

スピルリナに含まれる膵リパーゼ活性阻害物質の単離及び食後の血中脂質上昇抑制作用

韓 立坤,^{*,a} 李 東霞,^b 向 蘭,^c 弓 小杰,^b
黄堂泰昌,^d 鈴木 公,^a 奥田拓道^a

Isolation of Pancreatic Lipase Activity-inhibitory Component of *Spirulina Platensis* and It Reduce Postprandial Triacylglycerolemia

Li-Kun HAN,^{*,a} Dong-Xia LI,^b Lan XIANG,^c Xiao-Jie GONG,^b
Yasumasa KONDO,^d Isao SUZUKI,^a and Hiromichi OKUDA^a

^aDepartment of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, 3-1-100 Tsukide, Kumamoto City 862-8502, Japan, ^bKey Laboratory of Bioorganic Chemistry, Dalian University, Dalian City 116023, China, ^cSchool of Pharmacy, Shandong Univesity, Jinan City 250012, China, and ^dSpirulina Bio-Lab. Co., Ltd., 1-13-6 Nishinakajima, Yodogawa-ku, Osaka 532-0011, Japan

(Received July 18, 2005; Accepted October 29, 2005; Published online November 2, 2005)

In the process of investigating the hypolipidemic effects of *Spirulina platensis*, we found that the aqueous extract of *S. platensis* may inhibit the intestinal absorption of dietary fat by inhibiting pancreatic lipase activity. The aqueous extract of *S. platensis* (500 mg/kg) reduced the elevation of rat plasma triacylglycerol levels after oral administration of the lipid emulsion 2 h after administration. To clarify the hypolipidemic effects of *S. platensis*, the active component was isolated and designated 1'-*O*-(palmitonyl)-2'-*O*-(caprylonyl) glyceryl- β - α -D-galactopyranoside (glycolipid H-b2). Glycolipid H-b2 was found to inhibit pancreatic lipase activity in a dose-dependent manner. The fractions containing glycolipid H-b2 (250 mg/kg) reduced the elevation of rat plasma triacylglycerol levels after oral administration of the lipid emulsion 2 h after administration. Furthermore, we examined the effects of phycocyanin isolated from *S. platensis* on pancreatic lipase activity. Phycocyanin inhibited the pancreatic lipase activity in a dose-dependent manner. These results suggest that the inhibitory effects of *S. platensis* on postprandial triacylglycerolemia may be due in part to the inhibition of pancreatic lipase activity by glycolipid H-b2 and phycocyanin.

Key words—*Spirulina platensis*; pancreatic lipase activity; phycocyanin; glycolipid H-b2

はじめに

スピルリナ (*Spirulina platensis*) は藍藻類ラセン藻に属する植物であり、蛋白質、各種ビタミン、ミネラルなどを多く含んでおり、消化、吸収され易いため、原産地のアフリカやメキシコでは古くから食料として利用されてきた。¹⁻³⁾ 近年、健康食品としてブームになってきたスピルリナに関して数多くの研究が進められ、肥満者の体重減少、高脂血症患者のコレステロール濃度低下や耐糖能改善作用などが多く報告されている。^{4,5)} 食事の脂質の大部分は

長鎖脂肪酸よりなるトリアシルグリセロールである。このトリアシルグリセロールはそのままの形で腸管から吸収されることなく、かならずリパーゼによって2-モノアシルグリセロールと脂肪酸に分解されたのち、胆汁酸とともに混合ミセルを形成し、小腸上皮細胞に吸収される。こうして吸収された分解物は小腸上皮細胞内で再びトリアシルグリセロールに合成される。したがって、リパーゼによる脂肪分解を阻害し、食事に含まれるトリアシルグリセロールの腸管吸収を阻害・遅延することは肥満の改善予防にとって好ましい状態である。⁶⁾ そこで、今回、膵リパーゼ活性の阻害作用を指標にしてスピルリナに含まれる活性成分を単離し、その構造を同定したので報告する。

^a熊本県立大学環境共生学部, ^b大連大学生物有機化学重点実験室, ^c山東大学薬学院, ^d株式会社スピルリナ研究所

*e-mail: hanlikun@hotmail.com

実験の部

1. 被検物質 スピルリナ粉末は株式会社スピルリナ研究所から提供されたものを用いた。スピルリナ粉末 (100 g) を純水 1 l で 50°C, 1 時間抽出した。得られた抽出液を減圧で溶媒留去し、水エキス 12.3 g を得た。

2. 実験動物 実験動物にはウィスター系雄性ラット及び ICR 系雌性マウスを用いた。8 週齢のラット及び 4 週齢のマウスはそれぞれ日本チャールスリバー (株) (横浜) と日本クレア (大阪) から購入し、12 時間の明暗サイクルのある飼育室 (温度 23 ± 1°C, 湿度 60%) にて 1 週間予備飼育したのち、健康な動物を実験に供した。なお、本実験は熊本県立大学制定の動物実験指針に基づく動物実験管理委員会の承認の下に行われた。

3. 腓リパーゼ活性に及ぼすスピルリナの阻害作用 腓リパーゼ活性はトリオレインからのオレイン酸遊離量を測定することによって算出した。前報の方法⁷⁾に準じて、トリオレイン 80 mg (SIGMA Chemical Co. Ltd., USA), レシチン 10 mg (和光純薬工業株式会社, 東京), 胆汁酸 5 mg (SIGMA Chemical Co. Ltd., USA) を 9 ml の 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.0) 中で 10 分間超音波処理を行うことで均一な懸濁液とし、これを基質液として用いた。実験操作としては、基質液 0.1 ml にブタ由来の腓リパーゼ液 0.05 ml (SIGMA Chemical Co. Ltd., USA) (最終濃度 1 µg/ml) 及び検体液 0.1 ml を加え、37°C, 30 分間反応させ、遊離した脂肪酸を銅試薬法で定量した。活性値は検体無添加の値を 100% とし、各検体の活性値を算出した。

4. 3 日間の高脂肪食摂取マウスの糞中への脂質排泄量に及ぼすスピルリナの影響 12 匹の健康な雌性マウス (5 週齢) を対照群、スピルリナの水エキス 1% (1 g/100 g 飼料) 投与群及びスピルリナの水エキス 3% (3 g/100 g 飼料) 投与群の 3 群に分け、ステンレス製ケージに 1 匹ずつを入れて飼育した。対照群ではマウスに牛脂 40% を含む高脂肪食⁷⁾を餌箱にて自由摂取させた。スピルリナの 1% 投与群及び 3% 投与群では牛脂 40% を含む高脂肪食にスピルリナの水エキス 1% 及び 3% を加えて餌箱にてマウスに自由摂取させた。飼料は Table 1 に準じて作成した。飼育期間中、マウスの摂食量を測定し、

Table 1. Diet Composition

	Spirulina extracts (g/kg)		
	0	10	30
	(g/100 g)		
Beef tallow	40	40	40
Cornstarch	10	10	10
Sugar	9	9	9
Mineral mixture ^{a)}	4	4	4
Vitamine mixture ^{a)}	1	1	1
Casein	36	35	33
Spirulina extracts	0	1	3

^{a)} Mineral and vitamine mixtures (AIN 76) were purchased from Oriental Yeast (Tokyo, Japan).

また、マウスの糞を採取して糞中の脂質の含量を測定した。

5. スピルリナに含まれる腓リパーゼ活性の阻害物質の単離 スピルリナ粉末 (500 g) をメタノール 10 l で室温、7 日間抽出した。得られた抽出液をろ過し、減圧で溶媒留去し、メタノールエキス 146 g を得た。メタノールエキス 5 g を少量のメタノールで溶かし、シリカゲルを加えて乾燥させたのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて CH₂Cl-CH₃OH-H₂O (90 : 10 : 1, 1 l) で溶出し、H-a (1.05 g), H-b (1.23 g), H-c (865 mg) 及び H-d (1.17 g) の 4 つのフラクションに分けて、腓リパーゼ阻害作用のある H-b フラクションについて HPLC (カラム : ODS (II) 10φ×250 mm ; 溶媒 : 98% メタノール ; 流速 : 1.0 ml/min ; 検出器 : 210 nm) を用いて精製し、H-b2 を得た。H-b2 を IR (KBr), ¹³C-, ¹H-NMR, エレクトロスプレーイオン化 MS, ¹³C/DEPT, プロトン検出 HETCOR: HMQC, ¹H-¹H COSY, プロトン検出, 遠隔 ¹H-¹³C 異核間の相関 : HMBC など手法を用いて 1'-O-(palmitonyl)-2'-O-(caprylonyl) glyceryl-β-α-D-galactopyranoside (以後 glycolipid H-b2 に略する) として同定した。

6. コーンオイル負荷後のラット血漿中の中性脂肪の変動に及ぼすスピルリナの影響 コーンオイルエマルジョンは前報の方法⁸⁾に準じて調製した。ラットを 1 群 6 匹として対照群、スピルリナ粉末投与群 (125, 500 mg/kg) 及び腓リパーゼ活性の阻害作用のあるフラクション投与群 (100, 250 mg/kg) の 5 群に分け、一晩絶食しコーンオイル負荷実験を

行った。対照群ではコーンオイルエマルジョン 1 ml 及び純水 1 ml の混合液を非麻酔下でラットに経口投与した。スピルリナ粉末投与群ではコーンオイルエマルジョン 1 ml とスピルリナ粉末の懸濁液 1 ml の混合液（スピルリナ粉末 125,500 mg/kg）をラットに投与した。膵リパーゼ活性の阻害作用のあるフラクション投与群ではコーンオイルエマルジョン 1 ml と膵リパーゼ活性の阻害作用のあるフラクションの懸濁液 1 ml の混合液（膵リパーゼ活性の阻害作用のあるフラクション 100, 250 mg/kg）をラットに投与した。コーンオイル投与前、投与後 60, 120, 180, 240, 300 分まで非麻酔下でラットの尾静脈より採血した。血漿中の中性脂肪含量の測定は和光純薬のトリグリセライド-E-テストキットを用いて測定した。

7. 統計処理 結果はすべて平均値±標準誤差で表示した。統計処理には Super ANOVA ソフト (Abacus Concepts, Berkeley, CA) を用い、分散分析を行ったのち、Bonferroni/Dunn All means) 検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

結 果

1. 膵リパーゼ活性に及ぼすスピルリナ及びその成分の影響 Figure 1 に示すように、スピルリナの水エキスは膵リパーゼ活性を濃度依存的に阻害した。50%阻害を示すのは $5 \mu\text{g/ml}$ である。スピルリナに含まれているフィコシアニンも阻害作用を示し、50%阻害を示す濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ であった。また同じくスピルリナに含まれているクロロフィル a や β -カロチンには阻害作用は認められなかった。したがって、スピルリナにはフィコシアニン以外に膵リパーゼ活性を強く阻害する成分が存在すると示唆された。

2. 高脂肪食摂取マウスの糞中の脂質量に及ぼすスピルリナの影響 Table 2 に示すように、高脂肪食摂取マウスに比べて、スピルリナの水エキス 1%含有高脂肪食の投与では 3 日目にマウスの糞の排泄を促進し、糞への脂質排泄量も有意な高値を示した。スピルリナの水エキス 3%含有高脂肪食の投与では糞の排泄量及び糞への脂質排泄量を有意に増加した。

3. Glycolipid H-b2 の同定及びその膵リパーゼ阻害作用 1'-O-(palmitonyl)-2'-O-(caprylonyl)

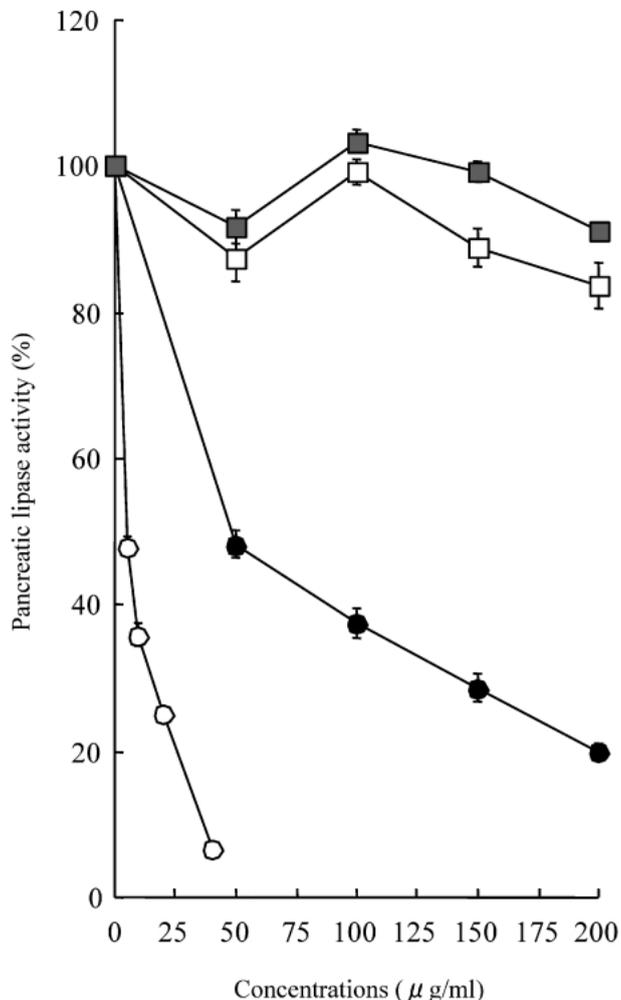


Fig. 1. Effects of Aqueous Extract of Spirulina Platensis and Its Components on Pancreatic Lipase Activity

○: Aqueous extract of Spirulina platensis, ●: Phycocyanin, □: Chlorophyll a, ■: β -carotene.

glyceryl- β - α -D-galactopyranoside (glycolipid H-b2) (Fig. 2): 常温下で無色液体, UV λ (MeOH) nm: 221, 264. IR (KBr) cm^{-1} : 3396.55, 2927.12, 2855.6, 1738.67, 1461.35, 1378.99, 1167.1, 1074.82, 980.35. $^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD): δ 5.24 (1H, H-2), 4.41 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-1 α), 4.42 (1H, d, J = 7.5, H-1''), 4.21 (1H, H-1 β), 3.39 (1H, dd, J = 5.5, 11.0 Hz, H-2 α), 3.48 (1H, d, H-5''), 3.72 (1H, dd, H-2 β , H-6''), 3.81 (1H, H-4''), 3.50 (1H, H-2''), 3.45 (1H, d, H-3''), 2.32 (H-2', H-2''), 1.60 (H-3', H-3''), 1.28 (H-4'—15', H-4''—7''), 0.89 (6H, t, J = 9 Hz, H-16', H-8''). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD₃OD): δ 174.8 (C-1', 1''), 105.3 (C-1''), 76.7 (C-5''), 74.8 (C-3''), δ 72.3 (C-2''), 71.7 (C-2), 70.2 (C-4''), 68.7 (C-3), 64.09 (C-1), 62.4 (C-6''), 35.1 (C-2', 2''), 33.0 (C-14', C-6''), 30.1

Table 2. Effects of *Spirulina Platensis* on Fat Excretion into Faeces of Mice Fed a High-fat Diet for Three Days

	High fat diet	High fat diet containing <i>Spirulina</i> extracts 1%	High fat diet containing <i>Spirulina</i> extracts 3%
Day 1			
Food intake (g/mouse)	2.58±0.12	3.08±0.25	3.25±0.06
<i>Spirulina</i> extracts intake (mg/mouse)	0.0±0.0	30.8±2.47	97.6±1.87
Faeces (g/mouse)	0.31±0.06	0.26±0.03	0.73±0.10*
Excretion TG (mg/g)	36.8±2.27	47.2±4.11	54.9±2.01*
Day 2			
Food intake (g/mouse)	3.41±0.22	3.14±0.22	3.19±0.18
<i>Spirulina</i> extracts intake (mg /mouse)	0.0±0.0	31.4±2.21	95.6±5.49
Faeces (g/mouse)	0.28±0.10	0.41±0.23	0.64±0.17*
Excretion TG (mg/g)	45.3±1.56	51.8±1.07*	71.8±4.23*
Day 3			
Food intake (g/mouse)	3.12±0.26	2.63±0.05	3.38±0.13
<i>Spirulina</i> extracts intake (mg/mouse)	0.0±0.0	26.3±0.54	101.3±3.89
Faeces (g/mouse)	0.35±0.02	0.61±0.17*	1.21±0.21*
Excretion TG (mg/g)	40.1±4.51	59.3±3.31*	85.6±2.13*

Results are expressed as means±S.E. of four mice. *Significantly different from high-fat diet-treated group, $p<0.05$. TG=triacylglycerol.

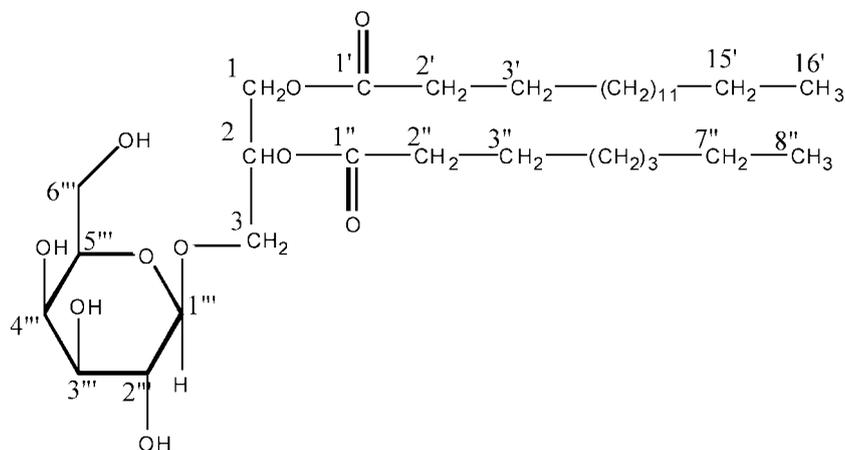


Fig. 2. Structure of 1'-O-(palmitonyl)-2'-O-(caprylonyl) glyceryl- β -D-galactopyranoside (Glycolipid H-b2)

—30.8(C-4', 13', C-4'', 5''), 26.0(C-3', 3''), 23.7 (C-15', 7''), 14.4(C-16', 8''). N-ESI-MS: $[M-H]^-$: 619.

Figures 3, 4 に示すように、スピルリナのメタノールエキスは腓リパーゼ活性を濃度依存的に阻害した。H-a, H-c 及び H-d フラクシオンは弱い腓リパーゼ阻害作用を示したが、H-b フラクシオンの方が強い阻害作用を示した。H-b フラクシオンより同定した glycolipid H-b2 は腓リパーゼ活性を濃度依存的に阻害した。

4. コーンオイル負荷後のラットの血中中性脂肪の変動に及ぼすスピルリナ及び Glycolipid H-b2 の影響 対照群に比べて、スピルリナ粉末の投与群

ではスピルリナ粉末 500 mg/kg 投与が脂質負荷後 120 分に脂質負荷による中性脂肪の上昇を有意に抑制した。125 mg/kg の投与では有意な変化が認められなかった。血清濃度—時間曲線面積 (AUC, mg/dl·min) でみた場合にも同様な結果が認められた (対照群 AUC; 12027.40, 125 mg/kg 投与群 AUC; 11619.46, 500 mg/kg 投与群 AUC; 10289.80)。さらに、glycolipid H-b2 を含有するフラクシオンをラットに投与したところ、250 mg/kg の投与では脂質負荷後 120 分に脂質負荷による中性脂肪の上昇を有意に抑制したが、100 mg/kg の投与では有意な変化が認められなかった。また血清濃度—時間曲線面積 (AUC, mg/dl·min) でみた場合にも同様な結果

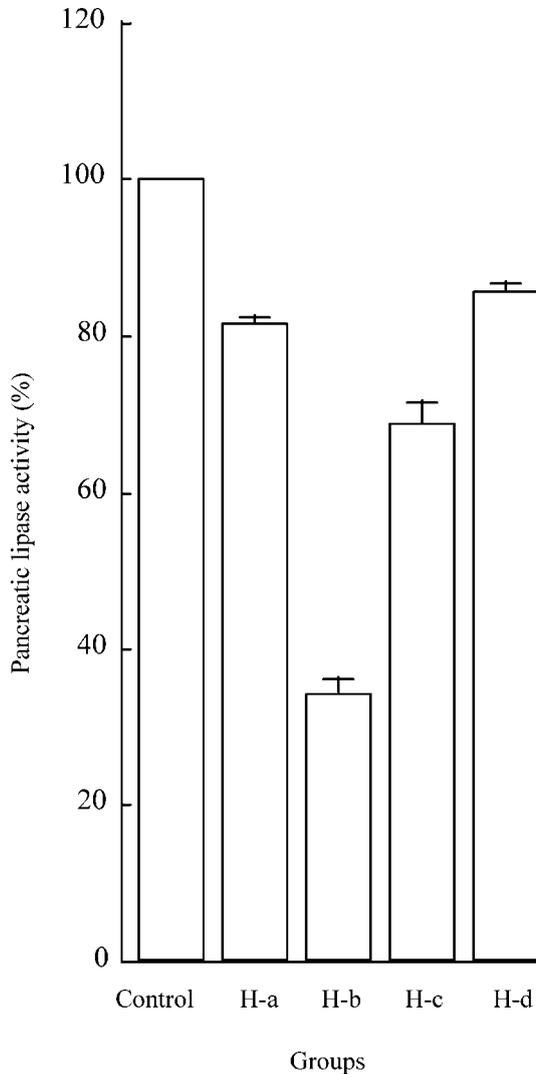


Fig. 3. Effects of Fractions from Methanol Extract of Spirulina Platensis on Pancreatic Lipase Activity

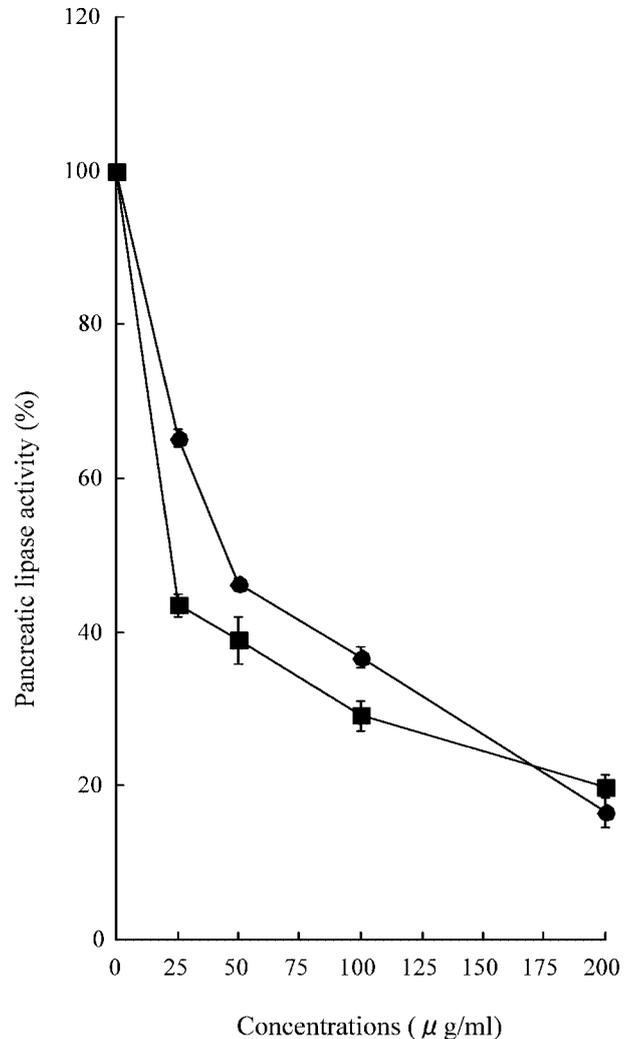


Fig. 4. Effects of Methanol Extract of Spirulina Platensis and Glycolipid H-b2 on Pancreatic Lipase Activity

■: 1'-O-(palmitonyl)-2'-O-(caprylonyl) glyceryl-β-α-D-galactopyranoside (glycolipid H-b2), ●: Methanol extract of Spirulina platensis.

が認められた (対照群 AUC; 12027.40, 100 mg/kg 投与群 AUC; 11966.23, 250 mg/kg 投与群 AUC; 10458.73) (Fig. 5).

考 察

近年、食生活の欧米化に伴い、特に脂質摂取量の増加によって肥満を始めとする生活習慣病患者が急増していることが指摘されている。肥満は、摂取エネルギーと消費エネルギーのアンバランスを特徴とするエネルギー代謝異常であり、結果として脂肪細胞に中性脂肪が過剰に蓄積した状態である。食事中的トリアシルグリセロールの腸管吸収を抑制遅延することは肥満や高脂血症の予防の1つである。食事中的トリアシルグリセロールはかならず膵臓リパー

ゼの働きを受けて2-モノグリセライドと脂肪酸に分解されたのちに吸収される。したがって、膵臓リパーゼによる脂肪の分解を阻害することによって、血中のカイロミクロン量を低下させ、肥満や高脂血症を改善できると期待されるのである。⁶⁾

最近、膵リパーゼ活性の阻害物質の抗肥満作用や抗高脂血症作用においては多くの研究結果が報告されている。⁹⁻¹¹⁾ これまでに筆者らはお茶の種子サポニン、¹²⁾ 桔梗¹³⁾ やショウガ⁸⁾ など植物の膵リパーゼ阻害作用を報告してきたが、藻類の膵リパーゼ活性阻害作用についての報告が少ないのは現状である。

そこで、筆者らはスピルリナの膵リパーゼ活性阻害作用と脂肪の腸管吸収抑制作用を検討することにした。スピルリナの抽出物が膵リパーゼ活性を強く

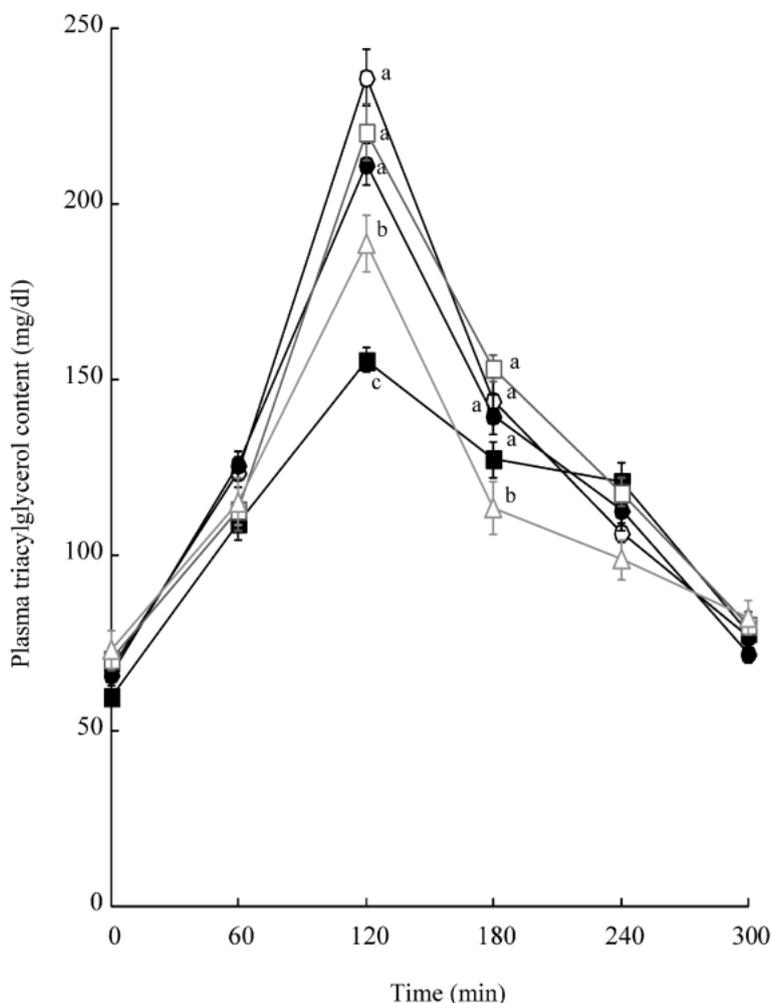


Fig. 5. Effects of Aqueous Extract of *Spirulina Platensis* and the Fractions Containing Glycolipid H-b2 on Rat Plasma Triacylglycerol Levels after Oral Administration of a Lipid Emulsion

○: Lipid emulsion alone, ●: 125 mg/kg aqueous extract of *Spirulina platensis*, ■: 500 mg/kg aqueous extract of *Spirulina platensis*, □: 100 mg/kg fractions containing glycolipid H-b2, △: 250 mg/kg fractions containing glycolipid H-b2. Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

阻害し、脂質負荷後のラットの血中中性脂肪の上昇を有意に抑制した。一方、スピルリナの成分の腭リパーゼ活性の阻害作用を検討したところ、スピルリナに含まれているフィコシアニンが強い阻害作用を示したが、クロロフィル a や β -カロチンには阻害作用は認められなかった。このことはスピルリナの腭リパーゼ活性の阻害作用にはフィコシアニンの働きが大きく寄与していることを示している。さらにフィコシアニンの腭リパーゼ活性阻害作用はスピルリナエキスより弱かったことからフィコシアニン以外に、他の有効成分も存在することが示唆された。そこで、筆者らはその有効成分を単離し、同定することにした。シリカゲルカラムクロマトグラフィー等の手法を用いてスピルリナから腭リパーゼ活性阻害物質として glycolipid H-b2 を同定した。Glycolipid

H-b2 は強く腭リパーゼ活性を阻害した。また glycolipid H-b2 を含有するフラクションが脂質負荷後のラットの血中中性脂肪の上昇をも有意に抑制した。また、マウスに3日間スピルリナの抽出物1%、3%を含有する高脂肪食を摂取させ、3日間の糞を集めて糞中の脂肪量を測定した。高脂肪食投与のみに比べてスピルリナの抽出物の投与群では糞への脂肪排泄量が高値を示した。スピルリナの抽出物は食後の高脂血症を改善し、その作用機構の一部は腭リパーゼ活性阻害によると考えた。これらのことより、スピルリナの抽出物を長期摂取することによって、肥満改善の可能性が期待できた。一方、スピルリナの抽出物及び glycolipid H-b2 を含有するフラクションの投与量については、通常、ヒト（平均体重 60 kg）が1日に6gスピルリナの抽出物（2g

/回/日×3回)を摂取すると仮定して設定した。スピルリナの抽出物を500 mg/kgで投与する場合はヒトの飲む量の66.7倍に相当する。Glycolipid H-b2を含有するフラクションを250 mg/kgで投与する場合はヒトの飲む量の6.7倍に相当する。この投与量は腓リパーゼの阻害作用を示す濃度に比べて顕著に高かったため、今後、スピルリナの抽出物及びglycolipid H-b2を含有するフラクションの投与量を低く設定し、ラットに長期投与してその投与効果を検討する必要があると思われる。

これらの結果はスピルリナの腓リパーゼ活性の阻害作用にはフィコシアニン及びglycolipid H-b2の働きが大きく寄与したことを示した。今後、glycolipid H-b2の腓リパーゼ活性の阻害作用機序についてさらに検討していきたい。

REFERENCES

- 1) Quillet M., *Ann. Nutr. Aliment.*, **29**, 553–561 (1975).
- 2) Narasimha D. L., Venkataraman G. S., Duggal S. K., Eggum B. O., *J. Sci. Food Agric.*, **33**, 456–460 (1982).
- 3) Dam R., Lee S., Fry P. C., Fox H., *J. Nutr.*, **86**, 376–382 (1965).
- 4) Nakaya N., Homma Y., Goto Y., *Prog. Med.*, **6**, 3125–3134 (1986).
- 5) Araki K., Itoh E., Takakuwa Y., Kato T., *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **47**, 395–400 (1994).
- 6) Okuda H., Han L. K., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **118**, 347–351 (2001).
- 7) Han L. K., Kimura Y., Okuda H., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **23**, 174–179 (1999).
- 8) Han L. K., Gong X. J., Kawano S., Saito M., Kimura Y., Okuda H., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 213–217 (2005).
- 9) Zhao H. L., Sim J. S., Shim S. H., Ha Y. W., Kang S. S., Kim Y. S., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **29**, 983–990 (2005).
- 10) Heck A. M., Yanovski J. A., Calis K. A., *Pharmacotherapy*, **20**, 270–279 (2000).
- 11) Suter P. M., Marmier G., Veya-Linder C., Hanseler E., Lentz J., Vetter W., Otvos J., *Atherosclerosis*, **180**, 127–135 (2005).
- 12) Han L. K., Kimura Y., Kawashima M., Takaku T., Taniyama T., Hayashi T., Zheng Y. N., Okuda H., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **25**, 1459–1464 (2001).
- 13) Xu B. J., Han L. K., Zheng Y. N., Lee J. H., Sung C. K., *Arch. Pharm. Res.*, **28**, 180–185 (2005).