

平成28年度 産学共同連携研究

ラットにおける
ベニサシ果汁梅粉末の生理作用について

仁愛大学人間生活学部健康栄養学科

【目的】

脂質の多い食事は、脂質異常症などの生活習慣病発症へとつながる可能性がある。

健康を気にしている人々へ向けて、食後の中性脂肪上昇を抑える食品、コレステロールが高めの方に適する食品などの特定保健用食品が多く販売されている。

特定保健用食品に多く使用されている機能性成分のポリフェノールに着目し、含まれている量が多い梅を用い実験することとした。

今回我々が使用した紅映梅には、クエン酸やリンゴ酸、機能性成分のポリフェノールを豊富に含んでいる。その梅果汁粉末を高脂肪食に添加しラットに与え、生理的にどのような影響を及ぼすか照準食群と比較検討した。

また、腸内容物中の腸内フローラと臭気成分について解析した。

【方法】

- ◆実験動物：F-344系オス 4週齢ラット 24匹 1群 6匹
飼育期間 56日間
- ◆群と飼料の設定
4日間の標準飼料で予備飼育をし、本飼育では実験飼料及び水は自由摂取法による。
 - ◇標準食群（SD群）AIN-93G
 - ◇高脂肪群（HFD群）
 - ◇紅映梅0.5%添加高脂肪食（U0.5群）
 - ◇紅映梅3%添加高脂肪食（U3群）
- ◆測定項目：飼料摂取量、臓器重量、血漿・肝臓脂質濃度、血漿グルコース濃度
腸内フローラの分析(外部委託分析)、臭気分析分析（質量分析計）
- ◆統計：Scheffeの多重比較検定後、Welchのt検定法（両側）と分散分析を行い、危険率は0.05未満を有意とした。

飼料組成				g/100g
組成	標準食	高脂肪食	梅 0.5% 高脂肪食	梅 3.0% 高脂肪食
ミルクカゼイン	20.0	20.0	20.0	20.0
L-シスチン	0.3	0.3	0.3	0.3
コーンスターチ	39.75	25.75	22.62	7.0
α-コーンスターチ	13.2	13.2	13.2	13.2
シュークロース	10.0	10.0	10.0	10.0
梅パウダー (梅エキス分)	-	-	3.13 (0.5)	18.75 (3.0)
大豆油	7.0	7.0	7.0	7.0
ラード	-	14.0	14.0	14.0
セルロースパウダー	5.0	5.0	5.0	5.0
AIN-93Gミネラル混合	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93Gビタミン混合	1.0	1.0	1.0	1.0
酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
エネルギー (kcal/g)	4.0	4.7	4.7	4.7
脂質エネルギー比率 (%)	15.8	40.2	40.2	40.2

飼料摂取量、臓器重量、肝臓脂質、血漿濃度

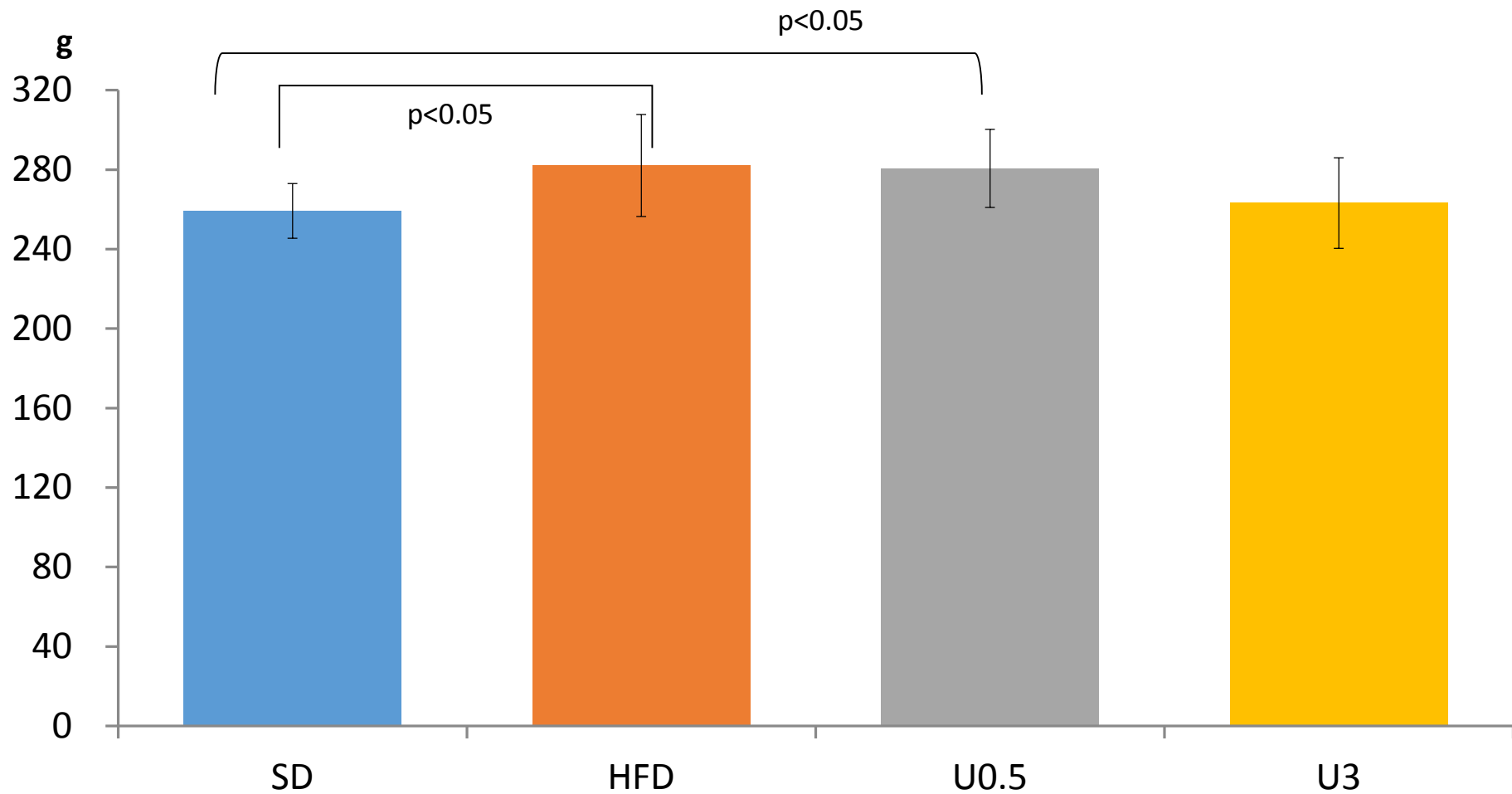
	群	SD	HFD	U0.5	U3
	n	6	6	6	6
飼料摂取量	総飼料摂取量(g/57day)	643.8±22.9 ¹ * ※	599.8±49.8 *	610.6±40.1	575.3±46.4 ¹ ※
	総エネルギー量(kcal)	2575.2±91.6 ¹ * ※	2819.1±234.1	2869.8±188.5 ※	2703.9±218.1 ¹
臓器重量	体重増加量(g)	182.7±14.6	205.7±25.2	204.3±17.3	186.4±21.5
	肝臓重量(g/100B.W)	3.35±0.03 ¹ a	3.03±0.09b	3.04±0.09b	3.05±0.16b
	盲腸重量(g/100B.W)	1.41±0.04 ¹ *	1.29±0.21	1.28±0.19	1.22±0.07 *
肝臓脂質	肝臓中総脂質(mg/g)	41.57±7.14a	68.33±5.78b	61.35±6.81b	67.18±12.56b
血漿濃度	血漿中グルコース濃度(mg/dL)	166.6±21.6 ¹	150.4±10.4 ¹	154.8±18.2	145.6±20.0
	血漿中トリグリセリド濃度(mg/dL)	159.0±24.2a	132.7±43.3ab *	169.5±14.7 ¹ a *	102.0±24.1b
	血漿中総コレステロール濃度(mg/dL)	72.0±7.6	69.6±10.6	75.1±5.4	72.5±7.9
	血漿中HDL-コレステロール濃度(mg/dL)	46.7±7.9 *	37.9±5.8 *	42.9±4.5	43.1±5.1
	血漿中NEFA濃度(mg/dL)	1.15±0.20	1.04±0.30	1.21±0.11 ¹	1.08±0.23
	血漿中GOT濃度(mg/dL)	49.24±9.24 * ※	62.61±11.00 * ◇	51.66±4.64◇◎	60.76±8.46※◎
	血漿中GTP(mg/dL)	14.38±5.33	11.35±1.23	13.72±2.35	11.71±1.37

1:n=5

平均±標準偏差 p<0.05

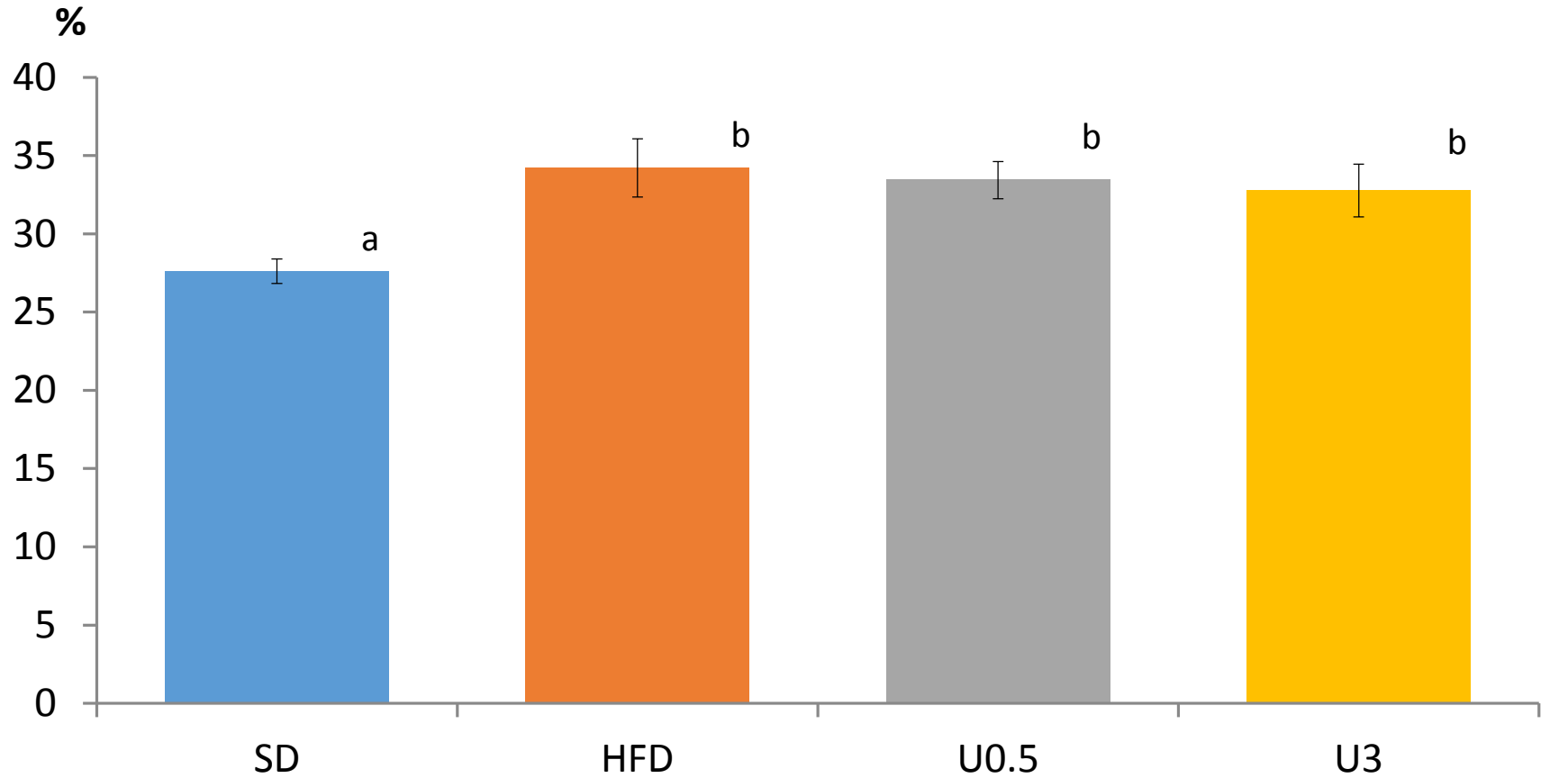
と、※と※、◇と◇、◎と◎は有意差あり

最終体重



平均±標準偏差 p<0.05

飼料効率

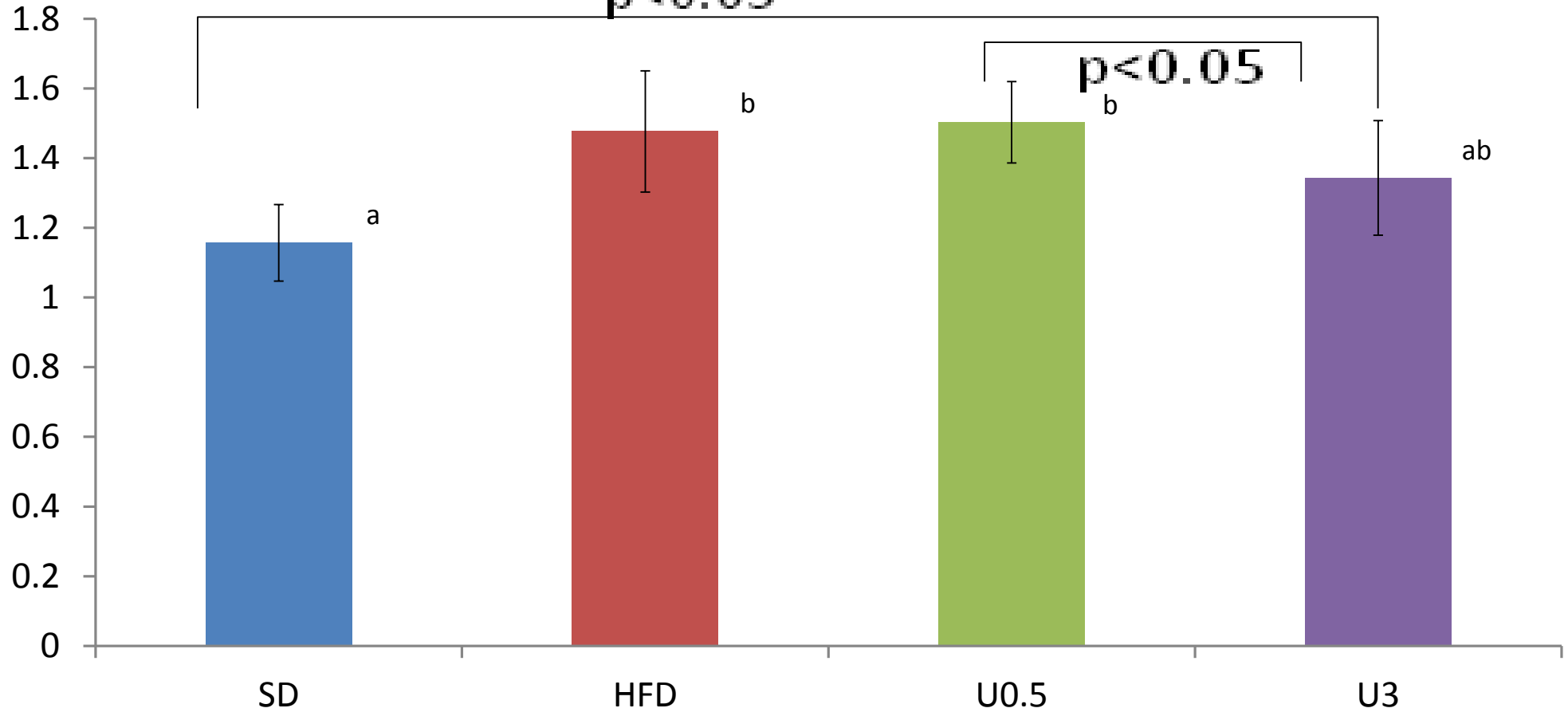


平均±標準偏差 p<0.01

* :n=5

体重100g当たり後腹壁脂肪重量

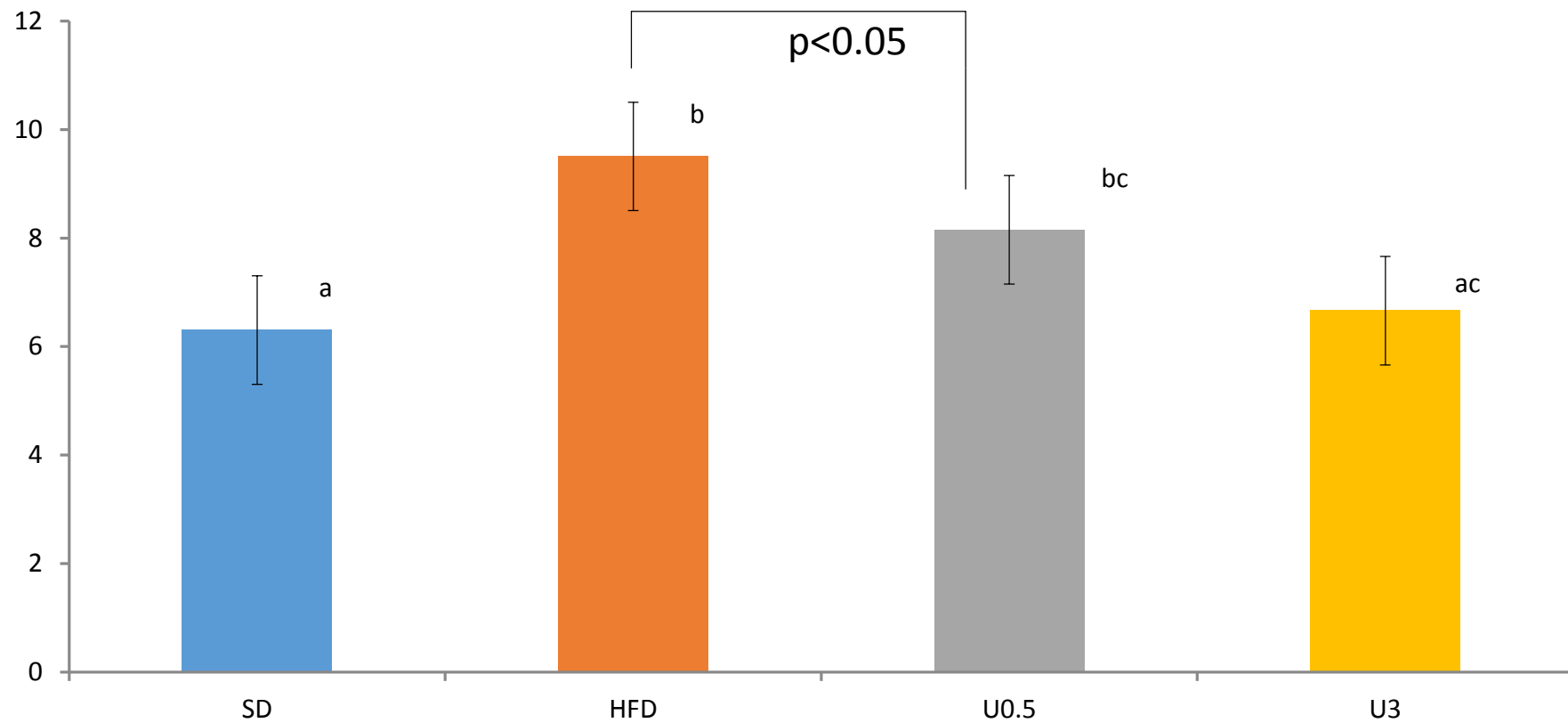
g/100B.W



平均±標準偏差 p<0.05

肝臓中トリグリセリド濃度

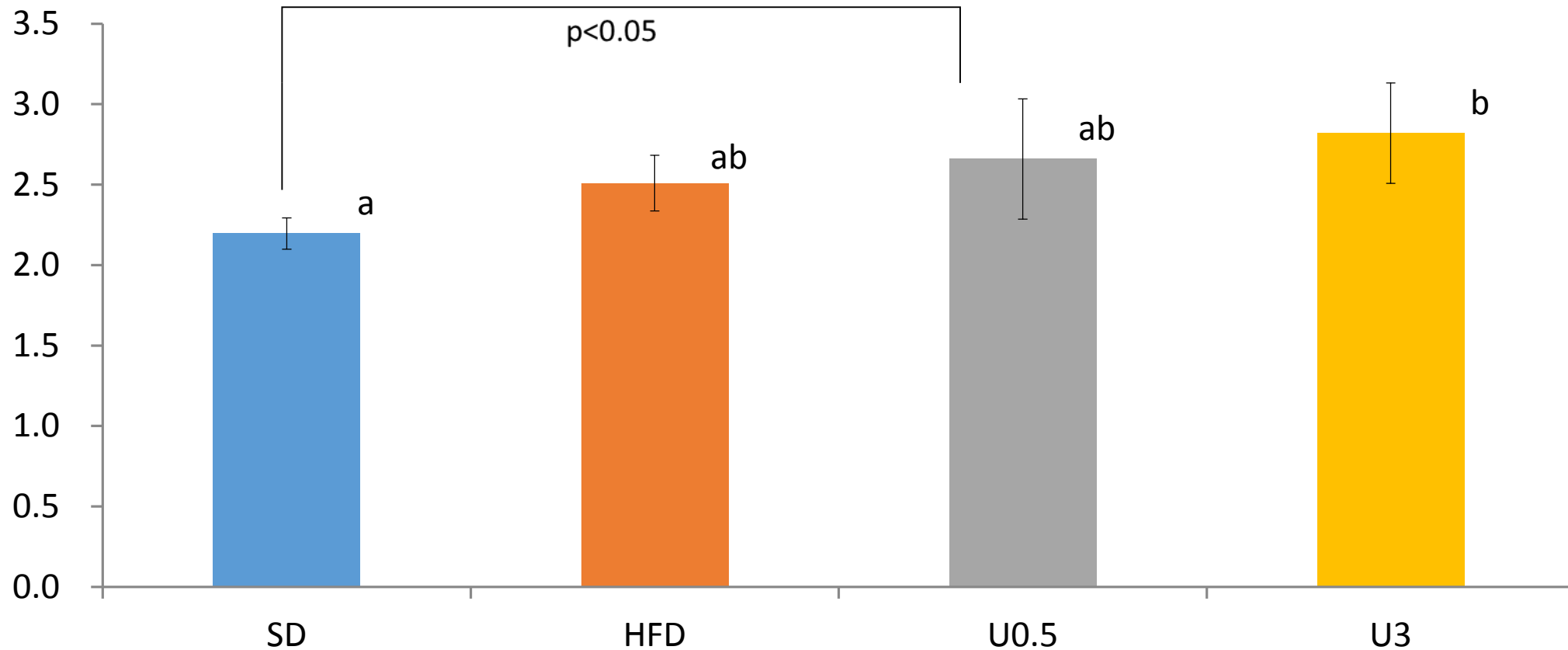
mg/g



平均±標準偏差 p<0.05

肝臓中総コレステロール濃度

mg/g



平均±標準偏差 p<0.05
※:n=4

【まとめ】

紅映梅添加群において後腹壁脂肪や肝臓中トリグリセリド濃度がHFD群より低値を示したことから、紅映梅果汁粉末の添加が脂質の代謝や合成に何らかの影響を及ぼすと考えられた。

しかし、紅映梅果汁粉末の添加による抑制メカニズムは、本研究では明らかになっておらず、脂質関連遺伝子や酵素（ACC、HMG-CoA、FAS、DGAT1、DGAT2など）や紅映梅の成分分析を含め、今後更なる研究課題の究明が必要である。

腸内フローラの分析

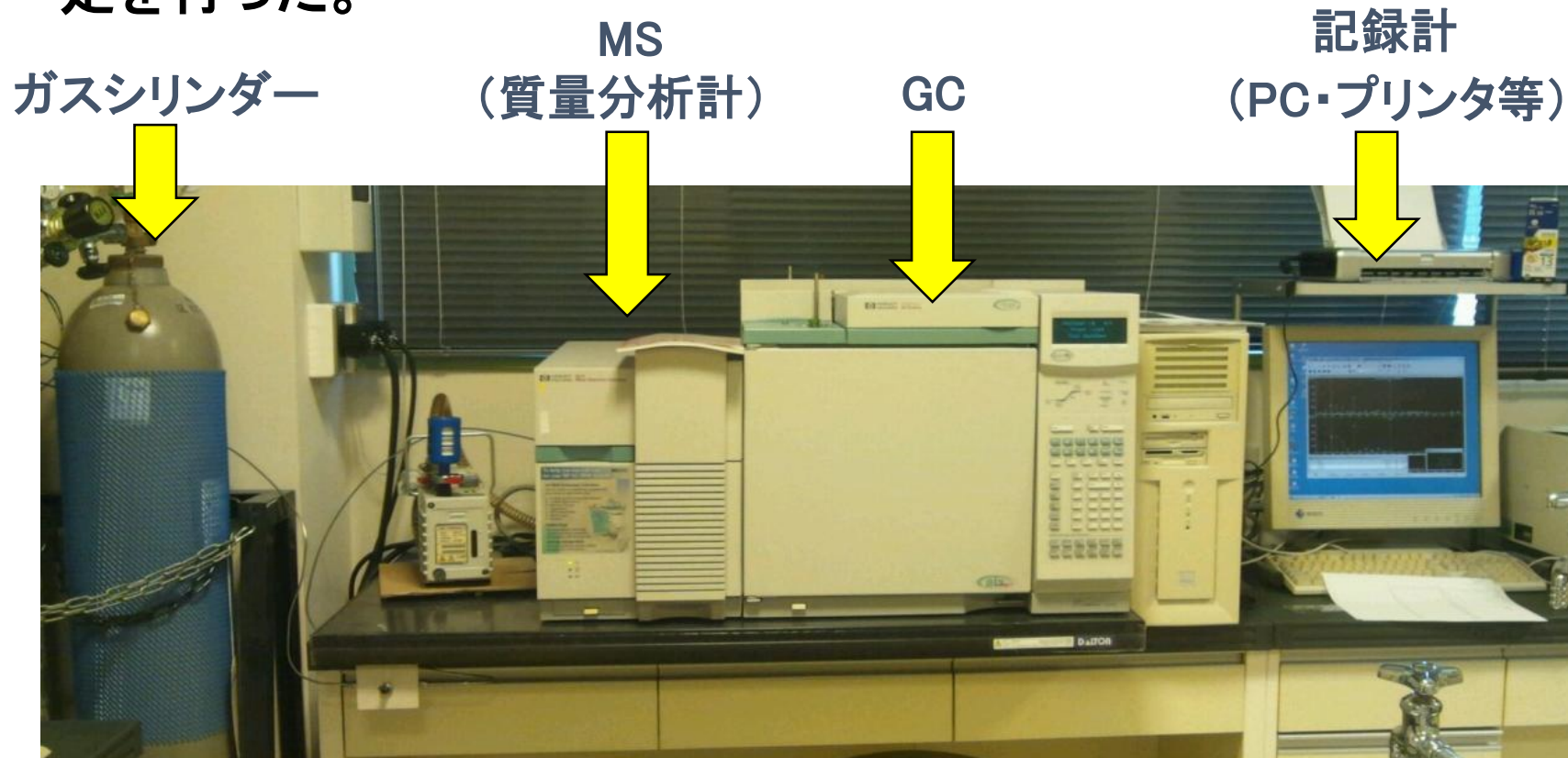
業者に委託(分析依頼先:コスモ・バイオ株式会社)

→盲腸内容物を凍結後、DNAを抽出し、全菌種・フィルミクテス門(悪玉菌)およびバクテロイデス門(善玉菌)に対する3種のプライマーを用いて、リアルタイムPCRアッセイを行った。

盲腸内容物の臭気成分の 測定・分析

ガスクロマトグラフィー(GC-MS)装置を使って盲腸内容物の臭気成分の分析を行った。

試料を気化し、その成分を分子の単位まで分離させ、成分測定を行った。



臭気成分分析に用いたラットの群分け

SD群(標準)

HF群(高脂肪食)

U0.5群(高脂肪食に梅果汁0.5g添加)

U3.0群(高脂肪食に梅果汁3.0g添加)

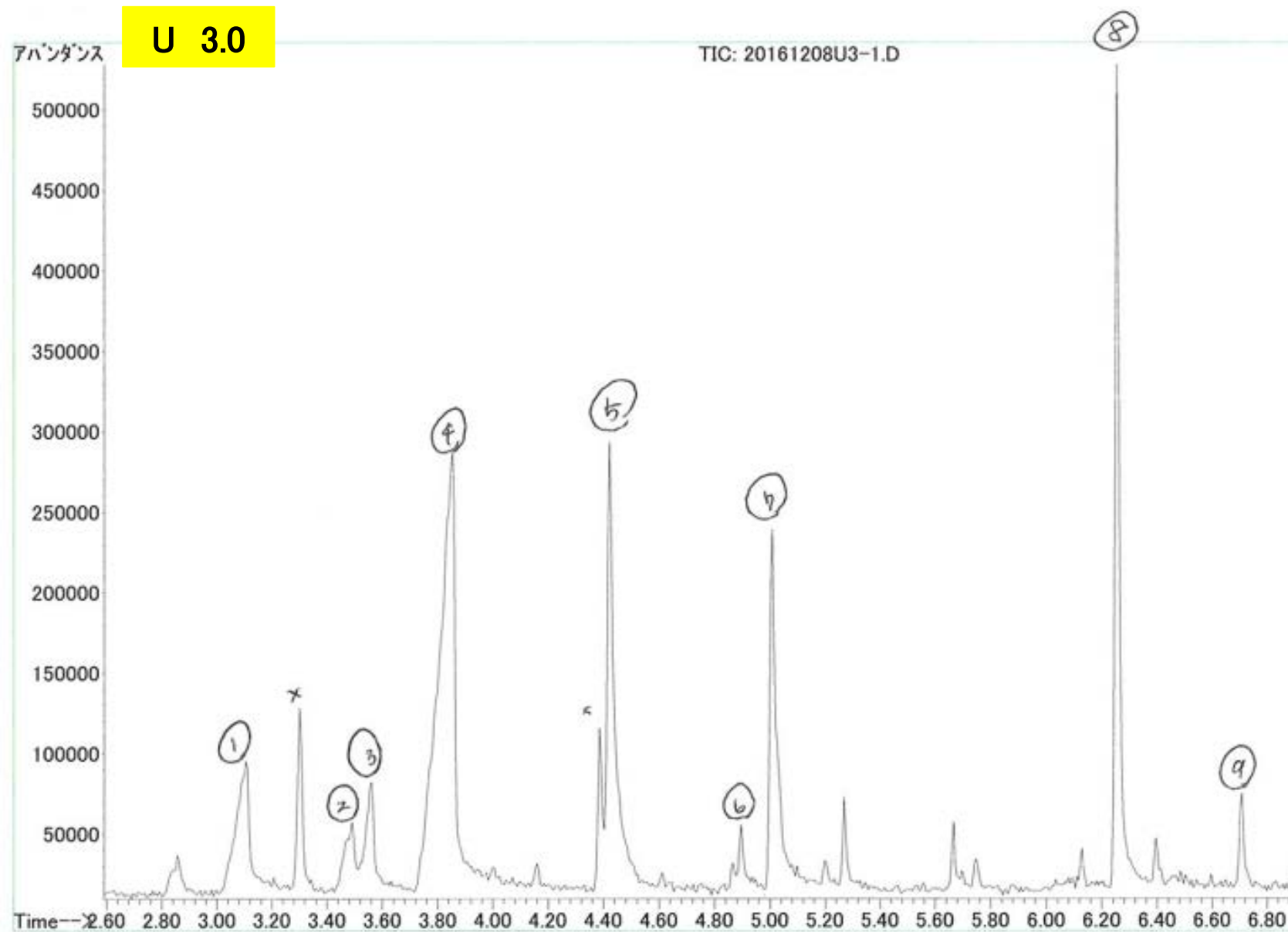
試料調製

解剖検体は窒素冷凍して、冷凍庫-80度で保管した。盲腸検体は、自然解凍して蒸留水で溶解したあと冷凍遠心機(8000回転/分)で遠沈した。

分析に使用した検体は各群2件を用いた。

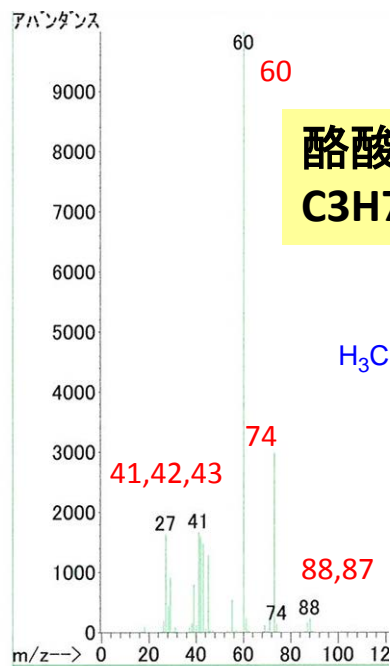
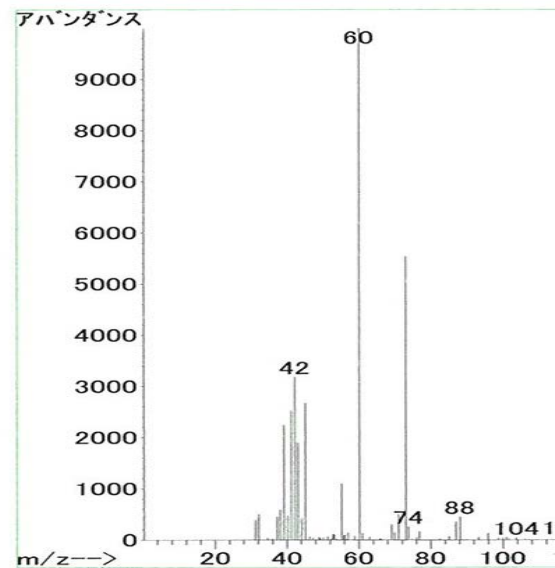
清澄液を質量分析装置に挿入して解析した。

臭気成分の同定(例)

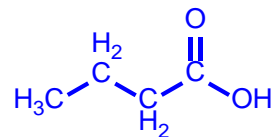




ライブラリ検索 : C:\¥Database¥NIS
 一致率 : 58
 ID : Butanoic acid



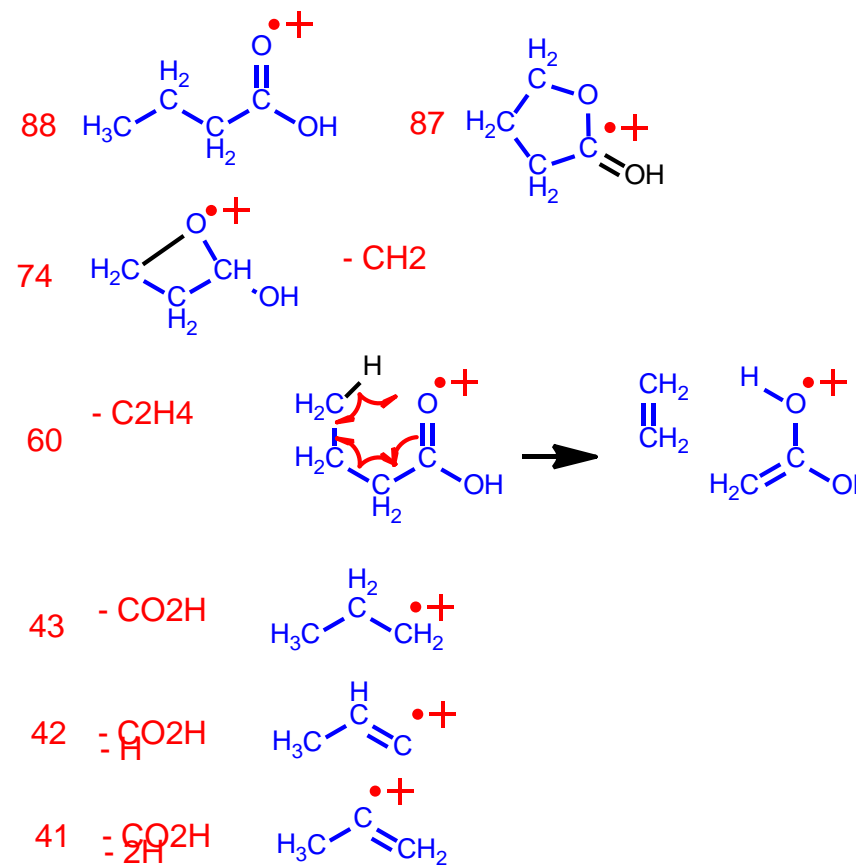
酪酸 CH₃(CH₂)₂CO₂H
C₃H₇CO₂H=88



- 88 M+
- 87 -H
- 74 -14(-CH₂)
- 60 -28(-C₂H₄)
- 43 (C₃H₇)
- 42 (C₃H₆)
- 41 (C₃H₅)

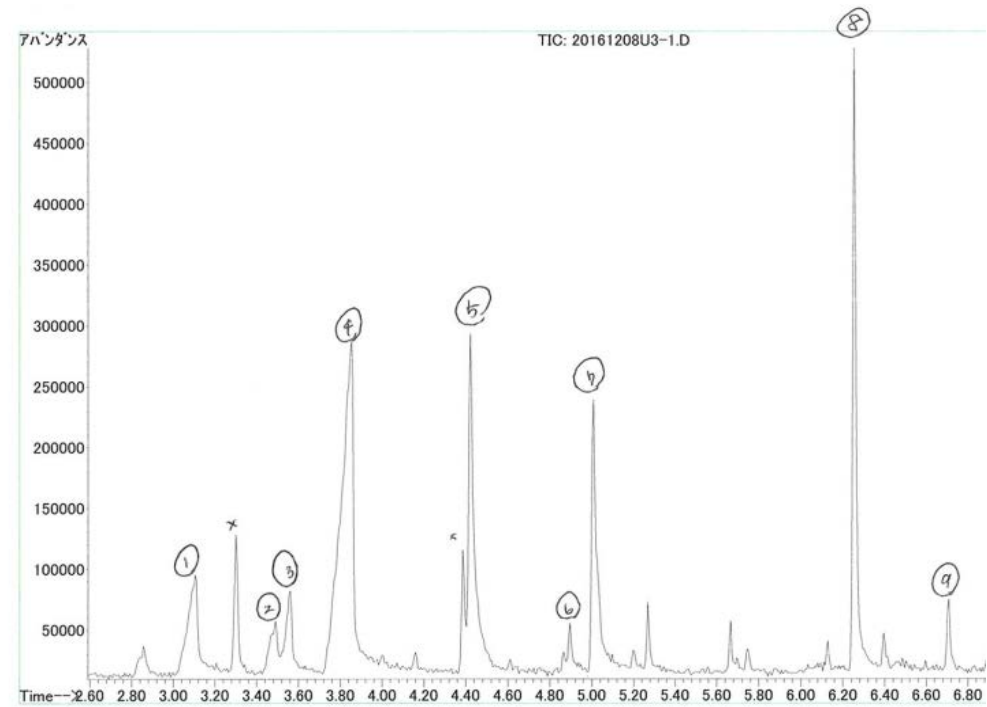
U3.0

番号一致率	保持時間	化合物
58	3.11	酪酸



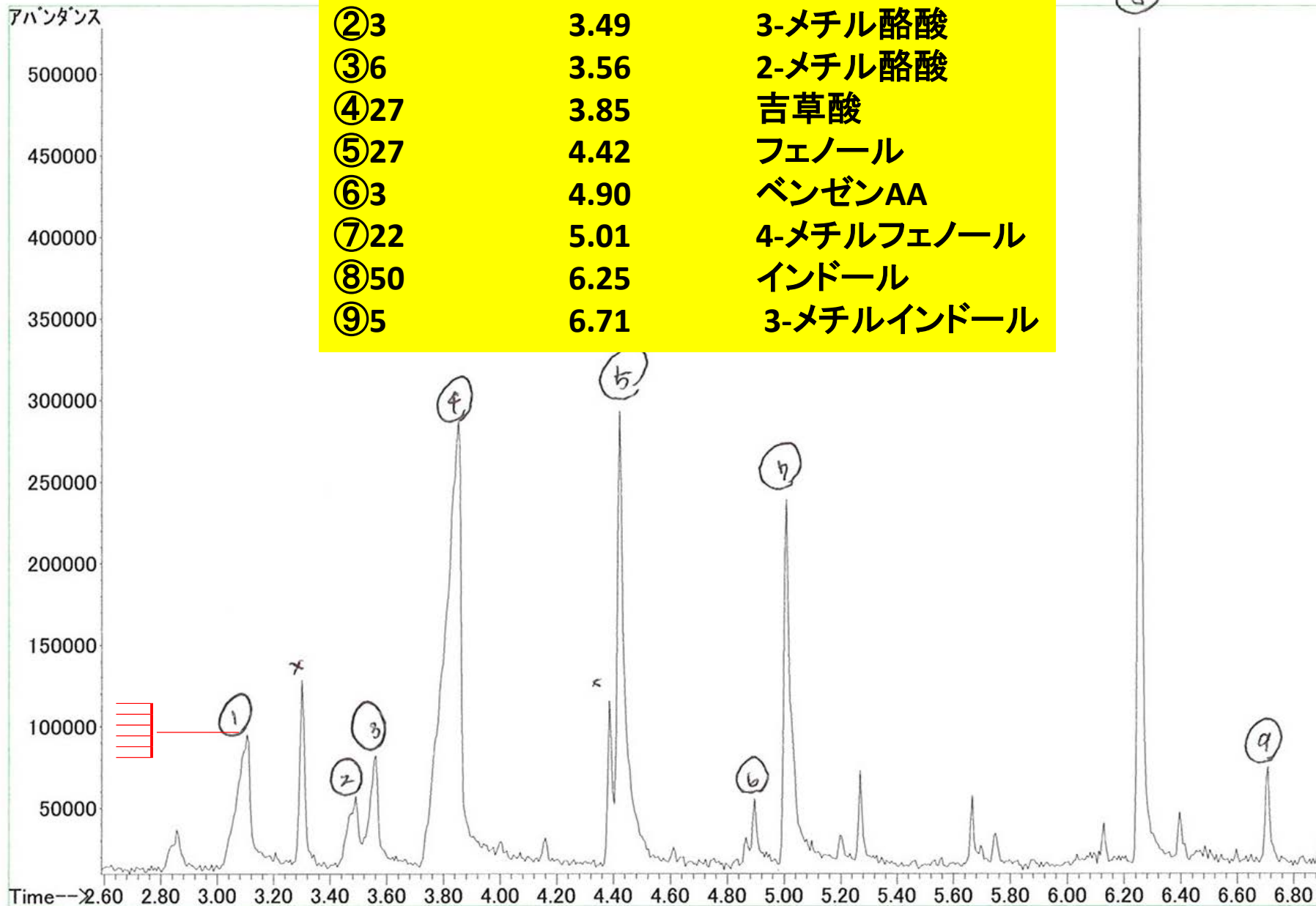
臭気成分の同定(例)

	番号一致率	保持時間	化合物
①	58	3.11	酪酸
②	64	3.49	3-メチル酪酸
③	64	3.56	2-メチル酪酸
④	78	3.85	吉草酸
⑤	94	4.42	フェノール
⑥	76	4.90	ベンゼンAA
⑦	95	5.01	4-メチルフェノール
⑧	94	6.25	インドール
⑨	93	6.71	3-メチルインドール

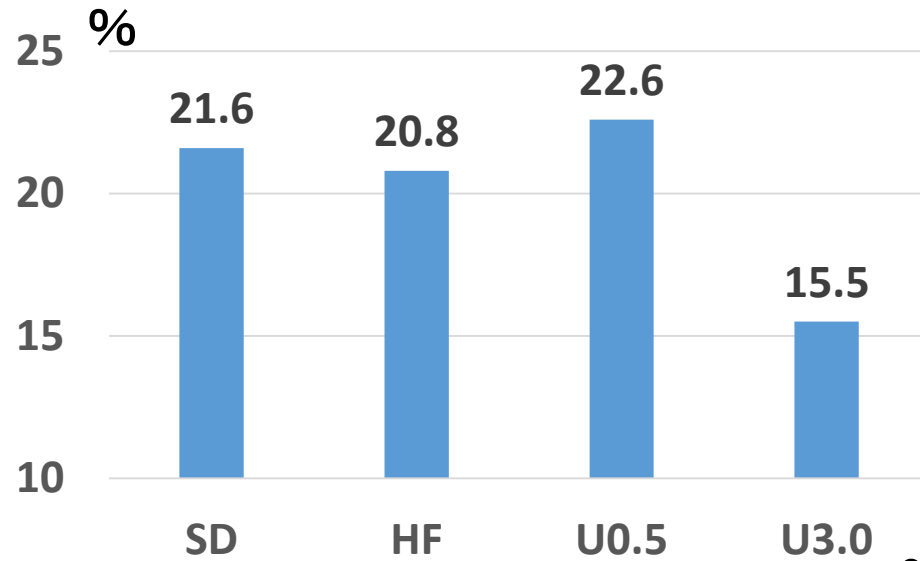


U 3.0

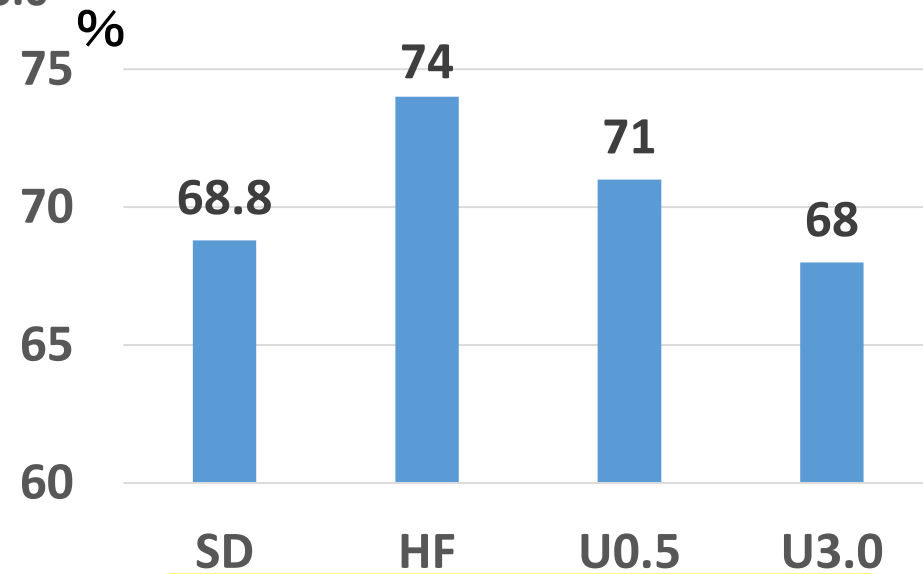
高さ(base3)	保持時間	化合物
①8	3.11	酪酸
②3	3.49	3-メチル酪酸
③6	3.56	2-メチル酪酸
④27	3.85	吉草酸
⑤27	4.42	フェノール
⑥3	4.90	ベンゼンAA
⑦22	5.01	4-メチルフェノール
⑧50	6.25	インドール
⑨5	6.71	3-メチルインドール



腸内フローラの結果および考察



善玉菌(バクテロイデス門)



悪玉菌(フィルミクテス門)

バクテロイデス門
(善玉菌)

フィルミクテス門
(悪玉菌)

SD群とHF群

HF群で減少



HF群で増加



HF群とU群※

U群で増加



U群で減少

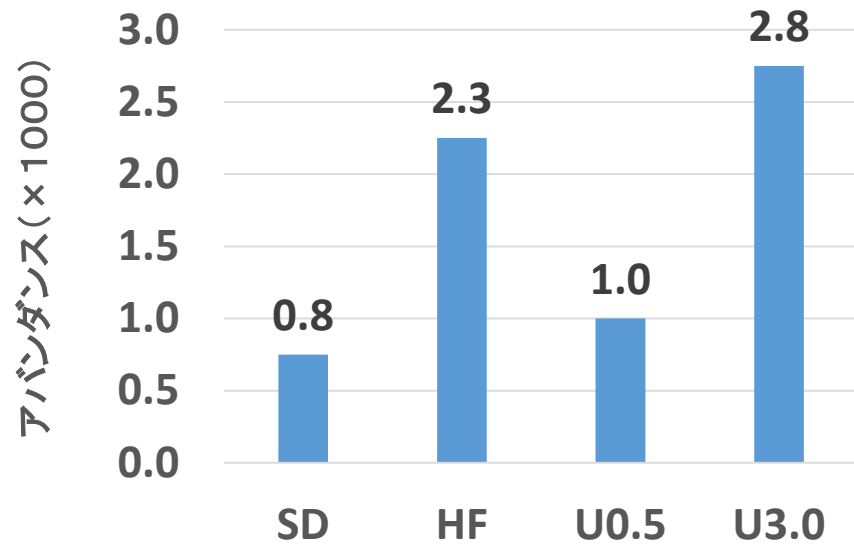


※U群 = U0.5群とU3.0群

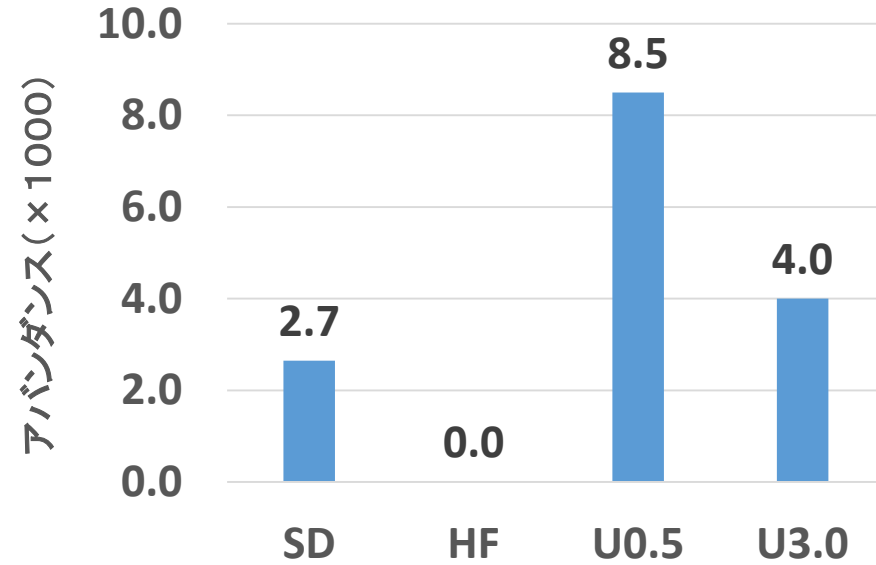
臭気成分測定の結果および考察

	SD	HF	U0.5	U3.0
プロピオン酸	○	○	○	○
酪酸	○		○	○
3-メチル酪酸	○		○	○
2-メチル酪酸	○	○	○	○
吉草酸	○	○	○	○
フェノール	○	○	○	○
ベンゼンAA			○	○
4-メチルフェノール	○	○	○	○
インドール	○	○	○	○
3-メチルインドール	○	○	○	○

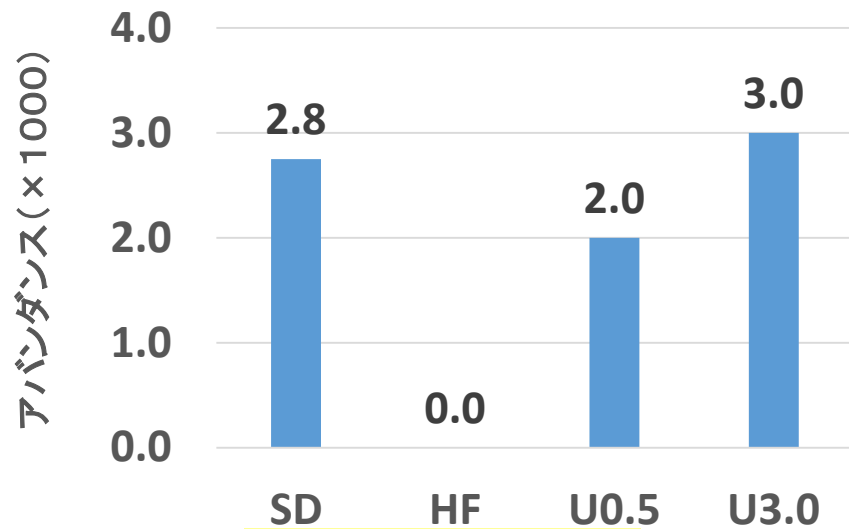
比較(短鎖脂肪酸)



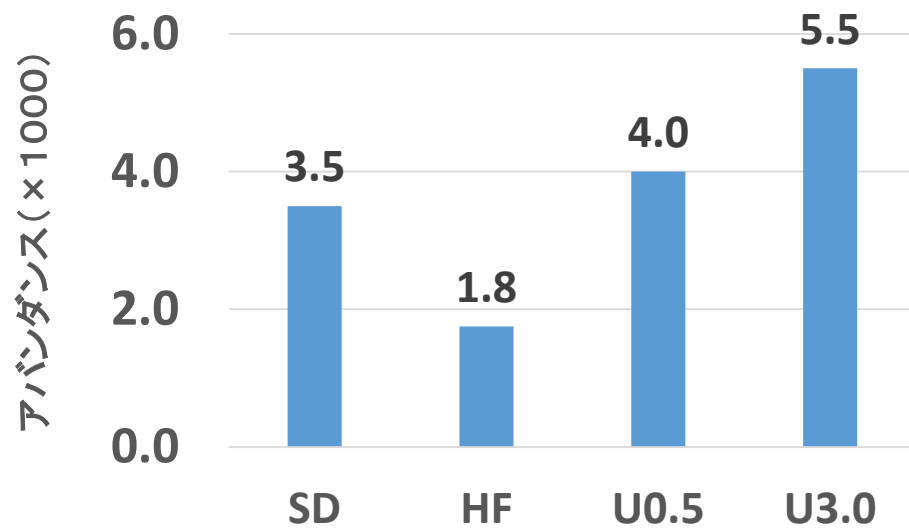
プロピオン酸



酪酸

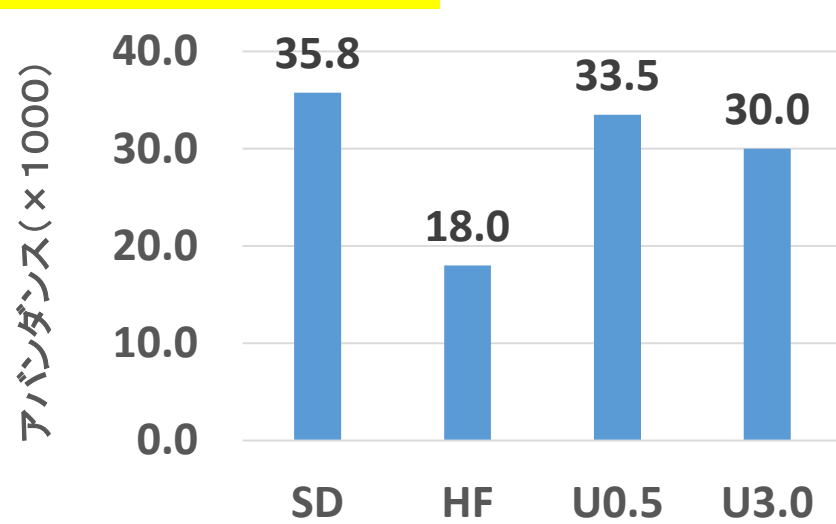


3-メチル酪酸

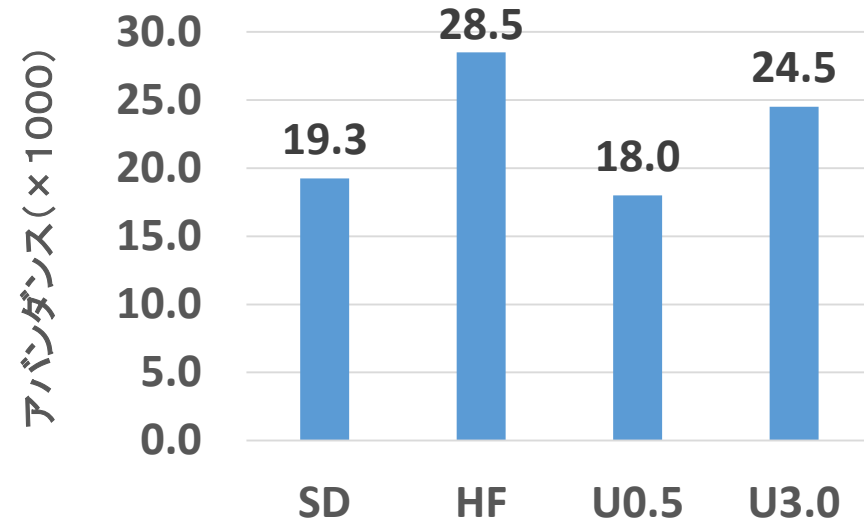


2-メチル酪酸

比較 フェノール類



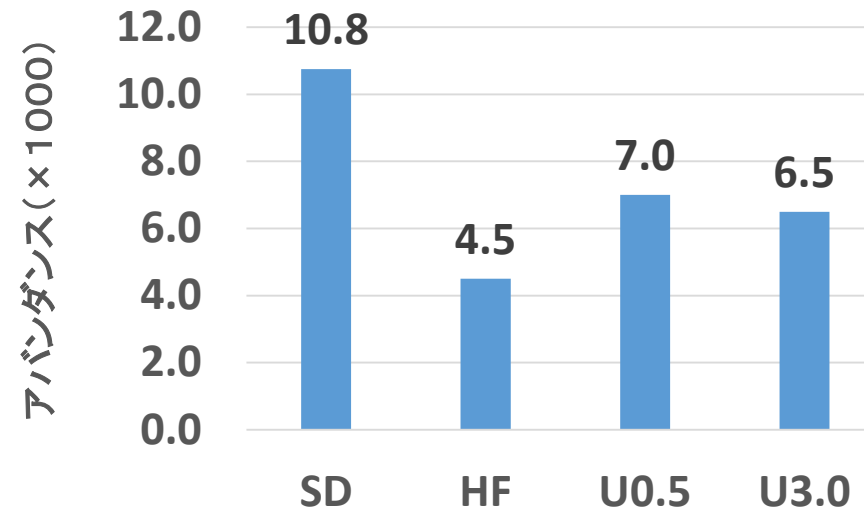
フェノール



4-メチルフェノール

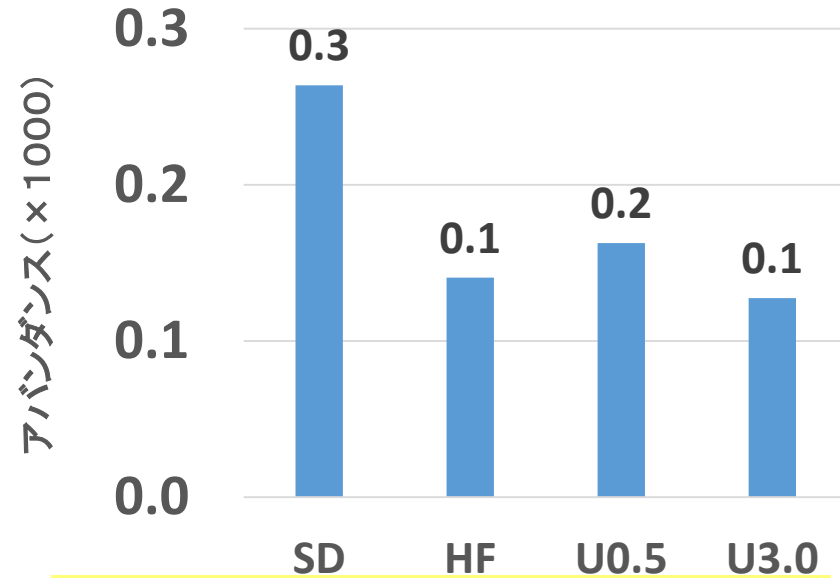
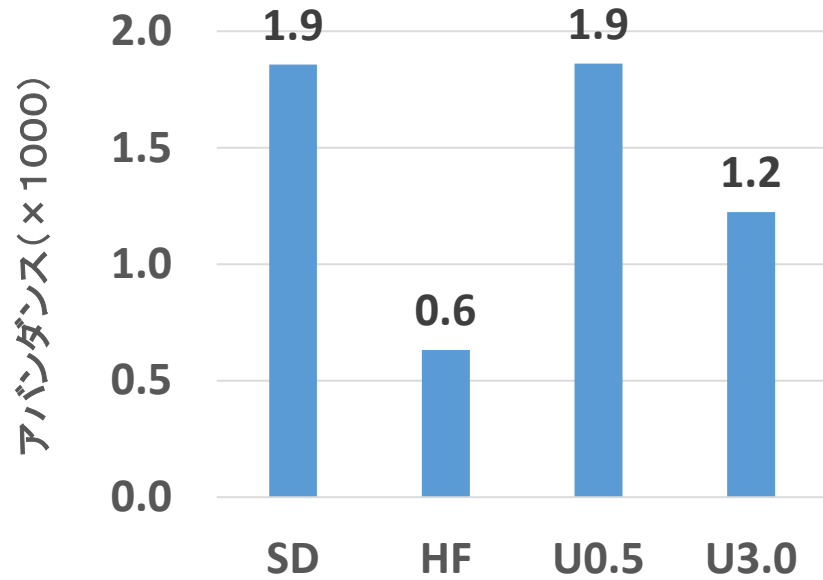


インドール

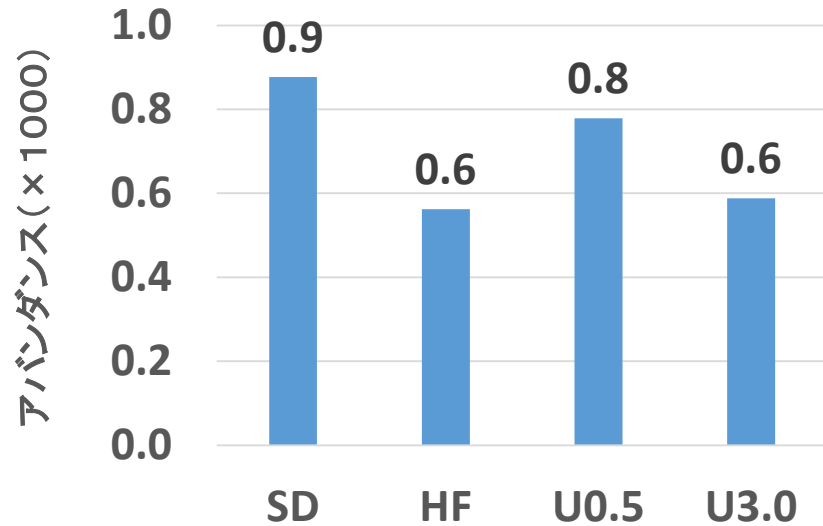


3-メチルインドール

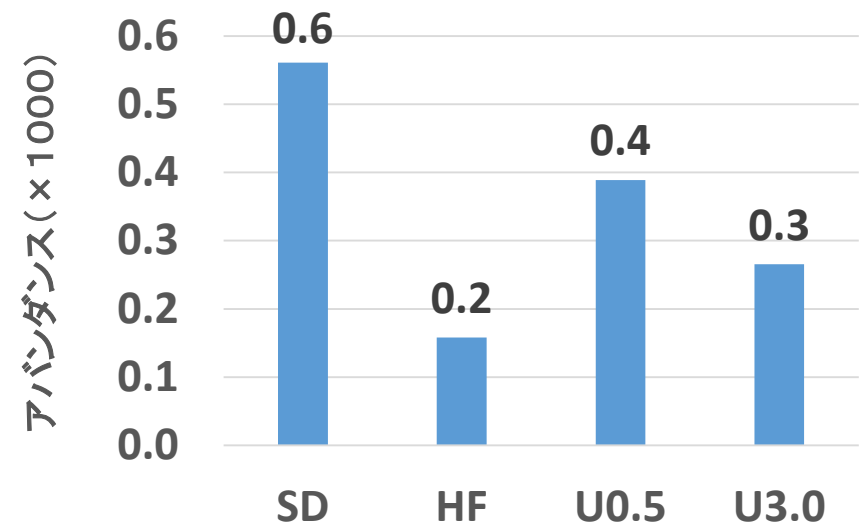
比較 フェノール類



①フェノール/4-メチルフェノール



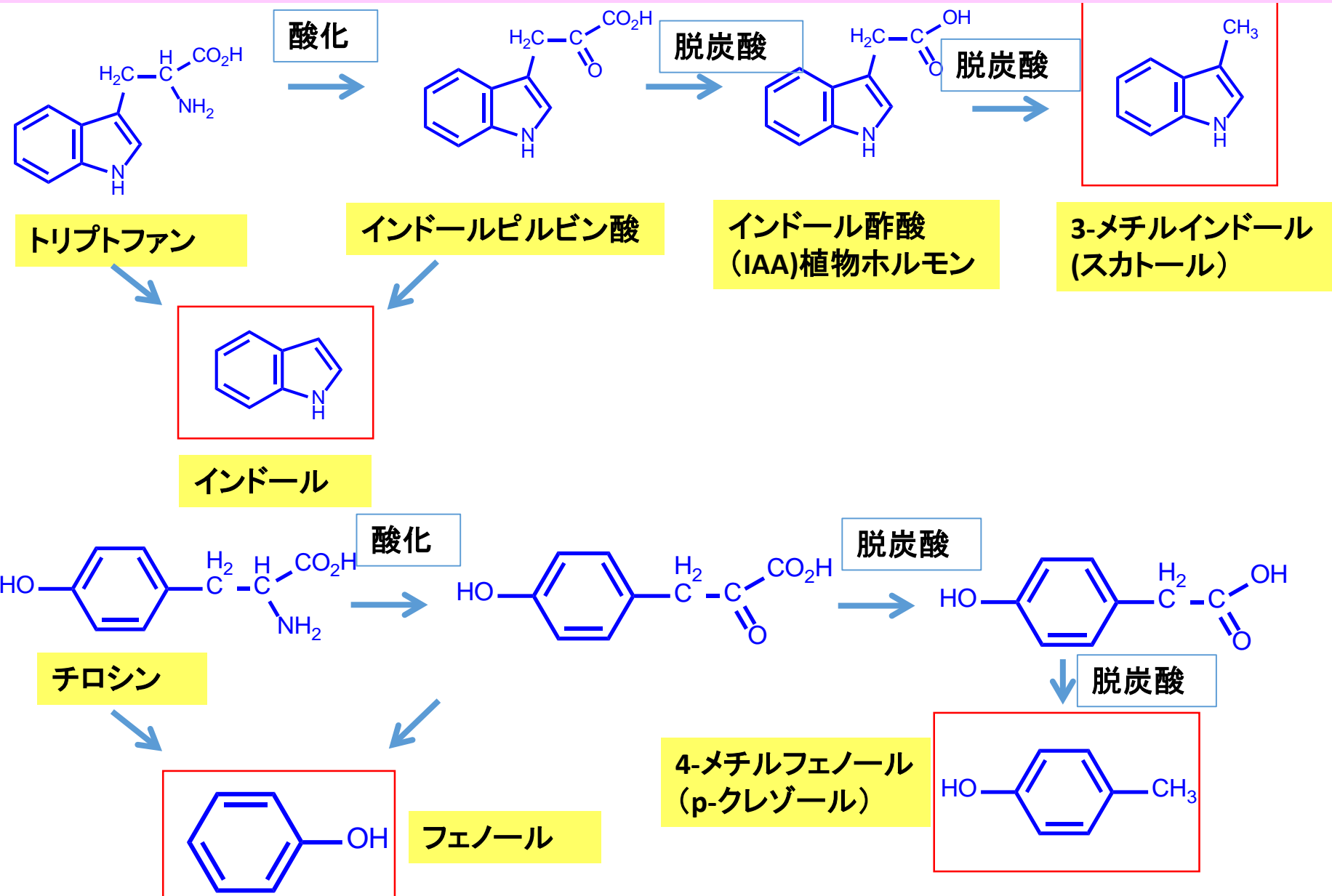
②3-メチルインドール/インドール



③フェノール/インドール

④3-メチルインドール/4-メチルフェノール

インドールと3-メチルインドール、フェノールと4-メチルフェノール生成機構



まとめ

梅果汁粉末の添加



善玉菌の増加



短鎖脂肪酸の生成促進



ミネラル吸収促進

管腔内が酸性に傾く
(pHの低下)

梅果汁粉末はミネラル吸収を促進関与すると考えられる。