

# 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 (Ⅱ)

九州大学農学部教授 菅野道廣

## はじめに

動物性加工食品中に含まれている酸化コレステロール (CHOL) には種々の病態の発症ならびに老化を促進する可能性があることに関心が集められている。加工乳製品を含め多くの動物性加工食品には予想以上のレベルの種々の酸化CHOLが含まれている場合があり、それらは小腸からCHOLの1/2程度の割合で吸収されることを前年度報告した。したがって、最近のように加工食品が食生活の中で大きなウエイトを占めるようになってくると、酸化CHOLの大量摂取に直結し、国民の健康に及ぼす影響が危惧されるようになる。このことから、酸化CHOLの生体に及ぼす影響とその発現メカニズムを把握し、すすんで影響を制御する方法を検討することは緊急の研究課題であるといえよう。しかしながら、吸収された酸化CHOLの生体への影響に関する *in vivo* での研究例は非常に限られている。

本研究は酸化CHOLの脂質代謝に及ぼす影響に焦点を当て、食餌たん白質による酸化CHOLの悪影響を軽減するための基礎的知見を得ることを目的としている。そこで、本年度はラットに酸化CHOLを投与し、食餌たん白質の違いが酸化CHOLの影響に及ぼす効果を知るため、カゼイン (動物性たん白質) および分離大豆たん白質 (植物性たん白質) を用いて検討した。

## 実験方法

酸化CHOLの調製：コレステロールを150°Cで24時間加熱後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、メタノールで溶出し酸化CHOL混合物を調整した。組成はTable 1に示す通りであり、酸化CHOLとしての純度は92%であった。

動物実験：4週齢のSprague-Dawley系雄ラットを市販固形飼料で4日間予備飼育

後、食餌たん白質としてカゼイン（CAS）あるいは分離大豆たん白質（SOY）を20%レベルで含むAIN-76タイプの純化食を用い、CHOL無添加（Non-chol）、CHOL0.3%添加（Chol）あるいは酸化CHOL0.3%添加（Oxy-chol）の条件下で3週間ペアフィーディング法で飼育した。食餌脂肪はサフラワー油を用い5%レベルとし、すべての飼料にコール酸ナトリウムを0.075%レベルで添加した。飼育0、5、15および21日目に尾静脈より採血し血清CHOL濃度を測定した。飼育終了後、断頭屠殺し血清と肝臓の脂質濃度、脂肪酸組成ならびに過酸化脂質濃度を測定した。

## 結果と考察

ラットの摂食量、体重増加量および肝臓重量はTable 2に示している。摂食量が同じになるような条件で飼育したにもかかわらず、酸化CHOLの摂取はCAS、SOYの両群ともラットの成長を同程度抑制した。一方、CHOL食は肝臓肥大をもたらしたが、酸化CHOL食では肥大は認められず、肝臓の相対重量はCAS群に比べてSOY群で低い傾向にあった。いずれにしても、食餌たん白質の違いは酸化CHOLによる成長阻害作用に対し大きな影響を及ぼさないようであった。

Fig. 1に示すように、飼育期間中の血清CHOL濃度は、両たん白質群ともCHOLの摂取で有意に上昇し、その程度は従来の報告通りCAS群で高かった。一方、酸化CHOLは血清CHOLをむしろ低下させる傾向を示し、低下の程度はCAS群でより明確であった。このように、酸化CHOLの血清CHOL濃度に及ぼす影響に対し、SOYよりもCASの方がはっきりとした応答を示すことは興味がある。

3週間飼育後の血清および肝臓の脂質濃度をFig. 2に示す。まず、肝臓CHOL濃度はCAS群、SOY群ともCHOL摂取で上昇し、その程度はSOY群で軽度であった。これに対し、酸化CHOLを摂取してもCHOL濃度は上昇せず、両たん白質群ともに無添加食と同じレベルであった。肝臓トリグリセリド濃度でもCHOL濃度と同様な応答がみられた。肝臓リン脂質濃度にはCAS群でのみ有意な変化が認められたが、違いの程度は大きくなかった。一方、血清のCHOL濃度はCHOL食で上昇したが、CAS群でより顕著であった。しかし、酸化CHOLを摂取した場合には血清CHOL濃度は上昇せず、SOY群でむしろ高い傾向にあった。これらの結果か

ら、酸化CHOLとCHOLは肝臓と血清の脂質濃度に異なった影響を及ぼすことが明らかとなったが、酸化CHOL摂取時における食餌たん白質の種類の影響は総体的にはあまり著しいものではなかった。

肝臓ホスファチジルコリンの脂肪酸組成を測定した結果 (Table 3)、多価不飽和脂肪酸の長鎖・不飽和化はCAS群でよりよく進行し、とくにn-3系多価不飽和脂肪酸での違いが顕著であった。リノール酸の不飽和化指標 (desaturation index、リノール酸に対するその代謝産物の比) はCAS群、SOY群ともCHOLの摂取で低下し、酸化CHOLを摂取した場合には逆に高くなる傾向にあり、CAS群では有意に上昇した。この点は酸化CHOLの特異的機能の一つといえよう。酸化CHOLは肝臓でのリノール酸代謝系の律速酵素である $\Delta 6$ 不飽和化酵素に対して、CASが食餌たん白質源である場合には酵素活性を上昇させるという特異的効果を発揮するが、SOYはむしろその効果を弱める可能性が考えられた。なお、同様な結果が肝臓ホスファチジルエタノールアミン画分でも観察された。

血清および肝臓の過酸化脂質濃度はFig. 3に示すように、CHOL摂取により低下する傾向にあったが、酸化CHOLは食餌たん白質の種類に関わらずTBA値を上昇させた。このTBA値の上昇に対しては食餌たん白質間で差があり、とくに肝臓ではSOY群でCAS群に比べて高かった。このように、酸化CHOLは組織内での脂肪酸過酸化反応を誘起させる可能性が示されたが、CASでその程度は軽減できようであった。

以上の結果から、酸化CHOLによるCHOLならびに脂肪酸代謝攪乱作用に対する食餌たん白質の違いの影響はあまり明確ではなかったが、少なくとも脂質過酸化抑制の点ではCASの方が優れているようであった。今後は、ホエーたん白質をも用い、より体系的に種々のパラメーターについて酸化CHOLの影響を検討する必要があると考えられた。

## 要 約

酸化CHOLの摂取はラットの脂質代謝をかなりはっきりと攪乱することが明らかとなった。この作用に対する食餌たん白質の影響は必ずしも明確ではなかったが、血清

や肝臓のCHOL濃度、肝臓リン脂質の多価不飽和脂肪酸組成についてはCASとSOYの間で軽度ながら差が認められた。この差異の解釈にはまだ多くのデータの蓄積が必要である。ただ、SOYはCASに比べて酸化CHOL摂取に起因する生体内での脂肪酸過酸化反応を促進する可能性が示されたが、この点についても関連諸パラメーターを測定して確認する必要がある。

#### 参考文献

- 1) Osada, K., Sasaki, E. and Sugano, M. (1994) Biosci. Biotech. Biochem., 58:782-783.
- 2) Osada, K., Kodama, T., Cui, L., Itoh, Y. and Sugano, M. (1994) Biosci. Biotech. Biochem., 58:1062-1069.
- 3) Osada, K., Sasaki, E. and Sugano, M. (1994) Lipids, 29:555-559.

Table 1. Composition of Cholesterol  
Oxidation Products

Sterols	Weight %
7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol	6.0
Cholesterol	8.0
7 $\beta$ -Hydroxycholesterol	13.3
5 $\beta$ -Epoxycholesterol	3.9
5 $\alpha$ -Epoxycholesterol	14.2
Cholestanetriol	3.3
7-Ketocholesterol	26.7
25-Hydroxycholesterol	1.7
Unknown sterols*	22.9
<b>Total oxidized cholesterol</b>	<b>92.0</b>

\* Composed of more than 20 components.

Table 2. Effect of Dietary Protein on Growth Parameter in Rats Fed Oxidized Cholesterol

Groups		Body weight (g)		Food intake (g/day)	Liver weight (g/100g B.W.)
		Initial	Gain		
CAS	Non-chol	112 ± 6	124 ± 5 <sup>ab</sup>	17.0 ± 0.3	4.82 ± 0.10 <sup>a</sup>
	Chol	112 ± 5	142 ± 5 <sup>a</sup>	17.4 ± 0.1	5.66 ± 0.22 <sup>b</sup>
	Oxy-chol	112 ± 5	107 ± 5 <sup>b</sup>	16.3 ± 0.5	4.70 ± 0.07 <sup>a</sup>
SOY	Non-chol	112 ± 6	139 ± 4 <sup>A*</sup>	17.4 ± 0.1	4.38 ± 0.23 <sup>A</sup>
	Chol	112 ± 4	134 ± 7 <sup>A</sup>	17.3 ± 0.5	4.96 ± 0.20 <sup>B*</sup>
	Oxy-chol	112 ± 4	109 ± 15 <sup>B</sup>	15.9 ± 1.0	4.15 ± 0.11 <sup>A*</sup>
Significance of <i>f</i> value					
Protein		-	NS	NS	NS
Sterol		-	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01
Interaction		-	NS	NS	NS

Mean ± SE for 6 rats in each group. Data were analyzed by two-way ANOVA. When the *f* value for the protein or sterol effect was significant (*P* < 0.05), the differences between means were inspected by Duncan's multiple range test.

<sup>ab, AB</sup>Values without a common superscript letter are significantly different at *P* < 0.05. Non-chol, cholesterol-free diet; Chol, 0.3% cholesterol diet; Oxy-chol, 0.3% oxidized cholesterol mixture diet. \*Significantly different from the corresponding value in the rats fed casein at *P* < 0.05.

Table 3. Effect of Dietary Protein on Polyunsaturated Fatty acid Compositions of Liver Phosphatidylcholine in Rats Fed Cholesterol or Oxidized Cholesterol

Groups		Fatty acids (weight %)				
		18:2 (n-6)	20:3 (n-6)	20:4 (n-6)	22:6 (n-3)	(20:3+20:4) /18:2
CAS	Chol-free	12.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	28.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.3 <sup>a,*</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>a</sup>
	Chol	17.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	22.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.3 <sup>b,*</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>b</sup>
	Oxy- chol	11.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	31.0 ± 0.6 <sup>a,*</sup>	5.8 ± 0.2 <sup>b,*</sup>	3.0 ± 0.1 <sup>c,*</sup>
SOY	Chol-free	13.9 ± 0.8 <sup>A</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>A</sup>	28.7 ± 1.3 <sup>A</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>A</sup>	2.2 ± 0.2 <sup>A</sup>
	Chol	17.7 ± 1.3 <sup>B</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>B</sup>	23.2 ± 1.5 <sup>B</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>B</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>B</sup>
	Oxy- chol	11.1 ± 0.3 <sup>A</sup>	1.4 ± 0.4 <sup>A</sup>	28.7 ± 0.4 <sup>A</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>A</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>A</sup>
ANOVA <i>f</i> value						
Protein		<i>P</i> < 0.05	NS	NS	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01
Sterol		<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01	<i>P</i> < 0.01
Interaction		NS	NS	NS	NS	NS

Mean ± SE for 6 rats in each group. Data were analyzed by two-way ANOVA. When the *f* value for the protein or sterol effect was significant (*P* < 0.05), the differences between means were inspected by Duncan's multiple range test. <sup>abc, ABC</sup> Values in the same protein group without a common superscript letter are significantly different at *P* < 0.05. \*Significantly different from the soybean protein group at *P* < 0.05 (Student's *t*-test). NS, not significant.

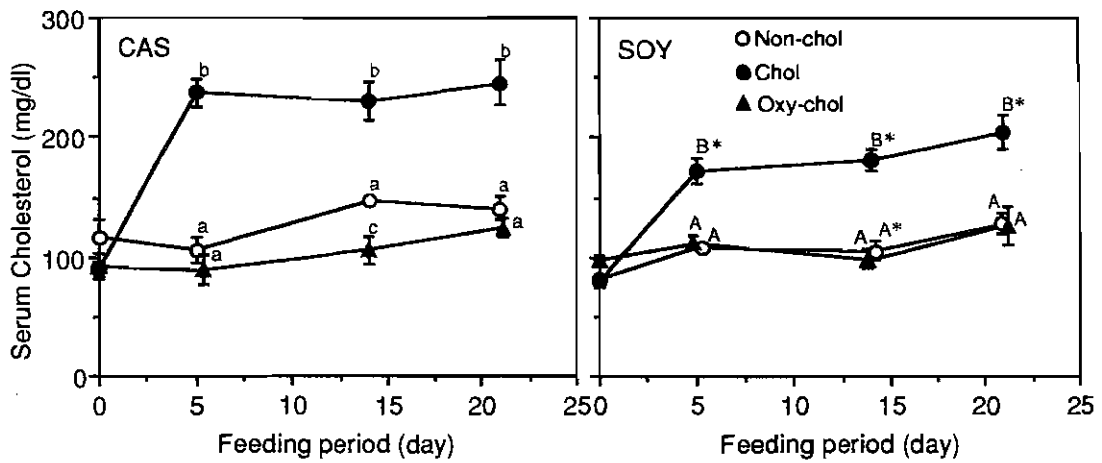


Fig. 1. Protein-Oxidized Cholesterol Interactions on the Concentrations of Serum Cholesterol.

Mean  $\pm$  SE for 6 rats in each group. Data were analyzed by two-way ANOVA. When the  $f$  value for the protein or sterol effect was significant ( $P < 0.05$ ), the differences between means were inspected by Duncan's multiple range test. <sup>abc, ABC</sup> Values in same protein group without a common superscript letter are significantly different at  $P < 0.05$ . \*Significantly different from casein group at  $P < 0.05$  (Student's  $t$ -test).

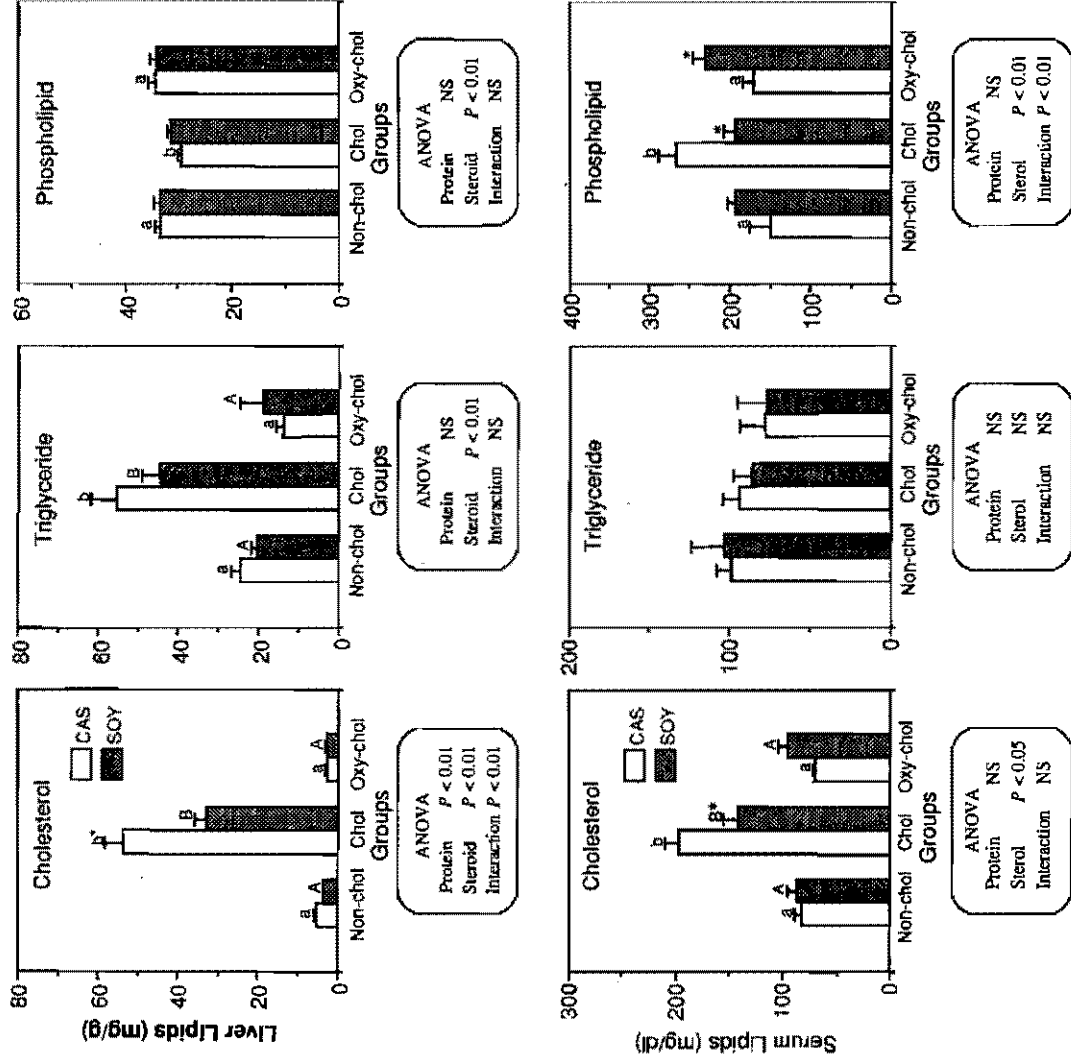


Fig. 2. Effect of Oxidized Cholesterol on Lipid Content of Liver and Serum.

Means±SE for 6 rats in each group. Data were analyzed by two-way ANOVA. When *f* value for the protein or steroid effect was significant ( $P < 0.05$ ), the differences between means were inspected by Duncan's multiple range test. *ab*, *AB* Values without a common superscript letter are significantly different at  $P < 0.05$ .

\*Significantly difference from the corresponding value in the rats fed casein at  $P < 0.05$ .



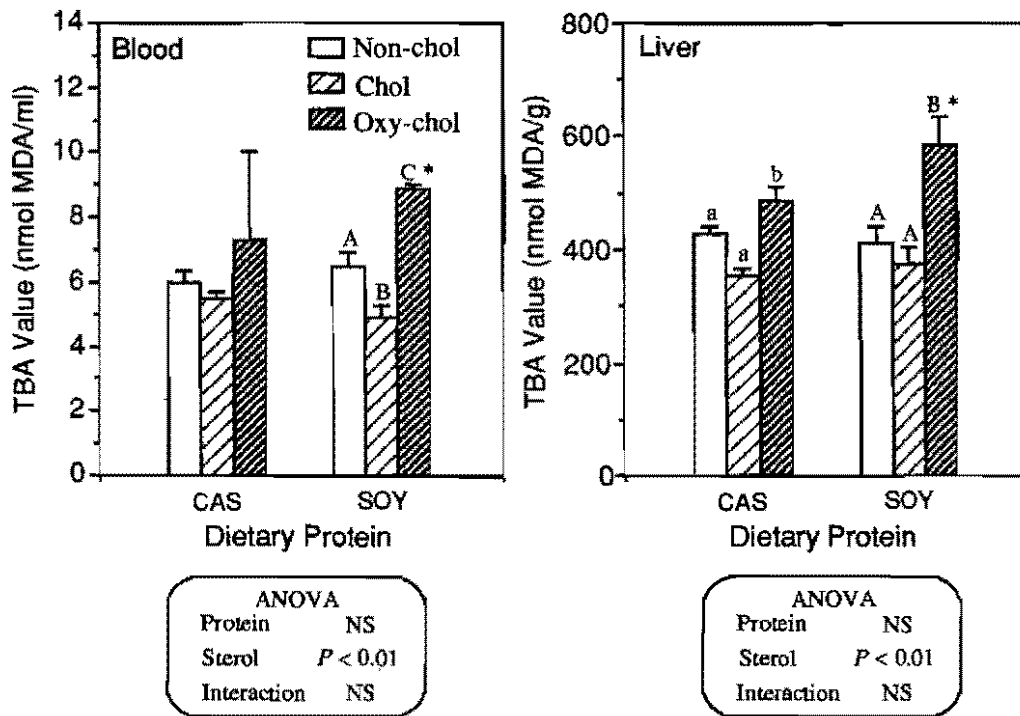


Fig. 3. Protein-Oxidized Cholesterol Interactions on Concentration of Tissue Lipoperoxides.

Mean  $\pm$  SE for 6 rats in each group. Data were analyzed by two-way ANOVA. When the  $f$  value for the protein or sterol effect was significant ( $P < 0.05$ ), the differences between means were inspected by Duncan's multiple range test. <sup>ab, ABC</sup> Values in same protein group without a common superscript letter are significantly different at  $P < 0.05$ . \*Significant different from casein group at  $P < 0.05$  (Student's  $t$  - test). MDA; malondialdehyde.