

(p. 1)

プルーンは卵巣切除により誘発されたラットの高コレステロール血症を抑制する

エドラルイン・A・ルーカス (Edralin A. Lucas)、シャニル・ジュマ (Shanil Juma)、バーバラ・J・ストーカー (Barbara J. Stoecker)、バーラム・H・アルジュマンディ (Bahram H. Arjmandi)

オクラホマ州立大学栄養科学部、米国オクラホマ州スティルウォーター

自然な、あるいは手術による閉経を経験した女性に見られるコレステロールの増加は、卵巣ホルモンの欠乏と関連づけられてきた。本研究の目的は、食物繊維や植物由来物質の優れた供給源であるプルーンが、卵巣を切除した (*ovx*) ラットモデルにおけるコレステロールの減少に対し、いかなる効用をもたらすかを調査解明することであった。90 日齢のメスの *Sprague-Dawley* 製ラット 48 匹を、ランダムに次の 4 グループに分けた。擬似手術をほどこし (*sham*) 対照食を与えたグループ、*ovx* で対照食を与えたグループ、対照食にプルーンを少量添加した食餌 (*LD* ; 5%) を与えた *ovx* グループ、対照食にプルーンを多量に添加した食餌 (*HD* ; 25%) を与えた *ovx* グループである。45 日間の実験期間の後、ラットを安楽死させ分析用に組織を採取した。卵巣を切除し対照食を与えたグループは、その影響で血清中の総コレステロール濃度が *sham* に比べ 22% 上昇したが、*HD* プルーン食を与えたグループでは、高密度リポタンパク質濃度を一定値を保ちながら、血清コレステロール濃度の上昇が抑えられた。*HD* グループにおける肝臓中の総脂質濃度は、*ovx* グループに比べ 13% 低かった。本研究の成果より、プルーンが、卵巣ホルモン欠乏による高コレステロール血症の諸特性を抑えることが明らかになった。閉経後の女性に見られる高コレステロール血症の治療法として、エストロゲン置換療法の代わりに食事療法を選択する場合、プルーンがどれほど有効であるかを確証するためには、投与量応答の研究を行う必要がある。機構に関する研究も、作用の方式を解明するために必要である。(J. Nutr. Biochem. 11;255-259, 2000) ©Elsevier Science Inc. 2000. 全ての権利は左記に帰属する。

キーワード：コレステロール；脂質；繊維

緒言

女性は閉経が始まると、卵巣ホルモンの欠乏によって冠動脈疾患 (CHD) の発症率が急激に上昇する^{1,2}。血中のコレステロール濃度は、CHD の主要因の一つとされてきた³。自然な、あるいは手術による閉経を経験した女性に見られる、総コレステロール濃度および低密度リポタンパク質 (LDL) 濃度の上昇を抑制するには、エストロゲン置換療法 (ERT) が有効である⁴との

報告がされてきた。ERT が評価を得てきたのは、主に脂質およびリポタンパク質代謝の代替的役割として有望とされるためである⁵。とはいえ、ERT は、子宮内膜ガンおよび乳ガンの発症率上昇を伴う危険性があり^{6,7}、禁忌のない女性にしか勧めることはできない。コレステロールを減少させるその他の薬理学的手段も、副作用を伴うことが多く⁸、他のタイプの薬物療法を受けている人間には合わないこともある。このように、コレステロール濃度や CHD の発症率を低下させるには、できるだけ非薬理学的手段をとることが好ましい。

コレステロール濃度を低下させる代替案としては、プルーンなど食物繊維が豊富な乾燥果実を食事に取り入れる方法がある。血清中のコレステロール濃度低下に食物繊維が有効であることを示す研究は多々あるが、いずれにおいても使用されているのは精製した食物繊維である。しかし、精製された食物繊維が精製前とは異なる作用をする可能性もある。食物繊維、特にペクチン、オオバコ種子、オート麦のふすま等の可溶性食物繊維は、人間^{9,10} および動物¹¹⁻¹³ における血清中のコレステロール濃度を下げるのに有効であることが示されてきた。食物繊維は、ステロールの便中排出量増加や、コレステロールの胆汁酸転化率上昇¹⁴ を含めたいくつかの機構によって、コレステロール濃度を低下させるのである。

コレステロール濃度低下を引き起こすプルーンの作用を扱った研究は、これまでのところ極めて少ない。動物を使った唯一の研究¹⁵ では、高脂血症ラットに、プルーンから分離した食物繊維を 6%添加した食餌を与えている。その結果、血清中および肝臓のコレステロール濃度が、ペクチンを 3%添加した食餌を与えた場合と同程度に低下した。この実験を行った研究グループ¹⁶ は、軽度の高コレステロール血症を患う男性に 1 日 100 グラムのプルーンを摂取させたところ、血清中の総コレステロール濃度が低下したと報告している。その一方で、卵巣ホルモン欠乏に誘発された血清コレステロール濃度の上昇に対し、プルーンが果たす役割についての研究は未だ行われていない。

(p. 2)

優れた食物繊維源であるプルーンには、脂質代謝を促進するフェノール類、アスコルビン酸、カロテノイドも含まれている¹⁷。本研究の目的は、卵巣を切除したラットモデル (ovx) におけるコレステロールの減少に、プルーンがいかなる効用をもたらすかを調査解明することであった。今回、プルーン投与量の上限として 25% (w/w) を選んだ理論的根拠は、この量ならばラットにほとんど負担がかからないという予備実験の結果にある。従って、この投与量が効果を期待できる最低量であるという解釈は適当ではない。この 25%という投与量と同じぐらい、卵巣ホルモン欠乏によるコレステロールの増加を効果的に抑制すると思われるプルーン投与レベルを 5~25%の間で明確にするには、さらなる投与量応答の研究が必要である。

材料と方法

動物と食餌

90 日齢のメスの Sprague-Dawley 製ラット 48 匹を、Harlan Sprague-Dawley (米国インディアナ州インディアナポリス) から購入した。ラットは、当研究所に到着後すぐ個別のしきりに収容し、諸環境を制御された実験室で飼育した。なお本研究は、オクラホマ州立大学の動物保護および用途に関する委員会が作成した動物の倫理的保護および取り扱いの指針に、厳密に従うものである。ラットは 3 日間実験室の環境に順応させた後、12 匹ずつ、次の 4 グループに分けた。擬似手術をほどこし (sham) 対照食を与えたグループ、ovx で対照食を与えたグループ、対照食にプルーンを少量添加した食餌 (LD ; 5%) を与えた ovx グループ、対照食にプルーンを多量に添加した食餌 (HD ; 25%) を与えた ovx グループである。ovx グループには卵巣切除手術を施し、sham グループには、卵巣を切除せずに同様のストレスを与える手術を行った。対照食としては、カゼインベースの粉末食 (AIN-93M に修正を加えたもの¹⁸⁾) を与えた。プルーン添加食のグループには、対照食の 5~25% (w/w) を組成 (表 1) の明らかなプルーンの乾燥粉末に置き換えた食餌を与えた。どの食餌も、エネルギー総量、炭水化物、タンパク質、脂質、食物繊維総量が等しくなるように調整した (表 2)。さらにカルシウムやリンの濃度についても、すべての食餌でプルーン添加食の組成とほぼ等しくなるように調整した。ラットには、食餌や脱イオン水を自由に摂取させた。食物摂取量は、与えた時点の食餌量と残った食餌量の差から求めた。

施術から 45 日後、断食期間を経ることなく、ラットに塩酸ケタミン (体重 1kg あたり 100mg) とキシラジン^{〔訳注: "xylidine" (キシリジン) の誤りの可能性あり〕} (体重 1kg あたり 5mg) の混合物で麻酔をし、腹大動脈より放血した。採取した血液サンプルを 4°C、1,500×g で 20 分間遠心分離機にかけ、血清を分離した。得られた血清の部分標本を凍結し、後の分析のために -20°C で保存した。肝臓は速やかに摘出し、氷温の生理食塩水で洗浄後秤量、-20°C 下密閉容器内で保存し、分析を待った。脾臓、子宮、腎臓、心臓、副腎も回収し、ブロットィング、秤量した。

表1 粉末プルーンの主要成分*

成分	粉末プルーン 100g あたりの量
近似分析 (g)	
タンパク質	3.0
脂肪	0.5
総炭水化物	80.0
総食物繊維	9.0
ミネラル (mg)	
カルシウム	72.0
鉄	3.0
カリウム	1,050.0
ナトリウム	5.0
リン	108.0
ホウ素	3.4
抗酸化物質 (mg)	
ビタミンC	0.63
カロテノイド	0.60
フェノール類およびフラボノイド	22.4
キノン類	0.058
ORAC 単位	5,770

*カリフォルニアプルーン協会（米国カリフォルニア州プレザントン）が、乾燥プルーン 100g あたりの値として報告。バッチにより異なる場合がある。

+ORAC—酸素ラジカル吸収能力 (J・マクブライド(1999)、食物で老化は防止できるか? (Can foods forestall aging? Agri. Res. 47, 14-17.)

表2 実験食の組成

成分	対照食	LD	HD
	食餌 1kg あたりの g 数		
炭水化物			
総量	720.7	720.7	720.7
コーンスターチ	465.7	425.7	265.7
マルトデキストリン	155	155	155
ショ糖	100	100	100
プルーン*	—	40	200
タンパク質			
総量	140	140	140
カゼイン	140	138.5	132.5
プルーン*	—	1.5	7.5
脂肪			
総量	40	40	40
ダイズ油	40	39.75	38.75
プルーン*	—	0.25	1.25
食物繊維			
総量	50	50	50
セルロース	50	45.5	27.5
プルーン*	—	4.5	22.5
ビタミンミックス ⁺	10	10	10
ミネラルミックス			
総量	35	35	35
ミネラルミックス (Ca-P 欠乏) ⁺⁺	13.4	13.4	13.4
炭酸カルシウム	9.88	9.79	9.43
プルーン*由来カルシウム	—	0.036	0.18
リン酸カリウム (一塩基酸)	5.6	5.48	5.0
リン酸ナトリウム (一塩基酸)	3.44	3.32	2.84
プルーン*由来リン	—	0.054	0.27
クエン酸カリウム (一塩基酸)	0.9	0.9	0.9
ショ糖	1.78	2.02	2.98
酒石酸水素コリン	2.5	2.5	2.5
L-システイン	1.8	1.8	1.8
熱量密度 [§] (食餌 1g あたりの kJ)	17.6	17.5	17.4

*Sunsweet Growers Inc.製の乾燥プルーン（米国カリフォルニア州ユバシィー）。プルーンの成分組成は表 1 に記載。

+Harian Teklad（米国ウィスコンシン州マディソン）製のビタミンミックス（TD #94047）。ビタミンミックスの成分は以下のとおり（g/kg）；ニコチン酸、3.0；パントテン酸カルシウム、1.6；ピリドキシン塩酸、0.7；チアミン塩酸、0.6；リボフラビン、0.6；葉酸、0.2；D-ビオチン、0.02；ビタミン B₁₂（0.1%マンニトール溶液）、2.5；DL- α -トコフェリル酢酸（500IU/g）、15；ビタミン A パルミチン酸（500,000IU/g）、0.8；コレカルシフェロール（500,000IU/g）、0.2；フィロキノン、0.075；ショ糖、974.705。

++Harian Teklad（米国ウィスコンシン州マディソン）製のミネラルミックス（TD #79055）。このミネラルミックスは AIN76 をベースに、カルシウムとリンを除去しショ糖を希釈剤としたものである。

*ポンプ熱量計で測定した熱量密度（Parr Instrument 1261 Calorimeter、イリノイ州モリーン）

（p. 3）

血清トリグリセリド、総コレステロールおよび高密度リポタンパク質コレステロール

血清コレステロール（TG）および総コレステロール濃度を、Sigma Diagnostics（米国ミズーリ州セントルイス）製のキットにより、酵素を用いて決定した。血清中の高密度リポタンパク質（HDL）コレステロール濃度は、ショブロンとエルクルンド¹⁹の沈殿法を修正した方法¹³によって決定した。以上の分析は、Cobas-Fara II Clinical Analyzer（米国ニュージャージー州モントクレア）により、製造元の指示に従って、市販の目盛り測定器と厳密な品質管理の下に調製された試料を用いて行った。HDL 以外のコレステロール濃度は、総コレステロールから HDL コレステロールを差し引いて求めた。

肝臓中の総脂質と総コレステロール

肝臓の小片を携帯型のホモジェナイザー（Biospec Products Inc.、米国オクラホマ州バートルズビル）で均質化し、クロロホルム：メタノール 2：1（v/v）混合液で抽出した。抽出液に 0.12mol/L の塩化ナトリウム水溶液を加えて相分離した後、有機層部分を回収し、肝臓中の総コレステロール濃度を決定した。決定に際しては、氷酢酸-FeSO₄-H₂SO₄²⁰の呈色試薬を使用した。肝臓中の総脂質は、フォルチ重量測定法²¹により決定した。肝臓中の総コレステロールおよび総脂質は、肝臓 1g あたりの値を計算、報告した。

統計的解析

データ解析の過程で、各処理グループ毎の平均値と標準誤差の計算を行った²²。処理グループ間の差が統計的に有意 ($P<0.05$) かどうかを決定するため、One-way 分散分析 (ANOVA) を行った。この結果で平均値間に何らかの有意差があるとみなせる場合は、さらにチューキークレイマーの追跡多重比較テストで、どの平均値間に有意差があるかを決定した。全統計的解析を通じて使用したのは、GraphPad InStat Software (version 2.0, 1993; 米国カリフォルニア州サンディエゴ) である。

結果

食物摂取量と体重および器官の重量

食物摂取量、体重および器官の重量に関するデータを、表 3 に掲載した。ovx グループの平均食物摂取量については、グループ間で有意な差は認められなかったが、sham グループの摂取量は、予想に違わず²³ovx よりも低かった。実験開始時、全処理グループの平均体重に大きな差はなく、226~231g であった。全ラットは実験期間中に体重が増加し、ovx グループのラットの体重増加量は、sham グループよりも大きかった。排便の湿重量および乾重量から判断したところ、プルーン食を摂取したラットに下痢症状は見られなかった。

卵巣切除によって子宮組織の萎縮が引き起こされたが、これは手術が成功した証拠とみなせる。腎臓、心臓、副腎の重量 (体重 100g あたりの g 数) は、ovx グループよりも sham グループの方がかなり高かった (表 3)。その一方で、肝臓および脾臓の重量は、各処理グループ間で差が見られなかった。

血清中の総コレステロール、HDL コレステロール、非 HDL コレステロールおよびトリグリセリド

卵巣切除の影響で、血清中の総コレステロール濃度は、sham ラットに比べて 22%と大きく上昇した (表 4)。この上昇は、LD プルーン食により幾分抑えられ、さらに HD プルーン食によってほぼ抑制された ($P<0.01$)。卵巣切除に誘発された血清中の総コレステロール濃度の上昇は、sham ラットと比較した結果 (表 4)、その 62%が非 HDL コレステロール部分によるものであった。さらに重要なことには、HD プルーン食は、HDL コレステロール濃度を変えずに非 HDL コレステロール濃度の上昇を抑制したのである (表 4)。

肝臓中の総コレステロールおよび総脂質

肝臓中の総コレステロールは、卵巣切除を含めたいかなる処理によっても、大きな影響は受け

なかった（表 4）。その一方で、肝臓中の総脂質量は、sham ラットよりも ovx ラットの方が約 18% ($P=0.053$) 高かった。HD プルーン食を摂取させたラットの肝臓中の総脂質量は、対照食をとらせた ovx ラットよりも 13%低かった。

表 3 ラットの体重および器官の重量に対する卵巣切除 (ovx)、低プルーン食 (LD) 摂取、高プルーン食 (HD) 摂取の効果*

測定項目	sham	ovx	ovx+LD	ovx+HD	標準 誤差	ANOVA (<i>p</i> -値)
食物摂取 (ラット 1 匹の 1 日あたりの g 数)	12 ^a	16 ^a	16 ^a	15 ^{a,b}	0.90	=0.004
体重 (g)						
初期値	228	228	226	231	2.0	=0.317
最終値	266 ^b	314 ^a	328 ^a	328 ^a	4.3	<0.001
器官の重量 (体重 100g あたりの g 数)						
子宮	0.265 ^a	0.045 ^b	0.044 ^b	0.044 ^b	0.01	<0.001
肝臓	2.76	2.65	2.49	2.70	0.07	=0.076
腎臓 ⁺	0.674 ^a	0.575 ^b	0.548 ^b	0.554 ^b	0.02	<0.001
脾臓	0.233	0.231	0.236	0.232	0.01	=0.975
心臓	0.368 ^a	0.328 ^b	0.322 ^b	0.320 ^b	0.01	<0.001
副腎 ⁺	0.038 ^a	0.028 ^b	0.029 ^b	0.029 ^b	0.00	<0.001

*数値は平均値、各グループの $n=12$ である。

+二つの器官の総重量

^{a,b} 同じ行の数値間で、他と異なる上付き文字のある値は、有意差 ($P<0.05$) の認められたもの。
ANOVA—分散分析。

(p. 4)

表 4 卵巣切除 (ovx) とブルーングが血清および肝臓のパラメータに及ぼす効果*

測定項目	sham	ovx	ovx+LD	ovx+HD	標準 誤差	ANOVA (<i>p</i> -値)
血清						
総コレステロール (mmol/L)	2.49 ^b	3.04 ^a	2.89 ^{a,b}	2.51 ^b	0.12	0.005
HDL コレステロール (mmol/L)	2.11	2.44	2.22	2.12	0.12	0.185
非 HDL コレステロール (mmol/L)	0.37 ^b	0.60 ^a	0.67 ^a	0.39 ^b	0.06	0.012
トリグリセリド (mmol/L)	1.04 ^a	0.68 ^{a,b}	0.57 ^b	0.63 ^{a,b}	0.10	0.022
肝臓 (肝臓 1g あたりの mg 数)						
総コレステロール	3.02	3.01	2.96	2.84	0.12	0.723
総脂質	41.1 ^b	48.5 ^a	48.4 ^a	42.2 ^b	2.2	0.053

*数値は平均値、各グループの $n=12$ である。

^{ab} 同じ行の数値間で、他と異なる上付き文字のある値は、有意差 ($P<0.05$) の認められたもの。

LD—低ブルーング食、HD—高ブルーング食。

ANOVA—分散分析、HDL—高密度リポタンパク質。

考察

結果としては、以前得られた我々の研究成果¹³や他の諸研究²⁴⁻²⁶と一致したが、卵巣切除は、血清中の総コレステロールを有意な幅で増加させた。卵巣切除が高コレステロール血症を誘発する正確な機構は、現在のところ不明である。ステロールの合成速度の上昇は、可能性の一つには数え難い。というのも、ラットの卵巣切除は、コレステロールの合成速度を制限する酵素の一つ、肝臓の HMG-CoA 還元酵素の活性を大幅に低下させるという報告があるからである^{27,28}。LDL レセプターの活性低下も、卵巣切除に伴って生じるとは考えにくい^{29,30}。おそらく、血清コレステロールの増加の要因としてもっとも考えられるのは、コレステロール除去の速度低下か、肝臓におけるコレステロールの胆汁酸への転化であろう。卵巣そのものの除去や子宮の萎縮によって、LDL 除去の領域が消失するということである。例えば、ハムスターなど小動物モデルの卵巣は、組織 1 グラムあたりの LDL 除去能力が肝臓に次いで高いという報告がある³¹。ovx ラットは、実際に子宮が萎縮しただけでなく、腎臓、心臓、副腎の重量も減少した。これらの現象は今のところ説明がつかないが、卵巣の除去やそれに伴う諸組織の重量低下には、卵巣切除にかかわる LDL 除去能力の減損や血清コレステロール濃度の上昇が関係していると思われる。

さらに肝臓の 7 α -ヒドロキシラーゼ活性の低下も、卵巣ホルモン欠乏の際に見られる高コレステロール血症の一要因である可能性がある。当研究室の最近の研究³²により明らかになったのは、卵巣を切除すると肝臓の 7 α -ヒドロキシラーゼ mRNA レベルが低下するが、この効果はエストロゲンの投与で大きく逆転するということである³³。これらの研究成果を裏づけるかのように、コルビンら (Colvin et al.)³⁴は、ovx のカニクイザルに抱合エストロゲン^{訳注:原文では、conjugated equine estrogen} となっているが、辞書では、conjugated estrogen の説明中に equine が出てくるので、原文のスペルミスではないかと思われる³⁵を経口投与したところ、肝臓の 7 α -ヒドロキシラーゼ活性が大きく上昇することを発見した。以上の機構に加えて、単独もしくは連合したその他の機構が、卵巣ホルモン欠乏に関連するコレステロールの増加を引き起こす要因になっているのではないかと考えられる。

今回、肝臓中の総コレステロール濃度は、卵巣切除とプルーン食のどちらにも影響を受けなかった。しかし、肝臓中のコレステロール濃度は、通常食餌中に存在するコレステロールにきわめて敏感であるため、この結果は当然予測されたものであった。以前我々が行った研究では、食餌にわずか 0.3%ほどのコレステロールを添加しただけで、肝臓中のコレステロール濃度が 4 倍もの上昇をみた¹¹。

本研究では、食餌中にプルーンを 25%添加した場合、卵巣切除による血清中の総コレステロールおよび非 HDL コレステロール濃度の上昇が抑制された ($P<0.01$)。また、程度こそ大きくはないが、プルーン 5%食も ovx 動物の血清コレステロール濃度を低下させた。プルーンには、食物繊維が約 9%、そのうちペクチンが 60%も含まれており¹⁶、優れた食物繊維源と考えられている³⁵。我々の観察^{11,12} および他の研究結果³⁶⁻³⁸により、血清中の総コレステロールを有意に減少させるには、ラットの食餌にペクチンを 3~8%添加する必要があることがわかった。現在の研究では、プルーン 5%食および 25%食に含まれる食物繊維のレベルは、ペクチンに換算してそれぞれ約 0.3%と 1.4%であった。これらのレベルは、以前有効であるとされたレベルに比べてかなり低く、従って高コレステロール血症に対するプルーンの効果は、食物繊維の豊富さだけによるものではないと考えられる。プルーンに含まれるフェノール類およびフラボノイド (表 1) は、LDL コレステロールの酸化を抑制する⁴⁰と同時に、コレステロールの血清中レベルを下げる³⁹と報告されてきた。プルーンに含まれるフェノール類およびフラボノイドが、高コレステロール血症の抑制や LDL コレステロールの酸化防止にどの程度有効であるかは、重要な研究課題である。

さらに今後の研究で、プルーンが卵巣ホルモン欠乏により誘発される障害を抑制する機構について解明しなければならない。本研究の成果から、コレステロールを下げるために最低限必要なプルーン添加レベルが 25%であるという結論を導き出すのは早急である。食餌中のプルーンレベルを 25%より低くしても、卵巣ホルモン欠乏によるコレステロール増加の抑制に、同様の効果をもたらすかもしれないのである。ただしこれは推論に過ぎず、その確証を得るには、効果の投与量依存性に関する研究を行う必要がある。

謝辞

著者は、エリザベス・ドローク博士 (Elizabeth Droke)、ヒョウンチュル・ハン博士 (Hyoungchul Han)、ジャロッド・キング氏 (Jarrod King)、ダグラス・ラング博士 (Douglas Lange)、ヤン・リー氏 (Yeong Rhee)、およびアマニ・ソリマン氏 (Amani Soliman) に対し、その技術的支援に深く感謝します。本研究は、一部カリフォルニアプルーン協会の支援により行われました。