

牛乳成分に対する代謝応答の変動要因

—特に高齢者の健康と牛乳飲用について—

国立健康・栄養研究所臨床栄養部部長 板 倉 弘 重
角 田 伸 代
池 本 真 二

はじめに

牛乳の成分としてたんぱく質、脂質、糖質、無機質、ビタミン、水などがあげられるが、牛乳と健康との関連で問題とされているのは脂質である。飽食時代を迎えて栄養の過剰摂取による肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧が主要な成人病として注目され、これらに引続いて発生する虚血性心疾患や脳血管疾患は主要な死因となっている。

脂質は高エネルギーの栄養素であり、脂質を含む食品の摂取が多くの成人病のもとになるのではないかと問題視されているのが現状である。

普通牛乳100gには脂質が3.2~3.5g含まれ、その大部分は脂肪酸である。コレステロールは11mg含まれている、がわずかであり、牛乳の脂質としては牛乳に含まれている脂肪酸の生体に及ぼす影響が問題である。そこで脂肪酸の脂質代謝に及ぼす影響をみるために今回は培養細胞を用いて検討を行った。

方 法

脂肪酸はパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、EPA、DHAについてそれぞれ純度99%のエチルエステルを用いて実験した。

細胞培養はヒト肝芽細胞腫由来細胞HepG2を用い、 α MEM培地に10%仔牛血清を加えて行った。培養フラスコにおいて増殖させた細胞をトリプシン処理にて回収し、60mmペトリ皿に 0.5×10^6 個の細胞をまき、CO₂インキュベータ内で4日間培養した。細胞を0.7%牛血清アルブミンを加えてホモジナイズした脂肪酸を含む α MEM培地で試験培養し、24時間後に分析した。

試験培養をした培地を回収し、2000rpm10分間遠心した後、上清をKBrで比重1.21に調整し35000rpm、40時間超遠心分離を行いリポ蛋白分画を得た。

各リポ蛋白分画中の蛋白量と脂質量を測定した。

細胞からのRNAの精製は酸性グアニジンチオシアネート法により行った。培養後の細胞をPBSで洗い、グアニジンチオシアネート溶液でプレート上の細胞をはがした後、酸性条件下でフェノールとクロロホルム溶液にて水層を抽出した。これをイソプロパノール沈澱した後、沈澱を再度グアニジンチオシアネート溶液、さらに水に溶かして同様の操作を行ってRNA溶液とし、分光光度計でRNA濃度を測定した。

ヒトゲノムDNAを鋳型として第26エクソンに存在する8465塩基から8712塩基のアポB248Bpと第4エクソンに存在する1361塩基から1635塩基のアポA I 275bpをPCRにより増幅し、TAクローニングキットを用いTAベクターにライゲートした。このプラスミドDNAをINV α Fコンピテント細胞にトランスフォームし、得られたコロニーよりプラスミドDNAをアルカリ法により精製した。精製したプラスミドは塩基配列を確認した後RNase Protectionに用いた。精製し塩基配列を確認したプラスミドDNAを鋳型として、RNAプローブを作成した。

RNAサンプルを乾燥させハイブリダイゼーション混流で希釈を行ったプローブを加え熱処理後、一晚インキュベートしてハイブリダイゼーションを行った。その後RNaseを加えて1本鎖のRNAを切断し、さらにRNaseを不活性化した後RNAを抽出した。RNAをloading bufferに溶かし熱処理後、7M尿素を含む6%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行ない、アポB、アポA I mRNA量を求めた。

実験結果

脂肪酸の負荷濃度の違いによるアポBとアポA Iの蛋白量およびアポ蛋白mRNA量を調べた。脂肪酸負荷濃度はヒト血清濃度を基準として、7種の脂肪酸ごとにレベルを変えて5段階に定めた(表1)。アポ蛋白量は0mM比で示した(図1)。アポB量は生理的濃度程度の負荷範囲内ではリノール酸で濃度に応じて低下が認められた。パルミチン酸、ステアリン酸は増加傾向が認められた。1.2mMの高濃度の脂肪酸負荷では飽和脂肪酸をのぞいて、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、EPA、

DHAいずれも著しく低下していた。飽和脂肪酸のなかでも、パルミチン酸とステアリン酸とではアポB生成量に違いが認められ、脂肪酸を負荷しない場合に比較してパルミチン酸負荷ではアポB量が2～2.5倍に増加したが、ステアリン酸はほとんど変化が認められなかった。生理的濃度の範囲内ではパルミチン酸とオレイン酸が脂肪酸を負荷しない場合より2倍以上増加しているが、これについてアポB生成量が多かったのはDHAで1.5倍程度に増加していた。

アポA I量は生理的濃度の負荷において、リノール酸では脂肪酸負荷量が増加するに伴って低下が認められた。オレイン酸は脂肪酸を負荷しない場合に比べて3倍程度のアポA I生成量の増加が認められ、しかも1.2mMの負荷を除けば増加傾向がみられた。1.2mMの大量負荷に対するアポA I蛋白量の生成を比較するとパルミチン酸、ステアリン酸の飽和脂肪酸は増加しているが、オレイン酸および多価不飽和脂肪酸はいずれも低下がみられた。1.2mM濃度の脂肪酸負荷の場合の作用はアポB、アポA Iともほぼ同様の傾向が認められている。

アポB mRNA、アポA I mRNA発現量は β -アクチンで値を補正した後、0 mM比をとり百分率で示した(図2)。アポB mRNA発現量は脂肪酸の生理濃度の負荷ではリノール酸をのぞいてほぼ100%であった。なかでもパルミチン酸は脂肪酸濃度に依存して増加傾向がみとめられた。これに対してリノール酸は低下傾向がみられた。脂肪酸負荷量が1.2mMの場合はアポB mRNA発現量の変化が蛋白量の場合より小さいが、飽和脂肪酸では大きく、 α -リノレン酸をのぞく多価不飽和脂肪酸および一価不飽和脂肪酸で低下傾向がみられた。

アポA I mRNA量は脂肪酸を負荷しない場合に比べてリノール酸で70%ほどに低下し、次いで α -リノレン酸、EPAでわずかに低下傾向がみられた。パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸は100%をわずかに越える程度であった。脂肪酸1.2mMの負荷ではパルミチン酸とオレイン酸の飽和脂肪酸で125%程度の増加が認められているが、その他の脂肪酸の負荷では100%以下であった。

考 察

普通牛乳100g中に含まれている主要な脂肪酸量を見ると飽和脂肪酸が多く、次い

で一価不飽和脂肪酸があり、多価不飽和脂肪酸が非常に少ないことが特徴である（表2）牛乳および乳製品の健康に及ぼす影響を考える場合にこの脂肪酸構成の特徴を考慮に入れることが大切であると思われる。

動脈硬化進行の評価に重要な要素として、LDLとHDLがある。LDLの構成アポ蛋白がアポBであり、HDLの主要構成アポ蛋白がアポA Iである。アポBとアポA Iは動脈硬化危険因子の評価に臨床応用されている。ここではアポBの異常高値とアポA Iの異常定値が動脈硬化の高リスクとして問題となっている。

今回、生理的濃度に近い脂肪酸負荷を培養細胞HepG2細胞に対して行ない、アポBおよびアポA Iの蛋白量およびmRNA生成量に対する影響を観察した。また1.2mMの比較的高い濃度の脂肪酸を負荷して比較した。

その結果飽和脂肪酸およびオレイン酸は飽和脂肪酸濃度の負荷でアポBおよびアポA Iの蛋白量もmRNA量も増加させる作用のあることが認められた。これに対して多価不飽和脂肪酸は増加傾向が認められず、特にリノール酸はアポB、アポA Iともに低下傾向が認められた。

リノール酸は血清コレステロール濃度を低下させることが知られているが、HepG2細胞を用いた実験でアポBおよびアポA Iの蛋白生成量も低下させることが認められた。

n-3系多価不飽和脂肪酸ではコレステロール低下作用がリノール酸より弱いとされているがHepG2細胞の実験結果はそれを支持する所見の1つとも考えられる。

アポBの異常増加は動脈硬化の進行に関与し、臨床的には望ましいことではないが、一方ではアポBは脂質を神経系や筋肉に運搬するために重要な役割をしており、低アポB血症では神経機能障害、歩行障害、死亡率の増加をもたらすことが報告されている。

飽和脂肪酸を高濃度にしてもHepG2細胞のアポB、アポA I生成能が低下しなかったことは飽和脂肪酸が細胞機能を良好に維持し逆に多価不飽和脂肪酸が細胞毒として作用しやすいことを示唆していることも考えられる。このことは牛乳が健康の維持に安全なものであり、適切な摂取を工夫すれば優れた効果をあらわすと考えられる。

Table.1 脂肪酸の負荷濃度

	1*	2*	3*	4*	5*	生理的濃度#
パルミチン酸	0.20	0.40	0.60	0.80	1.20	0.27
ステアリン酸	0.04	0.08	0.12	0.20	1.20	0.07
オレイン酸	0.20	0.40	0.60	0.80	1.20	0.24
リノール酸	0.20	0.40	0.60	0.80	1.20	0.36
α -リノレン酸	0.01	0.02	0.03	0.05	1.20	0.01
EPA	0.01	0.03	0.05	0.10	1.20	0.03
DHA	0.03	0.06	0.09	0.12	1.20	0.05

単位 : mM

*1-5の負荷量はFig.1.2の凡例を示す。

#は、培養液中で血清濃度が10%であることを考慮して1/10の値で示している。

*5の1.2mMは血清中全脂肪酸濃度の1/10量である。

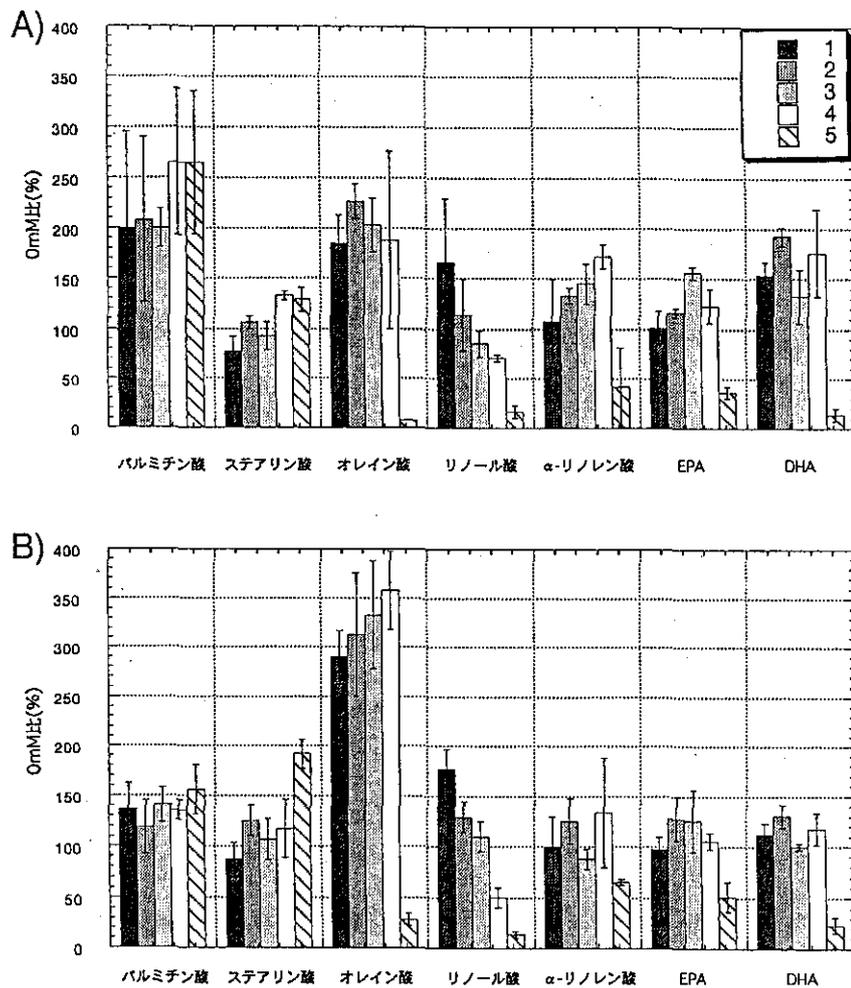


Fig. 1 アポ蛋白量に及ぼす脂肪酸の影響

A) : アポB量, B) : アポA1量, 値はMean \pm SD (n=3)

1-5の凡例はTable 1.の*1-5の負荷濃度を示す。

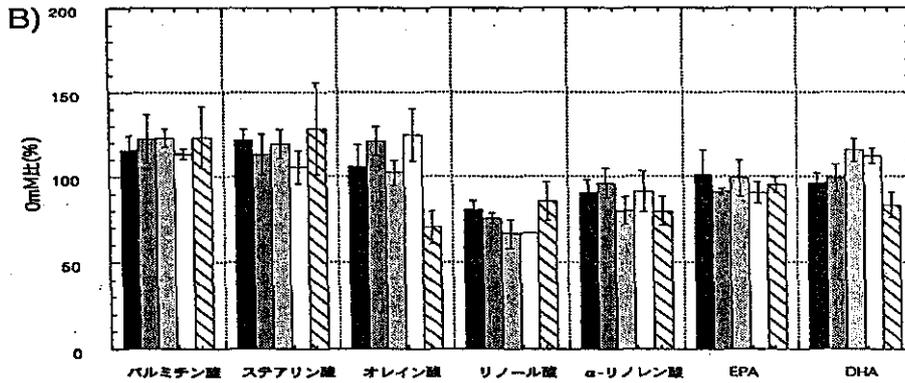
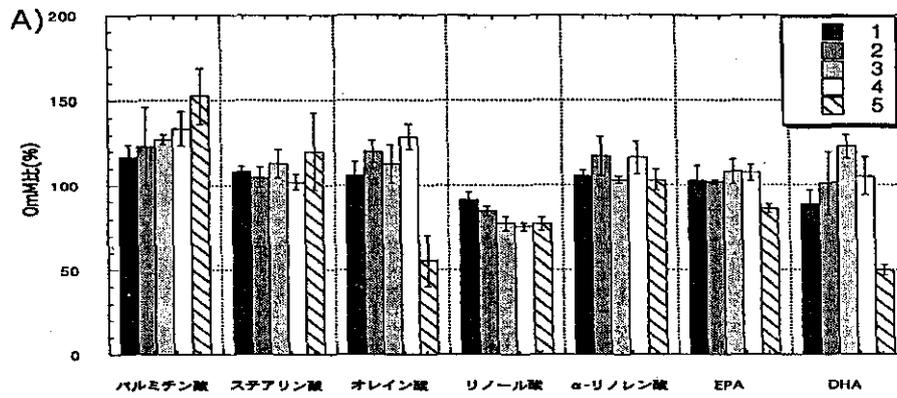


Fig. 2 アポ蛋白mRNA量に及ぼす脂肪酸の影響

A): アポBmRNA量, B): アポAmRNA量, 値はMean±SD (n=3)
1-5の凡例はTable の*1-5の負荷温度を示す。

表2 普通牛乳100g中に含まれている主要な脂肪酸量

脂肪酸名	脂肪酸量 (mg)	その他を含めた合計
パルミチン酸 (16:0)	906	飽和脂肪酸 2174
ステアリン酸 (18:0)	364	
ミリスチン酸 (14:0)	345	
酪酸 (4:0)	124	
ラウリン酸 (12:0)	108	
デカン酸 (10:0)	93	
ヘキササン酸 (6:0)	77	
オクタン酸 (8:0)	45	
オレイン酸 (18:1)	794	一価不飽和脂肪酸 914
パルミトレイン酸 (16:1)	54	
ミリストレイン酸 (14:1)	35	
リノール酸 (18:2, n-6)	86	多価不飽和脂肪酸 105
リノレン酸 (18:3, n-3)	13	
アラキドン酸 (20:4, n-6)	3	

普通牛乳100g中に脂質は3.5g、脂肪酸は3192mg