

酸化コレステロール誘導性脂肪肝の食事卵黄による改善

九州大学大学院農学研究院・准教授 佐藤 匡央

■ 緒 言

脂肪肝とはトリアシルグリセロール(TG)が肝臓重量の10%に達した状態と定義されており、脂肪性肝炎や肝硬変、肝癌への進行が危惧されている生活習慣病の一つである。その発症原因として糖質・脂質摂取過剰¹⁾、アルコール摂取過剰^{2,3)}、タンパク質摂取不足⁴⁾などの食習慣が挙げられる。肝臓に蓄積した脂質は運動時のエネルギーとして消費されにくいため、脂肪肝の治療法として食事療法が効果的とされている^{5,6)}。

当研究室では、酸化コレステロールとラードの同時摂食により誘発される脂肪肝モデルラットの確立に成功している。その機構解明を試みたところ、ラードの摂食により肝臓に蓄積する7 α -hydroxycholesterolが核内受容体の一つであるLXRリガンドとして機能し、Fatty acid synthase(FAS)転写の活性化を介して肝臓脂肪の蓄積に寄与する可能性が示唆された。

さらに一昨年度および昨年度の報告で、鶏卵黄摂取の低タンパク質誘導性脂肪肝、四塩化炭素誘導性(CCl₄)脂肪肝およびアルコール誘導性脂肪肝に対する有効性を報告した。そこで本研究では、酸化コレステロール誘導性脂肪肝に対する鶏卵黄の摂取の有効性を検討することを目的とした。

■ 方 法

3週齢SD系雄ラット20匹をAIN-76組成に準じ、10%ラードを含む食餌(C①食)を与えて2週間予備飼育した。(Table 1)その後体重に応じて、コントロール食(C②食)、0.02%酸化コレステロール添加食(OC食)、12.4%鶏卵黄添加食(EY食)、0.02%酸化コレステロール+12.4%鶏卵黄添加食(OE食)を与えた計4群に分け、2週間本飼育を行った。酸化コレステロールはコレステロールを150°Cで12時間加熱し、エタノールで抽出した後、未酸化物をカラム精製によって除去して作製したものを用いた。(Table 2)作製した酸化コレステロール組成はガスクロマトグラフィーにより測定した。なお、鶏卵黄非添加群には各群で脂質量および水分量が同等となるように、コレステロールおよびHigh oleic safflower oilおよび水分を添加した。鶏卵黄中のコレステロール濃度はガスクロマトグラフィーにより測定し、TG濃度およびリン脂質(PL)濃度は化学法により測定した。(Table 3)本飼育後5時間絶食させた後に屠殺し、肝臓および血清を得た。肝臓の総脂質はFolchの方法を用いて抽出後、TG濃度、PL濃度、コレステロール濃度を化学法により測定した。血清コレステロール濃度、TG濃度、PL濃度は市販の臨床用キットを用いて測定した。さらに血中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性を市販の臨床用キットを用いて測定した。肝臓および血清酸化コレステロール濃度はGC-MSにより測定した。また、肝臓摘出直後に肝臓からミクロソーム画分を得て、ミクロソーム中のミクロソームトリアシルグリセロール輸送タンパク質(MTP)のタンパク質量をWestern Blottingにより測定した。さらに、肝臓から得たサイトソルを用い、脂肪酸合成酵素(FAS)活性を化学法により測定した。

なお、これらの研究は九州大学動物実験規定に従って行った。

また、データはmean \pm SEMで示した。群間の検定を2元配置分散分析およびTukeyの多重比較(StatView Version4.5, Abacus Concept Inc., Berkeley, CA)で行った。 $p < 0.05$ をもって有意とした。

■ 結 果

体重、摂食、組織重量

酸化コレステロール摂取により白色脂肪組織重量が増加した。

鶏卵黄摂取による影響は見られなかった。(Table 4,5)

肝臓脂質

酸化コレステロール摂取によりTG濃度が増加した。

鶏卵黄摂取によりTG濃度の減少傾向が見られた。(Table 6)

血清脂質

酸化コレステロール摂取により HDL コレステロール濃度、PL 濃度が増加した。
鶏卵黄摂取により ALT 活性が増加した。(Table 7)

酸化コレステロール量

酸化コレステロール摂取により肝臓および血清中 7 β -Hydroxycholesterol 濃度が増加した。
鶏卵黄摂取により血清中総酸化コレステロール濃度、 α -epoxycholesterol、 β -cholestantriol、
7-ketocholesterol 濃度が減少した。(Table 8,9)

肝臓 MTP タンパク質量

群間で有意差は見られなかった。(Table 6)

肝臓 FAS 酵素活性

鶏卵黄摂取により減少した。(Table 6)

■ 考 察

酸化コレステロールのみを添加した食餌を与えた群において、肝臓 TG 濃度の有意な増加が見られ、肝臓 TG が肝重量の 9.94% に達していた (Table 6) ことから、酸化コレステロールとラードの同時摂取による脂肪肝形成の誘導が確認できた。一方、鶏卵黄を添加した群において非添加群と比較して肝臓 TG 濃度の減少傾向が見られたことから、鶏卵黄摂取によって酸化コレステロール誘導性脂肪肝形成を改善し得る可能性が示唆された。昨年度の報告により酸化コレステロール誘導性脂肪肝の発症機構は、ラードの摂食により肝臓に蓄積する 7 α -hydroxycholesterol が LXR リガンドとして機能し、FAS 転写の活性化を介して肝臓脂肪の蓄積に寄与する可能性が示唆された。また、一昨年度の報告により鶏卵黄摂取は MTP タンパク質量の増加を促すことで、血中への VLDL 分泌を促進することが示された。今回、FAS 酵素活性は鶏卵黄摂取により低下していた (Table 6) ことから、鶏卵黄摂取は肝臓で脂肪酸合成を抑制することで脂肪肝改善の一因となり得ることが示唆された。また、MTP タンパク質量に群間で有意差が見られなかった (Table 6) ことから、酸化コレステロール誘導性脂肪肝は肝臓から血液中への脂質分泌には影響を与えないことが明らかになった。また、肝臓中に蓄積した酸化コレステロールのうち、25-Hydroxycholesterol は鶏卵黄摂取による増加傾向が見られた (Table 8)。25-Hydroxycholesterol は脂肪酸合成に関与する遺伝子の発現を調節する Sterol-regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) が膜結合型から成熟型への移行を抑制するという報告がある^{7,8)}。さらに、昨年度の報告により 25-Hydroxycholesterol による FAS 転写活性の抑制作用が明らかとなった。これらのことから、鶏卵黄摂取によって肝臓中に蓄積した 25-Hydroxycholesterol が脂肪酸合成抑制に寄与した可能性が考えられる。しかし、この作用が有意差を与えるほど FAS 酵素活性抑制に影響を与えたとは考えづらく、他にも鶏卵黄中に含まれる成分が複合的に作用し脂肪酸合成を抑制したと考えられる。また、鶏卵黄摂取によって血清中の総酸化コレステロール濃度および自動酸化によって生成する 3 種類の酸化コレステロール (α -epoxycholesterol、 β -cholestantriol、7-ketocholesterol) 濃度の低下が見られた (Table 9)。鶏卵黄摂取による血清中の酸化コレステロール低下作用に関しては未だ報告がなく、その機構解明および鶏卵黄による脂質代謝改善との相互作用など今後追究する必要があると考えられる。

■ 要 約

酸化コレステロール誘導性脂肪肝を発症させさらに鶏卵を摂取させたラットでは、その肝臓における脂肪酸合成は抑制され、それに伴い肝臓 TG を減少させ、脂肪肝を改善する可能性が示唆された。さらに、鶏卵黄摂取は血清中の酸化コレステロール濃度を減少させる作用があることが示された。

■ 文 献

1. Ackerman Z., Orion-Herman M., Grozovski M., Rosenthal T., Pappo O., Link G. and Sela B.A. (2005) Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension* May;45(5):1012-1018
2. Sougioultzis S., Dalakas E., Hayes P.C. and Pleviris J.N. (2005) Alcoholic hepatitis :from pathogenesis to treatment. *Currebt Medical Research and Opinion*. Sep(21):1337-1346

3. O'Shea R.S. and McCullough A.J., (2005) Treatment of alcoholic hepatitis. *Clinics in liver disease*. Feb (9):103-134.
4. Maloney C.A., Gosby A.K., Phuyal J.L., Denyer G.S., Bryson J.M. and Caterson I.D. (2003) Site-specific changes in the expression of fat-partitioning genes in weanling rats exposed to a low-protein diet in utero. *Obesity Research*. Mar;11 (3):461-8
5. Angulo P. (2003) Current best treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Opinion on pharmacotherapy* May;4(5):611-623
6. Adams L.A. and Angulo P. (2005) Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic Medicine* Sep;22(9):1129-1133
7. Adams C.M., Reitz J, De Brabander J.K., Feramisco J.D., Li L., Brown M.S., and Goldstein J.L. (2004) Cholesterol and 25-Hydroxycholesterol Inhibit Activation of SREBPs by Different Mechanisms, Both Involving SCAP and Insigs. *J. Biol. Chem.* 279: 52772 - 52780.
8. Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 6511-6518.

Table 1. Composition of each experimental diets

Ingredients	C①	C②	OC	EY	OE
			(g)		
Sucrose	450.0	398.5	398.3	400.0	399.8
Casein	200	200	200	177.0	177.0
Corn starch	150	150	150	150	150
Lard	100.0	106.6	106.6	106.6	106.6
High oleic safflower oil	--	43.4	43.4	---	---
Egg yolk	--	---	--	131.5	131.5
Cellulose	50	50	50	50	50
Mineral Mix	35	35	35	35	35
Vitamin Mix	10	10	10	10	10
DL-Methionine	3	3	3	3	3
Choline bitartrate	2	2	2	2	2
Cholesterol	--	1.46	1.46	---	---
Oxycholesterol	--	---	0.2	---	0.2
Moisture	--	65.1	65.1	---	---

Diet composition is based on AIN-76.

Table 2. Composition of oxysterol

	%
7 α -Hydroxycholesterol	1.493
7 β -Hydroxycholesterol	4.833
β -epoxycholesterol	3.361
α -epoxycholesterol	6.005
β -cholestanetriol	3.602
α -cholestanetriol	1.936
7-ketocholesterol	24.554
25-Hydroxycholesterol	2.148
unknown	43.926
total	100

Table 3. Chemical composition of Egg Yolk

	EY
	%
Protein	15.18
Lipids	35.20
Cholesterol	1.11
Triacylglycerol	24.65
Phospholipids	8.36
Oxycholesterol	1.08
Others	49.62
	100

Table 4. Growth parameter

parameters	Control		Egg Yolk		ANOVA		
	Control	Oxycholesterol	Control	Oxycholesterol	OC	EY	OC×EY
Initial body weight (g)	201.54 ± 3.64	202.50 ± 4.59	200.58 ± 3.52	202.82 ± 4.00	N.S.	N.S.	N.S.
Final body weight (g)	328.42 ± 6.42	336.52 ± 5.12	325.40 ± 10.92	339.04 ± 8.04	N.S.	N.S.	N.S.
Body mass gain (g)	261.32 ± 6.56	271.28 ± 3.78	257.82 ± 10.61	272.64 ± 7.60	N.S.	N.S.	N.S.
Total food intake (g)	584.46 ± 10.59	599.46 ± 11.62	568.58 ± 23.92	610.12 ± 16.53	N.S.	N.S.	N.S.
Food intake per day (g/day)	20.58 ± 0.26	20.97 ± 0.52	19.88 ± 0.78	21.33 ± 0.51	N.S.	N.S.	N.S.
Feed efficiency	446.92 ± 3.78	452.80 ± 4.47	453.58 ± 5.35	446.84 ± 2.80	N.S.	N.S.	N.S.

Values are means±SEM of 5 rats. Data were analyzed by two way ANOVA ($p < 0.05$). N.S.; not significant.

Table 5. Liver and WAT weight

parameters	Control		Egg Yolk		ANOVA		
	Control	Oxycholesterol	Control	Oxycholesterol	OC	EY	OC×EY
Liver weight (g)	16.54 ± 0.47	18.07 ± 0.87	16.16 ± 0.92	16.54 ± 0.71	N.S.	N.S.	N.S.
Liver weight (g/100g body weight)	5.05 ± 0.19	5.36 ± 0.19	4.95 ± 0.14	4.87 ± 0.10	N.S.	N.S.	N.S.
Total WAT (g)	23.99 ± 1.09	29.55 ± 1.07	23.78 ± 3.06	27.49 ± 1.87	$p < 0.05$	N.S.	N.S.
Total WAT (g/100g body weight)	7.30 ± 0.25	8.79 ± 0.34	7.25 ± 0.76	8.10 ± 0.50	$p < 0.05$	N.S.	N.S.
Mesenteric (g)	3.34 ± 0.23	3.78 ± 0.12	2.93 ± 0.31	3.33 ± 0.22	N.S.	N.S.	N.S.
Renal (g)	1.13 ± 0.13	1.51 ± 0.09	1.12 ± 0.16	1.22 ± 0.08	N.S.	N.S.	N.S.
Peritoneal (g)	4.25 ± 0.27	5.75 ± 0.18	4.82 ± 0.72	4.90 ± 0.66	N.S.	N.S.	N.S.
Epididymal (g)	4.57 ± 0.43	5.33 ± 0.41	4.03 ± 0.31	4.47 ± 0.28	N.S.	N.S.	N.S.
Subcutaneous (g)	10.69 ± 0.57	13.18 ± 0.61	11.50 ± 1.75	13.56 ± 0.97	N.S.	N.S.	N.S.

Values are means±SEM of 5 rats. Data were analyzed by two way ANOVA ($p < 0.05$). N.S.; not significant.

Table 6. Liver parameter

parameters	Control		Egg Yolk		ANOVA		
	Control	Oxycholesterol	Control	Oxycholesterol	OC	EY	OC×EY
Liver							
Cholesterol	12.29 ± 0.88	9.27 ± 0.48	10.18 ± 0.51	10.46 ± 0.72	<i>p</i> =0.056	N.S.	N.S.
Triacylglycerol	71.90 ± 1.79	99.38 ± 8.45	65.27 ± 4.23	87.00 ± 4.02	<i>p</i> <0.001	<i>p</i> =0.087	N.S.
Phospholipids	29.77 ± 1.17	29.30 ± 0.57	29.43 ± 0.54	30.49 ± 0.79	N.S.	N.S.	N.S.
FAS activity	20.60 ± 2.36	29.80 ± 6.33	12.58 ± 3.02	11.73 ± 1.92	N.S.	<i>p</i> <0.001	N.S.
MTP protein expression	100.00 ± 10.54	103.76 ± 9.51	84.74 ± 13.12	95.80 ± 15.54	N.S.	N.S.	N.S.

Values are means±SEM of 5 rats. Data were analyzed by two way ANOVA (*p*<0.05). N.S.; not significant.

Table 7. Serum parameter

parameters	Control		Egg Yolk		ANOVA		
	Control	Oxycholesterol	Control	Oxycholesterol	OC	EY	OC×EY
Serum							
Cholesterol	85.32 ± 6.23	114.02 ± 12.16	86.44 ± 6.63	90.84 ± 9.07	<i>p</i> =0.08	N.S.	N.S.
HDL-cholesterol	23.66 ± 2.41	43.90 ± 5.58	26.09 ± 2.19	30.09 ± 3.84	<i>p</i> <0.001	N.S.	N.S.
Triacylglycerol	264.34 ± 36.20	320.06 ± 50.90	256.13 ± 30.79	404.51 ± 102.40	N.S.	N.S.	N.S.
Phospholipids	197.47 ± 7.21	245.92 ± 21.39	202.38 ± 7.30	210.86 ± 15.96	<i>p</i> <0.05	N.S.	N.S.
AST activity	101.82 ± 11.55	102.95 ± 9.75	114.71 ± 14.88	108.46 ± 2.17	N.S.	N.S.	N.S.
ALT activity	5.99 ± 0.54	7.49 ± 0.36	8.13 ± 0.83	8.37 ± 0.52	N.S.	<i>p</i> <0.05	N.S.

Values are means±SEM of 5 rats. Data were analyzed by two way ANOVA (*p*<0.05). N.S.; not significant.

Table 8. Oxysterol levels of liver

Oxysterols	Control		Egg Yolk		ANOVA		
	Control	Oxysterol ($\mu\text{g/g}$ liver)	Control	Oxysterol	OC	EY	OC \times EY
<i>Autoxidation products</i>							
7 β -Hydroxycholesterol	0.39 \pm 0.07	2.62 \pm 0.16	0.42 \pm 0.14	1.90 \pm 0.30	$P < 0.001$	N.S.	N.S.
β -Epoxycholesterol	1.47 \pm 0.43	1.03 \pm 0.16	0.95 \pm 0.21	1.11 \pm 0.33	N.S.	N.S.	N.S.
α -Epoxycholesterol	0.97 \pm 0.28	1.03 \pm 0.19	1.14 \pm 0.53	1.07 \pm 0.29	N.S.	N.S.	N.S.
β -Cholestenetriol	0.68 \pm 0.16	0.46 \pm 0.12	1.52 \pm 0.85	0.72 \pm 0.49	N.S.	N.S.	N.S.
α -Cholestenetriol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
7-Ketocholesterol	0.62 \pm 0.21	0.39 \pm 0.06	0.76 \pm 0.41	1.11 \pm 0.76	N.S.	N.S.	N.S.
<i>Autoxidation and enzymatic oxidation products</i>							
7 α -Hydroxycholesterol	0.47 \pm 0.09	0.47 \pm 0.12	0.63 \pm 0.22	0.64 \pm 0.24	N.S.	N.S.	N.S.
25-Hydroxycholesterol	0.68 \pm 0.05	0.98 \pm 0.17	1.38 \pm 0.66	1.41 \pm 0.51	N.S.	N.S.	N.S.
<i>Enzymatic oxidation products</i>							
4 β -Hydroxycholesterol	0.43 \pm 0.15	0.46 \pm 0.12	0.61 \pm 0.23	0.26 \pm 0.05	N.S.	N.S.	N.S.
22(R)-Hydroxycholesterol	0.05 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	N.S.	N.S.	N.S.
24(S)-Hydroxycholesterol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
27-Hydroxycholesterol	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.03	0.05 \pm 0.03	N.S.	N.S.	N.S.
Total oxysterols	5.82 \pm 1.25	7.83 \pm 0.64	7.57 \pm 2.92	8.75 \pm 2.14	N.S.	N.S.	N.S.

Values are means \pm SEM of 5 rats. Data were analyzed by two way ANOVA ($p < 0.05$).

n.d.; not detected. N.S.; not significant.

Table 9. Oxysterol levels of serum

Oxysterols	Control		Egg Yolk		ANOVA		
	Control	Oxysterol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Control	Oxysterol	OC	EY	OC \times EY
<i>Autoxidation products</i>							
7 β -Hydroxycholesterol	8.67 \pm 0.89	10.81 \pm 2.67	4.27 \pm 0.97	11.54 \pm 1.32	$P < 0.01$	N.S.	N.S.
β -Epoxycholesterol	40.95 \pm 7.80	21.98 \pm 4.46	17.82 \pm 5.75	23.59 \pm 6.11	N.S.	N.S.	N.S.
α -Epoxycholesterol	35.16 \pm 10.73	34.69 \pm 18.41	12.93 \pm 3.82	12.65 \pm 5.24	N.S.	$P < 0.05$	N.S.
β -Cholestenetriol	49.83 \pm 15.58	71.31 \pm 11.15	25.79 \pm 7.52	42.26 \pm 8.88	N.S.	$P < 0.05$	N.S.
α -Cholestenetriol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
7-Ketocholesterol	26.63 \pm 4.36	26.05 \pm 4.83	11.41 \pm 2.44	22.92 \pm 4.22	N.S.	$P < 0.05$	N.S.
<i>Autoxidation and enzymatic oxidation products</i>							
7 α -Hydroxycholesterol	6.93 \pm 1.17	8.25 \pm 3.65	3.18 \pm 0.65	6.73 \pm 0.96	N.S.	N.S.	N.S.
25-Hydroxycholesterol	14.89 \pm 5.27	19.66 \pm 6.83	9.01 \pm 2.31	19.68 \pm 1.38	N.S.	N.S.	N.S.
<i>Enzymatic oxidation products</i>							
4 β -Hydroxycholesterol	5.23 \pm 2.29	4.40 \pm 1.62	1.45 \pm 0.99	2.64 \pm 1.70	N.S.	N.S.	N.S.
22(R)-Hydroxycholesterol	n.d.	2.62 \pm 1.14	n.d.	n.d.	N.S.	N.S.	N.S.
24(S)-Hydroxycholesterol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
27-Hydroxycholesterol	3.76 \pm 1.47	n.d.	n.d.	n.d.	N.S.	N.S.	N.S.
Total oxysterols	187.37 \pm 42.22	202.73 \pm 34.90	85.86 \pm 19.05	142.01 \pm 13.07	N.S.	$P < 0.05$	N.S.

Values are means \pm SEM of 5 rats. Data were analyzed by two way ANOVA ($p < 0.05$).

n.d.; not detected. N.S.; not significant.