

小豆ポリフェノール飲料による高脂肪食 投与雌マウスの体重増加抑制

小嶋道之[§], 西 繁典, 齋藤優介, 弘中和憲,
小嶋 浩, 前田龍一郎*

帯広畜産大学食料生産科学

* 帯広畜産大学基礎獣医学

Drink Containing Adzuki Polyphenol Inhibits Weight
Gain in Female Mice on High-Fat Diets

Michiyuki Kojima[§], Shigenori Nishi, Yusuke Saito,
Kazunori Hironaka, Hiroshi Koaze
and Ryuichiro Maeda*

Department of Food Production Science, Obihiro Uni-
versity, 11, Nishi-2-sen, Inada-cho, Obihiro 080-8555

* Department of Basic Veterinary Science, Obihiro Uni-
versity, 11, Nishi-2-sen, Inada-cho, Obihiro 080-8555

Hepatic disorders were absent in female mice given both a high-fat diet and a drink containing adzuki polyphenol (APP) for seven weeks, with no significant difference observed in the amount of feces between the experimental and control (high-fat diet only) mice. However, the average weight of mice given the APP drink was significantly lower than that of control mice, and the difference in the weight of ovary circumference fat was particularly marked. Additionally, the fat content of the feces of the mice given the APP drink was significantly higher than that of control mice, indicating greater fat elimination via the feces. An *in vivo* experiment found an inhibitory effect on pancreatic-lipase-activity dependent on an APP concentration with an IC_{50} of 38.0 ppm. Based on these results, it was suggested that in female mice given both a high-fat diet and the APP drink for a long period of time, APP inhibits pancreatic lipase activity, thus blocking the digestion and absorption of dietary fat and promoting fat elimination in the feces, thereby controlling weight gain.

(Received Nov. 6, 2006; Accepted Feb. 5, 2007)

Keywords: high-fat diet, adzuki polyphenol, lipase, inhibition, adiposity control

キーワード: 高脂肪食, 小豆ポリフェノール, リパーゼ, 阻害, 脂肪蓄積抑制

肥満は、皮下脂肪型肥満とマルチプルリスクファクターの内臓脂肪型肥満に区別できる¹⁾。特に後者の内臓脂肪型肥満は、高脂血症、高血糖症および高血圧症などとともに生活習慣病の危険因子の一つであり、それらの合併症であ

るメタボリックシンドロームは動脈硬化症に発展する確率が非常に高い²⁾ので、生活習慣病の人に対する食事や運動指導等による体質改善が奨励されている。また、血液中のカイロミクロン濃度を急上昇させないことや腓リパーゼ活性を抑制することは、肥満の予防に効果的であると考えられている³⁾。

これまでに我々は、北海道産小豆にはポリフェノールが豊富に含まれていて小豆ポリフェノールに生体内抗酸化活性や肝臓保護機能のあること⁴⁾、血清コレステロール濃度の上昇抑制作用⁵⁾や血糖値上昇抑制作用⁶⁾のあることをラットやマウスを用いた研究から明らかにしてきた。またWuらは、多くの農産物の中でも、小豆は抗酸化活性の高い食材であることを報告している⁷⁾。このように小豆および小豆ポリフェノールは生活習慣病予防に広く効果を示すことが期待されることから、本研究は高脂肪食餌と同時にアルコール可溶性の小豆ポリフェノール (APP) 飲料を与えた雌マウスの体重上昇および脂肪蓄積に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行った。その結果、卵巣周囲の脂肪組織の蓄積抑制と APP に腓リパーゼ活性抑制作用のあることを明らかにしたので報告する。

1. 実験方法

(1) 実験動物と餌・飲料の調製

1週間室内環境に順化させた14週齢の雌マウス (ddY系) を用いて、高脂肪食餌および APP 飲料の投与実験を行った。市販の高脂肪食餌 (クイックファット, 日本クレア) は、真空包装して4℃で保存したものを与えた。また、飲料として用いた APP は、帯広市内の細川製館(株) から出た小豆煮汁を以下のようにして調製した。すなわち、小豆煮汁を等容量の合成吸着剤 (DAIAION HP-20, 三菱化学) に通し、糖やタンパク質を除去するために2倍量の蒸留水で3回以上水洗し、続いて樹脂の3倍量のエタノールでポリフェノールを溶出した。濃縮乾固後に蒸留水に再溶解して APP を調製した⁸⁾。飲料は、APP 飲料 (カテキン相当量として1 mg/ml に調製したもの) およびコントロールとして水道水を自由摂取させた。ポリフェノール量は Folin-Ciocalteu 法⁴⁾ で測定しカテキン相当量として表した。また、モノマー型とオリゴマー型のポリフェノールを分離するために、高畑らの方法⁹⁾ に従って APP の一部を Sephadex LH-20 (5 ml ゲル容量, Amersham Bioscience) カラムに供した。順次、各 30 ml のエタノールおよびメタノールで溶出した画分をそれぞれ APP-E 画分および APP-M 画分とした。また、実験動物の取り扱いには Guide for the Care and Use of Laboratory Animals¹⁰⁾ に従って行った。

(2) 臓器重量の測定と血清成分の分析

高脂肪食餌および APP 飲料を7週間投与後に一晩絶食して、エーテル麻酔下で解剖を行い、臓器および血液を採取した。血液から遠心分離により得た血清は、各種の成分

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地

* 〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地

[§] 連絡先 (Corresponding author), kojima@obihiro.ac.jp

分析に用いた⁵⁾。血清中の総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸およびリン脂質量は TDX アナライザー (Abbot) を用いた酵素法で測定した。また、Non-HDL コレステロールは総コレステロールと HDL コレステロールの濃度差より算出した。

(3) 糞中脂肪の定量分析

糞は凍結乾燥後、約5倍量のクロロホルム-メタノール溶液 (2:1, v/v) を加え室温で20分間、超音波発生装置で脂質を抽出した。1000×gで遠心分離して抽出溶液を回収し、残渣は同様の操作を2回以上繰り返した。集めた抽出溶液は、窒素乾固後に恒量値を求め、糞中の脂肪量とした¹¹⁾。また、ヘキサン-エーテル-酢酸 (80:20:1, v/v) を展開溶媒としたケイ酸 TLC により、脂肪成分の比較を行った。

(4) 盲腸内 pH の測定

盲腸から搾り出した内容物に蒸留水を加えて10 mlに定容後、15分間超音波発生装置で攪拌後、水溶液の pH を測定した。

(5) 腓リパーゼ活性の測定

腓リパーゼ活性は、トリオレインからのオレイン酸遊離量を基に算出した¹²⁾。基質溶液は、9 ml の TES 緩衝液 (pH 7.0) に 80 mg のトリオレイン (Sigma), 10 mg のレンチン (太陽化学), 5 mg のコール酸ナトリウム (関東化学) を加えて激しく攪拌後、さらに超音波処理を行い調製した。20 μ l の基質溶液, 30 μ l の豚由来腓リパーゼ (3 mg/ml, EC 232.619.9, Sigma), 20 μ l の既知濃度の APP 溶液をよく混和後、37°C, 30 分間反応させ、ただちに NEFA-C テストワコー (和光純薬) を用いて遊離脂肪酸量を測定した。コントロールにおける遊離脂肪酸量との比較から、腓リパーゼ活性に対する阻害率を算出した。

(6) 統計処理

それぞれのデータは平均±標準偏差で表した。データ間の有意差は T-test で行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

2. 実験結果および考察

14 週齢の雌マウスに7週間、高脂肪食餌と同時に APP 飲料を与えたところ、投与後の2-3週間の体重変動には個体差が著しく認められたが、一部を除き4週目以降の体重増加はコントロール群に比較して有意に抑制されていた (Fig. 1)。また、実験期間を通して両群の摂食量は5.3~5.5 g、飲水量は5.7~6.0 ml であり、有意差は認められなかった。すなわち、高脂肪食餌と水を与えた成熟した雌マウスの増加する体重に比べ、高脂肪食餌と APP 飲料を与えたマウスの体重増加は顕著に抑制された。

APP 飲料を与えた群の血清成分を調べたところ、中性脂質、リン脂質、遊離脂肪酸、総コレステロールおよび HDL コレステロールの含量は、コントロールのそれより低い傾向にあったが有意差は認められなかった (Table 1)。また、高脂肪食餌と APP 飲料を投与して7週目の雌

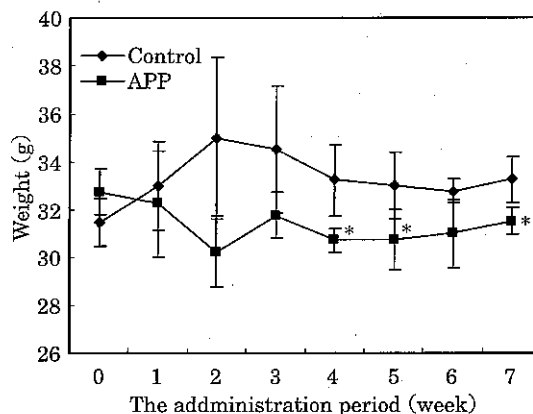


Fig. 1 Body weight change in mice drunk Adzuki polyphenol for 7 weeks ($n=5$, $P < 0.05$)

The number shows the week, after the drink to given. * mean significances at 5% level, compared with the value of the control.

Table 1 Serum lipids components after 7 weeks of dietary treatment in mice¹

Components	APP	Control
Neutral lipids (mg/dl)	7.71±4.39	10.40±6.73
Free fatty acid (mEq/l)	1.76±0.57	2.17±0.56
Phospholipids (mg/dl)	138.6±33.0	149.4±32.3
Total cholesterol (mg/dl)	111.1±22.6	120.8±35.0
HDL-cholesterol (mg/dl)	62.7±17.3	75.0±23.0
Non HDL-cholesterol ² (mg/dl)	48.4±8.0	45.8±14.3
Total protein (g/dl)	5.21±0.50	5.12±0.38
LDH (U/l)	982.1±370.4	1623.6±1109.7
GOT (U/l)	179.9±51.2	270.0±201.0
GPT (U/l)	36.4±7.0	46.2±16.3
ALP (U/l)	285.4±155.0	286.8±61.7
CHE (U/l)	3013.9±460.0	2905.2±292.2

Abbreviation ; LDH : Lactate dehydrogenase.

GOT : Glutamic oxaloacetic transaminase.

GPT : Glutamic pyruvic transaminase.

ALP : Alkaline phosphatase.

CHE : Cholinesterase.

¹ Values are means±standard deviations for 5 mice.

² Non HDL-cholesterol is total cholesterol - HDL-cholesterol.

マウス血中の肝臓障害指標となる各種の酵素活性値¹³⁾に、有意差は認められなかった (Table 1) ことから、APP 投与による肝臓への障害は起きていないと判断した。

高脂肪食餌と APP 飲料を投与後7週目の雌マウスの臓器重量を比較したところ、盲腸と卵巣周囲の脂肪重量に有意差が認められた (Table 2)。しかし、他の臓器；肝臓や小腸などの重量には顕著な差は認められなかった。APP 飲料を与えた群の盲腸重量はコントロール群よりも有意に重かったのは、高脂肪食餌の消化吸収が抑制されて盲腸内

Table 2 Weight of internal organs and feces after 7 weeks of dietary treatment in mice¹

Weight	APP	Control
Liver (g)	1.31±0.12	1.34±0.13
Small intestines (g)	1.94±0.24	2.16±0.46
Cecum (g)	0.37±0.10*	0.28±0.08
Hypodermic fats (g)	0.43±0.20*	0.90±0.31
Feces (g/day)	1.17±0.15	1.44±0.31

¹ Values are mean ± standard deviation for 5 mice.

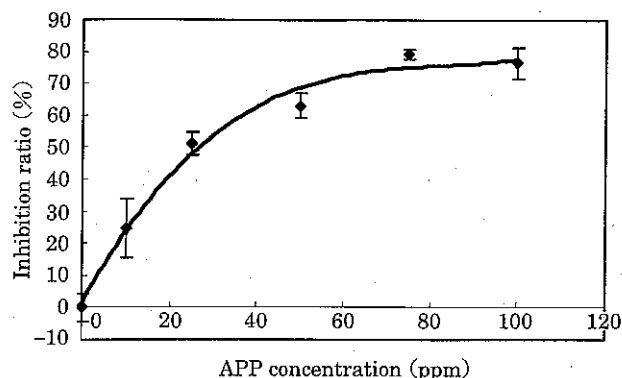
*P<0.05.

に未消化物が貯留した状態を示しているのかもしれない。しかし、両群の盲腸内 pH は、前者が 7.64 ± 0.09 、後者が 7.82 ± 0.15 で、有意差は認められず、両群の盲腸内微生物発酵は同程度であると判定した。7週目の雌マウスの体重はコントロールのそれよりも有意に低かったが、臓器重量から考えて、卵巣周囲の脂肪重量が原因であると考えられる。すなわち、APP 飲料を与えた群の雌マウス卵巣周囲の脂肪が少ないことにより、コントロールより体重増加が抑制されたと推定した。

また、解剖前3日間の糞重量に、有意差は認められなかった (Table 2)。しかし、APP 飲料を与えた群の糞中に含まれる脂肪量は 32.0 ± 0.7 mg/g dry, コントロール群のそれは 29.0 ± 1.4 mg/g dry であり、前者の脂肪量が有意に高かった。すなわち、APP 群の雌マウスにおける糞中への脂肪排泄は、コントロール群のそれよりも多いことが判明した。高脂肪食餌を与えたマウスにショウガ水抽出液を与えた場合にも同様の結果が報告されている¹²⁾。

In vitro 実験により、腓リパーゼ活性は、添加した APP の濃度に依存して抑制された (Fig. 2)。同様のことが、茶やサポニンなどでも報告されている^{13)~16)}。また、腓リパーゼ活性に対する APP の抑制濃度を検討したところ、 IC_{50} は 38.0 ppm であった。カラムで調製した APP-E 画分および APP-M 画分の腓リパーゼ活性に対する抑制効果は、APP-E 画分の IC_{50} は 188.3 ppm, APP-M のそれは 27.8 ppm を示した。これらの結果は、主にオリゴマー型の APP-M 画分が腓リパーゼ活性の抑制に関係していることを示している。

今回の結果より、高脂肪食餌を与えた雌マウスの体重増加の抑制は、主に脂肪蓄積の低下と関係していた。すなわち、APP による腓リパーゼの活性抑制作用により、食餌性脂肪の消化・吸収が抑制され、体内への脂肪輸送が低下したこと、および糞中への脂肪排泄が増加したことにより、雌マウスの体重増加が抑制されたと考えられる。しかし、茶カテキン類では、脂肪代謝が盛んとなり脂肪の消費促進や熱としての放散などが報告¹⁷⁾されていることから、APP 長期投与による体内脂肪の代謝活性化機構への影響についても今後の検討課題である。

Fig. 2 Effect of adzuki polyphenol (APP) on pancreatic lipase activity *in vitro*

APP was added to triolein/lecithin/sodium cholate/pancreatic lipase.

3. 要 約

高脂肪食餌と同時に小豆ポリフェノール (APP) 飲料を7週間与えた雌マウスの肝臓障害はほとんど認められず、糞重量にもコントロールとの差は認められなかった。しかし、APP 飲料を7週間与えた雌マウスの体重は、コントロールよりも有意に低く、特に卵巣周囲の脂肪重量が顕著に低かった。また、APP 飲料を与えた雌マウスの糞に含まれる脂肪含量がコントロールよりも有意に高く、糞中への脂肪排泄が示された。また、*in vitro* 実験により、APP の濃度に依存した腓リパーゼ活性の抑制作用が認められ、活性阻害の IC_{50} は 38.0 ppm であった。これらの結果より、長期間、高脂肪食餌と同時に APP 飲料を雌マウスに与えると、APP が腓リパーゼ活性を抑制することにより食餌性脂肪の消化・吸収を抑制し、脂肪が糞中に排泄されて、体重増加の抑制が起きていると推定した。

この研究は日本豆類基金協会の資金援助を受け、帯広畜産大学 21 世紀 COE プログラム研究の一環として行った。

文 献

- 1) 奥田拓道, 内臓脂肪と皮下脂肪の機能, 臨床医, 23, 48-52 (1997).
- 2) Fujioka, S., Matsuzawa, Y., Tokunaga, K. and Tarui, S., Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism*, 36, 54-59 (1987).
- 3) Okuda, H. and Han, L.K., Medicinal plant and its related metabolic modulators. *Folia Pharmacol. Jpn.*, 118, 347-351 (2001).
- 4) 小嶋道之, 山下慎司, 西 繁典, 斉藤優介, 前田龍一郎, 小豆ポリフェノールの生体内抗酸化活性と肝臓保護作用, 食科工, 53, 386-392 (2006).
- 5) 小嶋道之, 西 繁典, 山下慎司, 斉藤優介, 前田龍一郎, 小豆エタノール抽出物添加飼料によるラットの血清コレステロール上昇抑制, 食科工, 53, 380-385 (2006).
- 6) 小嶋道之, 西 繁典, 斉藤優介, 弘中和憲, 小嶋 浩, 前田龍一郎, 小豆ポリフェノールの単回および継続投与が血中

- グルコース濃度に及ぼす影響, 食科工, 54, 50-53 (2007).
- 7) Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4026-4037 (2004).
- 8) Nakahara, K., Kawabata, S., Ono, H., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T. and Hamada, S., Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glycosyltransferases of mutans *Streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 968-973 (1993).
- 9) Takahata, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Furuta, S., Takahashi, M. and Suda, I., Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5843-5847 (2001).
- 10) Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press (Washington, D. C. 1996).
- 11) Yang, T.T. and Koo, M.W., Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci.*, 66, 411-423 (2000).
- 12) 韓 立坤, Xiao-Jie Gong, 河野志穂, 齋藤雅人, 木村善行, 奥田拓道, ショウガの抗肥満作用について, *YAKUGAKU ZASSHI*, 125, 213-217 (2005).
- 13) Han, L.K., Takaku, T., Li, J., Kimura, Y. and Okuda, H., Anti-obesity action of oolong tea. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 23, 98-105 (1999).
- 14) Han, L.K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., Zheng Y.N. and Okuda, H., Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 25, 1459-1464 (2001).
- 15) Zhao, H.L., Sim, J.S., Shim, S.H., Ha, Y.W., Kang, S.S. and Kim Y.S., Antiobese and hypolipidemic effects of platycodin saponins in diet-induced obese rats: evidences for lipase inhibition and calorie intake restriction. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 29, 983-990 (2005).
- 16) Xu, B.J., Han, L.K., Zheng, Y.N., Lee, J.H. and Sung, C.K., *In vitro* inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi Radix* on pancreatic lipase. *Arch. Pharm. Res.*, 28, 180-185 (2005).
- 17) Murase, T., Nagasawa, A., Hase, T., Tokimitsu, I., Shimasaki, H. and Itakura, H., Dietary tea catechins reduce development of obesity accompanied with gene expression of lipid-metabolizing enzymes in mice. *J. Oleo Sci.*, 50, 711-715 (2001).

(平成18年11月6日受付, 平成19年2月5日受理)