

食餌たん白質のシロネズミ血清コレステロール値およびアポリポたん白質におよぼす影響

EFFECTS OF DIETARY PROTEINS ON SERUM LEVELS OF CHOLESTEROL AND APOLIPOPROTEINS IN RATS

山王義一・木村達也・田中武彦（大阪大学医学部）

Yoshikazu SANNO, Tatsuya KIMURA and Takehiko TANAKA
Osaka University Medical School, Osaka 530

ABSTRACT

(1) The authors established dietary conditions under which hypercholesterolemia was induced constantly within a short period of time in young rats. (2) Components in the diet to cause this hypercholesterolemia were proved to be protein, fat and cholesterol, indicating that this animal model might be a good model of human hypercholesterolemia. Sucrose, however, was found to play no role in producing hypercholesterolemia. (3) The hypercholesterolemia caused by casein diet was associated with higher plasma levels of apoB and it was furthermore suggested that turnover of this apoprotein might be accelerated under this condition.

食餌たん白質、特に植物性たん白質と動物性たん白質がシロネズミの血清脂質、なかでも血清コレステロール値に影響を与える食餌条件はどのようなものであるかをコレステロール負荷動物で検討した。また、血清コレステロール値が影響を受けるメカニズムを解明する目的で、血清リポたん白質のアポたん白質の動態の解析を試みた。

実験方法

動物は雄性SD系シロネズミ（日本クレア）を用い、Table 1に示す食餌を3週間自由に与えた。動物の年齢は多くの場合、6週齢で実験を開始した。動物の屠殺は絶食を行わずに午後2時に設定した。

血清コレステロール値およびHDL-コレステロール値の測定は酵素法（和光キット）で行った。

アポたん白Bの測定はTMU法によった。ただし、試料としてはEDTAによる血漿から遠心によってキロミクロン分画を除いた後に、超遠心法によって総リポたん白分画を分離し、生理食塩水（2 mM EDTA）に2昼夜透析後、この総リポたん白分画について

TMU法を用いた。

また、アポたん白Bの代謝回転を二重標識法で求めた。このために、第1日目の午後1時に体重当たり一定量の ^3H -ロイシンを腹腔内に投与し、第2日目の午前9時に同様に ^{14}C -ロイシンの投与を行い、その4時間後、午後1時に屠殺し、EDTAによる血漿を得て、超遠心法を2回繰り返して総リポたん白分画（キロミクロンを除く）を分離し、透析後、TMU法によりアポたん白Bを分離、クロロホルム・メタノール混液で洗浄後、放射能を測定し、 $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ 比を求めた。同時に肝臓抽出液についても $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ 比を求めた。

結果と考察

昨年度は40週齢以上のシロネズミについての成績を報告したが、確かにSPI食で血清コレステロール値はカゼイン食のそれに比べて有意に低下したが、その差はあまり大きいものではなかった。ただし、この時の食餌たん白含量は12%と設定した。しかし、高齢のシロネズミを大量に用いることは、実験上困難を伴うので、今回は若齢の動物で明瞭な血清コレステロール値

Table 1. Diet composition (g)

	15%	20%	30%	40%
Protein	15	20	30	40
Dextrin	44.75	39.75	29.75	19.75
Sucrose	20			
Lard	10			
Vitamins	1			
Minerals	4			
Cellulose	2			
Oil	2			
Cholesterol	1			
Cholic acid	0.25			
H ₂ O	55			

Table 2. Effect of protein concentrations in diet

Protein	Conc.		Total chol. (mg/100 ml)	HDL chol. (mg/100 ml)	Weight gain (g/week)
Casein	15	(4)	61.4 ± 2.4	25.7 ± 1.4	31.4 ± 3.5
	20	(4)	433.0 ± 274.5	17.1 ± 3.6	24.9 ± 7.0
	30	(4)	361.7 ± 122.1	14.7 ± 3.6	33.1 ± 10.8
	40	(5)	446.7 ± 127.1	14.4 ± 1.5	44.4 ± 4.5
Soy protein	15	(5)	78.7 ± 8.4	36.6 ± 5.6	16.7 ± 4.4
	20	(3)	54.3 ± 5.8	34.8 ± 3.1	33.3 ± 4.3
	30	(5)	64.6 ± 21.9	39.7 ± 6.6	33.3 ± 5.3
	40	(3)	80.5 ± 22.4	41.9 ± 3.7	34.8 ± 4.4

Table 3. Time course of cholesterol feeding

		Total chol. (mg/100 ml)	HDL chol. (mg/100 ml)	Weight gain (g)
0 time	(5)	106.0 ± 15.7	45.6 ± 16.1	0
1 week	(5)	297.7 ± 35.6*	44.5 ± 17.8	47.6 ± 9.0
3 weeks	(5)	293.8 ± 143.3**	23.9 ± 3.1**	115.2 ± 8.5
4 weeks	(6)	304.1 ± 72.9*	35.2 ± 7.0	135.2 ± 15.5

* p < 0.001, ** p < 0.05

の差をもたらす条件を探した。

Table 2 に食餌たん白含量の影響の検討の結果を示す。すなわち、カゼイン食の場合、15%では血清コレステロール値に変化はみられないが、20%以上に上げると著明な上昇がみられる。20%でややバラツキが大きい、30%、40%ではかなり安定して高値が得られた。一方、SPI 食では15%から40%までたん白含量を上げても、その血清コレステロール値にほとんど変化が

みられない。また、HDL-コレステロール値はカゼイン食で血清コレステロール値が高値を示すと有意に低下を示す。このことは SPI 食と比較しても同様である。次に、この血清コレステロール値のカゼイン食(30%)による上昇の時間経過を検討したのが Table 3 である。これによれば、第1週ですでに血清コレステロール値は上昇し、その後ほとんど変わらない。ただ、HDL-コレステロール値は第1週ではまだ減少を示さない。

Table 4. Effects of diet composition

Diet		Total chol. (mg/100 ml)	HDL chol. (mg/100 ml)	Weight gain (g)
Complete	(4)	439.5±113.0	28.1±6.6**	83.3±44.5
-Lard	(5)	103.2± 37.6	49.0±9.9**	94.8± 9.4
-Sucrose	(3)	608.3± 81.8	25.9±5.5	63.0±40.0
-Lard and sucrose	(6)	126.8± 40.9*	43.6±6.4**	87.0±15.0
-Cholesterol	(6)	73.9± 7.3*	38.0±5.1	103.5±13.7

* p<0.05, ** p<0.02

Table 5. Effect of fats

Diet		Total cholesterol (mg/100 ml)	HDL cholesterol (mg/100 ml)
Lab. chow	(4)	51.2± 10.3	22.2±6.0
Lard-diet	(4)	280.1±137.6*	22.6±6.5
Salad oil-diet	(4)	174.6± 36.3**	33.4±8.3

* p<0.05, ** p<0.002

Table 6. Effect of proteins in cholesterol-diet

	Lab. chow (4)	Casein (3)	Soy protein (4)
Total cholesterol (mg/100 ml)	87.0± 7.5	400.5±174.3*	67.2±21.1
HDL cholesterol (mg/100 ml)	51.4±12.8	24.4± 4.0	30.5±13.1
Apo B (mcg/ml)	149.0±21.0	391.7±142.1*	141.8±37.0
Weight gain (g)	125.8±20.4	114.3± 14.4	122.0±13.8

* p<0.05

以上によって、若齢のシロネズミにおいても確実にかつ早期に血清コレステロール値の上昇を示す条件が明らかにされた。

われわれの用いた合成食餌は1%コレステロール、0.25%コール酸の他に、蔗糖を20%，ラードを10%含んでいる。そこで、これらが高コレステロール血症を誘導するのに不可欠かどうか再検討した。Table 4の成績が示すように、ラードが重要な役割を果たしているが、蔗糖の影響はみられなかった。また、この含量のラードではコレステロールの負荷が同時になければ、血清コレステロール値に影響をおよぼさない。つまり、コレステロールの負荷とラードの併用によって高コレステロール血症が惹起される。コレステロールの負荷だけでも、無コレステロール食に比べて血清コレステ

ロール値の有意の上昇がみられる。

この脂肪の添加の影響をさらに検討するために、ラードの代わりにサラダ油（大豆油とナタネ油の混合）を用いた場合と比較したのが Table 5 である。この場合、合成食による飼育が1週間と短いことの影響かも知れないが、ラード食群とサラダ油食群との間に有意差は認められなかったが、サラダ油食群の方に減少傾向がみられた。

このように、若齢の動物に短期に著明な高コレステロール血症をもたらす食餌条件の影響を解析するためには多くの要因がからんでいるであろうが、リポたん白質のアポたん白質の動態を検討する必要がある。そこで、まずアポたん白 B に注目した。Table 6 に示すように、TMU 法によるとカゼイン食で著明な上昇が

Table 7. Double labelling of apo B

Diet	Animal no.	Total chol. (mg/100 ml)	HDL chol. (mg/100 ml)	¹⁴ C/ ³ H		Weight gain (g/16 d)
				liver (mcg/ml)	apo B (mcg/ml)	
Casein	1	221.4	16.9	.384	.324	112
	2	281.7	24.1	.346	.777	123
		(251.6)	(20.5)	(.365)	(.552)	(118)
Soy protein	1	33.7	22.4	.338	.144	101
	2	40.4	20.5	.357	.235	104
		(37.1)	(21.5)	(.348)	(.190)	(103)

みられるのに、SPI食群では血清コレステロール値もアポたん白Bも固型食群と変化がなかった。この高コレステロール血症に伴うアポたん白Bの上昇のメカニズムを知るために、二重標識法によるアポたん白Bの代謝回転を調べた。まだ予備実験で例数も各群2例と少数なので確定的ではないが、Table 7にみられるように、高コレステロール血症でみられるアポたん白Bの上昇は同時にアポたん白Bの代謝回転の上昇を伴っているようである。

要 約

(1)若齢のシロネズミにおいても、短期に確実に高コレステロール血症を引き起す食餌条件が得られた。

(2)この合成食の組成のうち、たん白質、脂肪、コレステロールが高コレステロール血症を誘導するのに重要な役割を果たしているが、蔗糖はほとんど影響を示さなかった。

(3)カゼイン食でみられる高コレステロール血症ではアポたん白Bの上昇がみられ、同時にアポたん白Bの代謝回転の上昇も示唆された。