研究ノート

大豆ステロール摂取がラットの中性ステロール 体内レベルと排泄に及ぼす影響

片 桐 充 昭, 清 水 純 夫
飯田女子短期大学家政学科

Effects of Dietary Soysterol Intake on Neutral Sterol Level in Liver, Serum and Feces of Rats

Mitsuaki Katagiri and Sumio Shimizu
Department of Domestic Science, Iida Women's College

This study deals with the metabolism of dietary soysterol in the liver, serum and fece of rats. Three kinds of experimental diets ; a standard diet (S), a diet containing 1% cholesterol (C), and a diet containing 3% soysterol (mixture of campesterol and β -sitosterol, 35 : 57) and 1% cholesterol (P) were given to rats (five males per group) for seven days respectively. The rats were sacrificed on Day 7. In another experiment, rats were fed the P diet for the first seven days and then switched to the S diet for another seven days. Sterols in serum, liver and feces were determined by the gas chromatography-mass spectrometry method. The retention times of the gas chromatogram of feces after seven days revealed the presence of six principal sterols, three of which were identified as cholesterol, campesterol and β -sitosterol. The unknowns were found to be dihydro-compounds derived from the former sterols, namely coprostanol, campestanol and sitostanol by the GC-MS method. Dietary soysterols inhibited serum and liver cholestrol in the P group. Significant difference was not observed between the sum of fecal four sterols (campesterol, campestanol, β -sitosterol and sitostanol) and the sum of dietary campesterol and β -sitosterol. Selective absorption of campesterol by the liver and serum was observed as the dietary ratio of campesterol to β -sitosterol (0.6) changed in the liver (3.7) and in serum (2.3).

Jpn. J. Nutr., 51 (3) 149~157 (1993)

は じ め に

筆者らはこれまでに大豆加工食品の食品学的研究を行ってきた¹⁻⁴⁾が、更に、生理的に重要な成分の1つである大豆ステロールについて、直接ケン化-GLC法により多種類の豆類のステロール別含量を検討した³⁾。不ケン化物である大豆ステロールは、シトステロール (Sitosterol) 57%, カンベステロール (Campesterol) を35%含んでいる。このうち、シトステロールが血清コレステロール量の減少作用を示すことについては多くの研究がある⁵⁻⁷⁾。これらのステロールの分析は、古くより不ケン化成分として定量されてきた。この方法は比色法等により行われており、微量の生体試料を多数の成分に分けて分析するには種々の困難を伴っていた。近年は、直接ケン化法にガスクロマトグラフィー (GLC) を併用 (直接ケン化-GLC法) することにより、多数の試料分析を迅速化することが可能となった。酵素法・比色法等に比較し、GLCによる定量法の有効性は既に認められている⁸⁻¹²⁾。

Key words : dietary soysterol, serum cholestrol, liver cholesterol, neutral sterol, excretion of sterol
大豆ステロール, 血清コレステロール, 肝コレステロール, 中性ステロール, ステロールの排泄

Table 1 Composition of diets

(%)

Constituents	Standard diet (S)	Cholesterol diet (C)	Test diet (P)
Casein	22	22	22
Lard	10	10	10
Soybean oil ^a	1	1	1
Salt mixture ^b	4	4	4
Vitamin mixture ^b	0.85	0.85	0.85
Choline chloride	0.15	0.15	0.15
Cholesterol	0	1	1
Bile salts ^c	0	0.25	0.25
Soysterols ^d	0	0	3
Sucrose	62	60.75	57.75

^a Mixed with vitamin A (3,000 IU), vitamin D (300 IU) and tocopherol (100 mg/kg).

^b This was identical with that of Harper's mixture.

^c Bacto-oxygall prepared at Difco Laboratories.

^d Soysterols containing from 35% campesterol and 57% sitosterol.

本報では、ラットに大豆ステロールを投与し、血清、肝臓、消化管内容物及び糞中の中性ステロールについて、直接ケン化-GLC法にGC-MSを併用して、各ステロール成分の同定及びそれらの2週間にわたる経日変化を調べ、次のようないくつかの興味ある知見を得たのでその詳細を報告する。すなわち、① 大豆ステロール（カンベステロールとシトステロールの混合物）がラット血清コレステロールを低下させる効果の再確認、② 肝臓及び血清への中性ステロールの貯留変化、③ 糞中に排泄される中性ステロール並びにそれらのジヒドロ体であるコプロスタノール（Coprostanol）、シトスタノール（Sitostanol）¹³⁾の他、新たなジヒドロ体であるカンベスタノール（Campestanol）の確認等である。

実 験 方 法

1. 供試ラット及び飼料組成

SD系雄ラット（日本生物材料センター）4週齢のものを5日間予備飼育し、15頭（体重115±11g）を3群（各群5頭）に分け、Table 1に示した3種の飼料（S：基本飼料、C：S飼料にコレステロール1%添加、P：C飼料に大豆ステロール3%添加）により飼育した。

本実験で飼料に添加した大豆ステロールは、シトステロールとカンベステロールを、それぞれ57%、35%含有するもの（東京化成工業社製）を用いた。

2. ラット飼育条件と分析試料

次のⅠ及びⅡの2通りの条件でそれぞれ飼育し、分析に供した。

(1) 飼育条件Ⅰによる飼育（1週間飼育）

S、C及びPの3種の飼料で7日間飼育した。飼料投与量は20g/日/頭とし、残存量との差を摂取量とした。また、水は自由に摂取させた。

(2) 飼育条件Ⅱによる飼育（2週間飼育）

P飼料で7日間飼育した後、S飼料に切り替えて、更に7日間飼育し、その間に排泄した糞を経時的に採取してステロール類を分析した。飼料投与及び給水その他の条件は、飼育条件Ⅰと同様にした。

(3) 分析試料（血清，肝臓，消化管内容物，糞）の採取

生体試料は，ラットをエチルエーテルで麻酔し，開腹後ただちに心臓より採血して血清を分離し，同時に肝臓及び食道から直腸までの消化管を摘出した。消化管を切開し，内容物を採取した。また，糞は毎日採取した。各試料は凍結（ -30°C ）して保存し，適時分析に供した。

3. 中性ステロール類の分析

(1) 試料の分析条件（直接ケン化-GLC法）

ラットの生体試料及び糞中ステロール類の分析には，試料の直接ケン化とGLCを組み合わせた方法（直接ケン化-GLC法）を用いた。今回は次のケン化条件で実施した。すなわち，ウルトラホモジナイザーで均一化した試料0.5g前後を精秤し，90% KOH 1ml及びエチルアルコール 12mlを加え，60分間， 90°C で加熱ケン化し，エチルエーテル及びヘキサンで不ケン化物を抽出し，2.0mlに定容とした後，GLC試料とした。

GLC分析条件は，次のとおりである。

装置：本体は日立263-70型（検出器 FID），データ処理装置は日立833データ処理装置

カラム：5%SE-30Uniport HP, 60~80 mesh, 3mm (i.d.) $\times$ 3m ガラスカラム

注入・検出器温度： 280°C

窒素ガス（キャリアー）流量：35ml/min

カラム温度： 250°C

(2) ステロールの定量

ガスクロマトグラムの結果をデータプロセッサ（日立263-70型）にて処理し，得られたピーク面積値（AREA値）を用い，検量線（Fig.1）により定量した。なお，コレスタノール，シトスタノール，カンペスタノールは，それぞれの炭素数の同一の前述ステロールの検量線を用い，計算した。

(3) 中性ステロール類のGC-MSによる分析

Fig. 1 Calibration curve of sterols from direct saponification-GLC method

Fig. 2 Gas chromatogram of sterols and their dihydro-compounds in feces of rats (Column, Silicone SE-30 Uniport HP; Temp. programmed: 250°C , FID)

本実験で用いた大豆ステロール、コレステロール及び糞中排泄ステロールを直接ケン化-GLC法で分離定量したが、この方法を用いた時の分離ピークの単一性及び成分の同定を保持時間 (Rt), 標品添加実験に併せてGC-MSによって確認した。その条件は、次のとおりである。

装 置：日立GC-MS, M-80B

カラム：FFS, BondedOV-1, 45m×0.25mmID

カラム温度：250°C

キャリアーガス：ヘリウム (30ml/min)

イオン源温度：180°C

イオン化電圧：70eV

(4) 統計処理

測定結果は、平均値±標準偏差 (M±SD) で示し、差の検定は、Mann-Whitney法によって行った^{13,14)}。

結果及び考察

本実験の操作は次のように行った。

直接ケン化-GLC法によるラット組織と糞などの中性ステロール分析、GC-MSによる分子構造の確認、次いで同法を用いて飼料の大豆ステロールがラットの血清、肝臓の中性ステロール類に与える影響、更に糞中に排泄されたステロール類の変動を調べたものである。結果及び考察を以上の順に述べる。

1. ステロールの分析精度と同定

標品 (コレステロール, カンベステロール, シトステロール) を用い、回収試験並びに試料への標品添加試験を試みたところ、前記3種のステロールの回収率 (5回平均) はコレステロール 98.6%, カンベステロール 98.6% 及びシトステロール 98.4% であり、ステロール別回収率の差はほとんど認められなかった。

2. 糞不ケン化物のガスクロマトグラム分析

飼育条件Ⅱの2週間飼育における8日目の糞からケン化抽出したステ

Fig. 3 GC-MS of Peaks a~f (Fig. 2)

ロール類のガスクロマトグラムをFig.2に示した。チャート上に主要ピーク6個 (a, b, c, d, e, f) が認められた。

Fig.2のb, d, fは、標準品のRtと比較し、bはコレステロール、dはカンベステロール、fはシトステロールのRtとそれぞれ一致した。更に、GC-MS (Fig.3)によりピークb, d, fのM⁺はそれぞれ386, 400, 414であることを確認した。

3. 中性ステロール及びジヒドロステロール類の確認¹⁵⁻¹⁷⁾

Fig.3から、残りのピークa, c, eについて、aはb (コレステロール: M⁺=386)+2=388, cはd (カンベステロール: M⁺=400)+2=402, eはf (シトステロール: M⁺=414)+2=416であることを確かめた。また、ピークb, d, fは共通のフラグメントイオン213 [M- (side chain + 42 + HOH)] を示し、更にa, c, eに共通のフラグメントイオン

Table 2 Body weight, intake of diets and excretion of sterols

Group	Final body weight (g)	Body weight gain (g/7 days)	Intake of diets (g/7 days)	Sterols	Intake of sterols (mg/7 days)	Sterols in feces (mg/7 days)	Contents in digestive tract (mg/organ)		E ₁ + E ₂ (mg)
							E ₁	E ₂	
S (n=5)	131±10	16±2.0	62±3.0	Cholesterol	0±0.0	2±0.3	0±0.2	0±0.2	2±0.2
				Coprostanol		2±0.1	1±0.1	1±0.1	3±0.1
				Campesterol	1±0.1	1±0.1	1±0.2	1±0.2	2±0.2
				Campestanol		1±0.2	0±0.1	0±0.1	1±0.1
				Sitosterol	2±0.2	2±0.2	1±0.3	1±0.3	3±0.3
				Sitostanol		1±0.3	1±0.1	1±0.1	2±0.2
C (n=5)	132±12	17±2.2	54±4.4	Cholesterol	409±34	57±11.1	61±5.1	61±5.1	118±10.6
				Coprostanol		14±3.0	10±4.0	10±4.0	24±3.6
				Campesterol	1±0.2	1±0.1	0±0.1	0±0.1	1±0.1
				Campestanol		0±0.1	1±0.1	1±0.1	1±0.1
				Sitosterol	2±0.1	1±0.1	1±0.1	1±0.1	2±0.1
				Sitostanol		1±0.1	1±0.2	1±0.2	2±0.1
P (n=5)	143±16	28±3.6	84±6.0	Cholesterol	756±54.1 ^a	640±67.2	119±12.5	119±12.5	759±81.0 ^b
				Coprostanol		96±10.3	2±0.3	2±0.3	98±10.2
				Campesterol	793±55.6 ^c	534±57.1	89±12.1	89±12.1	623±68.2 ^a
				Campestanol		91±12.2	3±1.1	3±1.1	94±13.3
				Sitosterol	1,297±93.2 ^e	953±89.6	66±17.8	66±17.8	1,019±107.4 ^f
				Sitostanol		137±12.7	5±0.7	5±0.7	142±14.1

^{a-f} Significant difference was not observed among ^a and ^{b,c} and ^{d,e} and ^f (*p* < 0.05).

* Significant difference was not observed among initial body weights of each group (115±11g) (*p* < 0.05).

Table 3 Effect of dietary soysterols on serum and liver sterol levels (M ± SD)

Group	Serum (mg/100ml)			Liver (mg/100g)		
	Cholesterol	Campesterol	Sitosterol	Cholesterol	Campesterol	Sitosterol
S (n=5)	83±4.1 ^a	±	±	356±25 ^d	±	±
C (n=5)	229±14 ^b	±	±	1,578±95 ^e	±	±
P (n=5)	118±9.4 ^c	9±0.7	4±0.3	752±75 ^f	33±3.2	9±0.9

^{a-c} Significantly different among each group of a, b, c (*p* < 0.05).

^{d-f} Significantly different among each group of d, e, f (*p* < 0.05).

± : trace

Fig. 4 Changes of sterols in excreted feces.

* Switched point from Diet P to Diet S.

215が認められた。215-213=2, すなわちステロイド環内 (B環) のC5, C6位の二重結合が水素化されたものであると考えられた。

aはNTH¹⁵⁾の標準コプロスタノールに一致することによりコプロスタノールと確認し, cはカンベステロールのジヒドロ体であるカンベスタノール, eはシトステロールのジヒドロ体であるシトスタノールと確認した。

4. 1週間飼育における体重変化及びステロール類の出納

大豆ステロール及びコレステロールを飼料に添加し, 7日間投与した時の結果は次のとおりであった。

(1) 飼料摂取量及び体重

7日間 (飼育条件I) 各試験飼料で飼育したところ, 体重増加量はS群 16g, C群 17g, P群 28gであり, P群で増加量が大きかった (Table 2)。これは, 飼料摂取量によるものと考えられた。また, 表には掲げていないが, 飼育開始後3日間は概して飼料摂取量 (平均S群 6.0, C群 7.1, P群 11.8g/日/頭) が少なく, 体重増

加量（平均S群 0.6g/日/頭，C群 1.1g/日/頭，P群 1.6g/日/頭）も少なかった。以後，急速に飼料摂取量，体重ともに増加した。

(2) 大豆ステロールと中性ステロールの出納

ステロール類の摂取量及び排泄量（Table 2）：7日間の総コレステロール摂取量は，C群で400mg/頭程度であったが，これに比べP群では750mg/頭程度と多かった。これは飼料摂取量に伴う差であるが，大豆ステロール添加によって，摂取量が多くなったことは注目される。また，それぞれの摂取ステロールと糞及び消化管内容物に存在するステロールとそのジヒドロ体の合計量の間には差は認められなかった。

血清及び肝臓の中性ステロール類：P飼料を7日間投与した時の血清及び肝コレステロール濃度をTable 3に示した。血清コレステロール濃度はS群で83mg/100ml，コレステロール添加のC群は229mg/100mlであるのに対して，大豆ステロール添加のP群は118mg/100mlと，C群に比べてほぼ半量であり，明らかに上昇抑制効果が認められた。また，肝臓のコレステロール量に対しても同傾向が認められ，血清コレステロール低下に伴って肝臓コレステロール貯留量も低下する関係がみられた。

血清大豆ステロール濃度は，試験飼料飼育のP群ではカンベステロールがシトステロールより高値を示した（Table 3）。そこで，カンベステロール/シトステロール比（Camp./Sito.比）を求めると，P群は2.3を示した。また，肝臓では3.7であった。飼料のCamp./Sito.比は $35/57=0.61$ であることから，明らかにカンベステロールはシトステロールより吸収，貯留されやすいと考えられた。また，カンベステロールとシトステロールの生体への吸収，保留，排泄の点から考慮すると，消化管でのシトステロール吸収は飼料中の濃度がカンベステロールよりも高いにもかかわらず，血清中の濃度はカンベステロールより低値であった。すなわち，シトステロールはカンベステロールより吸収されにくく，肝臓への貯留も少なく，排泄されやすいと推定できる。

これらの結果は直接ケン化-GLC法によったものであるが，小腸粘膜はステロールのごくわずかな構造の違いを見分けるのではないかとする説明を支持し¹⁸⁾，更に従来¹⁹⁾とも同傾向であった。

(3) 糞中の中性ステロール類とそのジヒドロ体

摂取したステロール類は，一部は消化管内で微生物変化を受けてジヒドロ体として，一部は未消化で通過し，糞中に現れた。P群の糞中に排泄されたステロール類は，飼育7日間の合計量でラット腸内で計算上約13%がジヒドロ化されたことになった。また，飼育7日目の解剖時の消化管内のジヒドロ化合物は僅少であった（Table 2）。

また，ステロール類の摂取量と，糞中に排泄されたカンベステロール，シトステロール及びそれぞれのジヒドロステロール類の合計値との間には有意な差は認められなかった。

5. 2週間飼育における糞中ステロール類の変動

P飼料で7日間飼育後，S飼料に切り換えて更に7日間飼育した時のラット糞中の中性ステロール類の分析結果を，経時的及びステロール別にFig.4に示した。飼育3日目前後までは飼料摂取量が少なく，それに伴って糞排泄量も少なく，結果的に糞中ステロール排泄も少なかったが，4日目以後増加した。全体からみると，ステロールはラット消化管内などで一部ジヒドロ化されること（実験期間の14日間合計で約17%），ステロール摂取量が多くなるとジヒドロ化率が低下すること（7日目約3%）が判明し，この比率は大豆ステロールの成分間で差はなかった。また，S飼料に切り換えた8日目以降14日目までの7日間の合計ジヒドロ化率は約30%で，P飼料を投与した1日目から7日目までの約13%に比べ2倍以上であった。また，飼育最終日（14日目）の糞中ステロールのジヒドロ化率は，コレステロール 45%，カンベステロール 39%，シトステロール

45%を示した。そしてP飼料からS飼料に変わっても、数日間腸内残存ステロールは日ごとに減少しながら、ジヒドロ化率は上昇しつつ排泄されたものと考えられた。直接ケン化-GLC法を用いた糞中のジヒドロステロールとして中川ら²⁰⁾によってコプロスタノールが分析され、また、池田らはシトスタノールの糞中の存在を明らかにしている¹³⁾。本実験ではコプロスタノール、シトスタノールに加えて新たにカンベステロールがラット腸内で一部ジヒドロ化され、カンベスタノールとして糞中へ排泄されることを認めた。

要 約

大豆ステロールをラットに投与し、血清、肝臓におけるステロール量及び排泄量への影響に加えて、ラット消化管でのステロールのジヒドロ化についても調べた。

- 1) ラット生体試料及び糞中のステロール分析は試料の直接ケン化と非誘導体のままガスクロマトグラフィーを行う分析法を併用した簡易迅速な方法によって測定した。
- 2) 糞中ステロールの中に、大豆ステロール成分の1つであるシトステロールがジヒドロ化されたシトスタノールの他、新たにカンベステロールのジヒドロ体であるカンベスタノールが排泄されることを確認した。
- 3) 大豆ステロールは、血清と肝コレステロールの蓄積を阻止した。また、それぞれの摂取ステロール量と糞及び消化管内容物に存在する中性ステロールとそのジヒドロ体の合計量との間には、有意差は認められなかった。
- 4) 基本飼料に3%大豆ステロール（カンベステロール35%、シトステロール57%の混合物）と1%コレステロールを添加した飼料をラットに7日間与え、その後標準飼料に切り換えて7日間飼育した時、糞中に排泄された総ステロール類に対するジヒドロステロール量比は前期で約17%であり、また各ステロール成分間によるジヒドロ化率の相違は小さかった。
- 5) カンベステロール/シトステロール比は、飼料の大豆ステロールにおける同比0.61 (35/57) に対し、血清 2.3 (9/4)、肝臓 3.7 (33/9) と変化した。すなわち血清、肝臓では両ステロール比が大豆ステロールのそれに対し増加し、カンベステロールはシトステロールより吸収、保留されやすいことが判明した。

*

本研究に当たり、ご指導を賜りました東京農業大学教授 鴨居郁三博士、長谷川忠男博士、並びに国立健康・栄養研究所 辻 啓介博士に、またGC-MS測定にご協力いただきました長岡香料(株) 仁井皓迪博士に深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 片桐充昭, 清水純夫, 貝原弘道: みそのエステル型脂肪酸, 遊離脂肪酸および有機酸の抽出とガスクロマトグラフィー, 農化, **60**, 385~387 (1989)
- 2) 片桐充昭, 清水純夫: 各種みそ中のガスクロマトグラフィーによるエステル型脂肪酸, 遊離脂肪酸および有機酸の定量, 日食工誌, **33**, 667~673 (1986)
- 3) 片桐充昭, 清水純夫, 貝原弘道, 片桐千代: ガスクロマトグラフィーによる各種納豆の脂肪酸および有機酸の成分含量, 日食工誌, **34**, 305~308 (1987)
- 4) 片桐充昭, 清水純夫: もやし(大豆, グリーングラム, ブラックグラム)の二酸化炭素ガス処理によるγ-アミノ酪酸含量変化, 日食工誌, **36**, 916~919 (1989)
- 5) 保井明子, 金田尚志: 植物ステロールの白ネズミ血漿コレステロール低下作用におよぼすトコフェロー

- ルの効果, 栄養と食糧, **26**, 25~32 (1973)
- 6) 木田芳隆, 池田郁男, 菅野道広, 山本統彦: ヒトおよび実験動物の血清リポたん白質中の植物ステロールの分布, 栄養と食糧, **32**, 369~376 (1979)
- 7) Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G. V. and Gallo, L. L.: Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols, *J. Lipid Research*, **29**, 1573~1582 (1988)
- 8) 中川靖枝, 辻 啓介, 岩尾裕之, 辻 悦子, 鈴木慎次郎: 酵素法, 比色法, ガスクロマトグラフ法によるコレステロール定量法の比較, 栄養と食糧, **32**, 389~395 (1979)
- 9) 日高公雄, 吉田宏三, 井崎やえ子, 戸田和子: 食品中のビタミンE, コレステロール, 脂肪酸含有量調査および一日摂取量の推定, 栄養と食糧, **39**, 308~320 (1986)
- 10) 貝原弘道, 片桐充昭, 片桐千代: 豆類のステロール組成, 飯田女子短期大学紀要, 第9集, 32~38 (1988)
- 11) Tsui, I. C.: Rapid determination of total cholesterol in homogenized milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 421~424 (1989)
- 12) Schwadorf, K. and Müller, H. M.: Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 457~462 (1989)
- 13) Ikeda, I. and Sugano, M.: Comparison of absorption and metabolism of β -sitosterol and β -sitostanol in rats, *Atherosclerosis*, **30**, 227~237 (1978)
- 14) 市原清志: バイオサイエンスの統計学, p.90 (1991) 南江堂, 東京
- 15) EPA/NIH MASS SPECTRAL DATA BASE, p.3031 (1983)
- 16) 日本生化学会編: 生化学データブック, p.102 (1979) 東京化学同人, 東京
- 17) 藤野安彦: 脂質分析法入門, p.214 (1980) 学会出版センター, 東京
- 18) Subbiah, M. T., Kottke, B. A. and Carlo, I. A.: Uptake of campesterol in pigeon intestine, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 643~646 (1971)
- 19) Konalande, J. E. and Fisher, H.: Evidence for a nonabsorptive antihypercholesterolemic action of phytosterols in the chicken, *J. Nutr.*, **98**, 435 (1969)
- 20) 中川靖枝, 辻 啓介, 岩尾裕之, 辻 悦子, 鈴木慎次郎: ショ糖とコレステロール代謝に関する研究—第3報—高コレステロール飼料摂取ラットの血清高密度リポたん白質コレステロール値並びに糞中への中性ステロール排泄量に及ぼす影響, 栄養学雑誌, **39**, 115~121 (1981)

(受付: 平成4年7月22日)