

退行性疾患モデル動物の開発と栄養化学的解析に関する研究

西園, 祥子
九州大学農学研究科食糧化学工学専攻

<https://doi.org/10.11501/3180514>

出版情報：九州大学, 2000, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

第2節 食事スフィンゴリエリンとホスファチジルコリンの効果

緒言

スフィンゴリエリンは、ヒトではホスファチジルコリンに次いで2番目に多いリン脂質である。近年の研究から、スフィンゴリエリンとその代謝産物であるセラミドやスフィンゴシンが、細胞の分化やアポトーシスに関わるシグナル伝達分子となることや細胞のホメオスタシスおよびストレス応答に対して重要な機能分子となる可能性が示唆されている [24、25]。スフィンゴリエリンは消化管でスフィンゴリエリナーゼによりセラミドとホスホコリンに分解され、吸収されるとともに、粘膜細胞のシグナル分子としても作用し、栄養素の吸収に影響する可能性が示唆されている [26]。また、消化管において、スフィンゴリエリンは胆汁酸塩が誘導する細胞毒性を防ぐことが報告されている [27]。

これらの報告から、食事スフィンゴリエリンは第4章第1節で観察された老化促進モデルマウス (SAMP8) における脂肪吸収の低下に対して改善効果を有することが期待される。そこで、食事スフィンゴリエリンの効果について調べるために、純化スフィンゴリエリン (純度99%) を食事に0.1%もしくは0.5%添加して、1ヶ月間飼育した。また、スフィンゴリエリンの効果が、ホスホコリン基に由来するのかセラミド基に由来するのかを調べるために、ホスホコリン基を有するホスファチジルコリンとスフィンゴリエリンの効果を比較した。この際、ホスファチジルコリンおよびスフィンゴリエリンはいずれも、純度99%のものを0.5%食事に添加し、1ヶ月間飼育した。さらに、スフィンゴリエリン摂取の長期的な効果を調べるために、3ヶ月および6ヶ月飼育を行った。この際、多量の純化スフィンゴリエリンが必要となるが、調製が困難なため、スフィンゴリエリンとホスファチジルコリンの混合物 (1:1、w/w、純度99%) を用いた。添加量は、先の実験の純化スフィンゴリエリンの添加量0.1%とスフィンゴリエリン添加量が等しくなるように、0.2%とした。

実験方法

実験試薬

スフィンゴミエリン（純度99%）、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの混合物（1:1、w/w、純度99%）およびホスファチジルコリン（純度99%）は雪印乳業（埼玉）から入手した。ピンクリスチンおよびラクトースはナカライテスク、シッフ試薬はMerck、ライトグリーンはSigma Chemicalsからそれぞれ購入した。

実験動物

マウスは4週齢、雄のSAMR1とSAMP8（SPF、セアック吉富）を用いた。マウスはホワイトフレーク（オリエンタル酵母工業）を敷いたプラスチックケージで1匹ずつ飼育した。第2章と同様に4日間予備飼育を行った。食事は第4章第1節と同様にAIN-76組成に基づく純化食を調製した [45]。その食事組成（g/kg）は、サフラワー油50、カゼイン200、コーンスターチ150、セルロース50、ミネラル混合（AIN-76-MX）35、ビタミン混合（AIN-76-VX）10、DL-メチオニン3、重酒石酸コリン2および蔗糖500とした。これらのマウスを用いて、（1）添加スフィンゴミエリン量を変えた短期飼育（1ヶ月）、（2）スフィンゴミエリンとホスファチジルコリンをそれぞれ添加した短期飼育（1ヶ月）および（3）スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物を与えた長期飼育（3ヶ月および6ヶ月）を行った。（1）添加スフィンゴミエリン量を変えた短期飼育（1ヶ月）では、3つの実験を行った。実験1では、SAMR1とSAMP8に純化食または0.1%スフィンゴミエリン添加食を与え、1ヶ月間飼育した。実験2および3では、純化食または0.5%スフィンゴミエリン添加食を与え、1ヶ月間飼育した。（2）スフィンゴミエリンとホスファチジルコリンをそれぞれ添加した短期飼育（1ヶ月）では、実験4としてSAMP8に0.5%スフィンゴミエリン添加食または0.5%ホスファチジルコリン添加食を与え、1ヶ月間飼育した。（3）スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物を与えた長期飼育（3ヶ月および6ヶ月）では、実験5としてスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの混合物（1:1、w/w）を0.2%添加した食事を3ヶ月または6ヶ月間与えた。純化食およびスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物を添加した食事の脂肪酸組成およびス

テロール量を、Table 4-16とTable 4-17に示す。いずれの実験においても、食事は2日おきに交換した。実験1、2、4および5では飼育終了日の2週間前から6日間糞を採集した。7時間絶食後、ネンブタール麻酔下で心臓採血した。血清は第2章と同様に分離した。

Table 4-16. Fatty acid composition of the control diet and the diet containing the mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine

	Control diet	Test diet
	%	
16:0	7.13±0.24	8.20±0.37
18:0	2.77±0.12	3.15±0.05
18:1(n-9)	12.76±0.19	13.83±0.04
18:1(n-7)	0.76±0.03	0.80±0.02
18:2	76.42±0.34	73.59±0.56

Data are mean±SEM for 3 samples.

Table 4-17. Sterol levels of the control diet and the diet containing the mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine

	Control diet	Test diet
	μg/g diet	
Cholesterol	35.02±1.58	33.57±0.71
Campesterol	11.55±0.33	12.03±0.25
Stigmasterol	6.13±0.21	6.21±0.28
β-Sitosterol	49.49±1.10	51.41±1.58
β-Sitostanol	9.48±0.69	9.64±0.23

Data are mean±SEM for 3 samples.

クリプト細胞の増殖速度の測定

クリプト細胞の増殖速度はGoodladの方法に従って測定した [73]。マウスに生理食塩水で調製した100 $\mu\text{g/ml}$ ピンクリスチンを1 mg/kg体重となるように腹腔内投与し、細胞の分化を中期で停止させた。2時間後、小腸を摘出し、第4章第1節と同様にパラフィン切片を作製した。切片は脱パラフィン後、室温で1 N塩酸に1分浸した後、60°Cの1 N塩酸に10分浸けた。さらに、室温で1 N塩酸に1分浸した後、1分間水洗した。次に、シッフ試薬に45分浸し、10分水洗後、ライトグリーンに10分浸け発色させた。ライトグリーンは0.2%ライトグリーン水溶液100 mlに酢酸0.2 ml添加して調製した。1分間の水洗後、第2章と同様にカナダバルサムで包埋した。

分析

見かけの脂肪吸収率、絨毛およびクリプトの高さ、アルカリホスファターゼおよびスクラーゼ活性、小腸粘膜、肝臓および血清脂質濃度、MGATおよびDGAT活性、脂肪酸代謝関連タンパク質のmRNA発現、糞中の中性ステロール濃度は第4章第1節と同様に測定した。小腸筋層の高さは絨毛およびクリプトの高さと同様に観察し、測定した。ラクターゼ活性はスクラーゼ活性と同様に測定し、0.056 Mスクロース溶液の代わりに、0.056 Mラクトース溶液を用いた。マウスPPAR γ (0.4 kb) のcDNAはHindIIIとBamHIで、18S ribosomal RNA (0.752 kb) のcDNAはSphIとBamHIで制限酵素消化した。マウスPPAR γ のcDNAは藤井博氏 (新潟大学医学部) から頂いた。

小腸粘膜および食事の脂肪酸組成は、総脂質をクロロホルム:メタノール (2:1、v/v) 抽出後、第3章と同様に硫酸:メタノール (1:115、v/v) でトランスメチル化し、脂肪酸メチルエステルとしてOmegawax 320キャピラリーカラム (カラム長30 m、内径0.32 mm、フィルム厚0.25 μm 、キャリアガスヘリウム、スプリット比1:100、カラム温度190°C、インジェクタおよびディテクタ温度250°C、Supelco) によるガスクロマトグラフィーを行った。石鹼膜流量計を用いて、カラム流量は1 ml/minに、スプリット流量は50 ml/minに、セプタムパージ流量は11.5 ml/minに設定した。ガスクロマトグラフはGC-14A (島津製作所) を、データの解析はChromatopac C-R7A (島津製作所) を用いた。

糞中の中性ステロールの測定は第4章第1節と同様に行った。また、食事脂肪をクロロホルム:メタノール (2:1、v/v) で抽出し、ステロール量を測定した。

統計処理

有意差検定はANOVAとSchefféの多重比較またはprotected least significant difference (PLSD) 法により行った。

実験結果

(1) スフィンゴミエリンの効果 (実験1~3)

成長、摂食量、肝臓重量および小腸重量に及ぼす食事スフィンゴミエリンの影響 (実験1および2)

体重および摂食量に及ぼす0.1% (実験1) および0.5% (実験2) スフィンゴミエリン添加食の影響をTable 4-18に示す。初体重および終体重は、いずれの実験でもSAMR1に比べSAMP8で低く、スフィンゴミエリン摂食の影響は見られなかった。体重増加量は、実験1では系統および食事の影響が見られなかったが、実験2ではSAMR1に比べSAMP8で低い値を示した。平均摂食量は実験1では差が見られなかったが、実験2ではSAMR1に比べSAMP8で低く、スフィンゴミエリン摂食により低い値を示した。食事効率も、実験1では差が見られなかったが、実験2ではSAMP8で低い値を示した。

肝臓重量、小腸重量および小腸のタンパク質量に及ぼすスフィンゴミエリンの影響をTable 4-19に示す。肝臓重量はいずれの実験でも、SAMP8で低い値を示した。100 g体重あたりの肝臓重量は、実験1では系統および食事の影響が見られなかったが、実験2ではSAMP8で低い値を示した。空腸重量は、実験2ではSAMP8で低かった。回腸重量は実験1ではスフィンゴミエリン摂食により低い値を示し、実験2ではSAMP8で低い値を示した。空腸のタンパク質量は、実験2ではSAMP8で低く、回腸重量はいずれの実験でもSAMP8で低い値を示した。実験1と実験2では、空腸重量が大きく異なった。これは、実験の手技的なものによると考えられ、そのために

空腸のタンパク質量も実験1と実験2で大きく異なる値となったと思われる。

Table 4-18. Growth parameters in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 1 and 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
<u>Initial body weight (g)</u>							
0.1% Sph	33.0±0.2	32.6±0.2	28.0±0.3	27.6±0.3	P<0.05	NS	NS
0.5% Sph	21.6±0.3	21.6±0.4	19.2±0.3	19.3±0.3	P<0.05	NS	NS
<u>Final body weight (g)</u>							
0.1% Sph	36.0±0.8	35.0±0.8	31.7±0.6	30.4±0.6	P<0.05	NS	NS
0.5% Sph	34.3±0.5	32.9±0.5	28.9±0.3	29.1±0.5	P<0.05	NS	NS
<u>Body weight gain (g)</u>							
0.1% Sph	3.00±0.66	2.38±0.60	3.71±0.47	2.75±0.59	NS	NS	NS
0.5% Sph	16.9±0.5	15.2±0.5	13.3±0.4	13.8±0.7	P<0.05	NS	NS
<u>Food intake (g/day)</u>							
0.1% Sph	4.53±0.13	4.55±0.11	4.70±0.18	4.50±0.13	NS	NS	NS
0.5% Sph	4.69±0.05	4.52±0.07	4.48±0.05	4.40±0.06	P<0.05	P<0.05	NS
<u>Food efficiency (g intake/g day)</u>							
0.1% Sph	0.023±0.005	0.019±0.004	0.028±0.004	0.022±0.005	NS	NS	NS
0.5% Sph	0.139±0.004	0.129±0.005	0.114±0.004	0.121±0.006	P<0.05	NS	NS

Data are mean±SEM for 10 or 11 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% or 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Sph; sphingomyelin, NS; not significant.

Table 4-19. Liver and mucosal weight and mucosal protein in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the diet containing sphingomyelin in experiment 1 and 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
<u>Liver weight (g)</u>							
0.1% Sph	1.84±0.06	1.77±0.06	1.61±0.05	1.49±0.06	P<0.05	NS	NS
0.5% Sph	2.04±0.10	2.03±0.06	1.58±0.05	1.55±0.06	P<0.05	NS	NS
<u>Liver weight (g/100 g body weight)</u>							
0.1% Sph	5.10±0.10	5.00±0.12	5.08±0.09	4.89±0.15	NS	NS	NS
0.5% Sph	5.89±0.23	6.03±0.19	5.37±0.14	5.38±0.11	P<0.05	NS	NS
<u>Jejunum weight (g)</u>							
0.1% Sph	0.238±0.015	0.232±0.017	0.238±0.019	0.229±0.011	NS	NS	NS
0.5% Sph	0.646±0.666	0.666±0.020	0.577±0.021	0.550±0.020	P<0.05	NS	NS
<u>Ileum weight (g)</u>							
0.1% Sph	0.198±0.023	0.182±0.013	0.211±0.020	0.149±0.012	NS	P<0.05	NS
0.5% Sph	0.243±0.019	0.261±0.029	0.199±0.013	0.195±0.013	P<0.05	NS	NS
<u>Mucosal protein (mg)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.1% Sph	34.0±2.7	37.2±1.8	34.4±2.9	35.0±1.8	NS	NS	NS
0.5% Sph	98.4±5.4	95.9±1.8	86.4±3.6	79.7±4.1	P<0.05	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.1% Sph	24.5±2.4	25.9±0.8	21.7±1.4	20.5±1.2	P<0.05	NS	NS
0.5% Sph	35.7±3.3	35.7±4.4	26.2±2.0	25.1±2.1	P<0.05	NS	NS

Data are mean±SEM for 10 or 11 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% or 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Sph; sphingomyelin, NS; not significant.

見かけの脂肪吸収率に及ぼすスフィンゴミエリンの影響 (実験1および2)

実験1および2での見かけの脂肪吸収率をTable 4-20に示す。6日間の糞重量は、実験1ではスフィンゴミエリン摂食により低い値を示したが、実験2ではスフィンゴミエリン摂食の影響は見られなかった。糞中の脂肪重量は、実験1と2のいずれにおいてもSAMP8で高かった。また、実験2においては、スフィンゴミエリン摂食によりSAMR1程度まで低下した。見かけの脂肪吸収率は、いずれの実験でもSAMP8で低く、スフィンゴミエリン摂食によりSAMR1程度まで上昇した。

Table 4-20. Fecal weight, fecal lipid weight and apparent lipid absorption rate in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 1 and 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
<u>Fecal weight (g/6 days)</u>							
0.1% Sph	2.65±0.12	2.43±0.04	2.55±0.14	2.08±0.17	NS	P<0.05	NS
0.5% Sph	2.24±0.08	2.19±0.10	2.35±0.05	2.22±0.05	NS	NS	NS
<u>Fecal lipid weight (mg/6 days)</u>							
0.1% Sph	20.5±0.8	21.4±1.7	39.0±4.5	28.5±1.5	P<0.05	NS	NS
0.5% Sph	18.7±1.2 ^a	17.3±1.6 ^a	27.5±1.7 ^b	18.0±1.5 ^a	P<0.05	P<0.05	P<0.05
<u>Lipid absorption (%)</u>							
0.1% Sph	98.3±0.1 ^b	98.2±0.1 ^b	97.1±0.2 ^a	98.0±0.2 ^b	P<0.05	P<0.05	P<0.05
0.5% Sph	98.3±0.1 ^b	98.4±0.1 ^b	97.5±0.1 ^a	98.4±0.1 ^b	P<0.05	P<0.05	P<0.05

Data are mean±SEM for 6 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% or 0.5% sphingomyelin diet, respectively. ^{ab}Different superscript letters show significant difference at P<0.05 by Scheffé method. Sph; sphingomyelin, NS; not significant.

小腸絨毛および刷子縁膜の発達に及ぼすスフィンゴリエリンの影響（実験1および2）

実験1と2における空腸および回腸での絨毛およびクリプトの高さ、クリプト細胞の増殖速度に及ぼすスフィンゴリエリンの影響をTable 4-21に示す。空腸および回腸の絨毛の高さは、系統および食事の影響を受けなかった。実験2でクリプトの高さは、空腸では差が見られなかったが、回腸ではSAMR1に比べSAMP8で低く、スフィンゴリエリン摂食により高い値を示した。クリプト細胞の増殖速度は、空腸では差は見られなかったが、回腸ではSAMP8で低かった。

実験1および2のアルカリホスファターゼ活性およびスクラーゼ活性をTable 4-22に示す。アルカリホスファターゼ活性は、空腸、回腸ともに差が見られなかった。スクラーゼ活性は、実験1では差が見られなかったが、実験2では空腸において、SAMP8で低く、回腸においてはスフィンゴリエリン摂食により低い値を示した。

小腸粘膜の脂質濃度に及ぼすスフィンゴリエリンの影響（実験1および2）

小腸粘膜の脂質濃度に及ぼすスフィンゴリエリンの影響をTable 4-23に示す。空腸粘膜のトリグリセリド濃度は実験1では、スフィンゴリエリン摂食により低い値を示し、実験2ではSAMP8で低い値を示した。回腸のトリグリセリド濃度は、実験1では差が見られなかったが、実験2ではSAMP8で低い値を示した。空腸のコレステロール濃度は、実験1ではスフィンゴリエリン摂食により高い値を示したが、実験2では差は見られなかった。回腸のコレステロール濃度は、実験1では差が見られなかったが、実験2ではSAMP8で高い値を示した。空腸および回腸のリン脂質濃度は、いずれの実験においても差が見られなかった。

Table 4-21. Villus and crypt heights and crypt cell proliferation rate in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 1 and 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
<u>Villus height (μm)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.1% Sph	350 \pm 14	367 \pm 22	310 \pm 13	276 \pm 13	NS	NS	NS
0.5% Sph	590 \pm 26	613 \pm 30	567 \pm 15	608 \pm 26	NS	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.1% Sph	144 \pm 6	160 \pm 5	150 \pm 7	137 \pm 5	NS	NS	NS
0.5% Sph	179 \pm 10	184 \pm 8	171 \pm 12	198 \pm 8	NS	NS	NS
<u>Crypt height (μm)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.5% Sph	108 \pm 6	112 \pm 3	109 \pm 3	114 \pm 4	NS	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.5% Sph	77.0 \pm 2.6	83.0 \pm 2.8	67.2 \pm 2.7	74.8 \pm 1.7	$P<0.05$	$P<0.05$	NS
<u>Crypt cell proliferation rate (metaphases/crypt/2 h)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.5% Sph	10.6 \pm 0.7	11.4 \pm 0.4	9.56 \pm 0.64	10.0 \pm 0.8	NS	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.5% Sph	9.94 \pm 0.91	11.5 \pm 0.8	6.98 \pm 0.40	7.28 \pm 0.60	$P<0.05$	NS	NS

Data are mean \pm SEM for 3 or 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% or 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Sph; sphingomyelin, NS; not significant.

Table 4-22. Alkaline phosphatase and sucrose activities in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 1 and 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
<u>Alkaline phosphatase ($\mu\text{mol } p\text{-nitrophenol formed/min/mg protein}$)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.1% Sph	0.517±0.067	0.728±0.096	0.711±0.105	0.723±0.157	NS	NS	NS
0.5% Sph	1.22±0.09	1.16±0.07	1.08±0.09	1.28±0.11	NS	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.1% Sph	0.442±0.060	0.353±0.035	0.318±0.031	0.371±0.043	NS	NS	NS
0.5% Sph	0.122±0.010	0.129±0.008	0.131±0.010	0.129±0.009	NS	NS	NS
<u>Sucrase ($\mu\text{mol sucrose hydrolyzed/min/mg protein}$)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.1% Sph	1.23±0.07	1.23±0.05	1.18±0.07	1.15±0.07	NS	NS	NS
0.5% Sph	1.10±0.07	1.20±0.03	0.95±0.04	1.04±0.08	$P<0.05$	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.1% Sph	0.572±0.056	0.530±0.040	0.516±0.047	0.495±0.039	NS	NS	NS
0.5% Sph	0.505±0.012	0.382±0.037	0.447±0.027	0.434±0.030	NS	$P<0.05$	NS

Data are mean±SEM for 6 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% or 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Sph; sphingomyelin, NS; not significant.

Table 4-23. Mucosal lipid levels in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 1 and 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
<u>Triglyceride ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.1% Sph	13.6 \pm 3.2	7.42 \pm 1.38	13.6 \pm 3.1	7.89 \pm 1.94	NS	$P<0.05$	NS
0.5% Sph	10.5 \pm 2.3	13.7 \pm 1.7	6.26 \pm 1.44	8.08 \pm 2.41	$P<0.05$	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.1% Sph	11.8 \pm 4.1	10.2 \pm 2.6	19.4 \pm 3.9	20.7 \pm 6.0	NS	NS	NS
0.5% Sph	30.2 \pm 6.0	43.1 \pm 10.1	11.5 \pm 2.1	13.2 \pm 3.2	$P<0.05$	NS	NS
<u>Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.1% Sph	19.1 \pm 2.0	14.9 \pm 0.7	18.6 \pm 1.7	15.5 \pm 0.6	NS	$P<0.05$	NS
0.5% Sph	14.4 \pm 1.2	14.9 \pm 0.6	14.2 \pm 0.3	16.2 \pm 0.8	NS	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.1% Sph	20.6 \pm 2.6	15.6 \pm 0.4	20.4 \pm 1.9	17.9 \pm 1.4	NS	NS	NS
0.5% Sph	17.0 \pm 0.6	15.9 \pm 1.4	18.0 \pm 1.4	20.5 \pm 1.7	$P<0.05$	NS	NS
<u>Phospholipid ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)</u>							
<i>Jejunum</i>							
0.1% Sph	149 \pm 9	138 \pm 3	160 \pm 14	143 \pm 7	$P<0.05$	NS	NS
0.5% Sph	104.6 \pm 6.3	106.3 \pm 6.6	96.1 \pm 3.9	101.6 \pm 4.2	$P<0.05$	NS	NS
<i>Ileum</i>							
0.1% Sph	136 \pm 13	121 \pm 10	107 \pm 6	118 \pm 9	$P<0.05$	NS	NS
0.5% Sph	79.9 \pm 8.1	90.6 \pm 6.6	84.2 \pm 5.5	80.1 \pm 6.6	$P<0.05$	NS	NS

Data are mean \pm SEM for 6 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% or 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Sph; sphingomyelin, NS; not significant.

MGATおよびDGAT活性に及ぼすスフィンゴミエリンの影響 (実験3)

実験3での小腸ミクロソームMGATおよびDGAT活性をTable 4-24に示す。

MGAT活性に差は見られなかったが、DGAT活性はSAMP8で低かった。

Table 4-24. MGAT and DGAT activities in the small intestine in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 3

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein						
MGAT	28.7±2.9	29.8±1.1	30.2±2.0	31.0±1.5	NS	NS	NS
DGAT	9.19±0.60	8.46±0.91	4.58±1.01	2.57±0.97	$P<0.05$	NS	NS

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% sphingomyelin diet, respectively. MGAT; monoacylglycerol acyltransferase, DGAT; diacylglycerol acyltransferase, NS; not significant.

小腸粘膜脂肪酸組成に及ぼすスフィンゴミエリンの影響 (実験1および2)

小腸粘膜脂肪酸組成に及ぼすスフィンゴミエリンの影響をTable 4-25およびTable 4-26に示す。実験1では、22:5(n-6)のドコサペンタエン酸と22:5(n-3)のドコサヘキサエン酸がSAMR1に比べSAMP8で高く、16:0のパルミチン酸がスフィンゴミエリン摂取により増加した。実験2では、20:3(n-6)のジホモγ-リノレン酸がSAMR1に比べSAMP8で低かった。また、16:1のパルミトレイン酸、18:2のリノール酸、22:4(n-6)のドコサテトラエン酸はスフィンゴミエリン摂取により高い値を示し、18:0のステアリン酸、20:4(n-6)のアラキドン酸、22:5(n-6)のドコサペンタエン酸はスフィンゴミエリン摂取により低い値を示した。

Table 4-25. Fatty acid composition of total phospholipid in the small intestine in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 1

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
	weight%						
16:0	13.3±1.2	15.0±0.6	13.8±0.6	16.7±0.2	NS	<i>P</i> <0.05	NS
16:1	0.7±0.3	1.0±0.2	0.6±0.2	0.5±0.2	NS	NS	NS
18:0	25.0±0.5	23.1±0.6	22.8±0.9	23.2±0.2	NS	NS	NS
18:1	8.0±0.8	7.1±0.5	6.9±0.2	6.6±0.3	NS	NS	NS
18:2	29.6±1.1	28.9±0.7	30.6±1.2	31.5±0.9	NS	NS	NS
20:3 (n-6)	1.8±0.4	1.5±0.1	1.3±0.1	1.4±0.1	NS	NS	NS
20:4 (n-6)	14.4±0.3	14.2±0.5	13.5±1.0	14.2±0.7	NS	NS	NS
22:4 (n-6)	0.8±0.2	0.7±0.0	0.6±0.1	0.7±0.1	NS	NS	NS
22:5 (n-6)	0.5±0.1	0.4±0.0	0.6±0.1	0.5±0.1	<i>P</i> <0.05	NS	NS
22:6 (n-3)	2.6±0.2	2.6±0.1	2.2±0.2	2.2±0.1	<i>P</i> <0.05	NS	NS

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% sphingomyelin diet, respectively. NS; not significant.

Table 4-26. Fatty acid composition of total phospholipid in the small intestine in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
	weight %						
16:0	14.5±0.6	15.6±0.6	15.1±0.5	14.9±0.2	NS	NS	NS
16:1	0.6±0.1	1.0±0.2	0.5±0.1	0.9±0.1	NS	<i>P</i> <0.05	NS
18:0	27.2±0.4	25.8±0.6	26.9±0.3	26.2±0.5	NS	<i>P</i> <0.05	NS
18:1	7.4±0.2	7.2±0.3	7.6±0.3	6.9±0.2	NS	NS	NS
18:2	28.8±0.4	30.8±0.7	28.1±0.7	31.4±0.4	NS	<i>P</i> <0.05	NS
20:3 (n-6)	1.7±0.1	1.7±0.1	1.5±0.0	1.4±0.0	<i>P</i> <0.05	NS	NS
20:4 (n-6)	15.2±0.1	13.0±0.5	15.2±0.3	13.3±0.4	NS	<i>P</i> <0.05	NS
22:4 (n-6)	0.8±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0	NS	<i>P</i> <0.05	NS
22:5 (n-6)	1.1±0.1	0.7±0.1	1.2±0.1	0.8±0.0	NS	<i>P</i> <0.05	NS
22:6 (n-3)	1.2±0.1	1.1±0.0	1.1±0.0	1.2±0.1	NS	NS	NS

Data are mean±SEM for 6 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% sphingomyelin diet, respectively. NS; not significant.

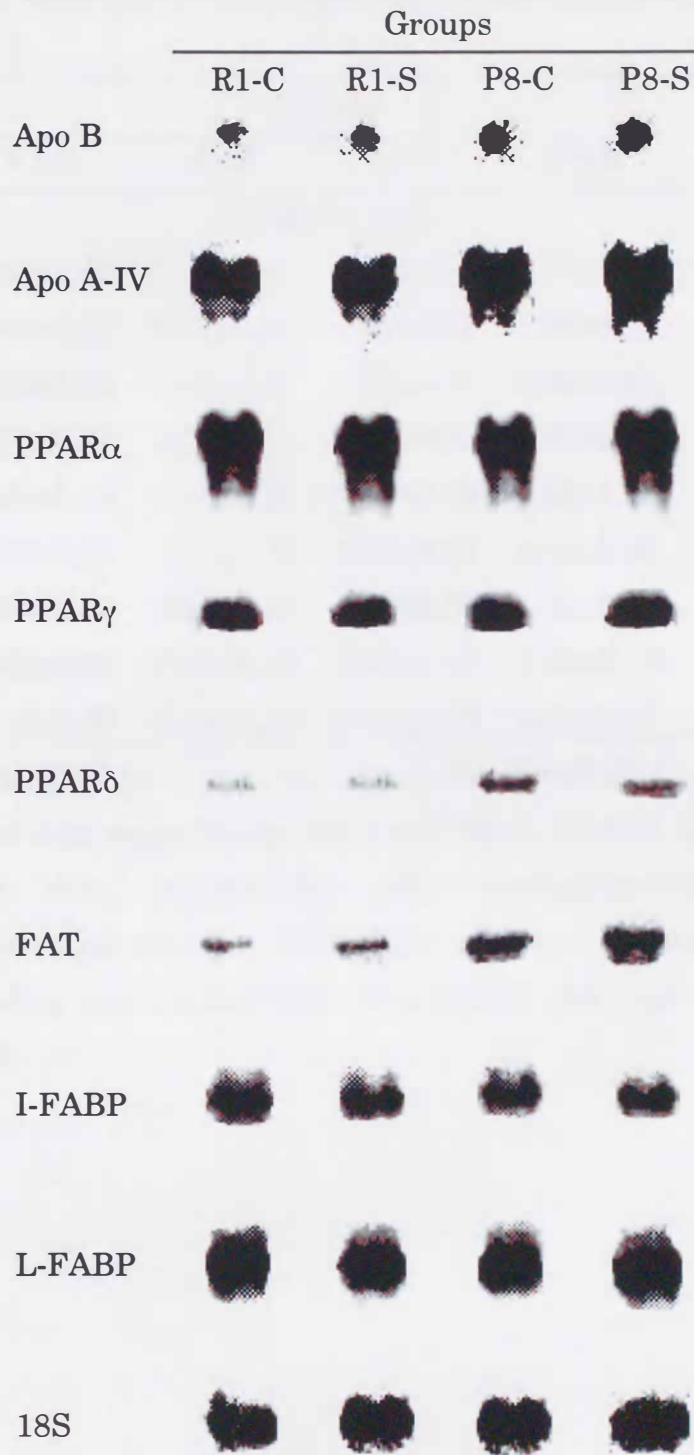
脂肪酸代謝関連タンパク質の発現に及ぼすスフィンゴリエリンの影響 (実験2)

実験2での脂肪酸代謝関連タンパク質の発現をFigure 4-5およびTable 4-27に示す。PPAR α 、PPAR γ 、I-FABP、L-FABPおよび18S mRNA量に差は見られなかったが、apo B、apo A-IV、PPAR δ およびFAT mRNA量はSAMR1に比べSAMP8で高い値を示した。

血清および肝臓の脂質濃度に及ぼすスフィンゴリエリンの影響 (実験1および2)

実験1と2における血清および肝臓の脂質濃度に及ぼすスフィンゴリエリンの影響をTable 4-28に示す。血清のトリグリセリド濃度は、実験1では差が見られなかったが、実験2ではスフィンゴリエリン摂食により高い値を示した。血清のコレステロール濃度およびリン脂質濃度はいずれの実験においても、SAMR1に比べSAMP8で低く、スフィンゴリエリン摂食により低い値を示した。肝臓のトリグリセリド濃度は、実験1では差が見られなかったが、実験2ではSAMR1に比べSAMP8で低く、スフィンゴリエリン摂食により高い値を示した。肝臓のコレステロール濃度は、実験1ではSAMP8で高く、実験2では低い値を示した。肝臓のリン脂質濃度は、実験1ではSAMR1に比べSAMP8で低く、実験2ではSAMP8で高かった。

Figure 4-5. Intestinal mRNA abundance for fatty acid metabolism-related proteins in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 2



R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Apo; apolipoprotein, PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor, FAT; fatty acid translocase, I-FABP; intestinal fatty acid binding protein, L-FABP; liver FABP, 18S; 18S ribosomal RNA, NS; not significant.

Table 4-27. Intestinal mRNA abundance for fatty acid metabolism-related proteins in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
	Arbitrary unit						
Apo B	1.00±0.40	1.42±0.43	3.79±0.29	2.77±0.33	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Apo A-IV	1.00±0.07	1.09±0.12	1.42±0.24	1.85±0.18	<i>P</i> <0.05	NS	NS
PPAR α	1.00±0.20	1.05±0.22	0.92±0.11	0.99±0.21	NS	NS	NS
PPAR γ	1.00±0.08	1.06±0.10	0.91±0.07	0.95±0.13	NS	NS	NS
PPAR δ	1.00±0.26	1.40±0.38	2.87±0.59	2.42±0.65	<i>P</i> <0.05	NS	NS
FAT	1.00±0.23	1.58±0.43	2.84±0.38	2.26±0.50	<i>P</i> <0.05	NS	NS
I-FABP	1.00±0.21	0.88±0.25	1.10±0.23	1.35±0.39	NS	NS	NS
L-FABP	1.00±0.03	0.93±0.10	1.10±0.08	1.00±0.10	NS	NS	NS
18S	1.00±0.07	0.96±0.07	0.92±0.17	0.83±0.21	NS	NS	NS

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Apo; apolipoprotein, PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor, FAT; fatty acid translocase, I-FABP; intestinal fatty acid-binding protein, L-FABP; liver FABP, 18S; 18S ribosomal RNA, NS; not significant.

Table 4-28. Serum and liver lipid levels in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin containing diet in experiment 1 and 2

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-S	P8-C	P8-S	Strain	Diet	SxD
<i>Serum</i>							
<u>Triglyceride (mg/dl)</u>							
0.1% Sph	82.9±5.0	94.0±6.3	92.3±7.2	98.0±5.6	NS	NS	NS
0.5% Sph	78.4±3.1	98.3±8.1	85.8±5.0	108±10	NS	P<0.05	NS
<u>Cholesterol (mg/dl)</u>							
0.1% Sph	227±10	207±9	141±3	131±2	P<0.05	P<0.05	NS
0.5% Sph	284±10	224±8	223±6	154±8	P<0.05	P<0.05	NS
<u>Phospholipid (mg/dl)</u>							
0.1% Sph	309±13	277±11	221±7	200±4	P<0.05	P<0.05	NS
0.5% Sph	394±12	307±7	300±5	216±11	P<0.05	P<0.05	NS
<i>Liver</i>							
<u>Triglyceride (mg/g liver)</u>							
0.1% Sph	36.8±5.0	34.4±4.7	52.2±2.7	47.9±5.0	NS	NS	NS
0.5% Sph	38.8±5.2	61.2±6.1	28.1±4.2	29.6±5.6	P<0.05	P<0.05	NS
<u>Cholesterol (mg/g liver)</u>							
0.1% Sph	2.81±0.19	2.88±0.15	3.27±0.11	3.37±0.27	P<0.05	NS	NS
0.5% Sph	3.46±0.10	3.64±0.19	3.21±0.08	2.94±0.17	P<0.05	NS	NS
<u>Phospholipid (mg/g liver)</u>							
0.1% Sph	31.3±0.8	31.5±1.6	29.9±0.4	30.9±1.0	P<0.05	NS	NS
0.5% Sph	29.4±0.6	29.5±0.7	30.2±0.8	32.0±0.6	P<0.05	NS	NS

Data are mean±SEM for 6 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-S and P8-S; SAMR1 and SAMP8 fed 0.1% or 0.5% sphingomyelin diet, respectively. Sph; sphingomyelin, NS; not significant.

(2) スフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの効果 (実験4)

成長、摂食量、肝臓重量および小腸重量に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響の比較

実験4における成長、摂食量、肝臓重量および小腸重量に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響をTable 4-29に示す。初体重、終体重、平均摂食量、食事効率、肝臓重量および小腸重量は、3群で差は見られなかった。空腸のタンパク質量はスフィンゴミエリン摂食群に比べホスファチジルコリン摂食群で高かった。回腸のタンパク質量に差は見られなかった。

Table 4-29. Growth parameters in SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
Initial body weight (g)	20.2±0.1	20.1±0.4	20.1±0.4
Final body weight (g)	28.7±0.5	28.1±0.6	27.5±0.6
Gain (g)	8.54±0.28	7.96±0.53	7.54±0.62
Food intake (g/day)	4.44±0.04	4.41±0.07	4.38±0.06
Food efficiency	0.0641±0.0020	0.0602±0.0037	0.0625±0.0026
Liver weight (g)	1.44±0.03	1.44±0.03	1.38±0.04
Relative liver weight	5.10±0.08	5.12±0.08	5.18±0.12
Jejunum weight (g)	0.531±0.022	0.509±0.017	0.554±0.019
Ileum weight (g)	0.217±0.007	0.224±0.013	0.211±0.011
Jejunum protein (mg)	80.8±2.4 ^{ab}	74.8±2.7 ^a	83.4±1.5 ^b
Ileum protein (mg)	29.9±1.1	33.2±1.2	31.3±2.0

Data are mean±SEM for 13 mice (Control), 14 mice (Sph) or 12 mice (PC).

^{ab}Different superscript letters show significant differences at $P<0.05$ by PLSD method. Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

見かけの脂肪吸収率に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響の比較

実験4における見かけの脂肪吸収率に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響をTable 4-30に示す。糞重量に差は見られなかったが、糞中の脂肪重量はコントロール群に比べスフィンゴミエリン摂食群で低く、ホスファチジルコリン摂食群では中間的な値を示した。見かけの脂肪吸収率はコントロール群に比べスフィンゴミエリン摂食群で高く、ホスファチジルコリン摂食群では中間的な値を示した。

Table 4-30. Fecal weight, fecal lipid weight and apparent lipid absorption rate in SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
Fecal weight (6 days)	2.47±0.04	2.45±0.07	2.35±0.05
Fecal lipid weight (mg/6 days)	74.4±1.9 ^b	65.5±2.0 ^a	68.4±2.6 ^{ab}
Lipid absorption (%)	94.3±0.2 ^a	95.0±0.2 ^b	94.6±0.2 ^{ab}

Data are mean±SEM for 10 mice per group. ^{ab}Different superscript letters show significant differences at $P<0.05$ by PLSD method. Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

小腸絨毛および刷子縁膜の発達に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響の比較

実験4における小腸絨毛および刷子縁膜の発達に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響をTable 4-31に示す。空腸および回腸の絨毛、クリプトおよび筋層の高さ、アルカリホスファターゼ活性に差は見られなかった。スクラーゼ活性は、空腸ではスフィンゴミエリン摂食群と比較してホスファチジルコリン摂食群で低い値を示したが、回腸では差が見られなかった。

Table 4-31. Villus, crypt and muscularis heights and alkaline phosphatase and sucrase activities in SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
Villus height (μm)			
Jejunum	566 \pm 44	451 \pm 44	502 \pm 52
Ileum	115 \pm 7	133 \pm 7	127 \pm 6
Crypt height (μm)			
Jejunum	49.0 \pm 4.7	43.0 \pm 2.5	46.5 \pm 6.2
Ileum	33.0 \pm 2.4	35.5 \pm 1.3	35.5 \pm 2.5
Muscularis height (μm)			
Jejunum	23.5 \pm 2.5	18.5 \pm 3.0	24.0 \pm 3.7
Ileum	25.5 \pm 1.9	28.0 \pm 2.2	20.0 \pm 3.3
Alkaline phosphatase ($\mu\text{mol } p\text{-nitrophenol formed/min/mg protein}$)			
Jejunum	1.40 \pm 0.08	1.37 \pm 0.05	1.74 \pm 0.28
Ileum	0.123 \pm 0.013	0.149 \pm 0.026	0.129 \pm 0.013
Sucrase ($\mu\text{mol sucrase hydrolyzed/min/mg protein}$)			
Jejunum	1.01 \pm 0.06 ^{ab}	1.17 \pm 0.07 ^b	0.962 \pm 0.044 ^a
Ileum	0.394 \pm 0.044	0.434 \pm 0.050	0.495 \pm 0.066

Data are mean \pm SEM for 4 mice per group. ^{ab}Different superscript letters show significant differences at $P < 0.05$ by PLSD method. Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

小腸粘膜の脂質濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響の比較

実験4における小腸粘膜の脂質濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響をTable 4-32に示す。空腸および回腸のトリグリセリド濃度は、スフィンゴミエリン摂食群で他群より高い傾向があり、特にホスファチジルコリン摂食群と比較すると有意差があった。空腸および回腸のコレステロール濃度に差は見られなかった。空腸のリン脂質濃度はコントロール群に比べスフィンゴミエリン摂食群で高く、ホスファチジルコリン摂食群では中間的な値を示した。回腸のリン脂質濃度に差は見られなかった。

Table 4-32. Mucosal lipid levels in SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
	$\mu\text{g}/\text{mg}$ protein		
Triglyceride			
Jejunum	10.6 \pm 3.0 ^{ab}	20.3 \pm 4.9 ^b	7.36 \pm 0.71 ^a
Ileum	180 \pm 34 ^{ab}	250 \pm 37 ^b	119 \pm 45 ^a
Cholesterol			
Jejunum	16.4 \pm 1.1	18.5 \pm 0.8	15.8 \pm 1.0
Ileum	20.7 \pm 2.1	17.3 \pm 0.5	17.8 \pm 0.9
Phospholipid			
Jejunum	123 \pm 7 ^a	135 \pm 3 ^b	128 \pm 6 ^{ab}
Ileum	105 \pm 17	112 \pm 2	112 \pm 9

Data are mean \pm SEM for 4 mice (Control, PC) or 5 mice (Sph).

^{ab}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$ by PLSD method. Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

小腸粘膜トリグリセリドおよびリン脂質の脂肪酸組成に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響の比較

実験4における小腸粘膜トリグリセリドおよびリン脂質の脂肪酸組成及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響をTable 4-33およびTable 4-34に示す。小腸粘膜トリグリセリドの脂肪酸組成は、3群で差が見られなかった。

小腸粘膜リン脂質の脂肪酸組成は18:1(n-7)、20:4(n-6)がスフィンゴミエリン摂食群で低かった。18:2(n-6)は、コントロール群に比べホスファチジルコリン摂食群で高く、スフィンゴミエリン摂食群でさらに高い値を示した。22:5(n-6)はコントロール群に比べスフィンゴミエリン摂食群およびホスファチジルコリン摂食群で低い値を示した。22:6(n-3)はコントロール群およびスフィンゴミエリン摂食群にくらべホスファチジルコリン摂食群で高い値を示した。

Table 4-33. Fatty acid composition of triglyceride in the small intestine of SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
		%	
16:0	18.8±3.4	23.7±0.6	18.3±3.3
16:1	4.7±1.4	6.2±0.6	3.4±0.9
18:0	4.4±1.4	3.8±0.6	6.2±1.3
18:1(n-9)	28.4±2.0	26.1±1.0	25.5±0.6
18:1(n-7)	2.3±0.3	2.0±0.1	2.0±0.1
18:2(n-6)	34.5±1.1	32.7±0.7	36.6±2.8

Data are mean±SEM for 4 mice (Control, PC), 5 mice (Sph). Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

Table 4-34. Fatty acid composition of total phospholipids in the small intestine of SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
		%	
16:0	14.0±0.1	14.1±0.2	14.3±0.23
16:1	0.8±0.1	1.0±0.1	0.6±0.1
18:0	25.1±0.3	23.3±0.6	24.7±0.7
18:1(n-9)	1.6±0.0	1.4±0.0	1.6±0.1
18:1(n-7)	2.3±0.3 ^b	2.0±0.1 ^a	2.0±0.1 ^b
18:2(n-6)	29.8±0.2 ^a	34.0±0.5 ^c	31.6±0.7 ^b
20:3(n-6)	1.2±0.0	1.2±0.0	1.3±0.1
20:4(n-6)	15.3±0.3 ^b	13.2±0.3 ^a	14.2±0.4 ^b
22:4(n-6)	1.2±0.1	1.1±0.1	1.1±0.0
22:5(n-6)	1.8±0.1 ^b	1.0±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a
22:6(n-3)	1.0±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a	1.4±0.1 ^b

Data are mean±SEM for 4 mice (Control, PC), 5 mice (Sph).

^{abc}Different superscript letters show significant difference at $P<0.05$ by PLSD method. Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

血清脂質濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響の比較

実験4における血清の脂質濃度をTable 4-35に示す。血清のトリグリセリド濃度に差は見られなかったが、血清のコレステロール濃度およびリン脂質濃度はコントロール群およびホスファチジルコリン摂食群と比較してスフィンゴミエリン摂食群で低かった。

Table 4-35. Serum lipid levels in SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
		mg/dl	
Triglyceride	90.2±6.4	101±8	103±10
Cholesterol	162±8 ^b	119±9 ^a	144±8 ^b
Phospholipid	263±9 ^b	204±10 ^a	249±8 ^b

Data are mean±SEM for 13 mice (Control), 14 mice (Sph) or 12 mice (PC). ^{ab}Different superscript letters show significant difference at $P<0.05$ by PLSD method. Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

糞中へのステロール排泄に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響の比較

実験4における糞中へのステロール排泄に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの影響をTable 4-36に示す。糞中のコレステロール量はコントロール群およびホスファチジルコリン摂食群と比較して、スフィンゴミエリン摂食群で高かった。糞中のコプロシトスタノール、カンペステロールおよびβ-シトステロールおよび総植物ステロール量に差は見られなかった。

Table 4-36. Fecal sterol excretion in SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin diet or the phosphatidylcholine diet in experiment 4

Groups	Control	Sph	PC
		mg/day	
Cholesterol	0.719±0.049 ^a	0.912±0.127 ^b	0.732±0.066 ^a
Coprostostanol	0.314±0.025	0.329±0.045	0.348±0.030
Campesterol	0.083±0.003	0.079±0.004	0.099±0.010
β-Sitosterol	0.274±0.009	0.279±0.013	0.316±0.030
Total plant sterol	0.672±0.035	0.687±0.058	0.763±0.057

Data are mean±SEM for 5 mice per group. ^{ab}Different superscript letters show significant difference at $P<0.05$ by PLSD method. Sph; sphingomyelin, PC; phosphatidylcholine.

(3) スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の効果 (実験5)

成長、摂食量、肝臓重量および小腸重量に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における成長および摂食量に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-37に示す。初体重はSAMR1に比べSAMP8で低く、3ヶ月飼育のSAMP8よりも6ヶ月飼育のSAMP8がわずかに大きかった。終体重および体重増加量はSAMR1に比べSAMP8で低く、3ヶ月飼育よりも6ヶ月飼育で高い値を示した。平均摂食量はSAMP8で高く、6ヶ月飼育で低い値を示した。食事効率はSAMP8で低く、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の摂食により低い値を示した。また、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低い値を示した。

実験5における肝臓重量、体重100 g当たりの肝臓重量、空腸と回腸重量および空腸と回腸のタンパク質量をTable 4-38に示す。肝臓重量はSAMR1に比べSAMP8で低く、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の摂食により低い値を示した。また、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で高い値を示したが、体重100 g当たりの肝臓重量を算出したところ、飼育期間の影響は見られなかった。空腸重量はSAMP8で低く、6ヶ月で高い値を示した。回腸重量は6ヶ月飼育で高かった。空腸および回腸のタンパク質量は、重量と同じ傾向を示した。

見かけの脂肪吸収率に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における見かけの脂肪吸収率に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-39に示した。糞重量は6ヶ月飼育で低い値を示した。糞中の脂肪重量は、3ヶ月飼育ではSAMR1に比べSAMP8で高い値を示した。6ヶ月飼育では、3ヶ月飼育に比べ低い値を示し、系統による違いは見られなかった。見かけの脂肪吸収率は、3ヶ月飼育ではSAMP8で低く、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で高い値を示した。6ヶ月飼育では系統による違いは見られなかった。

Table 4-37. Growth parameters in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
Initial body weight (g)	25.1±0.4 ^c	25.0±0.3 ^c	21.1±0.4 ^a	20.9±0.3 ^a	25.4±0.5 ^c	25.7±0.3 ^c	22.7±0.2 ^b	22.4±0.2 ^b	Strain, Period, SxP
Final body weight (g)	42.5±0.6	41.1±0.5	35.4±1.0	33.2±1.0	44.8±1.2	45.5±1.1	38.5±1.0	37.4±0.6	Strain, Period
Body weight gain (g)	17.4±0.6	16.1±0.4	14.3±0.6	12.4±0.8	19.4±1.2	19.8±0.9	15.8±1.0	15.0±0.6	Strain, Period
Food intake (g/day)	4.38±0.08	4.31±0.05	4.49±0.09	4.48±0.12	4.05±0.06	4.15±0.05	4.39±0.07	4.42±0.06	Strain, Period
Food efficiency (g gain/g intake)	0.044±0.002	0.041±0.001	0.035±0.002	0.030±0.002	0.027±0.002	0.027±0.001	0.020±0.001	0.019±0.001	Strain, Diet, Period

Data are mean±SEM for 10 or 11 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{abc}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$ by Scheffé method. NS; not significant.

Table 4-38. Liver and mucosal weights and mucosal protein in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-PS	P8-C	P8-PS	R1-C	R1-PS	P8-C	P8-PS	Strain, Diet, Period
Liver weight (g)	2.02±0.05	1.86±0.06	1.49±0.07	1.40±0.04	2.17±0.13	1.99±0.09	1.58±0.07	1.52±0.03	Strain, Diet, Period
Relative liver weight (g/100 g body weight)	4.76±0.10	4.52±0.14	4.23±0.18	4.22±0.11	4.82±0.20	4.36±0.13	4.11±0.08	4.08±0.08	Strain, Diet
Jejunum weight (g)	0.669±0.029	0.634±0.030	0.583±0.005	0.610±0.013	0.697±0.014	0.706±0.018	0.669±0.026	0.631±0.027	Strain, Period
Ileum weight (g)	0.240±0.021	0.241±0.010	0.212±0.012	0.226±0.031	0.295±0.022	0.289±0.012	0.325±0.023	0.319±0.017	Period
Jejunum protein (mg)	136±6	140±8	119±4	129±5	180±11	180±7	148±4	154±11	Strain, Period
Ileum protein (mg)	57.7±1.7	55.6±1.4	50.0±2.5	52.6±8.3	103±6	110±2	106±5	102±8	Period

Data are mean±SEM for 10 or 11 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-PS and P8-PS; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the 0.2% level, respectively. NS; not significant.

Table 4-39. Fecal weight, fecal lipid weight and apparent lipid absorption rate in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
Fecal weight (g/6 days)	2.38±0.11	2.34±0.05	2.52±0.05	2.44±0.13	1.98±0.06	2.16±0.06	2.26±0.13	2.09±0.07	Period
Fecal lipid weight (mg/6 days)	43.2±3.0 ^a	40.3±5.6 ^a	66.5±2.1 ^b	64.3±8.0 ^b	33.9±1.9 ^a	30.6±1.2 ^a	41.1±6.7 ^a	35.3±3.1 ^a	Strain, Period, SxP
Lipid absorption (%)	95.9±0.4 ^b	96.1±0.5 ^b	94.0±0.3 ^a	94.2±0.5 ^a	96.2±0.1 ^b	96.6±0.1 ^b	95.6±0.6 ^b	96.0±0.3 ^b	Strain, Period, SxP

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{ab}Different superscript letters show significant difference at $P<0.05$ by Scheffé method. NS; not significant.

小腸絨毛および刷子縁膜の発達に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における小腸絨毛および刷子縁膜の発達に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-40に示す。空腸絨毛の長さはSAMP8では、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低い値を示した。回腸絨毛の長さは、SAMP8で短く、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の摂食によりSAMR1程度まで増加した。クリプトの長さは、空腸では差は見られなかったが、回腸では混合物の摂食により長く、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で短くなった。純化スフィンゴミエリンを摂食させた短期飼育の実験から、スフィンゴミエリン摂食により小腸の弾力が増加するように思われたために、小腸筋層の高さを測定した。空腸筋層の高さは、6ヶ月飼育で低く、回腸では6ヶ月飼育のSAMR1に比べ、3ヶ月飼育の混合物を摂食したSAMP8で高い値を示した。

実験5におけるアルカリホスファターゼ、スクラーゼおよびラクターゼ活性に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-41に示す。アルカリホスファターゼ活性は、空腸では3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低く、6ヶ月飼育ではSAMP8で低い値を示した。回腸では、SAMP8で低く、6ヶ月飼育で低い値を示した。スクラーゼ活性は、空腸では6ヶ月飼育で低かった。回腸では、SAMP8で低く、6ヶ月飼育で低い値を示した。ラクターゼ活性は、空腸ではSAMR1に比べSAMP8で低く、6ヶ月飼育で低い値を示した。回腸では3ヶ月飼育に比べ、6ヶ月飼育で低い値を示した。

Table 4-40. Villus, crypt and muscularis heights in the small intestine in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
Villus height (μm)									
Jejunum	516 \pm 42 ^{ab}	615 \pm 23 ^{bd}	701 \pm 60 ^d	643 \pm 20 ^{cd}	565 \pm 28 ^{abc}	562 \pm 53 ^{abc}	477 \pm 24 ^a	555 \pm 40 ^{abc}	Period, SxP, SxDxP
Ileum	178 \pm 10 ^b	183 \pm 9 ^b	150 \pm 9 ^a	180 \pm 7 ^b	179 \pm 9 ^b	192 \pm 4 ^b	140 \pm 10 ^a	196 \pm 8 ^b	Strain, Diet, SxD
Crypt height (μm)									
Jejunum	56.8 \pm 4.5	63.0 \pm 3.3	66.4 \pm 6.7	69.7 \pm 2.2	59.2 \pm 3.2	61.0 \pm 2.7	51.2 \pm 3.3	64.0 \pm 3.5	NS
Ileum	48.4 \pm 7.1	53.0 \pm 3.7	41.6 \pm 6.7	52.7 \pm 3.4	37.2 \pm 4.2	40.7 \pm 1.0	33.6 \pm 1.9	38.7 \pm 2.0	Diet, Period
Muscularis height (μm)									
Jejunum	36.0 \pm 5.8	33.3 \pm 6.2	37.6 \pm 5.2	37.7 \pm 5.4	34.8 \pm 4.5	37.0 \pm 4.6	48.4 \pm 5.2	53.0 \pm 5.0	Period
Ileum	38.4 \pm 2.3 ^{ab}	41.7 \pm 3.3 ^{ab}	37.2 \pm 2.1 ^{ab}	47.0 \pm 4.2 ^b	32.4 \pm 5.8 ^a	42.0 \pm 6.2 ^{ab}	41.2 \pm 5.2 ^{ab}	41.7 \pm 5.4 ^{ab}	SxDxP

Data are mean \pm SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{abcd}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$ by Scheffé method. NS; not significant.

Table 4-41. Alkaline phosphatase, sucrase and lactase activities in the intestinal mucosa in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
Alkaline phosphatase ($\mu\text{mol } p\text{-nitrophenol formed/min/mg protein}$)									
Jejunum	1.29 \pm 0.05 ^c	1.32 \pm 0.10 ^c	1.30 \pm 0.11 ^c	1.17 \pm 0.11 ^c	1.13 \pm 0.06 ^c	1.04 \pm 0.06 ^{bc}	0.66 \pm 0.13 ^a	0.77 \pm 0.11 ^{ab}	Strain, Period, SxP
Ileum	0.16 \pm 0.02	0.18 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.077 \pm 0.003	0.070 \pm 0.002	0.056 \pm 0.004	0.057 \pm 0.003	Strain, Period
Sucrase ($\mu\text{mol sucrose hydrolyzed/min/mg protein}$)									
Jejunum	1.10 \pm 0.05	1.13 \pm 0.05	1.10 \pm 0.07	1.02 \pm 0.10	0.76 \pm 0.05	0.77 \pm 0.03	0.71 \pm 0.09	0.72 \pm 0.06	Period
Ileum	0.54 \pm 0.06	0.62 \pm 0.06	0.45 \pm 0.03	0.47 \pm 0.06	0.34 \pm 0.03	0.33 \pm 0.01	0.33 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	Strain, Period
Lactase ($\mu\text{mol lactose hydrolyzed/min/mg protein}$)									
Jejunum	0.12 \pm 0.00	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	0.09 \pm 0.01	0.087 \pm 0.006	0.089 \pm 0.008	0.081 \pm 0.013	0.082 \pm 0.008	Strain, Period
Ileum	0.11 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	0.11 \pm 0.02	0.063 \pm 0.001	0.068 \pm 0.004	0.072 \pm 0.006	0.071 \pm 0.006	Period

Data are mean \pm SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{abc}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$ by Scheffé method. NS; not significant.

小腸粘膜の脂質濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における小腸粘膜の脂質濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-42に示す。空腸粘膜のトリグリセリド濃度は、6ヶ月飼育のSAMP8で高い値を示した。回腸では、SAMR1に比べSAMP8で著しく高い値を示した。空腸のコレステロール濃度は混合物の摂食により低い値を示し、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低い値を示した。空腸のリン脂質濃度は6ヶ月飼育で低い値を示した。回腸のリン脂質濃度は、SAMP8で低く、6ヶ月飼育で低い値を示した。

小腸粘膜トリグリセリドおよびリン脂質画分の脂肪酸組成に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における小腸粘膜トリグリセリドおよびリン脂質画分の脂肪酸組成に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-43およびTable 4-44に示す。小腸粘膜トリグリセリド画分の脂肪酸組成は、16:0のパルミチン酸がSAMR1に比べSAMP8で低く、18:2(n-6)のリノール酸がSAMR1に比べSAMP8で高かった。18:0のステアリン酸はSAMR1に比べSAMP8で低く、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低い値を示した。18:1(n-9)のオレイン酸は6ヶ月飼育で高い値を示した。18:1(n-7)はSAMP8で低く、6ヶ月齢で高い値を示した。

小腸粘膜リン脂質画分の脂肪酸組成は、16:0のパルミトレイン酸が、純化食を3ヶ月摂食したSAMP8に比べスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物を添加した食事を6ヶ月間摂食したSAMP8で高い値を示した。18:0のステアリン酸は3ヶ月飼育のSAMP8に比べスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物を6ヶ月間摂食したSAMP8で低い値を示した。18:1(n-9)のオレイン酸は3ヶ月飼育のSAMP8に比べ6ヶ月飼育のSAMP8で高い値を示した。18:2(n-6)のリノール酸は、純化食を3ヶ月摂食したSAMP8に比べ、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物を含む食事を6ヶ月間摂食したSAMP8で高い値を示した。20:4(n-6)のアラキドン酸は3ヶ月飼育のSAMP8に比べ6ヶ月飼育のSAMP8で低い値を示した。22:5(n-6)のドコサペンタエン酸はSAMR1に比べSAMP8で高く、3ヶ月飼育に比べ6

ヶ月飼育で高い値を示した。22:6(n-3)のドコサヘキサエン酸は混合物の摂食により高い値を示した。

脂肪酸代謝関連タンパク質発現に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における脂肪酸代謝関連タンパク質発現に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-45に示す。apo A-IV、I-FABPおよびL-FABP mRNA量は系統、食事、摂食期間いずれの影響も見られなかった。Apo B mRNA量は3ヶ月では、SAMR1に比べSAMP8に混合物を摂食させると高い値を示した。また、3ヶ月飼育のSAMR1に比べて、混合物を摂食させた6ヶ月飼育のSAMR1で高い値を示した。PPAR α およびFAT mRNA量は6ヶ月飼育で高い値を示した。PPAR δ mRNA量はSAMP8で高い値を示した。

血清脂質濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における血清脂質濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-46に示す。血清のトリグリセリド濃度は、3ヶ月飼育ではSAMR1に比べSAMP8で低く、6ヶ月齢では両系統で差は見られなかった。SAMR1は3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低い値を示した。血清コレステロール濃度は、SAMR1に比べSAMP8で低く、混合物摂食により低い値を示した。また、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で高い値を示した。血清のリン脂質濃度は、SAMR1に比べSAMP8で低く、混合物の摂食によりさらに低い値を示した。

Table 4-42. Mucosal lipid levels in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
Triglyceride ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)									
Jejunum	4.50 \pm 0.89 ^a	4.79 \pm 0.67 ^a	6.94 \pm 1.80 ^a	9.60 \pm 2.15 ^{ab}	4.79 \pm 0.71 ^a	4.79 \pm 1.22 ^a	34.5 \pm 11.5 ^c	22.2 \pm 4.7 ^{bc}	Strain, Period, SxP
Ileum	41.6 \pm 20.7	32.1 \pm 9.2	208 \pm 76	196 \pm 65	31.4 \pm 15.7	18.1 \pm 8.3	161 \pm 48	235 \pm 37	Strain
Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)									
Jejunum	13.5 \pm 0.6	12.5 \pm 0.9	13.1 \pm 0.7	11.8 \pm 0.5	10.9 \pm 0.7	10.7 \pm 0.5	11.2 \pm 1.2	9.10 \pm 0.83	Diet, Period
Ileum	11.6 \pm 0.7	11.6 \pm 0.8	11.1 \pm 0.5	10.7 \pm 0.8	7.74 \pm 0.31	7.28 \pm 0.24	7.21 \pm 0.78	6.74 \pm 0.79	Period
Phospholipid ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)									
Jejunum	80.2 \pm 5.8	79.5 \pm 4.0	86.5 \pm 4.3	70.8 \pm 6.0	68.6 \pm 7.2	71.7 \pm 5.9	61.5 \pm 6.5	63.8 \pm 7.1	Period
Ileum	62.9 \pm 6.2	64.2 \pm 5.2	45.0 \pm 3.3	44.4 \pm 9.3	46.5 \pm 3.5	44.4 \pm 3.8	37.3 \pm 5.8	34.6 \pm 6.4	Strain, Period

Data are mean \pm SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{abc}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$ by Scheffé method. NS; not significant.

Table 4-43. Fatty acid composition of triglyceride in the small intestine of SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
	%								
14:0	0.88±0.22	1.15±0.65	0.80±0.19	0.77±0.25	0.95±0.03	1.00±0.24	0.78±0.12	0.62±0.13	NS
16:0	21.06±0.55	22.32±0.42	17.70±1.32	18.98±1.51	21.38±0.94	19.30±1.00	18.60±0.77	16.87±0.96	Strain
16:1	4.89±0.79	4.84±1.41	5.13±0.77	4.98±0.77	5.29±0.73	5.06±0.60	5.43±0.42	5.37±0.40	NS
18:0	4.78±1.04	7.63±2.86	3.69±0.62	4.52±1.14	4.77±1.92	3.89±0.92	2.06±0.23	2.02±0.18	Strain, Period
18:1(n-9)	33.68±1.88	32.20±1.99	35.28±1.86	32.20±1.59	36.14±2.48	38.40±2.16	37.73±0.97	36.87±0.53	Period
18:1(n-7)	3.50±0.18	3.18±0.38	2.78±0.13	2.76±0.24	3.66±0.24	3.44±0.42	3.28±0.07	3.07±0.18	Strain, Period
18:2(n-6)	32.08±1.82	29.82±1.43	35.42±0.81	37.11±1.09	28.76±0.93	29.91±1.00	32.91±0.61	35.80±0.78	Strain

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and PC-8; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. NS; not significant.

Table 4-44. Fatty acid composition of total phospholipids in the small intestine of SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
	%								
16:0	14.8±0.4	14.9±0.3	14.1±0.6	15.2±1.7	15.2±0.3	15.2±0.5	14.8±0.9	14.6±0.4	NS
16:1	0.8±0.1 ^{abc}	0.8±0.1 ^{abc}	0.6±0.0 ^a	0.8±0.1 ^{ab}	0.8±0.1 ^{abc}	0.8±0.1 ^{abc}	1.0±0.0 ^{bc}	1.1±0.1 ^c	Strain, SxP
18:0	26.0±0.4 ^{abc}	26.7±0.8 ^{bc}	28.1±0.7 ^c	28.3±0.7 ^c	25.1±0.4 ^{ab}	24.9±1.1 ^{ab}	24.7±0.9 ^{ab}	23.8±0.9 ^a	Period, SxP
18:1(n-9)	8.2±0.8 ^{ab}	7.1±0.6 ^a	6.3±0.2 ^a	6.8±0.7 ^a	9.2±0.7 ^{bc}	7.8±0.3 ^{ab}	10.6±1.0 ^c	10.4±0.8 ^{bc}	Period, SxP
18:1(n-7)	2.2±0.1	2.2±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1	2.3±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1	2.0±0.1	NS
18:2(n-6)	27.7±0.4 ^{ab}	26.9±1.0 ^{ab}	25.4±1.0 ^a	25.1±1.8 ^a	26.4±0.6 ^{ab}	25.8±0.5 ^{ab}	26.4±1.1 ^{ab}	28.7±1.2 ^b	SxP
20:4(n-6)	16.7±0.2 ^{abc}	17.5±0.9 ^{abc}	19.1±1.0 ^c	16.9±1.5 ^{ab}	17.2±0.6 ^{abc}	18.7±1.0 ^{bc}	16.0±0.5 ^a	15.4±0.8 ^a	SxD, SxP
22:5(n-6)	1.8±0.2	1.6±0.1	2.2±0.1	2.5±0.4	2.3±0.2	2.1±0.1	2.6±0.1	2.2±0.1	Strain, Period
22:6(n-3)	0.7±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	1.1±0.1	0.4±0.0	1.0±0.5	0.5±0.0	0.6±0.0	Diet

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{abc} Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$ by Scheffé method. NS; not significant.

Table 4-45. Intestinal mRNA abundance for fatty acid metabolism-related proteins in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
	Arbitrary unit								
Apo B	1.00±0.09 ^a	1.18±0.13 ^{ac}	1.77±0.27 ^{ab}	2.10±0.44 ^{bc}	1.82±0.21 ^{ab}	2.24±0.39 ^b	1.92±0.38 ^{ab}	1.96±0.34 ^{ab}	SxP
Apo A-IV	1.00±0.15	0.91±0.10	1.09±0.17	1.34±0.35	1.59±0.37	1.63±0.24	1.40±0.18	1.34±0.12	NS
PPAR α	1.00±0.16	1.13±0.22	1.06±0.18	1.03±0.19	1.15±0.15	1.68±0.20	1.27±0.21	1.41±0.16	Period
PPAR δ	1.00±0.23	1.05±0.21	2.50±0.56	2.41±0.67	1.86±0.32	2.44±0.59	2.34±0.62	2.84±0.60	Strain
FAT	1.00±0.12	0.77±0.19	0.96±0.22	1.13±0.39	2.63±0.86	2.31±0.44	1.54±0.38	1.58±0.52	Period
I-FABP	1.00±0.20	0.93±0.23	1.29±0.33	1.71±0.70	1.51±0.54	1.49±0.39	1.34±0.32	1.40±0.39	NS
L-FABP	1.00±0.20	0.67±0.13	0.95±0.18	0.99±0.24	0.93±0.21	0.85±0.09	0.87±0.17	0.97±0.23	NS

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{ab}Different superscript letters show significant difference at $P < 0.05$ by Scheffé method. Apo; apolipoprotein, PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor, FAT; fatty acid translocase, I-FABP; intestinal fatty acid-binding protein, L-FABP; liver FABP, NS; not significant.

Table 4-46. Serum lipid levels in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
Triglyceride (mg/dl)	76.3±2.5 ^b	84.5±5.6 ^b	59.4±5.0 ^a	63.4±2.7 ^a	55.0±1.9 ^a	56.2±2.3 ^a	52.0±3.0 ^a	58.5±3.7 ^a	Strain, Period, SxP
Cholesterol (mg/dl)	316±9	311±7	187±5	173±7	328±13	317±10	206±7	183±5	Strain, Diet, Period
Phospholipid (mg/dl)	409±9	398±11	278±4	269±8	424±15	401±13	308±9	269±6	Strain, Diet

Data are mean±SEM for 10 or 11 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. ^{ab}Different superscript letters show significant differences at $P<0.05$ by Scheffé method. NS; not significant.

糞中へのステロール排泄に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における糞中へのステロール排泄に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 4-47に示す。コプロスタノールはSAMR1ではわずかに検出されたが、SAMP8では検出されなかった。糞中のコレステロールはSAMR1に比べSAMP8で高かった。コプロスタノールとコレステロールの和はSAMR1に比べSAMP8で高い値を示した。糞中のコプロシトスタノール量はSAMR1に比べSAMP8で高く、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低い値を示した。糞中のカンペステロール量は、SAMR1に比べSAMP8で低く、混合物の摂食により低い値を示した。また、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低かった。糞中の β -シトステロール量は、6ヶ月飼育で低かった。糞中の総植物ステロール量は、混合物摂食で低い値を示し、3ヶ月飼育に比べ6ヶ月飼育で低かった。

血清ステロール濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響

実験5における血清ステロール濃度に及ぼすスフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂食の影響をTable 3-48に示す。血清コレステロール、コプロスタノール、カンペステロールおよび β -シトステロール濃度はSAMR1に比べSAMP8で低かった。

Table 4-47. Fecal sterol excretion in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 or 6 months in experiment 5

	3 months				6 months				3 factor ANOVA
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain, Diet, Period
Coprostanol	mg/day								
	0.009±0.005	0.035±0.011	n.d.	n.d.	0.006±0.004	0.019±0.007	n.d.	n.d.	
Cholesterol	0.347±0.007	0.304±0.012	0.486±0.026	0.446±0.076	0.325±0.030	0.320±0.012	0.489±0.030	0.446±0.044	Strain
<u>Copro+Chol</u>	0.355±0.011	0.339±0.021	0.486±0.026	0.446±0.076	0.331±0.034	0.340±0.008	0.489±0.030	0.446±0.044	Strain
Coprositostanol	0.120±0.007	0.120±0.013	0.147±0.007	0.126±0.011	0.081±0.010	0.080±0.006	0.135±0.008	0.111±0.009	Strain, Period
Campesterol	0.113±0.006	0.092±0.008	0.083±0.004	0.079±0.005	0.095±0.003	0.090±0.005	0.076±0.004	0.069±0.005	Strain, Diet, Period
β-Sitosterol	0.273±0.012	0.225±0.012	0.249±0.016	0.249±0.022	0.194±0.007	0.196±0.013	0.216±0.009	0.201±0.014	Period
<u>Total plant sterols</u>	0.506±0.023	0.437±0.014	0.479±0.022	0.454±0.035	0.370±0.019	0.367±0.017	0.428±0.007	0.381±0.017	Diet, Period

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. Copro; coprostanol, Chol; cholesterol, NS; not significant.

Table 4-48. Serum sterol levels in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the sphingomyelin plus phosphatidylcholine diet for 3 months in experiment 5

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-SP	P8-C	P8-SP	Strain	Diet	SxD
	mg/ml						
Cholesterol	2.50±0.19	2.52±0.05	1.54±0.08	1.44±0.09	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Cholestanol	0.0386±0.0034	0.0377±0.0010	0.0195±0.0016	0.0175±0.0007	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Campesterol	0.0233±0.0021	0.0241±0.0004	0.0192±0.0055	0.0116±0.0007	<i>P</i> <0.05	NS	NS
β-Sitosterol	0.0062±0.0005	0.0066±0.0003	0.0059±0.0002	0.0051±0.0004	<i>P</i> <0.05	NS	NS

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-SP and P8-SP; SAMR1 and SAMP8 fed the diet containing a mixture of sphingomyelin and phosphatidylcholine at the 0.2% level, respectively. NS; not significant.

考察

(1) スフィンゴリエリンの効果

加齢に伴い食事脂肪の吸収率が低下するSAMP8とその対照マウスであるSAMR1を用いて、食事スフィンゴリエリンが消化管機能とくに食事脂肪の吸収に及ぼす影響について検討した。はじめに、スフィンゴリエリンを0.1%あるいは0.5%含む純化食を摂食させた。スフィンゴリエリンは体重増加量および食事効率に影響しなかったが、0.5%スフィンゴリエリン添加食の摂食では、摂食量が低下する傾向を示した。回腸重量は0.1%スフィンゴリエリン添加食を与えると低い値を示したが、0.5%スフィンゴリエリン添加食では差が見られなかった。肝臓重量、空腸重量、空腸と回腸のタンパク質量にスフィンゴリエリン摂食の影響は見られなかったことから、スフィンゴリエリンは体重や臓器重量には影響しないと考えられた。

糞重量は0.1%スフィンゴリエリンを添加すると低い値を示したが、0.5%スフィンゴリエリン添加では差が見られなかった。糞中の脂肪重量は、0.1%スフィンゴリエリン添加では差が見られなかったが、0.5%スフィンゴリエリンを添加すると低い値を示した。見かけの脂肪吸収率は、いずれの添加量においてもSAMP8の吸収率の低下をSAMR1程度まで改善した。

絨毛および空腸クリプトの高さにはスフィンゴリエリン摂食の影響は見られなかったが、回腸クリプトの高さは0.5%スフィンゴリエリン摂食により高い値を示した。クリプト細胞の増殖速度、アルカリホスファターゼ活性および空腸のスクラーゼ活性にスフィンゴリエリンの影響は見られなかった。回腸のスクラーゼ活性は、0.5%スフィンゴリエリンにより低下した。食事スフィンゴリエリンの加水分解酵素であるアルカリ性スフィンゴリエリナーゼの小腸内分布から、食事スフィンゴリエリンの消化吸収は主に小腸の中部から下部で行われることが報告されている [79]。このことから、スフィンゴリエリンは空腸よりも回腸に影響すると思われる。

SAMP8では、加齢に伴い小腸粘膜のトリグリセリド量が著増するとともに、DGAT活性が低く、小腸粘膜でのトリグリセリドの再合成系に変化が生じると思われる。そこで、小腸粘膜の脂質濃度を測定したところ、空腸粘膜のトリグリセリドおよびコレステロール濃度は、0.1%スフィンゴリエリン摂食により低い値を示した

が、0.5%スフィンゴリエリン食では影響が見られなかった。また、リン脂質濃度はスフィンゴリエリン摂食の影響が見られなかった。小腸マイクロソームのMGATおよびDGAT活性はスフィンゴリエリンの影響が見られなかった。これらのことから、食事スフィンゴリエリンは小腸粘膜でのトリグリセリドの再合成に影響しないと考えられた。

小腸粘膜リン脂質の脂肪酸組成を調べたところ、0.1%スフィンゴリエリン食では、パルミチン酸が高い値を示した。0.5%スフィンゴリエリン食では、パルミチン酸に差は見られなかったが、パルミトレイン酸、リノール酸およびドコサテトラエン酸が高い値を、ステアリン酸、アラキドン酸およびドコサペンタエン酸は低い値を示した。アラキドン酸は胆汁中のリン脂質に多く含まれていることから、胆汁リン脂質の吸収がスフィンゴリエリン摂食群では低く、そのためにアラキドン酸が低い値を示した可能性が考えられる。また、添加したスフィンゴリエリンの脂肪酸組成は測定していないが、摂食したスフィンゴリエリンの脂肪酸組成を反映している可能性も考えられる。

脂肪酸代謝関連タンパク質の発現を調べたところ、いずれにおいてもスフィンゴリエリン摂食の影響は見られなかった。

血清および肝臓のトリグリセリド濃度は0.5%スフィンゴリエリン摂食により高い値を示した。この結果は、スフィンゴリエリンによる脂肪吸収率改善を反映しているものと思われる。しかし、スフィンゴリエリンの代謝産物であるセラミドやスフィンゴシンが特別な作用を発揮したために生じた結果である可能性も否定できない。血清のコレステロールおよびリン脂質濃度は0.1%および0.5%スフィンゴリエリン食により低下した。肝臓のコレステロールおよびリン脂質濃度に差は見られなかった。これらの結果から、スフィンゴリエリンは食事脂肪の吸収率低下を改善するとともに、血清のコレステロールおよびリン脂質濃度を低下させる可能性が示唆された。以上の結果から、食事スフィンゴリエリンは、1ヶ月程度の短期飼育ではSAMP8における食事脂肪吸収率をSAMR1程度まで改善する作用を有することが示された。

(2) スフィンゴリエリンとホスファチジルコリンの効果

スフィンゴリエリンは消化管腔内に存在するアルカリ性スフィンゴリエリナーゼ

によりホスホコリンとセラミドに加水分解される。そこで、SAMP8を用いて、ホスホコリン基を有するホスファチジルコリンが脂肪の吸収に及ぼす影響をスフィンゴミエリンと比較した。体重増加量、摂食量、食効率、肝臓重量および小腸重量に差は見られなかったが、空腸のタンパク質量はスフィンゴミエリン摂食群に比べホスファチジルコリン摂食群で高い値を示した。糞重量に差は見られなかったが、糞中の脂肪重量はスフィンゴミエリン摂食により低い値を示し、脂肪の吸収率は高い値を示した。ホスファチジルコリン摂食は中間的な値を示した。従って、ホスファチジルコリンはスフィンゴミエリンほどではないが、ある程度、脂肪吸収改善作用があることが示唆された。しかし、スクラーゼ活性はスフィンゴミエリン摂食に比べ、ホスファチジルコリン摂食で高い値を示した。また、小腸粘膜のトリグリセリド濃度は、ホスファチジルコリン摂食群に比べスフィンゴミエリン摂食群で高い値を示した。さらに、小腸粘膜リン脂質の脂肪酸組成および糞中へのコレステロール排泄量はスフィンゴミエリン食で多群と顕著に異なっていた。すなわち、リノール酸がスフィンゴミエリン摂食群、ホスファチジルコリン摂食群、コントロール群の順に高い値を示した。アラキドン酸はスフィンゴミエリン摂食により低い値を示した。ドコサヘキサエン酸はコントロール群およびスフィンゴミエリン摂食群と比較してホスファチジルコリン摂食群で高い値を示した。糞中へのコレステロールの排泄はスフィンゴミエリン摂食により高い値を示した。血清のトリグリセリド濃度に差は見られなかったが、コレステロールおよびリン脂質濃度はスフィンゴミエリン摂食により低い値を示した。このような効果は、食事スフィンゴミエリンがコレステロールの排泄を増加させたためと考えられた。したがって、食事スフィンゴミエリンはトリグリセリドとコレステロールの吸収に対して異なる影響を及ぼす可能性がある。これらのことから、食事スフィンゴミエリンは、ホスファチジルコリンとは異なる機構で消化管に作用し、脂肪吸収改善作用を発揮していると思われる。

以上の結果から、スフィンゴミエリンによるSAMP8の食事脂肪吸収低下改善作用は、スフィンゴミエリン分子そのものあるいはその構成成分であるセラミド基またはスフィンゴシンによると考えられた。

(3) スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物の長期摂取の効果

スフィンゴミエリンを与えた短期飼育の結果から、食事スフィンゴミエリンは1ヶ月程度の短期飼育では、SAMP8における食事脂肪吸収低下をSAMR1程度まで改善することが示された。そこで、長期摂食実験を行い、加齢に伴う変化に対する効果について調べた。長期間飼育するために必要な量の純化スフィンゴミエリンを調製することは困難であるため、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの混合物を用いて行った。添加量は、スフィンゴミエリンを0.1%添加した場合に、脂肪の吸収率が改善されたことから、スフィンゴミエリンとしての添加量を等しくするために、0.2%とした。

スフィンゴミエリンの短期間摂取の場合と同様に、体重増加量に対する効果は見られなかった。また、食事脂肪の吸収に対する改善効果も見られなかった。また、小腸の組織重量、形態観察、微絨毛膜の酵素活性、脂質濃度、脂肪酸代謝関連タンパク質発現にもスフィンゴミエリン食の影響は見られなかった。このように、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリン混合物を長期間与えた場合とスフィンゴミエリンのみを短期間与えた場合とで脂肪の吸収に関する諸パラメーターの効果が異なった原因として、(1) ホスファチジルコリンの共存はスフィンゴミエリンの効果を消失させる、(2) 長期飼育の場合には加齢効果が大きすぎるため、スフィンゴミエリンの効果を観察できない等の理由が考えられる。

食事と小腸粘膜トリグリセリドの脂肪酸組成を測定したところ、混合物添加の影響は見られず、食事を反映してリノール酸が多く、次いでオレイン酸が多かった。したがって、SAMP8でみられた小腸粘膜へのトリグリセリドの蓄積は、食事由来のトリグリセリドの蓄積であることが示唆された。血清コレステロールおよびリン脂質濃度は、混合物摂食によりやや低下する傾向があったが、短期飼育のスフィンゴミエリン食の場合ほど顕著ではなかった。なお、糞中のステロール量を測定したところ、コプロスタノールおよびコレステロール量は混合物摂食の影響を受けなかったが、カンペステロールは低い値を示し、総植物ステロール量も低い値を示した。コプロスタノールはSAMR1のみで検出された。純化食と混合物添加食のステロール量を測定したところ、食事による違いは見られなかった。血清のステロール量をガスクロマトグラフィーで測定したところ、混合物摂食の影響は見られなかったが、

いずれのマウスでもコレスタノールが確認された。

小括

加齢に伴って食事脂肪の吸収低下を示すSAMP8を用いて、食事スフィンゴリエリンが消化管機能に及ぼす影響について検討した。SAMR1とSAMP8に、0.1%または0.5%スフィンゴリエリン添加食を1ヶ月間摂食させたところ、SAMP8において糞中の脂肪重量は低く、脂肪吸収率はSAMR1程度まで増加した。スフィンゴリエリンによる脂肪吸収改善のメカニズムを調べたところ、スフィンゴリエリン摂食により回腸のクリプトは長くなったが、小腸粘膜の脂肪量、微絨毛膜発達の指標であるアルカリホスファターゼ活性とスクラーゼ活性および脂肪酸代謝関連タンパク質発現にスフィンゴリエリン摂食の影響は見られなかった。食事スフィンゴリエリンは、血清のコレステロールおよびリン脂質濃度を低下させた。

スフィンゴリエリンは消化管腔内でホスホコリンとセラミドに加水分解されることから、スフィンゴリエリンによる脂肪吸収改善効果をホスホコリン基を有するホスファチジルコリンと比較した。SAMP8に0.5%スフィンゴリエリンあるいは0.5%ホスファチジルコリン添加食を1ヶ月間摂食させたところ、ホスファチジルコリンはスフィンゴリエリンほど脂肪の吸収率を改善しなかった。スフィンゴリエリンは糞中へのコレステロール排泄を増加させ、血清コレステロール濃度を低下させたが、ホスファチジルコリンにはそのような作用は見られなかった。

スフィンゴリエリンの長期摂食の影響を調べるために、スフィンゴリエリンとホスファチジルコリンの混合物を0.2%添加した純化食を、SAMR1とSAMP8に3ヶ月または6ヶ月間摂食させた。スフィンゴリエリンとホスファチジルコリンの混合物は食事脂肪の吸収および小腸絨毛の発達には影響しなかったが、血清のコレステロールおよびリン脂質濃度をスフィンゴリエリンと同様に低下させた。

これらのことから、食事スフィンゴリエリンはSAMP8における食事脂肪吸収低下をSAMR1程度まで改善するとともに、血清コレステロールおよびリン脂質濃度を低下させることが示された。スフィンゴリエリンによる食事脂肪吸収改善作用は、

スフィンゴリエリン特有あるいはセラミド基によると考えられたが、そのメカニズムについては不明である。また、スフィンゴリエリンはコレステロールの吸収を阻害し、血清コレステロール濃度やリン脂質濃度を低下させることが示された。

第3節 食事ラクトシルセラミドの効果

緒言

第4章第2節で、食事スフィンゴミエリンはSAMP8における見かけの脂肪吸収率低下を改善することおよびコレステロールの吸収を阻害し、血清コレステロール濃度を低下させることを明らかにした。スフィンゴミエリンは消化管腔内で、アルカリ性スフィンゴミエリナーゼによりホスホコリンとセラミドに加水分解されることが報告されている。前節では、ホスホコリン基を有するホスファチジルコリンがスフィンゴミエリンと同様の作用を示さないことを示した。そこで、セラミド基を有するラクトシルセラミドがスフィンゴミエリンと同様の作用を有するかを検討した。

実験方法

実験試薬

ラクトシルセラミド（純度99%）は雪印乳業から入手した。*N*-メチル-*N*-ニトロソ尿素、無水酢酸、デオキシコール酸（3 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid）、ウルソデオキシコール酸（3 α , 7 β -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid）およびコール酸（3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid）はナカライテスク、ノルデオキシコール酸（23-nor-5 β -cholanic acid-3 β , 12 α -diol）、 α -ムリコール酸（5 β -cholanic acid-3 α , 6 β , 7 α -triol）および β -ムリコール酸（5 β -cholanic acid-3 α , 6 β , 7 β -triol）はステラロイズ（米国）、コンゴレッドは九州片山化学、リソコール酸（3 α , 6 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid）はガスクロ工業（東京）、ヒオデオキシコール酸（3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-oic acid）はApplied Science Laboratories（米国）からそれぞれ購入した。

実験動物

マウスは4ヶ月齢、雄のSAMR1とSAMP8 (SPF、セアック吉富) を用い、4日間予備飼育を行った。食事はAIN-76組成に基づく純化食を調製し、ラクトシルセラミド食にはラクトシルセラミドを0.5%添加した [50]。食事は2日おきに交換し、1ヶ月間飼育した。飼育期間中、6日間糞を採集した。7時間絶食後、ネンブタール麻酔下で心臓採血し、血清を分離した。

分析

見かけの脂肪吸収率、小腸粘膜、肝臓および血清脂質濃度、糞中の中性ステロール濃度は第4章第2節と同様に測定した。

糞中の酸性ステロイドの測定は、ガスクロマトグラフィーを用いて行った。糞中ステロイドの抽出は第4章第1節の中性ステロールと同様に行い、内部標準としてノルデオキシコール酸500 μg を加えた。中性ステロールを抽出した後のTS19チューブに、エタノールに溶解した0.1%コンゴレッド溶液を1、2滴加えた。2 N塩酸を溶液が青くなるまで添加し、酸性にした。ジエチルエーテル5 mlで酸性ステロイドを3回抽出し、抽出液をネジ口試験管に回収した。回収した抽出液の約半分をガスクロチューブにとり、メチル化、アセチル化を行った。窒素ガスで乾固後、ジエチルエーテル:メタノール (9:1, v/v) 約1 mlを入れた。ジアゾメタン発生装置を組み立て、ドラフト内で調製した。ジアゾメタンは発ガン物質であるので、使用直前に調製し、使用後はすぐに窒素ガスで乾固した。N-メチル-N-ニトロソ尿素0.5~0.8 gをTS19チューブに取り、もう一方のTS19チューブには約10 mlのジエチルエーテルを入れた。いずれのチューブにもガラス管を通したゴム栓をし、氷上に置いた。N-メチル-N-ニトロソ尿素を入れたチューブに、窒素ガスを吹き込み、バスツールピペットで50%水酸化カリウム約1 mlを添加した。反応が開始し、ジエチルエーテルが黄色になった。反応は、N-メチル-N-ニトロソ尿素側のチューブが透明になるまで行った。黄色のジエチルエーテル液をジアゾメタン溶液とし、酸性ステロイド試料の入ったガスクロチューブに、溶液が黄色になるまで添加した。10分ごとに攪拌し、15から30分室温で反応させた。乾固後、無水酢酸1 mlを添加し、30分ごとに攪拌しながら、40°Cのドライブロックで2時間反応させた。-30°Cで保存した。乾固後、アセト

ンに溶解し、ガスクロマトグラフィーに供した。再び保存する際はアセトンを除去し、無水酢酸中に保存した。酸性ステロイドの同定は、ノルデオキシコール酸100 μg にリソコール酸40 μg 、デオキシコール酸60 μg 、ヒオデオキシコール酸80 μg 、ウルソデオキシコール酸40 μg 、コール酸45 μg 、 α -ムリコール酸15 μg および β -ムリコール酸10 μg を添加し、同様にメチル化、アセチル化して行った。分析は3% Silicone AN-600 (Gas chrom Q、メッシュ100~120、日本クロマト工業、東京)を充填したガラスカラム(内径2.6 mm、長さ2 m、島津製作所)とキャリアガスにヘリウムガスを用いた。ガスクロマトグラフはGC-7A(島津製作所)を、データの解析はChromatopac C-R6A(島津製作所)を用い、インジェクターおよびディテクタ温度は300°C、カラム温度は260°Cで行った。

統計処理

有意差検定はANOVAとSchefféの多重比較により行った。

実験結果

成長、摂食量、肝臓重量および小腸重量に及ぼす食事ラクトシルセラミドの影響

体重、摂食量、肝臓重量および小腸重量に及ぼすスフィンゴリエリンの影響をTable 4-49に示す。初体重および終体重はSAMR1に比べSAMP8で低く、ラクトシルセラミド摂食の影響は見られなかった。体重増加量は系統および食事の影響が見られなかった。平均摂食量および食効率はSAMR1に比べSAMP8で低かった。体重100 g当たりの肝臓重量はSAMP8で低かった。小腸重量に差は見られなかったが、体重100 g当たりの小腸重量はSAMP8で高かった。

見かけの脂肪吸収率に及ぼすラクトシルセラミドの影響

見かけの脂肪吸収率に及ぼすラクトシルセラミドの影響をTable 4-50に示す。6日間の糞重量は、SAMR1に比べSAMP8で高かった。糞中の脂肪重量は、SAMP8で高く、ラクトシルセラミド摂食によりさらに高い値を示した。見かけの脂肪吸収率はSAMP8で低く、ラクトシルセラミド摂食によりさらに低い値を示した。

小腸および肝臓トリグリセリド濃度に及ぼすラクトシルセラミドの影響

小腸および肝臓トリグリセリド濃度に及ぼすラクトシルセラミドの影響をTable 4-51に示す。空腸および回腸のトリグリセリド濃度は、SAMR1に比べSAMP8で高かった。肝臓のトリグリセリド濃度はSAMR1では、ラクトシルセラミド摂食により高い値を示したが、SAMP8ではラクトシルセラミド摂食の影響は見られなかった。また、SAMR1に比べSAMP8で低い値を示した。

血清脂質濃度に及ぼすラクトシルセラミドの影響

血清脂質濃度に及ぼすラクトシルセラミドの影響をTable 4-52に示す。血清トリグリセリド濃度はSAMR1にラクトシルセラミドを摂食させると高い値を示した。血清コレステロール濃度およびリン脂質濃度は、SAMR1に比べSAMP8で低く、ラクトシルセラミド摂食により低い値を示した。

糞中への中性および酸性ステロイド排泄に及ぼすラクトシルセラミドの影響

糞中への中性および酸性ステロイド排泄に及ぼすラクトシルセラミドの影響をTable 4-53に示す。糞中のコプロスタノールとコレステロール量の和は、SAMR1に比べSAMP8で高く、ラクトシルセラミド摂食により高い値を示した。糞中の植物ステロール量はラクトシルセラミド摂食により高い値を示した。糞中の酸性ステロイド量は、SAMP8でデオキシコール酸およびヒオデオキシコール酸が低く、 $\alpha+\omega$ ムリコール酸が高かった。糞中の総酸性ステロイド量に、系統およびラクトシルセラミド摂食の影響は見られなかった。

Table 4-49. Growth parameters in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the lactosylceramide diet

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-L	P8-C	P8-L	Strain	Diet	SxD
Initial body weight (g)	39.1±0.6	39.1±0.6	32.9±0.3	32.5±0.5	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Final body weight (g)	44.4±0.8	44.5±0.6	38.0±0.9	37.6±0.8	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Body weight gain (g)	5.22±0.35	5.45±0.37	5.06±0.43	5.10±0.52	NS	NS	NS
Food intake (g/day)	4.33±0.09	4.50±0.04	4.63±0.07	4.71±0.06	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Food efficiency (g gain/g intake)	0.0466±0.0027	0.0469±0.0032	0.0421±0.0030	0.0416±0.0036	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Relative liver weight (g/100 g B.W.)	3.87±0.17	4.06±0.20	3.59±0.11	3.57±0.15	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Intestinal weight (g)	1.37±0.04	1.40±0.07	1.41±0.06	1.43±0.07	NS	NS	NS
Intestinal weight (g/100 g B.W.)	3.22±0.13	3.21±0.13	3.87±0.27	3.82±0.22	<i>P</i> <0.05	NS	NS

Data are mean±SEM for 11 mice (R1-C), 10 mice (R1-L and P8-L), and 9 mice (P8-C) for body weight, food intake and liver weight and 6 mice (R1-C), 4 mice (R1-L and P8-C) and 5 mice (P8-L) for intestinal weight. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-L and P8-L; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% lactosylceramide diet, respectively. NS; not significant.

Table 4-50. Fecal weight, fecal lipid weight and apparent lipid absorption rate in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the lactosylceramide diet

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-L	P8-C	P8-L	Strain	Diet	SxD
Fecal weight (g/6 days)	2.38±0.08	2.57±0.06	2.60±0.06	2.67±0.07	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Fecal lipid weight (mg/6 days)	31.3±4.6	65.6±4.9	90.1±4.7	121±14	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	NS
Apparent fat absorption (%)	97.4±0.3	95.6±0.3	93.0±0.3	92.3±0.9	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	NS

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-L and P8-L; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% lactosylceramide diet, respectively. NS; not significant.

Table 4-51. Triglyceride content in the intestinal mucosa and liver in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the lactosylceramide diet

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-L	P8-C	P8-L	Strain	Diet	SxD
Jejunum (mg)	2.22±0.41	2.94±0.62	6.74±1.24	3.69±1.18	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Ileum (mg)	0.86±0.28	1.85±0.61	10.5±1.3	10.2±2.3	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Liver (mg/g liver)	22.5±3.7 ^b	35.9±2.5 ^a	8.42±1.59 ^c	7.47±0.75 ^c	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05

Data are mean±SEM for 5 mice per group. R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-L and P8-L; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% lactosylceramide diet, respectively. ^{abc}Different superscript letters show significant difference at *P*<0.05 by Scheffé method. NS; not significant.

Table 4-52. Serum lipid levels in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the lactosylceramide diet

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-L	P8-C	P8-L	Strain	Diet	SxD
	mg/dl						
Triglyceride	96.0±3.6 ^a	121±9 ^b	105±13 ^{ab}	89.5±6.0 ^a	NS	NS	P<0.05
Cholesterol	326±10	275±18	216±11	139±21	P<0.05	P<0.05	NS
Phospholipid	394±7	359±25	285±11	216±24	P<0.05	P<0.05	NS

Data are mean±SEM for 6 mice (R1-C), 5 mice (R1-L and P8-L) and 4 mice (P8-C). R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-L and P8-L; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% lactosylceramide diet, respectively. ^{ab}Different superscript letters show significant difference at P<0.05 by Scheffé method. NS; not significant.

Table 4-53. Fecal excretion of neutral and acidic steroids in SAMR1 and SAMP8 fed the control diet or the lactosylceramide diet

	Groups				ANOVA		
	R1-C	R1-L	P8-C	P8-L	Strain	Diet	SxD
	mg/day						
<u>Neutral steroids</u>							
Copro+Chol	0.490±0.049	0.608±0.056	0.613±0.051	0.833±0.101	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	NS
Plant sterols	0.537±0.048	0.578±0.020	0.541±0.029	0.671±0.039	NS	<i>P</i> <0.05	NS
<u>Acidic steroids</u>							
Lithocholic acid	0.023±0.006	0.017±0.005	0.026±0.002	0.022±0.005	NS	NS	NS
Deoxycholic acid	0.290±0.036	0.308±0.025	0.160±0.022	0.210±0.012	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Hyodeoxycholic acid	0.046±0.007	0.061±0.004	0.027±0.007	0.026±0.008	<i>P</i> <0.05	NS	NS
α+ω Muricholic acid	0.177±0.025	0.151±0.011	0.261±0.029	0.184±0.018	<i>P</i> <0.05	NS	NS
β-Muricholic acid	0.029±0.005	0.044±0.005	0.045±0.012	0.068±0.036	NS	NS	NS
Total	0.565±0.064	0.581±0.040	0.519±0.024	0.510±0.021	NS	NS	NS

Data are mean±SEM for 5 mice (R1-C and R1-L) and 4 mice (P8-C and P8-L). R1-C and P8-C; SAMR1 and SAMP8 fed the control diet, respectively. R1-L and P8-L; SAMR1 and SAMP8 fed 0.5% lactosylceramide diet, respectively. Copro; coprostanol, Chol; cholesterol, NS; not significant.

考察

スフィンゴミエリンと同様に分子内にセラミド構造を有するラクトシルセラミドが、SAMR1およびSAMP8の消化管機能に及ぼす影響を検討した。摂食量はSAMR1に比べSAMP8で高く、食事効率、肝臓重量および小腸重量はSAMP8で低い値を示した。体重増加量、摂食量、食事効率、肝臓重量および小腸重量は、食事ラクトシルセラミドの影響を受けなかった。

糞重量はSAMP8で高く、摂食量を反映していると考えられた。糞中の脂肪重量は、前節の2ヶ月齢のマウスと同様にSAMP8で高かった。スフィンゴミエリンとは異なり、ラクトシルセラミド摂食により糞中の脂肪重量は高い値を示した。従って、見かけの脂肪吸収率はラクトシルセラミドによりさらに低下した。ラクトシルセラミドは消化管内腔でガラクトシルセラミダーゼにより加水分解されることが報告されている [80]。食事由来のラクトシルセラミドが消化管で完全に分解されるかどうかは明らかではない。したがって、本研究ではラクトシルセラミドからどの程度セラミドが生じたか否かは明らかではない。

小腸のトリグリセリド濃度は上部、下部ともにSAMR1に比べSAMP8で高い値を示したが、食事の影響は見られなかった。小腸粘膜へのトリグリセリドの蓄積は、4ヶ月および7ヶ月齢のマウスでも観察された。肝臓のトリグリセリド濃度はSAMR1よりもSAMP8で低かった。SAMP8は食事脂肪の吸収が悪いため、肝臓のトリグリセリド濃度が低下していると思われた。SAMR1ではラクトシルセラミド摂取により、肝臓のトリグリセリド濃度は高い値を示した。0.5%スフィンゴミエリン添加食を摂食させた場合にも、同様の結果が得られた。

血清トリグリセリド濃度は系統の影響を受けなかったが、ラクトシルセラミド摂取SAMR1で増加した。血清コレステロールおよびリン脂質濃度はSAMR1に比べSAMP8で低く、ラクトシルセラミド摂食によりさらに低い値を示した。血清のコレステロールとリン脂質に対する影響は、スフィンゴミエリンを摂取させた場合にも観察された。

植物ステロールの排泄に差は見られなかったが、コプロスタノールおよびコレステロールの排泄はSAMP8で高く、ラクトシルセラミド摂食によりさらに高い値を示

した。本実験で観察された血清コレステロール濃度の低下には、ステロールの排泄増加が関与していると考えられた。一方、酸性ステロイドの総排泄量は系統と食事の影響を受けなかった。このように、ラクトシルセラミドは食事脂肪やコレステロールの排泄を増加させるが、胆汁酸の吸収には影響せず、また体重増加量にも悪影響を及ぼさなかった。したがって、他の栄養素の吸収に対する抑制作用は少ないと思われた。

ラクトシルセラミドはSAMR1において、血清と肝臓のトリグリセリド濃度を増加させた。このような系統特異的な作用におけるラクトシルセラミド摂取の意義については現在、不明である。本研究では、ラクトシルセラミドがスフィンゴミエリンと同様に、加齢に伴う脂質吸収・代謝の変化を調節する可能性を示した。

小括

ラクトシルセラミドは、スフィンゴミエリンと共通のセラミド構造を有している。先の研究で、食事スフィンゴミエリンが加齢に伴う食事脂肪の吸収低下を改善することを示した。本研究では、ラクトシルセラミドがスフィンゴミエリンと同様に、加齢に伴う消化管機能の変化に影響するかについて調べた。4ヶ月齢のSAMR1とSAMP8に、純化食または0.5%ラクトシルセラミド添加食を与え、1ヶ月間飼育した。見かけの脂肪吸収率は、ラクトシルセラミド摂食によりさらに低下した。ラクトシルセラミドは両系統マウスの血清コレステロール濃度とリン脂質濃度を低下させ、糞中の中性ステロールの排泄を増加させた。これらの結果は、ラクトシルセラミドがスフィンゴミエリンと異なる機構で食事脂肪の吸収に作用していることを示唆するとともに、スフィンゴミエリンによる血清コレステロールおよびリン脂質濃度低下作用は、セラミド基に由来するコレステロール吸収阻害によることが示唆された。

第5章 Apo E欠損マウスにおける消化管機能の解析

緒言

apo Eは主として肝臓で生産され、コレステロールや脂肪酸の運搬および血清リポタンパク質代謝に影響することが知られている。ヒトでapo Eのイソタイプはコレステロール吸収に影響することが指摘されていることから、トリグリセリドの吸収および代謝にも影響する可能性がある [28]。本研究ではapo E欠損マウスとそのwildタイプであるC57BL/6Jマウスを用いて、消化管での脂肪の吸収・輸送および脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を調べた。

実験方法

実験試薬

DL- α -トコフェロールは和光純薬工業から購入した。他の試薬については、第4章第1節に示した。

実験動物

7~8週齢のC57BL/6Jとapo E欠損マウスに前節と同様にAIN-76純化食を与え3週間飼育した。食事組成 (g/kg) は、オリーブ油97、サフラワー油3、カゼイン200、コーンスターチ150、セルロース50、ミネラル混合 (AIN-76-MX) 35、ビタミン混合 (AIN-76-VX) 10、DL-メチオニン3、重酒石酸コリン2、コレステロール0.4、蔗糖449.6とした。Adanらの実験条件に従って、食事にはDL- α -トコフェロールを0.32%添加した [81]。飼育期間中、6日間糞を採集した。7時間の絶食後、ネンブタール麻酔下で心臓採血し、血清を分離した。

分析

見かけの脂肪吸収率、小腸での脂肪酸代謝関連タンパク質発現量および血清脂質濃度は、第4章第1節と同様に測定した。

統計処理

有意差検定はStudent's *t*-testにより行った。

実験結果

成長、摂食量、見かけの脂肪吸収率、血清および肝臓脂質濃度

成長、摂食量、見かけの脂肪吸収率、血清および肝臓脂質濃度をTable 5-1に示す。初体重に差は見られなかったが、終体重および摂食量はwildタイプに比べapo E欠損マウスで有意に高かった。糞重量、糞の脂肪重量および見掛けの脂肪吸収率に差は見られなかった。血清トリグリセリドおよびコレステロール濃度はapo E欠損マウスで8.8倍高く、HDLコレステロール濃度はapo E欠損マウスでwildタイプの半分であった。血清リン脂質濃度はapo E欠損マウスで3.1倍高かった。肝臓のトリグリセリド濃度はapo E欠損マウスで1.8倍高かった。肝臓の総コレステロール濃度に差は見られなかったが、遊離コレステロール濃度はapo E欠損マウスで1.2倍高かった。肝臓のリン脂質濃度に差は見られなかった。

小腸における脂肪酸代謝関連タンパク質の発現

小腸における脂肪酸代謝関連タンパク質の発現量をFigure 5-1およびTable 5-2に示す。小腸のFAT mRNA量に差は見られなかったが、PPAR α 、PPAR γ 、PPAR δ 、L-FABP、I-FABP、I-BABP、apo A-IVおよびapo B mRNA量はapo E欠損マウスで低かった。

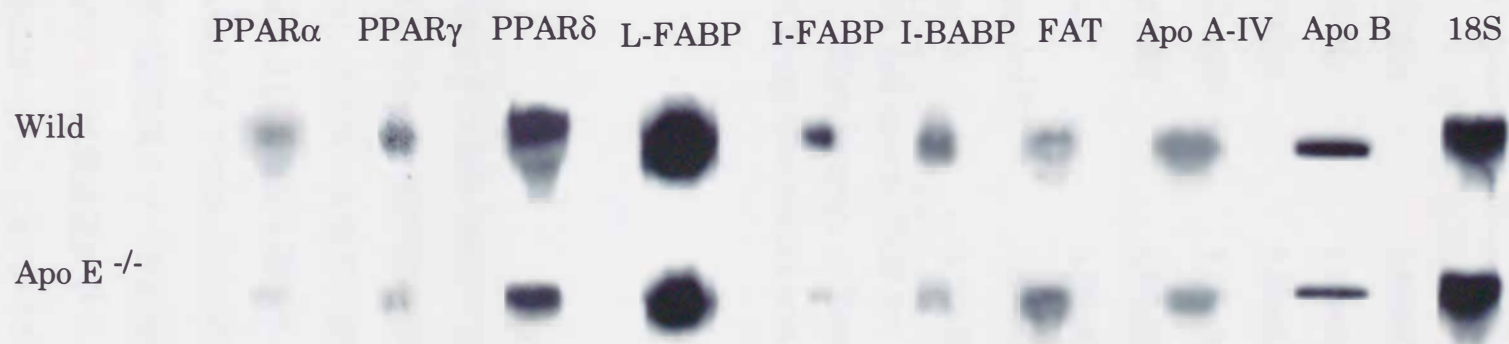
Table 5-1. Growth parameters, fecal weight, fecal lipid weight, apparent lipid absorption rate, serum and liver lipid levels in wild type mice and apo E knock-out mice

	Wild	ApoE ^{-/-}
Initial body weight (g)	20.6±0.4	23.0±1.2
Final body weight (g)	25.4±0.5	28.7±1.0*
Body weight gain (g)	4.86±0.51	5.67±0.71
Food intake (g/day)	2.80±0.12	3.49±0.21*
Fecal weight (g/6 days)	2.18±0.11	2.13±0.06
Fecal lipid weight (mg/6 days)	101±12	89.4±6.1
Lipid absorption (%)	95.1±0.6	96.4±0.2
Serum (mg/dl)		
Triglyceride	48.5±1.9	428±76*
Cholesterol	150±8	1325±191*
HDL cholesterol	88.0±2.2	44.2±15.0*
Phospholipid	238±8	731±103*
Liver (mg/g liver)		
Triglyceride	6.89±0.75	12.4±1.9*
Total cholesterol	6.22±0.98	8.11±0.33
Free cholesterol	2.22±0.08	2.59±0.08*
Esterified cholesterol	4.00±0.95	5.51±0.34
Phospholipid	27.7±0.7	27.3±0.6

Data are mean±SEM for 7 mice (Wild) and 6 mice (Apo E^{-/-}).

*Significantly different from the wild type mice at $P < 0.05$ by Student's *t*-test.

Figure 5-1. Intestinal mRNA abundance for fatty acid metabolism-related proteins in wild type mice and apo E knock-out mice



Data are mean \pm SEM for 6 mice per group. *Significantly different from the wild type mice at $P < 0.05$. PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor, L-FABP; liver fatty acid-binding protein, I-FABP; intestinal FABP, I-BABP; ileal bile acid binding protein, FAT; fatty acid translocase, Apo; apolipoprotein, 18S; 18S ribosomal RNA.

Table 5-2. Intestinal mRNA abundance for fatty acid metabolism-related proteins in wild type mice and apo E knock-out mice

	Wild	ApoE ^{-/-}
Arbitrary unit		
PPAR α	1.00 \pm 0.30	0.52 \pm 0.03*
PPAR γ	1.00 \pm 0.12	0.45 \pm 0.06*
PPAR δ	1.00 \pm 0.06	0.51 \pm 0.08*
L-FABP	1.00 \pm 0.11	0.42 \pm 0.04*
I-FABP	1.00 \pm 0.30	0.16 \pm 0.02*
FAT	1.00 \pm 0.21	1.43 \pm 0.10
Apo A-IV	1.00 \pm 0.09	0.53 \pm 0.03*
Apo B	1.00 \pm 0.08	0.71 \pm 0.06*

Data are mean \pm SEM for 7 mice (Wild) and 6 mice (Apo E^{-/-}). *Significantly different from the wild type mice at $P < 0.05$ by Student's *t*-test.

考察

Apo Eは肝臓などの臓器や細胞で生産され、細胞内コレステロールや脂肪酸の運搬および血清リポタンパク質代謝に影響することが知られている。ヒトでapo Eのイソタイプはコレステロール吸収に影響することが指摘されていることから、トリグリセリド吸収および代謝にも影響する可能性がある [28]。そこで、apo E欠損マウスとそのwildタイプであるC57BL/6Jマウスを用いて、食事脂肪の吸収および小腸での脂肪酸代謝関連タンパク質発現について調べた。

Apo E欠損マウスでは摂食量が多く、終体重が高かった。脂肪の吸収にapo E欠損の影響は見られなかった。これまでの報告と一致して、血清トリグリセリド、コレステロールおよびリン脂質濃度は、apo E欠損マウスで高く、HDLコレステロール濃度は低かった。肝臓トリグリセリドおよび遊離コレステロール濃度は、apo E欠

損マウスで高かった。小腸での脂肪酸代謝関連タンパク質発現を調べたところ、FAT mRNA量に差は見られなかったが、PPAR α 、PPAR γ 、PPAR δ 、L-FABP、I-FABP、apo A-IVおよびapo B等の小腸細胞内での脂質運搬に関わるほとんどすべての遺伝子発現は、apo E欠損マウスで低かった。したがって、これら遺伝子の発現差異は、食事脂肪の吸収に重要な役割を果たしていないと思われた。

小括

食事脂肪の吸収におけるapo Eの役割について調べた。wildタイプであるC57BL/6Jマウスとapo E欠損マウスを比較したところ、apo E欠損マウスでは摂食量が多く、終体重が高かった。脂肪の吸収にapo E欠損の影響は見られなかった。血清トリグリセリド、コレステロールおよびリン脂質濃度は、apo E欠損マウスで高く、HDLコレステロール濃度は低かった。肝臓トリグリセリドおよび遊離コレステロール濃度は、apo E欠損マウスで高かった。小腸での脂肪酸代謝関連タンパク質発現を調べたところ、FAT mRNA量に差は見られなかったが、PPAR α 、PPAR γ 、PPAR δ 、L-FABP、I-FABP、apo A-IVおよびapo B mRNA量はapo E欠損マウスで低かった。これら遺伝子の発現差異は食事脂肪の吸収に重要な役割を果たしていないと思われた。以上の結果より、apo Eは食事脂肪の吸収に直接関与していないが、小腸粘膜細胞での脂肪酸代謝や胆汁酸の吸収に影響する可能性が示唆された。

第6章 総括

糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病の発症には食習慣が深く関わっていることから、予防のための食環境の構築が必要とされている。また、病的加齢変化にも食習慣は影響すると考えられている。このような退行性疾患を予防・改善し、健康な生活を長期間維持するためには、食環境の改善が必要となる。本研究では、動脈硬化、糖尿病および病的加齢変化の予防・改善に必要な食環境に関する基礎的知見を得るために、退行性疾患モデル動物の開発といくつかの食事成分の評価を行った。

まず、免疫担当細胞が媒介する動脈硬化症のモデル動物を作製した。アレルギーを高発するBNラットに多量のビタミンD₂を4日間投与し、コレステロールとコール酸を含む食事で13週間飼育した。その間、免疫系を活性化するために、抗原としてOVAを腹腔内投与し、感作した。その結果、以前の研究と同様にBNラットでも、多量のビタミンD₂投与およびコレステロールとコール酸を含む食事の摂食により動脈硬化病変を呈した。動脈硬化病変は主に泡沫細胞からなり、OVAで感作したラットで病変が大きかった。免疫系活性化の指標であるOVA特異的IgGおよび炎症反応に関与する肥満細胞の活性化の指標である血清キマーゼ濃度はOVA感作により高い値を示した。OVA感作は血清脂質濃度に影響しなかった。血清キマーゼ濃度と大動脈弓内膜肥厚との間には、正の相関が見られた。これらの結果は、血清脂質濃度とは独立して、免疫担当細胞が動脈硬化病変の形成に重要な役割を果たすことを明確にするとともに、この動物モデルが動脈硬化発症における免疫担当細胞の役割に対する食事の影響を評価するために有用であることを示した。

次に、インスリン依存性糖尿病の発症に及ぼす食事成分の役割を評価した。インスリン依存性糖尿病の発症には、食品成分や化学物質から生じるフリーラジカルやウイルス感染による膵臓β細胞の特異的な損傷が関与していると考えられている。抗酸化剤の摂取は、インスリン依存性糖尿病に有効である可能性が考えられることから、食事成分として合成抗酸化剤であるTBHQまたはカレーに含まれる黄色色素でありリポキシゲナーゼ阻害活性を有するクルクミンの効果を調べた。5週齢のSD系雄ラットに、合成抗酸化剤であるTBHQを0.0028%添加した食事あるいは無添加の

AIN-76純化食を与え、1週間飼育した。STZ投与によりインスリン依存性糖尿病を発症させ、さらに1週間飼育した。また、SD系雄ラットにAIN-76純化食を与え、200 mg/kg体重のクルクミンを毎日投与して、1週間飼育した。STZを投与後、さらに1週間飼育した。TBHQ摂食はSTZ投与に基づく膵臓ランゲルハンス島からのインスリン分泌の低下、高血糖および高トリグリセリド血症を改善した。一方、クルクミンにはそのような改善効果は見られなかった。その原因として、クルクミンの吸収率が低いことおよび吸収されたクルクミンが迅速に分解されることが関与していると思われる。また、クルクミンとTBHQではラジカル消去作用がそれぞれ異なっているため、クルクミンではインスリン依存性糖尿病に対する改善作用が観察できなかった可能性もある。これらの結果は、ある種の抗酸化剤の食事への添加がフリーラジカル産生を介した膵臓β細胞の傷害に基づく糖尿病作用に対して有効である可能性を直接的に支持した。

加齢に伴い消化管機能が変化し、栄養素の吸収は低下すると考えられている。特に脂肪の吸収低下は必須脂肪酸や脂溶性ビタミンの欠乏をきたすために重要な問題である。そこで、加齢に伴い種々の老化病態を示すSAMが加齢に伴う消化管機能の変化を評価する動物モデルになりうるかについて調べた。1ヶ月齢のSAMR1とSAMP8をAIN-76純化食で2、4および7ヶ月齢まで飼育した。SAMP8ではSAMR1と比較して、体重増加量および脂肪吸収率が低く、加齢に伴い小腸粘膜に多量の脂肪沈着を起こした。脂肪の吸収に影響する因子として、小腸の吸収表面積、吸収に関与する小腸細胞機能、小腸内腔での食事脂肪の消化・吸収能、小腸粘膜でのトリグリセリドの再合成、小腸粘膜から血中への食事脂肪の輸送ならびに小腸粘膜細胞での脂肪酸代謝関連タンパク質の発現量を調べた。小腸の吸収表面積の指標である絨毛の長さは、回腸ではSAMP8で低かった。小腸内腔での食事脂肪の消化・吸収能の指標として摂食後の小腸内容物における遊離脂肪酸含量を調べたところ、SAMP8で高かったことから、食事脂肪の分解・吸収能はSAMP8では低下していないと考えられた。脂肪分解産物の吸収に関与する細胞機能の指標として測定したアルカリホスファターゼ活性およびクリプトの高さ、小腸細胞内でのトリグリセリド再合成活性の指標であるDGAT活性および小腸粘膜から血中への輸送の指標である標識食事脂肪の血中における相対的蓄積量はSAMR1に比べSAMP8で低かった。小腸での脂

脂肪酸代謝関連タンパク質の発現を調べたところ、apo BおよびFAT mRNA量は加齢に伴い増加し、PPAR δ mRNA量はSAMP8で高かった。SAMP8におけるこのような食事脂肪の吸収および輸送の低下には、各臓器で普遍的に発現している転写調節因子PPAR δ の発現増加が関与していると思われる。これらの結果から、SAMP8は加齢に伴う消化管での食事脂肪の吸収変化を評価するのに有用なモデルになりうることが示された。

スフィンゴミエリンおよびスフィンゴミエリン由来のセラミドは、細胞の分化やアポトーシスに関わるシグナル分子であることが報告されている。また、食事スフィンゴミエリンは大腸ガンの腫瘍形成を抑制するとともに、消化管において胆汁酸塩が誘導する細胞毒性を防ぐことが報告されている。そこで、SAMR1とSAMP8を用いて、スフィンゴミエリンが加齢に伴う食事脂肪の吸収に及ぼす影響について検討した。0.1%または0.5%スフィンゴミエリン添加食を1ヶ月間摂食させたところ、SAMP8で見られた食事脂肪の吸収率低下はSAMR1程度まで改善された。スフィンゴミエリンによる脂肪吸収改善のメカニズムを調べたところ、スフィンゴミエリン摂食により回腸のクリプトが高くなったが、小腸粘膜の脂肪量、微絨毛膜発達の指標であるアルカリホスファターゼ活性とスクラーゼ活性、および脂肪酸代謝関連タンパク質発現にはスフィンゴミエリン摂食の影響が見られなかった。食事スフィンゴミエリンは血清コレステロールおよびリン脂質濃度を低下させた。

スフィンゴミエリンは消化管腔内でホスホコリンとセラミドに加水分解されることから、スフィンゴミエリンによる脂肪吸収改善効果をホスホコリン基を有するホスファチジルコリンと、スフィンゴミエリンの効果を比較した。SAMP8に0.5%スフィンゴミエリンあるいは0.5%ホスファチジルコリン添加食を1ヶ月間摂食させたところ、ホスファチジルコリンはスフィンゴミエリンほど脂肪の吸収率を改善しなかった。スフィンゴミエリンは糞中へのコレステロール排泄を増加させ、血清コレステロール濃度を低下させたが、ホスファチジルコリンにはそのような作用は見られなかった。

スフィンゴミエリンの長期摂食の影響を調べるために、スフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの混合物を0.2%添加した食事を、SAMR1とSAMP8に3ヶ月または6ヶ月間摂食させた。スフィンゴミエリンとホスファチジルコリンの混合物は食

事脂肪の吸収には影響しなかったが、血清コレステロールおよびリン脂質濃度をスフィンゴリエリンと同様に低下させた。

さらに、セラミド基を有するラクトシルセラミドを0.5%添加した食事を、SAMR1とSAMP8に1ヶ月間与えたところ、食事脂肪の吸収はさらに低下した。糞中へのコレステロールの排泄は、ラクトシルセラミド摂食により増加し、血清コレステロール濃度は低い値を示した。これらの結果から、スフィンゴリエリンによる脂肪吸収改善効果は、スフィンゴリエリン特有の効果であることが示されたが、その作用メカニズムについては明らかにできなかった。また、スフィンゴリエリンによる血清コレステロールおよびリン脂質濃度低下作用はセラミド基によるコレステロール吸収阻害によると思われる。

Apo Eのイソタイプはヒトでコレステロールの吸収に影響することが指摘されていることから、食事脂肪吸収の吸収にも影響する可能性が考えられる。そこで、apo Eノックアウトマウスとそのwildタイプマウスを用いて、消化管での脂肪吸収に及ぼすapo Eの役割について調べた。食事脂肪の吸収率にapo Eノックアウトの影響は見られなかったが、小腸でのPPAR α 、PPAR γ 、PPAR δ 、L-FABP、I-FABP、apo A-IVおよびapo B mRNA量はapo Eノックアウトマウスで低かった。これら遺伝子発現の差異は食事脂肪の吸収に重要な役割を果たしていないと思われる。以上の結果から、apo Eは食事脂肪の吸収に直接関与していないが、小腸粘膜細胞での脂肪酸の代謝や胆汁酸の吸収に影響する可能性が示された。

以上のように、動脈硬化、糖尿病および病的加齢変化における食事成分の役割を評価するための動物モデルの構築を行い、いくつかの食事成分の効果について調べた。実験動物を用いて得られたこれらの結果は、ヒトにそのまま当てはめることは困難であるが、ヒトを対象とした退行性疾患に対する食事成分の有効性を研究していく上で、基礎的な知見を示すと考えられる。

後記

本研究を行うにあたり御懇篤なる御指導を賜った九州大学大学院農学研究院今泉勝己教授に深甚の謝意を表す。

また、本研究中、終始御指導と御鞭撻を頂いた九州大学大学院農学研究院池田郁男助教授に厚く御礼を申し上げる。

実験にあたり御指導とご協力を頂いた宮崎大学農学部窄野昌信助教授、九州大学大学院農学研究院佐藤匡央助手に厚く御礼を申し上げる。

本研究に協力された藤原佐知子、石川美和、河野美咲、鈴木崇子、小川明子の諸氏をはじめ九州大学農学部栄養化学研究室員各位に感謝する。

文献

- 1) Ju, H.-R., Matsuura, I., Yamada, K., Sugano, M. and Imaizumi, K. Systemic release of mucosal mast-cell p.rotease in primed Brown Norway rats after feeding with β -lactoglobulin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 771-775 (1995).
- 2) Ju, H.-R., Okumiya, M., Nishizono, S., Ki, M., Sugano, M. and Imaizumi, K. Increase in degranulation of mucosal mast cells in rats sensitized with milk whey protein hydrolysates compared with native proteins. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 663-668 (1997).
- 3) Turner, M. W., Barnett, G. E. and Strobel, S. Mucosal mast cell activation patterns in the rat following repeated feeding of antigen. *Clin. Exp. Allergy*, **20**, 421-427 (1990).
- 4) Sakono, M., Fukuyama, T., Ni, W.-H., Nagao, K., Ju, H.-R., Sato, M., Sakata, N., Iwamoto, H. and Imaizumi, K. Comparison between dietary soybean protein and casein of the inhibiting effect on atherogenesis in the thoracic aorta of hypercholesterolemic (ExHC) rats treated with experimental hypervitamin D. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 514-519 (1997).
- 5) Rabinovitch, A., Suarez, W. L., Thomas, P. D., Strynadka K. and Simpson, I. Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation. *Diabetologia*, **35**, 409-413 (1992).
- 6) Porte, Jr., D. and Schwartz, M. W. Diabetes complications: why is glucose potentially toxic? *Science*, **272**, 699-700 (1996).
- 7) Sumoski, W., Baquerizo, H. and Rabinovitch, A. Oxygen free radical scavengers protect rat islet cells from damage by cytokines. *Diabetologia*, **32**, 792-796 (1989).
- 8) Rakieten, N., Rakieten, M. L. and Nadkarni, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep.*, **29**, 91-89 (1963).
- 9) Slonim, A. E., Surber, M. L., Page, D. L., Robert, A. S. and Burr, I. M.

- Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. *J. Clin. Invest.*, **71**, 1282-1288 (1983).
- 10) Robbins, M. J., Sharp, R. A., Slonim, A. E. and Burr, I. M. Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia*, **18**, 55-58 (1980).
 - 11) Sandler, S. and Andersson, A. The partial protective effect of the hydroxyl radical scavenger dimethyl urea on streptozotocin-induced diabetes in the mouse *in vivo* and *in vitro*. *Diabetologia*, **23**, 374-378 (1982).
 - 12) Ke, P. J., Nash, D. M. and Ackman, R. G. Mackerel skin lipids as an unsaturated fat model system for the determination of antioxidative potency of TBHQ and other antioxidant compounds. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **54**, 417-420 (1977).
 - 13) Philip, G. R., Forrest, H. N. and George Jr., C. F. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition *Ad Hoc* Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
 - 14) Sharma, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1811-181, (1976).
 - 15) Huang, M. T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T. F., Laskin, J. D. and Conney, A. H. Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res.*, **51**, 813-819 (1991).
 - 16) Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhara, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. and Yamamuro, T. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Aging Dev.*, **17**, 183-194 (1981).
 - 17) Matsumura, A., Higuchi, K., Shimizu, K., Hosokawa, M., Hashimoto, K., Yasuhira, K. and Takeda, T. A novel amyloid fibril protein isolated from senescence-accelerated mice. *Lab. Invest.*, **47**, 270-275 (1982).
 - 18) Higuchi, K., Yonezu, T., Kogishi, K., Matsumura, A., Takeshita, S., Higuchi,

- K., Kohno, A., Matsushita, M., Hosokawa, M. and Takeda, T. Purification and characterization of a senile amyloid-related antigenic substance (apo SAS_{SAM}) from mouse serum. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12834-12840 (1986).
- 19) Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matsuo, T., Nagawa, Y. and Takeda, T. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol. Behav.*, **38**, 39-406 (1986).
- 20) Yagi, H., Katoh, S., Akiguchi, I. and Takeda, T. Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence-accelerated mouse: SAMP/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Res.*, **474**, 86-93 (1988).
- 21) Issemann, I. and Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferator. *Nature*, **347**, 645-650 (1990).
- 22) Schaffer, J. E. and Lodish, H. F. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, **79**, 427-436 (1994).
- 23) Baier, L. J., Bogardus, C. and Sacchettini, J. C. A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10892-10896 (1996).
- 24) Hannun, Y. A. and Bell, R. M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, **243**, 500-507 (1989).
- 25) Kolesnick, R. N. Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog. Lipid Res.*, **30**, 1-38 (1991).
- 26) Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Webb, S. K., Reiter, A., Adams, J. and Merrill, Jr., A. H. Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas *versus* adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **50**, 4936-4941 (1996).
- 27) Moschetta, A., van Berge-Honégouwen, G. P., Portincasa, P., Palasciano, G., Groen, A. K. and van Erpecum, K. J. Sphingomyelin exhibits greatly enhanced

- protection compared with egg yolk phosphatidylcholine against detergent bile salts. *J. Lipid Res.*, **41**, 916-924 (2000).
- 28) Kesäniemi, Y. A., Ehnholm, C. and Miettinen, T. A. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. *J. Clin. Invest.*, **80**, 578-581 (1987).
- 29) Gown, A. M., Tsukada, T., and Ross, R., Human atherosclerosis, II: Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.*, **125**, 191-207 (1986).
- 30) Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A. and Libby, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler. Thromb.*, **13**, 197-204 (1993).
- 31) Hanson, G. K., Seifert, P. S., Olsson, G. and Bondjers, G. Immunohistochemical detection of macrophages and T lymphocytes in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb.*, **11**, 745-750 (1991).
- 32) Drew, A. F. and Tipping, P. G. T helper cell infiltration and foam cell proliferation are early events in the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**, 1563-1568 (1995).
- 33) Kovanen, P. T. Mast cells in human fatty streaks and atheromas: implications for intimal lipid accumulation. *Curr. Opin. Lipidol.*, **7**, 281-286 (1996).
- 34) Schwartz, L. B. and Austen, K. F. Metabolism of LDL in mast cells recovering from degranulation. *Prog. Allergy*, **34**, 271-321 (1984).
- 35) Takai, S., Shiota, N., Kobayashi, S., Matsumura, E. and Miyazaki, M. Induction of chymase that forms angiotensin II in the monkey atherosclerotic aorta. *FEBS Letters*, **412**, 86-90 (1997).
- 36) Schwartz, L. B., Yunginger, J. W., Miller, J., Bokhari, R. and Dull, D. Time-course appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J. Clin. Invest.*, **83**, 1551-1555 (1989).

- 37) Fillias, L. C., Andrus, S. B., Mann, G. V. and Stare, F. J. Experimental production of gross atherosclerosis in the rat. *J. Exper. Med.*, **104**, 539-552 (1956).
- 38) Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, Jr., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- 39) Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1955).
- 40) Fisher, R. A. in "Statistical Methods for Research Workers," Vol. 14, Oliver and Boyd, Edinburgh, pp. 140-142 (1970).
- 41) Minick, C. R. and Murphy, G. E. Experimental induction of atheroarteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. *Am. J. Pathol.*, **73**, 265-300 (1973).
- 42) Xu, Q., Dietrich, H., Steiner, H. J., Gown, A. M., Schoel, B., Mikuz, G. S., Kaufmann, H. E. and Wick, G. Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler. Thromb.*, **12**, 789-799 (1992).
- 43) Gibson, S. and Miller, H. R. P. Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases. *Immunology*, **58**, 101-104 (1986).
- 44) Ma, H. and Kovanen, P. T. IgE-dependent generation of foam cells: an immune mechanism involving degranulation of sensitized mast cells with resultant uptake of LDL by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **15**, 811-819 (1995).
- 45) Freeman, B. A. and Crapo, J. D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 412-426 (1982).
- 46) Morel, D. W. and Chisolm, G. M. Antioxidant treatment of diabetic rats

- inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J. Lipid Res.*, **30**, 1827-1834 (1989).
- 47) Palmer, A. M., Thomas, C. R., Gopaul, N., Dhir, S. Anggard, E. E., Poston, L. and Tribe, R. M. Dietary antioxidant supplementation reduces lipid peroxidation but impairs vascular function in small mesenteric arteries of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetologia*, **41**, 148-156 (1998).
- 48) Bleich, D., Chen, S., Zipser, B., Sun, D., Funk, C. D. and Nadler, L. Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice. *J. Clin. Invest.*, **103**, 1431-1436 (1999).
- 49) Sajithlal, G. B., Chithra, P. and Chandrakasan, G. Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1607-1614 (1998).
- 50) American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutrition studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348 (1977).
- 51) Yoshida, H., Kumamaru, J., Mawatari, M., Ikeda, I., Imaizumi, K., Tsuji, H. and Seto, A. Lymphatic absorption of seal and fish oils and their effect on lipid metabolism and eicosanoid production in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1293-1298 (1996).
- 52) Nagao, K., Yoshida, S., Nakagiri, H., Sakono, M., Sato, M. and Imaizumi, K. Gemfibrozil reduces non-high-density lipoprotein cholesterol in exogenously hypercholesterolemic (ExHC) rats fed a high-cholesterol diet. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, **120**, 579-586 (1998).
- 53) Gotoh, M., Maki, T., Kiyozumi, T., Satomi, S. and Monaco, A. P. An improved method of isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation*, **40**, 437-441 (1985).
- 54) Okamoto, Y., Ishida, H., Taminato, T., Tsuji, K., Kurose, T., Tsuura, Y., Kato, S., Imura, H. and Seino, Y. Role of cytosolic Ca²⁺ in impaired sensitivity to glucose of rat pancreatic islets exposed to high glucose *in vitro*. *Diabetes*,

- 41, 1555-1561, (1992).
- 55) Okeda, T., Ono, J. and Todo, S. Simple method for the collection of pancreatic islets by the use of Ficoll-Conray gradient. *Endocrinol. Jpn.*, **26**, 495-499, (1979).
- 56) Babu, P. S. and Srinivasan, K. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat. *Mol. Cell. Biochem.*, **152**, 13-21 (1995).
- 57) Ravindranath, V. and Chandrasekhara, N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, **16**, 259-266 (1980).
- 58) Wahlstrom, B. and Blennow, G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 86-92 (1978).
- 59) Jeejeebhoy, K. N., Ahmad, S. and Kozak, G. Determination of fecal fats containing both medium and long chain triglycerides and fatty acid. *Clin. Biochem.*, **3**, 157-163 (1970).
- 60) Carvajal, O., Sakono, M., Sonoki, H., Nakayama, M., Kishi, T., Sato, M., Ikeda, I., Sugano, M. and Imaizumi, K. Structured triacylglycerol containing medium-chain fatty acids in sn-1(3) facilitates the absorption of dietary long-chain fatty acids in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 793-798 (2000).
- 61) Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G. V. and Gallo, L. L. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols, *J. Lipid Res.*, **29**, 1573-1582 (1988).
- 62) Forstner, G. G., Sabesin, S. M. and Isselbacher, K. I. Rat intestinal microvillus membran. *Biochem. J.*, **106**, 381-390 (1968).
- 63) Dalqvist, A. Method for assay of intestinal disaccharidase. *Anal. Biochem.*, **7**, 18-25 (1964).
- 64) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

- 65) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 66) Imaizumi, K., Abe, K., Kuroiwa, C. and Sugano, M. Fat containing stearic acid increased fecal neutral steroid excretion and catabolism of low density lipoproteins without affecting plasma cholesterol concentration in hamsters fed a cholesterol-containing diet. *J. Nutr.*, **123**, 1693-1720 (1993).
- 67) Storry, J. E. and Tuckley, B. Thin-layer chromatography of plasma lipids by single development. *Lipids*, **2**, 501-502 (1967).
- 68) Sato, M., Nagao, K., Hayami, T., Sugano, M. and Imaizumi, K. Repression of fat-dependent intestinal apo A-IV mRNA abundance by medium chain triacylglycerols and protein, and elevation by carbohydrates of fat-dependent apo A-IV transport in suckling rat pups. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **41**, 293-306 (1995).
- 69) Richard, L. and Arnis, K. Triacylglycerol synthesis by purified triacylglycerol synthetase of rat intestinal mucosa. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13630-13636 (1995).
- 70) Subhash, C. J. and Wang F. C. Triacylglycerol biosynthetic enzymes in lean and obese Zucker rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **1255**, 237-243 (1995).
- 71) Chirgwin, J. V., Przbyla, A. E., McDonald, R. J. and Rutter, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **25**, 5294-5299 (1979).
- 72) Nagao, K., Sakono, M., Sakurai, H., Sato, M. and Imaizumi, K., Exogenously hypercholesterolemic (ExHC) rats, compared with their progenitor Sprague-Dawley rats, have altered mRNAs for cholesterol 7 α -hydroxylase and LDL receptor and activities of cholesterol 7 α -hydroxylase and acyl-CoA:cholesterolacyltransferase in the liver in response to dietary cholesterol. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118B**, 949-55 (1997).
- 73) Goodlad, R. A. Microdissection-based techniques for the determination of cell proliferation in gastrointestinal epithelium: Application to animal and

- human studies. *Cell Biology*, **2**, 205-216 (1994).
- 74) Atillasoy, E. and Holt, P. R. Gastrointestinal proliferation and aging. *J. Gerontol.*, **48**, B43-49 (1993).
- 75) Geokas, M. C., Contreas, C. N., and Majumdar, A. P. N. The aging gastrointestinal tract, liver, and pancreas. *Clin. Geriatr. Med.*, **1**, 177-205 (1985)
- 76) Holt, P. R. and Balint, J. A. Effects of aging on intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol.*, **264**, G1-6 (1993).
- 77) Smith, S. J., Cases, S., Jensen, D. R., Chen, H. C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D. A., Raber, J., Eckel, R. H. and Farese, Jr. R. V. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature Genet.*, **25**, 87-90 (2000).
- 78) Mansbach, C. M. and Dowell, R. Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *J. Lipid Res.*, **41**, 605-612 (2000).
- 79) Nyberg, L., Nilsson, Å., Lundgren, P. and Duan, R.-D. Localization and capacity of sphingomyelin digestion in the rat intestinal tract. *J. Nutr. Biochem.*, **8**, 112-118 (1997).
- 80) Kobayashi, T. and Suzuki, K. The glycosylceramidase in the intestine. Purification and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, **256**, 7768-7773 (1981).
- 81) Adan, Y., Shibata, K., Ni, W., Tsuda, Y., Sato, M., Ikeda, I. and Imaizumi, K. Concentration of serum lipids and aortic lesion size in female and male apo E-deficient mice fed docosahexaenoic acid. *Biosci., Biotech. Biochem.*, **63**, 309-313 (1999).



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

