紫甘しょジュース飲用ラットにおける 四塩化炭素誘起肝障害の軽減

須田郁夫*・古田 収*・西場洋一*・山川 理**・
松ヶ野一郷***・杉田浩一***

Reduction of Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats Administered Purple- Colored Sweetpotato Juice

Ikuo SUDA*, Shu FURUTA*, Yoichi NISHIBA*,
Osamu YAMAKAWA**, Kazusato MATSUGANO***
and Koichi SUGITA***

* Kyushu National Agricultural Experiment Station,
Nishigoshi, Kumamoto 861-11

** Kyushu National Agricultural Experiment Station,
Miyakonojo, Miyazaki 885

*** Miyazaki JA Food Research & Development Inc.,
Ikimeda, Miyazaki 880

The purple-colored sweetpotato juice containing anthocyanin pigments was prepared from "Ayamurasaki", and the reduced effects on carbon tetrachloride-induced liver injury of rats were studied. The pretreatment with purple-colored sweetpotato juice orally for 5 consecutive days prior to carbon tetrachloride treatment effectively reduced in GOT, GPT, LDH and thiobarbituric acid-reactive substance (TBA-RS) in serum and liver TBA-RS and oxidized protein levels. These results demonstrated reducing effects of purple-colored sweetpotato juice against carbon tetrachloride-induced liver injury.

(Received Oct. 11, 1996 ; Accepted Dec. 17, 1996)

我々が日常摂取している野菜、果物、豆類、穀類には種々の機能性物質、たとえば抗酸化性物質や抗変異原性物質、抗発がん性物質、コレステロール低下物質などが含まれていることが明らかにされてきている。甘しょにおいても抗酸化作用¹⁾、メラニン生成抑制作用²⁾、抗菌作

用³⁾などの機能性を有することが報告されている。

近年になり、九州農業試験場では、機能性成分として注目されているβ-カロテン、アントシアニン系色素を含むオレンジ系統、紫色系統の甘しょの育成およびそれらを利用した用途開発研究を盛んに行っている。そこで著者らは、これら高色素系甘しょが、試験管内レベル（例えば、リノール酸の自動酸化を利用した抗酸化能評価¹⁾）だけではなく、実験動物レベルでも機能性を発揮しているかを実証する試験を計画した。

本報告では、アントシアニン⁴⁾やその他のフラボノイド⁵⁾⁶⁾が肝障害防止効果を持つことに着目し、かつ現在開発を進めている紫甘しょジュースに付加価値を見出すため、四塩化炭素(CCl₄)により引き起こされるラットの肝障害に対する紫甘しょジュースの軽減効果について検討を行った。なおラットに与えたジュース量は、ヒトが日常生活で摂取可能な量になるように設定した。

実験方法

1. 紫甘しょジュースの調製

九州農業試験場甘しょ育種研究室が1995年に栽培した紫肉色甘しょ「アヤムラサキ」をジュース原料とした。原料甘しょは加温洗浄後、剥皮、カット、沸騰水中でのブランチング処理を行った後、クラッシュし、酵素処理を行って得られたピューレを遠心分離して変褐色の認められない甘しょ果汁を得た。甘しょ果汁分は官能評価試験にて好ましいと判断された30%とし、リンゴ果汁と柑橘果汁で糖度・酸度を調整して、190gの缶飲料とした(Fig. 1)。

2. 実験動物

実験動物は5週齢のWistar/ST系雄ラット(体重120-140g)を日本エスエルシーより購入し、市販固形飼料(MRストック、日本農産工業)で3日間予備飼育した後、各群の体重が揃うように群分け(n=8の3群)を行った。第1群(水道水飲用-オリーブ油投与)、第2群(水道水飲用-CCl₄投与)、第3群(紫甘しょジュース飲用-CCl₄投与)の各々のラットは、以下、Fig. 2に示すような実験スケジュールにて処理した。飼育は個別ケージにラットを入れ、温度23±1℃、湿度55±5%の12時間明暗サイクル(7:00-19:00照明)で行った。

第1群、第2群では水道水を自由に摂水させた。一方、第3群では2個の給水瓶を準備し、1つの給水瓶には、

* 農林水産省九州農業試験場流通利用研究室(〒861-11 熊本県菊池郡西合志町須屋 2421)

** 農林水産省九州農業試験場甘しょ育種研究室(〒885 都城市横市町 6644)

*** 宮崎県JA食品開発研究所(〒880 宮崎市生目台 3-3-2)

Fig. 1 Trial product of sweetpotato juice

Two sweetpotato juice were prepared from sweetpotato cultivar containing β -carotene or anthocyanin pigment. Purple-colored sweetpotato juice (right) was used in this study.

Fig. 2 Protocol of animal treatment

Rats in Group 3 were given both of purple-colored sweetpotato juice (1/25 fold diluted solution, 20 ml/100 g) and tap water on Day 0 to 4.5 and followed tap water only. Rats in Group 1 and Group 2 were received tap water only. On Day 5, olive oil (0.2 ml/100 g) or a mixture of CCl_4 and olive oil (1:3, v/v, 0.2 ml/100 g) was given through stomach tube. At 24 h after CCl_4 treatment, blood was withdrawn by heart puncture under light ether anesthesia. Then, the liver was perfused in situ with ice-cold 0.9% saline and excised. All rats were fasted on Day 4.5 to 6.

紫甘しょジュースの1/25倍希釈液を体重100 g当たり20 ml (50 kg 体重のヒト当たり400 ml相当量) になるように入れ、もう一つの給水瓶には水道水を入れ、自由に摂水させた。同時に与えても、ラットは紫甘しょジュース希釈液の方を嗜好飲用するため、与えたジュースは12時間以内に全量が飲用された。紫甘しょジュース希釈液の飲用開始は毎朝9時から行い、5日間継続させた。この期間中飼料は自由に摂食させた。

5日目に、第1群にはオリーブ油 (0.2 ml/100 g 体重) を、第2群と第3群にはオリーブ油で希釈した CCl_4 (和光純薬、精密分析用) 溶液 (0.05 ml CCl_4 /0.2 ml/100 g 体重) を胃ゾンデを用いて経口投与した。なお、 CCl_4 (あるいはオリーブ油) 投与12時間前から翌日屠殺するまでの間は、絶食させるとともに、飲用水としては水道水を与えた。 CCl_4 (あるいはオリーブ油) 投与24時間後、エーテル麻酔下で心臓採血し、さらに生理食塩水にて還流して肝臓を摘出した。血液からの血清の回収は血清分離剤入り採血管 (テルモ、ベノジェクトIIオートセップ) を用いて行った。肝臓は0.5 mM BHTを含む1.15% KCl溶液で20% ホモジナイズ液とし、分析試料とした。

3. 一般血清成分の分析

血清中のトランスアミナーゼ (GOT, GPT)、乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性および総蛋白質量は日立自動分析装置7070型を用いて調べた。測定試薬としては和光純薬製の測定キット、GOT (JSCC準拠処方)、GPT (JSCC準拠処方)、LDH (Wroblewski-La Due法)、TP (ビウレット法) を使用した。

4. チオバルビツール酸反応物質 (TBA-RS) および酸化蛋白の測定

血清および肝臓ホモジナイズ液中のTBA-RS量は、YAGI法⁷⁾、KIKUGAWAらの方法⁸⁾に準じて各々測定し、nmol/mg 蛋白で表した。蛋白量は、血清の場合にはビウレット法により、肝臓ホモジナイズ液の場合にはLOWRY法により求めた。

肝臓ホモジナイズ液中の酸化蛋白量は、何&安本の方法⁹⁾に準じて、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) の取り込み量 (nmol/mg 蛋白) で評価した。

5. 統計処理

データは全て平均 (mean) $\pm$ 標準偏差 (SD) で表した。有意差の検定にはStudent-*t*検定を用い、有意水準を5%とした。

実験結果及び考察

CCl_4 がラットに肝障害を引き起こし、その際には血清

中の GOT・GPT 活性が上昇することはよく知られている^{4)~6)10)}。本研究でもこのことは確認され、「水道水飲用-CCl₄投与」群の血清 GOT・GPT 活性は「水道水-オリーブ油投与」群の 62 倍、31 倍と高くなった (Fig. 3)。その「水道水飲用-CCl₄投与」群に比べ、「紫甘しょジュース飲用-CCl₄投与」群では、GOT・GPT の活性上昇が抑制されていた。同様な結果が LDH でも得られた (Fig. 3)。また「水道水飲用-CCl₄投与」群の肝臓には顕著な斑点病変が現れたのに対し、「紫甘しょジュース飲用-CCl₄投与」群の肝臓では抑制されていた。

MIYAZAWA ら¹⁰⁾¹¹⁾ は肝臓の TBA-RS 量は CCl₄ 投与により増加すると報告している。そこで肝臓の TBA-

RS 量を調べたところ、我々が用いた CCl₄ ラットでも同様に増加していることが確認された (Fig. 4)。一方、この増加は紫甘しょジュース飲用により抑制された。同様な抑制効果は、血清の TBA-RS 量および肝臓の酸化蛋白量でも認められた (Fig. 4)。

以上の結果は、CCl₄ で誘起される肝障害（組織からの酵素遊離や酸化的ストレスなど）が紫甘しょジュースの前飲用により軽減することを明らかに示している。今回の動物実験においては、CCl₄ 投与前後には飼料および紫甘しょジュースは与えていないため、それらに含まれている成分が CCl₄ の体内吸収を妨害したということは考えにくい。あらかじめ体内に取り込まれた紫甘しょ

Fig. 3 Effects of purple-colored sweetpotato juice on the serum GOT, GPT and LDH levels in CCl₄-treated rats

Rats were treated according to protocol as shown in Fig. 2. Results are expressed as means $\pm$ SD of 8 experiments. Asterisks indicate significant differences from Group 2 ($P < 0.001$).

Fig. 4 Effects of purple-colored sweetpotato juice on the serum TBA-RS and liver TBA-RS and oxidized protein levels in CCl₄-treated rats

Rats were treated according to protocol as shown in Fig. 2. Results are expressed as means $\pm$ SD of 8 experiments. Asterisks indicate significant differences from Group 2 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

ジュース由来の成分が肝障害軽減効果を示した可能性が高いと考えられる。紫甘しょ中にはアントシアニン以外にも各種フラボノイドが含まれているため、そのうちのどのような成分が肝障害軽減効果を示したのかは現時点では判らない。紫甘しょジュースの原料に用いた「アヤマラサキ」はアントシアニン系色素を高含量含み¹²⁾、また赤ワインから抽出したアントシアニン混合物を投与したラットでは、CCl₄による肝障害が抑制されるという報告⁴⁾から考えると、アントシアニン系色素が重要な軽減因子であるかも知れない。一方、(+) cyanidanol-3を投与したラット⁵⁾、あるいは galangin を投与したマウス⁶⁾でも CCl₄による肝障害が抑制されるという報告もあり、フラボノイドも軽減因子の一つであるかも知れない。軽減因子の同定については、アントシアニン含量の高いフラクションを摂取させる実験を実施するなどして今後検討したい。

紫甘しょジュースが動物に投与された場合、1) アントシアニンがそのままの状態で吸収されて効果を示すのか、2) 腸管内あるいは体内で代謝変換された化合物が効果を示すのか、3) あるいはそれ以外の成分が効果を示すのか、4) 紫甘しょジュース飲用は急性肝炎だけではなく慢性肝炎に対しても効果を示すのか、5) モデル動物と同様、人体に対しても効果を示すのかなど、今後検討しなければならない問題点は種々ある。しかし、本報告でラットに飲用させた紫甘しょジュース量は50 kg 体重のヒト当たり400 mlであり、この飲用量でCCl₄による急性肝障害を軽減する効果が確認されたことは大きな意味を持つと考えられる。

要 約

アントシアニン系色素を含む「アヤマラサキ」を原材料にして紫甘しょジュースを試作し、四塩化炭素で引き起こされるラットの肝障害に対する軽減効果を調べた。

四塩化炭素処置前に紫甘しょジュースをあらかじめ5日間前飲用させることにより、血清中のGOT, GPT, LDH, TBA 反応物質、および肝臓中のTBA 反応物質、酸化蛋白レベルが低下し、肝障害軽減効果が確認された。

本研究は農林水産省の総合開発研究「高収益畑作」の予算の一部で行われた。本試験を行うにあたり、実験補助をして頂いた吉田美恵、福盛美智子の両氏に深く感謝する。

文 献

- 1) FURUTA, S., NISHIBA, Y. and SUDA, I.: *Sweetpotato Research Front*, 1, 3 (1995).
- 2) 下園英俊・小堀真珠子・新本洋士・津志田藤二郎: 食科工, 43, 313 (1996).
- 3) 奥野成倫・吉元 誠・熊谷 享・山川 理: 九農研, 58, 34 (1996).
- 4) MITCHEVA, M., ASTROUG, H., DRENSKA, D., POPOV, A. and KASSAROVA, M.: *Cell. Mol. Biol.*, 39, 443 (1993).
- 5) PERRISSOUD, D. and WEIBEL, I.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 312, 285 (1980).
- 6) JUNG, B.D., KIM, C.H., KIM, J.H. and HEO, M.Y.: *J. Pharm. Soc. Korea*, 40, 320 (1996).
- 7) YAGI, K.: *Biochem. Med.*, 15, 212 (1976).
- 8) KIKUGAWA, K., KOJIMA, T., YAMAKI, S. and KOSUGI, H.: *Anal. Biochem.*, 202, 249 (1992).
- 9) 何 普明・安本教傳: 栄食誌, 43, 121 (1990).
- 10) MIYAZAWA, T., SUZUKI, T., FUJIMOTO, K. and KANEDA, T.: *J. Biochem.*, 107, 689 (1990).
- 11) MIYAZAWA, T., TSUCHIYA, K. and KANEDA, T.: *Nutr. Rep. Inter.*, 29, 157 (1984).
- 12) 藤井正美・清水孝重・中村幹雄: 食用天然色素(光琳, 東京), p. 103 (1993).

(平成8年10月11日受付, 平成8年12月17日受理)