

令和5年度（2023年度）

神戸女子大学大学院家政学研究科

修士論文要旨

高脂肪食摂取ラットにおける EV00 投与とウォーキング併用による体熱産生への影響—TRPA1・TRPV1blocker を用いた検討—

博士前期課程（食物栄養学専攻）今村理紗

【背景・目的】

これまで、本研究室では高脂肪食摂取ラットへのエキストラバージンオリーブ油（EV00）投与と日常的な身体活動の歩行運動 [Mild treadmill walking, MTW (W) : トレッドミルで 4 m/分、20 分/日、5~6 回/週、傾斜及び電気刺激無し] の併用による体熱産生への影響について調べてきた。その結果、肩甲骨間褐色脂肪組織（IBAT）中脱共役たんぱく質（UCP1）発現量、脳及び腓腹筋 BDNF（脳由来神経栄養因子）発現量を増加させ、体熱産生を亢進させることが示唆され、報告してきた。そこで本研究では、高脂肪食摂取ラットにおいて、EV00 投与と MTW を併用した場合の体熱産生への影響について調べるとともに、白色脂肪組織（IWAT）における褐色化（ベージュ化）への影響について調べた。特に TRPA1 あるいは TRPV1 blocker を投与し受容体を介するメカニズムについて検討することにした。

【方法】

SD 系 4 週齢雄ラット（42 匹）を用い、実験食は高脂肪（30%脂肪）食で、脂肪分の 15%ラードに対し、15%ROO（精製オリーブオイル：ポリフェノールを含まない）を加えた ROO 食をコントロール食とし、これに対し 15%ラードに 15%EV00 を加えた EV00 食の 2 種類とした。実験群は、これらの実験食を摂取する ROO 群及び EV00 群の 2 群に対し、それらに MTW を併用して行う、ROO+W 群及び EV00+W 群の 2 群と共に、さらに blocker を実験食に添加し投与する EV00+W+TRPA1（967079 0.16mg/kg BW）blocker 群、EV00+W+TRPV1（BCTC 5mg/kg BW）blocker 群の合計 6 群（各群 7 匹）に分け、28 日間ペアフィーディングで飼育した。体熱産生への影響を調べるために、飼育最終日 1 日分の尿を代謝ケージで採集し、尿中カテコラミン分泌量を HPLC 法で測定した。肩甲骨間褐色脂肪組織（IBAT）中脱共役たんぱく質（UCP1）発現量、脳 Transient receptor potential ankyrin subtype1（TRPA1）、Transient receptor potential vanilloid subtype1（TRPV1）及び BDNF 発現量をウエスタンブロット法で測定した。また、IWAT におけるベージュ化について調べるために、IWAT 中 UCP1、Vascular endothelial growth factor（VEGF）についてもウエスタンブロット法で測定した。ストレスの指標である血漿中コルチコステロン濃度については HPLC 法で測定した。

【結果・考察】

実験食投与 28 日後、体重及び臓器重量は各群いずれも有意差はなかったが、体重増加量は、コントロール群である ROO 群に対し、ROO+W 群、EV00+W 群で有意に低い値を示した。ストレスの指標である血漿

中コルチコステロン濃度は、コントロール群である R00 群に対して EV00+W 群で有意差はなく低下傾向であったことから、本研究で行った MTW と EV00 投与がラットにとって大きなストレスにはなっていないと考えられた。尿中ノルアドレナリン分泌量について、コントロール群である R00 群に対し、EV00+W 群で有意に高い値を示した。一方、TRPA 1 及び TRPV1blocker 投与により尿中カテコラミン分泌量は減少し、blocker 投与の効果が認められた。IBAT 及び IWAT 中 UCP 1 発現量について、コントロール群である R00 群に対して EV00+W 群で有意に高い値を示した。一方、TRPA 1 及び TRPV1blocker 投与により IBAT 及び IWAT 中 UCP1 発現量は減少し、blocker 投与の効果が認められた。IWAT 中 VEGF 発現量は、コントロール群である R00 群に対し、EV00+W 群で有意に高い値を示した。一方、TRPA1 及び TRPV1 blocker 投与により IWAT 中 VEGF 発現量は減少し、blocker 投与の効果が認められた。脳 TRPA1 発現量は、コントロール群である R00 群に対して EV00+W 群で有意に高い値を示した。一方、TRPA1 及び TRPV1blocker 投与により発現量は有意に低下し、コントロール群に対して有意差はなくなった。

以上の結果より、日常的な身体活動下における高脂肪食摂取ラットへの EV00 投与と MTW の併用は、TRPA1 及び TRPV1 の活性を介して交感神経活動を惹起させることで、ノルアドレナリン分泌量及び IBATUCP1 発現量を増加させ、体重増加量を減少させることが示唆された。また、IWATUCP1 及び VEGF 発現量を増加させ、ベージュ化を促進させることが示唆された。

成人期の朝食摂取習慣に影響を与える要因

博士前期課程 食物栄養学専攻 川除明日香

【背景】 朝食摂取頻度の高い者は、非感染性疾患への罹患が低いことが報告されている。しかし、20～30歳代の朝食摂取頻度は、他の年代と比較して特に低いことが報告されている。大学生・短期大学生を対象とした先行研究では、現在の朝食摂取頻度には、現在の食生活と過去の食生活が関連することが報告されているが、私たちの知る限り20～30歳代の男女における実態を捉えたものはまだない。そこで、朝食摂取習慣のひとつである朝食摂取頻度について、①20～30歳代男女の、過去の食生活、現在の食生活が、それぞれ現在の朝食摂取頻度に関連している、②20～30歳代男女の、過去の食生活が、現在の健康に対する意識を形成し、現在の朝食摂取頻度に影響を与えることを仮説とし解析を行った。

【目的】 ①20～30歳代男女の、朝食摂取頻度と過去の食生活、及び朝食摂取頻度と現在の食生活との関連を調べること、②20～30歳代男女の過去の食生活が、現在の朝食摂取頻度に、どのようにして影響するかを調べることをとする。

【方法】 東京大学社会科学研究所附属社会調査・データアーカイブ研究センターから「食育に関する意識調査2019」の個票データの提供を受け二次解析を行った。回答者のうち20～30歳代の357名を分析対象とし、現在の朝食摂取頻度と当人が小学生・中学生・16～18歳頃の食生活・食体験、性別や居住形態等の属性項目等との関連について、R version 4.2.2を用いてFisherの直接確率法による独立性の検定を行うとともに、Spearmanの相関係数を算出した。また、過去の食生活、現在の食生活の項目の因子構造を調べるために、探索的因子分析を行った。有意水準は0.05とした。

【結果】 20～30歳代の朝食摂取頻度と有意な関連の見られた過去の食生活では、小学生の頃に食事に関する話を聞いたり指導を受けたこと ($p < 0.05$)、中学生のころ・16～18歳の頃に1日3食決まった時間に食事を摂っていたこと ($p < 0.05$, $p < 0.001$)、16～18歳の頃の自宅での食事が心地よかったこと ($p < 0.05$)、16～18歳の頃に家族と一緒に食料品の買い物をしていたこと ($p < 0.05$)、16～18歳の頃に家族から嫌いなものでも何とかして食べさせようとした経験 ($p < 0.05$)があった。20～30歳代の朝食摂取頻度と有意な関連のみられた現在の食生活では、20～30歳代、20歳代、30歳代のそれぞれにおいて、現在の健康的な食事への取り組み意識 ($p < 0.001$)、栄養バランスのとれた食生活の実践 ($p < 0.001$)があった。また、20～30歳代と30歳代では、現在の主観的健康感 ($p < 0.01$)、現在の食育への関心度 ($p < 0.01$)も有意な関連がみられた。

上記の結果を踏まえ、過去の食生活が現在の食生活にどのように影響するかを検証するために、探索的因子分析を行った結果、30歳代のみを解析した場合に、適合度指標を満たす因果関連図を作図することができた (TLI 0.94, RMSEA 0.05, BIC 44.74)。「現在の朝食摂取頻度」は、「健康的な食生活の心がけ」「栄養バランスに配慮した食生活の実践」「食育への関心度合い」とともに、「現在の健康を意識した食生活因子 (F2)」となった。「16～18歳の頃に家族と一緒に食料品の買い物をした体験」「16～18歳の頃に自宅での食事が楽しく心地良かった体験」は「16～18歳頃の家庭での好意的な食環境の因子 (F3)」となった。F2はF3の影響を受けることが示唆された。

【考察・結論】 探索的因子分析の結果について、先行研究では、食生活に関する意識の向上は、健全な食行動の実行に繋がることが報告されている。また、別の先行研究では、食卓や家庭の雰囲気が良いと健康意識や食事の質が高いことが報告されている。これらを踏まえた結論として、①20～30歳代男女において、過去の食生活、現在の食生活が、それぞれ朝食摂取頻度と関連していることが示唆され、また、②20～30歳代男女において、16～18歳の頃の食に関する良好な家庭環境が、現在の健康を意識した食生活の形成に関連することで、朝食摂取頻度に影響する可能性が示唆された。今後は、過去の親の考え方を交えた分析を行う等、介入調査及び分析を行う必要があると考えている。

C2C12 筋細胞においてアミノ酸欠乏が Cb1-b 量と

IGF-1 シグナル伝達に及ぼす効果

博士前期課程（食物栄養学専攻） 鈴木花菜

【背景・目的】

運動と栄養、特にアミノ酸摂取は、筋肥大をおこす因子である。逆に不動により筋萎縮が生じるが、その際、Cb1-b の発現が亢進し、その結果 IGF-1 シグナルが抑制されることが報告されている。今回、アミノ酸の欠乏においても、Cb1-b の発現が変動し IGF-1 シグナルが抑制されるのか検討した。

【方法】

C2C12 細胞の培地を 2%ウマ血清が含まれる Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM) に置換、C2C12 細胞を筋細胞に分化させた。分化 C2C12 筋細胞の培地をアミノ酸不含有 DMEM に置換、5 時間及び 24 時間培養後、分化 C2C12 筋細胞中の Cb1-b mRNA 量を RT-PCR で測定、アミノ酸含有 DMEM 培養時のそれと比較した。また、ウェスタンブロットで Cb1-b 量、ATF4 量、IGF-1 刺激による Akt、及び S6 キナーゼ (S6K) のリン酸化を調べた。

【結果・考察】

アミノ酸不含有 DMEM は、アミノ酸含有 DMEM に比べて、C2C12 筋細胞の Cb1-b mRNA 量を増加させた。一方、同処置で Cb1-b タンパク質は増加しなかった。不動では増加した Cb1-b により IRS-1 がユビキチン化され、その分解が亢進する結果、IGF-1 作用が Akt に伝達されにくくなると報告されている。今回、Cb1-b タンパク質の増加は認められなかったが、実際に IGF-1 シグナルは抑制されていないことの確認を試みた。アミノ酸の有無に関わらず、IGF-1 刺激は Akt のリン酸化を促進した。IGF-1 による S6K のリン酸化は、アミノ酸の有無に関わらず有意に増加したが、アミノ酸を含まない培地では、IGF-1 刺激前後ともにリン酸化は低値であった。アミノ酸欠乏は、Cb1-b mRNA 量を増加させるにも関わらず、Cb1-b タンパク質の増加には至らなかった。アミノ酸欠乏時、IGF-1 シグナルのうち少なくとも Akt までは活性化されること、しかし、その下流に位置する mTORC1 の活性化は十分でないことが明らかとなった。

カワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*) の

腸内細菌による胆汁酸変換

博士前期課程 食物栄養学専攻 野田二千翔

【背景・目的】肝臓で合成されるコール酸 (CA) やケノデオキシコール酸 (CDCA) を一次胆汁酸という。一次胆汁酸は、腸内細菌により変換され二次胆汁酸となる。二次胆汁酸の中にはデオキシコール酸 (DCA) やリトコール酸 (LCA) のように大腸がんのプロモーターや胆汁鬱滞に関与する有害なものがある。一方、ウルソデオキシコール酸 (UDCA) のように原発性胆汁性胆管炎 (PBC) の治療薬や養殖魚の肝機能減退による発育障害に対する医薬品として有益な働きをもつ胆汁酸がある。本研究では、海産魚類であるカワハギから有益な胆汁酸である UDCA を産生する腸内細菌を単離特定した。そのため、その菌株の胆汁酸変換に対する特性を調べた。

【方法】カワハギの腸内容物から腸内細菌を単離した。CA を基質として定性的に薄層クロマトグラフィーでスクリーニングを行った。そこで、 7α -Hydroxysteroid dehydrogenase (7α -HSDH) と 7β -Hydroxysteroid dehydrogenase (7β -HSDH) 酵素活性を持つ腸内細菌 (FK-322 株) を選別した。FK-322 株の同定は、株式会社テクノスルガ・ラボに依頼した。次に、胆汁酸の変換反応を観察するため培養実験を行った。PYG 液体培地に 0.2 mM の各種胆汁酸を添加し、 37°C で 1~4 日間、嫌気培養した。胆汁酸の変換反応を調べる定量的な分析には、高速液体クロマトグラフィーを用いた。

【結果・考察】胆汁酸の 7α -水酸基を 7β -水酸基へ変換する *Clostridium* 属の腸内細菌 (FK-322 株) をカワハギの腸内容物から単離した。この変換では、中間体として 7-ケト体である 7-オキシデオキシコール酸 (7=ODCA) と 7-オキシリトコール酸 (7=OLCA) を経る 2 段階の反応であることを示した。さらに、CA からの変換に比して CDCA からの変換は著しく活性が高かった。中間体である 7=ODCA と 7=OLCA を添加した実験では、 7β -水酸基への還元が高い活性を示した。7-ケト体の還元物であるウルソコール酸 (UCA) と UDCA を添加した実験では、脱水素化はほとんど起こらなかった。脱抱合反応に関して FK-322 株はタウリン抱合体に高い脱抱合活性を示した。グリシン抱合体では、グリココール酸 (GCA) はほとんど反応しなかったが、グリコケノデオキシコール酸 (GCDCA) には緩やかな脱抱合反応が見られた。

今回の成績から *Clostridium* 属の FK-322 株は、主にタウリン抱合胆汁酸に優位な脱抱合活性と、 7α -水酸基の 7β -水酸基へのエピメリ化活性を有することが明らかとなった。UDCA はヒトにとって有益な胆汁酸であることはよく知られている。魚類でも養殖魚に対し UDCA は消化酵素活性を上昇させ栄養素の蓄積を促進させることが報告されている。有益な代謝物を産生する腸内細菌の探索は、ヒト以外にも他の動物種に対し有益な代謝物の腸内からの持続的供給を期待できるものと考えられる。

高脂肪食摂取ラットにおけるオレウロペイン投与及び Walking による 体熱産生への影響- TRPA1 及び TRPV1 blocker を用いた検討 -

博士前期課程（食物栄養学専攻）畑田芽衣

【背景・目的】

高脂肪食（High fat diet: HF）摂取ラットに対しエキストラバージンオリーブオイル（EV00）中に含まれる主要なポリフェノールであるオレウロペインを、地中海地域の EV00 によるポリフェノール摂取相当量の 0.04% 添加投与すると共に、トレッドミルを用いた日常の生活活動における歩行運動を想定した軽い運動 [mild treadmill walking, MTW (W)] を行った場合、体熱産生にどのように影響するのか調べた。また、肩甲骨間褐色脂肪細胞組織（IBAT）及び鼠径部白色脂肪組織（IWAT）における UCP1 発現量等を測定し、IWAT のベージュ化への影響についても調べた。本研究では、特に TRPA1 あるいは TRPV1 blocker の実験食への添加投与による影響を調べることにより、受容体を介するメカニズム検討も併せて行った。

【方法】

ラットは SD (Sprague-Dawley) 系、4 週齢の雄ラット 42 匹を市販の固形飼料の CE-2（自由摂取）で 1 週間予備飼育した後、6 群に群分けした。その後、ペアフィーディングで 28 日間飼育した。実験食はリサーチダイエット社製高脂肪食 D12451M をコントロール食（HF）とし、これに対し、地中海地域の EV00 によるポリフェノール摂取相当量であるオレウロペイン 0.04% を添加したオレウロペイン食（HF0）とした。また、MTW (W) を行う群は、トレッドミル（室町機械 MK-680MU）を用いた歩行運動（20 分/日、速度 4 m/分、傾斜及び電気刺激無し）を週に 5~6 日行った。実験群は HF 群（n=7）、HF+W 群（n=7）、HF0 群（n=7）、HF0+W 群（n=7）、HF0+W+TRPA1 blocker 群（n=7）及び HF0+W+TRPV1 blocker 群（n=7）の合計 6 群とした。体熱産生への影響を調べるため、飼育最終日の尿中カテコラミン分泌量を HPLC 法で、飼育後の IBAT 及び IWAT 中 UCP1 発現量等を Western blotting 法を用いて測定した。

【結果・考察】

本研究の結果により、高脂肪食摂取ラットにおいてオレウロペイン添加投与と MTW の併用は、尿中カテコラミン分泌量、IBAT 及び IWAT 中 UCP1 レベルを有意に増加させたが、それらの増加は TRPA1 及び TRPV1 blocker 投与により抑制されることが示唆された。

従って、高脂肪摂取ラットのオレウロペイン添加投与と MTW 併用による体熱産生亢進のメカニズムにおいて TRPA1 及び TRPV1 受容体が関与していることが示唆された。さらに、鼠径部皮下白色脂肪組織における UCP1 の蛋白量が増加したことから、白色脂肪組織のベージュ化の可能性も示唆された。

普通脂肪食摂取ラットにおけるオレウロペイン投与とウォーキングの併用による

体熱産生への影響-TRP チャネルのアンタゴニストによるメカニズムの検討-

博士前期課程（食物栄養学専攻）久枝 愛実

【背景・目的】

これまで、高脂肪食摂取ラットにおいて、エキストラバージンオリーブオイル（EVOO）及び EVOO 中の主要なポリフェノールであるオレウロペインの投与と日常的身体活動の歩行運動であるウォーキング（MTW）の併用により、肩甲骨間褐色脂肪組織（IBAT）の脱共役たんぱく質 1（UCP1）発現量及びカテコラミン分泌量が相加・相乗的に増加したことから、より効果的に体熱産生が亢進することを報告してきた。

そこで、本研究では、普通脂肪食摂取ラットに地中海地域の EVOO によるポリフェノール摂取量に相当する 0.04%オレウロペインを投与し、MTW を併用した場合の体熱産生への影響を調べた。また、TRPA1 及び V1 ブロッカーを実験食に添加して、ラットに経口投与し、メカニズムを検討した。そして、IWAT におけるベージュ脂肪細胞発現の指標である UCP1 及び PGC1- α 発現量を測定し、白色脂肪組織におけるベージュ化への影響を調べた。

【方法】

SD 系 4 週齢雄ラット (42 匹) を用い、実験食は、5%脂肪食をコントロール食（LF）と、これにオレウロペインを添加したオレウロペイン食（LF0）の 2 種類にした。実験群はこれらの実験食を摂取する LF 群、LF0 群に対し、それぞれ MTW (w: トレッドミルで 4 m/分、20 分/日、5~6 回/週、電気刺激及び傾斜なし) を併用させる LF+W 群、LF0+W 群、blocker を投与する LF+W+TRPA1blocker 群、LF0+W+TRPV1blocker 群の 6 群に分け、28 日間ペアフィーディングで飼育した。

【結果・考察】

実験後の体重及び体重増加量は、LF 群に対して、LF+W 群で有意に低くなり、他の群に有意差はなかった。尿中ノルアドレナリン及びアドレナリン、ドーパミン分泌量は LF 群に対して、LF0+W 群において有意に高い値を示したが、A1 及び V1blocker 投与で、有意差がなくなった。ストレスのバイオマーカーである血漿中コルチコステロン濃度は LF 群に比べ各群に有意差は認められませんでした。このことから、本研究で行った MTW はラットにとってストレスになっていないと考えられる。IBAT 中 UCP1 発現量は LF 群に対して、LF0+W 群において高い傾向を示し、A1 及び V1blocker 群において低い傾向を示した。IWAT 中 UCP1 及び PGC1- α 発現量において、LF 群に対して、LF0+W 群及び V1blocker 群において有意に高い値を示しました。一方、A1blocker 群において低い値を示し、LF 群に対して、有意差がなかった。

これらのことから、普通脂肪食摂取ラットにおけるオレウロペイン投与と MTW の併用により尿中ノルアドレナリン及びアドレナリン分泌量、特に IWAT UCP1 及び PGC1- α 蛋白発現量を有意に増加させた一方、TRPA1 及び TRPV1 blocker によりそれらは抑制されることが示された。即ち、オレウロペイン投与と MTW 併用は、TRPA1 及び TRPV1 受容体を介して、相加・相乗的に体熱産生を亢進させることと共に、白色脂肪のベージュ化マーカー蛋白質である UCP1 及び PGC1- α 蛋白発現量を増加させ、IWAT のベージュ化を促進させる可能性が示唆された。

低温スチーミング加熱によるブロッコリーの

アスコルビン酸増加メカニズムの解明

博士前期課程（食物栄養学専攻）福井 湖乃美

【背景・目的】 低温スチーミング加熱とは、100℃以下で蒸し加熱をする調理方法である。調理温度がおいしさや品質に影響することが認識され、これまでに低温スチーミング加熱についても、調理に伴う野菜の食味や栄養成分の変化が報告されている。特に、アスコルビン酸含量に関して、山崎ら(2008)は、大根、小松菜、春菊を低温スチーミング加熱すると生より総アスコルビン酸(TAsA)が増加する傾向にあったこと、村山ら(2007)は春菊やほうれん草では低温スチーミング加熱に伴いアスコルビン酸含量が増加したことを報告している。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多い。そこで、本研究では低温スチーミング加熱に伴うブロッコリーの還元型アスコルビン酸(以下 AsA)増加メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】 試料には、神戸市内の仲卸業者から購入したブロッコリー(長野県産、品種 SK9-099 および鳥取県東伯産、品種不明)を用いた。加熱は、スチームコンベクションオーブン(SCOS-4RS、ニチワ電機)のスチームモードで行い、加熱温度は60℃、70℃、80℃、加熱時間は5分、10分、15分とした。加熱中の品温および庫内温度はポータブルマルチログガー(ZR-RX40V、オムロン)で測定し、加熱後、花蕾部と花茎部に分けてサンプリングした。AsA および酸化型アスコルビン酸(以下 DAsA)の定量は2,4-ジフェニルヒドラジン法を用い、Ascorbate peroxidase(以下 APX)の活性測定はNakano・Asada(1981)の方法を、L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase(以下 GLDH)の活性測定はObaら(1994)の方法をそれぞれ改変して行った。総グルタチオン含量の定量にはGSSG/GSH Quantification Kit(同仁化学研究所)を用いた。統計処理はTukey法およびt検定を行った。

【結果・考察】 1. AsA 含量は、花蕾部、花茎部とともに加熱に伴い減少する傾向があったが、減少割合は両部位で加熱温度が高いほど小さく、60℃から80℃の範囲では、高い温度で加熱した方が、AsA 含量が維持されていた。2. ブロッコリー由来のAPXの至適温度は23~30℃前後であり、花蕾部、花茎部とも40℃までは高い活性レベルであったが、反応温度が60℃以上では、至適温度の1/6程度まで低下した。3. ブロッコリー由来GLDHは高い熱耐性を有し、花蕾では反応温度40℃、50℃、60℃より反応温度80℃、花茎では反応温度50℃より反応温度80℃での活性が有意に高かった。以上のことから、ブロッコリーの低温スチーミング加熱にともなうAsAの増減には、APXが大きく関与しており、70℃や80℃までの昇温速度が速い調理条件で、AsAが多く残存する可能性が示唆された。