

博士學位論文

内容の要旨

及び

審査の結果の要旨

第 13 集

平成 29 年度
(2017 年度)

実践女子大学

は し が き

本篇は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、平成30年3月5日日本学において学位を授与した者の、論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した甲は、学位規則第4条第1項（いわゆる課程博士）によるものであることを示す。

目 次

課程の修了によるもの（課程博士）

甲第7号 博士(食物栄養学) 富 重 慶 子 5

食品の機能性成分がカイロミクロン apoB48 の分泌に与える影響の解析
—家兔反転腸管系および動物個体を用いた検討—

課程の修了によるもの
(課程博士)

食品の機能性成分がカイロミクロン apoB48 の分泌に与える影響の解析
— 家兔反転腸管系および動物個体を用いた検討 —

実践女子大学大学院 生活科学研究科
富重 慶子

概要【目的】 動脈硬化性心血管障害の危険因子として食後高脂血症が注目されている。本研究では組織レベルでのカイロミクロン (CM) の分泌を検討することを目的として、反転腸管系を用いて分泌されるアポリポ蛋白 B48 (apoB48) およびトリグリセライド (TG) 等の成分測定を試みた。さらに、脂質代謝に影響を与えるとされる数種のポリフェノールが CM の分泌に与える影響を反転腸管系を用いた実験と動物個体に成分を投与した実験において観察した。**【方法】** 家兔の小腸切片から反転腸管嚢 (sac) を作製し、脂質ミセル溶液に浸漬した後に sac 内に分泌される apoB48 等の測定を行った。動物個体における検討では、成分投与後の apoB48 分泌の経時的変化と長期投与による測定を行った。real-time PCR を用いて、遺伝子発現調節を検討した。**【結果】** 反転腸管系において、apoB48 および脂質の分泌を検出し定量することができた。resveratrol (Res)、genistein (Gen)、curcumin (Cur) の添加によりコントロールに比べ apoB48 減少がみられ、特に Res、Cur では濃度依存的であった。Cur 添加により、*apob*、*apobec1*、*alcf* 遺伝子発現に有意な濃度依存的な減少がみられた。動物個体における検討では、apoB48、TG 分泌に対照群に比べ大きな変化はみられなかった。**【結論】** 反転腸管を用いて CM 分泌の定量的な観察系を確立した。Res、Gen、Cur は遺伝子発現調節を介して apoB48 分泌を抑制し、CM レムナント粒子数の減少を通じて動脈硬化抑制的に働く可能性が示唆された。今回の動物個体の検討では、血中脂質分泌に対照群との違いは確認できなかった。

key words : 反転腸管、カイロミクロン、apolipoproteinB - 48、ポリフェノール

【緒言】

近年、食生活の変化と高齢化に伴い心血管障害が増加し、その原因としてのメタボリックシンドロームや動脈硬化への対策が必要とされている。これらの発症リスクとしては肥満、内臓脂肪、LDL コレステロール、インスリン抵抗性などが挙げられているが、いずれも食事性脂質の関与が大きく、特に食後高脂血症の影響が注目されている。食事由来の腸管リポ蛋白であるカイロミクロン (以下 CM) はリポ蛋白リパーゼ (以下 LPL) によって水解されることにより CM レムナントとなる。この CM レムナントは以前から言われているように動脈硬化の発症リスクとなる¹⁾²⁾が、CM または CM レムナントの分析には CM1 粒子当たり 1 分子存在している CM 粒子を統合するアポリポ蛋白 B48 (以下 apoB48)³⁾ の測定が必要である。我々は apoB48 の C 末端の合成ペプチドを用いて apoB48 特異的モノクローナル抗体を樹立して ELISA 系を開発し、apoB48 の定量測定を可能とした⁴⁾。

これまで脂質代謝の研究においては、培養細胞系⁵⁾⁶⁾ やヒトや実験動物を使つての報告⁷⁾⁸⁾ はみられるが、腸管組織レベルにおいて脂質の代謝を観察した報告は乏しく、さらに CM 分泌を直接的に分析した検討はみられない。まず、本研究において家兔の小腸の反転腸管系を用いて、組織での CM 分泌を観察する方法を検討した。

反転腸管系は、1954 年に Wilson & Wiseman がラットとハムスターの腸管を用いてブドウ糖吸収の研究を報告⁹⁾ して以降、ビタミン¹⁰⁾、薬剤¹¹⁾、ミネラル¹²⁾、ホルモン¹³⁾、リン酸の取り込み¹⁴⁾ 等について検討されている。脂質の代謝についても報告¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾ があるが、その分泌量を定量的に検討している研究はない。

本研究では、動脈硬化の抑制に資する食品成分を探索することを目的として、①反転腸管を用いた CM 測定系を確立するとともに、食品成分がこれに与える影響を観察することとした。さらに、2015 年我々が培養細胞を用いて検討した⁶⁾ 脂質代謝に影響を与えるとされるポリフェノールの Res、Gen、Cur を複数の濃度で添加して、CM の分泌に与える影響を検討した。

個体を用いた検討としてこれらの食品成分を投与して CM 分泌に与える経時的変化と、家兔に食品成分を長期投与し CM 分泌に与える影響を検討した。

研究 1 家兎の小腸を用いた反転腸管研究のための予備研究

【方法】

1. 実験材料(実験動物・試薬)

実験動物は New Zealand White rabbit 雄 8 週齢～(体重 2.0～3.0kg)を用いた。試薬は medetomidine (ドミツール、日本全薬工業)、midazolam (ドルミカム、アステラス製薬)、butorphanol tartrate (ベトルファール、明治製菓ファルマ)、aprotinin (アプロチニン溶液、和光純薬)、resveratrol (東京化成) (以下 Res)、genistein (東京化成) (以下 Gen)、curcumin (和光純薬) (以下 Cur)を用いた。腸管の反転に用いた経ロゾンデは、ディスポーザブルフィーディングニードル (エグゼック)を用いた。

尚、本研究は実践女子大学生活科学部動物実験委員会の審査、承認を受けて実施した。

2. 漿膜側 serosal side の培地の調製

反転腸管囊 (以下 sac) の内腔に分注する漿膜側の培地は、DMEM 培地「ニッスイ」(日本製薬株式会社)に 10%ウシ胎児血清(FBS) (GIBCO)、10%NaHCO₃を加えて作製し、アプロチニンを 145KIU/ml で添加した。

3. 粘膜側 mucosal side 脂質ミセルの調製

脂質ミセルは培養実験に用いたもの¹⁹⁾に準じ培地 1ml あたり 100mM oleic acid (シグマ) (以下 OA) 6μl、25mM cholesterol (シグマ) (以下 Chol) 2μl、100mM 2-monooleoylglycerol (シグマ) (以下 2-MO) 2μl、100mM phosphatidylcholine (シグマ) (以下 PC) 2μl、100mM lysophosphatidyl-choline (シグマ) (以下 LPC) 2μl を試験管内で混合し窒素下で乾燥した。DMEM (FBS- に溶解した胆汁酸 (24mM sodium taurocholate (SIGMA) (以下 Tau) を培地 15ml (1 本) あたり 1240μl 分注し超音波槽 (ULTRASONIC300, J. M. NEY COMPANY) で 10 分間処理した。さらに 1 本 15ml になるように DMEM (FBS-) を加えて、1 分間超音波処理し脂質ミセルを作成した。培地中の最終濃度は以下の通りである。OA : 600μM、Chol : 50μM、2-MO : 200μM、PC : 200μM、LPC : 200μM、Tau : 2mM

4. 脂質ミセルに添加する食品成分の調製

食品成分 Res、Gen、Cur は DMSO に 200mM に溶解して用いた。

5. 反転腸管の作製⁹⁾²⁰⁾

家兎は 3 種混合麻酔薬 (medetomidine 0.5mg/ml、midazolam 2.0mg/ml、butorphanol tartrate 0.5mg/ml)²¹⁾を 1.0～3.0ml/体重 kg の麻酔下に正中切開にて開腹した。小腸は胃側より順次 6.5cm ずつ約 30 個の切片を作成した。経ロゾンデを切片内腔に挿入し、先端を結紮して引き抜くことにより反転し、もう一方の片端を結紮し反転腸管を作製した。漿膜側 (内部) に 2. で作製した培地を sac 1 本あたり 300～400μl 分注した。

6. 反転腸管の実験

脂質ミセル溶液を分注したコニカルチューブを 37°C に孵置し、酸素注入下で 15～300 分間 sac を浸漬した。Sac 内の培地を回収し、-20°C にて保存した。

7. 実験条件と粘膜側の条件による実験デザイン

1) 用いた腸管切片の部位による検討

腸管切片は胃側から大腸側にむかって順に位置をラベルして識別し、sac を作成した。Sac を脂質ミセル溶液に 60 分間浸漬した後、漿膜側の培地を回収した。

2) 浸漬時間の検討

Sac を脂質ミセル溶液に 15 分、30 分、60 分、180 分、300 分間浸漬し、漿膜側の培地を回収した。

3) 添加する脂質溶液の種類による影響の検討

Sac を、脂質ミセル 10.5ml、脂質ミセル 5.25ml + 牛乳 5.25ml、牛乳 5.25ml + DMEM 5.25ml に浸漬し、60 分後に漿膜側の培地を回収した。

8. ApoB48 およびトリグリセライド (以下 TG) の測定

Sac 内の培地中の apoB48 は、ELISA 法により測定した。測定には Rabbit ApoB-48 ELISA KIT (Shibayagi, Japan)を用いた。TG は glycerol-3-phosphate oxidase を用いた酵素法「トリグリセライド E-テストワコー」(GPO・DAOS 法)で測定した。いずれも測定操作については製造者のプロトコールに従って行った。

9. 統計処理

分散分析ののち Tukey 法にて多重比較を行った。p < 0.05 を有意差有りとした。

【結果】

1. 用いた腸管切片の部位による検討

ApoB48 の分泌は胃側から順番に作製した sac で 4-6sac 目まで増加して最大となり、以降、大腸側へ向かい徐々に減少した。TG の分泌では 7-9sac 目まで増加して最大となり、以降徐々に減少した。TG/ apoB48 比は小腸の上部から中部に向けて比が大きくなり、下部に向かって小さくなった(図 1)。この結果から、以降の反転腸管実験の小腸は幽門より 20cm 下方から採取した。

2. 浸漬時間の検討

脂質ミセルに浸漬して行った検討の結果、apoB48 分泌は浸漬時間に伴って増加したが、30 分と 60 分の浸漬時間では顕著な変化はなかった。TG 分泌は浸漬時間の増加に伴って有意に増加した。TG/apoB48 比は、60 分後まで増加し、180 分以降は大きな変化はなかった(図 2)。

この結果から、以降の反転腸管実験は浸漬時間 60 分とすることにした。

3. 添加する脂質の種類による影響の検討

ApoB48 分泌は、脂質ミセルのみの溶液への浸漬に比べ、ミセル+牛乳、牛乳を加えた溶液への浸漬において低値であった。TG 分泌ではミセルのみの溶液へ浸漬に比べ、ミセル+牛乳において高値、牛乳を加えた溶液への浸漬において有意に高値であった(図 3)。

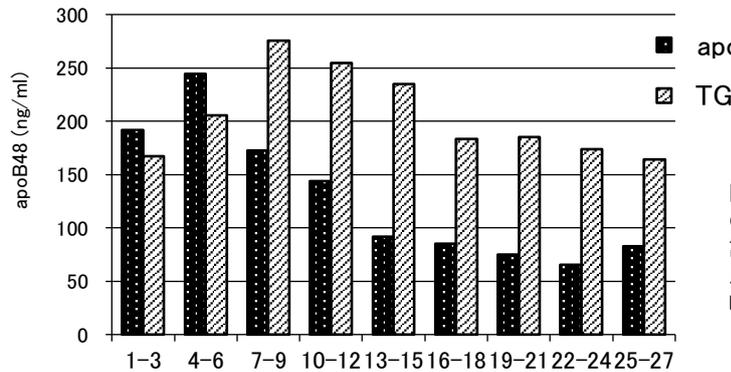


図 1 反転腸管嚢の作成に用いた腸管切片の部位による apoB48 および TG 分泌の検討
反転腸管嚢は胃側から大腸側に向けて No.1-27 とした

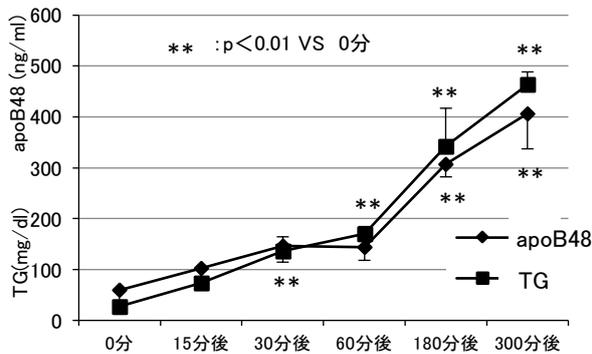


図 2 反転腸管嚢の脂質ミセル浸漬時間による apoB48 および TG 分泌の検討

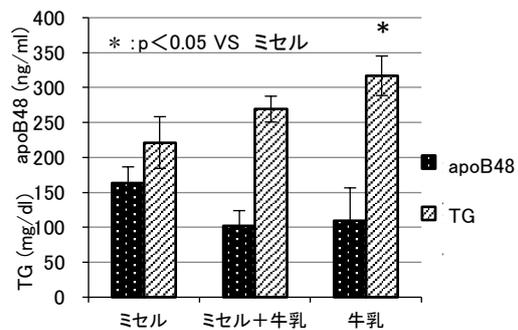


図 3 脂質溶液の種類による apoB48 および TG 分泌の検討

研究 2 家兔反転腸管系によるカイロミクロン apoB48 の合成・分泌に食品成分等が与える影響

【方法】

1. 実験材料(実験動物・試薬) 研究 1 と同じ実験材料を用いた。
2. 漿膜側 serosal side の培地の調製 研究 1 と同じ方法で行った。
3. 粘膜側 mucosal side 脂質ミセルの調製 研究 1 と同じ方法で行った。
4. 脂質ミセルに添加する食品成分の調製
食品成分 Res、Gen、Cur は DMSO に濃度 200mM、400mM に溶解して用いた。

5. 反転腸管の作製⁹⁾²⁰⁾

研究1と同じ方法で行ったが、sac中に分注した培地は400 μ lとした。

6. 粘膜側溶液への食品成分の添加による影響の検討

4で調製した食品成分溶液を最終濃度100、200、400 μ Mになるように脂質ミセル溶液に添加した。Sacを食品成分が添加された脂質ミセル溶液に小腸上方から下方にかけ均等になるように振り分け、各々5sac浸漬した。脂質ミセル溶液は37 $^{\circ}$ Cに孵置し、酸素注入下で60分間sacを浸漬した。Sac内の培地を回収し、-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。組織は採取し、RNAlater[®]Solution (Ambion, USA)に浸漬して-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。

7. ApoB48の測定

ApoB48は研究1と同じ方法で測定した。

8. TG、総コレステロール(TC)、low-density lipoprotein(LDL)、high-density lipoprotein(HDL)の測定

Sac内の培地中のTG、TC、LDL、HDLは各々LabAssay[™] Triglyceride (GPO・DAOS method) (Wako, Japan)、LabAssay[™] Cholesterol (Cholesterol Oxidase・DAOS method) (Wako, Japan)、Lタイプワコー LDL-C・M (選択消去法) (Wako, Japan)、HDL-コレステロール E-テストワコー (リンタンクスチレン酸・マグネシウム塩沈殿法) (Wako, Japan)を用いて測定した。測定操作については製造者のプロトコールに従って行った。

LDL測定における検量用試料はマルチキャリブレーター リピッド(Wako, Japan)を使用した。

9. 遺伝子発現調節の測定

採取した小腸組織はtotal RNAをRNeasy Plus Mini Kit(50) (キアゲン) およびQIAshredder[™](50) (キアゲン)を用いて抽出した。cDNAはHigh Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)を用いて調製した。Apo B, 編集酵素 APOBEC1, APOBEC1 補因子 A1CF、18sRNA, actin β , ApoA1, コレステロール輸送体 NPC1L1, 核内受容体 PPAR γ の遺伝子発現を測定した。各プライマー・プローブ (Applied Biosystems Inc) 1 μ l と調製した cDNA 1.9 μ l を TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l と混合し、TaqMan array96-well plate に分注した。real-time PCR (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems)を用いてcDNAを増幅し、 β -アクチンを内在コントロールとして解析を行った。

10. 統計処理

分散分析ののちTukey法にて多重比較を行った。p<0.05を有意差有りとした。

【結果】

1. ApoB48、TGの測定結果

ApoB48分泌では、3成分とも対照群に比べて減少が見られ、ResとCurでは濃度依存的な減少がみられた(図4)。各々、28.5%、38.9%減であった。TG分泌では、Res添加で増加傾向にあり400 μ M添加で有意な増加がみられたが、Gen、Cur添加では対照群に比べ変化はなかった(図5)。

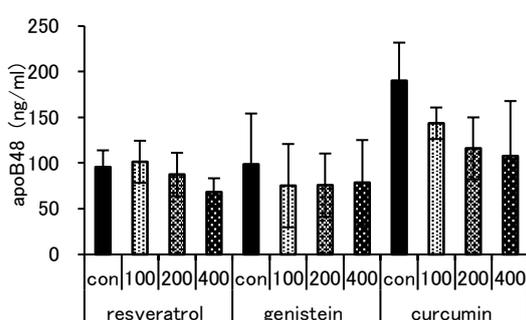


図4 食品成分がapoB48分泌に与える影響の検討 (反転腸管系を用いた検討)

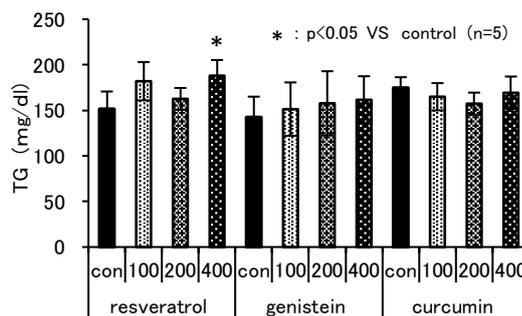


図5 食品成分がTG分泌に与える影響の検討 (反転腸管系を用いた検討)

2. TC、LDL、HDLの測定

Res添加で、TCでは100 μ M添加において有意な増加がみられたが、その他の濃度、では対照群に比べ大きな変化はなかった。LDLでは、すべての濃度において有意な増加がみられた。HDLでは、いずれの添加濃度でも対照群に比べ大きな変化はみられなかった(図6)。

Gen、Cur 添加では、TC、LDL、HDL 分泌でいずれの添加濃度でも対照群に比べ大きな変化はみられなかった(図 7、図 8)。

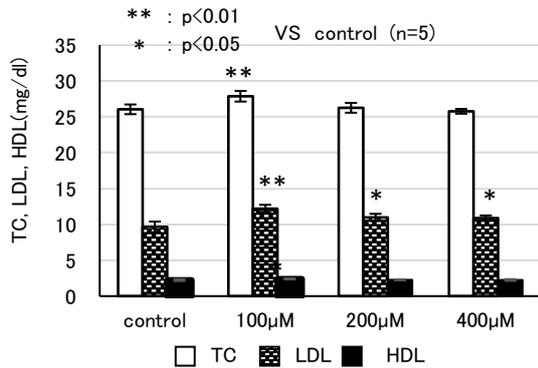


図 6 resveratrol が TC、HDL、LDL 分泌に与える影響

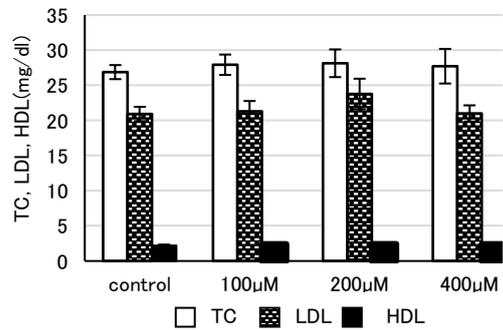


図 7 genistein が TC、HDL、LDL 分泌に与える影響

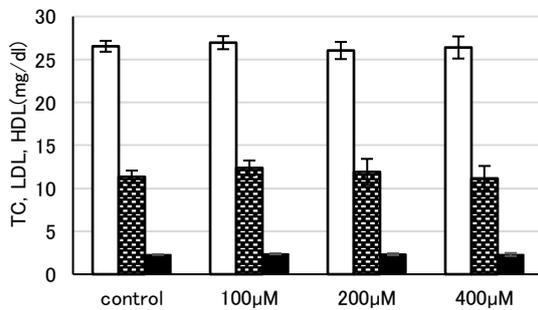


図 8 curcumin が TC、HDL、LDL 分泌に与える影響

3. 遺伝子発現調節の結果

Res 添加では、*apob* の発現が対照群に比べ濃度依存的に減少し 200µM (26.9%) では有意であった。*apobec1* と *a1cf* は対照群に比べ、発現に増加がみられた(図 9)。Gen 添加では *apob* の発現が対照群に比べ濃度依存的な有意な減少が見られた。*apobec1* と *a1cf* は対照群に比べ発現に有意な増加がみられたが、濃度が濃くなるに従い増加の程度は少なくなった(図 10)。

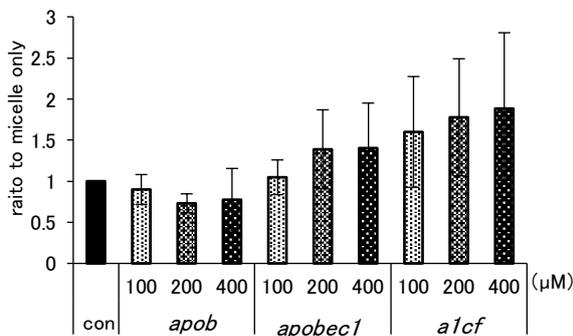


図 9 resveratrol による遺伝子の発現調節

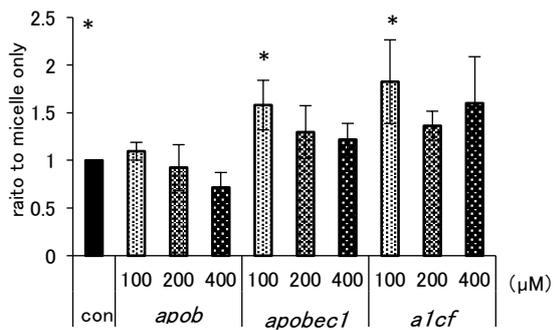


図 10 genistein による「遺伝子の発現調節

Cur 添加では、*apob*、*apobec1*、*a1cf*すべて、対照群に比べ濃度依存的な有意な減少が見られた(図 11)。

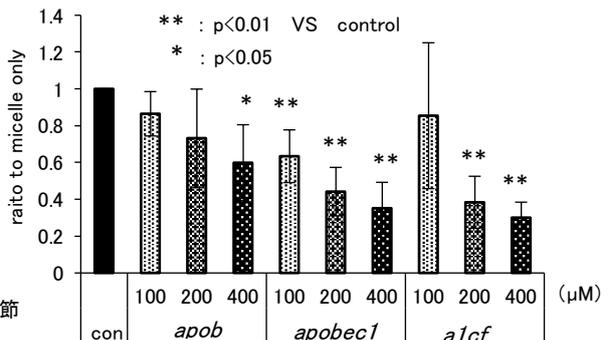


図 11 curcumin による遺伝子の発現調節

研究3 食品成分投与によるカイロミクロン分泌への経時的影響の検討

【方法】

1. 実験材料(実験動物・試薬)

実験動物は New Zealand White rabbit 雄 8 週齢～(体重 1.7～3.0kg) (東京実験動物株式会社) を用いた。投与した食品成分試薬は resveratrol (東京化成) (以下 Res)、genistein (LC Laboratories) (以下 Gen)、curcumin (和光純薬) (以下 Cur) を用いた。

2. 食品成分の投与と採血

家兎 4 羽(食品 1 成分毎)に 1 週間高脂肪飼料 (1%コレステロール、6%ピーナッツオイル含有に調製 LRC-4、オリエンタル酵母工業 (株)) を摂取後、21 時間絶食させた。8 日目(絶食後)高脂肪飼料+食品成分各々 0、200、400、800 μ mol/kg 体重を 1 時間摂取させた。高脂肪食摂取前、摂取開始前、1、3、6、9 時間後の 6 回採血し、血漿を -20°C にて保存した。食品 1 成分について家兎を 4 羽使用し、各個体における用量依存性を検討するため 4 サイクルの実験を行った。2 サイクル目以降の高脂肪食摂取は 3 日間とし、1 日目採血のデータは初回時の検体を使用した。

3. ApoB48 の測定

2. で採取した血清の apoB48 は、70 倍に希釈し ELISA 法により測定した。測定には Rabbit ApoB-48 ELISA KIT (Shibayagi, Japan) を用いた。測定操作については製造者のプロトコールに従って行った。測定後、補正を行った。

4. TG、TC、LDL、HDL の測定

2. で採取した血清の TG、TC、LDL、HDL は各々研究 2 も示した Kit を用いて測定した。測定操作については製造者のプロトコールに従って行った。LDL 測定における検量用試料はマルチキャリブレーターリッピド (Wako, Japan) を使用した。TG、TC、LDL の測定では、検体を生理食塩水で以下の倍率に希釈して行った。TG : 2 倍、TC : 10 倍、LDL : 5 倍

・統計処理 分散分析ののち Tukey 法にて多重比較を行った。p < 0.05 を有意差有りとした。

【結果】

1. apoB48 測定結果

食品成分の長期投与では、血漿中の apoB48 分泌はいずれの成分においても有意な差はみられなかった(図 12、13、14)。

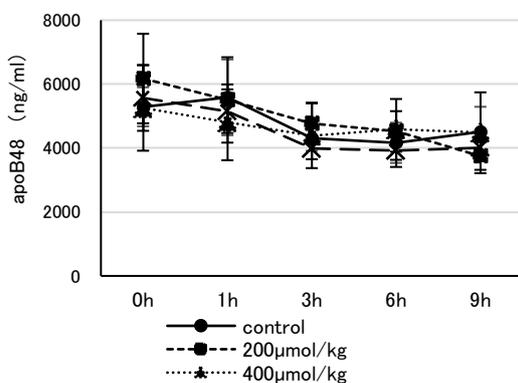


図 12 resveratrol 投与による apoB48 分泌の経時的変化

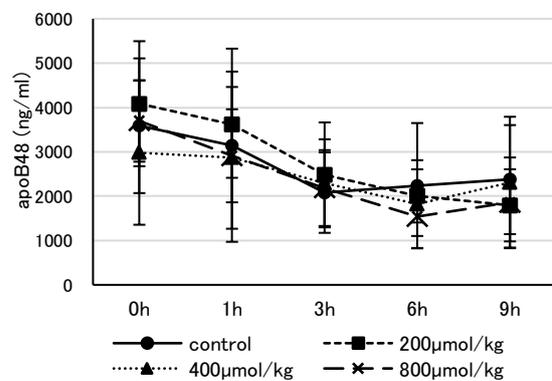


図 13 genistein 投与による apoB48 分泌の経時的変化

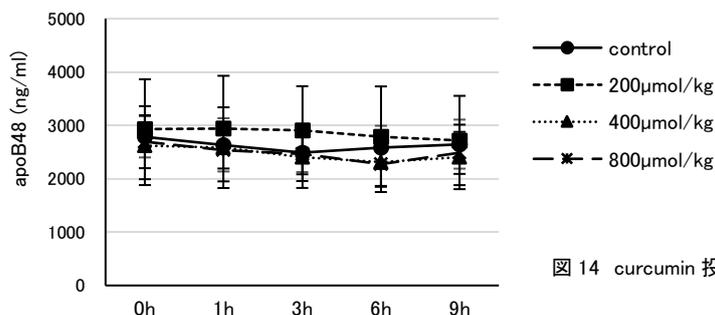


図 14 curcumin 投与による apoB48 分泌の経時的変化

研究 4 食品成分長期投与によるカイロミクロン分泌への影響の検討

【方法】

1. 実験材料(実験動物・試薬)

実験動物は New Zealand White rabbit 雄 10 週齢(体重 1.8~2.1kg) (東京実験動物株式会社) を用いた。投与した食品成分試薬は resveratrol (東京化成) (以下 Res)、genistein (LC Laboratories) (以下 Gen)、curcumin (和光純薬) (以下 Cur) を用いた。

2. 食品成分の投与と採血

12羽の家兔を4グループに分け、すべてのグループに1日目から7日間高脂肪飼料(研究3と同じ)を与えた。8日目から2週間グループ1はコントロールとして引き続き高脂肪飼料のみを与えた。残りの3グループは高脂肪飼料と共にグループ2はResを1500 μ mol/kg体重/day²²、グループ3はGenを20 μ mol/kg体重/day²³、グループ4はCurを600 μ mol/kg体重/day²⁴与えた。採血は1、8、15、22日目に耳の静脈より取り、遠心分離後血清を-20℃にて保存した。

3. 組織(小腸、肝臓、大動脈)採取

長期投与後、家兔は研究1と同じ方法にて開腹した。小腸は胃から25cm、71cm、114cmから各々1cmの切片を5片採取した。肝臓は左葉、右葉各々5片採取した。小腸、肝臓ともに採取後、十分な量のRNAlater®Solution (Ambion, USA) に浸漬して-20℃にて保存した。大動脈を採取し縦に切開して写真を撮った後、ホルマリンに浸漬し保存した。

4. ApoB48 の測定 研究3の3と同じ方法で測定した。

5. TG、TC、LDL、HDL の測定 研究3の4と同じ方法で測定した。

6. 遺伝子遺伝子発現の測定 採取した組織を研究2の8と同じ方法で測定した。

7. 大動脈の染色 [1] [2]

保存してあった大動脈を70% ethanolで簡単に洗浄し、0.5% Sudan IV溶液(溶媒:70% ethanolとacetone(1:1))に20分間浸漬した後、1時間流水中で洗浄した。

8. 長期投与後家兔の小腸を使用した反転腸管実験

成分を長期投与した家兔の小腸を採取し、研究1、2と同じ方法で反転腸管実験を行った。浸漬液は脂質ミセルのみとした。回収した sac 内培地の apoB48、TG の測定を行った。

【結果】

1. ApoB48、TG 分泌の結果

血漿中の apoB48 分泌はいずれの成分においても、対照群に比べ22日目の測定結果において有意な差はなかったが、コントロールに比べGen、Cur投与が低かった(図15)。血漿中のTG分泌はDay8と比べDay22において対照群、Res群、Gen群、Cur群、各々74.3%、89.0%、44.3%、48.7%の増加がみられた。対照群に比べGen投与群、Cur投与群では増加率が低かった。(図16)

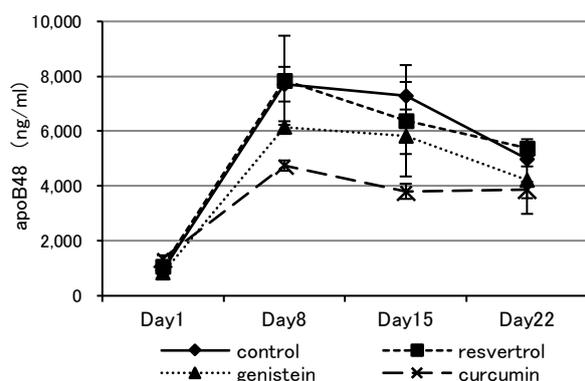


図 15 食品成分の長期投与による血清 apoB48 分泌に与える影響

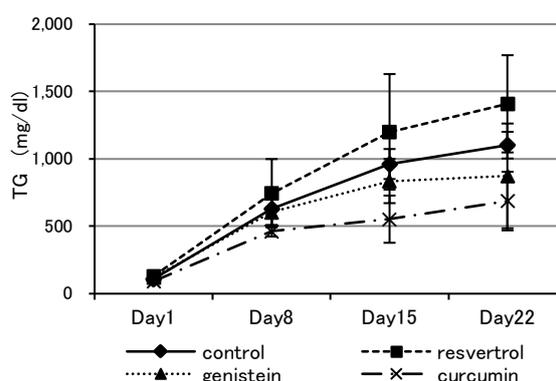


図 16 食品成分の長期投与による血清 TG 分泌に与える影響

2. 反転腸管実験での培地 apoB48、TG 測定の結果

対照群に比べ、投与群の小腸使用の反転腸管では、Res、Gen の apoB48 分泌に増加の傾向がみられ、TG 分泌では3成分に減少の傾向がみられた。(図17、18)

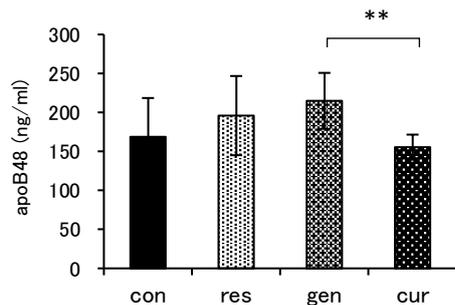


図 17 成分を長期投与された家兎小腸の apoB48 分泌への影響(反転腸管による検討)

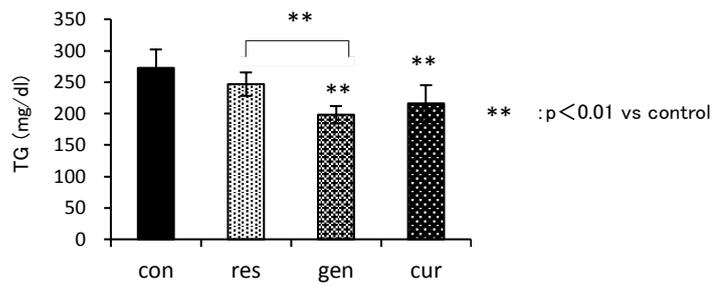


図 18 成分を長期投与された家兎小腸の TG 分泌への影響(反転腸管による検討)

【考察】

食後高脂血症研究では様々な細胞系や個体系の研究が行われてきているが、細胞レベルと個体レベルを結ぶ腸管組織を使用したでの研究は乏しく実験手段として確立されていない。本研究では、反転腸管を CM 分泌を定量的に測定しうる実験系として確立した。

反転腸管囊の作製は Wilson ら⁹⁾や Hamilton らの報告²⁰⁾を参考にしたが、本研究では、小腸を反転させる補助器具として小動物用の経口ゾンデを使用し、これにより sac の識別表示、sac 内への培地の分注が容易となった。

これまで、反転腸管系を用いての脂質に関する研究としては、種々の条件下でのタウロコール酸の取り込み・蓄積をみた研究¹⁸⁾²⁵⁾やりんご未熟果実由来ポリフェノールの脂肪の吸収阻害作用の研究²⁶⁾、脂質吸収におけるカルシウム、マグネシウムイオンの影響をみた研究¹⁶⁾、リノール酸やオレイン酸の取り込みを観察した研究¹⁷⁾²⁷⁾がある。反転腸管系での脂質の吸収・分泌を検討した研究において、電子顕微鏡で細胞質内への脂質小滴の蓄積および細胞外への出現¹⁵⁾、CM 様粒子を形態的に観察した報告¹⁶⁾があるが、CM の分泌を定量的に検討した報告はない。

粘膜側に添加する脂質については、前述の研究では粘膜側の脂質をオレイン酸やリノレン酸、リノール酸をそのまま添加¹⁶⁾¹⁷⁾²⁷⁾またはミセル化して添加¹⁵⁾²⁶⁾している。我々は培養細胞系での脂質代謝の検討⁶⁾に用いた脂質ミセル¹⁹⁾を調製した後、反転腸管に吸収させて漿膜側に分泌された apoB48 と TG を測定しカイロミクロン分泌を定量的に観察した。

まず、反転腸管系で脂質代謝を検討するために小腸の部位による違いを観察した。apoB48 分泌は胃側から約 25cm で最も多くなり TG 分泌は apoB48 分泌より少し下部の約 50cm で最大となった。すなわち、脂肪の吸収能、apoB48 の合成・分泌能が胃側の sac において大腸側より高いことが示唆された。この CM 分泌の結果を受けて、反転腸管実験は幽門より 20cm 下方からの小腸切片を使用することが適切であると考えた。また、切片部位を小腸上～下部を均等に選択して用いることにより部位による違いの影響を排除した。

次に浸漬時間による apoB48 と TG 分泌について検討した。どちらの分泌においても浸漬時間が延びるに従い、分泌量は増加した。脂質関係を検討した他の研究¹¹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²⁵⁾では 30 分から 4 時間の浸漬時間であったが、apoB48 分泌では 30 分から 60 分までの増加が多くなく増加率もどちらの分泌も時間が経つに従って減少してきたので、浸漬時間は 60 分が適切であると考えた。

浸漬する脂質溶液をミセルと牛乳で比べた結果では、牛乳の量の増加により apoB48 分泌は減少し、TG 分泌は増加した。TG/apoB48 比は、牛乳の比率が多くなるにしたがって大きくなった。すなわち、TG 分泌が多いことは牛乳溶液の脂肪濃度 (18mg/ml) がミセル溶液 (0.5mg/ml) に比し著しく高く、高率に吸収したことによると考えられる。一方 apoB48 は、通常は細胞内で過剰合成されており、TG の増加にしたがって分泌が増加するはずであるがむしろ減少がみられている。飽和脂肪酸が多い乳脂肪はカイロミクロン粒子サイズを減少させる²⁸⁾すなわち相対的に apoB48 を増加させることが知られているので、ここではホエイのタンパク成分などが apoB48 の減少に関与した可能性がある。ホエイや乳製品において報告されている抗動脈硬化作用²⁹⁾³⁰⁾は apoB48 を介するところがあるかもしれない。

さらに本研究では、脂質代謝に影響を与える可能性が報告されている数種のポリフェノールについて反転腸管系を用いて検討した。ワインポリフェノールの成分である resveratrol (Res)²²⁾

31)32)大豆イソフラボンの成分である genistein (Gen)²³⁾³³⁾、ウコンの成分である curcumin (Cur)⁶⁾³⁴⁾³⁵⁾の3食品成分を脂質ミセル溶液に添加しCM分泌を検討した。

これまで Res の脂質代謝への影響については、血中脂質低下作用²²⁾³⁶⁾³⁷⁾、抗動脈硬化作用³⁸⁾³⁹⁾、酸化 LDL と apoB が減少したとの報告⁴⁰⁾等がある。また、電気泳動による apoB48 分泌の検討³¹⁾や apoB48、apoB100 の分化異化率を検討している報告³²⁾はあるが、apoB48 を直接定量して CM 分泌を検討した報告はない。また、大豆イソフラボンおよび主要成分である Gen の脂質代謝への影響では、血中脂質低下作用⁴¹⁾⁴²⁾、抗動脈硬化作用³³⁾が報告されている。Gen の影響の検討において肝臓細胞を用いての apoB 分泌減少の報告⁴³⁾はあるが、CM や apoB48 の分泌を検討した報告はない。2015 年に著者が培養腸管細胞 Caco2 を用いて Cur の脂質代謝への影響について、apoB48 の分泌が遺伝子転写と mRNA 編集のレベルで抑制されることにより、動脈硬化抑制に働く可能性を報告した⁶⁾。その他の報告では血中脂質低下作用³⁴⁾³⁵⁾、抗動脈硬化作用⁴⁴⁾、NPC1L1⁴⁵⁾の発現減少も報告されている。今回の反転腸管系の研究の結果では、apoB48 分泌はコントロールに比べ 3 成分の添加において減少がみられた。apoB48 は CM1 粒子当たり 1 分子存在しているの³⁾、apoB48 の減少は分泌された CM 粒子数が減少していることを意味する。一方、TG 分泌においてはわずかな増減がみられたが、対照群に比べ大きな変化はなかった。そのため、TG/apoB48 比では 3 成分とも対照群に比べて増加がみられた。これらのことは 3 食品成分の添加により TG 分泌量に大きな変化がないにもかかわらず、CM の粒子数が減少したことにより CM の粒子サイズが増大していることを示している。この結果は我々が先に腸管細胞 Caco2 極性培養系で検討した結果⁶⁾と同じである。CM 粒子は血中で LPL により代謝されることにより同数の CM レムナント粒子となるので CM 粒子数の減少は動脈硬化巣の形成に働く CM レムナント¹⁾²⁾の粒子数減少をもたらすことになる。今回用いた 3 種の食品成分は apoB48 分泌減少を通して CM レムナント粒子数を減少させる効果があると考えられ、動脈硬化抑制的に働く可能性が示唆される。脂質関連タンパク質の遺伝子転写解析の結果、Res と Gen は *apob* 遺伝子が、Cur では *apob*、*apobec1*、*alcf* が対照群に比べ濃度依存的な減少をみせており、3 成分が遺伝子転写レベルで apoB48 分泌を抑制していることが観察された。

反転腸管系の検討によるその他の脂質の測定において、肝臓から分泌される LDL が測定された。培養細胞を用いた検討⁶⁾で apoB100 が検出されなかったの、組織からの分泌ではなく別の原因がある可能性が高いと考える。反転腸管作製時に腸間膜の除去を行うが、その処理が十分でなく血液がコンタミしてしまったか、また除去としてはある程度十分であっても血液が付着していたことも考えられる。

動物個体を用いた検討では、高脂肪飼料+食品成分摂取後の apoB48、TG 等分泌の経時的変化を観察した検討と、高脂肪飼料+食品成分を長期間投与して食品成分の apoB48、TG 等分泌への影響の検討を行ったが、いずれの成分・濃度においても対照群に比べ有意な差はなく、大きな変化もみられなかった。しかし、長期投与実験後に採取した大動脈を観察において、対照群の大動脈において動脈硬化の初期病変の脂肪線条 (fatty streak) 的な変化が認められたが、投与群においてはわずかなものか、または認められなかった。

血中脂質の経時的な変化を観察した検討では、高脂肪飼料摂取後 1、3 時間後と上昇し、3 時間後をピークに apoB48、TG 分泌が減少している報告⁴⁶⁾があり、今回の結果とは大きく異なった。また、長期投与を行っての検討についても前述の 3 成分の先行研究でヒトあるいは動物への投与実験研究において、血中脂質低下作用²²⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾⁴¹⁾⁴²⁾が報告されており今回の結果とは異なっているが、実験期間が 7~24 週間であり今回の検討では期間が短かった可能性は十分考えられる。しかし、Res 投与の研究で実験期間が 8 週間で血中脂質に大きな変化は見られなかったが、抗動脈硬化作用は見られたとの報告⁴⁷⁾もあり、今回の結果はこの報告と同じ結果となった。また、長期投与実験において血中脂質の変化が観察されなかったことについては、長期投与後の家兎小腸を用いた反転腸管実験で対照群に比べ投与群の小腸で apoB48 分泌が増加した結果から、食品成分を小腸内腔に添加した場合と摂取して小腸壁内に成分が取り込まれた場合とでは CM 分泌または apoB48 分泌への影響に違いがある可能性が考えられる。

本研究は、Res、Gen、Cur が apoB48 分泌に与える影響を細胞生物学的な検討に続き、組織さらには動物個体を用いて検討したものである。組織での検討のための反転腸管系で脂質代謝を検討する系を確立し、Res、Gen、Cur について培養細胞株の検討に続き、CM レムナント粒子数の減少

を介し動脈硬化抑制的に働く可能性が示唆された。また、遺伝子発現調節の結果より、Res、Gen、CurはCM apoB48の合成・分泌を、遺伝子転写とmRNA編集のレベルで抑制することが明らかとなり、脂質改善、動脈硬化の抑制に関与しうる可能性が示唆された。

【結論】

反転腸管を用いたCM分泌の定量的な観察系を確立した。反転腸管系を用いて食品成分が脂質代謝に与える影響を観察することができた。resveratrolなどのポリフェノールはapoB48分泌を減少させ、動脈硬化抑制的に働く可能性が示唆された。食品成分投与による検討では、apoB48分泌には大きな変化はみられなかったが、動脈硬化の初期病変の抑制が確認できた。

【文献】

- 1) Florén CH, Albers JJ, Kudchodkar BJ, Bierman EL. : Receptor-dependent uptake of human chylomicron remnants by cultured skin fibroblasts. *J Biol Chem.*, 256(1): 425-33 (1981)
- 2) Simons LA, Dwyer T, Simons J, Bernstein L, Mock P, Poonia NS, Balasubramaniam S, Baron D, Branson J, Morgan J, et al. : Chylomicrons and chylomicron remnants in coronary artery disease: a case-control study. *Atherosclerosis.*, 65(1-2):181-9 (1987)
- 3) Phillips ML, Pullinger C, Kroes I, Kroes J, Hardman DA, Chen G, Curtiss LK, Gutierrez MM, Kane JP, Schumaker VN. : A single copy of apolipoprotein B-48 is present on the human chylomicron remnant. *J Lipid Res.*, 38(6): 1170-7 (1997)
- 4) Kinoshita M, Kojima M, Matsushima T, Teramoto T: Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA. *Clin Chim Acta*, 351(1-2): 115-120 (2005)
- 5) Danielle Chateau, Thomas Pauquai, François Delers, Monique Rousset, Jean Chambaz, Sylvie Demignot: Lipid Micelles Stimulate the Secretion of Triglyceride-Enriched Apolipoprotein B48-Containing Lipoprotein by Caco-2 Cells. *J Cell Physiol*, 202(3): 767-776 (2005)
- 6) 富重慶子、細川優、中川靖枝、松島照彦: 培養腸管細胞からのカイロミクロンApoB-48の合成、分泌に対しcurcuminが与える影響. *日本臨床栄養学会雑誌*, 37(2): 122-129 (2015)
- 7) Hepner G, Fried R, St Jeor S, Fusetti L, Morin R: Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Am J Clin Nutr*, 32(1):19-24 (1979)
- 8) Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M: Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1127(2):141-6 (1992)
- 9) Wiseman, T. H. Wilson and G. : The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*, 123(1): 116-125 (1954)
- 10) 秋山俊夫: ビタミンB1の腸管吸収-ラット空腸による実験-. *消化と吸収* 10: 97-99 (1987)
- 11) Patel JP, Korashy HM, El-Kadi AO, Brocks DR: Effect of bile and lipids on the stereoselective metabolism of halofantrine by rat everted-intestinal sacs. *Chirality*, 22(2): 275-283 (2010)
- 12) 小林悦子、青木康展、鈴木和夫: 年齢による腸管からのカルシウムとストロンチウムの識別的取り込みの変化. 十二指腸粘膜上皮細胞膜のりん脂質組成の変化との関連. *衛生化学*, 38(2): 149-155 (1992)
- 13) 田中 浩一郎、山本 善彦、村上 正裕、山本 昌、村西 昌三: in vitro 反転腸管法を用いたLauroyl-TRHの消化管吸収機構に関する検討. *Drug Delivery System*, 8(3): 205-208 (1993)
- 14) Mary PL, Rao JP. : Phenol red inhibits uptake of phosphate by the everted gut sacs of mice. *Kobe J Med Sci*, 48(1-2): 59-62 (2002)
- 15) Stmuss, Elliott W: Electron microscopic study of intestinal fat absorption in vitro from mixed micelles containing linolenic acid, monoolein, and bile salt linolenic acid, monoolein, and bile salt. *J Lipid Res*, 7: 307-323 (1966)
- 16) EW., Strauss: Effects of calcium and magnesium ions upon fat absorption by sacs of everted hamster intestine. *Gastroenterology*, 73(2): 421-424 (1977)
- 17) Bitman J, Wrenn TR, Weyant JR, Wood DL. : Effect of dietary fat and cholesterol on uptake

of oleic acid and triolein by everted sacs of bovine small intestine. *J Dairy Sci*, 65(7): 1148-1154 (1982)

18) Masaru KITAGAWA, Kimikazu IWAMI, Fumio IBUKI: Na⁺-Dependent Transport System for Taurocholate in Rat Small Intestine; Its Localization in the Terminal Ileum and Variation by Fasting. *Agric Biol Chem*, 54(3): 685-689 (1990)

19) Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, Demignot S: Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol*, 202(3): 767-776 (2005)

20) Hamilton KL, Butt AG.: Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. *Adv Physiol Educ*, 37(4): 415-426 (2013)

21) 今野和則、堀内伸二、磯江孝治、松田浩典、藤原広和、古谷真美、高島宏昌: ラットおよびウサギにおける3種混合麻酔薬の検討. *秦野研究所年報*, 35: 53-59 (2012)

22) Tanko Y, Jimoh A, Ahmed A, Mohammed A, Ayo JO.: Resveratrol Protects Rabbits Against Cholesterol Diet-Induced Hyperlipidaemia. *Niger J Physiol Sci*, 31(1): 71-75 (2016) 22) Stark A, Madar Z.: The effect of an ethanol extract derived from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on bile acid absorption and cholesterol levels in rats. *Br J Nutr*, 69: 277-287 (1993)

23) Zhao H, Li C, Cao JG, Xiang HL, Yang HZ, You JL, Li CL, Fu XH.: 7-Difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein, a novel genistein derivative, has therapeutic effects on atherosclerosis in a rabbit model. *J Cardiovasc Pharmacol*, 54(5): 412-20 (2009)

24) Naito M, Wu X, Nomura H, Kodama M, Kato Y, Kato Y, Osawa T.: The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *J Atheroscler Thromb.*, 9(5): 243-50 (2002)

25) Stark A, Madar Z.: The effect of an ethanol extract derived from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on bile acid absorption and cholesterol levels in rats. *Br J Nutr*, 69: 277-287 (1993)

26) 東 知宏、長田 恭一、相倉 悦子、今坂 浩、半田 正之: りんご未熟果実由来ポリフェノール摂取による肥満予防作用. *日本食品科学工学会誌*, 60(4): 184-192 (2013)

27) Chow SL, Hollander D.: A dual, concentration-dependent absorption mechanism of linoleic acid by rat jejunum in vitro. *J Lipid Res*, 20(3): 349-356 (1979)

28) Kalogeris TJ, Story JA.: Lymph chylomicron size is modified by fat saturation in rats. *J Nutr.*, 122(8): 1634-42 (1992)

29) Nabi XH, Ma CY, Manaer T, Heizati M, Wulazibieke B, Aierken L.: Anti-atherosclerotic effect of traditional fermented cheese whey in atherosclerotic rabbits and identification of probiotics. *BMC Complement Altern Med.*, 16:309: 1-13 (2016)

30) Chrysant SG, Chrysant GS.: An update on the cardiovascular pleiotropic effects of milk and milk products. *J Clin Hypertens*, 15(7): 503-10 (2013)

31) Pal S, Ho SS, Takechi R.: Red wine polyphenolics suppress the secretion of ApoB48 from human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 53(7): 2767-2772 (2005)

32) Dash S, Xiao C, Morgantini C, Szeto L, Lewis GF.: High-dose resveratrol treatment for 2 weeks inhibits intestinal and hepatic lipoprotein production in overweight/obese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(12): 2895-2901 (2013)

33) Lee CS, Kwon SJ, Na SY, Lim SP, Lee JH.: Genistein supplementation inhibits atherosclerosis with stabilization of the lesions in hypercholesterolemic rabbits. *J Korean Med Sci*, 19(5): 656-61 (2004)

34) Shin SK, Ha TY, McGregor RA, Choi MS.: Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism. *Mol Nutr Food Res*, 55(12): 1829-40 (2011)

35) Patil TN, Srinivasan M.: Hypocholesteremic effect of curcumin in induced

- hypercholesteremic rats. *Indian J Exp Biol*, 9(2): 167-169 (1971)
- 36) Cho IJ, Ahn JY, Kim S, Choi MS, Ha TY. : Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(1): 190-194 (2008)
- 37) Marines de Castro, Angela P. M. Veiga, Maria R. Pacheco: Plasma lipid profile of experimentally induced hyperlipidemic New Zealand white rabbits is not affected by resveratrol. *J Appl Res*, 9(1): 18-22 (2009)
- 38) Wong RH, Howe PR, Buckley JD, Coates AM, Kunz I, Berry NM. : Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 21(11): 851-6 (2011)
- 39) M. Castro, M. M. R. Pacheco M. D, M. R. F. Machado M. D. : Morphology of aortic arch in rabbit with atherosclerosis treated with resveratrol. *Intern J Appl Res Vet Med*, 7(4): 190-195 (2009)
- 40) Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, García-Almagro FJ, Avilés-Plaza F, Parra S, Yáñez-Gascón MJ, Ruiz-Ros JA, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. : Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Mol Nutr Food Res*, 56(5): 810-821 (2012)
- 41) Elizabeth A. Kirk³, Phuong Sutherland, Shari A. Wang, Alan Chait, and Renee C. LeBoeuf: Dietary Isoflavones Reduce Plasma Cholesterol and Atherosclerosis in C57BL/6 Mice but not LDL Receptor-Deficient Mice. *J. Nutr*, 128(6): 954-959 (1998)
- 42) 神田知、天野真佐理、高松美和、相良未木、家森幸男：積極的な大豆食摂取が中高齢者の循環器疾患リスクファクター軽減に及ぼす影響。 *大豆たん白質研究*, 5: 138-143 (2002)
- 43) Nica M Borradaile, Linda E de Dreu, Lisa J Wilcox, Jane Y Edwards, and Murray W Huff: Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J*, 366(2): 531-539 (2002)
- 44) Quiles JL, Mesa MD, Ramírez-Tortosa CL, Aguilera CM, Battino M, Gil A, Ramírez-Tortosa MC. : Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(7): 1225-31 (2002)
- 45) Feng D, Ohlsson L, Duan RD. : Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids Health Dis*, 9(40): 1-5 (2010)
- 46) Kinoshita M, Matsushima T, Mashimo Y, Kojima M, Kigure M, Teramoto T. : Determination of immuno-reactive rabbit apolipoprotein B-48 in serum by ELISA. *Exp Anim.*, 59(4): 459-67 (2010)
- 47) Matos RS, Baroncini LA, Précoma LB, Winter G, Lambach PH, Caron EY, Kaiber F, Précoma DB. : Resveratrol causes antiatherogenic effects in an animal model of atherosclerosis. *Arq Bras Cardiol.*, 98(2): 136-42 (2012)

【発表論文】 「ウサギ反転腸管系を用いた脂質吸収とカイロミクロンの分泌の測定」
日本臨床栄養学会誌、39(4):230-236 (2017)

【学会発表】

1. 「家兎の反転腸管を用いた回路ミクロンの分泌・に食品成分等が与える影響の検討」
2017年(平成29年)1月15日、第51回 日本成人病(生活習慣病)学会学術集会
演題番号：51、都市センターホテル
2. 「Analysis of chylomicron apoB48 secretion using everted intestinal sac system: Effects of food ingredients.」
2017年9月10-14日、42nd FEBS CONGRESS, Jerusalem, Israel P.5、演題4-019
3. 「カイロミクロン ApoB-48 の分泌に栄養素、食品成分等が与える影響～反転腸管系を用いた検討～」 2017年(平成29年)10月13日、第39回日本臨床栄養学会総会、幕張メッセ
page.203、演題0-024

平成29年度 食物栄養学専攻 博士後期課程（博士）論文
主査・副査講評要旨

氏名 富重 慶子

論文名 食品の機能性成分がカイロミクロン apoB48 の分泌に与える影響の解析
—家兔反転腸管系および動物個体を用いた検討—

本邦の死因の2位3位を占め、寝たきりの主因でもある動脈硬化性脳血管疾患について、腸管から分泌されるカイロミクロンによる食事性高脂血症が大きな危険因子であることが知られている。一方、いくつかの食品の機能性成分について、基礎的研究において動脈硬化を抑制するとする報告がみられるが、その効果や機序の詳細は明らかになっていない。

本研究は、カイロミクロンの構造タンパクである apoB48 に着目し、その分泌をタンパク質および遺伝子での解析を試みたものである。組織レベルの研究として開発、確立した反転腸管実験系において、食品成分として、修士課程の腸管細胞系を用いた研究において効果が見られた resveratrol, curcumin, genistein の3成分を用い、いずれにおいても対照群に比べ apoB48 減少の傾向を確認し、Res、Cur では濃度依存的な減少を見いだしている。遺伝子発現調節の検討では、Res、Gen 添加において *apob* 遺伝子発現に減少の傾向がみられ、Cur では *apob*、*apobec1*、*alcf* 遺伝子発現を抑制することを確認している。家兔個体への短期および長期の成分投与実験においては、血中脂質濃度に対照群との違いは確認できなかったが、成分を長期投与した家兔の大動脈には、対照群でみられた動脈硬化病変が抑制されていることを観察し、組織研究と合わせ、3成分特に Curcumin において脂質異常の抑制の可能性とその機序を解明した。

本研究をより発展させるためには投与期間を初めとする実験条件をさらに検討する必要がある。一方、系の複雑化を考慮すると、細胞、組織、個体において一貫した知見を得、組織での遺伝子レベルでの機序を見いだした成果は大きい。

本研究の成果は、動脈硬化の危険因子及び抑制因子としての食生活により適切に対応が期待できる貴重な研究として、食物栄養学専攻の博士論文として相応しいと評価できる。

| | |
|----------|--|
| 氏名（本籍） | 富重 慶子（山口県） |
| 学位の種類 | 博士（食物栄養学） |
| 学位記番号 | 甲第7号 |
| 学位所授与年月日 | 平成30年3月5日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第4条第1項 該当 |
| 論文題目 | 食品の機能性成分がカイロミクロン apoB48 の分泌に与える影響の解析—家兔反転腸管系および動物個体を用いた検討— |
| 論文審査委員 | 主査 教授 松島 照彦 副査 教授 細川 優 副査 教授 中川 靖枝 |

博士学位論文 内容の要旨及び審査の結果の要旨 第13集 平成29年度

2018年 4月 1日

編集・発行 実践女子大学大学院
東京都日野市大坂上4-1-1
〒191-8510 Tel 042(585)8817

機関リポジトリにより公表