

胆汁酸混合ミセルの構造解析:
モノオレインと脂肪酸の含有割合変化に伴う胆汁酸混合ミセルの形態変化
Structural characterization of bile salt based mixed micelles:
Morphological changes in bile salt-based micelles with ratio of monoolein and oleic acid

相澤秀樹^{1,*}, 市川創作², 小竹(奈良)英一³, 長尾昭彦⁴

¹ 摂南大学薬学部, 〒573-0101 枚方市長尾峠町 45-1

² 筑波大学生命環境系, 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

³ 農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門, 〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12

⁴ 十文字学園女子大学人間生活学部健康栄養学科, 〒352-8510 埼玉県新座市菅沢 2-1-28

Hideki Aizawa^{1,*}, Sosaku Ichikawa², Eiichi Kotake-Nara³, Akihiko Nagao⁴

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Nagaotouge-cho 45-1, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan.

² Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

³ Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Kannonda 2-1-12, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

⁴ Department of Health and Nutrition, Faculty of human life sciences, Jumonji University, Sugasawa 2-1-28, Niiza, Saitama, 352-8510, Japan

1 はじめに

脂溶性の薬理成分や食品機能性成分などは、疎水性が高いため水への溶解性も低く、また水に容易に分散しないため、水溶性の成分と比較して一般に生体への吸収性が低い。さらに、不溶化した脂溶性成分が気管などの呼吸器や食道などの消化管に付着して炎症を引き起こすことが知られている。したがって、これらの脂溶性成分を水媒体に分散・可溶化し、消化管への付着を抑制すると共に、生体への吸収性を制御する技術が、安全で有効なサプリメントや医薬品の開発に求められている。

脂溶性成分は、小腸において胆嚢から分泌された胆汁酸とレシチンによって乳化され、脂質滴中に溶解した状態で存在する。この脂質滴を構成する脂質成分が、膵液に含まれる脂肪分解酵素によって加水分解されることで、胆汁酸混合ミセルが形成される。この胆汁酸混合ミセルは、胆汁酸を主成分とし、コレステロールやリゾレシチン、モノアシルグリセロール、脂肪酸などの成分で構成されており、脂溶性機能成分もこの胆汁酸混合ミセルによって可溶化される。胆汁酸混合ミセルが、腸壁の刷子縁膜の細胞に近接すると、胆汁酸混合ミセルを構成する脂溶性機能成分や、モノアシルグリセロール、脂肪酸などが体内へと吸収されると考えられている。

このように、脂溶性機能成分は腸で胆汁酸混合ミセルにより可溶化された状態で存在し、生体内へと吸収される。このため、胆汁酸混合ミセルの大きさ

と形状を評価して議論することは、脂溶性の薬理成分や食品機能性成分の生体への吸収メカニズムを明らかにし、その吸収性を制御する技術を開発する際の有用な基礎的知見となる。

胆汁酸混合ミセルにより可溶化したβ-カロテンの吸収性が、ヒトの小腸細胞を模した結腸腺癌由来細胞 Caco-2 細胞を用いて評価されている [1]。その結果、胆汁酸としてタウロコール酸ナトリウム (ST)、モノオレイン(ORG)、オレイン酸(OLA)、リゾホスファチジルコリンの一分子種である 1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(MPPC)からなる胆汁酸混合ミセルでは、胆汁酸混合ミセルの MPPC の割合が増加するにつれて、β-カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量が増加し、その後わずかに減少し一定になったと報告されている [1]。この MPPC 含有割合の増加に伴う胆汁酸混合ミセルの形態変化を小角 X 線散乱で用いて解析した結果、胆汁酸混合ミセルは球形ミセルから楕円体ミセルへと変化することがわかった [2]。

一方、胆汁酸としてタウロコール酸ナトリウム (ST)、モノオレイン(ORG)、オレイン酸(OLA)、ホスファチジルコリンの一分子種である 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)からなる胆汁酸混合ミセルでは、胆汁酸混合ミセル中の POPC の割合が増加するにつれて、β-カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量が減少したと報告されている [1]。この POPC 含有割合の増加に伴う胆汁

酸混合ミセルの形態変化を小角 X 線散乱で用いて解析した結果、胆汁酸混合ミセルは球形ミセルから楕円体ミセルへ、さらに円柱状ミセルと変化することがわかった[2]。

これらの結果より、胆汁酸混合ミセルは、その組成に応じて形態が変化すると共に、 β -カロテンの Caco-2 細胞への吸収量も変化することが明らかになり、胆汁酸混合ミセルの形態変化と β -カロテンの吸収性の関係性が示唆された[2]。

胆汁酸混合ミセルは、モノオレイン(ORG) とオレイン酸(OLA)などの疎水性部位を核として、その周りを胆汁酸が取り巻いた構造であると考えられている[3]。これまでの検討により、胆汁酸混合ミセルに含まれる MPPC もしくは POPC の割合により、その形態が変化することを明らかにした[2]。しかし、MPPC または POPC 以外のモノオレイン(ORG) およびオレイン酸(OLA)の影響については、いまだ検討されていない。そこで、本研究では表 1 に示す組成の胆汁酸混合ミセルについて、小角 X 線散乱測定装置により散乱曲線を測定し、これに幾何学構造モデルに基づく理論散乱曲線をフィットすることで、混合ミセルの形態を明らかにし、その変化について議論した。

表 1 胆汁酸混合ミセルの組成

	ST (mM)	ORG (mM)	OLA (mM)	ST:ORG:OLA の割合
a	80	0	0	-
b		4	1.33	60:3:1
c		15.6	5.2	60:12:4
d		31.2	10.4	60:24:8
e		46.9	15.6	60:36:12
f		63	21	60:48:16

*胆汁酸としてタウロコール酸ナトリウム(ST)、モノオレイン(ORG)、オレイン酸(OLA)。ここで、ST:ORG:OLA の割合については OLA 濃度 1.33mM の比率を 1 としたときの割合で示す。

2 実験

2-1 胆汁酸混合ミセルの調製

試料は、高純度の胆汁酸としてタウロコール酸ナトリウム(ST, Sigma-Aldrich 社製)、モノオレイン(ORG, Sigma-Aldrich 社製)、オレイン酸(OLA, ナカライテスク社製)を用いた。胆汁酸を溶解したリン酸緩衝生理食塩水、オレイン酸を溶解したヘキサン溶液、モノオレインを溶解したメタノール溶液を調製した。

表 1 の各組成になるように、モノオレインのメタノール溶液とオレイン酸のヘキサン溶液を混合してから遠心エバポレーターで溶媒を除去し、これに胆汁酸のリン酸緩衝生理食塩水で分散させて pH 7 に調製し試料とした。

2-2 小角 X 線散乱測定と解析

高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリー BL-6A の小角 X 線散乱測定装置を用いて、各試料、および参照試料としてリン酸緩衝生理食塩水を 300 秒測定した。得られた X 線強度の 2D 画像をソフト Fit-2D で、散乱ベクトル q と X 線強度 $I(q)$ の数値データに変換した。その数値データについて吸収補正などの補正を行い、胆汁酸混合ミセルの散乱ベクトル q と散乱断面積 $SCS(q)$ を求めた。得られた胆汁酸混合ミセルの散乱ベクトル q と散乱断面積 $SCS(q)$ に、種々の幾何学構造モデルから導出された理論散乱曲線を非線形最小二乗法でフィティングすることにより胆汁酸混合ミセルの形と大きさを求めた。

3 結果および考察

表 1 の組成で調製した各胆汁酸混合ミセルを測定して得られた散乱ベクトル q と散乱断面積 $SCS(q)$ の関係を図 1 に黒実線で示す。

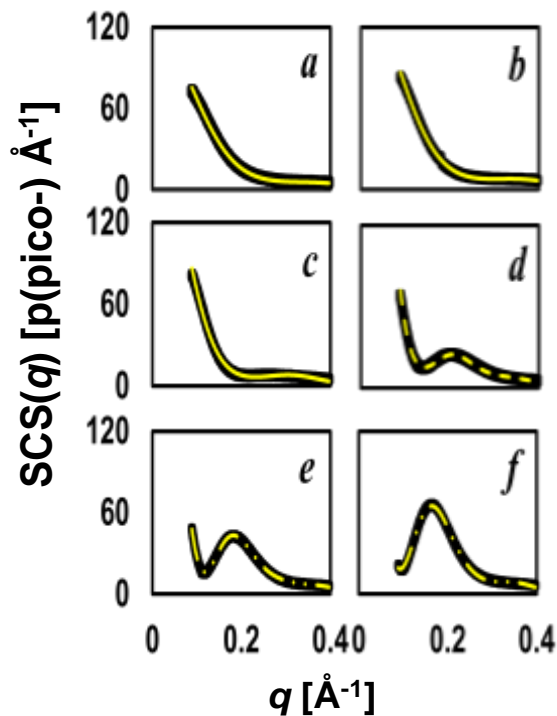


図 1 : 各胆汁酸混合ミセルの小角 X 線散乱曲線 (黒実線) と、これに二重層球の理論式 (黄色実線)、二重層楕円の理論式 (黄色破線)、あるいは二重層円柱の理論式 (黄色二点破線) でフィットした理論曲線

また、実験で得られた散乱曲線に対して、種々の幾何学構造モデルから導出された理論散乱曲線を非線形最小二乗法でフィティングし、二重層球の理論式、二重層楕円の理論式、あるいは二重層円柱の理論式のいずれかでフィットできた結果を図 1 に橙色の実線や破線で示す。フィティングにより得られた各

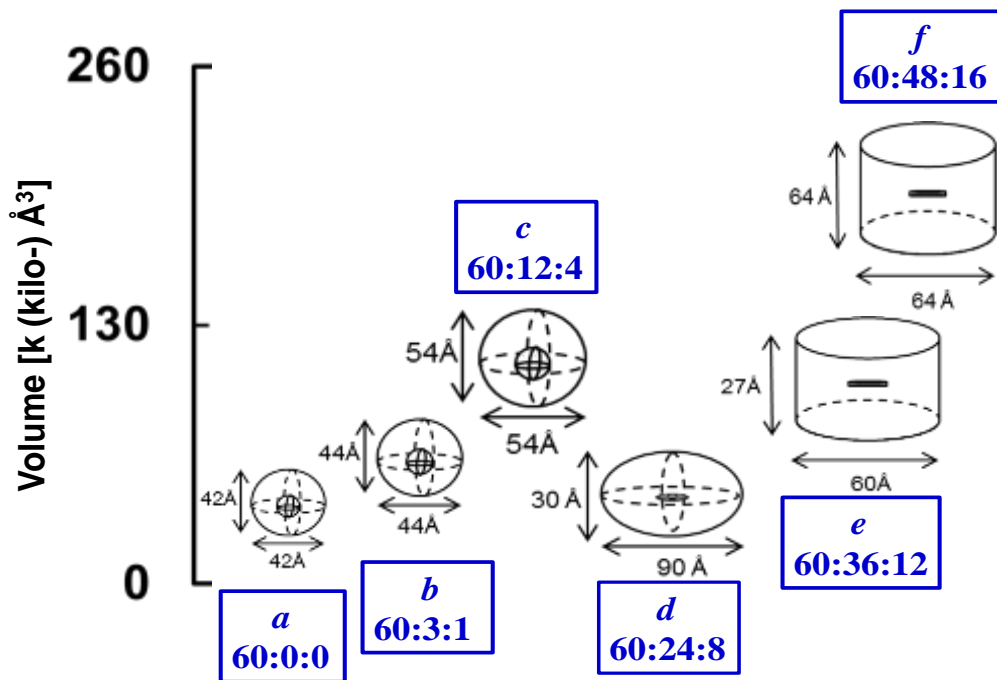


図2：各組成の混合胆汁酸ミセルの形と大きさの模式図と体積との関係

組成の胆汁酸混合ミセルの体積を表2にまとめて示す。表1のa, bとcの各混合胆汁酸ミセルの小角X線散乱曲線については二重層球の理論式で、表1のdについては二重層楕円体の理論式で、表1のeとfについては二重層円柱の理論散乱で良好にフィッティングすることができた。

各組成の胆汁酸混合ミセルの形と大きさ、および体積を図2に模式的に示す。表1のa, bとcの各胆汁酸混合ミセルは二重層球形ミセルであったが、モノオレイン(ORG)とオレイン酸(OLA)の含有割合の増加に伴い、体積が増大することがわかった。

モノオレイン(ORG)とオレイン酸(OLA)の含有割合が増加した表1のdの組成の胆汁酸混合ミセルは回転楕円体状ミセルに変化し、体積はわずかに減少した。さらにモノオレイン(ORG)とオレイン酸(OLA)の含有割合が増加した表1のeとfの混合ミセルでは円柱状ミセルとなり、その体積は急激に増大した。

この結果から、胆汁酸混合ミセルの形態は、MPPCやPOPCのみならず、モノオレイン(ORG)やオレイン酸(OLA)の含有割合によっても変化することがわかった。

4 まとめ

小角X線散乱解析により、胆汁酸としてタウロコール酸ナトリウム(ST)、モノオレイン、オレイン酸からなる胆汁酸混合ミセルの形態がモノオレイン(ORG)とオレイン酸(OLA)の含有割合により変化することを明らかにした。モノオレイン(ORG)とオレイン酸(OLA)の割合の増加に伴い、二重層球形ミセルの体積が増大して、二重層楕円体に変形するととも

に体積がわずかに減少した。さらに増加すると、二重層円柱へと変形し、体積が増大した。

表2 胆汁酸混合ミセルの組成とその体積

	ST:ORG:OLA の割合	体積 ($\times 10^3 \text{ \AA}^3$)
a	60:0:0	39
b	60:3:1	45
c	60:12:4	82
d	60:24:8	42
e	60:36:12	76
f	60:48:16	205

*胆汁酸としてタウロコール酸ナトリウム(ST)、モノオレイン(ORG)、オレイン酸(OLA)。

ここで、ST:ORG:OLAの割合についてはOLA濃度1.33mMの比率を1としたときの割合で示す。

謝辞

本研究課題遂行にあたり、BL-6Aの小角X線散乱装置の設定をしてくださった小角散乱ビームライン担当の五十嵐教之氏、清水伸隆氏、森丈晴氏に感謝いたします。

参考文献

- [1] T. Sugawara *et al.*, *J. Nutr.* **131**, 2921 (2001)
- [2] H. Aizawa *et al.*, *Photon Factory Activity Report 2013 B* (2013)
- [3] 長尾昭彦, "食総研ニュース", No.5 (2002)

*dr.aizawa.hideki@gmail.com