

## ビタミンEとメチオニン不足がラットの 肝臓機能に及ぼす影響

赤沢典子\*・鷹齋テル\*・長谷川智子\*\*

(1984年6月30日受理)

### 1 緒 言

日本人の食生活は向上しているかのようにみえるが、嗜好中心に食物が選択され加工食品依存度の高い現代においては、一部に蛋白質のとり方や脂肪とビタミンEの摂取のバランスが不均衡になる問題が生じる。著者らは先にビタミンE欠乏で低蛋白飼料を投与したラットし、急死の生じることを確認しその死亡原因について検討し、その死亡原因は広範な食事性肝壊死によるものと推定した。また過酸化脂質の増加は致命的な肝臓障害と相関しており、ビタミンE欠乏による組織の過酸化の促進が関与している事を明らかにした<sup>1)</sup>。

György ら<sup>2)</sup>はラットの食事性肝壊死の重要な因子は含硫アミノ酸であると述べている。また Harpar ら<sup>3)</sup>は脂肪肝を防ぐのには必須アミノ酸の十分な量が必要であると述べている。

そこで本実験では、ビタミンE欠乏で含硫アミノ酸であるメチオニン不足の飼料をラットに投与し生体に及ぼす影響、特に肝臓機能に及ぼす影響について、過酸化脂質及びグルタチオンの生成、肝臓の組織学的、生化学的变化の点から検討した。

### 2 実験方法

#### 1) 実験動物及び飼料配合

実験動物は離乳直後の Wistar 系雄ラットを用い、4群に分け1つの群は7~9匹とした。それらのラットは1匹ずつ各ケージに入れ、室温23~25°Cとして12週間飼育した。

飼料および飲水は自由に摂取させた。飼料配合は表1-Aに示す。1群はメチオニンとビタミンEを添加した群、2群はメチオニン添加・ビタミンE欠乏群、3群はメチオニン不足・ビタミンE添加群、4群はメチオニン不足・ビタミンE欠乏群とした。基礎飼料の組成は $\alpha$ -澱粉61.6%、脱脂大豆20%、分子蒸留コーンオイル10%、無機塩類4%、ビタミンB混合1%、塩化コリン0.1%、ビタミンA1000iu・粉末ロシ2.0% (100g/Diet) である。1、2群のメチオニン添加群はDL-メチオニンを0.2g%、1,3群のビタミン添加群はdl- $\alpha$ -トコフェロールアセテートを飼料100gにつき10mg添加した。

脱脂大豆のアミノ酸含量は表1-Bに示す。脱脂大豆のビタミンEは液体クロマトグラフィーで測定したが検出されなかった。

\* 岩手大学 教育学部

\*\* 静岡大学 教育学部

表1-A 飼料配合(%)

群	$\alpha$ -澱粉	脱脂 <sup>1)</sup> 大豆	DL-メチオニン	コーン油 <sup>2)</sup>	無機塩類 <sup>3)</sup>	ビタミン混合 <sup>4)</sup>	塩化コリン	ビタミンA <sup>5)</sup> (IU)	ビタミンE <sup>6)</sup> (mg)	粉末ロン
1 {メチオニン添加 VE添加	61.7	20	0.2	10	4	1	0.1	1000	10	2
2 {メチオニン添加 VE欠乏	61.7	20	0.2	10	4	1	0.1	1000	0	2
3 {メチオニン欠乏 VE添加	61.9	20	0	10	4	1	0.1	1000	10	2
4 {メチオニン欠乏 VE欠乏	61.9	20	0	10	4	1	0.1	1000	0	2

- 1) 脱脂大豆：粉末状植物性たん白
- 2) コーン油：分子蒸留コーン油
- 3) 無機塩類：Happer Salt Mixture
- 4) ビタミン混合：Happer Vitamin Mixture
- 5) ビタミンA：理研ドライA-B300P
- 6) ビタミンE：dl- $\alpha$ -トコフェロールアセテート

表1-B 脱脂大豆アミノ酸含量(100g中)

アミノ酸名	量(g)	アミノ酸名	量(g)
トリプトファン	0.19	アラニン	0.72
リジン	1.03	シスチン	0.12
ヒスチジン	0.42	メチオニン	0.08
アルギニン	1.27	バリン	0.82
スレオニン	0.66	イソロイシン	0.77
セリン	0.87	ロイシン	1.31
グルタミン酸	3.10	アスパラギン酸	1.88
プロリン	0.86	チロシン	0.57
グリシン	0.70	フェニールアラニン	0.85

## 2) 測定方法

(1) 赤血球溶血試験，血清トコフェロール，血中の過酸化脂質および血清 GOT，GPT の測定法は前報<sup>4)</sup>のとおりである。

## (2) 肝臓の脂肪量及び肝臓グルタチオン

肝臓の総脂肪量はソックスレー抽出法により重量測定を行った。肝臓の還元型と酸化型グルタチオンの測定は肝臓を摘出後，すみやかに秤量し肝臓1gにつき0.1Mリン酸ナトリウム EDTA 緩衝液15mlと25%メタリン酸4mlを加え水中でホモジナイズレ4℃で10000回転，30分間遠心分離し上清液を検体液とし，Hissinら<sup>5)</sup>の方法に従った。

## (3) 血清のアミノ酸

血清のアミノ酸は Dionex D-500 アミノ酸アナライザーにより分析定量を行った。

## (4) 組織標本の作製

屠殺後直ちに，下垂体，副腎，精巣，肝臓および脾臓を摘出し秤量した後，10%ホルマリン液で固定しパラフィンに包埋した。切片はH-E染色，トリクローム染色およびPAS染色を行って鏡検した。

### 3 結 果

#### 1) 発育と臓器重量

発育はどの群もほぼ同様で実験終了時の体重はいずれも330g前後であった。

内分泌腺(下垂体, 副腎, 精巣), 肝臓及び脾臓の重量(体重100g当り)は表2に示す。下垂体と精巣の重量はメチオニン添加やビタミンE添加の有無による違いは認められなかった。副腎はメチオニン不足の3群とメチオニンとビタミンE欠乏の4群で有意の差(P<0.05)をもって小さい値を示した。肝臓はビタミンE欠乏の2群(P<0.05)とメチオニンとビタミンE欠乏の4群(P<0.001)で肥大が認められた。

表2 体重及び組織の重量(体重100g当り)

群	ラット数	体 重 (g)	下垂体 (mg)	副 腎 (mg)	肝 臓 (g)	脾 臓 (g)	精 巣 (g)
1 {メチオニン添加 VE添加	7	325±15 <sup>1)</sup>	2.7±0.3	12.9±2.0	2.7±0.2	0.19±0.03	0.91±0.15
2 {メチオニン添加 VE欠乏	7	345±38	2.3±0.3	12.5±2.0	3.1±0.3	0.19±0.04	0.99±0.10
3 {メチオニン欠乏 VE添加	8	347±39	2.4±0.4	10.3±2.0 <sup>※2)</sup>	2.9±0.3	0.17±0.03	0.99±0.10
4 {メチオニン欠乏 VE欠乏	8	333±33	2.4±0.2	10.2±2.0 <sup>※</sup>	3.0±0.2 <sup>※※※3)</sup>	0.21±0.03	0.98±0.25

- 1) M±SD
- 2) P<0.05
- 3) P<0.01

#### 2) 赤血球溶血率と血清の総トコフェロール

溶血率及び総トコフェロールは表3に示す。溶血率は1群(+Met, +VE)と3群(-Met, +VE)で正常な値を示した。2群(+Met, -VE)と4群(-Met, -VE)では明らかに溶血率は高くビタミンE欠乏状態が認められた。

表3 赤血球溶血試験, 血清の総トコフェロール量と血清の過酸化脂質量

群	ラット数	溶 血 率 (%)	血清トコフェロール (mg/ml)	過酸化脂質 (nmol/ml)
1 {メチオニン添加 VE添加	7	6.9±11.1 <sup>1)</sup>	0.49±0.23	12.24± 1.06
2 {メチオニン添加 VE欠乏	7	100.0± 3.0 <sup>※※※2)</sup>	0.19±0.04 <sup>※※※</sup>	63.88±26.06 <sup>※※※</sup>
3 {メチオニン欠乏 VE添加	8	4.6± 6.7	0.64±0.07	11.99± 1.68
4 {メチオニン欠乏 VE欠乏	8	95.4± 6.2 <sup>※※※</sup>	0.25±0.05 <sup>※※※</sup>	60.78±20.93 <sup>※※※</sup>

- 1) M±SD
- 2) P<0.001

血清のトコフェロールは1群(+Met, +VE)と3群(-Met, +VE)では0.5~0.6mg/dlであった。2群(+Met, -VE)と4群(-Met, -VE)では有意(P<0.001)に低い値を示し

た。溶血率および血清トコフェロールはメチオニン添加の有無による差は認められなかった。

### 3) 血清の過酸化脂質

血清の過酸化脂質は表3にみられるように、1群(+Met, +VE)と3群(-Met, +VE)で12nmol/mlでメチオニン添加の有無による差は明らかでなかった。2群(+Met, -VE)と4群(-Met, -VE)は約60~64nmol/mlの値を示し、ビタミンE欠乏である2群と4群はビタミンEを添加した1, 3群に比べて血清の過酸化脂質は5倍の増加が認められた。

### 4) 肝臓の脂肪量と血清の GOT, GPT.

肝臓の脂肪量及び血清の GOT, GPT は表4に示す。肝臓の脂肪量は肝臓重量に対する比率で表わした。肝臓の脂肪量はメチオニンを添加していない3群(P<0.001)と4群で増加の傾向が認められた。血清 GOT は、1群(+Met, +VE)と3群(-Met, +VE)で89~106 u/lの値を示したのに対して2群(+Met, -VE)と4群(-Met, -VE)は186~189 u/lの値を示し有意に高く、ビタミンE欠乏にした群でGOTが増加したことが認められた。血清のGPTは、3群(-Met, +VE)と4群(-Met, -VE)で有意に高い値を示し、メチオニンを添加しない群で増加が認められた。

表4 肝臓の脂肪量, 血清 GOT, GPT 及び肝臓中の GSH, GSSG

群	ラット数	脂肪 (肝重量比%)	GOT <sup>1)</sup> (u/l)	GPT <sup>2)</sup> (u/l)	GSH <sup>3)</sup> (μg/g)	GSSG <sup>4)</sup> (μg/g)
1 {メチオニン添加 VE添加	7	3.21±0.53 <sup>5)</sup>	106±20	9.0±3.5	1541±436	1495±410
2 {メチオニン添加 VE欠乏	7	3.36±0.70	189±64 <sup>※6)</sup>	14.7±2.0	312±197 <sup>※※※</sup>	1314±188
3 {メチオニン欠乏 VE添加	8	4.54±0.78 <sup>※※※</sup>	89±13	20.8±9.1 <sup>※</sup>	691±249 <sup>※※※</sup>	991±171 <sup>※※※</sup>
4 {メチオニン欠乏 VE欠乏	8	4.05±0.89	186±38 <sup>※※※(8)</sup>	17.3±4.0 <sup>※※7)</sup>	336±216 <sup>※※※</sup>	1126±111 <sup>※</sup>

1) GOT: グルタミン酸とオキサロ酢酸転移酵素

2) GPT: グルタミン酸とピルビン酸転移酵素

3) GSH: 還元型グルタチオン

4) GSSG: 酸化型グルタチオン

5) M±SD

6) P<0.05

7) P<0.01

8) P<0.001

### 5) 肝臓中のグルタチオン

肝臓中の還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) は表4に示す。肝臓中のGSHは1群に比べて2群(+Met, -VE)では、312 μg/gの値を示し有意 (P<0.001) に低下した。また、3群(-Met, +VE)では691 μg/gの値を示し有意 (P<0.001) に低下し、4群(-Met, -VE)でも著しく低い値336 μg/gを示した。

これらの結果から肝臓中のGSHはメチオニンの不足により減少し、ビタミンE欠乏によりさらに著しく減少することが認められた。一方、肝臓中のGSSGは1群に対して2群(+Met, -VE)では差は認められなかった。3群(-Met, +VE)と4群(-Met, -VE)では有意に低い値を示した。これらのことから肝臓中のGSSGはメチオニン欠乏により減少するが認められた。

5) 血清のアミノ酸

血清のアミノ酸は表5に示す。必須アミノ酸の中で変動のみとめられたのはメチオニンであった。3群(-Met, +VE)及び4群(-Met, -VE)のメチオニンを添加していない群では血清のメチオニンは1, 2群に対して有意に低い値を示した。血清のシスチンはいずれの群も著しく低く有意の差は認められなかった。

表5 血清のアミノ酸量 (nmol/ml)

群	ラット数	バリン	メチオニン	シスチン	イソロイシン	ロイシン	トリプトファン	フェニールアラニン	リジン
1	{メチオニン添加 VE添加} 7	191.2 ±31.3 <sup>1)</sup>	90.5±17.1	8.3±6.8	169.3 ±23.9	211.0 ±35.1	106.3 ±19.4	105.6 ±20.3	607.9 ±93.2
2	{メチオニン添加 VE欠乏} 7	227.0 ±20.9	84.6± 8.8	7.8±4.5	174.5 ±11.7	249.9 ±21.0	95.6 ± 7.7	114.0 ± 8.4	646.1 ±53.9
3	{メチオニン欠乏 VE添加} 7	206.2 ±19.8	60.1± 4.9 ※※※ <sup>3)</sup>	7.3±3.0	159.8 ±15.3	220.1 ±28.6	104.9 ±19.4	105.7 ±20.3	613.7 ±93.2
4	{メチオニン欠乏 VE欠乏} 7	182.0 ±19.9	61.6± 6.5 ※※ <sup>2)</sup>	7.5±3.0	136.0 ±15.4	202.6 ±16.7	89.1 ± 4.0	90.0 ± 9.3	657.7 ±36.8

- 1) M±SD
- 2) \*\*P<0.01
- 3) \*\*\*P<0.001

6) 肝臓の組織学的変化

メチオニンとビタミンEを添加した群のラットの肝細胞の配列は正常で、組織学的に著明な変化は認められなかった(図1-1)。2群のビタミンE欠乏の肝臓では肝細胞が萎縮または壊死しているものが認められた(図1-2)、また肝細胞にはリポフスチンが蓄積していた。3群のメチオニン欠乏群では肝臓の細胞索の配列がやや乱れているものが認められ、中には軽度の脂肪変性を呈するものが認められた(図1-3)。4群のメチオニンとビタミンE欠乏群では肝細胞の著しい萎縮が認められた(図1-4)。また、肝細胞の中心部にPAS陽性のリポフスチン顆粒が出現し(図1-5)、これらのPAS陽性の細胞が中心静脈に沿って出現した。また類洞が拡張し小出血が認められた。

4 考 察

著者らは低蛋白(10%カゼイン)・ビタミンE欠乏ラットが実験開始5~6週頃から急死することを認め、その死亡原因は食事性肝壊死であることを報告<sup>1)</sup>した。食事性肝壊死に特に重要な因子として含硫アミノ酸が関係すると報告されている。そこで本実験ではメチオニン不足でビタミンE欠乏ラットに食事性肝壊死が出現するメカニズムについて検討することを目的に実験を行った。飼料に用いた蛋白源としての脱脂大豆のアミノ酸を成長期ラットの必須アミノ酸必要量パターンと比較すると脱脂大豆の第一制限アミノ酸は含硫アミノ酸であり、第二制限アミノ酸はスレオニン、第三制限アミノ酸はリジンである。

体重発育はいずれの群も差は認められなかった。山口ら<sup>2)</sup>は脱脂大豆にメチオニンを添加することにより発育に対する効果を認めているが、添加したメチオニン量の相違によるものと思

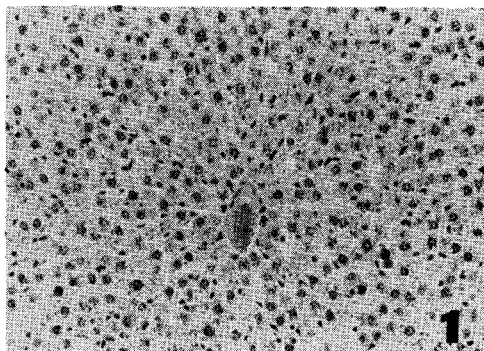


図1-1 メチオニン・ビタミン添加群のラットの肝細胞。細胞は正常。H E 染色 20×7

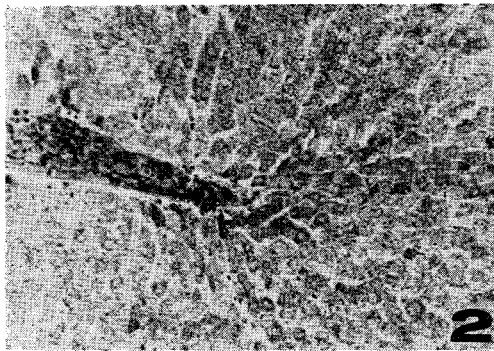


図1-2 ビタミンE欠乏群。細胞の壊死した部分が見られる。T C 染色 20×7

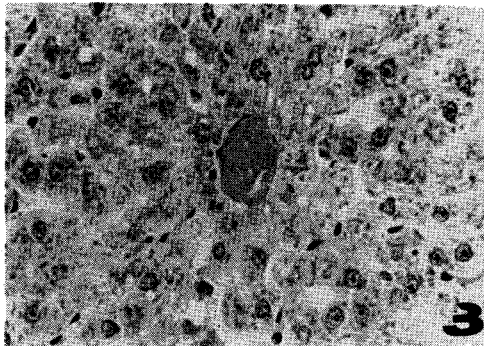


図1-3 メチオニン欠乏群。軽度の脂肪変性が見られる。H E 染色 40×7

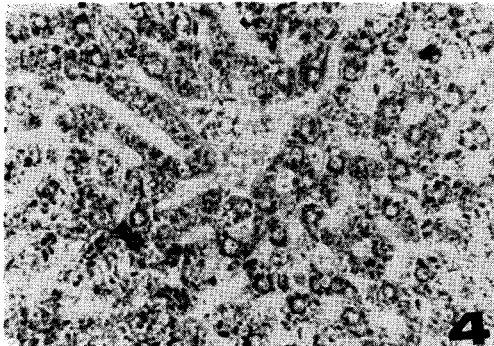


図1-4 メチオニン不足・ビタミンE欠乏群。肝細胞の著しい萎縮が認められる。T C 染色 40×7

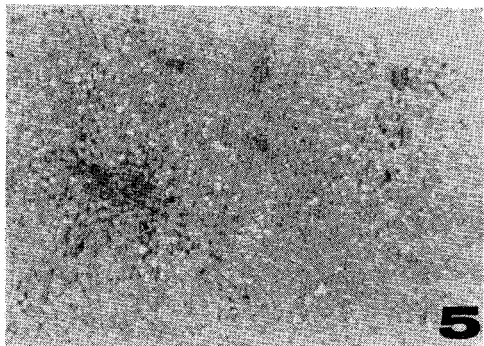


図1-5 メチオニン不足・ビタミンE欠乏群。肝小葉の中心部にリボフスチン顆粒の出現 PAS 染色 10×7

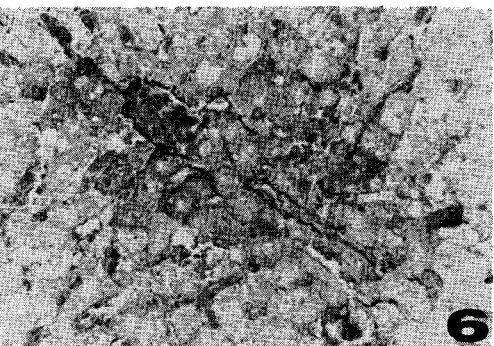


図1-6 図1-5の拡大 PAS 染色 40×7

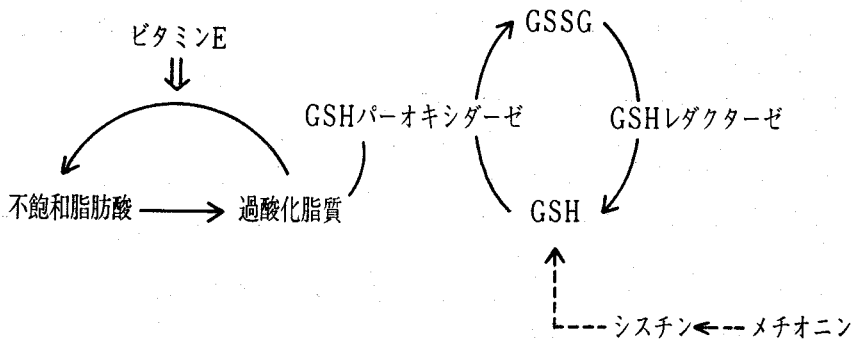
われる。

血清のビタミンEはビタミンEを添加しない群では明らかに低く、ビタミンEの欠乏状態を示していると考えられる、一方メチオニン添加の有無による血清ビタミンEの変動は認められ

なかった。血清の過酸化脂質はビタミンEを添加しない群では明らかに増加が認められたがメチオニンの添加の有無による過酸化脂質の変動は認められなかった。東條ら<sup>9)</sup>は摂取蛋白(10%カゼインと20%カゼイン)レベルの違いによる肝臓の過酸化脂質の相違は認められなかったと報告している。また Harada ら<sup>9)</sup>は高蛋白・ビタミンE欠乏ラットに対して低蛋白・ビタミンE欠乏ラットの過酸化脂質の相違を認めていないが、低蛋白・ビタミンE欠乏ラットで diseased のものは肝臓中の過酸化脂質が高くなる傾向にあったと報告している。著者らは低蛋白・ビタミンE欠乏ラットで特に死亡直前と思われたラットでは特に過酸化脂質が増加することを報告した。

ビタミンE欠乏ラットでは血清のGOTの上昇、メチオニン不足でビタミンE欠乏ラットでは血清のGOTとGPTの上昇が認められ、これらのラットでは肝臓に何らかの障害を受けていることが伺えた。

グルタチオンはグルタチオンパーオキシターゼの構成成分として働き、生体の脂質過酸化障害防止に関与している。グルタチオンは細胞中には酸化型で存在し、それはグルタチオンレダクターゼによりすみやかに還元型に変わる。ビタミンE、グルタチオンとメチオニンとの関連は図2のように考えられている<sup>10)</sup>。



図一2 メチオニンとグルタチオンとの関連

本実験に於て、メチオニン不足群(-Met, +VE)ではGSHとGSSGの減少が認められた、GSHの生成にはメチオニンが必要であり、メチオニンの不足はGSH生成量とGSSGの生成量にも関与してくると考えられる。一方、ビタミンE欠乏群(+Met, -VE)ではGSHのみ減少が認められた。このことは過酸化脂質の増大がGSHを消費し、またビタミンE欠乏により肝細胞中にパーオキシターゼが増加することにより、GSH→GSSGへの形成がなされたとも考えられる。メチオニンとビタミンE欠乏の群ではGSHとGSSGの減少が認められ、GSHの減少はメチオニン欠乏のみの群より著しいことが認められる。メチオニンやシスチンの含硫アミノ酸はグルタチオンの形成に役立っており細胞質中の脂質過酸化に対して類似の効果をもっと推察されているが<sup>11),12)</sup>、本実験に於てもその事が伺えた。

10%カゼイン・ビタミンE欠乏ラットの肝臓では著しい脂肪肝が認められ、また、これらの脂肪化した細胞と共に萎縮した小型で細胞質が壊死の直前と思われる細胞が出現することを報告したが、メチオニン不足・ビタミンE欠乏ラットに於ても細胞の萎縮や壊死した細胞が認められた。KwashiorkorではVLDLアポ蛋白の合成が低下し中性脂肪がVLDLになって血中へ

放出されず脂肪肝になる<sup>13)</sup>と推察されている。メチオニンの不足は蛋白合成の低下を起し、肝臓から脂肪の放出低下をまねく事も肝臓障害の起こる原因のひとつに考えられる。メチオニン不足・ビタミンE欠乏ラットの肝臓障害はメチオニン不足によるグルタチオン形成及びアポ蛋白合成の低下とビタミンE欠乏による脂肪酸の過酸化が関与していると考えられる。

## 要 約

メチオニン不足・ビタミンE欠乏が肝臓の機能にどのような影響を与えるのかを検討するために Wistar 系雄ラットを用い、メチオニン添加・ビタミンE添加群、メチオニン添加・ビタミンE欠乏群、メチオニン不足・ビタミンE添加群、メチオニン不足・ビタミンE欠乏群の4群とし、12週間飼育した。各群の赤血球溶血率、血清トコフェロール量、血清の過酸化脂質、肝臓の脂肪量、血清 GOT, GPT, 肝臓中の GSH, GSSGの測定及び肝臓組織について組織学的検討を行い、次の結果を得た。

1) 発育はいずれの群も差は認められなかった。肝臓組織重量はビタミンE欠乏群及びメチオニン不足・ビタミンE欠乏群で増加した。

2) 赤血球溶血率の上昇、血清トコフェロールの減少、血清の過酸化脂質の上昇が、ビタミンE欠乏群及びメチオニン不足・ビタミンE欠乏群に認められた。摂取メチオニン量の違いによる変動はみられなかった。

3) 肝臓の還元型グルタチオンはメチオニン不足により減少し、ビタミンE欠乏によりさらに減少した。酸化型グルタチオンはメチオニン不足により減少した。

4) 血清の GOT, GPT はメチオニン不足・ビタミンE欠乏群で共に上昇した。

5) 血清のアミノ酸量はメチオニン不足群及びメチオニン不足・ビタミンE欠乏群で減少した。

6) メチオニン不足・ビタミンE欠乏ラットの肝臓は細胞の著しい萎縮が認められ、また、PAS陽性のリポフスチン顆粒が出現した。

本研究に当り、御指導頂きました岩手大学農学部見上晋一博士、常磐学園短期大学教授小柳達男博士、血清のアミノ酸の定量に御指導頂きました、岩手大学農学部西沢直行博士に感謝申し上げます。また御協力頂きました教育学部家政学研究室及び農学部家畜解剖学研究室の諸姉、諸兄に感謝致します。さらに分子蒸留コーンオイルを御提供下さいましたエーザイ株式会社及び脱脂大豆を御提供下さいました味の友株式会社に感謝致します。

なお、本研究の一部は科学研究費(課題番号58580036)の補助をうけた。

## 文 献

- 1) 赤沢典子, 鷹嘴テル: 家政学雑誌 35, (1984).
- 2) György, P., Goldfbatt, H., : Nature 163, 30 (1949).
- 3) Harpar, A.E., : J. Nutr., 50, 187 (1955).
- 4) 赤沢典, 鷹嘴テル, 見上晋一, 大島徹, 山田静弘: ビタミン 54, 199 (1980).
- 5) Hissin, P.J., Hilt, R., : Analy. Bioche., : 74, 214 (1976).



- 6) National Academy of Sciences-National Research Council: Nutrition Requirements of Domestic Animals, NO10 "Nutrient Requirement of Laboratory Animals" ., P64 (1972).
- 7) 山口迪夫, 岩谷昌子, 宮崎基嘉: 栄養学雑誌 39, 275 (1981).
- 8) 東條仁美, 宮崎基嘉: 栄養学雑誌 36, 159 (1978).
- 9) Harada., N., Takahashi, Y.: Agr. Bio. Chem., 46, 2645 (1982).
- 10) Tateishi, N., Hirasawa, M., Higashi, T., Sakamoto, Y.: J. Nutr., 112, 2217 (1982).
- 11) Chen, L.H., Liao, S., Packett, L.V.: Nutr. Rep. Inter., 4, 1 (1971).
- 12) Chen, L.H., Packett, L.V.: Nutr. Rep. Inter., 5, 4 (1972).
- 13) 楠智一, 衣笠昭彦: 小児内科 13, 593 (1981).