【原著】

乳酸菌(EF 2001)の抗高脂血症に対する研究

具　然和[1,2]、糸川由佳[1]、高木康之[1]、前中俊宏[1]、山下剛範[1]、大嶋正己[1]、
長谷川武夫[1]、鈴木郁功[1]、岩佐正弘[3]、岩佐広行[3]、小林和雅[3]、石田寅夫[1,2]

[1] 鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科
[2] 鈴鹿医療科学大学 Hi-tech 研究所
[3] 日本 BRM 研究所

(受付：平成19年6月26日)
(受理：平成19年8月23日)

要　旨

自覚症状がない高脂血症は、血液中の脂質（脂肪)、特にコレステロールと中性脂肪（トリグリセライド）が増えた状態のことをいう。高脂血症は症状が全くない。高脂血症は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病に比べ、怖い病気という人が少なく、わからないという人も多いという結果が出ている。本研究では、高脂血症モデルマウスを用いて、*EF2001*（2001 strains of *Enterococcus faecalis*）の高脂血症に対する効果を研究した。総コレステロールの測定結果については Control 群に比べ EF2001 投与群の総コレステロール値は EF2001 の 250 mg/kg 投与群および 400 mg/kg 投与群で 2 週間後、6 週間後、7 週間後に有意の低下が見られた。また、トリグリセライドの測定結果については Control 群に比べ EF2001 の 250 mg/kg 投与群で 2 週間後、3 週間後、5 週間後に有意の低下が見られた。また、Control 群に比べ EF2001 の 400 mg/kg 投与群においても 2 週間後、3 週間後、5 週間後に有意の低下が見られた。したがって、高脂血症は、EF2001 の有効成分である β-グルカンにより、ホルモンが分泌され、細胞の turn over が上昇し、ヘパリン・リポタンパク質因子の低下を含む特異代謝が関与されたと考えられる。また、糖尿病、糖尿病境界型、肥満人における新陳代謝を促す可能性がある。

キーワード：EF2001、高脂血症、コレステロール、トリグリセライド

緒　言

タンパク質と脂質を主成分とする生体膜は、エネルギーの産生、刺激の伝達、細胞間相互作用、分泌など多彩な生命機能が営まれる場であり、生体膜の研究は、生命現象の解明と医療の向上のために不可欠なものとなりつつある。特に、様々な生体膜の機能発現に際し、膜脂質の示す重要な役割が、近年、急速に明らかにされ、膜脂質研究はライフサイエンスの中心課題の一つとして大いに注目され始めたところである。しかし、生体膜がいろいろな種類の脂質分子種から構成され、かつ超分子構造体であることなどの理由により、遺伝子や蛋白質など他の生体分子に比較すると膜脂質機能の分子レベルでの研究は未だ解決すべき問題点が多く、この研究分野のさらなる発展が求められている現状にある。脂質が関わる肥満や心疾患などの成人病のみならず、脂質代謝が関わる遺伝病も数々発見されてきており、膜脂質疾患の病因解明、治療、予防法の開発は 21 世紀に向けて国民の健康の保持・増進のために極めて重要である。このような背景をふまえて、本研究では、脂質シグナリング系を制御する有用な新規生理活性薬物を開発し、肥満、心疾患などの脂質代謝が関わる

膜脂質疾患の病因解明と予防・治療法の基盤を確立することを目標に研究を展開してきた。高脂血症は自覚症がでた時には、すでに心臓や脳または下肢の動脈硬化が進み、突然、脳梗塞のような脳動脈疾患や狭心症、心筋梗塞などの冠動脈疾患を引き起こすため、高血圧と同様にサイレント・キラーとも呼ばれている怖い病気である。従って、本研究では、*EF2001*（2001 strains of *Enterococcus faecalis*）を用いて高脂血症のモデルマウスを用いて抗高脂血症効果について調べ、医療への応用・発展の可能性を検討した。

研究方法

実験動物に HcB-19/Dem（HcB-19）マウスを用い、22±3 ℃、湿度 60-70% の状況下で、飼料および水は自由摂取とし、1 週間の予備飼育後、1 群（Control 群）、2 群（*EF2001* 250 mg/kg 与群）、3 群（*EF2001* 400 mg/kg 投与群）とした。血漿中のトリグリセリド、コレステロール量を測定した。過剰トリグリセリドのリポプロテイン、過剰コレステロールのプラズマ・アポリポ蛋白 B を測定した。

ICR マウスの 5 週齢の雄を各群 10 匹使い、実験群は Control 群（蒸留水投与）、*EF2001* の 250 mg/kg 投与群、*EF2001* の 400 mg/kg 投与群、Normal 蒸留水投与群と計 4 群にした。飼育条件については、ICR マウス 5 週齢 雄を用い、Conventional な条件（22±3 ℃、湿度 60%）で、7 時から 12 時間の明暗サイクルとし、一定の飼料および水（上水道）は自由摂取とし、1 ヶ月間の予備飼育をした。マウスに与えた飼料は高脂血症モデルマウスを作るために、マウス・ラット・ハムスター用 CLEA Rodent Diet Quick Fat（日本クレア）を 1 ヶ月与えた。また、対象群としてマウス・ラット・ハムスター飼育繁殖型 CE-2（日本クレア）をマウスに与えた。

和光純薬工業（株）の測定キットコレステロール E テストワコーおよびトリグリセライド E テストワコーを使用して吸光度測定をすることにより、総コレステロール量とトリグリセリド量を測定し、対象群と比較して高脂血症モデルマウスであることを確認後、Control 群、*EF2001* 250 mg/kg 投与群、*EF2001* 400 mg/kg 投与群、Normal（対象）群とした。採血前に 12 時間の絶食を行い、空腹状態で眼底採血により採血し遠心分離後、血清を取り出し、その血清より、総コレステロール、トリグリセライド量を測定した。測定方法はそれぞれのプロトコールにのっとって行った。

EF2001 は、(株) 日本ベルムから提供された。研究結果の統計処理法は、平均値 ± 標準誤差で表し、一次検定として Control に対して各試験群の評価を *ANOVA* 検定により行い、その後有意差のあるものに対して二次検定として *Fisher* 検定を実行し、Control と各試験群との比較を行った。

研究結果

総コレステロールの測定結果を Fig.1. に示した。総コレステロールの測定結果については Control 群に比べ EF2001 投与群の総コレステロール値は EF2001 の 250 mg/kg 投与群および 400 mg/kg 投与群で 2 週間後、6 週間後、7 週間後に有意の低下が見られた。

トリグリセライドの測定結果を Fig.2. に示した。Control 群に比べ *EF2001* 250 mg/kg 投与群で 2 週間後、3 週間後、5 週間後に有意の低下が見られた。また、Control 群に比べ *EF2001* 400 mg/kg 投与群で 2 週間後、3 週間後、5 週間後に有意の低下が見られた。

考　察

本研究において *EF2001* 投与後、コレステロールの結果については有意の低下が見られた。また、トリグリセライドの測定結果については Control 群に比べ *EF2001* の投与群で有意な低下も見られ、投与量の依存性も認められた。これは、*EF2001* の有効成分である β-グルカンにより、免疫系や神経系統の機能発現において生理活性脂質の制御に対し、重要な役割を果たすものと考えられる[1]。

また、*EF2001* の有効成分により、生理活性脂質の受容体に働きかけるものと思われる[1]。

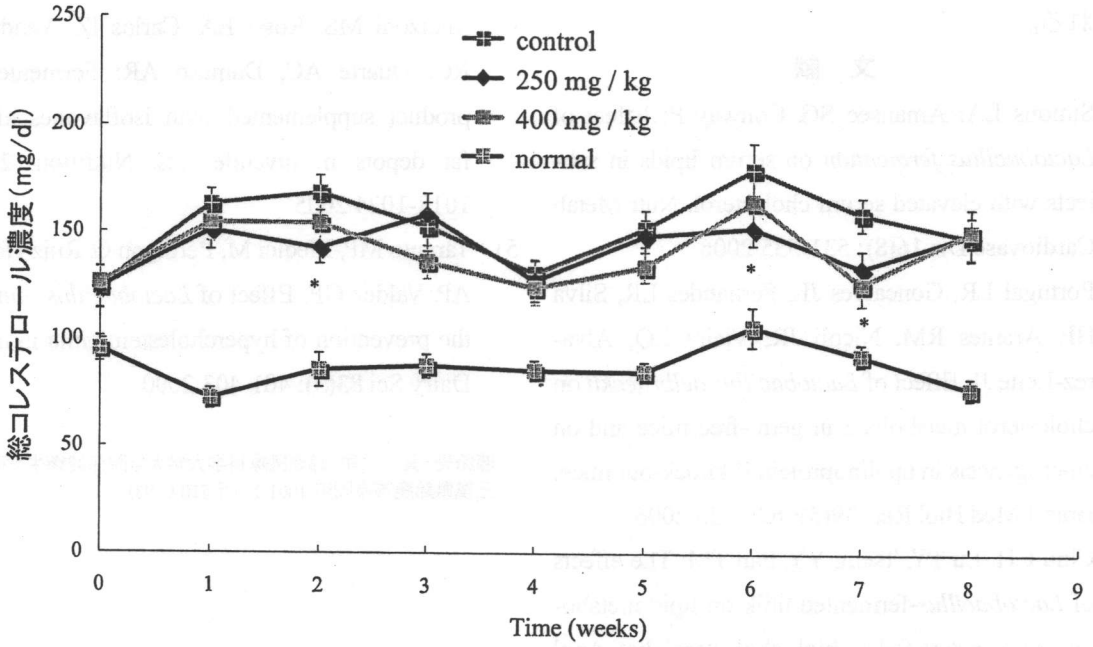

Fig.1. 総コレステロール濃度

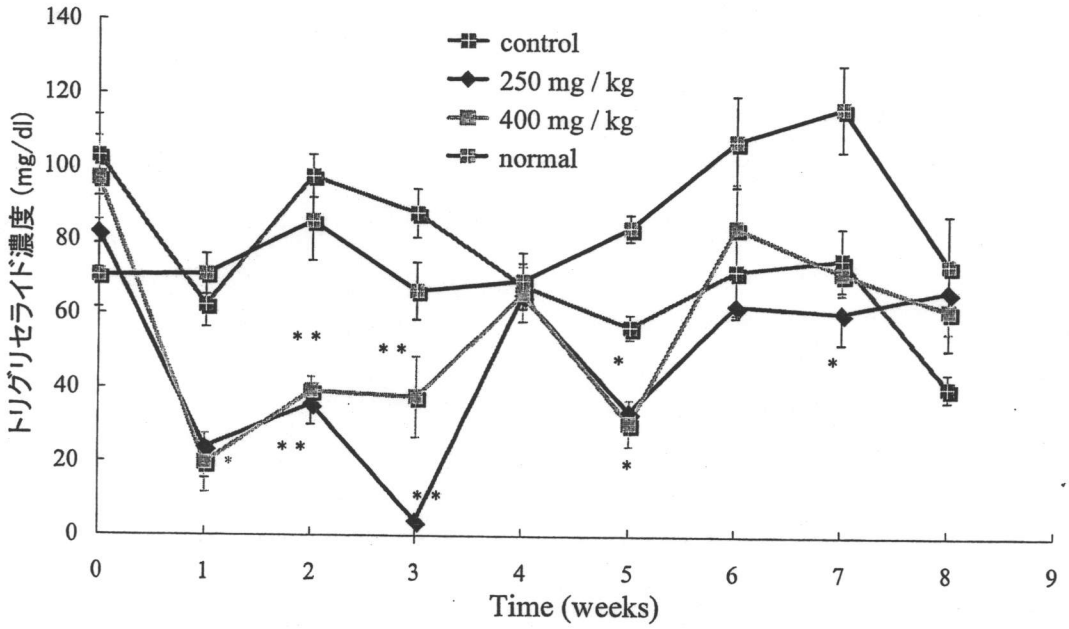

Fig.2. トリグリセライド濃度

さらに、脂質と蛋白質の相互作用により、リン脂質分子を特異的に認識し、トリパノソーマの細胞表面を覆う GPI（グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー）蛋白質の GPI 部分に合成され、脂肪分解および蓄積を防止されるものと考えられる [2]。また、*EF2001* の有効成分は、高脂血症に対する n-3 系脂肪酸の予防効果により、高脂血症の予防に役に立つものと考えられる [3]。さらに、*EF2001* の有効成分である β-グルカンにより、ホルモンが円滑に分泌され、脂肪細胞の代謝が促進され、ヘパリン・リポタンパク質因子の低下を含む特異代謝が関与されたと考えられる [4]。また、糖尿病、糖尿病境界型、肥満人における新陳代謝を促す可能性がある [5]。今後、新しい生理活性脂質の代謝酵素、受容体の遺伝子のクローニングおよび脂溶

性生理活性物質のシグナル伝達機構の解明が望まれる。

文　献

1) Simons LA: Amansec SG, Conway P: Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. Nutr Metab Cardiovasc Dis **16(8):** 531-535 2006
2) Portugal LR, Goncalves JL, Fernandes LR, Silva HP, Arantes RM, Nicoli JR, Vieira LQ, Alvarez-Leite JI: Effect of *Lactobacillus delbrueckii* on cholesterol metabolism in germ-free mice and on atherogenesis in apolipoprotein E knock-out mice. Braz J Med Biol Res. **39(5):** 629-635 2006
3) Chiu CH, Lu TY, Tseng YY, Pan TM: The effects of *Lactobacillus*-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. Appl Microbiol Biotechnol **71(2):** 238-245 2006
4) Manzoni MS, Rossi EA, Carlos IZ, Vendramini RC, Duarte AC, Damaso AR: Fermented soy product supplemented with isoflavones affected fat depots in juvenile rats. Nutrition. **21(10):** 1018-1024 2005
5) Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF: Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. J Dairy Sci **83(3):** 401-403 2000

連絡先：具　然和　鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科、三重県鈴鹿市岸岡町 1001-1（〒510-0293）

Antihyperlipidemic Effect of *Enterococcus Faecalis 2001* (EF 2001)

Yeun-Hwa GU [1,2], Yuka ITOKAWA [1], Yasuyuki TAKAGI [1], Toshihiro MAENAKA [1], akenori YAMASHITA [1], Masami OSHIMA [1], Takeo HASEGAWA [1], Ikukatsu SUZUKI [1], Masahiro IWASA [3], Hroyuki IWASA [3], Kazumasa KOBAYASHI[3], and Torao ISHIDA [1,2]

[1] Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science
[2] Hi-tech Research Center, Suzuka University of Medical Science
[3] Nihon BRM Research Center, Tokyo Japan

Summary

2001 strains of *Enterococcus faecalis* were studied on their hyperlipidemic effects. Possible mechanisms of cholesterol removal by strains of *Enterococcus faecalis 2001* were examined. Cholesterol assimilation as determined by the difference in cholesterol content in the medium before and after the incubation period has shown that all *Enterococcus faecalis 2001* strains were able to assimilate cholesterol at varying levels ranging from 170 to 120 mg/dl. Binding of cholesterol to *Enterococcus faecalis 2001*cells has been demonstrated using growing, heat-killed, and resting cells in phosphate buffer. In the present study, serum cholesterol levels was found to be decreased in the *Enterococcus faecalis 2001* treated group as compared with the control group. We also compared it with the control group about triglyceride, and the *Enterococcus faecalis 2001* group showed significantly decreased levels in triglyceride. Therefore, as for the hyperlipidemia, it is suggested that hormones are secreted smoothly by the β-glucan which is the primary active component of *Enterococcus faecalis 2001*, and metabolism of fat cells is promoted. β glucan has reported to promote the metabolism of fat cells, and to bring some specific metabolism of a fall in a heparin lipoprotein factor. These metabolic changes may be thought to be participated. The presented findings indicated that strains of *Enterococcus faecalis 2001* could remove cholesterol *via* various mechanisms and may be promising candidates for use as a dietary adjunct to lower serum cholesterol *in vivo*.

Key words: *Enterococcus faecalis 2001,* Hyperlipidemia, Cholesterol, Triglyceride

Address: Yeunhwa GU, Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science ,
1001-1 Kishioka-Cho, Suzuka City, Mie 510-0293 Japan