

令和元年6月3日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07739

研究課題名(和文)生物物理学的アプローチで捉える両親媒性物質の輸送運命

研究課題名(英文)Transport-fate of amphiphiles by using biophysical approaches

研究代表者

城内 文吾 (SHIROUCHI, BUNGO)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：00548018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：胸管リンパカニキュレーションおよび門脈カニキュレーションを施したラットを用いて、両親媒性物質(グリセロリン脂質)の吸収・輸送動態ならびにグリセロリン脂質摂取が他の食事脂質のリンパ輸送に対する影響を調べた。その結果、ホスファチジルセリン摂取が消化管ホルモン分泌を介して胃排出を抑制することを見出した。また、食餌リゾリン脂質は腸管での物理化学的特性を介してリンパ脂質輸送を低下させ、その作用はsn-1位型とsn-2位型で異なることを示した。食事分析を通じて、日本人のリン脂質クラスごとの摂取量を明らかにし、一部のリン脂質クラスの供給源を重回帰分析により予測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、主要なリン脂質クラスの栄養生理機能に関する知見が積み上げられてきており、微量リン脂質クラスについてはその摂取量の少なさから、栄養生理機能に関する情報も少ない。本研究において、微量リン脂質クラス(PS, LysoPL)の栄養生理機能を見出し、その作用機序が腸管を起点していることを明らかとした。また、実際の食事に含まれるリン脂質クラスごとの摂取量を示すとともに、推定統計学的手法が機能性成分の供給源予測に活用できることを新たに提示した。

研究成果の概要(英文)：Using thoracic lymph duct- and portal vein-cannulated rats, we investigated the absorption and transport dynamics of dietary amphiphiles (glycerophospholipids; glycerolPL) and the effects of dietary glycerolPL on lymphatic transports of other dietary lipids. We found that dietary PS reduced gastric emptying through stimulation of gut hormone secretion. In addition, we observed that dietary sn-1 lysoPL decreased lymphatic TAG levels, whereas dietary sn-2 lysoPL decreased lymphatic cholesterol levels. These results suggest that different actions of sn-1 and sn-2 lysoPLs exert through the physicochemical properties in the gut. Limited information was available regarding intakes of PL molecular classes among Japanese people from diets and food sources. We quantified the contents of them in 120 meals and conducted a stepwise multiple regression analysis to identify predictors of each PL class intake. Our results determined the daily intake of each PL class and the food sources of PC and PE.

研究分野：栄養化学

キーワード：両親媒性物質 グリセロリン脂質 門脈 リンパ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

短鎖・中鎖・長鎖脂肪酸、トリアシルグリセロール (TAG)、コレステロールなどの輸送機構については理解が進んでいる一方で、エタノール可溶性のような両親媒性物質の腸管吸収後の輸送については、門脈系とリンパ系のどちらに依存するのか、それとも分配が存在するのか明確なエビデンスがない。リン脂質 (グリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質に大別される) は親水基と疎水基の両方を有する両親媒性分子である。グリセロリン脂質の塩基 (親水基) にはコリン、エタノールアミン、イノシトールおよびセリンがあり、塩基ごとに物性も異なる。食事リン脂質の中でもホスファチジルコリン (PC) の吸収・輸送は、TAG やコレステロールと同様にアポリポタンパク質 B<sub>48</sub> が会合したカイロミクロンでのリンパ輸送と考えられており、門脈系輸送の寄与は不明である。また、PC 以外のリン脂質の吸収・輸送も不明な点が多い。申請者はこれまでに、グリセロリン脂質摂取が病態モデル動物の非アルコール性脂肪性肝疾患の発症を予防・改善することを見出し、その作用機序として脂質代謝の中心臓器である肝臓の代謝変動、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカイン産生調節が関与することを示した。両親媒性分子であるグリセロリン脂質にはリンパ系以外に門脈系を介した輸送系が存在し、肝臓へのリン脂質の迅速な供給も上述の栄養生理機能発現に寄与しているのではとの着想を得た。

### 2. 研究の目的

腸管で吸収された栄養素、機能性成分ならびに薬物が生体内の組織に運搬される経路は、その物質の物理化学的特性により異なり、門脈系 (親水性物質) あるいはリンパ系 (疎水性物質) を介して輸送される。実験動物を用いた生理学的研究は、種々の物質の吸収・輸送の理解に大きな成果を挙げてきた。しかし、エタノール可溶性のような両親媒性物質の動態 (門脈系とリンパ系のどちらに依存するのか、2 つの経路の分配が存在するのか) については明確なエビデンスが見受けられない。本研究では、門脈ならびに胸管リンパカニューレーション手術を施した動物を用いて、両親媒性物質としてグリセロリン脂質の吸収・輸送動態、グリセロリン脂質摂取が他の脂質の吸収・輸送動態に与える影響を評価し、得られる生理現象を物理化学的側面から説明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) グリセロリン脂質の分析法である TLC-リン定量に代わる酵素法およびトリプル四重極型 LC/MS/MS 分析法の検討

(2) グリセロリン脂質の吸収・輸送動態評価

無麻酔・無拘束下で、門脈血ならびにリンパ液を採取できる各種手術 (門脈カニューレーション手術ならびに胸管リンパカニューレーション手術) を施したラットに、各グリセロリン脂質を含む食餌を摂取させ、門脈血およびリンパ液を経時的に採取した。門脈血およびリンパ液中のグリセロリン脂質濃度はトリプル四重極型 LC/MS/MS にて分析した。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ならびに承認を得て実施した。

(3) グリセロリン脂質の栄養生理機能

ホスファチジルセリン (PS) の栄養生理機能

微量リン脂質クラスである PS の栄養生理機能に関する報告は少ない一方で、主要なリン脂質クラスである PC の摂取は TAG 摂取と比較して胃排出を遅延させることが報告されている。そこで、門脈カニューレーション手術を施したラットに、構成塩基が異なる PC と PS (いずれも大豆由来) を摂取させ胃排出能に及ぼす影響を比較した。実験食とアセトアミノフェンを懸濁した溶液を経口投与し、経時的に門脈血中のアセトアミノフェン濃度を測定することで胃排出能を評価した。また、門脈血中の数種の消化管ホルモン濃度を ELISA 法にて測定した。

リゾリン脂質 (LysoPL) の栄養生理機能

微量リン脂質クラスである LysoPL の栄養生理機能についてはよく分かっていないことから、胸管リンパカニューレーション手術を施したラットに、卵黄由来 LysoPL 含有食を与え、リンパ脂質輸送動態を評価した。また、*in vitro* 試験により PL と LysoPL の腸管での物理化学的特性を比較した。

(4) 日本人の食事中リン脂質クラスの定量およびそれらの食物源の重回帰分析予測

リン脂質の栄養生理機能に関する知見が集積してきた一方で、リン脂質クラス別の摂取量に関する情報は不足している。我々がリン脂質の栄養生理機能を享受するうえで、摂取状況ならびに供給源となっている食品群の把握といった基礎的知見は必要である。ある日本企業の社員食堂ならびに寮の 30 日分の食事 (朝食、2 種類の昼食、夕食の合計 120 食) に含まれる各リン脂質クラスを定量した。また、各食品群の重量測定、栄養計算ソフトによる各栄養素量の計算も行った。さらに、重回帰分析による各リン脂質クラスの食物源の特定も試みた。

### 4. 研究成果

(1) グリセロリン脂質の分析法である TLC-リン定量に代わる酵素法およびトリプル四重極型

## LC/MS/MS 分析法の検討

グリセロリン脂質の分析法として、TLC-リン定量が知られている。しかし、本法での測定可能なダイナミックレンジや操作時間を考慮すると、多数の試料を取り扱うには不向きと考えた。蛍光物質を用いた酵素法による生体サンプルのグリセロリン脂質の定量を試みたが、共存するアミノ酸による影響を排除できず、分析結果に正誤差を与えるため、酵素法での定量を断念した。そこで、LC/MS/MS MRM ライブラリ リン脂質プロファイリング(島津製作所)を導入し、グリセロリン脂質の定量を試みた。血漿およびリンパ液のサンプル調製を最適化することで、LC/MS/MS によるリン脂質プロファイリングと脂肪酸組成の決定が簡便に行えるようになった。

### (2) グリセロリン脂質の吸収・輸送動態評価

グリセロリン脂質 A の輸送について門脈カニューレシオン法にて評価したところ、A 摂取後に門脈血中での濃度上昇が認められなかったことから、グリセロリン脂質 A がインタクトな形で門脈輸送される可能性は低いと考えられた。胸管リンパカニューレシオン法での評価も行ったところ、A 摂取後に濃度上昇が認められたことから、インタクトな形でリンパ輸送される(カイロミクロンにて運ばれる)可能性が示されたが、その輸送量は PC と比較するとわずかであった。

### (3) グリセロリン脂質の栄養生理機能

#### PS の栄養生理機能

PC 摂取と比較して、胃内容物重量は PS 摂取により有意に高値を示し、門脈血中アセトアミノフェン濃度は PS 摂取で有意に低値を示した。また、PS 摂取は門脈血中 CCK 濃度を有意に上昇させた。以上より、PS の胃排出抑制作用は PC よりも強く、この作用には CCK 分泌が関与することが明らかとなった。

#### LysoPL の栄養生理機能

PL 摂取と比較して、リンパ液中の TAG 濃度曲線下面積(濃度ピーク 3 時間目~7 時間目)は *sn*-1 LysoPL 摂取で有意に減少した。また、リンパ液中のコレステロール濃度曲線下面積(濃度ピーク 3 時間目~7 時間目)は PL 摂取と比較して、*sn*-2 LysoPL 摂取で有意に減少した。*sn*-1 LysoPL 食を用いた人工エマルションの分散安定性は他の食餌と比較して有意に低く、腸管での脂質消化効率が低い可能性が示された。また、胆汁酸ミセルへの LysoPL 添加は他の脂質の溶解性を有意に低下させた。以上より、LysoPL は腸管での物理化学的特性を介してリンパ脂質輸送を低下させ、その作用は *sn*-1 位型と *sn*-2 位型で異なることが明らかとなった。

### (4) 日本人の食事中リン脂質クラスの定量およびそれらの食物源の重回帰分析予測

各リン脂質クラス含量(平均値のみ記載)は以下の通りで、PC は 2.17 g/day、ホスファチジルエタノールアミン(PE)は 0.632 g/day、ホスファチジルイノシトール(PI)+PS は 0.123 g/day、リゾ PC (LPC) は 0.313 g/day、スフィンゴミエリン(SM)は 0.127 g/day であった。本研究サンプルに含まれる三大栄養素、ビタミン類、ミネラル類の含量と国民健康・栄養調査の摂取量データは高い一致率を示したことから、本研究で得られたリン脂質含量は摂取量とみなすことができた。PC および PE については自由度調整済み決定係数( $R^2$ )が 0.6 以上の重回帰式が得られた。PC の供給には(標準偏回帰係数 $\beta$ が高い順から)卵類、肉類、乳類、魚介類、豆類、きのこ類、穀類および油脂類が寄与しており、PE の供給には卵類、豆類およびきのこ類が寄与していた。以上より、日本人の各リン脂質クラスの摂取量、PC および PE の供給源が明らかとなり、推定統計学的手法(重回帰分析)が機能性成分の供給源予測に活用できることを示した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

SHIROUCHI Bungo, YAMANAKA Rikako, TANAKA Shoji, KAWATOU Fagyun, HAYASHI Takuya, TAKEYAMA Ai, NAKAO Akiko, GOROMARU Ryoko, IWAMOTO Masako, SATO Masao. Quantities of Phospholipid Molecular Classes in Japanese Meals and Prediction of Their Sources by Multiple Regression Analysis. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 64(3), 215-221, 2018, doi: 10.3177/jnsv.64.215. 査読有。

[学会発表](計 10 件)

城内 文吾. 食事リン脂質の脂質代謝調節に関する研究. 第 73 回日本栄養・食糧学会大会. 2019 年.

武山 藍, 城内 文吾, 寺本 麻未, Wang Tianyu, 佐藤 匡央. リゾリン脂質は腸管での物理化学的特性を介してリンパ脂質輸送を低下させる. 第 73 回日本栄養・食糧学会大会. 2019 年.

SHIROUCHI Bungo. Alleviation of metabolic syndrome with dietary egg white protein. 日本油化

学会第 57 回年会 JOCS-AOCS Joint Symposium (Health and Nutrition). 2018 年 .

武山 藍、城内 文吾、寺本 麻未、Wang Tianyu、佐藤 匡央 . リゾリン脂質摂取がリンパ液中脂質濃度に及ぼす影響 . 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 . 2018 年 .

城内 文吾、寺本 麻未、武山 藍、佐藤 匡央 . ホスファチジルセリン摂取は消化管ホルモン分泌を介して胃排出を抑制する . 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 . 2018 年 .

武山 藍、城内 文吾、河内 明日香、有馬優子、佐藤 匡央 . ホスファチジルコリン摂取後のリンパ液中サイトカイン濃度 . 日本農芸化学会 2018 年度大会 . 2018 年 .

TERAMOTO Asami, SHIROUCHI Bungo, SATO Masao. Effects of dietary phosphatidylserine on gastric emptying and postprandial glycemic response in rats. AFELiSA (International Symposium on Agriculture, Food, Environmental and Life Science in Asia) 2017. 2017 年 .

寺本 麻未、城内 文吾、武山 藍、佐藤 匡央 . ホスファチジルセリン摂取による胃排出遅延作用 . 平成 29 年度日本食品科学工学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会 . 2017 年 .

城内 文吾、山中 理華子、田中 翔士、河東 華均、林 拓也、中尾 晶子、五郎丸 瞭子、岩本 昌子、佐藤 匡央 . 日本人の食事中リン脂質クラスの定量およびそれらの食物源の重回帰分析予測 . 第 71 回日本栄養・食糧学会大会 . 2017 年 .

梶原 千聖、城内 文吾、有馬 優子、佐藤 匡央 . 胆管結紮によるリンパ脂質吸収の抑制および回腸の炎症に対する大豆由来ホスファチジルコリンの効果 . 平成 28 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会 . 2016 年 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/nutrchem/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 匡央

ローマ字氏名：SATO Masao

研究協力者氏名：武山 藍

ローマ字氏名：TAKEYAMA Ai

研究協力者氏名：寺本 麻未

ローマ字氏名：TERAMOTO Asami

研究協力者氏名：有馬 優子

ローマ字氏名：ARIMA Yuko

研究協力者氏名：梶原 千聖

ローマ字氏名：KAJIHARA Chisato

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。