植物性色素がシロネズミの血清および肝臓 コレステロール値に及ぼす影響

辻 啓 介, 辻 悦 子, 鈴木 慎次郎

国立栄養研究所栄養生理部

Effects of Plant Pigments on Serum and Liver Cholesterol Levels in Rats

Keisuke Tsuji, Etsuko Tsuji, Shinjiro Suzuki

Division of Physiology, The National Institute of Nutrition

The effects of several plant pigments or its derivatives on cholesterol metabolism in rats were studied.

1. Serum and liver cholesterol depressing activity of Cu-Na-chlorophyllin, a water soluble derivative of chlorophyll, was markedly confirmed in the hypercholesterolemic rats placed on the diet containing 1% cholesterol and 0.25% bile salts.
2. However, no significant alterations in the level of serum cholesterol were shown in rats fed a cholesterol free, Cu-Na-chlorophyllin diet as compared with the control group. In such condition, a slight decrease in the liver cholesterol level was observed by Cu-Na-chlorophyllin supplement.
3. The hypocholesterolemic activities of β -carotene, rutin, quercetin and xanthophyll were not recognized.

Jap. J. Nutr. 33 (4) 153~159 (1975)

従来、動脈硬化症を防ぐ目的で、血中コレステロール低下作用物質が多数食品成分から見出されてきている。これらの物質にはリノール酸やエリタデニンのように生体内に吸収されて初めて効果を発揮するものもあるが、一方塩化第2鉄のように消化管内で胆汁酸塩と結合しその吸収を妨げる結果血漿コレステロール値の上昇を抑制するものも見出されている¹⁾。さらに消化管内でコレステロールと特異的に結合するトマチン²⁾にも塩化第2鉄同様の作用が報告されており、これらの物質は消化管内を未吸収の状態で通過中に外因性もしくは腸肝循環中の内因性の胆汁酸やコレステロールの吸収や再吸収を阻害することにより、血中や肝コレステロールの減少をもたらすものと推定されている。また著者らも、難消化性の多糖類であるコンニャクマンナンに^{3)~5)}同様の作用機序を認め報告している。

難消化性、難吸収性の食品成分について、生体内で利用されにくいところから非栄養成分とみなされてきたが、消化管内における他の栄養素や生理活性物質あるいは腸肝循環性因子との相互作用を介して生体に影響を与える可能性を考慮しなければならない。例えば日常摂取している食品中の天然色素や合成食用色素についてはカロチンやルチンなどの生理活性を有するものを除くと、主に着色による食欲増進の利点だけが評価されてきたが、これは大部分の色素が難吸収性であることにその原因があった。しかし1970年に Subba Rao らは、カレー粉の色素であるクルクミンが糞中へのコレステロールと胆汁酸の排泄促進により血中コレステロール値の上昇を抑制することを見出しており⁶⁾ 非栄養成分の植物性色素にもコレステロール代謝に関与しているものがあることを明らかにした。

金田らは海藻をコレステロール摂取シロネズミに与えると、緑藻では血中コレステロールの上昇抑制作用が強いが、紅藻や褐藻ではこの作用が弱いことを報告した^{7)~8)}。また Kondratiev⁹⁾ はクロレラを人に大量摂取さ

せたところ血中コレステロールを低下させたが、脱色クロレラでは、この効果が失われることを見出した。これらの実験成績は緑色色素である葉緑素に脱コレステロール作用があることを示唆するものと思われるが、従来葉緑素とコレステロールとの関係を追求した研究は少なく、またその結論にもかなり相違があった^{10)~12)}。そこでわれわれはクロロフィリンを中心に数種の植物性色素についてシロネズミの血清および肝コレステロールに及ぼす影響を検討し若干の知見を得たので報告する。

実験方法

供試試料：銅クロロフィリンナトリウムは日清化学(株)製の食品添加物用で、乾物当り純度99.7%のものを使用した。 β -カロチンは田辺製薬(株)、ルチン、ケルチン、キサントフィルは東京化成工業(株)の製品を使用した。

実験動物：全実験を通じてSprague-Dawley系ラット(日本クレア(株))を用いた¹³⁾。各実験に用いたラットの性、頭数、実験開始時の平均初体重、飼育期間は実験結果の各表の脚注に記した。

飼料：基本飼料の組成は表1のとおりである。飼料中油脂源として大豆油とラードの比率が6:8と1:10の2種類の飼料を使用した。前者を標準飼料1、後者を標準飼料2とした¹⁴⁾。これら2種の標準飼料にコレステロール1%と胆汁酸塩0.25%を各々添加し、コレステロール飼料1と2とした。植物性色素は0.5~2%をコレステロール飼料、または標準飼料(実験4)の蔗糖と置換した。

飼育方法と動物の処理：飼料と水は自由に摂取させ、隔日ごとに摂食量と体重を測定した。実験期間終了後、実験1から5では1夜絶食させ、実験6では絶食させることなく断首採血し、常法に従い遠心分離して血清を得た。また肝臓および内容物を含む盲腸をただちに摘出し、濾紙で血をぬぐって重量を測定した。

コレステロールの定量方法：血清コレステロール値は既報¹³⁾のようにSobelとFernandezの方法¹⁵⁾に準じて定量した。また肝コレステロール値はSperryとWebbの方法¹⁶⁾に従って抽出、ジギトニン処理を施した後、形成したジギトニドを氷酢酸に溶解し以下血清と同様に比色定量した。

実験結果

植物色素中食品に量的にもっとも多く含まれるのは葉緑素であるが、この色素は比較的不安定であるから安定な誘導体である銅クロロフィリンナトリウムについて、コレステロール代謝に及ぼす影響をはじめに検討した。

初体重113gの雄ラットに油脂源として大豆油6%とラード8%を含む標準飼料1、この飼料にコレステロ

Table 1 Composition of standard diets

Components	Standard diet 1 (%)	Standard diet 2 (%)
Casein	22	22
Soybean oil ¹⁾	6	1
Lard	8	10
Salt mixture ²⁾	4	4
Vitamin mixture ²⁾	0.85	0.85
Choline chloride	0.15	0.15
Sucrose ³⁾	59	62

1) Supplemented per 1 kg of diet with vitamin A, 3,000 IU; vitamin D, 300 IU; and vitamin E, 100 mg.

2) Purchased from Tanabe Amino Acid Research Foundation.

3) Each supplement was added at the expense of sucrose.

4) The cholesterol diet 1 and 2 were the standard diet 1 and 2 respectively supplemented with 1% cholesterol and 0.25% bile salts (bacto-oxygall, Difco. Lab.).

Table 2 Effects of Na-Cu-chlorophyllin supplementation on food intake, body weight gain, liver weight, and serum and liver cholesterol levels in male rats fed the hypercholesterolemic diet (Exps. 1 and 2)

	Dietary Group	No. of Rats	Food Intake (g/day)	Body Wt. Gain (g/day)	Liver Wt. (g)	Total Cholesterol	
						Serum (mg/100 ml)	Liver (mg/g)
Experiment 1 ¹⁾							
A	Standard 1	12	16.0±0.7 ^{a,2)}	6.7±0.3 ^a	6.7±0.2 ^b	95± 3 ^c	3.4±0.1 ^c
B	Cholesterol 1	11	15.7±0.6 ^a	7.1±0.4 ^a	8.7±0.4 ^a	145±15 ^a	49.4±1.6 ^a
C	B+1% Chlorophyllin	10	15.2±0.7 ^a	6.7±0.5 ^a	7.5±0.4 ^b	107± 5 ^b	28.0±1.1 ^b
Experiment 2 ¹⁾							
A	Cholesterol 1	4	15.7±0.8 ^a	7.1±0.7 ^a	8.1±0.3 ^a	144±23 ^a	43.2±3.7 ^a
B	A+2% Chlorophyllin	4	15.6±0.9 ^a	7.2±0.3 ^a	8.1±0.2 ^a	97± 6 ^b	15.3±1.1 ^b

¹⁾ The average initial body weight ($M \pm SE$), 113 ± 2 g in Exp. 1 and 126 ± 5 g in Exp. 2 and the feeding period, 10 days. Male rats were fasted during one night before sacrifice.

²⁾ Mean $\pm$ S.E. Values within a column not followed by the same alphabetical letter are significantly different ($P < 0.05$).

ール1%と胆汁酸塩0.25%を添加したコレステロール飼料1と、さらにこの飼料に銅クロロフィリンナトリウムを1%加えた飼料を各々10日間投与した(実験1)。飼育期間中の飼料摂取量と体重増加量は3群で変化がなく、クロロフィリン添加による便の異常も観察されなかった。飼育終了後1夜絶食して解剖した時の肝湿重量では、コレステロール飼料群に比べ5%の危険率でクロロフィリン群が低下していた。血清および肝総コレステロール量では対照のコレステロール飼料群よりそれぞれ26.2%, 42.8%低く、飼料中のコレステロールと胆汁酸塩によるコレステロール上昇を明らかに抑制した。実験1とほぼ同様の実験条件でクロロフィリン量を2%に増加した実験2では、肝重量の低下が認められなかった点が実験1と異なった。一方血清と肝コレステロール値はそれぞれ対照より32.6%,

65.5%の低値を示し、クロロフィリンの量的な増加によりコレステロール上昇抑制作用が強く表われた。次に雌ラットを2週間コレステロール飼料と2%クロロフィリン添加コレステロール飼料で飼育し、経日的に血清と肝コレステロール値の変化を追求した(図1, 図2)。なお図表には示さなかったが、飼育中の体重増加量は両群で差がなかった。また肝重量は各飼育期間中クロロフィリン群で対照よりも軽く、特に14日目では対照群の 9.0 ± 0.2 gに比べ 7.7 ± 0.5 gと有意に低下していた。血清コレステロール値(図1)は雌が雄

Fig. 1 Time course changes of the serum cholesterol level in rats fed the hypercholesterolemic diets supplemented with or without Na-Cu-chlorophyllin (Exp. 3). Vertical bars indicate $\pm$ SEM of 4 or 5 rats. The average initial body weight, 98 ± 2 g and the feeding period, 14 days. Female rats were fasted during one night before sacrifice.

よりも食餌性コレステロールと胆汁酸に鋭敏に反応し¹³⁾、対照群では飼育5日目で 242 mg/100 ml にも上昇し、ほぼこのレベルが14日目まで保たれていた。2%クロロフィリン添加群では実験2の雄の場合と同じくコレステロール上昇は極めてわずかであった。図2の肝コレステロール量はクロロフィリン群においてもかなりの蓄積が見られたものの、14日目でも対照群のほぼ半分にとどまった。

以上のように過コレステロール血症を誘発する飼料に銅クロロフィリン

を1~2%添加すると血清及び肝コレステロールの上昇抑制作用が認められたので、次にコレステロールや胆汁酸塩を含まない標準飼料にクロロフィリン2%を添加して雌ラットを飼育した(実験4)。結果は表3に示したように血清コレステロールは変化なく、肝コレステロールのわずかであるが統計的に有意な減少を認めただけであった。

Table 3 Effects of Na-Cu-chlorophyllin addition to the diet without containing cholesterol on body weight gain, liver weight, and serum and liver cholesterol levels in female rats (Exp. 4)

Dietary Group	No. of Rats ¹⁾	Body Wt. Gain (g/day)	Liver Wt. (g)	Total Cholesterol	
				Serum (mg/100 ml)	Liver (mg/g)
A Standard 1	8	5.3±0.2 ^{a2)}	4.6±0.2 ^a	99±4 ^a	3.20±0.09 ^a
B A+2% Chlorophyllin	7	4.8±0.2 ^a	4.6±0.2 ^a	96±6 ^a	2.79±0.08 ^b

¹⁾ The average initial body weight(M±SE), 84±3 g and the feeding period, 10 days. Female rats were fasted during one night before sacrifice.

²⁾ See the footnote of Table 2.

他の植物性色素としてβ-カロチン、ルチン、ケルセチン、キサントフィルを0.5~2%コレステロール飼料に添加して血清と肝コレステロール値への影響を調べた(表4)。これらの色素は飼料摂取量、成長、肝重量にはあまり影響を及ぼさず、わずかにキサントフィル2%添加群で体重増加量が1日1頭当り対照の7.9 gから9.3 gに増加していただけであった。難吸収性多糖類摂取時によく観察される内容物を含む盲腸重量の増加は、フラボン系色素であるルチンとケルセチンに共通してみられ、β-カロチンとキサントフィルとは変化がみられなかった。血清コレステロール値はコレステロール飼料2を用いた実験6では、雄ラットでも対照群で 256 mg/100 ml とかなり高値を示した。一方、肝コレステロール値は絶食を負荷しなかったこともあって実験5に比べ全般的に低値を示した。しかしβ-カロチン、ルチン、ケルセチンおよびキサントフィルの各添加飼料は血清や肝コレステロールの上昇を抑制する効果はまったく認められなかった。

Fig. 2 Time course changes of the liver cholesterol level in rats fed the hypercholesterolemic diets supplemented with or without Na-Cu-chlorophyllin (Exp. 3). Initial body weight and the feeding period were the same as in Fig. 1.

Table 4 Effects of β -carotene, rutin, quercetin or xanthophyll addition on food intake, body weight gain, organ weight, and serum and liver cholesterol levels in rats fed the hypercholesterolemic diet (Exps. 5 and 6)

Dietary Group		No. of Rats	Food Intake (g/day)	Body Wt. Gain (g/day)	Liver Wt. (g)	Caecum Wt. (g)	Total Cholesterol	
							Serum (mg/100 ml)	Liver (mg/g)
Experiment 5 ¹⁾								
A	Cholesterol 1	3	15. 2±0. 9 ^{a2)}	7. 5±0. 3 ^a	7. 8±0. 6 ^a	1. 4±0. 1 ^b	146±33 ^a	57. 6±14. 6 ^a
B	A+0. 5% β-Carotene	4	15. 9±0. 8 ^a	7. 5±0. 5 ^a	7. 9±0. 5 ^a	1. 2±0. 1 ^b	135±28 ^a	64. 1±8. 4 ^a
C	A+2% Rutin	4	15. 4±0. 3 ^a	7. 7±0. 4 ^a	7. 8±0. 4 ^a	4. 7±0. 6 ^a	202±58 ^a	72. 8±8. 8 ^a
Experiment 6 ³⁾								
A	Standard 2	5	16. 1±0. 7 ^a	7. 1±0. 5 ^b	10. 2±0. 2 ^c	2. 2±0. 1 ^b	101± 8 ^b	2. 8±0. 1 ^b
B	Cholesterol 2	5	17. 6±0. 7 ^a	7. 9±0. 4 ^b	12. 9±0. 6 ^{a, b}	1. 9±0. 1 ^b	256±25 ^a	29. 9±0. 9 ^a
C	B+2% Quercetin	5	17. 4±0. 4 ^a	8. 1±0. 2 ^b	11. 5±0. 3 ^b	4. 2±0. 4 ^a	282±37 ^a	34. 7±1. 9 ^a
D	B+2% Xanthophyll	5	18. 2±0. 6 ^a	9. 3±0. 3 ^a	13. 4±0. 4 ^a	2. 1±0. 2 ^b	235±18 ^a	34. 0±2. 3 ^a

¹⁾ The average initial body weight ($M\pm SE$), 100 $\pm$ 2 g, and the feeding period, 10 days. Male rats were fasted during one night before sacrifice.

²⁾ See the footnote of Table 2.

³⁾ The average initial body weight ($M\pm SE$), 110 $\pm$ 3 g, and the feeding period, 8 days. Male rats were not fasted before sacrifice.

⁴⁾ Caecum weight includes its contents.

考 察

各被験色素が飼料摂取量および体重増加量に及ぼす影響は少なく、わずかにキサントフィル 2% 添加飼料で体重が対照のコレステロール飼料群よりも却って増加したにすぎないが、なぜ体重が増加したかその理由は明らかでない。銅クロロフィルリン塩の 2% 摂取でも、飼料にコレステロールと胆汁酸が有る無しにかかわらず著しい変化は見出せなかったため、本報の実験条件下では成長阻害の心配はないものと推定される。肝重量はコレステロール飼料で標準飼料よりも増加し、クロロフィルリン投与群ではこの肝重量の増加が抑制される（実験 1, 3）か、もしくは同レベルに保たれていた（実験 2）。他の色素ではケルセチンで肝重量の低下傾向が観察されたが、色素は多糖類³⁾¹⁷⁾ の場合よりも肝重量への影響は少ないようである。内容物を含む盲腸重量の増加は難吸収性多糖類に共通して認められた現象¹⁷⁾ であるが、配糖体色素であるルチンとケルセチンの 2 種のフラボン系色素にも同様に惹起されたことは興味深い。多糖類と配糖体色素は共に構造中に糖を含んでいるので、これらの糖の分解と盲腸腫大とは何らかの関連性を有することが推定される。

1933年に Blumer らは家兎に 30 日から 98 日間コレステロールを摂取させても、週に 4 回飼料に 10 g のクロロフィル (Chlorosan) をを加えることにより血清コレステロールの上昇を抑制できると報告した¹⁰⁾。しかし Altschul らは同じく家兎に 1 日 0.25 g の脂溶性もしくは水溶性のクロロフィルを経口的に投与しても血清コレステロールは変化しなかったとし、前者らとの実験結果が異なっている。この 2 つの報文ではクロロフィルそのものを用いたのか、それとも誘導体を用いたのか明らかでなかった。また飼料条件も後者では明記していないが、ウサギの血清コレステロール値から判断すると正常値に近く無コレステロール飼料を用いたものと推定される。本研究の銅クロロフィルリンについての実験では、加コレステロール飼料の実験結果（実験 1～3）は Blumer らの知見¹⁰⁾ とよく一致し、一方無コレステロール飼料の実験結果（実験 4）は Altschul ら¹¹⁾ の成績とよく一致した。従って飼料中にコレステロール（と胆汁酸塩）を加えるか否かによって Blumer らと

Altschul らの結果に差異が生じたものと推定される。近年、土屋はシロネズミにコレステロールとクロロフィリンや銅クロロフィリンを同時に摂取させても血中コレステロールの上昇は抑えられなかったとしている¹²⁾。しかし、土屋の研究¹²⁾では投与量が1日 25 mg と本研究の投与量の1/6以下であり、あまりにも少量すぎたため、ネガティブであったものと思われる。従って、銅クロロフィリンナトリウムとしては今回初めて脱コレステロール作用が確認されたものといえよう。

一方クロロフィリンが肝コレステロール量に及ぼす影響は従来まったく研究されていなかった。外因性コレステロールは肝臓—血液プールとくに肝臓にもっとも顕著に蓄積され(図2)、脂肪肝形成にも関連が深い。肝コレステロール量の変化は血清のそれに劣らず重要な指標とされている。今回銅クロロフィリンは肝臓への食餌性コレステロールの蓄積にも血清同様抑止効果を示した。即ちシロネズミの性差にかかわらず飼料中2%の摂取で明らかに対照のはば1/2~1/3に抑えられた。また投与量が1%の場合でも血清と共に肝コレステロールの段階的な低下作用が認められた。無コレステロール飼料へのクロロフィリン2%添加は肝臓では血清と異なり統計的に有意の差が認められたが、コレステロール量の減少はわずかであるので、飼料条件や絶食負荷などのコレステロール合成系に変化を及ぼすような条件変動ではこの結果は変化しうるものかもしれない。

血中コレステロール低下物質の作用機序は大別して、(1)生体内コレステロールの合成阻害、(2)他組織からの血液へのコレステロールの移動の制限、(3)消化管内におけるコレステロールまたは胆汁酸塩の吸収阻害(排泄促進)の3つが、考えられる。(1)の合成阻害は外因性コレステロール自体でも誘起されるため、無コレステロール飼料に被験物質を加えて飼育したときのみ血中や肝コレステロールが低下するが、クロロフィリンは逆に飼料にコレステロールと同時に添加したときに著しく血清と肝コレステロールが低下したため、この作用機序ではないと思われる。次に(2)の組織—血液間の移動制限による脱コレステロール物質とみなされているエリタデニンは飼料中コレステロールの有無に拘らず肝コレステロールは変化しない¹³⁾。この点は今回のクロロフィリンの成績と大きく異なる区別点である。次にわれわれはクロロフィリンの消化吸収が極めて悪く大部分が糞中に排泄されることを観察している。この消化吸収されにくいという特性は(3)の吸収阻害に属すると推測されているコンニャクマンナンやクルクミンと共通しており、しかも食餌性コレステロールの血液や肝臓への蓄積を抑制するが、無コレステロール飼料に添加しても血中や肝コレステロールの著しい低下はおこさないという点も極めてよく類似している。詳しい作用機序の研究は今後さらに追求したいが以上考察してきたようにクロロフィリンの脱コレステロール作用は(3)のコレステロールもしくは胆汁酸の吸収阻害の可能性が強いものと想定される。

植物性食品にはコレステロール低下作用物質が多数含まれているため、緑藻⁷⁾⁸⁾、クロレラ⁹⁾、ハウレンソウ¹⁰⁾などの緑色植物の脱コレステロール作用を葉緑素単独の効果と断定することは困難であるが、本研究の結果から少なくともその一因子である可能性は強くなった。銅クロロフィリンは食品添加物として大量に常用されており、脱コレステロール作用という新しい生理効果の解明は動脈硬化の予防と治療にも利用される道を開くものと期待される。

要 約

食品成分から脱コレステロール物質を検索する目的でシロネズミのコレステロール代謝に及ぼす植物性色素の影響を調べた。

1) 葉緑素の水溶性誘導体である銅クロロフィリンナトリウム塩に過コレステロール血症シロネズミの血清

および肝コレステロール値の低下作用が認められた。

2) 無コレステロール飼料にクロロフィリンを添加しても血清コレステロール値には変化がなかったが、肝コレステロール値は若干低下した。

3) β -カロチン、ルチン、ケルセチン、キサントフィルの0.5~2%添加では脱コレステロール作用は、観察されなかった。

終りに貴重な試料を提供された日新化学㈱並びに田辺製薬㈱に厚くお礼申し上げます。

(本研究の概要は第24回日本栄養・食糧学会総会(1970)にて報告した。)

文 献

- 1) Siperstein, M. D. et al : *Science*, **111**, 386 (1953)
- 2) Cayen, M. N. : *J. Lipid Res.*, **12**, 482 (1971)
- 3) 辻啓介, 他 : 栄養学雑誌, **26**, 113 (1968)
- 4) 辻啓介, 他 : 栄養学雑誌, **31**, 152 (1973)
- 5) 辻啓介, 他 : 栄養と食糧, **27**, 405 (1974)
- 6) Subba Rao, D., et al : *J. Nutr.*, **100**, 1307 (1970)
- 7) 金田尚志, 他 : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **29**, 1,020 (1963)
- 8) 金田尚志, 他 : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 1,026 (1965)
- 9) Kondratiev, Y. I., et al : *Voprosy Pitaniya*, **25**, 9, 14 (1966)
- 10) Blumer, C., et al : *Arch. f. Exp. Path. Pharmac.*, **173**, 42 (1933)
- 11) Altschul, V. R. and T. A. Smart : *Arzneimittel Forsch*, **11**, 762 (1961)
- 12) Tsuchiya, Y. : *Proc. Intl. Seaweed Symp.*, **6**, 747 (1969)
- 13) 辻 啓介, 鈴木慎次郎 : 栄養学雑誌, **30**, 235 (1972)
- 14) 辻 啓介, 他 : 栄養学雑誌, **33**, 51 (1975)
- 15) Sobel, C. and Fernandez, A. : *Clin. Chem.*, **12**, 739 (1966)
- 16) Sperry, W. M. and Webb, M. : *J. Biol. Chem.*, **187**, 97 (1950)
- 17) 辻 啓介, 他 : 栄養学雑誌, **32**, 155 (1974)
- 18) 辻 悦子, 他 : 栄養学雑誌, **33**, 9 (1975)
- 19) 入谷信子 : 栄養と食糧, **22**, 258 (1969)

(受付 : 昭和50年7月25日)