爆砕処理オリーブ葉粉末による脂肪吸収および胆汁酸再吸収の促進効果

小林謙一^{*1}・夏川 大^{*2}・尾形明日美^{*1}・高田恭輔^{*1}・室田友紀子^{*1}・
綿谷鮎子^{*1}・寺本明子^{*1}・牧 恒雄^{*2}・山本祐司^{*1}・田所忠弘^{*1}

(^{*1}東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科, ^{*2}東京農業大学地域環境科学部生産環境工学科)

Effect of olive leaf powder prepared by steam explosion process on lipid absorption and bile acid reabsorption in the intestine

Ken-Ichi Kobayashi^{*1}, Dai Natsukawa^{*2}, Asumi Ogata^{*1}, Kyosuke Takada^{*1},
Yukiko Murota^{*1}, Ayuko Wataya^{*1}, Akiko Teramoto^{*1}, Tsuneo Maki^{*2},
Yuji Yamamoto^{*1}, Tadahiro Tadokoro^{*1}

^{*1}Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku,
Tokyo 156-8502

^{*2}Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka,
Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

We examined the effects of olive leaf powder on cholesterol metabolism, using the rats fed on high cholesterol diets. The olive powder was treated by steam explosion. Besides a group of rats fed on a control diet (AIN93G), we made three groups fed on different kinds of high cholesterol diets: the basic one, the one containing the olive leaf powder (1.5% add), and another containing olive leaf extract (0.25% add).

Through feeding the rats during the test period, the values of total bile acids and total lipids in the feces decreased significantly in the group fed on the olive leaf powder and that fed on the olive leaf extract. The values of total cholesterol in the feces and triglyceride in the liver decreased significantly in the group fed on the olive leaf extract. These results indicate that the olive leaf powder facilitates the lipid absorption and the bile acid reabsorption in the ileum. This function may be due to oleuropein, the major polyphenol in olive leaves.

緒 言

オリーブ (*Olea europaea*) は、モクセイ科の植物である。オリーブの果実部はもっぱら食用やオリーブ油として使用され、地中海世界における食生活・食文化にとって重要な農作物として位置づけられている。一方、オリーブの葉部はほとんど使用されることはなく、廃棄されるのが現状であった。しかし、近年オリーブ葉が、食品素材として注目を集めている。それは、オリーブ葉の抽出エキスを血糖降下作用¹⁾、抗高血圧作用²⁾、抗酸化作用³⁾

など生体における機能性が報告され始めてきたからである。また、オリーブ葉よりポリフェノールであるオレウロペインが発見され⁴⁾、それが機能性の本体であると考えられている。

このような動きの中で、オリーブ葉からの機能性成分の抽出技術に関する研究も進められてきたが、メタノール⁵⁾やヘキサン⁶⁾など有機溶媒を使用したものが多く、食品への応用を考えると、安全性に課題が残ってきた。これを踏まえ、超音波処理など様々な処理法が報告⁷⁾されてきたが、近年夏川らは、蒸煮・爆砕処理法を用いた

抽出技術⁸⁾を確立し、この技術を用いればオリーブ葉抽出物中のオレウロペイン含有量が増加することを見出した。そこで本研究では、爆砕オリーブ葉が、従来のオリーブ葉抽出成分と同様の機能性があるかどうかを検討する目的で、脂質代謝特にコレステロール代謝に着目し、コレステロール負荷ラットに及ぼす影響についての検討を行った。

実験材料および方法

1. 実験材料および飼料の調製

爆砕オリーブ葉試料の調製は、夏川らの蒸煮・爆砕処理法⁸⁾にて行った。具体的には、小豆島産オリーブ葉100 gを爆砕装置に投入し、0.3 MPa (138℃)の条件で1分間保持した後に、急激に大気圧に戻した。処理後のオリーブ葉を凍結乾燥し、小型ミルにて粉碎後、0.5 mmのメッシュで通すことで粉末を微細化・均一化した。オリーブ葉抽出粉末は、オレウロペインが主成分であるオピエース（エーザイ・フードケミカル株式会社製）を用いた。爆砕オリーブ葉粉末およびオリーブ葉抽出粉末（オピエース）中のオレウロペイン含有量は、それぞれ100 gあたり6.8 g, 34.0 gであった。

2. 実験動物および飼育方法

4週齢のSprague-Dawley (SD)系雄ラット（東京実験動物（株））24匹を用いて、AIN93Gを与えた群を対

照群、高コレステロール群、爆砕オリーブ葉粉末群、オリーブ葉抽出粉末群の4群に分け、各群6匹として2週間飼育した。ラットは、購入後一般飼育用飼料（MF, オリエンタル酵母（株））で3日間予備飼育した。その後、対照群には世界的な動物実験基準食であるAIN93Gを与えた。高コレステロール食群には、AIN-93Gを基本組成として、1%コレステロール添加したものを与えた。また、1%コレステロール食群用飼料に、1.5%爆砕オリーブ葉粉末を加えたものを爆砕オリーブ葉粉末群用飼料とし、0.25%オリーブ葉抽出粉末を添加したものをオリーブ葉抽出粉末群用飼料とした。飼料組成の詳細は、Table 1に示した。動物飼育室は、温度23±2℃、湿度55±10%に保持し、照明時間は7:00～19:00の12時間とした。飼料摂食量は毎日測定し、体重は1日おきに測定した。飼育14日目に糞を採取し、凍結乾燥後、測定に供した。実験最終日は6時間絶食後、ペントバルビタール麻酔下で開腹し、心臓より採血し血漿を得た。ついで肝臓を摘出し、秤量後肝臓脂質の測定に供した。肝臓組織は、生理食塩水を用いて灌流し、実験に供するまで-80℃で保存した。その他の臓器について肉眼的に観察した。

なお、動物実験に関しては、「実験動物の飼養および保管等に関する基準」（昭和55年3月27日、総理府告示第6号）に則り、また東京農業大学動物実験委員会の承

Table 1 各飼料組成表

Ingredient (g)	Diet			
	Control	High- cholesterol	Olive leaf powder	Olive leaf extract
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0
Cornstarch	397.5	382.5	367.5	380.0
-Cornstarch	132.0	132.0	132.0	132.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0	70.0	70.0
Fiber	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mixture	10.0	10.0	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014
Cholesterol	—	10.0	10.0	10.0
Sodium cholate	—	5.0	5.0	5.0
Olive leaf powder	—	—	15.0	—
Olive leaf extract	—	—	—	2.5
Total	1000	1000	1000	1000

認のもとで実施した。

3. 血漿、肝臓、糞中脂質の測定

血漿を用いて、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪を測定した。それぞれ、コレステロールE-テストワコー、HDL-コレステロール-テストワコー、トリグリセライド-テストワコー（いずれも和光純薬工業㈱、大阪）を用いた。

肝臓および糞中脂質は、Folch *et al.* の方法⁹⁾ に準じて抽出した。すなわち、肝臓および糞からクロロホルム：メタノール（2:1 v/v）で抽出し、蒸発乾固後、残渣を2-プロパノールで溶解し、肝臓および糞中脂質とした。肝臓脂質中の総コレステロール、中性脂肪を上記と同様のキットを用いて測定した。糞中脂質に関しては、総コレステロールを上記と同様の方法で、総胆汁酸については、胆汁酸テストワコー（和光純薬工業㈱、大阪）を用い測定した。

4. 統計処理

測定値は、平均値±標準偏差で示した。群間比較は、Tukey-Kramer 法を用いて解析を行った。

実験結果

1. 体重変化および飼料摂取量

実験期間中の体重の変化を Fig. 1 に示した。体重の変化においては、各群間で有意差は認められなかった。また、飼料摂取量に関して有意差は認められなかった（データは省略）。

2. 実験動物の観察および剖検

実験期間中、全ての実験動物において異常行動等は認められず、死亡例もなかった。しかし、糞に関しては、顕著な肉眼的変化を観察した。1%高コレステロール負

荷群では、黄白色をした軟便であったのに対し、コントロール群、爆砕オリーブ葉粉末供与群およびオリーブ葉抽出供与群では、茶色の固い形状糞であった。剖検時の臓器の異常は肉眼的には観察されなかった。

3. 糞中脂質に及ぼす影響

糞中で顕著な肉眼的変化を観察したので、糞中脂質の分析を行った (Fig. 2)。糞中総脂質量は、高コレステロール群に対し、爆砕オリーブ葉粉末群、オリーブ葉抽出粉末群で、有意 ($p < 0.01$) な低下が観察された。

糞中コレステロールは、高コレステロール群に対し、爆砕オリーブ葉粉末群で低下傾向が、オリーブ葉抽出粉末で有意な低下が観察された。

糞中胆汁酸に関しては、爆砕オリーブ葉粉末群、オリーブ葉抽出粉末群ともに対照群に比べ有意な低下が観察された。

4. 血漿脂質に及ぼす影響

本実験における血漿中の総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、総脂質量、遊離脂肪酸の変化を Table 2 に示した。

総コレステロールは、高コレステロール群に対し、爆砕オリーブ葉粉末群、オリーブ葉抽出粉末群いずれも増加傾向を示したものの、有意な変化は示さなかった。

HDL-コレステロール量は、高コレステロール群に対しては、いずれの群も有意差は見られなかった。しかし、爆砕オリーブ葉粉末群に対して、オリーブ葉抽出粉末群では有意 ($p < 0.01$) な増加を観察した。

血漿総脂質、遊離脂肪酸、中性脂肪は、高コレステロール群に対し差は認められなかった。

Fig. 1 各飼料摂取によるラット体重変化

Fig. 2 各飼料摂取によるラット糞中脂質の変化のグラフ

(a) 総脂質量 (b) 総コレステロール量 (c) 胆汁酸量

数値は平均値±標準偏差。異符号間に有意差あり。ただし control 群は解析に含めず。($p < 0.01$)

5. 肝臓脂質に及ぼす影響

肝臓脂質に及ぼす影響について Table 3 に示した。

肝臓総コレステロールは、対照群に対して全ての群で有意な変化はなかった。

中性脂肪は、爆砕オリーブ葉粉末群で減少傾向、オリーブ葉抽出粉末では有意 ($p < 0.01$) な低下が認められた。

考 察

近年、夏川らの研究⁸⁾で、オリーブ葉を爆砕処理するとオリーブ特有のポリフェノールであるオレウロペインが大量に抽出することができることを見出された。オレウロペインは、抗酸化活性³⁾、抗ウイルス活性¹⁰⁾等を有し、その機能性が注目されているものの不明な点も多い。また、生活習慣病を予防するという観点から、オレウロペインが脂質代謝に及ぼす影響についても研究がなされ、脂質負荷マウスにおいて血漿中中性脂肪上昇の抑制が報告されている¹¹⁾。しかし、そのメカニズムについては不明な点も多い。本研究では、爆砕処理オリーブ葉粉末が、脂質代謝特にコレステロール代謝に及ぼす影響を検討する目的で、コレステロール負荷ラットを用いて動物実験を行った。その結果、糞の肉眼的に顕著な変化を観察した。通常、1%高コレステロール負荷をすると、吸収できなかったコレステロールや脂質が糞中へ移行し、黄白

色をした脂肪便となる。しかし、爆砕オリーブ葉粉末供与群およびオリーブ葉抽出供与群では、1%高コレステロール負荷しているにも関わらず、通常状態の茶色の固い形状糞であった。そこで、糞中成分の検討を行った結果、コレステロール食群と比較し、爆砕オリーブ葉粉末群およびオリーブ葉抽出粉末群で、糞中胆汁酸、総脂質量の顕著な低下を観察した (Fig. 2)。しかし、糞中コレステロールに関しては、オリーブ葉抽出粉末群にのみ有意な低下を観察した。本結果より、爆砕オリーブ葉粉末には、腸管における脂肪吸収および胆汁酸の再吸収を促進させる効果がある可能性が示唆された。腸管における脂肪吸収作用は、腸管上皮細胞管腔膜における脂質の吸収が亢進している可能性が考えられるが、ポリフェノールによるそのような効果はこれまで報告例が無く、新規の機能性である可能性がある。また、オリーブ葉抽出粉末より爆砕オリーブ葉粉末の方がより強い脂肪吸収促進作用があったことに関しては、オレウロペインだけでなくオリーブ葉に含まれる他の成分との相乗効果が起きている可能性がある。一方、胆汁酸は、回腸下部の胆汁酸トランスポーターである ileal bile acid transporter (IBAT) や apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) により再吸収される¹²⁾。従って、オリーブ葉特にオレウロペインがこれらのトランスポーターに影響を

Table 2 各飼料の摂取によるラットの血漿脂質の変化

	Control	High cholesterol	Olive leaf powder	Olive leaf extract
Total cholesterol (mg/dL)	96.19 ± 23.02	247.98 ± 76.29	306.97 ± 96.45	292.73 ± 62.18
HDL- cholesterol (mg/dL)	56.84 ± 5.22	24.38 ± 4.59	16.86 ± 3.59 ^a	27.74 ± 6.75 ^b
Triglycerides (mg/dL)	121.28 ± 25.00	99.43 ± 25.33	80.66 ± 7.53	89.07 ± 6.40
Total-lipids (mg/dL)	372.50 ± 71.11	593.33 ± 128.69	591.33 ± 110.67	581.17 ± 93.90
Nonesterified fatty acid (mEq/L)	1.14 ± 0.09	0.93 ± 0.20	1.11 ± 0.17	1.10 ± 0.07

数値は平均値±標準偏差。異符号間に有意差あり。ただし control 群は解析に含めず。(p < 0.01)

Table 3 各飼料の摂取によるラットの肝臓脂質の変化

	Control	High cholesterol	Olive leaf powder	Olive leaf extract
Total cholesterol (mg/g Liver)	9.24 ± 2.97	160.78 ± 20.91	125.77 ± 40.30	143.59 ± 15.50
Triglycerides (mg/g Liver)	90.20 ± 63.17	174.13 ± 20.28 ^a	125.77 ± 40.30	99.62 ± 32.24 ^b

数値は平均値±標準偏差。異符号間に有意差あり。ただし control 群は解析に含めず。(p < 0.01)

及ぼしている可能性が考えられるが、更なる検討が必要である。

一方、血中や肝臓中における脂質成分には、顕著な影響が観察されなかった。しかし肝臓の中性脂肪が爆砕オリーブ葉群で低下傾向、オリーブ葉抽出粉末群で有意な低下を観察した (Table 3)。これは、胆汁酸の影響で説明できる。胆汁酸は、食餌性の脂質をミセル化し、脂質の消化吸収に重要な分子として知られてきたが、近年、胆汁酸は食事とリンクする重要なシグナル伝達分子であるという認識が高まりつつある¹³⁾。回腸下部より吸収された胆汁酸は、門脈を通過して肝臓に送られる。肝臓に送られた胆汁酸は、胆汁酸核内受容体である farnesoid X receptor (FXR) を介し、small heterodimer partner (SHP) の発現が亢進し、sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) の発現が抑制された結果、脂肪

酸合成遺伝子発現が低下し、肝臓内での中性脂肪が低下することが知られている¹⁴⁾。本結果は、以上のような機序で、肝臓中の中性脂肪が低下したものと考えられる。しかし、飼育期間が2週間であったために、血中中性脂肪にまでは影響を受けなかったと考えられる。従って、オレウロペインの摂取期間が長ければ、血中中性脂肪濃度の低下につながるかも知れない。また胆汁酸は、褐色脂肪細胞において胆汁酸受容体として機能している G-protein-coupled receptor (TGR5) を介して、ミトコンドリア内膜に存在するプロトンチャネルである uncoupling protein 1 (UCP-1) の発現を誘導し、熱産生を亢進することが知られている。最近、オレウロペインと別のオリーブ葉に含有するトリテルペンである oleanolic acid が TGR5 アゴニストであるという報告¹⁵⁾ やオレウロペインが褐色脂肪組織における UCP-1 発現を誘導す

るという報告¹⁶⁾がある。

以上より、オレウロペインを含むオリーブ葉抽出成分が、胆汁酸による中性脂肪合成及びエネルギー代謝調節に吸収レベルから代謝レベルに至るまで関係していることが示唆された。

要 約

本研究では、爆砕オリーブ葉粉末が、従来のオリーブ葉抽出成分と同様の機能性があるかどうかを検討する目的で、コレステロール負荷ラットに及ぼす影響についての検討を行った。その結果、爆砕オリーブ葉給餌およびオリーブ葉抽出粉末給餌で糞中の胆汁酸、総脂質の顕著な低下が観察された。また、オリーブ葉抽出粉末給餌で肝臓中性脂肪の有意な減少が観察された。これらの結果より、爆砕オリーブ葉粉末には、腸管において脂肪の吸収および胆汁酸再吸収を促進する作用があることが示唆された。また、この作用がオリーブ葉中のオレウロペインによるものであることが推察された。

謝 辞

本研究において、オリーブ葉抽出粉末として用いたオビエースをご提供いただいたエーザイ・フードケミカル株式会社に感謝いたします。

引用文献

- 1) Al-Azzawie, HF., Alhamdani, MS., Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.*, 78:1371-1377. (2006)
- 2) Zarzuelo, A., Duarte, J., Jiménez, J., González, M., Utrilla, MP., : Vasodilator effect of olive leaf., *Planta Med.* 57:417-419 (1991)
- 3) Somova, LI., Shode, FO., Ramnanan, P., Nadar, A., : Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies africana leaves. *J Ethnopharmacol.*, 84:299-305 (2003)
- 4) Ficarra, P., Ficarra, R., de Pasquale, A., Monforte, MT., Calabrò, ML., : HPLC analysis of oleuropein and some flavonoids in leaf and bud of *Olea europaea* L. *Farmaco.*;46 :803-815. (1991)
- 5) Savournin C., Baghdikian B., Elias R., Dargouth-Kesraoui F., Boukef K., Balansard G. Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves *J. Agric. Food Chemistry.*, 49: 618-621. (2001)
- 6) Guinda, A., Lanzon, A., Rios, J.J., Albi, T., : The isolation and quantification of the components from olive leaf: Hexane extract. *Grasas y Aceites*, 53, 419-422. (2002)
- 7) Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, JM., Luque de Castro, MD., : Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr. A.* 1108: 76-82 (2006)
- 8) 夏川大, 牧恒雄: 爆砕処理による野蚕繭の精練 (1) 繭綿回収率について, *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, 13 (2008) in press
- 9) Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, GH.,: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509, (1957)
- 10) Lee-Huang, S., Huang, PL., Zhang, D., Lee, JW., Bao, J., Sun, Y., Chang, YT., Zhang, J., Huang, PL., :, Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 872-884. (2007)
- 11) 木村義行, 住吉真帆, オリーブ葉の糖・脂質代謝作用 (第1報) —脂質負荷マウスにおけるオリーブ葉エキスの血漿中中性脂肪値上昇に対する作用— 医学と薬学, 50, 335-339. (2007)
- 12) Chen, F., Ma, L., Dawson, PA., Sinal, CJ., Sehayek, E., Gonzalez, FJ., Breslow, J., Ananthanarayanan, M., and Shneider, BL.: Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter, *J. Biol. Chem.*, 278, 19909-19916, (2003)
- 13) Watanabe M, Houten SM, Matak C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, and Auwerx J.,: Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation, *Nature*, 439, 484-489 (2006)
- 14) Forman, BM., Goode, E., Chen, J., Oro, AE., Bradley, DJ., Perlmann, T., Noonan, DJ., Burka, LT., McMorris, T., Lamph, WW., Evans, RM., and Weinberger, C.,: Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*, 81, 687-693 (1995)
- 15) Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., and Saladin, R.,: Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*, *Biochem Biophys Res Commun.* 362, 793-798. (2007)
- 16) Oi-Kano, Y., Kawada, T., Watanabe, T., Koyama, F., Watanabe, K., Senbongi, R., and Iwai, K.,: Oleuropein, a Phenolic Compound in Extra Virgin Olive Oil, Increases Uncoupling Protein 1 Content in Brown Adipose Tissue and Enhances Noradrenaline and Adrenaline Secretions in Rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 54, 363-370 (2008)