

ラット血清、肝臓脂質濃度に及ぼすコレステロールとリン脂質投与の影響

黒田圭一、小島義樹*

Effect of Dietary Cholesterol and Phospholipid on Serum and Liver Lipids of Rats

Keiichi Kuroda Yoshiki Kobatake*

The lowering of serum and liver cholesterol concentration with dietary phospholipids has been assumed to be the repression of cholesterol absorption from the intestine is brought by existing together with dietary phospholipids in the intestine was studied. Four groups of rats were fed a diet with alternatively switching on every other day of 1) a hypercholesterolemic diet / a olive oil diet, 2) a hypercholesterolemic diet/a egg yolk phospholipid diet, 3) a hypercholesterolemic diet / a hydrogenated egg yolk phospholipid diet, and continuously fed 4) a olive oil diet (control group), respectively. The concentrations of the serum and liver cholesterol of 3 groups were higher than that of the control group, and not significantly different from each other. On the other hand, fecal cholesterol of group 3 was higher amounts than those of group 1 and 2. These results suggest that when cholesterol is co-existing with dietary phospholipids in the intestine, the absorption of cholesterol is repressed. It is assumed, however, that the hydrogenated phospholipids keep the effects of repression after its ingestion.

著 言

食品中のリン脂質は、血清および肝臓中の脂質濃度、特にコレステロール濃度を低下させる効果があることが知られている¹⁻⁴⁾。著者らも、これまで食品中のリン脂質が血液中および肝臓中の各種脂質濃度に及ぼす影響を検討してきており、異なった食品から抽出されたリン脂質間の比較^{5,6)}、同一起源でもリン脂質組成の異なったリン脂質間の比較⁷⁾、同一起源で同一リン脂質組成であるが脂肪酸組成の著しく異なったリン脂質間の比較⁸⁾等に

ついてすでに報告している。その場合、高コレステロール飼料投与および無コレステロール飼料投与時のいずれの場合においても、血清、肝臓中のコレステロール濃度を低下させる、あるいは上昇を抑制する効果が認められた⁵⁻⁹⁾。本実験では同一起源のリン脂質でしかもその結合する脂肪酸の組成がまったく異なった場合、それらリン脂質を摂取したラットの血清および肝臓中の脂質濃度に与える影響が相違するかどうかを追求する事を目的とした。すでに我々は高コレステロール負荷条件においてこれらリン脂質の作用の相違を検討してき

*千葉県立衛生短期大学

た。この結果、いずれのリン脂質も強いコレステロール上昇抑制効果を示したが、脂肪酸組成の相違はそれほど血清コレステロール濃度に影響を与えないことをみた。これらのリン脂質の血清脂質に対する効果は消化管からコレステロールの吸収をリン脂質が抑制することが原因と考えられるので、コレステロール負荷に際して同時にリン脂質が存在する条件でコレステロールの吸収が抑制されるのか、あるいはリン脂質とコレステロールが時間をずらせて摂取された時でもコレステロールの吸収が抑制されるのか確認する必要がある。今回はリン脂質を含まない高コレステロール飼料を与えた次の日に、通常飼料に卵黄リン脂質または水素添加卵黄リン脂質をそれぞれ添加した飼料を与えるようにし、これを2週間の間繰り返し、血清および肝臓コレステロール濃度に与える影響を調べ、消火管内でのリン脂質とコレステロール吸収との関係を検討したので報告する。

実験方法

1. 実験動物

実験には、3週齢のSprague-Dawley系の雄ラットを東京実験動物(株)より購入した。数日間固型飼料(クレアCE-2)により飼育し、1週間20%ガゼインの予備飼料で飼育後、成長に異常のないラットのみを用いた。実験群は各群5匹とし、1匹ずつアパートメント式飼育ゲージに入れ飼育した。

2. 実験飼料及び飼料投与法

一週間予備飼料で飼育したラットは5匹ずつ4群に分け、各実験飼料を2週間投与した。試験飼料は、Table 1に示したように0.5%コレステロール、0.25%コール酸Naを含む高コレステロール飼料(Diet 1)、無コレステロール飼料に試験油脂として5%オリーブ油(Diet 2)、5%卵黄リン脂質(Diet 3)、5%水素添加卵黄リン脂質(Diet 4)をそれぞれ含む飼料を合計4種調整し、

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredient(g/100g)	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Mineral Mixture*	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin Mixture*	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose powder	2.0	2.0	2.0	2.0
α -Corn starch	15.0	15.0	15.0	15.0
Sucrose	47.25	48.0	48.0	48.0
Cholesterol	0.5	—	—	—
Sodium Cholate	0.25	—	—	—
Lard	5.0	5.0	5.0	5.0
Olive oil	5.0	5.0	—	—
Egg yolk phosphlipids	—	—	5.0	—
Hydrogenated egg yolk Phospholipids	—	—	—	5.0

*AIN-76™

	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th	10th	11th	12th	13th	14th
Group 1	▲	△	▲	△	▲	△	▲	△	▲	△	▲	△	▲	△
Group 2	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○	▲	○
Group 3	▲	◎	▲	◎	▲	◎	▲	◎	▲	◎	▲	◎	▲	◎
Group 4	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△

Fig 1. Feeding program of dietary groups.

Diet 1 ...▲ Diet 2 ...△ Diet 3 ...○ Diet 4 ...◎

Table 2. Composition of sample phospholipids.

	Olive oil	Egg yolk Phospholipids (%)	Hydrogenated egg yolk Phospholipids (%)
Phospholipid content (P×25)		94.2	89.5
Phosphatidylcholine		79.7	82.8
Phosphatidylethanolamine		10.5	8.8
Lyso-phosphatidylcholine		1.6	1.8
Neutral lipid		3.3	2.0
Sphingomylin		1.6	1.4
	(Fatty acid composition, %)		
14:0	tr	0.2	tr
16:0	10.1	29.7	29.7
16:1	0.9	1.2	nd
17:0	nd	nd	0.3
18:0	3.3	15.7	54.2
18:1(n-9)	77.9	26.3	nd
18:2(n-6)	6.2	13.3	nd
18:3(n-3) & 20:1	0.9	0.2	nd
20:0	nd	nd	6.7
20:3(n-9)	nd	0.6	nd
20:4(n-6)	nd	5.4	nd
22:0	nd	nd	8.7
22:5(n-6)	nd	0.8	nd
22:5(n-3)	nd	0.3	nd
22:6(n-3)	nd	5.0	nd
24:0	nd	nd	0.1
24:1	nd	0.4	nd

tr = trace. nd = not detected

Fig.1に示したように単一の群に2種類の飼料を隔日毎に交互に投与した。すなわち群1はDiet 1とDiet 2を交互に、群2はDiet 1とDiet 3を交互に、群3はDiet 1とDiet 4を交互に、群4はDiet 2を連続してそれぞれ2週間投与した。

3. 動物処理法

2週間の実験最終日、7:00a.m.から7時間絶食後、ネンブター麻酔下で心臓から採血することにより屠殺し、直ちに肝臓を摘出した。肝臓は0.9%食塩水を肝門脈から圧入することにより十分脱血した。血液は約1時間氷水中に静置後、3500rpm、15分間の条件で遠心分離を行い血清を採取した。

4. 測定法

実験飼料投与期間の体重増加量、飼料摂取量を測定すると共に、血清については総コレステロール(T-chol)濃度をキットによる酵素法により測定した。また実験期間中の最終10日間に排せつされた糞を採取した。

肝臓、糞は2:1のクロロホルム:メタノール混

液(C-M混液)により総脂質を抽出し、肝臓T-chol及びふん中のコレステロールはC-M混液抽出物をけん化後、ジキトナイドを生成¹⁰⁾させ硫酸発色法¹¹⁾により測定した。リン脂質組織は、イヤトロンスキャン法(Iatronscan TH-10)により分析した。リン脂質の分離にはシュウ酸をコーティングしたロッドをCH₂Cl₂:MeOH:H₂O(65:35:4)の組成の溶媒で展開する方法を用いた¹²⁾。

5. 試薬及び試験油脂

実験に用いた試薬はすべて特級品を用い、実験飼料へ添加した試験油脂の成分組成はTable 2に示した。卵黄リン脂質、水素添加卵黄リン脂質の2種のリン脂質組成は非常に近いパターンを示していた。脂肪酸組成は、卵黄リン脂質では16:0、18:1、18:0、18:2、20:4、22:6が主要な脂肪酸であったが、水素添加卵黄リン脂質では不飽和脂肪酸がほぼ完全にそれに対応する飽和脂肪酸に変換しており、16:0、18:0、20:0、22:0が主要脂肪酸であった。卵黄リン脂質の旭化成工業(株)、水素添加リン脂質はキューピー(株)においてそれぞれ製造されたものであった。

Table 3. Effect of dietary egg yolk phospholipids and hydrogenated egg yolk phospholipids on weight gain, food intake, liver weight and fecal weight.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Initial body weight(g)	126.0±3.0*	126.0±2.5	126.2±3.9	126.2±3.8
Weight gain (g/2weeks)	104.4±4.8*	91.6±7.2 ^{ab}	79.6±9.8 ^b	102.4±4.4 ^{ab}
Food intake (g)				
Diet 1	118.1±3.7	112.5±3.7	116.8±4.9	
Diet 2	118.1±4.1			228.5±13.5
Diet 3		102.0±3.4		
Diet 4			91.4±7.4	
Total	236.2±7.5	214.5±7.0	208.2±12.2	228.5±13.5
Weight gain/Food intake	0.44±0.01*	0.42±0.02 ^{ab}	0.39±0.02 ^b	0.45±0.01*
Liver weight (g)	12.80±0.52*	11.10±0.70 ^{ab}	10.23±1.11 ^b	10.83±0.67 ^{ab}
Fecal weight (g/10 days)	6.74±0.37*	6.78±0.35*	8.69±0.70 ^b	7.10±0.57*

*Mean±SEM(n=5). Means in the same horizontal column not sharing a common superscript letter are significantly different(p<0.05).

6. 統計処理

データの統計処理はDuncanの多重検定法によって行った。

実験結果及び考察

実験期間中の体重増加量、飼料摂取量、肝臓重量と糞重量をTable 3に示した。14日間の体重増加量は、群1、群2、群4の3つの群間では有意の差が認められなかった。群3では、群1に比較して有意に低下しており、群2、群3に比べて低下の傾向が見られた。一方、飼料摂取量も群3は、群1、群2、群4に比較して低下の傾向がみられたが、体重増加量ほどの差はみられなかった。これは水素添加卵黄リン脂質には、18:0、20:0、22:0のような飽和脂肪酸が結合しているためその吸収利用がわるかったのではないかと考えられる¹³⁾。その結果飼料利用率も群3で群1に比べて明らかに低値が認められた。肝臓重量は群1で最も高く、群1に比較して群2、群4で低い傾向がみられ、群3では明らかに低値が認められた。

実験最終10日間中の乾燥糞重量は、水素添加卵黄リン脂質を摂取した群3で他のいずれの群よりも有意に高い結果が認められたが、これも飼料効率と関係があるものと考えられる。また水素添加卵黄リン脂質を投与すると糞重量が増加する⁸⁾ことは、さきに確認しているが、この現象は水素添

加した飽和脂肪酸を結合したリン脂質は腸管内で加水分解されにくいと考えられる。

血清中の総コレステロール濃度、中性脂肪濃度、肝臓中の総コレステロール、糞中のコレステロール濃度をTable 4に示した。血清総コレステロール濃度は、コレステロールを含まないDiet 2を連続投与した群4では、コレステロールを含む飼料を隔日に摂取した他の3つの群よりも有意に低値を示したが、他の3群間には有意の差はみられなかった。血清中の中性脂肪濃度は、群3で他の3つの群に比較して明らかに低値あるいは低下の傾向がみられた。肝臓中の総コレステロール濃度は、血清中にそれと同様の傾向がみられ、群1、群2、群3に比較して群4で著しく低い値を示したが、群1、群2、群3の3群間には、有意の差は認められなかった。高コレステロール飼料投与で、リン脂質の同時摂取は、血清、肝臓中のコレステロール濃度の上昇を抑制する作用を持つことが認められている^{5,6)}。またコレステロールを含まない飼料投与時でも、リン脂質を4週間程度摂取すると、血清、肝臓中のコレステロール濃度が低下している⁹⁾。しかし、本実験の2週間程度高コレステロール飼料とリン脂質を別々に摂取させるという条件下では、血清、肝臓中のコレステロール濃度に与えるリン脂質の影響は少なかった。この理由としては、高コレステロール飼料投与時、リン脂質が影響を与えるのは腸管でのコレステロールの吸収

Table 4. Effect of dietary egg yolk phospholipids and hydrogenated egg yolk phospholipids on concentration of various lipids in serum, liver and feces of rats.

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Serum total cholesterol(mg/100 ml)	114.7±11.8 ^{*ab}	138.3±14.2 ^a	118.9±23.5 ^{ab}	74.1±2.0 ^b
Serum triglyceride (mg/100 ml)	141.5±24.6 ^a	142.1±13.9 ^a	89.7±14.2 ^b	117.8±8.1 ^{ab}
Hepatic total cholesterol (mg/g)	25.1±0.9 ^a	26.2±2.7 ^a	22.4±1.1 ^a	7.4±0.3 ^b
Fecal cholesterol (mg/10 days)	33.6±2.4 ^a	31.3±0.8 ^a	57.0±5.7 ^b	8.7±1.0 ^c

*Mean±SEM (n=5). Means in the same horizontal column not sharing a common superscript letter are significantly different(p<0.05).

阻害であることがこれらのデータからも強く推定される。

10日間中の糞中のコレステロール濃度は、群4では8.7mgと最も低く、群1と群2はそれぞれ33.6mg、31.3mgと差がなく、群3は57mgと有意に高い値が認められた。この結果は少なくとも水素添加した飽和脂肪酸を含むリン脂質の投与は隔日毎に投与したコレステロールとの間にも何らか互いに影響を与える可能性があることを示していた。

要約

リン脂質(PL)投与による血清や肝臓中のコレステロール(Chol)濃度の上昇抑制はその吸収阻害が原因と考えられるが、消化管内でリン脂質とCholが同時に共存するときその現象が起こるかどうかを検討する実験を行った。ラットに次の4実験群、1)高Chol飼料とオリーブ油飼料交互投与、2)高Cholと卵黄PL飼料交互投与、3)高Chol飼料と水素添加卵黄PL飼料交互投与、4)オリーブ油飼料のみ(対照)、を設けた。前3者の交互投与は隔日とした。血清および肝臓のChol濃度は対照群より他の3群はいずれも高く、相互に差はなかった。群3の糞中Chol量は群1と群2より多かった。この結果はCholがPLと消化管で同時に存在するとき、Chol吸収の抑制が起こると推定された。また、水素添加PLでは摂取後も吸収抑制の影響が残る可能性が見られた。

本研究の一部は平成2年度文部省科学研究費助成金(奨励研究(A)、課題番号:02780078)によって行ったことを記して謝意を表します。

引用文献

- 1)Oversen, L., Ebbesen, K., and Olesen, E.S.:J. Paarenteral Enteral Nutr.,9,716 (1985)
- 2)Imaizumi,K., Mawatari,K., Murata,M., Ikeda,I. and Sugano,M.:J.Nutr.,113,2403 (1983)
- 3)Galli,C., Tremoli,E., Giani,E., Maderana,P., Gianbranceschi,G. and Sirtori,C.R.:Lipids,20,561(1985)
- 4)Rampone,A.J. and Machida,C.M.:J.Lipids Res.,22,744(1981)
- 5)黒田圭一、小島義樹、西出英一、山口迪夫:栄養学雑誌、45,263(1987)
- 6)黒田圭一、小島義樹:帝京短期大学紀要,7,9 (1989)
- 7)小島義樹、黒田圭一、斎藤衛郎、西出英一、山口迪夫:日本栄養・食糧学会誌,41,457(1988)
- 8)小島義樹、黒田圭一、西出英一、山口迪夫:日本栄養・食糧学会誌、42,369(1989)
- 9)小島義樹、黒田圭一、山口迪夫:日本栄養・食糧学会誌、41,23(1988)
- 10)Sperry,W.M. and Webb,M.:J. Biol. Chem., 187,97(1950)
- 11)Sobel,C. and Fernandez,A.:Clin. Chem., 12,739(1966)
- 12)Banerjic,A.K., Ratnayake,W.M.N. and Ackman,R.G.:Lipids,20,121(1985)
- 13)Westergaad,H. and Dietschy,H.J., Jr.:J. Clin. Invest.,58,97(1976)