

ウズラ卵白オボムコイドのラット脂質代謝に及ぼす影響

田中 翠*, 大西 規世**, 竹田 早希**, 田代 操*.*

* (武庫川女子大学大学院生活環境学科研究科食物栄養学専攻)

** (武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Effect of Japanese quail ovomucoid on lipid metabolism in rats

Midori Tanaka *, Noriyo Ohnishi **, Saki Takeda **, Misao Tashiro *.*

* *Food Science and Nutrition Major*

Graduate School of Human Environmental Science,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo, 663-8558, Japan

** *Department of Food Science and Nutrition,*

School of Environmental Sciences,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo, 663-8558, Japan

It is well known that trypsin inhibitors (TIs) alter exocrine pancreatic function. We found that dietary TIs decreased serum triglyceride levels in Wistar rats in a previous investigation. In this study, we tried to confirm the effect of TIs on lipid metabolism of Sprague-Dawley (SD) rats with Japanese quail ovomucoid (OM) as a TI. Five-week-old male SD rats were fed a 20% casein control diet or OM diets containing 0.1% OM, 0.2% OM or 0.4% OM for 4 weeks. Rats had no change in food intake and growth rate between the control and OM fed groups. An OM fed group (0.4% OM) had lower serum triglyceride levels and no change in serum cholesterol levels. OM led to increased pancreatic protein content and trypsin and chymotrypsin activities in a dose dependent manner, but no difference in amylase activity. Liver fatty acid synthetase activity significantly decreased in OM fed groups. Therefore, we suggested that dietary OM caused increased pancreatic protein synthesis, which resulted in increased energy expenditure and decreased serum triglyceride levels.

緒 言

食品には動物のトリプシンを特異的に阻害するタンパク質が存在し、トリプシンインヒビター(TI)と呼ばれている。TIは抗栄養物質に分類されており、TIを摂取させたラットで膵臓肥大や成長抑制が起こることが報告されている¹⁾。しかし、少量のTIの摂取ではラットの成長を阻害せず、ガン予防や糖尿病症状の改善に有効であるとの報告もある²⁾³⁾。先の研究により、我々はWistar系ラットに0.2%TI含有飼料を投与することによってラットの血中中性脂肪値が低下すること

を認めている⁴⁾。これはTI摂取による膵臓のTrophic効果によりエネルギー代謝が変動し、この変動に伴って脂質代謝が影響されたものと考えている。

本研究ではラットとしてSD系を用いて、TIの脂質代謝に及ぼす影響を投与量依存性の面から検討した。さらにTIのTrophic効果が脂質代謝に影響を及ぼすという仮説についての検討を試みた。また、本研究ではTIとしてウズラ卵白オボムコイド(OM)を用いた。通常食用されているのは鶏卵であるが、鶏卵のオボムコイドはヒトのトリプシンを阻害しない⁵⁾。一方、ウズラOMはヒ

トリプシンを阻害し, その面において非常に興味深い。

実験方法

1. 実験材料

ウズラ卵白オボムコイド(OM)はウズラ卵白より Lineweaver と Murray の TCA-アセトン法⁶⁾により調製した。

2. 動物実験

Table 1. Composition of experimental diets (g/100g diet)

Ingredient	Control	0.1%OM	0.2%OM	0.4%OM
Casein	20	19.9	19.8	19.6
OM	0	0.1	0.2	0.4
Corn starch	60	60	60	60
Olive oil	10	10	10	10
Vitamin mixture	1	1	1	1
Mineral mixture	5	5	5	5
Cellulose powder	4	4	4	4

生後4週のSD系雄性ラットを固形飼料(MF:オリエンタル酵母工業)で1週間予備飼育し, その後実験飼料にて28日間飼育を行った。実験飼料はOMの添加量を変え(0%, 0.1%, 0.2%, 0.4%), カゼインで調整を行った(Table 1)。

動物は無作為に各6匹ずつ4群に分け, 金網ケージに1匹ずつ入れ, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 7\%$, 12時間の明暗サイクルの飼育室で飼育を行った。水は自由に, 飼料は4時間(11:00~15:00)に制限して摂取させた。摂食量は毎日測定を行った。飼育期間終了後, エーテル麻酔下で開腹して腹部大動脈より採血し, 肝臓, 膵臓を摘出して重量を測定した。血液は3,000rpmで15分間遠心分離し, 上清(血漿)を得た。小腸は胃幽門から10cmを切り取り, 生理食塩水で内部を洗浄した後切り開いてスライドガラスで粘膜をこすり取った。小腸粘膜は重量を測定し凍結乾燥した。血漿と臓器は分析時まで -80°C で保存した。

3. 血清及び肝臓脂質濃度の測定

血清脂質はDRI-CHEM5500(富士フィルム株式会社)を用いて, 総コレステロール(TCHO-PⅢ), HDL-コレステロール(HDL-C-PⅢ), 中性脂肪(TG-PⅢ)を測定した。血中遊離脂肪酸は測定キット(和光純薬工業, NEFA-Cテストワコー)を用いて定量した。

肝臓脂質の分析はFolchらの方法⁷⁾に従って脂

質を抽出し総脂質量を測定した後に, 測定キット(和光純薬工業)により総コレステロール(コレステロールEテストワコー), 中性脂肪(トリグリセライドEテストワコー), リン脂質(リン脂質Cテストワコー)を定量した。

4. 肝臓, 膵臓, 小腸粘膜のタンパク質の定量

肝臓は蒸留水を加えてホモジナイズしたものに等量の10%TCA溶液を加え, 沈殿したタンパク質を0.1N NaOHで溶解したものをサンプル溶液とした。膵臓は0.15M NaClを含む0.01M リン酸バッファー(PBS)を加えてホモジナイズし, 同様にTCA処理したものをサンプル溶液とした。小腸粘膜は凍結乾燥させたものに40倍量の生理食塩水を加えてホモジナイズし, 10%TCAを加えた。沈殿したたんぱく質を0.1N NaOHで溶解したものをサンプル溶液とし, 全てLowryらの方法⁸⁾により測定した。

5. 膵臓の酵素活性測定

膵臓にPBSを加えてホモジナイズし, ホモジネイトを遠心分離(4°C , 30 min, $20000 \times g$)して得た上清を酵素液としてTrypsin, Chymotrypsin, α -Amylaseの活性をそれぞれ測定した。TrypsinとChymotrypsinの活性は酵素液にエンテロキナーゼを加えて24時間反応させたものを酵素試料溶液とした。それぞれベンゾイルアルギニン-p-ニトロアリニド, ベンゾイルチロシン-p-ニトロアリニドを基質とした酵素反応による410nmでの吸光度上昇から測定した。両酵素の1Unitは 37°C , 1分間での酵素反応で410nmでの吸光度を1.0上昇させる活性と定義した。

α -Amylase活性はBernfeldらの方法⁹⁾により測定し, 1Unitは 37°C , 1分間で $1 \mu\text{mol}$ のマルトースを遊離させる活性と定義した。

6. 肝臓の脂肪酸合成酵素活性測定

肝臓の脂肪酸合成酵素活性は仲佐らの方法¹⁰⁾に従って測定した。すなわち, 肝臓ホモジネイトを遠心分離(4°C , 60min, $100000 \times g$)して得た上清を酵素液とし, 全量1ml中に0.5Mリン酸Buffer(pH7.0), 1mM 2-メルカプトエタノール, 0.1mM NADPH, 0.033mM acetyl-CoA, 0.1mM malonyl-CoAおよび酵素液が含まれるように反応液を調整し, 30°C で反応させて340nmにおけるNADPHの吸光度の減少を測定した。分子吸光係数 6.22×10^3 からNADPHの減少量を求め, 本酵素の1unitを 30°C で1分間に $1 \mu\text{mol}$ のNADPHを減少させ

る活性とした。

7. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差(mean±SEM)で示し、市販のソフト(カレイダグラフ, Ver 3.6)による一元配置の分散分析で統計処理を行った。さらに多群間での比較には Turkey HSD 法を用い、 $p < 0.05$ 以下で有意差ありと判定した。

実験結果及び考察

1. 体重増加量と飼料摂食量

実験食開始日と飼育最終日の体重、実験食投与期間の体重増加量と飼料摂食量を Table 2 に示す。

0.1%OM 群を除いた 3 群間において、4 週間の飼育での体重増加量、飼料摂取量に特に差は見られなかった。0.1%OM 群では摂食量が低下しており体重増加量も少なかった。McLaughlin らは大豆 TI の投与による摂食抑制効果は肥満ラットに対し正常ラットでは弱いと報告¹¹⁾しており、また今回の実験において最も低濃度である 0.1%OM 群で摂食抑制効果が発現したとは考えにくい。0.1%OM 群の摂食低下に関してはおそらく個体差あるいは飼育において何らかのストレスが存在したことが考えられる。したがって、今回の飼育条件下では OM はラットの成長に影響を与えないものと考えられた。

Table 2. Body weight and food intake of rats fed experimental diets

	Control	0.1%OM	0.2%OM	0.4%OM
Initial body weight (g)	115±2	111±2	111±2	112±1
Final body weight (g)	238±12	207±5	230±14	238±8
Body weight gain (g)	123±10	96±4	118±14	126±8
Food intake (g)	337±23	280±9	333±26	336±16

Values are means ± SEM of 6 rats per group

2. 肝臓及び血清の脂質量

肝臓脂質量を Table 3 に、血中脂質濃度を Table 4 に示す。肝臓の総脂質量は 4 群間で違いは見られなかった。総コレステロール濃度とリン脂質濃度においても各群に有意な違いは見られなかった。中性脂肪濃度は有意ではないが、OM 摂食により低下する傾向が見られた。

血清の脂質量においては、中性脂肪濃度が OM 摂食で低下する傾向が見られた。総コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度、遊離脂

肪酸濃度には特に差は見られなかった。これらの結果より、前回の実験同様に OM が脂質代謝に影響を与え、中性脂肪を低下させる傾向が確認された。

Table 3. Liver lipids of rats fed experimental diets

	Control	0.1%OM	0.2%OM	0.4%OM
Total Lipid (mg/g Liver)	50±2	41±3	47±3	54±4
Triglyceride (mg/g Liver)	8.5±1.1	8.4±1.9	7.6±2.0	7.3±1.7
Cholesterol (mg/g Liver)	2.5±0.1	2.4±0.2	2.6±0.1	2.8±0.2
Phospholipid (mg/g Liver)	13±0.5	13.±0.4	12±0.4	12±0.3

Values are means ± SEM of 6 rats per group.

Table 4. Serum lipids concentration of rats fed experimental diets

	Control	0.1%OM	0.2%OM	0.4%OM
Triglyceride (mg/dl)	101±21	64±7	71±7	58±5
Total Cholesterol (mg/dl)	81±4	79±5	83±10	80±4
HDL-Cholesterol (mg/dl)	38±4	44±5	38±3	41±4
NEFA (mEq/l)	79±9	78±9	69±4	82±8

Values are means ± SEM of 5~6 rats per group.

3. 臓器重量とタンパク質含量

肝臓、膵臓、小腸粘膜の重量とタンパク質量を Table 5 に示す。肝臓においては重量とタンパク質含量でどの群においても違いは見られなかった。膵臓重量と膵臓のタンパク質量は OM 摂取により増加する傾向を示した。これは TI の Trophic 効果によるものであり、前回の実験で TI 摂取によりラットの膵臓に起こった現象と一致している。一般的に TI による膵臓の Trophic 効果はコレシストキニン(CCK)の分泌増加によると考

Table 5. Liver, pancreas and mucosa scraping weights and protein content of rats fed experimental diets

	Control	0.1%OM	0.2%OM	0.4%OM
Liver weight (g/100g BW)	3.39±0.21	3.23±0.13	3.47±0.18	3.32±0.11
Pancreas weight (g/100g BW)	0.32±0.03	0.33±0.03	0.31±0.03	0.39±0.01
Mucosa scraping weight (g/100g BW)	0.15±0.024	0.19±0.016	0.16±0.013	0.16±0.021
Protein content				
Liver (mg/g liver)	166±5	170±4	158±4	176±4
Pancreas (mg/g Pancreas)	140±5	146±8	175±16	149±7
Mucosa scraping (mg/g dry mucosa)	601±11	666±46	597±27	669±57

Values are means ± SEM of 5~6 rats per group.

えられており, TI の慢性投与で血中 CCK の増加を介して7日以内にラットの膵臓で肥大が起こることが報告¹²⁾されている。ただし, CCK の摂食抑制作用は今回の実験においては観察されていない。また, 通常 CCK により α -Amylase 活性は上昇するが後述のとおり今回の実験において差は見られなかった。これらのことより, OM 摂取によって CCK 分泌が増加したとは考えられるが, おそらくその分泌はそれほど著しいものではなかった可能性も考えられる。小腸粘膜重量は各群で変化は見られなかったが, タンパク質含量においては 0.4%OM 群で Control 群に対して上昇しており, OM 摂取で増加する可能性が示唆された。

4. 膵臓の酵素活性

膵臓の Trypsin, Chymotrypsin, α -Amylase の活性を Table 6 に示す。Trypsin と Chymotrypsin 活性は OM 投与量依存的に上昇した。 α -Amylase 活性に関しては前回の実験で TI 摂取により活性が上昇したのに対し, 各群で差が見られなかった。Roy らは大豆 TI をマウスに摂取させたときに Trypsin, Chymotrypsin, α -Amylase の活性が上昇したと報告¹³⁾している。 α -Amylase の活性については検討が必要である。しかし, これらの酵素活性の上昇も Trophic 効果によるものと考えられ, やはり OM 摂取によって膵機能の亢進が認められた。

Table 6. Pancreatic enzyme activities of rats fed experimental diets

	Control	0.1%OM	0.2%OM	0.4%OM
Trypsin (U)	33.4±5.6	35.6±5.4	45.2±5.7	52.9±2.6
(U/g pancreas)	44.3±5.9	50.3±4.0	64.0±7.7	57.3±2.3
Chymotrypsin (U)	12.7±1.3 ^a	16.0±2.3 ^a	20.8±2.7 ^a	28.0±2.0 ^b
(U/g pancreas)	17.3±1.7 ^a	22.5±1.6 ^{ab}	29.5±3.6 ^b	30.2±1.1 ^b
α -Amylase (kU)	31.0±2.2	29.1±4.9	31.4±4.6	34.1±2.7
(kU/g pancreas)	42.3±3.5	41.0±5.6	44.2±6.2	36.8±2.0

Values are means \pm SEM of 6 rats per group. Values with different superscript are significantly different (P<0.05).

5. 脂肪酸合成酵素活性

膵臓の脂肪酸合成酵素の活性は OM の投与量に依存して有意に低下した (Table 7)。このことより OM 摂取によりエネルギー代謝が亢進していることが推測される。これは OM 摂取による Trophic 効果によって膵臓でのタンパク質合成が高まったことが原因のひとつと考えられる。よって, この結果は TI 摂取による Trophic 効果が脂

質代謝に影響を及ぼすという我々の仮説を支持するものと考えられる。

Table 7. Fatty acid synthetase activities of rats fed experimental diets

	Control	0.1%OM	0.2%OM	0.4%OM
Fatty acid synthetases (U)	5.89±0.60 ^a	4.03±0.40 ^b	3.96±0.42 ^b	3.55±0.17 ^b
(U/g Liver)	0.73±0.02 ^a	0.60±0.03 ^b	0.49±0.01 ^c	0.45±0.01 ^c

Values are means \pm SEM of 5~6 rats per group. Values with different superscript are significantly different (P<0.05)

要約

ウズラ卵白オボムコイド(OM)のラット脂質代謝へ与える影響について検討を行うため, SD 系の幼ラットに OM 含量の違う飼料(0%, 0.1%, 0.2%, 0.4%)を4時間 meal feeding で4週間与えた。OM はラットの成長には影響を与えなかった。0.4%OM 群では血中中性脂肪濃度が低下傾向を示したが, 血中コレステロール濃度はどの群においても違いは見られなかった。肝臓については重量に違いは見られなかったが, 中性脂肪含量が OM 摂取で低下する傾向が観察された。膵臓重量は OM 投与量依存的に増加し, 膵臓タンパク質, Trypsin 活性, Chymotrypsin 活性も有意に上昇しており Trophic 効果の発現が確認された。肝臓の脂肪酸合成酵素活性においては OM 投与量依存的に有意に低下しており, エネルギー代謝が亢進したことが示唆された。以上の結果は, OM 摂取に伴う血中中性脂肪低下現象は膵臓の Trophic 効果による代謝変動が関係するという我々の仮説を支持するものであった。

文献

- 1) Liener, I. E., Kakade, M. L., Proteinase inhibitors, in "Toxic constituents of plant foodstuffs", 2nd ed., ed. by Liner, I. E., Academic press, New York, pp.7-71 (1980)
- 2) Losso, J. N., Crit.Pev. Food Sci. Nutr., **48**, 94-118 (2008)
- 3) Laurenti, O., Piccoli, A., Bravi, C., Cassone-Faldetta, M., Bellini, C., Leoni, L., Ferri, C., De Mattia, G., Diabet. Med., **13**, 642-645 (1996)
- 4) 田代操, 澤田小百合, 竹田早希, 日本食品科学工学

- 会誌, **55**, 416-420 (2008)
- 5) Feeney, R. E., Means, G. E., Bibler, J. C., *J. Biol. Chem.*, **244**, 1957-1960 (1969)
- 6) Lineweaver, H., Murray, C. W., *J. Biol. Chem.*, **171**, 565-581 (1947)
- 7) Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H., *J. Biol. Chem.*, **226**, 467-509 (1957)
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 9) Bernfeld, P., *Meth. Enzymol.*, **1**, 149-158 (1955)
- 10) 仲佐輝子, 山口真由美, 沖中靖, 目鳥幸一, 高橋周七, 日本農芸学会誌, **69**, 1491-1498 (1995)
- 11) McLaughlin, C. L., Peikin, S. R., Baile, C. A., *Physiology & Behavior*, **31**, 487-491 (1983)
- 12) 宮坂京子, 金井節子, 太田稔, 船越顕博, 瘳臓, **22**, 117-122 (2007)
- 13) Roy, D. M., Schneeman, B. O., *J.Nutr*, **111**, 878-885 (1981)