

高コレステロール食摂取ラットにおける 食餌レクチンの血清コレステロール低下作用

萱島知子, 片山徹之
(広島大学大学院教育学研究科・人間生活教育学*)

Dietary lectin has a hypocholesterolemic activity in rats fed a cholesterol-enriched diet

Tomoko KAYASHIMA, Tetsuyuki KATAYAMA

Department of Human Life Sciences Education, Graduate School of Education, Hiroshima University

Summary

Dietary lectins have been established to lead to depressed activities of some intestinal enzymes, growth retardation and even death for experimental animals, particularly when consumed in large quantities. In this study, we examined the effect of dietary lectin (concanavalin A) on serum and hepatic levels of cholesterol in rats fed a 0.5% cholesterol containing diet at doses that did not affect food intake and body weight. Dietary lectin inhibited the increase in the hepatic and serum levels of cholesterol in the cholesterol-feeding rats. Lectin-mediated decrease in the serum cholesterol was mainly due to the reduction of very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein fractions, but a high-density lipoprotein fraction was not at all affected by dietary lectin. These results suggest that the dietary lectin might be an effective hypocholesterolemic factor.

レクチンは「非免疫起源の糖結合性タンパク質もしくは糖タンパク質で、細胞を凝集するか、または複合糖質を沈降させるもの」と定義されている¹⁾。現在までに多くのレクチンが、植物、動物、微生物界に広く分布することが知られている。食品中ではダイズやインゲンマメなどの豆類に多く含有されており²⁾、それ以外ではコメ³⁾やコムギ⁴⁾、ジャガイモ⁵⁾、サトイモ^{6, 7)}、トマト⁸⁾、海藻類⁹⁾などにも分布することが知られている。食品に含まれるレクチンには乾燥状態での加熱調理で活性が残存しているものや、タンパク質加水分解酵素に耐性を有するものがあることが報告されており¹⁰⁾、我々は各種の食品からある程度のレクチンを摂取していることが予想される。

一方、栄養学的にレクチンは、抗栄養素因子として害作用が強調されてきた。特に豆類に含まれるレクチンについては、実験動物への成長阻害作用が多く報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。Higuchiらは、シカクマメのレクチンを食餌中1.2%添加することによりラットの有意な成長阻害が生じ、それ以上のレベルでは添加量の増加にしたがって摂食量および体重が著しく減少し、5%以上添加すると短期間で死に至ることを示している¹⁴⁾。また、豆類以外のレクチンについても、サトイモのレクチンをマウスに経口投与した場合に、小腸粘膜に顕著な形態変化を起こすとともに⁷⁾、小腸の消化酵素活性を低下させることが示されている⁶⁾。最近、フィチン酸やシュウ酸などの抗栄養素因子が抗酸化作用、抗脂肪肝作用および抗癌作用といった有益な機能を有することが明らかとされてきている¹⁶⁻¹⁸⁾。これらの報告に対して、害作用を示さないレベルでの食餌レクチンの栄養学的機能性については、あまり注目されていない。

近年、我が国でも栄養過剰の傾向から、肥満や生活習慣病などの疾病が問題となっている。動物性食品の過剰摂取に

*所在地：東広島市鏡山1-1-1 (〒739-8524)

よって誘発される高コレステロール血症は虚血性心疾患の最も危険な因子の一つとして考えられており、その予防や改善が求められている。そこでこのように過剰栄養による健康への影響が問題となっている場合、添加濃度を考慮すれば、栄養素吸収阻害作用を示すレクチンが栄養素の吸収を部分的に阻害することでむしろ好ましい作用を発揮しているのではないかと考え、検討することとした。本研究では、特にコレステロール代謝に注目し、ラットの成長に害作用を示さない添加レベルのレクチンがコレステロール摂取ラットの血清コレステロール濃度の上昇を緩和するのではないかと考え、実験を行った。その結果、食餌レクチンにより血清コレステロール濃度増大の抑制が認められたため、さらに食餌レクチンによる血清リポタンパク質画分のコレステロール分布への影響について検討を加えた。

実験方法

1. 実験動物と飼育

実験動物としてウイスター系の雄ラット（広島実験動物株式会社）を用い1群5匹とした。実験1では、初体重約73gのラットを用い、飼育期間は14日間とした。実験2では、初体重約93gのラットを用い、飼育期間は5日間とした。飼育室の温度は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ とし、明暗周期12時間（明期は8:00~20:00）とした。飼育最終日の朝8:00に餌を抜き取り、午後1:00から3:00の間にエーテル麻酔し、心臓採血により血液を採取し、血清を分離した。肝臓をすばやく取り出し、 -80°C に保存した。なお、本実験は「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（昭和55年3月、総理府告示第6号）」に則って実施した。

2. 実験飼料

実験飼料はTable 1に示した。レクチンとしてはタチナタマメの種子を起源とするコンカナバリニンA（Concanavalin A；和光純薬工業株式会社）を用いた。コレステロール食は基本食に0.50%コレステロールと0.13%コール酸ナトリウムを炭水化物源と置き換えて添加し、さらにレクチン添加食にはコレステロール食に0.17または0.34%レクチンをカゼインと置き換えて添加した。なお、現実レベルでのレクチンの摂取量は明確にはなっていない。このため本実験では、予備実験よりラットの体重増加量と食餌摂取量に有意な影響を与えない最大の添加量が0.34%程度であったことから、この値を基準にしてレクチンの添加量を設定した。

実験1は基本食、コレステロール食、0.17%および0.34%レクチン添加のコレステロール食の4群に分け、食餌および飲水は自由に摂取させた。実験2では、コレステロール食、0.34%レクチン添加コレステロール食の2群に分け、食餌摂取量を正確に合わせる目的で食餌は一日あたり11gに制限し摂取させた。

Table 1 Composition of experimental diets.

Ingredients	Normal	Cholesterol		
		None	0.17% Lectin	0.34% Lectin
		g/kg diet		
Casein	200	200	198.3	196.6
DL-Methionine	3	3	3	3
Corn oil	50	50	50	50
Mineral mixture *	35	35	35	35
Vitamin mixture *	10	10	10	10
Cellulose powder	50	50	50	50
Corn starch	435	428.7	428.7	428.7
Sucrose	217	217	217	217
Cholesterol	-	5	5	5
Sodium cholate	-	1.3	1.3	1.3
Concanavalin A	-	-	1.7	3.4

*AIN-93 mixture¹⁹⁾

3. 測定方法

実験飼料投与期間の体重と飼料摂取量は毎日測定した。肝臓脂質をFolchらの方法²⁰⁾で抽出し、その一部を乾固し重量法により総脂質を測定した。肝臓のコレステロールおよび中性脂肪含量は、肝臓抽出液の一定量を乾固後、*tert*-ブチルアルコール30 μ lとTriton X-100:メタノール混液20 μ lを加えて溶解し、市販のキット(和光純薬工業株式会社;コレステロールCII-テストワコー, トリグリセライドG-テストワコー)にて測定した²¹⁾。肝臓リン脂質含量は、リン脂質-テストワコー(和光純薬工業株式会社)にて測定した。血清コレステロール, 中性脂肪, リン脂質濃度, 肝臓リン脂質含量については、それぞれ前述のキットを用いて測定した。また実験2において、血清試料を群ごとにプールし、HatchとLeesの超遠心法²²⁾により血清カイロミクロン画分($d < 0.950$), 超低比重リポタンパク(VLDL)画分($d = 0.950 \sim 1.006$), 低比重リポタンパク(LDL)画分($d = 1.006 \sim 1.063$), 高比重リポタンパク(HDL)画分($d = 1.063 \sim 1.210$), 非リポタンパク画分($d > 1.210$)に分画した。なお、リポタンパク質の分画は人のリポタンパク質画分の比重に従った。各リポタンパク画分を分画後、それぞれのコレステロール濃度を前述のキットを用いて測定した。また、血清の遊離コレステロールについては市販のキット(和光純薬工業株式会社;遊離コレステロールC-テストワコー)にて測定し、血清のコレステロールエステル量は総コレステロール値から遊離コレステロール値を差し引くことによって求めた。

4. 統計処理

統計処理は、分散分析を行った後、実験1はDuncanのmultiple range test²³⁾, 実験2は*t*検定を用いて行い、危険率が5%以下を有意とした。

実験結果

1. 実験1

Table 2に示したように、食餌摂取量および体重増加量は食餌コレステロールと本実験で用いたレベルのレクチン摂取による有意な影響はみられなかった。血清コレステロール濃度は、普通食群と比較してコレステロール群で有意に増加し、この増加は0.17%レクチン添加により抑制傾向を示し、さらに0.34%レクチンにより有意に抑制された(Table 2)。血清中性脂肪とリン脂質濃度は各群間での顕著な差は見られなかった(Table 2)。また、コレステロール摂取により肝臓コレステロール含量も有意に増加したが、この増加は食餌0.17%レクチン添加によりすでに有意に抑制された(Table 2)。肝臓重量, 肝臓中性脂肪およびリン脂質含量は、食餌コレステロールおよびレクチンにより顕著な影響を受けなかった(Table 2)。

Table 2 Effects of feeding lectin to rats for 14 d on serum and liver lipids (Experiment 1)¹

	Normal	Cholesterol		
		None	0.17% Lectin	0.34% Lectin
Body weight gain (g/day)	8.21 \pm 0.07	8.50 \pm 0.36	7.86 \pm 0.21	8.14 \pm 0.43
Food intake (g/day)	14.9 \pm 0.5	15.2 \pm 0.6	14.4 \pm 0.4	14.3 \pm 0.3
Serum				
Cholesterol (mmol/L)	2.61 \pm 0.34 ^a	6.83 \pm 1.06 ^c	6.21 \pm 1.03 ^{bc}	4.06 \pm 0.48 ^{ab}
Triglyceride (mmol/L)	0.751 \pm 0.046	0.839 \pm 0.052	0.699 \pm 0.081	0.732 \pm 0.091
Phospholipids (mmol/L)	1.91 \pm 0.09	2.01 \pm 0.19	2.11 \pm 0.21	1.89 \pm 0.17
Liver				
Relative weight (% of body wt)	4.60 \pm 0.16	5.12 \pm 0.24	5.43 \pm 0.11	5.07 \pm 0.13
Cholesterol (μ mol/g)	13.5 \pm 1.5 ^a	68.3 \pm 2.0 ^c	48.4 \pm 0.7 ^b	46.0 \pm 0.4 ^b
Triglyceride (μ mol/g)	50.3 \pm 15.6	88.4 \pm 10.3	59.1 \pm 14.3	83.9 \pm 14.1
Phospholipids (μ mol/g)	29.5 \pm 1.6	31.5 \pm 3.5	28.5 \pm 3.3	28.0 \pm 2.0

¹ Values are means (n=5) and SEM. Means for a variable not sharing a common superscript letters (a, b, c) are significantly different ($P < 0.05$) as determined by Duncan's multiple test.

2. 実験2

食餌摂取量を正確に揃えた本実験においても、食餌0.34%レクチン摂取による体重増加量への有意な影響は認められなかった (Table 3)。実験1と同様に、血清総コレステロール濃度は、食餌0.34%レクチンにより有意に低下した (Table 3)。このときレクチン添加により、血清遊離コレステロールおよびコレステロールエステル濃度はそれぞれ有意に低下したが、エステル型と遊離型の比については有意な影響は確認されなかった (Table 3)。またレクチンによる血清総コレステロール濃度の低下は、量的にみると主にエステル型のコレステロールによるものであった (Table 3)。Fig. 1に血清リポタンパク質画分のコレステロール量を示した。食餌レクチンによる血清総コレステロール濃度の低下は、主にLDL, VLDLのコレステロール量の低下によるもので、HDLのコレステロールへの影響はほとんど認められなかった (Fig. 1)。また、カイロミクロン画分のコレステロール量についても、食餌レクチンによる低下の傾向が観察された (Fig. 1)。

Table 3 Effects of feeding lectin to rats for 5 d on serum cholesterol (Experiment 2) ¹

	Cholesterol	
	None	0.34% Lectin
Body weight gain (g/day)	4.92 ± 0.24	5.28 ± 0.08
Serum		
Cholesterol		
Total (mmol/L)	5.63 ± 0.34	3.98 ± 0.41 *
Free (mmol/L)	1.14 ± 0.78	0.75 ± 0.10 *
Esterified (mmol/L)	4.50 ± 0.28	3.23 ± 0.31 *
Esterified/free (mol/mol)	4.01 ± 0.18	4.42 ± 0.37

¹ Values are means (n=5) and SEM. *Significantly different from cholesterol-free group by Student's *t* test (P < 0.05).

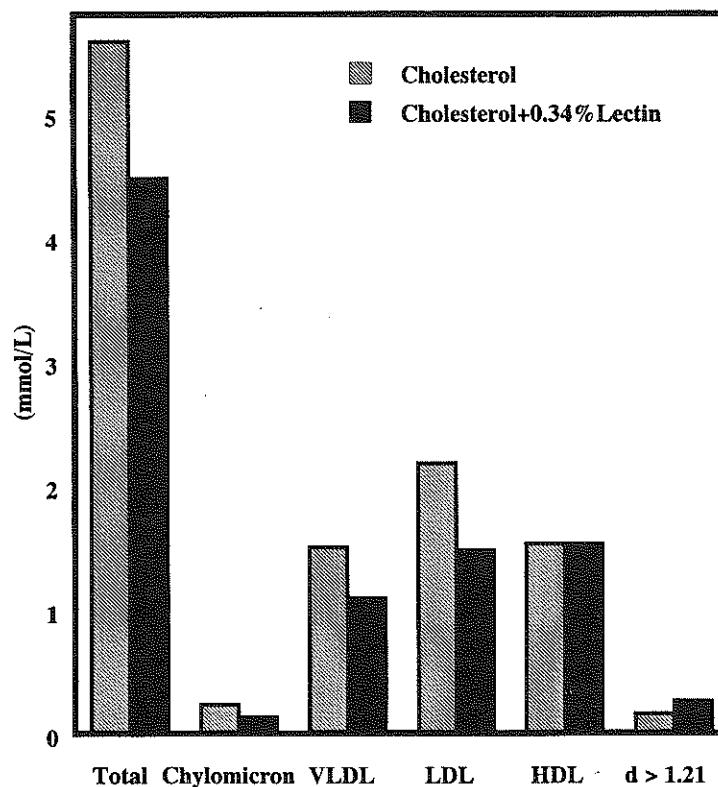


Fig. 1 Distribution of cholesterol among the lipoprotein fractions of rats fed 0.5% cholesterol containing diets with or without 0.34% lectin (experiment 2). Values are based on the pool of five rats.

考 察

食餌レクチンの栄養学的機能については、小腸粘膜の酵素活性を抑制し成長阻害を示す抗栄養素因子としての研究が活発に行われてきた。しかしながら、成長に害を与えないレベルでの食餌レクチンの機能についての栄養学的研究はほとんど見られない。本研究では成長阻害作用を示さない添加レベルでの食餌レクチンの機能に着目し、コレステロール摂取ラットにおける血清および肝臓コレステロールへの影響を検討した。その結果、ラットの成長に負荷を与えない添加レベルの食餌レクチンがHDLコレステロール濃度へ影響を与えず血清総コレステロール濃度低下作用を示すことが明らかとなり (Table 2)、食餌レクチンが高コレステロール血症改善に対して有効である可能性が示唆された。

本研究において、コレステロールの小腸からの吸収に関与しているカイロミクロンのコレステロール含量が食餌レクチンにより減少した (Fig. 1)。また、我々はすでにラットを用いた実験により、食餌0.34%レクチンがコレステロール添加食において糞中への中性ステロールの排泄を促進することを確認している (Kayashima他、投稿中)。これらの結果より、食餌レクチンによる血清コレステロール濃度低下作用の機構については、コレステロール吸収阻害と糞中への排泄促進が深く関わっているものと思われる。食餌レクチンは小腸粘膜の上皮細胞に結合し上皮細胞の成熟を阻害するとされている²⁴⁾。本研究で用いたレクチン、コンカナバリンAについても、ラット腹腔内投与により小腸での細胞脱落や絨毛の短小化が報告されている²⁵⁾。さらにNakataら¹⁵⁾は食餌0.3%コンカナバリンAが、場合によってはラットの腸粘膜の酵素、シュクラーゼ、アルカリホスファターゼ、ロイシンアミノペプチダーゼの活性を低下させることを示している。したがって、食餌レクチンが小腸粘膜上皮細胞に影響を与えることにより、コレステロールの吸収阻害を誘導している可能性も考えられる。一方、本研究において血清中性脂肪およびリン脂質濃度は食餌レクチンによる有意な影響を受けなかった。また、これまでの実験より食餌0.34%レクチン (コンカナバリンA) はコレステロール摂取ラットの血清アルブミン、グロブリン、総タンパク質、尿素窒素、グルコース濃度に対しても有意な影響を与えないことが明らかとなっている (Kayashima 他、投稿中)。近年、ある種のレクチンが糖以外の物質に対しても結合性を示すことが報告されており^{26, 27)}、さらに豆類に由来するレクチンの多くは糖結合部位に加えて疎水性部位を有することが知られている^{28, 29)}。これらのことから、レクチンがコレステロールに対して直接または間接的に結合し、特異的にコレステロール吸収を抑制し、糞中への排泄を高めているかもしれない。現在、本研究で見出された食餌レクチンによるコレステロール低下作用の機構については、上述した可能性を中心に詳細に検討を進めている。

肝臓中性脂肪含量について、0.17%レクチン添加コレステロール食群がコレステロール食群と比べて有意ではないが低い値を示した (Table 2)。しかしながら0.34%レクチン添加においてはこのような傾向は確認されなかった (Table 2)。本研究では比較的短期間の実験を行ったが、より長期の飼育を行うことによって、食餌レクチンが肝臓中性脂肪含量に与える影響についても明確にする必要があると思われる。

レクチンの実験動物への成長阻害作用に関して、Nakataら¹⁵⁾は食餌レクチンが実験動物に毒性を発現するには消化酵素に対して耐性を持つことが必須であると指摘している。コンカナバリンAは消化酵素への耐性を有しており、ラットに経口摂取させた場合に72時間後に糞中に6割程度の活性が存在していることが報告されている¹⁵⁾。したがって血清コレステロール濃度低下作用に関してもコンカナバリンAが難消化性であることが深く関与している可能性が考えられる。今後は、他の各種レクチンによるコレステロール代謝への影響について、その消化性および成長阻害作用と関連付けて検討を行なう予定である。

参考文献

- 1) Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N (1980) What should be called a lectin?. *Nature* 285: 66.
- 2) Sharon N, Lis H (1990) Legume lectins - a large family of homologous proteins. *FASEB J* 4: 3198-3208.
- 3) Tsuda M (1979) Purification and characterization of a lectin from rice bran. *J Biochem (Tokyo)* 86: 1451-1461.
- 4) Nagata Y, Burger MM (1972) Wheat Germ Agglutinin. *J Biol Chem* 247: 2248-2250.

- 5) Allen AK, Neuberger A (1973) The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. *Biochem J* 135: 307-314.
- 6) Seo Y, Une S, Tsukamoto I, Miyoshi M (1990) The effect of lectin from taro tuber (*colocasia antiquorum*) given by force-feeding on the growth of mice. *J Nur Sci Vitaminol* 36: 277-285.
- 7) Seo Y, Tsukamoto I, Miyoshi M (1991) Effects on the growth of mice of orally administered lectin from taro tuber (*colocasia antiquorum*). *Nihon Kasei Gakkaishi (J Home Econ Jpn)* 42: 211-218.
- 8) Nachbar MS, Oppenheim JD, Thomas JO (1980) Lectins in the U.S. diet - Isolation and characterization of a lectin from the tomato (*lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem* 255: 2056-2061.
- 9) 堀 貫治 (1994) 海藻のレクチン 新しいレクチンカテゴリー. *化学と生物* 32 : 586-594.
- 10) Nachbar MS, Oppenhem MD and JD (1980) Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a review of the literature. *Am J Clin Nutr* 33: 2338-2345.
- 11) Honavar PM, Shih C-V, Liener IE (1962) Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from *phaseolus vulgaris*. *J Nutr* 77: 109-114.
- 12) Pusztai A, Grant G, Palmer R (1975) Nutritional evaluation of kidney beans (*phaseolus vulgaris*): the isolation and partial characterisation of toxic constituents. *J Sci Fd Agric* 26: 149-156.
- 13) Kimura T, Satanachote C, Yoshida A (1982) Effect of feeding of raw winged bean seeds on gastrointestinal functions in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 28: 27-32.
- 14) Higuchi M, Tsuchiya I, Iwai K (1984) Growth inhibition and small intestinal lesions in rats after feeding with isolated winged bean lectin. *Agric Biol Chem* 48: 695-701.
- 15) Nakata S, Kimura T (1985) Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. *J Nutr* 115: 1621-1629.
- 16) Kayashima T, Katayama T (2002) Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems. *Biochim Biophys Acta* 1573: 1-3.
- 17) Okazaki Y, Kayashima T, Katayama T (2003) Effect of dietary phytic acid on hepatic activities of lipogenic and drug-metabolizing enzymes in rats fed 1,1,1-trichloro-2,2-bis (P-chlorophenyl) ethane (DDT). *Nutr Res* 23: 1089-1096.
- 18) Shamsuddin AM, Vucenik I (1999) Mammary tumor inhibition by IP6: a review. *Anticancer Res* 19: 3671-3674
- 19) Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127 (5 Suppl): 838S-841S.
- 20) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- 21) Danno H, Jincho Y, Budiyo S, Furukawa Y, Kimura S (1992) A simple enzymatic quantitative analysis of triglycerides in tissues. *J Nutr Sci Vitaminol* 38: 517-521.
- 22) Hatch FT, Lees RS (1968) Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* 6: 1-68
- 23) Duncan DB (1955) Multiple range and multiple *F* tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- 24) Pusztai A (1994) Characteristics and consequences of interactions of lectins with the intestinal mucosa. *ALAN* 44 (4 Suppl. 1): 10S-15S.
- 25) Lorenzsonn V, Olsen WA (1982) *In vivo* responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. *Gastroenterology* 82: 838-848.
- 26) Gegg CV, Etzler ME (1994) Photoaffinity labeling of the adenine binding sites of two *dolichos biflorus* lectins. *J Biol Chem* 269: 5687-5692.

- 27) Ramasamy M, Alpers DH, Saxena V, Seetharam B (1990) Effect of lectins on the cobalamin-protein binding reactions: implications for the tissue uptake of cobalamin. *J Nutr Biochem* 1: 213-219.
- 28) Roberts DD, Goldstein IJ (1983) Binding of hydrophobic ligands to plant lectins: titration-with arylaminonaphthalenesulfonates. *Arch Biochem Biophys* 224: 479-484.
- 29) Edelman GM, Wang JL (1978) Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives-III interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. *J Biol Chem* 253: 3016-3022.