

腸管は構造リン脂質生成の場となるか？
—卵黄リゾリン脂質摂取後のリンパ脂質解析—

九州大学大学院農学研究科栄養化学分野・助教 城内 文吾

■ 緒言

食事脂質は管腔内で消化された後、腸管上皮細胞内での再エステル化を経て、リンパ系へと輸送される。構造脂質とは、脂肪酸の生体内での機能をより強く発現するためにグリセロール骨格の特定の位置に特定の脂肪酸を組み込んだグリセロ脂質[トリアシルグリセロール(TAG)、グリセロリン脂質]のことである¹⁾。構造脂質の調製方法には、化学法(エステル交換・エステル化、分別、水素添加)、酵素法(加水分解、エステル化、エステル転移)および生物法(微生物や植物自身に合成させる)がある²⁾。ラット腸管上皮細胞が構造脂質生成の場(構造脂質調製の生物法の一つ)となりうるか不明である。

リン脂質はエネルギー源としてだけでなく、塩基の供給を担い、TAG代替物としても期待される素材である。また、卵黄リン脂質から製造されるリゾリン脂質は医薬品・化粧品素材としても利用されている。一方、*n*-3系脂肪酸、とくに α -リノレン酸はTAGで摂取すると生体内異化が速く、高度な機能発現にはリン脂質に結合している必要がある³⁾。本研究では、生理的環境下でリンパ液採取が可能な半永久胸管リンパカニューレション手術を施したラットに、卵黄由来リン脂質(PL)または、その加水分解物である *sn*-1 位型リゾリン脂質(*sn*-1 LysoPL)、*sn*-2 位型リゾリン脂質(*sn*-2 LysoPL)と亜麻仁油(Linseed oil)を同時に摂取させ、リンパ液中に α -リノレン酸を含有する構造リン脂質が生成されるかを調べた。

■ 方法

食餌組成

American Institute of Nutrition(AIN)-76 組成⁴⁾に準じた食餌を Basal diet とし、meal-feeding 期間および手術後の回復期間にラットに与えた。術後3日目のリンパ液回収時には、PL diet(食餌脂質：Linseed oil 5%, PL 2%)、*sn*-1 LysoPL diet(Linseed oil 5%, *sn*-1 LysoPL 2%)あるいは *sn*-2 LysoPL diet(Linseed oil 5%, *sn*-2 LysoPL 2%)を与えた。各実験食のコレステロール含有量は0.200%となるように調製した。

半永久胸管リンパカニューレション手術⁵⁻⁷⁾およびリンパ液の回収

実験には、7週齢雄性 Sprague-Dawley(Jcl:SD)系ラット(日本クレア株式会社)を用い、室温21-23°C、12時間(8:00点灯、20:00消灯)のライトサイクルで飼育した。給餌方法は meal-feeding 法を用い、朝夕(10:00~、16:00~)それぞれ1時間の計2時間摂食させ、自由飲水とした。Basal dietで5日間飼育した後に、イソフルラン吸入麻酔を施し、胸管リンパ管にヘパリン生理食塩水を満たしたシラスコン医療用チューブ(株式会社カネカメディックス)を挿入した。チューブは内皮に固定縫合した後、皮下を通して頭部に固定した(Figure 1)。なお、開腹患部にスルファメトキサゾール粉末(ナカライテスク)を適量散布することで術後の感染防止、鎮痛剤ベトルファール(Meiji Seika ファルマ株式会社)を腹腔内投与することで術後の疼痛管理に配慮した。また、体力回復に139 mM グルコースおよび85 mM 塩化ナトリウムを含む等張水溶液を飲水として与えた。回復期間を2日間設け、この期間においても上記のスケジュールで Basal diet を与えた。術後3日目に PL diet、*sn*-1 LysoPL diet あるいは *sn*-2 LysoPL diet を30分間摂食させた(*n*=5/group)。摂食前に30分間、摂食開始から1時間ずつ計7時間リンパ液を回収した(Figure 2)。リンパ回収後、ラットはソムノペンチル(共立製薬株式会社)とイソフルランの併用麻酔下で、腹部大動脈採血により屠殺を行った。回収したリンパ液は4°Cでover night 静置した後、フィブリンを除去した。リンパ流量の計算方法は、実験食摂取前に30分間回収したリンパ流量を1時間あたりに換算した値を0時間目の値とし、実験食摂取後から1時間までのリンパ流量を1時間目の値とした。以下、同様に7時間目まで計算した。なお、本動物実験は、九州大学動物実験委員会による動物実験計画書の審査と九州大学総長の承認を得て実施した(承認番号:A28-073-2)。

リンパ液中の脂質分析

摂食前および摂食開始後の各時間のリンパ液中の TAG およびコレステロール濃度は酵素法 (Triglyceride E-test Wako, Cholesterol E-test Wako ; 和光純薬株式会社) により測定した。

リンパ液中のリン脂質分子種の分析

リンパ液中のリン脂質分析には LC/MS/MS MRM ライブラリ リン脂質プロファイリング (LCMS-8050 from Shimadzu Co., Ltd.) を用いた。1 回目の分析にて、リン脂質のクラス決定 (極性基の脱離で生じるプロダクトイオンをモニタリング) を行い、得られた分子イオンから α -リノレン酸を含有するリン脂質分子種 (PC クラス 17 種, PE クラス 13 種, PI クラス 5 種, PS クラス 2 種, LysoPC クラス 1 種, LysoPE クラス 1 種の全 39 種) を推定した。2 回目の分析にて、それらの脂肪酸組成を解析することでリン脂質分子種を決定した。リンパ液中のリン脂質分子種の定量に際し、内部標準として PC-22 : 0/22 : 0 および LysoPC-10 : 0 (Avanti Polar Lipids, Inc.) を用いた。なお、リンパ液を回収時間の体積比に準じて 1 本にプールしたものを分析に供し、得られた濃度にリンパ流量を乗じて輸送量を算出した。また、HPLC ならびに MS の分析条件は以下の通りであった。

< HPLC 分析条件 >

装置	: LCMS-8050
カラム	: Phenomenex Kinetex C8 (150mm L. × 2.1mm I.D., 2.6 μ m)
移動相 A	: 20mM ギ酸アンモニウム
移動相 B	: アセトニトリル/イソプロパノール (1 : 1)
タイムプログラム (B%)	: 20% (0min) → 20% (1min) → 40% (2min) → 92.5% (25min) → 100% (26min) → 100% (30min)

流速 : 0.25mL/min

注入量 : 1 μ L

カラムオープン温度 : 60°C

< MS 分析条件 >

イオン化法 : ESI (Positive/Negative)

ネブライザガス流量 : 3.0L/min

ドライイングガス流量 : 10.0L/min

DL 温度 : 250°C

ヒートブロック温度 : 400°C

インターフェース温度 : 200°C

CID ガス圧 : 230kPa

統計解析

実験で得られたデータは、平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析には 4Steps エクセル統計 (Statcel 4)⁸⁾ を使用し、one-way ANOVA で解析後、*post hoc* test として Tukey-Kramer multiple comparison test を用いた。なお、 $P < 0.05$ を統計的に有意であるとし、 $P < 0.10$ を傾向とした。

■ 結果および考察

ラットの体重および実験食の摂食量

リンパ液回収時のラットの体重ならびに、実験食の摂食量に群間で有意差は認められなかった (data not shown)。

リンパ流量およびリンパ脂質濃度

各時間のリンパ流量に実験食摂食の影響は認められなかった (Figure 3A)。リンパ液中 TAG 濃度は PL 群と比較して、*sn*-1 LysoPL 群で実験食摂取後 1 時間目にて有意な高値、摂取後 6 および 7 時間目にて有意な低値を示し、*sn*-2 LysoPL 群で摂取後 6 時間目に有意な低値を示した (Figure 3B)。また、リンパ液中の TAG 濃度曲線下面積 (TAG-AUC_{3-7h}) は PL 群と比較して、*sn*-1 LysoPL 群で有意な低値を示した (data not shown)。リンパ液中コレステロール濃度は PL 群と比較して、*sn*-1 LysoPL 群で摂取後 5 および 6 時間目に有意な低値を示し、*sn*-2 LysoPL 群で摂取後 6 時間目に有意な低値を示した (Figure 3C)。また、リンパ液中のコレステロール濃度曲線下面積 (Cho-AUC_{3-7h}) は PL 群と比較して、

sn-1 LysoPL 群で低下傾向、*sn*-2 LysoPL 群で有意な低下を示した (data not shown)。本研究において、*sn*-1 および *sn*-2 LysoPL 摂取が PL 摂取と比較して、食後のリンパ脂質濃度を低下させること、*sn*-1 LysoPL は TAG 濃度に、*sn*-2 LysoPL はコレステロール濃度に対して強く作用すること (*sn*-1 と *sn*-2 型 LysoPL で異なる可能性) が示された。Kobayashi らは、ガレート型カテキンがコレステロール自体ではなく、ホスファチジルコリン (PC) との特異的相互作用を介してコレステロール吸収抑制作用を発揮することを示唆している⁹⁾。摂取した *sn*-1 および *sn*-2 LysoPL がミセルへの脂質溶解性に影響することが考えられるため、今後 *in vitro* 試験で検証する予定である。

リンパ中のリン脂質分子種

LC/MS/MS MRM ライブラリに登録されている α -リノレン酸含有のリン脂質分子種のうち、1 回目の分析 (リン脂質クラス決定) にて分子イオンから 39 種類の α -リノレン酸含有のリン脂質分子種が推定された。そのうち 5 つの分子種 (PC-16:0/18:3, PC-18:0/18:3, PC-18:1/18:3, PC-18:2/18:3, PC-18:3/18:3) が 2 回目の脂肪酸組成決定分析によりリンパ液中に検出された。PC-16:0/18:3 が最も多く存在したが、その量に群間で差は認められなかった (Figure 4A)。*sn*-2 LysoPL 群でのみ PC-18:2/18:3 および PC-18:3/18:3 が検出された (Figure 4A)。リゾリン脂質については、6 分子種 (LysoPC-16:0, LysoPC-18:0, LysoPC-18:1, LysoPC-18:2, LysoPC-20:4, LysoPE-18:0) がリンパ液中に検出され、LysoPC-16:0 が最も多く存在したが、群間で差は認められなかった (Figure 4B)。LysoPC-16:0 が最も多く存在したことは、PC を摂取した場合においてもカイロミクロン中の PC の 60% 程度が内因性、すなわち胆汁由来であること¹⁰⁾、胆汁由来 PC の腸管内腔での加水分解により LysoPC-16:0 が多く生成される^{11,12)} という先行研究と矛盾しないものであった。また、小腸に存在するリゾリン脂質アシル基転移酵素 (LPCAT3) は基質として *sn*-1 位に飽和脂肪酸が結合したリゾリン脂質を好むことが報告されている¹³⁾。よって、PC-16:0/18:3 が最も多く存在したことは、小腸上皮細胞内に LPCAT3 の基質となる LysoPC-16:0 が豊富に存在したことを反映していたものと考えられた。

今回は、リンパ液を回収時間の体積比に準じて 1 本にプールしたものを分析に供しており、各リン脂質分子種の時間的変化が不明であるため、今後は各時間のリンパ液を LC/MS/MS 分析対象とする予定である。

■ 要 約

卵黄由来リン脂質の加水分解物である LysoPL と亜麻仁油の同時摂取により、ラットのリンパ液中において α -リノレン酸を含有する構造リン脂質が生成される可能性が示された。また PL 摂取と比較して、*sn*-1 および *sn*-2 LysoPL 摂取が食後のリンパ脂質濃度を低下させること、*sn*-1 LysoPL は TAG 濃度に、*sn*-2 LysoPL はコレステロール濃度に対して強く作用すること (*sn*-1 と *sn*-2 型 LysoPL で作用が異なる可能性) が示された。

■ 文 献

- 菅野道廣. (2016) 脂質栄養学 -「日本人の健康と脂質」の理解を求めて-. 幸書房, 東京.
- 鈴木修, 佐藤清隆, 和田俊 監修. (2006) 機能性脂質の新展開. シーエムシー出版, 東京.
- Burdge GC. (2006) Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 75, 161-168.
- American Institute of Nutrition. (1977) Report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Committee on Standards for Nutrition Studies. *J Nutr*. 107, 1340-1348.
- Shirouchi B, Kawamura S, Matsuoka R, Baba S, Nagata K, Shiratake S, Tomoyori H, Imaizumi K, Sato M. (2011) Dietary guar gum reduces lymph flow and diminishes lipid transport in thoracic duct-cannulated rats. *Lipids* 46, 789-793.
- Shirouchi B, Nakamura Y, Furukawa Y, Shiraishi A, Tomoyori H, Imaizumi K, Sato M. (2012) Ezetimibe inhibits lymphatic transport of esterified cholesterol but not free cholesterol in thoracic lymph duct-cannulated rats. *Cardiovasc Drugs Ther*. 26, 427-431.
- Matsuoka R, Shirouchi B, Kawamura S, Baba S, Shiratake S, Nagata K, Imaizumi K, Sato M. (2014) Dietary egg white protein inhibits lymphatic lipid transport in thoracic lymph duct-cannulated rats. *J Agric Food Chem*. 62, 10694-10700.
- Yanai H. (2015) Statcel 4-the usefull add-in software forms on Excel, 4th edn. OMS, Tokyo.

9. Kobayashi M, Nishizawa M, Inoue N, Hosoya T, Yoshida M, Ukawa Y, Sagesaka YM, Doi T, Nakayama T, Kumazawa S, Ikeda I. (2014) Epigallocatechin gallate decreases the micellar solubility of cholesterol via specific interaction with phosphatidylcholine. *J Agric Food Chem.* 62, 2881–2890.
10. Scow RO, Stein Y, Stein O. (1967) Incorporation of dietary lecithin and lysolecithin into lymph chylomicrons in the rat. *J Biol Chem.* 242, 4919–4924.
11. Nilsson A. (1968) Intestinal absorption of lecithin and lysolecithin by lymph fistula rats. *Biochim Biophys Acta.* 152, 379–390.
12. Kazachkov M, Chen Q, Wang L, Zou J. (2008) Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids* 43, 895–902.

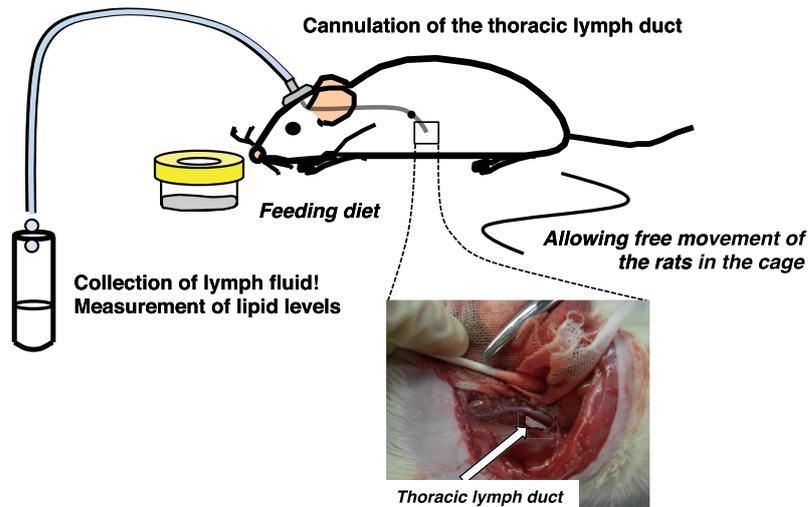


Figure 1. Permanent thoracic lymph duct cannulation method

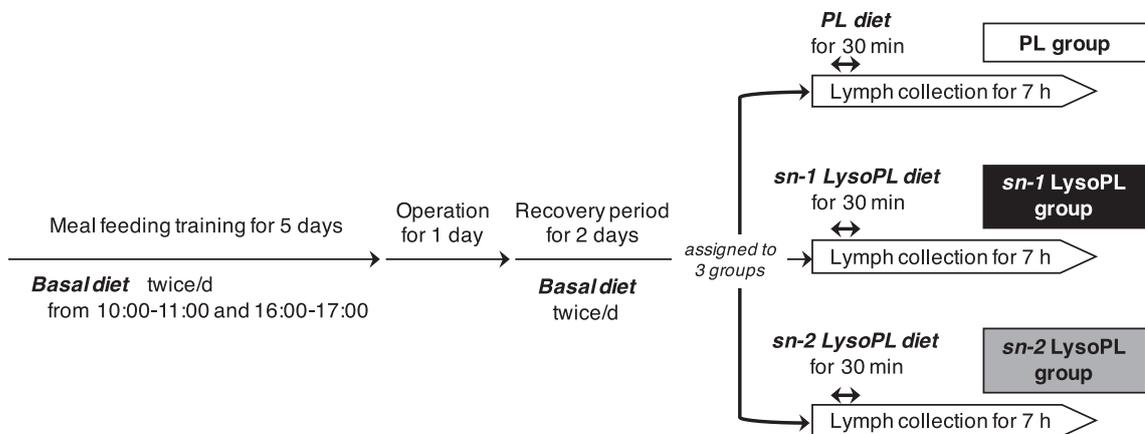


Figure 2. Experimental protocol

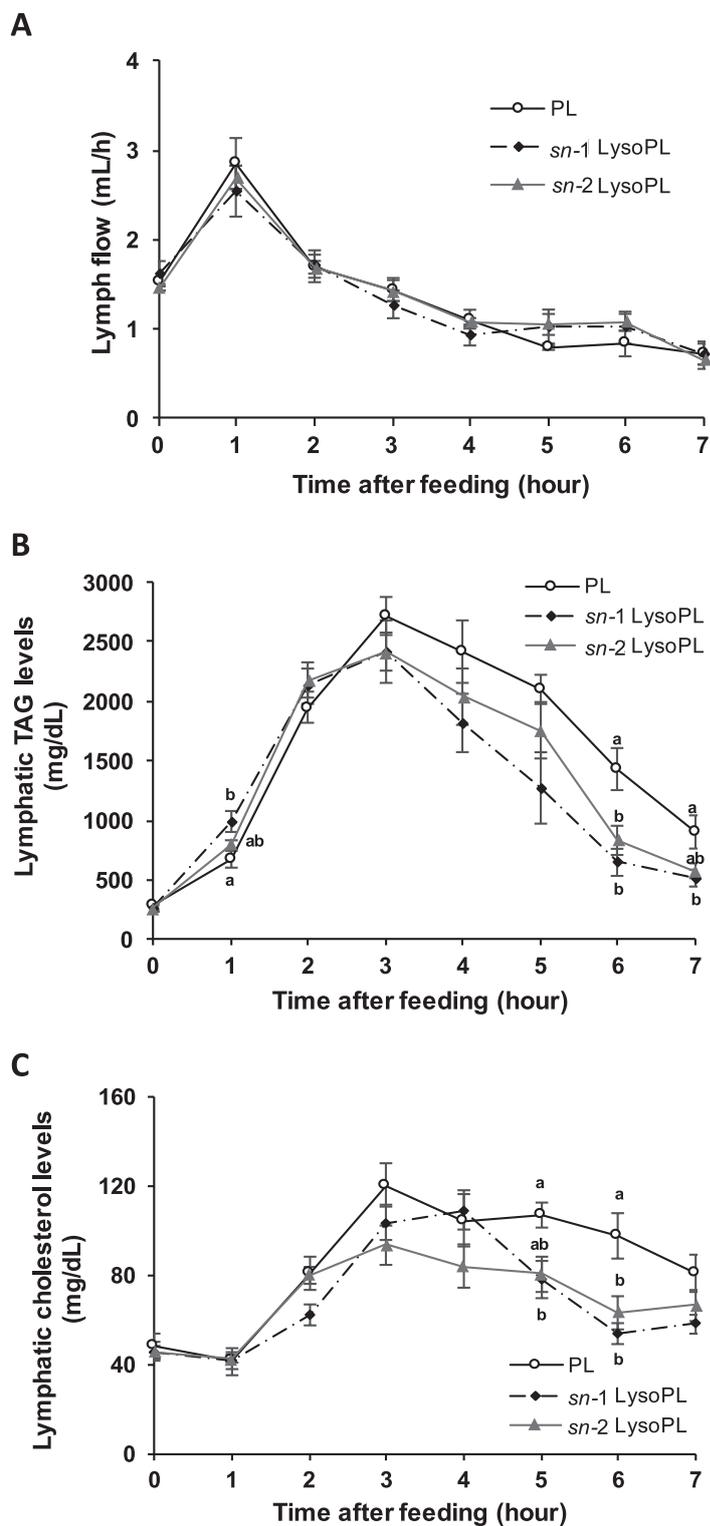


Figure 3. Lymph flow (A), Lymphatic levels of TAG (B) and cholesterol (C) in thoracic lymph-duct cannulated rats fed PL, *sn-1* LysoPL, or *sn-2* LysoPL diet. Values are expressed as mean \pm SEM ($n=5$ /group). Comparisons among the groups were performed using one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparison *post hoc* test. Different letters show significant difference at $P<0.05$.

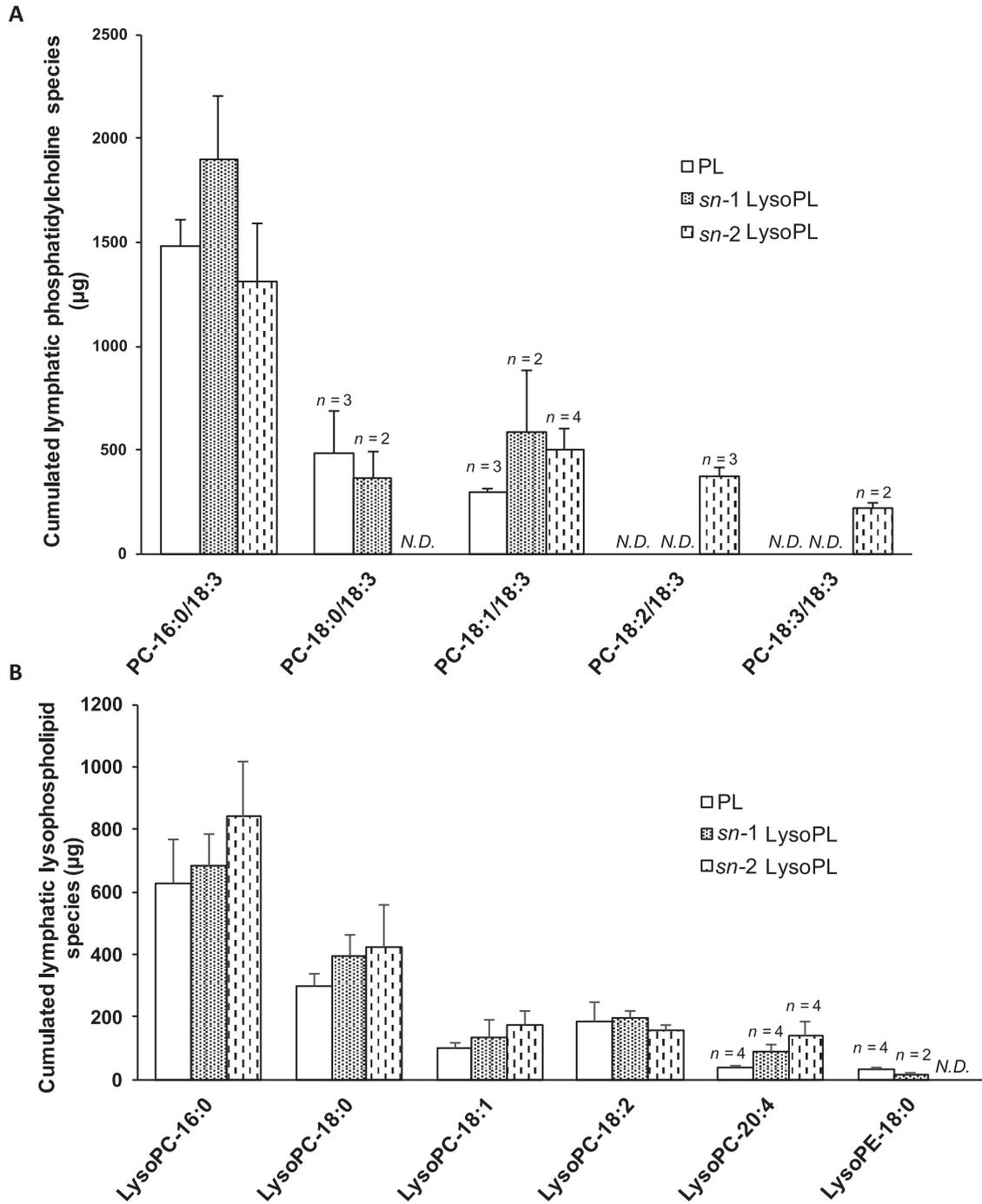


Figure 4. Lymphatic levels of phosphatidylcholine (A) and lysophospholipid (B) species in thoracic lymph-duct cannulated rats fed PL, *sn*-1 LysoPL, or *sn*-2 LysoPL diet. Values are expressed as mean \pm SEM ($n=2-5$ /group).