Methiin 食の高コレステロール食シロネズミに おける脂質代謝に及ぼす影響

S-Methyl-L-Cysteine Sulfoxide (Methiin)

の抗コレステロール作用 (第2報)

糸 川 嘉 則, 内 野 碩, 西 野 紀 子

京都大学医学部衛生学教室

Effect of S-Methylcysteine Sulfoxide on Fat Metabolism in Experimental Hypercholesterolemia of Rats Anti-Hypercholesterolemic Effect of S-Methylcysteine Sulfoxide (Part 2)

Yoshinori Itokawa, Hiroshi Uchino, Noriko Nishino

Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 24 (9), 481~484 (1971)

Twenty four male Wistar rats weighing about 100 g. were separated into four groups. A semi-synthetic diet was administered to each group and hydrogenated coconut oil was used as the source of fat. Group 1 was given a basal diet, group 2 a basal diet supplemented with 1% cholesterol and 0.2% cholic acid, group 3 a basal diet supplemented with 0.25% S-Methylcysteine Sulfoxide (Methiin), 1% cholesterol and 0.2% cholic acid. A diet which contained 0.5% Methiin, 1% cholesterol and 0.2% cholic acid was administered to the fourth group. After two weeks of this dietary regimen the animals were killed by decapitation. The blood, liver and aorta were removed immediately and portions of these tissues were examined to determine cholesterol and phospholipid levels.

The blood cholesterol level in rats fed 1% cholesterol added diet was elevated to approximately 500 mg/dl. (group 2) and supplementation of Methiin to the cholesterol diet depressed this elevation significantly. In contrast, phospholipid levels revealed no significant change in the experimental groups. Total cholesterol of the liver decreased significantly by the addition of Methiin to hypercholesterolemic diet but free cholesterol in liver and total cholesterol in aorta revealed no significant change. This effect of Methiin concerning nutrition of vegetables showed the given consideration.

(Received September 9, 1971)

著者らの1人糸川は前報¹⁾においてキャベツより抽出された Methiin (S-Methylcysteine Sulfoxide) がシロネズミの血清コレステロール値を低下させる作用を有することを報告した。本報では Methiin のこのような作用をさらに確認するため、高コレステロール食摂取シロネズミに Methiin を与え血液および肝臓のコレステロール、燐脂質などに及ぼす Methiin の影響についてさらに詳細な研究を行なったので報告する。

実験材料および方法

1. Methiin

前報と同じくキャベツより単離した結晶を用いた¹⁾。

2. 実験動物

体重100g前後の4匹同腹のWistar系雄シロネズミを4群(1群6匹)に分け、1匹ずつ金網のケージ中で室温20~25°Cの環境で飼育した。

3. 飼料

表1に示すとき組成の飼料を毎日午前10時に1日7~10g宛与えた。すなわち同腹4群の飼料摂取量は毎日同一量とし2週間飼育後屠殺した。なお屠殺前24時間は絶食させた。

4. コレステロール、燐脂質の定量

表1. 飼料組成

(%)

	A 基本食	B コレステ ロール食	C 0.25% Methiin コレステロール食	D 0.5% Methiin コレステロール食
乳製カゼイン	15.0	15.0	15.0	15.0
蔗糖	68.3	67.1	66.85	66.6
水解ヤシ油	10.0	10.0	10.0	10.0
セルローズ末	2.0	2.0	2.0	2.0
塩化コリン	0.2	0.2	0.2	0.2
塩混合*	4.0	4.0	4.0	4.0
ビタミン混合**	0.5	0.5	0.5	0.5
コレステロール		1.0	1.0	1.0
コール酸		0.2	0.2	0.2
Methiin			0.25	0.5

* 塩混合の組成(%)は NaCl 4.6, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 9.3, K_2HPO_4 25.6, $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 14.5, $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3.2, $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 34.9, MgSO_4 7.0, KI 0.9 であった。

** ビタミン混合(1g中)の組成は Vitamin A Palmitate 2,500 I. U., Calciferol 200 I. U., Thiamine HCl 1 mg, Riboflavin 1.5 mg, Nicotinic Acid Amide 10 mg, Pyridoxin HCl 1 mg, Folic Acid 0.5 mg, Pantothenic Acid Ca 5mg, Vitamin B₁₂ 10 μg (γ), Ascorbic Acid 37.5 mg, dl- α -Tocopherol 1 mg であった。蔗糖で 1g とする。

1) 血液, 血管壁コレステロールの定量 血液および血管壁のコレステロール測定には前回²⁾は Zak の方法²⁾によったが, 今回は Abell らの方法³⁾によることにした。すなわち試験管に血液 0.1ml およびエタノール 2.0 ml を加え, これに 50% KOH 0.2ml を加えて 70°C 30 分間沸騰させる。室温に冷却した後蒸留水を加えて 4 ml とする。血管壁は下行大動脈を心臓の起部より 3 cm 切り取り秤量したのち切片を試験管に入れ, エタノール 2.0 ml, KOH の結晶 1 個をそのまま入れる。これを 70°C 30 分間加温すれば切片は完全に溶解する。これに蒸留水を加えて 4 ml とする。メスアップした液に石油エーテル 4 ml を加えて 4 分間振盪, 2 層に分れてから石油エーテル層を新しい試験管に取る。残った水層に再び石油エーテル 4 ml を加えて振盪後石油エーテル層を取り, 前のものとブールする(回収率は 95% 以上である)。集めた石油エーテル層 (8 ml) に蒸留水 2 ml を加え 30 秒間振盪して洗浄した後エーテル層を取り, 40°C の水浴で窒素ガスを通じて蒸発させる。残留した脂質に最純水酢酸 1 ml を加え 70°C 10 分間加温, 室温に冷却した後無水酢酸 2 ml, 濃硫酸 0.1 ml を加え混和, 25°C 30 分間水浴させ, 日立分光光度計により 620m μ で吸光度を測定し, 同時に反応させたコレステロール標準品 (Sigma) の値と比較してコレステロール量を算出する。

2) 肝臓遊離および総コレステロール量の定量 肝臓の遊離および総コレステロール量は Sperry-Webb の方法⁴⁾により定量した。すなわち肝臓 1 g を秤量し 9 倍量のエタノール・アセトン (1:1) 液でホモゲナイズする。これを試験管に移しガラス沸石を入れ 70°C 10 分間沸騰

させる。冷却後エタノール・アセトン液で 20 ml とするこれを濾過し濾液中より 2.0 ml 取る。正常の肝臓では 200 μg 程度のコレステロール量になる。コレステロール濃度の高い肝臓では 0.2~0.5 ml 取り, これにエタノール・アセトンを加えて 2 ml とする。遊離コレステロール量の定量には 10% 酢酸 1 滴加えて digitonine solution (0.5% digitonine in 50% エタノール) 1 ml を加える。析出した digitonide の結晶を熟成させるために暗所に一夜放置した後, 700 g $\times$ 10 分間遠沈し上清をすてる。沈澱 digitonide をアセトン・エーテル混合液 (1:2) 2 ml で 1 回洗浄して遊離のステロールを除去する。残った少量のエーテルは 45°C 水浴でとばす。沈澱物に最純水酢酸 1 ml を加え 70°C 10 分間加温, 冷却後血液のばあいと同じように無水酢酸 2 ml, 濃硫酸 0.1 ml を加えて混和, 25°C 30 分間水浴中で発色させ 620m μ で吸光度を測定する。

総コレステロール量を定量する時は 2 ml のエタノール・アセトン浸出液に 50% KOH を 1 滴添加し, 45°C 30 分間加温する。室温に冷却後フェノールフタレイン液 (0.1% in 70% エタノール) 1 滴加えて赤色の消えるまで 10% 酢酸で中和し, digitonine 試薬 1 ml を加えて digitonide の結晶を得る。以下遊離コレステロールの定量と同様の操作を行なう。

3) 血液磷脂質量の定量 血液中の磷脂質量は King の方法⁵⁾を基にして定量した。すなわち血液 0.2 ml にメタノール 4 ml, クロロフォルム 4 ml を加え, ガラス沸石を入れて 70°C に 5 分間沸騰させる。冷却後さらにクロロフォルム 4 ml を加える。これを分解ホルベン中に濾過し, 生理的食塩水 2 ml を加え 30 秒間振盪, 2 層に

分かれるまで静置したのち水層をすてる。この操作により無機磷が除去される。これにガラス沸石を入れ、窒素気流を上から流して 80°C 水浴でドラフト中でクロロフォルムを蒸発させる。残った脂質に 1.5 ml 70% 過塩素酸を加えて無色になるまで湿式酸化する。冷却後一定量にメスアップして Fiske-SubbaRow の方法⁹⁾ に準じて磷の含有量を測定し、磷脂質量はレシチンの値を代表として換算した。

実験結果

1. 血液コレステロール値, 磷脂質量

各群の血液コレステロール値, 血液磷脂質量値および C/P 比 (血液のコレステロールの磷脂質に対する割合) を上記の方法により測定した結果を表 2 に示す。

表 2. 血液コレステロール量, 磷脂質量および C/P 比

飼料	血液コレステロール量 (mg/dl)	血液磷脂質量 (mg/dl)	血液 C/P
A 基本食	145±11	211±7	0.69±0.06
B コレステロール食	497±81	236±17	2.16±0.34
C 0.25% Methiin コレステロール食	395±70*	241±18	1.62±0.23*
D 0.5% Methiin コレステロール食	279±46**	202±8	1.38±0.23**

(6例平均値±S. D.)

* B の値に対する有意差 0.05>P>0.01

** // 0.01>P

すなわち 1% コレステロール食により血液コレステロール値は 500mg/dl と上昇するが, これに Methiin を添加した群ではコレステロール値は有意に低下する。そしてこの作用は 0.25% 添加のばあいよりも 0.5% 添加の時の方が低下が大きい。これに対して血液磷脂質量には余り変化が認められない。したがって C/P 比は同様にコレステロール食に比較して, これに Methiin を同時に与えたもので有意に改善が認められた。

2. 肝臓遊離および総コレステロール値

肝臓の遊離および総コレステロール量を定量した結果

表 3. 肝臓総および遊離コレステロール

飼料	肝臓総コレステロール量	肝臓遊離コレステロール量
A 基本食	688±151	313±42
B コレステロール食	3229±297	449±54
C 0.25% Methiin コレステロール食	2887±246*	449±45
D 0.5% Methiin コレステロール食	2758±300*	358±46

(mg/100 g Wet Weight, 6例平均値±S. D.)

* B の値に対する有意差 0.05>P>0.01

表 4. 大動脈壁コレステロール量

飼料	コレステロール量
A 基本食	1.46±0.48
B コレステロール食	3.54±0.87
C 0.25% Methiin コレステロール食	2.70±0.50
D 0.5% Methiin コレステロール食	3.11±0.68

(mg/g Wet Weight, 6例平均値±S. D.)

を表 3 に示す。

肝臓の総コレステロール量は Methiin の添加により有意に減少するが遊離のコレステロールには余り影響が認められなかった。

3. 動脈壁コレステロール値

動脈壁のコレステロール量は表 4 に示すように Methiin 添加による作用は明らかではなかった。

4. 飼料摂取量, 体重, 肝臓重量, 脾臓重量

飼育 2 週間後における体重増加, 肝臓重量の体重に対する割合, 脾臓重量の体重に対する割合を表 5 に示す。

すなわち 1% のコレステロール食により肝臓の重量が増加するが Methiin により増加抑制の傾向が認められる。また前報¹⁾ で認められた脾臓の肥大はこのような短期間の実験では余り著明には現われなかった。

考 察

松本, 糸川らは前報¹⁾ において Methiin が高コレステロール食シロネズミの血清コレステロール値を低下さ

表 5. 飼料摂取量, 体重増加量, 肝臓重量・体重比, 脾臓重量・体重比

飼料	飼料摂取量 (g)	体重増加 (g)	肝臓重量/体重 (%)	脾臓重量/体重 (%)
A 基本食	120	22.0±2.0	3.64±0.32	0.21±0.02
B コレステロール食	120	18.8±2.4	5.14±0.44	0.23±0.03
C 0.25% Methiin コレステロール食	120	16.3±2.5	4.82±0.61 ⁺	0.22±0.03
D 0.5% Methiin コレステロール食	120	18.4±1.9	4.78±0.55 ⁺	0.27±0.04

⁺ B の値に対して有意差なし

(6例平均値±S. D.)

せる作用を有することをつきとめて報告したが、今回はこの作用をさらに明らかにするためにより高度の実験的高コレステロール症の動物を作製して観察した。すなわち脂質としてはオリーブ油の代わりに完全に飽和脂肪酸のみよりなる加水分解したヤシ油に、1%コレステロールおよび0.2%コール酸を添加した飼料をシロネズミに食べさせて実験を行なった。その結果、前回の成績に比較して血液中のコレステロール値を2倍以上に上昇させることができ、前報よりもはげしい高コレステロール症を作ることができた。

この飼料に Methiin を0.25%, 0.5%の濃度に添加して与えると血液中のコレステロール量は有意に低下し前報の結果を再現することができた。一方、血液中に磷脂質量は Methiin を加えてもそれ程低下しないので Methiin は過コレステロールのばあい脂質代謝系のうちでコレステロール代謝系にのみ特異的に働く何らかの作用を有していることが考えられる。血液のみに限らず肝臓の総コレステロール量も Methiin により有意に低下するから、一般的な体内の過剰のコレステロールを低下させるような作用を有するものと考えられる。動脈のコレステロール値には変化が認められなかった、これは実験期間が短期間であること、シロネズミには動脈硬化が起こりにくいこと⁷⁾などのためと考えられる。

総 括

(1) 高コレステロール食のシロネズミの飼料中に同時に Methiin を添加することにより血液のコレステロール値を有意に低下させることを確認した。この作用は0.5% Methiin 添加の方が0.25%添加のばあいより有効であった。

(2) 血液磷脂質量は Methiin の添加あるいはコレステロール添加などによって変化は認められなかった。血液のコレステロール・磷脂質比は Methiin 添加により有意に改善された。

(3) 肝臓では Methiin 添加により重量の増加がおさえられる他、総コレステロール量も有意に低下したが、遊離のコレステロール量には余り影響が認められなかった。

(4) 前報において報告した Methiin 添加時における脾臓の肥大、あるいは黒変はこの実験条件では認められなかった。

終わりに臨み御指導、御校閲いただいた藤原元典教授ならびに Methiin の抽出に御尽力いただいた井上喜久子、吉田喜代子、杉野鏡子、藤井和子、池田桃子、多賀照子、小林美代、菱川愛子、中田千恵子の諸氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 松本 和, 糸川嘉則, 藤原元典: 栄養と食糧, **24**, 249 (1971)
- 2) Zak, B.: *Am. J. Clin. Pathol.*, **27**, 583 (1957)
- 3) Abell, L. L., Levy, B. B., Brodie, B. B. and Kendall, F. E.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 357 (1952)
- 4) Sperry, W. M. and Webb, M.: *J. Biol. Chem.*, **187**, 97 (1950)
- 5) King, E. J.: *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932)
- 6) Fiske, C. H. and SubbaRow, Y.: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)
- 7) Constantinidis, P.: *Experimental Atherosclerosis*, 61 (1965) Elsevier Publishing Company (Amsterdam-London-New York)

(昭和46年9月9日受理)