

## 胆汁酸混合ミセルの構造解析:

 $\beta$ -カロテンの Caco-2 細胞への吸収量とミセル構造との相関

## Structural characterization of bile salt based mixed micelles:

A reciprocal relationship between the mixed micelle structure and the amount of  $\beta$ -carotene absorbed from the mixed micelles into the human intestinal Caco-2 cells.相澤秀樹<sup>1,2,\*</sup>, 市川創作<sup>2</sup>, 長尾昭彦<sup>3</sup><sup>1</sup> 摂南大学薬学部, 〒573-0101 枚方市長尾峠町 45-1<sup>2</sup> 筑波大学大学院生命環境科学研究科, 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1<sup>3</sup> 農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所, 〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12Hideki Aizawa<sup>1,2,\*</sup>, Sosaku Ichikawa<sup>2</sup> and Akihiko Nagao<sup>3</sup><sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, Nagaotouge-cho 45-1, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan.<sup>2</sup> Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan<sup>3</sup> National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, Kannonda 2-1-12, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

## 1 はじめに

食品機能成分や薬効成分には、水に溶けにくい難水溶性あるいは脂溶性有効成分がある。これらの成分の人体への吸収量を調節する技術が、安全で効果的なサプリメントや医薬品の開発に求められている。この様な成分の一つである脂溶性  $\beta$ -カロテンはビタミン A の前駆体であり、その人体への吸収量を制御する技術の開発は、安全で効果的なサプリメント開発につながると期待される。

$\beta$ -カロテンは脂溶性であるため脂質中に存在する。 $\beta$ -カロテンを含有した脂質は、消化酵素により部分的に加水分解されると共に、胆汁に含まれる胆汁酸により乳化され胆汁酸を主成分とする混合ミセルを形成し、腸で吸収される。このため、 $\beta$ -カロテンなどの脂溶性ビタミンは、油とともに摂取すると吸収性が高まるといわれている。このような背景から、胆汁酸混合ミセルの大きさと形状を求め、 $\beta$ -カロテンの腸における吸収性との関係を議論することは、有用な知見となる。

既往の研究において、 $\beta$ -カロテンの腸における吸収性を、ヒトの小腸細胞を模した結腸腺癌由来細胞 Caco-2 細胞を用いて評価した結果が報告されている [1]。その研究では、胆汁酸(STH) 2mM、モノオレイン(ORG) 100 $\mu$ M、オレイン酸(OLA) 33 $\mu$ M、 $\beta$ -カロテン 1 $\mu$ M に、さらにリゾホスファチジルコリンの化合物一種である 1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(MPPC)、あるいはホスファチジルコリンの化合物一種である 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)のどちらかを加えた混合ミセルは、MPPC あるいは POPC の割合に

より  $\beta$ -カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量が異なることが報告されている [1]。

本研究では、この既往の研究における胆汁酸混合ミセルの組成を参考に、表 1 から 3 に示す組成の混合ミセルについて、小角 X 線測定装置で測定し散乱曲線を得て、その散乱曲線に幾何学構造モデルに由来する理論散乱曲線をあわせることで、これら組成の異なる混合ミセルの形と大きさを求め、 $\beta$ -カロテンの Caco-2 細胞への吸収量との関係について議論した。

## 2 実験

## 2-1 胆汁酸混合ミセル溶液の調製

$\beta$ -カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量が報告された既往の研究 [1]における試料濃度では薄く、フォトンファクトリー BL-10C の小角 X 線散乱測定装置で、解析に適う散乱曲線が得られなかった。このため、各成分の混合比は同じで濃度を 40 倍にした胆汁酸混合ミセル溶液を表 1 から 3 のとおり調製し、小角 X 線散乱により測定した。

試料は、高純度の胆汁酸(STH, 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)、1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (MPPC, Affymetrix 社製)、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, 日本油脂社製)を用いた。胆汁酸ダルベッコ変法イーグル培地を主成分とする培地溶液、オレイン酸ヘキサソール溶液、モノオレインメタノール溶液、MPPC メタノール/クロロホルム(1:1)溶液、POPC メタノール/クロロホルム(1:1)溶液を調製した。表 1 から 3 の組成表の組成になるように、モノオレインメタノール溶液と MPPC メタノール/クロロホルム(1:1)溶液もしくは POPC メタノール/クロロホルム(1:1)溶液もしくは POPC メタノール/クロロホルム(1:1)溶液もしくは POPC メタノール/クロロホルム(1:1)溶液

ム(1:1)溶液を混合し、遠心エバポレーターで粉末にし、さらにオレイン酸ヘキサン溶液を加え混合してから遠心エバポレーターで粉末にし、最後に胆汁酸ダルベッコ変法イーグル培地を主成分とする培地溶液で混合して pH7 に調整した溶液を試料とした。

表 1: STH ミセルと STH, ORG, OLA 混合ミセルの組成

	STH (mM)	ORG (mM)	OLA (mM)
MSD	80	—	—
MSOOD	—	4	1.33

表 2: STH, ORG, OLA, MPPC 混合ミセルの組成

	STH (mM)	ORG (mM)	OLA (mM)	MPPC (mM)
MSOAMD 50	—	—	—	2
MSOAMD 100	—	—	—	4
MSOAMD 200	80	4	1.33	8
MSOAMD 300	—	—	—	12
MSOAMD 400	—	—	—	16

表 3: STH, ORG, OLA, POPC 混合ミセルの組成

	STH (mM)	ORG (mM)	OLA (mM)	POPC (mM)
MSOOPD 50	—	—	—	2
MSOOPD 100	—	—	—	4
MSOOPD 200	80	4	1.33	8
MSOOPD 300	—	—	—	12
MSOOPD 400	—	—	—	16

2-2 小角 X 線散乱測定と解析  
 フォトンファクトリー BL-10C の小角 X 線散乱測定装置を用いて、各試料溶液と参照溶液としてダルベッコ変法イーグル培地を主成分とする培地溶液を 300 秒測定した。得られた X 線強度の 2D 画像を Fit-2D ソフトで、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。その数値データを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。胆汁酸混合ミセルの散乱ベクトル  $q$  と散乱断面積  $SCS(q)$  に様々な幾何学図形のモデル式から計算された計算結果を非線形最小二乗法であてはめ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 から 3 の組成で調製した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。

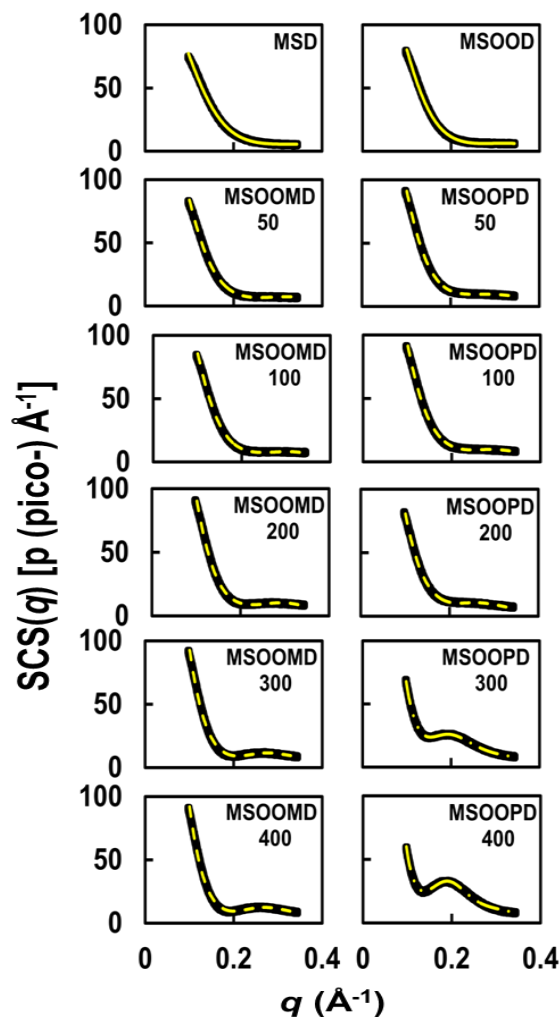


図 1: 各胆汁酸混合ミセルの小角 X 線散乱曲線 (黒実線) と、これに二重層球の理論式 (黄色実線)、二重層楕円の理論式 (黄色破線)、あるいは二重層円柱の理論式 (黄色二点破線) で合わせた理論曲線

また、様々な幾何学図形のモデル式を非線形最小二乗法で散乱曲線にあてはめることにより二重層球の理論式、二重層楕円の理論式、二重層円柱の理論式のいずれかで合わせた結果を図 1 に黄色の実線や破線で示す。

表 1 の MSD と MSOOD の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 2 の MSOAMD 50 - 400、表 3 の MSOOPD 50 - 200 については、二重層楕円体の理論式で、MSOOPD 50 - 200 については、二重層円柱の理論式に一致した。

$\beta$ -カロテンを含んだ胆汁酸混合ミセル溶液から Caco-2 細胞中へ吸収させた  $\beta$ -カロテンの吸収量とそれぞれの組成における胆汁酸混合ミセルの形と大きさを図 2 に併せて示す。MSD と MSOOD の胆汁酸混合ミセルは二重層球形ミセルであった。

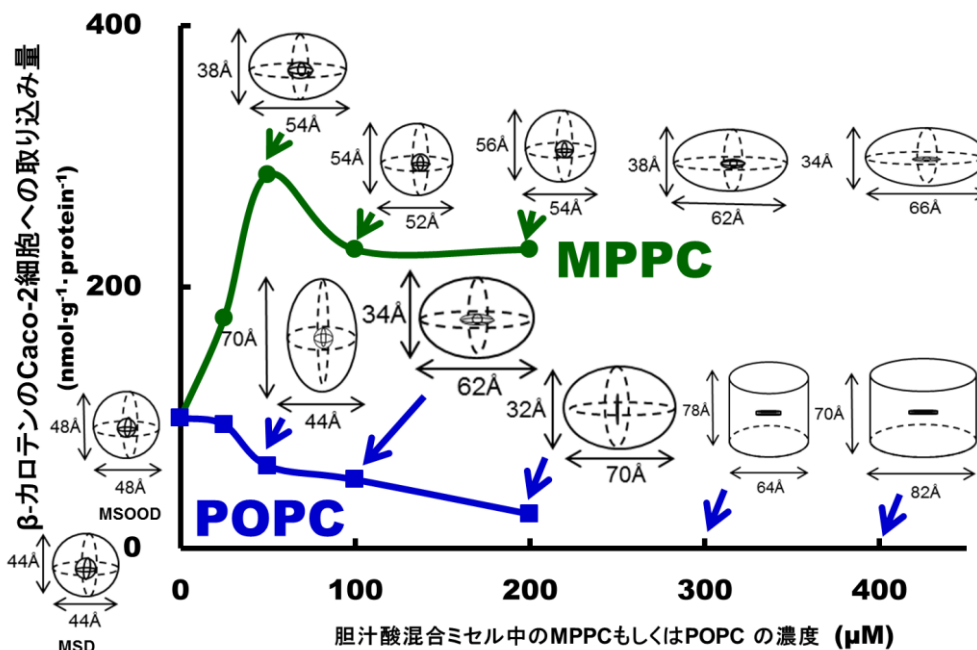


図2：β-カロテンを含んだ胆汁酸混合ミセル溶液から Caco-2 細胞に吸収された β-カロテンの量の変化[1]と各組成における混合胆汁酸ミセルの形と大きさの模式図 (β-カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量については文献[1]から引用した。Sugawara et al. 2001 © 2001 American Society for Nutrition 本報告の著者の一人である長尾昭彦は文献[1]の著者でもあり、本報告では著者の文献[1]の表と図を再利用する権利を援用した。)

MSOOD の胆汁酸混合ミセルでは、MPPC 濃度の増大に伴い、β-カロテンの取り込み量は増加した後わずかに減少し、その後ほぼ一定となる結果が報告されている[1]。本研究における小角 X 線散乱解析の結果、この MPPC 濃度の増大に伴い二重層球形ミセルから二重層楕円体へと変形していき、ミセルが大きくなることがわかった。

一方、MSOOD の胆汁酸混合ミセルで POPC 濃度の増大に伴い、β-カロテンの取り込み量が減少する果が報告されている[1]。本研究における小角 X 線散乱解析の結果、この POPC 濃度の増大に伴い、ミセルの形態は、二重層球形ミセルから二重層楕円体に、さらに二重層円柱へと変形し、ミセルが大きくなることがわかった。

これらの結果から、サイズが小さく表面が大きな曲率を持った混合ミセルで、β-カロテンの取り込み量は比較的高い値を示す一方で、サイズが大きく表面の曲率が小さな混合ミセルでは、β-カロテンの取り込み量が低い傾向が見られた。これより、β-カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量に対して、胆汁酸混合ミセルの構造が影響することが示唆された。

#### 4 まとめ

小角 X 線散乱解析により、胆汁酸混合ミセルに含まれるリン脂質濃度により混合ミセルの形と大きさが増えることを明らかにした。すなわち、胆汁酸、モノオレイン、オレイン酸、および 1-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(MPPC)からなる混合ミセルの MPPC 濃度が増大すると、二重層球形ミセル

から二重層楕円体へと変形し、ミセルが大きくなることを明らかにした。また、胆汁酸、モノオレイン、オレイン酸、および 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)からなる混合ミセルの POPC 濃度が増大すると、二重層球形ミセルから二重層楕円体に、さらに二重層円柱へと変形し、ミセルが大きくなることを明らかにした。

β-カロテンを含んだ胆汁酸混合ミセル溶液から Caco-2 細胞に吸収された β-カロテンの吸収量と、小角 X 線散乱解析より得られた各混合ミセルの形状の関係について検討した結果、サイズが小さく表面が大きな曲率を持った混合ミセルで、β-カロテンの取り込み量は比較的高い値を示す一方で、サイズが大きく表面の曲率が小さな混合ミセルでは、β-カロテンの取り込み量が低い傾向が見られ、β-カロテンの Caco-2 細胞への取り込み量に対して、胆汁酸混合ミセルの構造が影響することが示唆された。

#### 謝辞

本研究課題遂行にあたり、本課題を採択していただきました Photon Factory Program Advisory Committee ならびに BL-10C の小角 X 線散乱装置の設定をしてくださったビームライン担当者に感謝いたします。

#### 参考文献

[1] T. Sugawara et al., *J. nutr.* **131**, 2921 (2001)

\* dr.aizawa.hideki@gmail.com