

# カゼイン摂取によるラットのアルコール性肝障害抑制作用に関する研究

東北大学大学院農学研究科栄養学分野：駒井 三千夫

共同研究者：白川 仁、Puspo Edi Giriwono

橋本 拓也、後藤 知子

## 要 約

近年、我が国におけるアルコール飲料の総消費量は増加の傾向にあり、それを反映してアルコール摂取に起因する健康障害が深刻な社会問題の一つとなってきた。このような疾患の予防・治療のために様々な食品成分が評価されてきているが、牛乳の有効性を示すデータは出ていなかった。今回このため、牛乳中の主要タンパク質であるカゼインのアルコール性肝障害改善効果について検討した。我々は、LieberとDeCarliのエタノール含有液体飼料の脂質含量などに変更を加えることによって、より短期間でアルコール性肝障害を引き起こすことのできる動物実験モデルを確立したので、この系を用いて検討を行った。

これまで、カゼインの微生物酵素分解物（種々の機能性ペプチド）にも同様な効果があると言われてきて、これらカゼイン分解物は牛乳の加工物で既に商品化されているものもある。しかし、その場合は加工食品であり、主として微生物発酵させて生ずる機能性ペプチドの研究と開発商品が多い。こうした加工食品の有用性はすでに良く知られていて、健康の維持に有効に使われつつある。しかし、今回我々はカゼインそのものを摂取するだけでもアルコール性肝障害抑制に有効であるというデータを得た。このことは、日常生活において牛乳そのものを飲む機会を増やすことが健康の維持に重要であることを示唆している。

**キーワード：**カゼイン（牛乳タンパク質）、アルコール性肝障害、抗炎症作用、ラット

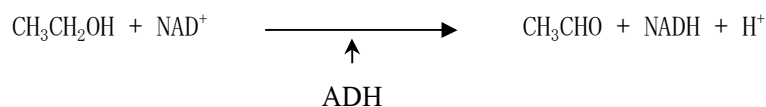
## 緒 論

近年、わが国におけるアルコール飲料の消費量は顕著に増加しており、これに伴った健康障害が深刻な社会問題になってきた。アルコールの摂取は、ストレスの解消、疲労回復、気分転換などに有効であり、現代人にとって生活習慣の潤滑油となりうる嗜好飲料中の成分である。近年ではよく企画されたコホート研究により、ワイン摂取の多い地方では動脈硬化の患者が際立って少なくなる“フレンチ・パラドックス”や、『適量の飲酒は全死亡率を低下させ、アルコールをまったく摂取しないよりも健康にプラスであるが、過度の飲酒は死亡率を大幅に上昇させる』という“J-curve”現象が報告されてきた。これらの報告を基に、健康増進を期してアルコールを摂取するケースも増加してきた。

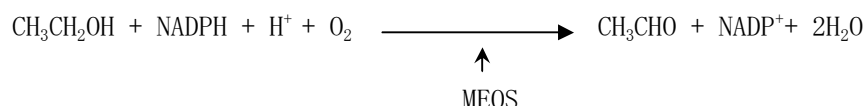
しかし、これらの利点の反面、アルコールはその摂取方法によっては健康状態を脅かす存在になるという事実はもはや疑う余地がない。アルコール性疾患には急性障害と慢性障害とがあるが、中でも慢性的症状は、一般に脂肪肝、アルコール性肝炎、アルコール性肝繊維症、肝硬変に分類され、標的器官はその代謝のほとんどを司る肝臓を始めとし、二次的に肺繊維化や腎機能障害も助長されることが報告されてきている。

アルコール摂取後の代謝経路には以下のようなものが存在している<sup>(7)</sup>。

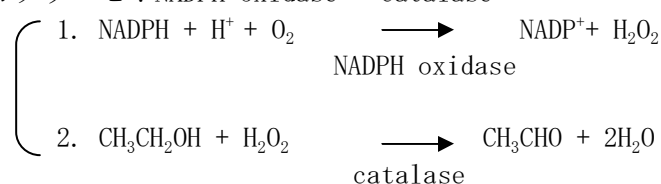
1) アルコール脱水素酵素： alcohol dehydrogenase (ADH)



2) ミクロソーム・エタノール酸化系：Microsomal ethanol oxidizing system (MEOS)



3) カタラーゼ：NADPH oxidase + catalase



肝細胞におけるエタノール代謝には細胞質に存在するアルコール脱水素酵素 (ADH) が最も大きな役割を占めている。しかし、急性的な摂取がなされた際や、アルコール摂取が慢性的となり、ADHのみでは代謝が行き届かない際にはミクロソーム・エタノール酸化系 (MEOS) によっても代謝がなされる。MEOSは、1968年にLieberらによって発見・命名されたが、現在ではCYP2E1依存性のエタノール代謝経路として広く認められている。なお、MEOSによってエタノールが代謝された際には、スーパーオキシドアニオン ( $\text{O}_2^-$ ) や、ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) が産生されると考えられている (Haber-Weiss reaction)。また、CYP2E1の発現は肝臓中心静脈近傍で高いことが知られており、アルコール性肝障害が組織学的に中心静脈近辺に強く認められることの一因であると考えられている。そのほかに、カタラーゼを介したアルコール代謝経路の存在が確認されているが、その寄与は前述の二つの経路と比較して非常に少ないと考えられている。

これらアルコール代謝経路が動くことによって、代謝補因子となるNAD(P)の状態は還元型が優勢となる (redox shift)。すなわち、肝臓中のNAD(P)が還元型にシフトされるため、脂肪酸代謝が滞りやすくなり、肝臓の脂肪化が誘発されるに至る。また、アルコールは腸間膜のバリアー層を破壊することにより、血中へのエンドトキシン (LPS: lipopolysaccharide) 流出量を増加させ、重度の症状においては敗血症を引き起こしてしまうほか、前述のように産生されたROSによって脂質過酸化や細胞毒性が認められ、様々な症状を引き起こしてしまう。近年では、代謝途中経路のアセトアルデヒド ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) が核内受容体のDNA結合活性を損傷するといった分子生物学的な報告もなされており、これらの成因に関しては今なお、議論の余地を残している。

アルコール性肝障害に限らず、多くの疾病の成因を評価する際、実験動物を用いた手法は必須不可欠であるが、アルコールを強く忌避するという動物の嗜好はこの症例の評価を困難としてきた。また、アルコールが元来液体であるという物性も難点の一つであった。そのような背景の下、アルコール摂取による健康障害を評価しようとLieberらはアルコール含有の液体飼料を作出し、対照群にはアルコールの代わりに等カロリーの炭水化物で置き換える方法を考案した液体飼料法

として、現在最もスタンダードな方法として用いられるようになった。

現在、アルコール性肝障害を評価する手法には、上記のような液体飼料を用いた方法と胃ゾンデを用いて経口的にアルコールを投与するTsukamoto-Frenchモデルがほとんどであるが、どちらの飼育系も、いまだに多くの研究者によって改善が望まれている。Tsukamoto-Frenchモデルにおいては毎回エタノールを強制的に投与するため、“急性的な摂取の連続による慢性化”を引き起こし、ヒトで見られるような症例とは大きく異なる可能性が高い。また、多くの個体を一度に評価する際、毎日の経口投与の手間も軽視することはできない。一方、Lieberらの液体飼料では、4週間ほどの飼育で十分に肝臓の脂肪化を評価し得ると報告されているが、その失敗例も少なくはない。当研究室では以前、Lieberらの飼料組成に準じた試験系を組み、9週間の実験飼育を行ったが、肝臓の脂肪化の度合いには個体差が大きく、肝炎を評価する際の指標である血漿トランスアミナーゼ活性であるGPT (= ALT) およびGOT (= AST) 活性の上昇も緩やかであった。

また、近年、肝機能改善に効果があるとされる有効成分や食品が市場に多く出されている。その中には、アラニン、グルタミンなどのアミノ酸や、ウコンのクルクミン、ゴマ（胡麻）のセサミンなどのほか、豚肉ペプチドや牛肉ペプチドなど食品タンパク質分解物もある。これらの作用の多くは抗酸化による効果であるとされており、ヒトで科学的に肝機能改善への確かな有効性が報告されているものは少ない。

牛乳に関連しては、カゼインに由来するペプチドには血圧降下作用を有するラクトリペプチドやカルシウムの吸収促進作用を有するホスホペプチド、抗炎症や免疫抑制に働くグリコマクロペプチドなど様々な生体調節機能を示すペプチドがある。そのほか、ペプチドには利尿、腎保護、血糖抑制、細胞増殖などの生理機能があると考えられている。カルピス食品工業㈱の江尻らは、その中の細胞増殖機能に注目し、培養細胞系を用いたスクリーニングによってカゼインのプロテアーゼ分解物が高い細胞増殖活性を有することを確認した。さらに四塩化炭素やガラクトサミンによる急性肝炎モデル動物を用いた実験により、カゼインペプチドが肝障害マーカーである血漿GPT活性を低下させることを確認した。

これらカゼイン分解物は牛乳の加工物で既に商品化されているものもある。しかし、その場合は加工食品であり、主として微生物発酵させて生ずる機能性ペプチドの研究と開発商品が多い。こうした加工食品の有用性はすでに良く知られていて、健康の維持に有効に使われている例もある。しかし、今回我々はカゼインそのものを摂取するだけでアルコール性肝障害抑制に有効であるというデータを得たので、報告する。

## 実験方法

### 1) 使用動物

7週齢のWistar/Std系の雌ラット24匹を用いた（日本エス・エル・シー㈱）。昼夜12時間ずつの明暗サイクル（明期：08:00-20:00）の動物室（温度 $23 \pm 2^{\circ} \text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10 \% \text{RH}$ ）で個別飼育した。実験開始前に固型飼料で3日間馴化飼育し（船橋農場F-2）、その後二つの実験群に分けた。すなわち、対照として分離大豆タンパク質（Soy protein isolate = SPI）を含有したものと、牛乳タンパク質としてカゼインを含有したものを調製し、アルコール流動食に入れて16日間与えた。

屠殺の14時間前にアルコール流動食を取り除いて絶食させ、代わりに脱イオン水を与えた。EDTA-2Na処理した採血管に採血し、遠心分離して血漿を取り、種々の分析用の組織サンプルを $-25^{\circ}\text{C}$ に保存した。肝臓は、一部を摘出後に急速に液体窒素で凍らせ、 $-70^{\circ}\text{C}$ に保存しその後の分析用試料とした。別な一部を、RNA抽出用としてRNA later (Ambion, Japan) 中に入れて $-30^{\circ}\text{C}$ に保存した。

なお、この研究に関する動物実験は、東北大学大学院農学研究科の動物実験委員会の動物実験指針に則り、許可されてから行われた。

## 2) アルコール入り流動食による実験食の組成

液体飼料の作成は1989年に改善されたLieber-DeCarli formulaを基本として作成した (表1)。脂質含量を可能な限り高めるため、1150 ~1500 kcal/ Lの飼料を調製し、その後室温で放置して飼料の安定性を評価した。飼料中脂質成分はコーン油 (味の素社製) を主とし、飽和脂肪酸含量が高く、肝臓脂肪化を高度に誘発することが知られているラード油 (Sigma社製) の添加を試みた。飼料を均一に攪拌するための乳化剤としてキサンタンガム (Sigma社製) を用い、その濃度検討を行った。脂質とアルコール以外の成分は粉末混合 (Pre-Mix) として事前に乳鉢を用いて調製し、攪拌の際に脂質及びアルコールの添加を行った。攪拌にはBraun社製のブレンダーを用いた。なお、添加によってアルコール性肝障害を助長することが報告されているビタミンAに関しては、通常のビタミン混合よりも5倍量含んだものを調製し飼料に供した。

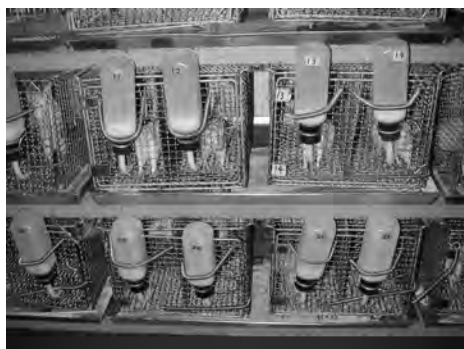


写真1 高脂肪エタノール含有液体飼料を用いた実験飼育

### Alcohol 飼料

- ① 脂質成分・水分を除いた乾燥成分である粉末混合 (Pre-Mix) を作成した
- ② メスシリンダーで約 $40^{\circ}\text{C}$ に加温された蒸留水を760mL測り取った
- ③ ミキサー内に約 $40^{\circ}\text{C}$ に温めた蒸留水を200 mL入れた
- ④ Pre-Mix 94.1gを入れた。

表1 改良型アルコール負荷飼料の組成 エタノール含有液体飼料の作成例 (写真2)

Ingredient	Diets	
	Control	Alcohol
Sodium Saccharin	0.287	0.287
DL-methionine	0.3	0.3
Cellulose	1.1	1.1
Vitamin mix	2.4	2.4
Xanthan Gam	2.5	2.5
Mineral mix	8.3	8.3
Soy protein Isolate	46.5	46.5
Corn oil	53	53
sucrose	124.4	32.7
Ethanol	0	50
Water	1000	860
Total(g)	1000	910
g/ml	1	0.91
Total volume (mL)	1000	1000



- ⑤ コーン油（味の素社製）を53.0g入れた
- ⑥ ミキサー内に残りの蒸留水を全て加えた
- ⑦ 一分間ミキサーで攪拌した
- ⑧ 50 gのエタノールをミキサー内に加えた
- ⑨ 15秒間ミキサーで攪拌した
- ⑩ 3L容のプラスチック製ボトルに入れて、4℃にて保存した

- ・液体飼料は腐敗が早いため、調製から三日以内のもののみを飼料として供した。
- ・使用する前にプラスチック製ボトル内で攪拌してから飼料として供した。
- ・Alcohol飼料の比重は0.91 g/ mLである。

### 3) 実験群

基本タンパク質 (Control) は分離大豆タンパク質のSPI (soy protein isolate) であるが、これを牛乳タンパク質であるカゼインに置き換えて実験を行った。すなわち実験群は以下の通り (表2)。

- ・大豆タンパク質食 (SPI)
- ・大豆タンパク質+アルコール食 (SPI + Alcohol)
- ・カゼイン (Casein)
- ・カゼイン+アルコール食 (Casein + Alcohol)

表2 実験に用いたアルコール流動食

Constituent	Treatment group			
	SPI.Con	Cas.Con	SPI.Alc	Cas.Alc
Na saccharin	0.29	0.29	0.29	0.29
L-methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
Cellulose	1.10	1.10	1.10	1.10
Vitamin mixture**	2.4	2.4	2.4	2.4
Xanthan gum	2.5	2.5	2.5	2.5
Mineral mixture*	8.3	8.3	8.3	8.3
Sucrose	124.4	124.4	32.7	32.7
Protein				
SPI	46.5		46.5	
Casein		47.3		47.3
Corn oil	53	53	53	53
Ethanol			50	50
Dist. water	759.7	741.6	759.7	741.6
Total calories (Kcal)	1150	1150	1150	1150

All values are gram/L. \* Oriental composition. \*\* modified vitamin mix (see appendix 1. for details).

Legend: SPI.Con. – No alcohol + SPI; Cas.Con – No alcohol + casein; SPI.Alc. Alcohol + SPI; Cas.Alc. – Alcohol + casein.

#### 4) 飼育条件と組織サンプリングおよび遺伝子発現の測定方法

前述のように、Wistar系ラット (Wistar/Std)、7週齢のメスを用い、以下の条件で25日間の実験飼育を行った。実験群はアルコール群およびコントロール群の2群を設けペアフィーディングを行った。飼育期間中は5日ごとに尾静脈から血漿を採取し、肝障害マーカーである血漿GPT (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ [=ALT「アラニントランスアミナーゼ」]) 活性、およびGOT (グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ [=AST「アスパラギン酸トランスアミナーゼ」]) 活性を測定した。以降この報告では科学的な正式名称であるALT, ASTのほうを用いることとする。また、解剖後、各種脂質代謝マーカーの測定および定量RT-PCR法によって、肝臓における脂質代謝関連の遺伝子発現量を測定した。エタノール投与条件はアルコールへの馴化を行う必要性から、3%濃度飼料から始め、4日目以降、5%含有食と上げていった (ラットがアルコールに対応できなくなって、負担になるため)。測定項目を以下にまとめた。

##### ・摂食量と体重変化 :

##### ・肝臓の代謝マーカーの測定 (粗脂質、中性脂肪 (トリグリセリド)、総コレステロール、HDL-コレステロール、血糖値、等) :

屠殺時に麻酔下に腹大動脈から全血を採決し、4℃下1,875 x g で、15分間遠心して血漿を分離して種々のマーカーを測定した。血漿トリグリセリド、コレステロール、HDL-コレステロール等の脂質濃度は、和光純薬工業(株)製キット (大阪) で測定した。なお、LDL-コレステロール濃度は、Friedewaldの公式によって計算して求めた。血糖値は、Glucose C2キット (和光純薬工業(株)) で測定した。

・ 血漿中肝障害マーカーの測定 (GOT, GPT) :

和光純薬工業(株)のTransaminase CII キットを用いて測定した。

・ 肝臓の組織観察 (脂肪化や繊維化などの光学顕微鏡レベルでの解析) :

肝臓を摘出し、Folch法によって脂質を抽出し、トリグリセリド濃度、総コレステロールを前述の和光純薬工業(株)のキットで測定した。

・ 肝臓グリコーゲン濃度の測定 :

Loらの方法によって定量した。スクリュウキャップ付きの試験官に一定量の肝臓を入れ、硫酸ナトリウム飽和の30%KOH溶液を組織の10倍量加え、ヒートブロックに入れて20-30分間煮沸した。氷冷してから1.1-1.2倍量の95%エタノールを加えてグリコーゲンを沈殿させた。この沈殿を蒸留水に溶解させ、等量の5%フェノールを加えた。98%硫酸5 mlを素早く加え、十分に攪拌し、10分間放置した。次に、大きくかき混ぜ、30℃の恒温槽に入れて20分間温めた。これを490 nmで比色定量した。

・ 定量RT-PCR法を用いた肝臓中脂質代謝関連マーカーの遺伝子発現変化 :

肝臓からのTotal RNAの抽出

- ① RNAレーター中・-20℃で保存してあったサンプル約100 mgを、キムワイプでRNAレーターを除去した後、Isogen (Nippon Gene) 1 mLに入れた。
- ② ホモジナイザー (Polytron) を用いて十分に組織を粉砕した。
- ③ 3分間常温放置した後、氷上にて保存した。
- ④ 1.5mL容エッペンドルフチューブに残渣ごと移し、クロロホルム200  $\mu$  Lを加えた
- ⑤ Vortexで15秒間、十分に攪拌した
- ⑥ 10分間室温で放置した
- ⑦ 13.000rpm・4℃・15minの条件で遠心分離をかけた (⇒RNA層、タンパク層、DNA層の三層に分離する)
- ⑧ 上層のRNA層を中間層を取らないように注意しながら他の1.5mL容チューブに移した
- ⑨ ⑧にIsopropanol 500  $\mu$  L (等量) を加え、よく混ぜた
- ⑩ 10分間室温で放置した
- ⑪ 13.000rpm・4℃・15minの条件で遠心分離をかけた (⇒RNAペレットの沈殿)
- ⑫ RNAペレットを流さないように上清を捨て、500  $\mu$  Lの70 %エタノールを注いだ
- ⑬ 13.000rpm・4℃・10minの条件で遠心分離した
- ⑭ ⑫~⑬ (エタノールリンス) を再び繰り返した
- ⑮ 上清を捨て、エタノールを出来る限り素早く乾かした
- ⑯ 400  $\mu$  LのDepc. d H<sub>2</sub>OでRNAペレットを溶解した
- ⑰ 濃度・コンディションチェックのために20  $\mu$  Lを別のチューブに移し、100 %エタノール760  $\mu$  L (2倍量) およびPEB-III38  $\mu$  L (1/10量) を加え、よく攪拌して-20℃で保存した

### RNAの濃度検討

前項で抽出したTotal RNA溶液10  $\mu$  Lを60倍に希釈し、分光光度計を用いて濃度検討を行った。

核酸は260 nm付近の紫外線を吸収するため、分光光度計を用いてRNA濃度を測定することができる。光路長が10 mm (10 mmキュベット) の場合、260 nmでの吸収度が1.0のとき、RNAの濃度は約40  $\mu$ g/mlになる。従って、RNA濃度を求める計算式は以下のようになる。

$$\text{RNA濃度}(\mu\text{g/ml}) = \frac{A_{260} \times 40 \times 10}{\text{光路長}(\text{mm})}$$

また、 $A_{260}/A_{280}$ が1.6~1.8であることを確認した

### 0.7% アガロースゲルの作成

- ① アガロースゲル0.7 gを三角フラスコに取り、TAEバッファー100 mLで溶解した
- ② 電子レンジを用いて5分間加熱した。
- ③ 加熱中に蒸発した水をmilli Qで補い、50  $^{\circ}$ C程度に下がるまで常温で放置した
- ④ ゲル板に流し込み、コームを用いてウェルを作り、約1時間放置した。

### 電気泳動によるRNAの状態確認

- ① 残ったRNA溶液を希釈し、2.5  $\mu$ g相当のRNA溶液 (12  $\mu$  L) に泳動用マーカー (3  $\mu$  L) を加えた
- ② 65 $^{\circ}$ C・5分間の変性をかけた
- ③ 直ちに氷冷 (5分間以上) し、0.7%アガロースゲルにアプライし、TAEバッファー1100mLを用いて150 V・400mA・35分の条件で泳動した
- ④ UVトランスイルミネーターを用いて各サンプルのRNAのコンディションが均一であることを確認した

### Total RNAからのcDNAの合成

- ① 冷凍保存したTotal RNAを二回、500  $\mu$  Lの70 %エタノールでリンスした
- ② Depc. dH<sub>2</sub>Oを用いてRNAペレットを溶解させ、各サンプルを1  $\mu$ g/ $\mu$  Lに希釈した
- ③ あらかじめ7.5  $\mu$  Lのマスター・ミックス(以下MM)1 (参照) を分注したPCRチューブ (200  $\mu$  L容) に4.0  $\mu$  LのTotal RNA溶液を分注した。各サンプルRT+および-用の二本のチューブを用意した。
- ④ 遠心機でスピンドウンした
- ⑤ サーマルサイクラーを用いて65  $^{\circ}$ C、5分間の条件で変性をかけた
- ⑥ 氷上で5分間以上放置した
- ⑦ RT+用のチューブにMM2を、RT-用のチューブにMM3を各10  $\mu$  L分注した
- ⑧ サーマルサイクラーを用いてPCRに供した



## ・Western blottingによる肝臓中タンパクの検出

### ・ Whole cell lysateの調製

肝臓サンプル約0.3 gを5倍容量 (1500  $\mu$ L) のPBS bufferおよび1/100容量 (15  $\mu$ L) の100mM PMSF in Isopropanolでホモジナイズし、20  $\mu$ LをBradford法によるタンパク定量に、100  $\mu$ LをSDS化に供し、残りを1.5mL容チューブごと液体窒素に漬けて-80  $^{\circ}$ Cで保存した

### ・ Bradford法によるタンパク定量

Bradford法は定量性に優れるが、SDS化したサンプルには不適である。泳動用のサンプルとは区別が必要である。(なお、SDS化したサンプルではRolly法が用いられる。)

- ① 分取したWhole cell lysate 20  $\mu$ LをPBS bufferで適宜希釈 (本実験では40倍に希釈) した
- ② 標準曲線作成のためにBSAタンパクを0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/ mLに調製した
- ③ サンプル20  $\mu$ LにProtein assay reagent (5倍希釈) 1 mLを入れて標準曲線を作成しタンパク含量を算出した

なお、真核生物のelongation factor 1 $\alpha$ -1 (EF1 $\alpha$ 1)の発現を1.0にnormalizeして遺伝子発現の変化を表した。

## 結果と考察

### 実験食の摂取量と体重変化

毎日の摂取量を図1Aに、エネルギー摂取量を図1Bに示した。SPI-Control群は、他の3群と比べて摂取量とエネルギー摂取量が多かった。体重変化とその増加量を図2Aと図2Bに示した。飼育6日目頃から差がつき始め、9日目からSPIとカゼインのアルコール群で体重の増加量が有意に低かった。図2の結果から、両タンパク質の対照群であるSPI.Con. 並びに Cas.Con. では、それぞれ2.1 g/dayおよび1.9 g/dayの体重増加率を示したが、それぞれのアルコール群であるSPI.Alc. およびCas.Alc. では、それぞれ1.1 g/dayおよび1.0 g/dayであった。

### 血漿トランスアミナーゼ (ALT and AST) 活性

非絶食時の血漿ALT およびAST 活性の変化は、図3に示した。その結果、ALT活性は、飼育10日目以降でアルコール摂取群で高くなるが、カゼイン群よりもSPI群で有意に高い値となった。ASTでも同様であり、15日目以降にSPI群で有意に高くなった。しかし、カゼイン群では上昇は全く認められなかった。

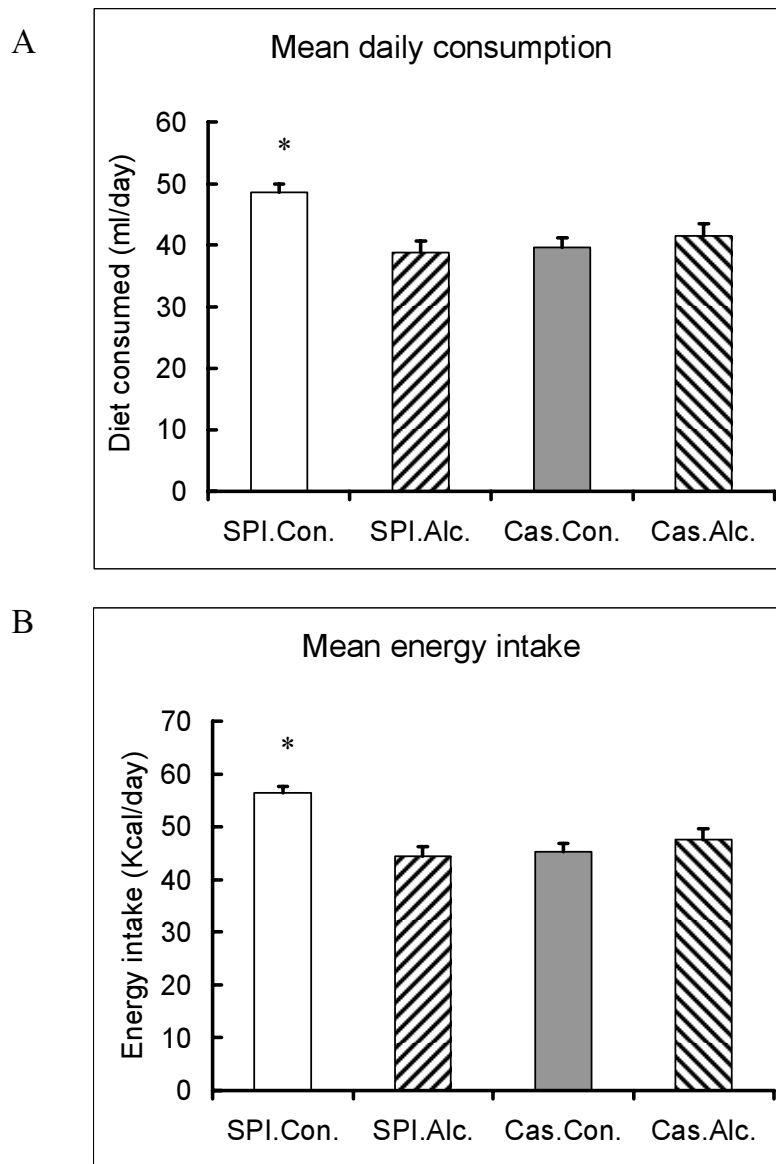


図1. Alcohol affects diet consumption and energy intake. The amount of diet consumed and energy intake was significantly lower in SPI.Alc. group indicating the effect that alcohol cause in daily consumption. All values are mean  $\pm$  SE; n = 6; \*  $p < 0.05$  against all other groups.

また、21日間の飼育終了時に、14時間絶食下に測定した血漿ALT およびAST 活性は、図4に示した。これをみると、カゼイン食よりも大豆タンパク質であるSPI群で大幅に有意に高くなった。牛乳タンパク質のアルコール性肝障害抑制作用が顕著に認められた。一般に、絶食時のアルコール摂取は、NADH、ピルビン酸、リンゴ酸が増え、糖新生が抑制されるために血糖値が下がり気味となる。このために、肝細胞においてもエネルギー供給不足となり、より肝障害が悪化したものと推察される。この現象が、カゼイン食ではあまり影響を受けていなかったのが、大豆タンパク質の場合には大きく影響を受け肝障害が悪化したものと推察される。

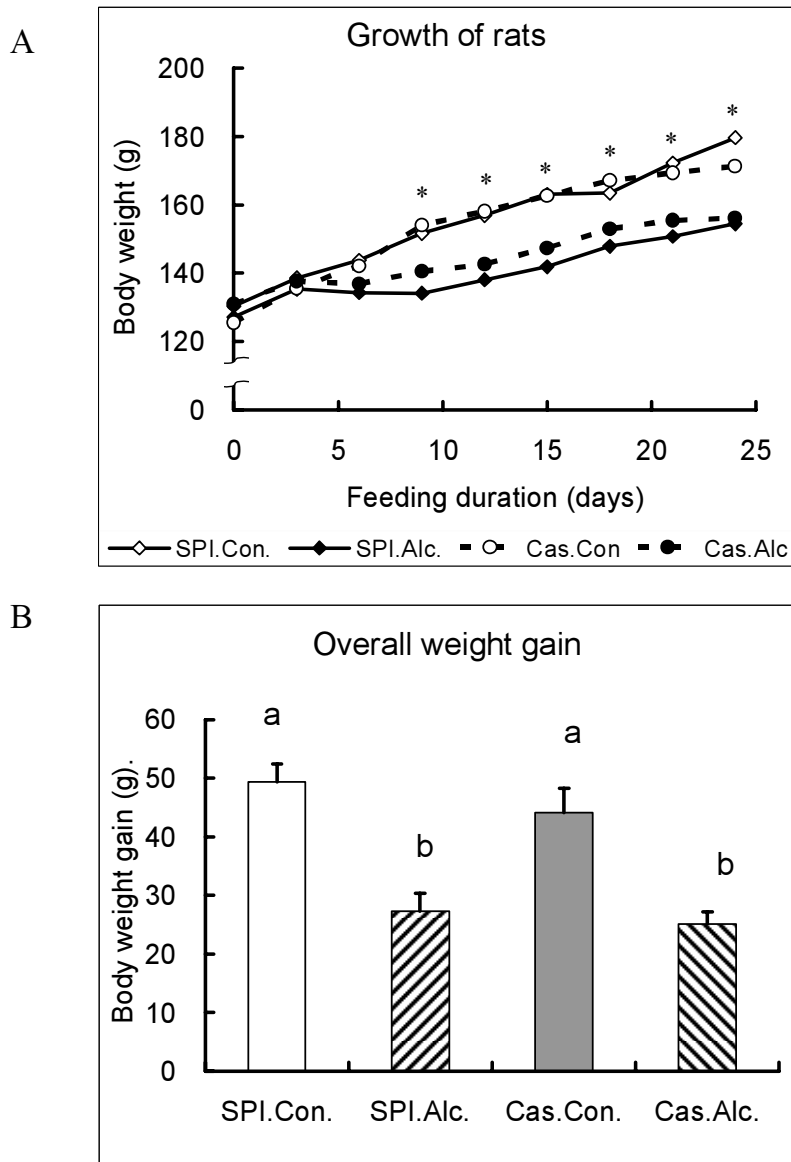
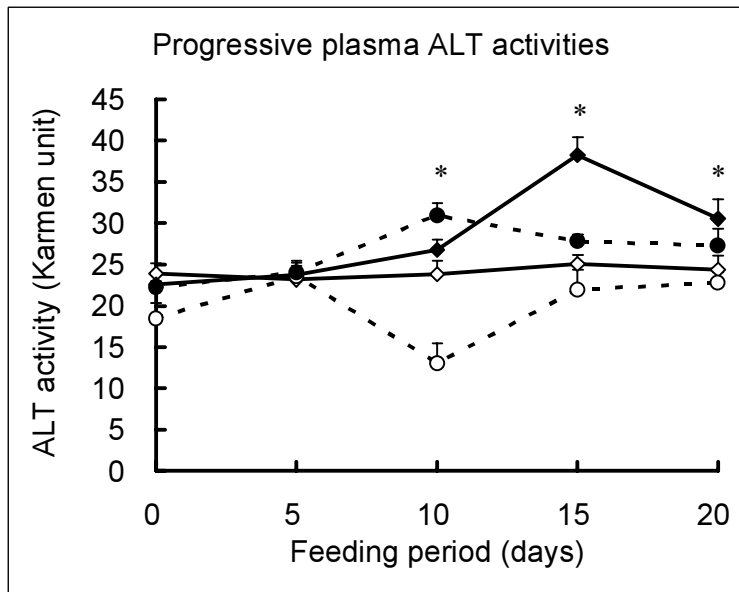


図 2. Alcohol reduces growth and overall weight gain. Both alcoholic groups were observed to experience reduced (A) growth and (B) overall body weight gain. All values are mean  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; \*  $p < 0.05$  against corresponding alcoholic group. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

#### 血漿ならびに肝臓中脂質濃度

肝臓中総脂質量は、図 5 に示した。肝脂質濃度は、アルコール給餌の 2 群で、アルコールを与えていない 2 群と比べて平均値が高い値を示し、この中でも SPI 群で有意に高い値となった。また、肝臓中のトリグリセリド濃度のほうでは、アルコール給餌の 2 群で、アルコールを与えていない 2 群に比べて高い値が示された。当研究室のこれまでの報告通り、肝臓に脂質がある程度蓄積している脂肪化が起きていることが示唆された。

A



B

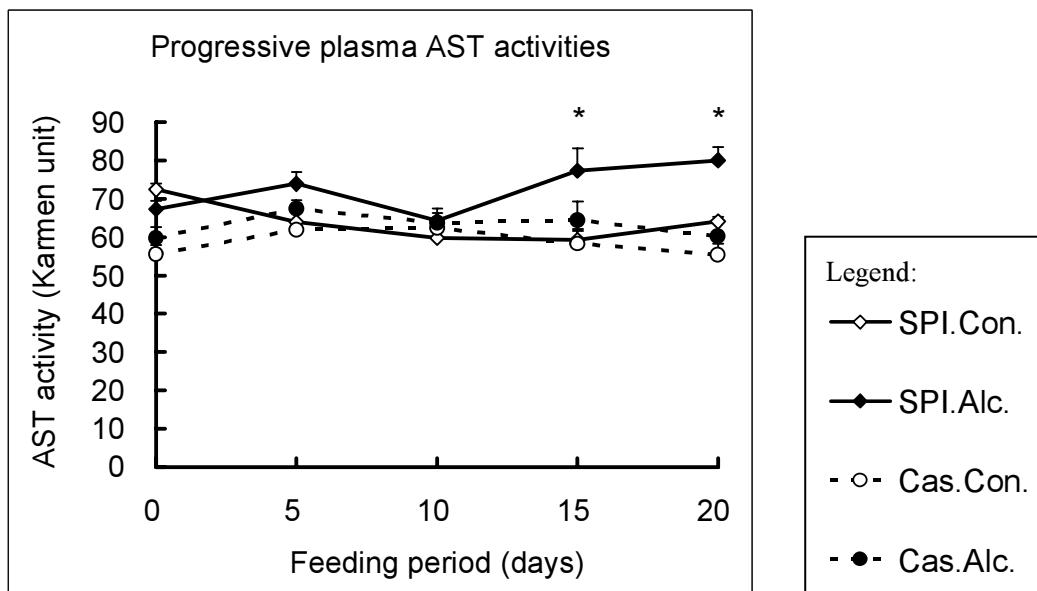


図3. Progression of liver damage induced by alcohol treatment. (A) Rise in plasma ALT activities indicates liver damage may be seen from as early as day 10 in the significant increase of ALT by Cas.Alc. (B) Increased plasma AST in SPI.Alc. may be seen from day 15, corresponding with the increase in plasma ALT. All values are mean  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; \*  $p < 0.05$  against its corresponding control group.

屠殺時の空腹時（14時間絶食後の）血漿トリグリセリド濃度、総コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度の測定結果を図6に示した。その結果、血漿トリグリセリド濃度は、SPI食のアルコール摂取群でのみ有意に低い値となった。カゼイン群ではアルコール摂取による変化は認められなかった。総コレステロール濃度については、カゼイン食はSPI食よりも高い値となっていたが、62.4 mg/dlなので必ずしも高すぎる値とは判断されない。また、SPI食でもカゼイン食でも、アルコール摂取によってこの値が有意に低下した。この値は、むしろ低下し過ぎの値であ

ろうと考えられる。HDL-コレステロール濃度では、カゼイン食で高い値であり、これがアルコールの慢性摂取によって半減した。血漿HDL-コレステロール濃度は、各組織から肝臓へ戻るときのリポタンパク質コレステロールであるので、いわゆる善玉コレステロールと言われている。カゼイン食群ではこの値が33 mg/dl程度であり、総コレステロールの53%を占めている。このため、カゼイン食群で一般に総コレステロール濃度が高いことはこの実験系では大きな問題とはならないであろう。

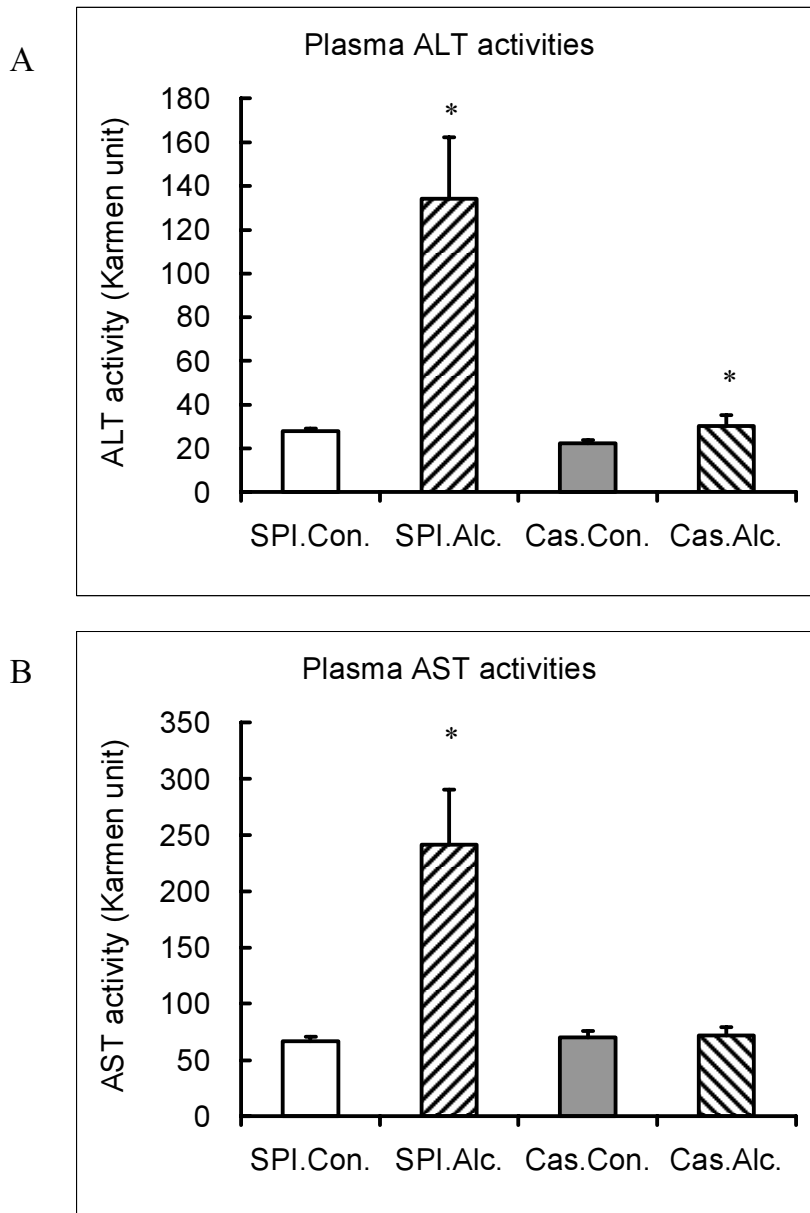


図 4. Enhanced plasma ALT and AST activities due to fasting. (A) ALT and (B) AST activities were observed to be markedly increased due to the 14 hours of fasting condition prior to dissection. All values are mean  $\pm$  SE; n = 6; \*  $p < 0.05$  against its corresponding control group.

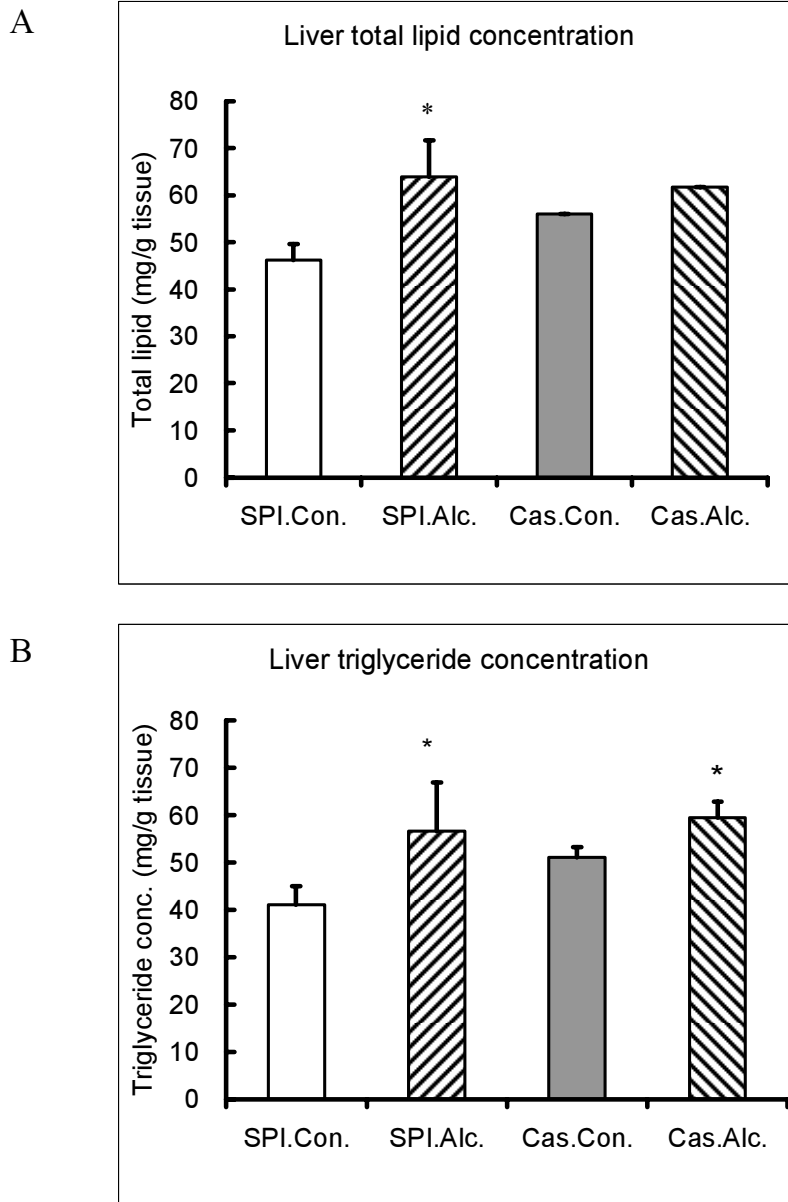


図5 Liver lipids concentrations were increased due to chronic administration of alcohol. All values are mean + SE; n = 6; \* p < 0.05 against its corresponding control group.

#### 血糖値、肝グリコーゲンおよび肝グルコース濃度

空腹時の血糖値（血漿グルコース濃度）と解剖時の肝グリコーゲン濃度を図7に示した。血糖値はSPI食でカゼイン食よりも高い値となっており、アルコール摂取によって低下した。SPI食では肝臓のグリコーゲン濃度がアルコール摂取によって高くなっていることから、とくにSPI食においては慢性のアルコール摂取は糖新生系が抑制されている状況が推察される。一方、カゼイン食ではそのような明確な応答は認められなかった。

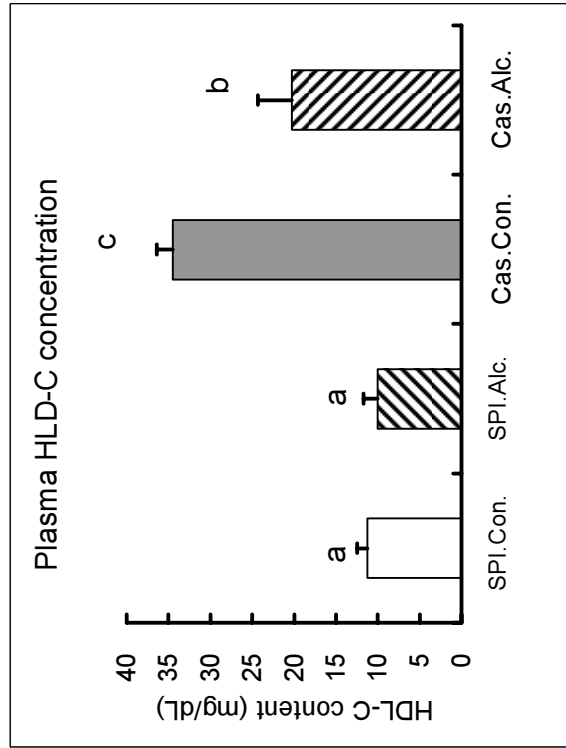
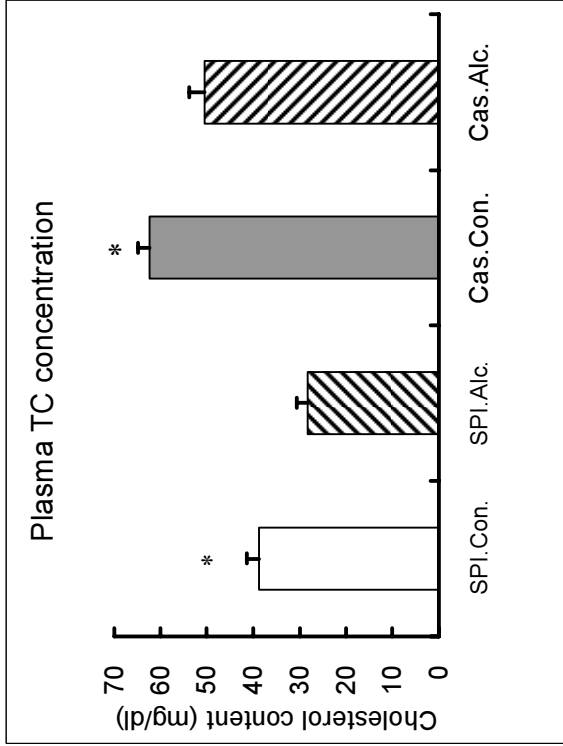
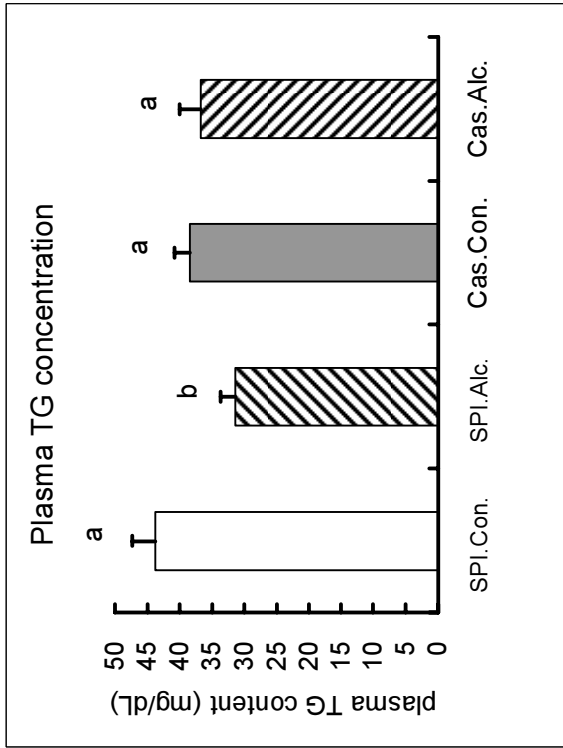


Fig 6. Plasma lipids concentrations. SPI was observed effective in reducing plasma total cholesterol compared to casein. Further reduction in TG concentration seen in alcohol groups is indicative of disrupted export of TG from the liver. All values are mean  $\pm$  SE; n = 6; \*  $p < 0.05$  against its corresponding control group. Different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$ .

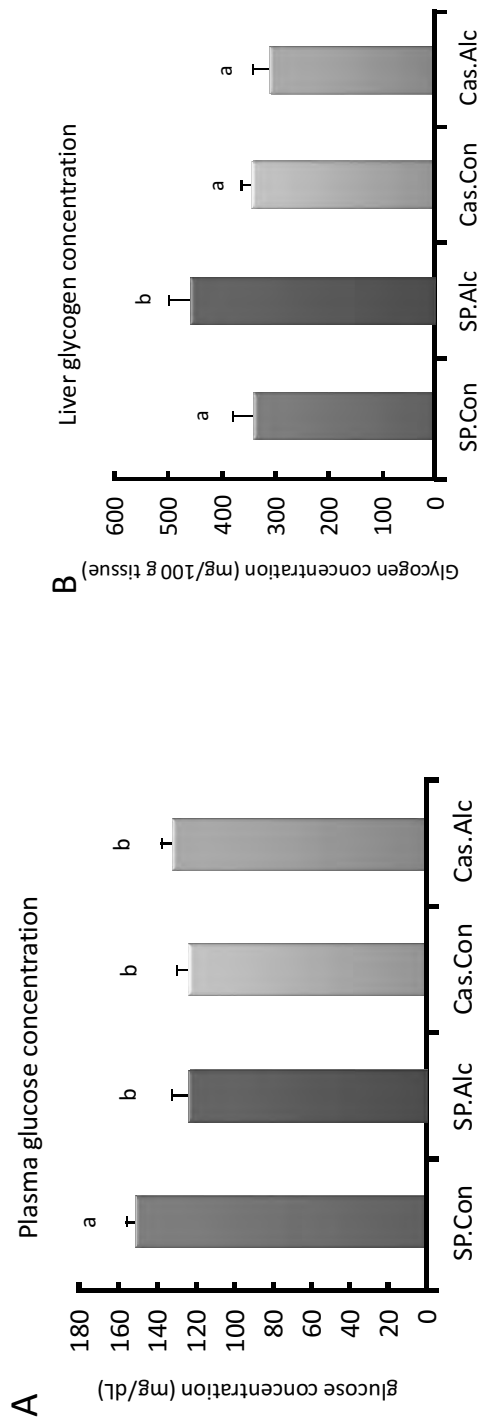


Figure 7. Fasting gluconeogenesis is inhibited by alcohol in SPI treated groups as indicated by lower blood glucose and higher glycogen level. (A) Blood glucose level in SPI.Alc was substantially decreased compared to the relative change of Cas.Alc. Gluconeogenesis was apparently suppressed in SPI.Alc as indicated by significantly higher glycogen store (B). All values are mean  $\pm$  SEM; n = 6; \*  $p < 0.05$  SP.Alc vs. SP.Con.



## 定量RT-PCR法を用いた肝臓中脂質代謝関連マーカーの遺伝子発現変化

当研究室の先行研究で、主に脂肪組織で発現しており肝臓中でも糖代謝に関わっている核内転写因子PPAR $\gamma$ とその標的遺伝子Glucose-6-phosphate dehydrogenaseのmRNA量を測定したところ、アルコール群で有意に低下、もしくは低下傾向であった。これは、アルコール代謝の結果「NADH+ H<sup>+</sup> / NAD<sup>+</sup>」比が還元型にシフトして高値となり、糖新生を抑制する報告と一致する。また、アルコール（エタノール）のアセトアルデヒドへの酸化によって、酢酸（acetate）が生ずるが、これも肝臓の遺伝子発現に影響を与えることが考えられ、その中でも脂肪酸の $\beta$ -酸化系に関わるキーとなる転写活性化因子への影響が予測される。今回の実験条件で飼育終了時にサンプリングした肝臓中のこの脂質代謝関連マーカー遺伝子発現の測定結果を以下にまとめた。

その結果、SPI食のアルコール群では、PGC1-a (PPAR-gamma co-activator 1 alpha), PGC1b (PPAR-gamma co-activator 1 beta), PPAR-a (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), RXRa (retinoid X receptor alpha), Fabp1 (Liver fatty acid binding protein)の発現のすべてが、非アルコール群に比べて抑制されていた。

一方、カゼイン食のアルコール群では、これらの遺伝子の発現が逆に亢進していたり (PGC1-alpha, PPAR-alpha, Acox1)、あるいは抑制が顕著ではなかった (PGC1b, RXRa, Fabp1)。大豆タンパク質 (SPI) 食でのアルコール慢性摂取によるこのような転写因子の発現変化は、脂肪酸 $\beta$ -酸化を阻害し、PGC1-aやPGC1-b、さらには最近報告されているFXRの発現を抑制し、糖新生系のPckやG6pc発現のダウンレギュレーションを引き起こすことに繋がる。すなわち、アルコール性肝障害における肝脂肪化の憎悪、肝細胞のエネルギー不足等に繋がっているものと推察される。しかし、この発現変化はカゼイン食ではほとんど認められず逆方向の発現変化さえ見られた。こうした発現の違いの中に、カゼイン食のアルコール群で肝障害が抑制された要因があったものと推察される。牛乳の主要タンパク質であるカゼインによるアルコール肝障害抑制作用の大方のメカニズムは明らかになったが、ヒトに近いモデルでのなお詳細な検討が必要である。また、今回の実験結果は、大切なタンパク質源である大豆タンパク質を悪く言うものではなく、あくまでもアルコール多飲の条件下という特殊な条件での結果であることを付記したい。

## 参考文献

- 1) DeCarli LM, Lieber CS.: Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J Nutr.* 91 (3), 331-6, 1967
- 2) Sato M, Lieber CS: Hepatic vitamin A depletion after chronic ethanol consumption in baboons and rats. *J Nutr.* 111 (11), 2015-23, 1981
- 3) Fischer M, You M, Matsumoto M, Crabb DW.: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) agonist treatment reverses PPAR $\alpha$  dysfunction and abnormalities in hepatic lipid metabolism in ethanol-fed mice. *J Biol Chem.*, 278 (30), 27997-8004, 2003
- 4) Fisher H, Halladay A, Ramasubramaniam N, Petrucci JC, Dagounis D, Sekowski A, Martin JV, Wagner GC. : Liver fat and plasma ethanol are sharply lower in rats fed ethanol in conjunction with high carbohydrate compared with high fat diets. *J Nutr.*, 132 (9), 2732-2736, 2002
- 5) Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Thomas P, Dannenberg AJ. : Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B-dependent genes. *Am. J. Physiol., Gastrointest Liver Physiol.*, 284 (2):G321-327, 2003
- 6) Nollevaux MC, Guiot Y, Horsmans Y, Leclercq I, Rahier J, Geubel AP, Sempoux C: Hypervitaminosis A-induced liver fibrosis: stellate cell activation and daily dose consumption. *Liver International*, 26, 182-186, 2006.
- 7) Purohit V, Russo D, Coates PM.: Role of fatty liver, dietary fatty acid supplements,

- and obesity in the progression of alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol.*, 34 (1), 3-8, 2004
- 8) Nanji AA, Dannenberg AJ, Jokelainen K, Bass NM.: Alcoholic Liver Injury in the Rat Is Associated with Reduced Expression of Peroxisome Proliferator- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )-Regulated Genes and Is Ameliorated by PPAR $\alpha$  Activation. *J Pharmacol Exp Ther.*, 310 (1):417-424, 2004
- 9) Mizuno S, Matsuura K, Gotou T, Nishimura S, Kajimoto O, Yabune M, Kajimoto Y, Yamamoto N.: Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br J Nutr.*, 94(1):84-91, 2005
- 10) 橋本 拓也: 修士論文 (=未公表「東北大学・大学院農学研究科・栄養学分野」、2005年)
- 11) Puspo Edi Giriwono: 修士論文 (=未公表「東北大学・大学院農学研究科・栄養学分野」、2008年)