

宮 崎 大 学 大 学 院

博 士 学 位 論 文

生体内で脂質量低減効果を発揮する食品因子の探索

2019年3月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

横山大悟

# 目次

略語一覧 .....	1
序 論 .....	3
第 1 章 乳清タンパク質加水分解物ペプチドは高スクロース食を 摂食したラットの肝臓脂質量を 低下させる.....	9
1.1 緒 論.....	10
1.2 実 験 方 法 .....	12
1.2.1 試験試料 .....	12
1.2.2 実験動物, 飼料および方法 .....	14
1.2.3 血液分析 .....	19
1.2.4 肝臓脂質分析.....	19
1.2.5 酵素活性分析.....	19
1.2.6 遺伝子発現分析 .....	20
1.2.7 統計解析 .....	21
1.3 結 果 お よ び 考 察.....	22
1.3.1 WPP 含有飼料の自由摂食試験.....	22
1.3.2 WPP 含有飼料の時間制限給餌試験.....	28
第 2 章 モノグルコシルルチンの日常的な摂取は, マウスの消化管抑制ペプチド分泌を抑制する ことによって, 高脂肪食誘発性肥満を予防する .....	32
2.1 諸 論.....	33
2.2 実 験 方 法 .....	35
2.2.1 試薬類.....	35
2.2.2 実験動物および方法 .....	37
2.2.3 血液分析 .....	38
2.2.4 肝臓脂質分析.....	38

2.2.5 血中ホルモンおよびサイトカイン分析.....	39
2.2.6 血漿からのケルセチン代謝物の抽出.....	39
2.2.7 HPLC ダイオードアレイ検出器 (DAD) .....	40
2.2.8 統計解析 .....	41
2.3 結 果.....	42
2.3.1 摂食量, 体重および組織重量 .....	42
2.3.2 血中脂質パラメーター .....	45
2.3.3 肝臓中脂質レベル.....	45
2.3.4 血中メタボリックホルモンおよびサイトカインレベル .....	45
2.3.5 $\alpha$ MR の吸収.....	50
2.4 考 察.....	52
総 括 .....	55
謝 辞 .....	57
参考文献.....	58

## 略語一覧

$\alpha$ MR	: alpha monoglucosyl rutin, アルファモノグルコシルルチン
CVD	: cardiovascular disease, 心血管疾患
DAD	: ダイオードアレイ検出器
FASN	: fatty acid synthase, 脂肪酸合成酵素
GIP	: gastric inhibitory polypeptide, 消化管抑制ペプチド
HDL	: high-density lipoprotein, 高密度リポタンパク質
HFD	: high-fat diet, 高脂肪食
HPLC	: high-performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー
IL-6	: interleukin 6, インターロイキン-6
LFD	: low-fat diet, 低脂肪食
MCP-1	: monocyte chemoattractant protein 1, 単球走化性タンパク質-1
ME	: malic enzyme, リンゴ酸酵素
PL	: phospholipid, リン脂質
SD	: Sprague-Dawley
SPP	: soy protein-hydrolyzed peptide, 大豆タンパク質加水分解ペプチド
TG	: triglyceride, トリグリセライド
TNF $\alpha$	: tumor necrosis factor $\alpha$ , 腫瘍壊死因子- $\alpha$

T-chol : total cholesterol, 総コレステロール

WPP : whey protein-hydrolyzed peptide, 乳清タンパク質加水分解ペプチド

ZT : Zeitgeber time, ツァイトゲバー時刻

## 序 論

心血管疾患（CVD）は、心臓または血管を伴う疾患の一種であり、狭心症や心筋梗塞などの冠動脈疾患が含まれる。他にも、脳卒中、心不全、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、弁膜症、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、血栓塞栓症、静脈血栓症が含まれる。CVD の発症メカニズムは症状によって異なるが、主要な CVD である冠状動脈疾患、脳卒中、末梢動脈疾患は、一般的にアテローム性動脈硬化症を伴う。アテローム性動脈硬化は、損傷を受けた動脈の壁から、特定の種類の白血球（単球および T 細胞）をその動脈の壁に引き寄せる化学物質が放出されることで始まる。それらの白血球はその動脈の壁の中に侵入し、そこで泡沫細胞（脂肪蓄積マクロファージ）に変化し、コレステロールやその他の脂肪性物質を内部に蓄えるようになり、それにより動脈の壁の中で平滑筋細胞が増殖するようになる。やがて、脂肪性の物質を豊富に含んだ泡沫細胞が蓄積していき、それらの細胞によって線維状の膜に覆われた沈着物（アテロームやプラーク）が形成され、それらは動脈の内側を覆う膜の中でまだら状に蓄積されていく。時間が経過するにつれて、プラーク内にカルシウムが蓄積する。プラークは、太い動脈や中型の動脈の全域にわたって形成されるが、通常は動脈が分岐している部分から始まる。アテロームは動脈の中で大きくなり、次第に動脈の内腔を狭めていく。アテローム性動脈硬化によって動脈が狭くなると、その動脈から供給を受けている組織には十分な量の血液と酸素が

送られなくなる。プラークは破裂（破綻）する可能性があり，そうなると内部の物質が血流中に放出され，その物質は血栓の形成を誘発する。形成された血栓によって動脈内の血流が完全に遮断されることがあり，心臓発作や脳卒中の主な原因となる。また，アテローム性動脈硬化症は，高血圧，喫煙，糖尿病，運動不足，肥満，高血圧，栄養不足，アルコールの過剰摂取などによって引き起こされる恐れがあることから，日常の生活習慣や他の疾患との関連も重要な要因である。特に，CVD の主要な危険因子は血中脂質量の異常高値であることが報告されており [1]，血中脂質量の上昇を伴ったメタボリックシンドロームを患う人々では CVD の危険性が増加する [2]。

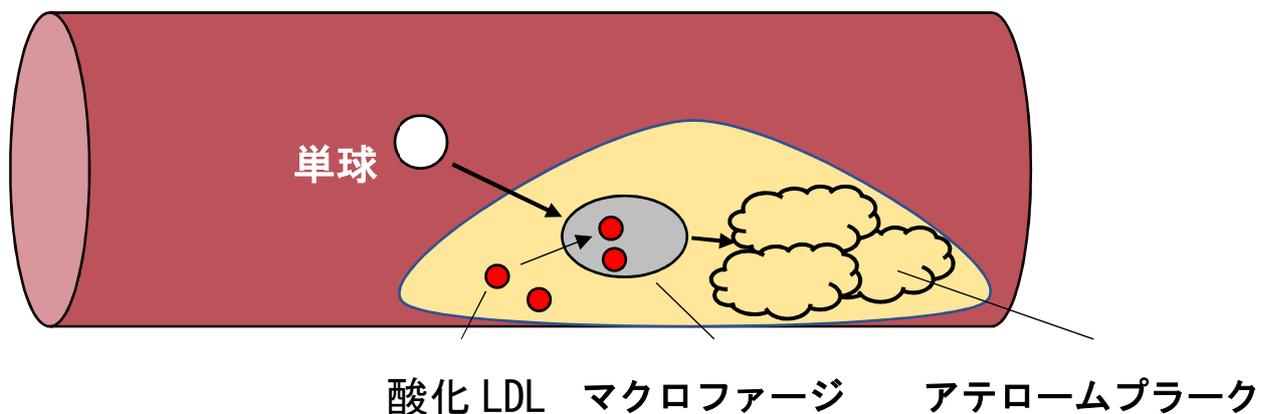


図1 アテローム性動脈硬化症の概念図

従来は，血中脂質量が高値を示す症状は高脂血症と呼ばれていたが，2007 年に日本動脈硬化学会が診断名を脂質異常症に改定した。脂質異常症の診断基準（空腹時採血）は，

- ・ LDL コレステロールが 140 mg/dL 以上（高 LDL コレステロール血症）
- ・ HDL コレステロールが 40 mg/dL 未満（低 HDL コレステロール血症）
- ・ トリグリセライドが 150 mg/dL 以上（高トリグリセライド血症）

であり、血中のコレステロール（Chol）やトリグリセライド（TG；中性脂肪）の濃度が高すぎる状態あるいは低すぎる状態が脂質異常症である。つまり、「従来は高脂血症と呼ばれていた病態も、脂質異常症の一部に含まれている」と考えれば良い。脂質異常症の要因は遺伝的、環境的、またはその両方である可能性がある。一般的に、遺伝的症候群の手がかりとしては非常に高い値の Chol レベルや TG レベル、キサントーマ、家族性の高脂血症または CVD 等が挙げられる。環境的要因としては、特に食習慣が重要な因子だと考えられている。豚肉や牛肉などの肉類に含まれる動物由来の脂質やタンパク質は血中脂質を上昇させるとの報告があることから、食生活の欧米化への変化が一因とされている。なお、日本を含む先進国では、脂質異常症の多くは脂質量が上昇する状態であり、血中脂質量上昇が CVD の危険性を高めることから、本学位論文内では、「高脂血症」を「血中の脂質量が上昇した状態を示す症状」として用いる。

CVD に起因する死亡率はここ数十年で大幅に低下しているものの、未だに日本を含む経済協力開発機構（OECD）諸国の主要な死因のひとつである [3]。近年、多くの研究グループが、CVD 発症を予防するために血中脂質量を調節するための適切な

栄養療法および食事療法を調査している。例えば、食用の鳥の巢は、ラットの高脂肪食誘発高コレステロール血症を改善できる [4]。穀物食物繊維の摂取は、高脂肪食を与えたマウスにおける肝臓の脂肪毒性および脂質異常症を予防する [5]。一方、肉・乳・卵など動物由来タンパク質は、血中脂質量を上昇させ、高脂血症ひいては動脈硬化症を誘発することが示唆されている。しかしながら、動物性タンパク質が及ぼす影響はその種類によって異なり、乳清には、抗酸化作用や抗原毒性作用 [6]などの生物学的機能に対する機能性があり、インスリン抵抗性や筋肉タンパク質合成の刺激を改善する [7, 8, 9]など、有益な成分を含むものもある。さらに、乳清タンパク質の摂取が生理学的脂質代謝を調節することも示唆されている [10]。すなわち、乳清タンパク質を含んだ飼料をラットに与えると、カゼイン飼料を与えられたラットと比較して、リンゴ酸酵素 (ME) および脂肪酸合成酵素 (FASN) を含む肝臓脂質生成酵素活性の低下により血清 TG を有意に減少させる。また、他の動物性タンパク質源とは異なり、大豆タンパク質のように乳清タンパク質も肝臓中性脂質量を減少させることが報告されている [11]。これらは、乳清タンパク質が脂質異常症の予防を目的とした食事療法において有益な成分である可能性を示している。

生命保険データの分析では、2 型糖尿病や CVD などの健康への悪影響のリスクが肥満に深く関わっており、肥満と死亡率の関係が明らかになっている [12, 13]。肥満は、過体重 ( $BMI \geq 25.0 \text{ kg / m}^2$ ) と重度肥満 ( $BMI \geq 30.0 \text{ kg / m}^2$ ) のいずれかに分

類することができる。NCD Risk Factor Collaboration の推計によると、2025 年には、先進国の肥満者の割合は、男性 18%超、女性で 21%超、重度肥満は男性 6%、女性 9%を超えると予想されている [14]。肥満関連疾患の経済的負担は、米国では約 48~660 億ドル/年、2030 年までには英国では 19 億 2000 万ポンド/年と試算される [15]。したがって、高脂血症に加えて、過剰な体重増加と肥満の予防対策も優先研究課題である。

体重増加は、エネルギー消費がエネルギー摂取量よりも低いときに生じる、慢性の正のエネルギーバランスから生じる。従って、日々の食物消費の管理は体重を制御するために重要である。近年の研究では、我々が日常口にする食品が、脂質の吸収と蓄積を阻害したり、エネルギーの燃焼を促進したりして、肥満を予防するいくつかの成分を含んでいる可能性があることが報告されている。例えば、緑茶カテキン、カカオオリゴマープロシアニジンおよびグルコマンナンは、脂質吸収を抑制することが報告されている [16, 17, 18, 19]。また、果実に見られる天然のポリフェノール化合物であるレスベラトロールは、ゼブラフィッシュにおいて AMP 活性化プロテインキナーゼ  $\alpha$  (AMPK  $\alpha$ )、サーチュイン 1、およびペルオキシソーム増殖剤応答性受容体  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) を介して脂質代謝を調節することが示されている [20]。さらに、チリペッパーカプサイシンは、褐色脂肪組織を活性化することによって transient receptor potential cation channel subfamily V (TRPV1) を活性化し、エネルギー消費を減少さ

せることが報告されている [21]。これらのデータは、このような化合物が豊富な食品の日常的な摂取が、体重増加の予防に寄与することを示唆している。

本学位論文では、乳清タンパク質加水分解ペプチド (WPP) とケルセチン配糖体 ( $\alpha$ -モノグルコシルルチン) に着目し、第 1 章では、血中脂質量の上昇を抑制する効果を介して高脂血症の予防効果が期待できる候補成分 (WPP) について、また第 2 章では、食事誘発性肥満の予防効果が期待できる候補成分 ( $\alpha$ -モノグルコシルルチン) について、それぞれ動物モデルを用いて評価した。

## 第1章

# 乳清タンパク質加水分解物ペプチドは高スクロース食を 摂食したラットの肝臓脂質量を低下させる

This chapter is based mainly on:

Yokoyama D., Sakakibara H., Fukuno H., Kimura K., Hori A., Nara T., Kato K. and Sakono M.,  
Whey Protein-hydrolyzed Peptides Diminish Hepatic Lipid Levels in Rats Consuming High-  
sucrose Diets, *Food Science and Technology Research*, 2016, 22, 631-638

## 1.1 緒 論

前述の通り、一般的に肉・乳・卵など動物由来タンパク質は、血中脂質量を上昇させ、高脂血症ひいては動脈硬化症を誘発させる可能性が指摘されているが、一部の動物由来タンパク質、例えば乳清タンパク質には、抗酸化作用や抗遺伝毒性作用 [6]などの有益な機能性を発揮するものもある。さらに、加工することで作用が異なる場合もある。例えば、牛乳からカゼインを除去するチーズ製造時に生じる副産物である乳清を加水分解した乳清タンパク質加水分解物は、乳清タンパク質とは異なった挙動を示す。具体的には、乳清タンパク質加水分解物をラットに経口投与すると、投与7分後に最大血漿アミノ酸濃度に達し、総タンパク質は投与後30分で同様のレベルに達する [22]。これは、乳清タンパク質を経口投与した場合よりも早い。乳清タンパク質を加水分解することで消化性が高まり、その結果、タンパク質よりも吸収されやすいことによると考えられている。さらに、加水分解物によって生じるいくつかのペプチドは強力なラジカル消去活性を示すこと [23]、結腸腫瘍発生の予防においてより有効であることも示されている [24]。また、加水分解物は優れた筋肉タンパク質の合成も示している [25]。このように、動物由来タンパク質は種類だけでなく、加水分解などの処理によっても機能性が異なる。しかしながら、脂質異常症の調節に対する乳清タンパク質加水分解物の日常的な摂取の影響に関する情報は限られている。

本章では、血清、肝臓脂質濃度、肝臓中脂質生成酵素活性に対する乳清タンパク質加水分解ペプチド (WPP) の影響について、ラットモデルを用いて評価した。また、摂食時刻の影響についても比較測定した。近年のラットやマウスなどのげっ歯類を用いた動物実験では、AIN-93 組成に準じた精製食が使用される場合が多い。AIN-93 の組成は、実験齧歯類の正常な成長ために必要な栄養素の組成を American Institute of Nutrition (AIN) が公表したものである [26]。一方、AIN-93 精製食が公表される以前は、組成が異なる AIN-76 精製食が用いられていた。AIN-76 精製食と AIN-93 精製食の主な相違点は、スクロースの含量にある。具体的には、AIN-76 精製食のスクロース含量は 50%であったのに対し、AIN-93 精製食ではスクロースの含量を 10%に減らし、その減分をコーンスターチで置き換えている。食餌中のスクロース含量が高いと、高脂血症および脂肪肝を含むいくつかの代謝合併症を誘起する可能性が高い [27, 28]、すなわち、健康な成長を阻害する可能性がある示唆されたために変更された。本研究では、この特徴を「食事由来の軽度な高脂血症を誘導する食餌」として利用した。

## 1.2 実験方法

### 1.2.1 試験試料

本研究で使用した WPP は、雪印メグミルク株式会社（東京）から提供された HW-3 を用いた。タンパク質類の平均分子量は約 400Da であり、主成分はジおよびトリペプチドである。その主要なアミノ酸は、分枝鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）およびリシンである（表 1-1）。大豆タンパク質加水分解ペプチド（SPP）は不二製油株式会社（大阪）から購入した。SPP は、100g 当たり 4.2g の水分、81.01g のタンパク質、0.2g の脂質、4.1g のミネラル、および 10.5g の炭水化物からなる。セルロース、 $\beta$ -コーンスターチ、スクロース、ビタミン混合物（AIN-76）、ミネラル混合物（AIN-76）およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH）をオリエンタル酵母工業株式会社（東京）から購入した。カゼイン、コーン油、DL-メチオニン、および重酒石酸コリンを和光純薬工業株式会社（大阪）から入手した。マロニル-CoA は、シグマアルドリッチ（ミズーリ州, 米国）から入手した。その他の試薬はすべて試薬特級グレードを使用した。

表 1-1. 乳清タンパク質加水分解ペプチドおよび大豆タンパク質加水分解ペプチドのアミノ酸組成 (%)

アミノ酸	乳清タンパク質	大豆タンパク質
	加水分解ペプチド (WPP)	加水分解ペプチド (SPP)
イソロイシン	5.7	3.9
ロイシン	12.3	6.7
リシン	9.8	6.7
メチオニン	2.2	0.9
シスチン	2.5	1.2
フェニルアラニン	3.7	4.6
チロシン	3.5	3.5
スレオニン	5	3.8
トリプトファン	2	0.7
バリン	5.4	4.2
ヒスチジン	1.9	2.6
アルギニン	2.7	8.5
アラニン	5.2	4.2
アスパラギン酸	10.6	12.5
グルタミン酸	17.4	21.7
グリシン	1.8	4.3
プロリン	3.6	4.6
セリン	4.9	5.4

## 1.2.2 実験動物，飼料および方法

すべての動物の維持管理および実験は，国立大学法人宮崎大学の実験動物規則に従って行われた（実験番号 2008-007-6）。本研究では，以下の2つのプロトコールに従って試験を行った。

### 【プロトコール 1】

17匹のSD雄性ラット（4週齢，九動株式会社，佐賀）を室温  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度  $55 \pm 5\%$  の部屋で，個々のステンレス製ケージで飼育した。市販の飼料（CE-2，日本クレア株式会社，東京）および脱イオン水を自由飲水させ，明期開始を 7:00 すなわち Zeitgeber Time (ZT) 0 および暗期開始を 19:00 (ZT12) とした。1週間順化させた後，動物を以下の3つの群に無作為に分けた。第1群は AIN-76 [29] 組成に準じた精製粉末飼料を摂食させた。他の2つのグループは，表 1-2 に示されるように，WPP10%または20%含有食餌を摂食させた。2週間後，非絶食下の ZT2 にてペントバルビタールナトリウム ( $30\text{mg}/\text{kg}$  体重) を用いた麻酔下で腹部静脈から血液を採取した。30分間室温で静置した後， $1000 \times g$  で20分間遠心分離することによって血清を分離した。肝臓は摘出して重量を測定した。その後の分析のために，すべての試料を  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

表 1-2. AIN-76 に準じた飼料組成

成分	Control (AIN-76)	WPP10	WPP20	SPP20
(%)				
タンパク質源				
カゼイン	20	10	-	-
WPP	-	10	20	-
SPP	-	-	-	20
スクロース	50	50	50	50
$\beta$ -コーンスターチ	15	15	15	15
コーン油	5	5	5	5
セルロース	5	5	5	5
ミネラル混合物	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合物	1	1	1	1
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3	0.3
重酒石酸コリン	0.2	0.2	0.2	0.2

WPP：乳清タンパク質加水分解ペプチド， SPP：大豆タンパク質加水分解ペプチド

## 【プロトコール 2】

摂食パターンを 12 時間の暗明サイクルを通して 2 時間間隔で測定した (図 1-1)。自由摂食条件下では, 明期 (休眠期) の摂食量は少なく, 暗期 (ZT12) の開始直前に劇的に増加した。活発な食物消費は, 暗期の始めと終わりに 2 つのピークを示した。これらの結果は, 以前に発表された報告 [30]と同様であった。空気および温度調節された部屋のステンレススチール製ケージに, 4 匹の雄 SD ラット (4 週齢, 日本エスエルシー, 静岡) を CE-2 飼料および脱イオン水を自由に摂取させた。1 週間の順化後, CE-2 飼料を使用してさらに 1 週間の時間制限給餌順応期間を設けた。続いて, 動物を AIN-76 ベースの精製粉末飼料 (コントロール), 20%WPP 含有食 (WPP20), および 20%大豆タンパク質加水分解ペプチド (SPP) 含有食 (SPP20) の 3 つのグループに無作為に分けた。それぞれの群に, 有効食物摂取期間 (ZT23-1 および ZT11-13) に対応した 2 時間, 2 回給餌した。WPP20 および SPP20 群は, この期間中, 個々の食事を自由に摂取できた。しかし, 対照群には, Stevanovic ら [31]によって報告された改変された方法に従って, WPP20 および SPP20 群における前日の平均摂取量に基づいた, AIN-76 ベースの食物の一定量が与えられた。14 日間の摂食試験の後, 10 時間の絶食に続いて ZT23 にてペントバルビタールナトリウム (30mg / kg 体重) による麻酔下で尾静脈から血液を採取した。血清をプロトコール 1 のように 1000×g で 20 分間遠心分離し, 分析まで-80°Cで保存した。



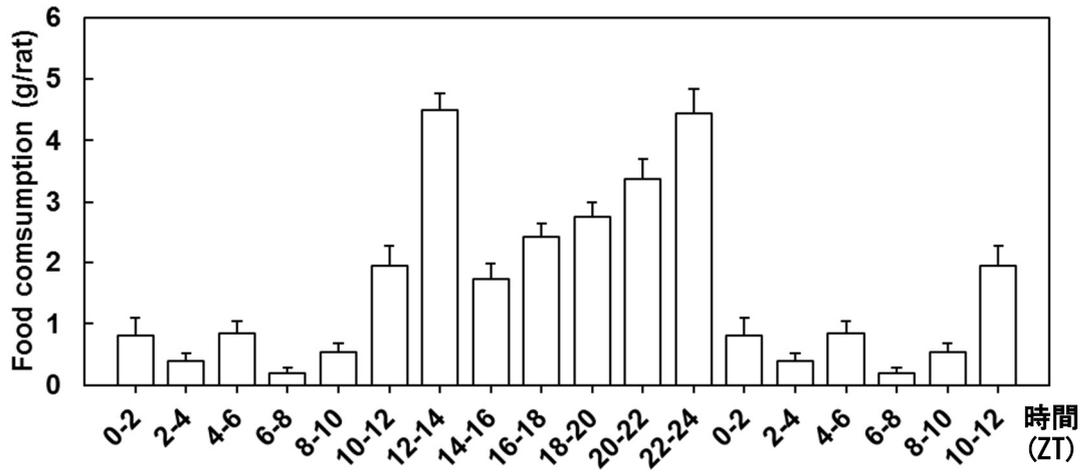


図1- 1. Sprague-Dawley ラットの摂食パターン

20 匹のラットを、12 時間の明暗サイクルの下で、温度および湿度制御された室内（温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$ ）の個々のステンレス製ケージにて飼育した。AIN-76 に準じたの精製粉末食餌および脱イオン水を自由摂取させ、摂食量を 2 時間間隔で 36 時間測定した。値は平均値  $\pm$  標準誤差 ( $n = 20$ ) として表した。

### 1.2.3 血液分析

TG, 総コレステロール (T-chol) およびリン脂質 (PL) を含む 3 つの血清脂質パラメーターを, それぞれの E-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて分析した。

### 1.2.4 肝臓脂質分析

肝臓脂質は, Folch ら [32]の方法によって抽出した後, 一定量のヘキサンに溶解した。この抽出液を用いて Sperry and Webb [33]の方法に記載されているように, T-chol 量を測定した。TG および PL 量は, 以前に報告されている方法を用いて分析した [34, 35]。

### 1.2.5 酵素活性分析

Graham [36]により記載された改変された方法を用いて, 肝臓組織からサイトゾル画分を調製した。すなわち, 0.25mol / L のスクロース, 0.01mol / L の Tris-HCl (pH7.4) および  $1\mu\text{mol} / \text{L}$  の EDTA-2Na を含む緩衝液 10 容量中に肝臓組織を入れ, 4°Cでホモジナイズした。ホモジネートを 4°C,  $700\times\text{g}$  で 10 分間遠心分離し, 上清をさらに遠心分離した ( $10,000\times\text{g}$ , 4°C, 10 分)。最後に,  $126,000\times\text{g}$ , 4°Cで 60 分間遠心分離することによってサイトゾル画分を得た。FASN および ME の酵素活性を, Kelley ら [37]および Ochoa [38]の方法に従ってそれぞれ測定した。サイト

ゾル画分中のタンパク質含量は、Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, 米国) を用いて定量した。

### 1.2.6 遺伝子発現分析

Chomczynski ら [39]の改変された方法に従って、各肝臓組織 (各 100mg) からトータル RNA を抽出した。RNA の吸光度を 260nm および 280nm で測定して核酸純度を評価し、トータル RNA 濃度を 260nm での吸光度に基づいて決定した。トータル RNA クオリティーは、28S および 18S rRNA によって求めた。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, 米国) を製造元の指示に従って、最終容量 10  $\mu$ L 中で 200  $\mu$ g のトータル RNA を逆転写した。TaqMan Universal PCR Master Mix (10  $\mu$ L, Applied Biosystems), DNase / RNase フリー水 (8  $\mu$ L), ハウスキープングまたは個々のターゲットプライマー (1  $\mu$ L) を含む PCR 混合液 19  $\mu$ L に 1  $\mu$ L の cDNA 溶液を加えた。本研究で使用したすべてのプライマーは、Applied Biosystems から次のように得た。18s:Hs\_99999901\_s1, Cyp7a1:Rn00564065\_m1, Fasn:Rn00569117\_m1, Srebf1:Rn01495769\_m1, Srebf2:Rn01502638\_m1, Hmgcr:Rn00565598\_m1。定量的 RT-PCR を MiniOpticon リアルタイム PCR 検出システム (Bio-Rad Laboratories) で行った。標的遺伝子の相対発現レベルは、キャリブレーションとして 18s を用いた比較自動閾値サイクル法によって算出した。群間の発現レベルの相対的差異は、AIN-76 に準じた精製食を摂取しているコントロール群を 100 とし、

サイクルタイム (Ct) 値および相対的增加として表される群間の相対差を用いて表した。各実験は二重でおこなった。

### 1.2.7 統計解析

統計解析は、ソフトウェアプログラム Stat View for Windows (Version 5.0, SAS Institute, 米国)を用いておこなった。対照群と処置群との間の差異の統計的分析を、one-way ANOVA, 続いて Williams または Tukey の多重比較をおこない、有意水準 5%で検定した。

## 1.3 結果および考察

### 1.3.1 WPP 含有飼料の自由摂食試験

本研究では、WPP がラット血清および肝臓脂質レベル、ならびに肝臓の脂質生成酵素活性に及ぼす影響を評価した。雄性 SD ラットに、20%カゼイン食 (AIN-76 精製, コントロール群), 10%WPP + 10%カゼイン食 (WPP10 群) または 20%WPP 食 (WPP20 群) を 14 日間自由摂食させた。カゼインや大豆タンパク質などの他のタンパク質源と比較して、乳清タンパク質を豊富に含む食餌を与えたラットは、体重変化には変化がないものの食餌摂食量を減少させることが報告されている [10, 40]。しかしながら、本研究において WPP 含有食は、食物摂取全体に影響を与えないようであった (表 1-3)。この相違は、乳清タンパク質と比較して WPP の消化率および吸収が良好であることに起因する可能性がある [22]。さらに、体重および肝臓重量は変化がなかった (表 1-3)。

表 1-3. 乳性タンパク加水分解ペプチドの自由摂食が生物学的パラメーターに及ぼす影響

	Control	WPP10	WPP20
体重(g)			
初体重 (day 0)	134.1±2.4	133.9±1.9	133.8±1.8
終体重 (day 14)	243.0±5.6	240.4±8.8	240.0±5.7
摂食量 (g/day)	21.3±0.6	22.3±1.0	21.2±0.4
肝臓重量 (g)	14.4±0.6	13.9±0.9	14.4±0.8

ラットに、それぞれの食事を 14 日間自由摂食させた。



WPP10 または WPP20 群ラットの非絶食下における TG, T-chol および PL の血清レベルは, コントロール群と比較して減少した (図 1-2A~C)。特に, WPP20 群の血清 T-chol および PL レベルはコントロール群と比較して有意に低下した。WPP10 および WPP20 群の肝臓 TG は, コントロール群より有意に低かった (図 1-2D)。肝臓の T-chol は用量依存的に減少し, WPP20 群で有意に減少した (図 1E)。逆に, 肝臓 PL レベルは WPP の摂取の影響を受けなかった (図 1-2F)。これらの結果は, 肝臓脂質レベルを分析しなかったが, 3 時間の絶食期間の SD ラットで血清 TG レベルが低下 (カゼインベースの食餌では 182mg / dL からホエータンパク質ベースの食餌では 150mg / dL まで) することを報告した Morifuji ら [10]と一致している。また Morifuji らは, タンパク質源としてのカゼインと比較して, 乳清タンパク質を与えたラットにおける肝臓脂質生成酵素 FASN および ME の活性および遺伝子発現の有意な減少を報告した。本研究では, WPP の自由摂食は, より少ない量の WPP を含有する WPP10 群においてさえ, 肝臓の FASN および ME 活性を有意に阻害した (図 1-3)。

さらに, WPP 群における Fasn の肝臓中遺伝子発現は, コントロール群と比較して用量依存的に減少した (図 1-4A)。さらに, コレステロール生合成の律速段階の触媒作用を担う Srebf1, Srebf2 および Hmgcr [41]の肝臓中遺伝子発現は, 有意またはわずかな減少を示した (図 1-4B~D)。AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性化は, 乳清ペプチド含有する食餌を摂食するマウスから採取した筋肉で観察される

ことが報告されている [42]。AMPK の活性化は, SREBF1c 活性を低下させる [43]。さらに Fasn 発現は, Fasn のプロモーター領域に結合し, それを活性化する転写因子 SREBF1c の発現または核成熟の調節によって影響を受けることが報告されている [44]。したがってこれらの結果は, WPP 含有食が, AMPK 経路を介して Fasn などの TG およびコレステロールの生合成に関与する遺伝子の発現を抑制し, 結果として肝臓や血液の総脂質レベルを低下させることを示している。

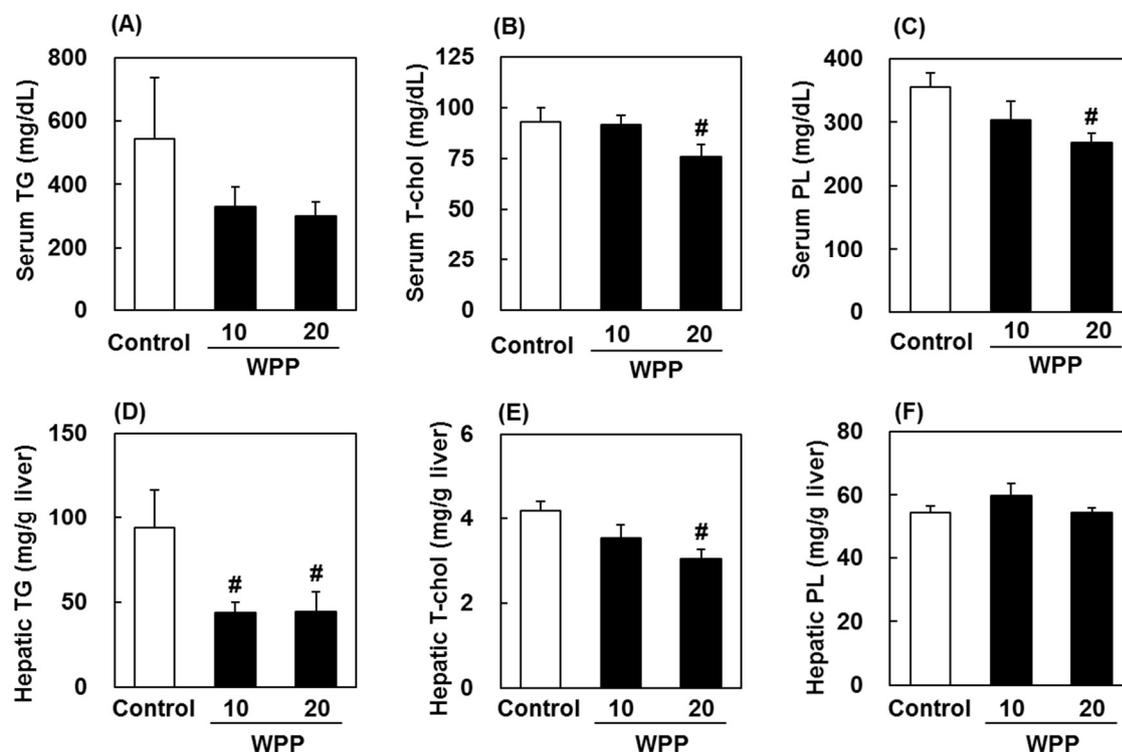


図 1-2. 乳清タンパク質加水分解ペプチドの自由摂食が血清および肝臓脂質レベルに及ぼす影響  
ラットに 14 日間コントロール食 (AIN-76), 10%または 20%の WPP を含有した食事を自由摂食させた。未絶食下で血清および肝臓サンプルを採取し, 脂質レベルを分析した。(A) 血清 TG, (B) 血清 T-chol, (C) 血清 PL, (D) 肝臓 TG, (E) 肝臓 T-chol, (F) 肝臓 PL。値は平均±標準誤差 (n = 6) で示した。#P < 0.05 対コントロール群 (William' s test)。

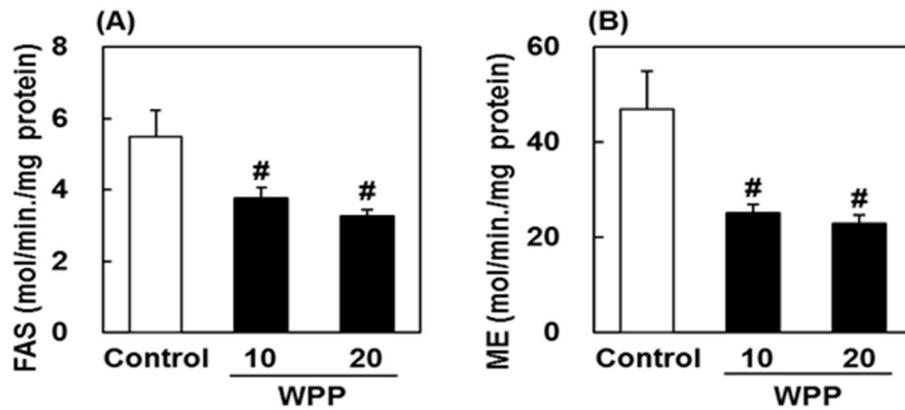


図 1-3. 脂肪酸合成関連酵素活性に及ぼす乳性タンパク質加水分解ペプチドの自由摂食の影響  
ラットに 14 日間コントロール食 (AIN-76), 10%または 20%の WPP を含有した食事を自由摂食させた。未絶食下で血清および肝臓サンプルを採取し, 酵素活性を分析した。(A) 脂肪酸合成酵素 (FASN) および (B) リンゴ酸酵素 (ME)。値は平均±標準誤差 (n = 6) で示した。#P < 0.05 対コントロール群 (William' s test)。

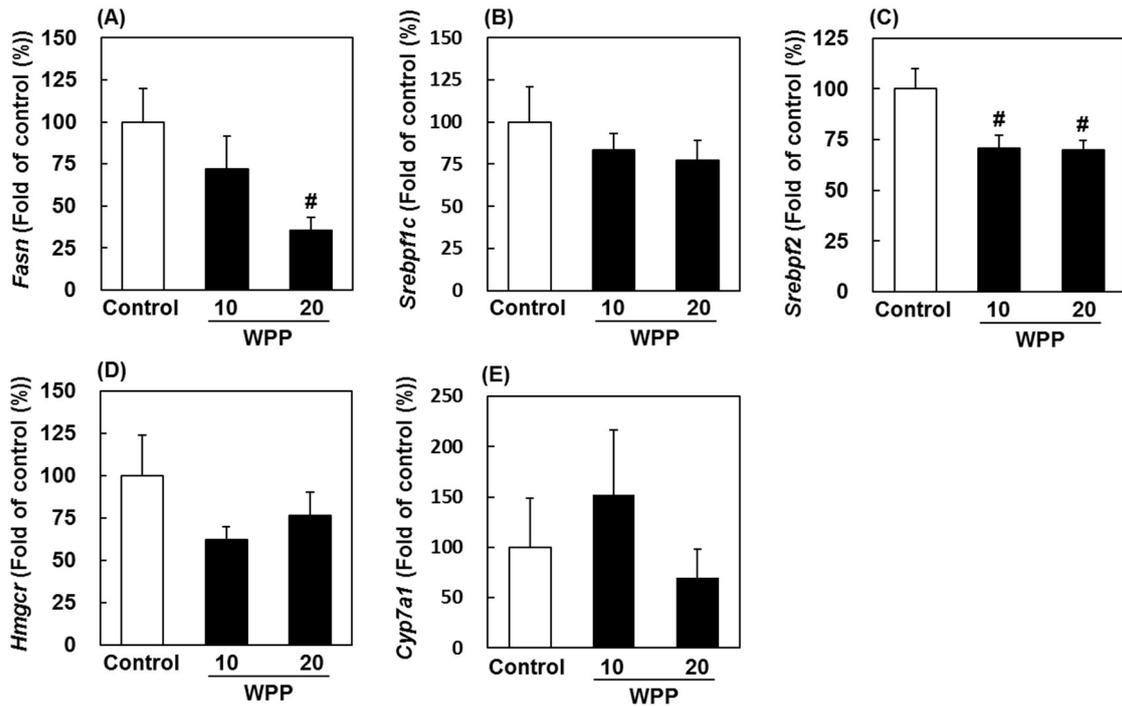


図1-4. ラット肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす乳性タンパク加水分解ペプチドの自由摂食の影響

ラットに14日間コントロール食 (AIN-76), 10%または20%のWPPを含有した食事を自由摂食させた。未絶食下で血清および肝臓サンプルを採取し、遺伝子発現を分析した。(A) *Fasn*, (B) *Srebp1c*, (C) *Srebp2*, (D) *Hmgcr* and (E) *Cyp7a1*. 値は平均±標準誤差 (n = 6) で示した。#P < 0.05 対コントロール群 (William's test)。

### 1.3.2 WPP 含有飼料の時間制限給餌試験

ラットに高炭水化物、無脂肪食を 28 日間与えた非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) のモデルを用いて、Hamad らは 1 日 1 回 0.15g/日/ラットの乳清タンパク質加水分解物の経口投与が、有意に血清 T-chol および肝臓 TG レベルの低下させることを報告した [45]。プロトコール 1 では、ラットに自由摂食させた。さらに、プロトコール 2 では摂食時間を制限する時間制限給餌における WPP 含有飼料の脂質レベルに対する影響を評価した。

雄性 SD ラットに 14 日間 20%カゼイン食 (AIN-76 精製食, コントロール群), 20%WPP 食 (WPP20 群), または 20%SPP 食 (SPP20 群) を与えた。上記のように、ラットは、ラットに食物に自由に接近した時間 (ZT11-13 および ZT23-1 にそれぞれ対応する) の暗期の始めおよび終わりに活性給餌期間の 2 つのピークを示した (図 1-1)。14 日間の摂食後、10 時間の絶食条件下の ZT23 に対照群から収集した血清中の TG および T-chol レベルは、それぞれ 102mg / dL および 99mg / dL であった (図 1-5)。興味深いことに、AIN-93G のような正常な食事を与えた絶食下雄性 SD ラット (10 週未満) からの TG および T-chol レベルは、30~50mg / dL と 60~90mg / dL との間であった [46]。本研究では、コーンスターチをスクロース (表 1-2) に置換した AIN-76 飼料を使用して、軽度の脂質異常症を誘発した [27, 28]。結果として、絶食したコントロール群ラットにおいて観察された血清 TG および T-chol レベルは、

高スクロース含有飼料での時間制限給餌において、軽度の異常脂質血症を誘発することを確認した。しかしながら、WPP 含有飼料を与えたラットは、血清 TG レベルが 64mg/dL、T-chol レベルが 77mg/dL と、コントロール群と比較して有意に減少し (図 1-5)、WPP の血清 TG および T-chol 低下効果は SPP [47]と同様であることが示唆された。体重および肝臓重量、ならびに摂食量は、実験期間中の WPP および SPP 含有飼料摂食の影響を受けなかった (表 1-3)。さらに、10 時間絶食後に得られた結果ということを鑑みると、これらの効果が脂質吸収阻害によるものではない可能性を示している。

ラクタスタチンは、牛乳中の  $\beta$ -ラクトグロブリン由来のペプタペプチド (イソロイシン - イソロイシン - アラニン - グルタミン酸 - リシン) である。Nagaoka ら [48]は  $\beta$ -ラクトグロブリンのトリプシン加水分解物が低コレステロール血症活性を発揮することを報告している。本研究で使用した WPP の有効成分を同定することはできなかったが、WPP の主成分がジおよびトリペプチド分子量 (400Da) であったため、ラクタスタチンが血液および肝臓の脂質レベルを低下させる有効成分であるとは考えにくい。興味深いことに、結合したリン脂質を有する SPP は、完全な SPP よりも高いコレステロール低下作用を示すことが報告されている [49]。SPP の低分子量画分は、低および高分子量画分混合物よりも高い血清 TG および T-chol 低下効果を示した [47]。したがって、肝臓脂質代謝を調節する活性ペプチドの探索を含む、乳清タンパク質加水分解ペプチド中に存在する個々のペプチドやアミノ酸の役割を明

らかにするためにさらなる研究が必要である。

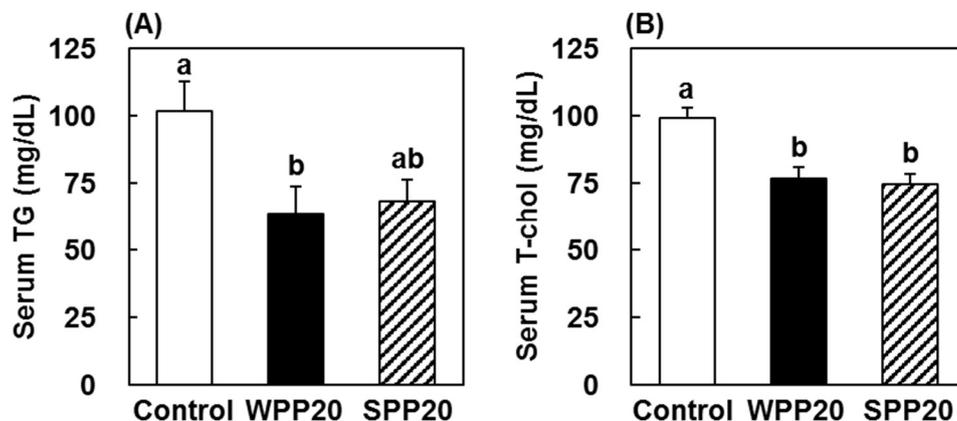


図 1-5. 乳清および大豆タンパク質加水分解ペプチドの時間制限給餌が血清脂質レベルに及ぼす影響

ラットには, ZT23-1 および ZT11-13 中に 14 日間毎日, 食餌を含むコントロール食 (AIN-76), 20% 乳清または大豆タンパク質加水分解ペプチドを含む食餌を与えた。また全ての群の摂食量を均質化した。10 時間の絶食後に血清試料を ZT23 で採取し, 脂質レベルを分析した。(A) 血清 TG, (B) 血清 T-chol。値は平均±標準誤差 (コントロール群: n = 7, WPP20 群: n = 7, SPP20 群: n = 8) を示し, 異なるアルファベット間で有意差を示す (P < 0.05, Tukey's test)。

表 1-3. 乳清および大豆タンパク質加水分解ペプチドの時間制限給餌が生物学的パラメータに及ぼす影響。

	Control	WPP20	SPP20
体重 (g)			
初体重 (day 0)	189.6 ± 4.3	189.2 ± 3.3	189.3 ± 4.5
終体重 (day 14)	250.8 ± 5.5	249.0 ± 6.9	247.7 ± 9.4
摂食量 (g/day)	16.5 ± 0.1	16.8 ± 0.2	17.0 ± 0.2
肝臓重量 (g)	8.4 ± 0.3	8.5 ± 0.4	7.9 ± 0.5

ラットには, 14 日間, ZT23-1 および ZT11-13 で毎日同量の給餌をおこなった。

## 第2章

モノグルコシルルチンの日常的な摂取は、  
マウスの消化管抑制ペプチド分泌を抑制することによって、  
高脂肪食誘発性肥満を予防する

This chapter is based mainly on:

Yokoyama D., Tanaka W., Hashizume Y., Tandia M., Sakono M., Shimoi K. and Sakakibara H.,  
Daily consumption of monoglucosyl-rutin prevents high-fat diet-induced obesity by suppressing  
gastric inhibitory polypeptide secretion in mice, *Functional Foods in Health and Disease*, 2018,  
8(7), 353-371

## 2.1 諸 論

主要なフラボノイドの 1 つであるケルセチン (図 2-1A) は, 抗糖尿病, 抗肥満活性を示し, また脂質代謝を調節することが報告されている [50, 51, 52]。ケルセチンの大部分は, 植物において O-グリコシドでのみ存在し, アグリコンで存在することは少ない [53]。従って, ケルセチンの影響に関する研究は, アグリコン体に加えてグルコシドについても評価すべきである。

ルチン (quercetin-3-O-rutinoside, 図 2-1B) は主要なケルセチン配糖体の 1 つであり, そば種子, コリアンダー, モロヘイヤなどの植物食品に広く分布している [53, 54]。しかしながら, その生物学的利用能はケルセチンアグリコンより低いと報告されている [55]。このような中で, 近年, グリコシルトランスフェラーゼを用いてルチンにグルコース 1 分子を結合させた  $\alpha$  モノグルコシルルチン (4G- $\alpha$ -D-glucopyranosyl rutin,  $\alpha$ MR, 図 2-1C) が, ルチン類似物として注目されている [56]。興味深いことに, ラットにおける  $\alpha$ MR の吸収速度は, アグリコン体の約 4.5 倍早く [57], また, アグリコン体より強い放射線防護特性を発揮することが *in vitro* 試験で確認されている [58]。さらに,  $\alpha$ MR は, ラットのアゾキシメタン誘発結腸発がん予防, 抗酸化防御機構の活性化, 糖化の抑制も報告されている [59, 60, 61]。

このように, 多様な機能を有する可能性を有する  $\alpha$ MR であるが, その生理機能に

関するデータはいまだ不十分である。本章では、 $\alpha$ MR がマウスの食餌誘発性体重増加に及ぼす影響を調べた。さらに、抗肥満効果の根底にある機構を解明するために、インシュリン、レプチン、インターロイキン6 (IL-6)、レジスチン、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )、胃抑制性ポリペプチド (GIP)、グレリンおよびグルカゴンの変化を評価した。

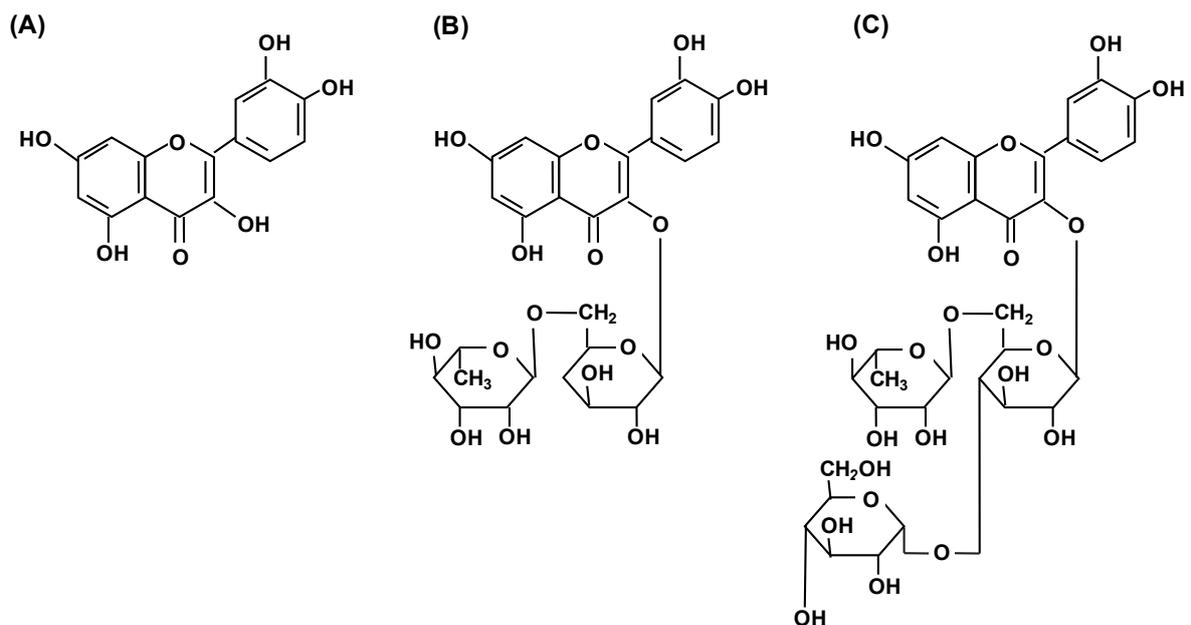


図 2-1. (A)ケルセチン, (B)ルチンおよび(C)  $\alpha$ -モノグルコシルルチンの構造

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬類

$\alpha$ MR は東洋精糖株式会社（東京）より供与された。Material Safety Data Sheet (MSDS)-Europe による  $\alpha$ MR の毒物学的情報は, LD50 経口(マウス), > 42,000mg /kg, 皮膚および目の刺激はなしである。ケルセチンはシグマアルドリッチ（米国）から入手した。コントロール低脂肪食（LFD）は実験室用飼料（MF, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京）を用いた。また, MF系高脂肪食（HFD）, 0.5%  $\alpha$ MR 含有 LFD および HFD の作製は, オリエンタル酵母工業株式会社（場所）に委託した。試験に供した各食餌の組成を表 2-1 に示す。その他の試薬はすべて試薬特級のものを使用した。

表 2-1. 飼料組成

成分	LFD	LFD+ $\alpha$ MR	HFD	HFD+ $\alpha$ MR
				(%)
水分	7.9	7.9	7.9	7.9
粗タンパク質	23.1	23.1	23.1	23.1
粗脂質	5.1	5.1	30.0	30.0
粗灰分	5.8	5.8	5.8	5.8
粗繊維	2.8	2.8	2.8	2.8
可溶性無窒素物	55.3	54.8	30.4	29.9
$\alpha$ MR	—	0.5	—	0.5

エネルギー (kcal/g) <sup>1</sup>	359.5	357.5	484.0	482.0
-----------------------------	-------	-------	-------	-------

$\alpha$ MR:  $\alpha$ -モノグルコシルルチン, LFD: 低脂肪食 (コントロール), HFD: 高脂肪食  
<sup>1</sup>エネルギー値はアトウォーター係数を用いて算出した。可溶性無窒素物および粗タンパク質については 4kcal / g, 粗脂質については 9kcal / g であった。

## 2.2.2 実験動物および方法

雄性 C57BL/6J マウス（日本エスエルシー株式会社，静岡）を，室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ，相対湿度  $55 \pm 5\%$  の部屋で飼育した。明期開始を 7:00 (ZT0)，暗期開始を 19:00 (ZT12) とし，実験室用飼料と脱イオン水を自由摂取させた。1 週間の順化後，以下のプロトコールに従って 2 つの実験に供した。すべての動物の維持管理および実験は，国立大学法人宮崎大学の実験動物規則に従って行われた（実験番号 2014-005-4）。

### 【プロトコール 1】

5 週齢のマウス 96 匹を無作為に LFD, LFD + 0.5%  $\alpha$  MR, HFD, HFD + 0.5%  $\alpha$  MR の 4 つの群に分けた（表 2-1）。さらに各グループを 2 つのサブグループに分けた。4 週間後に最初のサブグループを解剖し，13 週間後，残りのサブグループを解剖した。マウスは ZT11~ZT13 間にイソフルランによる麻酔をおこなった。本研究では，サブグループあたり 6 匹のマウスを 6 時間の絶食下で解剖し，残り 6 匹のマウスを非絶食下で解剖した。麻酔下で，血液サンプルを腹部静脈から血清 Capiject チューブ（Terumo Medical Corporation, 米国）に採取した。室温で 30 分間放置した後，遠心分離 ( $3,500 \times g$ , 90 秒) により血清画分を分取し，分析まで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。肝臓，腎臓，胸腺，脾臓，および内臓脂肪の一部の重量を測定した。肝臓切片を液体窒素中で急速凍結後に脂質分析のために  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

## 【プロトコール 2】

8週齢のマウス6匹を無作為に3群に分け、ケルセチン(500 $\mu$ mol/10mL/kg体重)、 $\alpha$ MR(500 $\mu$ mol/10mL/kg体重)または溶媒(脱イオン水, 10mL/kg体重)[62]を経口投与した。1時間後、イソフルラン麻酔下マウスを断頭し、ヘパリン処理したCapiject管に血液を採取した。血漿画分を3500 $\times$ gで90秒間の遠心分離によって分離し、1mLの血漿に15 $\mu$ Lのギ酸を加えて酸性化した。5 $\mu$ Lの100mMアスコルビン酸を加えた後、血漿を分析に供するまで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 2.2.3 血液分析

E-テストワコー(和光純薬工業株式会社, 大阪)を用いて、血清生化学パラメーター(TG, T-chol, 高密度リポタンパク質[HDL]コレステロール, 遊離コレステロール, PLおよび非エステル化脂肪酸)を分析した。non-HDLコレステロール量は、以下の式を使用して算出した。

$$\text{non-HDL コレステロール} = \text{T-chol} - \text{HDL コレステロール}$$

### 2.2.4 肝臓脂質分析

肝臓試料からの脂質は、以前に報告された改変方法[32, 63, 64](Folchら, 1957,

Horiuchi ら, 2007, Kudo ら, 2007) に従って抽出した。肝臓試料の 200mg を 1mL の 50mM 酢酸ナトリウムでホモジナイズした。次いで, 6mL のクロロホルムメタノール混合液 (2:1 [vol/vol]) を加え, 混合物を 40°C で 30 分間インキュベートした。500  $\mu$ L 分量の有機相を遠心濃縮器 (CC-105, 株式会社トミー精工, 東京) で乾固させた。残渣を 10% Triton X-100 含有イソプロピルアルコール 200  $\mu$ L に溶解し, TG, T-chol および PL レベルを, E-テストワコーを用いて分析した。

### 2.2.5 血中ホルモンおよびサイトカイン分析

標的タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を有する活性微粒子色素を含むマルチプレックスバイオメトリック酵素結合免疫吸着アッセイに基づく免疫測定法を, 製造元の指示に従って使用した。GIP, IL-6, インスリン, レプチン, 単球走化性タンパク質 1 (MCP-1), レジスチン, TNF $\alpha$ , グレリンおよびグルカゴンの同時検出および定量にマウス代謝ホルモンパネル (MMHMAG-44KK-9, Millipore, 米国) および, マウスアディポネクチン Single Plex パネル (MADPNMAG-70K-1, Millipore) を使用した。多検体プロファイルおよび MAGPIX システム (Millipore) を用いて, サイトカインレベルを評価した。

### 2.2.6 血漿からのケルセチン代謝物の抽出

抽出は, 以前に報告された方法 [62] にいくつかの変更を加えて実施した。2 匹のマ

ウス由来の凍結血漿サンプル (800  $\mu$ L) を 0.01M シュウ酸で平衡化した Bond Elut Plexa (30mg) 抽出カートリッジ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, 米国) に負荷した。カートリッジを 2mL の 0.01mM シュウ酸で洗浄した後、ケルセチン代謝産物を 0.5%トリフルオロ酢酸含有メタノール 1mL で溶出した。濃縮遠心分離機を用いて溶出液を乾固させた。残渣を 0.5%トリフルオロ酢酸含有メタノール 100  $\mu$ L に溶解し、0.2  $\mu$ m メンブレンフィルター (Millex-LG, Millipore) でろ過した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

### 2.2.7 HPLC ダイオードアレイ検出器 (DAD)

ケルセチン、 $\alpha$ MR およびそれらの代謝産物を、以前の報告 [53]に記載されているように、DAD と組み合わせて HPLC で分析した。HPLC システムは、ChromNAV クロマトグラフィーデータステーション、PU-2089 Plus ポンプ、AS-2057 Plus オートサンプラー、CO-2060 Plus カラムオーブン、および 200-600nm の波長をモニタリングする MD-2018 Plus DAD システムを備えた JASCO LC-NetII/ADC システムを使用した。カラム、Capcell Pak UG120 (3.0mm i.d.  $\times$  150mm, 3  $\mu$ m, 資生堂株式会社, 東京) を 40°C で使用した。直線勾配溶離は、50mM リン酸ナトリウム (pH3.3) および 10%メタノールからなる溶液 A, 70%メタノールからなる溶液 B を用いて、0.4mL /分の流速で次のように送った。最初に 100%の溶液 A, 70%A で 10 分間, 65%A で 15 分間, 60%A5 分間, 50%A5 分間, さらに 10 分間 0%A, 0%A で 20 分

間維持した。抽出液の注入量は  $4\mu\text{L}$  であった。

### 2.2.8 統計解析

統計解析は、StatView for Windows (バージョン 5.0, SAS Institute, Cary, NC, 米国) を用い、One-way ANOVA をおこなった。Tukey-Kramer 法をグループ間の多重比較に適用し、有意確率 5% で検定した。

## 2.3 結 果

### 2.3.1 摂食量, 体重および組織重量

6週間後, HFD 群は LFD 群より有意に高い体重増加を示した (図 2-2)。10週目および13週目に, HFD +  $\alpha$ MR 群の体重増加は HFD 群の体重増加よりも有意に低く, LFD 群との差はなかった。試験期間中, HFD および HFD +  $\alpha$ MR 群のマウスの摂取エネルギーは同量 (それぞれ1日当たり 12.7, 13.0kcal /マウス) であった。一方これらの群と比較して, LFD 群 (1日当たり 11.1kcal /マウス) での摂取エネルギーは低かった (表 2-2)。内臓脂肪重量は, 第4週および第13週に HFD 群で有意に増加した (表 2-2)。 $\alpha$ MR の添加によって13週目に内臓脂肪重量を減少させたが, この効果は4週目には観察されなかった。

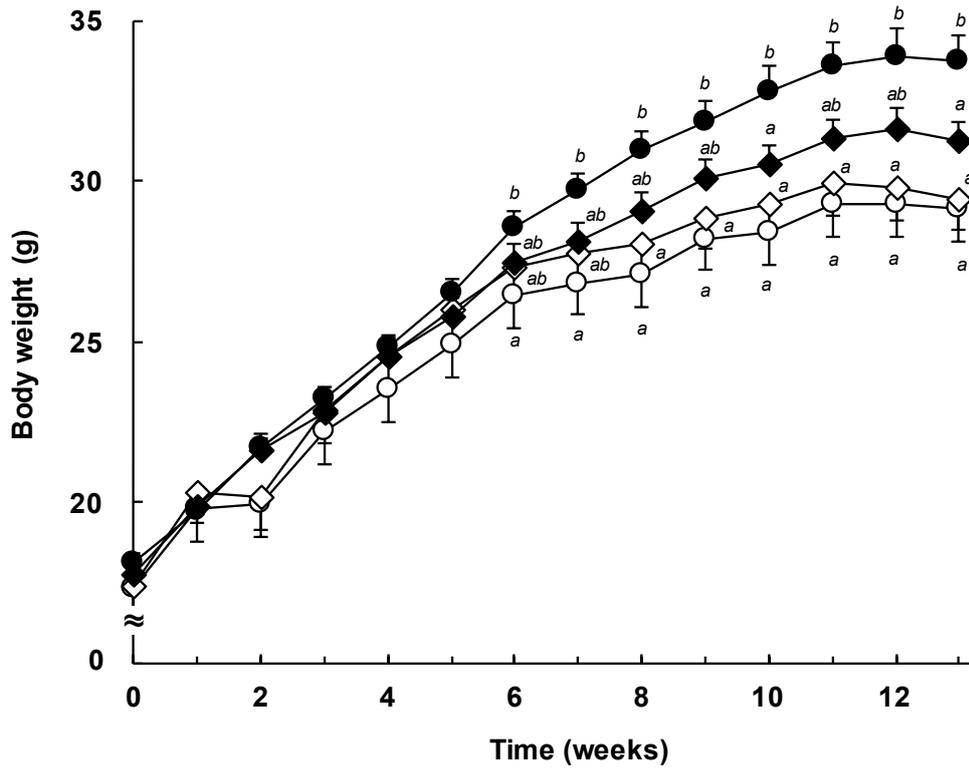


図 2-2.  $\alpha$ -モノグルコシルルチン ( $\alpha$ MR) がマウスの体重増加に及ぼす影響  
 ○ : LFD, ◇ : LFD+ $\alpha$ MR, ● : HFD, ◆ : HFD+ $\alpha$ MR

表 2-2.  $\alpha$ -モノグルコシルルチン ( $\alpha$ MR) がマウスの体重, 摂食量および臓器重量に及ぼす影響

	LFD	LFD+ $\alpha$ MR	HFD	HFD+ $\alpha$ MR
体重 (g) <sup>1</sup>				
初期 (week 0)	17.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	17.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	18.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	17.8 ± 0.3 <sup>a</sup>
中間 (Week 4)	22.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	22.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	23.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	22.8 ± 0.4 <sup>a</sup>
最終 (week 13)	29.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	29.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	33.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	31.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
摂食量				
kcal/マウス/日	11.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.0 <sup>a</sup>	12.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	13.0 ± 1.0 <sup>b</sup>
相対臓器重量 (g/100 g 体重)				
中間 (week 4)				
肝臓	4.95 ± 0.29 <sup>a</sup>	4.80 ± 0.17 <sup>ab</sup>	4.43 ± 0.24 <sup>ab</sup>	4.08 ± 0.15 <sup>b</sup>
腎臓	1.27 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.04 <sup>a</sup>
脾臓	0.24 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.01 <sup>a</sup>
内臓脂肪	1.29 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.76 ± 0.34 <sup>b</sup>	2.67 ± 0.27 <sup>b</sup>
最終 (week 13)				
肝臓	3.92 ± 0.17 <sup>ac</sup>	4.17 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.24 ± 0.05 <sup>bc</sup>	3.48 ± 0.06 <sup>c</sup>
腎臓	1.17 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.06 <sup>ab</sup>
脾臓	0.26 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>b</sup>
内臓脂肪	1.37 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.81 ± 0.17 <sup>ac</sup>	4.76 ± 0.23 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.65 <sup>cd</sup>

LFD：低脂肪食, HFD：高脂肪食。データは平均値±標準誤差を示す。

<sup>1</sup>初期 (week 0) および中期 (week 4) の群はそれぞれ 24 匹のマウスからなり, 最終 (week 13) の群はそれぞれ 12 匹のマウスからなる。異なる文字間は有意差を示す (p < 0.05, Tukey's test)。

### 2.3.2 血中脂質パラメーター

4 週目および 13 週目の両方で、T-chol, HDL コレステロール, 遊離コレステロール, および PL レベルは, 解剖前絶食の有無にかかわらず, LFD 群よりも HFD 群マウスで有意に高かった (図 2-3A~D)。non-HDL コレステロールおよび TG レベルもまた, 非絶食条件下の HFD マウスにおいて 13 週目で有意に高かった (図 2-3E, F)。T-chol および non-HDL コレステロールレベルの増加は, 第 13 週には  $\alpha$ MR の添加によって抑制されたが, 内臓脂肪重量同様に 4 週目の段階では抑制されなかった。

### 2.3.3 肝臓中脂質レベル

TG, T-chol, および PL のような主要な肝臓脂質を評価した。肝臓中の TG レベルのみが, 13 週目に未絶食条件下の HFD 群マウスにおいて有意に増加し (図 2-4A),  $\alpha$ MR の添加はこの増加を抑制した。T-chol, PL レベルは, LFD と HFD 群間で差はなかった (図 2-4B, C)。

### 2.3.4 血中メタボリックホルモンおよびサイトカインレベル

試験食餌の 13 週間の非絶食条件下で, マウスのアディポネクチン, GIP, IL-6, インスリン, レプチン, MCP-1, レジスチン, TNF $\alpha$ , グレリンおよびグルカゴンの血清レベルを分析した。グレリンおよびグルカゴン値は検出限界以下であった。

血清 GIP およびレプチンレベルは、HFD 群において有意に増加したが（図 2-5A, B),  $\alpha$ MR を添加することでこの増加を抑制する傾向があった。他の 6 つのホルモン およびサイトカインのレベルは、LFD および HFD グループ間で差はなかった（図 2-5C~H)。

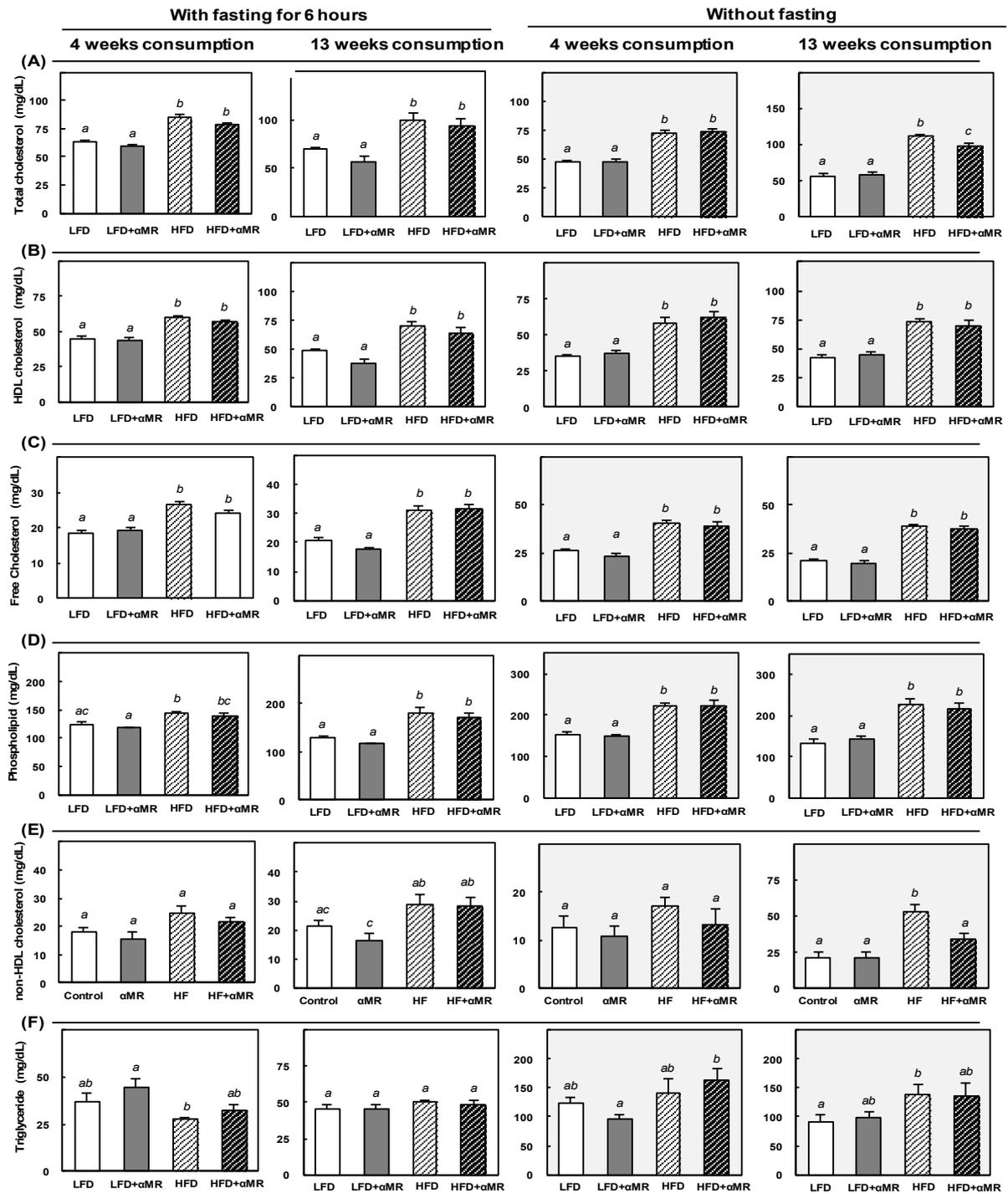


図 2-3.  $\alpha$ -モノグルコシルルチン ( $\alpha$ MR) がマウスの血中生化学的パラメーターに及ぼす影響  
 マウスを、低脂肪食 (LFD), LFD + 0.5%  $\alpha$ MR, 高脂肪食 (HFD), および HFD + 0.5%  $\alpha$ MR の 4 つのグループに分けた。各群から 12 匹のマウスを 4 週目に解剖し、残りの 12 匹のマウスを 13 週目に解剖した (6 時間の絶食または未絶食のいずれか)。データは血清脂質レベルを示す (平均  $\pm$  標準誤差,  $n = 6$ )。 (A) T-chol, (B) 高密度リポタンパク質 (HDL) chol, (C) 遊離コレステロール, (D) PL, (E) 非 HDL chol, (F) TG。異なる文字間は有意差を示す ( $p < 0.05$ , Tukey's test)。

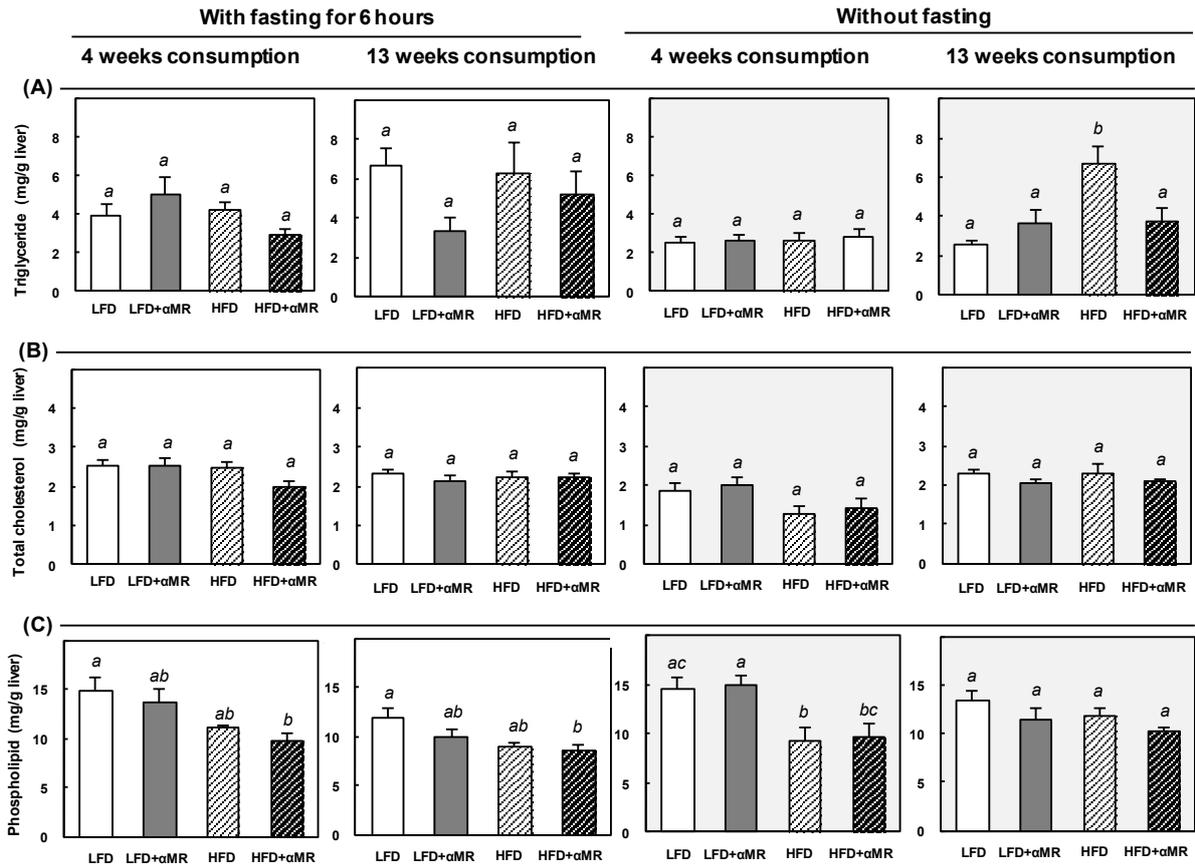
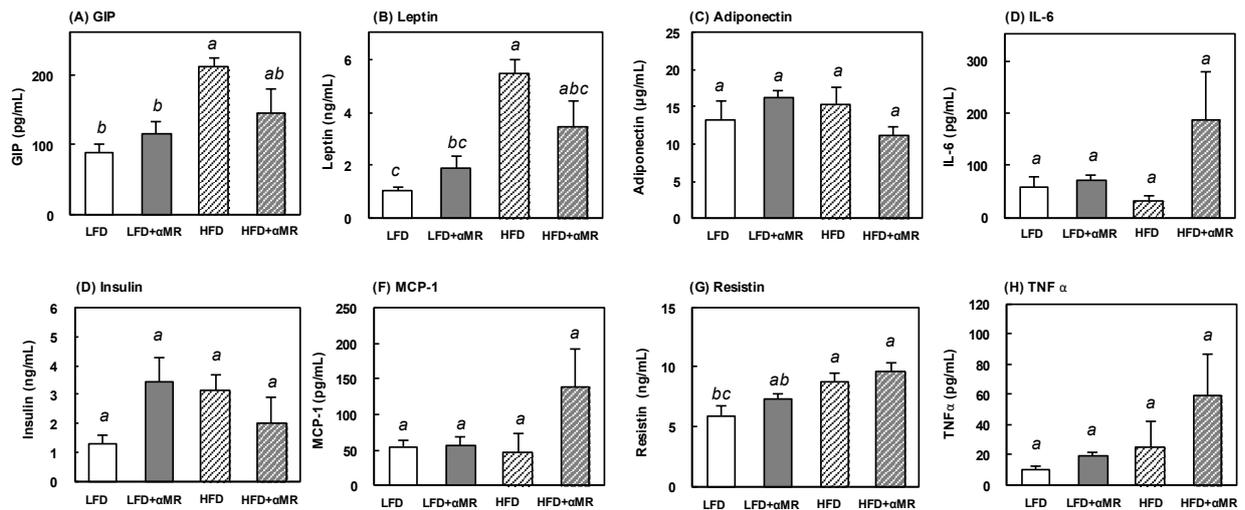


図 2-4.  $\alpha$ -モノグルコシルルチン ( $\alpha$ MR) がマウスの肝臓脂質レベルに及ぼす影響

マウスを、低脂肪食 (LFD), LFD + 0.5%  $\alpha$ MR, 高脂肪食 (HFD), および HFD + 0.5%  $\alpha$ MR の 4 つのグループに分けた。各群から 12 匹のマウスを 4 週目に解剖し, 残りの 12 匹のマウスを 13 週目に解剖した (6 時間の絶食または未絶食のいずれか)。データは肝臓脂質レベルを示す (平均  $\pm$  標準誤差,  $n = 6$ )。 (A) TG, (B) T-chol, (C) PL。異なる文字間は有意差を示す ( $p < 0.05$ , Tukey's test)。



**図 2-5.  $\alpha$ -モノグルコシルルチン ( $\alpha$ MR) がマウスの血中パラメーターに及ぼす影響**

低脂肪食 (LFD),  $\alpha$ MR を添加した LFD, 高脂肪食 (HFD), または  $\alpha$ MR を添加した HFD を用いた 13 週間の摂食試験の血中ホルモンおよびサイトカインレベル。(A) アディポネクチン, (B) 消化管抑制ペプチド (GIP), (C) インターロイキン 6 (IL-6), (D) インスリン, (E) レプチン, (F) 単球走化性タンパク質 1 (MCP-1), (G) レジスチン, (H) 腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )。データは平均  $\pm$  標準誤差 (n = 6) で示し, 異なる文字間は有意差を示す (p < 0.05, Tukey's test)。

### 2.3.5 $\alpha$ MR の吸収

図 2-6 は、溶媒、ケルセチンまたは  $\alpha$ MR を投与したマウスから採取した 370nm の血漿サンプルにおける HPLC クロマトグラムを示す。主要なピークは溶媒対照群マウスの血漿には現れなかった。ケルセチンおよび  $\alpha$ MR で処置したマウスから収集した血漿中に 10 以上の主要なピークが検出された。これらのピークの保持時間は、ケルセチンまたは  $\alpha$ MR のものと一致しておらず、化合物がそのままの形態ではほとんど吸収されなかったことを示している。両方の群からの血漿中で検出されたピークは、典型的なフラボノイドスペクトルを示し、クロマトグラムは類似していた。

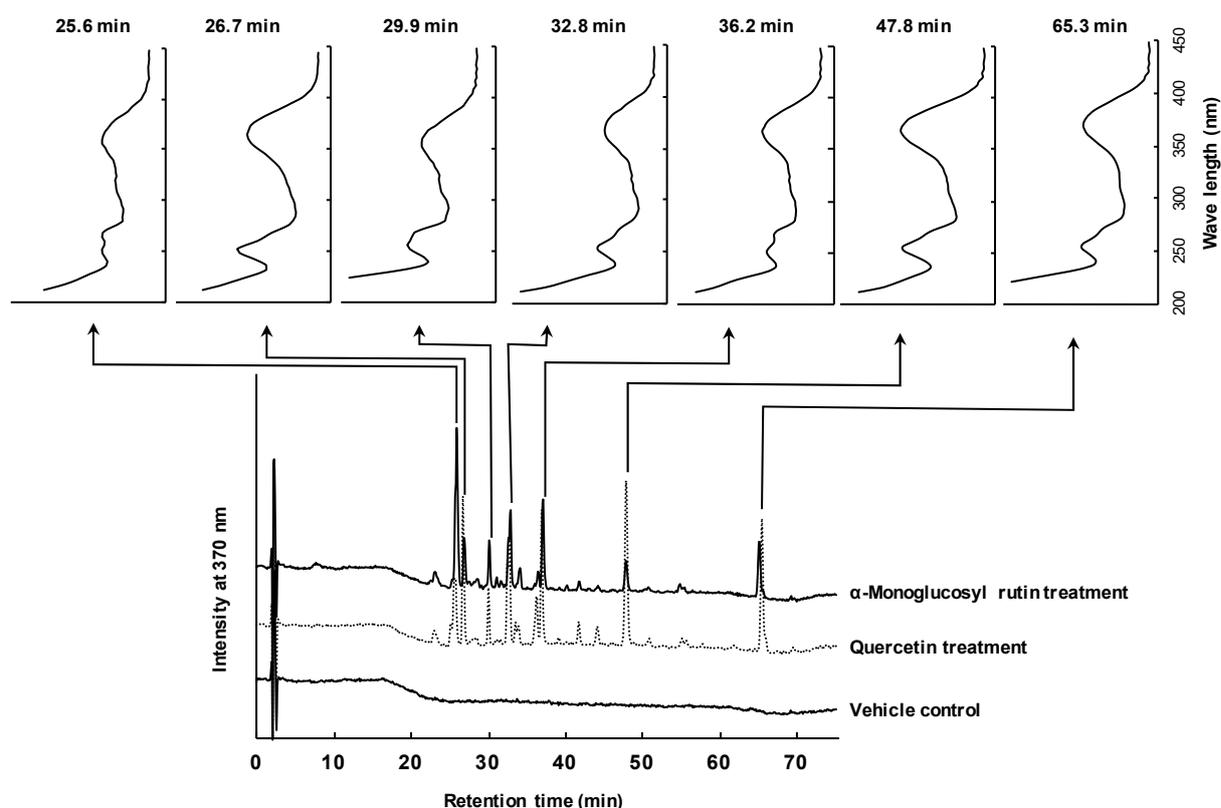


図 2-6. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のクロマトグラム (370nm)  
 $\alpha$ -モノグルコシルルチンまたはケルセチンを、雄の C57BL / 6 マウスに経口投与 (500  $\mu$ mol / kg 体重) した。コントロール群には溶媒を与えた。1 時間後、血液サンプルを採取し、血漿画分中のケルセチンおよびその代謝産物を HPLC ダイオードアレイ検出を用いて分析した。



## 2.4 考 察

肥満は、特に先進国で世界的な懸念となっており、それに応じて重要な研究課題となっている。本研究では、マウスにおける食餌誘発性肥満に対する  $\alpha$ MR の効果を評価した。0.1%および0.5%の  $\alpha$ MR を含む HFD を用いた未発表の予備研究では、HFD によって誘導された過剰な体重増加が 0.5%  $\alpha$ MR によって有意に阻害されることを見出した。0.1%  $\alpha$ MR の摂取は体重増加を抑制したが有意ではなかった。したがって本研究では、0.5%の  $\alpha$ MR を用いた。HFD 群は、6週間後に LFD 群よりも体重が増加した。しかしながら  $\alpha$ MR の添加は、10、13週目に体重増加を有意に減少させた。HFD、HFD +  $\alpha$ MR 群は、試験期間中に同量のエネルギーを摂取したが、LFD 群ではより少ない傾向にあった。内臓脂肪重量は、4週目および13週目の両方において HFD 群で有意に高かった。HFD への  $\alpha$ MR 添加は、13週目では内臓脂肪重量を有意に抑制したが、4週目ではその抑制は見られなかった。

体重増加は、慢性的な正のエネルギーバランスによって引き起こされる [13]。肥満の主な原因はエネルギー摂取量の増加、特に脂質の高摂取である [65,66]。脂質吸収を阻害する機能性食品は、体重増加を遅くしたり抑制したりすることがある。本研究では HFD の摂食後に血清コレステロール値が上昇し、 $\alpha$ MR を添加すると13週目にその増加が抑制されることを見出した。また、HFD 群で4週目の血清 TG レベ

ルに対する  $\alpha$ MR の影響を評価することはできなかったが、以前の研究でコーン油摂取マウスの血清 TG 上昇は  $\alpha$ MR によって抑制されなかった。さらに 13 週目において、 $\alpha$ MR が HFD を与えたマウスの血清コレステロール値と non-HDL コレステロール値の上昇を抑制することを見出した。これらの変化は、体重の増加がなく内臓脂肪蓄積が観察された初期の段階（4 週目）では明らかではなかった。従って、 $\alpha$ MR は過剰な体重増加が観察されていない脂質蓄積の初期段階には影響を及ぼさない可能性が示され、 $\alpha$ MR の日常的な摂取は、脂質蓄積を抑制し、それによって過剰な体重増加を抑制することが示唆された。

$\alpha$ MR による抗肥満効果のメカニズムの 1 つは、胃腸管における活性が考えられる。胃腸管は脂肪やグルコースなどの栄養素によって刺激され、十二指腸内分泌 K 細胞から分泌される GIP のような肥満に関連するいくつかのペプチドホルモンを分泌するという報告がある [67]。GIP は、膵島  $\beta$  細胞を刺激し、GIP 受容体に結合することによってインスリン分泌を促進することが知られている [68]。GIP はまた、GIP レベルの低下によって、HFD 摂食マウスにおける体重増加を制限することが示されているように [69]、脂質代謝に直接的な作用を示すようである。従って、GIP の作用を減少させる食物成分は、肥満を予防するのに有効である。Fukuoka らは、米糠からのトリテルペンアルコールとステロールは、HFD を与えたマウスの脂質促進性の血漿 GIP を低下させ、血漿レプチン、肝 TG および脂肪重量の調節とともに体重増加を抑制することを報告した [70]。本研究において  $\alpha$ MR の添加は、ほぼコントロー

ルレベルで血清 GIP を維持することが確認された。内臓脂肪重量、血清レプチンおよびインスリンレベルも、Fukuoka ら [70]によって報告された結果と同様であり、 $\alpha$ MR が十二指腸内分泌腺 K 細胞に影響を与え、GIP 分泌を調節する可能性があることを示した。しかし、その詳細なメカニズムに関しては、さらなる研究が必要である。本研究では、非絶食条件下でのみ血清メタボリックホルモンとサイトカインレベルを評価した。いくつかのホルモンおよびサイトカイン分泌は、摂食時および絶食時に異なると報告されている [71,72]。従って、GIP に対する  $\alpha$ MR の効果は、絶食条件下で変化する可能性がある。

摂取された  $\alpha$ MR は血中に吸収されると報告されている [55,57]。本研究では検出可能な量のインタクトな  $\alpha$ MR は、血漿画分において発見されなかった。しかしながら、ケルセチンアグリコンと類似のパターンを有する複数のケルセチン代謝産物が存在した。これまでの報告によれば、ケルセチン 3,4'-ジ-O- $\beta$ -グルコシド、ケルセチン 3-O- $\beta$ -グルコシドおよびケルセチン 4'-O- $\beta$ -グルコシド [73]が挙げられる。今後、それらの正確な構造を同定する必要がある。本研究結果は、 $\alpha$ MR が、AMPK  $\alpha$ -Sirt1-PPAR  $\gamma$  経路および TRPV1 経路を調節 [20,21]することによって、循環するケルセチン代謝産物を介してその抗肥満効果を発揮し得ることを示した。

## 総 括

世界保健機関が発表した世界保健統計（2017年）によると、2015年の世界の総死亡数の多くが、脳卒中やがん、糖尿病、虚血性心疾患などの生活習慣病に関連した病が原因で死亡している。また、このような生活習慣病の多くが脂質異常症（高脂血症）や肥満（内臓脂肪蓄積）と関連していることが知られている。故に、高脂血症や内臓脂肪蓄積を抑制する食品成分が広く探索されている。中でも乳清タンパク質は動物性タンパク質源にもかかわらず、脂質量を低減させることが報告されている。しかしながら、その加水分解物に同様の効果があるかは未だ明らかとなっていなかった。また、フラボノイドの一つであるケルセチンは、多様な機能を有することから注目を集めている。本研究では、WPPの摂取による生体内脂質量に及ぼす影響、またケルセチン配糖体の $\alpha$ MRの摂取が、食事誘発性肥満を予防すること、さらにその予防機構について評価した。

第1章より、乳清タンパク質加水分解ペプチドの自由摂取が肝臓TGおよびT-cholレベルを有意に減少させることを初めて示した。これは、WPPが循環脂質レベルを低減させ、その結果脂質異常症を減弱させることを示唆している。また、これらの効果が、乳清タンパク質と同様に、TGおよびコレステロール生合成に関連する肝臓遺伝子発現の下方制御を介して発揮され得ることを示した。

ついで第2章より、 $\alpha$ MRの毎日の摂取が、GIP分泌を調節することにより食事誘発性の内臓脂肪蓄積を抑制し、結果的に過剰体重増加を予防することを初めて実証した。

したがってWPPや $\alpha$ MRは、生体内脂質量の低減や体重減少効果を有する潜在的機能性食品であることが示唆された。しかしながら、これらの作用機序解明のためのさらなる研究が必要である。

## 謝 辞

本論文は筆者が宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。窄野 昌信教授には主指導教員として、また榊原 啓之教授、山崎 正夫教授並びに、菅本 和寛准教授には副指導教員として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。大島 達也教授、仲西 友紀准教授並びに、河野 智哉准教授には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。本研究の第一章の実験では雪印メグミルク株式会社に乳清タンパク質加水分解ペプチドを、第二章の実験では東洋精糖株式会社に $\alpha$ -モノグルコシルルチンを提供していただくとともに有益なご助言をいただきましたこと、ここに感謝の意を表します。最後に、宮崎大学栄養化学研究室の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

2019年1月吉日

## 参考文献

- [1] Enkhmaa, B., Surampudi, P., Anuurad, E., and Berglund, L., "Lifestyle changes: effect of diet, exercise, functional food, and obesity treatment, on lipids and lipoproteins.," *Endotext*, 2000.
- [2] Nakajima, K., "Pharmacotherapy of mixed dyslipidemia in the metabolic syndrome.," *Curr. Clin. Pharmacol.*, vol. 5, pp. 133-139, 2010.
- [3] OECD Health Policy Studies, "Cardiovascular Disease and Diabetes; Policies for Better Health and Quality of Care.," 2015.
- [4] Yida, Z., Imam, M. U., Ismail, M., Ismail, N., and Hou, Z., "Edible bird's nest attenuates procoagulation effects of high-fat diet in rats.," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 9, pp. 3951-3959, 2015.
- [5] Han, S., Jiao, J., Zhang, W., Xu, J., Wan, Z., Zhang, W., Gao, X., and Qin, L., "Dietary fiber prevents obesity-related liver lipotoxicity by modulating sterol-regulatory element binding protein pathway in C57BL/6J mice fed a high-fat/cholesterol diet.," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 15256, 2015.
- [6] Hoffman, J. R. and Falvo, M. J., "Protein - Which is best?," *J. Sports Sci. Med.*, vol. 3, pp. 118-130, 2004.
- [7] Deminice, R., Comparotto, H., and Jordao, A. A., "Whey protein supplementation increases methionine intake but not homocysteine plasma concentration in rats.," *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, vol. 40, pp. 46-50, 2015.
- [8] Kim, J., Paik, H. D., Yoon, Y. C., and Park, E., "Whey protein inhibits iron overload-induced oxidative stress in rats.," *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, vol. 59, pp. 198-205, 2013.
- [9] Tong, X., Li, W., Xu, J. Y., Han, S., and Qin, L. Q., "Effects of whey protein and leucine supplementation on insulin resistance in non-obese insulin-resistant model rats.," *Nutrition*,

vol. 30, pp. 1076-1080, 2014.

- [10] Morifuji, M., Sakai, K., Sanbongi, C., and Sugiura, K., "Dietary whey protein downregulates fatty acid synthesis in the liver, but upregulates it in skeletal muscle of exercise-trained rats.," *Nutrition*, vol. 21, pp. 1052-1058, 2005.
- [11] Aparicio, V. A., Sanchez, C., Ortega, F. B., Nebot, E., Kapravelou, G., Porres, J. M., and Aranda, P., "Effects of the dietary amount and source of protein, resistance training and anabolic-androgenic steroids on body weight and lipid profile of rats.," *Nutr. Hosp.*, vol. 28, pp. 127-136, 2013.
- [12] WHO Organization, "Obesity: Preventing and managing the global epidemic.," *WHO Technical Report Series*, vol. 894, pp. 1-253, 2000.
- [13] Vecchie A, Dallegri F, Carbone F, Bonaventura A, Liberale L, Portincasa P, Fruhbeck G, Montecucco F, "Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases.," *Eur J Intern Med*, vol. 48, pp. 6-17, 2018.
- [14] NCD Risk Factor Collaboration, "Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants.," *Lancet*, vol. 387, pp. 1377-1396, 2016.
- [15] Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M, "Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK.," *Lancet*, vol. 378, pp. 815-825, 2011.
- [16] Koo SI, Noh SK, "Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect.," *J Nutr Biochem*, vol. 18, pp. 179-183, 2017.
- [17] Yasuda A, Natsume M, Sasaki K, Baba S, Nakamura Y, Kanegae M, Nagaoka S, "Cacao procyanidins reduce plasma cholesterol and increase fecal steroid excretion in rats fed a high-cholesterol diet.," *Biofactors*, vol. 33, pp. 211-223, 2008.
- [18] Gallaher CM, Munion J, Hesslink R., Jr Wise J, Gallaher DD, "Cholesterol reduction by

- glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats.," *J Nutr*, vol. 130, pp. 2753-2759, 2000.
- [19] Mineo S, Noguchi A, Nagakura Y, Kobori K, Ohta T, Sakaguchi E, Ichianagi T, "Boysenberry Polyphenols Suppressed Elevation of Plasma Triglyceride Levels in Rats.," *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, vol. 61, pp. 306-312, 2015.
- [20] Ran G, Ying L, Li L, Yan Q, Yi W, Ying C, Wu H, Ye X, "Resveratrol ameliorates diet-induced dysregulation of lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*).," *PLoS One*, vol. 12, p. e0180865, 2017.
- [21] Varghese S, Kubatka P, Rodrigo L, Gazdikova K, Caprnda M, Fedotova J, Zulli A, Kruzliak P, Busselberg D, "Chili pepper as a body weight-loss food.," *Int J Food Sci Nutr*, vol. 68, pp. 392-401, 2017.
- [22] Nakano, T., Simatani, M., Murakami, Y., Sato, N., and Idota, T., "Digestibility and absorption of enzymatically hydrolyzed whey Pprotein.," *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. (Japanese)*, vol. 47, pp. 195-201, 1994.
- [23] Contreras, M. D. M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., and I, R., "Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology.," *Food Sci. Thechnol.*, vol. 44, pp. 9-15, 2011.
- [24] Attaallah, W., Yilmaz, A. M., Erdogan, N., Yalcin, A. S., and Aktan, A. O., "Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran sodium sulfate induced colonic tumors in rats.," *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 18, pp. 817-822, 2012.
- [25] Kanda, A., Nakayama, K., Fukasawa, T., Koga, J., Kanegae, M., Kawanaka, K., and Higuchi, M., "Post-exercise whey protein hydrolysate supplementation induces a greater increase in muscle protein synthesis than its constituent amino acid content.," *Br. J. Nutr.*, vol. 110, pp.

981-987, 2013.

- [26] Reeves, P. G., Nielsen, F. H., and Fahey, G. C., Jr., "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.," *J. Nutr.*, vol. 123, pp. 1939-1951, 1993.
- [27] Gerber, P. A., and Berneis, K., "Regulation of low-density lipoprotein subfractions by carbohydrates.," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 15, pp. 381-385, 2012.
- [28] Reeves, P. G., "Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet.," *J. Nutr.*, vol. 127, pp. 838S-841S, 1997.
- [29] American Institute of Nutrition, "Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies.," *J. Nutr.*, vol. 107, pp. 1340-1348, 1977.
- [30] Liu, M., Shen, L., Liu, Y., Tajima, D., Sakai, R., Woods, S. C., and Tso, P., "Diurnal rhythm of apolipoprotein A-IV in rat hypothalamus and its relation to food intake and corticosterone.," *Endocrinology*, vol. 145, pp. 3232-3238, 2004.
- [31] Stevanovic, D., Starcevic, V., Vilimanovich, U., Nesic, D., Vucicevic, L., Misirkic, M., Janjetovic, K., Savic, E., Popadic, D., Sudar, E., Micic, D., Sumarac-Dumanovic, M., and Trajkovic, V., "Immunomodulatory actions of central ghrelin in diet-induced energy imbalance.," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 26, pp. 150-158, 2012.
- [32] Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H., "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.," *J. Biol. Chem.*, vol. 226, pp. 497-509, 1957.
- [33] Sperry, W. M. and Webb, M., "A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination.," *J. Biol. Chem.*, vol. 187, pp. 97-106, 1950.
- [34] Fletcher, M. J., "A colorimetric method for estimating serum triglycerides.," *Clin. Chim. Acta*, vol. 22, pp. 393-397, 1968.
- [35] Rouser, G., Siakotos, A. N., and Fleischer, S., "Quantitative analysis of phospholipids by thin-

- layer chromatography and phosphorus analysis of spots.," *Lipids*, vol. 1, pp. 85-86, 1966.
- [36] Graham, J. M., "Subcellular fractionation. In "A Practical Approach," Graham, J. M.; Rickwood, D., ed. Eds.," *Oxford University Press*, pp. 1-29, 1997.
- [37] Kelley, D. S., Nelson, G. J., and Hunt, J. E., "Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes.," *Biochem. J.*, vol. 235, pp. 87-90, 1986.
- [38] Ochoa, S., "Malic enzyme: malic enzymes from pigeon and wheat gram. In "Methods in Enzymology,"," *Colowick, S. P.; Kaplan, N. O., ed. Eds. Academic Press: New York*, pp. 739-753, 1955.
- [39] Chomczynski, P. and Sacchi, N., "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.," *Anal. Biochem.*, vol. 162, pp. 156-159, 1987.
- [40] Zhou, J., Keenan, M. J., Losso, J. N., Raggio, A. M., Shen, L., McCutcheon, K. L., Tulley, R. T., Blackman, M. R., and Martin, R. J., "Dietary whey protein decreases food intake and body fat in rats.," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 19, pp. 1568-1573, 2011.
- [41] Brown, M. S., and Goldstein, J. L., "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor.," *Cell*, vol. 89, pp. 331-340, 1997.
- [42] Ichinoseki-Sekine, N., Kakigi, R., Miura, S., and Naito, H., "Whey peptide ingestion suppresses body fat accumulation in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6).," *Eur. J. Nutr.*, vol. 54, pp. 551-556, 2016.
- [43] Deng, X., Dong, Q., Bridges, D., Raghow, R., Park, E. A., and Elam, M. B., "Docosahexaenoic acid inhibits proteolytic processing of sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) via activation of AMP-activated kinase.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1851, pp. 1521-1529, 2015.

- [44] Menendez, J. A. and Lupu, R., "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis.," *Nat Rev Cancer*, vol. 7, pp. 763-777, 2007.
- [45] Hamad, E. M., Taha, S. H., Abou Dawood, A. G., Sitohy, M. Z., and Abdel-Hamid, M., "Protective effect of whey proteins against nonalcoholic fatty liver in rats.," *Lipids Health Dis.*, vol. 10, p. 57, 2011.
- [46] Shrestha, S., Ehlers, S. J., Lee, J. Y., Fernandez, M. L., and Koo, S. I., "Dietary green tea extract lowers plasma and hepatic triglycerides and decreases the expression of sterol regulatory element-binding protein-1c mRNA and its responsive genes in fructose-fed, ovariectomized rats.," *J. Nutr.*, vol. 139, pp. 640-645, 2009.
- [47] Tamaru, S., Kurayama, T., Sakono, M., Fukuda, N., Nakamori, T., Furuta, H., Tanaka, K., and Sugano, M., "Effects of dietary soybean peptides on hepatic production of ketone bodies and secretion of triglyceride by perfused rat liver.," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 71, pp. 2451-2457, 2007.
- [48] Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., and Kuwata, T., "Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 281, pp. 11-17, 2001.
- [49] Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G., and Yamamoto, K., "Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells.," *J. Nutr.*, vol. 129, pp. 1725-1730, 1999.
- [50] Forney LA, Lenard NR, Stewart LK, Henagan TM, "Dietary quercetin attenuates adipose tissue expansion and inflammation and alters adipocyte morphology in a tissue-specific manner.," *Int J Mol Sci*, vol. 19, p. 895, 2018.
- [51] Peng J, Li Q, Li K, Zhu L, Lin X, Lin X, Shen Q, Li G, Xie X, "Quercetin improves glucose and lipid metabolism of diabetic rats: involvement of Akt signaling and SIRT1.," *J Diabetes*

*Res*, vol. 2017, p. 3417306, 2017.

- [52] Ting Y, Chang WT, Shiau DK, Chou PH, Wu MF, Hsu CL, "Antiobesity efficacy of quercetin-rich supplement on diet-Induced obese rats: effects on body composition, serum lipid profile, and gene expression.," *J Agric Food Chem*, vol. 66, pp. 70-80, 2018.
- [53] Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K, "Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas.," *J Agric Food Chem*, vol. 51, pp. 571-581, 2003.
- [54] Bai CZ, Feng ML, Hao XL, Zhong QM, Tong LG, Wang ZH, "Rutin, quercetin, and free amino acid analysis in buckwheat (*Fagopyrum*) seeds from different locations.," *Genet Mol Res*, vol. 14, pp. 19040-19048, 2015.
- [55] Makino T, Shimizu R, Kanemaru M, Suzuki Y, Moriwaki M, Mizukami H, "Enzymatically modified isoquercitrin, alpha-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside, is absorbed more easily than other quercetin glycosides or aglycone after oral administration in rats.," *Biol Pharm Bull*, vol. 32, pp. 2034-2040, 2009.
- [56] Suzuki Y, Suzuki K, "Enzymatic formation of 4G-alpha-D-glucopyranosyl-rutin.," *Agric Biol Chem*, vol. 55, pp. 181-187, 1991.
- [57] Shimoi K, Yoshizumi K, Kido T, Usui Y, Yumoto T, "Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and alphaG-rutin, a water soluble flavonoid, in rats.," *J Agric Food Chem*, vol. 51, pp. 2785-1789, 2003.
- [58] Yu H, Haskins JS, Su C, Allum A, Haskins AH, Salinas VA, Sunada S, Inoue T, Aizawa Y, Uesaka M, Kato TA, "In vitro screening of radioprotective properties in the novel glucosylated flavonoids.," *Int J Mol Med*, vol. 38, pp. 1525-1530, 2016.
- [59] Funabiki R, Takeshita K, Miura Y, Shibasato M, Nagasawa T, "Dietary supplement of G-rutin reduces oxidative damage in the rodent model.," *J Agric Food Chem*, vol. 47, pp. 1078-1082,

1999.

- [60] Matsunaga K, Yoshimi N, Shimoi K, Yamada Y, Katayama M, Sakata K, Kumo T, Yoshida K, Qiao Z, Kinae N, Mori H, "Inhibitory effects of dietary monoglucosyl-rutin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats.," *Asian Pac J Cancer Prev*, vol. 1, pp. 211-216, 2000.
- [61] Nagasawa T, Tabata N, Ito Y, Aiba Y, Nishizawa N, Kitts DD, "Dietary G-rutin suppresses glycation in tissue proteins of streptozotocin-induced diabetic rats.," *Mol Cell Biochem*, vol. 252, pp. 141-147, 2003.
- [62] Sakakibara H, Ogawa T, Koyanagi A, Kobayashi S, Goda T, Kumazawa S, Kobayashi H, Shimoi K, "Distribution and excretion of bilberry anthocyanins [corrected] in mice.," *J Agric Food Chem*, vol. 57, pp. 7681-7686, 2009.
- [63] Horiuchi R, Kitawaki R, Takagi N, Fukuda M, "Effects of okara on levels of plasma and hepatic lipids, and adipocytokine in rats.," *Bull Mukogawa Women's Univ Nat Sci*, vol. 55, pp. 41-46, 2007.
- [64] Kudo T, Tamagawa T, Kawashima M, Mito N, Shibata S, "Attenuating effect of clock mutation on triglyceride contents in the ICR mouse liver under a high-fat diet.," *J Biol Rhythms*, vol. 22, pp. 312-323, 2007.
- [65] Swinburn B, Sacks G, Ravussin E, "Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity.," *Am J Clin Nutr*, vol. 90, pp. 1453-1456, 2009.
- [66] Vranesic Bender D, Nutrizio M, Josic M, Ljubas Kelecic D, Karas I, Premuzic M, Domislovic V, Rotim C, Krznaric Z, "Nutritional status and nutrition quality in patients with non-alcoholic fatty liver disease.," *Acta Clin Croat*, vol. 56, pp. 625-634, 2017.
- [67] Yabe D, Seino Y, "Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and beta cell preservation.," *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 107, pp. 248-256, 2011.

- [68] Ravn P, Madhurantakam C, Kunze S, Matthews E, Priest C, O'Brien S, Collinson A, Papworth M, Fritsch-Fredin M, Jermutus L, Benthem L, Gruetter M, Jackson RH, "Structural and pharmacological characterization of novel potent and selective monoclonal antibody antagonists of glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor.," *J Biol Chem*, vol. 288, pp. 19760-19772, 2013.
- [69] Nasteska D, Harada N, Suzuki K, Yamane S, Hamasaki A, Joo E, Iwasaki K, Shibue K, Harada T, Inagaki N, "Chronic reduction of GIP secretion alleviates obesity and insulin resistance under high-fat diet conditions.," *Diabetes*, vol. 63, pp. 2332-2343, 2014.
- [70] Fukuoka D, Okahara F, Hashizume K, Yanagawa K, Osaki N, Shimotoyodome A, "Triterpene alcohols and sterols from rice bran lower postprandial glucose-dependent insulintropic polypeptide release and prevent diet-induced obesity in mice.," *J Appl Physiol*, vol. 117, pp. 1337-1348, 2014.
- [71] Huang L, Tan HY, Fogarty MJ, Andrews ZB, Veldhuis JD, Herzog H, Steyn FJ, Chen C, "Actions of NPY, and its Y1 and Y2 receptors on pulsatile growth hormone secretion during the fed and fasted state.," *J Neurosci*, vol. 34, pp. 16309-16317, 2014.
- [72] Zhang Y, Foncea R, Deis JA, Guo H, Bernlohr DA, Chen X, "Lipocalin 2 expression and secretion is highly regulated by metabolic stress, cytokines, and nutrients in adipocytes.," *PLoS One*, vol. 9, p. e96997, 2014.
- [73] Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terao J, "Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women.," *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 279, pp. R461-R467, 2000.
- [74] Balagtas, J. V., Hutchinson, F. M., Krochta, J. M., and Sumner, D. A., "Anticipating market effects of new uses for whey and evaluating returns to research and development.," *J. Dairy Sci.*, vol. 86, pp. 1662-1672, 2003.

