

令和7年度（2025年度）

神戸女子大学大学院家政学研究科

修士論文要旨

# ハスカップの脱顆粒抑制成分の特定

博士前期課程（食物栄養学専攻）井塚 聖奈

## 【背景・目的】

マスト細胞における脱顆粒は、I型アレルギー（即時型過敏症）反応の発症において中心的な役割を担う。アレルゲンが体内に侵入すると、あらかじめ特定の抗原に感作されていたマスト細胞や好塩基球上の高親和性IgE受容体（ $Fc\epsilon R1$ ）に結合したIgE抗体同士を架橋することで細胞が活性化し、細胞内でシグナル伝達が起こる。その結果脱顆粒が誘発され、ヒスタミンをはじめとする顆粒内物質が放出されることで、くしゃみや鼻水などのアレルギー症状が引き起こされる。脱顆粒を抑制する作用を持つ食品の報告は何例もあり、当研究室でもアサイー、ハスカップ、ブラックベリーなどにその効果を確認している。しかし、有効成分については特定されているものは少ない。そこで本研究では、ハスカップに含まれるマスト細胞の脱顆粒抑制効果を持つ成分の特定を目的とした。

## 【方法】

試料には、ハスカップ果実を超音波破碎後、遠心分離、濾過滅菌して得られた水抽出物を用いた。水抽出物はゲル濾過クロマトグラフィーにより高分子群（H1~H4）、低分子群（L1~L6）として分取した。さらにHPLCによりピークの分析および分取を行い、遠心エバポレーターにより濃縮後、脱顆粒反応実験に供した。実験に用いたモデル細胞はラット好塩基球性白血病細胞株RBL-2H3細胞（RBL-2H3細胞）で、脱顆粒の指標となる $\beta$ -hexosaminidase（ $\beta$ -hex）の活性によりその効果を評価した。

## 【結果・考察】

ハスカップ水抽出物をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離した画分のうち、H4画分にマスト細胞の脱顆粒抑制効果が認められた。H4画分は高分子群と低分子群の境界に位置していることから、その有効成分の分子量は約5,000であると考えられた。ハスカップの主要アントシアニンであるCyanidin 3-glucoside（C3G）は脱顆粒抑制効果を持つことが報告されているが、分子量は約449であり、H4画分含有成分の想定分子量とは大きな差がある。さらに、ハスカップ試料とC3G標品のピークが一致しないことから有効成分はC3Gではないと考えられる。あるいは、C3Gが他の分子と結合して働いたりする可能性も否定できないため、今後さらに検討していく必要がある。

今後はH4画分のHPLCによる分注、脱顆粒反応実験を進める。H4画分のクロマトグラム上で離れた位置に溶出している成分同士が複合的に効果を発揮している可能性もあるため、分注する間隔を広げたり、分注した試料を複数用いたりして実験を行う必要がある。また、抽出条件の再検討が必要である。

## 2腎1クリップ腎血管性高血圧モデル(2K1C)ラットにおける

### 昆布摂取の血圧上昇抑制効果と性差・性ホルモンとの関係

博士前期課程(食物栄養学専攻) 小椋 美歩

#### 【背景・目的】

高血圧は心血管合併症などの複数の疾病発症に関与しており、死亡率が上昇することが知られている。若年齢では、男女の血圧差は、男性の高血圧が多く、年齢を重ねるにつれて、男性よりも女性に多くみられることが報告されている。閉経後高血圧に関する研究は、エストロゲン/アンドロゲン比率の変化、エンドセリンおよび酸化ストレスの増加、レニン-アンジオテンシン系(RAS)の活性化などが関与していることが報告されているが、未だメカニズムは解明されていない。

私たちは、昆布摂取が2-kidney, 1-clip renovascular hypertension モデル(2K1C)ラットの血圧を低下させることを観察している。昆布摂取による血圧上昇抑制効果は明らかにされていないが、血管拡張作用のあるNOSやeNOSの増加やレニン-アンジオテンシン系の調節であることが示唆される。しかし、昆布摂取による性差をみた研究は知る限りない。

以上のことから、OVXラットでは血圧が上昇し、OVX+2K1Cラットでは、それがさらに上昇すること、これらが昆布を摂取すると血圧上昇が抑制されるという仮説のもと、本実験では雌のOVX+2K1Cラットに対する昆布摂取の血圧上昇抑制効果を観察し、性ホルモンとの関連性を調べることで、メカニズムにおける性差を確認することを目的とする。さらに、それらの昆布摂取の血圧に対する効果への関与について性差の観点からも検討する。

#### 【方法】

4週齢のSD系雄性ラット、雌性ラットを2週間の予備飼育後、6週齢で内径0.254mmの銀製クリップを左腎動脈に装着し、左腎動脈を狭窄させる腎血管性高血圧モデル(2-kidney, 1-clip renovascular hypertension ; 2K1C)導入手術を行った。雌性ラットには、両側の卵巣を結紮切断する卵巣摘出((Ovariectomy; OVX))導入手術を行った。手術後、それぞれの群に標準餌(CTL)と昆布5%(w/w)添加餌(SJ)を与えた。

週1回収縮期血圧(SBP)測定を行い、安定した連続10回を測定し、その平均値を各週のSBPとした。実験終了時には、鼠経動脈から平均血圧(mean arterial blood pressure; MAP)測定を行った。

群構成は以下の通りである。

- 1) MALE-SHAM-CTL、 2) MALE-2K1C-CTL、 3) MALE-2K1C-SJ、
- 4) FEMALE-SHAM-CTL、 5) FEMALE-2K1C-CTL、 6) FEMALE-2K1C-SJ、
- 7) OVX-SHAM-CTL、 8) OVX-2K1C-CTL、 9) OVX-SHAM-SJ
- 10) OVX-2K1C-SJ

**【結果・考察】**

雄、雌、OVX を比較した血圧では、MALE-2K1C-CTL 群と比較して、OVX-2K1C-CTL 群、FEMALE-2K1C-CTL 群では 6 週間の期間を通じて収縮期血圧（SBP）に有意な変化が認められた。MALE-2K1C-SJ 群と比較して、FEMALE-2K1C-SJ 群、OVX-2K1C-SJ 群では 6 週間全体を通しての有意な SBP の変化が認められた。雌、OVX の比較では、有意な SBP の結果は確認されなかった。昆布摂取による血圧上昇抑制効果でも雌、OVX の比較で、有意な SBP の結果は確認されなかった。

雄と比較した雌、OVX の SBP で雄が有意に高かったのには、雄の体重が雌よりも大きくなるため腎動脈の狭窄が重度である可能性が考えられる。雌、OVX を比較して SBP に有意な結果が確認されなかったことから、性ホルモンによる血圧上昇への影響がないことが示唆される。

# インスリン抵抗性 C2C12 細胞におけるロイシンおよびその代謝産物の インスリンシグナル伝達とアミノ酸トランスポーター量に及ぼす影響

博士前期課程 (食物栄養学専攻) 三浦寧夏

## 【背景・目的】

分岐鎖アミノ酸(branched-chain amino acid : BCAA)は、筋タンパク質の合成促進および分解抑制を介して筋肥大を起こすことが知られている。一方で、BCAA 及びその代謝産物である分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸(branched-chain  $\alpha$ -ketoacid : BCKA)の血漿中濃度とインスリン抵抗性には相関関係があることが報告されている。しかし、因果関係は十分に明らかになっていない。今回、筋細胞を用いて、培養液への BCAA やその代謝産物の添加および細胞内 BCAA の代謝促進は、インスリン抵抗性に影響を及ぼすか検討した。また、細胞外 BCAA 濃度の変動は、インスリン抵抗性によるアミノ酸トランスポーター量の変化に起因するか検討した。

## 【方法】

C2C12 細胞の培地を 2%ウマ血清含有の Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM)に置換、筋細胞に分化誘導を行った。分化 C2C12 筋細胞の培地をパルミチン酸(palmitic acid : PA)、ロイシンまたはロイシンの代謝産物である $\alpha$ -ケトイソカプロン酸( $\alpha$ -ketoisocaproate : KIC)、分岐鎖 $\alpha$ -ケト酸脱水素酵素複合体キナーゼ阻害剤(3, 6-dichlorobenzo(b) thiophene-2-carboxylic acid : BT2)含有、血清不含有 DMEM に置換、20 時間培養後インスリン刺激を行いウェスタンブロットで Akt リン酸化を測定し、インスリン抵抗性を評価した。また、L 型アミノ酸トランスポーター1 (L-type amino acid transporter 1 : LAT1)、ミトコンドリア BCAA トランスポーター(SLC25A44)量を調べた。細胞外 BCAA 濃度については、培地中の BCAA を測定した。

## 【結果・考察】

PA はインスリンの有無にかかわらず、C2C12 筋細胞の Akt のリン酸化を減少させた。PA およびインスリンは細胞外 BCAA 濃度に影響を与えなかった。ロイシンは Akt のリン酸化に影響を及ぼさなかった。KIC は Akt のリン酸化に影響を与えないが、KIC 添加時 PA による Akt のリン酸化抑制はみられなかった。また、BT2 添加時、PA による Akt のリン酸化抑制がみられなかった。しかし、LAT1、SLC25A44 の変動は明確ではなかった。KIC は Akt のリン酸化を促進し、BT2 は抑制するが、それがアミノ酸トランスポーター量や細胞外 BCAA 濃度の変動に起因するかは不明である。

## 【結論】

C2C12 細胞における PA によるインスリン抵抗性に BCKA やその代謝産物が影響をおよぼす可能性がある。

# 日常的身体活動下における高脂肪食摂取ラットのオレウロペイン

## 投与による褐色・白色脂肪組織における UCP1 への影響

博士前期課程 食物栄養学専攻 栄養化学研究室 桃原 志帆

### 【背景・目的】

これまで、本研究室では、エキストラバージンオリーブオイル (EVOO) に含まれるポリフェノールのオレウロペインは、高脂肪食 (HF) 摂取ラットにおいてノルアドレナリン (NA) 分泌を促進し、肩甲骨間褐色脂肪組織 (IBAT) の脱共役蛋白質 (UCP1) を増加させ、体熱産生を亢進させることを報告してきた。また、高脂肪食 (HF) 摂取ラットに、Mild Treadmill Walking (MTW : 速度 4 m/分、20 分/日、5-6 日/週、電気刺激と傾斜なし : J Nutr Sci Vitaminol 70, 193-202, 2024.) と EVOO の主要なポリフェノールであるオレウロペインを 0.08% 実験食に添加して投与し、尿中ノルアドレナリン分泌量、IBAT UCP1、脳 Trancient Receptor Ankyrin 1 (TRPA1)・Trancient Receptor Vanilloid 1 (TRPV1)、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 発現量を相加・相乗的に増加させ、体熱産生を効率的に亢進させることを見出し報告した。

本研究では HF 摂取ラットに、MTW と共に、オレウロペインを 0.04% (地中海地域の日常 EVOO 摂取量相当のポリフェノール量) を実験食に添加して投与し、体熱産生の指標として交感神経活動の状況を示す尿中カテコールアミン分泌量を測定すると共に、IWAT UCP1 発現量等を測定することで体熱産生への影響について調べ、さらにそのメカニズム解明のため、IWAT における温度・痛み受容体 TRPA1 及び TRPV1 と共に、機械刺激受容体 Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo1) の発現量を測定することとした。

### 【方法】

ラットは SD 系 4 週齢の雄ラット (28 匹) を用い、実験食はリサーチダイエツト社製高脂肪食 D12451 をコントロール食 (HF) としオレウロペインを 0.04% 添加したオレウロペイン食 (HFO) とした。HF 群と HFO 群に MTW (W) を行う群をあわせ、実験群は HF 群、HF+W 群、HFO 群、HFO+W 群、の合計 4 群とし、ラットを 28 日間ペアフィーディングで飼育した。飼育最終日の尿中カテコールアミン分泌量を HPLC 法で、飼育後の IWAT UCP1、TRPA1、TRPV1 及び Piezo1 発現量はウエスタンブロット法を用いて測定した。

### 【結果・考察】

実験食投与 28 日後の尿中 NA・アドレナリン分泌量は、HF 群に対し HFO+W 群で有意に高い値を示した。また IBAT UCP1 発現量は HF 群に対し HFO 群、HFO+W 群で有意に高い値を示した。脳 TRPA1 及び TRPV1 はどちらも、HF 群に対し HFO+W 群で有意に高値を示した。IWAT TRPA1・TRPV1 及び Piezo1 はいずれも、HF 群に対し HFO+W 群で有意に高値を示した。

以上の結果より、日常的身体活動下におけるオレウロペイン添加投与が TRPA1・TRPV1 及び Piezo1 の 3 つの受容体をいずれも活性化させたことで、これらの刺激により NA・アドレナリン分泌が有意に増加した結果、IBAT 及び IWAT 両方の UCP1 発現量の増加が引き起こされたものと考えられた。