

濃縮脱塩梅酢がハムスターの脂質代謝に及ぼす影響

田中 智弘, 河内 浩行, 松井 徹, 矢野 秀雄
(京大院農 動物栄養科学*)

The effect of concentrated and desalted plum vinegar on lipid metabolism in hamsters

Tomohiro TANAKA, Hiroyuki KAWACHI, Tohru MATSUI and Hideo YANO
Laboratory of Nutritional Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Plum vinegar is a by-product of pickled plum "Umeboshi", and has been believed to contain various useful components deriving from the plum fruit. The aim of this study was to investigate the effect of concentrated and desalted plum vinegar on lipid metabolism in hamsters. Twenty-four male Golden Syrian hamsters aged 6 weeks were randomly assigned to 3 groups that were given a control diet or diets supplemented with the concentrated and desalted plum vinegar at 2 levels (25ml/kg and 50ml/kg) for 43 days. The addition of concentrated and desalted plum vinegar did not affect growth parameters, serum and liver cholesterol concentrations, and gene expressions related to triglyceride synthesis in the liver. On the other hand, serum and liver triglyceride levels were decreased by the higher dose of concentrated and desalted plum vinegar. The present experiment shows that the concentrated and desalted plum vinegar can decrease serum and liver triglyceride without affecting gene expression related to triglyceride synthesis in the liver.

梅酢は梅干し生産の副産物であり、梅果実由来の様々な有用成分を含むと考えられる。梅酢から粗精製した疎水性有機画分を高血圧自然発症ラットの飼料に添加した試験では血清中の脂質の酸化、血圧の上昇、肝臓トリグリセリド(TG)の蓄積が抑制されたことが報告されている¹⁾。ハムスターは脂質代謝^{2,3)}、食餌性アテローム発生要因に対するLDL+VLDLの応答などがヒトと多くの類似性を持つことから^{4,5)}、脂質代謝の研究を行うためのモデル系として有用である。本実験では、濃縮脱塩梅酢がハムスターの脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

実験方法

供試動物

雄ゴールデンシリアンハムスター6週齢(体重約80g)24匹を用い、各8匹の3区に割り当てた。

供試飼料および試験区

飼料はAIN76を基に15%のラード、0.2%のコレステロールを加え、コーンオイルを1%に減じ、シクロース含量で調整した高脂肪・高コレステロール食を対照とし、対照食に25 ml/kg (L区)あるいは50 ml/kg (H区)の濃縮脱塩梅酢(東農園)を液体として飼料に添加した。全ての動物に対照食を7日間給与し馴致後、43日間各飼料を給与した。体重を1週間ごとに、飼料摂取量を毎日記録した。

*所在地：京都市左京区北白川追分町(〒606-8502)

試料採取

試験最終日に、15時間絶食後、血清および肝臓を採取した。体重100 gあたり6 mgのペントバルビタールを腹腔に投与し、エチルエーテルで追麻した状態で、頸部を開き、頸動脈を切開しロートで試験官に受け血液を採取した。その後、4℃、3000回転で20分遠心分離し血清を得た。血清中HDLコレステロール (HDLcho) 濃度分析用試料を除き、試料は測定まで-20℃で保存した。また、血清中HDLcho濃度は即日に測定した。肝臓は採取後重量を測定し、液体窒素で直ちに凍結させ、測定まで-80℃で保存した。

分 析

血清中総コレステロール (Tcho) 濃度, HDLcho濃度, TG濃度をそれぞれ市販のキット (HDL-コレステロール E-テストワコー, コレステロールE-テストワコー, トリグリセライドE-テストワコー) を用いて測定した。肝臓中Tcho濃度およびTG濃度は, Folchらの方法⁶⁾を用いて肝臓から脂質を抽出し, イソプロピルアルコールを用いて溶解し, 前述のそれぞれ市販のキットを用いて測定した。血清中Tcho濃度とHDLcho濃度の差を血清中VLDLコレステロール+LDLコレステロール (VLDLcho+LDLcho) 濃度として算出し, アテローム形成指標をVLDLcho+LDLcho/HDLchoとして求めた⁷⁾。また, 肝臓からTRIzol reagent (Invitrogen) を用いてRNAを抽出し, Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR法) で遺伝子発現を半定量的に測定した。cDNA合成には, 市販のキットRNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Takara) を用いた。マウスを参考に18S rRNAのプライマーをデザインした。肝臓中脂肪酸合成酵素 (FAS), アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACC) は, GenBankの配列を基にプライマーをデザインした (Table 1)。各遺伝子発現量は18SrRNAの発現量で補正し対照区を100とし相対値で示した。またそれぞれPCR断片については, クローニング後シーケンスを行い, ハムスターの目的断片であることを確認した。濃縮脱塩梅酢中ポリフェノール含量の定量は, SingletonとRossiの方法⁸⁾を用いて行った。

Table 1 Primers for PCR amplification gene products and specific conditions used for the amplification of each gene studied

Primers	Sense primer	Antisense primer	Length (bp)	GenBank accession no.
FAS	5'-AGCCCTCAAGTGCACAGTG-3'	5'-TGCCAATGTGTTTTCCCTGA-3'	81	AF356086
ACC	5'-ACACTGGCTGGCTGGACAG-3'	5'-CACACAACCTCCAACATGGTG-3'	76	AF356089
18S rRNA	5'-CGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT-3'	5'-TCGGGCCTGCTTTGAACACTCTAA-3'	213	X00686
Conditions	Annealing	Elongation	No. of cycles	
FAS	58℃ - 30s	72℃ - 60s	40	
ACC	58℃ - 30s	72℃ - 60s	28	
18S rRNA	58℃ - 30s	72℃ - 60s	17	

統計処理

統計処理は、一元配置分散分析を行い、分散分析の結果が有意であった場合は各区間の差をTukeyの多重検定で検討した。危険率5%未満を有意とした。

結果と考察

採食量, 体重増加, 飼料効率, 肝臓重量は, 各試験区において濃縮脱塩梅酢添加による影響は認められなかった (Table 2)。濃縮脱塩梅酢は血清中Tcho濃度およびHDLcho濃度, 肝臓中Tcho濃度に有意な影響を及ぼさなかったが, 血清中および肝臓中TG濃度の有意な減少がH区で認められた (Table 3)。高血圧自然発症ラットを用いた報告では, 梅酢から粗精製した疎水性有機成分の添加は肝臓中TG濃度を低下させるが, 血清中TGには影響を及ぼさないことが示されている¹⁾。本試験では濃縮脱塩梅酢中成分が肝臓中TGのみならず血清中TG濃度を減少させる効果を有することが明らかになった。

Table 2 Effect of the concentrated and desalted plum vinegar on growth parameters in hamsters

	Control	Concentrated and desalted plum vinegar	
		25ml/kg	50ml/kg
Food intake (g/d)	5.63 ± 0.22	6.09 ± 0.13	5.70 ± 0.18
Weight gain (g/d)	0.62 ± 0.11	0.72 ± 0.07	0.44 ± 0.07
Food efficiency (g/kg)	106 ± 18	117 ± 9	75.8 ± 10.2
Liver weight (g/100g BW)	4.88 ± 0.19	4.88 ± 0.05	4.74 ± 0.06

The values are means ± S. E. for 8 hamsters.

Table 3 Effect of the concentrated and desalted plum vinegar on gserum and liver lipid parameters in hamsters

	Control	Concentrated and desalted plum vinegar	
		25ml/kg	50ml/kg
Serum parameters (mg/100ml)			
HDLcho	106 ± 11	128 ± 3	116 ± 4
Tcho	282 ± 28	271 ± 12	252 ± 6
VLDLcho+LDLcho	178 ± 36	143 ± 10	135 ± 5
VLDLcho+LDLcho/HDLcho	2.37 ± 1.12	1.12 ± 0.08	1.17 ± 0.06
TG	294 ± 38 ^a	274 ± 21 ^{ab}	187 ± 22 ^b
Liver parameters (mg/g liver)			
Tcho	17.4 ± 1.0	17.1 ± 0.8	17.0 ± 0.9
TG	7.10 ± 0.53 ^a	6.48 ± 0.55 ^{ab}	5.16 ± 0.50 ^b

The values are means ± S. E. for 8 hamsters per group.

^{a, b} Within a row, values that do not share the same superscript letters are significantly ($p < 0.05$) different from each other.

濃縮脱塩梅酢には650 mg/lのポリフェノールが含まれており、H区の飼料に含まれるポリフェノール量は3.25mg/100gであった。Lucasら⁹⁾は卵巣摘出ラットにおいてブルーンの給与が脂質代謝を改善することを報告しており、ブルーンに含まれるポリフェノールがその原因であることを示唆している。彼らの報告ではブルーンを添加した飼料中ポリフェノール量は5.6 mg/100gであった。

血清中および肝臓中TG濃度が減少するメカニズムとして、合成阻害や吸収阻害、 β 酸化促進などが考えられる。本実験では、肝臓中FAS mRNAおよびACC mRNAの発現量に各区間で有意差は認められなかった (Table 4, Fig 1)。したがって、濃縮脱塩梅酢はTG合成に影響を及ぼさないことが示唆された。ジャスミン茶に含まれるポリフェノールを飼料に添加するとアポリタンパク質Bを減少させることが報告されている¹⁰⁾。小腸で合成され、外因性TGを抹消組織に運搬するリポタンパクであるキロミクロンは、その合成にアポリタンパク質Bを必要とする。そのため、アポリタンパク質Bが減少すると、TGの吸収阻害が起こると考えられる。さらにポリフェノールの一種である茶カテキン類を高濃度で飼料に添加すると肝臓の β 酸化関連酵素 (アシルCoAオキシダーゼと中鎖アシルCoAデヒドロゲナーゼ) のmRNA発現が上昇し、また脂質の β 酸化活性が増加することが報告されている¹¹⁾。したがって、濃縮脱塩梅酢中ポリフェノールはTGの吸収および脂肪酸の β 酸化に影響を及ぼしている可能性があり今後の検討課題である。結論

Table 4 Effect of the concentrated and desalted plum vinegar on genes transcription related to triglyceride synthesis in the liver

	Control	Concentrated and desalted plum vinegar	
		25ml/kg	50ml/kg
FAS	100 ± 6.6	95.8 ± 2.8	90.6 ± 2.5
ACC	100 ± 19.6	103.2 ± 17.3	85.7 ± 9.3

The values are means ± S. E. for 8 hamsters.

mRNA levels are expressed as a percentage of control.

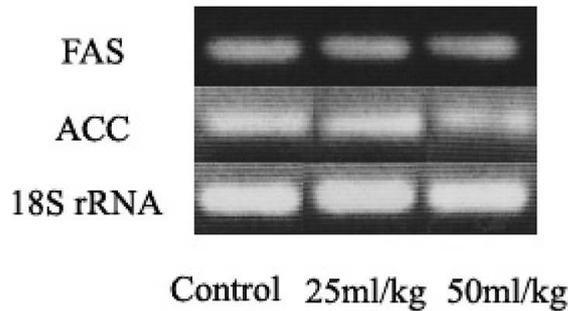


Fig. 1 Semi-quantitative RT-PCR analyses for mRNA expression of FAS and ACC in hamster liver

として、濃縮脱塩梅酢は脂肪酸合成酵素の遺伝子発現に影響することなく、血清及び肝臓中TG濃度を減少させることが明らかになった。

文 献

- 1) 高寺恒慈, 小川 博, 目黒忠道, 白坂憲章, 吉栖 肇, 2004. 梅酢抽出物が高コレステロール食飼育脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットの血圧と脂質代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食料学会誌, 57: 249-255.
- 2) Spady DK, Dietschy JM. 1985. Rates of cholesterol synthesis and low-density lipoprotein uptake in the adrenal glands of the rat, hamster, and rabbit in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 836: 167-175.
- 3) Kris-Etherton PM, Dietschy J. 1997. Design criteria for studies examining individual fatty acid effects on cardiovascular disease risk factors: human and animal studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65 (Suppl): 1590S-1596S.
- 4) Kowala MC, Nunnari JJ, Durham SK, Nicolosi RJ. 1991. Doxazosin and cholestyramine similarly decrease fatty streak formation in the aortic arch of hyperlipidemic hamsters. *Atherosclerosis*, 91: 35-49.
- 5) Kahlon TS, Chow FI, Knuckles BE, Chiu MM. 1993. Cholesterol-lowering effects in hamsters fed beta-glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran, and oat bran and their combinations. *Cereal Chemistry*, 70: 435-440.
- 6) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- 7) Kikuchi-Hayakawa H, Onodera N, Matsubara S, Yasuda E, Chonan O, Takahashi R, Ishikawa F. 1998. Effects of soy milk and bifidobacterium fermented soy milk on lipid metabolism in aged ovariectomized rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62: 1688-1692.
- 8) Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- 9) Lucas EA, Juma S, Stoecker BJ, Arjmandi BH. 2000. Prune suppresses ovariectomy-induced hypercholesterolemia in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11: 255-259.
- 10) Chan PT, Fong WP, Cheung YL, Huang Y, Ho WK, Chen ZY. 1999. Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet. *Journal of Nutrition*, 129: 1094-1101.
- 11) Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, Tokimitsu I. 2002. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *International Journal of Obesity*, 26: 1459-1464.