

ノート

アケビの外因性酸化コレステロール吸収阻害効果

渡部 忍*・福井 晴子**・勝部 拓矢*

1. 目 的

酸化コレステロールは、コレステロールの熱分解物の総称で、血管の老化ともいわれる動脈硬化を強く誘導することが報告されている^{1),2)}。

調理や電子レンジ加熱でも生成するため、日ごろの食事から酸化コレステロールを除去することは難しいのが現状である。生体内でもコレステロール代謝物（内因性酸化コレステロール）として生成するが食事由来（外因性酸化コレステロール）に比べその量はわずかで、外因性酸化コレステロール由来動脈硬化を予防する新たな素材が求められている。この対策として酸化コレステロールの吸収抑制あるいは吸収した細胞からの排出を促進するような素材の摂取が考えられる。

そこで、県内素材を用いた新たな抗動脈硬化素材の開発を目的として、腸管上皮細胞への酸化コレステロール取込を指標にスクリーニングを行い、強い取込抑制を示したアケビを素材に抗動脈硬化機能を検証したので、その結果について報告する。

2. 方 法

2.1 スクリーニング素材

試料は、県内で自生、栽培、加工されたものを用い凍結乾燥し、使用するまで保存した。乾燥物10gを1Lの超純水で沸騰しながら10分間加熱した抽出液を乾燥しエキス粉末を得た。エキス粉末は超純水で10mg/mLに調製し測定試料とした。試料には、桑葉、桑根、桑枝、トチ種皮、トチ実、大麦若葉、クズ花、アケビ果皮、生姜茎、よもぎ葉など表1に示す素材を用いた。

2.2 腸管上皮細胞への酸化コレステロール取込評価

酸化コレステロールは腸管経路で吸収されることが報告されている^{3),5)}。そこで、有望素材のスクリーニング方法として腸管上皮細胞（Caco-2）への酸化コレステロールの取込量を測定することにより吸収阻害（排出促進）効果を評価した。

Caco-2細胞は、MEM培地を用い96ウェル培養プレートに 2×10^4 /wellになるよう播種し、37℃、5%CO₂の条件

で2週間培養した。酸化コレステロールは、7 α hydroxy-cholesterol (7 α HC), 7 β hydroxycholesterol (7 β HC), 7ketocholesterol (7ketoCHL), 25hydroxy cholesterol (25HC) を用いそれぞれ1mg/mLエタノール溶液を調製し各100 μ Lを混ぜ乾固したのち100 μ Lのエタノールに溶解し混液を調製した。混液100 μ L, 6.8mg/mL タウロコール酸ナトリウム20 μ L, リノール酸8.3 μ L, 5 μ M CI976 (2,2-Dimethyl-N-(2,4,6-trimethoxy phenyl) dodecanamide) 39.4 μ LをN₂ガス下でエタノールを除いた後、ハイグルコースDMEM (HGDMEM) 培地91.7 μ Lに懸濁し超音波処理でミセルを調製し、使用時に同培地で10倍希釈した。培養プレートの各ウェルを100 μ LのHGDMEMに交換し24時間インキュベート後、新たなHGDMEMに交換後、10mg/mLに調製した各試料を10 μ L添加し30分インキュベートした。酸化コレステロールミセル10 μ Lを加え、3時間後に培地を除き細胞をPBSで洗浄した後、細胞を回収し、メタノールおよびtEMEで酸化コレステロールを抽出しヘキサンで回収したのち、シリル化剤で誘導体化しGC/MS測定試料とした。微極性キャピラリーカラム (Agilent製HP-5MS) を用い、Heガス1.4ml/minフロー、MRM分析法で分析した。酸化コレステロールのみを添加した場合をコントロールとして試料添加区で得られた数値をコントロールの数値で標準化した。試料、酸化コレステロール無添加区をブランクとした。

2.3 トランスウェルを用いた腸管上皮細胞膜透過評価

腸管上皮細胞膜を介した吸収抑制について調べるためトランスウェル（透過膜）上で培養したCaco-2細胞膜の上部（アピカル側）に試料を添加し透過膜を通過した（バソラテラル側）試料を定量し腸管上皮細胞膜透過性を評価した。

12ウェルのトランスウェルインサートにCaco-2細胞を 4×10^4 /well 播種し35℃、5%CO₂の条件で2週間培養した。アピカルに500 μ Lの培地および試料50 μ Lを添加し1時間インキュベート後、酸化コレステロールミセル50 μ Lを加え3時間後に培地1.5mLを添加したバソラテラルから培地を回収した。酸化コレステロールを抽出後誘導体化しGC/MS分析試料とした。陽性コントロールとしてコレステロールトランスポーター阻害剤のezetimibeを用い、酸化コレ

*生物応用科, **カナツ技研工業株式会社

ステロールのみを添加した場合をコントロールとした。得られた数値をコントロール値と比較し評価した。また、試料、酸化コレステロール無添加区をブランクとし、コレステロールの動向を確認するためCholesterol-3,4-¹³C₂ (CHL-3,4-¹³C₂) を用いた。

2.4 動物を用いたアケビの動脈硬化予防効果の検証

in vitroの結果、アケビ果皮熱水抽出物で酸化コレステロールの腸管膜吸収阻害効果が確認された。そこで、生体内での効果を検証するため動脈硬化発症モデルマウスを用いて動脈硬化の予防効果について評価を行った。なお、動物試験は(一財)日本食品分析センターに委託し実施した。

アケビは、本県で栽培されたものを用い果皮・果実を乾燥粉末化し検体とした。マウスは、ALB/c.KOR/Stm Slc-Apoesh1系/雄、12週齢を用い、試験区は標準食群 (CRF-1; オリエンタル酵母社製)、コレステロール (Chol) 食群; CRF-1+0.15% Chol, 酸化コレステロール (oxiChol) 食群; CRF-1+0.15% oxiChol, アケビ食群; CRF-1 + 0.15% oxiChol + 3%検体の4群を設定した。1週間馴化後、体重を指標に各群10匹に群分けした。8週間飼料摂取後(水・飼料は自由摂取)解剖肝臓、大動脈は摘出後一部を10%中性緩衝ホルマリン固定しヘマトキシリン染色し、血管動脈硬化巣は画像処理により動脈硬化巣面積比を算出した。肝臓トリグリセリド (TG)、総コレステロールは、Folchらの方法⁴⁾で測定した。血液はヘパリン処理後血漿を分離しTG、総コレステロール (TCHO)、HDLコレステロール (HDLc) は生化学自動分析装置(富士フィルムメディカル社製)で測定し、LDLコレステロール (LDLc) はTCHOとHDLcから算出した。血中酸化コレステロールは血漿を10N KOHでけん化後ヘキサソで回収し誘導体化後GC/MSで分析した。

3. 結果および考察

3.1 腸管上皮細胞への酸化コレステロール取込評価

食事由来の酸化コレステロールは、小腸腸管上皮細胞のコレステロールと同様トランスポーターを介した取込や排出が行われていると考えられている^{3), 5)}。そこで、腸管上皮モデル細胞であるCaco-2細胞を用い、酸化コレステロールおよび試料を添加し一定時間後に細胞内に取り込まれた酸化コレステロール量の低下から吸収阻害効果(あるいは排出促進効果)を評価した。その結果、桑葉、トチ(種皮・実)、クズ花、大麦若葉、アケビ果皮で強い効果が確認された(表1)。アケビは、70%の吸収阻害効果を示し、また県内企業で栽培が進められていることから、腸管上皮細胞膜透過評価によりさらに詳細な検討を行った。

表1 酸化コレステロール吸収阻害素材のスクリーニング

| | 7αHC | 7βHC | 25HC | 7ketoCHL |
|-----------|-------|-------|-------|----------|
| control | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| BLK | 0.0 | 0.8 | 0.3 | 0.2 |
| 桑葉 | 8.6 | 11.2 | 0.9 | 7.7 |
| トチ種皮 | 20.6 | 15.2 | 0.7 | 3.6 |
| トチ実 | 18.4 | 13.7 | 9.9 | 7.4 |
| 桑根 | 26.2 | 20.9 | 6.5 | 15.3 |
| 大麦若葉 | 29.4 | 27.1 | 2.2 | 16.9 |
| クズ花 | 47.2 | 27.0 | 24.9 | 14.7 |
| アケビ果皮 | 17.6 | 33.2 | 30.8 | 35.9 |
| 生姜茎 | 33.4 | 34.9 | 34.5 | 41.3 |
| よもぎ葉 | 32.1 | 33.6 | 42.6 | 37.6 |
| 桑枝 | 34.2 | 34.3 | 39.2 | 50.4 |
| クロモジ枝 | 73.5 | 55.2 | 9.4 | 24.5 |
| トチ果皮 | 80.4 | 61.7 | 16.2 | 27.6 |
| 栗 | 87.9 | 44.0 | 34.8 | 21.0 |
| カスターニエ実 | 54.8 | 47.8 | 54.1 | 40.1 |
| アブラギリ | 45.4 | 45.3 | 54.1 | 52.6 |
| サンショ果实 | 27.5 | 64.7 | 37.4 | 69.1 |
| 柿葉 | 56.1 | 51.7 | 54.1 | 53.9 |
| シナアブラギリ | 49.4 | 51.7 | 57.5 | 58.9 |
| マタタビ | 53.4 | 55.6 | 66.7 | 57.6 |
| トウゴマ葉柄 | 57.4 | 58.2 | 62.1 | 56.4 |
| ヤマシャクヤク | 48.4 | 50.7 | 74.7 | 60.6 |
| クズ(葉・茎・蔓) | 54.8 | 54.3 | 67.9 | 57.6 |
| オトコヨモギ | 50.1 | 48.6 | 76.0 | 62.9 |
| ミンモトソウ | 51.7 | 55.3 | 81.5 | 63.6 |
| ゴボウ | 62.2 | 52.9 | 64.5 | 74.4 |
| キキョウ | 56.0 | 56.2 | 87.2 | 55.1 |
| オケラ | 52.1 | 52.7 | 83.9 | 67.3 |
| シイタケ | 64.3 | 64.1 | 65.6 | 69.4 |
| サツマイモ蔓 | 61.8 | 62.3 | 68.0 | 75.8 |
| 陰陽竹 | 60.4 | 58.9 | 85.1 | 64.1 |
| トウゴマ葉 | 68.1 | 64.7 | 73.6 | 65.1 |
| いちじく果皮 | 66.8 | 68.5 | 74.8 | 72.6 |
| シラン | 55.6 | 55.4 | 106.6 | 70.6 |
| ハナビラタケ | 64.1 | 65.9 | 91.9 | 66.4 |
| レンギョウ | 63.4 | 65.8 | 91.3 | 73.9 |
| 生姜葉 | 70.8 | 71.1 | 88.6 | 65.1 |
| いちじく葉 | 74.8 | 75.0 | 71.3 | 80.2 |
| モロヘイヤ | 69.7 | 66.9 | 71.3 | 95.9 |
| ノダケ | 67.8 | 65.6 | 96.3 | 75.5 |
| ビャクブ | 78.0 | 62.5 | 94.5 | 71.5 |
| アカメガンショ葉 | 75.5 | 73.7 | 79.6 | 80.8 |
| マイタケ | 68.4 | 70.4 | 97.4 | 74.0 |
| アラゲキクラゲ | 89.6 | 89.4 | 75.7 | 79.5 |
| ブナシメシ | 79.9 | 80.8 | 114.2 | 84.1 |
| 生姜根 | 88.1 | 94.4 | 109.3 | 78.9 |
| ハマウド | 77.5 | 75.9 | 115.7 | 101.7 |
| ワレモコウ | 83.9 | 82.2 | 116.2 | 89.2 |
| ナバナ | 83.5 | 82.3 | 118.8 | 92.3 |
| マイタケ | 87.5 | 91.4 | 112.7 | 93.1 |
| アケビ蔓 | 102.8 | 95.3 | 111.7 | 97.1 |
| キクバヤマボクチ | 106.1 | 104.8 | 109.7 | 95.6 |
| エノキタケ | 98.4 | 100.5 | 118.6 | 102.9 |
| 十六ささげ | 204.0 | 13.0 | 4.1 | 207.6 |
| チーマディラーバ | 0.0 | 135.6 | 140.6 | 157.7 |
| 柿洗搾りかす | 118.9 | 124.2 | 107.0 | 86.5 |
| 鳴沢菜 | 127.7 | 94.9 | 101.2 | 114.4 |
| クロモジ葉 | 113.5 | 111.2 | 101.2 | 114.0 |
| アケビ若葉 | 109.9 | 104.0 | 118.7 | 108.1 |
| ナタマメ実 | 126.5 | 91.3 | 82.9 | 140.4 |
| フナバラソウ | 106.1 | 102.6 | 135.9 | 109.5 |
| ヤマゴボウ | 118.0 | 124.3 | 106.9 | 117.9 |
| 緑茶 | 113.8 | 128.0 | 134.0 | 92.8 |
| 夏薬天 | 124.3 | 119.9 | 123.7 | 107.3 |
| ノアザミ | 108.9 | 117.0 | 138.3 | 113.0 |
| カスターニエ果皮 | 130.9 | 128.0 | 131.1 | 92.7 |
| タサアイ | 151.9 | 114.8 | 114.3 | 115.2 |
| こぶ高菜 | 118.4 | 129.4 | 126.6 | 121.9 |

コントロールに対する割合(%)

3.2 トランスウエルを用いた腸管上皮細胞膜透過評価

トランスウエルを用いた腸管上皮細胞による膜透過試験の結果、アケビ果皮は酸化コレステロールの膜透過を抑制し、またCholesterol-3,4-¹³C₂の膜透過抑制も確認された。一方、コレステロールのトランスポーター NPC1L1の阻害剤ezetimibeでも酸化コレステロールの膜透過が抑制されたことから、4種類の酸化コレステロールはコレステロールと共通のトランスポーター NPC1L1を介して腸管上皮膜

を透過し体内に取り込まれることが示唆された (図1)。

3.3 動物を用いたアケビの動脈硬化予防効果の検証

アケビ果皮熱水抽出物に酸化コレステロールの腸管上皮膜透過阻害効果が認められたことから動物を用いて動脈硬化予防効果としての効果を検証した。

摂餌量について、1週間の予備試験ではすべての群間で有意差は見られなかったが、本試験ではアケビ食群でコレステロール摂取群と有意な差が見られた。しかし、酸化コレステロール摂取群とは有意な差は見られなかったことから、主にアケビ食群と酸化コレステロール摂取群を中心に考察することとした (表2)。

3.3.1 大動脈の動脈硬化巣への影響

大動脈弓から一定位置の血管を開きオイルレッドで染色した結果、アケビ食群で染色部の減少傾向が確認された。染色部の面積比で数値化した結果、アケビ食群は酸化コレステロール食群に対し有意な低下が見られた。一方、コレステロールおよび酸化コレステロール食群は標準食群に対し増加傾向が見られたものの、両者の差は無く外因性酸化コレステロールのコレステロール以上の動脈硬化発症リスクは見られない結果となった (図2)。

3.3.2 血中コレステロール及び肝臓脂質への影響

血中酸化コレステロール濃度は、oxiChol食群において標準食群に対し有意に増加したこと、食事由来の酸化コレステロールが血中に取り込まれたことが推測され、アケビ食群はoxiChol食群に対し有意な減少が確認された (表3)。この結果は、腸管上皮膜透過試験結果と同様にアケビの酸化コレステロール吸収阻害効果を示唆する結果となった。血中のTCHO, HDLC, LDLC濃度では、Chol食群で有意に増加し、oxiChol食群ではChol食群に対し減少傾向が見られた。酸化コレステロールによる肝臓のコレステロール合成律速酵素 (HMG-CoA reductase) 活性が低下が報告されており、脂質代謝かく乱作用の一つと考えられた⁶⁾。アケビ食群はoxiChol食群に対して有意な差は認められなかった (表4)。また、肝臓脂質へのアケビの効果はTGでは見られなかったが、TCHOは酸化コレステロール摂取に対しアケビ摂取により標準食群程度まで有意な低下を確認した (表5)。

3.3.3 肝臓組織観察

肝臓組織観察の結果 (図3)、Chol食群では標準食群に比べ多数の脂肪滴と組織の黒ずみが観察された。oxiChol食群ではChol食群に比べ脂肪滴は明らかに減少したものの組織の黒ずみ、細胞形状の乱れが観察された。一方、アケビ食群では、標準食群に比べ組織の黒ずみは見られるものの脂肪滴はわずかで、oxiChol食群に比べ組織の黒ずみ、脂肪滴ともに改善傾向が見られた。アケビ摂取により酸化コレステロールによる細胞へのダメージが軽減したものと推測された。

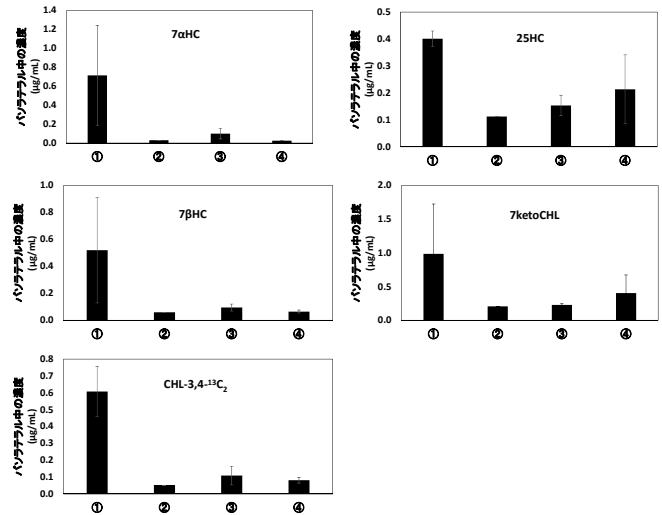


図1. アケビ果皮の酸化コレステロール腸管上皮膜透過抑制効果
①コントロール, ②BLK, ③ezetimibe, ④アケビ果皮
数値は平均値±標準偏差

表2 摂餌量

| | 標準食群 | Chol食群 | oxiChol食群 | アケビ食群 |
|----------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 平均摂餌量(g) | 5.4 ± 0.5 ^{ab} | 5.5 ± 0.4 ^b | 5.3 ± 0.2 ^{ab} | 5.0 ± 0.2 ^a |

数値は平均値±標準誤差 異なる肩文字は有意差あり(p<0.05)

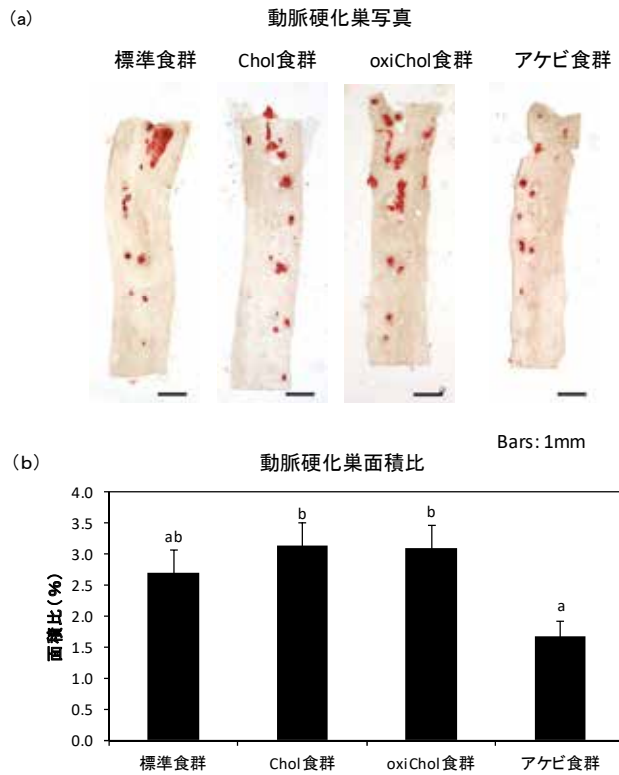


図2 動脈硬化巣への影響
(a) 血管内壁のヘマトキシリン染色結果. (b) 動脈硬化巣の面積比
数値は平均値±標準誤差(n=10), カラムの異なる文字は有意差あり(P<0.05)

表3 血中酸化コレステロール

| | 標準食群 | Chol食群 | oxiChol食群 | アケビ食群 |
|------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 7αHC (μg/dL) | 47.9 ± 17.1 ^a | 69.7 ± 15.5 ^b | 194.8 ± 53.1 ^c | 104.5 ± 22.0 ^d |
| 7βHC (μg/dL) | 65.7 ± 23.9 ^a | 105.8 ± 16.8 ^b | 623.7 ± 298.1 ^c | 272.5 ± 69.2 ^d |
| 25HC (μg/dL) | 56.1 ± 20.0 ^a | 83.3 ± 9.7 ^b | 212.3 ± 83.2 ^c | 100.3 ± 17.2 ^b |
| 7ketoHCL (μg/dL) | 127.7 ± 51.1 ^a | 190.5 ± 53.8 ^b | 471.9 ± 134.8 ^c | 247.8 ± 44.3 ^b |

数値は平均値±標準誤差。異なる肩文字は有意差あり(P<0.05)

表4 血中コレステロール

| | 標準食群 | Chol食群 | oxiChol食群 | アケビ食群 |
|--------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| TCHO (mg/dL) | 841.0 ± 54.0 ^a | 1181.0 ± 94.7 ^b | 935.0 ± 49.0 ^{ab} | 908.0 ± 38.1 ^a |
| HDL (mg/dL) | 115.0 ± 19.2 ^a | 205.0 ± 22.8 ^b | 141.0 ± 19.6 ^{ab} | 118.0 ± 16.4 ^a |
| LDL (mg/dL) | 698.0 ± 45.6 ^a | 953.0 ± 100.3 ^b | 766.0 ± 46.4 ^{ab} | 759.0 ± 28.2 ^{ab} |

数値は平均値±標準誤差。異なる肩文字は有意差あり(p<0.05)

表5 肝臓脂質

| | 標準食群 | Chol食群 | oxiChol食群 | アケビ食群 |
|-------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| TG (mg/g) | 36.5 ± 6.0 | 49.1 ± 10 | 43.6 ± 4.1 | 51.7 ± 5.5 |
| TCHO (mg/g) | 5.3 ± 0.4 ^{ab} | 9.7 ± 0.6 ^c | 7.4 ± 0.7 ^{ac} | 4.8 ± 0.4 ^b |

数値は平均値±標準誤差。異なる肩文字は有意差あり(P<0.05)

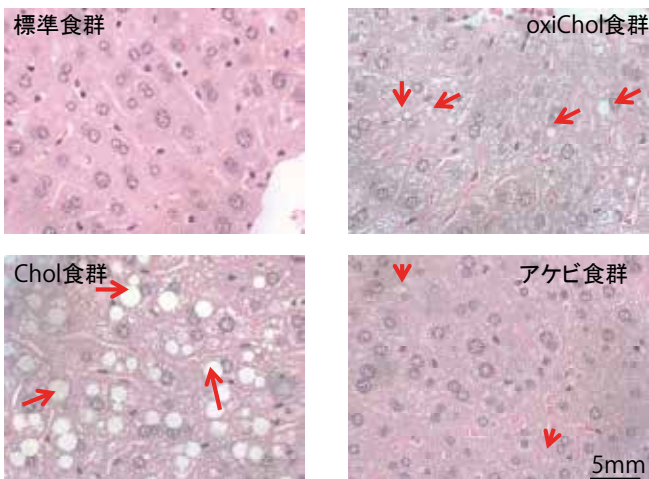


図3 肝臓組織観察

4. まとめ

アケビは山菜料理の素材として親しまれており、島根県

内でも多く自生している。

我々は本研究において、動脈硬化発症モデルマウスを用いた実験により外因性酸化コレステロールに由来する動脈硬化巣がアケビ摂取により減少することを確認した。その作用機序は、in vitro試験においてアケビ果皮熱水抽出物が酸化コレステロールのCaco-2細胞への取込と、腸管上皮細胞モデルCaco-2細胞膜の透過を抑制し、実際にin vivo試験でアケビ食群においてマウス血中酸化コレステロール濃度が低下することから、酸化コレステロールの腸管吸収阻害が主要因と考えられる。

さらに、アケビは、肝臓TCHOの低下および肝臓組織観察結果から酸化コレステロールの肝臓組織へのダメージ軽減、脂肪滴減少が認められた。

以上のことからアケビが新たな抗動脈硬化予防の素材として有望であることが明らかになった。

文 献

- 1) Iona Stapanian, Xian-Mang Pan, Joseph H. Rapp and Kenneth R. Feingold. Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *Journal of Lipid Research*. 2003, Vol. 44, p.705-715.
- 2) 長田恭一. 酸化コレステロールと脂質代謝の変動. *化学と生物*. 2012, Vol.50, No.11, p.783-785.
- 3) Terunuma, S.; Kumata, N.; Osada, K. Ezetimibe impairs uptake of dietary cholesterol oxidation products and reduces alterations in hepatic cholesterol metabolism and antioxidant function in rats. *Lipids*. 2013, vol.48(6), p.587-595.
- 4) Folch, J.; Lees, M. and Stanley, G.H.S. Evaluation of Various Extraction Techniques for Efficient Lipid Recovery from Thermo-Resistant Microalgae, *Hindakia*, *Scenedesmus* and *Micractinium* Species—Comparison of Lipid Extraction Methods from Microalgae. *Journal of Biological Chemistry*. 2006, vol.226, p.497-509.
- 5) 熊田紀子, 山中智史, 照沼彰一郎, 長田恭一. エゼチミブによる酸化コレステロールの有害作用の低減効果. *脂質生化学研究*. 2010, 52号, p.119-122.
- 6) Tasuku, Sasaki; Youichi, Fujikane; Yamato, Ogino; Kyoichi, Osada; Michihiro, Sugano. Hepatic Function and Lipid Metabolism Are Modulated by Short-term Feeding of Cholesterol Oxidation Products in Rats. *Journal of Oleo Science*. 2010, vol.59(9), p.503-507.