

氏名(本籍)	勝 俣 学 (神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第26号
学位授与年月日	平成18年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	食品の機能性成分としてのパントテン酸誘導体の脂質低下作用に関する研究
論文審査委員	(主査) 坂 田 亮 一 (副査) 赤 堀 文 昭 押 田 敏 雄 鈴 木 嘉 彦

論 文 内 容 の 要 旨

食肉中には、パントテン酸 (PaA)、パンテテイン (PaSH)、コエンザイム A (CoA) など各種 PaA 誘導体が含有される。これらには、血中コレステロール (CH) やトリグリセリド (TG) の値を減少させるなど脂質低下作用のあることが知られている。しかし、いずれの化合物も、含有量が少ない、生理作用が弱い、不安定で容易に酸化される、分解されやすい、工業的生産に不向きである等の欠点があるので、機能性食品として応用するためには、それらの欠点を解決する必要がある。本研究では、PaA 誘導体の中で、比較的安定で酸化されにくく、工業的生産が容易なパンテテイン-S-スルホン酸 (PaSSO₃H) に注目した。

PaSSO₃H の生理作用に関する研究は、これまでビフィズス菌の成長促進因子としての観点から進められてきた。例えば、*Bifidobacterium bifidum* N4 株を用いた PaSSO₃H の代謝経路に関する研究では、PaSSO₃H は、PaA 誘導体の中で脂質低下作用を示し、機能性食品として用いられているパンテチン (PaSS) と、PaA から 4'-ホスホパンテテイン (P-PaSH) を経て CoA に至る一連の代謝経路の中で、P-PaSH 以降 CoA まで同様の経路で代謝される。もし動物の生体内においても、PaSSO₃H が細菌と同様の経路で代謝されるならば、PaSS と同様に脂質代謝に効果を持つ可能性がある。しかし、今までに PaSSO₃H およびその塩が脂質代謝に影響を及ぼすという報告はない。

PaSSO₃H は粘稠性が高く結晶化が困難なので、本研究では、そのカルシウム塩のパンテテイン-S-スルホン酸カルシウム (PaSSO₃Ca) を用い、脂質低下作用およびその作用機序について以下の検討を行った。

第1章 マウス、ラット、ハムスターおよびウズラの血中脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

PaSSO₃Ca の各種動物に対する脂質低下作用を調べた結果、脂質低下作用に種差が存在し、血中 CH 低下作用はマウス、ハムスターおよびウズラにおいて、血中 TG 低下作用はマウス、ラットおよびハムスターにおいて認められた。このような種差が見られた理由としては、動物種による脂質およびリポタンパク代謝の違い、また、リノレン酸、ビタミン E 誘導体あるいはセサミンに見られるような動物種による投与化合物への感受性の違いが考えられる。

第2章 高 CH 飼料給与動物の脂質動態に及ぼす PaSSO₃Ca の影響

高 CH 飼料で飼育した時の血中脂質に及ぼす PaSSO₃Ca の影響を、マウス、ラット、ハムスター、ウズラおよびウサギを用いて検討した。

その結果、1% CH (0.5% コール酸ナトリウム (CA) 含有) 飼料で2週間飼育したマウスでは CH 低下作用を示さなかった。ハムスターでは、1% CH (0.2% CA 含有) 飼料での3週間飼育による血中 CH 上昇に対し、有意ではないが、低下傾向を示した。一方、1% CH (0.5% CA 含有) 飼料で2週間飼育したラットでは、1週間から2週間で有意 ($p < 0.05$) な血中 CH 低下作用を示した。他方、ウズラを 0.5% CH (0.1% CA 含有) 飼料で飼育すると、4週間で血中 CH は正常群の約6倍に上昇し、16週間目まで上昇した。この血中 CH 上昇に対し、PaSSO₃Ca は観察期間中すべての週で有意 ($p < 0.05$) な低下作用を示した。さらに、ウサギを 0.5% CH 飼料で30日間飼育すると、血中 CH は10日から30日まで上昇し、この上昇に対し PaSSO₃Ca は21日目に有意 ($p < 0.05$) な低下作用を示した。

第3章 実験的高 CH・TG 血症ラットに及ぼす PaSSO₃Ca の影響

卵黄の2週間反復経口投与 (卵黄:卵白 = 3:1, 2mL/日) による高 CH・TG 血症、甲状腺ホルモン合成阻害剤である PTU (6*n*-propyl-2-thiouracil) の2週間反復経口投与 (1 mmol/kg/日) による甲状腺機能低下時の高 CH・TG 血症、およびトライトン (界面活性剤、400mg/kg、静脈内単回投与) 誘発高脂血症のモデルラットに対する PaSSO₃Ca の脂質低下作用を検討した。

その結果、卵黄投与ラットでは無処置群ラットと比較し、血中 CH および TG が上昇したが、PaSSO₃Ca はこの無処置群ラットの両脂質の上昇を有意 ($p < 0.05$) に抑制した。PTU 投与ラットでも、無処置群ラットより血中 CH および TG が上昇し、PaSSO₃Ca は、この両脂質の上昇を有意 ($p < 0.05$) に抑制した。また、トライトン投与によりラット血中 CH および TG は、他のモデル同様上昇するが、PaSSO₃Ca はこれに対しても有意 ($p < 0.05$) な上昇抑制効果を示した。

第4章 実験的高 TG 血症および脂肪肝ラットに及ぼす PaSSO₃Ca の影響

高 TG 血症および脂肪肝には、①血中 TG 分解酵素活性の低下による高 TG 血症モデル (アロキサン (AX)、イントラリポス (IL))、②外因性 TG 投与による高 TG 血症モデル (IL)、③脂肪組織からの FFA 動員による高 TG 血症モデル (AX)、④脂肪の合成亢進による高 TG 血症モデル (フルクトース

(FW)、AX)、⑤FFAの酸化障害性高TG血症・脂肪肝モデル（急性エタノール（ET）投与、慢性ET投与）、⑥VLDL合成障害による肝臓からのTGの血中への放出抑制による脂肪肝モデル（テトラサイクリン（TC）、オロチン酸（OA）、エチオニン（EN））、および⑦VLDL合成亢進による脂肪肝モデル（FW）などが知られている。そこで、それぞれのタイプの高TG血症および脂肪肝ラットを作成し、PaSSO₃Caの高TG血症および脂肪肝に対する効果について検討した。

その結果、AX、IL、FW、ETで誘発した高TG血症のラットにおける血中TG、およびET、TC、OA、ENで誘発した脂肪肝のラットにおける肝臓のTGに対して、PaSSO₃Caは有意（ $p < 0.05$ ）な低下作用を示すことを明らかにした。

第5章 PaSSO₃Caの脂質低下作用機序の検討

第1節 高CH飼料給与ラットを用いたCH低下作用の機序

PaSSO₃Caの血中CH低下の作用機序について、1%CH（0.5%CA含有）飼料で2週間飼育したラットを用いて、PaSSO₃Caの、①CHの吸収、分布および胆汁中への排泄に及ぼす影響、②胆汁中への胆汁酸（BA）およびCHの排泄に及ぼす影響、③低比重リポタンパク（LDL）-CHの血中からの消失に及ぼす影響、④CHのふん中への排泄に及ぼす影響、および⑤肝臓における酢酸およびメバロン酸（MA）からのCH合成に及ぼす影響について、それぞれ検討した。

その結果、PaSSO₃Caは、①³H]-CH経口投与後の経時的な血中放射能レベル（48時間まで観察）から、CH吸収に影響しなかった。胆汁中への¹⁴C]-CH（静脈内投与）および³H]-CH（経口投与）由来の放射能の排泄量（CHあるいはBAを含む。48～50時間の2時間分）をそれぞれ高CH群の118%および120%に上昇させた。②高CH群に比較し、胆汁中へのBA排泄量を0～6時間で高CH群の118%に上昇し、CH排泄量に影響を与えなかった。③¹⁴C]-CHで標識したLDL-CHを多く含む血清を静脈内投与（ 3.7×10^6 dpm /ラット）した後の、血中放射能（¹⁴C]-CH）を経時的に測定したところ、血中からのCHの消失時間を0～30分で高CH群の約1/3に短縮した。④ふん中への¹⁴C]-CHおよび¹⁴C]-BAの排泄量を、高CH群の108%に上昇させた。⑤肝臓での¹⁴C]-酢酸および¹⁴C]-MAからの¹⁴C]-CH合成を、それぞれ高CH群の70%および68%に低下させた。

これらの結果から、PaSSO₃Caは腸管でのCHの吸収に影響を与えず、吸収されたCHのBAへの変換を促進し、BAの腸肝循環を阻害し、胆汁中およびふん中へのCHの排泄を早め、血中からのCH消失を促進することがわかった。一方、肝臓においても、PaSSO₃CaはMAからCHまでの合成経路を阻害することにより、肝臓中のCHを減少させることが判明した。

第2節 ラットの脂質動態に及ぼすPaSSO₃Caの作用

第1章において、市販ラット飼料で飼育したラット（正常群）に対し、PaSSO₃Caの2週間反復投与が血中CH値に影響を与えないことを明らかにした。この原因について、PaSSO₃Caの、①CHの吸収、分布および胆汁中への排泄に及ぼす影響、②胸管リンパからのCH吸収に及ぼす影響（摂食および絶食下で8時間まで観察）、③肝臓における酢酸からのCH合成に及ぼす影響について、それぞれ検討した。

その結果、 PaSSO_3Ca は、① $[\text{^3H}]\text{-CH}$ 経口投与後の経時的な血中放射能レベル（48時間まで観察）から、 CH 吸収を上昇させることが示された。胆汁中への $[\text{^{14}C}]\text{-CH}$ （静脈内投与）および $[\text{^3H}]\text{-CH}$ （経口投与）由来の放射能の排泄（ CH あるいは BA を含む。48～50時間の2時間分）を、それぞれ正常群の117%および137%に上昇させた。胆汁中の BA および CH を測定したところ、 BA は正常群の116%に上昇し、 CH 量に変化はなかった。②絶食下で胸管リンパ中へ分泌される累積 CH 量を、6および8時間で有意（ $p < 0.05$ ）に低下した。③肝臓で、 $[\text{^{14}C}]\text{-酢酸}$ からの $[\text{^{14}C}]\text{-CH}$ 合成を正常群の82%に低下した。

これらの結果から、ラットにおいて PaSSO_3Ca 投与により CH の消化管からの吸収が上昇し、これにより血中 CH は正常値より一時的に上昇することが推察された。一方、肝臓において、 CH 生合成の抑制および胆汁中への BA の排泄が増加することを明らかにした。また、血中では CH 消失が亢進して血中 CH は減少し、正常値に戻ることを示した。このように、 PaSSO_3Ca は正常ラットの血中 CH を低下させない機序を究明した。

第3節 ラットに対する PaSSO_3Ca のTG低下作用の機序

第3章および第4章において、 PaSSO_3Ca は各種高TG血症または脂肪肝モデル動物の、血中および肝臓中のTG低下作用を示すことを、明らかにした。そこで、 PaSSO_3Ca の血中および肝臓中のTG低下作用の機序を究明するため、ラットを用い PaSSO_3Ca の、①オリーブオイル（OO）吸収に及ぼす影響（OO投与後24時間まで観察）、②胸管リンパからのTG吸収に及ぼす影響（摂食および絶食下で8時間まで観察）、③絶食およびノルエピネフリン（NE）静脈内投与時の脂肪組織から血中への脂肪酸（FFA）遊離に及ぼす影響、④酢酸からのTG合成に及ぼす影響、⑤肝臓中のCoA量に及ぼす影響、⑥外因性TGの血中からの消失に及ぼす影響、⑦TG代謝関連酵素活性に及ぼす影響（1% CH 飼料で飼育したラットおよびTC誘発脂肪肝ラット）、および⑧*in vitro*でのTG分解に及ぼす添加効果について、それぞれ検討した。

その結果、 PaSSO_3Ca は、①OO投与後の血中TG量を、12時間～24時間で有意（ $p < 0.05$ ）に低下させた。②絶食下で胸管リンパ中へ分泌される累積TG量を、4、6および8時間で有意（ $p < 0.05$ ）に低下させ、摂食下でその効果は消失した。③絶食およびNE投与により、上昇した血中FFAを有意（ $p < 0.05$ ）に低下させた。④ $[\text{^{14}C}]\text{-酢酸}$ からの $[\text{^{14}C}]\text{-TG}$ 合成を有意（ $p < 0.05$ ）に上昇させた。⑤肝臓中のCoA量を変化させなかった。⑥脂肪乳剤静注後の血中TGの消失を、対照群の60%に短縮させた。⑦高 CH 群に比較し、血中lipoprotein lipase（LPL）と肝性TG lipase（HTGL）の活性を上昇させた。TC処置群に比較し、血中LPLとHTGL活性を上昇させた。また、TC処置による肝臓中のTG上昇、血中TG低下を有意（ $p < 0.05$ ）に抑制した。⑧血中TG分解を亢進させ、LPL活性を上昇させた。

これら⑥、⑦および⑧の結果から、 PaSSO_3Ca による血中TGの低下は、TGのFFAへの分解（異化）が原因であることが明らかとなった。さらに③の結果より、FFA動員の抑制もTG低下に影響を与えることを究明した。また、TC処置時の肝TG上昇、血中TG低下を有意に抑制したことで、 PaSSO_3Ca によるTGの肝臓からの放出促進が脂肪肝改善の作用機序として示唆された。

このように、脂質代謝の正常なマウス、ハムスター、ウズラに対し PaSSO_3Ca は血中 CH および TG の値を低下させる作用を有し、高 CH 飼料で飼育したラット、ウズラ、ウサギに対しても血中 CH 低下作用を示した。一方、 PaSSO_3Ca は卵黄、PTU および トライトン 投与により作成した高脂血症ラットに対しても血中 CH および TG 低下作用を示し、AX、IL、FW、ET、TC、OA および EN によって誘発される高 TG 血症と脂肪肝に対しても、TG 低下作用を有することを見出した。さらに、 PaSSO_3Ca の持つ血中 CH 低下作用機序は、主に肝臓での CH から BA への変換の促進と、BA の腸肝循環の阻害によることを示した。また、血中 TG 低下作用機序は、TG 分解系の酵素活性を上昇させることに起因することを究明した。

論文審査の結果の要旨

食品の持つ機能性の中で三次機能として、生理活性効果が現在着目されている。これまで成人病を起こす原因食品とみなされてきた食肉にも、保健機能を示す種々の生理活性物質が存在していることが最近の研究でわかってきた。その中で、血中コレステロール (CH) やトリグリセリド (TG) を減少させるなど、脂質低下作用を示すパントテン酸 (PaA) 誘導体が食肉中にも含有されることが知られている。

本研究では、PaA 誘導体の中で、比較的安定で酸化されにくく、工業的生産が容易なパンテテイン-S-スルホン酸 (PaSSO_3H) に注目し、そのカルシウム塩のパンテテイン-S-スルホン酸カルシウム (PaSSO_3Ca) を用い、脂質低下作用およびその作用機序について検討を行った。本研究の概要は以下の通りである。

第1章で、正常な各種動物 (マウス、ラット、ハムスターおよびウズラ) の血中脂質に及ぼす PaSSO_3Ca の影響を調べた結果、 PaSSO_3Ca の脂質低下作用には種差が存在し、血中 CH 低下作用はマウス、ハムスターおよびウズラにおいて、また、血中 TG 低下作用はマウス、ラットおよびハムスターにおいて認められた。このような種差が見られた理由として、著者は動物種による脂質およびリポタンパク代謝の違い、また、リノレン酸、ビタミン E 誘導体あるいはセサミンに見られるような動物種による投与化合物への感受性の違いによるものと考えている。

第2章では、高 CH 飼料で飼育した時の血中脂質に及ぼす PaSSO_3Ca の影響を、マウス、ラット、ハムスター、ウズラおよびウサギを用いて検討した。その結果、マウスでは 1% CH (0.5% コール酸ナトリウム (CA) 含有) 飼料で 2 週間飼育しても CH 低下作用を示さなかった。ラットでは、1% CH (0.5% CA 含有) 飼料で 2 週間飼育すると、1 週間から 2 週間で有意 ($p < 0.05$) な血中 CH 低下作用を示した。ハムスターでは、1% CH (0.2% CA 含有) 飼料での 3 週間飼育による血中 CH 上昇に対し低下傾向を示したが、有意な差は認められなかった。ウズラを 0.5% CH (0.1% CA 含有) 飼料で飼育すると、4 週間で血中 CH は正常群の約 6 倍に上昇し、16 週間目まで上昇したが、これに対し、 PaSSO_3Ca

は観察期間中すべての週で有意 ($p<0.05$) な低下作用を示した。ウサギを 0.5% CH 飼料で 30 日間飼育すると、血中 CH は 10 日から 30 日まで上昇し、これに対し PaSSO_3Ca は 21 日目に有意 ($p<0.05$) な低下作用を示した。

第 3 章で、高 CH・TG 血症実験モデル動物に対する PaSSO_3Ca の脂質低下作用を検討した。すなわち、ラットを用い、卵黄の 2 週間反復経口投与 (卵黄:卵白 = 3:1, 2mL/日) による高 CH・TG 血症、甲状腺ホルモン合成阻害剤である PTU (6*n*-propyl-2-thiouracil) の 2 週間反復経口投与 (1 mmol/kg/日) による甲状腺機能低下時の高 CH・TG 血症、およびトライトン (界面活性剤、400mg/kg、静脈内単回投与) 誘発高脂血症のモデルを作成し、それぞれのモデル動物に対する PaSSO_3Ca の脂質低下作用を検討した。その結果、卵黄投与ラットでは無処置群ラットと比較し、血中 CH および TG が上昇したが、 PaSSO_3Ca はこの無処置群ラットの両脂質の上昇を有意 ($p<0.05$) に抑制した。PTU 投与ラットでも、無処置群ラットより血中 CH および TG が上昇し、 PaSSO_3Ca は、この両脂質の上昇を有意 ($p<0.05$) に抑制した。また、トライトン投与により、ラット血中 CH および TG は他のモデルと同様に上昇するが、 PaSSO_3Ca はこれに対しても有意 ($p<0.05$) な上昇抑制効果を示した。

第 4 章で、実験的高 TG 血症および脂肪肝のラットに及ぼす PaSSO_3Ca の影響を調べた。高 TG 血症誘発には、アロキササン (AX)、イントラリポス (IL)、フルクトース (FW) を用いた。一方、脂肪肝ラットは、テトラサイクリン (TC)、オロチン酸 (OA)、エチオニン (EN)、エタノール (ET) 処置 (慢性、急性) により作成した。その結果、AX、IL、FW、ET で誘発した高 TG 血症ラットに対し PaSSO_3Ca は血中 TG を有意 ($p<0.05$) に低下させた。また、ET、TC、OA、EN で誘発した脂肪肝ラットに対しても PaSSO_3Ca は肝臓の TG レベルを有意 ($p<0.05$) に低下させた。

第 5 章では、 PaSSO_3Ca の脂質低下作用の機序について追究した。まず、高 CH 飼料給与ラットを用い PaSSO_3Ca の CH 低下作用の機序を検討した。方法として、1% CH (0.5% CA 含有) 飼料で 2 週間飼育したラットを用いて、 PaSSO_3Ca の、① CH の吸収、分布および胆汁中への排泄に及ぼす影響、② 胆汁中への胆汁酸 (BA) および CH の排泄に及ぼす影響、③ LDH-CH の血中からの消失に及ぼす影響、④ CH のふん中への排泄に及ぼす影響、および⑤ 肝臓における酢酸およびメバロン酸からの CH 合成に及ぼす影響について、 $[^3\text{H}]\text{-CH}$ および $[^{14}\text{C}]\text{-CH}$ などを用いて調べた。その結果から、 PaSSO_3Ca は腸管での CH の吸収に影響を与えず、吸収された CH の BA への変換を促進し、BA の腸肝循環を阻害し、胆汁中およびふん中への CH の排泄を早め、血中からの CH 消失を促進することがわかった。一方、肝臓においても、 PaSSO_3Ca はメバロン酸から CH までの合成経路を阻害することにより、肝臓中の CH を減少させることが判明した。

次に、ラットの脂質動態に及ぼす PaSSO_3Ca の作用を検討した。第 1 章において、市販ラット飼料で

飼育したラット（正常食群）に対し、 PaSSO_3Ca の2週間反復投与が血中CH値に影響を与えないことを明らかにしたが、この原因について、 PaSSO_3Ca の、①CHの吸収、分布および胆汁中への排泄に及ぼす影響、②胸管リンパからのCH吸収に及ぼす影響（摂食および絶食下で8時間まで観察）、③肝臓における酢酸からのCH合成に及ぼす影響について、それぞれを調べた。その結果から、ラットでは PaSSO_3Ca 投与によりCHの消化管からの吸収が上昇し、肝臓においては、CH生合成の抑制および胆汁中へのBAの排泄が増加した。また、血中ではCH消失が亢進して血中CHは減少し、正常食ラットの血中レベルと同程度まで戻ることが明らかとなった。

また、第3章および第4章において、 PaSSO_3Ca は各種高TG血症または脂肪肝モデル動物の血中および肝臓中のTG低下作用を示したが、その機序を究明するため、ラットを用い PaSSO_3Ca の、①オリーブオイル（OO）吸収に及ぼす影響、②胸管リンパからのTG吸収に及ぼす影響、③絶食およびノルエピネフリン（NE）静脈内投与時の脂肪組織から血中への脂肪酸（FFA）遊離に及ぼす影響、④酢酸からのTG合成に及ぼす影響、⑤肝臓中のCoA量に及ぼす影響、⑥外因性TGの血中からの消失に及ぼす影響、⑦TG代謝関連酵素活性に及ぼす影響、および⑧*in vitro*でのTG分解に及ぼす添加効果について、それぞれ検討した。その結果、 PaSSO_3Ca は、①OO投与後の血中TG量を12時間～24時間で有意（ $p<0.05$ ）に低下させた。②絶食下で胸管リンパ中へ分泌される累積TG量を、4、6および8時間で有意（ $p<0.05$ ）に低下させ、摂食下ではその効果が消失した。③絶食およびNE投与により、上昇した血中FFAを有意（ $p<0.05$ ）に低下させた。④ $[^{14}\text{C}]$ -酢酸からの $[^{14}\text{C}]$ -TG合成を有意（ $p<0.05$ ）に上昇させた。⑤肝臓中のCoA量を変化させなかった。⑥脂肪乳剤静注後の血中TGの消失を、対照群の60%に短縮させた。⑦高CH群に比較し、血中lipoprotein lipase（LPL）と肝性TG lipase（HTGL）の活性を上昇させた。一方、TC処置群に比較し、血中LPLとHTGL活性を上昇させた。また、TC処置による肝臓中のTG上昇、血中TG低下を有意（ $p<0.05$ ）に抑制した。⑧血中TG分解を亢進させ、LPL活性を上昇させた。これら⑥、⑦および⑧の結果から、 PaSSO_3Ca による血中TGの低下は、TGのFFAへの分解（異化）促進が原因であることが明らかとなった。さらに③の結果より、FFA動員の抑制もTG低下に影響を与えることを究明した。また、TC処置時の肝TG上昇、血中TG低下を有意に抑制したことで、 PaSSO_3Ca によるTGの肝臓からの放出促進が脂肪肝改善の作用機序として示唆された。

以上のように、脂質代謝の正常なマウス、ハムスター、ウズラに対し PaSSO_3Ca は血中CHおよびTGを低下させる作用を有し、高CH飼料で飼育したラット、ウズラ、ウサギに対しても血中CH低下作用を示した。一方、 PaSSO_3Ca は卵黄などの投与により作成した高脂血症ラットに対しても血中CHおよびTG低下作用を示した。また、AX、ILなどの化学物質によって誘発される高TG血症と脂肪肝に対しても、 PaSSO_3Ca はTG低下作用を有することを明らかにした。さらに、 PaSSO_3Ca の持つ血中CH低下作用機序は、主に肝臓でのCHからBAへの変換の促進、およびBAの腸肝循環の阻害によることを示した。また、血中TG低下作用機序は、TG分解系の酵素活性を上昇させることに起因することを究明した。

本研究では、保健的機能を持つパントテン酸誘導体の中で、パンテテイン-S-スルホン酸の持つ脂質低下作用を明らかにし、その作用機序を究明したことから、食肉中に含まれる物質には（保健）機能性食品としての有用性のあることを示唆した。すなわち、本研究の成果は、高脂血症などの予防を目指した付加価値のある食品開発に寄与する基礎的研究であり、動物応用科学の分野からヒトの健康増進およびQOL（Quality of Life）に貢献する意義は極めて大きく、博士（学術）の学位を授与するにふさわしい業績と判定する。