

令和元年度

神戸女子大学大学院健康栄養学研究科

修士論文要旨

糖化ストレスに起因する認知症予防を目指した亜鉛化合物の効果

神戸女子大学大学院 修士課程 (健康栄養学専攻) 井上 ゆかり

【背景・目的】

高齢者の増加に伴い、糖尿病や認知症は、国内のみならず世界でも増加の一途を辿っている。両疾患は密接な関係があり¹⁾、「インスリン不足」や「インスリン抵抗性」により、グリア細胞への糖取り込みに異常をきたし、脳の神経細胞が影響を受ける。そのため、糖尿病罹患者は、認知症を併発するリスクが高いと考えられている。病理・病態学的解析においても、糖尿病に起因する合併症や認知症に AGEs (Advanced Glycation End Products) が、重要な役割を果たしていることが明らかになった。本研究では、糖尿病および認知症の両罹患者に共通して低下しているミネラルであり、且つ糖尿病治療効果があると報告されている亜鉛に着目し、AGEs 生成抑制と神経細胞への保護効果を検討することによって、糖尿病起因による認知症の予防や治療への可能性を明らかにした。

【方法】

抗糖化作用のスクリーニング試験として、ヒト血清アルブミンとグルコースおよび被験物質をリン酸緩衝液中で反応させた。その後、蛍光測定を行い、被験物質の抗糖化作用を蛍光性 AGEs 生成抑制率から評価した。抗糖化試験において活性の高かった被験物質で、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) を用いた神経細胞保護効果の評価を行った。神経細胞死を惹起させるメチルグリオキサール (MG)、グリオキサール (GO)、グリセルアルデヒド (GA) を使用し、被験物質と細胞毒性物質を同時に曝露後、被験物質の有無による生存細胞数の比較を行った。

【結果】

N-アセチルシステイン (NAC) 及びビタミン C (VC) とそれらの亜鉛錯体に、抗糖化 (AGEs 生成抑制) 作用があることが認められた。またそれらの抑制率は、濃度依存的であった。細胞試験では、被験物質無しで細胞毒性物質を曝露された時よりも、Zn(NAC) や Zn(VC)₂ 添加時の方が、生細胞は多く存在しており、細胞毒性物質からの細胞保護作用を有していることを認めた。特に GO や GA に対する保護作用は有意なものであった。

【結論】

Zn(NAC)、Zn(VC)₂ の AGEs の生成抑制作用によって AGEs 蓄積が防止され、アミロイドβタンパク質の蓄積も防ぐ可能性がある。また Zn(NAC)²⁾、Zn(VC)₂³⁾ の血糖降下作用による糖化ヘモグロビン生成抑制と亜鉛補充も可能となることから、GO、GA からの神経細胞保護を示す結果と併せて、糖尿病起因による認知症への移行や増悪への予防効果がさらに期待できる。

【参考文献】

- 1) Biessels GJ et al. *Lancet Neurol*, 5, 64-74, 2006
- 2) Adachi Y et al. *BioFactors*, 29, 213-223, 2007
- 3) 小嶋良種ら, *ビタミン*, 10, 77, 571-576, 2003

【背景・目的】

高血圧は生活習慣病リスク要因の一つであり、高血圧の約 90%は遺伝的因子に加え、過剰な塩分摂取、ストレスなどの環境因子が関与し発症原因が特定できない本態性高血圧である。本態性高血圧の対症療法は、食事療法や機能性食品の活用を行い、続いて降圧剤による薬物治療に移行する。食品の機能性が注目される中、本研究では機能性成分を多く含み日常的に摂取できるコーヒーに着目し、高血圧改善効果に焦点を当てた。食品による血圧低下を図るには、レニン-アンジオテンシン系の制御が重要である¹⁾。この系の昇圧因子であるアンジオテンシン II の生成に寄与するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性を評価することで、血圧低下への効果を検討することが可能である¹⁾。インスタントコーヒーやワイン、ビールなどの醸造過程で生成されるメラノイジンが ACE 阻害作用を有するとの報告があるが、これらの研究報告は未だ少ない^{2,3)}。そこで本研究ではコーヒーの焙煎、抽出方法の違いによる ACE 阻害活性への影響を *in vitro* と *in vivo* の両面から評価した。

【方法】

in vitro 実験では、コーヒー豆専門店で焙煎された焙煎時間の異なる 9 種類の焙煎豆と生豆を自家焙煎した焙煎豆、カフェインレスコーヒーの焙煎豆を 2 種類の方法（ペーパードリッパ、抽出時 9 気圧下のエスプレッソ）で抽出した試料の ACE 阻害活性を測定した。ACE 阻害能が確認されたコーヒー抽出液を分子ふるいにより分画し、ACE 阻害作用成分の検索を行った。*in vivo* 実験では、自然発症高血圧ラット (SHR) に ACE 阻害能が確認されたコーヒー抽出液 (7.5 mL/kg BW) を腹腔内投与 (ip) し、経時的な血圧変動を観察した。血圧が最低値となる時刻を確認し、その時刻に解剖した。血中及び組織中の ACE 活性の測定と、血中カテコールアミンの定量分析を行い、交換神経系への影響を確認した。

【結果】

コーヒー豆専門店の焙煎豆と自家焙煎豆の ACE 阻害活性の結果より、高い ACE 阻害能を有する焙煎、抽出条件は、深煎り焙煎のエスプレッソ抽出であることを発見し、ACE 阻害作用成分として分子量 1,000 前後の範囲に溶出されるメイラード反応生成物を確認した。ACE 阻害能が確認されたコーヒー抽出液を SHR に ip 投与した結果、投与後 2 時間に血圧低下が認められた。また、血管の ACE 活性は高血圧モデル群間で比較すると、コーヒー抽出液を投与した群は control 群に比べ低値を示し、健常モデルと同程度の活性率であった。

【考察】

各種焙煎豆の *in vitro* 実験における ACE 阻害活性の結果より、ACE 阻害活性に有効な試料調製の条件は、焙煎および抽出方法が重要であり、カフェインの有無は試験管レベルの検討には影響しないことが明らかとなった。ACE 阻害作用成分のメイラード反応生成物はショ糖とアミノ酸・タンパク質とのメイラード反応にクロロゲン酸などのフェノール系酸化重合物を巻き込んだ高分子であることが考えられた⁴⁾。SHR において、コーヒー抽出液投与による血圧の低下は血管の ACE 阻害作用に起因すると考えられた。

【参考文献】

- 1) 化学と生物、53、4、228-235 (2015)、2) J. Agric. Food Chem.、55、4、1480-1485 (2007)、
- 3) J. Brew. Soc. Japan.、96、3、199-206 (2001)、4) 日本栄養・食糧学会、58、2、85-98 (2005)

食物アレルギー児のための鶏卵、牛乳・乳製品、小麦を使用しない保育所の給食献立の検討

神戸女子大学大学院 修士課程（健康栄養学専攻） 中井美帆

【背景・目的】

保育所給食における食物アレルギー対応には、その原因となる食物を除去する除去食対応と原因食物を除去した後に栄養学的にほぼ同等で摂取可能な他の食物に代替する代替食対応とがある。しかし、これらの対応における給食の給与栄養量は給与栄養目標量を満たしていないとする報告もある¹⁾。今後、食物アレルギー児が増加することを考慮すれば、管理栄養士・栄養士は非食物アレルギー児への給食だけではなく、食物アレルギー児への給食においても栄養管理の対象とする必要がある。そこで本研究では、食物アレルギーの主要な原因食物の鶏卵、牛乳・乳製品、小麦の3食物を用いない場合であっても、給与栄養目標量を満たした保育所給食の献立作成が可能であるかについて検討することを目的とした。

【方法】

①保育所給食の基本献立食から、3食物（鶏卵、牛乳・乳製品、小麦）を除去した場合の給与栄養量を算出し、給与栄養目標量と比較した。②3食物を共に用いず、且つ給与栄養目標量を満たした給食の献立を作成した。

【結果】

①基本献立食から原因食物を除去した結果、除去後の給与栄養量は多くの栄養素で給与栄養量を満たしていなかった。また、昼食のみならず間食においてもその不足が目立った。②3食物を共に用いずに給与栄養目標量を満たした献立作成は可能であった。

【結論】

保育所給食の基本献立食から3食物を除去した場合の給与栄養量は、多くの栄養素で給与栄養目標量を満たしていなかった。これは、昼食のみならず間食においてもその不足が目立つことから、間食の献立を作成する際にも、これらの食物の使用頻度について考慮する必要がある。また、3食物を共に用いずに給与栄養目標量を満たす献立作成が可能であることから、食物アレルギー児への給食は、非食物アレルギー児と同様の栄養管理は可能である。今後、食物アレルギー児が増加することを考慮し、非食物アレルギー児への給食と同様に食物アレルギー児への給食においても、給与栄養目標量を満たした献立作成が必要である。そして、施設で対応が必要な原因食物の種類や数に応じて、特定の食物を使用していない給食を全児童へ提供することも食物アレルギー対応の一つである。

【文献】

- 1) 佐藤誓子, 佐藤勝昌, 梶原苗美: 保育所において食物アレルギー児が摂取している給食の栄養評価, 体力・栄養・免疫学会, 2013;23;127-140.

糖質制限かつ高タンパク質食と糖質制限かつ高脂肪食が2型糖尿病予防に及ぼす影響

—自由摂取法とペアフィーディング法を用いた **KK-A^y**マウスに対する評価—

神戸女子大学大学院 修士課程（健康栄養学専攻） 西尾 茉奈美

【背景・目的】平成26年患者調査によると、わが国の糖尿病患者数は316万6,000人となり、平成28年国民健康・栄養調査では糖尿病が強く疑われる者は約1,000万人と推計され増加の一途をたどっている。近年、糖尿病を有する動物に糖質制限食を摂取させると、体重減少や血糖値の低下、インスリン抵抗性が改善すると報告されている^(1,2)。しかし、糖質制限食は体重増加やインスリンの感受性の低下、肝臓や腎臓への悪影響などが懸念されており、安全性や有効性については未だ確立されていない^(3,4)。本研究では、2型糖尿病モデルマウスに糖尿病発症前段階から「糖質制限かつ高タンパク質食」と「糖質制限かつ高脂肪食」を自由摂取法またはペアフィーディング法で摂取させ、糖尿病予防効果や生体内への影響を検討することを目的とした。

【方法】健常モデルにC57BL/6Jマウス（1群）と2型糖尿病モデルにKK-A^yマウス（6群）を用意した。KK-A^yマウスに標準食を与える群（2群）、KK-A^yマウスに糖質制限かつ高タンパク質食を与える群（2群）KK-A^yマウスに糖質制限かつ高脂肪食を与える群（2群）に分け、さらに自由摂取法とペアフィーディング法に分けた。90日間飼育し、得られた血清、肝臓、腎臓、脂肪を用いて糖代謝や脂質代謝、ミネラル量の測定などから糖質制限食による各臓器への影響を評価した。

【結果】糖質制限かつ高タンパク質食の自由摂取群、ペアフィーディング群ともに、体重増加を抑制し、随時血糖値の低下や肝臓中脂肪の減少がみられた。しかし、腎重量やBUNは有意な高値を示し、糸球体の肥大化が確認された。糖質制限かつ高脂肪食の自由摂取群は体重増加を促進し、随時血糖値の上昇抑制がほとんどみられず、血清インスリン濃度は高値を示した。一方ペアフィーディング群では随時血糖値の上昇を緩和していた。糖質制限かつ高脂肪食の自由摂取群、ペアフィーディング群ともにGPTや肝臓脂肪量は高値を示し、ペアフィーディング群の脂肪細胞1つあたりの面積はControlに比べ有意な高値を示した。

【考察】糖質制限かつ高タンパク質食は、糖質枯渇により脂質をエネルギー源として利用し、脂肪蓄積量を減少させ、肥満を抑制し糖代謝異常を予防出来た可能性が考えられる⁽⁵⁾。しかし、摂取したタンパク質が多く、アミノ酸代謝が過剰になり腎臓が酷使されたことが腎機能の低下につながったと考えられる。糖質制限かつ高タンパク質食は糖尿病の発症を遅延できる可能性があるが腎臓病のリスク因子となる可能性が高い。糖質制限かつ高脂肪食は、過剰の脂肪摂取により体内の脂肪量を増加させ、肝機能の低下も引き起こし、肥満やインスリン抵抗性を重症化させたと考えられる。糖質制限かつ高脂肪食を摂取することは糖尿病予防には適切ではなく、さらに肝臓疾患のリスク因子となる可能性が高い。

【参考文献】(1)大阪樟蔭女子大学研究紀要 6-7: 253-263, 2016 (2) Diabetes 53: 2004 (3) Plos one 9-8: e104948, 2014 (4)日本栄養・食糧学会誌 58-2: 59-64, 2005 (5)イラスト生化学入門—栄養素の旅—: 東京教学社: 16-17, 2014年4月1日, 3版25刷

ぶどう山椒抽出物の筋萎縮予防効果の検討

神戸女子大学大学院 修士課程 (健康栄養学専攻) 新田 祐子

【背景・目的】我が国の65歳以上の総人口に占める割合(高齢化率)は、28.1%と増加の一途をたどっている¹⁾。筋肉量の低下は、寝たきりのリスクを高め、基礎代謝の低下や生活習慣病のリスク要因であるといわれている²⁾。そのため、高齢者が心身ともに健康で自立した生活を送るために、筋肉量及び筋力の維持が必要不可欠となる。筋萎縮の原因は、加齢のみならずベッドレストやギブス固定のような長期的な不活動により廃用性筋萎縮が誘導される。また筋萎縮は、活性酸素種の過剰発生により悪化するといわれており、近年ではこれを抑制する抗酸化能をもつ食品に注目が集まっている³⁾。本研究で使用した、山椒は古くから食品や漢方薬として用いられ日本人に馴染み深いスパイスであるが、山椒についての報告は、未熟果実部に関するものが多く、他の部位に関する報告は少ない。そこで本研究では、利用価値の少ない山椒の成葉、内樹皮、種子の成分が近年話題となっている抗酸化能による筋萎縮予防に効果的であるかについて検討し新たな有用性を見出すことを目的とした。

【方法】試料には、和歌山県産のぶどう山椒(未熟果実、成葉、内樹皮、種子)を用いた。*in vitro* 実験では、フォーリン-チオカルト法によるポリフェノール量の定量及び Hydrophilic Oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) 法による抗酸化能を測定した。また、 H_2O_2 の酸化促進によるマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞(理化学研究所、茨木)の細胞死抑制効果を、山椒各部位の熱水抽出液を添加し細胞生存率を算出することで検討を行った。*in vivo* 実験においては、*in vitro* 実験の結果より選択した未熟果実及び内樹皮を用いた。非後肢懸垂群(Water-Suspension (-))、後肢懸垂群(Water-Suspension (+))、未熟果実または内樹皮の熱水抽出物を自由摂取させ後肢懸垂を行った(Fruit-Suspension (+))、(Inner bark-Suspension (+))の4群に群分けした。飼育後得られた、ヒラメ筋及び大腿骨、血清等を用いて筋萎縮予防効果の検討を行った。

【結果】山椒の部位別総ポリフェノール量は成葉が最も高く、次いで内樹皮、未熟果実、種子の順となった。MWA(メタノール、水、酢酸)抽出及び熱水抽出物のH-ORAC値は、内樹皮が最も高値を示した。C2C12細胞培養液に H_2O_2 と各抽出液を添加した実験において、 H_2O_2 曝露による細胞死誘導を行ったコントロールと比較し、内樹皮の抽出液を添加した細胞で高い生存率を示した。これらの*in vitro* 実験の結果より行った*in vivo* 実験では、山椒の熱水抽出物の摂取による筋萎縮予防効果の検討を行ったが、統計学的有意な差は見られなかった。しかしながら、未熟果実熱水抽出物の摂取により骨強度項目に改善傾向が見られた。

【考察】総ポリフェノール量は成葉が最も高値を示したが、抗酸化能においてはMWA抽出及び熱水抽出共に内樹皮が最も高値を示した。総ポリフェノール量とH-ORAC法による抗酸化能に正の相関がみられなかったのは、溶媒の差によるものであると考えている。過酸化水素の酸化による細胞死抑制効果の実験から、内樹皮熱水抽出物に高い抗酸化能をもつことが示唆された。今回*in vitro* 実験で、2種の山椒熱水抽出物の摂取が筋萎縮予防に効果的であるという有効な結果を得ることができず、山椒の新しい有用性を見出すことができなかつたと結論付けた。しかしながら、未熟果実熱水抽出物の摂取により骨強度改善効果が示唆され、山椒自体の新たな有用性につながる可能性があると考えられる。

【参考文献】

1) 平成30年度 高齢化の状況及び高齢社会対策の実施現況, 第一章高齢化の状況, 令和元年版, 内閣府, 2019, https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2018/zenbun/pdf/1s1s_01.pdf (2019 12 27)

2) 理学療法学 45(5) 2018 p.332-341 3) 化学と生物 54(11) 2016 p.841-846