

牛乳極性脂質の脂質代謝に及ぼす影響

北海道大学大学院水産科学研究院：宮下 和夫

1. 序論

近年、急激に食生活の欧米化が進み、脂質や糖分の摂取量が増加したことによって、肥満や肥満に起因するメタボリックシンドロームが大きな社会問題となっている。国の統計によれば、40～74歳におけるメタボリックシンドローム該当者数は約960万人、更に、予備群者数は約980万人と推定されている。また、40～74歳の男性の2人に1人、女性の5人に1人が、メタボリックシンドローム、またはその予備軍に該当するとされている。メタボリックシンドロームの予防には食生活の見直しが非常に重要であると考えられており、食品中の各栄養成分の働きについて新たな角度からの検討が行われている。

ところで、牛乳や乳製品は日本人の食生活に欠かせない食品の1つである。第二次世界大戦後、国の酪農政策や学校給食での牛乳の支給、牛乳の健康食品としての認識が浸透し始めたことにより、牛乳・乳製品の生産が激増した。現在牛乳は、多くの食品の原材料として利用され、生乳換算で年間約1,200万トンが消費されており、これは米の国内消費量の約1.5倍、小麦の約3倍もの量にあたる。日本人はカルシウム摂取量の約43%を牛乳・乳製品から摂取しており、その割合は魚介類の約3倍にあたる（中央酪農会ホームページより引用）。また牛乳のカルシウムは魚や野菜と比較して吸収率が高いことも特徴的であり、効率的にカルシウムを摂取できる食品として、牛乳・乳製品の存在価値は以前にも増して大きくなっている。また、牛乳のタンパク質は必須アミノ酸をバランス良く含み、栄養価が高いことでも知られている。この良質なタンパク質は戦後の日本人の体格の向上や、免疫機能の上昇による結核を中心とした感染症の激減に寄与したとされている。

一方で、牛乳に含まれるコレステロールや飽和脂肪酸の栄養効果については、否定的な見方が多い。牛乳脂質については、冠動脈疾患との関連で健康にとってマイナスとのイメージが先行しており、科学者ですら牛乳脂質の悪影響を既定の事実として受け止めていることも多い。しかし、牛乳脂質の栄養機能性についての科学的評価はまだ確立されているとはいえない。牛乳脂質に含まれる主な12の飽和脂肪酸のうち、血漿総コレステロールを上昇させるとされているのは3種類(12:0, 14:0, 16:0)のみで、あとの9種類にはこうした効果はない。また、最近では、総コレステロールの上昇と疾患との関係には必ずしも相関はないこと、コレステロールに関しては、一部のLDLコレステロールの増大とHDLコレステロールの減少が問題であることが明らかにされており、牛乳脂質の摂取と冠動脈疾患との関係について再考察すべきとの主張もある(German JB et al., Crit Rev Food Sci Nutr, 46:57-92 (2006); Eur J Nutr 48:191-203 (2009)など)。

確かに過剰な脂質の摂取は心臓病や肥満およびメタボリックシンドロームを誘発するが、牛乳や乳製品の適切な摂取は、これらの疾患のリスクファクターにはならない。むしろ、含まれる牛乳脂質中の機能性成分の効果に着目した研究を行い、その栄養効果について総合的に理解することが必要である。牛乳脂質中の機能性成分については、共役リノール酸(CLA)の研究が多い(Parodi PW, J Dairy Sci 82:1339-1349 (1999)など)。我々もCLAの機能性についてこれまで幾つかの検討

を行っており、抗腫瘍活性(Beppu F et al., J Nutri Biochem 17:830-836 (2006) ; Kohno H et al., Cancer Sci 95:481-486 (2004))や内臓脂肪蓄積抑制作用(Ohashi A et al., J Nutr Sci Vitaminol 50:416-421 (2004))を報告している。その他、酪酸などの短鎖脂肪酸、カプリン酸などの中鎖脂肪酸、トランス脂肪酸などの特定の脂肪酸に着目した研究も多いが、牛乳リン脂質や牛乳スフィンゴ脂質に特化した検討例はほとんどない。わずかに、牛乳リン脂質の抗菌・抗ウイルス作用 (van Hooijdonk ACM et al., Br J Nutr 84:S127-S134 (2000))などが報告されている程度である。

一方、リン脂質一般やスフィンゴ糖脂質一般の機能性については多くの報告がある。例えば、スフィンゴ糖脂質の骨格であるスフィンゴイド塩基は、神経組織などの構成成分として重要である。スフィンゴ糖脂質の抗腫瘍活性 (Schmelz EM et al., Cancer Res 56:4936-4941 (1996))や、牛乳由来のスフィンゴ糖脂質のコレステロール低下作用(Imaizumi K et al., Nutr Res 17:111-114 (1997))についての報告もある。また、リン脂質の機能性についてトリアシルグリセロールと比較した例も多い。しかし、牛乳極性脂質に特徴的な生理作用についての知見はほとんどない。

そこで、本研究では、牛乳由来のリン脂質とスフィンゴミエリンが牛乳極性脂質の特徴的成分であることに着目し、これらの牛乳極性脂質の栄養機能性、特に脂質代謝改善作用について明らかにすることを目的とした。こうした観点からの検討例はこれまでになく、新たな牛乳由来の機能性成分の発見が期待できる。

現在、バター、チーズ、ヨーグルトなど様々な種類の乳製品が製造されているが、これらが乳製品を加工する際には必ず副産物が発生する。例えばチーズを製造する際のチーズホエイ、クリームを製造する際のスキムミルクなどである。チーズホエイには血漿コレステロール低下作用が報告されている β -ラクトグロブリンや免疫グロブリンなどのホエイタンパク質が含まれており、機能性食品の素材としての利用が期待されている。また、乳糖やミネラルなどの微量成分も含まれているが、これらの栄養、生理的意義などの研究も進んでおり、多くの分野で工業的な利用が試みられるようになってきている。このように乳製品の製造工程で排出される副産物に機能性を見出すことで新たな利用用途の拡大、そして環境への負担を軽減できる。

一方で、バターオイルを製造する際の副産物であるバターセーラムは、極性脂質やタンパク質が濃縮されているが、現在そのほとんどが廃棄されている状態である。バターオイルとは、バターの脂質分だけを回収したもので、主に製菓や製パンなどに用いられている。乳脂の大部分は脂肪球の形で存在しているが、中心のトリアシルグリセロールを取り囲んでいるのがタンパク質や極性脂質で構成された乳脂肪球皮膜 (MFGM : Milk Fat globule membrane)と呼ばれる膜であり、トリアシルグリセロールと水の界面を形成し、脂肪球の安定に重要な働きをしている。内側の膜には主にホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールなどが存在し、外側の膜にはホスファチジルコリンやスフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質などが存在している。バターオイルの成分の大部分はトリアシルグリセロールであるので、その製造工程で発生する副産物であるバターセーラムにはMFGMの構成成分が多く、他の乳製品と比較して特に極性脂質が多く含まれている点が特徴的である。従ってバターセーラムは極性脂質の原料としての利用が期待されている。これまでは、動物実験に供する量の牛乳極性脂質を脂質クラス毎に分離することは難しかったが、本研究ではバターセーラムに極性脂質が多く含まれていることに着目し、これを原料として各種極性脂質を調製した。

2. 実験方法

2-1 牛乳極性脂質の分離と分析

1) バターセーラム (BS) からの脂質の抽出

BS粉末を抽出ビンに入れ、10倍量のエタノールを加え一晩浸漬した。その後、吸引ろ過してろ液を回収した。残渣をエタノールに一晩浸漬し抽出を繰り返した。ろ液をロータリーエバポレーターで濃縮した後、クロロホルム/メタノール/水 (10:5:3, v/v/v) に溶解し、分液ロートにて一晩液々分配を行った。下層のクロロホルム層をナス型フラスコに回収し、再びロータリーエバポレーターで濃縮した。さらに真空ポンプに接続した減圧デシケーター内で溶媒を完全に除去してBS脂質を得た。

2) BS脂質からの中性脂質の除去および極性脂質の分離・分画：

(a) 極性脂質の分離

液液分配と溶媒抽出法を用いてBS脂質から中性脂質の除去および極性脂質の分離を行った。

(b) ジエチルエーテルによる固液分配

極性脂質画分に、多量のジエチルエーテルを加え、 -20°C で一晩静置した。その後、ろ紙を用いてろ過し、ろ液を回収した。ろ紙上に残った画分はジエチルエーテルでよく洗浄し、その後クロロホルム/メタノール(2:1, v/v)でろ紙から溶出させ、ナス型フラスコに回収した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。さらに真空ポンプに接続した減圧デシケーター内で溶媒を完全に除去し、グリセロリン脂質画分として回収した。ろ液はロータリーエバポレーターで濃縮し、デシケーター内で完全に溶媒を除去し、スフィンゴ脂質画分として回収した。

(c) エタノールによる固液分配

(b)で得られたグリセロリン脂質に多量のエタノールを加え、 -20°C で一晩静置した。その後、ろ紙を用いてろ過し、ろ液を回収した。ろ液はロータリーエバポレーターで濃縮し、デシケーター内で完全に溶媒を除去し、ホスファチジルコリン (PC) 画分として回収した。

(d) ピリジンによる固液分配

(b)で得られたスフィンゴ脂質に多量のピリジンを加え、 -20°C で一晩静置した。その後、ろ紙を用いてろ過し、ろ液を回収した。ろ液はロータリーエバポレーターで濃縮し、デシケーター内で完全に溶媒を除去し、スフィンゴミエリン (SPM) 画分として回収した。

(e) オープンカラムによる極性脂質の分画

(a)で得られた極性脂質をクロロホルムに溶解してカラムに供した後、クロロホルムを流して不要な成分を溶出させた。その後クロロホルム/メタノール(9:1, v/v)にて溶出した画分を回収し、ホスファチジルエタノールアミン(PE)画分とした。

3) 各画分の脂質組成分析：

上記の方法で得られたPC、PE、SPM画分をクロロホルムに溶解してシリカゲルTLCプレートにスポットし、クロロホルム/メタノール/25%アンモニア(65:35:5, v/v/v)を用いて展開後、プレートをドラフト内で乾燥させた。さらにそのプレートを、スポットした部分を下にしてクロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水(10:4:2:2:1, v/v/v/v/v)で展開した。展開したプレートは乾燥後、銅試薬を噴霧してドラフト内で乾燥させた後、 180°C で5分間加熱して黒色の脂質スポット

を出現させた。その後スキャナーでプレートの画像を取り込み、Visual Basic ソフトを用いて、黒色スポットの濃淡からそれぞれの脂質含量を分析した。

4) 各画分の脂肪酸組成分析：

(a) 脂肪酸メチルエステルの調製

まず、10%塩化水素-メタノール溶液 10 mLに対して、脱水メタノール 10 mLで希釈することにより5%塩化水素-メタノール溶液を調製した。PC、PE、SPMの各画分約50 mgを遠沈管に採り、5%塩化水素-メタノール溶液を2 mL加え、100°Cのブロックヒーターで3時間加熱した。室温まで冷却した後、駒込ピペットで水を2 mL加え軽く振り、さらにn-ヘキサンを加えヴオルテックスミキサーで攪拌した後、上層を回収した。回収したn-ヘキサン層は中性になるまで水洗した。パスツールピペットに脱脂綿を詰めた後、n-ヘキサンに混ぜたシリカゲルを充填した。得られたn-ヘキサン層抽出物をカラムに負荷し、n-ヘキサンを流した。その後n-ヘキサン/ジエチルエーテル(95:5, v/v)により溶出し、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去して脂肪酸メチルエステルを得た。

(b) ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸組成分析

調製した脂肪酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー(GC)により分析した。その際、メチルエステルを5%(w/v)の濃度となるようにn-ヘキサンで溶解し、その1 μ Lを注入した。分析条件は以下の通りとした。

装置:GC-14B

インテグレーター:C-R3A Chromatopac

カラム:Omegawax 320(30m \times 0.32 mm i. d.) [Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA]

カラム温度:200°C

注入口温度:250°C

検出器温度:260°C

検出器:FID

キャリアガス:ヘリウム

流速:1 mL/min

2-2 動物実験

1) 実験動物と飼料の調製

3週齢のKK-*A*マウスのオスは購入した。飼料の調製に用いた油脂以外の構成成分は購入した。飼料中の大豆油は購入した。試験試料はAIN-93G組成(Reeves PG et al., J Nutr 123:1939-1951 (1993))に従って調製した。コントロール群用試料に含有する大豆油は13.51%(w/w)とした。実験飼料は12.51%(w/w)大豆油含有の飼料に対して牛乳由来極性脂質画分が1%となるように調整した。飼料の組成は表-1に示した。飼料は調製後直ちに真空パックして給餌まで-20°C下で保存した。

表-1 動物実験の飼料組成

(g/kg diet)	コントロール	PC (1%)	PE (1%)	SPM (1%)
α -corn starch	115	115	115	115
β -corn starch	346.3	346.3	346.3	346.3
casein	216	216	216	216
sucrose	87.12	87.12	87.12	87.12
KC flock	50	50	50	50
AIN-93G mineral mix	35	35	35	35
AIN-93G vitamin mix	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3
coline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
soybean oil	135.1	125.1	125.1	125.1
PC	0	10	0	0
PE	0	0	10	0
SPM	0	0	0	10

2) 飼育実験

3週齢のKK-*A*マウスを対照群用飼料により1週間予備飼育し、その後成長に異常のない固体を各群7匹ずつ体重にばらつきがないように群分けした。滅菌ウッドチップ床敷を入れたプラスチックケージに1匹ずつ入れて飼育した。飼育質の温度は23±1℃、湿度50±10%、明暗周期を12時間周期とした。飼料および水は自由摂取とし、4週間実験飼料による飼育を行った。

3) 採血および臓器の摘出と血清成分の分析

実験期間終了後、エーテル麻酔下で採血を行い、血糖値を測定した。臓器は採血終了後直ちに摘出し、生理食塩水でよく洗い十分に脱血した。各臓器は秤量の後、分析に供するまで-40℃下に保存した。血液成分の分析は外部に依頼した。

4) 肝臓脂質の抽出と分析

Folch法 (Folch J et al., J Biol Chem 226:497-509 (1957)) に従って肝臓から総脂質を抽出した。すなわち、-40℃で保存した肝臓約350 mgをホモジナイザーカップに入れ、約5 mLのクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)を加え、10,000 rpmで1分間ホモジナイズし、吸引ろ過を行った。残渣をホモジナイザーカップに戻し、約5 mLのクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)を加え、10,000 rpmで1分間ホモジナイズした。同様に吸引ろ過を行い、得られたろ液を秤量したナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空ポンプに接続した減圧デシケーター内にて溶媒を完全に除去した後、秤量した。

肝臓中のコレステロールとトリアシルグリセロール(TG)の測定には、コレステロール:E-テストワコーとTG:E-テストワコーを用いた。抽出、分析に用いた試薬・溶媒のうち10%塩化水素-メタノール溶液は購入した。また、その他の試薬・溶媒はすべて特級を用いた。

5) 肝臓中の遺伝子発現分析

肝臓からのtotal RNAの抽出はRNeasy[®] Mini Kitを使用した。RNA later中に保存した肝臓を約30 mg秤量し、Buffer RLTを600 μ Lとジルコニアビーズ2粒を加え、粉砕機を用い4,000 rpmで10秒間ホモジナイズした。その溶液をQIA shredder spin columnへ移し、15,000 rpmで2分間遠心分離した。次にCollection tubes (2 mL)に移した溶液に、70%エタノールを600 μ L加え、ピペッティングした後、RNeasy minicolumnへ移し、10,000 rpmで15秒間、RW1を700 μ L加え10,000 rpmで15秒間、さらにBuffer RPEを400 μ L加え、10,000 rpmで15秒間、さらに、Buffer RPEを400 μ L加え、10,000 rpmで2分間遠心分離を行った。ついで、Silica gel membraneをCollection tubesに乗せ、15,000 rpmで1分間遠心分離した。最後に新しいCollection tubes (1.5 mL)にSilica gel membraneに乗せ、RNase-free waterを30 μ L加え、10,000 rpmで1分間遠心分離し、この操作をもう一度行い、60 μ Lのtotal RNAを得た。total RNAは-80°Cで保存した。

抽出したRNAへの逆転写反応はHigh Capacity cDNA Archive Kitを使用し、添付説明書の方法に従って行った。すなわち、一定の割合で混合したRT master mixを50 μ Lずつエッペンドルフチューブに分注した。そこへtotal RNAを50 μ L加え、混合した。逆転写反応はサーマルサイクラーにて行った。最初に25°Cで10分間、さらに37°Cで120分間反応させ、cDNAサンプルを合成した。cDNAは-30°Cで保存した。

各プライマーおよび内部標準遺伝子として用いるGAPDHのPCR反応は2×TaqMan Universal PCR Master Mixを用いて、添付説明書の方法に従って行った。すなわち、一定の割合で混合した反応液を96-well Optical Reaction Plateに移し、ABI PRISM[®] 7500にてPCR反応を行った。最初に50°Cで2分間、次いで95°Cで10分間反応させた。その後、95°Cで15秒間、60°Cで1分間のPCR反応を40 cycle行った。反応後、ABI PRISM[®] 7500添付の説明書に従い、mRNAの発現量を定量した。遺伝子の内部発現量は、内部標準遺伝子のGAPDHに対する相対値として分析した。

6) 肝臓中の脂肪酸分析

水酸化ナトリウム4 gに対して脱水メタノール50 mLを加え、攪拌溶解させることにより2N水酸化ナトリウム-メタノール溶液を調製した。また、10%塩化水素-メタノール溶液10 mLに対して、脱水メタノール3.7 mLで希釈することにより2N塩化水素-メタノール溶液を調製した。Prevot and Mordretの変法 (Prevot AF and Mordret FX, Rev Fse Corps Gras, 23:409-423 (1976)) に従い、試料脂質のメチルエステル化を行った。抽出した肝臓脂質を遠沈管に約20 mg取り、秤量した。脂質全体の10%となるように内部標準として23:0を加え、1 mLの*n*-ヘキサンを加えた。次に2N水酸化ナトリウム-メタノール溶液を0.2 mL加え、ボルテックスミキサーで10秒間攪拌した後、50°Cの温浴で30秒間反応させた。その後、2N塩化水素-メタノール溶液を0.2 mL加えて溶液を中和し、ボルテックスミキサーで60秒間攪拌し、3,000 rpm、5分間遠心分離を行った。上層の*n*-ヘキサン層を分取した後、窒素ガスを吹き付けることにより*n*-ヘキサンを除去し、脂肪酸メチルエステルを調製し、ガスクロマトグラフィーによる分析を行った。

7) 統計計算の方法

得られた数値の平均値および標準偏差、標準誤差を各群で算出した。統計的検定には、多重比較法のダネットの方法を用いて行った。その際有意水準は $P < 0.05$ および $P < 0.01$ とした。

3. 結果と考察

3-1 牛乳極性脂質の分離と分析

まず、バターオイル残渣から得たBS脂質の一般分析を行ったところ、極性脂質が57.6%、中性脂質が42.4%含まれていた。また、中性脂質中のコレステロール含量は2%であった。予想通り、バターオイル残渣脂質には極性脂質が多く含まれていることが確認できた。BS脂質から得られた極性脂質を多量のジエチルエーテルに溶解して-20℃で一晩放置することにより、ジエチルエーテル可溶のグリセロリン脂質画分とジエチルエーテル難溶のスフィンゴ脂質に分画できた。また、このグリセロリン脂質画分を多量のエタノールに溶解して-20℃で一晩放置することにより、エタノール可溶のホスファチジルコリン(PC)画分を調製できることが確認された。一方、スフィンゴ脂質画分は多量のピリジンに溶解して-20℃で一晩放置することにより、ピリジン難溶のスフィンゴミエリン(SPM)画分を得ることができた。さらに、得られた極性脂質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分別することにより、ホスファチジルエタノールアミン(PE)画分を得ることができた。

表-2にそれぞれの画分の脂質組成を、また、表-3に脂肪酸組成を示した。PE画分はほとんどPEのみであったが、PC画分にはPC以外に、PEが14.6%、SPMが8.2%、また、SPM画分には、PCが16.3%、PEが10.3%含まれていた。また、どの画分も飽和脂肪酸および一価の不飽和脂肪酸が主な脂肪酸であり、多価不飽和脂肪酸はほとんど含まれていなかった。さらに、牛乳脂質に特徴的な炭素数4~12の短・中鎖脂肪酸もほとんど含まれていなかった。短・中鎖脂肪酸は大部分が牛乳由来中性脂質に含まれており、牛乳由来極性脂質にはほとんど存在しないとされている (Dewettinc K et al., Int Dairy J 18:436-457 (2008))。本実験の結果はこうした報告と一致した。

表-2 各画分の脂質組成

脂質クラス	画分		
	PC(1%)	PE(1%)	SPM(1%)
PC	71.9	-	16.3
PE	14.6	97.5	10.3
PS	3.0	1.3	1.7
PI	2.3	1.2	1.4
SPM	8.2	-	70.3

PC: ホスファチジルコリン
PE: ホスファチジルエタノールアミン
PS: ホスファチジルセリン
PI: ホスファチジルイノシトール
SPM: スフィンゴミエリン

表-3 各画分の主な脂肪酸組成

脂肪酸 (wt%)	画分		
	PC (1%)	PE (1%)	SPM (1%)
12:0	0.4	0.1	0.1
14:0	4.8	0.7	3.3
16:0	24.4	8.2	23.3
18:0	8.8	16.2	6.0
18:1n-9	34.1	49.2	4.4
18:1n-7	1.9	2.1	0.3
18:2n-6	6.8	9.7	0.8
18:3n-3	0.8	1.0	-
20:0	-	-	0.8
22:0	3.2	0.8	17.8
23:0	3.9	-	22.0
24:0	2.9	-	16.4

3-2 牛乳極性脂質の血中脂質と血糖値に及ぼす影響

牛乳脂質の主要成分は中性脂肪であるが、バターセーラム脂質中には上述のように極性脂質が濃縮されていた。また、バターセーラムの主要成分は牛乳のMFGM由来である。MFGM中のリン脂質の機能性として、抗癌作用 (Parodi PW, J Nutr 127:1055-1060 (1997))、記憶改善作用 (McDaniel MA et al., Nutrition 19:957-975 (2003))、抗菌作用 (Van Hooijdonk ACM et al., Br J Nutr 84:S127-S134 (2000))、胃潰瘍防止作用 (Kivinen A et al., Milchwissenschaft 47:694-696 (1992))が、また、スフィンゴ脂質の機能性としては抗癌作用 (Berra B et al., Eur J Cancer Prev 11:193-197 (2002); Dillehay DL et al., J Nutr 124:615-620 (1994); Duan R-D, Scand J Gastroenterol 33:673-683 (1998); Duan R-D et al., J Lipid Res 44:1241-1250 (2003); Parodi PW, J Dairy Sci 82:1339-1349 (1999); Schmelz EM et al., Cancer Res 56:4936-4941 (1996); Schmelz EM et al., J. Nutr. 130:522-527 (2000))が報告されている。しかし、その他の機能性についてはほとんど知見がない。

牛乳スフィンゴ脂質のスフィンゴシン骨格は他の生物由来のものとは異なっており、その機能性には興味を持たれる。Watら (Atherosclerosis 205:144-150 (2009))は、牛乳由来リン脂質が脂質代謝制御作用を有すると報告しているが、その場合用いた脂質はPC、PE、SPMをほぼ等量含む混合物であった。そこで、本研究では、牛乳極性脂質のどの画分が最も活性が高いかに着目して動物実験を行った。

実験動物としては4週齢の雄のKK-*A*マウス (肥満・糖尿病モデルマウス) を用い、1週間の予備飼育の後、AIN-93Gを基本組成とした実験飼料を4週間与えた (表-1)。コントロール群用試料に含有する大豆油は13.51% (w/w) とし、実験飼料は12.51%大豆油含有試料にPC、PE、SPMの画分をそれぞれ飼料に対して1% (w/w) となるように調製して与えた。なお、結果は示していないが、予備飼育中および実験飼育中において各群で摂餌量、飲水量共に有意な差は認められなかった。

表-4にマウスの体重、肝臓、および内臓白色脂肪（WAT）重量を示した。WAT重量に各群間で差は認められなかった。体重については有意な差は認められないものの、コントロール群と比較してPE1%群およびSPM1%群において減少傾向がみられた。また肝臓重量についてはコントロール群と比較してPE1%群およびSPM1%群で有意な減少がみられた。

表-4 牛乳極性脂質の肥満マウスの脂質含量等に及ぼす影響

	体重 (g)	肝臓重量 (g/100g 体重)	内臓脂肪重量 (g/100g 体重)
コントロール	39.48±0.68	5.81±0.17	9.96±0.31
PC (1%)	39.03±1.02	5.70±0.17	9.71±0.46
PE (1%)	37.20±0.48	4.44±0.43 ^b	10.08±0.31
SPM (1%)	37.77±0.88	4.67±0.19 ^a	10.65±0.39

a, b コントロールと比較して有意差あり (a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$)

マウスの血清中の総コレステロール量 (図-1)、LDLコレステロール量、HDLコレステロール量、リン脂質含量、遊離脂肪酸含量量には各群で有意な差は認められなかったが、中性脂質含量はコントロール群と比較してPE1%群で有意な減少が、SPM1%群では減少傾向が認められた (図-2)。また、血中のグルコース含量は、実験に用いたマウスが糖尿病病態マウスであるため、コントロールで高値を示したが、SPM1%群で有意な減少が、PE1%群では減少傾向が認められた (図-3)。

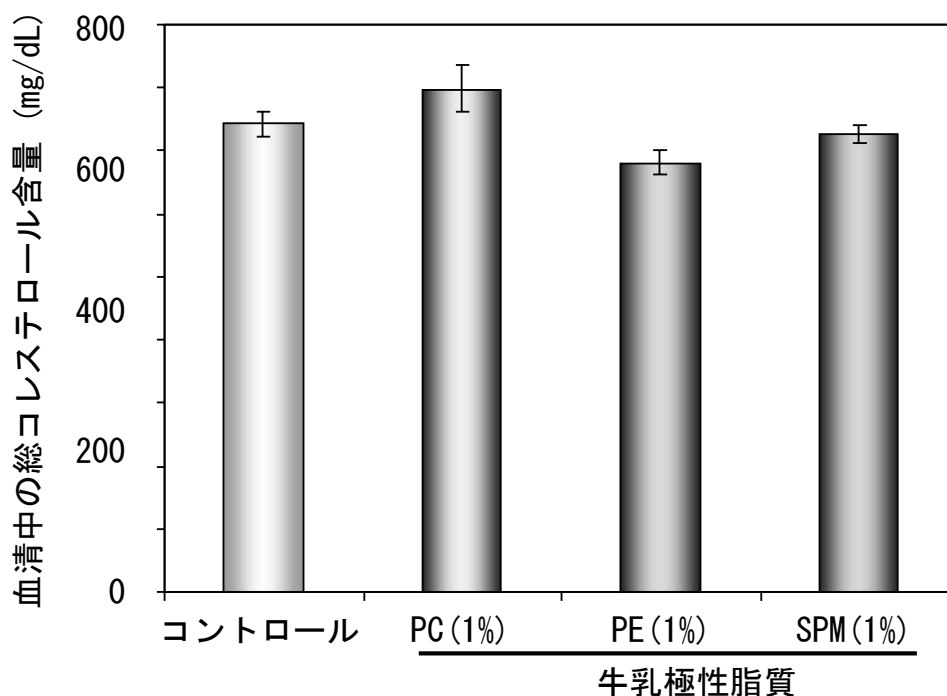


図-1 牛乳極性脂質の糖尿病病態マウスの血清中総コレステロール含量に及ぼす影響

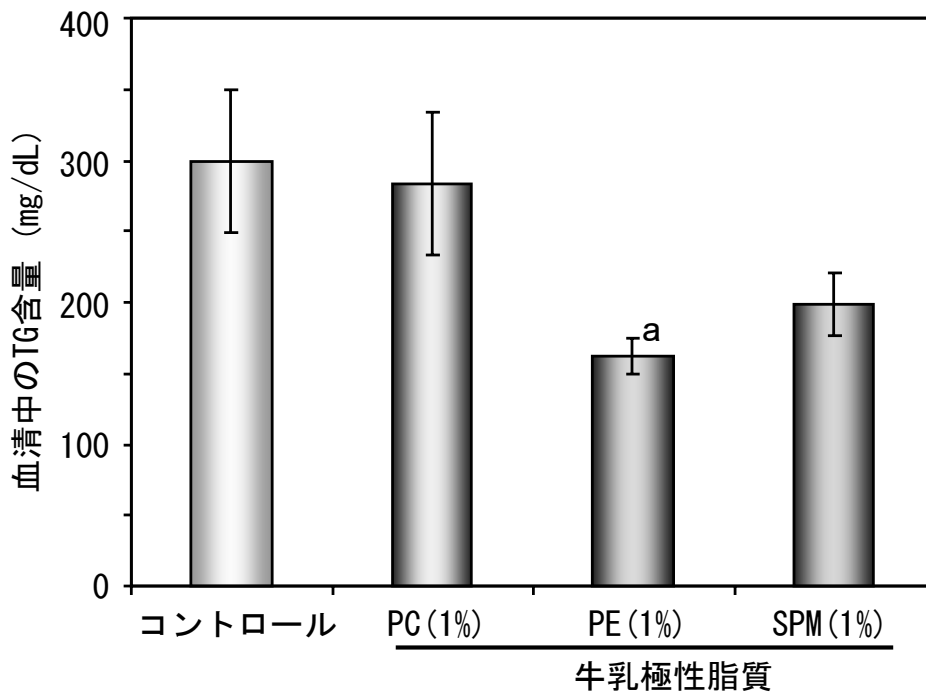


図-2 糖尿病病態マウスの血清中トリアシルグリセロール(TG)含量に及ぼす牛乳極性脂質の影響

^aコントロールと比較して有意差あり ($P < 0.05$)

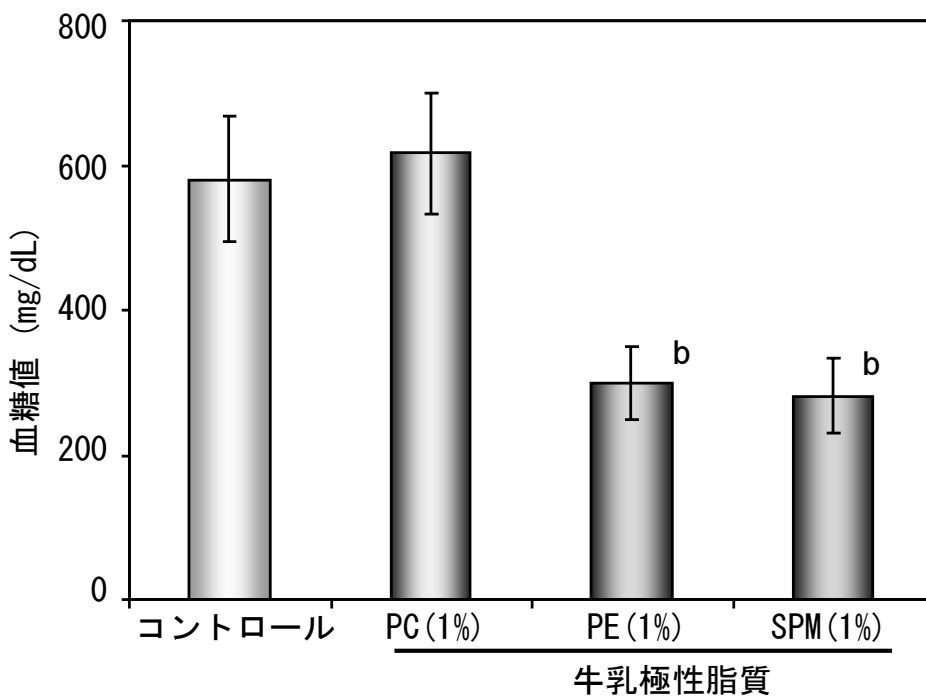


図-3 糖尿病病態マウスの血糖値に及ぼす牛乳極性脂質の影響

^bコントロールと比較して有意差あり ($P < 0.01$)

牛乳の極性脂質による脂質代謝については、上述のように、Watら (Atherosclerosis 205:144-150 (2009)) の報告があるのみだが、本研究によりその活性本体として、PEとSPM画分が初めて見出された。また、SPM画分が示した有意な血糖値の改善作用は、これまでに報告がなく、新たな牛乳成分の機能性といえる。その分子機構については現在さらに解明を進めているが、SPMをヒトが摂取した場合、セラミドまたはスフィンゴミエリンとして体内に取り込まれると考えられており、SPMの活性は、これらの構造が関与しているものと推察される。今後この点について着目した検討が必要と考えられる。一方、PEの場合、加水分解後、動物体内に吸収されるので、牛乳PEのみが脂質代謝改善作用を示すとは考えにくい。一般に牛乳リン脂質やスフィンゴ脂質は融点が高く、これがコレステロールなどの吸収阻害と関連しているとの報告 (Eckhardt ERM et al., Gastroenterology 122:948-956 (2002); Jiang Y et al., J Nutr 131:2358-2363 (2001); Noh SK and Koo SI, J Nutr 133:3571-3576 (2003)) もあるが、本研究で示された血糖値改善作用は、このメカニズムで説明することは難しい。吸収されたセラミドまたはスフィンゴミエリンによる分子機構に今後興味を持たれる。

3-3 牛乳極性脂質の肝臓の脂質代謝に及ぼす影響

3-2で示したように、牛乳由来極性脂質 (PEとSPM) を肥満・糖尿病病態マウス投与すると、脂質代謝と糖代謝が改善されるとともに、肝臓重量が対照群と比較して有意に減少することも明らかになった。そこでこれらの牛乳由来極性脂質成分の活性が肝臓で発揮されていることが推測されたため、牛乳由来のPEとSPMの肝臓の脂質代謝への影響を検討した。

図-4にマウスの肝臓中総トリアシルグリセロール量を示した。コントロール群と比較してSPM1%群において有意な減少がみられ、PE1%群においても有意差は認められないもののSPM1%群と同程度の減少がみられた。トリアシルグリセロールは肝臓中の脂質成分の大部分にあたるため、これが減少したことが肝臓重量の低下の大きな要因であることが考えられる。また、こうした肝臓での脂質代謝制御が、血清中でのトリアシルグリセロールの減少効果 (図-2) と関連していると推察できる。

一方、コレステロール含量 (図-5) には各群でほとんど差はなく、牛乳由来の各極性脂質は、コレステロール代謝には大きな影響を及ぼさないことが示された。このことはマウスの血清中の総コレステロール量 (図-1)、LDLコレステロール量、HDLコレステロール量に大きな違いが見られなかったことと一致している。

表-5にマウス肝臓脂質の脂肪酸組成を示した。脂肪酸組成でも牛乳由来PEとSPMの投与により、コントロール群と比較して違いが見られた。なお、PC投与群とコントロール群に肝臓脂肪酸組成にほとんど差は見られなかった。表-5に示したように、PE1%群では18:0の有意な増加が、SPM1%群では16:0と18:0の有意な増加が見られた。

表-6に調製した4種類の飼料から抽出した脂質の脂肪酸組成を示した。牛乳極性脂質の添加量が1%であったため、脂質の脂肪酸組成に大きな違いは見られなかった。したがって、PEとSPM投与で得られたコントロール群との脂肪酸組成の違い (表-5) は、PEとSPMそれ自体の脂肪酸組成に影響されたものではなく、これら極性脂質投与による生体内での脂肪酸代謝系への影響の結果と考えられた。

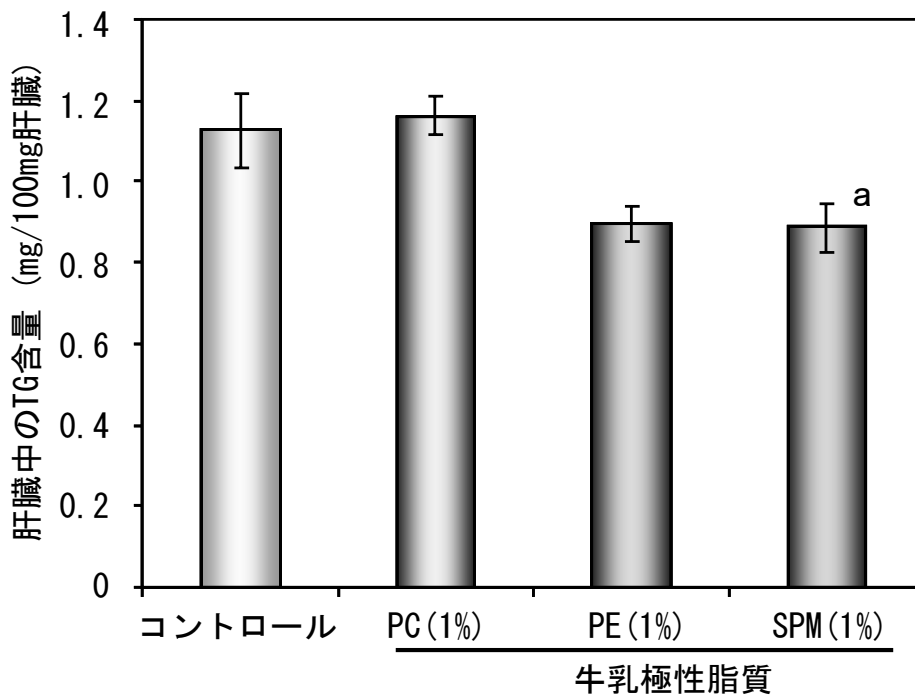


図-4 糖尿病病態マウスの肝臓中トリアシルグリセロール(TG)含量に及ぼす牛乳極性脂質の影響

^aコントロールと比較して有意差あり ($P < 0.05$)

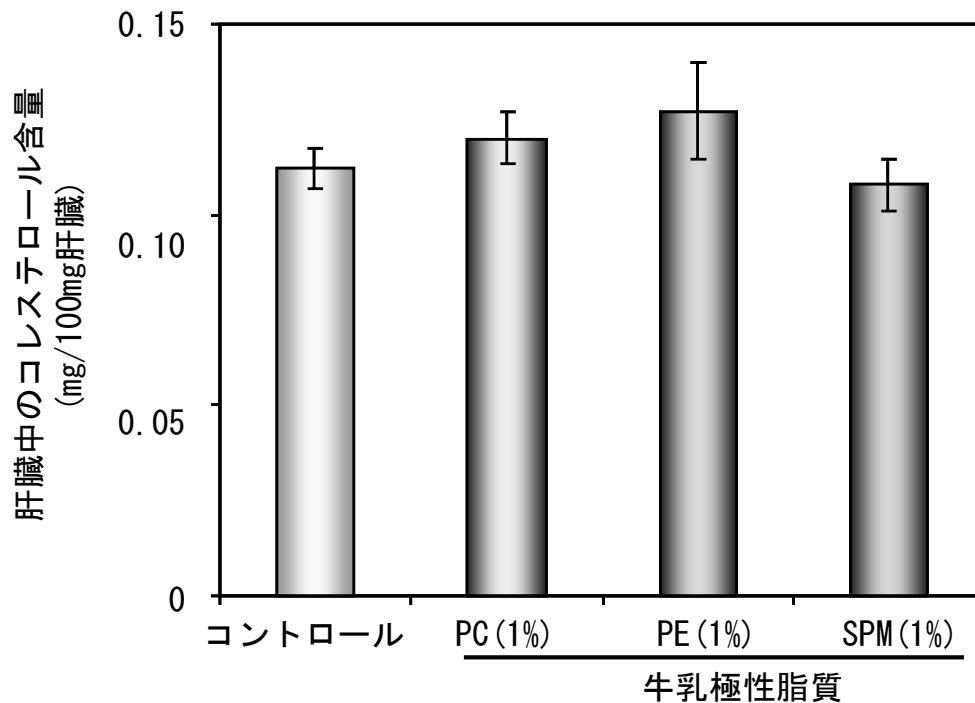


図-5 糖尿病病態マウスの肝臓中コレステロール含量に及ぼす牛乳極性脂質の影響

表-5 肝臓脂質の主な脂肪酸組成

脂肪酸 (wt%)	画分			
	コントロール	PC (1%)	PE (1%)	SPM (1%)
16:0	18.2±0.3	18.3±0.4	19.1±0.7	20.0±0.5 ^a
16:1n-7	1.0±0.1	1.0±0.1	1.1±0.1	1.3±0.1
18:0	6.4±0.5	6.1±0.3	7.9±0.3 ^a	7.8±0.4 ^a
18:1n-9	21.9±0.6	22.5±0.6	20.3±0.8	21.5±0.8
18:1n-7	1.6±0.1	1.5±0.0	1.6±0.1	1.9±0.1
18:2n-6	33.2±0.8	34.6±0.8	31.0±0.7	29.5±0.9 ^b

a, b コントロールと比較して有意差あり (a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$)

表-6 各飼料から抽出した脂質の主な脂肪酸組成

脂肪酸 (wt%)	画分			
	コントロール	PC (1%)	PE (1%)	SPM (1%)
14:0	1.6	1.9	1.6	1.7
16:0	25.5	25.4	24.2	25.3
16:1n-7	2.4	2.3	2.3	2.2
18:0	14.7	14.3	14.8	14.1
18:1n-9	39.6	39.2	40.3	37.0
18:1n-7	2.7	2.7	2.7	2.6
18:2n-6	8.7	8.5	8.7	8.1
18:3n-3	0.4	0.4	0.4	0.4
22:0	-	0.2	0.1	1.3
23:0	-	0.3	-	1.6
24:0	-	0.2	-	1.2

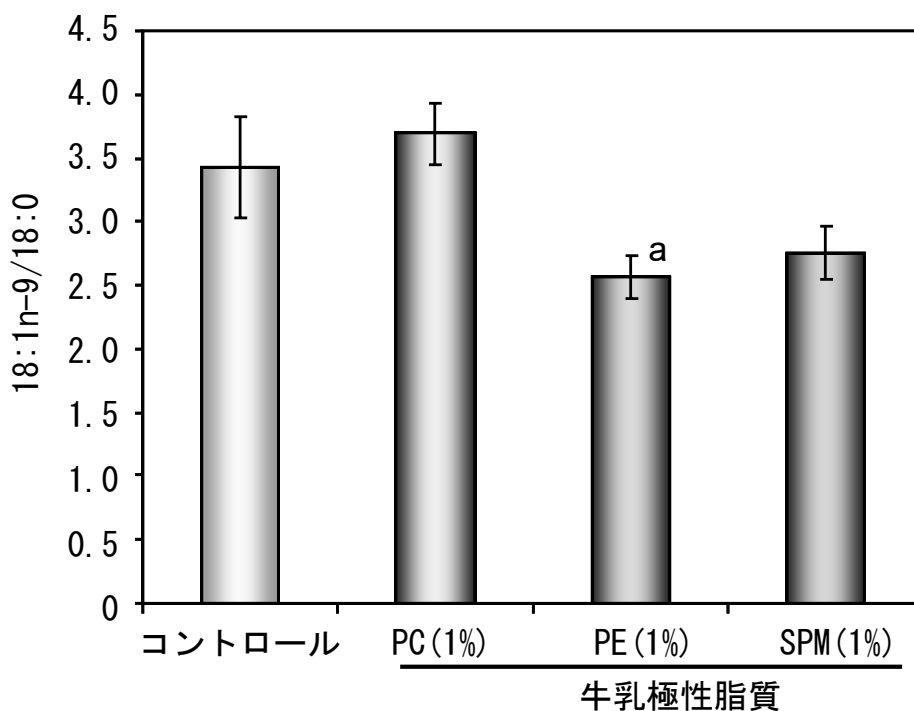


図-6 糖尿病病態マウスの肝臓脂肪酸組成比(18:1n-9/18:0)に及ぼす牛乳極性脂質の影響

^aコントロールと比較して有意差あり ($P < 0.05$)

こうした代謝系への影響を考察する上で重要な点として、飽和脂肪酸(16:0と18:0)からのモノ不飽和脂肪酸(16:1と18:1)への代謝制御が考えられる。そこで、その指標として18-1n-9/18:0を計算したところ(図-6)、コントロール群と比較してPE1%群では有意な減少、SPM1%群でも有意差はつかないものの減少傾向を示すことが明らかになった。生体内では、ステアリン酸CoA不飽和化酵素(SCD1)により、18:0から18:1n-9への合成が行われる。図-6の結果はこの酵素の活性低下を示唆している。そこで、肝臓中でのこのSCD1の遺伝子発現について調べたところ(図-7)、コントロール群と比較して、SPM1%群において有意に発現量が減少しており、PE1%群においても有意差はつかないものの減少傾向にあった。これは対照群と比較して、PE1%群とSPM1%群において18:0の割合が有意に増加し(表-5)、18:1n-9/18:0が減少していた結果(図-6)と一致するものであった。

SCD1は、単に18:0の不飽和化酵素として知られているだけでなく、その活性阻害が、肥満、インシュリン抵抗性、および脂質代謝異常の改善に有効なことが示され注目された。例えば、SCD1をノックアウトしたマウスでは、脂肪酸代謝や熱産生を亢進させ、さらにはインシュリン感受性をも向上させることが明らかにされた(Ntambi JM et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:11482-11486 (2002))。こうしたノックアウトマウスでは、脂質合成系の鍵成分であるSREBP-1とSREBP-1がコードするFASなどの脂肪酸合成酵素系の活性が低下する一方で、CPT-1などの脂肪酸分解系の酵素の活性が向上すること(Sampath H et al., J Biol Chem 282:2483-2493 (2007))、また、コレステロール合成系の酵素活性が阻害されること(Miyazaki M et al., J Biol Chem 275:30132-30138 (2000))も報告された。これらの結果などにより、SCD1は重要な代謝制御因子であると考えられている(Flower, MT and Ntambi JM, Curr Opin Lipidol 19:248-256 (2008); Flowers MT and Ntambi JM, Biochim Biophys Acta 1791:85-91 (2009); Ntambi JM and Miyazaki M, Prog Lipid Res 43:91-104 (2004); Paton CM and Ntambi JM, Am J Physiol Endocrinol Metab 297:E28-E37 (2008); Sampath H and Ntambi JM, Annu Rev Nutr 25:317-340 (2005))。

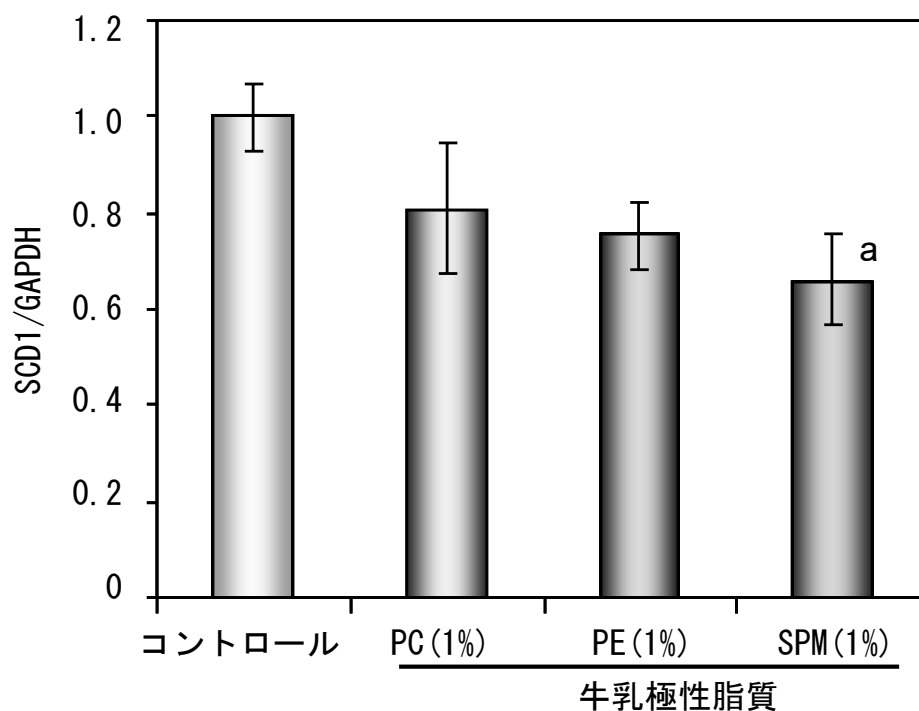


図-7 糖尿病病態マウスの肝臓中SCD1遺伝子発現に及ぼす牛乳極性脂質の影響

^aコントロールと比較して有意差あり ($P < 0.05$)

本研究で得られた、牛乳PEとSPMによるSCD1遺伝子発現制御は、これらの極性脂質投与により観察された脂質代謝制御や糖代謝制御 (図-2~図-4) の分子機構を解明する上で有力な手がかりとなる。現在、SPMの代謝物質として想定されるセラミドとスフィンゴシンを用いた機能性解析を進めているところである。