

共役型リノール酸と食品中の機能性成分との相乗作用による肥満防止

熊本県立大学環境共生学部 教授 菅野道廣
宮崎大学農学部 助教授 峯野昌信
長崎県立シーボルト大学看護栄養学部 講師 古場一哲

1. 緒言

共役型リノール酸 (conjugated linoleic acid、以下CLAと略称する) は反芻動物の体脂、乳脂中に少量成分ながら常在する脂肪酸で、表1に示すような優れた機能性が知られている¹⁻³⁾。CLAはリノール酸の位置および幾何異性体の総称で、数種の異性体からなっているが、主成分は9c, 11t-/9t, 11c-および10c, 12t/10t, 12c-18:2である。これら脂肪酸のうちどの異性体がCLAが示すきわめて多様な健康効果に責任があるのかはまだ明確ではない。活性本体の研究は今後の大きな課題の一つであろう。

これらの機能性のうち、もっとも注目を集めているのは制癌効果であり、その作用は同様の作用を示すn-3系多価不飽和脂肪酸に比べはるかに強いことが報告されているが、まだ動物実験の域を出ていない。ヒトへの適用が試みられているのは、肥満防止についてである。学術論文としてはまだ公表されていないが、1日当たり約2gを数ヶ月にわたって摂取すると、有意な体脂肪の減少があることが示されている。CLAは体脂肪のみを減少させ、体タンパク質量には影響せず、あるいはむしろ相対的には増加させるとも言われている。しかし、機能性食品素材としてはその効果発現にはかなりの時間を要することが問題であり、適当な食品成分との組み合わせでCLAの効果を増大させる必要がある。

図1にCLAが体脂肪を減少させるメカニズムとして考えられている応答を図示している。CLAは食欲抑制による脂肪摂取量の減少、リポタンパク質リパーゼ活性の抑制を介する吸収された脂肪の末梢組織への取り込みの抑制、ホルモン感受性リパーゼ活性の上昇を介する体脂肪の動員促進、そして肝臓での脂肪酸の燃焼促進によって積極的に体脂肪を減少させるとみなされている。このように、体脂肪減少に関わるシステムが構築されているにも関わらず、実際には予測されるようには効率的ではない。例えば、肝臓での脂肪酸の β 酸化促進作用は比較的弱く⁴⁾、おそらくこの過程が体脂肪減少効果のネックとなっていると考えられる。したがって、 β 酸化を亢進する食品成分の併用は、抗肥満作用を相乗的に高める可能性がある。

われわれは、ゴマ油中に高濃度に含まれるセサミンが、肝臓での脂肪酸酸化を有意に高めることを、

表1. CLAの多様な機能性

抗変異原作用
制癌作用 (乳癌、皮膚癌など)
飼料効率改善作用
肥満防止作用
抗酸化作用
免疫賦活作用
骨形成促進作用
鶏卵の孵化抑制
牛乳脂肪量減少作用

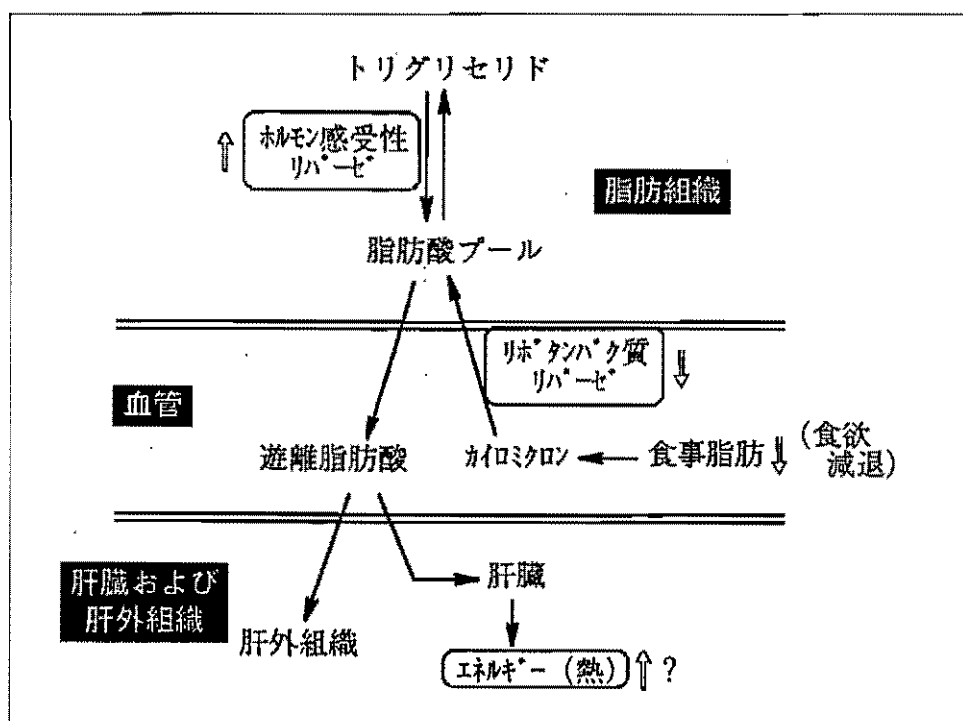


図1. 脂肪組織を中心とする脂肪酸代謝に及ぼす共役リノール酸の影響

ラットの単離肝臓環流実験⁵⁾ および肝臓の酵素系の応答測定⁶⁾ によって推定してきた。そこで、予備実験としてまず、この点とCLAの脂肪酸酸化促進作用を確認した、その成果を基に、ラットにセサミンとCLAを同時に摂取させ、体脂肪沈着に及ぼす影響を検討することにした。さらに、肝臓での脂肪酸合成抑制は体脂肪減少の有用な方法の一つであることから、そのような効果を発現する食品成分の併用効果についても検討した。すなわち、大豆タンパク質はカゼインと比較し、肝臓での脂肪酸合成を抑え、肝臓のみならず血清トリグリセリド濃度を減少させる作用がある⁷⁾。一方、n-3系多価不飽和脂肪酸も肝臓での脂肪酸合成を抑え、血清トリグリセリド濃度を下げる効果がある⁸⁾。そこで、これらの成分のCLAとの組み合わせ効果についてカゼインと比較検討した。このような組み合わせ効果の有用性は十分理解されている⁹⁾。

2. 実験方法

(1) 試薬類

サフラワー油 (リノール酸源) およびCLA はリノール油脂(株)より供与された。CLAはIpらの方法¹⁰⁾ でサフラワー油を異性化し調製さ

表2. CLA標品の脂肪酸組成

脂肪酸	リノール酸 (サフラワー油)	CLA
Weight %		
16:0	6.8	6.5
18:0	2.4	2.4
18:1	13.6	15.1
18:2	76.1	0.7
CLA	-	72.8
その他	1.1	2.5

CLAは9c,11t/9t,11c 46.8%, 10t,12c 48.1% が主成分であった。

れたもので、これら脂肪酸の組成は表2に示す通りであり、CLAの純度は約73%であった。セサミンは竹本油脂(株)から提供されたもので、セサミンとエピセサミンの47:53(w/w)混合物であった。

(2) 動物飼育法

a. セサミン実験

動物実験は熊本県立大学の実験動物飼育ガイドラインに従って行った。雄の4週齢Sprague-Dawleyラット(日本チャールスリバー(株)、横浜)を1匹ずつ飼育かごに入れ、温度21~23℃、照明8~20時の条件で飼育した。4日間飼育環境に慣らした後、各群8匹とし、リノール酸群、リノール酸+セサミン群、CLA群およびCLA+セサミン群の4群に分け、実験食を自由に摂食させた。実験食はAmerican Institute of Nutritionの推奨食(AIN-93G)に準じ調製した¹¹⁾。基本組成は表3に示す通りである。この試料にリノール酸あるいはCLA 1.0%、セサミン0.2%を添加した。体重と飼料摂取量は隔日毎に記録した。4週間飼育後、エチルエーテル麻酔下で腹部大動脈から採血した後、直ちに組織を摘出した。

b. タンパク質実験

4週齢のSprague-Dawley系雄ラットを上記の飼育実験と同様な飼料で3週間飼育した。タンパク質源としてカゼイン(和光純薬、大阪)および大豆タンパク質(フジプロR、不二製油、大阪)を用い、脂肪としては大豆油にかえエゴマ油(太田製油、名古屋)を用いた。リノール酸あるいはCLAは飼料中1%添加し、その分エゴマ油を減じた。3週間飼育後、一夜絶食させ、先のセサミン実験と同様に処理した。

(3) 分析方法

組織の脂肪酸組成はYamasakiらの方法¹²⁾に従って分析した。すなわち、Folchらの方法で抽出した脂質を、ジメチルスルフォオキシド共存下で硫酸メタノールによりメチル化し、ガスクロマトグラフィー(島津製作所GC-17A使用)により脂肪酸組成の分析を行った。カラムはSupercowax

表3. 実験食の組成

成分	含量(重量%)
コーンスターチ	39.748
糊化コーンスターチ	13.2
カゼイン	20.0
蔗糖	10.0
大豆油	7.0
ミネラル混合(AIN-93)	3.5
ビタミン混合(AIN-93)	1.0
L-シスチン	0.3
重酒石酸コリン	0.25
セルロース	5.0
tert-ブチルヒドロキノン	0.002

リノール酸あるいはCLAは1%レベルで添加し、その分大豆油を減じた。セサミンの添加量は0.2%で、コーンスターチで調整した。タンパク質の効果を調べた実験では、カゼインあるいは大豆タンパク質を用い、脂肪源はエゴマ油とした。

10 (0.32mm×60m、フィルム厚0.25mm、Supelco Inc., Bellefonte, PA) を用い、カラム温度は150℃から220℃の4℃/分の条件で昇温し、220℃に保持した。ピークの同定は、標準脂肪酸との比較、equivalent chain length法およびガスクロマトーマススペクトル法 (Jeol Auto MS 50使用) によって行った。

褐色脂肪組織のcarnitine palmitoyl acyltransferase活性の測定はBieberらの方法¹⁹⁾ に従い測定した。すなわち、背部肩胛骨下から摘出した褐色脂肪組織を0.3M mannitol、10mM HEPESおよび0.1mM EGTAを含む溶液でホモゲナイズし酵素源とし、palmitoyl-CoAおよびL-carnitineを含む基質を用い測定した。carnitine添加、無添加時における活性差から酵素活性を算出した。

血清の総コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質およびトリグリセリドはテストワコー脂質測定用キット (和光純薬、大阪) を用い測定した。

(4) 統計処理法

得られた結果は(株)ヒューリンクスのStat View-J4.02 (FPU) を用い、CLAとセサミンあるいはCLAとタンパク質の効果を二元配置分散分析を行った後、有意差があるものについては個々の群間でFisher's Protected least Significant Difference法によって有意差検定した。この報告では測定値は平均値±SEで示した。

3. 結 果

3-1 CLAの脂肪酸酸化促進作用：単離肝臓環流実験

Sprague-Dawley系雄ラットにリノール酸あるいはCLAを1%含むAIN-76タイプの飼料を14日間与えた後、肝臓を単離し、環流実験を行った⁵⁾。ラットの成長や肝臓重量に両群間で差はなかった。環流液に加えたオレイン酸の肝臓への取り込み量にはリノール酸群とCLA群とで同じであったので、表4に示す結果は、食餌脂肪酸が細胞内脂肪酸代謝に及ぼす影響を反映しているものと考えて良い。4時間の環流において、ケトン体の生成量はCLA群で有意に高く、逆に、トリグリセリドの分泌は低下傾向を示し、コレステロールでは有意に低くなった。つまり、CLAは肝臓での脂肪酸酸化を促進し、その結果脂肪酸をトリグリセリドとして分泌する能力を低減させることが示された。なお、この実験系での脂肪酸酸化の促進は、 β -ヒドロキシ酪酸/アセト酢酸比は上昇傾向を示し、すなわち両成分が平行して増加したことから、ミトコンドリアが主場であろうと推測された。

表4. 環流ラット肝臓におけるケトン体産生と脂質分泌に及ぼすCLA摂取の影響

パラメーター	環流期間 (時間)			
	1	2	3	4
ケトン体産生 (μmol/肝臓)				
リノール酸	239 ± 11	296 ± 9	368 ± 16	434 ± 22
CLA	282 ± 10*	380 ± 13*	489 ± 17*	598 ± 21*
β-ヒドロキシ酪酸/アセト酪酸比				
リノール酸	0.56 ± 0.05	0.66 ± 0.12	0.75 ± 0.75	0.90 ± 0.20
CLA	0.96 ± 0.06*	0.95 ± 0.17	1.04 ± 0.19	1.19 ± 0.21
トリグリセリド分泌 (μmol/肝臓)				
リノール酸	15.4 ± 1.8	22.0 ± 3.0	32.0 ± 3.0	44.6 ± 6.3
CLA	12.8 ± 0.7	19.6 ± 0.9	25.0 ± 2.2	32.2 ± 3.3
コレステロール分泌 (μmol/肝臓)				
リノール酸	4.76 ± 0.46	7.36 ± 0.71	9.51 ± 0.84	12.5 ± 0.6
CLA	3.47 ± 0.26	5.74 ± 0.14*	7.46 ± 0.21*	9.67 ± 0.33*

5 ~ 6 匹の平均値 ± SE. *リノール酸群に対し有意差あり、 $p < 0.05$.

CLAを含まない飼料を与えたラットの肝臓をCLAを添加して環流した場合には、摂食後のような応答は認められなかったことから、経口摂取ではじめて効果が発現することが確かめられた。

なお、環流後の肝臓の脂質を分析した結果、表5に示すように、CLAの摂取でコレステロール濃度は有意に減少していた。トリグリセリドおよびリン脂質濃度には変化は認められなかった。

コレステロールの減少はおそらく、合

成が抑えられた結果と推定される。なお、肝臓重量にはCLAの影響は観察されなかった。

表5. 環流後の肝臓脂質濃度

肝臓脂質	食餌群	
	リノール酸	CLA
	μmol/g 肝臓	
コレステロール	6.04 ± 0.38	4.25 ± 0.53*
トリグリセリド	22.7 ± 1.5	21.4 ± 2.6
リン脂質	27.7 ± 2.2	28.8 ± 1.1

5 ~ 6 匹の平均値 ± SE. *リノール酸群に対し有意差あり、 $p < 0.05$.

3-2 セサミンの脂肪酸代謝修飾作用

(1) 肝臓における脂肪酸酸化への影響

ラットに0、1、2および5%のセサミンを含む純化飼料（パーム油15%を含む）を15日間摂取させ、肝臓ミトコンドリアおよびペルオキシゾームの脂肪酸酸化活性をパルミトイルCoAを基質として測定した。この実験においてもラットの摂食量や成長には群間で差は認められなかったが、肝臓重量は0.2%以上のセサミン添加量に依存して増加した。図2に示すように、両画分での脂肪酸酸化活性は飼料のセサミン含量に依存して上昇した。しかし、上昇の程度はペルオキシゾームではるかに高かった。したがって、脂肪酸が多量肝臓に流入するような条件下でも、セサミンは比較的低レベルの摂取でも、十分脂肪酸を酸化し処理できる態勢を構築することが示された。なお、この充進作用は遺伝子レベルでの充進によるものであることが確かめられた。図3に示すように、酵素量は飼料中のセサミンレベルに応じてぞうかしているが、ミトコンドリアにおけるよりも、ペルオキシゾーム（Acyl-CoA oxidase, Peroxisomal bifunctional enzyme, Peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase）で増加量は明らかに高かった。

さらに、肝臓の脂肪酸合成系の鍵酵素の活性の及ぼす影響を検討したところ、表6に示すように、脂肪酸合成酵素およびグルコース-6リン酸脱水素酵素およびピルビン酸キナーゼの活性を抑制し、これも酵素レベルの低下によることが遺伝子発現の増加から確認された。ただ、リンゴ酸酵素については、逆に活性が上昇した。

これらの結果から、セサミンは肝臓における脂肪酸酸化を強く促進するだけでなく、同時に酸化促進より程度は低い、脂肪酸の合成を抑制することが明らかになった。したがって、CLAと

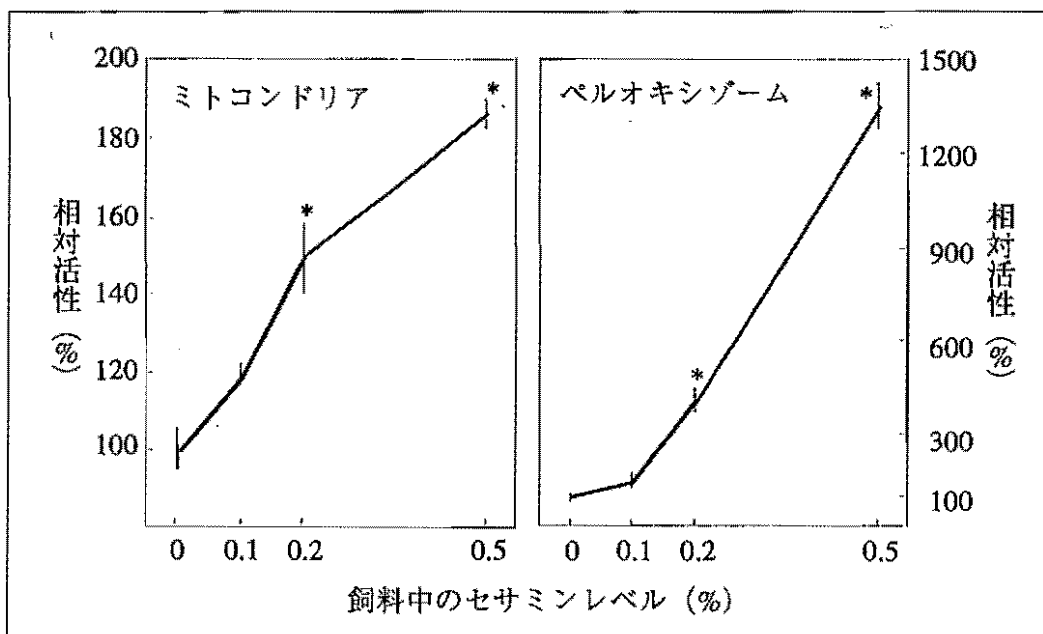


図2. パルミトイルCoAの参加に及ぼすセサミンの影響

5匹の平均値±SE. 飼育期間15日。* $p < 0.05$ 。

セサミンとの併用は、CLAの体脂肪減少効果を相加的あるいは相乗的に高める可能性が示唆された。これらの知見をもとに、両化合物の同時摂取の効果を確かめることにした。セサミンの効果から考え、以下の実験では添加量は0.2%とした。

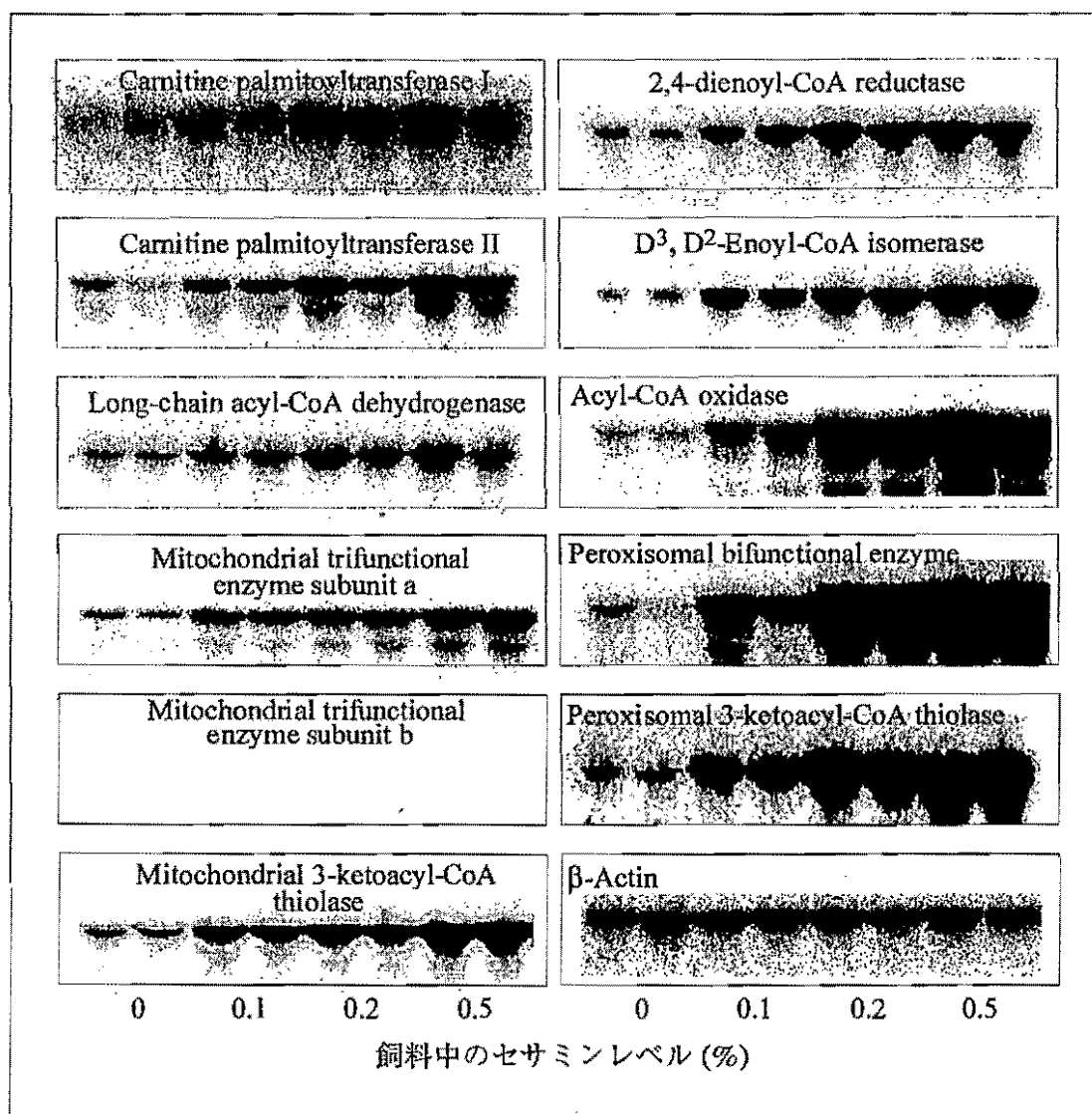


図3. ラット肝臓の脂肪酸酸化系酵素のmRNAのノーザンプロット分析
図2参照

表6. ラット肝臓の脂肪酸合成系鍵酵素の活性および遺伝子発現に及ぼすセサミンの影響

酵素	食餌群			
	パーム油	サフラワー油	パーム油 +セサミン	サフラワー油 +セサミン
酵素活性 (パーム油に対する相対値)				
Fatty acid synthetase	100 ± 10 ^a	56.9 ± 6.8 ^b	37.6 ± 3.2 ^c	39.0 ± 4.9 ^c
G-6-P dehydrogenase	100 ± 8 ^a	59.0 ± 6.4 ^b	34.7 ± 4.4 ^c	29.5 ± 1.7 ^c
Malic enzyme	100 ± 10 ^a	64.9 ± 5.3 ^c	117 ± 7 ^b	114 ± 9 ^b
Pyruvate kinase	100 ± 9 ^a	136 ± 4 ^b	45.1 ± 2.1 ^c	43.0 ± 2.6 ^c
遺伝子発現 (パーム油に対する相対値)				
Fatty acid synthetase	100 ± 18 ^a	48.2 ± 7.4 ^b	37.1 ± 6.2 ^b	38.3 ± 7.2 ^b
Malic enzyme	100 ± 21 ^a	66.8 ± 6.4 ^b	137 ± 13 ^{bc}	166 ± 19 ^c
Pyruvate kinase	100 ± 17 ^a	73.4 ± 5.3 ^a	41.1 ± 5.0 ^b	38.0 ± 1.2 ^b

6匹の平均値 ± SE. セサミン0.2%を含む10%脂肪食を18日間投与. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

3-3 セサミン実験

(1) 成長パラメーターと組織重量

表7に示すように、4週間の飼育期間中におけるラットの飼料摂取量および成長に各群間で差

表7. CLAとセサミンの同時摂取がラットの成長および組織重量に及ぼす影響

パラメーター	食餌群			
	リノール酸	リノール酸 +セサミン	CLA	CLA +セサミン
初体重 (g)	117 ± 8	117 ± 7	117 ± 6	117 ± 6
終体重 (g)	217 ± 31	222 ± 20	216 ± 4	219 ± 33
飼料摂取量 (g/日)	21.0 ± 2.2	20.8 ± 1.3	21.0 ± 0.9	20.5 ± 2.1
飼料効率	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.03
組織重量 (g/100 g体重)				
肝臓	4.36 ± 0.40 ^a	4.88 ± 0.41 ^b	4.40 ± 0.26 ^a	5.15 ± 0.28 ^b
腎臓	0.75 ± 0.04	0.76 ± 0.04	0.78 ± 0.03	0.77 ± 0.03
心臓	0.39 ± 0.04	0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.04	0.36 ± 0.04
肺	0.42 ± 0.05	0.39 ± 0.03	0.40 ± 0.05	0.39 ± 0.04
脾臓	0.22 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.04
脳	0.40 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.38 ± 0.03	0.39 ± 0.04

8匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

は認められなかった。したがって、飼料効率も4群間で同じであり、CLAの飼料効率改善効果は明確でなかった。秤量したいくつかの組織のうち、セサミン添加食の摂取によって肝臓重量はリノール酸およびCLAの両群でともに有意に増加したが、これは一過性の肥大であることはすでに観察されている¹⁴⁾。肝臓重量の増加は、リノール酸群とCLA群とで同程度であった。

脂肪組織については図4に示すように、腎臓周辺脂肪組織の重量はリノール酸摂取に比べ、CLA摂取により有意に減少し、セサミンの同時摂取によって、さらに有意に減少した。リノール酸群でも、セサミンとの組み合わせにより重量は有意ではないがかなりの減少傾向を示した。副睾丸周辺脂肪組織では、リノール酸と比べ、CLA摂取による重量減少効果は認められなかったが、セサミンの摂取によって有意ではないが両脂肪酸群とも減少する傾向が認められた。一方、褐色脂肪組織重量はCLAの摂取によりリノール酸の摂取に比べ、有意に増加したが、セサミンには付加的な効果は認められなかった。ただ、リノール酸群ではセサミン摂取により軽度な増加があった。

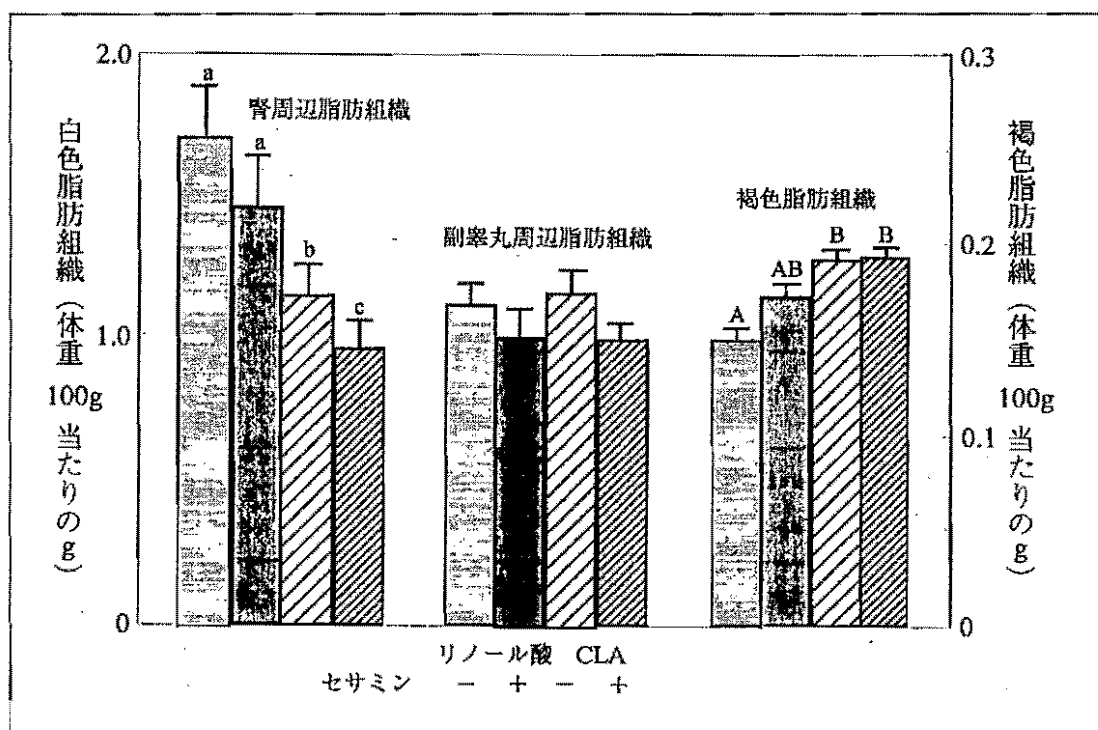


図4. ラットの脂肪組織重量に及ぼすCLAとセサミンの同時摂取効果
8匹の平均値±SE. 異なった文字間で有意差あり (p<0.05)。

(2) 血清脂質濃度

表8に血清脂質濃度の測定結果を示す。血清総コレステロール濃度はCLAを摂取してもリノール酸摂取の場合と同等であったが、両脂肪酸群ともセサミンの摂取で有意に低下した。この低下と平行して、血清リン脂質濃度も類似の変化を示した。トリグリセリド濃度もセサミン摂取により低下傾向を示したが、有意差は認められなかった。

表8. CLAとセサミンの同時摂取がラットの血清脂質濃度に及ぼす影響

血清脂質	食餌群			
	リノール酸	リノール酸 +セサミン	CLA	CLA +セサミン
	mg/dL			
総コレステロール	99.5 ± 24.1 ^a	72.0 ± 14.1 ^{bc}	85.4 ± 8.0 ^{ab}	63.1 ± 14.6 ^c
リン脂質	183 ± 31 ^a	142 ± 28 ^{bc}	168 ± 17 ^{ab}	135 ± 30 ^c
トリグリセリド	124 ± 43	60.6 ± 33.2	119 ± 34	96.4 ± 46.6

8匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

(4) 褐色脂肪組織のcarnitine palmitoyl acyltransferase活性

この酵素の活性はリノール酸摂取に比較し、CLAの摂取で有意に上昇したが、セサミンの同時摂取の効果は認められなかった（表9）。

表9. CLAとセサミンの同時摂取がラット褐色脂肪組織のcarnitine palmitoyl acyltransferase活性に及ぼす影響

酵素	食餌群			
	リノール酸	リノール酸 +セサミン	CLA	CLA +セサミン
	mmol/min/total tissue			
酵素活性	193 ± 44 ^a	199 ± 26 ^{ab}	239 ± 48 ^b	235 ± 45 ^{ab}

8匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

(5) 脂肪組織の脂肪酸組成

表10および11にそれぞれ腎周辺および副睾丸周辺脂肪組織総脂質の脂肪酸組成を示した。各群の応答は両組織ではほぼ同じであった。両脂肪酸群ともセサミンの摂取でリノール酸の割合が低下傾向を示したが、差は有意ではなかった。CLAの割合に対して、セサミン摂取の影響は認められなかった。ただ、CLA値は副睾丸周辺組織で高いようであった。n-3系およびn-6系多価不飽和脂肪酸の割合にも両脂肪組織間で差はなかった。

表10. CLAとセサミンの同時摂取がラット腎周辺脂肪組織の脂肪酸組成に及ぼす影響

脂肪酸	食餌群			
	リノール酸	リノール酸 +セサミン	CLA	CLA +セサミン
	Weight %			
14:0	1.9 ± 0.2	1.7 ± 1.0	2.1 ± 0.4	2.4 ± 0.2
16:0	26.8 ± 0.3 ^{ab}	29.7 ± 4.0 ^a	25.3 ± 2.0 ^b	27.8 ± 1.3 ^{ab}
16:1	6.1 ± 1.5 ^a	6.6 ± 0.4 ^a	3.3 ± 1.0 ^b	4.3 ± 0.8 ^b
18:0	3.0 ± 0.5	3.6 ± 0.9	3.1 ± 0.6	3.9 ± 1.1
18:1	20.0 ± 1.0 ^a	22.9 ± 2.1 ^b	20.0 ± 2.4 ^a	18.8 ± 0.8 ^a
CLA	0.1 ± 0.3 ^a	0.3 ± 0.4 ^a	5.9 ± 0.8 ^b	5.0 ± 0.7 ^b
18:2n-6	31.7 ± 3.2 ^{ab}	28.4 ± 5.5 ^a	33.8 ± 1.0 ^b	30.3 ± 1.0 ^{ab}
18:3n-3	4.2 ± 0.5 ^{ab}	3.7 ± 0.8 ^a	4.9 ± 0.8 ^b	4.6 ± 0.7 ^b

5匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

表11. CLAとセサミンの同時摂取がラット副睾丸周辺脂肪組織の脂肪酸組成に及ぼす影響

脂肪酸	食餌群			
	リノール酸	リノール酸 +セサミン	CLA	CLA +セサミン
	Weight %			
14:0	1.4 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.9 ± 0.4
16:0	20.4 ± 4.1	20.6 ± 1.9	20.0 ± 2.2	22.2 ± 3.9
16:1	5.9 ± 2.3 ^a	6.8 ± 1.0 ^a	3.8 ± 1.0 ^b	4.1 ± 0.8 ^b
18:0	3.4 ± 1.3	4.2 ± 1.8	5.2 ± 2.3	3.2 ± 0.6
18:1	23.2 ± 2.2 ^a	24.6 ± 3.2 ^a	21.7 ± 1.6 ^{ab}	18.5 ± 2.8 ^b
CLA	1.7 ± 1.5 ^a	2.1 ± 2.0 ^a	7.3 ± 1.8 ^b	8.4 ± 1.6 ^b
18:2n-6	34.3 ± 3.3	30.7 ± 4.1	31.0 ± 3.5	28.8 ± 5.2
18:3n-3	4.8 ± 0.8	5.2 ± 1.2	5.4 ± 0.7	4.8 ± 1.4

5匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

3-4 タンパク質実験

(1) 動物の成長と脂肪組織重量

食餌成分によるCLAの効果増強に関する実験の一端として、食餌タンパク質の種類の影響について検討した。

表12に示すように、ラットの摂食量はカゼイン-リノール酸の組み合わせで有意に高値を示したが、他3群間では変化はなかった。成長は大豆タンパク質の摂取により有意に低下した。このため、飼料効率はカゼイン群で有意に高くなったが、リノール酸とCLAとの間では差は認められなかった。

表12. CLAと食餌タンパク質がラットの成長および組織重量に及ぼすの影響

成長パラメーター および組織重量	食餌群			
	カゼイン		大豆タンパク質	
	リノール酸	CLA	リノール酸	CLA
初体重 (g)	128 ± 2	126 ± 2	126 ± 2	125 ± 2
体重増加量 (g)	149 ± 5 ^a	143 ± 5 ^a	122 ± 4 ^b	122 ± 5 ^b
飼料摂取量 (g/日)	19.0 ± 0.4 ^b	17.0 ± 0.4 ^a	17.5 ± 0.4 ^a	16.7 ± 0.3 ^a
飼料効率	0.38 ± 0.01 ^a	0.40 ± 0.01 ^a	0.33 ± 0.00 ^b	0.35 ± 0.01 ^b
組織重量 (g/100 g体重)				
肝臓	3.26 ± 0.13	2.98 ± 0.16	3.24 ± 0.24	2.85 ± 0.09
腎臓	0.74 ± 0.01	0.74 ± 0.03	0.78 ± 0.02	0.78 ± 0.02
心臓	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.01
肺	0.47 ± 0.04	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.44 ± 0.01
脾臓	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.03
脳	0.59 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.02 ^{ab}	0.65 ± 0.02 ^b	0.69 ± 0.01 ^b
睪丸	0.99 ± 0.02 ^{ab}	0.92 ± 0.04 ^a	1.07 ± 0.02 ^b	1.08 ± 0.03 ^b
腎周辺脂肪組織	3.26 ± 0.13 ^a	2.98 ± 0.16 ^b	3.24 ± 0.24 ^a	2.85 ± 0.09 ^b
副睪丸周辺脂肪組織	1.20 ± 0.05 ^a	1.05 ± 0.04 ^b	1.19 ± 0.04 ^a	1.01 ± 0.03 ^b

8匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

臓器重量については、食餌タンパク質の種類に関係なく、腎周辺および副睪丸周辺脂肪組織とも、CLA摂取により重量は有意に低下した。なお、肝臓重量は両タンパク質群ともCLAの摂取で有意ではないが減少する傾向を示した。

種々の組織へのCLAの取り込みを分析した結果を図5に示す（この図は前年度の報告書に予備的に付記したものに追補したものである）。CLAの取り込みは組織によってかなり異なることが明らかである。そして、軽度ではあるが、組織によっては両タンパク質間でCLAの取り込み割合にいくらかの違いが認められた。

(2) 肝臓脂質濃度

肝臓脂質濃度に及ぼす食餌タンパク質とCLAの相互作用の結果を表13に示す。コレステロール濃度は、CLA摂取の有無に関わらず、大豆タンパク質食の2群でカゼイン群に比べ有意に低かつ

た。トリグリセリドも同様な応答を示したが、カゼイン群でもCLAの摂取で有意に低下した。リン脂質濃度には食餌の影響は認められなかった。

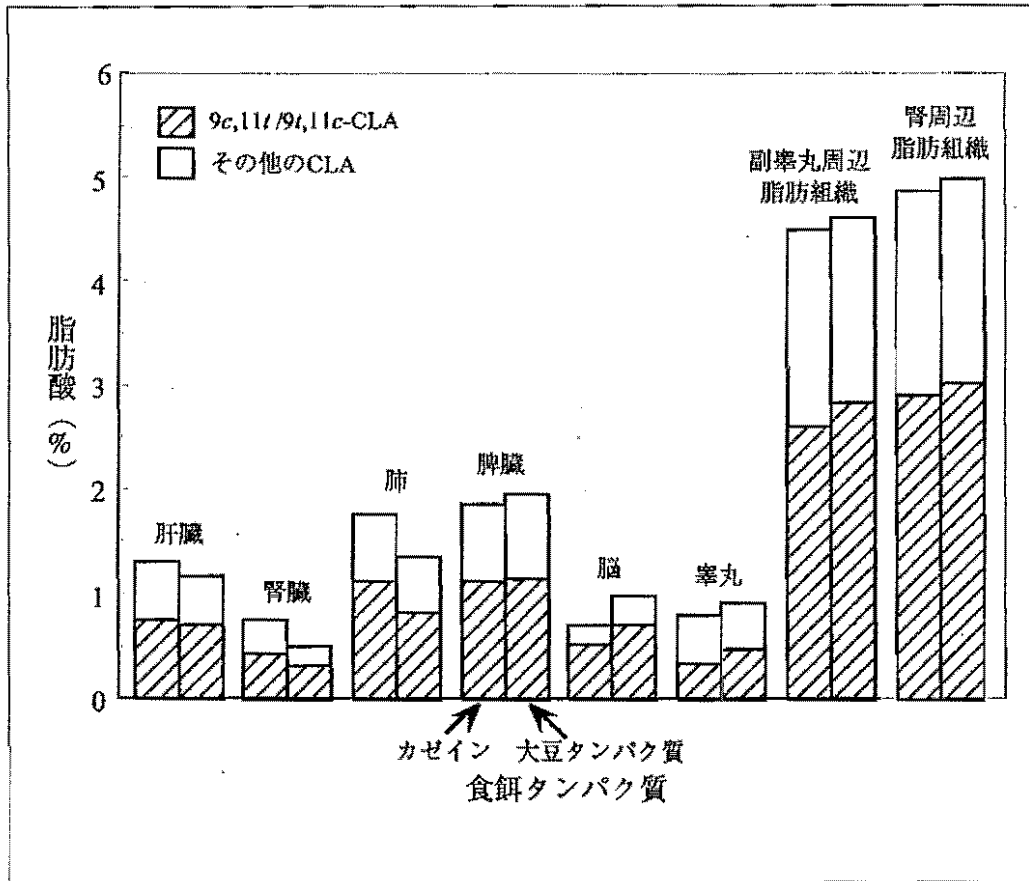


図5. 共役リノール酸の組織への取り込みに及ぼす食餌タンパク質の影響
各群6匹の平均値.

表13. CLAと食餌タンパク質がラットの肝臓脂質濃度に及ぼす影響

肝臓脂質	食餌群			
	カゼイン		大豆タンパク質	
	リノール酸	CLA	リノール酸	CLA
	mg/g			
コレステロール	4.71 ± 0.40 ^{bc}	5.04 ± 0.37 ^a	3.49 ± 0.27 ^b	3.91 ± 0.24 ^{bc}
トリグリセリド	21.9 ± 1.8 ^a	17.1 ± 1.4 ^b	9.40 ± 1.17 ^c	9.64 ± 1.40 ^e
リン脂質	27.8 ± 1.4	36.1 ± 6.5	30.8 ± 3.2	34.2 ± 3.2

8匹の平均値 ± SE. 異なった文字間で有意差あり、 $p < 0.05$.

4. 考 察

予備実験において、まず、CLAが肝臓での脂肪酸の β -酸化を亢進するが、その程度は顕著ではないことを、肝臓環流実験で観察した。一方、セサミンの脂肪酸酸化促進効果については、同様な肝臓環流実験で確認しているので¹⁵⁾、酵素レベルでの応答について検討した。その結果、セサミンがラット肝臓における脂肪酸の β -酸化を促進し、とくにミトコンドリアにおけるよりペルオキシゾームで数倍顕著であることを確認した。この活性上昇は脂肪酸酸化の鍵酵素のレベルでも観察された⁵⁾。CLA自身もペルオキシゾームの活性を上げる可能性が観察されているが¹⁶⁾、その程度はセサミンと比べればかなり低いようである。したがって、CLAとセサミンとの組み合わせは体内における脂肪酸酸化を亢進して、体脂肪の減少を積極的に促す可能性がある。

本研究では、セサミンの同時投与により比較的短期間にCLAの体脂肪減少効果が促進されることが観察された。すなわち、腎周辺脂肪組織では、CLA自身による組織重量減少に加え、セサミンとの共同作用によってさらに減少の程度が高められた。副睾丸周辺脂肪組織では有意な減少は認められなかったが、リノール酸、CLAの両群でセサミン添加によって組織重量は減少傾向を示した。より長期間継続飼育すれば、明確な差が得られるものと思われる。

このように、CLAとセサミンとの協調効果が認められたが、摂食量や成長、したがって飼料効率には何ら影響は観察されなかったため、セサミンが体タンパク含量に影響することはないと判断された。

一方、褐色脂肪組織の重量は、CLAの摂取で増加したが、セサミンを同時に摂取しても付加的な効果は認められなかったことから、CLAとセサミンとは別のメカニズムで脂肪酸代謝に影響しているものとみなされた。なお、リノール酸群では有意ではないがセサミンの摂取により褐色脂肪組織重量も増加傾向にあった。

いずれにしても、脂肪酸代謝に及ぼすセサミンとCLAの作用点は必ずしも同じではないことが指摘され、両者の組み合わせの有用性が示唆された。褐色脂肪組織での脂肪酸酸化の指標としてcarnitine palmitoyl acyltransferase活性を測定したが、この酵素の活性は組織重量の変化とよく一致しており、CLAの摂取で有意な上昇が観察された。ただし、CLAによる活性上昇あるいは重量増加は最大値に達しており、セサミンの付加的効果が見られなかった可能性もあろう。

血清脂質濃度に対しては、CLAの摂取により血清コレステロール濃度の低下傾向が観察されたが、セサミンの添加効果は両脂肪酸群で認められ、これまで知られているセサミンの降コレステロール作用を確認できた¹⁷⁾。この変化に伴って、血清リン脂質およびトリグリセリド濃度も減少したが、とくにトリグリセリドの減少は体脂肪減少との関連で好ましい環境をもたらしていることを示している。

脂肪組織の脂肪酸組成に関し、CLAの取り込みは有意な組織重量の減少が認められなかった副睾丸周辺脂肪組織で、明確な応答を示した腎周辺脂肪組織よりも高かった。このことは、前年度報告した実験でも観察されており、意味のある観察かも知れないが、現時点では説明できない。飼育期間が短いので直接比較はできないが、CLAの腎周辺脂肪組織への取り込み割合は、食餌脂肪をn-3系の α -リ

ノレン酸に富むエゴマ油を用いた場合には、かなり低下していた。このことは、食餌脂肪もまたCLA効果に影響する可能性を示唆している¹⁹⁾。また、CLAは脂肪組織での脂肪酸代謝を特徴的に修飾するようでもある¹⁸⁾。

一方、食餌タンパク質の種類如何に関わらず、CLAの体脂肪減少効果は再現できる可能性があった。CLAの摂取は腎周辺のみならず副睾丸周辺脂肪組織の重量を有意に低下させた。このような応答は、食餌脂肪として α -リノレン酸を多く含むエゴマ油を用いたことが関係しているのかも知れない。したがって、CLAは食餌脂肪とも相互作用を発揮する可能性が考えられる。食餌タンパク質の種類に影響されないことは、CLAの作用が用いた両タンパク質間での脂肪酸代謝への影響の違いを凌駕することを示唆している。しかし、肝臓トリグリセリド濃度は大豆タンパク質群で有意に低かったが、カゼイン群でもCLAの摂取により軽度ながら有意に低下したことから、食餌タンパク質とCLAとの間には何らかの相互作用が働いている可能性がある。

CLAの組織への取り込みに際してみられた差は、CLAがそれぞれの組織における代謝活性に異なった影響を及ぼす可能性を示唆している。したがって、CLAが作用するターゲットのスクリーニング法として、取り込みのデータは有用であるだけでなく、特定の作用を推定するのにも適用できると思われる。

これらの観察から、食餌成分との適当な組み合わせはCLAの生理機能増強策として有用な方策の一つとなるものと判断される。脂肪酸の β 酸化促進因子や脂肪合成抑制因子、さらには脂肪吸収に干渉する因子など、複数の因子を適宜組み合わせれば、より効果的であろう。そのような考えに基づく実験が待たれる。体脂肪減少効果は、CLAについては現在ヒトで実用化されている唯一の例であり、本実験の成果は、求められる作用をより少量のCLAで発現させることについて、有用な指標となるであろう。現在、CLAの効果を高めるために、これまでの情報を頼りに脂肪酸酸化促進効果があるカプサイシン（トウガラシの辛味成分）を添加したパンが試作されているが、辛味の点で問題があり、多機能性のセサミンを利用する方が優れていると考えられる。いずれにしても、CLAと機能性食品成分との適当な組み合わせは、健康効果を強める可能性が示されたことは、ヒトへの適用の面で有意義な知見であると考えられる。

いずれにしても、CLAは肥満防止効果に加え、アレルギー反応軽減作用など、脂肪酸代謝関連の機能があり^{19, 20)}、これらを総括して理解することが望ましく、より系統的な研究が必要であろう。

5. 要 約

予め単離肝臓環流実験において、CLAが肝臓での脂肪酸酸化を促進するが、その程度は顕著なものではないことを観察した。ついで、セサミンが肝臓の脂肪酸 β -酸化系の酵素活性を強く刺激し、その程度はミトコンドリアよりもペルオキシゾームにおいてより顕著であること、逆に脂肪酸合成系に対

しては抑制的に働くことを確認した。これらの観察に基づき、CLAとセサミンの協同効果についてラットを用いた飼育実験を行った。その結果、肝臓における脂肪酸の β 酸化促進作用が顕著なセサミンとの併用によって、ラットの脂肪組織重量に及ぼすCLAの減少効果は短期間で相乗的に強められることが確認された。また、食餌タンパク質もまたCLAの効果に相互作用をすることを支持する成績が得られた。さらに、食餌脂肪の種類も修飾因子である可能性があった。CLAと作用機構が異なる成分との組み合わせ効果が観察されたことは、CLAの応用価値を高めると同時に、さらなる研究の展開に大いに資するものと考えられる。

謝辞：本研究は、牛乳栄養学術助成金の援助によって行われた。ここに深甚の謝意を表する。

6. 引用文献

- 1) Belury, M. S. and Vanden Hauvel, J. P. (1997) Protection against cancer and heart disease by CLA : potential mechanisms of action. *Nutr. Disease Update*, 1, 58-63.
- 2) 池田郁男 (1999) 共役リノール酸の機能と代謝。油化学, 2, 35-43.
- 3) Pariza, M. W. (1999) The biological activities of conjugated linoleic acid. *Adv. Conjugated Linoleic Acid Res.*, Vol. 1, 12-20.
- 4) Sakano, M., Miyanaga, F., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fukuda, N., Watanabe, K., Iwata T. and M. Sugano (1999) Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. *Lipids*, 34, 997-1000.
- 5) Fukuda, N., Miyagi, C., Zhang, L., Jayasooriya, A. P., Sakano, M., Yamamoto, K., Ide, T. and M. Sugano (1998) Reciprocal Effects of Dietary sesamin on ketogenesis and triacylglycerol secretion by the rat liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 44, 715-722.
- 6) Ashakumary, L., Rouyer, I., Takahashi, Y., Fukuda, N., Aoyama, T., Hashimoto, T., Mizugaki M., and Sugano, M. (1999) Sesamin, a sesame lignan, is a potent inducer of hepatic fatty acid oxidation in the rat. *Metabolism*, 48, 1303-1313.
- 7) Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K. and Ikeda, H. (1996) Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wister fatty rats. *J. Nutr.*, 126, 380-388.
- 8) Osmundsen, H., Braud, H., Beauseigneur, F., Gresti, J., Tsoko, M., and Cluet, P. (1998) Effects of dietary treatment of rats with eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid on hepatic lipid metabolism. *Biochem. J.*, 331, 153-160.
- 9) 菅野道廣、奥村朋香、鎌田千束、飯尾雅嘉 (1999) 必須アミノ酸研究、No. 154, 60-64.
- 10) Ip, C., Chin, A. F., Scimeca, J. A. and Pariza, M. W. (1991) Mammary cancer prevention by conjugated

dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.*, 69, 6118 - 6124.

- 11) Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, G. C. (1993) AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents : Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.*, 123, 1939-1951.
- 12) Yamazaki, M., Kishihara, K., Ikeda, I, Sugano, M. Yamada, K. (1999) A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 933-938.
- 13) Bieber, L. L., Abraham, T. and Helmrath, T. (1972) A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal. Biochem.*, 50, 509-518.
- 14) Hirose, N., Doi, F., Ueki, T., Akazawa, K., Chijiwa, K., Sugano, M., Akimoto, K., Shimizu, S. and H. Yamada. (1992) Suppressive effect of sesamin against 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene induced rat mammary carcinogenesis. *Anticancer Res.*, 12, 1259-1265.
- 15) Fukuda, N., Zhang, L., Kodama, M., Sakano, M., Ide, T., Yamamoto, K. and Sugano, M. (1999) Effect of dietary sesamin on metabolic fate of an exogenous linoleic acid in perfused rat liver. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 45 : 437-448.
- 16) de Deckere, E. A. M., van Amelsvoort, M. M., McNeill, G. P. and Jones, P. (1999) Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br. J. Nutr.*, 82, 309-317.
- 17) Nakabayashi, A., Kitagawa, Y., Suwa, Y., Akimoto, K., Asami, S., Shimizu, S., Hirose, N., Sugano, M., and Yamada, H. (1995) α -Tocopherol enhances the hypocholesterolemic action of sesamin in rats. *Int. J. Vitamin Nutr. Res.*, 65, 162-168.
- 18) M. Yamasaki, K. Mansho, H. Mishima, M. Kasai, M. Sugano, H. Tachibana and K. Yamada (1999) Dietary effect of conjugated linoleic acid on lipid levels in white adipose tissue of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63 : 1104-1106.
- 19) M. Sugano, A. Tsujita, M. Yamasaki, K. Yamada, I. Ikeda and D. Krichevsky (1997) Lymphatic recovery, tissue distribution, and metabolic effects of conjugated linoleic acid in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 8 : 38-43.
- 20) M. Sugano, M. Yamasaki, K. Yamada and Y.-S. Huang (1999) Adv. Conjugated Linoleic Acid Res., 1 : 327-339.