

報文

脂質の消化・吸収に影響を与える食品成分のスクリーニング簡易評価法の開発

吉川友佳子, 松浦寿喜

武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科 (663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

著者連絡先 E-mail: toshikim@mukogawa-u.ac.jp

(受取日:2008年2月1日, 受理日:2008年2月21日)

要旨: 脂肪乳剤を持続的に経口投与したラットの門脈血中トリグリセライド (TG) および遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度を測定することにより, 脂質の消化・吸収を簡易的に評価できるか否かについて検討した。その結果, 門脈血中 TG および NEFA 濃度は脂肪乳剤の投与速度, すなわち脂肪の投与量に応じて増加した。また, 脂質吸収抑制作用を有するペクチンを脂肪乳剤と同時に持続投与したところ, ペクチン濃度の増加に伴って血中 TG および NEFA 濃度は低下し, TG-AUC および NEFA-AUC も低下した。したがって, 脂肪乳剤を持続投与したラットの門脈血中 TG および NEFA 濃度の変化を測定することで, 脂肪の消化吸収およびその阻害成分の評価が可能であることが示唆された。

キーワード: 脂肪吸収, TG, NEFA, ラット

1. はじめに

近年, 食品由来の機能性食品成分が数多く見出され, それらの成分を利用して生活習慣病を予防することを目的とした製品が商品化されるなかで, それら食品の有効性や安全性に関する科学的根拠の有無が重要視されるようになってきた¹⁾³⁾。新規に開発された食品および食品成分の有効性あるいは安全性を裏付けるための基礎的研究として, 実験動物を用いた試験は欠かすことができない。しかし, 食品および食品成分は, 医薬品と異なり生体に対する作用は穏やかなため, 有効性や安全性を評価するためには長期にわたる投与および多くの実験動物を用いた試験が必要となる。

著者らは, 機能性成分のスクリーニングを迅速かつ少数の実験動物で実施できる動物実験モデルの開発を目指して研究を重ねてきた。ラ

ット門脈カテーテル留置法は, ラットの胃および門脈にカテーテルを留置し, 無麻酔・無拘束下で試料の胃内投与と門脈血の採取を可能にした実験モデルであり, すでに糖質やミネラルの消化吸收機能の迅速評価法として利用している⁴⁾¹³⁾。この実験モデルでは, 消化管から吸収され, 門脈に放出された成分を直接採取して測定できることから, 肝臓における代謝を受けることなく, 高感度に検出できるメリットがある。したがって, 消化管から吸収され, 門脈に放出される糖質やタンパク質, ミネラルなどの評価に適した実験モデルといえる。一方, 脂質のように消化管からリンパ管を経て血中に放出される成分については, 胸管やリンパ管にカテーテルを挿入留置して, リンパ液中の成分の測定するのが一般的である¹⁴⁾¹⁷⁾。

著者らは, 糖質, たんぱく質, 脂質およびミ

ネラルの消化・吸収を同時に評価できるラット実験モデルの開発を目指しており,これを達成するためには門脈および胸管・リンパ管に同時にカテーテルを留置することが必要であった。しかし,門脈へのカテーテル留置は比較的容易であり,また無麻酔・無拘束下での長期間の飼育も可能であるのに対し,胸管・リンパ管へのカテーテル留置は繊細な技術を必要とするだけでなく,無麻酔・無拘束下での長期間にわたる飼育は困難であった。そこで,脂肪乳剤を持続的に経口投与したラットの門脈血中トリグリセライド(TG)および遊離脂肪酸(NEFA)濃度を測定することにより,脂質の消化・吸収を簡易的に評価できるか否かについて検討した。

2. 実験方法

2.1. 実験動物

4週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (Jcl:SD, 日本クレア株式会社) を購入し,室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 7\%$, 明暗周期 12 時間 (明期 8:00-20:00) の条件下で飼育した。固形飼料 (MF;オリエンタル酵母工業株式会社) および水は自由に与え, 3 週間予備飼育後 (7 週齢, $237.6 \pm 5.0\text{g}$), 実験に供した。

なお,本動物実験は「武庫川女子大学動物実験指針」に基づき設置された武庫川女子大学動物実験委員会の承認を得て,「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号) を遵守して行った。

2.2. 試薬

脂肪乳剤は,大豆油注射液 (20%イントラリポス, 大塚製薬株式会社) を使用した。ペクチンは,りんご由来試薬 (和光純薬工業株式会社) を使用した。

2.3. 胃および門脈カテーテル留置ラット実験モデルの作製

胃および門脈へのカテーテル留置は,既報にしたがって行った⁴⁾。すなわち,ラットを笑気・酸素・フローセン (導入期 2.5%, 維持期 1.5%) 混合ガス麻酔下に開腹し,胃に試料注入用カテーテル (ビニールチューブ:内径 0.5mm, 外径 1.0mm), 門脈に採血用カテーテル (ポリエチレンチューブ:内径 0.28mm, 外径 0.61mm, シリコンチューブ:内径 0.5mm, 外径 1.0mm) を留置した。これらのカテーテルの他端は,皮下トンネルを通して背部に出し,ハーネスおよび保護コイルを通して背部に出し,ハーネスおよび保護コイルを通しスイベルに接続した。さらに,試料注入用カテーテルは三方活栓にて経路を分岐し,一方をペリスターポンプ,他方をシリンジポンプに接続した (図 1)。胃および門脈にカテーテルを留置したラットは,無作為抽出にて 1 群 6 匹ずつに分け,ステンレス製代謝ケージ内で個別に飼育した。

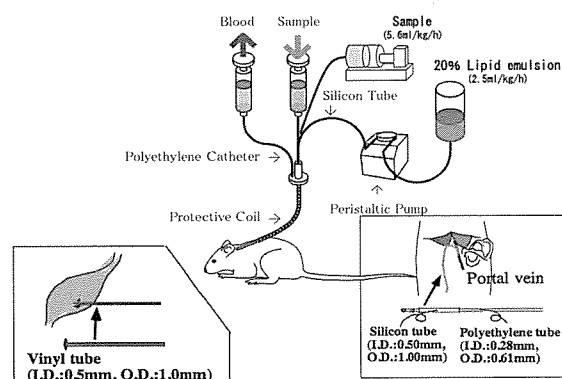


Fig. 1. Technique for the in vivo catheterization of the portal vein in the rat. The rats were anesthetized, and the beveled end of a heparin-filled catheter introduced into the portal vein followed by placement for a feeding gastrostomy.

2.4. 脂肪乳剤投与速度の検討

胃および門脈カテーテル留置ラットは16時間絶食した後、胃カテーテルよりペリスターポンプにて20%脂肪乳剤を1.25, 2.5あるいは5.0 ml/kg/hrの速度で6時間持続投与した。脂肪乳剤投与前(0分)から投与後360分まで、30分おきに門脈カテーテルより血液を0.05 ml採取し、得られた血液は、遠心分離して血漿とした。血中トリグリセライド(TG)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)およびリン(P)濃度は富士ドライケム5500(富士フィルム株式会社)、血中遊離脂肪酸(NEFA)およびグルコース濃度はNEFA C-テストワコーおよびグルコース CII-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

2.5. 水溶性食物繊維の脂質吸収抑制作用の測定

0.5%および2.0%ペクチンを5.7 ml/kg/hrの速度で120分間持続的に投与した後、さらに20%脂肪乳剤を2.5 ml/kg/hrの速度でペクチンと同時に持続投与した。その後、30分おきに門脈カテーテルより血液を0.05 ml採取し遠心分離して血漿とし、血中TG濃度およびNEFA濃度を測定した。測定した血中濃度から台形法により曲線下面積(Area under the curve : AUC)を求めた。

2.6. 統計処理

データは、平均値±標準誤差で表した。各群間の比較は、脂肪乳剤投与時における血中TG, NEFA, Glucose, Ca, MgおよびP濃度についてはBonferroni/Dunnの多重比較検定, AUCおよびペクチン投与時の血中TGおよびNEFA濃度についてはSheffeの多重比較検定を用いて行った。解析ソフトは、エクセル統計2006(Microsoft社)を用いた。

3. 結果

3.1. 脂肪乳剤の投与速度と血中TGおよびNEFA濃度の関連

20%脂肪乳剤を胃内に持続投与したときの血中TGおよびNEFA濃度の変化を図2に示した。脂肪乳剤を1.25 ml/kg/hrの速度で持続投与したときの血中TG濃度は、0分値に比し投与後360分まで有意な上昇は認められなかった。また、血中NEFA濃度は、0分値に比し脂肪乳剤投与後240分および300分で有意な上昇が認められたが、その他の時間では有意な差は認められなかった。

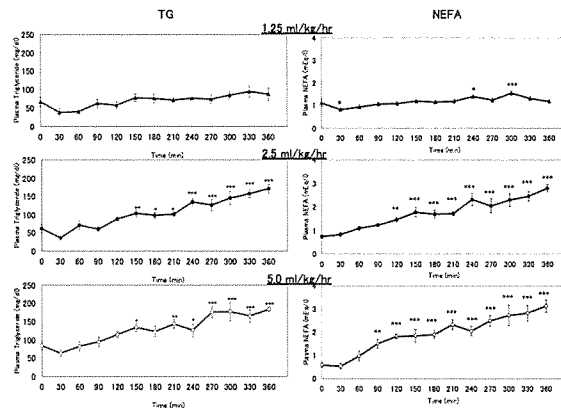


Fig. 2. Changes in portal plasma TG and NEFA concentrations during continuous administration of fat emulsion. The rats were received continuous intragastric infusion of 20 % fat emulsion at rates ranging from 1.25 to 5.0 ml/kg/hr. Values represent mean \pm S.E. of 6 rats. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. 0 min in each group.

次に、脂肪乳剤の投与速度を2.5 ml/kg/hrに設定した場合、血中TG濃度は0分値に比し投与後120分から有意に上昇し、360分まで徐々に上昇を続けた。血中NEFA濃度も同様に投与後120分から有意に上昇し、360分まで上昇を続けた。

さらに、脂肪乳剤の投与速度を 5.0 ml/kg/hr とした場合、血中 TG 濃度は投与後 120 分以降、血中 NEFA 濃度は 90 分以降で有意に上昇した。

0 分から 360 分までの血中 TG あるいは NEFA 濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、脂肪乳剤の投与速度が増すにつれ大きくなり、1.25 ml/kg/hr 投与群に比し 2.5 ml/kg/hr および 5.0 ml/kg/hr 投与群で有意な増大が認められた (図 3)。

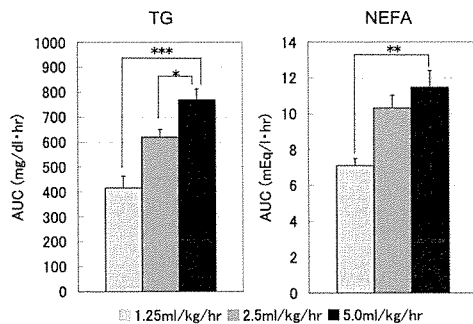


Fig. 3. Changes in TG and NEFA area under the curve (AUC) during continuous administration of fat emulsion. Values represent mean ± S.E. of 6 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

以上の結果より、脂肪乳剤の投与速度を 2.5 ml/kg/hr 以上に設定した場合、門脈血中 TG および NEFA 濃度が経時的に上昇し、AUC は脂肪乳剤の投与量依存的であることが明らかとなった。

3.2. 脂肪乳剤持続投与による脂質関連以外の測定項目への影響

本実験モデルの最終目標は、糖質、脂質およびミネラルの消化吸収を同時に評価することである。そこで、脂肪乳剤を持続投与したときの脂質関連以外の測定項目への影響について

検討した。その結果、血中グルコース、カルシウム、マグネシウムおよびリン濃度は、脂肪乳剤の投与によっても有意な変化は認められず、脂肪乳剤投与期間中一定の値で維持された (図 4)。

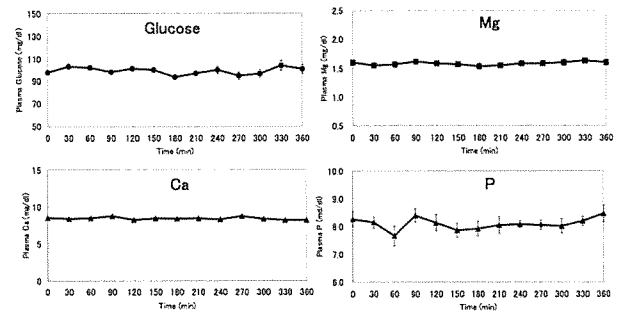


Fig. 4. Changes in portal plasma glucose, Ca, Mg and P concentration during continuous administration of fat emulsion. The rats were received continuous intragastric infusion of 20 % fat emulsion at rate of 2.5 ml/kg/hr. Values represent mean ± S.E. of 6 rats.

3.3. 脂質消化吸收評価法の検討

脂肪乳剤の投与速度を、血中 TG および NEFA 濃度が有意に上昇する最低速度である 2.5 ml/kg/hr に設定し、これに 0.5% および 2.0% ペクチンを持続投与したときの血中 TG および NEFA 濃度を測定した。0.5% ペクチン投与時の血中 TG および NEFA 濃度は、対照群に比し有意な低下は認められなかった。一方、2.0% ペクチン投与群の血中 TG および NEFA 濃度では、それぞれ 210 分以降および 120 分以降対照群に比し有意な低下が認められた (図 5)。

TG および NEFA 濃度の AUC は、ペクチンの投与量が増大するにつれ低下し、2% ペクチン投与群では対照群に比しいずれも有意に低値を示した (図 6)。

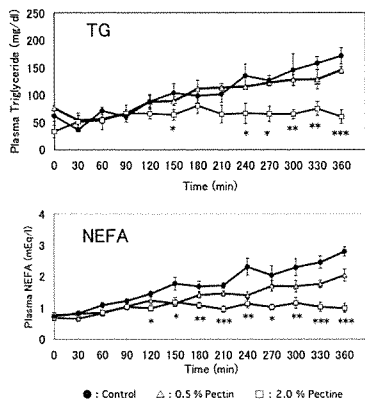


Fig. 5. Inhibitory effect of pectin on lipid absorption. Rats were continuously given 0.5 % or 2.0 % pectin for 120 min at a dose of 5.6 ml/kg/h using a syringe pump via the sample infusion catheter. In addition, 20 % lipid emulsion was continuously given concomitantly with pectin at a dose of 2.5 ml/kg/h using a peristaltic pump, and 0.05 ml of blood was collected via the blood collection catheter every 30 min for 360 min. Each bar indicates the mean \pm S.E. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. control.

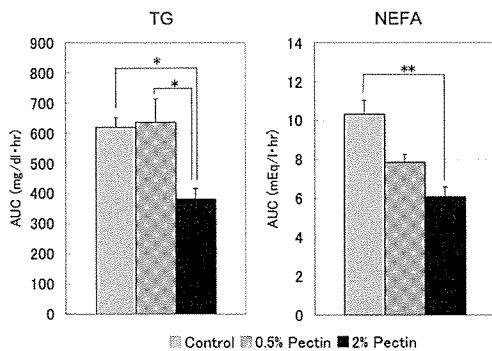


Fig. 6. AUC for the blood TG and NEFA levels following continuous administration of 20 % lipid emulsion to rats that were continuously administered various concentrations of pectin. Each bar indicates the mean \pm S.E. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

4. 考察

ラットの胃および門脈にカテーテルを留置し、胃カテーテルから 20%脂肪乳剤を持続的に投与したとき、20%脂肪乳剤の投与速度が 2.5 ml/kg/hr 以上で門脈血中 TG および NEFA 濃度が経時的に上昇した。胃から摂取された脂質は、小腸から吸収されリンパ管を経て血中に放出され、体循環にのった後肝臓で処理される。20%脂肪乳剤を持続投与したとき門脈血中 TG 濃度が経時的に上昇し続け、さらに投与速度を増すとその上昇が著しくなったことから、脂肪乳剤由来の TG はリンパ管を経て血中に放出され、門脈血中 TG として検出されたものと推察された。

経静脈内に投与された脂肪乳剤はすばやく分解されて NEFA として検出されることから¹⁸⁾、今回の実験で TG 濃度と連動して NEFA 濃度が変化したのは、血中に放出された TG が triglyceride lipase により分解され、NEFA に変換されるためであると推測された。このように、門脈血中 TG および NEFA 濃度は脂肪乳剤の投与速度すなわち脂肪の投与量に応じて増加することが明らかとなった。また、血中 TG 濃度-時間曲線下面積(TG-AUC)および血中 NEFA 濃度-時間曲線下面積(NEFA-AUC)が脂肪乳剤の投与速度依存的に増加することから、脂肪乳剤をラットの胃内に持続投与し、門脈血中 TG 濃度および NEFA 濃度を測定することで、消化管から吸収される脂肪量の変化を測定できるものと考えられた。また、血糖値、Ca、Mg および P 濃度への影響は認められないことから、糖質、脂質およびミネラル吸収同時評価モデルとして利用できる可能性が示唆された。

次に、本実験モデルが脂質の吸収量を血中 TG 濃度および NEFA 濃度として反映しているか否かを明らかにするため、20%脂肪乳剤を 2.5 ml/kg/hr の速度で投与したラットに、

脂肪の吸収を抑制する効果を有する食品成分を投与し, 血中 TG および NEFA 濃度の変化を測定した。

脂肪の吸収を抑制する食品成分として食物繊維が知られている¹⁹⁻²²⁾。食物繊維は, 脂肪と結合したり, あるいはミセルの形成を阻害することで脂肪の排泄を促進し, 血中の脂質濃度を低下させる働きがある。そこで, 脂肪乳剤を持続投与したラットに食物繊維の一つで脂質吸収抑制作用が報告されているペクチン^{23,24)}を持続的に投与し, 門脈血中 TG および NEFA 濃度を測定したところ, ペクチン濃度を増加させることにより血中 TG および NEFA 濃度の上昇が抑制され, TG-AUC および NEFA-AUC もペクチン濃度の上昇にともなって減少することが明らかとなった。したがって, 脂肪乳剤を持続投与したラットの門脈血中 TG および NEFA 濃度の変化を測定することで, 脂肪の消化吸収およびその阻害成分の評価が可能であることが示唆された。

文献

- 1) 梅垣敬三:機能性食品研究における動物実験の考慮すべきポイント. 日本栄養・食糧学会誌 59, 277-282 (2006).
- 2) 大濱宏文:錠剤, カプセル状等の健康食品に求められる品質と安全性の保証について-厚生労働省ガイドラインから-. 食品衛生学雑誌 47, J1-6 (2006).
- 3) 古田賢二, 小澤康子:「健康食品」の安全性にかかわる情報の検討について(東京都食品安全情報評価委員会報告). 食品衛生学雑誌 47, J305-310 (2006).
- 4) 松浦寿喜, 施紅雲, 土生充美, 作道忠義, 市川富夫:ラット門脈カテーテル留置法による消化吸収機能の評価法の開発. 消化と吸収 19, 56-60 (1996).
- 5) 松浦寿喜, 市川富夫:ラット門脈血中グルコース濃度の変化を指標とした D-キシロースの α -グルコシダーゼ阻害作用の評価. 日本栄養・食糧学会誌 50, 363-368 (1997).
- 6) 松浦寿喜, 岸本三香子, 市川富夫:フラクトオリゴ糖を添加した成分栄養剤がラットの門脈血中アンモニア, カルシウム, マグネシウムおよびリン濃度に与える影響. 日本栄養・食糧学会誌 52, 279-284 (1999).
- 7) 松浦寿喜, 堀名恵美, 岸本三香子, 市川富夫:ラットにおける各種糖質の α -グルコシダーゼ活性阻害時間の比較. 日本栄養・食糧学会誌 54, 155-160 (2001).
- 8) 松浦寿喜, 堀名恵美, 吉川友佳子:イソチオシアン酸アシルがラットの糖質消化吸収機能に与える影響. 日本食品化学学会誌 10, 29-33 (2003).
- 9) 西川 泰, 檜内賀子, 高田曜子, 上中居和男, 堀名恵美, 松浦寿喜:インスリーナ葉抽出物の α -グルコシダーゼ阻害能の比較. 日本栄養・食糧学会誌 56, 375-378 (2003).
- 10) 松浦寿喜, 吉川友佳子, 升井洋至, 佐野満昭:各種健康茶のラットにおける糖質吸収抑制作用. 薬学雑誌 124, 217-223 (2004).
- 11) 松浦寿喜, 吉川友佳子:健康食品および特定保健用食品のラットにおけるスクロース消化吸収抑制作用. 食品・臨床栄養 1, 33-42 (2006).
- 12) 吉川友佳子, 松浦寿喜, 中村亮太, 山元英樹, 鈍宝宗彦:ラットにおける各種茶の血糖上昇抑制作用. 日本食品化学学会誌 13, 51-55 (2006).
- 13) Takano, Y., Matsuura, T., Yoshikawa, Y., Satsu, H., Sato, R., Shimizu, M. : Modulation of the Intestinal Ca²⁺

- Uptake by a Cheese Whey Protein Digest. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1487-1493 (2007).
- 14) Bollman, J.L., Cain, J.C., Grindley, J. H.: Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine or thoracic duct of the rat. *J Lab Clin Med* 33, 1349-1352 (1948).
 - 15) Boyd, M., Risovic, V., Jull, P., Choo, E., Wasan, K.M.: A stepwise surgical procedure to investigate the lymphatic transport of lipid-based oral drug formulations: Cannulation of the mesenteric and thoracic lymph ducts within the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 49, 115-120 (2004).
 - 16) Martin, J.C., Caselli, C., Broquet, S., Juanéda, P., Nour, M., Sébédio, J.L., Bernard, A.: Effect of cyclic fatty acid monomers on fat absorption and transport depends on their positioning within the ingested triacylglycerols. *J Lipid Res* 38, 1666-1679 (1997).
 - 17) Tsuzuki, T., Kawakami, Y., Abe, R., Nakagawa, K., Koba, K., Imamura, J., Iwata, T., Ikeda, I., Miyazawa, T.: Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *J Nutr* 136 2153-2159 (2006).
 - 18) Yoshioka, T., Koike, S., Okamoto, H.: Fat tolerance test in pregnancy: Intralipid loading test. *Tohoku J Exp Med.* 134 195-201 (1981).
 - 19) Kishimoto, Y., Oga, H., Tagami, H., Okuma, K., Gordon, D.T.: Suppressive effect of resistant maltodextrin on postprandial blood triacylglycerol elevation. *Eur J Nutr* 46, 133-138 (2007).
 - 20) Slavin, J.L., Marlett, J.A.: Effect of refined cellulose on apparent energy, fat and nitrogen digestibilities. *J Nutr* 110, 2020-2026 (1980).
 - 21) Mickelsen, O., Makdani, D.D., Cotton, R.H., Titcomb, S.T., Colmey, J.C., Gatty, R.: Effects of a high fiber bread diet on weight loss in college-age males. *Am J Clin Nutr* 32, 1703-1709 (1979).
 - 22) Stasse-Wolthuis, M., Albers, H.F., van Jeveren, J.G., Wil de Jong, J., Hautvast, J.G., Hermus, R.J., Katan, M.B., Brydon, W.G., Eastwood, M.A.: Influence of dietary fiber from vegetables and fruits, bran or citrus pectin on serum lipids, fecal lipids, and colonic function. *Am J Clin Nutr* 33, 1745-1756 (1980).
 - 23) Cummings, J.H., Southgate, D.A., Branch, W.J., Wiggins, H.S., Houston, H., Jenkins, D.J., Jivraj, T., Hill, M.J.: The digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium absorption and large bowel function. *Br J Nutr* 41, 477-485 (1979).
 - 24) Kay, R.M., Truswell, A.S.: Effect of citrus pectin on blood lipids and fecal steroid excretion in man. *Am J Clin Nutr* 30, 171-175 (1977).

Development of a simple screening assessment method for food components
that affect lipid digestion and absorption

Yukako YOSHIKAWA, Toshiki MATSUURA

Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Science,
Mukogawa Women's University, 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya 663-8558, Japan

*Correspondence should be addressed. Tel.: +81-798-45-9884, Fax: +81-798-45-9884,

E-mail : toshikim@mukogawa-u.ac.jp

(Received February 1, 2008; Accepted February 21, 2008)

ABSTRACT

In the present study, we investigated whether lipid digestion and absorption could be easily assessed in rats given continuous oral administration of lipid emulsion by measuring portal blood concentrations of triglyceride (TG) and non-esterified fatty acids (NEFA). The results showed that TG and NEFA levels in portal blood increased in proportion to the dosing rate of lipid emulsion; in other words, the lipid dose. When pectin, which inhibits lipid absorption, was continuously administered concomitantly with lipid emulsion, increases in blood TG and NEFA levels were suppressed in proportion to increases in pectin concentration, and TG-AUC and NEFA-AUC also decreased. These findings suggest that lipid digestion and absorption as well as hypolipidemic agents can be assessed by measuring changes in portal blood concentrations of TG and NEFA in rats continuously administered lipid emulsion.

Keywords : lipid digestion and absorption TG NEFA rat

責任編集者 : 瀧井幸男