平成 16 年度厚生労働科学研究費（循環器疾患等総合研究事業）
日本人の食事摂取基準（栄養所要量）の策定に関する研究
主任研究者　柴田　克己　滋賀県立大学　教授

Ⅲ．分担研究者の報告書

カロテノイドの必要量

分担研究者　　寺尾純二　徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部　教授
研究協力者　　板東紀子　徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部　教務員

研究要旨
　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，多くは抗酸化活性や免疫賦活活性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質と量を明らかにする必要がある．そこで，ヒトでのカロテノイド摂取と体内蓄積および活性発現を解析することを目標として，本年度はマウスへの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．さらにリコペンは肝臓や脾臓，皮膚に大量に蓄積するが，その他の組織（例えば脳，眼球）にも少量蓄積することが明らかになった．これらのデータはヒト実験における対照値として今後利用したい．

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可能性があるものが多い．ところが，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．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．今回の日本人の食事摂取基準策定（2005年版）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．そこで，今回のプロジェクトはプロビタミンAおよびその他の生理作用の面からヒトにおけるカロテノイドの必要量を明らかにすることを目的とする．とくに本年度は次年度以降のヒトボランティア実験に先だって，血漿や組織からのカロテノイドの分析方法を確立する．さらに，実験動物マウスを用いて摂取カロテノイドの各臓器への蓄積量を明らかにすることで，今後のヒト摂取実験の対照データとして利用したい．

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℃，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[1)]．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．採取した臓器は氷冷した生理食塩水で洗浄した後，ろ紙で水分を除去して重量を測定した．これらの臓器を9倍量のPBSを加えてポリトロンホモジナーザーまたはポッター型ホモジナイザーでホモジナイズし，調製したホモジネートは分析に供するまで－20℃で保存した．採取した臓器のうち膵臓，心臓，精巣，眼球は小さく個体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．

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(2:1，v/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℃で，3000rpm×5分遠心を行い2層分離した．上層のヘキサン層を褐色のバイアル瓶に移し，下層には再び1mlのジクロロメタンと2mlのヘキサンを加えて再抽出した．得られたヘキサン層を先のヘキサン層と合わせチッソガスで乾固し，これに酢酸エチルを500μl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β-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)，β-カロテン(450nm)，流速：1ml/min，カラム：TSKgel ODS-80Ts (4.6×250mm)(TOSOH Co., Japan)で行った．リコペンはリコペンとβ-カロテンの比から，β-カロテンはβ-カロテンと8-アポカロテナールのモル比から標準曲線を作成し蓄積量を求めた．

C. 結果および考察

リコペンの分析条件の検討

サンプルの前処理を図1に示している．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．分析の一例を図2に示した．また作成した標準曲線よるリコペンの検出限界は0.16pmolであった．

各種臓器におけるリコペンとβ–カロテンの蓄積

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，膵臓にもそれぞれ 0.9pmol/wet weight，1.0pmol/wet weight 蓄積が確認された．β-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）．

D.　考察

本研究はカロテノイドの必要量を明らかにすることを目的として組織のリコペン分析法を検討し，確立した分析方法に従いリコペン摂取マウスの各種臓器の蓄積量を測定した．確立したリコペンの検出限界は 0.16pmol 以下という高感度であり，蓄積量の少ない心臓，膵臓，眼球においても定量することができた．しかしながら蓄積量については採取臓器に僅かながら残存する血液由来のカロテノイドを含む可能性がある．リコペンの HPLC 分析に供する試料はβ-カロテン試料と同じヘキサン・ジクロロメタンの 2 層分離法で調製できる．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，すでに分析方法が確立されている®–カロテンの分析結果との比較も可能である[2)]．他のカロテノイドも本分析法で定量可能と判断できる．また，本年定量した各種臓器への蓄積量の結果は次年度以降に定量するヒト血漿濃度からヒト臓器への蓄積量を推定するための基礎データとして用いることにした．

E.　研究発表

１．発表論文

なし

２．学会発表

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

F.　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

G. 引用文献

1. Umegaki K, Aoshima M, Hirota S, Esashi T. Simultaneous dietary supplementation of sodium cholate and beta-carotene markedly enhances accumulation of beta-carotene in mice. *J Nutr* (1995) 125, 3081-3086.
2. Bando N, Yamanishi R, Terao J. Inhibition of immunoglobulin E production in allergic model mice by supplementation with vitamin E and β-carotene. *Biosci Biotechnol Biochem* (2003) 67, 2176-2182.

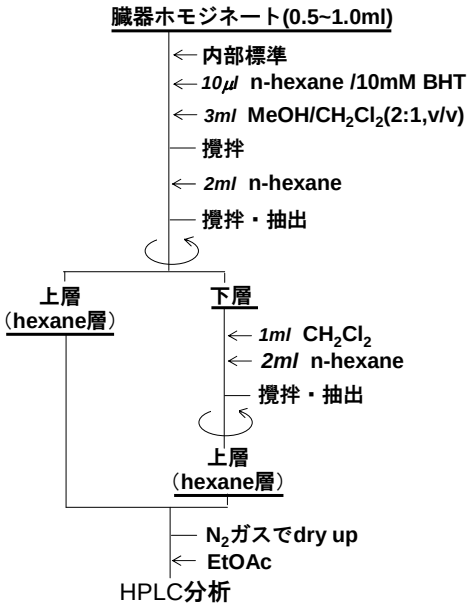

図１．カロテノイド分析用試料の調製方法
内部標準は，リコペン分析にはβ-カロテンをβ-カロテン分析には 8-アポカロテナールを用いた．

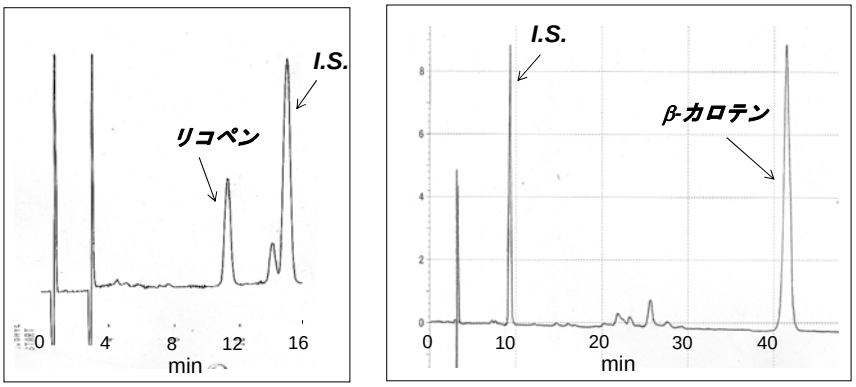

図２．代表的なリコペンとβ-カロテンの HPLC パターン

表1．リコペンとβ－カロテンの蓄積量

リコペン	pmol/wet tissue
肝臓	1238±539
皮膚	71.0±11.1
脾臓	67.4±52.4
腎臓	7.2±2.9
脳	2.4±1.5
精巣	2.3
心臓	2.1
膵臓	1.0
眼球	0.9

β－カロテン	pmol/wet tissue
肝臓	2010±550
皮膚	1647±349
腎臓	57.2±7.4
脳	2.6