Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

A study on the inhibitory mechanism for cholesterol absorption by α-cyclodextrin administration

Furune, Takahiro

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2016-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6681号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006681

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

A study on the inhibitory mechanism for cholesterol absorption by α-cyclodextrin administration

α－シクロデキストリン経口摂取による
コレステロール吸収阻害機構に関する研究

古根　隆広, 生田　直子, 石田　善行, 岡本　陽菜子, 中田　大介,
寺尾　啓二, 坂本　憲広

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
医　薬　食　品　評　価　科　学
（指導教員：坂本　憲広教授）

古根　隆広

【背景】

α－シクロデキストリン(αCD)はグルコース 6 分子が環状に連なった構造をしており、環状構造の外側が親水性を、内側が疎水性を示す。この性質によってαCD は空洞内に疎水性物質を取り込む包接能を持ち、例えば、脂肪酸などを包接することが報告されている。

αCD は水溶性食物繊維として広く利用されており、体重減少、血中コレステロールや中性脂肪低減、食後の血糖値上昇抑制など様々な機能性を有することが報告されている。これらの機能の内、血中コレステロール低減の作用機序については未だ不明のままである。

血中コレステロールはコレステロール摂取量に影響を受けるとされている。摂取されたコレステロールは通常、腸管内で胆汁によって小腸液に溶解もしくは分散することで吸収が促されている。胆汁にはレシチンや胆汁酸が含まれ、これらの分子がコレステロールのミセル形成に重要な役割を果たしている。いくつかの食物繊維は血中コレステロール低減効果を持っているが、その作用機序として食物繊維が胆汁酸に吸着することによってコレステロールのミセル形成を阻害していると推測されている。しかしながら、αCD はコレステロールや胆汁酸と包接しづらいため、コレステロールや胆汁酸が作用機序に関与しているとは考えづらい。一方、αCD は赤血球膜からレシチンを放出させることが報告されている。そこで、我々は、αCD はレシチンへの相互作用を介してコレステロールのミセル形成に影響する可能性があると考え、食後人工腸液(Fed State Simulated Intestinal Fluids: FeSSIF)を用いた *in vitro* の系において、αCD とレシチンとの相互作用やコレステロール溶解性に及ぼすαCD の影響を調べた。

【方法】

1. αCD とレシチンとの相互作用の検討

37℃で FeSSIF にαCD を加えて撹拌した後に、フィルターろ過を行い、ろ液中のレシチン、タウロコール酸(胆汁酸の一種)、そしてαCD 含量を分光光度計や HPLC を用いて定量し、評価した。

2. コレステロール溶解性試験

37℃で FeSSIF にαCD とコレステロールを加えて撹拌した後に、フィルターろ過を行い、ろ液中のコレステロール含量を HPLC にて定量し、評価した。

3. コレステロール溶解性に関する各種の水溶性食物繊維の比較

上記 2.と同じ試験系を利用してαCD と以下の 4 種の水溶性食物繊維のコレステロール溶解性に及ぼす影響について比較を行なった。

① 難消化性デキストリン
② グァーガム分解物
③ イヌリン
④ ポリデキストロース

なお、ポジティブコントロールとしてコレスチラミンを用いた。この薬剤は胆汁酸に対する結合能を有し、血中コレステロールを下げる働きを持つと考えられている。

4. FeSSIF の調製

FeSSIF は Vertzoni らが提案したものを用いた。ヒトの小腸液組成をベースに胆汁の成分であるレシチンやタウロコール酸がそれぞれ 3.75 mM、15 mM 加えられたものであり、調製したものは透明であった。

【結果及び考察】

1. αCD によるレシチン析出作用

αCD を 5%になるよう FeSSIF に加えて攪拌すると白色の析出物が観察された。一方、FeSSIF からレシチンを除いた溶液にαCD を 5%添加した際には析出物は生じなかった。これらの結果から、αCD 添加による析出現象はレシチンが関与していることが推察された。次に、析出物を解析するためにろ液中の各成分を分析した。その結果、レシチン含量はαCD の添加量に応じて減少することが判明した。2%以下のαCD 添加ではレシチン含量は低減しなかったが、3%のαCD 添加によって半減した。αCD を 4%添加した時、レシチンは元の FeSSIF の含量に対して 5%程度になり、5%以上のαCD 添加でレシチンは検出されなかった。一方、タウロコール酸含量はαCD の添加によって影響を受けなかった。αCD 含量について分析したところ、析出物が生じるαCD の添加条件ではその添加量に比べて低値を示し、その傾向はレシチン析出と相関が認められた。一方、FeSSIF からレシチンを除いた溶液ではαCD の添加量に関わらず、αCD 含量は減少しなかった。これらのことから、αCD の析出はレシチンに起因していると推察された。

αCD がレシチンを包接して析出している場合、αCD とレシチン析出には相関があると予想される。そこで、αCD 添加による析出現象について、ろ液中のレシチン含量とαCD 含量の経時変化について調べたところ、レシチン含量とαCD 含量は同時に低減し、この結果からレシチンとαCD は共析出していることが示唆された。3%のαCD を添加した際、レシチン含量は添加後 30 分までは直線的に減少し、その後は減少しなかった。6%のαCD 添加では添

加後 5 分後にはレシチンは検出されなかった。αCD 含量の減少とレシチン含量の減少には相関関係が見られ、3%のαCD を添加した際、αCD 含量は添加後 30 分までは直線的に減少し、その後は減少しなかった。6%のαCD 添加では添加後 5 分後にαCD 濃度は大きく低下し、その後は変化しなかった。これらの結果はレシチンとαCD が包接複合体を形成して析出している可能性を示唆している。

そこで、析出物のモル比を求めるために、それぞれの減少量から析出物中のレシチンとαCD の割合を算出した。レシチン析出量とαCD 析出量は、いずれもαCD 添加量依存的に増加し、5%以上のαCD 添加量では変化せず、析出物中のレシチンとαCD のモル比は 1:4.4 に相当することが判明した(それぞれレシチンとαCD のモル比として 1:4.3 (3%αCD)、1:4.5 (4%αCD)、1:4.4(5%αCD)、1:4.4(6%αCD))。これらの結果から、レシチン 1 分子に対してαCD が 4 分子もしくは 5 分子包接している可能性が考えられた。Schlenk らは脂肪酸の一種であるパルミチン酸 1 分子に対して 3 分子のαCD が包接することを報告していることから、脂肪酸 2 分子を持つレシチン 1 分子に対して 5 分子のαCD が包接することは十分あり得ると考えられる。

2. αCD のコレステロール溶解度低減効果

FeSSIF にコレステロールを添加し、37℃で攪拌するとコレステロールの溶解度が上昇したが、αCD を加えた場合はその添加量依存的にコレステロールの溶解度を低減させる結果が得られた。2%以下のαCD 添加ではコレステロールの溶解度は影響を受けなかったが、3%のαCD 添加によって、コレステロールの溶解度はαCD を加えていないサンプルの 30%程度であった。さらに 4%以上のαCD 添加によってコレステロールの溶解性はαCD を加えていないサンプルの 10%以下となった。αCD 添加によるコレステロール溶解度低減は、レシチン析出と傾向が一致しており、FeSSIF におけるαCD によるコレステロール溶解度低減効果はレシチンの析出効果が大きく関与していると考えられた。

3. コレステロール溶解性に関する各種の水溶性食物繊維の比較

一般に市販されており、血中脂質低減効果を持つ以下の水溶性食物繊維とαCD の FeSSIF におけるコレステロール溶解性に及ぼす影響について比較した。

まず、FeSSIF に及ぼす水溶性食物繊維の影響を調べるために、水溶性食物繊維をそれぞれ 5%となるよう FeSSIF に添加し、37℃にて攪拌したところ、前述の通りαCD は析出物を生じさせたが、他の水溶性食物繊維(難消化性デキストリン、グァーガム分解物、イヌリン、ポリデキストロース)はいずれも溶解した。なお、コレスチラミンは元々不溶性である。

次に各水溶性食物繊維を 3%または 5%添加してコレステロール溶解性試験を行なったところ、水溶性食物繊維を加えていないサンプルと比べ、αCD やグァーガム分解物、コレスチ

ラミンのみコレステロール溶解度が低減する結果が得られた。αCD 添加によるコレステロール溶解性への影響は前項と同様であったが、グァーガムでは 3%の添加では効果が見られなかったが、5%の添加で水溶性食物繊維を加えていないサンプルに対して 80%の溶解率となった。コレスチラミンでは 3%、5%いずれの添加量でも水溶性食物繊維を加えていないサンプルに対して 40%の溶解率となった。これらの結果から同一添加量あたりの比較においてはαCD が最も高いコレステロール溶解性低減効果を持つことが示された。グァーガム分解物の結果に関しては、Minekus らがグァーガム分解物はコレステロールの bioaccessibility (消化液中への溶解性などに関する性質)を下げると報告しており、本研究結果と一致している。他の水溶性食物繊維については別の作用機序によって血中脂質を低減させていることが推測された。難消化性デキストリンは水溶性食物繊維を加えていないサンプルよりもコレステロールの溶解性を微増させたが、難消化性デキストリンの脂質吸収阻害効果の作用機序についてはミセル安定化が寄与していると考察されているため、その効果によって溶解性がわずかに増加した可能性が考えられた。イヌリン及びポリデキストロースもコレステロール溶解度を低減させなかった。

【結論】

本研究により、αCD は添加量 5%という実用的な範囲内で、FeSSIF からレシチンを析出させ、その作用に伴ってコレステロールの溶解度を最大約 90%低減させることが見出された。この結果は、経口摂取したαCD が小腸管腔の胆汁酸ミセルからレシチンを析出させ、小腸液が本来持つコレステロールの溶解性を間接的に下げることによって、摂取したコレステロールの吸収量を下げている可能性を示唆している。

また、FeSSIF に及ぼす影響やコレステロール溶解性に対する影響についてαCD と他のいくつかの水溶性食物繊維を比較したところ、αCD のみレシチン析出効果を示し、同じ添加量において最も高いコレステロール溶解度低減効果を示したことから、他の水溶性食物繊維に対するαCD の特徴的な機能性が明確となった。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2583 号	氏　名	古根　隆広
論文題目 Title of Dissertation	α-シクロデキストリン経口摂取によるコレステロール吸収阻害機構に関する研究 A study on the inhibitory mechanism for cholesterol absorption by α-cyclodextrin administration		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 古屋敷智之 副　査 Vice-examiner 平井みどり 副　査 Vice-examiner 平田健一		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【目的】

α - シクロデキストリン(αCD)はグルコースが 6 分子環状に連なった構造をしており、外側が親水性を、内側が疎水性を示し、その空洞内に疎水性物質を取り込む包接能を持つ。

αCD は水溶性食物繊維として利用されており、体重減少、血中の総コレステロールや LDL - コレステロール低減など様々な機能性を有することが報告されているが、血中コレステロール低減の作用機序については未だ明らかにされていない。そこで、αCD 摂取による血中コレステロール低減効果メカニズムの解明を目的として本研究を行った。

αCD は食物繊維であり、体内に吸収されないため、小腸管腔で機能を発揮していると考えられた。摂取されたコレステロールは通常、腸管内で胆汁酸ミセルによって小腸液に溶解することで吸収が促されている。胆汁酸ミセルはレシチンや胆汁酸などによって形成されており、コレステロールの可溶化に重要な役割を果たしている。

いくつかの食物繊維は血中コレステロール低減効果を持っていると報告されているが、その作用機序としては食物繊維が胆汁酸に吸着することによってコレステロールの可溶化が阻害されているのではないかと推測されている。しかしながら、αCD はその空洞がコレステロールや胆汁酸の構造に対して小さいため、これらの分子を包接しづらい。そのため、αCD においては胆汁酸やコレステロールが作用機序に関与しているとは考えにくい。一方、αCD は赤血球膜からレシチンを放出させることが報告されている。

そこで、古根らは αCD が胆汁酸ミセル中のレシチンを包接することによって胆汁酸ミセルの形成を阻害し、コレステロールの溶解度を下げるのではないかとの仮説を立て、ヒトの食後の小腸液を模した人工腸液(Fed State Simulated Intestinal Fluids: FeSSIF)を用いて、αCD とレシチンとの相互作用やコレステロール溶解性に及ぼす αCD の影響、他の水溶性食物繊維との違いについて調べた。

【方法】

FeSSIF は Vertzoni らの報告に従って調製した。αCD とレシチンの相互作用に関する検討については、FeSSIF に αCD を加えて 37℃で攪拌し、攪拌後に目視やろ過後のろ液に含まれる各成分を分析することによって評価した。FeSSIF へのコレステロール溶解性に及ぼす αCD の影響については、37℃で FeSSIF に αCD とコレステロールを加えて撹拌した後に、フィルターろ過を行い、ろ液中のコレステロール含量を定量し評価した。また、コレステロール溶解性に関して、4 種の水溶性食物繊維(難消化性デキストリン、グァーガム分解物、イヌリン、ポリデキストロース)と αCD を比較した。その際、胆汁酸結合能を有するコレスチラミンをポジティブコントロールとした。

【結果】

1. αCD は添加量依存的に FeSSIF に溶解しているレシチンを析出させた。
2. レシチンと αCD は共析出したことから、これらの分子が包接体を形成する可能性が示唆された。そのレシチンと αCD のモル比は 1:4 もしくは 1:5 であった。
3. αCD は添加量依存的に FeSSIF におけるコレステロールの溶解度を低減させた。
4. αCD 添加によるコレステロール溶解度の低減は、レシチン析出と傾向が一致していたことから、本現象にはレシチンの析出が大きく関与していると考えられた。

5. 4種の水溶性食物繊維のFeSSIFに対する影響について調べた結果、いずれも析出物を生じなかった。
6. 各水溶性食物繊維を用いてコレステロール溶解性試験を行なったところ、水溶性食物繊維を加えていない実験系に比べ、αCDやグァーガム分解物、コレスチラミン添加した系においてコレステロール溶解度が低減し、5種の水溶性食物繊維の中でαCDが最も高い低減効果(5%添加時にPHGGの約5.9倍、CSAの約1.7倍)を示した。

【結論】

本研究により、αCDは胆汁酸ミセルのレシチンを析出させることによって、コレステロールの溶解度を間接的に低減させる機構を持つことが明らかになった。このことは、経口摂取したαCDが小腸管腔の胆汁酸ミセルからレシチンを析出させ、小腸液が本来持つコレステロールの溶解性を間接的に下げることによって、摂取したコレステロールの吸収量を下げる可能性を示唆している。

また、FeSSIFに及ぼす影響やコレステロール溶解性に対する影響についてαCDと他のいくつかの水溶性食物繊維を比較したところ、αCDのみがレシチン析出効果を示し、同じ添加量において最も優れたコレステロール溶解度低減効果を示したことから、他の水溶性食物繊維に対するαCDの特徴的な機能性が明確となった。

以上、本研究は、水溶性食物繊維であるαCDについて、胆汁酸ミセルとの相互作用やコレステロール溶解性低減効果について検討し、αCDが有する血中コレステロール低減効果の作用機序並びに他の水溶性食物繊維との相違点を明らかにしたものであり、ヒトの腸管内でαCDがどのようにコレステロールの吸収を阻害し、それによって血中コレステロールを低減するかを理解する上で重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。