リコピン摂取時間帯がラットおよびヒトにおける体内吸収に与える影響

誌名	日本栄養・食糧学会誌 : Nippon eiyō shokuryō gakkaishi = Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science
ISSN	02873516
著者名	青木,雄大 吉田,和敬 信田,幸大 砂堀,諭 西田,由香 加藤,秀夫 菅沼,大行
発行元	日本栄養・食糧学会
巻/号	70巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 147-155
発行年月	2017年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

日本栄養・食糧学会誌　第70巻　第4号　147-155（2017）

報　文

リコピン摂取時間帯がラットおよびヒトにおける体内吸収に与える影響

青木雄大[1]，吉田和敬[1]，信田幸大*,[1]，砂堀諭[1]，
西田由香[2]，加藤秀夫[2]，菅沼大行[1]

（2017年1月5日受付；2017年4月3日受理）

要旨：リコピンはトマトに豊富に含まれるカロテノイドであり，強い抗酸化作用を有することが知られている。これまでに，様々な栄養素の吸収に概日リズムが影響を与えることが示唆されてきているが，リコピンの吸収について，摂取時間帯による影響を検証した報告はなされていない。そこで我々は，摂取時間帯がリコピンの吸収に与える影響を，ラットを用いた動物試験および健常な成人男女を対象としたヒト試験で検証した。ラットおよびヒトに対し，リコピンを含む食品を，時間帯を変えて摂取させ，血中リコピン濃度を測定したところ，ラットでは活動期初期，ヒトでは朝に摂取した際に血中リコピン濃度が最も上昇した。また，リコピンを摂取するまでの絶食時間が長くなるほど，血中リコピン濃度の上昇が大きくなることが示された。以上から，リコピンの吸収は絶食時間の長さの影響を受け，そのため朝に摂取した際に最も吸収率が高くなることが推測された。

キーワード：リコピン，体内吸収，摂取時間帯，絶食時間

リコピンはトマトやトマト加工品に豊富に含まれるカロテノイドであり，活性酸素種，特に一重項酸素に対する消去能が強いことが知られている[1)2)]。この抗酸化作用を介して，リコピンは，がんや心血管疾患などの慢性疾患のリスクを低下させると考えられている[3)]。また近年は，リコピンから生体内で生成されたリコピン代謝体が種々の遺伝子の発現を調節することにより，抗酸化作用や解毒作用などの生理作用を発現していることも明らかになってきた[4)5)]。さらに疫学研究においても，血中のリコピン濃度が高い人ほど，前立腺がんなどのがんや心血管疾患といった慢性疾患のリスクが低くなることが報告されており[3)6-8)]，リコピンを豊富に含むトマトなどの食品を積極的に摂取することは，生活習慣病の予防に繋がることが期待される。

リコピンが生体内でその生理機能を発揮するためには，まず，生体内に吸収される必要がある。しかし，食品からのリコピンの吸収率は様々な因子の影響を受けることが知られており，その吸収率を高めるためには「摂り方」を工夫する必要がある[9)]。例えば，生のトマトを摂取した場合よりも，トマトジュースやトマトペーストのような加工品を摂取した場合においてリコピンの吸収率は高まることが報告されている[10)11)]。リコピンは，植物体の中では細胞壁に守られた細胞内に色素体として存在している。この細胞壁は，摂取した際にヒトの消化酵素による分解を受けにくいが，加工によって細胞壁が壊されることでリコピンが植物細胞から放出され，その吸収率が高まると考えられている[12)]。また，リコピンは，他の脂溶性の低分子物質と同様に，小腸において胆汁酸とともにミセルを形成し，能動輸送および受動輸送によって吸収されるため[13)]，ミセル化を促進するような摂り方において，すなわち油と一緒に摂取したり，加熱などにより立体異性体構造を変化（トランス体からシス体に変化）させて摂取したりすることで吸収率が高まることが知られている[9)]。

上述した「摂り方」はいずれも，リコピンを吸収されやすい状態にして腸管に届けるものであるが，リコピンを吸収する側，すなわちヒトの側にも吸収率に影響を及ぼす因子が存在する。その一つが“概日リズム”である[14)]。リコピンと吸収経路が類似している脂質の吸収にも，概日リズムが影響していることが示唆されている。例えば，小腸管腔側から小腸細胞内へのリコピンの能動輸送に関与しているスカベンジャー受容体クラスBタイプ1（SR-B1）[5)15)16)]や，小腸から肝臓への脂質の輸送に関与するミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質（MTP），アポ

* 連絡者・別刷請求先（E-mail: Yukihiro_Nobuta@kagome.co.jp）
[1] カゴメ株式会社イノベーション本部自然健康研究部（329-2762 栃木県那須塩原市西富山17）
[2] 東北女子大学家政学部（036-8530 青森県弘前市清原1-1-16）
（旧所属：県立広島大学生命環境学部（734-8558 広島県広島市南区宇品東1-1-71））

リポタンパク質A-IV（apoA-IV），ノクターニンなどの発現量はいずれも，概日リズムの影響を受けて日内変動することが知られている[17-19]。また，これらの遺伝子の発現量は，給餌刺激により作り出された概日リズムの影響を受けやすいとされている[17-19]。これらの報告を踏まえると，リコピンの吸収率は，その摂取時間帯や，1日の中の給餌（食事）のリズムの影響を受ける可能性がある。しかし，このことを検討した例は今までにない。

そこで本試験では，リコピンの摂取時間帯がその吸収率に与える影響を明らかにするため，リコピンの主要な供給源であるトマトを試験食品とし，摂取後のリコピンの血中濃度の推移を動物とヒトで評価するとともに，動物試験においては，給餌刺激やSR-B1遺伝子発現量との関連について検討を行った。

実　験　方　法

1. 動物実験

1.1　実験動物および飼料　本研究においては，実験1および実験2の2つの動物実験を実施したが，いずれも「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）」に基づき，公立大学法人県立広島大学動物実験委員会の許可を得た後に実施した（許可番号：13HA003）。9週齢のWistar系雄ラット（広島実験動物研究所）を購入し，室温25±1℃，湿度50±5%，明暗逆転の明暗サイクル12時間（明期；21:00-9:00，暗期；9:00-21:00）の条件下で高床式ステンレスケージ（5匹/ケージ）に入れて飼育した。試験飼料は，通常飼料とトマト飼料（トマトペースト凍結乾燥粉末を10%含有）の2種類とし，飼料のエネルギー量，および，飼料全体のエネルギーに占めるタンパク質（P），脂質（F），炭水化物（C）の比率（PFC比）が両飼料でほぼ同じになるよう，表1に示した組成で調製した。トマト飼料中のリコピン濃度は，実験1においては6.5 mg/100 g，実験2においては，9.8 mg/100 gであった。

1.2　摂餌方法　実験1では，75匹のラットを25匹ずつ，Breakfast（B）群，Lunch（L）群，Dinner（D）群の3群に分けた。各群のラットとも，暗期（9:00-21:00）の間に，初期（9:00-11:00），中期（13:00-15:00），終期（17:00-19:00）の3回に分けて通常飼料を摂取させ，1週間馴化させた。馴化後，3回の摂餌タイミングのうち，B群は暗期の初期，L群は暗期の中期，D群は暗期の終期に，それぞれトマト飼料を摂取させ，他の摂餌タイミングにおいては，通常飼料を摂取させた（図1A）。各群，各摂餌タイミングとも，給餌量を1ケージ（5匹）あたり30 gに統一して完食させ，摂餌期間は4週間とした。実験2では，75匹のラットを25匹ずつ，Breakfast（B）群，Late Breakfast（LB）群，Late Dinner（LD）群の3群に分けた。B群の摂餌タイミングは実験1と同様とした。LB群は，全ての摂餌時間帯をB群から4時間後ろにずらした。LD群は，3回目の摂餌時間帯のみをB群から4時間後ろにずらした（図1B）。そのため，LB群とLD群の3回目の摂餌時間帯は明期であったが，3回目の摂餌量は全群間で差がなかった。それぞれの摂餌タイミングで通常飼料を1週間摂取させ馴化後，図1Bに示したタイミングで，トマト飼料および通常飼料を摂取させた。摂餌量，摂餌期間は実験1と同様とした。

1.3　血液および小腸上皮の採取　4週間の摂餌期間の最終日の8:00，12:00，16:00，20:00，24:00の各時刻に，各群5匹ずつ，チオペンタール麻酔下で，実験1では肝静脈から，実験2では心臓から，いずれも全血を採取し，採取後に頸椎脱臼により安楽死させた。採取した血液は，1,000×g，10分，4℃で遠心分離後，上清を回収し血清試料とした。実験2では，遺伝子発現解析を目的に小腸上皮を採取した。ラットの空腸上部位を約2 cm切り出し，内腔に生理食塩水を通して洗浄後，腸を切開した。カバー

表1　試験飼料の栄養成分組成

成分	通常飼料　100gあたり	トマト飼料　100gあたり
ミルクカゼイン（g）	19.6	18.0
ラード（g）	9.7	9.6
大豆油（g）	9.7	9.6
ショ糖（g）	34.5	34.3
デキストリン（g）	8.6	5.5
αコーンスターチ（g）	8.6	5.5
ミネラル配合（g）	4.0	4.0
ビタミン配合（g）	1.0	1.0
セルロース（g）	4.0	2.5
コレステロール（g）	0.2	0.2
トマトペースト凍結乾燥粉末(g)	0.0	10.0
エネルギー（kcal）	460.4	457.1
P:F:C	17:38:45	17:38:45

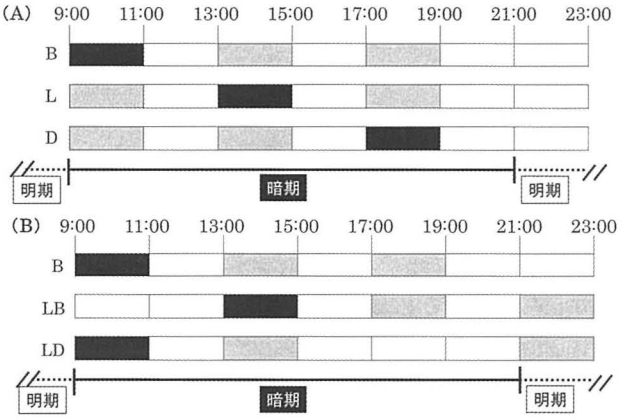

図1　摂餌スケジュール
（A）に実験1，（B）に実験2の摂餌スケジュールを示した。各試験群には，図中の■（黒色）で示した時間帯にトマト飼料を，■（灰色）で示した時間帯に通常飼料を摂取させた。また，暗期を実線で，明期を点線で示した。

ガラスを用いて小腸粘膜を採取し，2 mLのTRIzol（サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)，神奈川）に懸濁し，RNA抽出まで−80℃で保存した。

1.4 血清リコピン濃度の測定　血清リコピン濃度は，既報[20-23]に準じて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により定量した。血清200 μLに，内部標準物質であるトランス-β-8′-アポカロテナールのエタノール溶液（10 μM）を10 μL添加した。続いて，0.01%（w/v）のブチルヒドロキシルトルエン含有エタノールを1 mL添加し，さらに，ヘキサンとジクロロメタンの混合溶媒（4：1）（v/v）を4 mL加えた。混合溶液をラボミキサーにて1分間攪拌した後，1,000×*g*，4℃で10分間遠心分離し，上清を回収した。この抽出操作をもう1度繰り返し，上清を合せ，溶媒を窒素ガスで留去した。0.2 mLのヘキサン：アセトン：エタノール：トルエン（10:7:6:7）（v/v/v/v）溶液に残渣を溶解させ，0.20 μmフィルターでろ過し，HPLC用試料とした。HPLCによる分析には，C30カロテノイドカラム（250×4.6 mm，5 μm，(株)ワイエムシィ，京都）とPDA検出器（SPD-M10，(株)島津製作所，京都）を用い，460 nmにおける吸光度を測定した。移動相A（A液）はメタノール：tert-ブチルメチルエーテル：水（75:5:20）（v/v/v）とし，移動相B（B液）はメタノール：tert-ブチルメチルエーテル：水（8:90:2）（v/v/v）とした。グラジエント条件は，100%A液（0分）→100%B液（25分）→100%B液（28分）→100%A液（30分）→100%A液（40分）のリニアグラジエントとし，流速は毎分0.2 mLとした。測定値は，トランス-β-8′-アポカロテナールの抽出効率で補正した。

1.5 小腸の遺伝子発現解析　小腸粘膜のTRIzol懸濁液1 mLに，200 μLのクロロホルムを加えて攪拌後，室温で2分間静置し，12,000×*g*，15分間，4℃で遠心分離した。遠心分離した上清のうち350 μLから，MagNA Pure Compact（ロシュ・ダイアグノスティックス(株)，東京）によりRNAを抽出し，cDNA合成まで−80℃で保存した。RNAからcDNAへの逆転写反応には，PrimeScript® RT Master Mix（Perfect Real Time）（タカラバイオ(株)，滋賀）を用いた。mRNA発現量の定量は，SYBR Premix Ex Taq II（タカラバイオ(株)）とABI PRISM 7900 Sequence Detection System（サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)）を用いたRT-PCR反応により行った。反応条件は，初期変性（95℃，30秒）→PCR（変性：95℃，5秒→アニーリング/伸長：60℃，30秒）×40サイクル→解離（95℃，15秒→60℃，60秒→95℃，15秒）とした。プライマーは，タカラバイオ(株)より定量RT-PCR用のプライマーを購入した（表2）。SR-B1 mRNAの発現量は，ハウスキーピング遺伝子であるβ-アクチンの発現量に対する相対値で示した。

1.6 結果の解析　データは平均値±標準偏差で示した。3群間の比較には，一元配置分散分析を使用した。post-hoc testには，実験1においてはTurkey多重比較検定を，実験2においては，B群を対照群としたDunnett検定を用いた。2群間の比較には，対応のない*t*検定を用いた。いずれの検定でも，$p < 0.05$の場合に有意差ありとした。統計解析ソフトにはEZR[24]（ver. 1.26）を用いた。

2. ヒトを対象とした試験

2.1 研究対象者　試験開始時の研究対象者数の目標を24名に設定し，50名以上の20歳以上55歳以下の健常な成人男女に対し，口頭および書面にて試験内容を説明した後，書面による参加同意を得られた者を研究対象者候補とした。なお，以下のa)〜h)の除外基準に該当する者は候補から除外した。a）試験責任医師に血中中性脂肪が高いと判断された者，b）肝機能に異常が見られた者，c）消化吸収，呼吸器に障害がある者，d）1日3食（朝・昼・晩）の食事習慣を持たない者，e）授乳，妊娠中の者，f）試験食品にアレルギーがある者，g）喫煙習慣がある者，h）他のヒトを対象とする試験に参加している者。さらに，研究対象者候補を対象に，試験開始前にリコピンの吸収量に関する調査を実施し，リコピンを16 mg含む食塩無添加のトマトジュース160 mLを摂取した6時間後の血清リコピン濃度の変化量が0.025 μM以上であった者を選定し，研究対象者とした。

2.2 倫理審査　研究対象者の健康管理および採血は，チヨダパラメディカルケアクリニック（東京都千代田区内神田3-3-5）に委託した。研究計画は，カゴメ株式会社研究倫理審査委員会（審査番号：2015-R08）およびチヨダパラメディカルケアクリニック臨床試験審査委員会（KGM2015C03）にて審査され，承認を得た。研究計画の立案，実施にあたっては，ヘルシンキ宣言および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針を遵守した。

2.3 試験デザインと介入方法　試験デザインは非盲検試験とした。試験食品には，リコピンを16 mg含む食塩無添加のトマトジュース160 mLを用いた。研究対象者には，1日に1回，8:00（朝摂取），12:00（昼摂取），18:00（夜摂取）のいずれかの時間帯で試験食品を摂取してもらった。朝摂取時は，前日の夕食を21:00までに，

表2 PCRプライマーの配列

NM_031144	*Actb*	Forward	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
		Reverse	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
NM_031541	*Scarb1*	Forward	TTCATGAACCCGTGGACCAA
		Reverse	CCCTGGAATGCCTGGAACA

Actb，β-アクチン；*Scarb 1*，スカベンジャー受容体クラスBタイプ1（SR-B1）.

昼摂取時は当日の朝食を8:00までに，夜摂取時は当日の昼食を14：00までに摂るよう指導し，試験食品摂取時は，試験食品以外の飲食を禁止した。各試験食品の摂取には，1週間の間隔を設けた。試験デザインを図2に示した。試験期間中，研究対象者には制限事項として，a）試験開始前からの生活習慣を変えないこと，b）過度の運動，節食，過食をしないこと，c）カロテノイドを含むサプリメント，野菜ジュース，野菜・果実ミックスジュース，特にリコピンを多く含む野菜果実やその加工食品を摂取しないことを遵守するよう指導した。また，研究対象者には，体調，食事摂取時間，服用した医薬品を試験期間中毎日，日誌に記入してもらった。研究対象者のうち，試験を全て終了し，試験期間中の制限事項を遵守していた者を解析対象者として結果を解析した。

2.4　吸収されたリコピン濃度の測定　研究対象者から，試験食品摂取30分前，2時間後，4時間後，6時間後，12時間後に10 mLずつ採血し，血清を調製した後，血清中のtriglyceride-rich lipoprotein（TRL）画分中に含まれるリコピン濃度を測定した。血清800 μLの上に超純水800 μLを重層し，20℃，26,000×gで4時間遠心分離した。遠心後の血清の底面より800 μLを採取し，残った上層部をTRL画分とした。TRL画分中のリコピン濃度の測定は，回収したTRL画分800 μLを用いて，1.4の方法と同様に実施した。

2.5　有害事象の収集　試験期間中に発生した有害事象の収集と，発生した有害事象と試験食品摂取との関連性を検証するために，試験食品摂取前の採血時に医師の問診を行い，研究対象者の体調を確認した。また，試験食品摂取12時間後に採取した血液を用いて，血液学検査，血液生化学検査を実施し，試験責任医師が，有害事象の発生と検査値の異常変動の有無を確認し，有害事象や異常変動が認められた場合は，試験食品摂取との関連を判断した。

2.6　結果の解析方法　結果は平均値±標準偏差で示した。試験食品摂取前と摂取後の各時間でのTRL画分中のリコピン濃度から，TRL画分中のリコピン濃度変化量（Δリコピン濃度）を算出した。また，試験食品摂取前から摂取後12時間までのTRL画分中リコピン濃度の応答濃度曲線下面積（$IAUC_{0\text{-}12h}$）を算出した。それぞれの値について，Two-way ANOVAを実施後，朝摂取時の値を対照としてpost-hocでDunnett検定を用い，統計解析を実施した。全ての摂取時間帯において，日誌に記載された食事時間と試験食品の摂取時間とから，試験食品摂取までの絶食時間を算出し，絶食時間と$IAUC_{0\text{-}12h}$との関連性をPearsonの積率相関係数により求めた。また，統計解析前にスミルノフ・グラブス検定により外れ値の検定を実施した。いずれの検定でも，$p < 0.05$の場合に有意差ありとした。統計解析ソフトは，Dunnett検定にSPSS（ver. 15.0）を用い，スミルノフ・グラブス検定にEZR[24]（ver. 1.26）を用いた。

実験結果

1. 動物試験

1.1　血清リコピン濃度の推移　実験1における各群の血清リコピン濃度の推移を図3に示した。トマト飼料摂取の3時間後において，B群の血清リコピン濃度が他の2群と比較して有意に高値を示した。他の時間帯においては，血清リコピン濃度に群間で有意差は確認されなかった。本試験は同一の個体から経時的に採血を行ったものではないが，各群の血清リコピン濃度の平均値の推移から血中濃度曲線下面積（AUC）を算出（23時間値は，−1時間値と同じと仮定）したところ，B群において最も高い値となった（B群：0.466，L群：0.348，D群：0.319；単位：μg/mL×hr，図は示していない）。

実験2における各群の血清リコピン濃度の推移を図4に示した。トマト飼料の摂取15時間後において，LD群の血清リコピン濃度がB群と比較して有意に低値であった。それ以外の時間帯においては，血清リコピン濃度に群間差は見られなかった。実験1と同様にAUCを算出したところ，B群において最も高い値となり，次いでLB群，LD群の順となった（B群：0.415，LB群：0.342，LD群：0.280；単位：μg/mL×hr，図は示していない）。

図2　ヒト試験のスケジュール

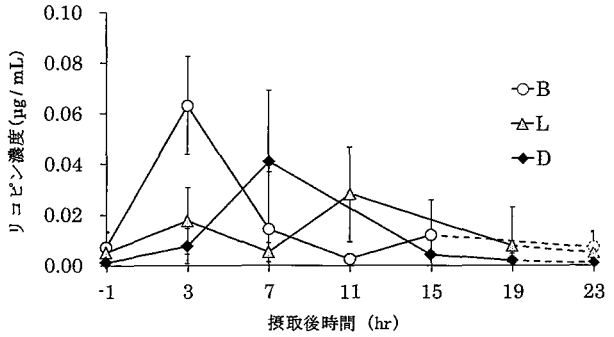

図3　実験1における各群の血清リコピン濃度の推移
トマト飼料摂取開始時刻（B群：9:00，L群：13:00，D群：17:00）を0時間とし，各群の血清リコピン濃度を経時的に示した。なお，23時間の値は−1時間の値と同じ値と仮定し，点線で示した。n = 3-5，平均値±標準偏差。異符号間に有意差あり（$p < 0.05$）。

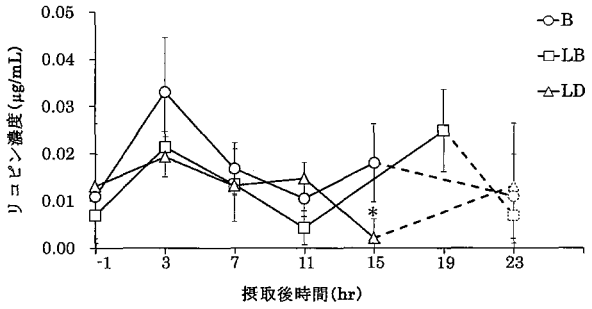

図4　実験2における各群の血清リコピン濃度の推移
トマト飼料摂取開始時刻（B群，LD群：9:00，LB群：13:00）を0時間とし，各群の血清リコピン濃度を経時的に示した。なお，23時間の値は−1時間の値と同じ値と仮定し，点線で示した。n = 5，平均値±標準偏差。
*$p < 0.05$（vs. B群）。

1.2　小腸のSR-B1 mRNA発現量　実験2における小腸のSR-B1 mRNA発現量の推移を図5に示した。いずれの時間帯においても，群間でSR-B1 mRNA発現量に有意な差はなかった。

2. ヒトを対象とした試験

2.1　解析対象者の選定　文書による同意を得た54名の候補者のうち，いずれの除外基準にも該当せず，トマトジュース160 mL（リコピン16 mg）を摂取した6時間後の血清中のリコピン濃度の変化量が0.025 μM以上であった23名を研究対象者として選定した。試験期間中に脱落，中止例はなく，試験期間中の制限事項からの逸脱も認められなかったため，研究対象者23名全てを解析対象者とした。解析対象者の背景は，男性12名，女性11名，平均年齢は40.1±7.7歳であった。その後，スミルノフ・グラブス検定により外れ値と判断された3名を除き，20名で以降の解析を実施した。

2.2　各摂取時間帯におけるTRL画分のリコピン濃度変化およびその$IAUC_{0\text{-}12h}$　試験食品摂取によるTRL画分のリコピン濃度の変化を，⊿リコピン濃度の推移（図6）と$IAUC_{0\text{-}12h}$（図7）として示した。TRL画分の⊿リコピン濃度は，試験食品摂取後4時間および6時間において，昼摂取時よりも朝摂取時で有意に高値を示した。また，$IAUC_{0\text{-}12h}$も，昼摂取時と比較して，朝摂取時では有意に高値であった。なお，夜摂取時との比較でも，朝摂取時

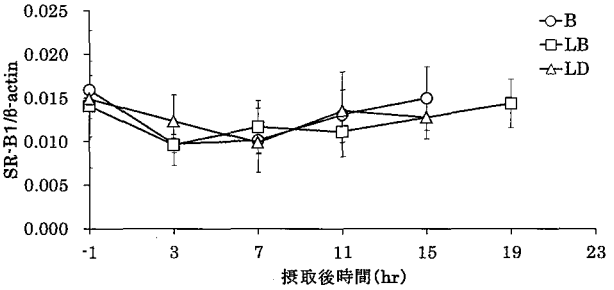

図5　実験2における各群の小腸SR-B1 mRNA発現量の推移
トマト飼料摂取開始時刻（B群，LD群：9:00，LB群：13:00）を0時間とし，SR-B1 mRNA発現量を，β-actin発現量に対する相対量として経時的に示した。n = 5，平均値±標準偏差。

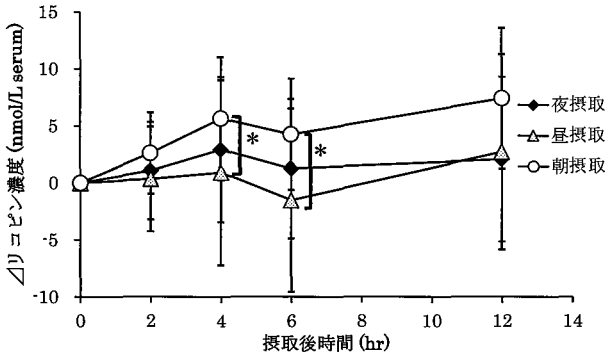

図6　ヒト試験におけるTRL画分中のリコピン濃度変化量の推移
トマトジュース摂取時刻（朝摂取：8:00，昼摂取：12:00，夜摂取：18:00）を0時間とし，その時点からのTRL画分中のリコピン濃度の変化量を経時的に示した。n = 20，平均値±標準偏差。*$p < 0.05$（vs. 朝摂取）。

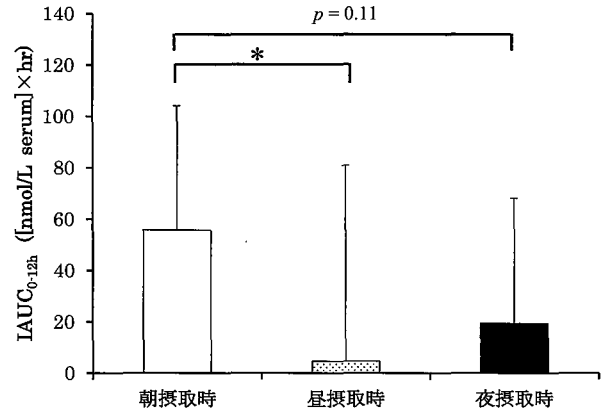

図7　ヒト試験におけるTRL画分中リコピン濃度の$IAUC_{0\text{-}12h}$
試験食品摂取から12時間後までのTRL画分中のリコピン濃度変化量から$IAUC_{0\text{-}12h}$を算出した。n = 20，平均値＋標準偏差。*$p < 0.05$（vs. 朝摂取）。

表3 絶食時間とTRL画分中の$IAUC_{0-12h}$

	絶食時間（時間）	$IAUC_{0-12h}$（μmol/L serum）
朝摂取時	12.0±0.5	55.8±49.4
昼摂取時	4.4±0.4	4.6±76.3
夜摂取時	5.0±0.6	19.3±48.7

は高値を示したが，統計学的有意差は認められなかった。

2.3 絶食時間と$IAUC_{0-12h}$との関連性 試験食品摂取前の絶食時間と$IAUC_{0-12h}$を，摂取時間帯ごとに表3に示した。平均絶食時間は朝，夜，昼の順に長く，$IAUC_{0-12h}$の値もまた朝，夜，昼の順に大きかった。全摂取時間帯の絶食時間と$IAUC_{0-12h}$との関連性をPearsonの積率相関係数により求めた結果，絶食時間と$IAUC_{0-12h}$の値との間には正の相関があることが示された（相関係数：0.357，$p < 0.01$）。

2.4 有害事象 試験期間中，研究対象者のうち，1名の血中尿酸値が高値になる，2名の中性脂肪が高値になる，1名が頭痛を発症するといった有害事象が発生したが，その全てについて，試験食品摂取との因果関係はないと試験責任医師により判断され，試験食品摂取との関連性が否定できない有害事象は認められなかった。

考 察

摂取時間帯の違いがリコピンの吸収率に与える影響を明らかにするために，動物試験（実験1）とヒト試験を実施した。また，そこで得られた結果のメカニズムを明らかにするために，給餌刺激がリコピンの吸収率やSR-B1の遺伝子発現量に与える影響を検証する動物試験（実験2）を実施した。食品成分の摂取時間帯とその吸収率との関連を検証する上では，一定の食事リズムを形成している条件下で試験を実施することが重要である。そこで，動物試験においては，いずれの実験でも，ヒトの食事様式（1日3食）を模すために，ヒトにとっての朝，昼，夜にあたる活動期初期，中期，後期でそれぞれ時間を決めて給餌して馴化し，ヒト試験においては，1日3食を規則正しく摂取している者を研究対象者とした。

なお，今回測定した体内へのリコピン吸収量は，動物試験，およびヒト試験ともに比較的大きなバラつきが認められた。この要因として，動物試験では，ラットを5匹/ケージで飼育したことにより個体ごとに摂餌量のバラつきが生じたこと，ヒト試験では，体内のリコピン蓄積量に差異があったことなどが考えられる。しかし，放射性同位体で標識したリコピンを用いて，その体内吸収と体内動態を検証した報告[25]でも同程度のバラつきが認められていることから，本試験の結果におけるリコピン吸収量のバラつきは妥当な範囲内であり，結果を考察するにあたって問題ないものと考える。一方，これらのバラつきを抑制する手段としては，動物の個別飼育を行い，摂餌量の個体差をなくすことや，ヒト試験の対象者選定において，普段の食事でリコピンの摂取量が低いヒトを対象とすることなどが考えられる。但し，前者は個別で飼育することによる動物へのストレスが懸念されたこと，後者は，研究対象者選抜において，トマトジュース飲用時に一定幅以上の血清リコピン濃度の上昇が認められた者のみを採用したことから，本研究においては実施しなかった。

実験1の結果，血清中リコピン濃度のAUCは活動期初期にトマト飼料を摂取したB群が最も高く，L群とD群では同等の値を示した。また，ヒトに対し，朝，昼，夜のそれぞれの時間帯にリコピンを16 mg含むトマトジュースを摂取させたところ，$IAUC_{0-12h}$は朝摂取時で最も高く，昼摂取時との比較では，その差は統計的に有意であった。この結果は，同じ量のリコピンを摂取する場合，朝（活動初期）に摂取すると，昼や夜に摂取した時と比べて，リコピンの体内への吸収率が高まる可能性があることを示すものであると考えられる。一方で，この結果がリコピンの吸収ではなく，消化・吸収過程におけるリコピンの代謝の日内変動により引き起こされた，すなわち，朝は代謝されにくく，昼や夜ではリコピンの代謝が活発に行われていた可能性もある。そこで，本試験の結果が，リコピンの吸収の違いにより引き起こされたのか，それとも代謝の違いにより引き起こされたのかを考察した。

リコピンは，主に腸管や肝臓に偏在するβ-Carotene-9′,10′-oxygenase（BCO2）により代謝される。BCO2によりリコピンが代謝されると，代謝産物としてApo-10′-lycopenalが産生されることが明らかになっている[26)27)]。既報を調査した結果，BCO2の発現や活性に関する日内変動を検証した報告は認められなかった。そこで，本試験で分析した血液サンプル中に含まれるApo-10′-lycopenal量を確認したが，いずれの血液サンプルでも，その量は検出限界以下であった。また，実験1では，各群で血清中リコピン濃度が最大値となる時間が異なっており，代謝がこれに影響を与えた可能性が考えられた。しかし，ラットにおけるリコピンの体内動態を検証した報告では，リコピンの肝臓中濃度は，経口摂取後飽和するまでに24時間程度かかるとされており[28)]，本試験で検出された動物試験における血清中リコピン濃度が最大値となる時間よりも後に生じている。さらに，ヒトにおいても，血中リコピン濃度の半減期は，5日間から33日間と幅はあるものの，比較的長期である[20)29)30)]。このことから，今回測定した血中リコピン濃度の値に対し，リコピンの代謝が与えた影響は低く，リコピンの吸収の違いが与えた影響が大きいと判断した。

次に，本試験で得られた吸収率の差が，1日の時間帯の中で「朝」という時間帯に摂取したことによるものなのか，もしくは，別の要因によるものなのかを考察した。実験2において，最後（ヒトの夜に該当）の給餌時間を4時間遅らせたLD群では，B群ないしはLB群と比較

して絶食時間が短く（10時間 vs. 14時間），血清中リコピン濃度のAUCは低値を示した。また，最後の給餌時間は同じだが，14時間絶食し，ヒトの昼に該当する時間帯にリコピン餌を摂取したLB群と比較しても，LD群の血清中リコピン濃度のAUCは低値を示した。このことから，朝摂取時にリコピンの吸収率が高くなった原因は，「朝」という時間帯よりも，絶食時間の長さに強く影響を受ける可能性が高いと考えられた。またこのことは，ヒト試験において，試験食品摂取時までの絶食時間と$IAUC_{0\text{-}12h}$との関連性を解析した結果，両者の間に正の相関が確認され，試験食品摂取までの絶食時間が長い程，$IAUC_{0\text{-}12h}$が高かったことからも支持される。これらのことから，絶食時間が長いほどリコピンの吸収率が高くなることが推測された。

前述した通り，リコピンは胆汁酸とともにミセルを形成した後，能動輸送と受動輸送とで体内に吸収される。このうち，リコピンの能動輸送に関与するSR-B1の発現リズムは，給餌刺激の影響を受けることが知られている[5)15)16)]。実験2の結果において，給餌前の値を対照とし，その他の各時間におけるSR-B1 mRNAの発現量をDunnettの多重比較検定で統計解析した結果，B群，LB群においては，給餌直前の発現量が給餌直後の発現量よりも高い傾向が見られた（それぞれ$p = 0.07$，$p = 0.09$）。従って，既報[31)32)]の通りSR-B1の発現リズムは，給餌刺激の影響を，ある程度受けることが示唆された。しかし，各群の小腸のSR-B1 mRNAの発現量は，測定したいずれの時間でも群間差はなく，SR-B1 mRNAの発現量は，絶食時間の長さの影響を受けていないことが示唆された。したがって，絶食時間が長くなることによるリコピン吸収率の増加は，SR-B1を介した能動輸送の促進によるものではないと考えられた。一方，胆汁酸は食事をすることで濃度が高くなるが，ヒトにおいては食後4時間で食事前の胆汁酸濃度に戻ることが知られている[33)]。今回実施したヒト試験では，朝，昼，夜いずれの摂取時間帯においても4時間以上の絶食を課しており，研究対象者間で胆汁酸濃度には差がなかったと考えられる。そのため，本試験で得られた絶食時間の長さとリコピンの吸収率との関係が，胆汁酸濃度の違いの影響を受けていた可能性は低いと推測された。以上から，これまで一般的に知られているリコピンの吸収メカニズムからでは，絶食時間の長さとリコピンの吸収との関連を考察することができなかったため，絶食によって生体に生じる変化を中心に，本試験の結果に対する考察を実施した。

絶食による生体内の変化の中で物質の吸収に影響を与えることが知られている要素として，胃内pHと胃内容物排出速度（gastric emptying rate，GER）がある。消化管のpHが異なることで，体内への吸収性が変化する物質があることが知られている[34)]。すなわち，絶食や摂食により胃のpHが変化し，吸収率に影響を与えた可能性が考えられるが，胃のpHは食後2-3時間で空腹時と同じ状態に戻ることが知られている。今回のヒト試験では，試験食品摂取までの絶食時間が最低でも4時間以上であるため，各摂取時間帯での胃のpHに大きな違いはなかったと考えられる。GERは，食物が胃に滞留している場合遅くなり，食物がない場合は速くなることが知られている[35)]。GERが遅くなると，経口摂取した物質が腸管に到達する時間が遅くなるため，体内への吸収速度が遅くなると共に，体内における最大濃度も低くなる。一般的に，ラットやヒトの食物の胃滞留時間は3時間程度と言われているが，実験1のL群やD群は，通常飼料を摂取した2時間後にトマト飼料を摂取していたため，トマト飼料摂取時には食物が胃内に滞留していた可能性が高い。実験1のL群やD群では，B群と比較して，リコピンの血清中の最大濃度が低くなっており，かつ，最大濃度を検出した時間も遅くなっていたことから，リコピンの吸収がGERにより影響を受けた可能性があると考えられた。一方で，実験2のLD群においては，通常飼料摂取の10時間後にトマト飼料を摂取しており，食物の胃内滞留がほとんどないと考えられる状況であるにもかかわらず，B群と比較してリコピン吸収率が低くなった。加えて，ヒト試験では，食事の間隔を最低でも4時間空けているため，試験食品摂取時のGERが，前の食事の胃内滞留の影響を受けていた可能性は低いと考えられた。以上より，実験1の結果からは，GERの関与を否定できないが，実験2やヒト試験結果を踏まえると，GERの関与は低いと考えられた。そのため，本試験の結果と，既報の情報だけでは，絶食時間の長さによるリコピンの吸収率向上の要因を特定するには至らなかった。

これまで，リコピンの吸収量を高める摂取方法として，一緒に摂取する食品の成分，加工方法，リコピンの立体構造などに注目して研究がなされてきたが，本試験においては，摂取時間帯による吸収率の違いを検証した。その結果，活動期初期や朝にリコピンを摂取することで，吸収率が高くなること，そして，この結果には絶食時間の長さが関連していると考えられることを明らかにした。この結果を受け，我々は，本試験で対象としたリコピン以外の栄養素について，摂取時間帯や絶食時間が吸収量に与える影響について検討した報告例を調査したが，調査した範囲では，絶食時間の長さが吸収に影響を与えることを示した報告は認められなかった。栄養素により吸収のメカニズムは異なることから，各栄養素の最適な吸収時間帯や，絶食時間の長さが吸収に与えるか否かについては個々に検討を要すると考える。また，本試験でリコピンの吸収と絶食時間との関連があった要因は，今回の研究だけでは明確にすることができなかった。この要因を明らかにするためには，今後，消化管におけるリコピンの吸収メカニズムの詳細を明らかにすると共に，それにかかわる因子が絶食時間によってどのような影響を受けるのかを明らかにする必要がある。

文　献

1) Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* **274**: 532–8.
2) Sies H, Stahl W (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* **62**: 1315–21.
3) Agarwal S, Rao AV (2000) Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* **163**: 739–44.
4) Erdman JW Jr, Ford NA, Lindshield BL (2009) Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Arch Biochem Biophys* **483**: 229–35.
5) Wang XD (2012) Lycopene metabolism and its biological significance. *Am J Clin Nutr* **96**: 1214S–22S.
6) Jain MG, Hislop GT, Howe GR, Ghadirian P (1999) Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada. *Nutr Cancer* **34**: 173–84.
7) Arab L, Steck S (2000) Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* **71**: 1691S–7S.
8) Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **94**: 391–8.
9) 青木雄大，菅沼大行（2016）カロテノイド摂取における野菜の加工・調理のすすめ．日本食育学会誌 **10**, 163–70.
10) Gärtner C, Stahl W, Sies H (1997) Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr* **66**: 116–22.
11) Böhm V, Bitsch R (1999) Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions to other carotenoids, the lipid status, and the antioxidant capacity of human plasma. *Eur J Nutr* **38**: 118–25.
12) Parada J, Aguilera JM (2007) Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* **72**: R21–32.
13) During A, Harrison EH (2004) Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch Biochem Biophys* **430**: 77–88.
14) Hussain MM, Pan X (2015) Circadian regulation of macronutrient absorption. *J Biol Rhythms* **30**: 459–69.
15) During A, Dawson HD, Harrison EH (2005) Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr* **135**: 2305–12.
16) Moussa M, Landrier JF, Reboul E, Ghiringhelli O, Coméra C, Collet X, Fröhlich K, Böhm V, Borel P (2008) Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *J Nutr* **138**: 1432–6.
17) Pan X, Hussain MM (2009) Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *J Lipid Res* **50**: 1800–13.
18) Hussain MM, Pan X (2012) Clock regulation of dietary lipid absorption. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **15**: 336–41.
19) Hussain MM, Pan X (2015) Circadian regulators of intestinal lipid absorption. *J Lipid Res* **56**: 761–70.
20) Oshima S, Sakamoto H, Ishiguro Y, Terao J (1997) Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of paprika juice in men. *J Nutr* **127**: 1475–9.
21) Aizawa K, Inakuma T (2007) Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan. *Food Sci Technol Res* **13**: 247–52.
22) Yoshida K, Yokoyama H, Oteki T, Matsumoto G, Aizawa K, Inakuma T (2011) Evaluation of the effect of dietary lycopene, the main carotenoid in tomato (*Lycopersicon esculentum*), on the *in vivo* renal reducing ability by a radiofrequency electron paramagnetic resonance method. *J Agric Food Chem* **59**: 2966–71.
23) Kodama Y, Kishimoto Y, Muramatsu Y, Tatebe J, Yamamoto Y, Hirota N, Itoigawa Y, Atsuta R, Koike K, Sato T, Aizawa K, Takahashi K, Morita T, Homma S, Seyama K, Ishigami A (2015) Antioxidant nutrients in plasma of Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma-COPD overlap syndrome, and bronchial asthma. *Clin Respir J* (in press).
24) Kanda Y (2012) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**: 452–8.
25) Mathews-Roth MM, Welankiwar S, Sehgal PK, Lausen NC, Russett M, Krinsky NI (1990) Distribution of [14C]canthaxanthin and [14C]lycopene in rats and monkeys. *J Nutr* **120**: 1205–13.
26) Raghuvanshi S, Reed V, Blaner WS, Harrison EH (2015) Cellular localization of β-carotene 15,15′ oxygenase-1 (BCO1) and β-carotene 9′,10′ oxygenase-2 (BCO2) in rat liver and intestine. *Arch Biochem Biophys* **15**: 19–27.
27) Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE, Von Lintig J (2001) Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin. *A J Biol Chem* **276**: 14110–6.
28) Zaripheh S, Boileau TW, Lila MA, Erdman JW Jr (2003) [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *J Nutr* **133**: 4189–95.
29) Cohn W, Thürmann P, Tenter U, Aebischer C, Schierle J, Schalch W (2004) Comparative multiple dose plasma kinetics of lycopene administered in tomato juice, tomato soup or lycopene tablets. *Eur J Nutr* **43**: 304–12.
30) Rock CL, Swendseid M, Jacob RA, Mckee RW (1992) Plasma carotenoid levels in human subjects fed a low carotenoid diet. *J Nutr* **122**: 96–100.
31) Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachias-

matic nucleus. *Gene Cells* **26**: 269–78.
32) Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001) Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachismatic nucleus of mice. *Eur J Neurosi* **13**(6): 1190–6.
33) 内田清久 (1992) 胆汁酸代謝と腸内細菌. ビフィズス **5**, 157–172.
34) 奥平典子, 荻原琢男 (2006) 消化管トランスポーターを意識した医薬品開発(1)—Influx transporter—. *Drug Delivery System*, **21**, 134–41.
35) 加藤隆一 (2014) 臨床薬物動態学, 第4版, p 27. 南江堂, 東京.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **70**: 147–155 (2017)

Original Paper

Effect of Eating Time on Lycopene Bioavailability in Rats and Humans

Yudai Aoki,[1] Kazutaka Yoshida,[1] Yukihiro Nobuta,[*,1] Satoshi Sunabori,[1] Yuka Nishida,[2] Hideo Kato,[2] and Hiroyuki Suganuma[1]

(Received January 5, 2017; Accepted April 3, 2017)

Summary: Lycopene, a major carotenoid in tomato, is one of the strongest natural singlet-oxygen quenchers. Circadian rhythms have been suggested to affect the bioavailability of many nutrients, but no previous studies have investigated such effects on lycopene. Therefore, we investigated the effects of the timing of lycopene ingestion on its bioavailability in both rodents and humans. Rats or healthy human subjects consumed lycopene-containing test food at different times, and their blood lycopene concentrations were then measured. It was found that the increase in blood lycopene level was highest when lycopene was ingested at the beginning of the active period (in rats) or in the morning (in humans). The result appeared to depend on not only the time slot chosen but also the length of the adjacent fasting period. Our findings suggest that the bioavailability of lycopene is maximal at breakfast because it follows a period of fasting.

Key words: lycopene, bioavailability, eating time, period of fasting

* Corresponding author (E-mail: Yukihiro_Nobuta@kagome.co.jp)
[1] Nature & Wellness Research Department, Innovation Division, Kagome Co., Ltd., 17 Nishi-Tomiyama, Nasu-Shiobara 329–2762, Japan
[2] Department of Domestic Science, Tohoku Women's College, 1–1–16 Kiyohara, Hirosaki 036–8530, Japan
Previous position; Department of Life Science, Prefectural University of Hiroshima, 1–1–71 Ujina-Higashi, Minami-ku, Hiroshima 734–8558, Japan