褐変 Glucosamine を投与したラットの血清及び 肝臓脂質の変化について

小柳 津 周*・田 村 弘**

Effects of Browning Products of Glucosamine on Serum and Liver Lipids of Rats

Makoto OYAIZU* and Hiroshi TAMURA**

* Musashino Nutrition College, 3-12-5, Minami Ikebukuro, Toshima-Ku,
Tokyo 171

** Experimental Animal Center, School of Medicine, Teikyo University,
2-11-1, Kaga, Itabashi-Ku, Tokyo 173

Rats fed on a purified diet (corn starch 50.8%, casein 23.3%, cellulose 3.0%, mineral 14.0%, moisture 8.9% and lard 10.0%) were given glucosamine-HCl (GA-HCl), free glucosamine (FGA), browning product of glucosamine (BGA) (0.4 g/rat/ week) as drinking water for 3 weeks, and total cholesterol (T-Chol) and triglyceride (TG) as well as fatty acid compositions in serum and liver were analyzed. The results obtained are as follows: 1) Body weight gain was lower for the FGA and BGA groups than for the control and GA-HCl groups, but total lipid contents and weight of liver were comparable among the groups. 2) Concentrations of serum T-Chol and TG were lower in the FGA and BGA groups. 3) BGA lowered the proportion of total polyenoic acids in the total lipid fraction of serum and liver.

(Received Dec. 20, 1988)

先に、キチンの分解生成物質に由来するグルコサミン褐変物質 (BGA: Browning products of glucosamine) が、油脂に対し抗酸化性を示すことを報告した¹⁾。さらに、BGA の調製過程を工夫することにより、抗酸化性を増大させることができた^{2,3)}。

BGA をいわし開き干しやビスケットに添加したところ、これらの食品に対しても、明らかな酸化防止作用が認められた⁴⁾。

近年、ヒトにおける脂質の代謝異常や生体内の過酸化脂質の生成などに抑制効果 (または抗酸化性) を示す物質として、トコフェロールなどの種々の物質が検討されている^{5,6)}。

そこで、Glucosamine-HCl (GA-HCl) から既報¹⁾のように BGA を調製し、ラードを付加した精製飼料

に添加してラットに与えた場合の血清中の脂質、特に、総コレステロール (T-Chol)、トリグリセリド (TG) ならびに、脂肪酸組成などを測定し、生体内の脂質に与える影響を検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験材料及び実験方法

1. 供試動物及び飼育条件

供試動物は SFP (Specific pathogen free) の Wistar 系雄ラット (10 週齢; 日本クレア) で、帝京大学医学部実験動物施設に搬入し、1 週間の予備飼育後、平均体重が約 300 g に達したところで実験に用いた。

飼育室は SPF 飼育用の隔離飼育室で、空気調和機により温、湿度をそれぞれ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $50 \pm 10\%$ に調節され、換気回数は 1 時間当たり約 18 回であった。ラットは、

* 武蔵野栄養専門学校 (〒171 東京都豊島区南池袋 3-12-5)

** 帝京大学医学部 (〒173 東京都板橋区加賀 2-11-1)

一群 5 匹とし、飲水はプラスチック製給水瓶に水道水を入れてオートクレープで滅菌したものを、実験前は自由に飲ませた。

飼料は、以下に示す成分からなる(株)船橋農場で調製した固形飼料を自由摂取させた。なお、飼料の主な組成は、50.8% のコーンスターチ、23.3% のカゼイン、10.0% のラード、3.0% セルロース、4.0% のミネラル、及び 8.9% の水分からなっていて、ビタミン欠乏食である。ラードの主な脂肪酸組成を Table 1 に示した。

2. 褐変物質の調製

遊離グルコサミン (FGA: Free glucosamine) は、既報¹⁾に準じて調製した。すなわち、グルコサミン塩酸塩 (GA-HCl) をメチルアルコール中で金属ナトリウムと反応させ脱塩し、濾液にエチルアルコールを加えて白色沈澱物を濾過し、残渣を減圧乾燥した。

BGA は、FGA を褐色のガラス容器に入れ、37°C の恒温器で 30 日間加温し、褐変させ調製した。

FGA と BGA の還元力は足立¹⁾の方法、褐変度は 450 nm¹⁾における吸光度、アミノ糖の残存量は ELSON-MORGAN 法の変法である BLIX 法¹⁾、pH は pH メーター¹⁾、抗酸化性はワールブルグ検圧装置¹⁾によりそれぞれ測定し、その結果を Table 2 に示した。

3. 褐変物質の投与方法と添加量

FGA, BGA 及び GA-HCl は、それぞれ約 0.4 g/匹/週になるように飲水に添加した。FGA, BGA 及び GA-HCl は、あらかじめ蒸留水に溶解後、毎日ラットに給与直前にメンブランフィルター (0.1 µm, 東洋口紙) を用いて濾過滅菌を行い投与した。なお、対照群には蒸留水を用いた。

4. 採血方法及び血清の調製

各動物は、被検物質投与 3 週間目に一夜絶食させ、エーテル麻酔後、腹部大動脈から採血し、血清を得た。

Table 1 Fatty acid composition of lard

Fatty acids	wt%
C _{14:0}	1.4
C _{16:0}	26.0
C _{16:1}	2.9
C _{18:0}	16.0
C _{18:1}	43.0
C _{18:2}	8.0
C _{18:3}	1.6
Others	0.6

Table 2 Reducing power, browning, amino-sugar, pH and antioxidative activity of FGA and BGA

	FGA	BGA
Reducing power* ¹	0.036	0.378
Browning* ²	0.000	0.144
Aminosugar* ³	0.254	0.001
pH	9.60	10.43
Antioxidative activity* ⁴	0.00	96.0

*¹Optical density at 700 nm, *²Optical density at 450 nm, *³Optical density at 530 nm, *⁴%

さらに肝臓を摘出し、肝臓中に含まれる血液を除くため、門脈から生理食塩水を注入し、切断した肝動脈と肝静脈から十分に血液を流出させた後、用時まで -80°C で凍結保存した。

5. 被検物質投与中のラットの体重、飲水量及び摂餌量
投与中のラットの体重は、投与開始日と最終日に測定した。また、飲水量及び摂餌量の測定は、24 時間毎に行った。

6. 血清中の T-Chol 及び TG の測定

ラット血清の T-Chol 及び TG の測定は、日水製薬の T-Chol 及び TG 測定用キット (酵素法) を用い、所定の方法で行った。

7. 総脂質の脂肪酸組成の測定

血清及び肝臓の総脂質 (TL) は、FOLCH ら⁷⁾の方法に準じ、クロロホルム:メタノール (2:1; v/v) で抽出し、その脂肪酸組成を、ガスクロマトグラフィー (GC) により分析した。

血清及び肝臓の TL は、三フッ化ホウ素メタノール法⁸⁾によりメタノリシスを行い、脂肪酸メチルエステルとした。これを、GC (日立; H-163 型) により、以下の条件で脂肪酸の分析を行った。

供試カラムはガラス製 (3 mm×3 m) で、15% DEGS/Chromosorb AW (80~100 mesh) を充填し、キャリアーガスは N₂ (42 ml/min) で、カラム温度を 195°C に保ち、水素イオン検出器で検出した。

脂肪酸の同定は、標準メチルエステルを用いたときの保持時間との比較⁹⁾¹⁰⁾ によって行い、各脂肪酸の定量は、ピーク面積を半値幅法¹¹⁾で計測して行った。

実験結果については、すべて標準偏差であらわし、有意差の検討は、t-検定によった。

Table 3 Body weight gain, food intake, water intake and liver weight

Groups	Body Weight(g)		Relative Liver Weight	Food intake* ¹ (g/day/5rats)	Water intake (ml/day/5rats)* ¹
	Initial	Gain* ¹			
Control (n=5)* ²	325±5.6* ³	73±9.1	3.85±0.5* ⁴	100±9.0	121±14.5
GA-HCl (n=5)	329±5.7	63±6.4	3.84±0.3	97±7.5	132±15.3
FGA* ⁵ (n=5)	333±7.9	48±8.5 ^{ab}	4.13±0.9	110±10.7	140±14.1
BGA* ⁵ (n=5)	335±9.4	47±7.3 ^{ab}	4.12±0.4	102±9.7	134±17.5

*¹Weight gain, food intake and water intake for 3 weeks, *²Numbers of rats, *³Values are the means±S.D., *⁴Liver weight, g per 100 g body weight, *⁵See Table 2

^a=Significantly different from the corresponding control at P<0.01

^b=Significantly different from the corresponding GA-HCl at p<0.025

実験結果及び考察

1. 投与中の体重，肝臓重量に与える GA の影響

動物の成長に関する各種パラメーターの測定値を Table 3 に示した。

被検物質投与終了時における体重は，FGA 及び BGA 投与群が対照群や GA-HCl 群よりも低い値を示し，摂餌量や飲水量などに差が見られないことから，体重の増加の抑制に影響を与えるものと推察した。

また，肝臓重量及び TL 含量については，被検物質投与による影響と思われる変動が認められなかった。

2. 血清中の TG 及び T-Chol 濃度に与える GA 投与の影響

TG と T-Chol の結果を Table 4 に示した。

各被検物質投与群の TG 値は，対照群と比較して低い傾向が認められ，特に BGA 投与群は FGA 投与群と比べても低い値を示した。

T-Chol 値でも被検物質投与群は，対照群と比べ，各群とも低い傾向を示し，FGA 及び BGA 投与群では，特に低かったが，FGA と BGA 投与群間では差が認められなかった。

キトサンやメラノイジンを投与したラットでは，血清中 Chol が低下し，食物繊維に類似した生理的影響を示す^{12)~14)}ことから，BGA (褐変生成物質)とその前駆物質である FGA にも血清中の T-Chol を低下させる傾向がみられたものと考えられた。

さらに，TG 値についても BGA 投与群で低い値を示したが，FGA 投与群では，対照群との間に有意の差が示されなかった。このことは，FGA と BGA の両

Table 4 Concentrations of Serum lipids

Groups	Triglyceride	Total cholesterol
	(mg/dl)	(mg/dl)
Control (n=5)* ¹	122.4±14.6* ²	70.5±3.4
GA-HCl (n=5)	118.2±13.8	67.1±2.9
FGA* ³ (n=5)	118.9±15.7	66.9±2.0 ^a
BGA* ³ (n=5)	95.9±13.1 ^{bc}	65.5±3.1 ^a

*¹Numbers of rats

*²Values are the means±S.D.

*³See Table 2

^a=Significantly different from the corresponding control at P<0.05

^b=Significantly different from the corresponding control at P<0.01

^c=Significantly different from the corresponding FGA at P<0.02

者が持つ性状の違いによりラット生体内で代謝あるいは吸収される過程が異なるためか，体重増加に影響を示したように成長が抑えられることにより起こるものか不明である。

3. 血清及び肝臓総脂質の脂肪酸の組成に与える GA の影響

血清と肝臓中 TL の脂肪酸組成を Table 5 と 6 にそれぞれ示した。

血清 TL から検出された脂肪酸は，最高 15 種であり，主な脂肪酸は各実験群ともに C_{16:0}，C_{18:1}，C_{18:2}，C_{20:4}

Table 5 Fatty acid compositions of total lipids in serum of rats (wt%)

Fatty acid	Groups			
	Control (n=5)* ²	GA-HCl (n=5)	FGA* ¹ (n=5)	BGA* ¹ (n=5)
C _{14:0}	0.9±0* ³	1.2±0	0.3±0	2.2±1.0
C _{16:0}	24.8±4.6	22.0±2.3	25.4±4.8	25.5±1.6
C _{16:1}	2.6±1.4	2.8±1.0	3.7±1.0	3.5±1.0
C _{18:0}	8.7±0.4	6.3±1.1	7.3±0.5	7.9±0.5
C _{18:1}	21.8±1.6	16.5±0.4 ^{acd}	24.8±4.4	24.1±2.9
C _{18:2}	18.9±2.2 ^b	31.3±6.5	18.2±0.7 ^b	17.9±2.1 ^b
C _{20:0}	0.7±0.6	0.6±0.2	1.3±0.3	1.6±0.3
C _{20:4}	20.5±3.3	18.5±2.5	16.5±1.6 ^a	16.0±2.7 ^a
C _{20:5}	1.1±0.3	0.6±0.2	2.3±0.3	2.1±0.6
Saturated acids	35.1±2.3	30.1±1.1 ^{acd}	34.3±2.5	37.2±0.7
Monoenoic acids	24.4±0.1	19.3±0.4 ^{acd}	28.5±2.4	27.6±1.3
Polyenoic acids	40.5±1.4 ^b	50.1±3.1	37.0±0.6 ^{ab}	36.0±1.1

*¹ See Table 2, *² Numbers of rats, *³ Values are the means±S.D.^a =Significantly different from the corresponding control at P<0.05^c =Significantly different from the corresponding GA-HCl at P<0.05^c =Significantly different from the corresponding FGA at P<0.05^d =Significantly different from the corresponding BGA at P<0.05

Table 6 Fatty acid compositions of the total lipids in liver of Rats (wt%)

Fatty acid	Groups			
	Control (n=5)* ²	GA-HCl (n=5)	FGA* ¹ (n=5)	BGA* ¹ (n=5)
C _{16:0}	15.2±3.8	18.1±2.5	16.6±2.5	20.0±3.6
C _{16:1}	0.8±0.3	1.1±1.0	1.3±0.5	1.9±0.9
C _{18:0}	22.6±2.6	16.7±3.0 ^b	15.4±2.1 ^a	17.5±2.6 ^b
C _{18:1}	17.9±3.2	15.3±1.5	17.9±1.8	19.3±3.4
C _{18:2}	14.7±1.9	16.9±2.5	17.8±3.0	16.0±1.5
C _{20:4}	23.1±2.6	26.1±13.9	24.6±1.4 ^c	20.4±0.6 ^d
C _{22:6}	5.1±1.8	5.7±1.0	5.9±1.0	4.6±1.3
Saturated acids	37.8±0.8	34.8±0.4 ^{ae}	32.0±0.3 ^{ae}	37.5±0.7
Monoenoic acids	18.7±2.0	16.4±0.4 ^e	19.2±0.9	21.2±1.7
Polyenoic acids	42.9±0.4	48.7±7.1 ^a	48.3±1.1 ^a	41.0±0.5 ^{ad}

*¹ See Table 2, *² Numbers of rats, *³ Values are the means±S.D.^a =Significantly different from the corresponding control at P<0.01^b =Significantly different from the corresponding control at P<0.025^c =Significantly different from the corresponding GA-HCl at P<0.05^d =Significantly different from the corresponding FGA at P<0.01^e =Significantly different from the corresponding BGA at P<0.05

であった。

$C_{18:1}$ 値は、GA-HCl 投与群が他の実験群よりも低く、 $C_{18:2}$ 値では、GA-HCl 投与群が最も高かった。

$C_{20:4}$ 値は、対照群よりも FGA と BGA 投与群で低かった。また、GA-HCl 投与群は他の実験群に比べ、総飽和酸と総モノエン酸値が低く、総ポリエン酸値が高かった。

肝臓 TL から検出された脂肪酸は、最高 17 種であり、主な脂肪酸は各実験群とも $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{20:4}$ であった。

$C_{18:0}$ 値は対照群よりも各実験群で低く、 $C_{20:4}$ 値は対照群よりも FGA や BGA 投与群で低く、さらに BGA 投与群は FGA 投与群よりも低かった。また、総飽和酸値は対照群と BGA 投与群が他の投与群よりも低く、総モノエン酸値では各実験群の間に差がみられなかったが、総ポリエン酸値では、BGA 投与群が他の実験群よりも低かった。

FGA と BGA 投与による血清及び肝臓 TL の脂肪酸は、血清のポリエン酸値が対照群よりも少なく、特に、 $C_{20:4}$ にその傾向が強く見られた。しかし、肝臓のポリエン酸値は、GA-HCl 及び FGA 投与群が対照群よりも高く、BGA 投与群は、僅かに低く推移する傾向が見られた。

前報⁴⁾で、BGA の油脂に対するモデル実験及び加工食品への応用で酸化性を認めた褐変物質¹⁾²⁾は、ラットの生体内におけるポリエン酸の減少傾向からも高度不飽和脂肪酸を安定的、かつ有効的に保持する作用があまり顕著でないものと推察された。

要 約

精製配合飼料（コーンスターチ：50.8%，カゼイン：23.3%，セルロース：3.0%，ミネラル：4.0%，水分：

8.9%）を摂取しているラットに GA-HCl、FGA 及び BGA を 3 週間飲水投与（0.4 g/rat/week）し、その血清中の T-Chol、TG 及び血清や肝臓総脂質の脂肪酸組成を測定した結果、次のような結果を得た。

(1) 体重の増加は、FGA や BGA 投与により低下した。しかし、肝臓 TL 含量は影響を受けなかった。

(2) 血清中の T-Chol や TG の濃度は、FGA や BGA 投与により低値を示した。

(3) 血清や肝臓 TL 中の総ポリエン酸の割合は、BGA 投与で低下した。

文 献

- 1) 小柳津周：栄養学雑誌，44，307 (1986)。
- 2) 小柳津周：日食工誌，35，771 (1988)。
- 3) 小柳津周：日食工誌，35，846 (1988)。
- 4) 小柳津周：栄養学雑誌，46，35 (1988)。
- 5) 岩井淳子・島崎弘幸・植田伸夫・宮沢雄治：油化，34，452 (1985)。
- 6) 長 修司・山本匡介・井出 隆・菅野道広：栄養と食糧，30，225 (1977)。
- 7) FOLCH, J., LEES, M. and SLOANE STANLEY, G.H.: *J. Biol. Chem.*, 226, 497 (1957)。
- 8) 日本油化学協会編：基準油脂分析試験法，2，4，20，2-77 (1971)。
- 9) 上田 正：水大研報，16，1 (1967)。
- 10) 太田 亨・山田 実：日水誌，35，1138 (1969)。
- 11) 植田伸夫：化学と生物，7，744 (1969)。
- 12) 五明紀春・三浦理代：栄養誌，36，331 (1983)。
- 13) TAKECUCCHI, H., NISHIOKA, Y., FUJISHIRO, M. and MURAMATSU, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 969 (1987)。
- 14) 石井孝彦：第 40 回日本栄養・食糧学会総会講演要旨 p. 112 (昭和 61 年 5 月，名古屋大学)。

(昭和 63 年 12 月 20 日受理)