

2020 年度 青森県立保健大学大学院博士論文

リンゴ果汁によるアスコルビン酸吸収増強の作用機序に関する研究

分 野 名 基礎研究・実用技術領域

学 籍 番 号 1893001

氏 名 舘花 春佳

指導教員名 井澤 弘美

提 出 日 2021 年 2 月 15 日

## 目次

### 表目次

### 図目次

1. 緒言	1
2. 実験材料及び実験方法	
(1) 試薬	3
(2) リンゴ果汁の調製	3
(3) 動物実験	3
(4) AsA 量の測定	4
(5) ラットの反転腸の作成及び AsA の取り込み量の測定	4
(6) ラット小腸各部位における SVCT1 タンパク質発現量の測定	4
(7) Caco-2 細胞の細胞培養及び細胞シートの調製	5
(8) Caco-2 細胞の細胞生存能の測定	5
(9) Caco-2 細胞の単層形成の評価	5
(10) Caco-2 細胞シートにおける AsA の透過能の解析	6
(11) 統計解析	6
3. 結果	
(1) AJ 摂取によるラット血漿中及び尿中の AsA 濃度の変動	7
(2) AJ 摂取によるラット組織中の AsA の含有量の変動	7
(3) AJ 摂取による小腸への AsA 取り込み量の変動	7
(4) AJ 摂取による小腸での SVCT1 タンパク質発現の変動	8
(5) Caco-2 細胞の安定性及び細胞生存能に対する AJ の影響	8
(6) Caco-2 細胞における SVCT1 タンパク質の発現に対する AJ の影響	9
(7) Caco-2 細胞における AsA 透過性に対する AJ の影響	9
4. 考察	11
謝辞	15
参考文献	16

## 表目次

表 1 : 2%AJ の摂取開始時 (0 日目) と 2 週間後 (14 日目) の尿中 AsA 濃度の变化
--

## 図目次

図 1 : アスコルビン酸の構造式
図 2 : 透過実験に用いたトランスウェルインサートの概略図
図 3 : ラット血漿中の AsA 濃度に対する AJ の影響
図 4 : ラット組織中の AsA 濃度に及ぼす AJ の影響
図 5 : ラット小腸各部位の AsA 含量に対する AJ の影響
図 6 : ラット反転腸による AsA の取り込みに対する AJ の影響
図 7 : ラット小腸各部位の SVCT1 タンパク質発現量への AJ の影響
図 8 : ラット小腸各部位における AsA 含量と SVCT1 発現量の相関
図 9 : Caco-2 細胞単層の経上皮電気抵抗値 (TEER) の経時変化
図 10 : Caco-2 細胞生存能への AJ の影響
図 11 : Caco-2 細胞における SVCT1 タンパク質発現量への AJ 添加の影響
図 12 : Caco-2 細胞における 0.01 mM (1.76 µg/mL) AsA 溶液と 10% AJ 添加時の AsA 取り込みの経時変化
図 13 : Caco-2 細胞における 0.1 mM (17.6 µg/mL) AsA 溶液と 10% AJ 添加時の AsA 取り込みの経時変化

## 1. 緒言

アスコルビン酸 (ascorbic acid: AsA 図 1) は、ラクトン構造を持つ水溶性ビタミンの一種であり、ヒトの健康にとって極めて重要な栄養素である。AsA は、体内で強い抗酸化物質として働く<sup>1)</sup>ほか、コラーゲン線維の構築<sup>2)</sup>やコレステロールなどの脂質代謝<sup>3)</sup>、アドレナリンなどカテコールアミンの合成に重要な酵素を助ける補因子としての働きがある<sup>4)</sup>。さらに、鉄の吸収促進、ビタミン E の再生にも関わっており<sup>5)</sup>、その生理作用は多岐にわたる。

ラットやマウスをはじめ多くの生物では、AsA は肝臓において生合成される。しかし、ヒトやサル、モルモットなどの限られた生物では、AsA を体内で合成することができない。それは、AsA はグルコースからいくつかの化学反応を経て合成されるが、この反応経路の末端に位置する酵素 L-グルノ- $\gamma$ -ラクトンオキシダーゼ (GLO) 遺伝子がヒトでは変異している<sup>6)</sup>ためである。従って、毎日の食事から必須栄養素として AsA を補給する必要がある。事実、AsA を一ヶ月間摂取しないと、体内貯蔵量が徐々に失われ、血漿中濃度が  $10 \mu\text{mol/L}$  以下になると壊血病のような欠乏症が発症する<sup>7)</sup>。日本人の成人における AsA の推定平均必要量 ( $83.4 \text{ mg/日}$ ) は、生活習慣病の一次予防の観点から心臓血管系の疾病予防効果ならびに有効な抗酸化作用を指標として設定されている<sup>8)</sup>。しかし、2019 年の国民健康・栄養調査によると、1~49 歳の一日常当たりの AsA 摂取量の平均値はこの推定平均必要量を満たしていない<sup>9)</sup>。また、特に高齢者では、成人に対し AsA の要求量が成人よりも高い可能性が示唆されている<sup>10)</sup>。従っていかに十分量の AsA を摂取させるかは、健康維持の促進のために非常に重要な課題の一つである。

体内に摂取された AsA の大部分は小腸から吸収され、次いで肝臓に送られ、更に血液を介して組織・臓器に輸送される。小腸での吸収は、小腸上皮細胞で発現している AsA トランスポーターの一つであるナトリウム依存性ビタミン C 輸送体 Sodium-dependent Vitamin C Transporter (SVCT) を介して行われる<sup>11)</sup>。また SVCT は腎臓の近位尿細管で AsA の再吸収も行う<sup>12)</sup>。ヒトの小腸での AsA の吸収率は、摂取量が  $200 \text{ mg/日}$  程度までは 90% であるが、 $1 \text{ g/日}$  以上になると 50% 以下となることがわかっており<sup>13)</sup>、AsA の体外排泄を検討した先行研究によると  $1 \text{ g/日}$  以上を摂取する意味はないことが明らかとなっている<sup>13-15)</sup>。つまり、AsA を大量に摂取した場合には、尿中にかなり排泄されるため、組織に蓄積される量はそれほど多くないことが明らかになっている。従って、体内 AsA 含量を増加させるためには、摂取量を増やすだけでなく、吸収能を促進させることが重要であると考えられる。しかし、中性脂肪の多い食材と一緒に摂取することで吸収増強が見込める脂溶性ビタミンに対し、水溶性ビタミンに関しては、吸収を促進させる方法に関する報告はほとんど無いのが現状である。

リンゴ(バラ科リンゴ属, *Malus domestica* Borkh.) は果物類の一種であり、世界的に最も栽培量および消費量が多い果物の一つである。食物繊維やペクチン、ポリ

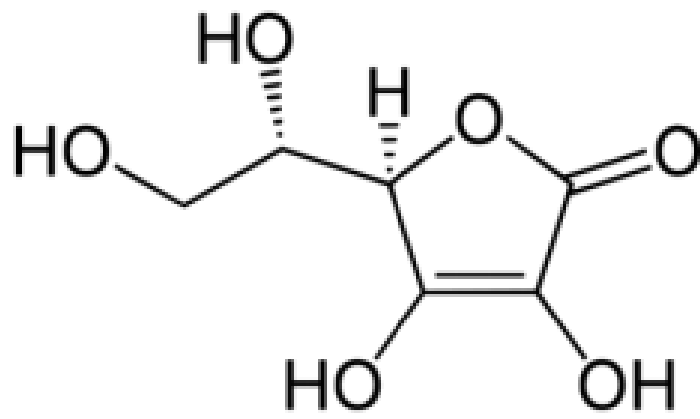


図 1 アスコルビン酸の構造式.

フェノールなど多くの機能性を持つ成分を含有し、それらの成分による健康増進効果は古くから注目を集めてきた<sup>16)</sup>。日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）によると、リンゴの AsA 含有量は 4 mg/100 g となっている。温州ミカン（35 mg）やバナナ（16 mg）など、他の果実と比較すると非常に少なく、AsA の供給源として優れていないと考えられてきた。一方で、リンゴ含有飼料を摂取させたラットやモルモットにおいて、血液中、肝臓や副腎の AsA の濃度が高値を示した報告<sup>17)</sup>がなされた。従って、リンゴの摂取は、生体内における AsA の蓄積を促進している可能性が期待される。しかし、AsA の体内への蓄積が吸収増強によるものか、あるいは排泄抑制によるものかなどの機構の詳細な解析は全く行われていないのが現状である。

以上の背景から、本研究では、リンゴの代替品としてリンゴ果汁（Apple juice : AJ）を用い、AJ 摂取により AsA の体内蓄積が促進するのか、またその機構はどのような様になっているのか、その詳細を解析した。具体的には第一に、AsA 合成能欠如モデルラットに AJ を摂取させ、ラットの血漿及び尿中の AsA 濃度、並びに組織中の AsA 蓄積量を定量化して、AsA の吸収促進効果の有無を解析した。第二に、AJ 摂取がラット小腸の AsA 輸送体 SVCT1 タンパク質の発現を促進し、その結果、AsA の吸収を促進するのか否かを解析した。そして上記 *in vivo* の系の結果が *in vitro* の系でも再現されるか、評価系として Caco-2 細胞を用いて、AJ による AsA 透過性、SVCT1 タンパク質発現量の変動を同様に解析した。

## 2. 実験材料及び実験方法

### (1) 試薬

AsA は食品添加物グレードのものを富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）から購入し、ペントバルビタールはナカライテスク（京都）から購入した。SVCT1 抗体はコスモ・バイオ株式会社（東京）またはアブカム株式会社（USA）、GAPDH 抗体はアブカム株式会社（USA）から購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、牛胎児血清 (FBS)、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 及び Trypsin-EDTA を GIBCO (USA) より購入した。その他の試薬は市販の特級品、または高速液体クロマトグラフィー用規格品を用いた。

### (2) リンゴ果汁の調製

実験に使用したリンゴ（ふじ）は青森県産のものを使用した。リンゴを果汁抽出機（GP-E1503, Green Power, 韓国）で搾汁した後、濾紙で濾過した。得られた果汁を超純水で 2% の濃度に希釈し、これをリンゴ果汁（AJ）とした。

細胞実験の AJ には、AJ 中の成分の均質性を保つため「APPLE JUICE 密閉搾り」（青森県農村工業農業協同組合連合会、青森）を使用した。これまでは、市販 AJ はすべて AsA 添加の製品であった。しかし近年、AsA 無添加の AJ が入手可能となった。そのため、果実と比較して均質性の高い市販 AJ を使用することとした。なお、この AJ から AsA は検出されなかった。

### (3) 動物実験

4 週齢の ODS 系雄性ラット（Clea, 東京）を温湿度管理された飼育室（ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度  $55\pm 7\%$ ）で 12 時間の明暗サイクルで個別に飼育した。ラットには、飼料として AsA 非含有の AIN-93G（Clea, 東京）、飲料水として 2 g/L の AsA 水溶液を自由摂取させた。飲料水中の AsA 量はヒドラジン比色法により測定した<sup>18)</sup>。2 週間の馴化飼育を行い、ラットをコントロール群（ $n=5$ ）と AJ 群（ $n=5$ ）の 2 群に分けた。コントロール群には AsA 水溶液のみを、AJ 群には AJ を添加した AsA 溶液を飲料水として与え、2～10 週間飼育した。AsA 溶液と AJ 含有 AsA 溶液は 2～3 日ごとに交換し、摂取量を測定した。

飼育期間中は、2 週間ごとに尿を採取した。ラットを 1 匹ずつガラス製メタボリックケージに入れ、採尿瓶をセットして 24 時間尿を採取した。尿の総量を測定した後、一部を AsA 量の測定に供するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

飼育期間終了後、ラットはペントバルビタールを用いた深部麻酔下で解剖した。血液を心臓から採取し、EDTA と穏やかに混合し、遠心分離（ $3,000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、15 分間）した。得られた血漿上清中の AsA 量を測定した。その後、左心室を介して氷冷リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate-buffered saline: PBS）で全身灌流した後、目的とする組織を採取した。小腸は幽門からトライツ靱帯までの間を十二指腸と

し，空腸と回腸は残りの長さを2等分した．さらに十二指腸は2等分したうちの上流部2分の1，空腸及び回腸は3等分したうちの上流部3分の1を分析に使用した．臓器は液体窒素にて凍結させ，分析時まで-80℃にて保存した．

すべての実験は，青森県立保健大学動物実験委員会の事前承認を得ている．動物の飼育は，青森県立保健大学動物実験規程に準じて行った．

#### (4) AsA 量の測定

尿，血漿，組織中の AsA は，ビタミン C アッセイキット（株式会社シマラボラトリーズ，東京）を用いてヒドラジン比色法により測定した．組織は14倍量の5.4%メタリン酸でホモジナイズし，遠心分離（1,000×g，4℃，10分間）した．血漿，尿は等量の10%メタリン酸塩と混合し，同様に分離した．得られた上清に0.2%の2,6-ジニトロインドフェノールを添加し，AsA をデヒドロアスコルビン酸（Dehydroascorbic acid : D-AsA）に変換し，これを測定用試料とした．

小腸各部位の AsA 量ならびに細胞培養液中の AsA 濃度は，ホモシステイン還元法を用いて高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography ; HPLC）（GL-7400/株式会社島津製作所，京都）にて測定した<sup>19)</sup>．

カラムに Shodex Asahipak NH2P-50 4D（粒形 3 μm，サイズ 4.6×150 mm）を用い，移動相は 100 mM リン酸/トリエタノールアンモニウム緩衝溶液・アセトニトリル（1：4），流速は 1.0 mL/min，カラム温度は 40℃，検出波長は 240 nm，注入量は 20 μL とした．ピーク面積を LabSolution（株式会社島津製作所，京都）を用いて収集，解析した．

#### (5) ラットの反転腸の作製及び AsA の取り込み量の測定

クレブスリンガー重炭酸溶液（Modified Krebs Ringer Bicarbonate Solution : KRB）及び AsA（最終濃度 10%）を添加した KRB(AJ(+)) KRB)をそれぞれ調製した．

反転腸は，武藤ら<sup>20)</sup>の方法を改変し調製した．摘出した小腸は3等分し，胃側より十二指腸，空腸，回腸とし，各部位の重量を測定した．小腸各部位を1g取り，AsA の取り込み量の測定に用いた．大腸側の端を結紮し，胃ゾンデを挿入し腸管を反転させた．次いで胃ゾンデごと腸管の胃側の端を結紮し，反転腸内を約 1 mL の AJ(-)KRB で満たした．胃ゾンデのシリコン先玉が含まれる部分を切除して，腸と反転腸管作成器具を切り離した．これを反転腸とした．

作成した反転腸を，9 mL の AJ(-)KRB あるいは AJ(+))KRB 溶液中に入れ，37℃，1時間インキュベートした．この時，試験管内を常に O<sub>2</sub>ガスで満たした．インキュベート終了後，ただちに反転腸を試験管から取り出し，反転腸外液と内液をそれぞれ注射器にて採取した．採取した液は AsA 濃度測定時まで-80℃で保存した．

#### (6) ラット小腸各部位における SVCT1 タンパク質発現量の測定

小腸各部位および細胞培養液中の SVCT1 タンパク質発現量の検出は，篠崎ら<sup>21)</sup>

の方法に従ってウエスタンブロット法により行った。すなわち，サンプルを 5～7 倍容量のバッファーを用いてホモジネートし，遠心分離（3,000×g, 4℃, 15 分間）し，上清をサンプルとして用いた。サンプルのタンパク質量は Pierce BCA Assay kit を用いて定量した。電気泳動はミニプロテイン TGX ゲルあるいはミニプロテイン TGX Stain-Free ゲル（Bio-Rad, 東京）を用い，Laemmli ら<sup>22)</sup>の方法に準じて行った。泳動後，Immun-Blot PVDF Membrane For protein Blotting（Bio-Rad 社）へ 15V, 30 分間の条件で転写した。抗体反応は，Western Breeze Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit（サーモフィッシャー・サイエンス，東京）を用いて行った。内部標準として GAPDH, または総タンパク質量を用いた。SVCT1 の抗体は Santa Cruz 社製（Anti SVCT1[H-11], 希釈率 1：400）または abcam 社製（ab236878, 希釈率 1：2,000）とし，GAPDH の抗体は abcam 社製（mAbcam 9484, 1：2,500）とした。二次抗体はキット内のものを使用した。SVCT1 及び GAPDH のバンド強度を Image J software program (NIH)を用いて定量し，各サンプルの SVCT1 のバンド強度を GAPDH のバンド強度で補正した。

#### （7）Caco-2 細胞の細胞培養及び細胞シートの調製

ヒト結腸癌由来培養細胞株 Caco-2 細胞は，青森県立保健大学健康科学部栄養学科の乗鞍敏夫博士より分与していただいた。継代数 20-50 代の細胞を，ウシ胎仔血清（最終濃度 10%），ペニシリン，ストレプトマイシン及びファンギゾンを含む DMEM 培地で，5%CO<sub>2</sub>, 37℃の条件下で培養した。Caco-2 細胞シートの調製には，ポリカーボネート膜製のトランスウェルインサート（Corning, USA）を使用し， $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>になるようにインサートのポリカーボネート膜上に細胞を播種した（図 2）。培地交換は，実験に用いるまで 1 日もしくは 2 日おきに培地を交換し，21~28 日間培養後に以下の実験に用いた。

#### （8）Caco-2 細胞の細胞生存能の測定

Caco-2 細胞の細胞生存能は澤村ら<sup>23)</sup>の方法を一部改良して行った。細胞を 96 well プレートに  $5.0 \times 10^5$  個ずつ播種し，24 時間培養した。その後，培地を吸引し，各細胞に AJ（最終濃度 0～100%）含有培地を添加し，0～24 時間の各時間で再度培養した。培養後，培地を除去し，細胞に MTT 試薬(最終濃度 0.4 mg/mL)を添加し，更に 4 時間インキュベートした。生成したホルマザン色素をイソプロパノールで溶解し，プレートリーダーを用いて得られたサンプルの吸光度（570 nm）により細胞の生存能を測定した。

#### （9）Caco-2 細胞の単層形成の評価

Caco-2 細胞は培養することで分化し，構造的及び機能的に成熟した小腸上皮細胞に類似する<sup>24)</sup>。Caco-2 細胞が小腸上皮様細胞に分化した状態であることを確認するため，Caco-2 細胞の分化中の単層形成は経上皮電気抵抗（Trans Epithelial

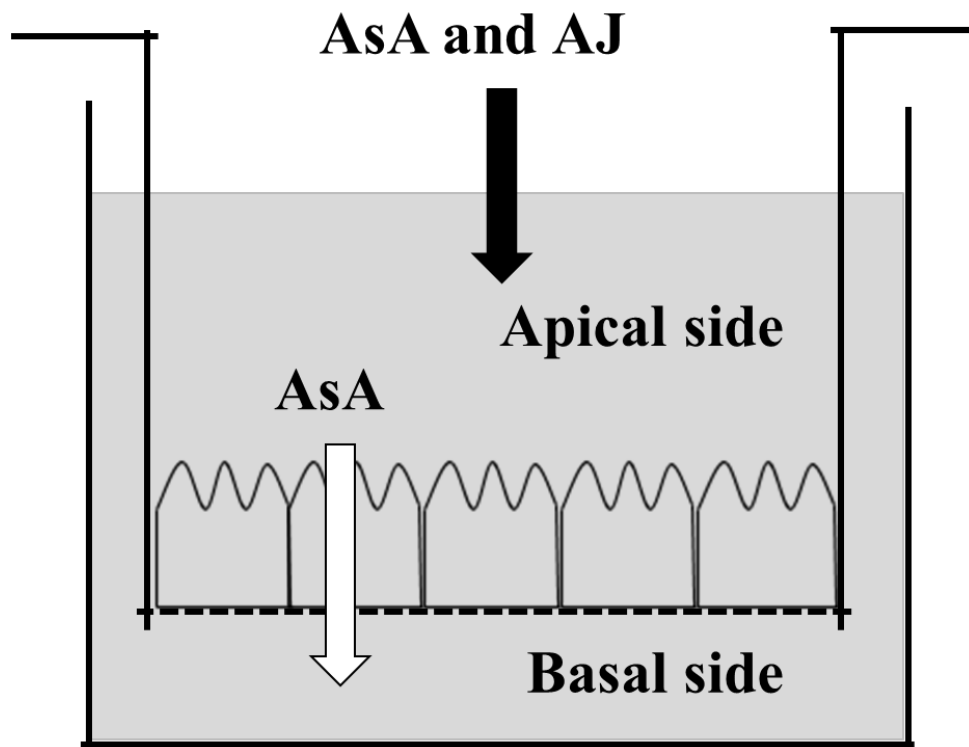


図 2 透過実験に用いたトランスウェルインサートの概略図。

AsA 透過実験にはトランスウェルインサートを用いた。Apical side の培養液に AsA 溶液ならびに AJ 溶液を添加し，所定の時間培養後に Apical side と Basal side の培養液を回収，AsA 濃度を定量した。

Electrical Resistance: TEER) の測定により評価した<sup>25)</sup>。トランスウェルインサートにて Caco-2 細胞を 21~26 日間培養し、タイトジャンクション (TJ) を形成した Caco-2 細胞の TEER を、1~2 日おきに測定した。播種翌日に測定した値を初期 TEER とした。TEER は、Millicell®-ERS (Millipore, MA, USA) を用いて測定し、 $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  以上の値で細胞単層の形成が十分であると評価した。

#### (10) Caco-2 細胞シートにおける AsA の透過能の解析

$2.0 \times 10^5$  個の Caco-2 細胞を 12 well プレートに撒き、実験に用いた。AsA の透過能の経時変化を解析するため、10% AJ 及び種々濃度の AsA 溶液を含む培地をトランスウェルインサートの apical side に 1.5 mL 添加し、Basal side には AJ 及び AsA の添加されていないコントロールの培地を 2 mL 添加した。0~24 時間培養し、各時間での apical side 及び basal side の溶液中の AsA 濃度を測定して、apical side より basal side へと透過した AsA 量を定量した。

#### (11) 統計解析

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) もしくは標準偏差 (S.D.) を用いて表した。2 群間の平均値の差の検定は Student の T 検定を用いた。多群間の平均値の差の検定は、一元配置分散分析 (one way ANOVA) 後、Control 群を基準とした Dunnett の多重比較検定を行った。危険率 0.05 未満 ( $P < 0.05$ ) である場合、統計的に有意な差があると判定した。

### 3. 結果

#### (1) AJ 摂取によるラット血漿中及び尿中の AsA 濃度の変動

最初に、ラットに AJ を経口投与すると、血漿中 AsA の濃度がどの様に変動するかを解析した。その結果、AJ の添加されていない 2 g/L の AsA 水溶液を摂取しているラットでは、血漿中の AsA 濃度は 0.57  $\mu\text{g/mL}$  であった。しかし 2% の AJ とともに摂取させると 3.43  $\mu\text{g/mL}$  となり、血漿中の AsA の濃度は著明に増加した (図 3A)。AJ 添加により味が変化し、AsA 摂取量が異なっているか否かを解析したところ、有意差は認めなかった (図 3B)。

そこで次に、2%AJ を摂取するとラットの尿中の AsA 濃度がどの様に変動するかを解析した。摂取開始時 0 日目には AJ 無添加のコントロール群と 2%AJ の摂取群では、尿中の AsA 量に有意な差は認めなかった。しかし、摂取 14 日目の尿中の AsA 濃度は、コントロール群で著明に増加し、その上昇率は、コントロール群  $66.8 \pm 39\%$ 、2%AJ 群で  $5.1 \pm 13\%$  であり、顕著な差が認められた (表 1)。

以上から、AsA を AJ とともに摂取させると、血漿中の AsA の濃度は増加し、逆に排泄量には低下することから、AJ によりラットの生体内に AsA が保持されていると考えられた。

#### (2) AJ 摂取によるラット組織中の AsA の含有量の変動

2%AJ とともに 2 g/L の AsA 水溶液を摂取させると、血漿中の AsA が最も高い値を示したことから、この条件下で AJ を摂取させたマウスの各種組織中の AsA の含量がどの様に変動するかを解析した。その結果、AJ 摂取群の胸腺及び眼球の AsA 含量は、それぞれコントロール群の 2.0 倍、8.5 倍までに有意に増加していた。一方、他の組織では、両群の間に有意な差は認められなかった (図 4)。小腸全体では AsA 含量の違いは認められなかったが、AsA は小腸から主に吸収されることから小腸の関与は大きいと考え、小腸の部位別にも AsA 含量の変動について解析した。その結果、十二指腸、回腸では、コントロール群と AJ 群との間に統計的に有意な差は認められなかった。しかし空腸では、コントロール群の 1.9 倍にまで増加し、AJ 群では有意に高値を示していた (図 5)。従って、AJ は空腸に特異的に作用していると考えられた。

#### (3) AJ 摂取による小腸への AsA 取り込み量の変動

小腸における AsA の吸収が AJ により実際に促進するか否かを解析した。ラットの反転腸を AJ(+)KRB 培地とインキュベートすると、AJ 摂取群ラットの十二指腸、空腸、回腸では、AJ(+)KRB 培地中から反転腸内液へと移動した AsA 含量は、コントロール群よりも、1.25、1.20、1.23 倍までにそれぞれ増加した。一方、小腸各部位の間での増加率の有意な違いは認められなかった (図 6A)。次に反転腸を AJ (-) KRB とインキュベートした。その結果、十二指腸、空腸、回腸の各

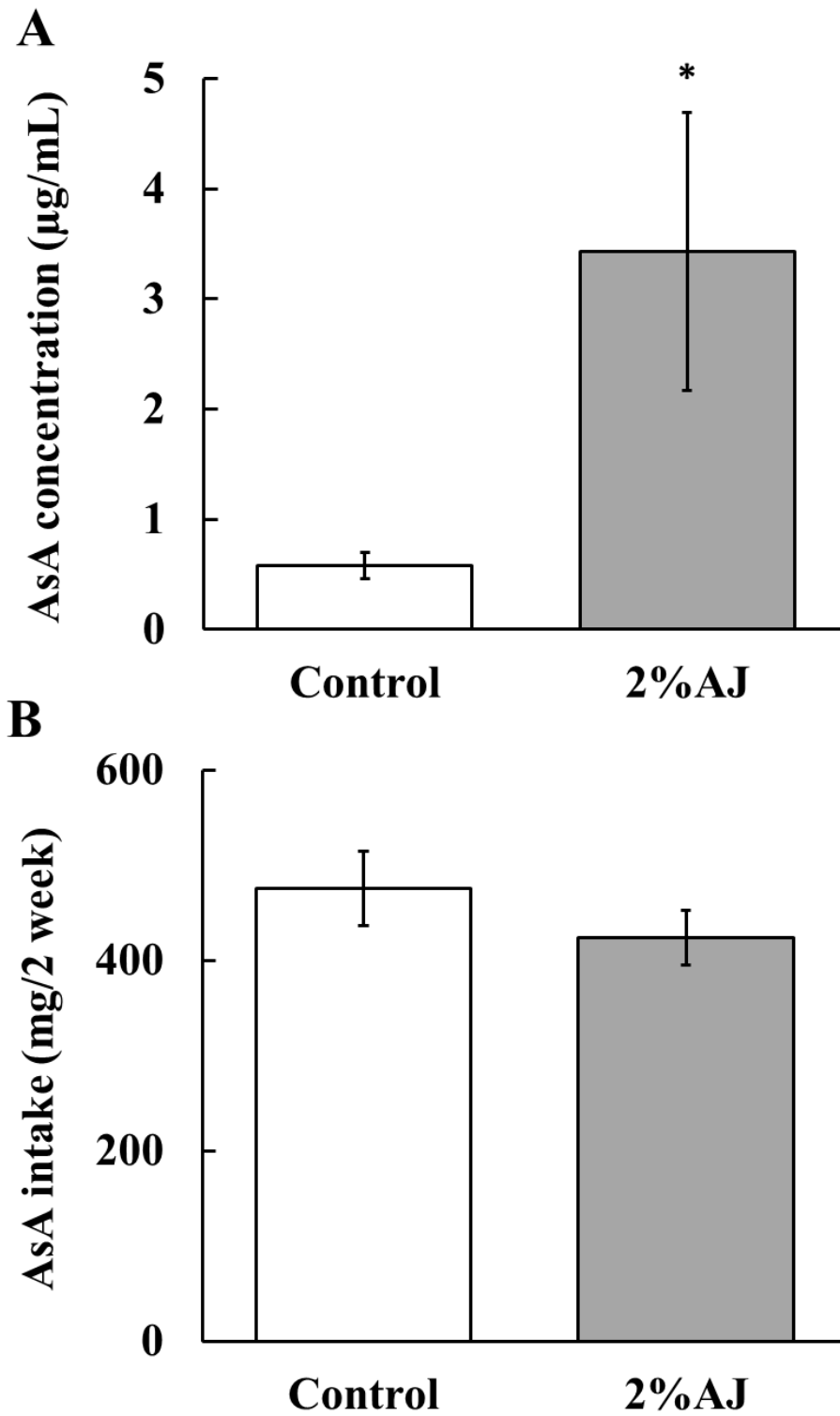


図3 ラット血漿中の AsA 濃度に対する AJ の影響.

2 g/L AsA 溶液のみを投与した群をコントロール (Control) 群, 2 g/L AsA 溶液と 2% AJ を投与した群を AJ 群とし, (A) 2 週間飼育後の各群の血漿中 AsA 濃度, (B) 飼育期間中の各群の 1 匹当たりの総 AsA 摂取量を測定した. \* $p < 0.05$ .

表 1 2%AJ の摂取開始時（0 日目）と 2 週間後（14 日目）の尿中 AsA 濃度の変化.

	AsA concentration (μg/mL)		Rate of increase (%)
	Day 0	Day 14	
Control group	0.039 ± 0.003	0.066 ± 0.006	66.8 ± 39.3
AJ group	0.057 ± 0.016	0.058 ± 0.007	5.1 ± 13.7

飼育開始時の尿中 AsA 量（Day 0），2 週間の飼育期間終了時の尿中 AsA 量（Day 14），各群の尿中 AsA 排泄量 AsA の 2 週間経過後の増加率を示した．2 g/L AsA 溶液と 2% AJ を経口投与した群を AJ 群．2 g/L AsA 溶液のみを投与した群をコントロール群とした．

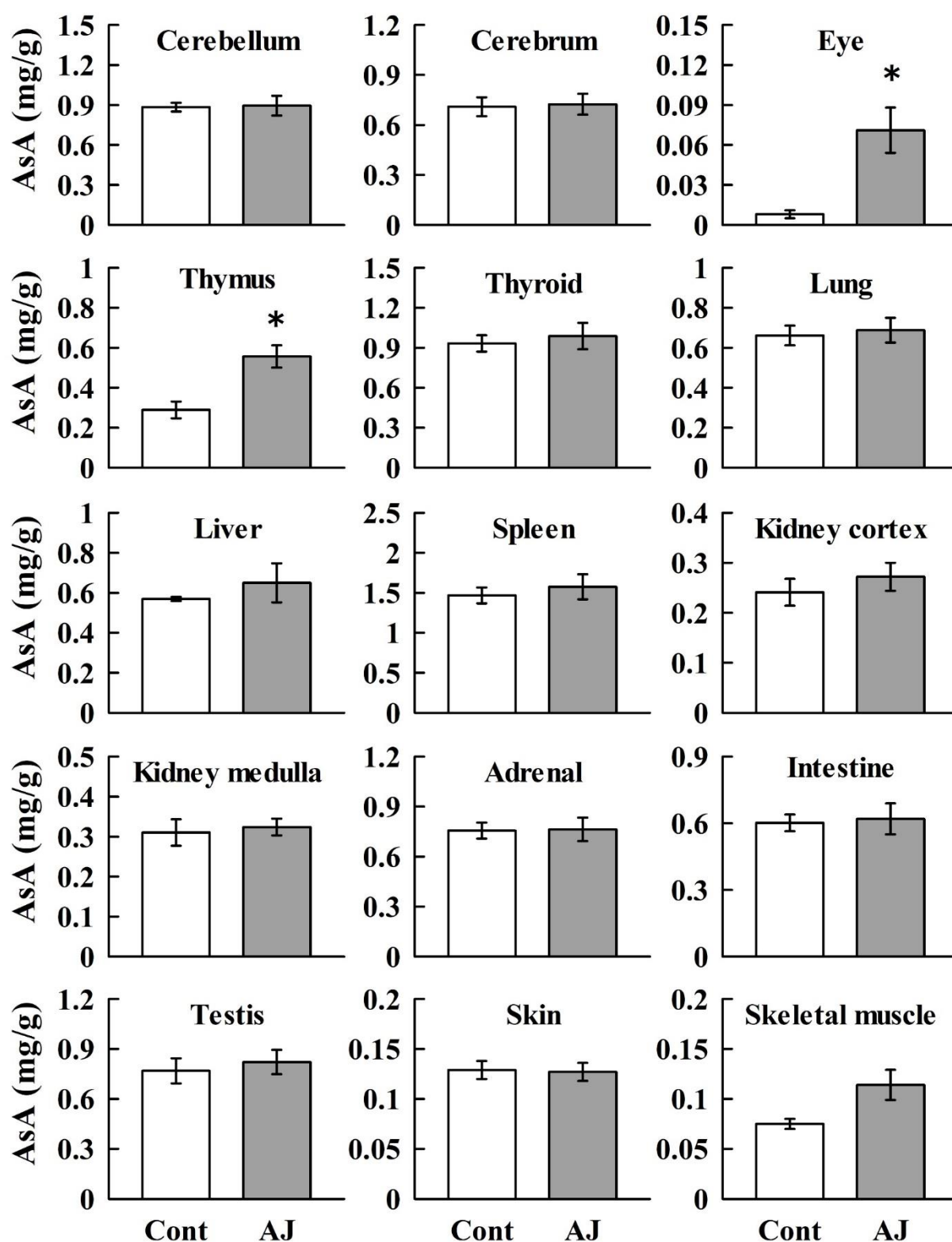


図4 ラット組織中のAsA含量に対するAJの影響.

2 g/L AsA 溶液と 2% AJ を経口投与した群を AJ 群, 2 g/L AsA 溶液のみを投与した群をコントロール (Cont) 群とした. 2 週間飼育後, 各群の臓器中 AsA 含量を測定した. \* $p < 0.05$ .

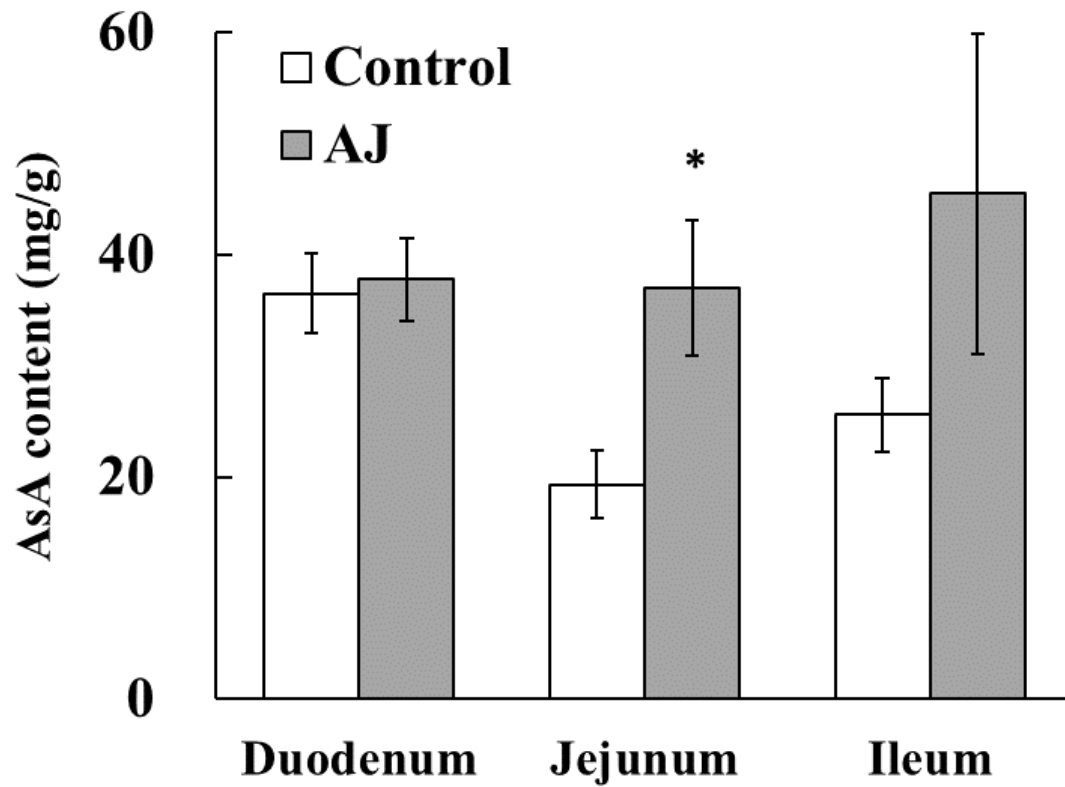


図 5 ラット小腸各部位の AsA 含量に対する AJ の影響。

10 週間飼育後の小腸各部位の AsA 含量を測定した。2 g/L AsA 溶液のみを投与した群をコントロール (Control) 群, 2 g/L AsA 溶液と 2% AJ を経口投与した群を AJ 群とした。\* $p < 0.05$

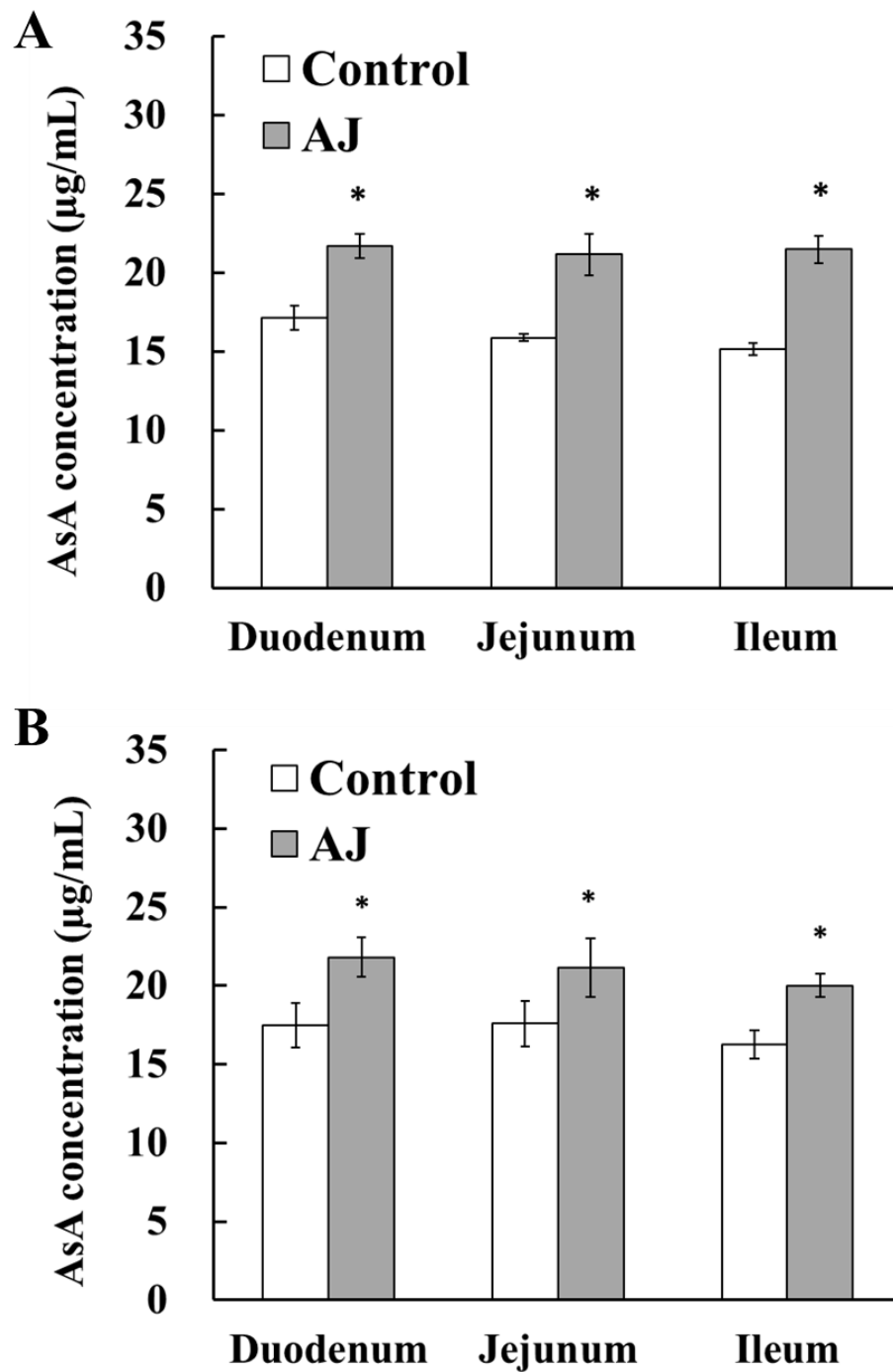


図 6 ラット反転腸による AsA の取り込みに対する AJ の影響.

10 週間飼育後, 小腸を摘出し, 十二指腸, 空腸および回腸の反転腸を作成した. 反転腸外液から内液へ取り込まれた AsA 濃度を測定し, 群間で比較した. 2 g/L AsA 溶液のみを投与した群をコントロール (Control) 群, 2 g/L AsA 溶液と 2% AJ を経口投与した群を AJ 群とした. (A) 反転腸外液に AJ を添加, (B) 反転腸外液に AJ 無添加. \* $p < 0.05$ .

反転腸内液の AsA 含量は、AJ 摂取群で 1.27, 1.33, 1.42 倍までに増加していた。しかも小腸各部位間での増加率には違いは認められなかった (図 6B)。この解析は、反転腸外液の AJ の有無に関わらず、小腸への AsA の取り込みが促進されることを意味している。従って、以上の結果から、AJ は小腸からの AsA の取り込みに直接関与するのではなく、小腸の何らかの機能を増強することで AsA の取り込みが促進されると考えられた。

#### (4) AJ 摂取による小腸での SVCT1 タンパク質発現の変動

生体内において、AsA の取り込みは、ナトリウム依存的に働く SVCT1 と SVCT2 が担っている。SVCT1 は肝臓、腎臓、小腸などに多く分布しており、高濃度の AsA の取り込みに関与しているが、低濃度の AsA は取り込むことができない。これに対し、SVCT2 は低濃度の AsA を効率的に取り込む。小腸からの吸収は高濃度の AsA の輸送となるため、SVCT1 の関与が大きい<sup>26)</sup>。AJ による小腸での AsA の取り込みの促進に SVCT1 タンパク質の発現が関与しているかを解析するため、AJ 摂取により SVCT1 タンパク質の発現がどの様に変動するのかをウエスタンブロット法で解析した。その結果、コントロール群の SVCT1 タンパク質の発現は、十二指腸、空腸、回腸で同程度であった (図 7)。またコントロール群と AJ 群で比較すると、十二指腸と回腸では、各群間に有意差は認めなかった。一方、有意な差ではなかったが、AJ 摂取群の空腸の SVCT1 発現量は、平均値がコントロール群の 2.4 倍であり、高値傾向 ( $p=0.15$ ) を示していた。また、十二指腸、空腸及び回腸それぞれの AsA 濃度と SVCT1 タンパク質の発現量の相関を解析したところ、いずれの部位においても AsA と SVCT1 のタンパク質発現量には強い正の相関関係があることが有意に示された (図 8)。以上から、SVCT1 の発現量が多い個体の小腸では AsA 含量が多いことが明らかとなり、小腸への AsA 蓄積には SVCT1 が関与していることが示された。

#### (5) Caco-2 細胞の安定性及び細胞生存能に対する AJ の影響

Caco-2 細胞をトランスウェルインサートで培養し、小腸上皮様細胞へと分化した単層形成の状態を TEER 測定によって評価した。増殖した上皮細胞では、TJ が形成されることで細胞間隙を分子が通過することなく、輸送体による選択的透過が可能となる。またこの TJ の形成により、管腔側と基底膜側との間でイオンの透過が制限されるため、電気抵抗が生じる。そのため電気抵抗値測定は細胞単層の TJ 形成を評価する方法として広く用いられている。その結果、培養 8 日目までは TEER 値が増加し、それ以降は  $500 \sim 600 \Omega \cdot \text{cm}^2$  前後で安定していた (図 9)。従って、培養 8 日目以降で TJ 形成が確認され、細胞単層の透過実験への使用が可能であることが明らかになった。

さらに、AJ の添加による細胞活性への影響を確認するために MTT 試験を行った。MTT 法は生細胞の還元酵素によって黄色のテトラゾール MTT が紫色のホル

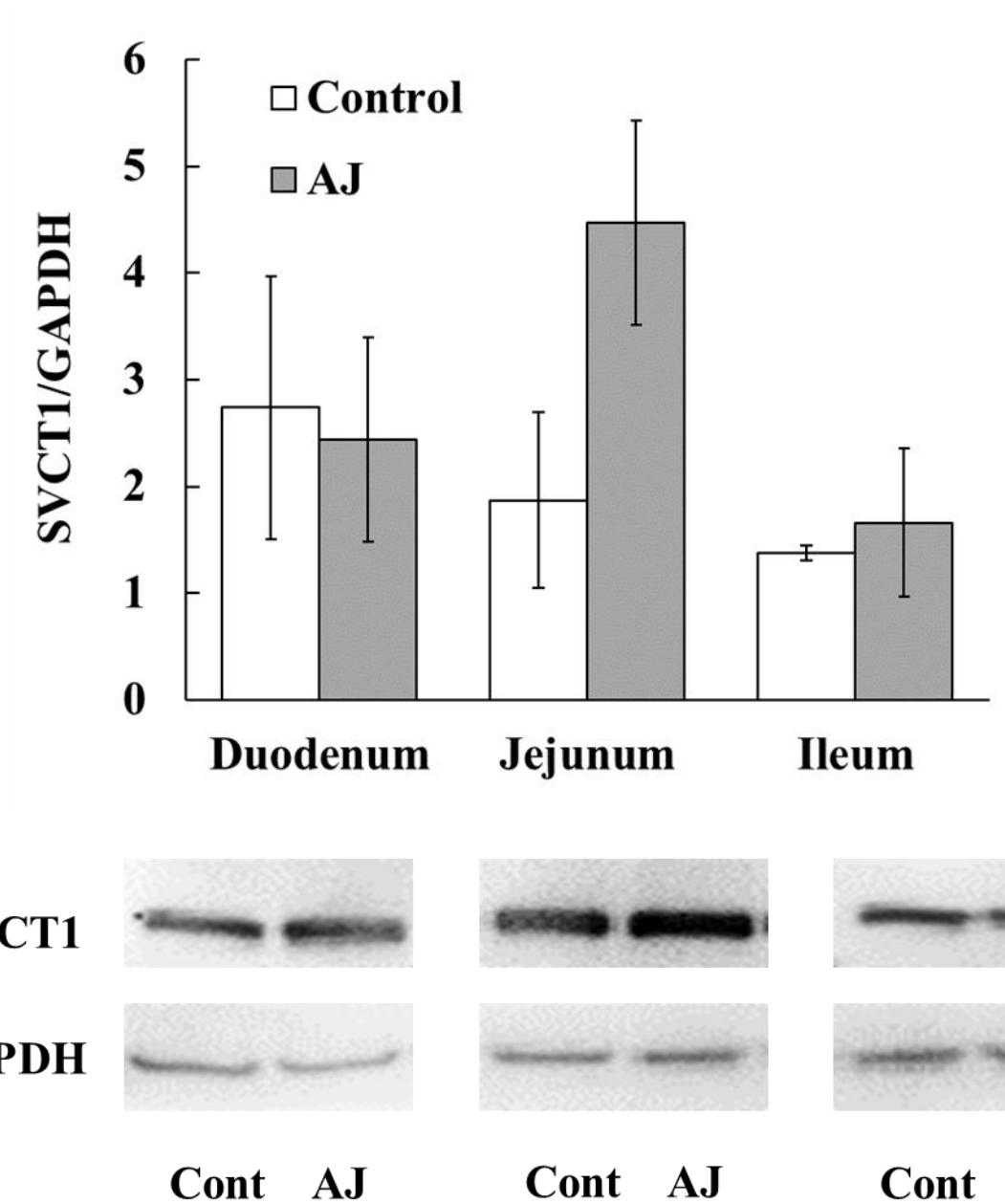


図7 ラット小腸各部位の SVCT1 タンパク質発現量への AJ の影響.

10 週間飼育後の小腸各部位の SVCT1 タンパク質発現量を測定した.

2 g/L AsA 溶液のみを投与した群をコントロール (Control) 群, 2 g/L AsA 溶液と 2% AJ を経口投与した群を AJ 群とした. SVCT1 のバンド強度を GAPDH のバンド強度で補正した値で表した.

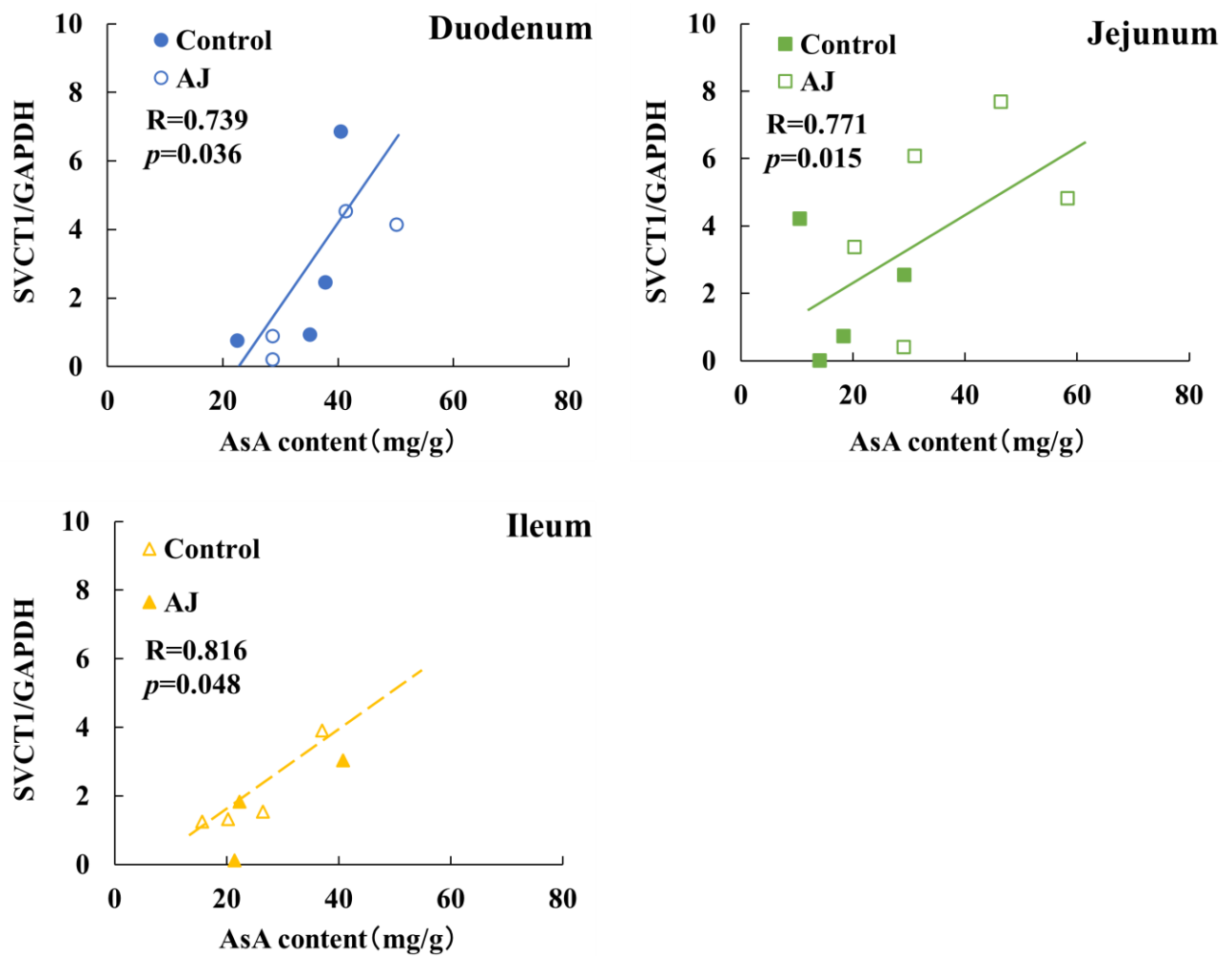


図8 ラット小腸各部位における AsA 含量と SVCT1 発現量の相関。

10 週間飼育後の小腸各部位の AsA 含量と SVCT1 タンパク質発現量を測定し、部位別の相関係数を算出した。2 g/L AsA 溶液のみを投与した群をコントロール (Control) 群、2 g/L AsA 溶液と 2% AJ を投与した群を AJ 群とした。

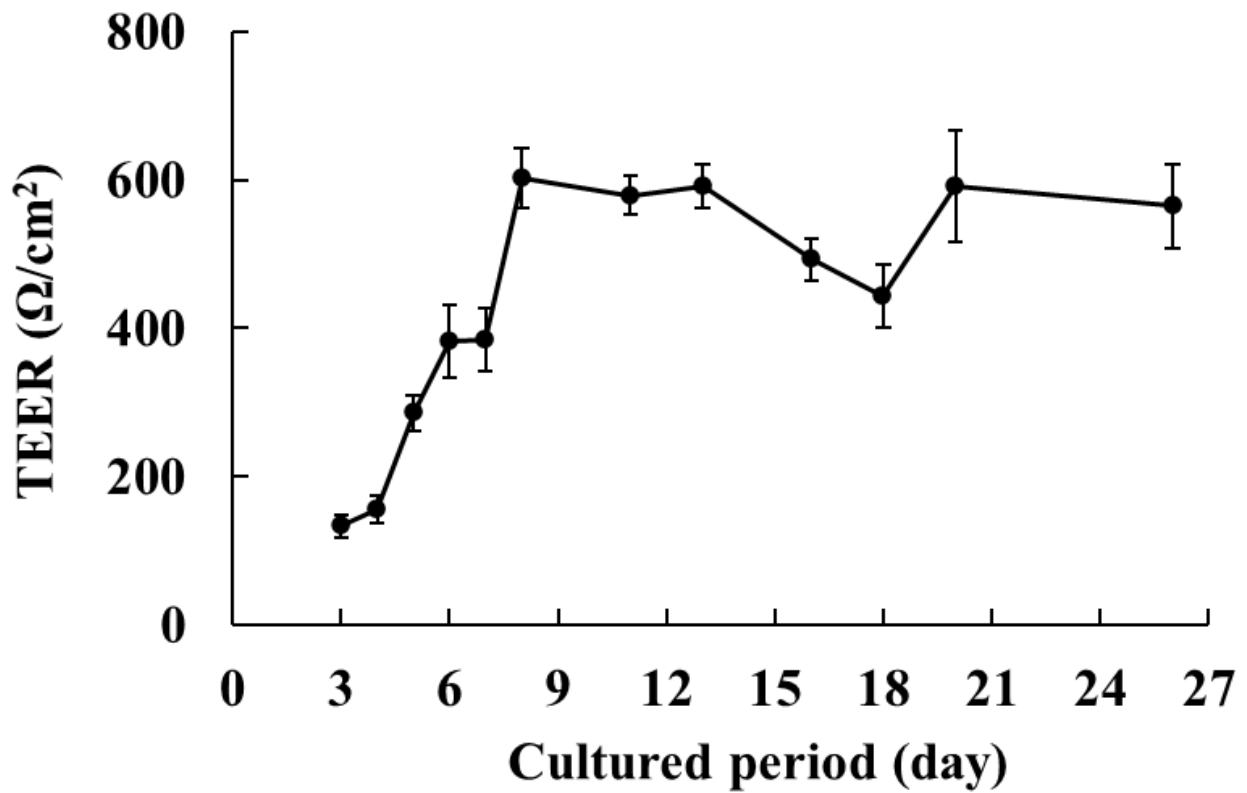


図9 Caco-2細胞単層の経上皮電気抵抗値（TEER）の経時変化。

Caco-2細胞を播種後、タイトジャンクションの形成を確認するため3～26日時点の経上皮電気抵抗値を測定し、経時変化を示した。

マザンに変換されることを利用して細胞のミトコンドリア活性を測定している<sup>25)</sup>。細胞生存能は、0% AJ, つまり溶媒のみで培養したコントロール群の吸光度に対する割合として表した。0% AJ の吸光度に対して、20% AJ 以上の添加では 70~90% の有意な生存能の低下が確認されたが、10% AJ の添加では有意な生存能の低下は認められなかった (図 10)。このため、以降の実験はすべて細胞傷害性を示さない 10% AJ を用いることとした。

#### (6) Caco-2 細胞における SVCT1 タンパク質の発現に対する AJ の影響

ラット小腸での AsA 取り込み促進に SVCT1 タンパク質の発現が関与していたことから、培養細胞においても AJ 添加が SVCT1 タンパク質の発現に影響を与えるかどうかをさらに検討した。Caco-2 細胞に 0.1 mM AsA と AJ 中の AsA を添加し 24 時間培養した後、SVCT1 タンパク質発現量をウエスタンブロット法を用いて解析した。AsA 非含有の培地で培養した細胞をスタンダード (Standard : STD) 群、AsA 添加培地で培養した細胞をコントロール (Cont) 群、AJ および AsA 添加培地で培養した群を AJ 群とした。その結果、各群間に有意な差は認められなかった (図 11)。このことから、AJ 添加により 24 時間時点での SVCT1 タンパク質発現量に変動はないことが明らかになった。

#### (7) Caco-2 細胞における AsA 透過性に対する AJ の影響

続いて、AJ 添加による AsA の細胞透過性を検討するため、AsA 透過量の経時変化を調べた。0.01 mM AsA 溶液単独で添加した群をコントロール群とし、0.01 mM AsA と 10% AJ を添加した群を AJ 群とした。その結果、apical side の培養液の AsA 濃度は、両群とも培養開始 24 時間まで徐々に減少していた (図 12)。また basal side においても経時的に AsA 濃度が増加していた。このことから、apical side の培養液から細胞中に経時的に AsA が取り込まれ、basal side に細胞中の AsA が放出されているため、apical side では AsA 濃度が減少し basal side では増加していることが確認された。また、basal side において、6 時間培養時点の培養液中の AsA 濃度は、コントロール群に対し AJ 群で 0.47 倍と有意に低値を示した。このことから、AJ 添加により 0.01 mM の AsA の細胞外排泄量は減少することが明らかになった。

この結果をふまえ、さらに高濃度の AsA 透過性に対する AJ 添加の影響を検討した。図 13 には添加する AsA 濃度を 0.1 mM とした場合の AsA 透過実験の結果を示す。Apical side において、12, 24 時間培養で AJ 添加により培養液中の AsA 濃度がそれぞれ 0.87 倍、0.85 倍と有意に低値を示した。また basal side においては、24 時間培養で AJ 添加により培養液中の AsA 濃度が 1.36 倍と有意に高値を示した。以上のことから、AJ による AsA の細胞内への吸収や細胞外への放出作用は AsA の添加濃度が高いほど顕著であることが明らかになった。ここまでの結果から、Caco-2 細胞において、AJ は細胞傷害性を示すことなく、比較的高濃度

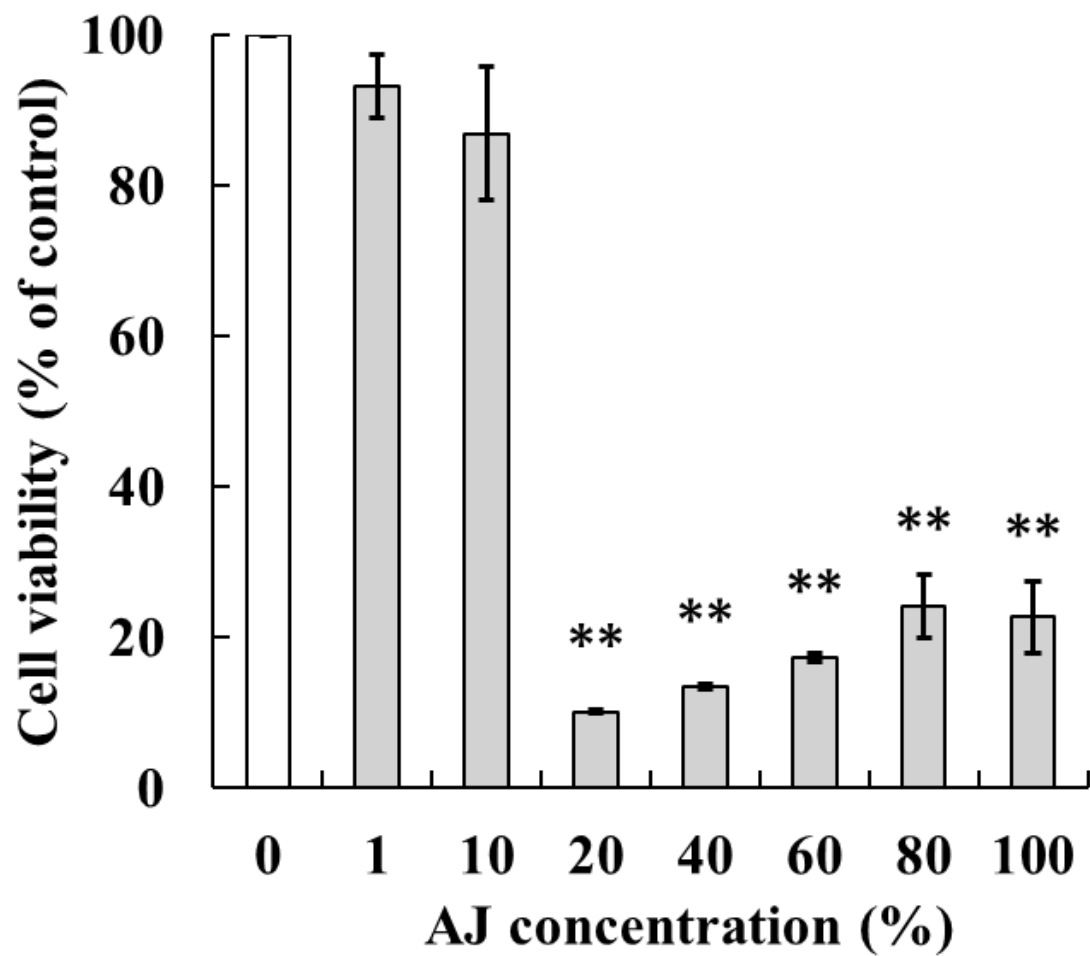
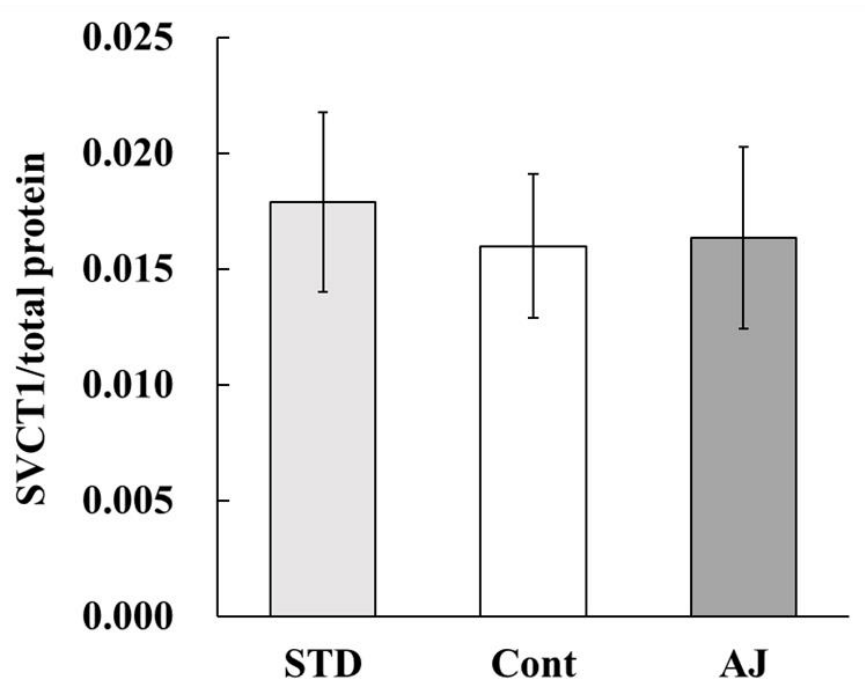


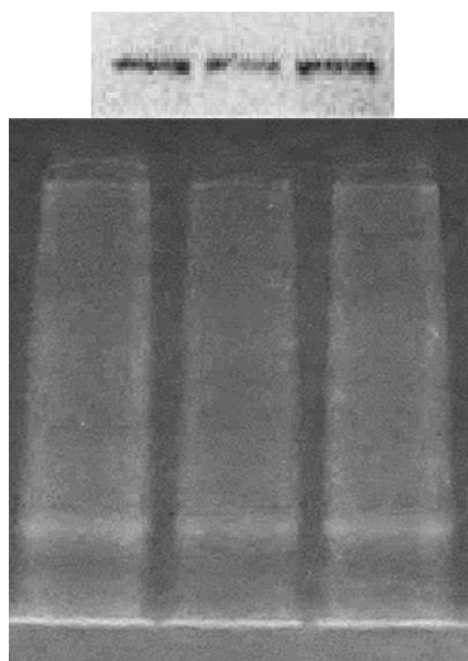
図 10 Caco-2 細胞生存能への AJ の影響.

Caco-2 細胞の培養液に各濃度の AJ を添加し 24 時間培養した後, MTT 法により各群の細胞生存率を測定した. 0% AJ, つまり溶媒のみを添加した群をコントロールとし, 値はコントロールに対する割合で示した. \*\* $p < 0.01$ .



SVCT1

Total  
protein



STD Cont AJ

図 11 Caco-2 細胞における SVCT1 タンパク質発現量への AJ 添加の影響.

Caco-2 細胞層に AsA 溶液（最終濃度 0.1 mM）と 10% AJ を添加し 24 時間培養した後，SVCT1 タンパク質発現量をウエスタンブロッティング法により測定した．スタンダード（STD）群には AsA と AJ は無添加，コントロール（Cont）群は AsA 溶液（最終濃度 0.1 mM）のみで培養した．SVCT1 のバンド強度を総タンパク質量のバンド強度で補正した値で表した．

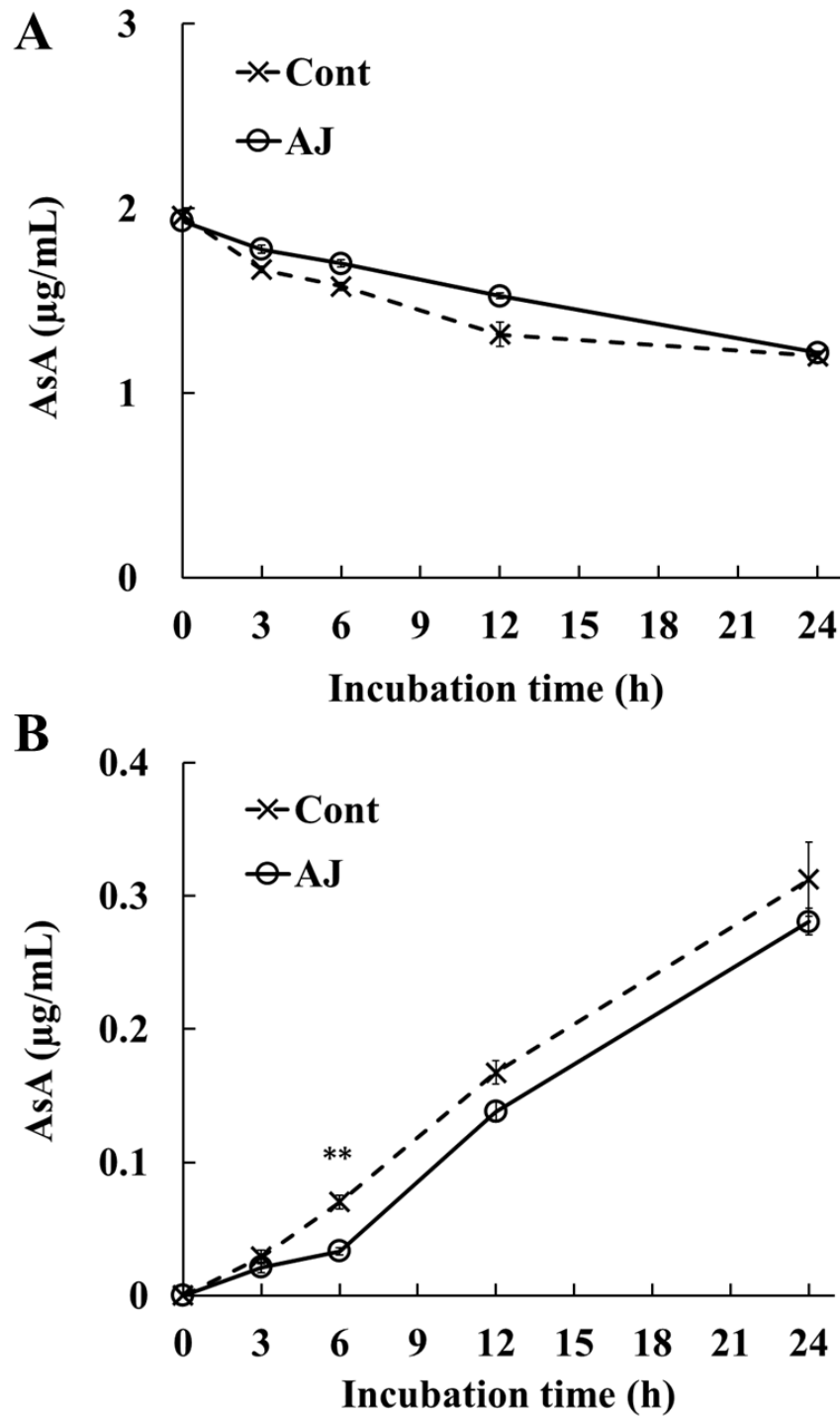


図 12 Caco-2 細胞における 0.01 mM (1.76 μg/mL) AsA 溶液と 10% AJ 添加時の AsA 取り込みの経時変化。

Caco-2 細胞層に AsA 溶液（最終濃度 0.01 mM）と 10% AJ を添加し 3～24 時間培養した．（A）インサート管腔側の培養液と（B）インサート基底膜側の培養液中の AsA 濃度をそれぞれ測定した．コントロール（Cont）群は AsA 溶液（最終濃度 0.01 mM）のみで培養した．\*\* $p<0.01$ ．

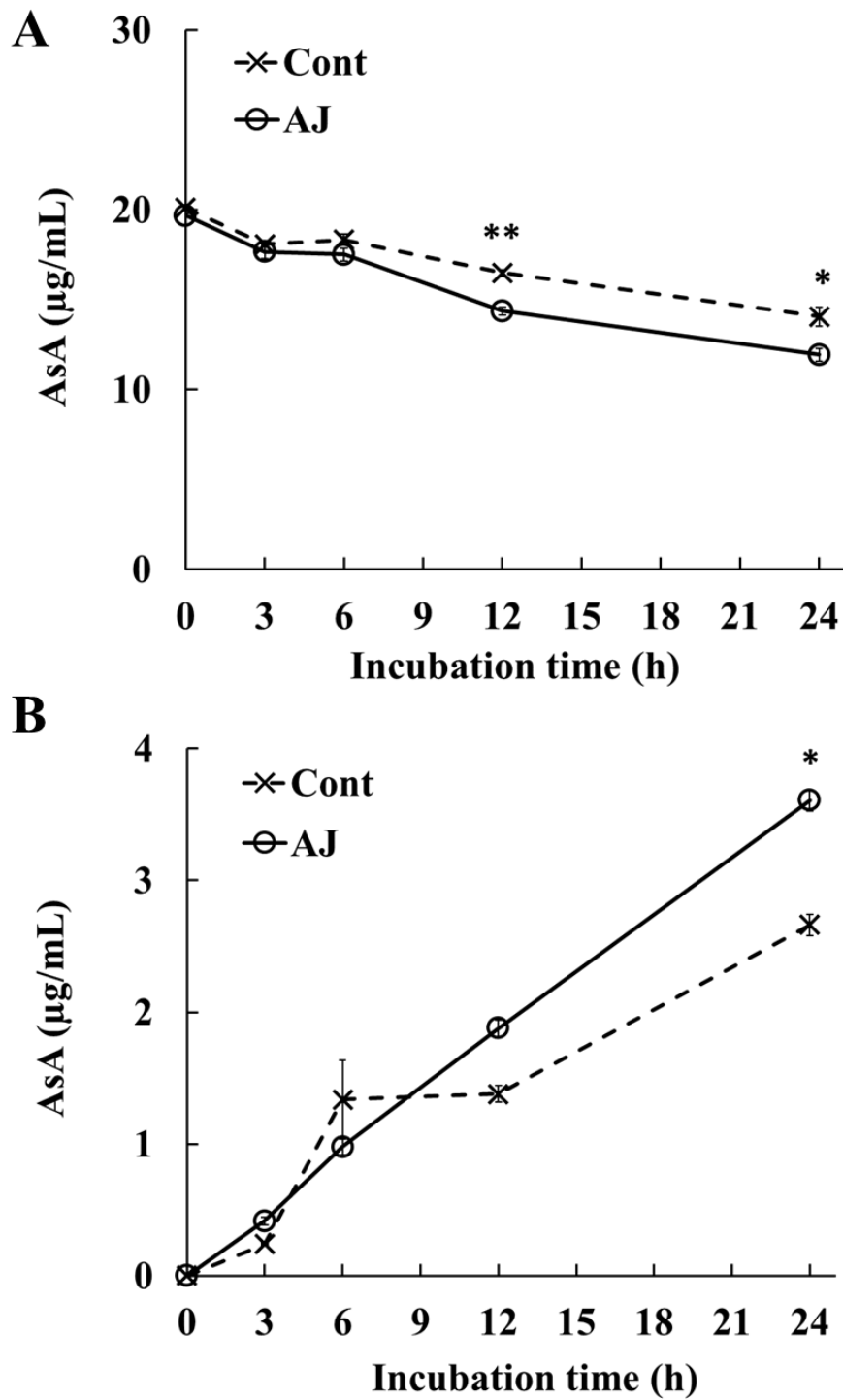


図 13 Caco-2 細胞における 0.1 mM (17.6  $\mu\text{g/mL}$ ) AsA 溶液と 10% AJ 添加時の AsA 取り込みの経時変化。

Caco-2 細胞層に AsA 溶液（最終濃度 0.1 mM）と 10% AJ を添加し 3～24 時間培養した．（A）インサート管腔側の培養液と（B）インサート基底膜側の培養液中の AsA 濃度をそれぞれ測定した．コントロール（Cont）群は AsA 溶液（最終濃度 0.1 mM）のみで培養した．\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

の AsA の透過を促進するという新規の知見が得られた。

#### 4. 考察

AsA は強い抗酸化作用のほか<sup>1)</sup>, コラーゲン線維の構築<sup>2)</sup>など生体内において非常に重要な役割を担っている。しかし, 水溶性ビタミンであることから, 生体内に十分に吸収され, 保持することが困難である。1~49 歳の日本人の一日当たりの AsA 摂取量の平均値は, 推定平均必要量を満たしていない<sup>9)</sup>。さらに高齢者では, 若年成人に比較して, 生体内の AsA を維持するための要求量が高いと報告され<sup>10)</sup>, 高齢化が進む我が国において AsA の生体内への保持方法の確立は社会的にも強く求められているなか, リンゴの摂取により生体内の AsA 濃度が著明に増加することが報告された<sup>17)</sup>。この結果から, リンゴの摂取は生体内における AsA の蓄積を促進している可能性が期待される。しかし, この先行研究ではリンゴの果実を材料とし混餌投与としており, 調製方法や投与量など詳細が明らかでない点が多くあった。さらに, AsA の体内への蓄積が吸収増強によるものか, あるいは排泄抑制によるものかなどの機構の詳細な解析は全く行われていないのが現状である。以上の背景から, 本研究では, リンゴの代替品としてリンゴ果汁 (AJ) を用い, AJ 摂取により AsA の体内蓄積が促進するのか, またその機構はどの様になっているのか, 詳細を解析した。最初に, AsA 合成能欠如モデルラットに AJ を摂取させ, ラットの血漿及び尿中の AsA 濃度への影響を解析した。

AJ 群の血漿中の AsA 濃度はコントロール群に対して 6 倍となり, 有意に高値を示した (図 2)。また尿中の AsA 量は, 2 週間の飼育前後でコントロール群では増加率 66.8%と経時的に増加傾向が認められたが, 2%AJ 群では増加率は 5.1%にとどまり, AJ 摂取により体外への AsA 排泄が抑制されていることが示された (表 1)。本研究での尿中 AsA 量の経時的増加は血漿での結果と類似している。AsA は近位尿細管で原尿から吸収され, 血漿へ移行するため, 原尿の AsA 濃度は血漿に依存していることが知られている<sup>17)</sup>。よって, AJ を摂取することで, 腎臓で AsA の再吸収が盛んに行われ, 血漿中に AsA が多く保持された可能性が考えられる。リンゴの摂取により尿中への AsA 排泄量が抑制したという報告はこれまでに無く, リンゴの新規の機能性を示唆する結果となった。さらに, AsA は小腸において吸収され, 血中に輸送された後各臓器に分布するが, 余剰分は尿中に排泄される。尿中への排泄量が減少していたことから, AJ の摂取により臓器中の AsA 蓄積が促進していることが示唆された。そこで臓器中 AsA 含量への AJ の影響を検討したところ, 臓器中の AsA 濃度は, 眼球, 胸腺において AJ 群で有意に高値となった (図 4)。この結果により, AJ 摂取により臓器特異的に AsA が蓄積していると考えられる。AsA は粘膜を正常に保つ働きがあると言われている。また, AsA はインターフェロンの産生, マクロファージの食作用の亢進, NK 細胞数の増加と遊走能の亢進などの免疫システムを刺激することが知られており, 要求量が多いことから免疫細胞内の AsA 濃度は高く維持されている<sup>27)</sup>。さらに, AsA が樹状細胞の CD80, CD86 などの発現を増加させることが報告されている<sup>28)</sup>。

一般的に、樹状細胞の共刺激分子である CD80 と CD86 の発現は、がん細胞の排除や傷害を可能にする T 細胞発生の重要なシグナルとなる。したがって、AsA により認められた CD80 と CD86 の発現上昇は、樹状細胞活性化を導くものであり、AsA が CD80 と CD86 発現を介して免疫応答の開始と維持に重要な役割を担っていることを示唆している。胸腺は、T リンパ球の分化・成熟など免疫系に關与している。AJ 摂取による胸腺への AsA の蓄積には免疫機能が關係していると考えられ、AJ を摂取することで免疫応答が活性化し、免疫機能の上昇に寄与する可能性が示された。さらに、AsA の抗酸化作用により角膜内の過酸化物を生じる酵素であるリポキシゲナーゼ活性を抑制しているという報告がある<sup>29)</sup>。眼球は恒常的に AsA の消費量が多い臓器であるため、AJ の摂取により特異的に AsA が蓄積していると考えられ、これによって酸化ストレスに起因した眼球の病変の予防につながる可能性が示唆された。

続いて、AsA は小腸から主に吸収されることから、小腸の各部位別にも AsA 含量の変動について解析した。結果、空腸において AJ 摂取により AsA 含量の有意な増加が認められた (図 5)。小腸各部位の重量に有意な差は認められなかった。AsA は十二指腸、空腸、回腸のうち十二指腸で最も多く取り込まれ、次に空腸、回腸の順であることが既知である<sup>30)</sup>。しかし、本研究結果から AJ の摂取により空腸からの AsA 吸収が特異的に増強する可能性が示された。

さらに、反転腸を用い小腸における AsA の吸収が AJ により実際に促進するかどうかを解析した。反転腸外液から反転腸内腔への AsA 取り込みはいずれの部位においても AJ 群が有意に高値を示した (図 6)。この結果から、AJ 群の小腸はコントロール群の小腸よりも多くの AsA を取り込み、そして全身に輸送することが示唆された。さらに、AsA 取り込みは反転腸外液の AJ の有無に関わらず促進された。AJ の存在下のみで取り込みが促進していた場合は、機構として AJ 中の成分と AsA の共輸送により、取り込み量が促進している可能性が考えられる。しかし、AJ に曝露した腸管であれば、AsA 取り込み時に AJ が無添加であっても取り込みが促進していた。このことから、取り込み促進機構としては AJ と AsA の共輸送等ではなく腸管機能への影響であることが強く推察される。培養細胞を用いた実験では、カカオポリフェノールにより AMPK のリン酸化を介して GLUT4 の細胞膜移行が促進され、グルコースの吸収が増強することが報告されている<sup>31)</sup>。この機能のように、AJ の摂取が腸管の機能を刺激することにより、結果として小腸からの AsA 取り込みが増強している可能性が明らかになった。

以上の結果を得て、AJ の摂取によって小腸での AsA の吸収が高まる機構の存在の可能性を見出した。そこで続いて、AsA 体内保持増強作用のメカニズムを解明するため、ラット小腸における SVCT1 トランスポーター発現量への AJ の影響を解析した。十二指腸及び回腸の SVCT1 タンパク質発現量はコントロール群と AJ 群で有意な差は見られなかった。一方で、空腸ではコントロール群に比べて AJ 群で高値傾向となった (図 7)。前述の通り、空腸では AJ 摂取により AsA 含量の

有意な増加が認められている。このことから、空腸での AJ による AsA 取り込み作用には SVCT1 発現量が寄与していることが考えられる。そこで、十二指腸、空腸及び回腸での AsA 濃度と SVCT1 濃度の相関を調べた。結果、すべての部位において有意な正の相関が認められ (図 8), SVCT1 の発現量増加と比例して腸管への AsA 取り込み量が増加することが明らかとなった。SVCT1 により輸送されるのは AsA であり、酸化型である DAsA の輸送は GLUT により細胞内へ取り込まれる<sup>26)</sup>。そのため、AJ の SVCT1 発現量への影響を検討するにあたり、培養中は一定レベルで AsA 濃度を維持する必要がある。しかし、AsA は非常に不安定な性質を有し、熱や光により速やかに酸化される。今回ラットに投与した飲料水中の AsA の安定性は確認できておらず、AsA の酸化により DAsA に変換されたため、SVCT1 発現が刺激されなかった可能性が考えられる。そこで *in vitro* 系として小腸モデル培養細胞を用い、培養液中に還元剤を添加することで AsA の安定性を確保し、AJ 添加による SVCT1 タンパク質発現量への影響を解析した。

実験には小腸モデル培養細胞として Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞は培養することで分化し、構造的及び機能的に成熟した小腸上皮細胞に類似することが分かっている。またコンフルエント直後では小腸上皮様細胞に分化しておらず、コンフルエントから 14 日後に小腸上皮様細胞に分化した状態であることが示されている<sup>24)</sup>。ヒト小腸の初代培養細胞は入手困難であることから、小腸における腸管機能を探索する細胞モデルとして、グルコースの吸収抑制作用や薬物の消化管透過性などの研究分野で広く用いられている。すなわち、Caco-2 細胞は AJ による AsA の吸収増強メカニズムを分子生物学的に評価するのに、最適な材料であると考えられた。

Caco-2 細胞の SVCT1 タンパク質発現量は、AJ 添加でほとんど変化が見られなかった (図 11)。ヒト皮膚線維芽細胞を用いた報告によると、0.5 mM AsA を用いた場合、細胞内への AsA の取り込みは 12 時間まで増加し、その後 24 時間まで徐々に減少する<sup>32)</sup>。細胞に添加した AsA 濃度、ならびに細胞種の違いによる最大細胞内 AsA 濃度の差<sup>33)</sup>は考慮しなければならないが、12 時間時点では SVCT1 タンパク質発現量のさらに大きな変動が確認できた可能性が考えられる。一方で、トランスウェルインサート上に培養した Caco-2 細胞の AsA 透過性を評価したところ、AJ 添加により AsA の透過が促進することが確認された。0.1 mM AsA 添加により細胞中に経時的に AsA が取り込まれているため、apical side の培養液では AsA 濃度が減少していることが確認された (図 13)。Basal side には細胞中の AsA が放出されるが、apical side と同様に、AJ の存在によって AsA の放出量が高値となった。0.01 mM の AsA 添加では AsA の濃度が低いため、AJ の有意な影響が認められなかった (図 12)。それに対し 0.1 mM の AsA 添加では高濃度の AsA であったため、SVCT1 発現が刺激され AJ の AsA 取り込み促進効果が認められたと考えられる。

ここまでの結果から、AJ 摂取により AsA の体内蓄積が促進するという新たな

知見が見出された．さらに，AJ 添加が腸管からの AsA 取り込みに関与していることが強く推察された．*in vivo* と *in vitro* のいずれにおいても，リンゴの AsA 取り込みへの関与はこれまでに報告されておらず，また他の水溶性ビタミンとの関連も示されていない．AJ により腸管からの AsA 取り込みが促進することにより，生体内において各臓器で充分量の AsA が保持されることとなれば，健康維持の促進の一助となる．近年の高齢化に際し，抗酸化作用などの酸化ストレスの防御系についてより一層の解明が求められていることから，食品成分による AsA 体内蓄積作用は非常に有用であるといえる．また本研究から得られた基礎的データは，リンゴの機能性成分の探索や他の水溶性ビタミン吸収機構の解明など様々な研究分野への応用が期待できる．

以上のことから，AJ には *in vivo* と *in vitro* の両方において，小腸細胞への AsA 取り込みを促進する作用があることが明らかとなった．また，*in vivo* での検討により取り込まれた AsA は体内の各組織に効率的に蓄積していることが明らかとなった．メカニズムとしては，腸管の AsA トランスポーターである SVCT1 が関与している可能性が示唆された．しかしながら，AJ による AsA 吸収促進機構の全容は未だに明らかとなっていない．特に，AJ の機能を明確にするためにはよりヒトに近い条件での検討が望まれ，ほかの食品成分との相互作用や現実的な摂取量などを考慮し，さらなる検討が必要とされる．

## 謝 辞

本研究は、青森県立保健大学大学院健康科学研究科 食品開発・安全学研究室にて行われたものです。本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力頂きました。

本研究を遂行するにあたり、興味深い研究テーマを与えてくださり、終始御懇篤なるご指導とご鞭撻を頂き、さらに研究における考え方や進め方をご教授下さいました 青森県立保健大学健康科学部栄養学科 井澤 弘美 准教授に深く感謝致しますとともに、御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、日々の研究だけでなく様々なご指導・ご鞭撻を賜りました、主査 青森県立保健大学健康科学部栄養学科 今 淳 教授に深く感謝致します。

本研究に際し、ご高閲と多くのご教授を賜りました、副査 地方独立行政法人青森県産業技術センター 弘前工業研究所 内沢 秀光 博士に深く感謝致します。

また本研究に際し、ご高閲と多くのご教授を頂き、さらに実験手法や研究の姿勢など多岐にわたりご指導賜りました 青森県立保健大学健康科学部栄養学科 乗鞍 敏夫 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり数々のご支援、ご協力をいただきました青森県立保健大学健康科学部栄養学科 食品開発・安全学研究室の諸氏に感謝致します。

最後に、温かく見守りそして辛抱強く支援して下さった家族に対しては深い感謝の意を表して謝辞と致します。

## 参考文献

- 1) Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB. J* 7. 1135-1142. 1993.
- 2) Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen; relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr.* 54. 1135S-1140S. 1991.
- 3) Takahashi K, Kishimoto Y, Konishi T, Fujita Y, Ito M, Shimokado K, Maruyama N, Ishigami A. Ascorbic acid deficiency affects genes for oxidation-reduction and lipid metabolism in livers from SMP30/GNL knockout mice. *Biochim Biophys Acta.* 1840. 2289-2298. 2014.
- 4) Amano A, Tsunoda M, Aigaki T, Maruyama N, Ishigami A. Effect of ascorbic acid deficiency on catecholamine synthesis in adrenal glands of SMP30/GNL knockout mice. *Eur J Nutr.* 53. 177-185. 2014.
- 5) Mackenzie B, Garrick MD. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: 898-986. 2005.
- 6) Gitte RH, Rats OD, Tine BA, Eva NJ, Runa LJ, Maria NB, Brigita P, Andres B, Andrea W, Tine RL, Jaroslaw M, Susanne B. Intake of whole apples or clear apple juice has contrasting effects on plasma lipids in volunteers. *Eur J Nutr.* 52.1875-1889. 2013.
- 7) Padayatty SJ, Levine M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ*, 164. 353-5. 2001.
- 8) Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, et al. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98. 9842-9846. 2001.
- 9) Ministry of Health, Labour and Welfare. National Health and Nutrition Survey Japan, 2019.
- 10) Brubacher D, Moser U, Jordan P. Vitamin C concentrations in plasma as a function of intake: a meta-analysis. *Int J Vitam Nutr Res.* 70. 226-237. 2000.
- 11) Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA. A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature.* 399. 0-75. 1999.
- 12) Corpe CP, Tu H, Eck P, et al. Vitamin C transporter Slc23a1 links renal reabsorption, vitamin C tissue accumulation, and perinatal survival in mice. *J Clin Invest.* 120. 1069-1083. 2010.
- 13) Tsujimura M, Higasa S, Aono K, Seki T. Vitamin C Activity of L-Dehydroascorbic acid in Human-Time-dependent Vitamin C Urinary Excretion after the Oral Load Vitamins. 80. 281-285. 2006. (in Japanese)
- 14) Kallner AB, Hartmann D, Hornig DH. On the requirements of ascorbic acid in

- man: steady-state turnover and body pool in smokers. *Am J Clin Nutr.* 34. 1347-1355. 1981.
- 15) Melethil S, Mason WD, Chang CJ. Dose-dependent absorption and excretion of vitamin C in humans. *Int J Pharmaceut.* 31. 83-89. 1986.
  - 16) Bondonno NP, Bondonno CP, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD. The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends Food Sci Technol.* 69.243-56. 2017.
  - 17) Renee SA, Rene S. Sparing effect of a fruit-enriched diet on ascorbic acid in hamsters and guinea pigs. *Med Sci Res.* 19. 107-108. 1991.
  - 18) Roscoe RS, George RK. A rapid, simple method for the determination of reduced, dehydro and total ascorbic acid in biological material. *J Biol Chem.* 212(1). 59-68. 1955.
  - 19) JGL Sciences LC Technical Note. HPLC による食品中のビタミン C の分析.
  - 20) Muto N. Evaluation of ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside as vitamin C source: mode of intestinal hydrolysis and absorption following oral administration. *Int J Vita Nutr Res.* 62. 318-323.1992.
  - 21) Shinozaki K, Hosokawa Y, Hazawa M, Kashiwakura I, Okumura K, Kaku T, Nakayama E. Ascorbic Acid Enhances Radiation-induced Apoptosis in an HL60 Human Leukemia Cell Line. *J. Radiat. Res.* 52. 229-237. 2011.
  - 22) Laemmli, L.J.K.: Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227. 680-685. 1970.
  - 23) Sawamura M, Odashima K, Nagakura K, Nakamura H. Anticancer drug susceptibility testing of human bladder cancer cell lines using MTT-assay. *Nippon Hinyokikagakkai.* 80(8).1195-1201. 1989. (in Japanese)
  - 24) Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando AY, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell. Biol.* 137. 1393-1401.1997.
  - 25) Jariya K, Praneet O, Tanasait N, Auayporn A, Theerasak R, Uracha R, Warayuth S. In vitro Permeability Enhancement in Intestinal Epithelial Cells (Caco-2) Monolayer of Water Soluble Quaternary Ammonium Chitosan Derivatives. *Pharm Sci Tech.* 11(2).497-508. 2010.
  - 26) Savini I. et al., SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids.* 34. 347-55. 2008.
  - 27) Kawada H, Kaneko M, Sawanobori M, Uno T, Matsuzawa H, Nakamura Y, Matsushita H, Ando K. High concentrations of L-ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1 $\alpha$  transcription. *PLoS One.* 8(4). e62717. 2013.
  - 28) Washko P, Rotrosen D, Levine M. Ascorbic acid transport and accumulation in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264. 18996-90024. 1989.

- 29) Williams RN, Paterson CA: Modulation of corneal lipoxygenase by ascorbic acid. *Exp Eye Res* 43: 7-13, 1986.
- 30) Hierro C, Monte MJ, Lozano E, Gonzalez-Sanchez E, Marin JJG, Macias RIR. Liver metabolic/oxidative stress induces hepatic and extrahepatic changes in the expression of the Vitamin C transporters SVCT1 and SVCT2. *Eur J Nutr.* 53. 401-412. 2014.
- 31) Kurimoto Y, Shibayama Y, Inoue S, Soga M, Takikawa M, Ito C, Nanba F, Yoshida T, Yamashita Y, Ashida H, Tsuda T. Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.* 61. 5558-5564. 2013.
- 32) Kishimoto Y, Saito N, Kurita K, Shimokado K, Maruyama N, Ishigami A. Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 11.430(2).579-584.2013.
- 33) Sato Y, Uchiki T, Iwama M, Kishimoto Y, Takahashi R, Ishigami A. Determination of dehydroascorbic acid in mouse tissues and plasma by using tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride as reductant in metaphosphoric acid/ethylenediaminetetraacetic acid solution. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 33(3). 364-369. 2010.