

短報

たんぱく質欠乏食がマウスの肝臓及び血清脂質に及ぼす影響

中村 博 範^{*1}

1. 緒言

たんぱく質欠乏を主な原因とするクワシオルコルでは、低アルブミン血症や低血糖症に加え、脂肪肝が起こることが知られている¹⁾。肝臓の脂質量は動的平衡が維持されており、肝臓で合成されたトリグリセリドやコレステロールは、リン脂質やアポたんぱく質とともに超低密度リポたんぱく質 (VLDL: very low-density lipoprotein) となり肝外に排泄される (図1)。そのため、通常は肝臓に脂質が過剰に蓄積することはない。しかし、飢餓などの低栄養や肥満などの過栄養の両面において肝臓への脂質の蓄積が認められる²⁾。肝臓への脂質の蓄積は、糖質および脂質の過剰摂取による脂質合成の亢進、脂肪組

織から肝臓への脂質の流入の増加、肝臓における脂肪酸酸化の低下、肝臓からの脂質の分泌障害のいずれか、またはこれらの組合せにより生じる³⁾。過栄養による肝臓への脂質の蓄積は、過剰摂取による肝臓での脂質合成の亢進と脂肪組織から肝臓への脂肪酸の過剰な流入が主な原因として考えられている⁴⁾。一方、低栄養による脂肪の蓄積については、過栄養とは異なる機序によって起こると考えられるがまだ定かではない。

そこで、本研究では、たんぱく質欠乏食がマウスの肝臓及び血清脂質に及ぼす影響について調べ、肝臓への脂質の蓄積の機序について検討を加えた。

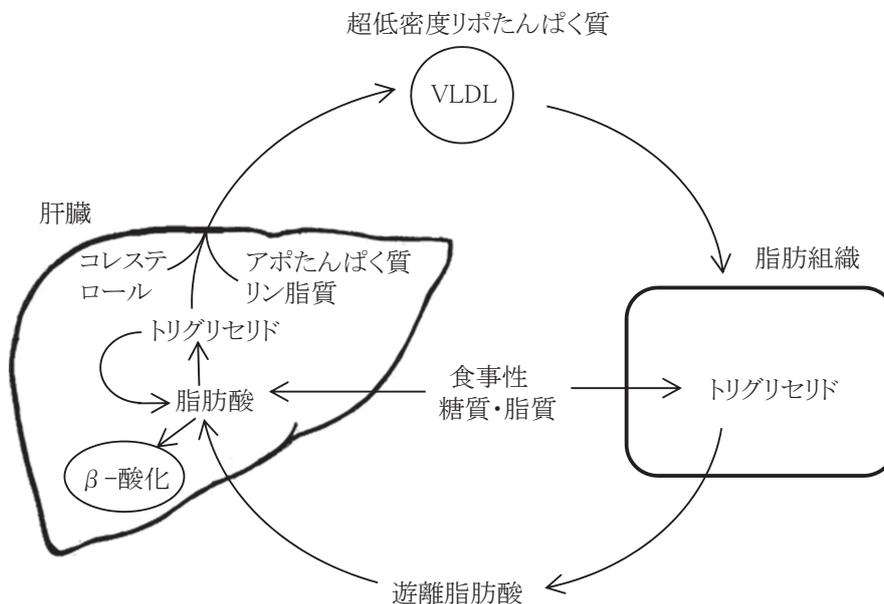


図1 肝臓と脂肪組織の脂質代謝の関係

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科
 (連絡先) 中村博範 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学
 E-mail: hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

2. 方法

2.1 試薬

分析に用いた試薬は、いずれも和光純薬工業（大阪府）から購入したものを使用した。また、水はミリポア（東京都）の超純水製造装置（Simpli Lab）の純水を使用した。

2.2 実験動物及び飼料

7週齢のC3Hマウス（雄・C3H/HeJcl）を日本クレア（東京都）から購入して使用した。飼料は、粉末原料をオリエンタル酵母工業（東京都）から購入し、オリエンタル配合に準じて調製した。それぞれの飼料組成を表1に示した。標準食（Standard diet; ST）は25%カゼイン食、たんぱく質欠乏食（Protein-deficient diet; PD）は1%カゼイン食とし、熱量を α -コーンスターチで標準食と等しくなるように調整した。ビタミンやミネラルについては、すべて同量とした。各飼料は、粉末原材料等に一定量の水を加えて練り、成型し乾燥させ準備した。

2.3 実験飼育

7週齢のC3HマウスをSTで1週間予備飼育をしたあと、標準食群（ST群、5匹）とたんぱく質欠乏食群（PD群、5匹）の2群に分け、各飼料で4週間飼育を行った。飼育は、マウス用の小型ケージを用いて行い、1ケージに1匹とした。また、飼料と水は自由摂取とし、体重と摂食量を毎日定時に測定した。飼育環境は、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ とし、明暗サイクルを12時間（明期8:00-20:00）とした。

飼育終了後、一晚（15時間以上）絶食させ、血液、臓器を採取した。採血は、イソフルラン麻酔下で開腹して下大静脈から行った。採血後、血液をマ

イクロチューブに入れ、室温に30分置いてから遠心分離して血清を採取した。臓器は、肝臓、腎臓、心臓、腓腹筋、脳、小腸を採取し、それぞれ湿重量を測定した。血清および肝臓は、分析まで冷凍保存（ -50°C ）した。

本動物実験は、川崎医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号13-006）。

2.4 肝臓の脂質量の測定

肝臓脂質の抽出は、Folch法⁵⁾で行った。肝臓のホモジネートとクロロホルム-メタノール混合液を混和して脂質を抽出し、遠心分離して有機層を分離した。有機層を秤量した試験管に回収し、有機溶媒を完全に除去して、脂質量を求めた。

肝臓脂質中のトリグリセリド量とコレステロール量は、抽出した脂質をイソプロパノールで溶解し、和光純薬工業の測定キット（トリグリセライドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコー）を使用して測定した。

2.5 血清成分の測定

血清中総たんぱく質濃度は、血清を純水で400倍希釈してLowry法⁶⁾で測定した。血清中のトリグリセリド、総コレステロール、遊離脂肪酸、グルコースは、それぞれ和光純薬工業の測定キット（トリグリセライドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコー、NEFA C-テストワコー、グルコースC-テストワコー）を使用して測定した。

2.6 統計処理

値は平均値 \pm 標準誤差で示した。2群間の比較はStudent's t-testで行い、p値0.05未満（ $p < 0.05$ ）を有意差ありとした。統計処理ソフトは、IBM SPSS Statistics 22を使用した。

表1 実験に用いた飼料組成 (g/kg)

原材料	標準食 ¹⁾ (ST)	たんぱく質欠乏食 ²⁾ (PD)
カゼイン	250	10
コーンスターチ	380	380
α -コーンスターチ	100	340
スクロース	50	50
大豆油	60	60
セルロースパウダー	80	80
ミネラル混合 ³⁾	60	60
ビタミン混合 ³⁾	20	20

¹⁾ 標準食(ST)は25%カゼイン食とし、オリエンタル酵母工業のオリエンタル配合に準じて調製した。

²⁾ たんぱく質欠乏食(PD)は、1%カゼイン食とし、熱量を α -コーンスターチで調整した。

³⁾ ミネラル混合及びビタミン混合は、オリエンタル酵母工業のオリエンタル配合を使用した。

3. 結果

3.1 体重変化および総摂食量

実験飼育期間の体重変化及び総摂食量を表2に示した。体重は、開始時と終了時を比較すると、ST群では有意に増加したのに対し、PD群では有意に減少した。総摂食量(g/28日)は、ST群と比較してPD群は有意に低値であった。

3.2 臓器重量

実験飼育終了時における各群の臓器重量(mg)を表3に示した。臓器重量は、ST群と比較してPD群では脳以外は有意に低値となり、肝臓と腎臓は、いずれもST群の1/2以下の重量であった。

3.3 肝臓の脂質量

各群の肝臓中の脂質量(mg/g liver)を表4に示した。総脂質量は、ST群と比較してPD群では有意に高値であった。また、トリグリセリド量とコレ

表2 実験飼育期間中の各群の体重変化及び総摂食量¹⁾

	標準食 (ST)	たんぱく質欠乏食 (PD)
開始時体重 (g)	23.2 ± 0.4	23.1 ± 0.5
終了時体重 (g)	27.0 ± 0.6 ^{a)}	15.2 ± 0.2 ^{a) b)}
体重変化量 (g)	3.8 ± 0.4	-7.9 ± 0.3 ^{b)}
総摂食量 (g/28日)	100.5 ± 1.4	82.4 ± 1.4 ^{b)}

¹⁾ 数値は、平均値±標準誤差を示す。

^{a)} 開始時体重に対して有意差 (p<0.05) あり。

^{b)} 2群間で有意差 (p<0.05) あり。

表3 実験飼育終了時の臓器重量

	標準食 ¹⁾ (ST)	たんぱく質欠乏食 ¹⁾ (PD)	PD/ST ²⁾ (%)
肝臓	906 ± 20	432 ± 13 ^{a)}	47.6
腎臓	379 ± 16	185 ± 3 ^{a)}	48.8
心臓	87 ± 2	63 ± 2 ^{a)}	72.2
腓腹筋	220 ± 5	143 ± 3 ^{a)}	65.0
小腸	685 ± 29	384 ± 39 ^{a)}	56.1
脳	367 ± 5	362 ± 22	98.7

¹⁾ 各臓器の湿重量 (mg) を平均値±標準誤差で示す。

²⁾ STの平均臓器重量に対するPDの平均臓器重量を割合として百分率 (%) で示す。

^{a)} 2群間で有意差 (p<0.05) あり。

ステロール量は、PD群は有意に高値であった。さらに、脂質の割合は、ST群と比較して、PD群では、トリグリセリドの割合が有意に高値を示し、逆に、その他の脂質の割合は有意に低値であった。

3.4 血清データ

各群の血清データの結果を表5に示した。血清中のトリグリセリドと総コレステロールは、ST群と比較して、PD群では有意に低値であった。遊離脂肪酸は、ST群とPD群に有意な差はなかった。総たんぱく質とグルコースは、ST群と比較してPD群は有意に低値であった。

4. 考察

4.1 たんぱく質欠乏食と栄養状態

実験飼育の開始時体重と終了時体重を比較すると、25%カゼイン食を与えたST群では、有意な体重増加があったのに対し、1%カゼイン食を与えた

PD群では、有意な体重減少がみられた。また、臓器重量は、脳を除きST群と比較してPD群では有意に低値であった。そのため、PD群では、体たんぱく質の分解が合成を上回った状態であったと考えられる。また、血清総たんぱく質濃度はST群と比較してPD群では有意に低値であった。血清たんぱく質は、肝臓でのたんぱく質合成を反映することから、PD群では、肝臓でのたんぱく質合成が低下していたと考えられる。次に、PD群は、ST群と比較して血中グルコース濃度（血糖値）が有意に低値となり、低血糖状態となっていた。血糖値は、絶食時においても肝臓のグリコーゲン分解や糖新生によって維持される。しかし、PD群では、肝臓容積の低下によってグリコーゲン貯蔵量が低下したことや、また、糖新生の原料となるアミノ酸の不足によって内因性のグルコース産生が低下していた可能性がある。血糖値の低下は、アドレナリンや副腎皮質ホ

表4 肝臓中の脂質量¹⁾

	標準食 (ST)		たんぱく質欠乏食 (PD)	
	mg/g liver	% ²⁾	mg/g liver	%
総脂質	57.9 ± 2.8	-	89.0 ± 9.3 ^{a)}	-
トリグリセリド	21.9 ± 2.1	38.0 ± 3.9	57.0 ± 9.0 ^{a)}	63.1 ± 4.0 ^{a)}
コレステロール	2.9 ± 0.1	5.1 ± 0.4	4.9 ± 0.6 ^{a)}	5.5 ± 0.3
その他の脂質 ³⁾	33.1 ± 3.2	56.9 ± 4.0	27.1 ± 2.1	31.4 ± 4.0 ^{a)}

¹⁾ 数値は、平均値±標準誤差を示す。

²⁾ 総脂質量を100%とした時の割合を示す。

³⁾ 総脂質量からトリグリセリド量とコレステロール量を差し引いた値。

^{a)} 2群間で有意差 (p<0.05) あり。

表5 血清データ¹⁾

	標準食 (ST)	たんぱく質欠乏食 (PD)
トリグリセリド (mg/dL)	136 ± 11	86 ± 6 ^{a)}
総コレステロール (mg/dL)	149 ± 6	63 ± 7 ^{a)}
遊離脂肪酸 (mmol/L)	0.96 ± 0.02	1.06 ± 0.06
総たんぱく質 (g/dL)	5.9 ± 0.1	4.5 ± 0.1 ^{a)}
グルコース (mg/dL)	184 ± 14	53 ± 4 ^{a)}

¹⁾ 一晩絶食後に採血して得た血清を用いた。数値は、平均値±標準誤差を示す。

^{a)} 2群間で有意差 (p<0.05) あり。

ルモンの分泌を高め、体たんぱく質の分解や脂肪組織の脂肪分解を促すため、PD群はST群と比較して、体重が有意に低値となったと考えられる。

4.2 肝臓への脂質の蓄積

図1に肝臓と脂肪組織の脂質代謝の関係を示した。肝臓への脂質の蓄積は、糖質および脂質の過剰摂取による脂質合成の亢進、脂肪組織から肝臓への脂質の流入の増加、肝臓における脂肪酸酸化の低下、肝臓からの脂質の分泌障害などのいずれか、またはこれらの組合せにより生じる³⁾。

まず、1つ目の脂質合成の亢進については、ST群とPD群の摂取量を比較すると、PD群はST群の8割程度の摂取であった。しかし、PD群の飼料はα-コンスターチ（糖質）の割合が高いため、PD群の糖質の摂取量は、ST群よりも高かったと考えられる。門脈から肝臓に取り込まれたグルコースは、グリコーゲンとして貯蔵されるが、その貯蔵量には限界があるため、グルコースから脂肪酸が合成される。低たんぱく質で飼育されたラットでは、脂

肪酸合成の律速酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼの発現が高まることが報告されている⁷⁾。

したがって、PD群では、肝臓での脂肪酸合成が高まっていた可能性がある。次に、2つ目の肝臓への脂質の流入については、PD群では遊離脂肪酸濃度が維持されていたことから、一定量の遊離脂肪酸が肝臓に流入していたと考えられる。たんぱく質欠乏では、内因性のグルコース産生の低下によって絶食時に低血糖になりやすい¹⁾。そのため、PD群では、脂肪組織の脂肪分解がST群よりもより生じやすく、肝臓により多くの脂肪酸が流入していた可能性がある。3つ目の脂肪酸酸化の低下については、脂肪酸のβ酸化は、ミトコンドリアで行われるが、ラットを絶食させると、肝ミトコンドリアの変性が起こることが報告されている⁸⁾。また、飢餓時にはオートファジーによってミトコンドリアなどの細胞小器官の分解が起こることが知られている⁹⁾。さらに、ミトコンドリアでの脂肪酸の利用においてはリシンやメチオニンから合成されるカルニチンが必要¹⁰⁾と

なるが、たんぱく質欠乏ではカルニチンの合成が低下していたと考えられる。したがって、ミトコンドリアの機能や量の低下によって、脂肪酸の利用が低下していた可能性はある。最後に、肝臓からの脂質の分泌については、PD群は、ST群と比較して血清トリグリセリドとコレステロールが有意に低値だった。絶食時において、血中には腸管に由来するカイロミクロン（キロミクロン）はないと考えられるので、血清のトリグリセリドやコレステロールは肝臓から分泌されるVLDLを反映する。したがって、PD群では肝臓からのVLDLの分泌が低下していた可能性がある。VLDLの形成においては、リン脂質やアポたんぱく質の合成とリポたんぱく質への脂質の付加が必要となる。リン脂質のホスファチジルコリン（レシチン）の合成においては、含硫アミノ酸のメチオニンからのメチル基の供給が必要である。たんぱく質欠乏ではメチオニン不足によってリン脂質合成が低下しVLDLの形成が低下すると考えられている¹¹⁾。肝臓の脂質の割合をみると、PD群ではリン脂質が大部分を占める「その他の脂質」の割合が低く、リン脂質合成が低下していたと考えられる。また、アポたんぱく質については、たんぱ

く質・エネルギー栄養失調症では合成が低下すると報告されている¹²⁾。血清たんぱく質濃度が低下していたことから、肝臓でのアポたんぱく質合成は低下していた可能性がある。さらに、VLDLの形成においては、リポたんぱく質にトリグリセリドを付加するミクロソームトリグリセリド転送蛋白（MTP: microsomal triglyceride transfer protein）の作用が必要となるが、低たんぱく質で飼育したラットではMTPの発現が低下することが報告されている⁷⁾。したがって、たんぱく質欠乏においては、VLDLの形成が低下し肝外への脂質の排泄が低下すると考えられる。

5. 結語

本実験の結果は、たんぱく質欠乏食を与えたマウスは、肝臓の脂質蓄積が起きることを示した。たんぱく質欠乏においては、VLDLとしての肝外への脂質の分泌が低下し、その一方で、低血糖によって脂肪組織での脂肪分解が高まるため、肝臓への遊離脂肪酸の流入が増え、肝臓に脂質が蓄積すると推察された。

文 献

- 1) Bandsma RH, Mendel M, Spoelstra MN, Reijngoud DJ, Boer T, Stellaard F, Brabin B, Schellekens R, Senga E and Heikens GT: Mechanisms behind decreased endogenous glucose production in malnourished children. *Pediatric Research*, **68**(5), 423-428, 2010.
- 2) 飯島俊彦, 坂本静男, 金子和弘: 脂肪肝の現状. 順天堂医学, **43**(3), 369-376, 1997.
- 3) 福井博: 栄養障害と steatohepatitis—その根底にあるものは何か—. 肝臓, **39**(1), 1-4, 1998.
- 4) 細田四郎, 中條忍, 饗庭昭彦: 栄養性肝疾患. 日本臨牀, **46**(増刊号), 398-401, 1988.
- 5) Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, **226**(1), 497-509, 1957.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**(1), 265-275, 1951.
- 7) Kang W, Lee MS and Baik M: Dietary protein restriction alters lipid metabolism and insulin sensitivity in rats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **24**(9), 1274-1281, 2011.
- 8) 松行真門, 吉田一郎, 弓削建, 木村昭彦, 山下雄: 絶食によるラット肝ミトコンドリアの変化. 肝臓, **28**(2), 264-265, 1987.
- 9) 上野隆: 哺乳類マクロオートファジーの基礎と病態. 化学と生物, **52**(5), 321-327, 2014.
- 10) 石見百江, 下岡里英, 嶋津孝: カルニチンがラットのエネルギー代謝に及ぼす効果. 日本栄養・食糧学会誌, **59**(2), 107-113, 2006.
- 11) 武藤知衣, 谷地理恵子, 小川貴弘, 五十嵐脩, 清瀬千佳子: メチオニン・コリン欠乏食誘発性脂肪肝に対する γ -トコフェロールの改善効果. ビタミン, **88**(7), 366-372, 2014.
- 12) Truswell AS: Pathogenesis of the fatty liver in protein-energy malnutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57**(5), 695-699, 1993.

Effects of Protein-deficient Diets on Liver and Serum Lipids in Mice

Hironori NAKAMURA

(Accepted Jan. 10, 2018)

Key words : protein-deficient, lipid metabolism, fatty liver, mice

Correspondence to : Hironori NAKAMURA

Department of Clinical Nutrition

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : hironori@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.27, No.2, 2018 457 – 462)