

低アレルゲン性卵白素材によるインスリン抵抗性 および肥満改善機序の解明

北里大学獣医学部動物資源科学科栄養生理学研究室・助教 落合 優

■ 緒言

卵白(EW)は高タンパク質低脂肪を特徴とし、これまでにコレステロール吸収抑制作用¹⁾など様々な生理機能を有するが、重篤な食物アレルギー症状を引き起こし、日本の食物アレルギー全体の38.7%を占める²⁾。したがって、卵アレルギーの原因物質であるアレルゲンを低減化することが求められている。

助成者の先行研究にて、EWをタンパク質分解酵素を用いて加水分解処理した試料(EWH)をラットに給餌した場合、食餌摂取や脂質合成酵素が抑制され、糖代謝関連指標が改善される可能性が示唆された^{3,4)}。本研究では食後の消化管をモデルとした水・油混合溶液中の物性を検討した(実験①)後、食餌摂取量を調節した条件下でEWまたはEWHの抗肥満作用をラットを用いて検討した(実験②)。次に、2型糖尿病モデルマウスの耐糖能に及ぼすEWおよびEWHの効果を検討した(実験③)。さらに、EW由来のアレルゲンをより低減化するための酵素反応条件の検討を実施し、反応生成物をマウスに経口投与した後の炎症指標の経時変化を検討した(実験④)。

■ 方法

【実験①】EWおよびEWHの物理化学的特性の検討

カゼイン、EWおよびEWHの分子量をSDS-PAGEにより検討した。また、各試料を経口で摂取(投与)した場合の消化管内における分散性について検討するため、水・油混合液中の粘性に及ぼす各タンパク質の影響を検討した。

【実験②】等エネルギー摂取下におけるEWおよびEWHの抗肥満作用の検討

Wistar雄ラットをカゼイン食群(C)、EW食群(EW)およびEWH食群(EWH)に分け、各食餌を8週間摂取させた。先行研究^{3,4)}にてEW群に食餌摂取が低下する現象が見られたため、ペアフィーディング法を用いた。飼育終了後、生体サンプルを回収し、生化学的分析に供した。血漿、糞(最終3日間)、組織および臓器に含まれる脂質の濃度または含有量を測定した。組織および臓器の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィー(GC)法で測定し、脂質合成の間接指標である脂肪酸の不飽和化酵素(SCD)活性指標を算出・測定した。また、糞中脂質成分を薄層クロマトグラフィー法により定性分析した。

【実験③】血中中性脂肪濃度上昇および食餌の消化管通過時間に及ぼすEWおよびEWH単回投与の効果検討

絶食させたddYマウスを対照群、EW群およびEWH群に分け、各試料(500mg/kg)と大豆油5mL/kgを投与した。投与6時間後までの血漿中性脂肪濃度およびその曲線下面積を求めた。

同様に各試料(500mg/kg)を投与し、その30分後にエバンスブルーを混合した流動食を投与した。投与5分後までの流動食の移動速度を[移動距離/全体(胃下部～回腸末端)×100%]で算出した。

【実験④】EWおよびEWHによる耐糖能改善作用の検討

ICRマウスおよび2型糖尿病モデルNSYマウスをそれぞれ普通食群(LF)または高脂肪高ショ糖食群(HF)に分け、HF群はさらに食餌タンパク質の違いにより、カゼイン食群(HF)、EW食群(EW)およびEWH食群(EWH)に分けた。各食餌を8週間自由摂取させ、本飼育6週目および7週目終了時に経口グルコース負荷試験(OGTT)およびインスリン負荷試験(ITT)を行った。

【実験⑤】卵白タンパク質由来アレルゲンの酵素処理法と酵素反応生成物の抗炎症作用の検討

生体内外でタンパク質を分解する酵素であるペプシン(Pe)、トリプシン(T)、キモトリプシン(CT)およびパイン(Pa)を用いてEWに含有されるアレルゲンの分解を検討した。まず初めに、各酵素1種類で処理する場合、次にPaとその他の酵素1種類を同時に処理する場合、最後にPaを含む2種類の酵素の反応順を変えた場合のアレルゲン分解度をSDS-PAGEおよび卵特異的アレルゲン定量ELISAキットを用いて定性定量した。

上記の酵素分解にて最もアレルゲン分解能を有したCT→Pa処理試料を用いて食物アレルギー関連指標である免疫グロブリンE(IgE)の血中濃度に及ぼす作用をマウスを用いて検討した。ICRマウスを蒸留水対照群(W)、アレルギー陽性対照EW群(EW)、Pa処理EW群(EWH-Pa)、CT→Pa処理EW群

(EWH-CT → Pa)および EWH 群(EWH)に分け、各試料溶液を 100mg/kg の用量で 2 週間反復投与後、血漿 IgE 濃度を測定した。

【統計解析】

得られたデータは平均値 ± 標準誤差で示した。一元分散分析を行い、有意差が確認された場合に Fisher-PLSD(実験②・③)、Tukey-Kramer 法(実験④)、Dunnett 法(実験⑤)により、群間の差を検定した。統計解析処理にはエクセル統計 2015(株式会社社会情報サービス)を用いた。

■ 結果

【実験①】EW および EWH の分子量と物理化学的特性

EWH においてはオボトランスフェリン(MW 77 kDa)、オボアルブミン(45 kDa)、リゾチーム(14 kDa)を示すバンドが消失または薄いことが確認された(Fig. 1-1)。EW および EWH に含有される卵特異的アレルゲン含量は【実験⑤】に記した。

また、カゼインと比較して EW および EWH の粘性は著しく低く、消化管内の水油混合溶液中に分散する可能性が高いことが示唆された(Fig. 1-2)。

【実験②】等エネルギー摂取下における EW および EWH による抗肥満作用

EW および EWH の等エネルギー摂取はエネルギー効率、腹腔内脂肪組織重量、屠体脂肪蓄積および体脂肪蓄積に対して有意な影響を及ぼさなかった。しかし、絶食時の血糖値、血清アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、レプチン濃度は低値となった(Table 2-1)。また、糞中に排泄される脂質を顕著に増加させ、肝臓および骨格筋における脂質蓄積を抑制する結果が示された(Fig. 2-1, 2-2)。脂質合成に関わる脂肪酸不飽和化酵素(SCD)活性指標は肝臓において EW および EWH 群で有意に低値となった(Table 2-2)。

【実験③】EW および EWH による血中中性脂肪値の上昇と食餌通過時間に及ぼす作用

油脂投与後の血中中性脂肪濃度上昇を抑制する効果は EW および EWH の単回投与には認められなかった。また、EW および EWH が食餌通過時間を遅延させる効果は認められなかった(Fig. 3)。

【実験④】EW および EWH による耐糖能改善作用

OGTT における血漿グルコース濃度は HF 群と比べて EW 群および EWH 群で低く推移し、その効果は EW 群と比べて EWH 群でより強く見られた(Fig. 4-1)。ICR マウスにおいては特に EW 群で血漿グルコース濃度が低く抑制される結果となった(Fig. 4-1)。また、ITT における血漿グルコース濃度の変動率は EW 群で低く推移したが、EWH 群では効果は確認されなかった(Fig. 4-2)。

【実験⑤】EW 由来アレルゲンの新規酵素処理法と抗炎症作用

EW を Pe、T、CT および Pa を用いて酵素処理した結果、Pa を用いて酵素反応処理をした場合のアレルゲン分解度が比較的良好であり、CT で処理した後に Pa で処理した反応生成物(EWH-CT → Pa)のバンドが著しく薄くなった(Fig. 5-1)。EW、EWH および EWH-CT → Pa に含まれる卵特異的アレルゲン含量はそれぞれ 15.1、3.1、0.01mg/g であった。これは電気泳動のバンドの濃さにも比例した。

アレルギー関連指標である血中 IgE 濃度に対しては、EW 投与により血漿 IgE 濃度の有意に高くなったが、EWH-CT → Pa 群においては EWH 群と同様に抑制された(Fig. 5-2)。

■ 考察

EW および EWH は等エネルギー摂取条件下においても糞中に排泄される脂質を有意に増加させた(実験②)ことから、消化管における脂質吸収を抑制し、血中を介して組織や臓器に運搬される脂質の量が減少したものと考えられる。その作用機序を検討すべく、EW および EWH に高い分散性が確認された(実験①)ため、消化管における脂質の消化吸収に及ぼす EW と EWH の作用に着目して単回投与試験を検討したが、脂質の消化吸収が抑制される作用や食餌の消化管通過速度を遅延させる作用については確認できなかった(実験③)。しかし、実験②にて EW と EWH の長期投与により消化管における脂質の吸収に関与する血漿 ALP 活性が EW および EWH 群で低値であったことは、長期的な EW および EWH の摂取による脂質吸収抑制作用の機序の可能性の一つであると考えられる。一方で体脂肪および腹腔内に蓄積される脂質含量に変化が生じなかったのは、ペアフィーディング法により対照群の食餌摂取量が制限されたことや脂質蓄積が脂肪組織で優先的に行われた可能性が考えられる。

また、血糖値および摂食関連因子であるレプチンの血中濃度が EW 群または EWH 群で低値となり、2 型糖尿病モデルマウスの耐糖能が EW 食および EWH 食の長期摂取によって改善することが OGTT や ITT において示唆された(実験④)。このことより、低アレルゲン性 EWH はこれまで助成者が報告してきた EW の抗肥満作用^{3,4)}を打ち消さず、インスリン抵抗性を改善する有効な食事タン

パク質源であることが示唆された。しかしながら、糖取り込みを中心とした作用機序については消化管、骨格筋や肝臓等を用いてより詳細に検討すべきである。

また、CT と Pa の併用処理により低アレルゲン化および抗炎症作用の可能性が示唆された(実験⑤)ため、アレルギー症状を予防または軽減する機能的食品としての開発が今後期待される。

■ 要 約

① EW および EWH はカゼインと比べて食後消化管内をモデルとした水・油混合溶液中で高い分散性を有した(実験①)。

② EW および EWH は等エネルギー摂取条件下において、摂食関連因子であるレプチンの血中濃度を低下させた。また、消化管における脂質の吸収を抑制し、肝臓および筋肉の脂質蓄積を抑制するが、腹腔内脂肪および体脂肪蓄積を抑制する効果はなかった(実験②)。

③ EW および EWH の単回投与は血中中性脂肪濃度の抑制および食餌通過時間の遅延には効果がなかった(実験③)。

④ EW および EWH は耐糖能を改善した(実験④)。

⑤ EW を CT → Pa の順で加水分解処理することにより、EW 由来のアレルゲンが効率よく分解され、血中アレルギー指標である IgE 濃度を抑制する傾向にあった(実験⑤)。

以上より、EW を低分子・低アレルゲン化した EWH は摂食量を調節した条件下においても異所性脂質の過剰蓄積を抑制し、インスリン抵抗性の進展を抑制する可能性が示唆された。また、卵由来アレルゲンをより低減化する酵素処理法を新規に見出すことができたが、食餌誘発性の肥満やインスリン抵抗性の改善に対する作用の有無については検討課題である。

■ 文 献

- [1] Matsuoka R, Shirouchi B, Kawamura S, Baba S, Shiratake S, Nagata K, Imaizumi K, Sato M(2014) Dietary Egg White Protein Inhibits Lymphatic Lipid Transport in Thoracic Lymph Duct-cannulated Rats, *J Agric Food Chem* 62:10694-10700
- [2] 厚生労働科学研究班 今井孝成(2011)「食物アレルギーの栄養指導の手引き 2011」、「食物アレルギーの栄養指導の手引き 2011」検討委員会出版
- [3] Ochiai M and Matsuo T(2014) Effect of Egg White and its Hydrolysate on Stearoyl-CoA Desaturase Index and Fat Accumulation in Rat Tissues, *Int J Food Sci Nutr* 65:948-952
- [4] Ochiai M, Kuroda T and Matsuo T (2014) Increased Muscular Triglyceride Content and Hyperglycemia in Goto-Kakizaki Rat Are Decreased by Egg White Hydrolysate, *Int J Food Sci Nutr* 65:495-501

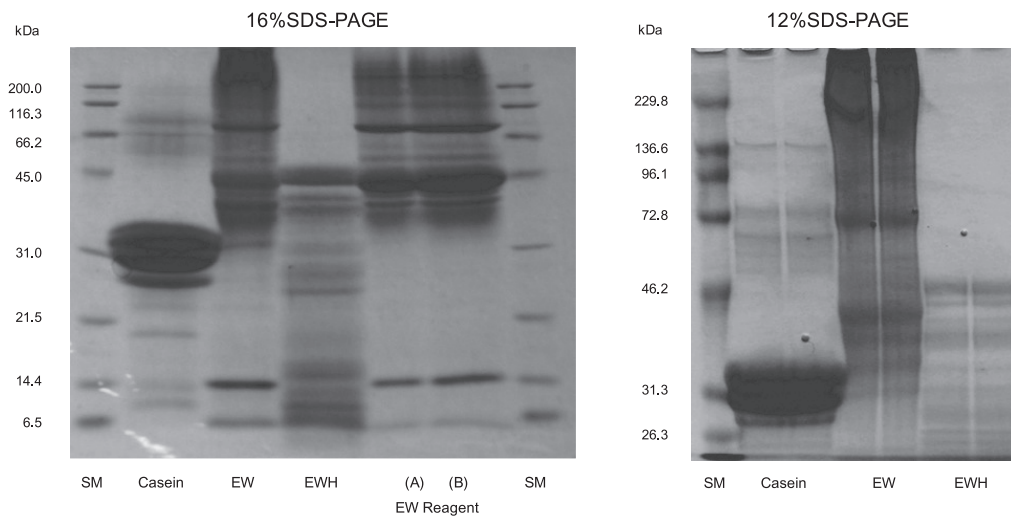


Fig.1-1 Protein electrophoresis patterns of dietary protein materials

Each lane in the left Fig shows protein molecular weight size marker (SM), casein, EW, EWH, EW chemical reagent, and SM from left to right (16% SDS-PAGE). Each lane in the right Fig shows SM, casein, EW, and EWH from left to right (12% SDS-PAGE). Each protein was stained with CBB R250. Each dietary protein concentration was at 5 mg/mL, and concentrations of EW crude reagent were at 5 (A) and 10 (B) mg/mL.

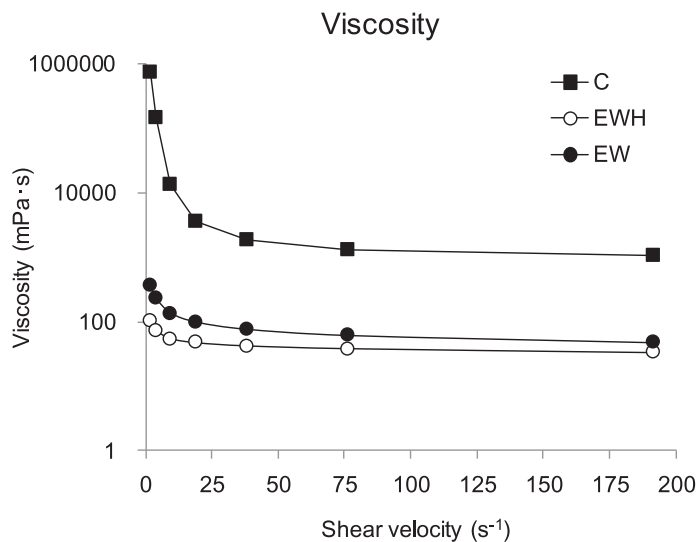


Fig.1-2 Effects of each protein material on viscosity
Values are mean \pm SE (n=3) in each shear velocity point.

Table 2-1 Body weight gain, food intake, tissues weight, and serum components

	C	EW	EWB
Body weight gain and food intake			
Body weight gain (g)	184.4 ± 8.3	184.6 ± 4.4	180.8 ± 6.3
Food intake (g/day)	11.5 ± 0.3	11.5 ± 0.3	11.0 ± 0.1
Food efficiency (g BW gain / g food intake) ¹	0.286 ± 0.005	0.284 ± 0.007	0.294 ± 0.007
Tissue weight (mg/g body weight)			
Liver	29.6 ± 0.4	28.0 ± 0.6 [†]	28.0 ± 0.4 [†]
Intra-abdominal adipose tissue ²	73.1 ± 3.0	66.3 ± 5.7	74.6 ± 5.2
Total hindlimb skeletal muscles ³	16.0 ± 0.3	16.6 ± 0.3	16.0 ± 0.3
Serum biochemical components			
Glucose (mg/100 mL)	147.9 ± 2.6	129.1 ± 3.7 ^{**}	135.4 ± 5.6 ^(†)
Insulin (µg/L)	2.5 ± 0.4	2.3 ± 0.3	3.1 ± 0.5
ALP (U/L)	267.2 ± 12.0	195.8 ± 12.3 ^{***}	209.0 ± 6.3 ^{**}
Leptin (pg/mL)	380.2 ± 94.2	133.5 ± 22.3 ^(†)	279.3 ± 114.1
TAG (mg/100 mL)	110.4 ± 10.5	95.1 ± 10.2	100.1 ± 21.5
NEFA (mEq/L)	0.79 ± 0.06	0.86 ± 0.06	0.91 ± 0.06
Total-CHO (mg/100 mL)	153.7 ± 5.2	139.5 ± 7.1	135.5 ± 5.0 [†]
HDL-CHO (mg/100 mL)	86.9 ± 3.9	76.0 ± 3.9	66.6 ± 1.6
non-HDL-CHO (mg/100 mL)	66.8 ± 2.6	63.6 ± 3.7	68.9 ± 4.4

Values are mean ± SE of 6 rats. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Fisher-PLSD test. ^(†), ^{*}, ^{**} $p < 0.1, 0.05, 0.01$, respectively (vs. C group). ¹Food efficiency were calculated by using a following formula; Food efficiency (g/g) = Body weight gain (g) / Food intake throughout the test period (g); ²Sum of perirenal, epididymal, and mesenteric adipose tissue weight; ³Sum of soleus, plantaris, gastrocnemius, tibialis anterior, and extensor digitorum longus muscles; ALP, alkaline phosphatase; TAG, triacylglycerol; NEFA, non-esterified fatty acids; CHO, cholesterol; HDL, high-density-lipoprotein.

Table 2-2 SCD activity indices, G6PDH and FAS activities of the liver and muscles

	C	EW	EWB
SCD index			
Liver			
C16:1/C16:0	0.10 ± 0.00	0.06 ± 0.01 ^{***}	0.07 ± 0.01 ^{**}
C18:1/C18:0	2.05 ± 0.08	1.12 ± 0.08 ^{***}	1.30 ± 0.12 ^{***}
Soleus muscle			
C16:1/C16:0	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.11 ± 0.01 ^(#)
C18:1/C18:0	2.03 ± 0.22	1.96 ± 0.10	1.71 ± 0.11
Perirenal adipose tissue			
C16:1/C16:0	0.17 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01 [#]
C18:1/C18:0	6.28 ± 0.16	6.43 ± 0.18	6.66 ± 0.22
G6PDH (μmol/min/g tissue)			
Liver	28.6 ± 1.3	33.1 ± 1.2 [*]	31.3 ± 1.5
Soleus muscle	1.42 ± 0.08	1.40 ± 0.06	1.48 ± 0.03
Gastrocnemius muscle	0.67 ± 0.04	0.64 ± 0.02	0.76 ± 0.05 [#]
FAS (μmol/min/g tissue)			
Liver	1.24 ± 0.14	1.44 ± 0.18	0.99 ± 0.12 [#]

Values are mean ± SE of 6 rats. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Fisher-PLSD test. ^{**}, ^{***} $p < 0.01$, 0.001 , respectively (vs. C group). ^(#), ^{*} $p < 0.1$, 0.05 , respectively (vs. EW group); SCD, stearyl-CoA desaturase; G6PDH, glucose 6-phosphate dehydrogenase; FAS, fatty acid synthase.

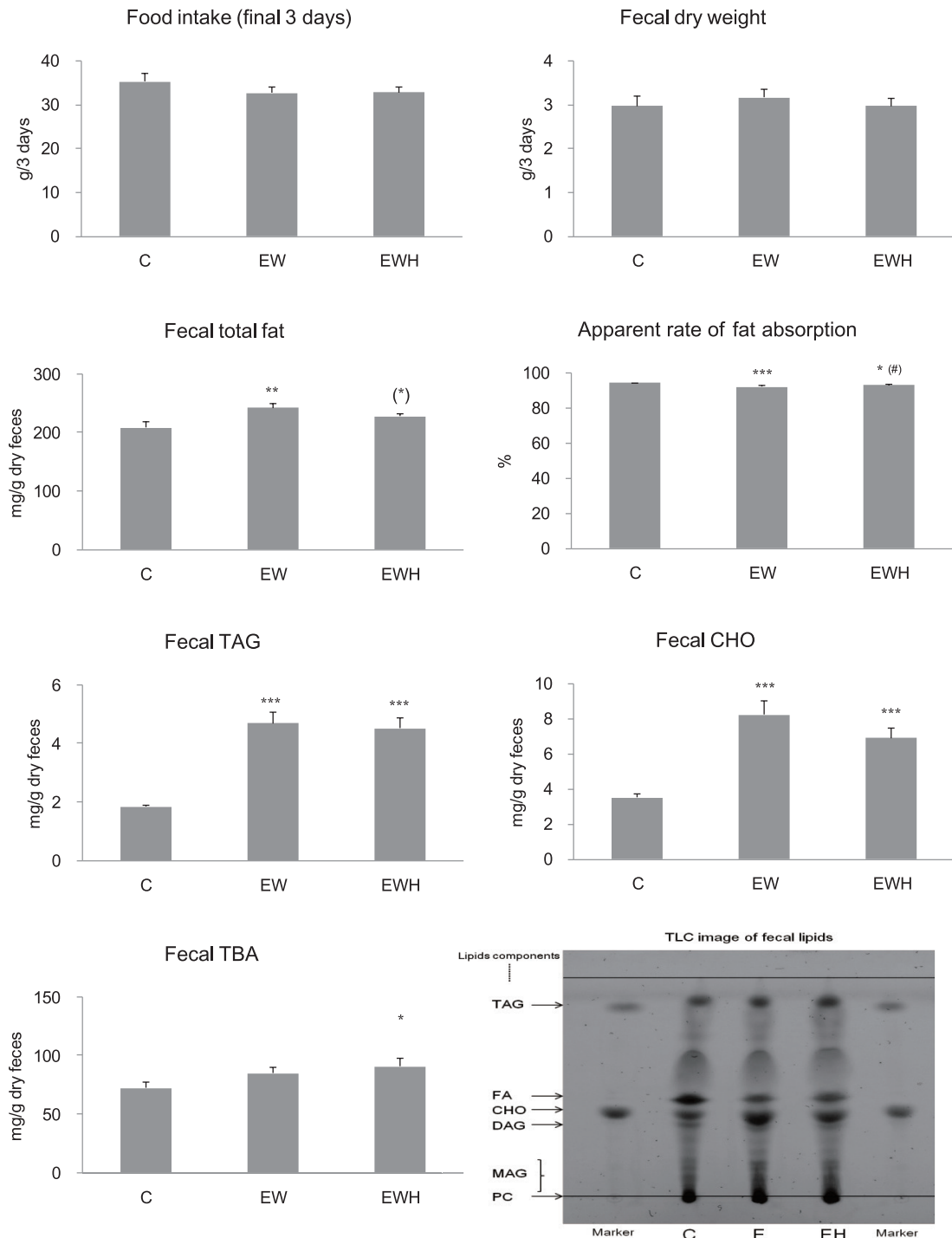


Fig.2-1 Fecal weight, fecal lipids contents, fecal TLC image, and apparent rate of fat absorption of paired-rats

Values are mean \pm SE of 6 rats per each group (except for fecal TLC image). Each band in the fecal TLC image was shown by using a mixture of the fecal lipids solution from each rat. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Fisher-PLSD test. A difference of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. (*), **, *** $p < 0.1, 0.05, 0.01, 0.001$ compared to C group, respectively. (#) $p < 0.1$ compared to EW group; TAG, triacylglycerol; CHO, cholesterol; TBA, total bile acids.

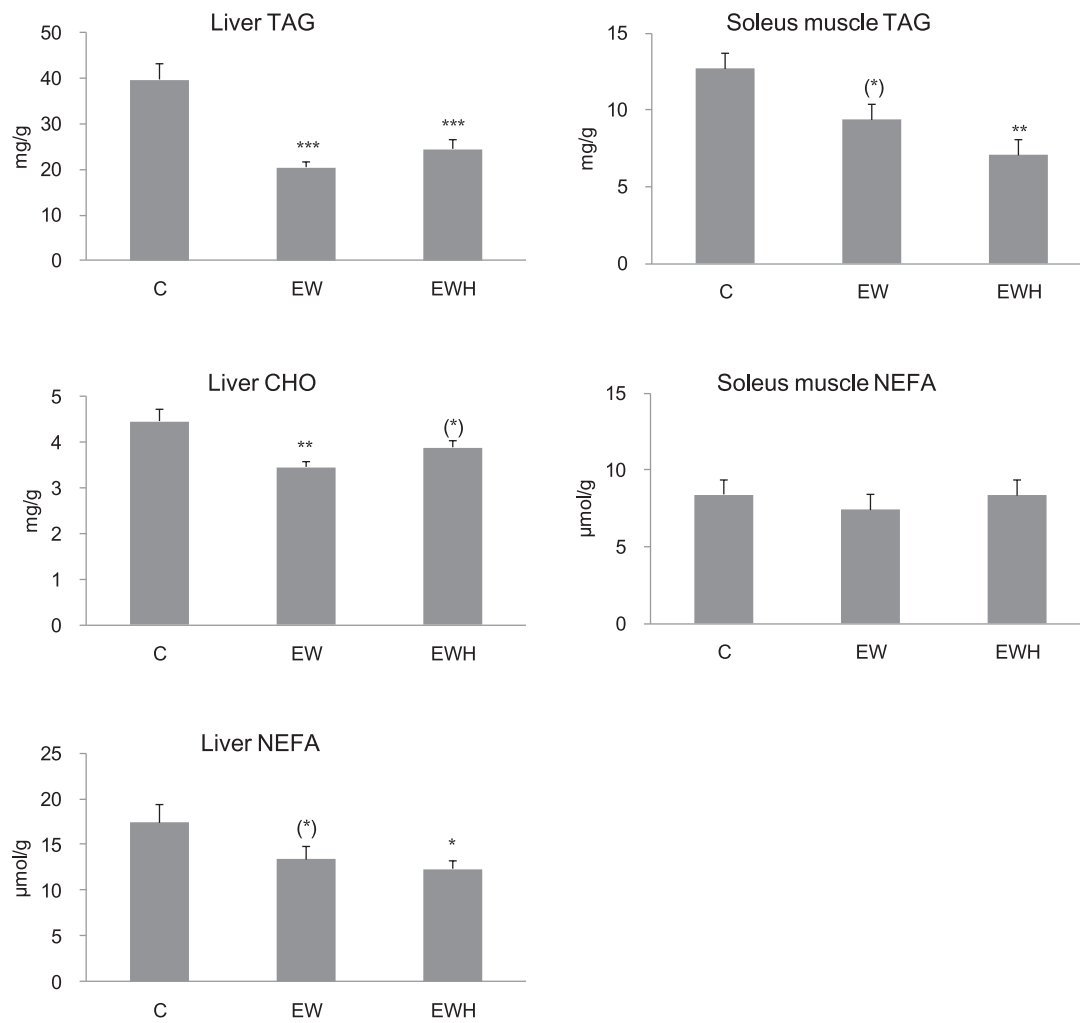


Fig.2-2 Lipids content in the liver and soleus muscle of rats

Values are mean \pm SE of 6 rats per each group. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Fisher-PLSD test. A difference of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. (*), (*), (*), (**), (***) $p < 0.1, 0.05, 0.01, 0.001$ compared with C group, respectively. NEFA, non-esterified fatty acids; TAG, triacylglycerol; CHO, cholesterol.

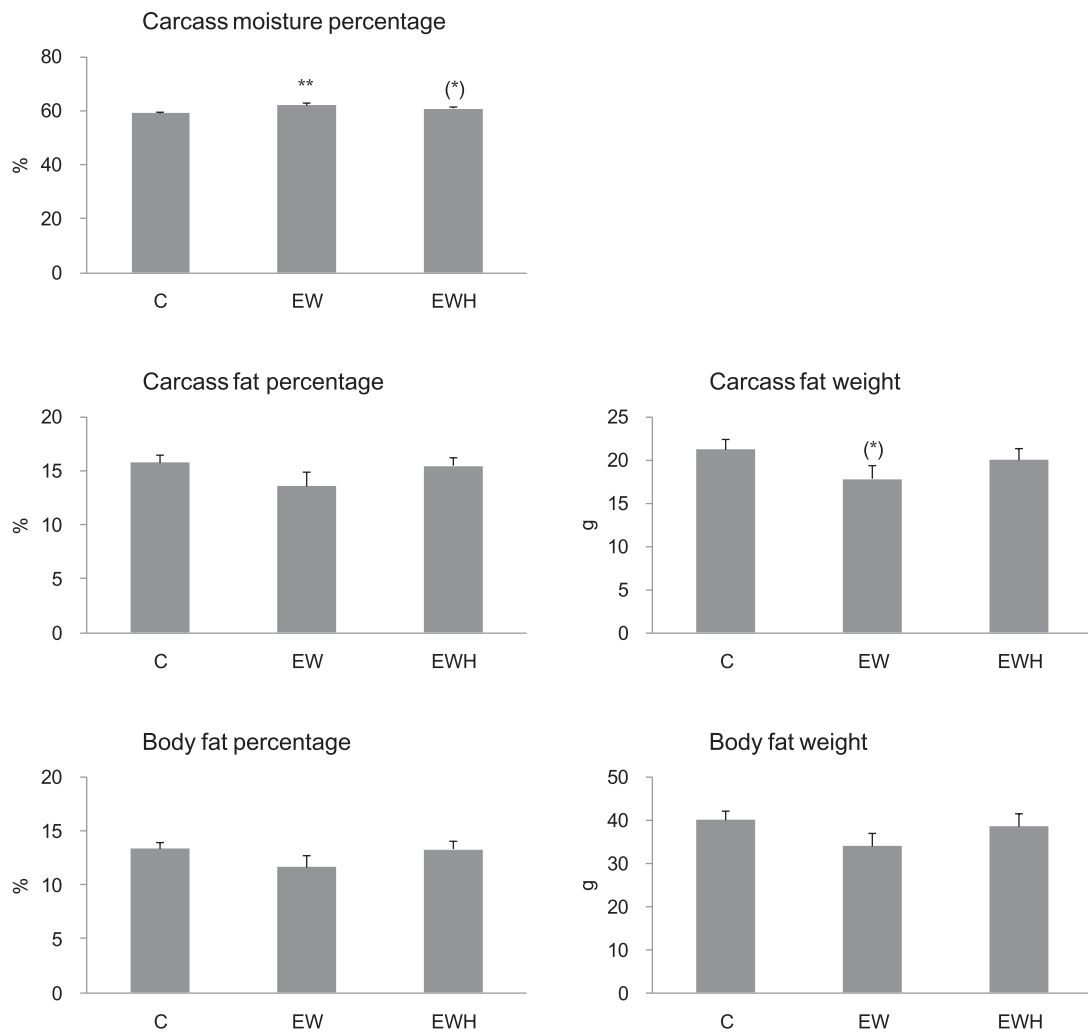


Fig.2-3 Percentage and weights of the carcass and total body fat of pair-fed-rats
 Values are mean \pm SE of 6 rats per each group. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Fisher-PLSD test. A difference of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. (*), ** $p < 0.1, 0.01$, compared with C group, respectively.

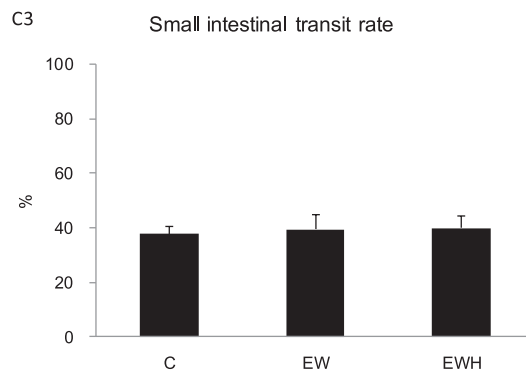
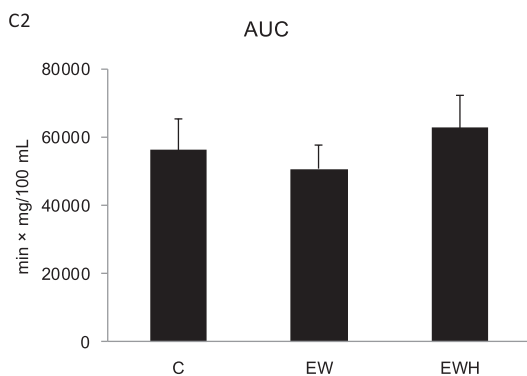
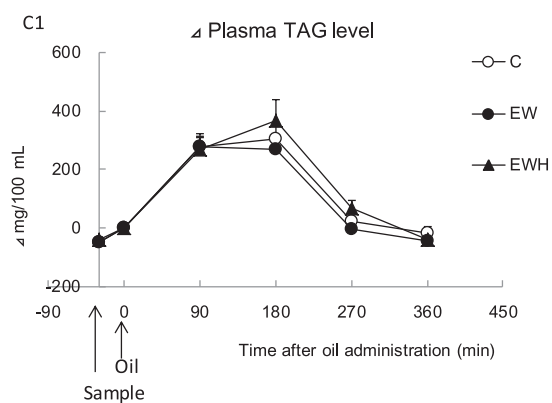


Fig.3 Effects of EW and EWH on plasma TAG elevation after the oil loading (C1 and C2) and small intestinal transit after the meal administration (C3) in ddY mice. Values are mean \pm SE of 13-15 mice (C1 and C2) and 6-9 mice (C3) per each group. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Fisher-PLSD test. A difference of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

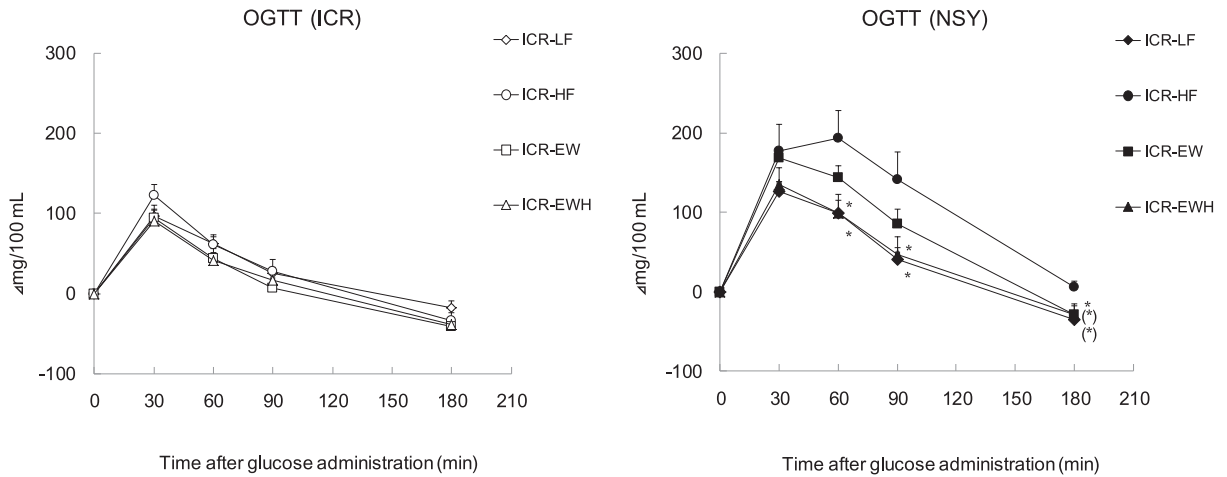


Fig.4-1 Effects of EW and EWH on plasma glucose level in OGTT in ICR and NSY mice
 Values are mean±SE of 8-9 mice per each group. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Tukey-Kramer test. A difference of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. * $p < 0.05$, ([†]) $p < 0.1$ (vs. HF)

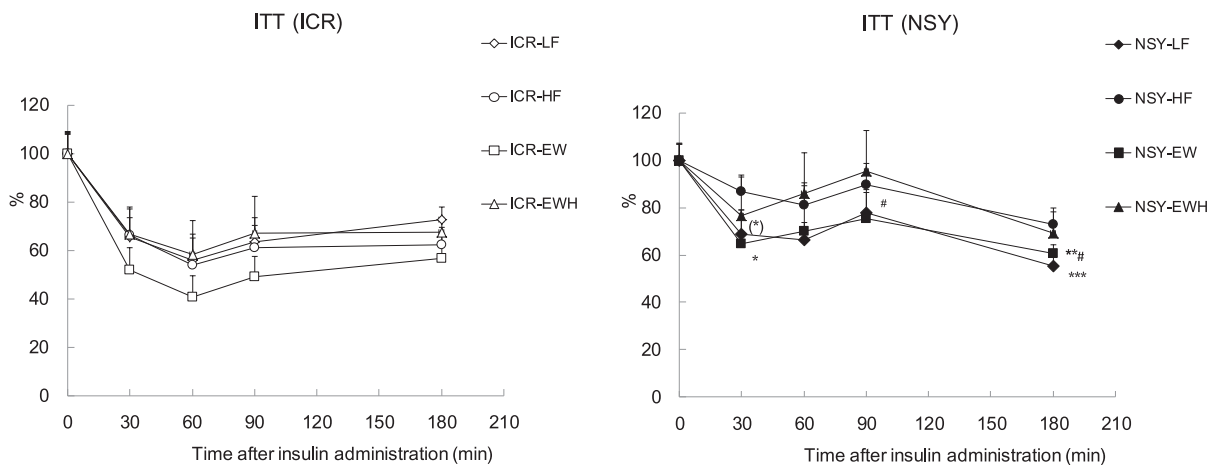


Fig.4-2 Effects of EW and EWH on plasma glucose level in ITT in ICR and NSY mice
 Values are mean±SE of 8-9 mice per each group. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Tukey-Kramer test. A difference of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. (*), (*), (*), (**), (***) $p < 0.1, 0.05, 0.01, 0.001$, respectively (vs. HF), # $p < 0.05$ (vs. EWH)

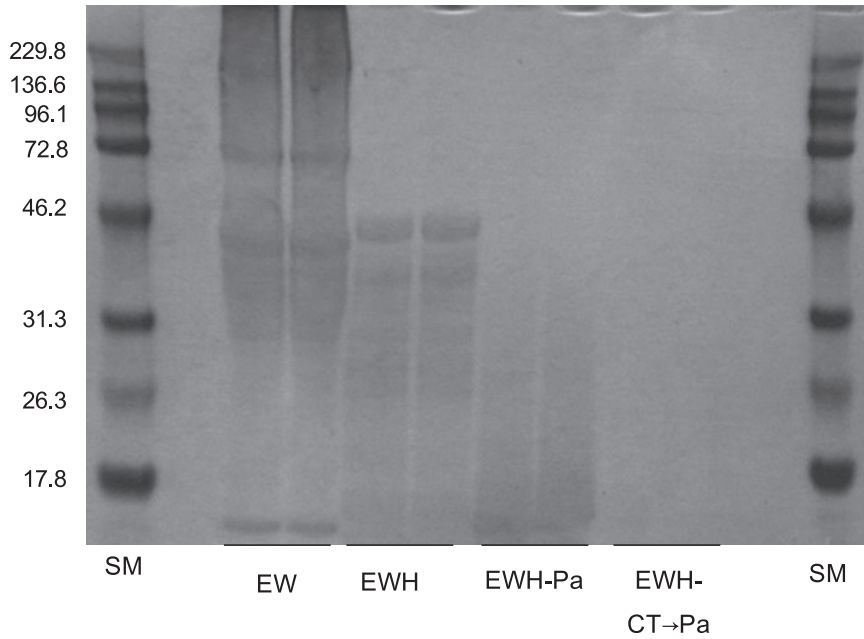


Fig. 5-1 Protein electrophoresis patterns of EW and each EWH
 Each lane shows size marker (SM), M, EW, EWH, EWH-Pa, EWH-CT → Pa, and SM from left to right (15% SDS-PAGE). Each protein was stained with CBB R250. Each dietary protein concentration was at 5mg/mL.

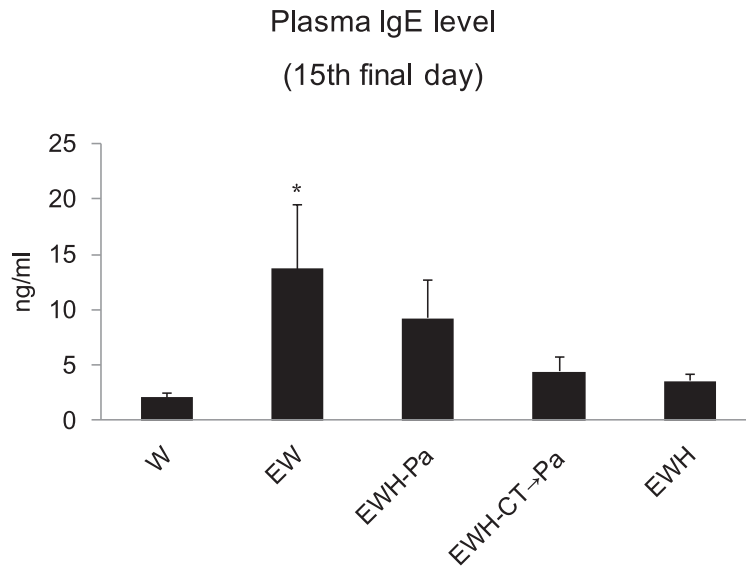


Fig.5-2 Plasma IgE level after sample administration for 2 weeks
 Values are mean±SE of 5 mice per each group. Statistically significant differences were evaluated by one-way ANOVA and Tukey-Kramer test. A difference of $p<0.05$ was considered to be statistically significant. * $p<0.05$ (vs.*W).