

高脂血症を伴う肥満のラットの血清脂質成分に及ぼす乳製品中の有機酸の影響についての研究

鳴門教育大学生生活健康系 前田 英雄

【目的】

遺伝性肥満Zuckerラットは多くの研究者により種々の異常が報告されている。その中でも肥満Zuckerラットで見られる高脂血症や高インシュリン血症は人の肥満でも同様に見られ、人の成人病のモデル疾患動物として用いられている。しかし、その異常の病因である遺伝子やその代謝産物に関しては現在まで明らかでない。本研究助成金では遺伝性の肥満Zuckerラットに牛乳・乳製品中に含まれている有機酸を混入した飼料を与え、それらが血清及び肝臓脂質に及ぼす影響について検討した。牛乳成分中に含まれる有機酸として特にクエン酸と酪酸に注目し、また乳製品中の有機酸としてヨーグルトに1%の割合で含まれている乳酸の以上3つの有機酸に注目した。本研究では、脂質合成が著しく亢進している遺伝性肥満Zuckerラット飼料摂取量、体重の変化、血清脂質量及び肝臓脂質量に及ぼすこれら有機酸の影響について比較検討した。また、最近著者らが見いだした肝臓脂質合成に連動する肝臓細胞質画分中の分子量120kDaタンパク質量についても併せて検討した。

【方法】

実験動物及び飼料：動物は10週令のオス肥満Zuckerラット（体重128-178g）をアメリカチャルズリバーより購入し、一群4匹ずつ4群に分け4種類の飼料（基本食群（5%コーンオイルを含む20%カゼイン食）、乳酸群（基本食群に1%乳酸を含む）、クエン酸群（基本食群に1%クエン酸を含む）、酪酸群（基本食群に1%酪酸を含む））で29日間飼育した。実験動物は一夜絶食し、屠殺後、血清と肝臓を試料として用いた。

脂質成分の分析法：血清脂質成分（トリグリセリド、コレステロール及びリン脂質）は酵素法により測定した。肝臓脂質はFolchらの方法により抽出し、トリグリセリ

ドはアセチルアセトン法、コレステロールはジギトニン法により測定した。

120kDaタンパク質の精製：120kDaタンパク質の精製は、肥満Zuckerラットの肝臓細胞質画分を25-50%硫酸で塩析し、透析後、50mM NaClを含む25mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化したDEAE-Sephacelに吸着させた。吸着したタンパク質は、200mM NaClの直線勾配で溶出し、溶出画分を1本おきに電気泳動し、銀染色することにより120kDaタンパク質を検出した。さらに純化精製するために120kDaタンパク質の多い画分をプールし、アミコンYM30膜で濃縮後、分取用のポリアクリルアミドゲルカラム (6%ゲル濃度、4.0cm I. D. ×3.5cm H) で分離した結果、電気泳動ゲルでCBB染色及び銀染色により単一のバンドまで精製できた。

イムノブロッキング：120kDaタンパク質量の測定のために肝臓を9倍量の0.1mM EDTAと5mM Tris-HCl (pH 7.4) を含む0.25M Sucroseでホモジナイズし、超遠心法 (105,000 × g, 60分) により細胞質画分を分離した。タンパク質の分離は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (6%ゲル濃度) により行った。泳動後、ゲルはニトロセルロース膜に転写し、120kDaタンパク質に対する一次抗体である家兎抗血清は100倍に希釈し、二次抗体 (抗家兎ヤギIgG-ペルオキシダーゼ) は3000倍に希釈後使用し、免疫染色法で測定した。

【結果】

1) 肥満Zuckerラットの体重増加量は酪酸群が他の3群に比較して大きい傾向を示した。この体重増加は食餌摂食量に基づくものであった (表1及び表2参照)。

表1 Zuckerラットの体重に及ぼす飼料の影響

飼料	基本食群	乳酸群	クエン酸群	酪酸群
	(g)			
初体重	189 ± 31	189 ± 14	198 ± 11	189 ± 10
終体重	413 ± 44	416 ± 43	419 ± 19	431 ± 7
体重増加量	224 ± 33	227 ± 29	225 ± 22	243 ± 14

表 2 Zuckerラットの摂食量に及ぼす飼料の影響

飼料	基本食群	乳酸群	クエン酸群	酪酸群
	(g/日)			
摂食量	29.4±2.5	30.5±2.7	30.1±2.6	32.3±1.4

- 2) 血清トリグリセリド量は同じ群でも個体差が大きかったが、乳酸群と酪酸群が基本食群とクエン酸群に比較して少ない傾向を示した。血清コレステロール量及びリン脂質量は乳酸群と酪酸群が基本食群とクエン酸群に比較して高い傾向を示した(表3参照)。
- 3) 肝臓トリグリセリド量及びコレステロールはいずれも乳酸群が最も高値を示した(表4参照)。

表 3 血清脂質成分に及ぼす飼料の影響

	基本食群	乳酸群	クエン酸群	酪酸群
	(mg/dl)			
トリグリセリド	344±189	246±85	386±131	278±146
コレステロール	242±36	267±41	239±30	276±40
リン脂質	327±55	373±31	332±6	363±38

表 4 肝臓脂質成分に及ぼす飼料の影響

	基本食群	乳酸群	クエン酸群	酪酸群
	(mg/dl)			
トリグリセリド	113±26 ^d	168±32 ^d	111±43	137±67
コレステロール	3.1±0.1 ^{a,b}	3.43±0.2 ^{a,c}	2.56±0.2 ^{b,c}	3.21±0.7

a, d P<0.05, b, c P<0.01

4) 肝臓細胞質中の120kDa タンパク質量は、4 群間で有意な差は認められなかったが、乳酸群で最も高い傾向を示した（結果再検討中）。

以上の結果、肥満Zuckerラットで見られる高脂血症は、飼料中に添加した乳酸、クエン酸及び酪酸の影響よりも個体の遺伝的因子の影響が強いことが推察された。また、飼料中に乳酸を添加すると肝臓脂質合成に連動する120kDaタンパク質の免疫染色したバンドが濃くなる傾向を示すことや肝臓脂質が増加したことから、乳酸は肝臓の脂肪合成を亢進することが推察された。