

酸化脂質と反応したタンパク質の栄養価：残留酸化脂質の影響について

堀米 隆男・内田 仙二

(家畜飼養学研究室)

Received June 30, 1979

The Nutritional Quality of Protein Incubated with Oxidized Lipid: the Influence of Oxidized Lipid Remaining in the Protein

Takao HORIGOME and Senji UCHIDA

(Laboratory of Animal Nutrition)

The mixture (1 : 1.5) of egg albumin and oxidized ethyl linolate (OEL, POV 2500) was incubated at 60°C and RH 80% for 4 days. The incubated mixture was incorporated into test diets to provide 1% or 2% OEL. Male rats of the Wister strain, weighing approximately 50 g each, were used. Although the diet intake of rats on the test diets was equal to that of rats on control diets, rats on the test diets showed smaller weight gains than rats on the control diets. Moreover, it was observed that rats on the test diets had yellow loose feces. But the feeding of the test diets did not cause an increase in the dry weight of small intestine.

Reacted albumin was prepared by incubating the mixture (2 : 1) of albumin and OEL as described previously and then extracting OEL with acetone followed by diethylether. Lysine, histidine, and cystine were distinctly decreased by the reaction of albumin with OEL. When 10% level of albumin in diets was used, diet intake and weight gain were greatly lowered by feeding the reacted albumin. The weight gain of rats receiving the reacted albumin was less than that of rats receiving control albumin even by pair-feeding on the basis of the amount consumed by rats on the reacted albumin. Both diet intake and weight gain were greatly improved by increasing reacted albumin level from 10% to 20%. There were not differences in diet intake and weight gain between the test and control groups in the case of 20% level of albumin. Rats given the reacted albumin showed yellow loose feces, but did not show an increase in the dry weights of stomach, small intestine and liver.

The cause for the lowered weight gain of rats receiving 10% reacted albumin in a diet is not completely elucidated by the lowered diet intake. The damage of amino acids and the remaining of OEL in the reacted albumin seem to be another cause for the lowered weight gain.

結 言

構成脂肪酸として不飽和酸を多く含む油脂は酸化し易く、酸化した脂肪酸は毒性を有することは広く知られている。一方、酸化した脂肪酸は種々のタンパク質と反応し、その結果リジン、ヒスチジン、メチオニンなどのアミノ酸の損失をまねくことが報告されて来た^{2,3,5,14)}。また近年、油脂を含む食品が多くなり、ヨース価の高い油脂を使用した場合には保存中に油脂の酸化の度合を示す過酸化値が上昇するものがあることが報告されている^{7,12)}。ニワトリ、ブタの飼料についても熱量を高めるために脂肪を加えることがあり、また飼料には多価不飽和酸を含む魚体加工の副産物や廃棄物も用いられるので脂肪酸の酸化が進むことが考えられる。従って食品および飼料の加工、保存中に酸化した脂肪酸がタンパク質と反応するこ

とは十分考えられるところである。

さきに著者の一人は酸化脂質と反応させたタンパク質（以下反応タンパク質と略記）の栄養価が低下することを報告した⁵⁾。しかし、この反応タンパク質の栄養価は損失したアミノ酸の補足によって、もとのタンパク質と同じ程度まで回復しない。その理由として反応タンパク質に酸化脂質あるいはその分解物が吸着または結合しているため、アセトンおよびエチルエーテルで抽出しても除去されずに少量ながら酸化脂質が残存し、その影響も考えられると述べて来た。その後、柳田ら¹⁴⁾は酸化脂質と反応したタンパク質をラットに給与すると、ラットの肝臓中性脂肪が増加するが、この現象も反応タンパク質のアミノ酸損失のみでは説明できないことを報告し、残存酸化脂質の作用も考えられると指摘している。そこで今回は、タンパク質と反応させた酸化脂質がラットに対しどのような作用を示すかをしらべ、反応タンパク質を給与した場合、残存していると考えられる酸化脂質の影響の有無を検討した。

材 料 と 方 法

1. タンパク質と酸化脂質との反応

タンパク質としては前回の試験⁵⁾に用いたものと同じの卵アルブミン（Difco 社、水分10.4%）を用い、酸化脂質も前回と同じクリノール酸エチル（半井化学薬品）を大形シャーレに入れ、25°C 前後において時々軽く攪拌しながら酸化を進め、過酸化価が 2500 m. e./kg に達したものを使用した。アルブミンと酸化リノール酸エチル（以下 OEL と略記）との反応は乳鉢中で両者を混合し、相対湿度 80% に調整したデシケーターに乳鉢ごと入れ、60°C に保ち、1日2回混合を行い、4日間反応させた。アルブミンと反応させた OEL（反応 OEL と略記）を動物試験に供する場合は、反応混合物（アルブミン 1.5 : OEL 1）をそのまま飼料に混和して給与した。比較のため、アルブミンの代りに粉末セルロース（100メッシュ）と反応させた OEL（セルロース・OEL と略記）を調製して試験に供した。セルロース・OEL の混合比は混合物の状態がアルブミンの場合と同程度にするため 1 : 1 とした。アルブミンと OEL との混合物は反応の進行とともに褐色に着色するが、セルロース・OEL の混合物の色は淡黄色であった。

一方、反応アルブミンを動物試験に用いる場合はアルブミン 2、OEL 1 の比率で混合して反応させた後、アセトンで 4 回、エチルエーテルで 3 回、ミキサーを用いて脱脂し供試した。反応アルブミンはアセトンおよびエチルエーテルで脱脂後も黄褐色に着色しており脱色できなかった。

2. 化学分析

過酸化価は WHEELER 法¹³⁾、窒素の分析は留出アンモニアをホウ酸溶液に吸収させるケルダール改良法⁹⁾ によった。タンパク質のアミノ酸分析は次のように行った。20mg 前後の試料を加水分解用試験管に秤取し、定沸点塩酸約 8 ml を加え、窒素ガスを十分吹き込んで管内の空気を窒素ガスと入れかえた後、減圧しながら管を封じ、110°C で 24 時間加水分解した。分解液は濾過後、ロータリーエバポレーターにより蒸発乾涸して塩酸を除去し、pH 2.2 の緩衝液に溶解して一定容となし、SPACKMAN の方法¹⁰⁾ に準じた 2 カラム方式のアミノ酸自動分析機（日本電子 JLC-6 AH）にかけた。含硫アミノ酸は MOORE⁸⁾ の過ギ酸酸化法により酸化した後、加水分解して分析した。

3. 動物試験および飼料組成

実験 1 反応 OEL の給与試験：脱脂した反応アルブミンの窒素含量（乾物中）は 11.69% であり、またアセトン、エチルエーテルで処理した対照アルブミンのそれは 12.77% である。この窒素含量の差異が反応アルブミンに残存している OEL またはその分解物に基づくかと考

え、両アルブミンの窒素含量から反応アルブミンに結合している OEL を計算すると 8.5% となる。従って反応アルブミンを 10% 混合した飼料には 0.85%, 20% 混合した飼料には 1.70% の OEL をそれぞれ含むことになる。そこで対照アルブミンを 10% および 20% 含む飼料に反応 OEL が 1.0% および 2.0% になるように混合したものを調製し、反応 OEL の作用をしらべた、対照飼料、試験飼料の組成を Table 1 に示した。反応 OEL は反応アルブミンをも含む混合物として加えてあるので、反応 OEL を 1.0% 含む試験飼料には表に示すとおり反応アルブミン 1.5% と対照アルブミン 10%, 計 11.5% のタンパク質を含むことになる。それ故、対照アルブミンを 11.5% 含む対照飼料 A と 10% 含む対照飼料 B とを調製した。セルロース・OEL を混合した試験飼料の場合は、セルロースと OEL の混合比 1:1 のものを加えてあるのでセルロース粉末を別に飼料に加えなかった。反応 OEL を 2% 含む試験飼料の場合はアルブミン量も倍量とし、対照飼料のタンパク質含量も試験飼料に合わせて 23% とした。動物試験は体重 50g 前後のウィスター系雄ラットを用い、1 群 5 頭とした。21 日目に体重測定後、エーテル麻酔、断首放血し小腸を切り取った。小腸を切り開いて内容物を除き、60°C で送風乾燥後、さらに 105°C で乾燥し小腸の乾燥重量を求めた。

実験 2 反応アルブミンの給与試験：脱脂した反応アルブミンに OEL が残存しているかどうかをラットに対する作用によって調べるため、反応アルブミンの給与試験を行なった。用いた動物は実験 1 と同様、ウィスター系ラット雄、体重 50g 前後のもので 1 群 5 頭とした。飼料の組成は Table 2 に示したが、タンパク質含量 10% と 20% の 2 種類とし、対照飼料には対照アルブミンを用いた。また反応アルブミン 10% の試験飼料にはリジン (L 形、一塩酸塩) とメチオニン (DL 形) をそれぞれ 0.65%, 0.35% 添加した。前回の試験⁵⁾において、反応タンパク質を 10% 含む飼料をラットに給与すると飼料摂取量が低下することが観察されたので、対照飼料を自由摂取させた群と試験飼料群の摂取量に給与量を合わせた制限給餌の対照群とを設けた。従ってアルブミン 10% 飼料では対照群 2、試験群 1、アルブミン 20% 飼料では対照群 1、試験群 1 で計 5 群で行なった。21 日目に体重測定後、断首放血し、胃、小腸、肝臓を切り取り、濾紙にて付着している血液、水分を除去し、胃、小腸はさらに内容物を除き、実験 1 の場合と同じようにして乾燥重量を求めた。

Table 1 Composition of diets used in Expt 1 (%)

	Low albumin diets				23% albumin diets	
	Control diet, A	Control diet, B	Test diet containing reacted OEL	Test diet containing cellul-OEL	Control diet	Test diet containing reacted OEL
Cellulose Powder	1.0	1.0	1.0	(1.0)	1.0	1.0
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Test OEL			1.0	1.0		2.0
(Reaction mixture)	—	—	(2.5)*	(2.0)**	—	(5.0)*
Egg albumin	11.5	10.0	10.0+(1.5)	11.5	23.0	25.0+(3.0)
Corn oil	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Corn starch	62.5	64.0	61.5	61.5	51.0	49.0

* The mixture (1:1.5) of OEL and albumin was incubated for 4 days and the resultant mixture was added to diet.

** The mixture (1:1) of OEL and cellulose was incubated for 4 days and the resultant mixture was added to diet.

Table 2 Composition of diets used in Expt 2 (%)

	Diet containing 10% control or reacted albumin	Diet containing 20% control or reacted albumin
Cellulose powder	1.0	1.0
Sucrose	10.0	10.0
Mineral mixture	4.0	4.0
Vitamin mixture	1.0	1.0
Control or reacted albumin	10.0	20.0
Corn oil	10.0	10.0
Corn starch	64.0	54.0

Reacted albumin was prepared by incubating the mixture (2:1) of albumin and OEL for 4 days and then successively extracting OEL thoroughly with acetone followed by diethyl ether.

L-lysine·HCl (0.65%) and DL-methionine (0.35%) were added to the diet containing 10% reacted albumin.

結果と考察

1. 反応 OEL の作用

実験 1 の結果を Table 3 に示した。表に従いアルブミン 10.0% および 11.5% の飼料を給与した群について見ると、反応 OEL 1% の試験飼料の群では、対照の 2 群に対し、摂取量には差は見られないが、増体量の少ない傾向が見られ、アルブミン 11.5% の対照群とは有意差が認められる。また試験群の 5 頭すべてに黄色の下痢便が観察された。一方、セルロース・OEL を 1% 給与した場合には摂取量、増体量とも対照群と差はなく、下痢便の程度も軽かった。従って反応 OEL は飼料に 1% 含有されてもラットの成長を抑制し、特徴のある下痢症状を起こし、その作用はセルロース・OEL よりも強いことが認められる。恐らくアルブミンと OEL との反応により、もとの OEL よりも生理作用の強い物質が生成されるものと思われる。次にアルブミンを 23% に、反応 OEL も 2% に高めた場合について見ると、増体量は対照群に対し有意差はないが少ない傾向が見られ、また下痢便も観察されたけれども、反応 OEL を倍量にしたことによる症状の悪化は認めることはできなかった。GREENBERG and

Table 3 Expt 1. Diet intake, body weight gain and small intestine weight of rats fed OEL incubated with albumin or cellulose

Level of albumin in diet	Group	Diet intake (g, 3 wks)	Weight gain (g, 3 wks)	Dry weight of small intestine (g/body wt 100g)	Physical appearance
10% or 11.5%	Control diet, A	198.9±0.3	67.9±3.2	0.80±0.13	
	Control diet, B	198.8±0.4	67.2±4.2	0.78±0.07	
	Test diet contg reacted OEL	198.6±0.9	61.4±2.9*	0.79±0.04	Severe diarrhea
	Test diet contg cellulose-OEL	198.6±0.7	72.3±5.4	0.73±0.04	Diarrhea
23%	Control diet	198.8±0.3	78.3±6.6	0.69±0.05	
	Test diet contg reacted OEL	196.7±2.4	71.5±4.4	0.75±0.04	Diarrhea

Each figure is the mean of 5 rats ± SD.

* Significantly different from the group fed control diet A ($P < 5\%$).

FRAZER⁴⁾はラットに酸化油を給与するとタンパク質要求量が増大し、タンパク質の量を多く与えれば酸化油を給与しても正常に成長させることができると報告している。このことから考えれば、アルブミンを11.5%から23%に高めた効果のために反応OELを倍量に増しても作用が強く表われなかったものと考えられる。

小腸重量について見ると、アルブミン10%および11.5%の飼料給与群では認められない。アルブミン23%の飼料給与群では試験群の方が重い傾向が見られるが有意差は見出せなかった。GREENBERG and FRAZER⁴⁾および滝川・大山¹¹⁾は酸化油を10%、飼料に加えた場合、給与したラットおよびヒナの小腸重量が増大し、酸化油の過酸化物価が高いほど小腸の肥厚が増大すると報告している。今回の実験のように酸化油の添加量が1~2%と少量ない場合は小腸重量に影響を与えるまでに至らないものと考えられる。

2. 反応アルブミンに吸着残存しているOELの作用

最初に反応アルブミンの損傷アミノ酸について述べる。Table 4には反応アルブミンおよび対照アルブミンについて、それぞれ3点ずつ加水分解を行なって得られたアミノ酸の値の平均と標準偏差を示した。対照アルブミンに対し有意に減少し損失の明らかなアミノ酸はリジン、ヒスチジンおよびシスチンの三種のみである。これまでの著者ら⁵⁾の実験および他の研究者らの報告^{2,3,14)}によれば、酸化脂質と反応させたタンパク質においてはリジン、ヒスチジン、アルギニン、スレオニンをはじめ、多くのアミノ酸が損傷をうけている。しかし金沢ら⁶⁾によれば、メチオニンはタンパク質の加水分解の際、共存する酸化脂質のため分解されるものであり、酸化脂質を除けばメチオニンの損失はほとんどないと報告されている。今回の著者らの実験でもタンパク質をそのまま加水分解した場合はメチオニンは大きく減少したが、タンパク質をあらかじめ過ギ酸で処理しメチオニンスルホンに酸化した後、加水分解したところ反応アルブミンのメチオニンは損失していないことが確かめられた。従って反応タ

Table 4 Amino acid composition of albumin made to react with oxidized ethyl linolate (mg amino acid per g N)

Amino acid	Control albumin	Reacted albumin
Asp	642±8	644±7
Thr	261±9	264±7
Ser	396±6	406±6
Glu	826±10	833±12
Pro	274±14	264±13
Gly	217±5	216±4
Ala	375±4	372±3
Val	455±6	456±5
Ileu	386±8	390±8
Leu	532±9	539±10
Tyr	261±6	255±7
Phe	399±7	389±8
Met	301±8	287±9
Cys	180±4	168±4*
Lys	429±12	285±9*
His	149±8	101±7*
Arg	349±10	337±6

Each figure is a mean (±SD) of values determined on three hydrolysates.

* Significantly different from the control albumin at the 0.05 level.

ンパク質の損傷アミノ酸に、報告者によって違いのあるのは、酸化脂質とタンパク質の反応条件の違いにもよるが、アミノ酸分析の方法および分析誤差なども影響しているためと考えられる。

次に Table 5 に反応アルブミンおよび対照アルブミンを給与した時の飼料摂取量、増体量、消化器官重量（実験2による結果）を示した。反応アルブミン 10% の試験飼料（リジン、メチオニンを補足）を給与した時の特徴は、自由摂取の対照群に比し飼料摂取量ならびに増体量が著しく低下することと下痢便が観察されることである。下痢便は実験1の場合と同様、黄色を呈していることから反応 OEL によるものと考えられ、アルブミンに OEL が残留していることを示すものである。飼料摂取量の低下は、反応 OEL の添加では飼料摂取量の低下は見られなかったのであるから、他の原因によるものである。考え得る原因としては必須アミノ酸の損失を伴うアルブミンの劣化のため、アミノ酸相互の比率が適正でなくなったことがあげられる¹⁾。この点に関してはリジンをすでに補足してあるので、他の損傷を受けたアミノ酸、ヒスチジンについて補足実験を行ない検討を加える必要がある。また増体量の低下については、飼料摂取量の低下が増体量の低下の直接の原因と考えられるので、試験群の摂取量にほぼ合わせて制限給餌した対照群と比較して見ると、やはり試験群の増体量が 5% の有意水準で少ない。従って飼料摂取量の低下のみでは両群の増体量の差を説明できず、アルブミンの劣化および OEL の残留が成長抑制のもう一方の原因となっていると考えられる。

Table 5 Expt 2. Diet intake, body weight gain and alimentary tract organ weights of rats fed reacted albumin or control albumin

Level of albumin in diet	Group	Diet intake (g, 3 wks)	Weight gain (g, 3 wks)	Stomach (dry wt g/body wt 100g)	Small intestine	Liver	Physical appearance
10%	Control diet (ad libitum)	211.0±1.1	64.3±1.3	0.14±0.01	0.66±0.05	1.10±0.03	
	Control diet (restricted)	136.2±1.2	21.3±4.2	0.20±0.01	0.76±0.07	1.23±0.03	
	Test diet contg reacted albumin	132.0±5.3	16.4±2.0*	0.19±0.03	0.78±0.10	1.13±0.07	Diarrhea
20%	Control diet	213.4±0.2	67.7±3.8	0.16±0.01	0.69±0.05	1.20±0.04	
	Test diet contg reacted albumin	210.9±0.9	67.6±4.1	0.14±0.01	0.67±0.02	1.17±0.03	Diarrhea

Each figure is the mean of 5 rats ± SD.

* Significantly different from the control group of restricted feeding (p<5%).

タンパク質 20% 飼料では試験群の摂取量、増体量ともに改善されて対照群、試験群の間に差はなくなり、ただ下痢便が観察された。この結果は前報⁵⁾の結果と同じであり、反応アルブミン含量を高くすれば摂取 OEL の量も増加するにもかかわらず、低タンパク質飼料の場合に見られる摂取量と増体量の低下が著しく改善される。これはタンパク質レベル 10% ではアルブミンの劣化のため、ラットの成長に適正なアミノ酸量を補給できないが、20% に高くすることにより必要なアミノ酸量を満すことができたためと解釈でき、さらに摂取 OEL に対する高タンパク質給与の効果もあったものと解される。

消化器官重量（体重 100g 当り）については、タンパク質レベル 10% の二つの対照群すなわち自由摂取群と制限給餌群の間でも胃、肝臓の間に有意差が見られ、小腸も有意差はないが制限給餌群の方が重い傾向である。これは日令が同じでも体重に差がある場合には単純

に消化器官重量を比較できないことを示すものである。それ故、体重の接近している制限給飼対照群と試験群を比較すると、胃、小腸、肝臓いずれについても差は認められない。またタンパク質レベル 20% の場合も同じく差は認められない。小腸については酸化脂質を給与すれば肥厚し重さが増加することが報告されているのであるから、実験 1 の結果から考え、アルブミンに吸着あるいは結合している OEL 量は小腸重量に影響をおよぼす程の量ではないと思われる。

摘 要

酸化リノール酸エチル（過酸化物質価 2500 m. e. / kg）と卵アルブミンを混合し、相対湿度 80%，60°C で 4 日間反応させた。この反応混合物を、酸化リノール酸エチルが 1% および 2% になるよう飼料に加え、体重 50g 前後のウィスター系雄ラットに 21 日間給与したところ、酸化リノール酸エチルを給与しない対照群と比較し飼料摂取量は低下しなかったが、増体量の少ない傾向と黄色の下痢便が認められた。しかし小腸重量には明らかな増加は認められなかった。

酸化リノール酸エチルと卵アルブミンとの反応混合物をアセトン、エチルエーテルで脱脂して得られる反応アルブミンのアミノ酸組成を調べたところ、リジン、ヒスチジン、システインが損傷を受け減少していた。この反応アルブミンを飼料に 10% 混合しラットに給与した結果、飼料摂取量と増体量の低下、黄色下痢便が観察された。反応アルブミン含量を 20% に高めると摂取量、増体量は著しく改善された。また反応アルブミンを給与した場合も消化器官、特に小腸の重量には対照群と差はなかった。

反応アルブミンの給与による下痢は、脱脂後の反応アルブミンになお少量ながら酸化リノール酸エチルが吸着していることを示すものであり、アルブミンの劣化とともにラットの成長に影響をおよぼしているものと認められた。

本実験の遂行に協力された山田和宏、竹村克巳の両君に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 芦田 淳：タンパク質栄養（赤堀四郎・中川八郎編），24-29，講談社・東京（1978）
- 2) DESAI, I. D. and A. L. TAPPEL : J. Lipid Research 4, 204-207 (1963)
- 3) GAMAGE, P. T. and S. MATSUSHITA : Agr. Biol. Chem. 37, 1-8 (1973)
- 4) GREENBERG, S. M. and A. C. FRAZER : J. Biol. Chem. 50, 421-440 (1953)
- 5) 堀米隆男・三浦道雄：農化 48, 437-444 (1974)
- 6) KANAZAWA, K., G. DANNO and M. NATAKE : J. Nutr. Sci. Vitaminol. 21, 373-382 (1975)
- 7) 金田尚志・渡辺寛子：栄養と食糧 16, 211-212 (1963)
- 8) MOORE, S. : J. Biol. Chem. 238, 235-237 (1963)
- 9) 米原太郎・岩尾裕之・久保彰治：食品分析法，99-107，柴田書店・東京（1963）
- 10) SPACKMAN, D. H. : Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 22, 499 (1963)
- 11) 滝川明宏・大山嘉信：日畜会報 46, Suppl. 81 (1975)
- 12) 戸谷洋一郎・戸谷永生・松尾登：栄養と食糧 28, 91-98 (1975)
- 13) WHEELER, D. H. : Oil & Soap, 9, 89 (1932)
- 14) YANAGITA, T. and M. SUGANO : J. Nutr. Sci. Vitaminol. 24, 581-588 (1978)