

〈一般研究課題〉 画期的な高吸収性抗酸化素材の創出

助成研究者 名城大学 本田 真己



画期的な高吸収性抗酸化素材の創出

本田 真己
(名城大学)

Development of a highly bioavailable antioxidant material

Masaki Honda
(Meijo University)

Abstract :

In recent years, *Z*-isomers of carotenoids have attracted attention because of their higher bioavailability than the naturally predominant (all-*E*)-carotenoids. However, little is known about the differences in biological activities between all-*E*- and *Z*-isomers. This study investigates the effects of isomer ratio of lutein, a xanthophyll carotenoid, on their antioxidant potentials and skin-related biological activities, as well as ultraviolet (UV)-blocking abilities. Evaluation of UV-blocking abilities revealed superior performance of *Z*-isomer-rich lutein against UV-A and UV-B radiation. Antioxidant assays revealed that all-*E*- and *Z*-isomer-rich lutein scavenged remarkably singlet oxygen and hydroxyl radicals. Moreover, *Z*-isomer-rich lutein showed greater lipid peroxidation scavenging activity than the all-*E*-isomer. *Z*-Isomer-rich lutein had potent anti-elastase activity than the all-*E*-isomer, suggesting its potential in skincare product development. These findings highlight the potential of geometric isomers to enhance the therapeutic efficacy of carotenoids for skincare applications.

1. はじめに

自然界に広く存在するカロテノイド類は、強力な抗酸化作用を有し、カラーバリエーションが多様であることから、健康食品や化粧品、動物飼料の色揚げ剤など幅広い用途で利用されている。しかし、カロテノイドの体内吸収性は極めて低く、それがしばしば産業利用上の課題となる。例えば、トマトに豊富に含まれるリコピンや、ケールやホウレンソウに豊富に含まれるルテインは、バ

イオアベイラビリティが10%以下と報告されている¹⁾。カロテノイドの体内吸収性を向上する手段として、乳化や微粒子化などの物理的な手段が伝統的に用いられている。近年、それら従来法より優れた手段として、「異性化技術」の活用が注目を集めている。一般に、カロテノイドは分子内に多くの共役二重結合をもち、天然では二重結合がすべてトランス体(トランス型)として存在する。一方、動物体内においては、二重結合の一部がシス体に異性化したシス型のカロテノイドが一定量存在する^{2,3)}。動物体内においてカロテノイドがシス型に異性化するメカニズムや、生体内におけるシス型カロテノイドの役割については未だ解明されていない。

近年、我々はカロテノイドの一種であるアスタキサンチンをシス型へ異性化してラットとモルモット、ニワトリに経口投与すると、トランス型と比較して体内吸収性がそれぞれ68.8、26.5、5.6倍向上することを明らかにした⁴⁻⁶⁾。さらに、皮膚や肝臓など特定の臓器・組織において、シス型カロテノイドが高濃度に蓄積されることを明らかにした^{4,7)}。シス型の優れた体内吸収性は、ヒト試験においても実証されている^{8,9)}。一方、トランス型とシス型カロテノイドの生理活性の差異についてはほとんど明らかにされていない。本研究は、新奇な高吸収性抗酸化素材の創出を目的として、シス型カロテノイドの生理活性の差異を調査した。この知見の取得はシス型カロテノイドの生体内における存在意義(役割)を明らかにする上でも重要である。具体的には、ルテインについて、紫外線遮蔽率、抗酸化作用および生理活性の差異を調査した。なお、経口摂取したルテインは肌に蓄積され、紫外線保護作用や肌質改善作用を示すことが報告されている^{10,11)}。よって本研究では、ルテインの異性化が肌に関する生理活性に及ぼす影響を中心に調査した。

2. 試料および実験方法

2-1. ルテインの異性化

既報に従い、トランス型ルテインから熱異性化により、シス型ルテインを調製した^{7,12)}。具体的には、トランス型ルテインの標準品(フナコシ社製)をエタノールに溶解し、溶液を耐圧容器(TVS-N2-10; 耐圧硝子工業社製)に導入した。耐圧容器のヘッドスペースを窒素ガスで置換した後、直ちに封をして窒素ガスで容器内を5MPaに加圧した。耐圧容器を180℃のオイルバス中で加熱し、ルテインをシス型に異性化した。

2-2. ルテイン異性体の分析

既報に従い、逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて、ルテイン異性体を分析した⁷⁾。トリアコンチル(C30)基を化学結合したシリカ系逆相カラム(ワイエムシィ社製)を固定相に用い、メタノール/アセトン/水(60:35:5, v/v/v)の混合液を移動相として用いた。移動相の流量とカラム温度をそれぞれ1.0 mL/minと35℃に設定した。ルテイン異性体はフォトダイオードアレイ検出器(SPD-M20A; 島津製作所社製)を用いて、440 nmの波長で検出した。ルテイン異性体はスペクトルデータおよび質量分析計を用いて同定した。

2-3. 紫外線遮蔽率の評価

トランス型とシス型ルテインの紫外線遮蔽率を、既報の手順に従い紫外可視分光光度計(VWSE-798; 日本分光社製)を用いて測定した^{13,14)}。ルテイン異性体のエタノール溶液の吸収スペ

クトルを測定し、紫外線遮蔽率測定プログラムを用いて遮蔽率を算出した。遮蔽率はUV-A領域(320-400 nm)とUV-B領域(280-320 nm)について評価を行った。

2-4. 抗酸化活性と生理活性の評価

トランス型とシス型ルテインの抗酸化活性および肌質改善作用を、既報の手順に従い*in vitro*で評価した^{13,14}。抗酸化作用は一重項酸素消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性、スーパーオキシドアニオン消去活性および過酸化脂質生成抑制能について評価した。肌質改善作用については、エラスターゼ阻害活性、細胞賦活作用、ヒアルロン酸産生能およびI型コラーゲン産生能について評価した。細胞賦活作用、ヒアルロン酸産生能およびI型コラーゲン産生能は、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて評価した。

3. 実験結果

3-1. ルテイン異性体のクロマトグラム

トランス型ルテインのエタノール溶液を180℃、5MPaで加熱する前後のクロマトグラムを図1に示す。加熱前はトランス型のピークしか検出されなかったが、加熱後は複数のシス型のピークが観察された。これらのピークはスペクトルデータおよび質量分析計のデータから、暫定的に図1に示すように同定された。主に9(9')-シス型と13(13')-シス型のルテインが加熱により生成した。熱異性化によりこれらの異性体が生じることは、リコピンやアスタキサンチンなど、他のカロテノイドにおいても報告されている^{12,15}。ピーク面積から加熱処理後のルテインの総シス型比率を計算すると、65.4%であった。この熱異性化によりシス型比率を強化したルテインについて、紫外線遮蔽率、抗酸化作用および生理活性を評価し、未処理のトランス型ルテインと比較した。

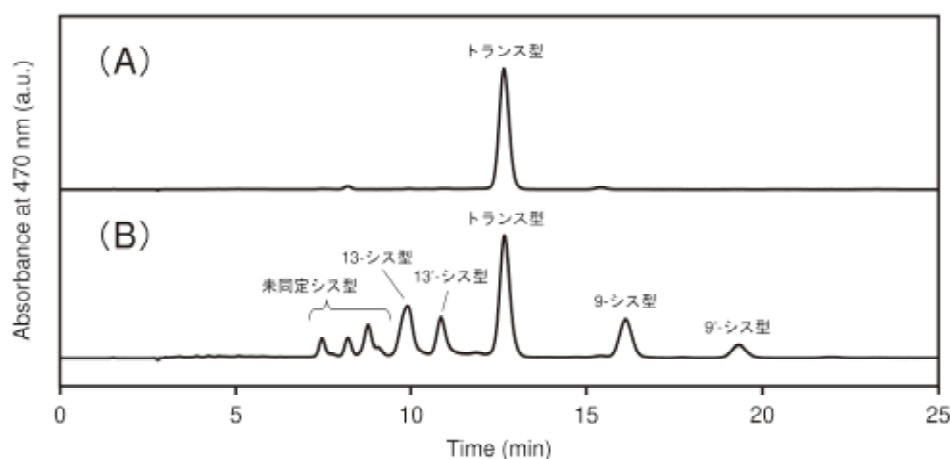


図1. 加熱前(A)と後(B)のルテイン異性体のクロマトグラム

3-2. 紫外線遮蔽率の評価

トランス型とシス型ルテインのエタノール溶液の紫外線遮蔽率を図2に示す。いずれの異性体も濃度依存的に紫外線遮蔽率が増加することが示された。トランス型とシス型を比較すると、シス型の方が優れた紫外線遮蔽効果を示すことを明らかにした。具体的には、UV-A遮蔽率は約2倍、UV-B遮蔽率は約3倍シス型の方が高かった。トランス型とシス型ルテインの吸収スペクトルを比

較すると、シス型には330 nm付近にトランス型にはみられない吸収極大が観察された。このシス型に特徴的な吸収極大が、紫外線遮蔽率の向上に寄与したと考えられる。リコピンやアスタキサンチンなど他のカロテノイドにおいても、シス型は紫外線領域に吸収極大を有することが確認されている^{13,14)}。以上より、シス型のルテインはトランス型より優れた紫外線保護作用を有すると考えられる。

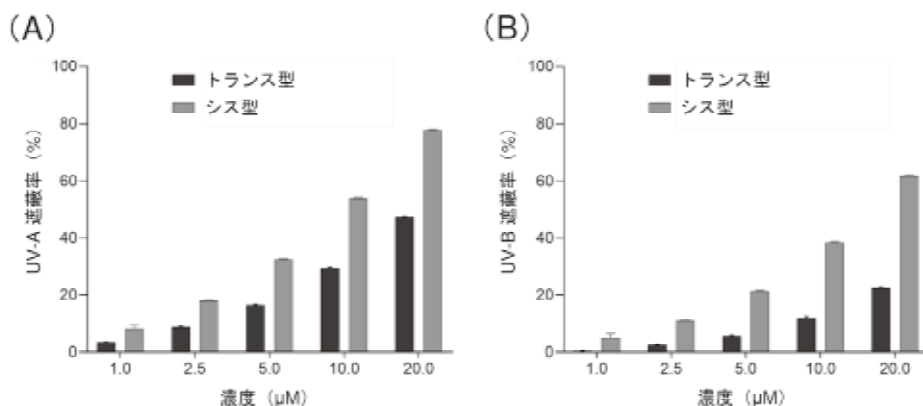


図2. トランス型とシス型ルテインのUV-A (A)およびUV-B (B)の遮蔽率

3-3. 抗酸化作用の評価

トランス型とシス型ルテインの一重項酸素消去活性、ヒドロキシラジカル消去活性、スーパーオキシドアニオン消去活性および過酸化脂質生成抑制能の測定結果を図3に示す。ルテイン異性体は

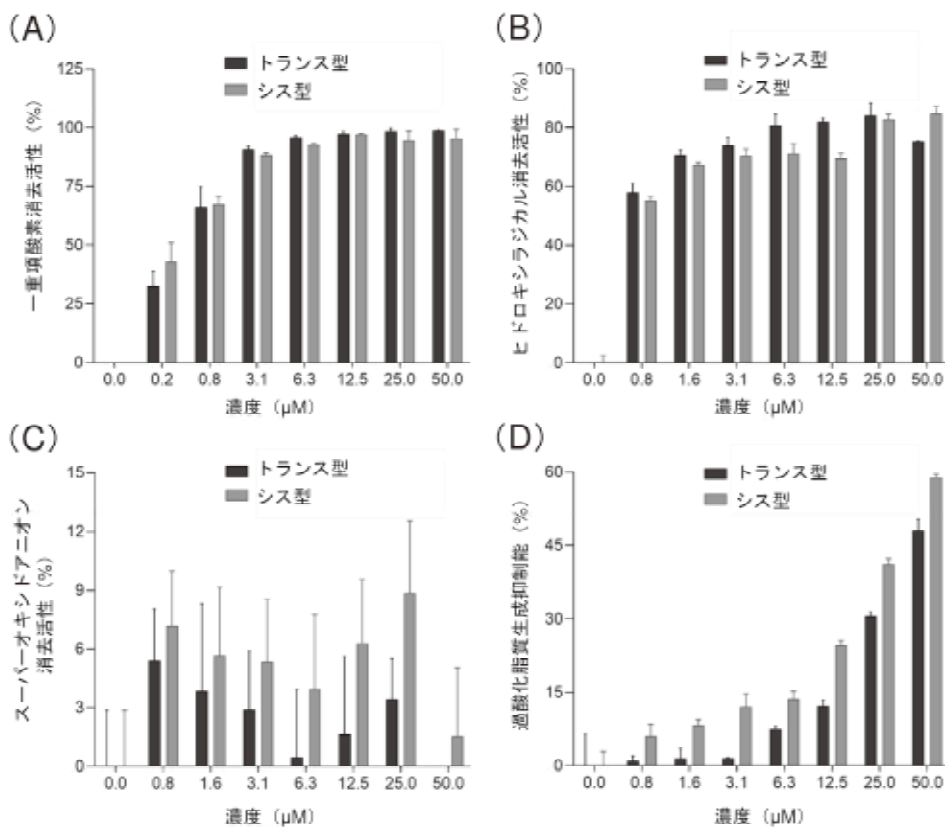


図3. トランス型とシス型ルテインの一重項酸素消去活性(A)、ヒドロキシラジカル消去活性(B)、スーパーオキシドアニオン消去活性(C)および過酸化脂質生成抑制能(D)

強力な一重項酸素消去、ヒドロキシラジカル消去および過酸化脂質生成抑制能を示した。一方、スーパーオキシドアニオン消去活性は低かった。トランス型とシス型の一重項酸素消去活性とヒドロキシラジカル消去活性はほぼ同等であった。トランス型とシス型ルテインの一重項酸素消去活性のIC₅₀値(50% Inhibition Concentration)はそれぞれ0.43 μMと0.32 μMであり、ヒドロキシラジカル消去活性はそれぞれ0.19 μMと0.22 μMであった。一方、過酸化脂質生成抑制能については、トランス型よりシス型の方が有意に優れていた。以上より、シス型ルテインはトランス型と同等以上の抗酸化活性を有することが示唆された。

3-4. 生理活性の評価

トランス型とシス型ルテインのエラスターゼ阻害活性、細胞賦活作用、ヒアルロン酸産生能、I型コラーゲン産生能の測定結果を図4に示す。ルテイン異性体は強力なエラスターゼ阻害活性を有しており、その活性はトランス型よりシス型の方が高かった。トランス型とシス型ルテインのエラスターゼ阻害活性のIC₅₀値はそれぞれ0.89 μMと0.01 μMであった。エラスターゼは蛋白分解酵素の一つで、結合組織であるエラスチンを分解する作用をもつ¹⁶⁾。よって、エラスターゼの活性を阻害する成分には、肌の弾力を維持する効果が期待される。また、ルテイン異性体は、添加濃度0.4 μM~2.5 μMの範囲において、有意な細胞賦活作用、ヒアルロン酸産生促進能、I型コラーゲン産生促進能を示さなかった。ヒアルロン酸の産生能はルテイン異性体を添加することでむしろ低下する傾向が観察された。その低下の程度はトランス型を添加した方が高かった。以上より、シス型ルテインはトランス型と同等以上の肌に関する生理活性を有することが示唆された。

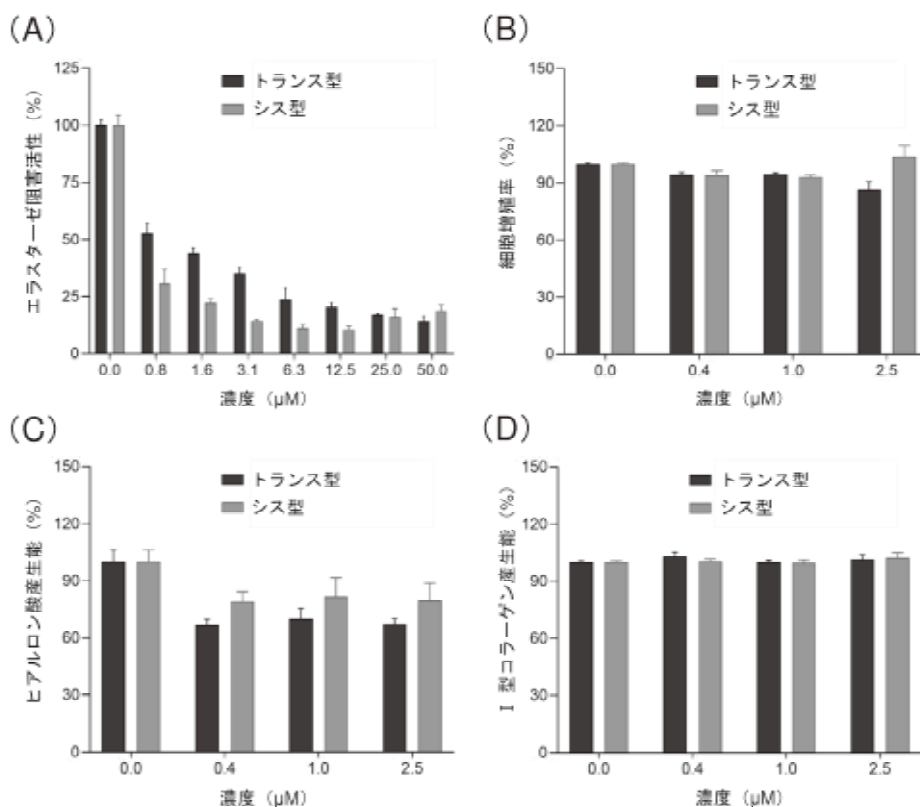


図4. トランス型とシス型ルテインのエラスターゼ阻害活性(A)、細胞賦活作用(B)、ヒアルロン酸産生能(C)およびI型コラーゲン産生能(D)

まとめ

高い抗酸化活性を有するカロテノイド類の一種であるルテインについて、トランス型とシス型の紫外線遮蔽率、抗酸化作用および生理活性の差異を調査した。紫外線遮蔽率は、トランス型よりシス型の方が有意に優れていた。抗酸化作用と生理活性については、トランス型とシス型はほぼ同等の活性を示したが、一部の評価(過酸化脂質生成抑制能、エラスターゼ阻害活性)においてはシス型の方が優れた活性を示した。以上より、既報の吸収性に関する知見⁷⁾と、今回評価した紫外線遮蔽率や生理活性の結果を総合的に判断すると、天然の存在形態であるトランス型のルテインよりシス型の方が高い健康効果を有する可能性が示唆された。一方、ルテイン異性体の生理活性に関する報告は非常に限られていることに加え、*in vitro* 試験の知見しかないため、今後動物やヒトを用いた生理活性の評価を行い、シス型ルテインの優位な効能を証明する必要がある。

参考文献

- 1) Ryan, L., O'connell, O., O'Sullivan, L., Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2008). Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 127–133.
- 2) Stahl, W., Schwarz, W., Sundquist, A. R., & Sies, H. (1992). *Cis-trans* isomers of lycopene and β -carotene in human serum and tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(1), 173–177.
- 3) Østerlie, M., Bjerken, B., & Liaaen-Jensen, S. (2000). Plasma appearance and distribution of astaxanthin *E/Z* and *R/S* isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(10), 482–490.
- 4) Honda, M., Murakami, K., Osawa, Y., Kawashima, Y., Hirasawa, K., & Kuroda, I. (2021). *Z*-Isomers of astaxanthin exhibit greater bioavailability and tissue accumulation efficiency than the all-*E*-isomer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(11), 3489–3495.
- 5) Honda, M., Kageyama, H., Zhang, Y., Hibino, T., & Goto, M. (2022). Oral supplementation with *Z*-isomer-rich astaxanthin inhibits ultraviolet light-induced skin damage in guinea pigs. *Marine Drugs*, 20(7), 414.
- 6) Honda, M., Kawashima, Y., Hirasawa, K., Uemura, T., Sun, J., & Hayashi, Y. (2021). Astaxanthin *Z*-isomer-rich diets enhance egg yolk pigmentation in laying hens compared to that in all-*E*-isomer-rich diets. *Animal Science Journal*, 92(1), e13512.
- 7) Honda, M., Takasu, S., Nakagawa, K., & Tsuda, T. (2021). Differences in bioavailability and tissue accumulation efficiency of (all-*E*)- and (*Z*)-carotenoids: A comparative study. *Food Chemistry*, 361, 130119.
- 8) Unlu, N. Z., Bohn, T., Francis, D. M., Nagaraja, H. N., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2007). Lycopene from heat-induced *cis*-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-*trans*-rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 98(1), 140–146.
- 9) Cooperstone, J. L., Ralston, R. A., Riedl, K. M., Haufe, T. C., Schweiggert, R. M., King, S. A., Timmers, C. D., Francis, D. M., Lesinski, G. B., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2015). Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as *cis*-isomers from tangerine compared

- to red tomato juice, a randomized, cross-over clinical trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(4), 658–669.
- 10) Roberts, R. L., Green, J., & Lewis, B. (2009). Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 195–201.
 - 11) Palombo, P., Fabrizi, G., Ruocco, V., Ruocco, E., Fluhr, J., Roberts, R., & Morganti, P. (2007). Beneficial long-term effects of combined oral/topical antioxidant treatment with the carotenoids lutein and zeaxanthin on human skin: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacology and Physiology*, 20(4), 199–210.
 - 12) Honda, M., Murakami, K., Zhang, Y., & Goto, M. (2021). Rapid and continuous astaxanthin isomerization in subcritical ethanol. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 60(39), 14060–14068.
 - 13) Honda, M. (2023). Z-Isomers of lycopene and β -carotene exhibit greater skin-quality improving action than their all-E-isomers. *Food Chemistry*, 421, 135954.
 - 14) Honda, M., & Nishida, Y. (2023). *In vitro* evaluation of skin-related physicochemical properties and biological activities of astaxanthin isomers. *ACS Omega*, 8(22), 19311–19319.
 - 15) Honda, M., Takahashi, N., Kuwa, T., Takehara, M., Inoue, Y., & Kumagai, T. (2015). Spectral characterisation of Z-isomers of lycopene formed during heat treatment and solvent effects on the E/Z isomerisation process. *Food Chemistry*, 171, 323–329.
 - 16) Sherratt, M. J. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age*, 31(4), 305–325.