

クロロフィルの血漿脂質改善効果

山下 かなへ, 野原 優子, 熊谷 元美, 並木 満夫*

(相山女学園大学家政学部, * 東京農業大学農学部)

平成 2 年 9 月 22 日受理

Effect of Chlorophyll on Plasma Lipids in Rats

Kanae YAMASHITA, Yuuko NOHARA, Motomi KUMAGAI
and *Mitsuo NAMIKI*Faculty of Home Economics, Sugiyama Jogakuen University,
Chikusa-ku, Nagoya 464***Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,
Setagaya-ku, Tokyo 156*

The effect of chlorophyll on plasma and liver lipids was studied in rats fed on diets containing 0, 0.2 and 0.5% cholesterol. A mixture of chlorophyll a and b extracted from alfalfa was fed to rats for 3 weeks. The lipid composition of plasma was determined by Iatroskan TLC-FID. Chlorophyll at the dietary level of 0.1 and 0.2% significantly decreased the levels of cholesteroles, free cholesterol, triglyceride and phospholipid in plasma when the diet did not contain cholesterol. The plasma cholesterol-lowering effect of chlorophyll tended to decline as the dietary level of cholesterol increased from 0 to 0.5%. Chlorophyll had no effect on the level of plasma cholesteroles in rats fed the 0.5% cholesterol diet. The total lipids and total cholesterol in liver remarkably increased with the increase of dietary cholesterol. These lipids in the liver of rats given chlorophyll also tended to be lower than in the control rats. These data demonstrate that chlorophyll has hypocholesterolemic action in rats when fed at a level as low as 0.1%.

(Received September 22, 1990)

Keywords: chlorophyll クロロフィル, plasma lipids 血漿脂質, dietary cholesterol 飼料コレステロール, plasma cholesterol ester 血漿エステル型コレステロール.

1. 目 的

緑黄食野菜の栄養効果については、一般にビタミンC、ビタミンA、カロチンなどのビタミン類が主要な有効成分とされ、さらに近年は食物繊維が注目されている。海藻類や野菜類にコレステロール低下作用が認められている^{1)~3)}が、その作用はおもに食物繊維の効果と考えられており、緑色食物の特徴的成分であるクロロフィルの降コレステロール効果を調べた研究^{4)~7)}はきわめて少ない。辻らの、植物性色素の血清および肝臓のコレステロール値に及ぼす影響を調べた研究⁴⁾では、銅クロロフィルナトリウム(1~2%)はコレステロール添加食を与えたラットの血清コレステロールの上昇を抑制したが、無添加群の血清コレステロールには影響しなかった。

Ito ら⁵⁾は、クロロフィルおよびクロロフィル関連物質(25 mg/(日・rat))を1%コレステロール添加食を摂取しているラットに投与した研究で、フェオフィチンとフェオフィコリンはコレステロール上昇抑制効果を示したが、クロロフィルは無効という結果を得た。また Altschul らの研究⁶⁾では、家兎に非経口的に与えたクロロフィルは血清コレステロールを低下させたが、経口投与した場合は無効であった。このようにクロロフィルあるいはクロロフィル関連物質のコレステロール低下作用については、投与量や投与方法、あるいは飼料へのコレステロールの添加の有無で異なった結果が得られている。一方、入谷²⁾は、ほうれんそう、わかめなどの降コレステロール効果を調べた研究で、コレステロールの

表 1. 飼料組成 (%)

組 成	CHOL-0			CHOL-0.2			CHOL-0.5		
	Cont.	Chl-0.1	Chl-0.2	Cont.	Chl-0.1	Chl-0.2	Cont.	Chl-0.1	Chl-0.2
カゼイン	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
ミネラル混合*1	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合*1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
コーンオイル	5.0	4.7*2	4.4*2	5.0	4.7*2	4.4*2	5.0	4.7*2	4.4*2
α-スターチ	70.5	70.3	70.1	70.25	70.05	69.85	69.88	69.68	69.48
クロロフィルオイル*3	—	0.5	1.0	—	0.5	1.0	—	0.5	1.0
コレステロール	—	—	—	0.2	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5
コール酸ナトリウム	—	—	—	0.05	0.05	0.05	0.125	0.125	0.125
合 計	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*1 AIN-76 TM. *2 クロロフィルオイルはコーンオイルを約 69% 含むので、クロロフィルオイルに含まれるコーンオイルと合せて 5.0% になるようにした。*3 クロロフィルオイルにはクロロフィルは 20.4% (クロロフィル a 10.8%, b 9.6%) 含まれるので、添加量はそれぞれ 0.1% と 0.2% になる。

1% 添加は血漿や肝臓のコレステロール値が上昇しすぎてほうれんそうなどの効果は不明であったが、コレステロール 0.1% 添加ではほうれんそうやわかめに降コレステロール効果を認めたと報告している。飼料コレステロール量がクロロフィルの降コレステロール効果に影響している可能性が考えられるので、本実験は飼料用アルファルファから抽出したクロロフィル a, b 混合物を用いて、クロロフィルのコレステロール低下作用をコレステロール無添加とコレステロール添加飼料をラットに与え、検討を行った。

2. 実験方法

(1) クロロフィル飼料 (クロロフィルオイル) の調製
飼料用アルファルファ (ムラサキウマゴヤシ) を 80% アセトン水溶液で 2 回処理し、抽出液に *n*-ヘキサンを加え、クロロフィルを *n*-ヘキサンに転溶し、濃縮した。濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて、カロチン、ワックス、油脂等とクロロフィル区分に分離し、クロロフィル区分を濃縮乾固した。エタノールに溶解し、コーンオイルを加え攪拌溶解したのち、減圧濃縮によりエタノールを除きクロロフィルオイルを得た。AOAC 公定法⁹⁾によりこのクロロフィルを測定したところ、クロロフィル a が 10.8%, クロロフィル b が 9.6%, コーンオイルが 69% 含有されていた (クロロフィルオイルの調製はタマ生化学¹⁰⁾に依頼)。

(2) 飼料組成

実験に用いた試験飼料は表 1 に示すとおりである。コレステロール無添加 (CHOL-0) 時を対照として添加し

た場合のクロロフィルの降コレステロール効果を調べた。コレステロールの添加量は 0.2% (CHOL-0.2) と 0.5% (CHOL-0.5) にした。またクロロフィルの添加量は乾燥した野菜 (ほうれんそう) 中のクロロフィル含量を参考に、乾燥野菜を 10~20% 添加した場合を目安として、0.1% と 0.2% (クロロフィル a とクロロフィル b の合計値) の 2 試験区とした。

(3) 動物の飼育と処理

実験動物としてはウィスター系 4 週齢雄ラット (体重約 60g, 日本エスエルシー¹¹⁾より購入) を 5 日間固型飼料で飼育し、1 群 6 匹として、表 1 に示した 9 種の飼料で 3 週間飼育した。ラットの飼育は CHOL-0 群, CHOL-0.2 群, CHOL-0.5 群と 3 回に分けて行った。飼育終了後ソムノペンチルで麻酔し、ヘパリン処理した注射器で心臓より採血した。肝臓は採血後肝臓静脈を切断して十分放血後、ろ紙で付着血液をふきとり重量を測定した。血漿と肝臓は測定まで -80°C の冷凍庫に保存した。

(4) 血漿および肝臓脂質類の測定

血漿脂質はイアトロスキャン⁹⁾¹⁰⁾ (イアトロスキャン TH-10, 株式会社ヤマト製) を用いて、コレステロールエステル、遊離コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質を同時に測定した。血漿 0.5 ml を共栓付き試験管にとり、Folch 溶液 (クロロホルム: メタノール=2:1, v/v) 10 ml とコレステロールアセテート 37.5 mg/dl 含有 Folch 溶液 1 ml を加えて 30 秒間振とうし、東洋ろ紙 No. 7 でろ過する。ろ液を共栓付き遠沈管にとり、蒸留水 2 ml を加え転倒混和を数回行ったのち、遠心分離

クロフィルの血漿脂質改善効果

(2,500 rpm, 10分間)し, 上層をアスピレーターで吸引除去する。下層を遠心型エバポレーター(ヤマト科学製 RD-31)で減圧乾固し, Folch 液 0.25 ml で再溶解して 1 μ l ずつを5本のクロマロッド(ヤマト薄層棒)にマイクロシリンジでスポットする。クロマロッドはヘキサン:ジエチルエーテル:ギ酸(63:7:0.14)混合展開溶媒で10 cm まで展開して乾燥し, イアトロスキャン TH-10 にてスキャンしてクロマトグラムをとる。脂質成分の標準としてはコレステロールパルミテイト(東京化成), コレステロール(東京化成), トリパルミテイト(東京化成), L-3-ホスファチジルコリンパルミテイト(シグマ)を用い, 内部標準としてコレステロールアセテートを加えて検量線を作成し, 定量した。

肝臓は 2.5 g を Folch 溶液でホモゲナイズし 50 ml に定容後, その一部につき Folch 法¹¹⁾で総脂質を, Pearson 法¹²⁾で総コレステロールを測定した。

(5) 統計的処理

有意差検定は Student の *t*-test によって行った。

3. 結果

(1) 体重増加

9種の試験飼料で3週間飼育したラットの体重増加量を図1に示す。体重増加は CHOL-0.5 群, CHOL-0.2 群, CHOL-0 群の順に大きくなる傾向を示した。クロフィルの投与は CHOL-0.2 群, CHOL-0.5 群ではほとんど影響なかったが, CHOL-0 群では減少傾向を

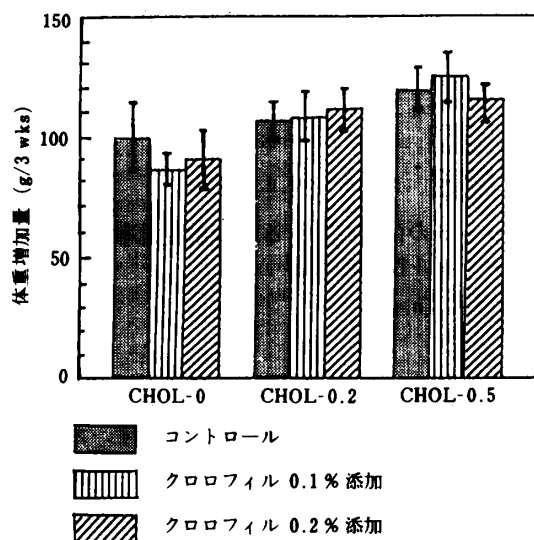


図 1. 試験飼料で3週間したラットの体重増加量

CHOL-0: コレステロール無添加, CHOL-0.2: コレステロール 0.2% 添加, CHOL-0.5: コレステロール 0.5% 添加。グラフは mean \pm S.E. (n=6) で示した。

示したので, クロフィル投与区では CHOL-0.5 群のほうが CHOL-0 群より有意に体重増加は大きかった。

(2) 血漿脂質に及ぼすクロフィル投与の影響

1) コレステロール

イアトロスキャンを用いて血漿脂質を測定するとコレステロールはエステル型と遊離型に分かれて, エステル型は検量線からコレステロールエステル(CE)量として定量される。分子量から計算すると CE の約 62% がコレステロールであるから, エステル型のコレステロールと遊離コレステロール(FC)を加算すれば総コレステロール量となる。このように計算した数値は化学的に測定した値と近似した値を示し, 本実験の結果を計算すると血漿総コレステロールの 70~80% がエステル型のコレステロールであった。図 2 に CE, 図 3 に FC の測定結果を示す。CE, FC ともコレステロールの摂取が増すにつれ増加したが, CE のほうが摂取コレステロール量の影響を大きく受けることがわかった。クロフィル投与により, CHOL-0 群の CE, FC ともに有意に減少したが, コレステロール摂取量が増すとクロフィル投与の効果は少なくなり, CHOL-0.5 群の CE はクロフィル投与で減少しなかった。

2) トリグリセリド

イアトロスキャン法ではトリグリセリド(TG)は分離が悪く, ピークも小さいので測定値に大きなバラツキがみられた。血漿 TG (図 4) は, コレステロールの摂

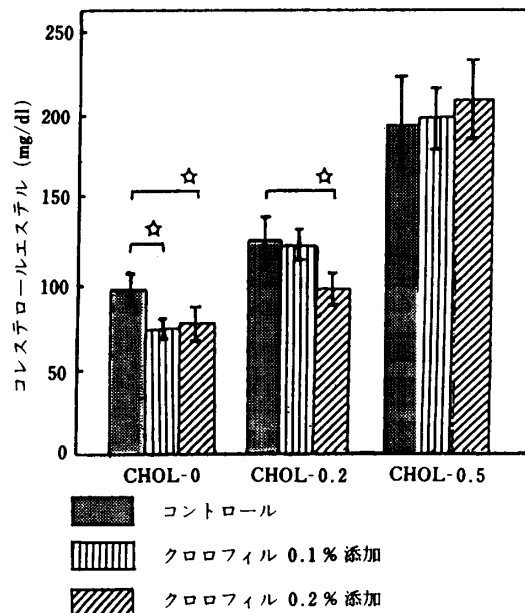


図 2. ラットの血漿コレステロールエステルに及ぼすクロフィル投与の影響

mean \pm S.E. (n=6). $\star p < 0.05$

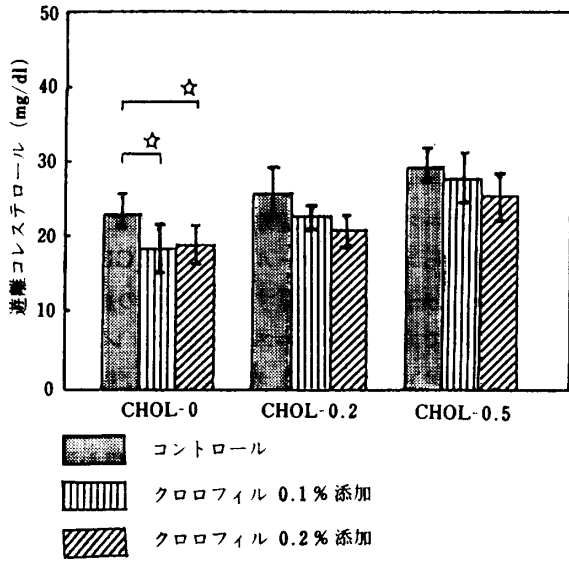


図 3. ラットの血漿遊離コレステロールに及ぼすクロロフィル投与の影響
mean ± S.E. (n=6). ☆ p < 0.05

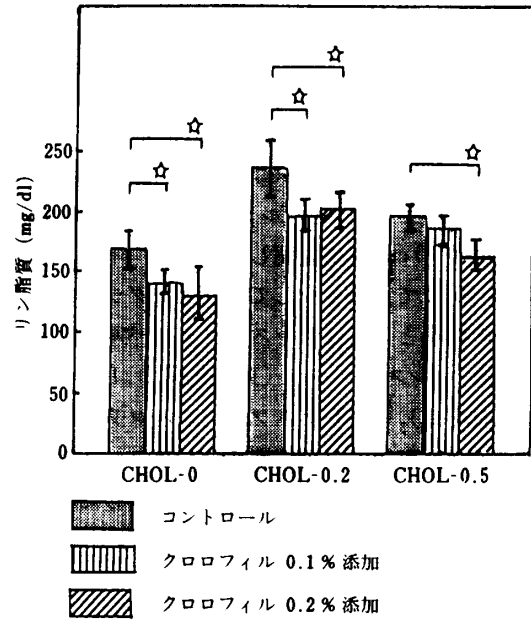


図 5. ラット血漿リン脂質に及ぼすクロロフィル投与の影響
mean ± S.E. (n=6). ☆ p < 0.05

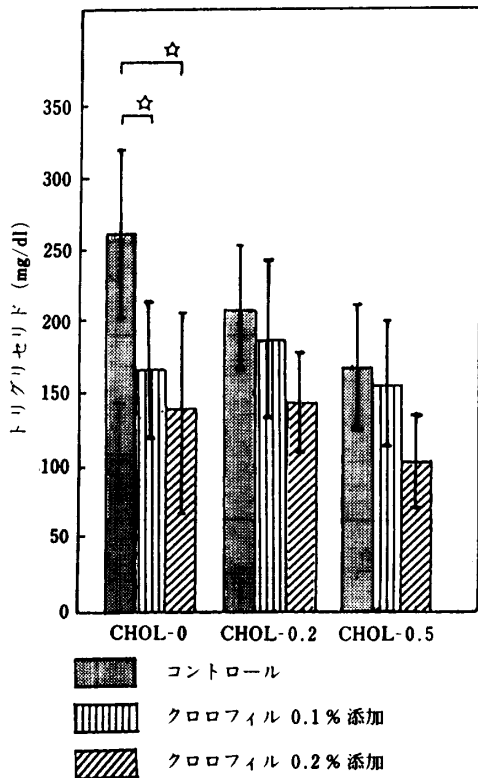


図 4. ラット血漿トリグリセリドに及ぼすクロロフィル投与の影響
mean ± S.E. (n=6). ☆ p < 0.05

取が増加するにしたがって減少傾向を示した。クロロフィル投与は血漿 TG を明らかに減少させた。とくにその効果は CHOL-0 群で大きく認められた。

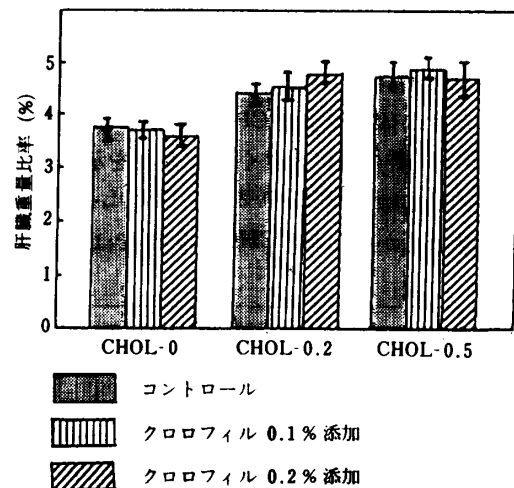


図 6. ラットの体重に対する肝臓重量比率に及ぼすクロロフィル投与の影響
mean ± S.E. (n=6)

3) リン脂質

血漿リン脂質 (PL) の結果を図 5 に示す。本実験では CHOL-0.2 群, CHOL-0.5 群, CHOL-0 群の順に高値を示した。他の報文¹³⁾にくらべ CHOL-0 群の値は低いのだがその理由はわからない。クロロフィル投与は、すべての群で血漿 PL を減少させた。クロロフィル投与を 0.1% から 0.2% に増加させた影響は CHOL-0.5 群にのみみられ、CHOL-0 群, CHOL-0.2 群では 0.1%

クロフィルの血漿脂質改善効果

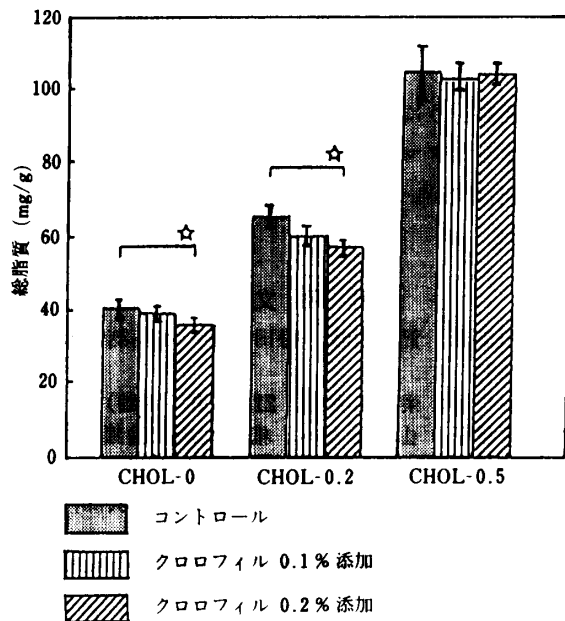


図 7. ラットの肝臓総脂質に及ぼすクロフィル投与の影響

mean \pm S.E. ($n=6$). $\star p < 0.05$

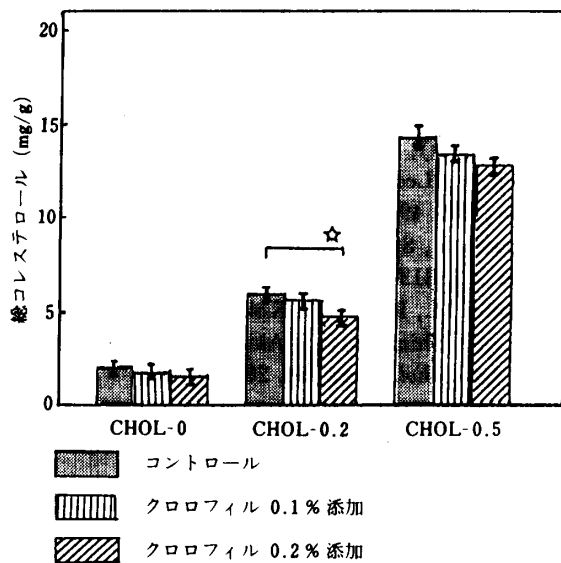


図 8. ラットの肝臓総コレステロールに及ぼすクロフィル投与の影響

mean \pm S.E. ($n=6$). $\star p < 0.05$

と 0.2% で差はみられなかった。

(3) 肝臓脂質に及ぼすクロフィル投与の影響

肝臓重量はコレステロールの摂取により増加した (図 6)。クロフィル投与により肝重量は CHOL-0.2 群に 0.2% 投与した場合増加傾向がみられたが、どの群においても有意な変化はみられなかった。

肝臓総脂質の結果を図 7 に示す。肝臓総脂質はコレス

テロール摂取量に応じて著しく増加した。クロフィルの投与は、総脂質を減少させる傾向を示し、とくに CHOL-0 群と CHOL-0.2 群に 0.2% 投与したラットは有意に減少した。肝臓総コレステロール (図 8) は、総脂質と同様にコレステロール摂取量に応じて著しい増加を示した。クロフィルの投与効果は血漿ほど明らかでないが、すべての群で減少傾向を示し、CHOL-0.2 群に 0.2% 投与したラットでは有意な減少となった。

4. 考 察

クロフィル投与の脂質代謝に及ぼす影響をコレステロール無添加、0.2%、0.5% 添加飼料で飼育したラットについて調べ、クロフィル投与は血漿脂質を低下させるという結果を得た。

血漿コレステロールに対するクロフィル投与の効果はコレステロール無添加の場合に大きく認められ、CHOL-0.2、CHOL-0.5 とコレステロールの添加量を増すにつれ効果は減じ、CHOL-0.5 の CE はクロフィルの投与で低下は認められなかった。Ito ら⁵⁾の研究ではフェオフィチンやフェオホルバイドにコレステロール低下作用を認めたが、クロフィルは無効であった。彼らのクロフィルの投与量、25 mg/(day·rat) は著者らの投与量とほぼ同量である。しかし彼らは飼料に 1% のコレステロールを添加している。入谷²⁾も認めているように、また本実験の 0.5% 添加の結果も同様と考えられるが、飼料のコレステロールが多いとクロフィルの低コレステロール効果は明確に表れにくくなるようである。クロフィルの低コレステロール効果は、Ito らの結果が示すようにフェオフィチン等に比べ小さいのかもしれない。

クロフィルに摂取コレステロールの吸収抑制作用があるかどうかを判定するにはコレステロールに対するクロフィルの量が少なすぎたのかもしれない。本実験ではクロフィルはコレステロール無添加、あるいは添加量の少ないところで低コレステロール作用を発揮している。クロフィルの作用としては、①胆管より分泌された胆汁酸やコレステロールの再吸収の阻害、②肝臓におけるコレステロール合成の阻害あるいはステロイド化合物の排泄の促進等が考えられる。肝臓での作用を考えたとき、クロフィルは吸収されなければならない。吸収量は測定してないが、肝臓のクロロホルム：メタノール抽出液はわずかではあるが緑色を呈していたし、またマウスに同量のクロフィルを投与した別の実験ではマウスの体は緑色をおびていた。

これらのことから、クロロフィルあるいはその代謝産物はある程度吸収されているようである。しかし、一方、ラットの糞は著しい緑黒色を呈していた。クロロフィルの多くはそのまま糞便中に排泄されるのかもしれない。クロロフィルのコレステロール低下作用の機構を明らかにするためには、糞便中に排泄されたステロイド化合物やクロロフィル関連物質を測定する必要があると考えられる。

5. 要 約

クロロフィルの血漿脂質改善効果をコレステロール無添加、0.2%、0.5%添加飼料にクロロフィルを0.1%または0.2%添加して検討し、次のような結果を得た。

- 1) 飼料へのクロロフィル0.1%または0.2%添加はラットの成長にほとんど影響しなかった。
- 2) 血漿脂質をイアトロスキヤンを用いて、コレステロールエステル、遊離コレステロール、トリグリセリド、リン脂質に分けて測定したところ、これら脂質はクロロフィル投与で減少した。
- 3) クロロフィルの血漿コレステロール低下作用は、コレステロール無添加群で大きく認められ、飼料コレステロール量の増加につれ効果は減少し、コレステロール0.5%群のコレステロールエステルに対しては無効であった。
- 4) 肝臓総脂質および総コレステロールは、コレステロール摂取量に応じて著しく上昇した。クロロフィル投与は総脂質、総コレステロールを減少させる傾向を示し、CHOL-0群とCHOL-0.2群にクロロフィル0.2%投与した総脂質と、CHOL-0.2群にクロロフィル0.2%

投与した総コレステロールは有意の減少となった。

本研究を行うにあたり、クロロフィル試料をご提供いただきましたタマ生化学(株)に厚く御礼申し上げます。なお本研究はすかいらーく学術研究調査助成金を受けて行いました。

引 用 文 献

- 1) 金田尚志, 荒井君枝, 徳田節子: 水産誌, **29**, 1020 (1963)
- 2) 入谷信子: 栄養と食糧, **22**, 258 (1969)
- 3) 野原優子, 山下かなへ: 相山大研究論集, **21**, 371 (1990)
- 4) 辻 啓介, 辻 悦子, 鈴木慎次郎: 栄養誌, **33**, 153 (1975)
- 5) Ito, K. and Tsuchiya, Y.: *Tohoku J. Agric. Res.*, **27**, 46 (1976)
- 6) Altschul, V.R. and Smart, T.A.: *Arzneimittel Forsch.*, **11**, 762 (1961)
- 7) 辻 啓介, 辻 悦子, 鈴木慎次郎: 栄養誌, **36**, 55 (1978)
- 8) Zscheile, F.P., Jr., Comar, C.L. and Mackinny, G.: *Plant Physiol.*, **17**, 666 (1942)
- 9) Bradley, D. M., Rickards, C.R. and Thomas, N.S. T.: *Clin. Chem. Acta*, **92**, 293 (1979)
- 10) ヤترون(株)(編): イアトロスキヤン分析法4(ヤترون印刷物), ヤترون(株), 東京(1986)
- 11) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)
- 12) Pearson, S., Sterm, S. and McGavack, T.H.: *Anal. Chem.*, **25**, 813 (1953)
- 13) Sugano, M., Inoue, T., Koba, K., Yoshida, K., Hirose, N., Shinmen, Y., Akimoto, K. and Amachi, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2669 (1990)