

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (11) 1052-1057 (1985)

大麦若葉青汁成分の研究. ラットの食餌による高コレステロール血症に対する影響

大竹英俊,^{*,a} 野中涼代,^a 澤田淑子,^a 萩原義秀,^a 萩原秀昭,^b 久保田和彦^c
日本薬品開発,^a 萩原健康科学研究所,^b 東京理科大学薬学部^c

Studies on the Constituents of Green Juice from Young Barley Leaves. Effect on Dietarily Induced Hypercholesterolemia in Rats

HIDETOSHI OHTAKE,^{*,a} SUZUYO NONAKA,^a YOSHIKO SAWADA,^a
YOSHIHIDE HAGIWARA,^a HIDEAKI HAGIWARA,^b
and KAZUHIKO KUBOTA^c

Research Laboratory, Nihon Yakuhin Kaihatsu Co., Ltd.,^a 1-26, 1-Chome, Mitsuya,
Minami, Yodogawa-ku, Osaka, 532, Japan and Hagiwara Institute of Health,^b
1173, Maruyama, Asazumachyo, Kasai, Hyogo, 679-01, Japan and
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo,^c
Ichigaya, Funagawaramachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 162, Japan

(Received April 13, 1985)

Hypocholesterolemic effects of green juice from young barley leaves were investigated on hypercholesterolemia in rats fed on a high cholesterol diet (HCD). The *n*-hexane extract from a water insoluble fraction of green juice showed hypocholesterolemic activity. At least two substances responsible for the hypocholesterolemic effects were isolated from the *n*-hexane extract and purified by silica gel chromatography. One of them was β -sitosterol, and the other *n*-hexacosyl alcohol which was a saturated higher alcohol having a molecular weight of 382. In the rats fed on HCD added with *n*-hexacosyl alcohol at a concentration of 1%, the plasma cholesterol level was hardly lowered on day 3 but markedly on day 9. In a similar experiment, β -sitosterol markedly lowered the plasma cholesterol level of rats on both day 3 and day 9. Through these experiments, we found that barley leaves contained hypocholesterolemic substances, and that two compounds such as β -sitosterol and *n*-hexacosyl alcohol were responsible for the hypocholesterolemic activity.

Keywords—barley leaf; green juice; hypocholesterolemic effect; *n*-hexacosyl alcohol; β -sitosterol

近年我国では、食生活の洋風化や環境の悪化などに伴い、成人病の増加傾向にあると言われ、動脈硬化、糖尿病、肥満、高血圧症などの脂質代謝障害は、特に生体コレステロールの変動と密接な関係にあると言われている。このような現象を背景として、脂質代謝を改善しようとする種々の試みがなされている。

著者らは、大麦若葉から得られた青汁の研究を続けており、すでにその中に強力な抗炎症性蛋白¹⁾ 突然変異抑制蛋白²⁾ の存在を立証し、報告してきた。また今回は、ラットの食餌による高コレステロール血症に及ぼす大麦青汁の効果について検討した結果、ラットの血中、肝コレステロール値を有意に抑制する成分がその中に含まれることを見出したので報告する。

実 験 の 部

1. 試料, 薬物及び試薬 大麦 (*Hordium vulgare* L. var. *nudum* Hook) は、大分県国東半島で栽培し、草丈 15—25 cm の葉部を刈り取り搾汁し、繊維質を除いた青汁を噴霧乾燥法で粉末化したもの (GM-SD) を出発原料として Chart 1 に示す方法で分画した。青汁の噴霧乾燥粉末 1 kg を水に溶かし、10000×*g* で 20 分間遠沈し、沈殿を集めて凍結乾燥し、*n*-hexane で抽出した。不溶部分を GM-R とし、可溶部分を濃縮して sample I を得た。Sample I は、シリカゲルのカラムに通して sample III とし、さらにシリカゲルカラムを通して IV—VI に分画した。Sample IV から後述のように hexacosyl alcohol を得た。Sample V は、主に β -sitosterol からなるが

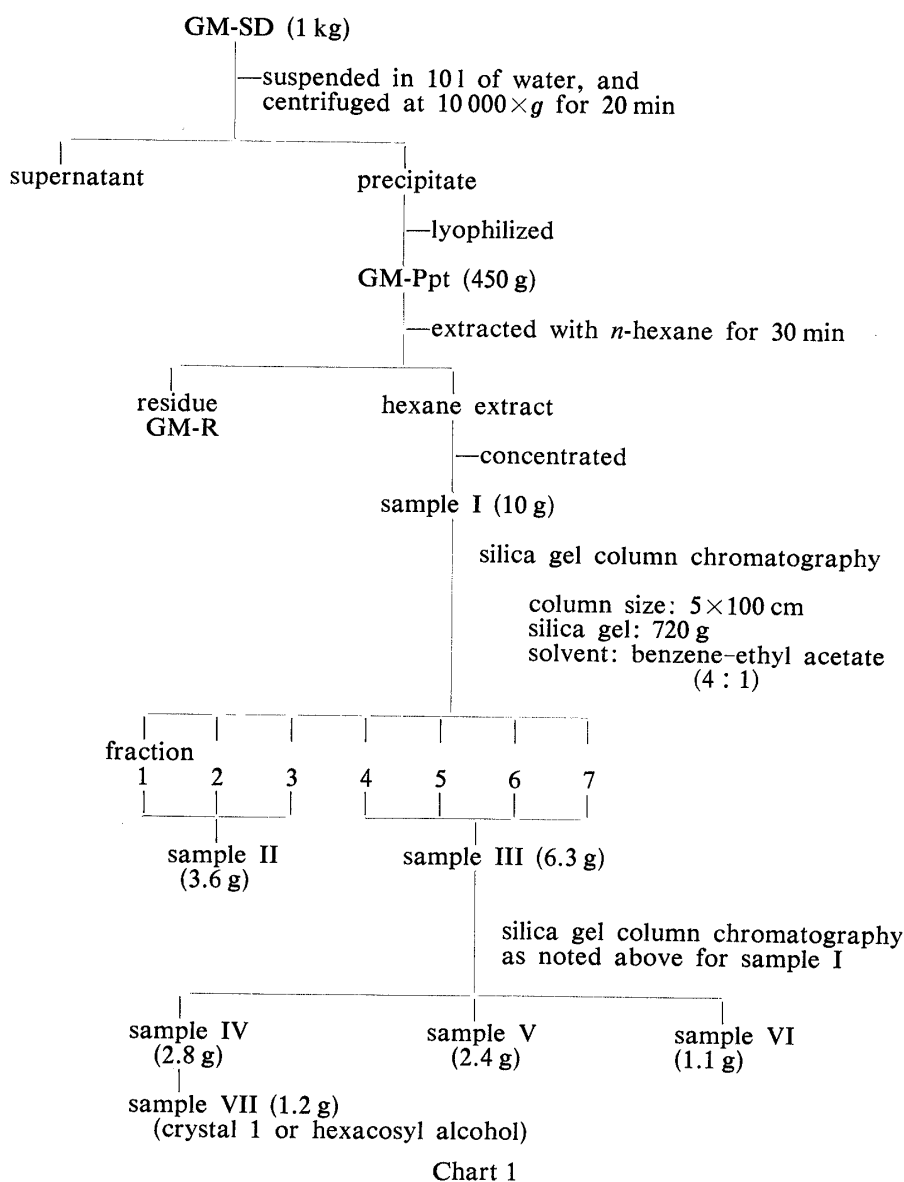


Chart 1

hexacosyl alcohol なども含んでいる。Sample VI は、少量の β -sitosterol と不明の有機物からなる。大麦青汁から分画された試料及び薬物はオリーブ油に懸濁して経口投与するか、又は高コレステロール血症飼料 (HCD) に 1% の濃度に添加して投与した。

対照薬には、ニコチン酸 (半井化学)、ソイステロール (森下製薬)、 β -sitosterol (メルク社) を用いた。

総コレステロール量 (酵素法)、遊離コレステロール量 (酵素法)、HDL-コレステロール量 (ヘパリン・マンガン結合沈殿法)、 β -リポ蛋白量 (ヘパリン-塩化カルシウム沈殿比色法)、トリグリセライド量 (GPO-*p*-クロルフェノール発色法) は、臨床検査用キット (和光純薬製) を用いて測定した。

2. 飼料及び供試動物 高コレステロール (HCD) 飼料は、天正らの飼料³⁾ を参考にして Table I に示す組成で調整した。動物は、Wistar 系雄性ラット (日本クレア) 4 週齢を購入し、通常飼育飼料 CE-2 (日本クレア製) で 1 週間飼育し、体重 100 g 前後のものを実験に供した。試料は、Table II に示す検体の GM-SD と GM-Ppt, sample I, GM-R 及びニコチン酸は、いずれもオリーブ油に懸濁して 1 日 1 回 6 日間ラットに経口投与した。このとき、control 群には、オリーブ油のみを経口投与した。他の実験での検体は、すべて HCD 飼料に添加して摂取させた。

3. 血清中及び肝コレステロール測定 血清脂質は、HCD 飼料飼育開始直前と、3 日目、6 日目、9 日目に測定した。ラットを 16 時間絶食 (水は自由に飲ませた) させ、無麻酔下背位に固定し、金武ら⁴⁾ の方法に従って頸静脈より約 0.6 ml ずつ採血した。血液は、凝固後遠心分離 (3000 rpm, 15 min,) を行って血清を分取し、血

清脂質を測定した。肝コレステロールは、実験6日目に肝臓を摘出し、その1gを精秤して20倍量のエタノールを加えホモジナイズしたのち、Abell¹⁰らの方法に準じて総コレステロール量を測定した。

4. 急性毒性試験 ICR系雄性マウス(日本クレア), 体重25—30g前後のものを用いた。試料は、オリーブ油に懸濁して経口投与し、投与後7日間通常固型飼料CE-2(日本クレア製), 水を自由に摂取させて飼育観察した。

5. 統計処理法 有意差検定は、Studentのt検定法により行った。

結 果

1. 高コレステロール飼料の検討

天正らの方法により調製したHCD飼料を用いてラットを飼育すると、血中総コレステロール値は正常値の3倍以上に上昇したが、ラットの体重増加が抑制され、下痢、立毛等の症状が認められた。これは用いたラットが、天正らの用いたものと系統が異なるため感受性に差があると思われたので、飼料の組成をTable Iに示すように改変して用いた。改変したHCD飼料でラットを飼育すると下痢、立毛の症状を現すことなく、Fig. 1に示すように血清中の総コレステロール値を3日目で約4倍に、6日目で約10倍にまで上昇させた。

スクリーニングには、このHCD飼料を用いて検討した。

2. 大麦若葉青汁分画のコレステロール血症抑制作用のスクリーニング

Chart 1に示す方法で分画したGM-SDの水溶性分画と不溶性分画について抗脂血症作用を調べた結果、水不溶性分画にその活性が認められた。そこで水不溶性分画を凍結乾燥法により粉末化し、*n*-ヘキサンで抽出し、抽出物をsample Iとし、その残渣をGM-Rとした。それぞれの分画試料をオリーブ油に懸濁して1日1回6日間経口投与した。対照薬には、ニコチン酸を用いた。

結果は、Table IIに示すようにsample Iであるヘキサン抽出物分画に有意な血中総コレステロール値を低下させる効果が認められた。

またHCD飼料にsample Iを1%, 0.5%, 0.25%添加し、対照薬にソイステロールを用いて調べてみると、1%添加では6日目、9日目で有意な効果を示した。0.5%添加では9日目にソイステロールと同様に有意なコレステロール低下作用を示した(Table III)。

このsample IをChart 1に示すように、更にシリカゲルクロマトグラフィーにより分画し、sample II, IIIとして調べると(Table IV)その血中総コレステロール低下効果は、sample IIIに認められたので、sample IIIを更にsample IV, V, VIに分画して抗脂血症作用のスクリーニングを行った(Table V)。その結果、sample VIはほとんど効果を示さなかった。Sample IVは、3日目ではほとんどコレステロール低下作用を示さないが、6日目になると有意な低下を示した。Sample Vは、3日目、6日目とも有意な抑制効果を示した。

Sample IVから後述の方法で結晶Iを単離した。このものをsample VIIとして抗脂血症作用を調べると、3日目、6日目では血中総コレステロール低下作用を示さなかったが、9日目では有意な効果を示した。

Table I. Composition of High Cholesterol Diet

Components	Tensho's (%)	Modified (%)
Cholesterol	2	1
Cholic acid	1	1
Casein	20	25
Sucrose	49	50
Hydrogenated fat	12	10
Cellulose	4	5
Vitamins, Minerals	4	4
Dried fish powder	8	4

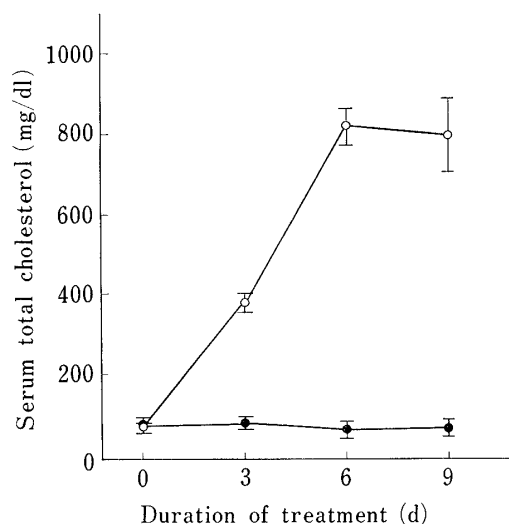


Fig. 1. Change in Serum Total Cholesterol Levels of Rats Fed on a High Cholesterol Diet

—○—, a high cholesterol diet shown by "modified" in Table I; —●—, a normal diet (CE-2, see text).

TABLE II. Effect of Young Barley Leaves Fractions on Serum Total Cholesterol Levels of Rats Fed on a Cholesterol Diet

Treatment	Dose (g/kg)	Serum total cholesterol (mg/dl) (Inhibition %) ^{a)}		LD ₅₀ (g/kg)
		Day 6		
Control		528.2±62.6		
GM-SD	5	493.1±66.0 (6.6)		>10
GM-Ppt	5	450.2±44.6 (14.8)		>10
Sample I	1	407.8±33.2 (22.8) ^{b)}		> 8
GM-R	1	454.7±43.9 (13.9)		>10
Nicotinic acid	0.5	330.1±67.1 (37.5) ^{b)}		

a) Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. b) $p < 0.05$, significantly different from the control group.

TABLE III. Effect of Young Barley Leaves Fractions on Serum Total Cholesterol Levels of Rats Fed on a Cholesterol Diet

Treatment	Dose ^{b)}	Serum total cholesterol (mg/dl) (Inhibition %) ^{a)}	
		Day 6	Day 9
Control		613.0± 26.5	683.9±37.9
Sample I	1%	510.2± 37.3 (16.8) ^{c)}	472.3±26.2 (30.9) ^{d)}
	0.5%	564.8± 33.8 (7.9)	506.5±34.6 (25.9) ^{d)}
	0.25%	667.2±101.8 (-8.8)	609.9±82.7 (10.7)
Soysterol	1%	553.6± 28.1 (9.7)	524.3±51.1 (23.3) ^{c)}

a) Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. b) Control rats were fed on a high cholesterol diet and other groups of rats on the high cholesterol diet added sample I or soysterol in the concentrations indicated in the table. c) $p < 0.05$ and d) $p < 0.005$, significantly different from the control group.

TABLE IV. Effect of Young Barley Leaves Fractions on Serum Total Cholesterol Levels of Rats Fed on a Cholesterol Diet

Treatment	Serum total cholesterol (mg/dl) (Inhibition %) ^{a)}	
	Day 6	Day 9
Control	250.0±13.2	693.3±61.0
Sample I	176.4±13.1 (29.6) ^{c)}	438.0±45.1 (36.8) ^{c)}
Sample II	198.0±24.8 (20.8)	502.0±61.8 (27.6)
Sample III	142.0±29.4 (42.8) ^{b)}	478.0±56.7 (31.0) ^{b)}
β -Sitosterol	179.0±23.5 (28.0)	346.0±70.0 (50.1) ^{c)}

Control rats were fed on a high cholesterol diet and other groups of rats on the high cholesterol diet added sample I—III or β -sitosterol at a concentration of 1%. a) Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. b) $p < 0.05$ and c) $p < 0.005$, significantly different from the control group.

肝臓 1g 当りの総コレステロール値は、結晶 I が得られた sample VII と sample V が対照の β -sitosterol と同様に、有意な血中コレステロール低下効果を示した (Table VI).

3. 大麦若葉青汁中のコレステロール血症抑制成分の構造解析

Sample IV をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム:ベンゼン:酢酸エチル=7:2:1) により分離し、酢酸エチルより再結晶して融点 78°C の無色鱗片状の結晶 I を得た。

本品の分析結果は以下のごとくであった。IR $\nu_{\max}^{\text{NaJol}}$ cm⁻¹: 3220 (OH). ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.15—1.46 (5H, m), 3.72 (2H, t, $J=7$ Hz). MS m/z : 382 (M⁺, weak), 364 (M⁺ - H₂O), 336 (M⁺ - H₂O - C₂H₄). Anal. Calcd C₂₆H₅₄O; C, 81.60; H, 14.22. Found: C, 81.62; H, 14.53. これより結晶 I は、CH₃(CH₂)₂₄-CH₂OH である *n*-hexacosyl alcohol (Ceryl alcohol) であることが判明した。

TABLE V. Effect of Young Barley Leaves Fractions on Serum Total Cholesterol Levels of Rats Fed on a Cholesterol Diet

Treatment	Serum total cholesterol (mg/dl) (Inhibition %) ^{a)}			
	Day 0	Day 3	Day 6	Day 9
Control	116.2±4.5	587.3±21.3	1184.6±95.8	
Sample III	106.2±7.1	446.0±53.8 (24.1)	776.4±48.9 (34.5) ^{c)}	
Sample IV	109.8±6.1	577.9±29.4 (1.6)	883.9±33.7 (25.4) ^{b)}	
Sample V	99.7±11.5	434.7±34.9 (26.0) ^{c)}	825.7±95.9 (30.3) ^{b)}	
Sample VI	126.9±11.1	567.8±40.3 (3.3)	1051.0±81.7 (11.3)	
β-Sitosterol	119.9±12.8	329.0±19.8 (44.0) ^{c)}	657.8±41.9 (44.5) ^{c)}	
Control	62.9±8.3	656.6±19.2	731.2±16.4	1006.8±79.6
Sample III	66.2±5.2	551.4±40.3 (15.9)	618.8±31.7 (15.4) ^{b)}	739.7±68.4 (26.5) ^{b)}
Sample VII	63.5±13.2	664.6±10.3 (-1.4)	695.3±24.8 (4.9)	796.1±35.5 (20.9) ^{b)}
β-Sitosterol	70.3±19.0	563.4±16.1 (14.1)	602.0±32.6 (17.7) ^{c)}	748.6±50.0 (25.6) ^{b)}

Control rats were fed on a high cholesterol diet and other groups of rats on the high cholesterol diet added sample III—VII or β-sitosterol at a concentration of 1%. a) Each value represents the mean±S.E. of 6 rats. b) $p < 0.05$ and c) $p < 0.005$, significantly different from the control group.

TABLE VI. Effect of Young Barley Leaves Fractions on Liver Total Cholesterol Levels of Rats Fed on a Cholesterol Diet for 6 d

Treatment	Liver wet weight (g)	Liver wet / Body weight (%)	Total liver cholesterol	
			mg	mg/g
Control	7.5±0.4 ^{a)}	5.3±0.3	180±8.5	24.2±0.4
Sample I	7.8±0.4	5.4±0.2	179±6.8	23.2±0.5
Sample II	6.9±0.3	5.1±0.3	166±5.7	24.1±0.5
Sample III	7.2±0.2	5.4±0.2	167±6.7	23.3±0.5
Sample VII	8.1±0.3	5.9±0.2	183±7.7	22.7±0.3 ^{b)}
β-Sitosterol	7.5±0.2	5.3±0.1	165±5.8	21.9±0.4 ^{c)}
Control	7.7±0.2	5.5±0.1	161±3.3	21.1±0.1
Sample IV	7.7±0.3	5.7±0.3	169±5.2	21.9±0.3
Sample V	7.1±0.3	5.4±0.3	133±7.8	18.7±0.5 ^{c)}
Sample VI	7.0±0.4	5.1±0.3	169±10.4	24.3±0.4
β-Sitosterol	7.2±0.4	5.0±0.3	138±3.1	19.3±0.4 ^{c)}

Control rats were fed on a high cholesterol diet and other groups of rats on the high cholesterol diet added sample I—VII or β-sitosterol at a concentration of 1%. a) Each value represents the mean±S.E. of 6 rats fed a high cholesterol diet. b) $p < 0.05$ and c) $p < 0.005$, significantly different from the control group.

Sample V は、シリカゲルクロマトグラフィーにより分離して、2つの結晶を得た。その1つは上記と同じ結晶 I であった。他方は酢酸エチルで再結晶し、融点 137—139°C の無色針状の結晶を得た。この結晶は、分子量 414、リーベルマン反応陽性で薄層クロマトグラフィーより β-sitosterol と同じ Rf 値を示し、機器分析 (赤外吸収 (IR), ¹H 核磁気共鳴 (¹H-NMR, mass) の結果もメルク社製の β-sitosterol と分析値が一致し、β-sitosterol であることを確認した。

4. 急性毒性

GM-SD, GM-Ppt, GM-R は 10 g/kg の経口投与で、また sample I は 8 g/kg の経口投与で何らの毒性効果も示さなかった (Table II)。

考 察

本研究で著者らが用いた HCD 飼料は、Wistar 系ラットで下痢などを伴わずに血清コレステロール値を順調

に経時的に上昇させた。ただし、HCD 飼料は自由摂取のために血清コレステロール値の変動は Table II—V の control に示すようになりに大きな値を示した。コレステロール低下剤の参照薬として β -sitosterol とソイステロールを用いた。ソイステロールは、脂質代謝改善剤として、わが国では医薬品として市販されているために参照薬として選んだ。

大麦若葉の青汁の水不溶性分画は、高コレステロール飼料で飼育したラットの血清総コレステロール値を低下させる作用を有することが判明した。この水不溶性分画のヘキサン抽出分画である sample I は、ソイステロールと比べて約 2 倍強い血中総コレステロール値低下作用を有し、LD₅₀ も経口投与で 8 g/kg 以上であった (Table II, III)。

この sample I は、Table II—IV に示すようにコレステロール低下作用が強いが、この分画をシリカゲルクロマトグラフィーにより分離、精製すると、分子量 382 の高級脂肪族アルコールの *n*-hexacosyl alcohol (Ceryl alcohol) と脂環状高級アルコールである β -sitosterol の 2 つの結晶が単離された。これらの物質の作用が総合して現れたものと考えられる。例えば、sample I 10 g 中には、hexacosyl alcohol が 1.2 g、 β -sitosterol は、約 1 g 含まれている。Sample III も同様に β -sitosterol と hexacosyl alcohol の両者の作用が現れ比較的強いコレステロール低下作用を示した。Sample IV と、これより分画した sample VII (hexacosyl alcohol) のコレステロール低下作用を比べると sample IV は投与 3 日目では、効果を示さないが、6 日目では有意な効果を示し、sample VII も効果が遅れて現れる傾向を示した。また sample VII は、肝コレステロール値も投与 6 日目で有意に低下させた (Table V, VI)。

Hexacosyl alcohol は、著者らが初めて、本研究でコレステロール低下作用を有することを発見したが、 β -sitosterol と比べるとほぼ同等の効力を有するが作用の発見は、 β -sitosterol より遅い特徴がある (Table V)。Hexacosyl alcohol は、簡単な鎖状アルコールであるにもかかわらず、このような作用が認められたのは極めて興味深い。ソイステロール、 β -sitosterol の血中コレステロール低下作用は、主として腸管からのコレステロールの吸収阻害とコレステロールの胆汁酸への異化促進によると報告されている。⁸⁻¹⁰⁾ *n*-Hexacosyl alcohol の作用機序は不明であるが、作用発現時間から考えて、 β -sitosterol とは少し異なる作用機序を有する可能性もある。

大麦若葉の青汁中には、強力な抗炎症蛋白、突然変異抑制蛋白、抗潰瘍性因子¹⁰⁾ の存在が立証されているが、今回更に大麦若葉の青汁中のヘキサン分画に高コレステロール飼料で飼育したラットの血中総コレステロール値を低下させる物質の存在を認め、その中から有効成分である *n*-hexacosyl alcohol と β -sitosterol の 2 種を単離した。今後、*n*-hexacosyl alcohol の抗脂血症作用の機序を明らかにしたいと考えている。

引用文献

- 1) 松岡 隆, 関 裕史, 久保田和彦, 大竹英俊, 萩原義秀, 炎症, **3**, 4, 602 (1983).
- 2) 萩原義秀, 宮内徹二, 大竹英俊, 尾方清信, 小村千世子, 木原まゆり, 片倉美登子, 日本薬学会第 101 回年会講演要旨集, 熊本, 1981 年 4 月, p. 360.
- 3) 天正 明, 清水 嵐, 竹縄忠臣, 菊地博之, 六城雅彙, 薬誌, **92**, 879 (1972).
- 4) 金武朝春, 日細菌, **37**, 943 (1982).
- 5) L. L. Abell, B. B. Levy, B. B. Brodie, F. E. Kendall, *J. Biol. Chem.*, **195**, 357 (1952).
- 6) 中山貞男, 根岸和代, 坂本浩二, 日薬理, **78**, 191 (1981).
- 7) G. Salen, E. H. Ahrens, Jr., S. M. Grundy, *J. Clin. Invest.*, **49**, 952 (1970).
- 8) 金田尚志, 徳田節子, 渡川尚武, 栄養と食糧, **19**, 439 (1971).
- 9) 黒田 勲, 杉谷幸男, 小佐妻恒夫, 美口量晶, 野沢東洋治, 佐藤周子, 武田富子, 松居孝子, 基礎と臨床, **5**, 1019 (1971).
- 10) 萩原義秀, 宮内徹二, 尾方清信, 大竹英俊, 笠井博子, 澤田淑子, 山本泰範, 久保田和彦, 日本薬学会第 101 回年会講演要旨集, 熊本, 1981 年 4 月, p. 359.