ラットの D-ガラクトサミン誘発肝障害に及ぼす大麦焼酎粕の影響

望月 聡¹・宮本安紀子¹・大神彩子¹・甲斐千晴¹・大島孝平²・

田中寿一²・外薗英樹³・竹嶋直樹^{3,4}・大森俊郎^{3,4}

(¹大分大学教育福祉科学部, ²半田市医師会健康管理センター, ³三和酒類株式会社, ⁴株式会社大麦発酵研究所)

平成 16 年 8 月 27 日受理

Effects of barley *shochu* lees on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats

Satoshi MOCHIZUKI¹, Akiko MIYAMOTO¹, Saiko OGA¹, Chiharu KAI¹, Kouhei OSHIMA²,
Toshikazu TANAKA², Hideki HOKAZONO³, Naoki TAKESHIMA^{3,4}, and Toshiro OMORI^{3,4}

(¹Faculty of Education and Welfare Science, Oita University, 700 Dannoharu, Oita 870-1192 ;

²Health Care Center, The Handa City Medical Association, 1-1 Kanda-machi, Handa 475-8511 ;

³Sanwa Shurui Co. Ltd., 2231-1 Yamamoto, Usa 879-0495 ;

⁴Barley Fermentation Technologies, Inc., 2211 Yamamoto, Usa 879-0467)

We investigated the effects of barley *shochu* lees (BSL) on the development of D-galactosamine (GalN)-hepatitis in rats. The plasma ALT and AST were significantly lower in the BSL-containing diet group than in the control. Further examination of histopathological findings in liver biopsy specimens showed that, although a remarkable necrosis and degeneration of hepatocytes in the center of the lobules were observed in the control, little necrosis and degeneration of hepatocytes were observed in the BSL-containing diet group. In another experiment, the BSL was separated into supernatant and precipitate fractions by centrifugation, and the influence of these fractions on a liver injury caused by GalN was investigated. The supernatant fraction significantly suppressed the plasma ALT and AST, whereas no significant effect was brought about by the precipitate fraction. These results suggest that substances to prevent liver injury caused by GalN may be contained in the supernatant fraction of BSL.

Key words : 大麦焼酎粕, ガラクトサミン, 肝障害

緒 言

本格焼酎の生産に際して副生する焼酎粕は、従来、主として海洋投棄によって処分されてきた。しかしながら、近年の世界的な環境保全の流れから、海洋投棄の自主規制が進められ、陸上で効率的処分法や未利用資源としての有用性に関する研究が行われている。

我々はこれまでに、大麦焼酎粕はオロチン酸を投与したラットの脂肪肝を用量依存的に抑制する作用があることを明らかにしてきた¹⁾。また、大麦焼酎粕由来の水不溶性食物繊維画分に、オロチン酸投与ラットの

脂肪肝生成を抑制する作用があることを報告している²⁾。今回我々は、大麦焼酎粕の新しい生理活性を探索する一環として、他の肝障害モデルに対する影響について検討した。すなわち、病理組織学的、血清生化学的所見が、ヒトにおけるウイルス性肝炎に類似している D-ガラクトサミン誘発肝障害モデルラット³⁾を用い、大麦焼酎粕の肝機能に対する影響を検討したので報告する。

実験方法

1. 実験サンプルの調製

1) 大麦焼酎粕：大麦焼酎粕をガーゼろ過し、大麦由来の溝条を取り除いた。次に、このろ液を凍結乾燥後に粉碎し、大麦焼酎粕乾燥物を得た。

2) 大麦焼酎粕上清画分：大麦焼酎粕をガーゼろ過し、大麦由来の溝条を取り除いた。次に、このろ液を 3,000×g で 3 分間遠心分離し、上清を得た。この上清に賦型剤としてマルトデキストリン（パインデックス #100；松谷化学工業(株)製）を乾燥重量中に 50% (w/w) となるように加え、凍結乾燥後に粉碎し、大麦焼酎粕上清乾燥物を得た。

3) 大麦焼酎粕沈殿画分：2) で得られた沈殿を凍結乾燥後に粉碎し、大麦焼酎粕沈殿乾燥物を得た。

Table 1 Composition of experimental diets (Exp. 1)

Components(%)	Control	BSL
Casein	22.0	16.5
Corn oil	5	3.3
Vitamin mixture	1	1
Mineral mixture	3.5	3.5
Cellulose	5	5
Test substance	—	17.1
Corn starch	42.3	35.5
Sucrose	21.2	17.9

BSL : barley *shochu* lees

なお、大麦焼酎粕からの収率は、上清画分 67%、沈殿画分 33% であった。

2. 動物実験 1) 動物の飼育方法及び飼料組成

実験には 5 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本 SLC ㈱：静岡）を用い、1 群 9 匹とした。午前 8 時から午後 8 時まで点灯した 23±1°C の動物飼育室で、1 匹ずつ金網ケージに入れ、予備飼育として市販固形飼料（MF：オリエンタル酵母工業(株)）で 4 日間、半合成飼料（Table 1, 2 中の対照食）で 2 日間飼育したのち、実験に供した。実験 1, 2 ともに、22% カゼインをたんぱく質源とした飼料を対照食とし、実験 1 では、実験食として飼料中のたんぱく質のうち 5% を凍結乾燥した大麦焼酎粕で置き換える、すなわち大麦焼酎粕を 17.1% 添加した飼料（Table 1）を用いて本飼育を行った。実験 2 では、飼料中のたんぱく質のうち 5% を大麦焼酎粕で置き換えた大麦焼酎粕添加飼料、及び、大麦焼酎粕の上清ならびに沈殿画分をそれぞれ大麦焼酎粕全体に相当する量を収率から求めて添加した飼料（Table 2）を用いて本飼育を行った。なお、大麦焼酎粕上清画分については、凍結乾燥の際にデキストリンを添加したので、他の群の飼料についても炭水化物の一部を同量のデキストリンで置き換えた。

いずれの実験においても、飼料は水道水と共に 15 日間自由摂取させた。本飼育開始後 14 日目に、D-ガラクトサミンを 350 mg/kg 体重の割合で投与量 2 ml/kg 体重となるように生理食塩水に溶解して、腹腔内に注射した。D-ガラクトサミン投与前後の絶食は行

Table 2 Composition of experimental diets (Exp. 2)

Components (%)	Control	BSL	Sup	Ppt
Casein	22.2	16.7	18.4	20.7
Corn oil	5	5	5	5
Vitamin mixture	1	1	1	1
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellulose	5	5	5	5
Test substance	—	13.7	9.2	4.2
Dextrin	9.2	9.2	9.2	9.2
Corn starch	36.1	30.6	32.5	34.3
Sucrose	18.0	15.3	16.2	17.1

In experiment 2, control, barley *shochu* lees (BSL), the supernatant fraction of BSL (Sup), and the precipitate fraction of BSL (Ppt) diets were used.

わず、投与 22 時間後にエーテル麻酔下で開腹し、心臓より採血したのち、肝臓を得た。血液は室温に 30 分間放置したのち、遠心分離 ($1,500 \times g$, 10 分間) して血清を得た。

2) 血清トランスアミナーゼ活性の測定

血清中のトランスアミナーゼ (ALT, AST) 活性の測定は、市販のキット (TA-LN カイノス; カイノス(株)製) で測定した。

3) 肝臓の病理組織学的検索

採取した肝臓を 10 % 中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学検査を行った。

3. 統計的有意差の検定

実験 1 における統計的有意差の検定は、Student の *t*-検定により行った。実験 2 における統計的有意差の検定は、Tukey の Multiple Range Test⁴⁾ を用いて行った。

結 果

実験 1. ガラクトサミン投与ラットの肝障害に対する大麦焼酎粕の影響

結果は表には示していないが、ラットの体重増加量・飼料摂取量・飼料効率、対照群と大麦焼酎粕添加食群の間に有意な差は認められなかった。血清トランスアミナーゼ活性の測定値を Table 3 に示した。大麦焼酎粕添加食群の血清 ALT 及び AST 値は、対照群の値に比べて有意に低下していた。

肝臓の病理組織学的検索結果を Fig. 1 に示した。比較として、正常ラットの肝組織鏡検像を Fig. 1, A

に示した。対照群 (Fig. 1, B) の肝小葉中心体に強く認められた肝細胞の変性・壊死が、大麦焼酎粕添加食群 (Fig. 1, C) では軽度で認めるのみであった。

実験 2. ガラクトサミン投与ラットの肝障害に対する大麦焼酎粕上清並びに沈殿画分の影響

結果は表には示していないが、ラットの体重増加量・飼料摂取量・飼料効率は、各群間に有意差は認められなかった。血清トランスアミナーゼ活性の測定値を Table 4 に示した。大麦焼酎粕添加食群の血清 ALT 及び AST 値は、実験 1 と同様に、対照群の値と比べて有意に低下した。また、大麦焼酎粕上清画分添加食群の血清 ALT 及び AST 値も大麦焼酎粕添加食群と同等の有意な低下が認められたが、大麦焼酎粕沈殿画分添加食群では殆ど低下が認められず、対照群との有意差がなかった。

考 察

本研究は、オロチン酸投与ラットの脂肪肝生成に対して強力な抑制効果を有する大麦焼酎粕について、他の肝障害モデルに与える影響を評価するために行った。本実験において、D-ガラクトサミンの投与によって、血液生化学的所見として血清 ALT 及び AST 値の顕著な上昇が、病理組織学的所見として肝細胞の変性・壊死が強く認められ、ヒトにおけるウイルス性肝炎に類似した顕著な肝障害が引き起こされた。それに対して大麦焼酎粕添加食を与えた場合には、肝障害を完全に抑制するまでには至らないまでも、有意な抑制効果が認められた。実験 2 は、肝障害抑制作用の関与成分を明らかにするための第一段階として行った。その結果、大麦焼酎粕を遠心分離 ($3,000 \times g$, 3 分間) して

Table 3 Effects of BSL on serum ALT and AST in rats injected with D-galactosamine (Exp. 1)¹⁾

Group	Control	BSL
ALT (Karmen unit)	1192 ± 63 ²⁾	546 ± 75**
AST (Karmen unit)	1789 ± 105	855 ± 111**

¹⁾Rats were fed a diet for 15 days.

²⁾Values are means ± SEM (n=9).

**Significantly different from the control at P<0.01 by Student's *t*-test.

BSL : barley *shochu* lees

得られた上清画分には、ガラクトサミン誘発肝障害抑制作用が認められ、有効成分は水溶性であることが示唆された。しかしながら、この上清画分中には乾燥重量換算で大麦焼酎粕の約4%に相当する不溶性成分が含まれていたため、さらに関与成分を絞り込むことと、肝障害抑制効果の再現性を確認する目的で次の検討を行った。すなわち、実験2で得られた大麦焼酎粕上清画分を $26,000\times g$ で15分間遠心分離して得られた上清及び沈殿画分について、ガラクトサミン肝障害に与える影響を調べた。その結果、ここにはデータは示さ

ないが、大麦焼酎粕上清画分の上清は、血清トランスアミナーゼ活性が対照群に比べて有意に低値を示し、その値は大麦焼酎粕上清画分よりも低い傾向を示した。一方、大麦焼酎粕上清画分の沈殿には対照群との間に有意差が認められず、上清画分の上清よりも有意に高値を示した。

ガラクトサミン誘発肝障害の成因については、完全には明らかとなっていないが、ガラクトサミンの代謝過程において、肝臓のUTPが利用されて濃度が著しく減少し、その結果として、RNA合成低下に基づく

Fig. 1 Histopathological findings in liver tissue sections stained with Hematoxylin and Eosine.

A, Light microscopy for normal liver tissue from an untreated rat. B, Light microscopy for liver tissue from a D-galactosamine-injected rat. C, Light microscopy for liver tissue from a D-galactosamine-injected rat on the BSL-containing diet.

BSL : barley *shochu* lees

Table 4 Effects of BSL, Sup and Ppt on serum ALT and AST in rats injected with D-galactosamine (Exp. 2)¹

Group	Control	BSL	Sup	Ppt
ALT (Karmen unit)	1309 $\pm$ 11 ^{2b}	920 $\pm$ 101 ^a	872 $\pm$ 100 ^a	1307 $\pm$ 26 ^b
AST (Karmen unit)	2321 $\pm$ 21 ^b	1312 $\pm$ 146 ^a	1178 $\pm$ 169 ^a	1987 $\pm$ 67 ^b

¹ Rats were fed a diet for 15 days.

² Values are means $\pm$ SEM (n=9). Means in a column not sharing a common superscript letter are significantly different ($p<0.05$) based on Tukey's multiple-range test.

BSL : barley *shochu* lees ; Sup : the supernatant fraction of BSL ; Ppt : the precipitate fraction of BSL

タンパク質合成阻害を引き起こすためであるとの報告がある⁹⁾。さらに、ガラクトサミンによって引き起こされる肝障害の発症・進展には、内因性エンドトキシンが関与していることを示唆する研究者も多い。すなわち、肝障害侵襲時に小腸粘膜の透過性が亢進して、消化管内の細菌やエンドトキシンが血中やリンパ球中に出現し^{6),7)}、それに伴って活性化されたマクロファージが生産するサイトカイン、ロイコトリエンなどが関与しているという報告がある⁸⁾。また、ガラクトサミン誘発肝障害の発症・進展に活性酸素が関与しているとの報告もある^{9),10)}。ガラクトサミン誘発肝障害に対して抑制作用を有する食事成分として、これまでに、小麦タンパク質 (L-グルタミン)¹¹⁾ や緑茶抽出物 (フラボノイド配糖体、水溶性食物繊維、テアニン)^{12)~14)}、種々の水溶性食物繊維¹⁵⁾ 等が報告されている。大麦焼酎粕中には、糖化・発酵過程を経ることによって分解・生成される様々な物質が混在しているため、いずれの物質がガラクトサミン誘発肝障害の抑制に関与するかは現在のところ十分には明らかにされていない。しかしながら、これまでの作用機序や有効成分に関する一連の報告から、大麦焼酎粕に認められたガラクトサミン誘発肝障害の抑制作用が単一の成分に起因する効果とは考え難く、タンパク質・オリゴ糖・抗酸化物質等が複合的に関与していると推察される。

今回の検討で明らかとなったガラクトサミン誘発肝障害抑制作用を有する大麦焼酎粕の水溶性画分は、ラットにおけるオロチン酸惹起脂肪肝に対しても抑制作用があることが既に明らかとなっている。今後は、大麦焼酎粕水溶性画分に含まれる肝機能改善作用の関与成分同定を進めると共に、作用機序の詳細を検討することが課題である。また、本研究では、血清トランスアミナーゼ活性が最高値に達する D-ガラクトサミン投与 22 時間後の肝機能に対する大麦焼酎粕の影響を調べたが、その後の経時的な影響についても検討する必要がある。すなわち、大麦焼酎粕の投与が D-ガラクトサミン誘発肝障害に対して、治癒効果があるかどうかを今後確認していきたい。さらに、将来的には症例研究などを通じ、ヒトでの有効性やその投与量についても確かめていく必要があると考えられる。

要 約

D-ガラクトサミン誘発肝障害ラットに対する大麦

焼酎粕の影響について検討した。その結果、大麦焼酎粕を摂取させたラットの血清 ALT 及び AST の値は、対照群の値に比べて有意に低下した。また、肝臓の病理組織学的検索では、D-ガラクトサミンの投与によって肝小葉中心体に強く認められる肝細胞の変性・壊死が、大麦焼酎粕を与えた場合には軽度で認めるのみであった。次に、大麦焼酎粕を遠心分離によって上清と沈殿画分に分け、それぞれのガラクトサミン誘発肝障害に対する影響を調べた。その結果、上清画分を投与した群では有意な血清 AST 及び ALT の低下が認められたのに対して、沈殿画分を投与した群においては低下作用が認められなかった。これらの結果から、大麦焼酎粕の上清画分にはガラクトサミン誘発肝障害を抑制する物質が存在することが明らかとなった。

文 献

- 1) 望月 聡, 宮本安紀子, 萩原美和子, 竹嶋直樹, 大森俊郎: 醸協, 96, 559-563 (2001)
- 2) 梅木美紀, 安東史子, 岩橋妙子, 外菌英樹, 林圭, 大森俊郎, 望月 聡: 日本食物繊維研究会誌, 7, 81-88 (2003)
- 3) D. Keppler, R. Lesch, W. Reutter, K. Decker: *Exp. Mol. Pathol.*, 9, 279-290 (1968)
- 4) G. W. Snedecor, W. G. Cochran: *Statistical Methods*. 6th ed. Ames, IA: Iowa State University Press (1967)
- 5) D. Keppler, J. Pausch, K. Decker: *J. Biol. Chem.*, 249, 211-216 (1974)
- 6) B. F. Rush Jr, A. J. Sori, T. F. Murphy, S. Smith, J. J. Flanagan Jr, G. W. Machiedo: *Ann. Surg.*, 207, 549-554 (1988)
- 7) E. A. Deitch, W. Bridges, J. Baker, J. W. Ma, L. Ma, M. B. Grisham, D. N. Granger, R. D. Specian, R. Berg: *Surgery.*, 104, 191-198 (1988)
- 8) R. F. Stachlewitz, V. Seabra, B. Bradford, C. A. Bradham, I. Rusyn, D. Germolec, R. G. Thurman: *Hepatology.*, 29, 737-745 (1999)
- 9) Y. Shiratori, H. Takikawa, T. Kawase, T. Sugimoto: *Gastroenterol. Japan.*, 21, 135-144 (1986)
- 10) Y. Shiratori, T. Kawase, S. Shiina, K. Okano, T. Sugimoto, H. Teraoka, S. Matano, K. Matsumoto, K. Kamii: *Hepatology.*, 8, 815

- 821 (1988)
- 11) A. Manabe, C. C. Cheng, Y. Egashira, T. Ohta, H. Sanada : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 42, 121-132 (1996)
- 12) K. Sugiyama, H. Puming, S. Wada, F. Tamaki : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 609-611 (1998)
- 13) S. Wada, H. Puming, N. Watanabe, K. Sakata, K. Sugiyama : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 570-572 (1999)
- 14) 杉山公男：食品と開発, 34, 7-10 (1999)
- 15) K. Sugiyama, H. Puming, S. Wada, S. Saeki : *J. Nutr.*, 129, 1361-1367 (1999)
-