

食餌性脂肪肝ラットの脂肪酸合成系酵素活性に 及ぼす食餌組成の影響

谷 由美子

Effect of Dietary Composition on Activities of Acetyl-CoA Carboxylase and Fatty Acid Synthetase in Liver of Fatty Liver Rats

Yumiko TANI

緒 言

食事中脂肪のエネルギー比および動物性脂肪の比率が年々増加している事は、国民栄養調査によって明らかであり、脂肪代謝に関連深い動脈硬化が原因の、心臓疾患および脳血管障害による死亡率が、悪性新生物に次いで高いことは一般に知られている。そして食餌タンパク質レベルの上昇による血清、肝臓脂質量の低下^{1~5)}や、リノール酸による肝臓脂質蓄積の抑制効果^{6, 7)}など、血清および肝臓脂質に及ぼす食餌組成の影響については多く報告されている。しかし脂肪酸合成系酵素活性とこれらの因子との関連についての報告は少ない。そこで本研究では、食餌タンパク質レベルの上昇や、多価不飽和脂肪酸の多い大豆油、および前報⁸⁾で著しく肝臓脂質の改善が認められた、ユッカサポニンとコンニャク精粉の投与による食餌性脂肪肝の改善が、脂肪酸合成系酵素活性にどのように影響するかを検討した。

実 験 方 法

1. 動物飼育法

生後8~9週齢のWistar系雄ラット24匹(270~290g)を3日間予備飼育後、低タンパク・コレステロール添加高脂肪食(Table 1)で2週間飼育後、カゼイン10%群(以下Cas-10と略記)、カゼイン20%群(以下Cas-20と略記)、大豆油群(以下Soyと略記)、ユッカサポニン・コンニャク精粉群(以下Yuc・Konと略記)の4群に分け、各群6匹としてさらに2週間飼育した。すなわちCas-10群はTable 1の飼料、Cas-20群はTable 1のカゼインを20%とし、その分コーンスターチを減少したもの、Soy群はTable 1のラードを大豆油に変更したもの、Yuc・Kon群はSoy群の飼料にユッカサポニン1.5%、コンニャク精粉3%添加したもので飼育した。飲水(水道水)および

Table 1 Composition of high fat and low protein diet

Ingredient	%
Corn starch ¹⁾	61.75
Casein ¹⁾	10
Lard ²⁾	20
Cellulose ¹⁾	2
Mineral mixture ³⁾	4
Vitamin mixture (AIN-76) ⁴⁾	1
Cholesterol ⁵⁾	1
Sodium cholate ⁵⁾	0.25

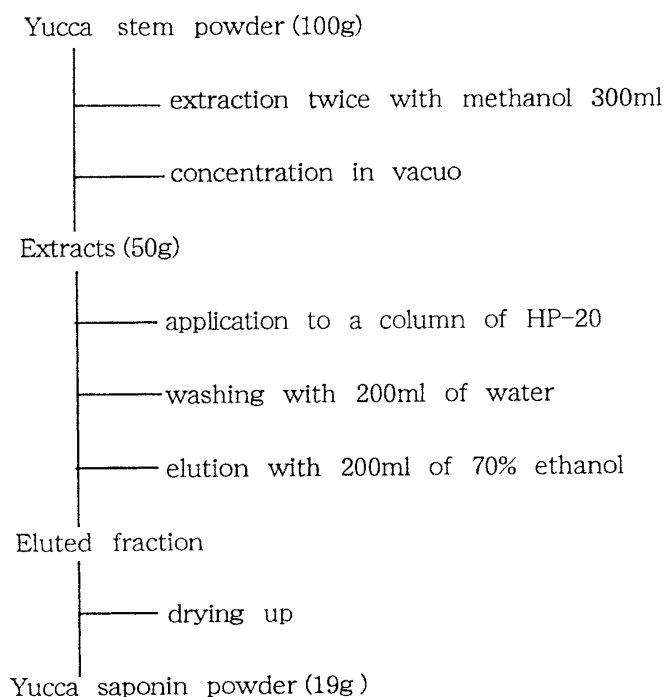
1) Japan CLEA Co., Tokyo.

2) Yoneyama Reagent Industries Co., Osaka.

3) This is identical to Harper's mixture²⁰⁾

4) Oriental Yeast Co., Tokyo.

5) Kanto Chemical Co., Tokyo.

Fig. 1 Preparation of saponin from *Yucca shidigera*

飼料は自由摂取とし、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 5\%$ 、1日12時間採光下 (am 8:00 ~ pm 8:00 明期) の空調動物室内で飼育した。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。糞は解剖前3日間採取し、3日間風乾後コレステロール (以下 chol と略記) の定量に用いた。飼育終了日に一夜絶食させ、エーテル麻酔下で解剖採血し、肝臓および腹腔脂肪 (腎臓、睪丸、副睪丸周囲および壁側脂肪) を摘出して重量を測定し、腹腔脂肪の体重比率を腹腔脂肪率とした。そして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)、 β -ヒドロキシ酪酸 (以下 β -HBA と略記)、肝臓の総脂質 (以下 TL と略記)、Chol、TG およびアセチル CoA カルボキシラーゼ活性 (以下 ACC と略記)、脂肪酸合成酵素活性 (以下 FAS と略記) を測定した。

ユッカサポニンユッカ (*Yucca shidigera*) の茎部粉末より、Fig. 1 の方法で調製した乾燥粉末 (三邦 KK 製) を用い、サポニン含有量は 80 ~ 85 % であった。コンニャク精粉はグルコマンナンの含有量が 99.9 % の KK マルモト製のものをを用いた。

2. 血清成分の分析

T-chol、HDL-chol および NEFA は、和光純薬工業 (株) のコレステロール E テストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法)、HDL-コレステロールワコー (ヘパリン・マンガン結合沈澱法)、NEFA-C テストワコー (ACS・ACOS 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)、 β -HBA は (株) 三和化学研究所のケトンテスト三和を用いた。

3. 肝臓脂質の分析

生理食塩水でかん流、洗浄した肝臓をろ紙で余分な水分を除去した後、一部を 50 倍容のクロホルム・メタノール (2:1) 混液で磨砕抽出した抽出液について以下の定量を行った。

肝 TL は重量法で, 肝 Chol は Zak-Henly 法⁹⁾ で, 肝 TG は和光純薬工業(株)の 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.

4. 糞中コレステロールの定量

糞の風乾物を磨碎して粉末とし, 肝 Chol と同様に定量した.

5. 肝臓の脂肪酸合成酵素活性およびアセチル CoA カルボキシラーゼ活性の測定

FAS 活性は, Nepokroeff ら¹⁰⁾ および仲佐ら¹¹⁾ の方法に準じて測定した. すなわち肝臓を 3 倍量の 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) でホモゲナイズした後, 50,000×g で 2 時間遠心分離して得た上清を酵素液とした. 活性は, アセチル CoA およびマロニル CoA よりパルミチン酸生成において, NADPH の減少を 340nm の吸光度の減少より測定した. 分子吸光係数 6.22×10^3 から NADPH の減少量を求め, 1unit は 30°C で 1 分間に 1 μ mol の NADPH を減少する酵素活性とした.

ACC [EC6.4.1.2] 活性は Tanade ら¹²⁾ および仲佐ら¹¹⁾ の方法に準じて測定した. すなわち肝臓を 5 倍量の 0.25M ショ糖溶液でホモゲナイズした後, 50,000×g で 2 時間遠心分離して得た上清を 40 % 飽和硫酸分画後, Sephadex G-50 カラムに通した流出液を, Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中で 37°C 30 分間予温したものを酵素液とした. 活性はアセチル CoA よりマロニル CoA を生成する反応系において, NADH の減少を 340nm の吸光度の減少より測定した. 分子吸光係数 6.22×10^3 から NADH の減少量を求めた. 1unit は 37°C で 1 分間に 1 μ mol の NADH を減少する酵素活性とした.

6. 統計処理

データは ANOVA と Duncan の multiple range test により群間の有意差 ($p < 0.05$) 検定を行った.

実 験 結 果

1. 飼料摂取量, 体重増加率および腹腔脂肪率におよぼす食餌組成の影響

飼料摂取量, 体重増加率および腹腔脂肪率は Table 2 に示した. 飼料摂取量は各群間に差がなかったが, 体重増加率は Cas-10 群に比べて Cas-20 群と Yuc・Kon 群が増加し, Soy 群は差がなかった. 腹腔脂肪率は Cas-10 群に比べて Cas-20 群は差がなく, Soy 群と Yuc・Kon 群は減少した. Cas-10 群に比べて大豆油投与群で腹腔脂肪の蓄積抑制がみられた.

Table 2 Effect of dietary composition on food intake, body weight gain and abdominal adipose tissue rate of rats fed on the high fat and low protein diet.

Group	Food intake ¹⁾ (g/day)	Body weight gain ²⁾ (%)	Abdominal adipose tissue ³⁾ (%)
Casein 10%	16.7±0.3 a	117±1 a	3.1±0.1 a
Casein 20%	16.8±0.4 a	136±3 b	3.1±0.1 a
Soybean oil	16.6±0.5 a	119±2 ac	1.9±0.1 b
Yucca saponin and konjak flour	16.3±0.5 a	123±2 c	2.5±0.1 c

Each value is the mean \pm SE for six rats.

1) Food intake over the experimental period of 4 weeks

2) Expressed as % of the initial body weight.

3) Rate to the final body weight.

Values in the same columns without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 3 Effects of dietary composition on serum lipids and 3-hydroxybutyric acid concentration of rats fed on the high fat and low protein diet.

Group	Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	NEFA (mEq/l)	3-Hydroxybutyric acid (mmol/l)
Casein 10%	81.4±2.9 a	39.3±0.9 a	48.8±1.8 a	0.74±0.04 ab	2.34±0.13 a
Casein 20%	71.6±3.2 b	40.5±2.1 a	33.7±2.1 b	0.86±0.03 ac	2.37±0.14 a
Soybean oil	67.1±1.6 b	29.2±1.3 b	25.7±1.5 c	0.89±0.06 c	2.44±0.18 a
Yucca saponin and konjak flour	70.7±1.2 b	32.5±1.6 b	22.0±0.9 c	0.81±0.03 ac	3.98±0.32 b

Each value is the mean ± SE for six rats

Values in the same columns without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 4 Effect of dietary composition on liver lipids contents of rats fed on the high fat and low protein diet.

Group	Total lipid (g/100g)	Cholesterol (g/100g)	Triglycerides (g/100g)
Casein 10%	32.5±1.4 a	9.5±0.5 a	10.9±0.8 a
Casein 20%	30.1±0.7 ab	9.6±0.2 a	7.9±0.5 b
Soybean oil	27.4±1.3 b	11.1±0.5 b	7.5±0.5 b
Yucca saponin and konjak flour	22.8±1.0 c	5.9±0.4 c	7.2±0.4 b

Each value is the mean±SE for six rats.

Values in the same columns without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 5 Effect of dietary composition on excretion of cholesterol to feces of rats fed on the high fat and low protein diet.

Group	Intake (mg/day)	Amount of excretion (mg/day)	Excretion rate (%)
Casein 10%	164±4 a	65±4 a	39±1 a
Casein 20%	166±8 a	70±4 ab	42±1 a
Soybean oil	156±7 a	85±7 b	55±1 b
Yucca saponin and konjak flour	171±4 a	153±4 c	85±1 c

Each value is the mean±SE for six rats

Values in the same columns without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 6 Effect of dietary composition on liver lipid metabolism enzyme activity of rats fed on the high fat and low protein diet.

Group	Acetyl-CoA carboxylase (unit/g of liver)	Fatty acid synthetase (unit/g of liver)
Casein 10%	0.92±0.02 a	0.12±0.01 a
Casein 20%	0.94±0.04 a	0.10±0 b
Soybean oil	0.52±0.01 b	0.08±0 c
Yucca saponin and konjak flour	0.68±0.01 c	0.07±0 c

Each value is the mean±SE for six rats.

Values in the same columns without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

2. 血清成分におよぼす食餌組成の影響

血清成分の測定結果は Table 3 に示した。Cas-10 群に比べて T-chol はいずれの群も減少し、HDL-chol は Soy 群と Yuc・Kon 群が減少した。TG は Cas-20 群で減少し、Soy 群と Yuc・Kon 群でさらに減少した。脂肪組織よりの放出が大きく影響するといわれている NEFA は、腹腔脂肪率が一番低かった Soy 群が増加し、Cas-20 群、Yuc・Kon 群も増加傾向がみられた。β-HBA は Yuc・Kon 群が増加した。

3. 肝臓脂質におよぼす食餌組成の影響

肝臓脂質の測定結果は Table 4 に示した。Cas-10 群に比べて TL は Cas-20 群で減少傾向がみられ、Soy 群、Yuc・Kon 群の順に有意に減少した。Chol は Yuc・Kon 群のみ著しく低値を示した。TG はいずれの群も減少した。Yuc・Kon 群は Cas-10 群に比べて、いずれの脂質も有意に低値を示した。

4. 糞中コレステロール排泄率におよぼす食餌組成の影響

糞中 Chol 排泄率を Table 5 に示した。糞中 Chol 排泄率は Cas-10 群に比べて Soy 群で増加し、Yuc・Kon 群で著しく増加し、前報⁸⁾ のラードを投与した場合と同じ結果となった。

5. 肝臓のアセチル CoA カルボキシラーゼ活性および脂肪酸合成系酵素活性におよぼす食餌組成の影響

ACC 活性および FAS 活性の測定値を Table 6 に示した。Cas-10 群に比べて ACC 活性は、Soy 群と Yuc・Kon 群で低下し、FAS 活性は Cas-20 群で低下し、Soy 群、Yuc・Kon 群でさらに低下した。大豆油を投与した Soy 群、Yuc・Kon 群とも脂肪酸合成系酵素活性はいずれも有意に低下した。

考 察

日本人の動物性脂肪の摂取量は 1980 年、1985 年、1990 年、1995 年で各々 1 日 26.9g、27.6g、27.5g、29.8g と徐々に増加していることより、本研究では低タンパク・コレステロール添加高脂肪食（ラードを使用）でラットを飼育して、脂肪肝モデルを作成し、食餌組成による改善程度を血清、肝臓脂質ならびに肝臓の脂肪酸合成系酵素活性について検討した。

血清の NEFA は、脂肪組織よりの放出と肝臓および筋肉などの組織への取込み状況で決まるが、主に前者の影響が大きいといわれている。NEFA は、Cas-10 群に比べていずれの群も増加または増加傾向がみられ、脂肪組織における脂肪の分解亢進が推察されるが、特に Soy 群でそ

の傾向が著しかった。Matsuo ら¹³⁾ は、サフラワー油がラードより体脂肪の蓄積抑制効果があることを認めており、本研究でも同様に、多価不飽和脂肪酸の多い大豆油を投与した Soy 群、Yuc・Kon 群で腹腔脂肪率が有意に低下した。

食餌タンパク質レベルと脂質代謝の関係については、Chol 無添加・5%大豆油食で、タンパク質レベルが4, 6, 20, 30%と上昇するに従って、血清の T-chol, TG, 肝臓の TL, TG の低下^{1, 3)} が認められており、田中ら⁵⁾ は Chol 添加・5%ラード食でタンパク質レベルが20から40%へ上昇すると、血清 T-chol が低下することを報告している。本研究でも同様に、Cas-10 群に比べて Cas-20 群で血清 T-chol, TG, 肝 TG が低下し、肝 TL は低下傾向がみられた。

食餌中脂質の量および質が血清や肝臓脂質レベルに影響することは周知のことであり、生活習慣病予防の観点から、脂肪のエネルギー比は20~25%、植物油:動物油:魚油の比率は5:4:1が望ましいとされている。本研究では脂肪肝の改善のため、食餌中のラードを一般に広く使用されている大豆油(脂肪酸組成 C_{16:0} 11%, C_{18:0} 3~4%, C_{18:1} 22~23%, C_{18:2} 54~55%, C_{18:3} 7~8%)¹⁴⁾ にかえた Soy 群、Yuc・Kon 群とも Cas-10 群に比べて腹腔脂肪率、血清 T-chol, TG, 肝 TL, TG が低下し、肝臓の FAS 活性、ACC 活性とも低下した。すなわち肝臓の脂肪合成が抑制されたため、肝よりの TG の放出も低下し、血清 TG および腹腔脂肪の低下が誘導されたものと思われる。3-HBA が Yuc・Kon 群で上昇したのは、肝臓におけるβ酸化の亢進も考えられる。脂肪酸組成が C_{16:0} 7%, C_{18:0} 2%, C_{18:1} 17%, C_{18:2} 78%¹⁴⁾ のサフラワー油は、大豆油と同様にリノール酸を50%以上含んでおり、ラードに比べて ACC 活性、FAS 活性が低下し、肝臓における脂肪合成および体脂肪の蓄積も抑制する同様の報告^{13, 15, 16)} がある。Matsuo ら¹⁵⁾ は脂肪酸合成系酵素活性の低下は、交感神経の亢進によるらしいと考察している。従って、大豆油においても同様のことが考えられる。大豆油もサフラワー油もリノール酸が50%以上含まれており、Allmann ら⁶⁾、Aoyama ら⁷⁾ はリノール酸による肝脂質の蓄積抑制効果を認めており、Hayes ら¹⁷⁾ は飽和脂肪酸に対してリノール酸が多いと、血清 Chol を低下すると報告している。いずれも本研究結果と一致していることより、大豆油投与群の脂肪肝の改善はリノール酸の効果が考えられる。

糞中 Chol 排泄率は、Cas-10 群に比べて大豆油投与の Soy 群、Yuc・Kon 群で増加し、Yuc・Kon 群では前報⁸⁾ のラード投与の場合と同様に著しく増加し、サポニンおよびコンニャク粉による Chol の吸収阻害が認められた。大豆油投与によるコレステロールの排泄促進効果については、中川ら¹⁸⁾、黒田ら¹⁹⁾ は大豆油群で Chol 排泄率の増加傾向を認めているにすぎず、本研究結果は興味深い。そして食餌コレステロールの吸収阻害が Yuc・Kon 群の血清および肝 Chol の減少をもたらしたと考えられる。

以上、リノール酸の多い大豆油投与による脂肪肝の改善および高脂血症の改善に、肝臓の脂肪酸合成系酵素活性の低下が関与している事が推察された。

要 約

低タンパク・コレステロール添加高脂肪食をラットに投与し、食餌性脂肪肝を作成した。この脂肪肝モデルラットの食餌を、高タンパク食または大豆油およびコレステロールの吸収阻害のあるユッカサポニン・コンニャク粉添加食にかえて、血清、肝臓脂質および脂肪酸合成系酵素活性におよぼす影響を検討した。

Cas-10 群に比べて Cas-20 群は血清 T-chol, TG, 肝 TG が減少し、肝の FAS 活性が低下した。大豆油投与の Soy 群、Yuc・Kon 群は腹腔脂肪率、血清 T-chol, TG, 肝 TL, TG が減少し、肝

の ACC 活性および FAS 活性とも低下した。また糞中 Chol 排泄率は増加し、特に Yuc・Kon 群は著しく増加して、血清および肝臓の Chol が減少した。高脂血症の改善および肝臓の TG の蓄積抑制と肝臓の脂肪酸合成系酵素活性は相関性が認められ、特にリノール酸の多い大豆油の改善効果は著しかった。

文 献

- 1) Yashiro, M. and Kimura, S. : Effect of the combination of voluntary exercise and dietary protein levels on the deposition of glycogen, liver and serum lipids in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 213 (1979)
- 2) 屋代正範, 木村修一 : 血清脂質およびリポ蛋白パターンにおよぼす運動および食餌蛋白レベルの影響, *脂質生化学研究*, **22**, 211 (1980)
- 3) Yashiro, M. and Kimura, S. : Effect of voluntary exercise and dietary protein levels on serum lipoprotein distribution and lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) activity of mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 59 (1980)
- 4) Yashiro, M., Hoshino, T. and Kimura, S. : Effect of voluntary exercise and dietary protein levels on the activity of serum glutamic pyruvic transaminase and the morphological picture of liver in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 71 (1980)
- 5) 田中千寿子, 曾根正江, 野崎幸久 : コレステロール投与ラットの血漿リポたん白質および肝臓脂質におよぼす飼料たん白質の影響, *栄養と食糧*, **34**, 555 (1981)
- 6) Allmann, D. W. and Gibson, D. M. : Fatty acid synthesis during early linoleic acid deficiency in the mouse. *J. Lipid Res.*, **6**, 51 (1965)
- 7) Aoyama, Y. Yoshida, A. and Ashida, K. : Effect of dietary fats and fatty acids on the liver lipid accumulation induced by feeding a protein-repletion diet containing fructose to protein-depleted rats. *J. Nutr.*, **104**, 741 (1974)
- 8) 辻原命子, 谷由美子 : 高脂肪高コレステロール食飼育ラットの脂質代謝に及ぼすユッカサポニンおよびコンニャク精粉の影響, *栄養・食糧学会誌*, **51**, 157 (1998)
- 9) 上田英夫 : 血液化学, コレステロール, *臨床検査法*, 398, 杏林書院 (1969)
- 10) Nepokroeff, C. M., Lakshmanan, M. R. and Porter, J. W. : Fatty acid synthase from rat liver : *Methods in Enzymology* (John M. Lowenstein ed.) Vol. 35, 37, Academic Press (1975)
- 11) 仲佐輝子, 山口真由美, 沖中靖, 目鳥幸一, 宮橋周士 : 高脂肪高コレステロール食投与ラットの血漿および肝臓中の脂質に及ぼす杜中茶抽出液の影響, *農芸化学会誌*, **69**, 1491 (1995)
- 12) Tanabe, T., Nakanishi, S., Hashimoto, T., Ogiwara, H., Nikawa, J. and Numa, S. : Acetyl-CoA carboxylase from rat liver, *Methods in Enzymology* (John M. Lowenstein ed.) Vol. 71, 5, Academic Press (1981)
- 13) Matsuo, T. and Suzuki, M. : Safflower oil diet decreases hepatic acetyl-CoA carboxylase activity by increasing α -adrenergic stimulation in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **17**, 179 (1994)
- 14) 原一郎, 島崎弘幸, 町田芳章 : 食用油脂, 油脂の栄養と疾病, 403, 411, 幸書房 (1990)
- 15) Matsuo, T., Sumida, H. and Suzuki, M. : Chemical sympathectomy increases hepatic acetyl-CoA carboxylase activity in rats fed a safflower oil diet. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **19**, 37 (1995)
- 16) Toussant, M. J., Wilson, M. D. and Clark, S. D. : Coordinate suppression of liver acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthetase by polyunsaturated fat. *J. Nutr.*, **111**, 146 (1981)
- 17) Hayes, K. C., Pronczuk, A., Lindsey, S. and Schade, D. D. : Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, 16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in nonhuman primates.

Am J Clin. Nutr., **53**, 491 (1991)

- 18) 中川靖枝, 辻 啓介, 辻 悦子, 鈴木慎次郎: しょ糖とコレステロール代謝に関する研究, 栄養学雑誌, **39**, 47 (1981)
- 19) 黒田圭一, 小島義樹, 西出英一, 山口迪夫: 脂肪酸組成の異なる3種のリン脂質およびその関連油脂のラット血清コレステロール上昇抑制効果の比較, 栄養学雑誌, **48**, 213 (1990)
- 20) Harper, A. E. : Amino acid balance and imbalance, I. Dietary levels of protein and amino acid imbalance. *J Nutr.*, **68**, 405 (1959)