

2022 年度

神戸女学院大学審査、学位論文(博士)

人間科学研究科人間科学専攻

酒粕の機能性に関する研究

GH1891 本野 由季

主査：高岡 素子 神戸女学院大学教授

副査：張野 宏也 神戸女学院大学教授

渡辺 敏郎 園田学園女子大学教授

目次

緒言	1
第1章. マウス 3T3-L1 細胞における酒粕素材抽出液の脂肪蓄積に対する影響	4
緒言	
1. 材料および方法	5
1-1. 酒粕素材の成分分析および酒粕素材抽出液の成分分析	
1-1-1. 材料	
1-1-2. 材料の成分分析	
(1) Somogyi-Nelson 法による全糖量の定量	
(2) Somogyi-Nelson 法による直糖量の定量	
(3) ケルダール法による粗タンパク質量の測定	
(4) 酵素-重量法による食物繊維量の測定	
(5) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたオルトフタルアルデヒド蛍光法による遊離アミノ酸の測定	
1-1-3. 酒粕素材抽出液の成分分析	
(1) 酒粕素材抽出液の作製	
(2) 固形分量の測定	
(3) Somogyi-Nelson 法による全糖量の定量	
(4) ローリー法によるタンパク質量の定量	
1-2. マウス 3T3-L1 細胞の培養	
1-2-1. マウス 3T3-L1 細胞の培養	
1-2-2. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較	

1-3. 統計処理	
2. 結果	11
2-1. 酒粕素材の成分分析および酒粕素材抽出液の成分分析	
2-1-1. 材料の成分分析	
(1)酒粕素材の成分分析の結果	
(2)高速液体クロマトグラフィーを用いたオルトフタルアルデヒド蛍光法による遊離アミノ酸の測定	
2-1-2. 酒粕素材抽出液の成分分析	
2-2. マウス 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に対する酒粕素材抽出液の影響	
2-2-1. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較	
3. 考察	14
3-1. 酒粕素材の成分分析および酒粕素材抽出液の成分分析	
3-2. マウス 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に対する酒粕素材抽出液の影響	
3-2-1. マウス 3T3-L1 細胞における脂肪蓄積	
第 2 章. マウス 3T3-L1 細胞における酒粕難消化成分の影響	17
緒言	
1. 方法	19
1-1. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1)による細胞生存率の測定	
1-2. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定	
1-3. 酒粕難消化成分抽出液の分画	

1-4. メタボローム解析による代謝物の解析	
1-4-1. メタボローム解析による代謝物の解析	
1-4-2. 細胞培養培地中の遊離アミノ酸の定量	
1-5. 脂肪蓄積関連遺伝子の発現の解析および LPL 活性の測定	
1-5-1. Real-time PCR による遺伝子発現の解析	
1-5-2. lipoprotein lipase (LPL)活性の測定	
1-6.統計処理	
2. 結果	23
2-1. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1)による細胞生存率の測定	
2-2. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定	
2-3. 酒粕難消化成分抽出液の分画	
2-4. メタボローム解析による代謝物の解析	
2-4-1. メタボローム解析による代謝物の解析	
2-4-2. 細胞培養培地中の遊離アミノ酸の定量	
2-5. 脂肪蓄積関連遺伝子の発現の解析および lipoprotein lipase(LPL)活 性の測定	
2-5-1. Real-time PCR による遺伝子発現の解析	
2-5-2. lipoprotein lipase(LPL)活性の測定	
3. 考察	26
3-1. マウス 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に対する酒粕難消化成分素材の影響	
3-1-1. マウス 3T3-L1 細胞における脂肪蓄積率の抑制	
3-1-2. メタボローム解析による代謝物の解析	

3-2-3. 脂肪蓄積関連遺伝子の発現の解析および LPL 活性の測定

第3章. マウス 3T3-L1細胞の脂肪蓄積に対するコウジ酸および酒粕の
影響 30

緒言

1. 方法 31

1-1. マウス 3T3-L1細胞の培養

1-2. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

1-3. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1)による細胞生存率の測定

1-4. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定

1-5. Real-time PCR による遺伝子発現の解析

1-6.統計処理

2. 結果 33

2-1. マウス 3T3-L1細胞に対するコウジ酸の影響

2-1-1. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

2-1-2. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1)による細胞生存率の測定

2-1-3. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定

2-1-4. Real-time PCR による遺伝子発現の解析

2-2. マウス 3T3-L1細胞に対する酒粕の影響

2-2-1. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

2-2-2. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1)による細胞生存率の測定

2-2-3. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定

2-2-4. Real-time PCR による遺伝子発現の解析

3. 考察 36

3-1. マウス 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に対するコウジ酸および酒粕の影響

第 4 章. 酒粕素材の美容効果 39

緒言

1. 材料および方法 40

1-1. 正常ヒト皮膚繊維芽細胞の培養

1-1-1. 材料

1-1-2. 正常ヒト皮膚繊維芽細胞の培養

1-1-3. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1)による細胞増殖率の測定

1-2. チロシナーゼ活性の測定

1-2-1. 材料

1-2-2. チロシナーゼ活性の測定

1-3. 統計処理

2. 結果 43

2-1. 正常ヒト皮膚繊維芽細胞における細胞増殖率の測定

2-2. チロシナーゼ活性の測定

3. 考察 44

3-1. 正常ヒト皮膚繊維芽細胞における細胞増殖率の測定

3-2. チロシナーゼ活性の測定

総括	47
謝辞	50
参考文献	50
図表	59

緒言

我が国の平均寿命は1980年代に世界第1位となり、2021年時点で男性は81.47歳、女性は87.57歳と、現在に至るまで常に上位を維持しており、健康長寿国として知られている [1]。日本が長寿国となった要因として、医学の進歩や生活水準の向上の他に、日本独自の食文化、すなわち日本食の影響が大きいと考えられている。日本食は欧米食と比べ、低脂肪、低カロリーであり、植物性食品や魚介類の構成量が多いと言われている。さらに、発酵食品や緑茶など、健康に有益であると考えられている食品を習慣的に食していることも特徴の一つである [2] [3]。

しかし、近年我が国では食の欧米化が進み、主要な食材が植物性食品から動物性食品へと変化したことにより、乳製品や肉類などの動物性タンパク質や油脂類摂取が増加し、肥満者が増加傾向にある。農林水産省の令和2年度食料需給表によると、国民1人の1年当たりの供給純食料(1人あたりの年間消費量に該当)を1975年と2020年で比較したところ、野菜の消費量は110.7kgから88.5kgに、魚介類の消費量は34.9kgから23.4kgと減少しているのに対し、肉類は17.9kgから33.5kg、牛乳・乳製品は53.6kgから94.3kg、油脂類は10.9kgから14.4kgと増加傾向にある [4]。加えて、核家族化の進行や共働き家庭の増加を背景に外食や中食が増加しており [5]、このような食生活習慣の変化も肥満者増加の要因となっている。

肥満は糖尿病、高血圧、高脂血症などの症状として複合的に見られるメタボリックシンドロームの原因であることから、多くの国々において問題視されている [6]。肥満度の判定には、国際的な標準指標である BMI(Body Mass Index) : 体重(kg)/身長(m)²が用いられており、統計上肥満との関連が強い糖尿病・高血圧・高脂血症の罹患が最も低い値とされている。また、体脂肪率に関

しては、男性で15～20%、女性で20～25%で標準、男性25%以上、女性30%以上で肥満であると判定される。

厚生労働省によると、日本国内における20歳以上の男女における肥満者の割合は、男性は1976年で15.2%であったのに対し、2020年では31.3%と増加傾向にある。また女性の肥満者の割合は1976年で21.1%であったのに対し、2020年では20.6%とわずかに減少したが、若年女性ではBMIは標準値でも、筋肉や骨と比較して脂肪が多い、つまり体脂肪率が高い状態（隠れ肥満）が多いことが示唆されている [7]。

一方、脂肪細胞とは細胞質に脂肪滴と呼ばれる脂肪の塊を有する細胞で、脂肪を貯える役割を持つ。脂肪細胞はアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質を分泌し、糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化を引き起こすことが認められている [8]。エネルギーの過剰摂取に伴い大型化した脂肪細胞が増加すると、脂肪細胞の機能不全に陥り、健康にマイナスの影響を与えるアディポサイトカインの分泌が亢進する。アディポサイトカインの1つであるアンジオテンシンⅡは血圧を上げる作用を持ち、高血圧症の原因となる。また、

TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) はインスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病の発症につながり、PAI-1(Plasminogen Activator Inhibitor type 1) は血液を固めて血栓を作りやすくすることが明らかにされており [9]、これらのアディポサイトカインにより生活習慣病と呼ばれる疾患を引き起こすことが認められ、脂肪細胞の肥大は生活習慣病の発症と密接な関係が深いとされている。我が国においても肥満者が増加傾向にあり、生活習慣病患者数の増加は現代の重要な社会問題となっている。

このような肥満による健康被害問題を解決する方法として、発酵食品が注目を集めている。発酵食品とは微生物を利用して食材をより有用な形に変化さ

せたもので、日本に数多く存在し、代表的な発酵手法である清酒醸造によって得られる副産物である酒粕も発酵食品の1つである。

酒粕とは、日本酒の醪（もろみ）を圧搾した後に残る固形物のことを指す。醪とは日本酒を造る際に、酒母という酒の胚になるものに、麴、蒸米、仕込み水を混ぜて発酵させたものである。酒粕は我が国において漬物、粕汁や甘酒として食され、長い食経験を持つ。「酒は百薬の長」とも言われ、清酒はヒトの健康に対し何らかのプラスの影響を及ぼしていると考えられ、さらに清酒製造の副産物に関しても同様な健康効果（機能性）を有していると考えられる。

これまで報告されている酒粕の機能性は、ラットを用いた研究においてコレステロール上昇抑制効果 [10] [11]、血圧降下作用 [12] [13]、マウスを用いた研究において肝障害抑制効果 [14]、ヒトの腸内環境の改善 [15]など、様々な効果が報告されている。さらに酒粕には食物繊維やレジスタントプロテインなどが豊富に含まれており、内臓脂肪の低下 [16]、脂質排泄 [16]などの肥満に対する抑制効果も認められている。

このように、酒粕はこれまで報告された以外でもまだ多くの機能性を持つ可能性が秘められていると考えられ、酒粕に関する研究は未だ発展の途上であると考えられる。よって、本研究では酒粕の新たな機能性を見出し、その詳細なメカニズムについて解析することを目的として研究を実施した。

本論文では、第 1-3 章において酒粕素材の脂肪細胞の脂肪蓄積効果の検証、4 章では酒粕素材の化粧品素材としての有効性の検証を目的とした。

第1章．マウス 3T3-L1 細胞における酒粕素材抽出液の脂肪蓄積に対する影響 緒言

第1章では酒粕素材の肥満抑制効果について検証するために、マウス由来の前駆脂肪細胞3T3-L1細胞を用いて、酒粕素材抽出液の前駆脂肪細胞3T3-L1細胞の分化および脂肪蓄積に対する影響について解析した。

本研究において使用した酒粕素材の試料は20℃、60℃、100℃にて抽出を行った。20℃での抽出は蒸留水添加、60℃での抽出は60℃に温めた蒸留水を添加した後、温度を維持しながら抽出を行った。60℃はアミノ酸が最も抽出され易い温度であるとされている。酒粕には豊富なアミノ酸が含まれており、アミノ酸は脂肪細胞の分化および脂肪蓄積に関与している可能性が示唆されているため60℃での抽出を行った。また、100℃での抽出は蒸留水を添加し、オートクレーブで高温抽出を行った。20℃および60℃よりも高温で抽出を行うことで、より抽出され易い成分があるのではと考え、100℃での抽出を行った。これら抽出試料を用いて成分分析を行うことで、脂肪細胞の分化および脂肪蓄積抑制に関与する成分を検討するため、成分分析を行った。

一方、3T3-L1細胞は脂肪細胞へ分化誘導されることで細胞内に脂肪滴を蓄積する特徴を有することから、脂質代謝の細胞モデル系として脂質代謝研究などに広く用いられている。高グルコース含有の培地中において、Dexamethasone(DEX) および 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) で48時間刺激し、インスリン存在下で培養することによって細胞内に脂肪滴を有することができるようになる [17]。3T3-L1細胞を用いた先行研究においては、ブルーベリー果皮抽出物における脂肪細胞の分化および脂肪蓄積抑制効果 [18]やミカン科樹木のキハダにおける脂肪蓄積抑制効果 [19]が報告されている。また、発酵食品に関しては、緑茶に含まれる Epigallocatechin gallate(EGCG)および

(-)-Epigallocatechin 3-(3'-O-methyl)gallate(EGCG3" Me)による脂肪蓄積抑制効果 [20]、発酵キムチにおける脂肪蓄積抑制効果 [21]、タイのタウジャオ（みそ様発酵食品）に含まれる1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-1 α -carboxylic acid(MCTA)の分化抑制効果 [22] など、3T3-L1細胞はさまざまな食品成分の脂肪蓄積または抑制効果の検証などに関する研究において活用されている。

よって本研究では、3T3-L1細胞を用いて、酒粕素材から抽出した試料の脂肪細胞における脂肪細胞分化および脂肪蓄積に与える影響について検討した。

1. 材料および方法

1-1. 酒粕素材の成分分析および酒粕素材抽出液の成分分析

1-1-1 . 材料

ヤエガキ発酵技研株式会社様より分与いただいた、以下3種類の酒粕素材を粉末化したものを材料として供試した。

- ・酒粕を凍結乾燥し粉末化した酒粕パウダー（以下、酒粕）
- ・酒粕を再度発酵して得られたエキスから不溶物を抽出し、粉末化した酒粕難消化成分パウダー（以下、難消化成分）
- ・酒粕を再度発酵して得られたエキスを粉末化した酒粕発酵エキス末（以下、発酵エキス末）

1-1-2 . 材料の成分分析

(1)Somogyi-Nelson 法による全糖量の定量

酒粕、難消化成分、発酵エキス末をそれぞれ直径 25mm、長さ 200mm の試験管に 1.0g 精秤し、蒸留水 20ml と 25%HCl(和光純薬工業株式会社) 2ml を加えて十分に攪拌後、シリコン栓 (25mm×21mm×29mm) の中心に穴を空けてガ

ラス管（外径 7mm）を通した冷却管を試験管に取り付け、沸騰湯浴中で 2 時間加熱した。加水分解終了後、冷却管を取り付けたまま流水で冷却した。加水分解後に得られた分解液全量を 50ml メスフラスコに写し、メスアップ後、No.2 のろ紙 (ADVANTEC) でろ過し、全糖量の定量のサンプルとした。

グルコースを 5mg/ml となるよう蒸留水で定量し、糖原液とした。糖原液を蒸留水にて調製し、検量線作成用標準溶液とした。試験管にサンプルまたは検量線作成用標準溶液を 0.25ml 入れ、ソモギー試薬（和光純薬工業株式会社）を 0.25ml 加え、十分に攪拌した後、試験管にアルミホイルでキャップをし、沸騰湯浴中で 20 分間加熱した。加熱後、流水で冷却し、ネルソン試薬（和光純薬工業株式会社）0.5ml を加えてよく攪拌し、室温で 15 分間反応させた。反応後、蒸留水を 4ml 加えて攪拌し、分光光度計 (GeneQuant 100 : GE Healthcare 製) により波長 500nm にて吸光度を測定した。検量線作成用標準溶液から検量線を作成し、サンプルの全糖濃度を求めた。

(2) Somogyi-Nelson 法による直糖量の定量

酒粕、難消化成分、発酵エキス末をそれぞれビオラモ遠沈管 (VIO-50R : AS ONE 製) に入れ、9 倍量の水温 20℃ の蒸留水を加えて十分に攪拌し、ロータリーミキサー (NRC-30D : NISSIN) にて 30 分間抽出した後、遠心分離機 (LC-120 : TOMY 製) にて遠心処理 (2500rpm、10 分) を行い、上澄みを直糖量の定量のサンプルとした。直糖量の定量は、(1) Somogyi-Nelson 法による全糖量の定量と同様の方法で行った。

(3) ケルダール法による粗タンパク質量の測定

酒粕、難消化成分をそれぞれビオラモ遠沈管に入れ、そこに 9 倍量の水温

20℃の蒸留水を加えて十分に攪拌し、ロータリーミキサーにて30分間抽出した後、遠心処理(2500rpm、10分)を行い、上澄みを粗タンパク質の定量のサンプルとした。

サンプルにケルダール用分解促進剤、濃硫酸および過酸化水素水を加え、420℃で1時間加熱処理した。処理後のサンプルをケルダール分析装置(Kjeltec 2300 : フォス・ジャパン株式会社製)に供し、得られた窒素含量に係数6.25を乗じたものを粗タンパク質量とした。

(4) 酵素 - 重量法による食物繊維量の測定

酒粕、難消化成分のそれぞれビオラモ遠沈管に入れ、そこに9倍量の水、20℃の蒸留水を加えて十分に攪拌し、ロータリーミキサーにて30分間抽出した後、遠心分離機で遠心処理(2500rpm、10分)を行い、上澄みを食物繊維定量のサンプルとした。

サンプルを0.08Mリン酸緩衝液(pH6.0)に懸濁し、 α -アミラーゼ(ターマミル : Novo Nordisk)を加え沸騰水中で30分間反応した。反応後、pH7.5に調整しプロテアーゼ(プロテアーゼP-5380 : Sigma)を添加し、60℃で30分反応させた。反応後、pH4.3に調整し、アミログルコシダーゼ(アミログルコシダーゼA-9913 : Sigma製)を添加し60℃で30分間反応させた。次に酵素処理した液の4倍量の95%エタノールを加え、1時間静置した後、吸引濾過し、さらにエタノールおよびアセトンで洗浄した。残渣を回収し、105℃で一晩乾燥させた後、重量を測定した。残渣中の粗タンパク質および灰分を測定し、残渣重量より両者を減じたものを食物繊維とした。

(5) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたオルトフタルアルデヒド蛍光法による遊離アミノ酸の測定

酒粕、難消化成分、発酵エキス末をビオラモ遠沈管に入れ、そこに9倍量の水温20℃、60℃の蒸留水を添加して十分に攪拌し、ロータリーミキサーにて30分間抽出(10分毎にボルテックスミキサーにより攪拌)した後、遠心分離機にて遠心処理(2500rpm、10分)を行い、上澄みを採取した。また、オートクレーブ(BS-325：TOMY製)を用い100℃で20分間処理した後、遠心分離機にて遠心処理(2500rpm、10分)を行い、上澄みを採取しサンプルとした。これらの上澄み液に9倍量の5%スルホサリチル酸(和光純薬工業株式会社)を加えて十分に攪拌した後、0.22μmのフィルター付きエッペン(Millipore)に入れ、遠心分離機(Centrifuge 5417R：Eppendorf AG製)で遠心処理(10000rpm、4℃、5分)を行い、ろ液を遊離アミノ酸分析用のサンプルとした。高速液体クロマトグラフィー(GL-7400：ジーエルサイエンス株式会社)を用いて、オルトフタルアルデヒド蛍光法により解析した。

1-1-3 . 酒粕素材抽出液の成分分析

(1) 酒粕素材抽出液の作製

酒粕、難消化成分、発酵エキス末をそれぞれビオラモ遠沈管に入れ、そこに9倍量の水温20℃、60℃の蒸留水を添加して十分に攪拌し、ロータリーミキサーにて30分間抽出(10分毎にボルテックスミキサーにより攪拌)した後、遠心分離機にて遠心処理(2500rpm、10分)を行い、上澄みを採取し20℃抽出および60℃抽出サンプルとした。また、オートクレーブ(BS-325：TOMY製)を用い100℃で20分間処理した後、遠心分離機にて遠心処理(2500rpm、10分)を行い、上澄みを採取し100℃抽出サンプルとした。

(2) 固形分量の測定

各酒粕素材抽出液を凍結乾燥し、得た乾燥物を固形物とした。

(3) Somogyi-Nelson 法による全糖量の定量

全糖量の定量は、1-1-2 . 材料の成分分析 (1) Somogyi-Nelson 法による全糖量の定量と同様の方法で行った。

(4) ローリー法によるタンパク質量の定量

サンプル 1ml を試験管にとり、アルカリ性銅液（和光純薬工業株式会社）を 5ml 加えて、ボルテックスミキサーを用いてよく混合し、室温で10分以上放置した。放置後、希釈フェノール試薬を 0.5ml 加え、直ちにボルテックスミキサーで混合し、室温で30分以上放置して反応させた。牛血清アルブミン（和光純薬工業株式会社）を蒸留水と混合して検量線作成用標準液を作製し、サンプルと同様の条件で反応させた。0 µg/ml の反応液をブランクとし、試料および検量線作成用標準液を添加した反応液を分光光度計 (GeneQuant 100 : GE Healthcare)、波長 750nm で吸光度を測定した。検量線作成用標準液から検量線を作成し、サンプルのタンパク質含量を求めた。

1-2. マウス 3T3-L1 細胞の培養

1-2-1. マウス 3T3-L1 細胞の培養

マウス繊維芽細胞 3T3-L1 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用いた。細胞は 10% Fetal Bovine Serum (以下 FBS) (GIBCO) と 1% Antibiotics (GIBCO) (ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン B を含む) を含む Dulbecco ' s Modified Eagle ' s Medium-high glucose (以下 DMEM) (Sigma-Aldrich) で培養した。

脂肪細胞への分化誘導は、コンフルエントに達した当日を 0 日目とし、3T3-L1 細胞を 0.5mM 3-isobutyl- 1-methylxanthine (IBMX) (Wako) 、 0.25 μ M

Dexamethasone (DEX) (Wako) 、 10 μ g/ml Insulin (Wako) 、 10%FBS を含む DMEM で培養し、分化誘導した。分化誘導48時間後、5 μ g/ml Insulin、 10%FBS を含む DMEMで培養し、以降48時間毎に培地交換を行い 8 日間培養し、これをコントロールとした。サンプル添加区には分化誘導時培地に各種酒粕素材抽出サンプルを培地に 0.1mg/ml および 1mg/ml となるように添加し、以降48時間毎に同じ組成の培地で培地交換を行い、 8 日間培養した。

1-2-2. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

分化誘導後培養 8 日目の細胞を 10%Phosphate buffered saline (以下 10%PBS) (ナカライテクス) で洗浄した後 10%ホルマリンにて細胞を固定し、 0.3%Oil Red O (和光純薬工業株式会社) にて染色した。染色後、風乾させた後、イソプロピルアルコール (和光純薬工業株式会社) を添加してOil Red Oを溶出させ、マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher SCIENTIFIC) を用いて 560nm で吸光度を測定した。コントロールの細胞の吸光度を脂肪蓄積率 100% とし、各酒粕サンプル添加培養細胞の脂肪蓄積率を算出した。

1-3. 統計処理

全てのデータは平均 \pm 標準偏差で表記し、統計ソフトはエクセル統計 (Ver2.12) を使用した。脂肪細胞における脂肪蓄積率については Dunnett 法による多重比較にて統計処理を行った。なお、 $P < 0.05$ および < 0.01 を有意とした。

2. 結果

2-1. 酒粕素材の成分分析および酒粕素材抽出液の成分分析

2-1-1. 材料の成分分析

(1) 酒粕素材の成分分析の結果

酒粕素材の成分分析結果を表 1 に示した。全糖量については 3 種類の酒粕素材で分析した。その結果、酒粕で 292.3mg/g、難消化成分で 219.1mg/g、発酵エキス末で 267.7mg/g であり、3 種類の材料間で有意な差は認められなかった（表 1）。

酒粕と難消化成分について、直糖量、粗タンパク質量、食物繊維量について成分分析を行い、表 1 に示した。直糖量については、酒粕は 6.6mg/g、難消化成分は 4.3mg/g、の直糖を含んでいることが明らかになった。粗タンパク質については、酒粕で 253.0mg/g、難消化成分で 413.0mg/g であった。また、酒粕は 76.0mg/g、難消化成分は 257.0mg/g の食物繊維を含んでいることが明らかになった。

酒粕素材の成分分析の結果、難消化成分には食物繊維が、発酵エキス末には遊離アミノ酸が豊富に含まれていることが明らかになった。

(2) 高速液体クロマトグラフィーを用いたオルトフタルアルデヒド蛍光法による遊離アミノ酸の測定

遊離アミノ酸総量の結果を表 2 に示した。酒粕 20℃抽出液では 51.4 mg/g、60℃抽出液では 58.4mg/g の遊離アミノ酸が、難消化成分 20℃抽出液では 21.5mg/g、60℃抽出液では 32.9mg/g、100℃抽出液では 26.5mg/g の遊離アミノ酸が含まれていた。また、発酵エキス末 20℃抽出液では 200.2mg/g、60℃抽出液では 193.0mg/g の遊離アミノ酸が含まれ、20℃抽出、60℃抽出の両方におい

て、発酵エキス末が遊離アミノ酸が最も多く含まれていた。

また、各材料の20℃および60℃抽出液の16種類の遊離アミノ酸量の結果について図1、2に示した。難消化成分の100℃抽出液の遊離アミノ酸を測定し、図3に示した。20℃抽出液では、発酵エキス末、酒粕、難消化成分の順で遊離アミノ酸総含量が高かったが、チロシンについては酒粕よりも難消化成分の方に多く含まれていた(図1)。また、60℃抽出液においても、同様な傾向を示した(図2)。さらに、難消化成分100℃抽出液においては、チロシンが最も多く含まれていた(図3)。

2-1-2. 酒粕素材抽出液の成分分析

酒粕素材を20℃、60℃、100℃で抽出した抽出液の成分分析の結果について、酒粕抽出液の結果を表3に、難消化成分抽出液の結果を表4に示した。

酒粕と難消化成分の直糖量、粗タンパク質量、食物繊維量の結果を表3、4に示した。

固形分量については、酒粕において20℃抽出液で5.08g/100ml、60℃抽出液で5.28mg/100ml、100℃抽出液では5.22g/100mlであった。一方、難消化成分では20℃抽出液で0.82g/100ml、60℃抽出液で0.80g/100ml、100℃抽出では1.01g/mgであった。酒粕抽出液においては抽出温度間で顕著な違いはみられなかったが、難消化成分においては20℃抽出液および60℃抽出液よりも、100℃抽出液で溶解量が多かった。

全糖量の定量の結果については、酒粕では20℃抽出液で1.74g/100ml、60℃抽出液で1.85g/100ml、100℃抽出液で1.91g/100ml、難消化成分では20℃抽出液で0.11g/100ml、60℃抽出液で0.13g/100ml、100℃抽出液で0.22g/mgであった。酒粕と難消化成分ともに抽出温度の上昇に伴い、全糖量が増加する傾向が見ら

れた。

タンパク質量は、酒粕では20℃抽出液で0.21g/100ml、60℃抽出液で0.20g/100ml、100℃抽出液で0.16g/100ml、難消化成分では20℃抽出液で0.54g/100ml、60℃抽出液で0.59g/100ml、100℃抽出液で0.66g/mgであった。難消化成分では抽出温度の上昇に伴い、タンパク質量が増加する傾向が見られた。

2-2. マウス 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に対する酒粕素材抽出液の影響

2-2-1. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

コントロールの分化誘導 8 日目の細胞における脂肪蓄積量をコントロールとして、各サンプル添加培養細胞の脂肪蓄積率を算出した。

蓄積率についてはコントロールの脂肪蓄積率を 100% とした。酒粕抽出液添加細胞の脂肪蓄積率は、20℃抽出液0.1mg/ml添加区で 99.2%、1mg/ml 添加区で 97.6%、60℃抽出液0.1mg/ml添加区で 94.4%、1mg/ml 添加区で 89.6%、100℃抽出液0.1mg/ml添加区で101.6%、1mg/ml 添加区では 89.8% であった（図4）。60℃抽出液 1mg/ml 添加区 ($p<0.05$) および 100℃抽出液 1mg/ml 添加区 ($p<0.01$) において、コントロールと比較し脂肪蓄積率の有意な抑制が認められた。

酒粕難消化成分抽出液添加細胞では、20℃抽出液0.1mg/ml添加区で 95.8%、1mg/ml 添加区で 96.1%、60℃抽出液0.1mg/ml添加区で 93.9%、1mg/ml 添加区で 90.7%、100℃抽出液0.1mg/ml添加区で 90.6%、1mg/ml 添加区で 80.9% であった（図5）。60℃抽出液 1mg/ml 添加区 ($p<0.05$)、100℃抽出液0.1mg/ml 添加区 ($p<0.05$) および 1mg/ml 添加区 ($p<0.01$) において、有意な脂肪蓄積率の抑制が認められた。とりわけ、100℃抽出液添加細胞では濃度依存的に脂肪蓄積が抑制され、1mg/ml 添加区では 80.9% と最も脂肪蓄積率が低かった。

発酵エキス末抽出液添加細胞では、20℃抽出液0.1mg/ml添加区で99.4%、1mg/ml添加区で97.8%、60℃抽出液0.1mg/ml添加区で114.6%、1mg/ml添加区で111.0%であり、コントロールと比較し全ての添加区において有意な違いは認められなかった(図6)。

3. 考察

3-1. 酒粕素材の成分分析および酒粕素材抽出液の成分分析

酒粕素材の成分分析の結果、酒粕と比較し、難消化成分は食物繊維含量および粗タンパク質量が多く含まれていることが明らかになった(表1)。難消化成分は、原料の酒粕を再び発酵させ、発酵物の不溶性画分を集めて乾燥させて製造するため、酒粕に含まれる不溶性食物繊維および不溶性タンパク質の大部分は難消化成分に含まれていると考えられる。

酒粕および難消化成分と比較し、発酵エキス末には遊離アミノ酸が多く含まれていることが認められた(表2)。その理由としては、発酵エキス末は酒粕を再び発酵させることで酒粕に含まれているタンパク質やペプチドの分解が起こり、遊離アミノ酸含量が増加したと考えられる。

酒粕素材抽出液の成分分析の結果においては、酒粕抽出液には全糖が、難消化成分抽出液にはタンパク質が多く含まれていることが明らかになった。酒粕素材の成分分析においても、酒粕は難消化成分と比較して全糖含量が高く、難消化成分は酒粕と比較してタンパク質が多く含まれていた(表3、4)。また、全ての成分において、抽出温度により抽出量や抽出成分に違いがみられることが明らかとなった。

3-2. マウス3T3-L1細胞の脂肪蓄積に対する酒粕素材抽出液の影響

3-2-1. マウス3T3-L1細胞における脂肪蓄積

Oil Red O染色による脂肪蓄積率の比較の結果、無添加のコントロールの細胞の脂肪蓄積率を 100% として比較した。その結果、難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加区で 80.9% と最も脂肪蓄積が抑制された（図 5）。難消化成分 100 °C抽出液に脂肪蓄積を抑制する成分が含まれていることが示唆された。

本研究において脂肪細胞における脂肪蓄積が抑制された要因として、2 つの考え方が推測される。1 つは、難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 培養細胞において、脂肪細胞の分化には変化がなく、脂肪の蓄積が抑制されたという考えである。

脂肪細胞において、脂肪合成に関与する酵素として、glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH)が知られている [17]。脂肪細胞における脂肪の合成は、グルコースからジヒドロキシアセトンリン酸を經由し、トリアシルグリセロールが生成される。GPDH はジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール 3-リン酸を生成する際に活性化する酵素である。本研究において、脂肪細胞培養時に難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養することで、GPDH の活性が抑制されたため、脂肪細胞における脂肪蓄積が抑制された可能性がある。

また、脂肪細胞やヒトを対象とした肥満における先行研究では、代謝物の関与が報告されている。肥満・糖尿病モデルマウスの血中代謝物を対象とした先行研究では、PPAR α を活性化した際に、血糖値制御作用がある

lysophosphatidylcholine(LPC)(16:0) と呼ばれる代謝物の血中濃度が特徴的に変動させ、さらにその代謝物 LPC(16:0) はインスリン抵抗性を生じた脂肪細胞の糖取込能を一部回復させることが報告されている [23]。また、ヒトの尿および血漿を対象とした先行研究では、肥満群と標準体重群の代謝物を比較したところ、

アミノ酸代謝プロファイルが異なることが明らかとなっている [24]。このことから、本研究においても、難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞において、細胞内で何かの成分の代謝の変化が脂肪蓄積抑制に関与している可能性が示唆される。

2つ目の考えは、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が抑制されたため、脂肪蓄積率が抑制されたという考えである。脂肪細胞は前駆脂肪細胞から脂肪細胞に分化することで細胞内に脂肪を蓄積することが可能となる。本研究において、前駆脂肪細胞培養時に難消化成分 100 °C抽出液を 1mg/ml 添加培養することで、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が抑制されたため、脂肪蓄積が抑制された可能性が考えられる。

これまで脂肪細胞の分化機構において、マスターレギュレーターとして C/EBPファミリー遺伝子と PPAR γ が同定されており、これらの遺伝子を中心とする転写因子カスケードが想定されている。分化誘導直後の脂肪細胞においては C/EBP β および C/EBP δ が協調して活性化することで、PPAR γ および C/EBP α の発現を誘導する。PPAR γ は、脂肪細胞特有の遺伝子発現を誘導し、さらに脂肪細胞に脂肪蓄積能を獲得させる [25]。C/EBP α はインスリン感受性の獲得 [26]や増殖と分化の切り替えの機能を持つ [27]ことが明らかとなっている。このことから、難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞において、細胞の分化および脂肪蓄積に関与する遺伝子発現が変化したことにより絞細胞の分化が抑制された可能性が考えられる。

以上のことから、第2章では第1章で明らかとなった難消化成分の脂肪蓄積抑制効果のメカニズムを明らかにするために、細胞内の代謝物の調べるためにメタボローム解析を行った。さらに、難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞の遺伝子発現の変化を解析するため、Real-time PCR(Real-time

Polymerase Chain Reaction) を行った。

第2章．マウス 3T3-L1 細胞における酒粕難消化成分の影響

緒言

第2章では、第1章で明らかとなった酒粕難消化成分の脂肪蓄積抑制効果について、そのメカニズムを明らかにするために、メタボローム解析および Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR) を行った。

メタボローム解析とは、オミックス解析の一種であり、生体内に存在する代謝物を対象とした解析方法で、生体内の低分子代謝物を包括的かつ網羅的にとらえる解析方法で、生理・病理機構の発見が可能であることが利点であるとされている [28]。

肥満・糖尿病モデルマウスの血中代謝物を対象とした先行研究では、PPAR α を活性化した際に、血糖値制御作用がある lysophosphatidylcholine(LPC)(16:0) と呼ばれる代謝物の血中濃度が特徴的に変動し、さらにその代謝物 LPC(16:0) はインスリン抵抗性を生じた脂肪細胞の糖取込能を一部回復させることが報告されている [23]。また、ヒトの尿および血漿を対象としたメタボローム解析の先行研究では、肥満群と標準体重群の代謝物を比較したところ、アミノ酸代謝プロファイルが異なることが明らかとなっている [24]。

本研究の第1章では、難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞で脂肪蓄積抑制が認められたことを示した。よって、難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養した3T3-L1細胞内の代謝物を解析し、脂肪細胞分化および脂肪蓄積抑制のメカニズムを代謝物変化の面から明らかにすることを試みた。

一方、Real-time PCRとは定量PCR(Q-PCR)のひとつで、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅を経時的に測定することで、増幅率に基づいてRNAの発現量を定量化する方法である。Real-time PCRでは、PCR増幅産物をリアルタイムでモニタリングするため、指数関数的増幅域で正確な定量を行うことができる。本研究で用いたインターカレーター法は、PCRによって合成された二本鎖DNAに結合し、励起光の照射により蛍光を発することを利用して解析する方法である。この蛍光強度を測定することにより、増幅産物の生成量をモニターできるのが特徴である。

今回実験に用いた3T3-L1脂肪前駆細胞は、前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化することによって、細胞内に脂肪を蓄積することが可能となる。これまで脂肪細胞の分化機構において、マスターレギュレーターとしてC/EBPファミリー遺伝子とPPAR γ が同定されており、これらの遺伝子を中心とする転写因子カスケードが想定されている。分化誘導直後の脂肪細胞においてはC/EBP β およびC/EBP δ が協調して活性化することで、PPAR γ およびC/EBP α の発現を誘導する。PPAR γ は、脂肪細胞特有の遺伝子発現を誘導し、さらに脂肪細胞に脂肪蓄積能を獲得させる[25]。C/EBP α はインスリン感受性の獲得[26]や増殖と分化の切り替えの機能[27]を持つことが明らかとなっている。

本研究の第1章では、難消化成分100℃抽出液1mg/ml添加培養細胞で脂肪蓄積抑制が認められたことを示した。よって、難消化成分100℃抽出液1mg/ml添加培養細胞においてどのような遺伝子の発現が上昇、または減少しているかを明らかにすることで、脂肪細胞分化および脂肪蓄積抑制のメカニズムを遺伝子発現の面から明らかにすることを目的に研究を行った。

以上のことから、第2章ではメタボローム解析による代謝物の解析およびReal-time PCRによる遺伝子発現の解析の2つの視点から、脂肪細胞における

難消化成分の脂肪蓄積抑制効果のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

1. 材料および方法

1-1. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1) による細胞生存率の測定

第1章 1-2-1. の方法で培養した難消化成分 1mg/ml 添加培養細胞（以下、難消化成分添加培養細胞）の分化誘導後 8 日目をサンプルとし、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System(タカラバイオ株式会社)を用いて測定した。培地を取り除き、12well プレーットの 1 番上の列に 10%FBS と 0.25% Antibiotics を含む DMEM 培地を 500 μ l 添加し、これをコントロールとした。残りの well は培地を取り除き、10%FBS と 0.25% Antibiotics を含む DMEM 培地と試薬溶液が 10 : 1 となるように混合したものを 500 μ l 添加した。培地交換後、37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた。反応後、96well プレーットに 100 μ l ずつ分注し、96well マイクロプレートリーダーにより波長 450nm で吸光度を測定した。無添加区の細胞の細胞生存率 100% とし、難消化成分添加培養細胞の細胞生存率を算出した。

1-2. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定

第1章 1-2-1. の方法で培養した難消化成分添加培養細胞を分化誘導後 4 日目および 8 日目に回収し、GPDH 活性測定キット(タカラバイオ株式会社)を用いて測定した。細胞を 10%PBS で 2 回洗浄し、GPDH 活性測定キットに付属の酵素抽出溶液を添加し、セルスクレーパーにて回収した。回収した細胞を 10,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離して脂肪画分を除去し、上清を実験試料とした。

酵素希釈用緩衝液は、使用する量に対して最終濃度が 1mM になるように

2-メルカプトエタノールを添加した。2-メルカプトエタノール 5 μ l を蒸留水 715 μ l に加えて 0.1M を作り、さらに、酵素希釈緩衝液11mlに対し 0.1M 2-メルカプトエタノールを 111 μ l 加えて 100 倍希釈して最終濃度 1mM とした。

反応基質は GPDH 基質全量を11mlの蒸留水で溶解し使用した。あらかじめ基質液を 96well プレートに 100 μ l ずつ分注し、30 $^{\circ}$ C でインキュベートした。

96well プレートに実験試料を 25 μ l 添加して攪拌後、マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, Thermo Fisher SCIENTIFIC)により波長 340nm にて吸光度の減少を測定し、1分当たりの吸光度の変化を求めた。カイネティックス測定プログラムを用い、測定時間15分、測定インターバル60秒(測定16ポイント)、OD リミット -0.5 に設定した。以下の式を用いて、GPDH 活性値を算出した。

$$\text{GPDH 活性 (unit / ml)} = \Delta\text{OD}_{340} \times 0.125\text{ml} \times \text{検体希釈倍率} / 6.22 \times 0.025\text{ml} \times 0.39$$

※ ΔOD_{340} = 測定した吸光度の最も高い値 - 最も低い値

1-3. 酒粕難消化成分抽出液の分画

第1章 1-1-3. (1) 酒粕素材抽出液の作製の方法において各温度で調製した難消化成分抽出液を下記に示す条件で HPLC により分画した。

カラム : CAPCELL PAK C18 UG120, 4.6 x 250mm (SHISEIDO)、カラム温

度 : 40 $^{\circ}$ C

流速 : 1 ml/min、溶媒 : A; 0.05 M TFA, B; アセトニトリル、組成 : 0 min - 10 min; 95% A, 10 min - 30 min; 95% A \rightarrow 40% A、検出 : 280 nm

1-4. メタボローム解析による代謝物の解析

1-4-1. メタボローム解析による代謝物の解析

第1章 1-2-1. の方法で培養した難消化成分添加培養細胞を分化誘導後4日目および8日目に回収し、混合溶媒 (MeOH (富士フイルム和光純薬株式会社) / H₂O/ CHCl₃ (富士フイルム和光純薬株式会社) = 2.5 / 1 / 1) を加えて十分に混合し、超音波処理により細胞を破砕した。内部標準物質として、1.0mg/mlの2-イソプロピルリンゴ酸 (Sigma-Aldrich) およびリビトール (富士フイルム和光純薬株式会社) を6μl 添加し、37℃、1200rpm で30分間振とうインキュベートした後、4℃、16000rpm で3分間遠心処理した。上清を新しいチューブに移し、Milli-Qを添加し、4℃、16000rpm で3分間遠心処理した。上清800μl を新しいチューブに移し、2時間の濃縮遠心処理後、一晩かけて凍結乾燥した。これらの乾燥試料に60μlの20mg/mlメトキシアミン (Sigma-Aldrich) 含有ピリジン溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社) を添加し、20分間超音波処理した。30℃で90分間、1200rpm でインキュベートし、MSTFA (ジューエルサイエンス株式会社) を30μl 添加した後、37℃で30分間インキュベートした。20℃、15000rpm で3分間遠心処理し、上清をサンプルとし、ガスクロマトグラフィ質量分析 (GCMS-TQ8040 : 島津製作所) にて解析を行った。

1-4-2. 細胞培養培地中の遊離アミノ酸の定量

第1章 1-2-1. の方法で培養した難消化成分添加培養細胞の細胞培養培地を分化誘導後4日目と8日目に回収し、各細胞培養培地に対し、9倍量の5%スルホサリチル酸 (和光純薬工業株式会社) を加えてよく攪拌した後、遠心分離機で遠心処理 (2500rpm、10分) した後、そのろ液を0.22μmのフィルター付きエッペンに入れ、遠心分離機で遠心処理 (10000rpm、4℃、10分) を行い、ろ液

を HPLC サンプルとした。第 1 章 1-1-2.(5) HPLC を用いたオルトフタルアルデヒド蛍光法による遊離アミノ酸量の測定と同様の方法により分析した。

1-5. 脂肪蓄積関連遺伝子の発現の解析および LPL 活性の測定

1-5-1. Real-time PCR による遺伝子発現の解析

第 1 章 1-2-1. の方法で培養した難消化成分添加培養細胞を分化誘導後 2 日目、4 日目および 8 日目に回収し、遺伝子発現を Real-time PCR で解析した。回収した細胞から、NucleoSpin RNA® Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて mRNA を抽出した。抽出した mRNA は、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ株式会社) とリアルタイム PCR 用プライマーセット (マウス脂肪細胞用) (コスモバイオ株式会社) を用いて DNA を合成した。遺伝子発現量の変化は $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて解析し、内部コントロールであるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA で補正した。

1-5-2. lipoprotein lipase (LPL) 活性の測定

第 1 章 1-2-1. の方法で培養した難消化成分添加培養細胞を分化誘導後 2 日目、4 日目および 8 日目に回収し、リパーゼ活性測定キット (Cayman Chemical, Michigan, USA) を用いて測定した。LPL 活性は、励起波長 385 nm , 発光波長 515 nm を用い、37°C で 30 秒ごとに 15 分間細胞の蛍光を分析した。LPL 活性の 1 単位は、1 分間に 1 nmol のトリグリセロールを形成する酵素量とした。

1-6. 統計処理

全てのデータは平均 \pm 標準偏差で表記し、統計ソフトはエクセル統計 (Ver2.12) を使用した。脂肪細胞における脂肪蓄積率および GPDH 活性について

は Dunnett 法による多重比較を、メタボローム解析、 Real-time PCR による遺伝子発現の解析および LPL 活性の測定については t 検定にて統計処理を行った。なお、 $P < 0.05$ および < 0.01 を有意とした。

2. 結果

2-1. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1)による細胞生存率の測定

無添加区の分化誘導後 8 日目の細胞をコントロールとして、難消化成分添加培養細胞の細胞生存率を算出した。その結果、コントロール区と比較し、難消化成分添加培養細胞における細胞生存率は 115.1% であり、難消化成分の細胞に対する毒性は認められなかった (図 7)。

2-2. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)活性の測定

難消化成分添加培養細胞における、脂肪細胞の分化誘導後 4 日目と 8 日目の GPDH 活性を測定し、比較結果を図 8 に示した。分化誘導後 4 日目においては、コントロール区と難消化成分添加区の GPDH 活性に有意な違いは見られなかったが、分化誘導後 8 日目 GPDH 活性においてコントロール区と比較し、難消化成分 100 °C 抽出液 1mg/ml 添加区で有意に低くなっており ($p < 0.01$)、難消化成分添加培養細胞の GPDH 活性の低下が認められた。

2-3. 酒粕難消化成分抽出液の分画

最も脂肪蓄積の抑制効果がみられた各温度で抽出した難消化成分抽出液について、HPLC による分画を行い、その結果を図 9 に示した。チャートのピークを比較したところ、20 °C 抽出液と 60 °C 抽出液では顕著な違いは見られなかったが、100 °C 抽出液において、5.849 分、7.334 分、10.036 分で、20 °C 抽出液

と60℃抽出液では見られないピークが観察された。

2-4. メタボローム解析による代謝物の解析

2-4-1. メタボローム解析による代謝物の解析

無添加培養細胞および難消化成分添加培養細胞の分化誘導後4日目と8日目の脂肪細胞の代謝物についてメタボローム解析を行った。その結果、80種類の代謝物が検出され、それらのうち有意な変動を示した代謝物を表5に示した。

コントロール区と比較し、難消化成分添加区で有意に高かった代謝物は分化誘導4日目では7種類、8日目では68種類であり、それに対し、有意に低かった代謝物は4日目で36種類、8日目では見られなかった。

メタボローム解析の結果、難消化成分添加細胞のバリン、ロイシン、イソロイシンはコントロール区と比較し4日目で有意に低く、8日目では有意に高い値を示した。これら3種類のアミノ酸は分岐差アミノ酸、**Branched chain amino acid (BCAA)**と称され、BCAAは体タンパク質の構成だけではなく、種々の代謝系を調整する因子としても機能し、インスリン抵抗性を抑制すること[29][30]から、肥満に関係が深いことが想定される。

コントロール区と難消化成分添加区の細胞内のBCAAの分化誘導4日目、8日目の変動について図10に示した。コントロール区では、分化誘導後4日目から8日目にかけて、BCAAの有意な低下が見られたのに対し(図10a,b,c)、難消化成分添加区では、BCAAは分化誘導後4日目から8日目にかけて、顕著な変動は見られなかった(図10d,e,f)。さらに、分化誘導4日目のBCAAにおいては、難消化成分添加区と比較してコントロール区で高かったのに対し、8日目のBCAAではコントロール区よりも難消化成分添加区で高い値を示した。

2-4-2. 細胞培養培地中の遊離アミノ酸の定量

無添加培養細胞（コントロール）および難消化成分添加培養細胞の分化誘導後 0 日目、4 日目、8 日目の培地中の BCAA について高速液体クロマトグラフィーにより解析し、その結果を図 11 に示した。コントロール区（図 11a,b,c）および難消化成分添加区（図 11d,e,f）とも、培地中 BCAA は分化誘導後 0 日目で高く、4 日目にかけて急激に低下し、8 日目は 4 日目とほぼ同じ値を示した。

2-5. 脂肪蓄積関連遺伝子の発現の解析および lipoprotein lipase(LPL) 活性の測定

2-5-1. Real-time PCR による遺伝子発現の解析

Real-time PCR を行い、分化誘導 2、4、8 日目の培養脂肪細胞における遺伝子発現を解析した。コントロール区における遺伝子の発現を 1.0 とした場合の難消化成分添加培養細胞の脂肪合成関連遺伝子の発現比を表 6 に示した。

IL-6 の発現については、無添加区と比較し、難消化成分添加区の分化誘導後全ての日程において発現が有意に低下していることが明らかとなった（図 12）。

2-5-2. lipoprotein lipase(LPL)活性の測定

コントロール区と比較し、難消化成分添加細胞の分化誘導後全ての日程において活性が高くなっていることが明らかとなり、とりわけ分化誘導後 4 日目と 8 日目においては有意に活性が高くなったことが認められた（図 13）。

3. 考察

3-1. マウス3T3-L1細胞の脂肪蓄積に対する酒粕難消化成分素材の影響

3-1-1. マウス3T3-L1細胞における脂肪蓄積率の抑制

第1章においてOil Red O染色による脂肪蓄積率の比較の結果、難消化成分100℃抽出液1mg/mL添加区において最も脂肪蓄積が抑制されたことを示した(図5)。

さらに、GPDH活性は、分化誘導後4日目においては、コントロール区と難消化成分100℃抽出液1mg/ml添加区に有意な違いは見られなかったが、分化誘導後8日目においてコントロール区と比較し、難消化成分100℃抽出液1mg/ml加区で有意に低くなっており($p<0.01$)、難消化成分100℃抽出液1mg/ml添加により、細胞のGPDH活性が低下することが認められた(図8)。GPDH活性は、分化誘導後4日目よりも分化誘導後8日目で活性が高かったことから、脂肪細胞は分化誘導後4日目から分化誘導後8日目にかけて、前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞へ分化が促進すると考えられる。GPDH活性は、前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する際に急増することが知られており、難消化成分100℃抽出液添加区では、分化誘導後4日目から分化誘導後8日目の間でGPDH活性が抑制され、脂肪細胞の分化および脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。

また、難消化成分抽出液の脂肪細胞の分化および脂肪蓄積に対する機能性を有する成分を解析するため、HPLCによる難消化成分抽出液の分画を行った。その結果、20℃抽出液と60℃抽出液においては顕著な差はみられなかったが、100℃抽出液において、5.85分および7.33分、10.04分の3か所において、20℃、60℃抽出液においてはみられなかったピークが確認された(図9)。また100℃抽出液のみで確認されたピークであったため、これらのピークはより高

温で抽出する難溶性成分であると考えられたが、今回の実験では具体的な成分については特定することはできなかった。

WST-1による細胞生存率の確認では、脂肪細胞の抑制が認められた難消化成分 100 °C抽出液添加 1mg/mL においても細胞毒性が認められないことを確認した。難消化成分の 100 °C抽出液添加による脂肪細胞の分化抑制および脂肪蓄積抑制は、細胞毒性によるものではないと考えられた。

3-1-2. メタボローム解析による代謝物の解析

分化誘導後 4 日目および 8 日目の脂肪細胞についてメタボローム解析を行った結果、コントロール区の細胞と比較し、難消化成分添加区の細胞では代謝物に相違が見られ、特にアミノ酸で違いが認められた (表 5)。

前駆脂肪細胞および成熟脂肪細胞についてのメタボローム解析の研究では、BCAA の代謝は脂肪生成および成熟脂肪細胞において強くコントロールされ、BCAA が脂肪細胞の分化および脂肪蓄積に関わっており [31]、BCAA は脂肪細胞の分化と成熟に深く関係していることが示されている。

本研究において、コントロール区の細胞内 BCAA は分化誘導後 8 日目と比較し、4 日目で高値を示し (図 10a,b,c)、コントロール区における培地の BCAA は 0 日目から分化誘導後 4 日目にかけて減少した (図 11a,b,c)。4 日目の細胞は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化準備期であり、分化に必要な BCAA を培地から細胞内に取り込み、溜め込んでいる状態であると考えられ、そのために細胞内 BCAA 濃度が高かったと推察された。次に、細胞中の BCAA は 4 日目から 8 日目にかけて減少したのに対し (図 10a,b,c)、培地中の BCAA は変化がみられなかった (図 10a,b,c)。これは、前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化し脂肪蓄積のために、脂肪合成に必要な BCAA を再度培地から細胞内に取り

り込んだ後、脂肪合成のために利用されたため、8日目に減少したと考えられる。

Halama et al. の培養脂肪細胞のメタボローム解析によると、BCAA のロイシンは分化誘導後4日目から代謝されコレステロールを合成し、またイソロイシンは代謝後に脂肪酸の鎖の付加反応に寄与することが示され、この2つのアミノ酸は脂肪合成に深く関与することが示されている [31]。本研究でもコントロール区の細胞内のロイシンとイソロイシンは分化誘導後4日目から代謝されて8日目にかけて減少したことから、ロイシンとイソロイシンが脂肪合成に関与したことが示唆された。

脂肪細胞の数は小児期および青年期に確立すると考えられており、体重の増減または栄養状態とは無関係に、成人ではその数は一定であることが明らかとなっている [32]。また、肥満の小児および若年では、健常者と比較して細胞内の BCAA 濃度が高いのに対し、肥満の成人では細胞内の BCAA 濃度が低いことが認められている [29] [33]。

本研究におけるコントロール区の培養脂肪細胞では、分化段階である培養4日目の培養細胞の BCAA 濃度が高かったことから、4日目の細胞は小児期および青年期の脂肪細胞の状態を反映し、また成熟期である8日目の細胞の BCAA 濃度は低かったことから、8日目の細胞は成人の脂肪細胞の状態を反映していると考えられた。

一方、難消化成分添加区では、培地中の BCAA は分化誘導前の0日目から分化誘導後4日目にかけて減少することが確認された (図 11 d、e、f)。これは、コントロール区と同様に、前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化するために必要な BCAA を培地から細胞内に取り込んだためであると考えられる。しかし、難消化成分添加区の細胞内の BCAA 濃度は4日目と8日目で大きな違いは見ら

れず、コントロール区と異なる結果を示した（図10d,e,f）。

アミノ酸はタンパク質合成に関与するだけでなく、余剰な体脂肪を減少させ、食事による肥満を抑制するための重要な役割も担っている [34]。マウスの実験において、ロイシンのグルコースおよびコレステロール代謝の改善や肥満症の抑制効果が確認され [35]、またイソロイシン摂取がUCPやPPAR α 、CD36 の発現を上昇させ、脂肪蓄積や高血糖症を抑制することが認められている [36]。

さらに BCAA 以外のアミノ酸では、マウス実験においてスレオニン摂取がUCPなどの遺伝子発現をコントロールし、体重増加抑制や脂肪細胞の脂肪蓄積抑制および肥大化を抑制していることが示唆され [37]、グルタミン摂取によるマウスの体重増加抑制や高血糖および高インスリン血症の改善効果が確認されている [38]。これらアミノ酸の脂肪合成抑制や肥満抑制効果の詳細なメカニズムについてその詳細は明かされていないが、インスリン抵抗性の改善や脂肪酸の酸化亢進によるエネルギー消費増加によるものではないかと考えられている [38]。

本研究のメタボローム解析においても、先行研究で脂肪蓄積抑制や肥満抑制効果が報告されている BCAA、スレオニン、グルタミンは、コントロール区と比較して難消化成分添加区の細胞で高値を示すことが確認された（表5）。このことから、難消化成分が脂肪細胞のアミノ酸の代謝に影響を及ぼし、脂質代謝に関わるUCPやPPAR α などの脂肪合成に関係する遺伝子発現を調節したことにより、脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。

3-2-3. 脂肪蓄積関連遺伝子の発現の解析およびLPL活性の測定

今回の結果において、無添加区と比較し、難消化成分添加区の分化誘導後全

での日程において IL-6 の発現が有意に低下していることが明らかとなった。

IL-6 は脂肪組織において複数の影響を及ぼすとされている。慢性的に高いレベルの IL-6 は、遺伝子やタンパク質の発現を変化させ、基礎的な脂肪分解に影響を与えると考えられている [39]。さらに、局所的に高濃度の IL-6 は、ヒトの脂肪組織におけるレプチン産生および脂質代謝を調節に関与している [40] [41]。また、3T3-L1 脂肪細胞を用いた研究において、IL-6 は LPL 活性を低下させることにより、ヒトの脂肪細胞代謝に直接影響を与える可能性があると考えられている [42] [43]。

本研究では、難消化成分添加区において無添加区と比較し、脂肪細胞における IL-6 の発現が減少し (図 12)、LPL 活性が増加した (図 13)。このように、難消化成分関連因子は IL-6 の発現を抑制し、間接的に LPL 活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、IL-6 はレプチンの産生を増加させることにより LPL 活性を抑制するため、肥満のヒトの脂肪組織において、パラクライン調節因子であると考えられている [44]。

本研究ではレプチンについての遺伝子解析は行っていないが、IL-6 の発現は、レプチンレベルの低下と関連し、それによって LPL 活性を増加させた可能性が考えられる。

第 3 章．マウス 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積に対するコウジ酸および酒粕の影響 緒言

第 1 章で示したように、難消化性成分を培地に添加することにより、脂肪蓄積抑制効果が認められた。よって、第 3 章では、脂肪細胞分化および脂肪蓄積抑制に寄与している特定の機能性成分を明らかにするため、難消化性成分を

含み一般的に私たちが口にすることができる酒粕および酒粕に含まれるとされている機能性成分であるコウジ酸 (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone) に焦点を当て、実験を実施した。

コウジ酸は1907年に斉藤賢道により米麴中から発見された化合物であり、麴菌がグルコース等の糖を発酵させることによって生成されることが知られている [45]。コウジ酸は、シミやそばかすの原因となるメラニンの合成に関与するチロシナーゼ活性を阻害することで、肌における美白効果を有することは広く認められている [46]。

コウジ酸の機能性として、ラットを用いた研究において、コウジ酸の摂取により、腓リパーゼ活性を阻害することで、肝臓重量増加の抑制や血清トリセリグリドを減少させる可能性が示唆されている [47]。高脂肪食摂取のラットに *Aspergillus oryzae* 抽出物を投与した結果、腓リパーゼを阻害したことにより肝臓重量増加の抑制や血清トリセリグリドの有意な減少が認められた [47]。

Aspergillus oryzae 由来のコウジ酸も腓リパーゼを阻害することが明らかとなり、*Aspergillus oryzae* と同様の効果が得られると考えられている [48]。

よって、第3章では酒粕に含まれているコウジ酸および、1、2章で用いた酒粕関連物質の抽出した材料である酒粕に焦点をあて、コウジ酸および酒粕を培地に添加して培養した3T3-L1脂肪細胞の分化および脂肪蓄積に対する影響を調べ、さらにそのメカニズムを明らかにするため、Real-time PCR によって細胞の遺伝子発見について解析を行った。

1. 方法

1-1. マウス3T3-L1細胞の培養

第1章 1-2-1. マウス3T3-L1細胞の培養と同様の方法で培養した。

1-2.Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

第 1 章 1-2-2. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較と同様の方法で行った。

無添加区の細胞から抽出した脂肪の吸光度を脂肪蓄積率 100% とし、コウジ酸添加区および酒粕添加区の細胞から抽出した脂肪の吸光度から、細胞の脂肪蓄積率を算出した。

1-3. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1) による細胞生存率の測定

第 1 章 1-2-1. マウス 3T3-L1 細胞の培養と同様の方法で培養した脂肪細胞の分化誘導後 4 日目および 8 日目をサンプルとし、第 2 章 1-1. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1) による細胞生存率の測定と同様の方法で細胞の生存率を測定した。

無添加区の細胞生存率を 100% とし、コウジ酸添加区および酒粕添加区における細胞生存率を算出した。

1-4. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の測定

第 1 章 1-2-1. マウス 3T3-L1 細胞の培養と同様の方法で培養した脂肪細胞の分化誘導後 4 日目および 8 日目に回収し、第 2 章 1-2. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の測定と同様の方法で GPDH 活性を測定した。

1-5. Real-time PCR による遺伝子発現の解析

第 1 章 1-2-1. マウス 3T3-L1 細胞の培養と同様の方法で培養した脂肪細胞の分化誘導後 4 日目および 8 日目に回収し、第 2 章 1-5-1. Real-time PCR による遺伝子発現の解析と同様の方法で、コウジ酸添加区および酒粕添加区における遺伝子発現を解析した。

1-6. 統計処理

全てのデータは平均 ± 標準偏差で表記し、統計ソフトはエクセル統計 (Ver2.12) を使用した。脂肪細胞における脂肪蓄積率および細胞生存率の測定、GPDH 活性については Dunnett 法による多重比較を用いて解析し、遺伝子発現の解析については *t* 検定にて統計処理を行った。なお、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$ を有意とした。

2. 結果

2-1. マウス 3T3-L1 細胞に対するコウジ酸の影響

2-1-1. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

無添加区の分化誘導後 4 日目および 8 日目の細胞における脂肪蓄積量をコントロールとして、コウジ酸添加区の脂肪蓄積率を算出した。

コウジ酸 0.01mg/ml 添加区において、分化誘導後 4 日目では 111.8%、分化誘導後 8 日目で 104.9 %、0.1mg/ml 添加区では、分化誘導後 4 日目で 108.5%、分化誘導後 8 日目で 94.5 %、1mg/ml 添加区では、分化誘導後 4 日目で 58.7%、分化誘導後 8 日目で 52.2% であった (図 14)。分化誘導後 4 日目および 8 日目のコウジ酸 1mg/ml 添加区において、脂肪蓄積が最も抑制され、コントロールと比較し蓄積率の有意な抑制が認められた ($p < 0.01$)。

2-1-2. Water Soluble Tetrazolium 1 (WST-1) による細胞生存率の測定

無添加区の分化誘導後 4 日目および 8 日目の細胞をコントロール (100%) として、コウジ酸添加区の細胞生存率を算出した。その結果、0.01mg/ml 添加区において、分化誘導後 4 日目で 103.5%、分化誘導後 8 日目で 99.4%、0.1mg/ml 添加区において、分化誘導後 4 日目で 105.1%、分化誘導後 8 日目で 101.8%、

1mg/ml 添加区において、分化誘導後 4 日目で106.9%、分化誘導後 8 日目で105.7%であり（図 15）、コウジ酸の細胞毒性は認められなかった。

2-1-3. glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の測定

コウジ酸 1mg/ml 添加培養細胞の分化誘導後 4 日目と 8 日目の GPDH 活性の比較結果を図16に示した。コウジ酸添加培養細胞において GPDH 活性は分化誘導後 4 日目および 8 日目においてコントロール区と比較して活性の低下が見られ、特に分化誘導後 4 日目においては有意に活性が低下した ($p<0.01$)。以上のことから、コウジ酸を 1mg/ml 添加することにより、脂肪細胞の GPDH 活性の低下することが確認された。

2-1-4. Real-time PCR による遺伝子発現の解析

コウジ酸 1mg/ml 添加区において、Real-time PCR による脂肪合成関連遺伝子の発現を解析した結果を表 7 に示した。

分化誘導後 4 日目において、脂肪細胞の分化因子である CEBP β および PPAR γ の発現が有意に減少していることが認められた（図 17）。また、脂肪蓄積の抑制に関わると考えられる IL-6 の発現が分化誘導 4 日目および 8 日目に有意に低下していることが明らかとなった（図 17,18）。

2-2. マウス 3T3-L1 細胞に対する酒粕の影響

2-2-1. Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較

無添加区の分化誘導後 4 日目および 8 日目の細胞における脂肪蓄積量をコントロールとして、酒粕添加区の脂肪蓄積率を算出した。酒粕添加区の 0.1mg/ml 添加区において、20℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目で 98.1%、分

化誘導後 8 日目で 98.9%、60℃抽出液添加区の分化誘導後 4 目で104.3%、分化誘導後 8 日目で 96.1%、100℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目103.5%、分化誘導後 8 日目で 89.6% であった（図 19）。

酒粕 1mg/ml 添加区においては、20℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目
103%、分化誘導後 8 日目で 93.6%、60℃抽出液添加区の分化誘導後 4 目
102.4%、分化誘導後 8 日目で 91.6%、100℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目
96.8%、分化誘導後 8 日目で 79.5% であった（図 20）。

本実験において、酒粕 100℃抽出液 1mg/ml 添加区の分化誘導後 8 日目
において、脂肪蓄積が 79.5%とコントロールと比較し最も抑制され、有意な脂肪
蓄積の抑制が認められた ($p<0.05$)。

2-2-2. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1) による細胞生存率の測定

無添加区の分化誘導後 4 日目および 8 日目の細胞における脂肪蓄積量をコン
トロールとして、酒粕添加区の細胞生存率を算出した。その結果、0.1mg/ml 添
加区において、20℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目103.7%、分化誘導後 8
日目105.4%、60℃抽出液添加区の分化誘導後 4 目105.1%、分化誘導後 8 日
目104.1%、100℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目100.7%、分化誘導後 8 日
目102.5%であった（図 21）。

1mg/ml 添加区においては、20℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目
108.3%、分化誘導後 8 日目100.7%、60℃抽出液添加区の分化誘導後 4 目
105.1%、分化誘導後 8 日目103.6%、100℃抽出液添加区の分化誘導後 4 日目
103.3%、分化誘導後 8 日目100.6%であり（図 22）、各酒粕抽出液の細胞毒性
は見られなかった。

2-2-3.glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性の測定

酒粕 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞の分化誘導後 4 日目と 8 日目の GPDH 活性の比較結果を図23に示した。酒粕 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞において分化誘導後 4 日目および 8 日目においてコントロール区比較し、有意な差はみられなかった。分化誘導後 4 日目においてはコントロール区と比較し大差はみられなかったが、分化誘導後 8 日目において GPDH 活性が低下し、分化誘導後 8 日目において、酒粕 100 °C抽出液添加により、GPDH 活性が低下する可能性が示された。

2-2-4.Real-time PCR による遺伝子発現の解析

酒粕 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞において、Real-time PCR で脂肪合成関連遺伝子の発現を解析した結果を表 8 に示した。分化誘導 4 日目および 8 日目ともに、酒粕 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞においては、IL-6 の発現が有意に低下していることが明らかとなった（図 24）。

3. 考察

3-1. マウス 3T3-L1細胞の脂肪蓄積に対するコウジ酸および酒粕の影響

コウジ酸は1907年に日本で米麴中に存在することが発見され、1924年にその化学構造が決定された、麹菌の二次代謝産物である [49]。コウジ酸は、1995年の食品衛生法改正に伴う既存添加物として現在食品添加物としての使用が認められており、メラニンの合成においてチロシナーゼ活性を阻害する能力を有する [50]。また、コウジ酸は多くの医学的用途を有し、抗菌、抗ウイルス、抗腫瘍、抗糖尿病、抗癌、抗寄生虫、抗酸化、抗増殖、および抗炎症活性などの効果が認められている [50]。

コウジ酸添加培養細胞の分化誘導後 4 日目および 8 日目の細胞の Oil Red O 染色による脂肪蓄積率を調べた結果、コウジ酸添加培養細胞 1mg/ml 添加培養細胞（以下、コウジ酸添加培養細胞とする）において、分化誘導後 4 日目で 58.7%、8 日目で 52.2% と最も脂肪蓄積が抑制された（図 14）。

コウジ酸添加培養細胞 1mg/ml 添加において、GPDH 活性は分化誘導後 4 日目および分化誘導後 8 日目で活性が低下しており、特に分化誘導後 4 日目では有意な GPDH 活性の低下が認められた。GPDH 活性は、前駆脂肪細胞が脂肪細胞に分化する際に急増することが知られており、コウジ酸添加培養細胞においては、とりわけ分化誘導後 4 日目で有意な GPDH 活性を抑制し（図 16）、脂肪細胞の分化および脂肪蓄積を抑制したと考えられる。

さらに、Real-time PCR で脂肪合成関連遺伝子の発現を解析した結果、分化誘導後 4 日目において、脂肪細胞の分化因子である Cebp β および PPAR γ の発現が有意に低下していることが認められた。また、IL-6 の発現が分化誘導 4 日目および 8 日目に有意に低下していることが明らかとなった（表 7）。

Cebp β および PPAR γ は脂肪細胞において分化因子とされており、これらの遺伝子発現によって前駆脂肪細胞から脂肪細胞へと分化することが知られている [51]。本研究において、コウジ酸添加培養細胞の分化誘導後 4 日目において Cebp β および PPAR γ の発現の低下が認められたことから、コウジ酸添加により脂肪細胞の分化が抑制されたことが示唆された。さらに、第 2 章で示したように、IL-6 は脂肪蓄積に関与していると考えられており [42] [43]、コウジ酸の添加において IL-6 の発現が低下していたことから、コウジ酸 1mg/ml を添加することにより IL-6 の発現が低下し、脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。

以上のことから、本研究ではコウジ酸 1mg/ml 添加することにより、分化誘

導後 4 日目において GPDH 活性が低下し、Cebp β および PPAR γ の発現が低下し、脂肪細胞の分化が抑制され、さらに分化誘導後 4 日目および 8 日目に IL-6 の発現が抑制されていたことから脂肪蓄積が抑制されることが認められ、コウジ酸は脂肪分化および脂肪蓄積の両方を抑制することが示唆された。

一方、酒粕添加培養細胞においては、Oil Red O 染色による脂肪蓄積率の比較の結果、100 °C 抽出液 1mg/ml 添加培養細胞（以下、酒粕添加培養細胞とする）の分化誘導後 8 日目において最も脂肪蓄積が抑制された（図 20）。GPDH 活性は、分化誘導後 4 日目ではコントロールと比較し大差はみられなかったが、分化誘導後 8 日目において GPDH 活性の低下が見られた。

さらに、Real-time PCR で脂肪合成関連遺伝子の発現を解析した結果、酒粕添加培養細胞において分化誘導後 4 日目および 8 日目に IL-6 の発現が有意に低下した（図 24）。IL-6 は第 2 章で示したように脂肪蓄積に関与していると考えられ [42] [43]、本研究において IL-6 の発現が抑制されていたことから、酒粕を培地に添加したことにより IL-6 の発現が低下し、脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。

麹菌を添加して作成する清酒の副産物である酒粕にも微量であるがコウジ酸は含まれていると考えられる。酒粕添加培養細胞においても分化誘導後 8 日目の脂肪蓄積の抑制が認められ、また GPDH 活性も低下傾向がみられたことから、これらの脂肪蓄積抑制効果は酒粕に含まれるコウジ酸の寄与が関係していることが推察される。しかしながら、脂肪蓄積抑制に対する他の成分の関与にも考えられ、さらなる解析が必要であると考えられる。

第4章．酒粕素材の美容効果

緒言

近年では酒粕は食品素材としてだけでなく、酒粕抽出液などを配合した化粧品が多く提案され、その美容効果にも注目されている。

先行研究では、マウス試験において酒粕に含まれる α -グルコシルグリセロール（以下 α GC）を皮膚に塗布することによるコラーゲン濃度の増加 [52]や、ヒト介入試験において α GCを含む化粧水の塗布による肌の弾力性の増加 [53]、また酒粕に含まれるスフィンゴ脂質による肌状態の改善 [54]などが報告され、酒粕による肌状態の改善効果が期待されている。

肌における美容効果の検証は、正常ヒト皮膚繊維芽細胞を用いた方法やチロシナーゼ活性阻害についての方法が確立されている。

皮膚線維芽細胞は、保湿、弾力性維持、細胞外基質の産生等の皮膚の基本的な機能を担う重要な細胞である。人の皮膚は表皮、真皮、皮下組織の3層構造となっており、皮膚線維芽細胞はこのうち真皮に多く存在しており、コラーゲンやエラスチンなどを生成する。これらの成分は肌の新陳代謝やハリ、弾力、潤いなどに影響していることから、線維芽細胞を用いて、美肌効果を検証できると考えられている。皮膚線維芽細胞を用いた先行研究では、サケ皮由来のコラーゲンペプチドによる皮膚線維芽細胞の増殖効果 [55]や HES1 の活性化が皮膚線維芽細胞の細胞老化を緩和することが明らかとなっている [56]。

また、チロシナーゼはシミやそばかすの原因となるメラニンが生成される際にはたらく酵素である。表皮細胞が紫外線などによって刺激を受けると、メラノサイト活性化因子が分泌される。このメラノサイト活性化因子によって、シグナルが色素細胞に伝えられ、シグナルを受けた色素細胞では、細胞内にあるチロシンが徐々に変化してドーパ、そしてドーパキノンとなり、やがてメラ

ニンとなる。その過程に作用するのがチロシナーゼである。

よって、第4章では、酒粕素材の美容効果を検証するため、正常ヒト皮膚線維芽細胞の培地に酒粕抽出物を添加し、線維芽細胞の増殖率について調べ、さらに酒粕抽出物チロシナーゼ活性阻害活性を検証し、酒粕素材の美容効果についても明らかにすることを目的とした。

1.材料および方法

1-1. 正常ヒト皮膚繊維芽細胞の培養

1-1-1. 材料

酒粕、難消化成分、発酵エキス末をそれぞれビオラモ遠沈管に入れ、そこに9倍量の水を20℃、60℃の蒸留水を添加して十分に攪拌し、ロータリーミキサーにて30分間抽出（10分毎にボルテックスミキサーにより攪拌）した後、遠心分離機にて遠心処理（2500rpm、10分）を行い、上澄みを採取し20℃抽出および60℃抽出サンプルとした。また、オートクレーブ（BS-325：TOMY製）を用い100℃で20分間処理した後、遠心分離機にて遠心処理（2500rpm、10分）を行い、上澄みを採取し100℃抽出サンプルとした。

1-1-2. 正常ヒト皮膚繊維芽細胞の培養

正常ヒト皮膚繊維芽細胞（倉敷紡績株式会社）を用いた。細胞は10%Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO) と 1% Antibiotics (GIBCO)（ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシンBを含む）を含む RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)、および2%FBSと1%Antibioticsを含む RPMI-1640 で培養した。

RPMI-1640(10%FBS と 1% Antibiotics を含む)10ml 入れた 100mm ディッシュ (IWAKI) に正常ヒト皮膚線維芽細胞を播種し、3日間培養した。培地を取り

除いて細胞を回収し、RPMI-1640(10%FBS 含む)と混合して 2×10^4 cells/ml に調整し、96wellプレート (IWAKI) に 100 μ l ずつ播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で3時間培養した。RPMI-1640(2%FBSと1% Antibioticsを含む)にて培地交換を行い、3日間培養した。サンプル添加区には RPMI-1640 (2%FBS と1% Antibioticsを含む)と各サンプルが10:1となるように混合した培地にて培地交換を行い、3日間培養した。

1-1-3. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1) による皮膚線維芽細胞増殖率の測定

1-1-2. の方法で培養した細胞を用い、Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System(タカラバイオ株式会社)にて細胞増殖率を測定した。培地を取り除き、RPMI-1640(10%FBS、1% Antibioticsを含む)で洗浄し、RPMI-1640(10%FBS、1% Antibioticsを含む)と試薬溶液が9:1の割合で混合した溶液を空白以外のwellに100 μ l ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で1時間インキュベートした。空白には RPMI-1640(10%FBS、1% Antibioticsを含む)を100 μ l 添加した。反応後、マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher SCIENTIFIC)により波長450nmで吸光度を測定した。無添加区の細胞の吸光度を細胞生存率100%とし、各種酒粕サンプル添加区の細胞生存率を算出した。

1-2. 酒粕抽出液のチロシナーゼ活性の測定

1-2-1. 材料

第1章 1-1-3 . 酒粕素材抽出液の成分分析 (1) 酒粕素材抽出液の作製と同様の方法で酒粕抽出液を作製した。この抽出液を50mMリン酸バッファー (pH6.8) を用いて10倍、100倍、1000倍に希釈し、実験に用いた。

さらに、酒粕1gに各濃度(20%、40%、60%、80%、100%)に調製したエタノ

ール溶液を 9ml 添加して十分に攪拌し、遠心分離機にて遠心処理(2500rpm、10分)を行い、上澄みを採取し、原液サンプルとした。50mMリン酸バッファー(pH6.8)を用いて原液サンプルを100倍および1000倍に希釈し、実験に用いた。

1-2-2. チロシナーゼ活性の測定

マッシュルーム由来チロシナーゼ(Sigma-Aldrich)を50mMリン酸バッファーに溶解して50U/mlに調製し、酵素液として用いた。

基質には3,4-Dihydroxy-L-phenilalanine(L-DOPE)(和光純薬工業株式会社)を50mMリン酸バッファーに溶解し0.03%に調製した。比較対象として、代表的なチロシナーゼ活性阻害物質であるコウジ酸(和光純薬工業株式会社)を蒸留水で1mg/mlとなるよう溶解し、比較した。96wellマイクロプレートに、0.03%L-DOPE、酵素液、各酒粕サンプルまたはアスコルビン酸溶液を各50μlずつ加えて攪拌後、25℃で15分インキュベートした。反応後マイクロプレートリーダーにより波長340nmにて吸光度を測定した。以下の式を用いて、チロシナーゼ阻害率を算出した。

$$\text{チロシナーゼ阻害率 (\%)} = 100 - \{(\text{sample} - \text{blank}) / (\text{control} - \text{blank})\} \times 100$$

※sample：基質、酵素液、各酒粕サンプルを加えた際の吸光度

blank：基質、50mMリン酸バッファー、各酒粕サンプルを加えた際の吸光度

control：基質、酵素液、50mMリン酸バッファーを加えた際の吸光度

1-3. 統計処理

全てのデータは平均±標準偏差で表記し、統計ソフトはエクセル統計(Ver2.12)を使用した。正常ヒト皮膚繊維芽細胞における増殖率およびチロシナ

ーゼ活性については Dunnett 法による多重比較にて統計処理を行った。なお、 $P < 0.05$ および < 0.01 を有意とした。

2. 結果

2-1. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1) による皮膚線維芽細胞増殖率の測定

無添加培養細胞をコントロールとし、酒粕および難消化成分、発酵エキス末を添加した際の正常ヒト皮膚線維芽細胞における細胞増殖率を示した。

酒粕添加培養細胞においては、60℃抽出液と100℃抽出液の0.5mg/ml添加培養細胞でそれぞれ119.6%、143.3%と有意な増殖が見られた(図25)。難消化成分添加培養細胞においては、20℃抽出液および60℃の0.1mg/ml添加培養細胞において、それぞれ119.7%と123.5%と有意な細胞増殖が見られた(図26)。発酵エキス末添加培養細胞においては、20℃抽出液では0.1mg/mlおよび0.5mg/ml添加培養細胞でそれぞれ122.0%、146.3%、60℃抽出液では0.1mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml添加培養細胞でそれぞれ124.5%、114.4%、116.5%、100℃抽出液では0.1mg/mlおよび0.5mg/ml添加培養細胞でそれぞれ124.5%、119.0%と有意な細胞増殖が見られた(図27)。

2-2. 酒粕のチロシナーゼ活性の測定

0.2M リン酸バッファーを添加した場合の吸光度をコントロール(阻害率0%)とし、酒粕の水抽出液およびエタノール抽出液のチロシナーゼ活性阻害率を示した。

酒粕水抽出液においては、60℃抽出液で阻害率が高くなっており、原液で28.2%と最も高く、10倍希釈液では15.5%、100倍希釈液では18.3%、1000倍希釈液では14.8%と濃度依存的に増加し、全ての処理区で10%以上の阻害率を示した。特に原液と100倍希釈液はコントロールと比較し、有意なチロシナー

ゼ活性阻害が認められた（図 28）。

エタノール抽出液においては、60%エタノール抽出1000倍希釈液で11.8%、100倍希釈液で14.3%と有意なチロシナーゼ活性阻害が認められた（図 29）。

3. 考察

3-1. Water Soluble Tetrazolium 1(WST-1) による皮膚線維芽細胞増殖率の測定

先行研究において、 α GCや α EG、アミノ酸による皮膚線維芽細胞の増殖効果が報告されている [57] [58] [59]。

α -GCは知覚神経を刺激してIGF- Iを増加させることが明らかとなっており [60]、IGF- Iは皮膚線維芽細胞で産生され、皮膚線維芽砂防自体の増殖分化にも作用するところが明らかとなっている [53]。

また、 α -EGは分子量 208Da の配糖体である。先行研究において、 α -EGを添加培養した正常皮膚線維芽細胞において α -EGを添加せずに培養した細胞に比べて、正常皮膚線維芽細胞増殖因子 I および VII の mRNA の発現が上昇したことにより、正常ヒト皮膚線維芽細胞が増殖したことが明らかとなっている [61]。また、I 型コラーゲン遺伝子である COL1A1 および COL1A2 の発現が上昇し、コラーゲン I 生成量がすることが明らかとなっている [61]。

さらにアミノ酸では、プロリンが皮膚線維芽細胞の増殖および皮膚細胞内のヒアルロン酸合成の増強 [62]、バリンやグルタミンが皮膚線維芽細胞を増殖させることが明らかとなっている [63]。

また、これらの成分は酒粕にも含まれていることから、本研究において酒粕素材抽出液には α GCや α EG、アミノ酸などが含まれており、これらの働きによってこれらのはたらきによって皮膚線維芽細胞が増殖したのではないかと考えられる。

3-2. 酒粕のチロシナーゼ活性の測定

人の皮膚は大きく分けて3層構造となっており、上から表皮、真皮、皮下組織の3層から構成されている。このうち真皮に多く存在している線維芽細胞は、コラーゲンやエラスチンなどを生成しており、これらの成分は肌の新陳代謝やハリ、弾力、潤いなどに影響している [64]。また、表皮細胞においては、シミやそばかすの原因となるメラニンが生成されている。表皮細胞が紫外線などによって刺激を受けることにより、メラノサイト活性化因子と呼ばれる情報伝達物質が分泌され、このメラノサイト活性化因子によって、そのシグナルが色素細胞に伝えられる。シグナルを受けた色素が徐々に変化してドーパ、そしてドーパキノンとなり、やがてメラニンとなる。この過程に作用するのがチロシナーゼであり、チロシナーゼの活性を阻害することで、シミやそばかすの生成が抑制され、美白につながると考えられている。

水抽出の酒粕において、メラニン合成阻害成分の1つとしてアルブチンが広く知られている [65]。アルブチンとはコケモモなどの植物に含まれている成分で、酒粕にも含まれていることが報告されている [15]。アルブチンはチロシンとチロシナーゼの結合を防ぐことにより、メラニンの合成を阻害すると考えられている。アルブチンは20℃の水にも溶解するが、一般的に植物体からのアルブチン抽出には熱水が用いられることが多く、アルブチンは高温での抽出効率が低いと考えられる。このことから、本研究においても高温抽出でアルブチンが効率的に抽出され、60℃または100℃抽出液での阻害率が高くなったのではないかと考えられる。

しかし、100℃抽出液では60℃抽出液程の阻害率がみられなかったことから、アルブチン以外の成分も関与していると考えられる。アルブチン以外のメラニン合成阻害成分としては、L-システインやグルタチオンが知られている。L-シ

ステインはアミノ酸の一種である。また、グルタチオンはアルブチン、L-システイン、グリシンから成るトリペプチドで、DOPA キノンに結合することでメラニンの合成を抑制すると考えられている [66] [67]。このことから、60℃水抽出液においてはアルブチン、L-システイン、グルタチオンなどのチロシナーゼ活性阻害成分が含まれ、それらの総合的なはたらきによってチロシナーゼ活性が阻害されたと考えられる。

エタノール抽出では、先行研究において、酒粕のエタノール抽出液添加がマウスメラノーマ細胞において、チロシナーゼ活性およびメラニン合成を阻害 [68]。また、酒粕粉末のヘキササン抽出に含まれるトリアシルグリセロールが強いチロシナーゼ活性阻害を示すことが明らかとなっている [69]。このことから、本研究において、酒粕のエタノール抽出液に含まれるトリアシルグリセロールなどの疎水性成分がチロシナーゼ活性を阻害したのではないかと考えられる。また、先行研究において、酒粕のメタノール抽出液には疎水性成分であるフェルラ酸が含まれており、チロシンと拮抗することでメラニンの生成を抑制することが報告されている [70]。さらに酒粕を40%エタノールで処理し、低温で1日～数日浸漬することで効率よくグルタチオンが抽出されること、また麴の75%エタノール抽出液にはフェルラ酸が含まれることが明らかとなっている [71] [71]。このことから、本研究では60%エタノールで酒粕を処理することで、チロシナーゼ活性を阻害するトリアシルグリセロール、フェルラ酸、グルタチオンなどの成分が抽出され、チロシナーゼ活性の阻害に寄与したのではないかと考えられる。

以上のことから、酒粕を摂取することによりヒト皮膚繊維芽細胞の増殖やチロシナーゼ活性が阻害され、酒粕を塗布したり、経口摂取したりすることで肌のハリの改善やメラニン生成の抑制などの美肌効果も期待できることが推察

された。

総括

本研究は、近年増加傾向にある肥満や肥満が引き起こすメタボリックシンドロームの予防・改善のために、わが国で古くから食されてきた発酵食品の1つである酒粕素材活用の可能性を検証することを目的に研究を行った。また、肥満防止効果以外にも酒粕素材の機能性が期待されており、酒粕素材の美容効果についても検証を行った。

第1章では酒粕素材の組成成分を分析し、その特徴をまとめた。また、マウス由来の前駆脂肪細胞3T3-L1細胞を用い、酒粕素材抽出液の前駆脂肪細胞分化および脂肪蓄積に対する影響について解析した。その結果、食物繊維が豊富に含まれていた酒粕難消化成分 100℃抽出液 1mg/ml を培地に添加した場合、細胞の脂肪蓄積が最も抑制された (80.9%)。

第2章では第1章で脂肪蓄積抑制効果が確認できた酒粕難消化成分 100℃抽出液 1mg/ml 添加培養細胞に焦点を当て、脂肪合成に関わる酵素活性の測定、メタボローム解析および Real-time PCR による遺伝子発現の解析を行った。

その結果、分化誘導後8日目でコントロール区と比較し、酒粕難消化成分 100℃抽出液 1mg/ml 添加培養細胞の GPDH 活性が低下することが認められた。またメタボローム解析において、酒粕難消化成分 100℃抽出液 1mg/ml 添加培養細胞ではコントロールと比較し、BCAAの代謝に変化が見られた。バリン、ロイシンは脂肪合成に関与していることが報告されており、BCAAの代謝変化が脂肪蓄積抑制に関与していることが示唆された。

また、Real-time PCR による遺伝子発現の解析では、酒粕難消化成分

100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞においてIL-6の有意な発現量の低下が見られた。IL-6の発現が低下することでLPL活性が高まることが報告されており、このメカニズムにより脂肪蓄積が抑制される可能性が示唆され、IL-6の発現低下が脂肪蓄積抑制に関与していることが示唆された。

第3章では、第1章において酒粕難消化成分 100 °C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞で脂肪蓄積抑制が確認できたため、その抑制効果に関与している成分の特定を試みた。本章では実際に食されている酒粕と、酒粕に含まれている成分であるコウジ酸をサンプルとして用い、3T3-L1細胞の脂肪蓄積、GPDH活性、Real-time PCRによる遺伝子発現の解析を行った。

その結果、コウジ酸 1mg/ml 添加培養細胞の脂肪蓄積率は、分化誘導後4日目で(58.7%) および8日目で(52.2%) と顕著に抑制されることが明らかとなった。また、コウジ酸 1mg/ml 添加培養細胞においては、分化誘導後4日目で有意にGPDH活性の低下がみられ、Real-time PCRによる遺伝子発現の解析では脂肪細胞の分化因子とされるCEBP β およびPPAR γ の発現低下が認められ、コウジ酸は脂肪細胞分化抑制に強く影響することが示唆された。さらに、コウジ酸添加によりIL-6の発現低下も確認され、IL-6の発現低下からLPL活性が上昇し、脂肪蓄積を抑制したことが推察された。3T3-L1細胞を用いた実験において、コウジ酸の脂肪蓄積抑制および脂肪細胞分化抑制に関する知見はこれまでに報告が見られず、本研究で認められたコウジ酸の脂肪蓄積抑制効果は初めて報告された知見であり、新規性がある研究結果であると考えられる。

一方、酒粕では酒粕 100 °C抽出液 1mg/ml 添加細胞で最も脂肪蓄積が抑制された(79.5%)。GPDH活性では、有意な結果ではなかったが、分化誘導後8日目において低下する傾向がみられ、Real-time PCRにおける遺伝子発現の解析ではIL-6発現が有意に低下した。

酒粕に含まれるコウジ酸は非常に微量であると考えられ、コウジ酸添加と比較して、酒粕添加による脂肪蓄積抑制効果は低かったが、**Real-time PCR**では、コウジ酸と同様に**IL-6**の発現低下が認められ、同様のメカニズムで脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。以上の結果から、酒粕摂取により肥満を抑制できる可能性が示唆された

第4章では、酒粕素材の新たな機能性の探索のため、正常ヒト皮膚線維芽細胞の培養やチロシナーゼ活性を測定することにより、酒粕の美容効果について検討した。正常ヒト皮膚線維芽細胞の培養においては、酒粕、発酵エキス末、酒粕難消化成分の各温度抽出液添加培養細胞において、細胞の増殖がみられた。チロシナーゼ活性においては、酒粕を水およびエタノールで抽出し、チロシナーゼ活性への影響について検討した。その結果、酒粕の水抽出およびエタノール抽出の両方において、チロシナーゼ活性の抑制がみられた。

以上のことから、酒粕を摂取することによりヒト皮膚線維芽細胞の増殖やチロシナーゼ活性が阻害され、酒粕を塗布したり、経口摂取したりすることで肌のハリやメラニン生成の抑制などの美肌効果も期待できることが推察された。

本研究の結果から、酒粕素材は肥満や肥満が引き起こすメタボリックシンドロームの予防・改善のために活用できる可能性が示唆され、また肌状態改善に関しても有効である可能性が示唆された。

本研究で明らかにすることができた酒粕の機能性を社会に広く知ってもらうことで、酒粕が人々の健康維持や増進、生活の質の向上に活用されることを期待したい。

謝辞

本研究を遂行するにあたって、多くのご指導、ご教示を下さりました神戸女学院大学高岡素子教授、また、論文に対しご指導くださった神戸女学院大学張野宏也教授、園田学園女子大学渡辺敏郎教授に感謝申し上げます。また、様々な助言を下さりましたヤエガキ発酵技研株式会社 井口隆文様、江見崇様、兵庫県立工業技術センター 今井武志様に心より感謝し、お礼申し上げます。

また第2章のメタボローム解析についてご指導いただきました神戸女学院大学 西海信准教授、兵庫県立大学 吉田優教授に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- [1] 厚生労働省, “令和3年簡易生命表,” 2022年7月29日. [オンライン]. Available: <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life21/dl/life18-15.pdf>. [アクセス日: 2023年1月17日].
- [2] 河野一世、柴田英之, “日本食からみる発酵食品の多様性と日本人の健康-肥満を中心に,” *日本調理科学学会誌*, 第43巻, 第2号, pp. 131-135, 2010.
- [3] 稲垣宏之、杉谷政則、瀬戸口裕子、伊藤良一、織谷幸太、西村栄作、佐藤進、加藤正俊、斎政彦、山本(前田)万里、亀井優徳, “高脂肪飼料摂取マウスにおける「べにふうき」緑茶の脂肪蓄積抑制効果,” *日本食品工学会誌*, 第56巻, 第7号, pp. 403-411, 2009.
- [4] 農林水産省, “令和元年食糧需給表(概算値),” 2021年. [オンライン]. Available: <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500300&tstat=000001017950&cycle=8&year=20191&month=0&tclass1=000001032890&tclass2=000001151387>. [アクセス日: 2020年5月20日].
- [5] 農林水産省, “食料消費の動向,” [オンライン]. Available: http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h26/h26_h/trend/part1/chap1

/c1_3_01.html. [アクセス日:2020年5月20日].

- [6] R. John Rodgers, Matthias H. Tschöp, John P. H. Wilding, “Anti-obesity drugs: Past, present and future,” *Disease Models & Mechanisms*, 第5巻, pp. 621-626, 2012.
- [7] 厚生労働省, “令和元年国民健康・栄養調査結果の概要,” 2020年.
- [8] 河田照雄, “肥満と生活習慣病:脂肪細胞の功罪,” *Trace Nutrients*, 第22巻, pp. 1-5, 2005.
- [9] 小林陽二、渋谷敏道、福生吉裕、赫彰郎, “健常人における tissue plasminogen activator(TPA), tissue plasminogen activator inhibitor(PAI-1)と血清脂質との関連性についての研究,” *日本老年医学会雑誌*, 第27巻, 第5号, pp. 578-583, 1990.
- [10] 芦田優子、斉藤義幸、川戸章嗣、杉並孝二、今安聰, “酒粕がラットのコレステロール代謝に及ぼす影響,” *日本農芸化学会誌*, 第71巻, 第2号, pp. 137-148, 1997.
- [11] 持田和美、栗林喬、斉藤憲司、菅原正義, “ラットのコレステロール代謝改善効果を有する酒粕粉末の調製,” *日本食品科学工学会誌*, 第47巻, 第2号, pp. 78-84, 2000.
- [12] 井上美保、石原伸治、渡辺敏郎、永井史郎、辻啓介, “乳酸菌で再醗酵させたアルコール醗酵副産物の本態性高血圧自然発症ラットにおける血圧上昇抑制作用,” *日本醸造協会誌*, 第100巻, 第8号, pp. 581-587, 2005.
- [13] Yoshiyuki Saito, Keiko Wanezaki (Nakamura), Akitsugu Kawato, and Satoshi Imayasu, “Structure and Activity of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Sake and Sake Lees,” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 第58巻, 第10号, pp. 1767-1771, 1994.
- [14] 伊豆英恵、後藤邦康、家藤治幸, “マウスのD-ガラクトサミン誘発肝障害における酒粕投与の影響,” *日本醸造協会誌*, 第101巻, 第11号, pp. 893-899, 2006.
- [15] 渡. 敏郎, “健康と美容に貢献する「酒粕」の成分,” *日本醸造協会誌*, 第107巻, 第5号, pp. 282-291, 2012.
- [16] 岸本由香、若林茂、徳永勝人, “内臓脂肪蓄積に及ぼす難消化性デキストリン長期投与の影響,” *日本食物繊維研究会誌*, 第4巻, 第2号, pp. 59-65, 2000.
- [17] 三上一保、新本洋士, “脂肪細胞分化誘導試験-前駆脂肪細胞株(3T3-L1)

- を用いた脂質代謝改善昨日評価法-,”平成21年度農林水産省補助事業(食農連携促進事業)食品機能性評価マニュアル集第I集(改訂2版), pp. 115-122, 2010.
- [18] Yunso Song, Hyoung Joon Park, Suk Nam Kang, Sun-Hee Jang, “Blueberry Peel Extracts Inhibit Adipogenesis in 3T3-L1 Cells and Reduce High-Fat Diet-Induced Obesity,” *PLoS One*, 第8巻, 第7号, pp. 1-12, 2013.
- [19] 新本洋士, 岩下恵子, 小堀真珠子, 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木 雅博, “マウス 3T3-L1 細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用,” *日本食品科学工学会誌*, 第52巻, 第11号, pp. 535-537, 2005.
- [20] 織谷幸太, 松井悠子, 栗田郁子, 木下洋輔, 上晋平, 柳江高次, 西村栄作, 加藤正俊, “「べにふうき」緑茶による脂肪蓄積抑制の作用機序,” *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 第56巻, 第7号, pp. 412-418, 2009.
- [21] Kyung Hee Lee, Jia Le Song, Eui Seong Park, Jaehyun Ju, Hee Young Kim, Kun Young Park, “Anti-Obesity Effects of Starter Fermented Kimchi on 3T3-L1 Adipocytes,” *Preventive Nutrition and Food Science*, 第20巻, 第4号, pp. 298-302, 2015.
- [22] 中原和彦, 新本洋士, 小堀真珠子, 亀山慎由美, 永田忠尊, 津志田藤二郎, “脂肪細胞への分化抑制効果を示す大豆発酵食品中の生理機能,” *国際農業研究成果情報*, 第8巻, pp. 33-34, 2000.
- [23] Haruya Takahashi, Tsuyoshi Goto, Yota Yamazaki, Kosuke Kamakari, Mariko Hirata, Hideyuki Suzuki, Daisuke Shibata, Rieko Nakata, Hiroyasu Inoue, Nobuyuki Takahashi, Teruo Kawada, “Metabolomics reveal 1 palmitoyl lysophosphatidylcholine production by peroxisome proliferator activated receptor α .,” *Journal of Lipid Research*, 第56巻, 第2号, pp. 254-265, 2015.
- [24] Sei Harada, Akiyoshi Hirayama, Queenie Chan, Ayako Kurihara, Kota Fukai, Miho Iida, Suzuka Kato, Daisuke Sugiyama, Kazuyo Kuwabara, Ayano Takeuchi, Miki Akiyama, Tomonori Okumura, Timothy M D. Eddels, Paul Elliott, Masaru Tomita, Asako Sato, Chizuru Suzuki, Masahiro Sugi, “Reliability of plasma polar metabolite concentrations in a large-scale cohort study using capillary electrophoresis-mass spectrometry,” *PLoS ONE*, 第13巻, 第1号, pp. 1-16, 2018.
- [25] Evan D. Rosen, Chung Hsin Hsu, Xinzhong Wang, Shuichi Sakai, Mason W. Freeman, Frank J. Gonzalez, Bruce M. Spiegelman, “C/EBP α induces

- adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway,” *Genes and Development*, 第 16 卷,第 1 号, pp. 22-26, 2002.
- [26] Zhidan Wu,Evan D Rosen,Regina Bru,Stefanie,Hauser,Guillaume Adelmant,Amy E Troy,Catherine McKeon,Gretchen J Darlington,Bruce M Spiegelman, “Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity,” *Molecular Cell*, 第 3 卷,第 2 号, pp. 151-158, 1999.
- [27] Bo T.Porse,Thomas Å.Pedersen,Xiufeng Xu,Bo Lindberg,Ulla M.Wewer,Lennart Friis Hansen,Claus Nerlov, “E2F Repression by C/EBP α Is Required for Adipogenesis and Granulopoiesis In Vivo,” *Cell*, 第 107 卷 107, 第 2 号, pp. 247-258, 2001.
- [28] 草野都、斎藤和季, “メタボロミクスの考え方と解析の概要,” *化学と生物*, 第 43 卷, pp. 101-108, 2005.
- [29] Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WE, Eisenson H, “A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance,” *Cell metab*, 第 9 卷, pp. 311-326, 2009.
- [30] 下村吉治、北浦靖之、門田吉弘, “分岐鎖アミノ酸とインスリン抵抗性,” *外科と代謝・栄養*, 第 49 卷, pp. 177-181, 2015.
- [31] Halama A, Horsch M, Kastenmuller G, Moller G, P Kumar, Prehn C, Laumen H, Hauner H, Hrabe de Angelis M, Beckers J, Suhre K, Adamski J, “Metabolic switch during adipogenesis : From branched chain amino acid catabolism to lipid synthesis,” *Arch Biochem Biophys*, 第 589 卷, pp. 93-107, 2016.
- [32] Spalding KL, Arner E, Westermarck PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Rydén M, Frisén J, Arner P, “Dynamics of fat cell turnover in humans,” *Nature*, 第 453 卷, pp. 783-787, 2008.
- [33] Mihalik SJ, Michaliszyn SF, de las Heras J, Bacha F, Lee S, Chace DH, DeJesus VR, Vockley J, Arslanian SA, “Metabolomic Profiling of Fatty Acid and Amino Acid Metabolism in Youth With Obesity and Type 2 Diabetes,” *Diabetes Care*, 第 35 卷, pp. 605-611, 2012.

- [34] Nie C, He T, Zhang W, Zhang G, Ma X, “Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism,” *International Journal of Molecular Sciences*, 第 19 卷, pp. 954-969, 2018.
- [35] Zhang Y, Guo K, LeBlanc RE, Loh D, Schwartz GJ, Yu YH, “Increasing Dietary Leucine Intake Reduces Diet-Induced,” *Diabetes*, 第 56 卷, pp. 1647-1654, 2007.
- [36] Junko N, Takayuki M, Mie A, Masataka S, Hironobu Y, “Isoleucine Prevents the Accumulation of Tissue Triglycerides and Upregulates the Expression of PPAR α and Uncoupling Protein in Diet-Induced Obese Mice1-3,” *The Journal of Nutrition*, 第 140 卷, pp. 496-500, 2010.
- [37] Ma Q, Zhou X, Sun Y, Hu L, Zhu J, Shao C, Meng Q, Shan A, “Threonine, but Not Lysine and Methionine, Reduces Fat Accumulation by Regulating Lipid Metabolism in Obese Mice,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 第 68 卷, pp. 4876-4883, 2020.
- [38] Opara EC, Petro A, Tevrizian A, Feinglos MN, Surwit RS, “L-Glutamine Supplementation of a High Fat Diet Reduces Body Weight and Attenuates Hyperglycemia and Hyperinsulinemia in C57BL/6J Mice,” *The Journal of Nutrition*, 第 126 卷, pp. 273-279, 1996.
- [39] Rotter V, Nagaev I, Smith U, “ Interleukin-6(IL-6)Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor-, Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects.,” *J. Biol. Chem*, 第 278 卷, pp. 45777-45784, 2003.
- [40] G. E. V, “ Transforming Growth Factor- β Enhances and Pro-inflammatory Cytokines Inhibit OB Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 第 240 卷, pp. 382-385, 1997.
- [41] Bruun J.M, Pedersen S.B, Kristensen K, Richelsen B, “ Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro.,” *Mol. Cell. Endocrinol*, 第 190 卷, pp. 91-99, 2002.
- [42] Trujillo M.E, Sullivan S, Harten I, Schneider S.H, Greenberg A.S, Fried S.K , “Interleukin-6 Regulates Human Adipose Tissue Lipid Metabolism and Leptin Production in Vitro,” *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 第 89 卷, pp. 5577-5582, 2004.

- [43] Greenberg A.S, Nordan R.P, McIntosh J, Calvo J.C, Scow R.O, Jablons D, “Interleukin 6 Reduces Lipoprotein Lipase Activity in Adipose Tissue of Mice in Vivo and in 3T3-L1 Adipocytes: A Possible Role for Interleukin 6 in Cancer Cachexia,” *Cancer Res*, 第 52 卷, pp. 4113-4116, 1992.
- [44] Fried S.K, Bunkin D.A, Greenberg A.S , “Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid,” *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 第 83 卷, pp. 847-850, 1998.
- [45] 岡村澄夫、伊藤俊彦、石井綾、沼山康紀, “コウジ菌によるコウジ酸の生産,” *秋田高専研究紀要*, 第 39 卷, pp. 115-118, 2004.
- [46] 三嶋 豊, 芝田 孝一, 瀬戸 英伸, 大山 康明, 波多江 慎吉, “コウジ酸のメラニン生成抑制作用と各種色素沈着症に対する治療効果,” *皮膚*, 第 36 卷, 第 2 号, pp. 134-150, 1994.
- [47] Shiv Kumar, K R Alagawadi, “Anti-obesity effects of galangin, a pancreatic lipase inhibitor in cafeteria diet fed female rats,” *Pharmaceutical Biology.*, 第 51 卷, 第 5 号, pp. 607-613, 2013.
- [48] Sarah Mohamed El-Korany, Omneya Mohamed Helmy, Ali Mahmoud El-Halawany, Yasser El-Mohammadi Ragab, Hamdallah Hafez Zedan , “Kojic acid repurposing as a pancreatic lipase inhibitor and the optimization of its production from a local *Aspergillus oryzae* soil isolate,” *BMC Biotechnology*, 第 52 卷, pp. 1-16, 2022.
- [49] R. Bentley, “From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid.,” *Natural product reports*, 第 23 卷, 第 6 号, pp. 1046-1062, 2006.
- [50] Saeedi M., Eslamifar M., Khezri, K. , “Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations.,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 第 110 卷, pp. 582-593, 2019.
- [51] 春日雅人、阪上浩、森要之, “脂肪細胞分化の転写制御,” *第 124 回日本医学会シンポジウム記録集 肥満の科学*, pp. 84-91, 2003.
- [52] Naoki Harada, Juan Zhao, Hiroki Kurihara, Naomi Nakagata, and Kenji Okajima, “Effects of Topical Application of α -D-Glucosylglycerol on Dermal Levels of Insulin-Like Growth Factor-1 in Mice and on Facial Skin Elasticity in Humans,” *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 第 74 卷, 第 4 号, pp. 759-765, 2010.

- [53] 岡嶋研二 , ““百薬の長”の効能のメカニズムを探る,” *日本醸造協会誌*, 第 105 卷,第 5 号, pp. 285-293, 2010.
- [54] 高橋宏志朗、平田みよ、田島麻理恵、中畑絵里子、浦野義崇、稲葉繁樹、北垣浩志 , “酒粕からのスフィンゴ脂質の検出・定量と清酒の種類による比較,” *日本生物工学会大会講演要旨集*, 第 64 卷, p. 166, 2012.
- [55] 本村亜矢子、秋田涼子、多田元比古、高橋義宣、江成宏之, “サケ由来コラーゲンペプチドとエラスチンペプチドのヒト皮膚繊維芽細胞(SF-TY)におけるヒアルロン酸産生促進および細胞増殖への相乗効果,” *日本水産学会誌*, 第 75 卷,第 1 号, pp. 86-88, 2009.
- [56] Zhiran Zou,Xiao Long,Qian Zhao,Yandong Zheng,Moshi Song,Shuai Ma,Yaobin Jing,Si Wang,Yifang He,Concepcion Rodriguez Esteban,Nanze Yu,Jiuzuo Huang,Piu Chan,Ting Chen,Juan Carlos Izpisua Belmonte,Weiqi Zhang,Jing Qu,Guang-Hui Liu, “ A Single-Cell Transcriptomic Atlas of Human Skin Aging,” *Development Cell*, 第 56 卷, pp. 383-397, 2021.
- [57] 坊垣 隆之、尾関 健二, “エチル- α -D-グルコシド高含有酒類の開発とその保湿機能,” *日本醸造協会誌*, 第 113 卷,第 6 号, pp. 336-345, 2018.
- [58] “特開 331579,” 2004.
- [59] “特開 162995,” 2014.
- [60] Harada Naoaki, “Stimulation of sensory neurons by capsaicin increases tissue levels of IGF-I, thereby reducing reperfusion-induced apoptosis in mice,” *Neuropharmacology*, 第 52 卷, pp. 1303-1311, 2007.
- [61] Takayuki Bogaki, Keiichi Mitani, Yuki Oura, Kenji Ozeki, “Effects of ethyl- α -D-glucoside on human dermal fibroblasts,” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 第 81 卷,第 9 号, pp. 1706-1711, 2017.
- [62] Hiroki Ohara, Satomi Ichikawa, Hitoshi Matsumoto, Minoru Akiyama, Norihiro Fujimoto, Takashi Kobayashi, Shingo Tajima, “Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts,” *Journal of Dermatology*, 第 37 卷,第 4 号, pp. 330-338, 2010 .
- [63] “特開 025155,” 2022.
- [64] Adachi Hiroaki,Okuno Ryosuke,Tanaka Hiroshi, “Effect of Cellular

- Senescence on the Structure of Collagen Produced by Fibroblasts,” *SPring-8/SACLA Research Report*, 第 9 卷,第 5 号, pp. 332-336, 2021.
- [65] K Maeda,M Fukuda, “ Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture,” *J Pharmacol Exp Ther*, 第 276 卷,第 2 号, pp. 765-769, 1996.
- [66] 山岸淑恵、勝呂栞, “メラニン産生抑制に対する L-シスチンの有効性,” *Food style 21*, 第 15 卷,第 5 号, pp. 58-61, 2011.
- [67] 松木光雄、渡部俊、小笠原綾子、三上健、松本 達二, “グルタチオンのメラニン合成阻害機構,” *YAKUGAKU ZASSHI*, 第 128 卷,第 8 号, pp. 1203-1207, 2008.
- [68] 内田智子、服部隆史、樫原修、谷久典、大石一三三, “酒粕由来阻害物のチロシナーゼ活性に対する影響,” *農芸化学講演要旨*, 第 169 卷, 1997.
- [69] Hyung Joon Jeon,Masafumi Noda, Masafumi Maruyama, Yasuyuki Matoba, Takanori Kumagai, and Masanori Sugiyama, “Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees,” *J Agric Food Che*, 第 54 卷,第 26 号, pp. 9827-9833, 2006.
- [70] 江崎秀男、森久美子、中村好志, “酒粕中のフェノール性抗酸化物質の分離と同定,” *椋山女学園大学研究論集*, 第 45 卷, pp. 11-22, 2014.
- [71] 黄桜株式会社, “酒粕の成分抽出方法と清酒及び酒類の製造方法,” pp. 公開番号 1999-075811, 1997.
- [72] 渡辺敏郎, “健康と美容に貢献する「酒粕」の成分,” *日本醸造協会誌*, 第 107 卷,第 5 号, pp. 282-291, 2012.
- [73] Ahmad Firdaus B. Lajis、Muhajir Hamid、Arbakariya B. Ariff, “Depigmenting effect of Kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- [74] Rotter V,Nagaev I,Smith,U, “ 14. Interleukin-6(IL-6)Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor-,Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects.,” *J. Biol. Chem*, 第 278 卷, pp. 45777-45784, 2003.
- [75] Bruun J.M,Pedersen S.B,Kristensen K,Richelsen B , “ 16. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro.,” *Mol. Cell. Endocrinol*, 第 190 卷, pp. 91-99, 2002.

- [76] Tsuyoshi Goto, Mariko Hirata, Yumeko Aoki, Mari Iwase, Haruya Takahashi, Minji Kim, Yongjia Li, Huei-Fen Jheng, Wataru Nomura, Nobuyuki Takahashi, Chu-Sook Kim, Rina Yu, Shigeto Seno, Hideo Matsuda, Megumi Aizawa-Abe, Ken Ebihara, Nobuyuki Itoh, Teruo Kawada, "The hepatokine FGF21 is crucial for peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist-induced amelioration of metabolic disorders in obese mice," *Journal of Biological Chemistry*, 第 292 卷, 第 22, pp. 9175-9190, 2017.

表 1 酒粕素材の成分分析結果

	酒粕	難消化成分	発酵エキス末
全糖量(mg/g)	292.3	219.1	267.5
直糖量(mg/g)	6.6	4.3	-
粗タンパク質(mg/g)	253	413	-
食物繊維(mg/g)	76.0	257.0	-

※-は未測定

表 2 HPLC 法による酒粕素材の遊離アミノ酸総量の比較

	酒粕	難消化成分	発酵エキス末
20℃抽出液(mg/g)	51.4	21.5	200.2
60℃抽出液(mg/g)	58.4	32.9	193
100℃抽出液(mg/g)	-	26.5	-

※-は未測定

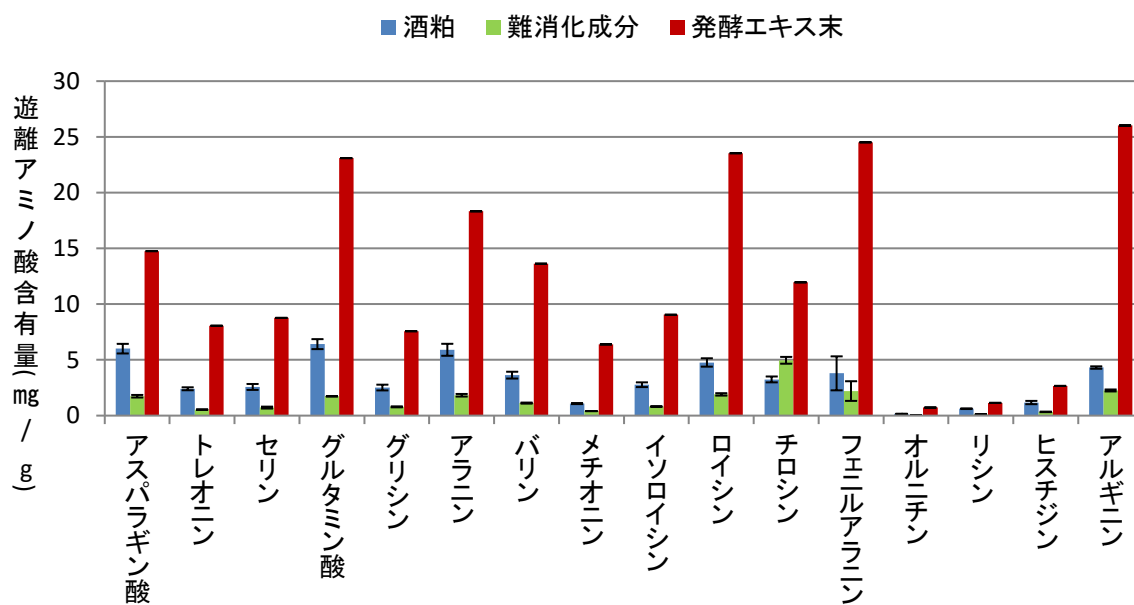


図 1 各材料の 20℃抽出液の遊離アミノ酸含量の比較

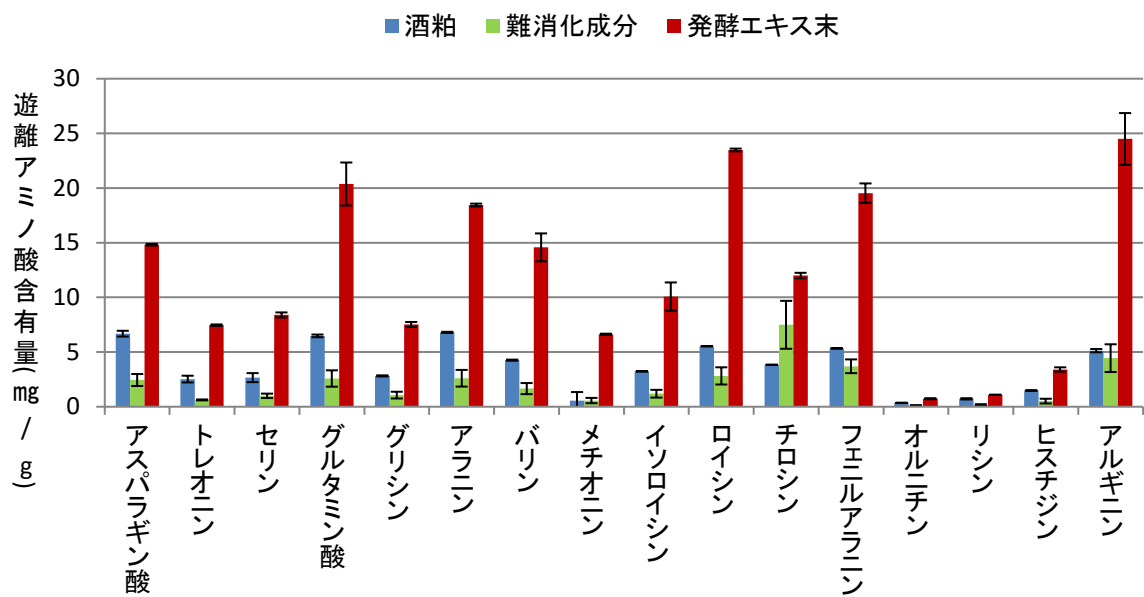


図2 各材料の60°C抽出液の遊離アミノ酸含量の比較

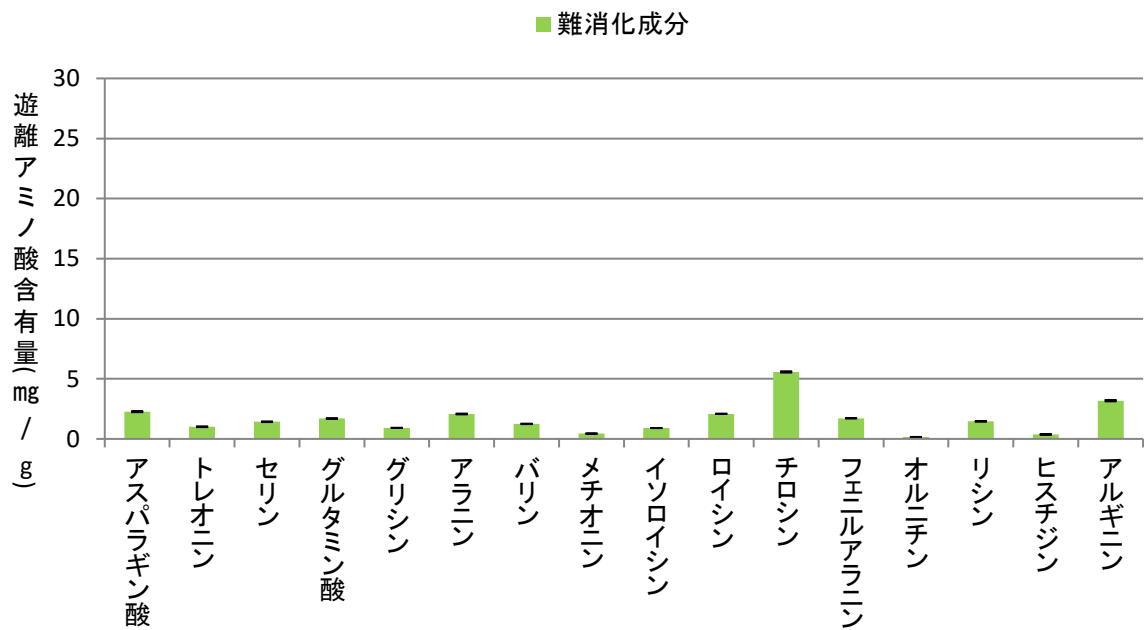


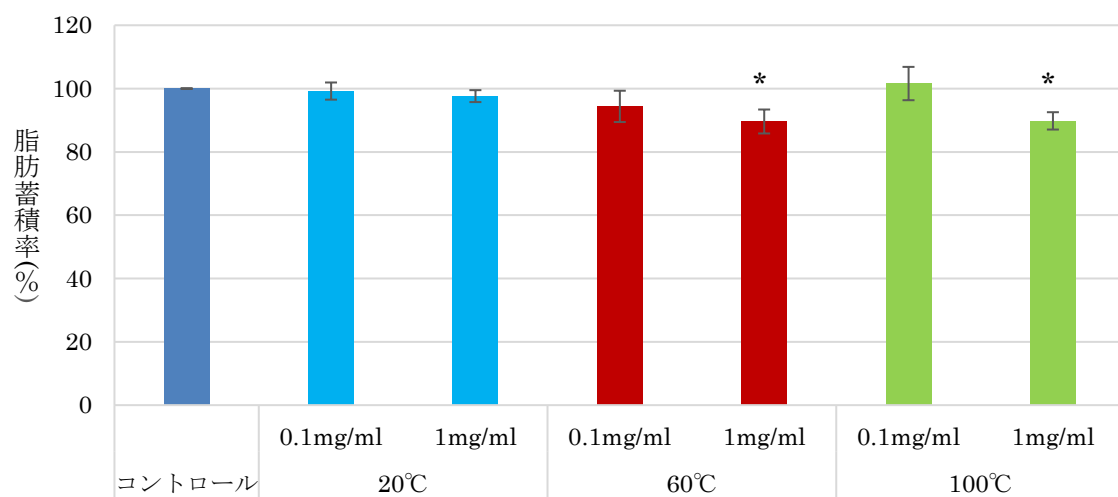
図3 難消化成分の100°C抽出液の遊離アミノ酸含量

表 3 酒粕抽出液(10g/100ml)の成分分析の結果

抽出温度(°C)	20°C	60°C	100°C
固形分(g/100ml)	5.08	5.28	5.22
全糖量(g/100ml)	1.74	1.85	1.91
タンパク質量(g/100ml)	0.21	0.20	0.16

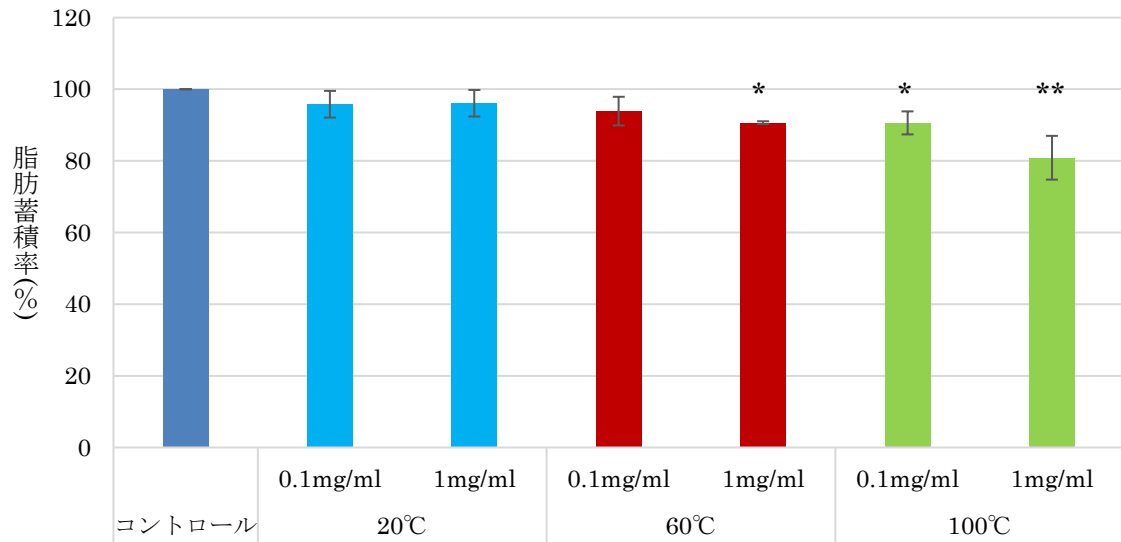
表 4 難消化成分抽出液(10g/100ml)の成分分析の結果

抽出温度(°C)	20°C	60°C	100°C
固形分(g/100ml)	0.82	0.80	1.01
全糖量(g/100ml)	0.11	0.13	0.22
タンパク質量(g/100ml)	0.54	0.59	0.66



* : P<0.05

図 4 酒粕抽出液添加培養細胞における脂肪蓄積率の比較



* : P<0.05, ** : P<0.01

図 5 難消化成分抽出液添加培養細胞における脂肪蓄積率の比較

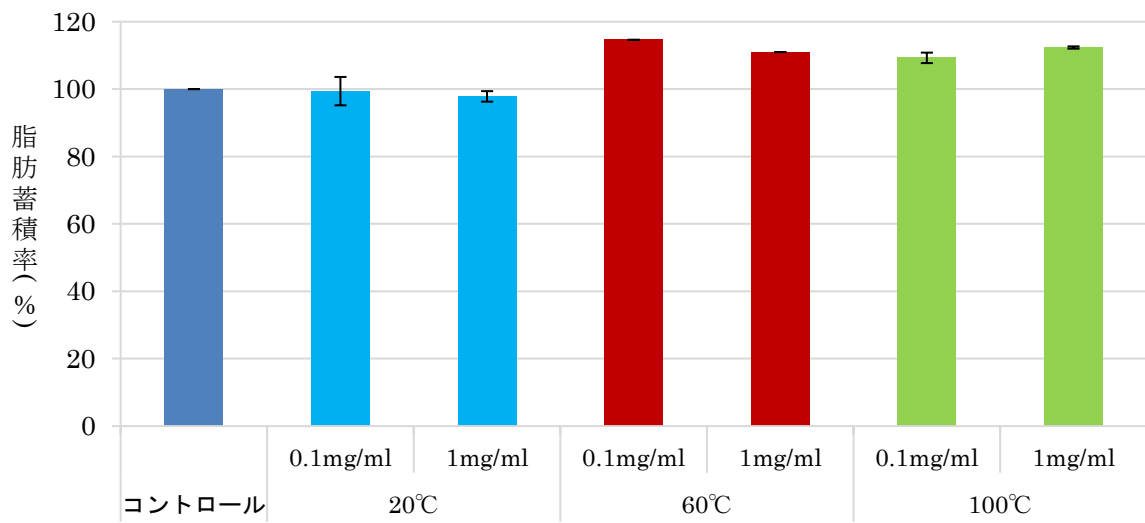


図 6 発酵エキス末抽出液添加培養細胞における脂肪蓄積率の比較

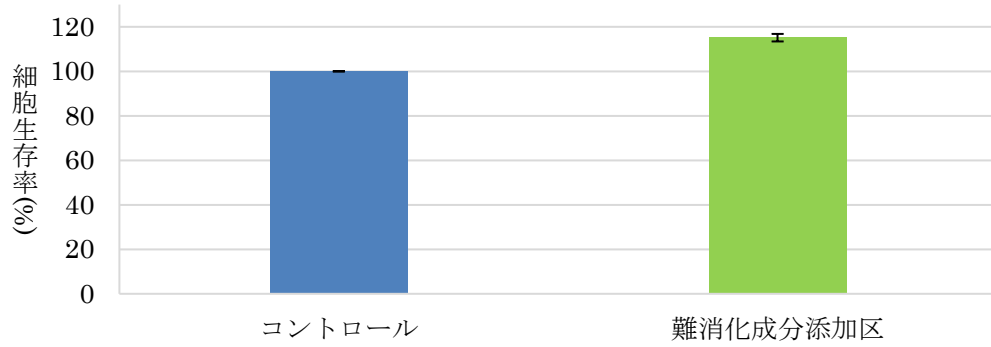
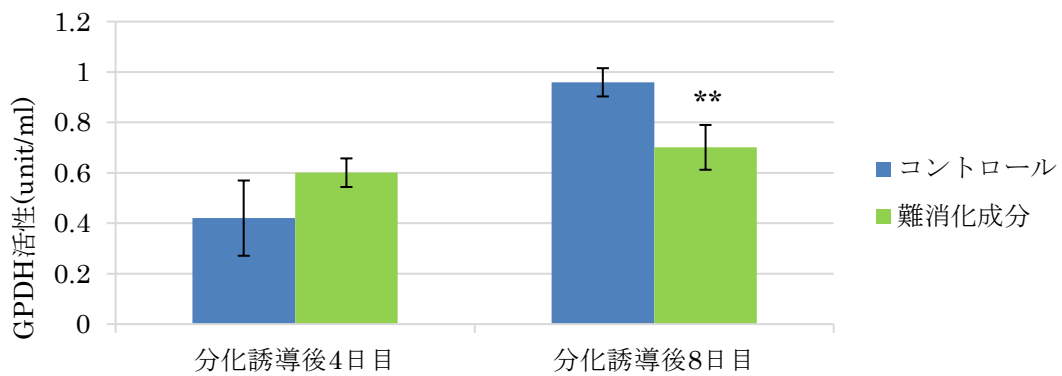


図7 難消化成分添加培養細胞における細胞生存率



** : P<0.01

図8 難消化成分添加培養細胞における
分化誘導後4日目と8日目のGPDH活性の比較

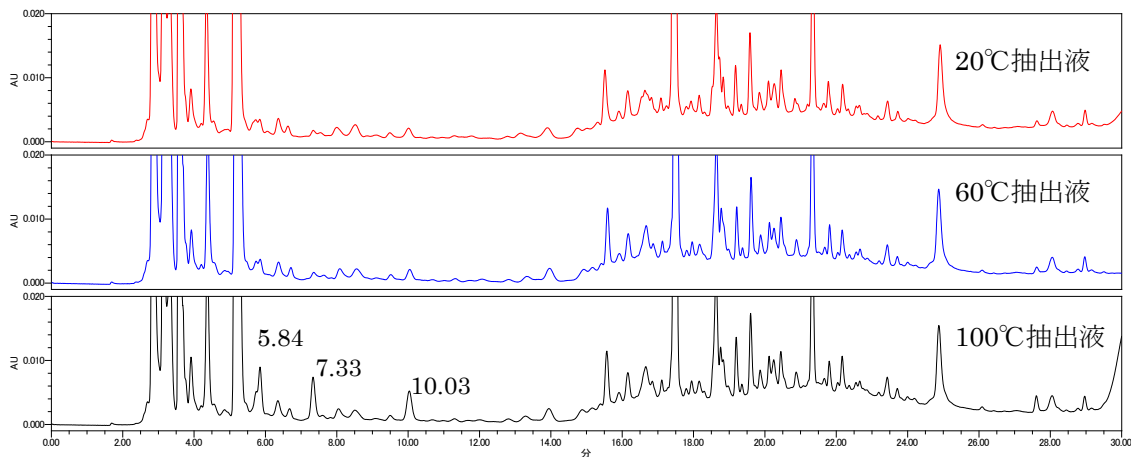


図9 難消化成分 20°C、60°C、100°C抽出液におけるHPLCによる分画結果

表 5 メタボローム解析による脂肪細胞内代謝物の測定結果

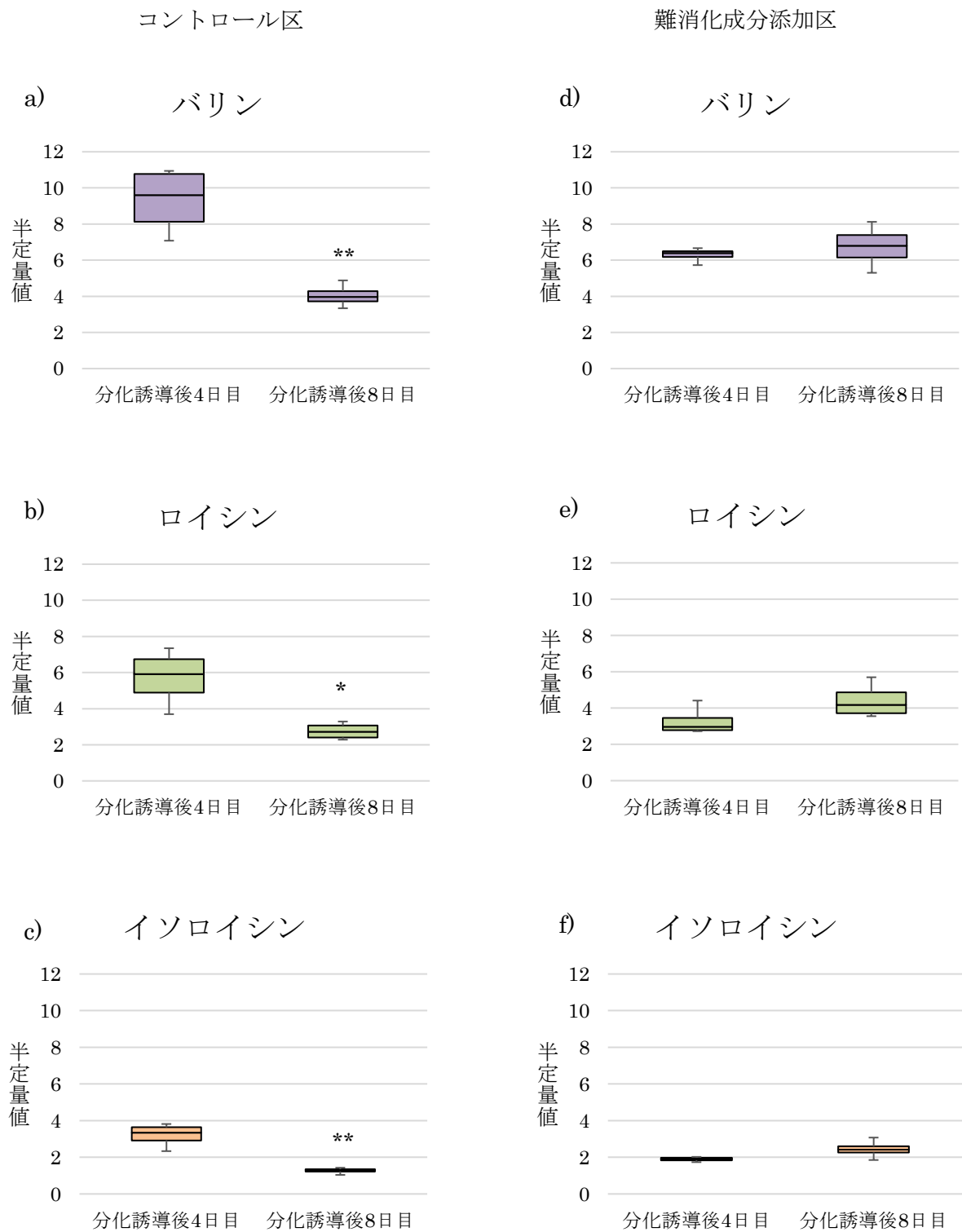
代謝物名	分化誘導後 4 日目		分化誘導後 8 日目	
	<i>p</i> 値	半定量値	<i>p</i> 値	半定量値
Pyruvic acid	<u>0.0055</u>	<u>0.76</u>	0.3270	1.11
Lactic acid	<u>0.0002</u>	<u>0.67</u>	0.1753	1.19
Glycolic acid	0.2290	0.91	<u>0.0019</u>	<u>1.38</u>
Alanine	0.1153	0.63	<u>0.0358</u>	<u>3.06</u>
2-keto-isovaleric acid	0.8862	0.96	<u>0.0436</u>	<u>2.81</u>
Glycine	0.8704	1.07	<u>0.0371</u>	<u>2.99</u>
2-Hydroxybutyric acid	0.2360	0.84	<u>0.0003</u>	<u>1.84</u>
Sarcosine	0.4409	1.09	<u>0.0076</u>	<u>1.54</u>
2-Aminoisobutyric acid	<u>0.0167</u>	<u>1.21</u>	<u>0.00002</u>	<u>1.51</u>
3-Hydroxybutyric acid	<u>0.0025</u>	<u>0.69</u>	0.0507	1.36
3-Aminopropanoic acid	<u>0.0080</u>	<u>0.26</u>	0.1166	2.78
Acetoacetic acid	0.1156	0.80	<u>0.0169</u>	<u>1.69</u>
3-Hydroxyisovaleric acid	0.1585	0.91	<u>0.0152</u>	<u>1.56</u>
Valine	<u>0.0192</u>	<u>0.68</u>	<u>0.0070</u>	<u>1.67</u>
Dihydroxyacetone	<u>0.0024</u>	<u>0.56</u>	0.1078	1.47
2-Aminoethanol	0.1878	0.87	<u>0.0003</u>	<u>1.79</u>
Glycerol	<u>0.0036</u>	<u>0.84</u>	<u>0.0021</u>	<u>1.38</u>
Leucine	<u>0.0327</u>	<u>0.57</u>	<u>0.0225</u>	<u>1.60</u>
Octanoic acid	<u>0.0417</u>	<u>1.29</u>	0.1766	1.32
Phosphoric acid	0.9007	1.01	<u>0.0067</u>	<u>1.64</u>

Isoleucine	<u>0.0075</u>	<u>0.59</u>	<u>0.0043</u>	<u>1.92</u>
Proline	<u>0.0151</u>	<u>0.52</u>	<u>0.0080</u>	<u>2.54</u>
Succinic acid	<u>0.0011</u>	<u>0.56</u>	<u>0.0452</u>	<u>1.53</u>
Glyceric acid	<u>0.0019</u>	<u>0.58</u>	0.5820	1.13
Uracil	<u>0.0023</u>	<u>0.73</u>	0.0786	1.29
Serine	<u>0.0129</u>	<u>0.41</u>	<u>0.0022</u>	<u>2.39</u>
Fumaric acid	0.5168	0.95	<u>0.0037</u>	<u>1.65</u>
Homoserine	0.1694	1.14	<u>0.0272</u>	<u>1.95</u>
Nonanoic acid	0.0633	1.14	<u>0.0063</u>	<u>1.47</u>
Threonine	<u>0.0232</u>	<u>0.63</u>	<u>0.0010</u>	<u>2.73</u>
Glutaric acid	0.0992	0.77	<u>0.0347</u>	<u>1.74</u>
Citramalic acid	0.1531	0.89	<u>0.0114</u>	<u>2.03</u>
Threitol	<u>0.0383</u>	<u>0.79</u>	<u>0.0498</u>	<u>1.83</u>
Malic acid	<u>0.0428</u>	<u>0.78</u>	<u>0.0492</u>	<u>1.83</u>
meso-Erythritol	<u>0.0023</u>	<u>0.81</u>	<u>0.0374</u>	<u>1.84</u>
Aspartic acid	<u>0.0231</u>	<u>0.56</u>	<u>0.0001</u>	<u>2.04</u>
3-Aminoglutaric acid	<u>0.0252</u>	<u>0.56</u>	<u>0.0001</u>	<u>2.03</u>
4-Hydroxyproline	<u>0.0102</u>	<u>0.61</u>	<u>0.0128</u>	<u>2.51</u>
Methionine	<u>0.0153</u>	<u>0.59</u>	<u>0.0027</u>	<u>2.31</u>
4-Aminobutyric acid	0.0670	1.15	<u>0.0056</u>	<u>2.75</u>
5-Oxoproline	0.1823	0.88	<u>0.0206</u>	<u>2.30</u>
Cysteine	<u>0.0100</u>	<u>0.53</u>	<u>0.0011</u>	<u>2.18</u>
Creatinine	0.1297	0.78	<u>0.0026</u>	<u>1.61</u>

2-ketoglutaric acid	0.7964	1.04	<u>0.0071</u>	<u>1.99</u>
Glutamic acid	<u>0.0148</u>	<u>0.55</u>	<u>0.0041</u>	<u>1.75</u>
5-Aminovaleric acid	0.3171	1.18	<u>0.0010</u>	<u>2.03</u>
Xylose	<u>0.0136</u>	<u>0.85</u>	<u>0.0268</u>	<u>2.05</u>
Phenylalanine	<u>0.0030</u>	<u>0.63</u>	<u>0.0077</u>	<u>2.33</u>
Lyxose	0.8255	0.98	<u>0.0004</u>	<u>1.46</u>
Arabinose	<u>0.0074</u>	<u>0.80</u>	<u>0.0164</u>	<u>1.84</u>
Ribulose	0.6849	0.93	<u>0.0118</u>	<u>1.39</u>
Lauric acid	0.0909	1.08	<u>0.0062</u>	<u>1.41</u>
Ribose	0.5429	1.05	<u>0.0007</u>	<u>1.48</u>
Homocysteine	<u>0.0041</u>	<u>0.63</u>	<u>0.0285</u>	<u>2.02</u>
Asparagine	0.0864	0.65	<u>0.0045</u>	<u>2.04</u>
Xylitol	<u>0.0292</u>	<u>0.72</u>	<u>0.0095</u>	<u>1.85</u>
Arabitol	0.2740	1.04	<u>0.0001</u>	<u>1.42</u>
2-Deoxy-glucose	0.5964	1.03	<u>0.00004</u>	<u>1.42</u>
Orotic acid	<u>0.0001</u>	<u>0.72</u>	<u>0.0005</u>	<u>1.74</u>
Isocitric acid	<u>0.0440</u>	<u>1.40</u>	0.0623	2.95
2-Aminopimelic acid	<u>0.0256</u>	<u>1.50</u>	<u>0.0350</u>	<u>3.09</u>
Citric acid	<u>0.0306</u>	<u>1.50</u>	<u>0.0343</u>	<u>3.16</u>
Ornithine	0.7128	0.88	<u>0.0249</u>	<u>1.84</u>
Glycyl-Glycine	0.1939	0.90	<u>0.0045</u>	<u>1.54</u>
Cadaverine	<u>0.0463</u>	<u>0.84</u>	<u>0.0039</u>	<u>1.47</u>
Mannose	<u>0.0048</u>	<u>0.73</u>	<u>0.0174</u>	<u>1.78</u>

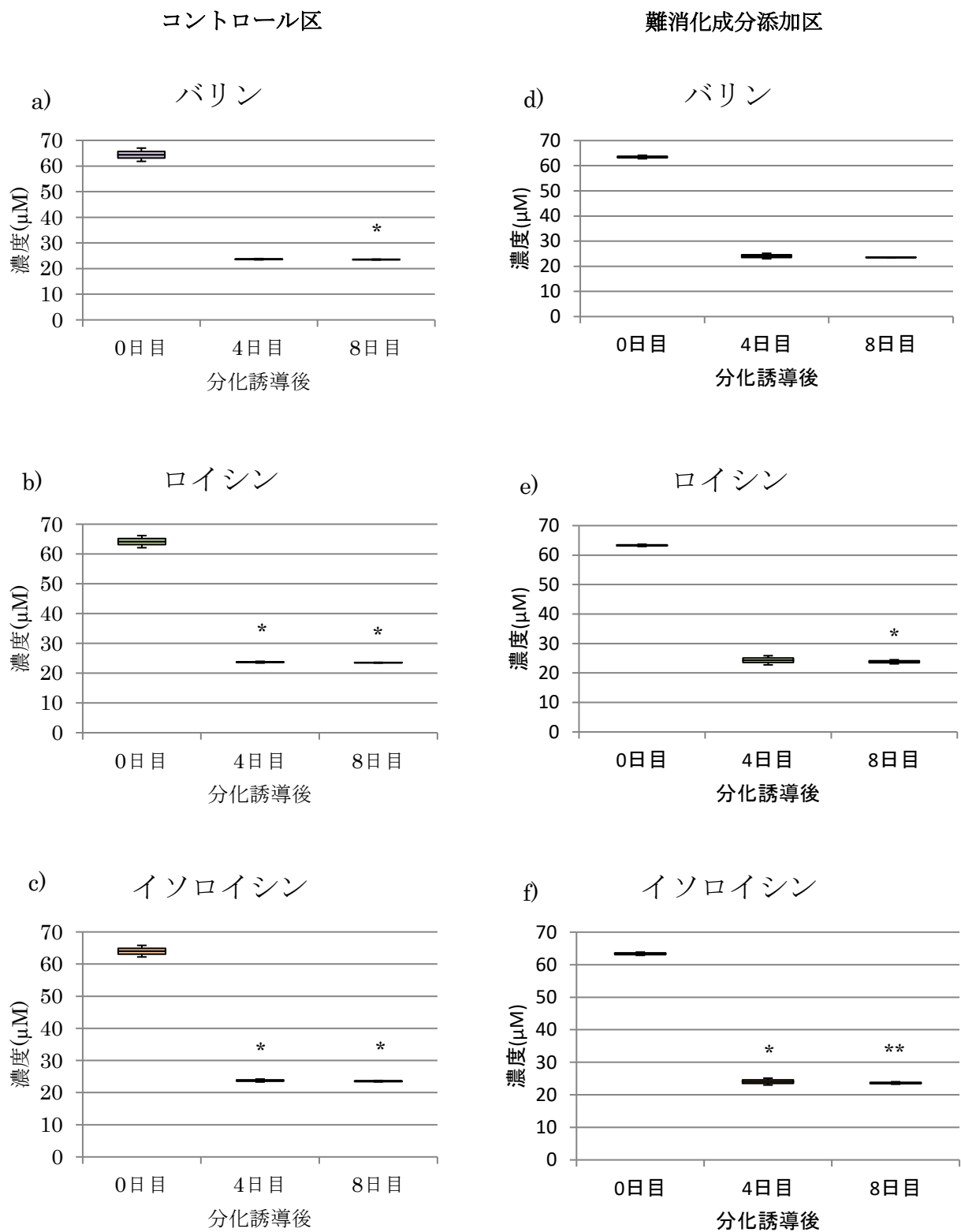
Glucose	<u>0.0015</u>	<u>0.47</u>	0.3026	2.10
Galacturonic acid	0.1774	0.87	<u>0.0058</u>	<u>1.84</u>
Glucuronic acid	0.1764	0.87	<u>0.0069</u>	<u>1.84</u>
Tryptamine	0.0584	0.82	<u>0.0219</u>	<u>1.85</u>
Glucaric acid	<u>0.0272</u>	<u>0.72</u>	<u>0.0077</u>	<u>1.71</u>
Palmitoleic acid	<u>0.0024</u>	<u>2.13</u>	0.0508	1.41
Inositol	0.2936	0.91	<u>0.0014</u>	<u>1.43</u>
Margaric acid	<u>0.0337</u>	<u>1.14</u>	<u>0.0023</u>	<u>1.38</u>
Kynurenine	<u>0.0583</u>	<u>0.73</u>	<u>0.0002</u>	<u>1.54</u>
2,3-bisphosphoglyceric acid	0.0936	0.77	<u>0.0005</u>	<u>1.58</u>
Cystamine	<u>0.0408</u>	<u>0.78</u>	<u>0.0091</u>	<u>1.43</u>
Elaidic acid	0.9684	0.98	<u>0.0328</u>	<u>1.29</u>
Stearic acid	0.9072	1.01	<u>0.0042</u>	<u>1.37</u>
Maltose	<u>0.0141</u>	<u>0.78</u>	0.1247	1.67

※太字は有意な違い($p < 0.05$) が認められたもの



* : P<0.05, ** : P<0.01

図 10 メタボローム解析による脂肪細胞における BCAA の測定結果



* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

図 11 HPLC による脂肪細胞培養培地の BCAA 濃度

表 6 Real-time PCR による分化誘導 2、4、8 日目の難消化成分添加培養細胞における遺伝子の発現比

遺伝子名	分化誘導後 2 日目	分化誘導後 4 日目	分化誘導後 8 日目
Adipoq	1.09	0.86	1.35
Adrb3	0.33	1.48	1.21
Cebpa	1.09	1.63	2.25
Cebpb	0.69	1.31	0.75
Cebpd	3.48	0.32	0.33
Fabp4	0.63	1.34	0.85
Il10	0.00	0.00	0.00
Il1b	0.00	0.00	1.30
Il6	0.40	0.23	0.65
Insr	1.06	1.11	1.37
Irs1	0.92	0.71	0.92
Irs2	1.57	0.56	0.68
Lep	0.00	0.00	1.03
Ccl2	0.51	1.47	1.13
Serpine1	1.80	1.20	1.32
Plin1	1.41	2.09	1.30
Pparg	0.98	1.32	1.13
Rbp4	0.00	0.00	1.64
Retn	0.95	1.23	0.92
Slc2a1	1.11	0.44	1.51
Slc2a4	1.13	1.16	1.72
Tnf	0.00	0.00	0.70
Ucp1	0.00	0.64	1.47
Ucp2	1.40	0.86	1.41
Ucp3	0.00	3.12	1.26
Ppargc1a	1.43	0.62	1.39
Lipe	0.99	1.08	1.27
Hsd11b1	1.07	0.56	1.01
Prdm16	0.00	0.83	1.31

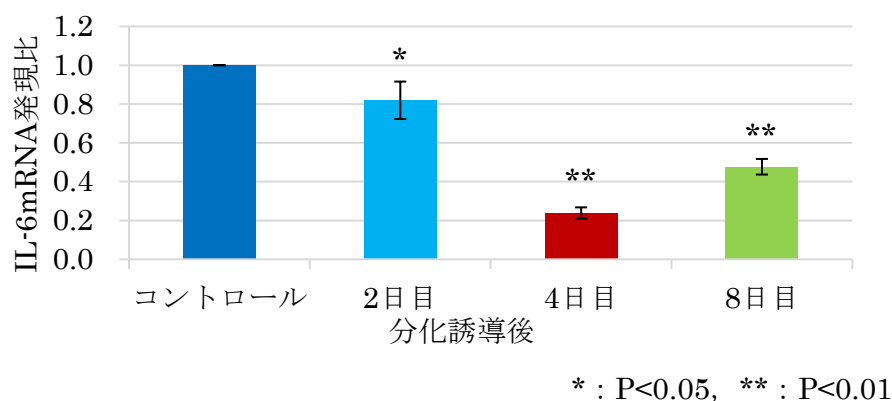


図 12 難消化成分添加培養細胞における Real-time PCR による IL-6 の発現比の比較

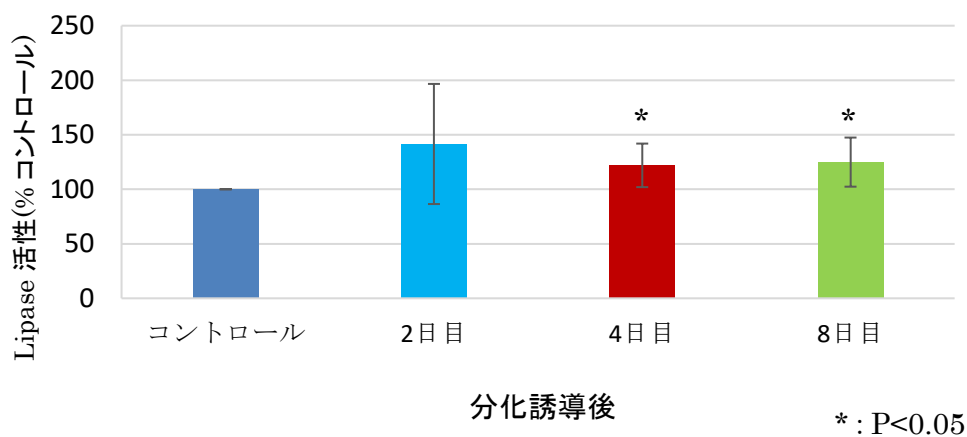


図 13 難消化成分添加培養細胞における LPL 活性の比較

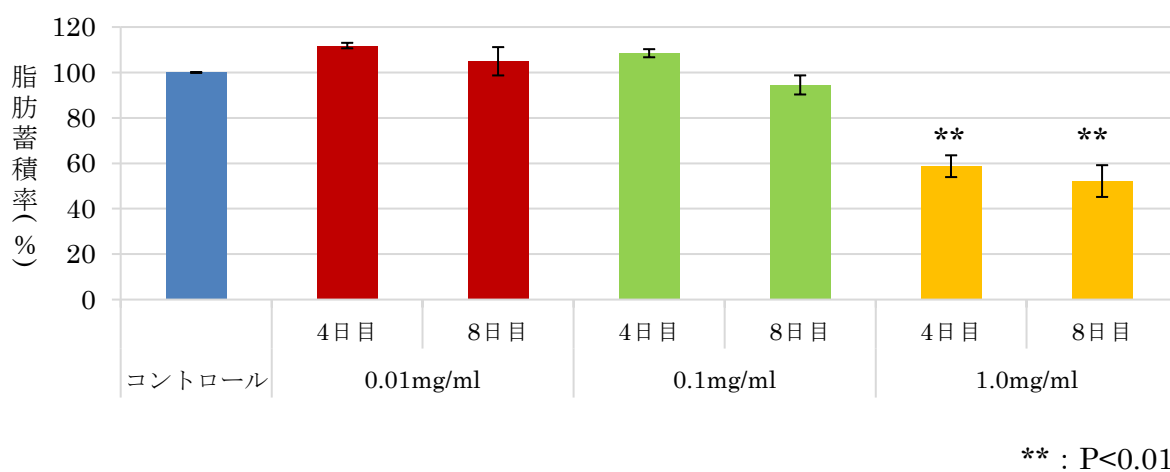


図 14 コウジ酸添加培養細胞における脂肪蓄積率の比較

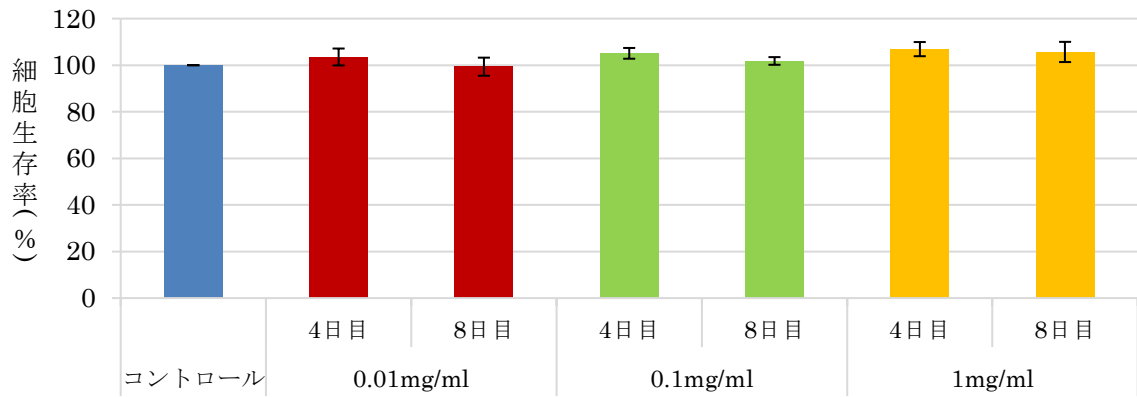


図 15 コウジ酸添加培養細胞における細胞生存率

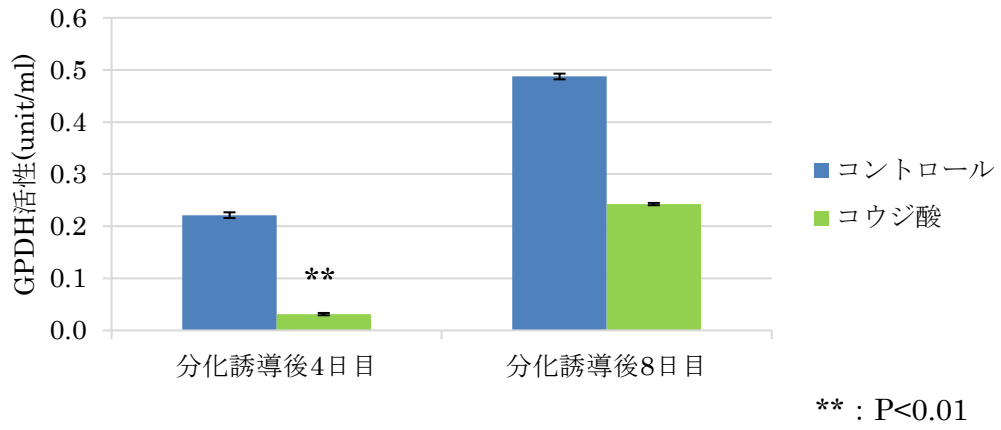
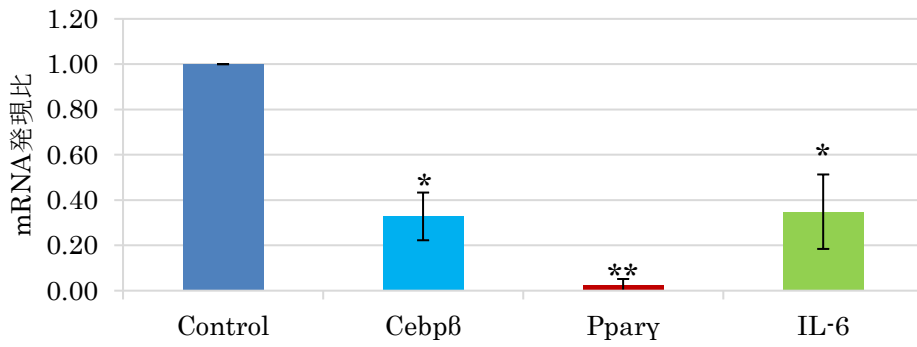


図 16 コウジ酸 1mg/ml 添加培養細胞における
分化誘導後 4 日目と 8 日目の GPDH 活性の比較

表 7 Real-time PCR によるコウジ酸添加培養細胞における遺伝子の発現比

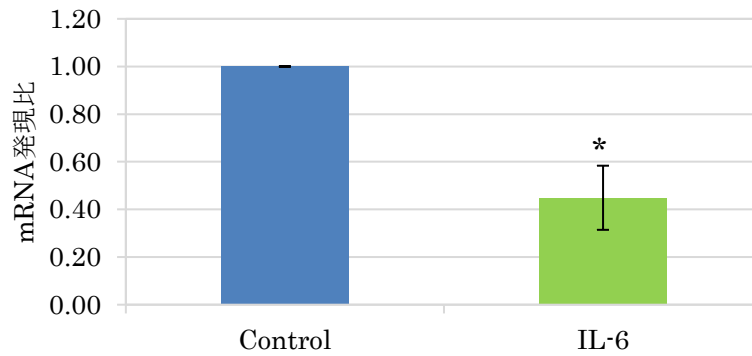
遺伝子名	分化誘導後 4 日目	分化誘導後 8 日目
Adipoq	3.79	0.38
Adrb3	4.43	0.19
Cebpa	0.86	0.41
Cebpb	0.25	0.44
Cebpd	0.00	0.46
Fabp4	1.44	0.48
Il10	0.00	0.00
Il1b	0.00	0.00
Il6	0.42	0.45
Insr	1.41	1.36
Irs1	4.93	0.45
Irs2	0.16	0.16
Lep	0.00	1.23
Ccl2	0.99	0.78
Serpine1	0.75	0.66
Plin1	2.01	0.80
Pparg	0.16	0.45
Rbp4	0.00	0.00
Retn	3.20	0.77
Slc2a1	1.22	1.02
Slc2a4	0.00	1.01
Tnf	0.00	0.00
Ucp1	0.00	0.00
Ucp2	1.60	0.78
Ucp3	0.00	0.00
Ppargc1a	0.70	0.32
Lipe	1.35	0.45
Hsd11b1	1.70	0.69
Prdm16	0.33	0.00



* : P<0.05, ** : P<0.01

図 17 分化誘導後 4 日目のコウジ酸 1mg/ml 添加培養細胞における

Real-time PCR による遺伝子発現比の比較



* : P<0.05

図 18 分化誘導後 8 日目のコウジ酸 1mg/ml 添加培養細胞における IL-6 の発現比の比較

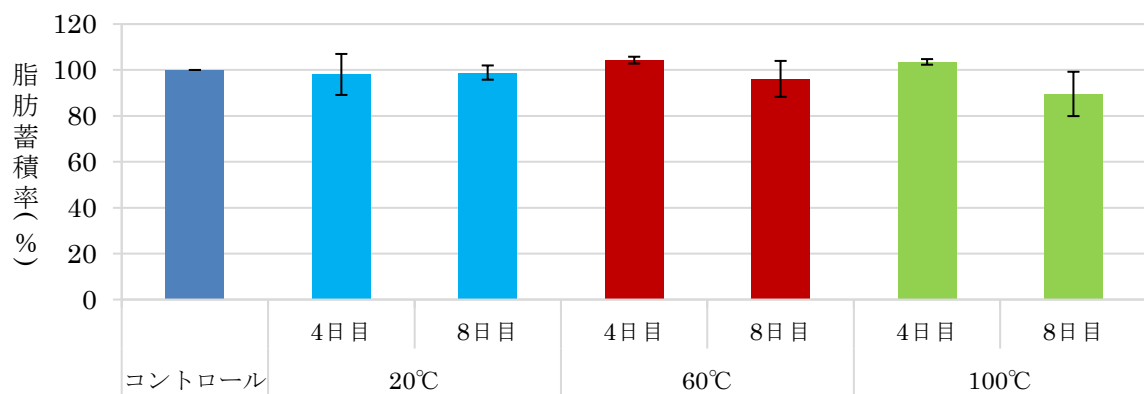


図 19 酒粕 0.1mg/ml 添加培養細胞における脂肪蓄積率の比較

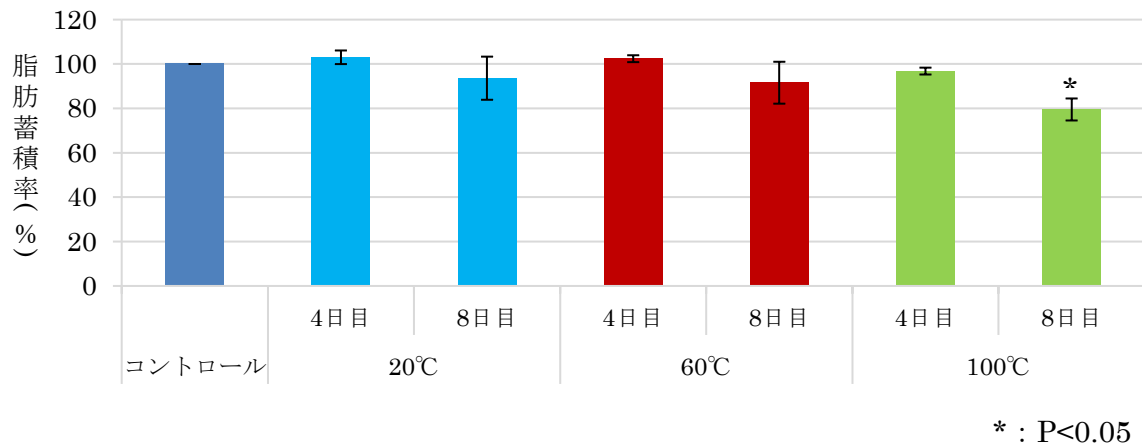


図 20 酒粕 1mg/ml 添加培養細胞における脂肪蓄積率の比較

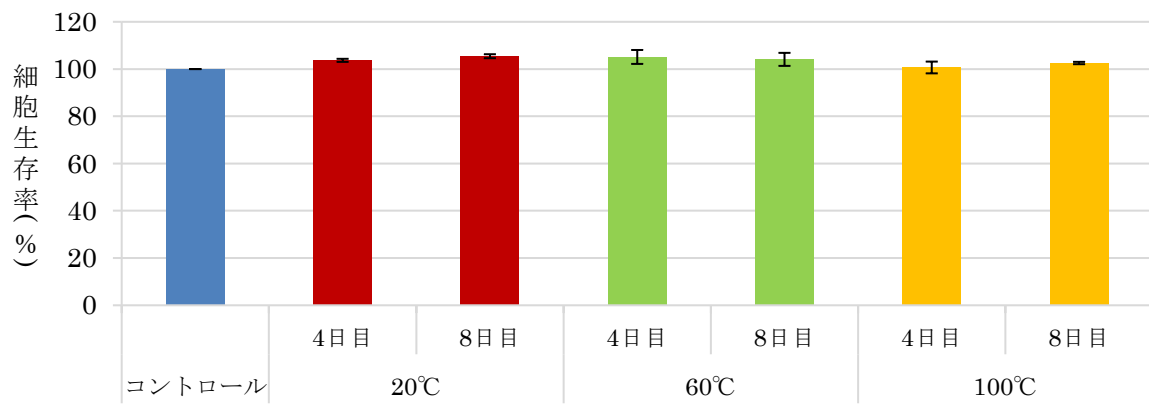


図 21 酒粕 0.1mg/ml 添加培養細胞における細胞生存率

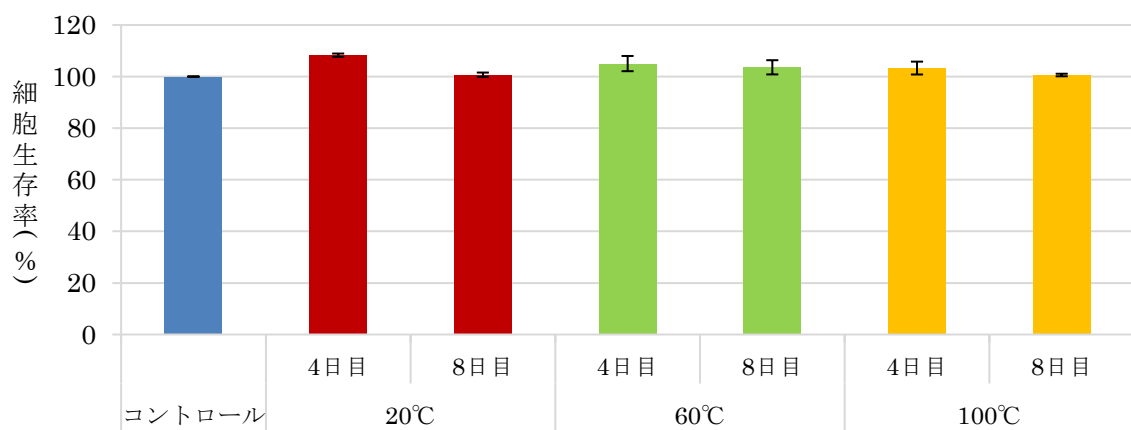


図 22 酒粕 1mg/ml 添加培養細胞における細胞生存率

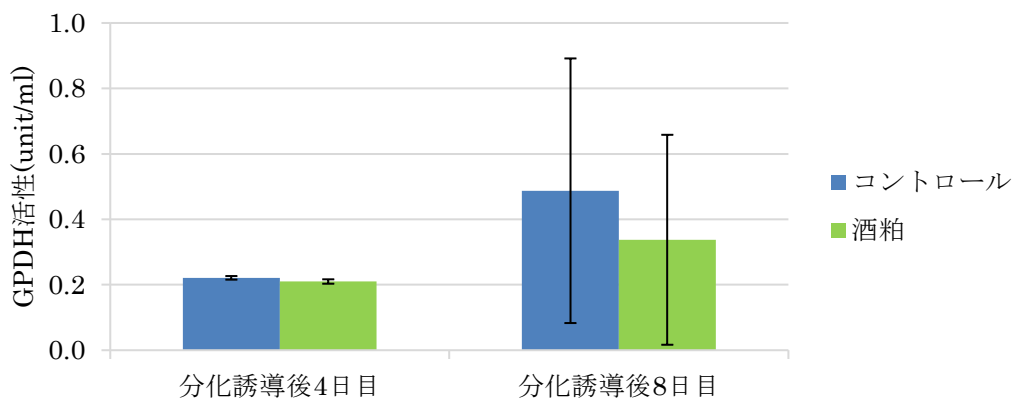
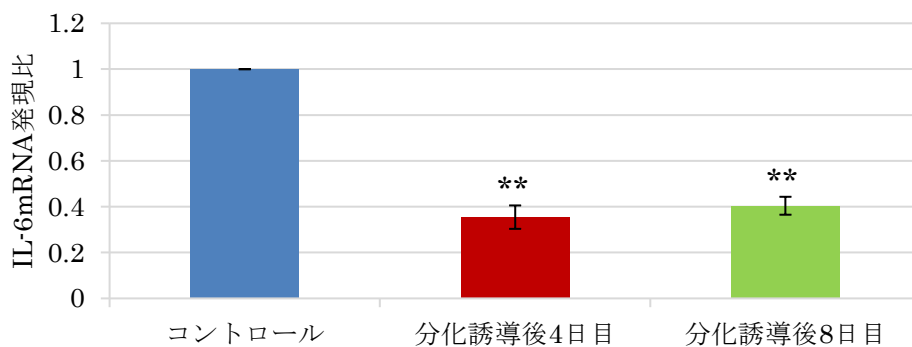


図 23 酒粕 100°C抽出液 1mg/ml 添加培養細胞における
分化誘導後 4 日目と 8 日目の GPDH 活性の比較

表 8 Real-time PCR による酒粕添加培養細胞における遺伝子の発現比

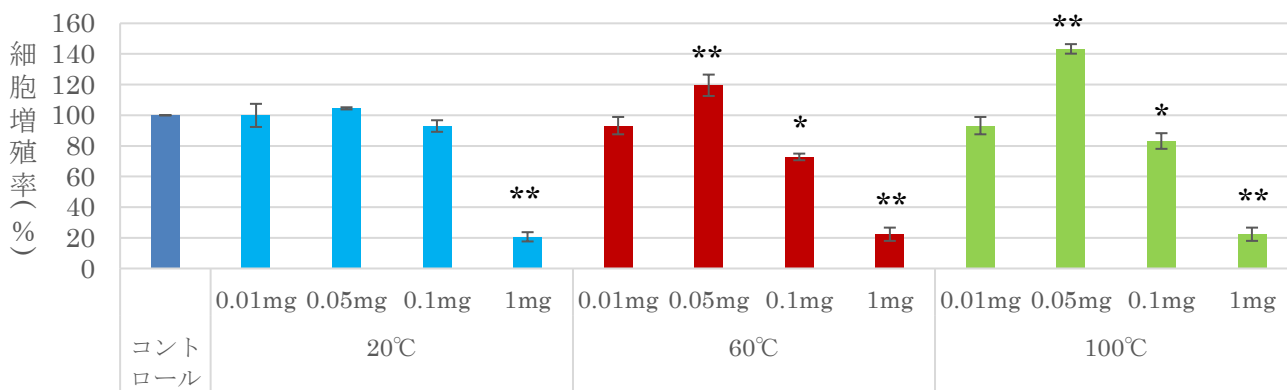
遺伝子名	分化誘導後 4 日目	分化誘導後 8 日目
Adipoq	3.05	1.59
Adrb3	3.95	3.60
Cebpa	1.30	1.47
Cebpb	1.45	0.82
Cebpd	0.00	1.14
Fabp4	2.44	0.82
Il10	0.00	0.00
Il1b	0.00	0.00
Il6	0.35	0.43
Insr	4.30	1.98
Irs1	1.64	0.98
Irs2	0.24	0.32
Lep	0.00	1.14
Ccl2	0.36	2.17
Serpine1	1.02	2.01
Plin1	1.21	2.43
Pparg	1.79	0.58
Rbp4	0.00	0.00
Retn	3.24	1.90

Slc2a1	0.46	1.35
Slc2a4	0.12	0.99
Tnf	0.00	0.00
Ucp1	0.00	0.00
Ucp2	1.79	1.94
Ucp3	0.00	0.79
Ppargc1a	0.40	2.44
Lipe	1.59	1.74
Hsd11b1	2.42	1.65
Prdm16	0.22	0.45



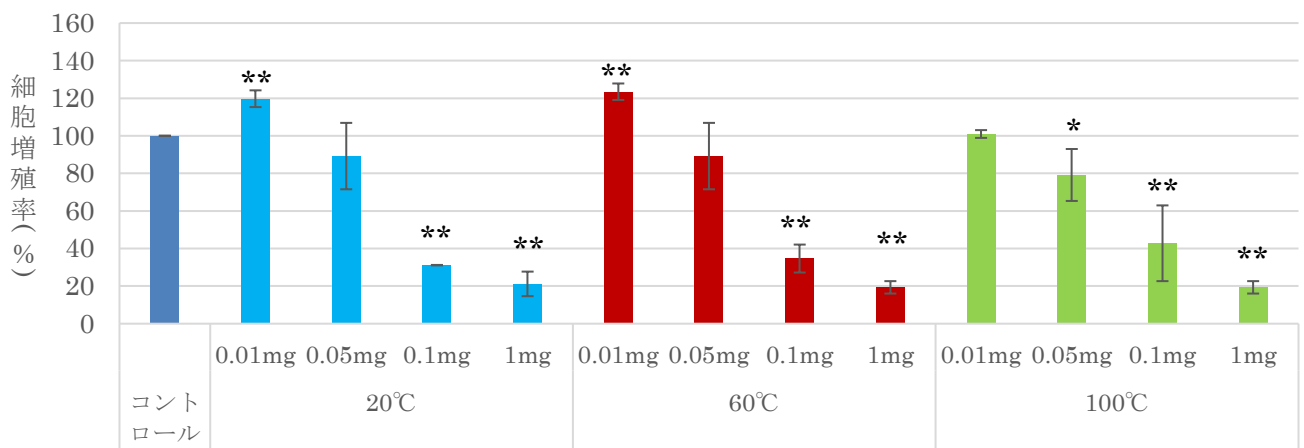
** : P<0.01

図 24 酒粕添加培養細胞における IL-6 の発現比の比較



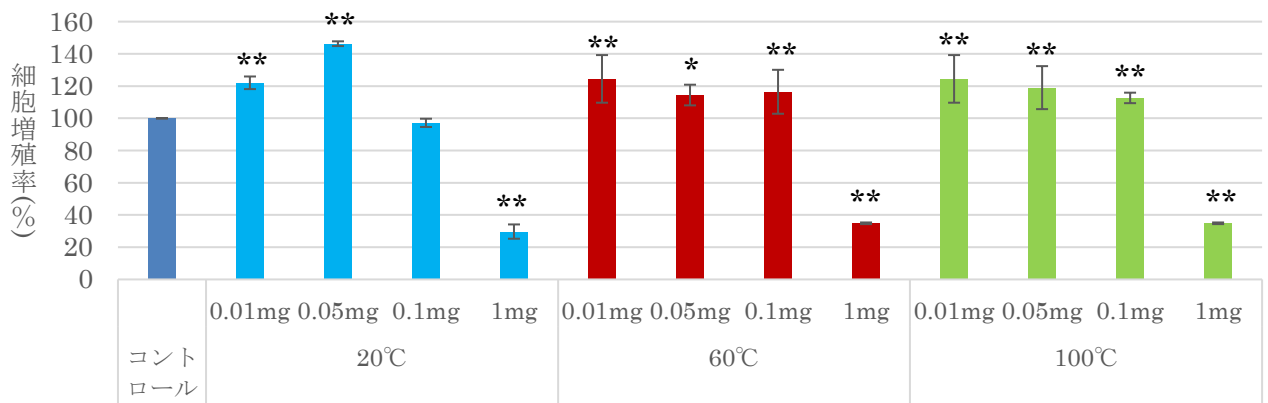
* : P<0.05, ** : P<0.01

図 25 酒粕添加培養細胞における正常ヒト線維芽細胞の増殖率



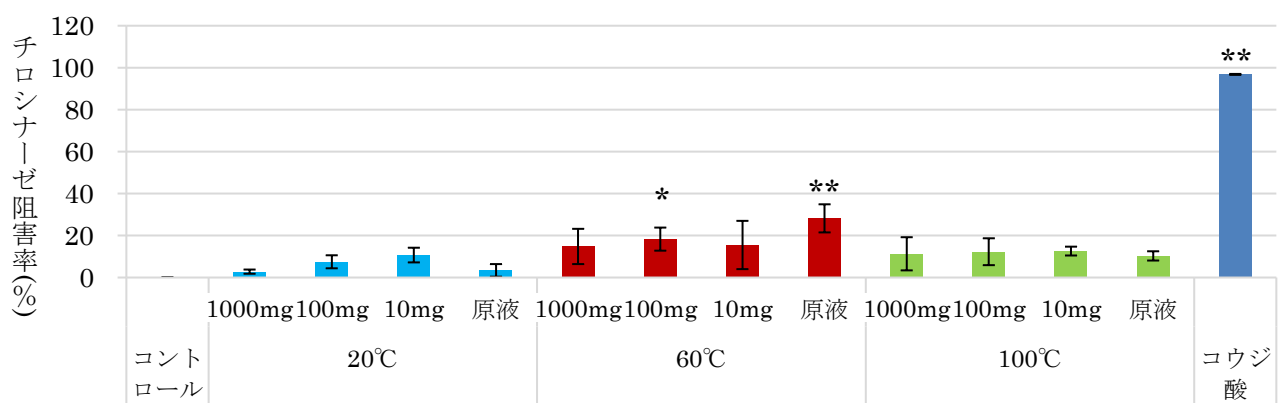
* : P<0.05, ** : P<0.01

図 26 難消化成分添加培養細胞における正常ヒト線維芽細胞の増殖率



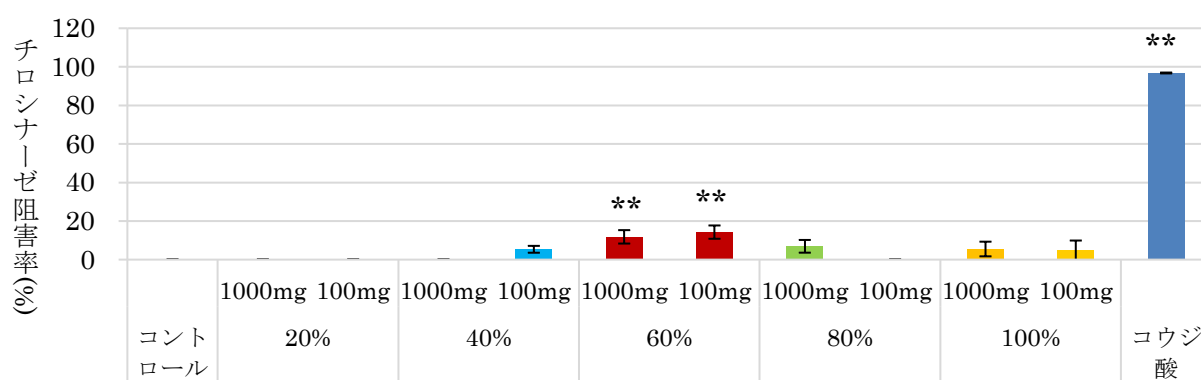
* : P<0.05, ** : P<0.01

図 27 発酵エキス末添加培養細胞における正常ヒト線維芽細胞の増殖率



* : P<0.05, ** : P<0.01

図 28 酒粕水抽出液添加培養細胞におけるチロシナーゼ活性の比較



* : P<0.05, ** : P<0.01

図 29 酒粕エタノール抽出液添加培養細胞におけるチロシナーゼ活性の比較

表 9 論文中の単語略称および正式名称

略称	正式名称
BMI	Body Mass Index
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor type 1
DEX	Dexamethasone
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
EGCG	Epigallocatechin gallate
EGCG3" Me	(-)-Epigallocatechin 3-(3"-O-methyl)gallate
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium-high glucose
10%PBS	Phosphate buffered saline
GPDH	glycerol-3-phosphate dehydrogenase
LPC	lysophosphatidylcholine

C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
PPAR γ	per-oxisome proliferator-activating receptor gamma
Real-time PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
LPL	lipoprotein lipase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
BCAA	Branched chain amino acid
IL-6	Interleukin-6
UCP	uncoupling protein
PPAR α	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
α GC	alpha-galactocylceramide
HES1	hairy and enhancer of split 1
L-DOPE	3,4-Dihydroxy-L-phenilalanine
α EG	ethyl α -D-glucoside