

卵黄カロテノイドの栄養機能性

北海道大学大学院水産科学研究院・教授 宮下 和夫

■ 緒 言

ルテインは生物生産量の最も多いカロテノイドの一つであり、緑色野菜中に多く見出される。卵黄脂質中にも飼料由来のルテインが含まれている。ルテインは、網膜や水晶体中の主要カロテノイドとして、眼の機能維持に不可欠である。卵黄からのルテインの摂取は、野菜からの摂取と比較して、より吸収されやすいことが知られている¹⁾。これは、ルテインが、卵黄中のリン脂質、トリアシルグリセロール(TG)、コレステロールなどと吸収されやすい混合物を形成するためとされている²⁾。また、卵黄中には飼料由来の種々のカロテノイドも含まれる。例えば、鶏の飼料として褐藻粉末を15%程度混合すると、卵黄脂質中に褐藻カロテノイドの代謝物で、抗肥満作用や抗糖尿病作用を有するフコキサンチノールの蓄積が報告されている³⁾。このように、卵黄脂質中にはその機能が期待される飼料由来の種々のカロテノイドが含まれており、その吸収性は野菜から摂取するよりも高い。さらに、卵黄脂質には、機能性成分としてのリン脂質や多価不飽和脂肪酸も含まれている。しかし、卵黄脂質の栄養機能性に関しては、卵黄中に含まれるコレステロールの悪影響のみがこれまで強調されていた。ただ、食事由来コレステロールの影響については、その量が極端に多くなければ健康に対する影響はほとんどないことが栄養学的には常識となっている。したがって、卵黄脂質の栄養機能性についても見直す必要があると考えられ、特に、卵黄に含まれる種々のカロテノイドの栄養機能性に関して、従来のように、その抗酸化性のみに着目するのではなく、分子栄養学的な観点からの生物活性の検討が期待されている。

そこで、本研究では、卵黄脂質に含まれるルテインなどのカロテノイドに着目し、その栄養機能性を、動物実験と培養細胞を用いて検討した。

■ 方 法

1) 試料の調製と分析：

- ①卵黄脂質の調製：鶏卵は函館近郊の農家から購入した。餌にはトウモロコシを主として与えたが、葉物野菜も使用した。鶏卵から得た卵黄からクロロホルム/メタノール混合溶液を用いて脂質を抽出した。
- ②卵黄カロテノイドの調製と分析：卵黄から脂質を抽出し、アセトン/*n*-ヘキサン(3:7, v/v)を溶出溶媒としたシリカゲルのオープンカラムクロマトグラフィーにより、卵黄カロテノイドを分取した。得られた卵黄カロテノイドの組成をHPLCにより分析した。
- ③HPLC分析：検出波長は250-700nmの範囲とした。固定相にはDevesoil ODS-UG-5カラム(4.6 i.d. × 250mm ; 5.7mm particle size、野村化学(株))を用いた。カラム温度は25°Cに設定した。移動相には、アセトニトリル、メタノール、酢酸エチル、蒸留水を用い、それぞれの溶媒比を変化させて試料の分析を行った。ルテイン、ゼアキサンチン、ピオラキサンチン、ネオキサンチンなどを購入または調製し、それぞれについて内部標準(パラレッド)を用いて検量線を作成した。検量線に基づき各カロテノイドの含量を分析した。

2) 動物実験：

卵黄脂質の機能性について動物を用いて以下の項目について評価した。

- ①脂質代謝改善関連：血中及び肝臓中の脂質量の測定、肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の発現解析。
- ②抗肥満関連：体重増減、脂肪組織重量、各組織中の肥満代謝関連遺伝子の発現解析。
- ③抗糖尿病関連：血糖値、インスリン量の測定、糖代謝関連遺伝子の発現解析。

3) 培養細胞実験：

HPLCにより検出できた各卵黄カロテノイドの機能性について、脂肪細胞を用いて、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化抑制能や脂肪蓄積抑制能の評価と関連遺伝子の発現解析を行った。

■ 結果

1) 試料の調製と分析：

卵黄から有機溶媒により、乾燥卵黄あたり約 35%の脂溶性画分(卵黄脂質)が抽出できた。卵黄脂質の組成を分析したところ、以下ようになった(数値は鶏卵 10 個の平均値)。TG:65.5%、ホスファチジルコリン:24.2%、ホスファチジルエタノールアミン:3.0%、その他リン脂質 :1.0%、コレステロール:5.0%、その他脂溶性成分:1.3%。

卵黄カロテノイドを HPLC で分析したところ、主要なカロテノイドはルテインで、分析した異なる鶏卵(n=10)中、 75.0 ± 12.2 mg/kg 脂質含まれていた。その他、ゼアキサンチン、ネオキサンチン、ビオラキサンチン及びルテインとネオキサンチンの代謝物と考えられるピークが検出された。

卵黄脂質中の主要脂肪酸の脂肪酸全体に占める割合(平均値)は以下ようになった。16:0:25.0%、16:1n-7:1.5%、18:0:11.1%、18:1n-9:28.4%、18:2n-6:18.8%、20:4n-6:3.3%、22:6n-3:5.3%。

2) 動物実験：

卵黄脂質中には約 5%のコレステロールが含まれている。したがって、血中脂質中の LDL コレステロールの増大が懸念される。一方、卵黄脂質の主要成分であるリン脂質や脂肪酸に 5%程度含まれる DHA には血中脂質改善作用のあることが知られている⁴⁾。そこで、ラット(Wistar;3 週齢の雄)に飼料(AIN93G)脂質(10%)の 1%と 2%を卵黄脂質に置換して、4 週間飼育した。その結果、表 1 に示したように、血中のコレステロール上昇は見られず、逆に総コレステロールや TG 含量は有意に減少した。さらに、肝臓中の総脂質含量も卵黄脂質投与により有意に減少し、また、肝臓中の TG やコレステロール含量も卵黄脂質投与で減少傾向を示した。(表 2)

食餌性のコレステロール含量が高い場合、肝臓中でのコレステロール代謝系がコントロールされる。また、リン脂質や DHA の肝臓脂質代謝系への影響も考えられる。そこで、肝臓の脂質代謝系遺伝子について解析したところ、コレステロールの合成に関わる酵素(HMG-CoA 還元酵素、CYP51、ACAT)の遺伝子発現については卵黄脂質投与による有意な変化は見られなかったが、胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 発現の有意な増大が、卵黄脂質 2%投与グループで見られた。一方、脂肪酸合成に関わる遺伝子(FAS と SCD1)や分解に関与する遺伝子(CPT1 と CPT2)については、分解系の遺伝子が卵黄脂質 2%投与で有意に増大し、合成系の遺伝子は減少傾向を示した。

表 2 で見られるように、卵黄脂質投与により、内臓白色脂肪組織の減少がラットで観察された。そこで、卵黄脂質を肥満・糖尿病病態マウスに投与したところ、マウスでも、内臓脂肪組織重量、血中脂質含量、肝臓脂質含量の減少傾向が観察された。この際、脂肪組織中での脂肪酸分解関連の遺伝子の有意な増大が見られた。

3) 培養細胞実験：

主要な卵黄カロテノイドはルテインであったが、その他の餌(トウモロコシと葉物野菜)由来のカロテノイドとしてゼアキサンチン、ネオキサンチン、ビオラキサンチンなども検出された。動物実験では、卵黄脂質投与により、内臓脂肪の蓄積抑制効果や血中脂質の改善効果が認められ、肝臓中の脂質代謝関連遺伝子や脂肪組織中での脂肪酸分解関連の遺伝子の変化が見られた。そこで、こうした卵黄脂質の機能性への卵黄カロテノイドの関与について、培養細胞を用いて検討した。

3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化させると、GPDH 活性が増大し、脂肪の蓄積が見られる。そこで、GPDH 活性を分化と脂肪蓄積の指標として卵黄カロテノイドの 3T3-L1 細胞への添加効果を調べた。卵黄カロテノイドの中では、含量は微量であったが、ネオキサンチンが非常に強い脂肪蓄積抑制と分化抑制作用を示した。(図 1)また、ルテインとビオラキサンチン添加では脂肪蓄積抑制効果(脂肪蓄積量の減少)は見られなかったものの、GPDH 活性を指標とした分化抑制作用は観察された。(図 2)

ネオキサンチンを脂肪細胞に添加した時の各種遺伝子発現について検討したところ、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである C/EBP α や PPAR γ の有意な減少と、これに伴う aP2 や LPL 等の脂肪細胞に特徴的なタンパク質の遺伝子発現も有意に減少した。(図 3)一方、他のカロテノイドでは、ルテインで LPL 遺伝子発現の有意な減少が見られた。

■ 考察

卵黄脂質を動物に投与することで、脂質代謝改善作用と内臓脂肪の蓄積抑制傾向が観察された。卵黄脂質の組成は多様であり、TG の他、リン脂質、コレステロール、カロテノイドやトコフェロールなどの抗酸化成分が含まれている。卵黄脂質が示した脂質代謝改善作用が、卵黄脂質中のリン脂質や、

脂肪酸中5%程度含まれているDHAに起因していることはこれまでの研究で明らかになっている^{4,5)}。一方、培養細胞実験で得られた結果より、卵黄脂質中のカロテノイドの寄与も推察された。

ところで、カロテノイドの機能性としてその抗酸化活性が良く知られている。カロテノイドの抗酸化活性は、プロビタミンA活性以外の機能性、例えば、抗癌作用や抗動脈硬化作用を説明するバックグラウンドとして理解されてきた。しかし、カロテノイドが酸化還元反応に敏感なシグナル伝達系などで重要な働きを示す可能性はあるものの⁶⁾、疾病予防にそれがどこまで関わっているかは定かではない。癌細胞の分化や増殖に関わる遺伝子発現に対するカロテノイドの制御機構については多数の報告があるが、その多くがカロテノイドの抗酸化活性とどのように関係するのか説明することはできない。カロテノイドはポリフェノールと比べればはるかに吸収されやすく、様々な細胞で遺伝子発現に対する特異的な制御作用を行う可能性がある⁷⁾。カロテノイドの生体機能性を説明するためには、その抗酸化活性に基づいて論ずるよりも、遺伝子レベルでの制御について調べていくことがより重要であろう。この場合、カロテノイドの機能性は各カロテノイドの構造によって大きく左右されるため、それぞれのカロテノイドによってその特徴が違ってくるものと思われる。

培養細胞で見られた卵黄カロテノイドの異なる活性は、こうした化学構造に起因すると考えられ、ネオキサンチンの示した強い脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制作用は、含まれるアレン構造によると推測できる⁸⁾。アレン構造を有するカロテノイドの抗肥満作用については海藻由来のフコキサンチンが良く知られており、その作用は内蔵白色脂肪細胞におけるUCP1の発現誘導によることを見出されている⁸⁾。一方、ルテインやビオラキサンチンにも脂肪細胞の分化抑制作用が見られたが、その活性は弱いものであった。しかし、肝臓細胞を用いた実験より、これらのカロテノイドが、肝臓中の脂肪酸分解系に対する促進効果を示すことがわかった。また、ルテインは脂肪細胞中でTGの分解促進活性を示すことも見出された。これらの結果より、卵黄脂質中の複数のカロテノイドが、互いに異なる働きを示すことにより、脂質代謝改善作用や抗肥満効果を示すことが推察できた。

卵黄カロテノイド組成は餌の影響を強く受ける。特に、強い抗肥満作用を有するネオキサンチンは、トウモロコシには含まれておらず、緑色葉野菜のみに見出される。さらに、動物実験やヒト試験で抗肥満作用が明らかにされている海藻カロテノイド、フコキサンチンの代謝物も鶏に褐藻粉末を投与することで卵黄脂質中に蓄積する³⁾。餌の組成をコントロールすることで卵黄カロテノイド組成を変化させ、その生理作用やカロテノイドの吸収について検討することも今後必要であろう。

■ 要 約

卵黄脂質にはコレステロールが5%含まれていたが、卵黄脂質を1%餌に混合しても血中及び肝臓コレステロールの増加は見られなかった。また、卵黄脂質を2%投与した場合には、血中総脂質と総コレステロール並びに肝臓総コレステロールが有意に減少した。卵黄脂質の脂質代謝改善作用は、肝臓中の関連酵素遺伝子の発現制御によることが明らかになった。さらに、卵黄脂質を動物に投与することにより、内蔵白色脂肪の減少が見られた。脂質代謝改善作用には、卵黄脂質中のリン脂質、DHAの他、カロテノイドも関わっていることが示された。卵黄カロテノイドの機能はそれぞれのカロテノイドによって異なり、卵黄カロテノイド含量のみならず、その組成を変化させることで、より栄養機能性に優れた卵黄が創出できるものと考えられた。

■ 文 献

1. Applegate E.(2000)J Am Coll Nutr, 19:495S.
2. Handelman G.J.(1999)Am J Clin Nutr, 70, 247.
3. Strand A. et al.(1998)Com Biochem Phys Part A 119:963.
4. Murata Y. et al.(1982)J Nutr, 112:1805.
5. Narayan B. et al.(2006)Food Rev Inter, 22:291.
6. Jakson M.J. et al.(2002)Mol Aspects Med, 23:209.
7. Chew B.P. and Park J.S.(2004)J Nutr, 134:257S.
8. 宮下和夫.(2008)化学と生物, 46:483.

表1 ラット血清中の脂質含量に及ぼす卵黄脂質投与の影響

血中脂質 (mg/dL)	グループ		
	コントロール	卵黄脂質(1%)	卵黄脂質(2%)
総脂質	279.1±13.8	260.8±13.8	248.8±13.8 ^a
TG	78.6±9.0	72.2±7.0	66.5±6.0
総コレステロール	80.6±6.0	70.0±3.0	65.5±6.3 ^a
HDLコレステロール	26.4±1.9	27.6±1.1	28.9±1.9
LDLコレステロール	7.3±0.8	6.4±1.1	6.2±0.8

a: P<0.05 vs コントロール

表2 ラット体重、肝臓重量、内臓白色脂肪組織重量に及ぼす卵黄脂質投与の影響

	グループ		
	コントロール	卵黄脂質(1%)	卵黄脂質(2%)
体重 (g)	285.7±11.8	286.9±10.8	293.3±10.7
肝臓重量(g/100g体重)	4.11±0.33	4.01±0.29	3.89±0.33
内臓白色脂肪組織重量(g/100g体重)	4.49±0.44	4.21±0.26	3.66±0.11 ^a
肝臓総脂質(mg/g肝臓)	83.1±12.0	63.7±14.4	53.1±7.8 ^a
肝臓TG(mg/g肝臓)	61.2±11.4	51.3±13.0	36.1±14.0
肝臓コレステロール(mg/g肝臓)	3.3±0.5	3.1±0.5	2.8±0.3

a: P<0.05 vs コントロール

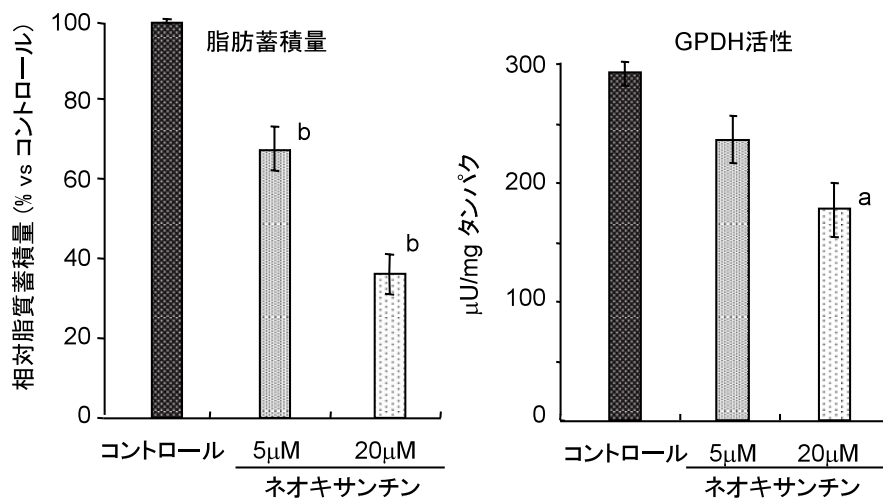


図1 脂肪細胞中の脂質の蓄積と GPDH 活性に及ぼすネオキサントンの効果
a,b コントロールと比較して有意差あり。(a:P<0.05; b:P<0.01)

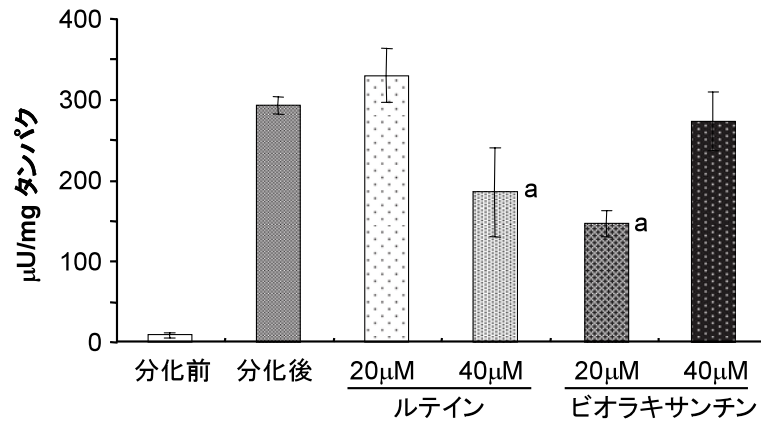


図2 脂肪細胞中の GPDH 活性に及ぼす卵黄カロテノイドの効果
a 分化後と比較して有意差あり。(P<0.05)

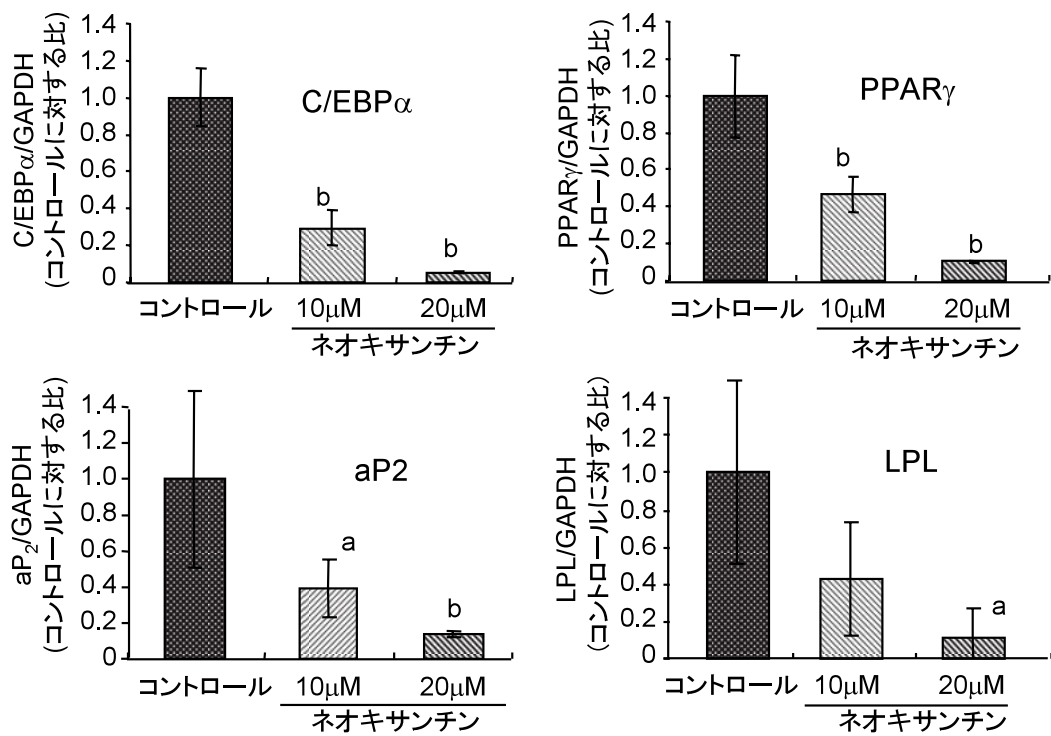


図3 脂肪細胞中の各種遺伝子発現に及ぼすネオキサチンの効果
a,b 分化後と比較して有意差あり。(a:P<0.05; b:P<0.01)