

## フィトステロールおよびミソのマウス血中脂質上昇抑制作用

芳野恭士\*<sup>1</sup>、後藤はるな<sup>1</sup>、栢村秀範<sup>2</sup>

<sup>1</sup>沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

<sup>2</sup>マルコメ株式会社 (〒380-0943 長野市安茂里 883)

\*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

## Inhibitory Effects of Phytosterols and Soybean Paste on the Elevation of Lipid Levels in Mouse Plasma

Kyoji YOSHINO, Haruna GOTO, Hidenori KAYAMURA

<sup>1</sup>Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

<sup>2</sup>Marukome Co., Ltd. (883 Amori, Nagano, Nagano 380-0943, Japan)

(Received January 17, 2013; Accepted February 19, 2013)

### Abstract

Metabolic syndrome is known as an important risk factor for cardiovascular disease. Hyperlipidemia and visceral fat accumulation could be caused by excessive fat intake. Soybeans contain several components, such as phytosterols (PS), that lower the levels of serum triglycerides (TG) and cholesterol (Cho) and prevent obesity. In addition, soybean paste (miso) is also known to have inhibitory effects on lipid absorption in animals. In this study, the synergistic effects of PS and miso on mouse plasma lipid levels were investigated. Administration of a high-fat diet or lipids increased the levels of TG and total cholesterol (TC) in mouse plasma. The concurrent ingestion of PS and miso significantly prevented the increase of these lipids in mouse plasma. The usage of PS and miso would be expected to suppress lifestyle-related diseases, such as atherosclerosis.

**Key words:** Plasma cholesterol, Phytosterols, Miso, Mouse

### 1. 緒言

平成 10 年に行われた国民栄養調査では、30～60 歳の男性および 60 歳以上の女性の 3 人に 1 人が肥満であると報告されている[1]。その原因の一つとして、近年、食生活の欧米化が進んだことで、動物性の食品を中心とした脂質の摂取割合の増加や糖質の過剰摂取が挙げられる[2]。肥満とともに内臓脂肪の蓄積や高脂血症を起こす要因の一

つに、過剰な脂質の摂取が考えられている[3]。

ダイズは栄養価が高いだけでなく、脂質吸収抑制作用などの保健作用のある成分が多く含まれていることが知られている[4,5]。さらに、ダイズから製造されるミソにも、脂質吸収抑制作用があり[6]、血中トリグリセリド (TG) 濃度やコレステロール (Cho) 濃度の低下作用、脂肪肝の形成抑制作用あるいは肥満抑制作用が認められる。

ステロールは、すべての動植物細胞の構成成分の一つである。Cho は高等動物の細胞膜の必須成分であるが、植物細胞の細胞膜には特有のステロール類が含まれ、フィトステロール (PS) と呼ばれている。PS としては、 $\beta$ -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール等が知られている。これらのステロール類の化学構造を図 1 に示す。

我々は普段の植物性の食事を通して、ある程度の PS を摂取している。PS は、Cho と化学構造が類似していることから、Cho の輸送系により吸収されるが小腸へは移行しにくく、その大部分が腸管内に排泄される。そのため、PS には Cho の取り込みを阻害し、血中コレステロール濃度を低下させる効果のあることが報告されている[7]。

ところで、ミソは日本人にとって摂取頻度の高

い食品であるため、その保健作用を強化するために、これまでに、タンパク質、ペプチド、リン脂質、イソフラボンを添加したものが開発されてきた。しかし、PS をミソに添加した例は見られない。本研究では、食事からの脂質の吸収を穏やかにする効果があるとされるミソに、さらに同様の作用を持つ PS を添加することで、高脂血症を予防するのにより有効な食品の開発を目指し、高脂食や脂質単独と PS およびミソを同時に投与した場合の、マウス血中脂質濃度への影響について検討した。

## 2. 実験

### 2.1 材料および実験動物

PS は、タマ生化学社より供与された $\beta$ -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、

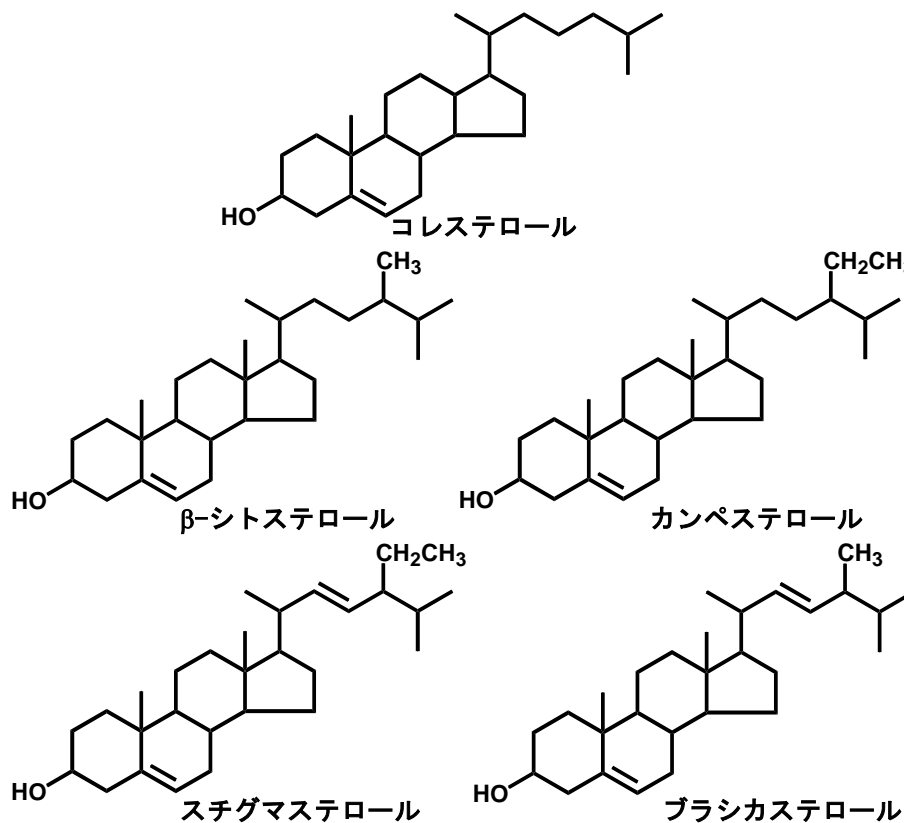


図 1 ステロール類の化学構造.

ブラシカステロールの混合物（含量 90%）を用いた。ミソは、マルコメ社より供与された信州赤色系の標準的なコメミソ（大豆：米（麴） = 2：1、塩分 22.5±1.5%、水分 5%以下）の凍結乾燥物を用いた。その他の試薬については、市販特級品を用いた。

実験動物は、日本 SLC 社より購入した 4 週齢の雄性 ddY 系マウスを用いた。マウスは 12 時間間隔で照明が点灯・消灯する部屋で飼育し、実験中は水道水を自由摂取させた。実験動物の取り扱いには、「沼津工業高等専門学校における動物実験に関する指針」に従った。

## 2. 2 高脂食摂取マウスの血中脂質濃度に対する PS およびミソの影響

既報[8,9]の方法を参考にし、PMI Nutr. Int. (USA)社製 Certified Rodent Diet 5002 粉末飼料に、TG としてナカライテスク社製コーン油を 10% (w/w)、および和光純薬工業社製 Cho を 5%(w/w) となるよう添加した飼料を調製し、高脂食とした。コーン油の脂肪酸組成は、リノール酸約 60%、オレイン酸約 30%、パルミチン酸約 10%であることが知られている[10]。何も添加しない飼料を標準食とした。

マウスを 1 群 4 匹とし、与える飼料の違いにより次の 5 群に分けた：1) 標準食群、2) 高脂食群（10% TG, 5% Cho 添加）、3) PS 添加高脂食群（10% TG, 5% Cho, 0.006% PS 添加）、4) ミソ添加高脂食群（10% TG, 5% Cho, 0.039% ミソ添加）、5) PS+ミソ添加高脂食群（10% TG, 5% Cho, 0.006% PS, 0.039% ミソ添加）。マウスにこれらの飼料を 1 匹当たり 1 日 5 g の供与量に制限して 5 日間摂取させ、飼育中は体重増加量および飼料摂取量を測定した。20 時間の絶食を行った後、5 日目に心臓から採取した血液を、4°C、850×g、15 分間遠心分離を行うことで上清の血漿を得た。血漿の TG 濃度、総コレステロール (TC) 濃度、低比重リポタンパク質 (LDL) -Cho 濃度および高比重リポタン

パク質 (HDL) -Cho 濃度は、和光純薬工業社製トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、LDL-コレステロール-テストワコー、HDL-コレステロール-テストワコーの各臨床検査キットを用いて測定した。

PS およびミソの飼料への添加量については、次のように設定した。ヒトにおける PS の摂取上限値は 1 日当たり 900 mg [11]、また、1 日当たりのミソの平均摂取量は 13 g である[12]。ヒトの標準体重を 60 kg とし、実験に用いたマウスの平均体重が約 20 g であったことから、ヒトでの平均的な摂取量をマウスに換算すると、1 日当たり PS は 0.375 mg、ミソは 1.81 mg に相当する。予備実験で、ミソを飼料に添加するとマウスの嗜好性が高まり、飼料の摂取量が増加することが確認されたため、本実験ではマウス 1 匹に供与する飼料を 1 日に摂取しきると予測される 5g に制限することとし、飼料 5 g 中に PS とミソがそれぞれこれらの量含まれるよう、その添加量はそれぞれ 0.006%と 0.039%とした。

## 2. 3 脂質単独投与マウスの血中脂質濃度に対する PS およびミソの影響

マウスを 1 群 5 匹とし、処理の違いにより次の 5 群に分けた：1) 対照群（試料懸濁用溶媒として 0.5%トラガカントゴム水溶液 0.5 mL 投与）、2) 脂質投与群（TG 250 mg, Cho 0.7 mg 投与）、3) 脂質+PS 投与群（TG 250 mg, Cho 0.7 mg, PS 0.375 mg 投与）、4) 脂質+ミソ投与群（TG 250 mg, Cho 0.7 mg, ミソ 1.81 mg 投与）、5) 脂質+PS+ミソ投与群（TG 250 mg, Cho 0.7 mg, PS 0.375 mg, ミソ 1.81 mg 投与）。20 時間絶食させたマウスに、これらを経口投与して 30 分後に血漿を採取し、その TG 濃度、TC 濃度、LDL-Cho 濃度、HDL-Cho 濃度を、市販の臨床検査キットを用いて測定した。

なお、TG および Cho の投与量は、マウスが 1 日に摂取する標準飼料 5 g 中のそれぞれの量である 250 mg および 0.7 mg を、また、PS およびミソ

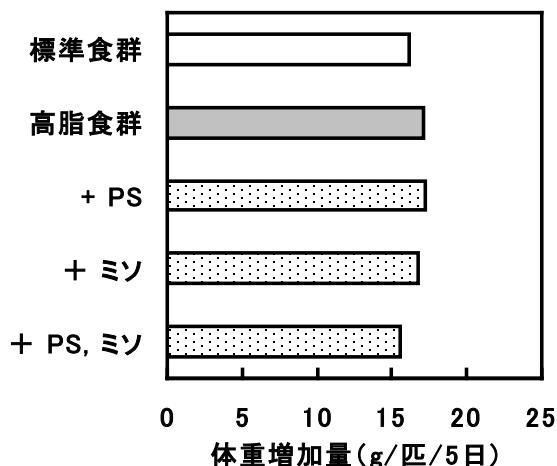


図 2 フィトステロールおよびミソを添加した高脂食摂取のマウス体重への影響 N=4.

の投与量は、前項でマウスに1日に摂取させた量である0.375 mg および1.81 mgをそれぞれ用いることとした。

### 2. 4 統計処理

データは、平均値±標準偏差で表した。実験群間の差については、パラメトリック法であるStudentのt検定を用いて解析し、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 高脂食摂取マウスの血中脂質濃度に対するPSおよびミソの影響

飼料摂取量については、全ての群で1匹当たり1日5 gを残さず摂取した。マウスの体重増加量は、標準食群に比較して高脂食群で高い傾向が見られた(図2)。高脂食群とPS添加高脂食群には、体重増加量の差は見られなかったが、高脂食群に比較するとミソ添加高脂食群で減少する傾向が見られ、さらにPS+ミソ添加高脂食群では減少が著しかった。

マウスの血中TG濃度およびTC濃度は、標準食群に比較して高脂食群で有意な増加が見られた(図3)。血中TG濃度およびTC濃度のいずれ

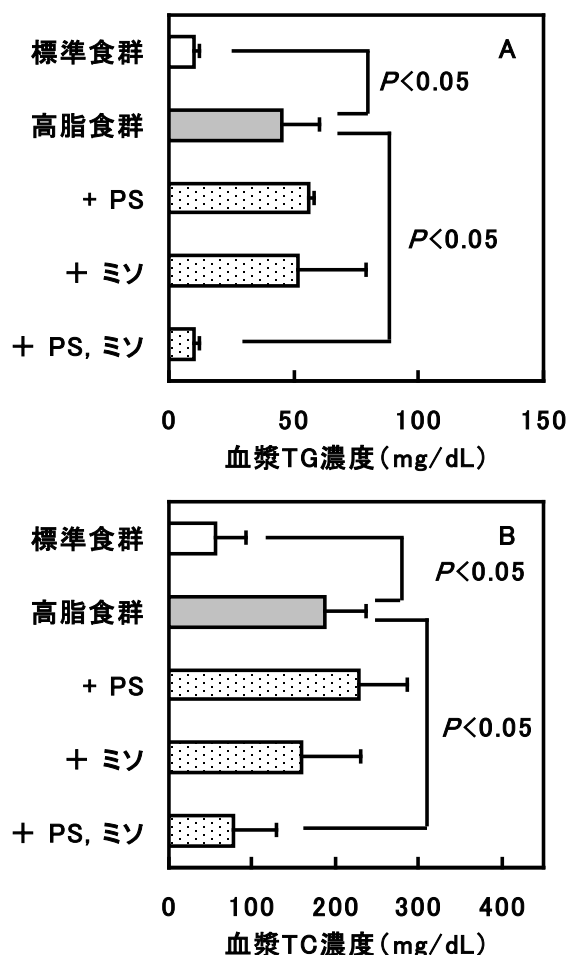


図 3 フィトステロールおよびミソを添加した高脂食摂取のマウス血漿トリグリセリド濃度および総コレステロール濃度への影響 A, 血漿トリグリセリド濃度; B, 血漿総コレステロール濃度. 平均 ± 標準偏差.  $N = 4$ .  $P < 0.05$ は指定した2群間の有意差を示す。

においても、PS添加またはミソ添加高脂食群の血中TG濃度は高脂食群と差が見られなかったが、PS+ミソ添加高脂食群では高脂食群に比較して有意な減少が見られた。これらの結果より、PSやミソ単独の添加では高脂食投与による血中TG濃度およびTC濃度の上昇が明確に抑制されなかったのに対し、PSとミソを同時に投与した場合には、高脂食による血中脂質濃度の上昇が抑制され、体重の増加も抑制されることがわかった。

血中リポタンパク質ごとのCho量について検討

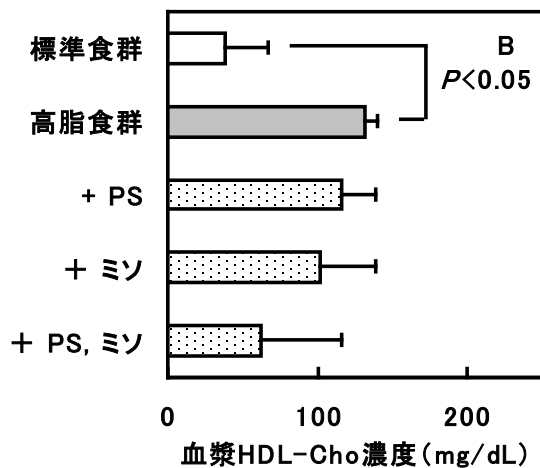
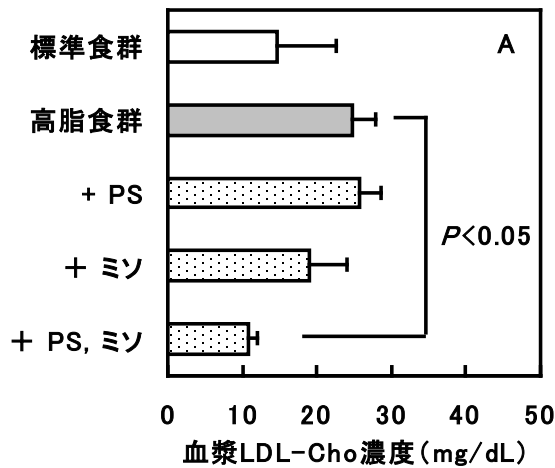


図4 フィトステロールおよびミソを添加した高脂食摂取のマウス血漿低比重コレステロール濃度および高比重コレステロール濃度への影響  
A, 低比重コレステロール濃度; B, 高比重コレステロール濃度. 平均 ± 標準偏差. N=4.  $P < 0.05$  は指定した2群間の有意差を示す.

したところ、血中 LDL-Cho 濃度は、標準食群に比較して高脂食群で増加する傾向が見られた (図4A)。高脂食群に比較して、PS 添加高脂食群の血中 LDL-Cho 濃度には差が見られなかったが、ミソ添加高脂食群では減少する傾向が見られた。さらに、PS+ミソ添加高脂食群では有意な減少が見られた。この結果から、PS およびミソを同時添加することで、血中 LDL-Cho 濃度の上昇抑制効果が強まることがわかった。悪玉コレステロールと呼ばれる血中 LDL-Cho 濃度を減少させることで、

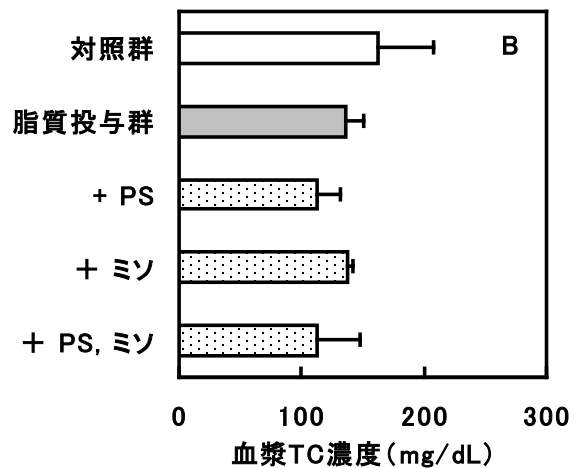
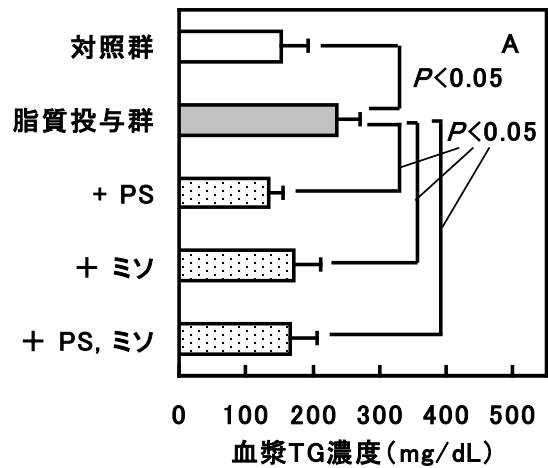


図5 脂質とフィトステロールおよびミソの同時投与におけるマウス血漿トリグリセリド濃度および総コレステロール濃度  
A, 血漿トリグリセリド濃度; B, 血漿総コレステロール濃度. 平均 ± 標準偏差. N=5.  $P < 0.05$  は指定した2群間の有意差を示す.

PS とミソの同時摂取は動脈硬化などの生活習慣病の予防に寄与する可能性がある。一方、善玉コレステロールと呼ばれる血中 HDL-Cho 濃度は、標準食群に比較して高脂食群で有意な増加が見られた (図4B)。高脂食群に比較して、PS 添加高脂食群、ミソ添加高脂食群、PS+ミソ添加高脂食群では、値が減少する傾向は見られたものの、有意な差は認められなかった。

### 3.2 脂質単独投与マウスの血中脂質濃度に対するPS およびミソの影響

前項で、高脂食を5日間摂取し続けた場合に、

PS およびミソの飼料への添加がマウスの血中脂質量の上昇を抑制することを確認した。この効果のメカニズムとしては、マウスにおける脂質の吸収抑制や体内脂質代謝への影響が考えられる。そこで、本実験では、脂質のみを多量に1回摂取した場合の、マウスの脂質の吸収に対するPSおよびミソの影響について検討した。

マウスの血中TG濃度は、対照群に比較して脂質投与群で有意な増加が見られた(図5A)。脂質投与群と比較すると、脂質+PS投与群、脂質+ミソ投与群および脂質+PS+ミソ投与群でマウス血中TG濃度が有意に減少した。特に、脂質+PS群で血中TG濃度の上昇抑制効果が大きかった。この結果から、PSとミソの両方に、TGの吸収を抑制する効果があることが確認できた。

本実験で、脂質との同時投与でPSとミソにTG吸収抑制作用が見られたにもかかわらず、前項で報告した高脂食摂取マウスでは、PSとミソを同時に投与した場合により強い血中脂質濃度の低下作用が見られた。従って、PSとミソの同時投与は、脂質の吸収抑制だけでなく、脂質の代謝改善にも効果がある可能性が予想されるが、この点は今後の検討課題である。

マウスの血中TC濃度は、対照群に比較して脂質投与群で上昇がみられず、脂質投与群との比較でも、脂質+PS投与群、脂質+ミソ投与群および脂質+PS+ミソ投与群の血中TC濃度に有意な違いは見られなかった(図5B)。

前項の高脂食飼育実験では、高脂食中のCho量がTG量の50%であったのに対し、今回の脂質単独投与実験ではCho量はTG量の0.28%と極めて少なかったため、このような結果になったものと考えられる。今後、Choの投与量をさらに増やした場合のPSとミソの効果について検討する必要がある。

#### 4. まとめ

脂質吸収抑制作用のあることが知られているPSとミソを組み合わせて、高脂食や脂質と同時に投与した場合の、マウス血中脂質濃度への影響について検討し、以下の結果を得た。

TGを10%、Choを5%添加した標準飼料をマウス1匹当たり1日5gで5日間摂取させると、標準食のみで飼育した場合に比較して、マウスの血中TG濃度およびTC濃度が高まり、体重も増加する傾向が見られた。高脂食に0.006%のPSや0.039%の凍結乾燥ミソを添加してマウスを5日間飼育したところ、PSやミソ単独の添加では高脂食投与による血中TG濃度およびTC濃度の上昇が明確に抑制されなかったのに対し、PSとミソを同時に添加すると、高脂食による血中脂質濃度の上昇が抑制された。マウスの体重についても、PSとミソを同時に添加することで、高脂食投与による増加が抑制された。この際、高脂食の摂取による血中LDL-Cho濃度の上昇はミソの添加で抑制される傾向が見られ、さらに、PSとミソを同時に添加することで有意に抑制された。一方、高脂食の摂取による血中HDL-Cho濃度の上昇は、PSやミソの添加では有意な変動は見られなかった。

次に、高脂食摂取マウスの血中脂質濃度を減少させるPSおよびミソの作用のメカニズムを検討するため、マウスにTG 250 mgおよびCho 0.7 mgの脂質混合物、さらにはこれにPS 0.375 mgおよびミソ 1.81 mgを添加したものを1回経口投与したときの、30分後の血中脂質濃度を測定した。脂質混合物の1回投与で、血中TG濃度が上昇したが、脂質混合物にPSおよびミソを同時に添加することでこの上昇が抑制されたことから、PSおよびミソによりTGの吸収が阻害されたものと考えられた。

以上の結果から、PSとミソの同時摂取は、高脂食の摂取による高脂血症の誘発を予防し、動脈硬化などの生活習慣病の抑制に寄与するものと期待される。PSとミソによるこのような効果が、脂

質の吸収抑制作用のみによるものか、また、相加効果や相乗効果があるのか、ミソ中の有効成分は何かといったことについては、今後さらに検討する必要がある。

#### 参考文献

- 1) 厚生労働省, 平成 10 年国民栄養調査結果 (1998).
- 2) K. Sato, H. Arai, Y. Miyazawa, M. Fukaya, T. Uebanso, M. Koganei, H. Sasaki, T. Sato, H. Yamamoto, Y. Taketani, E. Takeda, Palatinose and oleic acid act together to prevent pancreatic islet disruption in nondiabetic obese Zucker rats, *J. Med. Invest.*, vol.55, pp.183-195 (2008).
- 3) 大塚 礼, 玉腰 浩司, 下方浩史, 豊嶋英明, 八谷 寛, 職域中高年男性におけるメタボリックシンドローム発症に関連する食習慣の検討. 日本栄養・食糧学会誌, vol.62, pp.123-129 (2009).
- 4) 石見佳子, 大豆イソフラボンの機能性, 食品と開発, vol.34, pp.5-7 (1999).
- 5) 菅野道廣, 高松清治, 大豆の生理活性成分とその効用, 醸協, vol.99, pp.148-155 (2004).
- 6) 江崎秀男, 味噌の機能性成分, 生物学, vol.81, pp.531-533 (2003).
- 7) R.E. Ostlund, S.B. Racette, W.F. Stenson, Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol.77, pp.1385-1389 (2003).
- 8) T. Suanarunsawat, W. Devakul, N. Ayutthaya, T. Songsak, S. Thirawarapan, S. Pongshompoo, Antioxidant activity and lipid-lowering effect of essential oils extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with a high cholesterol diet, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol.46, pp.52-59 (2010).
- 9) 芳野恭士, 山口真翔, 齋藤圭祐, 後藤はるな, 金高 隆, 古賀邦正, 高脂食摂取マウスにおける *Salacia reticulata* の脂質低下作用. 技術・教育研究論文誌, vol.19, pp.23-29 (2012).
- 10) 池田稜子, 時枝久子, 椿油の特性とドレッシングにおける嗜好性. 九州女子大学紀要, vol.34, pp.1-9 (1998).
- 11) 株式会社ディーエイチシー, サプリメント小事典. ([http://www4.dhc.co.jp/supplejiten/seibun\\_index.html](http://www4.dhc.co.jp/supplejiten/seibun_index.html)). 2009. 3. 2 取得.
- 12) 厚生労働省, 平成 14 年国民栄養調査結果 (2002).