

牛乳乳清タンパク質の生体抗酸化作用に関する研究

九州大学農学部 教授 今 泉 勝 己

要 約

乳酸発酵乳や乳清タンパク質の生体内抗酸化作用、抗酸化作用を惹起する成分、発酵乳とその原料である脱脂粉乳との生体内抗酸化作用の比較、乳清タンパク質の抗動脈硬化作用などについて、平成7～9年度にかけて検討した。

平成7年度は、まず、通常食を与えたラットを用いて、牛乳乳清と発酵乳乳清の生体内過酸化に対する抗酸化作用と血清脂質濃度に及ぼす影響を検討し、抗酸化作用と血清コレステロール低下作用を有する成分が発酵乳乳清画分に存在することを明らかにした。つづいて、酸化ストレスを誘発する低タンパク質食や低ビタミンE食を摂取させたラットを用いて、牛乳乳清タンパク質ならびに発酵乳乳清が抗酸化作用を有することを確認した。

平成8年度は低ビタミンE食ラットを用いて、発酵乳乳清や乳清タンパク質画分中の抗酸化作用を惹起する成分ならびにその作用メカニズムについて検討し、次のような知見を得た。(1)まず、食事ビタミンEレベルの影響について検討し、低ビタミンE食は肝臓と血清の α -トコフェロール蓄積量を減少させ、肝臓と血清の過酸化物質濃度、赤血球の溶血阻害活性、還元型グルタチオン濃度、抗酸化に関連する酵素の活性、*in vitro*での $d < 1.063 \text{ g/ml}$ リポタンパク質の過酸化反応に対して酸化促進的に作用することを確認した。(2)乳清タンパク質および発酵乳乳清はこれら過酸化パラメーターの上昇を抑制した。(3)このような過酸化パラメーター上昇抑制作用の一部は乳清タンパク質類似アミノ酸混合物および発酵産物である乳酸によって再現されることを明らかにした。(4)生体内過酸化抑制作用は牛乳乳清の主要タンパク質である β -ラクトグロブリンで強いことを示すとともに、このタンパク質中のシステインは、ジあるいはトリペプチドとして吸収され効率的に還元型グルタチオン合成に利用されるという可能性を指摘した。

平成9年度は、脱脂粉乳乳酸発酵産物の脱脂粉乳に対する、生体内抗酸化作用における、優位性について検討した。また、生体内過酸化反応の亢進は動脈硬化の進展と関わっていることから、動脈硬化モデル動物であるアポE欠損マウスを用いて乳清タンパク質の抗動脈硬化作用について検討した。その結果、(1)脱脂粉乳発酵産物は体内のビタミンEの消耗抑制作用を介して生体内抗酸化作用を発揮すること及び、その作用は主として乳酸菌発酵で生じる有機酸に基づくことを確認した。しかし、(2)乳清タンパク質の抗動脈硬化作用を実証するまでには到らなかった。

これら一連の3年間の実験から、牛乳乳清タンパク質は生体内抗酸化作用があること、乳酸菌による発酵によって牛乳の生体内抗酸化作用が増強されることが明らかになった。本実験条件下では、乳清タンパク質に抗動脈硬化作用を認めることは出来なかったが、発酵乳製品の抗動脈硬化作用についてはさらに検討する必要がある。

研究目的

生体内過酸化反応の亢進は動脈硬化症や老化の促進に関与することが指摘されている。高齢化社会の到来を迎えたわが国においては、食生活の面からの健全な長寿の達成を促進する要因や、逆に阻害する要因の解明とその除去などが望まれている。したがって、栄養価に富み生体内過酸化反応抑制的に作動する食品成分を明らかにすることは重要な課題であり、かつ、このことを通して牛乳ならびに乳製品の利用拡大ならびにこの機能を利用した新しい食品の創製に大きく貢献することが期待される。

平成7年度は、通常食を与えたラットを用いて、牛乳乳清と発酵乳乳清の生体内過酸化と血清脂質濃度に及ぼす影響を検討した。平成8年度は発酵乳乳清や乳清タンパク質画分に含まれ抗酸化作用を惹起する成分とその作用メカニズムについて低ビタミンE食ラットを用いて検討した。

平成9年度は、生体内抗酸化作用における脱脂粉乳発酵産物の脱脂粉乳に対する優位性（実験Ⅰ）と乳清タンパク質の抗動脈硬化作用（実験Ⅱ）について、それぞれラットと動脈硬化モデルマウスを用いて検討した。

研究方法

「実験Ⅰ」

食事組成

Table 1にAIN-76™に準拠した食事組成を示した。10%のレベルで脱脂粉乳、脱脂粉乳乳酸菌培養物を添加し、それらに含まれるタンパク質量を考慮してカゼインを添加した。脱脂粉乳培養物と脱脂粉乳の粗タンパク質含量（%）は35.0と34.1%で、アミノ酸組成に差異は認められなかった。抗酸化性成分の効果の評価を容易にするために、細菌類用飼料中の通常のビタミンEレベルよりも低いビタミンEを含む飼料を調製した。そのために、ビタミンEフリーのビタミン混合を用いた。油脂源として市販のサフラワー油（49.4mg α -トコフェロール）と活性炭処理したサフラワー油（9.4mg α -トコフェロール）を用いた（それぞれの油脂を含む飼料を高ビタミンEおよび低ビタミンE飼料とした）。ビタミンEは両乳製品で検出されなかった。なお、脱脂粉乳培養産物は脱脂粉乳と比較してコハク酸、乳酸、ギ酸、酪酸を高濃度含んでいた。脱脂粉乳とサフラワー油あるいは活性炭処理サフラワー油を含む飼料群をそれぞれ、CO、CE群とした。脱脂粉乳培養物とサフラワー油あるいは活性炭処理サフラワー油を含む飼料群をそれぞれ、FO、FE群とした。

実験動物

5週齢のSprague-Dawley系雄ラットを用いた。Table 1の飼料で4週間飼育した。この間水を自由に与えた。飼育終了後、エーテル麻酔下で大動脈採血によって屠殺した。

分析

前年度に示した方法に従って、赤血球の溶血反応抑制活性、血清、肝臓と赤血球のthiobarbituric acid

reactive substance (TBARS) 濃度、血漿と肝臓の α -トコフェロール濃度および肝臓のグルタチオン濃度をそれぞれ測定した。血漿と肝臓のホモジネート (0.25ml) について、FeSO₄とCumene hydroperoxideを添加し一定時間インキュベーションし、過酸化物の生成をTBARSを指標にして測定した。

統計処理

結果は平均値と標準誤差で表し、Duncanの多重比較検定法およびANOVA検定を行った。

Table 1. Dietary composition for experiment I

Ingredients	Dietary group			
	CO	FO	CE	FE
	g/kg diet			
Vitamin free casein	165.9	165.0	165.9	165.0
Safflower oil (unstripped) ^a	100	100	0	0
Safflower oil (Vit E-stripped) ^b	0	0	100	100
Butter oil	3.4	0	3.4	0
Skim milk	100	0	100	0
Fermented skim milk	0	100	0	100
Cellulose	50	50	50	50
Mineral mix.	35	35	35	35
Vit E free vitamin mix.	10	10	10	10
DL-Methionine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2	2	2	2
Corn starch	150	150	150	150
Sucrose	380.7	385.0	380.7	385.0

^a Unstripped safflower oil contains 49.4 mg α -tocopherol per 100 g oil.

^b Stripped safflower oil contains 9.4 mg α -tocopherol per 100 g oil.

「実験Ⅱ」

食事組成

Table 2にAIN-76™に準拠した食事組成を示した。タンパク質源としてそれぞれカゼイン (Casein) と乳清タンパク質 (WPI) を用いた。これらタンパク質標品のタンパク質含量はそれぞれ、カゼインで87%、乳清タンパク質で89%であった。

実験動物

16～17週齢の雄アポE欠損マウスを用いた。これらのマウスは米国Jackson Laboratoryから購入し、以後、九州大学医学部実験動物施設で繁殖・維持している。Table 2の純化食と水を2カ月間自由に与えた。飼育終了後、エーテル麻酔下で心臓採血によって屠殺した。直ちに、心臓を含む全大動脈を摘

出し、実体顕微鏡下で可能な限り付着している脂肪組織を除いた。

Table 2 Composition of diets for experiment II

Ingredients	Dietary group	
	Casein	WPI
	g/kg diet	
Casein	200	0
WPI	0	200
Corn starch	150	150
Cellulose	50	50
Safflower oil	100	100
Vitamin mix.	10	10
Mineral mix.	35	35
DL-Methionine	3	3
Choline bitartrate	2	2
Sucrose	450	450

動脈硬化病変の観察

心臓を切り放した全大動脈をプラスチック板に固定後、Fig 1に示すように、スダンⅢの脂肪染色を施した。画像解析装置を用いて、染色された部分の面積を測定した。

分析

赤血球の溶血反応抑制活性、血清と赤血球のthiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 濃度、血漿と肝臓の α -トコフェロール濃度、肝臓のグルタチオン濃度、血漿の脂質濃度をそれぞれ測定した。

統計処理

結果は平均値と標準誤差で表し、Students'-tテスト法によって有意差の検定を行った。

Table 3 Growth parameters in rats fed skim milk and fermented skim milk

Dietary group	Body wt gain	Food intake	Relative liver wt
	g/4 wk	g/day	g/100g body wt
CO	198±7	19.9±0.5	3.33±0.07 ^a
FO	192±5	19.7±0.5	3.63±0.07 ^b
CE	201±6	19.4±0.4	3.71±0.08 ^b
FE	181±11	18.7±0.7	3.61±0.09 ^b

^{ab}Different superscript letters show significantly different at $P<0.05$.

Fig 1 Atherosclerotic lesions in Apo E defficient mice
White areas show the lesions stained with sudan III.



実験結果

「実験 I」

Sprague-Dawley系ラットの体重増加量、摂食量は食事の影響を受けなかったが、高ビタミンE食-脱脂粉乳群で肝臓重量がやや低下した (Table 3)。

赤血球の溶血阻害活性に対する食事の影響をFig 2に示した。低ビタミンE-脱脂粉乳群 (CE) で、僅かではあるが赤血球の阻害活性が低下した。一方、低ビタミンE-発酵脱脂粉乳群では溶血阻害活性の低下は見られなかった。

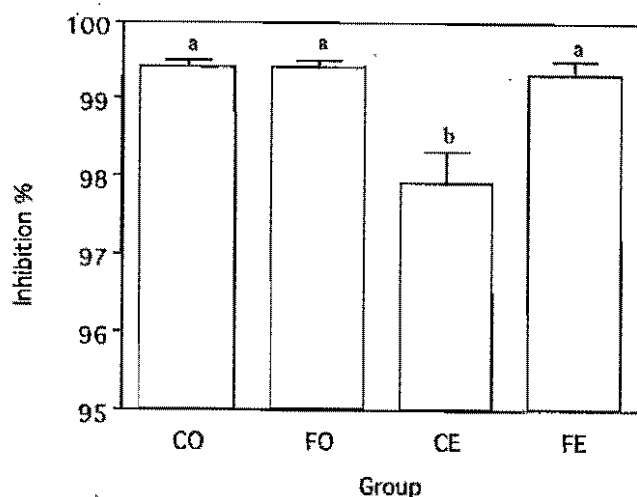


Fig. 2 Inhibition of red blood cell hemolysis in rats fed skim milk and fermented skim milk

^{ab} Different letters show significantly different at $P < 0.05$.

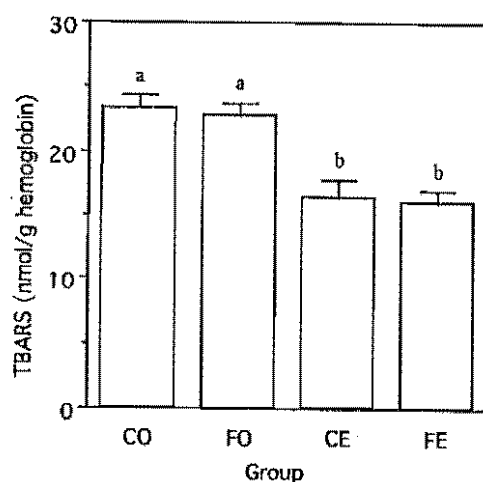


Fig. 3 TBARS in red blood cells in rats fed skim milk and fermented skim milk

^{ab} Different letters show significantly different at $P < 0.05$.

赤血球のTBARS濃度は、予想に反して低ビタミンE食ラット (CE, FE) で高ビタミンE食ラット (CO, FO) よりも低下した (Fig 3)。赤血球の場合と類似して、Cumene hydroperoxideで処理していない血漿のTBARS濃度も低ビタミンE食ラット (CE, FE) で低下した (Fig 4)。この場合のTBARS濃度は、発酵脱脂粉乳群 (FO, FE) で脱脂粉乳群 (CO, CE) と比較して低い傾向にあり、特に、高ビタミンE-発酵脱脂粉乳群のTBARS濃度は相当する脱脂粉乳群と比較して有意に低下した (Fig 4)。ヒドロペルオキシド処理によって血漿TBARS濃度はいずれも増加したが、その増加は低ビタミンE食ラット (CE, FE) で顕著であり、発酵脱脂粉乳群 (FE) でその上昇は脱脂粉乳添加群 (CE) よりも抑制された。Fig 5に肝臓のTBARS濃度を示した。赤血球や血漿の場合と異なり、ヒドロペルオキシド処理を行っていない肝臓ホモジネートのTBARS濃度は、低ビタミンE食ラット (CE, FE) で高ビタミンE食ラット (CO, FO) よりも増加した。その増加は発酵脱脂粉乳群 (FE) で脱脂粉乳群 (CE) よりも少なかっ

た。ヒドロペルオキシド処理によって肝臓ホモジネートのTBARSは増加し、特に、低ビタミンE食ラット (CE, FE) で顕著であった。この場合、発酵脱脂粉乳添加の影響は見られなかった。Fig 6に肝臓のグルタチオン濃度を示した。予想に反し、還元型グルタチオン濃度は高ビタミンE食ラット (CO, FO) と比較して低ビタミンE食ラット (CE, FE) で増加した。還元型グルタチオン濃度に対する発酵脱脂粉乳添加の影響は見られなかった。酸化型グルタチオン濃度は高ビタミンE-脱脂粉乳群 (CO) で相当する発酵脱脂粉乳群 (FO) や他群 (CE, FE) よりも高値を示した。

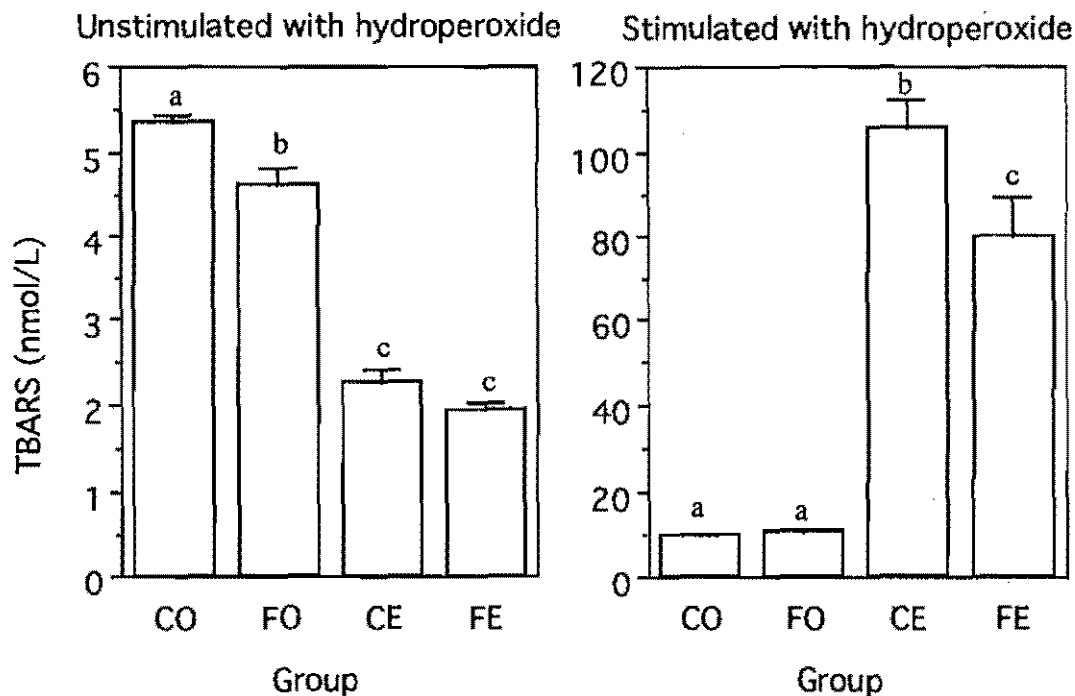


Fig 4 TBARS in plasma in rats fed skim milk and fermented skim milk
Plasma was incubated with or without cumene hydroperoxide, and TBARS was measured, respectively.

abc Different letters show significantly different at $P < 0.05$.

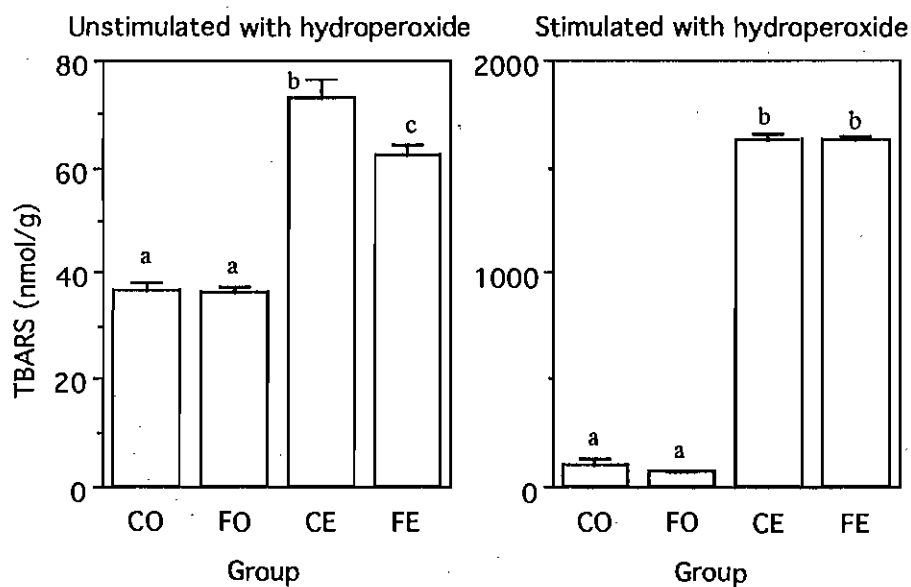


Fig 5 TBARS in liver in rats fed skim milk and fermented skim milk

Liver homogenate was incubated with or without cumene hydroperoxide, and TBARS was measured, respectively.

abc Different letters show significantly different at $P < 0.05$.

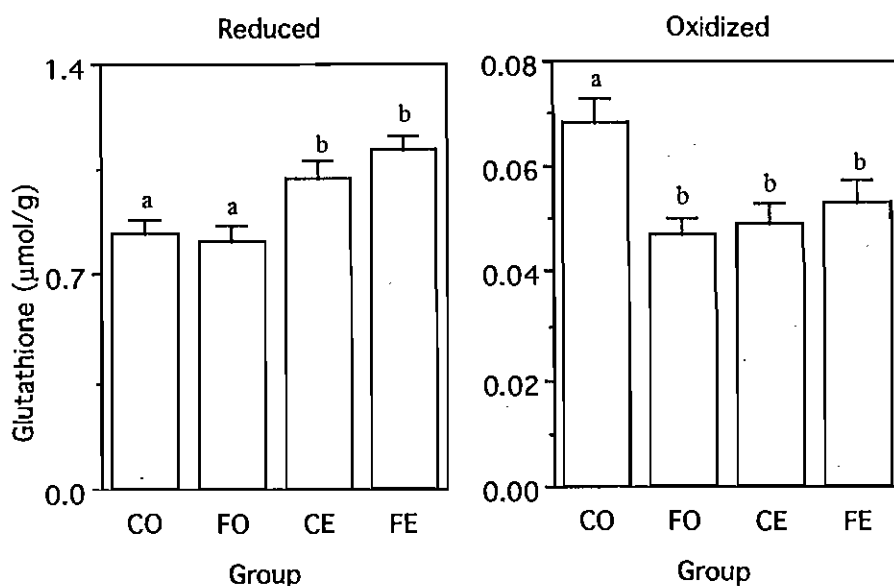


Fig 6 Reduced and oxidized form of glutathione in liver in rats fed skim milk and fermented skim milk

ab Different letters show significantly different at $P < 0.05$.

血漿、赤血球、肝臓の α -トコフェロールの濃度をFig 7に示した。これらの α -トコフェロール濃度は、予想されるように、低ビタミン食ラット (CE, FE) で高ビタミン食ラット (CO, FO) と比較して顕著に低下した。血漿の α -トコフェロール濃度は発酵脱脂粉乳群 (FO, FE) で脱脂粉乳群よりも

高い傾向にあり、特に、低ビタミンEラット-発酵脱脂粉乳群（FE）で相当する脱脂粉乳群（CE）と比較して α -トコフェロール濃度は有意に高かった。赤血球の α -トコフェロール濃度には発酵脱脂乳添加の影響は見られなかった。肝臓では、高ビタミンE-発酵脱脂粉乳群（FO）で相当する脱脂粉乳群（CO）よりも α -トコフェロール濃度は高かった。

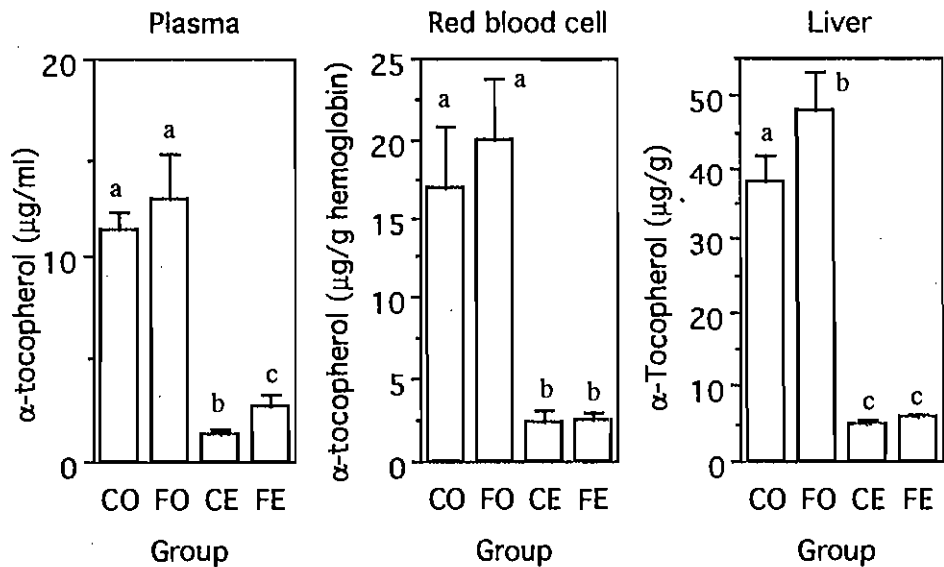


Fig 7. α -Tocopherol in plasma, red blood cells and liver in rats fed skim milk and fermented skim milk

abcDifferent letters show significantly different at $P<0.05$.

Table 4に血漿と肝臓の脂質濃度を示した。低ビタミンE食ラット（CE, FE）で高ビタミンE食ラット（CO, FO）と比較して血清トリグリセリド濃度は高く、また、発酵脱脂粉乳群（FO, FE）で脱脂粉乳群（CO, CE）よりも高い傾向にあった。血漿のコレステロールとリン脂質、肝臓のトリグリセリド濃度には食事の影響は見られなかった。肝臓のコレステロールとリン脂質濃度は低ビタミンE食ラット

Table 4 Plasma and liver lipids in rats fed skim milk and fermented skim milk

Lipids	Dietary gruop			
	CO	FO	CE	FE
Plasma (mg/dl)				
Triglycerides	56.8±6.5 ^a	71.7±9.3 ^{ab}	83.0±9.0 ^{ab}	99.5±11 ^b
Cholesterol	72.0±3.9 ^a	80.2±4.7 ^a	81.4±4.6 ^a	78.8±6.4 ^a
Phospholipids	115±5.8 ^a	127±8.6 ^a	139±7.4 ^a	137±12 ^a
Liver (mg/g)				
Triglycerides	14.8±3.1 ^a	18.7±5.2 ^a	13.6±2.0 ^a	14.0±1.2 ^a
Cholesterol	3.46±0.14 ^a	3.33±0.09 ^a	2.88±0.18 ^b	2.82±0.10 ^b
Phospholipids	35.0±0.58 ^a	34.5±0.29 ^a	31.3±0.41 ^b	32.1±0.43 ^b

^{ab}Different superscript letters show significantly different at $P<0.05$.

(CE, FE) で高ビタミンE食ラット (CO, FO) と比較して低下した。リン脂質とコレステロールは生体膜の構成成分であることから、この現象は低ビタミンE食によって生体膜の損傷が生じていることを示唆している。

「実験Ⅱ」

アポE欠損マウスの体重増加量、摂食量、肝臓重量に食事タンパク質の影響は認められなかった (Table 5)。

Table 5 Growth parameters in apo E deficient mice fed casein and whey protein isolate

Dietary group	Body wt gain	Food intake	Relative liver wt
	g/8 wk	g/day	g/100g body wt
Casein	7.8±1.6	3.9±0.0	0.05±0.00
WPI	8.6±0.9	3.9±0.1	0.05±0.00

血漿の脂質、TBARSと α -トコフェロール濃度をTable 6に示した。アポE欠損マウスの血漿総コレステロール濃度は500mg/dl以上であった。食事タンパクは血漿コレステロール濃度に影響しなかった。血漿のトリグリセリド、リン脂質、TBARSおよび α -トコフェロール濃度に食事の影響はなかった。赤血球の溶血阻害活性とTBARS濃度 (Table 7)、肝臓の還元型グルタチオンと α -トコフェロール濃度 (Table 8) に食事の影響は見られなかった。酸化型のグルタチオン濃度は乳清タンパク質群でやや高い傾向があった。

Fig 1に示すように、アポE欠損マウスの動脈硬化病変は胸部大動脈で腹部のそれよりも顕著であった。大動脈の弓部および腹部の病変面積に食事タンパク質の影響は見られなかった (Table 9)。

Table 6 Plasma lipid, TBARS and α -tocopherol in apo E deficient mice fed casein and whey protein isolate

Parameters	Dietary group	
	Casein	WPI
Lipids (mg/dl)		
Triglycerides	111±13.9	121±17.8
Phospholipids	330±47.7	358±30.7
Total cholesterol	549±89.2	580±44.1
HDL cholesterol	38.0±6.2	41.3±4.5
TBARS (nmol/ml)	12.4±1.4	11.3±1.1
α -tocopherol (μ mol/ml)	18.4±2.9	17.0±0.9

Table 7 Inhibition of hemolysis and TBARS in red blood cells in apo E deficient mice fed casein and whey protein isolate

Parameters	Dietary group	
	Casein	WPI
Inhibition of hemolysis (%)	98.6±0.5	99.3±0.2
TBARS in RBC (nmol/g hemoglobin)	3.38±0.31	4.39±0.47

Table 8 Glutathione and α -tocopherol in liver in apo E deficient mice fed casein and whey protein isolate

Parameters	Dietary group	
	Casein	WPI
Glutathione (μ mol/g)		
Reduced	10.4±0.38	9.48±0.48
Oxidized	0.445±0.01	0.498±0.018*
α -tocopherol (μ g/g)	117±16.4	114±6.1

*Significantly different from casein group at $P<0.05$.

Table 9 Atherosclerotic lesion area in apo E deficient mice fed casein and whey protein isolate

Lesion site	Dietary group	
	Casein	WPI
	Lesion %	
Whole aorta	10.4±0.9	8.6±1.7
aortic arch	33.5±3.4	28.9±5.1
without the arch	3.0±1.1	1.9±0.6

考 察

前年度までの実験において、乳酸菌による牛乳乳清発酵産物がカゼインと比較して生体抗酸化作用を示すことを報告した。これらの実験において乳清タンパク質も発酵乳乳清とほぼ同程度の抗酸化作用を示したことから、乳酸菌発酵産物の抗酸化作用が乳酸発酵に基づくのか、或いは単に、乳清画分中のタンパク質に基づくのかについては明確でなかった。そこで本年度は、脱脂粉乳とそれを乳酸発酵させた生産物をラットに与えることによって、生体内抗酸化に関わる諸パラメーターの比較検討を行った。ついで、生体内の過酸化反応の亢進は動脈硬化の発症と密接な関連があることが示唆されていることから、牛乳乳清タンパク質の動脈硬化に及ぼす影響について、アポE欠損マウスを用いて、カゼインと比較検討した。

まず、発酵乳産物の生体内抗酸化作用について検討した。本実験では、食事のビタミンEレベルを調製することによって生体内の酸化的ストレスが異なる条件を設定した。そのために、食事のビタミン混合からビタミンEを除いた。また、市販の植物油にはビタミンEが含まれていることから、飼料に用いる植物油を活性炭処理することでビタミンEを除いた。そして、飼料中のビタミンEのレベルが、AIN-76™食のビタミン混合を用いて調製された標準食から供給される量の約50%（高ビタミンE食）と15%（低ビタミンE食）の2段階となるように設定した。その結果、低ビタミン食を与えた場合には、血漿のcumene hydroperoxideによる過酸化反応の亢進に対して、発酵乳製品は恩恵的な作用を示した。また、赤血球の溶血阻害活性に対しても、僅かではあるが、発酵乳製品は恩恵的な作用をもたらした。低ビタミンE食ラットにおける血漿ビタミンEレベルの低下は脱脂粉乳群で発酵脱脂粉乳群よりも顕著であった。また、高ビタミンE食を与えたラットの肝臓のビタミンEレベルは、発酵脱脂粉乳群で脱脂粉乳群よりも高かった。したがって、発酵脱脂粉乳は脱脂粉乳と比較して、ビタミンE消耗の抑制を介して、生体内の酸化的ストレス上昇に伴う過酸化物の上昇や溶血阻害活性の低下に対して恩恵的に作用したと推察された。実験に供した脱脂粉乳とその発酵産物にはビタミンEは検出されず、アミノ酸の組成にも違いは認められなかった。しかし、乳酸発酵産物には、乳酸、コハク酸、ギ酸、酪酸などの有機酸が顕著に増加していた。昨年度に、乳酸は生体内抗酸化作用を示すことを報告した。したがって、このような有機酸が発酵乳の抗酸化作用を惹起する主成分ではないかと考えられた。なお本実験では、低ビタミンE食ラットにおいて高ビタミンE食ラットと比較して赤血球や血漿のTBARS値の低下や肝臓の還元型グルタチオンの増加が見られた。これらの結果の説明は困難であるが、前者については低ビタミンE食ラットでは過酸化反応の亢進のためにTBARSの分解が進んだ可能性があり、後者については補償的にグルタチオン合成系の活性が亢進したためと推察される。

昨年度、牛乳乳清タンパク質は、その乳酸菌発酵産物ほどではないが、ラットにおいては生体内抗酸化作用を示すことを報告した。生体内の過酸化反応の亢進は動脈硬化の発症と密接な関連があることが示唆されていることから、本年度は、引き続いて、牛乳乳清タンパク質の動脈硬化に及ぼす影響をアポE欠損マウスを用いて、カゼインと比較検討した。その結果、乳清タンパク質の動脈硬化の抑制作用は観察されなかった。本実験では、生体内の酸化あるいは抗酸化の指標として、血漿と赤血球のTBARS濃度、赤血球の溶血活性、肝臓のグルタチオン濃度、血漿と肝臓のビタミンE濃度について測定した。これまでのラットでの実験と異なり、何れのパラメーターの場合にも食事タンパク質の影響は観察されなかった。アポE欠損マウスでは、酸化型低密度リポタンパク質に対する抗体の力価が高いことが示されているように、生体内過酸化が亢進している。血漿のコレステロール濃度の上昇と合わせて、自然発症的な酸化ストレスの亢進がこのマウスの動脈硬化への罹り易さと関係していることが指摘されている。合成抗酸化剤のこのマウスへの投与は動脈硬化を軽減することが報告されていることから、本実験でタンパク質の効果が確認できなかったのは乳清タンパク質の抗酸化作用が弱いためであろうと考えられる。また、アポE欠損マウスは自然発症的に高コレステロール血症を呈し、それが原因となって動脈硬化を誘発することが指摘されている。以前のラットの実験では乳清タンバ

ク質は血漿コレステロール低下作用を示したが、本実験では確認できなかった。従って、このマウスで食品成分による動脈硬化の抑制作用を示すためには、抗酸化作用ならびに血漿コレステロール低下作用が強い成分を単独或いは併用して検討する必要があるだろう。

これらの結果から、乳酸発酵によって脱脂乳に抗酸化作用を増強させることができることと、その有効成分は各種の有機酸である可能性が示された。平成7～8年度の実験において乳清タンパク質に生体内抗酸化作用があることを確認したが、本年度の実験では、乳清タンパク質に抗動脈硬化作用を認めることは出来なかった。発酵乳の抗動脈硬化作用についてはさらに検討する必要があると思われる。