

厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する基礎的研究

平成 16 年度～18 年度 総合研究報告書

主任研究者 柴田 克己

I. 総合研究報告

9. カロテノイドの必要量

分担研究者 寺尾 純二 徳島大学大学院 教授

研究協力者 板東 紀子 徳島大学大学院 教務員

要旨

植物性食品に普遍的に含まれるカロテノイドは食事から吸収され組織に蓄積する。このうち、プロビタミン A として機能するのはわずかであり、多くはそのままの構造で吸収蓄積して酸化ストレス抵抗性の増強や免疫賦活活性の増強などの機能を発揮すると考えられている。一方、ヒト介入試験において β -カロテン大量摂取が発がんを誘発する可能性が示唆されたことから、日常摂取するカロテノイドの必要量を明らかにすることが急務である。そこで、本研究はヒトでのカロテノイド摂取が生体の酸化ストレス抵抗性にどのように影響するかを定量的な観点から明らかにすることを目的とした。まず 16 年度はマウスへの β -カロテンおよびリコペン長期摂取実験を行い、組織からの両者の高感度 HPLC 分析法を確立した。17 年度はヒトの血漿リポタンパクである LDL と HDL それぞれに蓄積したカロテノイド（とくに β -カロテン、ルテイン、リコペン）の簡便な定量法および LDL と HDL の酸化反応系を確立した。さらに 18 年度は HDL へのルテインの取り込み挙動を β -カロテンの場合と比較するとともに、LDL、HDL の酸化安定性に対する β -カロテンおよびルテインの影響を検討した。その結果、ヒト血漿ルテインと β -カロテン両者を添加した場合、HDL にはルテインのみが取り込まれたが、HDL の被酸化性にはルテインの取り込みは影響しなかった。一方、LDL では β -カロテンの取り込みにより酸化安定性の低下がみられた。しかしヒト摂取実験では β -カロテンの LDL への蓄積は被酸化性に影響しなかった。HDL にはルテインが選択的に蓄積したが、この場合も被酸化性には影響しなかった。以上の結果から、 β -カロテンおよびルテインを食事成分として大量摂取した場合（30 mg/日程度）には、血漿に移行したそれぞれのカロテノイドがプロオキダントとして害作用をもたらす可能性は低いと考えられた。

A. 目的

カロテノイドは植物性食品素材に普遍的に含まれる機能性物質である。その種類は500種を越えるが、プロビタミンAとして機能するのはわずかである。一方、ヒトは食事由来の多様なカロテノイドを吸収するとともに、そのままの形態で組織に蓄積することが知られている。これらの中には抗酸化活性や免疫賦活活性などにより生体に様々な生理効果をもたらすものが多いが、代表的なカロテノイドであるβ-カロテンの大量摂取は喫煙者に肺ガンを誘発したとするヒト介入試験結果も報告されている。この場合、血漿β-カロテン濃度は有効に生理機能を発揮する場合の3-5倍の上昇に過ぎない(図-1)。したがって、遺伝要因や環境要因が異なるヒトの多様な集団において食品から摂取すべきカロテノイドの質と量を明らかにする必要がある。第七次改定日本人の食事摂取基準策定ではカロテノイドの摂取量に関する踏み込んだ結論は得られていない。カロテノイドは生体内の低酸素分圧(15torr)では抗酸化活性を示すが、高酸素分圧(760torr)では逆に酸化を誘導するプロオキシダントとして作用することが報告されている。β-カロテンは培養細胞において酸化促進作用を発揮することも示されている。ヒトにおいて少量のカロテノイド摂取ではアンチオキシダントとして働くが、大量のカロテノイドを摂取した場合にはプロオキシダントとして作用する可能性がある。ただし、食品成分としてカロテノイドを大量摂取した場合、吸収されたカロテノイドが血液中で酸化促進的に働くのか、あるいは抗酸化的に働くのかについては明らかではない。そこで、今回のプロジェクト

トは抗酸化作用あるいは酸化促進作用の面からヒトにおけるカロテノイドの適切な必要量を明らかにすることを目的とする。そこで血漿におけるカロテノイドの作用を明らかにするために、ヒト血漿リポタンパク(HDL および LDL)の酸化反応系を確立することを試みた。次に血漿カロテノイドの機能発現のための必要量と安全摂取量を明らかにすることを目的として、通常以上の多量なカロテノイドの摂取が血漿リポタンパクの酸化安定性に与える影響をヒトボランティア試験により検討した。

B. 研究方法

動物飼育

Hos・HR-1ヘアレスマウス(♂, 8週令)(日本SLC)を実験動物として用い(n=5), 飼育は25°C, 12時間の明暗サイクルの条件下で行った。飼料はカロテノイドの吸収を高めるために0.25%のタウロコール酸を添加した20%カゼイン食に0.05%のリコペンまたはβ-カロテンを混合して作成した。この試験食をリコペンは5週間、β-カロテンは4週間自由摂取させた後、麻酔下で脱血屍殺し、背部皮膚とその他の臓器を摘出した。これらの臓器を9倍量のPBSを加えてホモジナイズし、調製したホモジネートは分析に供するまで-20°Cで保存した。採取した臓器のうち脾臓、心臓、精巣、眼球は小さく個別別にカロテノイドの蓄積量を測定するには不可能であるためプールしてホモジナイズした。

組織中のカロテノイド分析

ホモジネート0.5~1mlをネジ栓付試験管にとり、内部標準と、10μlの10mMBHT/ヘキサンを加えた。このサンプルに3mlのメ

タノール/ジクロロメタン(2:1v/v)を加えて vortex して脂質画分を抽出し、次いでヘキサン 2ml を加えて激しく攪拌した後、4°Cで、3000rpm x 5 分遠心を行った。得られたヘキサン層を濃縮し、酢酸エチルを 500 μ l 加えて残渣を溶解し HPLC の分析に供した。内部標準として、リコペンの定量には α -カロテンを、 β -カロテンの定量には 8-アポカロテナールを用いた。分析条件を以下に示す。移動層：リコペン(メタノール/酢酸エチル; 7:3, v/v), β -カロテン(メタノール/アセトニトリル/ジクロロメタン/水; 7:7:2:0.16v/v), 検出波長：リコペン(470nm), α -カロテン(450nm), 流速：1ml/min, カラム：TSKgel ODS-80Ts (4.6x250mm)(TOSOH Co., Japan)で行った。

血漿リポタンパクのカロテノイド分析

ヒト新鮮血から得た血漿を密度勾配遠心法により調製した LDL および HDL 100 μ L に内部標準として 8-アポカロテナールを添加した。攪拌後、イソプロパノール/ジクロロメタンを 300 μ L 及び氷酢酸 2.5 μ L を加えて遠心分離し、上清をそのまま HPLC 分析に供した。HPLC 分析条件を以下に示す。移動層：アセトニトリル/メタノール/ジクロロメタン; 7:2:1, v/v/v, 検出波長：450nm, 流速：1.0 ml/min, カラム：TSKgel ODS-80Ts (4.6 x 250mm)(TOSOH Co., Japan)で行った。

血漿リポタンパクの酸化反応

LDL あるいは HDL の P B S 溶液 (0.2mg protein/ml) にアゾラジカル発生剤(AAPH ; 0.2mM)を添加して、37°Cでインキュベーションした。一定時間後の反応液をとり、TBARS 測定および脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)測定 (ロダン鉄法) を行った。

LOOH 測定には測定キットを用いた。

ヒト血漿に対する β -カロテンおよびルテイン添加実験 (in vitro 実験)

ヒト新鮮血から得た血漿に 5 μ M の β -カロテンおよびルテインを添加し、37°Cで1時間インキュベーション後密度勾配遠心法にて LDL と HDL 画分を調製した。リポタンパクに蓄積したカロテノイドを逆相 HPLC にて定量した。リポタンパクの被酸化性を評価するために LDL あるいは HDL の P B S 溶液 (0.2mg protein/ml) にアゾラジカル発生剤(AAPH ; 0.2mM)を添加して、37°Cでインキュベーションした。6時間反応後の反応液をとり、前述の LOOH 測定を行った。

ヒトによる高カロテノイド含有食品摂取実験 (ex vivo 実験)

健康人被験者 (24才男性) は摂取1週間前からサプリメント類を摂取禁止し、緑黄色野菜の摂取も極力さけた。実験開始から1日160ml 缶入りニンジンジュース3缶 (トータルで β -カロテン 31.2mg 摂取) あるいは1日ほうれん草ピューレ450g (トータルで β -カロテン 22.3mg, ルテイン 35.0mg) を1週間連続摂取させた。採血後、上記と同じ方法で血漿 LDL, HDL 画分を得て、カロテノイド蓄積量を測定するとともに、アゾラジカル発生剤を用いた酸化反応を行った。

C. 結果と考察

リコペンの分析条件の検討と各種臓器におけるリコペンと α -カロテンの蓄積

サンプルの前処理を図2に示した。組織ホモジネートから塩化メチレン・メタノー

ルで抽出し、ヘキサンを加えて二層分配した後、ヘキサン層を濃縮し、HPLC分析用の試料とした。また作成した標準曲線によるリコペンの検出限界は 0.16pmol という高感度であった。また、HPLC分析に要する時間も 16分と短時間であり、多量の試料を簡便にかつ短時間に分析定量できた。他のカロテノイドも本分析法で定量可能と思われた。0.05%のリコペンを含む飼料を5週間摂取したマウスにおいて、肝臓を始めとする各種臓器に摂取カロテノイドの蓄積が認められた。新鮮重量あたりの蓄積は肝臓で顕著であり、次いで皮膚に高濃度に蓄積していた。また、微量ではあるが眼球、脾臓にもそれぞれ 0.9pmol/wet weight, 1.0pmol/wet weight 蓄積が確認された。□-カロテン添加飼料を4週間摂取したマウスの肝臓、皮膚、腎臓、脳における蓄積は飼料摂取期間がリコペン摂取より短いにもかかわらず、すべての期間でリコペンより高濃度であった(表-1)。

ヒト血漿リポタンパクのカロテノイド分析

HPLCによるヒト血漿のカロテノイド分析結果を図-3に示した。対象としたβ-カロテン、リコペン、ルテイン/ゼアキサンチンを分離定量できた。標準曲線を用いたリポタンパク中のカロテノイド定量結果からLDLにはβ-カロテンが、HDLにはルテイン/ゼアキサンチンが多く含まれることが確認された。したがって、それぞれのリポタンパク質における主な作用カロテノイドはβ-カロテンとルテイン・ゼアキサンチンであると考えられた。

血漿リポタンパクの酸化反応

LDL, HDLともにLOOH測定では一定の誘導期の後に酸化反応が促進することが示されたが、LDLに比べてHDLのLOOH蓄積はゆるやかであった(図-4)。これはHDLの方が酸化基質である脂質含量が少ないためと考えられた。本法により両リポタンパク質の被酸化性を簡便に評価できることがわかった。

ヒト血漿に対するβ-カロテンおよびルテイン添加実験 (in vitro 実験)

用いたヒト血漿リポタンパクにおいてLDLではルテインに比べβ-カロテンが多く存在し、HDLでは同程度存在した。血漿に添加した場合、ルテインはLDL, HDLともに蓄積したのに対し、β-カロテンはLDLのみに蓄積した(図-5)。したがって、外部から添加した場合、ルテインの方が両リポタンパクともに蓄積されやすいことが明らかである。アゾラジカル発生剤を用いたLDL, HDLの被酸化性に対するそれぞれのカロテノイド添加の影響を図-6に示した。β-カロテンが蓄積しやすいLDLでは酸化促進作用がみられたが、ルテインではLDL, HDLともに促進作用はみとめられなかった。血漿へのβ-カロテンの添加濃度である5μMはヒトへの高カロテン摂取介入試験で報告されている血漿濃度範囲である。したがって、β-カロテンは大量摂取によりLDLに対してプロオキシダントとして作用する可能性が示された。一方、ルテインは同様に摂取してもプロオキシダント作用は起こりにくいと思われる。

ヒトによる高カロテノイド含有食品摂取実験 (ex vivo 実験)

ニンジンジュースを摂取した場合、 β -カロテンはLDLの方がHDよりも蓄積しやすいことが確認された(図-7)。なお、LDLへの蓄積量は*in vitro*実験の場合とほぼ同じであった。一方、被酸化性を示すLOOH生成量にはLDL、HDLともに相違はみられなかった。したがって、今回設定した量のニンジンジュース摂取では上記の*in vitro*実験で示されたLDLのプロオキシダント作用はおこらないと思われた。ほうれん草ピューレ摂取では、LDL、HDLともにルテイン含量は増加したが、 β -カロテン含量は変化しなかった(図-8)。この原因は不明であるが、ルテインの共存が β -カロテンの吸収蓄積を抑制した可能性が考えられた。LDL、HDLともにルテイン含量の増加は被酸化性に影響しなかった。したがって、ルテインの大量摂取は血漿リポタンパクの被酸化性に影響しないと考えられた。今回の実験における β -カロテン、ルテイン摂取量はヒト介入試験で発ガン促進作用がみられた摂取量に近いレベルである。しかし、血漿濃度は数分の1である(0.8-1.2 μ M)。さらに多くの実験を積み重ねる必要はあるものの、今回の結果から食事成分としてのカロテノイドを大量摂取しても血漿にプロオキシダント作用が起こる可能性は低いと思われた。

結論

カロテノイドは植物性食品(野菜・果物)あるいはそれらの加工品(飲料、ピューレなど)から摂取する場合にはサプリメントのヒト介入試験でみられた害作用は起こりにくい。食品からの摂取の場合には、30mg/day程度大量摂取してもサプリメントに比べて血漿濃度が低く保たれることがそ

の理由のひとつと考えられた。

E. 研究発表

1. 発表論文

○板東紀子, 寺尾純二 サプリメントデータブック(吉川敏一, 桜井弘編) III-11 キサンフィル, III-12 カロテノイド (pp.359-374 オーム社, 2005)

2. 学会発表

○斎藤聡美, 板東紀子, 南裕子, 徳島沙知, 稲熊隆博, 寺尾純二「ヘアレスマウスにおける摂取リコペンの臓器への蓄積: UVA照射の影響」

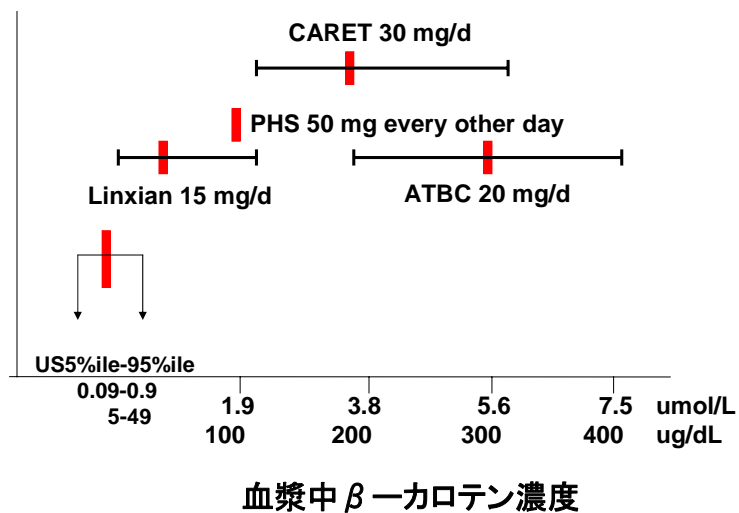
2004年度日本農芸化学会中四国支部大会:
2004年9月17日: 徳島大学

○瀬戸山真理, 板東紀子, 南裕子, 林宏紀, 寺尾純二「UVA照射により誘導される皮膚の酸化障害に対するリコペンの作用」第10回日本フードファクター学会 2005年11月24日 岡山大学]

○中嶋いく子, 関戸啓子, 寺尾純二「HDLの酸化安定性と抗酸化機能に及ぼす β -カロテンおよびルテインの影響」平成18年度日本栄養食糧学会中国四国支部大会(2006年10月28日 徳島)

G. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許予定
なし
3. 実用新案登録
なし
4. その他
なし



From Dr. S. Watanabe

図1. ヒト介入試験におけるβ-カロテン摂取量と血漿カロテン濃度の関係

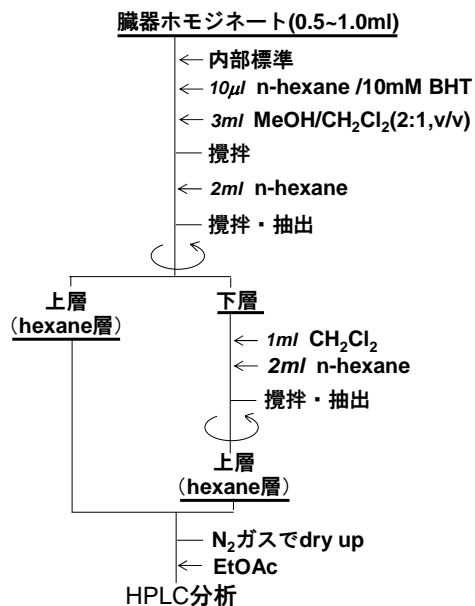


図2. カロテノイド分析用試料の調製方法

表1. リコペンとβ-カロテンの蓄積量

リコペン		β-カロテン	
pmol/wet tissue		pmol/wet tissue	
肝臓	1238±539	肝臓	2010±550
皮膚	71.0±11.1	皮膚	1647±349
脾臓	67.4±52.4	腎臓	57.2±7.4
腎臓	7.2±2.9	脳	2.6
脳	2.4±1.5		
精巣	2.3		
心臓	2.1		
膵臓	1.0		
眼球	0.9		

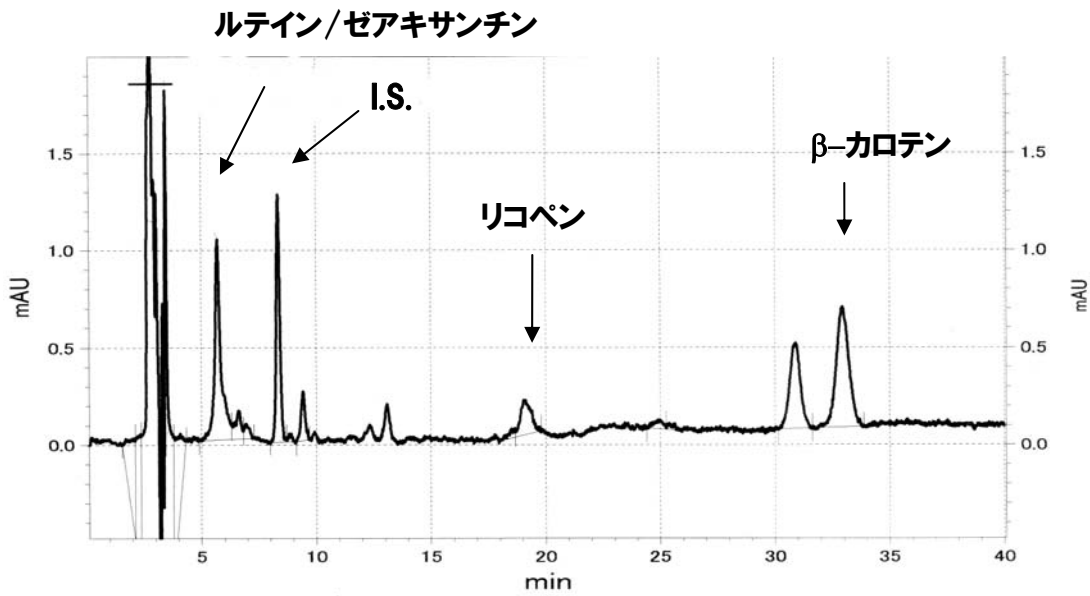


図3. HPLCによるヒト血漿のカロテノイド分析クロマトグラム
内部標準には8-アポカロテナールを用いた.

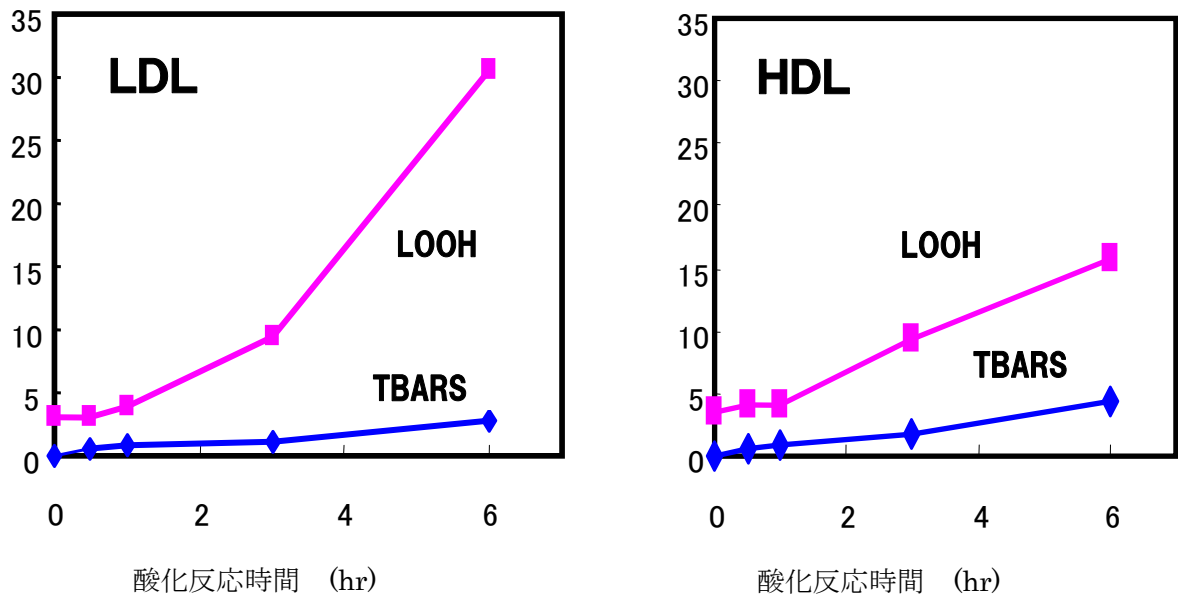


図 4. アゾラジカル発生剤によるヒト血漿 LDL と HDL の酸化反応の経時変化
 LOOH (脂質ヒドロペルオキシド) TBARS (T B A 反応性物質)
 (縦軸の単位は nmol/mg protein)

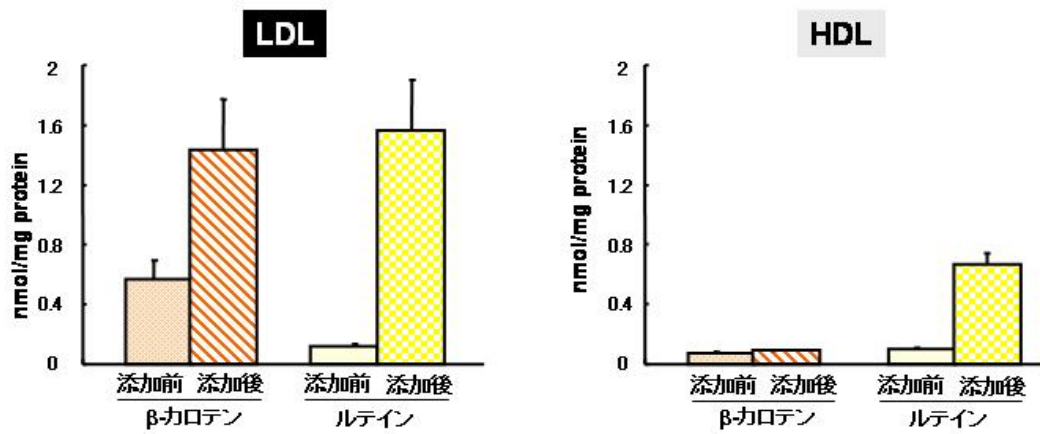


図 5. β-カロテンおよびルテインの血漿への同時添加によるリポタンパクへの分布蓄積

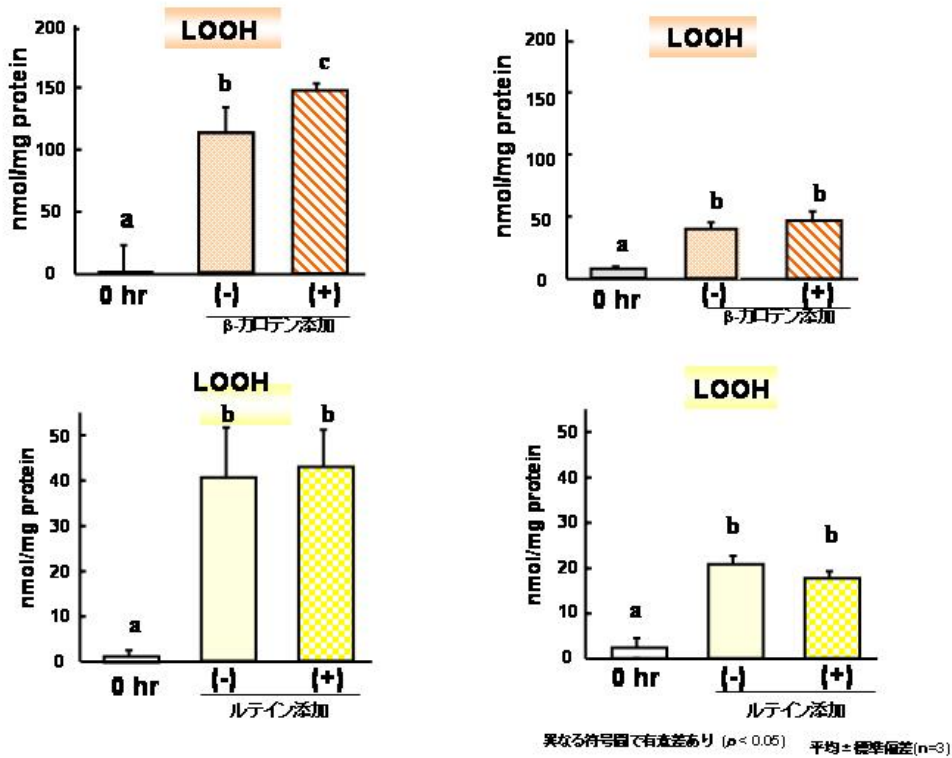


図 6. LDL と HDL の被酸化性に対する添加 β-カロテンおよびルテインの影響

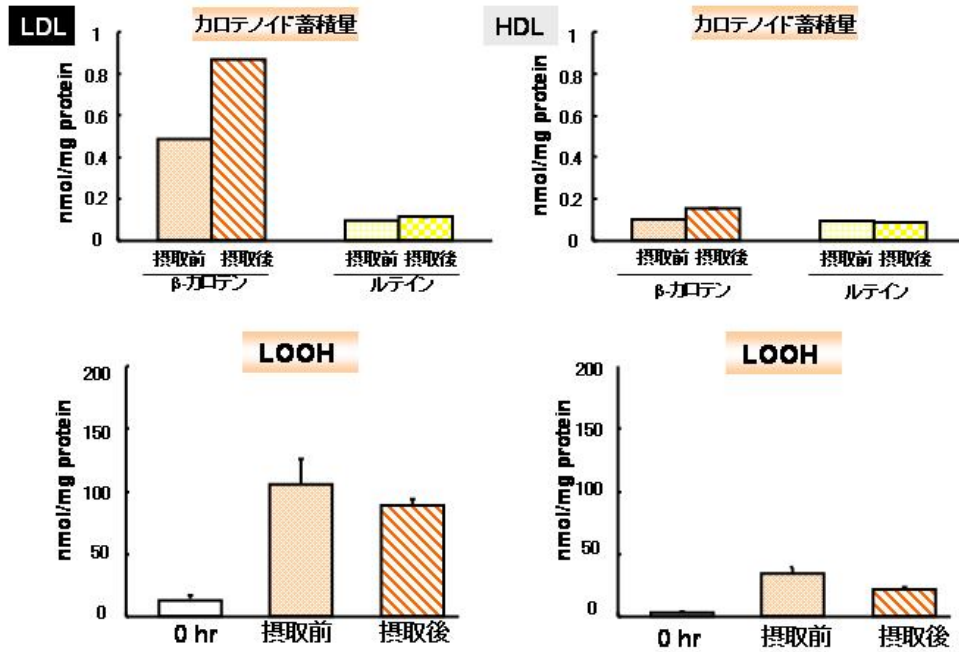


図 7. LDL および HDL の酸化安定性に対するニンジンジュース摂取の影響

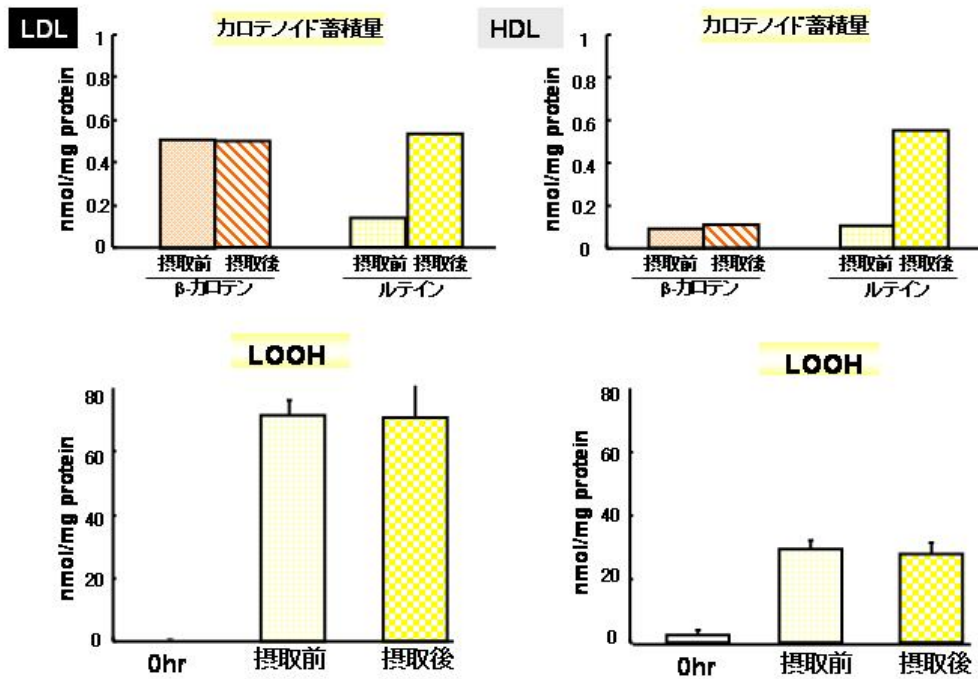


図 8. LDL および HDL の酸化安定性に対するほうれん草ピューレ摂取の影響