

# 牛乳由来ペプチドの抗動脈硬化作用に関する研究

東北大・院農・栄養学 駒井 三千夫

共同研究者：白川 仁<sup>1</sup>、定方 めぐみ<sup>1</sup>、後藤 知子<sup>1</sup>、

大日向 耕作<sup>2</sup>、吉川 正明<sup>3</sup>。

## 要 約

S D系ラットを用いて、カゼインの微生物酵素分解物が血中コレステロール値に及ぼす影響を評価するために、高コレステロール・高コール酸食条件下で7週間給餌した。すなわち、*Bacillus thermoproteolyticus* の産生するエンド型プロテアーゼであるサーモリシン消化されたカゼインの消化物をラットに長期投与して、血漿コレステロール値の上昇抑制について検討した。その結果、カゼインのサーモリシン消化物で飼育1週間目から血漿総コレステロール値の上昇抑制が観察され、3週目以降ではカゼイン群よりも平均値で95 mg/dl も低い値が観察された。また、血漿総コレステロール値のほかに、HDL-コレステロール値の改善や血漿トリグリセリド値の改善も観察された。また、カゼイン分解物を単回摂取させた24時間のコレステロール値の変化では、未分解カゼイン摂取で見られた一時的なコレステロール値の上昇が観察されず、単回摂取の場合にも血中コレステロール上昇を抑制していることが示唆された。腸管におけるコレステロール吸収阻害作用により血中コレステロール上昇を抑制するとされている大豆タンパク質給餌と比較して、血漿と肝臓コレステロール代謝および糞便中ステロール排泄が有意に増えていなかったため、カゼイン-サーモリシン分解物の血中コレステロール値上昇抑制効果は、大豆タンパク質とは異なる作用機序を介しているものと考えられた。カゼインサーモリシン分解物のこの作用メカニズムの解明には、さらに詳細な検討を要する。

キーワード: カゼイン分解物、サーモリシン、カゼイン、血漿コレステロール値、糞便中ステロール排泄、コレステロール代謝マーカー遺伝子、ラット

## 結 言

脂質異常症 dyslipidemia は血中の脂質濃度が過剰もしくは過少である状態を指し、生活習慣病について言及する場合、多くは脂質が過剰に存在する高脂血症 hyperlipidemia が問題となる。なかでも高コレステロール血症 hypercholesterolemia は、アテローム性動脈硬化症のリスクファクターとして非常に大きな位置を占めており、放置すれば致死率の高い虚血性心疾患や脳血管疾患へと容易に発展する危険性を秘めている。高コレステロール血症には先天的遺伝子異常に起因する家族性高コレステロール血症も報告されているが、現在発生している多くは食事習慣に依存している。

注：1) 東北大・院農、2) 京大・院農、3) 阪大・フロンティア研

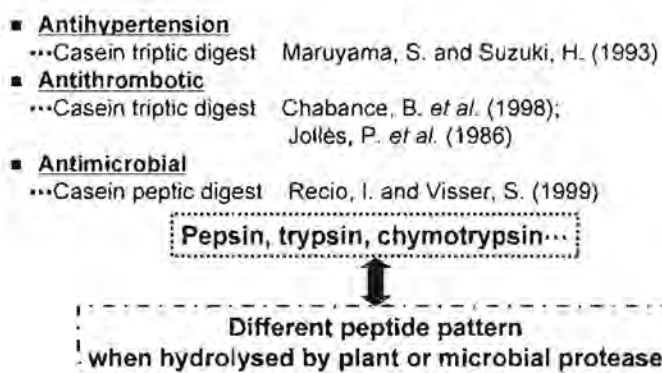
血中コレステロール濃度を低下させる薬剤としてはスタチン系のコレステロール合成阻害剤や、つい最近厚生労働省の認可が下りて発売が開始されたコレステロール吸収阻害剤エゼチミブ（商品名ゼチーア）等、数種の効果的な医薬品が発売されており、投薬治療も可能であるが、食習慣に由来する高コレステロール血症に関しては通常、食餌による予防や改善が奨励されている。

食餌成分の中でも特にタンパク質成分は、血中のコレステロール値に非常に大きな影響を与える。一般に動物性タンパク質（肉類、乳等）に比較して植物性タンパク質（小麦グルテン、大豆タンパク質等）にはコレステロール値を低下させる傾向があることが以前から示されているが、Sirtori らの報告により特に大豆タンパク質に強い血中コレステロール低下作用があることが明らかとなり、先進国において摂取が推奨される食品のひとつとなっている。また近年、Nagaoka らの成果から牛乳の乳清タンパク質も血清コレステロール低下作用を有することが示され、食餌中のタンパク質成分が血中コレステロール濃度に与える影響についてはさまざまなタンパク質種の可能性のみならず、その作用メカニズムについてもいまだ検討の余地が残されている。

食品タンパク質に含まれる微量成分の有無に関する議論はさておき、従前食品タンパク質が血中コレステロール濃度に与える影響の違いを説明するのに、タンパク質種によって異なるアミノ酸組成が指摘されてきた。これはタンパク質が消化管においてアミノ酸単位にまで消化・吸収された後にその作用を発揮すると考えるものであり、もっとも考えうる作用機序であるといえる。しかし、Iwami らおよび Sugano らの研究から、大豆タンパク質中の疎水性の高いアミノ酸配列が消化管内のステロイド化合物と結合してその腸管からの吸収を抑制し、糞便中への排泄を促進するというメカニズムが明らかとなり、タンパク質の機能性がその一次構造に起因する可能性が指摘されることとなった。

多くの報告により、タンパク質を酵素によって加水分解処理すると（すなわち一次構造を改変すると）、通常特別な生理作用を持たない食品タンパク質であっても機能性が付与されたり、機能性をもつものでもそれが強化されるといった現象が観察されている（図1）。さまざまな作用を示す食品タンパク質由来の生理活性ペプチドが数多く単離・同定されていることはよく知られてい

図1 機能性を有するカゼイン酵素分解物の例



るが、この場合はタンパク質中の生理活性を有するペプチド配列が、タンパク質分解酵素処理によって遊離してくることに起因していると考えられる。Chen らは大豆タンパク質のペプシン分解によって免疫刺激能を有するペプチドを単離した。また Suetsuna らはワカメのペプシン分解により、高血圧改善の指標となるアンジオテンシン I 変換酵素 (angiotensin I-converting enzyme: ACE) 阻害活性をもつペプチドを複数単離し、それらの配列を決定している。これらの研究は哺乳動物にも存在するタンパク質消化酵素を用いて食品タンパク質を処理した例である。タンパク質分解を体外で行った場合の分解物が、通常哺乳動物が摂取して消化管内で分解した場合と作用を異にしているのは、体外の条件でさまざまな位置での切断を受けることにより、摂取したのち内因性酵素と接触してもそれ以上切断されない耐性を獲得したペプチド (レジスタントペプチド) が生じるためと考えられている。

しかし、体内に存在しないプロテアーゼで分解した場合はどうであろうか。さまざまな生物種から得られる種々のプロテアーゼは各々固有の基質特異性を有しており、特異性の高低すなわち認識できるアミノ酸配列の厳密さも広い範囲に分布している。したがって種々のプロテアーゼ (もしくはその組み合わせ) で処理することにより生じるペプチド種にも無限の広がりができることになる。食品タンパク質を外因性プロテアーゼで処理した例として、Katsuda らは、豚肉を植物由来プロテアーゼであるパパインで処理した分解物のうち低分子量画分をウサギに給餌し、未処理の豚肉と比較して血漿および肝臓中のコレステロールの増加が抑制されることを見出した。また Megias らは、ヒヨコマメのタンパク質を alcalase<sup>®</sup> および flavourzyme<sup>®</sup> (微生物由来プロテアーゼ) で処理し、金属イオンをキレートするペプチドを単離している。

サーモリシン thermolysin (EC 3.4.24.27) は *Bacillus thermoproteolyticus* の産生するエンド型プロテアーゼで、Zn イオンを活性中心に持つ代表的な中性メタロプロテアーゼである (図 2)。名前の由来の通り、*B. thermoproteolyticus* は高温細菌の一種であり、サーモリシンも優れた耐熱性を有するため、食品を主として皮革・繊維・化粧品等に用いるタンパク質の工業生産における分解加工過程に広く利用されている。*Bacillus* 属はヒトやげっ歯類の腸内フローラにおいて優位種では



## 図2 Thermolysinの説明

- ◆ Endo-type neutral metalloprotease
- ◆ Derived from *Bacillus thermoproteolyticus*
- ◆ Substrate-specificity: hydrolyzes peptide bond at N-terminal side of hydrophobic amino acids
- ◆ Thermostable
- ◆ Widely used for industrial processing of food proteins or food additive

- 2) 大豆タンパク質11Sフラクションのサーモリシン+トリプシン消化物からLSRを検出し、高い効率でLSRが派生していることを見出した。



なく、ゆえにサーモリシンは外因性のプロテアーゼといえる。食品タンパク質をサーモリシンで処理した例では、乾燥カツオ（カツオブシ）、乳タンパク質 $\beta$ -カゼイン、乳清タンパク質 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ゼイン、ゴマタンパク質、豚肉等が報告されており、いずれも分解物中には、ACE阻害活性をもつペプチドが見出された。

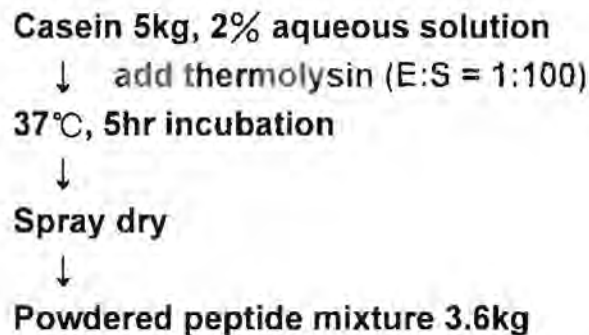
従来、植物タンパク質由来のコレステロール低下ペプチドが知られているが、最近、動物タンパク質からも同様なペプチドが派生することが判明した。図3に機能性を有するカゼイン酵素分解物の例を示した。共同研究を行ってきた京大の吉川らの研究で、低分子トリペプチド LSR (Leu-Ser-Arg) が抗動脈硬化作用を有している可能性が示されたこと、そしてこの LSR を派生する条件設定の実験では、大豆タンパク質からの抗動脈硬化ペプチドの生成効率を高める、このサーモリシンを選定できたこと、またκ-カゼイン由来の casoxin C から LSR を派生させる酵素としてサーモリシンを選定できたことなどから、元々抗動脈硬化作用を有している大豆タンパク質のみならず、カゼインについてもそのサーモリシン消化物が抗動脈硬化作用を有しているものと推察され、食品へのこの微生物酵素処理加工の有効性が示された。

この先行研究から、経口摂取後に消化管内でコレステロール低下ペプチド LSR を派生させる酵素的条件が判明した。すなわち、微生物酵素であるサーモリシン処理とトリプシン（内因性消化酵素）処理を行った消化物では LSR が多く派生した。このため、トリプシンが消化管内で働く経口摂取の場合には、サーモリシン処理のみで消化管内で LSR が多く派生することが期待される。動物に与える長期の実験と、流通する食品に適用する場合のコスト面からも、精製ペプチドを用いることは不可能である。このため、サーモリシン消化乳タンパク質（カゼイン）を高コレステロール血症モデル動物に長期投与して動脈硬化の進展に及ぼす影響を比較した。

## 実験方法

- 1) サーモリシンによるカゼイン分解物の調整 (図4)

図4 カゼイン-thermolysin分解物の調製



【材料】

カゼイン（牛乳由来、ビタミンフリー）：オリエンタル酵母  
 サーマリシン（THERMOASE PC10F）：天野エンザイム

【方法】

ビタミンフリーカゼイン 5kg を水 250L に溶解し 2 % 溶液とした。THERMOASE 粉末 50g を加えて攪拌し、カゼイン：サーモリシン（基質：酵素）= 100：1（w/w）の条件で 37℃ で 5 時間インキュベートし、加水分解反応を行った。反応液を冷却したのちプレートヒーターに移して 97℃ で酵素を達温失活させ、溶液をフィルターでろ過した。プレート型減圧濃縮機において 50℃ で循環濃縮して固形分を 15 % 程度にまで高めたのち、スプレードライヤー（噴霧乾燥器）にて濃縮液を噴霧乾燥し、ペプチド混合物の粉末を得た。ペプチド粉末は - 20℃ で保存した。

2) カゼイン分解物の抗コレステロール血漿効果の動物実験（図 5）

カゼイン-サーモリシン分解物摂取が生体内でのコレステロール代謝に与える影響を見るため、コレステロールおよびコール酸ナトリウムを飼料中に添加してコレステロール値を上昇させた状態でラットに給餌し、未分解のカゼインと長期的摂取による影響を比較した。また、すでにコレ

図5 飼育実験の概要

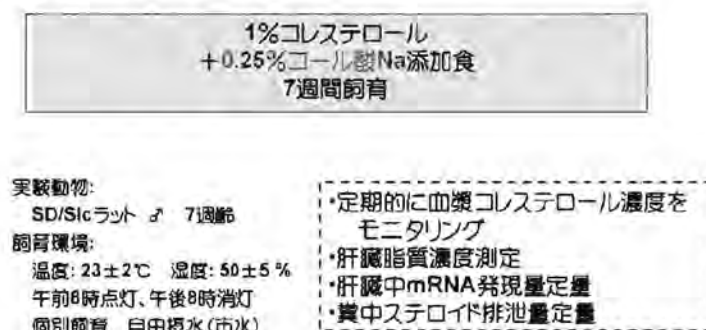


図6 飼料組成

| Ingredient               | (g/kg diet) |         |
|--------------------------|-------------|---------|
|                          | Exp. 1      | Exp. 2  |
| tert-butylhydroquinone   | 0.008       | 0.008   |
| L-Cystine                | 1.8         | 1.8     |
| Choline bitartrate       | 2.5         | 2.5     |
| Sodium cholate           | 2.5         | —       |
| Cholesterol              | 10          | 10      |
| Oriental vitamin mixture | 10          | 10      |
| Oriental mineral mixture | 35          | 35      |
| Soybean oil              | 40          | 40      |
| Cellulose                | 50          | 50      |
| Sucrose                  | 100         | 100     |
| Protein                  | 140         | 140     |
| Corn starch              | 608.192     | 610.692 |

Grouping based on  
protein source:

**C group**

...Casein

**CD group**

...Casein-thermolysin digest

**S group**

...Soy protein isolate

ステロール低下作用が詳細に解析されている分離大豆タンパク質（SPI）、およびそのサーモリシン分解物を同様に給餌し、カゼインを用いた場合と比較した。

#### 【実験動物および飼育環境】

Sprague-Dawley（SD）系ラット、雄性 6 週齢を日本エス・エル・シーより購入した。飼育環境は「東北大学における動物実験に関する指針」に準じ、東北大学農学部動物実験飼育棟において、室温 23±2℃、湿度 50±5%、8 時点灯・20 時消灯の 12 時間明暗サイクルに設定された部屋で金網ケージにて個別飼育した。水は水道水を自由摂水させた。

#### 【飼料】

##### 組成

AIN-93M に準じた 1% コレステロール・0.25% コール酸ナトリウム添加食を基本組成とし、14% のタンパク質成分を群ごとに置換した。組成を図 6 に示した。

##### 調製方法

成分のうち 35g/kg diet 以下の成分を、適宜乳鉢で磨砕しつつよく混合し、ストックしてその都度使用した。そのほかの成分も少ない方から順に乳鉢で少しずつ混合し、沸騰させた蒸留水を適宜加えて団子状にして、金属製容器に入れてラットに与えた。

#### 【実験群】

飼料のタンパク質成分ごとに 4 群に設定した。以下、右に示すように略記する。

- 未分解カゼイン（n=6） ..... C 群（Casein）
- カゼイン-サーモリシン分解物（n=7） ..... CD 群（Casein digested）
- 未分解 SPI（n=6） ..... S 群（SPI）
- SPI-サーモリシン分解物（n=7） ..... SD 群（SPI digested）

SPI-サーモリシン分解物は、カゼインの代わりに SPI（フジプロ F、不二製油）を用いた。

## 【飼育】

### 飼育

ラットは購入後ただちに個別の金網ケージに収容し、水と市販の固型飼料（F-2：船橋農場製）を与えて6日間馴化させた。7日目の13時にラット尾部の末端から約5～10cmの位置にメス刃を5mm程度刺し、静脈血をヘパリン処理済みキャピラリーに計約300μL採取して12000rpm、3分間遠心分離し、血漿サンプルを得、飼育0日目の血漿サンプルとした。以降血漿はすべて－20℃で保存した。採血後に各群それぞれ試験飼料を給餌し、2ないし3日ごとに新しい飼料と交換して、飼育終了時に総摂餌量を算出した。7週間の飼育期間中に週一回体重を測定し、13時～15時の間に絶食はかけずに尾静脈採血を行った。飼育6週目の採血終了後、ラットを代謝ケージに移して3日間馴化させたのち、4日目から48時間分の糞を採取し、個別ケージに戻した。採取した糞はユニパックに入れてステロイド分析開始まで－20℃で保存した。

### 解剖

7週間の飼育ののち、16時間絶食後の午後13時～16時の間に解剖に供した。ジエチルエーテル麻酔下でヘパリン処理した19ゲージ注射針を用い、腹部大動脈より全採血して失血死させた。ただちに肝臓を摘出して重量を測定し、第一葉の約100mgをRNA later（Ambion社）500μLを分注したエッペンドルフチューブにとって、mRNA分析まで－20℃で保存した。同じ葉から再び約100mgを空のエッペンドルフチューブにとって脂質分析用とし、肝臓の残りはユニパックに入れて共に液体窒素で凍結し、分析まで－80℃で保存した。心臓を摘出して剃刀で横半分に切り、生理食塩水で軽く洗浄したのちただちに10%ホルマリン-リン酸緩衝液中に採取して、冠状動脈の組織観察用とした。各種臓器を摘出して重量を測定した。血液は3000rpmで15分間冷却遠心分離して血漿を－20℃で保存した。

### 【分析方法】

市販のキットを用い、各血漿サンプル中の総コレステロール濃度を測定した（コレステロールE-テストワコー：和光純薬）。飼育5週目の尾静脈血漿および解剖後の腹部大動脈血漿に関しては、HDL-コレステロール、トリグリセリド、リン脂質濃度も測定した（それぞれHDL-コレステロールテストワコー、トリグリセリドE-テストワコー、リン脂質C-テストワコー：和光純薬）。LDL-コレステロール濃度はFriedewaldらによる方程式から算出した。

凍結した肝臓サンプルからFolch法で全脂質を抽出し、肝臓中のコレステロール、トリグリセリドおよび総脂質含量を定量した。またRNA laterに採取した肝臓からtotal RNAを抽出し、逆転写反応によりcDNAを合成して、リアルタイム定量RT-PCR法（real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction）を用いて肝臓中の脂質代謝関連遺伝子のmRNA発現量を定量した。

ホルマリン固定した心臓をパラフィン包埋して薄切し、ヘマトキシリン-エオシン染色を施して、顕微鏡観察像から冠状動脈の動脈壁肥厚度を求めた。

凍結乾燥した糞からステロイドを抽出し、ガスクロマトグラフィーで分析して糞中へのステロイド排泄量を定量した。

#### LDL-コレステロール濃度算出法

Friedewald らの方程式により、血漿中の総コレステロール (TC)・HDL-コレステロール (HDL-C)・トリグリセリド (TG) 濃度から LDL-コレステロール濃度 (LDL-C) を算出した。血漿中に存在するコレステロールが VLDL、LDL および HDL のいずれかに必ず含まれていると仮定し、VLDL-コレステロール濃度をトリグリセリド濃度で近似して求める式である。

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - \text{HDL-C} - \text{TG} / 5$$

#### 肝臓中脂質含量定量

Folch らおよび Carr らの方法に準じて行った。氷上の広口試験管に凍結した肝臓サンプル約 100mg を取り、氷冷したクロロホルム：メタノール＝2：1 の抽出液 5mL を加えて 60 秒間氷冷しつつホモジナイズした。液を濾過して濾液を目盛付共栓付試験管に取り、0.05 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1mL を加えて栓をし、1 分間以上攪拌した。氷上に静置して層を分けたのち、3000rpm、4℃で 10 分間遠心分離し、下層クロロホルム層の量を記録した。上層水層をアスピレートして除去し、脂質溶液とした。脂質溶液 1mL を試験管に採取して遠心エバポレーターで減圧乾固したのち、n-ヘキサン 100μL を加え攪拌してさらに減圧乾固して溶媒を完全に除去し、残った脂質の重量を測定して肝臓 1g 中の量を算出し、総脂質量とした。また、脂質溶液 0.6mL を試験管に取り、クロロホルムに溶解した 1 % Triton-X100 (v/v) を 1mL 加え、遠心エバポレーターで減圧乾固した。これに蒸留水 0.5mL を加えて 37℃で 15 分間加温し、よく攪拌して脂質を懸濁した。この懸濁液をサンプルとして市販のキットにアプライし (コレステロール：コレステロール E-テストワコー、トリグリセリド：トリグリセリド E-テストワコー、和光純薬)、酵素比色法でコレステロールおよびトリグリセリドを定量し、肝臓 1g 中の各脂質含量を算出した。

#### 肝臓中 mRNA 発現量測定

##### ・total RNA の抽出

市販 RNA 抽出試薬の ISOGEN (日本 GENE) を用いた。組織サンプルを専用のチューブに 0.1g とり、ISOGEN を 1mL 加えてホモジナイズし、室温で 5 分放置した。これをエッペンドルフチューブに移し、クロロホルム 200μL を加え攪拌して 2～3 分静置した後に 13000rpm、4℃、15 分間遠心分離した。3 層に分かれた後上層のみを分取し、500μL の 2-イソプロパノールを加えて混和し、室温に 10 分間放置した。放置後、13000rpm、4℃で 10 分間遠心分離し、得られた沈殿を 75 %エタノール 500μL で 2 回エタノールリンスした。この沈殿を DEPC  $\text{dH}_2\text{O}$  に溶解させ、一部を吸光度測定 (260nm、280nm) して RNA 濃度を求め、アガロースゲル電気泳動 (0.7 %アガロースゲル、TAE バッファーで 150V、35 分間) に供し RNA 純度検定を行った。

##### ・逆転写反応による cDNA 合成

抽出した total RNA を、前述の濃度検定の結果に基づいて 1μg/μL の濃度になるように DEPC

dH<sub>2</sub>O で溶解し、これを逆転写反応用の 200μL 容 PCR チューブ 2 本に 4μL ずつ分注した（逆転写酵素の添加の有無により RT (+)、RT (-) とした）。DEPC dH<sub>2</sub>O 4μL、10mM dNTP mix 1μL、50μM Oligo dT 1μL をそれぞれのチューブに分注し、PCR Thermal Cycler (Takara) にセットし、65℃で 5 分間加温して RNA を変性させ氷上に 1 分以上静置した。各チューブに 5×RT Buffer 4μL、0.1M DTT 1μL、RNase OUT 0.5μL、DEPC dH<sub>2</sub>O 4.25μL、Super Script III 0.25μL (RT (-) では、DEPC dH<sub>2</sub>O 0.25μL) を加え、チューブを再び PCR Thermal Cycler にセットし、25℃5 分→50℃60 分→70℃15 分で逆転写反応を完了させ、cDNA サンプルを得た。

・リアルタイム定量 RT-PCR での mRNA 発現量定量

96well の反応プレート (Micro Amp: Applied Biosystems) に 1/60 希釈した cDNA サンプル 2μL、SYBR premix EX Taq w/ ROX (Takara) 5.2μL、10nM プライマー各 0.2μL、dH<sub>2</sub>O 3.4μL を加え、リアルタイム PCR 反応を行った (7300 Real Time PCR System)。elongation factor-1 (EF-1) 遺伝子 mRNA 発現量で各遺伝子の発現量を補正し、C 群に対する相対発現量として示した。以下に使用したプライマーの配列を示す。

liver X receptor α (LXRα) :

Fw, ACCTCTGCGATCGAGGTGAT; Rev, AAAGTCTTCCCGGTTGTAAGTGA

cytochrome p450 7A1 (CYP7A1) :

Fw, CTGCCGGTACTAGACAGCATCA; Rev, ACCGTCCTCAAGATGGAGAGTG

ATP-binding cassette G5 (ABCG5) :

Fw, TCTGGGTTGCTCATTGGATCT; Rev, TGGGCATTTCTTCTATGTTTCTGAT

low-density lipoprotein receptor (LDLR) :

Fw, CCAAATGGCATCACACTAGATCTT; Rev, CCGACCACCCCCATTGA

farnesoid X receptor (FXR) :

Fw, AGCGGCATCTCCGATGAGTA; Rev, TCTGGAGAGAGGATGACAATTGC

small heterodimer partner (SHP) :

Fw, ACGCATACCTGAAAGGCACTATC; Rev, CAGGGCTCCAGGACTTCACA

elongation factor-1 :

Fw, GATGGCCCCAAATTCTTGAAG; Rev, GGACCATGTCAATGGGAG

動脈壁肥厚測定

10 %ホルマリン-リン酸緩衝液中にて固定した心臓サンプルをメッシュ袋に移し、軽く水洗したのち 50 %～無水のエタノールシリーズに浸漬して脱水した。トルエンに浸漬して透徹し、メッシュ袋から金属製サンプルかごに移して約 70℃の恒温機中にてトルエン:パラフィン= 1: 1 ~パラフィンに浸してパラフィン (メルク、融点 56 ~ 58℃) を滲透させた。パラフィンプロックに包埋したのち成形して木製ブロックに融着させ、回転式マイクロトームにて厚さ 4μm の連続切片を作成した。薄切は採取時の切断面 (心室中隔と垂直かつ心房と心室を分断する面)

と平行な面の切片が得られるように行い、心臓下部（心室側）の3か所から連続切片を得た。40℃の伸展機上にて、卵白グリセリンを接着剤として切片をスライドガラスに貼付した。スライドガラスごとキシレン〜エタノールシリーズで切片中のパラフィンを除去し、Meyer のヘマトキシリン染色液で核を、エオシン水溶液で細胞質を染色した。再度エタノールシリーズで脱水してキシレンで透徹し、有機系封入剤（Entellan Neu:Merck）を用いて封入して乾燥させ、組織観察に供した。

顕微鏡下で各個体の切片から10か所の冠状動脈を選び、接眼レンズ中のスケールで動脈内腔の直径（楕円形の場合は長径と短径の平均）および内中膜の厚さを測定し、内中膜厚/内腔径の比を求めて冠状動脈の内中膜肥厚度（intima-media thickness：IMT）とした。

#### 糞中ステロイド排泄量定量

##### ・抽出

採取した糞を真空凍結乾燥し、重量を測定した。乾燥した糞を磨砕して粉末とし、均一化したもの約100mgを共栓付試験管に採取し重量を記録した。100 %エタノール10mL および内部標準物質として 5 $\alpha$ -cholestane（シグマ、中性ステロイド用）500 $\mu$ g、23-nordeoxycholic acid（Steraloids 社、酸性ステロイド用）250 $\mu$ g を加え、70℃のウォーターバスで1時間抽出した。3000rpm で10分間遠心分離して糞の粉末を沈殿させ、上清を別の共栓付試験管に移して、残渣に再び100 %エタノールを加えて計3回同様に抽出した。上清は沸騰石を加えて90℃のウォーターバス中でエタノールを留去し、抽出液を濃縮した。完全にエタノールを蒸発させたのち、1.25N NaOH 3mL を加えて120℃で6時間オートクレーブにかけ、アルカリ存在下でエステル結合のケン化およびグリシン・タウリン抱合基の脱抱合を行った。ジエチルエーテル5mL を加えて計3回中性ステロイドを抽出し、別のネジロ試験管に採取して-20℃で保存した。抽出後のアルカリ性の水層にpH 指示薬として0.1 %コンゴレッドを加え、6N HCl を溶液が青くなるまで加えたのち、ジエチルエーテル5mL で計3回酸性ステロイドを抽出して、別のネジロ試験管で-20℃に保存した。以降溶媒除去はN<sub>2</sub>気流下、40℃湯浴中で行った。

##### ・中性ステロイド分析

抽出液をスピットチューブに少量採取し、ジエチルエーテルを除去して少量のメタノールを加え、共沸させて水分を完全に除去した。TMS 化試薬0.2mL を加えて30分間室温でTMS 化反応を行った。TMS 化試薬を除去したのち脱水した酢酸エチル1mL を加えてステロイド誘導体を溶解させ、3000rpm で5分間遠心分離して上清を別のスピットチューブに移した。酢酸エチルを除去してステロイドを一定量のヘキサンに溶解し、これをガスクロマトグラフィーのサンプルとしてアプライした。機器はGC2014（SHIMADZU）、カラムはSPB-1（Supelco 社）を用い、注入部300℃、カラム280℃、検出器300℃で分離し、FID で検出した。5 $\alpha$ -cholestane に対する相対保持時間からコレステロールおよびコプロスタノールのピークを同定し、各ピーク面積および48時間採取した乾燥糞重量から一日当たりのコレステロールおよびコプロスタノールの排

泄量を求め、これらの和を中性ステロイド排泄量とした。

#### ・酸性ステロイド分析

抽出液をスピッツチューブに少量採取して溶媒を除去し、ジエチルエーテル：メタノール＝9:1を1～2mL加えた。ジアゾメタンのジエチルエーテル溶液を液が黄色になるまで加え、室温で30分間メチル化反応を行った。溶媒を除去したのち無水酢酸1mLを加えて、ドライブロックにて140℃で2時間アセチル化反応を行った。無水酢酸を除去し、ステロイドをアセトンに溶解してガスクロマトグラフィーのサンプルとしてアプライした。機器はGC-8A、カラムはAN-600パッキドカラムを用い、注入部300℃、カラム260℃、検出器300℃で分離し、FIDで検出した。23-nordeoxycholic acidに対する相対保持時間からリトコール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、ヒオデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、コール酸および $\alpha$ - $\beta$ - $\omega$ -ムリコール酸のピークを同定し、各ピーク面積および48時間採取した乾燥糞量から一日当たりの各胆汁酸の排泄量を求め、これらの和を酸性ステロイド排泄量とした。

#### 【統計処理法】

経日的変化については repeated measure analysis of variance (repeated measure ANOVA：重複測定分散分析)を、その他には Student の t 検定を用い、危険率5%未満で有意な差とみなした。また本節における実験はタンパク質のサーモリシン分解による影響を観察することを目的として行ったので、有意差検定は各タンパク質の未分解物群と分解物群の間でのみ行い、異なるタンパク質間では傾向のみを観察した。

## 結果と考察

### 飼育の経過

各群の摂食量と体重の変化を表1に示した。両タンパク質において、未分解物群に比較して分解物群でわずかに体重増加量が多い傾向にあったが、有意な差は見られなかった。タンパク質のプロテアーゼ分解物に関しては未分解物との比較検討が多数行われているが、多くの報告において体重増加に影響がないとの結論が多い。しかしながらこれらの報告は主に消化器障害等の患者の栄養摂取を視野に入れて行われているもので、酵素は内因性のペプシン、トリプシン等が使用される頻度が高い。したがって、本節で観察された変化はわずかながら、サーモリシン分解物に特有である可能性がある。また、全体としてSPIを用いた2群ではカゼインを用いた2群に比較して体重増加が小さい傾向にあったが、SPIに含まれているトリプシンインヒビターや、大豆の主要な貯蔵タンパク質である $\beta$ -コングリシニン由来のペプチドが、ラットの食欲および体重増加量を低下させる現象が報告されている。

総摂餌量（乾燥重量）および体重増加量から飼料効率 food efficiency ratio (FER) を求めた（表1）。総摂餌量はカゼイン2群ではほぼ差がなく、S群に比較してSD群でわずかに高い傾向にあった。これは前述の大豆タンパク質由来ペプチドの特性による影響のほかに、水分補正の際の誤差

表 1 Effect of thermolysin-hydrolysed casein on total food intake, FER and weight of various tissues

|                                   | C             | CD            | S             | SD            |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Body weight gain (g)              | 247.0 ± 13.2  | 252.5 ± 9.4   | 218.6 ± 11.8  | 257.1 ± 10.3  |
| Total food intake (g)             | 1146.8 ± 81.4 | 1123.3 ± 37.4 | 1202.6 ± 52.8 | 1290.4 ± 57.2 |
| Food efficiency ratio             | 0.221 ± 0.021 | 0.225 ± 0.003 | 0.182 ± 0.007 | 0.200 ± 0.005 |
| Tissue weight (/100g body weight) |               |               |               |               |
| Liver (g)                         | 5.22 ± 0.29   | 5.63 ± 0.17   | 5.31 ± 0.29   | 5.53 ± 0.26   |
| Kidney (g)                        | 0.590 ± 0.019 | 0.605 ± 0.015 | 0.607 ± 0.016 | 0.596 ± 0.016 |
| Adrenal (mg)                      | 14.3 ± 1.3    | 12.4 ± 0.7    | 13.5 ± 0.9    | 11.1 ± 0.7    |
| Perirenal fat pad (g)             | 2.48 ± 0.35   | 2.91 ± 0.20   | 2.96 ± 0.29   | 3.00 ± 0.12   |
| Heart (g)                         | 0.290 ± 0.012 | 0.305 ± 0.007 | 0.307 ± 0.013 | 0.292 ± 0.012 |

Values are means ± SEM. n=6-7. No statistical difference was observed compared to each non-digested control group.

と見ることもできる。FER では、体重増加量の差異を反映してカゼイン 2 群が SPI の 2 群よりも高い傾向を示した。

本実験で用いたのは団子状の練り餌であったが、未分解のタンパク質を用いた場合と分解物とで、飼料の物性に少なからず違いがあった。未分解タンパク質の方は団子状にして放置し乾燥したのちも粉末としての性質を保っていたが、分解物はおそらくはその親水性のため、加水によって団子は柔らかく粘性を帯び、乾燥させると硬度が増す傾向にあった。これを反映して飼料摂餌量の水分補正の際の係数も変化し、経時的な乾燥の進行具合も異なるため、表 1 に示した総摂餌量および FER の値の信頼性については疑問が残る。分解物と未分解物の飼料物性の差を除くためには、粉末飼料の形態で給餌するのが適当であると考えられた。

#### 臓器重量

解剖時に摘出した肝臓、腎臓、副腎、腎周囲脂肪および心臓の重量を表 1 に併せて示した。各臓器とも群間に差はなく、未分解物の副腎が分解物に比較して重い傾向に見えるが、実際の重量はほぼ同じであった（未掲載データ）。よって観察された差は体重に対する相対重量で表したことに起因すると考えられた。

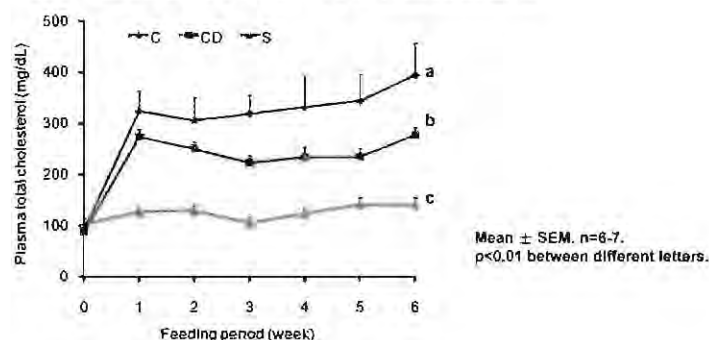
肝臓重量は群間に差は見られなかったが、コレステロール・コール酸無添加の食餌で同様に飼育した際には平均約 2.8g/100g BW（未掲載データ）であり、コレステロール・コール酸の慢性的摂取によりおよそ 2 倍にまで肥大していることがわかった。解剖所見においても各群とも重度の肝臓脂肪化を引き起こしており、腫れあがるように肥大し、色は白色がかり、ピンセットでつまむと容易に破れた（高「コレステロール+コール酸ナトリウム」食による影響が出ている）。

#### 血漿総コレステロール濃度の経日変化

一週間毎に尾静脈から採取した血漿を分析して、総コレステロール値の変化を見た（図 7）。SPI

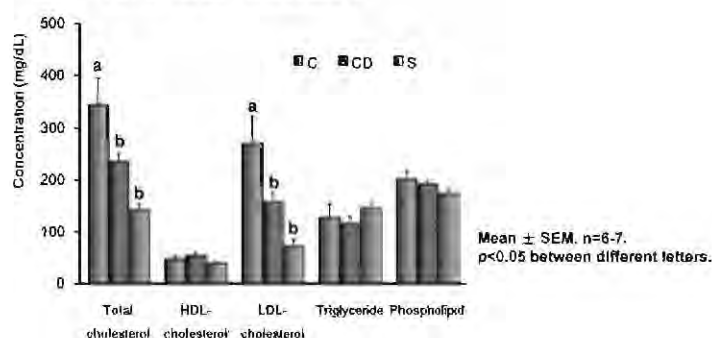
(1%コレステロール + 0.25%コール酸Na添加食 7週間飼育)

図7 血漿総コレステロール値の経日的変化



(1%コレステロール+0.25%コール酸Na添加食 7週間飼育)

図8 飼育5週目の血漿脂質



の2群ではコレステロールを摂取しているにもかかわらず血中の総コレステロール値は顕著な上昇を見せず、常に 150mg/dL 未満の値に保たれていた（以降、SPI のサーモリシン分解物群の測定データはほとんど同じであったため、省略する）。一方カゼインの2群では飼育開始からコレステロール値が大幅に上昇し、飼育開始1週目ではすでに 300mg/dL 前後にまで上昇していた。しかし驚くべきことに、C群では 300mg/dL 以上の値が保たれていたにもかかわらず、CD群では1週目から徐々に低下傾向を見せ、3週目以降は 230mg/dL 程度の値にまでコレステロール値の上昇が有意に抑制されており、カゼイン-サーモリシン分解物の血漿コレステロール上昇抑制作用が顕著に観察された。

なお、未公表の関係でデータは記載しないが、カゼイン分解物を単回摂取させた24時間のコレステロール値の変化では、未分解カゼイン摂取で見られた一時的なコレステロール値の上昇が観察されず、単回摂取の場合にも血中コレステロール上昇を抑制していることが示唆された。

#### 飼育5週目の血漿脂質

飼育5週目においては、C群に比較してCD群で総コレステロール値の上昇が40%程度まで抑制されていた。そこで5週目の血漿サンプルを用いて血中脂質の詳細な分析を行った（図8）。

HDL-コレステロール、トリグリセリドには分解物と未分解物の間で大きな差はなかったが、LDL-コレステロールにおいてはCD群でC群に比較して有意な低下を示し、総コレステロールの差異を反映した結果となった。リン脂質濃度には差は見られなかった。げっ歯類の血中LDL-コレステロールの値は通常比較的低値に保たれているが、カゼイン2群においては高コレステロール・高コール酸添加食の長期摂取によって、肝臓より分泌されたVLDLから代謝されて生じるLDLが血中に蓄積していると考えられた。

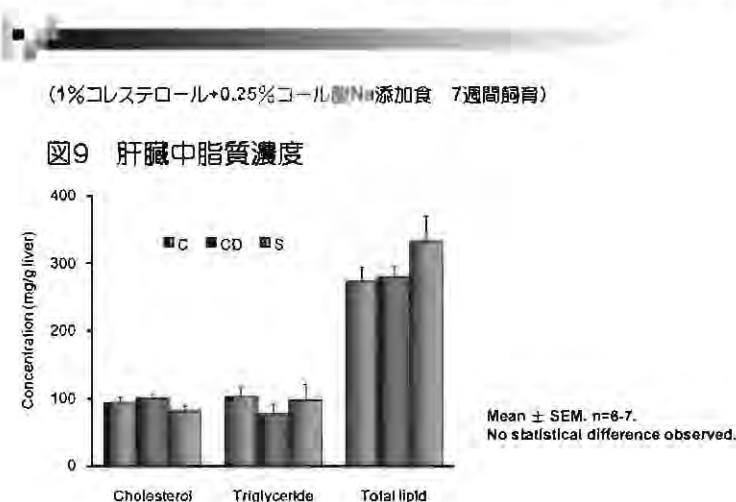
肝細胞中に脂質が蓄積しはじめると、細胞は過剰な蓄積を防ぐためにVLDL等のリポタンパク質分泌を亢進させるが、それにもかかわらず脂質が過剰に蓄積すると逆にリポタンパク質分泌が障害されることが分かっている。血漿トリグリセリド濃度は主としてVLDL量の指標となるが、血漿トリグリセリド濃度では傾向としてSPIの2群でカゼインの2群よりも高く、リポタンパク質分泌不全がSPI給餌により改善されている可能性が示唆された。

#### 解剖時の腹部大動脈血漿中の脂質濃度

5週目の値（採血時刻13時～15時、絶食なし）と比較して、16時間絶食後の腹部大動脈血中では全体的に脂質濃度の低下がみられた。総コレステロールではC群に比較してCD群で有意に低値であり、興味深いことにHDL-コレステロール濃度はC群でCD群に対して有意に高かった。また、5週目のHDL-コレステロールと比較してみると、C群では解剖後血漿においてHDL-コレステロールが増加傾向にあることが分かった。HDLは末梢から肝臓へのコレステロールの輸送を担っているとされている。この場合では、絶食中に肝臓でのコレステロール負荷が軽減されたことによる、コレステロール逆転送系の活性化に起因しているとも考えられる。

#### 肝臓中脂質含量

体内の過剰なコレステロールを処理する役割を持ち、コレステロールに対する感受性の最も高い臓器が肝臓である。解剖時に観察されたように全群において脂質含量が劇的に増加しており、重度の脂肪化を起こしていた（図9）。通常のコレステロール無添加食で飼育した場合は5mg/g liver未満（データ未掲載）であるコレステロールが、本実験系では80～100mg/g liverまで蓄積



し、トリグリセリドも通常の約2倍であった。分解物群とコントロール群の間には有意差は観察されなかった。のみならず、これまでの報告で肝臓へのコレステロール蓄積を抑制する効果が報告されている SPI 群においても、カゼイン2群に対して蓄積抑制傾向にはあるものの約80mg/g liver までコレステロール蓄積が進行しており、1%コレステロール・0.25%コール酸ナトリウム添加という本実験での飼料条件がSPIの効果を上回っていることが示唆された。

過剰量のコレステロールの存在によって遊離のコレステロールが細胞内に蓄積すると細胞毒性を示すため、肝細胞は自己防御機構として脂肪酸合成系を活性化してコレステロールを脂肪酸エステル化し、細胞内の脂肪滴に貯蔵しようとする。これによってトリグリセリド合成も亢進し、脂肪化に至ると考えられている。こういった現象は肝細胞のほかに、アテローム（動脈硬化粥腫）中のマクロファージにおいても観察される。

### 糞中ステロイド排泄量

中性および酸性ステロイド排泄量をガスクロマトグラフィーによって定量した（表2、図10、図11）。腸管内のコレステロールは食餌、胆汁または剥脱した上皮細胞のいずれかに由来し、コレステロールのままもしくは腸内細菌の代謝によりコプロスタノールに変換されるかして糞中に排泄される。これらは中性ステロイドと呼ばれる。一方肝臓で合成され胆汁中に排泄される胆汁酸は主にコール酸（CA）とケノデオキシコール酸（CDCA）、およびラットではこれに加えて $\alpha$ -ムリコール酸（ $\alpha$ -MCA）、 $\beta$ -ムリコール酸（ $\beta$ -MCA）の4種があり、腸内細菌による脱水酸化、酸

表2 Effect of thermolysin-hydrolysed casein on coronary intima-media thickness (IMT) and fecal steroid excretion

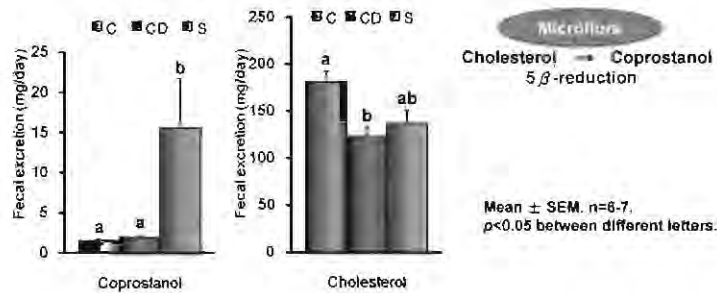
|                                                                      | C                                  | CD                                   | S                                  | SD                                 |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Intima media thickness (thickness/arterial internal diameter)</b> |                                    |                                      |                                    |                                    |
|                                                                      | 0.22 $\pm$ 0.02                    | 0.18 $\pm$ 0.01                      | 0.19 $\pm$ 0.01                    | 0.28 $\pm$ 0.04*                   |
| <b>Neutral steroid excretion (mg/day)</b>                            |                                    |                                      |                                    |                                    |
| cholesterol                                                          | 181.5 $\pm$ 11.0                   | 123.6 $\pm$ 10.1**                   | 137.3 $\pm$ 16.1                   | 152.8 $\pm$ 9.1                    |
| coprostanol                                                          | 1.6 $\pm$ 0.2                      | 2.0 $\pm$ 0.1*                       | 1.5 $\pm$ 0.1                      | 10.3 $\pm$ 5.8                     |
| <b>Total</b>                                                         | <b>183.1 <math>\pm</math> 11.1</b> | <b>125.6 <math>\pm</math> 10.1**</b> | <b>152.9 <math>\pm</math> 13.7</b> | <b>163.1 <math>\pm</math> 13.1</b> |
| <b>Acidic steroid excretion (mg/day)</b>                             |                                    |                                      |                                    |                                    |
| LCA                                                                  | 1.3 $\pm$ 0.3                      | 1.3 $\pm$ 0.1                        | 1.9 $\pm$ 0.3                      | 1.2 $\pm$ 0.1*                     |
| DCA                                                                  | 24.8 $\pm$ 3.2                     | 21.3 $\pm$ 1.7                       | 27.0 $\pm$ 3.1                     | 28.3 $\pm$ 3.4                     |
| CDCA                                                                 | 0.6 $\pm$ 0.3                      | 0.3 $\pm$ 0.1                        | 0.7 $\pm$ 0.2                      | 1.0 $\pm$ 0.3                      |
| HDCA                                                                 | 0.2 $\pm$ 0.1                      | 0.3 $\pm$ 0.1                        | 0.6 $\pm$ 0.2                      | 0.2 $\pm$ 0.1                      |
| UDCA                                                                 | 2.8 $\pm$ 0.5                      | 2.9 $\pm$ 0.5                        | 4.1 $\pm$ 0.8                      | 3.6 $\pm$ 0.3                      |
| CA                                                                   | 7.5 $\pm$ 2.8                      | 4.2 $\pm$ 1.0                        | 4.3 $\pm$ 0.4                      | 11.8 $\pm$ 1.5**                   |
| $\alpha$ -, $\omega$ -MCA                                            | 6.9 $\pm$ 0.9                      | 8.5 $\pm$ 1.4                        | 7.7 $\pm$ 0.7                      | 7.7 $\pm$ 1.0                      |
| $\beta$ -MCA                                                         | 8.3 $\pm$ 1.1                      | 9.3 $\pm$ 1.3                        | 8.5 $\pm$ 0.8                      | 8.7 $\pm$ 0.8                      |
| <b>Total</b>                                                         | <b>52.3 <math>\pm</math> 3.9</b>   | <b>48.0 <math>\pm</math> 4.4</b>     | <b>54.8 <math>\pm</math> 5.4</b>   | <b>62.5 <math>\pm</math> 4.6</b>   |
| <b>Total steroid excretion (mg/day)</b>                              |                                    |                                      |                                    |                                    |
|                                                                      | 235.4 $\pm$ 14.6                   | 173.6 $\pm$ 14.0**                   | 207.7 $\pm$ 17.9                   | 225.6 $\pm$ 17.4                   |

Values are means  $\pm$  SEM. n=5, \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared to each non-digested control group.

（表2の脚注の説明）Abbreviations: LCA, lithocholic acid; DCA, deoxycholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; HDCA, hyodeoxycholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid; CA, cholic acid;  $\alpha$ -,  $\omega$ -MCA,  $\alpha$ - and  $\omega$ -muricholic acid;  $\beta$ -MCA,  $\beta$ -muricholic acid.

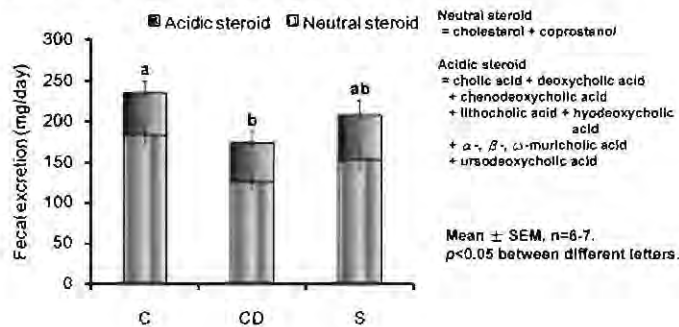
(1%コレステロール+0.25%コール酸Na添加食 7週間飼育)

図10 糞中中性ステロイド排泄量



(1%コレステロール+0.25%コール酸Na添加食 7週間飼育)

図11 糞中ステロイド排泄量



化還元および異性化を受けるとそれぞれデオキシコール酸 (DCA)、リトコール酸 (LCA) もしくはウルソデオキシコール酸 (UDCA)、 $\omega$ -ムリコール酸 ( $\omega$ -MCA)、ヒオデオキシコール酸 (HDCA) へと変換されて糞中に排泄され、これらを総称して酸性ステロイドと分類される。個々のステロイド化合物排泄量とその和を求め、一日当たりの排泄量として示した。

カゼイン-サーモリシン分解物の血中コレステロール上昇抑制作用から、糞中へのステロイド排泄量は増加しているものと推測したが、予想に反して中性ステロイド排泄量はC群に比較してCD群で有意に低値を示した。酸性ステロイド排泄量にはほぼ差はなく、総ステロイド排泄量はCD群でC群に対し有意に低値となった。また個々のステロイド種を見ていくと、コレステロール排泄量はCD群で有意に低いものの、コプロスタノールは30%程度有意に増加していた。この変化はSPIの2群でも観察され、コプロスタノール排泄量がカゼイン2群に比較して高い傾向にあった。SPIの場合は、コレステロールの吸収阻害作用によって腸管内に保持されるコレステロール量が相対的に増加し、腸内細菌に代謝される環境にある分子の割合が高まっていると推定されるが、CD群におけるコプロスタノール排泄の増加が同様の機構によるものであるかは不明である。発酵

乳の摂取により、通常の牛乳摂取よりもコプロスタノール排泄量が増加するという報告も存在する。

中性ステロイドに関しては、飼料へのコール酸添加に起因する胆汁酸プールの増加により肝臓での CYP7A1 活性は低下していると考えられ、糞中に排泄されるコレステロールには、酸化的代謝を受けずに肝臓から排泄されたものと食餌に直接由来するものとが混在していると推測された。

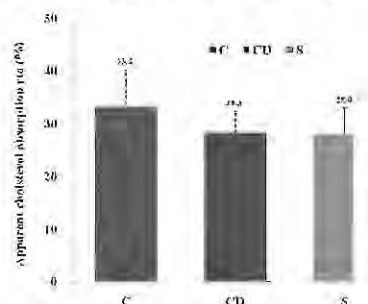
SPI の 2 群の間では中性・酸性ステロイドの総排泄量およびその和に差は見られなかったが、個々のステロイドに関しては LCA 量が SD 群で S 群に対して有意に低く、CA 量が多い結果となつて、カゼイン 2 群におけるサーモリシン分解の影響とは異なる傾向が見られた。CA 排泄量の増加は、飼料に由来する（もしくは吸収されて肝臓から排泄された）CA を捕捉する能力が SPI のサーモリシン分解によって高まっている結果とも考えられる。同様の現象が、Sugano らの大豆タンパク質加水分解物の高分子量画分で観察されている。

全群を通じて酸性ステロイドでは DCA が最も多く、これはほとんどが飼料中の CA（もしくは肝臓から排泄された CA）が代謝されて生じたものと推定できる。CA および DCA の CA 系胆汁酸を除けばもっとも多いのが  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\omega$ -MCA および HDCA の MCA 系胆汁酸であった。げっ歯類ではヒトと異なり、肝臓においてステロイド 6 $\beta$ -水酸化酵素が発現しているため、 $\alpha$ -MCA (3 $\alpha$ 6 $\beta$ 7 $\alpha$ ) や  $\beta$ -MCA (3 $\alpha$ 6 $\beta$ 7 $\beta$ ) 等ムリコール酸系胆汁酸合成の経路が存在している。

糞サンプル採取時のコレステロール摂取量および糞中中性ステロール排泄量より、見かけのコレステロール吸収率を求めた（図 12）。CD 群、SD 群においてそれぞれ C 群、S 群と比較して有意に上昇しており、タンパク質のサーモリシン分解により摂取コレステロールの吸収率が上昇しているようにも見えるが、計算に用いている中性ステロール排泄量には食餌由来だけでなく肝臓から分泌されたコレステロールも含まれていること、および吸収されたのち胆汁酸として排泄されるコレステロール分子が存在することには注意が必要である。

また、本実験で定量した 10 種のステロイドのほかにもヒドロキシル基が酸化されてケト体に変換されているものが存在するため、これらを含めると糞中に存在するステロイド化合物の種類は膨大な数に上るが、個々の存在量はマイナーであるのでここでは考察を省いた。

図 12 見かけのコレステロール吸収率に及ぼすカゼインのサーモリシン処理物の影響



Values are means  $\pm$  SEM, n=6-7. No statistical difference was observed.  
Apparent cholesterol absorption rate was calculated with following equation:  
Absorption rate (%) = ((cholesterol intake mg/day) - (neutral steroid excretion mg/day))  
times by 100 / (cholesterol intake mg/day)

### 冠状動脈内中膜肥厚度

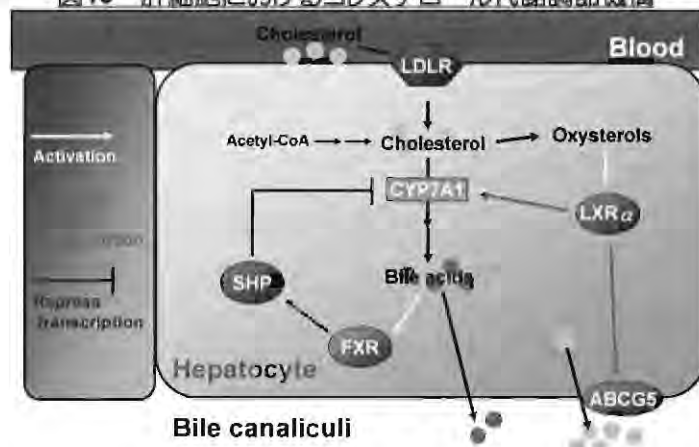
表2の上段に、顕微鏡観察像から求めた冠状動脈の内中膜肥厚度を示した。高脂血症モデル動物である脳卒中易発性高血圧自然発症ラット（SHR-SP：stroke-prone spontaneously hypertensive rat）などと異なり、通常ラットでは高脂血症によって誘導されるアテローム性動脈硬化病変は観察されないが、C群の血漿総コレステロール値が非常に高い値で推移していたことを鑑み、解剖後に心臓冠状動脈の動脈壁肥厚度を観察した。動脈内腔の直径に対する内膜・中膜の厚さの割合はC群に比較してCD群で低い傾向にあったが、有意な差は見られなかった。血中のLDLが酸化されて生じる酸化LDLは、血管壁に対する酸化ストレスを憎悪し肥厚を促進すると考えられ、カゼイン-サーモリシン分解物がコレステロール上昇抑制効果によってストレスを軽減しているとも説明できた。しかし、SD群ではS群に比較して有意に高い値を示し、SPIのサーモリシン分解により予期せぬ影響が見られた結果となった。4群を通してみるとこれらの値は必ずしも血漿コレステロール値を反映しておらず、血中脂質濃度とは独立した、もしくは依存度の低い表現型であると見られる。動脈壁の過形成 hyperplasia にはむしろ血圧や炎症性シグナルが重要な因子として関与してくると考えられ、サーモリシン分解SPIがこれらの因子に影響を与える可能性が示唆された。しかしこれらの肥厚度の値は、SHR-SPとは異なり全群において正常の範囲内と考えられる。

### 肝臓中 mRNA 発現量

肝臓中のコレステロール代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を定量した（図13、図14）。全体としてカゼインの2群に対してSPIの2群で発現量が低い傾向にあったが、カゼインではコントロール群と分解物群との間に有意差は観察されなかった。測定した遺伝子はいずれも、細胞中のコレステロールもしくは胆汁酸の存在によって（一次的には）転写が促進されるものである。コレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素（cytochrome P450 7A1：CYP7A1）は肝臓におけるコレステロール異化の律速酵素であり、胆汁酸合成経路の初段階を担っている。細胞内のコレステロールが酸化されて生ずるオキシステロールが核内受容体である liver X receptor（LXR $\alpha$ ）に結合すると、LXR $\alpha$ は活性化して核内に移行し、CYP7A1 やステロール膜輸送タンパク質 ABCG5 の mRNA 転写を促進することが知られている。また farnesoid X receptor（FXR）は胆汁酸をリガンドとして活性化し、small heterodimer partner（SHP）の転写を促進する。SHP タンパク質は CYP7A1 遺伝子のプロモーター領域で転写因子を不活性化し、CYP7A1 遺伝子の転写活性化を抑制することで、過剰な胆汁酸合成を抑えるフィードバックの働きをしている。

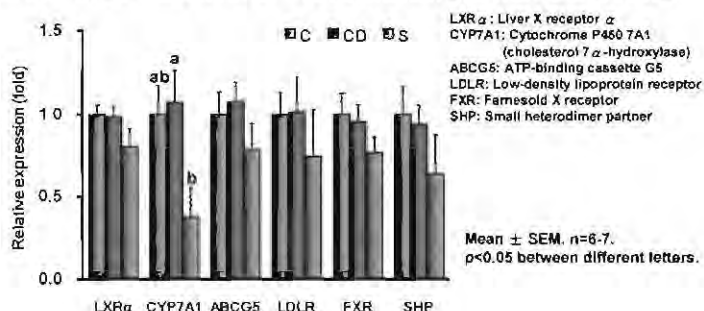
以上のことから、今回観察された SPI の2群での全体的なコレステロール代謝関連遺伝子発現の低下傾向は、コレステロールおよび胆汁酸の肝臓中の量がカゼイン2群に比較して少ないことを示すとも考えられるが、実際測定された肝臓中コレステロール量はカゼイン群と SPI 群とではほぼ同等であった（データ未記載）。これは核内受容体に結合できる状態のコレステロールもしくは胆汁酸分子が少なかったためとも考察できるが、近年の報告では、小腸上皮細胞が認識した胆汁酸量依存的に血中に分泌されるシグナル分子が肝臓に至り、肝臓での遺伝子発現を調節する機構

図13 肝細胞におけるコレステロール代謝調節機構



(1%コレステロール+0.25%コール酸Na添加食 7週間飼育)

図14 肝臓中コレステロール代謝関連遺伝子mRNA発現量



が提唱されている。このように遺伝子発現調節機構はフィードバックが入り組んでいてダイナミックであり、さらに食餌由来のコレステロールおよびコール酸が高いレベルで存在する本実験系では、このデータだけでは仮説の構築は困難であった。

## 考 察

本実験系（1%コレステロール・0.25%コール酸ナトリウム添加食、7週間飼育）の飼料組成は本来動脈硬化モデル動物の作出に用いられていたもので、Paigen diet と呼ばれる 15%ココアバター、1.25%コレステロール、0.5%コール酸添加食から高脂肪を除き、コレステロール・コール酸の添加量を少しくマイルドにしたものである。コール酸を添加することによって、胆汁酸ミセル形成が促進されて小腸上皮細胞からのコレステロール吸収が増加するとともに、コール酸自体が吸収されると肝臓では FXR-SHP が活性化して CYP7A1 遺伝子の発現が抑えられるので、胆汁酸へのコレステロール異化経路が抑制されて血中に分泌されるコレステロール量が上昇し、動脈硬化発症頻度が増大する。Paigen diet はマウス・ラット・ウサギ等の動物種や、遺伝子改変動物

も含めた異なる系統のマウスの間での動脈硬化感受性の違いを評価するために考案されたものであったため、コレステロール代謝にはかなり激しい影響を与える条件である。げっ歯類ではもともと肝臓からの apoB-VLDL 分泌量がウサギやヒトに比較して少なく、肝臓中にコレステロールを蓄積する傾向があり、加えて前述のように血中の LDL-コレステロール濃度が上昇しにくい傾向があるため、動脈硬化憎悪のためのコレステロール・コール酸添加量の設定が高くなってしまったものと思われる。

アテローム性動脈硬化に関する研究では血中コレステロール濃度が問題となるが、全身のコレステロール代謝を考慮する場合は肝臓における表現型が重要なデータとなる。たとえば本実験では、カゼインの2群のラットでは体重約 500g、血漿コレステロール濃度が 250 (CD 群) もしくは 350mg/dL (C 群)、肝臓重量が平均約 27g で肝臓中コレステロール含量が約 100mg/g liver であった。ラットにおいて体重の 8 %を血液が占めるとして概算すると、血中にあるコレステロールはそれぞれ 50 もしくは 70mg、一方肝臓中のコレステロール量は 2700mg にもなり、40 ~ 50 倍もの差がある。カゼイン分解物が未分解のカゼインと異なる影響を与える作用点を推測すると、血中に限らず肝臓での表現型をも重視するべきと考えられた。

食事成分が血中コレステロール濃度を低下させる、もしくは上昇を抑制する経路としては、植物ステロール・ポリフェノール等の脂溶性成分やコレステラミン樹脂、食物繊維等に代表される小腸でのコレステロール吸収阻害作用があり、大豆タンパク質もこの経路において効果を発揮している部分大きいとされる。これに類似して、コレステロールでなく胆汁酸と結合して小腸上皮細胞への再吸収を阻害するものがあり、大豆タンパク質は両方の作用をもつとされている。胆汁酸と結合することによって糞中への排泄量が増加することで肝臓での胆汁酸生合成経路が活性化し、同時に消化管内に存在するコレステロールの吸収も抑制して、二つの方向から体内のコレステロールプールを減少させると考えられている。これらの作用によって必然的に体内のコレステロール量は減少し、主たる代謝器官である肝臓でのコレステロール蓄積も軽減されると推測できる。

しかし、本実験系のカゼイン分解物が血中コレステロール濃度の上昇を抑制するメカニズムが大豆タンパク質のそれと同一もしくは類似のものであるか否かは、①SHRSPなどの動脈硬化症のモデル動物で検証する必要があること、②短期間の飼育でコレステロールが飽和しない状態での検討を要すること、などによって解明できるものと考えられる。さらに詳細な検討が望まれる。

## まとめ

SD系ラットを用いて、カゼインの微生物酵素分解物が血中コレステロール値に及ぼす影響を評価するために、高コレステロール・高コール酸食条件下で7週間給餌した。すなわち、*Bacillus thermoproteolyticus* の産生するエンド型プロテアーゼであるサーモリシン消化されたカゼインの消化物をラットに長期投与して、血漿コレステロール値の上昇抑制について検討した。その結果、

以下のことが明らかにされた。

- 1) カゼインのサーモリシン消化物で飼育 1 週間目から血漿総コレステロール値の上昇抑制が観察され、3 週目以降ではカゼイン群よりも平均値で 95 mg/dl も低い値が観察された。また、HDL-コレステロール値の改善や血漿トリグリセリド値の改善も観察された。
- 2) カゼイン分解物を単回摂取させた 24 時間のコレステロール値の変化では、未分解カゼイン摂取で見られた一時的なコレステロール値の上昇が観察されず、単回摂取の場合にも血中コレステロール上昇を抑制していることが示唆された。
- 3) 腸管におけるコレステロール吸収阻害作用により血中コレステロール上昇を抑制するとされている大豆タンパク質給餌と比較して、血漿と肝臓コレステロール代謝および糞便中ステロール排泄が有意に増えていなかったため、カゼイン-サーモリシン分解物の血中コレステロール値上昇抑制効果は、大豆タンパク質とは異なる作用機序を介しているものと考えられた。

## 参考文献

1. Ross, R., Glomset, J. A. 1976. Engl. J. Med. 296 : 369-377.
2. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high-blood cholesterol in adults. Executive summary of the Third Report of National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high-blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 2001. 285 : 2486-2497.
3. Sirtori, C. R., Agradi, E., Conti, F., Mantero, O. and Gatti, E. 1977. Lancet. 275.
4. 『牛乳成分の特性と健康』Ⅲ. 乳清タンパク質の血清コレステロール低下作用 長岡利ら 光生館 日本栄養食糧学会監修 pp57-84
5. Iwami, K., Sakakibara, K., and Ibuki, F. 1986. Involvement of post-digestion 'hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. Agric. Biol. Chem. 50: 1217-1222.
6. Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., et al. 1990. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. J. Nutr. 120 : 977-985.
7. Suetsuna, K., Nakano, T. 2000. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (Undaria pinnatifida). J. Nutr. Biochem. 11 : 450-4.
8. Morihara, K. and Tsuzuki, H. 1970. Eur. J. Biochem. 15 : 374-380.
9. Feder, J. and Schuck, J. M. 1970. Biochemistry. 9 : 2784-2791.
10. Otte, J., Shalaby, S. M. A., Zakora, M., et al. 2007. Fractionation and identification of ACE-inhibitory peptides from alpha-lactalbumin and beta-casein produced by thermolysin-catalysed hydrolysis. Int. Dairy J. 17 : 1460-1472.
11. Hernández-Ledesma B., Ramos, M., Recio, I. and Amigo, L. 2006. Effect of betalactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. Journal

- of Chromatography A 1116 : 31-37.
12. Gilardi, F., Mitro, N., Godio, C., Scotti, E., Caruso, D., Crestani, M., Fabiani, E. D. 2007. The pharmacological exploitation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, the key enzyme in bile acid synthesis : from binding resins to chromatin remodelling to reduce plasma cholesterol. *Pharmacol. Therap.* 116 : 449-472.
  13. Makishima, M. 2005. Nuclear receptors as targets for drug development : Regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 97 : 177-183.
  14. Goetz, R., Beenken, A., Ibrahimi, O. A., Kalinina, J., Olsen, S. K., Eliseenkova, A. V. et al. 2007. Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell. Biol.* 27 : 3417-3428.
  15. 『腸内フローラと食餌』 光岡知足 編 7. 健常人の腸内菌叢とその代謝活性および免疫能に及ぼす *Lactobacillus casei* 発酵乳の飲用効果 田中隆一郎 著 1992. 学会出版センター