

令和 2 年度

神戸女子大学大学院健康栄養学研究科

修士論文要旨

## 糠漬けによるメラニン生成抑制効果の検討 ー生糠および脱脂米糠の違いからー

神戸女子大学大学院 修士課程(健康栄養学専攻) 岩田菜由

### 【背景・目的】

漬物の歴史は古くからある。しかし、食の多様化で糠漬けの生産量は減少傾向にある。しかし、発酵食品ブームや自然志向とあいまって糠漬けは注目されている。糠漬けに使用される米糠は抗酸化作用や保湿作用を有しており、特にγ-オリザノールにはメラニン生成抑制作用などが報告されている。近年は自然志向にともない化学物質を使わずに自然の原料などにこだわった化粧品が多く販売されている。その中で米糠を用いた化粧品も多くある。男女ともにシミがない肌を魅力的だと判断しており、視覚的な肌質感を重要視する傾向があることが分かっている。そこで本実験では日常手軽に使用できる生糠と不要物として処理に苦慮している脱脂米糠、野菜はダイコン、ニンジン、キュウリと三種を用いて糠漬けを作成した。肌のシミは人の印象を左右することからも、本研究では化粧品として使用することを前提に、特にシミ防止を目的とし、糠漬け抽出物のチロシナーゼ活性抑制効果、ならびにマウス皮膚由来のマウスメラノーマ B16F0 細胞に対するメラニン生成抑制の影響を検討した。

### 【方法】

In vitro 実験のチロシナーゼ活性抑制試験は、生糠と脱脂米糠を使用し、ダイコン、ニンジン、キュウリの3種類の野菜を糠漬けにしたものと、未加工の生のものを絞り、それを被験物質として使用した。一方、コントロールは被験物質の代わりに蒸留水を用い、生成したチロシナーゼに対する阻害率を求めた。細胞実験では、マウスメラノーマ B16F0 細胞を細胞密度が  $2.5 \times 10^5$  個/ml になるように培養し、24 時間後、被験物質、 $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $10 \mu\text{M}$ ) を添加し24時間培養した。培養後、培地を除き10%DMSO・2M NaOH を添加し、60°Cで2時間加熱し405 nmの吸光度を測定することで、被験物質を作用させない系と比較してメラニン生成抑制効果を評価することとした。

### 【結果】

チロシナーゼ活性抑制試験では、生糠より脱脂米糠の方が高い阻害率を示した。生糠漬け、脱脂米糠漬け共に、キュウリとニンジンはどちらも濃度依存的にチロシナーゼ活性を抑制した。また旬の野菜と旬ではない野菜との比較では阻害率に大きな差はみられなかった。ダイコンにおいては、旬は生野菜、生糠漬け、脱脂米糠漬けともに阻害率に差はなくすべて100%程度の阻害率であった。一方、旬以外の方は脱脂米糠漬けが最も阻害率が高かった。3種類の野菜の中ではダイコンが最も阻害率が高かった。ダイコン(生糠漬け)抽出物とダイコン(脱脂米糠漬け)抽出物をマウスメラノーマ B16F0 細胞に添加したが両抽出物共

に、未添加の細胞のみと比較してメラニン生成率には有意な差がみられず、メラニン生成抑制効果を示さなかった。またメラニン生成率が細胞のみに比べて高くなる傾向があった。

#### 【考察】

生糠より脱脂米糠の方が高い阻害率を示したのは、 $\gamma$ -オリザノール量が脱脂米糠の方が多いと考えるためである。玄米中の $\gamma$ -オリザノールは品種や施肥、保管温度に影響を受けるとされているため、今回も同様の影響があると考えられる。ダイコンでは外皮に含まれる $\gamma$ -オリザノールと、生糠に含まれる $\gamma$ -オリザノールの浸透によりダイコンの糠漬けが最も効果が高かったと推測した。そのため細胞実験においては、ダイコン(生糠漬け)とダイコン(脱脂米糠漬け)をメラニン産生細胞に添加することでメラニン生成に関する実験を行った。しかしそのメラニン生成率に有意な差はみられず、顕著なメラニン生成抑制効果を示さなかった。その要因として、被験物質の添加回数が少なかったこと、被験物質の作成の際に水を用いたことが挙げられる。先行研究において、サンプルによって細胞実験で反応を示す成分を得るには抽出液を変える事が重要な要素であることがわかっていることから抽出を行う際に有機溶媒を使用することにより、メラニン生成抑制効果へより強い影響を及ぼすことができると推察する。

今後、抽出溶媒の違い、被験物質の量の違いによるメラニン生成抑制率の検討が必要だと考える。

## モリンガ (*Moringa oleifera*) 摂取が廃用症候群モデルラット大腿骨に与える影響

神戸女子大学大学院 修士課程(健康栄養学専攻) 高馬 聖花

【背景・目的】骨粗鬆症モデルラットで骨密度の低下を抑制した<sup>1)</sup>という報告があるモリンガは、アジア諸国、南洋諸島などの熱帯・亜熱帯地域に多く自生しており、一部地域では栄養価も高いことから「奇跡の木」とも呼ばれ古くから食用とされている。世界的に見てアジアには世界の高齢者の半数以上が居住しており、2030年前後にアジア全体が超高齢社会に突入すると推測されている。そこで本研究ではアジア諸国で容易に手に入るモリンガを廃用症候群モデルラットに摂取させ、骨代謝などへの影響を評価することとした。

【方法】9週齢の雄性 Wistar ラットを馴化期間として1週間市販固形飼料 CE-2(日本クレア株式会社、大阪)と水道水を自由摂取させた。馴化期間後10週齢時より、非後肢懸垂群(Control(-)群)、後肢懸垂群(Control(+))群、モリンガ熱水抽出物を摂取させ後肢懸垂を行う群(Moringa(+))群、タマネギ外皮熱水抽出物を摂取させ後肢懸垂を行う群(Onion(+))群の4群に分類した。Control(-)群、Control(+))群には水道水を摂取させた。なお、飼料はCE-2、飲料として与えた水道水およびモリンガ熱水抽出物、タマネギ外皮熱水抽出物は自由摂取とした。飼育期間終了後、深麻酔下で腹部大動脈からの採血および剖検後、主要臓器、大腿骨、ヒラメ筋の摘出を行った。採血した血液からは血清ALP濃度、アルブミン濃度、クレアチン濃度、オステオカルシン濃度の測定を行った。また、摘出した大腿骨については骨強度試験を実施し、ヒラメ筋についてはHE染色による組織学的観察を行って最大筋周囲径と最大筋横断面積を算出した。

【結果】血清ALP濃度は、Control(-)群 696.0(362.04)U/L、Control(+))群 575.3(317.30)U/L、Onion(+))群 717.8(105.75)U/L、Moringa(+))群 775.0(73.54)U/L、アルブミン濃度は、Control(-)群 4.0(0.15)g/dl、Control(+))群 3.7(0.50)g/dl、Onion(+))群 3.5(0.17)g/dl、Moringa(+))群 3.5(0.14)g/dl といずれの群も10週齢雄性 Wistar ラットの正常範囲である2.4(0.06)g/dl以上であった。クレアチン濃度は、Control(-)群 349.6(172.12)U/L、Control(+))群 650.3(305.31)U/L、Onion(+))群 484.3(145.14)U/Lとなった。血清中のオステオカルシン濃度は、Control(-)群 53.4(2.10)ng/ml、Control(+))群 49.1(4.51)ng/ml、Moringa(+))群 49.0(2.06)ng/mlとなった。2点ねじり法で測定した骨強度(Energy値)は、Control(-)群 56.8(3.10)mJ、Control(+))群 53.9(17.50)mJ、Onion(+))群 58.3(5.10)mJ、Moringa(+))群 56.8(15.90)mJとなり、骨の剛性を示すStiffness値は、Control(-)群 298.9(54.60)N/mm、Control(+))群 137.9(23.70)N/mm、Onion(+))群 203.3(17.40)N/mm、Moringa(+))群 154.5(35.20)N/mmであった。HE染色組織より算出したヒラメ筋の最大筋横断面積は、Control(-)群 6.87(0.84)mm<sup>2</sup>、Control(+))群 3.90(0.69)mm<sup>2</sup>、Onion(+))群 3.85(0.56)mm<sup>2</sup>、Moringa(+))群 4.16(0.66)mm<sup>2</sup>となった。また、ヒラメ筋最大筋周囲径はControl(-)群 12.96(0.82)mm、Control(+))群 10.56(0.38)mm、Onion(+))群 10.47(0.81)mm、Moringa(+))群 11.12(1.17)mmであった。

【考察】本実験ではモリンガ熱水抽出物は廃用症候群モデルラットの大腿骨強度並びに筋萎縮への影響を与えなかった。本実験は、後肢懸垂を実施せず水を投与した Control(-)群、後肢懸垂を実施し水を投与する Control(+)群の個体数が n=3 と不十分であり、後肢懸垂を実施しモリンガ熱水抽出物を投与した Moringa(+)群と Control(+)群との統計学的比較が不可能であり、モリンガ熱水抽出物の廃用症候群モデルラット大腿骨への影響を科学的に考察するには至らなかった。しかしながら、同条件で飼育した後肢懸垂モデル動物の、2点ねじり法により測定した Stiffness 値が 129.9N/mm(n=6)と報告されており<sup>2)</sup>、モリンガ熱水抽出物投与群の Stiffness 値 154.5N/mm(n=6)が後肢懸垂群に比べて Tukey-Kramer 検定で有意に高値を示していた事から、モリンガ熱水抽出物に含まれる骨代謝に関わる成分の可能性は今後検討されるべきであると考えられた。

【参考文献】1)Habib MK, et al. *J. Food and Dairy Sci.*, 3, 129 - 135, 2018 2)新田祐子, 神戸女子大学大学院修士論文, 2020

## 配位子に硫黄を有する亜鉛(II)錯体による抗糖尿病効果の検討 ーセレノプロテインPの遺伝子発現量からの検討ー

神戸女子大学大学院 修士課程(健康栄養学専攻) 根本久瑠見

### 【目的】

わが国の糖尿病患者数は増加しており、中でも2型糖尿病患者の増加は著しい。2型糖尿病はインスリンの分泌不足とインスリン抵抗性により引き起こされるもので、そのうちインスリン抵抗性は「インスリンが存在していても、作用が十分に発揮できない状態」であり、インスリンの標的臓器で、糖代謝の恒常性を担う肝臓はインスリン抵抗性に関わる重要な臓器である<sup>(1)</sup>。また、セレノプロテインP (SeP)は、肝臓で分泌されるセレン輸送タンパク質の1つであり、2型糖尿病患者では血中SeP濃度の上昇も見られ<sup>(2)</sup>、過剰な分泌がグルコース代謝を悪化させる<sup>(3)</sup>。そこで本研究では、亜鉛(II)錯体である亜鉛ジトロポロン錯体[Zn(trp)<sub>2</sub>]、亜鉛ジマルトール錯体[Zn(mal)<sub>2</sub>]、亜鉛ジチオトロポロン錯体[Zn(Strp)<sub>2</sub>]および亜鉛ジチオマルトール錯体[Zn(Smal)<sub>2</sub>]の抗糖尿病効果の可能性を、グルコース生成抑制効果とヒト肝癌腫瘍由来細胞であるHepG2細胞、2型糖尿病モデルマウスであるKK-A<sup>y</sup>マウスによるSePおよびグルコース-6-フォスファターゼ(G6PC)の遺伝子発現量の測定から抗糖尿病効果の可能性を検討した。

### 【方法】

グルコース生成抑制効果の評価は、各種試薬、酵素、および各亜鉛(II)錯体を混合し、生成したグルコース量からグルコース生成率を求めた。HepG2細胞による遺伝子発現量の評価では、各亜鉛(II)錯体を4時間作用させた後、total RNAを抽出した。抽出したtotal RNAをリアルタイムPCR法によりSeP並びに糖新生酵素であるG6PCの遺伝子発現量を測定した。動物実験による抗糖尿病効果の評価では、2型糖尿病モデルマウス(KK-A<sup>y</sup>)に[Zn(Smal)<sub>2</sub>]を腹腔内投与(0.1 mg Zn/kg~0.3 mg Zn/kg 体重)した。28日間飼育し、得られた血清、肝臓、腎臓を用いて糖代謝や脂質代謝、SePおよびG6PCの遺伝子発現量の測定から[Zn(Smal)<sub>2</sub>]投与による抗糖尿病効果について評価した。

### 【結果】

グルコース生成抑制効果の結果より、硫酸亜鉛、[Zn(trp)<sub>2</sub>]および[Zn(mal)<sub>2</sub>]ではグルコース生成率が有意に減少したが、[Zn(Strp)<sub>2</sub>]および[Zn(Smal)<sub>2</sub>]では減少は見られなかった。HepG2細胞によるSePおよびG6PCの遺伝子発現量の結果より、[Zn(Strp)<sub>2</sub>]および[Zn(Smal)<sub>2</sub>]において濃度依存的に発現量が減少する傾向にあった。一方で、[Zn(trp)<sub>2</sub>]や[Zn(mal)<sub>2</sub>]では発現量が増加していた。SePおよびG6PCの遺伝子発現量が減少した亜鉛(II)

錯体のうち[Zn(Smal)<sub>2</sub>]を腹腔内投与した結果、SeP および G6PC の遺伝子発現量は有意に低値となり、BUN および腎臓の TBARS 値も有意に低値を示した。また、有意差はないものの随時血糖値と HbA1c は低値となる傾向となった。一方で、SeP の遺伝子発現量と肝臓の TBARS 値には負の相関が見られた。

#### 【考察】

亜鉛(Ⅱ)錯体の中でも配位子の一部を硫黄に置換した[Zn(Strp)<sub>2</sub>]、[Zn(Smal)<sub>2</sub>]は、SeP および G6PC 遺伝子発現量の低下を伴う抗糖尿病効果があると示唆される。さらに [Zn(Smal)<sub>2</sub>]は動物実験において随時血糖値や HbA1c の低下、SeP および G6PC 遺伝子発現量の低下が確認され、[Zn(Smal)<sub>2</sub>]投与による血糖値の降下作用を有することが示唆された。また、腎機能の改善効果もあると示唆された。しかし、SeP の遺伝子発現量の減少は抗酸化作用の低下にもつながると考えられるため、今後投与の適正量の検討を行う必要がある。

#### 【参考文献】

- (1) 肝臓 56, p127-136 (2015)
- (2) 日本内科学会雑誌 105, p25-30 (2016)
- (3) Glycative Stress Research 5, p171-176(2018)