

コレステロール低下作用におよぼすレバン分子量の効果

山口英昌^{*1}, 林原幸恵^{*1}, 山本由喜子^{*1}, 飯塚 勝^{*2}

^{*1}大阪市立大学大学院生活科学研究科

^{*2}大阪市立大学大学院理学研究科

Effect of molecular weight of levan on lowering of serum cholesterol concentration in rats

Hidemasa YAMAGUCHI^{*1}, Sachie HAYASHIBARA^{*1}
, Yukiko YAMAMOTO^{*1} and Masaru IIZUKA^{*2}

^{*1}Department of food and Human Health Sciences, Graduate School of Human Life Science, Osaka City University,

^{*2}Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka City University

Summary

The effect of the molecular weight of levan on serum cholesterol concentration was investigated in rats fed cholesterol-free diets. Low molecular weight levan (L-levan, mol. wt. ca.10,000) and high molecular weight levan (H-levan, mol. wt. ca.2,000,000) were fed to male Sprague-Dawley rats. The amount of food intake and body weight gain were not affected by feeding of 5% of L-levan diet (L5%), but were reduced by 5% of H-levan diet (H5%). There was no significant difference in food efficiency between rats fed L5% and H5% diets. The relative weight of the liver was affected by H5% diets. Significant increase in the relative weights of the cecum wall and cecum contents was observed in rats fed H5% and L5% diets compared with the control, but there were no significant difference between the two groups. Concentration of serum cholesterol in rats was not reduced by feeding of L5% diet, by H5% diet. The results suggest that the difference of serum cholesterol concentration between the rats fed L5% and H5% diets was due to the degree of polymerization, although there was the possibility of being due to fermentation products.

Keywords : レバン *levan*, 高分子量レバン *high molecular weight levan*, 血清コレステロール *serum cholesterol*, 食物繊維 *dietary fiber*, コレステロール低下作用 *cholesterol-lowering activity*

．緒言

本研究では、レバンの分子量がラットの血清コレステロール濃度に与える影響を検討した。-2,1結合を有するフラクタンにはフラクトオリゴ糖やイヌリンがあり、生理作用に関する多くの研究が報告されてきた。-2,1フラクトオリゴ糖は、ビフィドバクテリウムの成長を促し、腸内細菌叢による短鎖脂肪酸(SCFA)の産生を改善し¹⁻⁴⁾、コレステロールやトリアシルグリセロールの濃度レベルを低下させる⁵⁻⁷⁾。また、イヌリンについてもトリ

グリセロール低下効果など生理作用に関する多くの報告がある⁷⁻¹⁰⁾。

一方、イヌリンと類似した多糖にレバンがある。レバンは、主鎖が-2,6結合を持つフラクトース残基からなる多糖で、天然には、牧草のチモシーグラスやイネ科の葉や茎に含まれている。しかし、これらの植物中に含まれているレバンは微量であり、また、酵素による生合成でも高分子量のは大量入手が困難であった。レバンの生理作用に関する研究報告は極めて少ないが¹¹⁻¹⁴⁾、一

つには高分子量レバンの大量入手が困難であったことによる。

著者らは独自に開発した固定化酵素法により高分子量レバンを大量に合成できることを見出した¹⁵⁾。また、この固定化酵素法で合成した分子量約200万の高分子量レバン(H-レバン)を用いて、ラットの生理作用におよぼす影響を検討し報告した。コレステロール無添加の条件下で、5%レバン飼料でラットを4週間飼育すると、血清コレステロール濃度がコントロール群と比べ有意に低下することを明らかにした。低下作用の要因が腸内細菌によるのではなく、レバンの重合度が高いことが低下作用に重要であると推論した^{12,13)}。

著者らとは逆に、長らはBacillus natto由来のレバンシュクララーゼにより生合成したレバンをラットに与えたがコレステロール濃度の低下が見られなかったと報告している¹¹⁾。長らの研究で用いたレバンは、分子量が低く約2000である。著者らは、長らによる結果との相違がレバンの重合度の違いによると考えた。しかし、これまで低分子量のレバンを大量に入手できず、ラットへの投与実験は行われていなかった経緯がある。

今回われわれは、分子量約1万の低分子量レバン(L-レバン)を大量合成することができた。そこで本研究では、分子量約1万のL-レバンと分子量約200万のH-レバンをラットに与え、血清コレステロール濃度に与えるレバンの重合度の影響を検討した。

・実験方法

1 試薬

分析および合成に使用したエタノールおよび試薬は和光純薬工業(株)より購入した。蔗糖は市販品を用いた。ラットの飼料として使用したビタミン混合(AIN-93G)、ミネラル混合(AIN-93VX)、重酒石酸コリン、カゼイン、 α -コーンスターチ、セルロースは、(株)日本農産工業より購入した。コーン油は市販の味の素ピュアオイルコーン油を使用した。粘度測定に使用したレバンはSerratia levanicum由来で和光純薬工業(株)より購入した。また、グアガムは三栄源エフ・エフ・アイ(株)より贈与された。

2 レバンの生合成

L-レバンは、反応1バッチあたり蔗糖200gを400mLの水に溶かし、200単位のレバンシュクララーゼを加え、30℃で4日間反応を行い合成した。反応後、30分間加熱して酵素を失活させ、反応液を大量のエタノールに加え

ることで粗レバンを得た。水/エタノール系で4回の再沈澱を繰り返すことにより、未反応の蔗糖やオリゴレバンなど低分子化合物を除いた。さらに、Sephadex G-100(4×20cm)カラムで約1%含まれる高分子量レバンおよび酵素を除去した後、凍結乾燥して精製レバンを得た(収率40%)。Asahipak GS-710H充填カラムを用いたHPLCの結果から、L-レバンの分子量は約1万であることが分かった。H-レバンは、前報の方法に従って合成した^{12,15)}。

3 動物飼育

日本クレア(株)より購入した3週令のSD系の雄ラットを5日間コントロール飼料で予備飼育した後、1群6匹とし5群に分けた。各群の飼料組成をTable 1に示した。セルロース5%を含む飼料をコントロールとした。各ラットをステンレス製のケージに入れ、24±1℃に調節され、12時間ごとに明暗させた室内で4週間飼育した。実験期間中、飼料および水は自由摂取させた。

ラットの腹腔にネプタールを注射した後、開腹して腹部大動脈より採血した。血液は、3000rpmで10分間、遠心分離し、血清を分離した。得られた血清は、コレステロール値を測定するまで-20℃で凍結保存した。また、肝臓、盲腸、盲腸壁を摘出し、湿重量を測定した。さらに、小腸、結腸の長さを測定した。

Table 1 Composition of experimental diets¹⁾

Ingredients	Control	H 1%	H 5%	L 1%	L 5%
Cellulose	5	-	-	-	-
Levan	-	1	5	1	5
Casain	28	20	20	20	28
Mineral mix ²⁾	5.3	3.5	3.5	5.3	5.3
Vitamin mix ³⁾	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	8.25	0.25	0.25	0.25	8.25
Corn oil	3	5	5	5	3
Corn starch	65.25	69.25	65.25	69.25	65.25

1) Numerical values showed the weight percent of ingredients in diets. L1% and L5% indicate the diets containing 1% and 5% of low molecular weight Levan, respectively. H1% and H5% indicate the diets containing 1% and 5% of high molecular weight Levan, respectively.

2) AIN-93G Mineral mix
3) AIN-93VX Vitamin mix

4 測定方法

レバンの不純物分離には、島津製作所製HPLC(LC-6AD)を使用した。移動相にイオン交換蒸留水を用い充填カラムはAsahipak GS-710Hを使用した。

レバン、グアガムの粘度は、多糖を蒸留水に懸濁後80℃で30分間加熱して溶解し(濃度0.5~2.0wt%)、Haake社製modelVT550粘度計を用いて37℃で測定した。

血清総コレステロール濃度は、血液を遠心分離し血清を分離した後、市販のキット(和光純薬製コレステロールC₁₆-test Wako)を用いて測定した。吸光度は、日立製作所製UV2000を用いて測定した。

5 統計処理

実験結果は、平均値 ± 標準誤差で示し、一元分散分析で処理した後、FisherのPLSD法により実験群間の差を検定し、P<0.05を有意とした。

・結果と考察

LおよびH-レバン飼料で飼育したラットの体重増加量、摂食量や摂食効率をTable 2に示した。H1%とH5%群では、体重増加率はコントロール群と比べ有意に低かった。実験期間の前半で体重増加量に有意差がみられたが、ある程度飼料に慣れた後半では体重増加量に改善がみられた。体重増加率の差は、飼料摂取量によっており、飼料効率を比べるとレバン投与群とコントロール群の間には有意差が見られなかった(Table 2)。

Table 2 Effects of levan on body weight gain, food intake and food efficiency

Diets	Body weight	Food intake	Food efficiency
	gain (g/4w)	(g/day)	(Food intake /Body weight gain)
Control	245.1±9.6	28.5±0.6	8.43±0.01
H1%	213.9±12.2*	28.0±0.8*	8.42±0.01
H5%	207.4±6.9*	27.6±0.6*	8.42±0.00
L1%	238.6±9.0	28.2±0.6	8.48±0.01
L5%	251.1±6.6	28.9±0.5	8.48±0.00

Mean ± SEM, n=6. The value with symbol* is significantly different (p<0.05) compared with that for the control.

ラットの小腸の長さは、いずれのレバン投与群も、コントロール群とくらべて有意差はみられなかったが、結腸はH5%群で、有意に長くなった(Table 3)。さらに、体重あたり肝臓重量はコントロール群とくらべてH5%群で有意に低下した。盲腸、盲腸壁、盲腸内容物の重量は、H5%群、L5%群ではコントロール群に比べて有意に高かったが、両群間には有意差はなかった。また、H1%群、L1%群では、有意差は見られなかった(Table 3)。レバンを5%投与した群では、コントロール群と比べて、腸内細菌叢の生育が増進された可能性がある。

Table 4に各レバン投与群によるラットの血清コレステロール濃度を示した。レバン投与群のうちH5%群で最大の血清コレステロール濃度の低下がみられ、コントロール群との間に有意差が認められた。この結果は前報^{12,13)}と同様の結果であった。H1%群では有意な低下は見

られなかった。一方、L-レバン投与群では1%群、5%群ともにコントロール群と比べ有意差はみられなかった。一般に食物繊維が血清コレステロールを低下させる要因として、胆汁酸やステロール吸着^{16,17)}、抱水能による抱き込みなどの要因が考えられる^{18,19)}。また、高分子量であることも低下の原因の一つである。その他に、消化管における多糖の加水分解生成物が、腸内細菌を増殖させ、結果として腸内細菌の生産物たとえばSCFAの産生なども一つの要因である。

SCFAの生成が盲腸内のpHを低下させ、胆汁酸の再吸収を減少させるという報告がある²⁰⁾。さらに加えて、プロピオン酸エステルが肝臓に達し、コレステロールの生成に影響するという報告もあるが^{21,22)}、SCFAが関わるこれら作用に対して疑義もある^{23,24)}。

前報でわれわれは、高分子量レバンは人工胃液によって部分的に加水分解を受け、約5%のフルクトースと極少量のオリゴ糖が生成することを明らかにした^{12,13)}。また、ビフィダス菌によるin vitroでの資化実験では、レバンは資化されないが、フラクトース、グルコースやレバンピオースなどは資化され、培地のpHを低下させることを報告した¹²⁾。これら結果は、レバン投与により盲腸内容物が増加した今回の結果 (Table 3)と整合性がある。

本研究の結果では、H5%群とL5%群ともに盲腸内容物や盲腸壁の重量が有意に増加した(Table 3)。しかし、コントロール群と比べ血清コレステロール濃度に有意の低下が見られたのはH5%投与群であり、L-レバン群ではコレステロール低下作用は見られなかった。したがって、腸内細菌によるSCFAの生成が血清コレステロールを低下させているとは考えにくい。むしろ、レバンの重合度の高さが影響しているとの仮説と矛盾しない結果である。

高分子量の多糖の方が低分子量のものよりコレステロール低下作用に効果があるという報告がある。たとえば、グアガムは、加水分解したグアガムよりコレステロール濃度の低下が大きい²⁵⁾。ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) は重合度が大きい方が、重合度の低

Table 3 Effects of levan on length of small intestine and colon and the weight of cecum, cecum contents and cecum wall

Diets	Length (cm)		Relative weight(g/100g E.W.)			
	Small intestine	Colon	Liver	Cecum	Cecum contents	Cecum wall
Control	108.3±5.2	12.7±0.7	4.83±0.22	9.82±0.03	8.61±0.03	0.21±0.02
H1%	105.7±1.5	11.1±0.4	4.59±0.13	9.89±0.16	8.64±0.03	0.25±0.02
H5%	111.3±4.0	14.7±0.7*	4.09±0.04*	1.79±0.22*	1.25±0.25*	0.55±0.03*
L1%	110.7±2.9	12.5±0.7	4.67±0.12	9.98±0.06	8.69±0.07	0.21±0.01
L5%	112.3±4.8	13.9±0.4	4.66±0.09	2.13±0.22*	1.57±0.25*	0.56±0.04*

Mean ± SEM (n=6) The value with symbol* is significantly different (p<0.05) compared with that for the control.

いHPMCより血中あるいは肝臓中のコレステロール濃度が低くなる²⁵⁾。また、高分子量グルカンが低分子のものより胆汁酸の排出に効果があるとも報告されている²⁶⁾。これらの報告は、われわれの仮説を支持する。

重合度が大きいと通常は多糖の粘性は高くなる。多糖の中でもグアガムのように粘性の高いものが、コレステロール低下作用が大きいという報告がある。粘調な多糖は、消化管中でコレステロールや胆汁酸を吸着し、糞中への排出を促すと報告されている^{18,27,28)}。コレステロール濃度の低下作用が見られたH-レバンの粘性を調べた。H-レバンの粘度は、グアガムや他のレバンに比べるとはるかに粘性は低かった(Table 5)。H-レバンの粘度が低いのは、直鎖構造でなく、分岐構造による櫛型構造のためである¹⁵⁾。H-レバンの場合、粘性はコレステロール低下の要因とはなっていない。

本研究では、ラット糞中のステロールや胆汁酸の濃度、短鎖脂肪酸の濃度などを測定していない。レバンの高分子量によるコレステロール濃度の低下が腸肝循環に関わると推測できるにしても、コレステロールの体内動態の詳細な検討が必要と考えている。今後さらなる検討を行う予定である。

Table 4 Effect of molecular weight of levan on serum cholesterol concentration

Diet	Concentration of the serum cholesterol (mmol/L)
Control	2.35±0.07
H1%	2.51±0.08
H5%	2.18±0.13 *
L1%	2.29±0.08
L5%	2.29±0.13

Mean ± SEM (n=6) The value with symbol * is significantly different (p<0.05) compared with the control.

Table 5 Viscosity of levan

Poly-saccharides	mol. wt.	Concentration (wt%)	Viscosity (mPa·s)
L-levan	10000	2.0	ND
H-levan	200000	2.0	<0.1
levan	500000	2.0	3.7
Guar gum	-	0.5	72.5

ND: Too low viscosity to measure.

引用文献

- 1 Bouhnik, Y., Flourie, B., Ouarne, F., Riottot, M., Bisetti, N., Bornet, N., and Rambaud, J.C.: Effects of prolonged ingestion of fructo-oligosaccharides (FOS) on colonic Bifidobacteria, fecal enzymes and bile acids in humans, *Gastroenterology*, 106, A598 (abs.) (1994)
- 2 Cummings, J.H., and Roberfroid, M.B., Andersson, H., Barth, C., Ferro-Luzzi, A., Ghos, Y., Gibney, M., Hermonsen, K., James, W.P., Korver, O., Lairon, D., Pascal, G., and Voragen A.G.: A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 51, 417-423(1997)
- 3 Roberfroid, M.B., Gibson, G.R., and Delzenne, N.: The biochemistry of oligofructose, a non-digestible fiber: an approach to calculate its caloric value, *Nutr. Rev.*, 51, 137-146 (1993)
- 4 Roberfroid, M.B.: Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides, *Nutr. Rev.*, 54, S38-42 (1996)
- 5 Tokunaga, T., Oku, T., and Hosoya, N.: Influence of chronic intake of new sweetener, "Neosugar" (fructooligosaccharide), on growth and gastrointestinal function of the rat, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 32, 111-121 (1986)
- 6 Delzenne, M., Kok, N., Fiordaliso, M.-F., Deboyser, D. M., Goethals, F.M., and Roberfroid, M.B.: Dietary fructooligosaccharides modify lipid metabolism, *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(suppl), 820S (1993)
- 7 Kaur, N., and Gupta, A.K.: Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition, *J. Biosci.*, 27, 703-714 (2002).
- 8 Levrat, M.-A., Remesy, C., and Demigne, C.: High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the cecum of rats adapted to different levels of inulin, *J. Nutr.*, 121, 1730-1737 (1991)
- 9 Wang, X., and Gibson, G.R.: Effect of the in vivo fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine, *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 373-380 (1993)
- 10 Letexier, D., Diraison, F. and Beylot, M.: Addition of inulin to a moderately high-carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol concentrations on humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 559-564 (2003).
- 11 Cho, S., Fujii, H., and Shiraishi, A.: Effect of polysaccharide produced by *Bacillus natto* or alcohol extract of yeast on the lipid metabolism of rats, *Fukuoka Joshi Daigaku Kaseigakubu Kiyo*, 16, 65-69 (1985)
- 12 Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S., and Yamaguchi, H.: In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats, *J. Nutr. Biochem.*, 10, 13-18 (1999)

- 13 Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matumoto, T., Saeki S., and Yamaguchi, H.: Hypocholesterolemic Effects of Levan in Rats. In "Hydrocolloids(Part2)-Fundamentals and applications in food, biology, and medicine", ed. Nishinari, K., Elsevier, Amsterdam, pp. 399-404 (2000).
- 14 Cho, S., and Kadota, M.: Binding capacity of various dietary fibers to taurocholate in a model system, *Fukuoka joshi Daigaku Kaseigakubu Kiyō*, 15, 33-39 (1984)
- 15 Iizuka, M., Yamaguchi, H., Ono, S., and Minamiura, N.: Production and isolation of levan by use of levansucrase immobilized on the ceramic support SM-10, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 322-324 (1993).
- 16 Vigne, J.L., Lairon, D., Borel, P., Portugal, H., Pauli, A.-M., Hautone, J.C., and Lafont, H.: Effect of pectine, wheat bran and cellulose on serum lipids and lipoprotein in rats fed on a low-, or high-fat diet, *Brit. J. Nutr.*, 58, 405-413 (1987)
- 17 Arjmandi, B.H., Ahn, J., Nathani, S., and Reeves, R. D.: Dietary soluble fiber and cholesterol affect serum cholesterol concentration, hepatic portal venous short-chain fatty acid concentrations and fecal sterol excretion in rats, *J. Nutr.*, 122, 246-253 (1992)
- 18 Ebihara, K., and Schneeman, B.O.: Interaction of bile acids, phospholipids, cholesterol and triglyceride with dietary fibers in the small intestine of rats, *J. Nutr.*, 119, 1100-1106 (1989)
- 19 Gallaher, D., and Schneeman, B.O.: Intestinal interaction of bile acids, phospholipids, dietary fibers, and cholestyramine, *Am. J. Physiol.*, 250, G420-426 (1986)
- 20 Remesy, C., Levrat, M.A., Gamet, L., and Demigne, C.: Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level, *Am. J. Physiol.*, 264, G855-862 (1993)
- 21 Illman, R.J., Topping, D.L., McIntosh, G.H., Trimble, R.P., Storer, G.B., Taylor, M.N., and Cheng, B.Q.: Hypocholesterolemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and in perfused rat liver, *Ann. Nutr. and Metab.*, 32, 95-107 (1988)
- 22 Wright, R.S., Anderson, J.W., and Bridges, S.R.: Propionate inhibits hepatocyte lipid synthesis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 195, 26-29 (1990)
- 23 Evans, A. J., Hood, R. L., Oakenfull, D.G., and Sidhu, G.S.: Relationship between structure and function of dietary fiber: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat, *Brit. J. Nutr.*, 68, 217-229 (1992)
- 24 Nishina, P.M., and Freedland, R.A.: Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes, *J. Nutr.*, 120, 668-673 (1990)
- 25 Gallaher, D.D., Hassel, C.A., Lee, K.J., and Gallaher, C. M.: Viscosity and fermentability as attributes of fiber responsible for the hypocholesterolemic effect in hamsters, *J. Nutr.*, 123, 244-252 (1993)
- 26 Lia, A., Hallman, G., Sandberg, A.S., Sundberg, B., Aman, P., and Anderson, H.: Oat beta-glucan increases bile acid excretion and a fiber-rich barley fraction increases cholesterol excretion in ileostomy subjects, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1245-1251 (1995)
- 27 Moundras, C., Behr, S.R., Demigne, C., Mazur, A., and Remesy, C.: Fermentable polysaccharides that enhance fecal bile acid excretion lower plasma cholesterol and apolipoprotein E-rich HDL in rats, *J. Nutr.*, 124, 2179-2188 (1994)
- 28 Moundras, C., Behr, S.R., Remesy, C., and Demigne, C.: Fecal losses of sterols and bile acids induced by feeding rats guar gum are due to greater pool size and liver bile acid secretion, *J. Nutr.*, 127, 1068-1076 (1997)

コレステロール低下作用におよぼすレバン分子量の効果

山口英昌，林原幸恵，山本由喜子，飯塚 勝

要旨：レバンの分子量がラットの血清コレステロール濃度に及ぼす影響を検討した。分子量約1万の低分子量レバン(L-レバン)を5%混合した飼料(L5%)を与えたラット群では、摂食量や体重増加率に変化は見られなかったが、分子量約200万の高分子量レバン (H-レバン)を5%含む飼料(H5%)を与えた群ではそれぞれの重量に減少が見られた。飼料効率は、L5%およびH5%両群とも、コントロール(5%セルロース)群と比べ差はなかった。また、体重あたり肝臓重量はH5%群で有意に低下した。レバン投与群では、盲腸や盲腸内容物の重量に増大が見られたがL5%とH5%群の間に差がなかった。一方L5%群では、血清コレステロール濃度は、コントロール群と比べ有意差は見られなかったが、H5%群では、有意な低下作用が見られた。これらの結果から、L5%とH5%群の血清コレステロール濃度の差は、腸内細菌叢による影響の可能性も否定できないが、レバンの重合度の差によると考えた。