

学 位 論 文 要 旨

氏 名 鶴 田 裕 美

題 目 佐賀特産食材の食品化学的及び栄養学的研究
Studies on food chemistry and nutrition of agricultural products in Saga.

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease)は、メタボリックシンドロームと関連して増加する肝臓病の一つである。その一部は、肝組織の慢性炎症や繊維化を引き起こして脂肪性肝炎となり、肝硬変や肝癌にまで進展する恐れがある。脂肪肝から肝炎へと重篤化する詳細なメカニズムは十分に分かっていないが、NAFLDの治療や予防効果を有する農産物由来の機能性食品の開発が望まれている。

佐賀県は、レンコン(学名: *Nelumbo nucifera*)の生産量が多い地域である。その一方で、味や見た目の悪い低品質のレンコンは、規格外品として大量に処分されており、問題となっている。未利用なレンコンを機能性食品として有効利用することが求められているが、レンコンの機能性に関する研究報告は少ない。そこで、本研究では、レンコンの機能性を明らかにするために、肥満・糖尿病モデル動物 (*db/db* マウス) の脂質代謝に及ぼす影響を検討し、活性成分の特定を行った。

まず、品種、品質および部位の異なるレンコンのポリフェノール量と抗酸化活性について調べたところ、レンコンの総ポリフェノール量は、品種による差はなかったが、未利用部位のポリフェノール量と抗酸化活性は、高品質部位よりも高かった。さらに、レンコンのポリフェノール量は、野菜の中でも比較的高いことが認められた。

次に、レンコン乾燥粉末を *db/db* マウスに3週間摂食させ、脂肪肝に及ぼす影響を検討した。その結果、レンコン乾燥粉末の摂取により、肝肥大、肝臓のトリグリセリド蓄積および肝臓障害マーカーが対照群に比べて顕著に改善した。これらの作用機序として、肝臓の脂肪酸合成系酵素活性と遺伝子発現の低下およびNAFLDを改善することが知られている血中アディポネクチン濃度の上昇が認められた。さらに、NAFLDの進行には、炎症性サイトカインと酸化ストレスの増加が関与することが示唆されているが、肝臓の炎症性サイトカインの遺伝子発現量は、レンコン乾燥粉末添加群で有意に低下した。

最後に、レンコン乾燥粉末中の脂肪肝改善成分を明らかにするために、レンコンのポリフェノール画分添加食を調製し、*db/db* マウスに3週間摂食させた。その結果、レンコンポリフェノール摂取により、脂肪肝の改善が認められ、脂肪肝の改善に脂肪酸合成系酵素活性の低下および肝臓の酸化ストレスレベルの改善が寄与していることが示唆された。さらに、レンコンポリフェノールの構造解析を行ったところ、様々な重合度のB型プロシアニジンとプロデルフィニジンのホモおよびヘテロポリマーが検出された。

本研究により、レンコン粉末およびその成分プロアントシアニジンが脂肪肝改善効果を有することを明らかにした。今後、未利用レンコンを機能性食品素材として有効利用できる可能性が示唆された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Yumi Tsuruta
題 目	Studies on food chemistry and nutrition of agricultural products in Saga. (佐賀特産食材の食品化学的及び栄養学的研究)

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is often associated with features of the metabolic syndrome and is emerging as the most common liver disease worldwide. NAFLD is the preferred term used to describe the spectrum of liver damage, ranging from hepatic steatosis to steatohepatitis, liver fibrosis and cirrhosis. Although the pathogenesis through which steatohepatitis evolves from hepatic steatosis has not been fully understood, it is necessary to develop effective therapies for the treatment of NAFLD and the discovery of functional food from agricultural products that will reduce the risk of NAFLD would be beneficial.

The lotus root (edible rhizome of *Nelumbo nucifera*) is the agricultural products which are much produced in Saga Prefecture. However the low quality and damaged lotus roots are often discarded. It is desired to find the health-beneficial property of lotus roots for effective use of the unused roots and the segments. In the present study, we investigated the functional components in lotus roots that would ameliorate NAFLD.

First, we analyzed the polyphenol contents and antioxidant activities of lotus roots of different varieties, qualities and parts. The total phenol content and antioxidative activity did not differ in the variety of lotus roots. Interestingly, the low quality parts, such as a lower part of segment of lotus roots, had a higher phenol content and antioxidative activity than the high quality parts of the lotus. Additionally, lotus root contained relatively high levels of polyphenolic compounds compared with other vegetables.

Subsequently, we studied the effects of the lotus root powder supplemented diet on the development of NAFLD in *db/db* mice which is an animal model of obesity, diabetes and dyslipidemia. After 3 weeks of feeding, hepatomegaly, hepatic triglyceride accumulation, and hepatic injury markers in serum were markedly alleviated in the lotus group compared with control group. These changes were attributable to the suppression of lipogenic enzyme activity and mRNA expressions due to the lotus diet. Serum level of adiponectin, which has protective effects against NAFLD, was significantly raised in the lotus group. Moreover, it was proposed that inflammatory cytokines and oxidative stress are suggested to be the key promoters of the progress of NAFLD, hepatic expressions of inflammatory genes were markedly suppressed by the lotus diet.

Finally, in order to characterize the active components in lotus roots, we tested whether feeding polyphenolic extract of lotus root to *db/db* mice. After 3 weeks of feeding, hepatic steatosis was markedly alleviated in the lotus polyphenol group. The effect was attributable to the suppression of lipogenic enzyme and oxidative stress levels in the liver. Then, the bioactive components in lotus root were characterized homo- and hetero-polymeric B-type procyanidin and prodelphinidin.

In conclusion, the lotus roots that contain proanthocyanidins can alleviate hepatic steatosis. The unused segments and low quality of the lotus roots might be able to utilize as the functional food materials.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	鶴 田 裕 美
審査委員	主査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 佐賀大学 准教授 永尾晃治
	副査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 佐賀大学 教授 藤田修二
	副査 鹿児島大学 准教授 大塚 彰
審査協力者	
題 目	佐賀特産食材の食品化学的及び栄養学的研究 (Studies on food chemistry and nutrition of agricultural products in Saga)
<p>非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease) は、メタボリックシンドロームと関連して増加する肝臓病の一つである。その一部は、肝組織の慢性炎症や繊維化を引き起こして脂肪性肝炎となり、肝硬変や肝癌にまで進展する恐れがある。脂肪肝から肝炎へと重篤化する非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease) は、メタボリックシンドロームと関連して増加する肝臓病の一つである。その一部は、肝組織の慢性炎症や繊維化を引き起こして脂肪性肝炎となり、肝硬変や肝癌にまで進展する恐れがある。脂肪肝から肝炎へと重篤化する詳細なメカニズムは十分に分かっていないが、NAFLD の治療や予防効果を有する農産物由来の機能性食品の開発が望まれている。</p> <p>佐賀県は、レンコン (学名: <i>Nelumbo nucifera</i>) の生産量が多い地域である。その一方で、味や見た目の悪い低品質のレンコンは、規格外品として大量に処分されており、問題となっている。未利用なレンコンを機能性食品として有効利用することが求められているが、レンコンの機能性に関する研究報告は少ない。そこで、本研究では、レンコンの機能性を明らかにするために、肥満・糖尿病モデル動物 (db/db マウス) の脂質代謝に及ぼ</p>	

す影響を検討し、活性成分特定を行った。

まず、品種、品質および部位の異なるレンコンのポリフェノール量と抗酸化活性について調べたところ、レンコンの総ポリフェノール量は、品種による差はなかったが、未利用部位のポリフェノール量と抗酸化活性は、高品質部位よりも高かった。さらに、レンコンのポリフェノール量は、野菜の中でも比較的高いことが認められた。

次に、レンコン乾燥粉末を *db/db* マウスに 3 週間摂食させ、脂肪肝に及ぼす影響を検討した。その結果、レンコン乾燥粉末の摂取により、肝肥大、肝臓のトリグリセリド蓄積および肝臓障害マーカーが対照群に比べて顕著に改善した。これら作用機序として、肝臓の脂肪酸合成系酵素活性および遺伝子発現の低下および NAFLD を改善することが知られている血中アディポネクチン濃度の上昇が示唆された。さらに、NAFLD の進行には、炎症性サイトカインと酸化ストレスの増加が関与していると言われており、肝臓の炎症性サイトカインの遺伝子発現量は、レンコン乾燥粉末添加群で有意に低下した。

最後に、レンコン乾燥粉末中の脂肪肝改善成分を明らかにするために、レンコンのポリフェノール画分添加食を調製し、*db/db* マウスに 3 週間摂食させた。その結果、レンコンポリフェノール摂取により、脂肪肝の改善が認められ、脂肪肝の改善に脂肪酸合成系酵素活性の低下および肝臓の酸化ストレスレベルの改善が寄与していることが示唆された。

さらに、レンコンポリフェノールの構造解析を行ったところ、様々な重合度の B 型プロシアニジンとプロデルフィニジンのホモおよびヘテロポリマーが検出された。

本研究により、レンコンのプロアントシアニジンは、脂肪酸合成酵素活性低下による脂肪肝改善効果を有し、今後、未利用レンコンを機能性食品として有効利用できる可能性が示唆された。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	鶴田裕美
審査委員	主査 佐賀大学 教授 柳田晃良
	副査 佐賀大学 准教授 永尾晃治
	副査 琉球大学 教授 屋宏典
	副査 佐賀大学 教授 藤田修二
	副査 鹿児島大学 准教授 大塚彰
審査協力者	
実施年月日	平成24年 1月 6日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成24年1月6日の公開審査会において、学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には、別紙の様な質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分な学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	鶴 田 裕 美
<p>[質問1] 野菜ポリフェノール含量を測った部位について [回答1] 可食部のみ使用しており、根や節の部分などは取り除いて測定を行った。</p> <p>[質問2] ポリフェノール含量の基準について [回答2] 標準物質は他の論文等と比較する場合は没食子酸を用いた。レンコンのポリフェノールの構成成分はカテキン類が多いため、実際の値に近い値で表す時はカテキンを標準物質に用いた。</p> <p>[質問3] レンコンを加工することによる有効成分の変化について [回答3] 中性条件下でのオートクレーブ処理では、PA（プロアントシアニジン:カテキン類の重合体）の共有結合は切れないが、分子量が小さい方がポリフェノールの吸収率が高いと言われているので、酵素等を用いてオリゴマー化する加工法を検討するのも興味深いと考えている。</p> <p>[質問4] ポリフェノール抽出溶媒の違いによる組成の変化について [回答4] 含水アセトンを用いるとPAを高分子まで抽出でき、ポリフェノールの抽出効率が高くなった。他の溶媒では同じ構成成分だが、低分子のものしか抽出されていなかった。</p> <p>[質問5] 体重低減に寄与する臓器重量の変化について [回答5] 脂肪組織重量に変化はなく、ほとんど肝臓に由来していると考えられる。</p> <p>[質問6] 血糖値が上昇していることについて [回答6] レンコンの摂取によってインスリン抵抗性の改善傾向は見られたが、糖尿病改善の特徴である血糖値の低下は見られなかった。対照群に比べ、レンコン摂取群で血糖値が上昇した原因については分からない。</p> <p>[質問7] ポリフェノールによる脂肪酸合成低下のメカニズムについて [回答7] 脂肪酸合成系酵素の抑制が主であると思われる。</p> <p>[質問8] 脂肪肝改善のメカニズムが脂質合成抑制の主であると考えられる理由について [回答8] PAが脂肪酸合成酵素の転写因子であるSREBP-1cの発現を抑制したとの報告もあるので、脂肪酸合成系酵素の抑制が低下メカニズムの主であると考えている。</p> <p>[質問9] レンコン粉末ではアディポネクチン上昇作用が認められたが、ポリフェノール抽出物では認められなかったことについて [回答9] レンコン粉末には、テルペン類など他の成分も含まれており、ポリフェノール以外の画分にアディポネクチンを上昇するような成分が含まれている可能性がある。</p> <p>[質問10] アディポネクチン上昇に寄与する物質が存在する画分について [回答10] 分画フローのヘキササン分配物にルテイン等のテルペン類が含まれる。トマトに含まれるテルペン類がアディポネクチンを上昇するという報告もある。</p> <p>[質問11] プロアントシアニジンの代謝について [回答11] 一般的に吸収率は低いと言われている。3量体程度まではそのままの形で体内に存在すると言われている。一部は肝臓で代謝を受け、グルクロン酸や硫酸抱合体で存在しているとの報告もある。</p> <p>[質問12] 食事として摂取する際の有効量について [回答12] 本研究の投与量で考えると生レンコン摂取量は1~2kg/日になる。リンゴ由来のPAでは、200mg/日の摂取でヒトの内臓脂肪量が低下したと報告しており、200mgのPAならば生レンコン50g~100gで摂取することができる。</p> <p>[質問13] プロアントシアニジンの検出について [回答13] ポリフェノール画分をさらにゲルろ過等で分画したが、分子量が異なるPAが検出されるだけで、レンコンに含まれるポリフェノールはPAが大部分を占めていた。</p>	