

エンドグループに五員環構造を有するカロテノイドの活性酸素種
に対する抗酸化機構ならびにヒト血中分布特性に関する研究

2020 年度

西野 梓

(Azusa Nishino)

論文目録

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済みである。

- 1) Azusa Nishino, Takashi Maoka, Hiroyuki Yasui. Analysis of reaction products of astaxanthin and its acetate with reactive oxygen species using LC/PDA ESI-MS and ESR spectrometry. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 1967-1970. [第 1 章]
- 2) Azusa Nishino, Takashi Maoka, Hiroyuki Yasui. Reaction of paprika carotenoids, capsanthin and capsorubin, with reactive oxygen species. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 4786-4792. [第 1 章]
- 3) Takashi Maoka, Azusa Nishino, Hiroyuki Yasui, Yumiko Yamano, Akimori Wada. Anti-oxidative activity of mytiloxanthin, a metabolite of fucoxanthin in shellfish and tunicates. *Mar. Drugs.* **2016**, 14, 93. [第 1 章]
- 4) Azusa Nishino, Takashi Ichihara, Takeshi Takaha, Takashi Kuriki, Hideko Nihei, Kazuhisa Kawamoto, Hiroyuki Yasui, Takashi Maoka. Accumulation of paprika carotenoids in human plasma and erythrocytes. *J. Oleo Sci.* **2015**, 64, 1135-1142. [第 2 章]
- 5) Takashi Ichihara, Azusa Nishino, Takeshi Takaha, Takashi Kuriki, Hideko Nihei, Hiroyuki Yasui, Takashi Maoka, Kazuhisa Kawamoto. Effect of paprika xanthophyll supplementation on oxygen uptake in athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Phys. Fitness Sports Med.* **2018**, 7, 247-252. [第 3 章]

目次

| | |
|--|----|
| 序論..... | 1 |
| 第 1 章 エンドグループの構造が異なる 7 種類のカロテノイドと ROS との化学反応機構 ならびに ROS 消去活性評価 | |
| 1-1. 緒言..... | 9 |
| 1-2. 実験方法..... | 11 |
| 1-3. 結果および考察..... | 17 |
| 1-4. 小括..... | 30 |
| 第 2 章 ヒト介入試験におけるパプリカ由来カロテノイドの経口摂取による循環血液への 移行性評価 | |
| 2-1. 緒言..... | 31 |
| 2-2. 実験方法..... | 32 |
| 2-3. 結果および考察..... | 37 |
| 2-4. 小括..... | 47 |
| 第 3 章 ヒト介入試験におけるパプリカ由来カロテノイドの運動機能改善効果の検証 | |
| 3-1. 緒言..... | 48 |
| 3-2. 実験方法..... | 50 |
| 3-3. 結果および考察..... | 53 |
| 3-4. 小括..... | 59 |
| 総括..... | 60 |
| 参考文献..... | 63 |
| 謝辞..... | 69 |

略語一覧

| | |
|---|---|
| ABC transporters | : ATP-binding cassette transporters |
| BCMO1 | : β -Carotene 15,15'-monooxygenase 1 |
| $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ | : Boron trifluoride-ethyl ether complex |
| ${}^n\text{Bu}_4\text{NF}$ | : Tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride |
| Carotenoid-OO \cdot | : Carotenoid endoperoxide radical |
| Carotenoid-O \cdot | : Carotenoid epoxide radical |
| ClBu_3P | : Tributylphosphonium chloride |
| DMPO | : 5,5-Dimethyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide |
| EFSA | : European food safety authority |
| EPA | : Eicosapentaenoic acid |
| ESR | : Electron spin resonance |
| Hb | : Hemoglobin |
| HbO_2 | : Oxyhemoglobin |
| HF | : Hydrofluoric acid |
| HPLC | : High performance liquid chromatography |
| JECFA | : Joint FAO/WHO expert committee on food additives |
| LDL | : Low density protein |
| $\text{LiN}(\text{TMS})_2$ | : Lithium bis (trimethylsilyl) amide |
| MDA-LDL | : Malondialdehyde-modified low density lipoprotein |
| MeMgBr | : Methylmagnesium bromide |
| MetHb | : Methemoglobin |
| NaBH_4 | : Sodium tetrahydroborate |
| NaIO_4 | : Sodium periodate |
| NaOMe | : Sodium methoxide |
| ${}^1\text{O}_2$ | : Singlet oxygen |
| $\cdot \text{O}_2^-$ | : Superoxide anion radical |
| $\cdot \text{OH}$ | : Hydroxyl radical |
| $\cdot \text{OOR}$ | : Peroxyl radical |
| $\cdot \text{OR}$ | : Alkoxy radical |
| 4-oxo-TEMPO | : 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-Oxyl Free Radical |
| PBS | : Phosphate buffered saline |
| PHGPx | : Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase |
| PPTS | : Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonate |
| ROS | : Reactive oxygen species |
| SOD | : Superoxide dismutase |

| | |
|----------------------|---------------------------------------|
| TBS | : Di- <i>tert</i> -butyldimethylsilyl |
| TES | : Triethylsilyl |
| THF | : Tetrahydrofuran |
| TMPD | : 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidone |
| p-TsOH | : <i>p</i> -Toluenesulfonic acid |
| $\dot{V}\text{CO}_2$ | : Carbon dioxide emission |
| $\dot{V}\text{E}$ | : Minute ventilation |
| $\dot{V}\text{O}_2$ | : Oxygen uptake |

序論

世界一の長寿国であると同時に超高齢社会を迎えたわが国では、少子高齢化に伴う社会保障関係費の増加による財政の圧迫が問題となっている。そのなかでも特に医療費が増加を続け 2014 年度には 40 億円を突破し[1] (Fig. 1)、医療制度自体の破綻が危惧される。今後も現在の医療制度を維持するためには、単なる寿命の延伸ではなく健康寿命を延伸させ、医療費の削減に取り組むことが必要である。そこで、政府は健康長寿社会を実現するために、税制整備など様々な施策を講じてセルフメディケーションの推進を図っている。

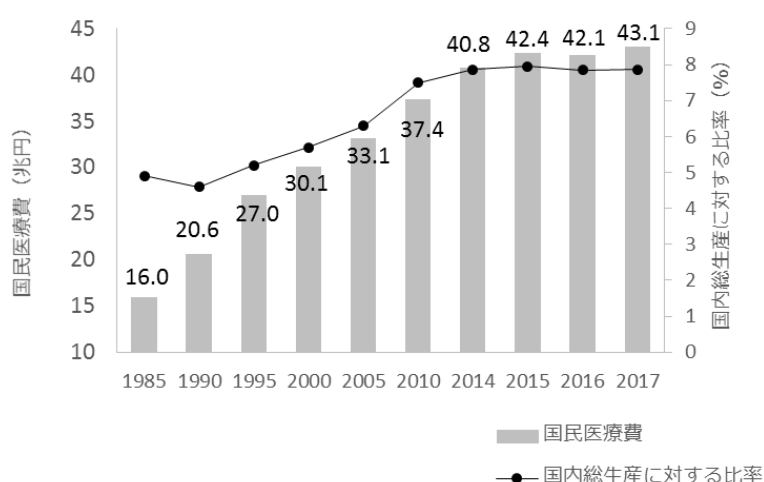


Fig. 1 国民医療費の推移

厚生労働省 平成 29 年度 国民医療費の概 [1] より作成

そのような社会的背景から、近年では予防医療の重要性が喚起されている。予防医療は、生活習慣の改善を中心とした健康増進により疾病を未然に防ぐ一次予防、疾病の早期発見および早期治療により重篤化を防ぐ二次予防、疾病罹患後の再発防止や後遺症治療などによる身体の回復・社会復帰に努める三次予防の三段階に分けられる。そのうち、一次予防に該当する生活習慣の改善において「食」は極めて重要な役割を果たす。「食」の機能は、一次機能（生命維持のための栄養機能）、二次機能（食事を楽しむための味覚・感覚機能）、三次機能（生理機能調節作用）に分類されるが、近年では食の三次機能にフォーカスした機能性食品の研究開発が加速している。その背景には、セルフメディケーションや予防医療推進の一端として、消費者庁により 2015 年 4 月に新たに創設された機能性表示食品制度が密接に関係している。これまで機能性食品における効果効能表示は法規制が厳しく、栄養機能食品と特定保健用食品のみに効果効能表示は認可されており極めて限定的であった (Fig. 2)。1991 年より導入されていた特定保健用食品制度（トクホ）では、個別、つまり製品ごとの臨床試験による効果検証や国による許認可審査を経る必要があるため、最終的な認可までに

多くの費用と時間が必要である。一方で、2015年に導入された機能性表示食品制度では、個別の臨床試験は必須ではなく、企業がシステマティック・レビュー（研究レビュー）により製品や機能性関与成分に対する科学的根拠を示し、それらを消費者庁へ届け出ることによって機能性表示が可能となる。機能性表示の内容については、あくまで「健康の維持・増進」に合致するものであって、疾病治療などへの言及は禁じられている。したがって、定められた範囲内での適用となるものの、特定保健用食品と比較すると製品開発への参入が比較的容易であることから、機能性表示食品が市場に次々と登場している。2020年2月現在、特定保健用食品が約1000品目であるのに対し、機能性表示食品は制度の新設からわずか5年で、約2300品目にのぼる。

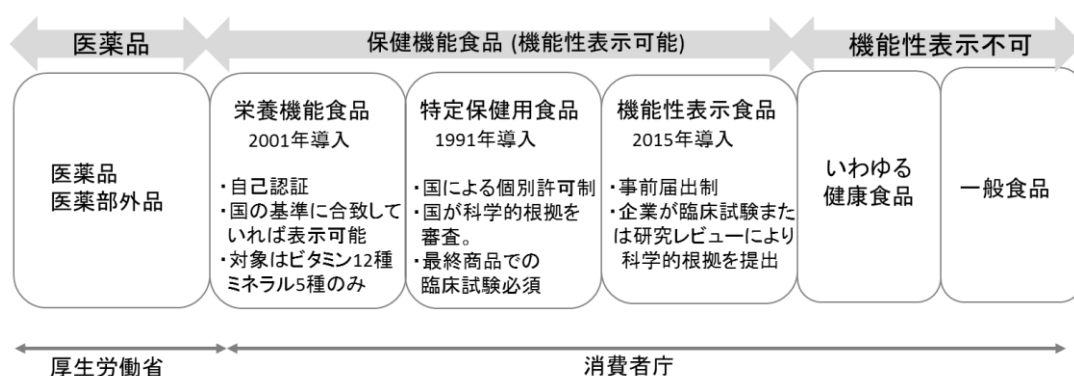


Fig. 2 食品の機能性表示に関わる制度

機能性表示食品の訴求内容は多岐にわたるが、その中でも特に「抗酸化機能」はかねてより多くの関心を集めており、今や一般消費者にも広く認知が進んでいる。その背景には、1970年代以降、老化やあらゆる疾病の亢進過程には生体内でのフリーラジカルおよび酸化反応が深く関与していることが次々に報告されてきたことが要因として挙げられる[2-4]。その一方で、「抗酸化」は身体への具体的な効果効能を示すものではなく曖昧な概念でもあり、生体内における抗酸化反応とは具体的にいったいどのようなことなのか、科学的に正しい理解がされていないケースが散見される。

生体内での酸化反応は主に活性酸素種（ROS）によって引き起こされるが、ROSはミトコンドリアでのエネルギー産生過程や身体表面への紫外線暴露などあらゆる生命維持活動の中で発生するため、その発生を完全に防ぐことは不可能である。生体内で発生したROSの主な標的となる反応対象物質は、生体膜の主要構成成分であるリン脂質である。リン脂質は生体膜の柔軟性維持のため不飽和脂肪酸を多く含むが、その炭素原子間の二重結合部位はROSによる酸化反応を容易に受ける。その結果、生体膜は過酸化脂質へと変換し、あらゆる機能低下を引き起こす。そのため、ヒトではROSに対する生体防御機構として抗酸化システムが高度に機能している（Fig. 3）。例えば、抗酸化酵素の一種であるスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）やカタラーゼはROSを分解（無毒化）する作用を有し、リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ（PHGPx）は、過酸化リン脂質を還元

し、元の状態に再生する作用をもつ[5]。またビタミン E などの脂溶性抗酸化成分は脂質過酸化抑制作用を有する[6]。このように、ヒトの生体内では抗酸化酵素と有機低分子の抗酸化物質によって ROS による生体成分のダメージに対する防御機構が備わっており、生体恒常性が維持されている。しかし、加齢に伴う抗酸化酵素の機能低下[7]や食生活の乱れによる抗酸化物質の摂取不足、過剰な運動負荷など、複数の要因が重なることで ROS による酸化反応と抗酸化システムによる防御反応のバランスが崩壊すると、生体は酸化ストレス状態に陥る。その結果、あらゆる生体成分が酸化を受けることで過酸化物質の異常蓄積が起これ、疾病の原因となり得る。実際に、動脈硬化や糖尿病の患者では、酸化ストレスが亢進し、血中の過酸化脂質が健常者と比べ多く蓄積していることが報告されている[8, 9]。こういった事実に基づき、抗酸化と老化や疾病には強い関連性があると考えられている。

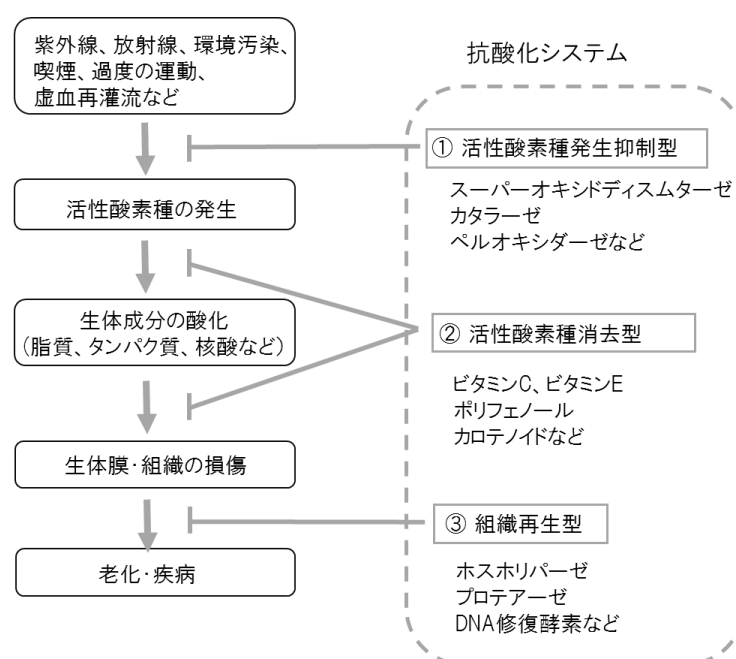


Fig. 3 酸化反応に対する生体防御機構

このような背景から、近年、食事由来の抗酸化物質の積極的な摂取により生体内の抗酸化力を高め、上述したような過酸化脂質蓄積の抑制や、直接的な ROS の捕捉・消去によって老化や疾病の予防に役立てようという取り組みが多くなされている。その中で特に、カロテノイド類（以下、カロテノイドと略）は代表的な食事由来の抗酸化物質として利用されている。カロテノイドは緑黄色野菜や藻類が生合成する黄色～赤色系の色素群の総称で、強力な抗酸化活性を有することを特徴とする[10]。カロテノイドは共通骨格として炭素数 40 のポリエン鎖をもち、その両末端に位置するエンドグループの多様性によって、現在、自然界に 750 種類以上の異なる分子の存在が確認されている。その化学構造上の特徴から、大きくカロテン類とキサントフィル類の 2 グループに分類される (Fig. 4)。前者は炭素と水素のみから構成される炭化水素で疎水性が高く、後者は末端部分に酸素を持ち、疎水性の高いポリエ

ン部と親水性を示す末端部から構成されることにより両親媒性を示す。また、末端構造に水酸基を持つキサントフィル類は、自然界では大部分が脂肪酸エステル体として存在する。

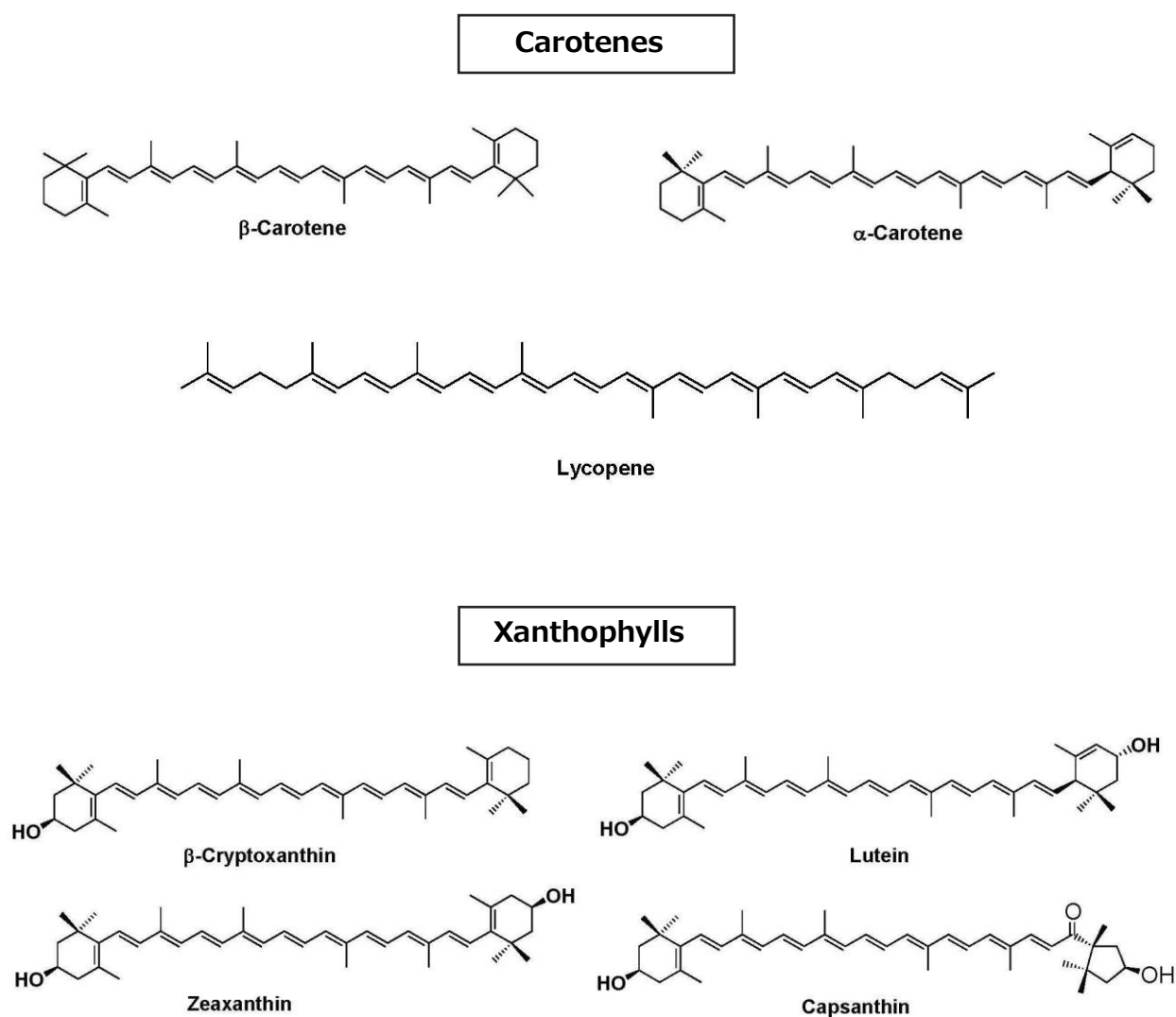


Fig. 4 カロテン類とキサントフィル類の代表例

カロテノイドは天然物質として 750 種類以上が存在しているものの、ヒトが日常的な生活において食事から摂取しているカロテノイドは限定的であり、その供給源は主に野菜（特に緑黄色野菜）や果物である。野菜や果物に含有される代表的なカロテノイドは、カロテン類に属する α -カロテン、 β -カロテン、リコピン、キサントフィル類に属するルテイン、ゼアキササンチン、 β -クリプトキササンチンの 6 種類であり、これらは食事によってヒトの生体内に取り込まれ、健常人の循環血液中から常に検出される[11, 12]。これらのうち、キサントフィル類の消化管からの吸収過程では、消化管内の脂質加水分解酵素によりエステル体から脂肪

酸が遊離されたのち、カロテン類と共に胆汁酸やコレステロールなどと混合ミセルを形成して小腸上皮細胞から吸収され、さらにカイロミクロンに組み込まれてリンパ系を介して体循環へ移行すると一般的に考えられている[13]。

種々の疫学研究において、上に挙げた各カロテノイドの血中濃度と生活習慣病や認知症などの疾病罹患リスクは逆相関関係を示すことが明らかにされており[14, 15]、強力な抗酸化活性に基づく多様な生理機能が注目を集めている。そのため近年では、疫学研究やヒトを対象とした介入試験の結果に基づき、ヒトの健康維持・増進に対するカロテノイドの利用が進められている。具体的な応用例としては、ルテインによる視機能の維持・改善効果や[16-18]、リコピンによる血中脂質の改善作用[19, 20]が挙げられ、わが国においてはこれらを訴求した機能性表示食品が一般市場で数多く販売されている。

今や、カロテノイドは代表的な食事由来の機能性成分、特に抗酸化物質として浸透している。しかしながら、カロテノイドの抗酸化作用については、疑義を生じさせる研究結果が過去に存在することも事実である。その発端は 1981 年に、Peto らが細胞実験、動物実験、及び疫学研究の総合的判断から、緑黄色野菜に含まれる β -カロテン (Fig. 4) が抗がん作用を示す可能性を報告したことに始まる[21]。それらの結果を受け、 β -カロテンのサプリメントによるがん予防効果を検証するため、1980 年～1990 年代にかけて 5 つの大規模長期介入ランダム化比較試験が実施された[22-26] (Table 1)。その結果、 β -カロテンの介入により、1 つの試験では胃がん罹患率は減少した一方で、2 つの試験では効果なしであり、喫煙者を被験者とした 2 つの試験では介入群での肺がん死亡率は上昇し、従来の見解に疑義が生じることとなった。

Table 1 主なβ-カロテンの大規模介入試験の概要

| 試験名 | 国 | 被験者 | 被験物質 | 結果 |
|---------------|--------|--------------------------------|---|--|
| Linxian study | 中国 | 男女 約30,000人 | レチノール、亜鉛、 リボフラビン、ナイアシン、 モリブデン、セレン、β-カロテン ビタミンC、ビタミンE | β-カロテン 15 mg/day ビタミンE 30 mg/day セレン 50 μg/day の組み合わせ投与で 総死亡率減少、特に胃がんの死亡率減少 |
| ATBC trial | フィンランド | 男性喫煙者 約30,000人 | β-カロテン 20 mg/day ビタミンE50 mg/day | β-カロテン投与群で肺がん罹患率が上昇 |
| CARET study | 米国 | アスベスト曝露男性 男女喫煙者 約18,000人 | β-カロテン 30 mg/day レチノール 25,000 IU/day | β-カロテン+レチノール投与群で 肺がん罹患率、肺がん死亡率が上昇 ※試験は途中で中止 |
| PHS study | 米国 | 男性医師 約20,000人 | β-カロテン 50 mg/day (隔日) アスピリン 325 mg/day (隔日) | β-カロテン投与は 総死亡率やがん罹患率に影響しない |
| WHS study | 米国 | 女性 約40,000人 | β-カロテン 50 mg/day (隔日) アスピリン 100 mg/day (隔日) ビタミンE 600 IU/day (隔日) | β-カロテン投与は 総死亡率やがん罹患率に影響しない |

この原因として、設定された β -カロテンの投与量が過剰であったこと、 β -カロテンがプロオキシダント活性を示す可能性や、そもそも野菜や果物中の抗がん作用を示す機能性成分の主体が β -カロテンであるという仮説が誤りである可能性など、様々な考察がなされているが[3, 27]、明確な説明はなされていない。

上述の β -カロテンのヒト介入試験の失敗に対する考察で指摘されているように、カロテノイドの生理機能研究を遂行するにあたっては、その基礎的知見が欠如していると判断される。著者は特に、まずはカロテノイドの臓器分布特性を把握することが重要だと考えた。しかしながら、カロテノイドの臓器分布特性や単一化合物を用いた体内動態に関する詳細な報告は非常に少ない。その要因として、カロテノイドの体内動態及び臓器分布については動物種間での差異が大きいことが明らかとなっており[28, 29]、カロテノイドの食習慣を持たないマウスやラットなどのげっ歯類をモデル動物とした場合には消化管吸収が極端に低く、ヒトを外挿するモデル動物として利用できないことが挙げられる。さらに、カロテノイドはヒトでの食経験が豊富であるがゆえに、豊富な食経験自体が安全性担保の根拠とされるため、医薬品等の新規化合物の研究開発過程において安全性の担保から要求される体内動態試験の実施がほとんど無いことも挙げられる。これらの背景を踏まえ、著者はカロテノイドをより効果的、かつ安全にヒトの健康の維持・増進へ活用するためには臓器分布特性を把握することが必須と考え、カニクイザルをモデル動物として食事性カロテノイド (β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、ルテイン、ゼアキサンチン) の臓器分布の検証を実施した[30]。その結果、カニクイザルがカロテノイドの臓器分布特性の検証においてヒトを外挿するモデル動物として適切であること、さらに、血液中および肝臓中のカロテノイド組成が食事中的カロテノイド成分比の影響を強く受ける一方で、その他の臓器においてはカロテノイドの分子極性を一因とする分布の選択性が存在する可能性を見出した。この結果より、著者はカロテノイドのサプリメントによる生理機能検証の標的組織としては、その臓器分布特性より、血液および肝臓が適切であると考えている。

次に、著者はカロテノイドの **ROS** に対する化学反応機構を明らかにすることが重要な課題であると考えた。これまで述べてきたように、カロテノイドの多様な生理機能の大部分はその強力な抗酸化活性に基づくものと捉えられている。しかしながら、抗酸化活性の高低のみが注目され、抗酸化反応の際に起こり得る化学反応論については検証が不十分である。低分子有機化合物である抗酸化物質は、**ROS** との化学反応による構造変化の結果、それ自身がプロオキシダントとして作用する事例が報告されている[31]。一般的にカロテノイドはプロオキシダントに変化しにくい安全な抗酸化物質として認識されているが、カロテノイドと **ROS** の化学反応に関しては報告が少なく、詳細は不明である。プロオキシダントとしての生体分子への作用は連鎖的な酸化反応を引き起こすため、化学反応産物およびその反応機構を評価することが、安全性の面からも必要である。

このような背景から、本研究では、第1章においてカロテノイドの抗酸化活性の測定、ならびにカロテノイドと **ROS** の化学反応性についての解析を行い、その化学反応論について考察した。第2章では、第1章で得られたカロテノイドと **ROS** の化学反応論的な知見から、抗酸化物質として最も有用性が高いと判断されたカプサンチンを高含有するパプリカ由

来カロテノイドをヒトに対してサプリメンテーションし、カロテノイドの血中濃度および血中組成に与える影響を評価した。さらに第3章では、第2章で得られたパプリカ由来カロテノイドのヒトの血液中への移行特性から、具体的な生理機能の評価指標として運動機能改善効果について着目し、パプリカ由来カロテノイドのヒト介入試験による運動機能改善効果の検証を実施した。

以下、得られた結果を3章にわたり、論述する。

第1章 エンドグループの構造が異なる7種類のカロテノイドとROSとの化学反応機構ならびにROS消去活性評価

1-1. 緒言

通常の大気中に存在する“酸素”とは電子的・エネルギー的に安定した基底状態の三重項酸素 ($^3\text{O}_2$) を示す。ROS は、 $^3\text{O}_2$ がエネルギー付与による励起反応や還元反応による電子の付与によって、基底状態よりも反応性の高い状態にある酸素種の総称である。生体内での主な ROS の産生と消去について、Fig. 1-1 に示した。ROS のひとつである一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は、 $^3\text{O}_2$ が光増感反応などによってエネルギー的に不安定な励起状態となっており、極めて反応性が高い。その生成過程はエネルギーの遷移によるものであり電子の授受を介しておらず、 $^1\text{O}_2$ に不対電子は存在しない。ヒトの体内において $^1\text{O}_2$ は、皮膚表面への紫外線暴露による光増感反応などによって発生する。また、 $^1\text{O}_2$ は白血球における次亜塩素酸生成過程においても生成すると考えられている[32]。一方で、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) やヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) は ROS の一種であるが、分子内に不対電子を有しておりフリーラジカルとも呼ばれる。生体内において、 $\cdot\text{O}_2^-$ はミトコンドリアの電子伝達系やキサンチン酸化酵素をはじめとした生体内酵素による $^3\text{O}_2$ の還元作用によって生成し、 $\cdot\text{OH}$ は遷移金属の存在下で過酸化水素の還元により容易に生成する。したがって、これらは生体内で常発的に発生している。 $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ は、非特異的な電子の引き抜き反応によりあらゆる生体分子の損傷を引き起こすと考えられている。これらの反応により酸化損傷を受けた生体分子は、それ自身が新たに不対電子を有するラジカル種を生成するため、生体内では連鎖的な酸化反応が生じている[33]。

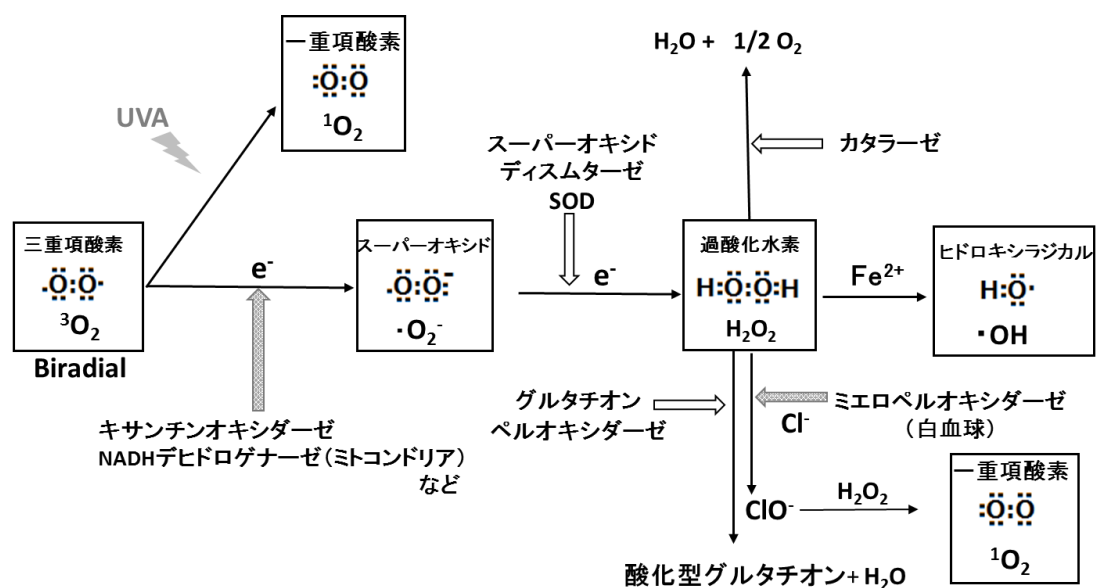


Fig. 1-1 生体内での主な ROS の産生と消去
([32]を元に作成)

このように常に生体は ROS による酸化損傷リスクに曝されているが、ヒトではそれらに対する生体防御機構として、抗酸化酵素と抗酸化物質から構成される抗酸化システムが機能している (Fig. 3)。代表的な食事由来の抗酸化物質であるカロテノイドは、優れた抗酸化活性を有することが知られているが、その活性は $^1\text{O}_2$ に対する物理的な消去活性によるものである。カロテノイドの $^1\text{O}_2$ に対する消去機構は、励起状態にある $^1\text{O}_2$ の過剰エネルギーを自身のポリエン鎖に遷移させ、熱エネルギーとして放出することで基底状態の $^3\text{O}_2$ に戻すことによる物理的消去である[34]。上述したカロテノイドによる $^1\text{O}_2$ の物理的消去過程では、化学反応を伴っておらずカロテノイド自身に構造変化は起きないと考えられている。したがって、カロテノイドは ROS の消去過程でプロオキシダントとして作用しない安全な抗酸化物質と理解されてきた。その一方で、カロテノイドの一種である β -カロテンが $^1\text{O}_2$ との反応によりエンドペルオキシドやエポキシドを形成すること[35-38]や、加えて、カロテノイドがラジカル捕捉反応を示すことが一部で報告されており[39]、ROS に対する化学的消去活性、すなわち、化学反応性を有することが示唆されている。しかしながら、カロテノイドと ROS との化学反応論に関する議論は乏しく、詳細については不明である。

序論で述べたように、過去の β -カロテンの大規模長期介入試験では、肺がん罹患率の上昇という結果を引き起こした。その一因として β -カロテンがプロオキシダントとして作用した可能性が指摘されており、 β -カロテンをはじめとするカロテノイドと ROS との化学反応に関する検証は重要な課題であると考えた。そこで、本章では LC-MS 法と ESR スピントラップ法を併用し、カロテノイドの ROS ($^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$) に対する消去活性評価と化学反応産物の詳細な解析により、その化学反応性について詳細に検証することとした。

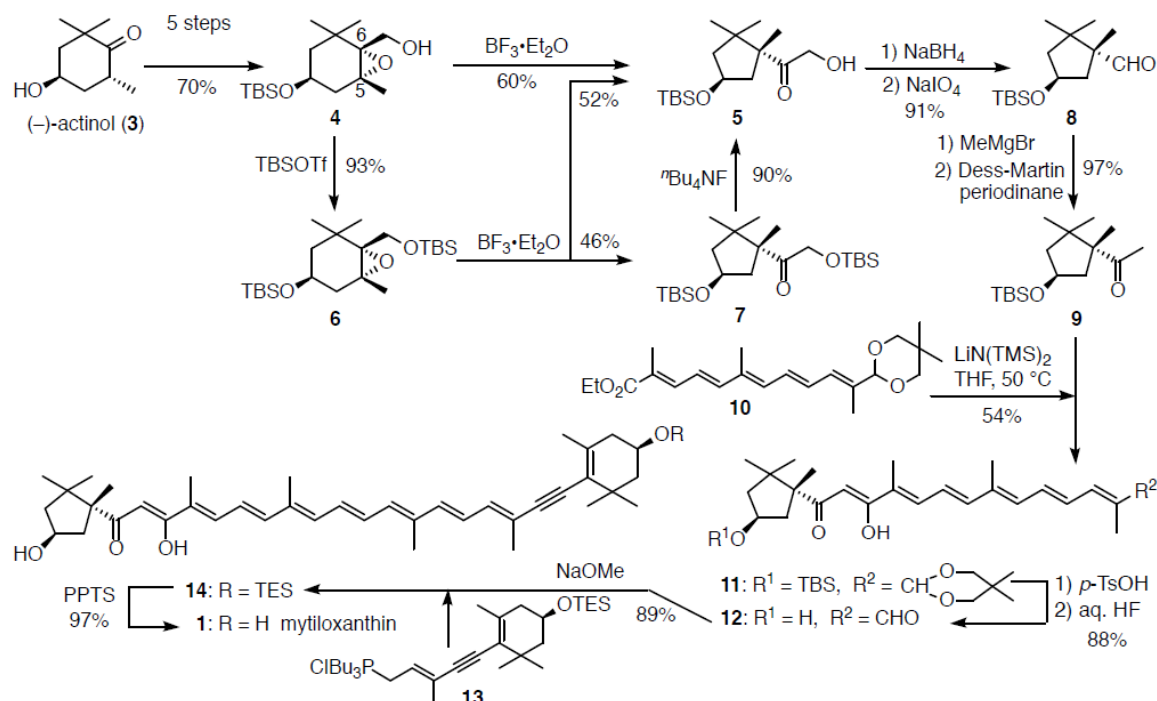
評価対象物質として、以下のカロテノイドを選択した。食事由来のカロテノイドとして、ヒトにおいて日常的に食事から摂取されている β -カロテンとゼアキサンチン、 β -カロテンよりも高い抗酸化活性を示すカロテノイドとして注目され、多くの機能性食品に利用されているアスタキサンチン、特徴的な末端構造を有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチン（以上3成分はエンドグループに五員環構造を有する）、フコキサンチン（アレン構造を有する）を同時に評価し、それらと β -カロテンについて、ROS との化学反応における相違点を検証した。

1-2. 実験方法

1-2-1. 実験材料

各カロテノイドについて、 β -カロテン、ゼアキサンチン、カプサンチン、カプソルビンはいずれも既報に従いパプリカ (*Capsicum annuum*) より[40,41]、アスタキサンチンは既報に従いパラコッカス菌 (*Paracoccus carotinifaciens*) より[42]、それぞれ調製した。カプサンチンジアセテート及びアスタキサンチンジアセテートはそれぞれピリジン触媒下での無水酢酸によるアセチル化により調製した。フコキサンチンは褐藻からの抽出・精製により調製した。高純度のミチロキサンチンを天然物からの抽出によって実験での必要量を得ることは困難であるため、既報[43]に従い、Scheme 1-1 の手順で化学合成した試料を用いた。(-)-アクチノール (3) から調製した 4 を $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (boron trifluoride-ethyl ether complex) で処理し、5,6 位のエポキシ構造の開環および環縮小により 60% の収率でシクロペンチルケトン (5) を得た。4 から 5 への反応収率は、TBS (di-*tert*-butyldimethylsilyl) エーテル (6) を経由する 3 段階の反応により 86% で得られた。さらに 5 を 4 段階の反応でメチルケトン (9) へ変換し、別途調製した共役エステル (10) との縮合反応により β -ジケトン (11) を得た。11 の加水分解および脱シリル化反応の後、得られたアポカロテナール (12) とアセチレンホスホニウム塩 (13) の縮合反応および脱シリル化により、ミチロキサンチン (1) を得た。3 から 1 への総収率は、18 ステップで 21% であった。

実験に用いたカロテノイドの構造を Fig. 1-2 に示した。



Scheme 1-1 Synthesis of mytiloxanthin
(*Mar. Drugs*. 2016, 14, 93., Scheme 1)

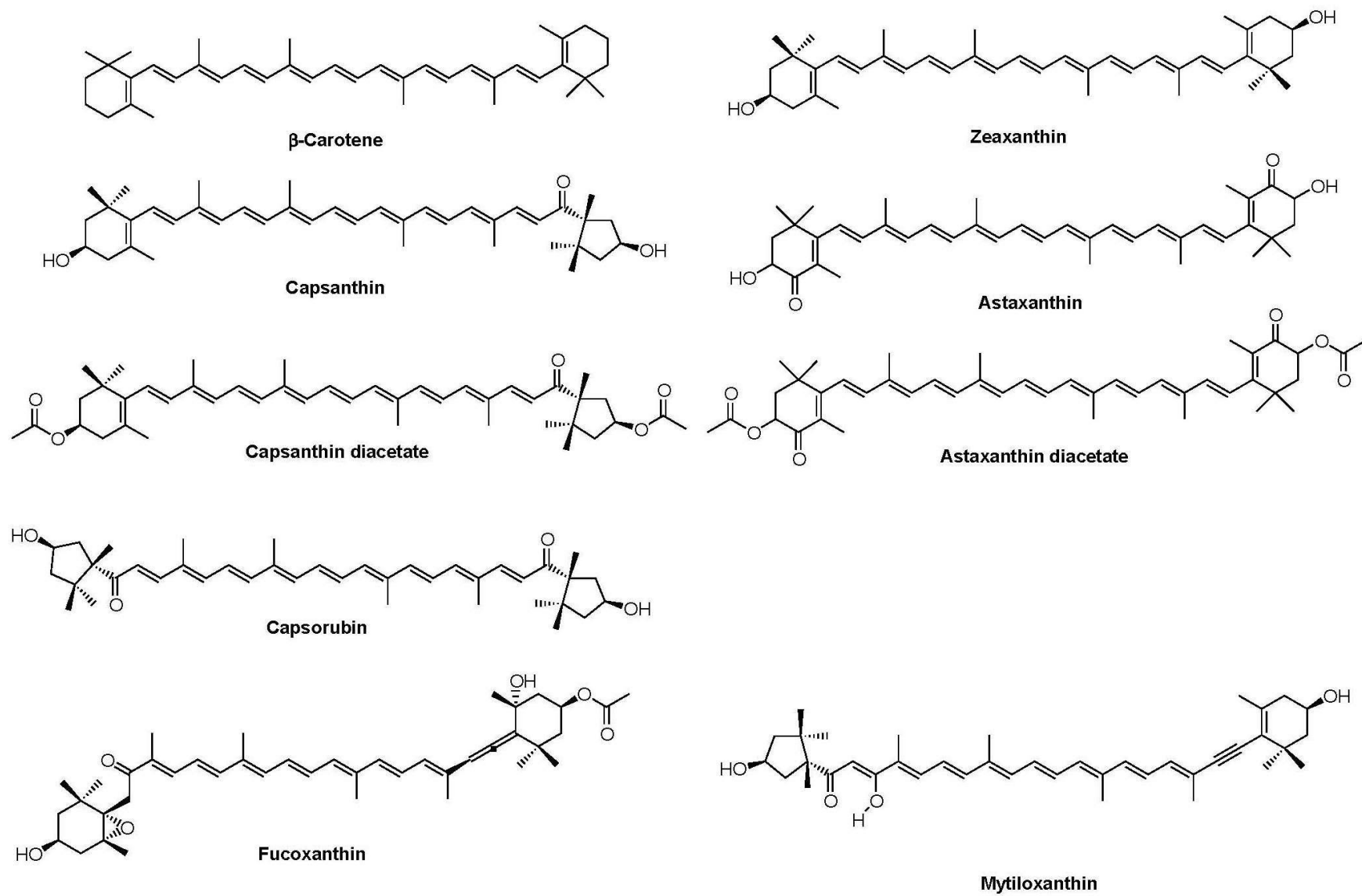


Fig. 1-2 Structures of carotenoids in this study

$^1\text{O}_2$ 発生剤としてヘマトポルフィリン、 $\cdot\text{O}_2^-$ 発生剤としてリボフラビン、 $\cdot\text{OH}$ 発生剤として過酸化水素を使用した。それらは、それぞれ和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。ESR 測定時のスピントラップ剤について、 $^1\text{O}_2$ に対しては Aldrich 社 (Milwaukee, WI, USA) より購入した 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidone (TMPD) を熱エタノール中で溶解した後に冷却して得られる再結晶物を、 $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{OH}$ に対してはラボテック株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) をそれぞれ使用した。

1-2-2. 実験装置および操作

1-2-2-1. LC-MS によるカロテノイドと ROS との化学反応産物の解析

HPLC 分析用透明ガラスバイアルに、各カロテノイドのアセトニトリル溶液 (20~70 $\mu\text{g/mL}$) 200 μL 、ROS 発生剤 200 μL をそれぞれ加え、ボルテックスでよく攪拌した後、三永電機製作所 (Osaka, Japan) 製 UV 光源装置 (SUPERCURE-203S) を用いて UV-A を照射し、カロテノイドを反応させた。ROS 発生剤には、 $^1\text{O}_2$ 用として 250 mM ヘマトポルフィリン水溶液を、 $\cdot\text{O}_2^-$ 発生剤として 0.025 mL リボフラビン水溶液を、 $\cdot\text{OH}$ 発生剤として 8 mM 過酸化水素水を用いた。これらの発生剤は UV-A の照射によって、各種 ROS を発生する。反応液を経時的に LC-MS/MS 測定法にて定性分析し、反応産物の構造解析を行った。分析条件を以下に示した。

UPLC : Acquity UPLC system (Waters Corporation)

カラム : Acquity UPLC 1.7 μm BEH C18 column 2.1 mm \times 100 mm (Waters Corporation)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 90% メタノール 流速 : 0.2 mL/min

検出波長 : フォトダイオードアレー (検出波長 200~600 nm)

ESI TOF MS : Waters Xevo G2S Q TOF mass spectrometer (Waters Corporation)

キャピラリー電圧 : 3.2 kV

コーン電圧 : 40 eV

ソース温度 : 120°C

ネブライザーガス : 窒素ガス 30 L/hr

MS-MS 分析条件

コリジョンガス : アルゴンガス

コリジョンエネルギー : 30 V

1-2-2-2. ESR スピントラップ法によるカロテノイドの ROS 消去活性評価

14 nmol/mL の各カロテノイドのアセトニトリル溶液 200 μL と ROS 発生剤 200 μL をそれぞれ混合した。2-2-2-1 と同様に、ROS 発生剤は、 $^1\text{O}_2$ として 250 mM ヘマトポルフィリン水

溶液を、 $\cdot\text{O}_2^-$ 発生剤として 0.025 mL リボフラビン水溶液を、 $\cdot\text{OH}$ 発生剤として 8 mM 過酸化水素水を用いた。さらにスピントラップ剤として、 $^1\text{O}_2$ の測定に対しては 500 mM TMPD 10 μL を、 $\cdot\text{O}_2^-$ 及び $\cdot\text{OH}$ の測定に対しては 250 mM DMPO 10 μL をそれぞれ添加し、ボルテックスでよく攪拌し、被験液とした。なお、コントロールとしてカロテノイドを含まないアセトニトリル溶液を用いて同様の手順で調製し被験液を用いた。ROS は高い反応性を示すが不安定な分子種であり、DMPO や TMPD などのスピントラップ剤とスピニアダクトを形成することにより (Fig.1-3)、安定的に ESR スペクトルの観測が可能となる。ESR スピントラップ法による測定では ROS の種類毎に特徴的な ESR スペクトルが得られ、その波形が ROS の種類を示し、シグナル強度が ROS の量を示す。Fig. 1-4 に DMPO と $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、ペルオキシラジカル ($\cdot\text{OOR}$) およびアルコキシラジカル ($\cdot\text{OR}$) とのアダクト体形成により特徴的に得られる ESR スペクトルを例示した。同様に、TMPD と $^1\text{O}_2$ により特徴的に得られる ESR スペクトルを例示した。

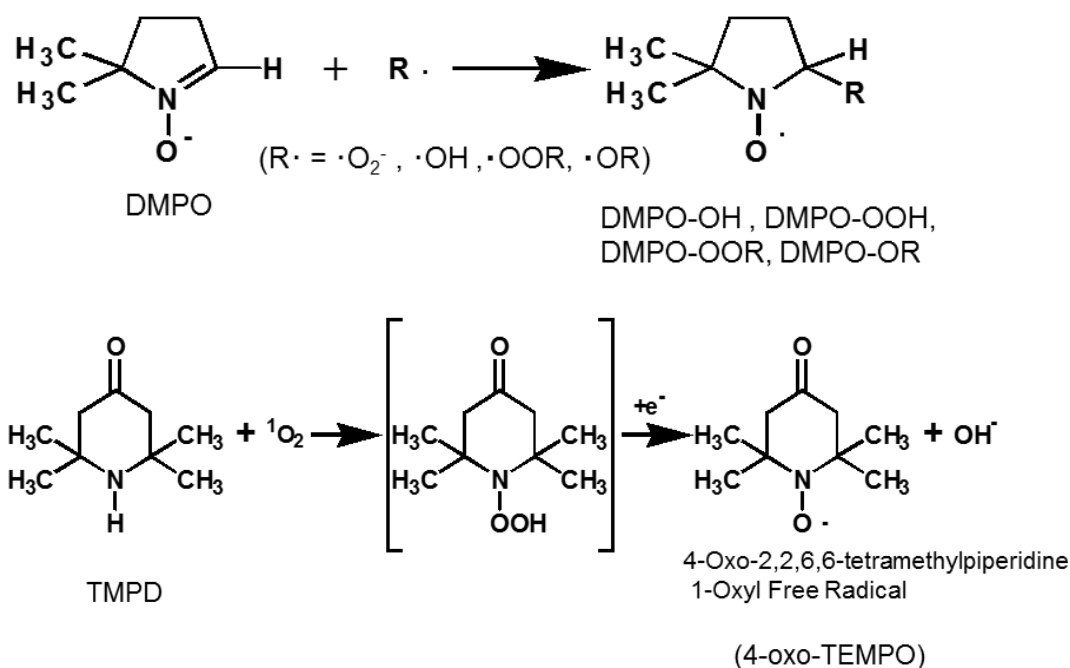
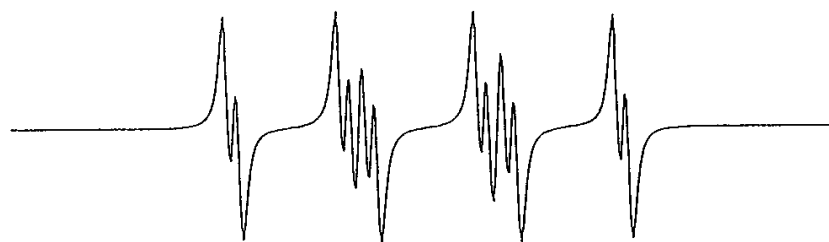
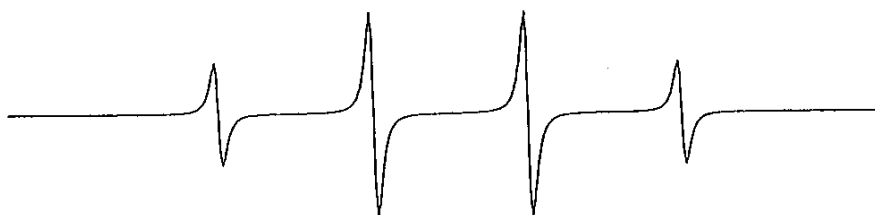


Fig. 1-3 Reaction of DMPO or TMPD with ROS



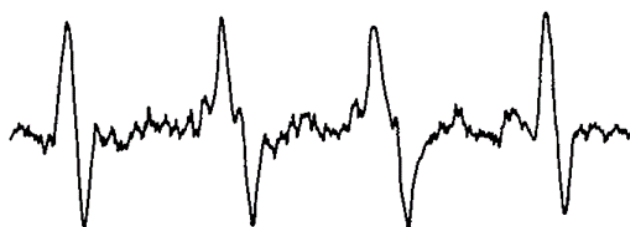
(A) ESR spectrum of DMPO-OOR due to $\cdot \text{O}_2^-$



(B) ESR spectrum of DMPO-OH due to $\cdot \text{OH}$



(C) ESR spectrum of DMPO-OOR due to $\cdot \text{OOR}$



(D) ESR spectrum of DMPO-OR due to $\cdot \text{OR}$



(D) ESR spectrum of 4-oxo-TEMPO due to $^1\text{O}_2$

Fig. 1-4 Typical ESR spectra of the spin-adducts derived from DMPO or TMPD and ROS

調製した各被験液に対し、ラボテック株式会社 (Tokyo, Japan) 製の石英扁平セルを用い、1-2-1-1 と同様に UV-A 照射により ROS を発生させ、同時に ESR 測定を開始した。ESR 測定条件を以下に示した。

ESR 分光器： JEOL JES-RFR30 spectrometer (日本電子株式会社, Tokyo, Japan)

測定磁場： 337.5 ± 5 mT

増幅比： 500

マイクロ波出力： 4 mW

変調磁場幅： 0.1 mT

掃引時間： 2 min

応答時間： 0.03 sec

掃引幅： 10 mT

ESR 測定は 3 回繰り返し行なった。 $^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{OH}$ の消去活性は、ESR スピンアダクト体のシグナル強度 (signal intensity) を計測し、コントロール比 (%) として算出した。

$^1\text{O}_2$ 及び $\cdot\text{OH}$ に対する消去活性の評価は、測定開始より 2 分後の検出結果で行った。また、スピンアダクトの経時変化に関するスペクトル解析については、その後も検出を継続しながら行い、経時的に ESR スペクトルを観測した。

1-2-3. 統計解析

実験結果は平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) として評価した。カロテノイドの消去活性について、コントロールに対する Student の t 検定を用いて有意差検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

1-3. 結果および考察

1-3-1. LC-MS によるカロテノイドと ROS の化学反応産物の解析

本章におけるカロテノイドと ROS の化学反応産物について、カプサンチンを代表例としてその構造式を Fig. 1-5 に示した。また、それらの LC-MS 分析における物性値データを Table 1-1 に示した。

Table 1-1 Mass-spectral and physicochemical data on reaction products of capsanthin with ROS.

| Reaction products | ESI TOF MS m/z (M+Na) ⁺ | Molecular formula | UV/vis (in 90% MeOH) |
|-----------------------------|---|---|-------------------------|
| Capsanthin | 607.4115 | C ₄₀ H ₅₆ O ₃ Na | 473 |
| Capsanthin diepoxide | 639.4217 | C ₄₀ H ₅₆ O ₅ Na | 405-420 |
| Capsanthin 5,6-epoxide | 623.4080 | C ₄₀ H ₅₆ O ₄ Na | 463 |
| Capsanthin 5,8-epoxide | 623.4080 | C ₄₀ H ₅₆ O ₄ Na | 448 |
| Capsanthone 5,6-epoxide | 621.3920 | C ₄₀ H ₅₄ O ₄ Na | 463 |
| Capsanthin diendoperoxide | 671.3937 | C ₄₀ H ₅₆ O ₇ Na | 446 |
| Capsanthin 5,6-endoperoxide | 639.4056 | C ₄₀ H ₅₆ O ₅ Na | 463 |
| Capsanthin 5,8-endoperoxide | 639.4003 | C ₄₀ H ₅₆ O ₅ Na | 448 |

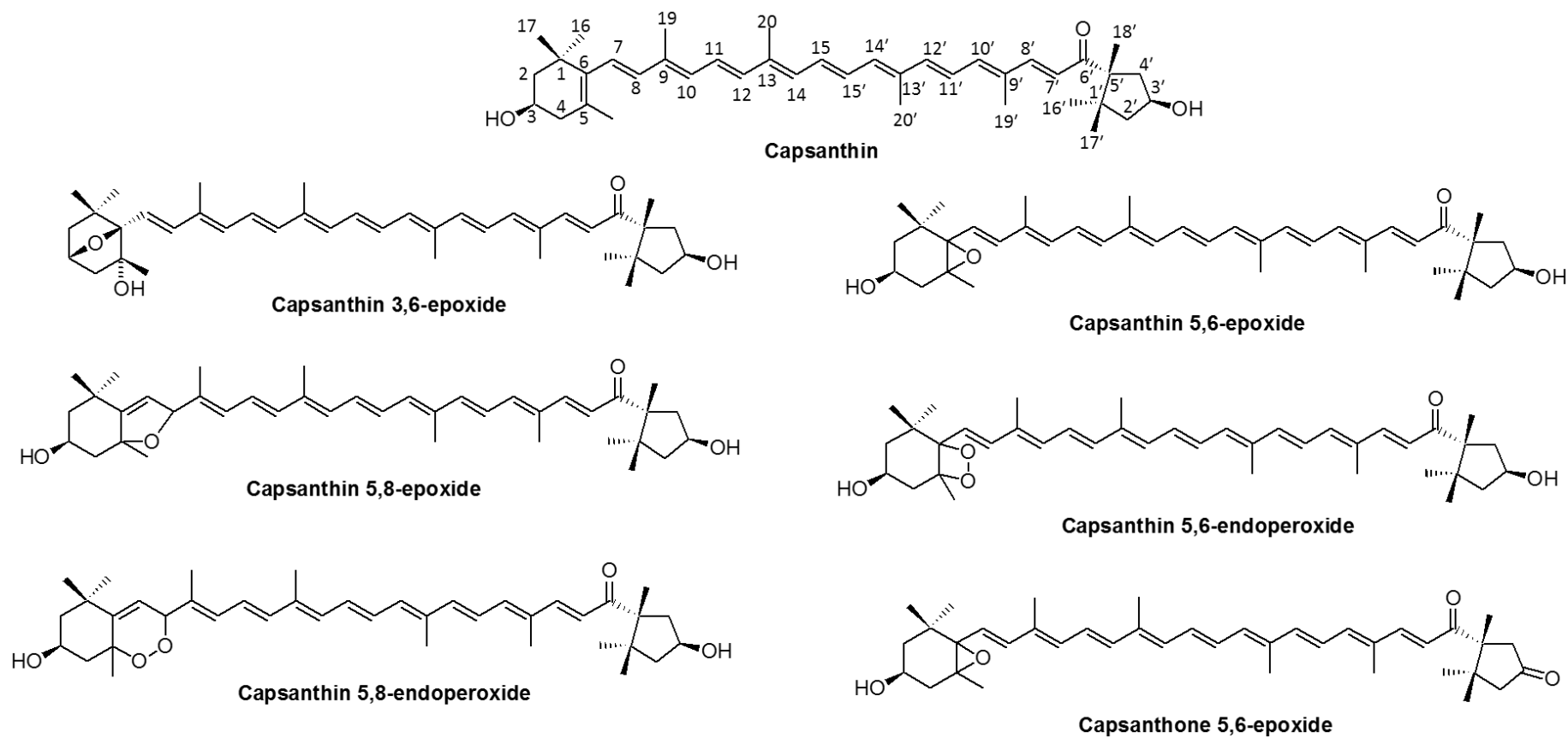


Fig. 1-5 Reaction products of capsanthin with ROS

カプサンチンと $^1\text{O}_2$ の反応における HPLC クロマトグラムを Fig. 1-6 に示した。反応時間 (=UV-A 照射時間) に伴い、化学反応産物である Peak 1、2、3 が生成した。それらの生成と共にカプサンチンのピークは徐々に減少し、反応開始 6 分後にはさらに急激に減少し、代わって Peak 1、2、3 のピークが強く検出された。引き続き UV-A 照射を継続したところ、カプサンチンにより赤～黄色を呈していた溶液は無色となり、ポリエン鎖の共役系が完全に開裂したことが示唆された。Peak 2 および Peak 3 は、共に分子式が $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_5$ 、極大吸収波長はカプサンチンの 473 nm より 10 nm 短波長側へシフトしており、463 nm であった。ESI-TOF MS、MS/MS、UV/vis の各スペクトルデータの解析により、Peak 2 および Peak 3 はカプサンチン ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_3$) の C-5 と C-6 の間にジオキセタン(-O-O-) 構造が付加したカプサンチン 5,6-エンドペルオキシドに相当し、Peak 2 と Peak 3 は立体異性体の関係にあると推察された。続いて Peak 1 について、分子式は $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_7$ 、極大吸波長は 446 nm であり、Peak 2 および Peak 3 のカプサンチン 5,6-エンドペルオキシド ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_5$, $\lambda_{\text{max}} = 463 \text{ nm}$) と比較して、酸素原子がさらに 2 つ付与した分子式であり、極大波長がさらに短波長側にシフトしていた。これより、Peak 1 は Peak 2 および Peak 3 (カプサンチン 5,6-エンドペルオキシド) にジオキセタン(-O-O-) 構造がさらに付加、それと共に共役二重結合がさらに失われた構造であることが予想され、カプサンチンジエンドペルオキシドであると考えられた。本研究の対象物質としたカプサンチン以外のカロテノイドと $^1\text{O}_2$ の反応においても同様に、カロテノイドのエンドペルオキシドおよびジエンドペルオキシドが主要な化学反応産物として生成した。本結果より、カロテノイドは $^1\text{O}_2$ との反応において、エンドペルオキシ型カロテノイドへの化学構造変化を伴うことが明らかとなった。

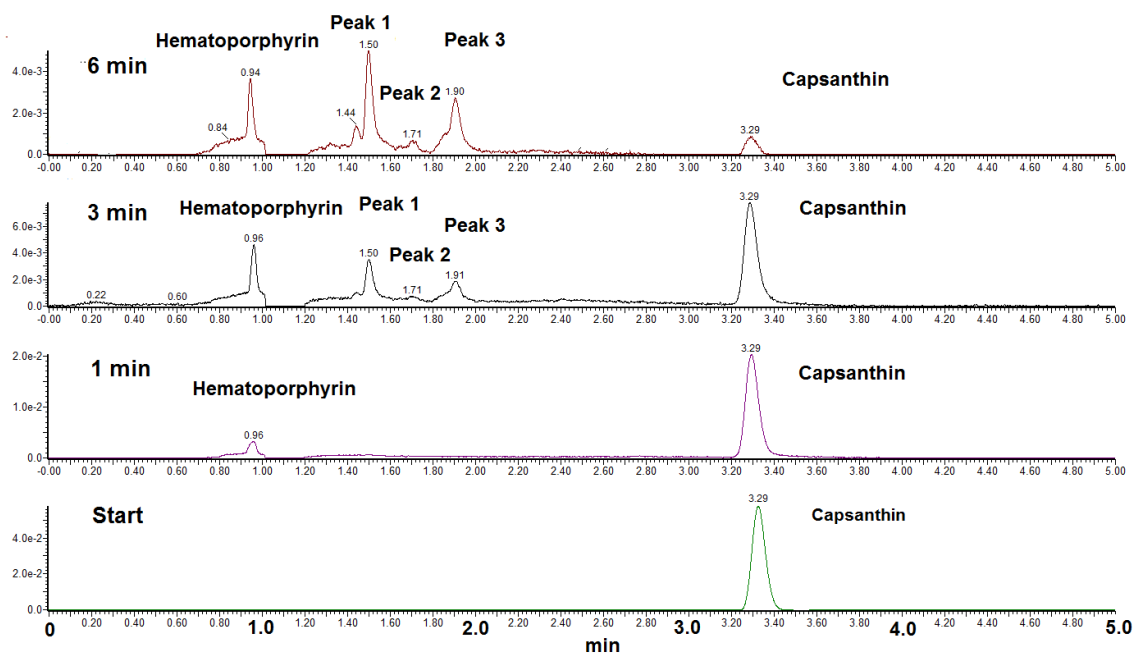


Fig. 1-6 HPLC chromatograms of reaction products of capsanthin with $^1\text{O}_2$

Peak 1: capsanthin di-endoperoxide and peaks 2 and 3: capsanthin 5,6-endoperoxide. HPLC condition ACQUITY UPLC system (Waters); column: BEH Shield RP18 (1.7 μm , 2.1 \times 100 mm); mobile phase: 90% MeOH; column temperature: 40 $^\circ\text{C}$; flow rate: 0.2 mL/min; detection: 450 nm.

(*J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 4786-4792., Fig. 4)

続いて、カプサンチンと $\cdot\text{O}_2^-$ との反応における HPLC クロマトグラムを Fig. 1-7 に示した。 $^1\text{O}_2$ との反応と同様に、 $\cdot\text{O}_2^-$ との反応時間に伴って Peak 1～6 が化学反応産物として生成し、その生成と共にカプサンチンが徐々に減少し、反応開始 6 分後には完全に消失した。HPLC クロマトグラムにおける化学反応産物の面積値は反応開始 6 分後に最大となった。その後、反応を継続すると徐々に化学反応産物の面積値は減少し、 $^1\text{O}_2$ との反応と同様、ポリエン鎖の共役系が開裂し反応液は無色となった。Peak 4 および Peak 5 について、共に分子式は $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$ 、極大吸収波長は 463 nm でありカプサンチンのエポキシド体であることが予想された。Peak 4 および Peak 5 の ESI-TOF MS、MS/MS、UV/vis の各スペクトルデータは、先行研究にて報告されているカプサンチン 5,6-エポキシドのスペクトルデータと一致しており [44, 45]、Peak 4 および Peak 5 はカプサンチン 5,6-エポキシドであり、互いに立体異性体であると考えられた。Peak 6 は Peak 4 および Peak 5 と同様、 $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_4$ の分子式をもちカプサンチンのエポキシド体であると考えられた。極大吸収波長は 448 nm であり、カプサンチン 5,6-エポキシド (Peak 4 および Peak 5) よりも短波長側へシフトしていることから、カプサンチン 5,8-エポキシドであると推察された。さらに Peak 4、Peak 5 および Peak 6 について、カプサンチンのメタクロロ過安息香酸によるエポキシ化反応により得たカプサンチン 5,6-エポキシド、カプサンチン 5,8-エポキシドの標準品と ESI-TOF MS、MS/MS、UV/vis の各スペクトルデータが一致することを確認し、Peak 4 および Peak 5 をカプサンチン 5,6-エポキシ

ド、Peak 6 をカプサンチン 5,8-エポキシドと構造決定した。Peak 1 および Peak 2 の分子式は $C_{40}H_{56}O_5$ であり、Peak 4、Peak 5 および Peak 6 に対してさらに酸素原子が一つ付与しており、極大吸収波長は 405-420 nm であった。これらより Peak 1 および Peak 2 はカプサンチンジエポキシドと予想されたが、エポキシ化部位は特定できなかった。Peak 3 の分子式は $C_{40}H_{54}O_4$ であり、カプサンチン ($C_{40}H_{56}O_3$) から水素原子が 2 つ少なく、酸素原子が一つ多いが、極大吸収波長はカプサンチン 5,6-エポキシドと同じ 463 nm であった。これらより、Peak 3 はカプサンチン 5,6-エポキシドの五員環に付くヒドロキシル基がケトンに酸化されて生成したカプサントン 5,6-エポキシドであると推察された。

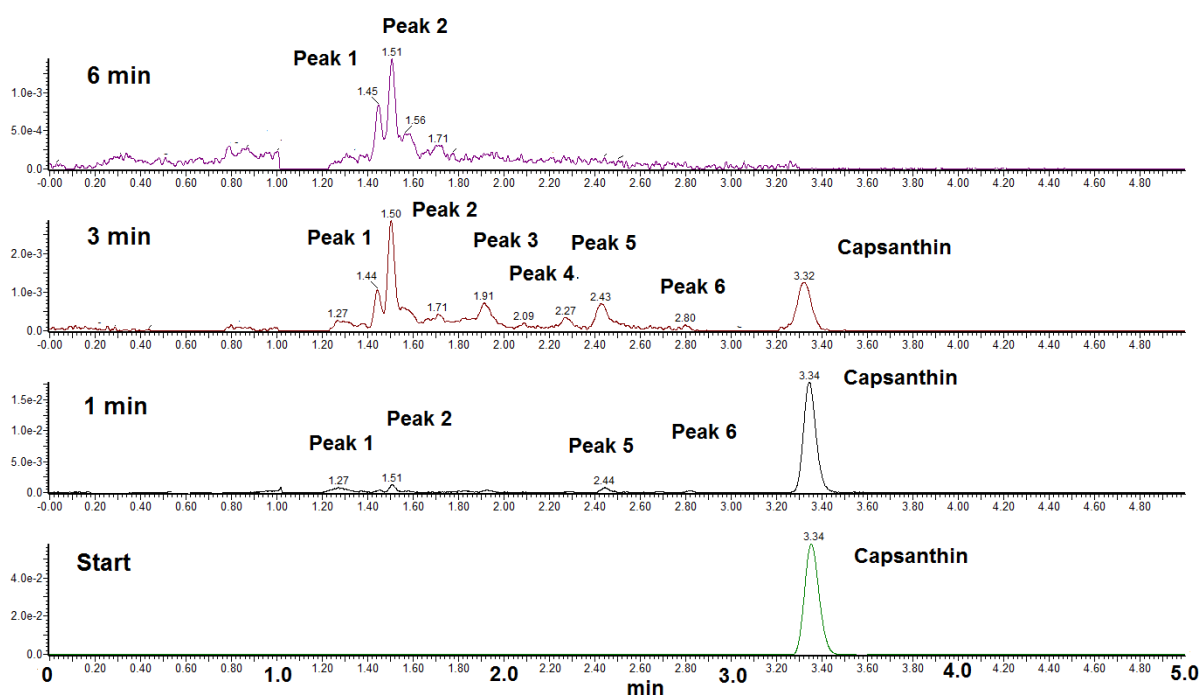


Fig. 1-7 HPLC chromatograms of reaction products of capsanthin with $\cdot O_2^-$.

Peaks 1 and 2: capsanthin diepoxide; peak 3: capsanthone 5,6-epoxide; peak 4, syn-capsanthin 5,6-epoxide; peak 5: anti-capsanthin 5,6-epoxide; and peak 6: capsanthin 5,8-epoxide. HPLC condition were described in Fig. 2-4

(*J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 4786-4792., Fig. 3)

カプサンチンと $\cdot\text{OH}$ との化学反応産物は $\cdot\text{O}_2^-$ と同様であり、カプサンチン 5,6-エポキシド、カプサンチン 5,8-エポキシド、カプサンチンジエポキシド、カプサントン 5,6-エポキシドが生成した。本研究で対象物質としたカプサンチン以外のカロテノイドと $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ との反応においても同様に、カロテノイドのエポキシドおよびジエポキシドが主要な化学反応産物として生成した。本結果より、カロテノイドは $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ との反応において、エポキシド型カロテノイドへの化学構造変化を伴うことが明らかとなった。

以上の結果より、カロテノイドは構造中への直接的な付加により ROS を化学的に消去するものと考えられ、その化学反応産物として $^1\text{O}_2$ との反応ではエンドペルオキシド型のカロテノイドを、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ との反応ではエポキシド型のカロテノイドを生成することが明らかとなった。カロテノイド種にかかわらず共通して上記の化学反応産物が生成したが、その生成速度、すなわち化学反応速度はカロテノイドの種類によって大きく異なっていた。

例として、 β -カロテンおよびカプソルビンと ROS の反応液を経時的に HPLC で分析した結果を Fig. 1-8 に示した。 $^1\text{O}_2$ との反応において、 β -カロテンは反応開始 1 分後からエンドペルオキシ型の β -カロテンが生成し、反応開始 10 分後にはそれらの増加と共にさらに開裂が進んだアポカロテナールと考えられるピークが多数検出された。一方でカプソルビンは反応開始 10 分後においても化学反応産物がほとんど生成されておらず、構造が維持されていた。したがって、 $^1\text{O}_2$ に対して β -カロテンは化学反応性が高く、カプソルビンの化学反応性は著しく低いことが示された。アスタキサンチンにおいてもカプソルビンと同様、ほとんど化学反応を起こさなかった。カロテノイドの $^1\text{O}_2$ に対する消去活性は、本研究で示したように一部では化学的消去がなされるものの、主としてポリエン鎖の共役系による物理的消去であると考えられるため、 $^1\text{O}_2$ との化学反応性に対する化学構造の安定性が、結果としてその消去活性に大きく影響するものと推察される。各カロテノイドの $^1\text{O}_2$ 消去活性の比較については次項で詳細に述べる。

同様に $\cdot\text{OH}$ との反応性についても、 β -カロテンおよびカプソルビンでの比較をおこなった (Fig. 1-9)。 β -カロテンでは、ほとんど化学反応産物は検出されず、 $\cdot\text{OH}$ との化学反応性は低い。一方でカプソルビンは反応開始と共に化学反応産物であるエポキシド体が生成され、反応経過時間に従い生成量が増加した。したがって、 $\cdot\text{OH}$ に対する β -カロテンの化学反応性は低く、逆にカプソルビンは高い化学反応性を有することが示された。アスタキサンチンやそのジアセテート体では、 $\cdot\text{OH}$ との化学反応性は著しく低かった。本研究においてカロテノイドは $\cdot\text{OH}$ を構造中へ直接的に付加することにより化学的に消去することが示唆されており、高い化学反応性を有するカプソルビンは $\cdot\text{OH}$ の消去活性が高いことが予想される。 $\cdot\text{OH}$ の消去活性評価については次項で詳細に述べる。

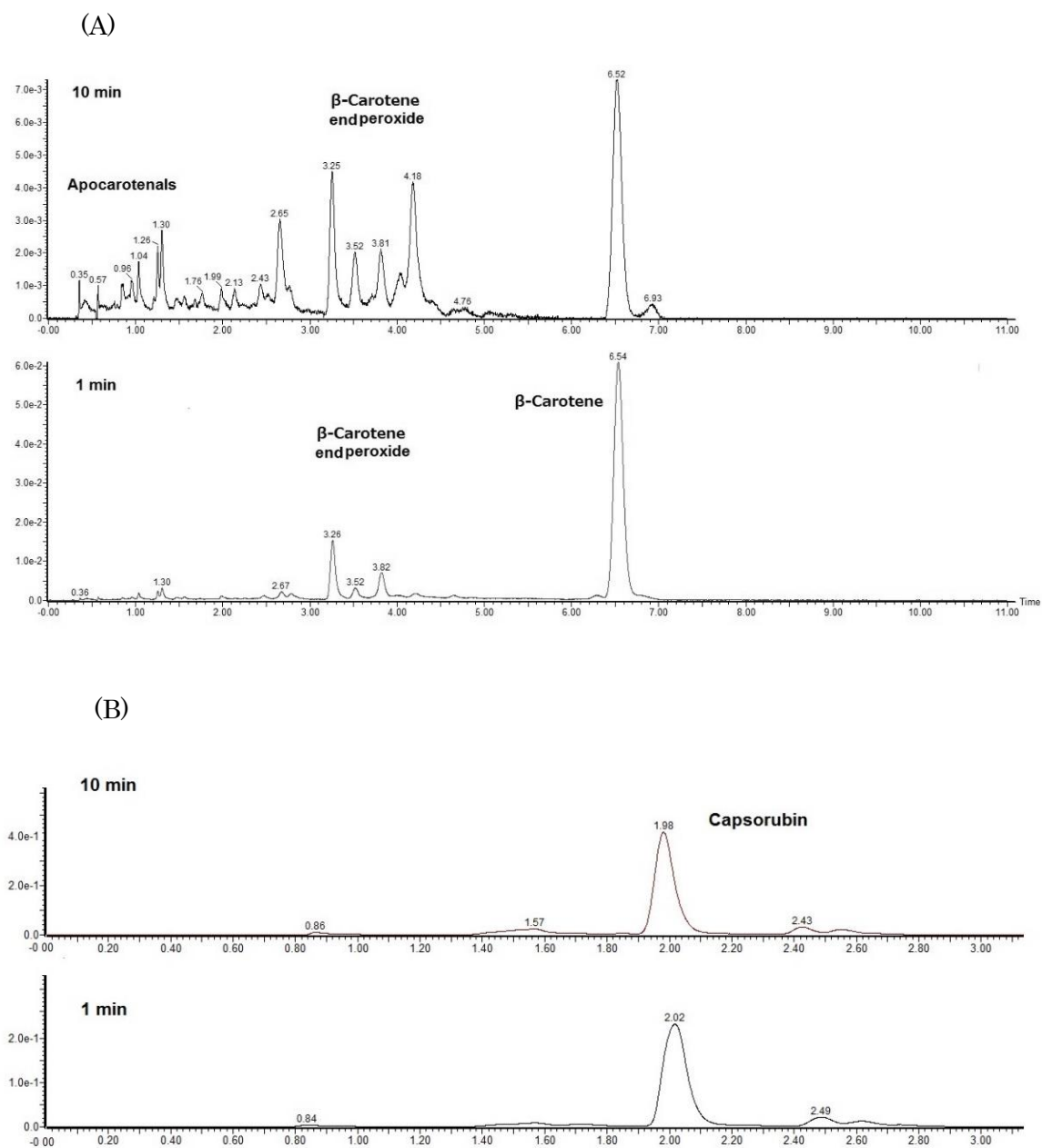


Fig. 1-8 HPLC chromatograms of reaction products of carotenoids with $^1\text{O}_2$.
(A) β -Carotene, (B) Capsorubin. HPLC condition were described in Fig. 2-4

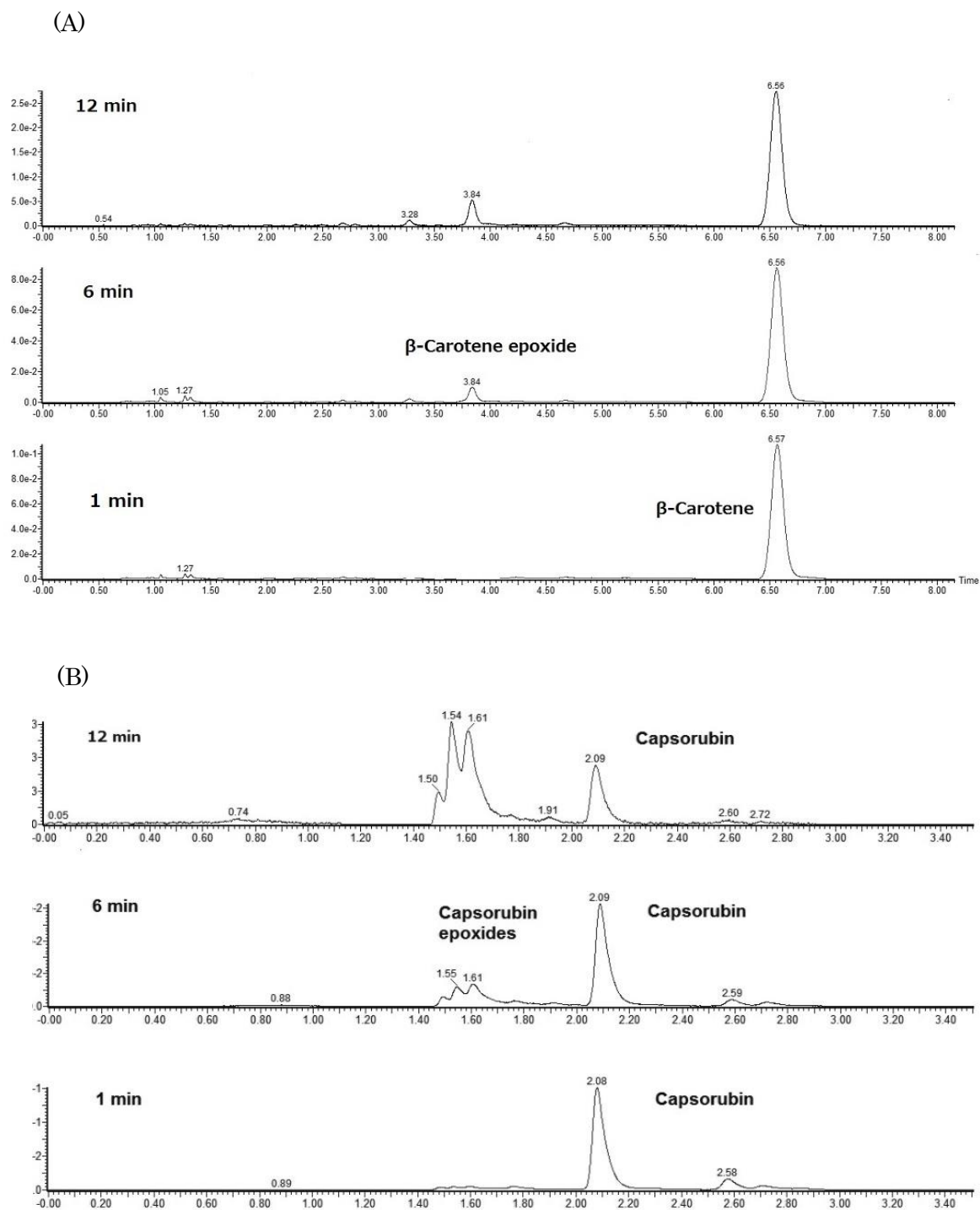


Fig. 1-9 HPLC chromatograms of reaction products of carotenoids with \cdot OH.

(A) β -Carotene, (B) Capsorubin. HPLC condition were described in Fig. 1-4

1-3-2. ESR スピントラップ法によるカロテノイドの活性酸素消去活性評価

各カロテノイドの $^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{OH}$ に対する消去活性を Fig.1-10 に示した。カロテノイドによる $^1\text{O}_2$ の消去は主に物理的消去であり、ポリエン鎖の共役二重結合の数とそれらに共役するエンドグループの構造、特にカルボニル基 ($\text{C}=\text{O}$) の数に依存すると報告されている [46, 47]。β-カロテンとアスタキサンチンを比較すると、β-カロテンはポリエン鎖に 9 つとエンドグループに 2 つの計 11 個の共役二重結合をもち、アスタキサンチンはそれらに加えてエンドグループに 2 つのカルボニル基が存在し、計 13 個の共役二重結合をもつ。β-カロテンとアスタキサンチンの $^1\text{O}_2$ 消去活性を比較すると、β-カロテン < アスタキサンチンであり、アスタキサンチンはコントロールと比較して有意に ($p < 0.01$) $^1\text{O}_2$ の消去活性を示した。同様に、構造中にカルボニル基を 1 つ有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチンについても有意な消去活性を示した ($p < 0.01$)。また、 $^1\text{O}_2$ の消去活性は末端のアセチル化によって増強し、カプサンチンジアセテート > カプサンチン、アスタキサンチンジアセテート > アスタキサンチンとなった。

一方でこれまで詳細な報告がないカロテノイドの $\cdot\text{OH}$ の消去活性について、アスタキサンチンおよびそのジアセテート体ではほとんど消去活性を示さなかった。 $\cdot\text{OH}$ の消去活性はミチロキサンチンが最も強く ($p < 0.01$)、カプサンチンおよびカプソルビンも消去活性を有することが明らかとなった ($p < 0.05$)。

本結果と 2-3-1 における化学反応産物の解析結果から、 $^1\text{O}_2$ の消去は、化学反応性の低いカロテノイドが物理的消去作用により高い消去活性を有することが示された。β-カロテンは $^1\text{O}_2$ との化学反応による分解を起こしやすく、ポリエン鎖が容易に開裂することで物理的消去活性を失い、 $^1\text{O}_2$ 消去活性が低くなるものと推察される。一方でアスタキサンチンやカプソルビンは、 $^1\text{O}_2$ に対する化学構造の側面からの安定性が高く、元来の構造を維持することで繰り返し $^1\text{O}_2$ の物理的消去が可能となり、高い消去活性を示すものと考えられる。また、エンドグループの水酸基をアセチル化したジアセテート体ではフリー体と比較して $^1\text{O}_2$ に対する化学構造上の安定性がさらに高まり、その消去活性も高まっていた (HPLC クロマトグラムのデータは示していない)。これらの化学構造に依存した反応安定性は、植物がカロテノイドを脂肪酸エステル、すなわちエンドグループの水酸基を保護する化学形で蓄積する生物学的な意義として、紫外線により常時発生する $^1\text{O}_2$ に対して構造安定性を高めるためではないかと著者は推察した。一方で、 $\cdot\text{OH}$ に対しては化学反応の親和性によるラジカル消去に依存するため、 $\cdot\text{OH}$ と化学反応を起こしやすいカロテノイドであるカプソルビンやカプサンチン、ミチロキサンチンが高い消去活性を示した。アスタキサンチンは $\cdot\text{OH}$ に対しては化学反応性が極めて乏しく、それに伴い $\cdot\text{OH}$ の消去活性も低い結果となった。

カプサンチンやカプソルビン、ミチロキサンチンは $^1\text{O}_2$ と $\cdot\text{OH}$ の両 ROS に対する消去活性を示した。これらの 3 種類のカロテノイドは共通して他のカロテノイドには見られないユニークな五員環構造 (κ-end group) を有する特徴をもち、エンドグループの特徴的な構造が抗酸化活性に大きく寄与していることが示唆された。すなわち、ROS の消去活性に関するカロテノイドの新たな構造活性相関が見出されたと考えている。

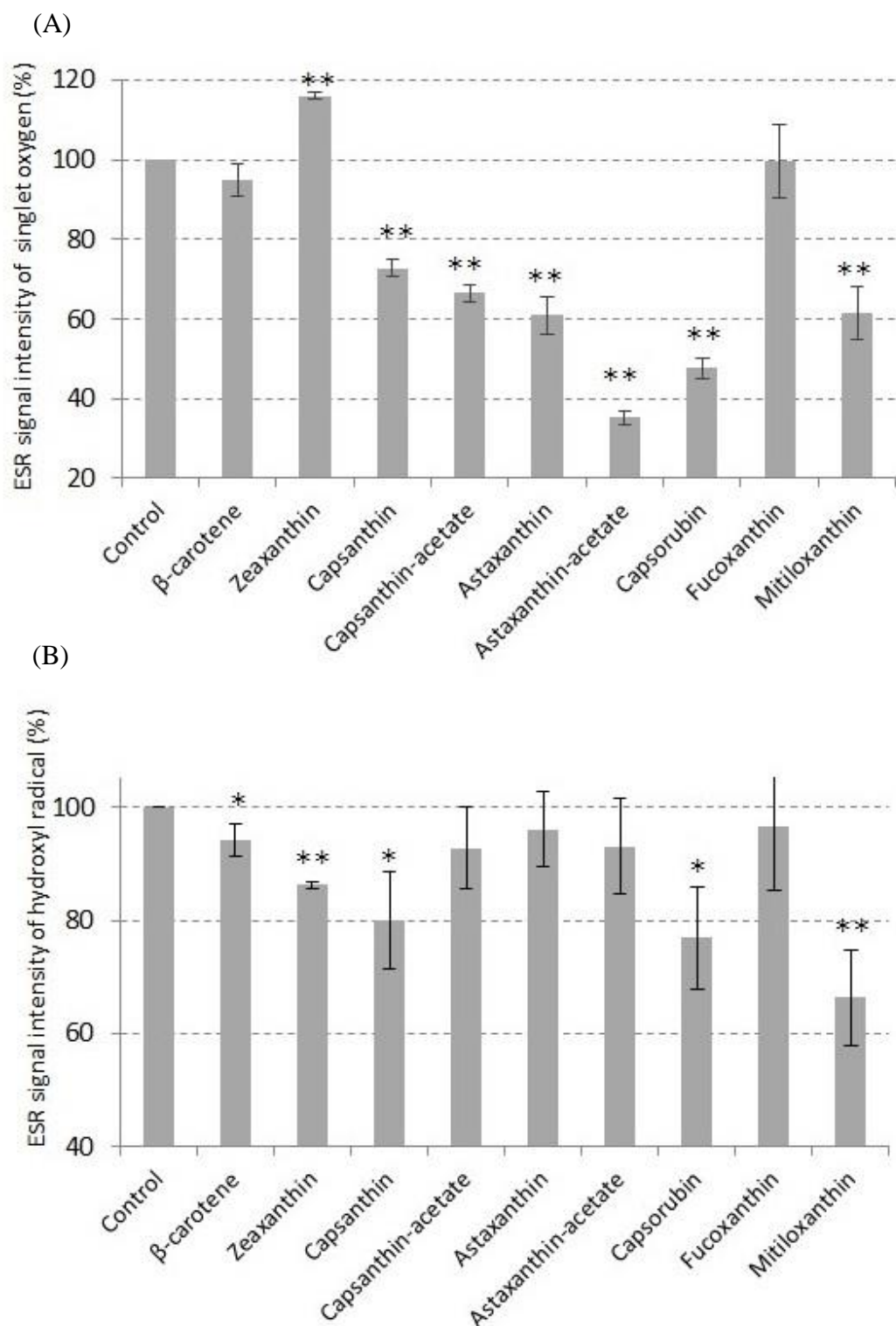


Fig. 1-10 Quenching effect on $^1\text{O}_2$ (A) and scavenging effect on $\cdot\text{OH}$ (B) with capsanthin, capsanthin-diacetate, capsorubin, and other carotenoids. The vertical axis shows the relative ratios (%) of the ESR signal intensity due to singlet oxygen (A) and hydroxyl radical (B) compared with the control group (100%). Significance compared with the control group:

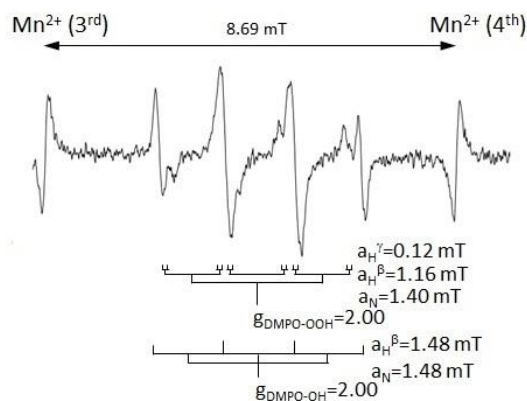
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(*J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 4786-4792., Fig. 2、*Mar. Drugs.* **2016**, 14, 93., Fig. 3 より改変)

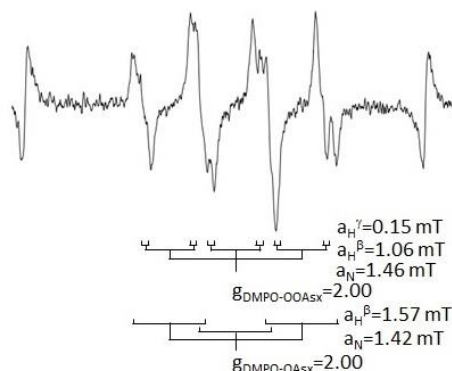
1-3-3. カロテノイドラジカル由来スピンアダクトのスペクトル解析によるラジカル種構造の推定

カロテノイドと $\cdot\text{O}_2^-$ の反応におけるスピンアダクトの ESR スペクトルでは、波形の経時的な変化が観測され、反応の進行に伴いスピントラップ剤と化学結合しているラジカル種自体が変化していることが示された。ESR スペクトルの経時変化について、アスタキサンチンジアセテートをモデル物質として Fig. 1-11 に示した。コントロールの ESR スペクトルでは反応開始 (=UV-A 照射) による $\cdot\text{O}_2^-$ の発生によってスピンアダクトとして DMPO-OOH と DMPO-OH が観測された。一方でカロテノイドと $\cdot\text{O}_2^-$ の反応では明らかにコントロールとは異なる波形を示し、カロテノイドペルオキシラジカル (Carotenoid-OO \cdot) およびカロテノイドオキシドラジカル (Carotenoid-O \cdot) と推定されるスピンアダクトが観測された。反応経過時間に伴って、最初に Carotenoid-OO \cdot が増加し、次いで Carotenoid-O \cdot の増加とともに Carotenoid-OO \cdot は減少した。1-3-1 においてカロテノイドと $\cdot\text{O}_2^-$ の化学反応産物としてエポキシ型カロテノイドが生成していることから、カロテノイドと $\cdot\text{O}_2^-$ の化学反応は Carotenoid-OO $\cdot \rightarrow$ Carotenoid-O $\cdot \rightarrow$ エポキシ型カロテノイドへと収束すると推察される。その反応機構についてアスタキサンチンジアセテートをモデル物質として Fig. 1-12 に示した。上述したようにカロテノイドと $\cdot\text{O}_2^-$ の反応では ESR スペクトルの経時変化を伴うため消去活性の評価はできなかったが、カロテノイドはその構造中への直接的な付加により $\cdot\text{O}_2^-$ を消去していると考えられ、また反応機構より、その過程で同時に 1 分子の $\cdot\text{OH}$ を消去していることが示唆された (Fig.1-12)。

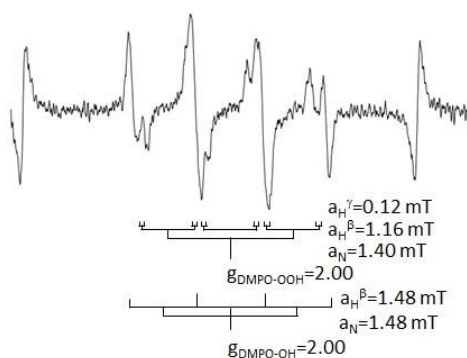
0-2.5 min without astaxanthin-diacetate



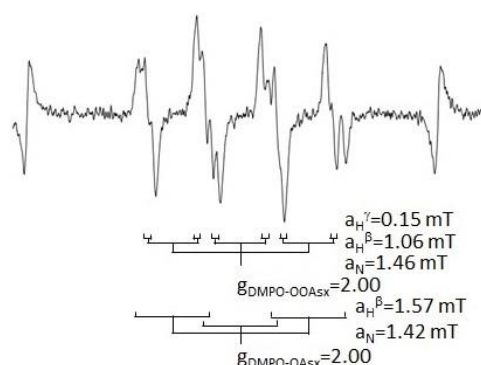
0-2.5 min with astaxanthin-diacetate



2.5 -5.0 min without astaxanthin-diacetate



5.0-7.5 min with astaxanthin-diacetate



12.5-15.0 min with astaxanthin-diacetate

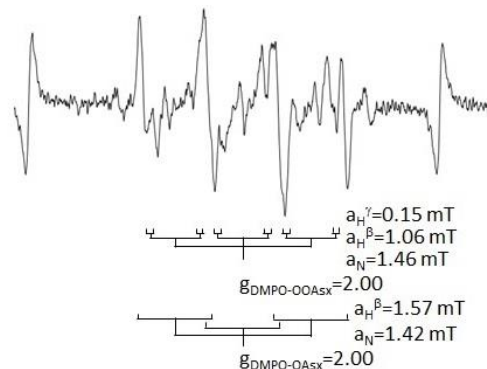


Fig. 1-11 ESR spectra due to 14 nmol/mL of astaxanthin-diacetate in acetonitrile (100 μL), 0.025 mM of riboflavin solution (100 μL), and 250 mM of DMPO (10 μL). After 2.5 min of UV-A irradiation (upper), after 7.5 min of UV-A irradiation (middle), after 15 min of UV-A irradiation (lower). ESR spectra due to both the DMPO-OOAsx (astaxanthin-diacetate-OO \cdot) and DMPO-OAsx (astaxanthin-diacetate-O \cdot) were observed. Initially, ESR signal of DMPO-OOAsx was dominant, and time dependently ESR signal of DMPO-OAsx was increased. On the other hand, only ESR spectra due to both the DMPO-OOH and DMPO-OH were observed without astaxanthin acetate, indicating the formation of $\cdot\text{O}_2^-$ followed by $\cdot\text{OH}$ in the control riboflavin/UV-A system. Left column: control (riboflavin + DMPO), Right column: riboflavin + astaxanthin-diacetate + DMPO.

(*Tetrahedron Lett.* **2016**, 75, 1967-1970., Fig. 3)

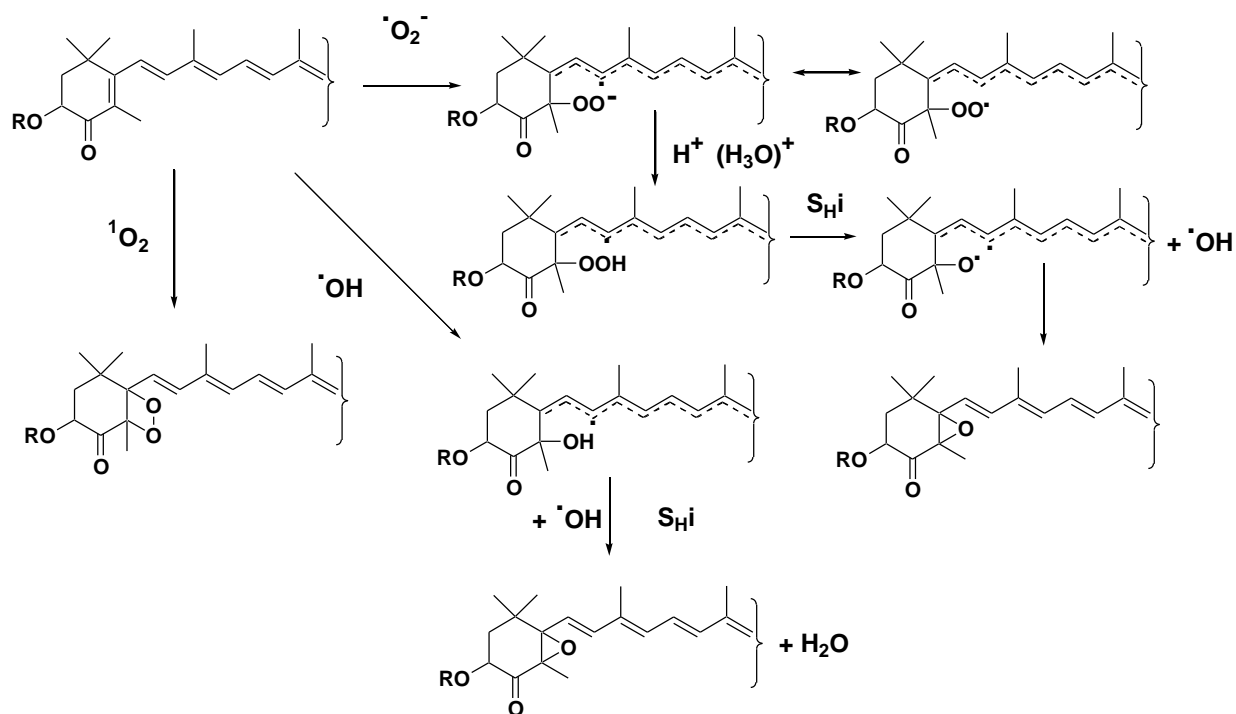


Fig. 1-12 Reaction schemes of astaxanthin and its diacetate with reactive oxygen species.

R= H Astaxanthin, R=Ac Astaxanthin-diacetate

S_{Hi} ; intra-molecular homolytic substitution reaction

(*Tetrahedron Lett.* **2016**, 75, 1967-1970., Fig. 4)

1-4. 小括

本研究より、カロテノイドは **ROS** と直接的に化学反応し、その化学反応産物として、 $^1\text{O}_2$ との反応ではエンドペルオキシド型のカロテノイドが、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ との反応ではエポキシド型のカロテノイドが生成することが明らかとなった。さらに、カロテノイドの **ROS** の消去活性は、**ROS** に対する化学反応性、つまり化学構造の安定性に大きく依存することが示された。カロテノイドによる $^1\text{O}_2$ 消去は、主に共役二重結合のエネルギー遷移機構による物理的消去であり、 $^1\text{O}_2$ に対する化学反応性が低いカロテノイドが高い消去活性を示した。一方、 $\cdot\text{OH}$ 消去は化学反応によるラジカル捕捉であるため、 $\cdot\text{OH}$ に対する化学反応性が高いカロテノイドが高い消去活性を示した。 $\cdot\text{O}_2^-$ の消去は $\cdot\text{OH}$ と同様に化学反応によるラジカル捕捉であるが、複数の化学反応を経由しており、Carotenoid-OO \cdot から Carotenoid-O \cdot を経てエポキシド型カロテノイドを生成することが明らかとなった。

カロテノイドと **ROS** の化学反応についてはこれまで詳細な解析および議論がされてこなかった。本研究により、カロテノイドは **ROS** との直接的な化学反応性を有し、これまでよく知られていた $^1\text{O}_2$ に対する物理的消去活性に加えて、 $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ に対する化学的消去活性を有することが明らかとなり、その反応性はカロテノイドの末端構造により大きく異なることが示された。

ROS との化学反応論から考察すると、本研究において評価対象物質とした、 β -カロテン、ゼアキサンチン、アスタキサンチン、カプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチン、フコキサンチンの中では、五員環構造を有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチンが最も抗酸化活性に優れるカロテノイドであることが示された。一方で、 β -カロテンはいずれの **ROS** に対しても消去活性は低いことが明らかとなった。加えて、カロテノイドの反応産物として新たな **ROS** や安定なラジカル種を生じることではなく、カロテノイド自身のエンドペルオキシド型およびエポキシド型へと反応物は収束し、プロオキシダントとしての危険性は認められなかった。

これらの結果より、カロテノイドの中でもエンドグループに五員環構造を有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチンは高い抗酸化活性に付随した優れた生理機能を有することが期待される。しかしながら、序論で述べたように、著者は過去の研究において、ヒトにおけるカロテノイドの臓器分布特性はカロテノイド種によって大きく異なることを明らかにしている。したがって、生理機能検証の前段として、第一にこれら五員環カロテノイドのヒトへの吸収性についての詳細な検証が必要である。

第2章 ヒト介入試験におけるパプリカ由来カロテノイドの経口摂取による循環血液への移行性評価

2-1. 緒言

栄養や酸素を全身の隅々まで運搬・供給すると同時に、二酸化炭素や老廃物の回収を担う血液および血管は全身の健康維持に重要な役割を果たす。その一方で、血液や血管は酸化障害を受けやすい組織でもある。例えば、血液中の LDL が ROS により酸化変性した酸化 LDL は動脈硬化の重大な因子と考えられている[48, 49]。酸化 LDL はマクロファージと共に血管内壁にプラークとして沈着し、その結果として血管内皮細胞の機能低下を惹起し、最終的には血栓の生成により重篤な心血管イベントを引き起こすことが知られている。それらの初期段階での予防手段の一つとして、積極的な抗酸化物質の摂取によって血中の抗酸化物質の濃度を高め、酸化 LDL の生成を抑制することが有効とされており、カロテノイドも抗酸化物質としてその一端を担うことが明らかにされている[50, 51]。また、赤血球は酸素運搬を担い、常に酸素と接しているために酸化障害を受けやすい組織であると考えられる。赤血球膜の構成成分であるリン脂質は ROS によって過酸化脂質へ変性するが、カロテノイドの一種であるルテインやアスタキサンチンの摂取によって、それらが赤血球へ移行して抗酸化力を発揮することで、赤血球における過酸化脂質量が低減することが報告されている[11, 12]。赤血球膜の酸化変性は、赤血球の機能低下へとつながり、全身への酸素供給能に関わると考えられる。したがって、抗酸化物質によって赤血球の酸化障害を抑制し、その機能を維持させることは重要である。

第1章においてカロテノイドは $^1\text{O}_2$ の物理的消去活性に加えて酸素ラジカルの化学的消去活性を有し、特に末端に五員環構造をもつ構造的特徴からカプサンチンやカプソルビン、ミチロキサンチンが $^1\text{O}_2$ および $\cdot\text{OH}$ の両方に対する高い消去活性を併せ持つことを明らかにした。これらの有効量を血中に取り込むことができれば、上述したような酸化 LDL の生成抑制や赤血球の酸化変性抑制など、その高い抗酸化活性を介してヒトにおける健康の維持・増進に貢献できる可能性が高いと考えられる。しかしながら、ミチロキサンチンは貝類などがごく微量に生合成する極めて希少なカロテノイドであり、天然から意図的に継続摂取することは極めて困難である。一方で、カプサンチンやカプソルビンは赤パプリカが特徴的に生合成するカロテノイドであり、それらを豊富に含有する赤パプリカの抽出物は日本国内で「パプリカ色素」として食品添加物リストに収載され、既に多くの食品へ利用されている。欧米においては、「Paprika extract, Paprika Oleoresin」として European Food Safety Authority (EFSA) や Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) での安全性評価や摂取基準の制定が実施済であるため、機能性食品への十分な応用実現性がある。しかしながら、赤パプリカ由来のカロテノイド（以下、パプリカ由来カロテノイド）については、ヒトでの詳細な吸収性評価の研究例が少ない。そこで本研究では、健常成人に対するパプリカ由来カロテノイ

ドのサプリメントテーションにおける、血漿中および赤血球中のカロテノイド濃度および組成の変化について詳細な解析を行い、パプリカ由来カロテノイドのヒト血中への吸収と分布、ならびに血中カロテノイド全体に及ぼす影響について評価を行った。

2-2. 実験方法

2-2-1. 被験物質および被験食の調製

被験物質であるパプリカ由来カロテノイドはグリコ栄養食品株式会社（Osaka, Japan）から提供されたパプリカ色素製剤「PapriX®」を使用し、それらを添加した飲料を調製し被験食とした。被験食の栄養組成を Table 2-1 に、被験食中のカロテノイド含有量および組成を Table 2-2 に示した。

Table 2-1 Ingredient of the test beverage

| Ingredient | g/100 mL |
|-----------------------|----------|
| Cyclic dextrin | 3.0 |
| Sucrose | 7.0 |
| Anhydrous citric acid | 0.18 |
| Sodium citrate | 0.12 |
| Sodium chloride | 0.005 |
| Potassium chloride | 0.008 |
| PapriX® | 0.7 |

PapriX is the commercial formulation used for the source of paprika carotenoid in this study.

Table 2-2 Carotenoid contents and composition of the test beverage

| Carotenoids | mg / 100 mL | % |
|------------------------|-------------|-------|
| β-Carotene | 0.90 | 12.9 |
| β-Cryptoxanthin | 0.54 | 7.7 |
| Cryptocapsin | 0.07 | 1.0 |
| Cucurbitaxanthin A | 0.57 | 8.2 |
| Zeaxanthin | 0.46 | 6.6 |
| Capsanthin 3,6-epoxide | 0.27 | 3.9 |
| Capsanthin | 3.27 | 46.7 |
| Capsorubin | 0.18 | 2.5 |
| Unknown | 0.74 | 10.5 |
| Total carotenoids | 7.00 | 100.0 |

(*J. Oleo Sci.* **2015**, 64, 1135-42., Table 1 より一部改変)

2-2-2. 被験者および試験方法

被験者は健常な男女 5 名（男性 3 名、女性 2 名）で、平均年齢は 22.0 ± 1.9 才であった。被験者は 4 週間、毎日朝と晩に被験食（飲料）を 100 mL ずつ、一日あたり合計 200 mL を摂取した。摂取開始前、摂取 2 週間後、摂取 4 週間後、摂取終了から 4 週間後に採血を行った (Fig. 2-1)。また、本試験はヘルシンキ宣言の主旨に従い被験者への十分な説明と同意を取得し、福島大学研究倫理委員会により承認されたプロトコルに従って実施された。

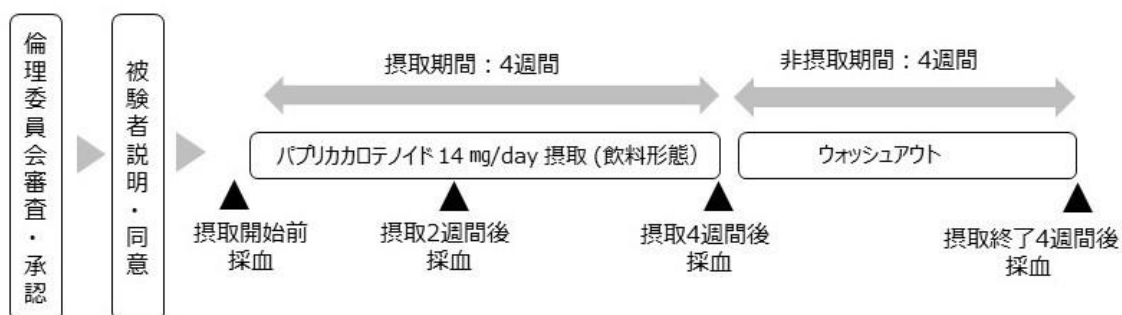


Fig. 2-1 Experimental design

2-2-3. 血中カロテノイドの分析

2-2-3-1. サンプル採取

ヘパリン入り真空採血管にて 10 mL の採血を行い、室温にて 30 分間放置後、 $1,000\times g$ 、10 min 室温下で遠心分離を行い、血漿を採取した。残った血球に 5 mL の PBS を添加し、別のチューブに移して $1,000\times g$ 、10 min 室温下で遠心分離を行い、上層を廃棄、同様の操作を 3 回繰り返し、血球成分の洗浄を行った。最後に上層を廃棄して残った血球（赤血球）を回収した。回収した血漿と赤血球は -80°C で保管した。

2-2-3-2. 前処理法

血漿中のカロテノイドは、1 mL の血漿に 2 mL のエタノールを加えて攪拌後、5 mL のジエチルエーテル：ヘキサン（2:8, v/v）溶液で抽出した。10 分間静置後、上層をフッ化ポリビニリデンメンブレンフィルター（0.45 μm pore size, Millipore corp., Massachusetts, USA）に供して不純物を除去した後、エバポレーターで濃縮乾固し溶媒を除去した。残渣をアセトン：ヘキサン（2:8, v/v）に再溶解し HPLC 分析に供した。

赤血球中のカロテノイドは、凍結と解凍を 3 回繰り返すことにより破碎させた 4 mL の赤血球を 6 mL の蒸留水に懸濁させ、50 mL のアセトンを添加、さらに 50 mL のジエチルエーテル：ヘキサン（2:8, v/v）溶液を加え、分析漏斗を用いて抽出した。エバポレーターで濃縮乾固により溶媒を除去し、残渣をアセトン：ヘキサン（2:8, v/v）に再溶解し HPLC 分析に供した。

2-2-3-3. 順相 HPLC 分析条件

カラム：Cosmosil 5SL-II 5 μm , 4.6 x 250 mm (Nacalai Tesque, Japan)

検出器：L-4250 UV-VIS detector (Hitachi) 検出波長：450 nm

ポンプ：L-6000 (Hitachi) 流速：1 mL/min

移動相：アセトン：ヘキサン（2:8, v/v）

2-2-4. 血漿および赤血球中のカプサントンの同定

Fig. 2-2 に血漿中および赤血球中のカロテノイドの HPLC クロマトグラムを示した。両者に検出された Peak 5 を上記 3-2-3 条件下における HPLC 分析にて繰り返し分取し、LC-MS に供し同定を試みた。Peak 5 は極大吸収波長が 477 nm, ESI TOF MS : m/z 583.4154 $[\text{MH}]^+ \text{C}_{40}\text{H}_{55}\text{O}_3$, Calc 583.4151; m/z 605.3949 $[\text{M}+\text{Na}]^+ \text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{O}_3\text{Na}$, Calc. 605.3970 であり、カプサントンの同定された。カプサントンの同定における分析条件は以下の通りである。

UPLC : Acquity UPLC system (Waters Corporation)

カラム : Acquity UPLC 1.7 μm BEH C18 column 2.1 mm \times 100 mm
(Waters Corporation)

カラム温度：40°C

移動相：メタノール 流速：0.4 mL/min

検出波長：フォトダイオードアレー（検出波長 200～600 nm）

ESI TOF MS：Waters Xevo G2S Q TOF mass spectrometer (Waters Corporation)

キャピラリー電圧：3.2 kV

コーン電圧：40 eV

ソース温度：120°C

ネブライザーガス：窒素ガス 30 L/hr

MS/MS 分析条件

コリジョンガス：アルゴンガス

コリジョンエネルギー：30 V

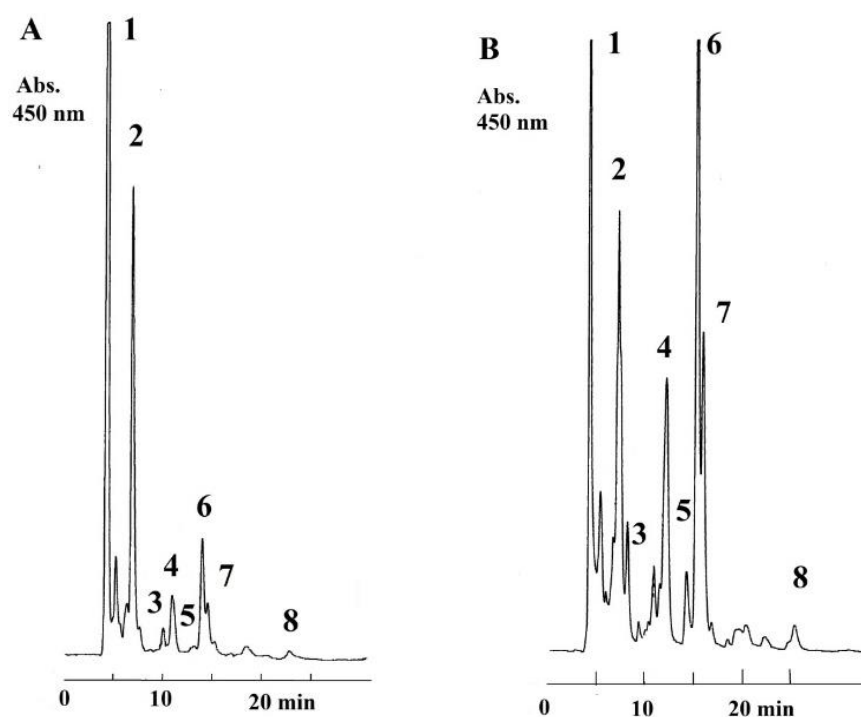


Fig. 2-2 HPLC chromatograms of carotenoids after ingestion of paprika carotenoids in plasma (A) and erythrocytes (B) samples

Peak identification: Peak-1 Total carotenes, Peak-2 β -Cryptoxanthin, Peak-3 Cryptocapsin, Peak-4 Cucurbitaxanthin A, Peak-5 Capsanthone, Peak-6 Lutein, Peak-7 Zeaxanthin, Peak-8 Capsanthin. HPLC conditions are described in Material and Methods

(*J. Oleo Sci.* **2015**, 64, 1135-42., Fig. 2)

2-2-5. 統計解析

実験結果は平均値±標準偏差（S.D.）として評価した。対応のある t 検定を用いて有意差検定を行った。有意水準は 5%未満とした。

2-3. 結果および考察

被験物質として用いたパプリカ由来カロテノイドは、カロテン類に属する β -カロテン、キサントフィル類に属する β -クリプトキサンチン、クリプトカプシン、ククルビタキサンチン A、ゼアキサンチン、カプサンチン 3,6-エポキサイド、カプサンチン、カプソルビンの計 8 種のカロテノイドを含有するマルチカロテノイドであり、主としてカプサンチンを含有する (Table 2-2)。これらは人工的に再構成されたものではなく、赤パプリカが生合成する天然のカロテノイド組成であり、赤パプリカからの溶媒（ヘキサン）抽出および濃縮により得られたものである。天然物であるために、その組成は原料である赤パプリカの生育状況によりわずかに変動があるものの、グリコ栄養食品(株)での製造段階から管理がされており、大きな変動はない

本章に関連する各カロテノイドの構造を Fig. 2-3 に示した。ルテインおよびその生体内代謝物である 3-ヒドロキシ- β , ϵ -カロテン-3'-オンは被験物質中には含まれないが、通常の食事から摂取され、ヒトの血液中で常に検出されるカロテノイドである。

摂取開始前、摂取開始 2 週間後、摂取開始 4 週間後、摂取終了 4 週間後（ウォッシュアウト 4 週間後）の血漿中のカロテノイド濃度および組成を Table 2-3 に、赤血球中のカロテノイド濃度および組成を Table 2-4 に示した。

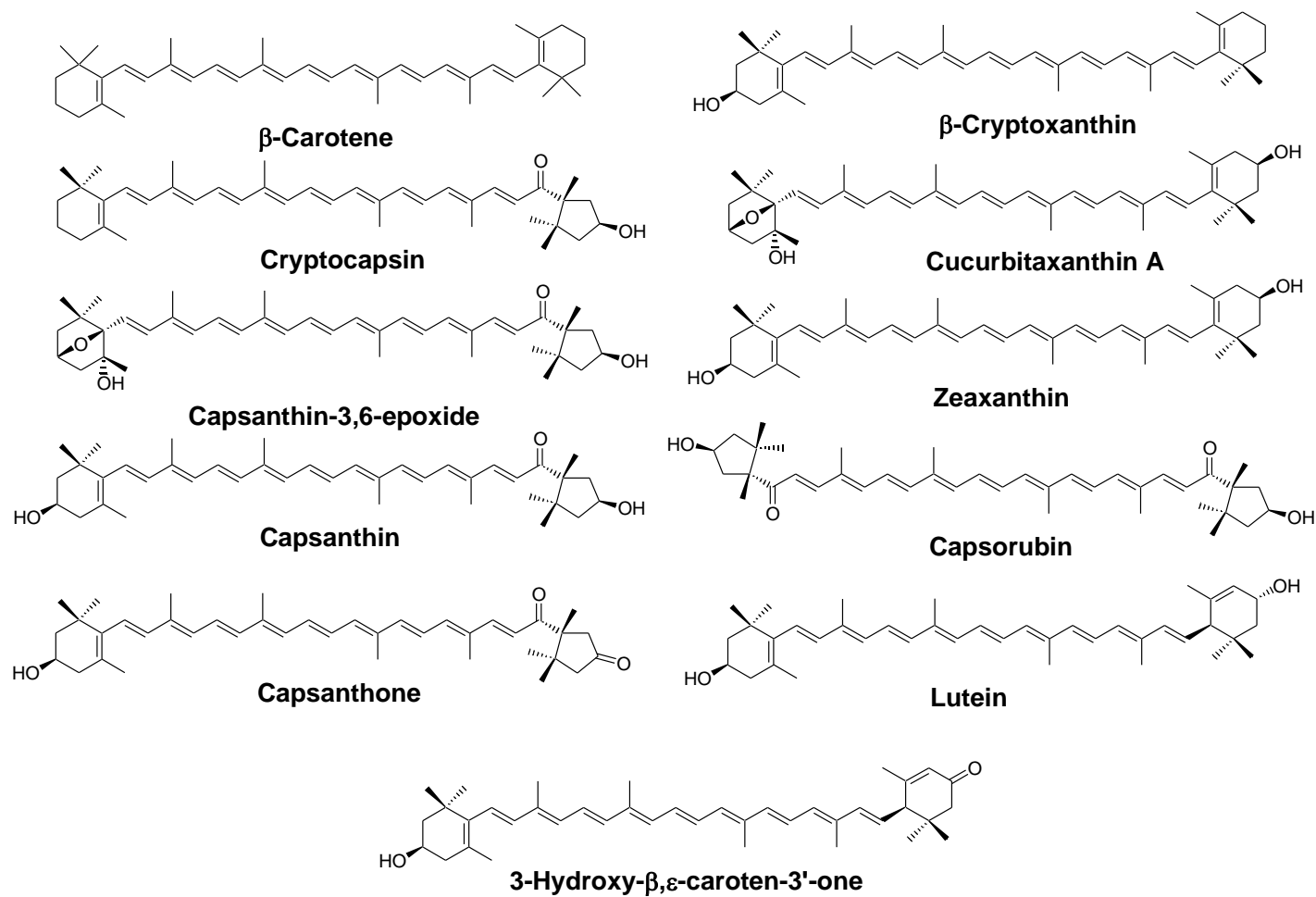


Fig. 2-3 The structures of carotenoids in this study

Table 2-3 Carotenoids contents and composition in plasma before, after ingestion of paprika and after clearance.

| Carotenoids (pmol/mL) | Before ingestion | | | 2weeks after ingestion | | | | 4weeks after ingestion | | | | 4 weeks after clearance | | | |
|-------------------------------|------------------|-------|-------|------------------------|-------|-------|----------|------------------------|-------|-------|----------|-------------------------|-------|-------|----------|
| | Mean | SD | % | Mean | SD | % | <i>p</i> | Mean | SD | % | <i>p</i> | Mean | SD | % | <i>p</i> |
| Total-carotenes | 1272.9 | 329.8 | 66.7 | 1260.3 | 159.4 | 53.3 | 0.957 | 1101.7 | 339.7 | 49.5 | 0.554 | 884.0 | 164.1 | 56.8 | 0.034 |
| β-Cryptoxanthin | 259.0 | 28.5 | 13.6 | 470.0 ** | 78.0 | 19.9 | 0.009 | 547.3 * | 124.4 | 24.6 | 0.010 | 333.1 ** | 45.5 | 21.4 | 0.005 |
| 3-Hydroxy-β, ε-Caroten-3'-one | 73.7 | 27.7 | 3.9 | 33.0 * | 13.3 | 1.4 | 0.034 | 28.0 * | 6.2 | 1.3 | 0.033 | 40.2 | 6.5 | 2.6 | 0.114 |
| Cryptocapsin | – | – | – | 10.7 * | 5.4 | 0.5 | 0.017 | 8.2 ** | 3.5 | 0.4 | 0.009 | – | – | – | |
| Cucurbitaxanthin A | – | – | – | 114.1 ** | 20.3 | 4.8 | 0.000 | 111.8 ** | 16.8 | 5.0 | 0.000 | 16.3 | 15.9 | 1.0 | 0.110 |
| Capsanthone | – | – | – | 39.6 ** | 7.4 | 1.7 | 0.000 | 54.6 ** | 12.6 | 2.5 | 0.001 | – | – | – | |
| Lutein | 248.3 | 80.6 | 13.0 | 249.1 | 96.6 | 10.5 | 0.979 | 204.1 | 37.4 | 9.2 | 0.198 | 274.6 | 65.2 | 17.6 | 0.472 |
| Zeaxanthin | 53.9 | 42.0 | 2.8 | 110.8 * | 33.2 | 4.7 | 0.015 | 100.9 ** | 47.6 | 4.5 | 0.008 | 8.4 | 2.6 | 0.5 | 0.084 |
| Capsanthin | – | – | – | 74.8 * | 33.7 | 3.2 | 0.011 | 70.1 ** | 16.9 | 3.1 | 0.001 | – | – | – | |
| Total carotenoids | 1907.8 | 371.7 | 100.0 | 2362.5 | 314.6 | 100.0 | 0.192 | 2226.6 | 468.2 | 100.0 | 0.404 | 1556.6 * | 248.7 | 100.0 | 0.041 |
| Total xanthophylls | 634.9 | 136.0 | 33.3 | 1102.1 ** | 235.8 | 46.6 | 0.004 | 1124.9 ** | 170.6 | 50.5 | 0.005 | 672.6 | 93.3 | 43.2 | 0.547 |

Total carotenes are the sum of α-carotene, β-carotene, and lycopene. Total carotenoids are the sum of total-carotenes, β-cryptoxanthin, 3-hydroxy-β, ε-caroten-3'-one, cryptocapsin, cucurbitaxanthin A, capsanthone, lutein, zeaxanthin, and capsanthin. Total xanthophylls is the sum of β-cryptoxanthin, 3-hydroxy-β, ε-caroten-3'-one, cryptocapsin, cucurbitaxanthin A, capsanthone, lutein, zeaxanthin, and capsanthin.

This accounts for about 90 percent of all carotenoids in plasma.

Mean values were significantly different in the paired t test between before and after supplementation. **p* <0.05, ** *p* <0.01.

(*J. Oleo Sci.* **2015**, 64, 1135-42., Table 3 より一部改変)

Table 2-4 Carotenoids contents and composition in erythrocytes before, after ingestion of paprika and after clearance.

| Carotenoids (pmol/mL) | Before ingestion | | | 2weeks after ingestion | | | | 4weeks after ingestion | | | | 4 weeks after clearance | | | |
|-------------------------------|------------------|------|-------|------------------------|------|-------|----------|------------------------|------|-------|----------|-------------------------|-----|-------|----------|
| | Mean | SD | % | Mean | SD | % | <i>p</i> | Mean | SD | % | <i>p</i> | Mean | SD | % | <i>p</i> |
| Total-carotenes | 9.6 | 5.1 | 24.1 | 18.7 ** | 7.9 | 21.5 | 0.008 | 15.1 ** | 5.9 | 18.9 | 0.007 | 14.4 | 4.7 | 26.8 | 0.216 |
| β-Cryptoxanthin | 8.0 | 2.1 | 20.1 | 15.6 * | 5.4 | 17.9 | 0.027 | 15.9 * | 4.8 | 19.9 | 0.024 | 15.5 * | 2.7 | 28.8 | 0.010 |
| 3-Hydroxy-β, ε-Caroten-3'-one | 3.9 | 2.1 | 9.6 | 2.6 | 0.6 | 3.0 | 0.356 | 1.8 | 0.5 | 2.3 | 0.195 | 2.0 | - | 3.7 | 0.130 |
| Cryptocapsin | - | - | - | 1.1 ** | 0.4 | 1.2 | 0.008 | 1.4 ** | 0.4 | 1.8 | 0.003 | - | - | - | - |
| Cucurbitaxanthin A | - | - | - | 11.1 ** | 3.7 | 12.7 | 0.004 | 10.1 ** | 1.6 | 12.6 | 0.000 | - | - | - | - |
| Capsanthone | - | - | - | 7.5 * | 3.4 | 8.6 | 0.012 | 5.7 ** | 0.4 | 7.1 | 0.000 | - | - | - | - |
| Lutein | 14.3 | 2.7 | 35.8 | 18.6 | 6.1 | 21.3 | 0.096 | 16.0 | 3.1 | 20.1 | 0.353 | 20.3 | 3.1 | 37.6 | 0.066 |
| Zeaxanthin | 4.1 | 1.5 | 10.4 | 9.9 * | 3.3 | 11.3 | 0.030 | 10.4 ** | 1.3 | 13.1 | 0.001 | 1.7 * | 0.3 | 3.1 | 0.034 |
| Capsanthin | - | - | - | 2.1 ** | 0.8 | 2.4 | 0.006 | 3.4 ** | 0.7 | 4.3 | 0.001 | - | - | - | - |
| Total carotenoids | 40.0 | 11.5 | 100.0 | 87.1 ** | 24.4 | 100.0 | 0.008 | 79.8 ** | 12.7 | 100.0 | 0.001 | 53.9 | 5.7 | 100.0 | 0.076 |
| Total xanthophylls | 30.4 | 6.7 | 75.9 | 68.4 ** | 18.9 | 78.5 | 0.009 | 64.8 ** | 8.0 | 81.1 | 0.000 | 39.5 | 2.7 | 73.3 | 0.059 |

Total carotenes are the sum of α-carotene, β-carotene, and lycopene. Total carotenoids are the sum of total-carotenes, β-cryptoxanthin, 3-hydroxy-β, ε-caroten-3'-one, cryptocapsin, cucurbitaxanthin A, capsanthone, lutein, zeaxanthin, and capsanthin. Total xanthophylls is the sum of β-cryptoxanthin, 3-hydroxy-β, ε-caroten-3'-one, cryptocapsin, cucurbitaxanthin A, capsanthone, lutein, zeaxanthin, and capsanthin.

This accounts for about 90 percent of all carotenoids in erythrocytes.

Mean values were significantly different in the paired t test between before and after supplementation. **p* <0.05, ** *p* <0.01.

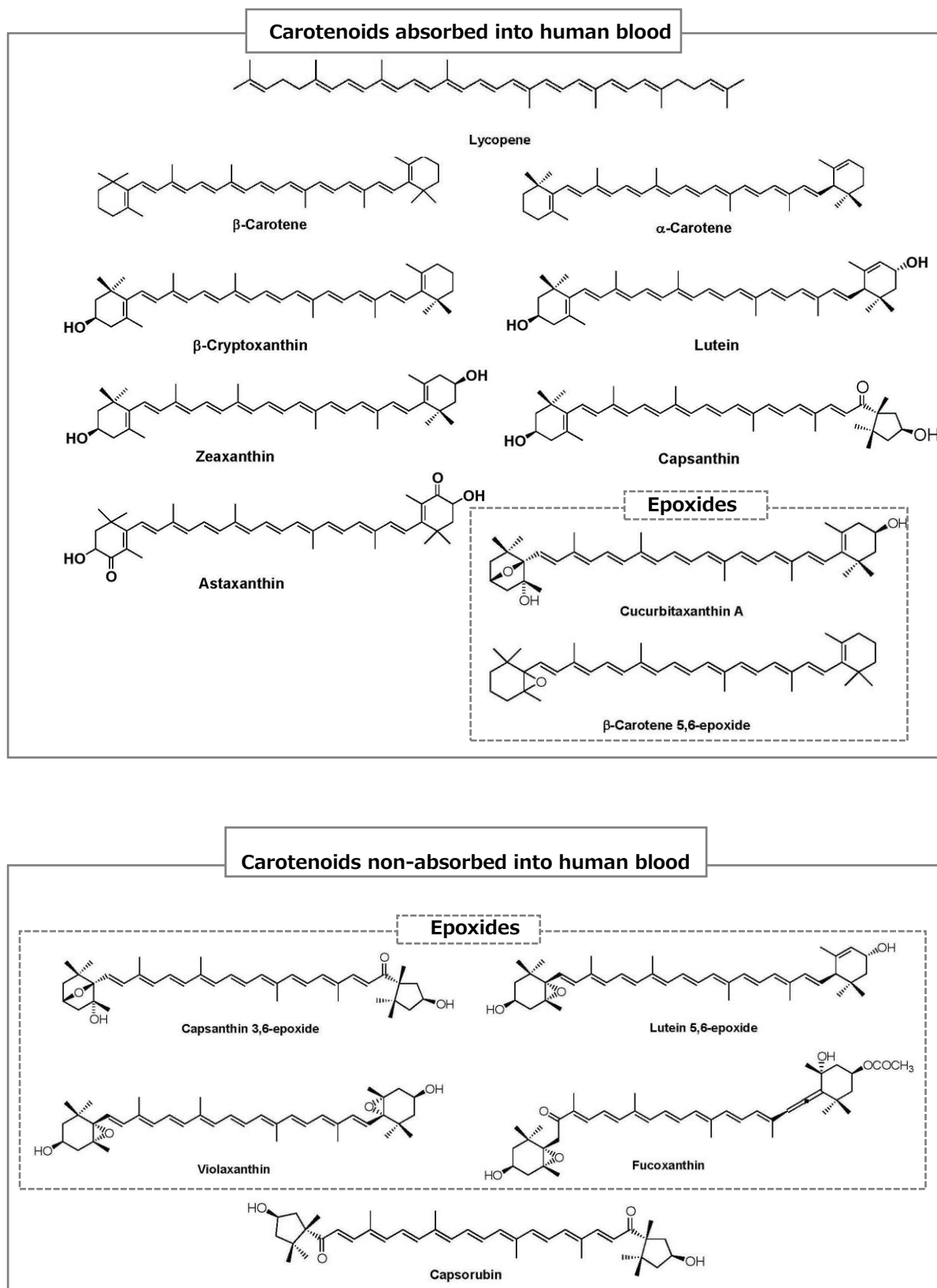
(*J. Oleo Sci.* **2015**, 64, 1135-42., Table 4 より一部改変)

通常の食事からの摂取機会が極めて少ない希少カロテノイドであるカプサンチン、クリプトカプシン、ククルビタキサンチン A は、摂取開始前の血中では検出されなかったが、摂取開始後にはそれらが血漿と赤血球でともに検出された。したがって、これらは日常的に多量に摂取されるカロテノイドではないものの、サプリメントーションにより血中への取り込みが可能であることが示された。一方で、同様に希少カロテノイドであるカプソルビンやカプサンチン 3,6-エポキシイドは摂取後も血中で未検出であった。パブリカ由来カロテノイドにおけるカプソルビン、カプサンチン 3,6-エポキシイドの組成比はそれぞれ 3%程度であり、摂取量が少なかったことが要因と考えられたが、1%程度の組成比であるクリプトカプシンが血中で検出された点を考慮すると、血中への吸収はカロテノイドの化学構造ならびにその構造に付随する分子の極性が関与するものと考えられる。

先行研究において、ヒトにおける高極性カロテノイドの生体利用効率は低いと考えられている[52]。カプサンチン 3,6-エポキシイドは順相 HPLC 分析においてルテインならびにゼアキサンチンと保持時間が近接しており、化合物としての極性は同程度であると予想されるが、カプサンチン 3,6-エポキシイドのみが血中で検出されないことから、カロテノイドの生体内への吸収は、化学構造に関連した単なる分子極性だけではなく、何らかの未同定の構造選択性が働いていることが推察される。

先行研究で、ヒトはルテイン 5,6-エポキシドやフコキサンチン、ビオラキサンチンなどのエポキシド型カロテノイドを消化管から吸収しないことが報告されている[53, 54]。また、ヒトにおけるルテインの生体利用性について、腸管で植物ステロールの排泄を介することで知られる ABC トランスポーターの ABCG5 が関与することが報告されており[55]、小竹らはエポキシド型カロテノイドの低い生体利用性に関しても同様の機構で、腸管からの排泄トランスポーターの関与の可能性を考察しているが[56]、現状では情報は乏しく詳細な検討が必要である。

著者は第 1 章でカロテノイドと $\cdot\text{O}_2^-$ ならびに $\cdot\text{OH}$ との化学反応産物としてエポキシド型カロテノイドが生成することを明らかにした。これらは ROS との化学的消去反応によって副産物として生成した、いわば「残骸物」であり、腸管の上皮細胞から消化管管腔への排泄トランスポーターによる積極的な体内からのクリアランスが起こることは、生体恒常性を維持する上でも道理にかなっており、重要であるように思われる。しかしながら一方で、本試験においてパブリカ由来カロテノイドの摂取によって血中から検出されたククルビタキサンチン A はエポキシド型カロテノイドであり、また先行研究では経口摂取によって β -カロテン 5,6-エポキシドがヒトの血中から検出されたことが報告されている[57]。つまり、全てのエポキシド型カロテノイドがヒトに吸収されない、という結論には至らない。本研究および先行研究にてヒトにおける血中への吸収性が評価されている各カロテノイドを Fig. 2-4 に示した。


Carotenoids non-absorbed into human blood

Epoxides



Capsanthin 3,6-epoxide



Lutein 5,6-epoxide



Violaxanthin



Fucoxanthin



Capsorubin

Fig. 2-4 The structure of carotenoids absorbed or non-absorbed into human blood from the gastro-intestine.

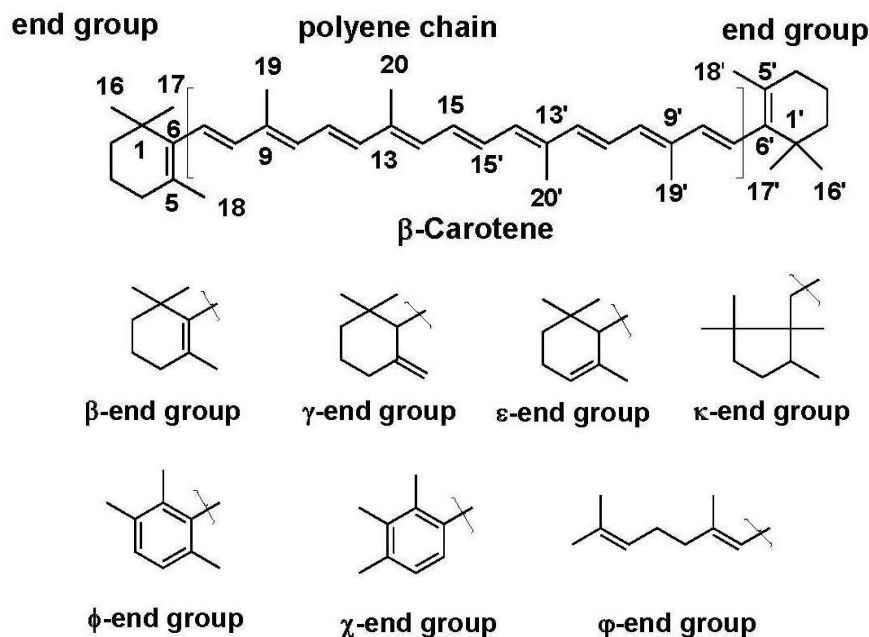


Fig. 2-5 The types of end group of carotenoids

カロテノイドのエンドグループの構造は、 β -末端基や ϵ -末端基、 γ -末端基など様々である (Fig. 2-5)。ヒトが日常的に摂取する食事由来のカロテノイド (α -カロテン、 β -カロテン、リコピン、ルテイン、ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン) は、直鎖状のカロテノイドで Ψ -末端基を有するリコピンを除いては、 β -末端基または ϵ -末端基を有している。例えば、ルテインは β -末端基と ϵ -末端基を一つずつ、 β -カロテンや β -クリプトキサンチンは β -末端基を2つ有している。Fig. 2-4 から、ヒトの血中で検出されているエンドグループが環状のカロテノイドは全て β -末端基を有していることが読み取れる。エポキシド型カロテノイドについても、血中で検出される β -カロテン 5,6-エポキシドやクルビタキサンチン A は片側が β -末端基構造を維持している。一方で血中に検出されないルテイン 5,6-エポキシドはエポキシ化によって β -末端基の構造が失われており、逆側の ϵ -末端基だけが維持されている。同様に、カプサンチン 3,6-エポキシドやビオラキサンチンについてもエポキシ化により β -末端基を失っている。また、両末端に五員環構造を有するカプソルビンについても β -末端基を有しておらず、本研究において血中移行性が確認されなかった。上記の包括的な結果より考察すると、ヒトにおけるカロテノイド、特にエンドグループが環状構造であるカロテノイドの消化管吸収機構には、 β -末端基の構造選択性が働いている可能性が考えられる。

ヒトの必須栄養素であるビタミン A は、その分子末端構造に β -末端基を有している。また、 β -カロテンや β -クリプトキサンチンなどプロビタミン A と呼ばれる一部のカロテノイドは、生体内でのビタミン A 欠乏時には代謝酵素である β -カロテン 15,15'-モノオキシゲナーゼ 1 (BCMO1) によってビタミン A に代謝変換され、ビタミン A として利用される (Fig.

2-6)。これらから、 β -末端基に対する構造選択性によって、生体内への優先的な吸収機構が存在することは十分に考えられ得る。しかしながら、現時点では推測の域を出ないため、今後さらなる検証が必要である。

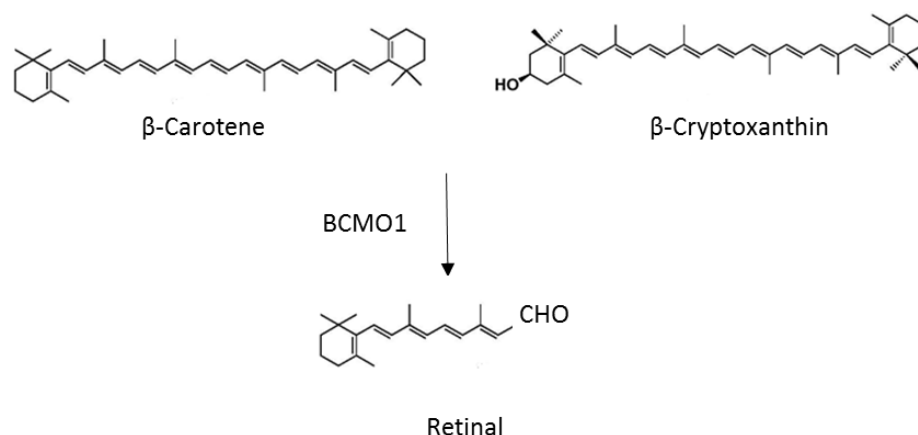


Fig. 2-6 Conversion of provitamin A to Retinal

上述したように、ヒトにおけるカロテノイドの血中への吸収性は、先行研究や本研究の結果から化学構造に関連した極性や、ポリエン鎖の両端部分の環状構造に依存した構造選択性の存在が考えられ、複数の要素が複雑に絡み合っていることが予想される。さらに、吸収過程のみではなく、体内からの排泄過程の側面についても同様に考察する必要がある。しかしながら、それらについては現段階では詳細な解明がされていない。カロテノイドの体内動態に関する研究において、体内への吸収過程ならびに体内からの排泄過程は、今後詳細に検討すべき重要な課題である。

β-クリプトキサンチンは食餌から日常的に摂取されるため、摂取開始前の血中においても検出されたが、摂取開始2週間後に血漿および赤血球でその濃度は有意に上昇した（血漿中； $p < 0.01$ ，赤血球中； $p < 0.05$ ）。パプリカ由来カロテノイド全体に占めるβ-クリプトキサンチンの組成比は8%程度であるにもかかわらず、その血中濃度上昇効果は極めて大きかった。したがって、β-クリプトキサンチンはサプリメントにより効率的にヒトの体内へ吸収されることが示唆された。

血漿中の総カロテノイド濃度は、摂取2週間後には摂取開始前と比較して上昇傾向が見られ、さらに総キサントフィル濃度については有意に上昇した ($p < 0.05$)。パブリカ由来カロテノイドの組成 (Table 2-2) は90%がキサントフィル類に属するカロテノイドであるため、総キサントフィル濃度を上昇させる効果が大きいものと考えられる。赤血球中では、摂取2週間後に総カロテノイド濃度、総キサントフィル濃度が共に有意に上昇した ($p < 0.05$)。血漿中と赤血球中の両者において、摂取4週間後に総カロテノイド量および総キサントフィル類のさらなる濃度上昇は見られず、摂取2週間後の時点で血中カロテノイド濃度は飽和に達

したものと考えられる。

摂取終了 4 週間後には総カロテノイド濃度は低下し、特に摂取開始前に血中に存在しなかったカプサンチン、カプサントン、クリプトカプシン、ククルビタキサンチン A は検出感度以下に消失した。したがって、一時的なサプリメントーションによるパプリカ由来カロテノイドの血中への長期滞留性は無いものと考えられる。しかしながら、例外的に β -クリプトキサンチンについては、摂取終了 4 週間後においても摂取前と比較して有意に高い濃度を維持していた ($p < 0.05$)。先行研究において、ヒトの血漿中における β -クリプトキサンチンの半減期は他のカロテノイドよりも有意に長いことが報告されており[58]、本研究においてもその事象が再現された。ヒトが日常的に食餌から摂取する総カロテノイドのうち、 β -クリプトキサンチンの組成比は 4.7% と低いにもかかわらず[59]、血中の総カロテノイドに占める組成比は血漿中で 14%、赤血球中で 20% と高かった。その理由は、上述した消化管からの吸収性の高さと血中での長期滞留性の寄与が考えられる。

ルテインはパプリカ由来カロテノイドには含まれないため、試験前から試験終了後まで一貫して食餌からの摂取のみであった。摂取期間中、わずかな変動はあるものの血中ルテイン濃度の著しい増減は認められず、パプリカカロテノイドのサプリメントーションによるルテインの吸収過程への競合阻害などは起きていないものと考えられる。血中飽和濃度の存在や、摂取中断による速やかな体内からの消失は生体への過剰蓄積が起こりにくいことを示唆しており、また他の食餌性カロテノイドの吸収阻害が起こらない点からも、パプリカ由来カロテノイドは安全性の高い化合物の混合体であると言える。

パプリカ由来カロテノイド摂取による総カロテノイドおよび各カロテノイド濃度の挙動は血漿と赤血球で類似していた。しかしながら、血漿と赤血球ではカロテン類とキサントフィル類の比率には大きな違いが認められた。摂取開始前のカロテノイド組成に着目すると、血漿ではカロテン類が 67%、残りの 33% はキサントフィル類であった。一方で、赤血球においてはカロテン類が 24%、残りの 76% はキサントフィル類であり、血漿と赤血球ではその組成比は逆転していた。先行研究において、炭化水素であり疎水性の高いカロテン類が血漿のリポタンパク質に結合して存在する一方、ポリエン骨格の疎水部に加えて酸素原子の存在により極性を示す末端構造をもつキサントフィル類は、赤血球膜のリン脂質二重層へ局在しやすいことが推察されており[60]、本結果はそれらを支持するものであった。パプリカ由来カロテノイドの組成は 90% がキサントフィル類であることから、摂取による血中カロテノイド濃度の上昇効果は血漿中と比較して赤血球においてより顕著に現れたものと考えられる。摂取前から摂取 4 週間後のキサントフィル類の組成比の変化は、血漿で 33%→51%、赤血球で 76%→81% であり、濃度変化に加えて組成の変化が認められた。第 1 章でも示したように、カロテノイドの ROS に対する消去活性は化学構造に依存しており、カロテン類と比較して共役系が長く複雑な構造をもつキサントフィル類がより高い活性を示す。カロテノイドのサプリメントーションにおいて、血中での LDL コレステロールの酸化抑制等、抗酸化物質としての具体的な効果を期待する際には、カロテノイド濃度の変化に加えて、その組成変化にも着目するべきである。

摂取開始後に血漿中および赤血球中で検出されたカプサントンは、赤パプリカに極少量

(総カロテノイド量に対して 0.5%以下) 存在することが報告されているが[61-63]、本研究に用いた被験食中では未検出であった。第 1 章にて、カプサンチンは $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ との化学反応において、五員環の水酸基がケトンに酸化され、さらに β -末端基がエポキシ化されたカプサントン 5,6-エポキシドが化学反応産物の一つとして検出された (Fig. 1-5)。一方で、ヒトの生体内では、カプサンチンの酸化的代謝により五員環の水酸基がケトンへ酸化されたカプサントンが生成することが報告されている[64]。本研究でも同様に、カプサントンはカプサンチンの生体内における酸化的代謝物として血中に検出されたものと推察される。したがって、血中のカプサントンはカプサンチンが吸収された後の代謝変換を反映していると考えられるため、カプサンチンの消化管吸収の総和を見積もる際には、カプサントンの血中濃度も考慮すべきである。特に、赤血球ではカプサントンはカプサンチンよりも高濃度で検出され、酸素運搬を担う赤血球は細胞内の溶存酸素濃度が高く酸化的環境にあるため、カプサンチンとその酸化的代謝物であるカプサントンのプロファイルは、赤血球での局所的な酸化反応の亢進を反映している可能性が推察される。

2-4. 小括

本章ではヒトを対象に、経口摂取によるパプリカ由来カロテノイドの血中への吸収と分布、ならびに血中カロテノイド全体に及ぼす影響について評価を行った。その結果、パプリカ由来カロテノイドに含有されるカプサンチンやクルビタキサンチン A、 β -クリプトキサンチンなどの血中濃度上昇が確認され、経口投与後にヒトの循環血液中へ吸収されることが明らかとなった。パプリカ由来カロテノイドの摂取により、血中の総カロテノイド濃度、特に総キサントフィル濃度が有意に上昇したが、その効果は血漿よりも赤血球で顕著であった。またカロテノイドの末端の化学構造が生体内への吸収に関与する可能性が推察された。

本結果より、パプリカ由来カロテノイドの摂取は血液中のカロテノイド濃度を上昇させることにより抗酸化力を高め、酸化 LDL の生成抑制や赤血球の酸化変性抑制などを通じて血液や血管機能の維持向上に寄与することが期待される。そこで著者は、パプリカ由来カロテノイドの経口摂取による血中酸化 LDL の改善効果を検証するため、健常成人を対象に 12 週間のプラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施した。一般的な生化学検査で汎用される酸化 LDL 指標であるマロンジアルデヒド修飾 LDL (MDA-LDL) を用いて介入前後の評価を試みたが、変動やバラツキが大きく正確な評価は困難であった。現行の血中酸化 LDL 測定方法はいずれも疾病罹患の有無を判断する目的で利用される評価指標であるため、食品由来の機能性成分の介入試験において対象となる健常域から疾病境界域の被験者でのわずかな変動を検出するには、感度および精度が不足していると考えられる。よって現行法での酸化 LDL の直接的な評価は困難であり、今後、高感度にこれらを検出できる手法を確立することが課題である。

また、本結果からパプリカ由来カロテノイドの経口摂取による循環血液中のカロテノイド濃度の上昇および組成変化に対する効果は、血漿よりも赤血球で顕著であり、赤血球機能への効果が期待されると考えた。そこで、それらについては第 3 章におけるヒト介入試験にて検証を実施することとした。

第3章 ヒト介入試験におけるパプリカ由来カロテノイドの運動機能改善効果の検証

3-1. 緒言

ヒトが生きていくためには酸素が不可欠であり、全身の各組織・臓器への十分な酸素供給が必要である。その中でも特に脳と筋肉は他の組織と比較してエネルギー消費量が大きく、多量の酸素を必要とする。呼吸により体内に取り込まれた酸素は赤血球中のヘモグロビン(Hb)に結合し全身に運搬されるため、酸素を全身へ効率良く運搬するためには赤血球の機能維持が重要である。赤血球の直径は約 $8\mu\text{m}$ であり、通常の形状ではそれよりも小さい直径をもつ毛細血管を通過することができない。そのため、健常な赤血球では毛細血管網を通過する際に自在に変形し(変形能)、通過後にその変形を修復(修復能)し、さらに元の形態を一定時間保持(形態保持能)している。赤血球は通過する血管径に応じてこの一連の変化を周期的に繰り返すことで、全身の末端組織への酸素供給を可能としている。したがって、赤血球変形能は生体内での酸素運搬において非常に重要であるが、その機能は赤血球膜の脂質プロファイルや膜タンパク質により大きく規定されている。赤血球変形能の主要な低下要因として、それらの規定因子の変性による赤血球膜の物理化学的性質の変化が挙げられる[65]。

赤血球は酸素と常に接するために ROS への曝露リスクが高く、さらに赤血球膜の脂質二重層はホスファチジルコリンやホスファチジルエタノールアミンなどの不飽和脂質から構成されており[66]、その炭素間二重結合が ROS による酸化を受けやすいと考えられる。赤血球膜の化学構造的な酸化変性は上述のように物理化学的性質の変化をきたし、赤血球変形能の低下を惹起することが考えられる。先行研究では、ヒト介入試験において、カロテノイドの一種であるルテインやアスタキサンチンの経口摂取により、赤血球における過酸化脂質量が低減することが報告されている[11, 12]。これらはアスタキサンチンやルテインが赤血球に分布し、その抗酸化力によって赤血球膜の脂質過酸化を抑制したものと考えられている。

著者は第1章において、カロテノイドと ROS の化学反応論から、カプサンチンやミチロキサンチンといった五員環構造を有するカロテノイドが優れた抗酸化活性を示すことを明らかにした。さらに第2章においては、カプサンチンを含むパプリカ由来カロテノイドの経口摂取により、カプサンチンをはじめとしたカロテノイドが血漿および血液に移行し、血液中のカロテノイド濃度の上昇効果をもたらすことを明らかにした。さらに、その上昇効果は血漿よりも赤血球で顕著であることを見出した。これらの結果より、カプサンチンを含むパプリカ由来カロテノイドは、経口摂取によって赤血球へ移行し、その優れた抗酸化力によって赤血球膜の酸化障害を抑制できるものと考えた。さらに、その結果として赤血球膜の酸化変性を抑制することで赤血球変形能の維持・改善に寄与し、全身への酸素運搬効率を高められると推測した。しかしながら、現状では赤血球変形能やその酸素運搬能力を直接的に評価するための適切な指標が見当たらない。そこで著者は有酸素運動負荷条件下での酸素摂取量を指標としたヒト介入試験を実施することとした。

冒頭で述べたように、筋肉はエネルギーおよび酸素の消費量が大きい組織である。運動負

荷時にはさらにそれらは顕著となり、活動組織での酸素需要の増大に伴い、酸素消費の亢進および多量の ROS が発生する[67]。そのような条件下においては、生体内における酸素運搬能力が極めて重要となる。そこで本章では、ヒトを対象としたパプリカ由来カロテノイドの摂取による運動機能改善効果の検証を目的として、一定強度の有酸素運動条件下における、呼気ガス分析による酸素摂取量を評価指標としたプラセボ対照二重盲検並行群間比較試験を実施することとした。

3-2. 実験方法

3-2-1. 被験物質および被験食の調製

被験物質であるパプリカ由来カロテノイドは第2章と同様、グリコ栄養食品株式会社 (Osaka, Japan) から提供されたパプリカ色素製剤「PapriX®」を使用し、それらを添加した飲料を調製し被験食とした。パプリカ群およびプラセボ群の被験食の栄養組成を Table 3-1 に示した。パプリカ由来カロテノイドの添加により、パプリカ群の被験食はオレンジ色を呈する。被験食（飲料）の容器は内容物を判別できない形状であったが、盲検性を高めるため、プラセボ群の被験食についてはごく微量の人工着色料にてオレンジ色に着色し、両被験食の外観に差がないように調製した。

パプリカ群の被験食に含まれるカロテノイドの組成は、Table 2-2 と同等であるが、本ヒト介入試験は機能性表示食品制度に準じて、機能性関与成分の定量を第三者機関分析として実施することとした。具体的には、(一財) 日本食品分析センターにおいて受託分析が可能である総キサントフィル量、カプサンチン量、 β -クリプトキササンチン量を定量した (Table 3-2)。総キサントフィル量はカラムクロマトグラフィーでカロテン類を除去した後にモル吸光係数を用いて溶液の吸光度より算出され、カプサンチンおよび β -クリプトキササンチンは HPLC 分析により標品の検量線を用いて算出される。

Table 3-1 Ingredient of the test beverage

| (A) | | (B) | |
|-----------------------|----------|-----------------------|----------|
| Ingredient | g/100 mL | Ingredient | g/100 mL |
| Cyclic dextrin | 3.0 | Cyclic dextrin | 3.0 |
| Sucrose | 7.0 | Sucrose | 7.0 |
| Anhydrous citric acid | 0.18 | Anhydrous citric acid | 0.18 |
| Sodium citrate | 0.12 | Sodium citrate | 0.12 |
| Sodium chloride | 0.005 | Sodium chloride | 0.005 |
| Potassium chloride | 0.008 | Potassium chloride | 0.008 |
| PapriX® | 0.5 | PapriX® | — |

(A) The test beverage for paprika group (B) The test beverage for placebo group
PapriX is the commercial formulation used for the source of paprika carotenoid in this study.

Table 3-2 Carotenoid contents in the test beverage for paprika group

| Carotenoids | mg / 100 mL |
|-------------------|-------------|
| Total xanthophyll | 4.50 |
| Capsanthin | 2.50 |
| β-Cryptoxanthin | 0.25 |

These were analyzed by Japan Food Research Laboratories.

3-2-2. 被験者および試験方法

本試験はヘルシンキ宣言の主旨に従い被験者への十分な説明と同意を取得し、福島大学研究倫理委員会により承認されたプロトコルに従って実施された。

試験デザインは、プラセボ対照二重盲検並行群間比較試験であった。被験者は福島大学陸上競技部に所属する健常な女性 14 名で、パプリカ由来カロテノイド摂取群（以下、パプリカ群）7 名とプラセボ摂取群（以下、プラセボ群）7 名の 2 群へ振り分けられた。パプリカ群は 19.7±0.5 才、体重 51.3±6.6 kg、プラセボ群は 20.0±0.0 才、体重 54.2±4.7 kg であった。被験者は 4 週間、毎日朝と晩に Table 3-1 記載の被験食（飲料）を 100 mL ずつ、一日あたり合計 200 mL を摂取した。摂取前（0 週目）と摂取後（4 週目）にトレッドミル運動による評価を実施した。

また、被験者は陸上競技部に所属しているため、日常的な一定のトレーニングを実施しており、試験期間中も通常通りのトレーニングを継続した。摂取開始 1 週目、3 週目、4 週目は 1 日あたり 3 時間を週 5 日、2 週目は冬季オフ期間であり、毎日 1 時間程度の軽いトレーニングを実施した。試験デザインを Fig. 3-1 に示した。

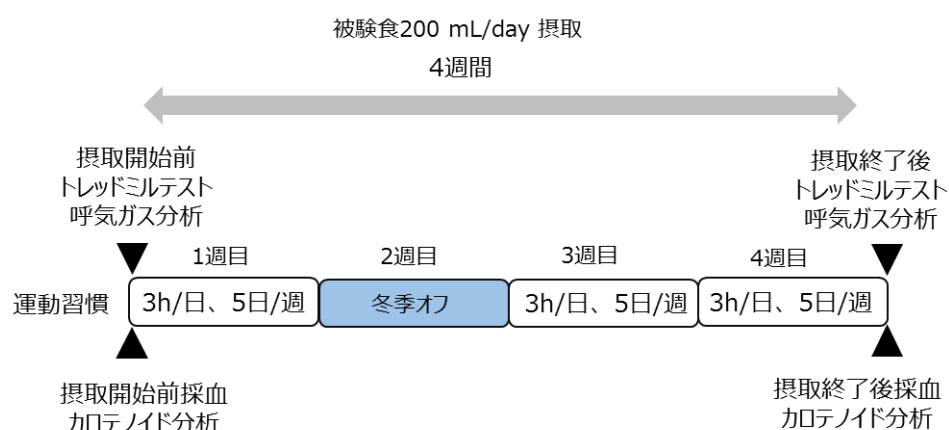


Fig. 3-1 Experimental design

3-2-3. 血中カロテノイドの分析

ヘパリン入り真空採血管にて 10 mL の採血を行い、室温にて 30 分間放置後、 $1,000\times g$ 、10 min 室温下で遠心分離を行い、血漿を採取した。回収した血漿は -80°C で保管した。前処理および分析は、2-2-3 と同様の方法で実施した。

3-2-4 トレッドミル運動における呼気ガス分析

各被験者は摂取開始前（0 週目）および摂取終了後（4 週目）に有酸素運動として 12 km/h の速度で 20 分間のトレッドミル運動を実施した。呼気ガス分析装置（Aero Monitor AE300S, Minato Medical Science, Osaka, Japan）を用い、トレッドミル運動開始前 2 分間の安静時、および 20 分間のトレッドミル運動中、5 分毎（0-5 分、5-10 分、10-15 分、15-20 分）の酸素摂取量（ $\dot{V}\text{O}_2$ ）二酸化炭素排出量（ $\dot{V}\text{CO}_2$ ）、換気量（ $\dot{V}\text{E}$ ）を測定した。呼吸商（RQ）は $\dot{V}\text{CO}_2 / \dot{V}\text{O}_2$ として算出した。

3-2-5. 統計解析

実験結果は平均値±標準偏差（S.D.）として評価した。群間比較については Welch's の t 検定を用いた。群内比較については、対応のある t 検定を用いて有意差検定を行った。いずれの検定においても有意水準は 5% 未満とした。

3-3. 結果および考察

3-3-1. 血漿カロテノイド濃度

血漿カロテノイド濃度を Table 3-3 に示した。パプリカ群では、被験食のパプリカ由来カロテノイドに含有されていた、カプサンチン、 β -クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、クリプトカプシン、ククルビタキサンチン A、および総カロテノイド、総キサントフィルの血漿濃度について摂取前後での有意な上昇が確認された。(カプサンチン： $p < 0.001$ 、 β -クリプトキサンチン： $p = 0.015$ 、ゼアキサンチン： $p = 0.061$ 、クリプトカプシン： $p < 0.001$ 、ククルビタキサンチン A： $p = 0.042$ 、総カロテノイド： $p = 0.01$ 、総キサントフィル： $p = 0.007$)。一方でプラセボ群では摂取前後においていずれのカロテノイドについても有意な変化は認められなかった。また群間比較においてもパプリカ群はプラセボ群に対し、各カロテノイド濃度が有意に上昇した(カプサンチン： $p < 0.001$ 、 β -クリプトキサンチン： $p = 0.011$ 、ゼアキサンチン： $p = 0.050$ 、クリプトカプシン： $p < 0.001$ 、ク、総カロテノイド： $p = 0.043$ 、総キサントフィル： $p = 0.014$)。これらの結果から、本試験においてもパプリカカロテノイドの摂取は循環血液中のカロテノイド濃度を上昇させることが示され、第 2 章の結果と一致した。本試験においては分析の負担軽減の側面から血漿のみの評価としたが、第 2 章と同様にして、血漿と共に赤血球中のカロテノイド濃度も上昇していることが予想される。

本研究における摂取開始前の血漿中の総カロテノイド濃度は、プラセボ群 2914.0 ± 595.5 pmol/mL、パプリカ群 2942.9 ± 494.1 pmol/mL であり、第 2 章における摂取開始前の総カロテノイド濃度 1907.8 ± 371.7 pmol/mL (Table 2-3) と比較して高かった。これらは被験者の違いや、試験実施時期について前者が冬季、後者が夏季であり、季節による食習慣の違いなどが影響していると考えられる。しかしながら、初期値に関係なく、パプリカ由来カロテノイドの摂取によって血液中のカロテノイド濃度が有意に上昇することが確認された。

Table 3-3 Carotenoids contents and composition in plasma before and after ingestion of the test beverage.

| Carotenoids (pmol/ml) | Placebo group | | | Paprika group | | | Between-group | |
|--------------------------|--------------------|------------------------|----------------|------------------|------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|
| | Before ingestion | 4weeks after ingestion | <i>p</i> value | Before ingestion | 4weeks after ingestion | <i>p</i> value | <i>p</i> value (Before) | <i>p</i> value (4 weeks) |
| Total-carotenes | 1758.3 ± 429.3 | 1696.7 ± 341.3 | 0.557 | 1526.1 ± 445.6 | 2014.0 ± 533.4 | 0.014 | 0.340 | 0.214 |
| b-Cryptoxanthin | 797.3 ± 168.0 | 877.4 ± 177.7 | 0.424 | 877.8 ± 290.6 | 1377.6 ± 372.6 | 0.015 | 0.540 | 0.011 |
| 3-OH-b,e-Caro-3'-one | 29.6 ± 9.1 | 33.1 ± 9.0 | 0.613 | 35.6 ± 6.0 | 29.9 ± 7.1 | 0.037 | 0.169 | 0.470 |
| Cryptocapsin | - | - | - | - | 2.8 ± 0.8 | < 0.001 | - | < 0.001 |
| Cucurbitaxanthin A | 18.0 ± 5.2 | 19.4 ± 6.4 | 0.442 | 19.0 ± 2.9 | 25.8 ± 6.9 | 0.042 | 0.646 | 0.099 |
| Capsanthone | - | - | - | - | 24.6 ± 12.5 | 0.002 | - | < 0.001 |
| Lutein | 298.6 ± 57.5 | 301.2 ± 65.5 | 0.939 | 373.5 ± 116.6 | 348.3 ± 137.9 | 0.689 | 0.162 | 0.436 |
| Zeaxanthin | 12.4 ± 3.8 | 15.1 ± 6.2 | 0.226 | 16.1 ± 3.7 | 43.5 ± 30.7 | 0.061 | 0.089 | 0.050 |
| Capsanthin | - | - | - | - | 41.8 ± 14.8 | < 0.001 | - | < 0.001 |
| Total carotenoids | 2914.0 ± 595.5 | 2942.9 ± 494.1 | 0.871 | 2848.2 ± 645.4 | 3908.2 ± 964.0 | 0.007 | 0.846 | 0.043 |
| Total xanthophylls | 1155.724 ± 205.916 | 1246.2 ± 201.8 | 0.418 | 1322.1 ± 281.6 | 1894.2 ± 506.6 | 0.012 | 0.233 | 0.014 |

Total carotenes are the sum of α -carotene, β -carotene, and lycopene. Total carotenoids are the sum of total-carotenes, β -cryptoxanthin, 3-hydroxy- β , ϵ -caroten-3'-one, cryptocapsin, cucurbitaxanthin A, capsanthone, lutein, zeaxanthin, and capsanthin. Total xanthophylls is the sum of β -cryptoxanthin, 3-hydroxy- β , ϵ -caroten-3'-one, cryptocapsin, cucurbitaxanthin A, capsanthone, lutein, zeaxanthin, and capsanthin.

This accounts for about 90 percent of all carotenoids in plasma. Values are expressed as the mean \pm SD. Welch's t-test was used for Between group comparisons, while within-group comparisons were performed with the paired t-test.

(*J. Phys. Fitness Sports Med.* **2018**, 7, 247-252., Table 1 より一部改変)

3-3-2. トレッドミル運動中における呼気ガス分析

トレッドミル運動前の安静時 2 分間、および 20 分間のトレッドミル運動中における 5 分毎 (0-5 min、5-10 min、10-15 min、15-20 min) の $\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}CO_2$ 、 $\dot{V}E$ 、RQ の分析結果を Fig. 3-2 に示した。摂取前においては、パブリカ群とプラセボ群でいずれの項目においても有意差は認められなかった (Fig.3-2 A, B, C,D)。したがって、摂取前において、本評価項目での両群の基礎的運動能力に差はないものと考えられた。一方で、摂取 4 週間後において、パブリカ群はプラセボ群に対し、運動開始 5 分後より有意に $\dot{V}O_2$ および $\dot{V}CO_2$ が低下し、運動後半、すなわち負荷が大きくなるほど有意差が大きくなることが確認された (Fig.3-2 E, F)。また、 $\dot{V}E$ および RQ についてもパブリカ群はプラセボ群に対し、運動開始 10 分後より有意に低下することが確認された (Fig.3-2 G, H)。

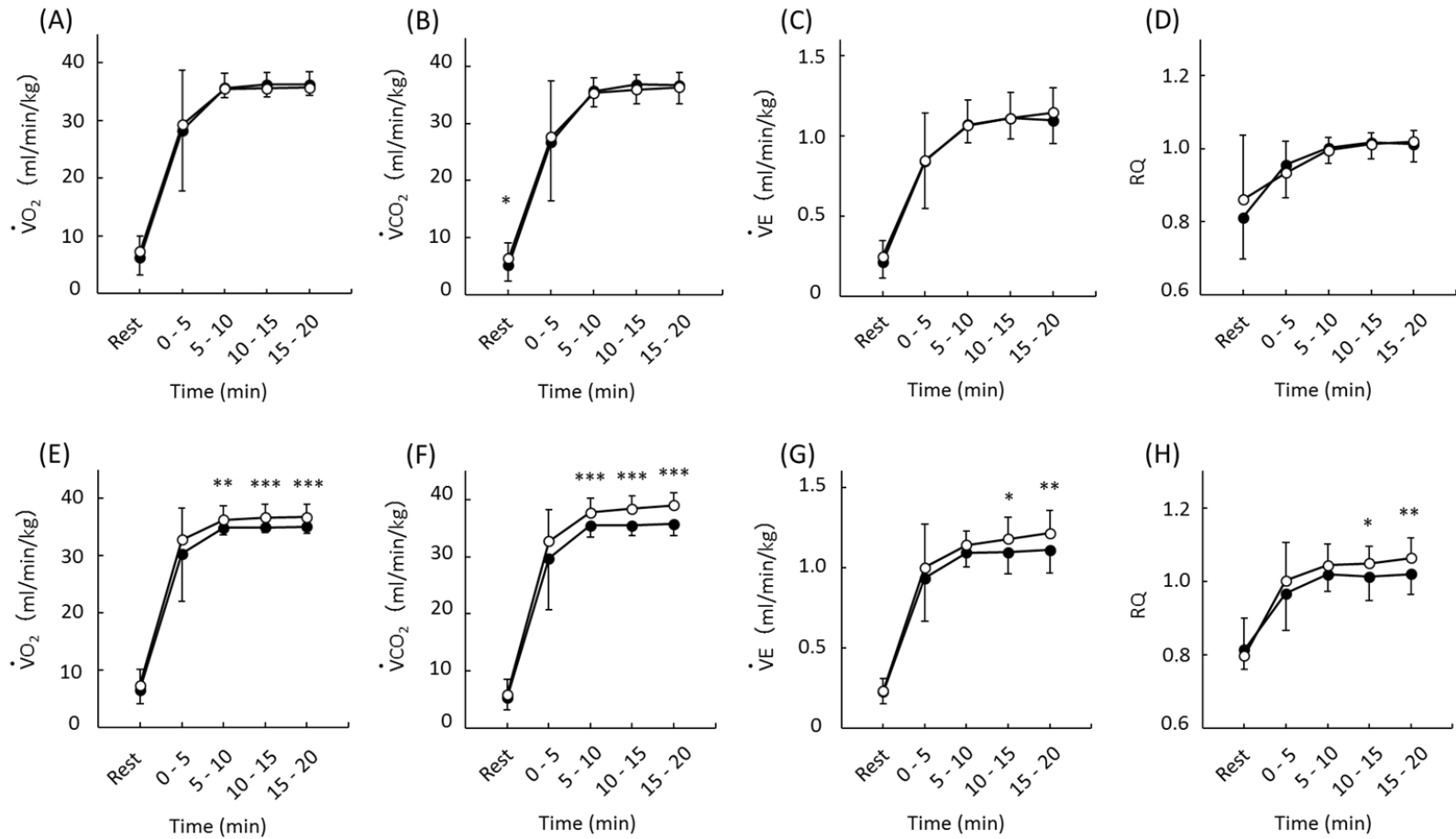


Fig. 3-2 Changes of respiratory parameters during treadmill exercise.

(A, B, C, D) before intervention. (E, F, G, H) after the 4-week intervention. Placebo group (○) and paprika group (●). Data are expressed as the mean \pm SD.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. placebo group. Welch's t -test was used for between-group comparison

(*J. Phys. Fitness Sports Med.* **2018**, 7, 247-252., Fig. 1)

呼吸ガス分析によって得られる $\dot{V}O_2$ は呼吸により生体内に取り込まれる酸素量（酸素摂取量）を、 $\dot{V}CO_2$ は呼気から排出される二酸化炭素量（二酸化炭素排出量）を、 $\dot{V}E$ は肺でのガス交換量（換気量）の指標である。いずれの指標も運動負荷により上昇することが知られている。トレッドミルやエルゴメーターによる運動負荷条件下における呼吸ガス分析によって得られるこれらの数値は、医療分野やスポーツ科学分野で、心肺機能や全身持久力の評価指標として汎用される。

本研究結果より、パプリカ由来カロテノイドの摂取によって一定強度（12 km/h, 20 min）の有酸素運動下における $\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}CO_2$ および $\dot{V}E$ がプラセボ群と比較して有意に低下することが実証され、パプリカ由来カロテノイドの摂取により同強度の運動をより少ない酸素摂取量で行えるようになり、持久力が向上したことが示唆された。

一定強度の有酸素運動負荷条件下における酸素摂取量をより低く抑えるという概念は、スポーツ科学分野において「ランニングエコノミー」と表現されている。ランニングエコノミーは、同じ距離をどれだけのエネルギー消費（＝酸素消費）で走行可能か、つまり「燃費」を示し、個人の運動パフォーマンスにおける重要な因子とされている[68, 69]。これらから、パプリカ由来カロテノイドの経口摂取は酸素摂取量の低減を介した持久力の向上により、運動機能の改善に有用であることが期待される。

また他のヒト介入試験において、本研究と同一被験物質であるパプリカ由来カロテノイドの継続的な経口摂取によって、一定強度の有酸素運動負荷条件下における心拍数の上昇が有意に抑制されることが報告されている[70]。運動負荷時の心拍数はエネルギー消費量の算出に用いられ、心拍数の上昇に伴ってエネルギー消費量が増加することが知られている[71]。つまり、一定強度の有酸素運動負荷下における心拍数低下は、すなわち、エネルギー消費が低下することを示しており、本研究結果と一致している。

本研究で示された生理機能の詳細なメカニズムについては明らかとなっていないが、緒言で述べたように、パプリカ由来カロテノイドの継続的な経口摂取により、赤血球中のカロテノイド、特に抗酸化力に優れるカプサンチンの濃度が上昇し、有酸素運動負荷によるエネルギー消費（酸素消費）に伴い多量に発生する ROS による赤血球の酸化障害が抑制されたと著者は推察している。それらにより、赤血球変形能が改善し、全身への酸素運搬効率が高まった可能性が考えられる。先行研究にて、赤血球におけるエイコサペンタエン酸（EPA）濃度と赤血球変形能に相関性が認められることが報告されており、赤血球膜における EPA の存在がその膜流動性を高めていることが指摘されている[72, 73]。また、最近の研究では、EPA の経口摂取により、赤血球変形能が改善し、運動負荷条件下における酸素摂取量（ $\dot{V}O_2$ ）が低減することが明らかにされている[74, 75]。EPA は赤血球膜のリン脂質を構成する多価不飽和脂肪酸であり、炭素間二重結合を多く含むため、ROS による酸化を受けやすい。上述の先行研究から、EPA の酸化変性による化学構造変化は、赤血球膜の物理化学的性質の変性を惹起し、赤血球変形能を低下させると考えられる。したがって、本研究において実証された効果の一因として、パプリカ由来カロテノイドが赤血球膜の EPA の酸化変性を抑制したことにより、赤血球変形能が改善したと推察される。

上述したように、有酸素運動負荷時にはミトコンドリアでのエネルギー産生の増加に伴っ

て ROS の発生量が増加することで、それらが様々な組織に障害を与えると考えられる。一方で、赤血球はミトコンドリアを持たない細胞である。赤血球の酸素運搬能の主体は Hb であり、Hb 1 分子中には、活性中心に二価鉄 (Fe^{2+}) が配位したヘムが 4 分子存在している。これらがそれぞれ酸素分子と結合し、オキシヘモグロビン (HbO_2) として酸素運搬の役割を果たしている。しかしながら、 HbO_2 は、必ずしも安定ではなく、結合した酸素分子 ($^3\text{O}_2$) によってヘムの活性中心にある Fe^{2+} が容易に三価鉄 (Fe^{3+}) に酸化され、酸素結合能力を失ったメトヘモグロビン (MetHb) へと変性する。同時に $^3\text{O}_2$ は $\cdot\text{O}_2^-$ へと還元され、新たな ROS を生じる[76] (Fig. 3-3)。

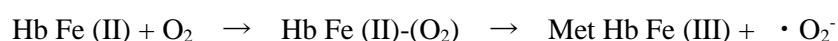


Fig. 3-3 Oxidation of Hb to MeHb

ミトコンドリアを持たない赤血球では、Hb から MetHb への自動酸化が主な ROS の発生部位と考えられる。血液中の Hb の約 3% が 1 日で自動酸化を受けるが、赤血球にはメトヘモグロビンの還元酵素群が存在しており、酸化還元反応が常に起きているため、実際の血液中の MeHb は全 Hb の 1% 程度と報告されている[77]。しかしながら、Hb→MetHb の過程で発生した $\cdot\text{O}_2^-$ が上述の赤血球の酸化障害に関わることが予想される。特に、安静時と比較して酸素要求量が 10 倍以上に増大する有酸素運動中には、一時的に MetHb の生成およびその生成過程での $\cdot\text{O}_2^-$ の発生が増大することが予想される。したがって、有酸素運動負荷条件下においては、筋肉など赤血球外でのエネルギー産生時に発生する ROS に加えて、Hb から MetHb への生成過程で赤血球内部にて発生する ROS の両者が赤血球に酸化障害を与えることが予想される。

本研究により、パプリカ由来カロテノイドの継続的な経口摂取によって、有酸素負荷運動時における酸素摂取量の有意な低下が実証され、運動機能向上効果が示された。そのメカニズムとして、赤血球に蓄積したパプリカ由来カロテノイドが、赤血球内外で発生した ROS の消去活性を発揮することによって、赤血球の酸化障害、特に赤血球変形能に関わる EPA をはじめとした赤血球膜の不飽和脂肪酸の過酸化を抑制したものと考えられた。しかしながら、これらメカニズムに関しては現状では推測の域を出ないため、直接的な赤血球変形能の評価や EPA を含めた赤血球膜構成成分の過酸化物の評価など、メカニズムの解明を今後の課題として研究を継続する。

3-4. 小括

本章においては、第1章にて示されたプサンチンが優れた抗酸化活性を有することと、第2章にて示された、カプサンチンを豊富に含有するパプリカ由来カロテノイドの経口摂取によって赤血球中のカロテノイド濃度が増大することから、赤血球機能における抗酸化の重要性に着目した。赤血球膜はその膜構成成分として不飽和脂肪酸を豊富に含み、また、酸素と常に接する細胞であるために、不飽和脂肪酸の炭素間二重結合がROSによる酸化障害を受けやすい。赤血球膜の酸化障害による化学構造変化は、それらの物理化学的性質を変性させ、赤血球変形能の低下を惹起すると考えられる。赤血球変形能は全身への酸素供給に関わる重大な因子である。これらから、著者はパプリカ由来カロテノイドの経口摂取は、赤血球中の抗酸化力を増大させ、赤血球膜の酸化障害抑制に寄与し、全身への酸素供給の側面において優れた生理機能を発揮できるのではないかと考えた。それらの評価指標として、酸素要求量の増大ならびに多量のROSが想定される有酸素運動負荷条件下での効果検証を実施することとし、プラセボ対照二重盲検群間比較試験を実施した。同程度の運動能力を有する被験者をパプリカ由来カロテノイド摂取群とプラセボ摂取群に分け、4週間に渡る被験食摂取期間の前後で、トレッドミルによる同強度の有酸素運動負荷を行い、運動中の呼気ガス分析を行った。その結果、摂取4週間後、パプリカ群はプラセボ群に対し、有意に $\dot{V}O_2$ 、 $\dot{V}CO_2$ およびVEが低下することが確認され、パプリカ由来カロテノイドの摂取により同強度の運動をより少ない酸素の取り込み量で行えるようになり、運動能力が改善することが明らかとなった。

疾病、特に生活習慣病の予防において運動は重要な要素であり、運動能力の向上は運動習慣の改善に有用である。本研究では試験開始時点での基本的身体能力の統一という観点から、陸上競技部に所属するアスリートを対象としたが、今後、一般人を対象とする研究が必要である。また、本研究では、赤血球変形能改善による酸素供給効率の改善に着目したが、赤血球変形能は血液全体の粘性を規定する要素の一つでもあり、高血圧や血栓などの疾病予防効果が期待される。

総括

現在、我が国では少子高齢化に伴う国民医療費の増加による財政の圧迫が問題となっている。健全な医療制度の維持ならびに健康長寿社会を実現するために、予防医療を発展させ、国民の健康の維持・増進を図ることは必須の課題である。その中で、食品成分のもつ様々な生理機能や有効性を明らかにし、科学的根拠を前提にした「食」による予防医療へのアプローチは、人々の健康の維持向上に大きな貢献を果たすことが期待される。国による特定保健用食品制度や機能性表示食品制度を背景に、機能性食品の研究開発が加速している。その一方、試験設計上の問題点や基礎的な知見の欠如などにより、科学的根拠への疑義が生じるケースも散見され、食品の生理機能研究を取り巻く多くの課題が浮き彫りとなっていることも事実である。医薬品と機能性食品では、研究開発過程における基本的な考え方、必要とされるエビデンスやバックデータの相違点も多い。今後、食品由来の機能性成分を予防医療の一旦として積極的に活用していくためには、その研究開発過程においてより積極的に医学的・薬学的な視点を取り入れることが重要であると著者は考えている。

そこで本研究では、近年食品由来の機能性成分の中でも特に、抗酸化物質として数多くの機能性食品に応用されているカロテノイドについて、基礎的な知見の充実を目的とし、研究に着手した。カロテノイドはその強力な抗酸化力に付随する生体内での様々な生理機能の発揮が期待され、*in vitro*での試験からヒトを対象とした介入試験まで多くの研究が実施されてきた。しかしながら 1990 年代に相次いで実施された β -カロテンによるがん予防効果の検証を目的とした大規模介入試験は全てが失敗に終わり、喫煙者においては β -カロテンの過剰投与によって肺がん罹患率の上昇を引き起こし、その有用性に多くの疑問が抱かれたまま現在に至る。その原因として β -カロテンのプロオキシダント説が最も根強く指摘されているが、カロテノイドによる ROS の消去は、 $^1\text{O}_2$ に対する物理的消去であるためにプロオキシダントにはならないという考え方が一般的であり、真相は明らかとなっていない。著者は、カロテノイドと ROS の化学反応論に関する議論の欠如が重大な課題であると考え、カロテノイドを今後も有用な抗酸化物質として機能性食品へ適切に活用していくためには、この問題についての詳細な検証が必要と考え、本研究にてそれらの検証に着手した。

第 1 章では、これまで詳細な議論がされてこなかったカロテノイドと ROS の化学反応論の検証を目的に、LC-MS 法と ESR スピントラップ法の併用により、カロテノイドと ROS の直接的な化学反応における反応産物の解析とその化学反応機構について考察した。また、カロテノイドの ROS に対する化学反応性と抗酸化活性の関係性について評価した。その結果、カロテノイドは $^1\text{O}_2$ との化学反応によりエンドペルオキシド型のカロテノイドを、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ との化学反応によりエポキシド型のカロテノイドを生成した。すなわち、カロテノイドは ROS に対し、従来知られていた $^1\text{O}_2$ の物理的消去活性だけでなく、自身の構造中への付加反応による $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ の化学的消去活性を有することが明らかとなった。さらに、カロテノイドの ROS に対する消去活性は、その化学反応性に大きく依存することが明らかとなった。 $^1\text{O}_2$ 消去は主にポリエン鎖の共役系による物理的消去であり、 $^1\text{O}_2$

に対する化学反応性が低く、化学構造の安定性の高いカロテノイドが強い消去活性を示す一方で、 $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ の消去は化学的消去反応であるため、それらに対する化学反応性が高いカロテノイドが高い消去活性を示した。この化学反応性はカロテノイドの末端構造により大きく異なっており、本研究において評価対象物質とした、 β -カロテン、ゼアキサンチン、アスタキサンチン、カプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチン、フコキサンチンの中では、五員環構造を有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチンが最も抗酸化活性に優れるカロテノイドであることが示された。一方で、過去に脚光を浴び、多くの大規模ヒト介入試験が実施されてきた β -カロテンは、いずれのROSに対しても消去活性が低いことが明らかとなった。これらの結果より、五員環構造を有するカロテノイドは抗酸化物質として、ヒトでの優れた生理機能の発揮が期待されるものと考えた。

これらの結果から、五員環構造を有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチンの経口摂取は、血液中の抗酸化力の向上を実現できるものと考えた。血液中の抗酸化力の向上は、酸化LDLの生成抑制や赤血球の酸化障害の抑制をはじめとし、血液や血管の機能維持に寄与することにより全身の健康維持へ貢献が期待できるものと考えた。しかしながら、これら五員環構造を有するカロテノイドのヒトへの吸収性について詳細な報告が極めて少ない。そこで第2章では、健康成人を対象にカプサンチン、カプソルビンをはじめ8種類のカロテノイドを含有するパプリカ由来カロテノイドのサプリメントーションを実施し、それらのヒト血中への吸収と分布、ならびに血中カロテノイド全体に及ぼす影響について評価を行った。その結果、パプリカ由来カロテノイドに含有されるカプサンチンやククルビタキサンチンA、 β -クリプトキサンチンなどの血中濃度上昇が確認され、経口摂取によってヒトの循環血液中へ吸収されることが明らかとなった。カロテノイドの種類により吸収効率は異なるものの、血中の総カロテノイド濃度の上昇が確認された。特に、その上昇効果は血漿よりも赤血球で顕著であった。

第1章にて示されたカプサンチンが優れた抗酸化活性を有すること、第2章にて示された、カプサンチンを豊富に含有するパプリカ由来カロテノイドの経口摂取によって赤血球中のカロテノイド濃度が増大すること、これら2点から、赤血球機能における抗酸化の重要性に着目した。赤血球膜の酸化障害は、全身への酸素供給に関わる重大な因子である赤血球変形能の低下を惹起すると考えられる。これらから、著者はパプリカ由来カロテノイドの経口摂取は、赤血球中の抗酸化力を増大させることで赤血球膜の酸化障害抑制に寄与し、全身への酸素供給の側面において優れた生理機能を発揮できるのではないかと考えた。それらの評価指標として、酸素要求量の増大ならびに多量のROSが想定される有酸素運動負荷条件下での効果検証を実施した。被験者をパプリカ摂取群とプラセボ群に分け、4週間の介入を行い、摂取前後でトレッドミルによる同強度の有酸素運動負荷を行い、運動中の呼気ガス分析を行った。その結果、摂取4週間後、パプリカ群はプラセボ群に対し、有意に $\dot{V}\text{O}_2$ 、 $\dot{V}\text{CO}_2$ 、 $\dot{V}\text{E}$ が低下することが確認され、パプリカ由来カロテノイドの摂取により同強度の運動をより少ない酸素の取り込み量で行えるようになる、すなわち運動能力が改善したことが示唆された。

疾病、特に生活習慣病の予防において運動は重要な要素であり、運動能力の向上は運動習

慣の改善に有用であることが期待できる。

本研究において、カロテノイドと ROS の化学反応機構を検証し、五員環構造を有するカロテノイドが抗酸化活性に優れることを見出した。続いて五員環構造を有するカプサンチンを豊富に含有するパプリカ由来カロテノイドのヒト介入を実施し、赤血球への優れた移行性と運動機能改善効果明らかにした。しかしながら、パプリカ由来カロテノイドの赤血球機能への寄与についてのメカニズムは不明であり、今後の課題とし研究を続ける所存である。

参考文献

1. 厚生労働省 平成 29 年度 国民医療費の概況.
2. Joseph A. Knight. Free radicals: Their history and current status in aging and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1998**, 28, 331–346.
3. Hercberg Serge. The history of beta-carotene and cancers: From observational to intervention studies. What lessons can be drawn for future research on polyphenols? *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 218–222.
4. Vishal Tandon, B.M. Gupta and Ritu Tandon. Free radicals / reactive oxygen species: commentary. *JK Pract.* **2005**, 12, 143–138.
5. Hirotaka Imai and Yasuhito Nakagawa. Structure and functions of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J. Japan Oil Chem. Soc.* **1999**, 48, 293–301.
6. Graham W. Burton and Keith Usherwood Ingold. Vitamin E: Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 194–201.
7. Yukie Niwa, Kohichi Ishimoto and Tadashi Kanoh. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood.* **1990**, 76, 835–841.
8. Mikio Kinoshita, Shinichi Oikawa, Kyoko Hayasaka, Akihiro Sekikawa, Tazuko Nagashima, Takayoshi Toyota and Teruo Miyazawa. Age-related increases in plasma phosphatidylcholine hydroperoxide concentrations in control subjects and patients with hyperlipidemia. *Clin. Chem.* **2000**, 46, 822–828.
9. Tazuko Nagashima, Shinichi Oikawa, Yoshitake Hirayama, Yoshihisa Tokita, Akihiro Sekikawa, Yasushi Ishigaki, Rie Yamada and Teruo Miyazawa. Increase of serum phosphatidylcholine hydroperoxide dependent on Glycemic control in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2002**, 56, 19–25.
10. Takashi Maoka. Biological functions of carotenoids. *Shokuhin-Rinshou eiyou.* **2007**, 2, 3–14.
11. Kiyotaka Nakagawa, Takehiro Kiko, Taiki Miyazawa, Carpentero Burdeos Gregor, Fumiko Kimura, Akira Satoh and Teruo Miyazawa. Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *Br. J. Nutr.* **2011**, 105, 1563–1571.
12. Kiyotaka Nakagawa, Takehiro Kiko, Keiji Hatade, Sookwong Phumon, Hiroyuki Arai and Teruo Miyazawa. Antioxidant effect of lutein towards phospholipid hydroperoxidation in human erythrocytes. *Br. J. Nutr.* **2009**, 102, 1280–1284.
13. Akihiko Nagao. Absorption and function of dietary carotenoids. *Forum Nutr.* **2009**, 61, 55–63.
14. Takehiro Kiko, Kiyotaka Nakagawa, Tsuyoshi Tsuduki, Toshihide Suzuki, Hiroyuki Arai and Teruo Miyazawa. Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers. Dis.* **2012**, 28, 593–600.

15. Minoru Sugiura, Mieko Nakamura, Kazunori Ogawa, Yoshinori Ikoma and Masamichi Yano. High serum carotenoids associated with lower risk for the metabolic syndrome and its components among Japanese subjects: Mikkabi cohort study. *Br. J. Nutr.* **2015**, 114, 1674–1682.
16. Liwen Feng, Kailai Nie, Hui Jiang and Wei Fan. Effects of lutein supplementation in age-related macular degeneration. *PLoS One.* **2019**, 14, e0227048.
17. Masaki Tanito, Akira Obana, Yuko Gohto, Shigetoshi Okazaki, Wernerand Gellermann and Akihiro Ohira. Macular pigment density changes in Japanese individuals supplemented with lutein or zeaxanthin: Quantification via resonance raman spectrophotometry and autofluorescence imaging. *Jpn. J. Ophthalmol.* **2012**, 56, 488–496.
18. Wolfgang Schalch, William Cohn, Felix M. Barker, Wolfgang Köpcke, John Mellerio, Alan C. Bird, Anthony G. Robson, Fred F. Fitzke and Frederik J.G.M. van Kuijk. Xanthophyll accumulation in the human retina during supplementation with lutein or zeaxanthin - the LUXEA (LUtein Xanthophyll Eye Accumulation) study. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 458, 128–135.
19. Torresani María Elena. Association between cardiovascular risk and lycopene consumption in Pre- and Post-Menopausal Women. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2009**, 59, 120–127.
20. Marja-Leena Silaste, Georg Alftan, Antti Aro, Y. Antero Kesäniemi and Sohvi Hörkkö Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. *Br. J. Nutr.* **2007**, 98, 1251–1258.
21. Richard Peto, Richard Doll, J. D. Buckley and M. B. Sporn. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature* **1981**, 290, 201–208.
22. The alpha-tocopherol beta carotene cancer prevention study group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* **1994**, 330, 1029–1035.
23. Gilbert S. Omenn, Gary E. Goodman, Mark D. Thornquist, John Balmes, Mark R. Cullen, Andrew Glass, James P. Keogh, Frank L. Meyskens, Barbara Valanis, James H. Williams, Scott Barnhart and Samuel Hammar. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **1996**, 334, 1150–1155.
24. Charles H. Hennekens, Julie E. Buring, JoAnn E. Manson, Meir Stampfer, Bernard Rosner, Nancy R. Cook, Charlene Belanger, Frances LaMotte, J. Michael Gaziano, Paul M. Ridker, Walter Willett, and Richard Peto. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **1996**, 334, 1145–1149.
25. I.-Min Lee, Nancy R. Cook, JoAnn E. Manson, Julie E. Buring and Charles H. Hennekens. Beta-carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: The women's health study. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, 91, 2102–2106.
26. William J. Blot, Jun-Yao Li, Philip R. Taylor, Wande Guo, Sanford Dawsey, Guo-Qing Wang, Chung S. Yang, Su-Fang Zheng, Mitchell Gail, Guang-Yi Li, Yu Yu, Buo-qi Liu, Joseph Tangrea, Yu-hai Sun, Fusheng Liu, Joseph F. Fraumeni, You-Hui Zhang, Jr. and Bing Li Nutrition.

- Intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, 85, 1483–1491.
27. James R. Marshall. β -Carotene: A miss for epidemiology. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, 91, 2068–2069.
 28. Christine M. Lee, Amy C. Boileau, Thomas W. M. Boileau, Alexa W. Williams, Kelly S. Swanson, Kasey A. Heintz and John W. Erdman, Jr. Review of animal models in carotenoid research. *J. Nutr.* **1999**, 129, 2271–2277.
 29. Kerri A. Slifka, Phyllis E. Bowen, Maria Stacewicz-Sapuntzakis and Susan D. Crissey. A survey of serum and dietary carotenoids in captive wild animals. *J. Nutr.* **1999**, 129, 380–390.
 30. Azusa Nishino, Takashi Ichihara, Kazuhisa Sugimoto, Takashi Kuriki, Hiroyuki Yasui, Takashi Maoka. Predicting organ carotenoids levels from analysis of plasma could lead to errors: A study in cynomolgus monkeys. *Nutr. Res.* **2019**, 61, 95–101.
 31. Guohua Cao, Emin Sofic and Ronald L. Prior. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, 22, 749–760.
 32. 今田 伊助, 佐藤 英介, 井上 正康. 生体における活性酸素・フリーラジカルの産生と消去. *化学と生物*. **1999**, 37, 411–419.
 33. Kota V. Ramana, Sanjay Srivastava and Sharad S. Singhal. Lipid peroxidation products in human health and disease 2014. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 2014, 162414.
 34. Junji Terao. Production and quenching of singlet molecular oxygen -Its role in oxidative stress. *Vitamins (Japan)*. **2016**, 90, 525–536.
 35. Ryo Yamauchi, Kakue Tsuchihashi and Koji Kato. Oxidation products of β -carotene during the peroxidation of methyl linoleate in the bulk phase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62, 1301–1306.
 36. H. D. Martin, Christoph Ruck, M. Schmidt, Simone Sell, Stefan Beutner, Bodo Mayer, and Robin Walsh. Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 2253–2262.
 37. Fiedor Joanna, Fiedor Leszek, Haessner Rainer and Scheer Hugo. Cyclic endoperoxides of beta-carotene, potential pro-oxidants, as products of chemical quenching of singlet oxygen. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, 1709, 1–4.
 38. Raphael C. Mordi, John C. Walton, Graham W. Burton, Lise Hughes, Keith Ingold U., David Lindsay A. and Douglas Moffatt J. Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron.* **1993**, 49, 911–928.
 39. Susumu Hama, Kanako Takahashi, Yuko Inai, Kanako Shiota, Ryota Sakamoto, Asako Yamada, Hiroyuki Tsuchiya Kiyoshi Kanamura, Eiji Yamashita and Kentaro Kogure. Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage. *J. Pharm. Sci.* **2012**, 101, 2909–2916.

40. Takashi Maoka, Yukiko Goto, Kaori Isobe, Yasuhiro Fujiwara, Keiji Hashimoto and Kooichi Mochida. Antioxidative activity of capsorubin and related compounds from paprika (*capsicum annuum*). *J. Oleo Sci.* **2001**, 50, 663–665.
41. Takashi Maoka, Kooichi Mochida, Mutsuo Kozuka, Yoshihiro Ito, Yasuhiro Fujiwara, Keiji Hashimoto, Fumio Enjo, Masakazu Ogata, Yoshitoshi Nobukuni, Harukuni Tokuda and Hoyoku Nishino. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *capsicum annuum* L. *Cancer Lett.* **2001**, 172, 103–109.
42. Akira Tsubokura, Hisashi Yoneda and Haruyoshi Mizuta. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1999**, 49, 277–282.
43. Yumiko Yamano, Masahiro Ohata, Akimori Wada. Stereocontrolled total synthesis of mytiloxanthin. *Carotenoid Sci.* **2015**, 20, 35–39.
44. József Deli, Péter Molnár, Zoltán Matus, Gyula Tóth, Andrea Steck and Hanspeter Pfander. Partial synthesis and characterization of capsokarpoanthins and 3,6-epoxycapsanthins. *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 1242–1253.
45. Carotenoids Hand Book, George Britton, Synnøve Liaaen-Jensen, Hanspeter Pfander Eds., Birkhäuser, Basel, Switzerland, **2004**.
46. Osamu Hirayama, Kyoko Nakamura, Syoko Hamada and Yoko Kobayashi. Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* **1994**, 29, 149–150.
47. Nobuyoshi Shimidzu, Masafumi Goto and Wataru Miki. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fish. Sci.* **1996**, 62, 134–137.
48. Tsimikas Sotirios. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2006**, 8, 55–61.
49. Rina Kato, Chihiro Mori, Keiko Kitazato, Satoru Arata, Takashi Obama, Masahiro Mori, Katsuhiko Takahashi, Toshihiro Aiuchi, Tatsuya Takano and Hiroyuki Itabe. Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, 29, 33–39.
50. Shunji Oshima, Fumihiro Ojima, Hideki Sakamoto, Yukio Ishiguro and Junji Terao. Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen-mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2306–2309.
51. Francesco Visioli, Patrizia Riso, Simona Grande, Claudio Galli and Marisa Porrini. Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *Eur. J. Nutr.* **2003**, 42, 201–206.
52. Eiichi Kotake-Nara and Akihiko Nagao. Intestinal absorption and metabolism of carotenoid. *Oleoscience.* **2012**, 12, 495–501.
53. Arun B. Barua and James A. Olson. Xanthophyll epoxides, unlike beta-carotene monoepoxides, are not detectably absorbed by humans. *J. Nutr.* **2001**, 131, 3212–3215.

54. Akira Asai, Lina Yonekura and Akihiko Nagao. Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans. *Br. J. Nutr.* **2008**, 100, 273–277.
55. Kristin L. Herron, Mary M. McGrane, David Waters, Ingrid E. Lofgren, Richard M. Clark, Jose M. Ordovas, and Maria Luz Fernandez. The ABCG5 polymorphism contributes to individual responses to dietary cholesterol and carotenoids in eggs. *J. Nutr.* **2006**, 136, 1161–1165.
56. Eiichi Kotake-Nara. Intestinal absorption of carotenoid. *J. Lipid Nutr.* **2012**, 21, 35–43
57. Barua Arun B. Intestinal absorption of epoxy- β -carotenes by humans. *Biochem. J.* **1999**, 339, 359–362.
58. Minoru Sugiura. Recent findings from nutritional epidemiologic studies about the relationship of β -cryptoxanthin and risk of lifestyle-related disease. *Oleoscience.* **2012**, 12, 515–523.
59. Agata Wawrzyniak, Jadwiga Hamulka, Emilie Friberg and Alicja Wolk. Dietary, anthropometric, and lifestyle correlates of serum carotenoids in postmenopausal women. *Eur. J. Nutr.* **2013**, 52, 1919–1926.
60. Kiyotaka Nakagawa, Takehiro Kiko, Keiji Hatade, Akira Asai, Fumiko Kimura, Sookwong Phumon, Tsuyoshi Tsuduki, Hiroyuki Arai and Teruo Miyazawa. Development of a high-performance liquid chromatography-based assay for carotenoids in human red Blood cells: Application to clinical studies. *Anal. Biochem.* **2008**, 381, 129–134.
61. Luis Almela, Jose M. Lopez-Roca, Maria E. Candela and Maria D. Alcazar. Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1606–1609.
62. Maria Isabel Minguez-Mosquera and Damaso Hornero-Mendez. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41, 1616–1620.
63. Maria Isabel Minguez-Mosquera and Damaso Hornero-Mendez. Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*capsicum annuum*) of the bola and agridulce varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1555–1560.
64. Masayoshi Nakayama, Yuji Utsunomiya, Akiko Komori, Yoshiko Murakami, Shunji Oshima and Takahiro Inakuma. Carotenoids in human blood plasma after ingesting paprika juice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, 64, 1096–1098.
65. Totu Maruyama, Keita Odashiro. Estimation of erythrocyte deformability and medical application. *J. Jpn. Soc. Biorheol.* **2013**, 27, 1-7.
66. Tamotsu Taketomi. Blood lipids. *油化学誌.* **1971**, 20, 127-134.
67. Shuji Oh-ishi. 運動と酸化ストレス -活性酸素と抗酸化防御のバランスの重要性- *IRYO.* **2015**, 64, 317-324.
68. Douglas L. Conley, Gary Krahenbuhl. Running economy and distance running performance of highly trained athletes, *Med. Sci. Sports Exerc.* **1980**, 12, 357-360.
69. Andrew M. Jones. The physiology of the world record holder for the women's marathon. *Int. J. Sports Sci. Coach.* **2006**, 1, 110-116.

70. Kyota Takami, Kaoru Kitagawa, Toshihiro Ishiko. A study on protocol for HR- $\dot{V}O_2$ relationships in estimating energy expenditure during sports activity. *中京大学体育学論叢*. **1995**, 37, 85-91.
71. Mizuki Yamada, Tomoka Matsuda, Takashi Ichihara, Mikako Sakamaki-Sunaga. Effects of orally ingested paprika xanthophylls on respiratory metabolism during endurance exercise: Study protocol for an interventional randomised controlled trial. *Heal. Sci. J.* **2020**, 14, 694.
72. Takashi Terano, Aizan Hirai, Tomohito Hamazaki, Satoru Kobayashi, Takao Fujita, Yasushi Tamura, Akira Kumagai. Effect of oral administration of highly purified eicosapentaenoic acid on platelet function, blood viscosity and red cell deformability in healthy human subjects. *Atherosclerosis*. **1983**, 46, 321-331.
73. Tomohito Hamazaki, Satoru Kobayashi, Masaharu Urakaze, Saburo Yano, Akira Kumagai. A possible mechanism how eicosapentaenoic acid increases red cell filterability. *Blood & Vessel*. **1985**, 16, 65-67.
74. Satoru Kobayashi, Ikuo Takaoka, Keisuke Sawaki, Takashi Terano, Aizan Hirai, Seiichi Fujishiro, Yasushi Saito, Shuuji Nakajima. Effects of fish oil ingestion on RBC membrane function of a long-distance runner in high-altitude training. *J. Lipid Nutr.* **2003**, 12, 75-84.
75. Fuminori Kawabata, Mitsuo Neya, Kei Hamazaki, Yuya Watanabe, Satoru Kobayashi, Tomoko Tsuji. Supplementation with eicosapentaenoic acid-rich fish oil improves exercise economy and reduces perceived exertion during submaximal steady-state exercise in normal healthy untrained men. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, 78, 2081-2088.
76. Keiji Shikama, Arika Matsuka, Yoshiaki Sugawara. The molecular mechanism of outoxidation for myoglobin and hemoglobin. *生物物理*, **2001**, 41, 74-71.
77. Jay Umbreit. Methemoglobin--it's not just blue: a concise review. *Am. J. Hematol.* **2007** 82, 134-44.

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学 代謝分析学分野 安井 裕之教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、ご助言およびご指導をいただきました京都薬科大学 生薬学分野 松田 久司教授、薬剤学分野 山本 昌教授に謹んで感謝いたします。

本研究に際して、終始御懇切なる御指導とご協力を賜りました一般財団法人 生産開発科学研究所 食物機能研究室 室長 眞岡 孝至 博士に深謝いたします。

本研究におけるヒト介入試験実施にあたり、多大なるご協力を賜りました福島大学人間発達文化学類 川本 和久 教授、二瓶 秀子 先生ならびに学生の皆様に深謝いたします。

本研究の遂行ならびに本論文の作成機会を与えて頂きました、江崎グリコ株式会社 取締役常務執行役員 健康科学研究所長 栗木 隆 博士に深く感謝いたします。あわせて諸種のご協力を頂きました、江崎グリコ株式会社 健康科学研究所の皆様、グリコ栄養食品株式会社 開発研究所の皆様に心から感謝致します。