

乳清タンパク質のマクロファージ 泡沫化に及ぼす影響

熊本大学医学部 堀内正公
生化学第2講座代表者

【研究目的】

乳清タンパク質 (Whey Protein) はヒト母乳のタンパク質の70%以上を占めている。最近の人工ミルクの研究によれば、乳清タンパク質/カゼイン比が高い程、乳児の血中コレステロール上昇が抑制される。もし、この抑制作用が乳児及び学童、成人でも同様であれば、乳清タンパク質の摂取によりコレステロール値の上昇を抑制し、動脈硬化に由来する虚血性心疾患の予防に使用できる可能性がある。本研究では、乳清タンパク質の血中コレステロール低下メカニズムを明かにするため、粥状動脈硬化症の初期病変と考えられているマクロファージの泡沫化に対する乳清タンパク質の影響を検討した。具体的には、ラット腹腔マクロファージ (M ϕ) をアセチルLDLで泡沫化させる *in vitro* の実験系に対する乳清タンパク質の抑制作用並びに、HDLの細胞コレステロールの引き抜き作用に対する効果を検討した。

【実験方法】

乳清タンパク質の抗泡沫化作用の検討

非刺激ウイスターラットの腹腔から得られる常在腹腔M ϕ 3×10^6 を培養皿(直径22 mm) に37°C 1時間保温し、付着M ϕ を調製した。個々の培養皿に1 mlのダルベッコ修飾培養液を加え、 $25 \mu\text{g/ml}$ のアセチルLDLを添加して16時間37°Cで保温し、細胞内に蓄積したコレステロールエステル (CE) を定量した。抗泡沫化の実験系では、乳清タンパク質をアセチルLDLと同時に添加して、24時間保温後に、FCとCEを同様に定量した。また、この実験系に50, 100 $\mu\text{g/ml}$ のHDLを共存させ、HDLの抗泡沫化作用に対する乳清タンパク質の効果も検討した。

乳清タンパク質の作用部位の検討

上記抗泡沫化系と同様の実験系において、腹腔M ϕ (3×10^6 cells) を放射性ヨード

(¹²⁵I) で標識したアセチルLDL (5 μ g/ml) と37°Cで90分間保温した。実験群では、5 mg/mlの乳清タンパク質を共存させた。保温後、細胞を遠心し、上清をトリクロル酢酸 (TCA) で沈澱させ、TCA可溶性の放射活性をライソゾーム内分解の指標として測定した。

乳清タンパク質の脱泡沫化作用の検討

ラット腹腔M ϕ (付着系) を25 μ g/mlのアセチルLDL (あるいはアセチルLDLのコレステロール部分を³H-コレステロールで標識したもの) と18時間保温し、細胞内にCEを蓄積させた。これらの泡沫細胞をメディウムで洗浄し、アセチルLDLを除いた後に、乳清タンパク質、HDL、あるいは両者と18時間保温し、細胞内CEの質量 (Mass) 及び、薄層クロマトグラフィーにより、CEを分離し、その放射活性を測定した。

【結 果】

乳清タンパク質の抗泡沫化作用

図1に示すように、ラット腹腔M ϕ をアセチルLDL (25 μ g/ml) と24時間保温すると、約46 nmol/mg proteinのCEが細胞内に蓄積した。この実験系にアセチルLDLと同時に乳清タンパク質を (1 - 10mg/ml) 添加して保温すると、細胞CE蓄積は1 mg/mlの乳清タンパク質で約30%抑制され、5 mg/mlで80%、10mg/mlでは90%と極めて著明に抑制された。

図2にHDLの抗泡沫化作用に対する乳清タンパク質の効果を示した。100 μ g/mlのHDLのみで24時間保温ではCE蓄積を約35%抑制した。この系に乳清タンパク質を1 mg/ml添加しておく、抑制は80%以上であった。即ち、乳清タンパク質はそれ自身の抗泡沫化作用のみでなく、HDLの抗泡沫化作用を促進する作用を有することを意味する。

アセチルLDLはM ϕ のスカベンジャーレセプターに結合し、細胞内に取り込まれてライソゾームで分解を受ける。この結果、細胞内FCが増量し泡沫化が生じる。このアセチルLDLによるin vitroの抗泡沫化系において、HDLはライソゾーム分解以降に作用している。乳清タンパク質の場合も (5 mg/ml以下の濃度) 放射ヨード標識ア

セチルLDLのライソゾーム分解に対して、影響を与えなかった。即ち、乳清タンパク質もHDLと同様、ライソゾーム以降に作用点があると思われる。

乳清タンパク質の脱泡沫化作用

Mφを $25\mu\text{g}/\text{ml}$ アセチルLDLと18時間保温し、泡沫化すると $25\text{nmol}/\text{mg}$ proteinのCE量が蓄積した。この泡沫細胞を $1\text{mg}/\text{ml}$ の乳清タンパク質と18時間保温すると、細胞CEは約25%減少した。即ち、乳清タンパク質は脱泡沫化作用を有することを意味する。この系に $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のHDLを共存させると、脱泡沫化作用は有意に増強した。

有効因子の同定の試み

以上、Mφを用いた抗泡沫化系および脱泡沫化系のin vitroの実験により、乳清タンパク質が抗泡沫化作用のみならず、脱泡沫化作用も有することが判明した。現在、乳清タンパク質をゲル濾過法やイオン交換カラムにて分離中であり、抗泡沫化および脱泡沫化作用を発揮する有効因子の同定を試みている。

【考 察】

粥状動脈硬化は高脂血症を基盤とする成人病であるが、病変は既に小児期から発症し、漸次進展するものと考えられる。従って、成人の血中コレステロール値とともに、小児の血中コレステロールの管理は、21世紀を担う若者に対する我々の重要な責務と考えられる。Mφの泡沫化系を用いた本研究によって、乳清タンパク質のコレステロール低下作用のメカニズム一端が明確にされた。即ち、乳清タンパク質は細胞コレステロール引き抜きの効率的なアクセプターとして作用していると考えられる。今後、乳清タンパク質の中からこの因子を同定する必要があるが、本現象の発見は社会的には2つの意義があると考えられる。第1に、乳清タンパク質を機能食品として一般食生活に導入し、食事性の高脂血症、特に高コレステロール血症に対して予防的に使用することが可能である。第2には、HDLの抗泡沫化・脱泡沫化作用に対して、乳清タンパク質の促進作用には注目するものがあり、成人の抗動脈硬化剤、あるいはその補助薬剤としての期待が出来ると考えられる。

【謝 辞】

本研究は全国牛乳普及協会の平成3年度研究委託に基づいて行われた研究であり、ここに全国牛乳普及協会に深謝するものである。

【関連文献】

- [1] 宮崎 章、坂本裕一郎、篠原守継、森野能昌、堀内正公：『泡沫化および脱泡沫化現象におけるHDLの役割』動脈硬化発生：進展の解明（住吉昭信・斎藤康編）共立出版 107-119.1991.
- [2] Ohta,T., Hattori,S., Murakami,M., Horiuchi,S., Nishiyama,S., & Matsuda,I.:Isolation of apolipoprotein A-I containing lipoproteins by immunoaffinity chromatography using a formylated derivative of cellulose gel. *Clinica Chimica. Acta*, 179, 183-190. 1989.
- [3] Takahashi,K., Fukuda,S., Naito,M., Horiuchi,S., Takata,K. & Morino,Y.:Endocytic pathway of high density lipoprotein via a trans-Golgi system in rat peritoneal macrophages. *Laboratory Investigation*, 61, 270-277. 1989.
- [4] Rahim, A. T. M. A., Miyazaki, A., Morino, Y. & Horiuchi, S. Biochemical demonstration of endocytosis and subsequent resecretion of high density lipoprotein by rat peritoneal macrophages. *Biochimica Biophysica Acta*, 1082, 195-203. 1991.
- [5] Miyazaki, A., Rahim, A. T. M. A., Araki, S., Morino, Y. and Horiuchi, S. : Chemical cross-linking alters HDL to be recognized a scavenger receptor in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 1082, 143-151, 1991.
- [6] Shinohara, M., Miyazaki, A., Shichiri, M., Morino, Y. and Horiuchi, S. : Exposure of rat peritoneal macrophages to acetylated low density lipoprotein results in release of plasma membrane cholesterol; an efficient substrate for esterification by acyl-CoA : cholesterol acyltransferase. *Jouranal of Biological Chemistry*, 267, 1603-1608, 1992.
- [7] Miyazaki,A., Rahim, A. T. M. A., Ohta, T., Morino, Y. & Horiuchi, S. : High

density lipoprotein mediates selective reduction in cholesteryl esters from macrophage foam cells. Biochimica Biophysica Acta, 1126, 73-80, 1992.

図 1

アセチルLDLに依るマクロファージの泡沫化に及ぼす乳清タンパク質の抗泡沫化作用

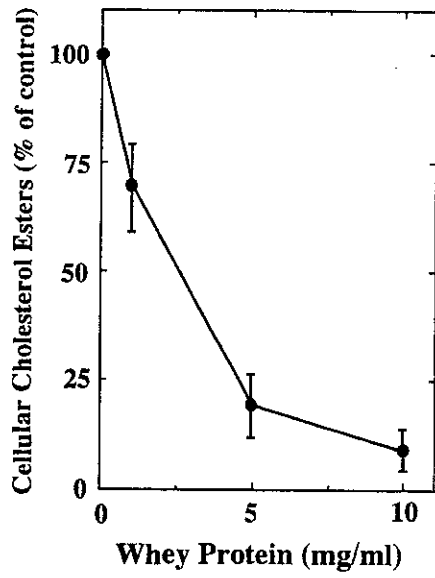


図 2

HDLの抗泡沫化作用に及ぼす乳清タンパク質の影響

