

マウスにおける食餌誘発性の脂質異常症、脂肪肝、耐糖能異常への効果について

【目的】

肥満、メタボリックシンドローム、2型糖尿病の予防・改善には、身体活動と食生活の管理が基本であり、食生活では、摂取カロリー制限とバランス、そして食後高血糖や高インスリン血症を抑えることが重要と考えられている。塩飽らは、アジア地域での民族比較研究により、日本人のメタボリックシンドローム、なかでも高中性脂肪血症発症に高炭水化物食摂取が関与している可能性を報告してきた。食後高血糖を引き起こす食事因子としては、炭水化物の摂取が強く関与している。炭水化物摂取による急激な血糖上昇は、肝臓への糖質の流入増大、糖から中性脂肪の合成が促進される。合成された中性脂肪は、門脈より放出され、血中の遊離脂肪酸濃度を増加させ、脂肪細胞に取り込まれて脂肪細胞内で再び中性脂肪に再合成され、蓄積される。また、脂肪細胞でも、血中からの糖の取り込みが促進され、脂質新生が促進される。脂肪細胞の肥大、すなわち肥満により、脂肪細胞から放出された遊離脂肪酸が肝臓に取り込まれ、中性脂肪の合成を高め、脂質代謝異常を引き起こす。

また、コレステロールにおいても、内因性コレステロールは、中性脂肪と同様に肝臓で主に合成され、血液中のリポタンパク質、中性脂肪と複合体となり、全身へ輸送される。この複合体は比重によって区別され、比重が高く中性脂肪を僅かに含むものを HDL コレステロール、比重が低く中性脂肪を多く含むものを LDL コレステロールと区別している。特に酸化した LDL コレステロールの血中濃度が増加するとアテローム性動脈硬化症を発症する危険が高まる。外因性コレステロールは胆汁を介し、腸に排泄されるが、胆汁酸と複合体を形成して腸管より再吸収される。

β -グルカン¹⁾は炭水化物であるが、長鎖の多糖類であるため、食物繊維であり、小腸での分解、吸収が遅いことが予想される。このため、食後の急激な血糖上昇を穏やかにする低 GI 成分であることが期待される。また、食物繊維の大きな効果として、食事により摂取した脂肪成分の吸収を抑えることが考えられる。パン酵母由来 β -グルカンを経口摂取させたヒト実験では、血中 LDL コレステロール値を下げ、HDL コレステロール値を上げる事が知られている。これは β -グルカンのもつ食物繊維効果であると考えられている。アルプロン製薬株式会社製品もパン酵母由来細胞壁抽出成分であり、同様の効果が期待できる。そのため、本研究では幅広く高 LDL コレステロール血症と脂質異常症への影響を観察するため、コレステロールやバターを負荷した食事誘導の脂質異常を惹起したマウスにおける改善効果を検証することを目的とする。また、一度吸収された β -グルカンはその性質、構造から

中長期間体内に留まることが予想される。そこで、同時に β -グルカンの中長期間体内貯留による脂質代謝に及ぼす影響も検証し、健康食品としての付加価値を高める事を目的とした。

【方法】

・実験動物と餌

実験動物には、食事の影響を受けやすく、肥満、糖尿病のモデルとなりやすいと考えられる C57BL/6J マウスを用いた。7 週齢の C57J/BL マウスを日本チャールズリバーより購入し、実験開始までの 1 週間に固形飼料 NMF（繁殖・維持用標準餌、オリエンタル酵母工業株式会社）にて馴化した。

餌に用いた基本飼料は表 1 に示す高脂高コレステロール食を用い、 β -グルカン食にはアルプロン製薬株式会社製の高純度 β -グルカンを 3%、対照物質にはミルクカゼインを 3% 添加した。

表1. 餌の成分

	β -グルカン食	対照食
β -グルカン (重量%)	3	-
ミルクカゼイン (重量%)	-	3
高脂高コレステロール成分		
コレステロール (重量%)	3	3
バター (重量%)	15	15
CE-2 (重量%)*	79	79

* CE-2は、マウス、ラット繁殖・維持用基本飼料(日本クレ
脂質:4.7重量%、炭水化物:50.6重量%、タンパク質:25重量

・投与方法および体重、摂食量測定

各マウスは、それぞれ独立したケージで飼育をした。 β -グルカン食、対照食とも投与期間を 54 日間（8 週間）とした。両群とも餌、水は自由摂取とし、体重、摂食量は、実験開始から終了まで 3-4 日おきに測定した。明暗周期は 12 時間とし、明 7 : 00-19 : 00、暗 19 : 00-7 : 00 にて飼育した。

・解剖および各臓器、血液の回収

両群マウスは、75日間投与後、16時間の絶食をした。麻酔下で、腹部大静脈より採血した。採取した血液は、ヘモグロビン A1c 用全血を分注後、遠心分離（1000 g × 10 分）し、血漿を回収した。灌流後、肝臓、副睾丸白色脂肪組織、肩甲骨周辺褐色脂肪組織、膵臓、筋肉（ヒラメ筋）、腎臓を摘出した。肝臓、副睾丸白色脂肪組織、肩甲骨周辺褐色脂肪組織、筋肉、腎臓は重量を測定した。

血液生化学検査

血液生化学検査には、回収した血漿を用いた。中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール、遊離コレステロール、血糖、 γ -GTP、GPT・GOT の測定には、それぞれ、グルコース CII テスト・ワコー、トリグリセライド E テスト・ワコー、NEFA C テスト・ワコー、コレステロール E テスト・ワコー、遊離コレステロール E テスト・ワコー、 γ -GTP テスト・ワコー、トランスアミラーゼ C テスト・ワコー（和光純薬工業株式会社）を用いた。また、HDL コレステロールの測定には、HDL コレステロール沈殿試液（和光純薬工業株式会社）にて分画後、コレステロール E テスト・ワコーを用いた。インスリンの測定には、ultrasensitive mouse/rat insulin ELISA kit（Merckodia AB 社）を用いた。

また、ヘモグロビン A1c の測定には、別途回収した全血を用い、DCA2000 システム（バイエルメディカル株式会社）で測定した。

・肝臓中の中性脂肪測定

肝臓中の脂肪測定は、冷凍保存しておいた肝臓断片を用いた。phosphate buffered saline (PBS) 中でホモジナイズ後、ソニケーター（amplitude 30, pulse time 5sec, treatment time 30sec）にて、PBS 中に中性脂肪を回収し、遠心分離（10000 g × 5 分）後、上清中の中性脂肪を酵素化学的アッセイ（トリグリセライド E テスト・ワコー）にて測定した。

・統計処理

SPSS（エス・ピー・エス・エス株式会社）を用いて 2 群間の検定を行い、 $P < 0.05$ を有意であるとした。

【結果】

・体重変化と摂食量

β -グルカン食群、対照食群の体重変化を図6に示した。投与開始時（8週齢）に β -グルカン食群、対照食群それぞれ、 $21.5 \pm 0.5\text{g}$ 、 $21.5 \pm 0.4\text{g}$ でほぼ同じ体重であった。対照食と比較して β -グルカン食群は、投与26日以降徐々に体重増加が緩やかとなり、投与40日目には有意に低体重であった。これ以降、 β -グルカン食群は徐々に体重増加するものの、対照食群と比較して有意に低体重であった。最終的には、投与75日目には、 β -グルカン食群、対照食群、それぞれ $30.3 \pm 1.2\text{g}$ 、 $32.4 \pm 1.7\text{g}$ となった（表2）。体重増加量で比較した場合も、 β -グルカン食群が29日以降有意に少なかった（表2）。また、投与期間中の両群で摂食量に有意な差はなかった（図7）が、実験期間を通した総摂餌量では、対照食が多かった。

体重の変化

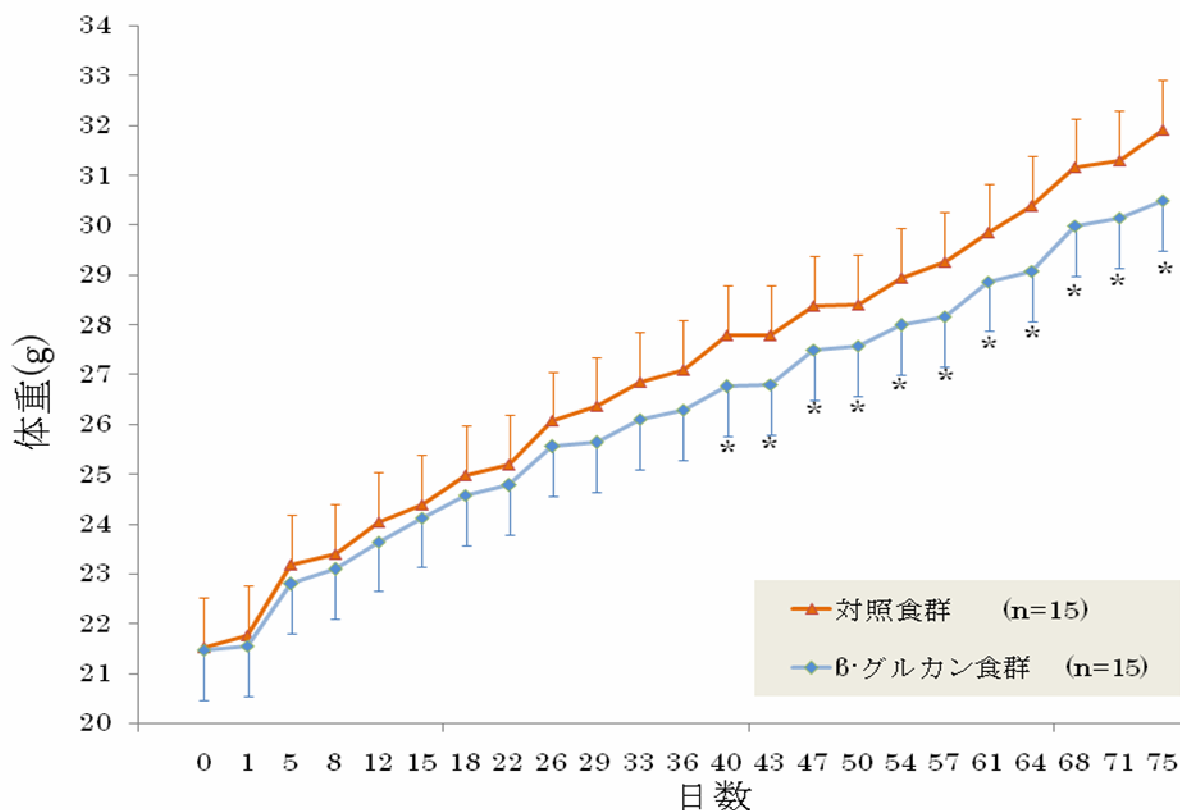


図6

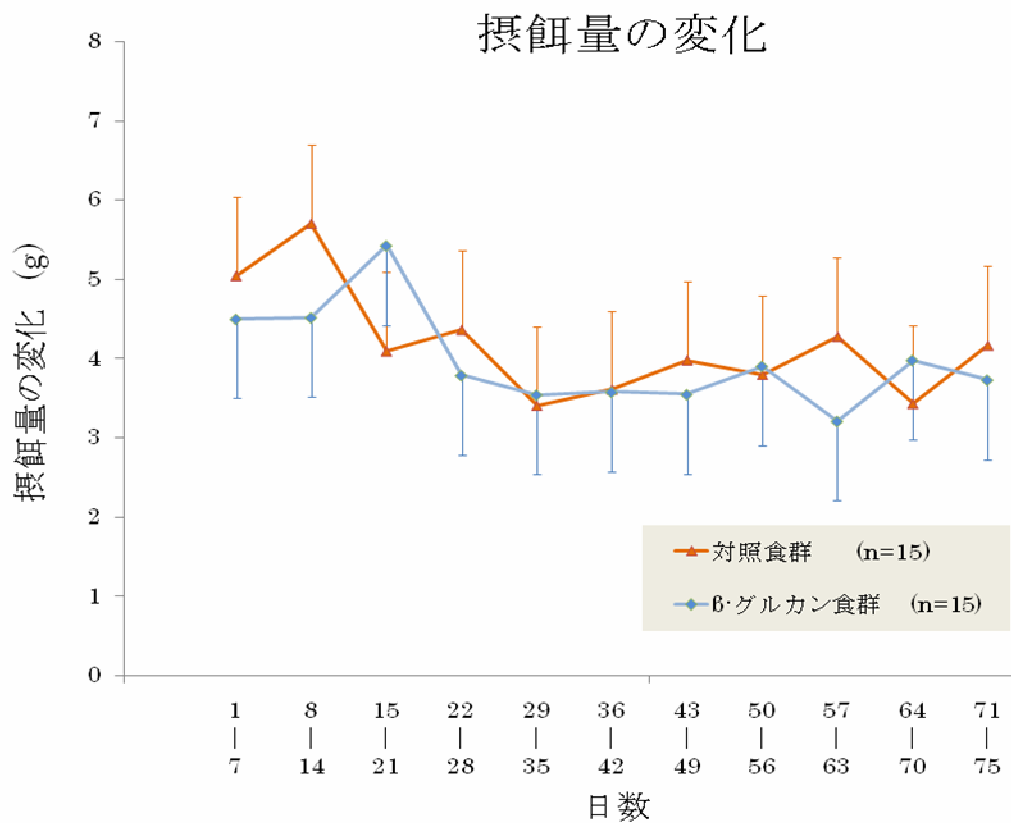


図 7

臓器重量

両群とも、それぞれ 75 日間の投与後、16 時間の絶食をさせ、麻酔下で採血、解剖を行った。解剖時に摘出した臓器のうち、肝臓、副睾丸白色脂肪組織、肩甲骨周辺褐色脂肪組織、ヒラメ筋、腎臓の重量を測定した。それぞれの群の臓器重量を表 2、図 8 に示した。

対照食群と比較して、 β -グルカン食群は、副睾丸白色脂肪組織重量が有意に低重量であった。肝臓、肩甲骨周辺褐色脂肪組織、ヒラメ筋は、特に顕著な違いであった。また、腎臓重量に関して、 β -グルカン食群は低重量であったが、解剖時の色、形、触感に特に変わった所見なかった。

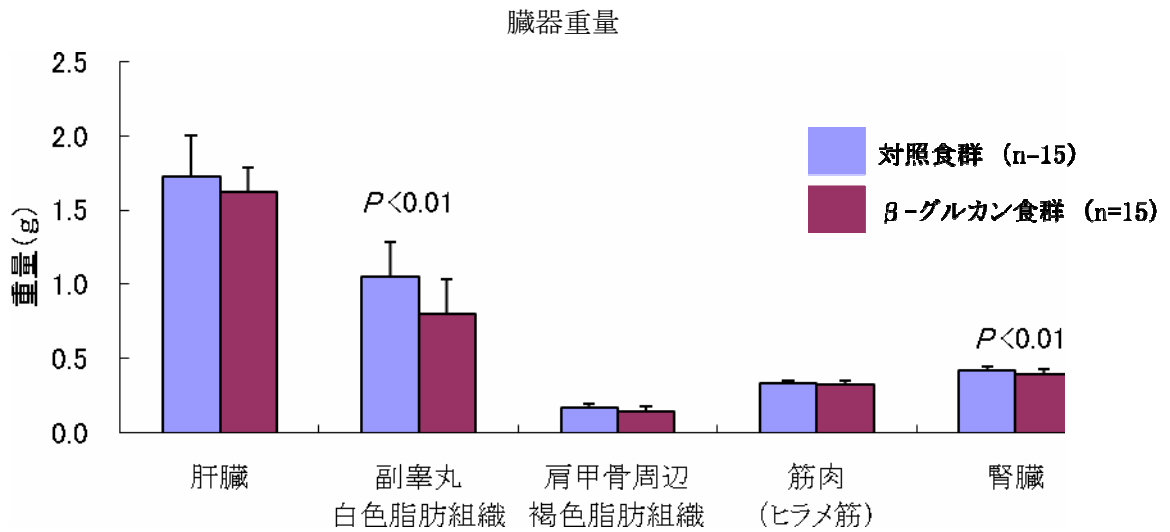


図 8

肝臓中の中性脂肪

肝臓中の中性脂肪測定結果を図 9 に示した。肝臓組織重量では、 β -グルカン食群は低値であったが、肝臓中の中性脂肪は、単位体積当たりの比較でも、肝臓当たりの比較でも、対照群より高値となった。

肝臓中の中性脂肪含量

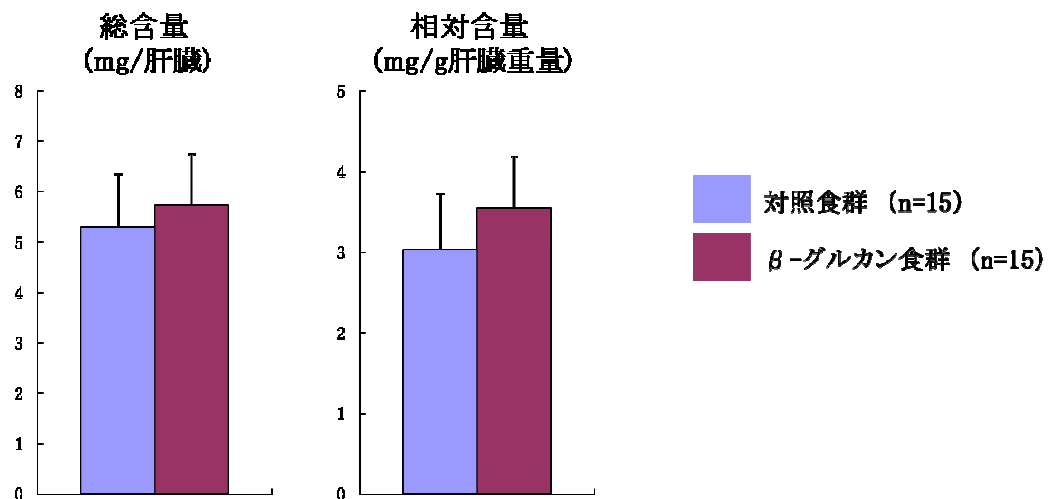


図 9

血液生化学検査

血液生化学検査は、分離した血漿を用いた。表 2 および図 10 に結果を示した。対照食群と比較して、 β -グルカン食群は、中性脂肪、遊離脂肪酸値が有意に低値であった。また、有意差は認められなかったが、総コレステロール、LDLコレステロール、遊離コレステロールが低かった。また、糖代謝関連する血糖、ヘモグロビン A1c、インスリン、肝機能に関連する GOT、GPT、 γ -GTP には、顕著な差は認められなかった。

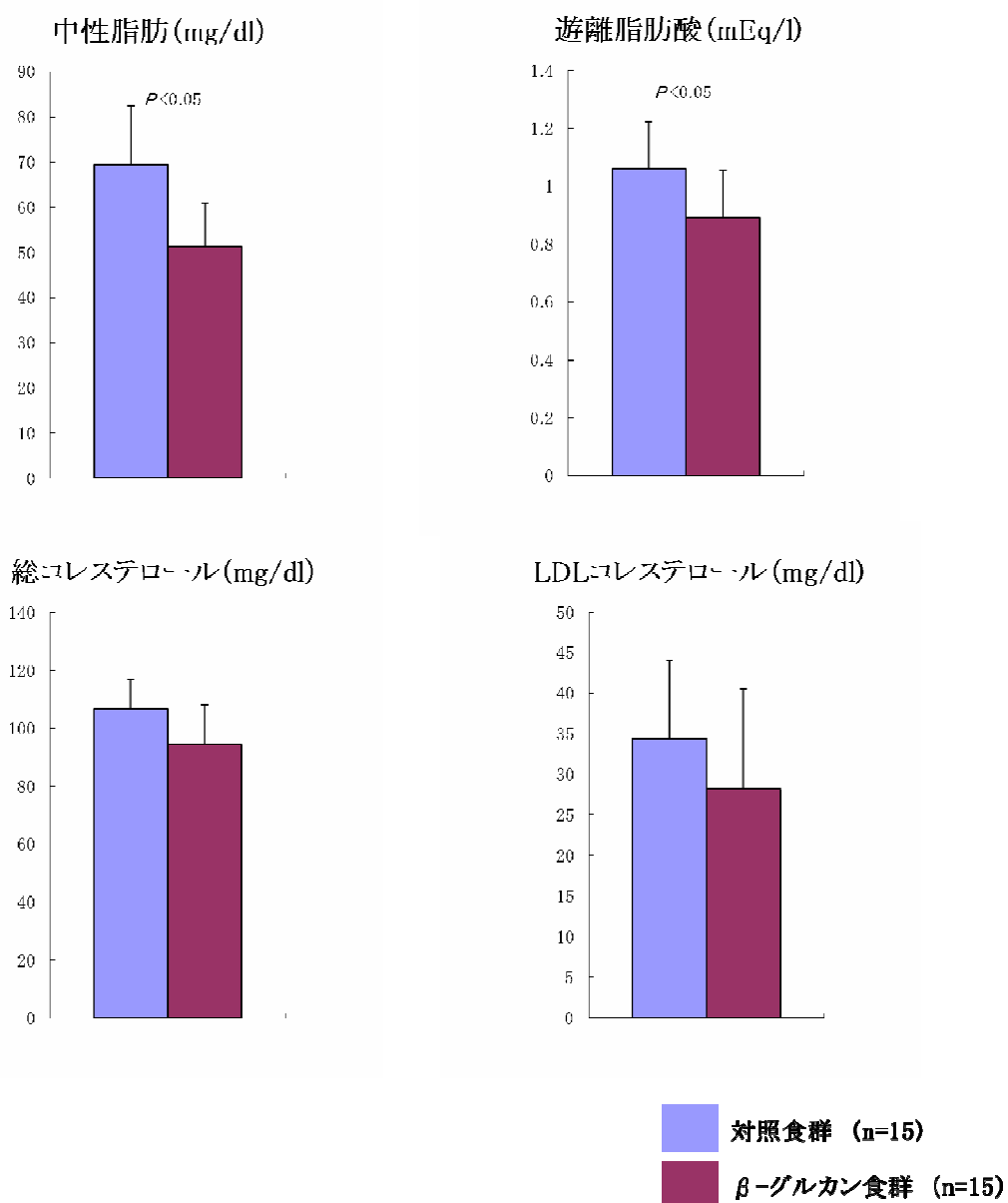


図 10

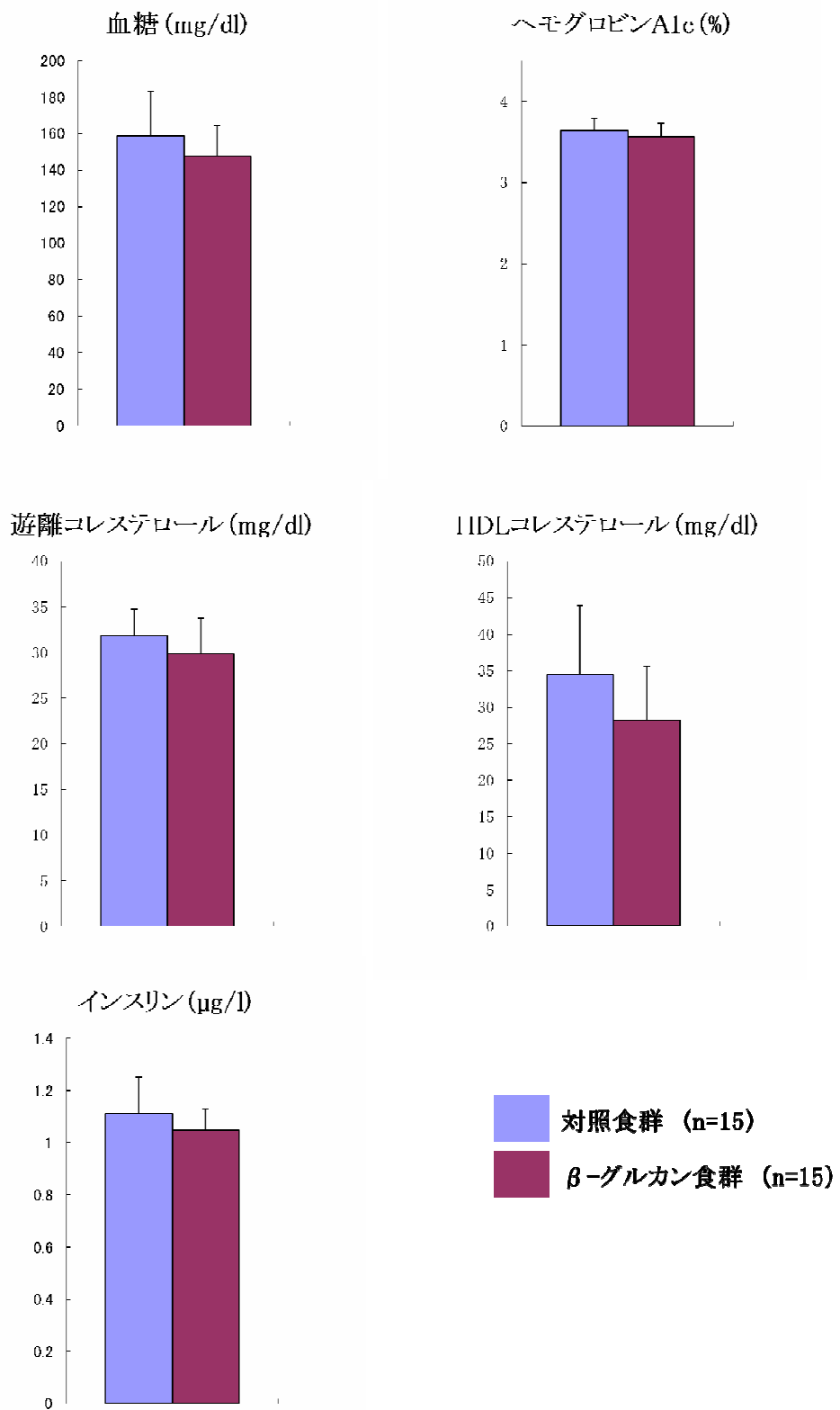
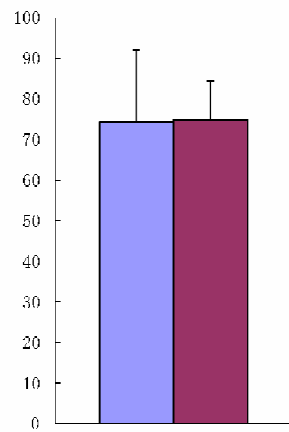
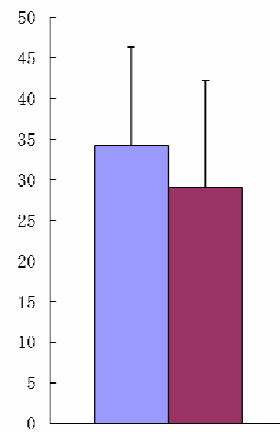


図 10 (続き 1)

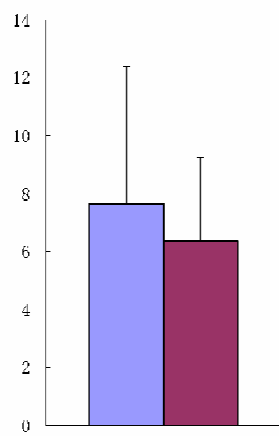
AST(GOT) (karmen unit)



ALT(GPT) (karmen unit)



γ -GTP (μ g/l)



対照食群 (n=15)
 β -グルカン食群 (n=15)

図 10 (続き 2)

表2. 各パラメーターのまとめ

	対照食	β -グルカン食
体重(g)		
1日目	21.5 ± 0.4	21.5 ± 0.4
75日目	32.4 ± 1.7	30.3 ± 1.3 *
変化量	11.0 ± 1.6	8.8 ± 1.2 *
摂餌量 (g)		
平均摂餌量(75日間)	4.7 ± 1.1	3.9 ± 0.7
総摂餌量	347 ± 84	297 ± 52
臓器重量 (g)		
肝臓	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.2
副睾丸白色脂肪組織	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.2 *
肩甲骨周辺褐色脂肪組織	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.03
腎臓	0.43 ± 0.03	0.39 ± 0.03 *
筋肉	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.03
肝臓中の中性脂肪含量		
総量 (mg/肝臓)	5.3 ± 1.1	5.7 ± 1.0
相対量 (mg/g肝臓重量)	3.0 ± 0.7	3.5 ± 0.6 *
血液生化学検査		
中性脂肪 (mg/dl)	69 ± 13	51 ± 10 *
遊離脂肪酸 (mEq/dl)	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2 *
総コレステロール (mg/dl)	107 ± 10	94 ± 14
LDLコレステロール (mg/dl)	34 ± 10	28 ± 12
遊離コレステロール (mg/dl)	32 ± 3	30 ± 4
HDLコレステロール (mg/dl)	59 ± 9	56 ± 7
血糖 (mg/dl)	159 ± 24	148 ± 16
ヘモグロビンA1c (%)	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2
インスリン (IU/l)	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
AST (GOT) (karmen unit)	74 ± 18	75 ± 10
ALT (GPT) (karmen unit)	34 ± 12	29 ± 13
γ -GTP (μ g/l)	7.7 ± 4.7	6.4 ± 2.9

*は、 $P < 0.05$ を示す。

LDLコレステロールは、(総コレステロール)-(HDLコレステロール)-0.2×(中性脂肪)により算出した。

【考察】

β -グルカンは、難消化性成分である食物繊維に分類されると同時に免疫賦活作用が多数報告されている天然由来成分である。食物繊維はそれ自身あるいは同時に摂取された食品の栄養成分が腸管で過剰に吸収されることを抑え、腸を健康に保つ効果がある。 β -グルカン（特に高純度 β -グルカン）は免疫賦活作用もあることから、一度、吸収されると生体に大きな影響を及ぼすことが予想された。今回行った食事誘導型の肥満、脂質代謝異常を発症するマウス実験では、体重増加、白色脂肪組織の増大、血中の中性脂肪、遊離脂肪酸の上昇を抑える効果が確認された。肝臓重量では、 β -グルカン食群が低値（有意差なし）であったが、肝臓中の中性脂肪含量では、有意に高値であった。これは、白色脂肪組織が有意に低重量であったこと、血中の中性脂肪、遊離脂肪酸が有意に低値であったことから、肝臓からの脂質の分泌を抑え、肝臓、脂肪組織間で行われる脂質の異常代謝が抑制されている可能性がある。 β -グルカン食群の肝臓中の脂肪含量は高値であるが、NAFLD/NASH（非アルコール性脂肪肝/脂肪肝炎）等の肝機能障害の代表的な指標であるAST (GOT)、ALT (GPT)、 γ -GTPの逸脱酵素活性値がむしろ対照群より低値であることから、今回確認された肝臓中の中性脂肪の有意な増大による脂肪肝、肝機能障害は発症していないと考えられる。

腎臓重量の比較では β -グルカン食群が有意に低かったが、アルプロン製薬株式会社製 β -グルカンは既に、第三者機関による安全性試験で安全が確認されている。解剖時の色、形、触感に特に変わった所見なかったことから、腎臓の委縮とは考えにくく、むしろ、この差はマウスの体重、体長増加の差による影響と考えられる。

アルプロン製薬株式会社製 β -グルカンは肝臓、白色脂肪組織を中心とした脂質代謝に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

4. 参考文献

1. Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y. Antitumor polysaccharides, lentinan and pachymaran. *Saishin Igaku*. 1970; 25: 1043-1048.
2. Maeda YY, Chihara G. Lentinan, a new immuno-accelerator of cell-mediated responses. *Nature*. 1971; 229: 634.
3. Dennert G, Tucker D. Antitumor polysaccharide lentinan. A T cell adjuvant. *J Natl Cancer Inst*. 1973; 51: 1727-1729.
4. Okubo Y, Komatsu N. Effect of shizophyllan on experimental candidiasis in mice *Nippon Saikingaku Zasshi*. 1975; 30: 262.
5. Nguyen BT, Stadtsbaeder S. Comparative biological and antitoxoplasmic effects of particulate and water-soluble polysaccharides, in vitro. *Adv Exp Med Biol*. 1979; 121: 255-268.
6. Fujimoto S, Orita K, Kimura T, Kondo T, Taguchi T, Yoshida K, Ogawa N, Furue H. Clinical evaluation of SPG (schizophyllan) as a therapeutic adjuvant after surgery of gastric cancer--controlled study by an envelope method. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1983; 10: 1135-1145.
7. Nakao I, Uchino H, Orita K, Kaido I, Kimura T, Goto Y, Kondo T, Takino T, Taguchi T, Nakajima T, Fujimoto S, Miyazaki T, Miyoshi A, Yachi A, Yoshida K, Ogawa N, Furue H. Clinical evaluation of schizophyllan (SPG) in advanced gastric cancer--a randomized comparative study by an envelope method. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1983; 10 :1146-1159.
8. DI CARLO FJ, FIORE JV. On the composition of zymosan. *Science*. 1958; 127: 756-757
9. Bradner WT, Clarke DA, Stock CC. Stimulation of host defense against experimental cancer. I. Zymosan and sarcoma 180 in mice. *Cancer Res*. 1958; 18: 347-351

10. Herbut PA, Kraemer WH. The possible role of the properdin system in transplantable cancer; the effect of zymosan on transplantable human carcinoma. *Cancer Res.* 1956; 16: 1048-1052.
11. Poutsiaka DD, Mengozzi M, Vannier E, Sinha B, Dinarello CA. Cross-linking of the beta-glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. *Blood.* 1993; 82: 3695-3700
12. Di Luzio NR, WilliamsDL, Sherwood ER, Browder IW. Modification of diverse experimental immunosuppressive states by glucan. *Surv Immunol Res.* 1985; 4: 160-167.
13. Williams DL, Sherwood ER, Browder IW, McNamee RB, Jones EL, Di Luzio NR. Pre-clinical safety evaluation of soluble glucan. *Int J Immunopharmacol.* 1988; 10: 405-414.
14. Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol.* 1999; 19: 65-96.
15. Maeda YY, Ishimura K, Chihara G. Antitumour polysaccharides and host defence against cancer: A new way for cancer immuno-chemotherapy (author's transl). *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 1976; 21: 425-435.
16. Wood PJ. Physicochemical properties and physiological effects of the (1-3) (1-4)-beta- D-glucan from oats. *Adv Exp Med Biol.* 1990; 270: 119-127
17. Obayashi T. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan determination for screening deep mycosis. *Rinsho Byori.* 1996; 44: 528-532.
18. Welch RW. Can dietary oats promote health? *Br J Biomed Sci.* 1994; 51: 260-270
19. Ross GD, Vetvicka V, Yan J, Xia Y, Vetvicková J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology.* 1999; 42: 61-74.

20. Würsch P, Pi-Sunyer FX. The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. A review with special emphasis on cereals rich in beta-glucan. *Diabetes Care*. 1997; 20: 1774-1780
21. Yadomae T. Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans. *Yakugaku Zasshi*. 2000; 120: 413-431
22. Structure and immunomodulating activities of fungal beta-1,3-glucans. *Dojin News* 2005; 114: 1-10
23. Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, Xing PX, Cheung NK, Ross GD. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol*. 200; 173: 797-806.
24. Salvador C, Li B, Hansen R, Cramer DE, Kong M, Yan J. Yeast-derived beta- glucan augments the therapeutic efficacy mediated by anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody in human carcinoma xenograft models. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 1239-1247.
25. Yoon TJ, Kim TJ, Lee H, Shin KS, Yun YP, Moon WK, Kim DW, Lee KH. Anti- tumor metastatic activity of beta-glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8: 36-42.
26. Mantovani MS, Bellini MF, Angeli JP, Oliveira RJ, Silva AF, Ribeiro LR. beta-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutat Res*. 2007 Aug 3;
27. Nabika T, Cui Z-H, Masuda J: The Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat: How Good Is It as a Model for Cerebrovascular Diseases? *Cell Mol Neurobiol* 2004; 24: 639-646.
28. Nabika T, Kobayashi Y, Yamori Y. Congenic rats for hypertension: how useful are they for the hunting of hypertension genes? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27: 251-256.

29. Nabika T, Yamori Y. Roles of the spontaneously hypertensive rats in the genetic study of hypertension. *Nippon Rinsho*. 2000; 58 Suppl 2: 713-716.
30. Frost G, Wilding J, Beecham J. Dietary advice based on the glycaemic index improves dietary profile and metabolic control in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 1994; 11: 397-401.
31. Shiwaku K, Anuurad E, Enkhmaa B, Kitajima K, Yamane Y. Appropriate BMI for Asian populations. *Lancet* 2004; 363: 1077.
32. Shiwaku K, Hashimoto M, Kitajima K, Nogi A, Anuurad E, Enkhmaa B, Kim JM, Kim IS, Lee SK, Oyunsuren T, Shido O, Yamane Y. Triglyceride levels are ethnic-specifically associated with an index of stearyl-CoA desaturase activity and n-3 PUFA levels in Asians. *J Lipid Res* 2004; 45: 914-922.
33. Shiwaku K, Hashimoto M, Nogi A, Kitajima K, Yamasaki M. Traditional Japanese dietary basics a solution for modern health issues? *Lancet* 2004; 363: 1737-1738.
34. Hudgins LC. Effect of high-carbohydrate feeding on triglyceride and saturated fatty acid synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225: 178-183.
35. Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman CK, Neese RA, Tremaroli JD, Hirsch J. Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *J. Lipid Res* 2000; 41: 595-604.
36. Jenkins DJ, AL Jenkins, TM Wolever, V Vuksan, AV Rao, LU Thompson, and RG Josse RG: Low glycemic index: lente carbohydrates and physiological effects of altered food frequency. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 760S-769S.
37. Nicolosi R, Bell SJ, Bistrrian BR, Greenberg I, Forse RA, Blackburn GL. Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. *Am J Clin Nutr*. 1999; 70: 208-212.
38. Miura NN, Ohno N, Aketagawa J, Tamura H, Tanaka S, Yadomae T. Blood clearance of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan in MRL lpr/lpr mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996; 13: 51-57.

39. Miura NN, Miura T, Ohno N, Adachi Y, Watanabe M, Tamura H, Tanaka S, Yadomae T. Gradual solubilization of Candida cell wall beta-glucan by oxidative degradation in mice. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998; 21: 123-129.
40. J. Yamada, et al: Alleviation of seasonal allergic symptoms with auperfine beta-1,3-glucan: A randomized sutudy. J allergy ClinImmunol 2007; 119: 1119-26.