報 文

ラットにおける食餌中ビタミン E の生体内抗酸化効果と
摂取たん白質レベルの関係

東 條 仁 美, 宮 崎 基 嘉*

国立栄養研究所母子栄養部, 基礎栄養部*

Antioxidative Action of Vitamin E in the Tissues of Rats Fed
on Diets with Different Protein Levels

Hitomi Tohjo and Motoyoshi Miyazaki*

Divisions of Maternal and Child Nutrition, and Basic Nutrition*, The National Institute of Nutrition

This paper was planned to study the antioxidative action of vitamin E in the tissues of rats fed on diets with different protein levels. The animals were fed basal diets with or without supplementation of vitamin E (*d*, *l*- α -tocopherol) for 4 weeks. The peroxidation of several tissues was examined by the thiobarbituric acid (TBA) assay.

Results obtained were as follows.

The values of TBA in the liver, kidneys and muscle were significantly higher in the vitamin E deficient groups than in the vitamin E supplemented groups.

Statistical difference of TBA values in the liver between vitamin E supplemented groups and vitamin E deficient groups was relatively higher than those in the kidneys and muscle. When the dietary protein level was graded at 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0% nitrogen levels, TBA values in the liver showed no difference among the four protein groups.

Some differences in the liver fatty acid pattern were observed between the vitamin E supplemented groups and the vitamin E deficient groups, i.e., the proportion of palmitic acid of the supplemented groups was significantly lower than that of the deficient groups. But, the proportion of oleic acid of the supplemented groups was significantly higher than that of the vitamin E deficient groups.

Cholesterol in plasma and liver, and the total liver lipids were not significantly different among the vitamin E supplemented groups. It was suggested that vitamin E prevented lipid peroxidation *in vivo*.

Jap. J. Nutr., 36 (4) 159~164 (1978)

目 的

生体内における脂質の代謝には各種のビタミンが促進的あるいは抑制的に作用¹⁾²⁾することが知られている。特にビタミンEについては高度不飽和脂肪酸の過酸化を防止する抗酸化作用を有することが明らかにされつつある。

生体内で過酸化物が生成されると組織細胞が障害され各種臓器に病変が現われる。動物の種類によって著しく相違するが動脈硬化症、肝細胞の壊死、溶血、筋肉の萎縮、脂肪組織の着色などが報告³⁾されている。したがって生体内での過酸化物の生成を防止することは各種疾病の発生を予防し、生体機能を正常に保つために重要である。本実験ではラットを用いて種々のたん白レベルの食餌に *d*, *l*- α -tocopherol (以下ビタミンEと記

す) を添加したものとししないものについて主として生体内での過酸化物生成量を測定した。

実 験 方 法

実験動物として生後3週齢のウィスター系雄ラットを使用し、数日間市販の固型飼料(日本クレア CE-2)で飼育後、体重変化の著しいものを除去し、体重のはほぼ等しいものを用いて試験飼料を投与した。飼育室の室温は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度はほぼ50%に保ち、明暗は蛍光灯で12時間サイクルに調節した飼育室で飼育し、飼料と水は自由摂取とした。

飼料中のたん白レベルは4段階に分け、窒素レベルで1.0%、1.5%、2.0%および3.0%とした。さらに、これら4段階についてビタミンE添加群と無添加群とを作った。したがって全部で8群となり、1群当りのラット数は6匹とした。たん白源としてビタミンフリーカゼイン(和光純薬製)を使用し、これらカゼインのN含量は飼料調製前に測定した。その他の飼料成分は表1に示した。ビタミンEは*d, l*- α -tocopherol(半井化学薬

Table 1 Composition of diets (g/100 g)

Ingredients	N (%)			
	1.0	1.5	2.0	3.0
Casein	7.1	10.6	14.1	21.2
Sucrose	30.0	30.0	30.0	30.0
α -Wheat starch	47.9	44.4	40.9	33.8
Lard	10.0	10.0	10.0	10.0
Salt mixture ¹⁾	4.0	4.0	4.0	4.0
Cellulose powder	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamin E ²⁾	0 or 10	0 or 10	0 or 10	0 or 10
Other vitamins ³⁾	Added	Added	Added	Added

1) Marmesh Johnson No. 446 salt [J. Nutr., 65, 161 (1958)]

2) *d, l*- α -tocopherol, (mg)

3) M. Miyazaki et al. [J. Jap. Soc. Food and Nutr., 35, 174 (1960)]

品)を使用し、添加群の飼料 100 g につき 10 mg の割合に添加した。その他のビタミン類と塩化コリンは宮崎ら⁴⁾の方法に従って十分量を投与した。飼料調製後、飼料中の脂質酸化を防止するため使用時以外はビニール製の袋に入れ密封し、 -20°C の冷凍庫中に保存した。

飼料の投与は一定量を水で練って団子状として与え、残量を常法に従い 105°C で乾燥し、投与量を求めた。

4週間にわたる実験期間終了後12時間絶食(ただし飲水は自由)させたのち、断頭して採血し、手早く肝臓、腎臓、筋肉の摘出を行ない、直ちに -20°C の冷凍庫に入れて組織の変性が起こらぬよう注意した。肝臓、腎臓および筋肉については過酸化物の生成量を知るため TBA 値を測定した。各臓器の TBA 値の測定は試料 1 g を 0.1M リン酸緩衝液 pH 7.4 でホモゲナイズし、最終容量を 100 ml とし、測定は Bieri と Anderson⁵⁾の法に準じた。その方法を略記すると、サンプルを軽く遠心し(1500 rpm. 10分)その上澄 2 ml に 10% TBA (トリクロール酢酸)溶液 1 ml と 1% TBA 酢酸溶液 2 ml を加え、 37°C 湯浴中で約 1 時間インキュベイトし、冷却後、遠心分離(3000 rpm. 15分)し、上澄液について 535 m μ で吸光度を測定した。

また血液については血清コレステロールを、肝臓についてはコレステロールと総脂質量を測定した。コレステロールの測定は Sperry と Webb の法⁶⁾に従い定量し、総脂質量はソックスレー抽出法により重量測定を行

なった。また肝臓の脂肪酸組成をStoffel⁷⁾らの法に準じて分析した。すなわち、肝組織1gを100 mlのFolch液で抽出し、メチル化を行なったのち大倉理研802型ガスクロマトグラフィーで分析した。ゼライト545を固定相、16% DEGSを液相とした充填剤を用いたステンレスカラムを装着し、カラム温度185°Cキャリアガスは窒素、検出器は水素炎イオン化検出器を用いた。

実験結果

各段階のたん白レベル (N1.0~3.0%) におけるビタミンE添加群 (E₁₀) と無添加群 (E₀) の体重増加量、肝臓重量、N摂取量、N効率を表2、表3に示した。なお、実験の都合上実験を2回に分けて実施したが、そ

Table 2 Body weight gain, liver weight and nitrogen efficiency (Exp. 1)

Groups		Body weight gain (g/4 weeks)	Liver weight (g)	Liver weight Body weight (%)	N-intake (g/4weeks)	N-efficiency ¹⁾
N (%)	E (mg/100 g)					
1.0	0	49.3±3.3 ²⁾	3.2±0.9	3.4	2.3±0.3	21.4
1.0	10	50.3±3.5	3.6±0.8	3.9	2.4±0.4	21.3
1.5	0	120.2±3.1	6.0±0.3	3.5	5.4±0.6	22.3
1.5	10	120.7±4.8	6.3±0.6	3.7	5.5±0.6	22.0
2.0	0	149.2±3.7	8.2±1.0	4.0	7.3±0.7	20.4
2.0	10	156.5±2.5	8.5±0.9	4.0	7.9±0.8	19.7

1) Body weight gain (g)/N-intake (g)

2) Mean±S. E. of six rats

Table 3 Body weight gain, liver weight and nitrogen efficiency (Exp. 2)

Groups		Body weight gain (g/4 weeks)	Liver weight (g)	Liver weight Body weight (%)	N-intake (g/4 weeks)	N-efficiency ¹⁾
N (%)	E (mg/100 g)					
1.5	0	126.5±3.1 ²⁾	7.0±0.8	3.9	5.7±0.6	22.2
1.5	10	127.9±2.9	7.2±0.9	3.9	5.8±0.6	22.0
3.0	0	171.7±3.5	11.6±0.7	4.2	11.6±0.7	14.0
3.0	10	162.7±3.6	11.0±1.1	4.2	11.2±0.8	14.5

1) Body weight gain (g)/N-intake (g).

2) Mean±S. E. of six rats.

れぞれ実験1、2として表2、3に示した。

体重増加量、N摂取量はともにたん白レベルの上昇に伴ない増加し、N効率はN 1.5%群で最高を示した。次に、ビタミンE添加群と無添加群との体重増加量はいずれのたん白レベル群でも両者の間に有意差はみられなかった。一方、肝臓重量はたん白レベルの上昇に伴って増加したが、体重100 g当りで計算すると各群ともほぼ同じ割合を示した。

各たん白レベルの肝臓、腎臓および筋肉のTBA値を表4、表5に示した。肝臓におけるTBA値はすべてのたん白レベル群ともビタミンE無添加群が添加群よりも高い値を示し、推計学的に有意差を認めた。すなわちビタミンEが体内で抗酸化的に作用したと考えられる。同様に腎臓、筋肉においてもビタミンE無添加群が添

加群より高い TBA 値を示したが、肝臓に認められたほどの差異はみられなかった。一方、たん白レベルを変えたとき、肝臓の TBA 値は各たん白レベル群の間に有意差は認められなかった。

次に N1.5% 群と 3.0% 群における血清と肝臓におけるコレステロール量、および脂質量を表 6 に示した。同一たん白レベルにおけるビタミン E 添加群と無添加群のコレステロール量、脂質量はともに近似した値を示し、推計学的有意差は認められなかった。

図 1 に示したように N1.5% 群の肝臓中脂肪酸組成はビタミン E 添加群と無添加群の間に若干の差異がみられた。すなわち添加群のパルミチン酸の比率は無添加群に比べ有意に低く、逆にオレイン酸では

Table 4 Effect of dietary protein and vitamin E levels on TBA values of rat liver¹⁾

Groups		TBA values ²⁾
N (%)	E (mg/100 g)	(OD/0.2 g×10)
1.0	0	3.4±0.6
1.0	10	1.5±0.4)*
1.5	0	4.1±0.6
1.5	10	1.7±0.7)*
2.0	0	4.5±1.1
2.0	10	1.9±0.4)*

1) Mean±S. E. of six rats.

2) Absorbancy at 535 mμ.

* Significantly different at p < 0.01.

Table 5 Effect of dietary protein and vitamin E levels on TBA values of various tissues¹⁾

Groups		TBA values		
N (%)	E (mg/100 g)	Liver	Kidney (OD/0.2 g×10)	Muscle
1.5	0	4.1±0.4	1.6±0.5	0.6±0.4
1.5	10	1.7±0.6)*	0.7±0.3)*	0.4±0.3
3.0	0	3.1±0.8	1.7±0.5	0.5±0.4
3.0	10	0.5±0.7)*	0.8±0.8)*	0.4±0.2

1) Mean±S. E. of six rats.

* Significantly different at p < 0.01.

Table 6 Contents of lipid and cholesterol in plasma and liver¹⁾

Groups		Total cholesterol		
N (%)	E (mg/100 g)	Liver lipid (mg/g)	Plasma (mg/dl)	Liver (mg/g)
1.5	0	122.5±4.1	88.3±3.1	5.1±1.0
1.5	10	120.8±4.4	96.3±3.8	5.6±1.0
3.0	0	130.8±4.8	112.2±3.0	4.9±0.8
3.0	10	131.8±3.6	111.3±4.4	4.8±1.0

1) Mean±S. E. of six rats.

有意の高値を示した。しかし、パルミチン酸とオレイン酸以外の脂肪酸については両群の間に著しい差異を認めなかった。

考 察

不飽和脂肪酸の過酸化物としては一般にマロンアルデヒドが知られている。この生成量を測定する方法とし

て TBA 法を用いた。

飼料中にビタミンEを添加しなかった群では添加群に比べ高い TBA 値を示したのであるから、ビタミンEが生体内で抗酸化作用を示した事は確かである。しかもこの値は臓器の種類によって差異がみられた。すなわち、肝臓では腎臓や筋肉よりも TBA 値の高値を示した。この事は肝臓が腎臓や筋肉よりもより脂質の酸化的影響を強く受けたものと推定される。J.G. Bieri⁹⁾ らもラットにおいて、

肝臓、率丸、腎臓、筋肉の順に高値を示し、ニワトリでは脳で最も高値を示す事を報告している。

今回我われはウィスター系のラットを用いて実験を行なったが、L.H. Chen ら⁹⁾ は同様な実験を S.D. 系ラットで行なっているが、カゼインレベルを10% (N 約1.6%) の時にビタミンE無添加群では著明に TBA 値が上昇しており、著者らの無添加群の結果と一致している。一方たん白レベルの変化による TBA 値への影響は Chen らの成績と著者らの結果とは差異がみられた。すなわち著者らは N1.0~N3.0% では TBA 値の変動を認めなかったが、Chen らはカゼインレベルを10%, 20%, 30% に増加するに従い TBA 値は減少することを認めている。この点について Chen らはたん白レベルの増加、特に含硫アミノ酸の増加は過酸化物の生成を抑制する事を示唆している。すなわち、たん白質、含硫アミノ酸はポリペプチド、グルタチオン等の形成に役立ち、形成されたこれら物質は細胞中の脂質過酸化に対してビタミンEの作用と類似した効果を持つと推察している。一方、Tappel¹⁰⁾ らはビタミンE欠乏ラットの肝臓において酵素の不活性化、スルホハイドロ基の減少、細胞内ミトコンドリアやライソゾーム膜の不安定化を認めている。このような細胞内変化に対してたん白量、含硫アミノ酸の増加が間接的にビタミンE欠乏を代償する作用があることを報告している。今回の著者らの実験では N 1.5% から N 3.0% レベルの範囲で行なったが、もう少し高いたん白レベルについて検討する必要がある。

各臓器において前記のようにビタミンE無添加によって過酸化物が増加したので脂肪酸組成にもなんらかの差異が認められるものと考え測定した結果、ビタミンE添加群と無添加群との間にパルミチン酸とオレイン酸の割合に差異がみられた。すなわち、ビタミンE添加群ではパルミチン酸の比率は低く、逆にオレイン酸の比率が大であった。これはビタミンEの存在により不飽和脂肪酸の自動酸化がある程度抑制されたものと思われる。この点について E.D. Will らは¹¹⁾¹²⁾ ビタミンE欠乏時には脂肪酸の過酸化がすすみ、不飽和脂肪酸の比率が減少し、飽和脂肪酸の比率が増加することを報告している。我われの結果もこれとよく似た傾向を示したが、この点については今後もう少し検討していく必要がある。

一方、血清、肝臓中のコレステロール量および総脂質量について J.G. Bieri¹³⁾ らは血清中のビタミンE含量とコレステロール量および総脂質量とは相関していることを報告している。しかし、著者らの実験ではビタミンE添加によってコレステロールや総脂質量に著明な変動は認められなかった。

いずれにしてもビタミンE欠乏実験を行なう時には用いた飼料の組成、特にビタミンEやセレンウムなどの抗酸化剤の存在量が問題になると思われる。今回用いた飼料中には微量のビタミンEがラード、カゼインなど

Fig. 1 Fatty acid pattern of liver

に含まれていると推定されるが、現在これら飼料中の微量のビタミンEを測定することは困難であるから、ラットを完全な欠乏状態に近づけるには過剰のリノール酸を飼料に添加して実験的に欠乏を発現させることが賢明であると思われる。また Chen⁹⁾ らは S.D. 系ラットを用いており、著者らはウィスター系ラットを使っているので実験動物の系統差の有無によるデータの差についても今後検討する必要がある。

要 約

食餌中のビタミンEが生体内で脂質の過酸化物の生成にどのような効果を持つかについて検討した。幼ウィスター系雄ラットを用い、飼料中にビタミンEを添加した群と無添加群とについて比較し、次のような結果を得た。

- 1) 肝臓、腎臓および筋肉について測定した過酸化物の生成はビタミンE無添加群では添加群よりも有意に高値を示した。
- 2) ビタミンE添加群と無添加群との肝臓における TBA 値の有意差は腎臓、筋肉に比べ高い値を示した。
- 3) 飼料中のたん白レベルを窒素で1.0%から3.0%レベルまでに変えたが肝臓の TBA 値に有意な差は認められなかった。
- 4) 肝臓における脂肪酸のパターンはビタミンE添加群と無添加群との間に若干の差異がみられた。すなわち、添加群のパルミチン酸の比率は無添加群に比べ有意に低く、逆にオレイン酸では有意の高値を示した。
- 5) 血中コレステロール量および肝臓中のコレステロール量や脂質量についてはビタミンE添加群と無添加群との間に有意差は認められなかった。

以上の結果、ビタミンEは生体内で過酸化物の生成を抑制することを認めた。

文 献

- 1) Abbas E. Kitabchi and Robert H. Williams : *J. B. C.*, **243**, 3248 (1968)
- 2) F. Edmund Hunter, Jr., A. Scott, D. E. Hoffster, J. M. Gebicki, J. Weinstein and A. Schreider : *J. B. C.*, **239**, 614 (1964)
- 3) L. H. Chen : *J. Nutr.*, **103**, 503 (1973)
- 4) 宮崎基嘉, 桜井芳人 : 栄養と食糧, **35**, 174 (1960)
- 5) J. G. Bieri and A. A. Anderson : *Arch. Biochem. Biophys.*, **90**, 105 (1960)
- 6) Sperry W. M. and M. Webb : *J. B. C.*, **187**, 97 (1950)
- 7) W. Stoffel, Florence Chu and Edward H. Ahrens, Jr. : *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959)
- 8) L. H. Chen, S. Liao and L. V. Packett : *Nutr. Rep. Inter.*, **4**, No. 1 (1971)
- 9) L. H. Chen and L. V. Packett : *Nutr. Rep. Inter.*, **5**, No. 4 (1972)
- 10) C. K. Chow, K. Reddy and A. L. Tappel : *J. Nutr.*, **103**, 618 (1973)
- 11) E. D. Wills : *Biochem. J.*, **99**, 667 (1966)
- 12) 藤田, 松本 : 薬学雑誌, **94**, 147 (1974)
- 13) J. G. Bieri : *Nutr. Reviews*, **33**, 161 (1975)

(受付: 昭和53年7月25日)