

称号及び氏名	博士（獣医学） 北川 雅啓
学位授与の日付	平成18年2月20日
論文名	「Studies on effect of protein and fat on carotenoid absorption, and antioxidative ability of carotenoid」 (カロテノイド吸収に及ぼす共存するタンパク質及び脂肪の影響とカロテノイドの抗酸化性に関する研究)
論文審査委員	主査 津山 伸吾 副査 小森 雅之 副査 中野 長久 副査 竹中 重雄

論文要旨

近年、 β -カロテンや種々のカロテノイドは、生体内でのビタミンA源としての働きの他、抗酸化性や発ガン予防などの機能が注目されている。これらの機能性は、カロテノイドが体内に蓄積されて初めてその作用が発揮される。それ故にカロテノイドの吸収を高める条件を検討することは重要である。 β -カロテンの吸収は、同時に摂取するタンパク質量や脂肪量に影響されることが報告されている。しかし、その影響は、脂肪量の増加により β -カロテン吸収量が増加するという報告もあれば、逆の結果を示す報告もある。また、ほとんどの報告がタンパク質量または脂肪量の影響を単独に検討したものであり、それらの相互的な影響を検討した報告はほとんどない。著者らは独身青年層を対象とした食事調査を実施し、カロテノイド供給食品である緑黄色野菜の摂取量と種類を調べ、同時に、カロテノイド吸収に影響を及ぼすタンパク質及び脂肪の充足率についても検討した。その結果、緑黄色野菜摂取量が少ないグループはタンパク質及び脂肪の充足率が低く、逆に、摂取量が多いグループではそれらの充足率が高かった。即ち、緑黄色野菜摂取量の少ないグループは、カロテノイド摂取量が少ないだけでなく、カロテノイドの吸収に影響を及ぼすタンパク質及び脂肪量が少ないことから、カロテノイド吸収量も少なくなっていると推察される。そこで、本論文では、 β -カロテンの吸収にタンパク質量及び脂肪量の相互的な偏りがどのように影響するかを検討した。

また、それらの影響を検討するために、血清や肝臓中に蓄積するカロテノイドやレチノイド量を測定する必要がある。これまでに様々な分析法が報告されているが、本論文では、より高精度な測定法の確立を目的に、抽出溶媒や試料溶媒の種類やケン化操作の有無につ

いて検討した。

さらに、カロテノイドの機能性の一つである抗酸化性に注目し、 β -カロテン、ビタミンCを豊富に含む柿やサヤエンドウの乾燥粉末を添加した飼料をラットに投与し、それらの体内蓄積量と紫外線照射による皮膚や肝臓への酸化的ダメージの相関性を検討した。

第1章 人血清及びラット肝臓中 β -カロテン及びレチノールのケン化を含む同時定量法の改良

近年、カロテノイド及びレチノイドの定量に、ケン化処理をしない方法がよく用いられるが、少量のサンプルで高精度の測定を行うための分析条件を検討する必要がある。本研究では、カロテノイド及びレチノイド同時測定へのケン化の影響を検討した。ケン化操作は肝臓では2.2 mol/L-KOH存在下、血清では2.5mol/L-KOH存在下、70°C、30minとし、その後、溶媒抽出した。溶媒は、*n*-ヘキサン、酢酸エチル及びクロロホルムを比較した。抽出後、溶媒を40°C、窒素ガス下で蒸発乾固し、試料溶媒で再溶解し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定し、9種類の試料溶媒による測定値を比較した。

ケン化操作の追加により、従来法に比して、 β -カロテンの測定値が血清で2.7倍高く、肝臓で1.5倍高くなった。レチノールでも血清で1.2倍高い測定値が得られた。また、抽出溶媒が*n*-ヘキサン、試料溶媒はC18カラム装着HPLCに移動相であるアセトニトリル:ジクロロメタン:メタノール:1-オクタノール(90:15:10:0.1, v/v)が最適であった。添加試験による回収率は、 β -カロテンは血清では99.7%、肝臓では107.1%であった。レチノールは、血清ではレチノールまたはレチニルパルミテートを添加した場合、それぞれ93.7%、98.3%であった。肝臓では、それぞれ92.8%、98.8%であった。

第2章 高速液体クロマトグラフィーによるラット肝臓および血清中レチノールおよびレチニルパルミテートの定量法の改良

レチノイドは、レチノール及びそのエステルなどとして生体内に含まれているが、ケン化操作により、総レチノールとして測定される。そこで、レチノール及びレチニルエステル、特にレチニルパルミテートの個別定量法を検討した。抽出溶媒として前述の3種類及び試料溶媒として同9種類について検討した。

肝臓及び血清中レチノールについては*n*-ヘキサンによる抽出が最も高い測定値を示した。また、レチニルパルミテートを酢酸エチルで抽出した場合、通常用いられる*n*-ヘキサンの7倍高い測定値を得た。したがって、肝臓中レチノール及びレチニルパルミテートを測定する場合、抽出溶媒として、レチノールは*n*-ヘキサンで、レチニルパルミテートは酢酸エチルで抽出する必要がある。C18カラム装着HPLC分析に移動相にアセトニトリル:ジクロロメタン:メタノール:1-オクタノール(90:15:10:0.1)が最適であった。また、添加試験による回収率は、レチノールでは血清で87.7%、

肝臓で 83.5%、レチニルパルミテートでは肝臓で 103.5%であった。

第 3 章 ラットにおける β -カロテン吸収に及ぼす食餌タンパク質量と脂肪量の影響

第 1 章の検討により得られた定量法を用いて、 β -カロテン吸収に及ぼす摂取タンパク質量及び脂肪量の影響を検討した。3 週齢の SD 系ラットを 3 週間、ビタミン A 欠乏飼料を摂取させ、その後、試験飼料を自由摂取させた。試験飼料は AIN-76 組成を改変した 20%タンパク質、10%脂肪を標準食 (MP・MF) とし、20%タンパク質、2%脂肪の低脂肪食 (MP・LF)、5%タンパク質、10%脂肪の低タンパク質食(LP・MF)、5%タンパク質、2%脂肪の低タンパク質・低脂肪食(LP・LF)を調製した。ビタミン A 源としては、 β -カロテンを飼料 100g 当たり 3000IU 添加した。5 週間の試験終了後、血清及び肝臓を採材し、肝臓及び血清 β -カロテン及びレチノール量を測定した。ラットは吸収した β -カロテンをレチノールに変換して蓄積することから、肝臓中レチノール量が β -カロテン吸収量を反映する。さらに、吸収された β -カロテンをレチノールへ変換する小腸粘膜 β -カロテン開裂酵素活性を測定した。

低タンパク質食群である LP・MF 群及び LP・LF 群は、MP・MF 群及び MP・LF 群より、肝臓中レチノール蓄積量が低下していた。また、小腸粘膜 β -カロテン開裂酵素活性も、LP・MF 群及び LP・LF 群で低下していた。一方、摂餌中脂肪含有量の違いは β -カロテンの吸収ならびに小腸粘膜中 β -カロテン開裂酵素活性に影響を与えなかった。以上のことより、 β -カロテン吸収に対する脂肪摂取量の影響は少なく、タンパク質摂取が β -カロテン吸収の重要な因子であり、また、それはタンパク質摂取の増加が小腸粘膜細胞内 β -カロテン開裂酵素活性に影響を及ぼし、 β -カロテンからレチノールへの変換を高め、受動輸送である β -カロテンの吸収促進に起因することが推察された。

第 4 章 柿及びサヤエンドウの投与が紫外線照射したラットの抗酸化能に及ぼす影響

果物や野菜にはカロテノイドやビタミン C などの抗酸化物質が豊富に含まれている。柿やサヤエンドウは、それらを豊富に含むことから、それらの摂取による生体抗酸化能への影響を検討した。ビタミン C 欠乏動物モデルとして、ビタミン C 合成能を欠く ODS ラットを用いた。試験飼料給餌前、3 週間はビタミン A を、また 1 週間はビタミン C を含まない飼料を摂取させた。試験飼料として、ビタミン A とビタミン C を含まない標準飼料(- β C・AsA)に、 β -カロテンとビタミン C を同時添加した飼料(+ β C・AsA)、ビタミン C のみを添加した飼料(+AsA)、 β -カロテンのみ添加した飼料(+ β C)、柿とサヤエンドウの凍結乾燥粉末をそれぞれ添加した飼料(+Ka、+Po)を調製し、2 週間摂取させた。試験期間中、酸化的ストレスとして紫外線 (UV-B) を 7.4kJ/m²、週 6 回照射した。試験終了後、血清ならびに組織を採材し、過酸化脂質量として TBARS、抗酸化

酵素活性としてグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px)、カタラーゼ (CAT)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性を、DNA損傷の指標として尿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を測定した。

肝臓中 β -カロテンは β -カロテンを摂取した + β C・AsA群、+ β C群、+Ka群及び+Po群で検出された。レチノールは β -カロテン欠乏飼料を摂取した - β C・AsA群及び+AsA群では少なかった。また、+Ka群及び+Po群は、柿やサヤエンドウ由来のカロテノイドが検出された。皮膚中のTBARS値は、+Ka群及び+Po群では低かったことから、柿やサヤエンドウ摂取による生体抗酸化能の向上が示された。また、尿中8-OHdGは、+ β C群、+ β C・AsA群、+Ka群及び+Po群で高かった。抗酸化酵素であるGSH-Px活性は、皮膚では+ β C・AsA群が- β C・AsA群と比べて高く、肝臓では+AsA群、+ β C・AsA群、+Ka群及び+Po群で高かった。GSH-Px活性はカロテノイドやビタミンC摂取により上昇し、過酸化脂質の生成が抑制され、そのためにカロテノイドやビタミンCを摂取した群でTBARS値が減少したと考えられる。一方、皮膚SOD活性は、- β C・AsA群が高値を示した。これは、カロテノイドやビタミンCがスーパーオキシドを消去するため、SOD酵素活性が- β C・AsA群以外では低下したことに起因すると推察される。以上の結果から、果物や野菜摂取によって体内に蓄積されたカロテノイドやビタミンCが紫外線照射によって生じる酸化的ストレスを軽減することが示唆された。

審査結果の要旨

β -カロテン等のカロテノイドは、生体内でビタミンA源として働く以外に、抗酸化性や発癌予防などの機能が注目されている。これらの機能はカロテノイドが体内に蓄積されてからその作用が発揮される故、カロテノイドの体内吸収を高める条件設定が重要である。タンパク質又は脂肪の単独摂取量により、 β -カロテンやカロテノイドの吸収に影響すると言及報告はあるが、タンパク質と脂肪の相互的摂取量に対する明確な報告はない。これは、生体内の血清や肝臓中に蓄積されるカロテノイドやレチノイド量の最適な抽出や測定が行われてこなかったことが原因である。本研究では、まず独身青年層の食事調査を実施し、カロテノイド供給食品である緑黄色野菜摂取量と種類及びタンパク質と脂肪の充足率について調べ、緑黄色野菜摂取量が少ないグループはタンパク質及び脂肪充足率が少なく、逆に摂取量が多いグループではそれらの充足率は高かったことから、カロテノイドの吸収量の減少はタンパク質や脂肪の充足率が影響していることを推察した。本論文で動物実験を通じて、 β -カロテンの吸収にタンパク質量及び脂肪量の相互的な偏りがどのように影響するかを、更にカロテノイドの抗酸化性に注目し、紫外線照射による皮膚や肝臓における酸化的ダメージとの相関について検討し、次のような成果を得ている。

1. カロテノイドやレチノイドの微量定量には、標品をケン化処理なしで高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析が広く用いられているが、これら高精度の微量分析を行う為に、ケン化処理を施した後に標品から各種抽出溶媒によるカロテノイドとレチノイド抽出効率及び HPLC の移動相 (試料溶媒) を検討し、ケン化操作により従来法に比べ、血清及び肝臓の β -カロテン及びレチノールの測定値は1.2倍高くなり、C18 カラム装着 HPLC の移動相はアセトニトリル：ジクロロメタン：メタノール：1-オクタノール (90 : 15 : 10 : 0.1) が最適であることを明らかにした。
2. レチノイドは、レチノールとそのエステル化合物として生体内に含まれ、ケン化処理により総レチノールとして測定される。レチノール及びレチニルエステル、特にレチニルパルミテートの個別定量法を検討し、肝臓及び血清中のレチノールは n-ヘキサンによる抽出が最も高く、レチニルパルミテートの抽出は酢酸エチルで抽出した時、従来法より7倍も高い値で抽出できた。C18 カラム装着 HPLC の移動相は肝臓レチノールに対しては (n-ヘキサン：ジエチルエーテル、76 : 24) が、血清ではクロロホルムが最適であり、肝臓レチノイルパルミテートにはエタノール又は (メタノール：トルエン、5 : 5)、血清では (メタノール：ジクロロメタン、6 : 4) が最適であることを示した。
3. ラットにおける β -カロテン吸収に及ぼす摂取タンパク質量と脂肪量の影響を比較した結果、飼料中の脂肪摂取量は β -カロテンの吸収量及び小腸粘膜に存在する β -カロテン開裂酵素活性に影響を与えず、タンパク質量の摂取増加が β -カロテンの吸収を増加させ、 β -カロテン解裂酵素活性を増加させた。このことから、 β -カロテンからレチノールへの転換が β -カロテン解裂酵素により高められ、受動輸送である β -カロテンの肝臓への吸収を促進することを明らかにした。
4. 柿やサヤエンドウに豊富に含まれるカロテノイドやビタミン C の抗酸化物質の摂取の生体抗酸化能への影響を、ビタミン C 合成能を欠く ODS ラットを用い、紫外線照射して検討した。肝臓では β -カロテン添加又は柿やサヤエンドウ凍結乾燥飼料を摂取した群に多く検出され、レチノールはビタミン A, C を含まない標準飼料で飼育した群では少なかった。皮膚では柿やサヤエンドウの凍結乾燥品を添加した群では過酸化脂質量は少なく、カロテノイドやビタミン C が生体内の抗酸化能を向上させることを示唆した。また、紫外線照射による DNA 損傷の指標として尿中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシンが β -カロテンとビタミン C 添加標準飼料群や柿及びサヤエンドウ乾燥品添加飼料群で高濃度検出した。グルタチオンペルオキシダーゼ(GPOx)活性は、皮膚では β -カロテン、ビタミン C、柿やサヤエンドウを添加した飼料群で高く、肝臓でも同じ測定結果を得た。従って、GPOx 活性はカロテノイドやビタミン C 摂取により体内濃度が上昇し、過酸化脂質の産生量を抑制することを明らかにした。一方、皮膚の(SOD)活性が β -カロテンとビタミン C 無添加群で高い活性を示したのは、これらの物質が生体内で紫外線照射により生じる活性酸素を消去するために本酵素活性がこれらの無添加飼料

群以外で低下したことを示唆した。

この成果は動物におけるカロテノイドとタンパク質量の摂取が生体内のビタミン A の濃度を高め、ビタミン C と共に、紫外線照射等による酸化ストレスを軽減することを示唆したもので、人や動物医学に貢献するところが大きく、本論文の審査および学力確認の結果から博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。