

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617032

研究課題名(和文) 食事成分の腸管吸収におけるリンパ系輸送の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the contribution of lymphatic transport to the intestinal absorption of various food factors

研究代表者

室田 佳恵子 (MUROTA, Kaeko)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：40294681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではリンパ系輸送の脂溶性食事成分吸収に対する寄与を再評価するとともに、脂質以外の食事成分に対するリンパ系輸送の役割について検討した。ビタミンEやカロテノイドの場合、小腸管腔における水への溶解性を向上させることでリンパへの輸送量が増加したが、フラボノイド配糖体では脂肪酸が吸収を抑制することが示唆された。また、疎水性が比較的高いメトキシフラボノイドはリンパへ輸送されやすいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the contribution of lymphatic transport to the intestinal absorption of various food factors, including vitamin E, carotenoids and flavonoids. Lymphatic transport level of highly hydrophobic vitamins was effectively enhanced when they were solubilized in the intestinal fluid, whereas a quercetin glucoside, a major flavonoid glycoside, was less absorbed when administrated with fatty acids simultaneously. It was also suggested that a relatively hydrophobic methoxyflavonoid was transported in the lymph at the higher level than quercetin.

研究分野：栄養化学・食品化学

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：腸管吸収 リンパ系輸送 カイロミクロン フラボノイド ビタミンE プロビタミンAカロテノイド

1. 研究開始当初の背景

経口摂取した物質は、小腸で吸収された後体内に運搬される経路として、門脈系とリンパ系のいずれかを利用する。糖やアミノ酸などの水溶性成分の場合は門脈を経て肝臓へと運ばれる一方、脂質や脂溶性ビタミンはカイロミクロンの構成成分としてリンパ管に入り、その後胸管で血流へ移行する。この2つの経路は、毛細血管壁の透過性に依存して選択されていると考えられているが、詳細はあまり注目されていない。栄養学的には門脈系輸送に比較して小腸におけるリンパ系輸送への関心は限られているが、薬学動態の観点からは肝臓における解毒代謝(初回通過効果)を回避して薬物等を体循環へ送り込む経路という側面がある。いずれも、カイロミクロンを介した脂溶性成分の吸収経路として寄与している。

我々はこれまで、主要な抗酸化性機能性成分であるフラボノイドについて、特にケルセチンに着目して生体利用性研究を行ってきた。ケルセチンの吸収は油脂との同時摂取により促進されることが先行研究から示唆されており、その機序は弱い疎水性分としてあるケルセチンの腸液への可溶化(ミセル化)が促進されるためだと考えられてきた。そんな中、我々は、ケルセチンは小腸で吸収された後、生じた代謝物の一部がリンパ系へも輸送されることを、リンパカニキュレーションラットを用いて明らかにした(Murota and Terao, 2005 FEBS Lett.)。ケルセチンがリンパに流入する割合は小さいが、ラットにおけるケルセチンの臓器分布では、胸管からリンパ液が最初に流れ込む肺への蓄積が大きいことが報告されている。このことから、一般的に脂質とみなされる分子以外にもリンパ系輸送を介して体内に吸収される食品成分が存在することが明らかとなった。また、リンパ液に出現するのは主にケルセチン抱合代謝物であったことから、リンパへと輸送される物質は必ずしも強い脂溶性を有する成分ではないことも示された。

2. 研究の目的

これまでの研究背景をふまえ、本研究では食事成分の腸管吸収においてリンパ系輸送の寄与と存在意義について再評価を行うことを目的とした。食品成分は多岐にわたるが、ここでは申請者が最初の報告を行ったフラボノイドと、同じく抗酸化を有する脂溶性分子であるビタミンEならびにカロテノイドに着目した。リンパに輸送される新規分子として取りあげるフラボノイドにはさまざまな分子種が存在するため、リンパ液中での局在性を明らかにするとともに、既に報告したケルセチン以外の分子についてもリンパ系を介した吸収が起こるのかを明らかにすることとした。従来よりリンパ系輸送を主として吸収される分子として知られるビタミンE(α -トコフェ

ロール)は、カイロミクロン構成要素としてリンパ系へ輸送される。また、カロテノイドにおいてはプロビタミンAである β -カロテン、 α -カロテン、 β -クリプトキサンチンについて検討した。プロビタミンAの場合、ビタミンEと異なり小腸細胞内で開裂分解ならびにエステル化反応を経てレチニルエステルへと変換されたものがカイロミクロンに組み込まれる。これら抗酸化ビタミンの吸収性を向上させるための摂取条件を明らかにしていくことを目的とした。

これらをもとに、食品成分吸収におけるリンパ輸送の果たす役割がどのようなものかを明らかにしていく。実際のところ、リンパ系を介した輸送は実は一種の「漏れ」とも考えられ、初回通過効果が回避されてしまうことも相まって、ヒトの健康にとって有害となる可能性も考えられる。そこで、脂溶性を有する有害成分としてメチル水銀のリンパ系輸送についても合わせて検討した。

3. 研究の方法

(1) リンパカニキュレーションラットを用いた食品成分のリンパ系輸送評価

本実験は、「近畿大学動物実験規程」に従い近畿大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

Wistar/ST 雄性ラット(8~10週齢)の胸管リンパ管にカニキュレーションを留置し、試料溶液投与用チューブを十二指腸に設置した。術後一晩回復させた非麻酔下の状態で、十二指腸に目的分子を含む試料溶液を投与し、リンパ液を経時的に回収した。また、尾部静脈より採血を行い、末梢血漿を得た。リンパ液ならびに末梢血漿は分析まで -30°C で保存した。リンパ液および血漿中のカロテノイド、レチニルエステル、および α -トコフェロールは常法に従い有機溶媒で抽出した後HPLC分析に供し、適切な内部標準を用いて定量した。フラボノイドについては、ほとんどが抱合代謝物として存在していることから、酵素的に脱抱合処理を行った後、HPLC分析に供した。

(2) ヒトボランティアによるタマネギソテー摂取試験

本実験は、近畿大学総合理工学研究科生命倫理委員会の審査・承認を得て実施された。

20歳代の健常な男女(計6名)を対象とし、市販タマネギ(淡路島産)をサラダ油を添加、あるいは無添加でソテーしたものを一晩絶食した状態で摂取してもらい、摂取前(絶食時)摂取後1.5hに採血を行った。これを遠心して得られた血漿を脱抱合処理後HPLC分析に供し、血漿ケルセチン代謝物濃度の変化を調べた。

(3) カイロミクロン分泌能を向上させた培養細胞系確立の試み

ヒト小腸上皮モデルとして汎用されさまざまな食事成分の吸収性評価にも用いられている Caco-2 細胞は、カイトミクロン分泌能が低いという欠点をもつ。CD36 はマウス小腸においてカイトミクロンの正常な形成・分泌に必要であることが報告されていることから、我々は Caco-2 細胞の CD36 発現を増加させた安定株を作成した（科学研究費補助金成果 課題番号 21780127）。本実験では、この作成株を用いて RI 標識オレイン酸および 2-モノオレインを投与したときの動態を調べ、カイトミクロン形成能を検討した。また、強制発現させた CD36 の細胞内局在についても確認した。

4. 研究成果

(1) 脂溶性ビタミンの吸収性評価

脂溶性ビタミンである γ -トコフェロールやプロビタミン A カロテノイドは、小腸で吸収されたものはほぼリンパ系へと輸送される。リンパカニキュレーションラットならびに門脈血採取による予備実験においてこのことを確認した後、脂溶性ビタミンの吸収性を向上させる方法について検討した。

構造の異なるプロビタミン A カロテノイドの吸収性評価

リンパカニキュレーションラットに対し、代表的なプロビタミン A である β -カロテンとともに、異性体である α -カロテン、キサントフィルである β -クリプトキサンチンの 3 種を投与し、リンパ液中に出現するカロテノイドならびに代謝産物であるレチニルエステルを定量した。その結果、擬似ミセルとして投与した場合、最も親水性の高い β -クリプトキサンチンを投与した場合に、未代謝カロテノイドおよびレチニルエステルの吸収性が最も高かった。ラット小腸はカロテノイド開裂酵素の活性が高く、 β -カロテンはほぼ全てがレチニルエステルへと変換されてしまう。そこで、 β -カロテン投与後の門脈血を採取しレチノイド濃度を定量したところ、同量のレチノールを投与した場合に比べてレチニルエステル濃度ははるかに低かった。すなわち、本条件においては γ -カロテンの吸収は β -クリプトキサンチンに比べてかなり低いことが示唆された。そこで、可溶化剤としてプロピレングリコールを用いたところ、小腸管腔における水への溶解性が向上したことでいずれのカロテノイドもリンパへの輸送量が増加し、特に β -カロテンでその傾向が顕著であった。しかし、 α -カロテンの場合では、同様に溶解度を高めてもリンパへの輸送量はそれほど上昇せず、小腸上皮細胞はこれら 2 つの分子の構造を認識し区別して吸収していることが示唆された。すなわち、カロテノイドのリンパ系輸送においては、小腸管腔内での可溶化（ミセル化）が必須である一方、生体はカロテノイド構造のわずかな違いも認識し選択吸収している可能

性がある。

ビタミン E の吸収性に対するナノテクノロジーの有効性

本研究課題の先行実験として、ビタミン E (α -トコフェロール) の吸収性に対するナノサイズ粒子化の影響を培養細胞系で調べたところ、粒子径の減少のみでは細胞取り込み量は増加せず、消化酵素の作用が吸収増加には必要であることが示唆されていた（参考：室田ら、2012 年度日本農芸化学会大会）。そこで、本実験ではナノサイズ粒子加工により可溶化したビタミン E のリンパ系輸送について評価した。その結果、ナノ化によりビタミン E の吸収性は向上することが示唆された。これらのことから、ビタミン E の吸収は小腸管腔での可溶性向上によって促進されたが、その機序は消化酵素の作用を受けやすくなったためではないかとも考えられる。今後もさらに詳細な機序を検討していく。

(2) フラボノイドの小腸における吸収に対するリンパ系輸送の寄与

ケルセチンの吸収性に対する油脂の影響

本研究課題の先行実験として、リンパカニキュレーションラットの十二指腸に大豆油とともに投与すると、油脂を添加しない場合に比べて、リンパ液中ならびに末梢血漿中のケルセチン代謝物濃度が有意に上昇することが示唆されていた。このとき、リンパ液中のケルセチン代謝物はカイトミクロンには局在していないことが示唆されていたことから、本実験において、油脂と同時にケルセチンを投与した後採取したリンパ液を限外ろ過し、ろ液に存在するカイトミクロンに付着していないケルセチン代謝物を定量したところ、未処理のリンパ液中濃度と変化はなく、リンパへと輸送されたケルセチン代謝物はカイトミクロンの構成成分にはなっていないことが示された（図、文献成果 1）。

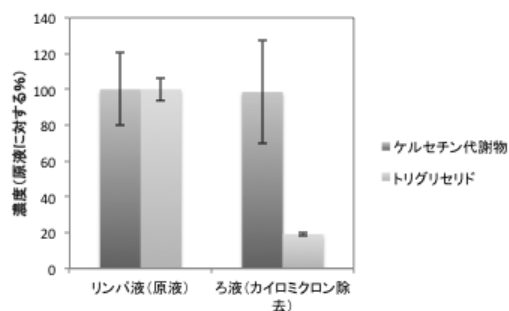


図 リンパ液およびろ液中のケルセチン代謝物およびトリグリセリド濃度比較

そこで、ケルセチンの吸収に対する油脂添加の影響をさらに検討するため、ヒトが実際にケルセチンを摂取するときの形態である配糖体を用いて、リンパカニキュレーションラットへの脂肪酸同時投与実験を行った。その結果、ケルセチンアグリコン投与の場合、脂肪酸を同時に投与することでリンパへの

輸送量が増えた一方、グルコース配糖体投与時ではむしろ脂肪酸が吸収を抑制することが示唆された。そこで、ヒトがタマネギソテーを摂取した場合の血漿ケルセチン代謝物濃度についても調べたところ、油炒めの方が油無添加のソテーよりも血漿濃度がわずかながらも高くなる傾向がみられた。これらの結果から、油脂の共存によるケルセチンの吸収促進効果は、アグリコンに対しては小腸管腔における可溶性の向上が一因と考えられたものの、通常の食事に含まれる配糖体の場合は可溶性よりもフードマトリクスからのフラボノイドの遊離ならびにその後の拡散が油脂により促進されたのではないかと考えられた。

ヘスペレチン吸収におけるリンパ系輸送の寄与の検討

ケルセチン以外のフラボノイドの腸管吸収に対するリンパ系輸送の寄与を明らかにするため、本実験では柑橘類に豊富に含まれるヘスペレチンについて検討した。ヘスペレチンには、かつてビタミンPとよばれた血管透過性調節作用に関連して、むくみの改善作用が期待されており、リンパ系輸送が機能性とも関連していることが期待されるフラボノイドである。

リンパカニューレションラットの十二指腸に、プロピレングリコールに溶解したヘスペレチン（アグリコン）を投与すると、リンパ液中からヘスペレチン抱合代謝物が検出された。また同時に採取した末梢血漿からもヘスペレチン抱合代謝物が検出されたことから、ヘスペレチンはすでに報告したケルセチンと同様、腸管細胞による代謝を受けた後、門脈と腸管リンパの両方に輸送されることが示唆された。同条件でケルセチンを投与した場合と比較したところ、ヘスペレチン投与時には末梢血漿濃度に対するリンパ液中濃度の比が高くなる傾向が示された。ヘスペレチンは分子内水酸基の1つがメチル化されたメトキシフラボノイドであり、化学構造上ケルセチンよりも疎水性が強い。このメトキシ基は抱合代謝物においても維持されていることが知られており、おそらく抱合代謝物もケルセチンの場合より疎水性が高いことから、リンパ系への移行割合が高かったものと推定された。本実験では脂質を同時投与しなかったにも関わらず、リンパ系輸送がケルセチンに比べて増加したことから、フラボノイドのリンパ系輸送は、分子構造（おそらく疎水性）に依存して変化することが推定された。今後、カイロミクロンへの局在等を明らかにしていくとともに、リンパ管内皮に対するヘスペレチンの作用等も検討していくことで、フラボノイドがリンパ系へ輸送されることが生理的に意味のあることなのか、解明していきたい。

(3) その他の食品由来成分におけるリンパ系

輸送の寄与の検討

リンパ系は生体にとって過剰な水分とその他の老廃物の排泄経路でもあり、小腸においても、「漏れ」の一種、あるいは排泄経路としてリンパ系輸送が機能している可能性が考えられる。我々は、食品汚染物質である有機水銀の吸収性に対するリンパ系輸送の関与を検討したところ、リンパカニューレションラットに投与したメチル水銀の一部がリンパ液からも検出されることを報告している（Murota et al., 2012 Biol Trace Elem Res）。そこで本実験においては、メチル水銀のリンパ系輸送に対する食事性油脂の影響を評価した。その結果、投与した水銀の一部はリンパ液へと輸送されるものの、油脂によるメチル水銀の吸収を促進する作用はみられなかった。本実験条件では、食品汚染レベルよりもはるかに大量のメチル水銀を投与しており、通常の食品において、油脂が存在することがメチル水銀の吸収性を高めることはないと考えられ、またリンパ系輸送が水銀の体内流入に寄与する割合も非常に小さいと推定された。

(4) CD36 導入培養細胞における脂質代謝特性の検討

リンパ系輸送の中心となるカイロミクロン形成の詳細を調べるための適切な小腸上皮細胞モデルとなる実験系は現在存在していない。そこで、カイロミクロンアセンブリをより詳細に解析する培養細胞モデルを確立するため、CD36 遺伝子を導入した Caco-2 細胞について脂質代謝に関する形質の変化を検討した。その結果、オレイン酸を与えた CD36 発現細胞では、トリグリセリド蓄積量が顕著に増加したものの、基底膜側へのトリグリセリド分泌量の増加は非常に小さかった。そこで、RI 標識脂肪酸を用いた細胞への取り込み実験を行ったところ、CD36 導入により細胞への脂肪酸取り込み量が増加したことが示唆された。しかしながら、カイロミクロン分泌に相当する基底膜側培地からの RI 検出はほとんど変化しなかった。本実験で用いた細胞株における CD36 の細胞内局在を調べたところ、細胞膜への移行が不十分で小胞体に CD36 が留まっていることが示唆され、また発現している CD36 分子は、分子量が小さく糖鎖付加が不十分である可能性が示された。以上のように、本実験では CD36 遺伝子導入による Caco-2 細胞のカイロミクロン形成・分泌能向上はみられず、改めて遺伝子導入法や CD36 以外の遺伝子についても検討することが必要である。

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 2 件)

1) Takagi M, Ukibe D, Murota K, Minami T.

Effect of lipids on the direct absorption of methyl mercury by lymph and blood. Science and Technology, 査読無, 26, 2014, 13-23.
<http://www.rist.kindai.ac.jp/no.26/minami.pdf>

2) Murota K, Cermak R, Terao J, Wolfram S. Influence of fatty acid patterns on the intestinal absorption pathway of quercetin in thoracic lymph duct-cannulated rats. Br J Nutr, 査読有, 109(12), 2013, 2147-2153.
DOI: 10.1017/S0007114512004564

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 藤田琴子, 室田佳恵子. ラットにおけるプロビタミン A カロテノイドの腸管吸収代謝動態. 第 17 回日本フードファクター学会学術集会, 2012 年 11 月 10 日, 静岡県男女共同参画センターあざれあ (静岡市)

2) Murota K. Contribution of lymphatic transport to the intestinal absorption of food components. International Conference on Food Factors 2011, 2011 年 11 月 22 日, Taipei International Convention Center (台北、台湾)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室田 佳恵子 (MUROTA, Kaeko)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号: 40294681

(2) 連携研究者

高橋 信之 (TAKAHASHI, Nobuyuki)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 50370135

村上 恵 (MURAKAMI, Megumi)

同志社女子大学・生活科学部・准教授

研究者番号: 80340769