

# 抗肥満作用を有する新規食品素材に関する研究 : ドクダミを中心として

著者	宮田 光義
学位名	博士(海洋科学)
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2009
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1342/00001058/">http://id.nii.ac.jp/1342/00001058/</a>

# 博士学位論文

## 抗肥満作用を有する新規食品素材に関する研究 ～ドクダミを中心として～

平成 21 年度  
(2010 年 3 月)

東京海洋大学大学院  
海洋科学技術研究科  
応用生命科学専攻

宮田 光義

# 目次

ページ

## 第1章 緒論

6

1.1.	はじめに	6
1.2.	肥満の判定基準と現状	6
1.3.	肥満の原因	7
1.4.	中性脂肪(TG)の消化・吸収機構	8
1.5.	膵リパーゼ	9
1.6.	FAT/CD36	10
1.7.	AQP	11
1.8.	脂肪細胞	11
1.9.	TGの蓄積機構	12
1.10.	脂肪細胞の増殖・分化機構	13
1.11.	TGの分解機構	15
1.12.	メタボリックシンドローム	15
1.13.	アディポサイトカイン	16
1.14.	ヘルスフードとは	17
1.15.	ドクダミ( <i>Houttuynia cordata</i> Thunb)	17
1.16.	とろろ昆布	18
1.17.	コガネタケヤシ( <i>Chrysalidocurpus lutescens</i> Wendl.)	18
1.18.	本研究の目的	19
	第1章の図表	20

## 第2章 ドクダミの抗肥満作用

24

2.1.	はじめに	24
2.2.	実験方法	24
2.2.1.	試薬	24
2.2.2.	実験動物	24
2.2.3.	抽出物の調製	24
2.2.4.	TG 負荷試験	25

2.2.5.	隣リパーゼ活性阻害の測定	25
2.2.6.	オレイン酸・グリセロール負荷試験	25
2.2.7.	腸管内に残存するオレイン酸とグリセロールの定量	26
2.2.8.	FAT/CD36 阻害試験	26
2.2.9.	AQP 阻害試験	27
2.2.10.	活性成分の分画と精製	27
2.2.11.	活性成分の構造決定	28
2.2.12.	細胞培養	28
2.2.13.	MTT アッセイ	29
2.2.14.	オイルレッド O 染色	29
2.2.15.	GPDH 活性の測定	29
2.2.16.	TG 分解活性の測定	30
2.2.17.	Total RNA の抽出	30
2.2.18.	RT-PCR による PPAR と C/EBP の mRNA の測定	30
2.2.19.	高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験	32
2.2.20.	肝臓中の脂質の抽出	32
2.2.21.	統計処理	32
<b>2.3.</b>	<b>結果</b>	<b>32</b>
2.3.1.	TG 吸収抑制作用とそのメカニズム	32
2.3.2.	TG 吸収抑制作用を有する活性成分の分画と構造決定	34
2.3.3.	TG 蓄積抑制作用とそのメカニズム	34
2.3.4.	抗肥満作用	35
<b>2.4.</b>	<b>考察</b>	<b>35</b>
2.4.1.	TG 吸収抑制作用とそのメカニズム	35
2.4.2.	TG 吸収抑制作用を有する活性成分の分画と構造決定	38
2.4.3.	TG 蓄積抑制作用とそのメカニズム	39
2.4.4.	抗肥満作用	40
2.4.5.	まとめ	40
	<b>第 2 章の図表</b>	<b>41</b>

## 第3章 とろろ昆布の抗肥満作用 84

3.1.	はじめに	84
3.2.	実験方法	84
3.2.1.	試薬	84
3.2.2.	実験動物	84
3.2.3.	実験試料の調製	84
3.2.4.	TG 負荷試験	84
3.2.5.	膵リパーゼ活性阻害の測定	85
3.2.6.	活性成分の分画	85
3.2.7.	カルバゾール法	85
3.2.8.	高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験	85
3.2.9.	肝臓中の脂質の抽出	85
3.2.10.	統計処理	85
3.3.	結果	86
3.3.1.	TG 吸収抑制作用とそのメカニズム	86
3.3.2.	TG 吸収抑制作用を有する活性成分の分画と推定	86
3.3.3.	抗肥満作用	86
3.4.	考察	87
	第3章の図表	89

## 第4章 コガネタケヤシの抗肥満作用 105

4.1.	はじめに	105
4.2.	実験方法	105
4.2.1.	試薬	105
4.2.2.	実験動物	105
4.2.3.	抽出物の調製	105

4.2.4.	TG 負荷試験	105
4.2.5.	膵リパーゼ活性阻害の測定	106
4.2.6.	細胞培養	106
4.2.7.	MTT アッセイ	106
4.2.8.	オイルレッドO 染色	106
4.2.9.	GPDH 活性の測定	106
4.2.10.	高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験	106
4.2.11.	肝臓中の脂質の抽出	106
4.2.12.	統計処理	106

<b>4.3.</b>	<b>結果</b>	<b>106</b>
4.3.1.	TG 吸収抑制作用とそのメカニズム	106
4.3.2.	TG 蓄積抑制作用とそのメカニズム	107
4.3.3.	抗肥満作用	107

<b>4.4.</b>	<b>考察</b>	<b>108</b>
-------------	-----------	------------

<b>第4章の図表</b>	<b>110</b>
---------------	------------

## **第5章 総括 126**

<b>参考文献</b>	<b>128</b>
-------------	------------

<b>謝辞</b>	<b>143</b>
-----------	------------

<b>添付資料</b>	<b>144</b>
-------------	------------

# 第1章 緒論

## 1.1. はじめに

肥満とは体内で余剰になったエネルギーが脂肪として脂肪細胞に過剰に蓄積し、体脂肪が異常に蓄積された状態を指す。肥満は脂肪が蓄積される部位によって内臓脂肪型肥満と皮下脂肪型肥満に大別されており、従来は外見上の問題として皮下脂肪型肥満が取り上げられつつあった。しかし、近年内臓脂肪型肥満が、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質の分泌バランスの崩壊によって、II型糖尿病<sup>1)</sup>、高血圧<sup>2)</sup>、高脂血症<sup>3)</sup>などの生活習慣病を引き起こすことが明らかにされてきていることから、皮下脂肪型肥満よりも重要視されてきている<sup>4,5)</sup>。これらの疾患が重複している病態のことを「メタボリックシンドローム」をいうが、メタボリックシンドロームの症状がさらに悪化すると死亡リスクの高い動脈硬化性疾患を発症することが知られている<sup>6-9)</sup>。このことから、肥満人口が増加傾向にある現代社会において、肥満を予防・改善することが重要であると考えられる。

## 1.2. 肥満の判定基準と現状

肥満の判定には、体脂肪の測定が必要である。空気中と水中での体重測定に基づいた体密度法や生体電気インピーダンス法等のいくつかの方法があるが、これらの方法は技術や設備の面を考えると実用的ではない。そこで、WHOは体格指数の中で体脂肪を最も反映していると認められているBody Mass Index(BMI、体重[kg]を身長[m]の2乗で割った数値)による方法を使用し、国際的にも急速に問題化している肥満の健康障害に対して、世界的な肥満対策を行うことを決定した<sup>10)</sup>。

WHOの肥満区分では、欧米人の疫学的な調査により判断してBMI 30を肥満の判定基準としたが、この判定基準では日本の肥満者の割合は約3%であるということがわかった。つまり、BMIと肥満によって起こるメタボリックシンドロームの相関性は人種によって異なっており、さらには、性別、年齢によっても異なっていることがわかっている<sup>11-14)</sup>。そこで厚生省(現:厚生労働省)と日本肥満学会は、日本における高血圧、高脂血症、糖尿病の合併症とBMIの相関関係を調査した。その結果、日本においてはWHOの分類での肥満前段階(Preobese or Overweight)の比較的軽いBMIで合併症が高いリスクで併発していることが示された。これに基づき日本肥満学会では、欧米がBMI 30を肥満としているのに対して、日本の肥満の判定基準をBMI 25とすることに決定した(Table 1)<sup>15)</sup>。

しかしながら、幼児や児童の成長期ではBMIは正常値が大きく変動するため、上記に示したBMIによる判定基準には適応できない。よって、小児の肥満判定には独自の肥満判定基準が設けられている。日本の場合、18歳未満の少児で肥満度が20%以上、かつ有意に体脂肪率が増加した状態(体脂肪率の基準値は男児25%、女児11歳未満30%、11歳以上35%)を肥満児の判定基準としている<sup>16)</sup>。

平成19年の国民健康・栄養調査<sup>17)</sup>によると、日本における成人の肥満者の割合は、男性30.3%、女

性 20.2%、全体で 24.9%であり、実におよそ 4 人に 1 人が肥満であるということになる。また、男女別で肥満者数の推移を見てみると男性では全ての年齢層において肥満者数が増加する傾向にある。一方、女性に関しては、全ての年齢層において肥満者数が横ばい傾向にある。

また、平成 20 年度の文部科学省学校保健統計調査報告書<sup>18)</sup>の 18 歳未満の肥満傾向児の割合を見てみると、男子では 9 歳から 17 歳にかけて 10%を超えており、15 歳で 13.5%と最も高くなっている。一方、女子は 10 歳から 17 歳にかけて女性 8%を超えており、12 歳で 9.8%と最も高くなっている。7 歳まで性別によって肥満傾向児の割合はほとんど違いが見られないが、8 歳から 17 歳にかけて、その割合に違いがみられるようになり、年齢が上がるにつれて、その差も大きくなる傾向にある。過去 30 年間で約 3 倍に増加しており、年々増加傾向にあるという。欧米の統計では、7 歳の肥満は 40%、思春期の肥満は 70~80%が成人肥満へ移行し、生活習慣病の温床、死亡率増加の原因となると考えられていることから<sup>19)</sup>、肥満児の増加も非常に深刻な問題である。

### 1.3. 肥満の原因

本来、摂取エネルギーと消費エネルギーのバランスは保たれているが、様々な環境要因や遺伝要因により、このエネルギーバランスが崩れることで肥満は引き起こされる。日本で肥満が増加した大きな要因の一つとして食の欧米化がある。動物性脂肪の多い欧米食を日常的に摂取することで過剰にエネルギーを摂取してしまい、摂取エネルギーが消費エネルギーを上回ることで、脂肪が体内に蓄積して肥満になる。事実、1970 年代に高度成長期に伴って食の欧米化が急速に進み、脂肪による摂取エネルギーが全エネルギーの 20%を越えており、この時期に肥満も急速に増加している。その他にも、食べ過ぎによるエネルギーの過剰摂取、朝食・昼食の欠食、まとめ食い、どか食いのような空腹時間が長くなる食べ方や夜の多食などの誤った摂食パターンも摂取したエネルギーが脂肪として貯蔵されやすくなり、肥満になりやすい。

また、運動不足による消費エネルギーの減少もその大きな要因として挙げられる。消費エネルギーは生命を維持するために不可欠な基礎代謝が 60%、体を動かす時に消費する活動代謝が 30%、食物の吸収時に発生する食事誘導性熱産生が 10%で構成されている。運動不足は活動代謝を減少させるだけでなく基礎代謝を減少させ、インスリンの分泌を上昇させ、脂肪合成酵素の活性を上昇させるなど、貯蔵エネルギーが貯まりやすい代謝異常をもたらす<sup>20-22)</sup>。ここ数十年間日本の成人の摂取エネルギーは 1 日当たり約 2,000 kcal で横ばい状態になっているが、肥満はこの間に男性は 4 倍、女性は 3 倍ほど増加したと推定されており、運動不足による消費エネルギーの減少が肥満の増加に深く関係していることが考えられる。この背景には、便利でストレスの多い現代社会の中で運動する時間が奪われ、体を動かす機会が失われているということがある。



#### 1.4. 中性脂肪(TG)の消化・吸収機構

中性脂肪(TG)の消化吸収は主に胃や小腸において行われている。摂取された TG は、まずは胃リパーゼによって分解され、TG の 3 位のエステル結合の加水分解を受けて、遊離脂肪酸とジグリセリドが生じる<sup>23)</sup>。この加水分解はそれほど強力なものではなく、小腸における膵リパーゼの加水分解と比較すると、補助的なものであるが、膵リパーゼの分泌が十分でない新生児にとっては、重要な役割を担っているとされる<sup>24, 25)</sup>。また、中鎖脂肪酸が結合した TG は、胃リパーゼで 1~3 位までのすべての脂肪酸が速やかに加水分解させるため、小腸での脂肪酸の消化吸収に異常がある場合は有効なエネルギー源となる<sup>26)</sup>。

次に、胃の中で生成されたジグリセリドや脂肪酸、まだ加水分解されていない TG は十二指腸に運ばれる。脂肪酸やタンパク質、アミノ酸などの刺激により、血中の消化管ホルモンであるコレシストキニンやセクレチンが分泌され、十二指腸壁からのアルカリ性の腸液、胆嚢からの胆汁や膵臓からの膵液の分泌を促す<sup>27-29)</sup>。胆汁には胆汁酸、リン脂質、コレステロールが含まれており<sup>30)</sup>、胆汁酸やリン脂質は脂質エマルションの外周を包み込んで、さらに細かく乳化する。乳化した TG は膵液に含まれる膵リパーゼにより加水分解されて、1 分子の TG から 2 分子の遊離脂肪酸と 1 分子の 2-モノグリセリドを生じる<sup>31)</sup>。このとき、胆汁酸が外周を包んだ脂肪滴に膵リパーゼが接近するためには、膵臓から分泌されるコリパーゼが橋渡し役として必要である<sup>32)</sup>。ただし、コリパーゼ自身にはリパーゼ活性を示さない。また、モノグリセリドリパーゼは腸管上皮細胞の頂端の細胞膜表面に発現していることが示唆されており、2-モノグリセリドの一部は、モノグリセリドリパーゼによって、グリセロールと脂肪酸に分解されることが知られている<sup>33)</sup>。

このようにリパーゼによって生成された加水分解物は胆汁酸とともに胆汁酸混合ミセルを形成する<sup>34)</sup>。ミセルの大きさは 4~6 nm 程度であり、外観上透明である。小腸上皮には絨毛と呼ばれる多数の突起がある。さらに、それぞれの吸収細胞の表面は微絨毛膜におおわれており、吸収面積を大きくしている。この吸収細胞の表面は unstirred water layer と呼ばれる管腔側の食物塊とは混じり合わない水層に覆われているが、ミセルの形態で初めてこの水層を通過して、微絨毛表面に近づくことができると考えられている<sup>35)</sup>。ここで、TG の加水分解物が単分子としてミセルから離脱し、微絨毛膜へと取り込まれていく。コレステロールの吸収には胆汁酸ミセルへの溶解が必須条件であり、胆汁酸が不足すると吸収は顕著に低下する<sup>35)</sup>。一方で、TG の加水分解物の 1 種である脂肪酸は胆汁酸が不足してもかなりの確率で吸収されることが知られているが<sup>35)</sup>、この場合の吸収メカニズムは解明されていない。

遊離脂肪酸、2-モノグリセリド、グリセロールといった TG 加水分解物は従来微絨毛膜のリン脂質二重膜を濃度勾配的な単純拡散により通過すると考えられてきたが、遊離脂肪酸とグリセロールの吸収に関しては、受容体タンパクによる促進拡散が存在していることが分かってきた。脂肪酸の小腸上皮細胞への取り込みは脂肪酸トランスロカーゼ(FAT)/CD36、細胞膜脂肪酸結合タンパク(FABPpm)が、そして、グリセロールの取り込みはアクアポリン(AQP)ファミリーが関与していると考えられる。

腸管上皮細胞に取り込まれた脂肪酸、2-モノグリセリド、グリセロールは小胞体に運搬される。この時、細胞質を通過して小胞体に移動するのであるが、脂肪酸は腸細胞の細胞質に存在する2種類の脂肪酸結合タンパク(I-FABP、L-FABP)に誘導されて、小胞体に効率よく取り込まれると考えられている<sup>36)</sup>。脂肪酸が滑面小胞体に達すると、アシル CoA 合成酵素によって、アシル CoA に活性化される。脂肪酸アシル CoA は滑面小胞体に入るとモノグリセリド経路を経由して TG に再合成される<sup>37)</sup>。この経路では、まず、モノグリセリドトランスアシラーゼによって、2-モノグリセリドと脂肪酸アシル CoA が反応して、ジグリセリドになり、さらにジグリセリドトランスアシラーゼによって、ジグリセリドと脂肪酸アシル CoA が反応して、TG になる。また、腸管上皮細胞には、もう1つグリセロール 3-リン酸経路と呼ばれるグリセロールから始まる TG の再合成経路が存在する<sup>38)</sup>。この経路は、脂肪酸のみが多量に吸収されて 2-モノグリセリドが不足した場合、あるいは、逆に 2-モノグリセリドが過剰に取り込まれて、モノグリセリドリパーゼによってグリセロールが生成された時に発動すると考えられる。グリセロール 3-リン酸経路では、まず、グリセロールがグリセロキナーゼによってグリセロール 3-リン酸に変換され、次に、グリセロール 3-リン酸アシルトランスフェラーゼによって、1分子のグリセロール 3-リン酸と2分子脂肪酸アシル CoA が反応し、1分子のホスファチジン酸が生成される。さらに、ホスファチジン酸はホスファチジン酸ホスホヒドラーゼによってジグリセリドになり、最終的に、ジグリセリドトランスアシラーゼによって、ジグリセリドと脂肪酸アシル CoA が反応して、TG になる。モノグリセリド経路とグリセロール 3-リン酸経路では、モノグリセリド経路が優先的に作動しており、腸管上皮細胞における TG の再合成の 75%を占めている<sup>39)</sup>。

再合成された TG は、滑面小胞体でコレステロールエステルやリン脂質とともに会合して、プレカイロミクロンを形成し、ミクロソームトリアシルグリセロール輸送タンパク(MTP)によりゴルジ装置に運ばれる<sup>40)</sup>。さらにアポリポタンパク B48(アポ B48)、アポ A-IV、アポ A-I と複合体を形成して、カイロミクロンとなりエキソサイトーシスにより細胞外へ分泌される<sup>41)</sup>。カイロミクロンは中心部に疎水性の TG とコレステロールエステルを保持し、その周りを両親媒性のリン脂質、遊離コレステロール、アポタンパクが覆った球状構造のリポタンパクである。このカイロミクロンは小腸リンパ腺に分泌されて、胸管を経由して鎖骨下大静脈に流入し、血中に出現する<sup>42)</sup>。

### 1.5. 腓リパーゼ

腓リパーゼは膵臓から分泌されるトリグリセリドリパーゼの中で最も知られており、研究されている酵素である<sup>43)</sup>。新生児の時は発現しておらず、年齢を重ねるごとにその発現量が増加し、1~2歳の年齢で、成人の発現量に達するとされている<sup>44-46)</sup>。腓リパーゼの mRNA は 465 個のアミノ酸から成るタンパク質をコードしており、最初の 16 個のアミノ酸配列は活性を持たないシングルペプチドである<sup>47, 48)</sup>。ヒトの腓リパーゼは 1977 年に単離・同定され、分子量は 48 kDa で、単一のオリゴ糖鎖を持つ<sup>47)</sup>。アミノ酸配列を比較すると、ヒトの腓リパーゼはブタとマウスに対して、それぞれ、85%と 80%の相同性を持ち、ブタとマウスの腓リパーゼは、77%の相同性を持つ<sup>49, 50)</sup>。

この酵素の立体構造には、2つのドメインが存在する。1つ目はN-末端ドメインであり、 / の  
ハイドrolラーゼ活性を持つ。このドメインは他のリパーゼやエステラーゼにも存在する<sup>51, 52)</sup>。この  
ドメインはセリン-ヒスチジン-アスパラギン酸の触媒3連構造を持っており、lidドメインと呼ばれる  
表面ループの下に隠されている。lidドメインは、238番目と262番目のシステイン間のジスルフィ  
ド結合間の部分のことを指し、基質が腓リパーゼの活性部位に接近するのを妨害している<sup>53)</sup>。また、  
オクチルグルコサイドとリン脂質を含む混合ミセルにおいて、腓リパーゼがコリパーゼと複合体を形  
成することが明らかにされた<sup>54)</sup>。その表面ループは活性型構造をとっている腓リパーゼの活性部位  
を開放し、形成するために移動する。lidドメインは、oil-water界面に移行するまでは閉ざされて、  
不活性の状態のままである。腓リパーゼ活性はトリブシンによってコントロールされないことから、  
その閉ざされたループ構造は不適切な腓リパーゼ活性を防ぐための1つの方法であると考えられる。  
もう1つのドメインであるC-末端ドメインはサンドウィッチ構造をとっており、コリパーゼに主  
な結合表面を供給している。

腓リパーゼはカルボキシルエステラーゼの1種であり、アシルグリセリドを加水分解するが、リン  
脂質、コレステロールエステル、ガラクト脂質を加水分解しない<sup>55, 56)</sup>。このリパーゼは様々な長さ  
を持つアシル鎖を中性脂肪のsn-1位とsn-3位から切り離す性質を持っている<sup>56)</sup>。長鎖脂肪酸(C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub>)  
結合型の中性脂肪の違いはほんの6倍ほどである<sup>57)</sup>。腓リパーゼは膵臓から過剰に分泌されるので、  
その速度の違いは大きな影響を与えることはなく、十分に全ての食餌由来の長鎖脂肪酸結合型の中性  
脂肪はこのリパーゼによって分解されることが考えられる。

## 1.6. FAT/CD36

脂肪酸の小腸上皮細胞への取り込みにはFAT/CD36が最も関与していると考えられている。  
FAT/CD36は哺乳類において、脂肪細胞の脂肪酸取り込みに関する研究から初めて発見され、ラットの  
FATが酸化LDLの受容体であるCD36(glycoproteinIV)に85%という高い相同性を示したという歴  
史的な背景から、FAT/CD36と呼ばれるようになった<sup>58)</sup>。FAT/CD36は高度に糖化されたポリペプ  
チド鎖から構成されており、脂肪細胞からクローニングされた見かけ上のFAT/CD36の分子量は88  
kDaである<sup>58)</sup>。この472個のアミノ酸から成るタンパク質(53kDa)には、窒素にリンクしている糖化  
部位は10か所あると予想されており、FAT/CD36の立体構造をみると、N末端側とC末端側にそれ  
ぞれ1つずつ膜貫通領域を持ち、両末端を短鎖の細胞質ドメインとして有し、また、窒素にリンクし  
ている糖化細胞外ループを保持している<sup>59)</sup>。FAT/CD36はヒトの胎盤、血小板、内皮細胞、単球、  
赤血球、脂肪細胞、肝細胞、筋細胞、腸細胞といったさまざまな細胞の細胞膜に存在している<sup>58-63)</sup>。  
FAT/CD36は多機能タンパクであり、そのリガンドとしては遊離脂肪酸に限らず、コラーゲン、トロ  
ンボスポンジン、酸化LDL等もある<sup>59-65)</sup>。FAT/CD36の発現誘導は細胞への脂肪酸の取り込みの増  
加を促すことが確認されている<sup>58-63)</sup>。FAT/CD36の遺伝子は独立した3つのプロモーターを持ち、グ  
ルコースによる転写調節、PPARsやC/EBPを介した制御など、組織により複雑な発現調節機構が

報告されている<sup>66-69)</sup>。また、FAT/CD36 は他の脂肪酸トランスポーターと違って、酵素活性を有さず、細胞膜に存在することから、細胞膜での脂質取り込み過程に関わるトランスポーター本体は FAT/CD36 であると考えられている<sup>70-73)</sup>。

#### 1.7. AQP

グリセロールが通過できる AQP は脂肪細胞から初めて同定された<sup>74)</sup>。AQPs は、小分子の膜タンパクであり、AQPs のアミノ酸配列は約 270 個のアミノ酸からなるポリペプチド単鎖である。3 つの細胞外ループ(A ループ、C ループ、E ループ)と 2 つの細胞内ループ(B ループ、D ループ)、6 つの膜貫通領域を持ち、N 末端と C 末端はともに細胞質内に存在している。B ループと E ループには保存性の高いアスパラギン-プロリン-アラニンのアミノ酸配列からなる NPA ボックスというモチーフを持っており、このモチーフが水を通わせるポアを形成することがわかっている<sup>75)</sup>。もともと、AQPs は水の輸送タンパクとして発見されたが、後にグリセロールも通過させることができることが発見され、このようなグリセロールも輸送することができる AQPs はアクアグリセロポリンと称されている<sup>76)</sup>。AQPs は AQP0 ~ AQP12 までのアイソフォームが存在し、この中でアクアグリセロポリンは AQP1、AQP3、AQP7、AQP9、AQP10 の 5 種類が確認されている<sup>76-78)</sup>。小腸においてもこれら 5 種類のアクアグリセロポリンが存在しており、特に AQP7 が小腸の上皮細胞の刷子縁膜に局在することから、AQP7 が小腸上皮細胞からのグリセロールの取り込みに大きく関与しているものと思われる<sup>79-81)</sup>。

#### 1.8. 脂肪細胞

体内に取り込まれたものの、エネルギーとして使われなかった TG は、脂肪組織に貯蔵される。脂肪組織はすべての哺乳動物に存在し、白色脂肪組織と褐色脂肪組織の 2 つに大別される。白色脂肪組織は全身に広く分布しているが、褐色脂肪はごく一部にしか存在しない。両者のうち、白色脂肪組織に含まれる白色脂肪細胞が余剰なエネルギーを TG の形で貯めこみ、必要に応じて TG を分解して、脂肪酸とグリセロールの形で全身に再供給する働きをもつ。また、最近では、白色脂肪細胞は、ただ単なる TG の貯蔵庫という働きだけではなく、メタボリックシンドロームと深く関与しているアディポサイトカインを分泌していることがわかっている<sup>82)</sup>。

白色脂肪細胞は、ヒトにおいて約 250 ~ 300 億個存在すると言われている。脂肪細胞は、以前乳幼児期や思春期などの限られた時期にした増加しないものと考えられていたが、近年になって、成人になっても過剰なエネルギーの摂取や運動不足によって脂肪細胞の数が増加し、肥満者では 400 ~ 600 億個に達することが明らかとなっている<sup>83)</sup>。その数は個体を構成する細胞数の 0.5 ~ 1% ほどにすぎないが、重量では健常者で体重の 20% 前後、肥満者では 30 ~ 40% にまで達する。白色脂肪細胞は内部に巨大な脂肪滴を 1 つ有したほぼ球状の細胞であり、1 つの白色脂肪細胞の中に、0.5 ~ 0.9  $\mu\text{g}$  の脂質が存在し、最大で 1.2  $\mu\text{g}$  もの脂質を蓄積することができる。その脂質のうち 90% 以上が TG である。脂肪滴の周りには、境界膜は存在せず、直接脂肪滴と細胞質が接している。また、白色脂肪細胞の大

きさは、平均で直径 60~90  $\mu\text{m}$  であるが、栄養状態によって直径が 10~150  $\mu\text{m}$  まで可逆的に変化する<sup>84)</sup>。

ヒトを含む様々な哺乳動物において、白色脂肪細胞の原基は胎生期にすでに確認される。白色脂肪細胞は、線維芽細胞、軟骨細胞、骨細胞、平滑筋細胞などの体の構造的枠組みを保つ結合組織の細胞群に属し、間葉系幹細胞に起源するものと考えられている。例えば、マウス胎仔由来の細胞株である C3H10T1/2 は、間葉系由来の筋肉細胞や骨細胞、軟骨細胞に加えて、白色脂肪細胞へと分化する<sup>85)</sup>。また、白色脂肪組織の stromal vascular 画分に含まれる細胞も、白色脂肪細胞のみならず、骨、軟骨細胞や筋肉細胞へと分化しうる<sup>86)</sup>。このように、間葉系幹細胞が脂肪細胞の起源であることを示唆する知見は多くあるものの、間葉系幹細胞から脂肪前駆細胞が生じるメカニズムはほとんど明らかになっていない。

### 1.9. TG の蓄積機構

白色脂肪細胞における TG の蓄積は、グルコースと遊離脂肪酸の取り込みによって開始される。

グルコースの取り込みはトランスロケーションによって細胞膜に動員されたグルコーストランスポーター4(GLUT4)によって行われている<sup>87)</sup>。GLUT4 を介して細胞内に取り込まれたグルコースは、解糖系に入って、グルコース 3-リン酸となり、グリセルアルデヒド 3-リン酸を経てジヒドロキシアセトンリン酸となる。ジヒドロキシアセトンリン酸は脂肪合成のバイオマーカーとしてよく知られているグリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GPDH)によって、グリセロール 3-リン酸となる<sup>88)</sup>。

遊離脂肪酸は血中に存在するカイロミクロンや VLDL に含まれる TG が、毛細血管内皮上に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)により分解されることによって、白色脂肪細胞に供給される<sup>89)</sup>。LPL の発現はインスリンによってコントロールされている。脂肪細胞には、脂肪酸トランスポーターとして FABPpm、FAT/CD36、FATP1 が発現しており、脂肪細胞が分化し、TG の蓄積能力を獲得すると、それらの発現量が増加することが知られている。これらのトランスポーターが脂肪酸の取り込みに関与する分子メカニズムは不明な点が多いが、遊離脂肪酸は、これらの脂肪酸トランスポーターを介して脂肪細胞内に取り込まれるものと考えられる<sup>90)</sup>。細胞内に取り込まれた遊離脂肪酸は、アシル CoA 合成酵素(ACS)によってアシル CoA になる。

また、グルコースが過剰に存在するとき、あるいは、脂肪酸が不足した時に、脂肪細胞はグルコースから脂肪酸を合成することができる。グルコースは解糖系を経て、アセチル CoA となり、アセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)によって、マロニル CoA が合成される。マロニル CoA が脂肪酸合成酵素(FAS)によってアセチル CoA と反応してパルミチン酸となり、ACS の作用によってパルミチン酸 CoA となる。その後、脂肪酸の不飽和化や伸長化が行われ、様々な脂肪酸のアシル CoA が合成される。取り込まれた遊離脂肪酸とグルコースから生成されたグリセロール 3-リン酸とアシル CoA は、グリセロール 3-リン酸経路を介して、最終的に TG となり、脂肪細胞内で脂肪滴として蓄積される。

このような TG の蓄積は主にインスリンによってコントロールされている。インスリンは膵臓の

細胞から分泌されるホルモンで、インスリン受容体と結合し、活性化することで、その作用を発揮する。インスリン受容体はチロシンキナーゼ型受容体であり、 $\alpha$  と  $\beta$  のサブユニットから構成されている。インスリンの結合により、 $\beta$  サブユニットがもつチロシンキナーゼ活性が刺激されると細胞内に存在するインスリン受容体基質(IRS)がリン酸化を受ける。IRS は 4 種類のアイソフォームが存在するが、そのうち IRS-1 と IRS-2 がインスリンの作用に中心的な役割を担っていることがわかっている<sup>91)</sup>。リン酸化された IRS はホスファチジルイノシトール 3(PI3)-キナーゼと結合する。PI3-キナーゼはホスファチジルイノシトール 4, 5-ビスリン酸をリン酸化して、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-トリリン酸を生成する酵素であり、IRS との結合により基質の存在する細胞膜付近に移行するとともに、その活性が増強する<sup>92)</sup>。脂肪細胞では、活性化された PI3-キナーゼが、Akt や aPKC と呼ばれるセリン-スレオニンキナーゼの活性化を促す。Akt には Akt1 ~ Akt3 の 3 種類のアイソフォームが存在し、aPKC は PKC $\alpha$  と PKC $\beta$  からなる PKC のサブファミリーである<sup>93)</sup>。これらのキナーゼがインスリンに起因する様々な TG の合成に関わる遺伝子の制御を行っている。例えば、GLUT4 のトランスロケーションはインスリンシグナルを介してコントロールされており<sup>94)</sup>、また、GPDH や ACC、FAS の発現もインスリンによって亢進されることが報告されている<sup>22, 95)</sup>。

#### 1.10. 脂肪細胞の増殖・分化機構

体内に過剰になったエネルギーは TG として脂肪細胞に蓄積されるが、脂肪細胞の TG の蓄積能力にも限界がある。TG の蓄積状況がある一線を越えると、脂肪細胞の肥大化だけでなく、脂肪細胞の増殖と分化が行われ、脂肪細胞の数が増大することがわかってきた。実際の *in vivo* での脂肪細胞の増殖や分化の分子メカニズムは、まだ不明な部分が多いが、マウスの白色前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞を用いた実験で多くの知見が得られており、細胞周期と非常に深く関わっていることが明らかにされてきている。

3T3-L1 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞に分化するためには、clonal expansion と呼ばれるといわれる細胞周期回転期とそれが停止した終末分化期の双方が必須であると考えられる。3T3-L1 細胞でいったんコンフルエントになり細胞周期が停止した前駆脂肪細胞はウシ胎児血清(FBS)とインスリン、デキサメタゾン(DEX)、イソブチルメチルキサンチン(IBMx)を含む培地によって、全細胞が同期して細胞周期に導入される。この時期を clonal expansion と呼び細胞周期を少なくとも 2 回転すると言われている<sup>96)</sup>。事実、S 期への移行を抑制する阻害剤を用いると、脂肪細胞の分化は抑制されることから、clonal expansion は細胞分裂を伴っており、それが分化にとっても必須であると考えられる<sup>97)</sup>。

また、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化過程では、各段階で特異的な遺伝子群の発現が認められ、その中にはマスターレギュレーターとなる転写因子が含まれる。その代表的なものとしては、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )によって制御されている。PPAR はリガンド依存性受容体型転写因子であり、ペルオキシソーム増殖作用を有する化合物によって活性化される核内受容体である<sup>98)</sup>。脊椎動物からは 3 種類のサブタイプがわかっており、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  に分類される<sup>99)</sup>。これらの

サブタイプのうち、 $\alpha$  と  $\beta$  には臓器特異性があり、PPAR $\alpha$  は肝臓や骨格筋、褐色脂肪細胞に多く発現し、脂肪燃焼を調節している<sup>99)</sup>。それに対して、PPAR $\gamma$  は白色脂肪細胞や胎盤、骨髄に多く発現している<sup>100)</sup>。哺乳動物では PPAR $\gamma$  は N 末端の配列が異なる PPAR $\gamma$  1 と PPAR $\gamma$  2 の 2 種類のアイソフォームが存在する。PPAR $\gamma$  1 と PPAR $\gamma$  2 は同一の遺伝子にコードされているが、異なった部位から転写、翻訳が開始されるため、PPAR $\gamma$  2 の N 末端は PPAR $\gamma$  1 よりもアミノ酸 30 個分だけ長く、その発現は白色脂肪細胞で特に多いことが特徴である<sup>100)</sup>。PPAR の構造は一般に、アイソフォームごとに異なる N 末端の AF1 領域、アイソフォーム間ではほぼ共通で Zn フィンガーモチーフを有する DNA 結合領域(C 領域)、核移行シグナルを持つ D 領域、C 末端のリガンド結合領域(AF2 領域)から構成されている<sup>101)</sup>。PPAR のリガンド結合領域は 13 の ヘリックスと 4 つの シートを含んでいる<sup>101)</sup>。PPAR の遺伝子転写活性調節には 2 通りの経路がわかっている。1 つは DNA 依存型であり、レチノイド X 受容体(RXR)とヘテロ 2 量体を形成して、標的遺伝子のプロモーターに結合することで転写活性を上昇させる(トランスアクチベーション)<sup>102)</sup>。その認識塩基配列は AGGTCA 様のコア配列が同方向に並んだダイレクトリピート型であり PPAR 反応エレメント(PPRE)と総称されている。PPAR/RXR のヘテロダイマーに PPAR や RXR のアゴニストが結合すると、コリプレッサーが乖離するとともにコアクチベーターが結合して、ターゲット遺伝子の転写を活性化できるようになる。PPAR の内因性リガンドはアラキドン酸やリノレン酸などの脂肪酸やその酸化物がリガンド候補として報告されている。もうひとつの PPAR の遺伝子の転写活性経路は、DNA 非依存的な方法で NF- $\kappa$ B や SP-1、AP-1 などが担う他の転写因子系に干渉し、その結果ターゲット遺伝子の転写を抑制するものである(トランスリプレッション)<sup>103)</sup>。PPAR のトランスリプレッションにおいては、PPAR のリガンド結合部位がリガンド依存的に SUMO 化され、誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)のプロモーターのコリプレッサー複合体を安定させることで、その発現を抑制することが報告されている<sup>104)</sup>。

また、PPAR と同様に脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られているのが CCAAT/エンハンサー結合タンパク(C/EBP)ファミリーの 1 種である C/EBP $\alpha$  である。C/EBP $\alpha$  は初めてラットの肝臓から単離され、無関係と思われていた CCAAT ボックスとエンハンサーのコアに結合したことから、そのように名付けられた<sup>98, 105)</sup>。C/EBP $\alpha$  は当初アルブミンの遺伝子発現を制御する転写因子として研究が進んだが、その後、炎症に関係する因子(NF-IL6)と相同性が高い 1 次構造を有することが明らかとなり、転写因子 C/EBP ファミリーとしてカテゴライズされた<sup>106)</sup>。C/EBP ファミリーは N 末端側に転写活性ドメインを有し、C 末端にはロイシンジッパー配列を持った DNA 結合ドメインを有している<sup>107)</sup>。このファミリーは C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\gamma$ 、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\epsilon$ 、COHP-10 の 6 種類のアイソフォームからなり、このうち、C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$  は脂肪細胞分化の関与するカスケードにおいて PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$  の上流にあり、PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$  の転写制御を行っている<sup>106)</sup>。また、COHP-10 は C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$  よりも早期に発現されており、脂肪細胞の分化を抑制する作用を有している<sup>108, 109)</sup>。C/EBP $\alpha$  と C/EBP $\beta$  に関しては、今のところ脂肪細胞の分化との関連性はわかっていない。3T3-L1 細胞を分化誘導させると、C/EBP $\alpha$  も PPAR $\gamma$  と同様に脂肪細胞内で高発現される。

この細胞株において C/EBP の発現を抑制すると分化が阻害されたことや、通常では脂肪細胞に分解しない線維芽細胞に C/EBP を強制発現させると脂肪細胞に分化したことが C/EBP が脂肪細胞分化のマスターレギュレーターと言われる所以である<sup>110)</sup>。

脂肪細胞の分化のマスターレギュレーターは PPAR と C/EBP の 2 種類が存在するが、脂肪細胞分化のシグナル伝達は PPAR からの経路だけであり、C/EBP からの経路は、PPAR の経路に集約されることがわかっている<sup>111)</sup>。その際に、終末分化において、C/EBP は PPAR のプロモーターに結合し、その発現を維持するのに重要であること<sup>112)</sup>、C/EBP 自身のプロモーターにも結合し、自己調節により C/EBP の発現を高く維持していることがわかった<sup>113)</sup>。

### 1.11. TG の分解機構

様々な臓器や組織の活動によって、エネルギー源が不足した状態になると、脂肪細胞内における TG は、ホルモン感受性リパーゼ(HSL)によって加水分解されて遊離脂肪酸とグリセロールが生成され、エネルギー源として供給される<sup>114)</sup>。HSL はカテコールアミンや副腎皮質刺激ホルモン、成長ホルモン、グルカゴンによって活性化される<sup>114)</sup>。これらのリガンドが各受容体に結合するとアデニレート・シクラーゼが活性化されて cAMP が生成される。これにより、cAMP 依存性のプロテインキナーゼ A(PKA)が活性化される。PKA の活性化によりリン酸化された HSL は細胞質から脂肪滴へと移動するとされる。このとき、脂肪滴表面にある lipotransin に結合することで、脂肪滴上に誘導されて、lipotransin の ATP への結合と加水分解により、HSL は lipotransin から離れて TG の分解を行うとされている<sup>115)</sup>。細胞質と脂肪滴の間には境界となる細胞膜が存在しない。この境界面では、ペリリピンと呼ばれるタンパクが発現しており、これによって、TG が脂肪滴として収納されている<sup>116)</sup>。ペリリピンが脂肪滴をコーティングすることで TG の分解を抑制していると考えられるが、PKA によってリン酸化されると HSL と連動して、脂肪滴を囲んでいたペリリピンも細胞質に移動し、HSL と TG が接しやすい環境を作る<sup>117-119)</sup>。また、HSL には脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク(aP2)が結合しており、TG の加水分解によって生成された脂肪酸は aP2 により輸送されるが<sup>120)</sup>、脂肪細胞外への脂肪酸の放出に関しては、まだ、脂肪酸トランスポーターを通過する報告はされておらず、不明な点が多い。脂肪細胞内にグリセロールキナーゼが存在しないため、グリセロールは脂肪細胞の細胞膜に存在する AQP7 を通過して、肝臓や筋肉に運ばれ、代謝されると考えられる<sup>74)</sup>。一方で、インスリンやプロスタグランジン E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、ニコチン酸、アデノシンは cAMP の産生を抑制するため、TG の分解を抑制する<sup>114)</sup>。インスリンは、cAMP を 5'AMP に分解するホスファチジエステラーゼ 3B の活性を促進したり、lipotransin と HSL の結合を強固にすることにより、TG の分解を抑制すると考えられている<sup>121)</sup>。

### 1.12. メタボリックシンドローム

メタボリックシンドロームとは、肥満症、糖尿病、高血圧、高脂血症の代表的な生活習慣病が、一個人に重複して発症する状態のことをいう。これらの疾患は、個別にも動脈硬化性疾患の発症リスク



とされてきたが、重積するとさらにそのリスクが高まることがわかっている。これまで、メタボリックシンドロームの基本的な構成要素としてどの疾患を取り上げるかについては提唱者によって、若干のずれがあったものの<sup>4, 6-8)</sup>、基本的には、肥満、インスリン抵抗性、糖尿病、高血圧、高脂血症を軸としており、現在確立されているメタボリックシンドロームの構成要素はこれらの疾患に集約されている。メタボリックシンドローム発症の起点は肥満であると考えられている。肥満、特に内臓脂肪型肥満がメタボリックシンドローム発症の上流に位置し、肥満によって生じたインスリン抵抗性により、糖尿病、高血圧、高脂血症が引き起こされる<sup>4, 5)</sup>。そして、糖尿病、高血圧、高脂血症が動脈硬化性疾患の発症・進展に大きな働きをしていると考えられている<sup>6-9)</sup>。

現在は、メタボリックシンドロームのリスクが認識され、日本では2005年に日本内科学会が中心となって、メタボリックシンドロームの診断基準を決定した<sup>122)</sup>。この診断基準は、かかりつけ医や企業診所、保健所などでも容易に用いることができるように作られており、厚生労働省もこの基準に基づいてメタボリックシンドローム該当者の推定数を割り出している。この診断基準の特徴は内臓脂肪型肥満を重要視し、ウエスト周囲径が、男性85 cm以上、女性90 cm以上を診断のための必須条件にした点である。腹部CTによる内臓脂肪面積100 cm<sup>2</sup>以上では、健康障害の合併症が増加することが以前から知られており、これに相当するウエスト周囲径として、その数値が採用された。このウエスト周囲径に加えて、空腹時高血糖、高血圧、高脂血症の3項目のうち、2項目以上該当すれば、メタボリックシンドロームと診断される。

厚生労働省が平成19年に実施した国民健康・栄養調査によると<sup>17)</sup>、メタボリックシンドロームに深く関係している上半身肥満(内臓脂肪型肥満)の疑いのある20歳以上の人(BMI 25 kg/m<sup>2</sup> 男性:腹囲 85 cm、女性:腹囲 90 cm)の割合は、男性29.3%、女性14.2%であった。年齢別で見ると、男性では50~59歳で最も高く34.4%、20~29歳で最も低い18.9%であり、女性の場合、年齢とともに上半身肥満の疑いのある割合は高くなっている。

### 1.13. アディポサイトカイン

メタボリックシンドロームと動脈硬化性疾患の発症には、肥満が非常に重要なファクターであることを前述したが、これは、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインと呼ばれる生理活性物質が深く関与しているからである。通常アディポサイトカインの分泌は正常に保たれているが、脂肪細胞が肥大化すると、その分泌バランスが崩壊し、その結果、メタボリックシンドロームの発症・進展につながるとされる。また、皮下脂肪型肥満よりも、内臓脂肪型肥満の方がメタボリックシンドロームを発症しやすいと言われている。この理由として、内臓脂肪組織からの方がメタボリックシンドロームに関わるアディポサイトカインが多く分泌されていること、このようなアディポサイトカインが門脈に流入し、肝臓に直接作用すること、さらには、中性脂肪が蓄えられやすく、かつ、分解されやすいことが考えられている<sup>123)</sup>。代表的なアディポサイトカインをTable 2にまとめた。

#### 1.14. ヘルスフードとは

肥満を予防・改善するには、食生活の改善や医薬品による処方、運動不足の解消によって摂取エネルギーと消費エネルギーのアンバランスを修正することである。しかし、忙しい現代社会において、食生活の改善や運動の習慣をつけることは困難であるし、薬による処方は、副作用が伴い、コストがかかってしまう。そこで、普段の食生活にヘルスフードを取り入れ、肥満を未然に予防する、肥満を悪化させないようにするといった予防医学的な食生活を目指すことが 1 つの実行しやすい改善策であると考えている。

ここでいうヘルスフードとは単に健康食品ではなく、以下の条件を満たしたものを言う<sup>124)</sup>。

1. 有効性が科学的に証明されている(ヒト臨床試験で有意差がある)。
2. 安全性が確保されている(できれば食経験があることが望ましい)。
3. 作用メカニズムが解明されている、あるいは推定可能である。

これらの条件が十分に満たされたものを信頼のおける機能性食品素材と評価すべきであり、今日の肥満対策として有用になりうると考えている。

また、肥満を予防・改善するためのヘルスフードの作用メカニズムとして考えられるのは、TG の吸収を抑制する、脂質代謝を亢進させる、摂取カロリーを制限する、満腹中枢を刺激する、TG の蓄積を抑制するの 5 点が考えられる。食品の場合、摂取する量が制限されることがないため、できるだけ副作用の少ないヘルスフードを開発する必要があり、食経験がある素材、あるいは、体外、すなわち、消化管内で抗肥満作用を発揮する素材を選択すべきであると考えている。現在、肥満の予防・改善をターゲットにした食品素材を作用メカニズムとともに Table 3 に示したが、肥満者が年々増え続けているという現状を踏まえると、特有の作用メカニズムをもつ、あるいはより効果的なヘルスフードが求められており、新たに抗肥満作用を有する素材を発見することが重要であると考えられている。

#### 1.15. ドクダミ(*Houttuynia cordata* Thunb)

以上のことを踏まえて、抗肥満作用を有する新規食品素材を探索することが非常に重要であると考え、私はマウスを用いた *in vivo* の実験において、消化管内で抗肥満作用を発揮すると考えられる TG 吸収抑制作用に着目し、コーン油負荷時における血中 TG 値の上昇抑制作用を指標として、約 100 種類の天然物抽出物、あるいは、そのままの素材でスクリーニングを行った。その結果、ドクダミ、とるる昆布、コガネタケヤシの 3 種類のサンプルで、TG 吸収抑制作用を見出したので、これらのサンプルを順に紹介する(Fig. 1)。

ドクダミ(*Houttuynia cordata* Thunb)は、ドクダミ科ドクダミ属の植物で、日本、中国、韓国の東アジアに広く分布している。葉はハートの形をしており、6~7 月にかけて 4 枚の白い苞の中央に黄色い花を穂状に多数咲かせるが、独特の臭気がある。これは、ドクダミに含まれるデカノイルアセトアルデヒドとラウリルアルデヒドといった脂肪族アルデヒド<sup>125)</sup>によるもので、乾燥させると分解されてほとんど無臭になる。ドクダミを天日干したものを十薬、または、重薬といい、伝統的な民間薬

として用いられてきた。効能としては、利尿作用、抗菌作用、解毒作用がある<sup>126)</sup>。ドクダミには、脂肪族アルデヒド以外にも、クエルセチン、イソクエルセチン、ルチン等のフラボノイド<sup>127)</sup>や、アリストラクタム B、ノルセファラジオン B、スペンディジン等のアルカロイドが含まれていることが報告されている<sup>128)</sup>。また、ドクダミの生理活性作用としては、抗酸化作用<sup>154)</sup>、抗ウイルス作用<sup>129)</sup>、抗菌作用<sup>130)</sup>、血圧低下作用<sup>131)</sup>、抗炎症作用<sup>132, 133)</sup>が報告されているが、抗肥満作用に関する報告はされていない。

#### 1.16. とろろ昆布

とろろ昆布は、昆布の表面を糸状に細く削ったもので、日本の伝統的な昆布加工食品で、原料昆布から、酢液処理 - 切断 - 砂落とし - 圧搾成形 - 切削のプロセスを経て製造される。とろろ昆布の原料として、主にマコンブ(*Laminaria japonica* Areschoug)とリシリコンブ(*Laminaria ochotensis* Miyabe)が使われている。

マコンブは形が整い、また品質佳良な昆布で、学術的にも、また、水産利用上からも日本の最も代表的な種類として有名である。北海道の室蘭から東北地方の三陸海岸までの太平洋及び津軽海峡一帯に広く分布している<sup>134)</sup>。

リシリコンブはマコンブとともに優れた品質を持つことで有名である。これらの昆布はその形態的特徴が非常によく似ているため、リシリコンブはマコンブと同じ、あるいはその変種という説もあるが、強いてマコンブと比較すると、一般に葉体が小さめであること、葉幅が狭くて 20 cm を超えるものが少ないこと、葉の基部が 2 年目葉体でも円形でなく、くさび状に細くなるものがあること、色が黒みを帯び、質が硬いことなどがある。また、は味やだしの点でも明らかな差があり、マコンブはごく上品な甘味があり、清澄で淡白なだしが出るのに対し、リシリコンブは甘味とともに産地により適度な塩味を含み、味が濃く香りがよいなど独特の風味を持っている。リシリコンブの分布は北海道の利尻、礼文両島を中心に宗谷、留萌地方を主産地としオホーツク海沿岸各地から知床岬を越え羅臼地方の一部にまで及んでいる<sup>135)</sup>。

コンブ科植物はアルギン酸やフコイダン等の水溶性食物繊維やまた、フコステロールやフコキサンチンの脂溶性成分も含まれている<sup>136-138)</sup>。コンブ科植物の抽出物や成分には抗ガン作用<sup>139-142)</sup>、抗酸化作用<sup>143)</sup>、血糖値上昇抑制作用<sup>144-146)</sup>、抗ウイルス作用<sup>147)</sup>、コレステロール排泄作用<sup>143, 144)</sup>、免疫賦活作用<sup>148, 149)</sup>、脂肪細胞分化抑制作用<sup>150)</sup>、抗炎症作用<sup>151)</sup>等の生理活性作用が報告されているが、抗肥満作用の報告はされていない。

#### 1.17. コガネタケヤシ(*Chrysalidocarpus lutescens* Wendl.)

コガネタケヤシ(*Chrysalidocarpus lutescens* Wendl.)は、ヤシ科タケヤシ属の常緑小高木であり、原産地がマダガスカル島である。コガネタケヤシは Fig. 1 のような外観をしており、高さは 3~8 m ほどの小型のヤシで、下部より分岐してそう生する。葉は淡緑色をしており、小葉を 40~60 枚ほど対生

させる。白色の花を咲かせて、果実は卵形で、黒紫色をしている。生育は早いですが、耐寒性は弱く、越冬温度は7~10°C以上は必要であるとされている<sup>152)</sup>。観葉植物として広く普及しているが、食経験はなく、生理活性作用の報告もされていない。

#### 1.18. 本研究の目的

これまで、述べてきたように、肥満は死亡リスクの高い動脈硬化性疾患の発症・進展につながるメタボリックシンドロームを引き起こす。また、肥満者数が年々増加傾向にある背景から、肥満を予防・改善する新しいヘルスフードを世の中に輩出し、予防医学的な食生活に貢献することが重要と考えている。そこで、本研究では、マウスを用いた *in vivo* の試験によってTG吸収抑制作用を見出したドクダミ、とろろ昆布、コガネタケヤシに関して、その作用メカニズムの解明、抗肥満作用に關与する脂肪細胞へのTG蓄積作用の確認、活性成分の構造決定、抗肥満作用の確認を行うことを目的とした。この3種類のうち、ドクダミが珍しいTG吸収抑制作用メカニズムを有していたこと、活性成分も未解明であること、さらには、食経験があることから、主にドクダミに関して研究を行った。

第 1 章の図表



*Houttuynia cordata* Thunb



*Chrysalidocarpus lutescens* Wendl.



Tororokombu

Fig. 1 Pictures of *Houttuynia cordata*, Tororokombu, and *Chrysalidocarpus lutescens*

**Table 1. Classification of Obesity by BMI**

<b>BMI</b>	<b>Japanese standard</b>	<b>WHO standard</b>
<18.5	Underweight	Underweight
18.5 <25	Normal range	Normal range
25 <30	Obese class I	Pre-obese
30 <35	Obese class II	Obese class I
35 <40	Obese class III	Obese class II
40	Obese class IV	Obese class III

$$\text{BMI (Body Mass Index)} = \frac{\text{Body weight [kg]}}{(\text{Body height [m]})^2}$$

**Table 2. Adipocytokines and Their Functions Involved in Metabolic Syndrome**

<b>Adipocytokines</b>	<b>Functions</b>
Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	The inhibition of insulin signal by JNK activation <sup>153)</sup>
Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	The increase of blood NEFA level, and the expression of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ and IL-6 <sup>154)</sup>
Resistin	The suppression of glucose uptake in myocytes and adipocytes <sup>155, 156)</sup> , the enhancement of hepatic gluconeogenesis <sup>157)</sup>
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	The inhibition of plasminogen activator <sup>158)</sup>
Angiotensinogen	The increase of blood pressure in renin- angiotensin system <sup>159)</sup>
Interleukin-6 (IL-6)	The inhibition of insulin signal via the enhancement of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression in myocytes and adipocytes <sup>160, 161)</sup>
Retinol binding protein 4 (RBP4)	The increase of hepatic PEPCK level, the inhibition of insulin signal in skeletal muscle <sup>162)</sup>
Leptin	The enhancement of energy expenditure, the reduction of feeding behavior <sup>163)</sup>
Adiponectin	The activation of PPAR $\alpha$ and AMP-activated protein kinase (AMPK) <sup>164-168)</sup>

**Table 3. Food Materials and Components for Prevention and Reduction of Obesity**

<b>Food materials</b>	<b>Main mechanism of anti-obesity effects</b>
Oolong tea polymerized polyphenols	Inhibition of lipase activity <sup>169, 170)</sup>
Astaxanthin	Enhancement of lipid metabolism <sup>171)</sup>
Medium-chain fatty acids	Improvement of $\beta$ -oxidation efficiency <sup>172)</sup>
L-carnitine	$\beta$ -oxidation enhancement <sup>173)</sup> , downregulation of adipogenesis-related gene expression, and upregulation of lipolysis-related gene expression <sup>174)</sup>
Chitosan	Inhibition of lipase activity <sup>175)</sup>
Capsaicin	Inhibition of adipocyte differentiation <sup>176)</sup> and increase of oxygen consumption via $\beta$ -adrenergic action <sup>177)</sup>
Catechins	Stimulation of lipid catabolism <sup>178)</sup> , Inhibition of adipocyte differentiation <sup>176)</sup> , and facilitation of adiponectin expression and secretion <sup>179)</sup>
Citrin	Inhibition of adipogenesis by suppressing C/EBP $\alpha$ expression <sup>180)</sup>



## 第 2 章 ドクダミの抗肥満作用

### 2.1 はじめに

ドクダミは、リパーゼ活性を阻害せず、リパーゼによって加水分解された TG 代謝産物である遊離脂肪酸(NEFA)とグリセロールの吸収を抑制することにより、TG の吸収を抑制することを明らかにした。また、マウス由来の白色脂肪前駆細胞株である 3T3-L1 細胞を用いて、TG の蓄積を抑制することも確認された。本章では、ドクダミの TG 代謝産物の吸収抑制作用のメカニズムと活性成分の構造、TG 蓄積抑制作用のメカニズム、抗肥満作用について検討を行った。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 試薬

DMEM 培地粉末、0.25% トリプシン-EDTA、RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor、M-MLV Reverse Transcriptase は、インビトロジェン株式会社から購入した。また、フリーグリセロール試薬、DIDS disodium salt、Thiazolyl blue tetrazolium bromide、イソプロテレノール塩酸塩はシグマアルドリッチ株式会社から購入した。さらに、Lipase Kit S、豚由来の膵リパーゼ、仔牛血清(CS)、牛胎児血清(FBS)、GPDH 活性測定キット、RNAiso Plus、rTaq DNA Polymerase はそれぞれ DS ファーマバイオメディカル株式会社、ICN バイオメディカルズ株式会社、三光純薬株式会社、Tissue Culture Biologicals、株式会社プライマリーセル、アプライドバイオシステムジャパン株式会社、東洋紡株式会社から購入した。その他の試薬は和光純薬株式会社から購入した。

#### 2.2.2 実験動物

実験動物は日本エスエルシー株式会社から購入した Slc:ddY マウスを用いた。これらの実験動物は 12 時間の昼夜サイクル(明期 8:00 ~ 20:00)、温度 24±1°C、湿度 50±10%の条件下で飼育し、飼料と水は自由摂取させた。標準飼料はラボ MR ストック(日本農産工業株式会社)を使用した。また、本研究は、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年 4 月 28 日、環境省告示 88 号)と東京海洋大学規定の動物実験等取り扱い規則を遵守し、動物実験を行った。

#### 2.2.3 抽出物の調製

ドクダミは東京海洋大学品川キャンパス内で 6 月から 8 月にかけて採取した。抽出には葉の部分を用い、生葉の重量の 10 倍量(v/w)の蒸留水、メタノール(MeOH)、エタノール(EtOH)で抽出した。蒸留水の場合は、100°C で 1 時間の熱水抽出を行い、MeOH と EtOH の場合は、常温で 2~7 日間付け込んで抽出した。この抽出操作は 2 回行った。抽出液をろ過して、減圧濃縮と凍結乾燥によって、抽出物を得た。また、ドクダミ葉熱水抽出物はこれ以降便宜上 WEH と略記することにした。

#### 2.2.4 TG 負荷試験

6 週齢、雄性の Slc:ddY マウスを標準飼料で 1 週間予備飼育した後、24 時間絶食させて実験を行った。平均体重がほぼ等しくなるように、コントロール群とサンプル投与群に群分けした( $n=8$ )。WEH メタノール抽出物(MEH)、エタノール抽出物(EEH)の活性を比較する場合は、サンプルの濃度を 1,000 mg/kg に設定して強制経口投与を行い、すぐにコーン油(8 ml/kg)を強制経口投与した。また、投与量依存性を確認するために、コントロール群(Control)と、WEH 250 mg/kg 投与群(250 mg/kg)、WEH 500 mg/kg 投与群(500 mg/kg)、WEH 1,000 mg/kg 投与群(1,000 mg/kg)の 4 群に分け、それぞれ蒸留水(20 ml/kg)、WEH(250、500、1,000 mg/20 ml/kg)を強制経口投与した後、すぐにコーン油(8 ml/kg)を強制経口投与した。投与開始直前(0 時間目)と投与開始後 1 時間おきに尾採血を 8 時間目まで行った。採血した血液は 1,400×g で 1 分間遠心分離した。血中 TG 値は、遠心分離して得られた血漿を用いて、トリグリセライド E-テストワコーで測定した。

#### 2.2.5 膵リパーゼ活性阻害の測定

リパーゼ阻害活性試験は、Lipase Kit S を用いて測定した。膵リパーゼ液は膵リパーゼを使用し、1 unit/ml となるように調製した。96 ウェルプレートに 5  $\mu$ l の酵素液、2  $\mu$ l のエステラーゼ阻害剤、発色液 73  $\mu$ l を入れて混合し、30°C で 5 分間プレインキュベートした。その後、サンプル溶液、あるいは、コントロールとして 10  $\mu$ l の蒸留水、または、MeOH を加えて、さらに、10  $\mu$ l の基質液を加えてよく混合してから、30°C、遮光下で 30 分間インキュベートした。200  $\mu$ l の反応停止液を加え、405 nm で吸光度を測定した。また、反応停止液を加えた後に基質液を加えたものをブランク溶液とした。

コントロールの反応率を 100%として、反応率(%)を次式のように算出した。

$$\frac{(\text{サンプル溶液を加えた反応液の吸光度}) - (\text{サンプル溶液を加えたブランク溶液の吸光度})}{(\text{コントロールの反応液の吸光度}) - (\text{コントロールのブランク溶液の吸光度})} \times 100$$

#### 2.2.6 オレイン酸・グリセロール負荷試験

6 週齢、雄性の Slc:ddY マウスを標準飼料で 1 週間予備飼育した後、24 時間絶食させて実験を行った。平均体重がほぼ等しくなるように、コントロール群(Control)、WEH 投与群(WEH)の 2 群に分けた( $n=6, 8$ )。

オレイン酸を負荷する場合、コントロール群、WEH 投与群に、それぞれ蒸留水(20 ml/kg)、WEH(1,000 mg/20 ml/kg)を強制経口投与した後、すぐにオレイン酸(8 ml/kg)を強制経口投与した。投与開始直前(0 時間目)と投与開始後 1 時間おきに尾採血を 8 時間目まで行った。

また、グリセロールを負荷する場合、3% (v/v)グリセロール溶液を調製し、グリセロール溶液(20 ml/kg)のみ、あるいは、WEH を懸濁させたグリセロール溶液(1,000 mg/20 ml/kg)を強制経口投与した。投与開始直前(0 分目)と投与開始後 15 分、30 分、60 分、120 分目に尾採血を行った。

得られた血液は 1,400×g で 1 分間遠心分離した。血中の TG 値と NEFA 値、グリセロール値は、遠

心分離して得られた血漿を用いて、それぞれトリグリセライド E-テストワコーと NEFA C-テストワコー、フリーグリセロール試薬を用いて測定した。

#### 2.2.7 腸管内に残存するオレイン酸とグリセロールの定量

まず、オレイン酸と WEH を均一に腸内に注入できるように、エマルションを作製した。1 ml のオレイン酸と 5 ml の蒸留水と 580 mg のコール酸ナトリウムを混合し、WEH 非添加と 300 mg の WEH 添加処理の 2 種類のエマルションを調整し、一晚 37°C、180 rpm で振とうさせた。6 週齢、雄性の Slc:ddY マウスを標準飼料で 1 週間予備飼育した後、24 時間絶食させて実験を行った。平均体重がほぼ等しくなるように、コントロール群(Control)、WEH 投与群(WEH)の 2 群に分けた( $n=3, 5$ )。

NEFA を注入する場合、コントロール群、WEH 投与群に、それぞれ 1 ml の WEH 非添加のエマルション、WEH を添加したエマルションを胃の下端部から切り込みを入れてゾンデで注入し、すぐにエマルションで満たされた部分の腸管の両端を縫合糸で縛った。20 分後、縛った部位を摘出した。摘出した腸内の内容物を 5 ml の生理食塩水で洗い流した。得られた内容物に 4 ml のヘキサンを加えて、20°C、800×g で 30 分間遠心分離し、上層を回収した。さらに、同じ回収操作を 2 回繰り返した。回収した上層を乾燥窒素ガスで脱溶媒し、1 ml のイソプロパノールを加え、これを NEFA 測定溶液とした。

また、グリセロールを注入する場合も同様に、コントロール群、WEH 投与群に、3%(v/v)グリセロール溶液を調整して、グリセロール溶液のみ、あるいは、WEH を懸濁させたグリセロール溶液を 1 ml 注入した。15 分後、縛った部位を摘出し、腸内の内容物を 5 ml の生理食塩水で洗い流した。得られた内容物を減圧濃縮と凍結乾燥によって、完全に乾固し、4 ml のイソプロパノールを加えて、20°C、800×g で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。得られた上清を減圧濃縮と凍結乾燥によって、完全に乾固し、1 ml の蒸留水を加えて、これをグリセロール測定溶液とした。

得られた測定溶液から、それぞれ NEFA C-テストワコーとフリーグリセロール試薬を用いて測定した。

#### 2.2.8 FAT/CD36 阻害試験

6 週齢、雄性の Slc:ddY マウスを標準飼料で 1 週間予備飼育した後、24 時間絶食させて実験を行った。平均体重がほぼ等しくなるように、ブランク群(Vehicle)、コントロール群(Control)、DIDS disodium salt 62.5  $\mu\text{mol/kg}$  投与群(LD)、DIDS disodium salt 250  $\mu\text{mol/kg}$  投与群(HD)、WEH 500 mg/kg 投与群(WEH)の 5 群に分けた( $n=6$ )。ブランク群には蒸留水(20 ml/kg)のみを強制経口投与し、それ以外の群は、上記した順に蒸留水(20 ml/kg)、DIDS disodium salt (62.5  $\mu\text{mol}/20 \text{ ml/kg}$ )、DIDS disodium salt (250  $\mu\text{mol}/20 \text{ ml/kg}$ )、WEH(500 mg/20 ml/kg)を強制経口投与した後、すぐにオレイン酸(8 ml/kg)を強制経口投与した。投与開始直前(0 時間目)と投与開始後 2 時間おきに尾採血を 8 時間目まで行った。得られた血液は 1,400×g で 1 分間遠心分離した。血中 NEFA 値は、遠心分離して得られた血漿を用いて NEFA

C-テストワコーで測定した。

### 2.2.9 AQP 阻害試験

6週齢、雄性のSlc:ddYマウスを標準飼料で1週間予備飼育した後、24時間絶食させて実験を行った。平均体重がほぼ等しくなるように、コントロール群(Control)、CuSO<sub>4</sub> 50 µmol/kg 投与群(LC)、CuSO<sub>4</sub> 200 µmol/kg 投与群(HC)、WEH 500 mg/kg 投与群(WEH)の4群に分けた( $n=4$ )。この順に3% (v/v)グリセロール溶液(20 ml/kg)のみ、あるいは、CuSO<sub>4</sub> (50 µmol/20 ml/kg)、CuSO<sub>4</sub> (200 µmol/20 ml/kg)、WEH(500 mg/20 ml/kg)を溶解させた3% (v/v)グリセロール溶液を強制経口投与した。投与開始直前(0分目)と投与開始後15分、30分、60分目に尾採血を行った。得られた血液は1,400×gで1分間遠心分離した。血中グリセロール値は、遠心分離して得られた血漿を用いて、フリーグリセロール試薬で測定した。

### 2.2.10 活性成分の分画と精製

15 gのWEHに750 mlの蒸留水を加えてよく攪拌させ、さらに、等量のMeOHを加えて、よく攪拌させ、24時間室温で静置させた。減圧ろ過によって、50% MeOH可溶画分と不溶画分に分けた。次に、50% MeOH可溶画分に10倍量(v/w)の100% MeOHを加えて、よく攪拌させ、24時間室温で静置させた。減圧ろ過によって、100% MeOH可溶画分と不溶画分に分けた。

100% MeOH不溶画分は、10% MeOHで10 mg/mlに調製し、14,300×g、4°Cで10分間遠心分離し、上清と残渣に分けた。得られた上清をコスモシル75C<sub>18</sub>-OPNのオープンカラムによって分画した。まずは、5 vol.の10% MeOHを流し、次に4 vol.の100% MeOHを流して、それぞれのフラクション(Fr.)をFr. I-1、Fr. I-2とした。また、遠心によって、得られた残渣はFr. I-3とした。さらに、Fr. I-1は、H<sub>2</sub>Oで33.5 mg/mlに調整し、14,300×g、4°Cで10分間遠心分離し、上清と残渣に分けた。得られた上清を活性炭のオープンカラムによって分画した。1/2 vol.のH<sub>2</sub>O、3 vol.のH<sub>2</sub>O、2 vol.の10% MeOH、4 vol.の25% MeOHと50% MeOH、4 vol.の100% MeOHの順に流して、それぞれのFr.をFr. I-1-0～Fr. I-1-5として、遠心によって、得られた残渣はFr. I-1-6とした。

また、100% MeOH可溶画分は、H<sub>2</sub>Oで20 mg/mlに調製し、コスモシル75C<sub>18</sub>-OPN(ナカライテクス株式会社)のオープンカラムによって分画した。2 vol.のH<sub>2</sub>O、3/2 vol.の25% MeOH、2 vol.の100% MeOHを順に流して、それぞれのFr.をFr. S-1～Fr. S-3とした。Fr. S-2は10% MeOHで100 mg/mlに調製し、Sep-Pak Vac C18 3cc カラムに通した。Sep-Pak カラムに通した溶液をHPLCによって分画した。HPLCのカラムはDevelosil RPARUEOUS-AR-5 (20×250 mm、野村化学株式会社)を用いて、流速5.0 ml/min、展開溶媒10% MeOHの条件下で、2mlの上清をインジェクトした。分画は215 nmの検出により行い、ピークに基づいて、Fr. S-2-1～Fr. S-2-4に分けた。

### 2.2.11 活性成分の構造決定

活性成分の構造は各種分析機器を用いて同定した。 $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル( $^1\text{H}$  NMR)はブルカー(株)AV400M 型装置(400 MHz)を用いて測定し、化学シフト値は測定溶媒の残留プロトンのシグナルを内部標準[D<sub>2</sub>O (4.87 ppm)]として、ppm で記載した。スピン結合定数  $J$  は Hz で記載した。

$^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル( $^{13}\text{C}$  NMR)はブルカー(株)AV400M 型装置(100 MHz)を用いて測定し、化学シフト値は ppm で記載した。多重度は HMQC スペクトルにより推定した。

二次元核磁気共鳴スペクトルはブルカー(株)AV400M 型装置(400 MHz)を用いて、以下の条件で測定した。

1. COSY : データポイント数(512 × 128)
2. HMQC : データポイント数(512 × 128),  $\Delta t = 1/2J = 180$  ms [ $^1J_{\text{CH}} = 145$  Hz]
3. HMBC : データポイント数(512 × 128),  $\Delta t = 1/2J = 83$  ms [ $^{2,3}J_{\text{CH}} = 6$  Hz]

### 2.2.12 細胞培養

マウス由来の白色前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから購入した。細胞培養の培地は 10% CS を含む DMEM 培地(DMEM/10% CS)を用い、50 ml 用の培養フラスコに 5 ml の細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を加えて、培養した。コンフルエントになったら、培地をアスピレーターで除去し、6 ml のリン酸緩衝液(PBS(-))を加えて、細胞を洗った。この洗浄操作は 2 回行った。PBS(-)を除去したのちに、1 ml の 0.25% トリプシン EDTA を加えて、室温で 5 分間静置させたのちに培養細胞を揺すって、細胞をはがした。培養フラスコに 9 ml の DMEM/10% CS を加えて、50 ml 用のファルコンチューブに移した。ピペティングをしたのちに、室温、250×g で、5 分間遠心分離を行った。培地を除去し、トリプシン EDTA を洗浄するために、10 ml の DMEM/10% CS を加えてピペティングをしたのちに、室温、250×g で、5 分間遠心分離を行った。この洗浄操作はもう 1 回行った。培地を除去し、DMEM/10% CS を加えて細胞懸濁液( $5.0 \times 10^4$  cells/ml)を調整し、細胞継代のためにその細胞懸濁液を 50 ml 用の培養フラスコに 5 ml 入れて、培養した。

また、MTT アッセイ、オイルレッド O 染色、GPDH 活性の測定、中性脂肪分解活性の測定のために、24 ウェルプレートに細胞懸濁液( $2.5 \times 10^4$  cells/ml)を 400  $\mu\text{l}$  ずつ各ウェルに分注し、培養した。また、Total RNA 抽出用に細胞懸濁液( $2.5 \times 10^4$  cells/ml)を 50 ml 用の培養フラスコに 5 ml 入れて、培養した。3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導のために、0.25  $\mu\text{M}$  デキサメタゾン(DEX)、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン(IBMX)、10  $\mu\text{g/ml}$  インスリンを含む DMEM/10% FBS で 2 日間培養した。この期間は TG を合成する準備期間であるため、TG 合成準備期と称することにした。その後、Total RNA 抽出のための実験では、6 日間、それ以外の実験では、10 日間、5  $\mu\text{g/ml}$  インスリンを含む DMEM/10% FBS で培養した。この期間は実際に TG を合成する期間であるため、TG 合成期と称することにした。TG 合成期では培地を 2 日おきに交換した。TG 合成準備期と TG 合成期の両期間に、あるいは、どち

らかの期間だけに WEH (12.5 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加し、TG 蓄積に及ぼす影響について検討を行った。また、GPDH 活性の測定では、10 日間の TG 合成期のみ WEH (12.5 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加した細胞を用い、TG 分解活性の測定では、2 日間の TG 合成準備期と 10 日間の TG 合成期において、WEH を添加していない細胞を用いた。

#### 2.2.13 MTT アッセイ

3T3-L1 細胞の生存率を測定するために MTT アッセイを行った。24 ウェルプレートの各ウェルに入った培地を除去し、500  $\mu\text{l}$  の PBS(-)を加えて洗浄した。PBS(-)を除去したのち、200  $\mu\text{l}$  の MTT 溶液(0.5 mg/ml Thiazolyl blue tetrazolium bromide)を加えて、37°C で 1 時間インキュベートした。MTT 溶液を除去し、2 ml の DMSO を加えて、細胞から色素を抽出した。各ウェルの色素抽出液を 200  $\mu\text{l}$  採って、96 ウェルプレートに移して、プレートリーダーで 550 nm の吸光度を測定した。

#### 2.2.14 オイルレッド O 染色

3T3-L1 細胞の脂肪滴を染色するためにオイルレッド O 染色を行った。オイルレッド O 染色原液(3 mg/ml)を蒸留水と 6:4 で混合し、室温で 15 分間静置した。その後、フィルターろ過を行って、オイルレッド O 染色液を得た。24 ウェルプレートの各ウェルに入った培地を除去し、500  $\mu\text{l}$  の PBS(-)を加えて洗浄した。PBS(-)を除去したのち、400  $\mu\text{l}$  の 10%ホルマリンを加えて、室温で 15 分間静置させた。10%ホルマリンを除去し、500  $\mu\text{l}$  の蒸留水を加えて洗浄した。蒸留水を除去したのち、500  $\mu\text{l}$  のオイルレッド O 染色液を加えて、室温で 15 分間静置させた。オイルレッド O 染色液を除去し、500  $\mu\text{l}$  の 60%EtOH を加えて洗浄し、除去した。この洗浄操作をもう 1 度行った。1 ml のイソプロパノールを加えて、染色部を抽出し、550 nm の吸光度を測定した。

#### 2.2.15 GPDH 活性の測定

GPDH 活性の測定は GPDH 活性測定キットを用い、分光光度計(V-530、日本分光株式会社)を用いて行った。24 ウェルプレートの各ウェルに入った培地を除去し、500  $\mu\text{l}$  の PBS(-)を加えて洗浄し、除去した。この洗浄操作をもう 1 度行った後に、800  $\mu\text{l}$  の酵素抽出液を加えて、3T3-L1 細胞を溶解させ、1.5 ml 用のエッペンドルフチューブに移した。各ウェルを 200  $\mu\text{l}$  の蒸留水で洗浄し、この洗浄液も細胞溶解液に混ぜた。冷水で満たした超音波破碎機で細胞を完全に破碎し、4°C、12,800 $\times$ g で 5 分間遠心した時の上清を検体とした。

350  $\mu\text{l}$  の反応基質溶液を分光光度計用セルに入れ、25°C で 5 分間加温し、検体も 25°C で加温した。セルに 650  $\mu\text{l}$  の検体を加えて、よく攪拌させ、340 nm の吸光度を測定開始後から 30 秒おきに 3 分間測定し、1 分間あたりの吸光度の変化量( $\Delta\text{OD}$ )を求めて、次式により、GPDH 活性を算出した。

GPDH 活性(U/ml) =

$$\frac{\Delta OD}{6.22(\text{NADH のミリモル分子吸光係数})} \times \frac{\text{反応総量[ml]}}{\text{検体量[ml]}} \times \frac{\text{検体希釈率}}{\text{光路長[cm]}}$$

#### 2.2.16 TG 分解活性の測定

各ウェルの培地を除去して、500  $\mu\text{l}$  の PBS(-)を加えて洗浄し、除去した。WEH 非添加、あるいは WEH 添加処理(12.5 ~ 200  $\mu\text{g/ml}$ )した 200  $\mu\text{l}$  の DMEM(フェノールレッド不含)培地を加えた。1 時間後に培地を回収し、減圧濃縮と凍結乾燥によって、完全に乾固した。乾固物を 1 ml のイソプロパノールを加えて、20°C、800 $\times g$  で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。得られた上清を減圧濃縮と凍結乾燥によって、完全に乾固し、100  $\mu\text{l}$  の蒸留水を加えて、これを検体とした。中性脂肪の分解活性は、検体中のグリセロール量を測定することで評価した。

#### 2.2.17 Total RNA の抽出

3T3-L1 細胞を PBS(-)で 2 回洗浄して除去し、RNAiso Plus を 2 ml 加え、細胞が完全に溶解するまでピペティングを行った。1.5 ml のエッペンドルフチューブに 1 ml ずつ分注して、5 分間常温で静置させたのち、1/5 量の 200  $\mu\text{l}$  のクロロホルムを加えて、よく攪拌した。5 分間常温で静置させたのち、12,000 $\times g$ 、4°C で 15 分間遠心分離を行った。上層(水層)を 600  $\mu\text{l}$  採取して、新しい 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて、攪拌した。5 分間常温で静置させたのち、12,000 $\times g$ 、4°C で 10 分間遠心分離を行った。RNA を含む沈殿物を吸い込まないように、上清を除去して、75% EtOH を加え、7500 $\times g$ 、4°C で 5 分間遠心分離を行った。完全に上清を除去して、100  $\mu\text{l}$  のジエチルピロカーボネート(DEPC)処理水を加えて、沈殿物を溶解させ、これを Total RNA 抽出液とした。

#### 2.2.18 RT-PCR による PPAR と C/EBP の mRNA の測定

Total RNA 抽出液を 40 倍希釈して、吸光度計で RNA 濃度を測定した。8 連 PCR チューブに以下の試薬を加えて、よく混合し、PreMIX を作った。65°C で 5 分間 MyCycler サーマルサイクラー(バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社)で加熱し、その後すぐに氷上で冷却した。Total RNA 抽出液は Total RNA の量が 2  $\mu\text{g}$  となるように加えた。

Total RNA 抽出液	X $\mu\text{l}$
50 $\mu\text{M}$ Oligo (dT) <sub>20</sub>	1 $\mu\text{l}$
10 mM dNTP mix	1 $\mu\text{l}$
<u>DEPC 処理水</u>	<u>Y <math>\mu\text{l}</math></u>
Total	12 $\mu\text{l}/\text{tube}$ (X+Y=10)

さらに、以下の試薬を加えて、37°C で 50 分間、70°C で 15 分間サーマルサイクラーを用いて cDNA 合成反応を行った。反応後は 80  $\mu$ l の超純水を加えて、PCR まで、-20°C で保管した。

PreMIX	12 $\mu$ l
5 $\times$ First strand buffer	4 $\mu$ l
0.1M DTT	2 $\mu$ l
40 U/ $\mu$ l RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	0.25 $\mu$ l
200 U/ $\mu$ l MMLV RTase	0.5 $\mu$ l
<u>DEPC 処理水</u>	<u>1.25 <math>\mu</math>l</u>
Total	20 $\mu$ l/tube

また、PCR preMIX を以下のように調整した。

超純水	X $\mu$ l
10 $\times$ Buffer (+Mg) for rTaq	2 $\mu$ l
2mM dNTPs	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M primer F	0.2 $\mu$ l
10 $\mu$ M primer R	0.2 $\mu$ l
5 U/ $\mu$ l rTaq DNA Polymerase	0.1 $\mu$ l
<u>cDNA</u>	<u>Y <math>\mu</math>l</u>
Total	20 $\mu$ l/tube (X+Y=15.5)

サーマルサイクラーで PCR preMIX を 95°C で 5 分間加熱し、95°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間、72°C で 1 分間を 30 サイクル反応させ、最後に 72°C で 5 分間反応させた。また、プライマーは、以下のものを用いた。

センス PPAR : 5'-ACCACTCGCATTTCCTTTGAC-3'

アンチセンス PPAR : 5'-TCAGCGGGAAGGACTTTATG-3'

センス C/EBP : 5'-TGCGTCTAAGATGAGGGAGTCA-3'

アンチセンス C/EBP : 5'-GGTGAGGACACAGACTCAAATCC-3'

センス GAPDH : 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'

アンチセンス GAPDH : 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動によって確認した。100 ml の TAE に 1 g のアガロース S を加えて、電子レンジで溶解させた。エチジウムブロマイドを 1  $\mu$ l 加えて、よく攪拌させて、ゲル板に流し込んだ。PCR 産物 5  $\mu$ l と 6 $\times$ loading dye 1  $\mu$ l をよく混合し、その混合物を電気泳動装置にセットしたゲル板のウェルにアプライした。100V で 13 分間、電気泳動し、254 nm 下でバンドを可視化した。



### 2.2.19 高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験

4週齢、雌性 Slc:ddY マウスを標準食で1週間予備飼育した後、各群平均体重がほぼ等しくなるように、群分けを行った。飼料は AIN-93M を基準にして作製した<sup>181)</sup>。WEH の抗肥満試験では、標準食群(ND)、高脂肪食群(HFD)、1%WEH を含む高脂肪食群(1%WEH)、2%WEH を含む高脂肪食群(2%WEH)の4群に分け、Table 4 に示した飼料を与えた。

体重と食餌摂取量の測定は週に2回行い、77日間飼育した。飼育終了後に24時間絶食し、尾採血を行い、得られた血液は1,400×gで1分間遠心分離した。血中のTG値、総コレステロール(TC)値、NEFA値、グリセロール値、血糖値は、遠心分離して得られた血漿を用いて、それぞれトリグリセライドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコー、NEFA C-テストワコー、フリーグリセロール試薬、グルコースC-テストワコーを用いて測定した。採血後、マウスを頸椎脱臼にて屠殺して、解剖し、傍子宮脂肪組織、肝臓、脾臓、腎臓を摘出して、重量を測定した。肝臓は重量測定後すぐに肝臓中の脂質を抽出・測定するまで-20°Cで保存した。

### 2.2.20 肝臓中の脂質の抽出

保存しておいた肝臓から Folch 法<sup>182)</sup>によって脂質を抽出した。肝臓を0.1g試験管に採って、Folch 溶媒(クロロホルム:メタノール=2:1)を4ml加えた。ポリトロンホモジナイザー(ULTRA-DISPERSER LK-22、ヤマト科学株式会社)を用いて1分間ホモジェナイズした後、各試験管に0.5%塩化ナトリウム水溶液を1ml加えて攪拌させ、800×g、20°Cで20分間遠心分離を行った。下層を採取し、再びFolch 溶媒を3ml加えて攪拌させ、800×g、10°Cで20分間遠心分離を行った。この抽出操作は2回行った。採取した下層を乾燥窒素ガスで脱溶媒し、残った沈殿物に1mlのイソプロパノールを加えて、これを肝臓の脂質抽出液とした。この脂質抽出液からトリグリセライドE-テストワコー、コレステロールE-テストワコーを用いて、肝臓に含まれる中性脂肪とTCを定量した。

### 2.2.21 統計処理

各値は平均値±標準誤差で表した。有意差検定は Student の *t*-検定で評価し、*p* 値が0.05未満であるとき、有意差があると評価した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 TG 吸収抑制作用とそのメカニズム

まず、WEH、ドクダミ葉の MeOH 抽出物(MEH)、EtOH 抽出物(EEH)の3種類の抽出物を用いて、コーン油負荷時のマウスの血中 TG 値の測定を行った。WEH 群と MEH 群は、コントロール群と比較して、それぞれ投与後1~5時間目、1~3時間目にかけて、有意に血中 TG 値の上昇が抑制された(Fig. 2)。一方、EEH 群はコントロール群との間に血中 TG 値の変化に差がみられなかった。また、AUC においても、WEH 群と MEH 群は、コントロール群と比較して、有意に低値を示したが、EEH

群とコントロール群との間では AUC に差はみられなかった(Fig. 3)。これらの結果から、WEH が最も TG 吸収抑制作用が強いと考えられたため、これ以降のドクダミの研究は WEH を用いることとした。

次に、WEH の投与量を、250、500、1,000 mg/kg に設定して、コーン油負荷時のマウスの血中 TG 値の測定を行った。WEH 250、500、1,000 mg/kg 投与群はコントロール群と比較して、それぞれ投与後 2、3 時間目、1~3 時間目、1~4 時間目にかけて、有意に血中 TG 値の上昇が抑制された(Fig. 4)。また、AUC においても、すべての WEH 投与群は、コントロール群と比較して、有意に低値を示し、投与量依存性も確認された(Fig. 5)。

また、WEH の TG 吸収抑制作用のメカニズムを解明するため、WEH が腓リパーゼ活性に及ぼす影響について確認したところ、15.63~1,000  $\mu\text{g/ml}$  の WEH の終濃度の範囲で腓リパーゼ活性に変化がみられなかった(Fig. 6)。

そこで、オレイン酸負荷時におけるマウスの血中 NEFA 値と TG 値に及ぼす WEH の影響を確認したところ、WEH 1,000 mg/kg 投与群は、コントロール群と比較して、オレイン酸負荷時における血中の NEFA 値と TG 値の上昇を、それぞれ投与後 1~3、8 時間目と 1~4、8 時間目で有意に抑制した(Fig. 7、9)。また、WEH 1,000 mg/kg 投与群の血中の NEFA 値と TG 値の AUC はともにコントロール群と比較して、有意に低値を示した(Fig. 8、10)。同様に、グリセロール負荷時におけるマウスの血中グリセロール値と TG 値に及ぼす WEH の影響を確認したところ、WEH 1,000 mg/kg 投与群は、コントロール群と比較して、投与後 15、30 分目でグリセロール負荷時における血中のグリセロール値と TG 値の上昇を有意に抑制した(Fig. 11、13)。また、WEH 1,000 mg/kg 投与群の血中のグリセロール値と TG 値の AUC はともにコントロール群と比較して、有意に低値を示した(Fig. 12、14)。

次に、マウスの腸管内にオレイン酸、あるいは、グリセロールを注入した時、腸管内に残存する NEFA 量、グリセロール量に及ぼす WEH の影響について確認した。WEH 注入群はコントロール群と比較して、オレイン酸注入時における腸管内残留 NEFA 量が有意に高値を示した(Fig. 15)。同様に、WEH 注入群はコントロール群と比較して、グリセロール注入時における腸管内残留グリセロール量が有意に高値を示した(Fig. 16)。

さらに、オレイン酸負荷試験では、脂肪酸トランスポーター-FAT/CD36 の阻害剤である DIDS disodium salt を用いて実験を行った。DIDS disodium salt 62.5  $\mu\text{mol/kg}$  投与群(LD)と 250  $\mu\text{mol/kg}$  投与群(HD)は、コントロール群(Control)と比較して、それぞれ投与後 2、6 時間目と 2~6 時間目において、血中 NEFA 値の上昇が抑制されており、AUC においても、有意に低値を示した。特に DIDS disodium salt 250  $\mu\text{mol/kg}$  投与群では、ブランク群(Vehicle)との間で血中 NEFA 値にほとんど差がみられず、AUC もほぼ同等の値を示した(Fig. 17、18)。また、WEH 500 mg/kg 投与群(WEH)はコントロール群と比較して、投与後 2、6 時間目で有意に血中 NEFA 値の上昇が抑制されており、AUC においても、有意に低値を示した。

同様に、グリセロール負荷試験では、グリセロール輸送チャネル AQP の阻害剤である  $\text{CuSO}_4$  を用

いて実験を行った。CuSO<sub>4</sub> 50 μmol/kg 投与群(LC)と 200 μmol/kg 投与群(HC)は、コントロール群(Control)と比較して、それぞれ投与後 15 分目と 15、30 分目において、血中 NEFA 値の上昇が抑制されており、AUC においても、有意に低値を示した。特に CuSO<sub>4</sub> 200 μmol/kg 投与群では、ほぼ完全に血中グリセロール値の上昇が抑制されており、AUC もほぼ 0 に近い値(9.9 ± 8.1 mg·min/dl)を示した(Fig. 19、20)。また、WEH 500 mg/kg(WEH)はコントロール群と比較して、投与後 15 分目で有意に血中グリセロール値の上昇が抑制されており、AUC においても、有意に低値を示した。

### 2.3.2 TG 吸収抑制作用を有する活性成分の分画と構造決定

WEH の NEFA 吸収抑制作用、あるいは、グリセロール吸収抑制作用を有する活性成分の分画をそれぞれ Fig. 21、22 に示したように行った。NEFA 吸収抑制作用が確認された画分をオレイン酸負荷試験で追跡したところ、Fr. S-2-1(収率 1.4%)と Fr. S-2-3(収率 0.8%)にその活性が確認された。Fr. S-2-1 と Fr. S-2-3 の活性を比較したところ、後者の NEFA 吸収抑制作用の方が強力であったため、Fr. S-2-3 を各種分析機器によって構造の同定を試みたところ、5-カフェオイルシキミ酸(Compound 1)であることが確認された(Fig. 21)。

同様に、グリセロール吸収抑制作用が確認された画分をグリセロール負荷試験で追跡した。Fr. I-1-0 ~ Fr. I-1-2 の各分画物の単独投与ではグリセロールの吸収抑制作用が確認されなかったが、グリセロール負荷試験でこれらの分画物を混合物を投与したところ、Fr. I-1 と同程度の活性が確認された。炎色反応、各種分析機器や TLC の分析から、Fr. I-1-0 ~ Fr. I-1-2 には Cu<sup>2+</sup>、あるいは、低分子のアミンが含まれていることが確認された。

### 2.3.3 TG 蓄積抑制作用とそのメカニズム

まず、3T3-L1 細胞の TG 合成準備期と TG 合成期の両期間において WEH を添加したところ、WEH はコントロールと比較して、25 ~ 200 μg/ml の範囲で 3T3-L1 細胞における TG の蓄積率を有意に減少させた。また、この範囲内でコントロールとの間で細胞生存率による有意差はみられなかった(Fig. 23)。

そこで、TG 合成準備期、あるいは、TG 合成期のどちらかに WEH を添加し、3T3-L1 細胞における TG 蓄積に及ぼす影響について確認した。WEH (12.5 ~ 200 μg/ml)を TG 合成準備期のみ添加した場合、コントロールとの間で、TG 蓄積率と細胞生存率に変化が見られなかった(Fig. 24)。一方、WEH (12.5 ~ 200 μg/ml)を TG 合成期のみ添加した場合、コントロールと比較して、WEH は 50 ~ 200 μg/ml の範囲で 3T3-L1 細胞における TG の蓄積率を有意に減少させた。また、この範囲内でコントロールとの間で細胞生存率による有意差はみられなかった(Fig. 25)。

次に、WEH (12.5 ~ 200 μg/ml)を TG 合成期のみ添加した時の GPDH 活性を測定したところ、WEH はコントロールと比較して、50 ~ 200 μg/ml の範囲で 3T3-L1 細胞における GPDH 活性を有意に減少させた。また、この範囲内でコントロールとの間で細胞生存率による有意差はみられなかった(Fig. 26)。

また、WEH の TG 分解活性に及ぼす影響について確認した。WEH (200 μg/ml)の添加により、TG

の分解活性と細胞生存率はコントロールとの間で変化が見られなかった。また、カテコールアミンの一種で TG の分解活性を亢進させるイソプロテレノール(10  $\mu$ M)の存在下でも、WEH (200  $\mu$ g/ml)とコントロールとの間で、TG 分解活性と細胞生存率に変化は見られなかった(Fig. 27)。

さらに、PPAR と C/EBP の mRNA 発現量に及ぼす WEH の影響について確認したところ、WEH (100, 200  $\mu$ g/ml)の添加によって、コントロールと比較して、PPAR と C/EBP の mRNA の発現量は濃度依存的に減少した(Fig. 28、29)。

#### 2.3.4 抗肥満作用

まず、高脂肪食を摂取させることにより、肥満モデルマウスを作製し、餌に WEH を混合することにより、体重と食餌摂取量に及ぼす影響について検討を行った。高脂肪食(HFD)群は標準食(ND)群と比較して、試験開始後 25 日目から体重が増加した(Fig. 30)。また、1%、2%の WEH を含む高脂肪食(1%、2% WEH)群は、HFD 群と比較して、それぞれ試験開始後 70~77 日目と 46、53~77 日目で、有意に体重の増加が抑制された。また、1%、2% WEH 群と HFD 群との間で食餌摂取量に差はほとんどみられなかった(Fig. 31)。

次に、絶食時におけるマウスの脂質・糖質関連の血中パラメータを測定した。HFD 群は ND 群と比較して、有意に血中の TG 値、総コレステロール(TC)値、遊離脂肪酸(NEFA)値、グリセロール値、グルコース値のすべての血中パラメータで、有意に高値を示した(Fig. 32~36)。また、1%、2% WEH 群は、HFD 群と比較して、有意に血中の TG 値、TC 値、NEFA 値、グリセロール値、グルコース値のすべての血中パラメータの上昇を抑制し、血中 TC 以外のパラメータでは投与量依存性も確認された。

また、解剖を行い、マウスの各臓器・組織の重量を測定した。HFD 群の傍子宮脂肪組織重量は、ND 群と比較して有意に増加した(Fig. 37)。また、1%、2% WEH 群の傍子宮脂肪組織重量は、HFD 群よりも有意に低値を示し、投与依存性も確認できた。一方で、肝臓、脾臓、腎臓の重量は、4 群間で差が見られなかった(Table 5)。

さらに、肝臓中の脂質量を測定したところ、HFD 群の肝臓中の TG、TC の量は、ND 群と比較して有意に増加し(Fig. 41、42)、1%、2% WEH 群の肝臓中の TG、TC の量は、HFD 群よりも有意に低値を示し、投与依存性も確認された。

## 2.4 考察

### 2.4.1 TG 吸収抑制作用とそのメカニズム

まず、ドクダミの抽出方法による活性を比較するために、ドクダミ葉の熱水抽出物(WEH)、メタノール抽出物(MEH)、エタノール抽出物(EEH)の 3 種類の抽出物を用いて、マウスにコーン油を負荷した時の血中 TG 値に及ぼす影響について確認し、また、TG の総吸収量の指標として曲線下面積(AUC)を求めた(Fig. 2、3)。この 3 種類の中で、Fig. 2 において WEH 群の投与後すべての測定点で血中 TG

値の平均値が最も低く、Fig. 3において WEH 群の AUC が最も小さいことから、WEH が最も強力な TG 吸収抑制作用を有すると考えられる。また、WEH のコーン油負荷時における血中 TG 値上昇抑制作用の投与量依存性を確認するために、WEH 250、500、1,000 mg/kg の経口投与で評価した(Fig. 4、5)。すべての WEH 群でコーン油負荷時における血中 TG 値上昇抑制作用がみられ、AUC は投与量が増加するにつれて減少しているため、投与量依存性があるものと考えられる。

TG は、緒論の 1.4 で紹介したとおり、そのままの形では体内に取り込まれず、消化リパーゼによって加水分解される必要がある。TG は消化リパーゼによって 2-モノグリセリド、グリセロール、NEFA に分解される。そして、これらの TG 代謝産物が腸管上皮細胞の細胞膜から取り込まれて、TG が体内に吸収されることになる。したがって、TG 吸収抑制作用のメカニズムとして考えられるのは、リパーゼ活性の阻害と TG 代謝産物の取り込み阻害である。そこで、まず、消化リパーゼの中で最も活性が強く、かつ TG の分解に最も大きな役割を担っている膵リパーゼを用いて、WEH のリパーゼ活性阻害活性を確認した(Fig. 6)。しかしながら、WEH には膵リパーゼ活性の阻害作用がみられなかった。

そこで、WEH には TG 代謝産物の取り込みの阻害作用があると考え、NEFA の一種であるオレイン酸とグリセロールをマウスに負荷した時の血中パラメータの変化をみた。その結果、WEH はオレイン酸負荷時における血中の NEFA 値と TG 値の上昇を抑制し、血中の NEFA 値と TG 値における AUC もともに低下させた(Fig. 7~10)。また同様に、WEH はグリセロール負荷時における血中のグリセロール値と TG 値の上昇を抑制し、血中のグリセロール値と TG 値における AUC もともに低下させた(Fig. 11~14)。したがって、WEH は NEFA やグリセロールといった TG の代謝産物の吸収を抑制していると考えられる。興味深いことに、オレイン酸のみ、あるいは、グリセロールのみを投与すると、血中 TG 値がそれぞれ血中の NEFA 値とグリセロールの経時的変化に類似した形で変動していることである(Fig. 9、11)。オレイン酸のみを投与した時、TG を合成するためには不足したグリセロールが必要であり、逆に、グリセロールのみを投与した場合は、不足した NEFA が必要である。血中にはグリセロールと NEFA が存在するため、おそらくこれらは TG の生成材料として供給されると思われる。また、グリセロールと NEFA はグルコースから合成することが可能であるため、肝臓中のグリコーゲン由来、あるいは、血中のグルコースからグリセロール 3-リン酸経路でグリセロールを合成することも考えられるし、ACC や FAS 等の脂肪酸合成関連酵素によって NEFA を合成することも考えられる。さらに、脂肪細胞中の TG を分解して、グリセロールや NEFA を放出することで供給することも可能であると考えられる。

さらに、NEFA とグリセロールの腸管からの取り込み阻害作用を確実なものとするために、麻酔下のマウスの腸管にオレイン酸、あるいは、グリセロールを注入し、WEH が腸管内の残留量に及ぼす影響を検討した(Fig. 15、16)。WEH は腸管内に注入されたオレイン酸、あるいは、グリセロールの残存量を増加させることがわかった。このことから、WEH は NEFA とグリセロールの腸管内から血中への移行を抑制し、TG、あるいは、その代謝産物負荷時のそれらの血中濃度の上昇を抑制すること

が考えられた。

WEH は NEFA とグリセロールの吸収抑制作用を有することが確認されたことから、次にこれらの取り込み機構に着目した。従来、NEFA とグリセロールは、腸管上皮細胞の刷子縁膜において拡散によって濃度勾配的に細胞内に取り込まれることが知られていたが、1990 年代以降の研究により、NEFA は FAT/CD36 という脂肪酸トランスポーターを介して、また、グリセロールは AQP7 というグリセロール輸送チャネルを介して、細胞内に取り込まれることが報告されている<sup>59, 73, 79-81</sup>。したがって、WEH は拡散、あるいは、トランスポーターを介して、NEFA とグリセロールの取り込みを阻害していることが考えられたため、FAT/CD36 の阻害剤である DIDS disodium salt<sup>183</sup> と AQP の阻害剤である CuSO<sub>4</sub><sup>78, 80, 184</sup> を用いた実験を試みた。本研究で実施しているオレイン酸負荷試験において、NEFA の取り込み機構が十分に明らかにされていないため、まずは、DIDS disodium salt を用いて、FAT/CD36 の NEFA の取り込みに対する貢献度について検討を行った。DIDS disodium salt は、投与量依存的にオレイン酸負荷時における血中 NEFA 値の上昇を抑制することが確認された。特に DIDS disodium salt を高濃度(250 μmol/kg)で経口投与した場合、オレイン酸負荷時における血中 NEFA 値の上昇がほぼ完全に抑制されていることから、この実験系におけるオレイン酸の吸収は FAT/CD36 を主に介して行われており、拡散による NEFA の取り込みの影響は無視できるものと考えられた(Fig. 17、18)。この条件下において、WEH はオレイン酸負荷時における血中 NEFA 値の上昇を抑制することが確認されているので、WEH は FAT/CD36 を阻害することによって、NEFA の吸収を抑制しているものと考えられる。

同様に、本研究で実施しているグリセロール負荷試験においても、グリセロールの取り込み機構が十分に明らかにされていないため、CuSO<sub>4</sub> を用いて、AQP7 のグリセロールの取り込みに対する貢献度についても検討を行った。CuSO<sub>4</sub> は、投与量依存的にグリセロール負荷時における血中グリセロール値の上昇を抑制することが確認された。特に、CuSO<sub>4</sub> を高濃度(200 μmol/kg)で経口投与した場合、グリセロール負荷時における血中グリセロール値の上昇がほぼ完全に抑制されていることから、この実験系におけるグリセロールの吸収は AQP7 を介して行われており、拡散によるグリセロールの取り込みの影響は無視できるものと考えられた(Fig. 19、20)。この条件下において、WEH はグリセロール負荷時における血中グリセロール値の上昇を抑制することが確認されているので、WEH は AQP7 を阻害することによって、グリセロールの吸収を抑制しているものと考えられる。また、AQPs は、さまざまな阻害剤によって、大きく分けて細胞外ループ、孔内、細胞内ループの 3 種類の部分に作用を受けることによって阻害されていることが知られている<sup>184-186</sup>。図には示していないが、WEH はグリセロール負荷時において、投与後早い時間帯(3~15 分)でマウスの血中グリセロール値の上昇を顕著に抑制した。WEH が細胞内ループに作用して AQP7 を阻害すると仮定すると、WEH が細胞内に取り込まれて、細胞内ループに作用するまでにある程度の時間を要することが予想され、投与後早い時間帯でグリセロールの取り込みを顕著に阻害するのは考えにくいいため、WEH は細胞外ループ、あるいは、孔内に作用して、AQP7 からのグリセロールの取り込みを阻害しているものと考えられる。

WEH の TG 吸収抑制作用について、以上の結果をまとめると、WEH は、膵リパーゼによる TG の加水分解には影響を与えず、グリセロールの取り込みに関与する AQP7 と NEFA の取り込みに関与する FAT/CD36 を阻害することにより、TG のリパーゼ代謝産物である NEFA とグリセロールの腸管上皮細胞からの取り込みを阻害し、その結果、TG の吸収を抑制していることが示唆された。これまで、TG 吸収抑制作用においては、リパーゼ阻害活性を有し、抗肥満作用を示す天然物由来の抽出物や成分は多く報告されているが<sup>187-190)</sup>、TG 代謝産物の吸収阻害活性をもつ天然物の抽出物や成分での *in vivo* による抗肥満作用は全く報告されていない。したがって、WEH の NEFA とグリセロールの腸管からの吸収阻害に由来する TG 吸収抑制作用は、新しく興味深い知見であると考えている。

#### 2.4.2 TG 吸収抑制作用を有する活性成分の分画と構造決定

WEH には NEFA とグリセロールの吸収を抑制する作用が確認されたため、WEH に含まれる NEFA 吸収抑制作用とグリセロール吸収抑制作用をもつ活性成分を分画した。

分析機器の結果から、NEFA 吸収抑制作用が確認された Fr. S-2-3 から 5-カフェオイルシキミ酸を同定した(Fig. 21)。この成分は、カフェ酸のカルボキシル基がシキミ酸の 5 位のヒドロキシル基と脱水縮合した構造を持つ化合物であり、マテ茶や緑茶、アロエベラ、ワラビ、ハマビシ、ユリ科シオデ属の *Smilax excelsa* や *S. glabra*、ミカン科サンショウ属の 1 種である *Zanthoxylum naranjillo* といった様々な植物に含まれていることが報告されている<sup>191-196)</sup>。5-カフェオイルシキミ酸は、抗酸化作用や熱帯病の病原体であるマンソン住血吸虫の増殖抑制作用を有することが確認されている<sup>191, 192, 196)</sup>。これまで、NEFA の取り込みを阻害する天然物由来の成分として、フラボノイドの 1 種であるフロレチンが知られているが<sup>183)</sup>、5-カフェオイルシキミ酸が NEFA の取り込みや FAT/CD36 を阻害するという報告はされていない。また、5-カフェオイルシキミ酸に類似した構造を持つものとして、クロロゲン酸とロスマリン酸のようなカフェ酸誘導体が挙げられる。クロロゲン酸はカフェ酸のカルボキシル基がキナ酸の 5 位のヒドロキシル基と脱水縮合した構造を持つ。クロロゲン酸は、NEFA の取り込みや FAT/CD36 を阻害することが報告されていないが、抗肥満作用があることが確認されている<sup>197)</sup>。ロスマリン酸はカフェ酸のカルボキシル基が 3, 4-ジヒドロキシフェニル乳酸のヒドロキシル基と脱水縮合した構造を持ち、スクリーニングにより、FAT/CD36 のアンタゴニストとして見出されたことが報告されている<sup>198)</sup>。したがって、5-カフェオイルシキミ酸が FAT/CD36 を阻害して、NEFA の吸収を抑制する可能性十分に考えられる。また、Fr. S-2-1 にも NEFA 吸収抑制作用があるため、5-カフェオイルシキミ酸以外にも、その作用を有する活性成分が WEH に含まれているものと考えられ、複数の NEFA 吸収抑制成分が存在するものと考えられる。

また、グリセロール吸収抑制作用を持つ活性成分は Fig. 22 の Fr. I-1-0 ~ Fr. I-1-2 に含まれており、炎色反応、NMR や TLC の分析からこれらの画分には  $\text{Cu}^{2+}$  と低分子のアミンが含まれていることが確認された。 $\text{Cu}^{2+}$  やアミンの 1 種であるテトラエチルアンモニウムは、AQPs を阻害することが報告されているため<sup>78, 80, 184, 199)</sup>、これら活性の確認された画分から検出された  $\text{Cu}^{2+}$  と低分子のアミンは、

WEH のグリセロール吸収抑制作用を持つ活性成分の一員である可能性が示唆された。しかしながら、Fr. I-1-0 ~ Fr. I-1-2 のそれぞれの画分を単独でグリセロール負荷試験で評価したところ、グリセロール吸収抑制作用は確認されなかった。一方、これらの画分を混ぜて同様に評価したところ、Fr. I-1 と同等のグリセロール吸収抑制作用が確認されたため、WEH に含まれる  $\text{Cu}^{2+}$  と低分子のアミンは、それぞれ単独でグリセロール吸収抑制作用を示さず、 $\text{Cu}^{2+}$  と低分子のアミン以外にも複数の活性成分が存在し、これらの活性成分が互いに協調し合うことで、グリセロールの吸収を抑制しているものと考えられる。

このように、WEH に含まれる NEFA、あるいは、グリセロールの吸収を抑制する活性成分は、互いに異なる成分であることが確認された。

#### 2.4.3 TG 蓄積抑制作用とそのメカニズム

WEH の抗肥満作用に関するさらなる生理活性を見出すために、マウス由来の白色前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞を用いた実験を行った。まず、3T3-L1 細胞を分化誘導させ、その後 TG を蓄積していく全過程における WEH の影響について検討した(Fig. 23)。WEH は 3T3-L1 細胞における TG 蓄積を抑制することが確認できた。次に、分化誘導中のみ、あるいは、分化誘導後のみに WEH を添加して、TG の蓄積に対する影響を確認したところ、WEH は分化誘導中では TG 蓄積に影響を及ぼさなかったのに対し(Fig. 24)、分化誘導後では TG の蓄積を抑制した(Fig. 25)。3T3-L1 細胞は分化誘導後に TG を合成し、蓄積していくので、WEH は TG 合成を抑制すると考えられる。また、脂肪細胞の TG 蓄積抑制作用は TG 合成抑制作用と TG 分解促進作用の 2 つの要因から成り立っている。WEH の TG 分解促進作用の有無を確認したところ、WEH には、その作用がみられなかった(Fig. 27)。

TG 合成には、さまざまな TG 合成関連酵素が存在するが、その中でも特に TG 合成のバイオマーカーとして用いられているのが、GPDH である。WEH が GPDH 活性に及ぼす影響について調べたところ、WEH は濃度依存的に GPDH 活性を阻害することがわかった(Fig. 28)。したがって、WEH は GPDH 活性阻害によって、脂肪細胞内の TG の蓄積を抑制することがわかった。GPDH はグリセロール 3-リン酸とジヒドロキシアセトンリン酸との変換に作用する酵素であり、グルコースからグリセロールを生合成するカスケードに存在することから、WEH はこのカスケードを抑制的に働きかけることによって、グルコースからの TG の合成を抑制しているものと考えられる。

GPDH の発現は、インスリンによってコントロールされており、そのため、インスリンによって発現が促進される PPAR $\gamma$  によって GPDH の転写が制御されていることが考えられている<sup>22, 200</sup>。そこで、WEH が 3T3-L1 細胞の分化過程における PPAR $\gamma$  の mRNA 発現量に及ぼす影響について確認したところ、WEH は PPAR $\gamma$  の mRNA 発現量を低下させた(Fig. 29)。したがって、WEH は PPAR $\gamma$  を介して、GPDH の活性を阻害したものと考えられる。また、WEH がもう 1 つの TG 合成のマスターレギュレーターとされる C/EBP $\beta$  の mRNA 発現量に及ぼす影響について調べたところ、WEH は C/EBP $\beta$  の mRNA 発現量も低下させた(Fig. 29)。PPAR $\gamma$  と C/EBP $\beta$  は、GPDH の発現以外にも、GLUT4



細胞質から細胞膜のトランスロケーション<sup>91)</sup>や、FAT/CD36、脂肪酸結合タンパクの aP2、脂肪酸合成関連酵素の ACC や FAS といった様々な TG 合成の関与因子の発現を制御することがわかっており<sup>22, 92, 159, 160)</sup>、WEH は、PPAR と C/EBP の発現抑制を介して、これらの TG 合成関連因子の発現を抑制し、グルコースからの NEFA やグルコースの合成効率を悪化させ、また、NEFA の取り込みや運搬の効率を低下させることで TG の合成を抑制し、TG の蓄積を抑制していることも示唆される。また、3T3-L1 細胞の分化誘導後では、インスリンによって TG 蓄積が引き起こされる。PPAR と C/EBP の発現はインスリンによって IRS-PI3-キナーゼ-Akt を経由して亢進・維持されていることから<sup>88-90)</sup>、WEH は PPAR と C/EBP の上流に存在するインスリンシグナルを抑制する、あるいは、PPAR と C/EBP の発現を直接的に抑制することで、TG の合成を抑制していると考えられる。

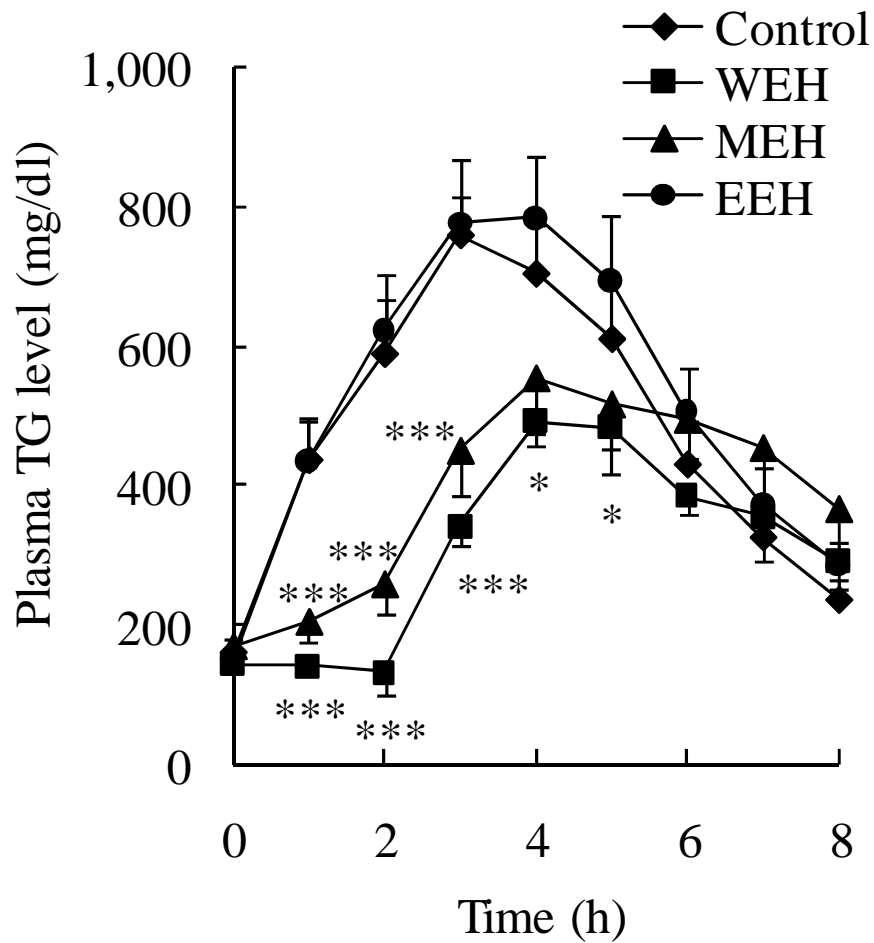
#### 2.4.4 抗肥満作用

WEH の抗肥満作用を確認するため、高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いて、抗肥満試験を行った。その結果、WEH は投与量依存的に高脂肪食摂取による体重と体脂肪の増加を抑制し、血中の脂質値、グリセロール値、グルコース値の上昇を抑制した(Fig. 30、32~37、41、42)。したがって、WEH は、肥満を予防・改善し、肥満に伴う血中脂質や血糖値の異常を改善することが証明された。また、WEH は脾臓と腎臓の重量や見た目の色・形に影響しなかったことから(Fig. 39、40)、これらの臓器に毒性を示さないものと考えられる。

#### 2.4.5 まとめ

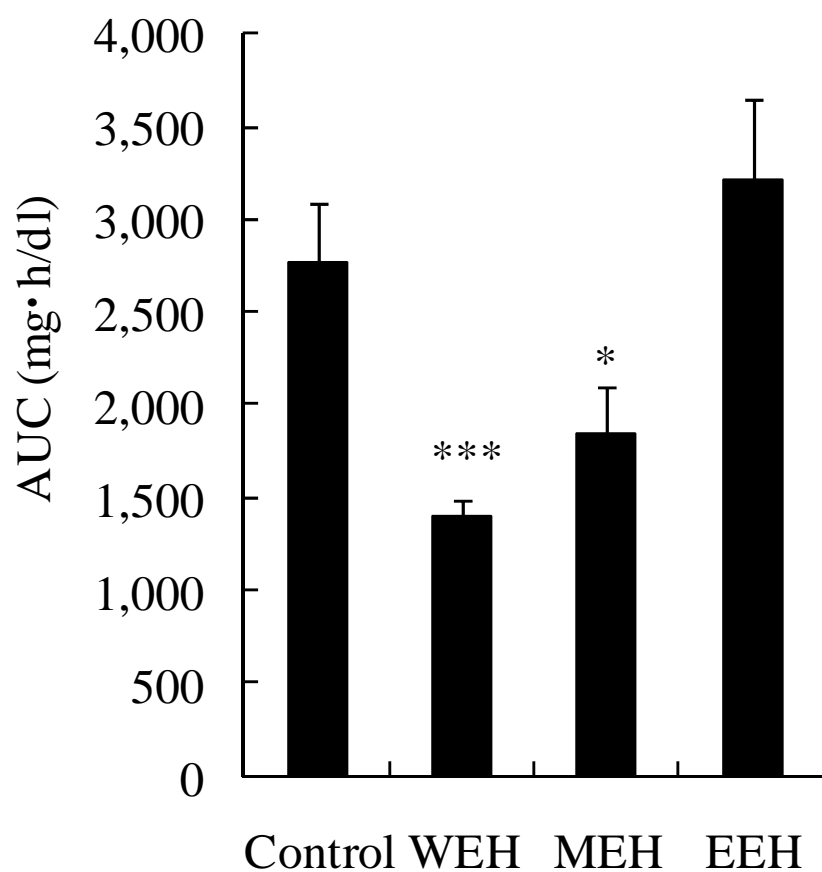
WEH は、脂肪酸トランスポーターである FAT/CD36、あるいは、グリセロール輸送チャネルである AQP7 を介して、NEFA とグリセロールの吸収を抑制することで、腸管からの TG の吸収を抑制することが明らかとなった。TG 吸収抑制成分の構造決定を試みたところ、NEFA 吸収抑制成分の 1 つとして、5-カフェオイルシキミ酸であることが確認され、グリセロール吸収抑制成分の一員として、Cu<sup>2+</sup>と低分子アミンである可能性が示唆された。また、WEH は、TG 合成のマスターレギュレーターとされる PPAR と C/EBP の mRNA の発現量を低減させ、GPDH 等の TG 合成関連遺伝子の発現を抑制し、脂肪細胞内における TG の合成を抑制することで、TG の蓄積を抑制することが考えられた。さらに、WEH は高脂肪食摂取によって誘発された肥満を抑制した。この作用は腸管からの NEFA とグリセロールの吸収抑制作用と脂肪細胞における TG 蓄積抑制作用の 2 つの効果が長期的に作用し、累積した結果であると考えられる。

第 2 章の図表



**Fig. 2 Effect of Water (WEH), Methanol (MEH), and Ethanol (EEH) Extracts of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves on Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

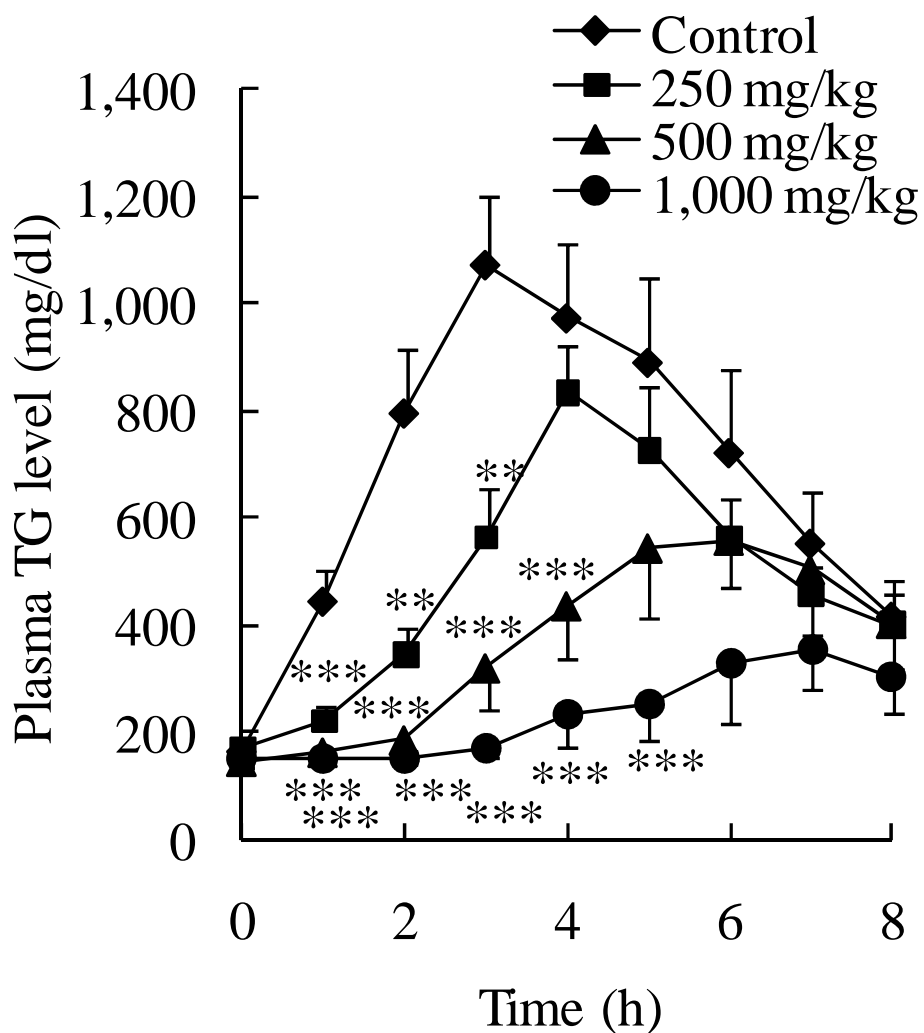
Distilled water (20 ml/kg), and WEH, MEH, and EEH solutions (1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, WEH, MEH, and EEH groups before oral administration of corn oil (8 ml/kg). Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 3 Effect of Water (WEH), Methanol (MEH), and Ethanol (EEH) Extracts of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves on the Area under the Curve (AUC) of Triglyceride (TG) Absorption after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

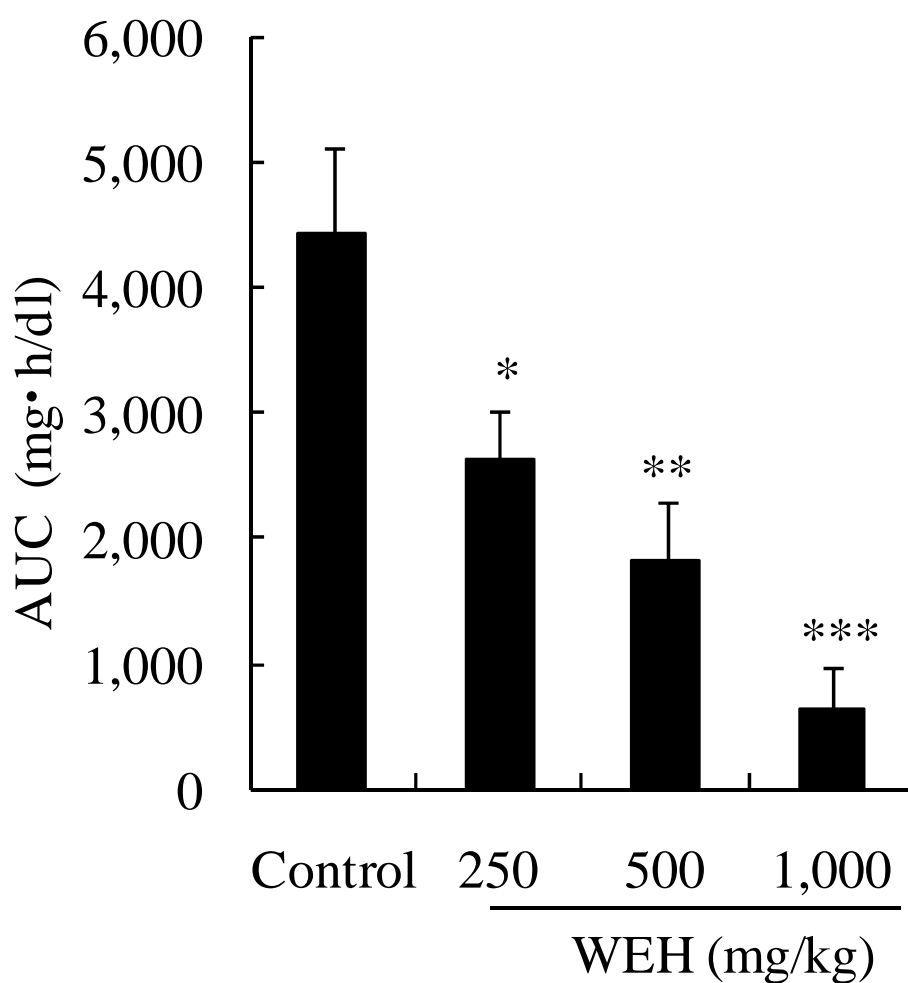
Level of total absorbed TG was evaluated using the AUC in Fig. 3. Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 4 Dose-Dependent Suppressive Effects of Water Extracts of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the elevation of Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

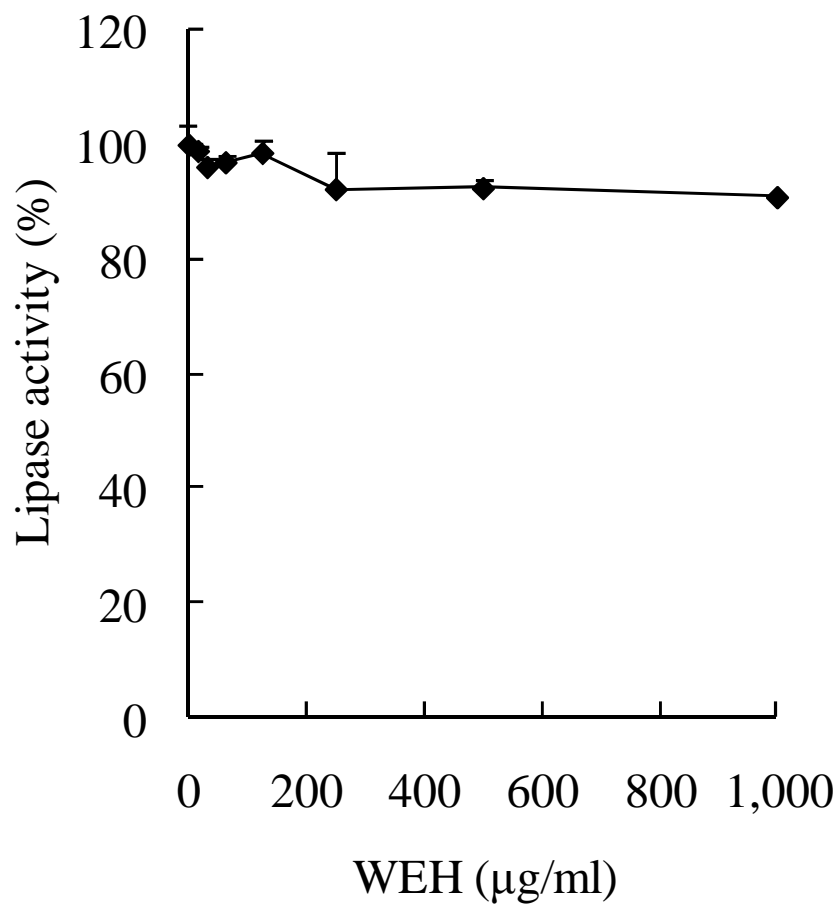
Distilled water (20 ml/kg) and WEH (250, 500, 1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, 250, 500, and 1,000 mg/kg groups before oral administration of corn oil (8 ml/kg). Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 5 Dose-Dependent Suppressive Effects of Water Extracts of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Triglyceride (TG) level after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

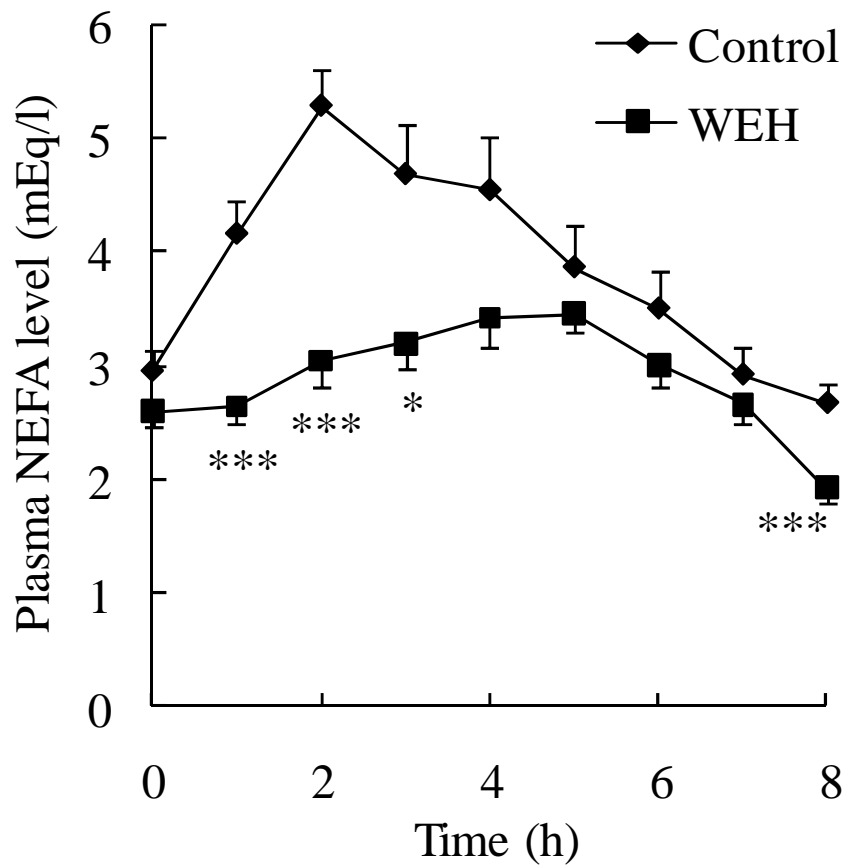
Level of total absorbed TG was evaluated using the AUC in Fig. 4. Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



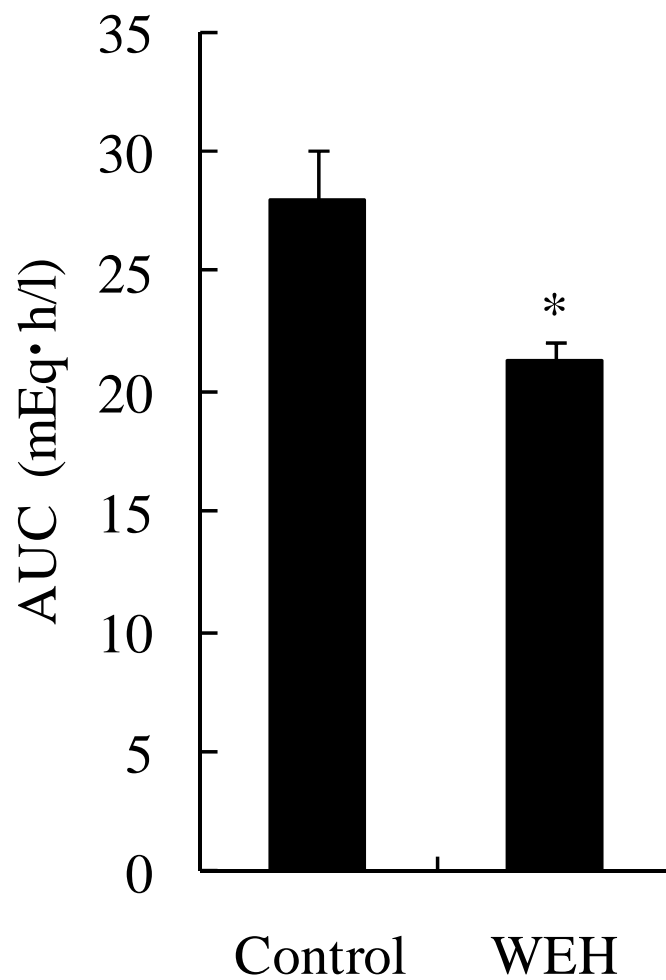
**Fig. 6 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Pancreatic Lipase Activity *in Vitro***

Lipase activity was measured using Lipase Kit S according to the protocol. Data ( $n = 3$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E.



**Fig. 7 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Plasma Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Level after Oral Administration of Oleic Acid in Mice.**

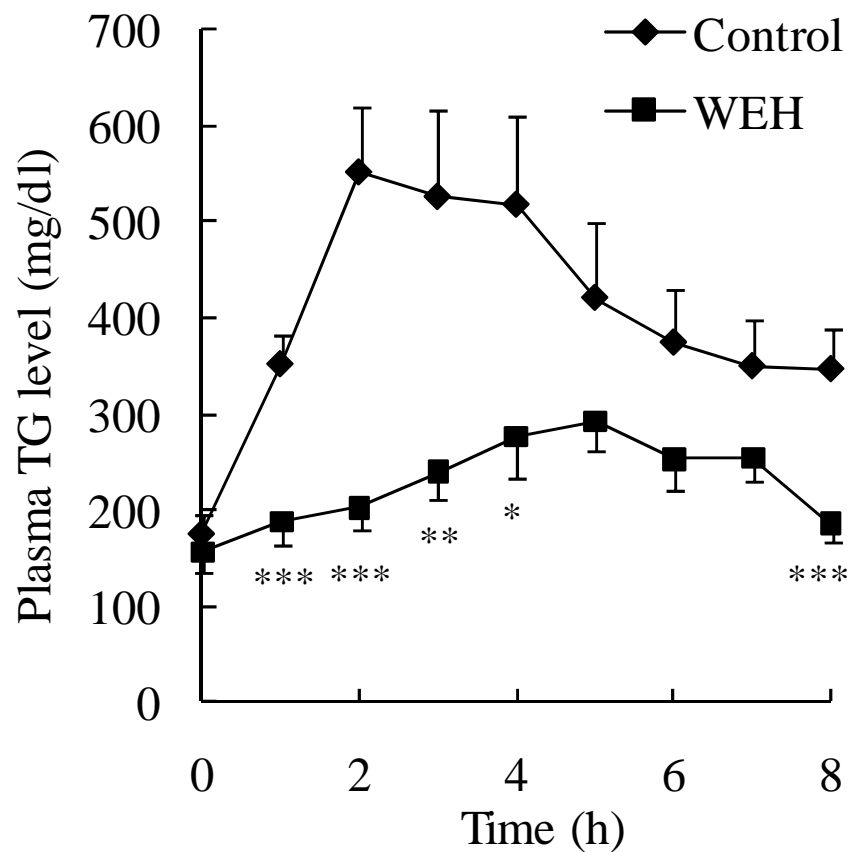
Distilled water (20 ml/kg) and WEH (1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control and WEH groups before oral administration of oleic acid (8 ml/kg). Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 8 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Level after Oral Administration of Oleic Acid in Mice.**

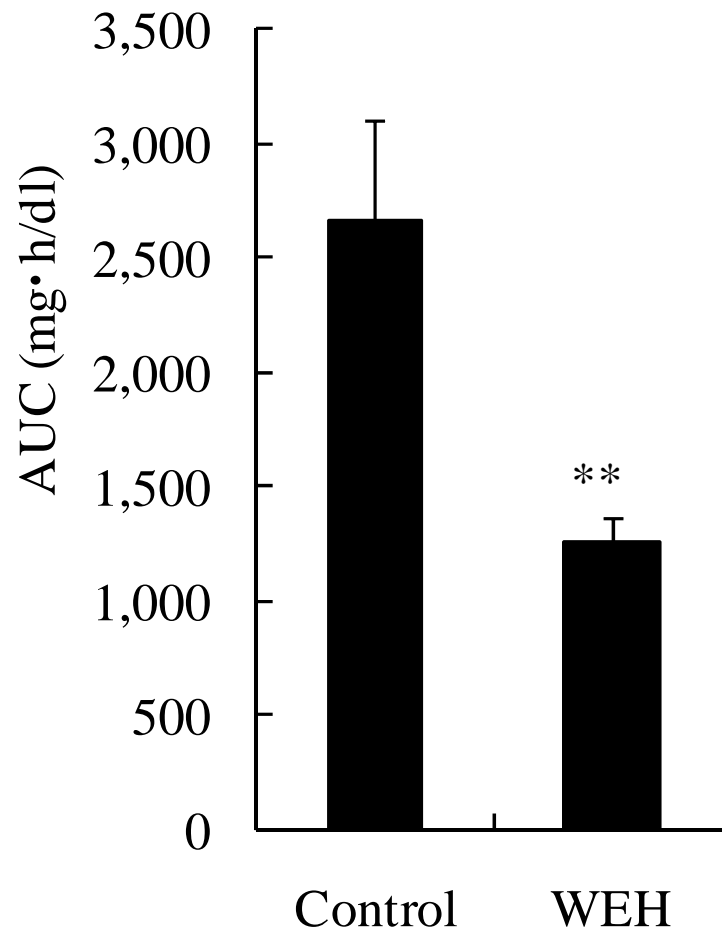
Level of total absorbed NEFA was evaluated using the AUC in Fig. 7. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$  vs. the control group.





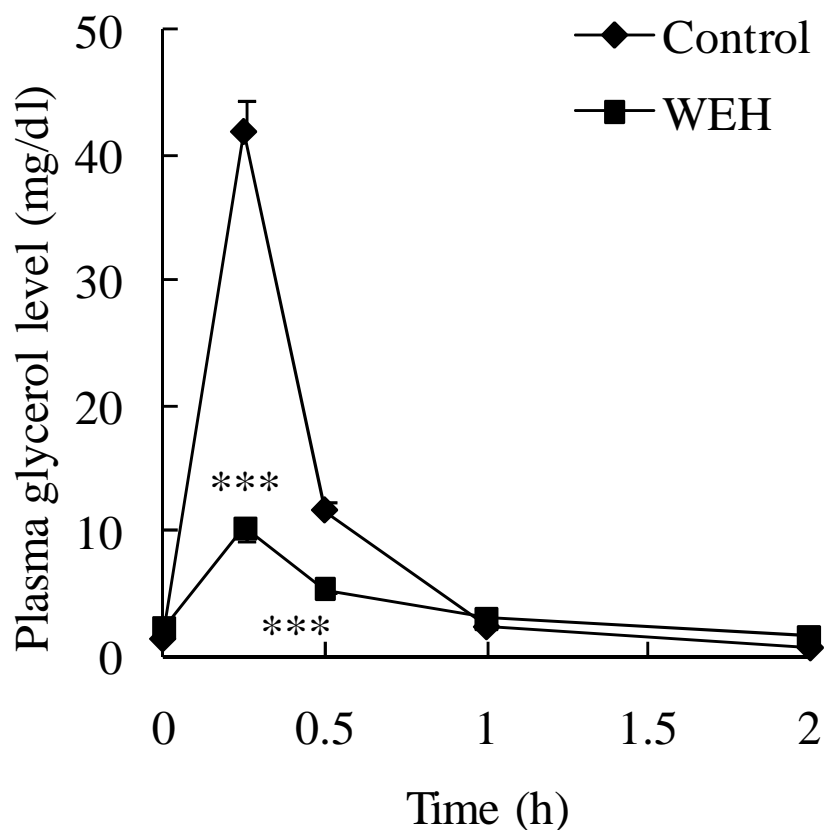
**Fig. 9 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Oleic Acid in Mice**

Distilled water (20 ml/kg) and WEH (1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control and WEH groups before oral administration of oleic acid (8 ml/kg). Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



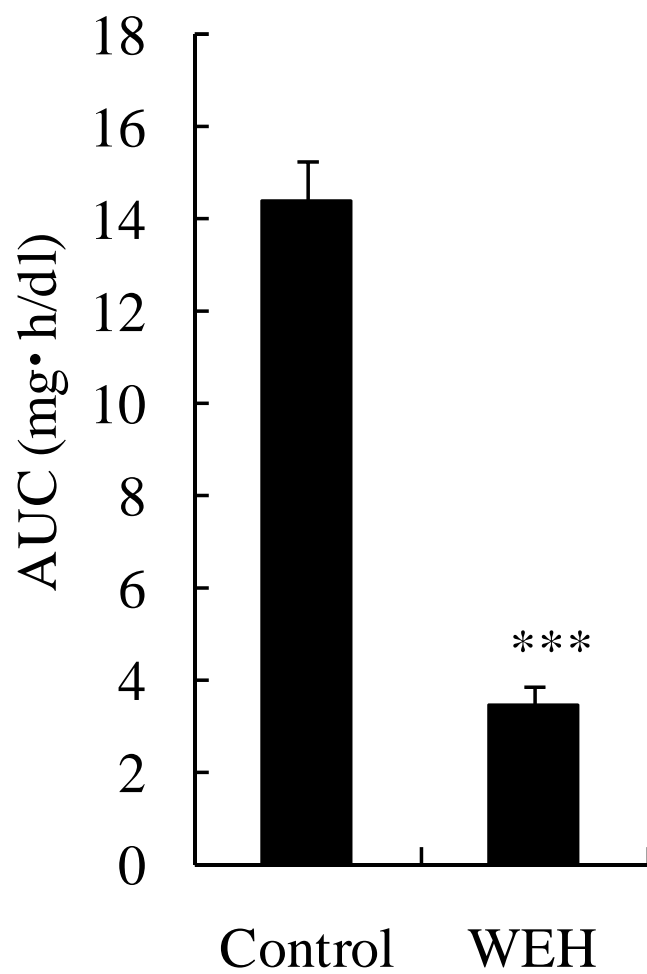
**Fig. 10 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Oleic Acid in Mice**

Level of total absorbed TG was evaluated using the AUC in Fig. 9. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.01$  vs. the control group.



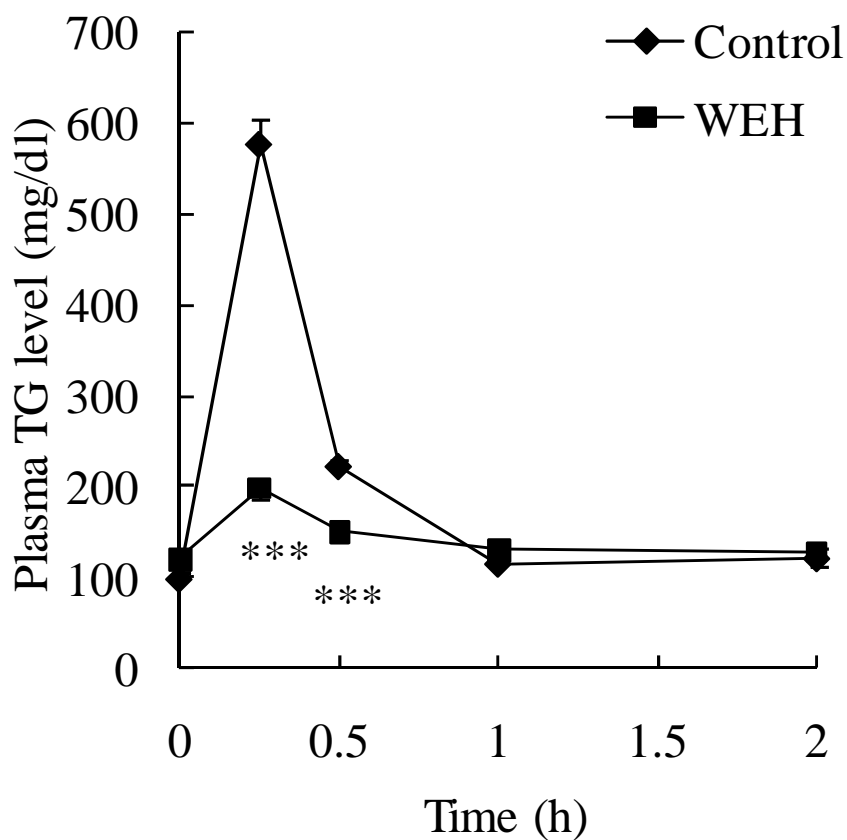
**Fig. 11 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Plasma Glycerol Level after Oral Administration of Glycerol in Mice**

Distilled water (20 ml/kg) and WEH (1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administrated to the mice in the control and WEH groups with glycerol (0.6 ml/kg). Data ( $n = 6$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



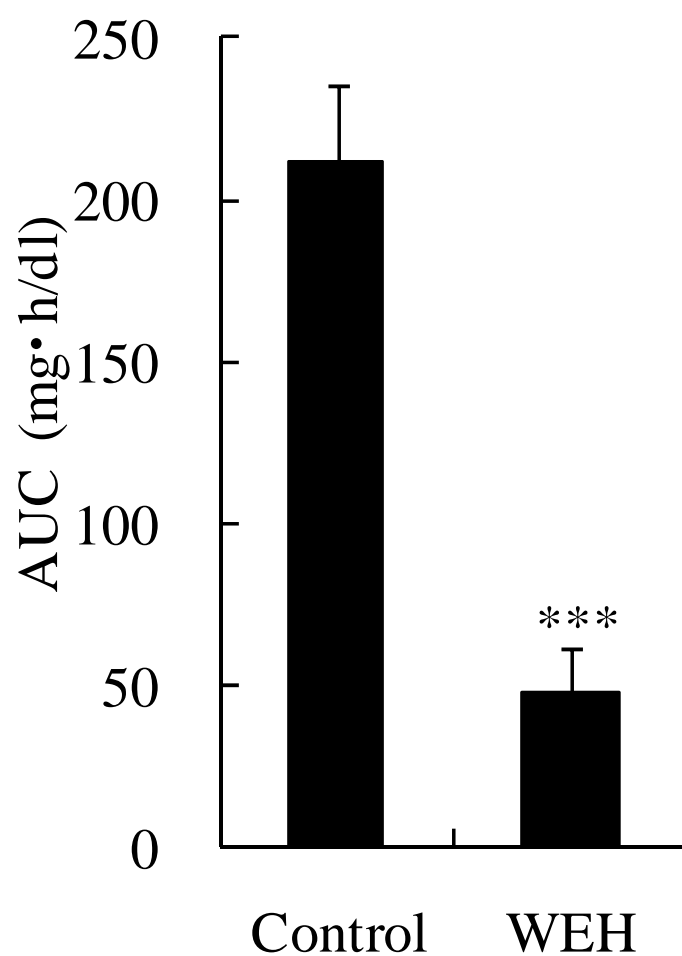
**Fig. 12 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Glycerol Level after Oral Administration of Glycerol in Mice**

Level of total absorbed glycerol was evaluated using the AUC in Fig. 11. Data ( $n = 6$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



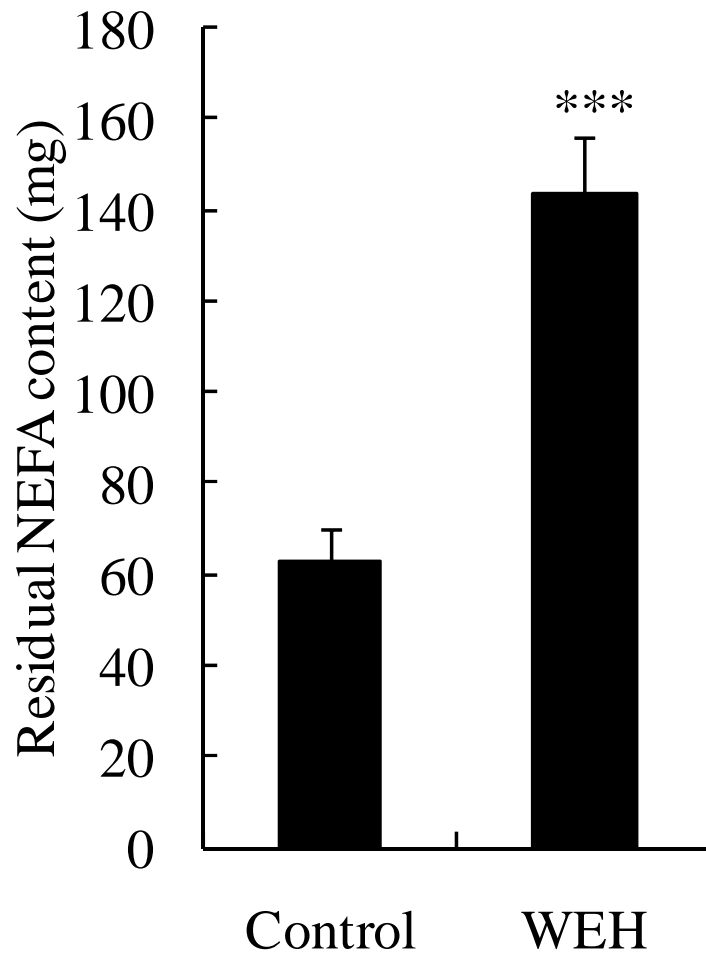
**Fig. 13 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Glycerol in Mice**

Distilled water (20 ml/kg) and WEH (1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administrated to the mice in the control and WEH groups with glycerol (0.6 ml/kg). Data ( $n = 6$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



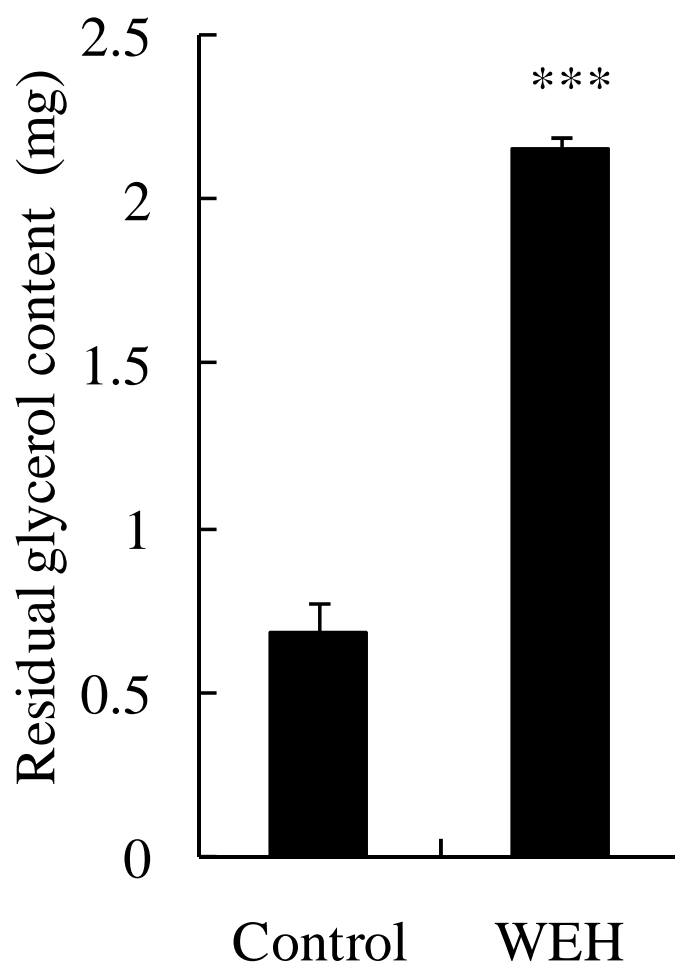
**Fig. 14 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Glycerol in Mice**

Level of total absorbed TG was evaluated using the AUC in Fig. 13. Data ( $n = 6$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 15 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Residual Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Content in the Lumen of the Small Intestine after Injecting the Emulsion in Mice**

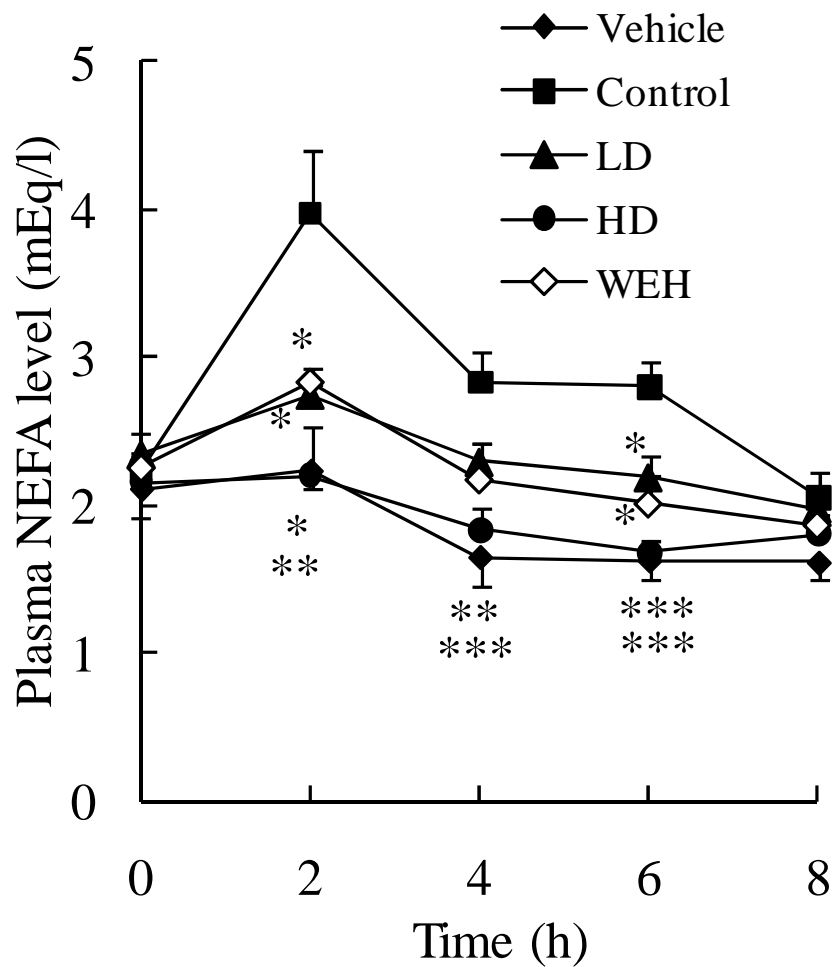
One ml of the emulsion with or without 50 mg of WEH was respectively injected into the mice in the control and WEH groups. Data ( $n = 5$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 16 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Residual Glycerol Content in the Lumen of the Small Intestine after Injecting Glycerol in Mice**

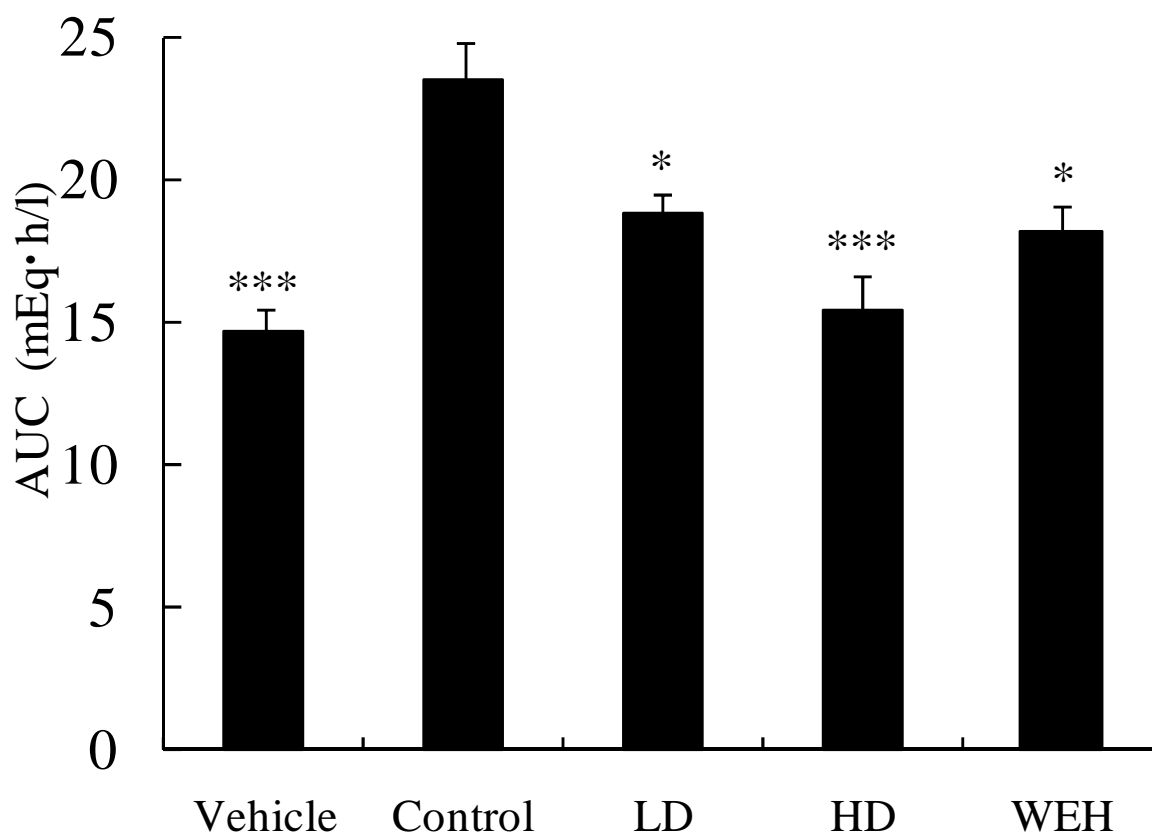
One ml of 3% (v/v) glycerol with or without 100 mg of WEH was respectively injected into the mice in the control (unfilled circle) and WEH (filled circle) groups. Data ( $n = 3$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.





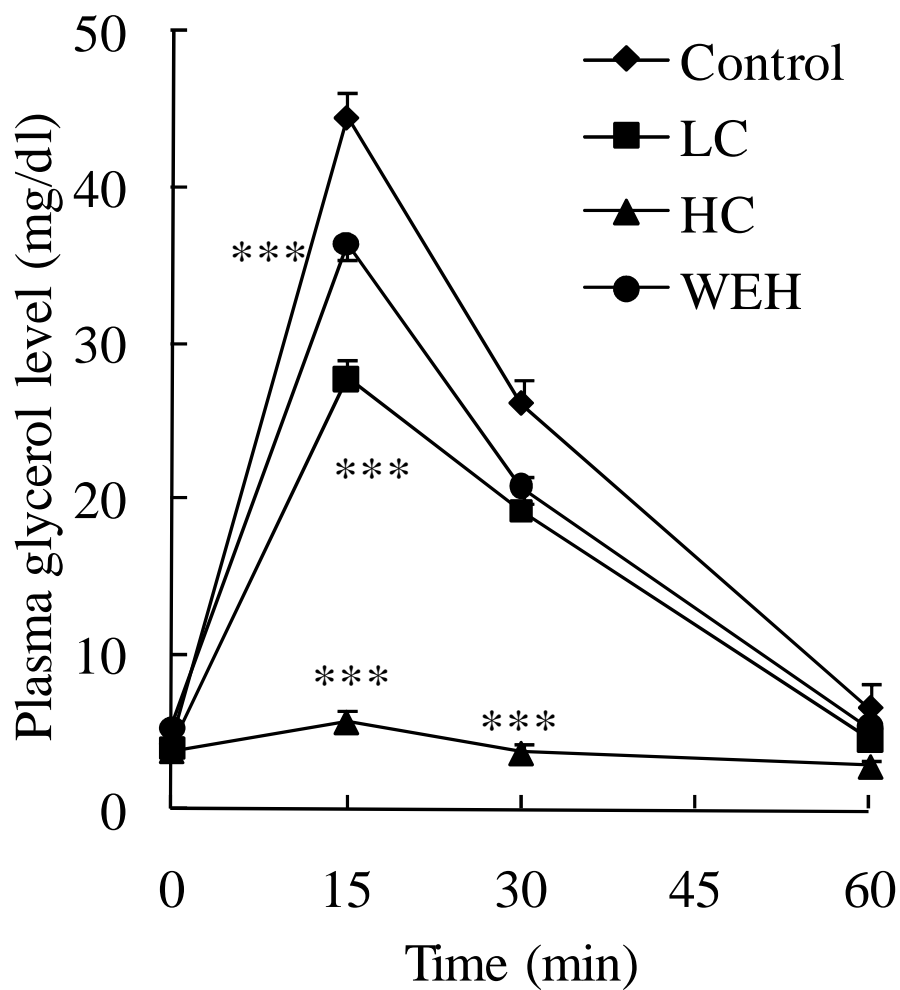
**Fig. 17 Effect of Combined Application of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) and 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-Disulfonate Disodium Salt (DIDS) on Plasma Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Level after Oral Administration of Oleic Acid in Mice.**

Distilled water (20 ml/kg), and DIDS disodium salt (62.5 and 250  $\mu\text{mol/kg}$ ), and WEH (500 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, LD, HD, and WEH groups before oral administration of oleic acid (8 ml/kg). Data ( $n = 5$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 18 Effect of Combined Application of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) and 4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-Disulfonate Disodium Salt (DIDS) on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Level after Oral Administration of Oleic Acid in Mice.**

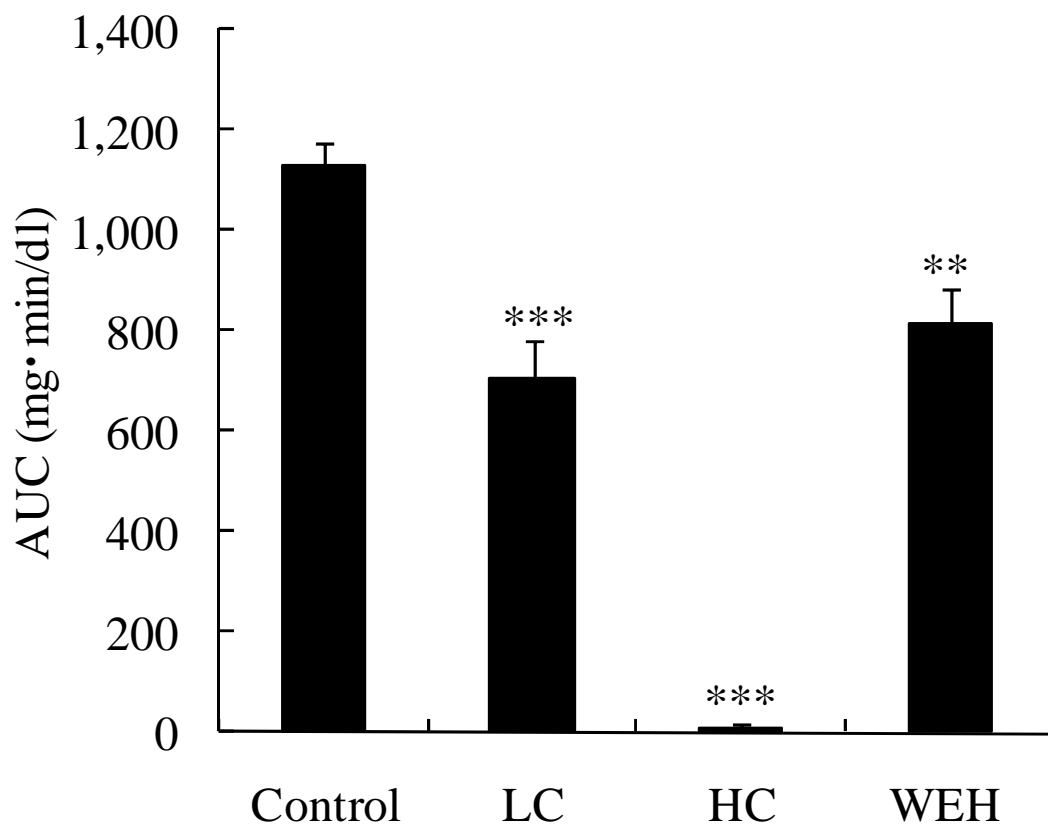
Distilled water (20 ml/kg), and DIDS disodium salt (62.5 and 250  $\mu\text{mol/kg}$ ), and WEH (500 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, LD, HD, and WEH groups before oral administration of oleic acid (8 ml/kg). Level of total absorbed NEFA was evaluated using the area under the curve (AUC) in Fig. 17. Data ( $n = 5$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



**Fig. 19 Effect of Combined Application of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) and  $\text{CuSO}_4$  on Plasma Glycerol Level after Oral Administration of Glycerol in Mice**

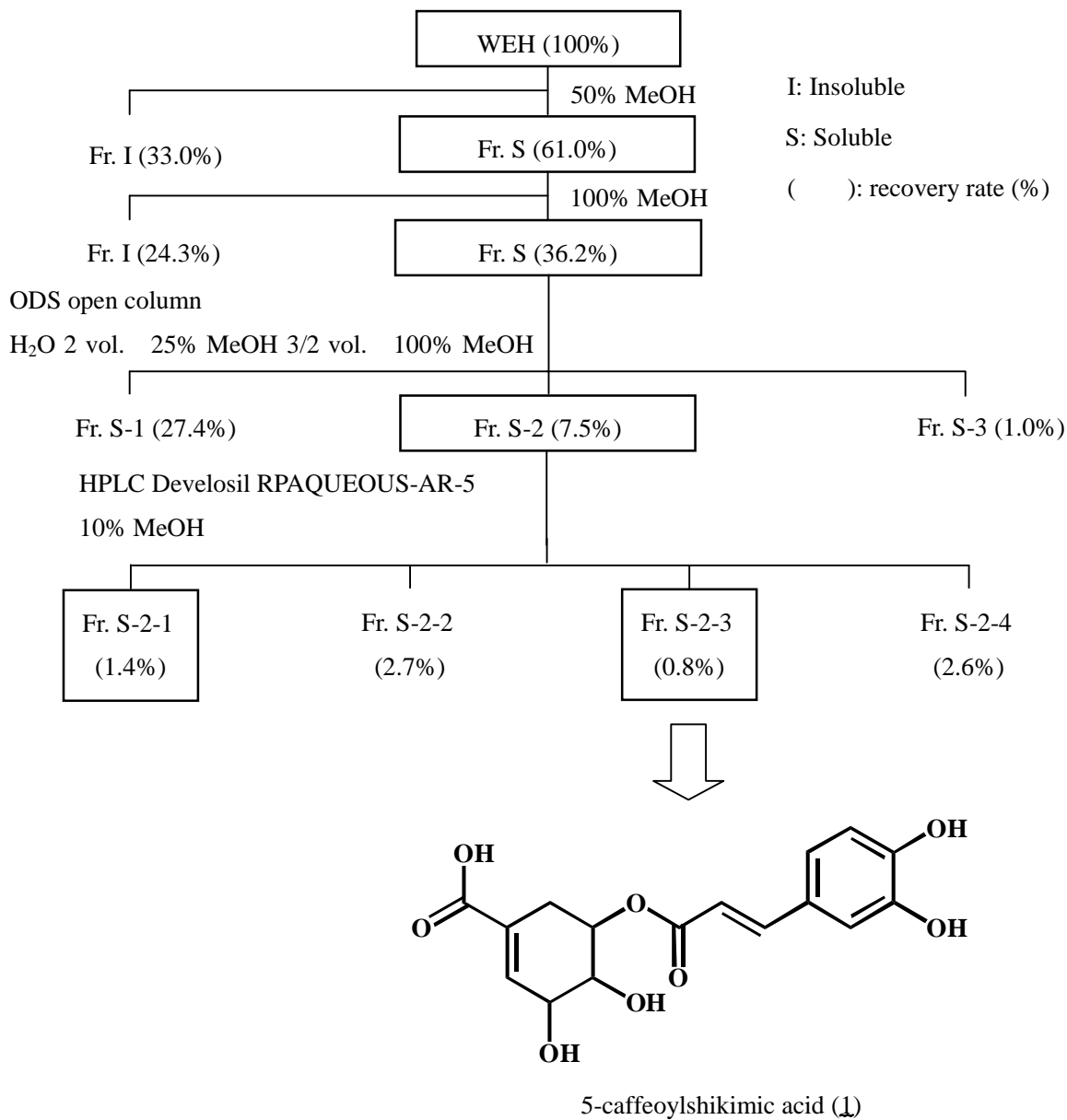
Distilled water (20 ml/kg), and  $\text{CuSO}_4$  (50 and 200  $\mu\text{mol/kg}$ ), and WEH (500 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, LC, HC, and WEH groups with glycerol (0.6 ml/kg).

Data ( $n = 4$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



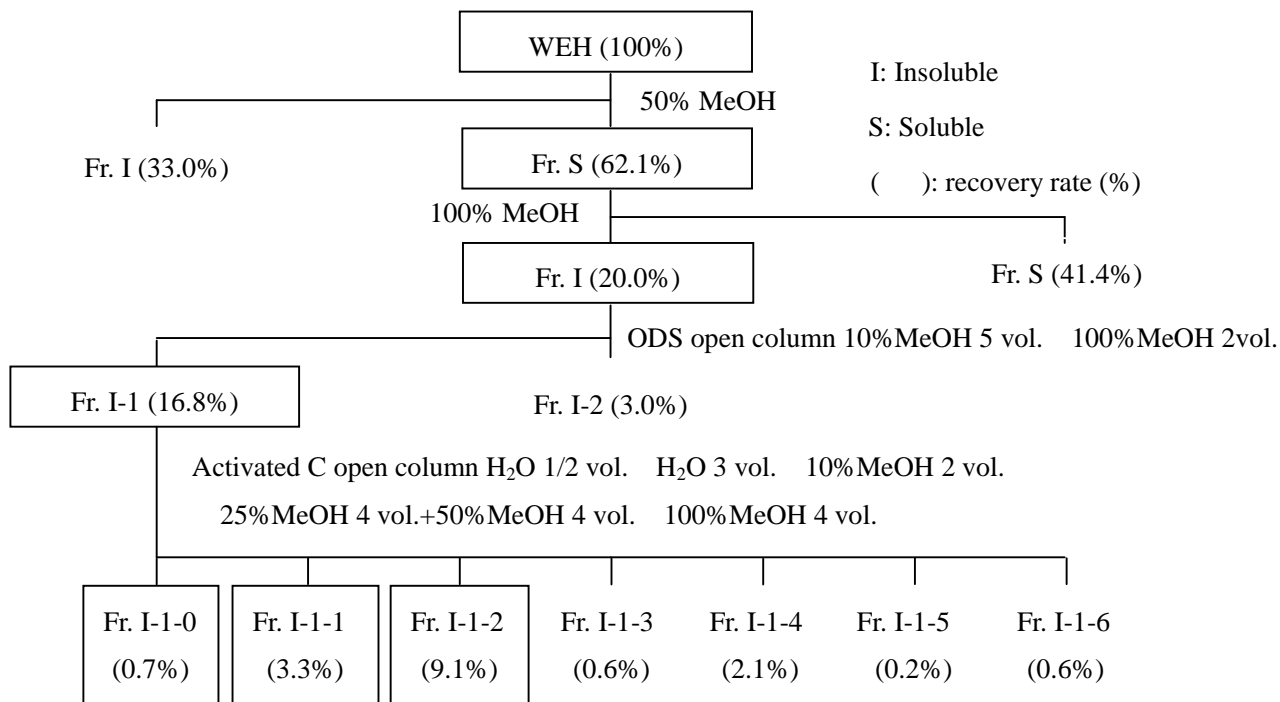
**Fig. 20 Effect of Combined Application of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) and CuSO<sub>4</sub> on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Glycerol Level after Oral Administration of Glycerol in Mice**

Distilled water (20 ml/kg), and CuSO<sub>4</sub> (50 and 200 μmol/kg), and WEH (500 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, LC, HC, and WEH groups with glycerol (0.6 ml/kg). Level of total absorbed glycerol was evaluated using the AUC in Fig. 19. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



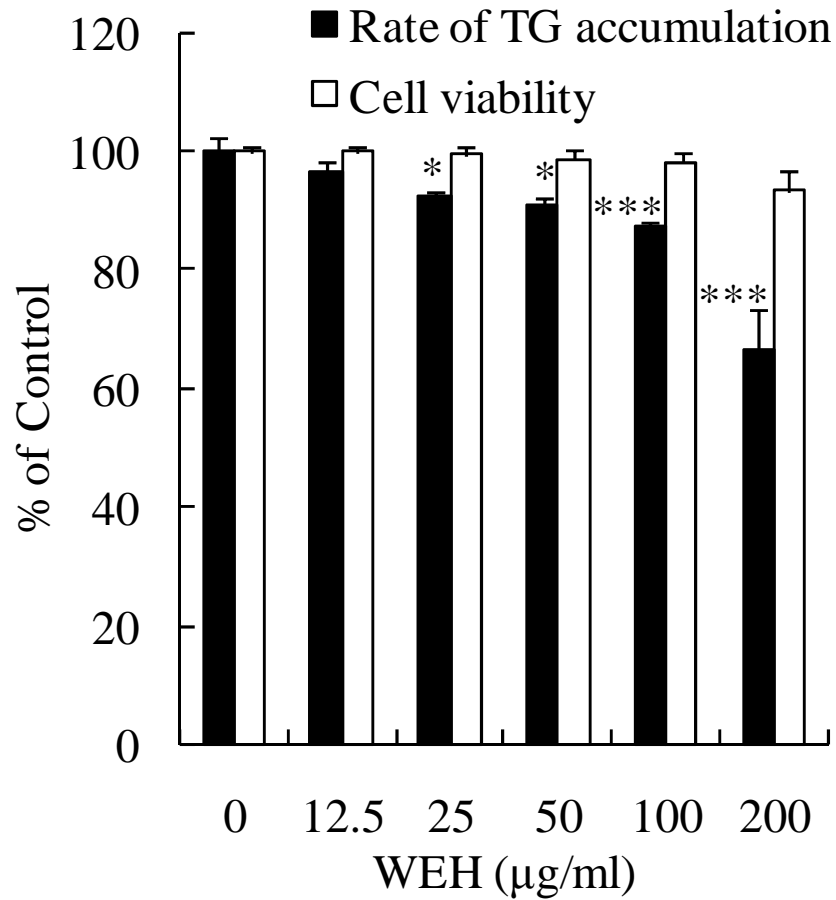
**Fig. 21 Fraction Scheme and Structure of Inhibitors of Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Absorption in Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH)**

Fractions containing inhibitors of NEFA absorption were enclosed with squares. The yield of each Fraction was shown in parenthesis. The inhibitory activity was confirmed by oleic acid-loading test in mice.



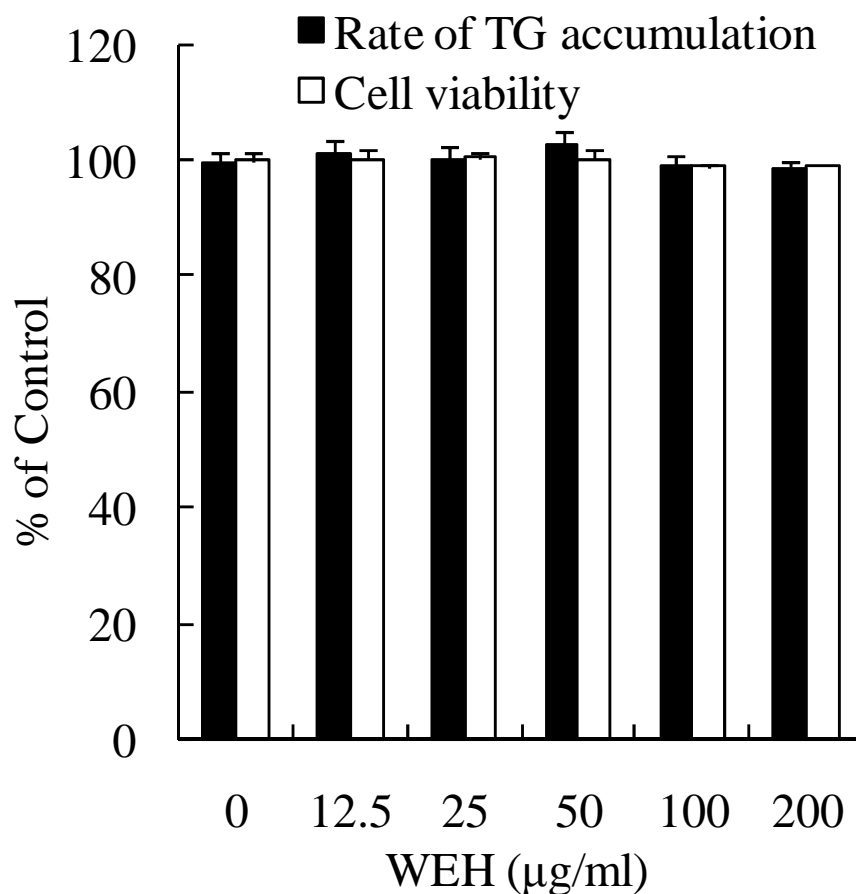
**Fig. 22 Fraction Scheme of Inhibitors of Glycerol Absorption in Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH)**

Fractions containing inhibitors of glycerol absorption were enclosed with squares. The yield of each Fraction was shown in parenthesis. The inhibitory activity was confirmed by glycerol-loading test in mice.



**Fig. 23 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Triglyceride (TG) accumulation and Cell Viability in 3T3-L1 Adipocyte**

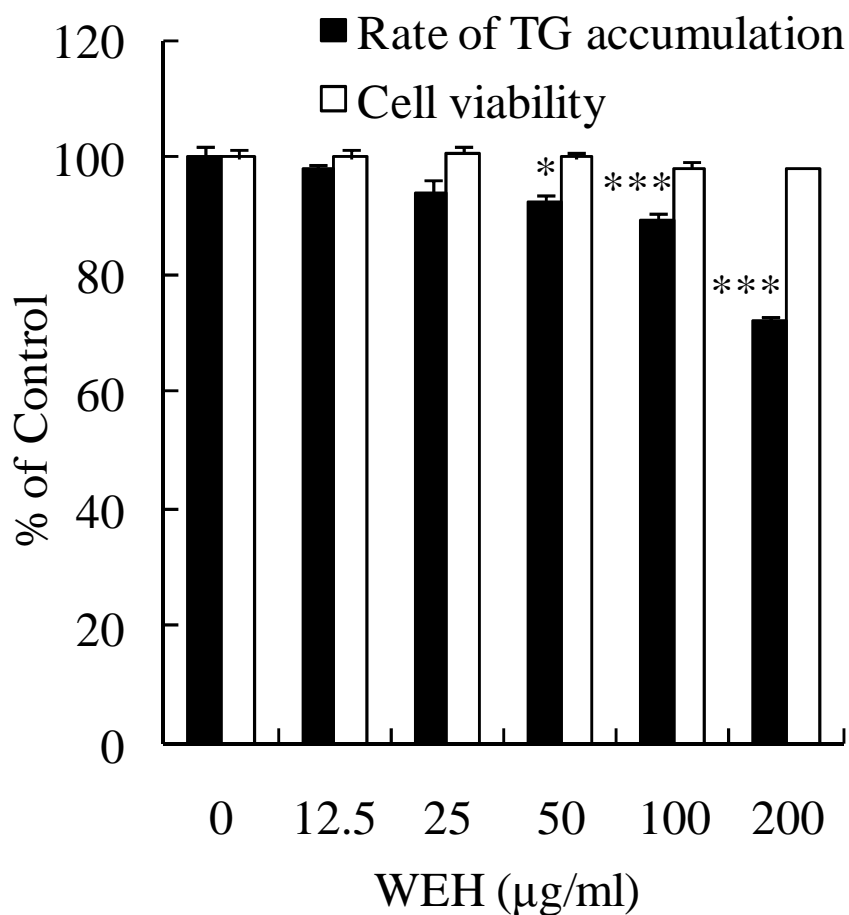
Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 12 days. TG accumulation and cell viability were respectively evaluated using oil red O staining and MTT assay. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control (WEH 0 µg/ml) group.



**Fig. 24 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Triglyceride (TG) accumulation and Cell Viability in 3T3-L1 Adipocyte during Differentiation-Induced Process**

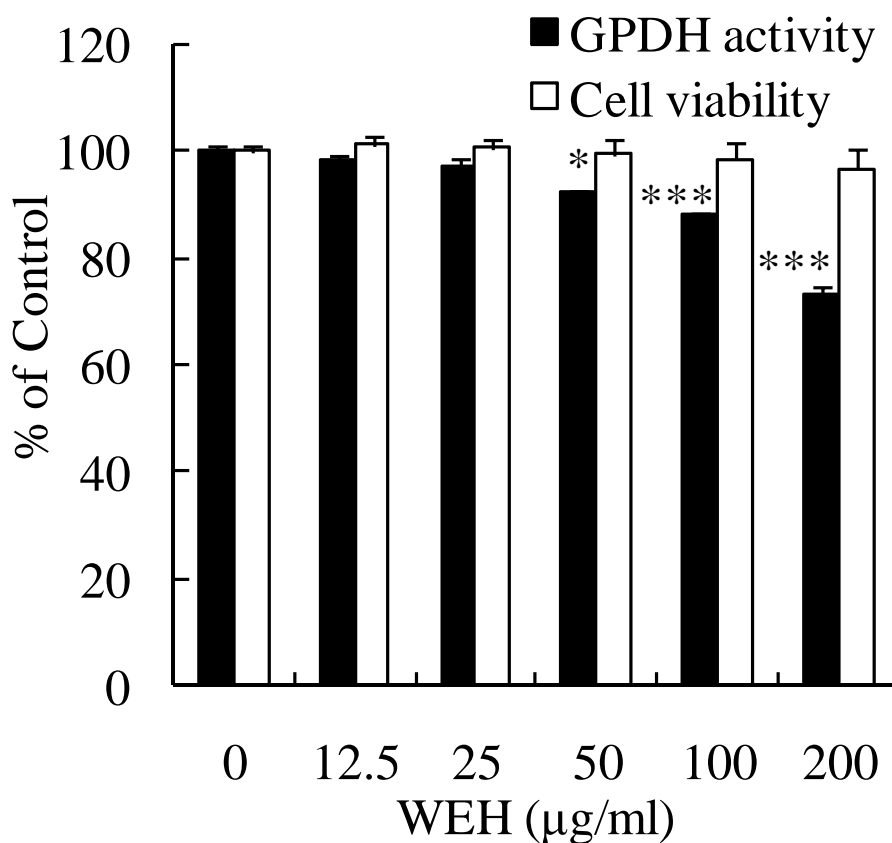
Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10 µg/ml insulin without WEH for 12 days. TG accumulation and cell viability were respectively evaluated using oil red O staining and MTT assay. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E.





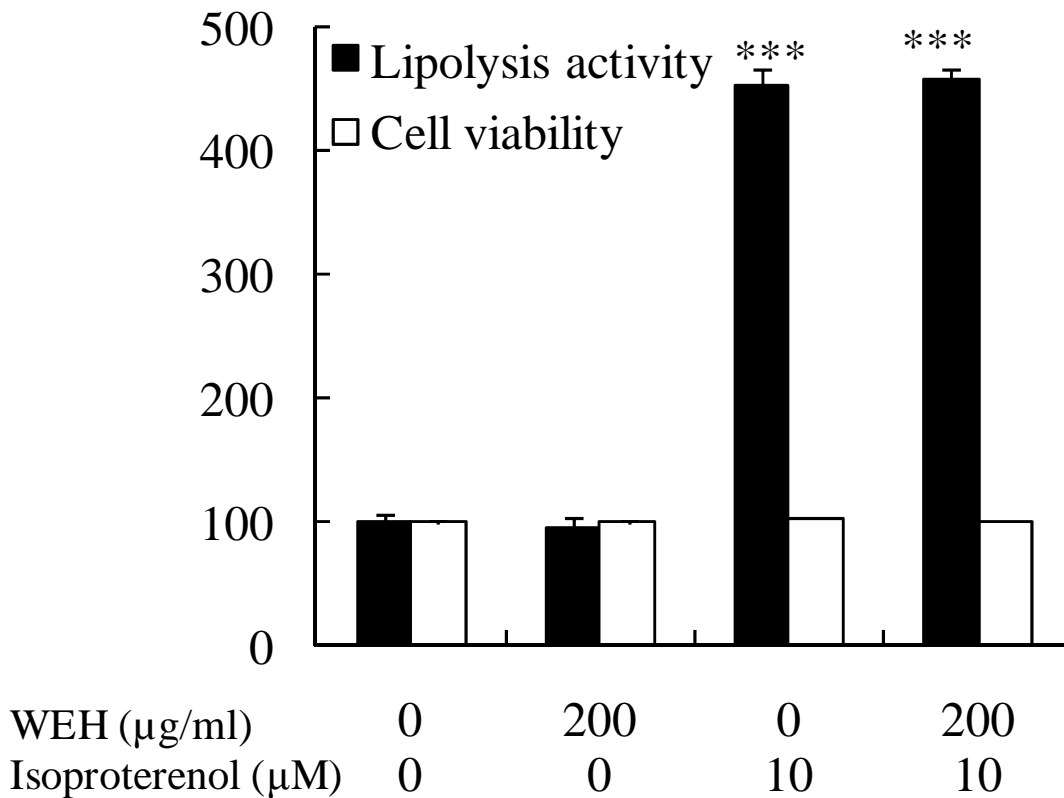
**Fig. 25 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Triglyceride (TG) accumulation and Cell Viability in 3T3-L1 Adipocyte after Differentiation-Induced Process**

Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 µg/ml insulin without WEH for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 12 days. TG accumulation and cell viability were respectively evaluated using oil red O staining and MTT assay. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control (0 µg/ml).



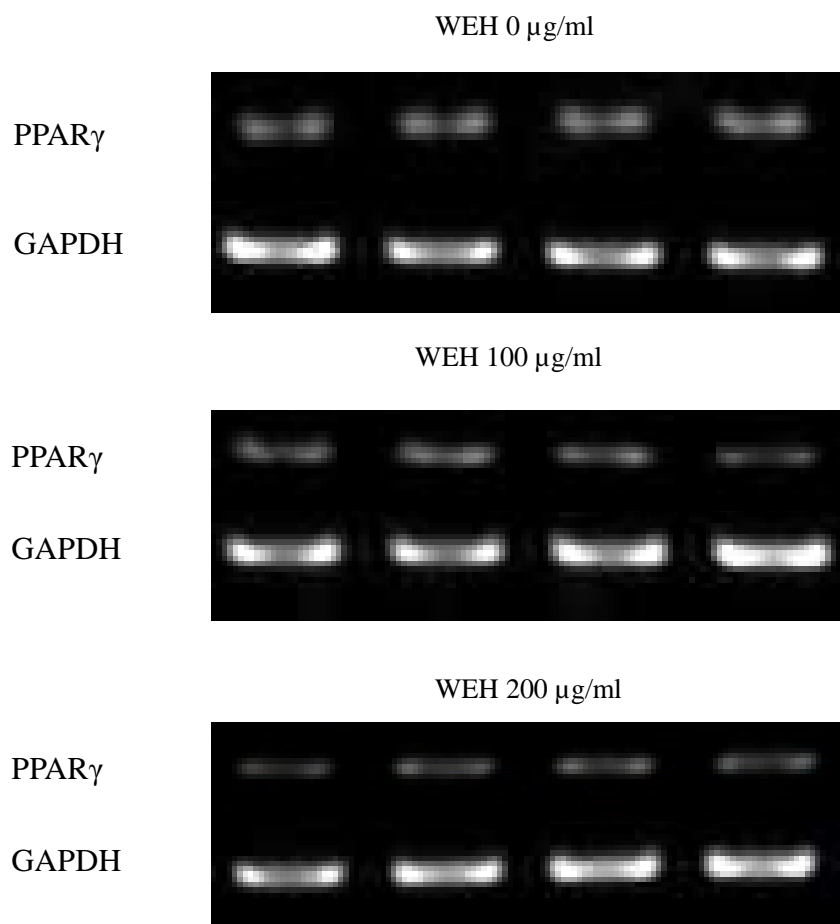
**Fig. 26 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) and Cell Viability in 3T3-L1 Adipocyte**

Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 12 days. GPDH activity and cell viability were respectively evaluated using GPDH Activity Measurement Kit and MTT assay. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control (0 µg/ml) group.



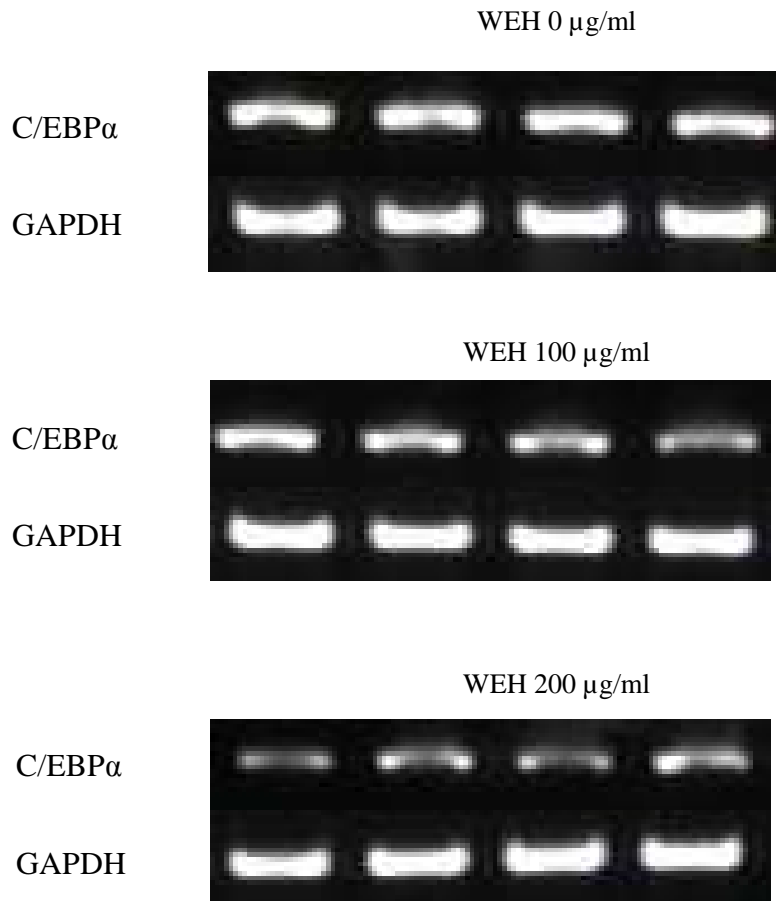
**Fig. 27 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on Lipolysis Activity and Cell Viability in Matured 3T3-L1 Adipocyte**

Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10 µg/ml insulin with or without WEH (12.5-200 µg/ml) for 12 days. Lipolysis activity and cell viability were respectively evaluated using glycerol measurement by Free Glycerol Reagent and MTT assay. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control (0 µg/ml WEH and 0 µM isoproterenol) group.



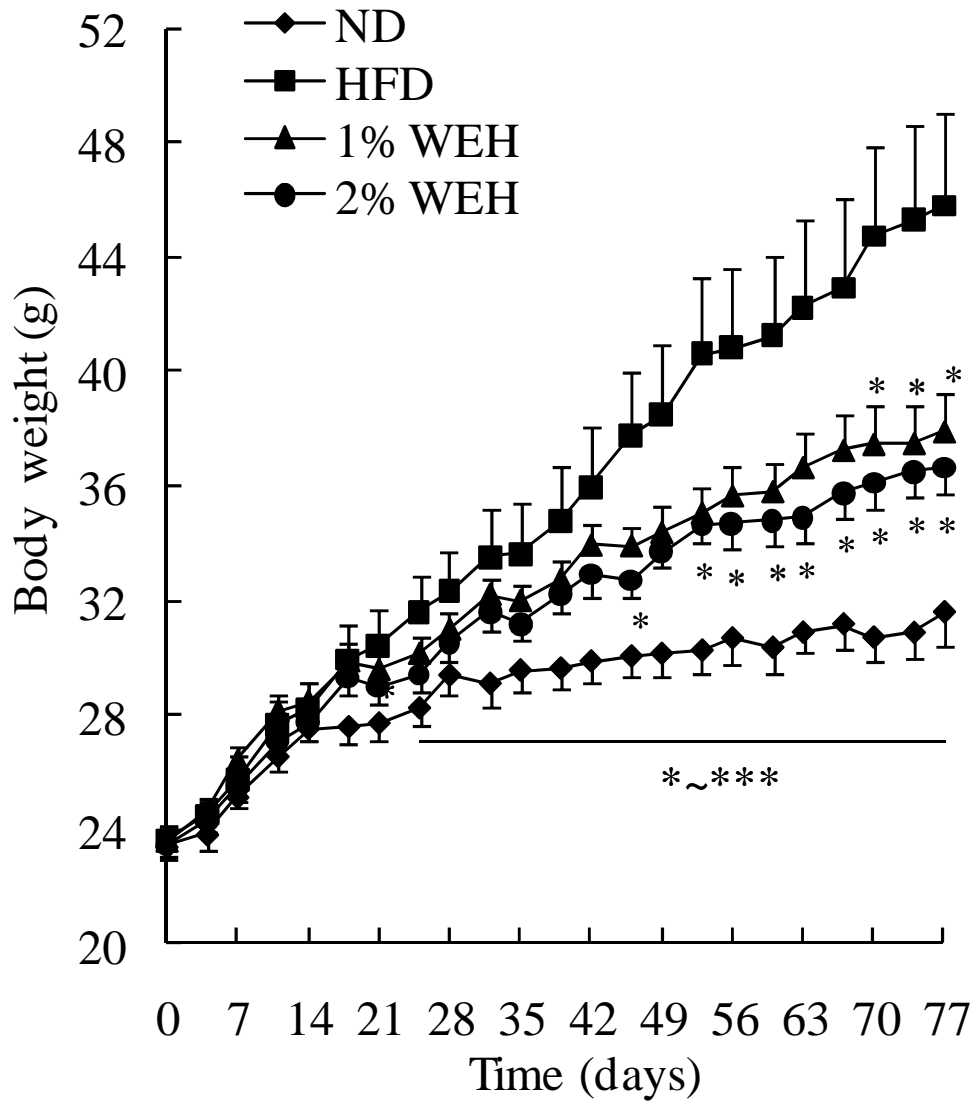
**Fig. 28 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on PPAR $\gamma$  mRNA Expression in 3T3-L1 Adipocyte**

Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin with or without WEH (100 and 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin with or without WEH (100 and 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 6 days. Expression of PPAR $\gamma$  and, a kind of housekeeping gene, GAPDH mRNAs were measured by RT-PCR.



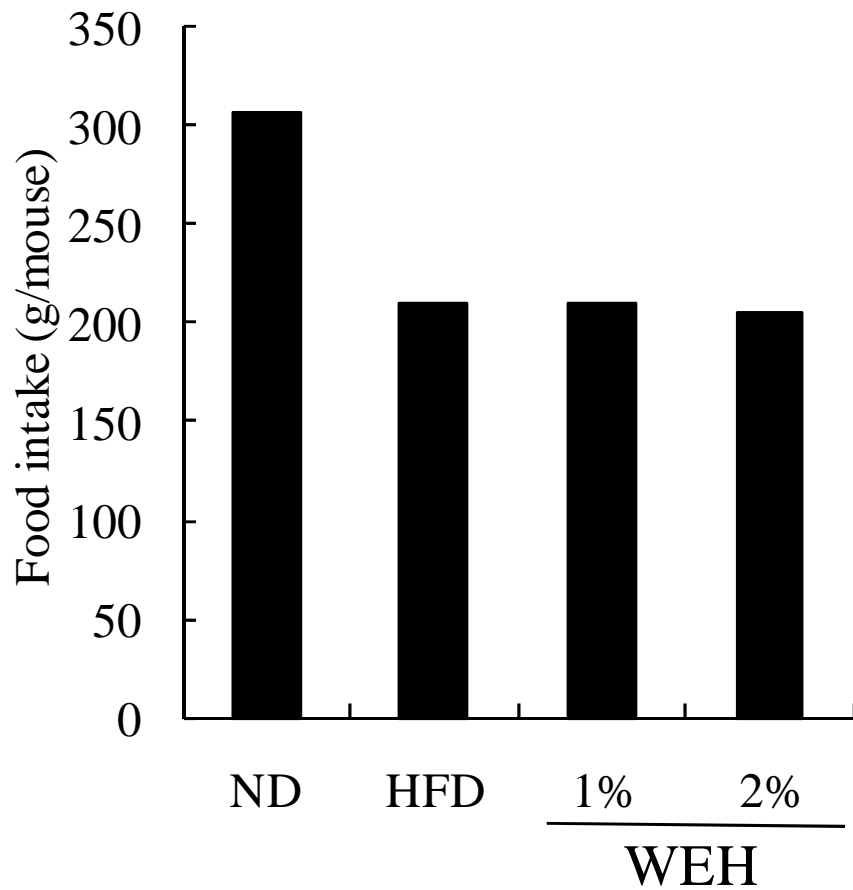
**Fig. 29 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on C/EBP $\alpha$  mRNA Expression in 3T3-L1 Adipocyte**

Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin with or without WEH (100 and 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin with or without WEH (100 and 200  $\mu\text{g/ml}$ ) for 6 days. Expression of C/EBP $\alpha$  and GAPDH mRNAs were measured by RT-PCR.



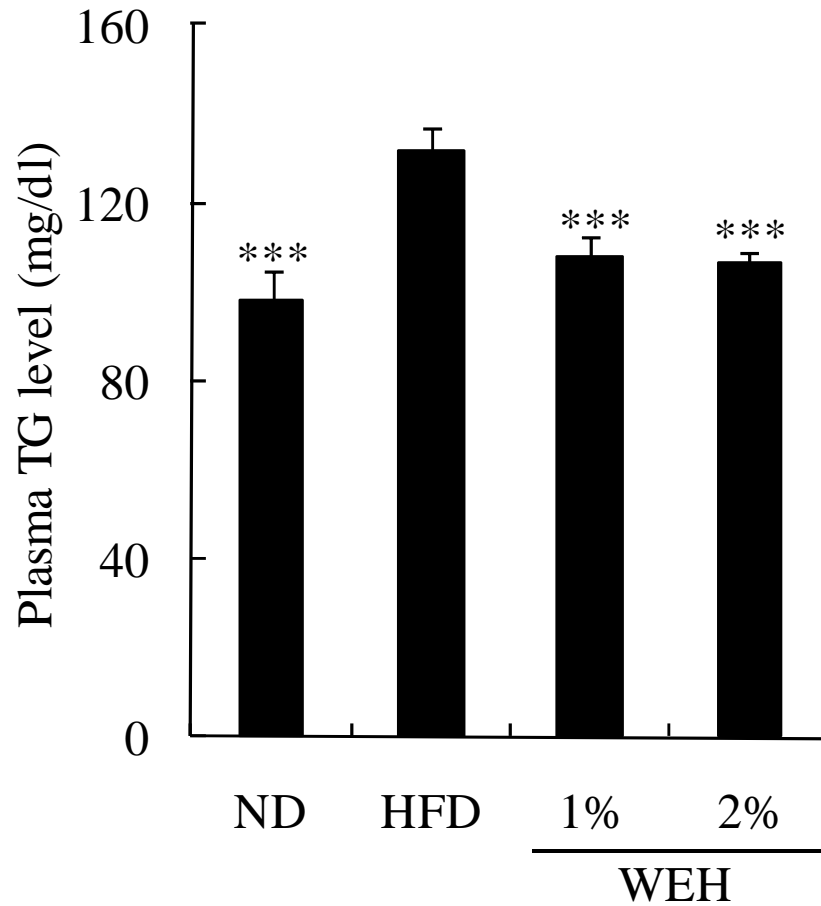
**Fig. 30 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Body Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. Body weight was measured twice a week. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



**Fig. 31 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Food Intake in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

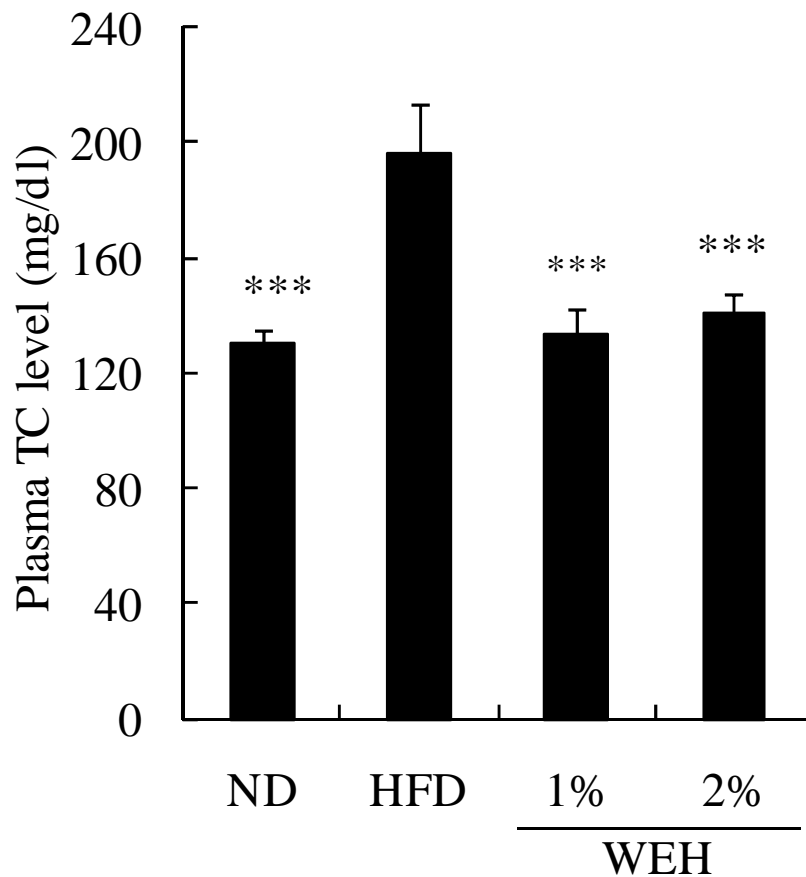
Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. Food intake was measured twice a week.



**Fig. 32 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Plasma Triglyceride (TG) Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

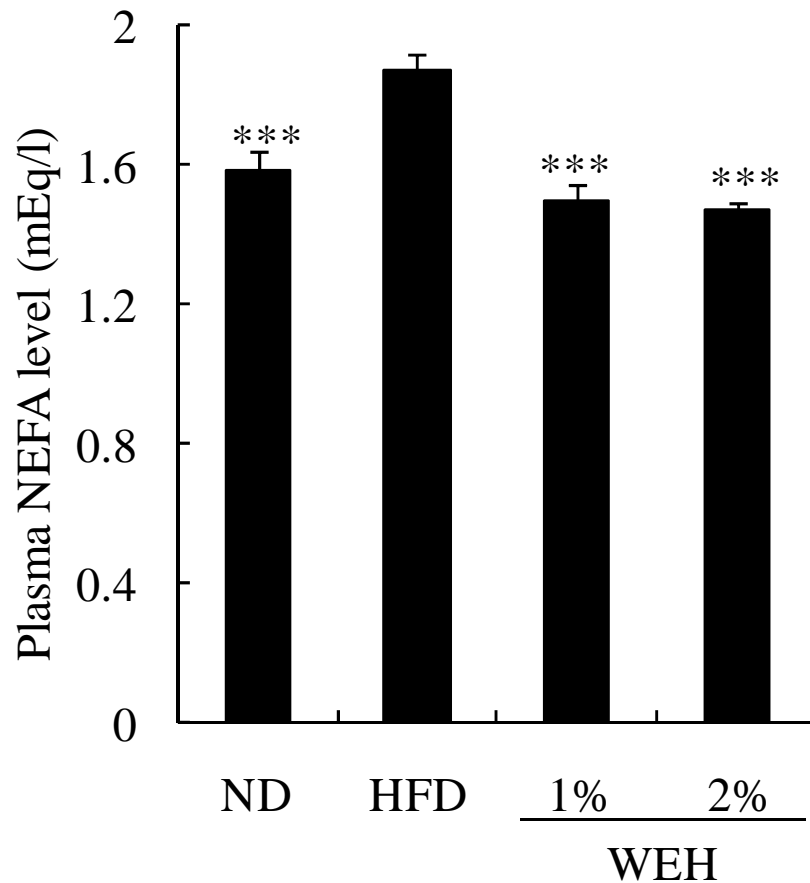
Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After these diets had been fed to the mice for 11 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma TG level was measured using Triglyceride E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.





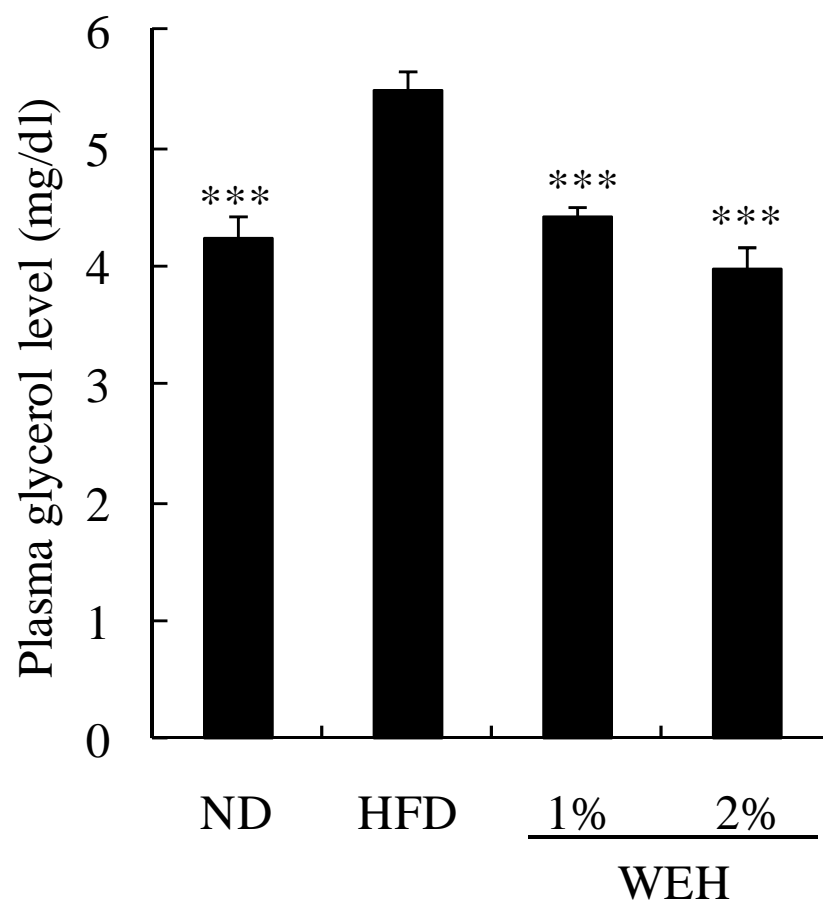
**Fig. 33 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Plasma Total Cholesterol (TC) Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After these diets had been fed to the mice for 11 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma TC level was measured using Cholesterol E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



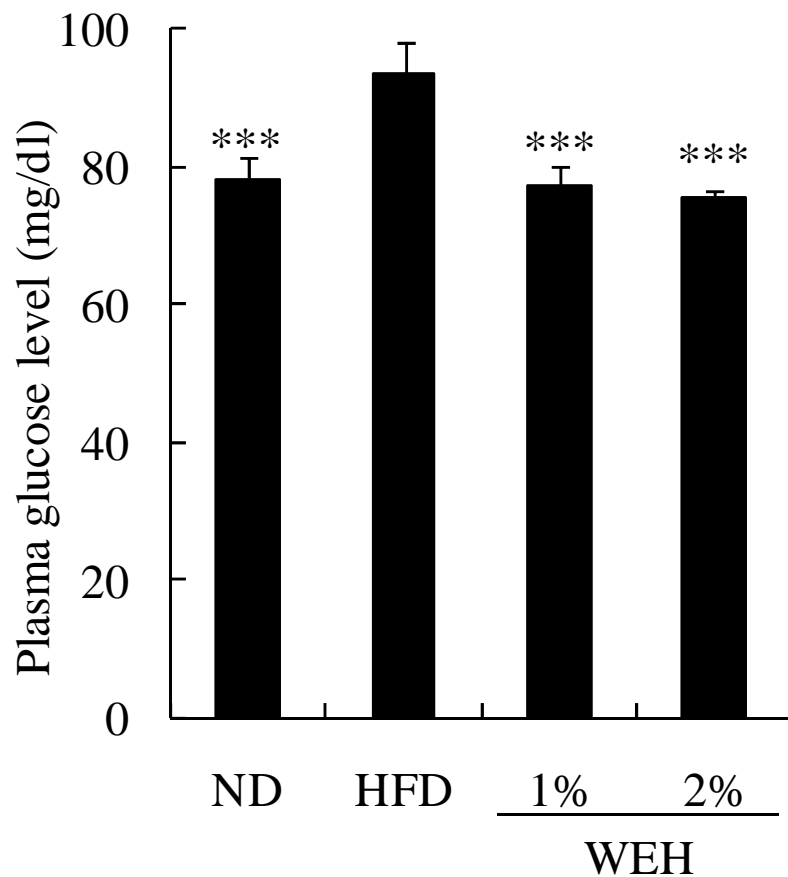
**Fig. 34 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Plasma Nonesterified Fatty Acid (NEFA) Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After these diets had been fed to the mice for 11 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma NEFA level was measured using NEFA C-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



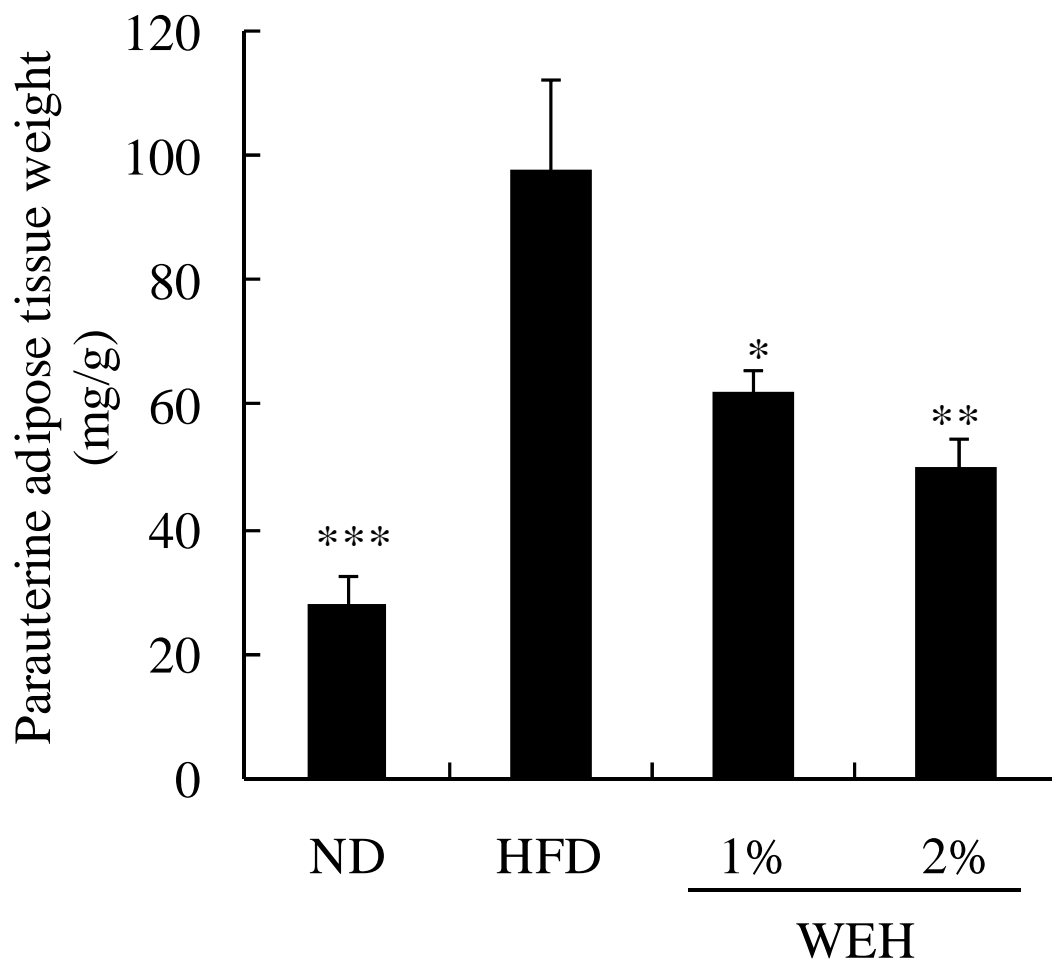
**Fig. 35 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Plasma Glycerol Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After these diets had been fed to the mice for 11 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma glycerol level was measured using Free Glycerol Reagent. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



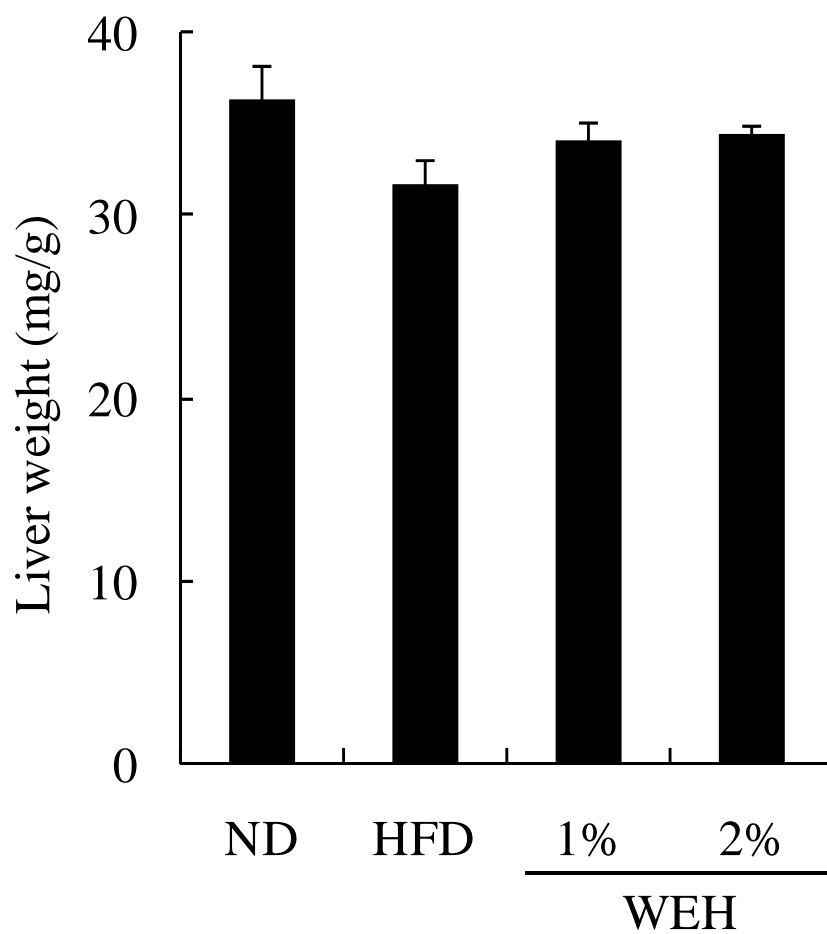
**Fig. 36 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Plasma Glucose Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After these diets had been fed to the mice for 11 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma glucose level was measured using Glucose C-II Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



**Fig. 37 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb Leaves (WEH) on the Parauterine Adipose Tissue Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the parauterine adipose tissue was dissected and weighed. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.

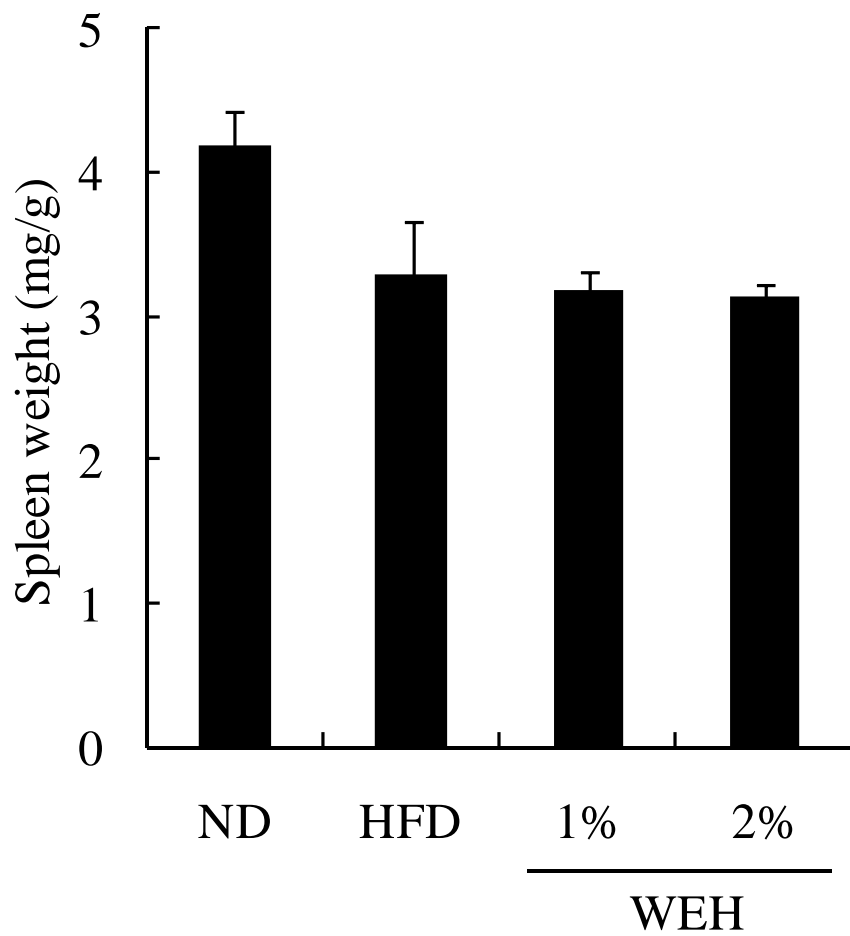


**Fig. 38 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb leaves (WEH) on the Liver Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4.

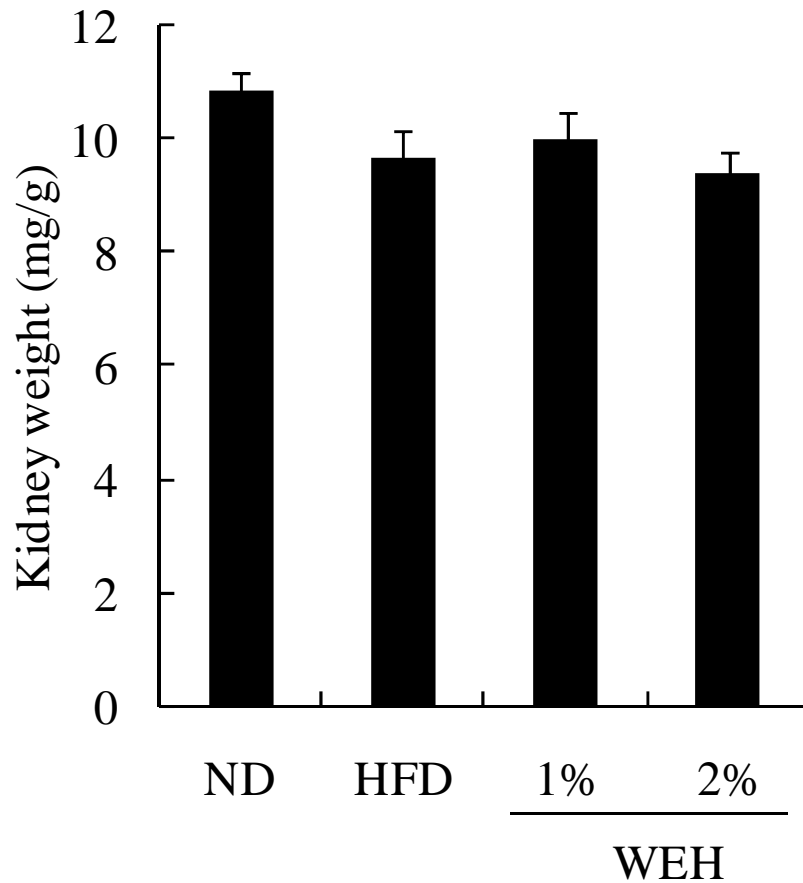
After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the liver was dissected and weighed.

Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E.



**Fig. 39 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb leaves (WEH) on the Spleen Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

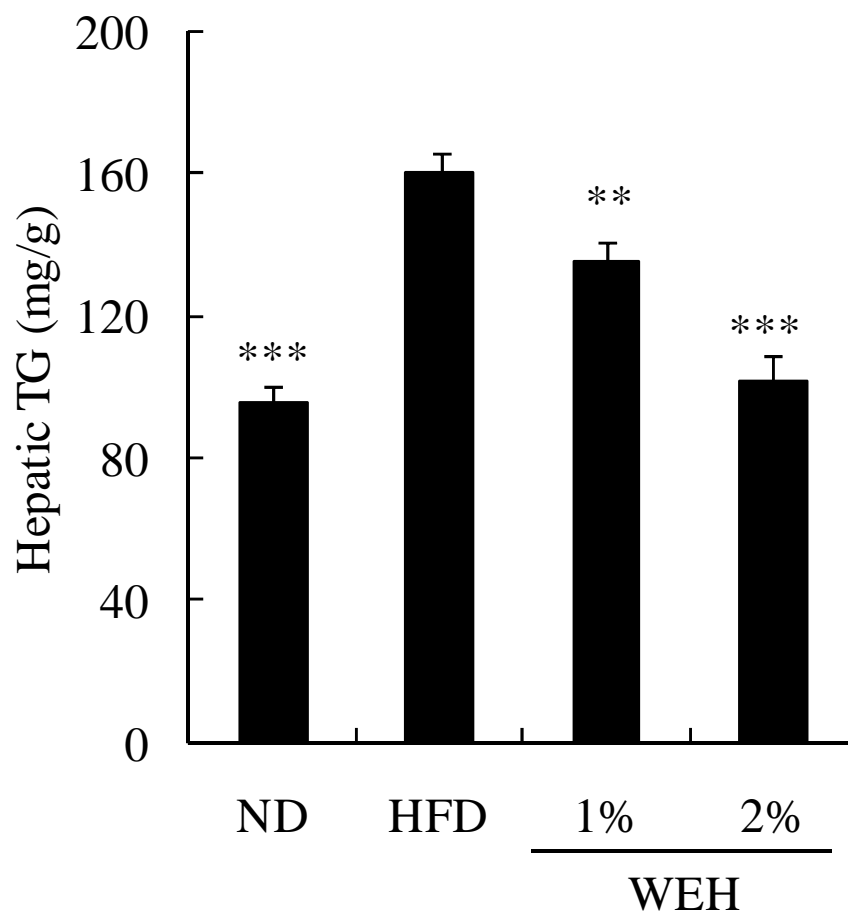
Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the spleen was dissected and weighed. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E.



**Fig. 40 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb leaves (WEH) on the Kidney Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

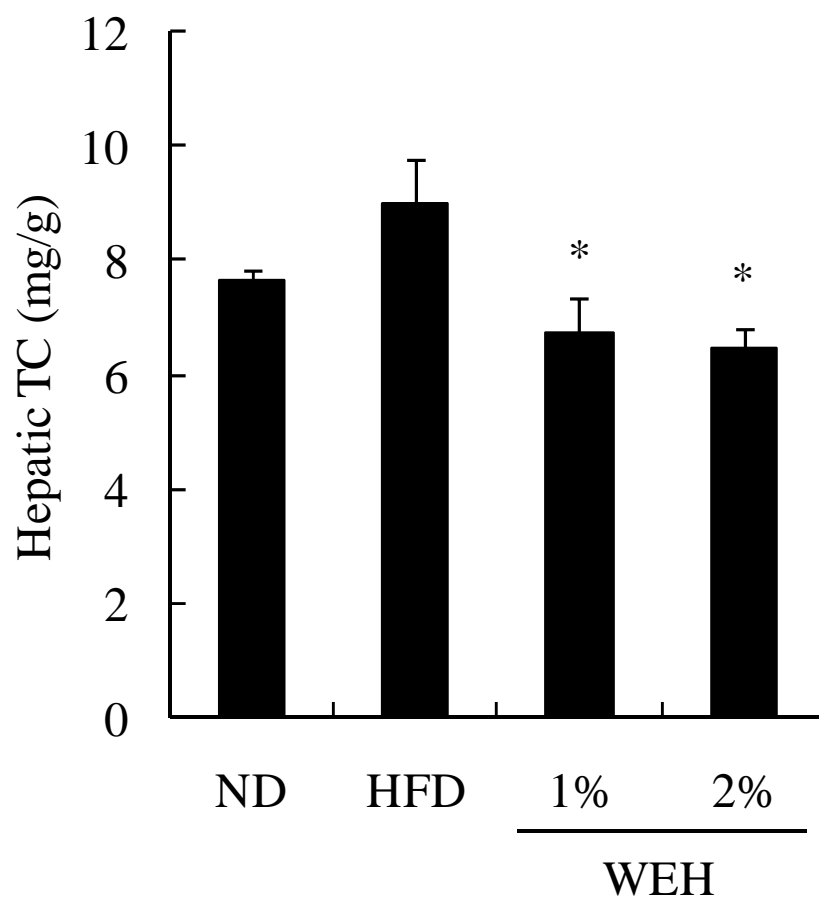
Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the kidney was dissected and weighed. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E.





**Fig. 41 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb leaves (WEH) on the Hepatic Triglyceride (TG) Content in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the liver was dissected and weighed. Lipids were extracted using Folch solution (chloroform : methanol = 2 : 1) from liver. Hepatic TG was measured using Triglyceride E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



**Fig. 42 Effect of Water Extract of *Houttuynia cordata* Thunb leaves (WEH) on the Hepatic Total Cholesterol (TC) Content in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% WEH, and 2% WEH groups were given diets shown in Table 4.

After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the liver was dissected and weighed.

Lipids were extracted using Folch solution (chloroform : methanol = 2 : 1) from liver. Hepatic TC was

measured using Cholesterol E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$  vs. the

HFD group.

**Table 4. Composition of Mouse Diets in the Anti-Obesity Test of WEH**

Ingredient	Group			
	ND	HFD	1% WEH	2% WEH
$\beta$ -Cornstarch	465.692	105.692	105.692	105.692
$\alpha$ -Cornstarch	155	155	155	155
Milk casein	140	140	140	140
Sucrose	100	100	100	100
Beef tallow	40	400	400	400
Cellulose	50	50	40	30
Mineral mix	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10
L-Cystine	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008
WEH	0	0	10	20

ND, normal diet; HFD, high-fat diet; WEH, water extract of *Houttuynia cordata* Thunb

leaves. All values are in g/kg of diet.

**Table 5. Organ Weight of the Obese Mice Induced by HFD ( $n = 8$ )**

	ND	HFD	1% WEH	2% WEH
Liver (mg/g of body weight)	36.4 $\pm$ 1.8	31.8 $\pm$ 1.3	33.9 $\pm$ 1.2	33.9 $\pm$ 1.2
Spleen (mg/g of body weight)	4.17 $\pm$ 0.25	3.28 $\pm$ 0.37	3.17 $\pm$ 0.14	3.13 $\pm$ 0.09
Kidney (mg/g of body weight)	10.9 $\pm$ 0.3	9.6 $\pm$ 0.5	10.0 $\pm$ 0.4	9.4 $\pm$ 0.4

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 1% and 2% water extract of *Houttuynia cordata* Thunb leaves (WEH) groups were given diets shown in Table 4. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the organs was dissected and weighed. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.

## 第3章 とろろ昆布の抗肥満作用

### 3.1. はじめに

とろろ昆布は、日本の伝統的な昆布加工食品である。本章では、削られていない昆布粗粉碎物と比較しながら、とろろ昆布の TG 吸収抑制作用や膵リパーゼ阻害活性、抗肥満作用を評価し、膵リパーゼ阻害活性を有する成分の推定を試みた。

### 3.2. 実験方法

#### 3.2.1. 試薬

使用した試薬は、2.1.1.で示したものをを用いた。

#### 3.2.2. 実験動物

実験動物は日本エスエルシー株式会社から購入した Slc:ddY マウスと SD ラットを用いた。実験動物の飼育条件と取り扱いに関しては、2.2.2.に従って実験を行った。

#### 3.2.3. 実験試料の調製

とろろ昆布はフジッコ株式会社から提供していただいた。また、とろろ昆布と比較するために、同じ原料(マコンブ約 80%、リシリコンブ約 20%)からなる削られていない昆布粗粉碎物を用いた。とろろ昆布は、50°C で 3 時間の常圧加熱により乾燥し、ミルで粉碎した粉末をメッシュでふるい、粒子径を 425 $\mu$ m ~ 600 $\mu$ m にそろえたものを、また、昆布粗粉碎物は、昆布の削る前のものを同様にして粒子径を 425 $\mu$ m ~ 600 $\mu$ m にそろえたものをサンプルとして用いた。また、とろろ昆布と昆布粗粉碎物はこれ以降便宜上 TK と NSK と略記することにした。

#### 3.2.4. TG 負荷試験

6 週齢、雌性の SD ラットを標準飼料で 1 週間予備飼育した後、24 時間絶食させて実験を行った。平均体重がほぼ等しくなるように、コントロール群(Control)、NSK 投与群(NSK)、TK 投与群(TK)の 3 群に分け( $n=8$ )、それぞれ蒸留水(20 ml/kg)、NSK (1,000 mg/20 ml/kg)、TK(1,000 mg/20 ml/kg)を強制経口投与した後、すぐにコーン油(5 ml/kg)を強制経口投与した。投与開始直前(0 時間目)と投与開始後 1 時間、あるいは 2 時間おきに尾採血を 10 時間目まで行った。採血した血液は 1,400 $\times$ g で 1 分間遠心分離した。血中 TG 値は、遠心分離して得られた血漿を用いて、トリグリセライド E-テストワコーで測定した。

### 3.2.5. リパーゼ活性阻害の測定

リパーゼ阻害活性試験は、2.1.5.に示したように、Lipase Kit S を用いて測定し、実験スケールは 2.1.5. の 10 倍量のスケールで行った。

### 3.2.6. 活性成分の分画

TK と NSK は弱アルカリ性のリン酸緩衝液(pH 7.4) で可溶画分(AS)と不溶画分に分けた。また、同様に、蒸留水で可溶画分(WS)と不溶画分に分けた。まず、2.5 g のサンプルに緩衝液を 50 ml 加えて、37°C、振とう速度 135 rpm で 30 分間インキュベートした。このサンプル懸濁液を 1,2000×g、20°C で 30 分間遠心分離し、上清と残渣に分けた。残渣に蒸留水を加えて全容量を 50 ml とし、よく攪拌させて、残渣懸濁液を 1,2000×g、20°C で 30 分間遠心分離して、再び上清と残渣に分けた。この洗浄操作は 2 回繰り返した。上清を凍結乾燥したものをリン酸緩衝液可溶画分とし、重量を測定した。この画分はカルバゾール法によるウロン酸定量、リパーゼ阻害活性試験まで、-20°C で保管した。

### 3.2.7. カルバゾール法<sup>201)</sup>

TK、あるいは、NSK の弱アルカリ性のリン酸緩衝液可溶画分(TK AS、NSK AS)に含まれるアルギン酸を定量するために、カルバゾール法によるウロン酸量の測定を行った。リン酸緩衝液可溶画分を 200 ml の蒸留水でよく溶かして、その溶解液を 1 ml 採って、冷却水中で 5 ml の四ホウ酸ナトリウム (95 mg/ml)を含む硫酸と混合させた。混合液を 100°C で 15 分間反応させて、冷却後に 0.2 ml の 0.125% カルバゾール溶液を加えた。2 時間後、550 nm の吸光度を測定した。また、検量線作成のために、D-グルクロン酸を用いた。

### 3.2.8. 高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験

4 週齢、雌性 Slc:ddY マウスを標準食で 1 週間予備飼育した後、各群平均体重がほぼ等しくなるように、群分けを行った。飼料は AIN-93M を基準にして作製した<sup>182)</sup>。標準食群(ND)、高脂肪食群(HFD)、3%NSK を含む高脂肪食群(NSK)、3%TK を含む高脂肪食群(TK)の 4 群に群分けし、Table 6 に示した飼料を与え、63 日間飼育を行った。飼育条件と血中の脂質パラメータや各組織・臓器重量の測定は 2.1.19 に従って行った。

### 3.2.9. 肝臓中の脂質の抽出

2.1.20.に示したように、-20°C で保存しておいた肝臓から Folch 法<sup>183)</sup>によって脂質を抽出した。

### 3.2.10. 統計処理

各値は平均値±標準誤差で表した。有意差検定は one-way ANOVA 検定後のダネット検定で評価し、*p* 値が 0.05 未満であるとき、有意差があると評価した。

### 3.3. 結果

#### 3.3.1. TG 吸収抑制作用とそのメカニズム

TK 1,000 mg/kg 投与群(TK)と NSK 1,000 mg/kg 投与群(NSK)はコントロール群(Control)と比較して、それぞれ投与後 3~8 時間で、投与後 4~6 時間で血中 TG 値の上昇を有意に抑制した(Fig. 43)。Fig. 43 より AUC を算出し評価すると、TK 群の AUC はコントロール群と比較して有意に低下した(Fig. 44)。また、NSK 群の AUC はコントロール群と比較して低くなる傾向がみられ、TK 群の AUC は NSK 群と比較して低くなる傾向がみられた。

次に、TK の TG 吸収抑制作用のメカニズムを解明するため、膵リパーゼ活性に及ぼす影響について確認したところ、TK (1 mg/ml)、あるいは、NSK (1 mg/ml)の処理によって、コントロールよりも有意にリパーゼ活性が低下した(Fig. 45)。また、TK は NSK よりも有意にリパーゼ活性を低下させた。

#### 3.3.2. TG 吸収抑制作用を有する活性成分の分画と推定

TK から弱アルカリ緩衝液で溶出される全成分量とアルギン酸量(TK AS)は、NSK から弱アルカリ緩衝液で溶出される量(NSK AS)と比較して、それぞれ 1.11 倍、1.29 倍の量が有意に溶出された(Fig. 46、47)。TK AS と NSK AS の処理によって、コントロールよりもリパーゼ活性が有意に低下した(Fig. 48)。また、TK AS の処理の方が NSK AS よりもリパーゼ活性が有意に低値を示した。

TK WS はコントロールとの間でリパーゼ活性に変化がなかったが、TK AS はコントロール、さらには、TK WS よりも有意にリパーゼ活性が低値を示した(Fig. 49)。

#### 3.3.3. 抗肥満作用

まず、高脂肪食を摂取させることにより、肥満モデルマウスを作製し、餌に TK や NSK を混合することにより、体重と食餌摂取量に及ぼす影響について検討を行った。高脂肪食群(HFD)は試験開始後 4 日目以降で、標準食群(ND)と比較して有意に体重が増加した(Fig. 50)。3% TK を含む高脂肪食群(TK)は HFD 群と比較して、試験開始後 59、63 日目で有意に体重の増加が抑制されたが、3% NSK を含む高脂肪食群(NSK)と HFD 群との間で体重に有意差はみられなかった。食餌摂取量では、HFD 群、NSK 群、TK 群の 3 群間でほとんど変化なかった(Fig. 51)。

次に、絶食時におけるマウスの脂質関連の血中パラメータを測定した。血中 TG 値では、HFD 群と ND 群、NSK 群、TK 群との間で有意差はみられなかったが、TK 群の血中 TG 値は、NSK 群と比較して、有意に低値を示した(Fig. 52)。また、血中 TC 値では、TK 群と NSK 群は HFD 群と比較して有意に低下しており、さらに TK 群は NSK 群と比較して、有意に低値を示した(Fig. 53)。

また、解剖を行い、マウスの各臓器・組織の重量を測定した。HFD 群の傍子宮脂肪組織重量は ND 群と比較して有意に増加した(Fig. 54)。TK 群は HFD 群と比較して有意に傍子宮脂肪組織重量が減少したが、NSK 群と HFD 群との間で傍子宮脂肪組織重量に有意差はみられなかった。また、TK 群は NSK 群と比較して、有意に傍子宮脂肪組織重量が低値を示した。TK 群の肝臓重量は HFD 群と比較

して有意に傍子宮脂肪組織重量が減少した(Table 7)。脾臓重量に関しては、4群間で差がみられなかった。腎臓重量では、HFD群はND群と比較して有意に減少しており、TK群はHFD群と比較して有意に増加した。

さらに、肝臓中の脂質量を測定した。肝臓中のTG量については、HFD群はND群と比較して有意に増加した(Fig. 55)。TK群はHFD群と比較して肝臓中のTG量が有意に減少したが、NSK群とHFD群との間で肝臓中のTG量に有意差はみられなかった。肝臓中のTC量は、4群間で変化がみられなかった(Fig. 56)。

### 3.4. 考察

TKは製造工程の中で、切削という工程を経て、非常に薄く削られている。この切削工程で昆布が薄く削られることで、本来昆布が保持している有効成分が、消化管内で溶出しやすくなり、生理活性も高まるものと推察した。また、食用昆布では、多くの生理活性作用が知られているが、TG吸収抑制作用や抗肥満作用に関する報告はない。したがって、TKの研究では、削られていないNSKと活性の強さを比較しながら、TKのTG吸収抑制作用と抗肥満作用について検討した。

Fig. 43、44より、TKはコーン油負荷時における血中TG値の上昇を抑制することがわかった。また、Fig. 43において、TK群はすべての測定点でNSK群の血中TG値の平均値は低く、Fig. 44において、NSK群のAUCはコントロール群と比較して低くなる傾向しかみられなかったのに対し、TK群のAUCはコントロール群と比較して有意に低下した。さらに、TK群のAUCはNSK群と比較して低くなる傾向が見られた。これらの結果からTKはNSKよりもコーン油負荷時における血中TG値の上昇をより顕著に抑制することがわかった。

また、TKの血中TG値上昇抑制作用のメカニズムを解明するために、まずは、膵リパーゼ阻害活性を確認した(Fig. 45)。TKは膵リパーゼ活性を阻害し、また、NSKよりも有意に膵リパーゼ活性を低下させることがわかった。したがって、TKは膵リパーゼ活性を阻害することで、TGの分解を抑制し、腸管からのTGの吸収を抑制していると考えられる。

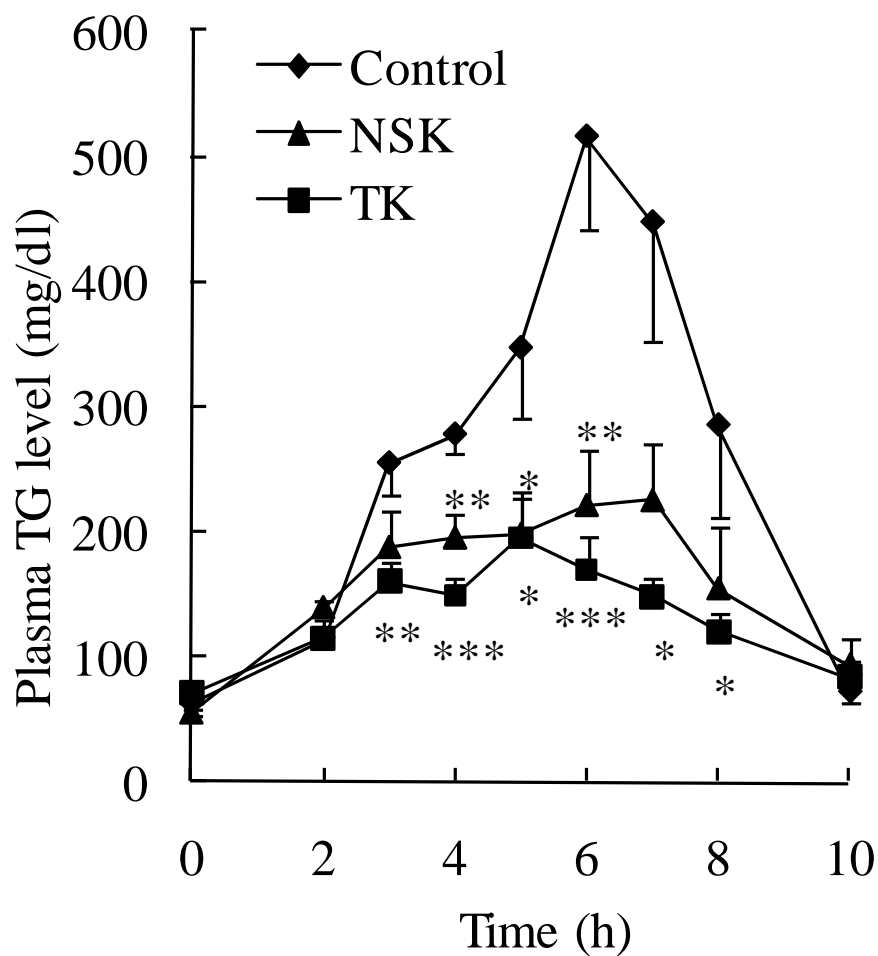
とろろ昆布の膵リパーゼ活性阻害作用は、溶出してくる成分量に関係していると考えられた。膵リパーゼが主に働いている部位は小腸であり、小腸内のpHは弱アルカリ性であるため、TKとNSKからpH 7.4のリン酸緩衝液中に溶出される全成分量を測定した(Fig. 46)。その結果、TKからの溶出成分の方がNSKよりも有意に多かった。また、昆布には多くの生理活性物質が含まれており、その中でも、最も知られている有効成分として、アルギン酸塩がある。アルギン酸塩はコレステロールの排泄作用を有することが報告されている<sup>202)</sup>。また、アルギン酸塩を含む水溶性食物繊維は、粘度を増強させてミセルの乳化状態を悪化させ、リパーゼ活性を阻害する可能性が考えられている<sup>203)</sup>。したがって、アルギン酸に焦点を当てて、TKとNSKからの溶出成分に含まれるアルギン酸塩の量を測定したところ、TKからの溶出アルギン酸塩の量の方がNSKよりも有意に多かった(Fig. 47)。これらの溶出量増加の理由として、TKは切削工程によって、薄く削られて細胞が破壊されているため、



表面積が増大し、成分が溶出しやすくなったことが考えられる。また、TK の NSK に対するアルギン酸塩量の比率は、全溶出成分量と比較して大きくなった。これは、アルギン酸塩が、相対的に他の成分よりも多く溶出されていることを示しており、このことが、TK の TG 吸収抑制作用にも関与していると考えられる。また、TK と NSK の弱アルカリ可溶画分(AS)の腓リパーゼ阻害活性を確認したところ、TK AS は腓リパーゼ活性を阻害し、NSK AS よりもその阻害活性が強力であり(Fig. 48)、さらに、Fig. 45 と Fig. 48 を見比べると NSK と NSK AS、あるいは TK と TK AS がほぼ同等のリパーゼ阻害活性をもっていることがわかる。したがって、AS にリパーゼ阻害活性をもつ主な成分が含まれていると考えられる。また、TK の水可溶画分(WS)と TK AS のリパーゼ阻害活性を比したところ、TK WS には有意な腓リパーゼ阻害活性が確認できなかったが、TK AS は TK WS よりも腓リパーゼ阻害活性が顕著であった(Fig. 49)。TK には水にも弱アルカリ溶液にも解けるアルギン酸塩と、水には溶けず、弱アルカリ溶液には溶けるアルギン酸が含まれている。弱アルカリ溶液であれば、アルギン酸もアルギン酸塩となって溶液中に溶出してくることで生理活性が増強されることが考えられるため、TK WS よりも TK AS の腓リパーゼ阻害活性の方が強いと考えられる。

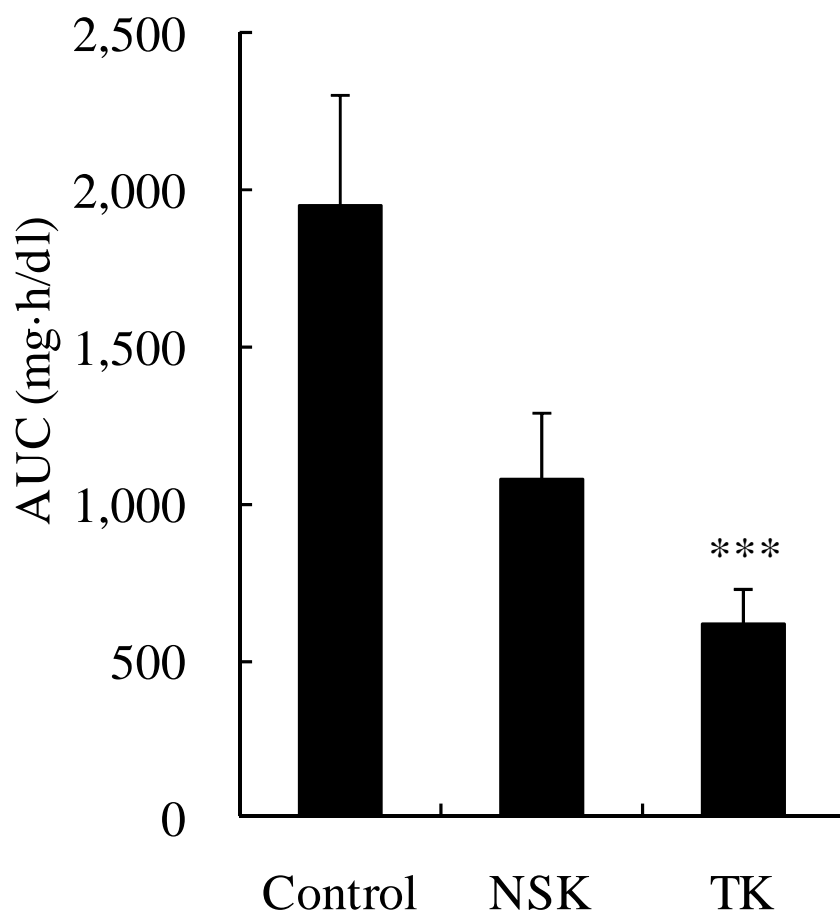
さらに、TK の肥満予防・改善効果を確認するために、高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いて、抗肥満試験を行った。Fig. 50 より、TK は、高脂肪食による体重の増加を有意に抑制することがわかった。一方で、NSK は高脂肪食による体重の増加を有意に抑制せず、TK と NSK との間で体重に有意差はみられなかった。傍子宮脂肪組織重量、血中と肝臓中の脂質パラメータを評価すると、TK は高脂肪食由来の傍子宮脂肪組織重量、血中 TC 値、肝臓中の TG 量の増加を有意に抑制した(Fig. 53、54、55)。さらに、TK は NSK よりも強い傍子宮脂肪組織重量、血中の TG、TC 値、肝臓中 TG 量の増加抑制作用を示した(Fig. 52、53、54、55)。TK 群の肝臓重量は、HFD 群と比較して有意に低値を示したが、脾臓重量に関しては、4 群間で差がみられなかった(Table 7)。腎臓重量では、NFD 群は ND 群と比較して有意に減少しており、TK 群は HFD 群と比較して有意に増加した。データは示していないが、体重を考慮せずに腎臓重量で 4 群を比較すると有意差はみられなかった。肥満マウスの体重と腎臓重量に正の相関性が成立しないことについては腎臓そのものの大きさは変化しておらず、肥満により体重が増加したことで、体重あたりの腎臓重量には有意差がみられただけだと考えている。これらの結果から、TK は、高脂肪食由来の脂肪組織および肝臓への TG 蓄積を抑制することで体重増加を抑制しており、血中脂質上昇を抑制することがわかり、その他の臓器にはほとんど影響を及ぼさない食品素材であることが示唆された。また、TK と NSK は高脂肪食由来の体重増加に及ぼす影響はほぼ同等であったが、TK は NSK よりも脂肪組織と肝臓への TG 蓄積を抑制することでより強い抗肥満作用、さらには、血中脂質上昇抑制作用を示すことが確認できた。抗肥満作用に寄与した成分として、アルギン酸が考えられるが、昆布には他にも、脂肪細胞の分化抑制作用や過剰なエネルギーを熱に変換する UCP1 の発現亢進作用を有することが報告されているフコイダンやフコキサンチンが含まれており<sup>204-206</sup>、これらの成分も抗肥満作用に貢献したのではないかと考えられる。

第3章の図表



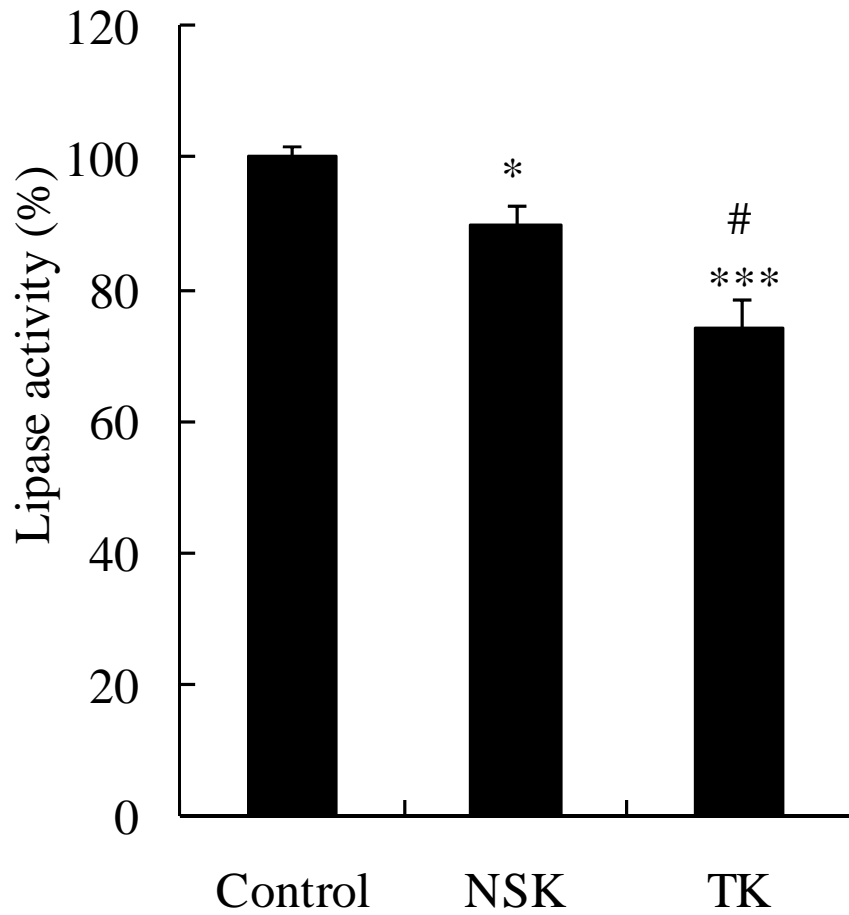
**Fig. 43 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Corn Oil in Rats**

Distilled water (20 ml/kg), NSK, and TK solutions (1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the rats in the control, NSK, and TK groups before oral administration of corn oil (5 ml/kg). Data ( $n = 6$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



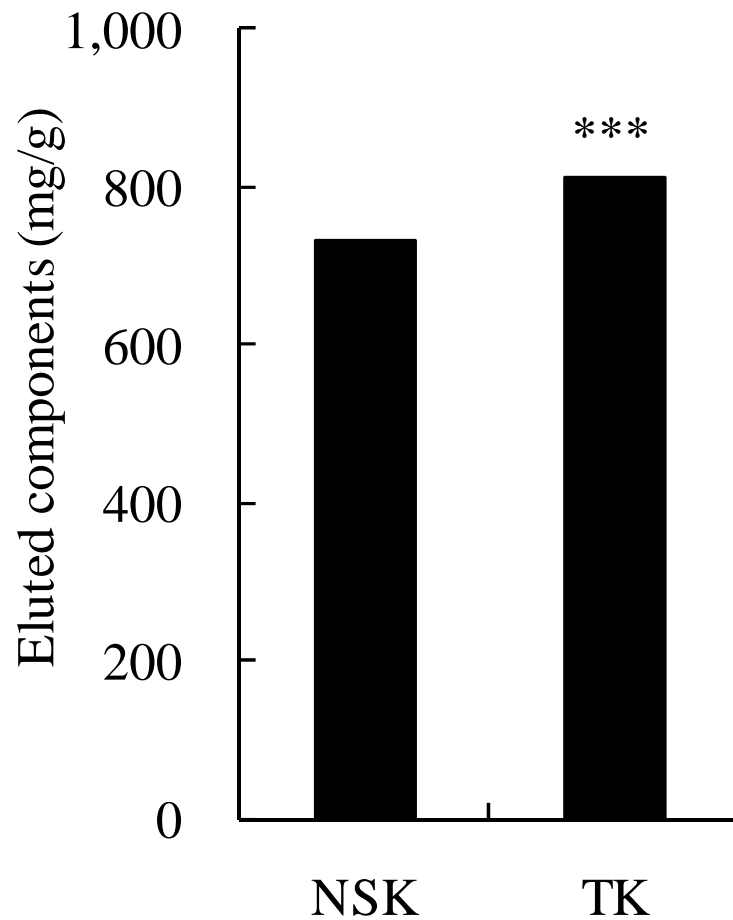
**Fig. 44 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Area under the Curve (AUC) of Triglyceride (TG) Absorption after Oral Administration of Corn Oil in Mice**

Level of total absorbed TG was evaluated using the AUC in Fig. 43. Data ( $n = 6$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control group.



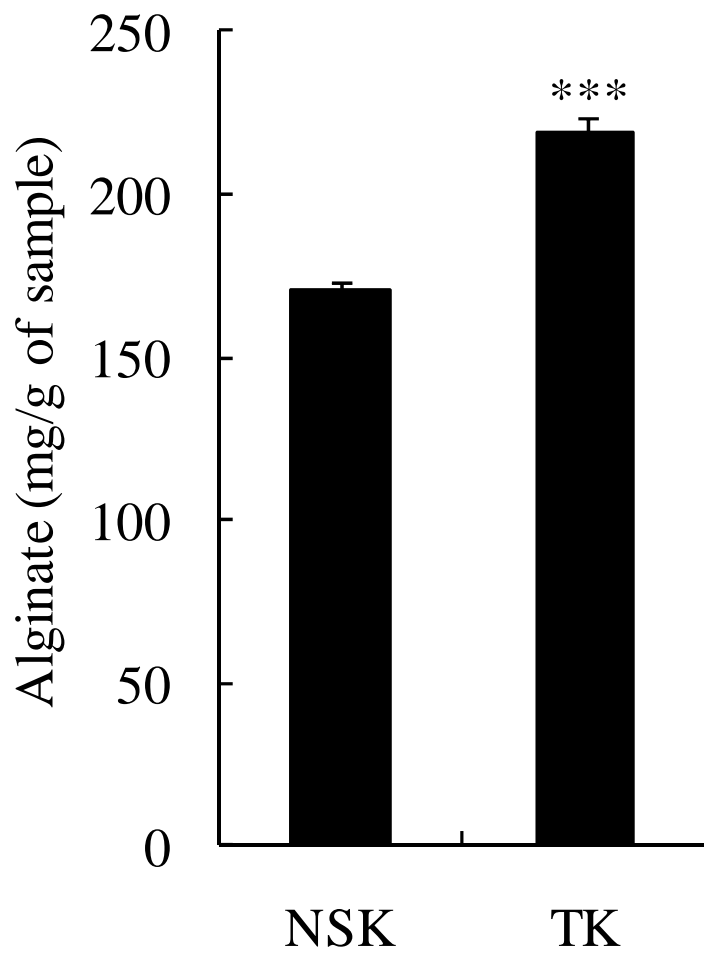
**Fig. 45 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on Pancreatic Lipase Activity *in Vitro***

Lipase activity was measured using Lipase Kit S according to the protocol. Data ( $n = 5$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. Control. #:  $p < 0.05$  NSK vs. TK.



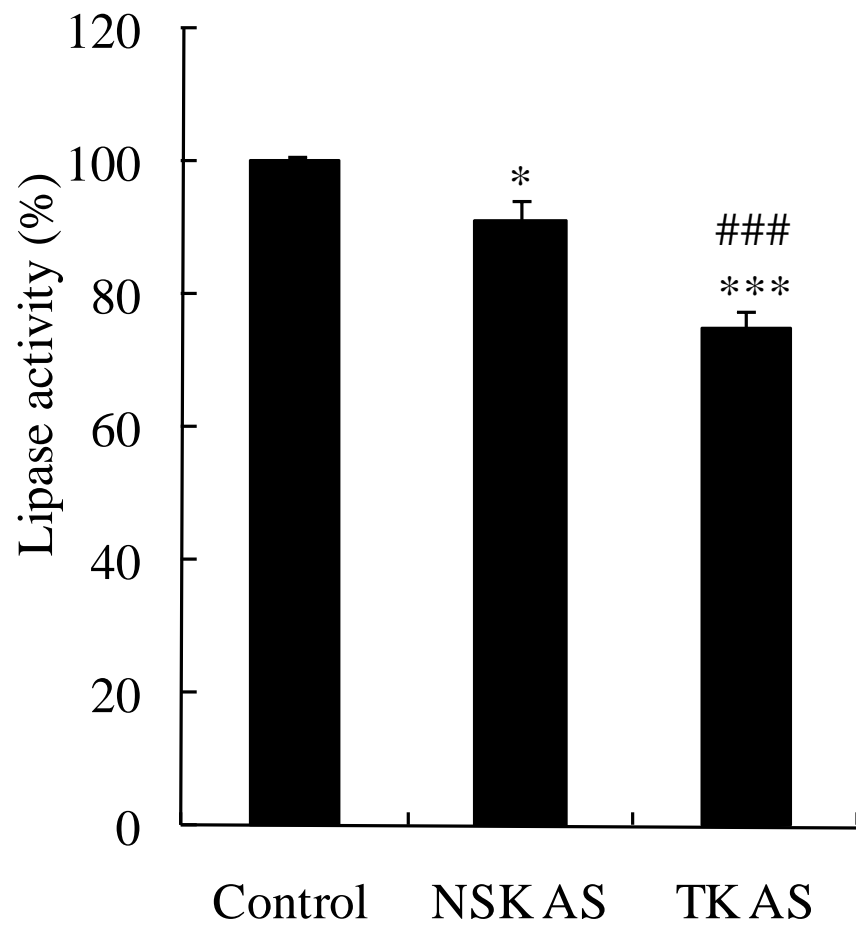
**Fig. 46 Content of Total Components Eluted from Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) into Weak Alkaline Solution**

NSK or TK were mixed with pre-incubated phosphate-buffered saline (pH 7.4) and incubated at 20°C, 135 rpm shaking speed for 30 min. The solutions were centrifuged at 37°C, 1,000×g for 30 min to obtain the supernatant. The residues were washed with distilled water and centrifuged at 3,500 rpm for 30 min twice. These washed supernatants were mixed and lyophilized to measure weight of total components. Data ( $n = 3$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. NSK.



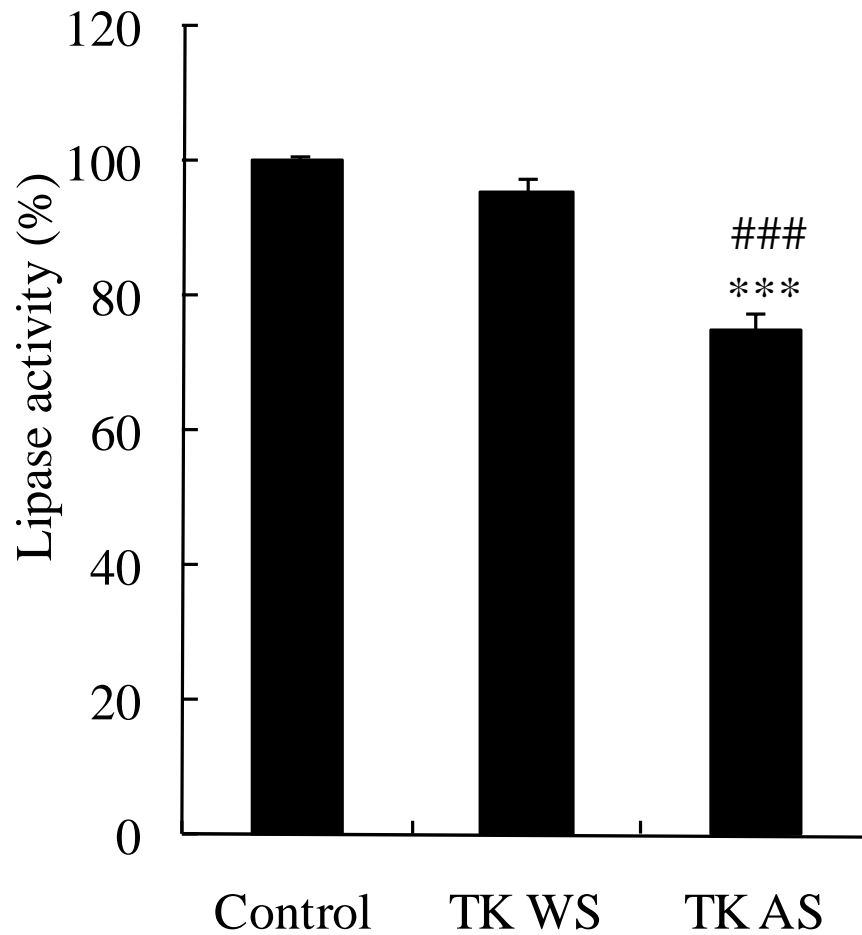
**Fig. 47 Alginic acid Content Eluted from Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) into Weak Alkaline Solution**

The uronic acid content was analyzed using total components eluted from NSK and TK into phosphate-buffered saline (pH 8.0) for alginic acid determination by the carbazole method<sup>23</sup>). Data ( $n = 3$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. NSK.



**Fig. 48 Effect of Weak Alkaline-Soluble Fraction (AS) from Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on Pancreatic Lipase Activity *in Vitro***

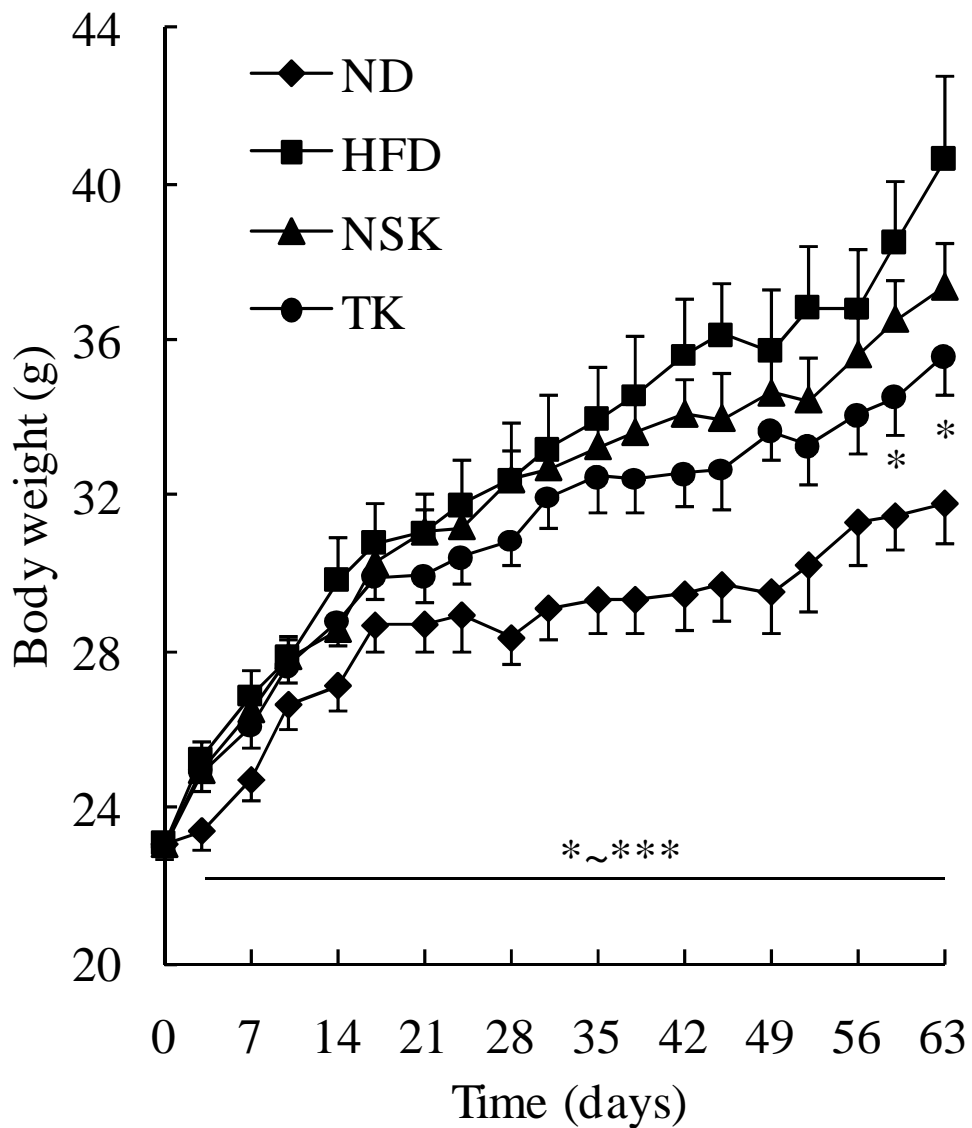
Lipase activity was measured using Lipase Kit S according to the protocol. Data ( $n = 5$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. Control. ###:  $p < 0.005$  NSK AS vs. TK AS.



**Fig. 49 Effect of Water- (WS) and Weak Alkaline (AS) -Soluble Fraction from Tororokombu (TK) on Pancreatic Lipase Activity *in Vitro***

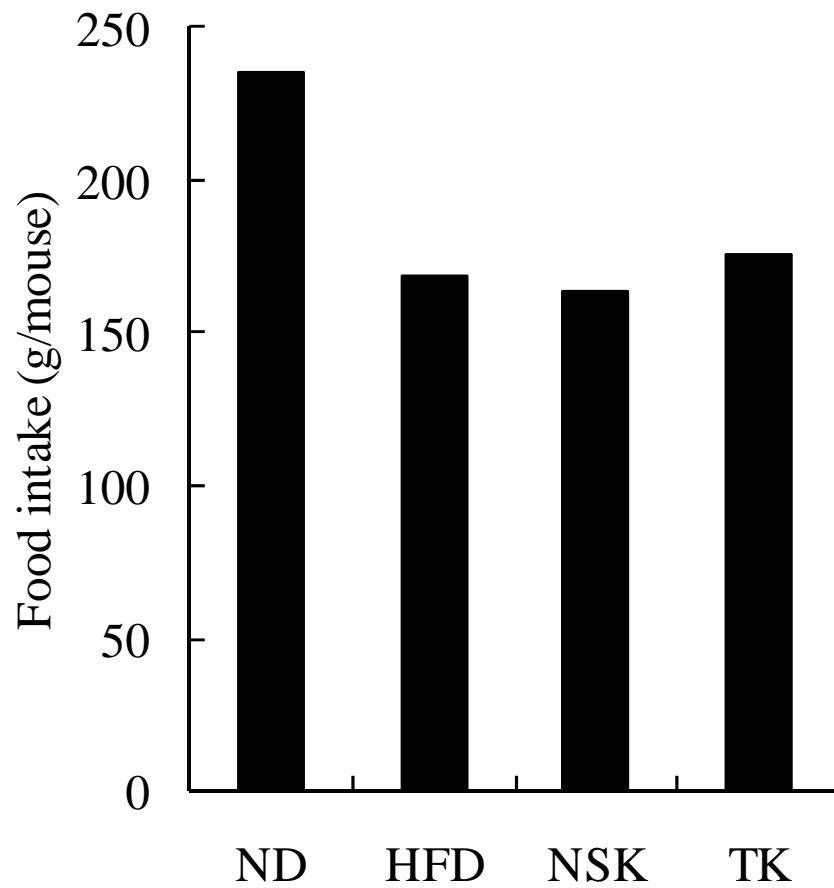
Lipase activity was measured using Lipase Kit S according to the protocol. Data ( $n = 5$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. Control. ###:  $p < 0.005$  TK WS vs. TK AS.





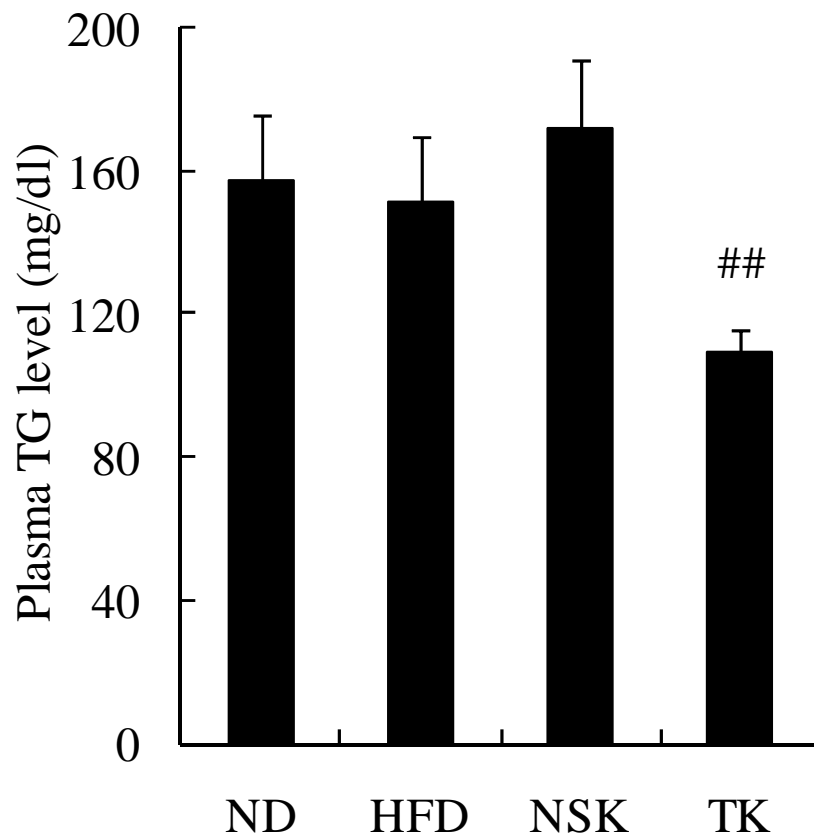
**Fig. 50 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Body Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 9 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), NSK, and TK groups were given diets shown in Table 6. Body weight was measured twice a week. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



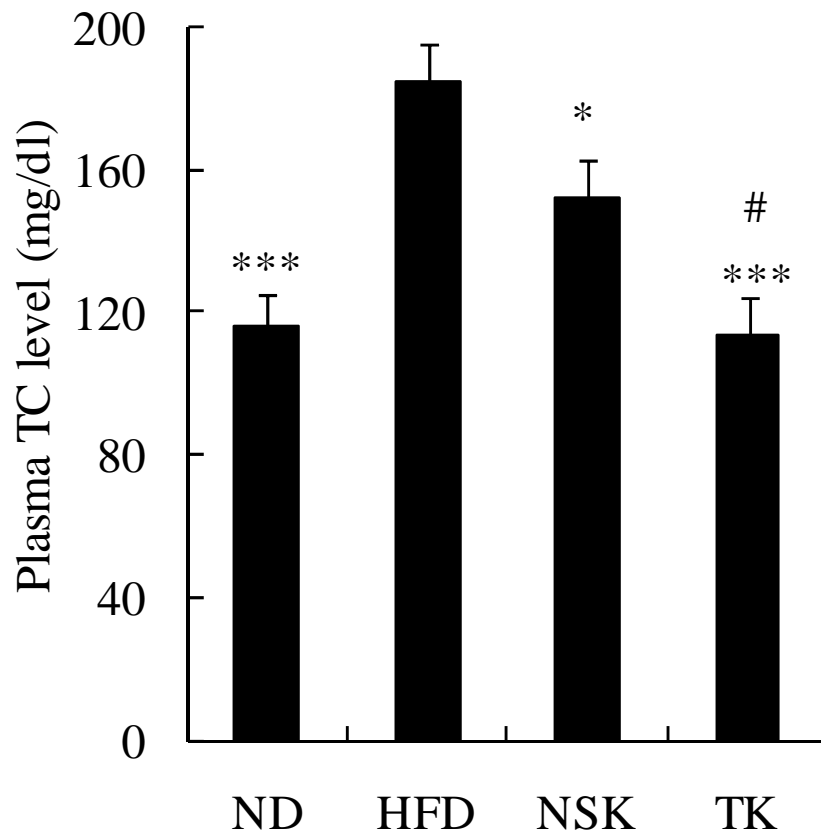
**Fig. 51 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Food Intake in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 9 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), NSK, and TK groups were given diets shown in Table 6. Food intake was measured twice a week.



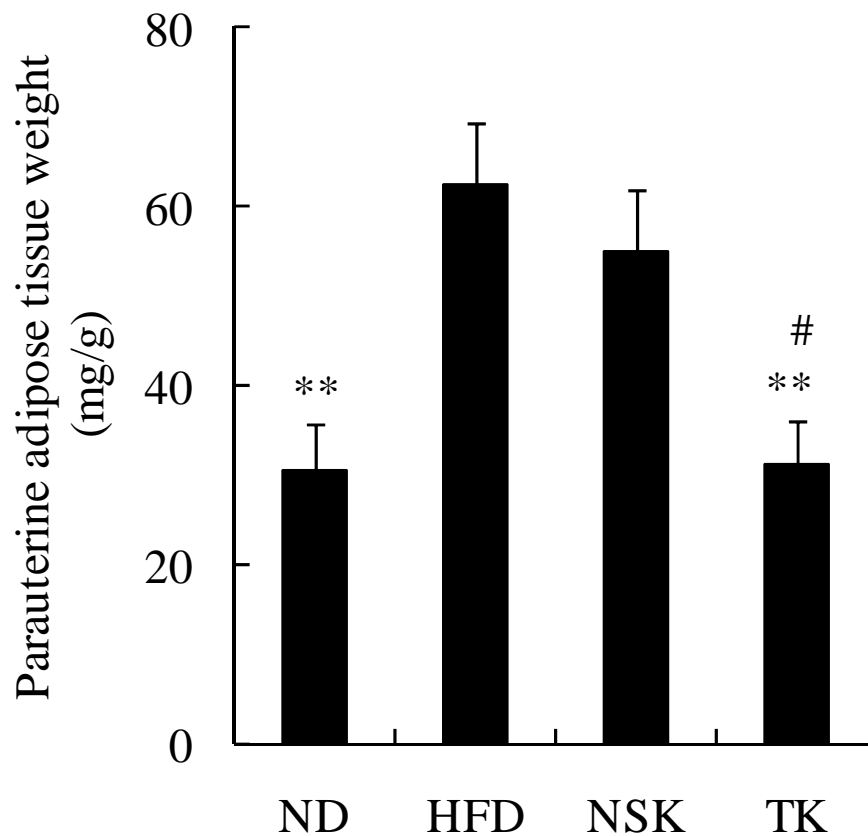
**Fig. 52 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Plasma Triglyceride (TG) Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 9 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), NSK, and TK groups were given diets shown in Table 6. After these diets had been fed to the mice for 9 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma TG level was measured using Triglyceride E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. ##:  $p < 0.01$  the NSK group vs. the TK group.



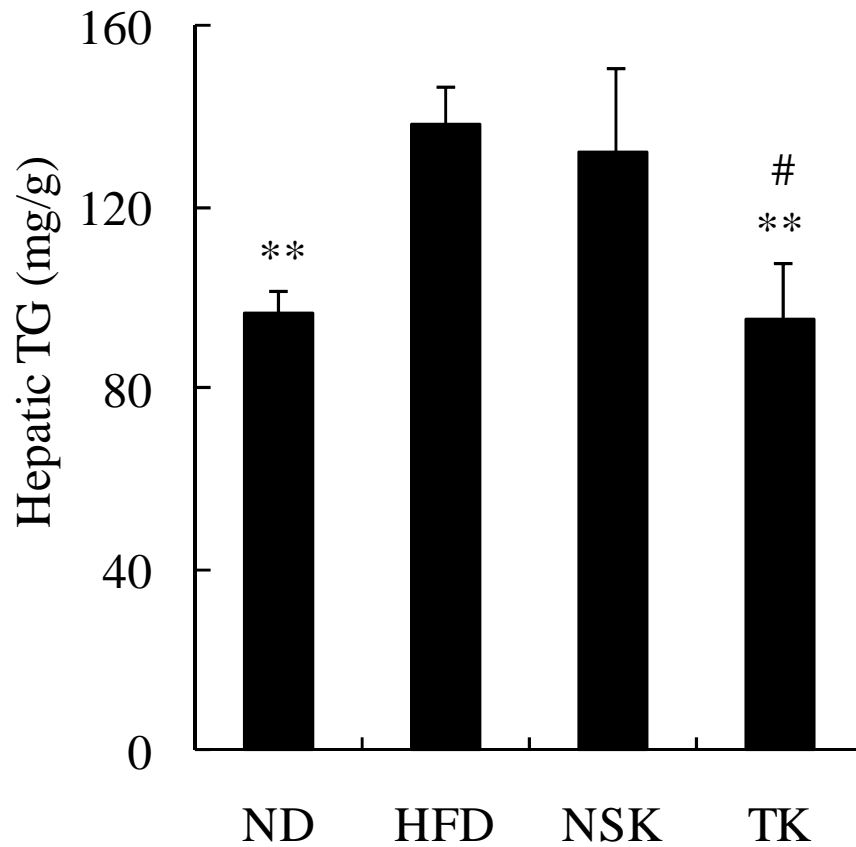
**Fig. 53 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Plasma Total Cholesterol (TC) Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 9 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), NSK, and TK groups were given diets shown in Table 6. After these diets had been fed to the mice for 9 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma TC level was measured using Cholesterol E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group. #:  $p < 0.05$  the NSK group vs. the TK group.



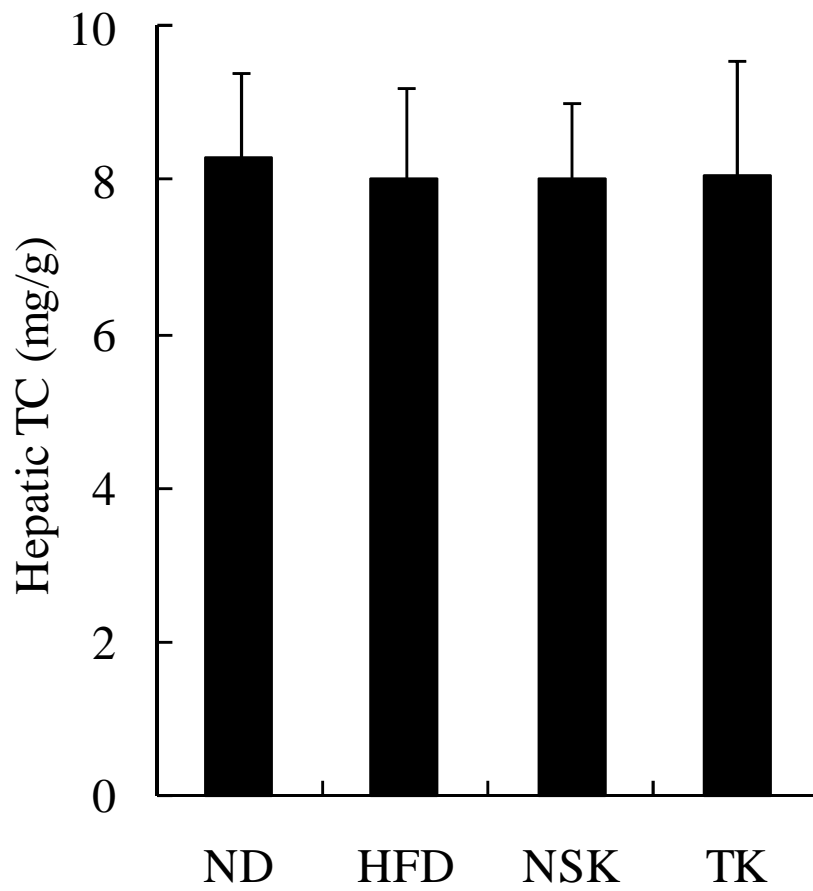
**Fig. 54 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Parauterine Adipose Tissue Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 9 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), NSK, and TK groups were given diets shown in Table 6. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the parauterine adipose tissue was dissected and weighed. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.01$  vs. the HFD group. #:  $p < 0.05$  the NSK group vs. the TK group.



**Fig. 55 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Hepatic Triglyceride (TG) Content in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 9 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), NSK, and TK groups were given diets shown in Table 6. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the liver was dissected and weighed. Lipids were extracted using Folch solution (chloroform : methanol = 2 : 1) from liver. Hepatic TG was measured using Triglyceride E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.01$  vs. the HFD group. #:  $p < 0.05$  the NSK group vs. the TK group.



**Fig. 56 Effect of Non-Shaved Kelp (NSK) and Tororokombu (TK) on the Hepatic Total Cholesterol (TC) Content in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 9 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), NSK, and TK groups were given diets shown in Table 6. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the liver was dissected and weighed. Lipids were extracted using Folch solution (chloroform : methanol = 2 : 1) from liver. Hepatic TC was measured using Cholesterol E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E.

**Table 6. Composition of Mouse Diets in the Anti-Obesity Test of TK**

Ingredient	Group			
	ND	HFD	NSK	TK
$\beta$ -Cornstarch	465.692	105.692	105.692	105.692
$\alpha$ -Cornstarch	155	155	144.68	144.68
Milk casein	140	140	137.54	137.54
Sucrose	100	100	100	100
Beef tallow	40	400	399.64	399.64
Cellulose	50	50	33.14	33.14
Mineral mix	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10
L-Cystine	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008
NSK	0	0	30	0
TK	0	0	0	30

ND, normal diet; HFD, high-fat diet; NSK, non-shaved kelp; TK, tororokombu.

All values are in g/kg of diet.



**Table 7. Organ Weight of the Obese Mice Induced by HFD ( $n = 8$ )**

	ND	HFD	NSK	TK
Liver (mg/g of body weight)	38.2 ± 0.9	39.2 ± 1.2	37.1 ± 3.0	34.7 ± 1.0 *
Spleen (mg/g of body weight)	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.3 ± 0.2
Kidney (mg/g of body weight)	10.7 ± 0.3 **	9.0 ± 0.4	9.6 ± 0.4	10.5 ± 0.5 *

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), 3% non-shaved kelp (NSK), and 3% tororokombu (TK) groups were given diets shown in Table 6. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the organs were dissected and weighed. Data are presented as the mean ± S.E.

## 第4章 コガネタケヤシの抗肥満作用

### 4.1. はじめに

コガネタケヤシは、これまで生理活性に関する報告は全くなく、本研究において、TG 吸収抑制作用を有することを新しく見出した。本章では、そのメカニズムについて明らかにし、3T3-L1 細胞における TG 蓄積抑制作用、抗肥満作用の有無について検討した。

### 4.2. 実験方法

#### 4.2.1. 試薬

使用した試薬は、2.1.1.で示したものをを用いた。

#### 4.2.2. 実験動物

実験動物は日本エスエルシー株式会社から購入した Slc:ddY マウスを用いた。実験動物の飼育条件と取り扱いに関しては、2.2.2.に従って実験を行った。

#### 4.2.3. 抽出物の調製

コガネタケヤシは株式会社赤塚植物園より提供していただいた。抽出には葉の部分を用い、生葉の重量の 10 倍量(v/w)の蒸留水、メタノール(MeOH)、エタノール(EtOH)で抽出した。蒸留水の場合は、100°C で 1 時間の熱水抽出を行い、MeOH と EtOH の場合は、常温で 2~7 日間付け込んで抽出した。この抽出操作は 2 回行った。抽出液をろ過して、減圧濃縮と凍結乾燥によって、抽出物を得た。また、コガネタケヤシ葉 MeOH 抽出物はこれ以降便宜上 MEC と略記することにした。

#### 4.2.4. TG 負荷試験

6 週齢、雄性の Slc:ddY マウスを標準飼料で 1 週間予備飼育した後、24 時間絶食させて実験を行った。平均体重がほぼ等しくなるように、コントロール群とサンプル投与群に群分けした( $n=8$ )。熱水抽出物(WEC)、MEC、エタノール抽出物(EEC)の活性を比較する場合は、サンプルの濃度を 1,000 mg/kg に設定して強制経口投与を行い、すぐにコーン油(8 ml/kg)を強制経口投与した。また、投与量依存性を確認するために、コントロール群と、MEC 500 mg/kg 投与群(500 mg/kg)、MEC 1,000 mg/kg 投与群(1,000 mg/kg)、MEC 1,500 mg/kg 投与群(1,500 mg/kg)の 4 群に分け、それぞれ蒸留水(20 ml/kg)、MEC(500, 1,000, 1,500 mg/20 ml/kg)を強制経口投与した後、すぐにコーン油(8 ml/kg)を強制経口投与した。投与開始直前(0 時間目)と投与開始後 1 時間おきに尾採血を 8 時間目まで行った。採血した血液は 1,400×g で 1 分間遠心分離した。血中 TG 値は、遠心分離して得られた血漿を用いて、トリグリセライド E-テストワコーで測定した。

#### 4.2.5. 膵リパーゼ活性阻害の測定

リパーゼ活性阻害の測定は、2.1.5.に示したように、Lipase Kit S を用いて測定した。

#### 4.2.6. 細胞培養

MEC の添加濃度範囲は 3.125 ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  に設定し、細胞培養は 2.1.12.に示した方法に従って行った。

#### 4.2.7. MTT アッセイ

MTT アッセイは 2.1.13.に示した方法に従って行った。

#### 4.2.8. オイルレッド O 染色

オイルレッド O 染色は 2.1.14.に示した方法に従って行った。

#### 4.2.9. GPDH 活性の測定

GPDH 活性の測定は 2.1.15.に示した方法に従って行った。

#### 4.2.10. 高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験

4 週齢、雌性 Slc:ddY マウスを標準食で 1 週間予備飼育した後、各群平均体重がほぼ等しくなるように、群分けを行った。飼料は AIN-93M を基準にして作製した<sup>182)</sup>。標準食群(ND)、高脂肪食群(HFD)、3%MEC を含む高脂肪食群(MEC)の 3 群に群分けし、Table 8 に示した飼料を与え、77 日間飼育を行った。飼育条件と血中の脂質パラメータや各組織・臓器重量の測定は 2.1.19 に示した方法に従って行った。

#### 4.2.11. 肝臓中の脂質の抽出

肝臓中の脂質の抽出は 2.1.20.に示した方法に従って行った。

#### 4.2.12. 統計処理

統計処理は 2.1.21.に示したように行った。

### 4.3. 結果

#### 4.3.1. TG 吸収抑制作用とそのメカニズム

まず、コガネタケヤシ葉の熱水抽出物(WEC)、MEC、EtOH 抽出物(EEC)の 3 種類の抽出物を用いて、コーン油負荷時のマウスの血中 TG 値の測定を行った。WEC 群、MEC 群、EEC 群は、コントロール群と比較して、それぞれ投与後 2 時間目、3~5、7、8 時間目、4 時間目で、有意に血中 TG 値の上昇が抑制された(Fig. 57)。また、AUC においては、MEC 群は、コントロール群と比較して、有意

に低値を示したが、WEC群とEEH群はコントロール群との間でAUCに差はみられなかった(Fig. 58)。これらの結果から、MECが最もTG吸収抑制作用が強いと考えられたため、これ以降のコガネタケヤシの研究はMECを用いることとした。

また、MECの投与量を、500、1,000、1,500 mg/kgに設定して、コーン油負荷時のマウスの血中TG値の測定を行った。MEC 1,000、1,500 mg/kg投与群(1,000、1,500 mg/kg)はコントロール群(Control)と比較して、それぞれ投与後5時間目、4~6時間目で、有意に血中TG値の上昇が抑制された(Fig. 59)。一方、MEC 500 mg/kg投与群(500 mg/kg)とコントロール群の間では差がみられなかった。また、AUCにおいては、MEC 500 mg/kg投与群とコントロール群の間では差がみられなかったが、MEC 1,000、1,500 mg/kg投与群は、コントロール群と比較して、有意に低値を示し、投与量依存性も確認できた(Fig. 60)。

次に、MECのTG吸収抑制作用のメカニズムを解明するため、腓リパーゼ活性に及ぼす影響について確認したところ、MEC (250~1,000 µg/ml)を添加すると、コントロールと比較してリパーゼ活性が有意に低下した(Fig. 61)。また、MECの添加量が多いほど、リパーゼ活性が低下することが確認された。

#### 4.3.2. TG蓄積抑制作用とそのメカニズム

3T3-L1細胞のTG合成準備期とTG合成期の両期間においてMECを添加したところ、MECはコントロールと比較して、12.5~50 µg/mlの範囲で3T3-L1細胞におけるTGの蓄積率を有意に減少させ、特に50 µg/mlの添加量ではTG蓄積率が半減することが確認された。また、この範囲内でコントロールとの間で細胞生存率による有意差はみられなかった(Fig. 62)。

次に、MEC(3.125~50 µg/ml)を添加した時のGPDH活性を測定したところ、MECはコントロールと比較して、3.125~50 µg/mlの範囲で3T3-L1細胞におけるGPDH活性を有意に減少させ、特に50 µg/mlの添加量ではGPDH活性が18.9%まで低下することが確認された。また、この範囲内でコントロールとの間で細胞生存率による有意差はみられなかった(Fig. 63)。

#### 4.3.3. 抗肥満作用

まず、高脂肪食を摂取させることにより、肥満モデルマウスを作製し、餌にMECを混合することにより、体重と食餌摂取量に及ぼす影響について検討を行った。高脂肪食群(HFD)は標準食群(ND)と比較して、試験開始後25日目から体重が増加した(Fig. 64)。また、3%のMECを含む高脂肪食群(MEC)は、HFD群と比較して、試験開始後70~77日目で有意に体重の増加が抑制された。また、MEC群とHFD群との間で食餌摂取量に差はほとんどみられなかった(Fig. 65)。

次に、絶食時におけるマウスの脂質関連の血中パラメータを測定した。HFD群はND群と比較して、血中のTG値とTC値が有意に高値を示した(Fig. 66、67)。また、MEC群は、HFD群と比較して、有意に血中TC値の上昇を抑制した。一方で、血中TG値においては、MEC群とHFD群の間では

みられなかった。

また、解剖を行い、マウスの各臓器・組織の重量を測定した。HFD 群の傍子宮脂肪組織重量は、ND 群と比較して有意に増加した(Fig. 68)。また、MEC 群の傍子宮脂肪組織重量は、HFD 群と比較して有意に減少した。一方で、肝臓、脾臓、腎臓の重量は、3 群間で差が見られなかった(Table 9)。

さらに、肝臓中の脂質量を測定したところ、HFD 群の肝臓中の TG の量は、ND 群と比較して有意に増加し、MEC 群の肝臓中の TG、TC の量は、HFD 群よりも有意に減少した(Fig. 69、70)。

#### 4.4. 考察

コガネタケヤシの抽出方法による活性を比較するために、コガネタケヤシ葉の熱水抽出物(WEC)、メタノール抽出物(MEC)、エタノール抽出物(EEC)の 3 種類の抽出物を用いて、マウスにコーン油を負荷した時の血中 TG 値に及ぼす影響について確認した(Fig. 57、58)。この 3 種類の中で、Fig. 57 において MEC 群の投与後 1 時間目以外のすべての測定点で血中 TG 値の平均値が最も低く、Fig. 58 において MEC 群の AUC が最も小さいことから、MEC が最も強力な TG 吸収抑制作用を有すると考えられる。また、MEC のコーン油負荷時における血中 TG 値上昇抑制作用の投与量依存性を確認するために、MEC 250、500、1,000 mg/kg の経口投与で評価した(Fig. 59、60)。MEC500、1,000 mg/kg 群でコーン油負荷時における血中 TG 値上昇抑制作用がみられ、AUC は投与量が増加するにつれて減少しているため、投与量依存性があるものと考えられる。

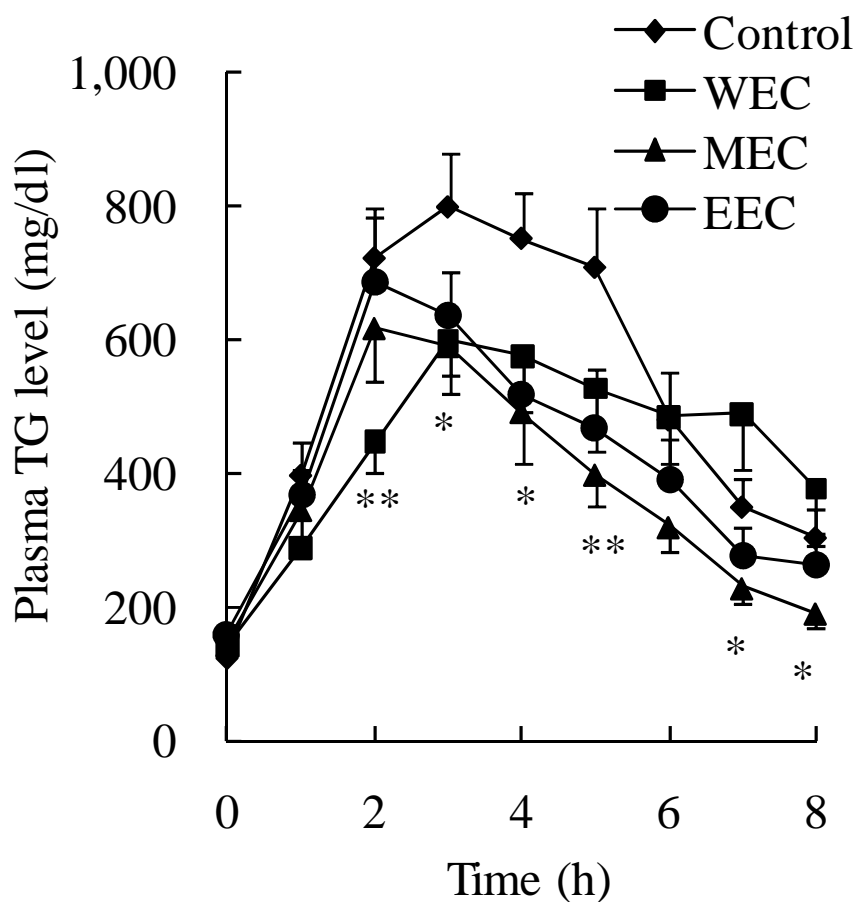
MEC の TG 吸収抑制作用のメカニズムを解明するため、MEC の腓リパーゼ阻害活性を確認したところ、MEC は腓リパーゼ活性を阻害した(Fig. 61)。したがって、MEC は、腓リパーゼによる TG の加水分解を阻害することで TG の吸収を抑制していることがわかった。

また、MEC の抗肥満作用に関するさらなる生理活性を見出すために、3T3-L1 細胞を用いた実験を行った。3T3-L1 細胞を分化誘導させ、その後 TG を蓄積していく全過程における MEC の影響について検討した(Fig. 62)。MEC は 3T3-L1 細胞における TG 蓄積を抑制することが確認できた。MEC が GPDH 活性に及ぼす影響について調べたところ、MEC は濃度依存的に GPDH 活性を阻害することがわかった(Fig. 63)。したがって、MEC は GPDH 活性阻害によって、脂肪細胞内の TG の蓄積を抑制することがわかった。GPDH の発現はインスリンによってコントロールされており、PPAR の転写制御を受けていると考えられている<sup>22)</sup>。MEC は WEH と同様に PPAR の発現を低下させることで、GPDH の発現を抑制し、その結果、TG の蓄積を抑制していると考えられる。

さらに、MEC の抗肥満作用を確認するため、高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いて、抗肥満試験を行った。その結果、MEC は高脂肪食由来による体重増加作用、体脂肪増加抑制作用、血中の TC 値の上昇抑制作用を示した(Fig. 64、67、68、69、70)。したがって、MEC は、肥満の予防・改善し、肥満に伴う血中脂質異常を改善することが証明された。この抗肥満作用は、腓リパーゼ活性阻害による TG 吸収抑制作用と脂肪細胞における TG 蓄積抑制作用の 2 つの効果が長期的に作用し、累積した結果であると考えられる。また、MEC は脾臓と腎臓の重量や見た目の色・形に影響しなかつ

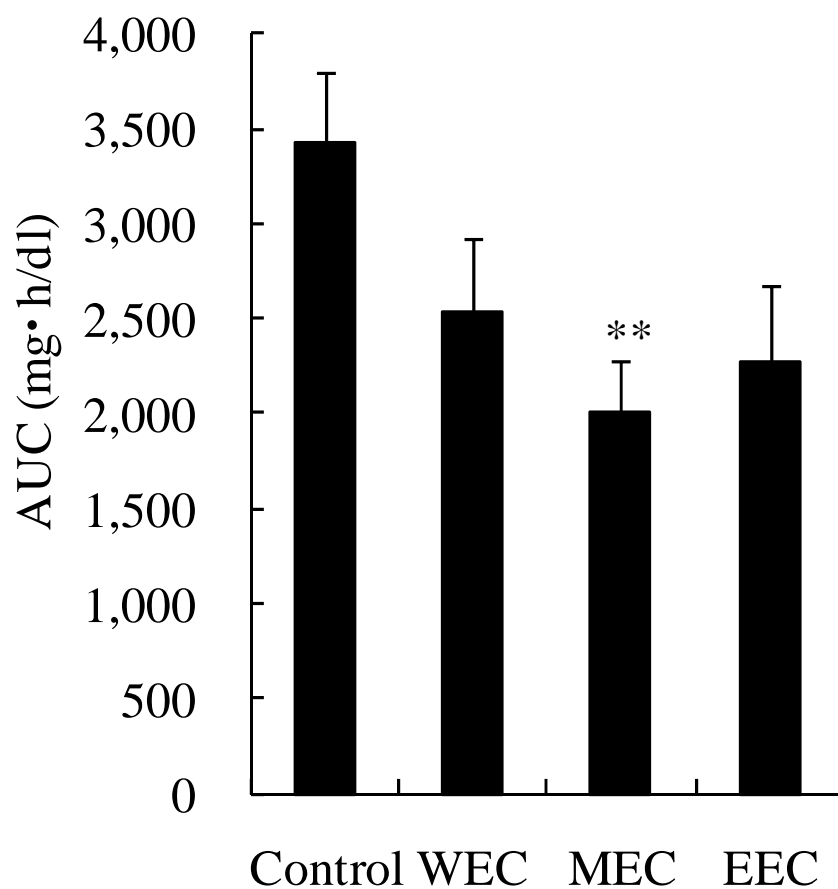
たことから(Table 9)、これらの臓器に毒性を示さないものと考えられる。

第 4 章の図表



**Fig. 57 Effect of Water (WEC), Methanol (MEC), and Ethanol (EEC) Extracts of *Chrysalidocurpus lutescens* Wendl. Leaves on Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

Distilled water (20 ml/kg), and WEC, MEC, and EEC solutions (1,000 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, WEC, MEC, and EEC groups before oral administration of corn oil (8 ml/kg). Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs. the control group.

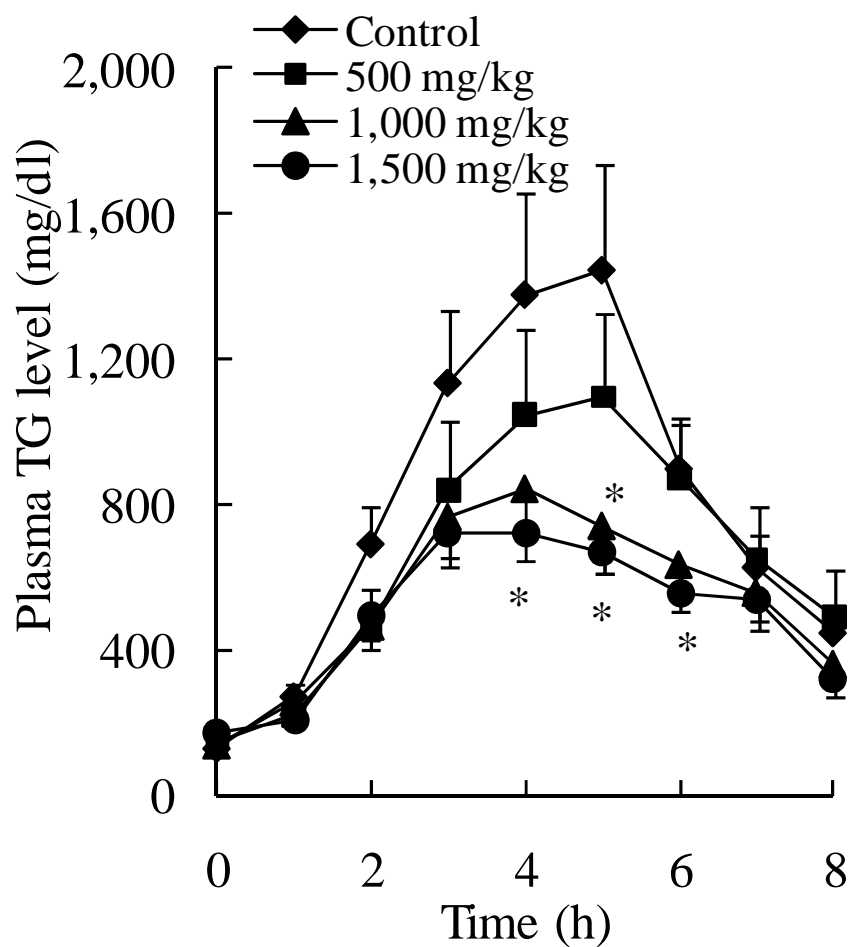


**Fig. 58 Effect of Water (WEC), Methanol (MEC), and Ethanol (EEC) Extracts of *Chrysalidocurpus lutescens* Wendl. Leaves on the Area under the Curve (AUC) of Triglyceride (TG) Absorption after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

Level of total absorbed TG was evaluated using the AUC in Fig. 55. Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E.

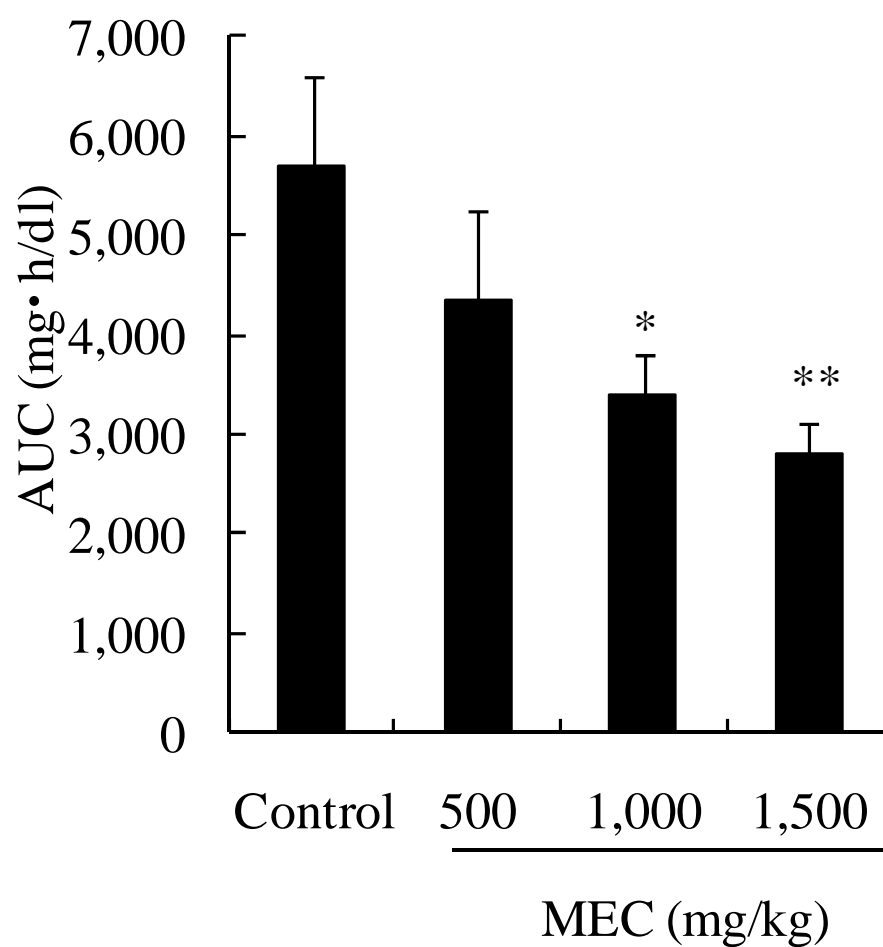
\*\* $: p < 0.01$  vs. the control group.





**Fig. 59 Dose-Dependent Suppressive Effects of Methanol Extract of *Chrysalidocurpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the elevation of Plasma Triglyceride (TG) Level after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

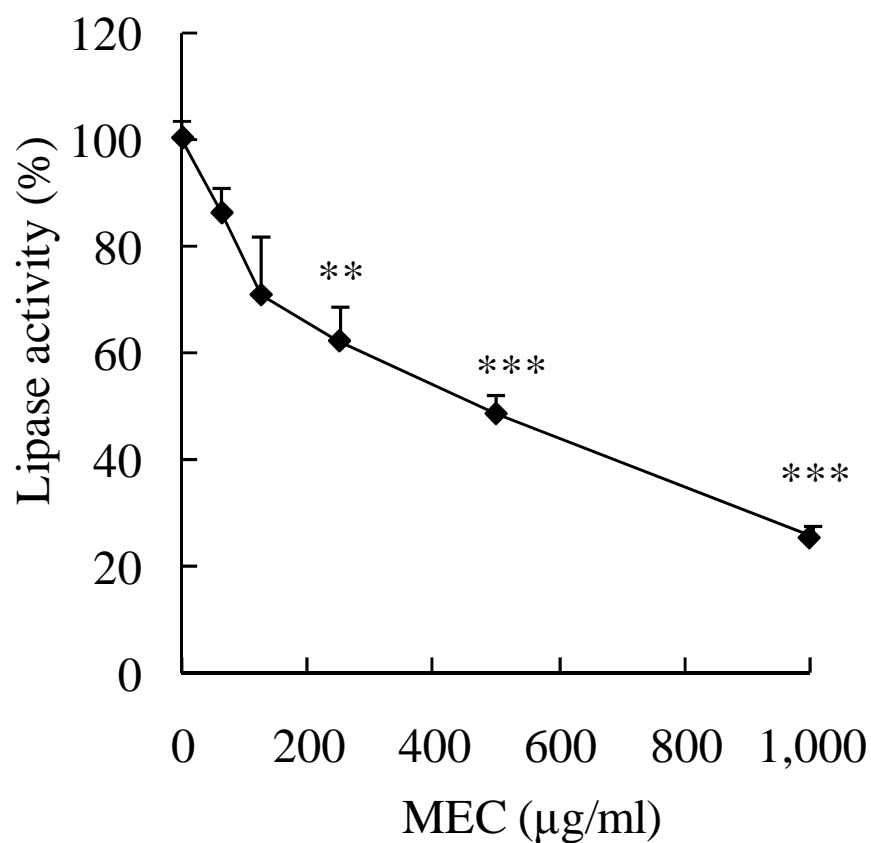
Distilled water (20 ml/kg) and MEC (500, 1,000, 1,500 mg/20 ml/kg) were respectively administered to the mice in the control, 500, 1,000, and 1,500 mg/kg groups before oral administration of corn oil (8 ml/kg). Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$  vs. the control group.



**Fig. 60 Dose-Dependent Suppressive Effects of Methanol Extract of *Chrysalidocurpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Area under the Curve (AUC) of Plasma Triglyceride (TG) level after Oral Administration of Corn Oil in Mice.**

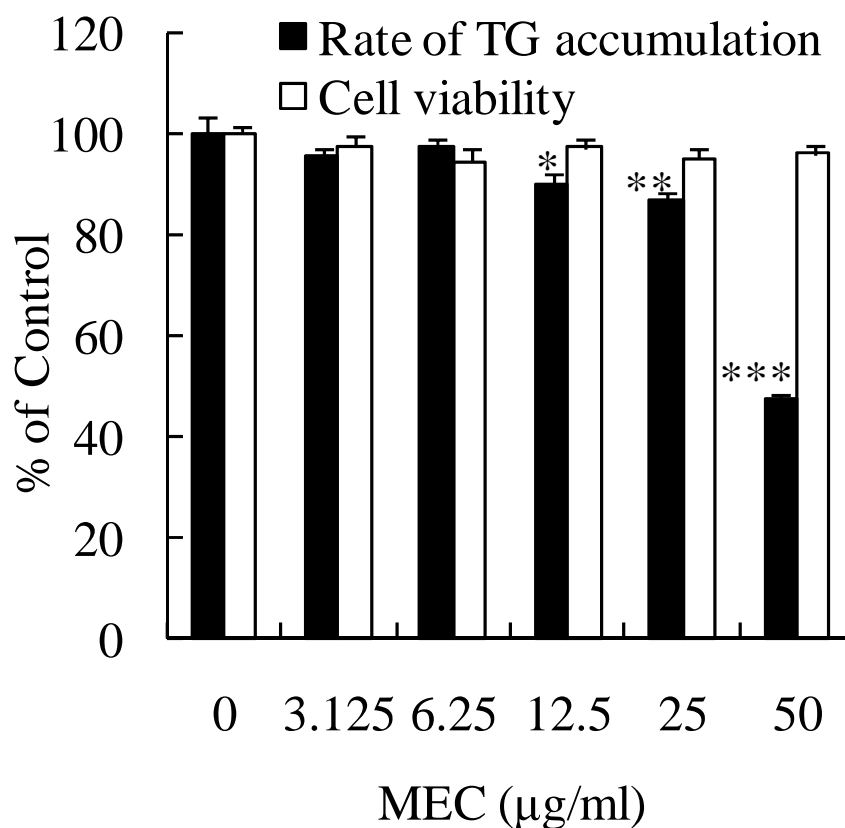
Level of total absorbed TG was evaluated using the AUC in Fig. 59. Data ( $n = 8$ ) are presented as mean  $\pm$  S.E.

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs. the control group.



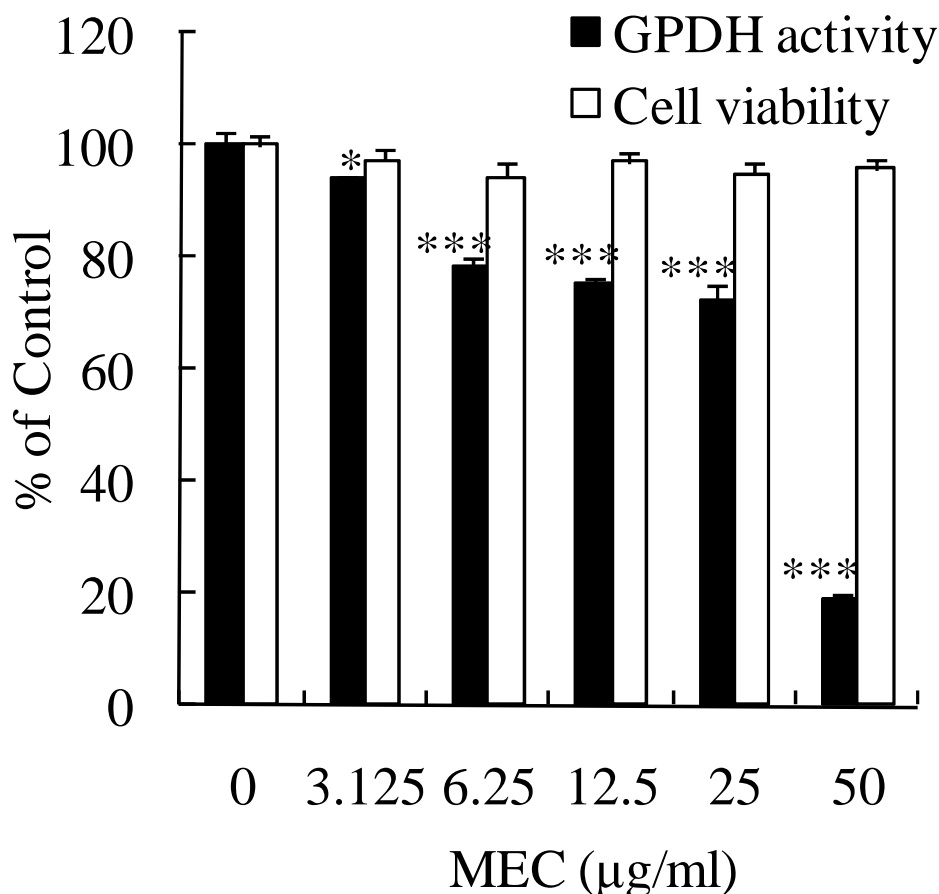
**Fig. 61 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on Pancreatic Lipase Activity *in Vitro***

Lipase activity was measured using Lipase Kit S according to the protocol. Data ( $n = 3$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control (0  $\mu\text{g/ml}$ ).



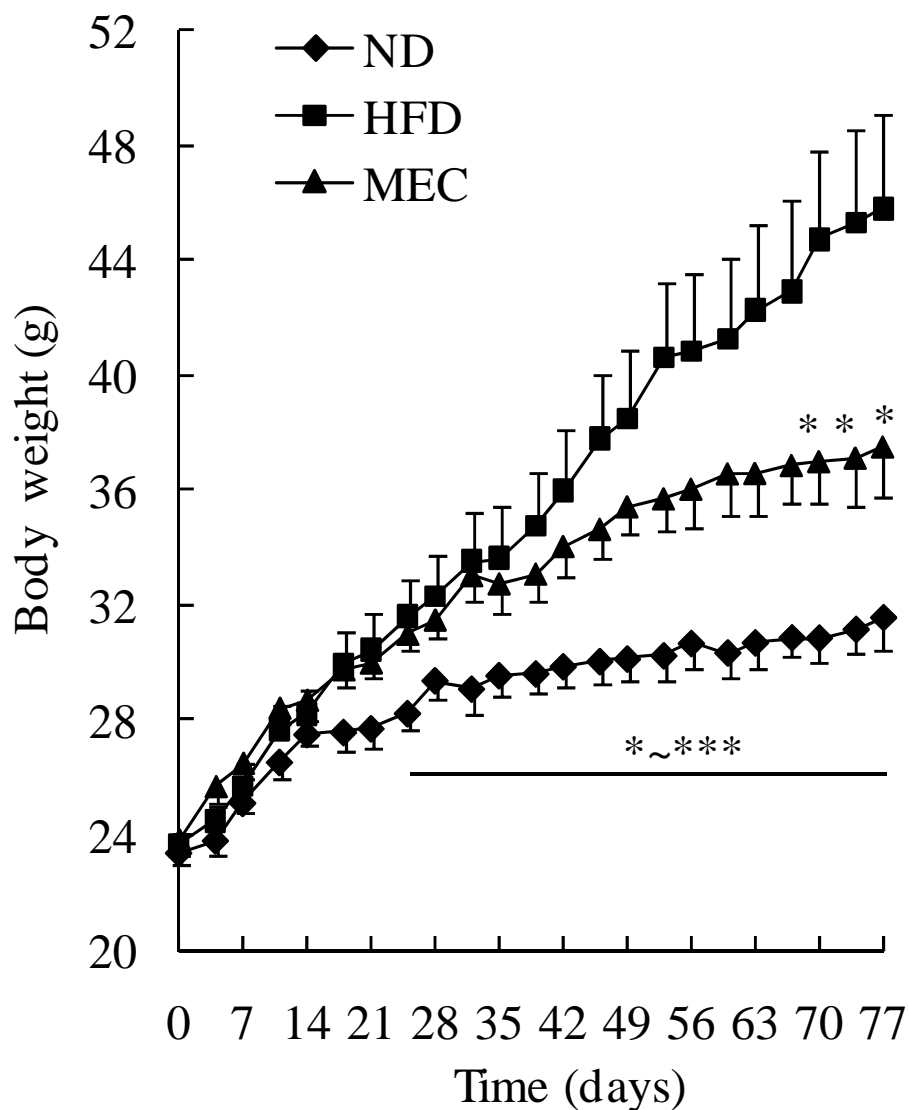
**Fig. 62 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on Triglyceride (TG) accumulation and Cell Viability in 3T3-L1 Adipocyte**

Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 µg/ml insulin with or without MEC (3.125-50 µg/ml) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10 µg/ml insulin with or without MEC (3.125-50 µg/ml) for 12 days. TG accumulation and cell viability were respectively evaluated using oil red O staining and MTT assay. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control (0 µg/ml).



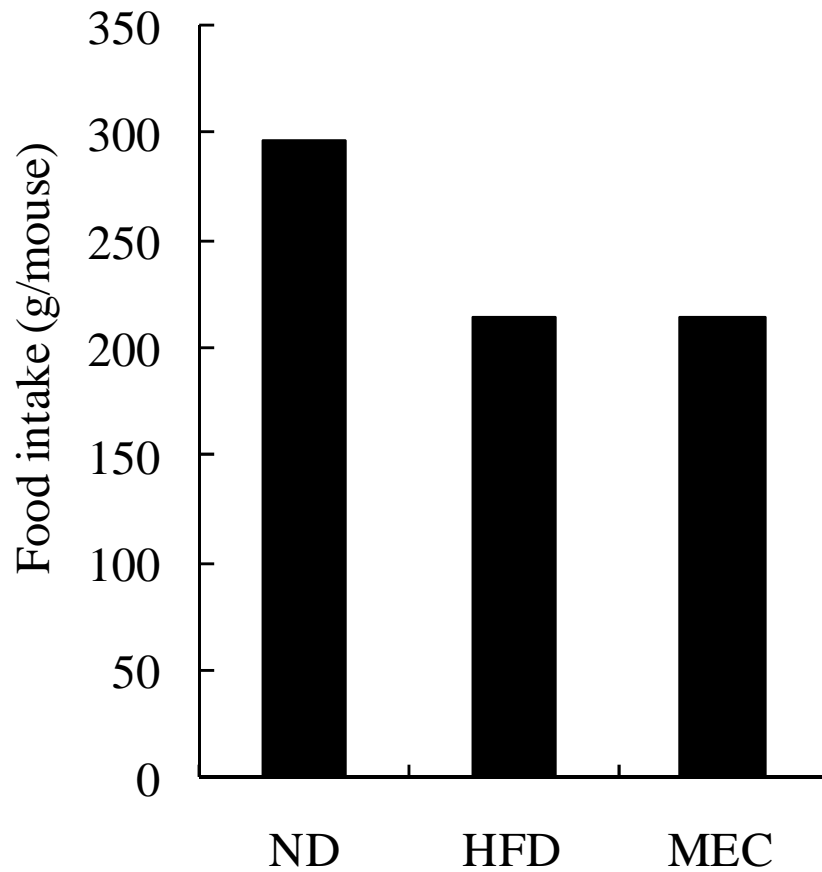
**Fig. 63 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) and Cell Viability in 3T3-L1 Adipocyte**

Differentiation to matured 3T3-L1 cells were induced by DMEM containing 10% FBS, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 10 µg/ml insulin with or without MEC (3.125-50 µg/ml) for 2 days in 24-well plate. Cells were then incubated in DMEM containing 10% FBS and 10 µg/ml insulin with or without MEC (3.125-50 µg/ml) for 12 days. GPDH activity and cell viability were respectively evaluated using GPDH Activity Measurement Kit and MTT assay. Data ( $n = 4$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the control (0 µg/ml).



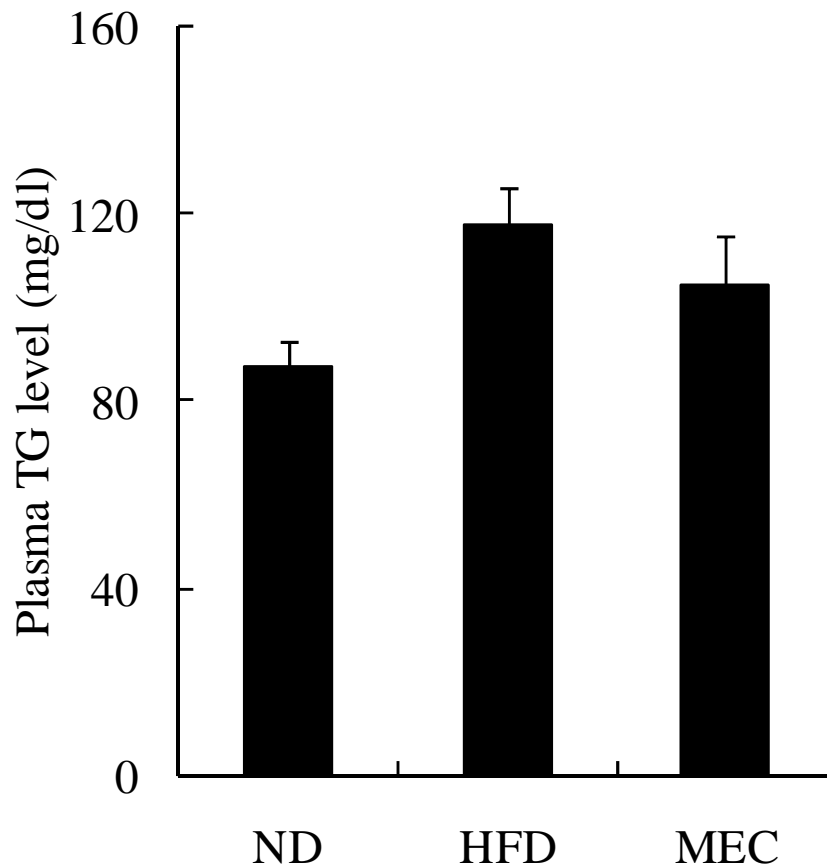
**Fig. 64 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Body Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and MEC groups were given diets shown in Table 8. Body weight was measured twice a week. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



**Fig. 65 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Food Intake in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

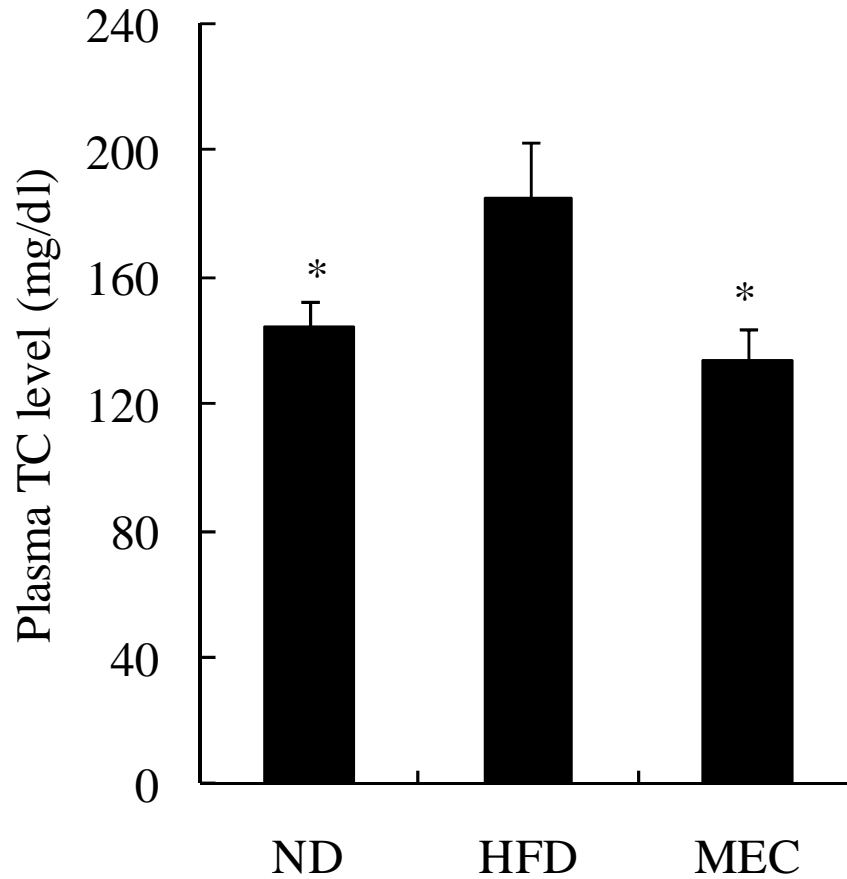
Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and MEC groups were given diets shown in Table 8. Food intake was measured twice a week.



**Fig. 66 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Plasma Triglyceride (TG) Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

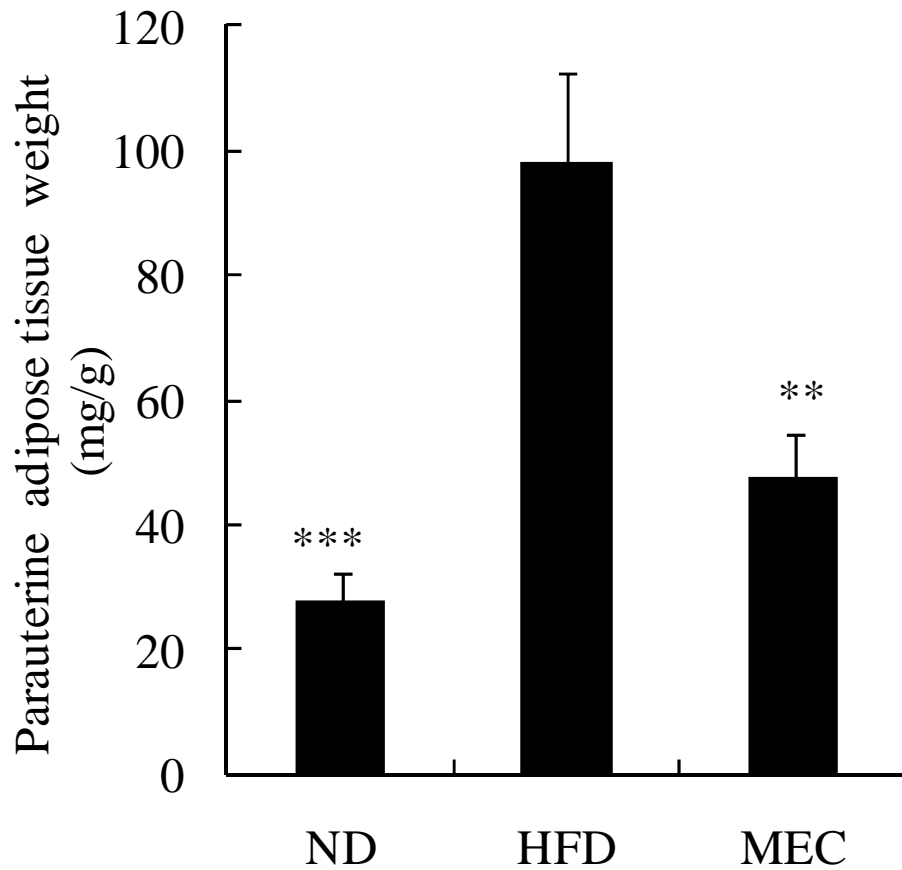
Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and MEC groups were given diets shown in Table 8. After these diets had been fed to the mice for 11 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma TG level was measured using Triglyceride E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E.





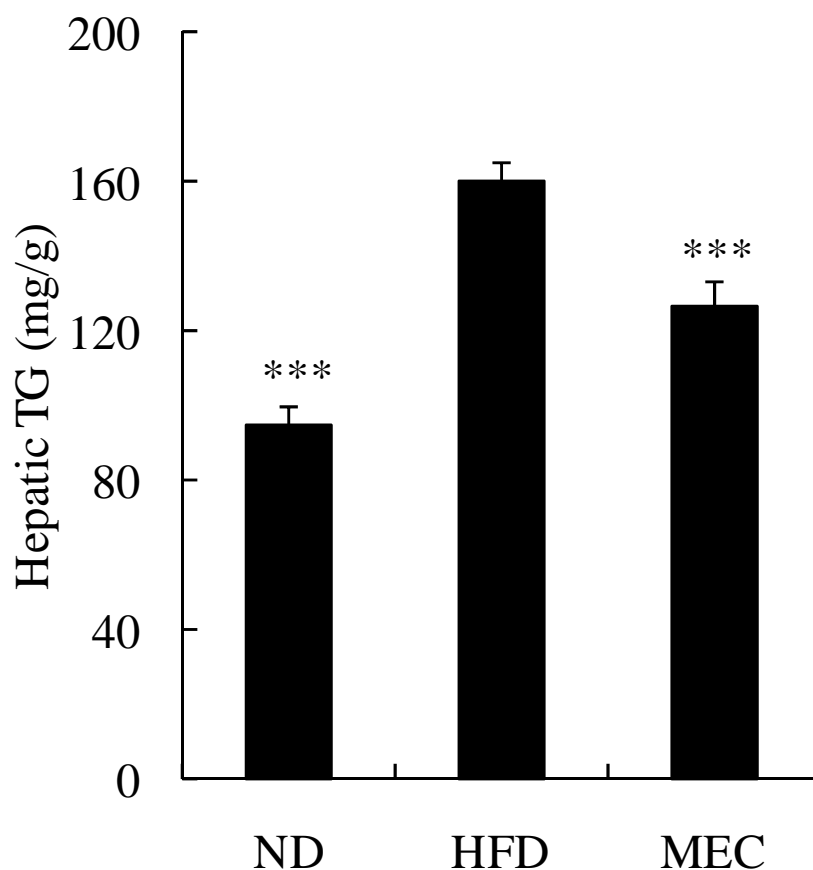
**Fig. 67 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Plasma Total Cholesterol (TC) Level in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and MEC groups were given diets shown in Table 8. After these diets had been fed to the mice for 11 weeks, the mice were fasted for 24 h and blood was taken from the tail vein. Plasma TC level was measured using Cholesterol E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$  vs. the HFD group.



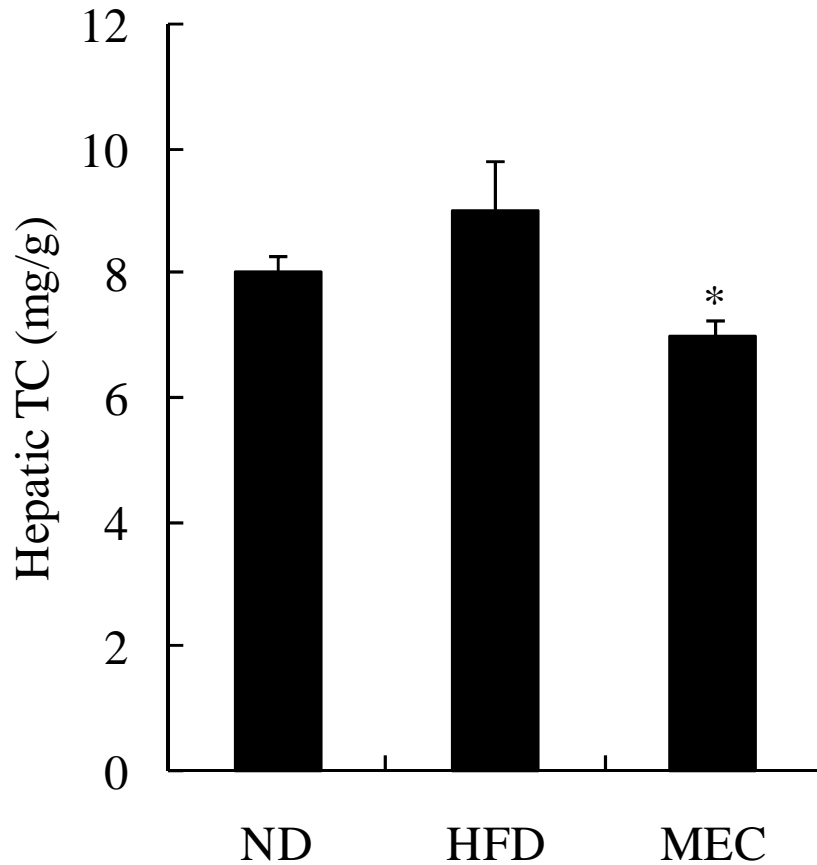
**Fig. 68 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Parauterine Adipose Tissue Weight in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and MEC groups were given diets shown in Table 8. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the parauterine adipose tissue was dissected and weighed. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



**Fig. 69 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Hepatic Triglyceride (TG) Content in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and MEC groups were given diets shown in Table 8. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the liver was dissected and weighed. Lipids were extracted using Folch solution (chloroform : methanol = 2 : 1) from liver. Hepatic TG was measured using Triglyceride E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*:  $p < 0.005$  vs. the HFD group.



**Fig. 70 Effect of Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) on the Hepatic Total Cholesterol (TC) Content in Obese Mice Induced by High-Fat Diet (HFD) for 11 Weeks**

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and MEC groups were given diets shown in Table 8. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the liver was dissected and weighed. Lipids were extracted using Folch solution (chloroform : methanol = 2 : 1) from liver. Hepatic TC was measured using Cholesterol E-Test Wako Kit. Data ( $n = 8$ ) are presented as the mean  $\pm$  S.E. \*:  $p < 0.05$  vs. the HFD group.

**Table 8. Composition of Mouse Diets in the Anti-Obesity Test of MEC**

Ingredient	Group		
	ND	HFD	MEC
$\beta$ -Cornstarch	465.692	105.692	105.692
$\alpha$ -Cornstarch	155	155	155
Milk casein	140	140	140
Sucrose	100	100	100
Beef tallow	40	400	400
Cellulose	50	50	20
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
L-Cystine	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008
MEC	0	0	30

MEC, methanol extract of *Chrysalidocorpus lutescens* Wendl. leaves.

All values are in g/kg of diet.

**Table 9. Organ Weight of the Obese Mice Induced by HFD ( $n = 8$ )**

	ND	HFD	MEC
Liver (mg/g of body weight)	$36.3 \pm 1.8$	$31.7 \pm 1.3$	$33.9 \pm 1.2$
Spleen (mg/g of body weight)	$4.17 \pm 0.24$	$3.28 \pm 0.37$	$3.15 \pm 0.25$
Kidney (mg/g of body weight)	$10.6 \pm 0.2$	$9.6 \pm 0.7$	$10.0 \pm 0.4$

Normal diet (ND), high-fat diet (HFD), and 3% Methanol Extract of *Chrysalidocarpus lutescens* Wendl. Leaves (MEC) groups were given diets shown in Table 8. After blood collection, the mice were killed with cervical dislocation and the organs was dissected and weighed. Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.

## 第5章 総括

これまでのスクリーニングの結果、ドクダミ、とろろ昆布、コガネタケヤシにTGの吸収抑制作用を見出し、これら3種類のサンプルについて、生理活性の確認、作用メカニズムの解明、活性成分の構造決定、抗肥満作用の確認を行ってきた。この中でも、特にドクダミのTG吸収抑制の作用メカニズムにおいて興味深い知見が得られたので、ドクダミを中心に研究を進めてきた。

ドクダミ葉熱水抽出物(WEH)は、腓リパーゼ阻害活性を示さず、脂肪酸トランスポーターであるFAT/CD36とグリセロール輸送チャネルであるAQP7を阻害することにより、リパーゼのTG代謝産物であるNEFAとグリセロールの腸管上皮細胞の刷子縁膜からの取り込みを抑制し、TGの吸収を抑制していることが考えられた。また、WEHに含まれるNEFA吸収抑制成分の1つとして、5-カフェオイルシキミ酸が同定され、また、グリセロール吸収抑制成分の一員として、Cu<sup>2+</sup>と低分子アミンの可能性が示唆された。特に、5-カフェオイルシキミ酸が、腸管からのNEFAの吸収を抑制する、あるいは、FAT/CD36を阻害するという報告はされていないため、新しい知見である。さらに、WEHはTG合成のマスターレギュレーターPPARとC/EBPのmRNA発現量を低下させることで、GPDHに代表されるような脂肪合成関連酵素の活性を阻害し、脂肪細胞におけるTGの蓄積を抑制することが示された。また、高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験によって、WEHには抗肥満作用や血中の脂質と糖の低下作用が確認された。これは、上記に示したWEHの腸管からのTG吸収抑制作用と脂肪細胞におけるTG蓄積抑制作用の2つの効果が長期的に作用した結果であると考えられる。また、脂肪組織以外の臓器に異常が見られなかったことから、毒性や副作用はないと考えられる。現在、市場に出ているTG吸収抑制作用を有する商品は腓リパーゼ阻害活性をもつものであるが、WEHはそれとは異なった作用メカニズム、すなわち、TG代謝産物の吸収抑制作用をもっている。ドクダミは食経験があって、WEHは食品で応用できる熱水抽出物であるため、従来との商品と組み合わせによって、より効果的なTG吸収抑制作用をもつ商品の開発につながることも考えられ、消費者の選択肢の幅も広げることができると思われる。また、グリセロール、NEFA、モノグリセリドといったTG代謝産物の取り込み阻害を標的にした抗肥満作用の研究は、腓リパーゼ活性阻害によるものと比較して、報告数が少ない。このドクダミの研究が先駆的な役割を担って、今後腓リパーゼの阻害による抗肥満作用の研究だけでなく、TG代謝産物の取り込み阻害による抗肥満作用の研究が盛んに行われるきっかけになることを強く期待したい。

とろろ昆布(TK)は腓リパーゼ活性を阻害することで中性脂肪の吸収を抑制し、抗肥満作用を有することがわかり、その作用は昆布粗粉碎物(NSK)よりも強力であることが確認された。この抗肥満作用の強さの違いは、とろろ昆布が非常に薄く削られていることに起因し、これによって表面積が増大し、アルギン酸に代表されるような活性成分が溶出されやすくなったためだと考えられる。また、とろろ昆布の食経験は豊富であり、安全性には問題はないと考えられる。

コガネタケヤシ葉メタノール抽出物(MEC)はリパーゼによる TG の分解を阻害することで TG の吸収を抑制していることが示された。また、MEC も WEH と同様に GPDH に代表されるような脂肪合成関連酵素の活性を阻害し、脂肪細胞における脂肪の蓄積を抑制することが確認された。GPDH の発現は PPAR $\alpha$  によって調節されていることから、おそらく MEC も PPAR $\alpha$  の発現を抑制するものと考えられ、それに伴って、脂肪細胞特異的な遺伝子群の発現を抑制することが推測される。高脂肪食由来の肥満モデルマウスを用いた抗肥満試験によって、MEC には抗肥満作用や血中脂質と低下作用が確認できた。上記に示した MEC の TG 吸収抑制作用と脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用の 2 つの効果は長期的に作用した結果であると考えられる。

以上のことから、ドクダミ、とろろ昆布、コガネタケヤシは肥満を予防・改善し、メタボリックシンドロームを予防・改善するためのヘルスフードの素材として非常に有効であると考えられる。また、これらの素材を食品に応用するためにも、さらなるメカニズムの解明、活性成分の構造決定、食品加工や安全性に関する研究の蓄積が必要であると思われる。近年、世界の肥満者数が年々増加傾向にある現状を考えると、肥満を予防・改善するためのヘルスフードの新規発見や開発が重要であると考えられる。今後もよりよいヘルスフードを追い求め、肥満によって引き起こされるさまざまな疾患に苦しむ人々を救うことができるように、私も一人の研究者として社会貢献していきたい。



## 参考文献

- 1) Golay A, and Ybarra J, Link between obesity and type 2 diabetes, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **19**, 649-663 (2005).
- 2) Montani JP, Antic V, Yang Z, Dulloo A, Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **26**, S28-S38 (2002).
- 3) 吉池信夫, Body Mass Index に基づく肥満の程度と糖尿病、高血圧、抗脂血症の危険因子との関連 - 他施設共同研究による疫学的検討 - . 肥満研究, **6**, 4-17 (2000).
- 4) Matsuzawa Y, Shimomura I, Nakamura T, Keno Y, Kotani K, and Tokunaga K, Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity, *Obes. Res.*, **3**, S187-S194 (1995).
- 5) Chan DC, Barrett HP, and Watts GF, Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, **4**, 227-246 (2004).
- 6) Reaven GM, Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*, **37**, 1595-1607 (1988).
- 7) Kaplan NM, The deadly quartet: Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension, *Arch. Inter. Med.*, **149**, 1512-1520 (1989)
- 8) DeFronzo RA, and Ferrannini E, Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease, *Diabetes Care*, **14**, 173-194 (1991).
- 9) Nakamura T, Tokunaga K, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Islam AH, Keno Y, Kobatake T, and Nagai Y, Contribution of visceral fat accumulation to the development of coronary artery disease in non-obese men, *Atherosclerosis*, **107**, 239-246 (1994).
- 10) A WHO Consultation on Obesity, Obesity-preventing and managing the global epidemic, World Health Organization, Geneva.
- 11) Onat A, Hergenc G, Keles I, Dogan Y, Yurkmen S, Sansoy V, Sex difference in development of diabetes and cardiovascular disease on the way from obesity and metabolic syndrome: Prospective study of a cohort with normal glucose metabolism, *Metab. Clin Exp.*, **54**, 800-808 (2005).
- 12) Goran MI, and Gower BA, Relation between visceral fat and disease risk in children and adolescents, *Am. J. Clin. Nutr.*, 70(suppl), S149-S156 (1999).
- 13) Tittelbach TJ, Berman DM, Nicklas BJ, Ryan AS, and Goldberg AP, Racial Differences in Adipocyte Size and Relationship to the Metabolic Syndrome in Obese Women, *Obes. Res.*, **12**, 990-998 (2004).
- 14) Bacha F, Saad R, Gungor N, Janosky J, and Arslanian SA, Obesity, Regional Fat Distribution, and Syndrome X in Obese Black Versus White Adolescents: Race Differential in Diabetogenic and Atherogenic Risk Factors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 2534-2540 (2003).

- 15) 松澤佑次, 日本肥満学会肥満症診断基準検討委員会, 新しい肥満の判定と肥満症の診断基準, *肥満研究*, **6**, 18-28 (2000) .
- 16) 朝山光太郎, 小児肥満症の判断基準 - 小児適正体格検討委員会よりの提言, *肥満研究*, **8**, 96-103 (2002) .
- 17) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室, 平成 19 年国民健康・栄養調査結果の概要, 厚生労働省ホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/12/h1225-5a.html>).
- 18) 文部科学省生涯学習政策局調査企画課, 平成 20 年度学校保健統計調査報告書, 文部科学省ホームページ([http://www.mext.go.jp/component/b\\_menu/other/\\_icsFiles/afieldfile/2009/05/08/1256666\\_2.pdf](http://www.mext.go.jp/component/b_menu/other/_icsFiles/afieldfile/2009/05/08/1256666_2.pdf)).
- 19) Klish WJ, Childhood obesity: Pathophysiology and treatment. *Acta Paediatr. Jpn.*, **37**, 1-6 (1995).
- 20) King DS, Staten MA, Kohrt WM, Dalsky GP, Elahi D, and Holloszy, JO, Insulin secretory capacity in endurance-trained and untrained young men, *Am. J. Physiol.*, **259**, E155-E161 (1990).
- 21) King DS, Dalsky GP, Staten MA, Clutter WE, Van Houten DR, and Holloszy JO, Insulin action and secretion in endurance-trained and untrained humans, *J. Appl. Physiol.*, **63**, 2247-2252 (1987).
- 22) Moustaid N, Jones BH, and Taylor JW, Insulin Increases Lipogenic Enzyme Activity in Human Adipocytes in Primary Culture, *J. Nutr.*, **126**, 865-870 (1996).
- 23) Hamosh M, and Scow RO, Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid, *J. Clin. Invest.*, **52**, 88-95 (1973).
- 24) Hamosh M, Sivasubramanian KN, Salzman-Mann C, and Hamosh P, Fat digestion in the stomach of premature infants. I. Characteristics of lipase activity, *J. Pediatr.*, **93**, 674-679 (1978).
- 25) Hamosh M, Scanlon JW, Ganot D, Likel M, Scanlon KB, and Hamosh P, Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants, *J. Clin. Invest.*, **67**, 838-846 (1981).
- 26) Hamosh M, Bitman J, Liao TH, Mehta NR, Buczek RJ, Wood DL, Grylack LJ, and Hamosh P, Gastric lipolysis and fat absorption in preterm infants: effect of medium-chain triglyceride or long-chain triglyceride-containing formulas, *Pediatrics*, **83**, 86-92 (1989).
- 27) Liddle RA, Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors, *Am. J. Physiol.*, **269**, G319-G327 (1995).
- 28) Konturek SJ, Konturek JW, Lamers CB, Tasler J, and Bilski J, Role of secretin and CCK in the stimulation of pancreatic secretion in conscious dogs. Effects of atropine and somatostatin, *Int. J. Pancreatol.*, **2**, 223-235 (1987).
- 29) Watanabe S, Chey WY, Lee KY, and Chang TM, Secretin is released by digestive products of fat in dogs, *Gastroenterology*, **90**, 1008-1017 (1986).
- 30) Coleman R, Bile salts and biliary lipids. *Biochem. Soc. Trans.*, **15**, 68S-80S (1987).

- 31) Sugano K, Pancreatic lipase, *Nippon Rinsyo* (in Japanese), **53**, 435-437 (1995).
- 32) Cambillau C, Verger R, and Carrière F, Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. Tilbeurgh H, and Bezzine S, *Biochim Biophys Acta*, **1441**, 173-184 (1999).
- 33) Ho SY, Delgado L, and Storch J, Monoacylglycerol metabolism in human intestinal Caco-2 cells: evidence for metabolic compartmentation and hydrolysis, *J. Biol. Chem.*, **277**, 1816-1823 (2002).
- 34) Whiting MJ, Bile acids, *Adv. Clin. Chem.*, **25**:169-232 (1986).
- 35) Thomson AB, Hotke CA, and O'Brien BD, and Weinstein WM, Intestinal uptake of fatty acids and cholesterol in four animals species and man: role of unstirred water layer and bile salt micelle, *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.*, **75**, 221-232 (1983).
- 36) Hsu KT, and Storch J, Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **271**, 13317-13323 (1996).
- 37) Négrel R, and Ailhaud G, Localization of the monoglyceride pathway enzymes in the villus tips of intestinal cells and their absence from the brush-border, *FEBS Lett.*, **54**, 183-188 (1975).
- 38) Polheim D, David JS, Schultz FM, Wylie MB, and Johnston JM, Regulation of triglyceride biosynthesis in adipose and intestinal tissue, *J. Lipid. Res.*, **14**, 415-421 (1973).
- 39) The separation of the alpha-glycerophosphate and monoglyceride pathways in the intestinal biosynthesis of triglycerides, Johnston JM, Rao GA, and Lowe PA, *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 578-580 (1967).
- 40) Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, and Bendayan M, Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons, *J. Biol. Chem.*, **277**, 16470-16477 (2002).
- 41) Green PH, Riley JW, Lipid absorption and intestinal lipoprotein formation, *Aust. N. Z. J. Med.*, **11**, 84-90 (1981).
- 42) Tso P, and Balint JA, Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics, *Am. J. Physiol.*, **250**, G715-G726 (1986).
- 43) Lowe ME, The triglyceride lipases of pancreas, *J. Lipid. Res.*, **43**, 2007-2016 (2002).
- 44) Payne RM, Sims HF, Jennens ML, and Lowe ME, Rat pancreatic lipase and two related proteins: enzymatic properties and mRNA expression during development, *Am. J. Physiol.*, **266**, G914-G921 (1968).
- 45) Lebenthal E, and Lee PC, Development of functional response in human exocrine pancreas, *Pediatrics*, **66**, 556-560 (1980).
- 46) Yang Y, and Lowe ME, Human pancreatic triglyceride lipase expressed in yeast cells: purification and characterization, *Protein Expr. Purif.*, **13**, 36-40 (1998).
- 47) De Caro A, Figarella C, Amic J, Michel R, and Guy O, Human pancreatic lipase: A glycoprotein,

- Biochim. Biophys. Acta*, **490**, 411-419 (1977).
- 48) Lowe ME, Rosenblum JL, and Strauss AW, Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA, *J. Biol. Chem.*, **264**, 20042-20048 (1989).
  - 49) Lowe ME, Rosenblum JL, and Strauss AW, Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA, *J. Biol. Chem.*, **264**, 20042-20048 (1989).
  - 50) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_081201.2?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence\\_ResultsPanel.Sequence\\_RVDocSum](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_081201.2?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum)
  - 51) Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, and Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, Sussman JL, Verschueren KHG, and Goldman A, The alpha/beta hydrolase fold, *Protein Eng.*, **5**, 197-211 (1992).
  - 52) Winkler FK, D'Arcy A, and Hunziker W, Structure of human pancreatic lipase, *Nature*, **343**, 771-774 (1990).
  - 53) Lowe ME, The catalytic site residues and interfacial binding of human pancreatic lipase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 17069-17073 (1992).
  - 54) van Tilbeurgh H, Egloff MP, Martinez C, Rugani N, Verger R, and Cambillau C, Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by x-ray crystallography, *Nature*, **362**, 814-820 (1993).
  - 55) Andersson L, Carriere F, Lowe ME, Nilsson A, and Verger R, Pancreatic lipase-related protein 2 but not classical pancreatic lipase hydrolyzes galactolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1302**, 236-240 (1996).
  - 56) Verger R, Pancreatic lipase, In: Borgstrom B, Brockman HL (eds) *Lipases*, 1st edn. Elsevier, Amsterdam, pp 84-150 (1984).
  - 57) Yang LY, Kuksis A, and Myher JJ, Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase in vitro: a reexamination, *J. Lipid Res.*, **31**, 137-147 (1990).
  - 58) Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, and Grimaldi PA, Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36, *J. Biol. Chem.*, **268**, 17665-17668 (1993).
  - 59) Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, and Jamieson GA, Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine, *Blood*, **80**, 1105-1115 (1992).
  - 60) Campbell FM, Bush PG, Veerkamp JH, and Dutta-Roy AK, Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta, *Placenta*, **19**, 409-415 (1998).
  - 61) Michelson AD, Wencel-Drake JD, Kestin AS, and Barnard MR, Platelet activation results in a redistribution of glycoprotein IV (CD36), *Arterioscler. Thromb.*, **14**, 1193-1201 (1994).

- 62) Greenwalt DE, Scheck SH, and Rhinehart-Jones T, Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet, *J. Clin. Invest.*, **96**, 1382-1388 (1996).
- 63) Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, and Protter AA, CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.*, **268**, 11811-11816 (1993).
- 64) Dutta-Roy AK, Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 1360-1372 (2000).
- 65) Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, and Quehenberger O, Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes, *J. Biol. Chem.*, **272**, 17551-17557 (1997).
- 66) Drover VA, and Abumrad NA, CD36-dependent fatty acid uptake regulates expression of peroxisome proliferator activated receptors, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 311-315 (2005).
- 67) Ferrer-Martínez A, Marotta M, Turini M, Macé K, and Gómez-Foix AM, Effect of sucrose and saturated-fat diets on mRNA levels of genes limiting muscle fatty acid and glucose supply in rats, *Lipids*, **41**, 55-62 (2006).
- 68) Drover VA, and Abumrad NA, Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancer-binding protein alpha, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 311-315 (2005).
- 69) Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, and Latruffe N, Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16710-16714 (1998).
- 70) Drover VA, Nguyen DV, Bastie CC, Darlington YF, Abumrad NA, Pessin JE, London E, Sahoo D, and Phillips MC, CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice, *J. Biol. Chem.*, **283**, 13108-13115 (2008).
- 71) Ehehalt R, Sparla R, Kulaksiz H, Herrmann T, Füllekrug J, and Stremmel W, Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts), *BMC Cell. Biol.*, **9**, 45.
- 72) Coburn CT, Knapp FF Jr, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, and Abumrad NA, Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice, *J. Biol. Chem.*, **275**, 32523-32529 (2000).
- 73) Nassir F, Wilson B, Han X, Gross RW, and Abumrad NA, CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine, *J. Biol. Chem.*, **282**, 19493-19501 (2007).
- 74) Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N, Ohno I, Mita S, Matsuzawa Y, Matsubara K, and Okubo K, Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 53-58 (1997).

- 75) Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, and Takata K, Aquaporins in the digestive system, *Med. Electron. Microsc.*, **37**, 71-80 (2004).
- 76) Hara-Chikuma M, and Verkman AS, Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 1386-1392 (2006).
- 77) Engel A, and Stahlberg H, Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions, and variable surfaces, *Int. Rev. Cytol.*, **215**, 75-104 (2002).
- 78) Abrami L, Berthouaud V, Deen PM, Rousselet G, Tacnet F, and Ripoche P, Glycerol permeability of mutant aquaporin 1 and other AQP-MIP proteins: inhibition studies, *Eur. J. Physiol.*, **431**, 408-414 (1996).
- 79) Laforenza U, Gastaldi G, Grazioli M, Cova E, Tritto S, Faelli A, Calamita G, and Ventura U, Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract, *Biol. Cell.*, **97**, 605-613 (2005).
- 80) Tritto S, Gastaldi G, Zelenin S, Grazioli M, Orsenigo MN, Ventura U, Laforenza U, and Zelenina M, Osmotic water permeability of rat intestinal brush border membrane vesicles: involvement of aquaporin-7 and aquaporin-8 and effect of metal ions, *Biochem. Cell. Biol.*, **85**, 675-684 (2007).
- 81) Donowitz M, Singh S, Salahuddin FF, Hogema BM, Chen Y, Gucek M, Cole RN, Ham A, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Lapierre LA, Broere N, Goldenring J, deJonge H, and Li X, Proteome of murine jejunal brush border membrane vesicles, *J. Proteome Res.*, **6**, 4068-4079 (2007).
- 82) Gnacińska M, Małgorzewicz S, Stojek M, Lysiak-Szydłowska W, and Sworczak K, Role of adipokines in complications related to obesity. A review, *Adv. Med. Sci.*, **54**, 1-8 (2009).
- 83) Bray GA, Bouchard C, James WPT, Handbook of obesity, Marcel Dekker, Inc., New York (1998).
- 84) Kawada T, and Takahashi N, Genesis and differentiation of adipocytes, *Adiposcience* (in Japanese), **1**, 8-18 (2004).
- 85) Konieczny SF, Emerson CP Jr., 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination, *Cell*, **38**, 791-800 (1984).
- 86) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, and Hedrick MH, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Eng.*, **7**, 211-228 (2001).
- 87) Watson RT, and Pessin JE, Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation, *Recent Prog. Horm. Res.*, **56**, 175-193 (2001).
- 88) Coleman RA, and Bell RM, Selective changes in enzymes of the *sn*-glycerol 3-phosphate and dihydroxyacetone-phosphate pathways of triacylglycerol biosynthesis during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Biol. Chem.*, **255**, 7681-7687 (1980).

- 89) Hartman AD, Lipoprotein lipase distribution in rat adipose tissues: effect on chylomicron uptake, *Am. J. Physiol.*, **232**, E316-E323 (1977).
- 90) Doege H, and Stahl A, Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models, *Physiology (Bethesda)*, **21**:259-268 (2006).
- 91) Yu KT, Czech MP. Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta subunit activates the receptor-associated tyrosine kinase activity, *J. Biol. Chem.*, **259**, 5277-5286 (1984).
- 92) White MF, IRS proteins and the common path to diabetes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **283**, E413-E422 (2002).
- 93) Farese RV, Sajan MP, and Standaert ML, Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **230**, 593-605 (2005).
- 94) Ito Y, Obara K, Ikeda R, Ishii M, Tanabe Y, Ishikawa T, and Nakayama K. Passive stretching produces Akt- and MAPK-dependent augmentations of GLUT4 translocation and glucose uptake in skeletal muscles of mice, *Pflugers. Arch.*, **451**, 803-813 (2006).
- 95) Iritani N, Sugimoto T, and Fukuda H, Gene expressions of leptin, insulin receptors and lipogenic enzymes are coordinately regulated by insulin and dietary fat in rats, *J. Nutr.*, **130**, 1183-1188 (2000).
- 96) Farmer SR, Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell. Metab.*, **4**, 263-273 (2006).
- 97) Tang QQ, Otto TC, and Lane MD, Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 44-49 (2003).
- 98) Issemann I, and Green S, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature*, **347**, 645-650 (1990).
- 99) Mandard S, Müller M, and Kersten S, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 393-416 (2004).
- 100) Zieleniak A, Wójcik M, and Woźniak LA, Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **56**, 331-345 (2008).
- 101) Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, and Milburn MV, Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Nature*, **395**, 137-143 (1998).
- 102) Zoete V, Grosdidier A, and Michielin O, Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 915-925 (2007).
- 103) Ricote M, and Glass CK, PPARs and molecular mechanisms of transrepression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 926-935 (2007).

- 104) Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, and Glass CK, A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma, *Nature*, **437**, 759-763 (2005).
- 105) Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, and Spiegelman BM, Transcriptional regulation of adipogenesis, *Genes. Dev.*, **14**, 1293-1307 (2000).
- 106) Cao Z, Umek RM, and McKnight SL, Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells, *Genes. Dev.*, **5**, 1538-1552 (1991)..
- 107) Ramji DP, and Foka P, CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem. J.*, **365**, 561-575 (2002).
- 108) Tang QQ, and Lane MD, Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 12446-12450 (2000).
- 109) Tang QQ, Grønborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, and Lane MD, Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **102**, 9766-9771 (2005).
- 110) Freytag SO, Paielli DL, and Gilbert JD, Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells, *Genes. Dev.*, **8**, 1654-1663 (1994).
- 111) Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, and Spiegelman BM, C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway, *Genes. Dev.*, **16**, 22-26 (2002).
- 112) Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, and Spiegelman BM, Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity, *Mol. Cell.*, **3**, 151-158 (1999).
- 113) Clarke SL, Robinson CE, and Gimble JM, CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 99-103 (1997).
- 114) Langin D, Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome, *Pharmacol. Res.*, **53**, 482-491 (2006).
- 115) Syu LJ, and Saltiel AR, Lipotransin: a novel docking protein for hormone-sensitive lipase, *Mol. Cell.*, **4**, 109-115 (1999).
- 116) Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, and Kimmel AR, Role of PAT proteins in lipid metabolism, *Biochimie*, **87**, 45-49 (2005).
- 117) Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, Lapillonne A, Chang BH, Quast MJ, Gorenstein D, Chen



- KH, and Chan L, Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Leprdb/db* mice, *Nat. Genet.*, **26**, 474–479 (2000).
- 118) Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, Roush DL, Zee JV, Gavriloova O, Reitman ML, Deng CX, Li C, Kimmel AR, and Londos C, Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity, *PNAS*, **98**, 6494–6499 (2001).
- 119) Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, Londos C, Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation, *J. Cell. Biol.*, **161**, 1093–1103 (2003).
- 120) Shen WJ, Sridhar K, Bernlohr DA, and Kraemer FB, Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **96**, 5528-5532 (1999).
- 121) Wijkander J, Landstrom TR, Manganiello V, Belfrage P, Degerman E, Insulin-induced phosphorylation and activation of phosphodiesterase 3B in rat adipocytes, possible role for protein kinase B but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase, *Endocrinology*, **139**, 219–227 (1998).
- 122) メタボリックシンドローム診断基準検討委員会, メタボリックシンドロームの定義と診断基準. 日本内科学会雑誌, **94**, 794-809 (2005).
- 123) 小村徳幸, 木原進士, 内臓脂肪組織と皮下脂肪組織, 脂肪細胞と脂肪組織, 207-210 (2007).
- 124) 矢澤一良, ヘルスフード科学概論, 11-12 (2003)
- 125) Xu CJ, Liang YZ, and Chau FT, Identification of essential components of *Houttuynia cordata* by gas chromatography/mass spectrometry and the integrated chemometric approach, *Talanta*, **68**, 108-115 (2005).
- 126) 指田 豊, 日本の薬草, 学研, 54-55 (2004).
- 127) Meng J, Leung KS, Jiang Z, Dong X, Zhao Z, and Xu LJ, Establishment of HPLC-DAD-MS fingerprint of fresh *Houttuynia cordata*, *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1604-1609 (2005).
- 128) Kim SK, Ryu SY, No J, Choi SU, and Kim YS, Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*, *Arch. Pharm. Res.*, **24**, 518-521 (2001).
- 129) Kusirisin W, Srichairatanakool S, Lertrakarnnon P, Lailerd N, Suttajit M, Jaikang C, and Chaiyasut C, Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients, *Med. Chem.*, **5**, 139-147 (2009).
- 130) Hayashi K, Kamiya M, and Hayashi T, Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV, *Planta. Med.*, **61**, 237-241 (1995).
- 131) Kim GS, Kim DH, Lim JJ, Lee JJ, Han DY, Lee WM, Jung WC, Min WG, Won CG, Rhee MH, Lee HJ, and Kim S, Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract

- against the intracellular bacterial pathogen salmonella within the RAW 264.7 macrophage, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2012-2017 (2008).
- 132) Yuan L, Wu J, Aluko RE, and Ye X, Kinetics of renin inhibition by sodium houttuynfonate analogs, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2275-2280 (2006).
  - 133) Taguchi K, Hagiwara Y, Kajiyama K, and Suzuki Y, Pharmacological studies of Houttuyniae herba: the anti-inflammatory effect of quercitrin, *Yakugaku Zasshi* (in Japanese), **113**, 327-333 (1993).
  - 134) Lu HM, Liang YZ, Yi LZ, and Wu XJ, Anti-inflammatory effect of *Houttuynia cordata* injection, *J. Ethnopharmacol.*, **104**, 245-249 (2006).
  - 135) 川嶋昭二, 日本産コンブ図鑑, 北日本海洋センター, 6-7, 23-25 (1989)
  - 136) Stevan FR, Oliveira MB, Bucchi DF, Nosedá, Iacomini M, and Duarte ME, Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **33**, 477-484 (2001).
  - 137) Mizuno M, Nishitani Y, Tanoue T, Matoba Y, Ojima T, Hashimoto T, and Kanazawa K, Quantification and localization of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 335-338 (2009).
  - 138) Zhang Z, Zhang P, Hamada M, Takahashi S, Xing G, Liu J, and Sugiura N, Potential chemoprevention effect of dietary fucoxanthin on urinary bladder cancer EJ-1 cell line, *Oncol. Rep.*, **20**, 1099-1103 (2008).
  - 139) Yamamoto I, and Maruyama H, Effect of dietary seaweed preparations on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in rats, *Cancer Lett.*, **26**, 241-251 (1985).
  - 140) Reddy BS, Numoto S, and Choi CI, Effect of dietary *Laminaria angustata* (brown seaweed) on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in male F344 rats, *Nutr. Cancer*, **7**, 59-64 (1985).
  - 141) Reddy BS, Sharma C, and Mathews L, Effect of Japanese seaweed (*Laminaria angustata*) extracts on the mutagenicity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, a breast carcinogen, and of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl, a colon and breast carcinogen, *Mutat. Res.*, **27**, 113-118 (1984).
  - 142) Teas J, Harbison ML, and Gelman RS, Dietary seaweed (*Laminaria*) and mammary carcinogenesis in rats *Cancer Res.*, **44**, 2758-2761 (1984).
  - 143) Bocanegra A, Benedi J, and Sanchez-Muniz FJ, Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo- and hypercholesterolaemic growing rats, *Br. J. Nutr.*, **95**, 696-702 (2006).
  - 144) Kimura Y, Watanabe K, and Okuda H, Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **54**, 47-54 (1996).
  - 145) Vaugelade P, Hoebler C, Bernard F, Guillon F, Lahaye M, Duee PH, and Darcy-Vrillon B, Non-starch polysaccharides extracted from seaweed can modulate intestinal absorption of glucose and insulin

- response in the pig, *Reprod. Nutr. Dev.*, **40**, 33-47 (2000).
- 146) Ohta A, Taguchi A, Takizawa T, Adachi T, Kimura S, and Hashizume N, The alginate reduce the postprandial glycaemic response by forming a gel with dietary calcium in the stomach of the ra., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **67**, 55-61 (1997).
  - 147) Romanos MT, Andrada-Serpa MJ, Mourao PA, Yoneshigue- Valentin Y, Costa SS, Pereira MS, Miranda MM, Goncalves JL, and Wigg MD, A sulphated fucan from the *Laminaria abyssalis* inhibits the human T cell lymphotropic virus type 1-induced syncytium formation in HeLa cells, *Antivir. Chem. Chemother.*, **13**, 219-221 (2002).
  - 148) Oomizu S, Yanase Y, Suzuki H, Kameyoshi Y, and Hide M, Fucoidan prevents C epsilon germline transcription and NFkappaB p52 translocation for IgE production in B cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 501-507 (2006).
  - 149) Jeong HJ, Lee SA, Moon PD, Na HJ, Park RK, Um JY, Kim HM, and Hong SH, Alginic acid has anti-anaphylactic effects and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation *Clin. Exp. Allergy.*, **36**, 785-794 (2006).
  - 150) Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Takahashi N, Kawada T, and Miyashita K, Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Int. J. Mol. Med.*, **18**, 147-152 (2006).
  - 151) Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, Jin XH, Koyama Y, Miyashita K, Yoshida K, Kase S, and Ohno S, Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide- induced inflammation in vitro and in vivo, *Exp. Eye. Res.*, **81**, 422-428 (2005).
  - 152) 土井 豊, 観葉植物事典, 34-36, (1996).
  - 153) Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, and Hotamisligil GS, A central role for JNK in obesity and insulin resistance, *Nature*, **420**, 333-336 (2002).
  - 154) Suganami T, Nishida J, and Ogawa Y, A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 2062-2068 (2005).
  - 155) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, and Lazar MA, The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, **409**, 307-312 (2001).
  - 156) Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, and Begum N, Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **285**, E106-E115 (2003).
  - 157) Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, and Lazar MA, Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia, *Diabetes*, **53**, 1937-1941 (2004).
  - 158) Sprengers ED, and Kluft C, Plasminogen activator inhibitors, *Blood*, **69**, 381-387 (1987).

- 159) Dickson ME, and Sigmund CD, Genetic basis of hypertension: revisiting angiotensinogen, *Hypertension*, **48**, 14-20 (2006).
- 160) Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, and Mooney RA, Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes, *J. Biol. Chem.*, **278**, 13740-13746 (2003).
- 161) Shi H, Tzamelis I, Bjørbaek C, and Flier JS, Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling, *J. Biol. Chem.*, **279**, 34733-34740 (2004).
- 162) Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, and Kahn BB, Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes, *Nature*, **436**, 356-362 (2005).
- 163) Ebihara K, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Masuzaki H, Satoh N, Tamaki M, Yoshioka T, Hayase M, Matsuoka N, Aizawa-Abe M, Yoshimasa Y, and Nakao K, Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action, *Diabetes*, **48**, 2028-2033 (1999).
- 164) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, and Kadowaki T, The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity, *Nat. Med.*, **7**, 941-946 (2001).
- 165) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J, Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, and Kadowaki T, Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis, *J. Biol. Chem.*, **278**, 2461-2468 (2003).
- 166) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, and Kadowaki T, Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase, *Nat. Med.*, **8**, 1288-1295 (2002).
- 167) Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, and Ruderman NB, Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16309-16313 (2002).
- 168) Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, and Goldstein BJ, Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes, *Diabetes*, **52**, 1355-1363 (2003).

- 169) Han LK, Takaku T, Li J, and Kimura Y, Okuda H, Anti-obesity action of oolong tea, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **23**, 98-105 (1999).
- 170) 中井正晃, ウーロン茶重合ポリフェノールの血中トリグリセリド上昇抑制作用メカニズム, *肥満研究*, **11**, 88-90 (2005) .
- 171) Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, Yazawa K. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **1**,893-899 (2007).
- 172) Papamandjaris AA, MacDougall DE, and Jones PJP, Medium chain fatty acid Metabolism and energy expenditure: Obesity treatment implications. *Life Sci.*, **62**, 1203-1215 (1998).
- 173) Wutzke K, and Lorenz H, The effect of L-carnitine on fat oxidation, protein turnover, and body composition in slightly overweight subjects, *Metabolism*, **53**, 1002-1006 (2004)
- 174) Lee MS, Lee HJ, Lee HS, and Kim Y, L-carnitine stimulates lipolysis via induction of the lipolytic gene expression and suppression of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Med. Food*, **9**, 468-473 (2006).
- 175) Han LK, Kimura Y, and Okuda H, Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **23**, 174-179 (1999).
- 176) Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, and Park OJ, Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 694-699 (2005).
- 177) Kawada T, Watanabe T, Takaishi T, Tanaka T, Iwai K, Capsaicin-Induced  $\beta$ -Adrenergic Action on Energy Metabolism in Rats: Influence of Capsaicin on Oxygen Consumption, the Respiratory Quotient, and Substrate Utilization *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **183**, 250-256 (1986).
- 178) Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, and Tokimitsu I, Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **26**, 1459-1464 (2002).
- 179) Cho SY, Park PJ, Shin HJ, Kim YK, Shin DW, Shin ES, Lee HH, Lee BG, Baik JH, and Lee TR, (-)-Catechin suppresses expression of Kruppel-like factor 7 and increases expression and secretion of adiponectin protein in 3T3-L1 cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **292**, E1166-E1172 (2007).
- 180) Kim MS, Kim JK, Kwon DY, and Park R, Anti-adipogenic effects of Garcinia extract on the lipid droplet accumulation and the expression of transcription factor, *Biofactors*, **22**,193-196 (2004).
- 181) Reeves PG, Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet, *J. Nutr.*, **127**, 838S-841S (1997).
- 182) Folch J, Lees M, Stanley GHS, A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).

- 183) Abumrad NA, Park JH, and Park CR, Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein, *J. Biol. Chem.*, **259**, 8945-8953 (1984).
- 184) Copper inhibits the water and glycerol permeability of aquaporin-3, Zelenina M, Tritto S, Bondar AA, Zelenin S, and Aperia A, *J. Biol. Chem.*, **279**, 51939-51943 (2004).
- 185) Mercury-sensitive residues and pore site in AQP3 water channel, Kuwahara M, Gu Y, Ishibashi K, Marumo F, and Sasaki S, *Biochemistry*, **6**, 13973-13978 (1997).
- 186) Structural basis of aquaporin inhibition by mercury, Savage DF, and Stroud RM, *J. Mol. Biol.*, **368**, 607-617 (2007).
- 187) Tsujita T, Takaichi H, Takaku T, Aoyama S, and Hiraki J, Antiobesity action of epsilon-polylysine, a potent inhibitor of pancreatic lipase, *J. Lipid Res.*, **47**, 1852-1858 (2006).
- 188) Lei F, Zhang XN, Wang W, Xing DM, Xie WD, Su H, and Du LJ, Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int. J. Obes. (Lond.)*, **31**, 1023-1029 (2007).
- 189) Karu N, Reifen R, and Kerem Z, Weight gain reduction in mice fed Panax ginseng saponin, a pancreatic lipase inhibitor, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2824-2828 (2007).
- 190) Liu W, Zheng Y, Han L, Wang H, Saito M, Ling M, Kimura Y, and Feng Y, Saponins (Ginsenosides) from stems and leaves of Panax quinquefolium prevented high-fat diet-induced obesity in mice, *Phytomedicine*, **15**, 1140-1145 (2008).
- 191) Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya AC, Cunha IB, Carvalho PO, and Eberlin MN, Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts, *Molecules*, **12**, 423-432 (2007).
- 192) Keyhanian S, and Stahl-Biskup E, Phenolic constituents in dried flowers of aloe vera (*Aloe barbadensis*) and their in vitro antioxidative capacity, *Planta Med.*, **73**, 599-602 (2007).
- 193) Fukuoka M, Chemical and toxicological studies on bracken fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. VI. Isolation of 5-O-caffeoylshikimic acid as an antithiamine factor, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **30**, 3219-3224 (1982).
- 194) Ivanova A, Serly J, Dinchev D, Ocsovszki I, Kostova I, and Molnar J, Screening of some saponins and phenolic components of *Tribulus terrestris* and *Smilax excelsa* as MDR modulators, *In Vivo*, **23**, 545-550 (2009).
- 195) Chen T, Li J, Cao J, Xu Q, Komatsu K, and Namba T, A new flavanone isolated from rhizoma *Smilax glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage, *Planta Med.*, **65**, 56-59 (1999).

- 196) Braguine CG, Costa ES, Magalhães LG, Rodrigues V, da Silva Filho AA, Bastos JK, Silva ML, Cunha WR, Januário AH, and Pauletti PM, Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms, *Z. Naturforsch. C.*, **64**, 793-797 (2009).
- 197) Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, and Lee MK, Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice, *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 937-943 (2010).
- 198) Wang L, Bao Y, Yang Y, Wu Y, Chen X, Si S, Hong B. Discovery of Antagonists for Human Scavenger Receptor CD36 via an ELISA-Like High-Throughput Screening Assay. *J. Biomol. Screen.*, (2010) in press.
- 199) Yool AJ, Brokl OH, Pannabecker TL, Dantzer WH, Stamer WD. Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidney-derived cell line. *BMC Physiol.*, **2**, 4 (2002).
- 200) PPARalpha governs glycerol metabolism, Patsouris D, Mandard S, Voshol PJ, Escher P, Tan NS, Havekes LM, Koenig W, März W, Tafuri S, Wahli W, Müller M, and Kersten S, *J. Clin. Invest.*, **114**, 94-103 (2004).
- 201) Bitter T, and Muir HM, A modified uronic acid carbazole reaction, *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962).
- 202) Kimura Y, Watanabe K, and Okuda H, Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **54**, 47-54 (1996).
- 203) Pasquier B, Armand M, Castelain C, Guillon F, Borel P, Lafont H, and Lairon D, Emulsification and lipolysis of triacylglycerols are altered by viscous soluble dietary fibres in acidic gastric medium in vitro, *Biochem. J.*, **314**, 269-275 (1996).
- 204) Kim MJ, Chang UJ, and Lee JS, Inhibitory effects of Fucoidan in 3T3-L1 adipocyte differentiation, *Mar. Biotechnol. (NY)*, **11**, 557-562 (2009).
- 205) Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Takahashi N, Kawada T, and Miyashita K, Fucoxanthin and its metabolite, fucoxanthinol, suppress adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Int. J. Mol. Med.*, **18**, 147-152 (2006).
- 206) Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues, Maeda H, Hosokawa M, Sashima T, Funayama K, and Miyashita K, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 392-397 (2005).

# 謝辞

ヘルスフード科学講座運営に当りご支援とご協力を頂きました株式会社中島董商店、及び、キューピー株式会社に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに当たり、また本論文をまとめるに際し、ご指導と御高配を賜りました東京海洋大学院海洋科学技術研究科応用生命科学専攻ヘルスフード科学(中島董一郎記念)寄附講座の矢澤一良客員教授ならびに小山智之客員准教授に深く感謝の意を表します。

本論文を作製するに当たり、多大なるご指導をいただきました小川廣男教授、長島裕二教授、木谷誠一教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、とろろ昆布と昆布粗粉碎物を提供していただき、多大なるご指導を頂きましたフジッコ株式会社の戸田登志也博士、紙谷年昭氏、そして、コガネタケヤシを提供していただき、多大なるご協力をしていただいた株式会社赤塚植物園の西村富生博士に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり多大なるご配慮をいただき、励まして下さいました湘南予防医科学研究所の大塚伊津子主任研究員、三瓶英子主任研究員、輿石君子氏に厚く御礼を申し上げます。

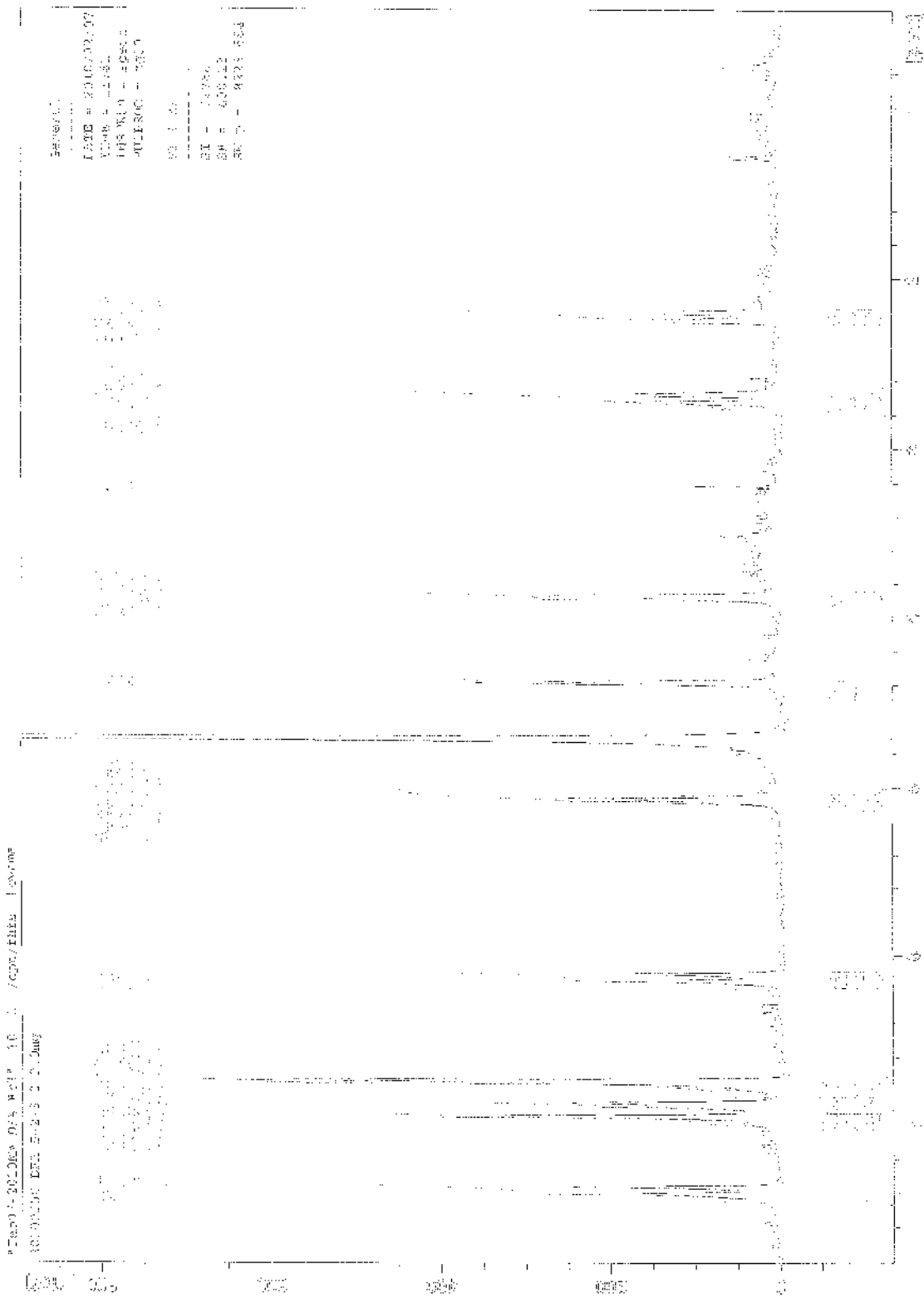
最後に、有益な助言、また激励を下さいました諸先輩方、同期の皆様をはじめ、研究室の皆様、私に関わってくれた全ての人、研究に使用した動物に深く感謝いたします。



## 添付資料

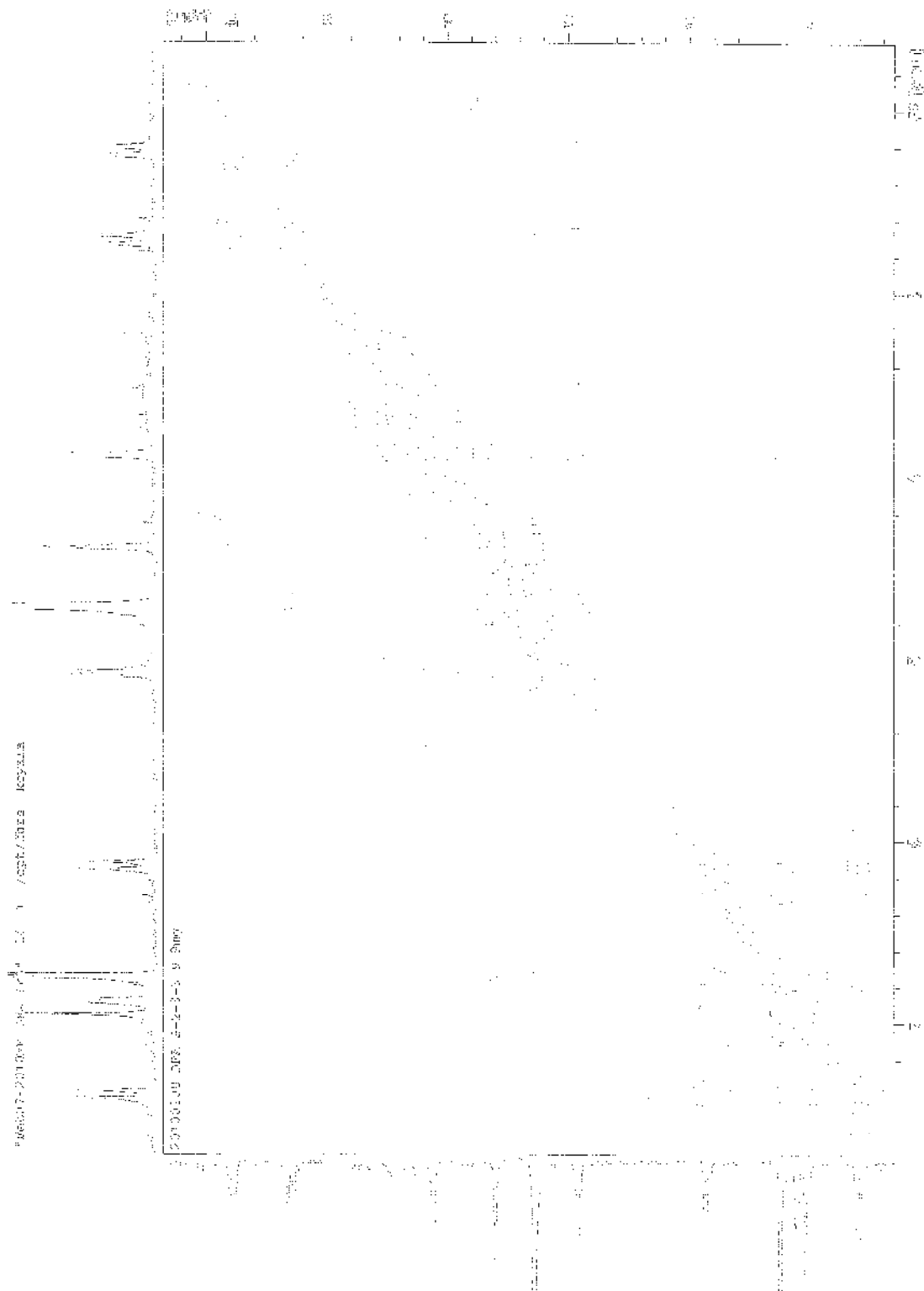
# 目次

WEH の compound 1 の NMR スペクトルデータ	ページ
$^1\text{H}$ NMR	146
$^{13}\text{C}$ NMR	147
COSY	148
HMQC	149
HMBC	150

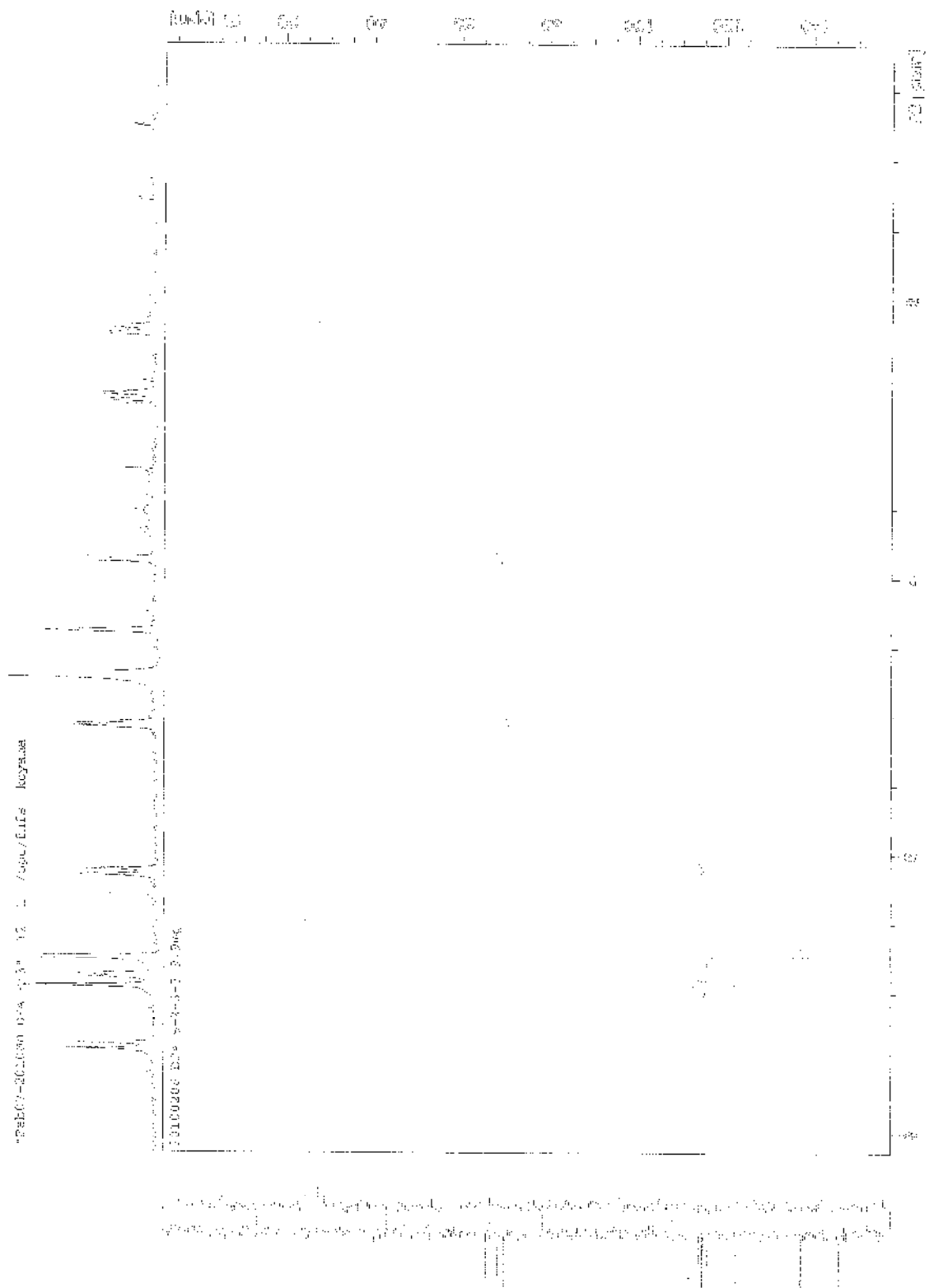


<sup>1</sup>H NMR spectrum datum of compound 1 of WEH





COSY datum of compound 1 of WEH



HMQC datum of compound **1** of WEH

