

ベニバナの  
花にみられるマウスの発育促進作用

ベニバナの保健衛生分野における  
利用拡大に関する研究・報告書

1984年

山形県衛生研究所

ベニバナの

花にみられるマウスの発育促進作用



最上ベニバナ



乾燥花

種子

## はじめに

ベニバナ、*Carthamus tinctorius* L. は初夏にアザミに似た花をつけ、咲き初めは鮮やかな黄色でやがて紅色に変わるキク科の植物である。また、ベニバナは、以下にのべる歴史的背景から、山形県の県花に指定されている。

本県におけるベニバナ生産の最初の記録は、1667年(寛文7年)であり、今から300年以上も前に遡る。その後、幕末の頃まで「最上ベニバナ」と称し、村山および置賜地域で作られ、最盛期(1800年前後)には年間200トン前後の生産高に達し、これらの地域における重要な作物の一つであった。しかし、明治初期の外国貿易に重点をおいた産業振興政策により、本県のベニバナ生産は生糸の生産へと転換し、ベニバナ畑は桑園に変わっていった。また、それに追い討ちをかけるように、中国およびインドからの安価なベニバナの輸入が始まるとともに、洋紅といわれるカルミン・コチニールおよびアニリンなどの化学染料が輸入されるようになった。最上ベニバナの生産の記録は、明治17年頃から、その姿を消してしまったのである。

第2次大戦後、日本に平和が戻り、人々の生活が安定するとともに、ベニバナを山形県を代表する花として、その復興と保存を図る民間の有志運動がおこった。山形紅花振興会および山形紅花保存会などがそれである。そして、昭和40年(1965年)には山形県紅花生産組合連合会が結成されるまでに至った。しかし、生産力において優る米国および中国からの安価なベニバナの輸入におされ、未だ、本県の産業の一つに加えられるに至っていない。収益を度外視した有志による保存運動が細々と続けられている現状にある。

このような状況下において、本県の県花、ベニバナ、の復興と保存そしてその利用拡大を図るには、ベニバナの特性を活かした、生産地に有利な利用法を見出す必要がある。

ベニバナの色素は、古くから織物の染料としてのみならず、食品の着色料および化粧料の原料に用いられ、その乾燥花は冷え症や生理不順などのいわゆる婦人病に効果があるといわれている。また、近年、その種子油に多く含まれるリノール酸が動脈硬化防止に効果が認められたことから、種子油は、一躍、健康食品としてクローズアップされてきた。

このように、ベニバナに関する昔からの伝承あるいは過去の記録によれば、少なくとも花および種子には、なんらかの薬理作用をもつ因子が含まれていること

がうかがわれる。

さて、本県におけるベニバナ生産の将来を考える時、種子生産に関しては、その品質および生産量において優る米国および中国に対抗することは難かしい。しかし、一方の花の薬効に関しては、新鮮さを必要とすることおよび古い歴史的背景から生まれた優れた栽培技術があり、それを基にして、より優れた品質のものに改良生産が可能であることから、その利用拡大の可能性が極めて高いと思われる。

そこで、われわれは、ベニバナ、特に花、に存在すると考えられる薬効に注目し、その生理活性因子の探索を、昭和55年度から5年間、調査および研究を行った。本報告書はそれらの総括である。

この報告書を作成するにあたり、多くの関係各位からたくさんの貴重な情報をいただき、かつ御教示いただいた。厚く感謝の意を表するとともに、本報告書に対する御批判と御教示をいただければ幸いである。

昭和60年2月

山形県衛生研究所

所長 片 桐 進

# 目 次

I 研究の目的	1
II 研究の経過	1
1. 研究計画の発端および研究組織	1
2. 研究方針の模索	5
1) ベニバナ成分の抽出・分析に関する基礎調査	5
2) ベニバナ成分の抗菌作用の探索	7
3) ベニバナ成分の生理作用の探索	8
3. 研究方針の設定	14
III 研究結果	15
1. 実験条件の設定のための基礎的研究	15
1) 肥満マウスおよび発育不全マウスの淘汰	15
2) マウスの水および飼料の摂取量	19
3) 妊娠マウスの受胎数	21
4) 妊娠の診断	22
5) 交配時の雌雄比と妊娠率	24
6) 母マウス当りの哺乳マウス数と仔マウスの発育	24
7) マウスの体重増加の雌雄差	26
8) ベニバナの粗栄養素分析	27
9) ベニバナ、特に乾燥花、のカーサミン画分と サフラワー・イエロー画分	28
10) 実験合成飼料の調整	30
11) 実験条件	32

2. ベニバナ成分の発育促進因子に関する研究 .....	33
1) 乾燥花および種子投与による仔マウスの発育促進.....	33
2) 乾燥花の水抽出画分およびクロロホルム・メタノール 抽出残渣にみられる仔マウスの発育促進因子 .....	39
(1) 乾燥花の水溶性画分とその残渣の投与 .....	39
(2) 乾燥花のクロロホルム・メタノール画分とその残渣の投与 .....	43
Ⅳ 研究の成果および考察 .....	46
Ⅴ あ と が き.....	47
Ⅵ 参 考 文 献.....	48

## I. 研究の目的

ベニバナは、以前、山形県の特産として県内陸部において栽培され、その花は紅餅に加工されて、紅あるいは生薬の原料として京に運ばれた。この歴史的背景により、現在、本県の県花に指定されている。また、近年、その種子に多量に含まれるリノール酸が、動脈硬化防止に有効であることが示唆され、種子油は健康食品としてクローズ・アップされている。このように花は生薬、種子油は健康食品としてすでに用いられ、なんらかの薬理作用があることがうかがわれるが、それらの科学的裏付けは未だなされていない。

本研究は、これらの薬理効果というベニバナの特性を数量的に把握し、その効果を確認して、山形県の県花であるベニバナの保健衛生分野における利用拡大を図る基礎的資料を得ることを目的に計画された。

## II. 研究の経過

### 1. 研究計画の発端および研究組織

昭和54年8月、山形県は、県花であるベニバナの振興を図り、その対策について総合的に調査および研究を推進するために、「山形県紅花振興対策協議会（会長、県企画調整部長）」を設置した（表1参照）。

#### 表1 山形県紅花振興対策協議会要綱

（設置）

第1条 紅花の振興策について総合的に対処するため、山形県紅花振興対策協議会（以下「協議会」という。）を設置する。

（所掌事務）

第2条 協議会は次に掲げる事務を行う。

- (1) 紅花振興に関する調査
- (2) 紅花に関する試験研究
- (3) その他前条の設置目的に関する事項

(組 織)

第 3 条 協議会は、委員 5 人以内で組織する。

2 委員は企画調整部長及び別表下欄に掲げる部の次長の職にある者をもって充てる。

(会 長)

第 4 条 協議会に会長を置き、企画調整部長をもって充てる。

2 会長は会務を総理し、協議会を代表する。

3 会長に事故あるときは、企画調整部長が指命する者がその職務を代行する。

(会 議)

第 5 条 協議会は会長が招集する。

2 会長は会議の議長となる。

(意見の聴取)

第 6 条 協議会は必要があるときは、委員以外の者の出席を求め、意見を聞くことができる。

(幹 事)

第 7 条 協議会に幹事を置き、別表右欄に掲げる職にある者をもって充てる。

2 幹事会は、協議会から命じられた事項について調査審議する。

3 幹事会は、企画調整部次長が招集する。

(庶 務)

第 8 条 協議会の庶務は企画調整課において処理する。

附 則

この要綱は昭和 54 年 8 月 10 日から施行する。

別表

部	予 定 ・ 研 究 課 題
企 画 調 整 部	紅花振興対策の計画、調整、企業体の研究
環 境 保 健 部	紅花の保健、医学効果、薬理成分の分析など
商 工 労 働 部	染料、織物、搾油等既存メーカーの経営と今後の見通し 加工、搾油試験、販路など
農 林 水 産 部	栽培、経営技術、試験分析実験、紅花栽培の現状と問題 点

県環境保健部は、「ベニバナの薬効成分等の保健衛生面での利用についての調査研究実施要綱」（表2）を定め、これらのことに関する調査および研究を山形県衛生研究所（衛生研究所）に依頼した。

表2 “ベニバナ”に関する調査研究計画

環境保健部薬務課

1. 調査研究の概要等

ベニバナは山形県下に於て古くから栽培され、花が紅の原料として利用されてきた。又、近年は種子油が健康食品として利用されるようになってきている。一方、花は古来“紅花”として漢方或いは民間薬として婦人薬等に大いに活用されてきたが、科学的解析はなされていない。

今回の調査研究では、本県特産のベニバナの保健衛生面の利用開発に資するため、これらベニバナの医学的効果、薬理作用に関する次の調査研究を実施する。

- (1) 動物実験によるベニバナの種子、花、葉茎の乳分泌、性成熟、並びに傷害肝、骨髄の細胞再生に及ぼす影響に関する調査研究
- (2) 紅花、生花の抗菌作用並びに抗ウイルス作用に関する調査研究
- (3) 紅花中の主成分の含量の調査研究

2. ベニバナの薬効成分等の保健衛生面での利用についての調査研究実施要綱

(1) 研究調査機関

山形県衛生研究所 代表 所長 宇留野 勝 水

(2) 研究目的

本県特産のベニバナの保健衛生面の利用開発を図るため、紅花、紅花色素等の薬効成分、有効成分を究明する。又、実際的利用についても考える。

(3) 研究計画

衛生研究所に特別プロジェクトチームを設け、研究の実施に当る。チームは、理化学部、細菌血清部、環境医学部の各部員の中から参加構成され、各々の研究課題につき、研究を行う。

(4) 研究期間

昭和55年度より3カ年の予定(昭和56年に5カ年と改められた)

(5) 研究結果の報告等

研究結果は毎年度発表するが、関連学術誌、学会等に発表しうるものとする。

(6) 必要経費

毎年申請する。

(注：ベニバナは植物、紅花は生薬で乾花を指す)

衛生研究所は、これを受け、直ちに、「ベニバナ研究班」(表3)を設置して、昭和55年度から基礎的調査を実施し、それらの結果を基にして、衛生研究所3部、理化学部、細菌血清部および環境医学部の分担研究課題を定めた(表4)。

表3 山形県衛生研究所ベニバナ研究班

研究課題	ベニバナ成分とその生理活性に関する研究
研究班の組織	研究班には、班長1名を置く。必要に応じて副班長1名を置くことができる。 また、研究の進展状況を把握し、それらを調整するために若干名の研究連絡委員を定め、班長の招集により研究連絡会議を行う。
研究方針	初め、各部分担研究を独自に実施し、その結果、発展性のある事実を発見した場合は、研究連絡会議で協議し、その事実の解析に全力をあげ、その他の分担研究は中止することがある。

## 研究連絡委員

年 度	昭和55～56年	昭和57年	昭和58年	昭和59年
班 長	宇留野勝水	片桐 進	片桐 進	片桐 進
副班長	片桐 進	—	—	—
連絡委員	関 文雄 後藤 幸治 鈴木 直慰 佐藤 孝男 松浦敬次郎 相川 勝悟	井上 善治 川住 長生 鈴木 直慰 佐藤 孝男 松浦敬次郎 相川 勝悟	井上 善治 川住 長生 桜井 守 東海林喜助 松浦敬次郎 相川 勝悟	真壁 仁 川住 長生 桜井 守 東海林喜助 松浦敬次郎 槇 十秋

表4 各部分担研究課題

理化学部	ベニバナ成分の抽出・分析に関する基礎調査 ベニバナ、特に花の主成分の抽出および分析・定量に関する方法論の検討
細菌血清部	ベニバナ成分の抗菌作用の探索 ベニバナ色素にある生理活性物質の細菌、特に食中毒原因菌に対する抗菌作用の検討
環境医学部	ベニバナ成分の生理作用の探索 ベニバナ、特に花の乳分泌、発育などに対する生理作用をマウスを用いて検討

以下に、各部で実施した基礎調査および基礎的研究の概要を示す。

## 2. 研究方針の模索

### 1) ベニバナ成分の抽出および分析に関する基礎調査(理化学部)

ベニバナの紅色色素カーサミンについての最初の報告は、Chevreul によってなされたが、その色素を精製し、分析して、 $C_{14}H_{16}O$  の化学式を提示した Schlieper (1846年)をはじめ、Malin および Radcliffe らにより、この色素が化学の分野

に登場した。その後、亀高、黒田らの一連の研究によって紅花の色素は、紅色色素カーサミンと黄色色素サフラワーイエローからなることが示された。

その化学構造については、多価フェノールとしての呈色反応およびフラボン、カルコン系化合物との比較などから検討された。また、山形大学工学部の小原らにより、合成化学面から、それらの構造が研究されている。

ベニバナの薬効については、産前、産後のいわゆる婦人病に対して、乾燥花3～5gを1日量として煎じて服用されているが、その有効成分についての研究報告はみあたらない。一般には、上記2つの色素が有効成分といわれているが、それらを定量する方法は確立されておらず、局方に掲載されるに至っていない。化学構造の研究には、ベニバナを紅餅に加工したペースト状のものあるいは粉末状のものが用いられている。

生薬としての品質をみる場合、ベニバナの種類およびその産地による相違、また生花の加工法による色素の変化なども検討し、最良の抽出法をみいだす必要がある。

ベニバナの色素カーサミンについて調査をはじめている県内製薬会社（オリエンタル薬品工業株式会社）からの情報によれば、カーサミンの抽出効率を生花と乾燥花で比較すると、生花からの収量が乾燥花のそれを上回るという。しかし、抽出法など詳細な条件は未だ発表されていない。

いずれにしても、まず生物活性物質の存在をつきとめることが先決であり、その物質の精製および分析は、それに続く研究である。

参考文献を下記に列記する。

#### 参 考 文 献

1. 特許 昭30-8943  
含水有機溶剤を用いてベニバナ赤色花卉からカーサミンの分離製造法
2. 特許 昭35-2383  
紅花花卉の処理法
3. 特許 昭45-16346  
紅花花卉の搾り汁の保存法
4. 特許 昭45-40913  
ベニバナ花卉粉末の錠剤製造法

5. 特許 昭47-4630  
紅花花卉からサフロールエローの先駆物質及びサフロールエローの純粋分離法
7. 亀高德平. 東京化学会誌, **27**, 1202, 1906.  
J. Chem. Soc. **97**, 1415, 1910.
8. 黒田チカ. 日本化学会誌, **51**, 237, 1930.
9. Schlieper. Ann. **58**, 357, 1846.
10. Malin. Ann. **136**, 116, 1865.
11. Radcliffe. J. Soc. Dyers. **13**, 158, 1897.
12. 羽根田作夫. 植研. **4**, 142, 1927.

## 2) ベニバナ成分の抗菌作用および動物細胞増殖促進因子の探索 (細菌血清部)

ベニバナにはカーサミンおよびサフラーイエローの色素を含有する。一般に色素には抗菌作用を持つものが多い。もしも、ベニバナの色素に抗菌活性があれば、食中毒予防の目的で食品に添加されている人工化合物に代わる新しい安全な食品添加物になりうる。

第1の実験は、ベニバナに含まれる細菌増殖の抑制物質を探することを目的に行われた。

ベニバナの花、葉および根を細切し、0.15M NaCl加、0.01M 磷酸緩衝液、pH 7.2、で水溶性成分を抽出した。

一方で、食中毒原因菌である大腸菌(F80-7)、腸炎ビブリオ(K-15)、黄色ブドウ球菌、セレウス菌(50-35)および枯草菌(ATCC6633)の各細菌 $10^6$ /mlを含むトリプトース寒天平板を作った。

そして、乾燥したバルブディスク(φ10mm、吸水量0.075ml)に花、葉、根の各抽出液をしみこませて、上記のそれぞれの細菌を含んだ寒天平板上にはりつけ、36℃、24時間培養した。抗菌作用の有無は、それぞれのベニバナ抽出液がしみこんだバルブディスクの周囲に出現する細菌の増殖阻止円の有無により判定した。

ベニバナは、デワおよびトゲナシの2種を用いたが、いずれにおいても、またそれぞれの花、葉、根の別なく、用いた細菌に対する増殖阻止円は認められなかった。

ところが、実験結果は示さなかったがセレウス菌の増殖抑制効果をみた実験に

において、その増殖阻止効果は認められなかったものの、逆に、増殖促進と思われる現象が認められた。そこで、第2の実験としてその増殖促進現象が、植物細胞のみならず、動物細胞に対しても同様に存在するか否かを検討した。 $3 \times 10^5$  cells/ml、 $3 \times 10^4$  cells/ml および  $3 \times 10^3$  cells/ml の濃度の動物細胞（ヒトの子宮頸部がん由来の HeLa 細胞およびアフリカミドリザル腎由来の GMK 細胞）を、上記の各抽出液を含有する培養液で細胞数の増加をみた。いずれの抽出液においても、用いた細胞の増殖を促進するという証拠は得られなかった。

### 3) ベニバナ成分の生理作用の探索（環境医学部）

- (1) ベニバナ種子の実質重量の測定：ベニバナの生理作用をみる一つの方法はベニバナ成分（花、種子およびそれらからの抽出画分など）を添加した飼料と添加しない飼料を動物に投与し、各群における発育の程度を比較することにはじまる。このような実験では、添加物の量を明確にしなければならない。

種子は殻と実質からなるが、研究開始当初は、その添加量は実質重量で計算すべきと考え、全種子重量に対する実質重量の割合を調べた。

昭和54年および昭和55年に山形県で栽培された最上ベニバナの種子20粒を無作為に選び、それぞれの全重量、殻の重量および実質重量を測定した。

表5に示したように、種子全重量に対する実質重量の割合は、栽培した年次により異なる。このことは、用いた実験材料ごとに計測しなければならないことを示しているが、その後の調査で、昭和54年の成績は例外的なものでほとんどの種子群（栽培別）の実質が占める割合は、表5の昭和55年産の数値にほぼ一致することがわかった。

なお、最終の実験（後述）においては、種子全体の粗栄養素分析の結果を基にして、種子添加飼料と無添加の基礎飼料との粗栄養素含量をほぼ同じく調整した。

表5 ベニバナ種子の実質重量

昭和54年産

種子No	種子全重量A(mg)	殻重量(mg)	実質重量B(mg)	B/A×100(%)
1	33.1	23.4	9.7	29.3
2	29.0	22.8	6.2	21.4
3	36.9	29.1	7.8	21.1
4	44.3	27.5	16.8	37.9
5	33.4	26.8	6.6	19.8
6	29.7	17.2	12.5	42.1
7	32.3	25.5	6.7	20.7
8	29.6	15.1	14.5	49.0
9	40.0	28.7	11.3	28.3
10	23.8	14.5	9.3	39.1
11	25.6	15.1	10.5	41.0
12	42.9	30.4	12.5	29.1
13	33.4	28.5	4.9	14.7
14	42.3	28.3	14.0	33.1
15	40.8	31.1	10.7	26.2
16	38.2	34.6	3.6	9.4
17	40.0	26.7	13.3	33.3
18	35.8	24.2	11.6	32.4
19	54.6	34.1	20.5	37.5
20	53.5	37.0	16.5	30.8
$\bar{x}$	36.96	26.03	10.98	29.8
SD	(±8.19)	(±6.51)	(±4.07)	(±9.93)

昭和55年産

種子No	種子全重量A(mg)	殻重量(mg)	実質重量B(mg)	B/A×100(%)
1	66.2	44.7	21.5	32.5
2	45.9	27.9	18.0	39.2
3	62.0	43.6	18.4	29.7
4	51.7	31.2	20.5	39.7
5	60.2	38.2	22.0	36.5
6	43.3	27.1	16.2	37.4
7	41.3	26.8	15.0	36.3
8	60.0	31.7	28.3	47.2
9	42.2	24.5	17.7	41.9
10	42.6	26.4	16.2	38.0
11	55.1	27.1	28.0	50.8
12	36.4	21.8	14.6	40.1
13	34.5	19.8	14.7	42.6
14	48.6	22.7	25.9	53.3
15	34.5	18.2	16.3	47.2
16	46.7	26.7	20.0	42.8
17	36.7	28.0	8.7	23.7
18	46.7	26.6	20.1	43.0
19	43.4	24.0	19.4	44.7
20	15.5	13.5	2.0	12.9
$\bar{x}$	45.67	27.50	18.17	38.98
SD	(±11.73)	(±7.69)	(±6.05)	(±9.25)

(2) 飼料に添加するベニバナの種子および乾燥花の割合の検討：ベニバナ成分添加飼料を、市販飼料とほぼ同様に、マウスが摂取しなければ、この投与実験は成立しない。そこで、乾燥花の添加量を変えて、その摂取量を調べたところ、市販飼料とほぼ同じ量を摂取できる乾燥花の添加率の最大値は5%であることがわかった。以後の実験におけるベニバナ成分の飼料への添加率は、すべて5%に定めた。

(3) 肥満マウスの除外：実験マウスとして選んだddY系マウスを新生マウスから成熟マウスまで体重の変動を追跡したところ、マウス体重に大きな個体差があり、5～20%の割合でいわゆる肥満マウスが出現することがわかった。そこで、生後1カ月あるいは2カ月に体重を測定し、体重の値がとびぬけて大きい値を示したものと小さい値を示したものを除きながら、兄妹交配あるいは同系交配を繰り返したところ、継代とともに、体重において個体差の少ないマウスを得ることができた。いわゆる肥満マウスの除去可能であることがわかった。したがって、このような選抜淘汰を実験終了まで継続し、実験用マウス系を保存することにした。この方法および実験成績についての詳細は、研究結果の項で示す。

(4) 多数の同時妊娠マウスの確保：各種の飼料で、それぞれ飼育されたマウス群の発育の差を、体重を指標にして、比較する時、偶然誤差をできるだけ少なくするために、同時に妊娠したマウスが多数必要である。

交配時に同じ飼育箱に入れる雌および雄マウスの比を変えて、それぞれの妊娠率を比較した。最終的に、雌雄比が3：2において最も高い妊娠率を示した。以後、この雌雄比で交配し、一度に多数のマウスを確保して実験に供した。

なお、妊娠を早期に診断する方法として、① 膺スメア法、② 体重の増加による方法の2つを比較した。簡便であり、診断率ほぼ100%を示した体重増加を指標にする後者の方法を採用することにした。後者の実験成績は後述する。体重増加が認められたマウスは雄マウスから離して、別の飼育箱に移して実験に用いることにした。

(5) 母マウス当りの哺乳マウス数（乳仔数）の設定：分娩後、母マウスが分

泌する乳量は、哺乳マウスの数によりかなり異なる。ラットの実験で、母ラット当りの哺乳ラットの数<sup>1)</sup>が2～12匹の範囲では、乳分泌量が哺乳ラットの数<sup>1)</sup>の対数に比例し、哺乳ラット数2以下では、乳分泌量が極端に少なく、また哺乳ラットが多すぎると母ラットの消耗が激しく、結果的に乳分泌量が少なくなるという報告がある。<sup>1)</sup>そこで、母マウス当りの乳仔数を変えて飼育し、哺乳マウスの体重の増加を指標にして、母マウス当りの適当な哺乳マウスの数を検討した。その結果(詳細な成績は後述)、その数は母マウス当り6匹の哺乳マウスにすることが適当であると判断した。

- (6) ベニバナ種子および乾燥花添加飼料投与群と非添加飼料投与群の母および仔マウスの体重変動：予備試験として、市販飼料を基礎飼料にして上記の各飼料を作成した。各群15匹の妊娠マウスに、妊娠中からそれぞれの飼料を与え、分娩後、前に示したように、母マウス当りの仔マウス数を一定(6匹)にして、母および仔マウスの体重の変動を追跡した(図1)。

種子および乾燥花を添加した飼料を投与した2群の仔マウスの体重は、生後14日目を除き、測定したいずれの時期においても、市販飼料のみを投与した対照群の体重に比べて有意に大きい値を示した(図1)。したがって、ベニバナ種子および乾燥花には母マウスの乳分泌を促進する因子あるいは乳に仔マウスの発育を促進する因子が存在することが示唆された。また、自然離乳(生後20日頃)後において、種子および乾燥花添加群と非添加群の体重の差が、前2者間ではほぼ同じような差を維持するが、それらと非添加群(対照)との差はやや大きくなる傾向がみられた(図1)。これは、種子および乾燥花にマウスの発育を促進する因子があることを強く示唆していると考えられた。しかし、ベニバナの種子および乾燥花を添加した飼料と市販飼料との間に栄養学的相違があることが考えられ、この成績を、そのまま、ベニバナの効果と判定するには至らなかった。

そこで、以後の実験においては、少なくとも粗栄養素のレベルで各飼料間の差を調整する必要があると判断した。

一方、母マウスの体重変化をみると、図1に示したように、市販飼料で飼育された母マウスの体重が、分娩後、大きく変動したのに対して、ベニバナ種子および乾燥花を添加した飼料で飼育された母マウスの体重は、そのように変動しなかった。あたかもベニバナに母マウスの分娩後における母マウス

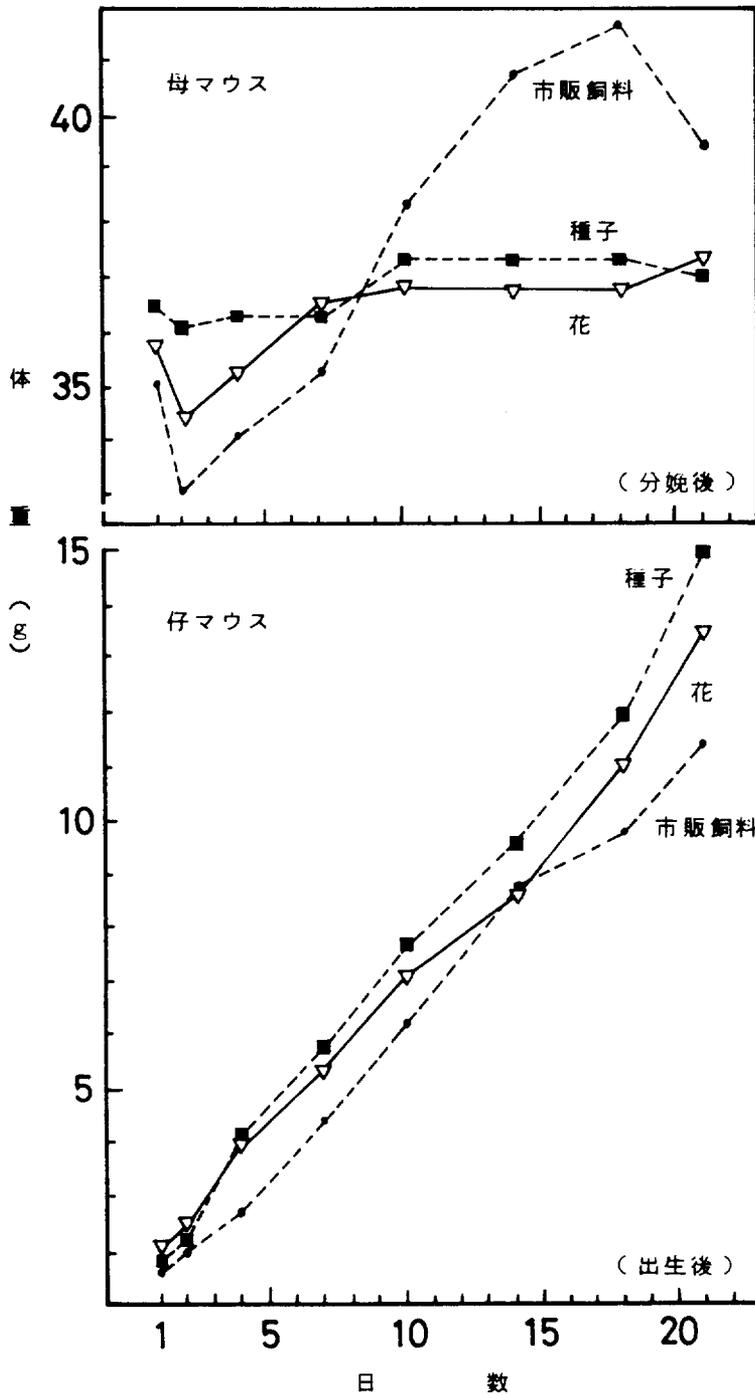


図1 乾燥花および種子投与による分娩後(出生後)の母マウスおよび子マウスの体重変化

の肥満を防止する効果があるかのようにみられた。しかし、その後の粗栄養素のレベルで各飼料間の差を調整した同様の実験では、各群に差が認められない場合が多く、この現象は再現性を欠くものであった。

- (7) ベニバナ成分のリンパ球芽球化活性の有無の検討：ある抗原に対する記憶をもったリンパ球を活性化し、生体に導入すると、その抗原をもつ細胞に特異的に結合し、その細胞を破壊する。この免疫学的現象をがんの治療に応用する努力がなされているが、その応用を実現するには、ある抗原に対する記憶をもつリンパ球が得られること、そしてそのリンパ球を大量に増殖させ得ることが必須条件である。

一方、婦人病に対する漢方薬の一つである当帰、*Angelica acutiloba*、の根にBリンパ球を非特異的に活性化（芽球化）する因子の存在が報告されている。<sup>2)</sup>これ以外の植物にも同様の因子が知られている。<sup>3)4)5)</sup>すなわち、リンパ球の増殖を促がす因子が、植物に存在するのである。

そこで、われわれは、ベニバナにおいて同様の因子の存在の有無を調べることにした。

当帰で行なわれている方法と同じように、ベニバナの根150gを1.5ℓの水と共に煮沸し、その抽出液を限外ろ過により濃縮後、RPMI-1640細胞培養液に対して透析して溶媒の交換を行なった（濃縮液の蛋白量：57mg/dl）。この濃縮液を蛋白量で最終濃度0, 50, 100および200 $\mu$ g/mlになるように培養液で調整し、各濃度の培養液でヒト末梢血リンパ球（ $5 \times 10^5$  cells/ml）を、炭酸ガス培養器（5% CO<sub>2</sub>）中で、静置培養した。培養6日後に細胞をギムザ染色液で染色して、芽球化リンパ球の出現の有無を観察した。芽球化陽性物質であるConA（2 $\mu$ g/ml）添加培養系では、約50%のリンパ球に芽球化が認められたが、ベニバナ根抽出成分を添加した培養系では、いずれの濃度においても、無添加培養系（対照）との間に差が認められず、ベニバナ根水抽出物中にリンパ球を芽球化する因子を検出することができなかった。

### 3. 研究方針の設定

前項に示した衛生研究所各部の分担課題についての調査および基礎的実験の成績を基にして、以後の研究の方針を次のように設定した。

- (1) ベニバナ成分の細菌に対する増殖阻止作用、動物細胞に対する増殖促進作用およびリンパ球に対する芽球化作用などは検出できなかったが、ベニバナ成分、特に乾燥花、にマウスの発育を促進する因子が存在することを示唆する成績が得られた。したがって、この発育促進因子の存在を示唆する現象の再現性を、実験条件を整えて、確認する必要がある。
- (2) さらに、乾燥花を分画し、どの画分にこの発育促進作用が存在するかを調べる。

以上のように研究の方針を設定し、まず、実験条件を整えるための基礎的研究から開始され、それらの成績を基にして、次の項にのべるような本実験が計画された。

そして、それらの結果から、ベニバナの花、特に水溶性画分、にマウスの発育促進因子の存在を強く示唆する成績が得られた。

### Ⅲ. 研究結果

#### 1. 実験条件設定のための基礎的研究

動物実験において、再現性のある成績をうるには、まず実験の目的に即した動物を選ぶことが必要である。今回の実験においては、

- ① できるだけ人間に近い動物であること。
- ② 動物の個体差が少ない動物であること。
- ③ 多数の個体を同時に飼育できる動物であること。
- ④ 短期間で実験目的に適した動物が多数得られること。
- ⑤ 経済的に実現可能であり、かつ技術的に少数の実験者で実施可能であること。
- ⑥ 用いる実験飼料は、栄養学的にほぼ同一であること。

などの条件を満たす必要がある。

これらの条件を満たす動物として、哺乳動物である ddY系マウス<sup>6)7)8)</sup>を用い、実験飼料は合成飼料を用いることにした。

#### 1) 肥満素因保有マウスおよび発育不全マウスの選抜淘汰

実験に用いたマウスは共通祖先 dd マウスより分離されたが、ddグループの系統間に成長、繁殖能力などに相違が認められている。ddY系マウスを購入し、予備飼育を行なったところ、生後2カ月で35 g以上の体重を示すものが5～20%の割合で出現することがわかった。

したがって、これらのいわゆる肥満マウスの出現をできるだけ少なくし、個体差の少ないマウス系を得るために、次のような選抜淘汰<sup>9)10)</sup>を行なった。その概略を図2-1、-2、-3に示した。

選抜淘汰の操作を加えない ddY系マウスの体重分布を雌雄別にみると、生後1カ月において図2-1aに示したような分布を示した。一見、かなり均一なように見えるが、それらを3回交配を繰り返し、3代目のマウスの体重分布をみると図2-1bのようになり、非常に個体差があることがわかる。それまでの各継代におけるマウスの体重分布から、選抜淘汰の条件を、マウスの平均体重 $\pm 2SD$  ( $2 \times$ 標準偏差値)で求め、原則として、生後2カ月体重において25 g以下および35 g以上を除去することにした。

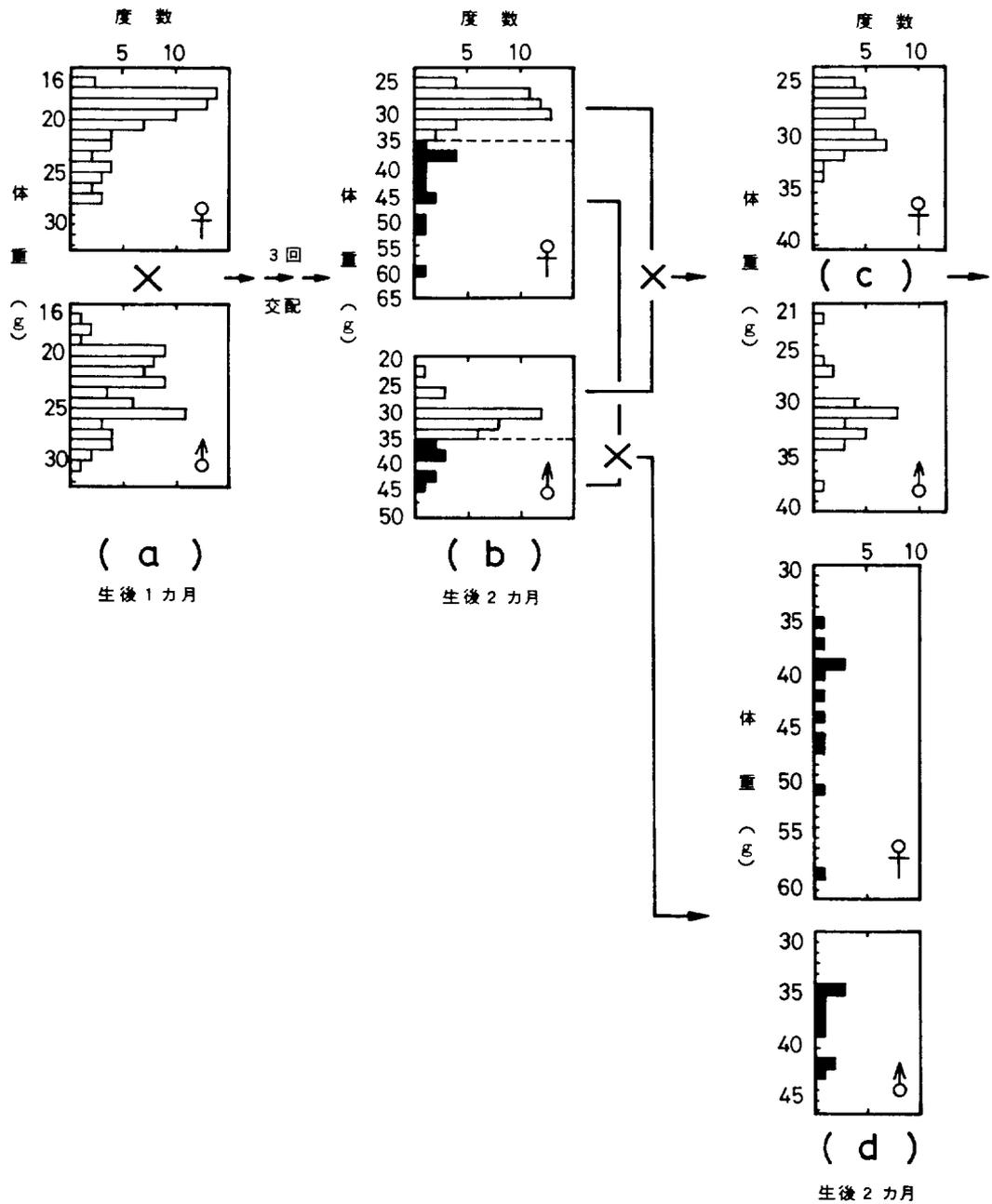


図2-1 肥満マウスおよび発育不良マウスの淘汰  
黒塗りは淘汰したマウス

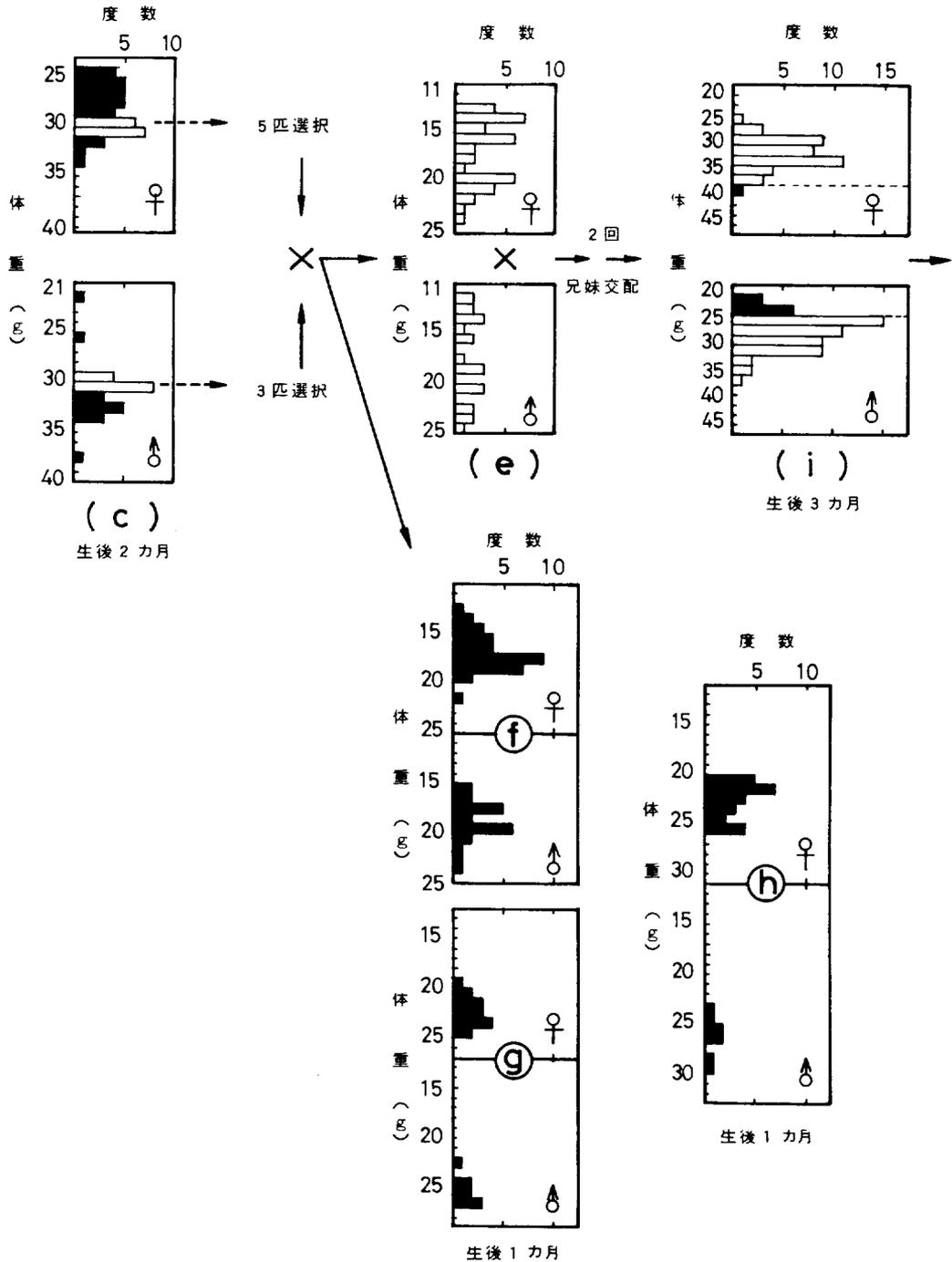


図2-2 肥満マウスおよび发育不良マウスの淘汰  
黒塗りは淘汰したマウス

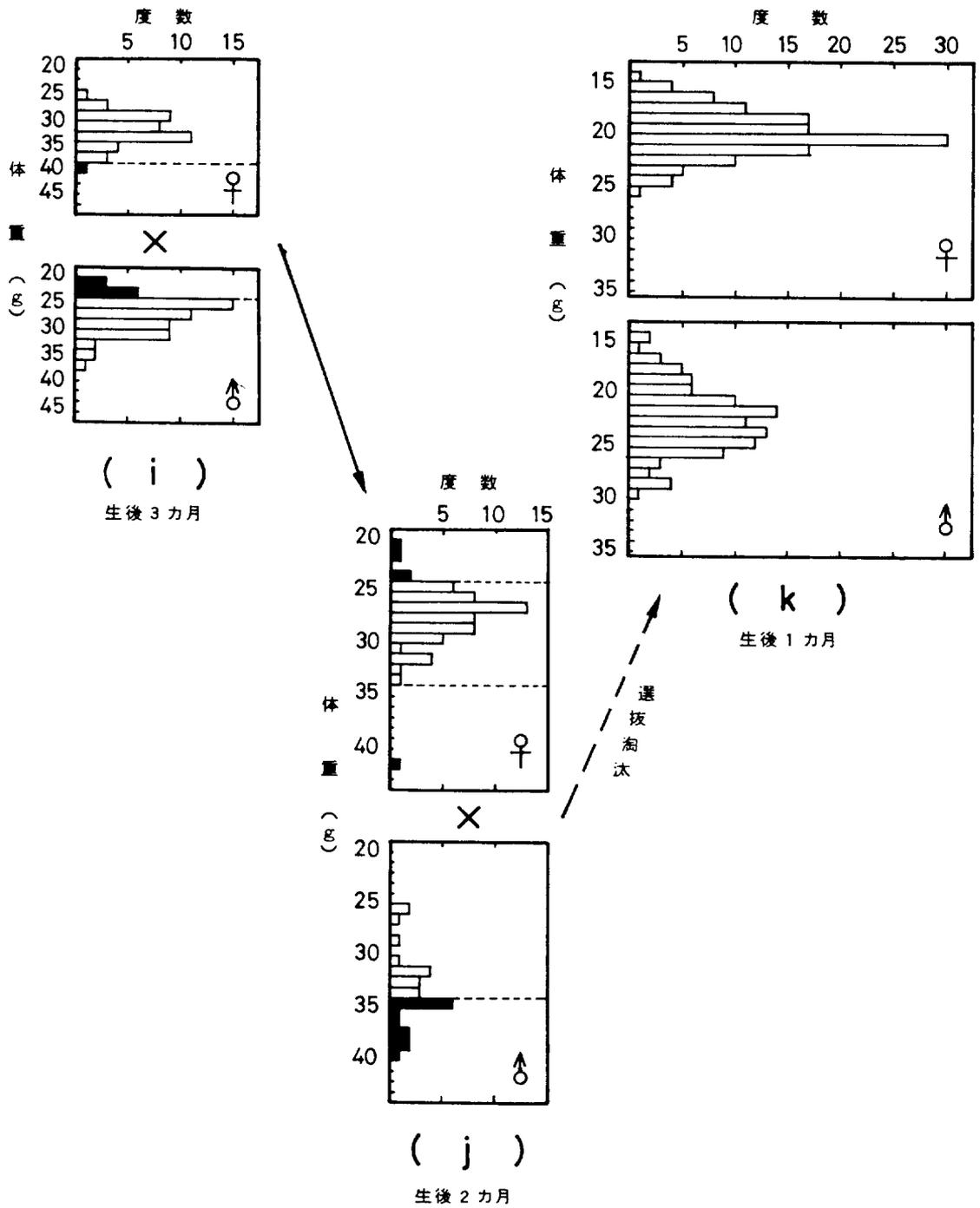


図2-3 肥満マウスおよび発育不良マウスの淘汰  
黒塗りは淘汰したマウス

次に、図2-1bのマウスを雌雄ごとに体重35 gで2分し、体重の軽いものおよび重いもの同志で交配した。その結果を図2-1cおよびdに示す。生後2カ月でそれぞれの仔マウスの体重分布をみると、各親マウスの生後2カ月における体重が35 g以下のもの(図2-1bの白スキの部分)同志からの仔マウスは、1例を除き、すべて35 g以下のマウスで占められ、逆に35 g以上のもの(図2-1bの黒塗りの部分)同志からの仔マウスはすべて35 g以上の体重を示した。このことは、体重の重いマウスおよび軽いマウスは遺伝的に支配されていることを示唆しており、生後2カ月で選抜淘汰することによって、いわゆる肥満マウスの出現をほぼ抑えることができる可能性が示された(図2-1c)。

ところが、続いて、図2-1c(図2-2cも同じ)の体重30~31 gの雌マウス5匹および雄マウス3匹を抽出し、兄妹交配を行なった。各雌雄つがい毎に生れてきたマウスの体重分布をみると、まだ、かなり広い範囲に分布していることがわかった。(図2-2c、-2f、-2gおよび-2h)。なお、残りの一つがいからのマウスの体重分布は測定しなかった。続いて、図2-2eのマウス系のみを、2回兄妹交配を続けた。最後の仔マウスの生後3カ月における体重分布は、図2-2i(図2-3iと同じ)にみられるように、比較的均一性が認められるようになったが、それらの雌雄の体重25~40 g(生後3カ月体重)のマウス同志で交配し、その仔マウスの体重分布を、生後2ヶ月でみると、特に雄マウスにおいて、35 g以上の体重を示すマウスがまだ出現する(図2-3j)。しかし、さらに数代選抜淘汰を繰り返して、図2-3kにみられるようなほぼ均一な体重を示すマウスが得られた。これらのマウス集団は2カ月後においても、それらの体重分布のパターンに変化はみられなかった。実験には、この系のマウスを各実験の前に選抜淘汰を数代繰り返して用いることにした。これらの成績をまとめると次のようになる。

- ① 選抜淘汰で得られたマウス群は少なくとも生後2カ月以内、雌雄ともに、その体重分布は正規分布を示す。
- ② 選抜淘汰で奇型の出現はみられなかったし、また病気に罹患しやすい傾向もみられなかった。
- ③ 繁殖能力は低下しない。

## 2) マウスの水および飼料の摂取量

ベニバナ成分を基礎飼料に添加することによって、水の摂取量および飼料の摂

取量が変わらないことがこの実験の必要条件である。この実験では、ベニバナ成分の添加の割合を5%に設定したが、その場合における種子または乾燥花添加飼料投与群の水および各飼料の摂取量を市販飼料投与群のそれらと比較してみた。妊娠マウスを上記の3つの投与群に分配し、それぞれの飼料で飼育した。分娩と同時に各投与群の母マウスを14匹とし、母マウス当りの仔マウスの数を6匹に調整した。母マウス1匹およびその仔マウス6匹ごとに飼育箱に分配し、分娩後26日間、水分および各飼料の摂取量を記録した。各投与群の摂取量は各14飼育箱のそれらの平均値で表わした。その結果を図3に示す。

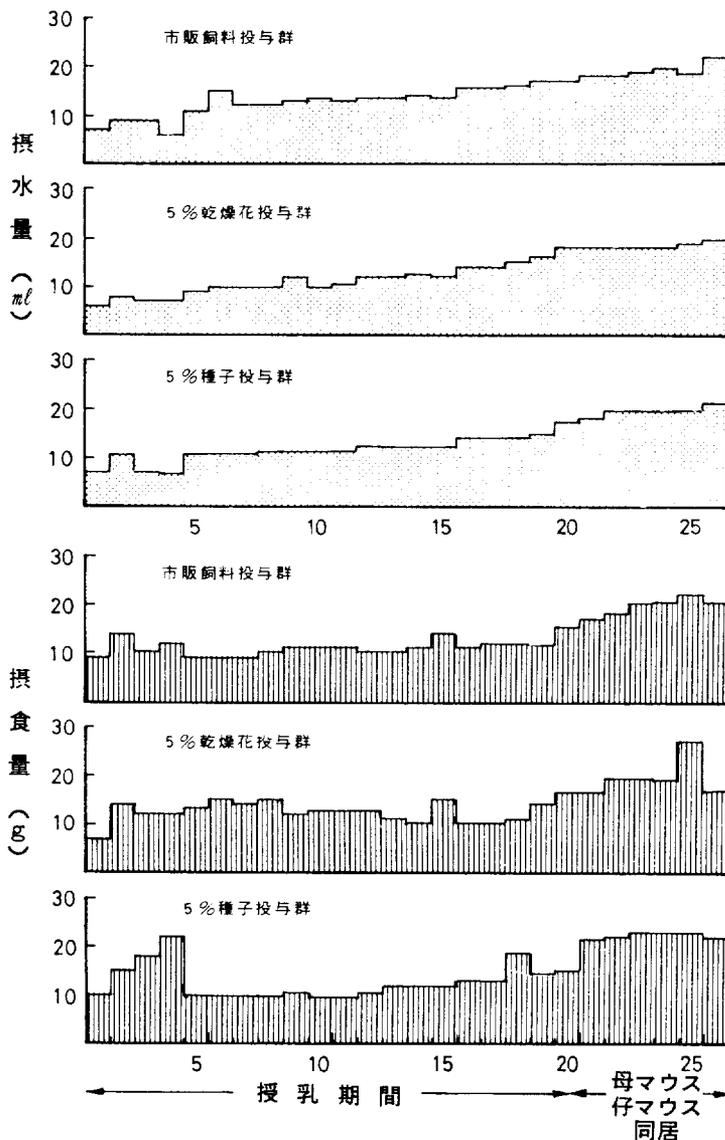


図3 ベニバナ種子、乾燥花添加飼料投与マウスの水分および飼料の摂取量の推移

摂水量および摂食量に多少の凹凸がみられるが、各投与群の間に大きな相違が認められない。分娩後5～7日の頃に、各投与群ともに飼料の摂食量が日ごとに大きく上下しているが、これはマウスが飼料をけちらした量が加算されていると考えられる。

すなわち、分娩後の母マウスおよび離乳後の仔マウスの摂水量および摂食量は、少なくとも仔マウスの出生後25日の間、飼料の種類に左右されず、ほぼ同じであることが示された。これは、ベニバナ成分の添加を5%にとどめる時、各投与群を比較できることを示している。

### 3) 妊娠マウスの受胎数

この実験においては、仔マウスの出生から成熟するまでの発育をベニバナ成分投与および非投与の間で比較する。したがって、各仔マウスの授乳条件および飼料摂取条件がほぼ同じでなければならない。飼料摂取条件は、前項で示したようにベニバナ成分の添加量5%に設定した。一方、哺乳期の仔マウスの栄養は母マウスからの授乳によることから、この時期における仔マウスはすべてほぼ均等に授乳される必要がある。母マウスの中には、自分が出産した仔マウスのみ授乳し、他の母マウスが出産した仔マウスには授乳しない場合がある。したがって、母マウスに付属させる仔マウスはその母マウスが出産した仔であることが必要である。また、この実験においては、結果を統計学的に比較することから、母マウス当りの仔マウスの数は少なすぎてはいけない。そこで、まず、妊娠マウスの受胎数の分布を調べた。

62匹の妊娠マウスを無作為に抽出し、分娩後、受胎数別の母マウスの度数分布をみた。図4にその1例を示す。受胎数1～13匹の広い範囲に分布し、8～9匹のものが最も多い。ベニバナ成分投与実験において、母マウス1匹当り6～7匹の仔マウスの実験系にすると、大部分の妊娠マウスを使用することができる。

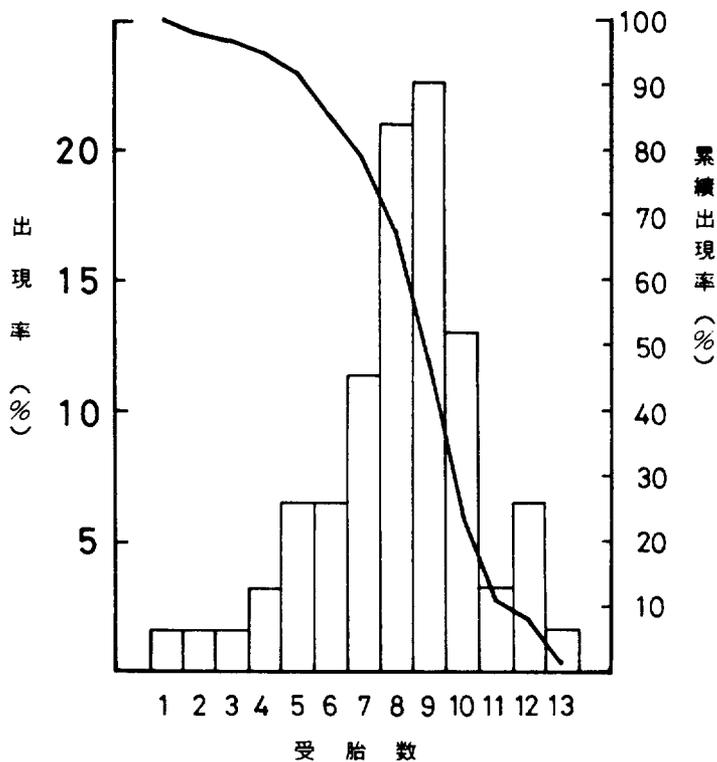


図4 受胎数別妊娠マウスの分布

#### 4) 妊娠の診断

妊娠の確認法としてはいろいろ検討されている<sup>11~18)</sup>。妊娠の有無およびその日数を正確に知るには、前にのべたように、膣分泌物の塗抹標本を鏡検する方法が優れている<sup>19)20)</sup>。しかし、いずれも妊娠の直接的診断法ではなく、また多数の動物を一度に取り扱う場合には手数がかかりそして時間もかかる。したがって、この実験では、簡単な体重測定による方法を用いた。

交配後、あらかじめ分娩まで妊娠マウスの体重を経時的に計測した。そして分娩後、新生仔マウスの数により群別して、各群(妊娠マウス数は10匹)の日別平均体重を、分娩日を妊娠21日目として、胎児数による群ごとに体重の増加を曲線で表わした。図5はその1例であり、図6は数回の実験のまとめである。母マウスの体重増加が、図6より、受胎数6匹以上と推定できた雌は雄から離すことにした。

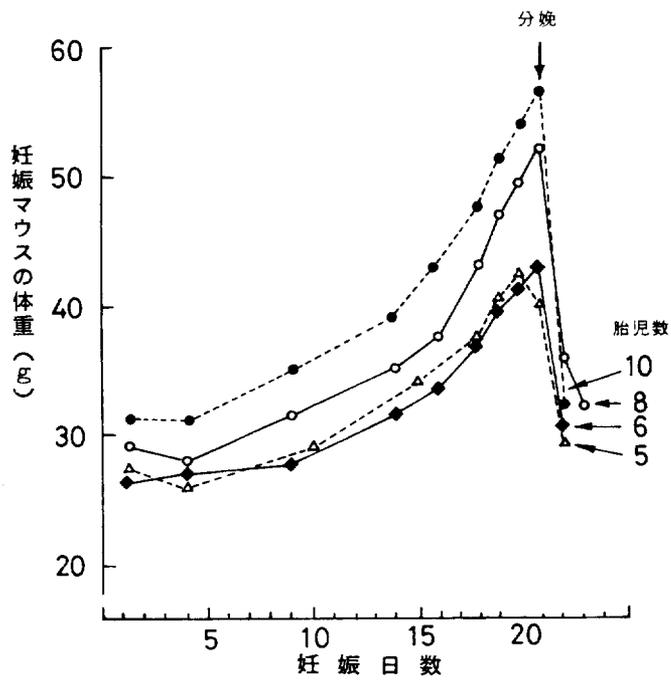


図5 胎児数による妊娠マウスの体重変化

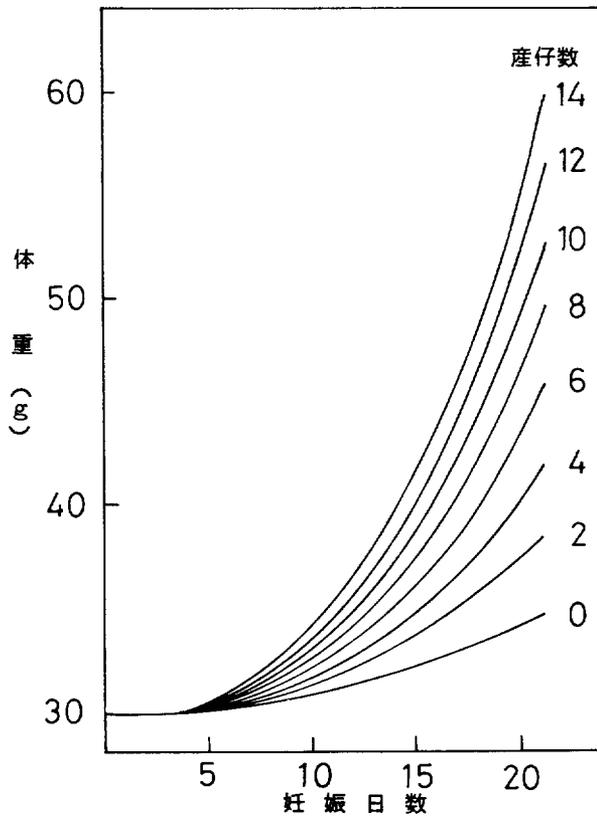


図6 産仔数(胎児数)別妊娠マウスの体重増加

## 5) 多数の同時妊娠マウスの確保

飼育環境、飼育者等に由来する偶然誤差の影響を少なくするために、一つの実験は同時に進行することが望ましい。したがって、多数の同時妊娠マウスの確保が必要である。そのため、多数の繁殖可能なマウスの確保と短期間の雌雄同居による高い妊娠率が要求される。

ほとんど同時に出生した雌雄マウスを用いて、交配時（生後2カ月以後）における雌雄比と妊娠率との関係を検討したところ、同居7日間で雌3：雄2の時に最も高い妊娠率（90～97%）を示し、雌雄比1：1の場合より若干高い妊娠率を示した。

交配に用いるマウスは、雌雄ともに、いわゆる毛なみがよく、体重25g以上の健康なものを用いるようにした。

## 6) 母マウス当りの哺乳マウスの数と仔マウスの発育（乳仔数とその仔マウスの発育）

哺乳マウスの発育は、母マウスからの乳分泌量に依存し、その乳分泌量は母マウスの栄養条件および乳仔数により異なる<sup>21)</sup>。

そこで、母マウス当りの乳仔数を設定するために、次のような実験を行なった。

母マウス当りの乳仔数4、8および14の3群（各群の母マウス数2～6匹）における仔マウスの体重増加を比較した（図7）。乳仔数が多いと仔マウスの体重増加率が悪くなることがわかった。また、生後7および14日目において、母マウスごとにその仔マウスの平均体重を求め、それらの値と乳仔数との関係をみると、乳仔数が多くなると仔マウスの体重は小さくなることがわかった。（図8）次に、乳仔数ごとに生後7日目と14日目で仔マウスの体重のバラッキを比較すると、乳仔数5～10の間では、両時期においてバラッキが少ないのに対して、乳仔数4および11のマウスでは、生後7日目でバラッキがみられなかったものでも生後14日目になるとそれが現われてきている（図8、矢印）。これらの結果から母マウス1匹当りの乳仔数は、5～10の間に設定すべきと判断された。

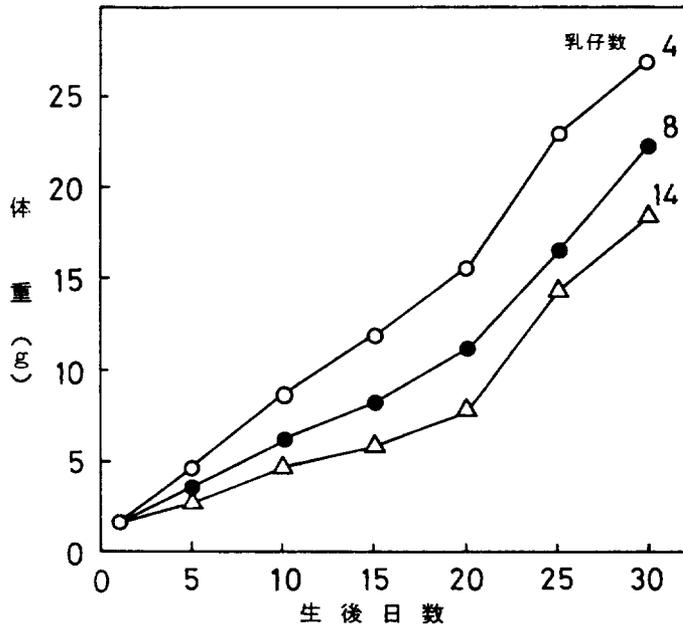


図7 母マウス当りの乳仔数とそれら仔マウスの体重増加

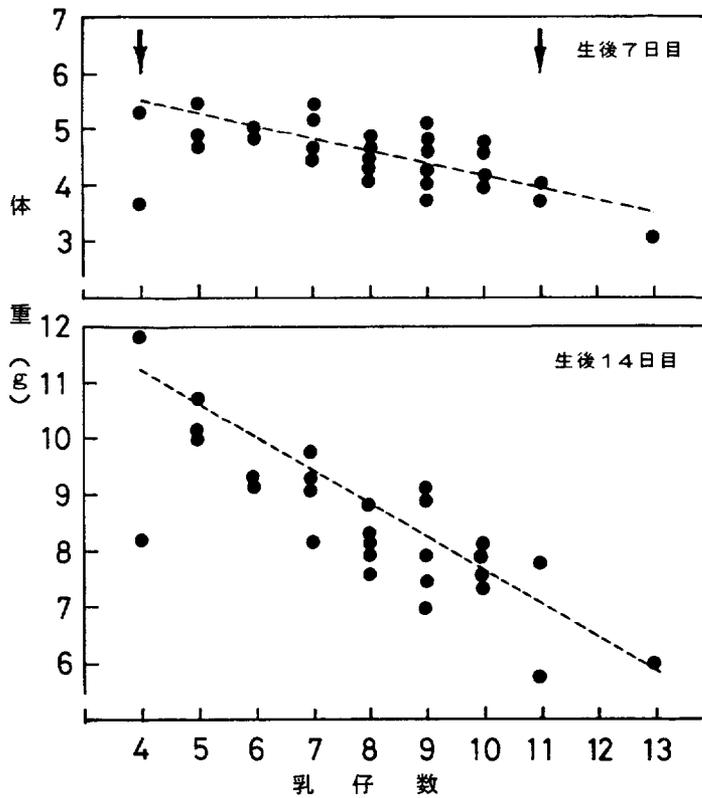


図8 乳仔数と仔マウスの体重

● : 1匹の母マウスから生まれた仔マウスの平均体重

## 7) マウスの体重増加の雌雄差

出生後の仔マウスの体重増加を観察する時、少なくとも成熟マウスにおいて雌雄間に大きな相違が認められた。したがって、ベニバナ成分添加および非添加飼料投与群の間で比較する際には、それぞれの群を構成する雌雄比をほぼ同一にしなければならない。しかし、一匹の母マウスから生れる仔マウスの雌雄比を同じくすることは不可能である。そこで、生後どの時期から、体重の雌雄差が生じてくるのか、またその雌雄差の開きと母マウス当りの乳子数との関係について調べた。

乳子数 4、8 および 14 の 3 群（各群の母マウス数 10 匹）に分けて、それぞれにおける仔マウスの体重増加を生後 35 日まで追跡した。図 9 に示したように、乳子数 4 の群では生後 25 日まで（図 9a）、8 の群では生後 20 日頃まで（図 9b）雌雄の間に大きな体重の差が認められないが、乳子数 14 の群では、生後 2 週頃にすでに雌雄差が明らかである（図 9c）。

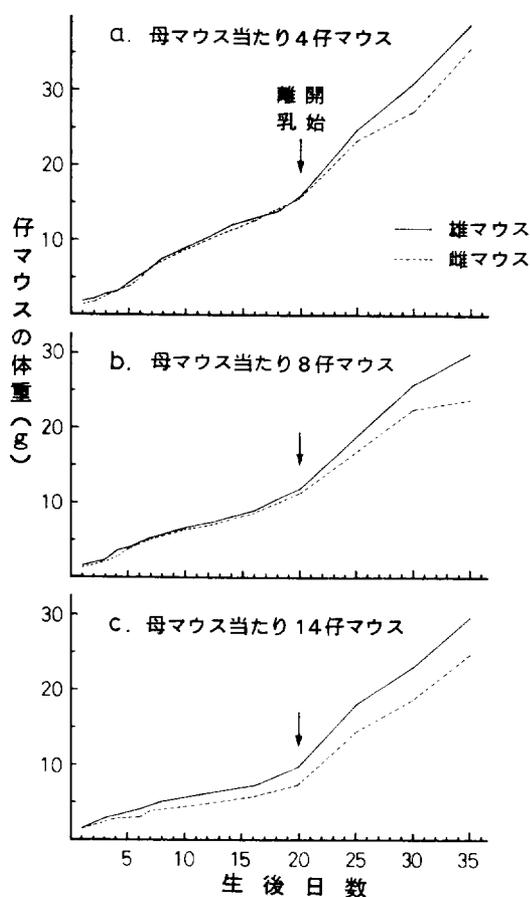


図9 母マウス当りの哺乳マウスの数（乳子数）とそれら仔マウスの発育

これらのことは、母マウス当りの乳子数を4～8の間に設定すると、生後25日頃まで、雌雄の別に無関係に、全体の平均値で各実験群を比較することができることを示している。

次に、乳仔数別に仔マウスの体重増加を比較した。哺乳期においては、乳仔数が多いと体重増加率が低いことがうかがわれる。しかし、離乳の後の体重増加率は乳仔数にあまり依存しないようである。

## 8) ベニバナの粗栄養素成分分析

先きのべたように、ベニバナ成分添加飼料と非添加飼料をマウスに投与し、各群のマウスの発育を比較する時、各飼料の粗栄養素組成をほぼ同一にする必要がある。

そこで市販飼料（船橋農場、飼育用F-2）とベニバナの種子および乾燥花の粗栄養素分析を行った。

### (1) 分析 方 法

衛生試験法注解（日本薬学会編、p.139-179、1980年版）の方法により行なった。

水分：常圧、105℃、乾燥法

粗蛋白：セミマイクロキエルダール法

粗脂肪：エーテル抽出法

粗繊維：ヘンネベルグストーマン改良法

粗灰分：550℃加熱灰化法

ビタミンE：バソフェナンスロリン発色法<sup>22)</sup>

β-カロチン：比色法<sup>23)</sup>

### (2) 結果（表6および表7）

ベニバナの成分組成を市販飼料のそれと比較すると、種子では、粗繊維（7.2倍）および粗脂肪（4.6倍）が多く、粗蛋白および粗灰分（各0.6倍）が少ない。一方、乾燥花では、粗繊維（5.7倍）、粗灰分（1.5倍）および粗脂肪（1.2倍）が多く、粗蛋白（0.6倍）が少ない。

また、脂溶性ビタミンの一つであるビタミンEおよびβ-カロチンを比べると

種子および乾燥花のビタミンE量は市販飼料より多いが、β-カロチン量は、市販飼料に比べて、乾燥花は3.6倍も多く、種子では半量以下である。乾燥花にβ-カロチンが非常に多いことが際立っている。

表6 ベニバナと市販飼料の成分分析値

成分名	単位	種子	乾燥花	飼料
水分	%	6.8	8.8	7.6
粗蛋白質	%	12.9	13.3	20.6
粗脂肪	%	20.6	5.2	4.5
粗繊維	%	18.8	14.8	2.6
粗灰分	%	3.2	7.7	5.0

表7 ベニバナと市販飼料中のビタミンE量とβ-カロチン量 (100g中)

成分名	単位	種子	乾燥花	飼料
ビタミンE	mg	14.5	16.3	5.6
β-カロチン	μg	4.2	32.8	9.2

これらの成績を基にして、対照飼料とベニバナ成分添加飼料との間の粗栄養素組成をできるだけ同じようにするように調整することにした。対照として用いる基礎飼料は市販飼料を用いず合成飼料にした。

なお、われわれは、先に種子の脂質分析を行なっているが、今回測定した種子の粗脂肪含量は、前報<sup>24)</sup>の成績とほぼ一致した。

### 9) ベニバナ、特に乾燥花、からのカーサミン画分とサフラワー・イエロー画分

乾燥花には、周知の如く、紅色色素、カーサミン、と黄色色素、サフラワー・イエロー、が含まれる。

乾燥花粉末の水溶性画分にはサフラワー・イエローの大部分が抽出され、その水抽出残渣には脂溶性のカーサミン、ビタミン、カロチンなどを含む。

乾燥花粉末をクロロホルム・メタノール(2:1)で抽出すると、紅い色素が抽出され、水洗しても色素はクロロホルム層に認められた。一方の黄色色素についてはメタノールに不溶という報告<sup>25)26)</sup>があるが、それを確かめることにした。

花の水溶性画分を用いて種々の濃度のメタノール溶液を加え、メタノール溶液への溶出量を調べた(図10)。

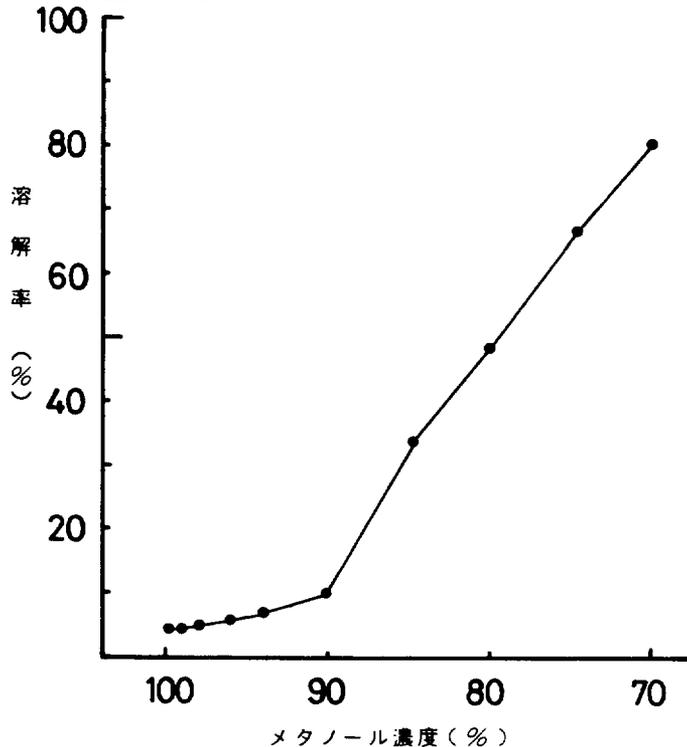


図10 乾燥花の水溶性画分のメタノール溶液に対する溶解性

メタノールの濃度90%以上では、ほとんど溶けないことが明らかである。

また、花の水溶性画分のクロロホルム・メタノール(2:1)およびクロロホルムに対する溶解性を調べたのが図11である。メタノールおよびクロロホルムには、ほとんど溶けないことが明らかである。

これらの成績から、サフラワー・イエローのほとんどが水で抽出されること、およびクロロホルム・メタノール(2:1)では抽出されないことがわかった。

乾燥花の分画は、水抽出とクロロホルム・メタノール抽出を行なうことにした。

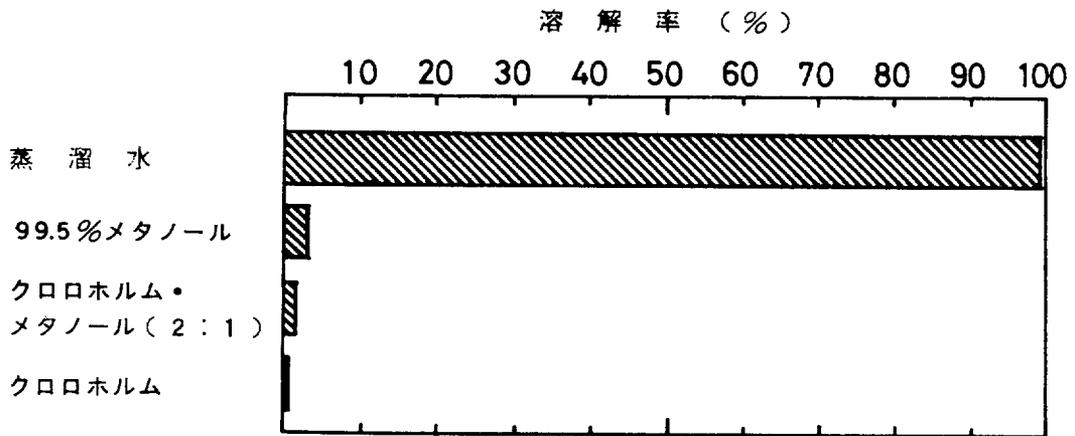


図 11 乾燥花・水溶性画分粉末のクロロホルムおよびメタノールに対する溶解性

### 10) 実験合成飼料の調整

基礎飼料として、カゼイン（船橋農場）、大豆油（ニッカ油脂KK）、澱粉（船橋農場）、塩類混合物（船橋農場）、ビタミン混合物（船橋農場）、セルローズ（東洋紙）および水分の混合物を用いた。それに表 8 に示したベニバナ成分（種子粉末、乾燥花粉末、花の水抽出画分とその残渣、および花のクロロホルム・メタノール抽出画分とその残渣）の各 5% あるいは 5% 相当量を基礎飼料に加え、実験用飼料とした。各飼料中の粗栄養素組成は、表 8 に示したように、基礎飼料に用いた各成分の量を増減し、調整した。

各ベニバナ成分は次のように調整した。

昭和 56 年、寒河江市および山形市で栽培した最上ベニバナを自然乾燥し、その花と種子をそれぞれ粉末にした。

乾燥花の水抽出：乾燥花粉末 250 g を 2 重の木綿地の袋に入れ、10 ℓ の蒸留水で室温 30 分間抽出した。この操作を 20 回繰り返した。えられた水溶性画分は少量ずつに分けて濃縮し、一定量の澱粉に吸着させて乾燥、粉末にした（花

表8 飼料の組成

飼料成分	基礎飼料		花・水抽出画分添加飼料		乾燥花添加飼料		花・水抽出残渣添加飼料		種子添加飼料		花・クロメタ抽出画分添加飼料		花・クロメタ抽出残渣添加飼料	
	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%	g	%
カゼイン	1,033.25	20.55	1,033.25	20.04	1,000.00	19.80	1,033.25	20.06	1,001.00	19.84	1,033.25	20.55	1,000.00	19.84
大豆	301.50	5.99	301.50	5.85	288.50	5.71	301.50	5.85	250.00	4.95	288.50	5.73	301.50	5.97
澱粉	3,375.50	67.15	3,375.50	65.49	3,250.00	64.37	3,375.50	65.55	3,281.25	65.05	3,375.50	67.15	3,250.00	64.37
塩類混合物	94.25	1.87	94.25	1.81	75.00	1.48	94.25	1.83	86.25	1.71	94.25	1.87	75.00	1.45
混合ビタミン粉末	25.00	0.49	25.00	0.48	25.00	0.49	25.00	0.48	25.00	0.49	25.00	0.49	25.00	0.49
セルロース	197.00	3.91	197.00	3.82	160.00	3.16	197.00	3.82	150.00	2.97	197.00	3.91	160.00	3.16
種子粉末	—	—	—	—	—	—	—	—	250.00	4.95	—	—	—	—
乾燥花粉末	—	—	—	—	250.00	4.95	—	—	—	—	—	—	—	—
花・水抽出画分	—	—	*127.10	2.46	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
花・水抽出残渣	—	—	—	—	—	—	*122.90	2.38	—	—	—	—	—	—
花・クロメタ抽出画分	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*13.00	0.25	—	—
花・クロメタ抽出残渣	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*237.00	4.69
合計	5,026.5		5,153.6		5,048.50		5,148.4		5,143.5		5,026.5		5,048.50	

\*は乾燥花の5%相当量

の水溶性画分)。一方、えられた残渣を花の水抽出残渣とした。

乾燥花のクロロホルム・メタノール抽出：乾燥花粉末 250 g にクロロホルム・メタノール (2 : 1) 1 ℓ を加え、室温で振盪しながら 30 分間抽出した。この操作を 3 回繰り返した後、抽出層からクロロホルム・メタノールを除いた (花・クロ・メタ画分)。一方、残渣も蒸発乾燥して、残渣からクロロホルム・メタノールを除いた。

### 11) 実験条件

上記の基礎的調査および研究の成績を基にして、実験条件を次のように設定した。

- (1) 実験用飼料：粗栄養素組成において、できるだけ同じように調整した 7 種の飼料を用いる (表 8)。各飼料の名称を次のように定めた。各添加物は、それぞれ 5% あるいは 5% 相当量含有する。
  - ① 基礎飼料：各実験用飼料の基礎にした合成飼料。
  - ② 種子：種子粉末を含む飼料
  - ③ 花：乾燥花粉末を含む飼料
  - ④ 花・水溶性画分：乾燥花粉末の
  - ⑤ 花・水抽出残渣：乾燥花粉末を水で十分に洗浄した残渣を含む飼料。
  - ⑥ 花・クロメタ画分：乾燥花粉末のクロロホルム・メタノール (2 : 1) で抽出した画分を含む飼料。
  - ⑦ 花・クロメタ残渣：乾燥花粉末をクロロホルム・メタノール (2 : 1) で十分洗浄した残渣を含む飼料。
- (2) マウス：選抜淘汰で肥満素因保有マウスをほぼ除去された ddY 系マウスを用いる。同時妊娠マウスをつくり、分娩まで市販飼料で飼育し、分娩後、母マウス当りの乳仔数を 6 匹に整えて、母マウスとその仔マウスごとに飼育箱に入れ各実験用飼料で飼育する。各飼料投与群の母マウス数は、原則として、15 匹とする。
- (3) 仔マウスの発育：発育の指標は、体重の増加とし、生後 60 日間観察する。

なお、生後 13 ~ 14 日目に強制離乳し、その後の仔マウスの生存率を調べる。したがって、離乳後の仔マウス数が死亡により減少する群が出現するが、そのような群では生き残った仔マウスの体重を追跡するにとどめる。

生後30日以後のマウスの体重は、雌雄別に測定し、雌雄比により全体の平均体重を補正する。

さて、マウスの発育に対するベニバナ成分投与の影響を調べるには、ベニバナ成分を投与する時期を変えて行うべきである。例えば、①ベニバナ成分を投与していたマウスを交配後、基礎飼料投与に切り換える（妊娠前の母マウスの栄養と胎児マウスの発育の関係）、②妊娠中のみベニバナ成分を投与する（妊娠中の栄養と胎児マウスの発育の関係）、③哺乳期のみにベニバナ成分を投与する（哺乳を通しての仔マウスの発育状況）および④離乳後ベニバナ成分を投与する（摂食による仔マウスの発育状況）など、種々の投与方法が考えられる。しかし、これらをすべて行なうことは大規模な実験になり、時間的、経済的および労力的に不可能である。したがって、今回の実験では、分娩後から実験終了までベニバナ成分を投与し、その観察期間中に強制離乳の実験も織り込むことにした。

## 2. ベニバナ成分の発育促進因子

先にものべたように、今回は、ベニバナの花に焦点をあて、実験を進めた。

### 1) 乾燥花および種子投与による仔マウスの発育促進

まず、乾燥花を分画せずに、仔マウスの発育促進作用の有無を調べた。

図12に生後30日までの花投与群、種子投与群および基礎飼料投与群それぞれの仔マウスの体重増加曲線を示した。

生後1週間までの体重は、3群に差は認められず、2週になってはじめて花および種子投与群の体重は基礎飼料投与群のそれに比して有意に大きい値を示した（ $p < 0.01$ ）。花および種子投与群の間には差がない。以後観察が終るまで、この関係が維持され、その差は漸次拡大していった。

離乳後の体重増加を、生後18日目の体重を基点として、各投与群の間で比較した（図12の挿入図）。乾燥花および種子投与群の体重増加は、基礎飼料投与群のそれより明らかに速いことがわかる。

強制離乳後、一時体重の減少がみられる。これは、離乳後数日の間、仔マウスの摂食状態が悪いことによると考えられる。

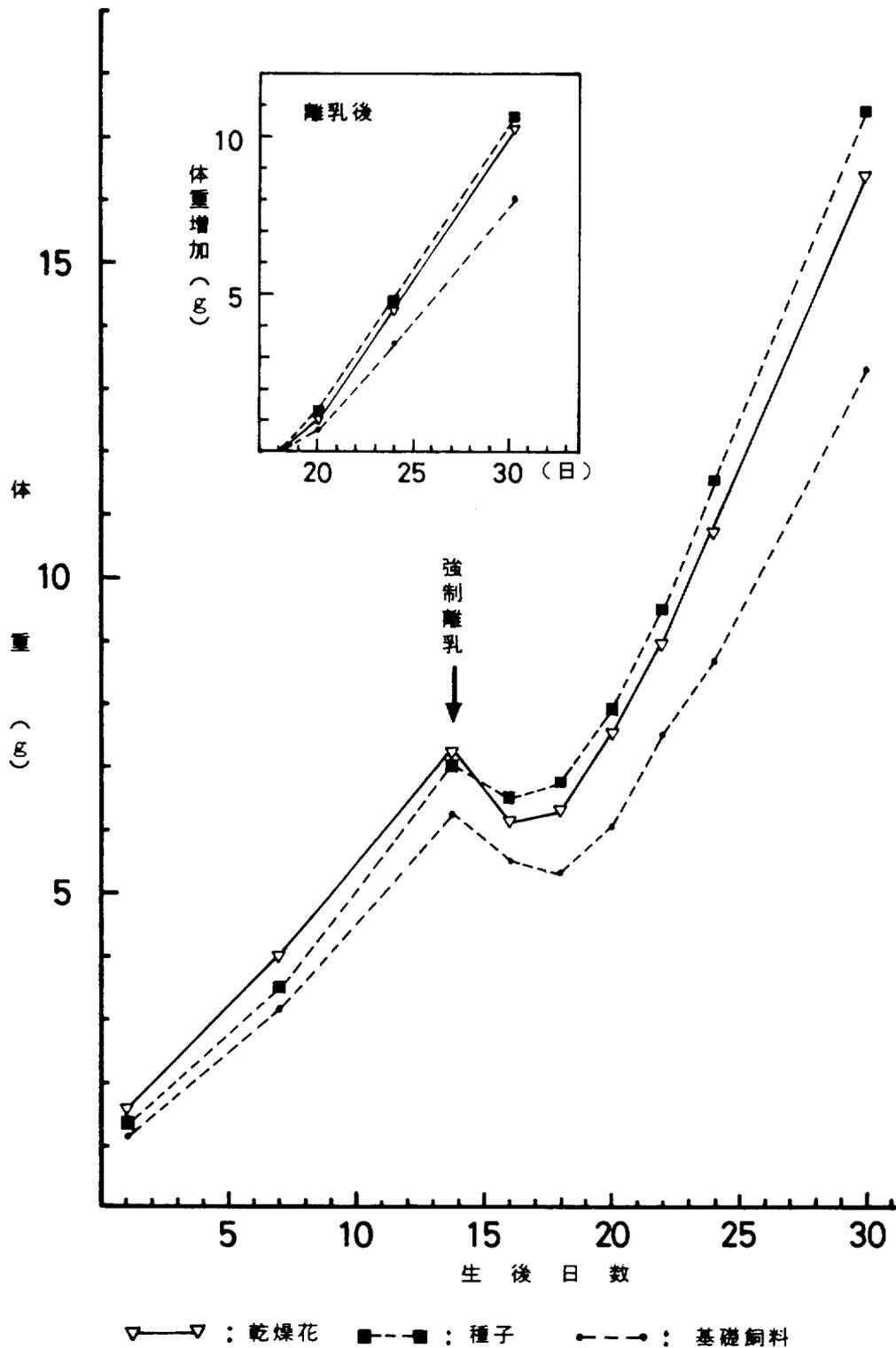


図12 乾燥花および種子投与マウスの体重増加

また、強制離乳後、自分で摂食するに十分な発育に至らぬ仔マウスは死亡する。そこで、各投与群における仔マウスの生存率を比較した。図 13 に示したように、基礎飼料投与マウスの生存率が強制離乳 6 日以後、20%以上が死亡したのに対して、乾燥花および種子投与群ではそれぞれ 1~2%が死亡するのみで、ほとんどの仔マウスは成熟マウスまで生長する。

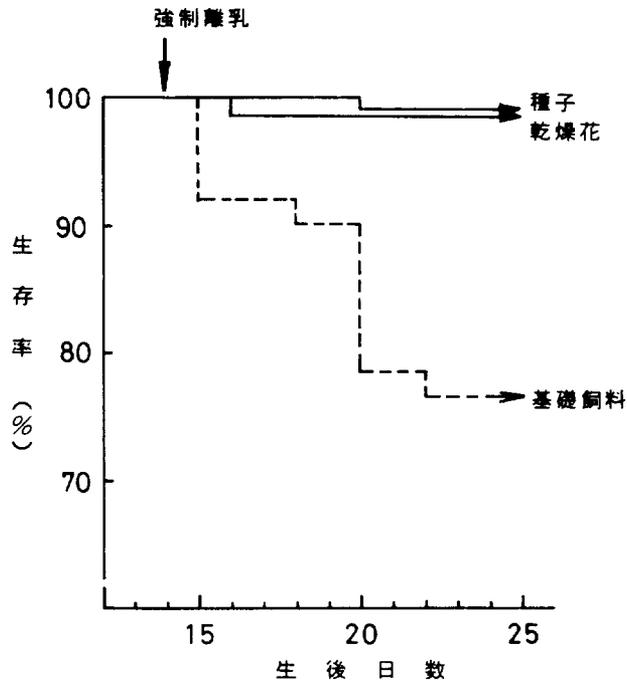


図 13 強制離乳後の仔マウスの生存率  
(乾燥花および種子投与群)

また、一方で仔マウスの被毛、開眼、開耳（音に反応を示す）および萌菌するまでの生後日数を各群で比較した。開眼、開耳および萌菌までの日数が花および種子投与群において若干早い傾向がみられたが、明らかな差を捕えることができなかった。

さて、花および種子投与群の仔マウスの体重増加が基礎飼料投与群のそれに比して有意に早いことがわかったが、それらの体重増加は、いわゆる肥満の範ちゅうに入るものであろうか？

先に、市販飼料を基礎飼料として 5%乾燥花および 5%種子をそれぞれ添加した飼料を投与した実験（図 1）の際に、マウスの観察終了時（生後 1 ヶ月）に屠殺し、各マウスの肝、腎、肺、心、消化管およびその他の組織別に粗脂質を測定した（その方法は、生化学実験講座 3 p.12~13、1974 を参考にした）。

臓器あるいは組織 1 g 当りの粗脂質量で比較すると、肝臓においてのみ、乾燥花および種子投与群が市販飼料投与群より小さな値を示し、その他の臓器および組織ではそのような差が認められなかった。そこで、われわれは図 12 と同じ実験条件でマウスを飼育し、生後 1 カ月および 2 カ月で肝臓の重量および粗脂質量を調べた。その結果を図 14 に示す。

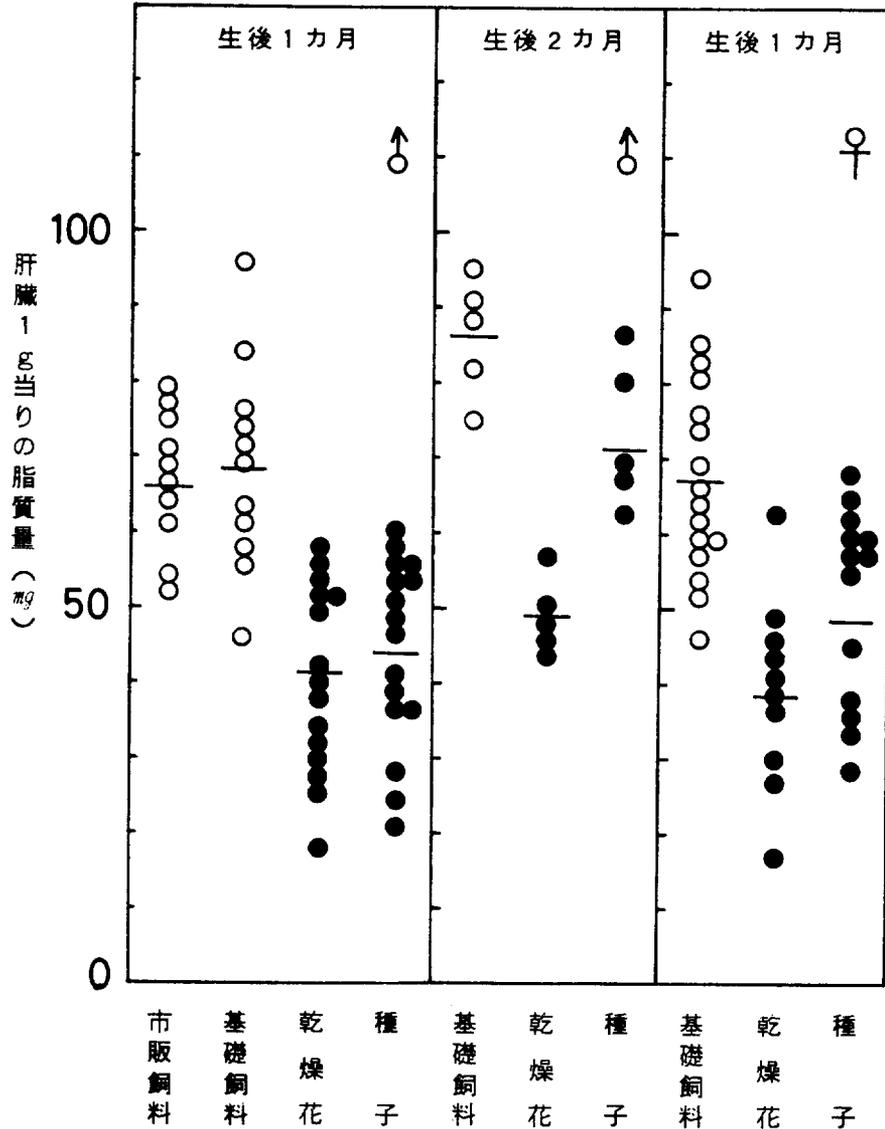


図 14 乾燥花および種子投与マウスの肝臓脂質量

雄マウスでみると、生後1カ月では基礎飼料投与群および市販飼料投与群に比して乾燥花および種子投与群は明らかに小さく、生後2カ月になると、基礎飼料投与群および種子投与群のそれらの値は上昇した。しかし、乾燥花投与群ではそのような変化を認めることができなかつた。また、雌雄差を生後1カ月でみる限り、それらの間に相違が認められない。

次に、再び同じ条件で飼育したマウスについて生後1カ月における肝重量と肝臓1g当りの粗脂質量との関係を各飼料群で比較した。雌雄別に比較した成績を図15および図16に示す。

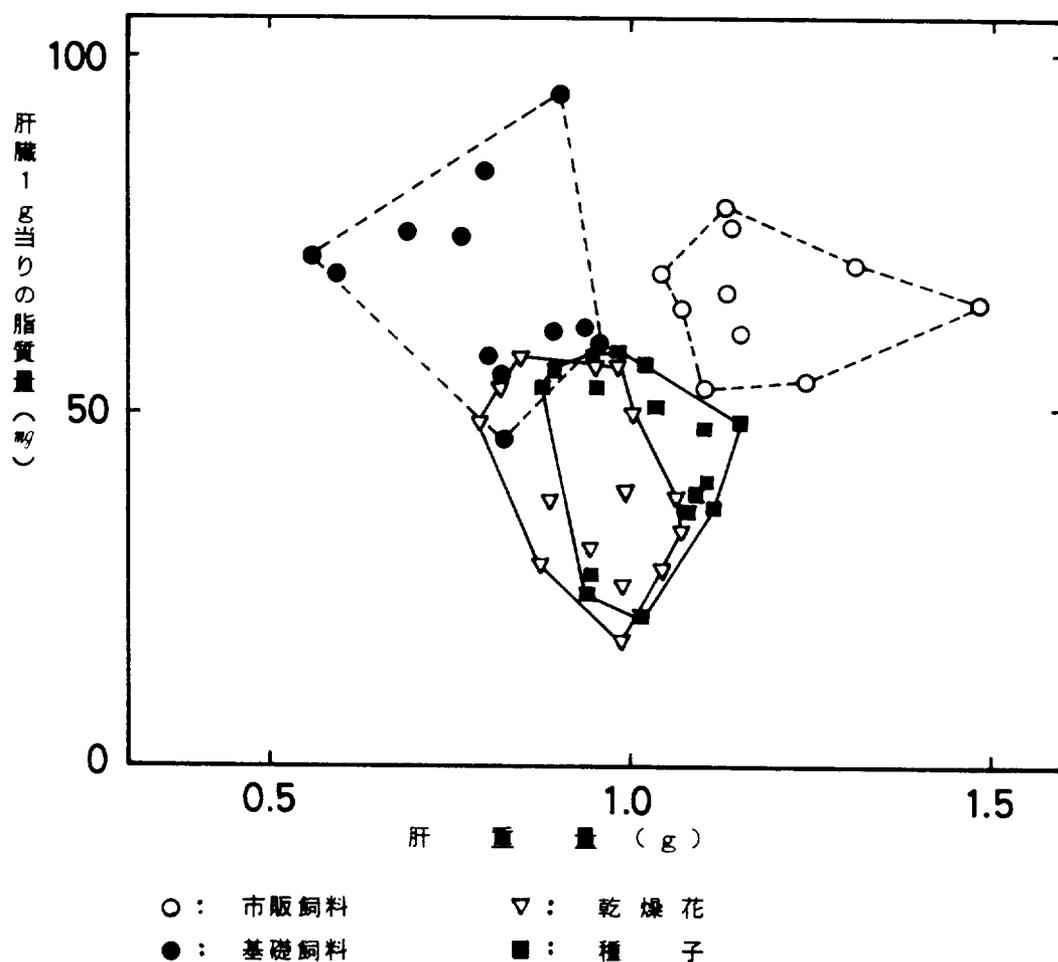


図15 乾燥花および種子投与マウス(雌)の  
生後1カ月における肝重量と肝脂質量の関係

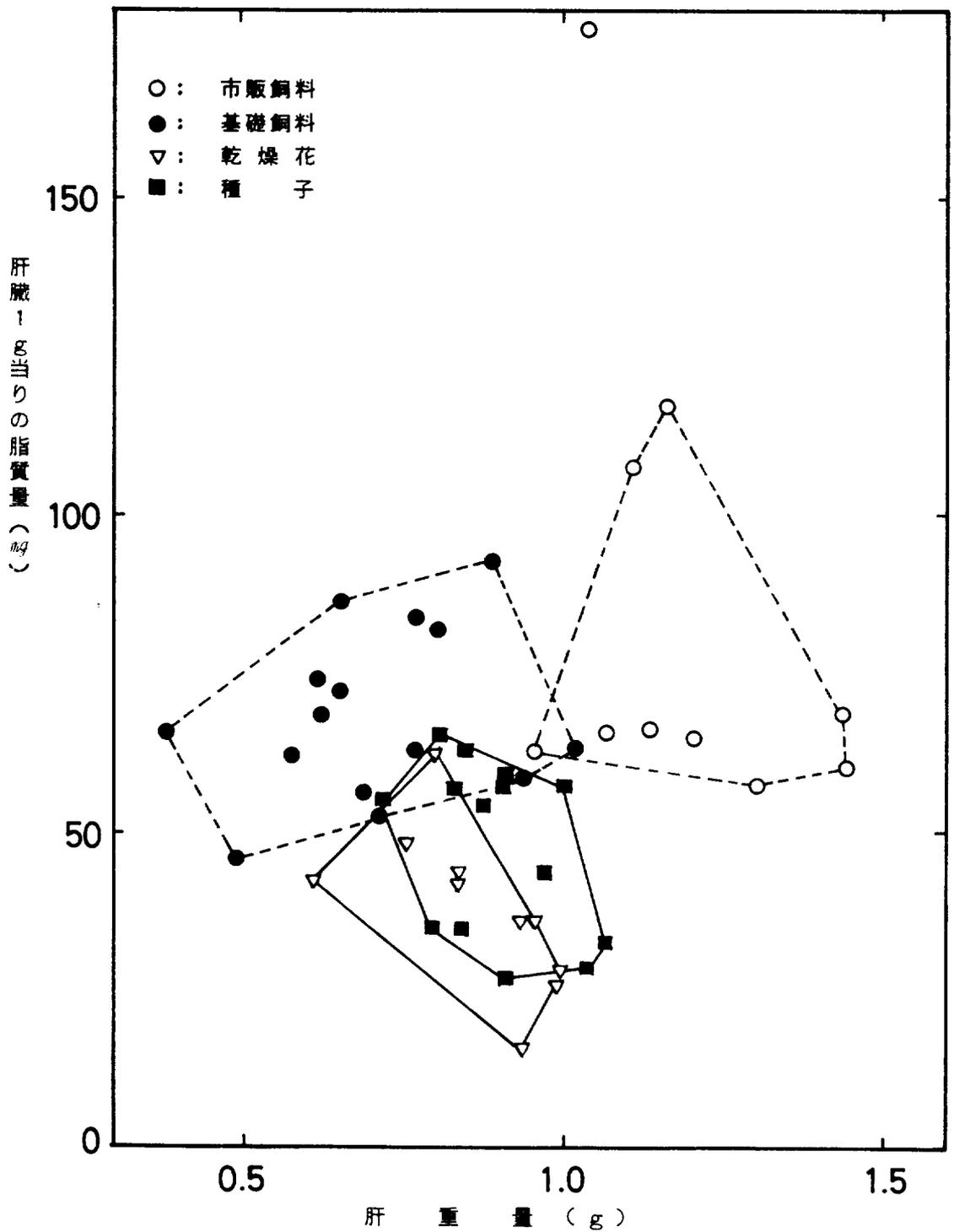


図16 乾燥花および種子投与マウス(雄)の  
 生後1カ月における肝重量と肝脂質量の関係

まず、肝重量を比較すると、基礎飼料投与群は市販飼料投与群より軽らく、乾燥花および種子投与群はその中間に位置する。種子投与群は乾燥花投与群より若干重い傾向がみられた。一方、肝臓 1 g 当りの粗脂肪量で比較すると、基礎飼料投与群は市販飼料投与群とほぼ同じであり、ベニバナの乾燥花および種子投与群は、いずれも、基礎飼料および市販飼料投与群より小さい値を示した。これらの関係は雌雄いずれにおいても同様の結果が得られた。

これらの事実は、ベニバナの乾燥花および種子投与群の肝臓の重量は市販飼料投与群よりは重く、粗脂質量においては、市販飼料および基礎飼料の両群より少ないことを示し、乾燥花および種子投与マウスの肝臓は脂肪肝ではないことを示唆している。

したがって、先にのべた肝臓以外の粗脂質量が、市販飼料投与群とベニバナの乾燥花および種子投与群との間に差が認められないことと考え合わせると、ベニバナ投与群の体重増加は、いわゆる脂肪蓄積による肥満ではないと考えられる。

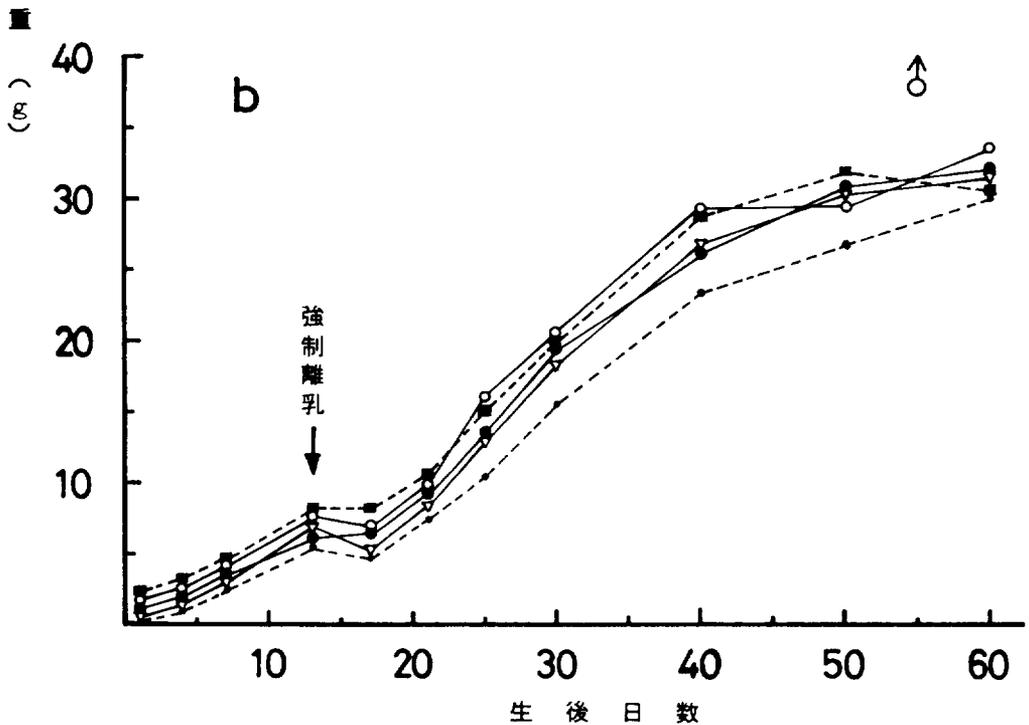
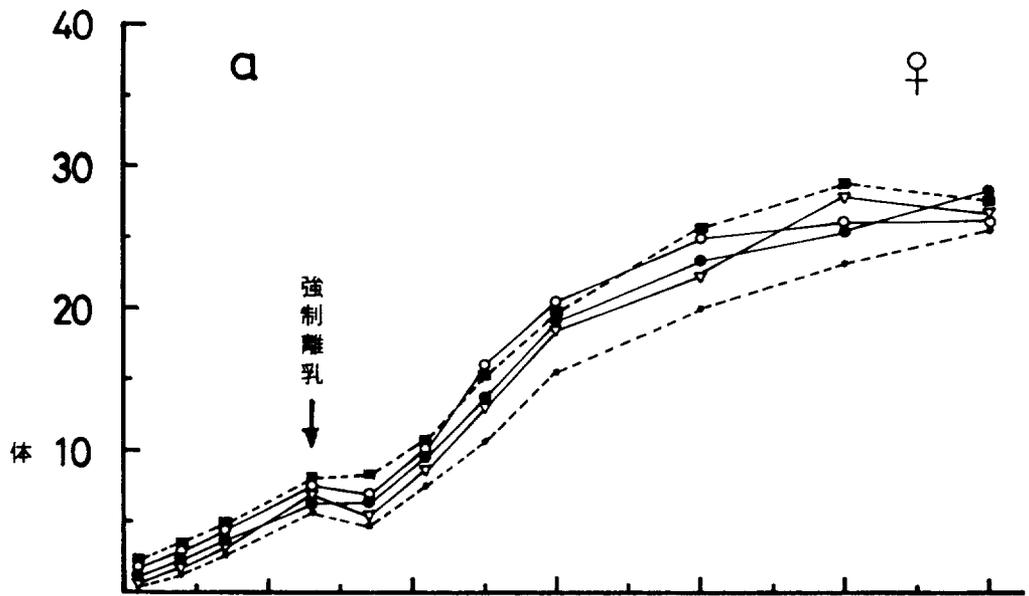
## 2) 乾燥花の水溶性画分およびクロロホルム・メタノール抽出残渣にみられる仔マウスの発育促進因子

乾燥花の水溶性画分と残渣を投与した時およびクロロホルム・メタノール抽出画分と残渣を投与した時の仔マウスの体重増加を追跡した。

### (1) 乾燥花の水溶性画分とその残渣の投与

まず、体重増加曲線のパターンをみると、図 17 に示したように、各投与群ともに強制離乳後 4 日目頃に一時的な体重増加の中断または減少が認められ、その後、再び増加を続け、生後 50 日頃にプラトーに達する。雌マウスの体重は雄マウスのそれより低い値を示しているが、それぞれの体重増加曲線のパターンは両者ともほぼ同じである。

強制離乳後の一時的体重の減少は、比較的早い時期に離乳したため、離乳直後の仔マウスの摂食状態が悪かったことに起因すると思われた。



○—○ : 花・水溶性画分      ●—● : 花・水抽出残渣  
 ■—■ : 種子      ▽—▽ : 乾燥花      ····· : 基礎飼料

図17 乾燥花の水抽出画分およびその残渣を投与したマウスの体重増加

次に図17の生後30日までの体重増加曲線を拡大してみる(図18)。生後4日目以後のいずれの時期においても、乾燥花、花・水溶性画分、花・水抽出残渣および種子の各投与群の子マウスの体重は、いずれも、基礎飼料投与群のそれと比して有意に大きい値を示している( $P < 0.001$ )。

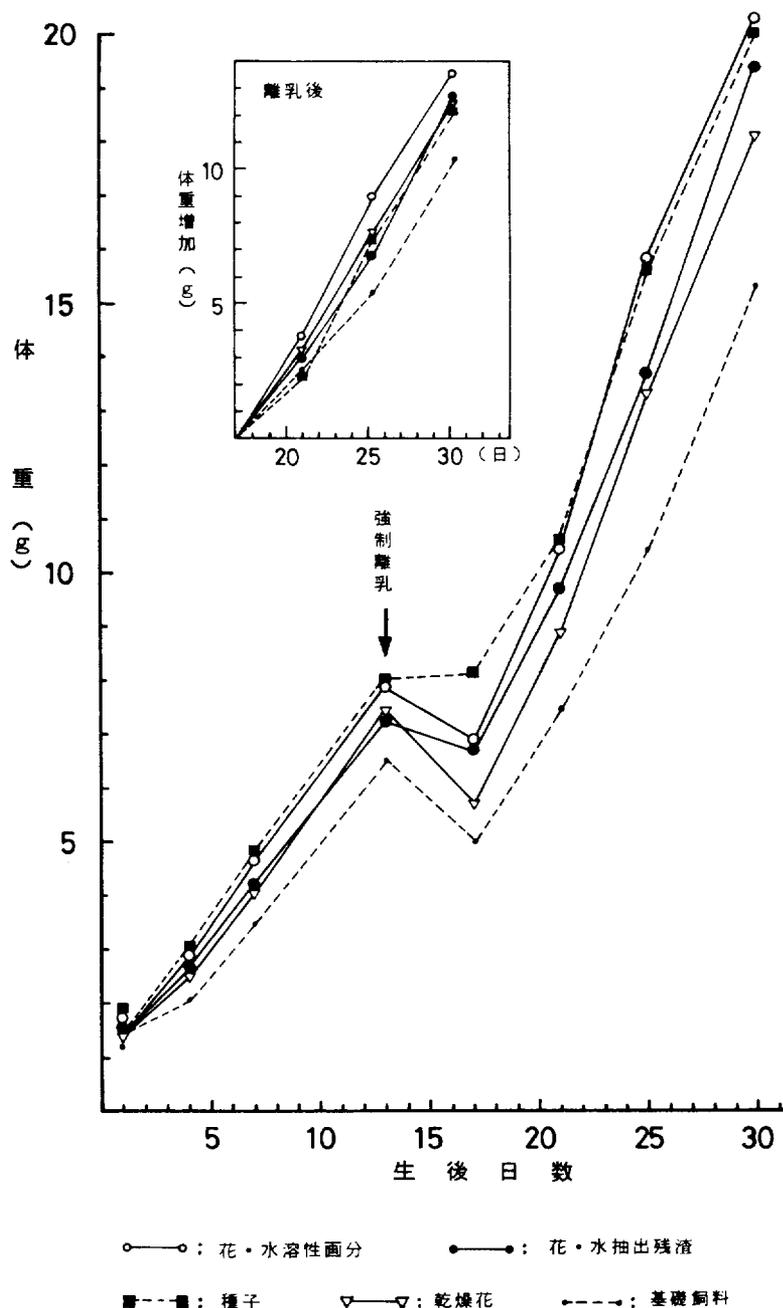


図18 乾燥花の水抽出画分およびその残渣を投与したマウスの体重増加

これらの仔マウスの体重増加を離乳前、離乳直後およびそれ以後の3つの時期について、解析した。

まず、離乳前の体重増加(図18、生後13日まで)をみる。生後4日目までは、ベニバナ成分投与群4群の間に差は認められないが、7日目以後になると、花・水溶性画分および種子投与群の体重は、乾燥花および花・水抽出残渣投与群のそれらより有意に大きい値を示し( $P < 0.001$ )、その差は日齢とともに拡大する。

次に強制離乳直後に体重が一時的に減少するが、離乳4日後の体重の減少の程度を各群間で比較すると、種子投与群ではほとんど変化がみられず、乾燥花および基礎飼料投与群で大きく、花・水溶性画分およびその残渣投与群では比較的小さいという傾向が認められた。

また、これらの体重の一時的減少と同時に基礎飼料投与群では離乳後13日までに約20%の仔マウスが死亡したのに対して、ベニバナ成分投与群4群いずれにおいても死亡例は認められなかった(図19)。

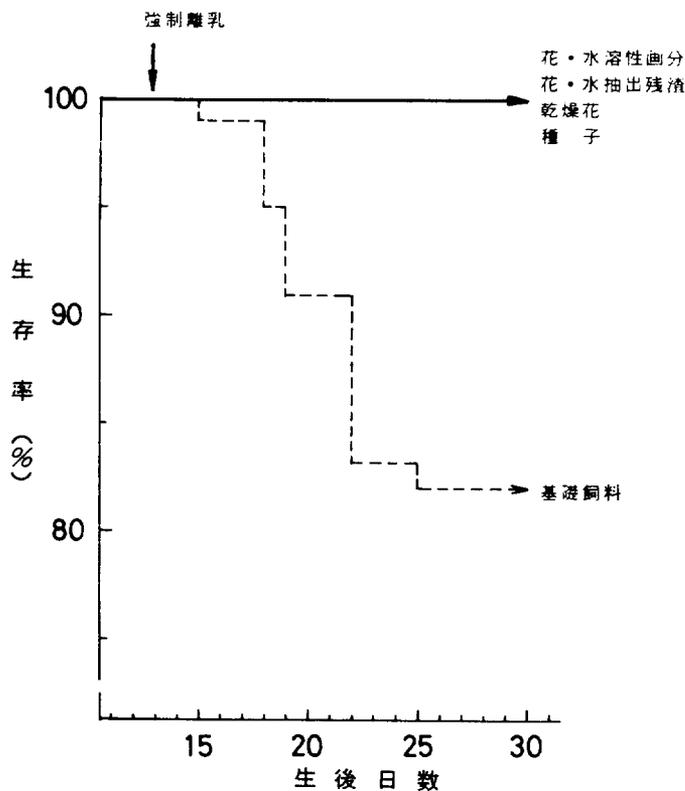


図19 強制離乳後の仔マウスの生存率  
(花・水抽出画分とその残渣の投与)

最後に、離乳後の体重増加の比較であるが、今回の投与実験が、哺乳期からの連続投与の方法をとっているために、離乳後の仔マウスの体重は、離乳前の発育に依存しており、それぞれの体重をそのまま比較することはできない。したがって、簡便法として、離乳後体重増加が開始する生後 17 日を基点として各群の体重曲線を描きなおしてみた(図 18、挿入図)。この成績でみる限り、明らかに、花・水溶性画分投与群が種子投与群をも凌ぎ最も早い体重増加を示していることがわかる。

## (2) 乾燥花のクロロホルム・メタノール画分とその残渣の投与

前の投与実験と全く同じ方法で、花・水溶性画分およびその残渣の代りに花・クロロホルム・メタノール抽出(クロ・メタ)画分およびその残渣を投与した。その結果を図 20 に示す。

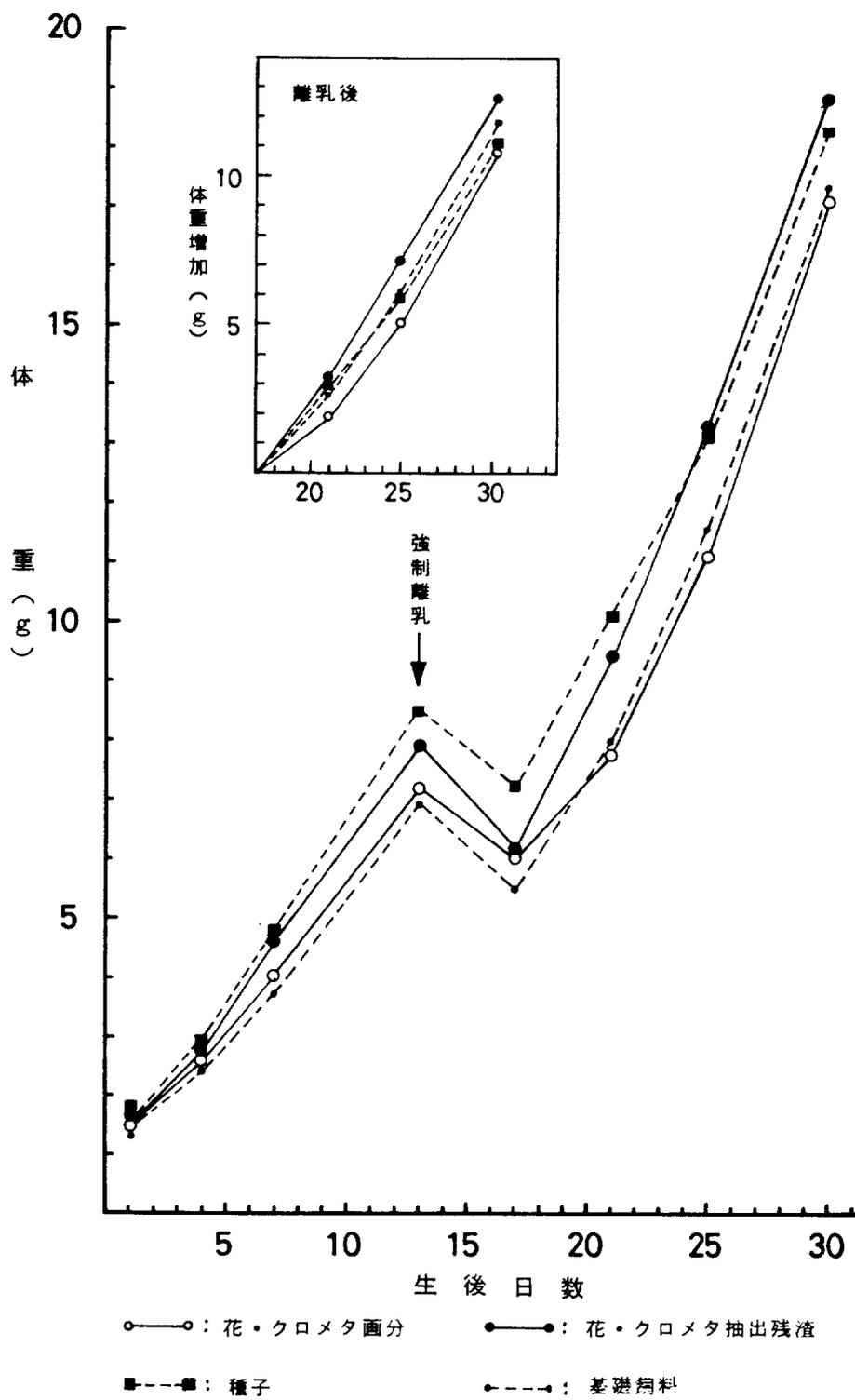


図20 花のクロロホルム・メタノール抽出画分とその残渣を投与したマウスの体重増加

生後7日目頃までは、すべての投与群に差が認められないが、それ以後、花・クロメタ残渣投与群の体重は、種子投与群のそれに及ばないものの、その他の花・クロメタ画分および基礎飼料投与群のそれらより有意に大きい値を示した ( $P < 0.001$ )。

また、強制離乳後の各投与群の生存率を比べると、図21に示したように、基礎飼料投与群では20%以上および花・クロ・メタ画分投与群で数%の仔マウスが死亡したのに対して、花・クロ・メタ残渣および種子投与群では死亡例が認められなかった。

離乳後の各投与群の体重増加を、前述の方法で比較すると(図20挿入図)、花・クロ・メタ残渣投与群において、最も良い体重増加率を示した。

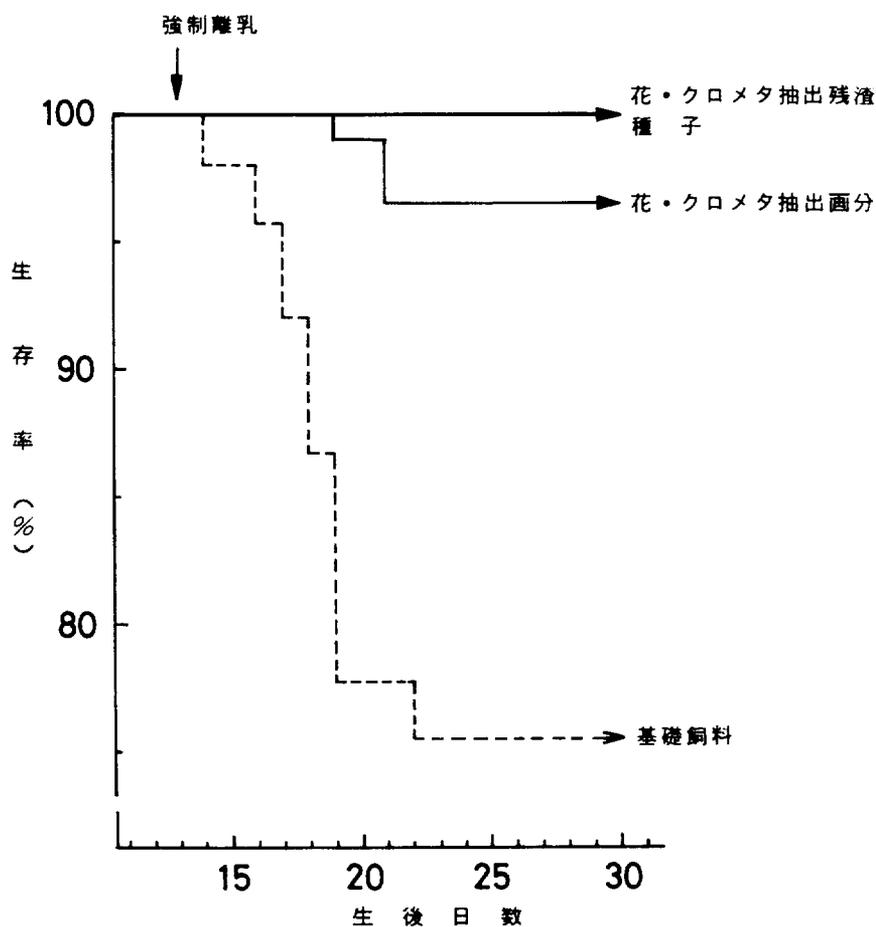


図21 強制離乳後の仔マウスの生存率  
(クロロホルム・メタノール抽出画分とその残渣の投与)

#### IV. 研究の成果と考察

動物を用いる実験においては、動物の個体差をいかに少なくするかが、実験結果の信頼性を左右する。

今回は、選抜淘汰により実験動物を整え、その同時妊娠・分娩により得られた動物を用いた。また、動物に投与する飼料は粗栄養素のレベルで、できる限り、ほぼ同じように調整した。このような条件の下に、行なわれた投与実験において、まず、乾燥花に仔マウスの発育を促進する因子の存在を認め(図12)、さらに、乾燥花の水溶性画分にその因子があることを示した(図18)。このことは、別に行なった乾燥花のクロ・メタ抽出画分とその残渣の投与実験で、仔マウスの体重増加率が前者よりも後者において有意に高い値を示したことにより裏付けられた(図20)。

これらの事実は、ベニバナの花の水溶性画分に、母マウスの乳分泌を質的にあるいは量的に促進する因子および仔マウスの発育を促進する因子が存在することを強く示唆している。

しかし、先にも述べたように、これらの事実を明らかにするには、ベニバナ成分をいろいろな時期(妊娠前、妊娠中、哺乳期および離乳後など)に投与し、それぞれの仔マウスの発育を基礎飼料投与群のそれと比較してみなければならない。今回の実験では、人的および経済的制約により、離乳前後を通してベニバナ成分を投与するという連続投与を余儀なくされた。そのために、離乳後の仔マウスの発育を比較する時、離乳前の栄養状態の影響を考慮しなければならない。したがって、今回は、ベニバナの花に発育促進因子の存在することを示唆するにとどまった。

一方、離乳前、すなわち哺乳期、における母マウスへの投与実験において、花の水溶性画分投与群および花のクロ・メタ残渣投与群の仔マウスの体重が、種子投与群と並んで、他の飼料投与群のそれらより有意に大きい値を示したことは(図18および20)、花の水溶性画分に母マウスの乳分泌を促進する因子あるいは乳に仔マウスの発育を促進する因子が存在することを示している。

また、乾燥花および種子を投与したマウスの体重がより早く増加したが、その体重増加がいわゆる肥満であるか否かを調べるために、先にのべた測定法により粗脂肪量を各臓器および組織について測定した。その結果(図14-16)、乾燥花および種子投与群の肝臓は基礎飼料投与群のそれに比べて重量がやや大きい粗

脂質量は少なく、肝臓への脂肪の蓄積はないと考えられた。また、その他の臓器および組織では、乾燥花および種子投与群と基礎飼料投与群との間に粗脂肪量の差を認めなかったことなどと考え合わせると、乾燥花および種子投与マウスの体重増加はいわゆる肥満の範ちゅうには入らないものと考えられる。

乾燥花投与群は、当然、発育促進因子を含有するにもかかわらず、水溶性画分投与群より発育が悪かった。これは恐らく、吸収の効率の相違による差であると考えられる。前にものべたように、乾燥花投与群の母マウスおよび仔マウスの糞便中に明らかに乾燥花由来と思われる不消化物が観察された。

さて、花の水溶性画分に母マウスの乳分泌促進因子あるいは仔マウスの発育促進因子があることが示唆されたが、その本体について論ずる成績は未だ持ち合せていない。しかし、この水溶性画分の主成分は、花に存在する黄色色素<sup>26)</sup>の Safflower yellow (SY)-1<sup>27)</sup>、SY-2<sup>26)</sup>、SY-3<sup>26)</sup> および紅色色素 (Carthamin) の前駆体<sup>26-28)</sup> などのフラボノイド系の色素である。紅色色素 (Carthamin) およびビタミン E、カロチンなどの脂溶性ビタミンなどはクロ・メタ画分に抽出される。したがって、水溶性のフラボノイド系色素が前述の 2 つの促進因子に深く関与していることがうかがわれる。牛にフラボノイドを含む牧草 (アシタバ) を投与すると増乳効果があるという<sup>29)</sup> が、哺乳期における仔マウスの発育促進は、ベニバナ、特に花、に多く含まれるフラボノイド系色素による増乳効果かもしれない。

## V. あ と が き

昭和 55 年から昭和 59 年の 5 年間にわたる研究により山形県の県花であるベニバナ、特に花の水溶性画分 (フラボノイド系色素?)、に母マウスの乳分泌を促進する因子および仔マウスの発育を促進する因子が存在することが示唆された。しかし、これらの成果は、さらにきめ細かな実験を行ない、われわれが発見した現象の解析が行なわれねばならない。この研究をさらに推進するには、各専門分野の研究者によるプロジェクト・チームの編成が必要である。

本研究には、衛生研究所職員全員が各分野で参加したが、特に、マウス発育促進因子の探索にあたり、当研究所顧問、東北大学・農学部教授・木村修一博士および前所長・故宇野賢勝水博士の指導の下に、実験を担当し、推進した松浦敬次

郎および高橋裕一研究員の尽力は大きい。また、実験結果の推計学的処理を担当した菅野穎一研究員、および本研究を推進するにあたって討論をかわした真石尚子および久間木国男両研究員の陰の力があつたことを付記する。

## VI. 参 考 文 献

- 1) 内藤元男(監修):「畜産大事典」、養賢堂、P1309, 1979
- 2) 熊沢義雄他:日本免疫学会総会記録、9, 321, 1979
- 3) Chessin, L. N. et al: J. Exp. Med. 124, 873, 1966
- 4) Poretz, R. and Goldstein, I.: J. Biochemistry, 9, 2890, 1970
- 5) Wada, S. et al: J. Biol. chem. 233, 395, 1958
- 6) 輿水肇他:実験動物技術、15(2), 87, 1980
- 7) 信永利馬:山形実験動物、(1), 13, 1978
- 8) 信永利馬:臨床婦人科、(31), 71, 1977
- 9) 近藤恭司:実験動物学(総論)、P88, 朝倉書店、東京、1970
- 10) 近藤恭司:実験動物の育種、P289、養賢堂、東京、1961
- 11) 上松嘉男他:実験動物技術、13(1), 40, 1978
- 12) 信永利馬、中村勝美:家畜繁殖誌(14), 1, 1968
- 13) 信永利馬他:家畜繁殖誌(11), 7, 1965
- 14) Whitten, W. K.: J. Endocrin., (17), 307, 1958
- 15) Bruce, H. M.: Nature (London), 184, 105, 1959
- 16) Bruce, H. M.: J. Repor. Fertil, 1, 96, 1960
- 17) Chipman, R. K. et al.: Nature (London), 210, 265, 1966
- 18) Chipman, R. K., Bronson, F. H.: Experientia, 24, 139, 1968
- 19) 小山良修、藤井寿子:動物実験手技、(41)、協同医書出版、東京、1967
- 20) 信永利馬:実験動物技術、(13), 73, 1978
- 21) 内藤元男:畜産大事典、P1303, 養賢堂、東京、1978
- 22) Kayden, J. H. et al.: J. Lipid., 14, 533, 1973
- 23) 岩尾裕之他:ビタミンの分析、講談社サイエンティフィック、P53, 東京  
1972
- 24) 真石尚子、鈴木正成:山形衛研報、(11), 68, 1979

- 25) 谷村顕雄他：天然着色料ハンドブック、光林、324, 1979
- 26) 柏木希介、鈴木孝男：家政学雑誌、29(5), 324, 1978
- 27) 小野寺準一他：第25回天然有機物討論会要旨集、P368, 1982
- 28) Onodera, J. et al. : Chem. Lett., 433, 1981
- 29) Wada, M. : Proc. Japan. Acad., 29, 218, 1981
- 30) 伊沢一男：薬食健康法事典、マイヘルス社、P244, 1978

ベニバナの花にみられる  
マウスの発育促進作用

発行日 昭和60年3月1日

編集 山形県衛生研究所  
発行 〒990 山形市十日町一丁目6番6号

印刷 株式会社 大風印刷