田 郁男, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. ラット胸管リンパカニューレーション試験による  $\gamma$ -オリザノールの腸管吸収の評価. 日本農芸化学会 2018 年度 (平成 30 年度) 大会 (2018年)
8. 仲川 清隆. オリザノールとフェルラ酸の分析技術と吸収代謝について. 第 5 回フェルラ酸研究会 (2018年)
9. 小林 エリ, 伊藤 隼哉, 加藤 俊治, 澤田 一恵, 松木 翠, 橋本 博之, 池田 郁男, 宮澤 陽夫, 仲川 清隆. マウス生体内における  $\gamma$ -オリザノールの存在形態の評価:  $\gamma$ -オリザノールの吸収代謝解明に向けて. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 (2017年)
10. 仲川 清隆. こめ油  $\gamma$ -オリザノールの分析と吸収代謝の評価. 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 (2017年)

〔図書〕(計 1 件)

1. 澤田 一恵, 松木 翠, 橋本 博之, 仲川 清隆. シーエムシー出版, 食品機能性成分の吸収・代謝・作用機序, 228-235 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)  
特になし。

取得状況 (計 0 件)  
特になし。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/kinoubunshi/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 宮澤 陽夫

ローマ字氏名: MIYAZAWA Teruo

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院農学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20157639

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。