

高脂肪食飼育ラットの脂質代謝におよぼす ウマ心臓ペプチドの影響

辻原 命子

Effects of Horse Heart Peptides on Lipid Metabolism in Rats Fed a High Fat Diet

Nobuko TSUJIHARA

緒 言

食品成分がこれを摂取する生体側に与える効果を食品機能という。食品機能は栄養としての1次機能, 呈味性や食品物性など感覚に関連した2次機能, そして生体調節に関連した3次機能に分類される¹⁾。1次機能, 2次機能については以前から報告が多くあるが, 最近, 食品の3次機能について注目されてきており, タンパク質の分解中間物質であるペプチドの3次機能に関してアンジオテンシン転換酵素阻害作用¹⁾やダイズペプチドのコレステロール上昇抑制機能²⁾, カゼインホスホペプチドのカルシウム吸収促進作用³⁾, イワシペプチドの血圧上昇抑制作用⁴⁾, 牛乳 κ -カゼインのトリプシン消化物による回腸収縮活性作用⁵⁾などの報告がある。特にペプチドによる脂質代謝への影響がよく研究されている。

一方, カルニチンは長鎖脂肪酸がミトコンドリアマトリックス内で β -酸化を受けてエネルギーとして利用されるのに不可欠な物質であり, Maebashiら⁶⁾も高脂血症時にカルニチンを投与することにより脂質代謝が改善したと報告している。また腹膜炎や敗血症時などの重症感染症時にカルニチンを投与することにより, 脂質代謝の改善することが認められている^{7,8)}。著者は本研究において現在廃棄されているウマ心臓の用途拡大の目的で, 比較的含有量の多いカルニチンに着目し, 高脂肪食飼育ラットを用いてウマ心臓より調製したカルニチン含有ウマ心臓ペプチドを投与し, 脂質代謝改善効果について pure なカルニチンを投与した場合と比較検討した。

実 験 方 法

1. 動物飼育法

8週齢(体重240~260g) Wistar系雄性ラット(日本エスエルシー株)18匹を用い, 対照区, L-カルニチンを添加したカルニチン投与区, カルニチン含有ウマ心臓ペプチド投与区に分け, 各々6匹ずつとした。いずれの群も購入後1週間日本クレア株の粉末飼料(CE-2)を投与して予備飼育した後, Table 1に示す組成の高脂肪食を4週間投与した。後半の2週間にカルニチン投与区にはカルニチン(100mg/匹/日)を添加し, ペプチド投与区にはTable 2に示す成分組成のウマ心臓ペプチドを2g/匹/日(カルニチン100mg含有)投与した。なおペプチド投与区ではペプチド投与により, タンパク質量, 糖質量が他の区より増加するため,

Table 1 Composition of high fat diet.

Ingredient	(%)
Corn starch ¹	51.75
Casein ²	20
Lard ³	20
Cellulose ⁴	2
Mineral mixture ⁵	4
Vitamin mixture ⁶	1
Cholesterol ⁷	1
Sodium cholate ⁸	0.25

^{1, 2} Japan Clea, Co., Tokyo

³ Yoneyama Reagent Industries, Co., Ltd., Osaka

⁵ This was identical with Harper's mixture(Ref 14)

⁶ Oriental yeast, Co., Tokyo (Ref 15)

^{7, 8} Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo

Table 2 General analysis of house heart peptides(%).

Moisture	3.2
Protein	59.6
Fat	0.1
Carbohydrate	17.2
Ash	19.9

カゼイン，コーンスターチを減らして調整を行なった。飼料および水（水道水）は自由摂取させ，飼育は各区とも個別ケージで行ない，室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相対湿度 $55 \pm 5\%$ ，1日12時間採光下（8:00a.m.～8:00p.m. 明所）の空調動物室内で行った。飼育期間中，週2回体重を測定し，飼料摂取量は毎日の残量を投与量より差し引いて算出した。飼育期間最終日に1晩（9:00p.m.～9:30a.m.）絶食させ，エーテル麻酔下で解剖採血し，肝臓，心臓および腹腔内脂肪（腎臓，睪丸周囲および壁側脂肪）を摘出して重量を測定し，腹腔内脂肪の体重比率を体脂肪率とした。また血清の総コレステロール（以下 T-chol と略記），HDL-コレステロール（以下 HDL-chol と略記），中性脂肪（以下 TG と略記），遊離脂肪酸（以下 NEFA と略記），2-チオバルビツール酸価（以下 TBA 価と略記），3-ヒドロキシ酪酸，肝臓の Chol，総脂質（以下 TL と略記），TG，TBA 価を測定した。

2. ウマ心臓ペプチドの調製法

ウマ心臓は，アルゼンチン産の冷凍品を用いた。ウマ心臓ミンチ 1 kg に水 2 l を加え，1 N-NaOH により pH8.0 に調整し，アルカラゼ 2.4L を 30ml 加え 60°C で 30分攪拌しながら反応させた。 90°C で 15分放置して反応を停止し，室温になるまで冷却した後，4000r.p.m. で

20分間遠心分離した。上澄 2ℓ を200mlまで減圧濃縮し、アセトンを1ℓ 加えて生成した沈殿物 80 g を精製ウマ心臓ペプチド (L-カルニチン5%含有) として実験に用いた。

3. 血清成分の分析

T-chol および HDL-chol は和光純薬工業(株)のコレストロールEテストワコー (コレストロールオキシダーゼ・DAOS法) と HDL-コレストロールワコー (ヘパリン・マンガン結合沈殿法) を用いた。TG は日本商事(株)のネスコート TG キット (L-グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ・酵素法)、TBA 価は八木式蛍光法⁹⁾ で測定した。NEFA は和光純薬工業(株)の NEFA-C テストワコー (ACS・ACOD法) を用いて測定した。3-ヒドロキシ酪酸は(株)三和化学研究所のケトンテスト「三和」を用いた。

4. 肝臓脂質成分の分析

肝組織 1 g を用い、クロロホルム・メタノール (v/v 2:1) 混液で磨砕抽出した後定容し、試料溶液とした。肝 TL は重量法で、肝 Chol は Zak-Henly 法¹⁰⁾ で、肝 TG は和光純薬工業(株)のキット試薬 TG テストワコー (アセチルアセトン比色法) を用いて測定した。肝 TBA 価は真杉ら¹¹⁾ の方法により測定した。

5. 肝臓および心臓のカルニチン量の測定

肝臓および心臓の総カルニチン量は臓器より Tris-HCl buffer (pH7.4) で抽出後 TCA で除たん白し、旭化成(株)の総カルニチン測定キットを用いて測定した。

結果および考察

1. 体重増加率、平均飼料摂取量および体脂肪率について

体重増加率、平均飼料摂取量および体脂肪率は Table 3 に示した。カルニチン投与区は対照区に比べて平均飼料摂取量は増加したが、体重増加率および体脂肪率は差がみられずカルニチンによる脂肪の酸化促進効果が推測された。ペプチド投与区は対照区、カルニチン投与区に比べて平均飼料摂取量が増加したにもかかわらず体重増加率は差がなく体脂肪率は著しく低下し、カルニチンの効果に加えてウマ心臓ペプチドの特異的な作用として興味深い結果を得た。

Table 3 Effects of peptides on body weight gain, food intake and abdominal adipose tissue in rats fed high fat diet.

Groups	Body weight gain ¹ (%)	Food intake ² (g/day)	Abdominal adipose tissue ³ (%)
Control	131±2	14.7±0.4	2.88±0.20
Carnitine	133±1	16.3±0.3 ^a	2.89±0.24
Peptides	135±2	18.1±0.3 ^{a,b}	2.29±0.13 ^{a,b}

Values are means±SE for six rats.

¹ Expressed as % of the initial body weight.

² Average food intake of the experimental period(two weeks).

³ Ratio to the final body weight.

^a Significantly different at p<0.05, against control group as determined by student's t-test.

^b Significantly different at p<0.05, against carnitine group as determined by student's t-test.

なお、今回使用したウマ心臓ペプチドは強い風味を持っていたが、平均飼料摂取量には影響がなかったのでラットにとっては抵抗がなかったものと思われる。

2. 血清成分について

血清成分の測定結果は Table 4 に示した。ペプチド投与区は、対照区およびカルニチン投与区に比べて T-chol が低下したにもかかわらず HDL-chol が増加し、血清コレステロールはカルニチン投与区より好結果を示した。TG は対照区に比べ、ペプチド投与区はカルニチン投与区と同様に低下した。TG の低下は、Carlo S. Rossi ら¹²⁾ が報告しているようにカルニチンがリポプロテインリパーゼを活性化し、血清中の TG がよく代謝されたものと思われる。また TBA 価も TG と同様に対照区に比べてカルニチン投与区、ペプチド投与区とも有意に低下した。TBA 価は過酸化脂質の量をあらわしており、過酸化脂質は不飽和脂肪酸が体内で発生した活性酸素によりラジカル連鎖過酸化反応が進行して生じたヒドロペルオキシド (LOOH) とさらに LOOH より生じた様々な過酸化生成物の総称である¹³⁾。ペプチド投与区で低値を示したことからカルニチンと同様にウマ心臓ペプチドによる過酸化脂質生成の抑制作用が期待される。NEFA は対照区に比べて、カルニチン投与区では差がなくペプチド投与区で他の 2 区より有意に低下した。血中 TG がリポプロテインリパーゼの作用により分解されたものと脂肪組織より放出され血中へ移送されたものが考えられるがペプチド投与区の NEFA の低下は、供給と消費のバランスで消費の方が勝った結果と考えられる。β-酸化の指標といわれる 3-ヒドロキシ酪酸は対照区に比べてカルニチン投与区で著しく増加し、カルニチンによる脂肪酸の酸化亢進が推察される。ペプチド投与区でも増加したが、カルニチン投与区より低下しており、脂肪酸の代謝がカルニチン投与区とペプチド投与区では相違した。

Table 4 Effects of peptides on serum components in rats fed high fat diet.

Groups	Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	NEFA (mEq/l)	3-Hydroxy butyric acid (mmol/l)	TBA value (nmol/ml)
Control	104.5±1.9	38.4±1.6	56.4±0.4	0.73±0.04	1.71±0.08	2.8±0.2
Carnitine	88.3±2.2 ^a	23.8±0.6 ^a	34.4±2.4 ^a	0.74±0.03	3.42±0.19 ^a	1.6±0.1 ^a
Peptides	79.6±1.8 ^{a,b}	39.9±1.1 ^{a,b}	34.8±4.7 ^a	0.65±0.03 ^{a,b}	1.92±0.13 ^{a,b}	1.7±0.1 ^a

Values are means±SE for six rats.

^a Significantly different at p<0.05, against control group as determined by student's t-test

^b Significantly different at p<0.05, against carnitine group as determined by student's t-test

3. 肝脂質成分について

肝脂質成分の測定結果は Table 5 に示した。ペプチド投与区は対照区に比べてカルニチン投与区と同様に TL, TG, TBA 価が有意に低下した。コレステロールは対照区、カルニチン投与区いずれの区よりも上昇した。ペプチド投与区は血清 T-chol が著しく低下していることより、血中コレステロールの肝臓への運搬が亢進したのに対して肝臓におけるコレステロールの代謝系の亢進はなかったと思われる。

Table 5 Effects of peptides on liver lipids in rats fed high fat diet.

Groups	Total lipids (g/100g)	Cholesterol (g/100g)	Triglyceride (g/100g)	TBA value (nmol/g)
Control	24.8±1.3	7.65±0.17	8.8±0.7	53.9±1.8
Carnitine	21.7±0.9 ^a	7.29±0.04	7.6±0.5 ^a	44.4±0.7 ^a
Peptides	22.7±0.7 ^a	8.03±0.24 ^{a,b}	7.0±0.3 ^a	48.9±0.7 ^{a,b}

Values are means±SE for six rats.

^a Significantly different at $p<0.05$, against control group as determined by student's t-test.

^b Significantly different at $p<0.05$, against carnitine group as determined by student's t-test.

4. 肝臓および心臓の総カルニチン量について

肝臓および心臓の総カルニチン量は Table 6 に示した。ペプチド投与区の肝臓カルニチン量は、対照区に比べてカルニチン投与区と同様に増加したが、カルニチン投与区に比べて低値であった。心臓のカルニチン量はペプチド投与区が対照区に比べてカルニチン投与区と同様に増加し、カルニチン投与区よりさらに増加した。カルニチンを合成する肝臓および合成できずに必要なカルニチンを血液より取り込む心臓のいずれもカルニチンの投与によって含有量が増加した。

以上、ウマ心臓ペプチドの脂質代謝への影響は、カルニチンとほぼ類似した有効性が認められた。一方、体脂肪率の著しい低下、HDL-cholの上昇などはカルニチン投与区と相違しており、ウマ心臓ペプチドのカルニチン以外のペプチド等の成分が関与していると考えられ興味深い。

Table 6 Effects of peptides on liver and heart carnitine levels in rats fed high fat diet.

Groups	Liver carnitine (μ mol/g)	Heart carnitine (μ mol/g)
Control	0.29±0.01	0.91±0.05
Carnitine	0.64±0.02 ^{a,b}	1.02±0.05 ^a
Peptides	0.35±0.02 ^{a,b}	1.20±0.07 ^{a,b}

Values are means±SE for six rats.

^a Significantly different at $p<0.05$, against control group as determined by student's t-test.

^b Significantly different at $p<0.05$, against carnitine group as determined by student's t-test.

要 約

カルニチン含量の高いウマ心臓の用途拡大の目的でウマ心臓ペプチドを調製し、カルニチンおよびペプチドの3次機能としての脂質代謝への影響を検討し、純品のカルニチン(金剛化学(株)製)を投与した場合と比較した。すなわち、8週齢のWistar系雄性ラットを対照区、カルニチン投与区およびカルニチン含有ウマ心臓ペプチド投与区の3群に分け、高脂肪食を投与して4週間飼育し、後半2週間にカルニチンおよびペプチドを投与した。飼育終了後屠殺解剖し、血清および肝臓脂質について測定した。ペプチド投与区は対照区に比べてカルニチン投与区と同様に平均飼料摂取量が増加したにもかかわらず体重増加率は変化なく、体脂肪率はペプチド投与区のみ有意に低下した。血清のT-chol, TG, TBA 価および肝臓のTL, TG, TBA 価もカルニチン投与区、ペプチド投与区とも低下した。ペプチド投与区はカルニチン投与区と相違してHDL-cholが増加した。肝臓および心臓のカルニチン含量はカルニチン投与区とも増加した。

最後に、ウマ心臓ペプチドを提供していただきました松平天然物研究所に感謝致します。さらに本研究の遂行にあたりご指導いただきました谷由美子教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 千葉英夫, 荒井綜一: 化学と生物, **26**, 34 (1988)
- 2) Yashiro, A., Oda, S. and Sugano, M.: *J. Nutr.*, **115**, 1325 (1992)
- 3) Naito, H., Kawakami, A. and Iwamura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 409 (1972)
- 4) 受田浩之, 松田秀喜, 黒田浩之, 島克裕, 松藤寛, 島豊: 農化, **65**, 1223 (1991)
- 5) 塩田明, 谷史人, 吉川正明, 千葉英夫: 農化, **64**, 557 (1990)
- 6) Maebashi, M., Kawamura, N., Sato, M., Iwamura, A. and Yoshinaga, K.: *Lancet* **2**, 805 (1978)
- 7) 嶋裕一: 外科と代謝・栄養, **23**, 45 (1989)
- 8) 山川満, 前田純, 三村芳和, 杉崎勝好, 藤田豊樹, 古屋清一, 大原毅: 日外科誌, **9**, 1355 (1987)
- 9) 八木國夫: ビタミン, **49**, 403 (1975)
- 10) 上田英夫: 臨床検査法, 398, 杏林書院 (1959)
- 11) 真杉文紀, 中村哲也: ビタミン, **51**, 21 (1977)
- 12) Carlo, S. Rossi and Noris, Silprandi: *The Johns Hopkins Medical Journal*, **150**, 51 (1989)
- 13) 寺尾純二: 化学と生物, **30**, 256 (1991)
- 14) Harper, A.E.: *J. Nutr.*, **68**, 405 (1959)
- 15) Oriental Yeast Company: Tech. Rep., 43 (1969)