TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

ヒメボウキ Ocimum canum の抗肥満作用に関する研究

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2018-04-09
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 今関, 亜紀子
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1531

修士学位論文

ヒメボウキ *Ocimum canum* の抗肥満作用に関する研究

平成 28 年度

(2017 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

食機能保全科学専攻

今関　亜紀子

目次

第 1 章　序論 1

1.1　肥満の現状 1

1.1.1　世界の肥満 1

1.1.2　日本の肥満 2

1.2　肥満の判定 4

1.3　肥満の合併症 6

1.4　ヒトにおける脂質代謝 8

1.5　機能性表示食品について 11

1.6　抗肥満作用を持つ天然素材 12

1.7　実験目的 14

第 2 章　材料と方法 15

2.1　試薬 15

2.2　実験動物 15

2.3　サンプルについて 16

2.3.1　ヒメボウキの紹介 16

2.3.2　調製法 17

2.4　血中成分の測定 18

2.4.1　グルコース（Glc）の測定 18

2.4.2　トリグリセライド（TG）の測定 18

2.5　リパーゼ阻害活性試験 19

2.6　高脂肪食長期給餌試験 21

2.6.1　肝臓中脂質測定 23

2.6.2　糞中脂質測定 23

2.7　高脂肪食長期給餌試験（再現実験）..... 23
2.8　精製および構造解析..... 26
2.8.1　カラムクロマトグラフィー..... 26
2.8.2　磁気共鳴スペクトル（NMR）..... 26
2.9　統計処理..... 27

第 3 章　ヒメボウキの抗肥満作用.....28
3.1　リパーゼ阻害活性試験の結果・考察..... 28
3.2　高脂肪食長期給餌試験の結果・考察..... 30
3.3　高脂肪食長期給餌試験（再現実験）の結果・考察..... 44
3.4　精製および構造解析の結果・考察..... 57

第 **4 章　総括**.....64

謝辞..... 66
参考文献..... 67

第1章　序論

1.1　肥満の現状

1.1.1　世界の肥満

現代社会において、肥満は重大な疾患として位置づけられている。一般には体格指数（BMI : Body Mass Index）= Body weight (kg) / Body height (m^2)により肥満が判定される。1980 年から 2013 年にかけて世界では過体重（BMI≧25 kg / m^2）と肥満（BMI≧30 kg / m^2）の罹患率は、成人では 27.5％、児童では 47.1％増加している。過体重と肥満者の数は 1980 年の 921 万人から 2013 年には 21 億人に増加した（The GBD 2013 Obesity Collaboration, 2014）。

先進国と発展途上国で増加はしているものの、性別によってパターンは異なる。先進国では男性の過体重と肥満者の割合が高く、発展途上国では女性の割合が高い。先進国と発展途上国の女性の肥満の罹患率は同等である。過体重および肥満の増加率は、1992 年から 2002 年の間に最大であったように見えるが、特に先進国では過去 10 年間で減速している。

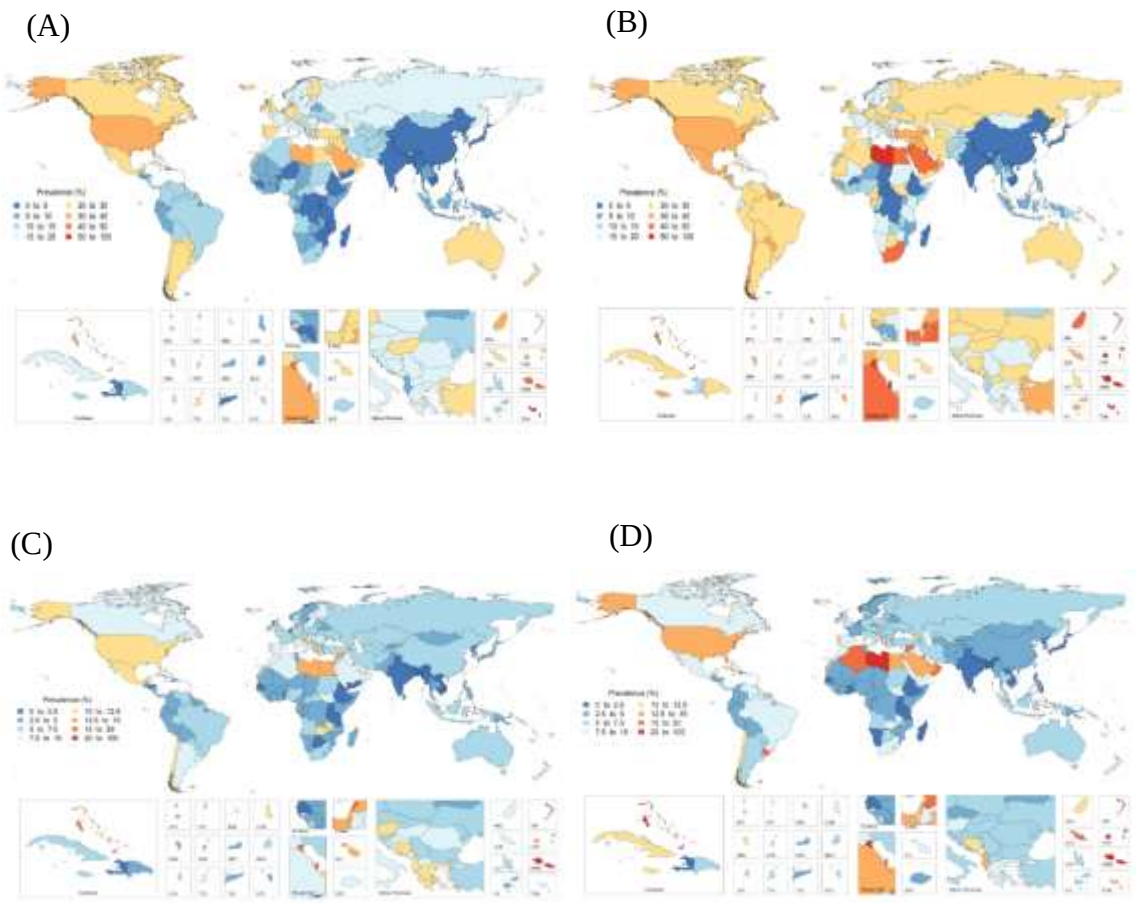


Figure 1-1 Age-standardized prevalence of obesity (BMI≧30 kg / m^2), 2013.
(A) age 20+ years, males, (B) age 20+ years, females, (C) age 2-19 years, males, (D) age 2-19 years, females, (The GBD 2013 collaboration, 2014).

1.1.2　日本の肥満

世界の肥満者の割合と比べると、日本の肥満者は少ない。他の国では女性の肥満者の割合が高いが、日本では男性の肥満者のほうが多い。日本と世界の肥満の基準は異なっており、厚生労働省が定めた基準では、BMI≧25 kg / m^2 を肥満としている。平成 27 年の国民健康・栄養調査の結果によると肥満者（BMI≧25 kg / m^2）の割合は男性 29.5%、女性 19.2%であり、この 10 年間で男性は横ばい、女性は有意に減少している（図 1-2）。

また、年代別にみると男性は 40 歳代の肥満者の割合が一番高く、女性は高齢者の割合が高い（図 1-3）（厚生労働省, 2015）。日本では、近年若い女性のダイエットも問題視されているが、その一方で肥満者は男女ともに全体の 20-30%を占めている現状から、肥満の問題も改善しなければならない課題である。

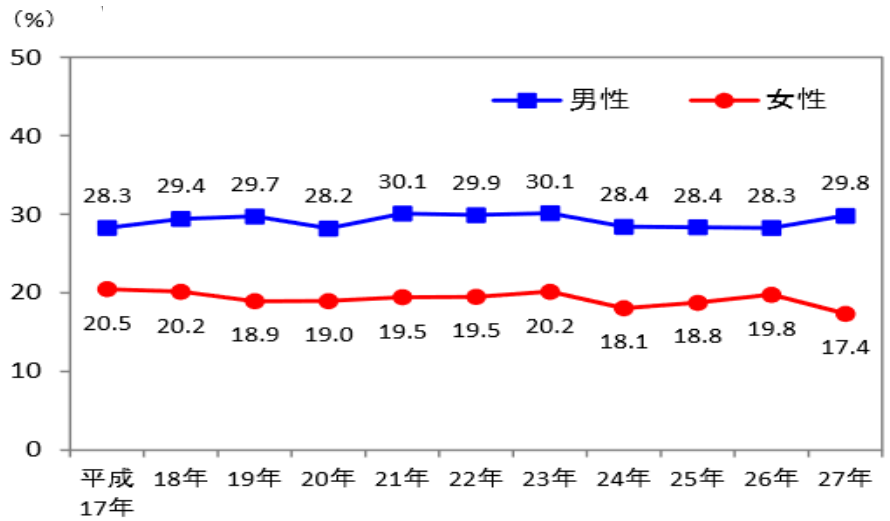


Figure 1-2 Age-standardized prevalence of obesity (BMI≧25 kg / m^2), age 20+ years, male and female in Japan, 2015 (National Health and Nutrition Survey, 2015).

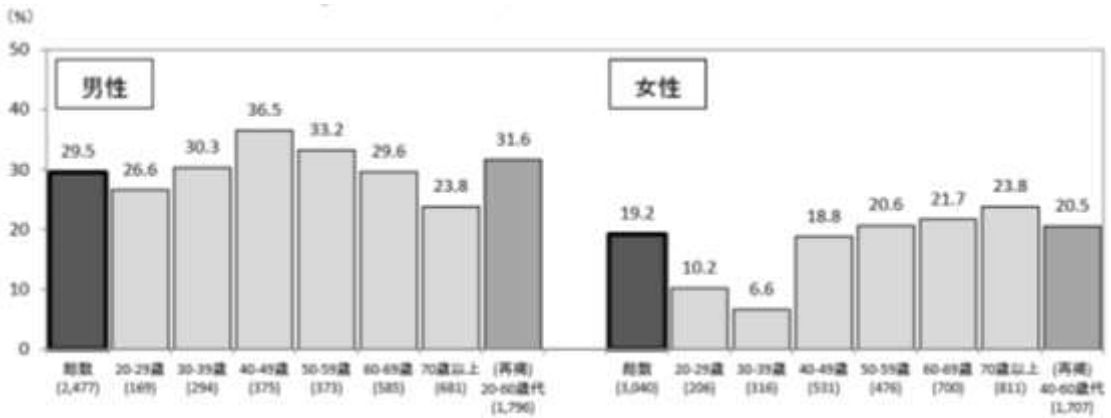


Figure 1-3 Ratio of obesity (BMI≧25 kg / m^2) age 20+ years, male and female in Japan, 2015 (National Health and Nutrition Survey, 2015).

1.2　肥満の判定

前節にも記載したが、肥満の判定には BMI（Body Mass Index、ボディマス指数）を用いられる。これは体重と身長の関係から算出される肥満度を示す世界共通の体格指数である。算出方法は BMI（kg / m^2）= 体重（kg）÷ 身長（m^2）である。

BMI の判定基準は、世界保健機構（WHO）と日本肥満学会とで異なる。これは日本を含むアジアの国等の人々は BMI が低くても糖尿病等の発症率が高いという報告がなされているためである（WHO expert consultation, 2004）。

WHO では、BMI≧25 kg / m^2 を「太り気味、過体重（overweight）」、BMI≧30 kg / m^2 を「肥満（obese）」としており、日本では BMI≧25 kg / m^2 を肥満としている（表 1-1）（日本肥満学会, 2000）。

BMI による肥満の分類は身長と体重のみの判定のため、体脂肪は少ないが筋肉質であるという人も肥満に判断されてしまう。そのため体脂肪・内臓脂肪も計測し、本当に肥満の状態であるものを対象にしなくてはならない。日本肥満学会ではフローチャートを作成し、より治療が必要な人を抽出できるようにしている（図 1-4）。

また、肥満とは体重が重いことではなく「脂肪組織が過剰に蓄積した状態」を指し、疾患ではない。一方、肥満症は「肥満に起因ないし関連する健康障害を合併するか、その合併が予測される場合で、医学的に減量を必要とする病態」である（日本肥満学会、2016）。

Table 1-1 Determination of obesity (Japan Obesity Society, 2016).

BMI (kg / m^2)	判定	WHO 基準
＜18.5	低体重	Underweight
18.5≦～＜25	普通体重	Normal range
25≦～＜30	肥満(1 度)	Pre-obese
30≦～＜35	肥満(2 度)	Obese class Ⅰ
35≦～＜40	肥満(3 度)	Obese class Ⅱ
40≦	肥満(4 度)	Obese class Ⅲ

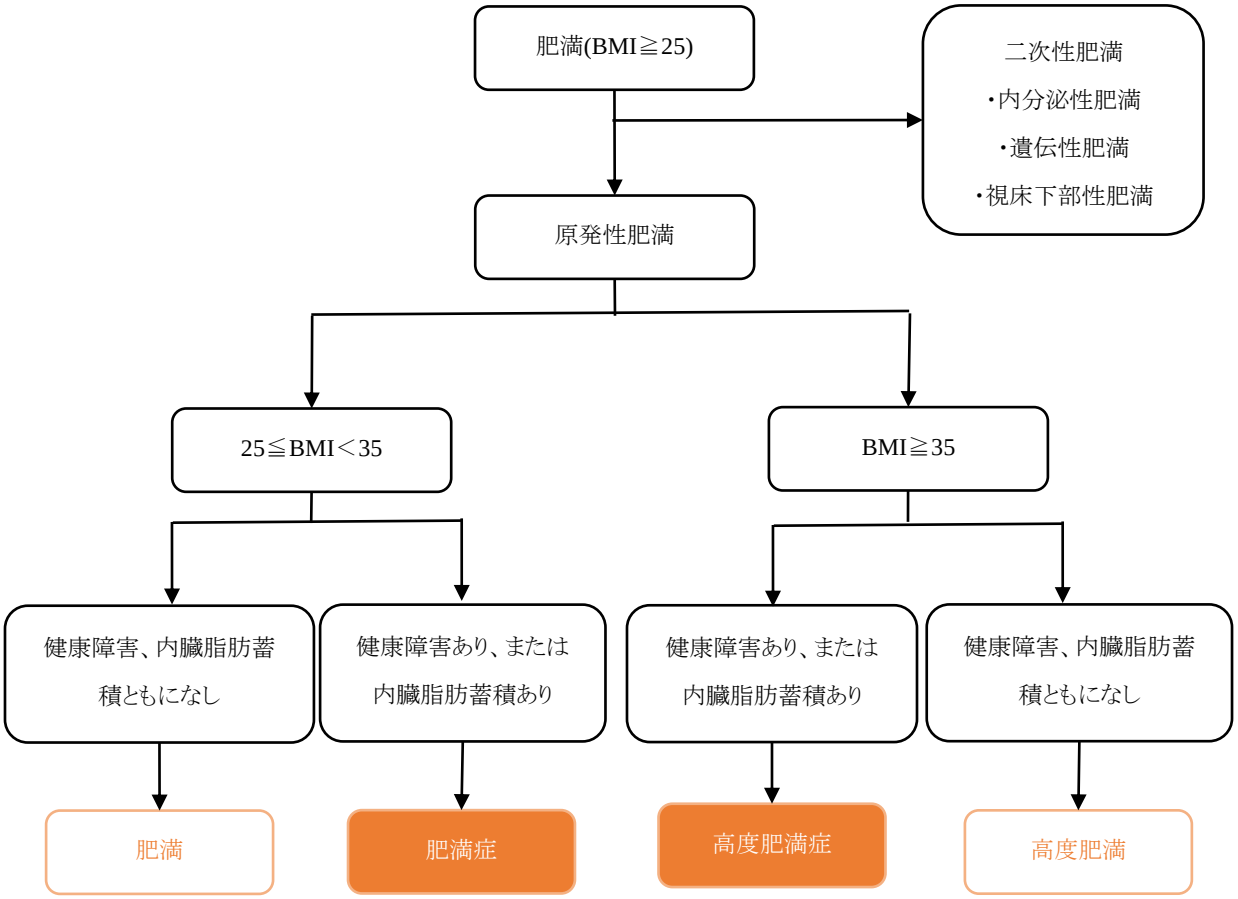


Figure 1-4 Diagnosis of obesity (Obesity Guidelines, 2016).

1.3　肥満の合併症

肥満である状態は様々な病気の合併リスクが上昇する。この肥満を放置しておくと肥満症となり、医学的治療が必要になる。内蔵脂肪型肥満（腹腔内の腸などの周りに内臓脂肪が過剰に蓄積するタイプの肥満）はインスリン抵抗性を惹起させることにより糖代謝を悪化させ、高血圧、脂質異常の合併リスクを高めることからメタボリックシンドロームの原因となる。主要合併症には、2 型糖尿病、メタボリックシンドローム、高血圧症、脂質異常症、心筋梗塞、脳卒中、特定の癌、睡眠時無呼吸および変形性関節症が含まれる（Flegal, K. M., et al., 2007）。ここでは合併症としてよくあげられる糖尿病、高血圧症、脂質異常症、メタボリックシンドロームと肥満の関係について述べる。

＜糖尿病（高血糖）＞

ヒトが活動するには血中のグルコースを各組織が細胞内に取り込むことでエネルギーが産生される。肥満になると、インスリンの血糖降下能が低下してインスリンの必要量が増えるため、膵臓にあるβ細胞がインスリンを増産し、高インスリン血症となる。しかし、インスリンが一定量を超えるとレセプターの量が、相対的に減少する状態となる（レセプター異常）。血糖の利用効率がさらに落ちて（インスリン抵抗性）、高血糖になる（糖尿病学会, 2013）。インスリンとレセプターが結合したあとの異常（レセプター結合以後の異常）も加わってくると、膵臓はこのような状態を正常化するために、さらにインスリンを増産するが血糖処理が追いつかず、糖尿病が発症する。レセプター結合以後の異常が発生するのは、肥大した脂肪細胞から、TNF-α、インターロイキン 6、レジスチンなどの、インスリンの効き目を下げる物質（サイトカイン）が出ることが主な原因である。

＜高血圧症＞

以前の日本では、食塩摂取量の多い痩せた高血圧患者が多かったが、近年では肥満を伴う高血圧患者が増加している。NIPPON DATA では 1980 年から 2010 年の 30 年の間で高血圧に対する肥満の寄与は、男性で 11%から 27%、女性で 19%から 26%に増加している（三浦克之ら, 2012）。また、肥満者の高血圧発症率は非肥満者の 2~3 倍となる事が報告されている（厚生労働省, 1990）。肥満を伴う高血圧の成因は、交感神経系亢進、食塩感受性の存在、インスリン抵抗性の関与などが指摘されている。

＜脂質異常症＞

厚生労働省の報告（厚生労働省, 平成 23 年度）によると、BMI が増加するほど血中のトリグリセライド（TG）の値は増加し、高密度リポタンパク質コレステロール（HDL-C）は低下することが示されており、一方で総コレステロール（TC）と低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）は相関が低い。肥満に起因する脂質異常症は高 TG 血症と低 HDL-C 血症である。これは内臓脂肪蓄積やインスリン抵抗性より肝臓から過剰にリポ蛋白が生産され、リポ蛋白を代謝するリポ蛋白リパーゼなどの酵素作用が減弱し、TG を多く含むリポ蛋白の代謝が滞ることによる。これにより、レムナント、酸化 LDL、small dense LDL などの動脈硬化惹起性リポ蛋白が出現し、食後高脂血症が起きやすい。

＜メタボリックシンドローム＞

メタボリックシンドロームは肥満の基準を超えていなくても内臓脂肪の蓄積（内臓脂肪面積≧100 cm^2）があることを前提として、その他にも、高血糖（空腹時血糖値≧110 mg / dL）、脂質代謝異常｛高 TG 値（≧150 mg / dL）かつ / または 低 HDL-C 値（40 mg / dL）｝、血圧高値｛収縮期血圧（≧130 mmHg）かつ/または拡張期血圧（≧85 mmHg）｝の 3 項目のうち 2 項目以上を満たすものをメタボリックシンドロームとしている。内臓脂肪が蓄積すると門脈血中の遊離脂肪酸上昇やアディポサイ

トカインの産生異常が起き、脂肪合成亢進やインスリン抵抗性を引き起こし脂質代謝異常・高血糖・血圧高値を引き起こし、心血管疾患となる。このことから、内臓脂肪の蓄積によって生じる多重危険因子を内臓脂肪の減少によって一挙に改善させることが重要となってくる。

1.4　ヒトにおける脂質の代謝

食物に含まれる脂質の大部分はトリグリセライド（TG）である。口から入ったTGは食道・胃を通過し、十二指腸へ入り消化作用を受ける。十二指腸に入ったTGは胆汁酸による乳化作用を受けミセル化する。膵液に含まれるリパーゼはTGの1および3位に位置する脂肪酸を切断し、2-モノアシルグリセロールと脂肪酸にする（図 1-5）。分解された脂質成分と胆汁酸の混合ミセルは空腸粘膜の柔毛表面で吸収される。小腸から吸収されたモノアシルグリセロールと脂肪酸は小腸上皮細胞で再びTGに合成され、アポタンパク質とともにキロミクロンを形成する。キロミクロンはリンパ管に入り、胸管を経て左鎖骨下静脈において合流する。食後3 ～4時間で血中TGが上昇するのはキロミクロンの上昇によるものである（図1-6）（川端輝江, 2011）。

リパーゼを阻害すると十二指腸での TG の取り込みが阻害される。したがって、体内に取り込まれなかった TG はそのまま小腸、大腸を通過し体外に排出される。

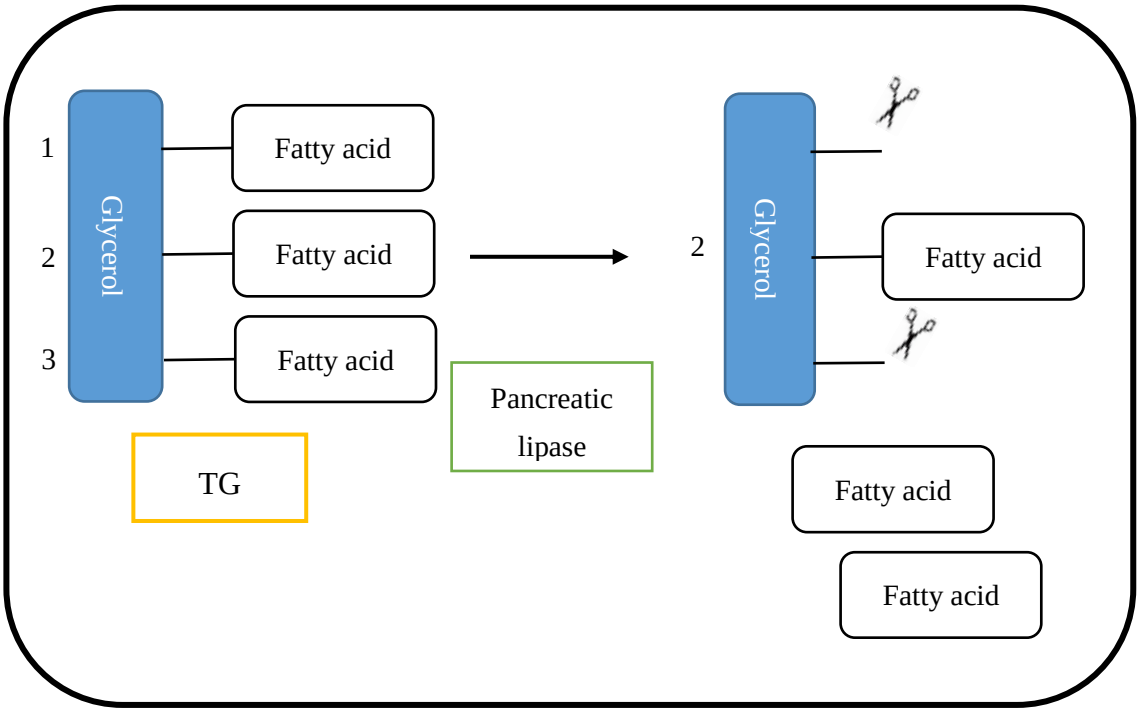


Figure 1-5 Decomposition of TG.

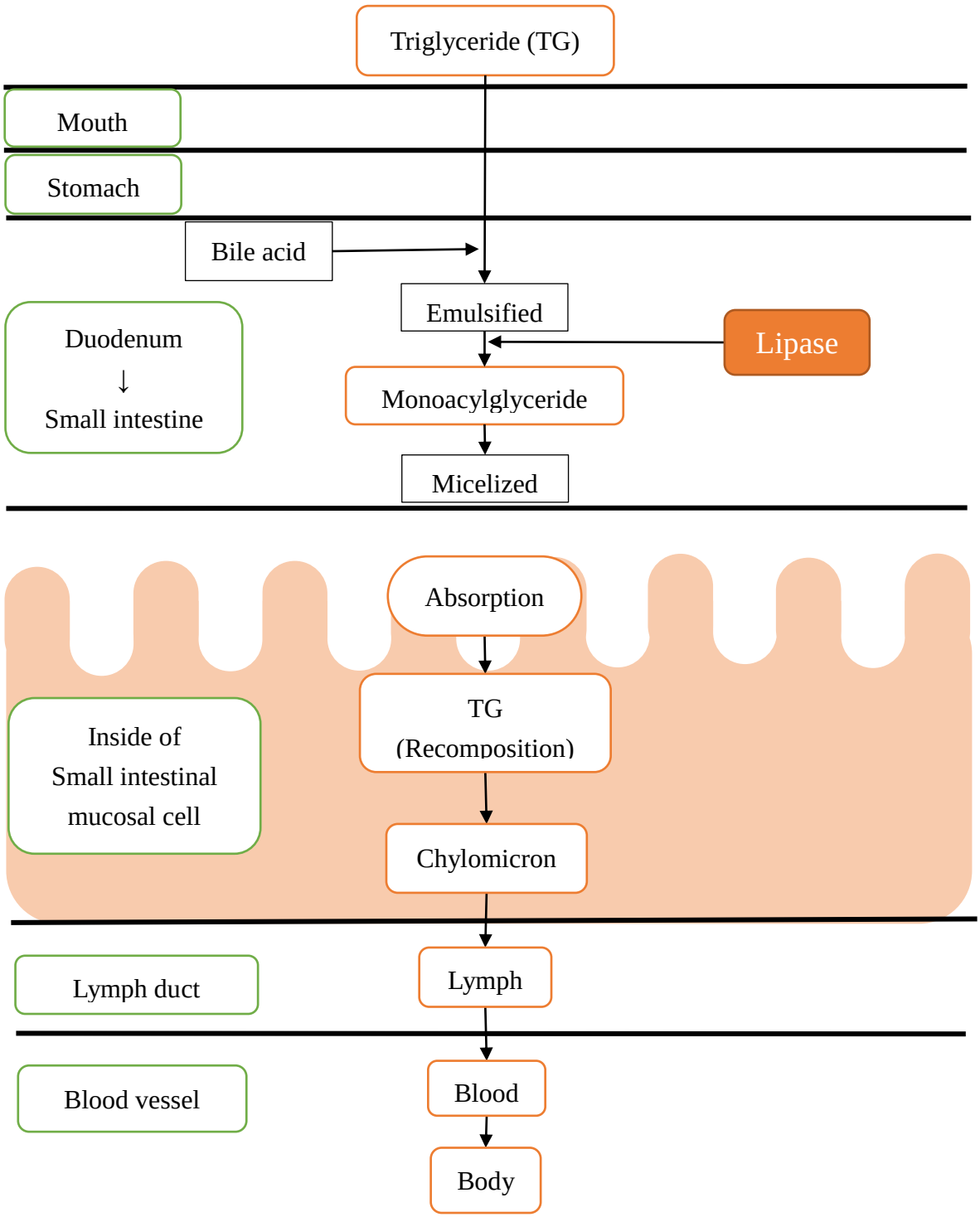


Figure 1-6 Metabolizing lipid (Kawabata T., 2011).

1.5　機能性表示食品について

世界中で肥満者が減少傾向になった国は 1 つもない（The GBD 2013 Obesity Collaboration, 2014）ことから、肥満の改善は非常に難しいと考えられる。様々な医薬品（Rodgers, R. J., et al., 2012）や外科的手術で対症療法を行うより、肥満者の増加を防ぐために必要になる事は「予防」である。

2015 年 4 月 1 日から導入された機能性表示食品制度（消費者庁　機能性表示制度）を合わせて保健用食品は 3 種類になった。機能性食品は食品の第三次機能を有する食品を定義したものである（岡田悦政ら, 2011）。これにより消費者は抗肥満作用を持つ食品をより容易に手に入れることができるようになった。

＜特定保健用食品（トクホ）＞

健康の維持増進に役立つことが科学的根拠に基づいて認められ、「コレステロールの吸収を抑える」などの表示が許可されている食品。表示されている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官が許可している。

＜栄養機能食品＞

一日に必要な栄養成分（ビタミン、ミネラルなど）が不足しがちな場合、その補給・補完のために利用できる食品。すでに科学的根拠が確認された栄養成分を一定の基準量含む食品であれば、届出などをしなくても国が定めた表現で機能性を表示することができる。

＜機能性表示食品＞

事業者の責任において、科学的根拠に基づいた機能性を表示した食品。販売前に安全性及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出られたもの。しかし、特定保健用食品とは異なり、消費者庁長官の個別の許可を受けたものではない。

Figure 1-8 Classification of functional foods in Japan.

1.6　抗肥満作用を持つ天然素材

現在商品化されている特定保健用食品や機能性食品の機能性物質は天然由来成分が多く存在する。例えば表 1-2 のようなものがある。

キノコに含まれるキトサン（宮沢紀子ら, 2013）、カテキンを含む緑茶（Ikeda, I. et al. 2004）や重合ポリフェノール（中井正晃ら, 2005）を含む黒烏龍茶などは、リパーゼの活性を阻害することで脂質の吸収を抑えることができ、肥満の予防や抑制に繋がる（図 1-10）。カテキンや烏龍茶ポリフェノールは熱水で抽出される、極性の高いフラボノイドである。カプサイシンは脱共役タンパク質（UCP）発現・活性による熱産生の亢進を起こす（川端二功ら, 2005）。りんご未熟果実由来のポリフェノールは、肝臓でのβ酸化を促進することで消費エネルギーを増大させる（Azuma, T., et al., 2013）。このように、抗肥満作用を有する食品素材は多く利用されているが、肥満者が増加する現在においてより有効な抗肥満作用を持つ機能性表示食品が求められている。

Table 1-2 Food material with effect of anti-obesity.

Food material with effect of anti-obesity	**Main mechanism**
Chitosan (Mushroom)	Inhibition of lipase activity.
Polymerized polyphenol (Oolong tea)	Inhibition of lipase activity.
Catechin (Green tea)	Inhibition of lipase activity. Promoting β oxidation in liver.
Capsaicin (Chili pepper)	Hyperthermia by UCP.
Polyphenol (Unripe apple)	Promoting β oxidation in liver.

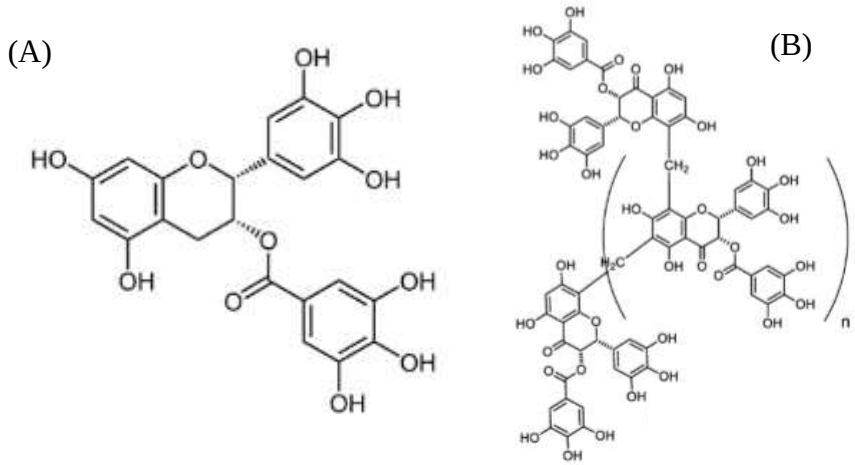


Figure 1-10 Structure of food material with anti-obesity effect. (A) Epigallocatechin gallate (EGCG), (B) Oolong tea polymerized polyphenol.

1.7　研究目的

このような現状を踏まえ、肥満の予防には機能性を持つ食品が効果的であると考えた。天然食用素材の中には抗肥満作用を持つものがあるが、すべては調べられていない。そこで抗肥満作用を有する新規食品素材の探索を in vitro における膵リパーゼ活性阻害試験により評価した。入手可能な天然サンプルをスクリーニングした結果、ラオスで薬草として使われているヒメボウキ *Ocimum canum*（以下 OC）に顕著なリパーゼ阻害作用がみられた。OC は抗糖尿病作用と抗菌作用はあるが、リパーゼ阻害については報告されていない。本研究では in vitro、in vivo の実験系を用いて、OC の抗肥満作用と成分の特定を目的とした。

第2章　材料と方法

2.1　試薬

トリグリセライド E-テストキット、グルコース CⅡ-テストキットは和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から入手した。リパーゼキット S は DS ファーマバイオメディカル株式会社より購入した。ヘパリンナトリウムは田辺三菱製薬株式会社（東京、日本）より購入した。ブタ膵リパーゼ、SDS は SIGMA ALDRICH, Co.より入手した。液体窒素はカヤマ酸素株式会社から購入した。コスモシール 75C_{18}-OPN はナカライテスク株式会社（京都、日本）より入手した。

2.2　実験動物

実験動物は日本エスエルシー株式会社（静岡、日本）から購入した 4 週齢の ddY マウスを用いた。マウスは飼育室（individual animal breeding system LP-80 CCFL-6ARSS, NK system）で温度 24±1℃、湿度 50±10％、12 時間の明暗周期（明期 8:00~20:00）とし、餌と水は自由摂取とした。予備飼育の餌はラボ MR ストック（日本農産工業株式会社、横浜、日本）を使用し、水は水道水を与えた。本研究では、東京海洋大学実験等取扱規則（平成 21 年 5 月 14 日）及び環境省告示第 88 号実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年 4 月 28 日）を遵守し、実験を行った。

2.3　サンプルについて

2.3.1　ヒメボウキ

ヒメボウキ（*Ocimum canum*、英名 : Hoary basil、インド名 : Nai Tulasi）（以下 OC）は、Lamiaceae 科に属し、アジアやアフリカに生息している。約 60 ㎝の高さまで成長し全体的に繊毛がある。白い花をつけ、レモンの香りを持っている。*O. canum* の近隣種には *O. basilicum* と *O. sanctum*（英名：Holy Basil）がある。*O. basilicum* はスイートバジルと呼ばれ、広く家庭料理などに使われている。*O. sanctum* は聖なるバジルと呼ばれ、アーユルヴェーダで使用されている。一般に *Ocimum* 属の植物の種子はバジルシードと呼ばれ、タイ、カンボジア、ミャンマー、ベトナム、台湾などの東南アジアを中心に生産されており、飲料やデザートとして食されている（吉積一真ら, 2009）。

OC の葉の抽出物は 2 型糖尿病の治療（Nyarkoa, A. K., et al., 2002）や、蚊の殺虫剤（Murugan, J. M., et al., 2016）としても使用されている。近隣種の *O. sanctum* はスプレゾトシン誘発糖尿病ラットの脂質代謝改善作用を示すという報告がされている（Husain, I., et al., 2015）。しかし、OC は脂質の代謝や、リパーゼに関わる報告はなされていない。

Figure 2-1 Picture of *O.canum* (left), *O.sanctum* (middle) and *O. basilicum* (right).

3.2.2　調製法

ラオスで採取した OC の全草（木質化した茎を除く葉、茎、花）乾燥粉末はツジコー株式会社より 2015 年に供給された。

＜OC メタノール抽出物（OCMeOH）の調製法＞

OC の全草乾燥粉末を測りとり、10 倍量の MeOH を加えて 3 日間室温で抽出した。それを吸引濾過したものを回転エバポレーターで減圧乾固し、凍結乾燥した。OCMeOH は、実験に使用するまで- 20℃に保管した。

＜OC 熱水粗抽出物（OCHW）の調製法＞

OC の全草乾燥粉末を測りとり、10 倍量の熱水を加えた。その後、100℃のインキュベーター（ISUZU Hot Air Sterilizer Azisai）で 1 時間加熱し、吸引濾過し凍結乾燥したものを OC 熱水粗抽出物（OCHW）とした。真空凍結乾燥機（RLE-206Ⅱ, 共和真空技術株式会社）にて 48 時間、棚温度 25℃で凍結乾燥した。棚温度を 25℃に設定した理由は、乾燥キャベツを調製する際にビタミンの崩壊が抑えられる最高温度だからである（西村敬子, 1980）。OCHW は茶色の粉末状であり、実験に使用するまで- 20℃に保管した。この操作により、1 g の全草粉末から約 0.3 g の OCHW が得られた。

2.4　血中成分の測定

2.4.1　Glc の測定

血液をヘパリン処理したマイクロチューブに入れ 5000 g、1 分、20℃、遠心（Centrifuge MCD-2000 model, Hsiangtai）し、得られた血漿を 96 穴プレートに 2 μL ずつ 2 well 分とった。グルコーステストワコーの発色液を 300 μL 入れよく攪拌し 37℃、5 分インキュベート（ADVANTEC THS020DB Tokyo Seisakusho Kaisya, Ltd）した。インキュベート後、直ちに吸光度 490 nm で測定した。

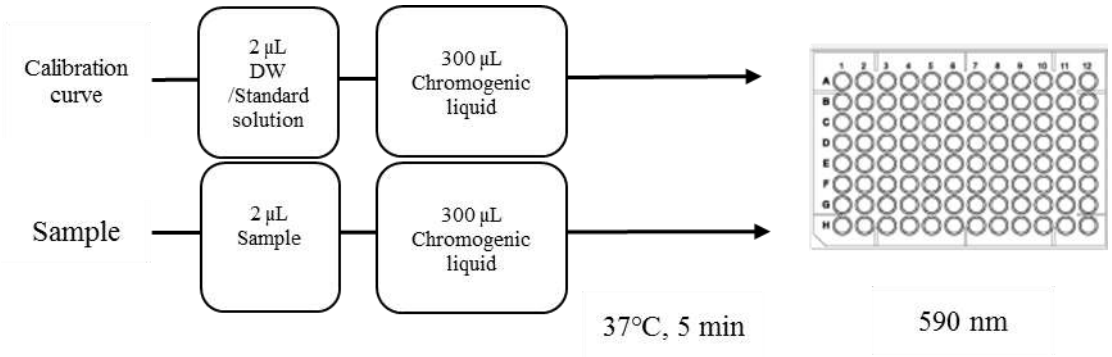


Figure 2-2 Glucose measurement method.

2.4.2　TG の測定

血液をヘパリン処理したマイクロチューブに入れ 5000 g、1 分、20℃、 遠心（Centrifuge MCD-2000 model, Hsiangtai）し、得られた血漿を 96 穴プレートに 2 μL ずつ 2 well 分とった。TG テストワコーの発色液を 300 μL 入れよく攪拌し 37℃、5 分インキュベート（ADVANTEC THS020DB Tokyo Seisakusho Kaisya, Ltd）した。インキュベート後、直ちに吸光度 590 nm で測定した。

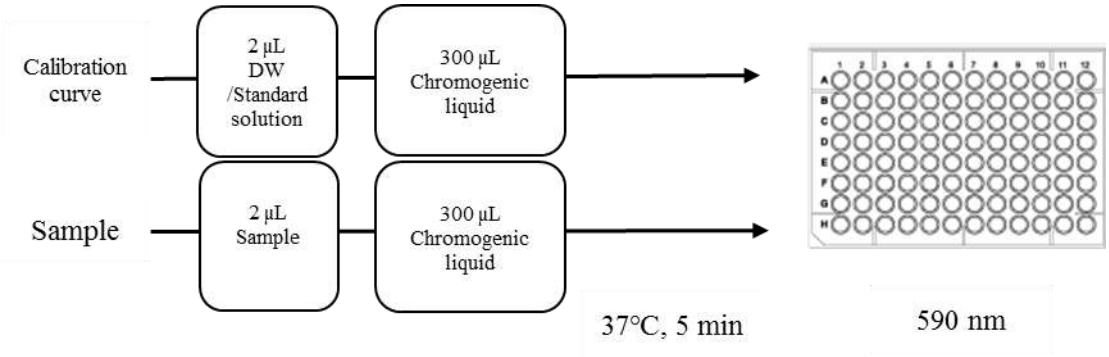


Figure 2-3 TG measurement method.

2.5　リパーゼ阻害活性試験

リパーゼの活性評価にはDSファーマバイオメディカル株式会社のリパーゼキットSを使用した。各試薬の調製法は以下のとおりとした。

<発色原液>

発色原末 20 mg に Buffer 0.2 mL、DW 1.8 mL を混合し、発色原液とした。

<反応停止液>

反応停止原液 2 ml をコーンチューブに移し、40 mL にメスアップした。

<基質液>

キットのものをそのまま使用した。

<リパーゼ液>

ブタの膵リパーゼ 50 mg と SDS 10 mg を 5 mL チューブに入れ、DW を 5 mL 加えよく攪拌し、3000 rpm で 1 分、20℃で遠心し、上清を使用した。

発色液（リパーゼあり）は発色原液 1 ml、Buffer 1 mL、ブタ膵リパーゼの上清 1 mL、DW 3.5 mL、エステラーゼ 0.2 mL を混合したものとした。酵素ブランクにはリパーゼの代わりに DW を加えた。

サンプル 25 μL と発色液（リパーゼあり、またはなし）65 μL をよく混合し、37℃のインキュベーターで 5 分予熱した。その後基質液 10 μL をよく混合し 20 分インキュベートした（100 μL incubation mixture）。インキュベーション終了後直ちに反応停止液を 160 μL 添加し、よく混和した。吸光度を波長 405 nm で測定した。

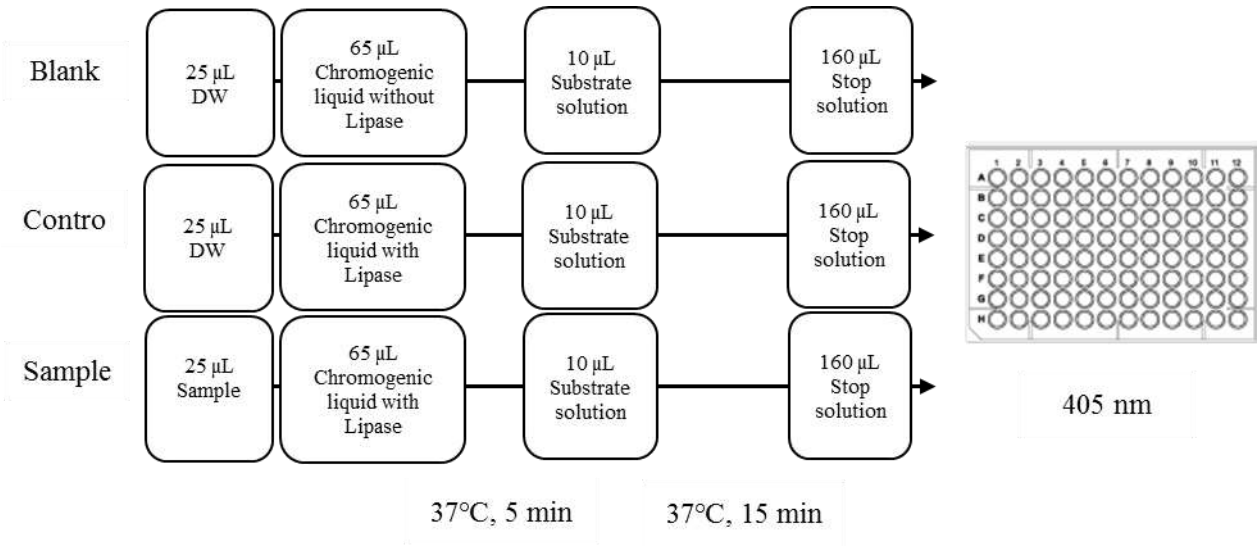


Figure 2-4 Lipase inhibitory activity test method.

2.6　高脂肪食長期給餌試験

4 週齢の雄性 ddY マウスを日本 SLC 株式会社から購入後、MR ストック（日本農産工業株式会社）で 1 週間予備飼育をした。その後体重の平均を揃え、普通食群（ND）、高脂肪食群（HFD）、3% OCHW 添加高脂肪食群（3% OCHW）、1% OCHW 添加高脂肪食群（1% OCHW）の 4 群（1 群 8 匹、個別飼育）に群分けし、それぞれの飼料を与えた。飼料組成は論文（Miyata, M., 2010）を参考に、表 2-1 の組成で調製し、真空凍結乾燥機（RLE-206Ⅱ,共和真空技術株式会社）にて 48 時間、棚温度 25℃で凍結乾燥した。

摂餌量、飲水量、体重測定、一般状態の観察は週 2 回行った。62 日後にマウスを解剖後、各臓器重量、血液パラメーター、肝臓・糞中脂質を測定した。各臓器は液体窒素で凍結後、- 80℃で保管した。なお、解剖時に絶食は行わなかった。

Table 2-1 Formulation of experimental diets for high fat diet long term feeding test 1.

	ND(AIN-93M)	HFD	3% OCHW	1% OCHW
β-cornstarch	**465.692**	**105.692**	**105.692**	**105.692**
α-cornstarch	**155**	**155**	**155**	**155**
Milk casein	**140**	**140**	**140**	**140**
Sucrose	**100**	**100**	**100**	**100**
Lard	**0**	**360**	**360**	**360**
Soybean oil	**40**	**40**	**40**	**40**
Cellulose	**50**	**50**	**20**	**40**
Mineral Mix*	**35**	**35**	**35**	**35**
Vitamin Mix**	**10**	**10**	**10**	**10**
L-Cystine	**1.8**	**1.8**	**1.8**	**1.8**
Choline	**2.5**	**2.5**	**2.5**	**2.5**
***tert*-Butylhydroquinone**	**0.008**	**0.008**	**0.008**	**0.008**
Sample	**0**	**0**	**30g OCHW**	**10g OCHW**
energy (kcal)	**3861**	**5672**	**5672**	**5672**

Values in the table represent g / 1000 g of diet.

*AIN-93M, **AIN-93(Choline free)

2.6.1　肝臓中脂質測定

Folch 法によって脂質を抽出した。肝臓を約 0.1 g 測りとり 2 倍量の生理食塩水を加え、ホモジナイザーで粉砕した。粉砕後、5000 g、1 分、25℃で遠心（Centrifuge MCD-2000 model, Hsiangtai）し、上層を 13 mm のねじ付き試験管に入れた。下層は生理食塩水を加え再度ホモジナイザーで粉砕した。下層を全て 13 mm のねじ付き試験管に入れ、Folch 溶媒（$CHCl_3$: MeOH ＝ 2 : 1）を加え遠心し、下層をバイアル瓶に集めた。この操作を 2 回繰り返した。その後、窒素ガスを吹き付け乾燥した。DMSO を 1 ml 加え、超音波洗浄機（ULTRASONIC CLEANER VS-150）で溶かし TG キットで測定した。

2.6.2　糞中脂質測定

Folch 法によって脂質を抽出した。マウスの糞を乾燥させ、その糞を約 0.1 g 測りとり 2 倍量の生理食塩水を加えふやかし、その後ホモジナイザーで粉砕した。前項と同様に、Folch 法により抽出した脂質を乾燥後 DMSO を 1 mL 加えて TG キットで測定した。

2.7　高脂肪食長期給餌試験（再現実験）

4 週齢の雄性 ddY マウスを日本 SLC 株式会社から購入後、MR ストック（日本農産工業株式会社）で 1 週間予備飼育をした。その後、体重の平均を揃え、普通食群（ND）、高脂肪食群（HFD）、OC 熱水粗抽出物添加群（OCHW）に（1 群 10 匹、個別飼育）分け、それぞれの餌を与えた。飼料組成は論文(Miyata, M., 2010)

を参考に、表 2-2 の組成で調製し、真空凍結乾燥機（RLE-206Ⅱ,共和真空技術株式会社）にて 48 時間（棚温度 25℃）凍結乾燥した。

摂餌量、飲水量、体重測定、一般状態の観察は週 3 回行った。60 日目に解剖後、各臓器重量、血液パラメーター、肝臓・糞中脂質抽出を行った。各臓器は液体窒素で凍結後、-80℃で保管した。なお、解剖時に絶食は行わなかった。

Table 2-2 Formulation of experimental diets for high fat diet long term feeding test 2.

	ND(AIN-93G)	HFD	OCHW
β-cornstarch	**465.692**	**105.692**	**105.692**
α-cornstarch	**155**	**155**	**155**
Milk casein	**140**	**140**	**140**
Sucrose	**100**	**100**	**100**
Lard	**0**	**360**	**360**
Soybean oil	**40**	**40**	**40**
Cellulose	**50**	**50**	**20**
Mineral Mix*	**35**	**35**	**35**
Vitamin Mix**	**10**	**10**	**10**
L-Cystine	**1.8**	**1.8**	**1.8**
Choline	**2.5**	**2.5**	**2.5**
***tert*-Butylhydroquinone**	**0.008**	**0.008**	**0.008**
Sample	**0**	**0**	**30g OCHW**
energy (kcal)	**3861**	**5672**	**5672**

Values in the table represent g / 1000 g of diet.

*AIN-93M, **AIN-93(Choline free)

2.8　精製および構造解析

2.8.1　カラムクロマトグラフィー

担体、カラムサイズ、溶出溶媒、1 volume 量は各回ごとに記載した。

2.8.2　磁気共鳴スペクトル（NMR）

＜^{1}H 核磁気共鳴スペクトル　(^{1}H NMR)＞

NMR (600 MHz, Bruker) を使用して測定し、以下の様式で記載した。

^{1}H NMR (測定周波数、測定溶媒)

化学シフト値は測定溶媒の残留プロトンのシグナルを内部標準 CD_2HOD (3.31 ppm)、として ppm で記載した。

＜^{13}C 核磁気共鳴スペクトル　(^{13}C NMR)＞

NMR (150 MHz, Bruker) を使用して測定し、以下の様式で記載した。

^{1}C NMR (測定周波数、測定溶媒)

化学シフト値は測定溶媒のシグナルを内部標準 $^{13}CD_3OD$ (49.0 ppm)として ppm で記載した。多重度は、HMCQ スペクトルより決定した。

＜二次元核磁気共鳴スペクトル＞

NMR (600 MHz, Bruker) を使用して測定し、以下の条件で測定した。

(1) COSY：データポイント数 (1024 × 256)または (512 × 256)

(2) HMQC：データポイント数 (1024 × 128)または (512 × 128)

$^{1}J_{CH}$ = 140 Hz

(3) HMBC：データポイント数 (1024 × 128)または (512 × 128)

$^{2,3}J_{CH}$ = 8 Hz

2.9　統計処理

各値は平均値±標準偏差で表した。有意差検定は Tukey-Kramer 検定、Dunnett 検定で評価し、 p 値が 0.05 未満であるとき、有意差があると評価した。

第3章　ヒメボウキの抗肥満作用

3.1　リパーゼ阻害活性試験の結果・考察

OC の全草乾燥粉末から調整した（OCMeOH、OCHW）この 2 つの抽出物の効果を *in vitro* のリパーゼ阻害活性試験の結果を図 3-1 に示した。

OCMeOH と OCHW はどちらも緑～黄色の呈色があり(図 3-2)、計測する吸光度(405 nm)に反応してしまうため、色ブランクを差引したもので評価した。OCMeOH のグラフで急激に値が変化している所があるが、これは色ブランクを差し引いたことにより生じたものである。直線近似部分を用いて求めたこの 2 つの抽出物の IC_{50} 値 (50%阻害率)は、OCHW では 0.15 mg / mL 、OCMeOH では 0.16 mg / mL であった。

OCMeOH にもリパーゼ阻害作用があると考えたが、緑色が吸光度に強く反映されており本来の活性よりも強く評価されている可能性が高いと考えられた。一方で OCHW では色による影響が少なく、充分なリパーゼ阻害活性を有すると考えられたことから、この抽出物に含まれる成分の探索を行った。

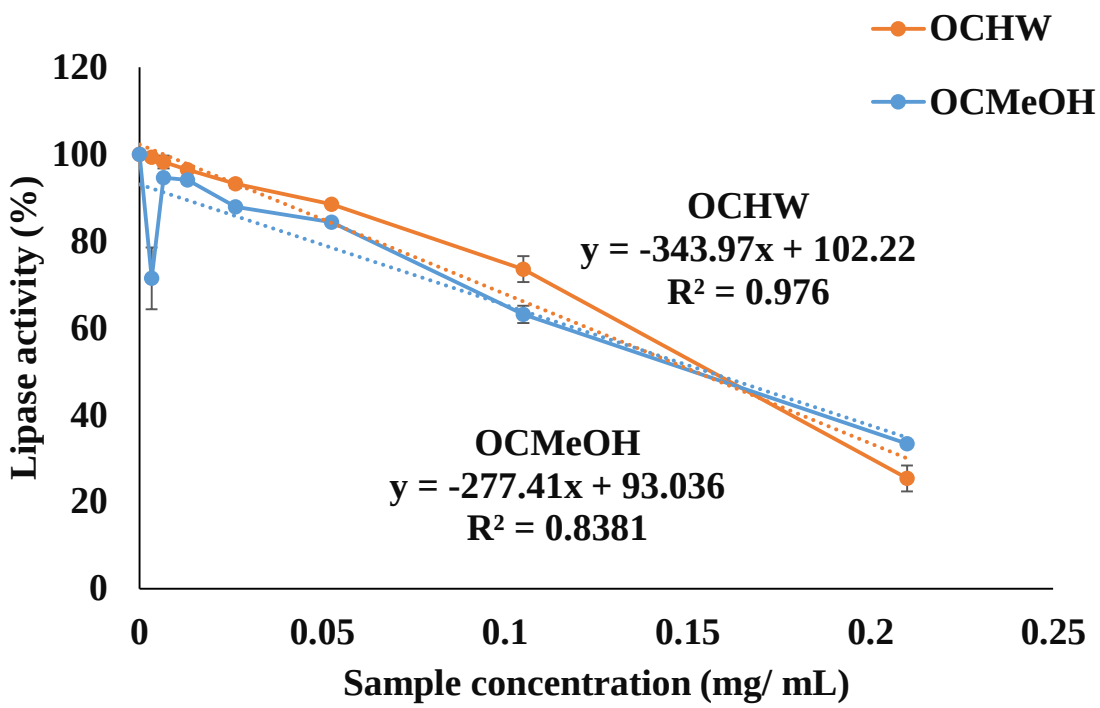


Figure 3-1 Lipase inhibitory activity test (*n* = 3).

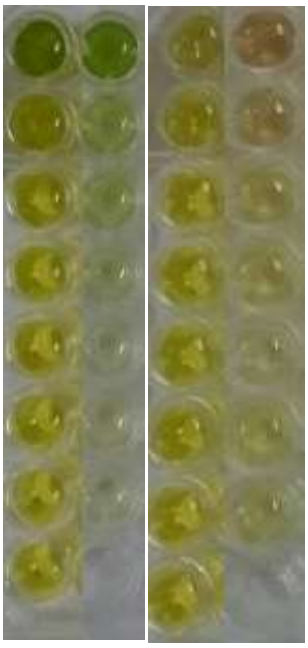


Figure 3-2 Lipase inhibitory activity test.

Left OCMeOH / color blank, Right OCHW / color blank.

3.2　高脂肪食長期給餌試験の結果・考察

OC の生体内での作用を確認するために、マウスに 2 か月間摂取させたときの影響を調べた。

4 週齢の雄性 ddY マウスを購入後、MR ストックで 1 週間予備飼育をした。その後、普通食群（ND）、高脂肪食群（HFD）、3% OCHW 添加高脂肪食群（3% OCHW）、1% OCHW 添加高脂肪食群（1% OCHW）の 4 群（1 群 8 匹、個別飼育）に群分けし、それぞれの飼料を与えた。摂餌量、飲水量、体重測定、一般状態の観察は週 2 回行った。62 日後にマウスを解剖後、各臓器重量、血液パラメーター、肝臓・糞中脂質を測定した結果を以下に示す。

試験期間中の摂餌量（図 3-3）、飲水量（図 3-4）ともにどの群間でも有意な差は見られなかった。各群の平均体重推移においては図 3-5 に示したとおり、ND 群と 3% OCHW 群が HFD に対して有意な差がみられた（$p < 0.01$）。このことから、3% OCHW には体重増加抑制効果があると考えた。

また、図 3-6 に示したとおり、肝臓重量 / 100 g 体重においては HFD 群に対してどの群も有意な差がみられなかった。体重当たりの肝臓の大きさが一番高いのは ND 群であったが、高脂肪食長期給餌試験では HFD 群において増加した体重で肝臓重量を割るため､割合として ND より小さくなっているためであり、実質的な変化はないと考えられる（桃井真理子, 2011, Miyata, M., et al., 2010）。腎臓重量には有意な差は見られなかった（図 3-7）。

精巣周囲の脂肪組織重量（図 3-8）と腎臓周囲の脂肪組織重量（図 3-9）は同じ傾向を示しており、3% OCHW 群では有意な差は見られなかったものの、HFD 群に対して脂肪組織重量が減少する傾向がみられた。リパーゼの活性を抑制することで脂質の摂取を減少させることにより、体重増加抑制効果、脂肪組織重量減少傾向がみられたと考えられる。血中パラメーターとして測定した Glc と TG

には HFD 群に対して有意な変化は見られなかった（図 3-10、図 3-11）。肝臓の TG 量（図 3-12）を測定したところ、どの群の間にも有意な差は見られなかったことから、OCHW は肝臓の TG 蓄積防止には働かないと考えられた。糞中の TG 量（図 3-13）において 3% OCHW 群、1% OCHW 群と ND 群の間で有意な差がみられた。HFD 群とはどちらの OCHW 群も有意な差は見られなかったが、どちらの OCHW 群も糞中の TG 量増加傾向がみられた。これは十二指腸でリパーゼの阻害をされたことにより、吸収されなかった TG が糞に混ざり体外へ排出されたためだと考えられた。各測定値は表 3-1 にもまとめて表示した。

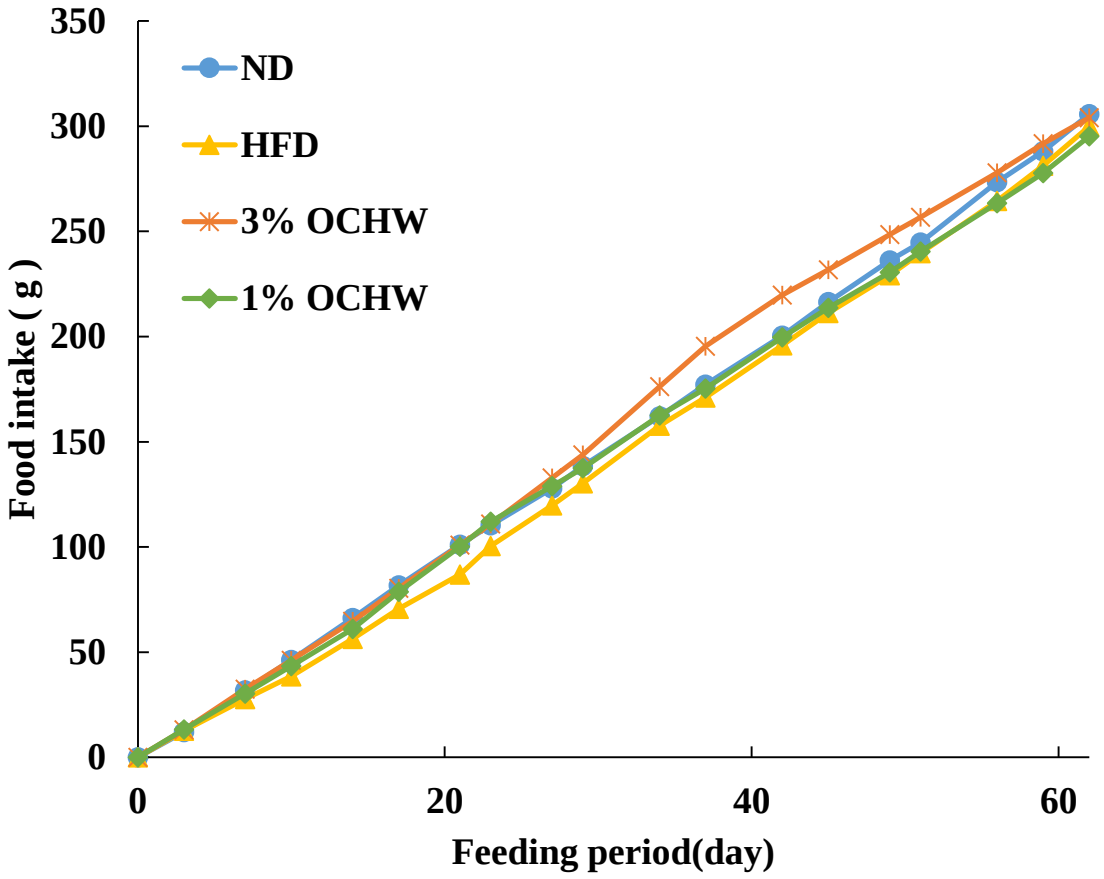


Figure 3-3 Cumulative food intake in high fat diet feeding test.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

There is no significant difference among the groups ($p < 0.05$, Tukey's test).

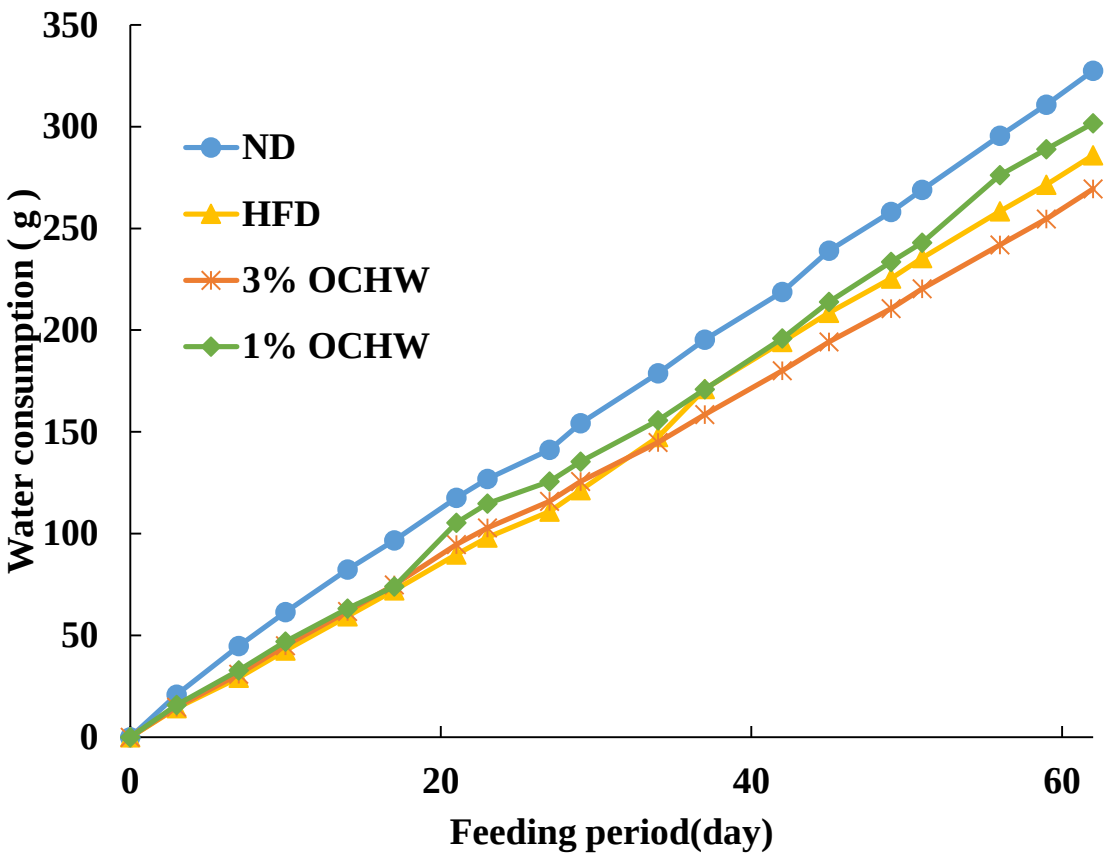


Figure 3-4 Cumulative water consumption.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

There is no significant difference among the groups ($p < 0.05$, Tukey's test).

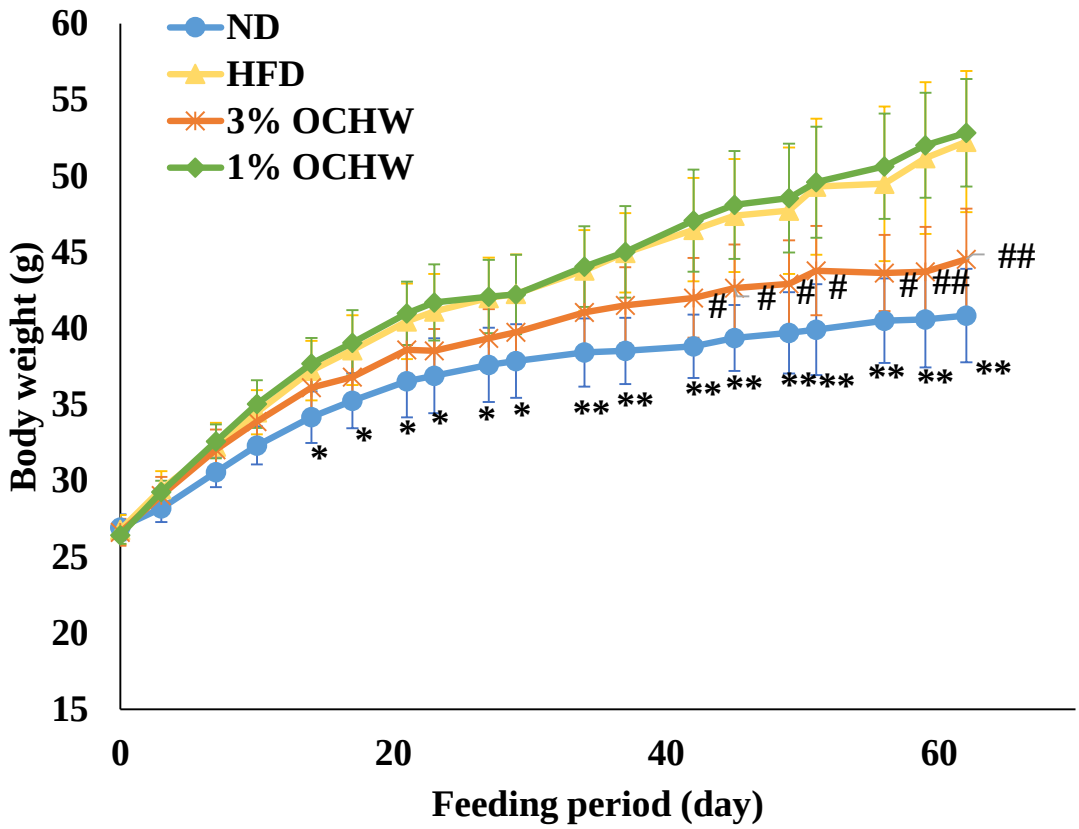


Figure 3-5 Changes body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

Different superscript letters indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$: *, $p < 0.01$:** vs HFD, Dunnett's test).

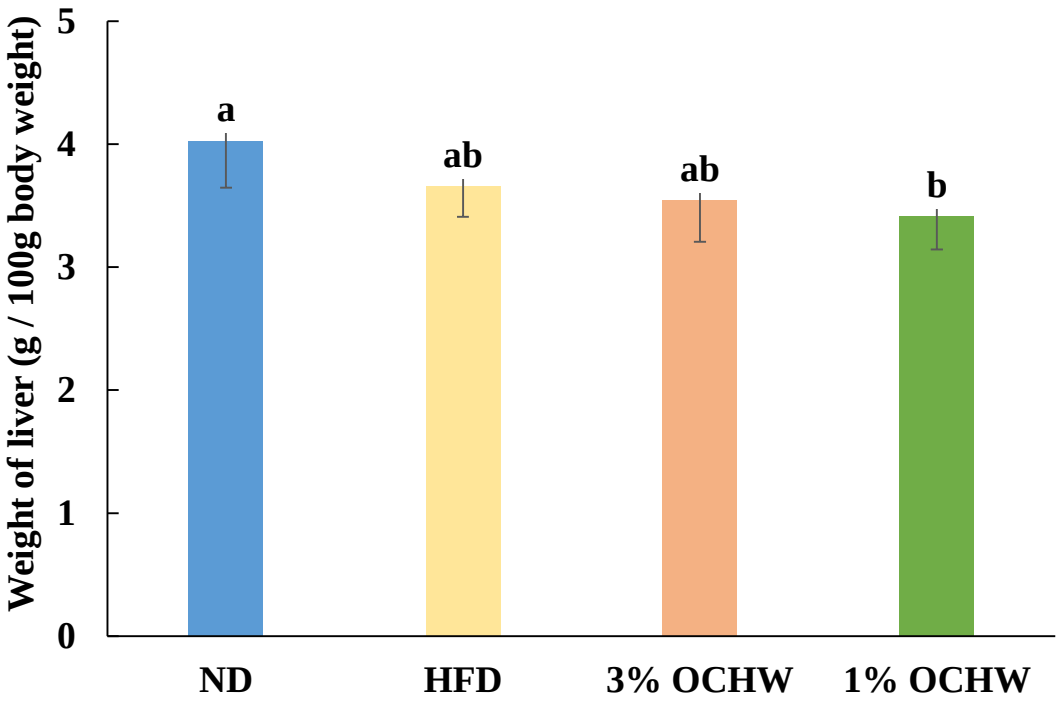


Figure 3-6 Weight of liver / 100g body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

Different superscript letters indicate significant difference among the dietary groups (p < 0.05, Tukey's test).

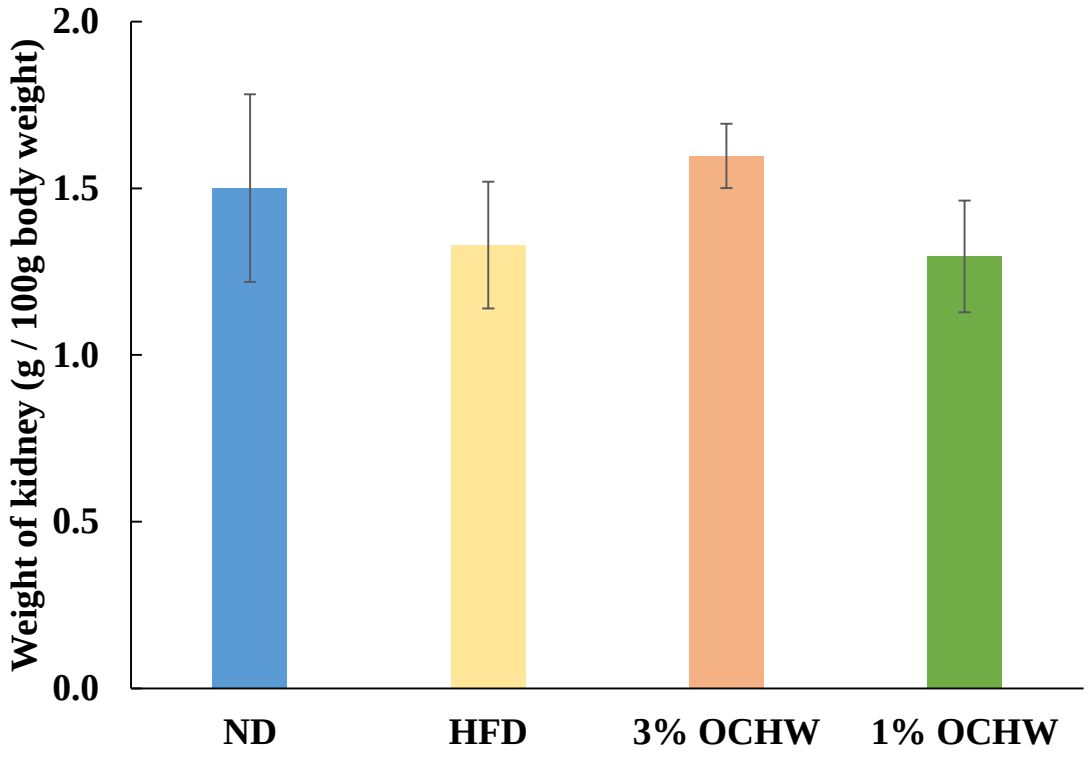


Figure 3-7 Weight of kidney / 100g body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, Tukey's test).

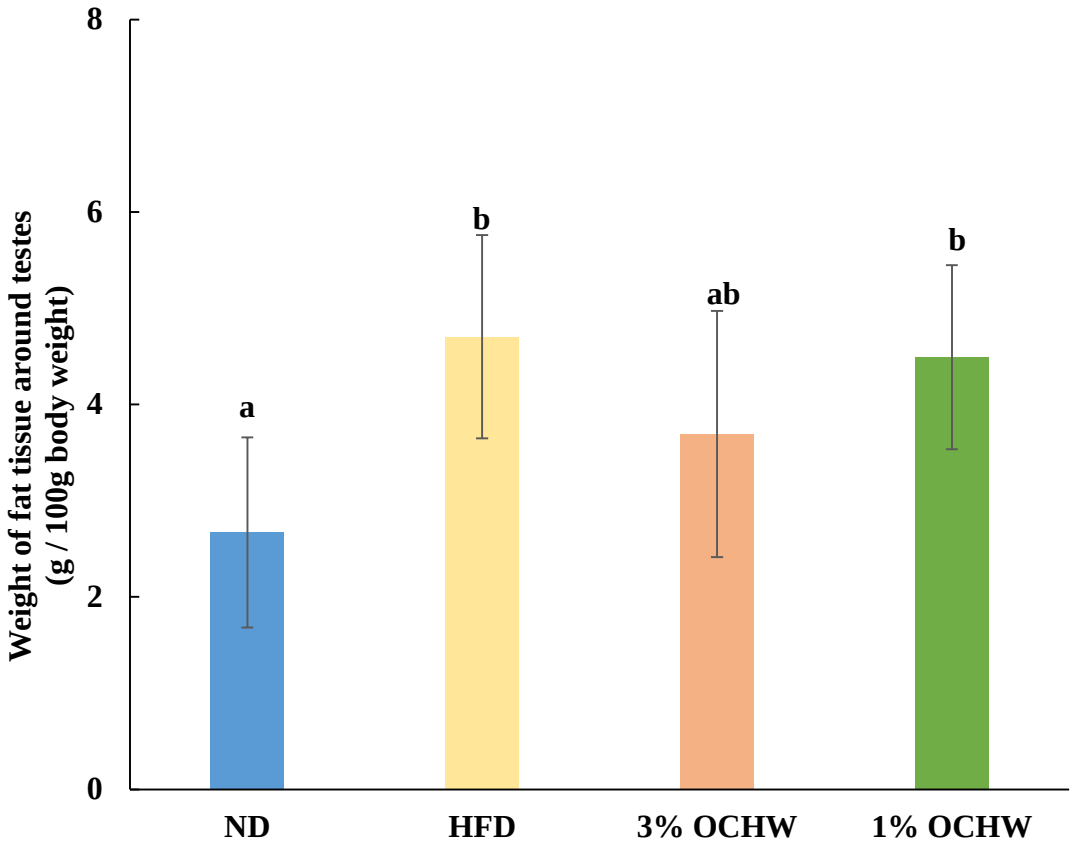


Figure 3-8 Weight of fat tissue around testes / 100g body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

Different superscript letters indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$, Tukey's test).

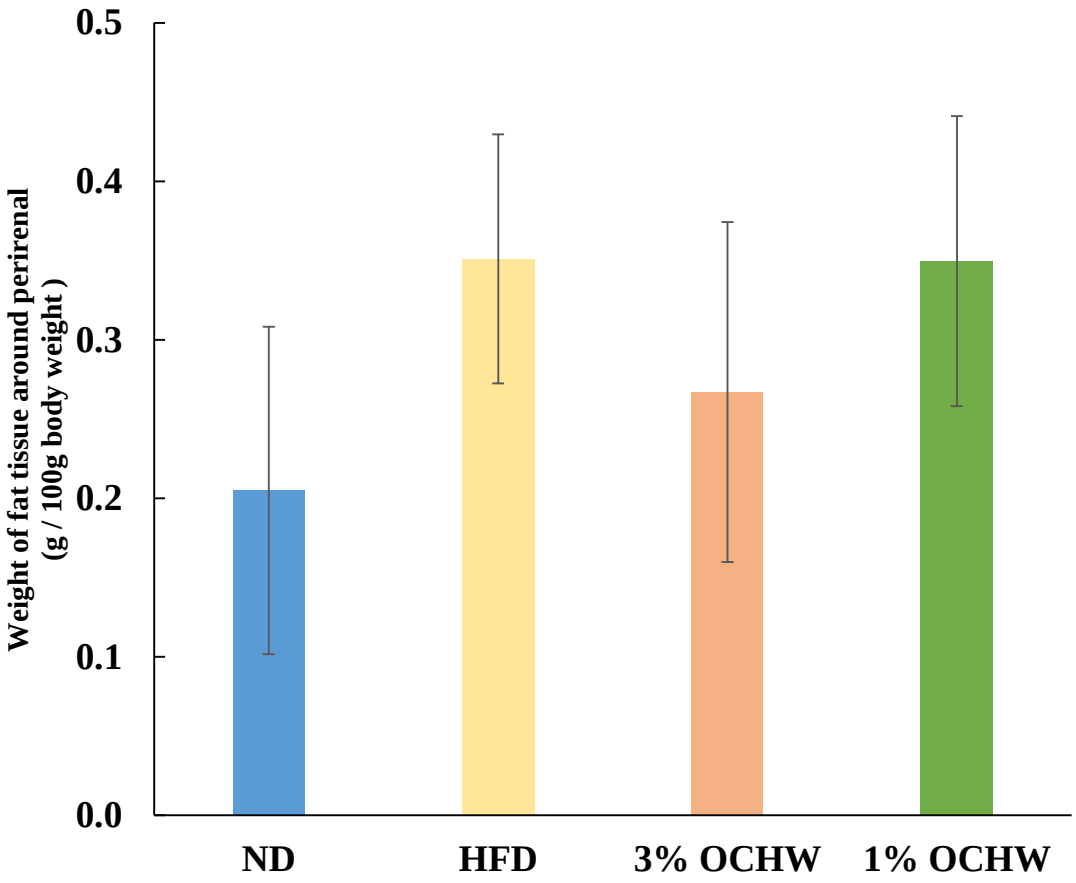


Figure 3-9 Weight of fat tissue around perirenal.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

There is no significant difference among the groups (p <0.05, Tukey's test).

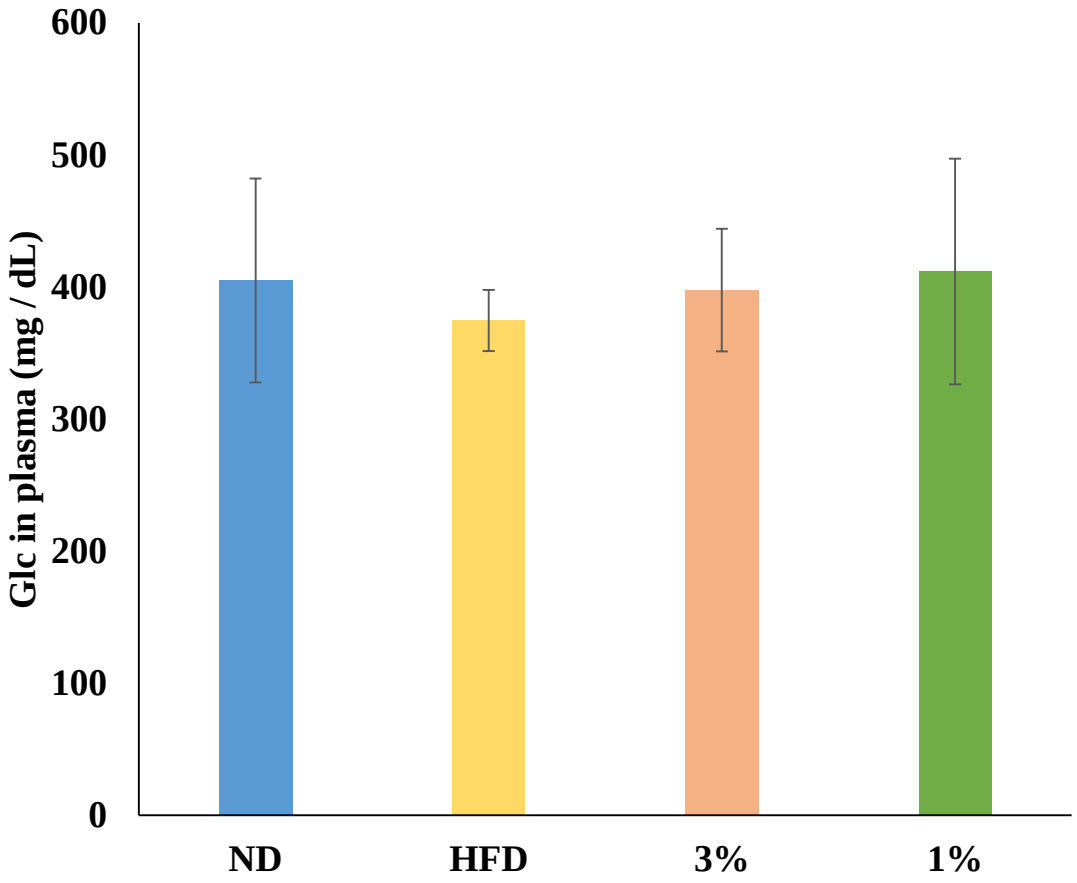


Figure 3-10 Glucose in plasma.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

There is no significant difference among the groups (p <0.05, Tukey's test).

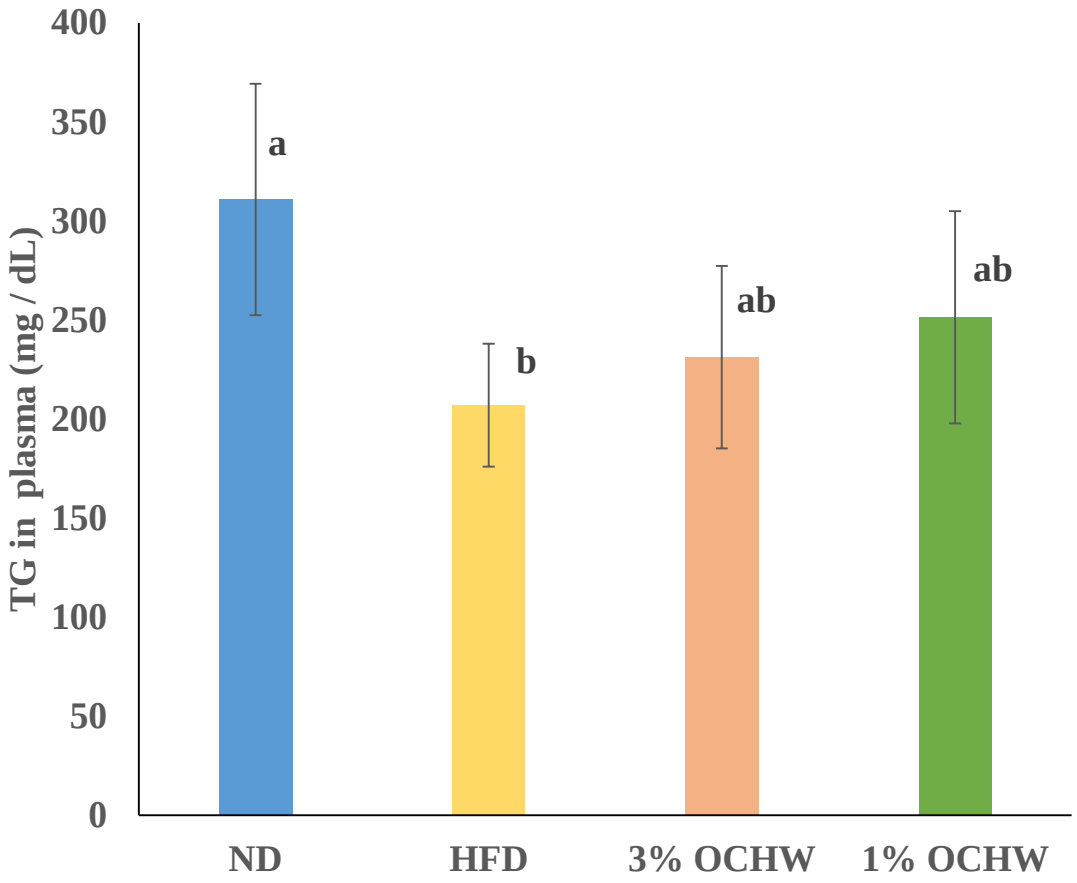


Figure 3-11 TG in plasma.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

Different superscript letters indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$, Tukey's test).

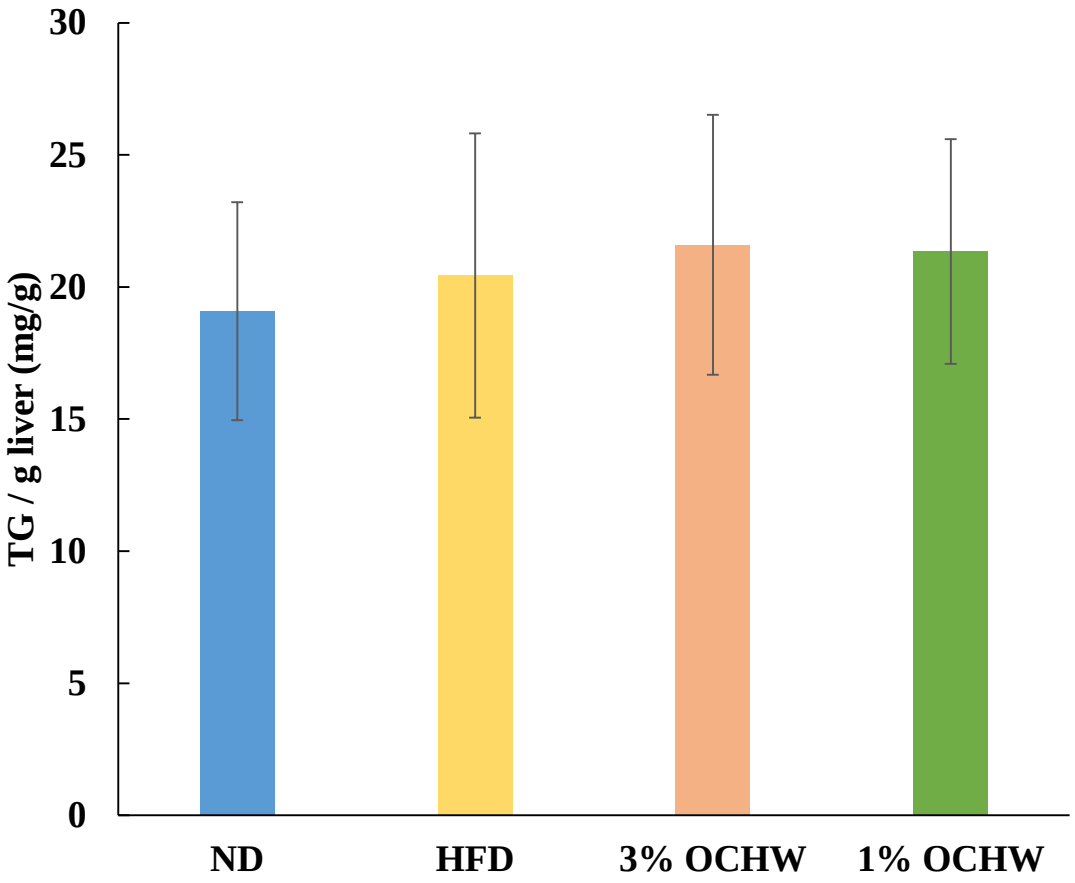


Figure 3-12 TG in 1 g liver.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

There is no significant difference among the groups ($p < 0.05$, Tukey's test).

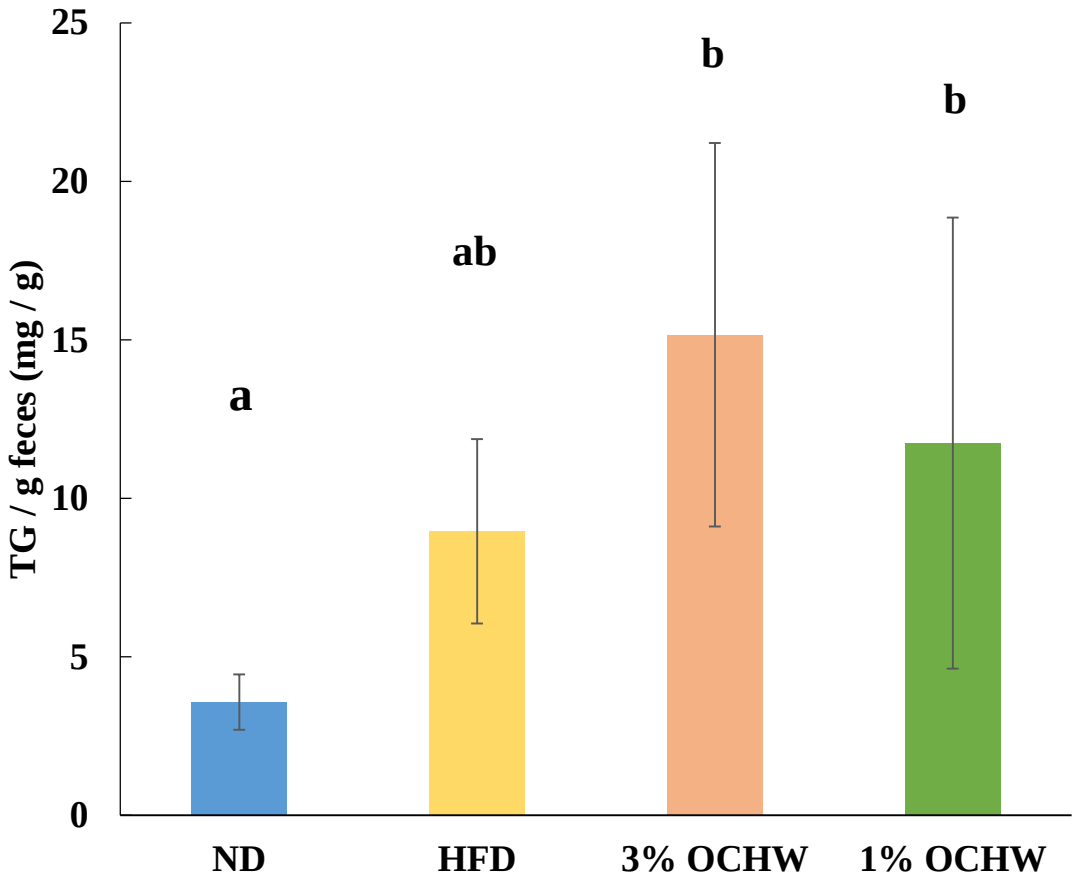


Figure 3-13 TG in 1 g feces.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

Different superscript letters indicate significant difference among the groups ($p < 0.05$: 1%, $p < 0.01$: 3% vs ND, Tukey's test).

Table 3-1 Body weight (g) and organs weight(g / 100 g).

	ND	HFD	3% OCHW	1% OCHW
Body weight before sacrificing (g)	**40.8±3.1 ****	**52.5±4.6**	**44.5±3.3 ##**	**52.8±3.5**
Liver (g/ 100 g body weight)	**4.0±0.4 a**	**3.6±0.2 ab**	**3.5±0.3 ab**	**3.4±0.27 b**
Kidney(g/ 100 g body weight)	**1.5±0.3**	**1.3±0.2**	**1.6±0.1**	**1.3±0.2**
Fat tissue around testes (g/ 100 g body weight)	**2.7±1.0 a**	**4.7±1.1 b**	**3.7±1.3 ab**	**4.5±1.0 b**
Fat tissue around perirenal (g/ 100 g body weight)	**0.20±0.10**	**0.35±0.08**	**0.27±0.11**	**0.35±0.09**
Glc in blood serum (mg/ dL)	**404.9±77.2**	**374.6±23.1**	**397.8±46.4**	**411.7±85.5**
TG in blood serum (mg/ dL)	**310.8±58.4 a**	**207±31.0 b**	**231.3±46.0 ab**	**251.4±53.5 ab**
TG in liver (mg/ g)	**19.1±4.1**	**20.4±5.3**	**21.6±4.9**	**21.3±4.3**
TG in feces (mg/ g)	**3.6±0.9 a**	**0.9±2.9 ab**	**15.2±7.1 b**	**11.7±4.7 b**

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. 3% OCHW is 3% OCHW + HFD. 1% OCHW is 1% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, HFD: n = 6, 3% OCHW, 1% OCHW: n = 7).

(p < 0.01: **, ##, Dunnett's test vs HFD, ^{a}p<0.05, Tukey's test)

3.3　高脂肪食長期給餌試験（再現実験）の結果・考察

OC の生体内での作用の再現性を確認するために、同じ混餌条件で再試験を実地した。

4 週齢の雄性 ddY マウスを購入後、MR ストックで 1 週間予備飼育をした。その後体重の平均を揃え、普通食群(ND)、高脂肪食群(HFD)、OC 熱水粗抽出物添加群(OCHW)に(各群 10 匹、個別飼育)分け、それぞれの餌を与えた。摂餌量、飲水量、体重測定、一般状態の観察は週 3 回行った。60 日目に解剖後、各臓器重量、血液パラメーター、肝臓・糞中脂質を測定した結果を以下に示した。各臓器は液体窒素で凍結後、-80℃で保管した。

60 日目において体重は ND 群と HFD 群（$p < 0.01$）、OCHW 群と HFD 群（$p < 0.05$）の間で有意な差がみられた。このことから体重増加抑制効果がみられたと考える。今回の臓器重量においては、どの群にも有意な差は見られなかった（図 3-17～3-20）。また、血中 Glc（図 3-21）、血中 TG（図 3-22）、肝臓 TG 量（図 3-23）にも有意な差は見られなかった。糞中の TG 量は前回と同様に、HFD 群に対して OCHW 群は糞中の TG 量増加傾向があり、再現性が取れたと考えられた（図 3-24）。これらの再現実験の結果によって、OCHW の抗肥満効果に再現性があると示された。また、これら測定値は表 3-2 にもまとめて示した。

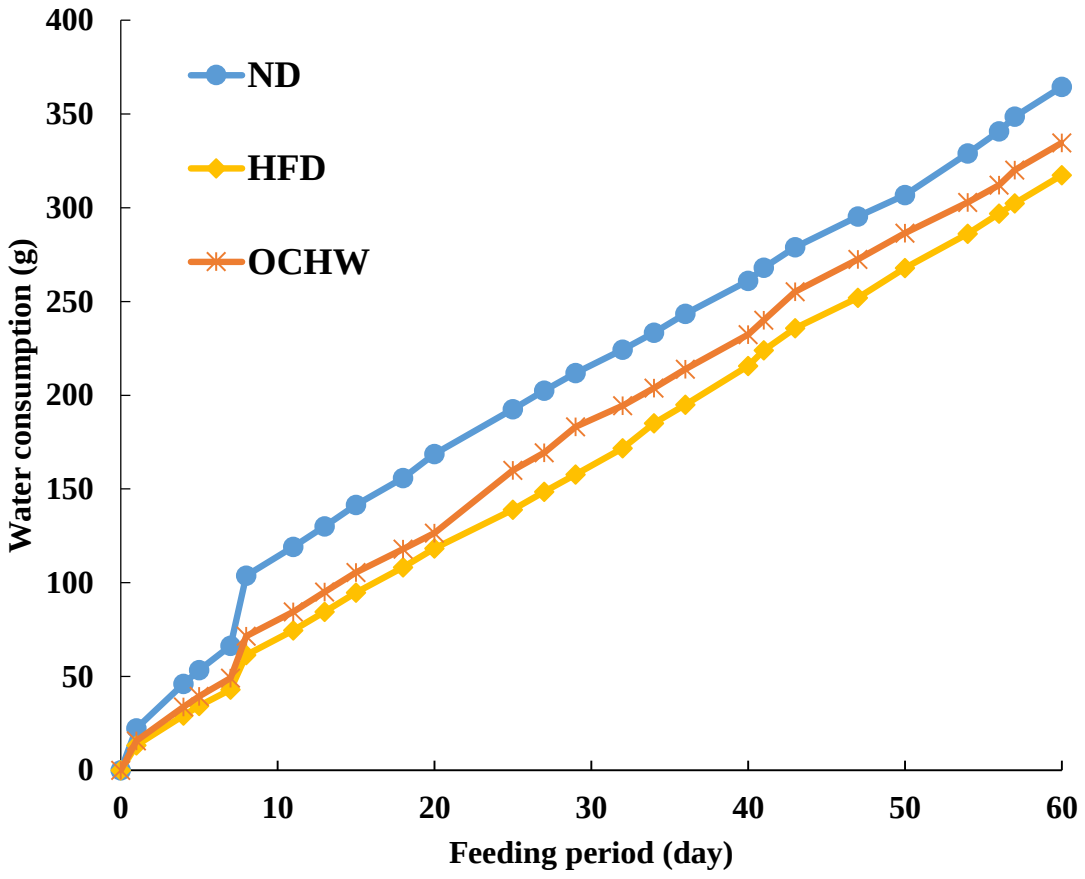


Figure 3-14 Cumulative water consumption.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

There is no significant difference among the groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

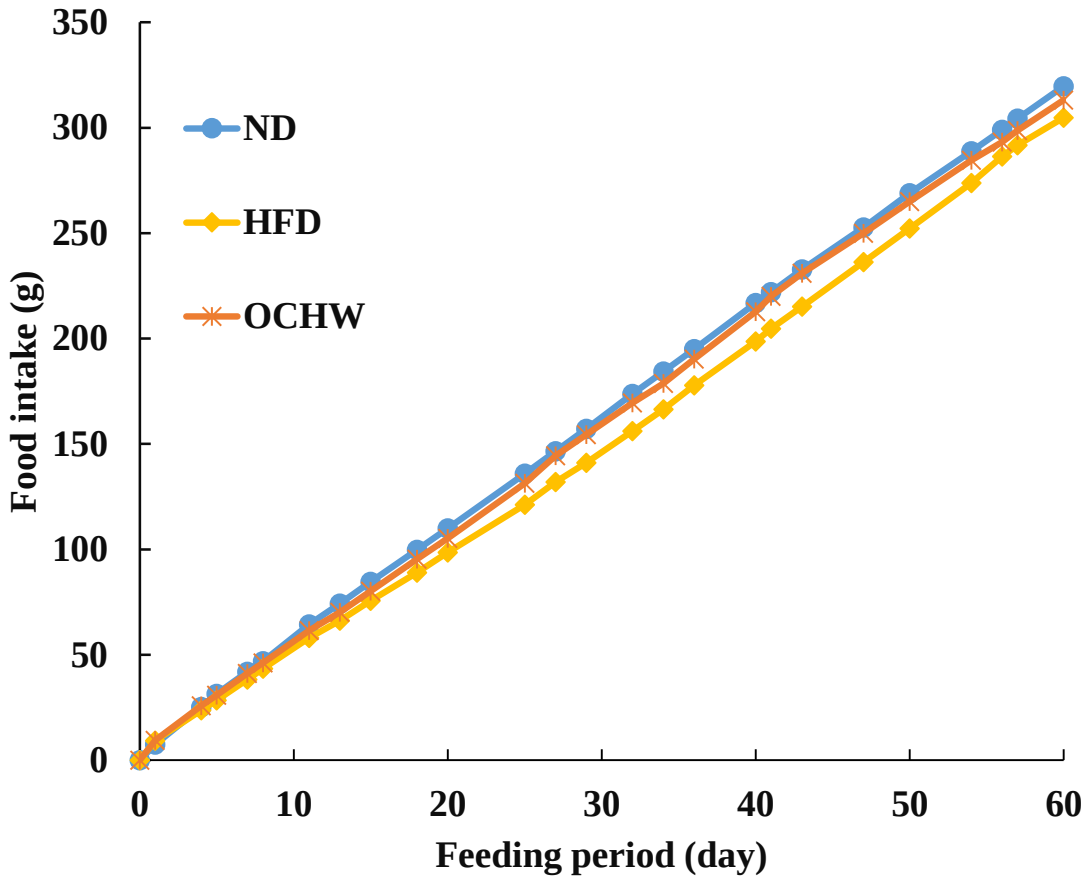


Figure 3-15 Cumulative food intake.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7) There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

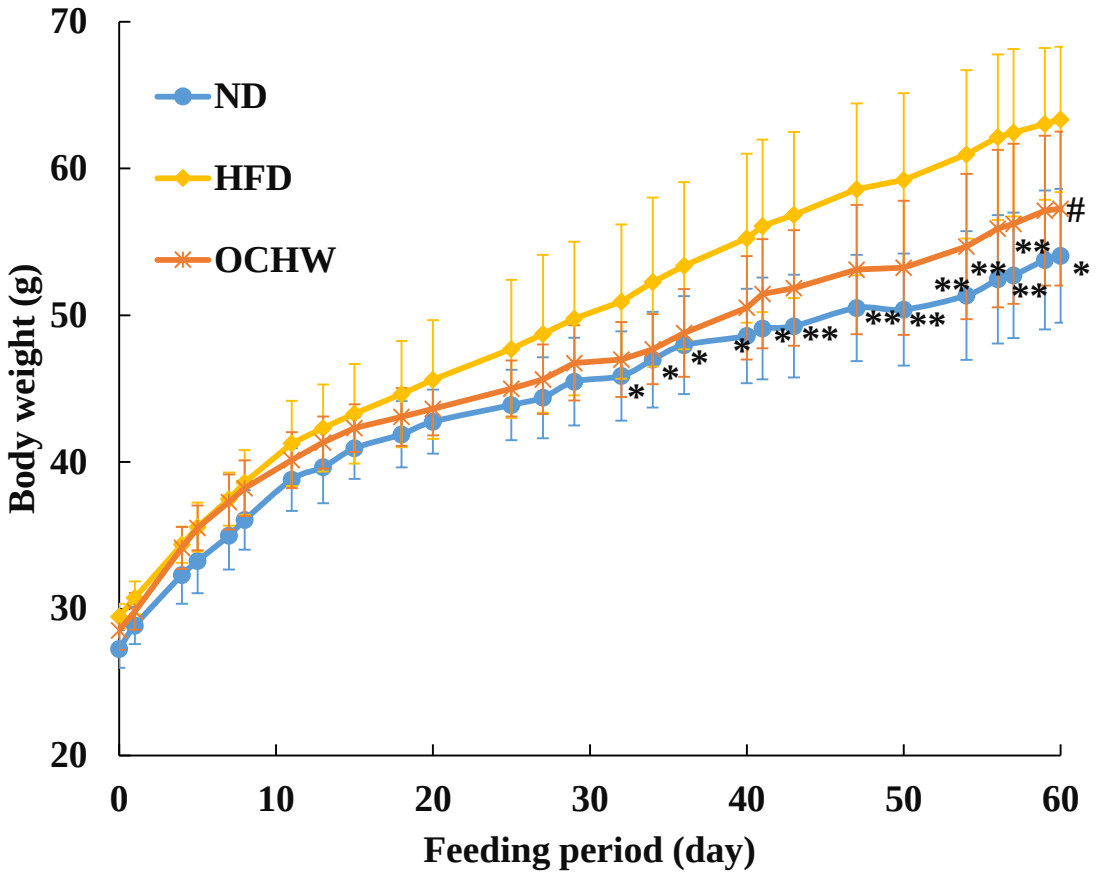


Figure 3-16 Change of average body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7)

Different superscript letters indicate significant difference among the dietary groups (p < 0.05: *, #, p < 0.01:** vs HFD, Dunnett's test).

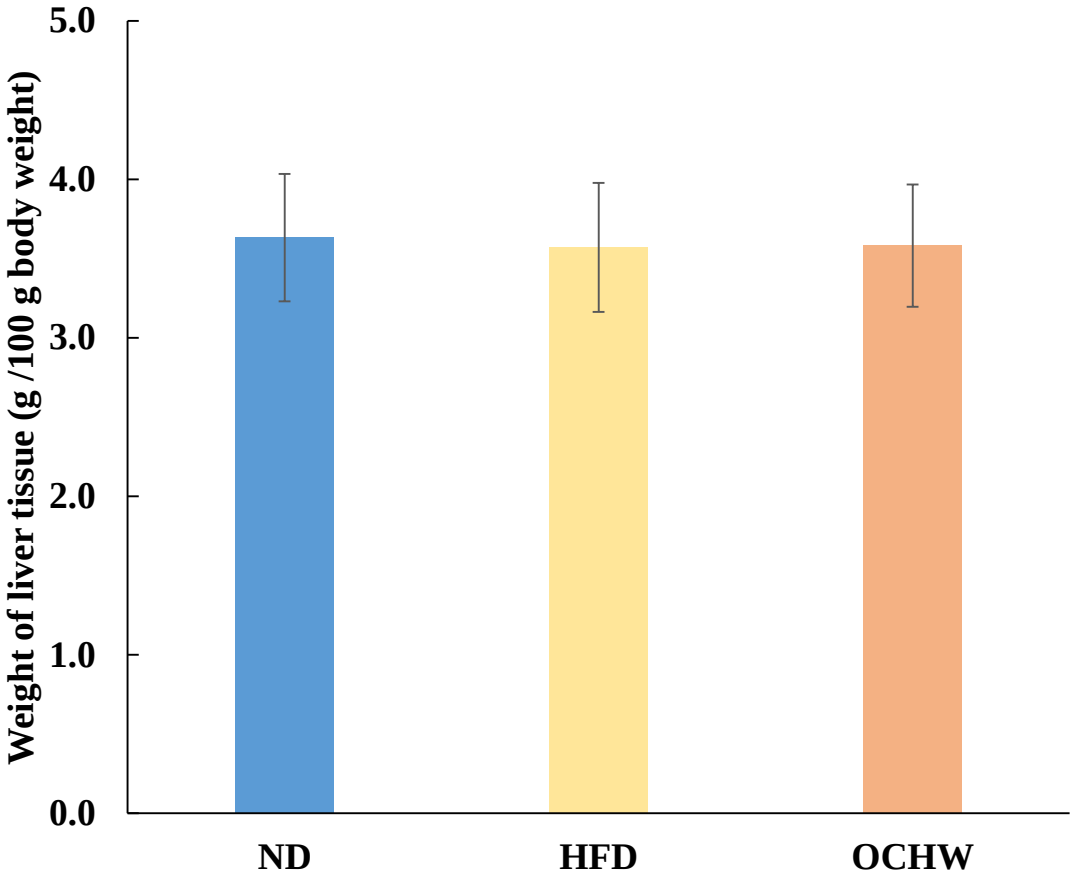


Figure 3-17 Weight of liver / 100 g body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7)

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

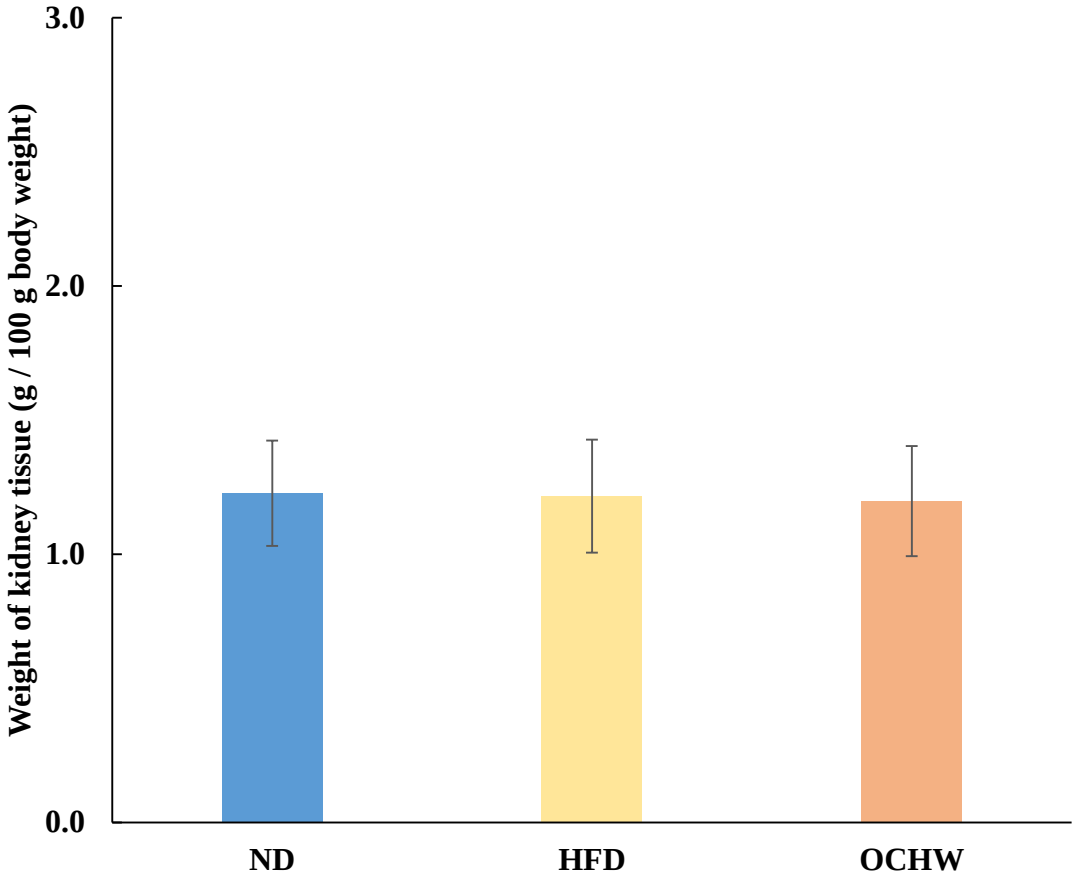


Figure 3-18 Weight of kidney / 100 g body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

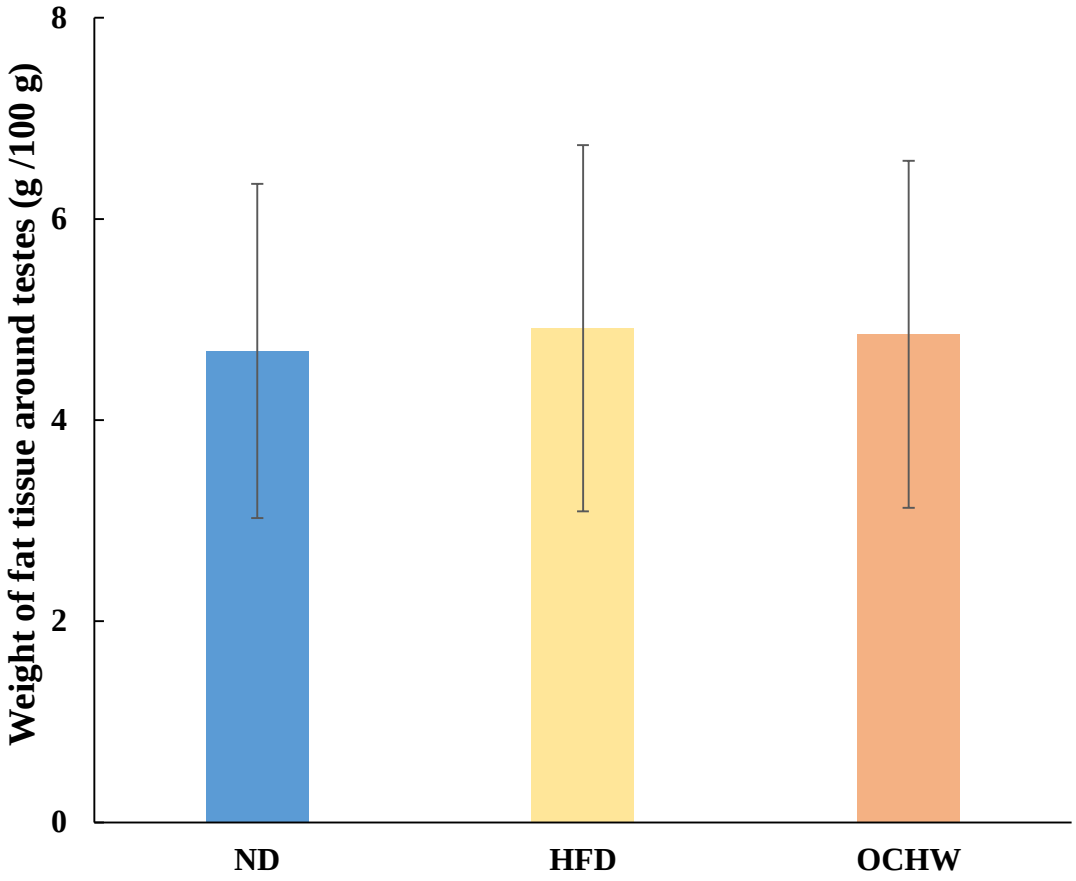


Figure 3-19 Weight of fat tissue around testes / 100 g body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

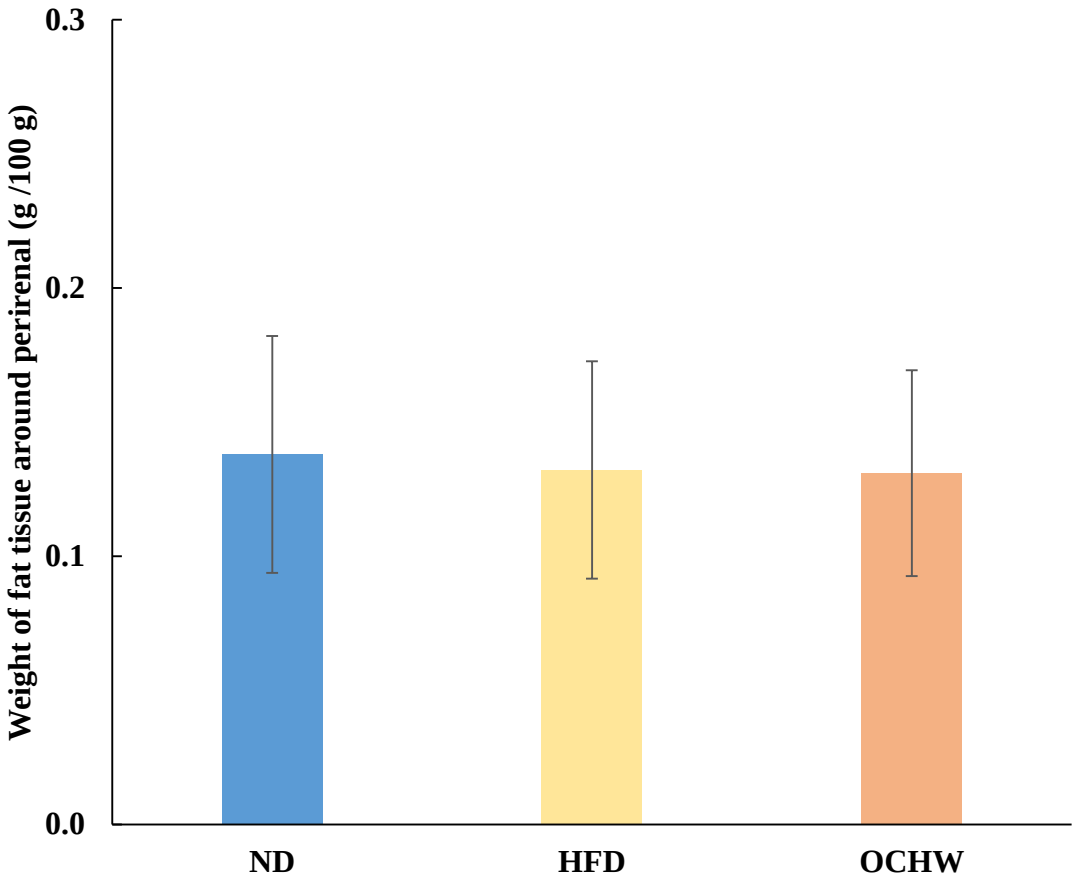


Figure 3-20 Weight of fat tissue around perirenal / 100 g body weight.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

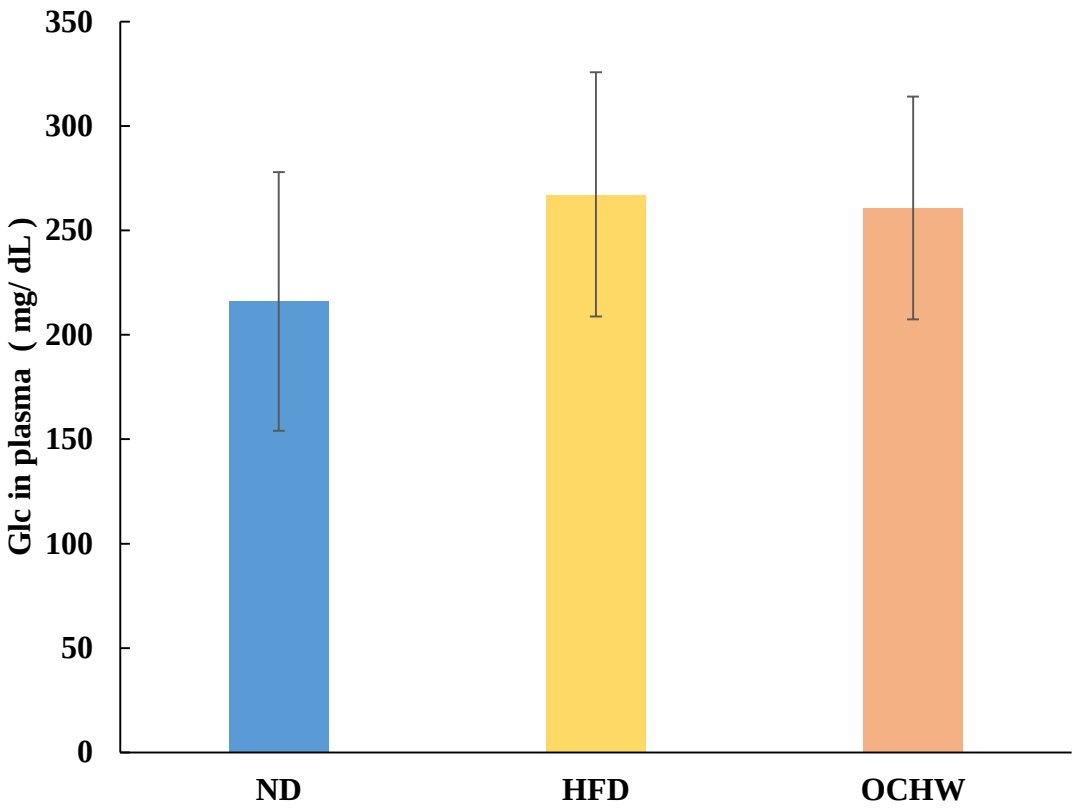


Figure 3-21 Glucose in plasma.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

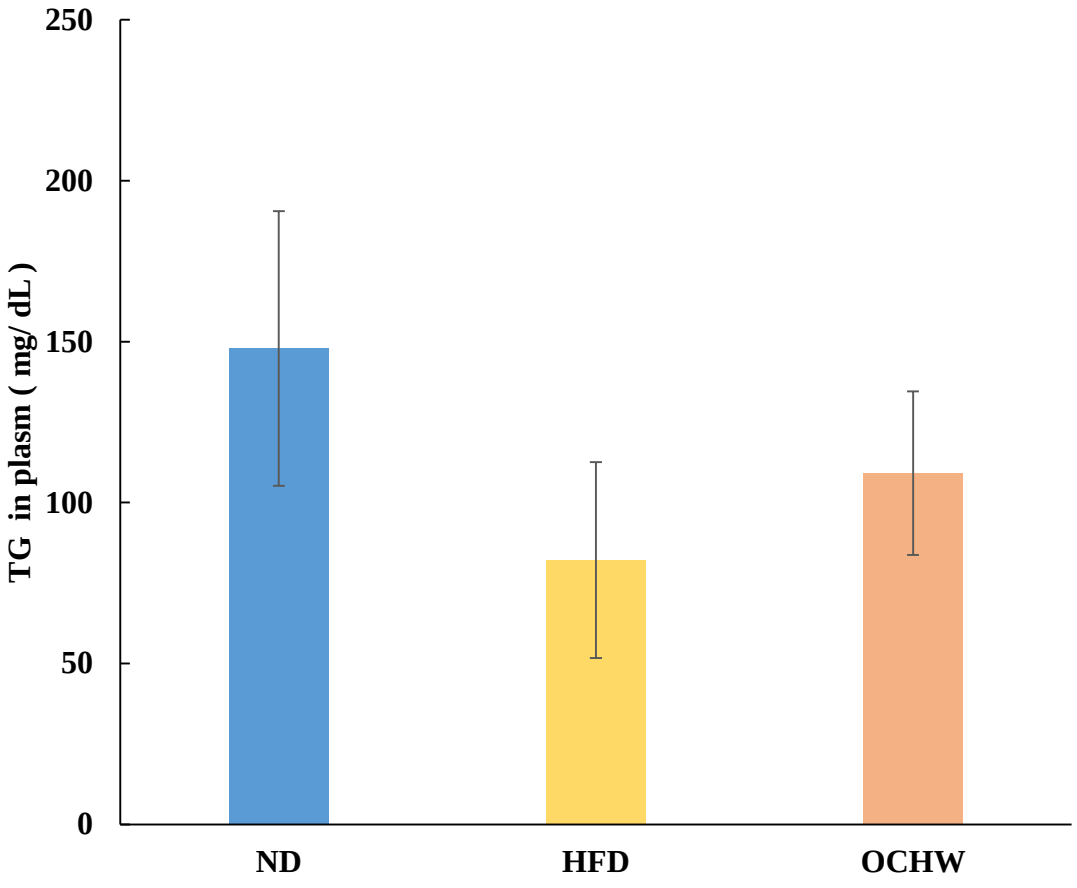


Figure 3-22 TG in plasma.

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

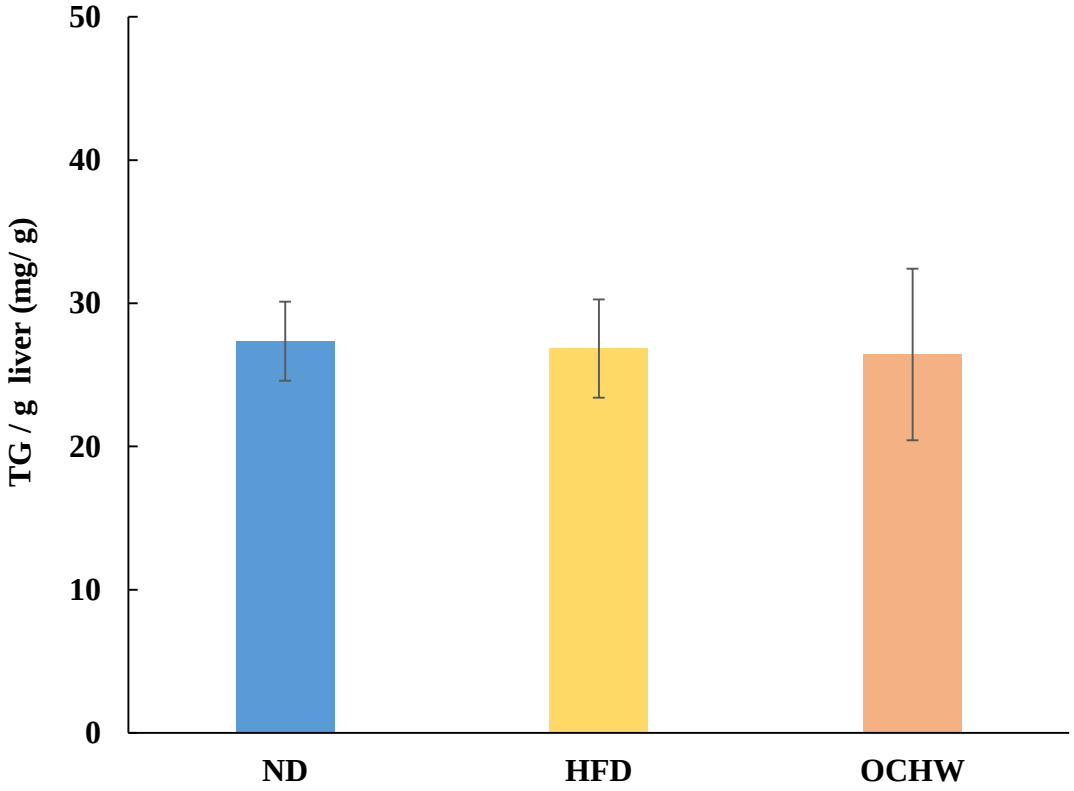


Figure 3-23 TG in 1 g liver (mg / g).

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

There is no significant difference among the dietary groups ($p < 0.05$, vs HFD, Dunnett's test).

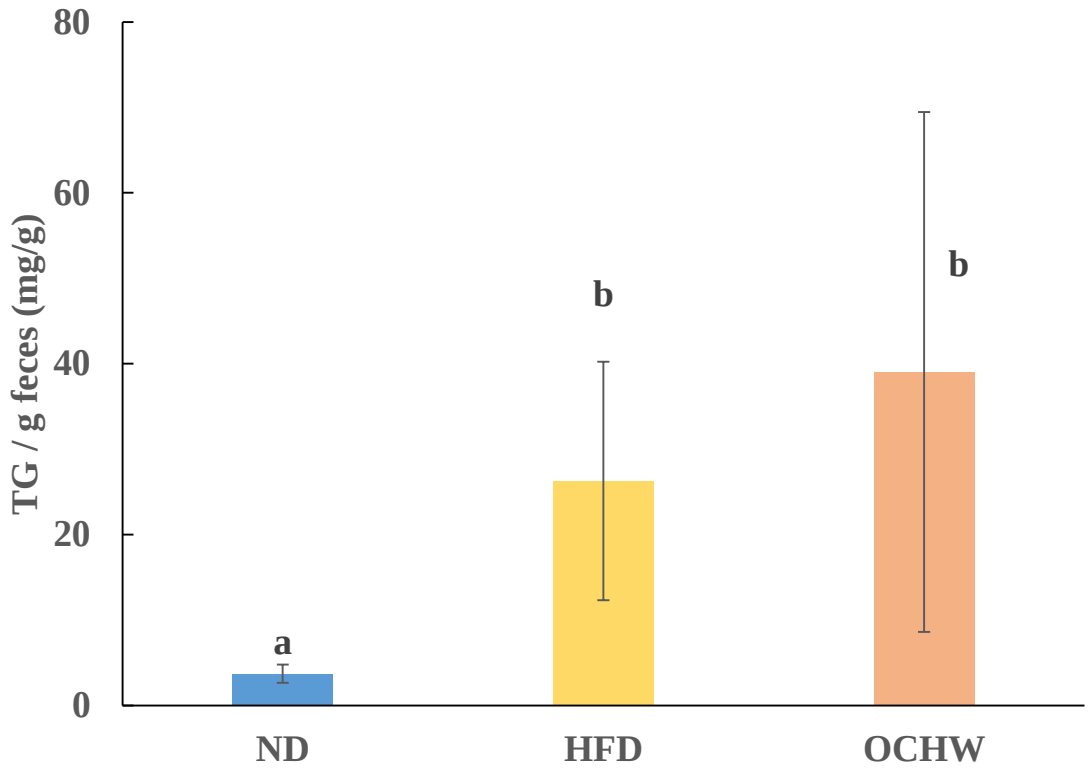


Figure 3-24 TG in 1 g feces (mg / g).

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

Different superscript letters indicate significant difference among the dietary groups.

Table 3-2 Body weight (g) and organs weight (g / 100 g).

	ND	HFD	OCHW
Body weight before sacrificing (g)	**54.1±4.6 ****	**63.3±4.9**	**57.3±5.2 #**
Liver (g/ 100 g body weight)	**3.6±0.4**	**3.6±0.4**	**3.6±0.4**
Kidney(g/ 100 g body weight)	**1.2±0.2**	**1.2±0.2**	**1.2±0.2**
Fat tissue around testes (g/ 100 g body weight)	**4.7±1.7**	**4.9±1.8**	**4.9±1.7**
Fat tissue around perirenal (g/ 100 g body weight)	**0.14±0.04**	**0.13±0.04**	**0.13±0.04**
Glc in blood serum (mg/ dL)	**216±62.0**	**267.3±58.5**	**260.8±53.3**
TG in blood serum (mg/ dL)	**147.8±42.7 a**	**82±30.4 b**	**109.1±25.4 ab**
TG in liver (mg/ g)	**27.4±2.8**	**26.8±3.4**	**26.4±6.0**
TG in feces (mg/ g)	**3.7±1.1 a**	**26.3±14.0 b**	**39.0±30.4 b**

ND is Normal Diet. HFD is High fat diet. OCHW is 3% OCHW + HFD. Values are means ± S.D for each group (ND, OCHW: n = 8, HFD: n = 7).

($p < 0.05$: #, $p < 0.01$: **, Dunnett's test vs HFD, [a] $p<0.05$ Tukey's test)

3.4　精製および構造解析の結果・考察

in vivo のリパーゼ活性阻害試験においてリパーゼの阻害がみられた OCHW の阻害物質を特定するために精製を行った。

まず、OCHW 0.7513 g を ODS カラムにて分離した（図 3-25）。ODS カラム（φ：35 mm、長さ：135 mm、ODS 量：15.00 g）に DW を 3 volume、100% MeOH を 3 volume を流し、溶出させた（1 volume = 30 mL）。各フラクションの回収率を表 3-3 に示した。溶出した液体を遠心凍結乾燥機で乾燥させた後、リパーゼ阻害活性試験を行った。

カラムクロマト（コスモシール）で得られた Fr.1～Fr.6 のリパーゼ阻害活性を評価した結果、Fr.1 と Fr.5 が強い活性を示したことから、これら画分に阻害物質が含まれると考えられた（図 3-26）。しかし Fr.5 の活性は、OCMeOH を評価したときと同様に Fr.5 の溶液の色が濃すぎるために吸光度が変化し、見かけ上活性が強く現れたと考えられた。よってリパーゼ阻害活性の本体は主に Fr.1 に含まれていると考え、この画分の分離を進めた。また、Fr.1 は水溶出の 1 番目のフラクションであることから、リパーゼ阻害活性物質は極性の高い物質であると判断された。

次に Fr.1 の NMR を測定した所、図 3-27 のような結果が得られた。この時点では混合物であり物質の特定には至らないが、プロトンでは 3～4 ppm、カーボンでは 60～80 ppm に主要なシグナルが観測された。HMQC（図 3-28）や COSY、HMBC などの 2D 実験でプロトンとカーボンの相関を見たところ、図 3-29 のような部分構造がみられた。これらより、Fr.1 に含まれる主成分は糖やグリセロールなどのポリオール低分子化合物であると推定された。実際にオリゴ糖（Fujikawa, S. et al., 2007）やガラクトグリセロール（吉本雄大, 2010, 高橋正和, 2014）にはリパーゼの阻害作用があると報告されていることから、類似の化合物

である可能性が考えられる。植物の熱水抽出物から得られるリパーゼ阻害活性物質を考えた時、緑茶のカテキン（Ikeda, I., et al., 2004）烏龍茶重合ポリフェノール（中井正晃ら, 2005）等のポリフェノール類を想定していた。しかし、^{13}C NMR の結果からはカルボニル基（＞C = O）やフェノール（Ar - OH）は見られなかった。このことから、OCHW に含まれるリパーゼ活性阻害物質はポリフェノールではないと判断された。

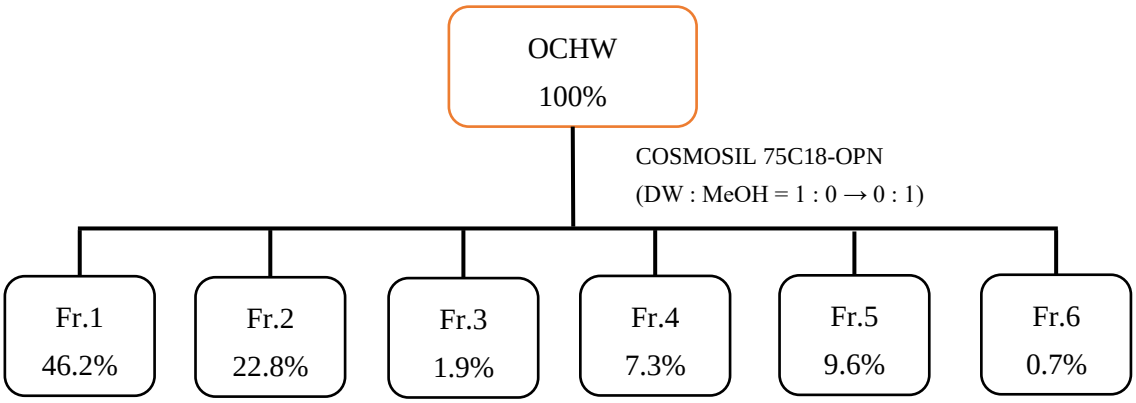


Figure 3-25 Separation scheme of OCHW.

Table 3-3 Portion of solution and recovery rate.

	Solvent	Dry weight (g)	Recovery rate (%)
Fr.1	DW	0.3470	46.2
Fr.2	DW	0.1716	22.8
Fr.3	DW	0.0143	1.9
Fr.4	100% MeOH	0.0548	7.3
Fr.5	100% MeOH	0.0722	9.6
Fr.6	100% MeOH	0.0051	0.7

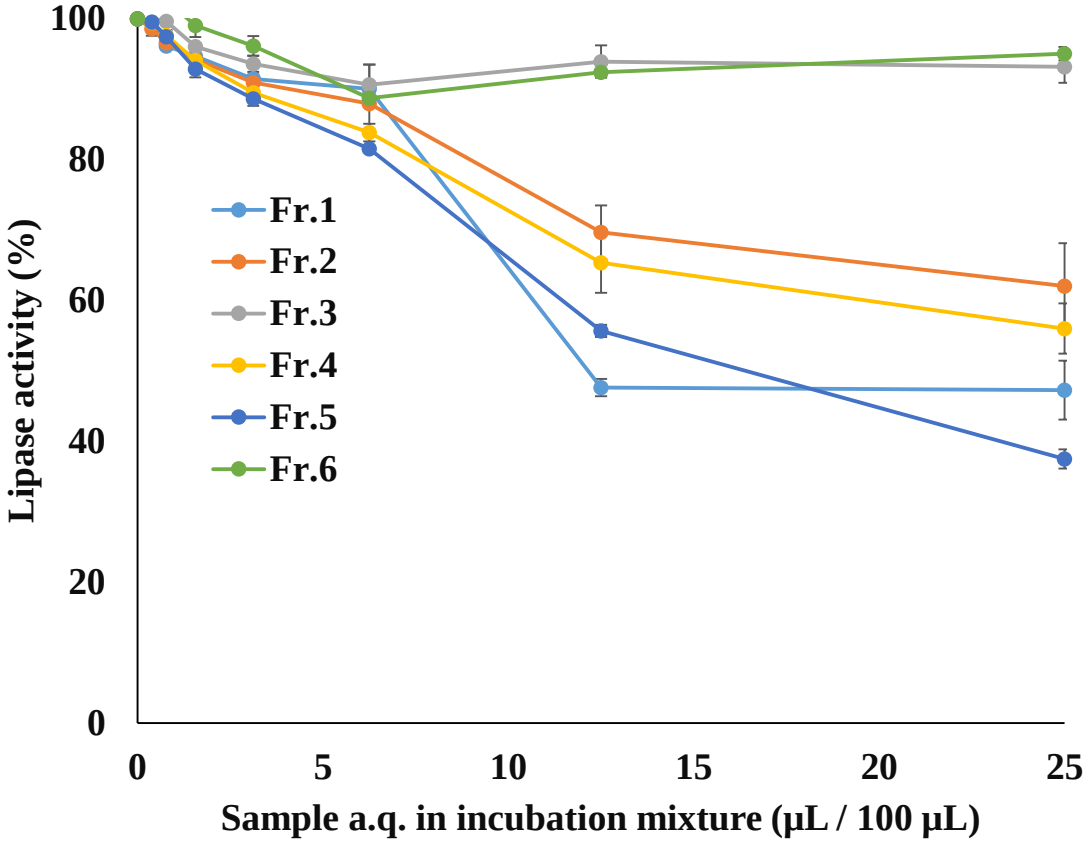


Figure 3-26 Lipase activity inhibitory test after subtracting color blank (*n* = 2).

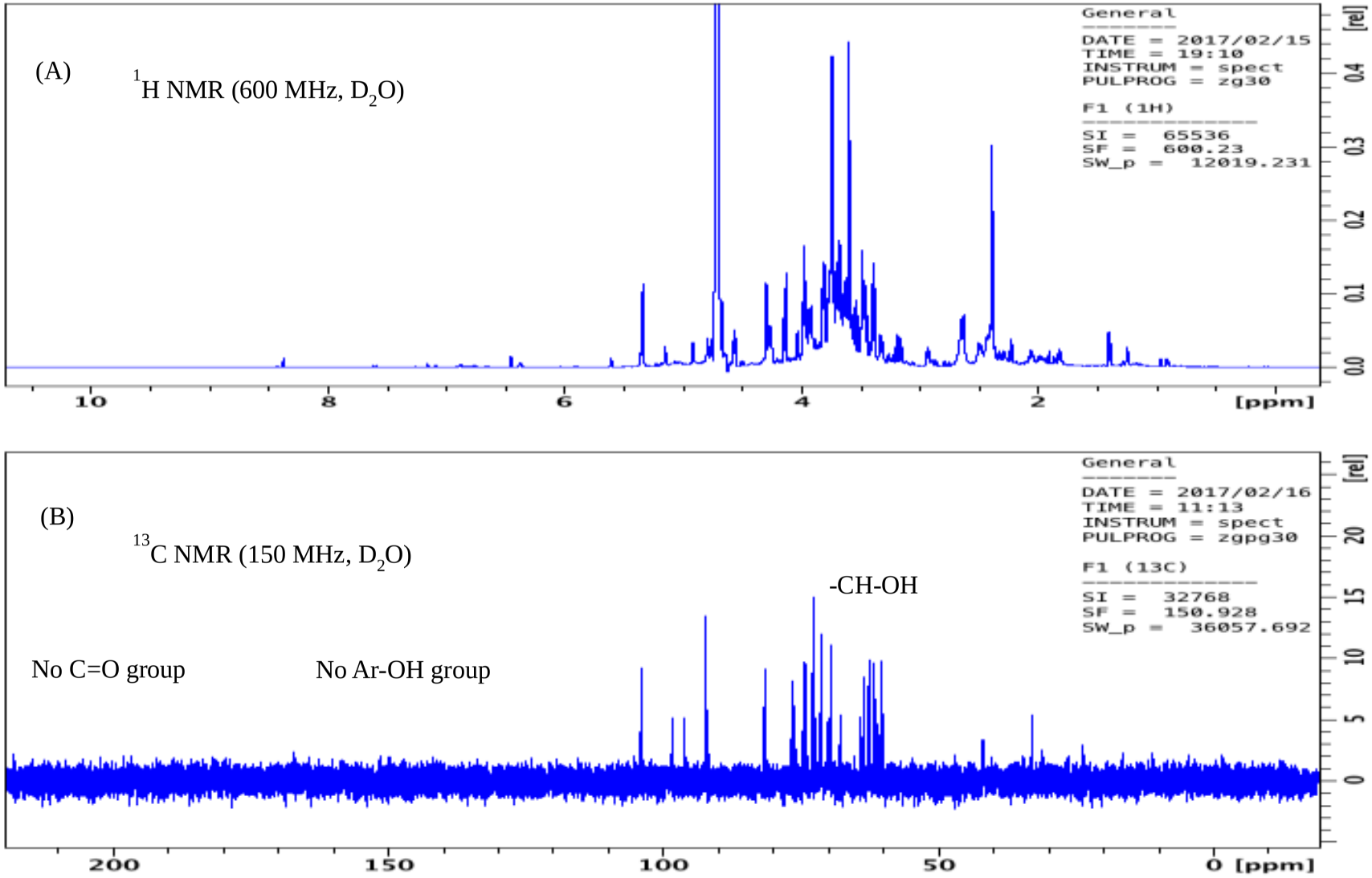


Figure 3-27 Result of NMR of Fr.1.

(A) ^{1}H NMR, (B) ^{13}C NMR

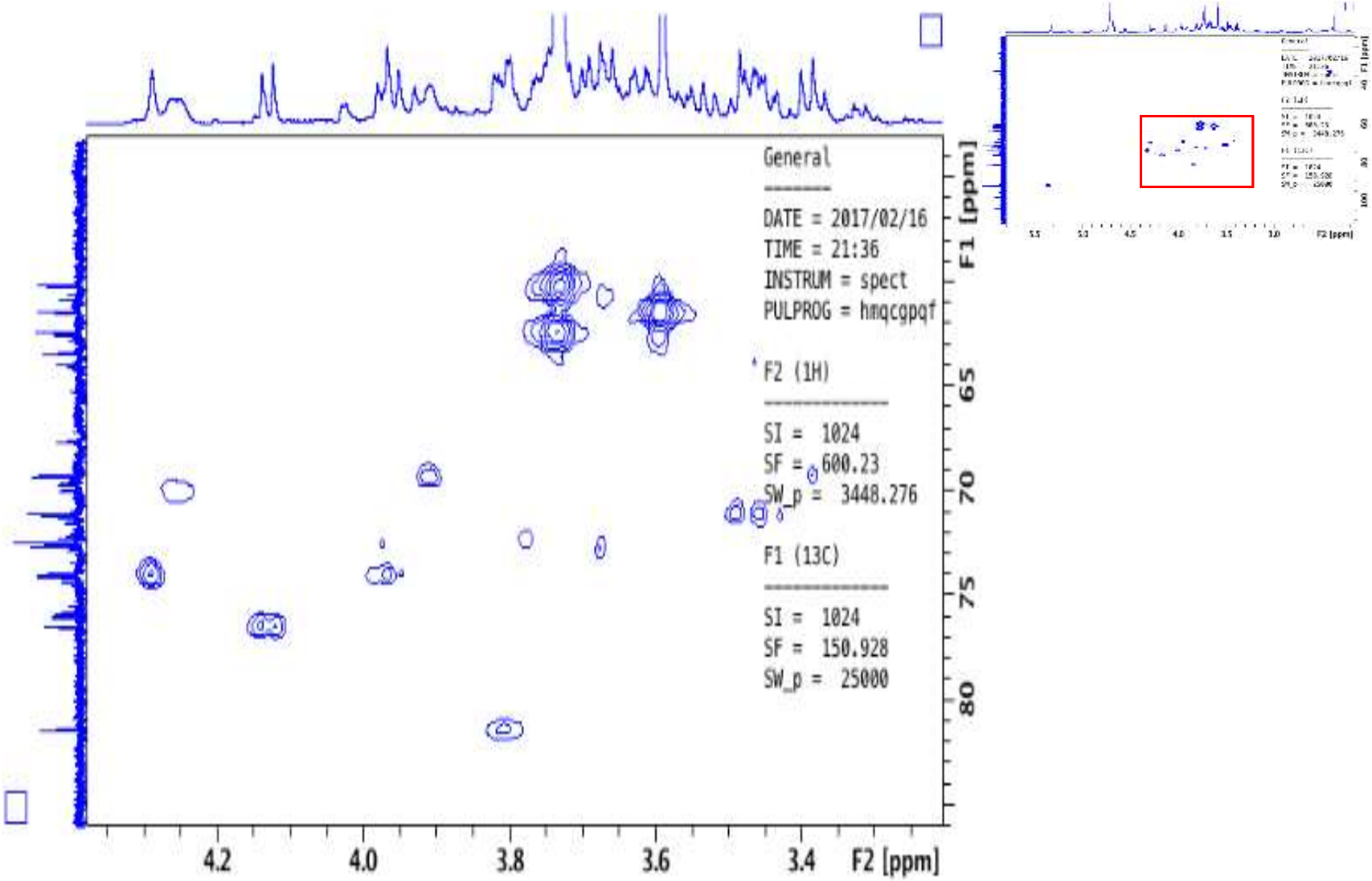
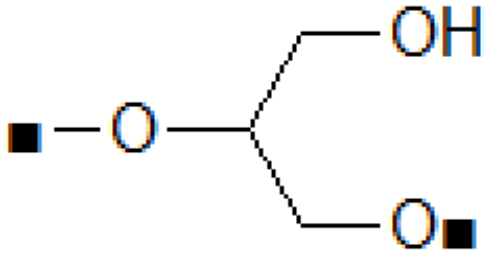
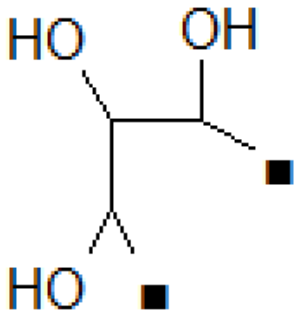


Figure 3-28 2D NMR HMQC spectrum.

(A)



(B)



(C)

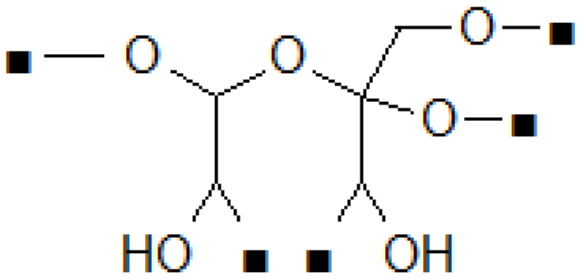


Figure 3-29 Expected partial structural formula.

第 4 章　総括

現在、肥満者の増加が世界中で深刻な問題になっていることを踏まえ、本研究では食品素材から抗肥満作用を持つ天然由来成分を探索した。その結果、*Ocimum canum*（OC）が有用であることを見出した。

OC の熱水粗抽出物（OCHW）はリパーゼ活性阻害試験において、リパーゼ活性を阻害したことからリパーゼの阻害による抗肥満作用があると考えた。その後の高脂肪食長期給餌試験において、高脂肪食群（HFD）と 3%OCHW 添加高脂肪食群（3% OCHW）は体重に有意な差がみられ体重増加抑制効果を示した。臓器重量において腎臓周囲の脂肪組織、精巣周囲の脂肪組織で 3% OCHW 群は減少傾向にあった。しかし、肝臓中の TG 量や血漿中の TG 量には影響を与えなかったことから、臓器の脂肪蓄積阻害には働かなかった。また肥満になるとインスリン抵抗性が働くため、血中 Glc 量が高くなると考えたが、相関はみられなかった。また、リパーゼを阻害すると食餌中の TG は消化・吸収されずに糞に混ざって体外に排出される。糞中の TG を測定した所、OCHW は HFD 群と比べると増加傾向が示された。これは十二指腸でリパーゼが阻害されたことにより、吸収されなかった TG が糞に混ざり体外へ排出され、体重増加世の抑制につながったためだと考えた。

高脂肪食長期給餌試験（再現実験）においても、高脂肪食群（HFD）と 3%OCHW 添加高脂肪食群（3% OCHW）は体重に有意な差がみられ体重増加抑制効果を示した。しかし、今回は脂肪組織には有意な変化がみられなかった。糞中の TG においては、HFD 群と OCHW 群の間に有意な差は見られなかったが、OCHW 群

の TG 量が顕著であったことから、OCHW 群のほうが糞中の TG 排出増加傾向があると判断された。このことから、リパーゼ阻害を裏付けるものであり、OC のマウスにおける作用が確認されたと考えた。

1 回目と 2 回目の試験結果を比較した場合､2 回目が若干弱いように見えるが、これは OCHW を抽出後半年間冷凍保存したことが原因の可能性がある。抽出物の安定性についての検討も必要だと思われる。

OCHW の精製において、Fr.1（水層の 1 番目）にリパーゼ活性阻害がみられたことから、OCHW に含まれるリパーゼの阻害物質は極性の高いものであると判断した。また、NMR の測定結果よりポリフェノール類によく見られるカルボニル基やフェノール基がみられないことから、ポリフェノールが含まれていないと考えた。2D 解析を行ったところ、ポリオール化合物が含まれることが推定された。この主成分はグリセロールやポリオールであり、OCHW に含まれる阻害活性物質はこれらに類似した成分である可能性が考えられた。

本研究によって、OCHW の抗肥満作用を明らかにすることができた。世界中で深刻な社会問題となっている肥満者の増加を、抗肥満作用を持つ食品で肥満を予防･改善していくことが不可欠である。そのために科学的根拠がある特定保健用食品や機能性表示食品が必要となる。OC の関与成分が明らかとなれば、既存のポリフェノール類とは異なる新しいタイプの抗肥満予防食品に応用できる可能性も広がる。以上のことから、本研究結果は非常に有用であると考える。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なる御指導をいただきました東京海洋大学大学院食品栄養化学研究室の小山智之准教授に深く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、多大なる御指導をいただきました食品栄養化学研究室の大島敏明教授、長阪玲子助教、食品微生物学研究室の久田孝准教授にお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、給餌試験用の飼料作成において多大なるご支援とご協力をいただきました東京海洋大学大学院水族栄養学研究室の栗本崇志氏に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、岸野未来さん、細田萌菜美さん、兵頭玄喜さん、傅 云さん、Jade Go Pahila さん、Lalitphan Kitsanayanyong さんを始めとする、食品栄養化学研究室の皆様に大変お世話になりました。ゼミの時間に、新しい切り口や知識、見解を与えて頂いたことに、心から感謝いたします。

本研究を行うにあたり、*Ocimum caunm* を提供して下さいましたツジコー株式会社の高橋大喜氏に深謝いたします。

最後に、東京海洋大学大学院在学中にすべての面においてあたたかく支援してくださった家族に感謝いたします。

参考文献

Azuma, T., Osada, K., Aikura, E., Imasaka, H., and Handa, M., Anti-obesity effect of dietary polyphenols from unripe apple in rats. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi **60** (4), 184-192, 2013.

Flegal, K. M., Graubard, B. I., Williamson, D. F. and Gail, M. H., Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*, **298**, 2028-2037, 2007.

Folch, J. Lees, M. and Sloane Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509, 1957.

Fujikawa, S., Fukui, Y., Watanabe, H., Nonaka, Y., Yasumoto, T., Naoki, H., フコダイン由来オリゴ糖. Japan Patent Kokai, 2007-051314, 2017.

Husain, I., Chander, R., Saxena, J. K., Mahdi, A. A. and Mahdi, F., Antidyslipidemic, Effect of *ocimum sanctum* leaf extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Ind J Clin Biochem*, **30 (**1), 72–77, 2015.

川端二功, 伏木亨,トウガラシの辛味と痛みとエネルギー代謝 化学と生物 **43**, (3), 160-165, 2005.

川端輝江, 基礎栄養学 栄養素の働きを理解するために, アイ・ケイ コーポレーション, 改訂一版, 186 pp, 2011.

厚生労働省科学研究：津下班 （津下一代, 村本あき子, 山本直樹, 玉腰暁子, 川渕孝一, 伊藤由希子, 中村正和, 小池城司, 沼田健之, 小谷和彦, 織田順, 宮地元彦,生活習慣病予防活動・疾病管理による健康指標に及ぼす効果と医療費適正化効果に関する研究：平成 23 年度報告書. 2012.

厚生労働省, 平成 2 年版 国民栄養の現状 ―昭和 63 年国民栄養調査成績―. 第一出版, 160 pp, 1990.

厚生労働省，平成 27 年 国民健康・栄養調査の結果. http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000142359.html 2017, March.

Ikeda, I., Tsuda, K., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Unno, T., Tomoyori, H., Goto, H., Kawata, Y., Imaizumi, K., Nozawa, A., and Kakuda, T., Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *The Journal of Nutrition*, 2004.

三浦克之，上島弘嗣，岡山明，岡村智教，和泉徹，大久保孝義，奥田奈賀子，尾島俊之，門田文，喜多義邦，清原裕，斎藤重幸，坂田清美，中川秀昭，中村保幸，中村好一，西信雄，早川岳人，寳澤篤，松村康弘，村上義孝，由田克士，宮本恵宏，2010 年国民健康栄養調査対象者の追跡開始 （NIPPON DATA2010）と NIPPON DATA80 / 90 の追跡継続に関する研究，平成 24 年度総括・分担研究報告書, 2012

Miyata, M., Koyama, T. and Yazawa, K., Water extract of *Houttuynia cordata* Thunb. leaves exerts anti-obesity effects by inhibiting fatty acid and glycerol absorption. *J Nutr Sci Vitaminol*, **56**, 150-156, 2010.

宮澤紀子，栗原昭一，浜屋忠生，瀬山智子，吉本博明，江口文陽，肥満モデル動物におけるキノコキトサンの抗肥満効果．日本きのこ学会誌, **21** (1), 30-35, 2013.

桃井真理子，シラタマカズラ葉抽出物の抗肥満作用．東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 食機能保全科学専攻 修士論文, 2011.

Murugan, J. M., Ramkumar, G., Shivakumar, M. S., Potential of *Ocimum canum* plant extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larval and adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Natural Product Research*, **30**, 2016.

中井正晃，福井祐子，小野佳子,ウーロン茶重合ポリフェノールの血中トリグリセリド上昇抑制作用メカニズム．肥満研究, **11** (1), 88-90, 2005.

日本糖尿病学会，科学的根拠に基づく糖尿病診察ガイドライン 2013，南江堂 560 pp, 2016.

日本肥満学会，肥満症診療ガイドライン 2016，ライフサイエンス出版，第 2 刷発行, 132 pp, 2016.

日本肥満学会肥満症診断基準検討委員会，新しい肥満の判定と肥満症の診断基準．肥満研究, 6, 18-28, 2000.

西村敬子，乾燥キャベツのビタミンの変化について．愛知教育大学研究報告, 29，芸術・保健体育・家政・技術科学編, 49-54, 1980.

Nyarkoa, A. K., Asare-Ananeb, H., Ofosuhenea, M., Addyc, M. E., Extract of *Ocimum canum* lowers blood glucose and facilitates insulin release by isolated pancreatic β-islet cells. *Phytomedicine*, **9** (4), 346-351, 2002.

岡田悦政，近藤照敏，白石安男，萩本逸郎，神田裕子，高橋正人，松尾善美，山本大誠，小林敏生，福渡努，健康長寿を目指す 健康管理学，八千代出版，第 1 版 1 刷発行, 206, 2011.

Rodgers, R. J., Tschöp, M. H. and Wilding, J. P., Anti-obesity drugs: past, present and future. *Disease Models & Mechanisms*, 5, 621-626, 2012.

消費者庁 機能性表示食品に関する情報 http://www.caa.go.jp/foods/index23.html 2017, March.

高橋正和，食由来機能分子としてのグリセロ糖脂質の利用性 腸管組織への作用と腸管吸収性から見た利用性，化学と生物, **52 (**10), 641-642, 2014.

The GBD 2013 Obesity Collaboration, Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E. C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S. F., Abraham, J. P., Abu-Rmeileh, N. ME, Achoki, T., AlBuhairan, F. S, Alemu, Z. A., Alfonso, R., Ali, M. K, Ali, R., Guzman, N. A., Ammar, W., Anwari, P., Banerjee, A., Barquera, S., Basu, S., Bennett, D. A, Bhutta, Z., Blore, J., Cabral, N., Nonato, I. C., Chang, J. C., Chowdhury, R., Courville, K. J, Criqui, M. H, Cundiff, D. K, Dabhadkar, K. C, Dandona, L., Davis, A., Dayama, A., Dharmaratne, S. D, Ding, E. L, Durrani, A. M, Esteghamati, A., Farzadfar, F., Fay, D. F. J., Feigin, V. L., Flaxman, A., Forouzanfar, M. H., Goto, A., Green, M. A., Gupta, R., Hafezi-Nejad, N., Hankey, G. J, Harewood, H. C, Havmoeller, R., Hay, S., Hernandez, L., Husseini, A., Idrisov, B. T, Ikeda, N., Islami, F.,

Jahangir, E., Jassal, S. K, Jee, S. H., Jeffreys, M., Jonas, J. B, Kabagambe, E. K, Khalifa, S. E. A. H., Kengne, A. P., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kim, D., Kimokoti, R. W., Kinge, J. M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kwan, G., Lai, T., Leinsalu, M., Li, Y., Liang, X., Liu, S., Logroscino, G., Lotufo, P. A , Lu, Y., Ma, J., Mainoo, N. K., Mensah, G. A., Merriman, T. R, Mokdad, A. H, Moschandreas, J., Naghavi, M., Naheed, A., Nand, D., Narayan, K. M. V., Nelson, E. L., Neuhouser, M. L, Nisar, M. I., Ohkubo, T., Oti, S. O., Pedroza, A., Prabhakaran, D., Roy, N., Sampson, U., Seo, H., Sepanlou, S., G, Shibuya, K., Shiri, R., Shiue, I., Singh, G., M, Singh, J. A, Skirbekk, V., Stapelberg, N. J. C., Sturua, L., Sykes, B. L, Tobias, M., Tran, B. X., Trasande, L., Toyoshima, H., Vijver, S.van,de, Vasankari, T. J, Veerman, J. L., Velasquez-Melendez, G., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Vos, T., Wang, C., Wang, S. X., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wright, J. L, Yang, Y. C., Yatsuya, H., Yoon, J., Yoon, S., Zhao, Y., Zhou, M., Zhu, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. L, and Gakidou, E., Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *THE LANCET*, 384(9945), 766–781, 2014.

WHO expert consultation, Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *THE LANCET*, **363,** 157-163, 2004.

吉積一真, ラネヴァ　ヴィオレッタ, 折原洋一, 富裕孝, バジルシード, Japan Patent Kokai 2007-200593, 2007.

吉本雄大, 新規グリコシルグリセロールの合成とその特性. 高知工科大学大学院工学研究科 基盤工学専攻 物質・環境システム工学コース 修士論文, 2010.