ラット反転小腸における β -カロテンの吸収と代謝挙動

高木 茂 明, 広 尾 禎 久

大 田 守 也, 木 村 吉 伸

岡山大学農学部生物資源開発学講座

Uptake of β -Carotene and Its Metabolic Behavior in Rat Inverted Small Intestine

Shigeaki TAKAGI, Sadahisa HIROO, Moriya OHTA and Yoshinobu KIMURA

Department of Bioresources Chemistry, Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.) 47, 287~293 (1994)

The absorption and metabolism of β -carotene by rat inverted small intestine were studied *in situ*. First, an assay system of β -carotene absorption and retinol production was established. Simultaneous use of NADH and NA in the incubation mixture was required for good β -carotene absorption. The pH optima of both β -carotene absorption and retinol production were the same, 7.7. Ten millimolar Na-cholate was required as a β -carotene solubilizing agent. Saponification was necessary in this assay system, because retinol ester was a major product, followed by transportation from the intestine to the incubation mixture. When new parameters, total β -carotene absorbed and total retinol produced, were introduced, the concentration of the substrate β -carotene had a great influence on the absorption rate of β -carotene (38~69 nmol/g intestine·h) and also the production rate of retinol (14~36 nmol/g intestine·h). The absorption ratio decreased with increasing concentration of the substrate β -carotene, and the ratios were 10.8%, 5.7% and 4.3% at 15, 30 and 70 μ M β -carotene, respectively. The production ratio of retinol from β -carotene absorbed increased from 15% to 75%, depending on the amount of β -carotene absorbed. These results indicate that a major proportion of β -carotene absorbed is rapidly cleaved, followed by production of retinol through retinal, suggesting the possibility that β -carotene is cleaved at the center site of the isoprenoid structure.

Key Words β -carotene, absorption of, vitamin A, production of, inverted intestine.

(Received March 4, 1994)

カロテノイドはプロビタミン A として有用である以外に、近年 β -カロテン^{1)~3)} や α -カロテン⁴⁾ ががん予防に有効であること、また一重項酸素の消去剤⁵⁾⁶⁾ としての機能をもつことなどが明らかにされてきている食品成分である。

カロテノイドは主として植物性食品からすべて経口摂取されるが、その吸収・代謝機構については未だ不明確な点が多く残されており、カロテンおよびキサントフィルの体内への取込みに関する報告は少ない⁷⁾⁸⁾。また吸収されたカロテノイドの小腸におけるビタミン A への開裂反応についても中央開裂⁹⁾ か逐次開裂¹⁰⁾ かの問題に結論はまだ出ておらず、さらにレチナール、レチノールお

よびレチノイン酸の間における酸化還元反応の選択的応機作などもほとんどわかっていない。

本研究では、カロテノイド非蓄積動物であるラットの反転小腸を用いて、*in situ* における β -カロテンの吸収とカロテノイドのレチノールへの変換反応および小腸からの輸送について明らかにすることを目的としており、カロテノイド吸収・代謝の測定系を確立し、その吸収速度と小腸における代謝挙動について調べた。

実験方法

1. ラ ッ ト

ウイスター系メスラットにラット用粉末飼料（日本クレア、CE-2）を3週齢から自由摂取させて25℃、暗所で10~14週齢まで飼育して供試した。

2. 反転小腸

ラットをエーテル麻酔して断頭屠殺し、小腸摘出後空腸と回腸を区別しないで約5 cm長にほぼ等分切断し(12本/ラット)、内容物を注射器にて排出後、氷冷生理食塩水に入れる。常法¹¹⁾を改変してパスツールピペットの先を小腸の一端部に引っかけて押し込むようにして反転した。反転小腸の両端は開放状態のまま供試した。

本実験ではすべて複数ラットの反転小腸から空・回腸の区別をしないで1匹分の小腸を12等分して合わせ、インキュベーションにおいてはそのうちの2本をランダムに組み合わせて用いた。

3. 試 薬

all-tans β -カロテンは日本ロシュ社から購入。グルタチオン (GSH), レチノール (RetOH), レチナール (Retal) およびレチノイン酸 (RetA) はシグマ社, ニコチンアミド (NA) とコール酸ナトリウム (CA) はナカライテスク社, 硫酸第一鉄アンモニウム (モール塩), ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADH) および活性アルミナは和光純薬の最純試薬を用いた。

4. β -カロテン溶液の調製

購入 β -カロテンの石油エーテル溶液を石油エーテルで平衡化したアルミナカラムにのせ、石油エーテル-エーテル系溶媒により溶出・精製してベンゼン溶液として -80°C に貯蔵したものから任意量取り出し $E_{1\text{cm}, 453\text{nm}} = 2,620$ (エタノール) を用いて濃度を測定した。 β -カロテン濃度が25 mlにしたとき $500\text{ }\mu\text{M}$ になるように上記ベンゼン溶液の一定量を取り、Tween-20を約3 ml加えてベンゼンを減圧留去後10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7) で25 mlにメスアップした。

5. 基質溶液の調製

10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7) 50 ml に15 mmol NaCl, 0.7 mmol KCl, 0.5 mmol GSH, 0.5 mmol CA, 0.2 mmol NA, 0.2 mmol NADH, および0.1 mmol モール塩を溶解し、これに $500\text{ }\mu\text{M}$ β -カロテンの Tween-20 可溶化液6~16 mlを加えて同緩衝液で100 mlとし、30~80 μM β -カロテン基質溶液とした。

6. インキュベーション

100 ml 褐色三角フラスコに基質溶液25 mlを入れ、 37°C , 15 min 予備加温後、反転小腸 (5 cm $\times$ 2本)を入れて振盪攪拌しながら反応を行わせた。なお、実験方法の2の項にも記述したとおりすべての実験において供試反転小腸は複数ラットからの空・回腸を12等分してランダムに2本を組み合わせ酵素的試料として用いており、インキュベーションは通常の酵素活性測定と同様のものとして行った。

所定時間後に小腸を取り出して10 mM HClに数秒浸して反応を停止させ、生理食塩水にて軽く洗浄後水分を

クリネックスティッシュで吸い取って小腸の湿重を秤量した。各実験区の反転小腸から生理食塩水中で粘膜を剝離したあと小腸残部を秤量し、小腸重量との差を粘膜重量とした。粘膜と残部はそれぞれアセトンを加えてポリトロンミキサーでホモジナイズし脂質を抽出した。抽出液からアセトンを減圧留去後、残液をエーテル-石油エーテル (1:1, v/v) で抽出し、溶媒を留去後少量のベンゼンとその20倍量のエタノールを加えて溶解し、さらに60%エタノール性KOHを1 Nになるように加えて室温に1夜放置しけん化した。少量のbutyl hydroxytoluene (BHT)を加えてエーテル:石油エーテル (1:1) で3回抽出し、さらにその水層に酢酸10 mlを加えてエーテル:石油エーテル (1:1) で抽出した。両者を合して無水硫酸ナトリウム脱水後溶媒を減圧留去し、メタノールを加え1 mlとしてHPLC用試料にした。また小腸を取り出した後の酵素反応液からエーテル:石油エーテル (1:1) で脂質を抽出し、無水硫酸ナトリウム脱水後けん化して不けん化物をメタノールに溶かして5 mlとしHPLCに供した。

7. HPLC

レチノイドおよびカロテノイドの分析はJASCO-880-PU型HPLCシステムに同875-UV検出器をつけ次の分析条件で行った。レチノイド:カラムはCapcel pak C₁₈SG-120S $5\text{ }\mu\text{M}$ (4.6 $\times$ 250 mm), 検出波長は350 nm, 流速は1.1 ml/min, 溶媒は(A)アセトニトリル:1%酢酸アンモニウム (8:2, v/v), (B)アセトニトリル:イソプロパノール (6:4, v/v)の濃度勾配溶出。カロテノイド:カラムはFinepak Sil 300 C₁₈ T-7 (4.6 $\times$ 250 mm), 検出波長は450 nm, 流速は1 ml/min, 溶媒は(A)95%メタノール, (B)アセトニトリルの濃度勾配溶出。定量法は次のようである。レチノイドの場合RetOH, RetalおよびRetAの各標準品の同条件下におけるクロマトグラムから標品濃度に対するピーク面積をプロットして定量式を求め((1)~(3)式), これを用いて定量した。

$$\text{RetOH (nmol/g)} = (A \times 7.0 \times 10^{-7} / W) \times V_1 / V_2 \quad (1)$$

$$\text{Retal (nmol/g)} = (A \times 9.1 \times 10^{-7} / W) \times V_1 / V_2 \quad (2)$$

$$\text{RetA (nmol/g)} = (A \times 4.9 \times 10^{-7} / W) \times V_1 / V_2 \quad (3)$$

ただし、 A =ピーク面積; V_1 =調製試料液量 (ml); V_2 =HPLC注入量 (ml); W =試料重量 (g)。

カロテノイドの場合、 β -カロテンの標準曲線をレチノイドと同様に作成し(4)式を求め定量した。

$$\beta\text{-カロテン (nmol/g)} = (A \times 1.12 \times 10^{-7} / W) \times V_1 / V_2 \quad (4)$$

実験結果

1. 生成 RetOH 定量のためのけん化処理

小腸において β -カロテンから生成した RetOH はこれまで脂肪酸エステルとして小腸から輸送される¹²⁾といわれているので、けん化処理が分析結果に及ぼす影響を調べた。粘膜と小腸残部からのアセトン抽出物から方法の項で述べたようにけん化した試料と未けん化対照試料とを調製して HPLC 分析を行い基質 β -カロテン濃度と RetOH 生成量との関係を求めた (Fig. 1)。 β -カロテン $15 \mu\text{M}$ のとき、未けん化試料では RetOH はほとんど検出されず、けん化により RetOH が増加したことから生成 RetOH の定量にはけん化処理が必須であることがわかった。

2. 最適 pH

反応混合物の pH が β -カロテン吸収および RetOH 生成に及ぼす影響を調べた (Fig. 2)。いずれの場合も最

Fig. 1. Retinyl ester production in rat inverted intestine under different β -carotene concentrations.

Incubation time, 60 min. ○, mucosa saponified; ◐, residue saponified; ●, residue unsaponified; •, mucosa unsaponified.

適 pH は 7.7 であり、これは β -カロテンジオキシゲナーゼ¹³⁾の最適 pH と同じであった。

3. NA および Fe^{2+} の必須性

反応混合物に加えた cofactor のうちほとんどは β -カロテン開裂酵素¹³⁾または RetOH 還元酵素¹⁴⁾の活性決定に必要なものであるが、このうち NA および Fe^{2+} の必須性について調べた。二価鉄イオンは β -カロテンジオキシゲナーゼの cofactor であるとされており¹⁵⁾, NA は同酵素活性およびレチナール還元酵素活性の安定化因子である。これらの必須性を調べた結果、NA および Fe^{2+} は単独では β -カロテンの粘膜吸収を促進しなかったが、RetOH 生成においては単独または併用でそれを促進した (Table 1)。

4. 新しい活性パラメータの導入

小腸粘膜についてけん化処理効果をみたとき (Fig. 1) 基質 β -カロテン $30 \mu\text{M}$ のとき 60 min 反応において RetOH 量が非常に低くなっていた。このことは小腸から反応液への RetOH 輸送が起きていることを予測させたため、反応液についても同様に分析を行った (Fig. 3)。ここではけん化後の結果のみを示している。この結果から、基質 β -カロテン濃度が高いときには RetOH エステ

Fig. 2. Effect of pH on β -carotene absorption and retinol production in rat inverted intestine.

Mucosa fraction, determined substrate β -carotene, $15 \mu\text{M}$. Incubation time, 40 min. ○, retinol produced; ●, β -carotene absorbed.

Table 1. Effect of NA and Fe^{2+} on β -carotene absorption and retinol production at inverted intestine.

Cofactor	β -carotene absorbed (nmol/g intestine)		Retinol produced (nmol/g intestine)	
	mucosa	residue*	mucosa	residue*
no	2.50	ND	0.42	0.20
2 mM NA	3.87	ND	1.56	0.92
1 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	2.60	ND	0.98	2.02
2 mM NA + 1 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	5.51	ND	1.76	1.50

Incubation time, 60 min. ND, not detected. Substrate β -carotene, $15 \mu\text{M}$. *Intestine residue after removal of mucosa.

Fig. 3. Effect of β -carotene concentration on transportation of retinyl ester from rat inverted intestine to incubation mixture.

Incubation time, 60 min. ○, Incubation mixture; ⊙, mucosa; ●, residue.

ルが小腸から反応液へすばやく外部輸送されていることがわかった。

Fig. 3 にみられるように反転小腸から反応液中への RetOH エステルの輸送は基質濃度が $30 \mu\text{M}$ になると急激に増加した。そこで、この系全体の反応量を表すパラメータとして“全 β -カロテン吸収量”および“全 RetOH 生成量”を (5) と (6) 式のようにそれぞれ設定して、これらを基質 β -カロテン濃度に対してプロットしたところ、いずれも基質濃度にほぼ 1 次比例する関係が得られた (Fig. 4)。

全 β -カロテン吸収量 (nmol)

$$= (\text{小腸 } \beta\text{-カロテン}) \text{ nmol} \\ + (1/2) (\text{全レチノール生成量}) \text{ nmol} \quad (5)$$

全レチノール生成量 (nmol)

$$= (\text{小腸レチノール}) \text{ nmol} \\ + (\text{反応液中のレチノール}) \text{ nmol} \quad (6)$$

なお、(5) 式で定義したパラメータには β -カロテンが小腸において中央開裂を受けるという仮定 (すなわち、(5) 式第 2 項において生成レチノールの $1/2 \text{ mol}$ が β -カロテンの 1 mol であるとする) を導入している。ここで直線関係が得られたことはこれらのパラメータが密接な相互関係をもっていることを示すものである。

ここで全 β -カロテン吸収量に対する全 RetOH 生成量の比は反転小腸において吸収された β -カロテンから RetOH への変換率と考えられるので、基質 β -カロテン $30 \mu\text{M}$ のときの値から作図的に RetOH 変換率を求めると 32.6% であった。

5. NADH 要求性

in vitro において RetOH 還元酵素の活性発現には NADH があれば NA は不要であることがわかっていて¹⁾、NADH 濃度が全 β -カロテン吸収量および全レ

Fig. 4. Effect of substrate β -carotene concentration on total β -carotene absorption and total retinol production in rat inverted intestine.

Incubation time, 60 min. ○, β -carotene absorbed; ●, retinol produced.

チノール生成量に及ぼす影響を NA の共存効果とともに調べた。この結果、全 β -カロテン吸収量および全レチノール生成量に対して NADH 単独ではその効果が認められなかったが、NA との併用により全 β -カロテン吸収量が明らかに高く、 5 mM NADH と 2 mM NA 併用により活性は 1.8 倍上昇した。したがって NADH と NA の併用が本実験では好ましく、方法の項で述べた各濃度を用いることにした。

6. 可溶化剤としてのコール酸ナトリウム

基質 β -カロテンはアセトンに溶かした後に Tween-20 を加えて乳化後アセトンを減圧留去し可溶化してから酵素反応液に加えているが、反応液中での主たる可溶化剤はコール酸ナトリウム (CA) であるので、 β -カロテン吸収代謝活性に対するこの濃度依存性を調べた。 β -カロテン吸収は CA 10 mM まで、また全 RetOH 生成は 5 mM まで濃度依存性がみられた (Fig. 5)。この結果から反応混合物中の CA 濃度を 5 mM とした。

7. β -カロテン濃度の依存性

β -カロテン吸収量および RetOH 生成量は基質 β -カロテン濃度に対する依存性が高いとみられるので、これについて β -カロテン吸収からレチノールエステルに至る一連の反応の Lineweaver-Burk プロットを行い (Fig. 6)、みかけの K_m 値を求めたところ $34.5 \mu\text{M}$ であった。そこで基質濃度を $70 \mu\text{M}$ にまで上げて同様の酵素反応を行わせ、 $15 \mu\text{M}$ および $30 \mu\text{M}$ の各濃度における結果と比較した (Fig. 7, Table 2)。基質 β -カロテン $70 \mu\text{M}$ における全 β -カロテン吸収量は $69 \text{ nmol/g intestine} \cdot \text{h}$ となって $30 \mu\text{M}$ のときの約 50% 増であり、また吸収 β -カロテンの RetOH への変換率はさらに上昇して約 75% であった。このことは基質 β -カロテンの小腸粘膜への取り込み、およびその RetOH への変換率が β -カロテン濃

Fig. 5. Dependence of Na-cholate concentration on both β -carotene absorption and retinol production in rat inverted intestine.

Substrate β -carotene, 70 μ M. Incubation, 60 min.
○, β -carotene absorbed; ●, retinol produced.

Fig. 6. Time course of total β -carotene absorption and total retinol production in rat inverted intestine.

○, total β -carotene absorbed at 70 μ M substrate β -carotene; ●, total retinol produced at 70 μ M substrate β -carotene; ○●, total β -carotene absorbed at 15 μ M substrate β -carotene; ●●, total retinol produced at 15 μ M substrate β -carotene.

度に強く依存することを示している。

考 察

β -カロテンの小腸粘膜における吸収とその後の代謝反応として、1) β -カロテンの小腸粘膜細胞の通過、2) 細胞内 β -カロテン dioxygenase (CDase) が触媒する開裂反応、3) 生成 Retal の Retal 還元酵素 (RRase) による還元反応、4) 生成 RetOH のエステル化反応が考えられ

Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of total retinol production against substrate β -carotene concentration in rat inverted intestine.

Incubation time, 60 min. Lineweaver-Burk plots were derived from the outside curve showing a relationship between total retinol production (V) and substrate β -carotene concentration (S).
 $K_m = 34.5 \mu$ M; $V_{max} = 46.5$ nmol/g intestine $\cdot$ h.

Table 2. Effects of substrate β -carotene concentration on total β -carotene absorption and total retinol production in rat inverted small intestine.

Item	Substrate β -carotene concentration (μ M)		
	15	30	70
Total β -carotene absorbed (nmol/g intestine $\cdot$ h)	38.7	40.7	69.0
Total retinol produced (nmol/g intestine $\cdot$ h)	14.8	18.1	36.4
Ratio of retinol produced to β -carotene absorbed (%) [*]	15.0	26.9	75.2
Absorption ratio of β -carotene (%) ^{**}	10.8	5.7	4.3

Incubation time, 60 min. ^{*}Ratios between initial velocities of curves in Fig. 7. ^{**}(Total β -carotene absorbed/substrate β -carotene) $\times$ 100.

る。

反転小腸を用いた *in situ* 実験において、反応混合物中の β -カロテンが上記 1) から 4) の反応を経て RetOH エステルに至るまでの各反応の最適条件は必ずしも同じでない。たとえば、最適 pH は *in vitro* 実験ではあるが CDase は 7.7¹³⁾, RRase は 6.3¹⁴⁾, RetOH エステル生成

酵素は $7.4^{10)}$ のように異なっている。本実験系において小腸内のpHがアルカリ性であることと、CDaseの最適pHが7.7であることを参考にして測定したところ、この*in situ*系における最適pHは7.7であった。*in vitro*実験ではRRase活性に比べて、CDase活性は非常に小さいことが観察されており、反転小腸においても後者の反応が制限因子となっている可能性が高い。そこで、本実験系におけるcofactorとしてはCDase活性発現に必要なものを基本にして検討した。その結果 (Table 1) Fe^{2+} は β -カロテン吸収にはむしろ負の効果さえ示したが、RetOH生成反応には有効であった。また同時に加えたNAもRetOH生成に有効であることがわかった。RRaseの重要な補酵素であるNADHの本実験系における濃度依存性は認められないが、NAとの共存の場合に β -カロテン吸収を増加させた。RetOH生成にはNADH単独またはNAとの併用効果はいずれも認められなかった。NADHは反転小腸の粘膜細胞内にRRaseの補酵素としての必要量は存在すると考えられるので、とくに反応混合液中にこれを加える必要はないが、NAとの共存で β -カロテンの取込み効果が認められたことはNAとNADHとの何らかの共同作用があることを推定させる。

β -カロテンの吸収とRetOH生成は基質 β -カロテンの可溶化剤であるコール酸ナトリウムの濃度に依存していた (Fig. 5)。コール酸ナトリウム10 mM以上では両活性とも一定となるので、反応には5 mMを用いたが、この濃度はコール酸ナトリウムの1次ミセルの臨界ミセル濃度¹⁷⁾にほぼ一致している。

反転小腸において β -カロテンから生成したRetOHはほとんどすべてがエステル型になっているが (Fig. 1) β -カロテンを吸収して5~15 min後には生成エステルが小腸から輸送・放出されはじめている (Fig. 6)。そうして、輸送の速度は基質 β -カロテン濃度に強く依存しており、同時に β -カロテン吸収量およびRetOH生成量も基質 β -カロテン濃度の影響を強く受けるので、 β -カロテンの粘膜内への取込みは非常に早く起こっていると思われる。カロテノイドの小腸における吸収は摂取カロテノイド量に比例するといわれており¹⁸⁾、本実験でも吸収速度が β -カロテン濃度に比例していることから (Fig. 4)、その小腸粘膜通過には拡散などの物理的因子の影響が大きいものと考えられる。 β -カロテンからのRetOH生成速度も基質 β -カロテン濃度に強く影響され、 β -カロテン15 μ Mでは15 μ M/g $\cdot$ hであったものが70 μ Mでは36 μ M/g $\cdot$ hにもなっている (Table 2)。また、吸収された β -カロテンのRetOHへの変換率も基質濃度に大きく依存していた。一方、基質 β -カロテンの吸収率は基質濃度が高いほど低くなり、15 μ Mのとき60 minで基質

の10.8%が吸収されているのに対し、70 μ Mでは約1/2になっていた。このことは β -カロテンの吸収が受動的輸送であることを示すと同時に、粘膜細胞表面では一定時間に一定量の β -カロテンを吸収していることをも示しており、 β -カロテン濃度が高いと粘膜と接触する頻度も高くなり、結果的に早く吸収されるものと考えられる。*in vitro*におけるCDase活性はRRase還元酵素のそれと比べて非常に小さく、この*in situ*実験において最適pHが*in vitro*におけるCDase活性のそれと一致することからも開裂反応が制限因子になっていることが推定できる。また、これまで議論になっている β -カロテン開裂様式については、RetOHエステルの生成速度が非常に大きいことから判断して、apo-carotenal¹⁹⁾を経る逐次開裂よりも中央開裂が優勢である可能性が高いと考えられる。

要 約

ラットにおける β -カロテンの吸収と代謝に関する知見を得るために、反転小腸を用いた*in situ*系により調べた。この活性測定系においてNADHとニコチンアミドの併用は β -カロテンの吸収を増加させた。反応系の最適pHは7.7であった。 β -カロテン可溶化剤としてのコール酸ナトリウムは10 mMまでは β -カロテンの吸収・代謝活性を上昇させた。生成レチノールの大部分はエステルとして小腸から反応液へ輸送されているので、けん化処理が必要であった。新しい活性尺度として“全 β -カロテン吸収量”および“全レチノール生成量”を導入すると、 β -カロテンの吸収速度(38~69 nmol/g intestine $\cdot$ h)およびレチノール生成速度(14~36 nmol/g intestine $\cdot$ h)は反応液中の基質 β -カロテン濃度に大きく依存していた。 β -カロテンの吸収率は基質濃度が高くなると減少し、基質 β -カロテン15, 30, 70 μ Mのときそれぞれ10.8, 5.7, 4.3%であった。また吸収された β -カロテンのレチノールへの変換生成率は15~75%であり、吸収 β -カロテン濃度に強く依存していた。これらの結果はラット小腸において β -カロテンの多くが速やかに開裂したあとレチナールを経てビタミンAに変換することを推測させ、 β -カロテン中央開裂の可能性の高いことを示唆している。

文 献

- 1) Bentram, J.S., Kolond, L.N. and Meyskens, F.L., Jr.: *Cancer Res.*, **47**, 3012 (1987)
- 2) Temple, N. and Basu, T.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 1211 (1987)
- 3) Tomita, Y., Himeno, K., Nomoto, K., Endo, H. and Hirohata, T.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **78**, 679 (1987)
- 4) Murakoshi, M., Nishino, H., Satomi, Y., Takayama, J., Hasegawa, T., Tokuda, H., Iwashima, A., Oku-

- zumi, J., Okabe, H., Kitano, H. and Iwasaki, R. : *Cancer Res.*, **52**, 6583 (1992)
- 5) 牛島義雄：蛋白質 核酸 酵素, **33**, 335 (1988)
- 6) Krinsky, N. and Deneke, S.M. : *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**, 205 (1982)
- 7) Goodman, T.W. : Annual Review of Nutrition (Olson, R.E., Beutler, E. and Broquist, H.P., eds.), Vol. 6, 273 (1986), Annual Reviews Inc. (Palo Alto)
- 8) Goodman, D.S., Blomstrand, R., Werner, B., Huang, H.S. and Shiratori, T. : *J. Clin. Invest.*, **45**, 1615 (1966)
- 9) Edman, J., Jr. : *Clin. Nutr.*, **7**, 101 (1988)
- 10) Wang, X.D., Tang, G.W., Fox, J.G. and Krinsky, N.I. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 8 (1991)
- 11) Pummer, D.T. (広海啓太郎, 毛利香耶子, 小林クリスティーナ, 井上国世, 井上省子共訳) : 実験で学ぶ生化学, 266 (1986), 化学同人 (京都)
- 12) Blomhoff, R., Green, M.H. and Norum, K.R. : Annual Review of Nutrition (Olson, R.E., Bier, D.M. and McCormick, D.B., eds.), Vol. 12, 37 (1992), Annual Reviews Inc. (Palo Alto)
- 13) Goodman, D.S. and Olson, J.A. : *Method Enzymol.*, **15**, 462 (1961)
- 14) 高木茂明, 藤井祐子, 木村吉伸 : 岡山大学農学部学術報告, **81**, 1 (1993)
- 15) 早石 修, 野崎光洋 (編) : 酸素添加酵素, 49 (1973), 東京大学出版会 (東京)
- 16) Helgerud, P., Petersen, L.B. and Norum, K.R. : *J. Lipid Res.*, **23**, 609 (1982)
- 17) 高木茂明, 井藤隆之, 中島明夫, 木村吉伸, 竹田邦雄 : 農化, **67**, 1055 (1993)
- 18) Brubacher, G.B. and Weiser, H. : *Int. J. Nutr. Res.*, **55**, 5 (1985)
- 19) Tang, G.W., Wang, X.D., Russell, R.M. and Krinsky, N.I. : *Biochemistry*, **30**, 9829 (1991)

(1994 年 3 月 4 日受理)