

## 卵摂取が、善玉コレステロール HDL の “量” と “質” に与える影響の解明

神戸大学医学部附属病院循環器内科・研究代表者 安田 知行

### ■ 緒言

背景；食生活の欧米化に伴い、高コレステロール血症患者が増加し、その結果、冠動脈疾患が急増している。冠動脈疾患予防には、薬物治療と共に食事、栄養指導の重要性も認識されている。高コレステロール血症患者の場合、動物性油脂の摂取制限と共に、コレステロール含有量の多い卵黄の摂取も制限することが多い。今までの疫学研究結果より、血清コレステロール量が、冠動脈疾患発症と有意な相関を示すことは明らかであるが、近年、コレステロールの輸送体であるリポ蛋白は、量のみならず質も冠動脈疾患発症に重大な影響を与えることが明らかになっている。例えば、悪玉と称される低比重リポ蛋白(LDL)の中でも、酸化 LDL や small dense LDL がより動脈硬化悪化作用を有することが報告され、善玉と称される高比重リポ蛋白(HDL)も、冠動脈疾患患者の HDL は、善玉作用が減弱していること、すなわち質的悪化が報告されている。

今まで、卵の摂取と、血清コレステロール量との相関を検証した臨床研究は多数存在するが、リポ蛋白の質との関連は明らかではない。卵摂取が冠動脈疾患発症に与える影響は未だ解明されていない。卵白には必須アミノ酸がバランスよく含まれており、卵黄に含まれるレシチンは HDL を増加させたと報告されている。今まで発表された研究報告から、我々は、卵摂取により血清コレステロール量は増加または不変で、質的には改善させるのではと予想した。今回、我々は、健常ボランティアに、4 週間毎日卵 2 個摂取を追加し、コレステロール量変化と質の解析を行い、卵摂取による動脈硬化抑制効果の検証を試みる。

卵摂取と血清コレステロール変化に関する研究は以前より行われている。1913 年にロシアで行われた研究において、家兎に卵を摂取させたところ、動脈硬化が進展したという報告がある。この結果に基づきヒトでも卵摂取で動脈硬化進展が起こると想起され、高コレステロール血症患者に卵摂取の制限を促している医師は多い。しかし、多くの臨床研究により、卵摂取は、必ずしも血清コレステロールを増加させないことが証明されている。さらに、卵摂取にて心血管病発症が増加したという報告もない<sup>1)</sup>。一方、卵には必須アミノ酸がバランスよく含まれ、卵黄に含まれるレシチンの一種であるフォスファチジルイノシトールは、HDL 増加作用が報告されている<sup>2)</sup>。臨床における観察研究は、数多く行われているが、介入試験において、卵摂取がリポ蛋白の抗動脈硬化作用に与える影響を検証した研究報告は、未だ存在しない。

目的；ヒト、ハムスターに通常食に加え卵負荷を行う。卵摂取が全般的な脂質プロファイルや HDL の抗動脈硬化作用に与える影響の検証を行う。

### ■ 方法

健常ボランティア 5 人に、通常の食事に加えて、卵を 2 つ追加してもらう。基本的には、新鮮な卵を用い、卵かけごはんなど、生で食べるようにする。この条件で 4 週間生活してもらい、卵負荷前後で採血を行い、血清コレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロール値を測定する。試薬を用いた沈殿法にて、HDL を精製し、HDL の“質”的評価を行った。

マウスと比較し、ハムスターとヒトの脂質代謝系は類似点が多い。そのため、ゴールデンハムスターを用い、ヒトにおける卵 1 日 5 ～ 10 個分に相当する卵白、あるいは卵黄を 4 週間投与する。その後、採血を行い、HDL を精製し、ヒトにおける研究と同様に、コレステロール引き抜き作用、抗酸化作用、抗炎症作用を検証する。ヒトにおける介入研究では、生活習慣や遺伝的背景から、研究結果が一定しない可能性もあるが、ハムスターであれば、遺伝的背景や食事は全く同じにすることが可能なため、ヒト研究を補完する意味で行った。

24 匹の 8 週齢オスの Golden Syrian Hamster を以下の 4 群に分けた。

- 1、Cont 群 (通常食の CE2 を継続)
- 2、Chol 群 (CE2 に、0.2 % cholesterol を混餌)
- 3、Yolk 群 (CE2 に、10%の卵黄粉末を混餌)
- 4、White 群 (CE2 に、10%の卵白粉末を混餌)

Cholesterolの投与量は、10%卵黄中に含まれるコレステロール量と同様になるように、決定した。ハムスター1匹あたりの食事量は15g/dayであった。

4週間投与したのちに5時間絶食状態でネブタール深麻酔下で、開胸下に心臓採血を行い、ヘパリン化された全血を採取。精製した血漿は解析まで、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保管した。肝臓、大動脈、内臓脂肪、小腸(上1/3)を回収し、RNA later内に保存し、後日TRIZOL reagentにてRNA精製を行った。Real-time PCRは、Takaraのキットを用い、Applied biosystemの機器にて行った。

T-cholesterol、Triglycerideは、WAKOキットによる生化学法にて測定を行った。より詳細な脂質解析は、Skylight biotech社(秋田県)に依頼し、HPLC法による解析を行った。血漿中の脂肪酸解析は、ガスクロマトグラフィー質量分析にて行った。

HDLの質的評価方法は、以下の3項目を行った。引き抜き能に使用したHDL分画は、ポリエチレングリコールを用いた沈殿法にて精製し、抗炎症作用に使用したHDLは、超遠心法にて精製した。PON-1に関しては、ほとんどHDL分画にのみ存在するため、血漿のまま測定を行った。

#### 1. コレステロール引き抜き能

ヒトマクロファージ由来の細胞株であるTHP-1細胞をアセチルLDL負荷とRIラベルしたコレステロール投与により泡沫化させ、さらにLXRアゴニスト処理により引き抜き能に参与するABCA1、ABCG1といったトランスポーターの発現を増加させた。このRIラベルされたコレステロールが、マクロファージ内に蓄積した状態で、細胞上清にHDL分画を投与し、8時間後の上清中のRIカウントを行うことで引き抜き能を測定した。

#### 2. 抗酸化能(PON-1活性)

HDLの抗酸化能の測定は、パラオキシネース tptp 活性を測定することで可能となる。血清を、基質であるparaoxonと $25^{\circ}\text{C}$ の条件下で96-well dish上にて培養し、4分培養前後の450nm吸光度の上昇度により、PON-1活性を測定した。

#### 3. 抗炎症能

血管内皮細胞に炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ を刺激すると単球の接着(動脈硬化の重要ステップ)を誘導する細胞接着因子VCAM-1の発現が増加する。このVCAM-1の発現増加をHDLが抑制することが、HDL抗動脈硬化作用の一つである。今研究では、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)TNF- $\alpha$ で刺激する際、超遠心法で分離したHDLを前投与し、VCAM-1発現抑制にどれほど参与するかをReal-time PCR法にて評価した。

統計解析は、GraphPad Prismにて行った。

## ■ 結果

5人の健常ボランティアに、通常の食事に加えて、卵2個を追加し、4週間負荷前後にて、空腹時採血を行った。体重は、前後で変化を認めなかった。脂質パラメーターに関しては、LDL-Cが増加する傾向を示したのみで、有意な変化は認められなかった(表1)。

コレステロール引き抜き能は、卵負荷後血清において、有意に増加傾向を認めたが、PON-1活性においては変化が認められなかった(図1)。

次に、24匹のハムスターをCont群、Chol群、Yolk群、White群に6匹ずつ分割し、4週間それぞれ負荷を行った。体重増加について各群間で有意差は認めなかったが、唯一、Yolk群のみ3~4週間で体重増加の鈍化が認められた。総コレステロール値、中性脂肪値ともにChol群、Yolk群で増加していたが、Yolk群でより顕著であった。White投与群では、軽度、両値ともに低下する傾向が認められた(図2)。

より詳細な脂質解析をHPLC法にて行った。Chol群、Yolk群で、HDLの増加が確認できたが、Yolk群では、VLDL、LDLの増加も顕著であった。White群では、HDL値は変化なく、VLDL、LDLに関してはむしろ低下傾向を認めた(図3)。

負荷マウスの脂肪酸解析結果は、卵に含まれると予想される脂肪酸が、Yolk群で有意に増加しており、飽和脂肪酸のパルミチン酸、不飽和脂肪酸のアラキドン酸が顕著に増加していた(図4)。

ついで、HDL機能の解析を行った。コレステロール引き抜き能は、Cont群と比較し、Chol群、Yolk群で顕著に増加を認めた。一方、VCAM-1抑制能に関しては、Chol群やYolk群のHDLでは、作用が減弱、消失しており、White群のHDLは、Cont群と同様の抗炎症作用を有していた(図5)。

肝臓、小腸におけるHDL関連遺伝子の発現をReal-time PCR法にて測定した。コレステロール逆転送に関連し、低HDL-C血症を誘導するCETP発現は、負荷にて変化を認めず、HDL合成に関連するABCA1発現も変化が認められなかった。唯一、HDL合成の材料となるapoA-Iの発現が、White群小

腸にて、有意に増加していた(図6)。

## ■ 考 察

ヒト研究では、少なくとも、通常食に卵2個を追加しても、血清脂質プロファイルは変化が認められなかった。HDL-コレステロールの抗動脈硬化作用は、軽微であるが有意にコレステロール引き抜き能の改善を認め、動脈硬化進展に関して卵摂取が良い影響を及ぼす可能性が示唆された。この結果は、1日1個の卵摂取は、冠動脈疾患、脳卒中に悪影響を与えないとしたメタアナリシスと同様の傾向であった<sup>3)</sup>。さらに、最近卵摂取でHDL-コレステロール機能改善を認めたという論文が発表されている<sup>4)</sup>。一方、ハムスター研究では、より卵負荷の影響を顕在化させるため1日当たり、食事の2割が、卵黄あるいは卵白という極端な卵負荷を行った。卵黄負荷では、HDL-コレステロール上昇が確認できたが、副作用として、動脈硬化惹起性のVLDL、LDL-コレステロールの増加を起こしてしまった。HDL-コレステロール引き抜き能は増加していたが、LDL-コレステロール増加のマイナス面を打ち消すまでには至らないと予想される。しかし、卵白負荷では、HDL-コレステロールの量、引き抜き能、抗炎症能といった質は保存したままで、VLDL、LDL-コレステロールの低下作用を認めた。元来、卵白には脂質成分はほとんど含まれていないため、VLDL、LDL-コレステロールの低下は予想できたが、HDL-コレステロールは低下しなかった。また、卵黄負荷では、アラキドン酸、パルミチン酸といった多量摂取では、動脈硬化や炎症惹起性を有すると報告されている脂肪酸が有意に増加していた。

この研究結果から過量の卵黄摂取は、高コレステロール血症を来し、動脈硬化リスクとなる可能性が示唆された。ただ、ヒトの研究からは1日2個程度あれば影響は小さいこともわかった。上記のメタアナリシスでも、多量の卵摂取は、冠動脈疾患リスクとなる一方、脳出血リスクは減らすことが報告されている<sup>3)</sup>。さらに、卵白に関しては過剰摂取にても、脂質プロファイルに良い影響を来すことが判明し、かつHDL-コレステロールの材料となるapoA-Iの小腸における産生を誘導した。apoA-I増加療法は、抗動脈硬化作用を有することが報告されており<sup>5)</sup>、卵白摂取は、apoA-I産生増加を介し、抗動脈硬化的に働く可能性がある。

今後は、動物モデルにおいて、動脈硬化形成時期まで飼育を延長し、卵黄、卵白摂取の動脈硬化に与える影響の検討を行うことと、さらにヒト臨床において、卵摂取と脂質、心血管病の関連について検討を行う予定である。

## ■ 要 約

1日2個までの卵摂取は、脂質プロファイルに悪影響を与えずに、HDL-コレステロール抗動脈硬化作用を改善させた。卵黄過剰摂取は、動脈硬化惹起性LDL-コレステロール量を増加させたが、卵白過剰摂取は、LDL-コレステロールを減少させ、HDL-コレステロール抗動脈硬化作用を保持していた。卵白摂取は、抗動脈硬化効果を有する可能性が示唆された。

## ■ 文 献

1. Jones PJ: Dietary cholesterol and the risk of cardiovascular disease in patients: A review of the harvard egg study and other data. *Int J Clin Pract Suppl*, 2009;1-8, 28-36
2. Burgess JW, et al: Phosphatidylinositol increases HDL-c levels in humans. *J Lipid Res*, 2005;46:350-355
3. Rong Y, et al: Egg consumption and risk of coronary heart disease and stroke: Dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ*, 2013;346:e8539
4. Andersen CJ, et al: Egg consumption modulates HDL lipid composition and increases the cholesterol-accepting capacity of serum in metabolic syndrome. *Lipids*, 2013
5. Nissen SE, et al: Effect of recombinant apoA-I milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: A randomized controlled trial. *JAMA*, 2003;290:2292-2300

表 1; ヒト臨床研究結果

Variable	egg pre(n=5)	egg post (n=5)
<i>Serum concentration</i>		
Total-C(mg/dl)	191.3 ± 10.5	208.3 ± 11.7
HDL-C (mg/dl)	49.7 ± 5.7	50.0 ± 6.2
LDL-C (mg/dl)	122.7 ± 7.0	136.3 ± 4.9
Triglycerides (mg/dl)	101 ± 20.8	102 ± 17.4
phospholipids (mg/dl)	205 ± 8.9	218 ± 19.2

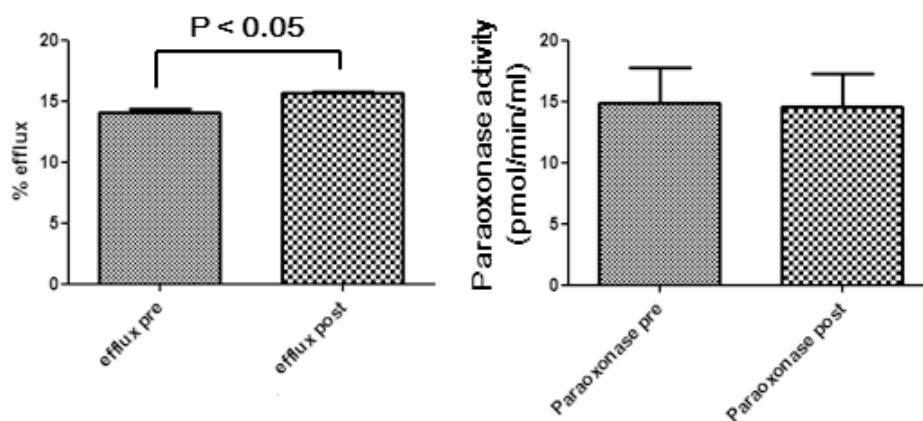


図 1; ヒト卵摂取前後の HDL 質的解析

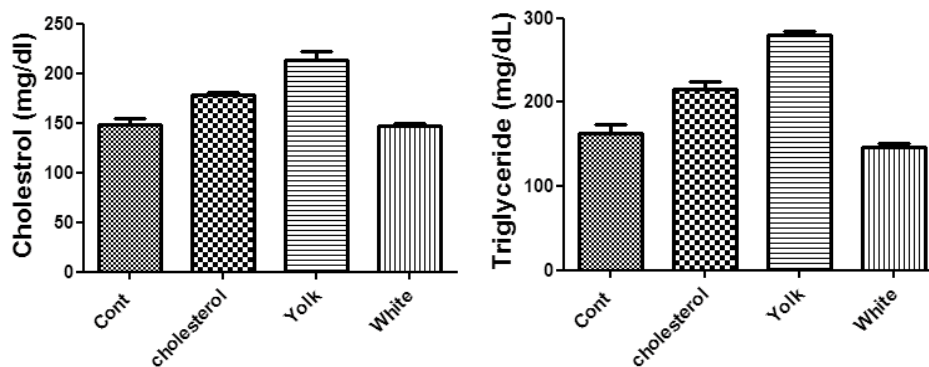


図 2; ハムスター卵負荷後のコレステロール(cholesterol)、中性脂肪(Triglyceride)値

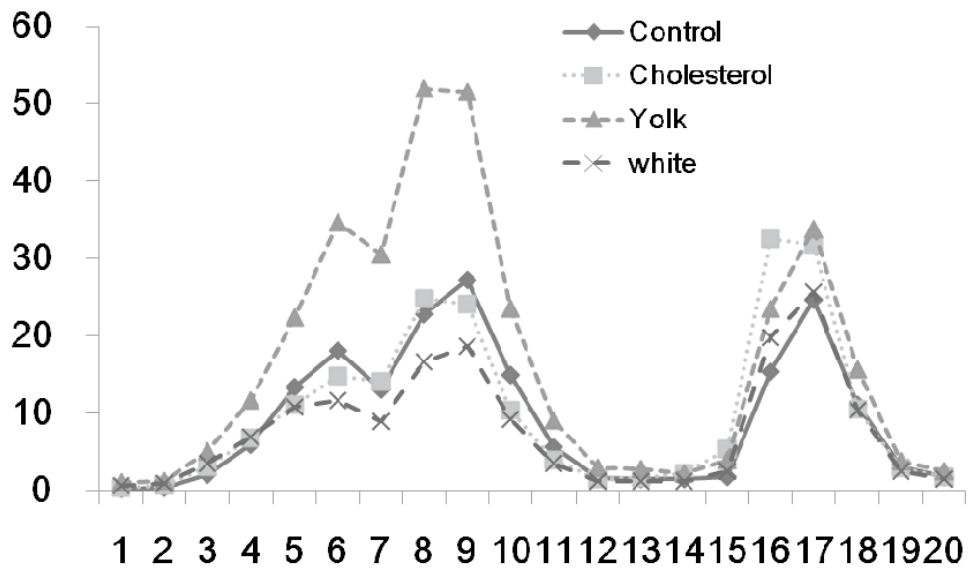


図 3; ハムスター血漿の FPLC 解析、縦軸はコレステロール濃度 (mg/dl)

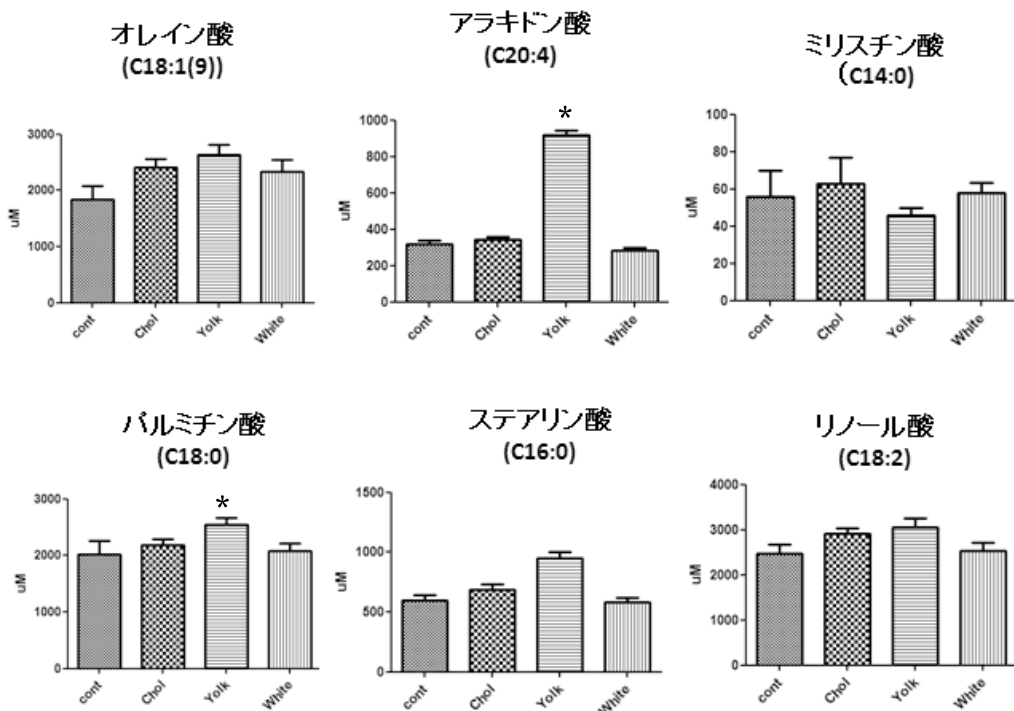


図 4; ハムスター血漿の脂肪酸解析

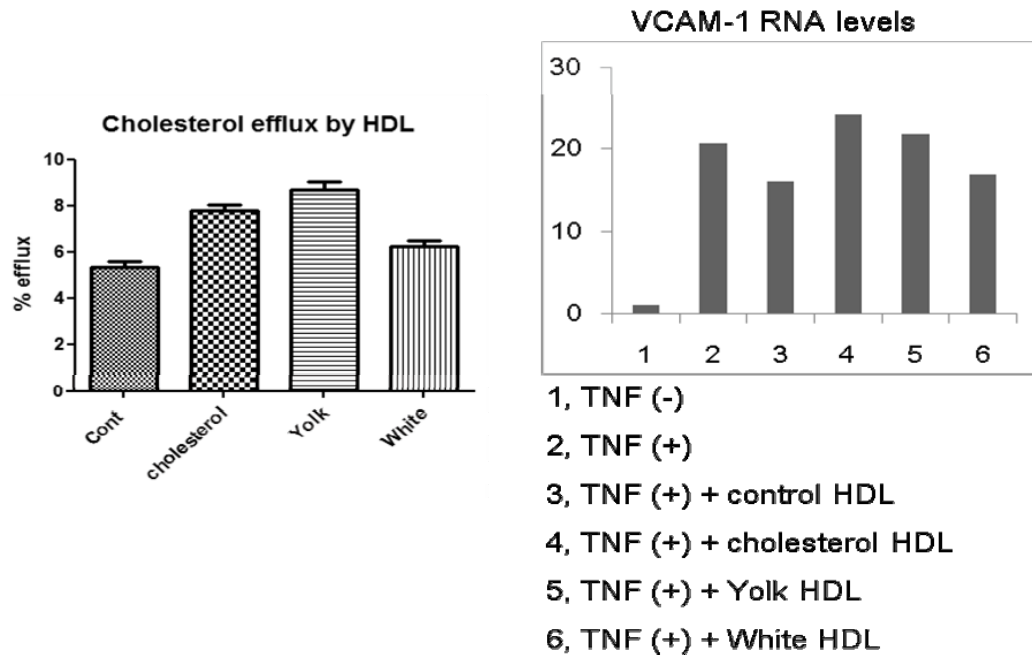


図 5; 卵負荷後ハムスターの HDL 質的解析、左; コレステロール引き抜き能、右; 抗炎症能(ヒト血管内皮細胞に炎症性サイトカイン TNF を刺激し、TNF による接着因子 VCAM-1 の各 HDL による発現抑制を検討した。)

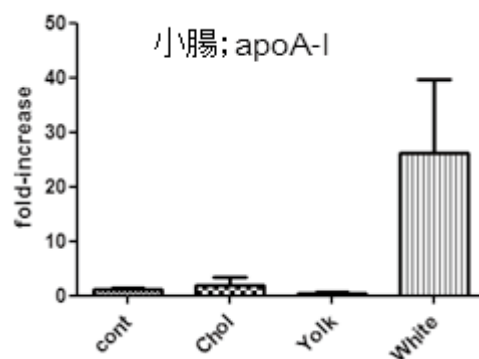


図 6; 卵負荷後ハムスターの小腸における HDL の材料となるアポリポ蛋白 A1(apoA-I)の遺伝子発現確認。