

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500020

研究課題名(和文) 機能性食品成分の吸収制御作用を生み出す脂質分子の構造特性

研究課題名(英文) Influence of the chemical structure of dietary lipids on the bioavailability of coexistent food factors

研究代表者

室田 佳恵子 (MUROTA, Kaeko)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：40294681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では食事性脂質の化学構造が食品成分の吸収制御に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

脂質の分子構造が構成脂肪酸の吸収性に及ぼす影響をラットを用いて検討した結果、DHA含有リン脂質は小腸でのリン脂質結合型DHAの産生を促進することが示された。これは、DHA含有リン脂質が膵酵素の消化産物としてDHA結合型リゾリン脂質を出現させる割合が高いためと考えられた。

また、脂質消化産物が共存して十分な可溶化状態である混合ミセルを形成することが、脂溶性ビタミンの小腸における吸収性の促進に重要であることが確認された。さらに、リン脂質から生じるリゾリン脂質は小腸上皮の透過性に影響することが示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to clarify the influence of the chemical structure of dietary lipids on the bioavailability of various food factors.

We investigated the intestinal absorption of docosahexaenoic acid (DHA) derived from phospholipid, triacylglycerol and free DHA using unanesthetized lymph-cannulated rats. Phospholipid administration resulted in a significantly higher level of DHA in the phospholipid fraction than the other two samples administrations in the lymph. DHA at the sn-2 position of phospholipids was less hydrolyzed by pancreatin than by purified phospholipase A2 in vitro.

Absorption of lipophilic vitamins was also examined. It is confirmed that digestive products from dietary lipids were important to enhance the vitamins absorption via enhancing the mixed micelle formation and the accessibility to the intestinal epithelium. Furthermore, lysolipids produced from dietary phospholipids were shown to affect the permeability of differentiated human Caco-2 monolayers.

研究分野：食品栄養化学

キーワード：リン脂質 消化 リンパ輸送 脂溶性ビタミン 小腸透過性

1. 研究開始当初の背景

食事中の主要な脂質は長鎖脂肪酸からなるトリグリセリド (TG) であるが、リン脂質も食事性脂質の 3~8% を占めるといわれており、種々の卵類や大豆などレシチン (リン脂質) を豊富に含む食品が日常的に摂取されている。リン脂質や中性脂肪には、結合している脂肪酸の違いによる多様な分子種があり、さらにリン脂質の場合は、*sn*-3 位の極性頭部の構造による分子種差が存在する。構成要素となる脂肪酸の分子種は食事性脂質の「質」を決めている。また、脂肪酸の違いは消化酵素の基質特異性を決める要因でもあり、消化されやすさは吸収されやすさと生理的に密接に関連している。TG とリン脂質など、分子形態の違いが構成要素である脂肪酸の吸収性に影響をもたらすかどうかについては、特に *n*-3 系必須脂肪酸を含有する脂質で注目されている¹。血中に存在する DHA 結合型リゾリン脂質が脳への DHA 供給に重要な役割を果たすことが以前より知られており²、食事性脂質の分子種は摂取する構成脂肪酸の吸収形態を制御する因子となる可能性がある。しかしながら、TG やリン脂質の構成脂肪酸の種類や結合位置の違いが吸収代謝にどのような影響をもたらすかは、十分に検討されているとは言いがたい。特に、グリセロール骨格の *sn*-1 位と *sn*-2 位は、化学的な安定性の違いにより *sn*-1 位結合型のグリセロ脂質へと優先的に異性化されてしまうため、結合位置に関しては明瞭な成果を得ることが困難である。

脂溶性食品成分は胆汁酸混合ミセルの状態では小腸内に可溶化される必要があるが、このときミセルに含まれる脂肪酸、リゾリン脂質、モノグリセリドなどの脂質消化産物は、自らが吸収されるだけでなく、他の食品成分に対する乳化剤としての役割を果たす。さらにリン脂質を摂取した場合には、消化に伴い脂質メディエーターとして作用する分子も生じることから、食後の小腸粘膜上皮に対して、細胞間輸送の制御などの直接的影響を介している可能性がある³。すなわち、リン脂質消化に由来する分子には、自らの構成成分である必須脂肪酸や、共存する他の食品由来成分の腸管吸収を制御する働きがあると考えられる。しかしながら、食品に由来する脂質消化産物の構成脂肪酸の種類や、グリセロール骨格への結合位置といった化学構造特性を詳細に比較検討した例はあまり見られない。

2. 研究の目的

本研究では、食事性脂質を栄養素としてのみではなく、食品成分の吸収を制御する因子としてとらえ、さまざまな食品成分の吸収制御に影響する構造特性を解明することで、種々の機能性食品成分の生体利用性を高め

ることのできる脂質という観点の情報を得ることを目的とした。そこで、食事性脂質の化学構造として、特にグリセロリン脂質に着目し、

- (1) *n*-3 系必須脂肪酸供与担体としてのリン脂質構造の有効性をトリグリセリドと比較すること
 - (2) 脂溶性機能成分の腸管吸収に及ぼす脂質消化産物の影響を細胞レベル、動物レベルで比較すること
 - (3) 小腸上皮の物質輸送経路に対する脂質消化産物の作用を細胞レベルで検討すること
- の 3 点について研究を実施することとした。

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吸収性評価

8-9 週齢の雄性 Wistar/ST ラットに対し、胸管リンパカニキュレーションを留置し、さらにサンプル投与用チューブを十二指腸に留置した状態で一晩回復させ、実験に用いた。投与サンプルとして、魚油 (DHA 含有トリグリセリドとして)、魚卵由来リン脂質 (DHA 含有ホスファチジルコリン (PC) として) を用い、化学構造の違いによる DHA の吸収動態への影響を検討した。脂質の吸収性については、リンパ液から抽出した脂質を TLC にて分離し、TG 画分とリン脂質画分を得た。それから抽出した脂質をメチル化し、ガスクロマトグラフィーで脂肪酸組成および含有量を求めた。また、脂質消化産物と胆汁酸塩による混合ミセルを模した乳化液を調製し、 α -トコフェロール、カロテノイド (β -カロテン、 γ -カロテン、 γ -クリプトキサンチン) についての吸収性評価を行った。さらに、ビタミン E 含有可溶化物を用い、乳化作用と脂質消化反応の影響を検討した。ビタミン E、ビタミン A の吸収量は HPLC 分析により求めた。

本研究は、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のもとで実施した。

(2) 膵酵素を用いた DHA 含有脂質の消化性評価

魚油、魚卵リン脂質、および卵黄由来 PC に対し、膵酵素製剤であるパンクレアチン、あるいは膵ホスホリパーゼ A2 (PLA2) を添加し、膵酵素の至適 pH である pH 8 での消化実験を行った。インキュベーション後に遊離した脂肪酸をガスクロマトグラフィーにて分析した。

(3) Caco-2 細胞を用いた食品成分の吸収評価と上皮透過性評価

ヒト結腸がん由来培養細胞株であり、ヒト小腸上皮モデルとして汎用されている Caco-2 細胞を Transwell 上に培養したものを実験系とし、卵黄由来 PC とその消化産物で

あるリゾ PC、グリセロホスホコリン等の粘膜代謝ならびに経上皮輸送、さらに経上皮電気抵抗への影響を評価した。また、ビタミン E や β -カロテンの経上皮輸送に対する脂質消化の影響についても検討した。

4. 研究成果

(1) n-3 系必須脂肪酸供与担体としてのリン脂質構造の有効性

我々は本研究開始に先立ち、ラットに DHA をリン脂質として投与した場合、大部分がトリグリセリド (TG) としてリンパ液へ輸送されるものの、一部はリン脂質 (PC-DHA) として吸収されることを見出していた。DHA を含むリン脂質は摂取後血漿中の PC-DHA を増加させること⁴、また DHA を含むリン脂質の摂取が中枢神経系への DHA 供給源として有効である⁵との報告がある。脂質は小腸で吸収された後、カイロミクロンに組み込まれ、まずリンパ液へと輸送されることから、本研究においてはリンパカニキュレーションラットに対して DHA を投与し、リンパ液中に出現する DHA の分子形態と投与サンプルの分子形態との関連を調べ、さらに DHA 含有脂質の小腸における消化吸收を検討した。

DHA 含有脂質として、魚油 (主に TG) ならびに魚卵由来リン脂質 (主にホスファチジルコリン, PC)、および遊離脂肪酸の混合物 (FFA) を用いた。一般的に、グリセロ脂質は DHA を主としてグリセロールの *sn*-2 位に結合した分子形態をしている。今回のサンプルにおいては、*sn*-1/3 位と *sn*-2 位への分配率は、いずれも 1:3 程度であり、DHA は優先的に *sn*-2 位に結合していることが確かめられた。3 種のサンプルの投与後 6 h の間にリンパ液に輸送された DHA を定量したところ、総吸収量には有意差がなかったが、PC-DHA としての輸送量は魚卵リン脂質投与時に有意に高かった (図 1)。

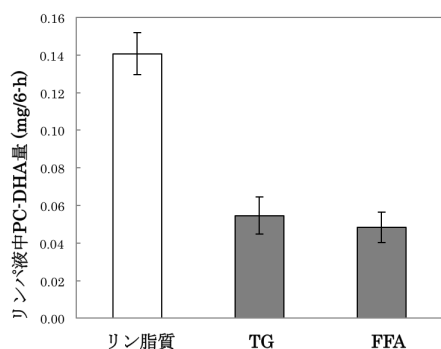


図 1 3 種の脂質サンプル投与後 6 h における PC-DHA 輸送量 (n=7、平均値 \pm SEM)

リン脂質投与による PC-DHA 輸送の増加がどのような吸収代謝経路を経て起こるかを明らかにするため、膵酵素による消化実験を行った。その結果、魚油 (TG) は膵酵素を

用いた *in vitro* 消化により、DHA を効率的に遊離脂肪酸へと変換することが確認された。一方、魚卵リン脂質の場合、膵臓由来ホスホリパーゼ A2 (PLA2) 標品によって消化された場合は、酵素の基質特異性に従って *sn*-2 位に主に結合する DHA が遊離したが、膵液抽出物であるパンクレアチンによる消化では、*sn*-1 位に結合する脂肪酸の方が優先的に消化されることが示された。*sn*-2 位に結合した脂肪酸の消化度が低下するという現象は、卵黄由来 PC に対しては起こらなかった。また、魚卵リン脂質からパンクレアチンの消化産物として生じるリゾリン脂質は、PLA2 消化産物と比べて、DHA を結合したものの割合が増加することが示唆された。このことから、DHA 含有リン脂質の場合、*sn*-2 位の結合した DHA は膵液消化に対して他の脂肪酸よりも抵抗性が高く、膵液中に存在する PLA1 活性を有するその他の酵素による消化が優先されることが示唆された。その結果産生された DHA 結合型リゾ PC が腸管細胞に吸収されることで、リンパ液中に DHA 結合リン脂質が増加するのではないかと推定できる (図 2)。現在これらの内容をまとめた論文を投稿中 (審査中) である。

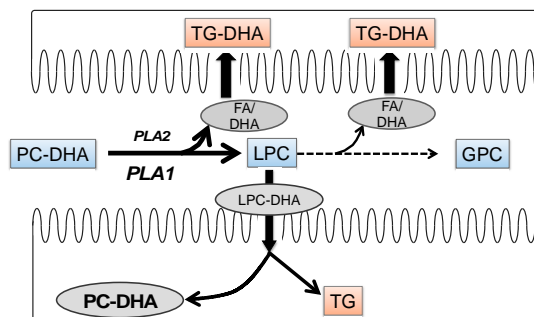


図 2 リン脂質結合型 DHA の消化吸收 (推定図)

(2) 脂溶性機能成分の腸管吸収に及ぼす脂質消化産物の影響

機能性食品成分の腸管吸収に及ぼす共存脂質の影響を調べるため、カロテノイドとして、カロテン、 β -カロテン、クリプトキサンチンの吸収比較を行った。通常ラットはカロテノイドの分解活性が高くヒトのモデルにはならないが、プロビタミン A カロテノイドから産生されるレチニルエステルも同時に分析することで、吸収性についての評価とした。食後腸内液モデルとして胆汁酸塩と脂質消化産物を用いた混合乳化液を調製しリンパカニキュレーションラットに投与したところ、3 種の吸収されやすさに違いがみられた。今回の調製サンプルでは、添加したカロテノイドに対する乳化効果が不十分であったらしく、これらをプロピレングリコールに溶解したときよりも吸収性が低かった。しかしながら、分子内に水酸基を有するクリプトキサンチンでは、カロテノイドおよびレチニルエステルの両方で、カロテンよりも吸収性が高く、脂質消化産物との親和性が高か

ったことが原因と考えられた。カロテノイドの吸収に関する Caco-2 を用いた先行論文においては、PC よりもリゾ PC 共存下の方が細胞への カロテン取り込みが増加するとの報告がある⁶。そこで、先行論文と同様の条件で調製した カロテン溶液を Transwell 上に培養した Caco-2 細胞に添加し、共存リン脂質の影響を調べた。その結果、共存させたリゾ PC は Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗を低下させ得る濃度であることが示された（次項参照）。先行研究では通常のプレート培養した Caco-2 細胞への取り込みを測定しており、培養条件が異なるが、リゾ PC が示したカロテノイドの細胞取り込み促進作用の少なくとも一部には、小腸粘膜細胞への直接的作用が関与するものと考えられた。

次に、別種の脂溶性ビタミンとして、 α -トコフェロール（ビタミン E）を同様な脂質消化産物混合乳化液に溶解したものの吸収性評価を行った。我々の研究室では本課題に先行して、Caco-2 細胞実験においては、食品用乳化剤を用いてナノレベルまで微細化したビタミン E は、脂質消化産物混合乳化液中のビタミン E に比べて吸収性が低いことを示していた。一方で、動物レベルにおいては、脂質消化産物混合乳化液と微細化ビタミン E の吸収性はほぼ等しく、一方で、微細化レベルが低い（マイクロサイズ）のビタミン E では、上記 2 種のサンプルよりも吸収性が低いとの結果が得られた。さらに、投与サンプル中に腓リパーゼの阻害剤を同時投与することにより、ナノレベルに微細化したビタミン E の吸収は有意に低下し、マイクロサイズのビタミン E と同程度となった。このことから、ビタミン E の吸収には、単なる親水性の向上や、微細粒子化による細胞取り込みの促進ではなく、ビタミン E と共存する脂質が消化され、脂質消化産物との混合ミセルが形成されることが重要であると考えられた。すなわち、微細粒子へと加工することで、親水性の表面積が拡大し、消化を受けやすくなったものと考えられる。現在、これらの内容をまとめ、論文準備中である。

(3) 小腸上皮の物質輸送経路に対する脂質消化産物の作用

リン脂質の消化産物の一種であるリゾホスファチジルコリン（LPC）は、炎症時などに産生され、血管内皮の透過性を亢進することが知られている。これまでに Caco-2 細胞に対しても、同様の作用を示すことが報告されている³。また、リゾホスファチジン酸（LPA）は、脂質メディエーターとして、創傷治癒等さまざまな作用を発揮することが知られている。我々の研究室では、Caco-2 細胞を用いて LPC と LPA が細胞間透過性に及ぼす影響を調べており、LPC が細胞間透過性を亢進させるのに対し、LPA は細胞間透過性を減弱させることを見出していた。そこで、本研究では、LPA の作用機序ならびに産生機序に

ついて検討した。我々の使用している Caco-2 細胞株では、少なくとも 3 種の LPA 受容体が発現していたが、アゴニスト、アンタゴニストを用いた検討により、2 種の受容体が LPA の作用発現に関与しているものと考えられた。また、各種阻害剤を用いた検討より、LPC の作用は細胞内カルシウム上昇と Rho/ROCK 系の活性化を介したものであったが、LPA はカルシウムシグナルには関与していないことが示唆された。次に、Caco-2 細胞が発現しているホスホリパーゼ、リゾホスホリパーゼについて調べた。Caco-2 細胞は LPC から LPA を産生するリゾホスホリパーゼ D（オートタキシン）は殆ど発現しておらず⁷、一方でホスファチジン酸（PA）から LPA を産生する酵素が存在していた。実際に、Caco-2 細胞に PA を添加すると、LPA 添加時と同様の効果が観察された。食品中には PA はあまり存在していないが、キャベツ由来のホスホリパーゼ D 活性により、胃内で PC から PA が産生されるとの報告がある⁸。従って、小腸においては、食事由来リン脂質が消化されることにより生じる LPC とともに、LPA が少量産生されることで、小腸上皮に対する過度な透過性亢進等の影響を限弱させているのではないかと考えられた。現在詳細について検討中である。

<引用文献>

1. J. Dyerberg *et al.*, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, (2010) 83:137-141.
2. M. Lagarde *et al.*, J. Mol. Neurosci., (2001) 16:201-204.
3. T. Sawai *et al.*, Pediatr. Surg. Int., (2002) 18:591-594.
4. J.P. Schuchardt *et al.*, Lipids Health Dis., (2011) 10:145.
5. L. Liu *et al.*, J. Lipid Res., (2014) 55:531-539.
6. T. Sugawara *et al.*, J. Nutr., (2001) 131:2921-2927.
7. M. Inaba *et al.*, (2013) Biochim. Biophys. Acta (2014) 1841:121-131.
8. T. Tanaka *et al.*, (2009) Biosci. Biotechnol. Biochem. (2009) 73: 1293-1300.

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 0 件）

〔学会発表〕（計 7 件）

室田佳恵子

消化管における脂質の消化吸收動態の腸内環境への影響、2016 年 9 月、フードサイエンスフォーラム第 22 回学術集会（岡山県美作市）

室田佳恵子、大塚芹、菅田望、村上陽子、伊佐治知也、寺尾純二、河田照雄、松村康生、大久保剛

ナノ粒子加工によるビタミン E の吸収促進作用の解明、2016 年 5 月、第 70 回日本栄養・食糧学会大会（兵庫県西宮市）

Kaeko Murota, Takeshi Ohkubo, Nozomi Sugata, Yoko Murakami, Rina Higashitani1, Tomoya Isaji, Junji Terao, Teruo Kawada, Yasuki Matsumura

Effect of nanoparticle processing on vitamin E absorption in human intestinal Caco-2 cells and rats, November, 2015, 7th International Conference on Food Factors, (Seoul, Korea)

Kaeko Murota, Mika Takagi, Shun Kumamoto, Takeshi Ohkubo, Akira Tokumura

Digestion and absorption of phospholipids as a dietary source of docosahexaenoic acid in rats, May, 2015, 12nd Asian Nutrition Congress (Yokohama, Japan)

室田佳恵子、熊本舜、福嶋伸之、徳村彰

Caco-2 細胞を用いた小腸上皮透過性に及ぼすリン脂質消化産物の影響評価、2015 年 3 月、日本農芸化学会 2015 年度大会（岡山県岡山市）

室田佳恵子、高木美佳、熊本舜、山川祥悟、岸野恵理佳、太久保剛、徳村彰

ラットおよびヒト Caco-2 細胞を用いた小腸におけるリン脂質消化吸收過程の解析、2014 年 5 月、第 68 回日本栄養・食糧学会大会（北海道江別市）

熊本舜、福嶋伸之、徳村彰、室田佳恵子

Caco-2 細胞を用いた食品成分による細胞間透過性亢進に対するリゾホスファチジン酸の作用解明、2014 年 5 月、第 68 回日本栄養・食糧学会大会（北海道江別市）

〔その他〕

ホームページ等（成果ページ準備中）

http://www.life.kindai.ac.jp/~murota/index/Food_Nutr_Chem_Lab.html

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・准教授

研究者番号：40294681

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

松村 康生 (MATSUMURA, Yasuki)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50181756

大久保 剛 (OHKUBO, Takeshi)

仙台白百合女子大学・人間学部・准教授

研究者番号：40513172