

三重大学大学院生物資源学研究科

博 士 論 文

天然未利用資源を活用した食品素材の創出と

その機能性評価

(Creation of food materials utilizing unused natural resources and
evaluation of their functionality)

辻製油株式会社

辻 威彦

令和5年 3月

目 次

略語表

1.	緒論	1
2.	高食塩食摂取ラットの尿中ナトリウム排泄と血糖値に及ぼす γ-トコフェロール富化食用油脂の摂餌効果	
2-1.	序論	16
2-2.	実験方法	18
2-3.	結果	22
2-4.	考察	33
3.	ショウガオイルに含まれる Monoamine oxidase (MAO)-A ならびに MAO-B 活性の阻害能について	
3-1.	序論	36
3-2.	実験方法	37
3-3.	結果	39
3-4.	考察	51
4.	柑橘類ヘキササン抽出物における抗肥満作用の評価	
4-1.	序論	53
4-2.	実験方法	55
4-3.	結果	59
4-4.	考察	69
5.	総括	74
6.	参考文献	82
7.	謝辞	93

略語表

ACC: acetyl-CoA carboxylase

5'-AMP: adenosine 5'-Monophosphate

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATP: adenosine triphosphate

bp: base pair

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

cDNA: complementary DNA

C/EBP α , β : CCAAT/enhancer binding protein α , β

γ -CEHC: γ - carboxyethyl hydroxychroman

CoA: coenzyme A

CPT1: carnitine palmitoyl transferase 1

CREB: cAMP response element binding protein

CSHE: *Citrus sphaerocarpa* hexane extract

dATP: deoxyadenosine triphosphate

DEG: differentially expressed gene

Dex: dexamethasone

DHA: docosahexaenoic acid

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: dimethylsulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

EPA: eicosapentaenoic acid

FBS: fetal bovine serum

FOXO1: forkhead box protein O1

FPKM: fragments per kilobase of exon per million mapped reads

GHE: ginger hexane extract

Glut4: glucose transporter type 4

HED: human equivalent dose

HMF: heptamethoxyflavone

HPLC: high performance liquid chromatography

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

LC/MS: liquid chromatograph-mass spectrometry

\log_2 FC: \log_2 fold-change

MAO: monoamine oxidase

MGO: methylglyoxal

mRNA: messenger RNA

MTT: 3-(4, 5-dimethylthial-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

OAA: oxaloacetic acid

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PDE: phosphodiesterase

PEP: phosphoenolpyruvic acid

PEPCK1: phosphoenolpyruvate carboxykinase

PFA: paraformaldehyde

PGC1- α : peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α

PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase

PIP3: phosphatidylinositol triphosphate

PKA: protein kinase A

PMC: 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman

PMFs: polymethoxyflavones

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ

ppm: parts per million

RANKL: receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand

RNA: ribonucleic acid

RNA-seq: RNA sequencing

SDGs: sustainable development goals

TCA cycle: tricarboxylic acid cycle

TIC: total ion chromatogram

Toc: tocopherol

α -TTP: α -tocopherol transfer protein

1. 緒論

ヒトの衣食住の生活様式において、食品の役割はきわめて高く位置付けられる。日本には古くから「医食同源」の中国思想が伝えられており、医と食の関連については共通の認識があった。しかし、古来ではこれらの関連は単に経験則に過ぎず、科学の領域までには達していなかった。科学として、食が本格的に研究されたのは、20 世紀初頭である。当時の日本では、政府が「食薬区分」の政策を取っていたため、食品の研究は農学部が主体となり、一方、医薬の研究は医学部が行ってきた。そのため、農学系の研究者は、食の研究を薬理ではなく、栄養学の範囲にとどめていた^{1,2)}。生命機能を維持するために必要なエネルギーの供給や栄養素の摂取は食品の最も大きな役割であり「一次機能」と呼ばれる。さらに食品の美味しさや豊かさによる食生活の充実を求められる役割は「二次機能」と呼ばれ、現在は、改めて「医食同源」の観念から生理機能性を謳う「三次機能」を付加価値とした食品が市場を拡大している(図 1-1)。食品の一次機能において、糖類や澱粉などの炭水化物、肉や魚からのタンパク質、そして油や油脂などの脂質はエネルギーの供給のカロリー源であり、食品を構成する主成分である。また、先に述べたように食品の研究が栄養学に踏み出したことから、食品学は画期的な成果を挙げた。これは日本人の主食とされるお米(玄米/米糠)から、鈴木梅太郎による有効成分のオリザニンの発見と命名である³⁾。オリザニンの欠乏が脚気を引き起こすため、ヒトにとって欠かすことのできない栄養素であることが実証され、三大栄養以外の栄養素となる「ビタミン」の名称が提唱され、オリザニンはその第一号のビタミン B₁ となった。ビタミンは医薬ではなく、糖質、タンパク質、脂質、ミネラルと同じ栄養素であり、食品から摂取される。ビタミンの発見により、食品の一次機能がエネルギー代謝や生命機能の維持として必要不可欠であり、基礎と応用を含めた栄養学は食品学の主軸となった。しかし、1960 年代の高度経済成長期となると、食糧問題は解消し、ヒトの栄養状態も大きく改善されたため、食事を楽しみ、交流の場となりうる風潮が築かれた。そこ

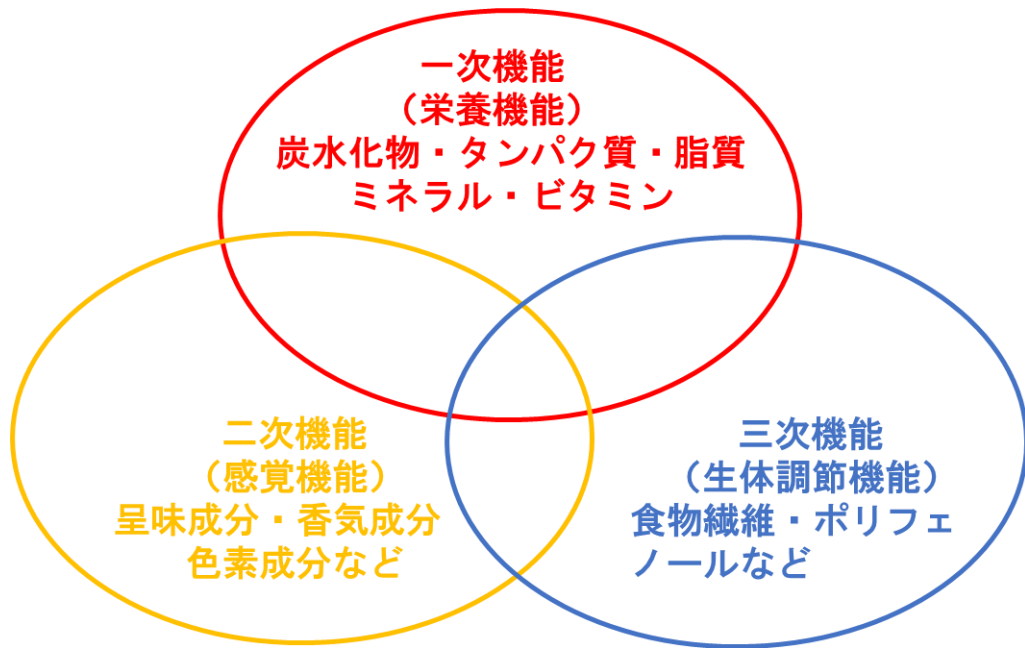


図 1-1. 食品の 3 つの機能

で、食品に求められたのは、美味しさや豊かさであり、いわゆる二次機能であった。そのため、食品学の研究において、美味しさの要因となる香味（フレーバー）の成分解析が開始された。食品産業では、美味しい食品を開発する競争が激化し、さらに、手軽に調理できるさまざまなインスタント食品も市場を賑わすようになった。さらにこの勢いはあらゆる食品に及び、栄養豊富で美味しい高級食や美食の時代を築き上げ、飽食の時代を楽しむことになった。しかし、20 世紀の終わりに近づいた頃、ヒトは恵まれ過ぎた食生活でのカロリー過多や偏食で生じる疾病を不安視し、食の改善によってこれを未然に防ぎたい願望が高まり始め、さらに高齢化社会問題が重なって拍車をかけた。代表として、代謝症候群（メタボリック・シンドローム）である肥満をはじめ、糖尿病、心疾患、高血圧、高コレステロール血症、動脈硬化、骨粗鬆症、がん、アレルギーなどの生活習慣病が大きな関心事となった⁴⁻⁶⁾。その中で、食品の研究にも画期的な変化が訪れた。行政から文部科学省科学研究費重点領域の「機能性食品」研究班が立ち上げられ、農学と医学の学術領域から選ばれた研究者らの約 10 年に及ぶ調査と議論のもと、医学農学の連携として「食品機能学」というコンセプトを提唱した⁷⁾。これまでに食品に求められていた栄養面と嗜好面での働きだけでなく、生体との相互作用を強調した食品の第三の働きとして、生活習慣病の予防となる生体調節面での働き「三次機能」が誕生した。この定義における食品類は「機能性食品」や「健康食品」などの名称で知られ、海外においても、「functional foods」としての国際語が定着した。また、機能性食品の創出は、食品や食品素材の生体調節への作用や機能の研究、研究結果の公表、新たな食品としての開発設計を経た成果の出口と考えられる。機能性食品は、生活習慣病の一次予防やリスクの低減への働きを持つ食品を意味する。しかしながら、三次機能の起因となる物質や成分のほとんどは、栄養学的にこれまでに注目されてこなかった非栄養性成分である。しかも機能の実態は生体の免疫系、分泌系、神経系、循環系、消化系の調節であり、その効果は生活習慣病のリスク軽減というかたちで発現する。機能性食

品はこれまでの食品や医薬品から区別する考え方が重要である。ヒトは毎日色々な栄養素をバランス良く摂取することで栄養欠乏症を防ぎ、健康を増進している。つまり、栄養素は健康なヒトでも、その基準量を充足するために毎日摂取を続けなければならない。また、これらの栄養素は食品から消化吸收を経て摂取するのが望ましい。しかし、食生活の乱れ、過労、運動不足、喫煙など好ましくない生活習慣が原因で病気になる。しかも病気は突然に発症するのではなく、予兆という段階を経て発症する。厚生労働省はこれを「半健康状態」と定義し、健康が半ば崩れかけ始めたこの状態においては、病院で診察を受け、医薬品に頼るほどではなく、日常の食生活を意識して改善することで対処できると唱えている。ここで役立つのが機能性食品である。学術的には、生体の調節によって生活習慣病のリスクを軽減し、その発症を遅らせることで健康寿命を延ばすことに役立つ補助食品とする考え方が一般的である。広義には機能性食品は特定の栄養素を充足させるための栄養補助食品（サプリメント）の一種に思われがちだが、厳密には異なる。生体の調節機能に働きかける成分を配合し付加価値を高めた食品は、機能性食品と思われがちであるが、日本の法規や規制下では製品に機能性が表示できないため、分類は一般食品となる。一般食品とは異なる機能性食品に該当するものは、栄養機能食品、特定保健用食品、機能性表示食品の3つに分類され、これらが保健機能食品と呼ばれる（図 1-2）^{8,9)}。栄養機能食品とは、一日に必要な栄養素（ビタミンやミネラルなど）が不足しがちな場合、その補給や補完のために利用できる食品であり、すでに科学的根拠が確認された栄養素を一定の基準量を含む食品であれば、届出なしで国が定めた表記に基づいて機能性を表示できる食品である。特定保健用食品とは、いわゆる特保（トクホ）と呼ばれ、1991年に厚生省から発令された制度に則した国が認定した機能性食品である。健康の維持や増進に役立つことが科学的根拠により認められ、健康訴求（ヘルスクレーム）の表示が許可されている食品となる。届出があった食品に対して、機能性の効果や安全性については国が審査を行い、食品ごとに消費者庁長

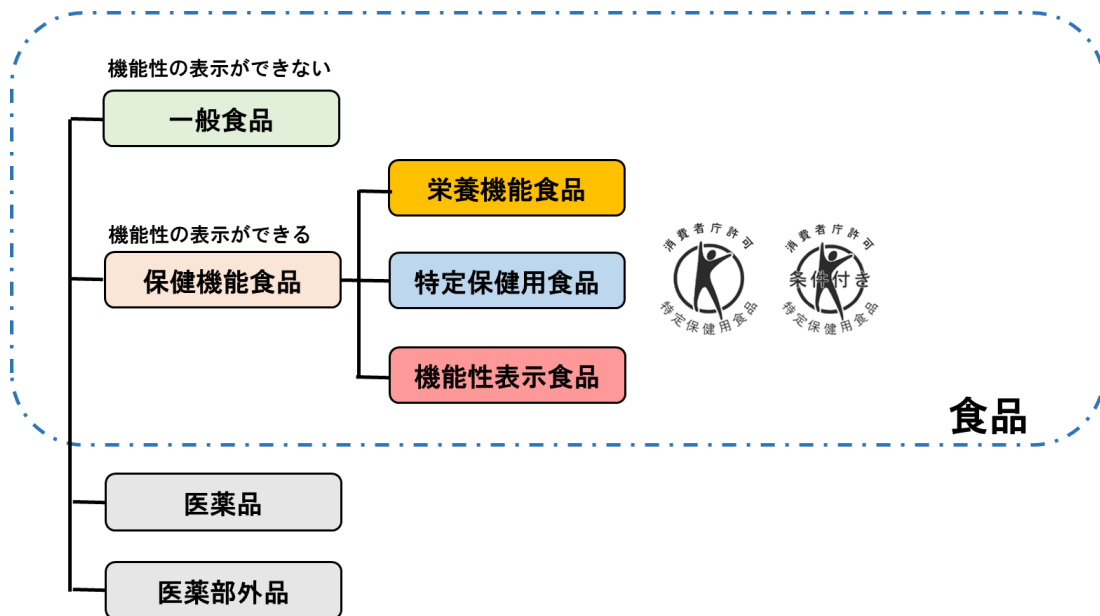


図 1-2. 一般食品と保健機能食品の分類*

* 消費者庁食品表示企画課、「機能性表示食品」って何？から引用

官の許可が必要である。令和3年6月における消費者庁の発表では、1077件の食品が認定を受けている。しかし、申請への研究費用や認定にかかる時間などのコスト負担が企業に求められ、製品一品目に表示が許可されるのみである。そこで、2014年4月に消費者庁から機能性表示食品の届け出制度が新たに発令された。この制度は、事業者（企業）の責任において、科学的根拠に基づいた機能性が表示され、販売前に安全性および機能性の根拠に関する情報などが消費者庁長官へ届けられた食品である。特に機能性の評価において、特定保健用食品とは異なり、製品を用いた臨床試験に代わって製品または機能性関与成分に関する文献調査（システマティックレビュー）の結果を届ければ良い。さらに個別に審査を受けるものではなく、届出の受理により番号が配布される制度である。したがって、申請する側には研究費用や受理にかかる時間が節約できるメリットが大きく、届出された機能性表示食品の件数は、施行8年目の2022年5月の時点で既に4961件である。件数は年々右肩上がりであり、ヘルスクレームを謳った機能性表示食品の市場拡大が予想される。

このような食品の背景や動向から、辻製油株式会社も食用植物油脂の製造販売をはじめ、さまざまな食品の研究開発に取り組んできた。一次機能に求められる栄養面は言うまでもなく、美味しさや外観の良さや品質を通じて食生活を豊かにする研究開発や製品開発の設計から製品を産み出してきた。しかし、顧客が求める美味しさや品質の向上を図れば図るほど、先に述べた機能性食品の要となりうる生体調節に働く成分やそれを多く含む部位を食品原料から除かなければならない逆行が付き物であった。そして、これらは食品加工において有効活用されずに廃棄されるなど十分に活用されない未利用資源となる。辻製油株式会社も例外ではなく、食品開発や製造に常に背中合わせで考えなければならない課題であった。

2020年度の農水省からの報告における日本の食品産業全体における食品廃棄物の発生量を表1-1に示した。食品産業全体では16236千トンであり、この内

で食品製造業は 13389 千トンであり、食品卸売・小売業は 1341 千トン、そして、外食産業は 1506 千トンである¹⁰⁾。食品製造業からの発生量が最も多く、内訳の約 82%を占める。日本は食料自給率が 40%未満であり、国土の資源が乏しいため、未利用資源である食品廃棄物の発生低減や利活用は必要不可欠である。また、近年における食品循環資源の再生利用等の実施率は食品産業全体では 86%で、食品製造業では発生量の 96%となる 10585 千トンとされている（表 1-2）。食品製造業に課された目標値は 95%であるので、あたかも数値目標は達成されているように思われる。しかし、再生利用の用途別を確認すると家畜・家禽への飼料が 8288 千トン、肥料へは 1504 千トンであり、再生利用の 90%以上を占める。また、海外では積極的に取り組まれているメタンガスやエタノールなどのバイオ燃料への再生利用は 5%にも満たない。飼料や肥料への再生利用は、それぞれの未利用資源を混合し、加熱、乾燥、発酵などのプロセスで加工されるが、再生利用された付加価値度合いは決して高いものではない。中には加工され形態を変えただけで未利用資源のままで留まっているものもあると思われる。食品製造の加工で発生する未利用資源であるゆえに新たな食品や食品素材として付加価値が見込める再生利用や利活用が望ましい。まして、これらの未利用資源にはヒトの生体調節への作用や改善が期待できる成分が含まれており、機能性食品への還元を目指した研究や開発が最良であると考えられる。このような観点から、これまでに取り組まれた研究開発の成果の一例を表 1-3 に示した。主な事例では、大豆の食品加工に際に発生する大豆胚軸の利用がある。大豆は植物性タンパク質としてアミノ酸スコアは優れており、食品加工において多く使用される原料である。主に食用としてきた大豆種子の部位は子葉と呼ばれ、その他に種子は 1-3%程度であるが胚軸が含まれる¹¹⁾。胚軸は強い収斂味を持つサポニン類が特異的に含まれており、大豆臭の原因となるリポキシゲナーゼ L1 を多く含むことから、タンパク質の凝固性や苦みを呈し食味に影響するため、豆腐などの大豆加工食品製造時にはむしろ積極的に除去されることが多い。そして、製

表 1-1. 食品産業からの食品廃棄物の発生量*

業種	令和2年度	令和元年度	対前年度増減率
食品産業合計	16,236	17,556	-7.5%
食品製造業	13,389	14,224	-5.9%
食品卸売業	231	247	-6.2%
食品小売業	1,110	1,185	-6.4%
外食産業	1,506	1,900	-20.8%

(単位：千トン)

* 農林水産省報告_令和2年度推計_食品廃棄物等の年間発生量および食品循環資源の再生利用等実施率をもとに作成

表 1-2. 食品循環資源の再生利用と用途別への内訳*

区分	発生量	再生利用 の実施量	用途別への再生利用の内訳				
			飼料	肥料	炭化燃料お よび還元剤	バイオ燃料	その他
食品産業合計	16,236	11,427	8,643	1,769	58	462	495
食品製造業	13,389	10,585	8,288	1,504	49	415	327
食品卸売業	231	134	40	69	2	4	19
食品小売業	1,110	427	171	122	6	34	94
外食産業	1,506	282	144	73	1	8	56

(単位：千トン)

* 農林水産省報告_令和2年度推計_食品廃棄物等の年間発生量および食品循環資源の再生利用等実施率をもとに作成

表 1-3. 未利用資源の機能性食品素材への活用例

原材料	活用資源	成分	企業
大豆	胚軸	イソフラボン	フジッコ
ぶどう	皮・種	ポリフェノール	メルシャン(キリン)
かぼちゃ	種	植物ステロール	Flora Labo
玉ねぎ	皮	ケルセチン	サントリー
アスパラガス	非可食部	ヒドロキシメチルフルフラール	アミノアップ化学
コーヒー	抽出豆滓	還元糖	エイチビーアイ株式会社
ホタテ	外套膜部	プラズマローゲン	レオロジー機能食品研究所
鮭	鼻軟骨	2型コラーゲン,プロテオグリカン	バイオマテックジャパン

造時に発生する胚軸の大部分は廃棄処分されるか、もしくは家畜飼料として利用されるに留まっていた。しかし、大豆が栄養価と美味しさに優れた食品だけでなく、含まれるアグリコン化合物イソフラボンの生体調節の作用についての研究が進展したことから機能性への注目が高まった^{12,13)}。女性様ホルモンの働きを有するイソフラボンが胚軸に多く含まれていることが見出され、未利用資源であった胚軸からイソフラボンを抽出・精製する研究や技術が報告され、機能性食品の開発を目指した付加価値利用が行われた。さらに食品素材や化粧品素材への用途を目的として、胚軸中のダイゼイン類を資化して、イソフラボンより作用が強いエクオールを産生する能力を有する微生物を用いて、大豆胚軸を発酵させることにより、エクオール含有大豆胚軸発酵物を得る開発も進められている¹⁴⁾。また、別の取り組みとして、玉ねぎの皮から抽出して利用されるケルセチンの研究開発が知られる。ケルセチンはフラボノイド類化合物であり、柑橘類、玉ねぎ、ソバをはじめとする植物体に含まれる。玉ねぎの生理機能が研究される中で食品加工の際に廃棄される玉ねぎの皮にケルセチンが多く含まれることがわかった¹⁵⁾。ケルセチンは、抗酸化作用、抗炎症作用、抗動脈硬化作用、抗腫瘍効果、降圧作用、血管弛緩作用が報告され、生体の調節機能としては有望である¹⁶⁾。そのため、廃棄されていた玉ねぎの皮から熱水またはエタノール抽出を行い、得られたケルセチン含有物を食品に添加し、機能性食品の開発設計に利用されている。また、粉碎した皮を熱水で抽出し、お茶のように飲用する商品も紹介されている。さらに農産物からの未利用資源だけでなく、水産物であるホタテの外套膜部（ひも）から高次脳機能作用の改善が期待されるエーテル型リン脂質であるプラズマローゲンの抽出精製が行われている。畜産加工業において、食味が劣る鶏胸肉の付加価値利用として含有するプラズマローゲンの利用研究が進められていたが、結合する脂肪酸がオレイン酸やリノール酸であることから、脳神経への相乗作用が有望視されるエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）に富む水産物由来の未利用資源の活用に変換された¹⁷⁾。高齢化社会で

問題視される認知機能の低下を予防・改善する機能性食品として、今後の研究成果や利用が期待される。

このように食品製造から発生する未利用資源を用いて、機能性成分やそれを含む食品の研究開発が研究機関や各企業で進められており、私たちにおいても課題であった油脂製造工程で発生する未利用資源の活用やこれまでに培った開発技術を他の未利用資源に用いて、新たな機能性素材の研究開発を進めてきた。本研究では、このような概念のもとで開発製造の検証を行い、量産化が可能となった製品の生理機能性を評価した報告を行う。

初項では、油脂の製造の脱臭工程から発生する脱臭留出滓（脱臭スカム）を活用し、トコフェロール（Toc）/ビタミン E を富化したキャノーラ油での生体調節の機能を評価した。一般的に植物油脂の製造は、原料から油脂を圧搾さらに抽出で得られた油を原油とし、原油は脱酸、脱色、脱臭の 3 つの精製工程を経て食用油脂となる（図 1-3）¹⁸⁻²⁰⁾。脱臭スカムは、油脂が脱臭工程の際に真空・高温下で水蒸気蒸留され、食味に適さない臭い成分とともに回収される濃縮物である。内容としては、植物由来の油溶性成分であり、Toc、植物ステロール、スクワレンなどの炭化水素が多く含有されている。脱臭スカムには、植物由来の有用成分が多く含まれているにもかかわらず、これまではビタミン製造メーカーに安価に引き取られ、付加価値利用が見出せていなかった。そこで、キャノーラ原油に脱臭スカムを添加し、再度、脱酸、脱色、脱臭を行うことで従来の精製で得られるキャノーラ油より Toc 含量が 3 倍以上高い製品を開発した[特許公告 6216599 号]。また、この製法で得られるキャノーラ油は Toc 同族体である γ -Toc の含有量が高いのが特徴であり、 γ -Toc には利尿や食塩の排出促進の生理機能性が近年報告されている²¹⁻²³⁾。そこで、この油脂を連続的に摂取することで、 α -Toc と異なる γ -Toc の機能が期待できるか、高食塩食摂取ラットの試験系を用いて評価を実施した。

次項では、油脂の製造に使用する有機溶剤 *n*-ヘキサンを用いて、未利用資源

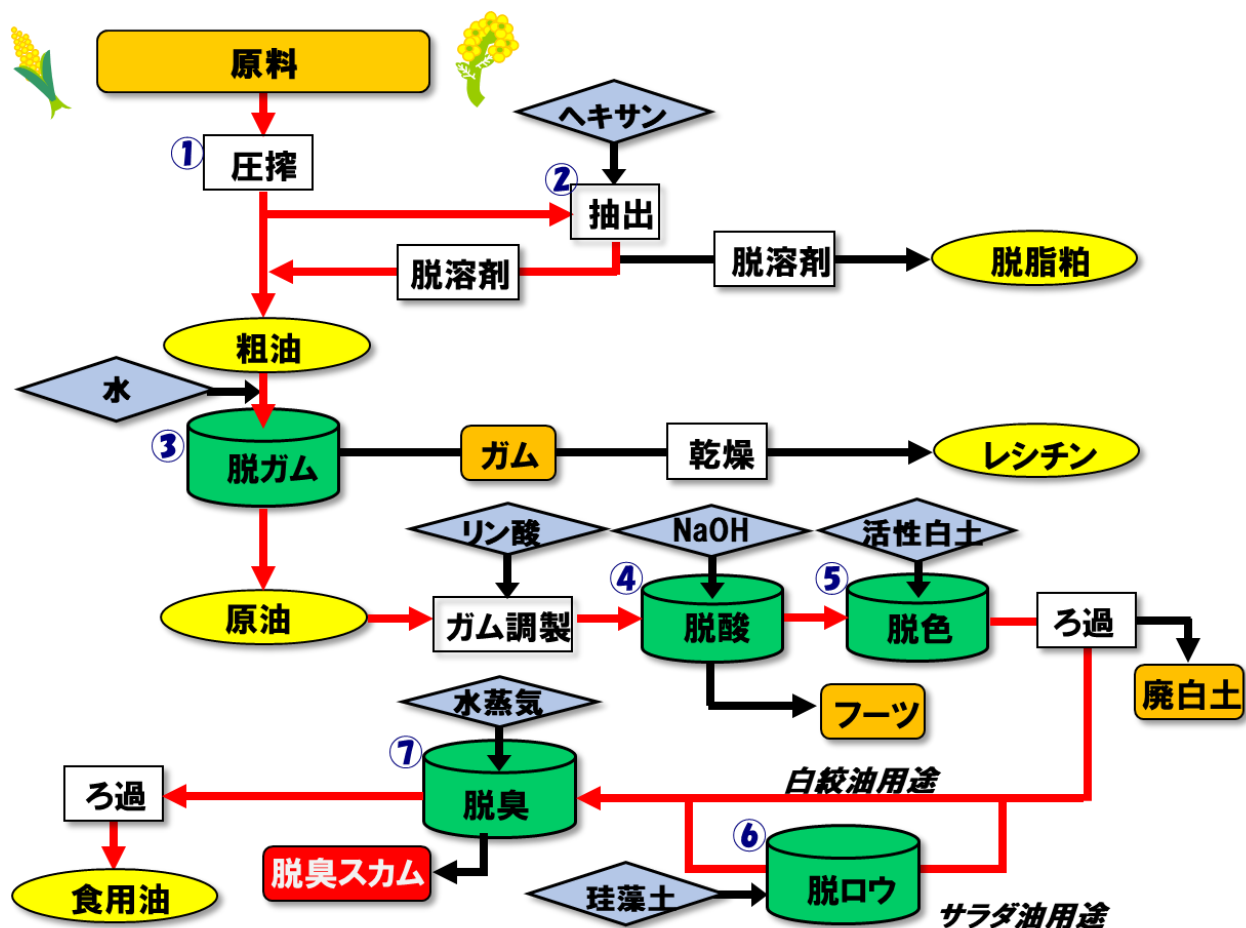


図 1-3. 植物油脂の製造方法

含有油分が 40%を超える原料は①圧搾で油を搾った後に、②*n*-ヘキサンによる抽出を行う。③脱ガム工程は、圧搾と抽出で得られた粗油にリン脂質相当量の加水を行い、攪拌で含まれるリン脂質を水和させた後に除去する。この工程までで原油が得られる。さらに、原油の遊離脂肪酸を中和除去する④脱酸工程、含まれる色素を吸着除去する⑤脱色工程、⑥サラダ油用途では、油に含まれるロウ分を冷却除去し、⑦食用として好ましくない臭い成分を蒸留除去する脱臭工程の精製を行い、食用油となる。

であるショウガの搾汁粕から抽出したショウガヘキサン抽出物（GHE）の生理機能を評価した。ショウガの加工から発生する搾汁粕を乾燥させずに *n*-ヘキサンで抽出することで、新鮮で爽やかな香気が強い天然の抽出物が得られた（図 1-4）。また、この抽出物にはショウガ由来の油溶性成分が濃縮されており、骨代謝や脂質代謝の改善作用やその有効成分について、これまでに報告が行われた²⁴⁻²⁶⁾。そこで、ショウガヘキサン抽出物のモノアミノオキシダーゼ（MAO-A & B）への作用を *in vitro* 発光測定系で調べた。MAO は、モノアミン代謝による神経伝達の不活性化や強い酸化作用を持つ過酸化水素の産生を行うため²⁷⁾、ショウガヘキサン抽出物がこの酵素活性の阻害能を有すれば、脳機能の低下を改善することが期待できると考えられる。

さらに、柑橘類の加工で生じる未利用資源の果皮（搾汁粕）に対して *n*-ヘキサン抽出から得られた抽出物の機能性を評価した。ゆず、すだち、かぼすの三つの果皮から得られた抽出物は、それぞれの柑橘類を特徴とする香気が感じられ、これまでに生理機能性が報告されている油溶性成分も含有していると考えられた（図 1-5）²⁸⁻³⁰⁾。そこで、前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化誘導系を用いた細胞評価によりこれら抽出物の抗肥満作用について検討を行い、作用が確認された抽出物の脂質代謝における作用機序や有効成分の探索を行った。



【製造方法の概略】

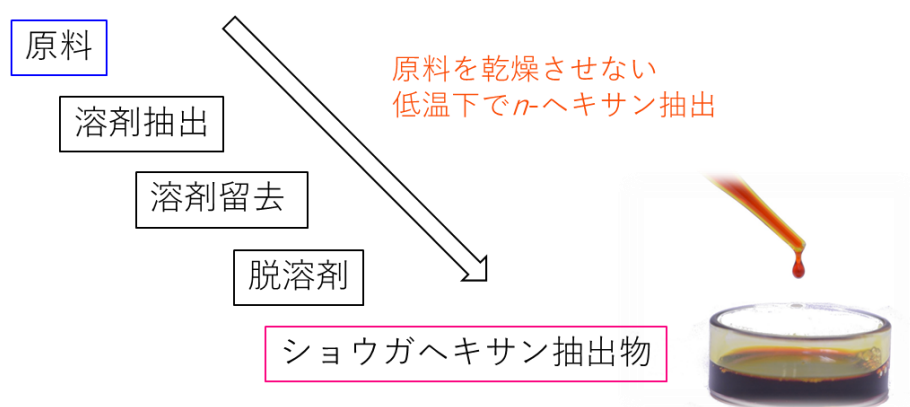


図 1-4. ショウガヘキサン抽出物の製造方法

搾汁加工で発生した果皮や搾汁粕を乾燥させず、低温下で n -ヘキサンを用いて抽出を行う。抽出溶液から n -ヘキサンを留去させる。抽出物は爽やかなショウガ香があり、油溶性成分が多く含まれる。



図 1-5. 柑橘類ヘキサン抽出物の製造方法

搾汁加工で発生した柑橘類の果皮を乾燥させず、低温下で *n*-ヘキサンを用いて抽出を行う。抽出溶液から *n*-ヘキサンを留去させる。左から、かぼすヘキサン抽出物、ゆずヘキサン抽出物、すだちヘキサン抽出物。それぞれの抽出物は特有の柑橘類の香気があり、油溶性成分が含まれる。

2. 高食塩食摂取ラットの尿中ナトリウム排泄と血糖値に 及ぼす γ -トコフェロール富化食用油脂の摂餌効果

2-1. 序論

ビタミンEは、脂溶性ビタミン群の一つであり、1922年EvansとBishopによりネズミの抗不妊因子として発見報告された。化学構造は、クロマン環とイソプレノ鎖により形成される8種のトコール族であり、トコフェロールには α 、 β 、 γ 、および δ -tocopherol (α 、 β 、 γ および δ -Tocと略称) の4つの同族体が存在する。構造上、フェノールの水酸基を有することから、水素供与体としての抗酸化性を示す³¹⁾。4種のToc同族体の中では δ -Tocが最も高い抗酸化作用を示すが、生体内で検出されるのは α -Tocであり、これが生理活性機能を発現していることが知られている。これは、食餌などから取り込まれ、吸収されたToc同族体のうち、肝臓において α -tocopherol transfer protein (α -TTP) が選択的に α -Tocと結合し、血中に輸送されるためである^{32,33)}。したがって、 α -Tocの抗酸化作用により、生体内の細胞膜脂質の酸化やDNAの損傷を防ぐだけでなく、自然発症高血圧ラットを用いた研究から免疫賦活作用³⁴⁾やIgE産生の抑制やヒスタミンおよびプロスタグランジンD₂の放出抑制によるアレルギー反応抑制作用が報告されている^{35,36)}。ビタミンEの主な供給源であるキャノーラ油（なたね油）、大豆油、コーン油などの食用植物油脂では4種のToc同族体のうち γ -Tocの含有割合が最も多いことが知られているが、上述の理由から α -Tocのみが生体内において生理作用を示す有用成分と考えられていた。

しかしながら、近年の研究から、 α -Toc以外のToc同族体もさまざまな生理作用を有していることが明らかとなってきた。その一つとして、 γ -Tocによる利尿促進やNa排泄促進作用などが挙げられる。Utoらの報告によると、過剰に食塩を摂取させたラットにおいて、 γ -Tocを44.4 mg/ラット体重kgで単回投与することで尿中へのNa排泄促進が確認されている²¹⁾。摂取された γ -Tocは肝臓内で γ -

carboxyethyl hydroxychroman (γ -CEHC) に代謝され、 γ -CEHCがNa利尿ホルモンとなり、腎臓において利尿とNa排泄促進を引き起こすとされる^{22,23)}。この実験における結果は、単回投与による報告であり、 γ -Tocを長期的・連続的に摂取させた際の作用については報告がない。また、連続的に γ -Tocを摂取させた研究報告として、ピリミジン酸化誘導体アロキサン誘導による糖尿病マウスへ γ -Tocを35 mg/kg投与で2週間合計10回経口摂取させることで、合併症の1つである皮膚創傷の炎症状態を緩和させ、血液生化学検査の結果からも、空腹時血糖値の降下、血漿中のglutamate oxaloacetate transaminase (GOT) の低下が報告されている³⁷⁾。さらに、糖尿病との関連が深い血糖値上昇において、解糖系から生成する代謝物methylglyoxal (MGO) の生成増加は、さまざまな疾患への関与が指摘されている³⁸⁾。Masterjohnらは、20代男性に一日当たり500 mgの γ -Tocを5日間摂取させると、血漿中 γ -Toc濃度が3倍以上増加し、食後の血糖値ではなく、MGO濃度の上昇を抑えたと報告している³⁹⁾。

一般的には、Toc は植物油を介して摂取される。しかしながら、食用植物油は高度に加工精製されるため、植物原油に含まれている Toc の約半量が製造副産物中へ移行し、失われている。これまでに私たちは、副産物の活用を図り、一般的な市販品よりも Toc 含有量を 2-3 倍以上高めた食用植物油の製造技術方法を開発した[特許公告 6216599 号]。そこで、本研究では、この特許製法により Toc 含量を高めた油脂を調製し、これを高食塩食摂取ラットに連続的に投与することで、ラットの尿中 Na 総排出量および血液生化学的検査項目がどのような影響を受けるかを調べた。また、一般的な市販のキャノーラ油に添加物として γ -Toc 製剤を添加して γ -Toc 含量のみを高めた油脂についても投与試験を実施し、各検査項目について比較した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 動物試験用油脂の調製

1) γ -Toc 投与量と投与期間の設定

本研究では γ -Toc を高含有する食用油脂をラットに 28 日間継続投与し、連続的な γ -Toc の摂取がラットの尿中 Na 排泄に与える影響を調査することを目的とした。また、一日当たりの γ -Toc 投与量は、連続投与であることを考慮して 30.5 mg/kg とした。本投与量はヒト等価用量 (human equivalent dose [HED] : 体重 60 kg) に換算すると 4.9 mg/kg となる。

2) 試験用油脂の調製法

γ -Toc 高含有油脂 A は、精製されたキャノーラ油に三菱ケミカルフーズ社製 (東京) のガンマブライトTM90 (d- γ -Toc90%以上) を添加して調製した。一方、 γ -Toc 高含有油脂 B は、 γ -Toc の最終濃度が γ -Toc 高含有油脂 A と同程度となるように調製した。すなわち、特許第 6216599 号に基づいて、キャノーラ種子を圧搾および抽出して得られた粗油に対して常法に従って、2% (w/w) 加水し、攪拌による脱ガム処理 (脱レシチン処理) を行った。脱ガム処理後のキャノーラ原油に油脂脱臭留出物 (α -Toc: 1.89%, γ -Toc: 4.90%, δ -Toc: 0.31%) を 8.0% (w/w) となるように添加した。続いて、含まれる遊離脂肪酸の当量 (測定酸価の半当量) になる水酸化ナトリウムを加えて脱酸処理を行った後、1% (w/w) の活性白土を加えて脱色処理 (60 Torr 以下、100-110°C、15 分) を行った。脱臭処理においては、Toc が蒸留除去されない真空温度下 (5 Torr 以下、220-225°C) で 60 分水蒸気蒸留を行い、 γ -Toc 高含有油脂 B を調製した。また、コントロールとして市販のキャノーラ油 (辻製油(株)製) を使用した。

2-2-2. 試験油脂の分析法

油脂分析（水分、色相、酸価、よう素価、屈折率）は基準油脂分析試験法（2017）に基づいて実施した。Toc 分析は HPLC を用いて実施した。すなわち、試験用油脂 0.10 g を 10 mL メスフラスコに秤量し、これに内部標準として 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychroman（PMC）を 62.5 μ g 加えて *n*-ヘキサンでメスアップし、HPLC 分析用試料（注入量：20 μ L）とした。カラムは Finepak SIL-5（4.6 mm I.D. \times 250 mm, 日本分光(株)製）を用い、溶離液は *n*-ヘキサン：イソプロピルアルコール（500 : 3 (v/v)）、流速 1 mL/min で蛍光検出器（JASCO FP-920 intelligent Fluorescence Detector、Ex.298 nm, Em.325 nm, 日本分光(株)製）により測定した。標準試薬には、ビタミン E 同族体セット（三菱ケミカルフーズ(株)製）を用いた。また、ラット肝臓中の Toc 含量の分析は以下の方法で行った。すなわち、各群の肝臓をまとめてフードミキサーで細かく裁断したもの 10 g を 140 mL 容ガラス瓶に秤量し、これに海砂 30 g を加えてガラス棒を使用してさらに細かく擦り潰した。これを 105°C で 4 時間乾燥させて水分量を求めた。さらに各乾燥サンプルに対して 30 mL の *n*-ヘキサンを添加し、室温で 5 分間攪拌混合し Toc を含む油脂を抽出した。その後、上澄みをフィルター（0.45 μ m, Agilent Technologies Japan, Ltd.）でろ過し、各上澄み液 5 mL を 10 mL メスフラスコに取り、これに内部標準として PMC を 62.5 μ g 加えて *n*-ヘキサンでメスアップし、上述の方法と同様に HPLC を用いて分析することで肝臓中の Toc 含量を求めた。

2-2-3. 動物試験の方法

1) 動物実験、実験動物および飼育条件

試験動物を用いた実験は株式会社ホクドー（札幌）に委託し、株式会社ホクドー動物実験委員会による承認（申請番号：2017-33）および動物実験規定に従って実施した。4 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラット（Slc：SD、SPF）18 匹

を日本エスエルシー株式会社（浜松）より購入した。室温 20-26℃、相対湿度 30-70%、明暗各 12 時間（照明時間：午前 7 時から午後 7 時）、換気回数 8-10 回/時間に設定した飼育室で、ラット用プラスチック製ケージ（W27×D44×H19 cm）に金網床を敷き、各ケージに 1 匹ずつ飼育した。ケージ交換は週 1 回以上行った。馴化飼育期間中に異常が認められなかったラットについて、各群の平均体重ができる限り均一になるように、体重層別無作為法にて 3 群（1 群あたり各 5 匹）に振り分けた。馴化期間中の飼料は粉末飼料 CE-2（日本クレア株式会社：東京）を自由摂取させた。投与開始日以降の飼料は CE-2 に最終濃度 5%含有となるよう NaCl を添加した高食塩食を自由摂取させた。また、投与 17 日目から最終濃度 8%含有となるよう NaCl を添加した高食塩食を自由摂取させた。飲料水は施設給水除菌装置（MJ25SR、株式会社川本製作所：名古屋）により次亜塩素酸ナトリウムを残留塩素 0.3-0.4 mg/L になるよう添加して除菌した地下水を、5 μm フィルター濾過後給水ボトルにより自由摂取させた。給水ボトル交換頻度は週 2 回以上とした。

2) 試験油脂の投与方法

試験油脂はディスポーザブル経口ゾンデ（有限会社フチガミ器械：京都）およびディスポーザブル注射筒（テルモ株式会社：東京）を用いて強制経口投与した。投与回数は 1 日 1 回、28 日間連日経口投与した。また投与量は各群いずれも 10 mL/kg とした。

3) 観察、測定および検査項目

全例について投与開始日（投与 1 日）から剖検日まで毎日、1 日 1 回以上一般状態を観察した。体重は投与 2、8、15、22 および 28 日（最終投与日）の投与前および剖検日に電子天秤（FX-1200I、株式会社 A&D：東京）を用いて測定した。全例について投与 1、7、14、21 および 27 日に給餌量を測定したのち、そ

それぞれの翌日（投与当日、投与 2、8、15、22 および 28 日）に残餌量を測定した。これらより、投与 2、8、15、22 および 28 日における摂餌量を算出した。尿量は全例について週 1 回の頻度で代謝ケージ（日本テクノ株式会社：東京）を使用して 24 時間蓄尿を採取し、その尿量を測定した。代謝ケージセットおよび採取は原則午前中とした。尿定性検査は、全例について週 1 回の頻度で採取した尿を使用し、マルティスティック SG（シーメンスヘルスケア株式会社：東京）を使用し、pH、蛋白、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、比重、ウロビリノーゲンを検査した。尿中 Na、Cl 総排出量および尿中 Na、Cl 総排出量（体重 100 g 換算）は、全例について週 1 回の頻度で定時に採取した尿を使用し、株式会社第一岸本臨床検査センター（札幌）に尿中 Na、Cl 量測定を依頼した。尿中の Na、Cl 量は、イオン選択電極法（自動分析装置 BM8060、日本電子：東京）を用いて測定した。尿中 Na、Cl 総排出量（体重 100 g 換算）については、尿中 Na、Cl 量、尿量および体重測定値をもとに試験施設にて算出した。また、ラットの Na 摂取量は、食餌量に含まれる NaCl 濃度を基準に算出を行った。すなわち、15 日までの Na 摂取量は図 2A の飼料摂餌量の 5%として得られた NaCl 量からモル比で算出した（15 日以降は飼料摂餌量の 8%として同様に算出）。血液生化学的検査は、全例について、試験終了後 16 時間以上絶食を行った後に下大静脈より採取した血液から血清を調製し、株式会社第一岸本臨床検査センターに測定を依頼した。肝臓採取は採血終了後、放血致死させ採取を実施した。肝臓は採取後、直ちに冷凍条件で保存した。

4) 統計処理

動物試験の結果において、体重、摂餌量、尿量、尿中 Na、Cl 量、尿中 Na、Cl 総排出量、尿中 Na、Cl 総排出量（体重 100 g 換算）、尿中クレアチニン濃度、血清クレアチニン濃度、クレアチニンクリアランス、血液生化学的検査について群ごとの平均値および標準偏差を算出し、さらにエクセル統計（株式会社 社会

情報サービス：東京）を用いて Bartlett により等分散性の検定を行った。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の検定法で解析した。一元配置分散分析で有意差がみられた場合は Dunnett の多重比較検定法を用いて対照群との間で平均値の比較を行った。Kruskal-Wallis の検定法により有意差が認められた場合は、Dunnett のノンパラメトリック多重比較検定を用いて対照群との間で平均値の比較を行った。有意水準は 5%未満とした。

2-3 結果

2-3-1. 試験油脂の分析値

本研究で用いた各試験油脂の分析値を表 2-1 に示した。コントロールのキャノーラ油の総 Toc 含量は 516 ppm であり、このうち γ -Toc は 67.8% (350 ppm) を占めていた。 γ -Toc 高含有油脂 B の総 Toc 含量は 5016 ppm で、コントロールの約 10 倍で、このうち γ -Toc は 66.3% (3328 ppm) を占めており、Toc 組成比はコントロールと同程度となっていることを確認した。 γ -Toc 高含有油脂 A の γ -Toc 含量は 3371 ppm であり、 γ -Toc 高含有油脂 B と同程度であることを確認した。

2-3-2. 動物試験のスキームおよび飼料摂取量と体重変化

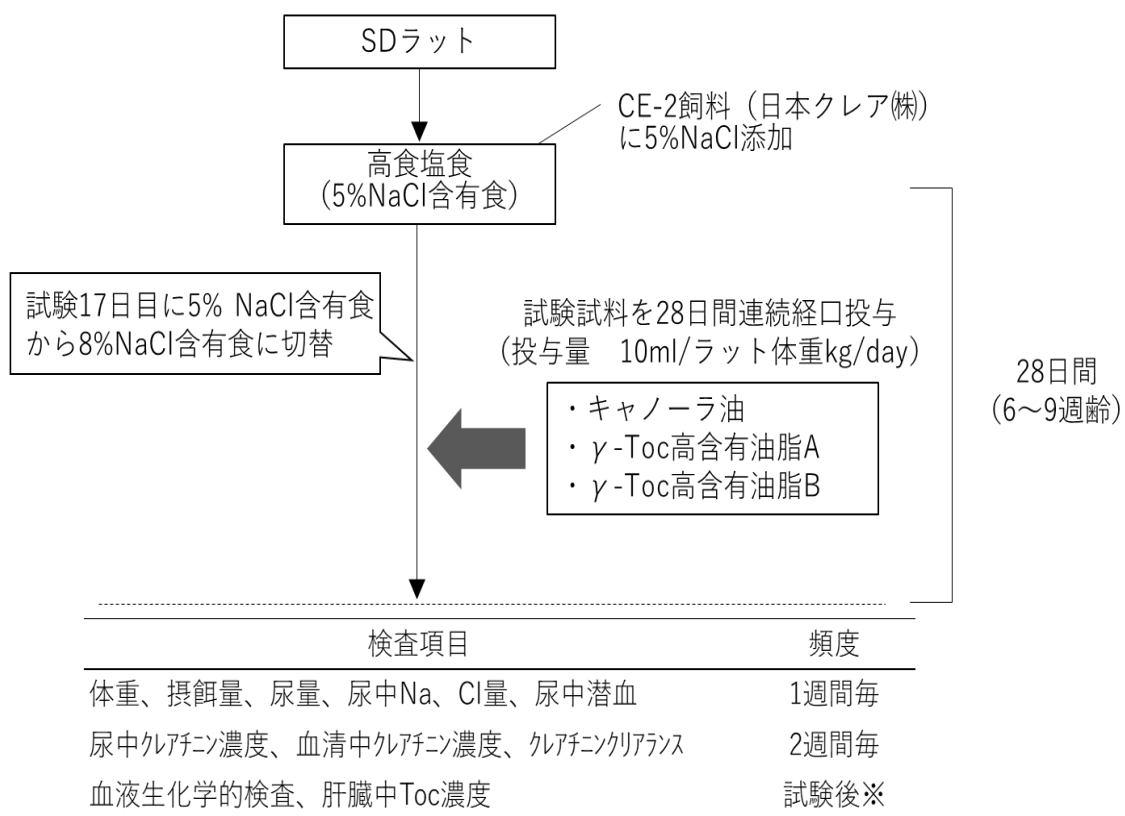
本研究における動物試験の概略を図 2-1 に示した。また、試験期間中にはキャノーラ油、 γ -Toc 高含有油脂 A および γ -Toc 高含有油脂 B 投与群のいずれのラットにおいても、呼吸数の減少、自発的な運動の低下、横臥、腹臥、また、震えなどの異常は認められなかった。飼料摂取量および体重変化の推移は、それぞれ図 2-2a および 2b に示した。飼料摂取量に関しては、本試験では高食塩食に加えて試験油脂を投与したため、各群において通常食摂取 (25-28 g/day) に比べて少な

表 2-1. 試験に用いた油脂の分析値

	コントロール (キャノーラ油)	γ-Toc高含有油脂A (γ-Toc製剤添加)	γ-Toc高含有油脂B (特許製法)
水分 (%)	0.02	0.03	0.04
色相※	4.0Y, 0.3R	4.0Y, 0.4R	20Y, 1.2R
酸価 (mg KOH/g)	0.03	0.03	0.05
よう素価	113.1	113.8	114.3
屈折率 (25℃)	1.4711	1.4712	1.4717
過酸化物价値 (meq/kg)	0	0	0.46
α-Toc	157 [30.4%]	212 [5.8%]	1,497 [29.8%]
γ-Toc	350 [67.8%]	3,371 [92.1%]	3,328 [66.3%]
δ-Toc	9 [1.7%]	76 [2.1%]	190 [3.8%]
総トコフェロール (ppm)	516	3,659	5,016

※ロビボンド法 (133.4mm セル) による分析

群構成： 計3群、各群5匹、計15匹使用（雄） 入手時：4週齢、使用時：6週齢



※16 時間以上絶食後

図 2-1. 動物試験のフロー図

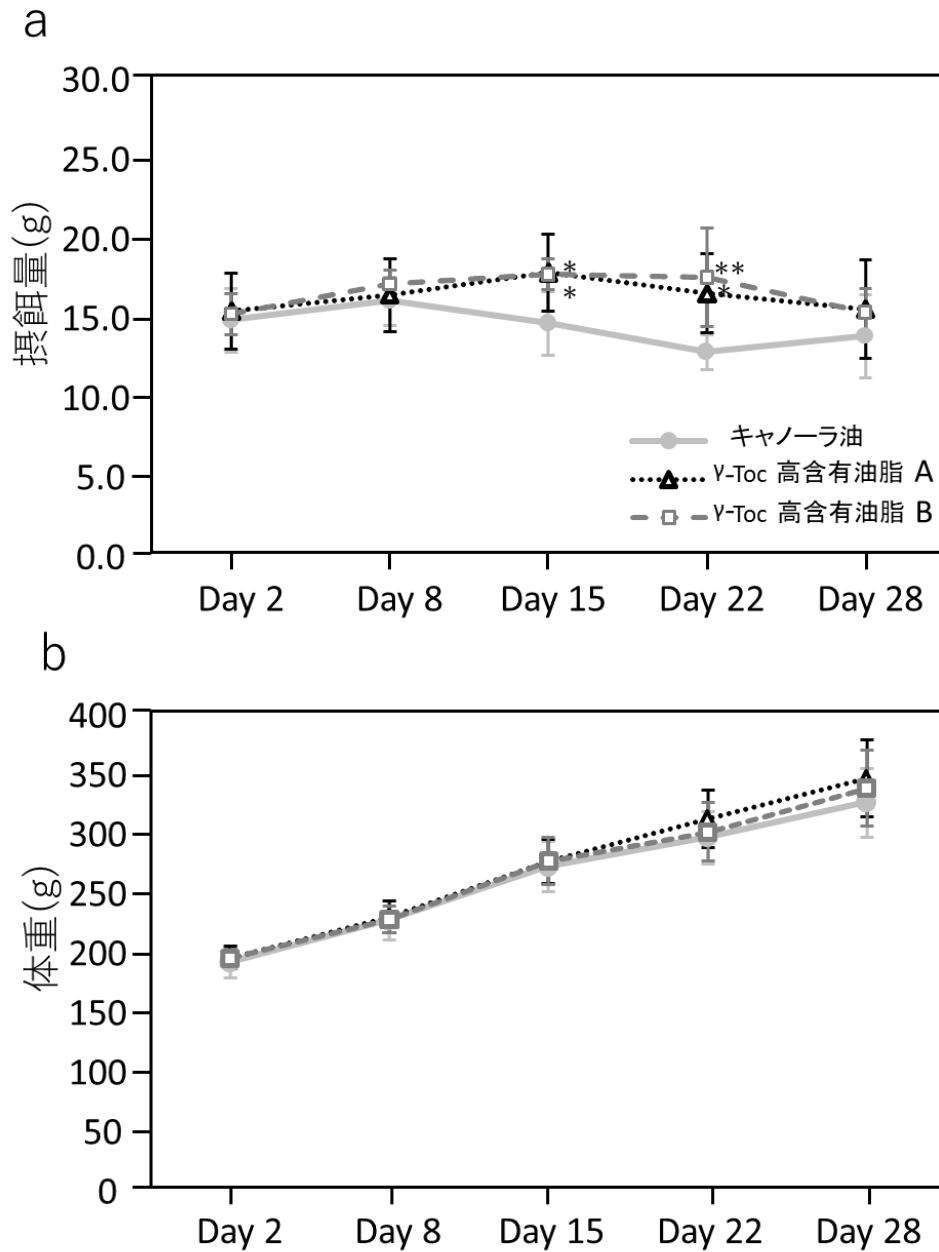


図 2-2. 試験期間におけるラットの飼料摂餌量と体重の推移

a: 飼料摂取量、b: 体重の推移

数値は平均値±標準偏差 (n = 5) を示す。

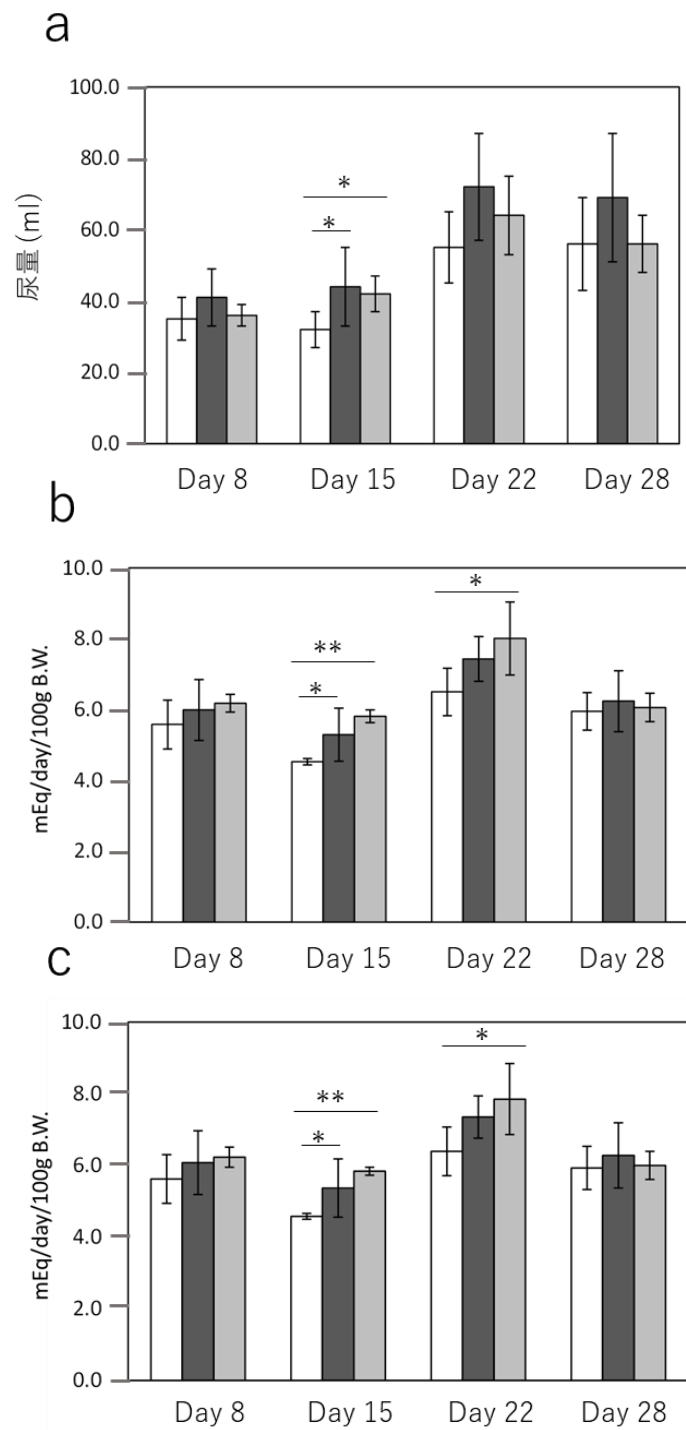
(* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ キャノーラ油との比較)

い傾向であった。また、各群において試験 9 日目までは差は認められなかったが、 γ -Toc 高含有油脂 A 投与群は、試験油脂投与 15 日目 ($p < 0.05$) および投与 22 日目 ($p < 0.05$) において、キャノーラ油投与群に比べて有意な高値を示した。さらに、 γ -Toc 高含有油脂 B 投与群も試験油脂投与 15 日目 ($p < 0.05$) および投与 22 日目 ($p < 0.01$) において、キャノーラ油投与群に比べて有意な高値を示した。一方、体重に関しては γ -Toc 高含有油脂 A および γ -Toc 高含有油脂 B 投与群いずれもキャノーラ油投与群との間に有意差は認められなかった。

2-3-3. 尿量、尿中Na, Cl総排出量（体重100g換算）、および尿定性検査

尿量に関しては、試験前の時点で各群ともに差は認められなかったが、試験15日目の時点で γ -Toc高含有油脂AおよびB投与群において、キャノーラ油投与群に比べて有意 ($p < 0.05$) に増加し（図2-3a）、その増加率は γ -Toc高含有油脂A投与群において137.5%、 γ -Toc高含有油脂B投与群において131.3%であった。本試験において、ラットの飲水量の測定は実施していないため、飲水量からの尿量への影響は明確ではないが、15日目以降において γ -Toc高含有油脂摂取群はキャノーラ油摂取群に比べて尿量の増加傾向を示した。

尿中 Na 総排出量（体重 100 g 換算）に関しても、試験前の時点では各群ともに差は認められなかったが、試験 15 日目の時点で γ -Toc 高含有油脂 A ($p < 0.05$) および B ($p < 0.01$) 投与群において、キャノーラ油投与群に比べて有意に増加し（図 2-3b）、その増加率は γ -Toc 高含有油脂 A 投与群において 116.8%、 γ -Toc 高含有油脂 B 投与群において 128.3%であった。 γ -Toc 高含有油脂 B 投与群に関しては、試験 22 日目の時点でもキャノーラ油投与群に比べて有意 ($p < 0.05$) に高値を示しており、その増加率は 123.2%であった。また、尿中 Cl 総排出量（体重 100 g 換算）は尿中 Na 総排出量と類似しており、概ね同等なモル比であることを確認した（図 2-3c）。



□キャノーラ油 ■γ-Toc 高含有油脂 A ▒γ-Toc 高含有油脂 B

図 2-3. 試験期間におけるラットの尿量と尿中の Na および Cl の総排出量
a: 尿量、b: 尿中 Na 総排出量 (体重 100 g 換算)、c: 尿中 Cl 総排出量 (体重 100 g 換算) 数値は平均値±標準偏差 (n = 5) を示す。

(* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ キャノーラ油との比較)

一方で、尿定性検査の各項目（pH、タンパク質、糖、ケトン体、ビリルビン、潜血、比重、ウロビリノーゲン）については群間で有意差は認められなかった（データ省略）。本動物試験では飼料を自由摂取させたため、先に述べたように各群間で摂餌量（Na 摂取量）に差が生じた。そこで、摂餌量の差が尿中 Na 総排出量に対してどの程度影響しているかを確認するために、摂餌量から換算される Na 摂取量と尿中 Na 総排出量との関連を比較した。その結果、図 2-4 に示すようにいずれの油脂においても尿中 Na 総排出量は Na 摂取量と数値の関連性が高く、摂餌量（Na 摂取量）が多い群ほど尿中 Na 総排出量が多くなっていた。したがって、本研究においては高食塩食摂取時の γ -Toc の連続的な摂取において尿中 Na 排出の促進は見られないものの、尿量の増加が確認された。

2-3-4. 血液生化学的検査および肝臓中のトコフェロール含量の比較

試験終了後16時間以上絶食を行った後に採取した血液から血清を調製し、血液生化学的検査を実施した。その結果、表2-2に示したように γ -Toc高含有油脂投与群において、キャノーラ油投与群に比べて血糖値の有意な低下が認められ、キャノーラ油投与群に対して γ -Toc高含有油脂AおよびB投与群はそれぞれ13.0%（ $p < 0.05$ ）および19.9%（ $p < 0.01$ ）低下した。特に γ -Toc高含有油脂B投与群における血糖値は、表記換算すると6.50 mmol/Lであり、キャノーラ油投与群が8.11 mmol/Lであるのに対して、Wangらの試験結果の報告における通常食で飼育したSDラットの正常値5.40 mmol/Lに近い値であった⁴⁰⁾。すなわち、空腹時血糖値の上昇が γ -Toc摂取によって抑えられ正常レベルが保たれたことが分かった。さらに、 γ -Toc高含有油脂B投与群は、キャノーラ油投与群に対して血中総コレステロールが上がり有意差（ $p < 0.01$ ）が見られたが、Ogawaらの報告による通常食での飼育ラットで測定された血中総コレステロール値を上回るものではなかった⁴¹⁾。また、その他の項目についてはNaを含めて群間で有意差は認め

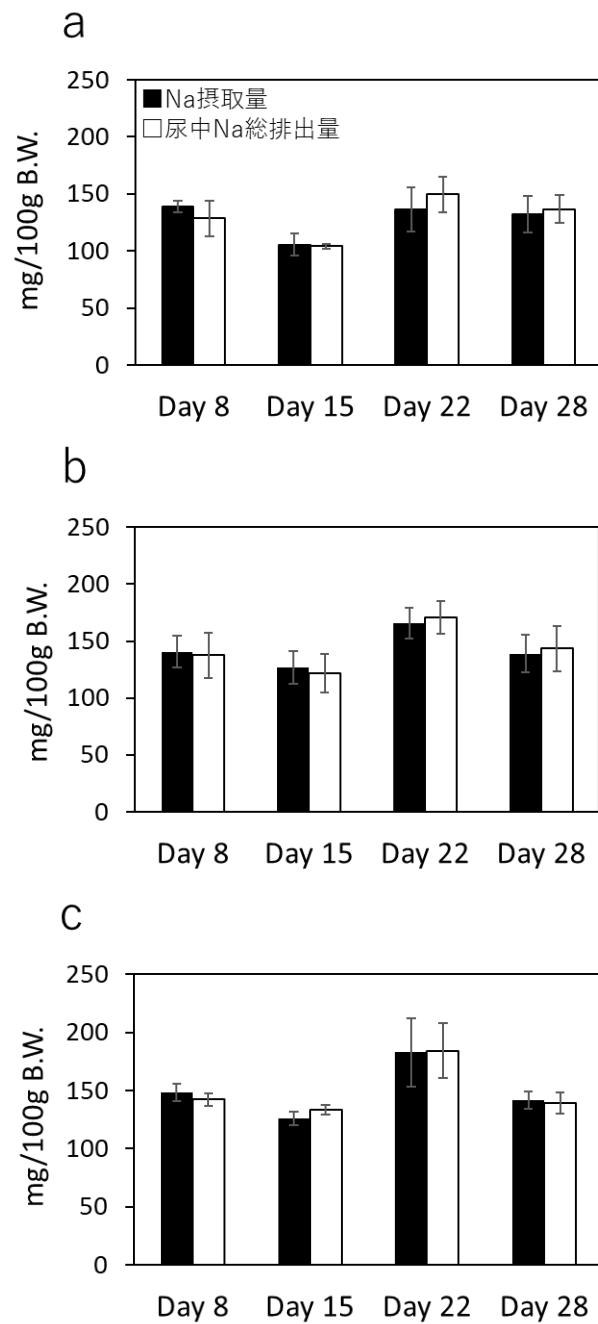


図 2-4. 摂餌量から換算される Na 摂取量と尿中 Na 総排出量との関連性

a: キャノーラ油、b: γ -Toc 高含有油脂 A、c: γ -Toc 高含有油脂 B
 数値は平均値 \pm 標準偏差 (n = 5) を示す。

表2-2. 油脂の投与による血液検査値への影響

試験群	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	γ -GTP (u/L)	Glucose (mg/dL)	T-Cho (mg/dL)	TG (mg/dL)	TP (g/dL)	T-Bil (mg/dL)	UN (mg/dL)	Crea (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
キャノーラ油	143±9	38±9	944±305	2±0	146±16	54±4	42±23	5.6±0.2	0.1±0.0	13.1±1.1	0.28±0.04	143±1	4.8±0.3	99±1
γ -Toc高含有油脂A	130±50	36±21	1,090±299	2±0	127±12*	59±7	61±25	5.7±0.1	0.1±0.0	12.5±1.9	0.26±0.02	144±1	4.6±0.2	99±1
γ -Toc高含有油脂B	119±20	30±6	900±82	2±0	117±11**	69±9**	48±21	5.7±0.2	0.1±0.0	12.7±2.5	0.26±0.02	144±1	4.6±0.2	100±1

AST:アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT:アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP: アルカリ性フォスファターゼ

γ -GTP:ガンマグルタミルトランスぺプチダーゼ、T-Cho:総コレステロール、TG:トリグリセリド、TP:血清総たんぱく、T-Bil:総ビリルビン

UN:尿素窒素、Crea:クレアチニン

数値は平均値±標準偏差(n=5)を示す。 (*: $p < 0.05$ 、 **: $p < 0.01$ キャノーラ油との比較)

られなかった。さらに、採血後に採取した肝臓に含まれるToc含量を分析した。その結果、表2-3に示したように投与した試験油脂のToc組成比はどの群においても α -Tocより γ -Tocの含有割合が多いが、肝臓組織中では比率が逆転し、どの群においても α -Tocの割合が顕著に多くなっていた。肝臓中 α -Tocは、 γ -Toc高含有油脂B (30.8 μ g/肝臓g) > キャノーラ油 (22.6 μ g/肝臓g) > γ -Toc高含有油脂A (15.6 μ g/肝臓g) の順で多かった。また、 γ -Tocも肝臓中に検出され、 γ -Toc高含有油脂A (2.6 μ g/肝臓g) > γ -Toc高含有油脂B (1.6 μ g/肝臓g) > キャノーラ油 (0.8 μ g/肝臓g) の順で含量が多かった。

表 2-3. ラット肝臓中の Toc 含量の比較

肝臓中Toc含量 ($\mu\text{g}/\text{肝臓g}$)	試験油脂		
	キャノーラ油	γ -Toc高含有油脂A	γ -Toc高含有油脂B
α -Toc	22.6	15.6	30.8
γ -Toc	0.8	2.6	1.6

各群 (5 匹) の肝臓をまとめてフードミキサーを使用して細かく裁断し、*n*-ヘキサンを使用して Toc を含む油脂を抽出後、HPLC を用いて分析した。

2-4. 考察

本研究では、ラットへの γ -Toc高含有油脂AおよびBの連続的な投与群において、キャノーラ油投与群に比べ、尿中Na, Cl総排泄量の増加が確認されたが、食餌から摂取されたNa摂取量との関連を比較した結果、Na摂取量と排泄量が同等であり、 γ -TocがNa排泄を促進するか否かは明確でなかった。一方、Utoらは、高塩食負荷させたラットへの γ -Toc 20-40 mg/ラット体重kgを単回投与することで、尿中Naの排泄促進効果が確認されたと報告しており、40 mgの単回投与では、畜尿の24hモニタリングにおいて、0-6 hの初期時間に尿中の γ -CEHCの検出量とあわせて、Na排泄が多いことを示している²³⁾。また、20 mgの単回投与では、24 hモニタリングにおける6 hごとにNa排泄量は40 mgの単回投与より小さいが、0-24 hにおける尿量は最も多い結果であり、尿量の増加に関しては、 γ -Toc高含有油脂を摂取させた本研究の結果も同様であった。しかし、油脂を介した γ -Tocの連続的な摂取において、尿中Na排泄量は増加したように思われたが、食餌より体内へ取り込まれたNa摂取量と同等であったため、Na排泄促進は明確でなかった。Utoらの試験方法と異なる点は、 γ -Tocの投与方法の違いがあり、さらに試験結果においては、Utoらの報告では、一定の給餌量は示されているが、一日当たりの食餌量の実測値が述べられていないため、食餌からのNa摂取量が明確でない。また、尿中へのNa排泄量が少ない群では、体内へのNa残存量について不明であり、試験結果からの血清中のNa含有量と同等な数値で正常にNaバランスの恒常性が保たれているか明確ではない⁴²⁾。

試験期間終了後に実施した血液生化学的検査の結果において、キャノーラ油投与群に比べ、 γ -Toc高含有油脂AおよびB投与群では、空腹時血糖値に有意な低値が確認された。 γ -Toc投与における空腹時血糖値の低下については、Shinらによるアロキサン誘導による糖尿病マウスへの γ -Tocの処理結果と一致するものであった³⁷⁾。一般に食餌から摂取された炭水化物や糖は、消化吸収を受け、血糖

として放出される。そして、上昇した血糖は各組織や器官で細胞内への取り込みが行われ、解糖系を通じたATP産生が促され、エネルギー化される。一方、取り込まれなかった糖は肝臓で多糖類のグリコーゲンとして蓄積され、これらの糖代謝により血糖値が低下する。細胞内への糖の取り込みにおいては、インスリンが分泌され、インスリン受容体との結合刺激により、glucose transporter type 4 (Glut4) のグルコース輸送が働く。また、インスリン抵抗性が上がると Glut4 への応答が弱くなり、細胞内への糖の取り込みが低下する。インスリン抵抗性は脂肪細胞から分泌される adipokine である adiponectin の発現に制御されるが、Toc が adiponectin の発現を誘導させる報告がある。Landrier らは、 α -Toc および γ -Toc を給餌させたマウスや 3T3-L1 細胞への処理において、adiponectin の発現上昇を報告しており、この現象は、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) の発現上昇に依存したものであった⁴³⁾。さらに、Toc は PPAR γ の内因性リガンドである 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 を増加させ、PPAR γ の発現促進をもって、adiponectin の発現をアップレギュレートに導くメカニズムを提唱している。また、糖の取り込みと Toc の関連性については、Singh らが酸化ストレス処理を行ったラット骨格筋細胞 L6 において、200 μ M γ -Toc の処理によりグルコースオキシダーゼ処理の酸化ストレスで低下したインスリン抵抗性を改善し、グルコースの取り込みが向上したと報告している⁴⁴⁾。さらに、Masterjohn らは糖代謝に関しての γ -Toc の作用として、高血糖に伴う糖の代謝副産物である MGO 上昇を γ -Toc の摂取で抑制し、心血管疾患のリスクを部分的に低下させる報告をしている³⁹⁾。また、Tanaka-Yachi らは α -Toc 処理がラット白色脂肪組織および 3T3-L1 細胞において、PPAR γ の発現促進につれて、uncoupling protein 1 (UCP1) の発現を上昇させ、エネルギー産生系の褐色様脂肪細胞に分化を促進させる役割を報告している⁴⁵⁾。このようにいくつかの報告とあわせて、本試験における連続的な γ -Toc 高含有油脂の摂取がラットの空腹時血糖値の低下を引き起こしたものと考えられる。この空腹時血糖値の上昇抑制が連続投与のどの時点から起こるか

は興味ある点で今後の研究課題としたい。

本試験において、ラットに連続的に摂取した γ -Toc高含有油脂からのTocが体内でどのような挙動を示したかを推察するために、肝臓中でのToc含量を測定した。その結果、いずれの群においても、 α -Tocは γ -Tocより高値を示した。この現象は肝臓組織に局在する α -TTPと α -Tocの選択的な関連性や摂取された γ -Tocが肝臓内でシトクロムP450を介して γ -CEHCに速やかに代謝されるためと考えられる。 α -Toc含量は γ -Toc高含有油脂Bが最も高く検出されたが、摂取した α -Tocに相関する値ではなく、肝臓内から α -TTPによる血中への運搬が促されていることも考えられる。また、 γ -Toc高含有油脂Bはキャノーラ油と同程度と見なせるToc同族体の比率であるため、 γ -Tocのみを添加した γ -Toc高含有油脂Aとは異なり、肝臓における α -Toc/ γ -Tocの値もキャノーラ油摂取群に近い値であった。すなわち、特許製法により製造された γ -Toc高含有油脂Bはキャノーラ油摂取と同様の自然なToc比率であり、安心・安全が求められる食品市場において意味のある素材と考えられる。本試験のように、Tocが多く摂取されると肝臓中における代謝バランスに変化が起こり、一部の α -Tocは α -CEHCに代謝を受けて排泄され^{46,47)}、また、 α -TTPへの非特異的な γ -Tocの結合が起こり、血中への運搬が促進されたと推察される⁴⁸⁾。よって、血中へ運搬された γ -Tocが糖代謝関連遺伝子の発現を変化させ、インスリン応答による細胞内への糖の取り込みの促進、すなわち、血糖値の低下が生じるのではないかと考えられる。

本試験結果から、 γ -Tocの連続的摂取によるNa排泄促進は有意に作用するものではない可能性が示唆された。しかし、 γ -Tocの連続的摂取により体内での代謝や輸送に変化が生じて、細胞内への糖の取り込みが促進し、血糖値が低下する作用が考えられた。今後、これらのメカニズムについては、より詳細な *in vitro*、さらに *in vivo* での検証を行い、他の成分との相乗作用についても解析を進める必要がある。

3. ショウガオイルに含まれる Monoamine oxidase (MAO)-A ならびに MAO-B 活性の阻害能について

3-1. 序論

ショウガ (*Zingiber officinale*) はショウガ属ショウガ科の多年生草本で、原産地は熱帯アジアとされている。根茎部は特有の香りおよび味の付与、保存性の向上を目的に広く利用されている。ショウガは調理用途のほかに、中国、インド、日本を中心に生薬として利用されてきている。中国最古の本草書である神農本草経にショウガは体力を補うことを目的として収載され、現在でも漢方医学で多くの処方に配剤され、甘草に次いで配合頻度が高い重要生薬である⁴⁹⁾。ショウガならびにショウガ抽出物の機能性研究は多数行われており、抗炎症、利胆、鎮吐、鎮静、抗肥満など種々の生理作用が報告されている⁵⁰⁾。その多くはバニロイドを含むフェノール性化合物であり、特徴的なピリッとするバニルルアセトン (zingiberone)、gingerol ならびにその脱水物のような刺激化合物の存在が知られている⁵¹⁾。ショウガに含まれるこれらの化合物はクルクミン誘導体であり、ウコンに含まれモノアミン神経系の活性化を介して抗うつ作用を有する diarylheptanoid curcumin と構造的に類似している⁵²⁾。ショウガに含まれる gingerol などのクルクミン誘導体はインドール類、イソチオシアン類、スルフォラファン類、アリルスルフィド類ならびにイソフラボノイド類とともにフィトケミカルと総称され医薬分野だけではなく、機能性食品はじめ通常の食素材としても注目されている⁵³⁾。これまでの研究では、ショウガオイルが PPAR γ 経路の脂肪細胞の分化を増進させること²⁴⁾、RANKL 誘導性の破骨細胞の分化を抑制すること²⁵⁾を報告している。

Monoamine oxidase (MAO) はモノアミン神経伝達物質の酸化を触媒する酵素群で、ヒトでは MAO-A と MAO-B が存在する。両者ともに中枢神経系において、神経細胞およびアストロサイトのミトコンドリア外膜に局在する。抹消組

織においては、MAO-A は肝臓、胃腸、胎盤に、MAO-B は血小板に存在する。モノアミンに対する MAO の基質特異性は、MAO-A は serotonin、noradrenaline と adrenaline、MAO-B は dopamine をそれぞれ標的とする⁵⁴⁾。MAO はモノアミン代謝によるそれら神経伝達の不活性化という作用を持つほか、強い酸化作用を持つ過酸化水素の産生過程にも関与している²⁷⁾。したがって、MAO 酵素の阻害剤は脳機能の低下を改善する機能性食材という魅力的なターゲットになると思われる。

これまでに私たちは、*n*-ヘキサン抽出技術を基盤として食用油の製造ならびに精油など植物素材からのオイル成分の抽出を行ってきた。さらに、オイル成分などの疎水性化合物の分散性を高めるために欠かせない界面活性作用を持つ大豆レシチンの開発製造も進めてきた。このような背景を生かして、本研究では日本食の薬味として愛用される天然物の中からショウガの *n*-ヘキサン抽出物（ショウガオイル）に着目し、*in vitro* 発光法を用いて、オイル中に含まれる MAO 阻害化合物をスクリーニングし、本体を単離し、IC₅₀（50%阻害濃度）を測定した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 実験材料

ショウガオイルは辻製油株式会社が製造販売する食品素材で、非乾燥のショウガ皮や搾汁粕を原料として Ito らの方法²⁵⁾で *n*-ヘキサン抽出法によって調製した。ユズオイルも同様の方法で調製した。標準物質として使用した R-(-)-deprenyl hydrochloride (deprenyl) と N-methyl-N-propargyl-3-(2,4-dichlorophenoxy)propylamine hydrochloride (clorgyline) ならびに組換えヒト MAO-A と MAO-B は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。MAO-Glo アッセイキットは Promega (WI, USA) から購入した。citral、6-gingerol と 6-shogaol は和光純薬から、phellandrene は Tokyo Chemical Industry (Tokyo,

Japan) から、farnecene は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。また、小麦胚芽油は市販品を購入して用いた。

3-2-2. 機器分析

1) NMR ならびに質量分析

The New Zealand Institute for Plant & Food Research Ltd. (<https://www.plantandfood.co.nz/page/about-us/>) に委託して行った。¹H-NMR および ¹³C-NMR は 399.74 MHz で操作できる Varian 400 Spectrometer で行った。試料は重水素化メタノールに溶解し、スペクトルは Standard Varian software で、分析は MestreNova software で行った。質量分析は microTOF-Q (Bruker, Germany) を用いて行った。

2) 逆相 HPLC

HPLC analysis system (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて行った：C18 column (φ 4.6 mm × 250 mm; Wako, Osaka, Japan) ; UV 検出 228 nm; カラム温度 40°C; 移動相は A = H₂O と B = CH₃CN; 勾配 0–20 min (30–90% B) ; 20–45 min (90% B) ; 流速 0.6 mL/min。

3-2-3. MAO 活性測定

試料は dimethylsulfoxide (DMSO) で溶解して保存液として使用した。用量曲線を求める実験では 5% グリセロールと 1.25%あるいは 10% DMSO を含む 100mM HEPES (pH 7.5) 溶液を用いた。ヒト MAO-A ならびに MAO-B 活性は Promega 社製 MAO-Glo キットを用い同社の Technical Bulletin にしたがって実施した。最大阻害能の 50%値 (IC₅₀) は clorgyline ならびに deprenyl を陽性コントロールとし、Origin Graphing Software (version 8.5) (MA, USA) を用いてグラフ化して算出した。

3-3. 結果

3-3-1. ショウガオイルの MAO 活性阻害能

粗原料であるショウガオイルについて濃度を変えて MAO 阻害能に対する IC_{50} を求めると、MAO-A に対して $0.041 \mu\text{L/mL}$ 、MAO-B に対して $0.031 \mu\text{L/mL}$ とそれぞれ ppb (parts-per-billion) 単位での阻害能を有することが示された (表 3-1)。比較対象として、ユズオイルと小麦胚芽油の MAO 阻害活性を測定した。ユズオイルに含まれる geranylated coumarin (auraptene) が MAO-B に対してより選択的に阻害活性を示すことが既に報告されている⁵⁵⁾。そこで、ユズオイルの MAO-A と MAO-B に対する IC_{50} を求めると MAO-A に対して $0.670 \mu\text{L/mL}$ 、MAO-B に対して $0.057 \mu\text{L/mL}$ であり、MAO-B に対する選択性が認められた。一方、このような MAO 阻害作用は小麦胚芽油には認められなかった。

3-3-2. ショウガオイルの分画

ショウガオイル中の gingerol などの主要成分については既にいくつかの報告が見られ、全て疎水性の高い化合物であることが知られている。ショウガオイルの分析では、主なピークは溶出順に 6-gingerol、neral (*cis*-citral)、geranial (*trans*-citral)、phellandrene、farnesene で既に報告したクロマトグラムと一致した²⁵⁾。なお、shogaol は *n*-ヘキサン抽出法で得られるショウガオイルでは検出されない。6-gingerol 以外の主成分の MAO 阻害能が弱いことから、含量の低い成分で強い MAO-B 阻害能を示す化合物が存在すると想定して逆相クロマトグラフィーで単離精製を進めた。図 3-1 にその全操作の流れを示した。

1) [第 1 段階] シリカゲルクロマトグラフィー

ショウガオイル 3 g をシリカゲルカラム (30 g) に加え、*n*-ペンタンと酢酸エチル混液 (4:1) で溶出操作を行った。得られた 8 画分 (Z12-Z19) について MAO 阻害能を測定した (図 3-2)。MAO 活性は比較的広い範囲の画分で

表 3-1. MAO の活性阻害におけるショウガオイルの作用

サンプル	IC ₅₀ : MAO-A (μ L/mL)	IC ₅₀ : MAO-B (μ L/mL)	MAO-A/MAO-B 阻害比率
ショウガオイル	0.041	0.031	1.32
ユズオイル	0.670	0.057	11.57
小麦胚芽油	阻害なし	阻害なし	該当なし

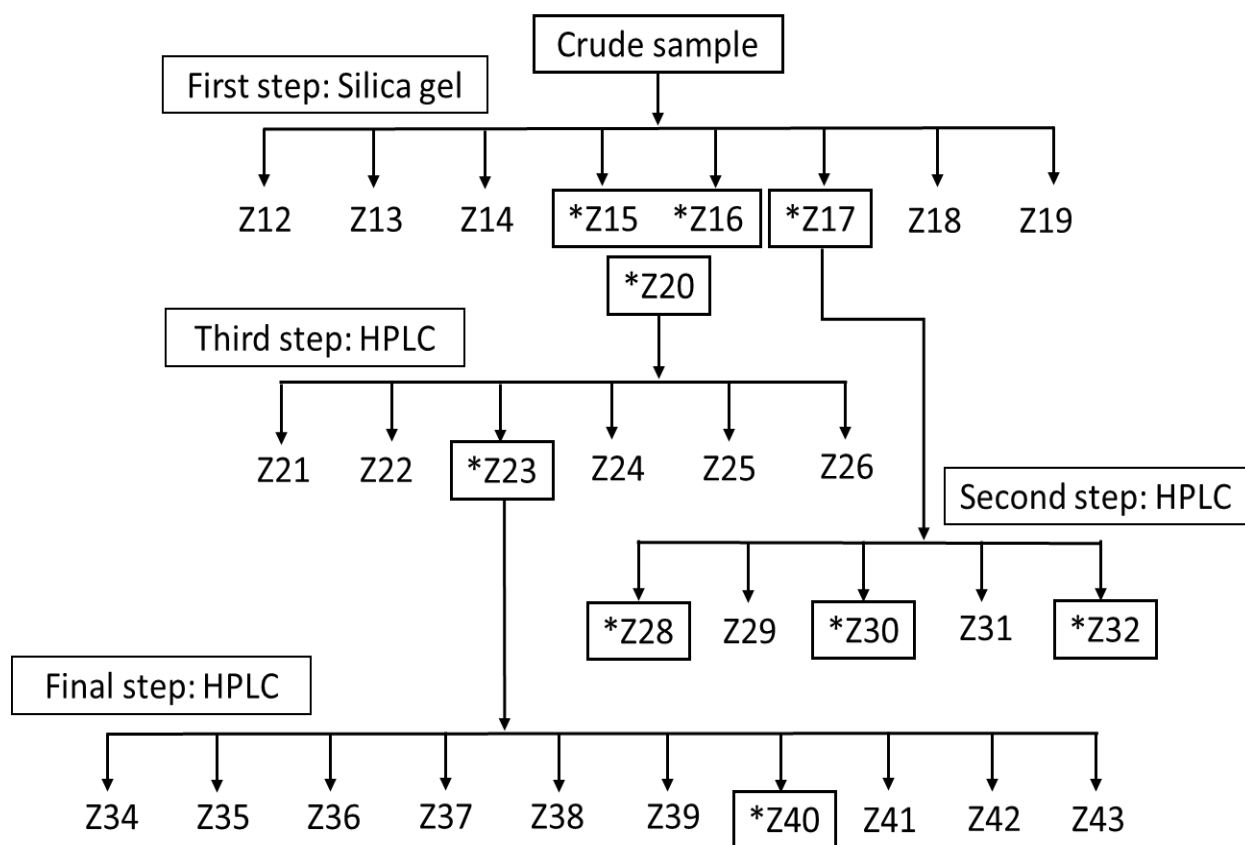


図 3-1. ショウガオイルの分画スキーム

* は次の分別に選択された高活性画分のサンプルを示した。

阻害されたが、なかでも Z17 が MAO-A に強い阻害能を示すことがわかった。一方、MAO-B に対する阻害能については、10 $\mu\text{g/mL}$ の阻害能の結果から Z15 と Z16 に焦点を絞った。

2) [第 2 段階] MAO-A 阻害能の高い Z17 画分の逆相 HPLC

Z17 画分を逆相 HPLC で精製し、得られた 5 成分 (Z28-Z32) について阻害能を測定した。その結果、Z28、Z30、Z32 が 10 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で MAO-A に対して同程度の強い阻害能を持つことが分かった。この内、Z28 は既報⁷⁾の HPLC クロマトグラムの保持時間とピーク形状が一致したことから 6-gingerol であると推測され、夾雑物が少ないことがわかった。この結果から、Z30 と Z32 も gingerol 誘導体であると推測し、¹H-NMR スペクトルと質量分析を行った。その結果、Z28、Z30、Z32 画分が質量 317.1721 の 6-gingerol ([M+Na] 計算値 317.1723 $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NaO}_4$)、質量 345.1972 の 8-gingerol ([M+Na] 計算値 345.2042 $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NaO}_4$) ならびに質量 373.2339 の 10-gingerol ([M+Na] 計算値 373.2349 $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{NaO}_4$) であることが推定された。これら 3 種の gingerol の ¹H-NMR スペクトルは Fleming らの報告⁵⁶⁾と一致した。

3) [第 3 段階] MAO-B 阻害能の高い画分 Z15 と Z16 の逆相 HPLC

MAO-B に対して強い阻害能を持つ画分 Z15 と Z16 を合わせた Z20 を C18 逆相 HPLC で分離し、得られた 6 画分の MAO 阻害能を調べた。その結果、Z23 画分が 1 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で MAO-A ならびに MAO-B に対して最も強い阻害能を示すことがわかった。そこで、Z23 画分を再度 HPLC で分画したところ、10 画分 (Z34-Z43) が得られた (図 3-1, Final step)。これらの MAO 活性阻害能を調べたところ、MAO-A に対しては幅広い画分で弱い阻害能を示した。一方、MAO-B に対しては Z40 が 1 $\mu\text{g/mL}$ 濃度でも顕著な阻害能を示すことがわかった (図 3-3)。Z40 画分は 2 つのピークが検出され、クロマトグラムの挙

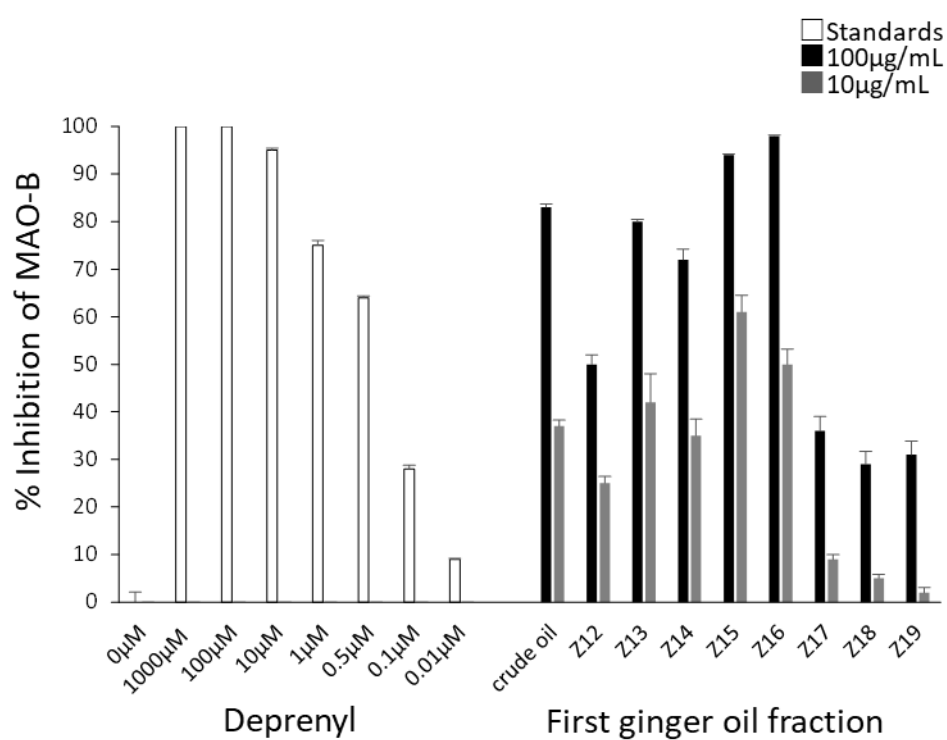
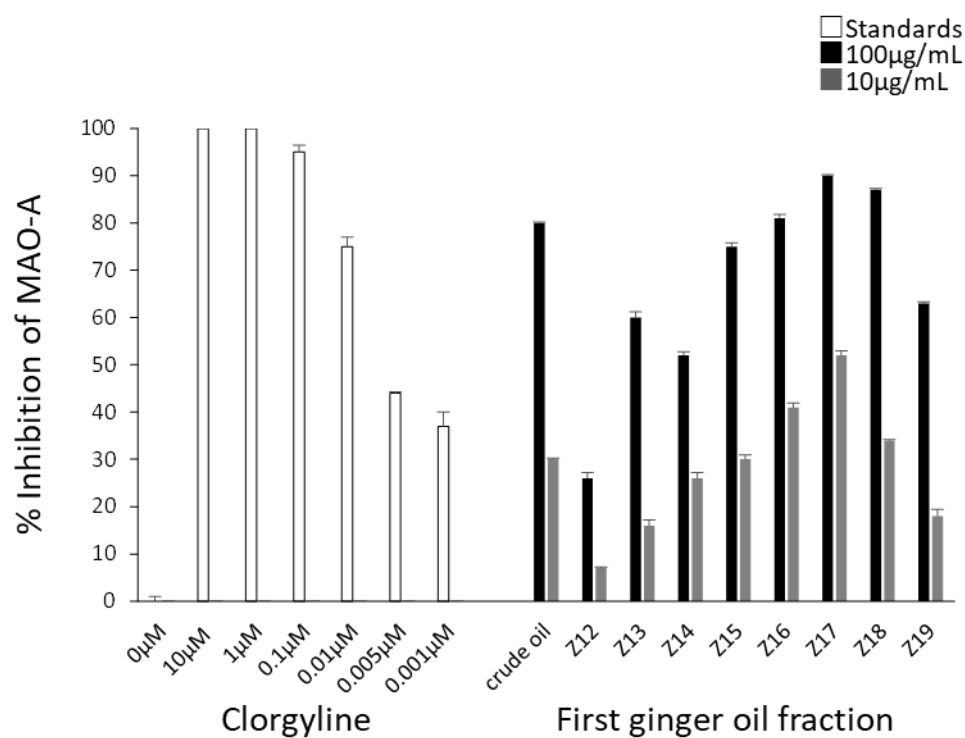


図 3-2. MAO-A および MAO-B 活性に対するショウガオイルから分離した画分の阻害作用

MAO の阻害率は 10 μg/mL と 100 μg/mL の処理濃度で測定した。

clorgyline と deprenyl は MAO-A と MAO-B 阻害の陽性コントロールとした。

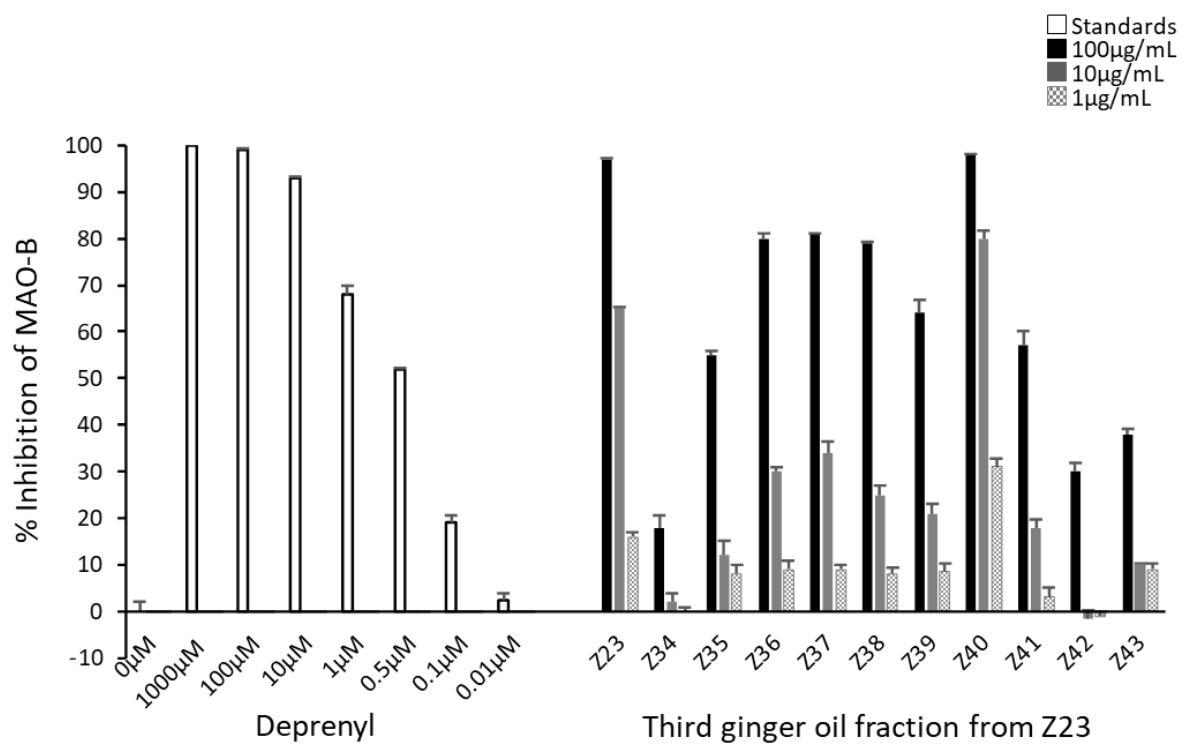


図 3-3. Z23 から分離した各フラクションにおける MAO-B 活性に対する阻害作用

MAO の阻害率は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理濃度で測定した。

deprenyl は MAO-B 阻害の陽性コントロールとした。

動から gingerdione と gingerdiol の誘導体と推定された。さらに各成分を溶出分画し、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、および質量分析により解析した結果、一つは質量 313.1383 の 1-dehydro-[6]-gingerdione ($[\text{M}+\text{Na}]$ 計算値 313.1416 $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NaO}_4$) (化合物 1) で、他方は質量 403.2076 の diacetoxy-[6]-gingerdiol ($[\text{M}+\text{Na}]$ 計算値 403.2097 $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{NaO}_6$) (化合物 2) であることが推定された。化合物 1 の ^1H -NMR スペクトルは Charles らの報告⁵⁷⁾と一致し、また化合物 2 の ^1H -NMR スペクトルは Kikuzaki らの報告⁵⁸⁾と一致した。参考までに化合物 1 の ^1H -NMR および ^{13}C -NMR データを表 2 に示し、NMR スペクトルおよび質量分析により推定された化合物 1 と 2 の構造を図 3-4 に示した。

3-3-3. MAO に対する IC_{50} 測定

ショウガオイルから分離された 5 種の化合物について IC_{50} を測定した。 ^1H -NMR スペクトルによる純度測定によりこれら 5 種の化合物の純度は 98%以上と算出され IC_{50} 測定に問題はないと判断した。また各化合物のモル濃度は純度と分子量から算出した。5 種の化合物の MAO に対する IC_{50} を表 3-3 に示した。MAO-A に対する IC_{50} は 8-gingerol が最も強く $54.6 \pm 2.0 \mu\text{M}$ であった。また、化合物 1 と化合物 2 の IC_{50} を陽性コントロールである clorgyline ならびに deprenyl と比較すると、i)化合物 1 は MAO-B に対して IC_{50} が $6.77 \pm 0.45 \mu\text{M}$ の強い阻害能を示し、MAO-A に対するよりも 10 倍の差があること、ii)化合物 2 は MAO-A と MAO-B に対して弱い阻害能を示すことがわかった。化合物 1 と 2 は溶解度が低く高濃度での値が得られなかったので、推定値を示した。化合物 1 および 2 の MAO-A と MAO-B に対する阻害曲線を図 3-5 および 3-6 に示した。

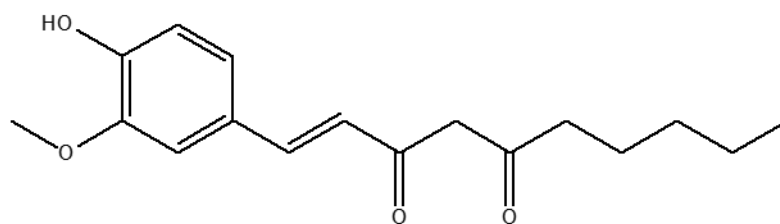
表 3-2. 化合物 1 の ^1H -NMR と ^{13}C -NMR のスペクトルデータ

Position	δ_{H}^a (J in Hz)	δ_{C}^b	HMBC ^a
1	7.49 d (16.0)	145.3 CH	3
2	6.61 d (16.0)	123.5 CH	1'
3		193.3 qC	
4	3.77 s	55.9 CH ₂	3, 5
5		205.0 qC	
6	2.54 t (7.4)	43.4 CH ₂	5, 7, 8
7	1.57 tt (7.3, 7.4)	23.1 CH ₂	5, 6, 8
8	1.26 m	31.2 CH ₂	
9	1.26 m	22.5 CH ₂	
10	0.86 t (7.2)	13.9 CH ₃	9
1'		126.6 qC	
2'	7.03 d (1.6)	109.6 CH	6'
3'		146.8 qC	
4'		147.7 qC	
5'	6.90 d (8.2)	114.8 CH	
6'	7.09 dd (1.6, 8.2)	124.1 CH	
OCH ₃		55.9 CH ₃	

^a Data were measured in MeOH-d₄ (600 MHz).

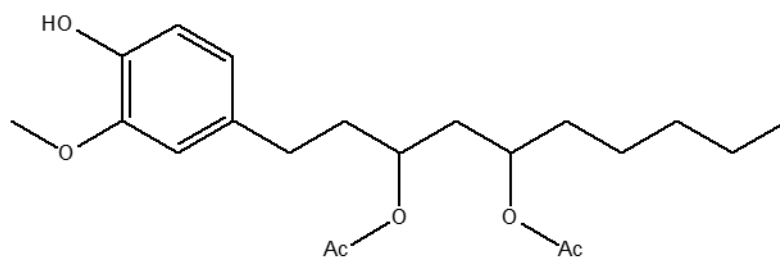
^b Data were measured in MeOH-d₄ (150 MHz).

1-dehydro-[6]-gingerdione



化合物 1

diacetoxy-[6]-gingerdiol



化合物 2

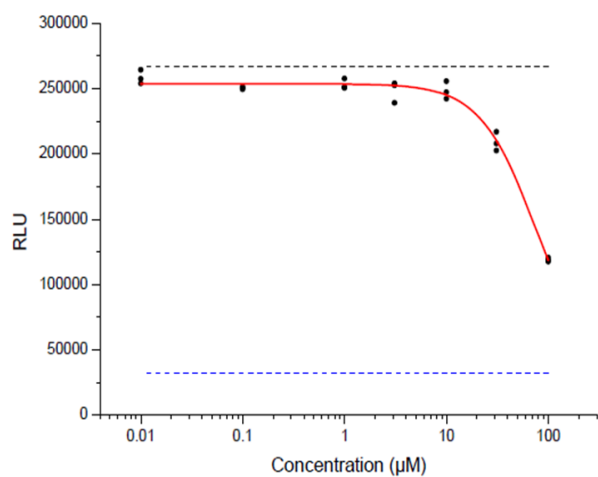
図 3-4. ショウガオイルから単離した化合物 1 と 2 の推定の化学構造

表 3-3. ショウガオイルから精製された各化合物(>98%)の MAO 阻害作用

化合物	IC ₅₀ : MAO-A	IC ₅₀ : MAO-B
6-Gingerol	175.7 ± 11.0μM	-
8-Gingerol	54.6 ± 2.0μM	-
10-Gingerol	113.4 ± 4.7μM	-
1-Dehydro-[6]-gingerdione (Compound 1)	>60μM*	6.77 ± 0.45μM
Diacetoxy-[6]-gingerdione (Compound 2)	>150μM*	>250μM*
Clorgyline (MAO-A control)	15.08 ± 0.69nM	-
R-(-)Deprenyl (MAO-B control)	-	338 ± 24nM

溶解度が低いために推定値を示したアスタリスクが付いた値を除いては、結果は全て平均±標準誤差で表した。

(a) Compound 1



(b) Compound 2

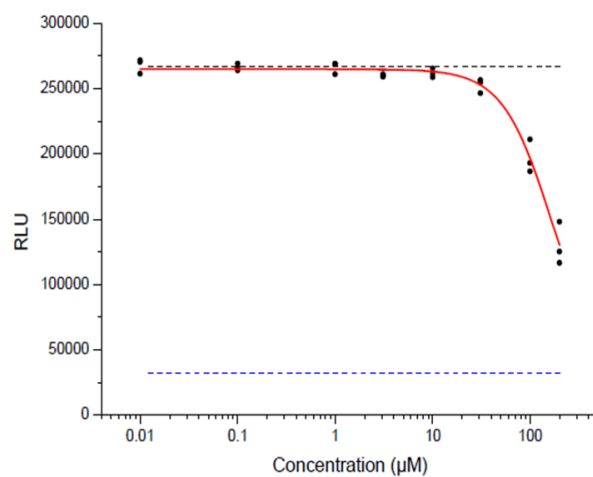
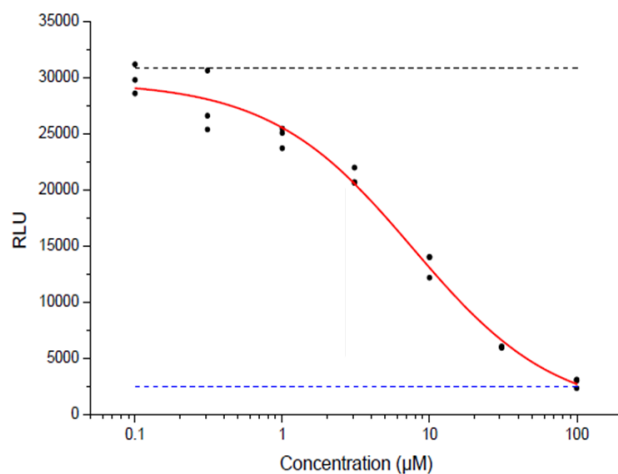


図 3-5. 1-dehydro-[6]-gingerdione (化合物 1) と diacetoxy-[6]-gingerdiol (化合物 2) の MAO-A に対する阻害曲線

(a) は化合物 1、(b) は化合物 2 の濃度における応答曲線。上の破線は阻害剤なしでの MAO-A の最大酵素活性値であり、下の破線は MAO-A なしでのバックグラウンド値を示す。Y 軸は相対発光単位 (RLU) を示す。

(a) Compound 1



(b) Compound 2

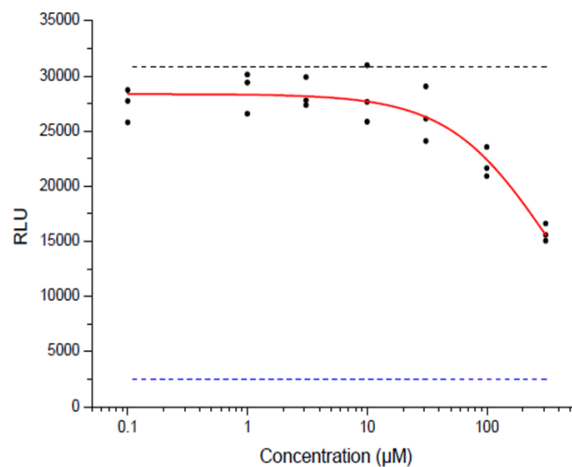


図 3-6. 1-dehydro-[6]-gingerdione (化合物 1) と diacetoxy-[6]-gingerdiol (化合物 2) の MAO-B に対する阻害曲線

(a)は化合物 1、(b)は化合物 2 の濃度における応答曲線。上の破線は阻害剤なしでの MAO-B の最大酵素活性値であり、下の破線は MAO-B なしでのバックグラウンド値を示す。Y 軸は相対発光単位 (RLU) を示す。

3-4. 考察

ショウガオイルの MAO 活性阻害能に焦点を当て、逆相クロマトグラフィーを駆使して 5 種の化合物を単離精製した。単離された成分のうち 3 種の gingerol について、ショウガ根茎中に存在することについては報告されている⁵⁸⁾。しかし、ショウガオイル中に存在し、弱い MAO-B 阻害能と、強い MAO-A 阻害能を持つことについてはこれまでに知られていない。ショウガオイル中の微量成分について詳細に調べ、化合物 1 と 2 を単離した。化合物 1、2 とともにショウガ根茎での存在については知られているが⁵⁷⁾、ショウガオイル中での存在と生理作用についてはこれまでに報告されていない。ショウガ根茎の *n*-ヘキサン抽出物の MAO-A 阻害活性については、geraniol と (-)-terpinen-4-ol が 125 µg/mL でそれぞれ 44.1% および 42.5% 阻害することが報告されているが⁵⁹⁾、MAO-B 阻害活性についてはこれまでに報告されていない。一方、本研究ではショウガ根茎の *n*-ヘキサン抽出オイルを各種クロマトグラフィーにより分画し、最も MAO 阻害活性が強い画分から既報の 2 成分とは異なる 5 種類の MAO 阻害活性成分を単離精製した。また、新たに MAO-B に対して強い選択的阻害能を有する化合物 1 を構造解析した。化合物 1 はパーキンソン病治療薬である陽性コントロールである deprenyl の MAO-B 阻害能 (IC₅₀) と比較して約 20 分の 1 の阻害作用を有することから、特異的かつ強力な MAO-B 阻害作用を有することが示唆された。したがって、ショウガオイルは機能性素材としてだけではなく、MAO-B 阻害による dopamine 神経系活性化を作用機序とする医薬品のリード化合物としての有用性が期待される。このように化合物 1 の MAO-B 阻害に関しては、興味ある知見が得られた。この化合物は 6-gingerol の生合成前駆体なので、栽培条件を検討することで収量を高めることができる可能性がある。いずれにしても、ショウガオイル中の化合物 1 の含量は全ピーク面積の約 1.5% と微量であった⁶⁰⁾ 特に化合物 1 の MAO-B に対する阻害様式に注目しており、そのためには、まず(1)血液脳関門について *in vitro* アッセイ法^{61,62)}で確認の上、(2)ミト

コンドリア膜に組み込まれた状態の MAO 活性の阻害様式の比較、(3) dopamine 神経系で入手可能なモデルマウスを調査した上で行動薬理実験、という順序で進めていく必要がある。

4. 柑橘類へキサン抽出物における抗肥満作用の評価

4-1. 序論

肥満者は世界中で増加しており、約 7 億 1200 万人が肥満であり、これは世界人口の約 10%に相当する⁶⁴⁾。肥満は深刻な健康問題であり、2 型糖尿病、冠状動脈性心臓病、高血圧、脂肪肝、癌などの多くの病気の危険因子である⁶⁵⁻⁶⁷⁾。過度のカロリー摂取量が増加すると、脂肪細胞はトリアシルグリセロールの形でエネルギーを蓄積し、その結果、脂肪生成が促進され、脂肪組織の量が増加し、肥満となる⁶⁸⁾。それゆえに、生活習慣病の予防には肥満の回避と改善が必要であり、脂肪の生成を調節することが重要である。脂肪の生成は、各段階による分化プロセスのいくつかの転写因子によって厳密かつ協調的に調節されている^{69,70)}。例えば、protein kinase A (PKA) を活性化する細胞内 cAMP の濃度の増加は、脂肪合成の開始に必要である^{71,72)}。PKA の活性化に続いて、主要な脂肪生成転写因子である peroxisomal proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) および C/EBP α の発現が促進されることで脂肪細胞への分化が促進される⁷³⁾。そして、PPAR γ および C/EBP α の発現の増加は脂肪滴を形成させ、sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) や脂肪細胞の成熟のマーカーとされる fatty acid binding protein 4 / adipocyte protein 2 (FABP4/aP2)、fatty acid synthase (FAS)、perilipin A、および adiponectin の発現の促進に関連している^{74,75)}。このように、前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いての脂肪細胞の分化から脂肪生成までのメカニズムに関するさまざまな研究の情報が得られ、薬物や天然成分が脂肪生成の促進、または、抑制を引き起こすことが明らかになりつつある^{69,70,75-77)}。

古くから柑橘類は日本も含めて、世界中で食用にされている。果実を生食で利用する他、果汁やジャムやペースト加工して食品素材となっている。日本では温州みかん以外にも、地域の特産な柑橘類が存在し、それぞれが食用にされている。

しかし、可食部や搾汁される部位以外は、ほとんど利用されず廃棄物となっている。ここ近年では、果皮などの未利用資源の活用が進められ、食品への再利用やバイオアルコール生産によるエネルギー変換などが実施され、廃棄物量の削減が行われている⁷⁸⁾。さらに、最近の研究では、柑橘系の果物に含まれる成分が骨代謝の改善、神経細胞への有効性、メラニン生成の阻害、皮膚の老化の抑制、抗腫瘍性、そして、抗肥満作用などの生理学的機能を持っていることが報告されている^{30,79-85)}。そのなかでもポリメトキシフラボン類 (PMFs) が多くの機能性にかかわる成分として知られている。柑橘類は、ノビレチンの他にも多くの PMFs を含んでおり、Li らはスイートオレンジ (*Citrus sinensis*) から 15 種以上の PMFs の存在を報告している⁸⁶⁾。PMFs は柑橘類の可食部や果汁よりも果皮に多く含まれている。脂肪細胞の分化や生成において、細胞内の cAMP が PKA に結合し、PKA が活性化されると AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化して、その下流の acetyl-CoA carboxylase (ACC) が調節される^{87,88)}。このように、PKA による標的分子のリン酸化が PKA シグナルの伝達とそれらの活性化において不可欠と考えられる。Heptamethoxyflavone (HMF) およびヒドロキシル化 PMFs は細胞内の phosphodiesterase E (PDE) の活性を阻害することで、cAMP を過剰に増加させ、PKA を活性化して脂肪生成を抑制することが報告されている。すなわち、PKA シグナル伝達の活性化因子は、肥満を予防する可能性がある^{89,90)}。

これまでに私たちは柑橘類の果皮を利用して、有機溶剤を用いた抽出物の調製を行ってきた。また、調製した抽出物には、天然香料としての柑橘系の香り成分だけでなく、皮からの油溶性成分も多く含まれていると考えている。本研究では、調製した柑橘類のヘキサン抽出物の抗肥満作用について、前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて評価を行った。また、抗肥満作用が確認されたかぼすヘキサン抽出物 (CSHE) において、関連遺伝子の発現への影響、抑制メカニズム、有効性を示す成分の探索を試みた。

4-2. 実験方法

4-2-1. サンプルの調製

これまでに報告したとおり、かぼす、ゆず、すだちの柑橘類の抽出物は、それぞれの搾汁後の果皮から調製した²⁵⁾。すなわち、果皮に *n*-ヘキサンを加え、10°C 以下で抽出を行った。抽出液をろ過した後、減圧下で *n*-ヘキサンを除去して、それぞれの抽出物が得られた。抽出物の収率は約 0.5%であった。抽出物はストック溶液として、25-100 mg/mL の濃度で DMSO に溶解させ、細胞培養には DMSO でさらに希釈して適切な濃度で使用した。また、細胞培養の培地への DMSO の最終濃度は 0.1%とした。

4-2-2. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルカラムクロマトグラフィーは、ガラスカラム (HARIO Science : ϕ 20 mm \times 300 mm) に Wakogel C-300 (Fujifilm Wako Pure Chemicals) 30 g を *n*-ヘキサンに懸濁させて充填した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには 2 g の CSHE を使用した。分画は *n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン:酢酸エチル=90:10 (v/v)、*n*-ヘキサン:エタノール=90:10 (v/v)、*n*-ヘキサン:エタノール=50:50 (v/v)、エタノールの順で行った。各溶出溶媒で溶出した画分は 25-35 mL ずつ 50 mL チューブ (TPP) に回収した。回収した各画分は薄層クロマトグラフィーにより成分を確認した。各画分を遠心エバポレーター (CVE-3100; EYELA) で濃縮後、重量を測定し収率を求めた。

4-2-3. LC/MS 解析

LC/MS システムは HPLC (Dionex UltiMate 3000; Thermo Fisher Scientific) と H-ESI ソース (Thermo Fisher Scientific) を備えたオービトラップ質量分析計 (LTQ Orbitrap Velos; Thermo Fisher Scientific) で構成した。Acclaim™ 120 C18 カラム (2 mm I.D. \times 150 mm, 3 μ m; Thermo Fisher Scientific) と移動相

A (0.1% ギ酸、水) および移動相 B (0.1% ギ酸、アセトニトリル) を使用した。クロマトグラフィーのグラジエント条件設定は、B 20% (0 min) → 80% (45 min) → 95% (75 min) → 20% (90 min) とし、流速は 0.2 mL/min とした。カラム温度 40°C、キャピラリー温度 230°C、ソース温度 450°C、電圧 3.5 kV、分解能 15000、質量走査範囲 m/z 80-1000 の条件下においてポジティブイオンモードで MS 分析を行った。

4-2-4. 細胞培養、脂肪細胞への分化とサンプル処理

マウス胎仔由来線維芽細胞株 3T3-L1 (JCRB, lot: 07232012) は、24 ウェルプレート (TPP) に 1.2×10^5 cells/well となるように播種し、500 μ L ずつの 10% FBS (Biowest) /DMEM (Nacalai tesque) で 37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

3T3-L1 細胞がコンフルエントになったのを確認して培地交換を行い、さらに 2 日後に 10 μ g/ml の Insulin (Sigma-Aldrich)、0.25 μ M の Dex (Sigma-Aldrich)、500 μ M の IBMX (Sigma-Aldrich) を添加した培地に交換することで分化誘導処理を行った (分化誘導初日)。分化誘導後 2 日目、4 日目、6 日目にそれぞれ 5 μ g/ml の Insulin を添加した培地に交換し、分化誘導後 8 日目まで培養を続けた。柑橘類ヘキサノ抽出物は 25-100 μ g/mL の濃度になるように培地に添加し、分化誘導初日から分化誘導後 8 日目まで処理した。

4-2-5. 細胞毒性の評価

細胞毒性の評価は MTT 法によって行った。 1.3×10^4 cells/well となるように 24 ウェルプレートに 3T3-L1 細胞を播種し、24 時間培養した。その後、さまざまな濃度の柑橘類果皮ヘキサノ抽出物を添加した培地に交換し、48 時間培養した。各ウェルに 0.5% MTT 溶液 (nacalai tesque) を 50 μ L ずつ添加し、37°C で 4 時間インキュベートした。生成されたホルマザンは酸性 2-プロパノ

ールにより抽出し、抽出液をマイクロプレートリーダー (MPR-A4i; 東ソー) で 550 nm の吸光度を測定することによって細胞毒性を算出した。

4-2-6. オイルレッド O 染色

分化誘導後 8 日目まで培養した細胞を PBS で 2 回洗浄した後、10%のホルマリン溶液を加え室温、遮光で 10 分間固定した。細胞を超純水で 2 回、60% 2-プロパノールで 1 回洗浄した後、フィルターろ過をした 0.2%オイルレッド O (Merck) /60% 2-プロパノール溶液を加え、室温、遮光で 30 分間染色した。細胞を 60% 2-プロパノールで 1 回、超純水で 2 回洗浄した。超純水を張ったまま光学顕微鏡 (CKX41/IX2-SL; OLYMPUS) で細胞を撮影した。超純水を除去し、60°Cの乾燥機でプレートを完全に乾燥させた後 100% 2-プロパノールで色素を抽出した。抽出液はマイクロプレートリーダーで 550 nm の吸光度を測定した。

4-2-7. RNA-seq ライブラリーの調製とシーケンシング

対数増殖中の細胞、分化誘導後 8 日目まで培養した細胞、分化誘導処理と CSHE 処理を行った 8 日目の細胞から TRIzol (Invitrogen) を使用し、プロトコールにしたがって total RNA を抽出した。次世代シーケンシングとデータ解析は(株)理研ジェネシスに依頼した。RNA-seq ライブラリー調製には Illumina TruSeq Standard mRNA Library Prep Kit (Illumina) を使用した。磁気ビーズが付いた oligo dT により total RNA から mRNA を精製した。精製した mRNA を断片化した後、ランダムプライマーを用いた逆転写により cDNA を合成した。さらにこの cDNA を鋳型とし、Polymerase I により 2 本鎖 cDNA を合成した。合成した 2 本鎖 cDNA の 3'末端に dATP を付加した後、Index アダプターを付加した。これを PCR により増幅させ、RNA-seq ライブラリーを調製した。調製したライブラリーは Illumina NovaSeq. 6000 (Illumine) により 150 bp のペアエンドで配列を読んだ。

4-2-8. トランスクリプトーム解析 (RNA-Seq)

付加した Index アダプター配列およびクオリティーの低い配列は cutadapt ソフトウェア (v1.2.1) を使用してリードから取り除いた⁹¹⁾。さらに、3'末端が poly-A/T である配列も PRINSEQ ソフトウェア (V0.19.2) を使用してリードから取り除いた⁹²⁾。TopHat ソフトウェア (v2.0.13) を使用してマウス GRCm38/mm10 リファレンスゲノムにリードをマッピングし⁹³⁾、Cufflinks ソフトウェア (v.2.2.1) によりリードカウントと遺伝子発現量を求めた⁹⁴⁾。なお、遺伝子発現量の定量は、既存アノテーションと新規アノテーションを Cuffmerge コマンドでマージしたデータを使用して行った。さらに Cuffquant コマンドで FPKM 値を算出し、Cuffdiff コマンドで発現変動遺伝子を検出した。パスウェイ解析は $\log_2FC > 1.6$ を満たす遺伝子を発現変動遺伝子 (DEG: differentially expressed gene) とし、iPathwayGuide (Advita Bioinformatics) ソフトウェアを使用して行った⁹⁵⁾。Venn 図の作成および DEG のオーバーラップの算出は VennDiagram ソフトウェア (v1.6.20) と統計ソフト“R” (v4.1.0) を用いて実施した。

4-2-9. 統計処理

数値は平均値と標準偏差 (SD) で記載した。数値は一元配置分散分析に基づいて、Tukey-Kramer の多重比較解析を統計ソフト“R”を用いて実施した。それぞれの処理群における p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありとした。

4-3. 結果

4-3-1. 柑橘類のヘキササン抽出物の細胞生存率への影響

柑橘類ヘキササン抽出物の細胞生存率への影響を調べるために、終濃度 25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の柑橘類ヘキササン抽出物で処理時の細胞生存率を MTT アッセイ法により評価した。その結果、*C. sudachi*を除くその他の抽出物においては、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで細胞毒性は観察されなかった（図 4-1A）。その後の実験は、すだちヘキササン抽出物は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を処理の上限とし、その他は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理を上限として実施した。

4-3-2. CSHEの脂肪細胞の分化における脂肪滴蓄積の影響

柑橘類のヘキササン抽出物が脂肪細胞の分化におよぼす影響を調べた。コンフルエント後の3T3-L1細胞を、最終濃度50、または100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の柑橘類ヘキササン抽出物で8日間処理を行った。その結果、図4-1Bに示すようにCSHEの処理では、オイルレッドO染色によって赤く染色された脂肪滴はほとんど確認されなかった。さらに、オイルレッドOの定量化を行った結果、CSHE処理のみで脂肪細胞の分化における脂肪滴の蓄積が抑制されたことが明らかになった（図4-1C）。さらに、CSHEには処理濃度依存的（25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に脂肪滴の蓄積を抑制する作用があった。

4-3-3. CSHEは脂肪細胞の分化における遺伝子発現の変動

3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化において、CSHEは脂肪滴の蓄積を抑制することが明らかとなった。そこで、分化誘導後8日目の細胞から、total RNAを抽出し、これを用いたRNA-Seq解析を実施し、CSHE処理の有無における遺伝子発現の差異を評価した。その結果、3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化において、4,669遺伝子の発現変動が観察された。そして、CSHE処理により1,838遺伝子の発現が変動し、脂肪細胞への分化誘導と共通した1,180遺伝子発現の増減変化が確認

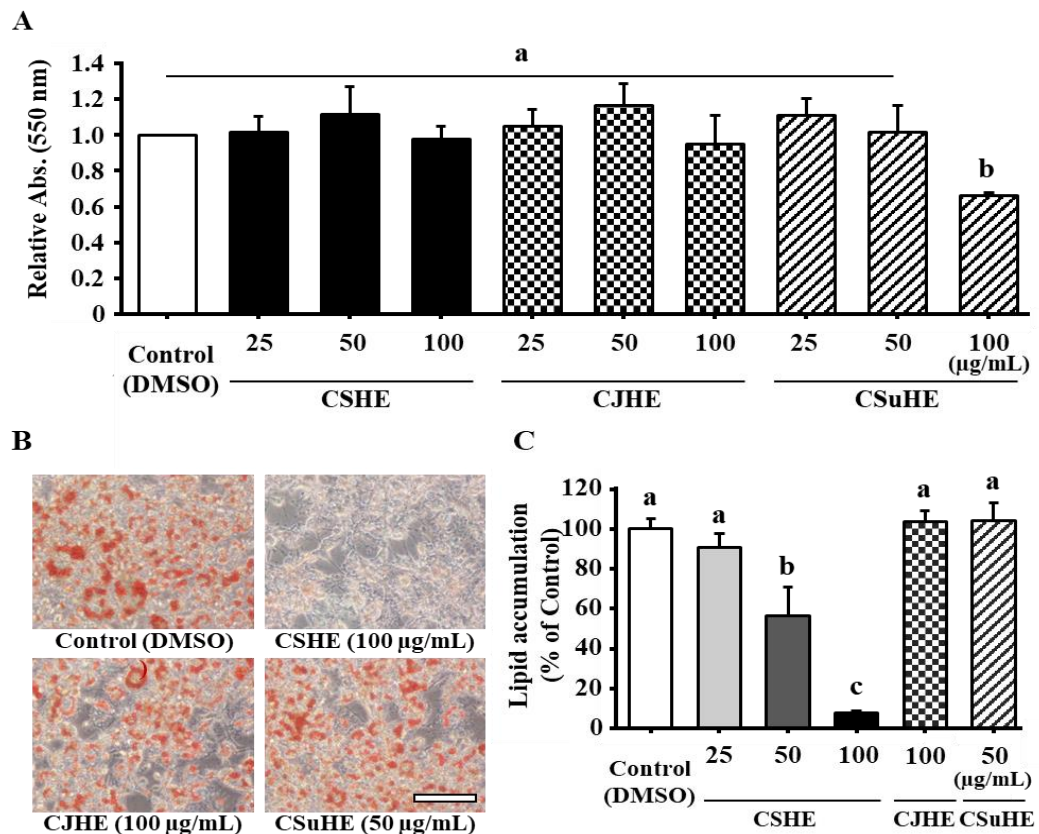


図4-1. 柑橘類ヘキサン抽出物の処理による細胞生存率と脂肪細胞の分化への作用

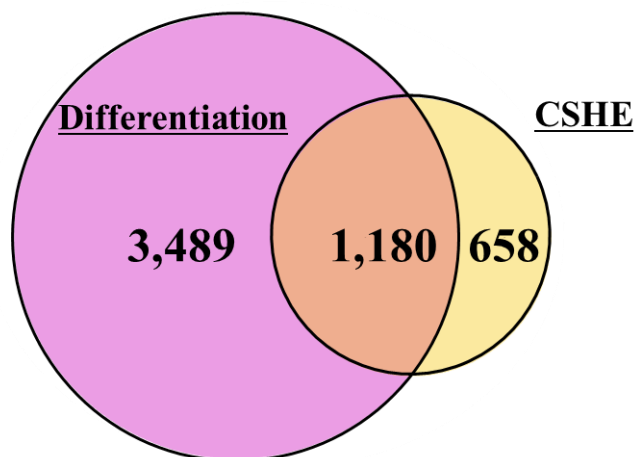
- A: それぞれの抽出物処理後に細胞生存率はMTTアッセイで評価した。CSHE, CJHEとCSuHEは、それぞれかぼす、ゆず、すだちヘキサン抽出物を示す。
- B: それぞれの抽出物の処理における3T3-L1脂肪細胞での脂肪滴の蓄積を示したイメージ。スケールバーは200 μm 。
- C: BのイメージとCSHEの濃度依存的処理における脂肪滴の蓄積の定量解析。全ての値は、平均値と標準偏差で示した ($n=3$)。MTTアッセイとオイルレッドO染色における統計処理は、Tukey-Kramer法で評価した。異なる文字は各処理群において、有意差あり ($p < 0.05$) を示す。

された (図4-2A)。さらに、CSHE処理は脂肪細胞の分化や糖代謝に影響するいくつかのパスウェイに変化を与えた (図4-2B, C)。脂肪細胞の分化にもかかわらず、CSHE処理はphosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK1) の発現を著しく減少させた。さらに、cAMPを5'-AMPに変換するphosphodiesterase 3B (PED3B) の発現が減少し、インスリンシグナル経路の上流に位置し、phosphatidylinositol diphosphateを3リン酸に変換するphosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) の発現を増加させた。また、脂肪の β 酸化において、アシルCoAをcarnitineと結合させ、ミトコンドリア内に輸送するcarnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1) の発現が増加し、転写コアクチベーターであり、エネルギー生産の制御を行うperoxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) の発現の増加が確認された。

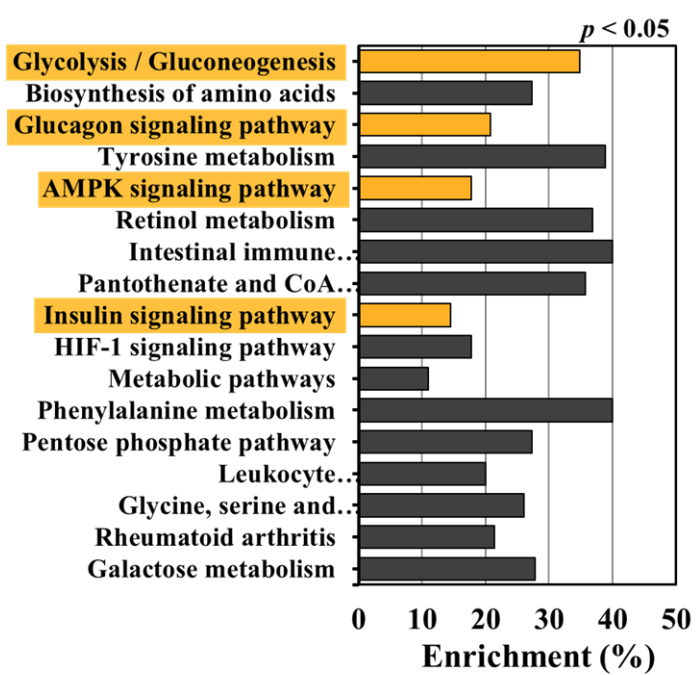
4-3-4. *n*-ヘキサン/エタノールで溶出したCSHE画分の成分分析

候補化合物を特定するために、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによるCSHEの分画を行い、得られた画分を3T3-L1脂肪細胞でオイルレッドOアッセイを実施した。得られた各画分の溶出溶媒と収量を表4-1に示した。図4-3Aに示すように、他のフラクションと比較して、*n*-ヘキサン/エタノール=9:1(v/v)で溶出した画分C (No. 17~26) は、3T3-L1での脂肪滴の蓄積を抑制した。続いて、フラクションNo.17~26の詳細分析において、フラクションNo.21~23で抑制効果が観察され、最終的にフラクション23が脂肪滴の蓄積を強く抑制していることが確認された (図4-3B, C)。また、フラクション23に含まれる成分は、抽出物全体の約2.5-3.0%を占めていた。これらの結果から、フラクション23には、揮発しやすい化合物に比べて極性の高い化合物が含まれており、それらが3T3-L1脂肪細胞への脂肪滴の蓄積を抑制していると推定した。

A



B



(次ページへ続く)

C

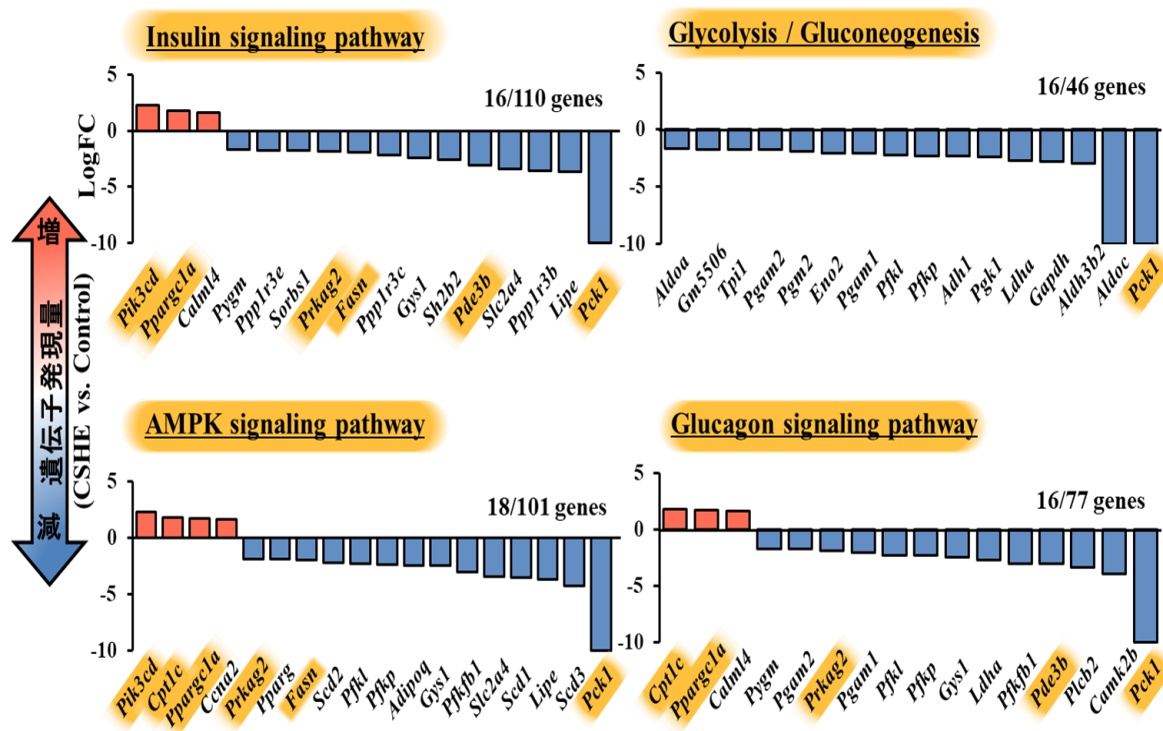


図4-2. トランスクリプトーム解析によるCSHEの脂肪細胞の分化への影響

遺伝子発現のlogFCは、未分化系と分化系コントロール（0.1%DMSO処理）および分化コントロールと50 μ g/mLのCSHE処理を行った分化系で算出した。下流解析において、logFC > 1.6の絶対値を遺伝子の発現変化（DEG）と定義した。

A: 比較した群から得られたDEGの重なりを示したVenn図。

B: CSHE処理において、検出されたDEGの割合が高く、iPathwayGuideによる解析から検出されたパスウェイの一覧。

C: iPathwayGuideより検出され、脂質代謝に関連性が高いパスウェイにおけるCSHE処理による遺伝子の発現の変化。

表4-1. CSHEから溶媒により分画された各フラクションの収量

Fr. Group (No.)	溶出溶媒	抽出物の収率: mg
A (1-6)	<i>n</i> -Hexane = 100	1448 (72.4 %)
B (7-16)	<i>n</i> -Hexane : Ethyl acetate = 90 : 10 (v/v)	280 (14.0 %)
C (17-26)	<i>n</i> -Hexane : Ethanol = 90 : 10 (v/v)	70 (3.5 %)
D (27-30)	<i>n</i> -Hexane : Ethanol = 50 : 50 (v/v)	20 (1.0 %)
E (31-34)	Ethanol = 100	n.d.

* CSHE 2.0 gを処理した。

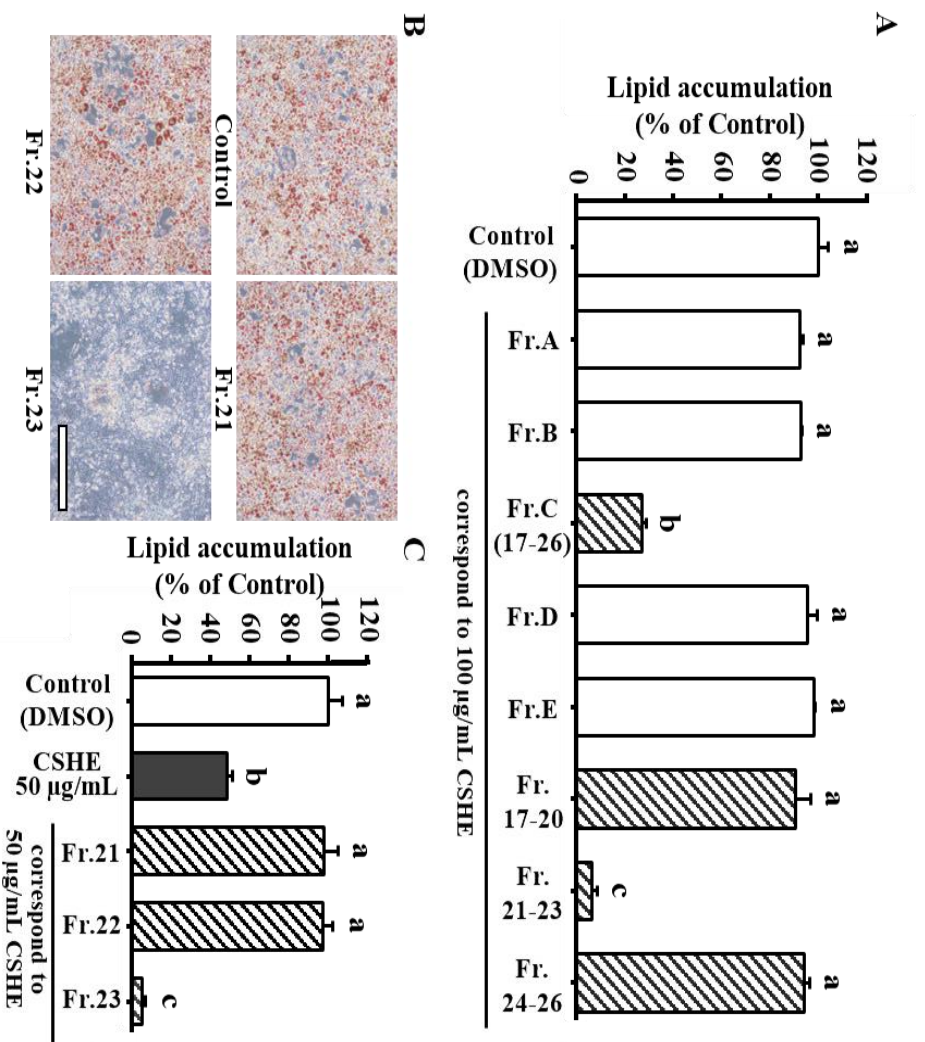


図4-3. CSHEの画分で処理した3T3-L1脂肪細胞における脂肪滴の蓄積

A: CSHEの画分で処理した3T3-L1脂肪細胞での脂肪滴蓄積の定量解析。

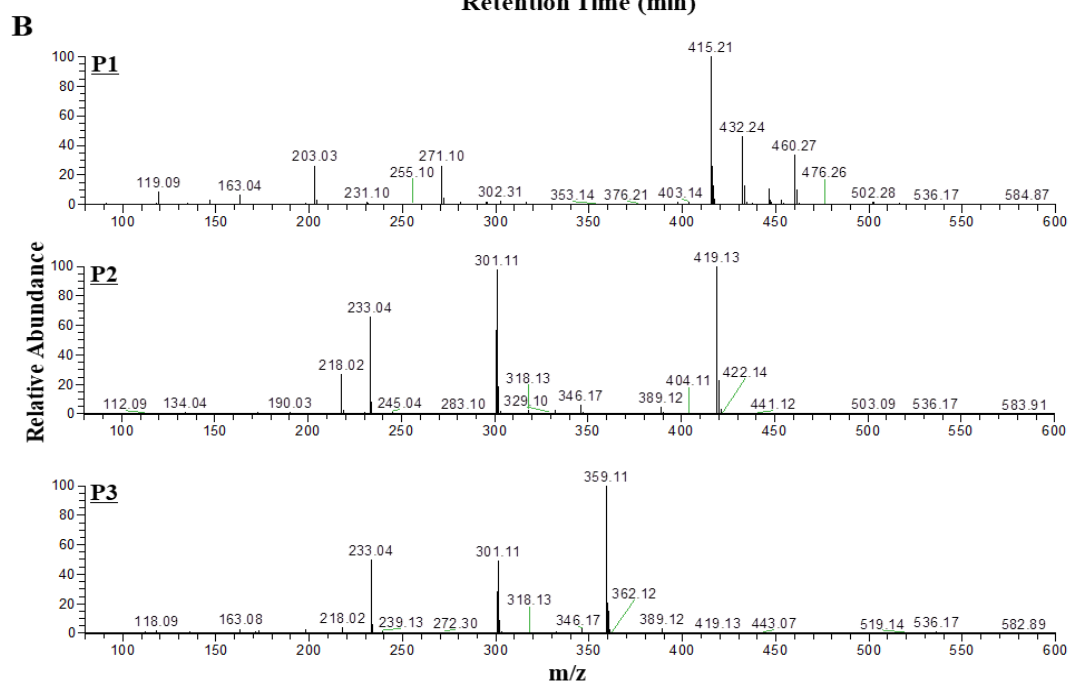
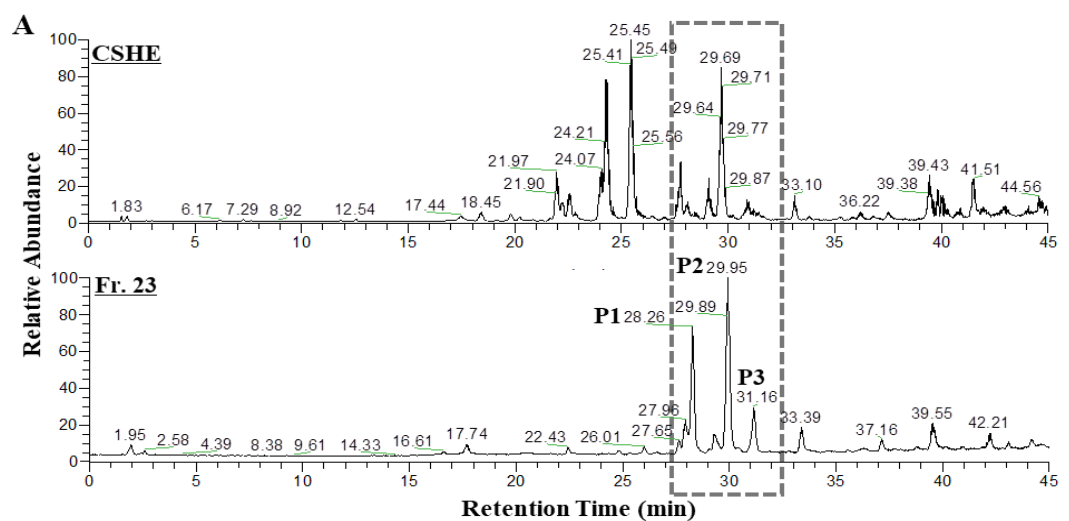
全ての画分の処理濃度は100 µg/mL。値は平均値と標準偏差で示した (n=2)。

B: フラクシヨン21-23の処理における3T3-L1脂肪細胞での脂肪滴蓄積を示したイメージ。スケールバーは800 µm。

C: フラクシヨン21-23で処理した3T3-L1脂肪細胞での脂肪滴蓄積の定量解析。処理濃度は、CSHEの50 µg/mLに相当する。値は平均値と標準偏差で示した (n=3)。統計処理はTukey-Kramer法で評価した。異なる文字は各処理群において、有意差あり ($p < 0.05$) を示す。

4-3-5. CSHEに含まれるヒドロキシル化PMFsの分析

候補成分を探索するために、脂肪滴の蓄積を抑制する成分が含まれるフラクション 23 を LC/MS を用いて、解析を行った。その結果、フラクション 23 の TIC クロマトグラムには、破線で囲った CSHE に含まれる化合物のピークが検出され、主な 3 つのピークを確認した。P1、P2、および P3 のリテンションタイムは、それぞれ 28.26、29.95、31.14 であった (図 4-4A)。さらに、P1、P2 および P3 に対応するこれらの主要なイオンピークに関する情報は LC/MS 分析によって取得された。P1、P2 および P3 のプレカーサーイオンピーク $[M+H]^+$ は、それぞれ m/z 415、419 および 359 の陽イオンモードで検出された (図 4-4B)。それゆえに、P1、P2 および P3 の分子量は、過去の柑橘類の成分としての報告⁸⁶⁾と ChemSpider (www.ChemSpider.com) や FooDB (www.foodb.ca/) の化学データベースを照らし合わせて 414、418、358 とそれぞれを決定し、これら 3 つの化合物の構造を決定また推定を行った。まず、P1 は *Citrus. junos* および *C. sudachi* のヘキサン抽出物でも検出され、本実験の *Citrus. Sphaerocarpa* ヘキサン抽出物に特異的なピークではないため、 β -シトステロールと断定した。次に、P2 と P3 は、それぞれテトラ (P3) とヘキサメトキシ型 (P2) のヒドロキシル基を持つ PMF であると推定した (図 4-4C)。



(次ページへ続く)

C

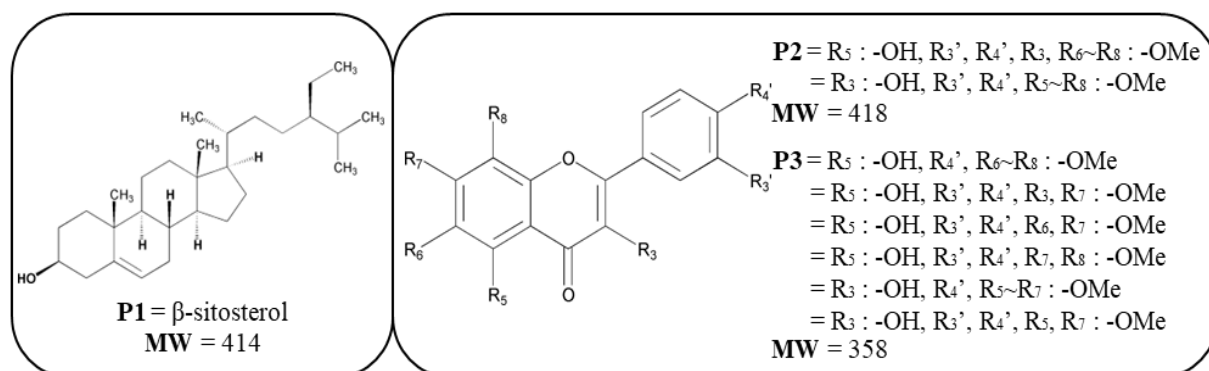


図 4-4. LC/MS 解析による CSHE とフラクション 23 の TIC クロマトグラムと推定された P1,P2,P3 化合物

A: CSHE とフラクション 23 の TIC クロマトグラム。P1, P2, P3 の 3 つのピークのリテンションタイムは、それぞれ 28.26, 29.95, 31.14min (フラクション 23 の灰色の点線内)。

B: P1, P2, P3 それぞれのマスペクトル ; 検出された生成ポジティブイオンは、P1... m/z 203, 271, 415、P2... m/z 233, 301, 419、 P3... m/z 233, 301, 359

C: P1, P2, P3 の推定化学構造

P1 はβ-sitosterol で、多くの植物体に含まれるステロール化合物である。

P2 はヒドロキシル化ヘキサメトキシフラボンで一つのヒドロキシル基と 6 つのメトキシ基を持った PMF 構造である。

P3 はヒドロキシル化テトラメトキシフラボンで一つのヒドロキシル基と 4 つのメトキシ基を持った PMF 構造である。

4-4. 考察

本研究において、日本を代表する柑橘類であるゆず、すだち、かぼすの果皮から *n*-ヘキサン抽出物を調製し、脂肪細胞の分化における抗肥満作用の評価を行った。その結果、脂肪細胞に分化誘導した3T3-L1細胞において、CSHEが特異的かつ濃度依存的に脂肪滴の蓄積を抑制することを発見した (図4-1B, C)。CSHEの主な成分は、D-limonene、 β -myrcene、 γ -terpineneなどの低極性で揮発性の高い成分が検出され⁹⁶⁾、約85%以上を占めていた (データ省略)。一方、CSHEの脂肪滴の蓄積の抑制作用はこれらの主な成分ではなく、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて *n*-ヘキサン：エタノール=9:1 (v/v) で溶出される極性を持つ化合物であった (図4-3)。柑橘類の果皮に含まれる脂溶性成分として、トリアシルグリセロール、脂肪酸、植物ステロール、カロチノイド、トコフェロール、そしてフラボノイド類が知られている。フラボノイド化合物では、メトキシ基がフラボン骨格に結合しているPMFが報告されており、例えば、nobiletin、tangeretin、およびsinensetinが含まれる^{30,97-99)}。最近の研究では、nobiletinが脂肪分解を促進し、cAMP response element binding protein (CREB) の活性化とPPAR γ のダウンレギュレーションを通じて3T3-L1の脂肪細胞への分化を抑制し、高脂肪食誘発性肥満マウスの肥満とインスリン抵抗性を改善することが報告されている¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾。また、同様にtangeretinは3T3-L1において、C/EBP α , C/EBP β , そして PPAR γ の発現をダウンレギュレートさせ、脂肪生成を阻害する報告もある¹⁰³⁾。さらに、SawamotoらはHMFによる脂肪生成の阻害のモデルを提案として、7つのメトキシ基が結合したHMFが、細胞内でcAMPを5'-AMPに変換するPDE3Bを阻害し、cAMPの濃度を増加させることによってPKA/AMPKシグナル伝達経路を活性化させ、そして、C/EBP α やPPAR γ などの脂質生成の転写因子を減少させ、adiponectinやperilipinなどの脂肪生成マーカーの発現も低下させて、脂肪生成が抑制されることを提案した⁸⁹⁾。以上の報告をもとに、CSHEから分画されたフラクション23には抗肥満作用を示すPMFsが含有されている

と予測していた。しかしながら、フラクション23には、nobiletinやtangeretinは含まれず、ヒドロキシル基が結合して極性がさらに高いPMFsが含まれている結果が得られた。過去の報告と今回の結果から、フラクション23に含まれるヒドロキシル化PMFsは、ヒドロキシル基がフラボン骨格のR3またはR5位に結合し、さらにR3'-R8の位置に4つと6つのメトキシ基が結合した化学構造であると考えられた (図4-4C)。Laiらは、nobiletinがほとんど含まれていないヒドロキシル化PMFs のサンプルを用いて、3T3-L1細胞におけるAMPK シグナル伝達経路の活性化を確認し、さらに、高脂肪食誘導させた肥満マウスの試験において、体重および内臓脂肪の減少や脂肪肝の抑制を報告している⁹⁰⁾。本研究において、同様にヒドロキシル化PMFsを含むフラクション23が3T3-L1の脂肪滴の蓄積を抑制し、Laiらの処理濃度 ($> 10 \mu\text{g/mL}$) より低濃度 ($< 2 \mu\text{g/mL}$) で作用が確認された⁹⁰⁾。今後の検討において、フラクション23に含まれる活性成分をそれぞれ単離して、成分の同定と細胞評価を進めていく必要がある。さらには、同定された成分が単独で、または、相乗して抗肥満作用を発現しているのかを明確にする必要もある。

脂肪細胞の分化と脂肪滴の蓄積の抑制に関連する遺伝子発現の変化を分析するために、3T3-L1 脂肪細胞でトランスクリプトーム解析を実行した。分化誘導 3T3-L1 脂肪細胞と 3T3-L1 前駆脂肪細胞を比較すると、4669 遺伝子の発現の変化が検出された。そして、分化誘導に CSHE 処理を行うと 1180 遺伝子の発現変化が確認された (図 4-2)。CSHE 処理による遺伝子の発現変化から、図 4-5 に脂肪生成の抑制に関するモデルを提案した。このモデルでは、カスケードの上流に位置する PI3K の発現増加と下流の PEPCK1 の発現低下を示している。PEPCK1 は糖新生の調節の主要な律速点であり、TCA cycle から産生される oxaloacetic acid (OAA) から phosphoenolpyruvate (PEP) の形成を触媒することが知られる¹⁰⁴⁾。すなわち、PEPCK1 の発現が大幅に減少すると、OAA から PEP への変換が停滞し、解糖/糖新生が阻害されることになる。さらに、脂肪生

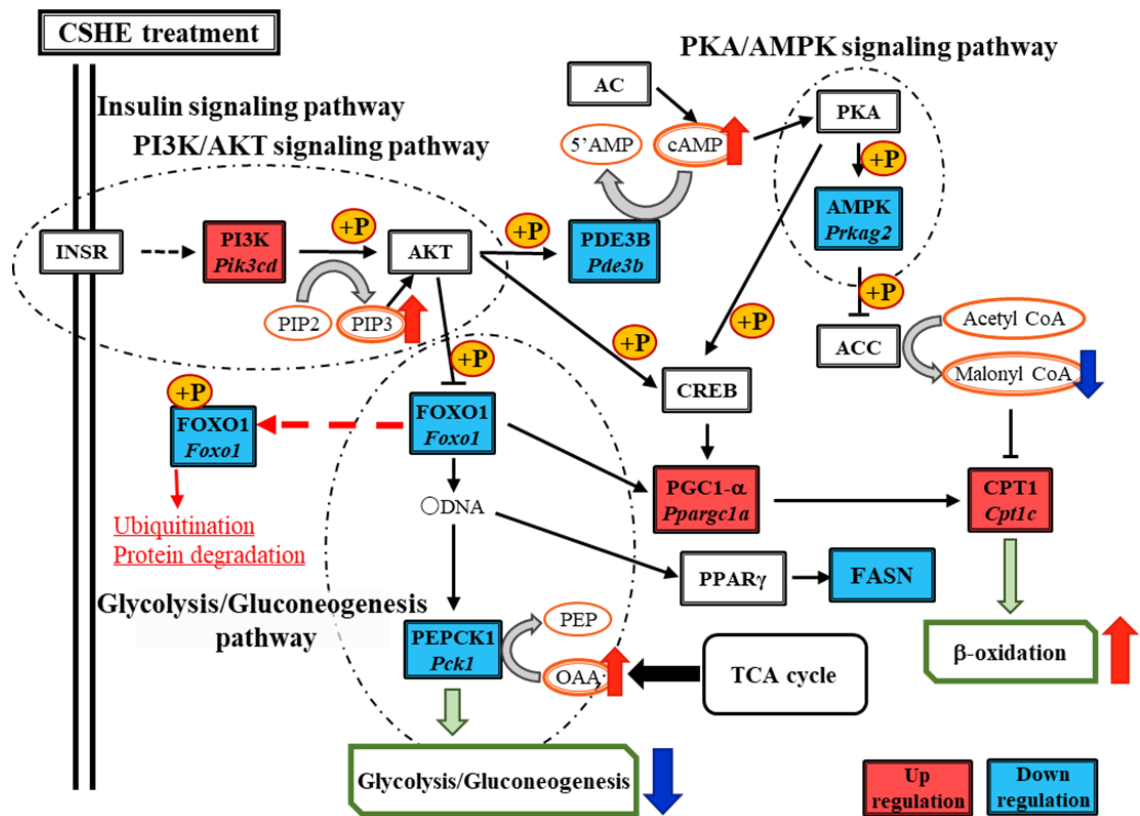


図 4-5. CSHE 処理による脂肪生成の抑制の提案モデル

成の抑制における PMF の分子標的として知られている PDE3B の発現も減少していた^{89,90)}。cAMP の 5'-AMP への変換の減少による cAMP の増加は、PKA/AMPK シグナル伝達経路の活性化を引き起こし、さらに、AMPK からのリン酸化による ACC の不活性化が malonyl CoA の産生を減少させ、β酸化を促進する CPT1 の発現を増加させると予測した。そして、β酸化により生成され、malonyl CoA に変換されない acetyl CoA が TCA 回路に取り込まれ、OAA との反応によりクエン酸が合成されることが考えられる。さらに、インスリンシグナル伝達経路における PI3K の発現の増加は、phosphatidylinositol diphosphate (PIP2) から phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP3) への変換を促進し、PI3K/Akt シグナル伝達経路は Akt の PIP3 によるリン酸化により活性化されると推測された。糖新生は Akt のリン酸化による forkhead box protein O1 (FOXO1) の不活性化により阻害されることが報告されてきた¹⁰⁵⁾。つまり、活性化された Akt によってリン酸化された FOXO1 は、核から細胞質に移行されるので PEPCK1 の発現を増強できない。さらに、PGC1-αは主に CREB によってアップレギュレーションされ、CPT1 の発現の増加を引き起こすと考えた¹⁰⁶⁾。この分析では、精製された個々の成分の代わりにかぼす由来のいくつかの成分を含む未精製の抽出物を使用して、脂肪生成の抑制にかかわる遺伝子発現の変化と関連する伝達経路の一連の情報を取得できた。それゆえ、他の天然物やそれらの抽出物についても同様に分析することで、このような情報を得ることができると思われる。私たちの結果を裏付けるために、将来的には、関連する個々の遺伝子の発現の変化、カスケードでのリン酸化による調節、および下流に位置する脂肪生成関連因子などの発現を解析する必要がある^{75,89)}。そして、得られた結果が作用機序や CSHE、言い換えればヒドロキシル化 PMF が作用する分子標的を明らかにするであろう。

現在、食生活と生活習慣病との関連性は非常に密接である。そのため、食事による病気の予防が不可欠であり、食経験のある植物を原料とした天然物由来の

成分は、毒性が少なく安全に摂取できる機能性成分として需要が高まっている。
このような背景のもと、さらに研究を進め、研究成果を反映した天然素材を提供
していく必要がある。

5. 総括

食品産業から発生する未利用資源の活用を目的とし、製油工程および農産物加工における未利用資源を用いて、新たな食品・食品素材の創出を行った。また、これらの外観や嗜好性だけでなく、秘められている生理機能性についての評価を実施した。

本研究において、まずは辻製油株式会社の根幹事業である食用油脂製造の精製工程から発生する脱臭スカムの有効利用を検討し、評価した。油脂の脱臭工程から発生する脱臭スクムは、油糧植物原料由来の油溶性化合物として、Toc (5-10%)をはじめ、植物ステロール (18-25%)、脂肪酸 (30-35%)、炭化水素族 (10-15%)などで構成される。微量栄養素である Toc が濃縮されて多く含まれることから、一部はビタミン E の製造原料としての販売もあった。また、食品の一次機能として、植物油脂はビタミン E を効率よく摂取する食品として知られるが、実際は製造工程で過半数以上のビタミン E が除去されている。そこで、脱臭スクムを回収し、原油に添加循環させて、精製条件の検討を重ねた結果、通常の製品と比較して Toc の同族体組成比を変えずに 3 倍以上高含有されるキャノーラ油を開発製造することが可能となった。植物油に含まれる Toc は、生体内での抗酸化活性が高いとされる α 体よりも γ 体が組成的に多く含まれる。ビタミン E としての生体機能性の価値は α 体のみとされていたが、近年の研究報告などで、 γ 体の特異的な機能性として体内から Na 排泄の促進作用が報告されていた²¹⁻²³⁾。そこで、Toc 含有量を高めたキャノーラ油を高塩分食で飼育を続けたラットに 28 日間摂取させ、 γ -Toc の長期摂取においても過剰に摂取された食塩を尿中排泄させることが可能であるか評価を行った。しかし、過去に報告されたラットへの γ -Toc の単回投与 (44.4 mg/kg) の結果とは異なり、尿量の増加は見られなかったものの、過剰に摂取された食塩の体内外への出納量はほぼ同量であり、排出が亢進される結果ではなかった。Toc の摂取形態などの実験手法の違いはあるが、詳細に見直し再評価をすることも必要であると思われる。しかし、Toc を連続

的、長期間摂取したラットの血液検査から高食塩の影響で上昇したと考えられる血糖値の低下が見受けられる結果が得られた。食餌からの消化吸収により血中で上昇する血糖はインスリン刺激応答により細胞内に取り込まれるが、応答性が低下すると高血糖状態が維持され、糖尿病への疾患となる。解釈が複雑ではあるが、インスリン応答と細胞内への糖の取り込みに関する研究報告をあわせて考察するに^{43,44)}、食塩ストレスで上昇した血糖が Toc の摂取効果によりインスリン応答性を改善し、細胞内への糖の取り込みを促進させた可能性が考えられた (図 5-1)。今後さらなる検証やメカニズムの解明が必要であるが、Toc が食生活の乱れから生じる高血糖状態を改善し、糖尿病の予防に有効である作用が期待される。また、Toc だけでなく、脱臭スカムを活用したこの油脂は、 β -sitosterol をはじめとする植物ステロールや squalene などの炭化水素も多く含まれる。これらの成分についても、植物ステロールの摂取による中性脂肪や総コレステロールの低下作用や神経変性疾患への改善報告などの機能性が報告され、また、squalene の皮膚や肌への保湿・潤いのエモリエント効果や生体内での活性酸素消去能によるパーキンソン病に対する作用が研究されている¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾。本研究では、Toc の機能性に注目して評価を進めたが、植物由来の他の成分による作用や Toc との相乗効果などが生体でいくつかの機能性作用を発現する可能性がある。現在、脱臭スカムは辻製油(株)の油脂製造からは約 10 t/月が排出されており、脱臭スカムをさらに利活用した製品の研究開発を実施し、さまざまな機能性を評価した結果を報告していくことは興味深い。

次に製油業で培った抽出技術を用いて、農産物加工で発生する未利用資源から天然抽出物の創出を行った。得られたショウガ由来と柑橘類由来のヘキササン抽出物は、それぞれの原料に由来して特徴的で力価の強い香気を有するので、食品の風味や香りの付加向上としての用途需要はあるが、香気に係る成分以外の成分も多く抽出されているため、これらの機能性の探索評価を実施した。その結果、ショウガヘキササン抽出物では、中枢神経系において脳機能に係るモノアミン神

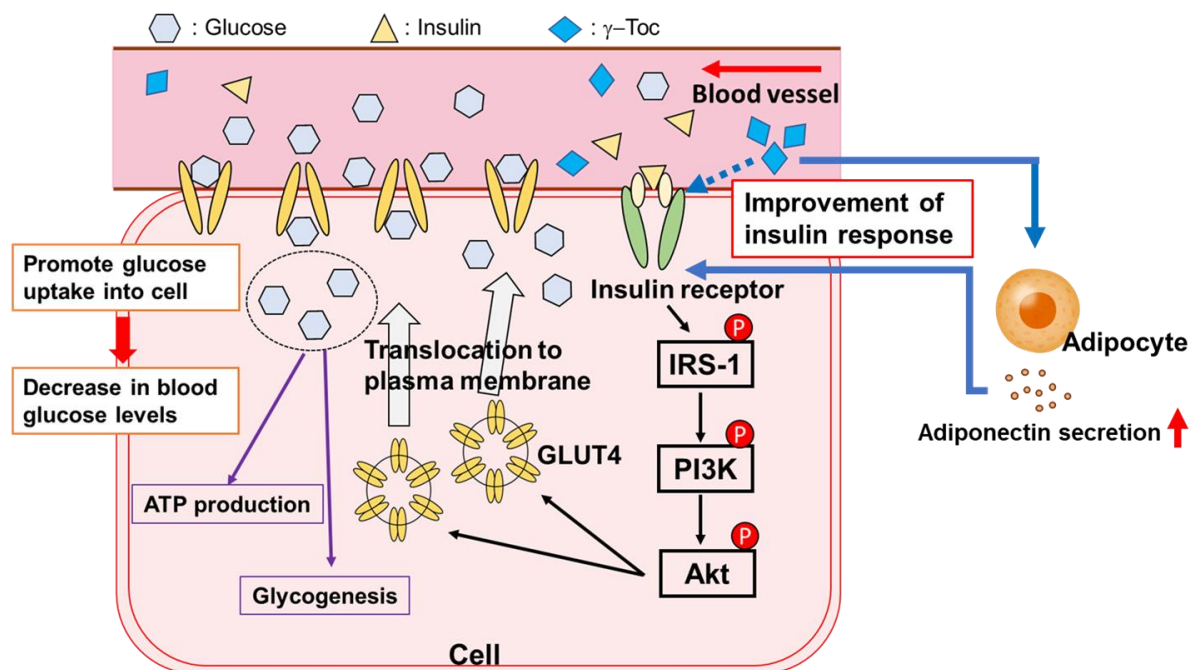


図 5-1. インスリン受容体を介した細胞内への糖の取り込みにおける γ -Toc の推定作用

食塩ストレスによりインスリン抵抗性が上がるが、血流を流れる γ -Toc の作用によりインスリン抵抗性が改善される。 γ -Toc がインスリン受容体に直接作用するか、または、間接的に脂肪細胞から adiponectin の産生を促進させることで細胞内への糖の取り込みが増加すると考えられる。

経伝達物質の酸化を触媒する酵素群 MAO に対する強い阻害活性が見出された。2 つの酵素 MAO-A と MAO-B における活性阻害能が見られたが、MAO-A 阻害については抽出物に含まれる gingerol 類の作用であり、柑橘類に含まれる auraptene も同様の阻害能を有することが報告されている⁵⁵⁾。また、MAO-B に対しては、MAO-A に作用せずに特異的に作用する成分が確認され、構造解析の結果、1-dehydro-[6]-gingerdione と diacetox-[6]-gingerdiol の成分が決定された。特に前者はきわめて低い濃度においても、MAO-B への阻害作用を持ち、基質特異性が高いため、選択的な作用として有効性が期待できる。この結果は、*in vitro* における酵素反応への直接阻害を確認したものであるため、今後は、神経細胞を用いた培養系における評価、さらにマウスなどの試験動物を用いた *in vivo* 評価系での作用発現の確認が必要である。また、この化合物の含有量は微量であるが、gingerol から派生する化合物であるため、抽出物に含まれる 6-gingerol の炭素鎖の脱水反応さらに 2 級水酸基を酸化してケトン基に変換し¹¹¹⁻¹¹³⁾、目的化合物の含有量を高める食品または創薬への加工技術の検討も進めたい (図 5-2)。さらに、柑橘類の果皮を含む未利用資源から同様なヘキサノ抽出法でいくつかの柑橘類抽出物を調製し、抗肥満作用の評価を実施した。その結果、かぼす抽出物において、分化誘導系脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪滴蓄積の抑制が見出された。柑橘類には、特に果皮部に多種のフラボノイド化合物が存在するという研究報告がされており⁸⁶⁾、nobiletin や tangeretin、そして HMF のようにいくつかのメトキシ基を有する化合物の抗肥満作用の報告が有る^{83,89)}。化合物の骨格となるフラボン自体は作用を持たないが、この骨格にメトキシ基が結合し、さらにヒドロキシル基が結合することでより抗肥満作用が高まる化合物も同定された⁹⁰⁾。また、これら化合物の作用機序は、PKA を介した AMPK の活性化にともない、その下流へのシグナル伝達による脂肪分解経路の促進と報告されている^{88,89)}。本研究の結果において、かぼす抽出物に見られた抗肥満作用における有効化合物はヒドロキシル基を有する PMFs が候補となった。さらに、粗抽

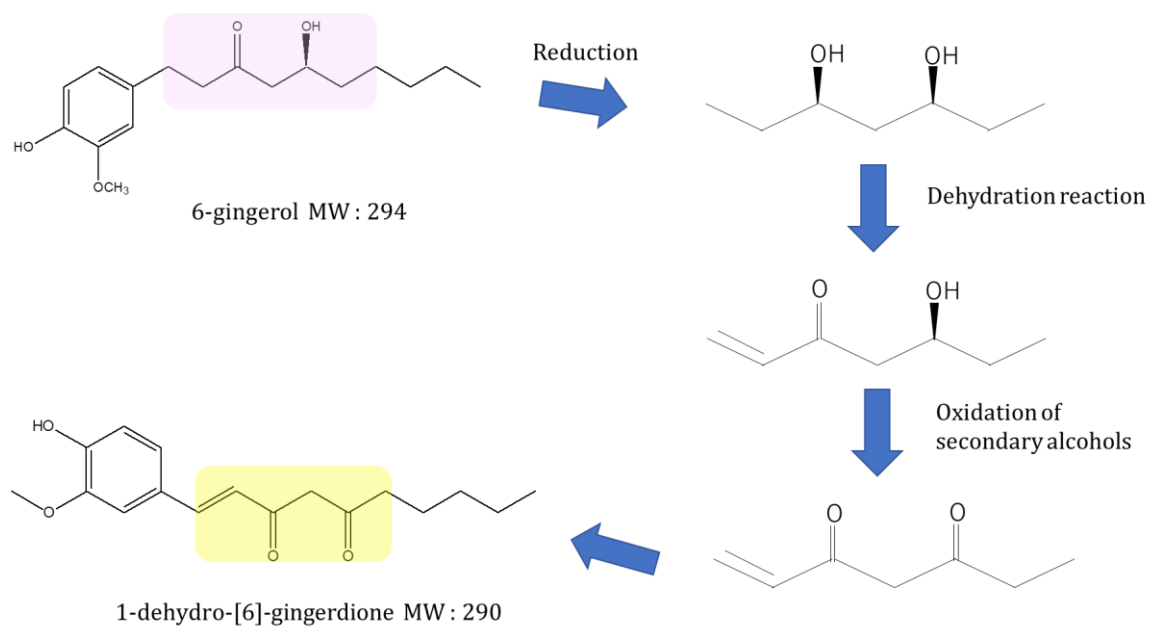



図 5-2. 6-gingerol から 1-dehydro-[6]-gingerdione への変換

抽出物に多く含まれる 6-gingerol の炭素鎖へ脱水反応による二重結合を付加し、さらに二級アルコールとしてのヒドロキシル基を酸化してケトン基に変換する。

出物での評価であるため、単一成分が一つの分子標的のみをターゲットとしているものではない。RNA-Seq 解析の結果より、いくつかの関与する因子が繋がるパスウェイが導かれたとおり、抽出物に含まれるいくつかの成分がそれぞれ異なる箇所作用して、抗肥満作用を発現させたことが考えられる。このように食品素材の評価においては、いくつかの成分が合わさり、主要となる、または、その他の機能性作用が相乗的効果として発現することが期待できる。それゆえに有効性を示す成分の単離、そして、構造決定も重要な検討ではあるが、他の成分と共存した際の機能性作用を評価し、解析を進めることも食品化学・食品機能学の観点からは大切ではないかと考えている。かぼす抽出物に含まれ、抗肥満作用を持つ成分の最終的な決定は、未だ行えていないが、抽出物全体として機能性の発現と作用機序を捉えたアプローチは食品の三次機能を追求するうえでも不可欠なものであると思われる。そして、この研究結果の活用の側面として、例えば、さまざまな柑橘類の未利用資源を用いて、抽出物を同様に調製し、これらの機能性を評価スクリーニングすることで、ある種の柑橘類では抗肥満作用が期待でき、また他種のものでは、骨代謝改善や神経機能の活性化などが期待できる有用性を示した機能性評価マップを作成し、それぞれが特産物として得られる地域に情報還元することで、各地域社会の活性化の一助となれば面白い（図 5-3）。また、天然物から機能性成分を発見することは、その成分の特徴だけを捉えるものではなく、構造活性相関などの情報が引き出され、食品素材から創薬分野にも繋がる価値を持つものと考えられる。

本研究における機能性評価は、食品加工から排出される未利用資源のもつ秘めたる有効性成分を既存製品に添加し、加工を行うことで付加価値を向上させた製品、または、有効成分を含む抽出物として調製し、機能性食品への素材として利活用を目的としたものであった。近年、私たちは第二創業として、社内や県内で発生する食品産業だけに留まらない未利用資源の活用を積極的に進める開発に取り組んでいる。その中で三重県を含む東紀州の山林業・木材加工業から発



	かぼす	ゆず	すだち	温州みかん	甘夏	シークワサー
品種						
産地	大分	高知	徳島	和歌山・静岡	三重	沖縄
機能性	抗肥満作用	抗炎症作用	免疫調節作用	骨代謝改善作用	血流改善作用	抗認知症機能
成分	HPMFs*	auraptene	sudachitin	β -cryptoxanthin	naringin	nobiletin

*HPMFs : hydroxylated polymethoxyflavone

図 5-3. さまざまな柑橘類と期待される生理機能性

生するヒノキの間伐材や木工加工未利用材を使用して、バイオマスボイラーによる熱エネルギー変換により食品加工と農業栽培への光熱エネルギーとして使用している。さらに、ボイラーで木材チップ燃焼を行う前にヒノキの香りを蒸留し精油として得る多段階活用も進めている。そして、得られたヒノキ精油の香りの用途をアピールするだけでなく、ヒノキ成分に秘められた機能性作用の探索についても研究を実施している。先にも述べたが、日本の食糧自給率は 40%未満であり、高度な加工技術を有する先進国であるにもかかわらず国内資源は非常に乏しい。国連サミットより SDGs の宣言により取り組みが推奨される中、あらゆる企業や団体が実践に取り組んでいる^{114,115)}。本研究が食品産業におけるゴール 1:「貧困をなくそう(需要を満たす食品の供給を)」はもとより、ゴール 3:「すべての人に健康と福祉を(食素材に含まれる成分の探求を行い、三次機能としての提供を)」、そして、ゴール 12:「つくる責任、つかう責任(持続可能な消費と生産_未利用資源の最大・最適な活用を図る)」この目標達成のため、短絡的な未利用資源の活用にとどまらず、多段階的かつ最大限の未利用資源の活用計画を図り、その計画をもとに基礎研究からの製品開発、製造技術による付加価値の高い製品の創出や転換につながるものと考えている。

6. 参考文献

- 1) 荒井 綜一：機能性食品 回顧と展望. 化学と生物, 35, 239-244 (1997).
- 2) 荒井 綜一：機能性食品. 日薬理誌, 110, 7-10 (1997).
- 3) 荒井 綜一：鈴木梅太郎とオリザニン その英知と理念が語るもの. 化学と生物, 47, 118-120 (2009).
- 4) 大澤 俊彦：生活習慣病と食品. 化学と教育, 46, 546-549 (1998).
- 5) 渡辺 毅：食と病-生活習慣病を例として. 日本栄養・食糧学会誌, 57, 15-19 (2004).
- 6) Goto, T., Kawada, T.: Life style diseases and functional foods. Clin. Calcium, 26, 453-458 (2016).
- 7) 食品機能性の科学編集委員会 編：「食品機能性の科学」, 産業技術サービスセンター (2008).
- 8) 消費者庁 HP 食品表示企画_特定保健用食品について.
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_for_specified_health_uses/
- 9) 消費者庁食品表示企画課, 「機能性表示食品」って何? (2014).
https://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/about_foods_with_function_claims/pdf/150810_1.pdf
- 10) 農林水産省報告, 令和三年度 食品廃棄物等の年間発生量および食品循環資源の再生利用等実施率について (2021).
<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syokuhin/attach/pdf/kouhyou-2.pdf>
- 11) 門間 美千子：大豆胚軸のプロテインボディ. 化学と生物, 29, 30-31 (1991).
- 12) Wang, Q., Ge, X., Tian, X., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, P.: Soy isoflavone.; The multipurpose phytochemical. Biomed. Rep., 1, 697-701 (2013).
- 13) Nakai, S., Fujita, M., Kamei, Y.: Health promotion effects of soy isoflavones. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 66, 502-507 (2020).
- 14) Muthyala, R.S., Ju, Y.H., Sheng, S., Williams, L.D., Doerge, D.R., Katzenellenbogen, B.S., Helferich, W.G.: Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. Bioorg. Med. Chem., 12, 1559-1567 (2004).

- 15) 小堀 真珠子：ポリフェノール高含有野菜とその応用戦略 -ケルセチン高含有タマネギの健康機能-. オレオサイエンス, 17, 475-481 (2017).
- 16) Kumar, M., Barbhai, M.D., Hasan, M., Punia, S., Dhumal, S., Chandran, D., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Tomar, M., Satankar, V., *et al*: Onion (*Allium cepa* L.) peels: A review on bioactive compounds and biomedical activities. Biomed. Pharmacother., 146, 112498 (2022).
- 17) Mawatari, S., Ohara, S., Taniwaki, Y., Tsuboi, Y., Maruyama, T., Fujino, T.: Improvement of blood plasmalogens and clinical symptoms in parkinson's disease by oral administration of ether phospholipids: A preliminary report. Parkinsons Dis., 2671070 (2020).
- 18) 宮川 高明：「食用油製造の実際」, 幸書房 25-188 (1988).
- 19) 小野 哲夫, 太田 静行：「食用油脂製造技術」, ビジネスセンター 96-229, 287-308 (1991).
- 20) 加藤 保春：油脂製造技術, オレオサイエンス, 1, 779-784 (2001).
- 21) Uto-Kondo, H., Tani, M., Kiyose, C., Usuda M., Taguchi, C., Hasegawa, M., Machida, N., Kishimoto, Y., Saito, H., Ueda, T., *et al* : Gamma-tocopherol accelerated sodium excretion in a dose-dependent manner in rats with a high sodium intake. J. Clin. Biochem. Nutr., 41, 211-217 (2007).
- 22) Saito, H., Kiyose, C., Yoshimura, H., Ueda, T., Kondo, K., Igarashi, O.: Gamma-tocotrienol, a vitamin E homolog, is a natriuretic hormone precursor. J. Lipid Res., 44, 1530-1535 (2003).
- 23) Uto, H., Kiyose, C., Saito, H., Ueda, T., Nakamijra, T., Igarashi, O., Kondo, K.: Gamma-tocopherol enhances sodium excretion as a natriuretic hormone precursor. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 50, 277-282 (2004).
- 24) Kaneoka, H., Ito, S., Araki-Hashikawa, Y., Yano T., Okumura, K., Nishimura, N., Kagotani, K.: Hexane extract of raw ginger enhances adipocyte differentiation through its PPAR γ ligand activity on 3T3-L1 preadipocytes. Jpn. J. Food Chem. Safety, 24, 16-24 (2017).
- 25) Ito, S., Ohmi, A., Sakamiya, A., Yano, T., Okumura, K., Nishimura, N., Kagotani, K.: Ginger hexane extract suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, 779-785 (2016).

- 26) Zang, L., Kagotani, K., Nakayama, H., Bhagat, J., Fujimoto, Y., Hayashi, A., Sono, R., Katsuzaki, H., Nishimura, N., Shimada, Y.: 10-Gingerol suppresses osteoclastogenesis in RAW264.7 cells and zebrafish osteoporotic scales. *Front. Cell Dev. Biol.*, 9, 588093 (2021).
- 27) Yamada, M., Yasuhara, H.: Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology*, 25, 215-221 (2004).
- 28) Choi, Y., Kim, Y., Ham, H., Park, Y., Jeong, H.S., Lee, J.: Nobiletin suppresses adipogenesis by regulating the expression of adipogenic transcription factors and the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Agric. Food Chem.*, 59, 12843-12849 (2011).
- 29) Feng, K., Lan, Y., Zhu, X., Li, J., Chen, T., Huang, Q., Ho, C.T., Chen, Y., Cao, Y.: Hepatic lipidomics analysis reveals the antiobesity and cholesterol-lowering effects of tangeretin in high-fat diet-fed rats. *J. Agric. Food Chem.*, 68, 6142-6153 (2020).
- 30) Yoshizaki, N., Hashizume, R., Masaki, H.: A polymethoxyflavone mixture extracted from orange peels, mainly containing nobiletin, 3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone and tangeretin, suppresses melanogenesis through the acidification of cell organelles, including melanosomes. *J. Dermatol. Sci.*, 88, 78-84 (2017).
- 31) Niki, E., Traber, M.G.: A history of vitamin E. *Ann. Nutr. Metab.*, 61, 207-212 (2012).
- 32) Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe T., Inoue K.: Primary structure of alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 268, 17705-17710 (1993).
- 33) Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H., Inoue, K.: Purification and characterization of the alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBS Lett.*, 288, 41-45 (1991).
- 34) Moriguchi, S., Muraga, M.: Vitamin E and immunity. *Vitam. Horm.*, 59, 305-336 (2000).
- 35) Inagaki, N., Nagai, H., Koda, A.: Effect of vitamin E on IgE antibody formation in mice. *J. Pharmacobiodyn.*, 7, 70-74 (1984).

- 36) Gueck, T., Aschenbach, J.R., Fuhrmann, H.: Influence of vitamin E on mast cell mediator release. *Vet. Dermatol.*, 13, 301-305 (2002).
- 37) Shin, J., Yang, S.J., Lim, Y.: Gamma-tocopherol supplementation ameliorated hyper-inflammatory response during the early cutaneous wound healing in alloxan-induced diabetic mice. *Exp. Biol. Med.*, 242, 505-515 (2017).
- 38) 辻 威彦, 梅本 善明, 松尾 雄志: 反応性の高いジカルボニル基を持つメチルグリオキサール (MGO) の生成と解毒、そして糖尿病合併症. *日本食品化学学会誌*, 28, 39-46 (2021).
- 39) Masterjohn, C., Mah, E., Guo, Y., Koo, S.I., Bruno, R.S.: γ -Tocopherol abolishes postprandial increases in plasma methylglyoxal following an oral dose of glucose in healthy, college-aged men. *J. Nutr. Biochem.*, 23, 292-298 (2012).
- 40) Wang, J.B., Liu, X.R., Liu, S.Q., Mao, R.X., Hou, C., Zhu, N., Liu, R., Ma, H.J., Li, Y.: Hypoglycemic effects of oat oligopeptides in high-calorie diet/STZ-induced diabetic rats. *Molecules*, 24, 558-571 (2019).
- 41) 小川 隆, 吉田 順一, 国場 幸史: 食餌性コレステロール長期負荷によるラット腎臓への影響. *日本腎臓学会誌*, 45, 361-366 (2003).
- 42) Nagao, S., Kugita, M., Kumamoto, K., Yoshimura, A., Nishii, K., Yamaguchi, T.: Increased salt intake does not worsen the progression of renal cystic disease in high water-loaded PCK rats. *PLoS One*, 14, e0207461 (2019).
- 43) Landrier, J.F., Gouranton, E., El Yazidi, C., Malezet, C., Balaguer, P., Amiot, M.J.: Adiponectin expression is induced by vitamin E via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism. *Endocrinology*, 150, 5318-5325 (2009).
- 44) Singh, I., Carey, A.L., Watson, N., Febbraio, M.A., Hawley, J.A.: Oxidative stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells is ameliorated by gamma-tocopherol treatment. *Eur. J. Nutr.*, 47, 387-392 (2008).
- 45) Tanaka-Yachi, R., Takahashi-Muto, C., Adachi, K., Tanimura, Y., Aoki, Y., Koike, T., Kiyose C.: Promoting effect of α -tocopherol on beige adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells and rat white adipose tissue. *J. Oleo Sci.*, 66, 171-179 (2017).

- 46) Radosavac, D., Graf, P., Polidori, M.C., Sies, H., Stahl, W.: Tocopherol metabolites 2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (alpha-CEHC) and 2, 7, 8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (gamma-CEHC) in human serum after a single dose of natural vitamin E. *Eur. J. Nutr.*, 41, 119-124 (2002).
- 47) Galli, F., Lee, R., Atkinson, J., Floridi, A., Kelly, F.J.: Gamma-tocopherol biokinetics and transformation in humans. *Free Radic. Res.*, 37, 1225-1233 (2003).
- 48) Yoshikawa, S., Morinobu, T., Hamamura, K., Hirahara, F., Iwamoto, T., Tamai, H.: The effect of gamma-tocopherol administration on alpha-tocopherol levels and metabolism in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 59, 900-905 (2005).
- 49) 吉川 雅之：ショウガ科の機能成分. *食品と開発*, 46, 8-11 (2011).
- 50) Ali, B.H., Blunden, G., Tanira, M.O., Nemmar, A.: Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 409-420 (2008).
- 51) Dugasani, S., Pichika, M.R., Nadarajah, V.D., Balijepalli, M.K., Tandra, S., Korlakunta, J.N.: Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J. Ethnopharmacol.*, 127, 515-520 (2010).
- 52) Xu, Y., Ku, B.S., Yao, H.Y., Lin, Y.H., Zhan, Y.H., Li, X.J.: The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 518, 40-46 (2005).
- 53) Baliga, M.S., Haniadka, R., Pereira, M.M., D'Souza, J.J., Pallaty, P.L., Bhat, H.P., Popuri, S.: Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51, 499-523 (2011).
- 54) Squires, R.F.: Discovery of monoamine oxidase forms A and B. *Vopr. Med. Khim.*, 43, 433-439 (1997).
- 55) Jeong, S.H., Han, X.H., Hong, S.S., Hwang, J.S., Hwang, J.H., Lee, D., Lee, M.K., Ro, J.S., Hwang, B.Y.: Monoamine oxidase inhibitory coumarins from the aerial parts of *Dictamnus albus*. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 1119-1124

(2006).

- 56) Fleming, S.A., Dyer, C.W., Eggington, J.: A convenient one-step gingerol synthesis. *Synthetic Commun.*, 29, 1933-1939 (1999).
- 57) Charles, R., Garg, S.N., Kumar, S.: New gingerdione from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Fitoterapia*, 71, 716-718 (2000).
- 58) Kikuzaki, H., Usuguchi, J., Nakatani, N.: Constituents of zingiberaceae. I. diarylheptanoids from the rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* ROSCOE). *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 120-122 (1991).
- 59) Semwal, R.B., Semwal D.K., Combrinck, S., Viljoen, A.M.: Gingerols and shogaols : Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, 117, 554-568 (2015).
- 60) Kukula-Koch, W., Koch, W., Czernicka, L., Glowniak, K., Asakawa, Y., Umeyama, A., Marzec, Z., Kuzuhara, T.: MAO-A inhibitory potential of terpene constituents from Ginger Rhizomes-A bioactivity guided fraction. *Molecules*, 23, 1301 (2018).
- 61) Asamenew, G., Kim, H.W., Lee, M.K., Lee, S.H., Kim, Y.J., Cha, Y.S., Yoo, S.M., Kim, J.B.: Characterization of phenolic compounds from normal ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and black ginger (*Kaempferia parviflora* Wall.) using UPLC-DAD-QToF-MS. *Eur. Food Res. Technol.*, 245, 653-665 (2019).
- 62) Hashimoto, Y., Shirakura, K., Okada, Y., Takeda, H., Endo, K., Tamura, M., Watari, A., Sadamura, Y., Sawasaki, T., Doi, T., *et al* : Claudin-5-binders enhance permeation of solutes across the blood-brain barrier in a mammalian model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 363, 275-283 (2017).
- 63) Unno, K., Pervin, M., Nakagawa, A., Iguchi, K., Hara, A., Takagaki, A., Nanjo, F., Minami, A., Nakamura, Y.: Blood-brain barrier permeability of green tea catechin metabolites and their neurotogenic activity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 61, 1700294 (2017).
- 64) Afshin, A., Forouzanfar, M.H., Reitsma, M.B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A.H., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., *et al*.: Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *N. Engl. J. Med.*, 377, 13-27 (2017).

- 65) Malik, V.S., Willet, W.C., Hu, F.B.: Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 16, 615-616 (2020).
- 66) Heindel, J.J., Newbold, R., Schug, T.T.: Endocrine disruptors and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 11, 653-661 (2015).
- 67) Misra, A., Singhal, N., Khurana, L.: Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils. *J. Am. Coll. Nutr.*, 29 (3 Suppl), 289S-301S (2010).
- 68) Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., Czech, M.P.: Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 367-377 (2008).
- 69) Tung, Y.C., Hsieh, P.H., Pan, M.H., Ho, C.T.: Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *J. Food Drug Anal.*, 25, 100-110 (2017).
- 70) Moseti, D., Regassa, A., Kim, W.K.: Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 124-147 (2016).
- 71) Madsen, L., Kristiansen, K.: The importance of dietary modulation of cAMP and insulin signaling in adipose tissue and the development of obesity. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1190, 1-14 (2010).
- 72) Rogne, M., Taskén, K.: Compartmentalization of cAMP signaling in adipogenesis, lipogenesis, and lipolysis. *Horm. Metab. Res.*, 46, 833-840 (2014).
- 73) Petersen, R.K., Madsen, L., Pedersen, L.M., Hallenborg, P., Hagland, H., Viste, K., Døskeland, S.O., Kristiansen, K.: Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 3804-3816 (2008).
- 74) Farmer, S.R.: Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.*, 4, 263-273 (2006).
- 75) Tsai, C.Y., Peh, M.T., Feng, W., Dymock, B.W., Moore, P.K.: Hydrogen sulfide promotes adipogenesis in 3T3L1 cells. *PLoS One*, 10, e0119511 (2015).

- 76) Kim, H., Hiraishi, A., Tsuchiya, K., Sakamoto, K.: (-) Epigallocatechin gallate suppresses the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes through transcription factors FoxO1 and SREBP1c. *Cytotechnology*, 62, 245-255 (2010).
- 77) Moon, H.S., Chung, C.S., Lee, H.G., Kim, T.G., Choi, Y.J., Cho, C.S.: Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. *Obesity*, 15, 2571-2582 (2007).
- 78) Patsalou, M., Samanides, C.G., Protopapa, E., Stavrinou, S., Vyrides, I., Koutinas, M.: A citrus peel waste biorefinery for ethanol and methane production. *Molecules*, 24, 2451 (2019).
- 79) Matsumoto, C., Inoue, H., Tominari, T., Watanabe, K., Hirata, M., Miyaura, C., Inada, M.: Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, suppresses inflammatory osteoclastogenesis and alveolar bone resorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79, 155-158 (2015).
- 80) Sawamoto, A., Okuyama, S., Yamamoto, K., Amakura, Y., Yoshimura, M., Nakajima, M., Furukawa, Y.: 3,5,6,7,8,3',4'-Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, ameliorates corticosterone-induced depression-like behavior and restores brain-derived neurotrophic factor expression, neurogenesis, and neuroplasticity in the hippocampus. *Molecules*, 21, 541 (2016).
- 81) Lai, H.C., Wu, M.J., Chen, P.Y., Sheu, T.T., Chiu, S.P., Lin, M.H., Ho, C.T., Yen, J.H.: Neurotrophic effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone: promotion of neurite outgrowth via cAMP/PKA/CREB pathway in PC12 cells. *PLoS One*, 6, e28280 (2011).
- 82) Kim, J.J., Korm, S., Kim, W.S., Kim, O.S., Lee, J.S., Min, H.G., Chin, Y.W., Cha, H.J.: Nobiletin suppresses MMP-9 expression through modulation of p38 MAPK activity in human dermal fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, 37, 158-163 (2014).
- 83) Hirata, T., Fujii, M., Akita, K., Yanaka, N., Ogawa, K., Kuroyanagi, M., Hongo, D.: Identification and physiological evaluation of the components from citrus fruits as potential drugs for anti-obesity and anticancer. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 25-28 (2009).
- 84) Tung, Y.C., Li, S., Huang, Q., Hung, W.L., Ho, C.T., Wei, G.J., Pan, M.H.:

- 5-Demethylnobiletin and 5-Acetoxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone suppress lipid accumulation by activating the LKB1-AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes and high fat diet-fed C57BL/6 Mice. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 3196-3205 (2016).
- 85) Lim, H., Yeo, E., Song, E., Chang, Y.H., Han, B.K., Choi, H.J., Hwang, J.: Bioconversion of citrus unshiu peel extracts with cytolase suppresses adipogenic activity in 3T3-L1 cells. *Nutr. Res. Pract.*, 9, 599-605 (2015).
 - 86) Li, S., Lo, C.Y., Ho, C.T.: Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4176-4185 (2006).
 - 87) Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., Lee, W.M. : Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.*, 34, 223-227 (2006).
 - 88) Djouder, N., Tuerk, R.D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R.F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R.A., *et al*: PKA phosphorylates and inactivates AMPK alpha to promote efficient lipolysis. *EMBO J.*, 29, 469-481 (2010).
 - 89) Sawamoto, A., Nakanishi, M., Okuyama, S., Furukawa, Y., Nakajima, M.: Heptamethoxyflavone inhibits adipogenesis via enhancing PKA signaling. *Eur. J. Pharmacol.*, 865, 172758 (2019).
 - 90) Lai, C.S., Ho, M.H., Tsai, M.L., Li, S., Badmaev, V., Ho, C.T., Pan, M.H.: Suppression of adipogenesis and obesity in high-fat induced mouse model by hydroxylated polymethoxyflavones. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10320-10328 (2013).
 - 91) Martin, M.: Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17, 10-12 (2011).
 - 92) Schmieder, R., Edwards, R.: Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27, 863-864 (2011).
 - 93) Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L.: TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 25, 1105-1111 (2009).
 - 94) Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., Pachter, L.: Transcript assembly and

- quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.*, 28, 511-515 (2010).
- 95) Draghici, S., Khatri, P., Tarca, A.L., Amin, K., Done, A., Voichita, C., Georgescu, C., Romero, R.: A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Res.*, 17, 1537-1545 (2007).
 - 96) Akakabe, Y., Sakamoto, M., Ikeda, Y., Tanaka, M.: Identification and characterization of volatile components of the Japanese sour citrus fruit *Citrus nagato-yuzukichi* Tanaka. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1965-1968 (2008).
 - 97) Li, S., Yu, H., Ho, C.T.: Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomed. Chromatogr.*, 20, 133-138 (2006).
 - 98) Nakajima, A., Nemoto, K., Ohizumi, Y.: An evaluation of the genotoxicity and subchronic toxicity of the peel extract of Ponkan cultivar 'Ohta ponkan' (*Citrus reticulata* Blanco) that is rich in nobiletin and tangeretin with anti-dementia activity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 114, 104670 (2020).
 - 99) Singh, B., Singh, J.P., Kaur, A., Singh, N.: Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Res. Int.*, 132, 109114 (2020).
 - 100) Saito, T., Abe, D., Sekiya, K.: Nobiletin enhances differentiation and lipolysis of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 357, 371-376 (2007).
 - 101) Kanda, K., Nishi, K., Kadota, A., Nishimoto, S., Liu, M.C., Sugahara, T.: Nobiletin suppresses adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by an insulin and IBMX mixture induction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820, 461-468 (2012).
 - 102) Lee, Y.S., Cha, B.Y., Choi, S.S., Choi, B.K., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K., Woo, J.T.: Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *J. Nutr. Biochem.*, 24, 156-162 (2013).
 - 103) He, Y.F., Liu, F.Y., Zhang, W.X.: Tangeritin inhibits adipogenesis by down-regulating C/EBP α , C/EBP β , and PPAR γ expression in 3T3-L1 fat cells. *Genet. Mol. Res.*, 14, 13642-13648 (2015).
 - 104) Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., Hanson, R.W.: Factors that control

- the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 40, 129-154 (2005).
- 105) Liu, Q., Zhang, F.G., Zhang, W.S., Pan, A., Yang, Y.L., Liu, J.F., Li, P., Liu, B.L., Qi, L.W.: Ginsenoside Rg1 inhibits glucagon-induced hepatic gluconeogenesis through Akt-FoxO1 interaction. *Theranostics*, 7, 4001-4012 (2017).
 - 106) Fernandez-Marcos, P.J., Auwerx, J.: Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 93, 884S-890S (2011).
 - 107) Li, X., Xin, Y., Mo, Y., Marozik, P., He, T., Guo, H.: The bioavailability and biological activities of phytosterols as modulators of cholesterol metabolism. *Molecules*, 27, 523-537 (2022).
 - 108) Sharma, N., Tan, M.A., An, S.S.A.: Phytosterols: potential metabolic modulators in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 12255-12274 (2021).
 - 109) Huang, Z.R., Lin, Y.K., Fang, J.Y.: Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14, 540-554(2009).
 - 110) Kabuto, H., Yamanushi, T., Janjua, N., Takayama, F., Mankura, M.: Effects of squalene/squalane on dopamine levels, antioxidant enzyme activity, and fatty acid composition in the striatum of Parkinson's disease mouse model. *J. Oleo Sci.*, 62, 21-28 (2013).
 - 111) Stevens, R.V., Chapman, K.T., Weller, H.N.: Convenient and inexpensive procedure for oxidation of secondary alcohols to ketones. *J. Org. Chem.*, 45, 2030-2032 (1980).
 - 112) Nwaukwa, S.O. and Keehn, P.M.: The oxidation of alcohols and ethers using calcium hypochlorite. *Tet. Lett.*, 23, 35-38 (1982)
 - 113) Arterburn, J.B.: Selective oxidation of secondary alcohols. *Tetrahedron*, 57, 9765-9788 (2001)
 - 114) Morton, S., Pencheon, D., Squires, N.: Sustainable Development Goals (SDGs), and their implementation. *Br. Med. Bull.*, 124, 81-90 (2017).
 - 115) 農林水産省 HP SDGs×食品産 <https://www.maff.go.jp/j/shokusan/sdgs/>

7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にお世話になりました。ここに深く感謝の意を示します。

研究全般にわたり、終始ご助言賜わり、研究の方針や論文作成についての御指導をしてくださった前三重大学大学院生物資源学研究科長奥村克純名誉教授と一般社団法人奥伊勢バイオサイエンスセンターの松尾雄志理事に心から感謝申し上げます。

研究についての的確な御指導、御助言を賜りました辻製油株式会社 辻 H&B サイエンス研究室の籠谷和弘次長、早川琢也研究員、油脂研究グループの梅本善明課長代理に深く感謝申し上げます。

NMR 解析、GC-MS 解析において、御助言、御協力を賜りました三重大学大学院生物資源学研究科生物機能化学研究室の勝崎裕隆准教授、また、RNA-seq 解析の御助言、御協力を賜りました三重大大学院生物資源学研究科分子細胞生物学研究室の竹林慎一郎准教授、三重大学大学院生物資源学研究科の生野彰宏特任助教に深く感謝申し上げます。

最後に、三重大学大学院生物資源学研究科において博士学位取得の機会を与えて下さり、励ましのお言葉を賜りました辻製油株式会社 辻保彦会長に深く感謝申し上げます。