

## 緑葉カロテノイドのニワトリ卵黄への 選択的移行とその機構

高木茂明・中野浩行・木村吉伸・近藤康博<sup>a)</sup>

田辺 昭<sup>a)</sup>

(生物資源開発学講座)

Received November 1, 1990

### A Selective Accumulation of Some Leaf Xanthophylls in Hen Egg Yolk and Its Manner.

Shigeaki TAKAGI, Hiroyuki NAKANO, Yoshinobu KIMURA  
Yasuhiro KONDO<sup>a)</sup>, Akira TANABE<sup>a)</sup>  
(Division of Bioresources Chemistry)

Absorption and distribution of leaf carotenoids in hen were studied for the purpose of clarifying the manner of selective accumulation of lutein into egg yolk.

Absorption ratios of individual leaf carotenoid were ranged from 50 to 65 %. Lutein, major leaf xanthophyll, was preferentially accumulated into egg yolk. For example 25 % of the lutein was absorbed. On the other hands, 0.6 % of the absorbed  $\beta$ -carotene, was accumulated. The compositions of both carotenoids in egg yolk were almost constant in all experimental groups, that is, about 85 % for lutein and 1 % for  $\beta$ -carotene.

After 3 days administration of leaf carotenoid, the net accumulation of lutein into ovary was 6 times more than that in liver, while little  $\beta$ -carotene was accumulated in ovary. Furthermore, since other xanthophylls, such as antheraxanthin and violaxanthin, were liable to accumulate more in liver than those in ovary, it is clearly suggests that lutein had a strong tendency to accumulate in ovary.

From these results, some mechanisms of the selective accumulation of lutein into ovary can be deduced.

### 緒 言

ニワトリ卵黄にはキサントフィル類が優先的に蓄積され、カロテン類は少いことがよく知られている<sup>5)</sup>。他の鳥類においても類似の傾向を示すが、ニワトリにおいては投与された $\beta$ -クリプトキサンチン<sup>1)</sup>、ネオキサンチン、ゼアキサンチン、及びルテイン<sup>4)</sup>の大部分は卵黄に移行することが認められている。

しかし、個々のカロテノイドの投与、吸収及び卵黄への移行について定量的に検討した報告はこれまでにない。著者の1人高木らは緑葉カロテノイドの1つであるルテインが蛋白質<sup>8)</sup>あるいは界面活性剤のSDS<sup>9)</sup>、コール酸の水溶液に分散してキラルな左巻きらせん構造を持

a) 家畜機能調節学講座 (Division of Animal Science)

った分子集合体を形成することを見出し、その像を電子顕微鏡で確認した<sup>11)</sup>。他のキサントフィル類についてもキラルな水溶性分子集合体を形成することを認めており<sup>10)</sup>、キサントフィルに共通な物理化学的性質と考えることができる。キサントフィルのこのような水溶性分子集合体の形成が、その良好な吸収性及び卵黄への蓄積に寄与していると考えられるので、緑葉カロテノイド及び $\beta$ -カロテインを用いてそれらについて調べた。

### 材料及び方法

**緑葉カロテノイド**：ハウレンソウ葉のアセトン抽出液からアセトンを留去したのち、エーテル：石油エーテル（1：1）混液によって脂質を抽出する。抽出液を芒硝で脱水後減圧濃縮し、少量のベンゼンを加えて溶解後1N水酸化カリウムのエタノール溶液を充分量加えて室温で12hr暗所放置する。不飽和化合物分をエーテル：石油エーテル（1：1）混液で抽出し、脱水と続いての溶媒留去後アセトン溶液とし、これを緑葉カロテノイドとした。

**飼料**：基礎飼料として市販鶏用飼料からとくにカロテノイドを含む原料を除去して配合したものを用いた（Table 1）。この基礎飼料に緑葉カロテノイドのアセトン溶液を加えて混合後風乾し、緑葉カロテノイド量の異なる2種の試験飼料を調製した。これらにカロテノイドを加えない対照区を含めて3試験区を設けた（Table 2）。

**鶏と飼育方法**：鶏は岡山県養鶏試験場から分譲された雌の白色レグホン種を1区5羽としてグループ飼育した。飼料は毎朝所定時刻に1羽当り140gを投与し、翌日の同時刻に残量を測定して摂取量を求めた。同時に糞量を測定しカロテノイド分析に供した。さらに、同時刻に採取したグループ内の産卵すべての卵黄を一緒にホモジナイズし、その1部をとってカロテノイド分析に供した。無殻卵及び破損卵が出た場合には、それらすべてを卵数に入れ、卵黄1ヶの平均重量を15gとして卵黄1ヶ当りのカロテノイド平均値を求めた。

飼育スケジュールは次の通りである。産卵鶏用の市販飼料（カネニ17：中国飼料）を30日間投与後すべての区を対照飼料（No. 1）に置き換える。対照飼料に置換10日後に No. 2、及び No. 3 区をそれぞれ Test A 及び Test B 飼料（Table 2）に換える。これら試験飼料を14日間投与後ふたたび対照飼料に変えて10日間飼育した。照明は AM 5：00から PM 7：00の14時間とした。この間の摂取及び排泄カロテノイド量と卵黄カロテノイド量との関係を調べた。

**カロテノイド分析**：HITACHI gel #3040を担体とした順相 HPLC<sup>12)</sup>によりカロテノイドを定量した。HPLC用カロテノイド試料の調製法は緑葉カロテノイド分析法<sup>12)</sup>に準じたが、卵黄の場合にコレステロール除去のため抽出脂質の不飽和化合物分に冷アセトンを加え、生じる多量の沈澱の戸別操作を挿入し、その滲液を分析に供した。

Table 1 Composition of ingredients in basal diet

Ingredient	Composition (%)
Milo	70.0
Soybean defatted	11.0
Rape seed defatted	3.0
Fish meal (65%)	5.5
Meat-bone meal	3.0
CaCO <sub>3</sub>	7.04
NaCl	0.3
Choline chloribe	0.01
Methionine	0.05

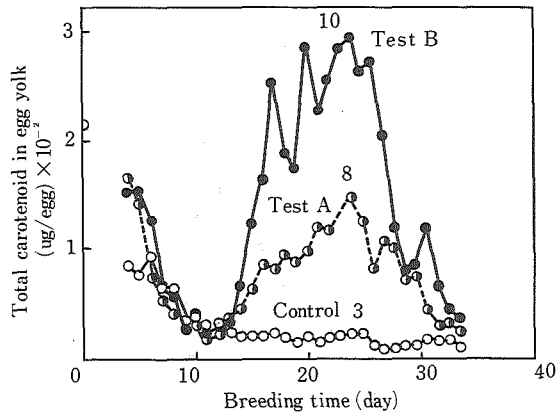
**Table 2** Experimental groups and carotenoid compositions in hen diets

Exp.	group	Leaf carot. μg/100g	β-carot. (%)	Lut. (%)	Anth. x. (%)	Violax. (%)	Neox. (%)	Cant. x.* (%)
No. 1	Control**	54.6	9.2	42.2	5.6	4.4	1.4	33.6
No. 2	Test A	573.8	13.3	64.6	8.9	10.9	4.0	2.4
No. 3	Test B	1407.0	16.7	63.6	5.8	12.3	4.7	1.6

\*Canthaxanthin had been originally contained in basal diet.

\*\*Carotenoids in basal diet will depend on leaf meal premixed.

Lut., lutein ; Anth. x., antheraxanthin ; Violax., Violaxanthin ; Neox., neoxanthin ; Cant. x., canthaxanthin.



**Fig. 1** Accumulation of leaf carotenoid in egg yolk.

Test diets (test A and B) were dosed after 10 days dosage of control diet. Figures indicate Roch Color Fan Index.

飼料に含まれるカンタキサンチンの定量は標準カンタキサンチンを用いて作製した標準曲線から導いた  $C = 312 \times S / 0.84$  を用いて行った。但し C はカンタキサンチン (ng), S はピーク面積 (cm<sup>2</sup>) である。

摂取カロテノイドの体組織への移行蓄積量測定法：対照飼料を30日間投与して、糞と卵黄のカロテノイド量が下限においてほぼ一定になった後 Test 飼料に替えて3日間投与し屠殺した。各区1羽ずつをこの分析に供した。血液は頸動脈を切断放血により採取し、直後に解剖して肝、消化管、卵巣を取り出してカロテノイド分析に供した。

### 結果と考察

投与カロテノイドの吸収と卵黄への移行：各試験グループにおける鶏1羽当りの各カロテノイド摂取量から糞中の排泄量を引いた値をカロテノイドの“みかけの吸収量”とし、その摂取量に対する比から“みかけの吸収率”を算出した。摂取カロテノイドのうち吸収量と卵黄蓄積量との差に相当するものは腸内への残留、他組織への移行、小腸粘膜及び肝における分解、及び腸内微生物の作用による変化などが考えられる。

飼育試験期間内における卵黄中の全カロテノイドの経時変化を Fig. 1 に示し、また各試験区におけるルテインとβ-カロテンの吸収量の経時変化を Fig. 2 に示す。対称飼料投与後10

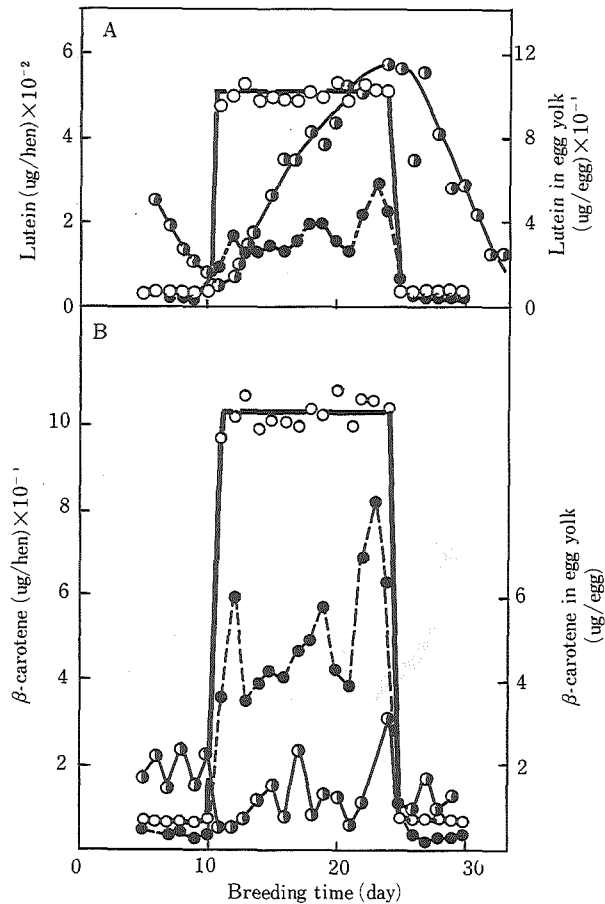


Fig. 2 Variation profiles of lutein (A) and  $\beta$ -carotene (B) in leaf carotenoids dosed, excreted and accumulated in egg yolk during breeding time.  
 ○—○, dosage of carotenoid : ●—●, excretion of carotenoid : ◐—◑, accumulation of carotenoid in egg yolk.

日間で卵黄に蓄積したカロテノイド量は市販飼料投与時の10%以下でほぼ一定となるので(Fig. 1, 2), この時点で試験飼料を投与した。カロテノイド摂取量が増加すれば全カロテノイドの排泄量及び卵黄への蓄積量は増加するが、ルテインと $\beta$ -カロテンの蓄積量の経時変化はそれぞれ特徴ある差異を示している。すなわち、ルテインの卵黄への蓄積量は摂取量に比例して約7日遅れて最大値を示しているのに対し、 $\beta$ -カロテンにおいては、その相関は明瞭でなく、またわずかしか蓄積しない(Fig. 2 B)。投与カロテノイドと排泄カロテノイドの関係では、ルテインと $\beta$ -カロテンとの差は小さくルテインのみかけ吸収率は約60%、 $\beta$ -カロテンのそれは約50%であるが、卵黄へのみかけ蓄積率(蓄積量/吸収量)においてルテインが30%に対し $\beta$ -カロテンが2%と差があるのはルテインが選択的に卵黄へ移行していることを示すものであろう。

各グループにおけるカロテノイドの摂取量、吸収量及び卵黄蓄積量の平均値を Table 3 に示す。吸収カロテノイドが卵黄に移行する時間は飼料投与後4日から10日<sup>5)</sup>であるが、Fig. 2

**Table 3** Absorption of dose carotenoid and accumulation of the absorbed carotenoid into egg yolk

Control diet	Carotenoid	Dose carot. ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Absorbed carot.		Accumulation ratio* (%)	Carot. in egg yolk	
			Absorbed ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Composition (%)		Accumd. ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Comp. (%)
	$\beta$ -carot.	6.8	1.8	26.0	61.6	1.1	6.1
	Cant. x.	25.1	15.6	62.1	16.3	2.5	14.1
	Lutein	35.2	15.5	44.0	82.7	12.8	71.1
	Anth. x.	4.2	1.0	24.2	72.6	0.7	4.1
	Violax.	3.3	1.7	52.9	48.0	0.8	4.6
	T. carot.	74.4	35.6	47.8	50.6	17.9	100.0

Test diet	Carotenoid	Net dose** ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Net absorbed carot.***		Net carot. accumd. into yolk ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Net accumulation ratio**** (%)	Carot. in egg yolk	
			Absorbed ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Composition (%)			Accumd. ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Comp. (%)
A	$\beta$ -carot.	93.9	51.0	54.3	0.3	0.6	1.4	1.3
	Cant. x.	-6.9	-6.9	—	-0.3	—	2.3	2.6
	Lutein	465.6	317.3	68.1	78.8	24.8	91.6	87.1
	Anth. x.	64.5	40.5	62.8	2.6	6.5	3.4	3.2
	Violax.	80.9	54.8	67.7	5.7	10.4	6.6	6.2
	T. carot.	700.3	456.6	65.2	87.2	19.1	105.2	100.0
B	$\beta$ -carot.	292.1	184.3	63.1	1.6	0.9	2.7	1.1
	Cant. x.	4.1	1.9	46.3	0.7	37.3	3.2	1.3
	Lutein	1104.6	719.9	65.2	198.9	27.6	211.7	85.9
	Anth. x.	99.3	48.3	48.6	7.0	14.6	7.8	3.2
	Violax.	217.3	132.2	60.8	20.2	15.3	21.0	8.5
	T. carot.	1715.5	1086.4	62.3	228.4	21.0	246.4	100.0

\*Carot. in egg yolk/absorbed carot.

\*\*Differences between dose carotenoids in test diets and those in control diet, which mean dose carotenoids originated from leaf carotenoid.

\*\*\*Differences between absorbed carotenoids in test diets and those in control diet, which mean absorbed carotenoids from leaf carotenoids.

\*\*\*\*Ratios of the net accumulated leaf carotenoids in egg yolk to the net absorbed ones.

(A) における摂取量のピークとルテインのそれとの差が約7日であるのでテスト飼料の投与開始7日目から12日目までの8日間の平均値である。各カロテノイドの吸収率はA, B両区において50~60%の範囲にあり、摂取量が増えれば吸収量も増加していることを示す。ここで、テスト区のカロテノイド量から対照区のそれを引いた値は投与した緑葉カロテノイドのみの挙動を表しているものと考えることが出来るので、Table 3ではそれらを「Net dose」及び「Net absorption」として示した。卵黄のNet蓄積カロテノイド量をNet吸収カロテノイド量で割った値を卵黄への蓄積率とし、吸収された各カロテノイドのうち卵黄に蓄積した割合を示す。吸収カロテノイドのうち、卵黄への移行蓄積率のもっとも高いのはルテイン(約25%)であり、ヒオラキサンチンとアンセラキサンチンはその約1/2である。これに対し $\beta$ -カロテンの蓄積率は1%以下と極めて低いことが特徴的である。さらに卵黄のカロテノイド組成は異なる量のカロテノイドを投与して、吸収量と蓄積量に3倍の差がある場合(テストA区及びB区)でもほとんど同じであり(Table 3)、これは卵黄のカロテノイド組成をほぼ一定に保つ機構が存在することを推測させる。換言すれば、このことは緑葉カロテノイドの摂取量に比例して卵黄中のカロテノイド量は増加するが卵黄カロテノイド組成は投与量に無関係にほぼ一定に保たれていることを示すものである。さらに、これらの結果は卵黄への

**Table 4** Distribution of spinach carotenoids to organs and blood in hen taken test B diet for 3 days

Carot.	Absorbed carot.* ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )	Net carotenoid accumulated in organs and blood after 3 days dose ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )					Net total carot. accumud. ( $\mu\text{g}/\text{hen}$ )
		Stomack	Intestine	Blood**	Liver	Ovary	
$\beta$ -carot.	156.4 (156.0)***	1.7 (0.8)	5.6 (5.1)	7.2 (5.0)	21.5 (-7.1)****	2.5 (-0.2)	(3.6)
Cant. x.	1.2 (-0.4)	—	4.2 (2.0)	7.9 (5.0)	40.0 (3.3)	13.5 (3.4)	(13.7)
Lutein	363.3 (346.3)	4.0 (3.1)	36.3 (35.2)	80.1 (72.3)	88.2 (2.6)	46.3 (19.7)	(132.9)
Anth. x.	13.1 (12.8)	0.8 (0.8)	3.9 (3.9)	8.2 (7.0)	16.2 (3.1)	2.0 (0.2)	(15.0)
Violax.	38.1 (37.9)	1.2 (1.2)	2.7 (2.7)	4.4 (3.1)	17.5 (5.5)	3.0 (0.8)	(13.8)
Total	613.2 (594.6)	7.7 (4.6)	52.8 (48.9)	107.9 (92.5)	184.0 (7.4)	67.2 (23.8)	(177.2)

\*Differences in quantities between dose carotenoid and the excreted.

\*\*Total blood volume is postulated as 1/13 of hen body weight.

\*\*\*All figures in parenthesis indicate net carotenoids migrated or accumulated, which are obtained from differences between test groups and control group.

\*\*\*\*Negative values will depend on the varieties of the individual hens.

キサントフィル類の蓄積が多いというこれまでの知見<sup>2,3,6)</sup>を構成カロテノイドレベルで明らかにしたものである。

**投与した緑葉カロテノイドの体内分布：**ニワトリに投与した緑葉カロテノイドのうち、多量のルテインが卵黄に蓄積され、その組成を一定とする機構の存在が示唆されるが、いっぽう吸収カロテノイドの移行による体内分布状態を調べた (Table 4)。表のかっこ内の数値は対照区の値を引いた3日間のカロテノイド Net 蓄積を示している。胃、腸及び血液中の投与に由来する Net カロテノイド量はそれぞれの組織へのカロテノイドの分布量を直接反映している。肝の正味カロテノイド蓄積量は3日間の短期間投与では $184\mu\text{g}$ の分布量に対し $7.4\mu\text{g}$ と比較的少いが、いっぽう卵巣には肝よりも多い蓄積が認められ、とくにルテインの蓄積が顕著である。みかけ吸収された $156\mu\text{g}$ の $\beta$ -カロテンのうち、胃と腸に滞るのは約4% ( $6\mu\text{g}$ ) また血液には約3% ( $5\mu\text{g}$ ) 分布するので、残部はレチノイドへ変換されたものと考えられることができる。したがって体組織への正味の移行量は少く、実際に肝と卵巣においては3日間投与で $\beta$ -カロテンの増加はない。これに対しルテインをはじめ他キサントフィル類の組織移行量は多く、例えば吸収ルテインの約6%が卵巣へ、アンセラキサンチンの24%が肝に蓄積している。各カロテノイドの消化管内の残存量の吸収カロテノイドに対する100分率を100から引いた値は各カロテノイドの3日間における吸収率を表すものと考えられ、 $\beta$ -カロテン、ルテイン、アンセラキサンチン、ピオラキサンチンはそれぞれ96.2, 88.9, 63.5, 89.7%となる。対照区の肝には試験区のそれとほぼ同じ量のカロテノイドが存在する。このことは肝がカロテノイドの貯蔵場所であることを示しており、さらに卵巣とくらべて多量の $\beta$ -カロテンを含むことから肝はレチノイド供給を調節している器管と考えられる。卵巣にはかなりの量のカロテノイドが吸収に伴って急速に蓄積される。各カロテノイドの蓄積率は3日間ルテイン5.7%、アンセラキサンチン1.3%、ピオラキサンチン2.2%、 $\beta$ -カロテンは0%である。この結果にもとづく卵巣ルテインの組成割合は67%であるが、10日間以上の長期投与によって約85%の多量のルテインを含む一定組成になるものと考えられる。

小腸粘膜におけるカロテノイドの吸収に関し  $\beta$ -カロテンなどのプロビタミン A が腸壁通過時に  $\beta$ -カロテン-15, 15'-オキシゲナーゼ及びレチナル還元酵素の作用<sup>7)</sup>によってレチノールへ変換されることが知られている。このことがニワトリにおいて吸収された  $\beta$ -カロテンの体内分布量が他のカロテノイドとくらべて極端に低い原因の1つと考えることができる。ニワトリにおいてキサントフィル類はオキシゲナーゼの作用を受けにくいとも考えられる。

吸収されたカロテノイドは主としてカイロミクロンに含まれてリンパ管から肝に入ると考えられる。肝では HDL にカロテノイドが組み込まれることが知られており、全血のカロテノイド組成はカイロミクロンと HDL の合計である。そうして、このうち HDL 中のカロテノイドが卵巣に移行して卵黄に蓄積するため、全血カロテノイド組成と卵黄のそれとは異り、卵黄カロテノイド組成はほぼ一定に保たれていると考えられる。ルテインが他のカロテノイドと比較して肝におけるよりも多く卵黄に蓄積されるのは、肝においてリポ蛋白質へのカロテノイドの組み込みに何らかの調節機構があるためであろう。この調節にルテインで観察された分子集合体が関与しているかどうかは今後の検討課題である。

### 摘 要

ニワトリにおける緑葉カロテノイドの吸収と体組織分布について部分的に明らかにするとともに、とくに卵黄へのルテインの集中選択的蓄積に関する知見を得た。

投与した緑葉カロテノイド各々のみかけ吸収率は50~65%とカロテノイドによる差は認められないが、卵黄への蓄積量及び蓄積率はキサントフィルが高く、なかでもルテインはそのみかけ吸収量の25%が卵黄に蓄積している。これに対し、 $\beta$ -カロテンはみかけ吸収量のわずか0.6%しか蓄積せず、卵黄全カロテノイドに占める割合もルテインの約85%に対し1%である。

3日間の短期投与による緑葉カロテノイドの肝、卵巣、血液への正味蓄積量において、ルテインは肝よりも卵巣に6倍以上の速度で蓄積するのに対し、他のキサントフィル及び $\beta$ -カロテンは肝に多く蓄積する傾向がある。このことは緑葉カロテノイドのうちルテインがとくに卵黄に蓄積しやすいことを示すものである。

### 謝 辞

本研究において鶏卵に関する実験方法及び関連資料について種々御教示頂いた本学佐藤勝紀教授にお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Brown, W. L. : The influence of Pimiento pigments on the color of the egg yolk of fowls. *J. Biol. Chem.*, **122**, 655-659 (1938)
- 2) Guantner E., W. Carlson, O. E. Olson, G. O. Kohler, A. L. Livingston : Pigmentation of egg yolks by xanthophylls from corn, marigold, alfalfa and synthetic sources. *Poultry Sci.*, **52**, 1787-1798 (1973)
- 3) 藤野安彦 : 卵黄脂質の化学。栄養と食糧, **24**, 317-324 (1971)
- 4) Martin-Garmendia, A. A., R. Gomez. : Digestibility and fate of lutein in chicken. *Comp. Biochem. Physiol.*, **70A**, 619-621 (1981)
- 5) Norman, G. H., A. H. Sykes, H. S. Baylay : Deposition of orally administered  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -APO-8-carotenoic acid ethyl ester and zeaxanthin in the egg yolk by laying hens. *British Poultry Sci.*, **14**, 507-519 (1973)
- 6) 齊藤道雄, 山田英世 : 産卵鶏における carotenoid 代謝に関する研究 (I)。緑餌多給時における卵の carotenoids 及び V. A. 含量。日畜学報, **27**, 255-261 (1957)
- 7) Singh, H., H. R. Cama : Enzymatic cleavage of carotenoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 49-61 (1974)
- 8) Takagi S., M. Shiroishi, T. O. Takagi : Interaction of lutein with ovalbumin and other proteins,

- association and acquisition of novel optical activity. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2111—1227 (1980)
- 9) Takagi S., K. Takeda, K. Kameyama, T. Takagi : Visible circular dichroism of lutein acquired on dispersion in an aqueous solution in the presence of a limited amount of SDS and a dramatic change of the CD spectrum with concentration of the surfactant. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2035—2040 (1982)
  - 10) Takagi S., M. Shiroishi, T. Takagi : Further studies on the acquisition of novel optical activity on interaction of lutein and other carotenoids with proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1159—1165 (1981)
  - 11) Takagi S., Y. Yamagami, K. Takeda, T. Takagi : Helical configuration of lutein aggregate dispersed in liposomes of phosphatidyl choline and digalactosyl-diglyceride. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1567—1572 (1987)
  - 12) Takagi S. : Determination of green leaf carotenoids by HPLC. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1211—1213 (1985)