

報 文

ラットによる食品含有フラボノイドの肝臓, 血清コレステロール,
血清8-イソプロスタニンに及ぼす影響の検討

八巻 幸二*, 高橋 陽子

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
食品機能研究領域・栄養機能ユニット

**Effect of some flavonoids in food on liver, serum cholesterol
and 8-isoprostane in rats.**

Kohji Yamaki* and Yoko Takahashi

Nutritional function Laboratory, Food function division, National Food Research Institute, NARO
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

Four typical edible flavonoids, which were catechin, quercetin, chrysin, and genistein, were evaluated on body and liver weight, aspartate aminotransferase, and alanine transaminase, serum cholesterol and 8-isoprostane in normal strain Sprague Dawley rats. These flavonoids were given by containing in standard diet for 4 weeks, after feeding these parameters were measured. By the flavonoids intake, there were no change of body weight and liver weight. Furthermore, healthy effects on liver, anti-oxidant effect, and reducing effect of genistein for total cholesterol in serum. These flavonoids have good effects for the intake for 4 weeks.

Keywords: food safety, flavonoids, high intake

緒 言

食物特に野菜等に含まれるフラボノイドは、これまで多くの健康機能が報告され、この性質を活用した

機能性食品の開発も盛んに行われている。特定保健用食品や、平成27年度から施行された機能性表示食品制度でも、食経験があるものであっても、成分の濃度を高めた食品あるいは錠剤やカプセル等の食物については特に、十分な配慮が必要となる。そこで、日常に大量摂

* 連絡先 (Corresponding author), kyamaki@affrc.go.jp

取の可能性のあるフラボノイドを選択し、汎用される系である Sprague Dawley (SD) ラットに4週間の混餌食を摂取させ、肝臓への影響、血清中のコレステロール値、細胞膜の酸化マーカーを測定してその影響を調べた。

実験材料および方法

1. 試料・試薬

フラボノイドとして、(+)カテキン (Sigma-Aldrich Co. LTD), ケルセチン (LKT Laboratories Inc.), クリシン (LKT Laboratories Inc.), ゲニステイン (LCL Laboratories) を用いた。動物の飼料として、NMF 粉末飼料 (オリエンタル酵母) を用い、規定の含量となるように混合し、エチレンオキサイド滅菌した後、給餌した。血液中のパラメータとして、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST, GOT) とアラニントランスアミナーゼ (ALT, GPT) の測定はトランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬) を、総コレステロール値はコレステロール E-テストワコー (和光純薬) を用い、8-イソプロスタンは酵素免疫測定法 (EIA) キット (Cayman chemical) を用いて測定した。

2. 動物

SD 系雄性ラット (日本チャールズリバー社) を4週齢で購入し、通常食で予備飼育後、フラボノイド添加食を給餌した。飼育は室温24-26度、湿度40-60%, 8:00-20:00 昼の環境下で飼育した。動物実験は農研機構規則で定められた飼育環境と食品総合研究所細則に従って、食品総合研究所動物実験委員会の承認の下に行われた。

3. 飼育・採血・血液中のパラメータ測定

フラボノイド4種、カテキン、ケルセチン、クリシン、ゲニステインをNMF粉末飼料に添加し、それぞれ、0 (コントロール), 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0% (w/w) になるように均一に混合し、フードカバー付給餌器 (オリエンタル) で給餌した。また2-3日おきに体重の測定と餌の残量を測定した。4週間飼育した後、麻酔下において頸動脈切断により、採血し放血致死させ、肝臓の重量を測定した。採取した血液は、凝固させた後、3000 rpm, 10 min, 4℃で遠心分離後、血清を採取した。採取した血清は、AST, ALT, 総コレステロール, 8-イソプロスタンの測定に用いた。

4. 統計処理

統計処理は、各群の平均値と標準誤差で表し、Dunnettの多重比較で各群とコントロール群との有意性の検定を行った。

結果および考察

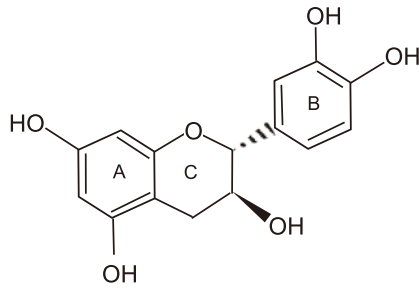
1. 体重および肝臓重量に対する影響

フラボノイドの体重と肝臓重量に対する影響を調べるため、ラットを用いた4週間の摂餌試験を行った。図1には、用いた4種の典型的なフラボノイドの構造式を示した。緑茶等に含まれる代表的フラボノイドであるカテキン (A) は、分類的には flavan-3-ol に含まれ、フラボノイドの基本骨格のC環の3番目に水酸基を有している。Flavanolの代表であるケルセチン (B) はタマネギに含まれている。Flavoneの代表であるクリシン (C) は、熱帯地方の野菜やハーブ等に多く含まれ、細胞試験で抗がん作用が確認されている¹⁾²⁾。また大豆に多く含まれるイソフラボンのゲニステイン (D) は、鶏飼育ではあるがサプリメントで免疫増強効果の報告があり³⁾、大豆製品に多く含まれている。クリシン以外は、日本で普通に摂取できるフラボノイドである。4週間摂取後、ラットは、外見上の変化はなく、行動観察でも異常な様子は確認されず、健康状態は異常無かった。図2には、4週間の飼育後に測定した体重を示した。高用量での体重減少傾向はあったが、用いた4種のフラボノイドとも、明らかに有意な体重減少は確認されなかった。ケルセチンの0.03%摂取群では有意な減少が確認された。体内での異物代謝臓器としての肝臓では、比重量の変動を調べた (図3)。その結果、有意な変動は確認されなかった。4種のフラボノイド全体では、上昇傾向が散見されるが、どれも有意なものではなかった。しかし、コントロールと比較し、上昇傾向が認められることは、代謝活性増加による血流上昇や炎症傾向など、肝臓への負担が影響しているものと想定される。

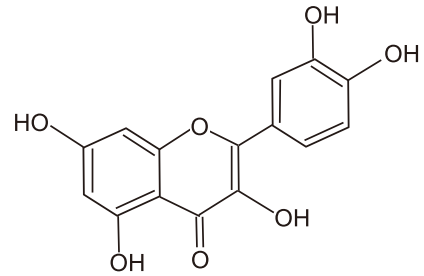
2. AST, ALT, 血清コレステロール, 血清8-イソプロスタンの影響

図4と図5は血中のASTとALTの結果である。ASTは肝臓を含めた全身の臓器に、ALTは肝臓に障害があった場合に、数値が上昇するマーカーである。4種のフラボノイドすべてに、これらマーカーの低下傾向が確認され、特にケルセチンでは0.1%, 0.3%食で有意な低下を示した。このことよりフラボノイドは肝臓

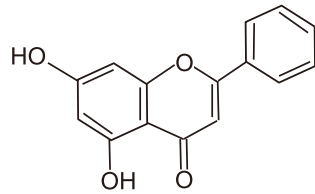
A カテキン



B ケルセチン



C クリシン



D ゲニステイン

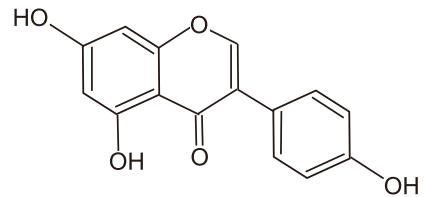


図1. 使用したフラボノイドの構造式

A カテキン, B ケルセチン, C クリシン, D ゲニステイン

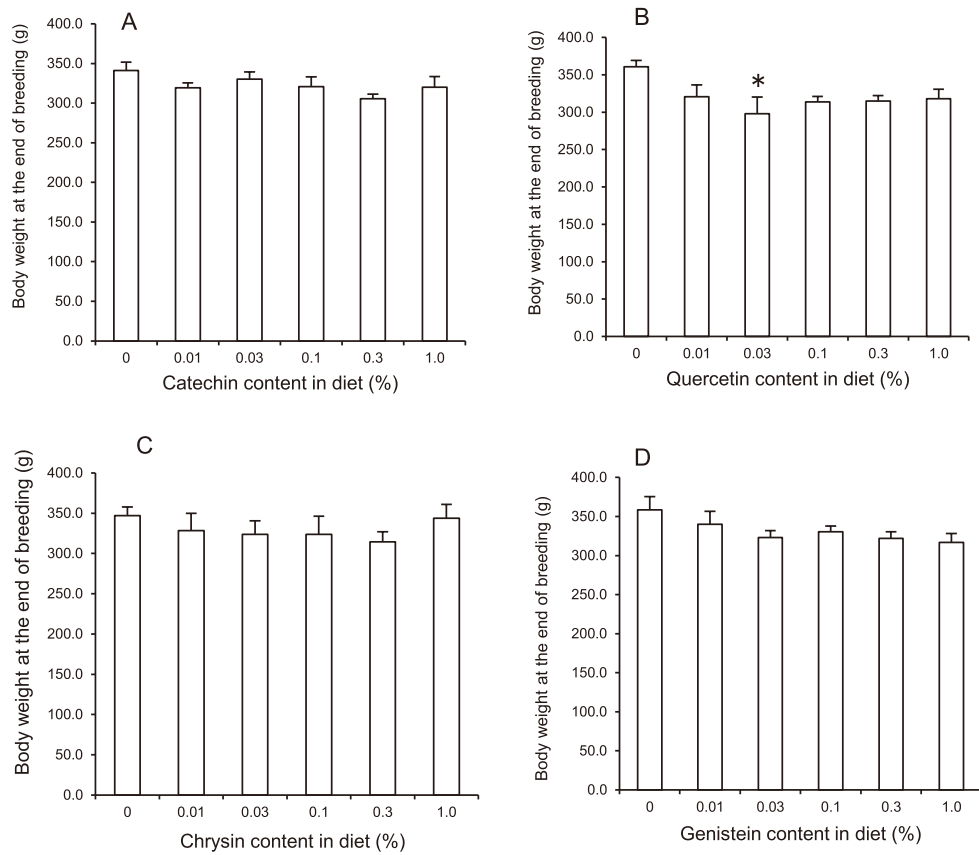


図2. 飼育期間終了時の体重

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置の飼育終了時の体重の結果を示した。値は平均値±標準誤差で表した (n=4)。*: p<0.05でコントロール群 (0%) と有意な差を示す。

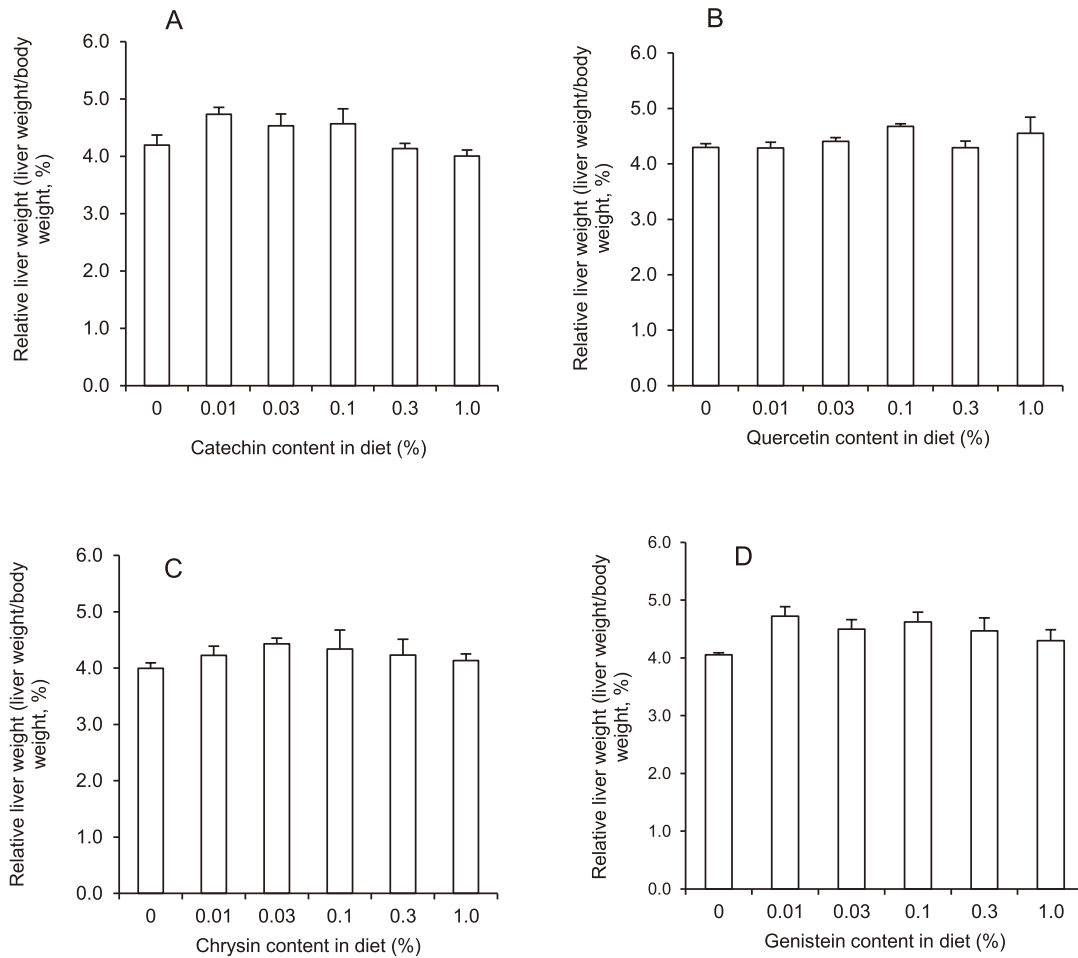


図3. 肝臓の比重量

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットの体重に対する肝臓比重量 (%)の結果を示した。値は平均値±標準誤差で表した (n=4)。

保護作用を有する可能性があると考えられた。カテキン、ケルセチン、ゲニステインには肝臓保護作用があることは既に報告があり⁴⁻⁶⁾、この事実を確認する結果になった。コレステロール値に対する効果は、ゲニステイン以外の3種のフラボノイドでは効果は確認されず、ゲニステインのみ有意な減少を示した(図6)。化学構造では、用いたフラボノイドのうち、ゲニステインのみB環とC環の結合位置の違いがあり、血中コレステロール濃度低下の影響に、この構造の重要性が示唆された。ゲニステインの血中コレステロール濃度に対する抑制効果は、既に多くの報告があり⁷⁾⁸⁾、この結果を支持するものである。注意喚起のためであるが、食品安全委員会からは、大豆イソフラボンの安全

な一日摂取目安量の上限値70~75 mg/日(大豆イソフラボンアグリコン換算値)と設定されており、この量を超えるのは好ましくない。またケルセチンの場合には、ヒト試験のコレステロール低下効果の報告があり⁹⁾、ラットとヒトでの感受性の差があると推定された。コレステロールのげっ歯類での試験では、ヒトとの違いが大きいため、同様な結果を得ることは困難であると考えられる。抗酸化性の効果として、血液中の8-イソプロスタンの測定を行った。8-イソプロスタンは、細胞膜に含まれるリン脂質の脂肪酸が酸素ラジカルによって酸化障害を受け、非酵素的反応で生成され、血液中に放出されると考えられ、酸化ストレスのマーカーとして用いられている。図7は、8-イソプロスタ

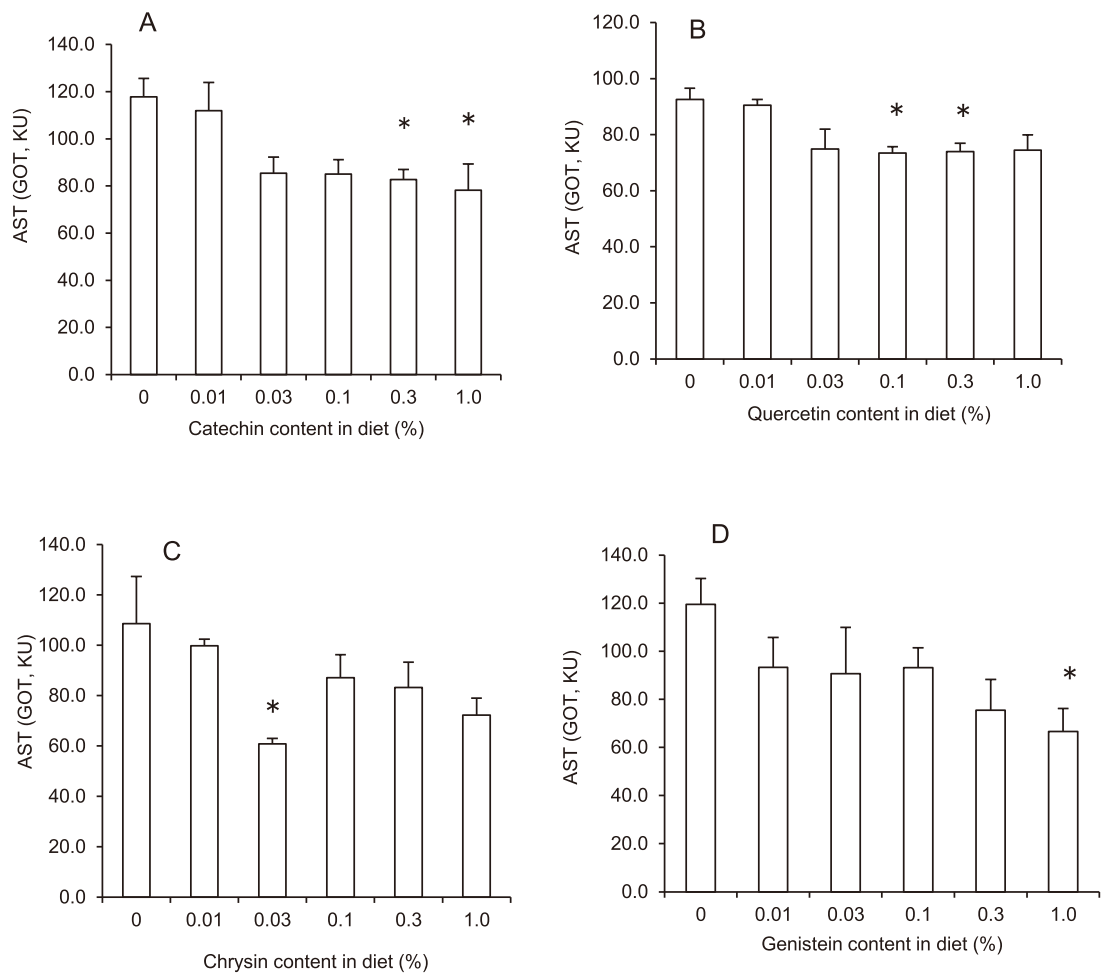


図4. 血液中AST (GOT) の測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, 測定キットを用いてASTの活性を測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: p<0.05でコントロール群 (0%)と有意差を示す.

ンの血中濃度を測定した結果である. ケルセチンは用量依存的な抑制効果を示したが, 他のフラボノイドは有意な変動は確認されなかった. カテキンでは, 全体の多重比較では有意な変動は認められなかったが, 0.01-0.1%群での層別解析を行うと5%で有意な抑制を示す結果であった. この結果は, 0.3%-1%群で何らかの他の抗酸化抑制因子の存在が推測された.

用いた4種のフラボノイドは最大用量の1%含有食でも, 外見や, 行動等の変化はなく, 健康状態を保ち, また有意な体重の減少もなく, 肝臓の比重量の変動は全く確認されなかった. この最大用量の1%含有食とは, ラットの1日当たり摂取する食餌量が約100 g/kgであることから換算すると, 1日の食事で

50 kg成人が50 gのフラボノイドを取る量となる. ASTでは, 0.1%以上の添加食で肝臓指標の減少が, 幾つかのフラボノイドで確認され, ALTではケルセチンが低下作用を示した. またコレステロール値の減少効果に関して, イソフラボンのゲニステインで抑制効果が確認された. 酸化ストレスマーカーの8-イソプロスタンでは, カテキンとケルセチンで, その抑制効果が確認され, 生体内での抗酸化効果が期待される.

謝 辞

本研究の一部は, 農研機構: 機能性を持つ農林水産物・食品開発プロジェクトの助成を受けた.

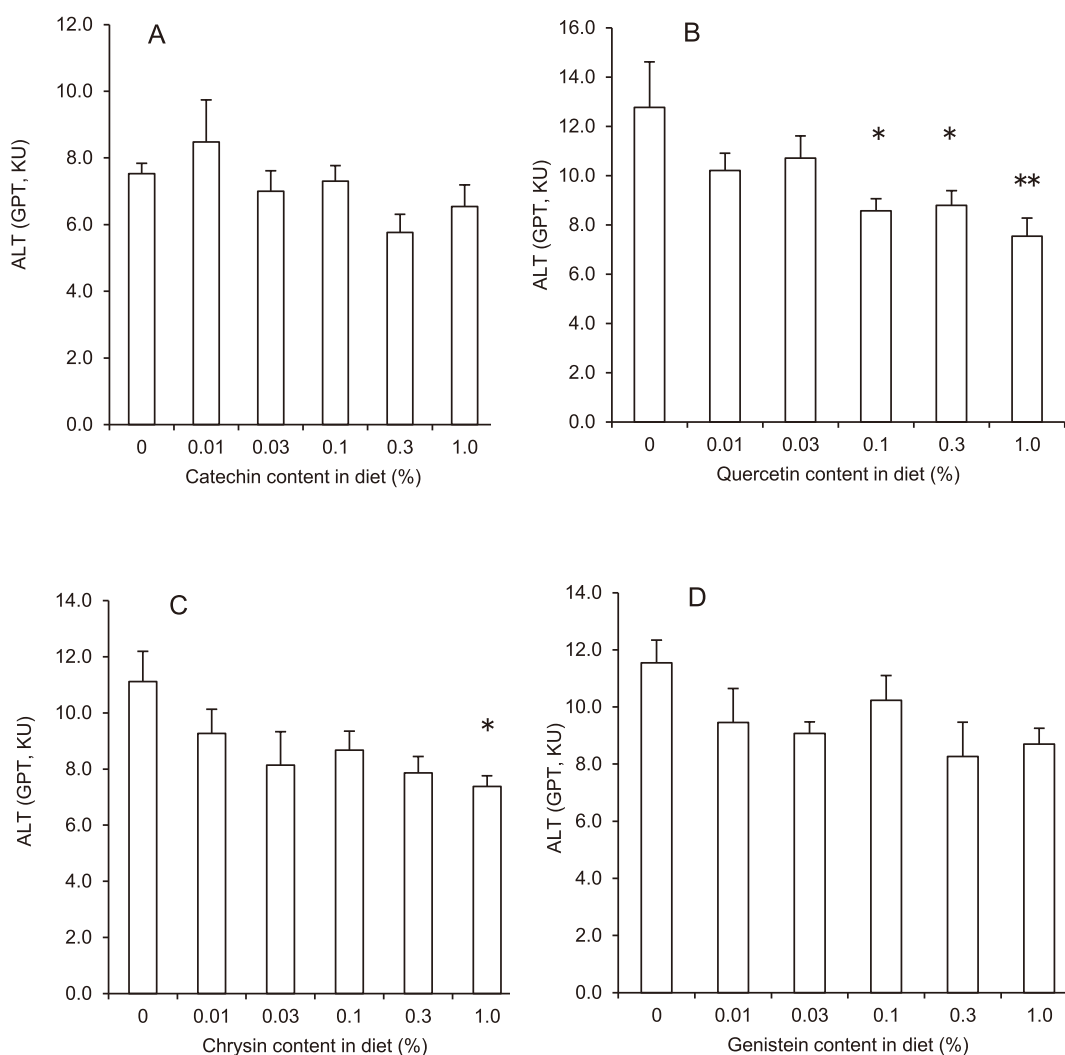


図5. 血液中ALT(GPT)の測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, 測定キットを用いてALTの活性を測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: p<0.05, **: p<0.01でコントロール群 (0%)と有意差を示す.

要約

4種のフラボノイド, カテキン, ケルセチン, クリシン, およびゲニステインをラットに摂餌投与し, 4週間飼育後の肝臓, 血清コレステロール, 8-イソプロスタンを測定した. フラボノイドの餌添加最大1%でも, 明らかな外見上, 行動等の変化は確認されず, また肝臓への変化も認められなかった. また肝臓保護作用と抗酸化効果およびゲニステインの抗コレステロール効果が確認された.

参考文献

- 1) Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn. Rev.* **8**, 122-146 (2014).
- 2) Xia Y, Lian S, Khoi PN, Yoon HJ, Joo YE, Chay KO, Kim KK, Do Jung Y. Chrysin inhibits tumor promoter-induced MMP-9 expression by blocking AP-1 via suppression of ERK and JNK pathways in gastric cancer cells. *PLoS One.* **10**, e0124007. (2015)

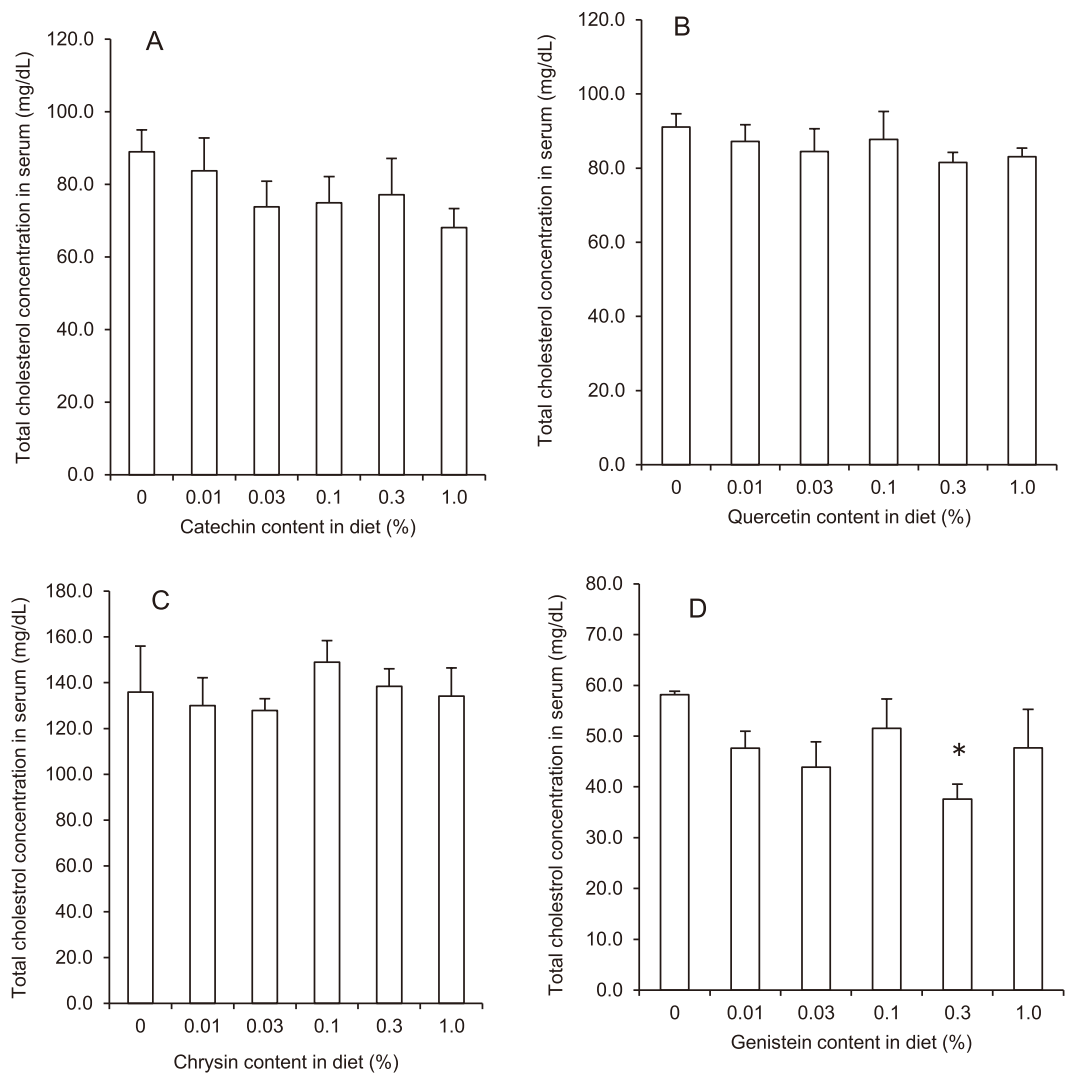


図6. 血液中総コレステロールの測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニス테인処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, コレステロール測定キットを用いて血清中の総コレステロールを測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: p<0.05でコントロール群 (0%) と有意差を示す.

- 3) Rasouli E and Jahanian R. Improved performance and immunological responses as the result of dietary genistein supplementation of broiler chicks. *Animal*. **9**, 1473-1480 (2015).
- 4) Tang Y, Gao C, Xing M, Li Y, Zhu L, Wang D, Yang X, Liu L, Yao P. Quercetin prevents ethanol-induced dyslipidemia and mitochondrial oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 1194-1200 (2012).
- 5) Delgado ME, Haza AI, García A, Morales P, Myricetin, quercetin, (+)-catechin and (-)-epicatechin protect against N-nitrosamines-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro*. **23**, 1292-1297 (2009).
- 6) Fan YJ, Rong Y, Li PF, Dong WL, Zhang DY, Zhang L, Cui MJ., Genistein protection against acetaminophen-induced liver injury via its potential impact on the activation of UDP-glucuronosyltransferase and antioxidant enzymes. *Food Chem. Toxicol.* **55**, 172-181 (2013).
- 7) Tang C, Zhang K, Zhao Q, Zhang J., Effects of Dietary Genistein on Plasma and Liver Lipids, Hepatic

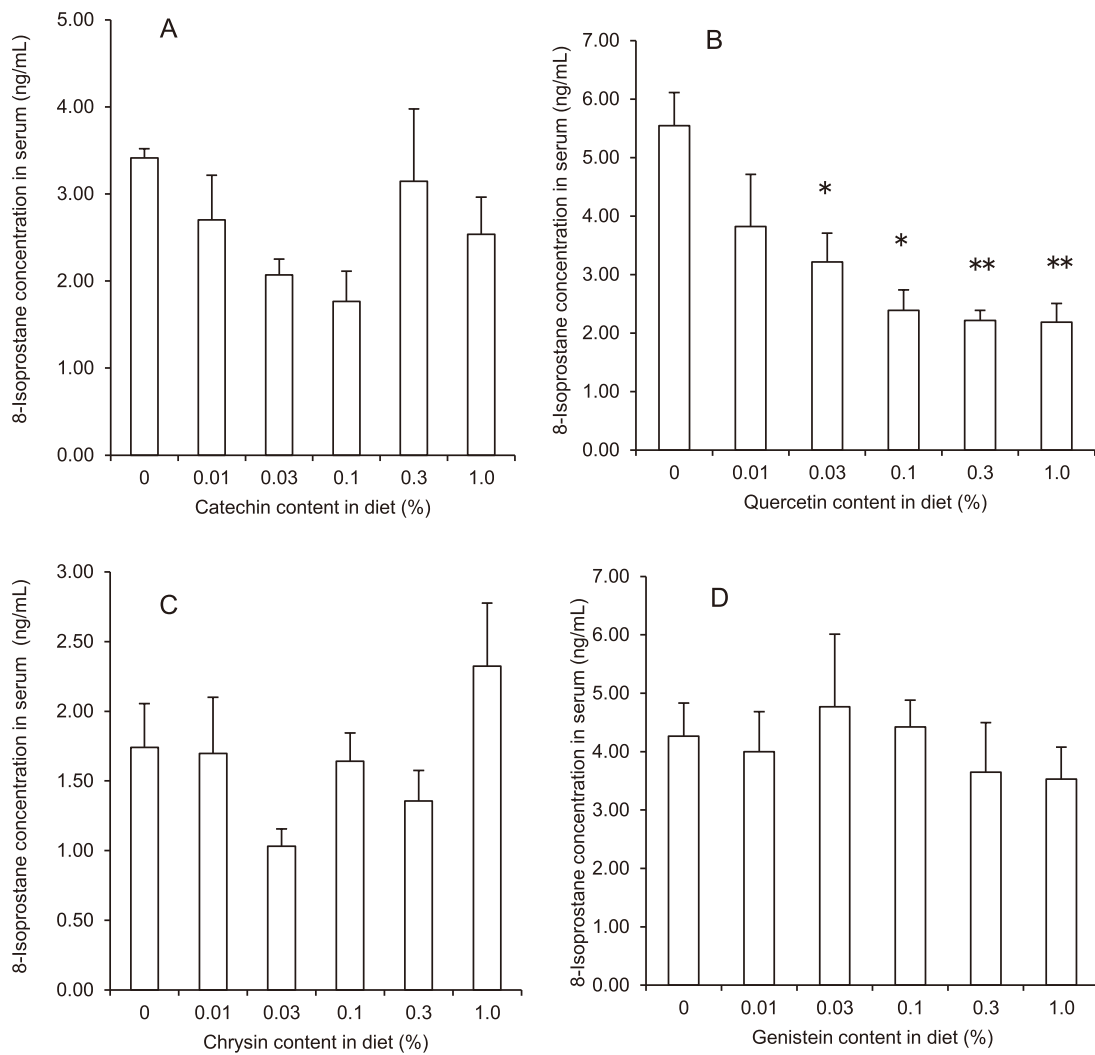


図7. 血液中 8-Isoprostane の測定結果

A: カテキン処置, B: ケルセチン処置, C: クリシン処置, D: ゲニステイン処置ラットから採血した後, 遠心分離後血清を採取した. この血清を用いて, 8-Isoprostane EIA測定キットを用いて測定した. 値は平均値±標準誤差で表した (n=4). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ でコントロール群 (0%) と有意差を示す.

- Gene Expression, and Plasma Metabolic Profiles of Hamsters with Diet-Induced Hyperlipidemia. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7929-7936 (2015).
- 8) Legette LL, Lee WH, Martin BR, Story JA, Arabshahi A, Barnes S, Weaver CM., Genistein, a phytoestrogen, improves total cholesterol, and Synergy, a prebiotic, improves calcium utilization, but there were no

- synergistic effects. *Menopause.* **18**, 923-931 (2011).
- 9) Lu TM, Chiu HF, Shen YC, Chung CC, Venkatakrishnan K, Wang CK., Hypocholesterolemic Efficacy of Quercetin Rich Onion Juice in Healthy Mild Hypercholesterolemic Adults: A Pilot Study. *Plant Foods Hum. Nutr.* Sep 18 (Online) (2015).