

安定同位体標識コリン関連化合物を用いた コリン代謝過程の精密解析

東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学部門・教授 三浦 豊

■ 緒 言

コリンは4級アンモニウムイオンのトリメチルアミノメタノールであり、卵や乳に豊富に含まれるビタミンB群に属するビタミン様物質である。我が国では必須栄養素としては認められておらず、食品成分表への記載と食事摂取基準はない。一方米国や欧州では摂取基準が定められており、食品への含量表示もされている¹⁾。コリンは主要リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)や神経伝達物質アセチルコリンの原料であるだけでなく、ベタインへの変換を介して一炭素経路にも関与していることから、適切なコリン摂取は健康維持において極めて重要と考えられる。食品中には水溶性の遊離コリン、リン酸化コリン(P-Cho)、グリセロホスホコリン(GPC)ならびに脂溶性のPC(リゾ体含む)、スフィンゴミエリンなど様々な形で存在しており、化合物ごとに異なる消化・吸収過程を経て体内に取り込まれ、代謝されていくと考えられているが、その過程に関して未知の点が多く残されている。本研究ではコリン関連化合物の消化・吸収過程を詳細に検討するため、安定同位体により標識したコリンを合成し、ラットに経口投与した際の腸管内、血中、さらに組織内での分布を質量分析により測定し、まだ明らかにされていないコリン代謝を詳細に検討することを目的とした。コリン摂取は肝機能維持、認知症発症との関連も指摘されており、コリン代謝の解明は国民の健康長寿のために重要な課題であり、本研究はその一端を担うものとなる。なお、申請段階ではコリン以外の関連化合物を安定同位体で標識することを計画していたが、合成が困難であったので、安定同位体標識コリンを用いた検討に絞って研究を進めることとした。

■ 方 法

1) 安定同位体標識コリンの合成

¹³C-Choの合成は以下の通りに行った。50 mlのナス型フラスコに10 mlのアセトニトリルを入れ、その後氷上で冷やしながらジメチルアミノエタノール 1.6 ml、¹³C-ヨードメタン 1 mlを続けて入れた。スターラーを入れて16時間攪拌させた後、吸引濾過にて溶媒を取り除いた。濾過の際はメンブレンフィルター親水性PTFEタイプ孔径0.50 μmを用い、濾過後に減圧状態のデシケーターにて十分に乾燥させてから実験に使用した。

2) ¹³C-Choを用いたコリン吸収・代謝の検討

Wistar系雄性ラットを4週齢で購入し、予備飼育の後、標準20%カゼイン食を2週間自由摂取させた。実験前日の夜から16時間絶食させた後、コリン溶液(合成した¹³C-Choを注射用蒸留水に溶かしたもの)を60 mg/kgでラットに経口投与した。経口投与前、30分後、1時間後、2時間後、4時間後に麻酔下で各ラットより、上腸間膜静脈、門脈、下大静脈、腹部大動脈の4か所から採血し、血清を調製した。なお、各群は5頭とした。

3) ¹³C-Choを用いたコリンの体内動態の検討

Wistar系雄性ラットを4週齢で購入し、予備飼育の後、標準20%カゼイン食で1週間飼育し、その後実験食で1週間飼育した。実験食は20%カゼイン食に含まれる重酒石酸コリン2.5 gについて、コリン量が等量となるよう、コントロール(Con)群では塩化コリン1.38 g、¹³C-Cho群では上記¹³C-ヨウ化コリン2.29 gに置き換えて作製した。1週間後に解剖し、下大動脈より採血した後、各臓器(脳、心臓、胸腺、肺、肝臓、脾臓、腎臓、消化管、精巣、精巣上体脂肪組織、大腿筋)の採取を行った。

4) コリン関連化合物の測定

調製した血清10 μlに90 μlのメタノールを添加し、15分超音波処理した後、15000 rpm、20 min遠心した上清を測定サンプルとした。臓器に関しては各臓器が250 mg/mlとなるようにメタノールを加え、ホモジェナイズ後に遠心した上清をサンプルとした。コリンおよび関連化合物の測定はLC-MS(水溶性コリン)およびLC-MS/MS(脂溶性コリン)を用いた²⁾。

5) その他

本研究で実施した動物実験については、東京農工大学動物実験委員会に研究計画を申請し、審査・承認を受けた上、関連法令を遵守して実施した。

測定値は平均値±標準誤差で示した。統計処理は、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test で行った。有意差は P 値が 0.05 未満のものとした。

■ 結 果

1) 安定同位体標識コリンの吸収・代謝

^{13}C -Cho 量については、すべての採血箇所です投与から 30 分後に有意に増加し、特に門脈と上腸間膜静脈では著しく増加した。また、いずれの採血箇所でも、投与から 2 時間後には投与前と同程度の値まで戻ることが確認された。血清中の ^{13}C -GPC 量については、すべての採血箇所です 4 時間後に有意に増加することが確認された。4 時間後の値は投与前の約 1.5 倍であった。 ^{13}C -P-Cho 量は門脈と上腸間膜静脈です投与から 4 時間後に有意に増加した。下大静脈と腹大動脈では大きな変化は見られなかった。 ^{13}C -Bet 量は、すべての採血箇所です投与から 1 時間後に有意に増加し、2 時間後に最大値となった。2 時間後の ^{13}C -Bet 量は投与前と比較して 5 倍以上の値となっていた。 ^{13}C を含む脂溶性コリンの総量は投与から 4 時間後にすべての採血箇所です有意に増加することが確認され、投与から 30 分後でもやや増加する傾向が見られた。

2) 安定同位体標識コリンの体内動態

飼育期間中の体重変化、食餌摂取量、各臓器重量については 2 群間で有意差は見られなかった。血清中の各コリン関連化合物含量については、 ^{13}C -Cho, GPC, Bet, PC 量が ^{13}C -Cho 群です有意に増加し、 ^{13}C -P-Cho 量のみ変化が見られなかった(結果は示さず)。

Con 群における各臓器中の Cho 量(内因性の Cho 量)について、臓器の単位重量当たりの Cho 量は腎臓が最も多く含まれており、次いで小腸、胸腺、脾臓の順であった。心臓や大腿筋では他の臓器と比較して、含まれる Cho 量が少なかった。また、 ^{13}C -Cho 増加量は、小腸で最も多く、次いで腎臓、脾臓の順であった。概ね内因性の Cho 量が多い臓器に関しては、 ^{13}C -Cho 増加量も多くなる傾向であった。一方、脳では内因性の Cho 量が比較的多いものの、 ^{13}C -Cho 量はあまり増加が見られなかった。内因性の GPC 量は、腎臓と小腸で特に多く存在しており、脂肪組織においても多くの GPC の存在が確認された。 ^{13}C -GPC 増加量についても同様に小腸や腎臓で多く、次いで胸腺や脂肪組織などでも大きく増加していた。精巣では、内因性の GPC 量は比較的多いものの、 ^{13}C -GPC 量はそこまで増加していなかった。また、今回測定した臓器の中で脳だけが、 ^{13}C -GPC が全く増加していなかった。内因性の P-Cho 量は、精巣で著しく多く含まれており、他にも脾臓や胸腺に多く含まれていた。一方、心臓や脂肪組織、筋肉では P-Cho があまり含まれていなかった。 ^{13}C -P-Cho 増加量は脾臓と精巣で特に多く、胸腺や肝臓でも比較的多かった。また、 ^{13}C -P-Cho 増加量は、概ね内因性の P-Cho 量に比例して変動していた。内因性の Bet 量は、腎臓と肝臓、精巣で特に多く含まれており、脳や筋肉にはあまり存在していなかった。 ^{13}C -Bet 増加量についても同様の傾向で、腎臓や肝臓で特に多く、脳や筋肉ではわずかであった。なお、脂溶性コリンに関しては肝臓、脂肪組織、肺、心臓、腎臓で ^{13}C -PC の蓄積が見られたが、大きな変化ではなかった。

■ 考 察

経口投与した ^{13}C -Cho の動態より、コリンは主として小腸から吸収され、肝臓に取り込まれた後、肝臓に蓄積するか、他のコリン関連化合物へと代謝されると考えられた。ベタイン、GPC と PC が 4 時間後にすべての採血箇所です増加していることから、肝臓に取り込まれたコリンはこれらの化合物に代謝されると考えられた。ベタインについては 30 分後にも一過性の増加が見られているため、経口投与されたコリンの一部は腸管内または小腸内でベタインへと変換されている可能性が示唆された。一方 P-Cho については門脈と上腸間膜静脈でのみ 4 時間後に増加していることから小腸内でコリンから P-Cho に変換され、その一部が肝臓へと移行している可能性が考えられた。さらに PC についてもベタインと同様に 30 分で一過性の増加が見られていることから、小腸でカイロミクロンとして吸収されるはずの脂溶性コリンの一部は門脈経由でも吸収されている可能性がある。

次に安定同位体コリンを 1 週間投与した際の臓器への蓄積を検討した結果より、経口摂取したコリンはほぼすべての臓器に取り込まれていることが明らかとなった。特に単位質量当たりの ^{13}C -Cho 増加量は小腸が最も多く、次いで腎臓や脾臓でも多く含まれており、摂取した Cho はこれらの臓器

に蓄積されやすいことが示唆された。 ^{13}C -Cho 量の増加があまり見られなかったのは脳や心臓、大腿筋であり、心臓や大腿筋などの内因性の Cho 量が少ない臓器(データ示さず)を除くと、脳では特に ^{13}C -Cho の増加量が他の臓器と比較して少ないことが分かった。脳においてコリンは主としてアセチルコリン合成に使用されることから、脳では摂取した Cho が Cho としてはあまり蓄積していない可能性が示唆された。

^{13}C -GPC 増加量が多いものから順に小腸、腎臓、胸腺となっており、これらの臓器では Cho として摂取した際に、GPC に合成、蓄積されやすいことが示唆された。GPC や Bet は主要な浸透圧調節物質として腎臓に存在することは報告されているが³⁾、今回の結果から小腸にも多量に存在し、Cho から GPC への代謝が活発に行われていることが明らかとなった。また、臓器の質量を考慮すると、肝臓でも Cho から多くの GPC が合成、蓄積されていることが示唆された。Cho として摂取した際に脳においては GPC に合成、蓄積されないことが示唆された。P-Cho は血中濃度が最も低いコリン関連化合物であり、 ^{13}C -Pcho 増加量は精巣、脾臓、肝臓、胸腺などの臓器で多く、Cho から P-Cho への代謝はこれらの臓器で活発に行われ、P-Cho として蓄積している可能性が示唆された。 ^{13}C -Bet については腎臓や肝臓で特に多く、これらの臓器はベタイン合成の主たる臓器と報告されている⁴⁾ことから、Cho から Bet への合成および蓄積が、腎臓と肝臓では他の臓器と比較して活発であることが示唆された。

脂溶性コリンについては、 ^{13}C -PC が蓄積する臓器とそうでない臓器が見られたが、大きな変化ではなく、1 週間の摂取では全量が多い PC の一部が置き換わっているのみであり、大きな影響は及ぼさないと推測された。

以上の結果より、コリンの吸収・代謝の一端がより詳細に明らかにされたが、食事から摂取するコリンの多くは PC(主としてレシチン)であり、PC の消化・吸収・代謝はコリンのそれとは大きく異なることも予想される。本研究では標識 PC 合成ができず、その点を明らかにするには至らなかったが、今後 PC だけでなく GPC の安定同位体標識体を合成し、ラットに投与する実験を実施することで、コリンおよび関連化合物の栄養素としての意義をより明確にしていくことを計画している。

■ 要 約

コリンおよびその関連化合物の吸収と代謝を明らかにする目的で、安定同位体標識コリンを合成し、ラットに単回または長期投与した。その結果、コリンは 2 時間以内に主として小腸から吸収され、その一部は P-Cho とベタインに代謝されてから肝臓に取り込まれることが明らかとなった。肝臓に到達したコリンは GPC や PC に代謝され、各臓器へと輸送されることも明らかとなった。長期投与したコリンは、検討したすべての臓器に取り込まれたが、臓器ごとにその代謝は異なることも明らかとなり、GPC に代謝されやすい臓器、P-Cho に代謝されやすい臓器が明らかとなった。特にアセチルコリンを合成している脳ではコリンとしてはほとんど存在していないことも示された。これらの結果により、これまで知られていたコリン代謝経路がさらにつまびらかになり、コリンの栄養素としての意義を明らかにすることができた。今後、PC や GPC などの高分子化合物の標識を行い、さらに検討することが必要である。

■ 文 献

- 1) 日比野英彦, 大久保剛(2017) “脂質系栄養素：コリンの普及に際し、アメリカの現状から” *Lipid Nutr.*, 26・1
- 2) Yamashita S, Kawada N, Wang W, Susaki K, Takeda Y, Kimura M, Iwama Y, Miura Y, Sugano M, and Matsuoka R. (2023) “Effects of egg yolk choline intake on cognitive functions and plasma choline levels in healthy middle-aged and older Japanese: A Randomized double-blinded placebo-controlled parallel-group study.” *Lipids in Health and Disease*, 22, 75.
- 3) Garcia-Perez A. and Burg M.B. (1991) “Renal medullary organic osmolytes” *Physiol Rev.* 71, 1081-1115.
- 4) Bianchi, G. and Azzone, G.F. (1964) “Oxidation of choline in rat liver mitochondria.” *J. Biol. Chem.* 239, 3947-3955.

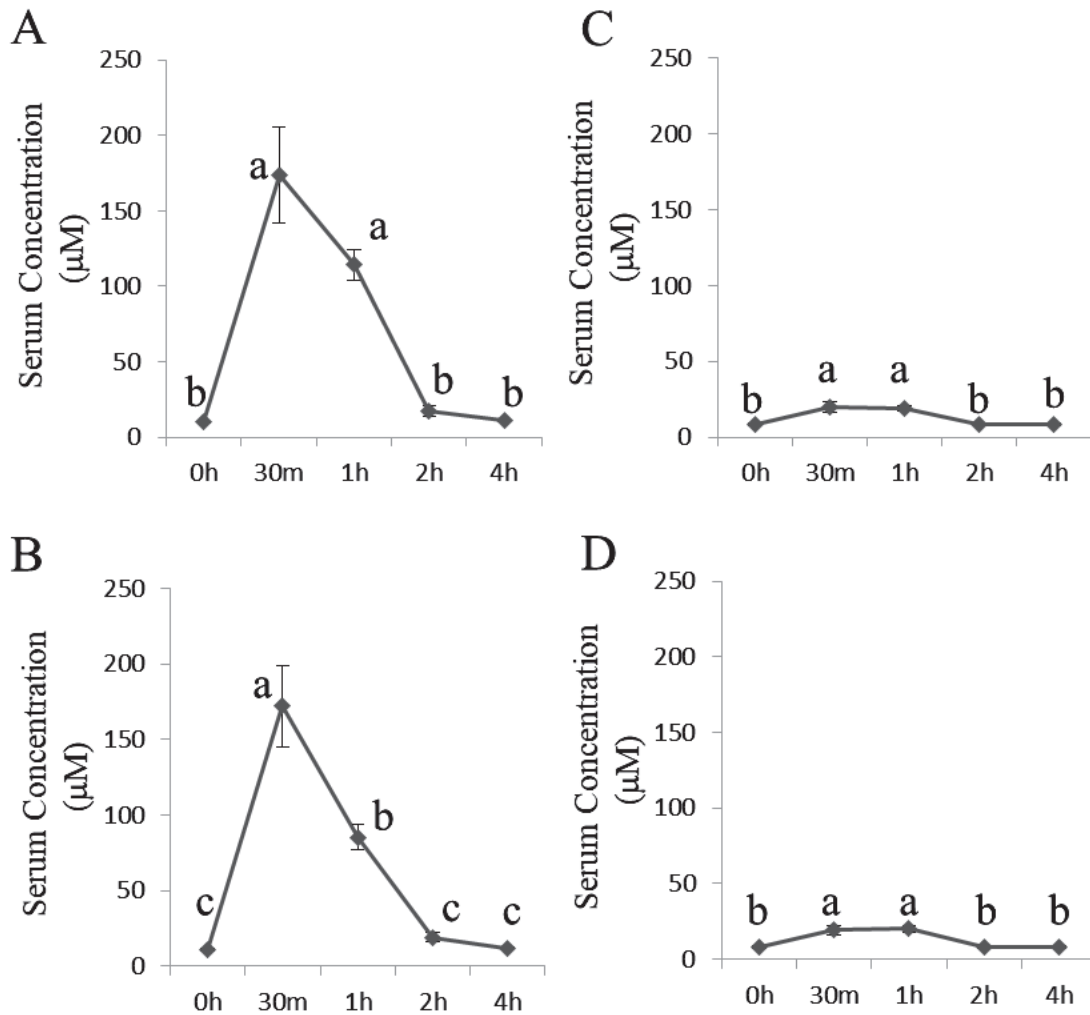


図1 ^{13}C -Cho の単回投与時の血中 ^{13}C -Cho 濃度の経時変化
 データは各群5頭の平均値と標準誤差で示した。異なるアルファベットを付した値に統計学的に有意差があることを示す。

A: 門脈
 B: 上腸間膜静脈
 C: 下大静脈
 D: 腹部大動脈

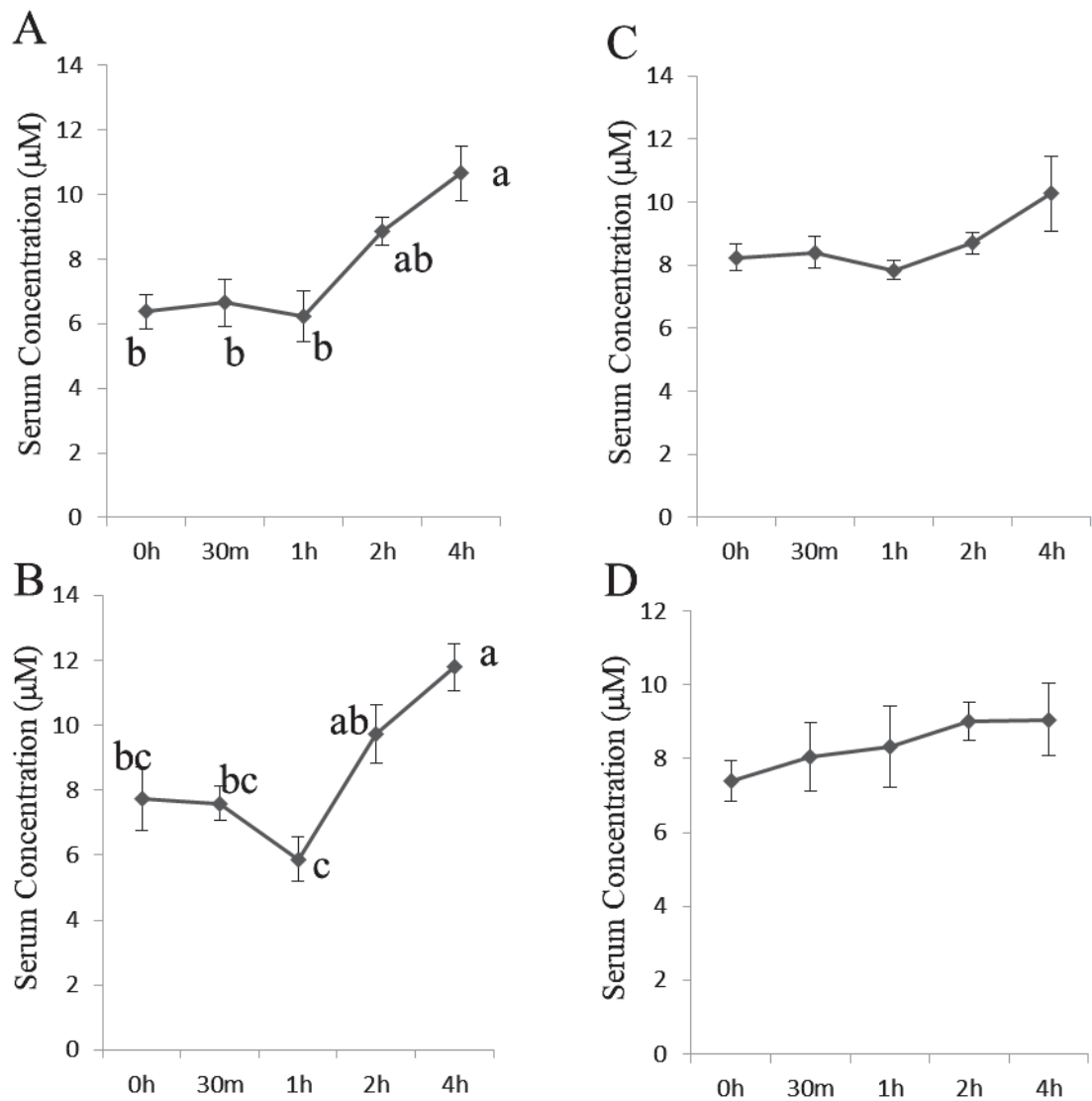


図2 ^{13}C -Cho の単回投与時の血中 ^{13}C -P-Cho 濃度の経時変化
 データは各群5頭の平均値と標準誤差で示した。異なるアルファベットを付した値に統計学的に有意差があることを示す。

A: 門脈
 B: 上腸間膜静脈
 C: 下大静脈
 D: 腹部大動脈

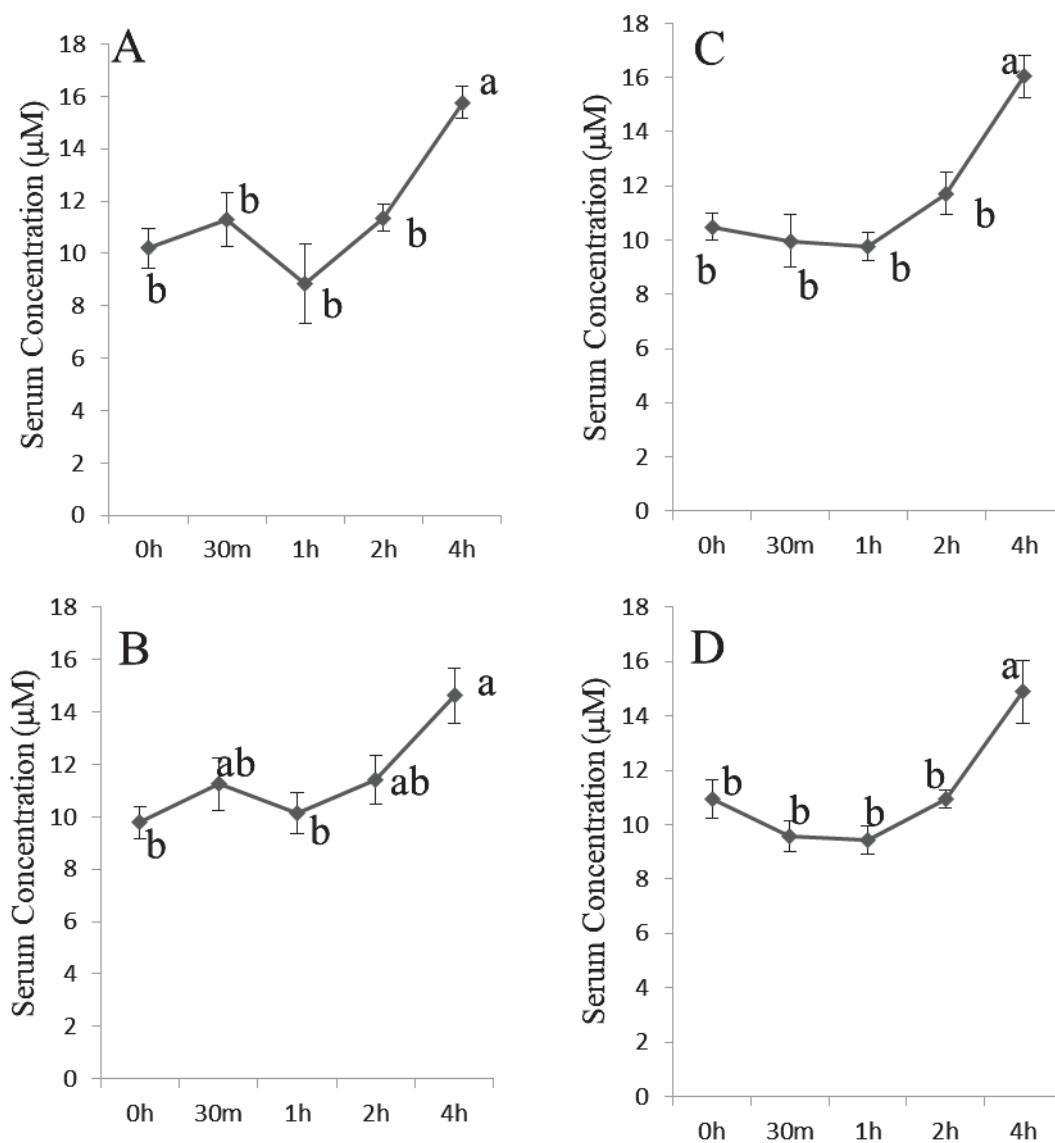


図3 ^{13}C -Cho の単回投与時の血中 ^{13}C -GPC 濃度の経時変化
 データは各群5頭の平均値と標準誤差で示した。異なるアルファベットを付した値に統計学的に有意差があることを示す。

A: 門脈
 B: 上腸間膜静脈
 C: 下大静脈
 D: 腹部大動脈

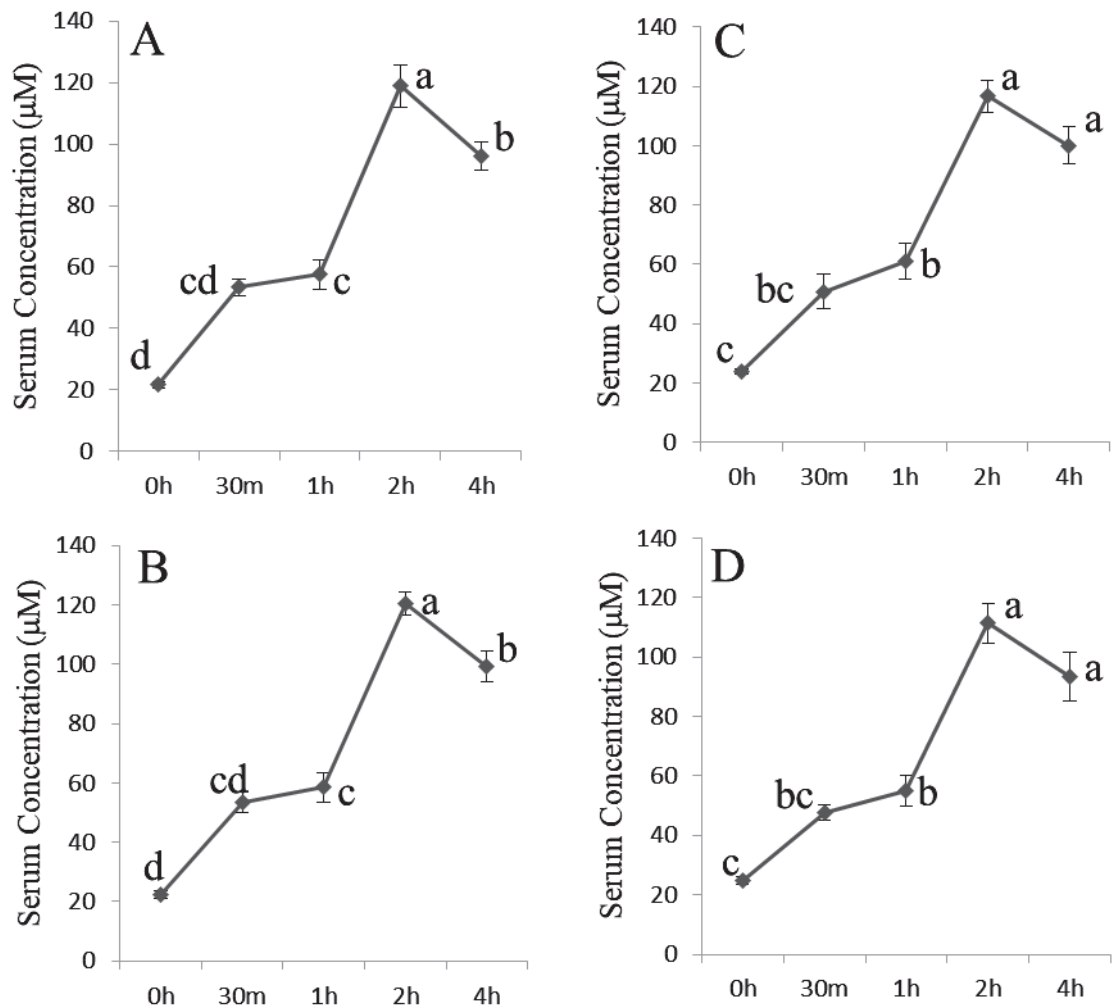


図4 ^{13}C -Cho の単回投与時の血中 ^{13}C -Bet 濃度の経時変化
 データは各群 5 頭の平均値と標準誤差で示した。異なるアルファベットを付した値に統計学的に有意差があることを示す。

- A: 門脈
- B: 上腸間膜静脈
- C: 下大静脈
- D: 腹部大動脈

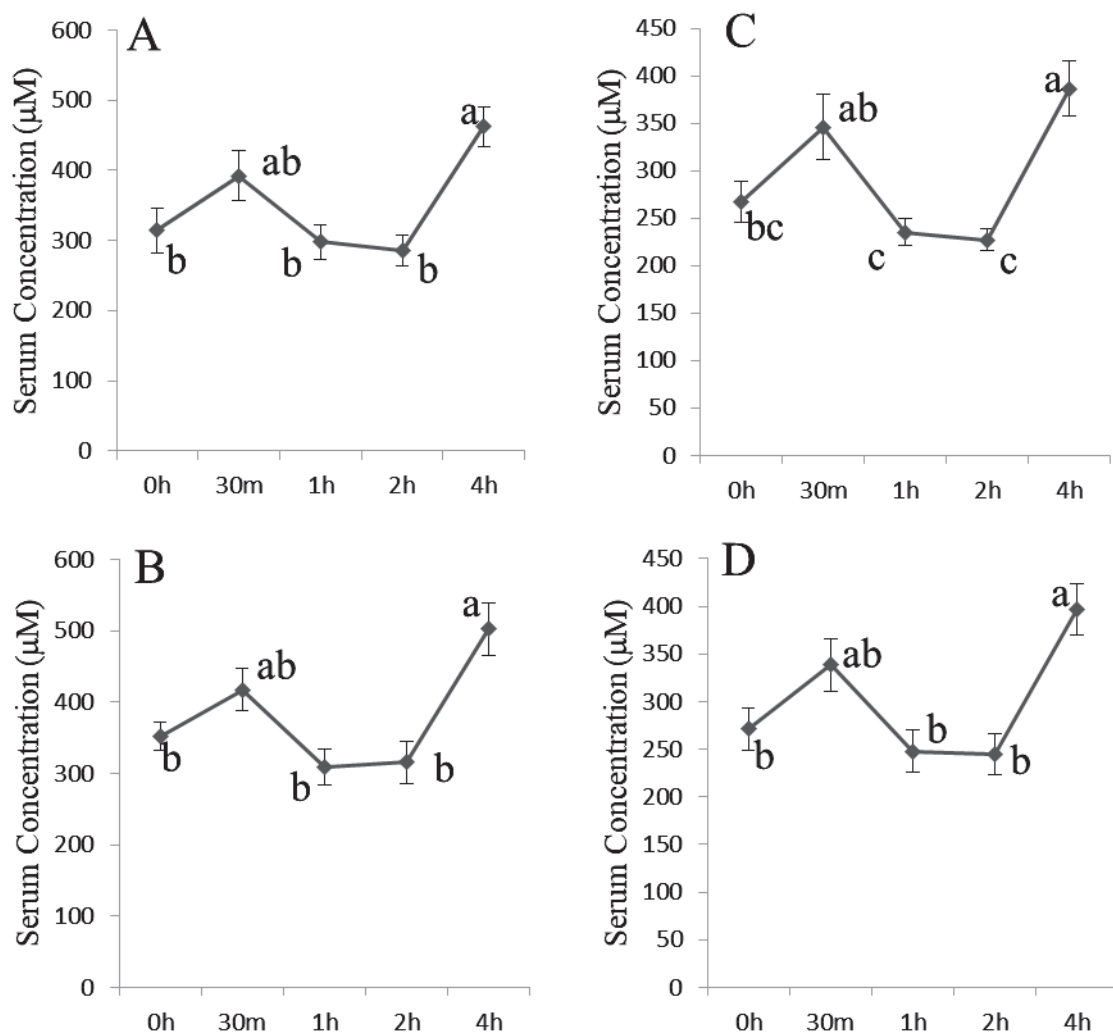


図5 ^{13}C -Cho の単回投与時の血中 ^{13}C -脂溶性コリン化合物濃度の経時変化
 データは各群5頭の平均値と標準誤差で示した。異なるアルファベットを付した値に統計学的に有意差があることを示す。

A: 門脈
 B: 上腸間膜静脈
 C: 下大静脈
 D: 腹部大動脈

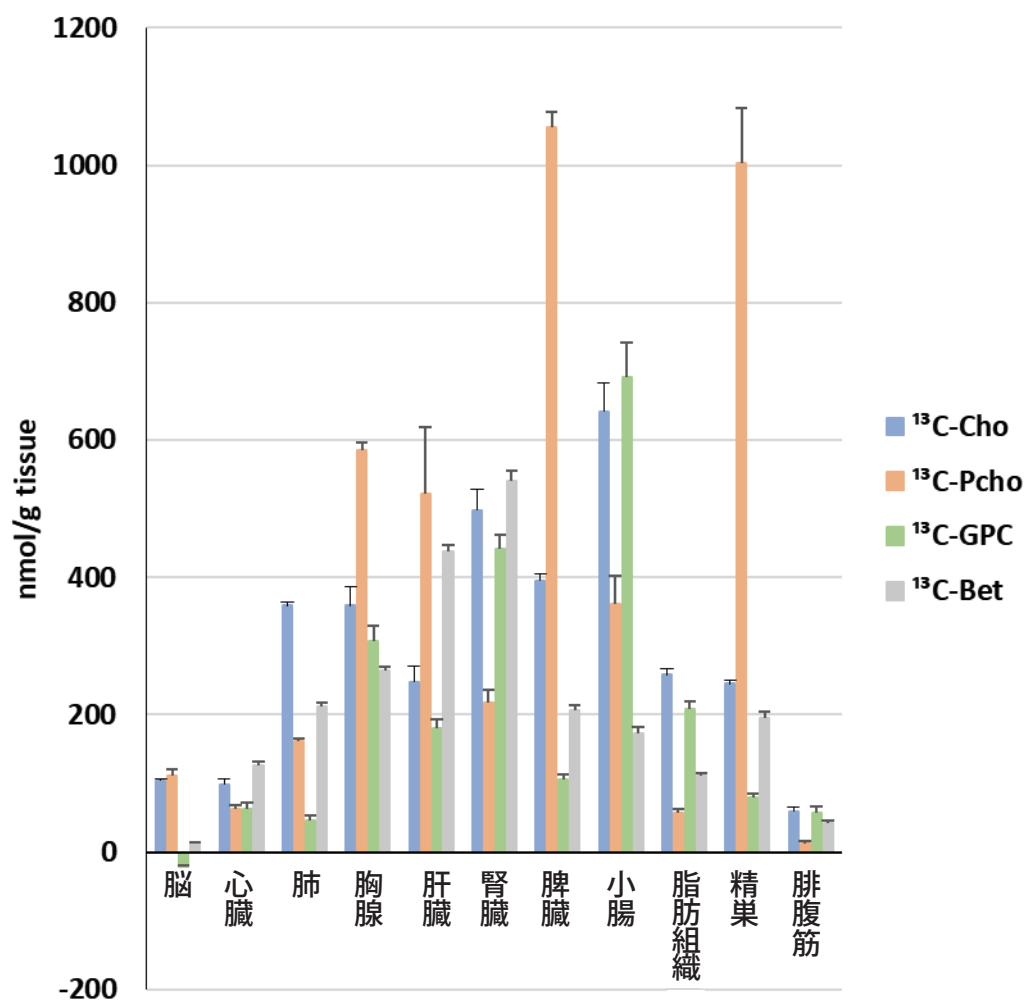


図6 $^{13}\text{C-Cho}$ の長期投与時の各組織内 ^{13}C -コリン関連化合物含量
 データは各群5頭の平均値と標準誤差で示した。各項目は別途測定した
 内因性 ^{13}C 化合物を差し引いた値