

平成 17 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

6. 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質と量を明らかにする必要がある。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する。本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（特に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。さらに抗動脈硬化作用との関連で注目されている HDL の抗酸化作用の評価手法の開発にも取り組んだ。これらの研究成果は次年度に実施予定の *in vitro*, *ex vivo* でのカロテノイドの抗酸化作用あるいは酸化促進作用評価のための基礎となるものである。

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。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。そこで、今回のプロジェク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。とくに本年度は次年度のヒトボランティア実験に先だって、ヒト血漿リポタンパクに存在するカロテノイドの分析方法を確立する。さらにカロテノイドが血漿において抗酸化剤から酸化促進剤に遷移する濃度を明らかにするために、HDL および LDL の酸化反応系を確立することを試みた。

B. 研究方法

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HDL100μLに内部標準として8-apocarotenalを添加した。攪拌後、isopropanol/dichloromethaneを300μL及び氷酢酸2.5μL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PBS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℃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(Budge&Aust法)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。

HDLの抗酸化作用の評価

リポタンパクの酸化反応で生成するLOOHとして、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)とコレステロールエステルヒドロペルオキシドは光増感反応を用いる常法により調製した。酸化LDLそのものは上記のAAPHによる酸化反応を利用して作成した。

C. 結果

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1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ることが明らかである。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。

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。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。

HDL の抗酸化作用の評価

PCOOH, CEOOH 及び酸化 LDL を調製した。現在, 酸化 LDL に対する HDL の作用を評価するための実験系を検討している。さらに LOOH に対する HDL の作用についても我々が開発した DPPP-TLC プロットを用いた評価法を試みているところである。

D. 考察

血漿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, まずヒト血漿リポタンパクに蓄積するカロテノイドの定量法を確立し, その分析法を用いて従来知られている LDL への β -カロテン, HDL へのルテイン・ゼアキサンチンの優位な蓄積を再確認した。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る。アゾラジカル発生系を用いた LDL および HDL の被酸化性評価方法を確立できたので, 次年度は本評価系を用いてリポタンパクの被酸化性に対するカロテノイドの影響の評価を行うことに決定した。さらに HDL が有する抗酸化作用としてパラオキシナーゼ-1(PON-1)活性に着目し, 酸化 LDL に働く PON-1 作用である

PC-OOH, CEOOH の直接還元反応(ペルオキシダーゼ活性)と加水分解反応(ホスホリパーゼ活性)を評価する手法を検討しているところである。手法が確立次第, HDL の抗酸化作用に対するカロテノイドの影響を検討したい。

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-タブック(吉川敏一, 桜井弘編) III-11 キサントフィル, III-12 カロテノイド (pp.359-374 オーム社, 2005)

2. 学会発表

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]

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

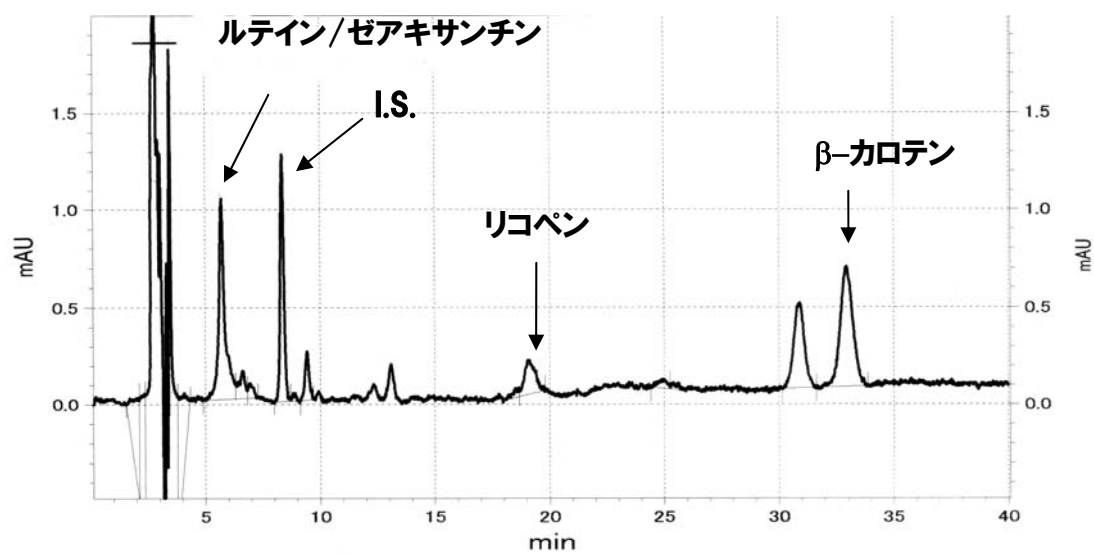


図1. HPLCによるヒト血漿のカロテノイド分析クロマトグラム
内部標準には8-アポカロテナールを用いた。

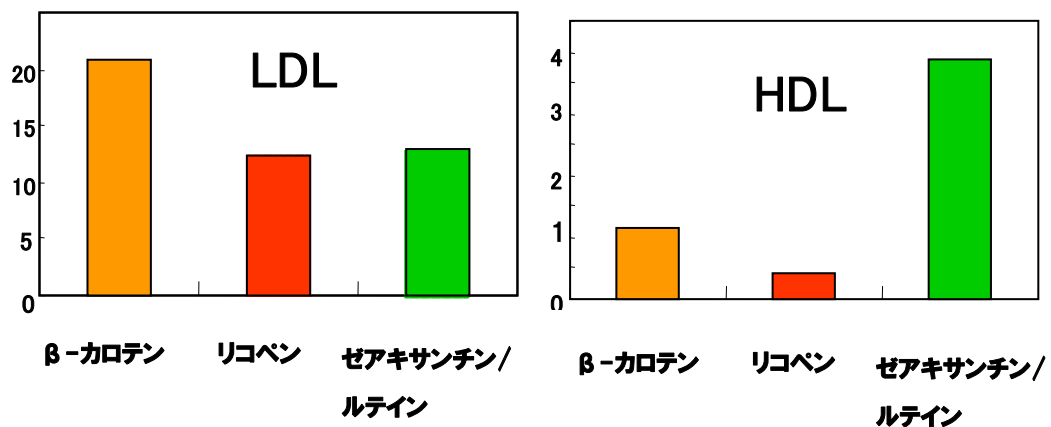


図 2. ヒト血漿 LDL と HDL のカロテノイド分布
(縦軸の単位は nmol/mg protein)

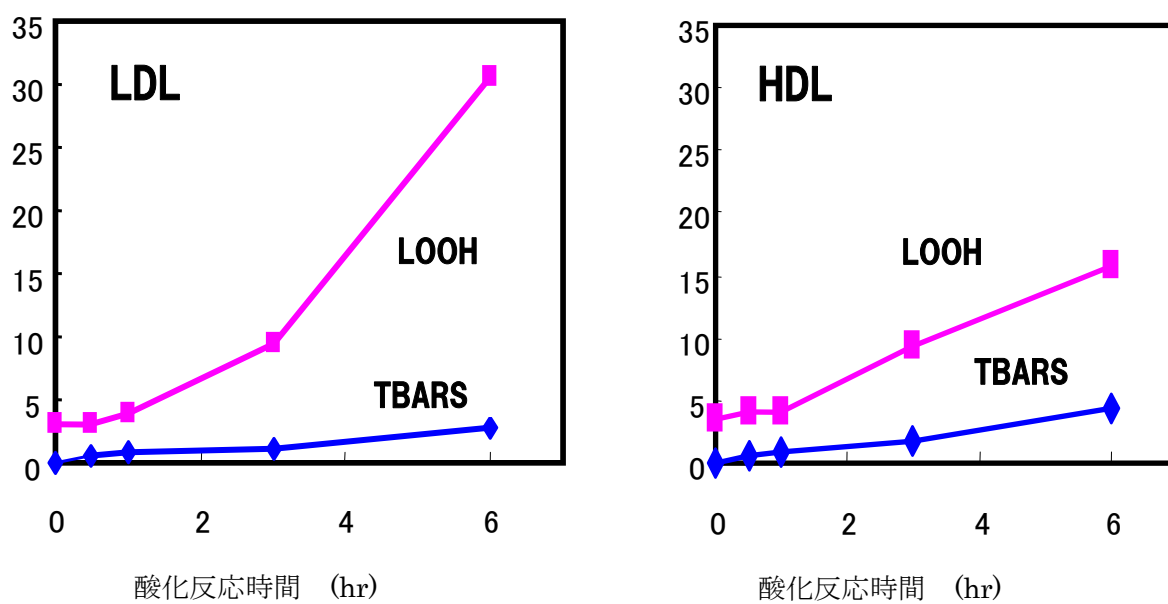


図-3 アゾラジカル発生剤によるヒト血漿 LDL と HDL の酸化反応の経時変化
LOOH (脂質ヒドロペルオキシド) TBARS (TBA 反応性物質)
(縦軸の単位は nmol/mg protein)