

## 報文

## ラットにおける乳化した親水性マリーゴールド花卉抽出物のルテイン吸収性の向上

谷口隆雄, 川田あゆみ, 井上美保, 葦名 毅, 上原秀章, 八木和幸, 渡辺敏郎\*, 長谷川直樹  
 ヤエガキ醗酵技研株式会社 (679-4298 姫路市林田町六九谷 681)

\* 著者連絡先 E-mail:watnb-ts@yaegaki.co.jp

(受取日: 2008年6月24日, 受理日: 2008年7月7日)

要旨: ルテインは多くの食品中に存在する。最も豊富で純粋な植物源は脂溶性マリーゴールド (*Tagetes erecta* L.) 花卉抽出物(MFO)である。我々は, 新しい親水性の乳化した MFO(EMFO)を開発した。親水性 EMFO の平均粒径は微小(23.2 nm)であり, 水に鮮明に溶解する。実験 A では, 脂溶性の MFO と親水性の EMFO でルテインの吸収効率に関する基本的なデータを得た。4週齢, 20匹の SD ラットを4群に分け, 0.02%ルテインを含む飼料を5日間摂取させた。親水性の EMFO はルテインの吸収で脂溶性 MFO よりも高かった。実験 B では, レシチンとセラミドが親水性の EMFO の吸収において必要であるか調べた。レシチンとセラミドを含まない親水性の EMFO よりも, レシチンとセラミドを含む親水性の EMFO のルテイン吸収が向上した。これらの結果は, レシチンとセラミドを含む親水性の EMFO のルテイン吸収の増加は微小平均粒径とレシチン, セラミドの補助の相伴うことによるものと示唆された。

キーワード: ルテイン, マリーゴールド花卉抽出物, 乳化, 吸収

## 1. はじめに

カロテノイドは自然界に数百種類存在しているが, ヒトの体からはわずかな種類のものしか検出されていない。その中でもルテインはヒトの血清や組織中から検出される代表的なカロテノイドの一つである。ルテインはキサントフィル類に分類され, 様々な緑色野菜や果物に含まれており, これらを食品として摂取することでヒトに対して生物学的機能を果たすものと考えられている。乳癌<sup>1)</sup>, 結腸癌<sup>2)</sup>, 肺癌<sup>3)</sup>, 皮膚癌<sup>4)</sup>等の腫瘍および白内障<sup>5)</sup>, 加齢性黄斑変性症<sup>6)</sup>等の眼疾病は, ルテインの摂取量と負の相関を示す疫学的研究結果が得られている。しかし, 緑色野菜のルテイン含量は低いため, 近年, 高濃度にルテインを含有するマリーゴールド (*Tagetes erecta* L.) 花卉抽出物(MFO:

Marigold Flower Oleoresin)が機能性食品(サプリメント)としてよく利用されている。Johnson<sup>7)</sup>らは, ホウレンソウから摂取したルテインのバイオアベイラビリティは MFO のルテインよりも低く, 高濃度のルテインを効率よく摂取することの必要性を報告している。しかしルテインは脂溶性カロテノイドであるため生体への吸収は食事における摂取脂質量によって異なることが考えられる。脂質は胆汁によってミセル化し腸管から吸収されるが, 脂質が少ないと脂溶性化合物は腸管から吸収されにくい。我々は, 脂溶性である MFO を O/W (Oil in Water) 乳化により微粒子分散化できれば親水性となり, 親水性になればルテインの生体への吸収性が高まると推測した。そこで本研究では, 乳化した MFO (EMFO: Emulsified

Marigold Flower Oleoresin) の調製と動物実験による MFO と EMFO のルテイン吸収性について比較した。

## 2. 実験方法

### (1) 微粒子分散ルテインの乳化

ルテインには、Fig. 1 に示すように遊離体ルテインとエステル体ルテインが存在する。そこで、マリーゴールド花卉抽出物(MFO)の乳化処理には、遊離体ルテイン (Lutein Soft Extract : 味の素, ルテイン含量 20%) とエステル体ルテイン (マリーゴールドオイル No.84790 : 三栄源エフ・エフ・アイ, ルテイン含量 16%) の両方で検討した。その他の乳化原材料には、レシチン (ホスファチジルコリン : 辻製油), セラミド (日本製粉),  $\alpha$ トコフェロール(理研ビタミン), グリセリン脂肪酸エステル (三菱化学) ショ糖脂肪酸エステル (三菱化学フーズ) グリセリン (坂本薬品工業), L-アスコルビン酸 (DSM ニュートリションジャパン) を使用した。

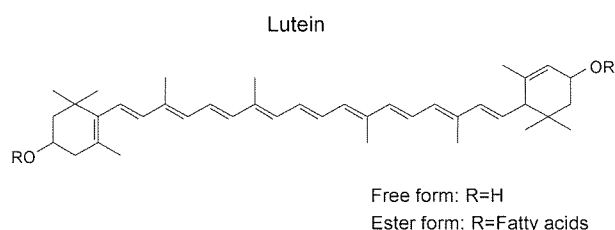


Fig. 1 Structures of lutein free form and ester form

乳化条件は、MFO (遊離体またはエステル体, ルテインの最終濃度 0.5%), 0.5%  $\alpha$ -トコフェロール, 3%グリセリン脂肪酸エステル, 3%ショ糖脂肪酸エステル, 55%グリセリン, 1%アスコルビン酸に水を加え、乳化系攪拌機で乳化処理した。さらにレシチンおよびセラミドを配合した MFO の乳化には、これらの乳化組成に 2%レシチンおよび 1%セラミドを加え

て乳化処理した (EMFO)。EMFO の粒度分布は、Horiba LA-500 にて測定した。

### (2) 動物実験

#### 実験 A

脂溶性 MFO と親水性 EMFO の吸収性の違いを確認するため動物実験を実施した。実験には日本クレアから入手した 4 週齢の雄性 SD ラットを用いた。飼育および保管に関しては「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) および「実験動物の飼養および保管等に関する基準」(昭和 55 年総理府告示第 6 号) の基準に沿っておこなった。またヤエガキグループの動物実験委員会指針に沿い、常に新しい指針やガイドラインに遵守して実施した。動物は、1 群 5 匹として 4 群に分け、各群の飼料は Table 1 (A) の組成のものを水道水とともにそれぞれ自由摂取させた。飼育室は、室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 明暗周期 12 時間 (7:00~19:00 点灯) に調整し、5 日間飼育した。

#### 実験 B

ルテイン吸収におけるレシチンおよびセラミドの効果を実験 A と同様の方法で評価した。各群, Table 1 (B) の組成の飼料を水道水とともにそれぞれ自由摂取させた。

### (3) 血清および肝臓中のルテイン含量

飼育終了後、ラットをエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、遠心分離 (3,000rpm $\times$ 10 分) によって血清を得た。また肝臓を摘出し、ルテインの分析に供するまで  $-80^\circ\text{C}$  にて保存した。血清中のルテイン含量測定試料の調製は、次のようにおこなった。まず 200 $\mu\text{l}$  の血清に 200 $\mu\text{l}$  のエタノールを加えて混合し、10 分間放置後、400 $\mu\text{l}$  のヘキサンを加えて混合し、遠心分離 (8,000rpm $\times$ 5 分) した。ヘキサン-エタノール層 (上層) を 350 $\mu\text{l}$  取り、それを乾固させ 50 $\mu\text{l}$  のヘキサン-アセトンの混液 (81:19)

Table 1 Composition of the experimental diets

## (A) Experimental A

Constituents (%)	MFO (Free form)	MFO (Ester form)	EMFO (Free form)	EMFO (Ester form)
Casein	22	22	22	22
Corn oil	5	5	5	5
Mineral mixture* <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture* <sup>1</sup>	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose	3	3	3	3
MFO (Free form)* <sup>2</sup>	0.1	—	—	—
MFO (Ester form)* <sup>3</sup>	—	0.125	—	—
EMFO (Free form)* <sup>4</sup>	—	—	4	—
EMFO (Ester form)* <sup>4</sup>	—	—	—	4
Saccharose	65.2	65.175	61.3	61.3

4 week old 20 male SD rats divided into 4 groups

\*<sup>1</sup> AIN-93<sup>TM</sup> mixture

\*<sup>2</sup> Lutein content: 20%.

\*<sup>3</sup> Lutein content: 16%.

\*<sup>4</sup> Lutein content: 0.5%.

## (B) Experimental B

Constituents (%)	MFO (Free form)	EMFO (Free form) (-)Lecithin (-)Ceramide	EMFO (Free form) (+)Lecithin (+)Ceramide
Casein	22	22	22
Corn oil	5	5	5
Mineral mixture* <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture* <sup>1</sup>	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
Cellulose	3	3	3
MFO (Free form)* <sup>2</sup>	0.1	—	—
EMFO (Free form) (-)Lecithin, (-)Ceramide* <sup>3</sup>	—	4	—
EMFO (Free form) (+)Lecithin, (+)Ceramide* <sup>3</sup>	—	—	4
Saccharose	65.2	61.3	61.3

4 week old 15 male SD rats divided into 3 groups

\*<sup>1</sup> AIN-93<sup>TM</sup> mixture

\*<sup>2</sup> Lutein content: 20%.

\*<sup>3</sup> Lutein content: 0.5%.

で再溶解させたものを HPLC でルテイン含量を測定した。抽出した肝臓のルテイン含量は、0.5g の肝臓に 8ml のエタノールおよび 8ml のヘキサンを加えてホモジネートした。さらに等量混合したヘキサン-エタノール溶液を加え 20ml にメスアップした後、濾過をおこない、濾液 1ml を乾固させ、100 $\mu$ l のヘキサン-アセトン溶液に再溶解させ、遠心分離 (8,000rpm  $\times$  5 分) 後の上清を HPLC にてルテイン含量を測定した。

HPLC の測定条件は次のようにおこなった。  
 装置：高速液体クロマトグラフ prominence シリーズ (島津製作所)  
 カラム：CLC-SIL(M) 4.6mm  $\times$  150mm (島津製作所) カラムオープン温度：30 $^{\circ}$ C  
 移動相：ヘキサン-アセトン溶液 (81:19)  
 流速：1.1 ml/min  
 検出波長：450 nm  
 解析：LC solution (島津製作所)。

#### (4) 統計処理

すべての測定値は、平均値  $\pm$  標準誤差 (SE) で示した。群間の有意差検定には、市販の統計解析ソフトウェア「SPSS ver. 12.0J for Windows (エス・ピー・エス・エス)」を用いて Bonferroni 法の多重比較検定をおこない、有意水準を危険率 5% 以下とした。

### 3. 実験結果および考察

親水性 EMFO の粒度分布測定結果を Fig. 2 に示した。平均粒径サイズは 23.2nm で、透明度の高い O/W 乳化製剤であった。

ニワトリ<sup>8)</sup>、マウス<sup>9)</sup>、ヒト<sup>10)</sup>においてルテインを与えると血清や肝臓中のルテイン濃度が上昇する研究報告は数多くある。そこで、実験 A では親水性 EMFO (遊離体およびエステル体) と脂溶性 MFO (遊離体およびエステル体) をラットに与えた場合の血清および肝臓ル

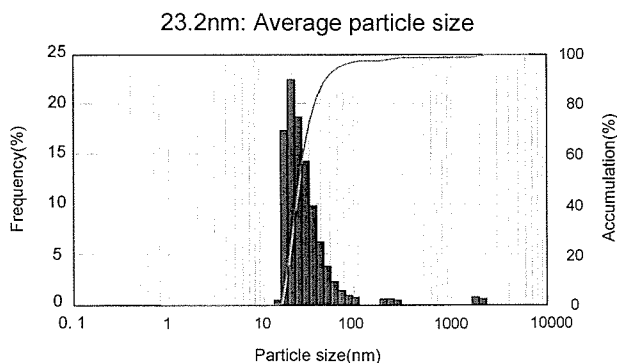


Fig. 2 Particle distribution result of hydrophilic emulsified marigold flower oleoresin (EMFO)

テイン濃度を測定し、比較した。Fig. 3 に示したように、血清および肝臓ルテイン濃度はともに乳化処理することで有意 ( $p < 0.05$ ) に向上した。脂溶性 MFO の遊離体ルテインとエステル体ルテインの吸収性を比較したところ、肝臓ではエステル体ルテインが遊離体ルテインよりも有意 ( $p < 0.05$ ) に優れた吸収性を示し、血清では有意差は認められないが、その傾向が確認された。Bowen ら<sup>11)</sup> のヒトを対象とした脂溶性ルテインの経口投与試験によると、エステル体ルテインは遊離体ルテインよりも生体利用性が高いことを示しており、それは本研究結果とも一致していた。しかし、親水性 EMFO では逆に、血清および肝臓において遊離体ルテインの吸収性はエステル体ルテインの吸収性よりも高い傾向が示された。ルテインの体内への吸収メカニズムに関する詳細な知見はまだ少ないが、一般に食品から摂取したカロテノイドは消化管内で胆汁酸、リン脂質と共にエマルジョン化され、さらに脂質加水分解酵素による分解を受け直径 4nm  $\sim$  60 $\mu$ m のミセルを形成することで小腸上皮細胞より吸収されることが知られている<sup>12)</sup>。本研究で得られた親水性 EMFO はエマルジョンの平均粒径が 23.2nm と微小であり腸管上皮細胞への吸収に対して有利に働き、ルテインを効率的に生体内へ吸収

させたものと考えられた<sup>13~14)</sup>。

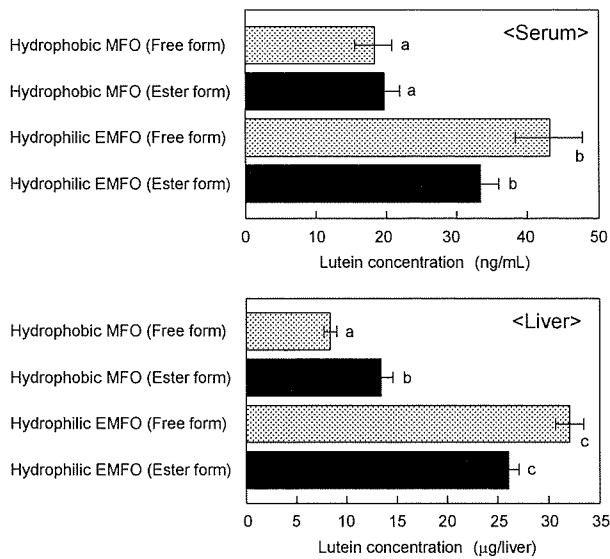


Fig. 3 Lutein concentrations in the serum and liver of the rats fed on lipophilic MFO and hydrophilic EMFO

Results are expressed as mean±SE. Values in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $p<0.05$ ).

実験 B では、EMFO の調製にレシチンおよびセラミドを加えた。レシチンは乳化剤の用途で広く利用されているが、生体内においては消化管内で胆汁中に含まれ、胆汁酸ミセルを形成し脂溶性機能成分の腸管吸収に深く関わっている<sup>15)</sup>。また、セラミドは全ての動物胞間に存在し、細胞間の接着および角質層の保湿に寄与している脂質で、近年では荒れ肌等の水分が低下した肌への有効成分として注目されている<sup>16)</sup>。そこで、レシチン-セラミドを配合した EMFO とレシチン-セラミドを含まない EMFO について実験 A と同様の動物実験をおこない比較した。Fig. 4 に示したように、肝臓ではレシチン-セラミドを配合した EMFO がレシチン-セラミドを配合しないものよりも有意( $p<0.05$ )に優れた吸収性を示し、血清においてもその傾向が確認された。レシチンは水中

油滴型乳化を形成し、 $\beta$ -カロテンの吸収を高める報告<sup>17)</sup>がある。本研究におけるレシチン-セラミドを配合した EMFO についても同様の作用が働いたものと推測された。また Sugawara ら<sup>18)</sup>によるとカロテノイドを含む混合ミセルを用いたカロテノイドの腸管吸収実験によるとレシチンを含むミセルは $\beta$ -カロテンやルテインの吸収を抑制することを報告しており、これは本研究とは異なる結果である。このような結果の差異は、この混合ミセルが本研究により得られたエマルジョンとは組成が異なっていることに起因するものと考えられた。一方、Shima ら<sup>19) 20)</sup>によると Caco-2 細胞を用いた親水性の蛍光物質 1,3,6,8-pyrenetetrasulfonic acid tetrasodium salt (PTSA) の腸管吸収モデル実験において、

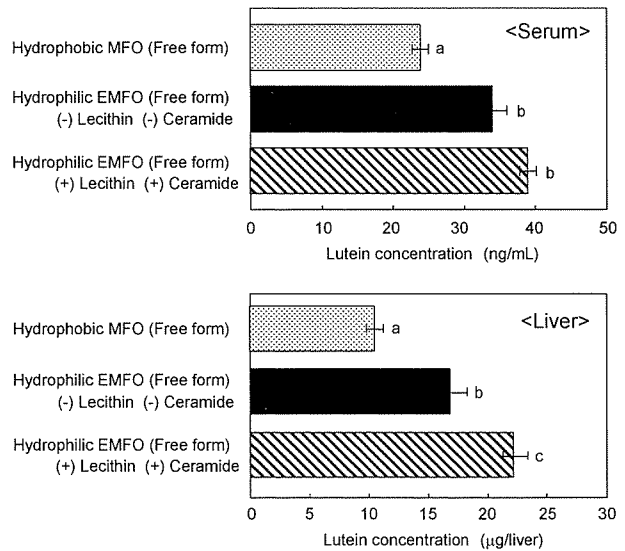


Fig. 4 Lutein concentrations in the serum and liver of the rats fed on lipophilic MFO, hydrophilic EMFO without lecithin and ceramide, and hydrophilic EMFO with lecithin and ceramide

Results are expressed as mean±SE. Values in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $p<0.05$ ).

C8 トリグリセリドを用いた W/O/W エマルジョンが PTSA の透過を促進させることを報告しており、エマルジョンの腸液による消化により生じた C8 モノグリセリドが細胞膜に作用することで透過促進が起こることを示唆している。親水性 EMFO も一部が腸管で崩壊し、生じたグリセリン脂肪酸エステルによる透過促進の可能性も考えられた。セラミドには特定の生体利用性を高める知見はこれまで認められていないが、本研究によってルテインの生体吸収にレシチンとともに寄与していることがわかった。これまで脂溶性カロテノイドは油脂と一緒に摂取することで吸収性が高まることが知られており、また油脂の種類によっても吸収性が変化する報告がある<sup>13) 21)</sup>。本研究では脂溶性カロテノイドであるルテインを O/W 乳化することで生体利用性を高め、さらにレシチンやセラミドを配合することでルテインの吸収性がより高くなることを動物実験で確認した。

#### 謝辞

本研究は、平成 17 年度兵庫県第二創業・新分野進出支援事業（先進的のものづくり産業支援）の補助を受け得られた研究成果であり、ご支援いただいた関係者各位に深くお礼申し上げます。

#### 文献

- 1) Sato, R., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Hoffman, S. C., Norkus, E., Comstock, G. W. : Prospective study of carotenoids, tocopherols, and retinoid concentrations and risk of breast cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 11, 451-457 (2002).
- 2) Slattery, M. L., Benson, J., Curtin, K., Ma, K. N., Schaeffer, D., Potter, J. D. : Carotenoids and colon cancer, *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 575-582 (2000).
- 3) Stefani, E. D., Boffetta, P., Deneo-Pellegrini, H., Mendilaharsu, M., Carzoglio, J. C., Ronco, A., Olivera, L. : Dietary antioxidants and lung cancer risk : a case-control study in Uruguay, *Nutr. Cancer*, 34, 100-110 (1999).
- 4) Wingerath, T., Sies, H., Stahl, W. : Xanthophyll esters in human skin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 335, 271-274 (1998).
- 5) Gale, C. R., Hall, N. F., Phillips, D. I., Martyn, C. N. : Plasma antioxidant vitamins and carotenoids and age-related cataract, *Ophthalmology*, 108, 1992-1998 (2001).
- 6) Sundelin, S. P., Nilsson, S. E. : Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 217-225 (2001).
- 7) Johnson, E. J., Hammond, B. R., Yeum, K. J., Qin, J., Wang, X. D., Castaneda, C., Snodderly, D. M., Russell, R. M. : Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density, *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1555-1562 (2000).
- 8) Breithaupt, D. E., Weller, P., Grashorn, M. A. : Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis, *Poult sci.*, 82, 395-401 (2003).
- 9) Park, J. S., Chew, B. P., Wong, T.

- S. : Dietary lutein absorption from marigold extract is rapid in BALB/c mice, *J. Nutr.*, 128, 1802-1806 (1998).
- 10) Granada, F., Olmedilla, B., Gil-Martínez, E., Blanco, I. : Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects, *Br. J. Nutr.*, 80, 445-449 (1998).
- 11) Bowen, P. E., Herbst-Espinosa, S. M., Hussain, E. A., Stacewicz-Sapuntzakis, M. : Esterification Does Not Impair Lutein Bioavailability in Humans, *J. Nutr.*, 132, 3668-3673 (2002).
- 12) 長尾昭彦 : 脂溶性栄養・機能成分の消化・吸収における脂質の機能, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品機能性研究センター 食品機能性に関連した研究成果情報(2005).
- 13) Clark, R. M., Yao, L., She, L., Furr, H. C. : A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions, *Lipids*, 35, 803-806 (2000).
- 14) Hollander, D., Ruble, P. E. Jr. : Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport, *Am. J. Physiol.*, 235, 686-691 (1978).
- 15) Fujita, H., Sasaki, R., Yoshikawa, M. : Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 2344-2345 (1995).
- 16) 阿部高樹 : 小麦セラミドの美容効果, 食品と開発, 36, 9-11 (2001).
- 17) 瀧澤佳津枝, 荻野裕司, 木村守, 増田泰伸, 久能昌朗, 長谷川峯夫 : マヨネーズによるカロテノイドの吸収促進効果, 日本農芸化学会講演要旨集(2004).
- 18) Sugawara, T., Kushiro, M., Zhang H., Nara, E., Ono, H., Nagao, A. : Lysophosphatidylcholine enhances carotenoid uptake from mixed micelles by Caco-2 human intestinal cells, *J. Nutr.*, 131, 2921-2927 (2001).
- 19) 島 元啓, 木村幸敬 : 腸管吸収を促進する可食性エマルション, バイオサイエンスとインダストリー, 60, 679-682 (2002).
- 20) Shima, M., Yohdoh, K., Yamaguchi, M., Kimura, Y., Adachi, S., Matuno, R. : Effects of medium-chain fatty acids and their acylglycerols on the transport of penicillin V across Caco-2 cell monolayers, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 61, 1150-1155 (1997).
- 21) 鏑木幸子, 大嶋俊二, 稲熊隆博 : 脂肪酸組成の異なるオイルによるカロテノイド吸収性の比較, ビタミン, 76, 167-168 (2002)
- 責任編集者 : 小城 勝相

A increase of lutein absorption in hydrophilic emulsified marigold flower oleoresin in rats

Takao Taniguchi, Ayumi Kawata, Miho Inoue, Tsuyoshi Ashina, Hideaki Uehara, Kazuyuki Yagi, Toshiro Watanabe\*, Naoki Hasegawa

YAEGAKI Technology Development Laboratories, YAEGAKI Bio-industry, Inc., 681

Mukudani, Hayashida, Himeji, Hyogo 679-4298

\*Correspondence should be addressed.

Fax: +81-79-268-8095, E-mail: watnb-ts@yaegaki.co.jp

ABSTRACT

Lutein is found in many foods, the richest and purest plant source is lipophilic marigold flower (*Tagetes erecta* L.) oleoresin (MFO). We developed a new hydrophilic emulsified MFO (EMFO). The mean particle size of hydrophilic EMFO is fine (23.2 nm), and it dissolves in the water clearly. The experiment A was designed to obtain basic data on the absorbance efficiency of the lutein in lipophilic MFO and hydrophilic EMFO. Four week old 20 male SD rats divided into 4 groups were fed diets containing 0.02% lutein for 5 days. Hydrophilic EMFO was higher than lipophilic MFO for the absorption of lutein. In experiment B, whether lecithin and ceramide was necessary in the absorption of the hydrophilic EMFO was examined. The lutein absorption improved the hydrophilic EMFO with the lecithin and ceramide further than the hydrophilic EMFO without the lecithin and ceramide. These results suggested that the increase of lutein absorption of hydrophilic EMFO with the lecithin and ceramide was due to concomitant the fine average particle size and by the support of lecithin and ceramide.

Key word: lutein, marigold flower oleoresin, emulsification, absorption