

高機能スプラウトの開発 (第2報)

—レッドクローバースプラウトの脂質代謝調節効果—

横山慎一郎、小寺美有紀、平井晶子*、中田光彦*、上野有紀**、大澤俊彦**

Development of Advanced Sprout (II)

— Lipid metabolism regulating effect by red clover sprout—

Shin-ichiro YOKOYAMA, Miyuki KODERA, Akiko HIRAI*, Mitsuhiko NAKADA*, Yuki UENO and Toshihiko OSAWA**

高脂肪食誘発型肥満モデルマウスを用いたレッドクローバースプラウト乾燥粉末摂取による健康影響について検証した。その結果、レッドクローバースプラウト乾燥粉末の摂取により、体重および精巣周囲脂肪組織重量の減少が確認された。また、血中の中性脂肪、総コレステロール、低比重リポタンパクコレステロールの低減効果が認められた。一方で、高比重リポタンパクコレステロールも低下した。以上より、レッドクローバースプラウト乾燥粉末は、抗肥満効果および脂質代謝調節機能を有することを明らかにした。

1. はじめに

レッドクローバーは、欧州およびアジア原産のマメ科植物であり、「コウシャジクソウ」として漢方にも利用されるハーブの一種である。また、市場規模は小さいものの、そのスプラウトはサラダ等に利用されている。レッドクローバーにはホルモノネチン、ビオカニンAといったイソフラボンが豊富に含まれていることが知られ、これがハーブとして重用される理由であると考えられる。

近年、マウスを用いた動物実験において、高脂肪食にホルモノネチンを0.1~10 mg/kg/日添加して12週間与えた結果、低用量より、体重増加、内臓脂肪蓄積、高脂血症、および骨密度減少の抑制が確認され、ホルモノネチンには高脂肪食による肥満と骨損失を防ぐ強い効果があると報告された。¹⁾

本研究では、レッドクローバースプラウトの商品価値を見出すべく、レッドクローバースプラウトがホルモノネチン単独投与と同様の効果を有するかを明らかにするために、高脂肪食誘発型肥満モデルマウスを用いたレッドクローバースプラウト乾燥粉末による抗肥満効果、特に脂質代謝に及ぼす影響について検証した。

2. 実験方法

2.1 供試試料等

レッドクローバースプラウト凍結乾燥粉末(RC)は以下の通り調製した。発芽5日目のレッドクローバースプラウト200 gを-65℃で予備凍結した後、凍結乾燥機(FDU-1200:東京理科機器株式会社)にて16時間凍結乾燥した。乾燥した標品は、ミル(Vita-Mixアブソルートミル、大阪ケミカル株式会社)にて粉碎し、これをRCとして使用した。

飼料はオリエンタル酵母工業株式会社より購入したAIN93Gベースのもの(コントロール食)、および高脂肪食(HFD)を用いた(表1)。

2.2 イソフラボンの定量²⁾

上記の操作にて得られたRC 20 mgに、1N塩酸600 μ Lを加え攪拌後、98℃で2 hインキュベートした。10N水酸化ナトリウム水溶液で中和後、再度凍結乾燥した。この乾燥物に80%メタノール水溶液を400 μ L添加し、5 min室温で攪拌、10℃条件下で15,000 rpmにて10 min遠心分離した。その後、上清をフィルターろ過し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行い、主要イソフラボンであるホルモノネチンおよびビオカニンAの定量を行った。HPLCの条件は以下の通り。

HPLCシステム: Alliance e2695 Separations Moduleおよび2998 Photodiode Array Detector(日本ウォーターズ株式会社)、カラム: Mygthysil RP-18 GP II 4.6 ϕ × 250 mm(粒径5 μ m、関東化学株式会社)、カラム温度: 40℃、溶媒: (A)0.1%酢酸および(B)0.1%酢酸含有アセトニトリル、流速: 1 ml/min、グラジエント条件: 0-30 min (A75%、B25%)、30-40 min (A75→30%、B25→70%)、40-44 min (A30%、B70%)、45 min (A75%、B25%)、検出波長: 260 nm

分析の結果、供試RC中のホルモノネチンおよびビオカニンA含量は3.5および0.45 mg/gであった。また、その他に主たるピークは観察されなかった。

2.3 実験動物

動物実験は、神戸BMラボラトリー動物福祉委員会の承認のもと「動物の愛護及び管理に関する法律」、「動物の愛護及び管理に関する条例」、「実験動物の飼養及び穂難並びに苦痛の軽減に関する基準」、および「動物の処分方法に関する指針」に準拠して行った。オスのC57BL/6Jマウス(8週齢)を日本チャールスリバー株式会

*(株)サラダコスモ 研究開発部

**愛知学院大学 心身科学部

社より購入して使用した。室温23℃、湿度55%の条件下で飼育した。明期は8-20時、暗期は20-8時とした。

表1 飼料組成等

成分 (%)	コントロール (AIN-93G)	高脂肪食 (HFD)
コーンスターチ	39.7486	13.5458
カゼイン	20	20
α-コーンスターチ	13.2	1.25
ショ糖	10	34
大豆油	7	1.15
ラード	0	20
セルロース	5	5
AIN-93G ミネラル混合物	3.5	3.5
AIN-93G ビタミン混合物	1	1
L-シスチン	0.3	0.3
重酒石酸コリン	0.25	0.25
BHT	0.0014	0.0042
合計	100	100
カロリー (Kcal/g)	4.0	4.7

2.4 動物実験

8週齢のマウスを8日間予備飼育後実験開始した。コントロール食に加え、HFDおよびHFDにRCを0.3%(w/w)混ぜた餌(HFD+RC)を用意し、これらのマウスに自由摂食させた(各群n=6)。マウスは各群個別飼いとし、1週間ごとに体重、4日間ごとに摂食量を測定した。実験開始から8週間経過後、イソフルラン吸引下でマウスを屠殺し、キャピジェクトII(ヘパリンリチウム+血漿分離剤入、テルモ株式会社)に採血した。転倒混和30 min後、4℃条件下で5,000 rpmにて20 min遠心分離し、血漿を採取した。得られた血漿はLipoSEARCH(スカイライトバイオテック)による中性脂肪およびコレステロール類の定量分析に供した。また、精巣周囲脂肪組織および肝臓を摘出し、その重量を計測した。

2.5 統計処理

得られたデータについてTukey-Kramerの多重比較検定を行い、危険率0.05未満のものを有意差ありと判定した。

3. 結果と考察

RC添加高脂肪食を自由摂食させ、高脂肪食誘導性の肥満に対する抑制効果を検討した。その結果、RC添加(HFD+RC)群において、HFD群に比べて有意差は認められないものの、体重増加が抑制される傾向が見られた(図1)。また摂餌効率においては、コントロール群が2.7±0.21%であるのに対し、高脂肪食摂取では高値を示すものの、HFD群で8.3±0.36%、HFD+RC群で7.0±0.65%と、両群間に差は見られなかった(図2)。臓器重量においては精巣周囲脂肪組織において顕著な差が認められた。すな

わち、高脂肪食摂取により重量は増加するものの、HFD+RC群では2.2±0.07gと、HFD群の2.7±0.08gに比べて有意な低下を示した(図3)。

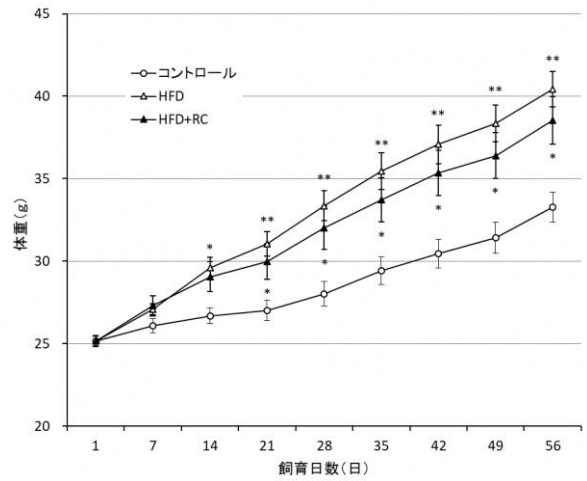


図1 体重変動

**p<0.01、*p<0.05 vs. コントロール

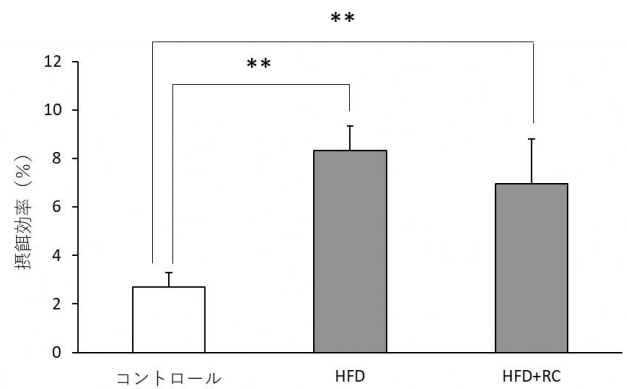


図2 摂餌効率

**p<0.01 vs. コントロール

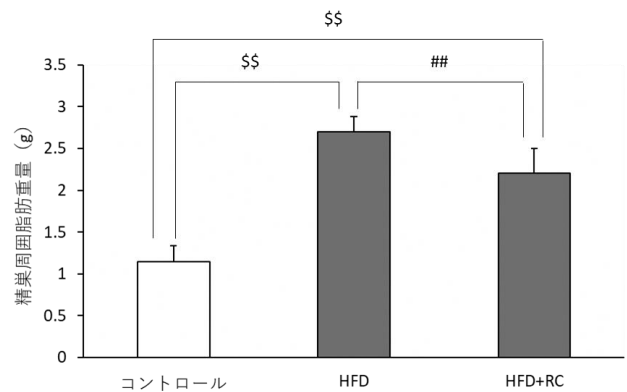


図3 精巣周囲脂肪組織重量

§§p<0.01、§p<0.05 vs. コントロール

##p<0.01 vs. HFD

一方、肝臓重量においては、コントロール群が $1.0 \pm 0.02\text{g}$ であるのに対し、両HFD群では肝肥大が認められるものの、HFD群では $1.1 \pm 0.02\text{g}$ とHFD+RC群では $1.1 \pm 0.04\text{g}$ と、両群間では有意な差は認められなかった(図4)。

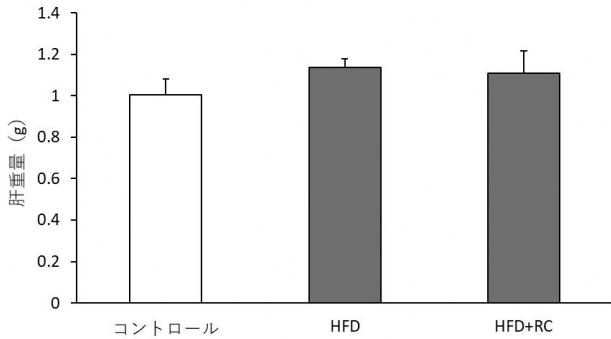


図4 肝重量

HFD+RC群では、HFD群との比較において、血中の中性脂肪、総コレステロール、LDLコレステロールの低減効果が認められた(表2)。一方で、VLDLコレステロールには変化が見られず、HDLコレステロールも低下することにより、L/H比の改善は見られなかった(表2)。

表2 血中脂質マーカー

試験群	コントロール	HFD	HFD+RC
TG	28.4 ± 4.2	$42.7 \pm 2.7^{\$}$	$28.8 \pm 2.9^{\#}$
Total-C	84.4 ± 1.9	$124.3 \pm 3.1^{\$\$}$	$100.2 \pm 2.6^{\$ \$, \#\#}$
VLDL-C	3.17 ± 0.36	$4.15 \pm 0.22^{\$}$	3.41 ± 0.18
LDL-C	8.93 ± 0.73	$28.6 \pm 1.03^{\$ \$}$	$20.3 \pm 1.12^{\$ \$, \#\#}$
HDL-C	71.8 ± 1.2	$92.7 \pm 1.9^{\$ \$}$	$73.6 \pm 1.9^{\#\#}$
L/H	0.124 ± 0.01	$0.295 \pm 0.01^{\$ \$}$	$0.279 \pm 0.02^{\$ \$}$

HFD: 高カロリー食; HFD+RC: 0.3% (w/w) 添加HFD; TG: 中性脂肪; Total-C: 総コレステロール; VLDL-C: 超低比重リポタンパクコレステロール; LDL-C: 低比重リポタンパクコレステロール; HDL-C: 高比重リポタンパクコレステロール; L/H: LDL-C/HDL-C 比。 $\$ \$ P < 0.01$ and $\$ P < 0.05$ vs. コントロール; $\#\# P < 0.01$ and $\# P < 0.05$ vs. HFD (n=6).

本研究において、0.3% (w/w) のRC添加は抗肥満効果および脂質代謝調節機能を示すことが明らかとなった。また、主要なインフラボンはホルモネチンであることも確認された。マウス(体重30 g)の1日の平均摂餌量は5g程度であることから、ホルモネチン摂取量としては約1.0 mg/kg/日に相当する。ホルモネチン単独投与での結果と比べると、VLDLコレステロールに変化が見られない、効果が低い等の違いはあるものの、傾向は類似していると言えよう。また、この添加量はヒト(体重60 kg)に換算すると1日あたり100 gのレッドクローバー生スプラウトを摂取する量に相当する。今後介入試験等、高機能スプラウトとして実用化に向けた詳細な研究の進展が期待される。

4. まとめ

食餌における0.3% (w/w) のレッドクローバースプラウト乾燥粉末添加は、高脂肪食誘発型肥満モデルマウスにおいて、抗肥満および脂質代謝調節効果を示すことが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) J. Gautam *et al.*, *Br J Nutr*, 117 (5), pp. 645-661, 2017
- 2) G. Wang *et al.*, *J Agric Food Chem*, 38 (1), pp. 185-190, 1990