

# 牛乳脂肪球皮膜物質による高コレステロール

## 血漿防御効果に関する研究

日 本 獣 医 畜 産 大 学

獣医内科学教室 教授 本 好 茂 一

〃 講 師 佐 向 敏 紀

乳 学 教 室 助 教 授 伊 藤 整

獣医衛生学教室 助教授 鎌 田 信 一

獣医公衆衛生学 助教授 林 正 利

血清コレステロール濃度が、動脈硬化への発生機序への引き金となり冠動脈性心疾患発症との間の関係は、昭和61年度の厚生省実態調査でも、明らかにされている。血清中の、特に低密度リポタンパク質（LDL）-コレステロール濃度を低下させる事は、このリスクからのがれるもっとも有効な方策であり、食物による高コレステロール症の予防や改善は、非常に重要な手段となりうる。多くの食品素材の中でも、特に牛乳には、栄養源以外の合目的性をもった各種活性構造物質が含まれている可能性は大きい。継続的な牛乳脂肪（バター）の多量摂取は、血清コレステロール濃度の上昇を招来するが、同量の脂肪を含むクリームの場合には、コレステロールの上昇は全く認められない事がボランティアによる人間血漿コレステロールで確かめられている。この事実はクリームの表面構造を形成している脂肪球皮膜成分（MFGM）中に降コレステロール作用がある可能性を示唆するものであり、動脈硬化防禦への一助となる可能性を秘めている。今回、クリームおよびMFGMの降コレステロール効果を調べるとともに、MFGMの電気泳動による理化学的検索を行った。

### 実験方法

#### 1. 試料（MFGM）の調製

Kanno ら<sup>2)</sup>の方法により調製した。すなわち生クリームを、3倍量の蒸留水で4回洗浄し、洗浄クリームを、4℃で一晩エージング後、小型のダイヤモンド型ステンレ

スチャーンを用いてチャーニングする。バターミルクを集め硫酸半飽和になるように固形硫酸を加え、塩析後、一晚放置し、3000rpm 30分間遠心分離する。上層の凝集部を集め、BaCl<sub>2</sub> で陰性の反応が得られるまで4℃で蒸溜水に対し透析し、凍結乾燥保存した。なお以上の操作をFig.1 に表図した。電気泳動用の可溶化試料については、上記で調整したMF GMをもとにKanno<sup>3)</sup> の方法により行った。すなわち調整したMF GMを、等量の0.3 M ジョードサリチル酸リチウム、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) に懸濁する。4℃で30分間攪拌し、4000×g で60分間遠心分離する。上澄液を集め、透析し、凍結乾燥したものを電気泳動に供した。

## 2. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

Basch ら<sup>4)</sup> の方法に準拠した。15%ポリアクリルアミドゲルを用い、0.03% SDS Tris-glycine 緩衝液 (pH8.3) でスラブcm当たり、1mAの電流で15時間泳動した。ゲルは、一部を蛋白染色のため0.03%クマシブルーで染色し、10%メタノール含有7%酢酸で脱色した。また残りの一部は、糖染色のため12.5% TCAゲルスラブの蛋白を固定化し、PAS染色を行った<sup>5)</sup>。

## 3. 実験飼料

実験に用いた飼料の組成をTable 1 に示した。主タンパク源はカゼインとし、血漿コレステロールレベルを上昇させるため、0.5 %コレステロールと0.25% コール酸ナトリウムを添加したものを基本飼料とし、対照群に与えた。試験群には基本飼料にクリームを20% (I群)、MF GM成分3% (II群) の割合で添加したものをそれぞれ与えた。クリームおよびMF GMを添加した実験飼料については窒素レベル、脂質量が同等になるようにカゼイン、バターで調整した。

## 4. 実験動物

4週齢のSprague-Dawley (SD) 系雄ラット (日本クレア) を使用した。一群10匹とし、個別ゲージで12日間飼育し、飼育期間中の食餌と水は自由に摂取させた。実験

開始時の体重は70-80gであった。

#### 5. 血漿中のコレステロール・トリグリセライドの分析

飼育6日目、12日目のラットからエーテル麻酔下で心臓採血し、直ちに遠心分離（3000 rpm 20分間）して血漿を得た。血漿中の総コレステロールは、コレステロールオキシダーゼによる和光 Cholesterol E-testキット、トリグリセライドはGPO-p-クロロフェノール発色による和光 Triglyceride G-testキットおよび高密度リポタンパク（HDL）-コレステロールはヘパリン-マンガン沈澱による和光HDL Cholesterol-testキットを用いてそれぞれ測定した。また、糞中の脂質量は凍結乾燥糞にメタノール：クロロホルム：水（1：1：1）を加え抽出乾固したもので測定した。糞中のコレステロールについては<sup>6)</sup>、乾燥糞を1 N NaOH/エタノール（1：9）でけん化し、濾過後の濾液を蒸発乾固し、さらに1 N NaOHに溶解後、n-ヘキサンで3回抽出した。ヘキサンを溜去後、コレステロール値を定量した。

#### 結果および考察

血漿中の脂質代謝改善に及ぼすクリームとMF GMの効果を離乳後の雄ラットを用いて比較検討した。

洗浄クリームから調製したMF GMの成分分析ならびに電気泳動による理化学的検索を行った。その結果、97%以上が脂質と蛋白質で占められている事がわかった。さらに、その構成割合をみると、脂質が約48.8%、蛋白質が49%そして炭水化物が1.05%であった（Tab12）。MF GMの蛋白構成は、一般に複数の蛋白からなっておりその多くは糖蛋白の形で存在している<sup>7)</sup>。これらの膜蛋白のいずれにコレステロール抑制効果があるのか否か、興味をもたれるが、それらを調べていく上にはあらかじめ構成蛋白の予備知識を得ておくことが必要と考えられた。そこで今回は、膜の可溶化に選択性を持つとされるジョードサリチル酸リチウムを用いてMF GM蛋白を可溶化し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で構成膜蛋白を分解した結果、Fig. 2に示したように蛋白バンドは約12本程度、そのうちPAS染色による糖蛋白バンドについては、太いバンドが2本、細いバンドが2本、計4本のバンドが認められた。

動物実験では、対照試料 (Table 1) を与えたものを対照群とし、これにクリームを20%およびMF GM成分を3%添加したものをそれぞれ実験Ⅰ群とⅡ群とした。実験期間は12日間とした。体重と摂取量を毎日記録するとともに糞の性状を観察した。対照群と実験群 (ⅠとⅡ群) の体重および摂食量には有意差は認められなかった。この事は、今回用いたクリームとMF GM成分の投与量が、ラットの発育に悪影響を及ぼさないという事を示すものであった。

糞の性状を対照群と実験群で比較すると、両実験群共に糞の軟化が顕著で、その色調は黄白色を呈していた (Fig. 3) [略]。実験群におけるこの糞の性状は、脂質の糞中への排泄増加を表しているものと考えられた。事実、乾燥g 当たりの糞中脂質量の測定結果をみると、対照群の73.5mgに対してクリーム投与群 (実験Ⅰ群) が 117mg、そしてMF GM投与群 (実験Ⅱ群) が 166mgと有意に高くなっていた (Table 3)。さらにまた、対照群、実験Ⅰ群およびⅡ群における乾燥g 当たりの糞中コレステロール量についても、それぞれ8.5 mg、28.7mgおよび34.7mgと実験群の方が高い値を示していた (Table 3)。これらの所見は、クリーム、特にクリームから調製したMF GM成分が腸管から脂質やコレステロールの吸収を阻害するという事を示唆していた。

高コレステロール飼料を与えた対照群の血漿総コレステロール濃度 (平均値) は、日数の経過に伴って増加を示した (Fig. 4)。一方、実験群は増加の割合が低く、12日目の実験Ⅰ群 (130mg/dl) と実験Ⅱ群 (150mg/dl) の値は対照群の値 (250mg/dl) に比べ有意に低くなっていた ( $P<0.05$ )。

以上の様に、クリームやMF GM成分の投与が高コレステロール食ラットの糞中脂質とコレステロールの排泄を増加させる事および血漿総コレステロール濃度の上昇を抑制するという事は、これらの物質、特にMF GM成分がラットの脂肪代謝の改善に有効に作用しているという事を示していた。今後は、MF GM成分の降コレステロール作用のメカニズムについて詳細な研究が必要である。

# 文 献

1. Howard, A.N. and Marks, J. Lancet 2:957 (1979)
2. Kanno, C., Shimizu, M. and Yamauchi, K. Agr. Biol. Chem. 39:1835 (1975)
3. Kanno, C. Agr. Biol. Chem. 49:3005 (1985)
4. Basch, J.J., Frederic, J.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H. J. Dairy sci. 68:23 (1985)
5. McGuckin, W.F. and McKenzie, R.F. Clin. Chem. 4:476 (1985)
6. 高橋時男、宮沢陽夫、藤本健四郎、金田尚志、日本栄養・食糧学会誌 39:377 (1986)
7. Shimizu, M., Kanno, C. and Yamauchi, K. Agr. Biol. Chem. 40:1711 (1976)

**Table 1 Composition of diet(%)**

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Casein          | 22    |
| Mineral mixture | 3.5   |
| Vitamin mixture | 1.2   |
| Lard(Butter)    | 10    |
| Cholesterol     | 0.5   |
| Sodium cholate  | 0.25  |
| Cellulose       | 3     |
| Sucrose         | 59.55 |
|                 | <hr/> |
|                 | 100   |

Table 2 Gross composition of bovine  
milk fat globule membrane

| Composition | % of total milk fat<br>globule membrane |
|-------------|-----------------------------------------|
| Protein     | 48.8                                    |
| Lipid       | 49.0                                    |
| Hydrocarbon | 1.05                                    |

Values were the mean of three preparations

Table 3 Fat and cholestrol levels of  
rat's feces

| Group   | Fat          | Cholesterol |
|---------|--------------|-------------|
|         | (mg/g feces) |             |
| Control | 73.5         | 8.5         |
| I       | 117.1        | 28.8        |
| II      | 166.0        | 34.8        |

Control : Chow(Table 1)

I : Cream 20%

II : Bovine milk globule membrane 3%

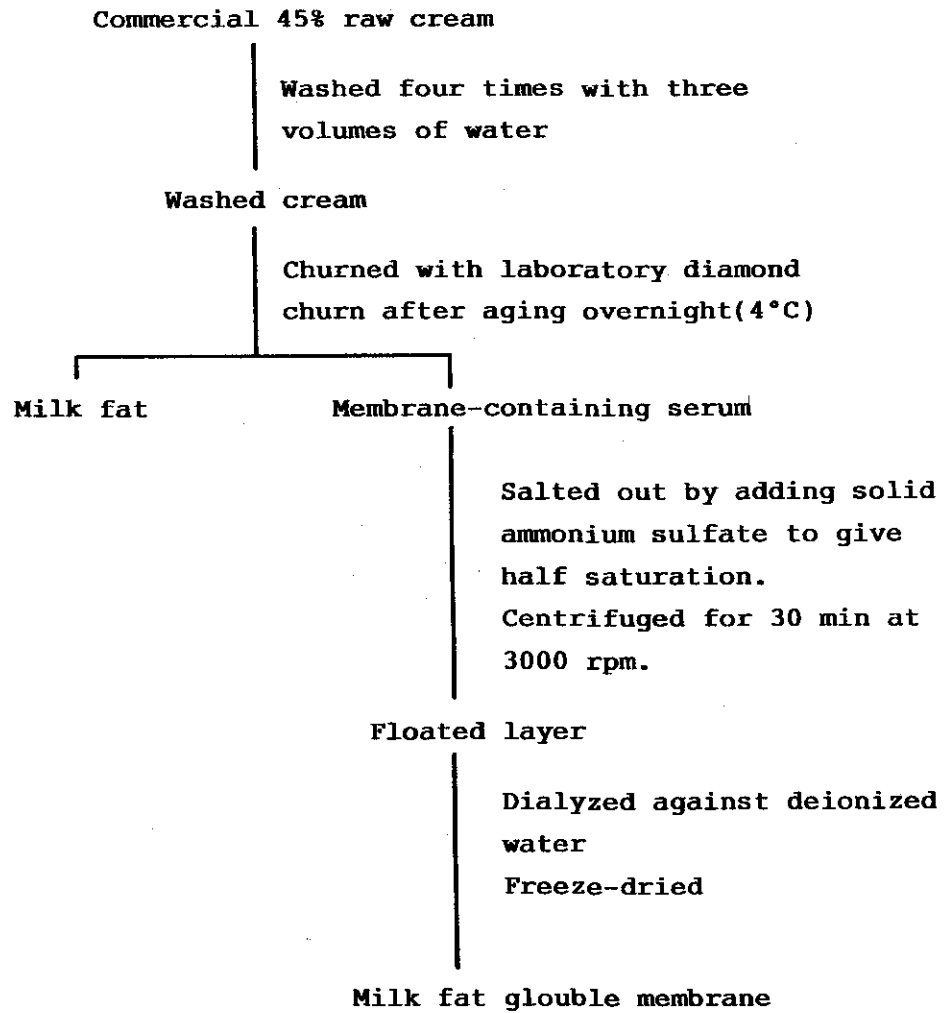
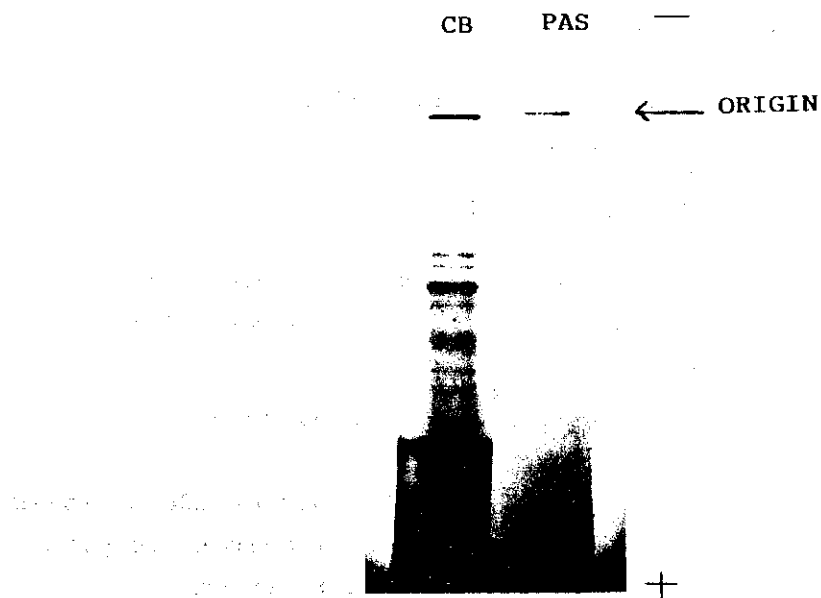


Fig. 1 Preparative procedure for fat-globule membrane fraction



**Fig.2** SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of bovine milk fat globule membrane. The electrophoresis was carried out in 15 % polyacrylamide gel at pH 8.3 with a current of 1 mA/gel/cm for 15 hr. Sample was applied 6.2 $\mu$ g/lane in the slab electrophoresis apparatus.

**CB:** Proteins stained with Coomassie brilliant blue

**PAS:** Glycoproteins stained with periodic acid-Schiff reagent

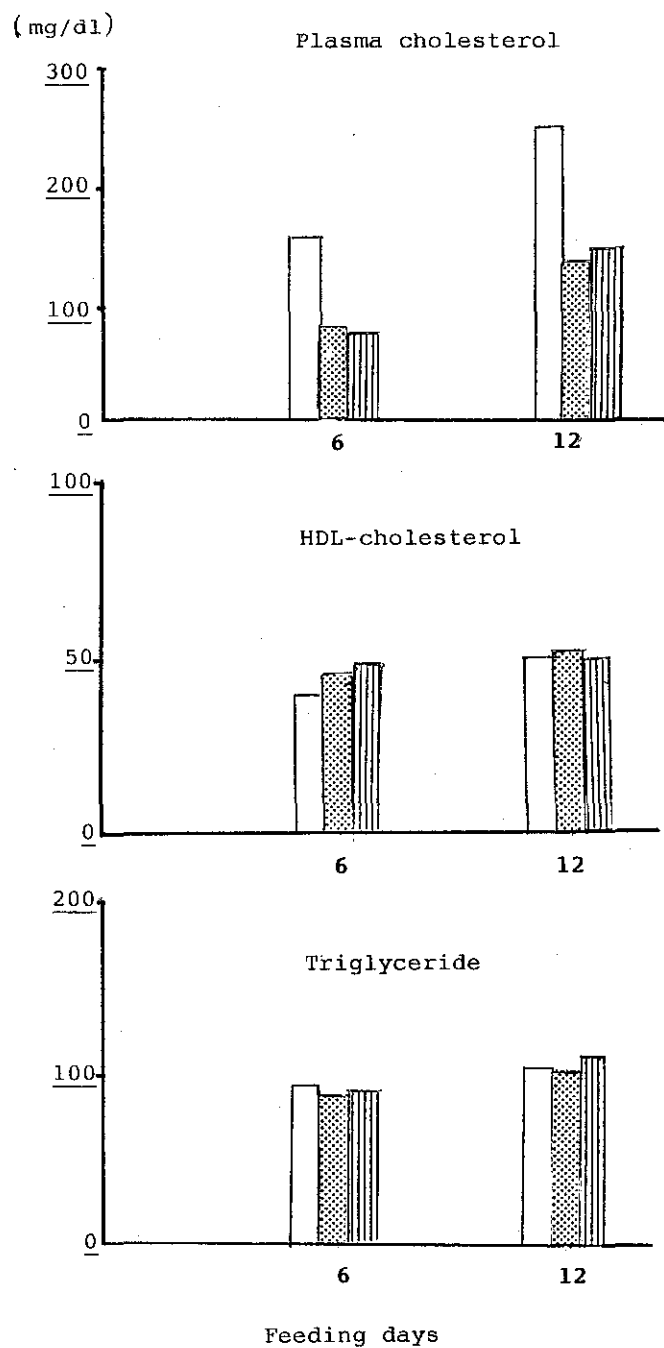


Fig.4 Effect of cream and MFGM on cholesterol levels

Control group :   
I group :   
II group : 