

メタボリックシンドロームの改善を目的とした
ウコンの有効利用法に関する諸研究

2024 年

渡邊 ゆかり

メタボリックシンドロームの改善を目的とした
ウコンの有効利用法に関する諸研究

指導教授 古庄 律

2024 年

渡邊 ゆかり

目次

第1章 序論.....	1
第2章 クルクミンの吸収に及ぼす食品加工法の影響.....	3
第1節 実験方法.....	3
第2節 結果.....	3
第3節 小括.....	5
第3章 フルクトースの吸収に及ぼすウコンの精油成分の影響.....	6
第1節 実験方法.....	6
第1項 実験材料.....	6
第2項 動物実験.....	8
第2節 結果.....	8
第3節 小括.....	10
第4章 ウコン抽出物の NASH モデルラットに対する効果.....	12
第1節 ウコンの精油成分の食餌誘導性 NASH モデルラット (SHRSP5/Dmcr) に対する効果.....	12
第1項 実験方法.....	12
第2項 結果.....	16
第2節 ウコンの精油成分の NASH 誘導飼料を摂取させた正常ラット (SD) に与え る影響.....	33
第1項 実験方法.....	33
第2項 結果.....	34
第3節 小括.....	47
第5章 生産地域での高品質化を図るための簡易定量法の開発.....	48
第1節 HPLC 法によるウコン中クルクミンの定量.....	48
第1項 方法.....	48
第2節 吸光度法によるウコン中クルクミンの定量.....	49

第 1 項 方法	49
第 3 節 結果	50
第 4 節 小括	54
第 6 章 総括	55
第 7 章 要旨	57
Summary	59
参考文献	61
謝辞	63

第1章 序論

近年、日本においても食の欧米化やライフスタイルの変化により肥満、糖尿病、高血圧症などの生活習慣病患者が増加の一途を辿っている。また、甘味料として果糖ブドウ糖液を添加した、いわゆるソフトドリンクの摂取量が増加したことにより、飲酒以外の生活習慣病が原因で発症する非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）が21世紀において、もっとも一般的な肝疾患になりつつある。その内、10～20%が非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を発症するといわれている。日本におけるNAFLDの有病率は9～30%であり、NASHの有病率は世界的に3～5%であることから、日本では100万人くらいと推定されている¹⁾。危惧すべきは、全世界でのNAFLDの推定有病率は、2000～2005年の20.3%から2011～2015年では26.8%へと増加していることから、NAFLDの増加と並行してNASHの有病率も増加している可能性が高いと考えられることである²⁾。NASHは肝硬変から肝がんへ進行する疾患であり、日本でも関心の高い肝疾患であるが、治療法が確立されていないのが現状である。NASHの発症機序については、肥満、糖尿病、高血圧症などの生活習慣病により肝臓内に中性脂肪が蓄積して脂肪肝となり（first hit）、さらに炎症性サイトカインや酸化ストレスなど（second hit）によりNASHになるというtwo-hit theory³⁾が一般的である。さらに最近では、腸内細菌叢の乱れや腸管や脂肪組織から放出される多数の因子の影響によるなど、より複雑なmultiple parallel hits説⁴⁾も提唱されている。

ウコン（鬱金、学名 *Curcuma longa* L、英語名 Turmeric）は、ショウガ科ウコン属の東南アジア原産の多年草である。紀元前から栽培され、インド伝統医学のアーユルヴェーダや香辛料、染料、生薬として古くから使われている⁵⁾。日本で栽培されているウコンには、秋ウコン（鬱金、ウコン、学名 *Curcuma longa* L）、春ウコン（姜黄、キョウオウ、学名 *Curcuma aromatica* S）、紫ウコン（莪朮、ガジュツ、学名 *Curcuma zedoaria* R）がある。生薬でウコンとされているのは秋ウコンである。秋ウコンはポリフェノール類のクルクミノイドを1～5%、その他には精油成分を約5%含んでいる。クルクミンは、鮮やかな黄色を呈していることから食用あるいは生地染料としても用いられている。日本では、カレーのスパイス、黄色4号の代替えとして沢庵漬の着色料として使われている。クルクミンには抗酸化作用⁶⁾、抗炎症作用⁷⁾、抗アルツハイマー作用⁸⁾、抗腫瘍作用⁹⁾など多くの報告があり、機能性表示食品としても多く用いられている。一方、近年ウコンにはクルクミン以外に精油成分としてターメロンやピサクロンなどのセスキテルペノイド類が数多く含まれていることが判明し、抗炎症作

用¹⁰⁾、胆汁分泌促進作用¹¹⁾などが報告されている。セスキテルペノイド類の1つであるビスクロンは、1989年に発表¹²⁾された比較的新しい物質で、その後、アルコール性肝障害や二日酔いに対する効果が報告されている¹³⁾。しかし、精油成分の有効性の知見は少ない。

ウコン生産地は南・東南アジア諸国で、世界の生産量の80%はインドである。日本国内では、そのほとんどが沖縄で栽培されているが、多くはインド、中国、その他東南アジア諸国から輸入されている。これらの地域の多くは後開発途上国(LDCs)であり、生活水準は低い現状にある。LDCsの生活水準向上の一手段として、希少で高品質のウコンを生産し、生薬として輸出することで外貨の獲得につなげる方法が考えられる。そのためには、高品質で高価に売買されるウコンを選別する必要がある。ウコンの取引はクルクミン含量が指標となっており、現在はクルクミン含量の定量は日本に輸入されてから行われているが、生産地で成分分析ができれば高品質のウコンを選別して輸出することが可能となる。また、ウコンは産地によって品種や栽培方法が異なることが品質に影響を及ぼしており、生産農家ごとに品質差が生じることの原因となっている。各農家から収集したウコンの成分分析を生産地で実施することにより、栽培に適した地質や栽培方法を明らかにできれば、より高品質のウコンの生産ができるものと考えられる。

そこで本研究では、①ウコン中の精油成分がメタボリックシンドロームの改善に対する有効性の解明、②高品質のウコンの選別を生産地で簡便迅速に行うためのクルクミンの簡易定量法の開発、を主な目的として実験を行い、以下のような結果を得た。

第2章 クルクミンの吸収に及ぼす食品加工法の影響

ウコンの主成分のひとつであるクルクミンの有効性については数多くの報告があるが、クルクミンは消化管での吸収率が非常に低いという欠点がある¹⁴⁾。クルクミンは経口摂取すると小腸に達し、大部分は糞便中に排泄される。一部は肝臓でグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体に代謝されるが、未変化体のクルクミンが血中に入る量は少ないと言われている。そこで本章では、加工技術（瞬間乾燥粉碎法）によって吸収率の改善ができるかを検討した。

第1節 実験方法

SD系ラット雄性、8週齢（日本エスエルシー株式会社）に①乾燥ウコンをミルで粉末化した試料（以下乾燥ウコン）、②瞬間乾燥粉碎法によって加工した試料（以下パウダー）を水に懸濁し、30 mg/kg・体重の投与量で経口投与し、投与2、4、6及び8時間後に尾静脈採血して血中クルクミン濃度をLC-MS/MSで測定した。

第2節 結果

血中クルクミン濃度の経時変化を Fig.1 に示す。

血中クルクミン濃度は投与後2時間において、乾燥ウコン及びパウダーとも最高血中濃度に達し、乾燥ウコンがパウダーよりも高値を示した。その後の推移はほぼ同様であった。

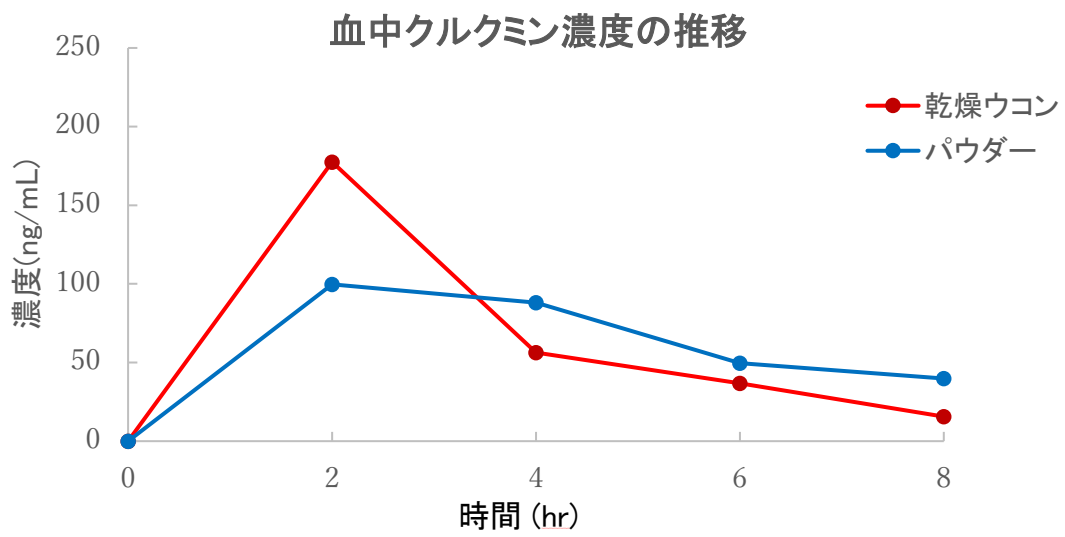


Fig.1 Blood concentration of curcumin in rat plasma.

第3節 小括

瞬間乾燥粉碎法による加工技術ではクルクミンの吸収を高めることはできなかった。ウコン中のクルクミンの吸収を高めることができた先行研究では、その粒子サイズはナノサイズで、クルクミンは水に溶けにくく、クルクミン同士が会合、凝集して分子サイズが巨大化することからリポソーム化していた¹⁵⁾。瞬間乾燥粉碎法での粒子サイズはそれよりも大きいサイズであったこと、また、瞬間乾燥粉碎法により粒子の凝集が起きたことにより硬度が増し、通常の常圧乾燥に比べてクルクミン溶解性が低下したことで、腸管での吸収向上につながらなかったのではないかと推測された。

第3章 フルクトースの吸収に及ぼすウコンの精油成分の影響

近年、日本では食生活の変化により清涼飲料水、スナック菓子、レトルト食品などを摂取する機会が多い。これらには、低温での甘味度が高く、かつ廉価に製造されるトウモロコシ、ジャガイモ、サツマイモのデンプンを酵素分解してグルコースとし、さらにその一部をフルクトースに異性化した果糖ブドウ糖と呼ばれる異性化糖液が広く使用されている。フルクトースは、肝臓で代謝されブドウ糖の解糖系に取り込まれるため直接は血糖値を上げないとされてきたが、大量に摂取すると肝臓で速やかに脂肪合成経路を介して脂肪に変換され、余剰分は脂肪細胞に貯蓄されるため、肥満等のメタボリックシンドロームのリスクファクターの一つとなっている¹⁶⁾。そのため、フルクトースの吸収を抑制する成分の探究が進められているが、現在は生薬の一つあるダイオウやユーカリ葉エキスなど一部にその効果が報告されているにすぎない。そこで本研究では、ウコンの精油成分がフルクトース吸収に及ぼす影響について検討した。

第1節 実験方法

第1項 実験材料

(1) 50%エタノール画分、ヘキサン画分の調製

試料のウコンはインド産秋ウコン粉末（株式会社エコロジーヘルスラボ）を使用した。ウコン粉末 100 g に 50%エタノール 5 L を加え、室温で 48 時間攪拌抽出した。吸引ろ過後の 50%エタノール抽出液 300 mL を分液ロートに移し、同量の n-ヘキサンを加え攪拌し分相後、下層の 50%エタノール層を回収した。この操作を 2 回繰り返す。50%エタノール層は直接、n-ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムで脱水した後、それぞれを減圧濃縮し、50%エタノール画分(EF)、ヘキサン画分(HF)とした。

(2) ビサクロン画分の調製

試料のウコンは (1) と同様の試料を使用した。ウコン粉末 400 g に 5 倍容の純水を加えて 66 時間攪拌抽出し、吸引ろ過して得られた抽出液を分割して、等量のクロロホルムを加えて分相し、クロロホルム層を回収した。このクロロホルム層を濃縮乾固し、残渣をエタノール/水(1:10)で溶解して遠心分離後、上清を凍結乾燥してビサクロン画分 (BIS) とした。

(3) 高速液体クロマトグラフによる分析

EF 画分および HF 画分について、高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いて定性分析を行った。クルクミノイドの標準品は、クルクミン(富士フイルム和光純薬)、クルクミン 2(デメトキシクルクミン)およびクルクミン 3(ビス-デメトキシクルクミン)(長良サイエンス)を用いた。HPLC は、ポンプ：LC-10AD(島津製作所)、オートサンプラー：SIL-20A(島津製作所)、カラム恒温槽：CTO-10A(島津製作所)、紫外可視検出器：SPD-10A(島津製作所)、データ処理ソフト：Chromato-Pro(ランタイムインストルメント)で構成され、波長：240 nm で分析した。分離には、Inertsil ODS-3 (ϕ 4.6×250 mm、GL Sciences)を用い、カラム温度：40°C、移動相：水/アセトニトリル(40/60)、流速：0.75 mL/min とした。

(4) ヘキサン画分のオープンカラムによる分画

ガラス製クロマトグラフィーカラム (ϕ 20×300 mm) に、n-ヘキサンで湿潤させたカラムクロマトグラフィー用シリカゲル (C-200、富士写真フイルム和光純薬工業) を 15 cm まで充填した。HF 画分 1 g を n-ヘキサン 2.0 mL に溶解し、n-ヘキサン：200 mL→n-ヘキサン：酢酸エチル (9：1)：200 mL→n-ヘキサン：酢酸エチル (1：1)：200 mL → n-ヘキサン：エタノール (99:1)：200 mL → n-ヘキサン：エタノール (1:1)：200 mL → エタノール 200 mL → クロロホルム 200 mL → メタノール 200 mL の順で展開した。分画した溶出液を減圧下濃縮し、HPLC で定性分析した。

(5) LC-MS/MS による分析

n-ヘキサン：酢酸エチル(99：1)画分について、LC-MS/MS を用いてセスキテルペノイドの分析を行った。セスキテルペノイドの標準品は、Bisacrone、ar-Turmerone、 α -Turmerone、Turmeronol A、Turmeronol B (長良サイエンス)を用いた。LC-MS/MS は、ポンプ：LC-20AD(島津製作所)、オートサンプラー：SIL-20A(島津製作所)、カラム恒温槽：CTO-20A(島津製作所)、質量分析計 LCMS-8040(島津製作所)、データ処理ソフト：Lab Solution (島津製作所)で構成され、分離には、TSKgel ODS-100V 3 μ m (ϕ 2.0×150 mm、東ソー)を用い、カラム温度：40°C、移動相：0.1%ギ酸含有アセトニトリル：水(60/40)、流速：0.2 mL/min とした。なお、Nebulizing gas 流量：3 L/min、Drining gas 流量：15 L/min、

Desolvation line 温度：250°C、Heat block 温度：400°Cとした。

第2項 動物実験

実験にはSD系ラット雄性、24週齢、(日本エスエルシー)を用いた。7日間の馴化飼育後、各群の平均体重がほぼ等しくなるように3群(n=5)に分けた。

大豆油または0.5%メチルセルロース水溶液を対照群とし、HF画分を10mg/kg・体重または100 mg/kg・体重の投与量で経口投与し、その30分後に40%フルクトース水溶液を経口投与した。投与前、フルクトース投与90分後に尾静脈採血し、血清中フルクトース濃度をEnzyChrom Fructose Assay Kit (フナコシ)を用いて測定した。

第2節 結果

(1) 50%エタノール画分およびヘキササン画分の成分

50%エタノール画分およびヘキササン画分の成分のクロマトグラムを Fig.2 に示す。50%エタノール画分では、9.98分にクルクミン、11.34分にクルクミン 2、12.87分にクルクミン 3 の3種類のクルクミノイドピークが確認された。一方、ヘキササン画分にはクルクミノイドのピークは確認されず、53.42分と89.31分に大きなピークが検出された。この2つのピークをカラムクロマトグラフィーで分画し、n-ヘキササン：酢酸エチル(99：1)で溶出した。LC-MS/MSによる分析の結果、53.42分のピークはar-Turmerone (MW=215)、89.31分のピークはβ-Turmerone (MW=218)と同定された。

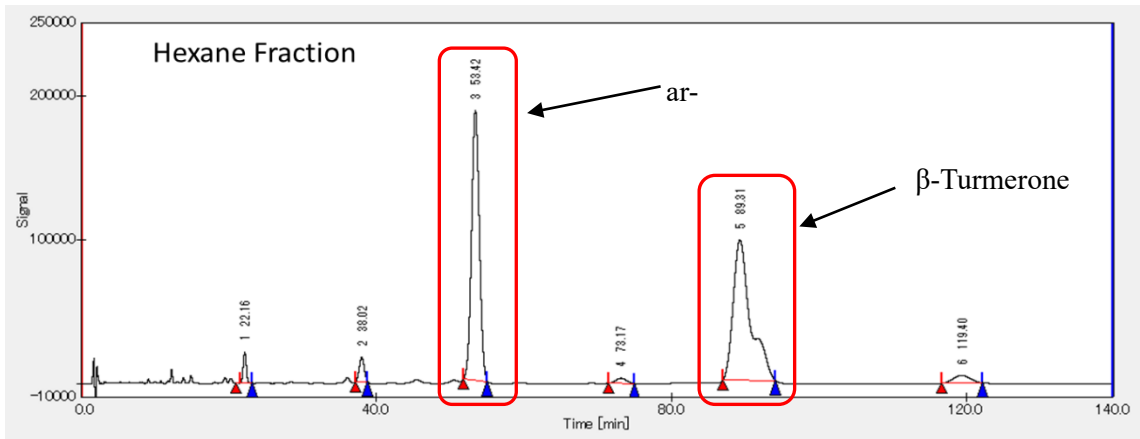
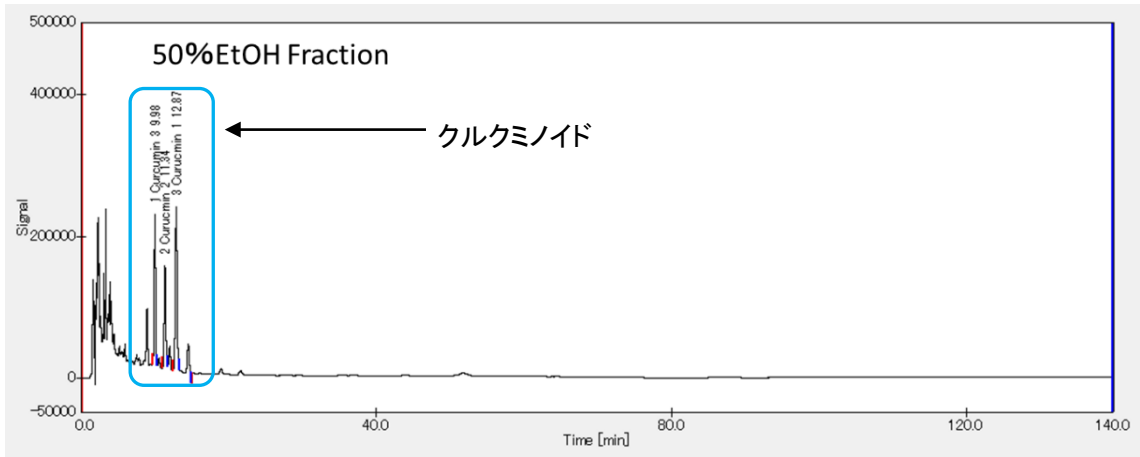


Fig.2. Chromatogram of 50% ethanol fraction and hexane fraction.

(2) ウコン抽出画分のフルクトース吸収に対する影響

ヘキサン画分のフルクトース吸収に対する影響の結果を Fig.3 に示す。

その結果、媒体が大豆油、メチルセルロース水溶液ともヘキサン画分は、投与後 90 分の血清中フルクトース濃度は投与前よりも高い値を示した。

第3節 小括

今回の実験では、ウコンの精油成分として分画した、 α -Turmerone と β -Turmerone を主成分とするヘキサン画分にはフルクトースの吸収抑制を示す効果は認められなかった。

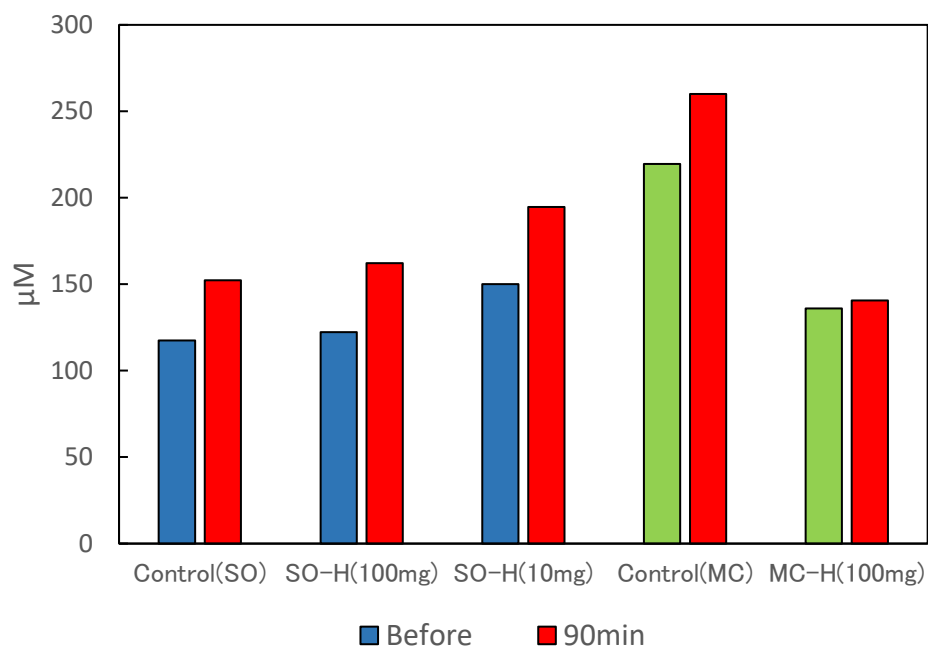


Fig.3. Concentration of fructose in rat serum.

第4章 ウコン抽出物の NASH モデルラットに対する効果

近年、日本においても食の欧米化やライフスタイルの変化により肥満、糖尿病、高血圧症などの生活習慣病患者が増加の一途を辿り、飲酒以外の生活習慣病が原因で発症する非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）がもっとも一般的な肝疾患になりつつある。その内、10～20%が非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）を発症するといわれており、NASH は肝硬変から肝がんに行進する疾患であるが、治療法が確立されていないのが現状である。

そこで NASH モデル動物に対して、ウコンの 50%エタノール画分、ヘキサソ画分およびビスクロン画分を投与し、それらの肝機能に及ぼす効果を 2 種類の NASH モデルラットを用いて検証した。

第1節 ウコンの精油成分の食餌誘導性 NASH モデルラット (SHRSP5/Dmcr) に対する効果

ウコンの 50%エタノール抽出画分、50%エタノール画分およびビスクロン画分を食餌性誘導 NASH モデルラットとして報告されている SHRSP5/Dmcr¹⁷⁾ を独自に設計したコリン欠乏-高脂肪・高フルクトース飼料で飼育し、肝機能および脂質代謝に及ぼす影響について検討した。

第1項 実験方法

(1) 飼料の調製

食餌誘導性 NASH 動物を作成するための食餌組成を Table 1 に示す。

AIN76 飼料組成に準じて、独自に設計したコリン欠乏-高脂肪・高果糖 (HFF-CD) 飼料を調製した。HFF-CD 飼料は、AIN76 飼料から塩化コリンを除き、カゼインをアミノ酸混合に変え、フルクトースを 25%、ラードとナタネ油を 30%となるように粉末油脂（ミヨシ油脂より供与）を用いて調製した。HFF-CD 飼料をベースにして、ビスクロン画分は知見¹⁸⁾をもとに体重 1 Kg 当たり 10 mg/kg 体重を添加して BIS 飼料とした。50%エタノール画分とヘキサソ画分は、それぞれ体重 1 Kg 当たり 100mg を添加して、50%エタノール画分添加 (EF) 飼料、ヘキサソ画分添加 (HF) 飼料とした。また、ウコン粉末は 3%となるように HFF-CD 飼料に添加した飼料を TM 飼料とした。

Table 1 Composition table of experimental diet (HFF-CD)

Items	PCTL	BIS	EF	HF	TM
	Weight(g)	Weight(g)	Weight(g)	Weight(g)	Weight(g)
Bisacrone		10mg/Kg·Bw			
Ethanol fraction			100mg/Kg·Bw		
Hexane fraction				100mg/Kg·Bw	
Termeric powder					30
胆汁酸 Na	5	5	5	5	5
DL-メチオニン	3	3	3	3	3
塩化コリン	none	none	none	none	none
AIN76 ビタミン混合	10	10	10	10	10
コレステロール	10	10	10	10	10
AIN76 ミネラル混合	35	35	35	35	35
セルロースパウダー	50	50	50	50	20
フルクトース	256	256	256	256	256
アミノ酸混合	170	170	170	170	170
粉末油脂(ラード)	205	205	205	205	205
粉末油脂(ナタネ)	251	251	251	251	251
ADE 剤	5	5	5	5	5
Total	1000	1000	1000	1000	1000

** :Hexane fraction, Ethanol fraction, and Bisacurone were dissolved in ADE and added.

(2) 実験動物

実験には SHRSP5/Dmcr ラット雄性、9 週齢（株式会社日本エスエルシー）を用いた。1 週間の馴化期間後、各群の平均体重がほぼ等しくなるように 5 群（n=5）に群分け、HFF-CD 飼料を与える対照（PCTL）群、BIS 飼料を与える BIS 群、EF 飼料を与える EF 群、HF 飼料を与える HF 群および TM 飼料を与える TM 群を設定した。給餌量は 13 g/日のペアフィーディングとし、給餌時に体重を測定した。また、各群のラットの収縮期血圧は、MK-2000 型非観血式血圧計（室町機械）を用いて飼育開始から 3 週間毎に測定した。

動物は、本学動物実験施設内の気温：22±2°C、湿度：60～65%、午前 8 時～午後 8 時の 12 時間照明に設定されたクリーン飼育室内で飼育し、飲料水は水道水を自由摂取とした。

試験飼育開始から 12 週間後にイソフルラン麻酔下で開腹し、下大静脈から採血して安楽死させ、肝臓、褐色脂肪、腎周囲脂肪、腹膜周囲脂肪、精巣上体脂肪を摘出して重量を測定した。肝臓重量は、摘出日の体重を基準として相対重量を算出した。摘出した肝臓は、一部を病理組織学的検査用に分割して 10%中性ホルマリン（マイルドホルム 10N、富士フィルム和光純薬）に浸漬した。残りは液体窒素で瞬間凍結後、-80°C条件下で凍結保存した。採血した血液は、血清分離管（セパラピッドチューブ、三商）で遠心分離（2,500rpm、15 分間）して血清を分離して-20°C条件下で凍結保存した。

(3) 血液生化学的検査

得られた血清を用いて AST、ALT、トリグリセライド（TG）、総コレステロール（T-Chol）を生化学自動分析装置 AU480（ベックマン・コールター・バイオメディカル株式会社）を用いて測定した。

(4) 肝臓中トリグリセライドおよび過酸化脂質量測定

肝臓中のトリグリセライド（TG）の測定は Folch 法¹⁹⁾に従い、凍結保存した肝臓を 10 倍容のメタノールでホモジナイズした後、20 倍容のクロロホルムを加え、40°Cで 1 時間混和し、一晩静置した後に遠心分離（3,000 rpm、15 分間）した。クロロホルム層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後にろ過して得られた抽出液を濃縮乾固させた。残渣を 2-プロパノール

で溶解したものを試料とし、トリグリセライドE・テストワコー（富士フイルム和光純薬）を用いて肝臓中TGを測定した。肝臓中の過酸化脂質（TBARS）量は大川ら²⁰⁾の方法に準じて、凍結保存した肝臓を1.15%塩化カリウム溶液中でホモジナイズした後、0.8%TBA試薬、20%酢酸および8.1%SDS存在下、95°C以上の沸騰水浴中で60分間加熱した。冷却後、n-ブタノール：ピリジン（15：1）を加えて攪拌抽出し、遠心分離（3,000 rpm、10分間）した上層を試料とし、波長535 nmの吸光度を測定してTBARS量を求めた。なお、TBARS量は、BCA法で求めた肝臓中タンパク質1g当たりの量として表した。

（5）肝臓の肉眼所見および病理組織学的検査

マイルドホルム10Nで固定した肝臓片をパラフィン包埋し、薄切切片を作製した。パラフィン切片はHematoxyline-Eosin（HE）染色およびSirius Red-Fast Green染色（Sirius Red染色）標本を作製した。Oil Red O染色標本は、肝臓の薄切切片から作製した。肝臓の脂肪蓄積はOil Red O染色により、線維化はSirius Red染色により観察した。

（6）脂質代謝関連遺伝子発現量

肝臓中の脂質代謝関連因子であるPPAR- α 、PPAR- γ および炎症性サイトカインのひとつでありNASHの病態惹起に関与するTNF- α の遺伝子発現量をRT-qPCRにて測定した。RNAの抽出は、Spasol[®]-RNA I SuperG（ナカライテスク）を用いた。cDNAは抽出したRNAを400ngの一定量に調製し、Prime Script[™] RT Master Mix（タカラバイオ）を用いて合成した。PPAR- α 、PPAR- γ およびTNF- α 発現量は以下に示すプライマーを用いてRT-qPCRで測定した。

○PPAR- α ：

GGACAAGGCCTCAGGATACCACTA(forward)

GACATCCCGACGGACAGGCACT(revers)

○PPAR- γ ：

CCTCCCTGATGAATAAAGATGG (forward)

CACAGCAAACCTCAAACCTTAGGC(revers)

○TNF- α ：

TTCCGAATTCCTACTGGAGCCTCGAA(forward)

TGCACCTCAGGGAAGAATCTGGAA(revers)

○18SrRNA :

GCCATGCATGTCTAAGTACGC(forward)

CCGTCGGCATGTATTAGCTC(revers)

PCR 法における増幅と定量は、TUNDEBIRD Next SYBR qPCR Mix (東洋紡) と CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) を用いた。遺伝子発現量は、内部標準法により 18SrRNA の発現量により補正した。

(7) 統計学的方法

得られた結果は、各群の平均値±標準誤差で表した。有意差検定は、エクセル統計 Statcel 4 を用いて Dannett 法で検定を行った。有意水準は、危険率 5%未満とし、5%未満と 1%未満に分けて表示した。

第2項 結果

(1) 体重

各群の体重推移を Fig.4 に示す。

BIS 群, EF 群, HF 群および TM 群とも有意ではないが、PCTL 群に比べて体重推移は抑制傾向を示した。

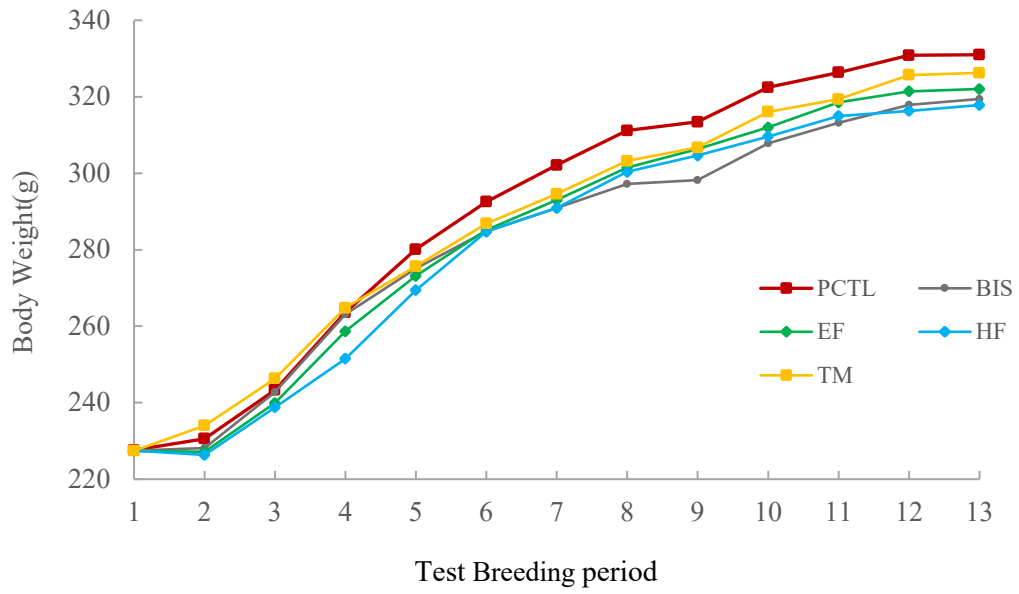


Fig.4 Growth curves of body weight in SHRSP5/Dmcr rats fed HFF-CD diet.

(2) 肝臓および脂質重量

肝臓重量および脂質重量を Table 2 に示す。

肝臓重量は、BIS 群、HF 群および TM 群とも PCTL 群に比べて有意ではないが増加傾向を示した。褐色脂肪および腹膜脂肪は BIS 群、EF 群、HF 群および TM 群とも PCTL 群に比べて増加傾向を示した。精巣上体脂肪については、EF 群、HF 群および TM 群が PCTL 群に比べて増加傾向を示した。一方、腎周囲脂肪は、BIS 群および HF 群は、PCTL 群に比べて減少傾向を示した。

Table 2 Body weight, liver weight and visceral lipid weights in SHRSP5/Dmcr rats fed HFF-CD diet

	PCTL	BIS	EF	HF	TM
Body Weight					
Initial (g)	227.6±9.2	227.5±8.0	227.4±4.4	227.5±6.2	227.4±6.5
Final (g)	331.0±16.0	319.4±9.1	322.0±11.6	317.8±7.7	326.2±8.9
Liver weight (g)	21.5±0.2	23.4±0.7	20.0±0.1	23.8±0.3	23.9±0.6
Liver weight / Body Weight (%)	6.46±0.20	7.29±0.17	6.20±0.07	7.40±0.08	7.27±0.20
Visceral lipid weight (g)					
Brown Fats	0.65±0.02	0.76±0.03	0.72±0.07	0.83±0.03	0.87±0.06
Peirineal	5.46±0.37	4.91±0.65	5.50±0.50	4.91±0.65	5.30±0.37
Peritoneal	2.82±0.36	3.68±0.20	3.25±0.33	4.47±0.50	3.55±0.53
Epididymal	4.68±0.32	4.90±0.46	5.25±0.47	5.18±0.41	5.42±0.31

(3) 血液生化学的検査

血液生化学的検査の結果を Fig.5 に示す。

AST は、TM 群が PCTL 群に比べて有意な($p < 0.05$)低値を示し、HF 群は低値傾向を示したが、BIS 群及び EF 群には有意な差は認められなかった。ALT は、BIS 群、EF 群、HF 群および TM 群とも PCTL 群に比べて低値傾向を示したが、有意な差は認められなかった。T-Cho もいずれの群も PCTL 群に比べて有意な差はなかった。TG は、BIS 群、EF 群および TM 群において有意ではないが低値傾向を示した。

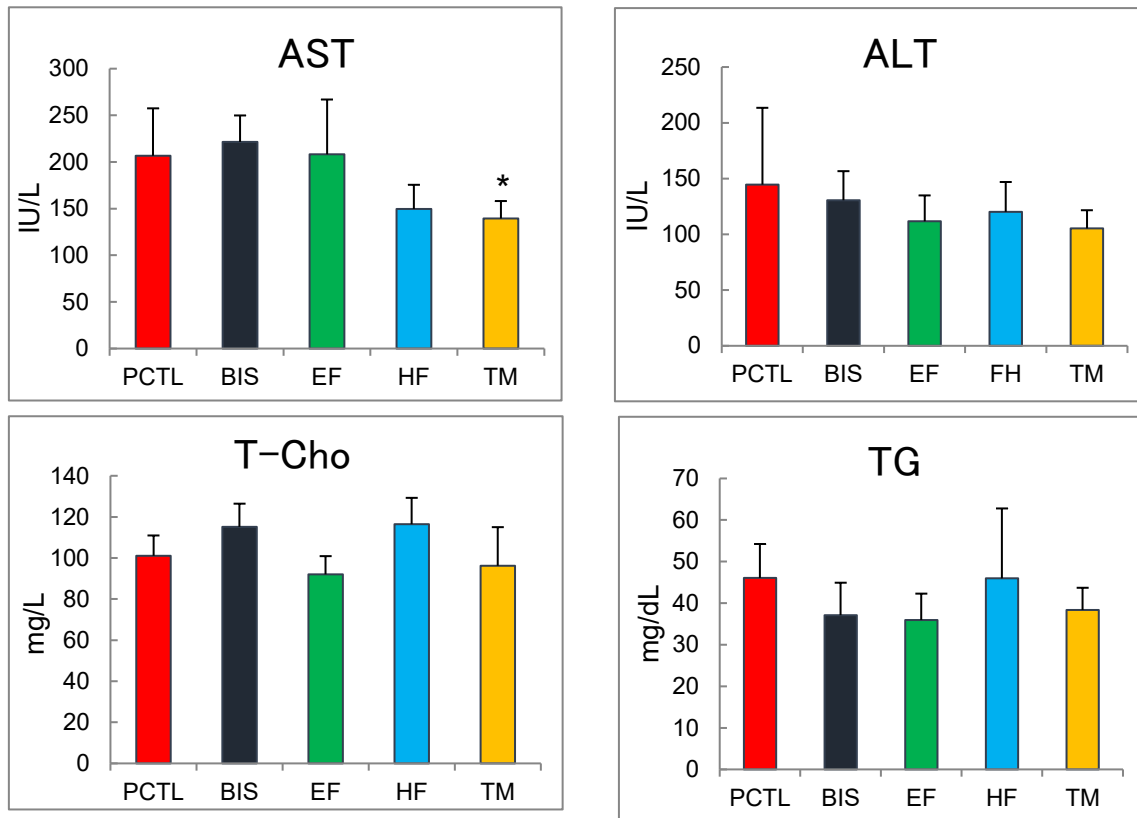


Fig.5 Serum ALT, AST, T-Cho, TG levels in SHRSF5/Dmcr rats fed HFF-CD diet.

Bars represent mean \pm S.E.

*

(4) 肝臓中トリグリセライドおよび過酸化脂質量測定

肝臓中トリグリセライド (TG) および過酸化脂質量 (TBARS) の結果を Fig.6 に示す。

肝臓中 TG はいずれの群も PCTL 群に比べて有意な差は認められなかったが、EF 群は低値傾向を示した。肝臓中 TBARS は BIS 群、EF 群および HF 群が PCTL 群に比べて有意な ($p < 0.05$) 低値を示した。

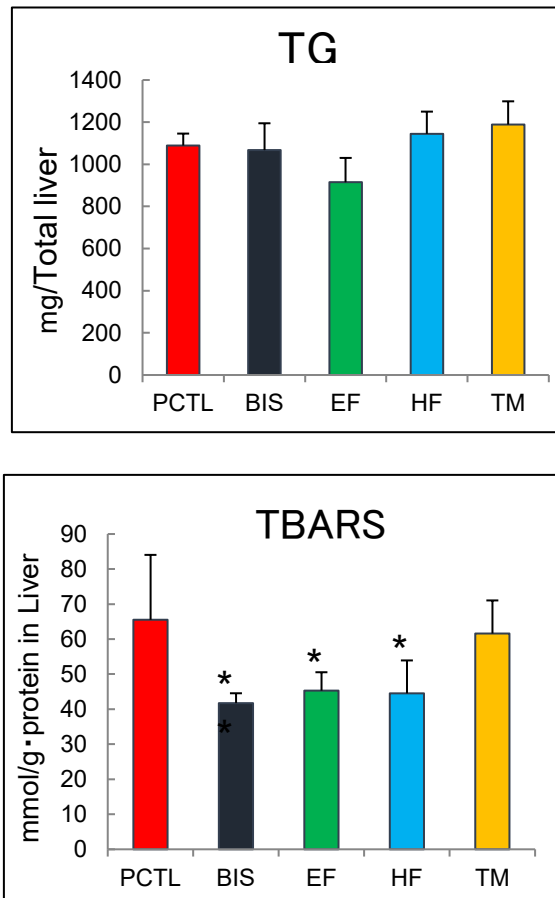


Fig.6 Hepatic TG,TBARS levels in SHRSP5/Dmcr rats liver fed HFF-CD diet.

Bars represent mean \pm S.E.

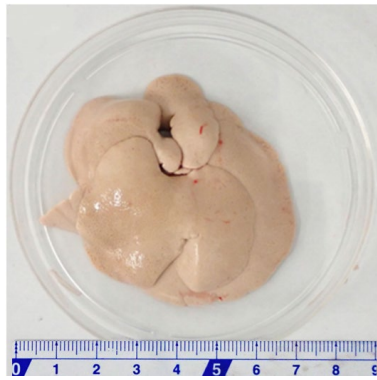
Significantly different from the PCTL group (*: $p < 0.05$ by Dunnett's test).

(5) 肝臓の肉眼所見および病理組織学的検査

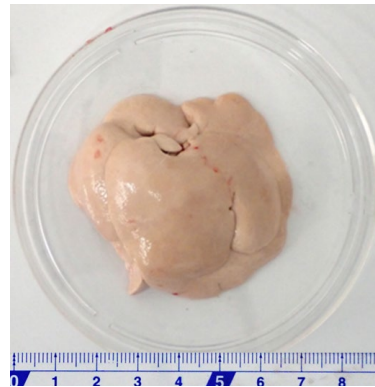
肝臓の解剖時の写真を Fig.7、HE 染色による病理組織像を Fig.8、Oil Red O 染色による病理組織像を Fig.9、Sirius Red 染色による病理組織像を Fig.10 にそれぞれ示す。

肝臓の解剖時の写真では、いずれの群も肝臓の白色化が認められ、脂肪肝となっていた。

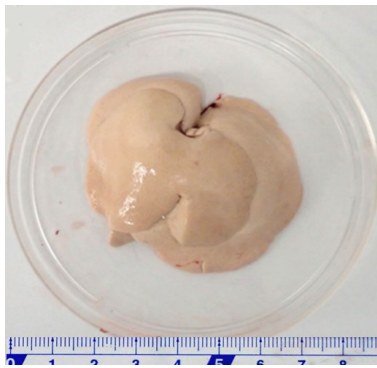
病理組織学的検査において、HE 染色では、PCTL 群および EF 群は、肝細胞中に大型空胞が認められた。一方、BIS 群および HF 群は、肝細胞中にはほとんどが中型空胞で、大型空胞が認められなかった。TM 群では、PCTL 群とほぼ同様に大型空胞を持つ肝細胞が認められた。Oil Red O 染色では、PCTL 群、BIS 群、EF 群および TM 群には領域全体が強陽性を示した。HF 群では中程度の陽性部位が大半であるが、その中でも弱陽性の領域が認められた。TM 群では、大脂肪滴性の組織より中小脂肪滴性の組織において陽性度が強い傾向があった。Sirius Red 染色では、PCTL 群、EF 群および TM 群では細胞間に伸びた線維化の部位が認められた。一方、BIS 群および HF 群は PCTL 群に比べて線維化が認められた部位は少なかった。



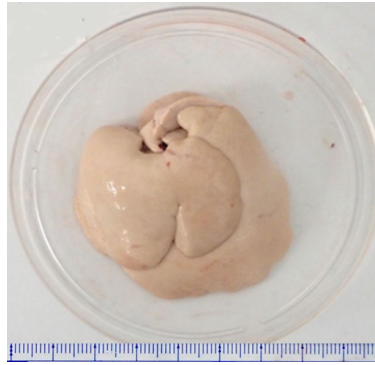
PCTL



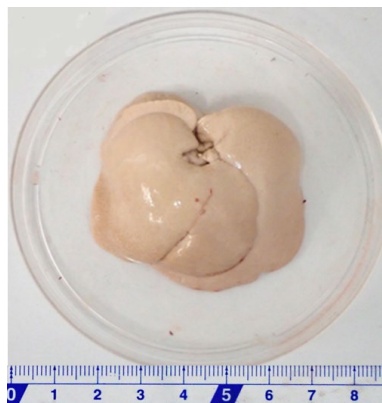
BIS



EF

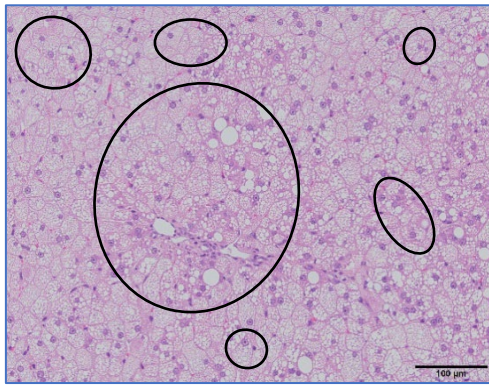


HF

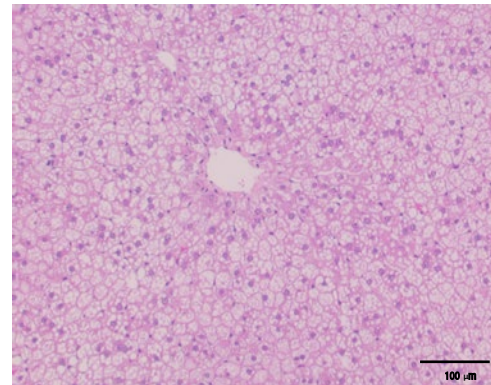


TM

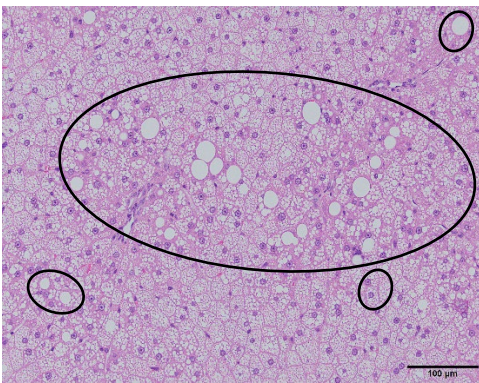
Fig.7 Macroscopic photos of liver in SHRSP5/Dmcr rat fed HFF-CD diet.



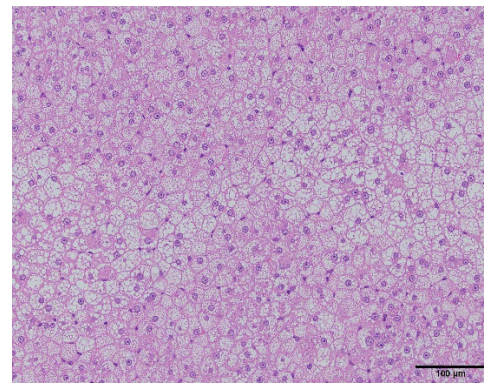
PCTL



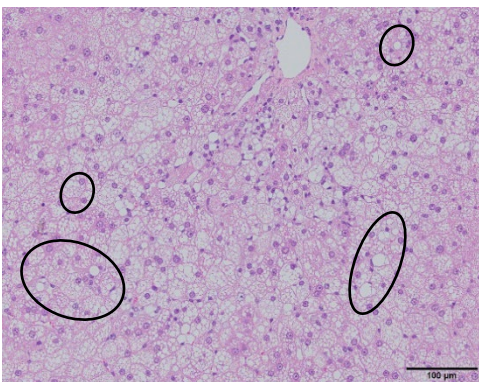
BIS



EF

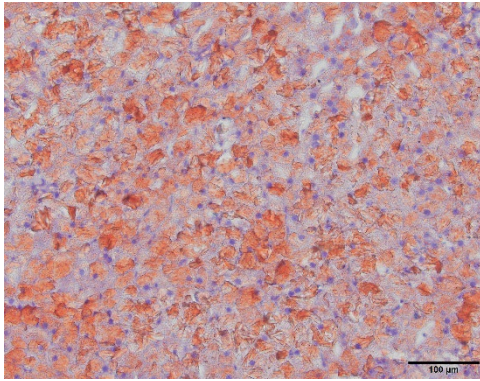


HF

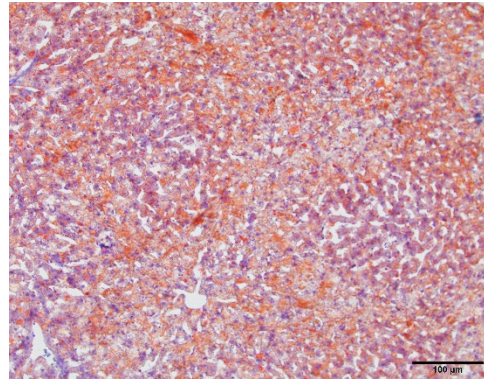


TM

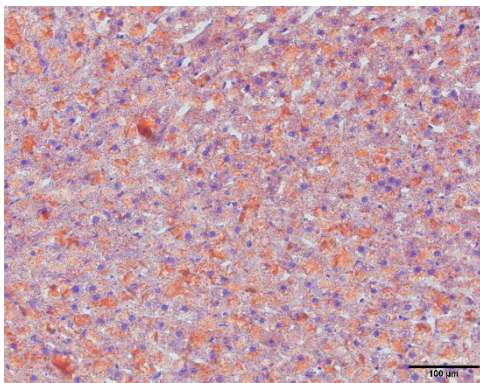
Fig.8 HE staining of liver in SHRSP5/Dmc^r rats fed HFF-CD diet.
Black circles indicate large vacuoles and ballooning hepatocyte.



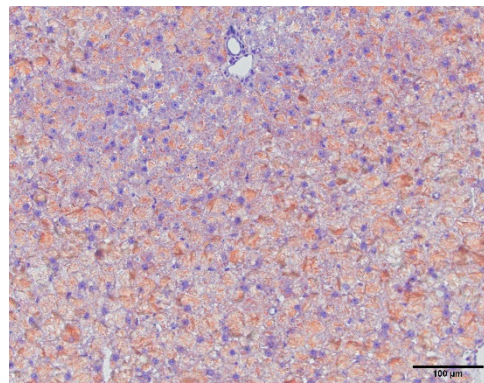
PCTL



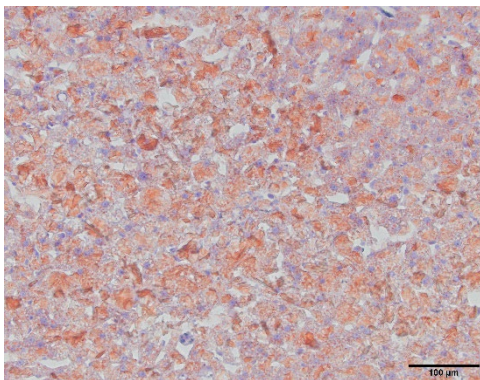
BIS



EF

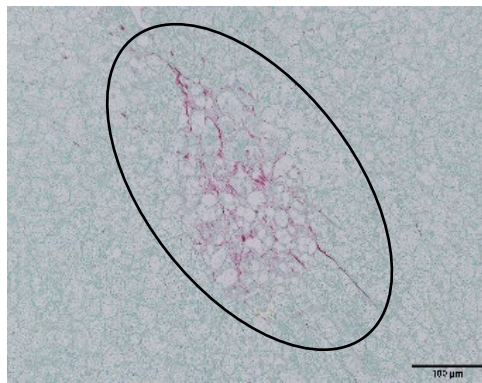


HF



TM

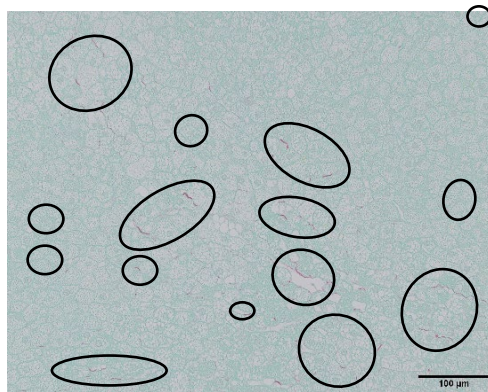
Fig.9 Oil Red O staining of liver in SHRSP5/Dmcr rats fed HFF-CD diet.



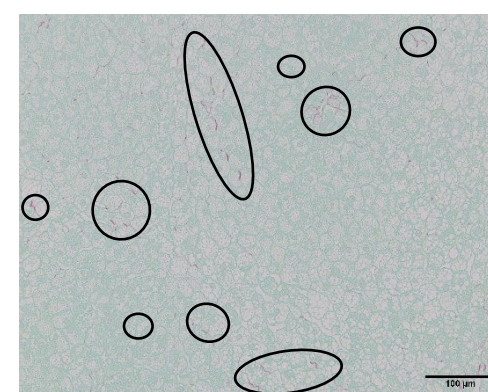
PCTL



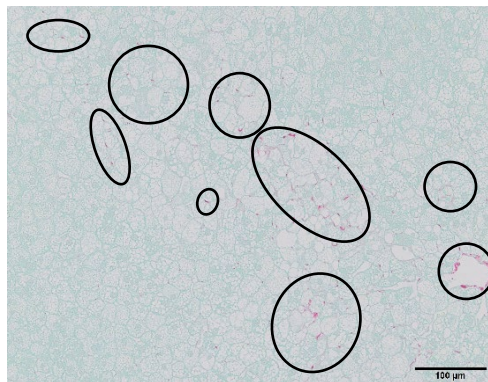
BIS



EF



HF



TM

Fig.10 Sirius red staining of liver in SHRSP5/Dmcr rats fed HFF-CD diet.
Black circles indicate area of fibrosis.

(6) 脂質代謝関連遺伝子発現量

脂質代謝関連遺伝子発現量の結果を Fig.11 に示す。

PPAR- α は、BIS 群および TM 群が PTCL 群に比べて高値傾向を示した。PPAR- γ は、BIS 群および HF 群が PTCL 群に比べて高値傾向を示した。TNF- α は HF 群が PTCL 群に比べて有意ではないものの低値を示したが、BIS 群、EF 群および TM 群は同程度であった。

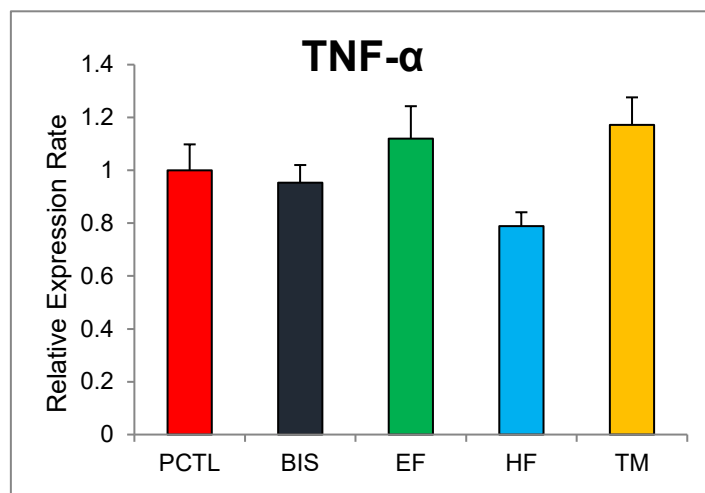
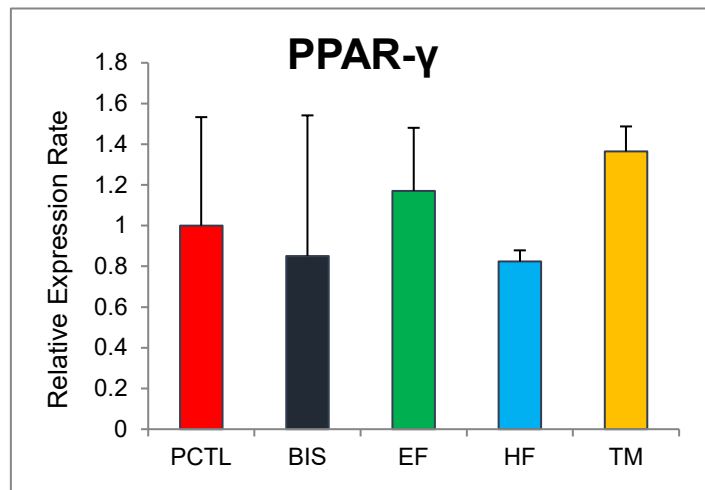
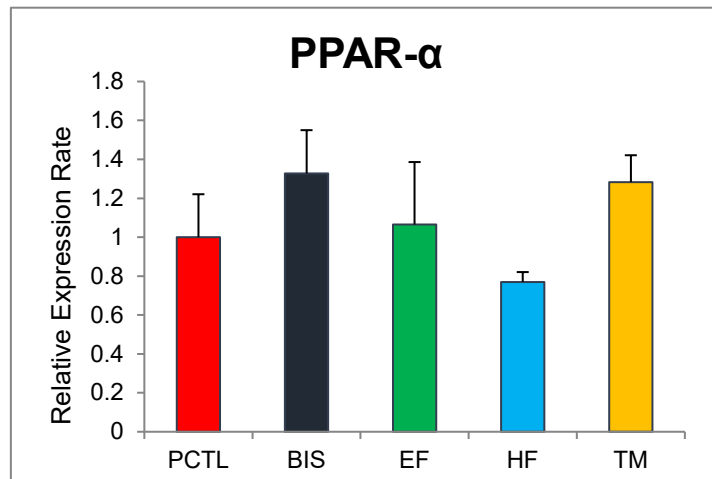


Fig.11 Hepatic gene expression involved in lipid metabolism in SHRSF5/Dmcr rats liver fed HFF-CD diet.

Bars represent mean \pm S.E.

(7) 収縮期血圧の推移

試験試料給餌開始から3週ごとに測定した収縮期血圧の推移を Fig.12 に示す。

3週目の PCTL 群の収縮期血圧は0週目の 130 mmHg から 170 mmHg まで上昇し、その後は高血圧状態を継続した。HF 群および TM 群に関しても同様の推移が見られ、0週目の血圧に対して、PCTL 群、HF 群、TM 群は有意な血圧上昇が認められた ($p < 0.01$)。これに対して BIS 群および EF 群では、3週目から12週目まで血圧上昇が抑制され、特に3週目と6週目、9週目は0週目との間に有意な差は認められなかった。また、これら2群は各測定週の PCTL 群に対して6週目までは有意な低値を示し ($P < 0.01$ or 0.05)、9週目においても EF 群は有意に低値を示した。12週目では、PCTL 群に対して、HF 群、TM 群間は有意な差は認められなかったが、BIS 群、EF 群、血圧の上昇が有意に抑制 ($p < 0.05$) された。

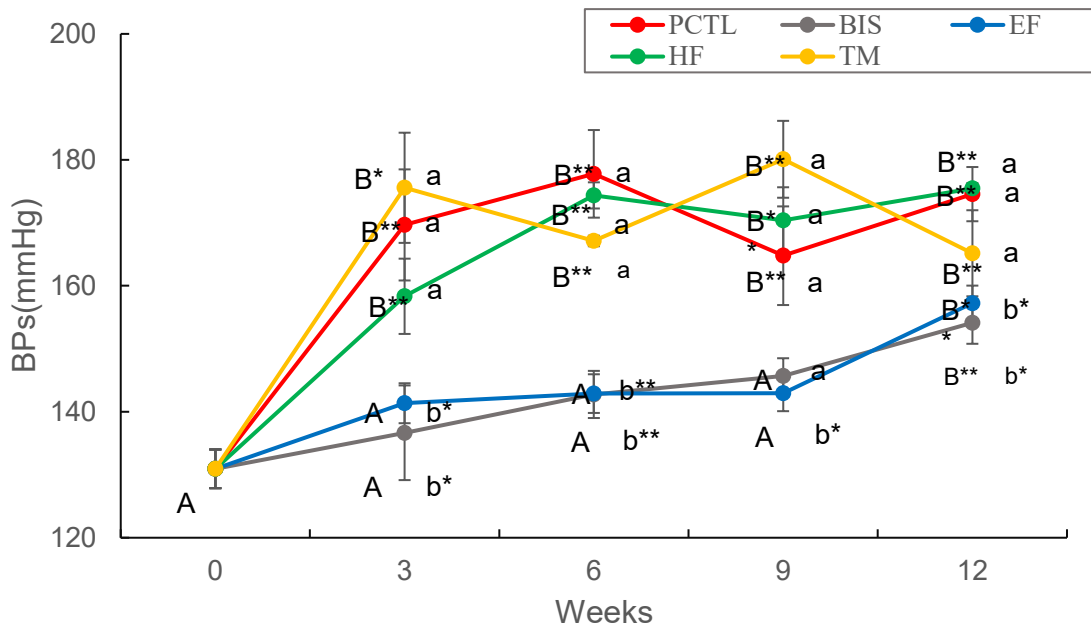


Fig.12 Changes in systolic blood pressure in SHRSP5/Dmcr rats fed HFF-CD diet. Data represent mean \pm S.E. Capital letters indicate significant differences from week 0 (** : $p < 0.01$ by Dunnett's test). Lowercase letters indicate significant difference from PCTL group at each week (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ by Dunnett's test).

第2節 ウコンの精油成分の NASH 誘導飼料を摂取させた正常ラット(SD)に与える影響

NASH モデル動物はマウスを用いて作製されることが多いが、採取できる試料の量が少なく、多岐にわたる測定ができない。前節において筆者らが独自に設計した飼料組成は、NASH モデルラットを容易に NASH に誘導できる飼料であることが判明した。NASH モデルラットは高価であることから、実験で使用できる匹数が限られる。そこで、本節では正常ラットに著者らが設計した NASH 誘導飼料を摂取させた場合の NASH 誘導の可能性と併せてウコン精油成分投与の影響について検討した。

第1項 実験方法

(1) 動物実験

実験には SD 系ラット雄性、9 週齢（株式会社日本エスエルシー）を入手し、1 週間の馴化期間後、各群の平均体重がほぼ等しくなるように 4 群 (n=5) に群分けし、HFF-CD 飼料を与える対照(PCTL)群、BIS 飼料を与える BIS 群、EF 飼料を与える EF 群、HF 飼料を与える HF 群および TM 飼料を与える TM 群とした。給餌量は 13 g/日のペアフィーディングとし、給餌時に体重を測定した。動物は、本学動物実験施設内の気温：22±2°C、湿度：60～65%、午前 8 時～午後 8 時の 12 時間照明に設定されたクリーン飼育室内で飼育し、飲料水は水道水を自由摂取とした。

試験飼育開始から 9 週間後にイソフルラン麻酔下で開腹し、下大静脈から採血して安楽死させ、肝臓、褐色脂肪、腎周囲脂肪、腹膜周囲脂肪、精巣上体脂肪を摘出して重量を測定した。肝臓重量は、摘出日の体重を基準として相対重量を算出した。摘出した肝臓は、一部を病理組織学的検査用に分割して 10%中性ホルマリン(マイルドホルム 10N、富士フィルム和光純薬)に浸漬した。残りは液体窒素で瞬間凍結後、-80°C条件下で凍結保存した。採血した血液は、血清分離管（セパラピッドチューブ、三商）で遠心分離(2,500 rpm、15 分間)して血清を分離し、-20°C条件下で凍結保存した。採取した血清および摘出した肝臓を用いて、前節と同様な方法で血液生化学的検査、肝臓中トリグリセライドおよび過酸化脂質量測定、脂質代謝関連遺伝子発現量、病理組織学的検査を行った。

第2項 結果

(1) 体重

各群の体重推移を Fig.13 に示す。

EF 群、HF 群および TM 群とも PCTL 群と同様な体重推移を示し、有意差は認められなかった。

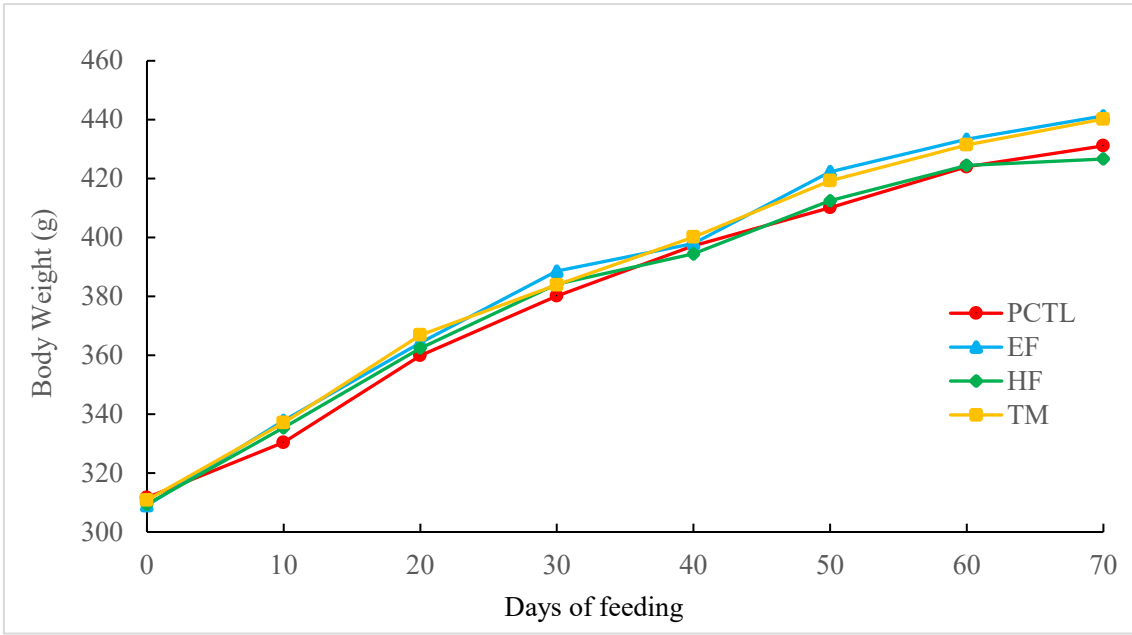


Fig.13 Growth curves of body weight in NASH model rats fed HFF-CD diet.

(2) 肝臓および脂質重量

肝臓重量および脂質重量を Table 3 に示す。

肝臓重量は、HF 群、EF 群および TM 群とも PCTL 群とほぼ同様であった。腎周囲脂肪は、HF 群、EF 群および TM 群とも PCTL 群に比べて有意な減少 ($p < 0.05$) が認められた。精巣上体脂肪においても、同様に HF 群、EF 群および TM 群において有意な減少 ($p < 0.05$ or 0.01) が認められた。腹膜脂肪については、HF 群、EF 群および TM 群とも PCTL 群に比べて有意差は認められなかったが、減少傾向を示した。褐色脂肪はいずれの群も PCTL 群に比べて有意な差は認められなかった。

Table 3 Liver weight and visceral lipid weights in NASH model rats fed HFF-CD diet

Group		PCTL	EF	HF	TM
Liver weight	(g/Kg. BW)	59.9 ± 1.5	59.4 ± 1.1	61.4 ± 1.4	60.5 ± 1.4
Perirenal fat	(g/Kg. BW)	25.9 ± 1.0	19.6 ± 1.4 **	20.5 ± 1.4 *	20.4 ± 0.8 *
Epididymal fat	(g/Kg. BW)	20.9 ± 1.0	16.9 ± 0.7 **	15.6 ± 0.2 **	16.6 ± 0.8 **
Peritoneal fat	(g/Kg. BW)	9.8 ± 1.0	7.7 ± 0.5	7.2 ± 0.6	7.6 ± 0.8
Brown fat	(g/Kg. BW)	1.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1

Each value shows mean ± S.E.

Significantly different from the PCTL group (*: p<0.05, **: p<0.01 by Dunnett's test).

(3) 血液生化学的検査および肝臓中トリグリセライドおよび過酸化脂質量

血液生化学的検査および肝臓中トリグリセライドおよび過酸化脂質量の結果を Table 4 に示す。

ALT は、EF 群および TM 群が PCTL 群に比べて有意な ($p < 0.05$) 低値を示し、HF 群は低値傾向を示した。AST は、EF 群が PCTL 群に比べて有意な ($p < 0.05$) 低値を示した。HF 群および TM 群が有意ではないが、PCTL 群に比べては低値を示した。TG は、HF 群が PCTL 群に比べて有意な ($p < 0.05$) 低値を示し、EF 群、TM 群は低値傾向を示した。

肝臓中 TG は、HF 群において PCTL 群に比べて有意な ($p < 0.05$) 低値が認められ、EF 群および TM 群は有意ではないが低値傾向が認められた。肝臓中 TBARS は EF 群および HF 群が PCTL 群に比べて低値を示したが、有意差は認められなかった。一方、TM 群は PCTL 群に比べて有意な ($p < 0.01$) 低値が認められた。

Table 4 Blood chemical in serum and liver of NASH model rats fed HFF-CD diet

Group		PCTL	EF	HF	TM
AST	(IU/L)	186.7 ± 20.0	127.9 ± 7.8 *	152.6 ± 13.0	142.7 ± 8.2
ALT	(IU/L)	102.1 ± 12.3	61.7 ± 4.6 *	81.1 ± 13.7	61.4 ± 5.7 *
Serum TG	(mg/dL)	54.8 ± 3.4	47.0 ± 5.8	37.7 ± 3.3 *	49.6 ± 1.7
Hepatic TG	(g/Total liver)	1.77 ± 0.19	1.55 ± 0.13	1.06 ± 0.13 *	1.57 ± 0.20
Hepatic TBARS	(mmol/g/protein liver)	878.3 ± 78.6	711.6 ± 57.5	726.2 ± 14.6	554.5 ± 43.1 **

Each value shows mean ± S.E.

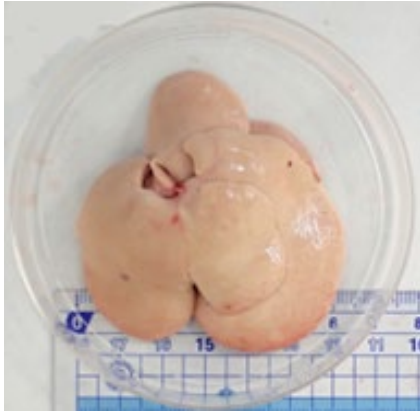
Significantly different from the PCTL group (*: p<0.05, **: p<0.01 by Dunnett's test)

(4) 肝臓の肉眼所見および病理組織学的検査

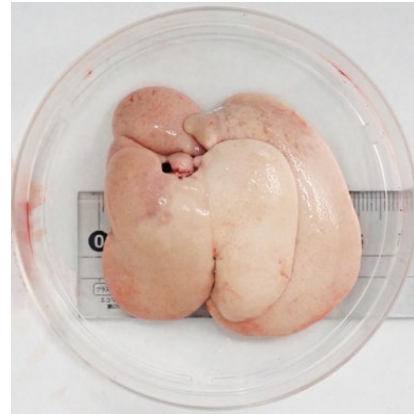
肝臓の解剖時の写真を Fig.14 に、病理組織像は HE 染色を Fig.15、Oil Red O 染色を Fig.16、Sirius Red 染色を Fig.17 に示す。

肝臓の解剖時の写真では、いずれの群も肝臓の白色化が認められ、脂肪肝となっていた。

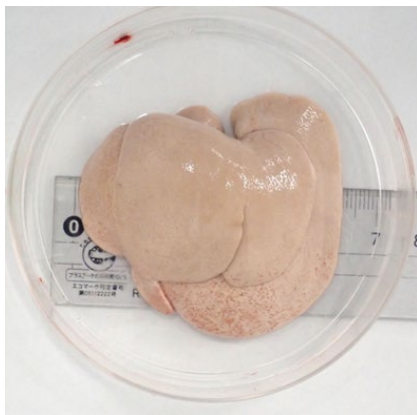
HE 染色では、PCTL 群は微小な空胞の充満により腫大した肝細胞が大多数を占め、肝細胞索は乱れていた。EF 群においても PCTL 群と同様に大空胞を持つ肝細胞の領域が散在していた。一方、HF 群は微小な空胞を持つ肝細胞が大部分ではあるが、一部に正常に近い肝細胞の領域が確認された。Oil Red O 染色では、PCTL 群および EF 群には領域全体が強陽性を示していた。HF 群では中程度の陽性部位が大半であるが、その中でも弱陽性の領域が認められ、脂肪の沈着が抑えられていた。Sirius Red 染色では、PCTL 群では線維化が進み Bridging に近い像が認められた。EF 群においても細胞間に伸びた線維化の部分が認められた。一方、HF 群には僅かな線維化が認められた程度にとどまった。



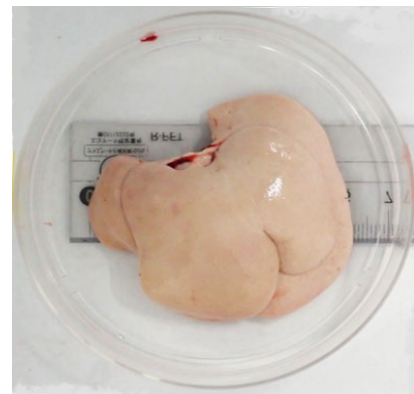
PCTL



EF

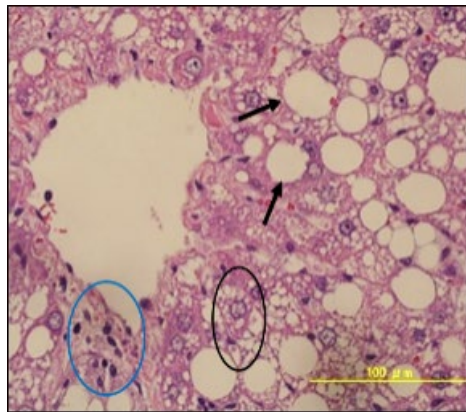


HF

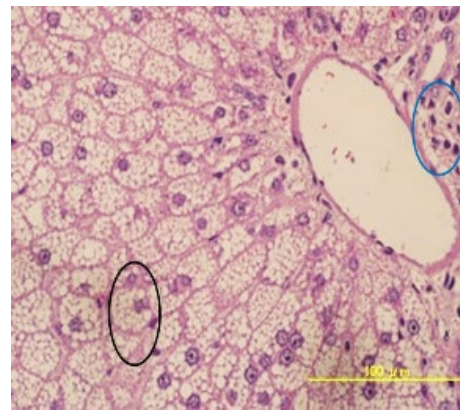


TM

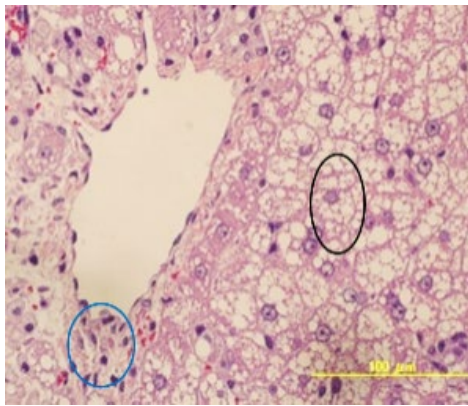
Fig.14 Macroscopic photos of liver in NASH model rats fed HFF-CD diet.



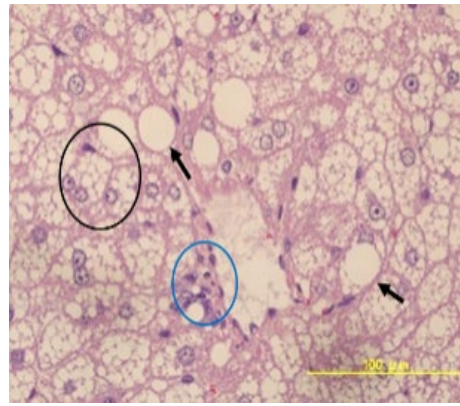
PCTL



EF

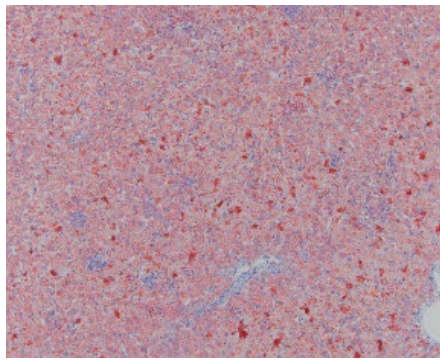


HF

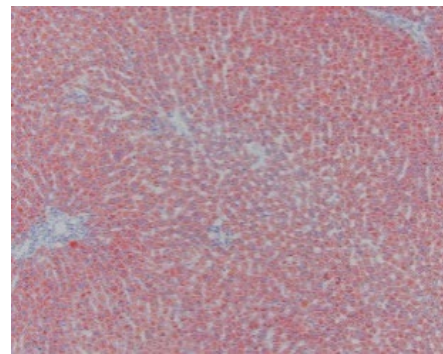


TM

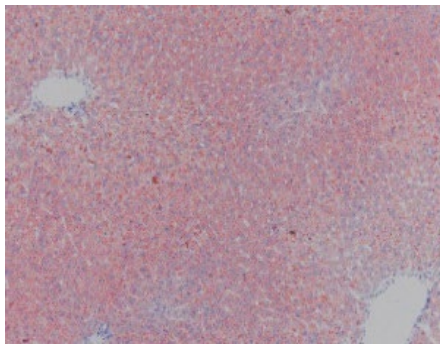
Fig.15 HE staining of liver in NASH model rats fed HFF-CD diet.
Black circles indicate ballooning hepatocyte.
Blue circles indicate inflammatory cell infiltration.
Black arrow indicate large vacuolar.



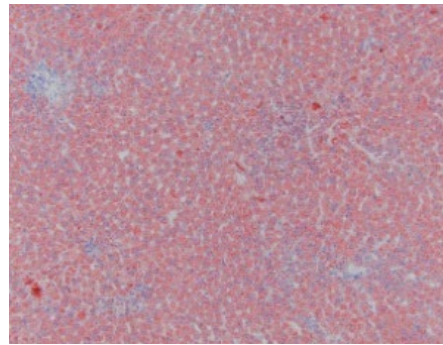
PCTL



EF



HF



TM

Fig.16 Oil Red O staining of liver in NASH model rats fed HFF-CD diet.



PCTL



EF



HF



TM

Fig.17. Sirius red staining of liver in NASH model rats fed HFF-CD diet. Red circles indicate area of fibrosis.

(5) 脂質代謝関連遺伝子発現量

脂質代謝関連遺伝子発現量の結果を Fig.18 に示す。

PPAR- α は、EF 群、HF 群および TM 群が PTCL 群に比べて有意な ($p < 0.01$) 高値を示した。PPAR- γ は、いずれの群も PTCL 群に比べて低値であったが、有意差は認められなかった。TNF- α においても、いずれの群も PTCL 群に比べて低値であったが、有意差は認められなかった。

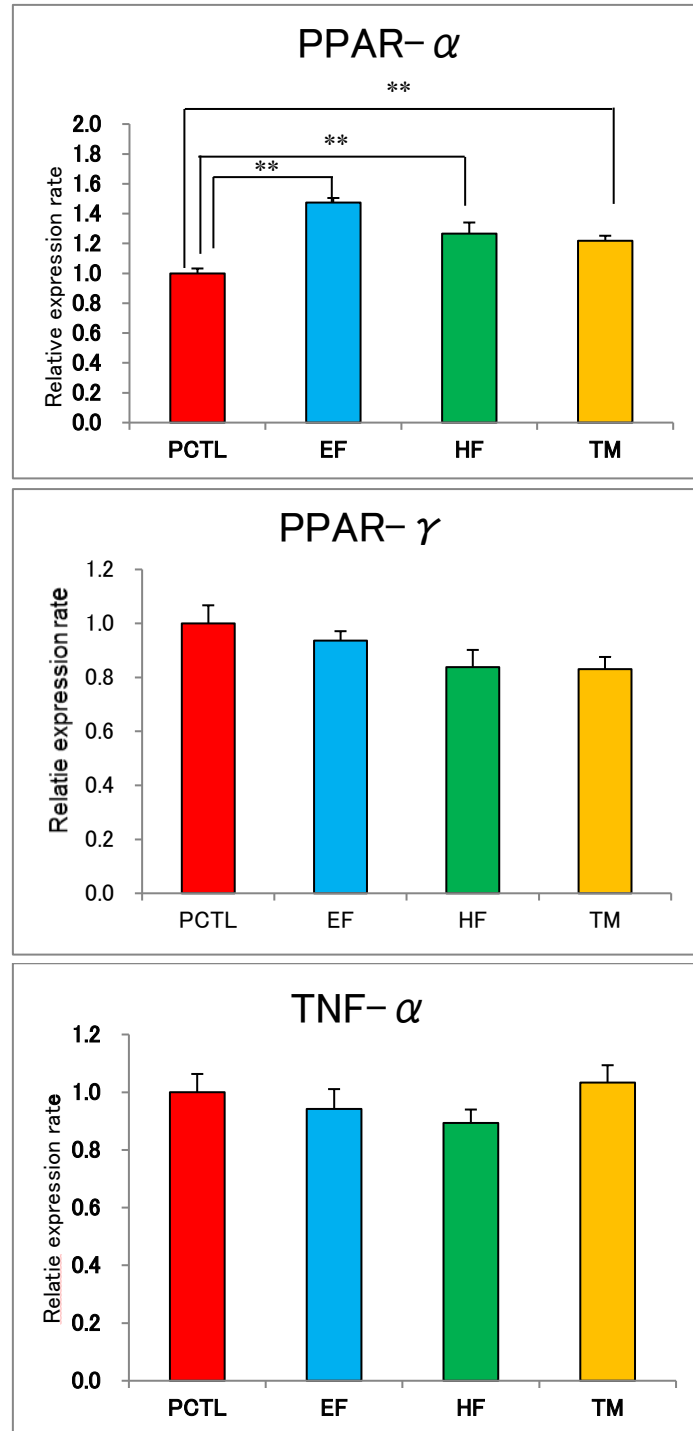


Fig.18 Hepatic gene expression involved in lipid metabolism in NASH model rats fed HFF-CD diet.

Bars represent mean \pm S.E.

Significantly different from the PCTL group (**: $p < 0.01$ by Dunnett's test).

第3節 小括

ヘキササン画分およびビスクロン画分の投与は、NASH モデルラット (SHRSP5/Dmcr) において、脂質代謝を促進することにより肝臓に脂肪化を抑制させ、さらに HFF-CD 飼料により NASH に誘導された正常な SD ラットにおいても脂質代謝を亢進することによって肝脂肪化と線維化を抑制させることが示唆された。

ウコンは、高フルクトース食を与えたラットでの脂質代謝改善効果についての報告²¹⁾²²⁾がある。また、ウコン油についても抗高脂血症効果²³⁾について報告がある。このウコン油の成分の中には、今回ヘキササンで抽出した画分に含まれていた成分と同じものが含まれていた。本研究においても、ヘキササン画分が脂質代謝亢進作用を示したものと推測される。

また、ビスクロン画分および50%エタノール画分については、有意な ($p < 0.01$) 血圧上昇抑制作用が認められた。クルクミンはプレバイオティクス効果として SHR の血圧上昇を抑制する²⁴⁾、あるいはウコン中のタンパク質加水分解ペプチドに ACE 活性阻害がある²⁵⁾という報告がある。しかし、ビスクロン画分の血圧上昇抑制作用の報告は見当たらない。これは、著者らが今回初めて明らかにした作用である。

さらに、独自に設計した HFF-CD 飼料は正常な SD ラットを NASH に誘導することが可能であることが確認された。CDAA 食や MCD 食による NASH モデルが一般的²⁶⁾²⁷⁾ではあるが、当研究で設計した HFF-CD 食はコリン欠乏に加えて高脂肪および高フルクトースを添加することにより、NASH の成因と言われるメタボリックシンドロームや異性化糖の過剰摂取の状況を反映できると考えた。その結果、SD ラットにおいて、肝臓重量の増加、肝臓への脂肪蓄積が認められ、やや弱いものの肝臓組織の線維化も認められた。

前章で、ヘキササン画分はフルクトースの吸収抑制効果がないことが明らかとなったが、本章において肝脂肪化と線維化を抑制することが認められた。このことから、ヘキササン画分は肝臓において、脂肪が脂肪細胞に蓄積されることを抑制していることが窺われる。このことにより、脂肪化された肝細胞から分泌されるサイトカインの刺激による星細胞の活性化が抑制され、NASH の線維化抑制につながったと推測される。

第5章 生産地域での高品質化を図るための簡易定量法の開発

ウコンの栽培を行っている南・東南アジア諸国の多くは、未だ LDCs にあたり、特に山村地域の生活水準は低い。なかでも、タイ、ラオス、ミャンマーの国境山岳地帯はゴールドトライアングルと呼ばれ麻薬の原料となるケシの栽培地帯で、世界最大の麻薬密造地域と言われる。そこからの脱却を図るために、ケシに代わって高収入につながる農作物の生産を推進している。その一つとして、生薬として高価で売買されるウコンを生産し、輸出することは外貨獲得の手段である。さらに、付加価値のある高品質のウコンを生産することは、現地の農民の生活向上にもつながるものと考えられる。そこで、ウコンの取引が主成分であるクルクミン含量を指標としていることから、クルクミン含量の定量が必要となる。

クルクミン含量の定量は HPLC 法が公定法となっているが、HPLC の装置が高額であること、高度な技術が要求されることもさることながら、分離に必要な溶媒・試薬などのランニングコストの費用が嵩むため、生産地では実施が難しい。現在は、日本に輸出されてから品質を確認しなければならないという現状がある。著者は、成分分析による品質管理を現地で行い、高品質のウコンだけを選別して輸出するには、経済的、技術的に乏しい現地の検査施設等でも行える簡便迅速なクルクミン定量法の確立が必要と考えた。そこで、HPLC 法に代わる廉価な分光光度計を用いた吸光度法による測定法について検討した。

第1節 HPLC 法によるウコン中クルクミンの定量

第1項 方法

(1) HPLC 用ウコンサンプル溶液の調製

乾燥ウコン試料をコーヒーミルで粉碎し、0.2 g を電子天秤で精秤してビーカーに入れ、メタノール/酢酸 (99:1) 25 mL を加えて 20 分間スターラーで攪拌抽出した後、抽出液を 50 mL 遠心管に移して、2,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を 50 mL メスフラスコに入れた。残留物は 25 mL のメタノール/酢酸混液を加えて同じ操作をもう一度行い、上清を合一してメタノール/酢酸 (99:1) で 50 mL に定容した。この溶液一部を 0.45 μm のフィルターでろ過して HPLC 用の試料とした。

(2) HPLC 用標準溶液の調製

クルクミン試薬（富士フィルム和光純薬株式会社）0.2 g を電子天秤で精秤し、メタノールを加えて 50 mL 容メスフラスコに定容した。5 倍、10 倍、20 倍、40 倍、80 倍に希釈して検量線用標準溶液とした。

(3) HPLC 条件

HPLC は、ポンプ：LC-10AD（島津製作所製）、オートサンプラー：SIL-10A（島津製作所製）、カラムオーブン：CTO-10A（島津製作所製）、検出器：SPD-10AV（島津製作所製）、システムコントローラー：SCL-10A（島津製作所製）、データ処理ソフト：Chromato-Pro（ランタイムインストルメント）で構成されたものを使用した。分析条件は、カラム：Cosmosil 5C18 MS-II（ ϕ 4.6×150 mm）、プレカラム：Cosmosil 5C18 MS-II（ ϕ 4.6×10 mm）、カラム温度：40°C、移動相：水/アセトニトリル/酢酸（56:43:1）、流速：1.0 mL/min、測定時間 20 分、検出波長：245 nm で行った。

第 2 節 吸光度法によるウコン中クルクミンの定量

第 1 項 方法

(1) 吸光度法用ウコンサンプル溶液の調製

HPLC 用の調製したウコンサンプルでは濃度が高く、吸光度が 2 を超えるため、メタノールで 40 倍に希釈して吸光度法用サンプルとした。

(2) 吸光度法溶標準溶液の調製

クルクミン試薬（富士フィルム和光純薬）0.2 g を電子天秤で精秤し、メタノールを加えて 50 mL 容メスフラスコに定容した。希釈してクルクミン濃度を 2.0 μ g/mL、4.0 μ g/mL、8.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL として検量線用標準溶液とした。

(3) 吸光度法条件

分光光度計によるクルクミン濃度の測定には、紫外可視分光光度計（V630-iRM、日本分光）を使用し、測定波長はクルクミンの極大吸収波長である 430 nm とした。

第3節 結果

(1) HPLC によるクルクミンの分析

代表的なクルクミンのクロマトグラムを Fig.19 に示す。

ウコン中には、クルクミン、デメトキシクルクミン、ビスデメトキシクルクミンの3種類のクルクミノイドが含まれていた。

(2) HPLC 法と吸光度法の相関性

3種類のウコン中に含まれるクルクミノイド含量を HPLC 法と吸光度法で測定し、その相関性を調べた。HPLC の測定値を説明変数、吸光度法による測定値を目的変数として回帰分析を行った結果、相関係数 (r) は 0.9896 となり、高い正の相関性が認められた。HPLC 法および吸光度法の測定結果を Table 5 に、散布図を Fig.20 に示す。

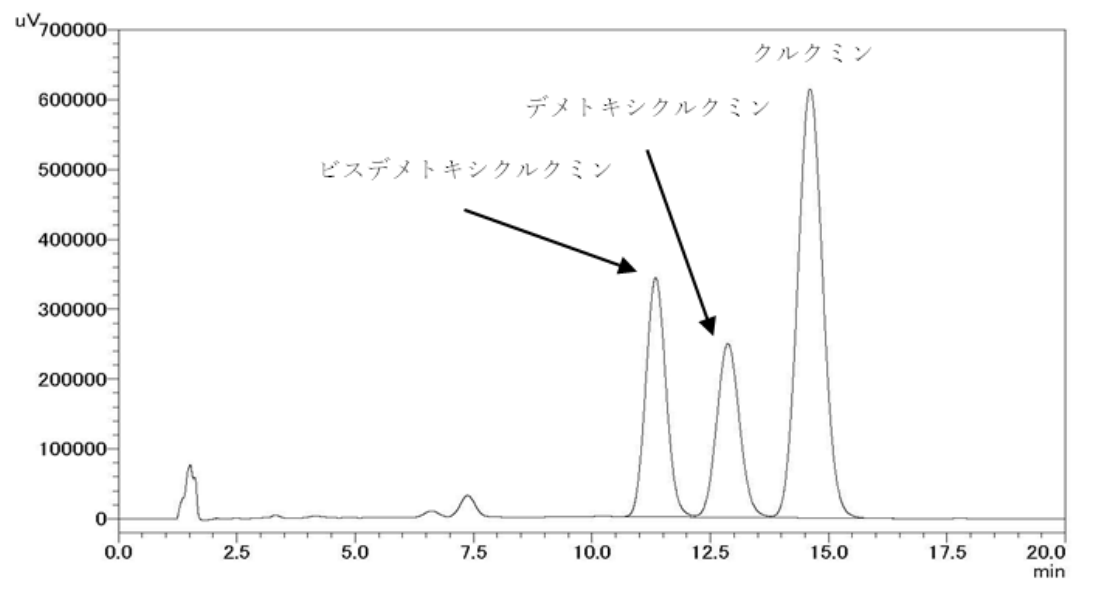


Fig.19 Typical chromatogram of curcuminoids.

Table 5 Concentration of Curcumin in Turmeric measured using HPLC or spectrophotometry

Sample No.	HPLC	Spectrophotometry	Sample No.	HPLC	Spectrophotometry
	Conc.µg/ml	Conc.µg/ml		Conc.µg/ml	Conc.µg/ml
2019S1-1	7.5	7.0	S1-1	0.3	0.7
2019S1-2	8.9	7.7	S1-2	0.2	0.6
2019S1-3	8.5	7.4	S1-3	0.2	0.6
2019S1-4	8.8	7.6	S1-4	0.2	0.6
2019S1-5	7.8	8.2	S1-5	0.3	0.6
2019S2-1	5.3	5.2	S2-1	7.7	7.0
2019S2-2	6.0	6.2	S2-2	7.7	7.2
2019S2-3	6.3	6.2	S2-3	8.9	7.6
2019S2-4	6.7	6.6	S2-4	8.3	7.5
2019S2-5	6.5	6.4	S2-5	8.7	7.4
2019S3-1	7.5	7.1	S3-1	8.0	6.9
2019S3-2	8.2	7.6	S3-2	8.2	7.2
2019S3-3	8.9	8.0	S3-3	8.7	7.5
2019S3-4	8.8	7.8	S3-4	8.7	7.6
2019S3-5	9.1	8.0	S3-5	8.8	7.7
A-1	5.1	5.3	S4-1	6.2	5.4
A-2	5.6	5.8	S4-2	5.7	5.5
A-3	6.2	6.0	S4-3	6.2	5.6
A-4	4.0	4.5	S4-4	7.7	7.0
A-5	6.2	6.2	S4-5	6.8	6.0
B-1	4.4	4.7	S5-1	7.2	6.6
B-2	4.6	4.5	S5-2	6.5	6.3
B-3	5.3	5.2	S5-3	7.2	6.7
B-4	5.0	5.0	S5-4	7.2	6.8
B-5	5.1	5.2	S5-5	7.8	7.0
C-1	8.0	7.1	S6-1	1.5	1.7
C-2	8.3	7.4	S6-2	1.6	1.8
C-3	9.4	8.0	S6-3	1.8	2.0
C-4	9.0	7.6	S6-4	2.2	2.0
C-5	9.1	7.7	S6-5	1.7	1.9
P-1	7.9	7.1			
P-2	8.2	7.5			
P-3	8.3	7.6			
P-4	8.7	7.4			
P-5	8.9	7.5			

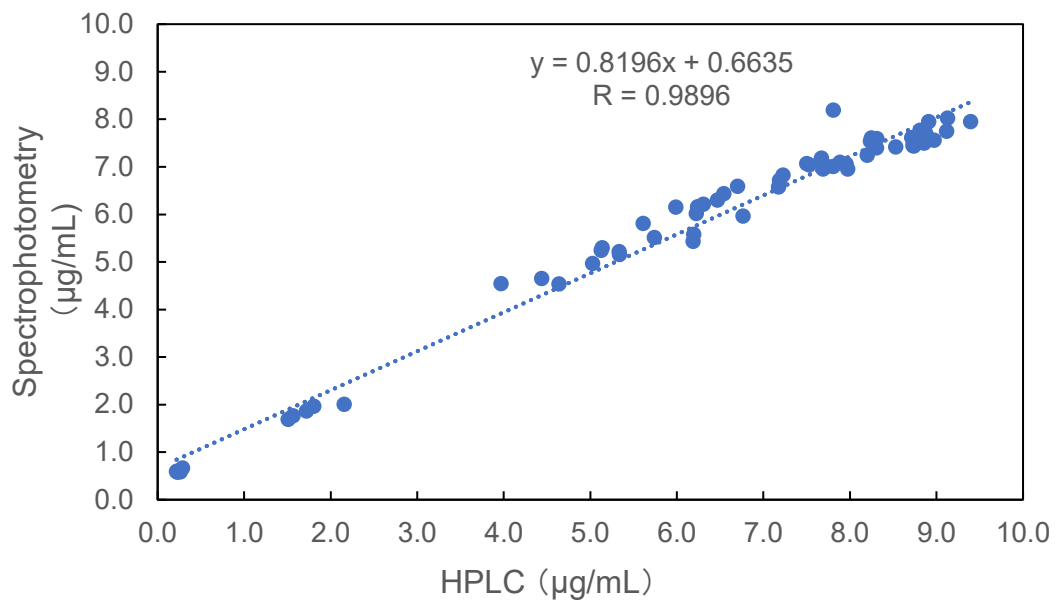


Fig.20 Correlation between HPLC and spectrophotometric methods in curcumin concentration

第4節 小括

ウコンにはクルクミンの他、デメトキシクルクミン、ビスデメトキシクルクミンの3種類のクルクミノイドが含まれており、これらを合わせて総クルクミノイドとしている。HPLC法では、これら3種類のクルクミノイドを分離して測定し、クルクミン含量だけを測定することができる。一方、吸光度法ではこの3種類を分離することができないため、3種類を合わせて測定することになり、クルクミンのみの濃度ではない。しかし、HPLC法と吸光度法の間には高い正の相関性が得られたことから、分光光度計による吸光度法を用いても、ウコン中のクルクミン含量を推定するには十分な精度と考えられた。

第6章 総括

本研究では、ウコンの有効利用法に関する諸研究として、ウコンの肝機能改善効果に注目し、近年、日本においてメタボリックシンドローム患者が増加していることから、ウコンのメタボリックシンドロームに対する効果について NASH モデルラットを用いて検討した。また、ウコンの生産地域である南・東南アジアの後発開発途上国地域の経済発展とその山村部の住民の生活水準向上のために、この地域で栽培されるウコンの高品質化を図るための手法として、ウコンの品質の基準となるクルクミン含有量を現地で簡便迅速に測定する方法の開発を試みた。

第2章では、ウコンの主要な機能性成分であるクルクミンの体内への吸収性を向上させるための加工方法について検討し、瞬間乾燥粉碎法によって微粉末化したウコン粉末をラットに投与し、血中クルクミン濃度の経時的変化を調べた。その結果、瞬間乾燥粉碎法で調製した場合でも血中クルクミン濃度は対照群との間に差は認められなかった。

第3章では、近年フルクトースの過剰摂取が原因の一つとされるメタボリックシンドロームを予防することを目的として、フルクトースの吸収に及ぼすウコンのヘキササン抽出物投与の影響について検討した。その結果、ヘキササンで抽出されたウコンの精油成分は、大豆油およびメチルセルロース中に懸濁したものを事前に投与してもフルクトースの吸収を抑制しないことが明かとなった。

第4章において、近年、ウコン精油中のターメロンなどのセスキテルペン類が、抗コレステロール、消化促進作用、抗炎症作用、胆汁分泌促進作用を示すことが知られており、その一つであるビスサクロンはアルコール性肝障害や二日酔いに対する効果が報告されている。これらのことに着目し、メタボリックシンドロームが原因となる NASH に対する効果を期待して、独自に設計した NASH 誘導飼料を食餌誘導性 NASH モデルラット SHRSP5/Dmcr に与え、肝脂肪化と肝線維化に及ぼすウコン精油成分の影響について検討した。その結果、ヘキササン画分およびビスサクロン画分において肝臓の脂肪化および線維化を抑制させることを見出した。さらにビスサクロン画分については、血圧上昇抑制作用があることを初めて明らかにした。また、正常ラットである SD 系ラットに対して本飼料を給餌した場合にも、PCTL 群のラットは NASH 様の肝脂肪化と肝線維化の進行が見られたが、ウコンのヘキササン抽出物を投与した群では肝疾患の抑制傾向が強く認められた。

第5章では、クルクミン含有量を測定は、日本薬局法では HPLC 法となっているが、より簡便な方法として分光光度計を用いた吸光度法によるクルクミン総量の測定方法を検討した。その結果、HPLC 法と分光光度計による吸光度法との間に高い正の相関関係が認められたことから、ウコン中のクルクミン含量測定には廉価で簡便な分光光度計による吸光度法が利用可能であることが示唆された。

以上のことから、本研究では、ウコンの精油成分には脂質代謝異常に起因する NASH の進行を抑制するという新たな知見が得られ、さらに高品質なウコンの生産地での選別方法を確立したことによりウコンの付加価値を高めることができた。このことは、持続可能な開発目標 (SDGs) の目標である「1. 貧困をなくそう。2. 飢餓をゼロに。3. すべての人に健康と福祉を。17. パートナーシップで目標を達成しよう。」に通じる意義のある研究であると確信する。

第7章 要旨

飽食の時代を迎え、先進国だけでなく世界中で肥満が最も重大な健康問題となっている。近年、日本においても食の欧米化やライフスタイルの変化により肥満、糖尿病、高血圧症などの生活習慣病患者が増加している。そのため、飲酒以外の生活習慣病が原因で発症する非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) が 21 世紀において、もっとも一般的な肝疾患になりつつある。

ウコンは、ショウガ科ウコン属の植物で根茎を香辛料、食品や繊維類の染料として古くから利用されてきた他に、生薬として様々な疾病の治療薬として用いられてきた。南・東南アジアでの栽培が盛んであり重要な輸出品目である。しかし、これらの栽培地域の多くは後発開発途上国 (LDCs) であり先進国に比べて生活水準は低い現状にある。LDCs の生活水準向上の手段としての外貨獲得のためには、高品質の農産物などを生産し、輸出する必要がある。ウコンもその一つと言える。そのために、高品質のウコンを栽培し、生薬として高価に売買されるものと一般使用品に選別する必要がある。ウコンの主要な機能性成分であるクルクミンは、その有効性について報告が数多くされている。一方、近年ではポリフェノール類の他に精油成分としてターメロンやビスクロンなどのセスキテルペン類が数多く含まれていることが発見されているが、これらの有効性に関する報告はまだ少ない。

本研究では、①ウコン中の精油成分がメタボリックシンドロームの改善に対する有効性の解明、②高品質のウコンの選別を生産地で簡便迅速に行うためのクルクミンの簡易定量法の開発、によりウコンの付加価値を高めることを主な目的として実験を行い、以下のような結果を得た。

- ① 食餌誘導性の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルを作製する独自の飼料組成を設計し、NASH モデルラットである SHRSP5/Dmcr と正常の SD 系ラットに、ウコンの各種抽出画分およびウコン末を添加した飼料で 9 ~12 週間飼育し、肝脂肪化および線維化に対する各画分の効果を検討した。その結果、ヘキササン画分およびビスクロン画分には、脂質代謝を亢進することで肝脂肪化を抑制し、NASH の病変の一つとされる肝線維化を抑制することを明らかにした。さらに、ビスクロン画分は血圧上昇抑制作用を有することを初めて明らかにした。
- ② ウコン中クルクミン量を分光光度計により吸光度法で測定した結果は、日本薬局方で定められた HPLC 法との間に良好な正の相関性が認められ、廉価で簡易な測定法となることが示唆された。

本研究結果は、新たなウコンの有効利用法を明らかにし、高品質なウコンの選別を現地で可能にしたものであり、LDCs に当たるウコンの主要生産国の経済発展に寄与する一助につながるものと考えられる。

Summary

In this study, the authors conducted various studies on the effective use of turmeric for the improvement of metabolic syndrome in order to add high value to turmeric. First, we focused on the effect of turmeric on improving liver function, and examined the effect of turmeric on metabolic syndrome, since the number of patients with metabolic syndrome has been increasing in Japan in recent years. Furthermore, in order to promote economic development in the least developed regions of South and Southeast Asia, where turmeric is produced, and to improve the living standards of the inhabitants of mountainous villages in these regions, we attempted to develop a simple and rapid method for measuring curcumin content, the standard for turmeric quality, in the field as a method to improve the quality of turmeric grown in these regions.

In Chapter 2, we examined processing methods to improve the absorption of curcumin, the major functional component of turmeric. Turmeric powder, which was ground to a fine powder by the instant drying and pulverization method, was administered to rats, and time-related changes of curcumin concentration in blood were examined. The results showed that turmeric powder processed by the instant drying and pulverization method did not improve the absorption rate of curcumin.

In Chapter 3, excessive fructose intake is considered to be one of the causes of metabolic syndrome. Therefore, the effect of administration of the hexane-extracted fraction of turmeric on the absorption of fructose was investigated. As result, the essential oil component of turmeric did not inhibit fructose absorption.

In Chapter 4, curcumin, a component of turmeric, has various functions such as antioxidant, anti-Alzheimer's, anti-inflammatory, anti-tumor, and hypoglycemic effects, and has long been used as an herbal medicine. In recent years, turmeric essential oil contains many sesquiterpenes such as turmerone, which are known to have anti-cholesterolemia, digestive, anti-inflammatory, and bile secretion-promoting effects. One of sesquiterpenes, bisacurone, has been reported to be effective against alcoholic liver disorders and hangovers. Based on these findings, rats were fed with NASH-inducing diet originally designed diets, and we investigated the effects of turmeric essential oil components on hepatic lipidification and fibrosis of NASH, which is caused by metabolic syndrome. As a result, the hexane and bisacurone fractions were found inhibited liver lipidification and fibrosis. Furthermore, the authors found for the first time that the bisacurone fraction had an inhibitory effect on blood pressure elevation.

In Chapter 5, we examined a method to measure the total amount of curcumin by spectrophotometry as a simpler method although the Japanese Pharmacopoeia uses the HPLC method to measure curcumin content. As a result, a high positive correlation was observed between the HPLC method and the spectrophotometric method. It was

suggested that the inexpensive and simple spectrophotometric method can be used to measure the curcumin content in turmeric.

In conclusion, the present study provides new knowledge that essential oil components of turmeric not only inhibit the progression of NASH caused by abnormal lipid metabolism, but also find to have an inhibitory effect on blood pressure elevation on SHRSP5/Dmcr, and furthermore, the establishment of a selection method for high-quality turmeric in producing areas has increased the added value of turmeric. This is significant research that is in line with the Sustainable Development Goals (SDGs) of "1. No poverty; 2. Zero hunger; 3. Good health and well-being ; 17. Partnerships for Goals." convinced that this research is significant to the goals of the SDGs (SDGs).

参考文献

1. 金 守良, 金 啓二: わが国における NAFLD/NASH の展望 *YAKUGAKU ZASSHI*, 136(4), 565-572 (2016)
2. NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2020, 日本消化器学会・日本肝臓学会
3. DAY, C.P., JAMES, O.F. : Steatohepatitis: A tale of two “hits ?”, *Gastroenterology*, 114 ,842-845 (1998)
4. TAKAKI, A., KAWAI, D. and YAMAMOTO, K.: Multiple Hits, Including Oxidative Stress, as Pathogenesis and Treatment Target in Non-Alcoholic Steatohepatitis(NASH), *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 20704-20728 (2013)
5. HIMESH, S. et al.: Qualitative and Quantitative Profile of Curcumin from Ethanolic Extract of *Curcuma longa*, *IRJP.*, 2, 180-184 (2011)
6. TRUJILLO, J., CHIRINO, Y.I., MOLIANA-JIJÓN, E., ANDÉRICA-ROMERO, A. C., TAPIA, E., PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.: Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings, *Redox Biolory*, 1, 448-456 (2013)
7. PULIDO-MORAN, M., MORENO-FERNANDES, J., RAMIREZ-TORTOSA, C., and RAMIREZ-TORTOSA, M.: Curcumin and Health, *Moleules*, 21, 264 (2016)
8. CHAINOGLU, E. and HADJIPAVLOU-LITINA, D.: Curcumin in Health and Disease: Alzheimer’s Disease and Curcumin Analogues, Derivatives and Hybrids, *Int. J. Med. Sci.*, 21,1975 (2020)
9. GIORDANO, A. and TOMMONARO, G.: Curcumin and Cancer, *Nutrients*, 11, 2376 (2019)
10. GUO, Y.-Q., WU, G.-X., PENG, C., FAN, Y.-Q., LI, L., LIU, F and XIONG, L.: New Bisabolane-Type Sesquiterpenoids from *Curcuma longa* and Their Anti-Atherosclerotic Activity, *Molecules*, 28, 2704 (2023)
11. WANG, Y., WANG, L., ZHU, X., WANG, D., LI, X.: Choleric Activity of Turmeric and its Active Ingredients, *J. Food Sci.*, 81, 1800-1806 (2016)
12. UEHARA, S., YASUDA, I., TAKEYA, K. and ITOKAWA, H.: New Bisabolane Sesquiterpenoides from the Rhizomes of *Curcuma Xanthorrhiza* (Zingiberaceae), *Chem. Pharm. Bull.* , 37, 237-240 (1989)
13. MEGUMI, C., MUROYAMA, K., SASAKO, H. and TSUGE, N.: Preventive Activity of ar-Turmerone and Bisacurone Isolated from Turmeric Extract Against Ethanol-induced Hepatocyte Injury, *Food Science and Technology Research*, 23, 275-281 (2017)
14. 宮澤 大樹, 張替 敬裕, 仲川 清隆: クルクミンの吸収代謝と生理作用発現の関係性, 日本農芸化学会, 化学と生物, Vol.54, No.7 (2016)
15. 高橋 誠: 食品素材の「ナノサイズ」カプセル化技術の開発, オレオサイエンス, 第 8 巻, 第 4 号 (2008)
16. MALIK, V. S., HU, F.B., :Fructose and Cardiometabolic Health, *JACC.*, 66(4)

(2015)

17. KITAMORI, K., et al. : Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr, *Environ Health Prev. Med.*, 17, 173-182 (2012)
18. ASHIDA H., TIAN X., KITAKAZE T, and YAMASHITA Y. : Bisacurone suppresses hepatic lipid accumulation through inhibiting lipogenesis and promoting lipolysis, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 67,43-52,(2020)
19. FOLCH J, LEES M, SLOANE S. GH. : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J Biol Chem.*, 226, 497-509 (1957)
20. OHKAWA, H., OHISHI, N., and YAGI, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351-358 (1979)
21. UECHI, S., FUKUSHIGE, K., OGIURA, G., KAWASHIMA, Y., SUNAGAWA, K., TAKO, M., HONGO, F.: Effect of oral administration of new fermented preparations containing turmeric on serum and liver lipid concentrations in rats feeding high fat and high cholesterol, *The Science Bulletin of the Faculty of agriculture. University of the Ryukyus*, 50, 165-170 (2003)
22. HAYASHI A.: Effect on Lipid Metabolism by Turmeric(*Curcuma longa* Linn) Supplementation in High Fructose-Diet-fed Rats, *Bulletin of Tokyo Kasei Daigaku 2, Natural science*, 54 (2), 13-18 (2014)
23. LING J., WEU B., JI H., LV G., LI S.: Anti-hyperlipidaemic and antioxidant effects of turmeric oil in hyperlipidaemic rats, *Food chem*, 130, 229-235 (2012)
24. LI, H.B., XU, M.L., DU, M-M., YU, X-J., BAI, J., XIA, W-J., DAI, Z-M., LI, C-X., LI, Y., SU, Q., WANG, X-M., DONG, Y-Y., KANG, Y-M.: Curcumin ameliorates hypertension via gut-brain communication in spontaneously hypertensive rat, *Toxicology Appl. Pharmacol.*, 429, (2021)
25. SOMPINIT, K., LERSIRIPONG, S., REAMTONG, O., PATTARAYINGSAKUL, W., PATIKARNMONTHON, N., PANBANGRED, W.: In vitro study on novel bioactive peptides with antioxidant and antihypertensive properties from edible rhizomes, *Food Science and Technology*, 134 (2020)
26. SAKAIDA I. et al.: Herbal medicine Inchin-ko-to (TJ-135) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet, *J Hepatol*, 38 (6), 762-6769 (2003)
27. FANG T., WANG H., PAN X., LITTLE P.J., XU S., and WENG J.: Mouse models of nonalcoholic fatty disease (NAFLD): pathomechanisms and pharmacotherapies, *Int. J Biol. Sci.*, 18(15), 5681-5697 (2022)

謝辞

学位論文を作成するにあたり、ご指導いただきました東京農業大学大学院
農学研究科 環境共生学専攻 古庄 律教授、国際食農科学専攻 山内 淳教
授、谷岡 由梨准教授、認定特定非営利活動法人 天然薬用資源開発機構 理
事長 山原 條二先生に厚くお礼申し上げます。

また、LC/MS/MS による測定を担っていただきました古庄 紀子氏に心か
らお礼申し上げます。

最後に、研究にご協力いただきました研究室の大学院生、学部 4 年生の皆様
に深く感謝いたします。