

酸化コレステロールの脂質代謝攪乱作用に対する 牛乳たん白質の効果

九州大学農学部教授 菅野道廣

はじめに

過酸化脂質が生体の諸機能に重大な影響を及ぼし、多くの疾患のみならず老化の引き金となる可能性に注目が集められている。現在まで、この問題に関する研究は脂肪酸の過酸化物質に焦点が当てられていて、コレステロール (CHOL) 酸化物の影響に関する知見は非常に限られる。CHOLが生体膜、リポたん白質の構成成分であることを考えれば、酸化CHOLの生物活性を知ることは極めて重要な研究課題である。さらに、酸化CHOLの生物活性の解明とその栄養的制御は、動物性脂肪の摂取が増加している現状から、国民健康に直結するきわめて重大な問題である。本研究は、食品中の酸化CHOLの種類と存在量ならびに生成経路から脂質代謝を中心とする代謝系への影響とその栄養的修飾まで、酸化CHOLの生物活性を理解するに必要な基礎知見を求めることを目的としている。そこで、本年度はまず、食品中の酸化CHOLの組成と含量、食品加工過程での生成の程度を防止法を検討し、ついで酸化CHOLの吸収の程度と共存する脂質成分の吸収への影響を調べた。

方法

(1) 酸化CHOLの分析：酸化CHOLを含む抽出液をシリカカラムクロマトグラフィー (Silica gel 60, 70-230 mesh, E. Merck) にかけて、酸化CHOLをメタノールで溶出した後トリメチルシリル化し、 5α -コレスタンを内部標準としてガスクロマトグラフィー (fused silica capillary ULBON HR-1 カラム、0.25mm x 50m、液層厚0.25 μ m、オープン温度280°C、インジェクター温度300°C、ヘリウム流速2.2ml/min) により分離定量した。各ピークの同定は標準物の保持時間との対比およびマススペクトロメトリーにより行った。個々の標準品についてこの条件下での

“response factor”には大きな差はなかったので、各測定値についての補正は行わなかった。

(2) 加熱に伴う酸化CHOLの生成：CHOLのクロロホルム溶液（50mg/ml）を窒素気流下で乾燥させ薄層のフィルムとし、種々の温度で加熱した。バターおよびチーズは薄く広げて加熱した。脂肪を共存させた場合には、CHOLと同量添加して同様に加熱した。試料からの酸化CHOLの抽出はFolchらの方法に準じて行い、常法に従って不飽和物を分離し、GLCに供した。

(3) CHOLおよび酸化CHOLの吸収測定：予め胸管リンパカニューレーションを施した体重300-340gのSD系雄ラットにTable 1に示すような組成のエマルジョンを胃内に投与し、経時的にリンパを採取し分析した。

結果と考察

(1) 酸化CHOLの分離定量

Fig. 1に示すように、キャピラリーガスクロマトグラフィーによって、多数の酸化CHOLの分別定量が可能であった。

(2) 加熱に伴う酸化CHOLの生成と食品の酸化CHOL含量

CHOLを種々の温度で加熱した場合、100°Cでは24時間までCHOLは比較的安定であったが、120°Cでは40%以上、150°Cでは70%以上が分解され、200°Cでは6時間で完全に分解した。これに伴って、多数の酸化CHOLが生成したが、7-ketocholesterolがもっとも多かった（Fig. 1参照）。

不飽和度を異にする種々の脂肪の共存下でCHOLを加熱した場合、Fig. 2に示すように、脂肪の不飽和度が高いほど酸化CHOLの生成量は多かったが、飽和脂肪の場合にも、CHOLのみの場合より酸化CHOLの生成の程度は多いようであった。この結果は、脂肪酸の酸化がCHOL酸化の引き金となることを指摘している。したがって、脂肪酸の酸化を抑えれば、CHOLの酸加もまた軽減できるとみなされる。

牛乳、バターおよびチーズ（プロセスチーズ）の酸化CHOL含量は、Table 2に示す通りである。牛乳には酸化CHOLは検出されなかったが、バターおよびチーズにはそれぞれ100g当たり約7mgおよび3mg含まれていた。この量は、各種の水産加工

品（日干し、塩辛、めんたいなど）の10-30mg/100gと比較してかなり低値であった。バターを50°Cあるいは100°Cで加熱すると軽度ながら酸化CHOLの増加が認められ、60分後にはそれぞれ約10mgおよび12mg検出された。チーズの場合には50°Cの加熱ではほとんど生成せず、100°Cでも増加の程度は僅かで、60分後でも4mg前後であった。これらの結果は、例数が少なく結論をだすにはいくらか制限はあるものの、脂肪が共存すれば比較的低い温度でもCHOLの酸化は起こること、ならびに共存する食品成分が酸化CHOL生成の程度に影響することを示している。

(3) 酸化CHOLの吸収

Fig. 3に示すように、ラットにおける酸化CHOLのリンパへの回収率はその種類により異なるものの、CHOLと比較して明らかに低く、全体としてはCHOLの約2/3であった。CHOLと酸化CHOLとの間での吸収率の違いは両者間でのリンパ流量の違いが原因の一つとみなされる。すなわち、酸化CHOLを含むエマルジョンを胃内に投与した場合、24時間のリンパ流量はCHOLの場合の1/2以下であった。また、酸化CHOLはエマルジョン中で不安定で沈殿しやすいことも関係する可能性もある。

一方、酸化CHOLは共存するCHOLと脂肪（トリオレイン）の吸収を共に約30%抑制することが観察された。

いずれにしても、酸化CHOLが吸収されることは確かであり、今後その影響を追究する予定である。

要 約

CHOLを含む生鮮食品では酸化CHOLは検出されなかったが、加工（加熱その他）に伴い多種類の酸化CHOLが生成した。加工の条件および共存成分が酸化CHOLの生成に影響した。CHOLの酸化は脂肪酸の酸化が引き金となるとみなされた。酸化CHOLはCHOLよりは低いが無視できない量吸収されることから、その生体への影響を検討する必要がある。

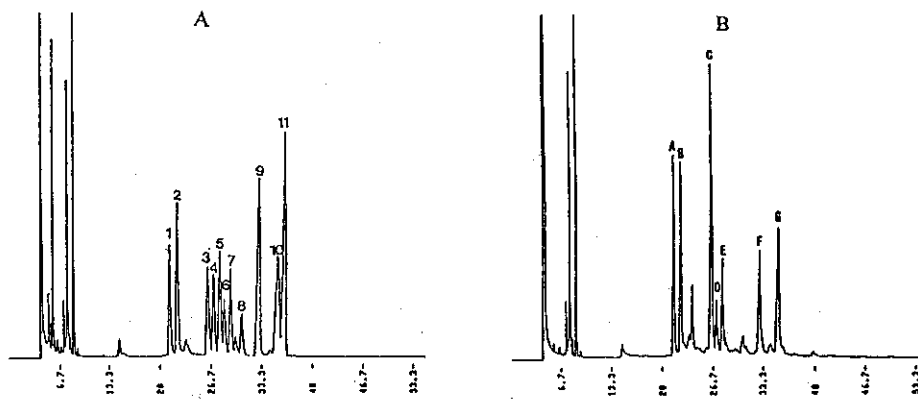


Fig. 1. Gas-Chromatographic Patterns of Oxidized Cholesterol Standards (A) and the Polar Fraction Rich in Oxidized Cholesterol (B).

Cholesterol was heated at 150°C for 24 hr. Peaks: 1, 7 α -hydroxycholesterol; 2, cholesterol; 3: 7 β -hydroxycholesterol; 4, 5 β -epoxycholesterol; 5, 5 α -epoxycholesterol; 6, 22(S)-hydroxycholesterol; 7, 22(R)-hydroxycholesterol; 8, 20 α -hydroxycholesterol; 9, cholestanetriol; 10, 7-ketocholesterol; 11, 25-hydroxycholesterol.

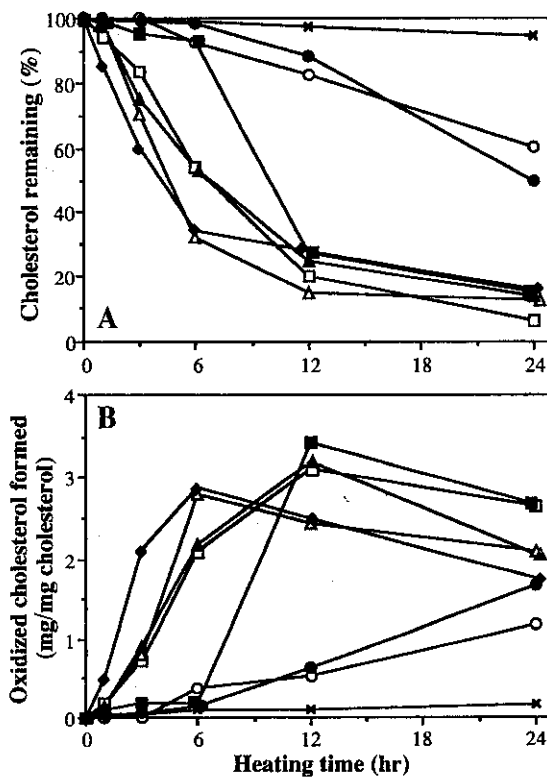


Fig. 2. Time course of cholesterol remaining (A) and oxidized cholesterol production (B) during heating in different triglyceride vehicles at 100°C for 24 hr in an electric oven. Triglyceride vehicles were: x, cholesterol alone; o, tristearin; ●, beef tallow; □, triolein; ■, soybean oil; Δ, safflower oil; ▲, linseed oil; ◆, sardine oil.

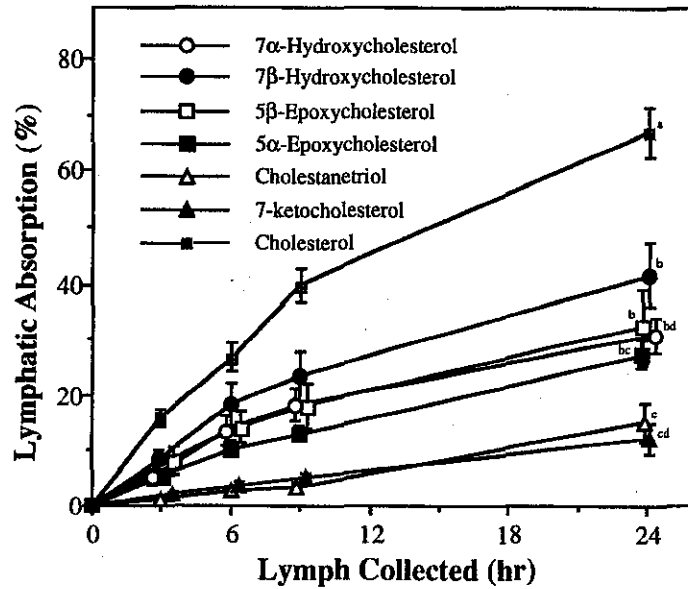


Fig. 3. Lymphatic absorption of cholesterol and various oxidized cholesterol. Data are presented as means \pm SE for 5 rats in each group. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$.

Table 1. Composition of Emulsion Used for Measuring Absorption of Oxidized Cholesterol

Ingredients	Amounts (mg/3 ml)
Sodium taurocholate	200
Fatty acid free albumin	50
Triolein	200
Cholesterol or Oxidized cholesterol mixture	25

Emulsion was prepared by sonication prior to use.

Table 2. Contents of Oxidized Cholesterol in Dairy Products

Sample	Sterols				Unknown*
	Cholesterol	7β-Hydroxy-cholesterol	Cholestane-triol	7-Keto-cholesterol	
Butter (mg/100g)	211	1.4	6.0	-	5.0
Cheese (mg/100g)	67	1.5	1.3	0.5	4.9
Milk (mg/ml)	1.7	-	-	-	-

*Composed of more than 4 components