

## 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、 $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin を含めて天然に 700 種類以上が存在し、抗酸化<sup>1, 2)</sup>、抗癌<sup>3, 6)</sup>、抗炎症<sup>7, 8)</sup>、抗肥満作用<sup>9-12)</sup>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  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, lycopene, phytoene, phytofluene,  $\zeta$ -carotene,  $\beta$ -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<sup>13, 14)</sup>。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<sup>15)</sup>、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<sup>16)</sup>、その血中濃度は通常食事下での  $\beta$ -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<sup>17)</sup>、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<sup>18)</sup>。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。)

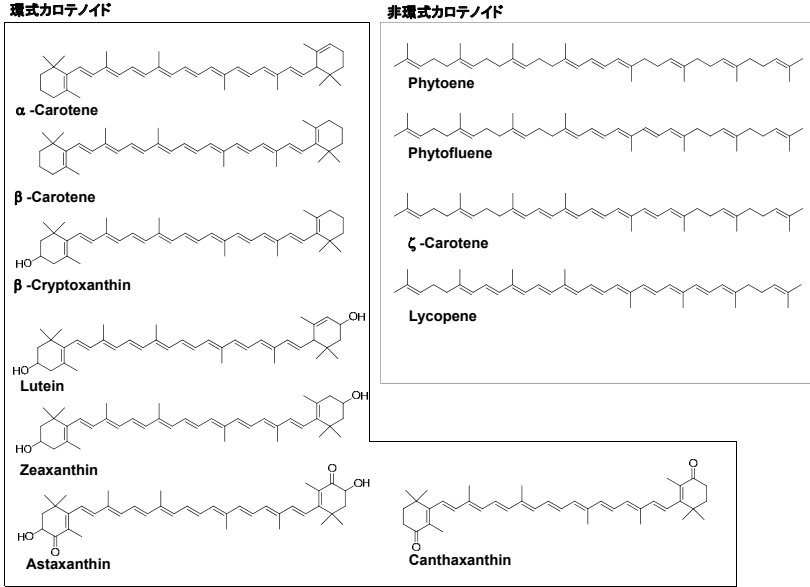


図1 代表的なカロテノイドの化学構造式

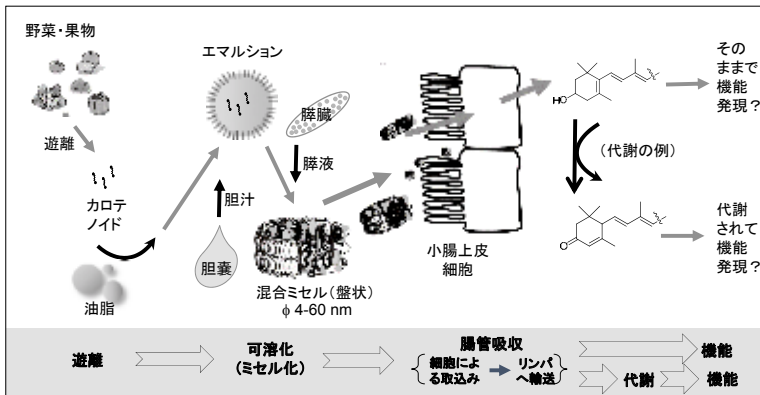


図2 カロテノイドの可溶化, 吸収, 代謝, 機能発現

## 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<sup>19)</sup>。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<sup>20)</sup>、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やマラリア原虫の感染<sup>21)</sup> 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<sup>22)</sup>。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<sup>23-26)</sup>。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<sup>27)</sup>、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<sup>28)</sup>。

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<sup>29)</sup>。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（ $\beta$ -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<sup>30)</sup>。

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、 $\beta$ -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、 $\alpha$ -carotene、 $\beta$ -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<sup>31-33)</sup>。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<sup>34)</sup>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<sup>33)</sup>。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<sup>35,36</sup>、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<sup>37-44</sup>。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% ( $\beta$ -carotene), 20% ( $\beta$ -cryptoxanthin), 7% (lutein/zeaxanthin) であると報告されている<sup>44</sup>。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  $\beta$ -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<sup>45</sup>。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<sup>46</sup>、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<sup>44,47</sup>。

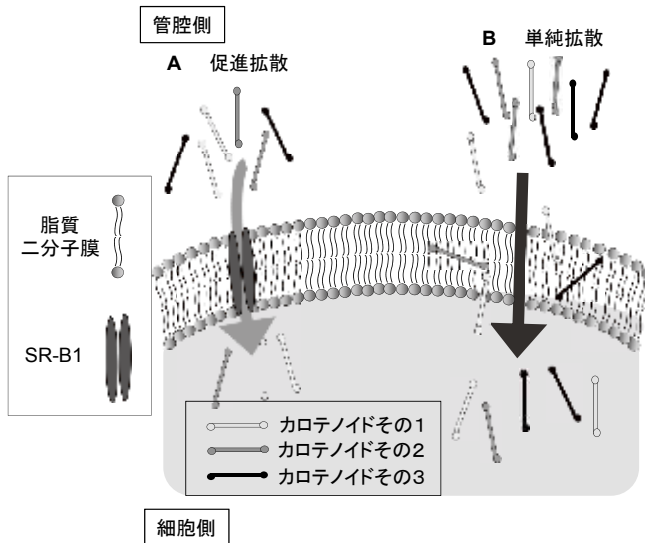


図3 カロテノイドの腸管上皮細胞膜での取込みメカニズム

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<sup>46)</sup>。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> $\alpha$ -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<sup>48,49)</sup>。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<sup>50)</sup>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)、

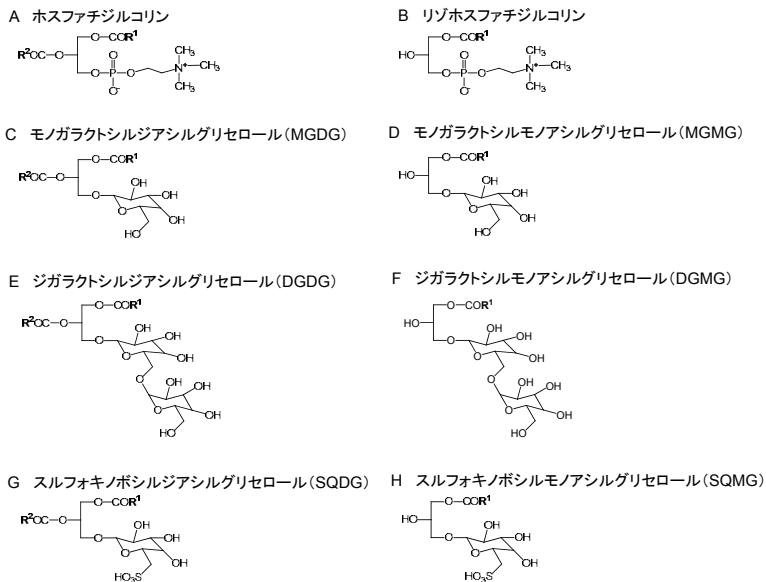


図4 リン脂質、グリセロ糖脂質、及びこれらリゾ体の化学構造式

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<sup>51)</sup>。可溶化過程では,  $\beta$ -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<sup>51, 52)</sup>。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示すことがわかる。

## 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<sup>48, 51)</sup>。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<sup>48, 51)</sup>。

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

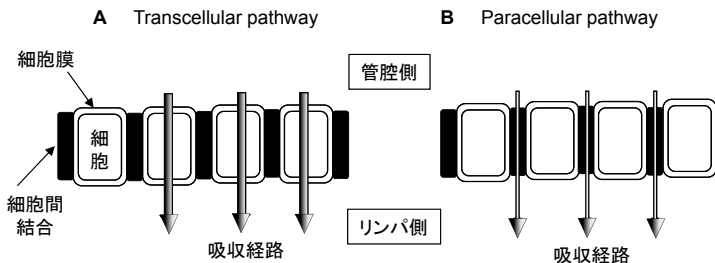


図 5 カロテノイドの腸管吸収 (取込みと透過) 経路

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<sup>27)</sup>，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<sup>53,54)</sup>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<sup>51)</sup>。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<sup>55)</sup>。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<sup>56)</sup>。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<sup>48,52)</sup>。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。

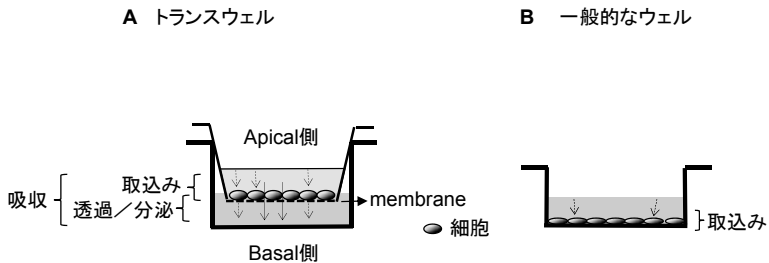


図6 トランスウェルと一般的なウェルの違い

- 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<sup>51)</sup>。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<sup>48, 52)</sup>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<sup>51)</sup>。

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<sup>57, 58)</sup>。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<sup>46)</sup>。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

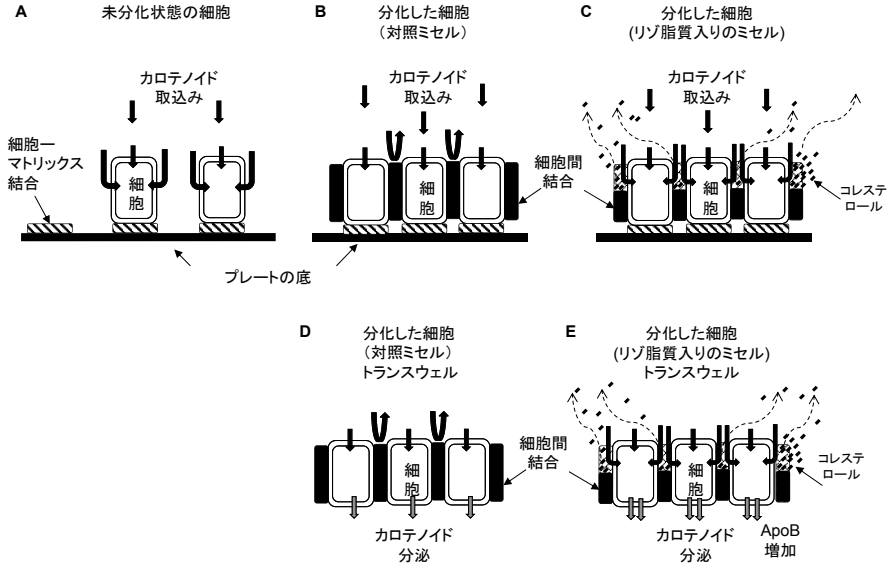


図7 カロテノイドの吸収推定経路のモデル

- 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（トランスウエル）  
 E, 分化した細胞（トランスウエル）：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<sup>56)</sup>。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<sup>59)</sup>。

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<sup>48)</sup>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<sup>60-62)</sup>、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<sup>9-12)</sup>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<sup>63-65)</sup>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<sup>66)</sup>、さらに吸収もされない可能性がある<sup>67)</sup>。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<sup>68)</sup>、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<sup>52)</sup>。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<sup>14)</sup>。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 $\beta$ -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<sup>47)</sup>。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<sup>59, 69-71)</sup>、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 $\beta$ -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<sup>15)</sup>、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  $\beta$ -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 $\beta$ -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

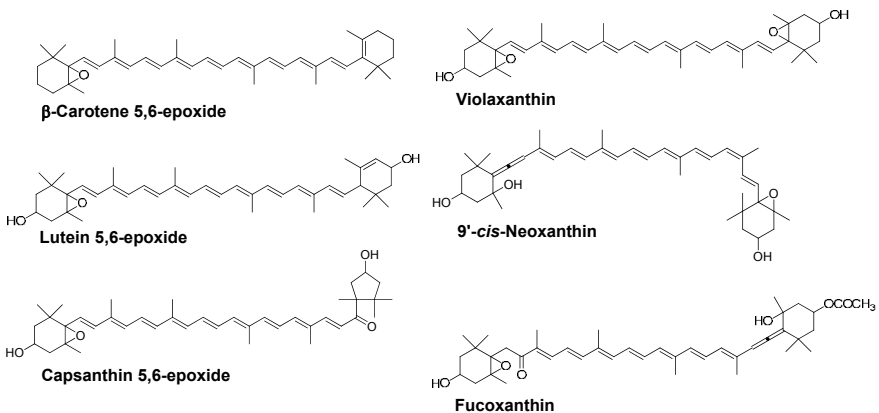


図8 様々なエポキシカロテノイドの化学構造式

は lutein や  $\beta$ -carotene より高かったため (neoxanthin, 30%; lutein, 15 - 20%;  $\beta$ -carotene, 5%)<sup>71)</sup>, 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  $\beta$ -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<sup>15)</sup>。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<sup>15)</sup>, 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<sup>72)</sup>, 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<sup>73)</sup>。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<sup>73)</sup>。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<sup>74)</sup>。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<sup>16)</sup> もの, 精製  $\beta$ -carotene 5,6-epoxide を 5 mg 摂取した場合の血漿中濃度 2290 nM<sup>75)</sup> に比べると非常に低い。

これらの実験結果から,  $\beta$ -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<sup>76-80)</sup> 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<sup>80)</sup>, 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<sup>81)</sup> 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<sup>82-84)</sup>。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、 $\beta$ -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<sup>85)</sup>。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、 $\beta$ -carotene 等のプロビタミン A が  $\beta$ -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  $\beta$ -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<sup>86-94)</sup>。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

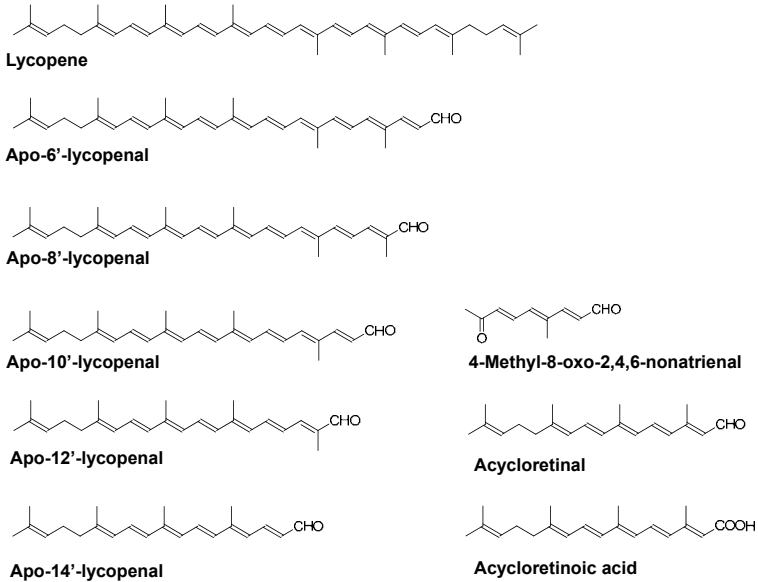


図9 様々な lycopene 開裂産物の化学構造式

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。 $\beta$ -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<sup>18)</sup>。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<sup>95)</sup>。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,  $\zeta$ -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<sup>96)</sup>、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<sup>97)</sup>。

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<sup>98)</sup>。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,  $\zeta$ -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<sup>98, 99)</sup>。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<sup>100)</sup>。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<sup>101)</sup>。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  $\beta$ -carotene-9', 10'-oxygenase (BCO2) は、 $\beta$ -carotene,  $\beta$ -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<sup>102-104)</sup>。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<sup>105, 106)</sup>。

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<sup>107-110)</sup>。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<sup>111)</sup>。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<sup>106)</sup>。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<sup>112)</sup>。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<sup>113)</sup>、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<sup>114)</sup>。



## 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代謝変換が起こることが見出されている<sup>69, 70)</sup>。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<sup>+</sup> が必要なが見出された。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<sup>70)</sup>。

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<sup>13, 115-118)</sup>、代

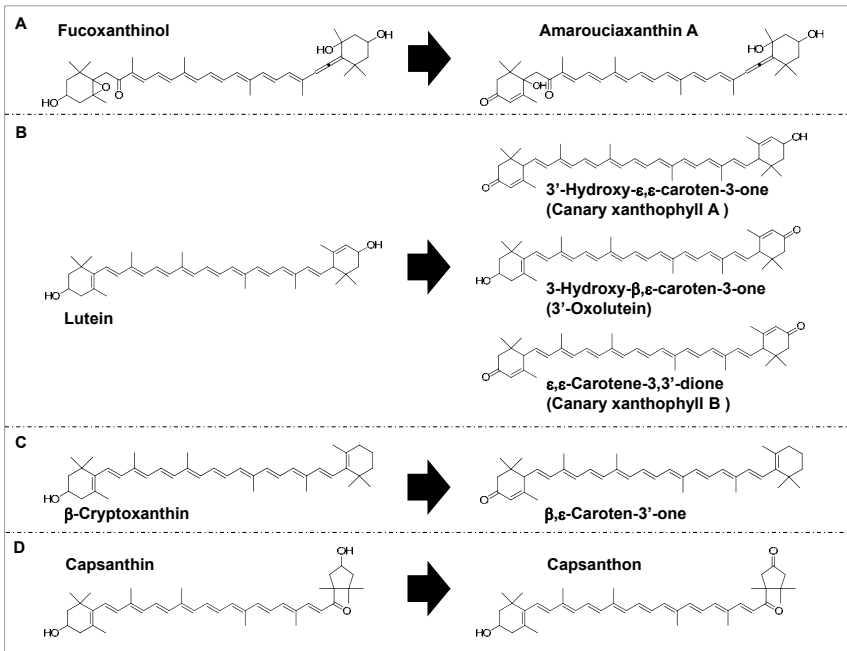


図 10 カロテノイドとその酸化代謝産物

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- $\epsilon, \epsilon$ -caroten-3-one,  $\epsilon, \epsilon$ -carotene-3,3'-dione) が著しく蓄積し<sup>119)</sup>、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<sup>120)</sup>。 $\beta$ -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  $\beta, \epsilon$ -carotene-3'-one (図 10C) の増加が認められている<sup>17)</sup>。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<sup>121)</sup>。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- $\beta$ -carotene の経口投与後、4-keto- $\beta$ -carotene と canthaxanthin が血漿中に見出された<sup>122)</sup>。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,  $\beta$ -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  $\beta$ -cryptoxanthin、これらの代謝産物 3 種類 (3'-hydroxy- $\epsilon, \epsilon$ -caroten-3-one,  $\epsilon, \epsilon$ -carotene-3,3'-dione,  $\beta, \epsilon$ -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<sup>17)</sup>。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  $\epsilon, \epsilon$ -carotene-3,3'-dioneの方が 3'-hydroxy- $\epsilon, \epsilon$ -caroten-3-one よりも強かった。 $\beta$ -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  $\beta, \epsilon$ -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  $\alpha, \beta$  不飽和カルボニル構造がある。Lutein 及び  $\beta$ -cryptoxanthin と同じ環状構造を有する 3-hydroxy- $\beta$ -damascone と、代謝産物と同じ  $\alpha, \beta$  不飽和カルボニル構造を有する 3-oxo- $\alpha$ -damascone の抗炎症作用を比較した研究が報告されている<sup>123)</sup>が、3-oxo- $\alpha$ -damasconeの方が強い効果を示す。 $\alpha, \beta$  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,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -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<sup>9-12)</sup>。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<sup>10)</sup>。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- $\epsilon, \epsilon$ -caroten-3-one に効果が認められた<sup>124)</sup>。

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<sup>125)</sup>。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- $\alpha$  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.  $\beta$ -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  $\beta$ -end group in xanthophylls is preferentially oxidized to a 3-oxo  $\epsilon$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -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  $\beta$ -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., Micoléa, 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. Acyclo-retinoic 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  $\beta$ -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- $\epsilon$ ,  $\epsilon$ -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).

