

Effects of whey peptide on the liver lipid accumulation and mild liver inflammation in mice.

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-03-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 工藤, 陽香 メールアドレス: 所属:
URL	https://otsuma.repo.nii.ac.jp/records/6525

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



平成 28 年度 博士論文

食餌性肥満モデルマウスにおける肝臓脂質蓄積
および軽度炎症に及ぼす乳由来ペプチドの影響

Effects of whey peptide on the liver lipid accumulation and
mild liver inflammation in mice.

指導教員 青江誠一郎 教授

大妻女子大学大学院
人間生活文化研究科(博士課程)
人間生活科学専攻
生活素材学専修
学籍番号：051114401
名前：工藤 陽香

目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 実験方法	
第 1 節 食餌性肥満モデルマウスの耐糖能, 肝臓脂質蓄積および炎症に及ぼすホエイペプチドとアミノ酸の影響	
2-1-1 実験の概略	4
2-1-2 人工消化試験	4
2-1-3 実験動物	4
2-1-4 実験飼料	5
2-1-5 飼育方法 (動物実験)	5
2-1-6 動物解剖とサンプル採取	5
2-1-7 分析方法	
(1) 血清分析	5
(2) 肝臓脂質の分析	6
(3) 脂肪組織の脂肪細胞のサイズ	6
(4) 耐糖能試験	6
(5) 糞中脂質量の測定	7
(6) 肝臓の mRNA 発現量の測定	7
(7) 肝臓の病理標本の観察	10
2-1-8 統計解析	10
Table1-1~Table1-2	11
第 2 節 Exp2 ラットにおけるアミノ酸吸収実験	
2-2-1 実験の概略	13
2-2-2 実験動物	13
2-2-3 実験飼料	13
2-2-4 飼育方法 (動物実験)	13
2-2-5 動物解剖とサンプル採取	13
2-2-6 分析方法	
(1) 血清分析	13
(2) 門脈中遊離アミノ酸濃度の測定	14
2-2-7 統計解析	14
Table2	16

第3節 Exp3 ペプチドとアミノ酸における肝臓脂質蓄積比較実験	
2-3-1 実験の概略	17
2-3-2 実験動物	17
2-3-3 実験飼料	17
2-3-4 動物解剖とサンプル採取	17
2-3-5 分析方法	
(1) 血清分析	18
(2) 肝臓脂質の分析	18
(3) 耐糖能試験	18
(4) 糞中脂質量の測定	18
(5) 肝臓 mRNA 発現量	18
(6) 肝臓の脂肪合成系・分解系の比活性の測定	18
2-3-6 統計解析	20
Table3	21

第3章 実験結果および考察

第1節 Exp1 食餌性肥満モデルマウスの耐糖能, 肝臓脂質蓄積および炎症に及ぼすホエイペプチドとアミノ酸の影響

3-1-1 人工消化試験	22
3-1-1 成長結果	22
3-1-2 臓器重量	22
3-1-3 血清生化学値ならびにインスリン, レプチン	22
3-1-4 肝臓脂質	23
3-1-5 副睪丸周辺脂肪組織の脂肪細胞のサイズ	23
3-1-6 耐糖能試験	23
3-1-7 糞中脂質重量	23
3-1-8 肝臓の mRNA 発現量	23
3-1-9 肝臓の病理切片	24
3-1-10 考察	24
Fig1-1	27
Table3-1-1~ Table3-1-6	28
Fig.1-2~Fig.1-3	34
Table3-1-7~Table3-1-9	36
Fig.1-4~Fig.1-5	40

第 2 節 Exp2	ラットにおけるアミノ酸吸収実験	
3-2-1	成長結果および臓器重量	41
3-2-2	血清生化学値	41
3-2-3	門脈中アミノ酸濃度	41
3-2-4	考察	41
	Table3-2-1~ Table3-2-3	43
第 3 節 Exp3	ペプチドとアミノ酸における肝臓脂質蓄積比較実験	
3-3-1	成長結果	46
3-3-2	臓器重量	46
3-3-3	血清生化学値ならびにインスリン濃度	46
3-3-4	肝臓脂質	46
3-3-5	耐糖能試験	46
3-3-6	肝臓の mRNA 発現量	46
3-3-4	肝臓中酵素の比活性の測定	47
3-3-7	考察	47
	Table3-3-1~ Table3-3-5	49
	Fig.3-1	54
	Table3-3-6~Table3-3-7	55
第 4 章	総合考察	57
第 5 章	謝辞	60
	参考文献	61

第1章 序論

近年、食の欧米化や運動不足など生活習慣の乱れに伴い、肥満と診断される人が増加している。メタボリックシンドロームとは、糖尿病、脂質異常症、高血圧、肥満、インスリン抵抗性が基本的な構成要素であり、これらが一個人に集積した状態により、動脈硬化性疾患発症の高いリスクをもたらすという疾患概念である。厚生労働省の平成 27 年の国民健康・栄養調査¹⁾によると、肥満者 (BMI $\geq$ 25)の割合は男性 29.5%、女性 19.2%となっており、過去 10 年間で女性のみ有意に減少している。しかし、健康日本 21²⁾の目標値であった値を未だ達成できていない状況である。また、メタボリックシンドロームに関する項目において、「糖尿病が強く疑われるもの」は男性 19.5%、女性 9.2%とほぼ横ばいである。「血中コレステロールが 240mg/dL 以上の者」も男性 9.8%、女性 17.8%と変化は見られていない。

2008 年 4 月より、メタボリックシンドロームに着目した特定健診・特定保健指導が実施され、それに伴い、メタボリックシンドロームにおいて併発する頻度の高い非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) が着目され始めた。日本での NAFLD 患者数は約 1000 万人とされており、今後さらに増加していくと予測されている。

NAFLD とは、組織診断あるいは画像診断において脂肪肝を認め、アルコール性肝障害など他の肝疾患を除外した病態である。NAFLD の多くは肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などを基盤に発症することから、メタボリックシンドロームの肝病変として捉えられており、病理学的な特徴として大滴性脂肪変成が見られる。NAFLD から NASH (非アルコール性脂肪肝炎) への発生機序としては、現在 two-hit theory が広く支持されている。まず肝細胞へのトリグリセリドの沈着が起こり (first hit)、そこに酸化ストレスやエンドトキシンなどの曝露 (second hit) が加わり発症するというものである³⁾。つまり、長期間による食習慣の乱れは、肝臓へ脂質を沈着させ、それに伴いインスリン抵抗性を惹起させ、耐糖能を悪化させる。耐糖能が悪化することにより、各組織での酸化ストレスが増大し、炎症性サイトカインが放出されメタボリックシンドロームへ発展していく。また、肝臓では、脂質蓄積によって酸化ストレスが増大し、炎症が起こると NASH の状態になり、進行すると不可逆性の肝硬変、肝細胞ガンへと発展する。それだけでなく、内臓脂肪から放出された遊離脂肪酸とグリセロールは、門脈を介して肝臓に直接流入し、脂質異常症や高血糖などを引き起こし、インスリン抵抗性につながる可能性が示唆されている⁴⁾。

メタボリックシンドロームも NAFLD も、ともに成因には食事を含む生活環境因子が含まれる。乳清 (ホエイ) とは、牛乳からカゼイン、脂肪、脂溶性ビタミン

ンなどを除いた水溶性部分のことで、チーズなど乳製品を作る工程で生産される。これらにはラクトアルブミンやラクトグロブリンなどの成分が含有されているにも関わらず、廃棄されてしまうことが多い。その乳清たんぱく質を濃縮、濾過を行い乳清たんぱく質分離物にし、さらにそれを酵素で分解することによって作られるものがホエイペプチド(WPH)である。WPHはジペプチドやトリペプチドが主成分となっているため消化・吸収されやすいことが特徴としてあげられる。乳製品および乳清たんぱく質の生理作用は既にヒトを対象とした疫学研究も行われており、CARDIA 研究(Coronary Artery Risk Development in young Adults)では、乳製品の摂取と BMI などインスリン抵抗性症候群の全ての要素と負の相関があることを発表している。動物実験においては、アメリカの Zemel⁵⁾らが、乳製品と乳由来の Ca を摂取すると、体重や体脂肪の減少が顕著だったことを発表し、さらに、低 Ca 食は脂肪蓄積を促進し、高 Ca 食は活性型ビタミン D や副甲状腺ホルモン(PTH)を抑制するため肥満が抑制されるという報告もされている⁶⁾⁷⁾。

乳清たんぱく質の脂質代謝への影響は、これまでに多く報告されている。乳清たんぱく質の血清コレステロール低下作用については、肝臓からの VLDL-コレステロールの排出速度の低下⁸⁾や糞中ステロイド排泄量の増加、またはコレステロール合成の抑制⁹⁾と様々な報告がされている。そして近年、乳清たんぱく質摂取による肝臓脂質の蓄積抑制¹⁰⁾¹¹⁾、高脂肪を与えたラットの体重増加、体脂肪率、および肝臓の脂肪滴数の低下を介した耐糖能の改善¹²⁾なども報告された。

また、血清コレステロールの低下や肝臓の脂質蓄積の抑制だけでなく、近年では炎症抑制作用も報告されている。乳清たんぱく質には抗酸化アミノ酸のシステインが豊富に含まれており、抗酸化物質であるグルタチオン合成のために必要な前駆体を供給し、グルタチオン濃度を上昇させ、酸化ストレスから細胞を守ることで、肝臓の炎症を抑制するメカニズムが示唆されている¹³⁾。Wei ら¹⁴⁾は、ラットにおいて抗酸化能を増加させることを介したインスリン抵抗性の改善作用を報告しており、山口ら¹⁵⁾は LPS 添加前に細胞を乳清たんぱく質、または WPH に曝すことにより TNF- α 産生が抑制されたことを確認している。動物実験では、糸ら¹⁶⁾が LPS を腹腔内投与したマウスにおいて、WPH を投与することにより血中 TNF- α 濃度、血中 IL-6 濃度が抑制されたと報告した。TNF- α は炎症だけでなくインスリン抵抗性にも関与しているため、これらサイトカインの抑制はメタボリックシンドローム予防にも関係する。また、近年特定の配列を持ったペプチドが抗炎症作用を持つと報告されており、Ala-Val-Phe, Trp-Leu-Ala, Leu-Phe といった配列が炎症抑制に有効だと示されている¹⁷⁾。

乳清たんぱく質および WPH には、バリン・ロイシン・イソロイシンといった BCAA が豊富に含まれていることも特徴であり、その中でも特にロイシンが

多く含まれている。BCAA は以前より骨格筋合成促進効果が知られ、今日では BCAA サプリメントとしても販売されているが、最近では糖代謝や脂質代謝にも影響しているのではという報告もされている。ロイシンにおいては、mTOR を介した筋たんぱく質の合成促進だけでなく、筋肉でのグリコーゲン合成促進作用など骨格筋に及ぼす影響がよく知られている。この骨格筋合成促進作用によってグルコースの取り込みが促進され、血糖値が低下するというメカニズムも考えられるが、それを確認している論文はない。そして、近年では肥満マウスにおける体重減少や血清コレステロールにも影響を及ぼすことが示された。Zhang ら¹⁸⁾は、ロイシンを混合した飲料を高脂肪食と共にマウスに摂取させると、食餌誘発性肥満、高血糖、血清コレステロール濃度の上昇を抑制したと報告した。これは、骨格筋中脱共役たんぱく質(UCP)の発現増加による安静時エネルギー消費量の増加による体脂肪量の減少が関係していると考えられている。また、Nairizi ら¹⁹⁾は、BCAA やロイシンの飲料水による摂取は、高脂肪食による体重増加や血清コレステロールを減少させると報告している。さらに、Macotela ら²⁰⁾は、高脂肪食とロイシンを同時に摂取すると、ロイシンを添加した群において脂肪酸合成酵素(FAS)やアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)の発現を抑制することにより肝臓脂質の蓄積が抑制され、高脂肪食単独摂取と比較してロイシン添加によって IRS-1 の Ser307 リン酸化が減少し耐糖能が改善したと報告した。イソロイシンにおいては、骨格筋においてインスリンが関与していない状態においても PI-3 キナーゼを刺激し、GLUT4 を細胞膜へ移行させ、インスリン非依存的なグルコースの取り込みを促進することが報告されている。しかし、バリンについては、ロイシン、イソロイシンのような脂質蓄積抑制および NAFLD に伴う慢性炎症への影響に関する報告は少ない。

著者のこれまでの研究²¹⁾において、乳清たんぱく質分離物と WPH で食餌性肥満モデルマウスでの耐糖能、肝臓脂肪蓄積、炎症に及ぼす影響について検討したところ、WPH の方がより効果が見られた。これは、WPH の易吸収性が要因であるのではないかと考えられる。しかし、ペプチド態での脂質代謝や肝臓脂質におよぼす報告をしている論文は少ない。そこで本研究では、乳清たんぱく質分離物を加水分解することで生成される WPH および WPH に多く含まれている BCAA における肝臓脂質蓄積抑制作用、および脂質蓄積によって惹起される軽度炎症への影響、およびそのメカニズムについて検討を行った。

第2章 実験方法

第1節 Exp.1 食餌性肥満モデルマウスの耐糖能, 肝臓脂質蓄積および炎症に及ぼすホエイペプチドとアミノ酸の影響

2-1-1 実験の概略

本実験は、著者のこれまでの研究²¹⁾におけるホエイペプチド(WPH)の耐糖能改善作用や脂質蓄積抑制作用がホエイペプチドそのものによるものか、アミノ酸によるものかを検証するため、低Ca性肥満モデルマウス(C57BL/6J)マウスを使用した動物実験を行い、WPHおよびWPHと同様のアミノ酸組成の飼料が耐糖能、脂質蓄積、および肝臓の炎症に及ぼす影響を評価した。

2-1-2 人工消化試験

実験を行うに際し、ペプチドが消化酵素によってどれだけ分解されるかを明らかにするため、人工消化試験を行った。

WPHを100ml容三角フラスコに2.5g秤量し、蒸留水50mlを加えた。塩酸でpH2.0に調整し、豚由来ペプシン(和光純薬工業株式会社)50mgを加え反応を開始した。37℃で振盪し、120分間消化を行った。その後、炭酸水素ナトリウム溶液でpH7.4に調整後、豚由来パンクレアチン(関東化学株式会社)4mgを加え、同様に120分間消化した。消化開始0分、60分、120分、180分、240分に人工消化液を1.5mlエッペンチューブに0.2ml採取し、速やかに-80℃で保存した。その後、Modified Lowry Protein Assay (Thermo Scientific)を用いLowry法にて測定を行った。

2-1-3 実験動物

5週齢雄のC57BL/6Jマウス(日本チャールス・リバー株式会社)を48匹用いた。固形飼料(NMF;オリエンタル酵母工業株式会社)を用い、1週間の予備飼育後、体重が均一になるように1群8匹ずつ6群に群分けし、12週間飼育した。飼育期間中、飼料と水は自由摂取とした。動物は、室温22±1℃、湿度50±5℃、12時間明暗サイクル(8:00~20:00)で飼育した。なお、本実験は大妻女子大学家政学部動物実験において定められた「実験動物施設の整備および管理の方法並びに具体的な実験方法を定めた規則」に則り、倫理審査委員会の承認を得て行った。

2-1-4 実験飼料

Exp1 の飼料組成を Table1-1, WPH, および AA 群のアミノ酸組成を Table1-2 に示した。

コントロール(CO)群の飼料は AIN-93G 組成を基本とし、糖質エネルギー比が 50%となるよう、ショ糖を添加し高糖質食とした。さらに、カルシウム濃度を 0.4%(MC), 0.2%(LC)となるように炭酸カルシウム(和光純薬工業株式会社)で調節した。たんぱく質の因子は、20%カゼイン(CO 群), カゼインの 10%をホエイペプチド(WPH 群), アミノ酸混合物(AA 群)に置換した群の計 3 水準とした。各群のたんぱく質、脂質量が等しくなるようにカゼイン、大豆油、ラードで調整した。

試験群の WPH は雪印メグミルク(株)より分与を受けた(HW-3)。AA 群のアミノ酸組成物は、WPH 群とアミノ酸組成が同じになるようにオリエンタル酵母工業(株)で調製してもらった。

大豆油、重酒石酸コリン、*t*-ブチルヒドロキノン(和光純薬工業株式会社、ラードは植田製油株式会社より購入した。

2-1-5 飼育方法 (動物実験)

動物は、室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル(8:00~20:00)で飼育した。

Table1-1 に示した実験飼料と水をそれぞれ 12 週間、自由摂取させ、体重と飼料摂取量を測定した。マウスは、2~3 日毎に体重及び飼料摂取量を測定した。飼料を入れた給餌器の重量を測定し、毎回給餌器の重量を測定しその差を摂取量とした。そして、体重増加量、飼料摂取量、飼料効率を求めた。

糞は、実験最終週の 7 日間ステンレスメッシュの上で飼育して回収し、表面を洗浄後、凍結乾燥し、粉砕をして分析用試料とした。

2-1-6 動物解剖とサンプル採取

解剖当日は 8:00 より 6 時間絶食させ、イソフルラン/CO₂ ガス麻酔下で安楽死させてから開腹し、心臓より採血、肝臓、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。血液は、氷中保存し、6500rpm, 15 分間、4℃で遠心分離し、血清を採取し、-80℃で保存した。肝臓は-40℃で保存した。

2-1-7 分析方法

(1) 血清分析

採取した血液は、血清を分離し、グルコース、トリグリセリド、遊離脂肪酸、総コレステロール濃度を酵素法にて分析した。グルコースは「グルコース CII-テストワコー」、トリグリセリドの定量には「トリグリセライド E-テストワコー」、遊離脂肪酸の定量には「NEFA C-テストワコー」、総コレステロール濃度の定量には「コレステロール E-テストワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社)を使用した。

血清レプチン濃度は、「マウス・レプチン・イノムアッセイキット」(R&D システムズ社製)を用いて、ELISA 法にて分析した。血清インスリン濃度は、「レビス インスリン-ラット(H タイプ)」(株式会社シバヤギ)を用い、ELISA 法にて分析した。

(2) 肝臓脂質の分析

肝臓を凍結乾燥後、粉碎し、クロロホルム：メタノール (2 : 1) 溶液を用いた Folch 法により抽出、水洗、乾固後、ドラフト内で窒素気流下によって溶媒を除去(60℃)し、10%TritonX-100 を含むイソプロパノールを加えて溶解し、トリグリセリド、総コレステロール濃度を酵素法にて分析した。

トリグリセリドの定量には「トリグリセライド E-ワコー」、総コレステロールの定量には「コレステロール E-ワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社)を使用した。

(3) 脂肪組織の脂肪細胞のサイズ

解剖時に摘出した副睾丸周辺脂肪は、2%酸化オスミウム(Osmium(VIII)Oxide, 和光純薬工業株式会社)で 37℃, 30 時間固定し、250 μ m と 25 μ m のメッシュで洗って回収し、コールターカウンター(Multisizer3)にて一定液量中の脂肪細胞の粒径を計測した。

(4) 耐糖能試験

耐糖能試験は、飼育最終週に朝 8 時より 6 時間の絶食後、20%グルコース溶液を、1.5g/kg体重となるように経口ゾンデを用いてマウスの胃内に投与した。投与前に尾部より採血し(0 分)、投与後 15 分、30 分、60 分、120 分後に同様に採血を行った。血糖値の定量には「小型血糖測定器 グルテストエース R」(株式会社三和科学研究所)を使用した。時間と血糖値の曲線から AUC(曲線下面積)を、空腹時血糖値と血清インスリン濃度から HOMA-IR を算出した。HOMA-IR は、マウス用の式がないためヒト用の式、空腹時血糖値(mg/dl)×血清インスリン濃度 (μ IU)/405 により算出した。

※血清インスリン濃度 (μ IU)=血清インスリン濃度(ng/ml)×26

(5) 糞中脂質量の測定

糞を洗浄後凍結乾燥し、粉碎後、0.5~1.0g 精秤し、4%酢酸含有のクロロホルム：メタノール（2：1）を用いた Folch 法により、糞中脂質を抽出した。Folch 水洗用ブランク（クロロホルム：メタノール：水(3:48:47)）を用いて可溶性塩類等を除去した。その後、恒量を求めたアルミカップに入れ、ホットプレート上で溶媒を蒸発させた。その後、105℃で1時間以上加熱し、30 分間デシケーター内に放置後、重量を測定した（2 回測定）。脂質摂取量、総脂質排泄量から見かけの消化吸収率を求めた。

(6) 肝臓の mRNA 発現量の測定

Total RNA の抽出をし、抽出した RNA に含まれる mRNA を逆転写反応(RT 反応)によって相補的 DNA(cDNA)を調製し、mRNA 発現量の測定に用いた。mRNA 発現量は、SYBR Green 法にて、内部標準として用いた 36B4 との相対比より求めた。なお、分析装置は Applied Biosystemes の 7300 Real-Time PCR System を用いた。

方法の詳細を以下に示す。

【total RNA の抽出】

RNeasy Mini kit(株式会社 Qiagen)のプロトコールに従い、14ml のチューブに Buffer RLT 調整液 (Buffer RLT 1ml + β -ME 10 μ l) を 1200 μ l 分注し、RNAlater(株式会社 Qiagen)で保存した肝臓を 20~30mg 入れ、3 分間ホモジナイザー(PRO サイエнтиフィック社)でホモジナイズし、12000rpm で 3 分間遠心した。上清を別のチューブへ 1000 μ l 移動し、同量の 50%エタノールを加え、ピペッティング混和を行った。700 μ l のサンプルを 2ml のコレクションチューブにセットした RNeasy Mini Spin Column に入れ、10000rpm で、室温(15~25℃)にて 15 秒間遠心後、フロースルー分画を捨てた。残りのサンプルも同様の操作を繰り返した。700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy Mini Spin Column に入れ、10000rpm で 15 秒間遠心した。フロースルー分画とコレクションチューブは捨て、RNeasy Mini Spin Column を新しい 2ml コレクションチューブをセットした。500 μ l の Buffer RPE を RNeasy Mini Spin Column に入れ、10000rpm で 15 秒間遠心した。同様に 500 μ l の Buffer RPE を RNeasy Mini Spin Column に入れ、10000rpm で 2 分間遠心した。RNeasy Mini Spin Column に 2ml の新しいコレクションチューブをセットし、12000rpm で 1 分間遠心した。フロースルー分画とコレクションチューブは捨て、RNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5ml のコレクションチューブに移した。50 μ l の RNase フリー水を RNeasy シリカゲルメンブレンに入れ、10000rpm で 1 分間遠心した。

再び RNase フリー水（下層の液）を再添加し、同様の操作を行った。溶解した溶液を 50 倍希釈し、RNA 量を吸光度計で測定した。260nm/280nm 比が 1.5～2.0 の範囲に調製した。

【cDNA の調製】

測定した RNA 量の濃度から計算して、5 μ g RNA/11.5 μ l DEPC 処理水にした。使用試薬は、10mM dNTPs(TOYOBO 株式会社) 2 μ l, 0.3 μ g/ml Random primer(ライフテクノロジージャパン)1.5 μ l, 5 $\times$ Rever Tra ace Buffer 4 μ l, Rever Tra ace(TOYOBO 株式会社) 1 μ l を混合し、Mixture 8.5 μ l を 5 μ g RNA/11.5 μ l DEPC 処理水に加え、緩やかにピペッティングした(Total 20 μ l)。RT-PCR(逆転写反応)にて、30℃で 10 分、42℃で 60 分、99℃で 5 分(逆転写酵素を熱失活させる)反応を行った。サンプルを DEPC 処理水で 20 倍に希釈し、相補的 DNA(cDNA)テンプレートとし、mRNA 発現量の測定に用いた。

【mRNA 発現量の測定】

総量 12.5 μ l の系で実施した。使用試薬は、Master Mix($\times$ 2) (Power SYBR Green,ABI 社)6.25 μ l, Primer Fw(45 μ M)0.5 μ l, Primer Rv(45 μ M)0.5 μ l, D₂O 3.75 μ l を混合し、Mixture とした。Micro Amp(96-well)に 12.5ng/ml Template(cDNA) 2 μ l と Mixture 10.5 μ l(Total 12.5 μ l)を入れ、振盪混合後、プレート遠心機にて混合液を底に集めた。次々と PCR にて、反応を行った。

測定項目とプライマー配列を以下に示す。

<36B4>

Fw:GGCCCTGCACTCTCGCTTTC

Rv:TGCCAGGACGCGCTTGT

<p40^{phox}>

Fw:CAGCCAACATCGCTGACATC

Rv:CAAAGTGGCTGGTGAAGCCT

<p47^{phox}>

Fw:ACTCTCACTGAATACTTCAACG

Rv:TCATCAGGCCGCACTTT

<p67^{phox}>

Fw:AAGCAAAAAGAGCCCAAGGAA

Rv:CATGTAAGGCATAGGCACGCT

<TNF- α >

Fw:ACCCTCACACTCAGATCATCTTC

Rv:TGGTGGTTTGCTACGACGT

<IL-6>

Fw:ACAACCACGGCCTTCCCTACTT

Rv:CATGTAAGGCATAGGCACGCT

<モノサイトケモアトラクタントプロテイン-1(MCP-1)>

Fw:CCACTCACGGCCTTCCCTACTT

Rv:TGGTGATCCTCTTGCTAGCTCTCC

<脂肪酸合成酵素(FAS)>

Fw:CCTGGATAGCATTCGGAACCT

Rv:AGCACATCTCGAAGGCTACACA

<PPAR α >

Fw:AGGAAGCCGTTCTGTGACAT

Rv:AATCCCCTCCTGCAACTTCT

<ステロール調節エレメント結合たんぱく質 1c(SREBP-1c)>

Fw:GGCACTAAGTGCCCTCAACCT

Rv:GCCACATAGATCTCTGCCAGTGT

<ステロール調節エレメント結合たんぱく質 2(SREBP-2)>

Fw:GACCGCTCTCGAATCCTCTTATGTG

Rv:GTTTGCTAGGTTGGCAGCAGCA

<HMG-CoA 還元酵素>

Fw:CCAAGGTGGTGAGAGAGGTGTT

Rv:CGTCAACCATAGCTTCCGTAGTT

<ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2(DGAT2)>

Fw:CTGGCTGATAGCTGTGCTCTACTT

Rv:CGATCTCTCTGCCACCTTTCTT

<アセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)>

Fw:GGATGACAGGCTTGCAGCTATG

Rv:GGAACGTAAGTCGCCGGATG

<スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)>

Fw: GCAGAAGGCAAGCGGTGAAC

Rv: TAGCAGGACAGCAGATGAGT

(7) 肝臓の病理標本の観察

肝臓の一部を 10%ホルマリン溶液に浸漬して固定した後，株式会社栄養・病理学研究所に依頼し，脱水・パラフィン浸透処理・薄切・伸展・乾燥した後，ヘマトキシリン・エオシン染色(HE 染色)および Oil Red O 染色をした。肝臓の病理組織標本を光学顕微鏡(キーエンス・デジタルマイクロスコープ)で観察した。

2-1-8 統計解析

すべての測定結果は平均±標準偏差で示した。統計方法は，たんぱく質とカルシウム添加量を因子として，二元配置の分散分析を行った。交互作用が有意になった場合は，カルシウム添加量別に解析を行った。群間での比較は Tukey-Kramer の多重比較法を用いた。有意水準は 5%とした。正規性の確認と Bartlett の等分散検定を行った。統計解析は JMP 9.0.0 (SAS Institute 社)を用いた。なお Table では異なるアルファベットの群間において有意差があることを示した。

(g/kg diet)

Table1-1 飼料組成

	LC-CO	LC-HW	LC-AA	MC-CO	MC-HW	MC-AA
カゼイン	200	105.9	100	200	105.9	100
HW-3		100			100	
アミノ酸(HW-3 と同組成)			100			100
L-シスチン	3	3	3	3	3	3
α コーンスターチ	104.486	99.086	104.486	99.486	94.086	99.486
ショ糖	500	500	500	500	500	500
大豆油	70	70	70	70	70	70
ラード	20	20	20	20	20	20
セルロース	50	50	50	50	50	50
AIN-93G ミネラル混合*	35	35	35	35	35	35
CaCO ₃	5.0	4.5	5.0	10.0	9.5	10.0
AIN-93G ビタミン混合	10	10	10	10	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
εブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

*CaCO₃ を含まない

LC 群の Ca 量 : LC-CO;0.204%,LC-HW;0.202%,LC-AA;0.202%

MC 群の Ca 量 : MC-CO;0.404%,MC-HW;0.402%,MC-AA;0.402%

CO:Control, WPH:Whey peptide, AA:amino acid

Table1-2 WPH および AA 群のアミノ酸組成(%):カゼインとの比較

	Casein(参考データ)
Aspartic Acid	10.1
Threonine	4.75
Serine	4.39
Glutamic Acid	17.08
Proline	4.96
Glycine	1.72
Alanine	4.9
Valine	5.05
Cystine	4.45
Methionine	2.06
Isoleucine	5.48
leucine	12.08
Tyrocine	3.72
Phenylalanine	3.57
Lysine	9.26
Histidine	1.91
Tryptophan	1.9
Arginine	2.63

Exp.2 ラットにおけるアミノ酸吸収実験

2-2-1 実験の概略

Exp.1 において肝臓の脂質蓄積抑制作用が示唆され、その要因の 1 つとして吸収されるアミノ酸の組成、および量に注目した。そのためこの実験では、ラットにコントロール、WPH 添加、AA 添加の食餌をそれぞれ投与し、摂食 3 時間後の門脈中のアミノ酸の分析を行う。

2-2-2 実験動物

4 週齢雄の SD ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を 15 匹用いた。固形飼料（NMF;オリエンタル酵母工業株式会社）を用い、5 日間の予備飼育後、6 日間飼育した。飼育期間中、飼料の投与は 1 日 1 時間のみとし、水は自由摂取とした。

2-2-3 実験飼料

飼料組成を Table3 に示す。Exp.3 の飼料は、Exp.1 の MC-CO 群、MC-WPH 群、MC-AA 群と同じものを使用した。

2-2-4 飼育方法（動物実験）

動物は、室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル(8:00～20:00)で飼育した。

ラットの食餌は 1 日 1 時間のみの投与とし、水は自由摂取とした。飼料を入れた給餌器の重量を測定し、毎回給餌器の重量を測定しその差を摂取量とした。体重は、飼育期間中毎日測定を行った。飼料組成は Table3-1 に示した。なお、本実験は大妻女子大学家政学部動物実験において定められた「実験動物施設の整備および管理の方法並びに具体的な実験方法を定めた規則」に則り、倫理審査委員会の承認を得て行った。

2-2-5 動物解剖とサンプル採取

解剖当日は 7:00 より 1 時間摂食させた後、2 時間の絶食後に解剖を行った。イソフルラン/CO₂ ガス麻酔下で安楽死させてから開腹し、門脈血および心臓より採血を行い、肝臓を摘出、重量を測定した。血液は、氷中保存し、6000rpm、15 分間、4℃で遠心分離し、血清を採り、 -80°C で保存した。肝臓は -40°C で保存した。

2-2-6 分析方法

(1) 血清分析

Exp.1 と同様の方法で行った。

(2) 門脈中ペプチド濃度

門脈中のペプチド濃度は、Exp.1 と同じ方法で Lowry 法を用いジペプチド以上のペプチド、たんぱく質濃度を測定後、Bio-rad Protein Assay(Bio-Rad Laboratories)を用いて Bradford 法にて総たんぱく質濃度を測定し、Lowry 法から Bradford 法の算出値を差し引いて求めた。

(3) 門脈中遊離アミノ酸濃度の測定

GC/MS を用いたメタボローム解析の測定条件を以下に示す。

装置:7890GC/5975C MSD with 7693 自動前処理付きオートサンプラ

カラム:DB-5ms+Duragurd(10m) 30m, 0.25mm, 0.25 μ m

注入量:1 μ L

注入法:スプリット, 10:1

注入口温度:250 $^{\circ}$ C

オープン:60 $^{\circ}$ C(7min)-10 $^{\circ}$ C/min-325 $^{\circ}$ C(10min)

カラム流量:1.1ml/min(定流量モード)

インターフェース温度:290 $^{\circ}$ C

イオン源温度:250 $^{\circ}$ C

測定モード:スキャン測定, 質量範囲, m/z 50-600

血清の誘導体化は、血清を 10 μ l 採取し、窒素気流化で乾固した後、内部標準は d24 ミリスチン酸を 2 μ l 添加した。門脈の血清は、2 つの方法で処理し、それぞれ分析を行った。

1. 血清 10 μ l を採取し、6mol/L 塩酸(0.04%(v/v)2-メルカプトエタノール含有)を 1ml 加え、脱気・封管した後、恒温乾燥器にて 110 $^{\circ}$ C, 24 時間加水分解した。15ml ファルコンチューブに移し、ドラフト内で窒素気流下(60 $^{\circ}$ C)によって溶媒を除去し、ピリジン溶液を 10 μ l, TMS 加えた後、上記 GC/MS にて測定した。
2. 血清 15 μ l を採取し、内部標準 5 μ l を加え計 20 μ l にし、窒素気流下(40 $^{\circ}$ C)で乾固させた。メトキシアミン塩酸塩濃度 40mg/ml のピリジン溶液を 10 μ l 加え、攪拌した後、1%のトリメチルクロロシラン含有 N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド(MSTFA+1%TSCS)を 90 μ l 加え、37 $^{\circ}$ Cで 30 分かけて誘導体化した。

2-2-7 統計解析

すべての測定結果は平均±標準偏差で示した。群間での比較は **Tukey-Kramer** の多重比較法を用いた。有意水準は 5%とした。正規性の確認と **Bartlett** の等分散検定を行い、不等分散の場合は、中央値と 25%, 75%タイル値で示した。不等分散の場合の多重比較は、**Steel-Dwass** の検定を用いた。統計解析は **JMP 9.0.0** (SAS Institute 社) を用いた。なお Table では異なるアルファベットの群間において有意差があることを示した。

Table2 飼料組成(g/kg)		(g/kg diet)		
		CO	AA	WPH
カゼイン		200	100	105.9
WPH				100
アミノ酸			100	
L-シスチン		3	3	3
α-コーンスターチ		99.486	100.486	94.586
スクロース		500	500	500
大豆油		70	70	70
ラード		20	20	20
セルロース		50	50	50
AIN-93G ミネラル混合物*		35	35	35
CaCO ₃		10.0	9.0	9.0
AIN-93 ビタミン混合物		10	10	10
コリン重酒石酸		2.5	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン		0.014	0.014	0.014

*CaCO₃を含まない

CO:Control, AA:amino acid , WPH:Whey peptide

Exp.3 肝臓脂質蓄積に及ぼすロイシンとバリンの影響

2-3-1 実験の概略

Exp.2 にてアミノ酸添加群の門脈からロイシンが多く検出された。また、有意差はなかったが唯一バリンがアミノ酸添加群より WPH 群で多く検出された。ロイシンは脂質代謝への影響が報告がされており、BCAA の中で最も生理活性が高い。一方、バリンは脂質代謝や生体への影響の報告数が少なく、BCAA の中で最も生理活性が低いとされている。

そのため本実験では、食餌誘発性肥満モデルマウスにロイシンとバリンを強化した高脂肪食を投与することで、NAFLD 状態におけるロイシン、バリンの肝臓脂質蓄積に及ぼす影響をカゼイン、ペプチド食と比較して検討した。

2-3-2 実験動物

5 週齢雄の C57BL/6J マウス(日本チャールス・リバー株式会社)を 30 匹用いた。固形飼料 (NMF;オリエンタル酵母工業株式会社) を用い、1 週間の予備飼育後、体重が均一になるように 1 群 10 匹ずつ 3 群に群分けし、12 週間飼育した。飼育期間中、飼料と水は自由摂取とした。動物は、室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル(7:00~19:00)で飼育した。なお、本実験は大妻女子大学家政学部動物実験において定められた「実験動物施設の整備および管理の方法並びに具体的な実験方法を定めた規則」に則り、倫理審査委員会の承認を得て行った。

2-3-3 実験飼料

Exp3 の飼料組成を Table3 に示した。

コントロール(CO)群の飼料は AIN-93G 組成を基本とし、脂質エネルギー比が 50%となるよう、ラードを添加し高脂肪食とした。たんぱく質の因子は、20% カゼイン(CO 群)、カゼインの 10%を WPH(WPH 群)、WPH のアミノ酸組成中に含まれる量と同等のロイシン+バリン添加(LV 群)に置換し、BCAA を強化した群の計 3 水準とした。各群のたんぱく質、脂質量が等しくなるようにカゼイン、大豆油、ラードで調整した。

試験群の WPH は雪印メグミルク(株)より分与を受けた。大豆油、重酒石酸コリン、*t*-ブチルヒドロキノン、L-ロイシン、L-バリンは和光純薬工業株式会社、ラードは植田製油株式会社より購入した。

2-3-4 動物解剖とサンプル採取

解剖当日は 8:00 より 6 時間絶食させ、イソフルラン/CO₂ ガス麻酔下で安楽

死させてから開腹し、心臓より採血、肝臓、後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、重量を測定した。血液は、氷中保存し、6000rpm, 15 分間、4℃で遠心分離し、血清を採り、－80℃で保存した。肝臓は－40℃で保存した。

2-3-5 分析方法

(1) 血清分析

Exp.1 と同様の方法で行った。

(2) 肝臓脂質の分析

Exp.1 と同様の方法で行った。

(3) 耐糖能試験

Exp.1 と同様の方法で行った。

(4) 糞中脂質量の測定

Exp.1 と同様の方法で行った。

(5) 肝臓の mRNA 発現量の測定

Exp.1 と同様の方法で行った。

なお、プライマーを以下に示す。

<アシル CoA 酸化酵素:ACOX>

Fw: CAGCGTTACGAGGTGGCTGTTA

Rv: TGCCCAAGTGAAGGTCCAAAG

<Stearoyl Coenzyme A desaturase 1: SCD1>

Fw: CCTTATCATTGCCAACACCAT

Rv: 5AGCCAACCCACGTGAGAGAA

<glyceral-3-phosphate acyltransferase,mitochondrial: mtGPAT>

Fw: ACAGTTGGCACAATAGACGTTT

Rv: CCTTCCATTTTCAGTGTTGCAGA

(6) 肝臓の脂肪合成系・分解系の比活性の測定

酵素源の調整を行い、分光法による比活性の測定を行った。

1. 酵素源の調整法

【試薬】

スクロース：和光純薬工業株式会社

EDTA(エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物)：ナカライテクス株式会社

トリス塩基：和光純薬工業株式会社

酢酸：和光純薬工業株式会社

【操作】

- ① マウスの肝臓(0.5g)に 4.5ml の氷冷ホモジナイズ用緩衝液(0.25M スクロース液-1mM EDTA-3mM トリス塩酸(pH7.2))を加え、ポッターエルベジェム型ホモジナイザーでホモジナイズした。
- ② ホモジネートを遠心チューブに移し、500×g, 10 分間, 4℃で遠心分離した。
- ③ 上清(ACOX の活性測定に使用)を他の遠心チューブに移し、8000×g, 10 分間, 4℃で遠心分離した。
- ④ 上清を他の遠心チューブに移した(FAS の活性測定に使用)。全ての酵素源は小分けして冷凍保存(-20~30℃)した。

2. FAS の比活性測定

【試薬】

リン酸二水素カリウム：和光純薬工業株式会社

リン酸水素二カリウム：和光純薬工業株式会社

アセチル CoA：SIGMA

NADPH：和光純薬工業株式会社

マロニル CoA：SIGMA

【操作】

- ① 測定用のセルに 0.2M リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)(0.5ml), 2.5mM アセチル CoA(0.02ml), 10mM NADPH(0.03ml), 酵素源(0.02~0.1ml)を入れ、水を加えて最終容量を 0.98ml とした。よく混ぜ、30℃に保温した恒温セルホルダーに装着した。なお、NADPH は測定当日に調整した。
- ② 340nm の波長でブランク反応を測定した。
- ③ 10mM マロニル CoA(0.02ml)を添加し、反応を開始した。
- ④ 反応の直線部分を計算に用いた(ブランク反応を差し引いて最終値を算出)。分子吸光係数は 6220M⁻¹cm⁻¹ である。

2. ACOX の比活性測定

【試薬】

リン酸二水素カリウム：和光純薬工業株式会社

リン酸水素二カリウム：和光純薬工業株式会社

4-アミノアンチピリン：和光純薬工業株式会社

フェノール：和光純薬工業株式会社

牛アルブミン：和光純薬工業株式会社

ペルオキシダーゼ：SIAMA

FAD：和光純薬工業株式会社

パルミトイル CoA：SIGMA

【操作】

- ① 緩衝液(100mM リン酸カリウム緩衝液, 1.64mM 4-アミノアンチピリン, 21.2mM フェノール(pH7.4))を調整した。測定当日に 4mg の牛アルブミンと 80unit のペルオキシダーゼを緩衝液(10ml)に溶かし, さらに 1mM FAD(0.1ml)を添加し, 測定用緩衝液とした。
- ② 測定用のセルに測定用緩衝液(0.5ml), 酵素源(0.005~0.01ml)を入れ, 水を加えて最終容量を 0.95ml とした。よく混ぜ, 30℃に保温した恒温セルホルダーに装着した。
- ③ 500nm の波長でブランク反応を測定した。
- ④ 2mM パルミトイル CoA(0.05ml)を添加し, 反応を開始した。
- ⑤ 反応の直線部分を計算に用いた(ブランク反応を差し引いて最終値を算出)。分子吸光係数は 6390M⁻¹cm⁻¹ である。

3. たんぱく質測定

【試薬】プロテインアッセイキットⅡ：日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

【操作】

セル内のたんぱく質濃度は, キットを用いて Bradford 法により測定した。

なお, 比活性の算定式は以下である。

$$\text{比活性(n mol/min/mg protein)} = \frac{(1 \text{ 分間当たりの吸光度変化}) \times (\text{反応液の容積 ml}) \times 1000}{(\text{mM 吸光度係数}) \times (\text{セル内のたんぱく質濃度})}$$

2-3-6 統計解析

Exp.2 と同様に解析を行った。

(g/kg diet)

	CO 群	WPH 群	LV 群
カゼイン	200	94.1	187.92
		105.9	
ロイシン			12.08
バリン			5.05
L-シスチン	3	3	3
コーンスターチ	55.486	56.396	50.436
α コーンスターチ	264	264	264
シヨ糖	100	100	100
大豆油	70	70	70
ラード	200.0	199.6	200.0
セルロース	50	50	50
AIN-93G 特殊ミネラル混合*	35	35	35
CaCO ₃	10.0	9.49	10.00
AIN-93G ビタミン混合	10	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014
飼料中ロイシン(g/kg)	16.800	19.400	27.800
バリン(g/kg)	12.000	10.900	16.700

*CaCO₃ を含まない

CO:Control, WPH:Whey peptide, LV:Leucine+Valine

第3章 実験結果および考察

第1節 Exp1 食餌性肥満モデルマウスの耐糖能，肝臓脂質蓄積

および炎症に及ぼすホエイペプチドとアミノ酸の影響

3-1-1 人工消化試験

人工消化試験の結果を Fig.1-1 に示した。

ペプシン消化を行った 60 分，120 分ではほとんど分解されなかったが，トリプシン消化では約 45% 分解され，最終的な消化残存率は 54.1% となった。

3-1-2 成長結果

マウスの成長結果を Table3-1-1 に示した。

初体重，飼料摂取量，飼料効率，体重増加量について，交互作用および各群間で有意差は認められなかった。初体重に有意差はなく，終体重はたんぱく質の因子で有意差が認められ，WPH 群で有意に低下した。

3-1-3 臓器重量

マウスの臓器重量の結果を Table3-1-2 に示した。

肝臓重量は各群間に有意差は見られず，交互作用も認められなかった。

総脂肪組織重量はたんぱく質の因子において有意差が見られ，WPH 群で CO 群と比べて有意に低下した。副睾丸周辺脂肪組織重量は，たんぱく質の因子において有意差が見られ，CO 群と比べ WPH 群で有意に低くなった。腸間膜脂肪組織重量は，たんぱく質の因子において有意差が認められ，CO 群と比べ WPH 群，AA 群で有意に低下した。後腹壁脂肪組織重量については交互作用，たんぱく質の因子，カルシウムの因子にて有意差は見られず，各群間で有意差は見られなかった。

3-1-4 血清生化学値ならびにインスリン，レプチン濃度

血清生化学値ならびにインスリン，レプチン濃度の結果を Table3-1-3 に示した。

血清トリグリセリド濃度は，たんぱく質の因子で有意差があり，WPH 群が CO 群に比べ有意に増加した。血清コレステロール濃度，血清遊離脂肪酸濃度は，各群間で有意差は見られず，交互作用も認められなかった。血清レプチン濃度

については、交互作用は認められなかったが、WPH 群、AA 群で CO 群と比べて有意に低かった。血清インスリン濃度は、各群間に有意差は見られず、交互作用も認められなかった。

3-1-5 肝臓脂質蓄積量

肝臓脂質蓄積量の結果を Table3-1-4 に示した。

肝臓トリグリセリド蓄積量(mg/liver)は、たんぱく質の因子において有意差が認められ、CO 群と比べて WPH 群で有意に低下した。コレステロール蓄積量(mg/liver)もたんぱく質の因子において有意差が認められ、CO 群と比べて WPH 群、AA 群で有意に低下した。

3-1-6 副睾丸周辺脂肪組織の脂肪細胞のサイズ

副睾丸周辺脂肪組織の脂肪サイズ(70 μ m 以上)の結果を Table3-1-5 に示した。

25~240 μ m 個数平均径は交互作用が有意となり、LC において CO 群と比べて WPH 群、AA 群で有意に低い値を示した。25~240 μ m 体積平均径では交互作用は認められなかったが、たんぱく質の因子において WPH 群、AA 群で低下傾向が見られた(p=0.07)。

70~200 μ m 個数平均径、70~200 μ m 体積平均径については各群間で有意差は見られなかった。

3-1-7 耐糖能試験

耐糖能試験の結果を Table3-1-6, Fig.1-2, Fig.1-3 に示した。

0 分値において有意差は見られなかったが、15 分値において AA 群が CO 群、WPH 群と比べて有意に高い値を示した。その後、30 分値、60 分値で交互作用が認められた。60 分値においては MC において、CO 群、WPH 群と比べて AA 群で有意に低下した。120 分値においてはたんぱく質の因子で有意差が認められ、CO 群、WPH 群と比べて AA 群で有意に低下した。

3-1-8 糞中脂質蓄積量

糞中脂質重蓄積量の結果を Table3-1-7 に示した。

糞中脂質排泄量は交互作用が見られ、Ca 添加量の因子でも有意差が見られ、MC で LC よりも排泄量が増加していた。それに伴い、見かけの消化吸収率においても交互作用が見られ、Ca 添加量の因子で有意差が見られ、MC で LC よりも吸収率が低下していた。

3-1-9 肝臓の mRNA 発現量

肝臓の mRNA 発現量の結果を Table3-1-8, Table3-1-9 に示した。

IL-6 の mRNA 発現量は、交互作用が認められ、MC において WPH 群、AA 群で有意に低い値を示した。NADPH オキシダーゼのサブユニットである p40^{phox}、p47^{phox}、p67^{phox} について、p47^{phox} は交互作用が有意となり、LC において AA 群が CO 群、WPH 群と比べて有意に低値を示した。p40^{phox}、p67^{phox} について交互作用は認められなかったものの、p67^{phox} において AA 群が CO 群と比べて有意に低い値を示した。MCP-1 はたんぱく質の因子において有意差があり、CO 群と比べて WPH 群で有意に低下した。SOD については、交互作用は認められなかったが、たんぱく質の因子において有意差があり、CO 群と比べて WPH 群、AA 群で有意に低下した。

転写因子である SREBP-1c 発現量は、交互作用が有意となり、MC において AA 群が有意に低い値を示した。SREBP-2 発現量について交互作用は認められなかったが、CO 群に比べて WPH 群、AA 群で有意に低値を示した。PPAR α も交互作用は認められなかったが、CO 群と比べて WPH 群で、CO 群、WPH 群と比べて AA 群で有意に低値を示した。DGAT2 については、交互作用は認められなかったがたんぱく質の因子で有意差が見られ、AA 群で CO 群と比べて有意に発現量が低下した。HMG-CoA 還元酵素、脂肪酸合成酵素(FAS)は、各群間で有意差は認められなかった。アセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)は、交互作用は認められなかったが、たんぱく質の因子において WPH 群、AA 群で CO 群と比べて有意に発現が低下していた。

3-1-10 肝臓の病理切片

肝臓の病理切片を Fig.1-4, Fig.1-5 に示した。

Fig.1-4 は各群の HE 染色の結果であり、CO 群には大滴性の脂肪滴が見られるが、WPH 群には見られない。また、AA 群にも脂肪滴が見られるが、CO 群ほど大きいものは少なかった。

Fig.1-5 は CO 群と WPH 群の HE 染色と Oil Red O 染色の結果である。HE 染色では白い部分、オイルレッド O 染色では赤い部分が中性脂肪であるが、どちらの染色方法でも WPH 群で脂肪蓄積を抑制していた。

3-1-11 考察

成長結果から、副睪丸周辺脂肪組織重量は WPH 群で有意に低くなった。また、副睪丸周辺脂肪組織の脂肪細胞のサイズにおいて、WPH 群は CO 群と比べてサイズが小さくなっていた。そのために、脂肪組織重量の低下が起こったと考えられる。さらに、血清レプチン濃度は脂肪組織重量に反映される²²⁾ため、副睪丸周辺脂肪組織重量の低下によって低くなったと考えられた。なお、脂肪

細胞サイズの小型化を引き起こす PPAR γ 発現量は今回測定していないため、今後検討する必要がある。

Ca 摂取量と脂肪組織の関係は、今までいくつかの論文で発表されている。Zemel ら²³⁾は 0.4%Ca 飼料を用いた実験において、副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌が促進し、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ の合成が促進されることで Ca が脂肪細胞内に流入するため脂肪の合成が促進されるメカニズムを提唱した。本実験で設定した Ca 濃度はどちらも低 Ca であったが、WPH のアミノ酸組成には Ca 吸収促進物質であるリシンやアルギニンが多く含まれており、なおかつ吸収されやすいペプチド態であるため終体重や脂肪組織重量に影響したと考えられた。

糞中脂質について、0.4%Ca 添加で脂質排泄量が有意に増加していた。しかし、過去の研究では 0.5%Ca 添加と 0.1%Ca 添加でも脂質排泄量に有意差は見られず²²⁾、高濃度(1.2%)添加した際に脂肪酸と Ca が塩を作り体外に排出されたという報告⁷⁾がある。0.4%Ca と 0.2%Ca で脂質蓄積に差が無かったことから、この糞中脂質排泄量の結果は脂質蓄積に影響していないと考えられる。

血清トリグリセリド濃度は、CO 群と比較して WPH 群で有意に上昇していた。Uno ら²⁴⁾は、肝臓のアミノ酸濃度が上昇するとアミノ酸シグナルおよび mTOR/S6K が活性化されることで神経シグナルを介して LPL の発現が低下し、血中トリグリセリド濃度が上昇することを報告している。そのため、吸収性の高い WPH 群で血清トリグリセリド濃度が有意に上昇したと考えられた。

肝臓脂質については、トリグリセリド蓄積量は WPH でのみ有意に低下した。このことから、肝臓脂質の低下作用は WPH 特異的な作用であると考えられる。また、Ca の因子において有意差は見られなかったため、肝臓脂質蓄積抑制作用は Ca 添加量に依存しないことが示唆された。小林ら²⁵⁾は、ラットに WPH を 20%含有させた食餌を 2 週間与えたところ、血清および肝臓のトリグリセリド濃度の低下、肝臓コレステロール濃度の低下を確認し、またそれらの作用は脂肪合成に関与する酵素の活性低下によるものであったと報告している。また、Shertzer²⁶⁾らは、高脂肪食を給餌したマウスにおいて乳清たんぱく質分離物を混ぜた水を 21 週間投与すると、肝臓の脂肪滴数および非極性脂質の沈着が有意に少なくなったと報告している。本実験での組織染色でも WPH 群で脂肪滴の沈着が CO 群と比べて減少していたことから、乳清たんぱく質およびホエイペプチドには肝臓脂質蓄積抑制作用があることが示された。

炎症マーカーについて、WPH は MCP-1 の発現を抑制していた。MCP-1 は、脂質蓄積によって産生される活性酸素によって増加する²⁷⁾。このことから、WPH は脂質の合成を抑制することで蓄積を抑え、脂質蓄積による活性酸素を低下させることで MCP-1 の発現を抑制することが考えられた。

今回、SREBP-1c および脂肪合成に関わる DGAT2 発現量は、AA 群で有意

に低い値を示した。PPAR α およびコレステロール合成に関わる SREBP-2 発現量は CO 群と比べて WPH, AA 群間で有意に低値を示した。AA 群においても CO 群と比べて脂質合成に関与する遺伝子の mRNA 発現に有意差は見られたが、肝臓トリグリセリド蓄積量に有意差が見られなかったことから、SREBP-1c や DGAT2 の発現を介したものではないと考えられた。脂肪酸の合成を促進する SREBP-1c は、インスリン- α PKC によって活性化され、脂肪酸合成やコレステロール合成を制御する²⁸⁾。Eller²⁹⁾らは、ラットにおいてカゼイン食と比べてホエイ食においてインスリン濃度に有意差はなかったが、肝臓 SREBP-1c 発現が有意に低下したと報告している。今回の実験では、Eller らと同じく血清インスリン濃度に有意差は見られなかったため、インスリン調節は関与しない他のメカニズムが肝臓脂質の蓄積に影響を与えていると考えられる。

肝臓において、炎症に関連する IL-6 および NADPH オキシダーゼのサブユニットである p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} は AA 群のみで CO 群と比べて有意に低下した。組織や細胞内に脂質が蓄積すると活性酸素による酸化ストレスが産生され、MCP-1 や TNF- α の増加や NADPH オキシダーゼの活性化が誘導される。その結果、マクロファージの誘導や、活性酸素がさらに増加することで炎症が促進する。Iwasa ら³⁰⁾は、四塩化炭素によって肝線維症にさせた Wistar 系雄ラットにおいて 10mg/kg/体重の BCAA を 16 週間投与したところ、アラキドン酸やリノール酸の過酸化代謝物であり細胞障害性の高い 4-HNE の減少、DNA 損傷の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の減少、ROS 防御システムのたんぱく質である SOD が増加したと報告している。しかし、今回の実験では SOD の mRNA 発現量の増加は認められず、この報告と一致しなかった。アミノ酸はミトコンドリアに直接入り込むため³¹⁾、AA 群のアミノ酸はミトコンドリアに流入し、NADPH オキシダーゼのサブユニットの発現を低下させることで活性酸素の産生を抑制し、炎症の惹起を抑制している可能性が考えられた。しかし、Olha ら³²⁾らは、高濃度の BCAA は NADPH オキシダーゼを活性化すると報告している。そのため、これらの作用には抗酸化作用の強いシステインが関与していることが考えられた。

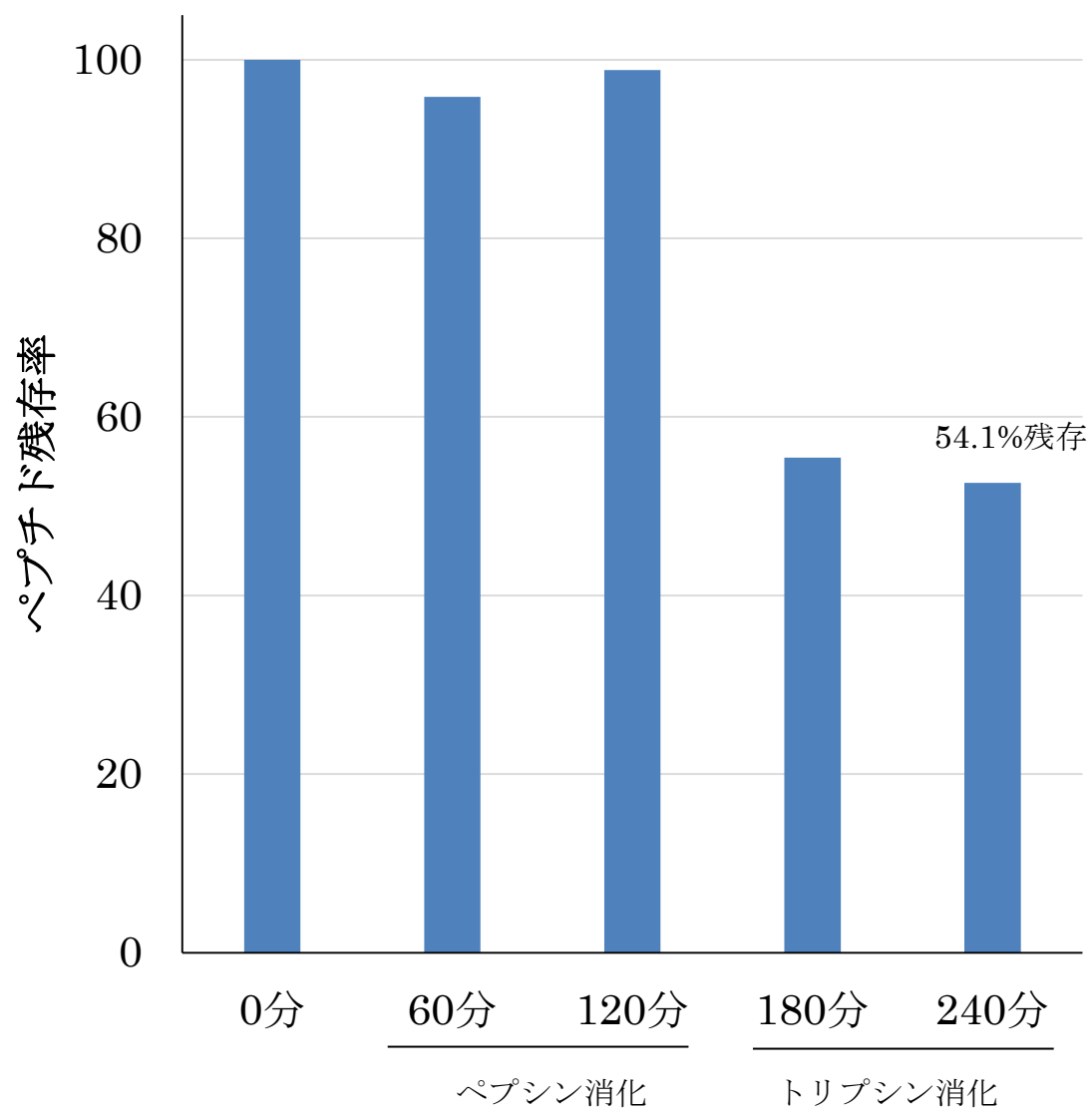


Fig.1-1 人工消化試験

Table 3-1-1 最終体重，飼料摂取量，体重増加量及び飼料効率

	MC			LC		
	CO	WPH	AA	CO	WPH	AA
初体重(g)	21.2±1.1	21.2±0.7	21.2±1.6	21.2±0.6	21.2±0.8	21.2±0.7
終体重(g)	39.9±1.1	35.9±1.0	36.6±1.0	37.4±1.0	35.9±1.0	35.8±1.0
体重増加量(g/day)	0.21±0.06	0.19±0.03	0.20±0.04	0.20±0.04	0.19±0.04	0.18±0.03
飼料摂取量(g/day)	3.4±0.2	3.3±0.3	3.7±0.1	3.5±0.2	3.5±0.1	3.6±0.1
飼料効率(%)	6.9±0.8	5.8±0.6	5.3±1.0	6.0±0.6	5.2±0.3	5.1±0.3

two-way ANOVA				multiple comparison for protein source effect		
	protein	Ca	concentration	protein*Ca concentration	CO	WPH
初体重(g)	NS		NS	NS		
終体重(g)	p<0.05		NS	NS	38.5±0.9 ^a	35.9±0.6 ^b
体重増加量(g/day)	NS		NS	NS		36.2±0.7 ^{ab}
飼料摂取量(g/day)	NS		NS	NS		
飼料効率(%)	NS		NS	NS		

数値は平均値±SE で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table 3-1-2 臓器重量

	MC			LC		
	CO	WPH	AA	CO	WPH	AA
肝臓重量(g)	1.55±0.06	1.40±0.05	1.39±0.05	1.45±0.07	1.37±0.06	1.34±0.05
総脂肪組織重量(g)	3.81±0.19	2.93±0.21	3.19±0.23	3.27±0.31	2.88±0.22	2.90±0.62
後腹壁脂肪組織重量(g)	0.83±0.06	0.81±0.20	0.62±0.06	0.72±0.07	0.62±0.05	0.63±0.05
副睾丸周辺脂肪組織重量(g)	2.23±0.10	1.60±0.16	2.00±0.14	1.93±0.17	1.73±0.14	1.73±0.14
腸間膜脂肪組織重量(g)	0.76±0.07	0.52±0.04	0.56±0.04	0.62±0.07	0.52±0.04	0.54±0.03

two-way ANOVA				multiple comparison for protein source effect	
	protein	Ca concentration	protein*Ca concentration	CO	WPH
肝臓重量(g)	NS	NS	NS		
総脂肪組織重量(g)	p<0.05	NS	NS	3.51±0.20 ^a	2.90±0.15 ^b
後腹壁脂肪組織重量(g)	p<0.05	NS	NS		3.03±0.16 ^{ab}
副睾丸周囲脂肪組織重量(g)	NS	NS	NS	2.06±0.11 ^a	1.66±0.10 ^b
腸間膜脂肪組織重量(g)	p<0.05	NS	NS	0.68±0.05 ^a	0.52±0.10 ^b

数値は平均値±SE で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table 3-1-3 血清生化学値およびインスリン，レプチン濃度

	MC				LC			
	CO		WPH		CO		WPH	
				AA				AA
トリグリセリド(mg/dl)	58.4±1.3 ^a	69.1±3.0 ^b	64.0±2.1 ^b	65.4±4.7 ^{ab}	78.8±6.5 ^{ab}	68.9±3.0 ^{ab}		
総コレステロール(mg/dl)	165.4±6.7	173.3±5.3	175.4±7.6	155.0±8.5	171.3±5.0	163.4±10.2		
遊離脂肪酸(mEq/dl)	0.55±0.02	0.48±0.03	0.48±0.03	0.48±0.02	0.51±0.03	0.47±0.02		
インスリン(ng/ml)	5.1±0.9	4.4±1.2	3.0±0.4	9.7±2.8	7.8±0.9	5.3±2.0		
グルコース(mg/dl)	353.7±6.5	388.2±13.6	402.2±26.7	419.8±27.3	425.9±19.5	373.7±24.9		
HOMA-IR	107.0±17.1 ^{ab}	109.2±29.3 ^{ab}	82.8±10.6 ^{ab}	327.5±98.3 ^a	149.5±48.9 ^{ab}	77.9±6.4 ^b		
レプチン(ng/ml)	50.9±3.8	34.3±5.2	34.7±2.7	42.4±7.8	29.4±4.5	28.9±5.3		

two-way ANOVA				multiple comparison for protein source effect			
	protein	Ca concentration	protein*Ca concentration	CO	WPH	AA	
トリグリセリド(mg/dl)	p<0.05	P<0.05	NS	62.4±3.7 ^a	73.9±3.7 ^b	66.6±1.9 ^{ab}	
総コレステロール(mg/dl)	NS	NS	NS				
遊離脂肪酸(mg/dl)	NS	NS	NS				
インスリン(ng/ml)	NS	NS	NS				
グルコース(mg/dl)	NS	NS	p=0.07				
HOMA-IR	p<0.05	p<0.05	p<0.05				
レプチン(ng/ml)	P<0.05	NS	NS	46.3±4.6 ^a	31.8±3.4 ^b	31.7±3.0 ^b	

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table 3-1-4 肝臓脂質量

	MC			LC		
	CO	WPH	AA	CO	WPH	AA
トリグリセリド(mg/g liver)	74.8±6.4	40.3±5.0	69.8±8.0	69.3±7.3	44.2±2.0	53.3±9.3
(mg/liver)	116.9±12.7	40.2±9.4	97.4±12.0	103.4±15.8	61.0±4.9	72.5±12.7
コレステロール(mg/g liver)	2.7±0.3	2.6±0.5	1.8±0.1	2.9±0.5	1.5±0.2	1.8±0.2
(mg/liver)	4.3±0.5	3.7±0.6	2.5±0.2	4.4±1.0	2.1±0.3	2.5±0.3

two-way ANOVA						multiple comparison for protein source effect	
	protein	Ca	concentration	protein*Ca concentration	CO	WPH	AA
トリグリセリド(mg/g liver)	p<0.05	NS	NS	NS	71.6±4.9 ^a	32.4±2.6 ^b	61.5±6.3 ^a
(mg/liver)	p<0.05	NS	NS	NS	109.2±10.3 ^a	59.5±5.1 ^b	84.9±9.1 ^{ab}
総コレステロール(mg/g liver)	p<0.05	NS	NS	NS	2.8±0.3 ^a	2.2±0.3 ^b	1.8±0.1 ^b
(mg/liver)	p<0.05	NS	NS	NS	4.4±0.6 ^a	3.0±0.4 ^b	2.5±0.2 ^b

数値は平均値±SE で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コレトロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table 3-1-5 副睾丸周辺脂肪組織の脂肪細胞のサイズ

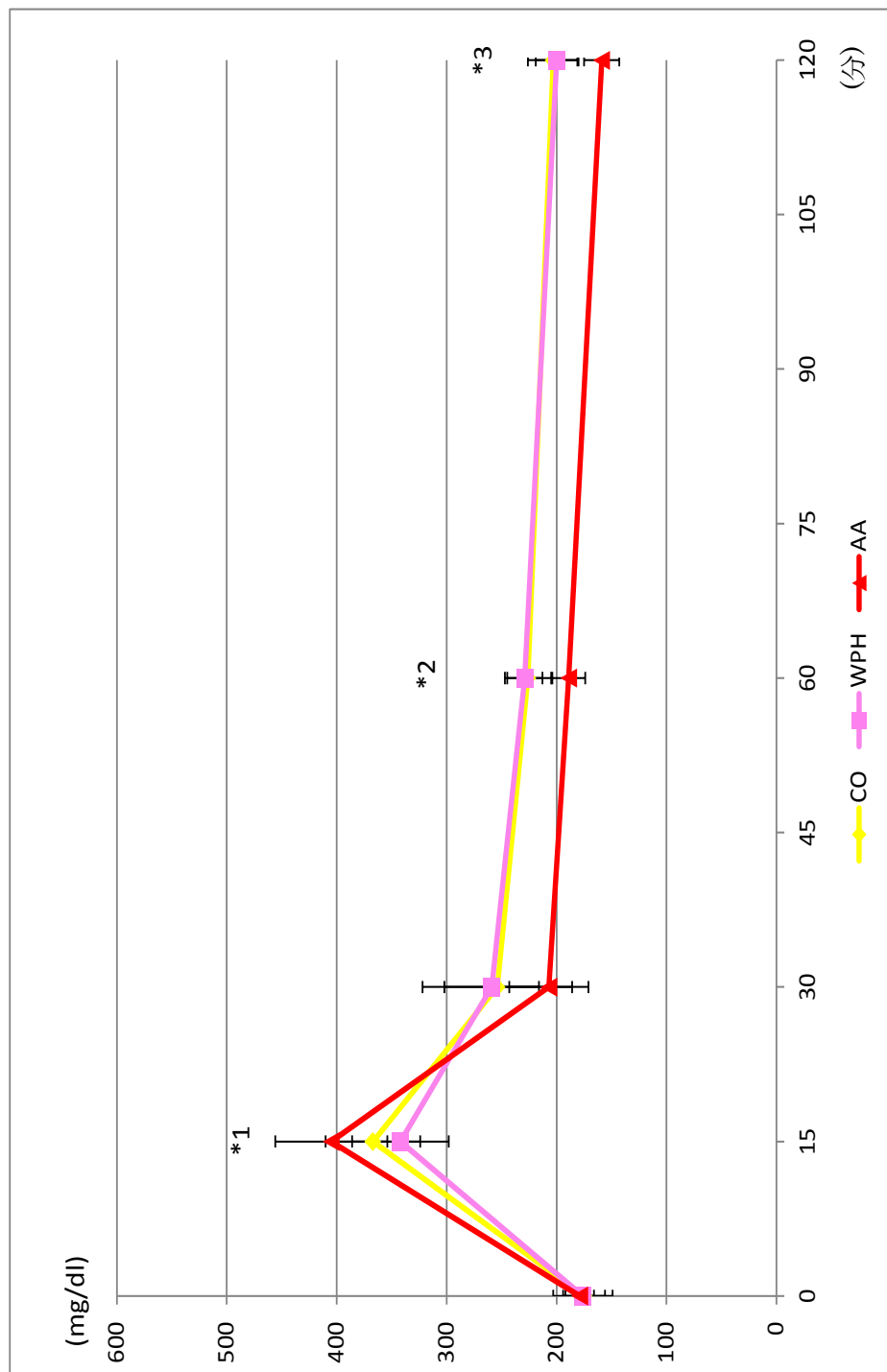
		MC		LC			
		CO	WPH	AA	CO	WPH	AA
25~240μm	個数平均径	75.5±10.9 ^{ab}	72.1±10.7 ^{ab}	64.4±12.4 ^b	86.0±7.3 ^a	62.6±7.0 ^b	65.7±9.8 ^b
25~240μm	体積平均径	122.0±10.1	120.8±6.5	120.3±8.1	127.0±7.0	113.3±9.0	120.4±11.3
70~200μm	個数平均径	108.1±8.7	108.7±4.9	110.4±4.5	114.0±5.5	104.76.2	109.4±7.8
70~200μm	体積平均径	123.3±10.8	124.1±4.9	127.0±3.6	127.9±6.8	118.4±8.0	124.8±8.0

two-way ANOVA			
	protein	Ca concentration	protein*Ca concentration
25~240μm 個数平均径	p<0.05	NS	p<0.05
25~240μm 体積平均径	p=0.07	NS	NS
70~200μm 個数平均径	NS	NS	NS
70~200μm 体積平均径	NS	NS	NS

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

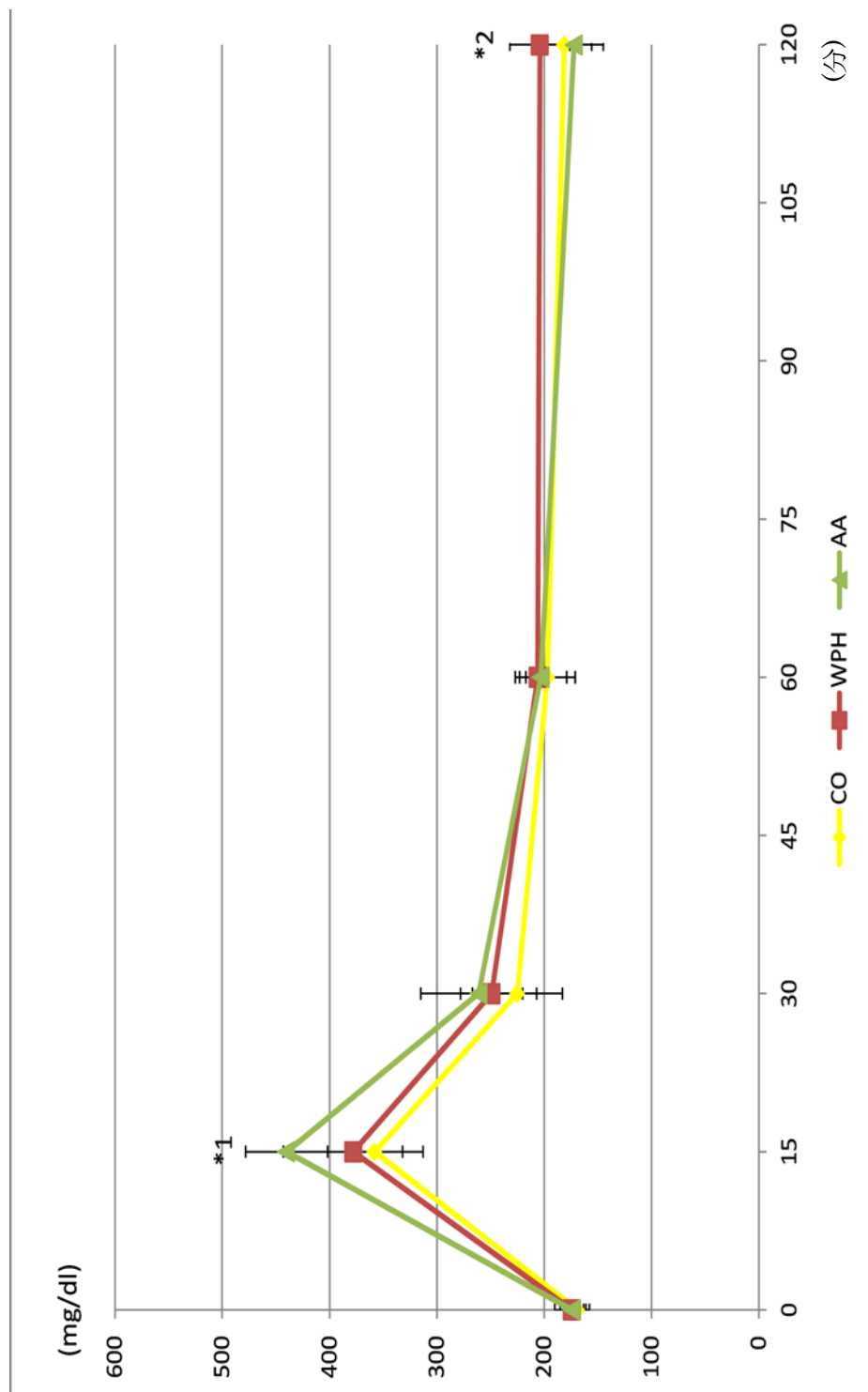


*1 は 15 分値において AA 群が CO 群, WPH 群と比べて有意に高いことを示す。

*2 は 60 分値において AA 群が CO 群, WPH 群と比べて有意に低いことを示す。

*3 は 120 分値 AA 群が CO 群, WPH 群と比べて有意に低いことを示す。

Fig.1-2 耐糖能試験(MC 群)



*1 は 15 分値において AA 群が CO 群, WPH 群と比べて有意に高いことを示す。
 *2 は 120 分値において AA 群が CO 群, WPH 群と比べて有意に低いことを示す。

Fig.1-3 耐糖能試験(LC 群)

Table 3-1-7 糞中脂質量

	MC			LC		
	CO	WPH	AA	CO	WPH	AA
総脂質排泄量(mg/d)	4.5±1.4 ^{ab}	3.8±1.2 ^{ab}	5.1±1.7 ^a	3.5±1.0 ^{ab}	4.1±1.2 ^{ab}	2.9±1.4 ^b
見かけの消化吸収率(%)	98.5±0.6 ^{ab}	98.7±0.4 ^{ab}	98.2±0.6 ^b	98.8±0.4 ^{ab}	98.5±0.4 ^{ab}	98.9±0.5 ^a

two-way ANOVA

	protein	Ca	concentration	protein*Ca
				concentration
総脂質排泄量(mg/d)	NS	p<0.05	p<0.05	p<0.05
見かけの消化吸収率(%)	NS	p<0.05	p<0.05	p<0.05

数値は平均値±SE で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table 3-1-8 肝臓 mRNA 発現量

	MC				LC	
	CO	WPH	AA	CO	HW	AA
IL-6	1.0±0.4	0.4±0.2	0.4±0.1	0.5±0.2	0.5±0.2	0.4±0.1
MCP-1	1.0±0.7	0.7±0.3	0.7±0.2	1.5±0.8	0.7±0.3	0.8±0.3
F4/80	1.0±0.1	1.0±0.2	0.7±0.2	1.0±0.5	1.2±0.5	0.8±0.2
p40phox	1.0±0.4 ^{ab}	0.7±0.2 ^{bc}	0.7±0.2 ^{abc}	1.1±0.3 ^a	0.9±0.2 ^{ab}	0.3±0.1 ^c
p47hox	1.0±0.4	0.7±0.2	0.6±0.2	0.7±0.2	0.7±0.2	0.3±0.2
p67phox	1.0±0.2	0.7±0.2	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.2	0.6±0.1
SOD	1.0±0.3	0.7±0.1	0.6±0.1	0.9±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1
SREBP-1c	1.0±0.3 ^{ab}	1.1±0.3 ^a	0.5±0.1 ^c	0.7±0.2 ^{bc}	0.5±0.1 ^c	0.5±0.1 ^c
SREBP-2	1.0±0.2	0.6±0.1	0.4±0.1	0.8±0.2	0.5±0.1	0.4±0.1
PPAR α	1.0±0.3	0.8±0.1	0.7±0.1	1.1±0.2	0.8±0.2	0.6±0.1
HMG-CoA reductase	1.0±0.3	0.8±0.2	0.8±0.2	1.0±0.2	0.9±0.3	1.0±0.4
FAS	1.0±0.5	0.7±0.3	0.6±0.1	0.8±0.4	0.7±0.3	0.8±0.2
DGAT2	1.0±0.4	0.9±0.1	0.7±0.1	0.9±0.2	0.9±0.1	0.6±0.1
ACC	1.0±0.3	0.6±0.2	0.6±0.2	0.7±0.2	0.5±0.1	0.5±0.1

数値は平均値±SE で表した。

有意水準は両側 5%未満とし、異なるアルファベット間で有意差がある。

CO; コントロール, WPH; ホエイペプチド, AA; アミノ酸

Table3-1-9 肝臓 mRNA 発現量の two-way ANOVA

	two-way ANOVA			protein		
	protein	Ca concentration	protein*Ca concentration	CO	WPH	AA
IL-6	p<0.05	p<0.05	p<0.05	1.00±0.23 ^a	0.49±0.06 ^b	0.55±0.06 ^{ab}
MCP-1	p<0.05	NS	NS	1.00±0.12	1.09±0.09	0.77±0.22
F4/80	NS	NS	NS			
p40phox	p<0.05	NS	p<0.05	1.00±0.09 ^a	0.75±0.09 ^{ab}	0.50±0.08 ^b
p47hox	p<0.05	p<0.05	NS	1.00±0.06 ^a	0.78±0.06 ^b	0.66±0.05 ^b
p67phox	p<0.05	p<0.05	NS	1.00±0.05 ^a	0.65±0.04 ^b	0.56±0.05 ^b
SOD	p<0.05	NS	NS			
SREBP-1c	p<0.05	p<0.05	p<0.05	1.00±0.05 ^a	0.64±0.05 ^b	0.48±0.06 ^c
SREBP-2	p<0.05	p<0.05	NS	1.00±0.06 ^a	0.81±0.15 ^b	0.75±0.12 ^b
PPAR α	p<0.05	NS	NS	1.00±0.06	0.67±0.06	0.72±0.06
HMG-CoA reductase	NS	NS	NS	1.00±0.14	0.75±0.10	0.76±0.06
FAS	NS	NS	NS	1.00±0.07 ^a	0.89±0.02 ^a	0.65±0.03 ^b
DGAT2	p<0.05	NS	NS	1.00±0.09 ^a	0.65±0.06 ^b	0.53±0.08 ^b
ACC	p<0.05	p<0.05	NS			

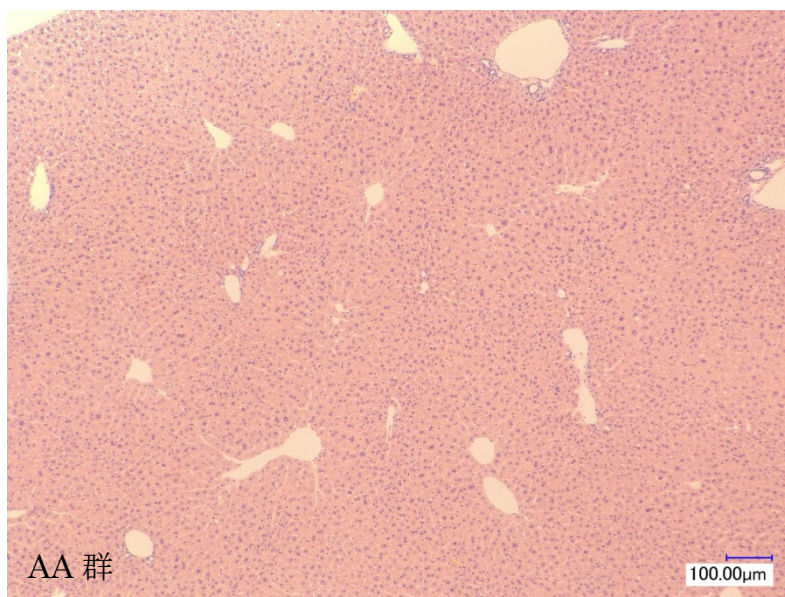
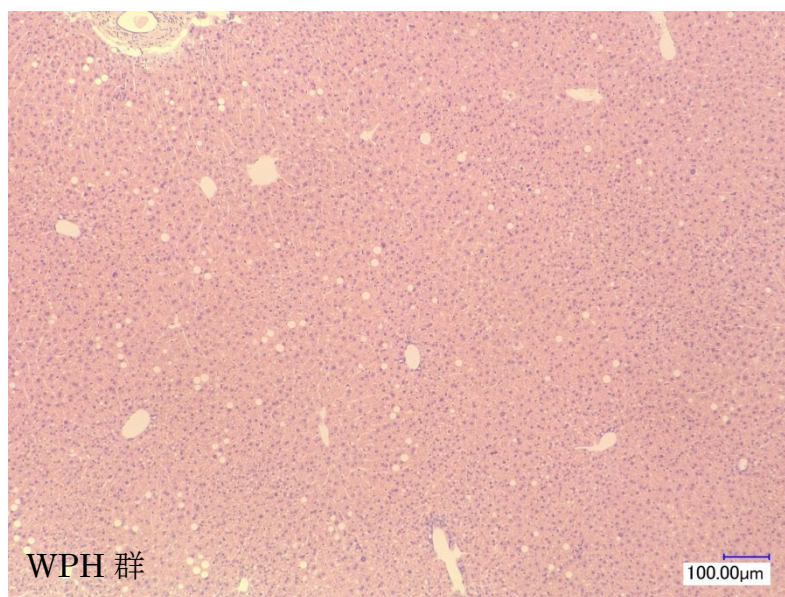
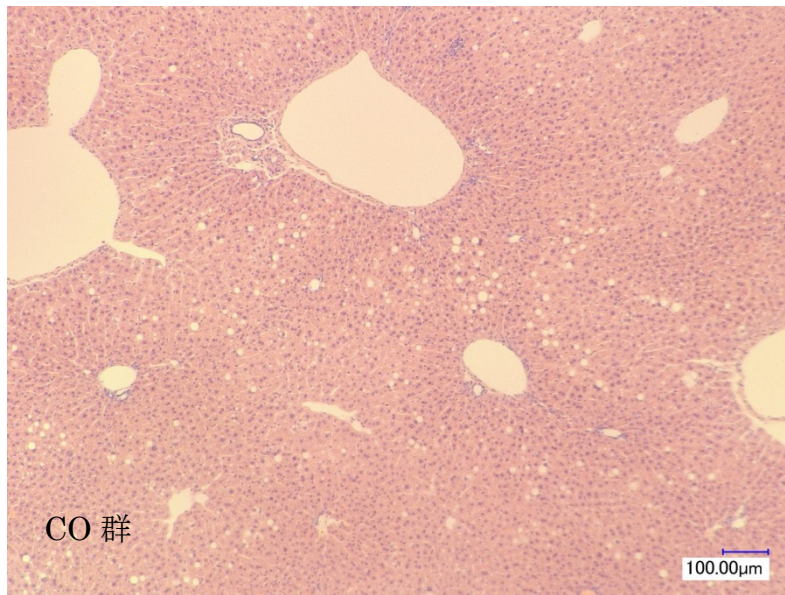


Fig.1-4 肝臓組織の HE 染色

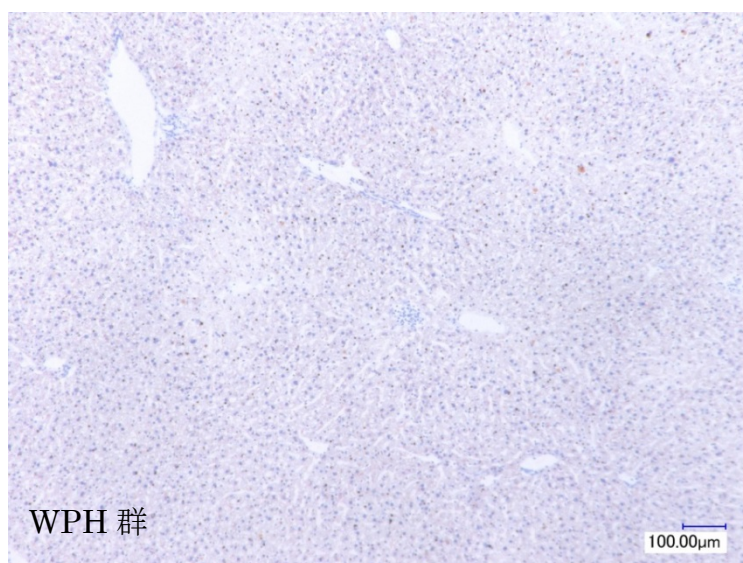
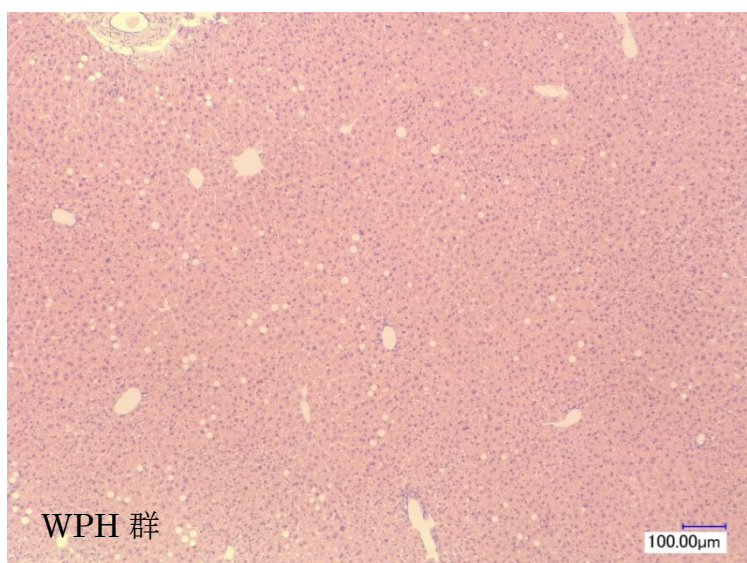
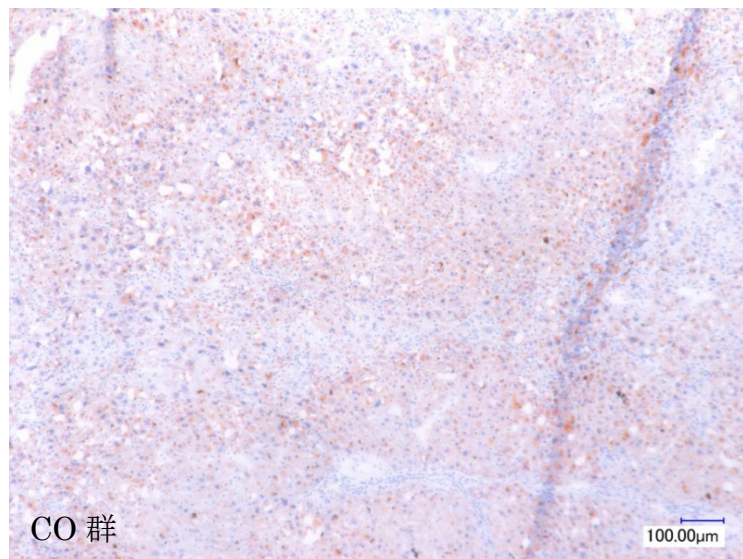
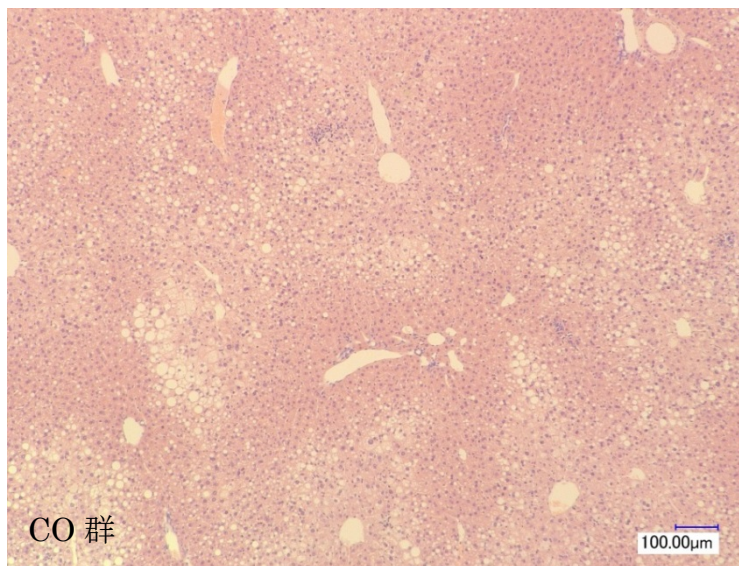


Fig.1-5 肝臓組織の HE 染色と Oil Red O 染色での比較

Exp.2 ラットにおけるアミノ酸吸収実験

3-2-1 成長結果および臓器重量

ラットの成長結果を Table3-2-1 に示した。

最終体重については、AA 群で CO 群より有意に低下した。初体重，1 日当たりの飼料摂取量は，各群間で有意差は見られなかった。

肝臓総重量については，WPH 群，AA 群で CO 群と比べて有意に低下していた。

3-2-2 血清生化学値

ラットの血清生化学値の結果を Table3-2-2 に示した。

血清脂質について，血清コレステロール濃度は AA 群で CO 群より有意に低下した。血清遊離脂肪酸濃度，血清トリグリセリド濃度は，各群間に有意差は見られなかった。

3-2-3 門脈中アミノ酸濃度

ラットの門脈中アミノ酸濃度の結果を Table3-2-3 に示した。

総遊離アミノ酸濃度は CO 群，WPH 群と比べて AA 群で有意に高値を示した。また，ロイシン濃度は WPH 群と比べ AA 群で有意に高値を示した。門脈中ペプチド濃度は各群間に有意差は見られなかった。

3-2-4 考察

最終体重について，1 日あたりの食餌摂取量に差はなかったが AA 群で CO 群と比べて有意に低下した。また，肝臓重量は CO 群と比べて WPH 群および AA 群で有意に低下し，血清コレステロール濃度も AA 群で CO 群と比べて有意に低い値を示していた。

門脈中のアミノ酸濃度は，総遊離アミノ酸は AA 群で CO 群，WPH 群と比べて有意に高値を示していた。ペプチドとアミノ酸はそれぞれ異なる経路を介して門脈を通り，肝臓に到達する。ペプチドは小腸から直接吸収された後，そのまま吸収されて標的器官に流入することが知られている³³⁾。WPH の主体であるジペプチド，トリペプチドは小腸や腎臓に存在し， H^+ 勾配を駆動力とするペプチドトランスポーター1(PEPT1)を介して吸収され，小腸でアミノ酸に分解後門脈を通して肝臓に輸送される。そして，一部はペプチド態のまま臓器に達することも報告されている。一方，アミノ酸は小腸に存在し Na^+ を駆動力とするアミノ酸トランスポーターによって吸収されるため，この吸収速度の違いが肝

臓の脂質代謝に影響していることも考えられた。そのため、門脈中のペプチド濃度を測定した結果、各群間で有意差は見られなかった。 H^+ 勾配を利用している PEPT1 の方がアミノ酸トランスポーターに比べて吸収速度が速く、ペプチドはアミノ酸の約 2 倍の速さで吸収される。Rubio ら³⁴⁾はカゼインおよびラクトアルブミンをラットに投与し、給餌後経時的に門脈のアミノ酸濃度を測定した結果、全ての時点でラクトアルブミン食がカゼイン食と比べてアルギニン、ロイシン、トリプトファン、リジンおよびメチオニンの遊離アミノ酸濃度が有意に高かったと報告している。また、カゼインとカゼインの加水分解物をラットに投与し経時的に比較したところ、分岐鎖アミノ酸であるバリンは全てのポイントで有意にカゼイン群の方が高く、ロイシンは 60 分値、105 分値でカゼイン加水分解物群が有意に高かったことを報告し³⁵⁾、カゼインとカゼイン加水分解物の小腸での吸収経路の違いを示唆している。このことから、測定時にはペプチドは吸収済みであり、結果 AA 群の遊離アミノ酸濃度が高く、血中ペプチド濃度に有意差が見られなかった可能性がある。そのため、WPH 群と AA 群の作用の違いは小腸での吸収速度が最も要因として考えられた。本実験では 1 時点のみでの測定であったため、具体的な吸収速度の差を検討するため、今後、飼料を摂取させてから経時的に門脈血を採取し、遊離アミノ酸濃度およびペプチド濃度を分析する必要がある。

Table3-2-1 最終体重, 飼料摂取量, 体重増加量及び飼料効率

	CO	WPH	AA
初体重(g)	130.5±3.3	129.2±4.9	130.6±3.9
最終体重(g)	112.0±4.7 ^a	109.5±2.6 ^{ab}	105.3±2.5 ^b
1日当たりの摂取量(g)	5.6±0.4	5.2±0.3	5.0±0.4
肝臓総重量(g)	6.9±0.4 ^a	5.9±0.6 ^b	5.6±0.2 ^b

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし, 異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table3-2-2 血清生化学値

	CO	WPH	AA
トリグリセリド(mg/dl)	172.7±46.1	193.8±53.4	146.4±19.9
総コレステロール(mg/dl)	84.8±13.7 ^a	67.4±9.6 ^{ab}	51.4±5.3 ^b
遊離脂肪酸(mEq/dl)	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table3-2-3 門脈中遊離アミノ酸濃度

	CO	HW	AA
遊離アミノ酸(μg/ml)	180.0±92.6 ^a	111.1±34.0 ^a	335.0±46.0 ^b
バリン(μg/ml)	1850±665	1958±259	1451±1599
ロイシン(μg/ml)	140.4±47.21 ^{ab}	70.9±35.6 ^b	377.4±203.9 ^a
イソロイシン(μg/ml)	1790±496	1944±530	2381±402
ペプチド濃度(mg/ml)*	2.9±0.3	3.1±0.3	2.9±0.2

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

*Lowry 法 — Bradford 法
(ジペプチド以上測定) (総たんぱく質測定)

Exp.3 ペプチドとアミノ酸における肝臓脂質蓄積比較実験

3-3-1 成長結果

マウスの成長結果を Table3-3-1 に示した。

飼料摂取量，飼料効率，初体重，終体重，体重増加量に有意差は見られなかった。

3-3-2 臓器重量

マウスの臓器重量の結果を Table3-3-2 に示した。

肝臓重量，腹腔内脂肪組織重量(後腹壁脂肪組織重量，腸間膜脂肪組織重量，腸間膜脂肪組織重量)において各群間で有意差は見られなかった。

3-3-3 血清生化学値ならびにインスリン濃度

血清生化学値ならびにインスリン濃度の結果を Table3-3-3 に示した。

血清トリグリセリド濃度は WPH 群で CO 群と比べて有意に高値であったが，CO 群と LV 群間では有意差は見られなかった。血清コレステロール濃度，血清遊離脂肪酸濃度において，各群間で有意差は見られなかった。血清インスリン濃度においても各群間で有意差は見られなかった。

3-3-4 肝臓脂質蓄積量

肝臓脂質蓄積量の結果を Table3-3-4 に示した。

肝臓トリグリセリド蓄積量(mg/liver)およびトリグリセリド濃度(mg/g liver)は CO 群と比べて WPH 群および LV 群で有意に低下した。肝臓コレステロール蓄積量(mg/liver) およびコレステロール濃度(mg/g liver)は各群間で有意差は見られなかった。

3-3-5 耐糖能試験

耐糖能試験の結果を Table3-3-5, Fig.3-1 に示した。

0 分，15 分，30 分，60 分，120 分値は各群間に有意差は見られなかった。AUC についても各群間に有意差は見られなかった。

3-3-6 肝臓の mRNA 発現量

肝臓の mRNA 発現量の結果を Table3-3-7 に示した。

CO 群と LV 群，CO 群と WPH 群を比較すると，炎症マーカーである TNF- α ，NADPH オキシダーゼのサブユニットである p40^{phox}，p47^{phox}，p67^{phox}，MCP-1，脂質代謝に関連する SREBP-1c, SREBP-2, HMG-CoA 還元酵素, FAS,

DGAT2, ACC, SCD1, mtGPAD, β 酸化に関係する PPAR α , ACOX, について各群間に有意差は見られなかった。F4/80 発現量は CO 群と比べて WPH 群で有意に低下した。

3-3-5 肝臓中酵素の比活性の測定

肝臓中酵素の比活性の測定結果を Table3-3-7 に示す。

FAS の比活性について、有意な差は見られなかった。ACOX の発現については、CO 群と比べて WPH 群, LV 群で有意に高い値を示した。

3-3-6 考察

最終体重や腹腔内脂肪組織重量に有意差はなかったが、血清トリグリセリド濃度が WPH 群で有意に増加したのは, Exp.1 と同じく肝臓にアミノ酸が流入したことによる, 神経シグナルを介した LPL 発現抑制によるものだと思われる²⁴⁾。WPH 群でより高値であったのは、ペプチド態で速やかに吸収されるため、肝臓へのアミノ酸流入が速かったからだと考えられる。

肝臓脂質については、肝臓重量に有意差はなかったが、肝臓 TG 蓄積量は CO 群と比べ WPH 群, および LV 群で有意に蓄積が抑制された。WPH 群は Exp.1 でも蓄積抑制作用が見られたため、再現性のある効果と言える。また、Exp.1 でのアミノ酸混合物の場合において有意差はなかったが、バリン、ロイシンを強化することで肝臓の脂質の蓄積抑制作用を示す可能性が考えられた。肝臓脂質の蓄積抑制作用は様々な乳製品中の成分において報告されている。Schneeman³⁶⁾らは全乳粉末と脱脂粉乳と比べると全乳粉末は肝臓コレステロールとトリグリセリドの蓄積を抑制したと報告し、Morishita ら³⁷⁾はマウスにおいて牛由来ラクトフェリンを 4 週間投与したところ、腸間膜脂肪組織重量と肝臓トリグリセリド蓄積量が有意に低下したと報告した。乳清たんぱく質中に多く含まれている BCAA に関しても、多数論文が発表されている¹⁸⁾¹⁹⁾。

さらに、肝臓の mRNA 発現量を測定した結果、脂質合成系および脂質分解系の遺伝子発現も有意差は見られなかった。このことから、肝臓脂質蓄積は酵素の発現量ではない可能性が考えられた。そこで、酵素活性を測定したところ、FAS について有意差は見られなかったが、ACOX は CO 群と比べて LV 群で有意に高値であった。ACOX は分解系の脂質代謝に関わっており、特に β 酸化に影響を与える。 β 酸化とは、脂肪酸を酸化して脂肪酸アシル CoA を生成し、さらにそこからアセチル CoA を取り出す代謝経路であり、ミトコンドリアと細胞小器官のペルオキシソームで行われる。ACOX はペルオキシソームでの β 酸化に関与しており、ペルオキシソームでの β 酸化は長鎖脂肪酸を短くし、ミトコンドリア内での β 酸化で分解しやすくする役割を担っている。高脂肪食を摂取

させると脂質が蓄積するが、ロイシンおよびバリンの強化によって酵素活性が高まり、 β 酸化を活性化することで、肝臓の脂質蓄積を抑制する可能性が示された。また、WPH 群も CO 群と比べて ACOX 活性が有意に高値であった。WPH の分岐鎖アミノ酸量は LV 群よりも少ないものの、LV 群と同じ結果が見られたことから、WPH の吸収速度の速さが、より少ないアミノ酸量でも効果を示した可能性が考えられる。今後、WPH 群と LV 群の具体的な吸収速度の差の確認、および呼吸商を測定し、どの程度 β 酸化が活性化されるか確認する必要がある。

炎症マーカーの発現については、LV 群は CO 群と比べて各項目で有意差は見られなかったが、WPH 群は F4/80 において CO 群と比べて有意に低下した。F4/80 はマクロファージに関連する遺伝子であり、脂質が蓄積すると活性酸素によって MCP-1 の増加し、それに伴いマクロファージが誘導されるため F4/80 発現が増加する。今回の実験では、WPH は高脂肪食による脂質蓄積に対し β 酸化を活性化させることで分解系を促進することで抑制し、その結果マクロファージの誘導を抑えたため F4/80 の発現を抑制したことが考えられた。

また、高脂肪食を摂取させることにより腸内環境が悪化し、リポ多糖類(LPS)が生産され、LPS が門脈を介して脂質が蓄積された状態の肝臓に到達すると、炎症が惹起されることがある³⁸⁾。Tsutsumi ら³⁹⁾は、WPH ベースの食餌をマウスに摂取させると、システインの抗炎症作用により LPS 誘導性の体重減少、および大腸と肝臓の損傷を抑制し、大腸内を保護する腸内細菌を増加させたと報告している。しかし本実験では、大腸内の分析は行っていないため、WPH が及ぼす腸内環境、および LPS 誘導性による肝臓の炎症と WPH については不明である。

Table3-3-1 最終体重, 飼料摂取量, 体重増加量及び飼料効率

	CO	WPH	LV
初体重(g)	21.5±1.3	21.6±1.3	21.5±1.2
終体重(g)	41.0±4.0	39.3±4.8	37.8±4.0
体重増加量(g/day)	0.26±0.05	0.24±0.02	0.22±0.05
飼料摂取量(g/day)	2.2±0.2	2.3±0.2	2.4±0.2

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とした。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table3-3-2 臓器重量

	CO	WPH	LV
肝臓重量(g)	1.2±0.2	1.3±0.2	1.1±0.2
総脂肪組織重量(g)	4.4±0.8	3.9±1.0	3.6±0.7
後腹壁脂肪組織重量(g)	1.1±0.4	0.9±0.2	0.9±0.2
副睾丸周辺脂肪組織重量(g)	2.5±0.5	2.2±0.5	2.2±0.5
腸間膜脂肪組織重量(g)	0.8±0.4	0.7±0.3	0.6±0.2

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とした。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table3-3-3 血清生化学値およびインスリン，レプチン濃度

	CO	WPH	LV
トリグリセリド(mg/dl)	82.2±16.1 ^b	109.7±24.0 ^a	87.9±18.7 ^b
総コレステロール(mg/dl)	155.1±37.5	172.5±17.6	146.6±42.3
遊離脂肪酸(mEq/dl)	0.47±0.10	0.50±0.07	0.51±0.09
インスリン(ng/ml)	36.8±12.1	40.8±16.9	43.2±10.6

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO；コントロール， WPH；ホエイペプチド， AA；アミノ酸

Table3-3-4 肝臓脂質蓄積量

	CO	WPH	LV
トリグリセリド(mg/g liver)	58.3±21.0 ^a	36.3±8.7 ^b	39.6±7.9 ^b
(mg/liver)	67.8±27.9 ^a	43.5±11.0 ^b	44.0±12.3 ^b
コレステロール(mg/g liver)	6.3±1.5	5.5±1.1	6.8±1.7
(mg/liver)	7.2±1.5	6.9±1.6	7.5±2.8

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table3-3-5 耐糖能試験

	CO	WPH	LV
0	177.1±27.3	185.2±19.4	179.6±26.6
15	374.6±18.3	365.2±41.4	352.3±55.6
30	299.2±65.2	306.4±74.4	259.6±48.9
60	258.5±35.9	277.5±36.1	243.6±30.4
120	222.0±40.0	215.2±18.5	210.4±43.1
AUC(Σ mgdL*min)	10719±2683	10169±3092	9467±2359

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とした。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

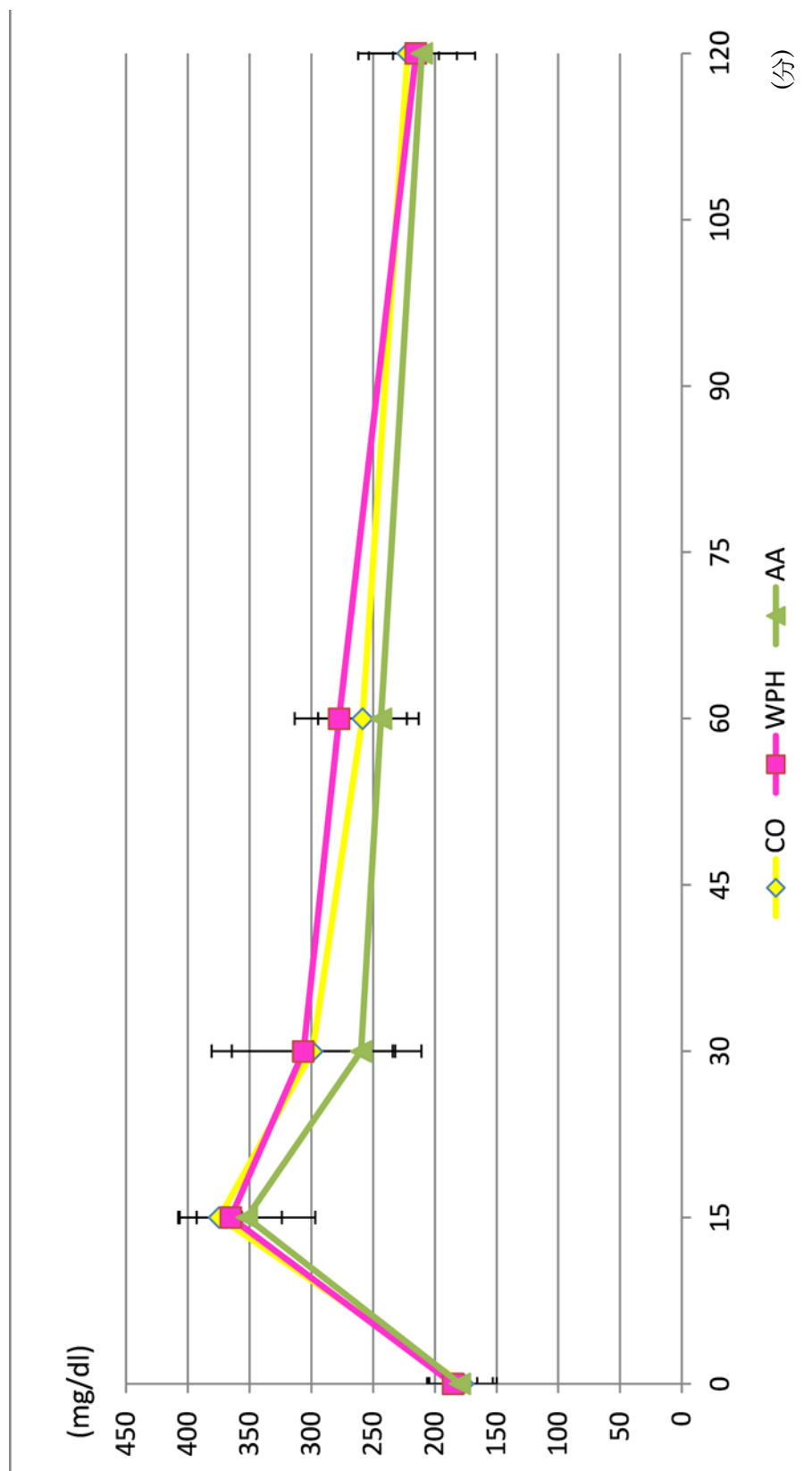


Fig.3-1 耐糖能試験

Table3-3-6 肝臓 mRNA 発現量

	CO	WPH	AA
TNF- α	1.0 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.4
MCP-1	1.0 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.4
F4/80	1.0 $\pm$ 0.3 ^a	0.7 $\pm$ 0.2 ^b	0.9 $\pm$ 0.4 ^{ab}
p40phox	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3
p47phox	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3
p67phox	1.0 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2
SREBP-1c	1.0 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.1 $\pm$ 0.3 ^a	0.8 $\pm$ 0.3 ^b
SREBP-2	1.0 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.2 $\pm$ 0.1 ^a	0.7 $\pm$ 0.2 ^b
PPAR α	1.0 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.1 $\pm$ 0.3 ^a	0.8 $\pm$ 0.3 ^b
HMG-CoA 還元酵素	1.0 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.5
FAS	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.3
DGAT2	1.0 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.4
ACC	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.2
ACOX	1.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2
SCD1	1.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.3
mtGPAD	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2

数値は平均値 $\pm$ SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

Table3-3-7 肝臓の脂肪合成系，脂肪分解系酵素の比活性

	CO	WPH	LV
(n mol/min/mg protein)			
FAS	16.6±2.4	17.5±2.3	17.0±1.5
ACOX	2.3±0.8 ^a	3.6±1.3 ^b	3.6±0.9 ^b

数値は平均値±SD で表した。

有意水準は両側 5%未満とし，異なるアルファベット間で有意差がある。

CO ; コントロール, WPH ; ホエイペプチド, AA ; アミノ酸

第4章 総合考察

Exp.1 では、耐糖能や肝臓脂質蓄積におよぼす WPH とアミノ酸、および Ca 量の影響について検討を行った。Exp.2 ではラットを使用し、門脈のアミノ酸濃度を測定することで小腸からの吸収量の検討を行う実験、さらに Exp.3 では門脈から多く検出されたアミノ酸を使用し、アミノ酸量を強化することで WPH と同じ効果が得られるかどうか、肝臓脂質蓄積および炎症の評価、脂質代謝関連酵素の酵素活性の測定を行った。

Exp.1 および Exp.3 において WPH で肝臓トリグリセリド蓄積の抑制作用が見られた。また、Exp.1 ではアミノ酸添加群で肝臓脂質蓄積は低下しなかったが Exp.3 においてロイシンとバリンを強化した群では有意に低下していたことから、Exp.1 でのアミノ酸量ではトリグリセリドの蓄積抑制作用は弱かったこと、アミノ酸での肝臓脂質蓄積抑制には BCAA の量に関連していることが示された。さらに Ca の添加量の因子において有意な差は見られなかったため、肝臓脂質の蓄積抑制作用は、アミノ酸が同組成の場合は WPH で顕著にみられる作用であり、Ca 添加量に影響されないことが示唆された。

肝臓の mRNA 発現量を測定すると、Exp.1 では ACC が WPH を添加(10%)することで有意に発現が低くなっていた。炎症マーカーは WPH 群で MCP-1 の発現が抑制された。糖質が分解されて生成されるグルコースは最終的にオキサロ酢酸とアセチル CoA に代謝され、このアセチル CoA は ACC によってマロニル CoA になり、FAS によってマロニル CoA を原料として脂肪酸炭素鎖の伸長を行う。また、脂質蓄積によって生じる活性酸素によって MCP-1 の発現が増加する²⁷⁾が、WPH は脂質合成、蓄積を抑制することで活性酸素の産生を低下させ、MCP-1 発現を低下させたことが考えられた。したがって、高ショ糖食を摂取させた場合、WPH は脂肪合成系酵素の mRNA 発現を抑制することで肝臓の脂質蓄積を抑制し、それにより MCP-1 発現を抑制することで炎症を抑制する可能性が示された。また、ACC はインスリン分泌に影響されることが知られているが、インスリン濃度に有意差は見られなかったことから、これらの酵素の発現抑制にはインスリン分泌の調節を介していないことが明らかとなった。

アミノ酸添加群は肝臓トリグリセリド蓄積に有意差は見られなかったが、NADPH オキシダーゼサブユニットの発現を抑制した。WPH と同じアミノ酸組成であるため、BCAA や抗酸化アミノ酸のシステインが多く含まれている。また、アミノ酸はミトコンドリアに直接流入する。そのため、アミノ酸は脂質蓄積には影響しないが、ミトコンドリアに直接流入し、NADPH オキシダーゼサブユニット発現を抑制することで活性酸素の産生を低下させ、炎症を抑制する

ことが考えられた。また、炎症マーカーの発現に関して、Olha ら^{3D)}が、高濃度の BCAA は NADPH オキシダーゼを活性化すると報告していることから、ロイシンおよびバリンを強化した Exp.3 では CO 群と比べて NADPH オキシダーゼサブユニットに差が無かったと考えられ、Exp.1 での炎症抑制作用はシステインによるものである可能性が考えられた。

一方、Exp.3 では肝臓の脂質合成系、および脂質分解系の mRNA 発現に有意差はなかったものの、ACOX の酵素活性がロイシン、バリン強化群(LV 群)で有意に高くなった。肝臓では β 酸化が行われており、PPAR α に制御される ACOX はペルオキシソームでの β 酸化に関わっている。ミトコンドリアでの β 酸化に関わる mtGPAD の遺伝子発現は有意な差は見られなかったことから、細胞内ペルオキシソームでの β 酸化が活性化していることが考えられた。このことから、ロイシンおよびバリンといった BCAA は ACOX の発現量に変化は起こさないが、酵素そのものの活性を高めることで β 酸化を活性化させ、脂質の蓄積を抑制する可能性が示された。

また、WPH 群は LV 群よりも BCAA 量が少ないにも関わらず、ACOX の活性が高くなっていた。WPH とアミノ酸は、それぞれ小腸に存在する吸収経路が異なるため、門脈のアミノ酸組成の検討を Exp.2 で行った。その結果、遊離アミノ酸濃度は WPH 添加群よりもアミノ酸添加群で有意に高く、ロイシンの濃度もアミノ酸群で有意に高値を示した。一方、門脈中ペプチド濃度は各群間で有意差が見られなかった。このことから、WPH はアミノ酸よりも早く吸収される可能性が示された。WPH はジ・トリペプチドが主体であり、H⁺駆動型トランスポーターである PEPT1 から吸収される。一方、アミノ酸は Na⁺駆動型トランスポーターであるアミノ酸トランスポーターから吸収される。Exp.3 の WPH 群と LV 群にはペプチドの含有量に違いがあり、ペプチドは吸収された後標的器官に直接流入することが報告されている³³⁾ため、アミノ酸に分解されなかった一部のペプチドにより、LV 群よりも少ない BCAA 量でも肝臓への流入がより速かったため同じような効果が見られたと考えられた。あるいは、遊離アミノ酸濃度の差から、アミノ酸流入量の違いによるアミノ酸シグナルの差も要因として考えられる。

Exp.3 の炎症マーカーの発現を測定すると、マクロファージの指標である F4/80 が WPH 群で CO 群と比べて有意に低値であった。F4/80 は、脂質が蓄積することで生じる活性酸素によって MCP-1 が増加すると、マクロファージが誘導されることで増加する。WPH は β 酸化を活性化させ脂質蓄積を抑制したことから活性酸素の産生を抑え、F4/80 も抑制したと考えられた。LV 群も同じメカニズムで脂質蓄積をしているにも関わらず F4/80 に変化が見られなかったことから、吸収速度または抗酸化作用を有するペプチドの配列に関わっている可能

性がある。また、活性酸素の産生を抑制していることを確認するため、今後酸化ストレスマーカーを測定する必要がある。

以上の結果から、WPH は Ca 添加量およびインスリン濃度に依存せず、肝臓トリグリセリド蓄積を抑制する可能性が示唆された。さらに、そのメカニズムとして、高ショ糖食を摂取させた場合は ACC 発現を抑制することによる脂質合成系の抑制、高脂肪食を摂取させた場合はペルオキシソームでの β 酸化に関わる ACOX の活性化によるものであることが示された。また、WPH は、高ショ糖食においては脂質合成抑制による MCP-1 発現抑制、高脂肪食においては脂質分解を促進することで蓄積を抑制し、その結果 F4/80 の発現を抑制することで炎症を抑制することが示された。これらの要因として、過去の報告からアミノ酸配列に含まれる BCAA¹⁷⁾や、アミノ酸流入量の違いによるアミノ酸シグナルの差が関連していると考えられる。

アミノ酸に関しては、Exp.3 にて WPH 中に多く含まれている BCAA のうち、バリンおよびロイシンを強化した食餌を摂取させると、強化させなかった Exp.1 では見られなかった肝臓トリグリセリド量の有意な低下が認められ、さらに ACOX の活性化が見られた。ACOX の活性化機構は不明であるが、これらの結果から、バリンおよびロイシンの添加量を増やすことにより ACOX の酵素活性を高め β 酸化を活性化させることで、肝臓脂質蓄積低下作用が見られる可能性が示された。また、Exp.1 にて NADPH オキシダーゼのサブユニットの発現の抑制は抗酸化アミノ酸であるシステインが要因である可能性が考えられた。WPH とは異なる結果が得られたことから、それぞれ異なるメカニズムで肝臓の炎症の惹起を抑制していることが示された。

今回の研究では、WPH およびアミノ酸を添加することで血清トリグリセリド濃度が有意に増加した。これは、肝臓のアミノ酸濃度が上昇すると mTOR が活性化されることで、神経シグナルを介して LPL の発現が低下するためである²⁴⁾。そのため、今後は血清中の脂質のプロフィールを解析する必要がある。飼料に関しては、WPH の添加量を 10% に設定したため、今後は WPH の添加量を 10% 以上にした場合どのような作用が見られるか、用量反応性が見られるか検討する必要がある。また、今回コントロールとして使用したカゼインも WPH と同じく乳由来であるため、カゼインをコントロールとしない場合の検討も必要である。ペプチドについては、WPH のアミノ酸組成特有のペプチドについては、WPH 中の特定のアミノ酸配列が肝臓脂質蓄積抑制作用や抗炎症作用を示している可能性もあるため、今後さらなる調査が必要である。

第5章 謝辞

本博士論文は、筆者が大妻女子大学大学院人間文化研究科人間生活科学専攻生活素材学専修課程在学中に栄養学研究室でまとめたものです。本論文を書き終えるにあたり、本研究に関して、終始手厚いご指導いただいた青江誠一郎教授、高波嘉一教授、田中直子教授には大変お世話になりました。指導教授でもある青江誠一郎教授は、お忙しい中、実験に関わることでなく、学会発表時の資料作成なども一から手厚くご指導いただきました。深く感謝いたします。また、共同研究していただいた雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所の奈良貴幸様、加藤健様にもこころより感謝申し上げます。本研究の一部は大妻女子大学人間生活科学研究所の「大学院生研究助成」のご支援を頂き、実施したことを御礼申し上げます。

大学院で生活するにあたり、本学博士課程 2 年の山中千恵美様、山形大学地域教育文化学部地域文化学科助教の山岸あづみ様、株式会社日本バリアフリーの加藤美智子様には、実験技術のご指導だけでなく、公私にわたる様々な場面で大変お世話になりました。また、本研究室の妹尾琴絵助手、不破美貴助手にも学生生活での事務処理および解剖時の補助など多岐に渡りサポートしていただきました。深く感謝申し上げます。

最後に、実家を離れても様々な面で支え続けてくれた両親、祖父母、ならびに妹、私を支えてくれた友人に感謝の意を表します。

人間文化研究科 人間生活科学専攻
栄養学研究室
工藤 陽香

平成 29 年 1 月 31 日

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室 平成 27 年国民健康・栄養調査の概要
- 2) 厚生労働省 健康日本 21
- 3) Day CP,James OF. 1998. Steatohepatitis. a tale of two 'hits?' *Gastroenterology* 114(4),842-855.
- 4) 中村正 肥満とメタボリックシンドローム:生活習慣病の最前線 P.15 中山書店(2005)
- 5) Zemel MB,Richards J,Mathis S,Milstead A,Gehardt L and Silvia E. 2005. Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects. *International journal of Obesity* 29,391-397.
- 6) Zemel,M.B.,Shi,H.,Greer,B.,Dirienzo,D.,and Zemel,P.C. 2000. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.*,14.1132-1138.
- 7) Zemel,M.B. 2003. Role of dietary calcium and dairy products in modulating adiposity. *Lipids*,38,139-146.
- 8) Ahmed,A.A.,McCarthy,R.D.and Porter,G.A. 1979. Effect of milk constituents on hepatic cholesterol-genesis. *Atherosclerosis*,32,347.
- 9) Essam M Hamad, Soad H Taha,Abdel-Gawad I Abou Dawood,Mahmoud Z Sitohy,and Mahmoud Abdel-Hamid. 2011. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats;*Lipids Health Dis.*10,57
- 10) Nagaoka,S.,Kanamaru,Y.and Kuzuya,Y. 1991. *Agric.Biol.Chem.*,55,813.
- 11) 山田明夫 乳タンパク質分解物の機能と応用への新たな可能性, 酪農科学シンポジウム(2016)
- 12) Shertzer HG, Woods SE, Krishan M, Genter MB, Pearson KJ. 2011. Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet., *J Nutr.*, 141(4),582-7.
- 13) Essam M Hamad, Soad H Taha, Abdel-Gawad I Abou Dawood, Mahmoud Z Sitohy, and Mahmoud Abdel-Hamid. 2011. Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats. *Lipids Health Dis.* 10, 57.
- 14) Wei Sheng Yan Jiu. 2011. Department of Nutrition and Food Hygiene,School of Radiation medicine and Public Health,Soochow University,Suzho China Sep,40(5),617-9.
- 15) 山口真, 他 日本病態栄養学会誌, 6(3), 249(2003)
- 16) 糸久枝, 他 日本病態栄養学会誌, 8(1), 15-21(2005)

- 17) Ye Ma.,Jie Haiming Shi., and Liangli (Lucy) Yu. 2016. Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. *J. Dairy Sci.* 99,6902-6912.
- 18) Yiyang Zhang,Kaiyang Guo,Robert E. LeBlanc,Daniella Loh,Gary J. Schwartz and Yi-Hao Yu. 2007. Increasing Dietary Leucine Intake Reduces Diet-Induced Obesity and Improves Glucose and Cholesterol Metabolism in Mice via Multiple Mechanisms. *Diabetes*, 56(6), 1647-1654.
- 19) Ali Nairizi,Pengxiang She et al. 2009. Leucine Supplementation of Drinking Water Does Not Alter Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Mice. *J.Nutr.* 139(4),715-719.
- 20) Yazmin Macotela, Brice emanuelli, Anneli M.Bang, Daniel O.Espinoza, Jeremie Boucher, Kirk Beebe, Walter Gall, and C.Ronald Lahn. 2011. Dietary Leucine-An Environmental Modifier of Insulin Resistance Acting on Multiple Levels of Metabolism.*PLoS ONE*, 6(6), e21187.
- 21) 工藤陽香 マウスの耐糖能, 肝臓脂質蓄積および炎症に及ぼす食餌性カルシウムと乳清たんぱく質の影響(2014)
- 22) Chiemi Yamanaka, Sachie Ikegami, Seiichiro Aoe. 2011. Effects of Amount and Chemical form of supplemental calcium on abdominal fat accumulation in KK mice.*J jpn Soc Nutr Food Sci.* 64,385-391.
- 23) Zemel, MB., H. Shi, B.Greer, D. Dirienzo, and P.C.Zemel. 2000. Regulation of adiposity by dietary calcium.*FASEB J.*14:1132-1138
- 24) Uno K, Yamada T, Ishigaki Y, Imai J, Hasegawa Y, Sawada S, Kaneko K, Ono H, Asano T, Oka Y, Katagiri H.2015. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nat Commun.* 13,6,7940.
- 25) 小林敏也 ホエイペプチド(HW-3)の栄養健康効果について *Milk Science.*2012.61,3.
- 26) Shertzer HG, Woods SE, Krishan M, Genter MB, Pearson KJ. 2011. Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet. *J Nutr.* 141(4),582-7.
- 27) 小塚智沙代, 屋比久浩市, 益崎裕章 酸化ストレスとメタボリックシンドローム *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY.*2012. 19(2),125
- 28) T. Matsuzaka, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, S. Tomita, M. Sekiya, A.

- Hasty, Y. Nakagawa, H. Sone, H. Toyoshima, S. Ishibashi, Jun-ichi Osuga and N. Yamada. 2004. Insulin-Independent Induction of Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c Expression in the Livers of Streptozotocin-Treated Mice. *Diabetes*. 53(3), 560-569.
- 29) Eller LK, Reimer RA. 2010. Dairy protein attenuates weight gain in obese rats better than whey or casein alone. *Obesity (Silver Spring)*. 18(4), 704-11.
- 30) Motoh Iwasa et al. 2013. Branched-Chain Amino Acid Supplementation reduces Oxidative Stress and Prolongs Survival in Rats with Advanced Liver Cirrhosis. *PLoS ONE*. 8(7)
- 31) 矢ヶ崎一三, 門脇基二, 舩重正一, 横越英彦 アミノ酸の機能特性—ライフサイエンスにおける新しい波— 建帛社
- 32) Olha Zhenyukh et al. 2017. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free Radic Biol Med*. 104, 165-177
- 33) Samuel Mburu Kamau, Rong-Rong Lu, Wei Chan, Xiao-Ming Liu, Feng-Wei Tian, Yi Shen et al. 2010. Functional Significance of Bioactive Peptides Derived from Milk Proteins. *Food Reviews International*. 26, 386-401.
- 34) Rubio LA. 2011. Differences in portal flow rates of amino acids and liver composition between rats fed casein or lactalbumin. *Arch Anim Nutr*. 65(6), 497-511.
- 35) Rubio LA, Clemente A. 2010. Molecular size distribution affects portal absorption rate of casein amino acid in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 94(5), e145-53.
- 36) Schneeman BO, Rice R, Richter BD. 1989. Reduction of plasma and hepatic triacylglycerides with whole milk-containing diets in rats. *J Nutr*. 119(7), 965-70.
- 37) Morishita S, Ono T, Fujisaki C, Ishihara Y, Murakoshi M, Kato H, Hosokawa M, Miyashita K, Sugiyama K, Nishino H. 2013. Bovine

lactoferrin reduces visceral fat and liver triglycerides in ICR mice. *J Oleo Sci.*,62(2),97-103.

- 38) Su GL. 2002. Lipopolysaccharides in liver injury.: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283(2),256-65.
- 39) Tsutsumi R, Horikawa YT, Kume K, Tanaka K, Kasai A, Kadota T, Tsutsumi YM. 2015. Whey Peptide-Based Formulas With ω -3 Fatty Acids Are Protective in Lipopolysaccharide-Mediated Sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 39(5),552-61.