

標 題 : The In Vivo Fate of Hydroxytyrosol and Tyrosol, Antioxidant Phenolic Constituents of Olive Oil, after Intravenous and Oral Dosing of Labeled Compounds to Rats
オリーブ油の抗酸化性フェノール成分、ヒドロキシチロソールとチロソールの in vivo での代謝の結末、ラベル化合物をラットへ静脈投与および経口投与後に

著 者 : K. L. Tuck, et al. (オーストラリア サウスオーストラリア大学 薬学部)

掲 載 誌 : J. Nutr. 131: 1993-1996 (2001)

要 旨 : オリーブ油中のフェノール成分は強力なラジカル捕捉剤と、in vitro 研究で示されてきた。2種類の放射性ラベル化フェノール成分であるヒドロキシチロソールとチロソールの吸収と排泄を、ラットを用いて in vivo で研究した。化合物を静脈注射(生理的食塩水)および経口投与(油溶液と水溶液)した。

両方の化合物を静脈注射および油溶液で経口投与すると、24時間にフェノール成分の尿排泄は、水溶液での経口投与法より有意に多かった。ヒドロキシチロソールとチロソールで静脈注射と経口投与法との間に尿に排泄されるフェノール化合物の量に有意差はなかった。

ヒドロキシチロソールをオリーブ油溶液と水溶液で投与したときの経口生物利用度はそれぞれ99%と75%と算定された。チロソールをオリーブ油溶液と水溶液で投与したときの経口生物利用度はそれぞれ98%と71%と算定された。

これは、ヒドロキシチロソールとチロソールの in vivo での代謝の結末を研究するために放射性ラベル化合物を用いた最初の研究である。

(はじめに)

注目すべき特徴がオリーブ油の使用である地中海食事は、冠状動脈性心疾患(心疾患:CHD)の低い発病率をもたらすと示されてきた(1)。オリーブ油の組成は主にトリアシルグリセロールで、0.5% - 1.0%の非グリセリド成分もある(2)。この微量成分中に各種フェノール化合物があり、その化学的な性質によって抗酸化物として作用する。

このフェノール化合物は重要な食事性抗酸化物(アスコルビン酸とトコフェロール)と少なくとも等しいラジカル捕捉活性を有すると、多数の in vitro 研究で示されてきた(3, 4)。フリーラジカルの野放しの生成は、心疾患と各種癌の原因となる。フェノール化合物はまた in vitro で LDL 酸化の強力な抑制剤で、過酸化連鎖反応を中断できる(5)。過酸化連鎖反応は心疾患と癌の原因に関連している(3)。このフェノール化合物が尿中に排泄されるイソプロスタンの量を減らし(6)、オリーブ油中の主なフェノール化合物が受動喫煙にさらされたラットの酸化ストレスを低下させる(7)と最近判明した。

健康に良い成果と関連するオリーブ油フェノール化合物の in vitro での特性の広大な証拠にもかかわらず、この化合物の吸収と排泄に関して限られたデータしかない。一つには、この成分が低濃度のため、生体内でこの化合物濃度が低くなると思われ検出が困難となるためである。オリーブ油中にみられる主要フェノール化合物、ヒドロキシチロソール [HT; 2-(3,4 - ジヒドロキシフェニル)エタノール]の吸収と排泄を、我々は観察した(2)。オリーブ油中にみられる量的に重要な他のフェノール化合物、チロソールの吸収と排泄も研究した。HT はオリーブ油中にみられる非常に限られた数のフェノール化合物の1つで、その吸収と処分を手短に測定した。Bai らは(8) HT を水溶液で多量投与したラットからのサンプルで、HT 血漿値をガスクロマトグラフィー マススペクトルで測定した。血漿に親化合物が速やかに現れて投与 10 分後に HT の最高値となった。

最近のヒト研究で、HT とチロソールを強化したエクストラバージンオリーブ油の経口投与後に、HT とチロソールの尿中回収を HPLC とマススペクトルを組合せて測定した(9)。グルクロニダーゼで加水分解した尿中で HT とチロソールの摂取量に対する回収率はそれぞれ 30% - 60%と 20% - 22%の範囲であった。HT のグルクロニド代謝は別として[(9)で示す]、経口投与および静脈注射後の HT とチロソールの生体での結末に関して限られた情報しかない。

材料と方法

材 料： HT(環の 2,5,6 が ^3H)およびチロソール(環の 3,5 が ^3H)を以前に発表した方法で合成して精製した(比放射能 HT66 Ci/mol; チロソール 13 Ci/mol)(10, 11)。全ての実験で使用する水は Milli-Q 水純化システムから得た。イタリア産のエクストラバージンオリーブ油を使用し、その HT 含量は HPLC 法で 13.2mg/kg と測定された(2)。 β -グルクロニダーゼ A 型とサルファターゼ 型を Sigma Chemical から得た。Halothane を Laser Animal Health から購入した。他の全ての試薬は分析等級以上で精製しないで用いた。サンプルの放射能(注： ^3H トレーサ由来)を Packard Tri-Carb 2000CA 液体シンチレーション カウンターで分析した。HPLC 分析を Hewlett Packard 1100 シリーズシステム(詳細省略)と DuPont の phenyl zorbac カラムで、移動相[水 99.5v/v(酢酸 0.2v/v 含有)/メタノール 0.5v/v, 1mL/分]で実施した。化合物を 281nm で検出した。HPLC 放射分析は Radiomatic 150TR-flow シンチレーション分析器で実施した(HPLC 流量 1mL/分)。

経口投与溶液の調製

油溶液： イタリア産のエクストラバージンオリーブ油 1300mg を 23.5mg の H^3 -HT に加えた(比放射能 17mCi/mmol)。イタリア産のエクストラバージンオリーブ油 1300mg を 14.7mg の H^3 -チロソールに加えた(比放射能 13mCi/mmol)。投与直前に混合物を完全に混合してフェノールを溶液中に均一に分布させた。

水溶液： 水 1300mg を 25.5mg の H^3 -HT に加えた(比放射能 12mCi/mmol)。水 1300mg を 14.4mg の H^3 -チロソールに加えた(比放射能 12mCi/mmol)。

静脈注射溶液の調製： H^3 -HT(6.5mg 比放射能 33mCi/mmol)を 5mL の注射用食塩水(9g/L)に加えた。放射能ラベル化チロソール(9.8mg 比放射能 5mCi/mmol)を 5mL の注射用食塩水(9g/L)に加えた。

動物と動物実験： 書面の倫理承認を地域委員会から得た。健康な雄 Sprague-Dawley ラット(350g)に、市販ラット食と水を投与実験前に少なくとも2日間自由に与えた。HT またはチロソールの放射能ラベル化溶液を投与する2時間前に、食物を取上げた。

各ラットにオリーブ油溶液 225mg または水溶液 225mg を管で強制経口投与するか、または軽い麻酔下に生理的食塩水 950mg を静脈注射(尾静脈)した。次にラットを個別代謝ケージに入れて食事と水を自由に与えた。尿サンプルを 1、2、3、4、8、および 24 時間後に採取した。

尿サンプルの処理： 尿を酢酸(80 μL) 入り試験管に集めて HT とチロソールの分解を最小にした。採取完了後に各尿サンプルの 100 μL を液体シンチレーション計測で総放射能を分析した。サンプルはまた HPLC 放射能検出器で、ラベル化された代謝物と水の存在を分析した。

代謝物の分析： 尿 50 μL を移動相 500 μL で希釈した。pH を 5.7 に合せ β -グルクロニダーゼ(50 μL)またはサルファターゼ(30 μL)を加えた。サンプルを 37 °C で 1 時間インキュベートしてから HPLC 放射能検出器で分析した。

糞サンプルの処理： 標準的な方法(12)を使用して糞サンプルを抽出し、放射能を分析した。

生物利用度の計算： 経口(油または水)と静脈注射による 24 時間中の排泄量と投与量との比で、生物利用度を測定する(数式 1 : 下記)。

$$F = \frac{\text{経口投与での排泄量}}{\text{静脈注射での排泄量}} \times \frac{\text{投与量(静脈)}}{\text{投与量(経口)}}$$

統計処理： 24 時間以内に排泄された放射能ラベル化 HT とチロソールの平均%値の差を投与方法について片側 ANOVA を用いて解析した。ANOVA で有意な結果が認められたときに(P<0.05)、群の差をさらに解析した(以下省略)。

結 果

HT 中のトリチウム(H^3)ラベルは芳香族環の全ての非置換部位に結合した。チロソールでは H^3 ラベルは芳香族環の C3 と C5 に取込まれた。HT とチロソールで H^3 ラベルの安定性を尿で調査した; 24 時間後にラベルの変化がないことが放射能検出 HPLC で観察された。HT(11)とチロソール中の H^3 ラベルは水溶液(pH 7)でも安定であった。

放射能ラベル化 HT およびチロソールの投与後に、時間とともにラットによって排泄される化合物のパーセント比を Table 1 および 2 に示す。全ての結果を投与放射能の量で正規化してある。HT とチロソール共に静脈注射は 2 時間以内、経口投与(油溶液と水溶液の両方)では 4 時間以内に過半数が排泄された。

HT とチロソールの典型的な放射能検出クロマトグラム(油溶液経口投与で 2 時間)を Fig. 1 と 2 に示す。尿サンプルと β -グルクロニダーゼまたはサルファターゼとの反応による結果を Fig. 1 と 2 に要約する。

HTの生物利用度(数式1)は、オリーブ油溶液での経口投与で99%；水溶液での経口投与では75%であった。油経口投与したラットと静脈注射したラットの間で24時間以内に排泄したHTの量に有意差はなかった。しかし静脈注射したラットが排泄したHTの量は、水溶液を経口投与したラットより有意に多かった($P<0.0001$)。油経口投与したラットが24時間以内に排泄したHTの量も水溶液を経口投与したラットより有意に多かった($P<0.0001$ ；Table 3)。

チロソールの生物利用度(数式1)は、オリーブ油溶液で経口投与と水溶液での経口投与で、それぞれ98%と71%であった。油経口投与したラットと静脈注射したラットの間で24時間以内に排泄したチロソールの量に有意差はなかった。しかし静脈注射したラットが排泄したチロソールの量は、水溶液を経口投与したラットより有意に多かった($P<0.05$)。油経口投与したラットが24時間以内に排泄したチロソールの量も、水溶液を経口投与したラットより有意に多かった($P<0.05$ ；Table 3)

考 察

放射能ラベル化HTおよび放射能ラベル化チロソールの吸収と排泄を、経口投与(エクストラバージンオリーブ油または水に分散)および静脈注射したラットの尿で、我々は研究した。文献にある従来の研究に基づいて、HTは血漿から速やかに除去されると知られており(8)、HT[代謝物を含む(9)]が速やかに尿に現れることは速やかに体から除去されることを意味する。HTの血漿除去を明確にするのが望ましいけれども、我々の主な検討事項はHTおよびその代謝物の吸収と排泄である。

地中海食事の一部としてHTおよびチロソールを摂取したときの吸収と排泄を再現するため、オリーブ油の系でラットに経口投与した。この結果を水溶液での経口投与および生理的食塩水での静脈注射と比較した。

HTおよびチロソールの生物利用度の計算値は、オリーブ油溶液で投与したときと比較して、水溶液で投与したときに有意に低かった。この生物利用度値で、生体内変化物を吸収した後でフェノール化合物が腸代謝される可能性を除外していない。水溶液と油溶液で投与された化合物の生物利用度の違いは、従来も注目された(13、14)。オリーブ油溶液で投与したときに上昇した生物利用度は「オリーブ油中に存在する他の抗酸化物が、吸収前に消化管に存在するフェノール化合物の分解を防止する」ためであろう。

我々の発見はヒトによる以前の結果と異なる(9)。これは2つの理由がありうる。第1に我々の研究はラットを使用し、この化合物がヒトとラットで違った方法で扱われる可能性がある。あるいはこの研究はHTおよびチロソールの吸収と排泄を評価するためのさらに正確な方法かもしれない、それは多数のラベル化されたHTおよびチロソールの複合体が検出できるためである(β-グルクロニダー

ぜ加水分解尿中で複合体が親化合物へ加水分解されるだけでない)。

最初は、HT またはチロソールのトリチウム(H^3)ラベルが体内で水と入代わることが心配の種であった。尿サンプルを HPLC 放射能検出器で分析したとき、溶出する最初のピーク (両方の化合物とも) はトリチウム水から分離され、それはカラムのポイド時間の後に溶出した。HT またはチロソールの尿サンプルにトリチウム水ピークは無いと認められた。さらに最初に溶出するピークは、尿サンプルのサルファターゼによる反応で消失した(親化合物が拡大、Fig. 1 と 2)。しかし代謝産物の確認に我々が注目したのは、経口または静脈注射でラットに投与した HT およびチロソールの吸収と排泄を観察することがこの研究の目的であったためである。

結論として、HT およびチロソールは経口投与後に吸収されて全身の循環系に入ると、我々は示してきた。オリーブ油溶液で投与したときにその生物利用度はほぼ完全である。従って、オリーブ油中の HT およびチロソールのようなフェノール化合物は全身で利用でき、直接的な抗酸化作用を発揮できる。

謝 辞

投与実験における支援で、我々は Anthony Lucas さんに感謝します。

引用文献

1 4 報告