

コレステロール代謝の動物種差と食餌たん白質の効果

SPECIES DIFFERENCE IN THE EFFECTS OF DIETARY PROTEIN ON CHOLESTEROL METABOLISM

山下洵子・藤多淑子・上村美和子・林 伸一（東京慈恵会医科大学）

Junko YAMASHITA, Yoshiko FUJITA, Miwako KAMIMURA and Shin-ichi HAYASHI

Department of Nutrition, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105

ABSTRACT

In mice, plasma cholesterol level was elevated moderately by feeding high-fat semisynthetic diets and markedly in genetically obese (ob/ob) strain. In contrast to the results with rats, plasma cholesterol level of mice was not affected by dietary proteins, namely casein and soy protein isolate (SPI), in either normal, goldthiogluconate (GTG)-obese, or the genetically obese mice. Also in contrast to the results with rats, sum of fecal neutral and acidic steroid excretions was not much affected by dietary proteins in mice. These results strongly suggested that, in rats but not in mice, casein caused hypercholesterolemia because of its very low ability to stimulate fecal steroid excretion compared with SPI. It was also noticed that feeding SPI diet caused an increase in the proportion of HDL-cholesterol in normal mice. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 10, 49-52, 1989.

大豆たん白質の降コレステロール効果の機序として、糞へのステロイド排泄促進効果が注目されている¹⁻³⁾。私共はこれまでの研究で、ラットと異なりマウスでは大豆たん白質の降コレステロール効果が発現せず、一方、糞への中性ステロイド排泄量もカゼインと SPI との間に差がみられないことを確かめた⁴⁻⁷⁾。今回は、さらに酸性ステロイド排泄量をも測定し、マウスの糞への全ステロイド排泄量に対する食餌たん白質の効果を血漿コレステロール濃度に対する効果と対比して検討した。

実験方法

実験動物は、日本クレアから購入した4週齢のICR系雌マウスを主として使用した。ゴールドチオグルコース (GTG) 投与による肥満マウスの作製方法は昨年度に報告した⁶⁾。遺伝性肥満 (ob/ob) マウスは和歌山県立医科大学の宮嶋正康博士より供与されたものより交配によって作製した。実験飼料として、前報⁶⁾の

とおり、コレステロール無添加の半合成飼料またはオリエンタル酵母社製の固型飼料 MF (chow) を用いた。血漿の総コレステロールおよび HDL-コレステロール濃度は既報⁵⁾に準じ和光純薬の酵素測定試薬と沈澱試薬を用いて測定した。糞のステロイドの分離抽出は Miettinen らの方法⁸⁾に準じた既報⁵⁾の方法 (Method I),あるいは Imai らの方法⁹⁾に準じた Method II によって行い、中性ステロイドはガスクロマトグラフにより、また酸性ステロイドの総量は和光純薬製 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いて定量した。その他の実験方法は既報⁴⁻⁷⁾に記したものと同様である。有意差検出は Student の t テストによった。

結 果

ゴールドチオグルコース (GTG) 投与によって過食するようにした ICR 系雌マウスを30% Crisco を含む高脂肪半合成飼料 (HF) で飼育すると、たん白質としてカゼインと SPI のいずれを用いても市販固型飼料

(chow) に比べて顕著な高コレステロール血症を呈し、カゼインと分離大豆たん白質 (SPI) との間に効果の差はみられなかった (Table 1)。これらのマウスの糞ステロイド分析の結果、中性ステロイド (コプロスタンールとコレステロール) と酸性ステロイド (3 α -水酸基を含む胆汁酸の総量) を加えた総排泄量はカゼイン飼料群と SPI 飼料群の間に有意差がみられなかった (Table 2)。

次に、各種飼料で飼育した正常の ICR 系雌マウスでの成績を Table 2 に示す。ラットと異なり、血漿コレステロール濃度は低脂肪食 (LF) では低値であり

高脂肪食 (HF) の場合のみ中等度の上昇がみられたが、いずれの場合にも、カゼイン飼料群と SPI 飼料群との間に有意差はみとめられなかった。糞の総ステロイド排泄量は GTG 処理マウスの場合と同じく、半合成飼料では一般に市販固型飼料の場合に比べて低値であり、SPI 飼料ではカゼイン飼料に比べて排泄増加傾向がみられたが、軽度であった。正常の ICR 系雄マウスを用いた別の実験では、血漿総コレステロール濃度、糞の総ステロイド排泄量ともに、カゼインと SPI との間でまったく差を認めなかった (Table 3)。ただし、この実験で SPI が血漿の HDL-コレステロールの比

Table 1. Dietary effects on plasma cholesterol level and fecal steroid excretion of goldthioglucoase (GTG)-treated mice

Diet	(n)	Body weight	Plasma cholesterol	Fecal steroid excretion			
				Neutral steroids		Acidic steroids	Total steroids
				Coprostanol	Cholesterol		
(GTG-treared)		<i>g</i>	<i>mg/100 ml</i>	<i>μ mol/ day</i>			
HF-casein	(7)	34.3±1.5	127±2 ^a	1.1±0.3	1.0±0.3	1.3±0.2	3.3±0.5 ^d
HF-SPI	(5)	37.2±2.8	138±14 [*]	0.8±0.1	0.8±0.1	0.8±0.2	2.4±0.4 ^{**}
Chow	(5)	27.2±1.7	77±6 ^b	1.5±0.8	3.0±0.9	4.3±0.4	8.8±0.9 ^e
(Normal)							
Chow	(5)	24.2±0.7	82±5 ^c	1.5±0.6	1.5±0.9	4.8±0.3	7.9±0.5 ^f

GTG-treated mice were fed experimental diets for 3 weeks. Fecal steroids were extracted by Method I. Results are means $\pm$ SE for the number of mice indicated in parentheses. *Significantly different from b and c ($p<0.01$) but not from a ($p>0.1$). **Significantly different from e and f ($p<0.01$) but not from d ($p>0.1$).

Table 2. Dietary effects on plasma cholesterol level and fecal steroid excretion of normal mice

Diet	Period	(n)	Plasma cholesterol	Fecal steroid excretion			
				Neutral steroids		Acidic steroids	Total steroids
				Coprostanol	Cholesterol		
	<i>week</i>		<i>mg/100 ml</i>	<i>μ mol/day</i>			
LF-casein	1	(5)	65±5	0.0±0.0	2.3±0.4	1.0±0.1	3.3±0.4
LF-SPI	1	(5)	71±7	0.4±0.1	2.3±0.6	1.5±0.2	4.2±1.2
LF-casein	3	(5)	78±6 ^a	0.4±0.2	1.4±0.3	1.1±0.1	2.9±0.5 ^e
LF-SPI	3	(5)	70±9 ^b	0.9±0.2	1.2±0.1	3.0±0.2	5.0±0.3 ^{**}
HF-casein	3	(4)	103±16 ^c	0.1±0.1	2.8±0.2	0.9±0.0	3.8±0.3 ^f
HF-SPI	3	(4)	116±3 [*]	1.4±0.6	2.0±0.4	1.2±0.2	4.5±0.5 ^{***}
Chow	3	(5)	59±4 ^d	0.1±0.0	3.3±0.2	4.2±0.2	7.7±0.2 ^g

Mice were fed test diets for indicated period from the age of 4 weeks. Fecal steroids were extracted by Method II. Results are means $\pm$ SE for the number of mice indicated in parentheses. *Significantly different from a, b, and d ($p<0.01$) but not from c ($p>0.1$). **Significantly different from e ($p<0.01$). ***Significantly different from g ($p<0.01$) but not from f ($p>0.1$).

率を上昇させたことは注目に値する。この点は今後さらに検討する予定である。

C57BL/6J 由来の遺伝性肥満 (ob/ob) マウスを用いての検討結果を Table 4 に示す。市販固型飼料を含む 3 種の飼料で 6 週間飼育したが、いずれの場合にも

顕著な高コレステロール血症を来とし、飼料間の差はなかった。糞ステロイド排泄量は SPI 飼料の方がカゼイン飼料に比べ若干増加していたが、市販固型飼料群に比べるといずれも低値であった。

Table 5 は、ラットとマウスのそれぞれについて、

Table 3. Dietary effects on plasma cholesterol level, fractional content of HDL-cholesterol and fecal steroid excretion of normal mice

Diet	(n)	Plasma cholesterol	HDL cholesterol	Fecal steroid excretion		
				Neutral steroids	Acidic steroids	Total steroids
		mg/100 ml	%	$\mu\text{mol/day}$		
LF-casein	(5)	121 $\pm$ 20	52 $\pm$ 3*	3.2 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.4
LF-SPI	(5)	106 $\pm$ 7	65 $\pm$ 1*	2.9 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.4
Chow	(4)	111 $\pm$ 13	58 $\pm$ 2	9.4 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 1.0

Normal male mice were fed experimental diets for 3 weeks. Fecal steroids were extracted by Method II. Results are means $\pm$ SE for the number of mice indicated in parentheses. *Significantly different from a ($p<0.005$).

Table 4. Dietary effects on plasma cholesterol level and fecal steroid excretion of ob/ob mice

Diet	(n)	Body weight	Plasma cholesterol	Fecal steroid excretion			
				Neutral steroids		Acidic steroids	Total steroids
				Coprostanol	Cholesterol		
(Obese)		<i>g</i>	<i>mg/100 ml</i>	<i>μ mol/day</i>			
LF-casein	(7)	50.2±1.5	236±21	0.1±0.1	1.0±0.3	0.6±0.1	1.7±0.2
LF-SPI	(5)	49.7±2.2	205±6	0.6±0.5	1.1±0.3	2.0±0.6	3.7±0.5
Chow	(5)	57.9±3.2	221±7	0.1±0.0	2.7±0.8	5.4±0.7	8.2±0.9
(Lean)							
LF-casein	(3)	32.0±0.5	75±10	0.3±0.4	1.4±0.3	0.8±0.2	2.5±0.1
LF-SPI	(8)	28.4±1.5	81±4	0.8±0.3	1.2±0.7	2.2±0.4	4.1±0.5
Chow	(5)	24.1±1.5	78±5	0.3±0.3	3.0±0.6	5.6±0.9	8.8±1.1

Mice were fed test diets for 6 weeks from the age of 10-11 weeks. Results are means $\pm$ SE for the number of mice indicated in parentheses. Fecal steroids were extracted by Method I.

Table 5. Comparison of dietary effects on fecal steroid excretion between rats and mice

Diet	Rats			Mice		
	(n)	$\mu\text{mol/day}$	%	(n)	$\mu\text{mol/day}$	%
Casein	(6)	6.1 $\pm$ 0.7	13	(36)	3.0 $\pm$ 0.2	34
SPI	(6)	16.6 $\pm$ 2.0	34	(37)	4.0 $\pm$ 0.2	45
Chow	(6)	48.2 $\pm$ 5.6	100	(29)	8.9 $\pm$ 0.4	100

Results are means $\pm$ SE for the number of rats or mice indicated in parentheses. Data for rats were taken from ref. 4, except that the amount of glycocholate was not included. Data for mice were taken from this paper.

各種飼料飼育時の糞ステロイド排泄量を取りまとめて比較したものである。カゼインと SPI はそれぞれ高脂肪食と低脂肪食の両方を含めた。また、各群の平均ステロイド排泄量について、市販固型食群のそれを100として相対的に表示した。表から明らかなように、ラットではカゼイン群のステロイド排泄量が特に低く、市販固型飼料群の13%, SPI 群に比較してもその38%にすぎないのが注目される。これに対し、マウスではカゼイン群のステロイド排泄量は市販固型飼料群の34%であり、SPI 群に比して有意に低値であるもののその差はわずかであった (SPI 群の76%)。

考 察

コレステロールの生体からの喪失経路としては、中性ステロイド (コレステロールとその腸管内誘導体) および酸性ステロイド (胆汁酸とその腸管内誘導体) の糞便への排泄がほとんど唯一の経路である。今回は、糞の酸性ステロイドを中性ステロイドから分画後、その大部分を占める 3α -ヒドロキシ誘導体の総量を酵素法で測定し、中性ステロイドの大部分を占めるコレステロールとコプロスタノールの量に加算して糞ステロイド排泄総量の近似値を求める方法を採用した。

ウサギ¹⁾、ブタ²⁾、ラット³⁾などの動物種では、カゼインと比較して大豆たん白質が血漿コレステロール濃度を低下させるとともに糞へのステロイド排泄を促進することから、血漿コレステロール濃度の決定要因としての糞ステロイド排泄の重要性が強く示唆されている。私共は前回までの報告で、マウスでは大豆たん白質の降コレステロール効果がみられないこと、また糞への中性ステロイド排泄を促進しないことを報告したが⁴⁻⁷⁾、今回の成績で、マウスの糞の総ステロイド排泄量は正常マウス、ゴールドチオグルコース肥満マウス、あるいは遺伝性肥満マウスのいずれにおいてもカゼイン飼料と SPI 飼料との間ではほとんど相違しないか、あるいは SPI 飼料の方がわずかに多いにすぎないことを確かめた。これは、ラットではカゼイン飼料の場合に糞ステロイド排泄量が著しく低下することと対照的である。したがって、ラットでは糞ステロイド排泄の低下がカゼインによる血漿コレステロール濃度上昇の原因であり、マウスでは糞ステロイド排泄量がほとんど同じレベルであることが、血漿コレステロール濃度が飼料たん白質によって影響されないことの原因であると推定される。

今回の糞ステロイド定量法はすべての糞ステロイド成分を含むものではないところに問題が残されている。

そこで、放射性標識ステロイドの利用による糞への総ステロイド排泄率を指標として飼料たん白質の効果を検討すべく準備中である。

文 献

- 1) Huff, M. W. and Carroll, K. K. (1980) : Effects of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits. *J. Lipid Res.*, **21**, 546-558.
- 2) Kim, D. N., Lee, K. T., Reiner, J. M. and Thomas, W. A. (1980) : Increased steroid excretion in swine fed high-fat, high-cholesterol diet with soy protein. *Exp. Mol. Pathol.*, **33**, 25-35.
- 3) Nagata, Y., Tanaka, K. and Sugano, M. (1981) : Further studies on the hypocholesterolaemic effect of soya-bean protein in rats. *Br. J. Nutr.*, **45**, 233-241.
- 4) 山下洵子, 上村美和子, 藤多淑子, 林 伸一 (1986) : ステロール排泄に対する食餌たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **7**, 76-79.
- 5) 山下洵子, 上村美和子, 林 伸一 (1987) : ステロール排泄に対する大豆たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 89-92.
- 6) 山下洵子, 上村美和子, 林 伸一 (1988) : マウスの血漿コレステロール濃度に対する食餌たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **9**, 82-85.
- 7) Hayashi, S. (1988) : Effect of soy protein on fecal sterol excretion, in "Proceedings of the International Symposium on Soy Protein in Human Nutrition", ed. by Inoue, G., The Research Committee of Soy Protein Nutrition (Japan), Osaka, pp. 165-172.
- 8) Miettinen, T. A., Ahrens, E. H., Jr, and Grundy, S. M. (1965) : Quantitative isolation and gas-liquid chromatographic analysis of total dietary and fecal neutral steroids. *J. Lipid Res.*, **6**, 411-424.
- 9) Imai, Y., Kawata, S., Inada, M., Miyoshi, S., Minami, Y., Matsuzawa, Y., Uchida, K. and Tarui, S. (1987) : Effect of cholestyramine on bile acid metabolism in conventional rats. *Lipids*, **22**, 513-516.