

氏 名	島 元 啓
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2248 号
学位授与の日付	平 成 11 年 5 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Effect of Medium-chain Fatty Acids and Their Acylglycerols on Transport-enhancement of Hydrophilic Bioactive Substances through Caco-2 Cell Monolayer as a Human Intestinal Model (親水性生理活性物質の Caco-2 細胞層透過に対する中鎖脂肪酸化合物の促進効果)

論文調査委員 (主 査) 教 授 松 野 隆 一 教 授 吉 川 正 明 教 授 伏 木 亨

論 文 内 容 の 要 旨

中鎖脂肪酸化合物は、吸収が困難な親水性物質の腸管吸収を促進することが知られている。本論文は、中鎖脂肪酸化合物のこの特性を生かして親水性物質の腸管吸収に優れた機能性食品の構築を目指し、ヒト結腸ガン細胞由来の Caco-2 培養細胞系を腸管上皮細胞単一層膜のモデルとして、中鎖脂肪酸化合物の吸収促進特性を明らかにすることを目的として行った研究結果をまとめたもので4章よりなっている。

中鎖脂肪酸化合物は、その細胞への分配という物理化学的過程と細胞内での生化学的過程を経て tight junction をゆるめるという二段階により吸収促進効果を発現するものと考え、第1章では前者に着目した研究を行った。フィルター上に Caco-2 細胞を単一層状に培養して拡散セルに装着し、親水性透過物質のモデル物質としてのペニシリン V (PcV) の透過に対する、炭素数 6 (C6), 8, 10 の3種類の中鎖脂肪酸についてそれぞれ3種類のアシルグリセロール (TG, DG, MG) とナトリウム塩 (FANa) の透過促進効果を調べた。効果の指標としては PcV がアピカル (腸管) 側からバソラテラル (基底膜) 側へ透過する際の見かけの透過係数を使用した。その結果、C6 DG, C8 MG, C10 FANa, C10 MG の4種の化合物に透過促進効果が認められた。この結果は、無限希釈時に1モルの物質を添加した際に低下する表面張力という意味を持つ、新たに提案した表面エネルギー低下係数 (SELC) と良く相関した。また、C9 から C14 までの脂肪酸ナトリウム塩にも透過促進効果が認められたが、効果の現れる閾値濃度が存在し、その値は SELC に対し逆比例した。

食品の構築という観点から、吸収促進が腸管に不必要な傷害を与えるものであってはならない。第2章では、中鎖脂肪酸化合物の透過促進効果と細胞の傷害の関係を検討した。MTT 法 (MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) で測定したミトコンドリアのデヒドロゲナーゼ活性の低下をもって細胞の傷害の指標としたが、透過促進が生じるとほぼ同時に、ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼ活性が低下することが明らかとなった。また、透過促進効果と活性低下の間には同一物質内で比例関係が見られ、物質が異なると比例定数が異なった。

第3章においては、中鎖脂肪酸化合物により誘導された透過促進状態から、細胞が元の状態へ回復する過程を調べた。本章では透過促進の指標として、感度の高い細胞単一層膜の電気抵抗 (transepithelial electric resistance, TEER) を採用した。その結果、C6 DG, C8 MG, C10 MG, C10 FANa のいずれに接触した場合も、それぞれ固有の接触時間、濃度域において透過促進状態からの回復が可能であった。また、ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼ活性の回復も見られたこと、及び DNA 合成を阻害する aphidicolin 存在下での回復も見られたことから、この回復は細胞増殖によるものではなく、細胞の傷害からの回復によるものであることが示唆された。さらに透過促進効果と回復過程の濃度依存性を定量的に評価した結果、C10 FANa が特に回復しやすい透過促進剤であることが明らかとなった。C10 FANa の場合、細胞膜損傷の指標である LDH (lactate dehydrogenase) の漏出が、バソラテラル側に多いなど、他の物質と異なる挙動を示した。

最終章第4章では、透過促進剤が引き起こす細胞内での生化学的過程に着目した。すなわち、細胞内情報伝達物質であるカルシウムイオンの中鎖脂肪酸化合物の作用による細胞内濃度の変化を、カルシウムイオンと蛍光プローブとの相互作用により発する蛍光を共焦点レーザー走査顕微鏡で追跡した。中鎖脂肪酸化合物の中で特にC10FANaの場合には、作用させた後数分で、カルシウムイオンの濃度が急激に上昇し、約10分後に再び減少することが明らかにされた。透過促進はそれに引き続いて起こった。一方、tight junctionと密接な関係がある細胞骨格を構成するアクチンフィラメントが斑点状に減少する現象も認められた。

論文審査の結果の要旨

中鎖脂肪酸及びそのアシルグリセロールは、腸管上皮細胞に作用しtight junctionをゆるめることによって、特定の輸送機構が存在しないことにより吸収が困難な親水性物質の腸管吸収を促進する。この特性に着目し、中鎖脂肪酸化合物を油相に、親水性の生理活性物質や機能性食品成分を内水相に封入したW/O/Wエマルジョンを調製後、粉末化することによって、消化管に至るまで分解を受けることなく、しかも腸管吸収に優れた食品を構築することが可能である。本研究は、ヒト結腸ガン細胞由来のCaco-2培養細胞系を腸管上皮細胞単一層膜のモデルとして、中鎖脂肪酸化合物の吸収促進特性を明らかにすることを目的としたものである。また、食品の構築という観点から、吸収促進が腸管に不必要な傷害を与えるものであってはならないので、細胞傷害性並びにそれからの回復についても検討した。成果として評価すべき点は次のとおりである。

1. 中鎖脂肪酸化合物の腸管での親水性物質の吸収促進効果が、その細胞への分配という物理化学的な過程と細胞内に取り込まれた後の生化学的な過程を経てtight junctionをゆるめるという直列に連なる二段階を経て発現されると捉えた。
2. 中鎖脂肪酸化合物の物理化学的性質と透過促進効果の相関を検討し、相関に適した新たな物質固有の物理化学的パラメーター、表面エネルギー低下係数(SELCD)を提案した。SELCDは、透過促進効果が現れる閾値濃度と逆比例の相関を示すなど、適した透過促進物質の選択のための一次スクリーニングを行うのに有用である。
3. 中鎖脂肪酸化合物の透過促進は、MTT法で測定したミトコンドリアのデヒドロゲナーゼ活性の低下を指標とする細胞傷害と1次的な相関を示したが、その比例係数である障害を受けた細胞の見かけの透過係数は化合物により異なることを見いだした。
4. 透過促進状態になった細胞は、透過促進物質それぞれとの固有の接触時間、濃度域以内において元の細胞の状態に回復することが可能であった。またこの回復は細胞の増殖によるものではなかった。
5. 透過促進時にはLDHの漏出が起こるが、C10FANaの場合にはバソラテラル側にも起こる。
6. C10FANaが細胞に取り込まれると、一時的に細胞内情報伝達物質であるカルシウムイオンの濃度が増加し、細胞骨格を構成するアクチンフィラメントが消失することが認められた。これによりC10FANaの透過促進機構は検討した他の中鎖脂肪酸化合物と異なっている可能性が示唆された。

以上のように本論文は、中鎖脂肪酸化合物の親水性物質に対する腸管吸収促進効果について新しい知見を加え、機能の高い食品の構築に当たって、吸収効率、安全性の両面から選択する規準を設定する基礎を与えるもので、栄養化学、食品機能学、食品物理化学並びに製造工学に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士(農学)の学位論文として価値のあるものと認める。なお、平成11年4月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。