

食糧

その科学と技術

Shokuryo — food science and technology —

54

国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構

食品総合研究所

NARO Food Research Institute (NFRI)
National Agriculture and
Food Research Organization (NARO)

2016.3

まえがき

農研機構、食品総合研究所は、農林水産物や食品の価値を最大限に向上させる技術の開発、多様で安全な食品を支える技術の提供、科学的で正しい食品の情報の発信など、食品に関わる基礎から応用に至る幅広い独創的な研究を通じて、豊かな食生活を実現し、我が国の食料問題を解決することを大きな役割としています。

当所では、様々な研究のうち、その時々の研究トピックスや今後の研究開発の考え方、技術の普及材料となる研究などを分かり易く解説した冊子、「食糧」を年1回刊行しています。今回の食糧54号では、「栄養・機能性・健康」をキーワードに関連深い研究成果を解説いたします。

平成27年4月1日から、新しい「機能性表示食品制度」が施行されました。本制度は、事業者の責任で、科学的根拠を基に商品に機能性を表示できる届出制度で、従来の消費者庁が個別に審査を行う特定保健用食品制度とは異なり、迅速に分かり易く食品の機能性を表示できる新しい制度として期待されています。また、生鮮農林水産物が機能性表示の対象になった世界で初めての制度であり、生鮮農林水産物の消費拡大による国民の健康維持・向上も大いに期待されます。

当所では長年にわたり食品の機能性に関する研究を行ってきました。食品の機能性は、栄養に関する1次機能、美味しさや嗜好性に関する2次機能、生体調節作用に関する3次機能に3つに分類されます。最近では、「機能性」と言った時には3次機能のみと誤解される方も多くいらっしゃいますが、本来はこの3つの機能が一体となって食品の機能性が発揮されます。

今回は、「栄養・機能性・健康」をキーワードに様々な側面を持つ食品の機能性研究の成果をご紹介します。この一冊で当所における食品機能性研究の最新の進捗状況を把握いただけるものと期待しています。

本冊子が食品に関係する研究者や技術者だけではなく、食に関心をお持ちの多くの方々に活用して頂くとともに、現在の食品総合研究所の活動について少しでもご理解を戴ければ幸いです。

なお、食糧の15号(1972年)以降は、ホームページでも公開しておりますので、ぜひご参照ください。

(http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/nfri/index.html)

平成28年1月

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
所長 大谷 敏郎

目 次

I	ケルセチンの生活習慣病予防機能 小堀真珠子	5
II	腸内菌叢による機能成分の代謝変換に関する解析 田村 基	19
III	大豆とその調理加工が脂質代謝改善作用に及ぼす影響 高橋 陽子	35
IV	カロテノイドの腸管吸収, 代謝, 機能 小竹 英一	49
V	農産物・食品の抗酸化能評価法開発と測定の意義 石川 祐子	81

I ケルセチンの生活習慣病予防機能

1. はじめに（コホート研究）

内臓脂肪蓄積に加えて、高血糖、脂質代謝異常、高血圧のうちの2つ以上を併せ持つ症候群であるメタボリックシンドロームは、食事や運動等の生活習慣に起因し、心疾患の発症危険度を大きく高める。実際、赤身の肉や加工肉に加えて高脂肪の乳製品や甘いものを多く食べる西洋型の食事は、肥満やメタボリックシンドロームを引き起こし、2型糖尿病や心筋梗塞のリスクを高めることが報告されている。またその一方で、野菜や果物、精製していない穀類、新鮮な魚やシーフード、旬の食物を多く食べ、油はオリーブ油が主体である地中海型食は、肥満やメタボリックシンドロームを予防して心血管疾患のリスクを低下させると考えられている。

ケルセチンは野菜、果物、茶等に広く含まれるフラボノイドである（図1）。フラボノイドの摂取と生活習慣病との関連について、これまでに欧米で複数の前向きコホート研究が行われた。これらのコホート研究では、食品摂取頻度調査表を用いた調査と、各食品のフラボノイド含量のデータベースからフラボノイドの摂取量を推定して、フラボノイドの摂取量と心血管疾患等のリスクとの関係を検討しており、ケルセチンやケンフェロール等を含むフラボノールの摂取量の多い人では、冠動脈性心疾患で死亡する割合が低いこと等を報告している¹⁾。Knektらは約1万人を対象としたフィンランドの調査において、ケルセチンの摂取量の多い人で虚血性心疾患での死亡率や喘息の発生率が低いこと、また男性では肺がんの発症率が低いことを報告した²⁾。

2. ケルセチンの摂取量の推定

一方、日本では東北地方の女性を対象にした横断研究が行われ、3日間の食事

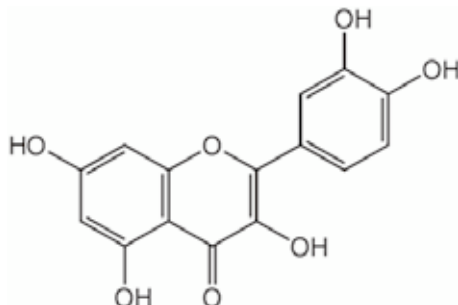


図1 ケルセチンの構造式

調査の結果から、ケルセチンは主にタマネギから摂取され、一日の摂取量は 9.3 ± 7.4 mg であったこと、またケルセチンの摂取量と血中総コレステロール及び LDL コレステロール値との間に負の相関があったことが報告されている³⁾。

筆者は、現在のケルセチンの摂取状況を明らかにするため、札幌医科大学と共同で摂取量調査を行った。札幌医科大学医学部では1976年から北海道地域一般住民を対象とした長期コホート研究(端野・壮瞥研究)を行い、メタボリックシンドロームの実態を明らかにするとともに、重症化予防のための特定健康診断や保健指導を行っている。そこで、北海道有珠郡壮瞥町において、平成25年度の一般住民特定健康診断受診者を対象とした食事調査を行った⁴⁾。この調査では食品摂取頻度調査表を用いて、特定健康診断前の6~7月によく摂取され、ケルセチン含量が多いことが予想される食品の摂取頻度と1回の摂取量を調査した。またこの時期に合わせて壮瞥町住民がよく利用する壮瞥町の農産物直売所や、近接する伊達市の大型スーパーで食品を入手してケルセチン含量を測定した。ケルセチンの測定は、タマネギに準じた方法で、配糖体を加水分解して総量を測定した⁵⁾。

その結果、6~7月に入手した食品では、ルチン(ケルセチン-3-ルチノシド)を多く含むアスパラや、サニーレタス、タマネギ、ピーマン、ロメインレタスのケルセチン含量が高かった。タマネギはケルセチン含量が高いことが知られているが、この時期のタマネギでは、11 mg/100 mg 新鮮重と低く、ピーマンと同程度であった。これらの値を用いて、食事調査を実施した20~93才の570名(男性210名、女性360名。平均年齢65才。)について、摂取量を計算したところ、ケルセチンの一日当たりの推定摂取量は、0.5~56.8mg。平均値及び中央値は16.2 mg 及び 15.5 mg であった。また、男性よりも女性の摂取量が多く、年齢が高い程、やや摂取量が多くなる傾向がみられた(図2)。また、ケルセチンの主な摂取源は緑茶であり、タマネギやアスパラ、トマト等からも多く摂取されていた(図3)。また12月にも41~91才の60名(男性24人、女性36人。平均年齢60才。)を対象とした調査を行った。季節に合わせて調査票の項目を修正し、12月によく食べる食品のケルセチン含量を測定した。冬季に測定した食品の中では、タマネギのケルセチン含量が最も高く41.9 mg/100 g 新鮮重であった。この時期のタマネギは北海道産であり、日本のタマネギのケルセチン含量約10-50 mg/100 mg 新鮮重のうち、北海道産では約30-50 mg/100 mg 新鮮重とケルセチンを多く含むことが明らかになっている。ケルセチンの推定摂取量は1日3.7~109.1 mg。平均値及び中央値は18.3及び16.1 mg であった。また冬季において、ケルセチンは主にタマネギ及び緑茶から摂取されていた(図3)。

更に、健康指標との関係を検討した。高血圧等で治療中の者を除外し、年齢を調整した偏相関分析を行った結果、偏相関係数-0.145 ($p=0.008$) でケルセチン摂取量が多いと拡張期血圧が低い傾向にあることが明らかになった。追跡調査が可能になれば、ケルセチン摂取と健康との関係がより明確になるだろう。

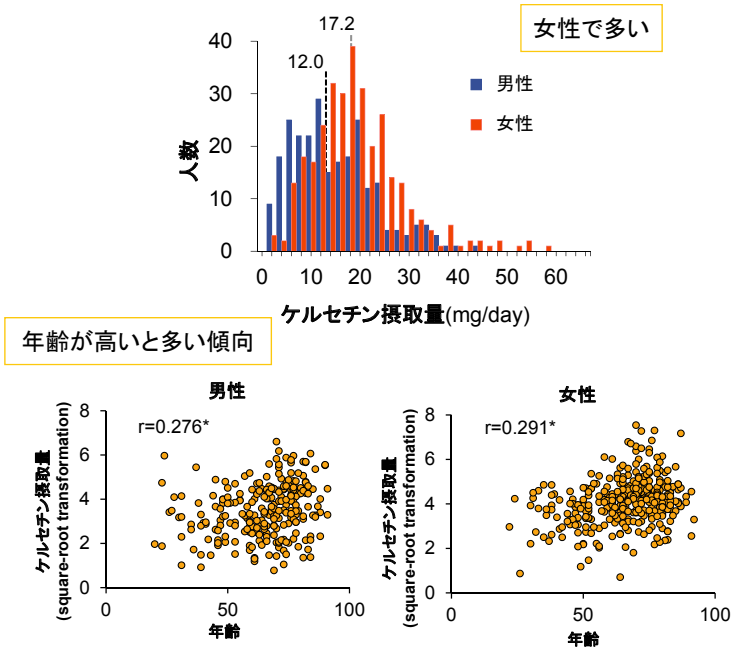


図2 北海道壮警町住民の夏季(6～7月)におけるケルセチンの推定摂取量
 r , 相関係数, $p < 0.0001$ Pearson correlation test

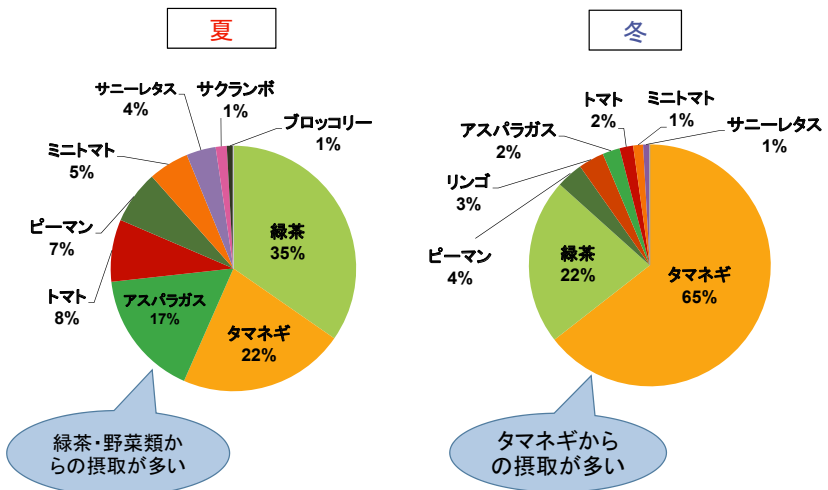


図3 ケルセチン摂取に寄与する夏季及び冬季の食品

3. モデルマウスを用いたケルセチンの機能性評価

このように、少ないながらも疫学調査でケルセチンが生活習慣病予防に有効であることを示唆する結果が得られている一方で、細胞レベルや試験管レベルではケルセチンの様々な作用機構が報告されている。筆者らは *in vivo* でのケルセチンの生活習慣病予防機構を明らかにするため、動物モデルを用いた検討を行った。

3.1. ケルセチンの糖尿病改善効果⁶⁾

ストレプトゾトシンはインスリンを産生する膵臓の β 細胞の細胞死を誘導してインスリンを低下させ、マウスに糖尿病を誘発する。そこでまず、ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスにケルセチン含有飼料を摂取させた。その結果、0.5%ケルセチン含有飼料を2週間摂取することにより、糖尿病により上昇した血糖値が低下し、低下したインスリン濃度は上昇して、糖尿病の症状が改善された(図4)。0.5%ケルセチン含有飼料を2週間摂取した後の血中のケルセチン濃度を、代謝産物を加水分解して測定してした結果は、約 $20 \mu\text{M}$ であった。ヒトがタマネギ 200-300 g を1週間摂取した後の血中濃度は $0.08\text{-}1.88 \mu\text{M}$ と報告

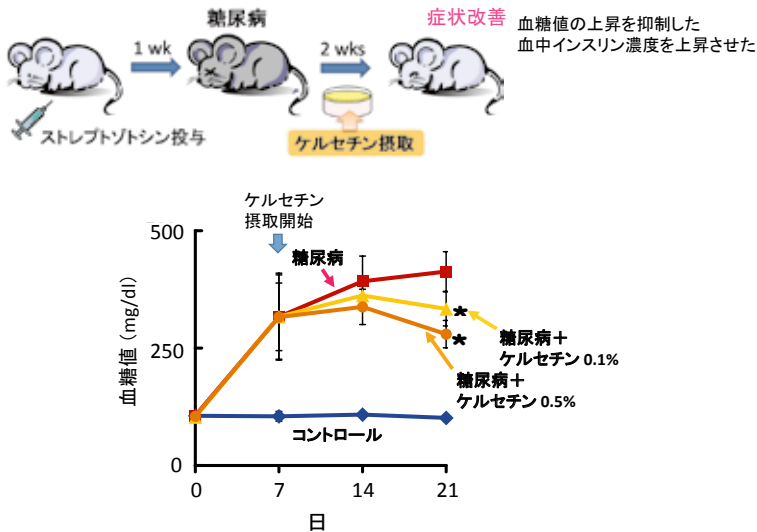


図4 ケルセチンはストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの糖尿病の症状を改善する

ストレプトゾトシンを腹腔内投与して1週間後に糖尿病を誘発したマウスに、ケルセチン 0, 0.1または0.5%を含む飼料を2週間摂取させた。

されている⁷⁾。個人差は大きいですが、マウスを用いた本試験ではその約10倍～250倍の血中濃度で明確な効果が示されたといえる。またこのとき、DNAマイクロアレイを用いて肝臓の遺伝子発現を網羅解析すると、糖尿病モデルマウスでは、肝障害に関わる炎症、ストレス、アポトーシス（細胞死）等のカテゴリーに含まれる遺伝子発現が上昇し、タンパク質の代謝や生合成に関わる遺伝子発現が低下して、肝障害が起こっていると予想された。実際、障害を受けている肝臓組織を断片化DNAを標識するTUNEL法で染色すると、糖尿病により肝障害が生じ、ケルセチン摂取により改善されていた（図5）。またケルセチンは細胞周期を停止させ、細胞死を誘導するCdkn1a等の遺伝子セットの発現誘導を抑制した。これらの遺伝子発現は酸化ストレスで誘導されることが明らかになっている。ケルセチンは膵臓においても、細胞周期制御因子のCdkn1aの発現誘導を抑制しており、膵臓及び肝臓で酸化ストレスを抑制し、Cdkn1aの誘導を抑制することによって、膵臓及び肝臓の細胞死を抑制し、膵臓の機能や肝障害を改善すると考えられた（図6）。

3.2. ケルセチンの肥満・メタボリックシンドローム改善効果

次に、よりヒトでの発症機構に近い食餌性肥満モデルマウスを用いて、ケルセチンによる肥満・メタボリックシンドローム予防効果を検討した。高脂肪・高ショ糖・高コレステロール食である西洋型食は、マウスにおいても肥満やメタボリックシンドロームを引き起こす。そこで、西洋型食に0.05%の割合でケルセチ

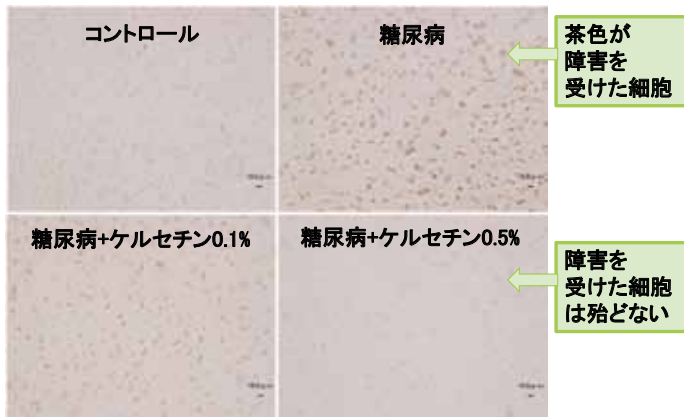


図5 ケルセチンはストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの肝障害を改善する
 ストレプトゾトシンを腹腔内投与して1週間後に糖尿病を誘発したマウスに、ケルセチン0.1または0.5%を含む飼料を2週間摂取させた後、肝臓組織をTUNEL法で染色した。

ンを添加して C57BL/6J マウスに摂取させたところ、20 週後には西洋型食で誘導される体重や脂肪重量の増加が抑制され、高血糖や血中のインスリン濃度、コレステロール濃度の上昇が改善された⁸⁾。また、血中や肝臓の酸化ストレスマーカーの上昇は抑制され、肝臓への脂肪蓄積が改善された (図7)。0.05%のケルセチンを添加した西洋型食を20週間摂取した後のケルセチンの血中濃度は約 $14\mu\text{M}$ で

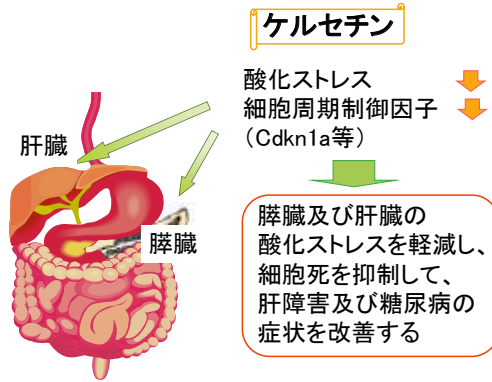


図6 遺伝子発現解析の結果等から予想されたケルセチンの糖尿病改善効果の作用機構

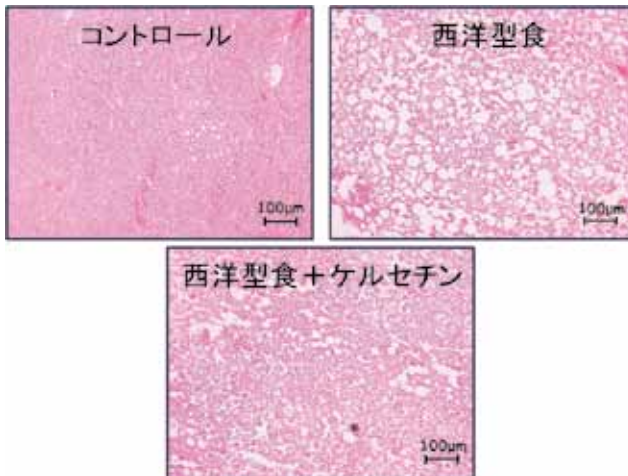


図7 ケルセチンは西洋型食摂取による肝臓の脂肪蓄積を抑制する C57BL/6J マウスにコントロール食、西洋型食または0.05%ケルセチンを含む西洋型食を20週間摂取させ、肝臓の組織染色を行った(白い部分が脂肪)。

あった。DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析では、西洋型食により脂肪蓄積に関わる転写因子 PPAR γ の誘導と関連する遺伝子発現の変動、ミトコンドリア機能低下に関わる遺伝子発現変化をはじめとする 1126 遺伝子の有意な発現変動が認められたが、ケルセチンで改善が予想された経路はミトコンドリア機能に関するもののみだった。そこで、脂肪肝に関連する脂質やグルコースの代謝及び抗酸化に関わる遺伝子発現を RT-PCR 法により個々に測定した結果、ケルセチンは西洋型食で誘導されるもののうち、脂肪蓄積に関わる PPAR γ とその標的分子である CD36、更に脂肪酸合成に関わる転写因子の SREBP1c の遺伝子発現を抑制した。また西洋型食で抑制されるもののうち、脂肪酸の β 酸化に関わる転写因子の PPAR α 、糖新生に関わる phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)、抗酸化酵素であるカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ 1 (GPX1) の遺伝子発現を誘導した。このうち、特に PPAR α と GPX1 の発現は摂取 8 週後で既に改善されており、過酸化脂質のマーカーも摂取 8 週後で有意に抑制されていた。酸化ストレスは脂肪蓄積を促進し、インスリン耐性を悪化させることが知られている。ケルセチンは肝臓において、まず酸化ストレスを軽減し、また脂肪酸の β 酸化に関わる遺伝子発現を改善する。そして、続いて脂肪蓄積に関わる遺伝子発現を改善して、徐々に脂肪蓄積を抑制すると考えられた (図 8)。

ケルセチンは西洋型食による内臓脂肪重量の増加を抑制したため、西洋型食に 0.05% のケルセチンを添加して 18 週間摂取させた後の精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現を網羅解析した。その結果は肝臓とは異なり、ケルセチンは西洋型食で

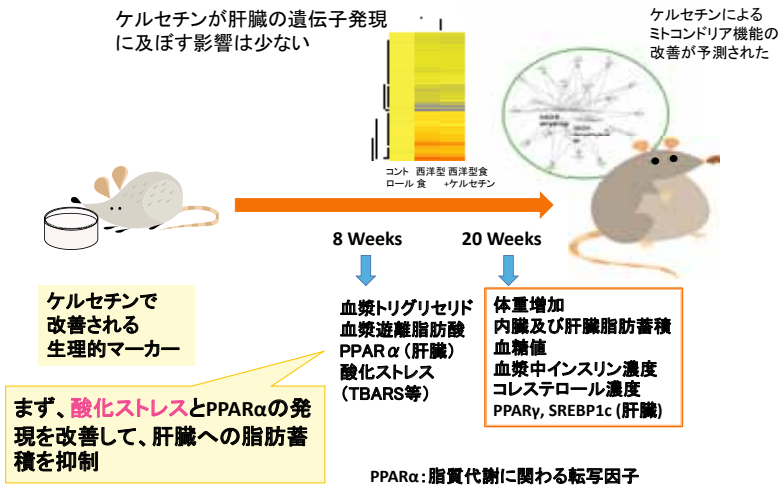


図 8 食餌性肥満モデルマウスにおけるケルセチンの脂肪肝改善効果

誘導される内臓脂肪組織の遺伝子発現変化を良く改善した(図9)。コントロール食、西洋型食またはケルセチン添加西洋型食を摂取したマウスの脂肪組織の間では、4657 遺伝子の発現が有意に異なっており、パスウェイ解析 (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity Systems) の結果から、西洋型食摂取により変化する 154 の生物学的機能のうち、104 の機能がケルセチンで改善されることが予想された。内臓脂肪の蓄積に伴い、脂肪組織中にはマクロファージが増加、活性化される。脂肪細胞やマクロファージが産生する炎症性サイトカイン $TNF-\alpha$ の増加は、全身の炎症を引き起こし、主なインスリン耐性の原因となると考えられている。最近では、リンパ球の T 細胞や B 細胞、NK 細胞、樹状細胞、マスト細胞等の免疫細胞の増加や活性化がマクロファージの増加・活性化や炎症に関わっていることが明らかになってきた。遺伝子発現解析の結果は、西洋型食により誘導されるマクロファージ、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞及びマスト細胞等の免疫細胞の増加や活性化を、ケルセチンが抑制することを示していた(図9)。脂肪組織をマクロファージのマーカーで染色すると、西洋型食を摂取することにより脂肪細胞周囲に蓄積したマクロファージが、ケルセチンを摂取することにより減少していることがわかる(図10)。またケルセチンは、西洋型食による精巣周囲脂肪組織の酸化ストレスマーカーの上昇を抑制するが、遺伝子発現解析の結果は、西洋型食で誘導される活性酸素種の産生に関わる遺伝子発現を抑制していた(図9)。この他、ケルセチンは脂肪蓄積に伴うミトコンドリアの機能低下を改善することが、遺伝子発現解析とミトコンドリア DNA 含量の測定から明らかになった(図11)。このようにケルセチンは内臓脂肪組織において、マクロ

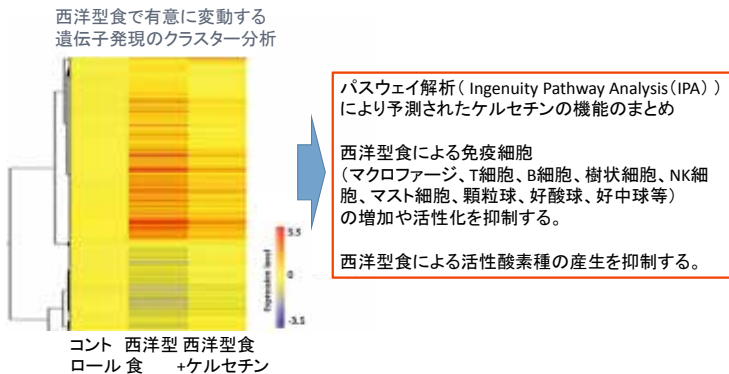


図9 西洋型食で変動する内臓脂肪組織の遺伝子発現のクラスター分析及びパスウェイ解析によりケルセチンで改善が予測された生物学的機能

マウスにコントロール食、西洋型食、0.05%ケルセチン含有西洋型食を18週間摂取させた後、DNAマイクロアレイを用いて精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現を網羅解析した。赤は発現量が増加した遺伝子、青は発現量が低下した遺伝子。

ファージや T 細胞等の様々な免疫細胞の増加・活性化，及び脂肪蓄積に伴う活性酸素種の増加を抑制して，メタボリックシンドロームの改善に寄与すると考えられる（図 12）。

0.05%のケルセチンを含む西洋型食を 18 週間摂取したマウスの血中では，メチル化，グルクロン酸化あるいは硫酸化された代謝産物が高濃度に存在するが，グルクロン酸あるいは硫酸で抱合体化されていないケルセチン及びイソラムネチン（ケルセチンの 3' 位が O-メチル化された化合物）は存在しない。また，精巢周囲脂肪組織には，それぞれ約 187 及び 75 pmol/g と比較的 low 濃度のケルセチン及びイソラムネチンが検出された他，僅かに抱合体化されていないケルセチン及びイソラムネチンも検出された。特にメチル化によりケルセチンの抗酸化能は

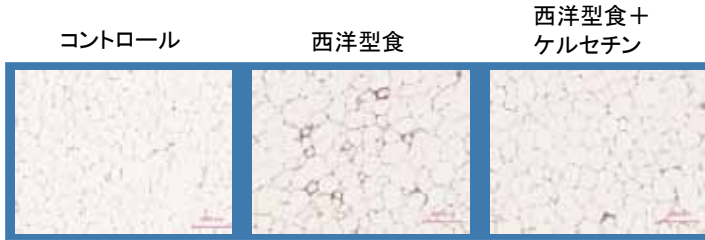


図 10 ケルセチンは西洋型食による内臓脂肪組織へのマクロファージの蓄積を抑制する

マウスにコントロール食，西洋型食，0.05%ケルセチン含有西洋型食を 18 週間摂取させた後，マクロファージに特異的に発現する膜タンパク質を抗体染色した。

パスウェイ解析によりケルセチンで改善が予想された標準経路

標準経路	P値	発現変動した遺伝子の割合
マクロファージ・単球における Fcγ レセプターを介した貪食	7.39E-09	30/92 (0.326)
ミトコンドリア機能障害	3.09E-07	34/136 (0.25)
補体システム	4.42E-06	11/23 (0.478)
ヘルパーT細胞のCD28シグナル経路	4.61E-06	28/110 (0.255)
ナチュラルキラー細胞のシグナル伝達	3.28E-05	23/98 (0.253)

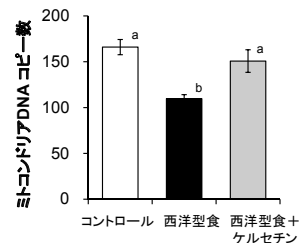
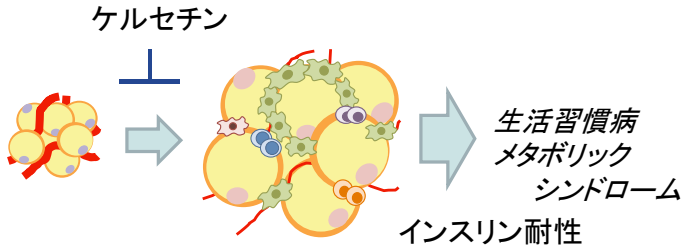


図 11 ケルセチンは内臓脂肪組織におけるミトコンドリアの機能障害を改善する

マウスにコントロール食，西洋型食，0.05%ケルセチン含有西洋型食を 18 週間摂取させた後，精巢周囲脂肪組織のミトコンドリア DNA コピー数を測定した。表は，遺伝子発現の網羅解析によりケルセチンで改善が予想された標準経路。



ケルセチンは、

- ・免疫細胞(マクロファージ、T細胞等)の増加・活性化を抑えて脂肪組織の炎症を抑制する
- ・脂肪の蓄積に伴う活性酸素種の増加を抑制する
- ・ミトコンドリアの機能障害を改善する

図 12 食餌性肥満モデルマウスにおけるケルセチンのメタボリックシンドローム予防効果のまとめ

低下するものの、血中及び組織中のケルセチン代謝産物もある程度の抗酸化能を維持していることが報告されており、これらの代謝産物が組織における活性酸素種の増加を抑制すると考えられる。

3.3. ケルセチンの高濃度摂取の影響

ケルセチンは *in vitro* で変異原性を示すが、ヒトでの発がん性はないとみなされている。これまでのところ、ケルセチン摂取によるヒトでの深刻な副作用は報告されていない。しかし、動物実験では、高濃度摂取によるプロオキシダント作用や甲状腺機能への影響が検討されている。筆者らは、ケルセチンの長期過剰摂取の影響を検討するため、標準飼料 (AIN93G) に肥満・メタボリックシンドローム改善に有効であった 0.05%、及びその 20 倍の 1%ケルセチンを添加して、C57BL/6J マウスに 20 週間摂取させた⁹⁾。その結果、0.05%及び1%ケルセチンは標準食を摂取した正常マウスの体重、肝臓重量、内臓脂肪重量及び血糖値、血中脂質濃度等の血中因子に影響を及ぼさなかった。また、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現網羅解析からは、0.05%及び1%ケルセチンは肝臓の遺伝子発現プロファイルに影響を及ぼさないことが明らかになった。これまでの研究から、動物モデルにおけるケルセチンの糖尿病や肥満・メタボリックシンドローム改善・予防効果には酸化ストレス抑制効果が関与していることが明らかになっている。そこで、血中及び組織中の酸化ストレスマーカーを測定した結果、1%ケルセチン含有飼料を摂取したマウスでは、血中、肝臓、内臓脂肪組織及び小腸で酸化ストレス低下作用を示していた (図 13)。また肝臓及び内臓脂肪組織では、

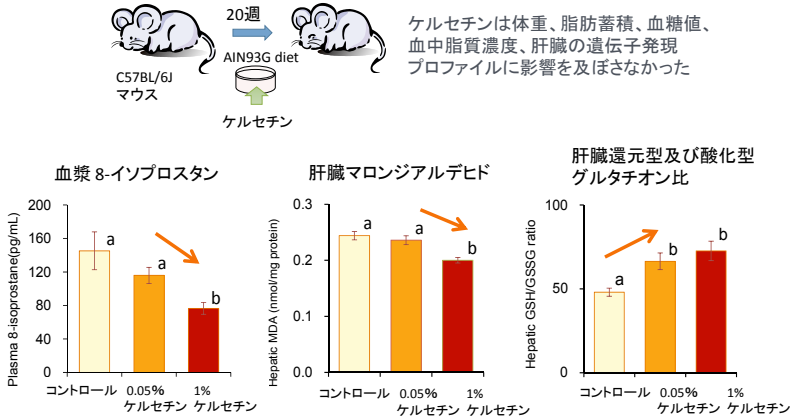


図 13 ケルセチンは正常マウスにおいて血中及び肝臓の酸化ストレスを軽減する
マウスに0.05% または 1% ケルセチン含有飼料を 20 週間摂取させた後、血中及び肝臓の酸化ストレスマーカーを測定した。

抗酸化酵素であるカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼの発現を誘導した。また、0.05%ケルセチン含有飼料を摂取したマウスにおいても、肝臓で弱い酸化ストレス低下作用が認められた。このように、ケルセチンの長期高濃度摂取では、これまでのところ明らかな有害作用は認められておらず、動物実験の結果は、ケルセチンが生体内において特に酸化ストレスの抑制に寄与することを示している。

3.4. ケルセチンの認知機能改善効果

認知症は要介護状態に至る主な原因であり、日本においては 460 万人、世界では 4500 万人を超えて急増している。しかし、認知症の主な原因であるアルツハイマー病には未だ確立された治療法がない。生活習慣病が認知症の発症に関わることが明らかになるにつれ、食生活を介した認知症の予防や認知機能の改善が期待されている。岐阜大の中川らは、食生活と関わりの深い GCN2 によるアミノ酸センサーシグナルとオートファジーを介してアルツハイマー原因物質アミロイド β を産生する新たなアルツハイマー病の発症メカニズムを明らかにした¹⁰⁾。さらにケルセチンがアミノ酸センサーシグナル経路に存在する eIF2 α のリン酸化を抑制してこの新規アミロイド β 産生経路を抑制し、アルツハイマーモデルマウスや正常老化マウスの認知機能を改善することを明らかにした^{11; 12)}。ケルセチンの認知機能改善効果に関する成果は、ケルセチンの生活習慣病予防機能と高含有農作物に関する農水省委託プロジェクト、及び認知機能障害予防作用を持つケルセチン高含有タマネギに関する農研機構プロジェクトにおいて得られたもの

である。現在、筆者も協力して軽度認知障害及び健常な高齢者を対象とした介入試験により、北海道農業研究センターで育成したケルセチン高含有タマネギ「クエルゴールド」の認知機能改善効果を検討している。

4. 終わりに（介入試験）

筆者らが実施中の介入試験は、ケルセチンを殆ど含まない白タマネギを比較対照として、約 50-100 mg のケルセチンを含むケルセチン高含有タマネギを摂取する試験である。摂取量調査の結果、一日当たりの推定ケルセチン摂取量は 0.5 ~ 109 mg, 平均及び中央値は約 15-18 mg であったことから、安全かつ有効性が期待できるケルセチン摂取量と考えられる。これまでにケルセチンの機能性に関して主にサプリメントを用いた介入試験が行われ、血圧低下作用等が報告されているが、その数は多くない。Egert らは 150 mg のケルセチンを含むカプセルを 6 週間摂取することにより BMI 25 以上の太り過ぎの人 (overweight) の収縮期血圧及び酸化 LDL 値が下がること、また 162 mg のケルセチンを含むタマネギの皮の抽出物を 6 週間摂取することにより太り過ぎから肥満 (obesity, BMI 30 以上) の高血圧患者の収縮期血圧が下がることを報告している¹³⁻¹⁵⁾。その他、Lee らは 100 mg のケルセチンを含むカプセルを 10 週間摂取した喫煙男性で、血清総コレステロール値、LDL コレステロール値、血糖値及び、収縮期及び拡張期血圧が低下したこと、また Pfeffer らは 150 mg のケルセチンを 8 週間摂取した健常男性で、腹囲、収縮期血圧、血中トリアシルグリセロールが低下し、HDL コレステロールが増加したことを報告しているが、一方で、Javadi らは 500 mg のケルセチンを 8 週間摂取した関節リウマチの女性では、酸化ストレスマーカー及び血圧に変化はなかったとしている¹⁶⁻¹⁸⁾。このように、ケルセチンのサプリメントとしての有効性は未だ十分には明らかになっていない。コホート研究の結果が示すように、食事からのケルセチンの摂取が生活習慣病予防により有効であるかもしれない。介入試験や疫学調査及び動物試験等を更に進展させることにより、タマネギ等の食品から摂取するケルセチンの有効性や、有効な摂取方法及び作用機構の解明が期待できる。

謝辞

第 2 章及び 3 章の研究は、農林水産省委託「農林水産資源を活用した新需要創出プロジェクト」、農研機構「機能性をもつ農林水産物・食品開発プロジェクト」及び科研費基盤研究 (C) において実施した。

(食品機能研究領域 機能性評価技術ユニット 小堀 真珠子)

引用文献

- 1) Peterson, J.J., Dwyer, J.T., Jacques, P.F., and McCullough, M.L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutr Rev*, **70**(9), 491-508.
- 2) Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., and Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*, **76**(3), 560-568.
- 3) Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., and Kinai, N. (2000). Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr*, **130**(9), 2243-2250.
- 4) Nishimuro, H., Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S., Ippoushi, K., Oike, H., Nagata, T., Akasaka, H., Saitoh, S., Shimamoto, K., and Kobori, M. (2015). Estimated daily intake and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, **7**(4), 2345-2358.
- 5) Watanabe, J., Takebayashi, J., Takano-Ishikawa, Y., and Yasui, A. (2012). Evaluation of a method to quantify quercetin aglycone in onion (*Allium cepa*) by single- and multi-laboratory validation studies. *Anal Sci*, **28**(12), 1179-1182.
- 6) Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y., and Takahashi, Y. (2009). Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res*, **53**(7), 859-868.
- 7) Moon, J.H., Nakata, R., Oshima, S., Inakuma, T., and Terao, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **279**(2), R461-R467.
- 8) Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y., and Oike, H. (2011). Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res*, **55**(4), 530-540.
- 9) Kobori, M., Takahashi, Y., Akimoto, Y., Sakurai, M., Matsunaga, I., Nishimuro, H., Ippoushi, K., Oike, H., and Ohnishi-Kameyama, M. (2015). Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice. *Journal of Functional Foods*, **15**, 551-560.
- 10) Ohta, K., Mizuno, A., Ueda, M., Li, S., Suzuki, Y., Hida, Y., Hayakawa-Yano, Y., Itoh, M., Ohta, E., Kobori, M., and Nakagawa, T. (2010). Autophagy impairment

- stimulates PS1 expression and gamma-secretase activity. *Autophagy*, **6**(3), 345-352.
- 11) Ohta, K., Mizuno, A., Li, S., Itoh, M., Ueda, M., Ohta, E., Hida, Y., Wang, M.X., Furoi, M., Tsuzuki, Y., Sobajima, M., Bohmoto, Y., Fukushima, T., Kobori, M., Inuzuka, T., and Nakagawa, T. (2011). Endoplasmic reticulum stress enhances gamma-secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **416**(3-4), 362-366.
 - 12) Hayakawa, M., Itoh, M., Ohta, K., Li, S., Ueda, M., Wang, M.X., Nishida, E., Islam, S., Suzuki, C., Ohzawa, K., Kobori, M., Inuzuka, T., and Nakagawa, T. (2015). Quercetin reduces eIF2alpha phosphorylation by GADD34 induction. *Neurobiol Aging*, **36**(9), 2509-2518.
 - 13) Egert, S., Bosy-Westphal, A., Seiberl, J., Kurbitz, C., Settler, U., Plachta-Danielzik, S., Wagner, A.E., Frank, J., Schrezenmeir, J., Rimbach, G., Wolfram, S., and Muller, M.J. (2009). Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr*, **102**(7), 1065-1074.
 - 14) Egert, S., Boesch-Saadatmandi, C., Wolfram, S., Rimbach, G., and Muller, M.J. (2010). Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr*, **140**(2), 278-284.
 - 15) Brull, V., Burak, C., Stoffel-Wagner, B., Wolfram, S., Nickenig, G., Muller, C., Langguth, P., Alteheld, B., Fimmers, R., Naaf, S., Zimmermann, B.F., Stehle, P., and Egert, S. (2015). Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *Br J Nutr*, **114**(8), 1263-1277.
 - 16) Lee, K.H., Park, E., Lee, H.J., Kim, M.O., Cha, Y.J., Kim, J.M., Lee, H., and Shin, M.J. (2011). Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutr Res Pract*, **5**(1), 28-33.
 - 17) Pfeuffer, M., Auinger, A., Bley, U., Kraus-Stojanowic, I., Laue, C., Winkler, P., Rufer, C.E., Frank, J., Bosch-Saadatmandi, C., Rimbach, G., and Schrezenmeir, J. (2013). Effect of quercetin on traits of the metabolic syndrome, endothelial function and inflammation in men with different APOE isoforms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **23**(5), 403-409.
 - 18) Javadi, F., Eghtesadi, S., Ahmadzadeh, A., Aryaeian, N., Zabihyeganeh, M., Foroushani, A.R., and Jazayeri, S. (2014). The effect of quercetin on plasma oxidative status, C-reactive protein and blood pressure in women with rheumatoid arthritis. *Int J Prev Med*, **5**(3), 293-301.

Ⅱ 腸内菌叢による機能成分の代謝変換に関する解析

1. はじめに

ヒトの腸内には 100 兆個以上の腸内細菌が生息し、糞便のうち、約半分が腸内細菌またはその死骸であると言われている。腸内菌叢はヒトが摂取した栄養分の一部を利用し、腸内菌同士でバランスを保ちながら、腸内フローラ（腸内菌叢）と呼ばれる一種の生態系を形成している。近年、腸内菌叢がヒトの健康に深く関係していることが明らかになりつつある。肥満および 2 型糖尿病の増加は単にヒト遺伝子の変化によるものだけでなく、腸内菌叢が関与していることが示唆されている^{1) 2)}。肥満状態では、痩せたヒトに比べてフィルミクテス門に属する細菌群のレベルが高く、バクテロイデス門に属する細菌群のレベルが低いことが報告されている³⁾。近年盛んに行われている種々の研究は、腸内菌叢が肥満に対して影響を及ぼすことを明らかにしつつある。我々が食事として摂取する食品の未消化の栄養分の一部を腸内菌叢が利用していることから、食事は腸内菌叢に影響を及ぼす。食品成分の腸内菌叢による代謝は、その代謝産物と宿主の健康との関連性を検討する上では重要である。

腸内菌叢が代謝に関わっている成分として多糖類やフィトエストロゲン等が知られている。フィトエストロゲンとは、女性ホルモンのように機能する外因性エストロゲンのことであり、植物エストロゲンとも呼ばれる。代表的なフィトエストロゲンには、大豆イソフラボンや植物リグナンがある。腸内菌叢は、腸内においてフィトエストロゲン代謝に影響を及ぼしている。腸内菌叢は、植物リグナンの一つセコイソラリシレジノールジグルコシドからは、エンテロジオールやエンテロラクトンを産生する。また、大豆イソフラボンのダイゼインからは、ダイゼインよりもエストロゲン活性が強い equol (エコール) を産生する。しかし、フィトエストロゲンの腸内菌叢による代謝については未解明の部分が多く、腸内菌叢のフィトエストロゲンの代謝性の解明は、食品成分と腸内菌叢の関連を明らかにする上では、重要な課題の一つであると考えられる。

2. フィトエストロゲンの機能性

フィトエストロゲンの機能性に関しては種々の報告がなされている。大豆イソフラボンや味噌汁の摂取が多いヒトほど乳がんリスクが低い傾向があること⁴⁾や、前立腺癌の発症率は、エコールの血漿濃度が高い人ほど低いこと等が報告されている⁵⁾。乳がんでの死亡リスクは、血清エンテロラクトン濃度が高い女性ほど低いといった報告⁶⁾もなされている。

尿中エンテロリグナン（エンテロジオール＋エンテロラクトン）濃度と血清トリグリセリド濃度とが逆相関にあり、エンテロリグナン濃度と血清 HDL コレ

ステロールレベルが正の相関があることが報告されている⁷⁾。亜麻仁（アマニ）粉はセコイソラリシレジノールジグルコシドを多く含む。このアマニ粉を閉経女性に投与することで、血清LDLや血清トリグリセリドが低下したため、閉経女性へのアマニ粉の投与は脂質代謝を改善する可能性が示唆されている⁸⁾。

フィトエストロゲンの更年期障害予防効果や骨粗鬆予防効果も期待されている。S-エコールサプリメントSE5-OH 40mg/dayを閉経した女性に投与した場合、イソフラボンを閉経した女性に投与する場合よりもホットフラッシュの頻度を減少させたことから、エコールの投与は閉経した女性の更年期障害改善に寄与すると推察されている⁹⁾。

日本人の閉経した女性で閉経後5年以内の人に対して24週間のヒト試験を行い、イソフラボン投与群には、75mgのイソフラボンを投与し、プラセボ群には、デキストリンを投与し、全ての被験者には日常摂取する程度の大豆食品の摂取を許可した。24週間の試験後、イソフラボン投与群と非投与群の間には骨密度に有意な差は認められなかったが、エコール産生者と非産生者に分けてイソフラボンの骨密度に対する効果を検討した場合、エコール産生者に対して体全体の骨密度の有意なプラスの効果が認められたことが報告されている¹⁰⁾。

3. 腸内菌叢による植物リグナンの代謝

代表的な植物リグナンにはゴマに含まれているセサミンや亜麻仁（アマニ）に含まれているセコイソラリシレジノールジグルコシドなどがあるが、セリ、アスパラガス、小松菜、ワサビ、ゴボウ、ゆず等にも植物リグナンが含まれ、植物リグナンは農産物に広く分布している。植物リグナンには、セサミンの他にもマタイレジノール、セコイソラリシレジノール、ピノレジノール、アルクチゲニン、7-ヒドロキシマタイレジノール、ラリシレジノールなどが存在する¹¹⁾。

腸内菌叢は植物リグナンを代謝し、エンテロジオールやエンテロラクトンなどの哺乳類リグナンと呼ばれるリグナンを消化管内で産生する。健康人にゴマを投与した後に血液を採取し、血漿を分析したところ、セサミン濃度よりも高い濃度でエンテロラクトンやエンテロジオールが検出されたことが報告されている¹²⁾。さらに、成人女性にアマニを投与した場合、尿へのエンテロラクトンやエンテロジオールの排泄量が、アマニに含まれる植物リグナンのセコイソラリシレジノールよりも多かったことが報告されている¹³⁾。ヒトが摂取した植物リグナンは、その多くが腸内菌叢の働きにより消化管内で哺乳類リグナンに変換されていると推定される。

セコイソラリシレジノールジグルコシドは、植物リグナンの配糖体である。セコイソラリシレジノールジグルコシドは、ジグルコシドの加水分解反応、脱メチル化反応、脱水酸化反応、脱水素反応といった腸内細菌による複数の代謝変換を経て、最終産物の一つエンテロラクトンを産生する（図1）。

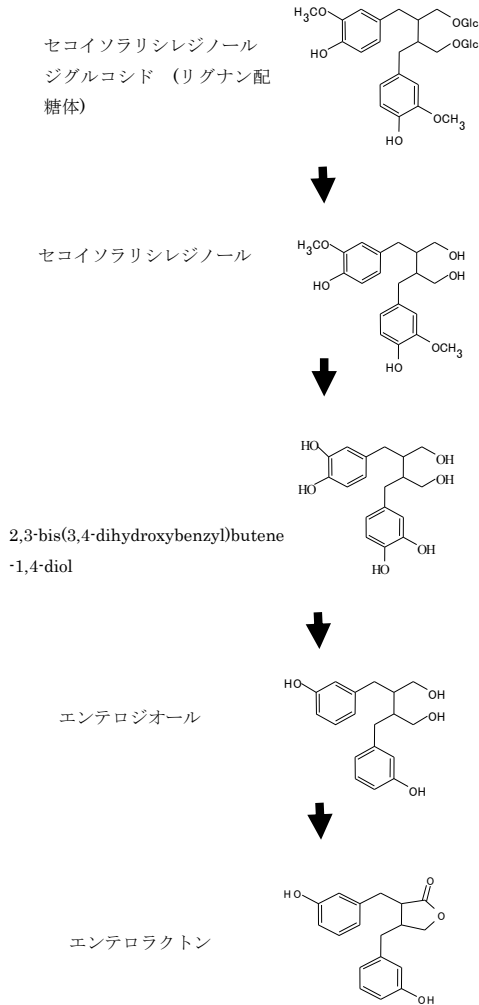


図 1. 腸内細菌によるセコイソラリシレジノールジグルコシドの代謝経路¹⁴⁾

セコイソラリシレジノールジグルコシドのジグルコシドの加水分解反応に関与する腸内細菌は、*Bacteroides distasonis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium cocleatum*, *C. ramosum* などが報告されている¹⁴⁾。著者らも健康人の糞便からセコイソラリシレジノールからセコイソラリシレジノールジグルコシドのジグルコシドの加水分解反応に関与する腸内細菌を見出したが、この腸内細菌は、*Clostridium* sp. SDG1020 株で *C. ramosum* と 16SrRNA 遺伝子の相同性が高い。

セコイソラリシレジノールから 2,3-bis (3,4-dihydroxybenzyl) butene-1,4-diol への変換には脱メチル化反応に関与する腸内細菌 *Eubacterium callanderi*, *E. limosum*, *Peptostreptococcus productus* 等が関与していることが報告されている¹⁴⁾。 *C. scindens* DSM5676^T, *Eggerthella lenta* DSM2243^T は *P. productus* SECO-Mt75m3 と共培養することでセコイソラリシレジノールからエンテロジオールへの変換に関与している¹⁴⁾。著者らは 2 菌の作用によってセコイソラリシレジノールからエンテロジオールへ変換する腸内細菌 *Eggerthella* sp. SDG-1110 と *Eubacterium* sp. SDG-1220 とを健康人の糞便から見出している。*Eggerthella* sp. SDG-1110 は *E. lenta* DSM 2243 (Accession no: CP001726) と 16SrRNA 遺伝子の相同性が高い。一方, *Eubacterium* sp. SDG-1220 は 16SrRNA 遺伝子の相同性が最も高い菌が *E. limosum* KIST612 (Accession no: CP002273) であり, 455 塩基中 432 塩基しか一致しなかった (94%) ことから, 本菌は新菌種の可能性が高い。エンテロジオールからエンテロラクトンへの変換には, 脱水素反応に関与する腸内細菌 *Lactonifactor longoviformis* が関与していることが知られている¹⁴⁾。著者らもエンテロジオールからエンテロラクトンへの変換に関与する腸内細菌を見出している。この腸内細菌は *L. longoviformis* DSM 17459^T (Accession no: DQ100449) の 16SrRNA 遺伝子の 435 塩基が完全に一致していた (100%) ため, *L. longoviformis* に属すると考えられる。

エンテロジオールやエンテロラクトンの産生性には個人差があることが知られている¹⁵⁾。エンテロジオールやエンテロラクトンは, 元の化合物である植物リグナンとは機能性が異なることが報告されているため, ヒト糞便菌叢のエンテロラクトン産生性の個人差を解明することは重要な課題と考えられる。また, エンテロジオールやエンテロラクトン産生性腸内菌叢の消化管内での機能性はほとんど解明されていないため, 今後これらのフィトエストロゲン産生性腸内菌の機能性解明も必要になってくると考えられる。

4. 腸内菌叢による大豆イソフラボンの代謝

エコールは, 大豆イソフラボンの一つダイゼインの腸内菌叢による代謝産物であるが, ダイゼインよりもエストロゲン作用が強いことが知られている。エコールはダイゼインよりもエストロゲン作用が強いため, 腸内菌叢の違いが大豆イソフラボンの機能性の違いに影響を及ぼすと考えられている。しかし, エコールの産生性は非常に個人差が大きい。エコール産生者の割合は欧米人よりも日本人の方が高いことが知られている。欧米では 30% 程度, 日本人では 50% 程度エコール産生能を有していると考えられている。食事が腸内菌叢に影響を及ぼすことから, 食生活の違いが日本人と欧米人のエコール産生性の違いに影響を及ぼしているのかもしれない。

腸内細菌は, 大豆イソフラボンの腸内代謝に重要な働きを行っている。大豆イ

ソフラボンの配糖体の一つであるダイジンは腸内細菌による加水分解反応を受けて、アグリコンであるダイゼインを生成する。この反応には、糖加水分解酵素を有する種々の腸内細菌が関与する。ビフィズス菌や大腸菌、乳酸菌の β -グルコシダーゼはダイジンからダイゼインを生成することが知られている（図2）。

ダイゼインからは、腸内細菌の還元反応によりフラボノイド骨格の二重結合が還元されてジヒドロダイゼインを産生する。筆者が健常人の糞便から分離した *Coprobacillus* sp. strain TM-40 株は、ダイゼインからジヒドロダイゼインを産生した¹⁷⁾。16SrRNA 相同性の解析結果から、*Coprobacillus* sp. strain TM-40 株は *Coprobacillus cateniformis* JCM 10603 (Accession no: AB030218) と 93% の相

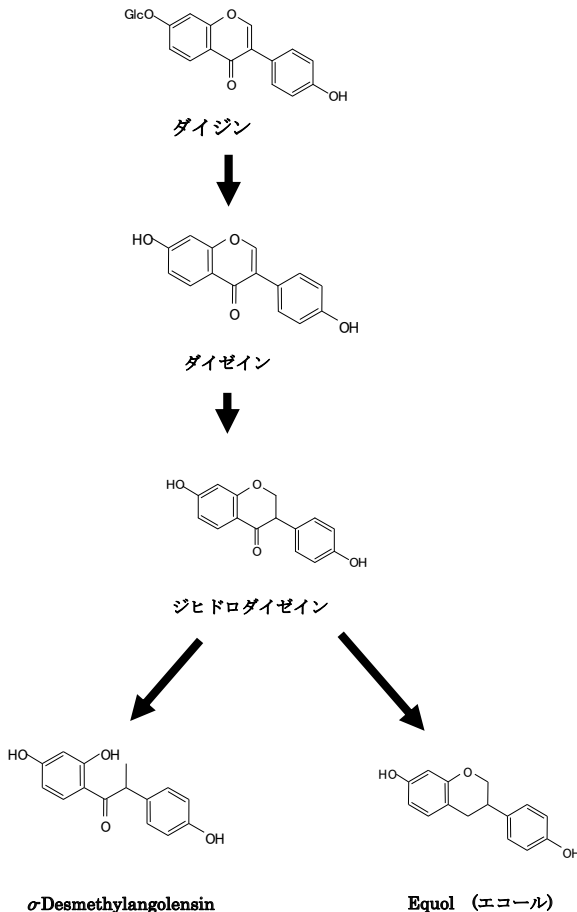


図2. 腸内細菌によるダイゼインの代謝経路¹⁶⁾

同性を有していた (図3)。 *Coprobacillus* sp. strain TM-40 は、最も相同性の高い細菌とでも 93%しか一致しないことから新奇腸内細菌であると考えられた。

ジヒドロダイゼインからは、主としてエコールと *O*-desmethylangolensin, この二つの代謝産物が産生することが知られている。 *E. ramulus*¹⁸⁾, strain HGH 136¹⁹⁾, strain SY8519²⁰⁾, などの腸内細菌はジヒドロダイゼインから *O*-desmethylangolensin を産生する。エコール産生菌の一つ *Eggerthella* sp. Julong 732 は、ジヒドロダイゼインからエコールを産生することが知られている²¹⁾。しかし、エコール産生菌である *Lactococcus garvieae* (Lc 20-92)²²⁾, *Slackia isoflavoniconvertens* DSM 22006²³⁾, *Slackia* sp. strain NATTS²⁴⁾, *Adlercreutzia equolifaciens*²⁵⁾ などはダイゼインからエコールを産生することが知られている。筆者が健常人の糞便から分離した *Slackia* sp. strain TM-30 もダイゼインからエコールを産生する²⁶⁾。16SrRNA 相同性の解析結果から、 *Slackia* sp. strain TM-30 は、 *Slackia* sp. strain NATTS (Accession no: AB505075) と 99% のホモロジーを有していた (図4)。

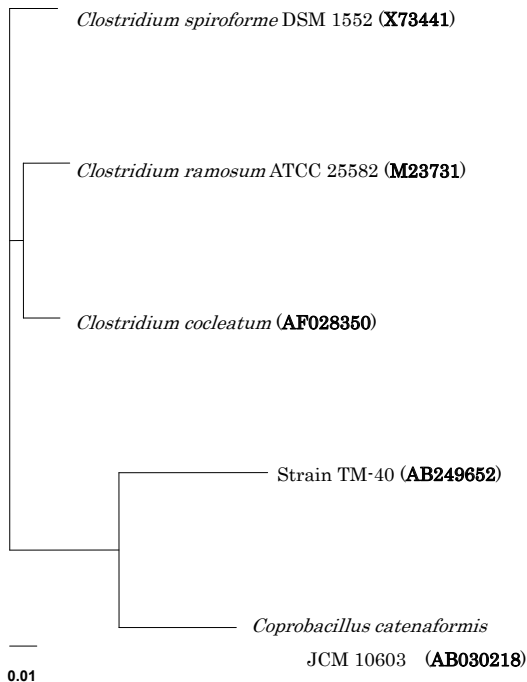


図3. Strain TM-40 の系統樹

バー (-) は塩基置換 % を示した。(0.01 は 1% 置換)

5. ヒト型腸内菌叢マウスの腸内菌叢に及ぼす大豆イソフラボンの影響

無菌マウスは腸内細菌を全く有していないマウスであり、ビニールアイソレーター内で滅菌飼料と滅菌水を与えて飼育することが可能である。無菌マウスを飼育しているビニールアイソレーターに飼料や飲水を搬入する場合は、飼料については、ガンマー線滅菌したものを、飲水については、オートクレーブ滅菌したものを無菌的にビニールアイソレーター内に搬入して使用する（図5）。

ビニールアイソレーター内で飼育している無菌マウスに、ヒトの糞便希釈液を

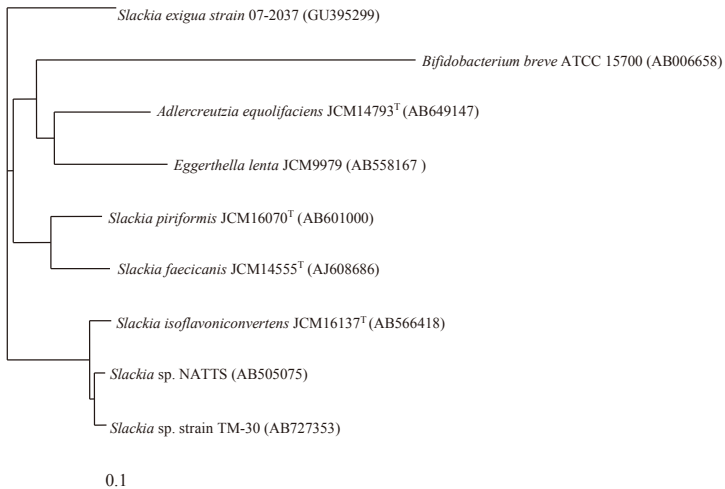


図 4. *Slackia* sp. strain TM-30 の系統樹
バー (—) は塩基置換 % を示した。

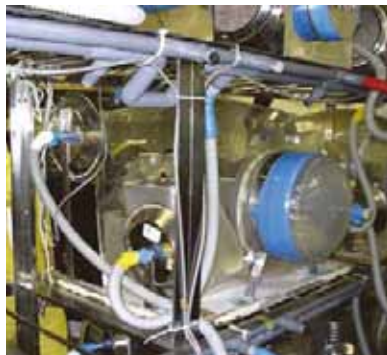


図 5. ビニールアイソレーターによる無菌マウスの飼育

投与することでヒトの腸内菌叢のみを有するヒト型腸内菌叢マウスを作製することが可能である。ヒト型腸内菌叢マウスはヒト由来の腸内細菌の機能を評価するには重要なツールである。ところで、肥満症状を示す Toll 様レセプター 5 を遺伝的に欠損したマウスの腸内菌叢を無菌マウスに移植すると、肥満になるとともに移植元の肥満マウスと同様に多くのメタボリックシンドロームの病態になることが報告されている²⁷⁾。イソフラボンの投与が腸内菌叢に及ぼす影響を検討する場合、ヒトの腸内菌叢を定着させたヒト型腸内菌叢マウスを用いて実験する方が、通常のマウスを用いて実験するよりも、イソフラボン投与がヒトの腸内菌叢に及ぼす影響をより推定し得ると考えられる。

筆者らは、無菌マウスにエコール産生性のヒト糞便を投与してヒト型腸内菌叢マウスを作製した。作製したヒト型腸内菌叢マウスと無菌マウスにイソフラボンを投与した場合、対照の無菌マウスでは、イソフラボンを投与してもエコールが産生されなかったのに対して、ヒト型腸内菌叢マウスでは、エコールが検出された。さらに、このヒト型腸内菌叢マウスにイソフラボンを投与した場合と、投与しない場合とで腸内菌叢の比較を行い、Clostridia の菌数が有意に高いことを明らかにした (図 6)。このことから、イソフラボンは Clostridia に対して増殖促進効果を有する可能性が示唆された²⁸⁾。

6. 乳酸菌によるイソフラボンの代謝性の解析

ゲニステインは、主要な大豆イソフラボンの一つである。筆者らが、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* JCM 2771 をダイジンもしくはダイゼインと嫌気培養

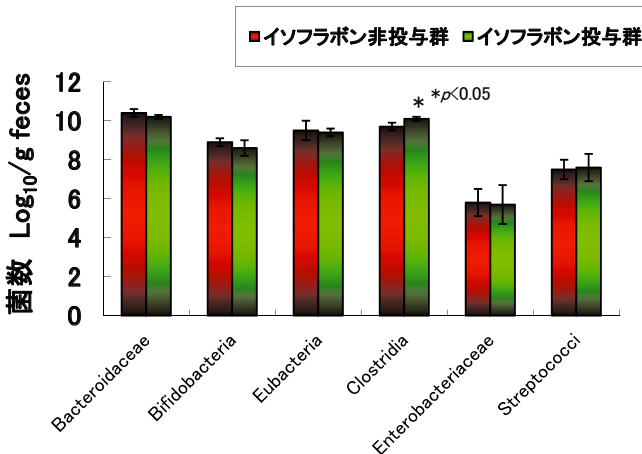


図 6. イソフラボン投与ヒト型腸内菌叢マウスと非投与ヒト型腸内菌叢マウスの腸内菌叢の比較

を行ったところ、ダイジンからはゲニステインが産生したがダイゼインからはゲニステインは産生しなかった²⁹⁾。(図7) このようにダイジンから乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 の作用でゲニステインが産生したことから、消化管内においてもダイジンからダイゼインやエコールが産生する反応ばかりでなく、ダイジンからゲニステインも産生している可能性がある。

エコール産生者の糞便希釈液にダイゼインを添加して *ex vivo* で嫌気培養を行った。エコール産生者の糞便希釈液に乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 を添加した場合と添加しない場合とでダイゼインからのエコール産生性を比較すると乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 を添加した方がエコール産生性が高まる傾向が認められた²⁹⁾。ヒトの腸内菌叢は個人差が大きいことが知られているため、すべてのヒトの腸内菌叢で乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 がエコール産生性を高めるかどうかは不明であるが、少なくとも、乳酸菌 *Lb. rhamnosus* JCM 2771 を添加してエコール産生性が向上したヒトの糞便の提供者に関しては、この乳酸菌を摂取することでエコール産生性が高まる可能性はある。

7. ヒト腸内菌叢のダイゼイン代謝性の解析

エコール産生能は個人差が大きいことが知られている。しかし、ヒトの腸内菌叢のダイゼインの代謝性と食事との関連性についての報告は少ない。そこで、京都府立医科大学の協力のもとで23才～60才の成人男女合計30名の糞便を採取し、糞便菌叢のダイゼイン代謝試験と食物摂取頻度調査 (Food Frequency Questionnaire Based on Food Groups: FFQg) を行い、腸内菌叢のダイゼイン代謝産物と食事情報との関連性を検討した。成人男女合計30名の新鮮糞便は、嫌

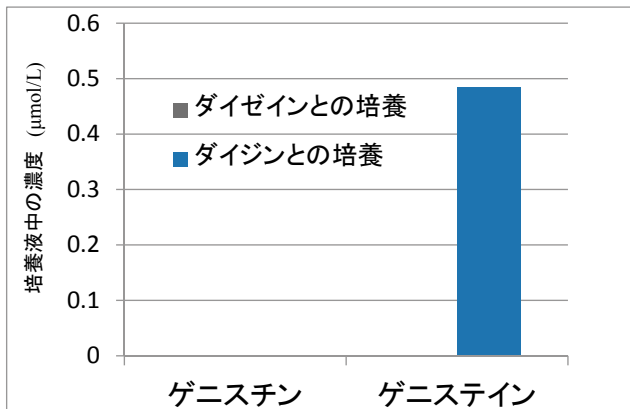


図7. *Lactobacillus rhamnosus* JCM 2771 とダイジンもしくはダイゼインとの嫌気培養結果

気度を保ちつつ、嫌気性培養液で希釈した。この新鮮糞便の希釈液にダイゼインを添加し、嫌気培養を行い、培養物の抽出物をLC-MS/MSで解析した。さらに、ヒト糞便希釈液とダイゼインとの嫌気培養で得られたジヒドロダイゼインやエコール濃度の結果と食物摂取頻度調査によって得られた摂取食品成分やBMI（ボディマス指数）の情報を解析した。

その結果、ヒト糞便のイソフラボン（ダイゼイン）代謝性はヒトによって個人差が大きいことが明らかとなった（図8）。また、ヒト腸内菌叢のダイゼイン代謝産物の一つジヒドロダイゼイン産生性は、男性と女性では異なり、男性の方が

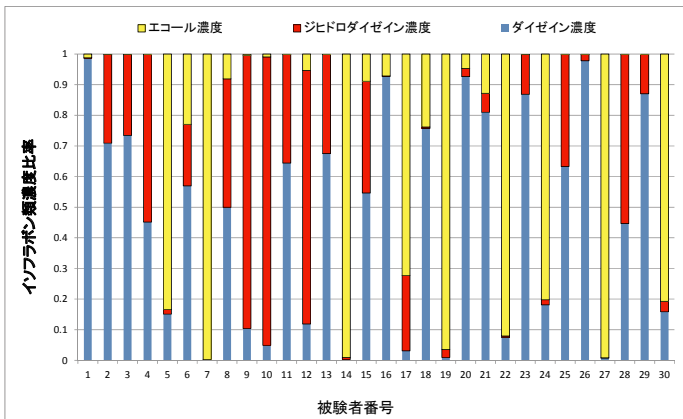


図 8. ヒト糞便菌叢のイソフラボン（ダイゼイン）代謝性の比較

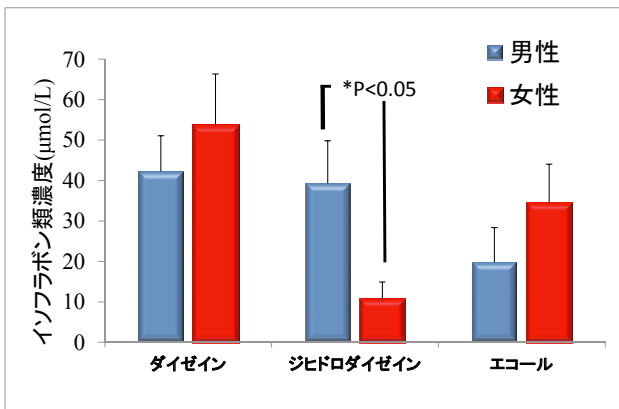


図 9. ヒト糞便菌叢のイソフラボン（ダイゼイン）代謝性の男女における比較
成人男性 15 人 成人女性 15 人での比較

有意に高い結果となった (図9)。

イソフラボンの代謝性は個人差が大きいにも関わらず、BMI 値とイソフラボンの代謝物との間には、男性と女性の間で異なった相関が認められた³⁰⁾。さらに、男性糞便菌叢培養液のジヒドロダイゼイン濃度と BMI 値との間に負の相関が認められ、(r=-0.66) 女性糞便菌叢培養液のエコール濃度と BMI 値との間には負の相関 (r=-0.4) が認められた。男性糞便菌叢のジヒドロダイゼイン産生性と BMI 値との間には負の相関が認められたため、男性糞便菌叢のジヒドロダイゼイン産生性と摂取食品成分との関連性を検討したところ、水溶性食物繊維摂取量とジヒドロダイゼイン産生性との間に正の相関が認められた (r=0.56)。調査した男性の BMI 値と水溶性食物繊維摂取量との間には負の相関が認められた (r=-0.52)。

近年、腸内菌叢がメタボリックシンドロームに関連しているという報告がある^{1) 2)}。イソフラボン類は、抗酸化作用を発揮していることが推察されている³¹⁾。また、イソフラボン類の弱いエストロゲン様活性が宿主の健康に寄与していることも推察されている³²⁾。しかし、エコールに比べて、ジヒドロダイゼインはエストロゲン活性が弱いことが知られており、男性の糞便菌叢のジヒドロダイゼイン産生能が BMI 値と負の相関が認められた原因は現在のところ不明である。本研究結果は、男性のジヒドロダイゼイン産生に関与する腸内菌叢が肥満抑制に関連する可能性を示唆する初めての知見である。しかし、被験者の数が少なく、予備的知見であるため、ジヒドロダイゼイン産生に関与する腸内菌叢が肥満抑制に関連するか否かはさらに被験者の数を増やして詳細に検討する必要がある。

肥満した成人に対して 10mg の S-エコールを含むタブレットを 12 週間に渡って投与したヒト試験では、S-エコールを投与した群はプラセボ投与群に比較して血清 LDL コレステロールレベルが有意に低値を示したことが報告されている³³⁾。今回のヒト試験では、女性の腸内菌叢のエコール産生能と BMI 値とに負の相関が認められた。腸内菌叢のエコール産生能力の高さは、脂質代謝の改善に寄与する可能性が示唆される。エコール産生性は、閉経した女性にとって有用であると考えられる。

動物試験のデータではあるが、レジスタントスターチ (難消化性でんぷん)³⁴⁾ やポリデキストロース^{35) 36)} がエコール産生性を高めるといった報告がある。したがって難消化性でんぷんや水溶性食物繊維を豊富に含む食材はエコール産生性を強化し得る候補食品成分の可能性がある。

近年、腸内菌叢がヒトの健康に深く関係していることが明らかになりつつある。しかし、フィトエストロゲンの腸内菌叢による代謝については未解明の部分が多い。今後の腸内菌叢のフィトエストロゲンの代謝性の解明は、腸内菌叢の生理学的意義の解明に大きく貢献すると期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究成果のうち「腸内菌叢の植物リグナン代謝」に関しては、日本製粉株式会社との共同研究による成果である。「ヒト型腸内菌叢マウスの腸内菌叢に及ぼす大豆イソフラボンの影響」に関しては、東京大学大学院農学生命科学研究科との共同研究による成果である。「ヒト腸内菌叢のダイゼイン代謝性の解析」に関しては、農林水産省委託プロジェクト「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発（平成23～25年度）」の助成により京都府立医科大学と共同で実施されたものである。

（食品機能研究領域 機能生理評価ユニット 田村 基）

引用文献

- 1) Lau E, Carvalho D, Pina-Vaz C, Barbosa JA and Freitas P, Beyond gut microbiota: understanding obesity and type 2 diabetes. *Hormones (Athens)*, **14**, 358-369 (2015).
- 2) Delzenne NM, Cani PD, Everard A, Neyrinck AM and Bindels LB, Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes, *Diabetologia*, **58**, 2206-2217 (2015).
- 3) Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S and Gordon JI, Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity, *Nature*, **444**, 1022-1023 (2006).
- 4) Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S and Tsugane S, Japan Public Health Center-Based Prospective Study on Cancer Cardiovascular Disease Group, Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 906-913 (2003).
- 5) Akaza H, Miyanaga N, Takashima N, Naito S, Hirao Y, Tsukamoto T, Fujioka T, Mori M, Kim WJ, Song JM and Pantuck AJ, Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **34**, 86-89 (2004).
- 6) Guglielmini P, Rubagotti A and Boccardo F, Serum enterolactone levels and mortality outcome in women with early breast cancer: a retrospective cohort study, *Breast Cancer Res. Treat.* **132**, 661-668 (2012).
- 7) Peñalvo JL, López-Romero P, Urinary enterolignan concentrations are positively associated with serum HDL cholesterol and negatively associated with serum triglycerides in U.S. adults, *J. Nutr.*, **142**, 751-756 (2012).
- 8) Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Juma S, Daggy BP, Stoecker BJ and Arjmandi BH, Flaxseed improves lipid profile without altering

- biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 1527-1532 (2002).
- 9) Jenks BH, Iwashita S, Nakagawa Y, Ragland K, Lee J, Carson WH, Ueno T and Uchiyama S, A pilot study on the effects of S-equol compared to soy isoflavones on menopausal hot flash frequency, *J. Womens Health (Larchmt)*, **21**, 674-682 (2012).
 - 10) Wu J, Oka J, Ezaki J, Ohtomo T, Ueno T, Uchiyama S, Toda T, Uehara M and Ishimi Y, Possible role of equol status in the effects of isoflavone on bone and fat mass in postmenopausal Japanese women: a double-blind, randomized, controlled trial, *Menopause*, **14**, 866-874 (2007).
 - 11) Peñalvo JL, Adlercreutz H, Uehara M, Ristimäki A and Watanabe S, Lignan content of selected foods from Japan, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 401-409 (2008).
 - 12) Peñalvo JL, Heinonen SM, Aura AM and Adlercreutz H, Dietary sesamin is converted to enterolactone in humans, *J. Nutr.*, **135**, 1056-1062 (2005).
 - 13) Nesbitt PD, Lam Y and Thompson LU, Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed, *Am. J. Clin. Nutr.*, **69**, 549-555 (1999).
 - 14) Clavel T, Henderson G, Engst W, Doré J and Blaut M, Phylogeny of human intestinal bacteria that activate the dietary lignan secoisolariciresinol diglucoside, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **55**, 471-478 (2006).
 - 15) Saarinen NM, Smeds AI, Peñalvo JL, Nurmi T, Adlercreutz H and Mäkelä S, Flaxseed ingestion alters ratio of enterolactone enantiomers in human serum, *J. Nutr. Metab.*, pii, 403076. doi: 10.1155/2010/403076. (2010).
 - 16) Rowland I, Faughnan M, Hoey L, Wähälä K, Williamson G, Cassidy A, Bioavailability of phyto-oestrogens. *Br. J. Nutr.* **89**, Suppl 1, S45-S58 (2003).
 - 17) Tamura M, Tsushida T and Shinohara K, Isolation of an isoflavone-metabolizing, *Clostridium*-like bacterium, strain TM-40, from human faeces, *Anaerobe*, **13**, 32-35 (2007).
 - 18) Schoefer L, Mohan R, Braune A, Birringer M and Blaut M, Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **208**, 197-202 (2002).
 - 19) Hur HG, Beger RD, Heinze TM, Lay JO Jr, Freeman JP, Dore J and Rafii F, Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein, *Arch. Microbiol.*, **178**, 8-12 (2002).
 - 20) Yokoyama S, Niwa T, Osawa T and Suzuki T, Characterization of an O-desmethylangolensin-producing bacterium isolated from human feces, *Arch. Microbiol.*, **192**, 15-22 (2010).

- 21) Kim M, Kim SI, Han J, Wang XL, Song DG and Kim SU, Stereospecific biotransformation of dihydrodaidzein into (3S)-equol by the human intestinal bacterium *eggerthella* strain Julong 732, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3062-3068 (2009).
- 22) 内山成人, 上野友美, 鈴木淑水, 新規エクオール産生乳酸菌のヒト糞便からの単離・同定, 腸内細菌学雑誌, **21**, 217-220 (2007).
- 23) Matthies A, Blaut M and Braune A, Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 1740-1744 (2009).
- 24) Tsuji H, Moriyama K, Nomoto K, Miyanaga N and Akaza H, Isolation and characterization of the equol-producing bacterium *Slackia* sp. strain NATTS, *Arch. Microbiol.*, **192**, 279-287 (2010).
- 25) Maruo T, Sakamoto M, Ito C, Toda T and Benno Y, *Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *eggerthella*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 1221-1227 (2008).
- 26) Tamura M, Hori S and Nakagawa H, Intestinal bacterium TM-30: an S-equol-producing bacterium isolated from human feces is involved in estrogen metabolism in vitro, *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 309-316 (2014).
- 27) Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT, Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, **328**, 228-231 (2010).
- 28) Tamura M, Hirayama K, Itoh K and Shinohara K, Effects of human intestinal flora on plasma and caecal isoflavones, and effects of isoflavones on the composition and metabolism of flora in human flora-associated (HFA) mice, *Microbial. Ecol. Health Dis.*, **16**, 18-22 (2004).
- 29) Tamura M, Hori S and Nakagawa H, *Lactobacillus rhamnosus* JCM 2771: impact on metabolism of isoflavonoids in the fecal flora from a male equol producer, *Curr. Microbiol.*, **62**, 1632-1637 (2011).
- 30) Tamura M, Hori S, Nakagawa H, Katada K, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. Relationships among fecal daidzein metabolites, dietary habit and BMI in healthy volunteers: a preliminary study. *Biosci. Microbiota. Food Health.*, **34**, 59-65 (2015)
- 31) Bhathena SJ and Velasquez MT, Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes, *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1191-1201 (2002).
- 32) Ørgaard A and Jensen L, The effects of soy isoflavones on obesity, *Exp. Biol.*

- Med. (Maywood)*, **233**, 1066-1080 (2008).
- 33) Usui T, Tochiya M, Sasaki Y, Muranaka K, Yamakage H, Himeno A, Shimatsu A, Inaguma A, Ueno T, Uchiyama S and Satoh-Asahara N, Effects of natural S-equol supplements on overweight or obesity and metabolic syndrome in the Japanese, based on sex and equol status, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **78**, 365-372 (2013).
 - 34) Tousen Y, Abe F, Ishida T, Uehara M and Ishimi Y, Resistant starch promotes equol production and inhibits tibial bone loss in ovariectomized mice treated with daidzein, *Metabolism*, **60**, 1425-1432 (2011).
 - 35) Tamura M, Hori S and Nakagawa H, Impact of dietary polydextrose on the daidzein metabolism in adult mice, *Bioscience and microflora*, **29**, 185-190 (2010).
 - 36) Tousen Y, Uehara M, Kruger MC and Ishimi Y, Effects of dietary fibre and tea catechin, ingredients of the Japanese diet, on equol production and bone mineral density in isoflavone-treated ovariectomised mice, *J. Nutr. Sci.*, **1**, e13, doi: 10.1017/jns.2012.14 (2012).

Ⅲ 大豆とその調理加工が脂質代謝改善作用に及ぼす影響

1. はじめに

2013年12月、日本人の伝統的な食文化である「和食」がユネスコ無形文化遺産として登録された。多様で新鮮な食材を用いる和食は、健康的な食生活を支える栄養バランスが整った食文化である。その和食に用いられる主要食材の一つが大豆である。大豆にはタンパク質やイソフラボン等の良質な栄養素や機能性成分が多く含まれており、古くから日本人の健康を支えてきた。我が国では伝統的に数多くの大豆食品が利用されており、国民一人あたり大豆摂取量は世界の中でもトップクラスである。一方、国際的に見ると、大豆は油脂や家畜飼料の原料となる油糧作物として扱われることが多く、食素材としてのイメージは薄い。しかし大豆の健康機能が知られるようになってからは、これまで大豆を食べていなかった地域でもヘルシーフードとして市場に出回るようになった。ここでは、脂質代謝改善作用を中心とした大豆および大豆食品の健康機能性と、調理加工が健康機能性に及ぼす影響について考えたい。

2. 大豆の脂質代謝改善作用

2.1 疫学調査研究の結果と大豆の栄養成分・機能性成分

Yamoriらが世界60地域で実施した疫学調査の結果、大豆の摂取量が多い集団では肥満度（BMI; Body Mass Index）、血圧、血中総コレステロール濃度が有意に低いことが明らかになった¹⁾。これは人種や性別、地域にかかわらず、大豆摂取が心臓病の予防と深い関係があることを示している。その関与成分と作用メカニズムを解明するため、これまで数多くの研究が行われている。

日本食品標準成分表2010によると、大豆の栄養成分のうち約35%はタンパク質、約20%は脂質である（図1）^{2) 1)}。これは、澱粉を主体とする炭水化物が50%以上を占める一般的な豆類とは対照的である。大豆にも炭水化物は約30%含まれているが、その多くは食物繊維に分類されており、糖類は少ない。また、大豆の特徴的な機能性成分はポリフェノールの一種、イソフラボンである。その他、サポニン、レシチン、植物ステロール等が知られている。以下、脂質代謝に関わる主な大豆の栄養成分・機能性成分について、これまでに報告されている作用を示す。

2.2 大豆タンパク質の脂質代謝改善作用³⁾

大豆タンパク質の脂質代謝改善作用は、血中コレステロール濃度低下、血中中性脂肪濃度低下、体脂肪蓄積抑制、糖尿病抑制等が報告されている。コレステ

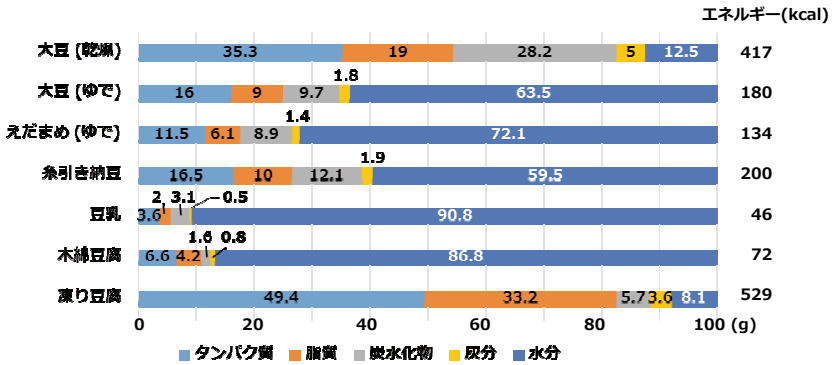


図1 大豆食品 100 g あたりの栄養組成

ロール代謝については、ラットやマウスを用いた研究で、乳タンパク質のカゼインと比べ、大豆種子から分離・精製された大豆タンパク質（分離大豆タンパク質）の摂取により、糞便中への胆汁酸およびコレステロールの排出量が増加することが観察されている。胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、胆汁として消化管に分泌されて食餌由来の脂肪やコレステロールとミセルを形成し、吸収を促進する。胆汁酸の大半は小腸で吸収された後も再利用されるが、大豆タンパク質摂取により糞便中への排出量が多くなると、新たに胆汁酸を合成しなければならなくなるため、材料となる生体内のコレステロール量が低下する。コレステロールはステロイドホルモンや細胞膜の構成物質であり、これらの合成にも必須である。また、消化管内でフリーの胆汁酸が減少すると、ミセルが形成できずに吸収量が低下することも、血中コレステロール濃度低下の一因となる。大豆タンパク質の消化物であるペプチドには、胆汁酸との強い結合能が確認されている。

大豆タンパク質による血中中性脂肪濃度低下作用は、肝臓での脂肪酸合成能の低下と脂肪酸β酸化能の亢進が知られている。大豆タンパク質を摂取すると、異化ホルモンであるグルカゴンの血中濃度が上昇するため、インスリン／グルカゴン比が低下する。その結果、肝臓で脂質合成系を制御する転写因子 SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c) が抑制されることで、脂肪酸合成系酵素の遺伝子発現が減少するのではないかと考えられている。また、CPT-1 (carnitine palmitoyltransferase-1) を誘導し、ミトコンドリア内への脂肪酸流入を促進することで、脂肪酸β酸化を亢進させることが見いだされている。

さらに、大豆タンパク質はカゼインと比べ、血中インスリン濃度を低下させることが示されており、II型糖尿病の発症を抑制すると報告されている。血中インスリン濃度が低下すると、インスリン感受性のある SREBP-1c の発現が低下し、肝臓での脂肪酸合成が抑制される。したがって、大豆タンパク質は脂肪肝の進行

を抑えてインスリンシグナル伝達を改善するため、インスリン抵抗性の抑制も期待できる。

このような研究結果を受けて、大豆タンパク質の健康機能表示が行政により認められるようになった。米国食品医薬局（FDA）は、「飽和脂肪およびコレステロールの低い食生活の一環として1日あたり25gの大豆タンパク質を摂取すると、心臓病のリスクを軽減することがある」とのヘルスクレーム（健康強調表示）を1999年に認めている^{4) iii)}。我が国では、基準を満たした大豆タンパク質を含む食品に対し、消費者庁が特定保健用食品として「コレステロールが高めの方に適する」旨の表示を許可している。

大豆タンパク質は単一のタンパク質ではなく、主要な成分ではグリシニン約40%、 β -コングリシニン約20%、脂質親和性大豆タンパク質約40%で構成されている⁵⁾。最近では、これらの各分画物が脂質代謝にどのような影響を与えるかも調べられており、そのうち β -コングリシニンは血中中性脂肪濃度の低下作用を示すことが明らかになってきた。Kohnoらは、血中中性脂肪濃度が高めの被験者が β -コングリシニンを含む錠薬を12週間摂取すると、プラセボ群と比べて血中中性脂肪濃度が有意に低下すること、20週間の摂取で内臓脂肪面積が有意に減少することを報告している⁶⁾。この β -コングリシニンも、血中中性脂肪濃度の上昇を抑制する特定保健用食品の関与成分として認められている。

2.3 大豆に含まれる脂質の脂質代謝改善作用⁷⁾

大豆油に含まれる脂質には、必須脂肪酸であるリノール酸や α -リノレン酸が多く含まれる。リノール酸は大豆油の約50%を占めるn-6系不飽和脂肪酸であり、血清コレステロール濃度の低下作用が知られている。 α -リノレン酸は大豆油に10%程度存在するn-3系不飽和脂肪酸である。 α -リノレン酸は酸化されやすいため、体内でエネルギー源として容易に消費される。また、これらの脂肪酸はPPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) のリガンドとして脂肪酸酸化を促進することも明らかになっている。

大豆レシチン（フォスファチジルコリン）の名称で知られているリン脂質も豊富である。リン脂質の摂取により血中や肝臓の脂質レベルが低下することは、実験動物を用いた研究で数多く示されている。大豆リン脂質は、脂肪酸合成の抑制により肝臓での脂質合成を低下させることがIdeらによって報告されている⁸⁾。

さらに、大豆油に含まれる植物ステロールには、コレステロールと類似の構造を持つシトステロールやカンペステロール等がある。植物ステロールは血中コレステロール、特にLDL（低密度リポタンパク質）コレステロールの低下作用があることが知られている。これは、植物ステロールが小腸でのコレステロール吸収を阻害するためであると考えられている。

2.4 大豆の食物繊維による脂質代謝改善作用

豆乳や豆腐を製造する際に生じるオカラには食物繊維が多く含まれる。大豆の食物繊維は、水溶性と不溶性の2種類に分けられ、それぞれ生理機能が異なる。一般的に、水溶性食物繊維は腸管からの脂質吸収を阻害することが知られている⁹⁾。大豆の食物繊維は腸内細菌によって資化されやすく、特に水溶性食物繊維から短鎖脂肪酸が効率よく生成される¹⁰⁾。この短鎖脂肪酸は腸内環境を整え、肝臓でのコレステロールの合成を阻害する可能性が示唆された。ラットを用いた試験では、小麦フスマと比べてオカラを与えた群で血清総コレステロール値の有意な低下が認められた¹¹⁾。

2.5 イソフラボンの脂質代謝改善作用

23のヒト比較介入試験データのメタ解析研究の結果、イソフラボンを含む大豆タンパク質は、動物性タンパク質と比べて血中脂質濃度を有意に改善したことが示された¹²⁾。分子学的研究の結果から、イソフラボンの抗動脈硬化作用は、イソフラボンが持つ抗酸化活性の他、胆汁酸分泌増加、腸管でのコレステロール吸収抑制、LDLレセプター活性増加等によるものであると考えられている¹³⁾。

その一方で、イソフラボン単独の効果を検証したメタ解析の結果では、脂質代謝改善作用にイソフラボンの関与は認められないとの報告もあり¹⁴⁾、ヒトでのイソフラボンそのものの脂質代謝改善作用についてはまだ明らかではない。

以上、大豆成分が脂質代謝改善作用に及ぼす影響をまとめたものを図2に示す。

3. 大豆の調理加工と食生活への貢献

豆類は自己防衛の手段として、動物や昆虫による食害や微生物等による変質を防ぐための成分を有している。大豆には、生体内で糖鎖構造と結合して炎症を引き起こすことがあるレクチンや、トリプシンインヒビターのような消化酵素阻害物質等が含まれている¹⁵⁾。そのため大豆は生食することができず、加熱等の調理加工が不可欠である。また、大豆は特有の豆臭さが敬遠されることがある。原因はリポキシゲナーゼという酵素であり、磨砕により大豆子実の細胞が破壊されると不飽和脂肪酸に作用して、臭みの原因物質であるn-ヘキサナールを発生させる¹⁶⁾。このような大豆の不快成分の生成抑制にも調理加工が必要である。

米食中心の東アジアでは、大豆を食糧として取り入れている地域が多い。大豆はタンパク質や脂質の貴重な供給源であり、米に不足するアミノ酸であるリジンも多く含んでいるため、米と大豆は理想的な組み合わせである。その東アジアでは、大豆の優れた加工特性を活かした大豆の調理加工法が発達し、様々な大豆食品が生み出されてきた。日本で生産されている大豆食品の例を図3に示す。我が国における大豆加工食品の多様さは大豆の消費量の多さに関係していると同時に、さまざまな食材を用いる食生活の豊かさを反映したものであると言える。

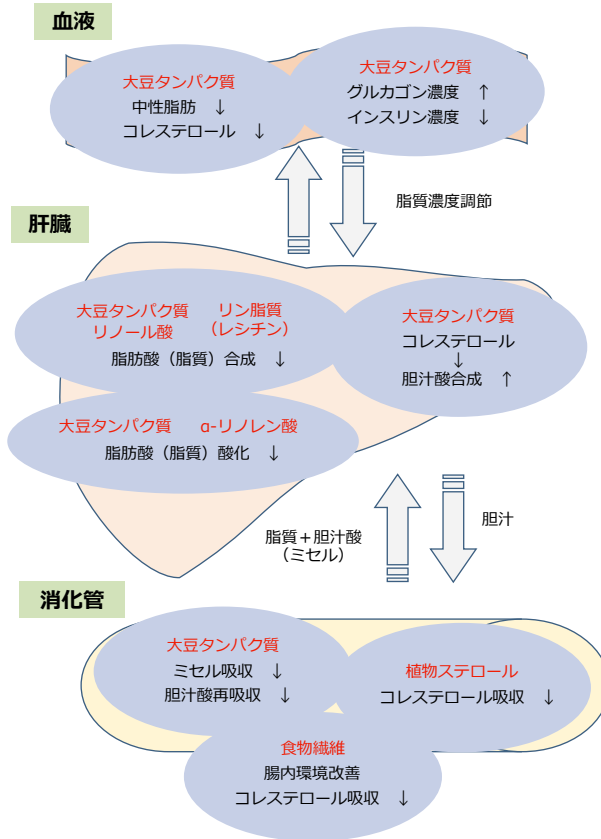


図2 脂質代謝に影響を及ぼす大豆の成分

4. 調理加工における機能性の変化

調理加工は食用に適さない成分を除去したり分解したりして美味しく食べられるようにするだけではなく、大豆に含まれる栄養成分の組成や機能性成分の含有量も変化させる。「大豆食品を食べましょう」と言われることがあるが、煎り豆や煮豆、豆腐、納豆、さらに味噌や醤油も大豆を原料とした食品である。どの大豆食品でもいいのか、1種類を多量に摂ってもいいのか、具体的な食べ方まで触れられることはほとんどない。しかし、同じ大豆を原料として大豆食品を作ったとしても、それぞれ製造方法が異なる大豆食品では、栄養の組成や含有量が違う(図1)。したがって、脂質代謝に対する影響も異なるはずである。では、どんな大豆食品を食べればよいのだろうか。

前述のように、大豆に含まれるいくつかの成分が脂質代謝改善に寄与すること

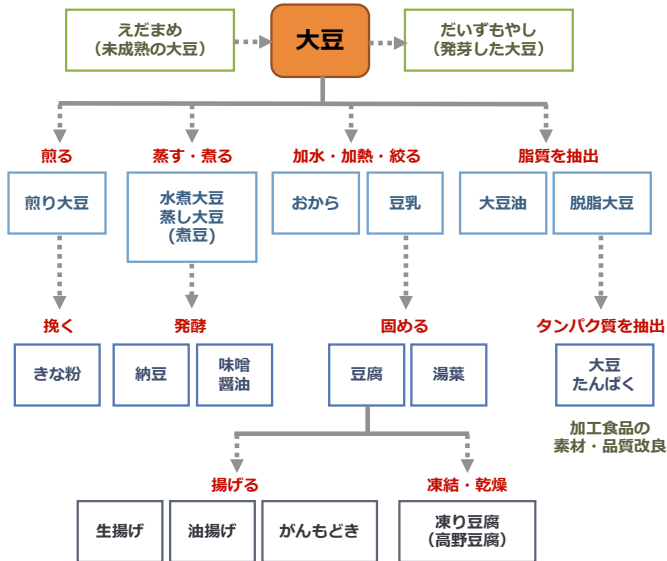


図3 日本で生産されている大豆食品の例

は、これまでの研究により理解が進んでいる。しかし、研究されているのは、大豆から単離された、または合成された成分についての作用メカニズムであることがほとんどである。一方、食品は複数の成分から構成されている。複数成分の共存下においては単一成分だけでは見られない相乗作用が生じる場合や、単独では脂質代謝改善作用を示す成分でも、他の成分の影響により相殺作用が働く場合もあることが予想される。あるいは、栄養組成は見かけ上同じであったとしても、生理機能が異なる場合もある。例えば、生卵とゆで卵は加熱の有無の違いだけで栄養組成はほとんど変わらないが、生卵の方が日持ちがよい。これは、生卵に含まれるリゾチームという溶菌作用のある酵素が加熱により失活するためである。大豆を例にとると、低アレルギー大豆食品が挙げられる。大豆のアレルゲンは大豆種子中の特定のタンパク質分子であり、発酵や酵素の利用、加圧・加熱・混捏処理により低アレルギー化が実現することが報告されている¹⁷⁾。このように同じ農産物であっても、食品加工がその素材の持つ生理機能に大きな影響を与えることがある。

したがって、大豆食品が有する真の脂質代謝改善作用を解明するには、食品に含まれる成分から推測するだけでなく、食品をひとつの食餌因子と捉え、食品そのものの機能性を研究する必要がある。食品の機能性研究においては、まず関与成分を特定し、その成分の作用メカニズムを解明するのが一般的な流れである。「食品そのもの」「食品丸ごと」の機能性は、「どの成分が」「どの作用メカニズム

に」「どれだけ寄与」しているかを推定するのが困難であるとされており、機能的な作用メカニズムの研究の対象とみなされることはほとんどなかった。しかし、我々が日常の食生活で口にしていないのは「農産物」「食品」「食事」であって、「食品成分」ではない。従来の機能的な研究の視点で見ると解決し難い問題点はあるが、これまで蓄積されている「食品成分」の機能的な知見を基に、実際に摂取している形状に近い「食品」の機能的な解明にも挑む必要があるのではないかと考えている。そこで我々は、日本に古くから伝わる大豆の加工食品である凍り豆腐の機能的な解明を試みた。

5. 凍り豆腐の脂質代謝改善作用の解明

5.1 凍り豆腐の栄養成分と血清脂質濃度低下作用

凍り豆腐は、加熱した豆乳に塩化カルシウム等の凝固剤を添加し、タンパク質成分を凝集させたものを脱水した後、緩慢凍結、低温熟成を経て、解氷、脱水、膨軟加工を行い、乾燥させたものである¹⁸⁾。凍り豆腐の主要な栄養成分の約半分（重量比）がタンパク質であり、約1/3を占める脂質が続く（図1）。畜肉や魚肉よりも高タンパク質であり、古来より保存食として重宝されてきた。また、日本人に不足しがちな鉄（6.8mg/100g）やカルシウム（660mg/100g）も比較的豊富に含まれている²⁾。さらに、大豆に多く含まれるイソフラボンも存在する。では凍り豆腐には、大豆の成分で報告されているような脂質代謝改善作用があるのだろうか。ここでは、凍り豆腐は実際に脂質代謝改善作用を示す食品なのか、さらに凍り豆腐中のタンパク質とイソフラボンに注目し、これらの成分がどの程度、どの代謝系に作用するのかを解析した¹⁹⁾。

本研究では、雄ラットを以下の6つの食餌群に分け、2週間の自由摂取による食餌試験を行った：①カゼイン+イソフラボンなし（C） ②大豆タンパク質+イソフラボンなし（S） ③カゼイン+イソフラボン（凍り豆腐食（⑥）と同等量）（CI） ④大豆タンパク質+イソフラボン（SI） ⑤食餌タンパク質源にカゼインと凍り豆腐を同等量使用（T10） ⑥食餌タンパク質源全てが凍り豆腐（T20）（図4）。








群名	C	CI	S	SI	T10	T20
タンパク質 (飼料重量の20%)					 	
イソフラボン (食餌重量比)	(0)	(0.012%) 大豆イソフラボン添加	(0.002%) 大豆タンパク質由来	(0.012%) 大豆イソフラボン添加	(0.006%) 凍り豆腐由来	(0.012%) 凍り豆腐由来
	ミルクカゼイン	ミルクカゼイン	大豆タンパク質	大豆タンパク質	凍り豆腐カゼイン	凍り豆腐

図4 凍り豆腐試験の食餌タンパク質源およびイソフラボン量

飼育期間終了時のラット血清の中性脂肪濃度および総コレステロール濃度の値を示す（図5）。カゼインのみのC群とイソフラボンを添加したCI群との差はほとんど見られなかったのに対し、大豆タンパク質のみを添加したS群および大豆タンパク質にイソフラボンを添加したSI群では低下しており、特に総コレステロールでは有意差が見られた。凍り豆腐を添加した群ではその量にかかわらず、C群と比べて両脂質濃度とも有意に低下していた。このことから、凍り豆腐はカゼインと比較すると血清脂質濃度を低下させることが明らかとなり、その作用は凍り豆腐中のタンパク質成分に由来することが示唆された。一方、イソフラボンは単独で摂取した場合は脂質代謝改善作用がなく、大豆タンパク質とともに摂取した時でも有意な低下作用を示さなかった。

5.2 凍り豆腐摂取により影響を受ける脂質代謝調節メカニズム

凍り豆腐の血清脂質濃度低下作用が示されたところで、その作用メカニズムはどのようなものであり、どの成分が関与していたのだろうか。作用メカニズムの解明方法として、従来の機能性解析で用いられてきた脂質代謝関連の遺伝子やタンパク質の発現量、酵素活性、代謝物の種類や量の測定に加え、生体における代謝の変化をグローバルに観察するオミクス解析の活用が広まってきた。本研究ではオミクス解析の中で研究報告例の多い、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトミクス解析を行った。DNA マイクロアレイを用いた脂質代謝制御メカニズムの研究方法については、既報を参照されたい²⁰⁾。

摂取した食餌の栄養成分が消化吸収され、最初に運ばれるのが肝臓である。肝臓は栄養成分の代謝や貯蔵、薬物や毒性成分の代謝分解等、生体の維持に大きな役割を果たす。肝臓で発現する様々な遺伝子の発現変化を調べることで、凍り豆腐を摂取したときの代謝全般に及ぼす影響を把握することができる。そこで、DNA マイクロアレイにより肝臓で発現していた遺伝子全ての mRNA 量を各食

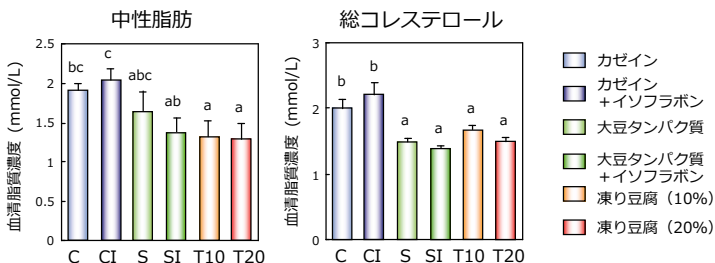


図5 凍り豆腐食が血清脂質濃度に及ぼす影響

値は平均±標準偏差で示す (n=7-8)。

abc 異なる文字を付した数値間には有意差があることを示す ($p < 0.05$)。

餌群の個体ごとに測定し、6つの食餌群間で発現量が有意に変化した遺伝子を選抜した。これらの遺伝子の機能を既存のデータベースで検索し、食餌の違いがどの代謝系の遺伝子発現に強く影響を与えていたのかを解析した。その結果、上位20の代謝系のうち約半数が脂質代謝に関連するものであった。酸化還元や薬物代謝、細胞周期関連の代謝系も少数存在したが、脂質代謝のように明確な影響の方向性を示す系はなかった。すなわち、凍り豆腐やその食品成分である大豆タンパク質やイソフラボンの摂取により、最も大きな影響を受ける代謝系は脂質代謝であり、その他には特に大きな影響がないことが示唆された。

次に、脂質代謝は各食餌によってどのような影響を受けたのか、食餌群ごとに各遺伝子発現量の変化パターンを解析し、脂質代謝調節作用の詳細を検討した。似た発現パターンを示した遺伝子をグループ化し、そのグループに含まれた遺伝子の機能を調べることで、食餌と脂質代謝の変化の関係を特定した。その結果、カゼインのみ、イソフラボンのみの食餌群で発現量が上昇し、大豆タンパク質のみ、大豆タンパク質+イソフラボン、そして2つの凍り豆腐食群では発現量が減少するパターンを示した脂質代謝関連遺伝子が最も多かった(図6)。これらの遺伝子の機能の多くは脂質合成に関わるものであった。したがって、肝臓での脂質合成系はカゼイン単独またはイソフラボン単独では上昇し、大豆タンパク質または凍り豆腐を含む食餌では減少したことが示された。このことは、凍り豆腐のイソフラボン成分ではなく、タンパク質成分が脂質合成を抑制することを示唆しており、この変化は血清中の脂質濃度の変化と一致した。

DNA マイクロアレイは一度に数万もの遺伝子発現を定量できることが最大の利点である。今回の研究では脂質代謝改善作用以外の変化は見いだせなかったが、これまで知られていなかった新しい機能性の探索にも活用できる。なお、本研究で得られたDNA マイクロアレイのデータは、食品総合研究所のホームページにある「ニュートリゲノミクス機能性評価データベース」の「実験一覧」から見ることができるⁱⁱⁱ⁾。

5.3 凍り豆腐の脂質代謝改善作用：既報のデータから

本研究以外でも凍り豆腐が脂質代謝に及ぼす影響を調べた研究があるので、併せて紹介する。Ishiguroらは、凍り豆腐加工の過程で、消化酵素による分解を受けにくいタンパク質分子画分HMF (high-molecular-weight fraction) が多く生成すること、さらに、分離大豆タンパク質よりも凍り豆腐タンパク質を摂取したラットの血中総コレステロール濃度が有意に低下することを示し、HMFの高い胆汁酸結合能によるものであると推定した²¹⁾。

ヒト試験では、肉中心の食餌を摂取する期間に上昇した血中総コレステロール濃度が、凍り豆腐を含む食餌に切り替えると、約1ヶ月間で元の濃度近くまで低下したことが報告されている²²⁾。血中中性脂肪濃度についても、牛肉を原料

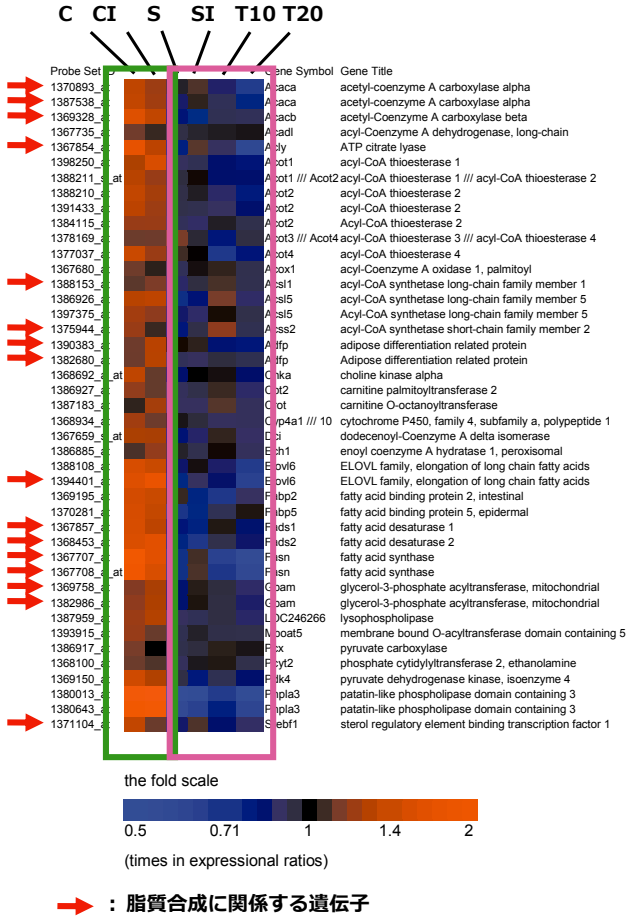


図 6 凍り豆腐食が肝臓の脂質代謝系遺伝子の発現に及ぼす影響 (一部)

としたハンバーグを単回摂取した後の上昇量と比較して、凍り豆腐を含むハンバーグを摂取した後ではその上昇が有意に抑制されたことが示されている²³⁾。

6. 大豆食品間での脂質代謝への影響の違い²⁴⁾

5. の凍り豆腐の研究では、凍り豆腐に含まれる食品成分から脂質代謝改善に関わる成分を推定し、その単独成分と凍り豆腐そのものの機能性を比較することで、代謝に関与する主成分とその作用メカニズムを説明しようとした。先に述べたように、従来の食品機能性研究では、関与成分の特定とそのメカニズム解明が重要だからである。しかし、食品そのものの機能性は特定の一成分だけで説明できる

とは限らない。食品をひとつの食餌因子としたときの機能性を評価する方法には、まだ指針がない状態である。我々は実験動物を用いて、食品そのものの機能性を成分で分割することなく、複数の食品間で機能性を直接比較することを試みた。

凍り豆腐の研究と同様に、雄ラットの飼料中に乾燥重量 300 g/kg の大豆食品を添加し、21 日間自由摂食させた。本研究では、同じ原料大豆を用いて製造した煎り大豆、豆乳、生豆腐、凍り豆腐の 4 種類を試料とした。食餌の腐敗を防ぐため、全て脱水・乾燥させた試料を用いたが、乾燥重量で同量を試験に供すると、元の食品の状態と乖離するのではないかと危惧が生じる。しかし、ヒトの食事 1 回あたりの喫食量で考えると、市販の凍り豆腐 1 枚に使われている大豆の量は、煎り大豆で 1/3 カップ、豆乳ではカップ 1 杯、生豆腐では 1/2 ~ 1/3 丁程度に相当し、その各 1 回分の食品の乾燥重量はいずれもほぼ同等である。したがって、乾燥状態での比較は妥当と考えた。乾燥させた各食品の栄養組成をみると、丸大豆（煎り大豆）から豆乳、生豆腐、凍り豆腐と加工度が上がるにつれてタンパク質と脂質の割合が増加し、炭水化物が減少していたのが特徴的だった。また、煎り大豆では、オカラ成分を除いて製造した他の大豆食品と比べて、不溶性が主体の食物繊維量が多かった。この栄養成分組成の違いがラットの脂質代謝改善作用にどのような影響を与えるかを解析した。

食餌試験の結果、有意差は検出されなかったが、血清および肝臓の中性脂肪と血清総コレステロール濃度は、煎り大豆群と比べて豆乳、生豆腐、凍り豆腐群で低下傾向が見られた。大豆タンパク質は肝臓での脂質合成系を抑制することが報告されているが、本研究でも、大豆タンパク質が豊富な豆乳、生豆腐、凍り豆腐を食べたラットの肝臓で脂肪酸合成系酵素の活性およびその遺伝子発現量の低下が認められ、大豆食品中のタンパク質が肝臓での脂質合成を抑制することが示唆された。

また、脂質の消化・吸収の点では、煎り大豆群の糞便中の総脂質量が、その他の食品群と比べると 2 倍以上増加していた。脂質の吸収を妨げる代表的な食品成分として食物繊維が考えられるが、食餌中の食物繊維量はセルロースを添加して全群でほぼ同等に合わせていた。したがって、煎り大豆に含まれる水溶性食物繊維またはセルロースとは異なる不溶性食物繊維に食餌脂質を強く吸着する性質があるのではないかと考えられた。さらに、糞便中の胆汁酸量を測定すると、生豆腐および凍り豆腐群で煎り大豆、豆乳群と比べて有意に高かった。生豆腐と凍り豆腐は豆乳中のタンパク質を凝集させているので、この凝集により変性した（あるいはその凍結・乾燥に由来する変性）タンパク質が消化管で胆汁酸を吸着し、再吸収を阻害する作用を持つ可能性がある。

本研究の結果、同じ原料大豆を用いて製造した大豆食品であっても、栄養組成や物理化学的な成分の変性により、食品の機能性が異なることが示唆された。新規の機能性食品でなく一般的な加工食品を日常的に摂取しても、ある程度の脂質

代謝改善作用が期待でき、個人の代謝状態に合わせて最適な機能性が得られる食品を選べる可能性も広がる。また、加工方法の工夫により食品の機能性をデザインし得ることなど、新しい機能性食品の創出につながるヒントが隠されているかもしれない。

しかし、このような食品同士を比較する方法には、多くの問題点が残されている。食品の機能性研究では、対照となる食餌群を設定するのが普通であるが、どのような食餌組成を当該食品の非摂取群とするのが望ましいのかを示す指針がない。また、各食品の単位重量あたりのエネルギー量や栄養組成が異なるため、試験対象の食品の差ではなく、そもそものエネルギー量等の違いに由来する差が生じたとの可能性は否定できない。さらに、エネルギー摂取量や栄養組成を揃えるにしても、そのために添加した食品精製物等の影響の方が強くなるのではないかと懸念もある。同じ原料を用いて作った食品では栄養組成の違いが顕著でないことや、相当の栄養組成の差があっても生理作用としての違いがほとんど見られないケースもある。「食品そのもの」の機能性研究はまだ始まったばかりであり、どのように評価するのが妥当であるかを模索することが今後の検討課題である。

謝辞

本研究は、農林水産省委託事業「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」および一般財団法人・旗影会の研究助成により実施されたものである。

(食品機能研究領域 栄養機能ユニット 高橋 陽子)

参考文献

- 1) Yamori, Y., Worldwide epidemic of obesity: hope for Japanese diets. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**, S2-S4 (2004).
- 2) 科学技術学術審議会資源調査分科会, 豆類, 「日本食品標準成分表 2010」(文部科学省), (2010).
- 3) 喜多村啓介編, タンパク質の機能性, 「大豆のすべて」, (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 154-169 (2010).
- 4) The Code of Federal Regulations, Title 21: Food Labeling. 101.82 Health claims: Soy protein and risk of coronary heart disease (CHD), United States.
- 5) Samoto, M., Maebuchi, M., Miyazaki, C., Kugitani, H., Kohno, M., Hirotsuka, M., and Kito, M., Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate. *Food Chem.*, **102**, 317-322 (2007).
- 6) Kohno, M., Hirotsuka, M., Kito, M., and Matsuzawa, Y., Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean β -conglycinin.

- J. Atheroscler. Thromb.*, **13**, 247-255 (2006).
- 7) 喜多村啓介編, 脂質の機能性, 「大豆のすべて」, (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 234-247 (2010).
 - 8) Ide, T., Murata, M., and Sunada, Y., Triacylglycerol and fatty acid synthesis in hepatocytes in suspension isolated from rats fed soybean phospholipid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 699-702 (1994).
 - 9) Kaczmarczyk, M.M., Miller, M.J., and Freund, G.G., The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism*, **61**, 1058-1066 (2012).
 - 10) Chen, W.J., Anderson, J.W., and Jennings, D., Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **175**, 215-218 (1984).
 - 11) 高橋太郎, 江頭祐嘉合, 真田宏夫, 綾野雄幸, 前田裕, 寺嶋正彦, ラットの成長, 消化性, 滞腸時間に及ぼす大豆食物繊維素材の影響, 日本栄養・食糧学会誌 **45**, 277-284 (1992).
 - 12) Zhan, S., and Ho, S.C., Meta-analysis of the effect of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 397-408 (2005).
 - 13) Rimbach, G., Boesch-Saadatmandi, C., Frank, J., Fuchs, D., Wenzel, U., Daniel, H., Hall, W.L., and Weinberg, P.D., Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease —A molecular perspective. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 1308-1319 (2008).
 - 14) Tokede, O.A., Onabanjo, T.A., Yansane, A., Gaziano, J.M., and Djoussé, L., Soya products and serum lipids: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Br. J. Nutr.*, **114**, 831-843 (2015).
 - 15) (公財) 日本豆類協会, 「新豆類百科」, (東京) pp. 147-148 (2015).
 - 16) Rackis, J.J., Sessa, D.J., and Honig, D.H., Flavor problems of vegetable food proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 262-271 (1979).
 - 17) 小川正, 日本人の食物アレルギーの現状と対策—大豆アレルギーに対する研究の歩み—, 総合福祉科学研究, **1**, 77-90 (2010).
 - 18) 石黒貴寛, 凍り豆腐, 「大豆の栄養と機能性」, (シーエムシー出版, 東京) pp. 147-152 (2014).
 - 19) Takahashi, Y., and Konishi, T., Tofu (soybean curd) lowers serum lipid levels and modulates hepatic gene expression involved in lipogenesis primarily through its protein, not isoflavone, component in rats. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 8976-8984 (2011).
 - 20) 高橋陽子, 食品成分による肝臓と脂肪組織の脂質代謝制御機構, 食糧 **44**, 73-91 (2006).

- 21) Ishiguro, T., Tatsunokuchi, S., Mitsui, N., Kayahara, H., Murasawa, H., Konishi, Y., and Nagaoka, S., Cholesterol-lowering effect of kori-tofu protein and its high-molecular-weight fraction content. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 575-577 (2011).
- 22) Fujii, M., Fukui, T., and Miyoshi, T., Effect of freeze-dried soybean curd (tofu) on various bodily functions. *J. Med. Invest.*, **46**, 67-74 (1999).
- 23) 石黒貴寛, 池田亮一, 三ッ井陳雄, 熊谷正樹, 村澤久司, Yamamoto, M.A.O., 凍り豆腐の食後中性脂肪上昇抑制効果, *薬理と治療*, **40**, 915-919 (2012).
- 24) 高橋陽子, 石黒貴寛, 八巻幸二, 大豆食品の栄養成分がラットの脂質代謝に及ぼす影響, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, p. 221, 北海道 (2014).

引用 URL

- i) 文部科学省, 「食品成分データベース」, <http://fooddb.mext.go.jp/> (2016 年 2 月 24 日確認)
- ii) アメリカ合衆国保険社会福祉省, 「食品表示ガイド」, pp. 165, <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM254435.pdf> (2016 年 2 月 24 日確認)
- iii) 農研機構食品総合研究所, 「ニュートリゲノミクス機能性評価データベース」, <http://foodfunction.dc.affrc.go.jp/ja/> (2016 年 2 月 24 日確認)

Ⅳ カロテノイドの腸管吸収, 代謝, 機能

1. はじめに

ヒトが摂取する食品の多くは水に溶けない脂溶性成分を含んでいる。これらの中には、ビタミン A, D, E, K 等の生体に必須の成分の他, カロテノイド, コエンザイム Q10, クルクミノイド等の様々な脂溶性栄養・機能成分が存在することが知られている。カロテノイドは微生物や植物により生合成される脂溶性の色素で, 代表的なプロビタミン A として知られている, β -carotene, α -carotene, β -cryptoxanthin を含めて天然に 700 種類以上が存在し, 抗酸化^{1, 2)}, 抗癌^{3, 6)}, 抗炎症^{7, 8)}, 抗肥満作用⁹⁻¹²⁾ 等の多様な生物活性が注目されている。

しかしながら, 一般的にカロテノイドの生体利用性 (簡単に言うならば, 「摂取したうち, どれだけ体内に吸収されて作用部位に到達したか」) は他の脂溶性成分に比べて低く, その中にはヒト組織中にほとんど見出されないものもある。生体利用性が低い理由は複合的であり, 食品マトリックス (葉物野菜などでの細胞壁) からの遊離のしにくさ, 腸管に吸収される形態 (混合ミセル) になりにくい, 混合ミセルとなったカロテノイドの全て (の量, 種類) が腸管から吸収されるわけではない等, 特に腸管吸収のメカニズムについては不明な点が多い。

体内蓄積については, ヒトは通常の食事下では約 40 種類ものカロテノイドを摂取しているが, 図 1 中の α -carotene, β -carotene, lycopene, phytoene, phytofluene, ζ -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, そしてこれらのカロテノイド由来と考えられる代謝産物だけがヒト血液中や母乳中に存在している^{13, 14)}。これら以外のカロテノイド, 例えばワカメ・コンブに多く含まれる fucoxanthin は通常の食事レベルでは吸収されず¹⁵⁾, コンブ濃縮物を多量に摂取すれば吸収されて血中に存在が確認されているが¹⁶⁾, その血中濃度は通常食事下での β -carotene や lutein と比べて非常に少ない。このような特定のカロテノイドのみが血液中に存在する理由についてはよくわかっていない。消化管内に特定のカロテノイドだけを吸収する機構が存在するのかもしれないし, 吸収された後のカロテノイドの蓄積は, 代謝変換機構によっても調節されている。代謝例として, 哺乳類において中央開裂酵素によるプロビタミン A カロテノイドからのビタミン A への変換や, 9' - 10' 間が酵素的に切断された開裂産物が知られている。カロテノイドの骨格を保持したままの酵素的代謝産物については, 最近報告されているものの¹⁷⁾, 代謝酵素の詳細については不明である。酵素的反応ではないが, 体内で化学的に分解, 開裂されている可能性もある¹⁸⁾。そして, このような代謝産物や分解物がカロテノイドの機能性を発揮していることも考えられる。

このように, 生体利用性は可溶化・腸管吸収／蓄積・代謝／分解に依存し,

機能性とも密接に関わっているため、これらを正確に把握することは、カロテノイドの生物活性メカニズムを考える上で重要である（図2）。本稿では可溶性・腸管吸収・代謝／分解・機能性に関する知見を紹介する。（ここでの「腸管吸収」は「細胞による取込み」と「（リンパへの）透過／分泌」の両方の過程を含む。）

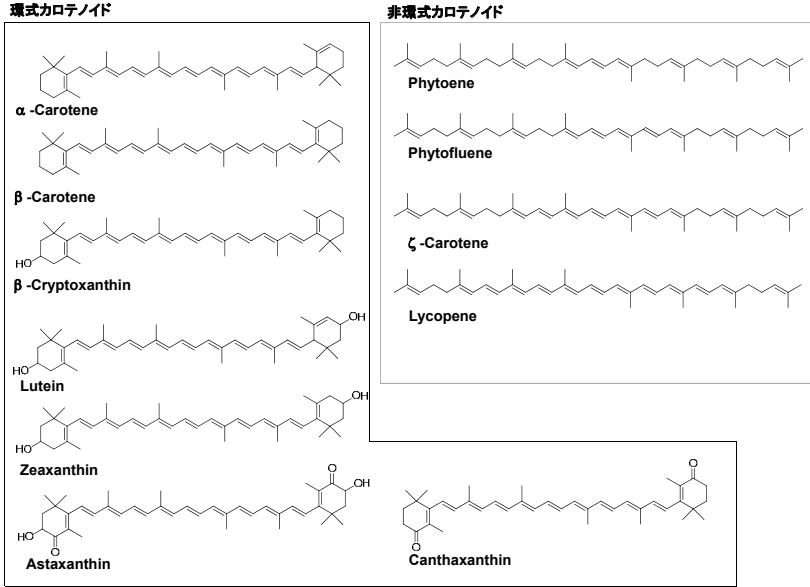


図1 代表的なカロテノイドの化学構造式

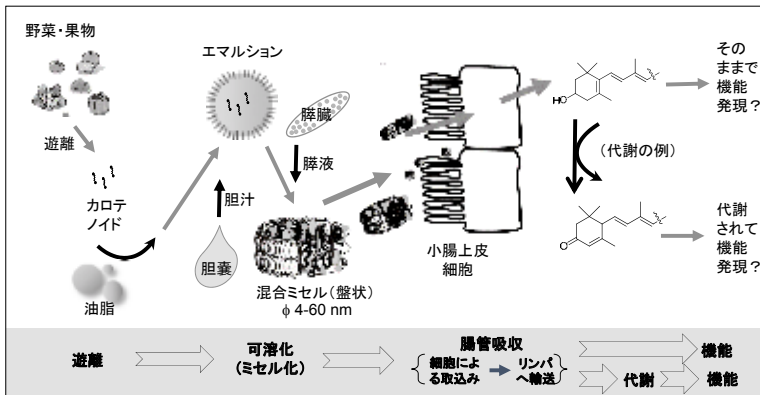


図2 カロテノイドの可溶化，吸収，代謝，機能発現

2. カロテノイドの腸管吸収と機能性

機能性成分には消化管から吸収された後に効果を発揮するものと、吸収されなくても機能を発揮できると考えられているものがある。我々はカロテノイドが種類にもよるが吸収されてからその機能を発揮していると考えている。例えば鳥類ではその体色を司るカロテノイドは、配偶者選別のために重要である。ウイルス感染や腸管に寄生虫がいると、血中、肝臓カロテノイドが減少し体色が悪くなる¹⁹⁾。カロテノイドが免疫を高める効果を有しており、鳥にとって体色の良さは体内カロテノイド量のインジケータ―かつ健康のバロメータ―で、好ましい配偶者として認識されるために重要なだろう。

ヒトでも、カロテノイド血中濃度と死亡率²⁰⁾、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やマラリア原虫の感染²¹⁾ との相関が示されている上に、カロテノイド色を呈する顔色がヒトとしての魅力度を高めることが報告されている²²⁾。ヒトの場合でも肌のカロテノイド色は健康であることを示すのかもしれない。このように、カロテノイドは吸収されて後、免疫力向上をはじめとして健康や寿命等と密接に関係していると考えられる。次に、カロテノイドの消化吸収過程について順に述べる。

3. カロテノイドの消化管内での可溶化

カロテノイドの腸管での吸収性は他の脂溶性成分と比べて低いことが知られている²³⁻²⁶⁾。カロテノイドは消化管内で分散し可溶化された後に吸収可能となるが²⁷⁾、消化液中に非常に溶解しにくいことが吸収性の低い一要因である。可溶化とは、カロテノイド等の脂溶性成分が両親媒性成分等によって見た目が見えなくなる程の小さい粒子となって水溶液中に分散されることを言う（粒子が比較的大きく、白濁したものはエマルションと言う）。可溶化前に、消化管でカロテノイドは食品から遊離する。生野菜では細胞壁のような硬いフードマトリックス存在下で遊離しにくいだが、加熱・調理・加工・咀嚼等によりカロテノイドの遊離が促進される²⁸⁾。

一方、動物性食品の場合は細胞壁が無いためカロテノイドは遊離しやすい。カロテノイドはC40 イソプレノイド骨格による高い疎水性のため食事から摂取した脂質中に溶け込み、胆汁により消化液中にエマルションとして分散する。さらに膵臓リパーゼにより脂質の消化がトリアシルグリセロールからモノアシルグリセロール/脂肪酸へと進んで、より小さい粒径の混合ミセルが生成し、ようやくここでカロテノイドはこのようなミセル中に組み込まれて可溶化される。混合ミセルは、胆汁酸、リン脂質、コレステロール、脂肪酸、モノアシルグリセロールからなる盤状型（図2）で、一般的な球状ミセルとは形状が異なる²⁹⁾。カロテノイドはこのような混合ミセル中に可溶化されることによって、はじめて腸管上皮細胞による取込みが可能になる。摂取した全量に対する混合ミセル中に可溶化

した割合は「バイオアクセシビリティ」とよばれ、生体利用性（こちらはバイオアベイラビリティとも言われる）の重要な要素となる。バイオアクセシビリティはフードマトリックス、調理・加工、カロテノイドの構造等に依存する。カロテノイドの構造では、疎水性の高いものほど可溶化されにくい。また、調理に使用した油脂等に大きく影響される。

4. 可溶化における油脂の効果

脂溶性成分を摂取する際、食材を油で調理すると吸収が良くなると一般には言われている。上で述べたような可溶化過程を鑑みれば油脂が多いとカロテノイドが溶ける量が増えて、バイオアクセシビリティが上昇し、結果として生体利用性が高まると推察される。我々は野菜に含まれる主要なカロテノイド（ β -carotene と lutein）の可溶化に及ぼす油脂の効果を試験管消化試験（ブタの胆汁及び消化酵素を用いて胃と腸での消化をシミュレーション）により調べた³⁰⁾。

ハウレンソウ中カロテノイドのバイオアクセシビリティの検討に用いた植物油脂7種類中、菜種油が最も効果が高い傾向を示したが、他の油脂間との比較で差は少なく、 β -carotene のバイオアクセシビリティはいずれも10 - 15%であった（油脂未添加の場合は6%）。一方で、lutein の可溶化に対しては、油脂が無くてもバイオアクセシビリティが高く（約60%）、油脂添加の効果はほとんど認められなかった。これらの結果から、油脂はより疎水性の高いカロテノイドの可溶化に効果的ということがわかる。つまり、 α -carotene、 β -carotene、トマトの主要赤色色素である lycopene などの可溶化には、調理の際の油脂が大きな役割を持っていると考えられる。また、この過程で可溶化されなかったカロテノイドは腸管から吸収されないだろう。

ハウレンソウ、コマツナ、ニンジン中の lutein のバイオアクセシビリティに比べて、カボチャのそれは低い傾向を示した。カボチャの lutein は脂肪酸とのエステル体であるため、より疎水性が高く他の野菜の lutein（フリー体）に比べてバイオアクセシビリティが低くなったと考えられる。この場合、逆に油脂の効果が得られそうに思えたがそうはならなかった。

サプリメントなどでの原料由来の lutein がエステル体の場合もバイオアクセシビリティは低いことが予想されるが、生体利用性レベルでのいくつかの比較試験では、フリー体の摂取と比べて両者に差がないという報告が多い³¹⁻³³⁾。エステル体の方の生体利用性が高い傾向が認められた研究³⁴⁾に対しては、その実験で使用したフリー体が結晶だったために、粉末として投与されたエステル体に比べて吸収されにくかった可能性が指摘されている³³⁾。カロテノイドの結晶は実験室レベルで有機溶媒にも溶けにくくなることがあるほどで、当然、摂取後の消化管でのバイオアクセシビリティ、結果としての生体利用性は低下すると思われる。生体利用性の向上を考える際には、カロテノイドの含有量だけではなく、

結晶、粉末というような形状も考慮すべきだろう。

5. 腸管上皮細胞によるカロテノイドの取込みとそれに影響を与えるミセル成分

可溶化の次の過程である腸管上皮細胞による取込みのメカニズムは、従来は腸管上皮細胞膜を介しての単純拡散（消化管管腔—細胞間の濃度差により起こる物質の移動）によると考えられていたが^{35,36}、近年では促進拡散（膜タンパクを介した積極的な物質の移動）も示唆されている³⁷⁻⁴⁴。その例として、ヒト小腸細胞モデル Caco-2 細胞を使った実験では、コレステロールの促進拡散を介することでよく知られている scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) がカロテノイドの取込みにも関与しており、その依存割合は、全取込み量の 50% (β -carotene), 20% (β -cryptoxanthin), 7% (lutein/zeaxanthin) であると報告されている⁴⁴。また、SR-B1 ノックアウト (KO) マウスでは野生型マウスと比較して β -carotene の吸収効率は著しく低いが、完全には抑制されていない⁴⁵。我々の研究でもカロテノイドの促進拡散の関与が示唆されており⁴⁶、実際には単純拡散と促進拡散が併存していると考えられる (図3)。疎水性の高いカロテノイドほど可溶化されにくいことをすでに述べたが、一度可溶化されてしまえば、どちらの拡散経路でも疎水性の高いもの程細胞に取込まれやすい^{44,47}。

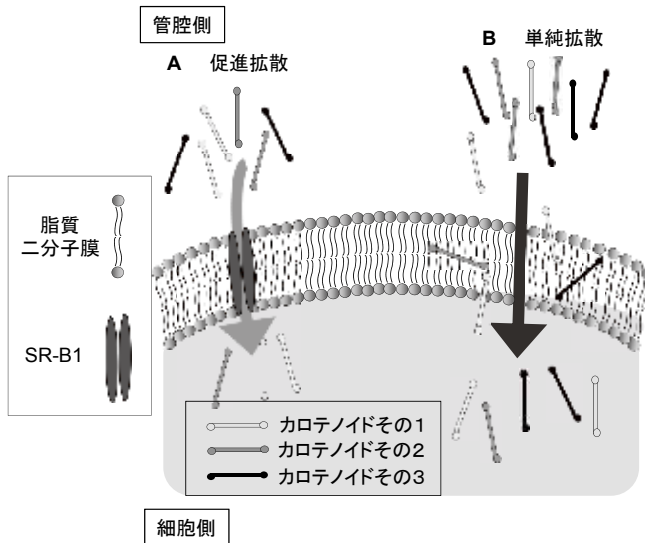


図3 カロテノイドの腸管上皮細胞膜での取込みメカニズム

A, 特定のカロテノイドのみを選択的に取り込む SR-B1 を介した促進拡散 B, 経路と非選択的な単純拡散経路の両方が存在していると考えられる。

カロテノイドの構造だけではなく、可溶化にかかわる混合ミセル構成成分や可溶化状態の違いによっても取込み量が大きく異なる。食品油脂がカロテノイドのバイオアクセシビリティに対して重要であることをすでに述べたが、油脂成分とその加水分解物を含む様々な成分は、混合ミセル中でカロテノイド分子と共存しており、腸管細胞によるカロテノイド取込みに対しても大きな影響を与える。我々は、Caco-2細胞を使ってカロテノイドの取込みに与える脂質/混合ミセル成分の影響を詳しく調べた⁴⁶⁾。食品由来の主要脂質はトリアシルグリセロールであるが、混合ミセル中に、これの加水分解物である脂肪酸を増やすことで、カロテノイドの取込みは促進された。代表的な脂肪酸の効果はオレイン酸>リノール酸> α -リノレン酸であった。ただし、脂肪酸は(アルカリ側)培地中のカルシウムと不溶性の塩を形成するため、このような実験系で脂肪酸の効果を調べる際には、カルシウム不含培地を使用する必要がある。

また、代表的なリン脂質であるホスファチジルコリン(図4A)は、カロテノイド取込みを抑制し、逆にその加水分解物であるリゾホスファチジルコリン(図4B)の場合では取込みを著しく高めた^{48,49)}。リン脂質は食事からも摂取し、また胆汁の成分としても分泌されている両親媒性物質であるが、似たような化学構造を有するグリセロ糖脂質は葉緑体チラコイド膜の主要な構成成分⁵⁰⁾であり、葉物野菜に多く含まれる。モノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、

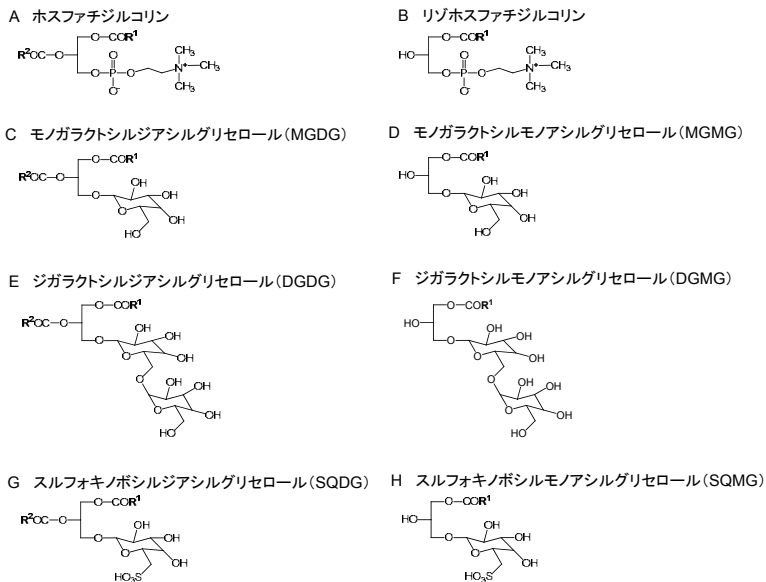


図4 リン脂質、グリセロ糖脂質、及びこれらリゾ体の化学構造式

ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG), スルフォキノボシルジアシルグリセロール (SQDG) 等 (図 4C, E, G) が知られ, カロテノイドと一緒に摂取していることからその生体利用性に何らかの影響を及ぼしていることが想像される。我々の研究では, DGDG, SQDG はホスファチジルコリン同様のカロテノイド取込み抑制効果を, これらのリゾ体 (図 4F, H) であるジガラクトシルモノアシルグリセロール (DGMG), スルフォキノボシルモノアシルグリセロール (SQMG) は, リゾホスファチジルコリン同様, カロテノイド取込み促進効果を示した⁵¹⁾。可溶化過程では, β -carotene に比べて極性の高い lutein 等に対しては油脂の効果がなかったことを説明したが, 取込み過程では脂質の促進効果は極性の高いカロテノイドに対しても効果を示した^{51, 52)}。以上の結果から, 特に両親媒性脂質はカロテノイドの腸管上皮細胞による取込みにきわめて重要な働きをすることがわかる。

6. 両親媒性脂質によるカロテノイドの腸管吸収抑制・促進効果のメカニズム

ホスファチジルコリン, DGDG, SQDG がカロテノイドの細胞取込みを抑制するメカニズムについて調べたところ, ミセル側に起因していることがわかった^{48, 51)}。これらの脂質を含む混合ミセル中に可溶化したカロテノイドの吸収スペクトルを分析するとピーク形状がブロードになりバンド幅全体が広がるが, これはカロテノイドの凝集体あるいは多量体がミセル内部で形成されていることを示している。凝集体/多量体では混合ミセルからカロテノイド分子が遊離しにくくなり, そのため細胞による取込み量が低下したと考えられる^{48, 51)}。

一方で, 加水分解物であるリゾリン脂質やリゾグリセロ糖脂質によるカロテノイド取込み促進メカニズムについては, 主に細胞側に起因していることを明らかにした。当初これらの脂質が腸管細胞膜の透過性を上昇させて取込みを促進すると想像していた。なぜなら, 一般的に腸管からの食品成分の吸収経路は

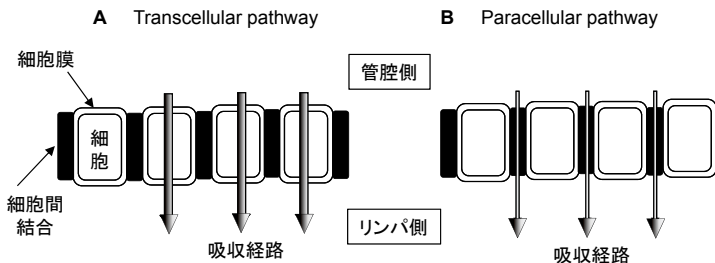


図 5 カロテノイドの腸管吸収 (取込みと透過) 経路

A, Transcellular pathway: 細胞膜を介した経路

B, Paracellular pathway: 細胞間隙を介した経路

transcellular pathway（細胞膜を通る経路）と paracellular pathway（細胞間隙を介する経路）が知られるが（図5），カロテノイド等の脂溶性成分の吸収は図3に示したように，脂質二重層からなる細胞膜を経由すると考えられており²⁷⁾，加えて，細胞膜モデルのリポソームを使った実験でリゾホスファチジルコリンが膜の透過性を高めると報告されていた^{53,54)}からである。

我々もリポソームを使って細胞膜透過試験を行い，リゾ脂質が細胞膜透過性に与える影響を調べた⁵¹⁾。確かにリゾホスファチジルコリンは膜の透過性を高めた。この結果だけを見れば，膜の透過性上昇が要因という結果に至っているとところであった。しかし，グリセロ糖脂質の膜透過性に与える効果は，モノガラクトシルモノアシルグリセロール（MGMG）> DGMD > SQMG となり，カロテノイドの細胞取込み効果と全く一致しなかった。この結果からは，細胞膜の透過性は取込みと関係ないと考えられる。

他に可能な吸収促進メカニズムとして，リゾホスファチジルコリンがタイトジャンクション（細胞間結合因子のひとつで，隣り合う細胞を接着させて様々な成分が細胞間を通過するのを防ぐバリアー）等の透過性を高めて basal 側へ透過（paracellular pathway）を促進することが報告されていた⁵⁵⁾。リゾホスファチジルコリンがトランスポーターや apo B の発現を高めて透過／分泌促進することも報告されていた⁵⁶⁾。これらの場合，トランスウェルチャンバー（図6A）を用いた実験結果であるため，一般的なウェルプレートを用いての脂溶性成分の細胞による取込み（図6B）に対して，これらのメカニズムをそのまま当てはめることは出来ない。さらに，我々のトランスウェルを用いた実験では，リゾ脂質によるカロテノイドのリンパへの輸送促進効果は認められたが，paracellular pathway の透過促進は認められなかった^{48,52)}。従って，取込み促進メカニズムに關与しているのは transcellular pathway であり，細胞膜経由で取込まれてリンパへ分泌されているはずである。

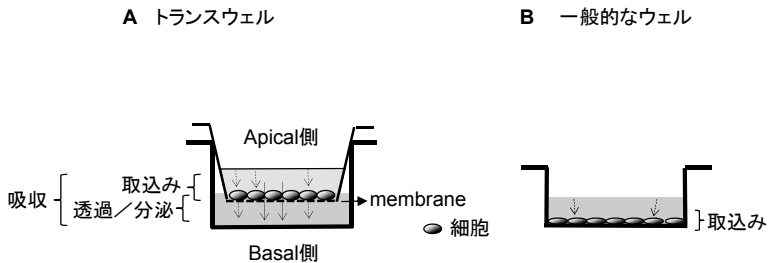


図6 トランスウェルと一般的なウェルの違い

- A, トランスウェルは2つのチャンバーからなり，上部に細胞を培養してカロテノイドの取込み量を，さらに下部に透過／分泌された量を調べることが出来る。
 B, 取込み量を調べる。

腸管細胞モデルのCaco-2は、通常、2-3週間培養を継続して細胞間の密着結合が十分発達した状態で吸収試験に使用する。我々は一般的なウェルプレートを用いて細胞間接着の存在しない（トリプシン処理して細胞をバラバラに分散した状態）、あるいは弱い接着状態（培養1-5日程度の細胞間接着が未発達）でカロテノイドの取込み試験を行い、リゾ脂質による促進効果に細胞接着性が関わっているかどうかを検討した⁵¹⁾。リゾ脂質の促進効果に細胞間結合が関与しているならば、このような状態の細胞ではその効果は認められないはずであるが、関与せずに細胞膜の透過性を高めて発揮しているならば、このような場合でも促進効果が発揮されるはずである。

トリプシン処理後及び培養1日の細胞での結果は、3週間培養した細胞の結果と全く異なり、対照の混合ミセルに可溶化させた細胞への取込み量が最も多く、リゾ脂質入りの場合はこれよりも低かった。そもそも細胞間接着が存在しない血球系の浮遊細胞でも実験を行ったが、トリプシン処理したCaco-2と同様の結果となった。Caco-2細胞では培養日数の経過に伴い細胞間の接着が発達していくと、対照ミセルからの取込み量は減少していくのに対し、リゾ脂質入りミセルからの取込み量は変化無く、数日後には逆転し、対照からの取込みよりも多くなった。これらの結果は、リゾ脂質の効果が細胞膜に対してではなく、細胞間接着に影響を与えて発揮されていることを示している。細胞が分散した状態では細胞の全表面からカロテノイドを取込めるが、培養用のディッシュの底に接着するとその面からは取込めず（図7A）、また培養日数が進んで細胞間が接近、接着すると吸収できるのは上面だけとなる（図7A, B）。この時に、リゾ脂質は細胞間接着の透過性を高めて取込み量を維持することで相対的に対照よりも取込みが高くなった（図7C）、と考えられる。上で述べたように細胞間隙経路でのリンパへの到達が無かったこと^{48, 52)}もあわせて考えると、リゾホスファチジルコリンはタイトジャンクション等の細胞間結合の透過性を高めて細胞間隙から細胞の側面膜を経る経路で脂溶性成分の取込みを高めていると考えられる⁵¹⁾。

リゾホスファチジルコリンやサイクロデキストリン等は細胞間コレステロールを遊離させてタイトジャンクションの透過性を高めることが報告されている^{57, 58)}。この時に外部からコレステロールを添加すると、透過性は低いまま維持されて吸収は促進されない。我々の研究でも、混合ミセルにコレステロールを加えると、対照のミセルからの取込みには影響が無いが、リゾホスファチジルコリン入り混合ミセルからの取込み促進効果は低下した⁴⁶⁾。この結果は上の推論を支持するものであった。リゾグリセロ糖脂質の場合も同様に細胞間コレステロールを放出させて細胞間の結合性を弱めることで取込み促進効果を発揮したものと考えられる（図7C）。

さらに、上で述べたが、リゾホスファチジルコリンは細胞による取込みだけでなく、アポリポタンパクの発現を高めて、細胞に取込まれたカロテノイドの

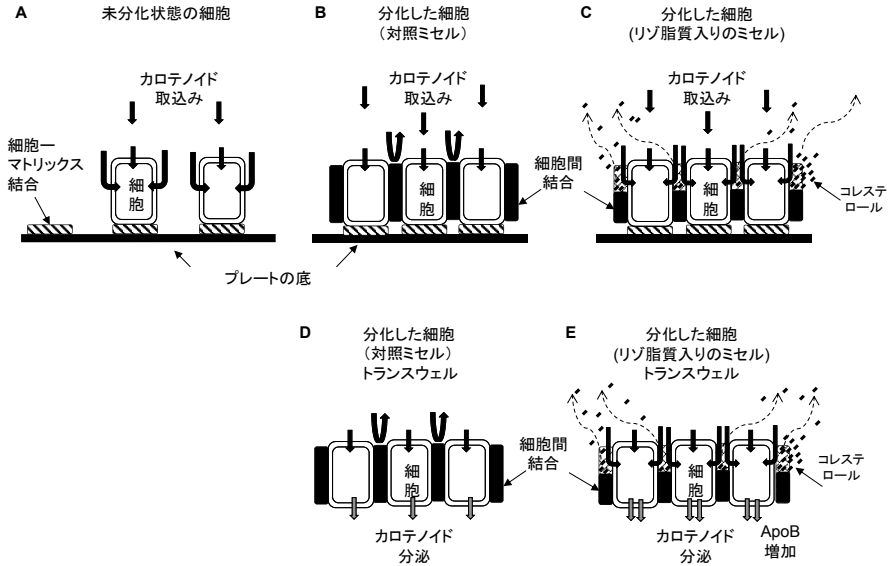


図7 カロテノイドの吸収推定経路のモデル

- A, 未分化細胞：細胞—マトリックス結合以外の部分から取込み可能。
 B, 分化した細胞：細胞間結合（タイトジャンクション等）により取込み可能な面積が大きく減る。
 C, 分化した細胞：リゾ脂質が細胞間コレステロールの遊離を促し，細胞結合の透過性を高めてカロテノイドの取込み促進効果が発揮される。
 D, 分化した細胞（トランスウェル）
 E, 分化した細胞（トランスウェル）：分泌も増加される。

細胞基底部からの透過（リンパへの分泌）を促進する効果も報告されている⁵⁶⁾。すなわち，リゾ脂質はカロテノイドの腸管吸収過程全体（取込み過程と透過／分泌過程の両方）に影響を及ぼしていると考えられる（図7E）。

ホスファチジルコリンやDGDG, SQDGは細胞によるカロテノイド取込みを抑制することを上で述べたが，実際にはこれが食事から摂取する脂質の形態である。確かにこのままではカロテノイドの可溶化が進んでも取込みが抑制されてしまうが，消化管内で酵素によりリゾ体に変換されることで，取込みが促進されると思われる。ただし，胆汁や膵液の分泌量を超えて大量にこれらの脂質を摂取した場合はリゾ体への変換が十分に行われず，カロテノイドの吸収は抑制されるだろう⁵⁹⁾。

その他，混合ミセルサイズは小さいものほど，そこに可溶化された脂溶性成分は細胞に取込まれやすいと一般的には考えられている。しかし，カロテノイドを可溶化した3種類の混合ミセル（対照，ホスファチジルコリン含有，リゾホス

ファチジルコリン含有)の粒径を測定した報告⁴⁸⁾では、ホスファチジルコリンミセルのサイズが最小であるにもかかわらず、カロテノイドの取込みが最も少なく、リゾホスファチジルコリンミセルと対照ミセルではほぼ同じサイズであったが取込みに大きな差があった。この結果は、細胞の取込みには一定以下のミセルサイズならば、その大小はあまり影響が無いことを示している。

7. 油脂の利用と摂取カロリー

油脂の摂取が野菜中のカロテノイドの生体利用性を高めることが実際にヒト試験でも確認されているが⁶⁰⁻⁶²⁾、メカニズムとしては、すでに述べたように油脂によるバイオアクセシビリティの増加に加えて、その加水分解物が腸管上皮細胞によるカロテノイドの取込みを高める効果によると考えられる。したがって、油脂はカロテノイドをはじめとした様々な脂溶性機能成分の生体利用性を高めるためには重要である。特に、加齢に伴い胆汁や膵液の分泌が生理的に減少するならば、カロテノイドや脂溶性ビタミンの生体利用性向上には、油脂の役割はより一層高まると言える。

一方、一般的には油脂の使用で摂取カロリーの増加が懸念されてしまう。そのため、カロテノイドのいくつかには抗肥満効果⁹⁻¹²⁾が報告されているが、それらの吸収を高めるためにわざわざ油脂を使うのでは、せっかくの機能が相殺されてしまうように思われるかもしれない。このような二律背反を解決する手段の一つがグリセロ糖脂質の使用である。リゾリン脂質もモノアシルグリセロールも吸収されて体内でトリアシルグリセロール等に再合成される⁶³⁻⁶⁵⁾が、リゾ糖脂質そのものは、ヒトではそれ以上加水分解されず⁶⁶⁾、さらに吸収もされない可能性がある⁶⁷⁾。そのメカニズムは不明であるが、multi-drug resistance 1 (MDR1, ATP-binding cassette transporter ABCB1)のようなトランスポーターにより管腔側へ排泄されるからかもしれない。実際、MGDGについては癌細胞を使った実験であるが、MDR1の機能を阻害することが報告されており⁶⁸⁾、他の種類のグリセロ糖脂質についても同様にMDR1の基質になるのかもしれない。カロテノイドの生体利用性を低カロリーで効率的に高めるという観点では、単にカロテノイド量を強化した食品を摂取するよりも、カロテノイド量は従来どおりでもグリセロ糖脂質等の吸収促進成分を多く含む食品を摂取した方が結果として、その生体利用性は高まる可能性がある。将来的には吸収促進成分高含有作物の開発をはじめとして、こうした成分の調味料等への高度利用が期待される。

8. カロテノイドの吸収・蓄積

ここまで、リゾ脂質の吸収促進機構について述べてきたが、様々な構造のカロテノイドに対して吸収促進効果が得られると考えている⁵²⁾。しかし、すでに述べたように、ヒトは約40種類ものカロテノイドを摂取しているものの、図1で示

したようなカロテノイドと、それらの代謝産物と考えられるものだけが、ヒト組織中に存在することが報告されていた¹⁴⁾。例えば、図8に示すような分子中にエポキシ基を持つ構造的特徴があるカロテノイドが食品には含まれており、neoxanthinとviolaxanthinは通常の食生活下で緑葉野菜からluteinや β -caroteneと共に摂取される。さらに、東アジアの人々は、貝、ウニ、ホヤ、褐藻類等からは、neoxanthinと類似した化学構造のfucoxanthinを摂取している。しかし、これら3種類のエポキシカロテノイドは通常の食生活下ではヒト組織中に見出されていなかった。このように、特定のカロテノイドのみが吸収・蓄積されているが、そのメカニズムについてはよくわかっていない。このようなカロテノイドの生体利用性をより高めようとする場合には、そのメカニズムを解明する必要がある。

Caco-2細胞を用いた研究では、これらのエポキシカロテノイド(neoxanthin, violaxanthin, fucoxanthin)は細胞に取込まれている⁴⁷⁾。また、混合ミセルに可溶化したエポキシカロテノイドをICRマウスに単回経口投与した研究でも吸収が確認されており^{59, 69-71)}、ほとんど同じ実験条件下で比較した場合、マウスでは試験したエポキシカロテノイドは β -caroteneやlutein同様(10 - 40 nM)に吸収されている。マウスにおいてはどのようなカロテノイドでも同程度吸収するものと考えられる。

一方、ヒトでの食品エポキシカロテノイドの生体利用性について調べた研究では¹⁵⁾、ホウレンソウの油炒め(3.0 mg neoxanthin, 6.5 mg violaxanthin, 13.4 mg lutein, 8.6 mg β -carotene)を1週間摂取し続けた後の血漿中のneoxanthinとviolaxanthinの濃度は定量限界以下であった。ただし、同一フードマトリックス中に共存する β -caroteneとluteinの血漿濃度は増加していた。さらに、試験管消化試験によるホウレンソウからのneoxanthinのバイオアクセシビリティ

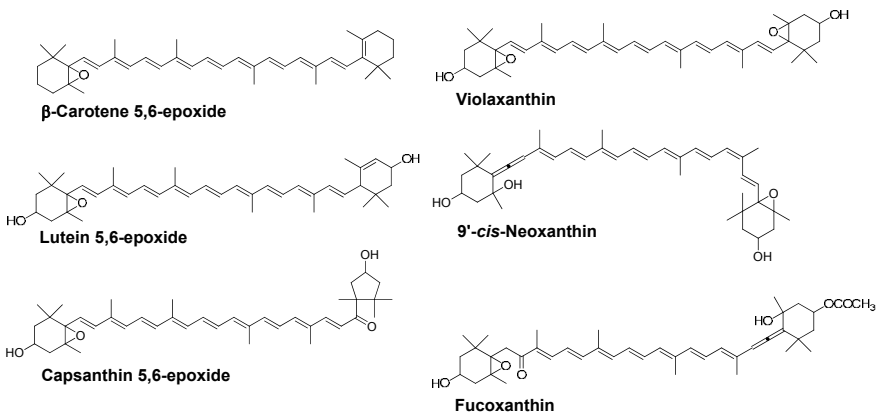


図8 様々なエポキシカロテノイドの化学構造式

は lutein や β -carotene より高かったため (neoxanthin, 30%; lutein, 15 - 20%; β -carotene, 5%)⁷¹⁾, 可溶化に問題は無い。すなわち, これらのエポキシカロテノイドはヒトではほとんど吸収・蓄積されないと考えられた。マウスの場合とは異なり, ヒトには lutein や β -carotene 等の特定のカロテノイドが吸収・蓄積されるような選択的吸収機構が存在するのかもしれない。

ワカメ中の fucoxanthin の生体利用性についてもヒト試験が行われている¹⁵⁾。しかし, ワカメの油炒め (6.1 mg fucoxanthin) 摂取後のヒト血漿中 fucoxanthinol (fucoxanthin の代謝産物) 濃度も定量限界以下であった。試験管消化試験によるワカメからのバイオアクセシビリティは 70% 以上と十分に高かったので¹⁵⁾, 可溶化には問題が無く, 上述のエポキシカロテノイドと同様に吸収されにくいと考えられた。生体利用性が低い他の要因として, 水溶性食物繊維がミセル溶液の粘度を高めてカロテノイドの拡散を低下させて取込みを遅らせるため⁷²⁾, ワカメ中に多量に含まれる食物繊維 (例えばアルギン酸) が fucoxanthin の吸収を低下させたのかもしれない。

したがって, このようなフードマトリックスの影響を避けてカロテノイドの生体利用性を調べる必要がある。精製エポキシカロテノイドあるいはオレオレジン (植物素材からの抽出物で, 食物繊維や他の極性物質を含んでいない) や濃縮物中のエポキシカロテノイドのヒトでの生体利用性を調べた報告がいくつかある。パプリカオレオレジンはエポキシカロテノイドとして capsanthin 5,6-epoxide (1.8 mg) と violaxanthin を (2.4 mg) 含んでいる。パプリカオレオレジン摂取後のカイロミクロン中に, これらは検出されなかった⁷³⁾。しかし, これらより含有量が少なかった 9-cis zeaxanthin (1.1 mg) は検出された⁷³⁾。この結果からは capsanthin 5,6-epoxide と violaxanthin はヒトには吸収されないと考えられた。さらに, 精製 violaxanthin (10 mg) あるいは精製 lutein 5,6-epoxide (10 mg) を摂取後の血漿中に, これらは検出されなかった⁷⁴⁾。コンブ濃縮物 (31 mg fucoxanthin) を摂取した場合で, 血中 fucoxanthinol 濃度が 44.2 nM に達した¹⁶⁾ もの, 精製 β -carotene 5,6-epoxide を 5 mg 摂取した場合の血漿中濃度 2290 nM⁷⁵⁾ に比べると非常に低い。

これらの実験結果から, β -carotene 5,6-epoxide より極性の高いエポキシカロテノイドはヒトに極めて吸収されにくいと考えられ, ホウレンソウとワカメを使った, フードマトリックスが存在する場合のヒト試験の結果とも一致している。

高極性エポキシカロテノイドはマウスといくつかの動物種⁷⁶⁻⁸⁰⁾ に吸収・蓄積される。例えば, フコキサンチンは貝, 鳥類, 水生昆虫等に吸収されることがわかっているが, 水生昆虫を餌とする魚への蓄積が認められておらず⁸⁰⁾, その理由はよくわかっていない。さらに, すでに述べたようにフードマトリックスの存在とは無関係にヒトにもほとんど吸収されないが, 促進拡散機構によって特定のカロテノイドが選択的に取込まれるのかもしれない。しかしながら, 高極性エポ

キシカロテノイドの腸管吸収が促進拡散機構を介さないとしても、単純拡散を介して腸管膜を通過できるはずである。したがって、促進吸収機構だけではヒト試験で示されたような吸収選択性を説明することはできない。これ以外の要因として、トランスポーターによる腸管細胞内から管腔側への排泄を考えると説明がつくが、この点に関しては鶏卵を摂取した場合の lutein の生体利用性に ABCG5/8 が関与しているとの報告がある⁸¹⁾ 程度で情報が少なく、その解明が課題である。以上をまとめると、カロテノイドの吸収は単純拡散、促進拡散、管腔側への排泄、これらの機構により総合的に調節されているのだろう。

このように吸収機構は不明ではあるが、投与方法の経験的な工夫によって吸収を高められる可能性がある。サケ、カニ等の赤色色素である astaxanthin (図1) も極性が高く生体利用性が低い傾向にある⁸²⁻⁸⁴⁾。例えば、1 - 48 mg の投与で血中濃度が 12 - 344 nM である。しかしながら、astaxanthin には、 β -carotene, lutein と同レベルで血中濃度が高い例 (2178 nM) が報告されている⁸⁵⁾。この報告では、100 mg の大量投与による効果の可能性は否定できないが、これまで述べたように、いくら大量に摂取しても全てが可溶化、吸収されるわけではないことから考えると、投与方法に何か吸収を高めるヒントがあるかもしれない。ここでは、astaxanthin のビードレット (ロシュ製、カロテノイド、ゼラチン、糖類のマトリックスをトウモロコシ澱粉でコートしたもの) を使用している。なぜビードレットで投与すると吸収効果が高いのか理由は不明であるが、fucoxanthin 等の高極性エポキシカロテノイドもビードレットで投与することが生体利用性を高める手段となるかもしれない。

ここまで述べた吸収過程に加えて、その後の化学的な分解や酵素的な代謝もカロテノイドの蓄積に影響していると考えられる。さらに、分解物や代謝産物こそがカロテノイドの機能を発揮している可能性がある。カロテノイドの酵素的代謝としては、 β -carotene 等のプロビタミン A が β -carotene-15,15'-oxygenase (BCO1) の作用でビタミン A に変換されることがよく知られているが、これ以外の非酵素的、酵素的開裂産物の生成とこれらの機能性について述べる。

9. カロテノイドの非酵素的酸化開裂産物とその機能性

非酵素的な β -carotene の開裂産物や酸化物、canthaxanthin (図1) の中央開裂産物である 4-oxo-retinoic acid 等の生成が試験管レベルで多数報告されていた⁸⁶⁻⁹⁴⁾。トマトやスイカに特徴的な赤色色素である lycopene は日常的な食事下により、ヒト血中にも多く存在している代表的な非プロビタミン A カロテノイドである。共役二重結合を 11 個有しており、図9のような酸化開裂産物が生成する可能性がある。ただし、9', 10' 位間の後述するような酵素で切断される経路もある。酸化による開裂はカロテノイドを分解し、体

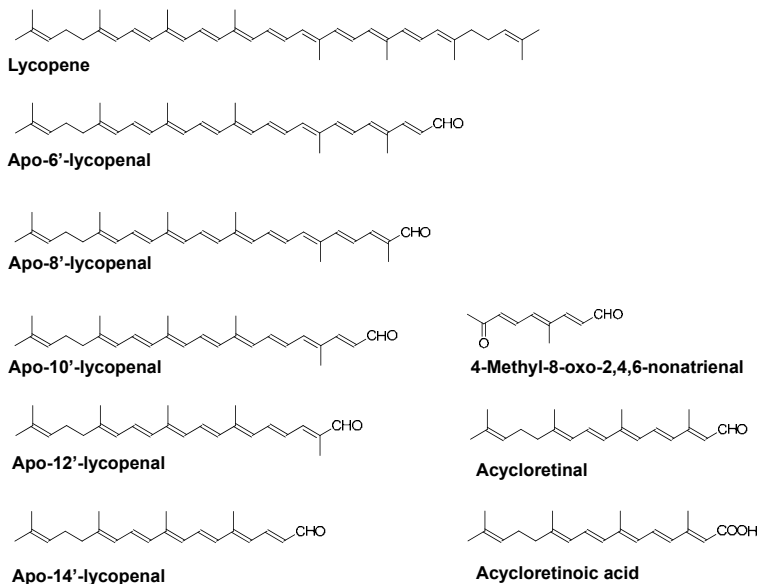


図9 様々な lycopene 開裂産物の化学構造式

内蓄積に影響を与えるだけでなく、このような分解物が機能を発揮している可能性がある。中でも特に注目されていたのは中央開裂産物であった。 β -Carotene の中央が開裂されてできる retinoic acid が核内レセプターのリガンドとして注目されていたからである。そして、有機溶媒中、リポソーム中、ミセル中などにおいて、lycopene 中央開裂産物である acycloretinal (図9) が生成すること、ブダ肝臓ホモジネートにより、さらに acycloretinoic acid へと変換されることを我々は明らかにしている¹⁸⁾。Astaxanthin についても様々な酸化開裂産物についての報告がある⁹⁵⁾。他の種類のカロテノイドでも同様の開裂産物が生成可能であろう。

開裂産物がカロテノイドの機能性を発揮している可能性について検討を行った。試験管反応液中の開裂産物は多岐にわたるため、まずは混合物を機能性試験に供した。トマト由来の非環式カロテン lycopene, phytopluene, ζ -carotene (図1) を有機溶媒中で自動酸化させて得られたそれぞれの開裂産物混合物の癌細胞増殖抑制効果を調べた。癌細胞としては、ヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) やヒト前立腺癌細胞 (PC-3, DU 145, LNCaP) を用いた。これらの細胞について検討した理由は、retinoic acid が HL-60 細胞を単球や顆粒球へ分化させることがよく知られており⁹⁶⁾、他のカロテノイドの中央開裂産物にも同様な効果を期待したこと、また多くの欧米諸国において 2000 年頃すでに男性癌死の 2 位を占めていた前立

腺癌への罹患（日本でも今や上位にある）がトマトやトマトベースの食品摂取量や lycopene 血中濃度等と逆の相関にあることが大変よく知られていたからである⁹⁷⁾。

その結果、カロテノイドそのものよりも、それらの開裂産物混合物の方が非常に強い増殖抑制効果を示した⁹⁸⁾。また、カロテノイドそのものの添加でも比較的強い効果を示した phytofluene, ζ -carotene は培地中で非常に不安定で細胞に添加した直後から酸化開裂されており、やはり開裂産物が非常に強い効果を発揮するものと考えられた^{98, 99)}。また、lycopene の中央開裂産物、acyclorethinoic acid を単離・精製してその機能を調べたところ、ヒト前立腺がん細胞にアポトーシスを誘導して増殖を抑制していることを見出した¹⁰⁰⁾。さらに、別の lycopene 開裂産物 4-methyl-8-oxo-2,4,6-nonatrienal（図 9）にもアポトーシス誘導による癌細胞（HL-60 細胞）増殖抑制効果が認められた¹⁰¹⁾。これらの結果は、カロテノイドの抗癌作用がその酸化開裂産物によることを強く示唆していた。ただし、ここで機能性を示したような lycopene 開裂産物のヒト組織での存在確認は行っていないため、実際に体内で機能性を発揮しているのかどうかは不明である。

次に、酵素的開裂産物について述べる。

10. カロテノイドの酵素的開裂産物と機能性

既に述べたが BCO1 はプロビタミン A カロテノイドの中央開裂を触媒する。一方、強制発現させた β -carotene-9', 10'-oxygenase (BCO2) は、 β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, lycopene 等、様々なカロテノイドの C-9' と C-10' 間の二重結合を開裂する¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾。ただし、phytoene と phytofluene は BCO2 の基質になるのかどうか、はっきりとわかっていない^{105, 106)}。

BCO2 の突然変異が動物に起こると、ヒツジ、ウシ、ニワトリ、ウサギではカロテノイドが代謝されずに脂肪組織へ蓄積して、体やミルクが黄色を呈する¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾。BCO2 の KO マウスに lutein を与えると、野生型と比べて lutein の炭素骨格を保持した代謝産物が著しく蓄積する¹¹¹⁾。BCO1 の KO マウスの肝臓では BCO2 の遺伝子発現が高まるとの報告もある¹⁰⁶⁾。BCO2 による炭素骨格の開裂はカロテノイドの主要な代謝変換であり、このような代謝が吸収機構と共にカロテノイドの蓄積に大きく影響していると考えられる。

BCO2 によって変換された可能性がある lycopene 代謝産物、apo-10'-lycopenal がトマトジュース摂取後のヒトの血中に存在している。ただし、その濃度は 0.3 nM 程である¹¹²⁾。Apo-10'-lycopenal がさらに apo-10'-lycopenoic acid に変換されて何らかの機能を発揮することが期待される。Apo-10'-lycopenoic acid には、マウスの肺癌予防作用¹¹³⁾、肥満・糖尿病モデルマウスに対する sirtuin 遺伝子の発現上昇による肝臓の脂肪変性抑制作用が報告されている¹¹⁴⁾。

11. 哺乳類におけるカロテノイドの酵素的代謝産物と機能性

非プロビタミン A カロテノイドは体内で、上で述べたような非酵素的あるいは酵素的な酸化開裂によって短い骨格のものへと徐々に分解されていくと考えられていただけで、哺乳類での他の代謝変換についてはほとんどわかっていなかった。

しかし近年、マウスにおいて fucoxanthin と lutein からケトカロテノイドへの酸化的代謝変換が起こることが見出されている^{69, 70}。Fucoxanthin を与えたマウスの血漿と肝臓から fucoxanthinol と amarouciaxanthin A が見出された。消化管内で fucoxanthin から加水分解によって生成した fucoxanthinol は体内を循環中、さらに amarouciaxanthin A へと酸化的に変換される（図 10A）。このような変換はヒト肝細胞モデル HepG2 でも起こる。さらに、そのような酸化的変換を触媒する脱水素酵素活性がマウス肝臓に存在すること、補酵素として NAD⁺ が必要なことが見出された。すなわち、哺乳類において酵素レベルでカロテノイド分子中の二級水酸基が酸化的に代謝変換されることが明らかにされた⁷⁰。

図 10B に示したような lutein の代謝産物と考えられる成分は、以前からヒトの血漿、母乳、肝臓、網膜中に存在することが知られていたが^{13, 115-118}、代

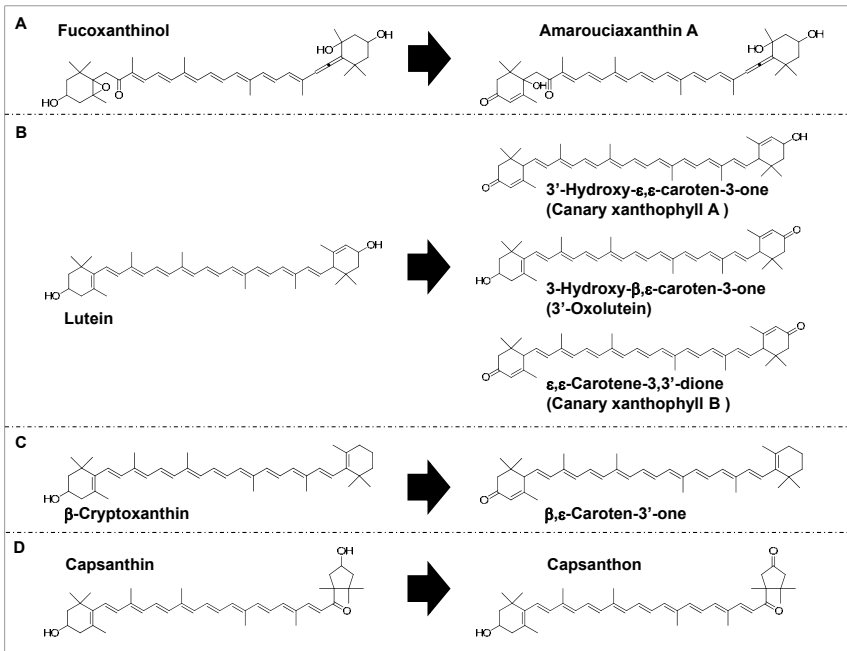


図 10 カロテノイドとその酸化的代謝産物

謝経路に関しては不明であった。Lutein 含有飼料を与えたマウスの血漿、肝臓、腎臓、脂肪組織中に lutein 代謝産物 (3'-hydroxy- ϵ, ϵ -caroten-3-one, ϵ, ϵ -carotene-3,3'-dione) が著しく蓄積し¹¹⁹⁾、マウス肝臓の lutein 代謝産物は未変換 lutein に対して約 2.5 倍に達していた。マウス肝臓よりは少ないが、ヒト血漿中にも lutein に対して約 23% もの代謝産物と考えられるケトカロテノイドが見出されている¹²⁰⁾。 β -Cryptoxanthin を多く含む温州みかんジュースを毎日摂取 (約 2 週間) した場合のヒトの血液には、その代謝産物である β, ϵ -carotene-3'-one (図 10C) の増加が認められている¹⁷⁾。すなわち、ヒトを含めた哺乳類体内でカロテノイド末端環の二級水酸基が酸化され、ケトカロテノイドに代謝変換されることを示している。このような酸化代謝変換は、ヒト血中に認められる代表的なカロテノイドだけではなく、他の様々なカロテノイドに対しても起こりえる、哺乳類に共通の代謝反応であると考えられる。Capsanthin を多く含むパプリカジュースの摂取後、ヒト血漿中には capsanthin に加えて capsanton が見出された¹²¹⁾。Capsanton は capsanthin の 3'-水酸基が 3'-ケト基へ酸化されて生成したと考えられる (図 10D)。4,4'-Dimethoxy- β -carotene の経口投与後、4-keto- β -carotene と canthaxanthin が血漿中に見出された¹²²⁾。今後、この酵素の本体、遺伝情報の解明、さらには KO マウスの作製等が期待される。

Lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin はこれまで述べたように、通常の食事下でヒト血中に多量に存在し、その代謝も活発に行われていることから、我々はこのような代謝産物の機能性について検討した。カロテノイドには様々な機能性が報告されているが、抗炎症作用について代謝前後のカロテノイドでその効果を比較した。Lutein と β -cryptoxanthin、これらの代謝産物 3 種類 (3'-hydroxy- ϵ, ϵ -caroten-3-one, ϵ, ϵ -carotene-3,3'-dione, β, ϵ -carotene-3'-one) について、RAW264 マウスマクロファージのポリリボサッカライド刺激による nitric oxide (NO) 産生抑制効果を比較した¹⁷⁾。その結果、lutein では NO 産生抑制効果は認められなかったが、代謝産物には認められた。その効果は ϵ, ϵ -carotene-3,3'-dione の方が 3'-hydroxy- ϵ, ϵ -caroten-3-one よりも強かった。 β -Cryptoxanthin にはそれ自体にも NO 産生抑制効果が認められたが、その代謝産物 β, ϵ -carotene-3'-one にはより強い効果が認められた。また代謝産物が、inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現を抑制していることも明らかにした。

これらの結果は、代謝産物が機能性を発揮、もしくはより強い機能を発揮していることを示していた。代謝産物に共通する化学構造として、マイケル反応部位として知られる α, β 不飽和カルボニル構造がある。Lutein 及び β -cryptoxanthin と同じ環状構造を有する 3-hydroxy- β -damascone と、代謝産物と同じ α, β 不飽和カルボニル構造を有する 3-oxo- α -damascone の抗炎症作用を比較した研究が報告されている¹²³⁾ が、3-oxo- α -damascone の方が強い効果を示す。 α, β 不飽和カルボニル構造が nuclear factor E2-related protein 2 (Nrf2) を活性化さ

せて, heme oxygenase-1 (HO-1) の発現を高めることで NO 産生を抑制していると考えられる。

代謝産物の別の機能性として抗肥満効果についても調べた。すでに fucoxanthin, neoxanthin, β -carotene, β -cryptoxanthin についてマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導抑制効果が報告されていた⁹⁻¹²⁾。しかし, lutein にはそのような効果が無い事も同時に報告されていた¹⁰⁾。Lutein 代謝産物に効果が見いだせれば, 代謝産物が機能を有する典型的な例となる。我々の研究でも確かに lutein に分化誘導抑制効果は認められなかったが, 同じ条件下で, 3'-hydroxy- ϵ, ϵ -caroten-3-one に効果が認められた¹²⁴⁾。

Lutein の投与が高脂肪食マウスのアテローム性動脈硬化を防止すること, そのメカニズムに HO-1 が関与していることが報告されている¹²⁵⁾。Lutein 投与で代謝産物が大量に蓄積することはすでに述べた。すなわち, この場合も実際には lutein 代謝産物が HO-1 の発現を増加させて抗肥満効果を発揮している可能性が高い。我々の培養細胞による結果も同様のメカニズムで効果が発揮されると推測できるが, その証明は今後の課題である。

12. おわりに

野菜・果物からのカロテノイド(その他の脂溶性機能成分も)は, まずはマトリックスから遊離しなければならないが, 調理, 加工が効果的である。生野菜として食べるならば, 当然, 咀嚼がこの過程でとても重要ということが理解できる。咀嚼が難しい場合は, スムージーやジュースにするなどの工夫が必要だろう。可溶化の過程に必要な胆汁や膵液の分泌量は限られており, 多量に疎水性の高いカロテノイドを摂取しても可溶化されるのは一部に過ぎない。また, 一般的には, 野菜は体に良いもの, 油脂・脂質は悪いものと見なされ, 野菜を食べる際に油脂の入った調味料等を使うのは良くないと考えられているかもしれない。確かに油の取り過ぎは良くないが, しかし, 全く使わないのでは脂溶性栄養・機能成分の吸収の機会を損なうことになる。可溶化, 腸管吸収の過程では食事由来の脂質が重要な役割を担っている。様々なカロテノイドが日常の食生活で摂取されているが, ヒト組織に蓄積されるカロテノイドの種類は限られている。腸管での選択的吸収や吸収後の代謝変換によって特定のカロテノイドが蓄積されるものと考えられる。従来からよく知られているカロテノイド蓄積の動物種間差やヒトでの顕著な個人差は, このような観点から説明できる可能性がある。吸収のメカニズムに関しては促進拡散を介する受容体の存在は明らかになったが, 吸収選択性との関係については不明な点が多く残されている。排泄機構の関与についてもほとんどわかっていない。これらのことから考えれば, 極めて吸収されにくい種類のカロテノイドをただ闇雲に大量に摂取してもあまり意味が無いことが理解できる。吸収メカニズムを解明して吸収促進技術の開発につなげることが重要であろう。さ

らに、吸収後は様々な分解物や代謝産物が生成して機能を発揮している証拠が得られてきた。代謝産物の機能を期待するには代謝酵素の発現を高めるなどの工夫が重要となるが、ここで示した酸化的代謝反応については酵素の実体が不明であり、今後の解明が待たれる。

(食品素材科学研究領域 脂質素材ユニット 小竹 英一)

参考文献

- 1) Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* **384**: 240-242 (1996).
- 2) Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**: 532-538 (1989).
- 3) Kotake-Nara, E., Asai, A., Nagao, A. Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Lett.* **220**: 75-84 (2005).
- 4) Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K., Nagao, A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J. Nutr.* **131**: 3303-3306 (2001).
- 5) Kotake-Nara, E., Terasaki, M., Nagao, A. Characterization of apoptosis induced by fucoxanthin in human promyelocytic leukemia cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 224-227 (2005).
- 6) Kotake-Nara, E., Sugawara, T., Nagao, A. Antiproliferative effect of neoxanthin and fucoxanthin on cultured cells. *Fisheries Sci.* **71**: 459-461 (2005).
- 7) Soontornchaiboon, W., Joo, S.S., Kim, S.M. Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 macrophages. *Biol. Pharm. Bull.* **35**: 1137-1144 (2012).
- 8) Marcotorchino, J., Romier, B., Gouranton, E., Riollet, C., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Landrier, J.F. Lycopene attenuates LPS-induced TNF- α secretion in macrophages and inflammatory markers in adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**: 725-732 (2012).
- 9) Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyashita, K. Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Int. J. Mol. Med.* **18**: 147-152

- (2006).
- 10) Okada, T., Nakai, M., Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K. Suppressive effect of neoxanthin on the differentiation of 3T3-L1 adipose cells. *J. Oleo Sci.* **57**: 345-351 (2008).
 - 11) Lobo, G.P., Amengual, J., Li, H.N., Golczak, M., Bonet, M.L., Palczewski, K., von Lintig, J. Beta,beta-carotene decreases peroxisome proliferator receptor gamma activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a beta,beta-carotene oxygenase 1-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **285**: 27891-27899 (2010).
 - 12) Shirakura, Y., Takayanagi, K., Mukai, K., Tanabe, H., Inoue, M. β -Cryptoxanthin suppresses the adipogenesis of 3T3-L1 cells via RAR activation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **57**: 426-431 (2011).
 - 13) Khachik, F., Beecher, G.R., Goli, M.B., Lusby, W.R. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* **63**: 71-90 (1991).
 - 14) Khachik, F., Spangler, C.J., Smith, J.C.Jr, Canfield, L.M., Steck, A., Pfander, H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal. Chem.* **69**: 1873-1881 (1997).
 - 15) Asai, A., Yonekura, L., Nagao, A. Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans. *Br. J. Nutr.* **100**: 273-277 (2008).
 - 16) Hashimoto, T., Ozaki, Y., Mizuno, M., Yoshida, M., Nishitani, Y., Azuma, T., Komoto, A., Maoka, T., Tanino, Y., Kanazawa, K. Pharmacokinetics of fucoxanthinol in human plasma after the oral administration of kombu extract. *Br. J. Nutr.* **107**: 1566-1569 (2012).
 - 17) Nagao, A., Maoka, T., Ono, H., Kotake-Nara, E., Kobayashi, M., Tomita, M. A 3-hydroxy β -end group in xanthophylls is preferentially oxidized to a 3-oxo ε -end group in mammals. *J. Lipid Res.* **56**: 449-462 (2015).
 - 18) Kim, S.J., Nara, E., Kobayashi, H., Terao, J., Nagao, A. Formation of cleavage products by autoxidation of lycopene. *Lipids* **36**: 191-199 (2001).
 - 19) Koutsos, E.A., Calvert, C.C., Klasing, K.C. The effect of an acute phase response on tissue carotenoid levels of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* **135**: 635-646 (2003).
 - 20) Shardell, M.D., Alley, D.E., Hicks, G.E., El-Kamary, S.S., Miller, R.R., Semba, R.D., Ferrucci, L. Low-serum carotenoid concentrations and carotenoid interactions predict mortality in US adults: the Third National Health

- and Nutrition Examination Survey. *Nutr. Res.* **31**: 178-189 (2011).
- 21) Friis, H., Gomo, E., Koestel, P., Ndhlovu, P., Nyazema, N., Krarup, H., Michaelsen, K.F. HIV and other predictors of serum beta-carotene and retinol in pregnancy: a cross-sectional study in Zimbabwe. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 1058-1065 (2001).
 - 22) Lefevre, C.E., Ewbank, M.P., Calder, A.J., von dem Hagen, E., Perrett, D.I. It is all in the face: carotenoid skin coloration loses attractiveness outside the face. *Biol. Lett.* **9**: 20130633 (2013).
 - 23) Richelle, M., Enslin, M., Hager, C., Groux, M., Tavazzi, I., Godin, J.P., Berger, A., Métairon, S., Quaile, S., Piguët-Welsch, C., Sagalowicz, L., Green, H., Fay, L.B. Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**: 171-177 (2004).
 - 24) Maiani, G., Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D., Schlemmer, U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **53** (Suppl 2): S194-S218 (2009).
 - 25) Holst, B., Williamson, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 73-82 (2008).
 - 26) Zaripheh, S., Erdman, J.W. Jr. Factors that influence the bioavailability of xanthophylls. *J. Nutr.* **132**: 531S-534S (2002).
 - 27) Yonekura, L., Nagao, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**: 107-115 (2007).
 - 28) Rock, C.L., Lovalvo, J.L., Emenhiser, C., Ruffin, M.T., Flatt, S.W., Schwartz, S.J. Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *J. Nutr.* **128**: 913-916 (1998).
 - 29) Small, D.M., Penkett, S.A., Chapman, D. Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **176**: 178-189 (1969).
 - 30) Nagao, A., Kotake-Nara, E., Hase, M. Effects of fats and oils on the bioaccessibility of carotenoids and vitamin E in vegetables. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 1055-1060 (2013).
 - 31) Chung, H.Y., Rasmussen, H.M., Johnson, E.J. Lutein bioavailability is

- higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J. Nutr.* **134**: 1887-1893 (2004).
- 32) Breithaupt, D.E., Weller, P., Grashorn, M.A. Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Poult. Sci.* **82**: 395-401 (2003).
- 33) Breithaupt, D.E., Weller, P., Wolters, M., Hahn, A. Plasma response to a single dose of dietary beta-cryptoxanthin esters from papaya (*Carica papaya* L.) or non-esterified beta-cryptoxanthin in adult human subjects: a comparative study. *Br. J. Nutr.* **90**: 795-801 (2003).
- 34) Bowen, P.E., Herbst-Espinosa, S.M., Hussain, E.A., Stacewicz-Sapuntzakis, M. Esterification does not impair lutein bioavailability in humans. *J. Nutr.* **132**: 3668-3673 (2002).
- 35) Hollander D., Ruble, P.E. Jr. Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *Am. J. Physiol. Endocrinol. MeTable* **235**: E686-E691 (1978).
- 36) Scita, G., Aponte, G.W., Wolf, G. Uptake and cleavage of β -carotene by cultures of rat small intestinal cells and human lung fibroblasts. *J. Nutr. Biochem.* **3**: 118-123 (1992).
- 37) Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., André, M., Portugal, H., Jourdeuil-Rahmani, D., Amiot, M.J., Lairon, D., Borel, P. Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem. J.* **387(Pt 2)**: 455-461 (2005).
- 38) Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M.F., Von Lintig, J. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 10581-10586 (2002).
- 39) Borel, P., Moussa, M., Reboul, E., Lyan, B., Defoort, C., Vincent-Baudry, S., Maillot, M., Gastaldi, M., Darmon, M., Portugal, H., Planells, R., Lairon, D. Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *J. Nutr.* **137**: 2653-2659 (2007).
- 40) Moussa, M., Landrier, J.F., Reboul, E., Ghiringhelli, O., Coméra, C., Collet, X., Fröhlich, K., Böhm, V., Borel, P. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *J. Nutr.* **138**: 1432-1436 (2008).

- 41) O'Sullivan, L., Aisling, S.A., O'Brien, N.M. Investigation of beta-carotene and lutein transport in Caco-2 cells: carotenoid-carotenoid interactions and transport inhibition by ezetimibe. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **79**: 337-347 (2009).
- 42) During, A., Hussain, M.M., Morel, D.W., Harrison, E.H. Carotenoid uptake and secretion by Caco-2 cells: beta-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions. *J. Lipid Res.* **43**: 1086-1095 (2002).
- 43) During, A., Harrison, E.H. Mechanisms of provitamin A (carotenoid) and vitamin A (retinol) transport into and out of intestinal Caco-2 cells. *J. Lipid Res.* **48**: 2283-2294 (2007).
- 44) During, A., Dawson, H.D., Harrison, E.H. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J. Nutr.* **135**: 2305-2312 (2005).
- 45) van Bennekum, A., Werder, M., Thuahnai, S.T., Han, C.H., Duong, P., Williams, D.L., Wettstein, P., Schulthess, G., Phillips, M.C., Hauser, H. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry* **44**: 4517-4525 (2005).
- 46) Kotake-Nara E., Nagao, A. Effects of mixed micellar lipids on carotenoid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**: 875-882 (2012).
- 47) Sugawara, T., Kushiro, M., Zhang, H., Nara, E., Ono, H., Nagao, A. Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* **131**: 2921-2927 (2001).
- 48) Yonekura, L., Tsuzuki, W., Nagao, A. Acyl moieties modulate the effects of phospholipids on beta-carotene uptake by Caco-2 cells. *Lipids* **41**: 629-636 (2006).
- 49) Kotake-Nara, E., Yonekura, L., Nagao, A. Effect of glycerophospholipid class on the beta-carotene uptake by human intestinal Caco-2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 209-211 (2010).
- 50) Block, M.A., Dorne, A.J., Joyard, J., Douce, R. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* **258**: 13281-13286 (1983).
- 51) Kotake-Nara, E., Yonekura, L., Nagao, A. Glyceroglycolipids affect uptake of carotenoids solubilized in mixed micelles by human intestinal Caco-2 cells. *Lipids* **50**: 847-860 (2015).

- 52) Kotake-Nara, E., Yonekura, L., Nagao, A. Lysoglyceroglycolipids improve the intestinal absorption of micellar fucoxanthin by Caco-2 cells. *J. Oleo Sci.* **64**: 1207-1211 (2015).
- 53) Ralston, E., Blumenthal, R., Weinstein, J.N., Sharrow, S.O., Henkart, P. Lysophosphatidylcholine in liposomal membranes: enhanced permeability but little effect on transfer of a water-soluble fluorescent marker into human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **597**: 543-551 (1980).
- 54) Sánchez, M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Espuny, M.J., Marqués, A., Manresa, A., Ortiz, A. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interface Sci.* **341**: 240-247 (2010).
- 55) Sawai, T., Drongowski, R.A., Lampman, R.W., Coran, A.G., Harmon, C.M. The effect of phospholipids and fatty acids on tight-junction permeability and bacterial translocation. *Pediatr. Surg. Int.* **17**: 269-274 (2001).
- 56) Petruzzelli, M., Groen, A.K., van Erpecum, K.J., Vrins, C., van der Velde, A.E., Portincasa, P., Palasciano, G., van Berge Henegouwen, G.P., Lo Sasso, G., Morgano, A., Moschetta, A. Micellar lipid composition profoundly affects LXR-dependent cholesterol transport across CaCo2 cells. *FEBS Lett.* **583**: 1274-1280 (2009).
- 57) Stankewich, M.C., Francis, S.A., Vu, Q.U., Schneeberger, E.E., Lynch, R.D. Alterations in cell cholesterol content modulate Ca(2+)-induced tight junction assembly by MDCK cells. *Lipids* **31**: 817-828 (1996).
- 58) Lambert, D., O'Neill, C.A., Padfield, P.J. Methyl-beta-cyclodextrin increases permeability of Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions. *Cell. Physiol. Biochem.* **20**: 495-506 (2007).
- 59) Baskaran, V., Sugawara, T., Nagao, A. Phospholipids affect the intestinal absorption of carotenoids in mice. *Lipids* **38**: 705-711 (2003).
- 60) Dimitrov, N.V., Meyer, C., Ullrey, D.E., Chenoweth, W., Michelakis, A., Malone, W., Boone, C., Fink, G. Bioavailability of beta-carotene in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**: 298-304 (1988).
- 61) Prince, M.R., Frisoli, J.K. Beta-carotene accumulation in serum and skin. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 175-181 (1993).
- 62) Brown, M.J., Ferruzzi, M.G., Nguyen, M.L., Cooper, D.A., Eldridge, A.L., Schwartz, S.J., White, W.S. Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**: 396-403

- (2004).
- 63) Field, F.J., Albright, E., Mathur, S.N. Regulation of triglyceride-rich lipoprotein secretion by fatty acids in CaCo-2 cells. *J. Lipid Res.* **29**: 1427-1437 (1988).
 - 64) Ho, S.Y., Delgado, L., Storch, J. Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **277**: 1816-1823 (2002).
 - 65) Field, F.J., Born, E., Chen, H., Murthy, S., Mathur, S.N. Lysophosphatidylcholine increases the secretion of cholesteryl ester-poor triacylglycerol-rich lipoproteins by CaCo-2 cells. *Biochem. J.* **304 (Pt 1)**: 35-42 (1994).
 - 66) Andersson, L., Bratt, C., Arnoldsson, K.C., Herslöf, B., Olsson, N.U., Sternby, B., Nilsson, A. Hydrolysis of galactolipids by human pancreatic lipolytic enzymes and duodenal contents. *J. Lipid Res.* **36**: 1392-1400 (1995).
 - 67) Ohlsson, L., Blom, M., Bohlinder, K., Carlsson, A., Nilsson, A. Orally fed digalactosyldiacylglycerol is degraded during absorption in intact and lymphatic duct cannulated rats. *J. Nutr.* **128**: 239-245 (1998).
 - 68) Martins, A., Vasas, A., Schelz, Z., Viveiros, M., Molnár, J., Hohmann, J., Amaral, L. Constituents of *Carpobrotus edulis* inhibit P-glycoprotein of MDR1-transfected mouse lymphoma cells. *Anticancer Res.* **30**: 829-835 (2010).
 - 69) Sugawara, T., Baskaran, V., Tsuzuki, W., Nagao, A. Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice. *J. Nutr.* **132**: 946-951 (2002).
 - 70) Asai, A., Sugawara, T., Ono, H., Nagao, A. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **32**: 205-211 (2004).
 - 71) Asai, A., Terasaki, M., Nagao, A. An epoxide-furanoid rearrangement of spinach neoxanthin occurs in the gastrointestinal tract of mice and in vitro: formation and cytostatic activity of neochrome stereoisomers. *J. Nutr.* **134**: 2237-2243 (2004).
 - 72) Yonekura, L., Nagao, A. Soluble fibers inhibit carotenoid micellization in vitro and uptake by Caco-2 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* **73**: 196-199 (2009).
 - 73) Pérez-Gálvez, A., Martin, H.D., Sies, H., Stahl, W. Incorporation of carotenoids from paprika oleoresin into human chylomicrons. *Br. J. Nutr.*

- 89:** 787-793 (2003).
- 74) Barua, A.B., Olson, J.A. Xanthophyll epoxides, unlike beta-carotene monoepoxides, are not detectibly absorbed by humans. *J. Nutr.* **131:** 3212-3215 (2001).
 - 75) Barua, A.B. Intestinal absorption of epoxy-beta-carotenes by humans. *Biochem. J.* **339(Pt 2):** 359-362 (1999).
 - 76) Matsuno, T., Ookubo, M. A new carotenoid, halocynthiaxanthin from the sea squirt, halocynthia roretzi. *Tetrahedron Lett.* **22:** 4659-60 (1981).
 - 77) Matsuno, T., Ookubo, M., Komori, T. Carotenoids of tunicates. III. The structural elucidation of two new marine carotenoids, amarouciaxanthin A and B. *J. Nat. Prod.* **48:** 606-613 (1985).
 - 78) Strand, A., Herstad, O., Liaaen-Jensen, S. Fucoxanthin metabolites in egg yolks of laying hens. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **119:** 963-974 (1998).
 - 79) Sangeetha, R.K., Bhaskar, N., Divakar, S., Baskaran, V. Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol. Cell Biochem.* **333:** 299-310 (2010).
 - 80) Matsuno, T., Ohkubo, M., Toriiminami, Y., Tsushima, M., Sakaguchi, S., Minami, T., Maoka, T. Carotenoids in food chain between freshwater fish and aquatic insects. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* **124:** 341-345 (1999).
 - 81) Herron, K.L., McGrane, M.M., Waters, D., Lofgren, I.E., Clark, R.M., Ordovas, J.M., Fernandez, M.L. The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs. *J. Nutr.* **136:** 1161-1165 (2006).
 - 82) Okada, Y., Ishikura, M., Maoka, T. Bioavailability of astaxanthin in Haematococcus algal extract: the effects of timing of diet and smoking habits. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73:** 1928-1932 (2009).
 - 83) Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kimura, F., Satoh, A., Miyazawa, T. Plasma Carotenoid Concentrations before and after Supplementation with Astaxanthin in Middle-Aged and Senior Subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75:** 1856-1858 (2011).
 - 84) Mercke Odeberg, J., Lignell, A., Pettersson, A., Höglund, P. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* **19:** 299-304 (2003).
 - 85) Østerlie, M., Bjerkeng, B., Liaaen-Jensen, S. Plasma appearance and

- distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. *J. Nutr. Biochem.* **11**: 482-490 (2000).
- 86) Handelman, G.J., van Kuijk, F.J., Chatterjee, A., Krinsky, N.I. Characterization of products formed during the autoxidation of beta-carotene. *Free Radic. Biol. Med.* **10**: 427-437 (1991).
- 87) Mordi, R.C., Walton, J.C., Burton, G.W., Hughes, L., Keith, I.U., David, L.A., Douglas, M.J. Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* **49**: 911-928 (1993).
- 88) McClure, T.D., Liebler, D.C. A rapid method for profiling the products of antioxidant reactions by negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **8**: 128-135 (1995).
- 89) Stratton, S.P., Schaefer, W.H., Liebler D.C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of beta-carotene. *Chem. Res. Toxicol.* **6**: 542-547 (1993).
- 90) Baker, D.L., Krol, E.S., Jacobsen, N., Liebler, D.C. Reactions of beta-carotene with cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of the prooxidant/antioxidant effect. *Chem. Res. Toxicol.* **12**: 535-543 (1999).
- 91) Yeum, K.J., Lee-Kim, Y.C., Yoon, S., Lee, K.Y., Park, I.S., Lee, K.S., Kim, B.S., Tang, G., Russell, R.M., Krinsky, N.I. Similar metabolites formed from beta-carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase, or linoleic acid hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**: 167-174 (1995).
- 92) Wu, Z., Robinson, D.S., Hughes, R.K., Casey, R., Hardy, D., West, S.I. Co-oxidation of beta-carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4899-4906 (1999).
- 93) Hu, X., White, K.M., Jacobsen, N.E., Mangelsdorf, D.J., Canfield, L.M. Inhibition of growth and cholesterol synthesis in breast cancer cells by oxidation products of β -carotene. *J. Nutr. Biochem.* **9**: 567-574 (1998).
- 94) Hanusch, M., Stahl, W., Schulz, W.A., Sies, H. Induction of gap junctional communication by 4-oxoretinoic acid generated from its precursor canthaxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**: 423-428 (1995).
- 95) Etoh, H., Suhara, M., Tokuyama, S., Kato, H., Nakahigashi, R., Maejima, Y., Ishikura, M., Terada, Y., Maoka, T. Auto-oxidation products of astaxanthin. *J. Oleo Sci.* **61**: 17-21 (2012).
- 96) Degos, L., Dombret, H., Chomienne, C., Daniel, M.T., Micléa, J.M., Chastang, C., Castaigne, S., Fenau, P. All-trans-retinoic acid as a

- differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* **85**: 2643-2653 (1995).
- 97) Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willett, W.C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 1767-1776 (1995).
- 98) Nara, E., Hayashi, H., Kotake, M., Miyashita, K., Nagao, A. Acyclic carotenoids and their oxidation mixtures inhibit the growth of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Nutr. Cancer* **39**: 273-283 (2001).
- 99) Nagao, A., Nara, E. Conversion of carotenoids to retinoids and other oxidation products. *ACS symposium series 851*, Food factors in health promotion and disease prevention. **28**: 322-335 (2003).
- 100) Kotake-Nara, E., Kim, S.J., Kobori, M., Miyashita, K., Nagao, A. Acycloretinoic acid induces apoptosis in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* **22(2A)**: 689-695 (2002).
- 101) Zhang, H., Kotake-Nara, E., Ono, H., Nagao, A. A novel cleavage product formed by autoxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 1653-1663 (2003).
- 102) Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt, K., Lederer, M.O., Breithaupt, D.E., von Lintig, J. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* **276**: 14110-14116 (2001).
- 103) Hu, K.Q., Liu, C., Ernst, H., Krinsky, N.I., Russell, R.M., Wang, X.D. The biochemical characterization of ferret carotene-9', 10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **281**: 19327-19338 (2006).
- 104) Mein, J.R., Dolnikowski, G.G., Ernst, H., Russell, R.M., Wang, X.D. Enzymatic formation of apo-carotenoids from the xanthophyll carotenoids lutein, zeaxanthin and β -cryptoxanthin by ferret carotene-9', 10'-monooxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **506**: 109-121 (2011).
- 105) Ford, N.A., Clinton, S.K., von Lintig, J., Wyss, A., Erdman, J.W. Jr. Loss of carotene-9', 10'-monooxygenase expression increases serum and tissue lycopene concentrations in lycopene-fed mice. *J. Nutr.* **140**: 2134-2138 (2010).
- 106) Lindshield, B.L., Canene-Adams, K., Erdman, J.W. Jr. Lycopeneoids: are lycopene metabolites bioactive? *Arch. Biochem. Biophys.* **458**: 136-140 (2007).
- 107) Våge DI, Boman IA. A nonsense mutation in the beta-carotene oxygenase

- 2 (BCO2) gene is tightly associated with accumulation of carotenoids in adipose tissue in sheep (*Ovis aries*). *BMC Genet.* **11**: 10 (2010).
- 108) Tian, R., Pitchford, W.S., Morris, C.A., Cullen, N.G., Bottema, C.D. Genetic variation in the beta, beta-carotene-9', 10'-dioxygenase gene and association with fat colour in bovine adipose tissue and milk. *Anim. Genet.* **41**: 253-259 (2010).
- 109) Eriksson, J., Larson, G., Gunnarsson, U., Bed'hom, B., Tixier-Boichard, M., Strömstedt, L., Wright, D., Jungerius, A., Vereijken, A., Randi, E., Jensen, P., Andersson, L. Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken. *PLoS Genet.* **4**: e1000010 (2008).
- 110) Strychalski, J., Brym, P., Czarnik, U., Gugolek, A. A novel AAT-deletion mutation in the coding sequence of the BCO2 gene in yellow-fat rabbits. *J. Appl. Genet.* (2015). [Epub ahead of print]
- 111) Amengual, J., Lobo, G.P., Golczak, M., Li, H.N., Klimova, T., Hoppel, C.L., Wyss, A., Palczewski, K., von Lintig, J. A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. *FASEB J.* **25**: 948-959 (2011).
- 112) Kopec, R.E., Riedl, K.M., Harrison, E.H., Curley, R.W. Jr, Hruszkewycz, D.P., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. Identification and quantification of apolycopenals in fruits, vegetables, and human plasma. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 3290-3296 (2010).
- 113) Lian, F., Smith, D.E., Ernst, H., Russell, R.M., Wang, X.D. Apo-10'-lycopenoic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro, and suppresses lung tumorigenesis in the A/J mouse model in vivo. *Carcinogenesis* **28**: 1567-1574 (2007).
- 114) Chung, J., Koo, K., Lian, F., Hu, K.Q., Ernst, H., Wang, X.D. Apo-10'-lycopenoic acid, a lycopene metabolite, increases sirtuin 1 mRNA and protein levels and decreases hepatic fat accumulation in ob/ob mice. *J. Nutr.* **142**: 405-410 (2012).
- 115) Khachik, F., Bernstein, P.S., Garland, D.L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**: 1802-1811 (1997).
- 116) Khachik, F., de Moura, F.F., Zhao, D.Y., Aebischer, C.P., Bernstein, P.S. Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**: 3383-3392 (2002).
- 117) Bhosale, P., Bernstein, P.S. Quantitative measurement of 3'-oxolutein from

- human retina by normal-phase high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **345**, 296-301 (2005).
- 118) Bhosale, P., Zhao, da Y., Serban, B., Bernstein, P.S. Identification of 3-methoxyzeaxanthin as a novel age-related carotenoid metabolite in the human macula. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**: 1435-1440 (2007).
- 119) Yonekura, L., Kobayashi, M., Terasaki, M., Nagao A. Keto-carotenoids are the major metabolites of dietary lutein and fucoxanthin in mouse tissues. *J. Nutr.* **140**: 1824-1831 (2010).
- 120) Khachik, F., de Moura, F.F., Chew, E.Y., Douglass, L.W., Ferris, F.L. 3rd, Kim, J., Thompson, D.J. The effect of lutein and zeaxanthin supplementation on metabolites of these carotenoids in the serum of persons aged 60 or older. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**: 5234-5242 (2006).
- 121) Etoh, H., Utsunomiya, Y., Komori, A., Murakami, Y., Oshima, S., Inakuma, T. Carotenoids in human blood plasma after ingesting paprika juice. *Biosci. Biotech. Biochem.* **64**: 1096-1098 (2000).
- 122) Zeng, S., Furr, H.C., Olson, J.A. Metabolism of carotenoid analogs in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **56**: 433-439 (1992).
- 123) Gerhäuser, C., Klimo, K., Hümmer, W., Hölzer, J., Petermann, A., Garreta-Rufas, A., Böhmer, F.D., Schreier, P. Identification of 3-hydroxy-beta-damascone and related carotenoid-derived aroma compounds as novel potent inducers of Nrf2-mediated phase 2 response with concomitant anti-inflammatory activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**: 1237-1244 (2009).
- 124) Kotake-Nara, E., Hase, M., Kobayashi, M., Nagao, A. 3'-Hydroxy- ϵ , ϵ -caroten-3-one inhibits the differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Biosci. Biotech. Biochem.* **80**: 518-523 (2016).
- 125) Han, H., Cui, W., Wang, L., Xiong, Y., Liu, L., Sun, X., Hao, L. Lutein prevents high fat diet-induced atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting NADPH oxidase and increasing PPAR expression. *Lipids* **50**: 261-273 (2015).

V 農産物・食品の抗酸化能評価法開発と測定の意義

1. はじめに

ヒトのような好気性生物は、呼吸により酸素を取り込んで生きるためのエネルギーを生産している。このとき体内に取り込まれた酸素の一部は、エネルギー代謝の際に電子伝達系において還元を受け、スーパーオキシド（アニオン）ラジカル (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) および一重項酸素 (1O_2) などの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) と呼ばれる物質に変わる (表1)¹⁾。このような活性酸素種は、もともと、細菌やウイルスの感染時におけるマクロファージの病原体排除機構をはじめとする生体防御に関わるなど、健康維持に重要な役割を果たしている。しかし、反応性が非常に高いため、ひとたび過剰となると生体中のタンパク質や脂質、あるいは核酸などの高分子と反応してタンパク質の変性や過酸化脂質の生成、遺伝子傷害などを起こし、これが生活習慣病の発症や老化の促進をもたらすと考えられている。

これらの生体成分の酸化傷害を防ぐために、生体にはスーパーオキシドディス

表1 生体内でのフリーラジカル・活性酸素種の発生

	生成する活性酸素種 ・フリーラジカル	成因	生成する場所
内因性 (細胞内)	O_2^-	呼吸鎖からの電子の漏洩	ミトコンドリア
	O_2^-	NADPH-Cu+P-450還元酵素	小胞内
	O_2^-	P-450	核
	H_2O_2	グリコール酸オキシダーゼ	ペルオキシソーム
	NO	尿酸オキシダーゼ NOS	細胞質
内因性 (細胞外放出)	O_2^- , NO, H_2O_2	活性化(免疫反応)	マクロファージ
	O_2^- , NO, OCi^- , H_2O_2	活性化(免疫反応)	好中球
	O_2^- , NO, H_2O_2	活性化(免疫反応)	血管内皮細胞
	NO	情報伝達(記憶形成など)	中枢神経細胞
外因性	フリーラジカル	薬物(代謝)	肝細胞小胞体
	フリーラジカル	食物、アルコール(代謝)	肝臓・消化管
	OH^{\cdot} , LO^{\cdot} , $\cdot OOH$, LOO^{\cdot}	金属(過酸化物の分解)	
	OH^{\cdot} , $\cdot OOH$	光・紫外線	皮膚・眼
	$\cdot OH_2$	放射線	不特定
	O_2^- , NO	熱(炎症、免疫反応)	
	OH^{\cdot}	超音波	
	NO, NO_2 , フリーラジカル	タバコ	肺胞・口腔・食道
	NO_x	大気汚染物質 酸素・オゾン	肺胞 眼・肺
	O_2^- , NO	病原体(免疫反応)	
	O_2^- , NO, OCi^-	虚血-再灌流(免疫反応) 精神的ストレス	血管内壁

ムターゼ (SOD) やカタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼのような活性酸素種を除去するメカニズムが備わっており, それと同時に, 生体中に存在する低分子量の抗酸化物質もその除去に働いている。しかし, 加齢等により活性酸素の消去能力が一部低下することに加え, 現代では大気汚染や紫外線などの環境要因や喫煙等の生活習慣, 精神的ストレスなどにより, 生体内での活性酸素種の産生と消去のバランスが崩れやすくなっている。そのため, 活性酸素種を消去しきれない, つまり酸化ストレスを受けやすい状況であると言える。このことから, 生体に備わったメカニズムに加え, 食事等により外部から抗酸化物質を体内に取り入れることが健康の維持に重要と考えられるようになってきている。

2. 抗酸化能²⁾とは

抗酸化能とは酸化を防ぐ能力のことを指し, 食品等の酸化変性を防ぐ機能から, 植物や動物などの生体防御機能までを含む非常に広い範囲の概念である。一般に, 生体調節機能の中で抗酸化能と称する場合には, 特に生体中において生体成分 (脂質・タンパク質・核酸など) の酸化を抑制する作用を指すことが多い。このような抗酸化作用, 生体の持つ酸化傷害に対する防御機構には, 大きく分けて4つの段階があると考えられている³⁾。1番目が酸化ストレスの原因となる内因性・外因性の活性酸素種・フリーラジカルそのものの発生を防ぐこと (予防的抗酸化物質: preventive antioxidants), 2番目がフリーラジカル等の捕捉による連鎖反応開始の抑制や連鎖反応成長の阻止 (ラジカル捕捉型抗酸化物質: radical-scavenging antioxidant), 3番目が障害を受けた生体分子の修復や再生 (修復・再生型抗酸化物質: repair and *de novo*), そして最後の4番目が必要に応じて抗酸化酵素などを産生し, 特定の場に遊走させること (適応機能: adaptation) である。

ラジカル捕捉型抗酸化物質は, ラジカル反応の抑制や連鎖的酸化反応の担い手となるものを捕捉する活性を有する物質であり, 一般的な抗酸化物質として考えられている。このため, 特に農産物・食品の抗酸化能としては, 直接的にこの活性を示す場合が多い。フリーラジカルや活性酸素の反応性はその種類によって異なり, 反応性と安定性 (寿命) はほぼ反比例しており, さらに生体膜の透過性も拡散という点から重要となる (表2)⁴⁾。たとえば, ヒドロキシルラジカルの場合, それ自体の反応性が非常に高いことから, 抗酸化作用の発現には抗酸化物質の反応性の高さよりも, 濃度の方が重要と考えられている。このように, 活性酸素種の中でも反応性や反応機構などに違いがあることから, それらの消去作用を示す抗酸化物質の種類にも違いが生じていると考えられる。

3. 農産物・食品の抗酸化能測定の意義

我が国は, 2007年に総人口に対して65歳以上の高齢者人口が占める割合 (高

表2 活性酸素種・フリーラジカル等の反応性

活性酸素種・フリーラジカルの種類	多価不飽和脂肪酸からの活性水素引き抜き($M^{-1}s^{-1}$)	二重結合への付加($M^{-1}s^{-1}$)	寿命	生体膜透過性
ヒドロキシル(HO^{\cdot})	10^9	10^9	very short	
チール(RS^{\cdot})	10^7	?	short	
アルコキシル(LO^{\cdot})	10^6	10^6	short	
ペルオキシル(HO_2^{\cdot} , LO_2^{\cdot})	10^2	10		
スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)	0	0		低
過酸化水素(H_2O_2)	0	slow	long	高
ヒドロペルオキシド($LOOH$)	0	slow		
一重項酸素(1O_2)	0	10^5		高
オゾン(O_3)	slow	10^6		
二酸化窒素(NO_2)	slow	slow		高
一酸化窒素(NO)				高
ペルオキシナイトライト($ONOO^{\cdot}$)				
<u>Hypochlorite(ClO^{\cdot})</u>				

吉川:抗酸化物質のすべて(1998)より

齢化率)が21.5%となり、世界で最も早く超高齢社会に突入している。特に、生産年齢人口(15～64才)の減少というだけでなく、健康寿命と平均寿命に男性で9.13年、女性で12.68年という大きな差があり⁵⁾、その間は日常生活に何らかの支障をきたしている(介護等を必要とする)ことから、それに伴う社会的負担の増大などが社会問題となっている。平均寿命と健康寿命との差が拡大すれば、さらなる介護医療費の増大につながることから、「疾病予防と健康増進、介護予防などを通じて、平均寿命と健康寿命の差を短縮し、個人の生活の質の低下を防ぐとともに、社会保障負担の軽減をはかる」という、健康寿命を延ばすための試みが厚生労働省を主体として進められている。

国民の健康寿命を延ばすために、主に生活習慣病の予防を目的として「適度な運動」「適切な食生活」「禁煙」などが推進されている。特に生活習慣病をはじめとする疾病の多くは生体内酸化ストレスの関与が示唆されていることから、「適切な食生活」、つまり食事が重要な鍵となると考えられる。前述のように食品に含有される種々の抗酸化物質は、生体内で生じる活性酸素種を消去し生体成分の酸化を防ぐことにより、健康の維持・増進に寄与すると期待されており、これまで食品の抗酸化能については数多くの研究が行われてきた。たとえば、野菜や果物を多く摂取するグループでは、発症要因として活性酸素種の関与が示唆されている脳卒中などのリスクが低下する⁶⁾ことから、野菜や果物の抗酸化能は疾病リスクの低減に有効ではないかと期待されている。

このような背景から、抗酸化成分の摂取量の目安として、消費者や食品産業界からも生鮮食品や加工食品への抗酸化能測定値の表示に対する期待が高まっている。しかし、体外から摂取する抗酸化物質が、本当に疾病リスクの低下に役立つのか、あるいは有効と判断された場合でも抗酸化物質を総量としてどの程度摂取

すればよいのかなどを明らかにするには、介入研究や疫学研究が求められるが、そのためには農産物・食品に含まれる抗酸化物質の総量を示す基準が必要である。また、食生活の中でどの程度の抗酸化物質量を摂取しているかを知るには、日常摂取する食品に含有される抗酸化物質、あるいは抗酸化能のデータベースが不可欠である。抗酸化物質は種類も多いため、個々の物質の抗酸化能を測定し、その総和を求めることは不可能であることから、抗酸化能を総量として評価するために、多種多様な抗酸化能測定法が開発されてきたが、それぞれに一長一短があり、異なる測定方法では値を比較することができないという問題が生じていた。そこで、抗酸化物質摂取の健康への効果を明らかにするためにも、まずその基礎技術となる農産物等の抗酸化能（抗酸化物質の活性酸素種消去能力の総量）を測るための妥当性の確認された抗酸化能測定法の確立が望まれている。

さらに、妥当性が確認された抗酸化能測定法を用い、我が国の農産物・食品を対象に、品種や栽培条件と抗酸化能の関係、加工・流通条件と抗酸化能の関係、あるいは品目毎の抗酸化能の分布と代表値を明らかにすることにより、抗酸化能を指標とした農産物の高付加価値化と品種選抜・栽培条件の最適化をはかり、高機能農産物の生産につなげることも可能となる。

4. 標準化に向けた抗酸化能測定法の選択

活性酸素種・フリーラジカル等は、前述のとおり反応性が高く寿命が短い、あるいは濃度が低いなどの理由から、そのものを直接測定することは難しい。そこで、抗酸化能の測定においては、フリーラジカル等による反応生成物を測定する方法を中心に検討されている。農産物や食品の抗酸化能の測定は古くから行われており、測定原理が異なる多種多様な方法が開発されてきた（表3）が、同じ抗酸化物質であっても測定方法によって得られる値が異なるため、異なる方法

表3 活性酸素種・フリーラジカル等の反応性

略称	分析方法		分析機器の汎用性の有無	生体への利用可能性	測定メカニズム	検体の親油性・親水性
	正式名称	簡便性				
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity	++	+	+++	HAT-based method	+++
TRAP	Total Radical-trapping Antioxidant Parameter	---	--	+++	HAT-based method	--
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasm	+++	+++	--	SET-based method	---
CUPRAC	Copper Reduction Assay	+++	+++		SET-based method	---
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	+	+	-	SET-based method	+++
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay	+	+	-	SET-based method	-
TOSC	Total Oxidant Scavenging Capacity	-	-	++	HAT-based method	---
LDL oxidation	Low-Density Lipoprotein Oxidation	-	+++	+++	HAT-based method	---
PHOTOCHEM	Photochemiluminescence	+	--	++	?	+++

AOU研究会ウェブサイト (<http://www.antioxidant-unit.com/>) より抜粋

による測定値を相互に比較することはできない。例えば、渡辺らは我が国で古くから使用されてきた DPPH ラジカル消去活性測定法と後述する ORAC 法を用いて抗酸化物質を測定し、その相関性を報告している⁷⁾。それによれば、抗酸化能の測定原理が前者は ET (electron transfer) 反応であるのに対し、後者は HAT (hydrogen atom transfer) 反応 (表 4) と異なるため、ほとんど相関は認められていない。このことは、抗酸化能の測定値を比較するためには統一された方法で測定することが必要であることを示している。さらに、抗酸化能の表示を見据えた場合、誰がどこで分析しても同じような測定値が得られること (妥当性) が確認された方法を用いることが必要となる。そこで、我々はこれまでに報告された抗酸化能評価法のうち、酸素ラジカル吸収能力 (oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法を選定し、測定法の妥当性確認を行うこととした。その理由として、ORAC 法は 1) 脂質過酸化連鎖反応に重要な役割を果たすペルオキシラジカルに類似したラジカルを用いた中性付近の pH での反応系を用いる。2) そのため、血清や臓器のホモジネートなどの生体成分も同一の基準で評価可能であり、たとえば抗酸化物質を実験動物に投与し、その前後の血清抗酸化能の変化などを追うこともできるなど測定結果の生体適合性が高い。3) 蛍光プレートリーダーでの測定が可能で汎用性が高く、測定のコストが安価であるなどの面で優位であると考えられるためである。また、ORAC 法ではカロテノイドなどの有する抗酸化能である一重項酸素消去活性を測定できないことから、愛媛大学で開発された一重項酸素消去活性 (singlet oxygen absorption capacity: SOAC) 法についても、測定法の改良と妥当性確認を行っている。

5. ORAC 法の妥当性確認

ORAC 法は、96 穴 マイクロプレートを用い、試料と蛍光プローブである fluorescein の混合液にラジカル発生剤である AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride) を加えてペルオキシラジカル (ROO^\cdot) を発生

表 4 抗酸化活性測定法の反応機序

	HAT-based method (Hydrogen atom transfer: 水素原子供与)	SET-based method (Single electron transfer: 一電子供与)
測定機序	抗酸化物質がラジカルに水素原子を供与することにより、基質の酸化を抑制する。	抗酸化物質がラジカルや酸化物などに一電子を供与することにより、基質を還元する。
特徴	反応が速い。 測定が pH や溶媒に依存しない。 水素原子が移行する反応はラジカルの連鎖反応に重要な反応であることから、より生体に関連性が高い。	反応が遅い。 測定が pH に依存する。 抗酸化物質が持つ還元力はラジカル除去活性には直接関連しないが、抗酸化物質として重要なパラメーターである。
測定系の例	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant parameter) TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity) LDL (Low density lipoprotein) 酸化反応	FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) CUPRAC (Copper Reduction Assay) TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去

させ、このペルオキシラジカルにより分解される fluorescein の蛍光強度の低下を経時的に測定し、その減少曲線下の面積 (AUC: area under the curve) を求める方法である⁸⁾。このとき、抗酸化物質 (もしくは Trolox (トロロックス): ビタミン E 類似物質) の存在下で測定した AUC からブランクの AUC を引いた差 (net AUC) を計算して、濃度既知の Trolox における net AUC に対する相対値を求め、抗酸化能を Trolox 当量に換算して表す (図 1)⁷⁾。

農産物・食品には種々の抗酸化物質が含まれるため、ORAC 法で抗酸化能を測定する際は、親水性の抗酸化物質はリン酸緩衝液 (水溶性の反応系) 中で測定する親水性 ORAC (H-ORAC) で評価し、親油性抗酸化物質は親油性 ORAC (L-ORAC) で測定する。H-ORAC 値は原法ではアセトン: 水: 酢酸 70: 29.5: 0.5 の組成からなる混合溶液に抽出される画分の測定値であり、ポリフェノールやアスコルビン酸などに由来する抗酸化能を評価する。それに対し、ヘキサン: ジクロロメタン 1:1 の溶液に抽出される親油性画分を L-ORAC 値として測定する。Wu らは、ランダムにメチル化された β -シクロデキストリンを溶解促進剤として使用 (7% β -シクロデキストリンを含む 50% アセトン水溶液) することにより、水溶性の反応系で親油性成分の活性を L-ORAC 値として測定できることを報告しており⁹⁾、L-ORAC は脂溶性ビタミンであるトコフェロールやゴマリグナンなどの測定に用いられる。

ORAC 原法では、Trolox 標準液もしくは試料溶液 (20 μ L) の 75mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 希釈液と 94.4nM フルオレセイン溶液 / 75mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 200 μ L) の混合液に、31.7mM AAPH 溶液 / 75mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 75 μ L) を加え、蛍光強度 (Ex 485nm 近傍, Em 530nm

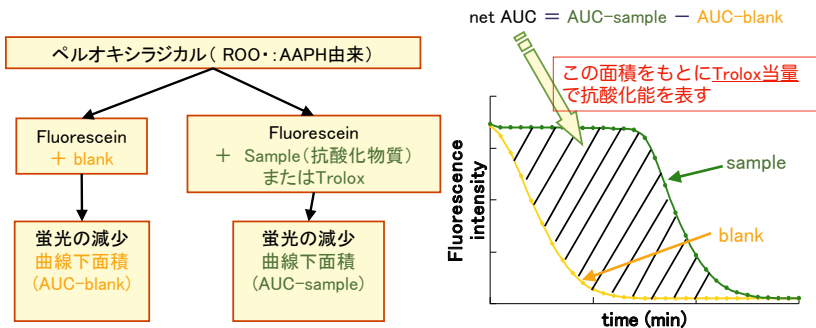


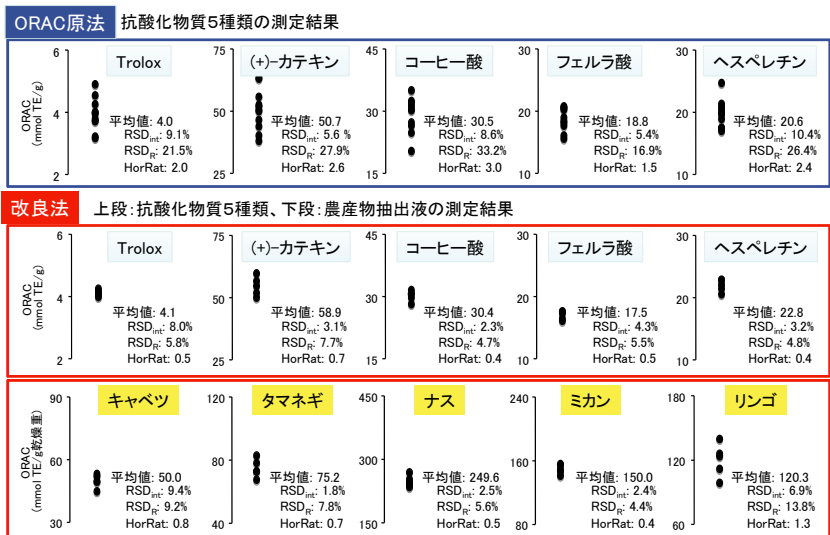
図 1 ORAC (酸素ラジカル吸収能力) 法測定原理

AAPH 由来のペルオキシラジカル ($\text{ROO}\cdot$) により分解される Fluorescein の蛍光強度を測定し、抗酸化物質 (もしくは Trolox) 存在下の減少曲線の面積 (AUC: Area Under the Curve) から blank の AUC を引いた差 (net AUC) の、濃度既知の Trolox での net AUC に対する相対値を求め、Trolox 当量に換算して、抗酸化力とする。

近傍)を2分間隔で90分間測定する。しかし、原法に基づいて5種類の抗酸化物質溶液(10.0 mg/L)を用いて測定を行った結果、室間再現性があまり良好ではなく、HorRat値が2を超える物質が存在した(図2上段)¹⁰⁾。そこで、このばらつきの原因を調べた結果、96穴プレートにおけるウェル間の温度ムラ、Trolox標準液や試料溶液の分注精度、AAPH溶液添加後の溶液の不均一さ等の問題が考えられた。また、室間再現精度の低い試料では、測定時における試料溶液の希釈倍率が高いほど、算出されるH-ORAC値が大きくなる傾向が認められた。原法では試料溶液の希釈倍率測定者に委ねられているが、測定時における試料の希釈倍率が測定者間で大きく異ならないよう収束させる工夫が必要であると考えられた。そこで、表5に示したような改良を加え、最終的に改良法の妥当性を確認することができた(図2)。これは、抗酸化能のような機能性評価法で妥当性確認を行った初めての例である。

6. 妥当性が確認された抗酸化能評価法の普及

妥当性の確認された改良H-ORAC法の分析手順書は食品総合研究所のウェブサイト(<http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/>)から請求が可能である。ORAC法では前述のように、農産物に含まれる抗酸化成分をポリフェノールやビタミンC



*HorRat: 分析法が妥当かどうかを判断する基準で、ハーモナイズド・プロトコールでは0.5~2.0の間であれば分析法が妥当であるとされる

図2 ORAC原法と改良法による室間共同試験結果

農研機構 2012年主要成果 (www.naro.affrc.go.jp/project/results/2012/310a0_02_54.html より)

のような水に溶けやすい物質とビタミン E のような油に溶けやすい物質に分けて抽出し、それぞれの抗酸化能を測定 (H-ORAC および L-ORAC) し、その和を抗酸化能 (ORAC 値) 総量として表す。そこで、L-ORAC 法についても原法に改良を加えた方法を確立し、妥当性確認のための室間共同試験が終了した¹¹⁾ことから、現在分析手順書の公開に向けた準備を進めている。さらに、農産物・食品の抗酸化能評価にあたっては、凍結乾燥粉末を試料として用いることが多いため、凍結乾燥粉末からの抽出、測定という一連の操作についての妥当性確認も行う予定である。

また、農産物に含有される代表的な抗酸化物質は、ポリフェノールとカロテノイドである。ポリフェノール類の抗酸化能については、ORAC 法により評価できるが、カロテノイドの抗酸化能は作用機序の違いにより ORAC 法で評価することはできない。そこでカロテノイド系抗酸化物質の測定法として、愛媛大学の向井らを中心に一重項酸素消去活性測定法である SOAC (singlet oxygen absorption capacity) 法 (図 3) が確立され¹²⁾、食品総合研究所をセンターラボとする妥当性確認への取り組みが進んでいる。SOAC 法についても、室間共同試験が終了し、妥当性が確認されたことから、論文の公表後に手順書の公開を行う予定にしている。

7. 抗酸化能評価法の今後

今後は、ポリフェノール系抗酸化物質の ORAC 値とカロテノイド系抗酸化物質の SOAC 値を測定することにより農産物の抗酸化能を評価し、疫学研究等を通じて健康に対する影響を明らかにできると考えている。また、本法により測定

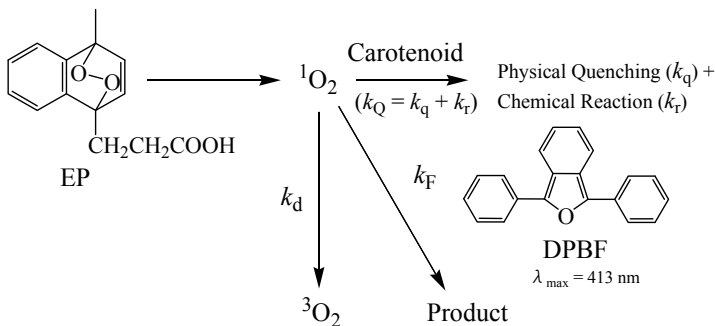


図 3 SOAC (一重項酸素消去活性) 法測定 の原理
(一重項酸素消去速度 (k_Q) 測定法)

EP (エンドペルオキシド) の熱分解により発生する一重項酸素が DPBF (1,3-ジフェニルイソベンゾフラン) を分解し、DPBF の持つ 430nm の特異的吸光が減少する事を利用し、 α -トコフェロールに対する半減期の値から算出する。

した農産物等の抗酸化能データベースの構築も同時に進めている。抗酸化能データベースは抗酸化物質の摂取と健康の維持・向上への関わりを科学的に明らかにするためにも必要であり、さらに農産物の高付加価値化に向けた抗酸化能の表示にも役立つと期待される。

また、食品として抗酸化物質を摂取した場合の生体内での働きを明らかにするためには、消化・吸収による生体への取り込みや、吸収後の存在形態などを明らかにしていく必要がある。ORAC法では血液などの生体成分も測定が可能であることから、動物等に食べさせた後、その血液の抗酸化能を評価する試験と組み合わせることも今後の研究方向として期待される。

8. 謝辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」（食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発）および「食料生産地域再生のための先端技術展開事業」において行われた。

（食品機能研究領域 機能性成分解析ユニット 石川 祐子）

引用文献

- 1) 井上正康編著：活性酸素と医食同源 分子論的背景と医食の接点を求めて、共立出版株式会社 (1996)
- 2) 二木鋭雄他編集：成人病予防食品の開発，シーエムシー出版 (1998)
- 3) 二木鋭雄他編：抗酸化物質 フリーラジカルと生体防御，学会出版センター (1994)
- 4) 吉川敏一編著：抗酸化物質のすべて，先端医学社 (1998)
- 5) 厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会 第2回健康日本21（第二次）推進専門委員会資料
<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/sinntyoku.pdf>
- 6) Feng J. He *et al.*: Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies, *Lancet*, **367**(9507), 320-326 (2006)
- 7) 渡辺純他：食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して ORAC法の有用性と他の測定法との相関性，*化学と生物*, **47**(4), 237-243 (2009)
- 8) 沖 智之：ORAC法，食品機能性評価マニュアル集第Ⅱ集，食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編集 p79-86 (2008)
- 9) Xianli Wu *et al.*: Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **52**(12), 4026-4037

(2004)

- 10) Watanabe J. *et al.*: Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.* **28**(2), 159-165 (2012)
- 11) Watanabe J. *et al.*: Improvement and interlaboratory validation of lipophilic oxygen radical absorbance capacity: Determination of antioxidant capacities of lipophilic antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.* **32**(2), 171-175. (2016)
- 12) Ouchi, A. *et al.*: Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoid and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. *J. Agric. Food Chem.*, **58**(18), 9967-9978. (2010)

食 糧 —その科学と技術—
第 54 号

平成 28 年 3 月 10 日 印刷
(非売品)
平成 28 年 3 月 10 日 発行

〒305-8642
茨城県つくば市観音台2-1-12
国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所
所 長 大谷 敏郎

URL : <http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/>

印刷所 牛久印刷株式会社
〒300-1236
茨城県牛久市田宮町531-27