

高脂肪高シヨ糖給餌ラットにおける富有柿幼果の 黒麹菌発酵物抽出液投与の影響

折居 千賀

Effects of Fermented Persimmon Extract on Sprague-Dawley Rats Fed High-Fat, High-Sucrose Diet

Chika Orii

We have shown that fermentation with *Aspergillus luchuensis* enhances the functionality of immature “Fuyu” persimmon. In this study, we examined the effect of oral administration of 1% (0.02 g/kg) or 0.1% (0.002 g/kg) fermentation extracts on Sprague Dawley rats fed a high-fat, high-sucrose diet. Total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol levels were significantly reduced following the administration of the fermented liquid extracts on days 7 and 14 when compared to those in the control group, which did not receive the extracts. The blood glucose level was decreased in the 0.1% group on day 7 after administration; conversely, no significant difference was observed in the 1.0% group, suggesting that the difference was independent of the concentration of the fermentation products. No significant differences in organ and fat weight were observed between the administered and control groups. These results suggested that the administration of fermented extracts of immature “Fuyu” persimmon affected the weight and increased the blood glucose levels in rats.

Key words: persimmon, fermentation, *Aspergillus luchuensis*, antiobesity, blood glucose level

1. 背景及び目的

柿 (*Diospyros kaki*) はこれまで、食用だけではなく葉あるいは染料や塗料として用いられており、日本人にはなじみ深い果物である。柿は中国を原産とする果物で、完全甘柿、不完全甘柿、渋柿に分類され、日本では富有柿、次郎柿、市田柿など様々な品種が存在する。果物としての柿は主に生食、干し柿として消費され、加熱処理に不向きで他の果物に比べて消費形態は多様ではない。また、毎年2割程度は摘果した果実や規格外果実が発生すると推定され、それらの処分にはコストがかかる。しかし柿は機能性に関して葉に抗アレルギー成分であるアストラガリン¹⁾、へたはトリテルペノイド類を含み、しゃっくり止めの漢方薬としても利用されている²⁾。そのほか、果実や果皮には抗肥満に関与するとされる β -クリプトキサンチンやタンニンをはじめとした柿ポリフェノールが含まれている³⁾。つまり柿そのものは機能性を有しているにも関わらず、消費形態の少なからず未利用資源としての側面もあわせ持っているといえる。そこで我々は柿を有効活用するための手段として発酵を選択し、これまでに黒麹菌を用いた富有柿幼果の発酵と発酵にともなう機能性の増強について報告した⁴⁾。 *In vitro* において富有柿幼果の黒麹菌発酵物

は、 β -リパーゼ阻害活性（吸収阻害型抗肥満）、ACE阻害活性（血圧上昇抑制）が増強され、同発酵物が機能性素材として活用できる可能性を示した。しかし、生体に対して同発酵物を投与した際にどのような影響を及ぼすかは不明であった。そこで、富有柿幼果発酵物の抽出液をSprague Dawleyラットに経口投与し、発酵物抽出液の摂取が生体に及ぼす影響について調べたので報告する。

2. 実験方法

2.1. 使用菌株

発酵菌は黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis* NBRC 111188, 旧 *Aspergillus awamori* NBRC4033) を用いた。これらはNBRC (Biological Resource Center, NITE) より購入した。同菌株をポテトデキストロース寒天斜面培地 (Difco Laboratories) で35°C, 3日間培養したものを種菌として用いた。

2.2. 発酵法および抽出法

原料は奈良県農業開発センターの協力のもと、7月上旬にかけて摘果した富有柿幼果を用いた。果実をへたや果皮、種子ごと細断し、-20°Cで保存した。発酵法⁴⁾を以下に

示す。効果約 40 g を 100°C の熱水で 5 秒間煮沸処理し、滅菌済みビーカーに移した。その後、滅菌済みステンレス鉢にて細断した試料を 300 mL バッフルフラスコに移し、通気性があるシリコ栓で密封した。黒麹菌を培養した斜面培地に滅菌水 10 mL を加えて懸濁したのち、孢子懸濁液 2.0 mL を効果に添加し、好気条件下、35°C で 7 日間静置発酵を行った。発酵終了後、水を用いて 4°C、4 日間抽出を行った。抽出液を減圧乾固したのち後述の投与濃度に合わせて適宜水に溶解し、試料溶液とした。

2.3. 試験動物および飼育条件

生後 6 週齢の雄 Sprague Dawley ラット (SD ラット, 日本エスエルシー株式会社) を購入し、1 週間の予備飼育を行った。飼育条件は室温 23°C ± 2°C, 湿度 55 % ± 10 %, 明暗周期は 12 時間とし、247 mm × 351 mm × 180 mm のアルマイト性ケージに 1 匹/ケージで収容した。飼料は予備飼育時に CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社), 試験時は固形飼料 F2HFHSD (高脂肪高シヨ糖食, オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させた。水は水質基準に関する省令に適合した水道水を給水瓶 (500 mL) に入れ、ステンレス製ノズルより自由摂取させた。床敷きにはエゾマツ, トドマツ (株式会社道央理化学産業) を用いた。

2.4. 群分けおよび被験物質の投与

予備飼育終了後、体重をもとに対照群 (水道水), 1 % (w/v) 発酵物抽出液群, 0.1 % (w/v) 発酵物抽出液群の 3 群に分けた (N=10)。発酵物抽出液を蒸留水に溶解し、ポリプロピレン製ディスポーサブル注射筒 (テルモ (株)) およびラット用胃ゾンデ ((有) フチガミ器械) を用いて強制経口投与した。投与容量は 5 mL/kg ラット体重とした。発酵物抽出液の投与容量は、直近の体重に基づいて算出し、1 % 試験群で 0.02 g/kg/日, 0.1 % 試験群で 0.002 g/kg/日となるようにした。対照群には蒸留水のみを投与した。試料の投与タイミングは餌の摂取が活発になる暗周期直前とし、1 日 1 回の投与を 8 週間 (0 日目より 56 日目まで) 行った。

2.5. 測定および採血

体重測定, 摂餌量測定, 血糖値測定および採血は週 1 回行った。血糖値測定および採血のため, 測定日前日より 16 時間の絶食を行った。体重は動物入荷日および群分け日に各 1 回, 群分け後は週 1 回で測定した。摂餌量は絶食実施前に残餌量を測定, 給餌再開時に給餌量を測定して摂餌量を算出した。血糖値測定は無麻酔下にて行い, 動物の尾を軽く剃刀で傷をつけ, 漏出する血液を血糖値自己測定器 (ニプロ株式会社) にて全血中の血糖濃度を測定した。血糖値測定後, ラットの尾静脈から約 0.5 mL の血液を採取した。採取した血液は遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) を行い, 血清を採取し, -80°C で凍結保存した。得られた血清について総コレステロール (T-CHO),

HDL-コレステロール (HDL-C), LDL-コレステロール (LDL-C), 遊離脂肪酸, 中性脂肪 (TG) について調べた。なお, LDL-C は日本動脈硬化学会『動脈硬化性疾患予防ガイドライン (2017)』に従い, Friedewald 式を用いて算出した。

Friedewald 式

$$\text{LDL-C (mg/dL)} = \text{総コレステロール (mg/dL)} - \text{HDL-コレステロール (mg/dL)} - (\text{中性脂肪 (mg/dL)} / 5)$$

試験最終日にイソフルラン麻酔下でラットの後大静脈より血液を採取し, 放血安楽死させた。採取した血液は遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) を行って血清を採取し, -80°C で凍結保存した。安楽死後のラットから, 肝臓, 腎臓, 脂肪組織 (精巣周囲, 腎周囲, 腸間膜周囲, 肝臓周囲と背部褐色脂肪) を採取して重量を測定した。

2.6. 統計解析

群間比較は Bartlett 検定を行い, さらに等分散であれば Dunnett 検定を, 不等分散であれば Steel 検定を用いた。有意水準は 5% とし, 統計解析には Statcel (Ver. 3.0) を用いた。

2.7. 動物実験の実施

この試験は (公財) 東洋食品研究所動物実験委員会の承認 (承認番号 2017-A-001) を得て 2017 年に実施されたものである。同試験の実施は株式会社ケー・エー・シーに委託して行った。また, 血液生化学検査はオリエンタル酵母工業株式会社に委託した。

3. 結果

3.1. 発酵物抽出液投与にともなう体重および摂餌量, 血糖値の経時変化

体重では, 1.0 % (w/v) 群と対照群との間に差はみられなかったが, 0.1 % (w/v) 試料群のみ他の 2 群よりも増加傾向を示した (図 1A)。摂餌量では, 1.0 % 試料群と対照群との間に差は見られなかったが, 0.1 % 試料群のみ他の 2 群に比べて摂餌量の増加が見られた (図 1C)。血糖値では 0.1 % 試料群にて投与 7 日目に有意な低値が見られたが, 21 日以降は顕著な差がみられなかった (図 1B)。一方, 1.0 % 試料群では投与 7 日目週から 21 日目までは血糖値が低下する傾向が見られたが, 21 日以降は対照群と比較して優位な差は見られなかった。

3.2. 発酵物抽出液投与にともなう抗肥満に関する項目の経時変化

週に 1 度の採血で得た血液について, T-CHO, HDL-C, LDL-C, 遊離脂肪酸, TG について調べた。総コレステロール (図 2A) は 0.1 % 試料投与群で 14 日目に有意な低値が見られ, 21 日目以降は対照群とほぼ同じ推移を示

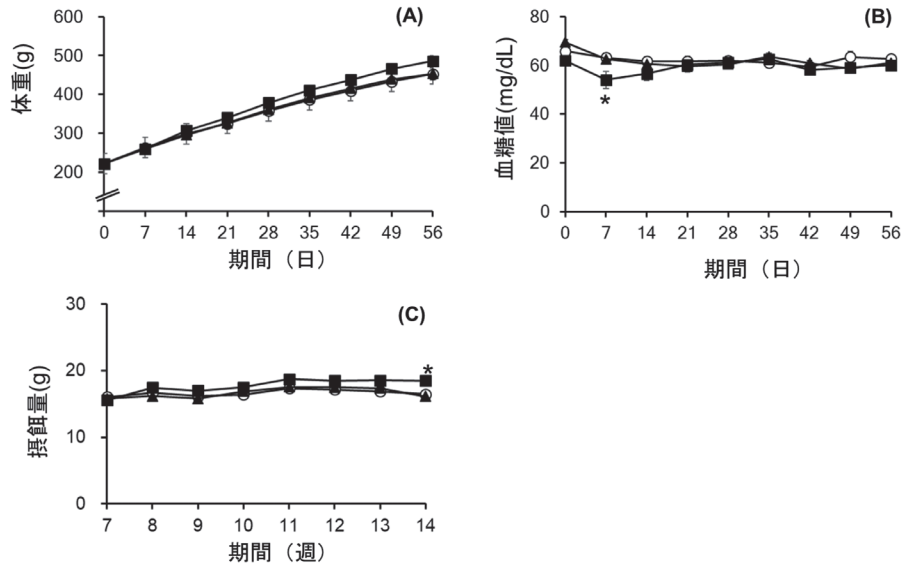


図1 体重, 血糖値, 摂餌量の経時変化

○, コントロール群; ■, 0.1%試料群; ▲, 1.0%試料群; *, $p < 0.05$

した。一方, 1.0%試料群では有意差は見られなかった。遊離脂肪酸では対照群, 試料群ともに同じ推移を示し, 有意差は見られなかった (図2B)。TGでは1.0%試料群, 0.1%試料群ともに有意差は見られなかったが, 試料群はいずれも21日目までは減少傾向を示し, 0.1%試料

群では28日以降で他の2群より低く推移した (図2C)。HDL-Cでは7日目にて0.1%試料群に有意な低値が見られ, 21日目以降は対照群とほぼ同じ推移を示した (図2D)。LDL-CはT-CHOおよびHDL-C値に連動する形で減少したが有意差は見られなかった (図2E)。

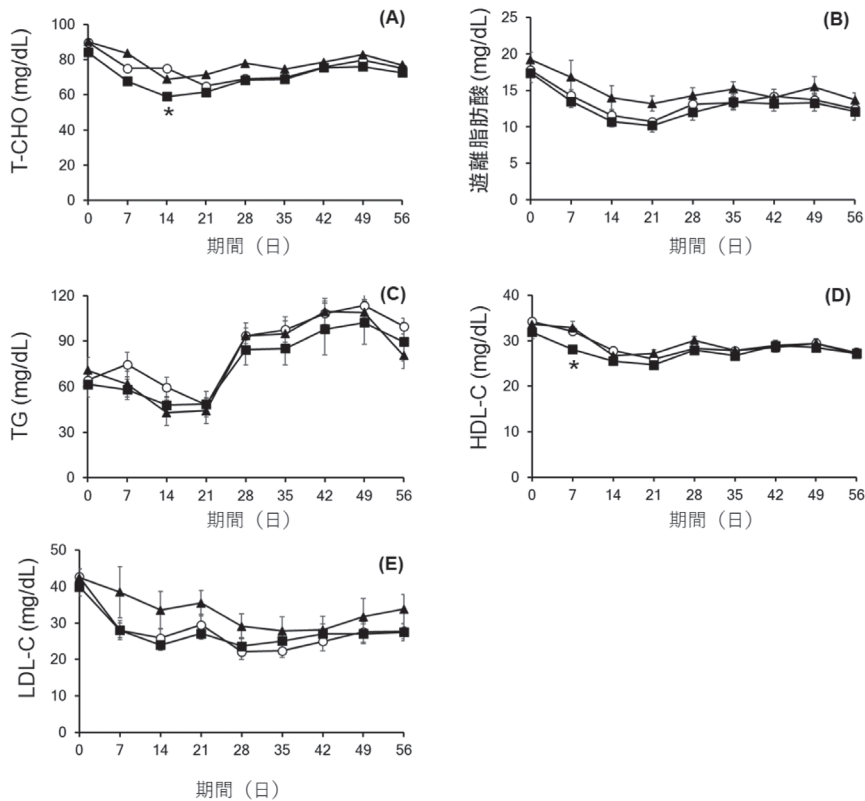


図2 各肥満項目の経時変化

○, コントロール群; ■, 0.1%試料群; ▲, 1.0%試料群; *, $p < 0.05$

3.3. 血液生化学検査

試験最終日に採取した血液（全採血）から調製した血清について血液生化学検査を行った（表1）。腎機能関連項目ではNaにて0.1%試料群で有意差が見られた（143.2 ± 0.3 mEq/L）。Clについて1.0%（102.4 ± 0.3 mEq/L）および0.1%試料群（101.0 ± 0.3 mEq/L）で有意な低値が見られた。肝機能についてはいずれの試料群も有意差

は見られなかったが、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）においては0.1%試料群、1.0%試料群は対照群と比較して低い値を示した。脂質代謝関連項目では有意差はみられなかったが、1.0%試料群においてLDL-Cが増加傾向を示し、TGが低値傾向を示した。

表1 血液生化学検査（全血）

項目	対照群	0.1%試料群	1.0%試料群
総タンパク質(g/dL)	6.0 ± 0.0	6.1 ± 0.1	6.1 ± 0.2
アルブミン(g/dL)	4.2 ± 0.0	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.2
尿素窒素(mg/dL)	12.3 ± 0.5	12.9 ± 0.3	12.3 ± 0.6
クレアチニン(g/dL)	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2
Na(mEq/L)	144.2 ± 0.3	143.2 ± 0.3*	143.7 ± 0.3
K(mEq/L)	4.6 ± 0.0	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1
Cl(mEq/L)	103.6 ± 0.5	101.0 ± 0.3**	102.4 ± 0.3*
AST(U/L)	94.5 ± 7.5	85.7 ± 6.7	93.2 ± 9.0
ALT(U/L)	40.7 ± 1.9	37.5 ± 2.1	36.8 ± 1.5
ALP(U/L)	466.7 ± 35.1	482.9 ± 30.2	438.8 ± 26.9
γ-GT ¹⁾ (U/L)	3>	3>	3>
T-CHO(mg/dL)	59.0 ± 2.8	59.6 ± 2.7	61.4 ± 3.6
遊離脂肪酸(mg/dL)	10.1 ± 0.6	10.3 ± 0.7	11.1 ± 1.0
TG(mg/dL)	47.8 ± 3.6	47.5 ± 6.6	42.3 ± 5.2
HDL-C(mg/dL)	21.4 ± 0.7	21.5 ± 0.7	21.1 ± 0.7
LDL-C(mg/dL)	28.0 ± 2.3	28.6 ± 2.3	31.8 ± 3.2
総胆汁酸(μmol/L)	4.8 ± 0.5	5.6 ± 0.7	5.5 ± 0.9

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

1) γ-グルタミルトランスフェラーゼ

3.4. 発酵物抽出液投与による組織および脂肪重量への影響

最終日に採取した各組織の重量を測定し、比較した（表2）。肝臓重量において0.1%試料群のみ有意差が見られた。また、腎周囲脂肪では各試料群は対照群と比較して低い値を示したが、有意差は見られなかった。背部褐色脂肪は試料群のほうが対照群よりも高い値を示したが、有意差は見られなかった。

4. 考察

これまで *In vitro* にて富有柿幼果が黒麹菌を用いた発酵によってβ-リパーゼ阻害活性やACE阻害活性、DPPHラジカル消去活性が増強されることを示した⁵⁾。しかし、*in vitro* で見られた効果が生体にどのような影響を与えるかは不明であった。そこでラットに発酵物抽出液を投与する試験を行うことは、同発酵物を摂取した際の影響を知るうえで重要であると考えた。

富有柿幼果発酵物抽出液をSDラットに8週間投与し、その影響を調べた。投与初期（0～14日目）において

0.1%（w/v）発酵物抽出液は血糖値、総コレステロール、HDL-Cを有意に低下させた。また、TGにおいても0.1%試料群において低下傾向がみられた。これまで *In vitro* においてβ-リパーゼ阻害活性を抗肥満の指標として用いていた。同阻害活性は脂肪の分解および吸収の阻害に關与するとされる⁵⁾。体内における脂肪の運搬に關与するのはカイロミクロンと呼ばれるリポ蛋白⁸⁾で、脂肪の腸管吸収およびカイロミクロンの上昇抑制がβ-リパーゼ阻害活性による抗肥満の作用機序とされる。酵素活性の阻害様式としては基質や酵素、基質-酵素複合体に作用する拮抗阻害、非拮抗阻害といったものがあげられる。このほかにもにがり⁸⁾のミネラルが、胆汁酸や脂肪のミセルに作用した結果、吸収されづらい形態に変化したことで吸収が抑制されると推測している。また、ウチワドコロ抽出物⁹⁾では、血中のTG増加が抑制された結果、糞便に排出される脂肪量が増加したという報告がある。被験物質の投与はラットの活動を開始する暗周期直前としたため、投与から食物の摂取までの時間に大きな開きはないと考えられる。そのため抗肥満への影響については *in vitro* で見られたβ-リパーゼ阻

表2 各臓器および脂肪重量

項目	臓器重量 (mg/g 体重)		
	対照群	0.1%試料群	1.0%試料群
肝臓	22.3±0.3	23.8±0.5*	22.3±0.3
右腎臓	2.5±0.1	2.6±0.0	2.5±0.0
左腎臓	2.5±0.0	2.5±0.0	2.5±0.1
精巣周囲脂肪	29.9±1.0	29.4±2.3	29.8±1.5
腎周囲脂肪	9.2±0.3	7.9±0.6	8.7±0.5
腸間膜周囲脂肪	7.8±0.3	7.8±0.6	7.8±0.3
背部褐色脂肪	1.6±0.2	1.9±0.1	1.9±0.2

* $p < 0.05$,

害活性による吸収阻害もまた影響している可能性がある。また、血糖値上昇抑制傾向もみられたことから、発酵物抽出液は糖の吸収に対しても何らかの影響を示すことが考えられた。被験物質の濃度については β -リパーゼ阻害活性の結果をもとに設定したが、濃度依存性は見られなかった。今回投与した発酵物抽出液は未精製の原液で、糖や有機酸といった様々な成分が含まれていることが推測される。そのため、濃度を濃くした場合には、機能性を示す成分とそれ以外の成分の作用によって効果が相殺された可能性もまた考えられた。

最終日(56日目)の血液生化学検査ではNa, Clにて有意差は見られた。しかし、日本エスエルシー社が提供するSDラットの正常値データと比較したところ差は見られなかったため、この有意差は生体で影響を及ぼすほどの差ではないと判断した。そのほかの項目では有意差は見られなかったものの、一部低値傾向がみられた。そのほか、0.1% (w/v) 発酵物抽出液投与群では、他の2群よりも摂餌量および体重の増加がみられた。餌として高脂肪高ショ糖餌を与えていたが、臓器重量や各種脂肪組織の重量で有意差が見られた項目は肝臓重量のみであった。さらに解剖時に脂肪肝と肉眼観察で判断できるのは全固体(30例)中1~2例であった。血液生化学検査での肝機能、腎機能、肥満項目においても試料群と投与群で顕著な差は認められなかった。このため、試料投与群で見られた体重の増加は病的な異変によるものではなく、発酵物抽出液がラットの食欲あるいは代謝に何らかの影響を与えた可能性が考えられた。

これらのことより、*In vivo*においても富有柿幼果発酵物抽出液の定期的な投与は高脂肪高ショ糖食給餌SDラットに対し抗肥満および血糖値上昇抑制に影響を与えることが示唆された。

5. 参考文献

- 1) 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, 新本洋士, 農産物のラジカル消去能の検索, 日本食品科学工学会誌, 49, 257-266, (2002)
- 2) 松浦信, 飯沼宗和, 資源植物の成分研究(第4報)

柿蒂の成分について その1, 薬学雑誌, 97, 452-455, (1977)

- 3) Izuchi R, Nakai Y, Takahashi H, Ushiyama S, Okada S, Misaka T, Abe K., Hepatic gene expression of the insulin signaling pathway is altered by administration of persimmon peel extract: a DNA microarray study using type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 3320-3329, (2011).
- 4) 中林敏郎, 果実および野菜類のタンニン成分(第7報) 甘柿と渋柿のタンニン組成の相違, 日本食品科学工学会誌, 18, 33-37, (1971)
- 5) 折居千賀, 黒麹菌および乳酸菌を用いた発酵による富有柿幼果の機能性向上. 日本栄養・食糧学会誌, 68, 225-232, (2015)
- 6) 折居千賀, 富有柿幼果黒麹菌発酵物の機能性に対する熱処理の影響, 日本防菌防黴学会誌, 45, 251-257 (2017)
- 7) 小島芳弘, 村中 隆, カワラケツメイに含まれる新規タンニンおよびそのリパーゼ阻害活性, 日本食品科学工学会誌, 59, 279-283, (2012)
- 8) 北川孝江, 韓 立坤, 奥田拓道, ラットにおける脂質エマルジョンの腸管吸収に及ぼすにがりの影響, 栄養学雑誌, 62, 91-94, (2004)
- 9) Chong-Suk KWON, Ho Yong SOHN, Sung Hee KIM, Ji Hyun KIM, Kun Ho SON, Jeong Soon LEE, Jin Kyu LIM, Jong-Sang KIM, Anti-obesity Effect of *Dioscorea nipponica* Makino with Lipase-inhibitory Activity in Rodents, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 1451-1456, (2003)