論文

玄米発酵抽出エキスが成長期ラットの肝機能に及ぼす影響

檜垣　俊介[1)]　松尾　達博[2)]

キーワード：玄米発酵抽出エキス、肝機能、ラット

要旨：近年、発酵食品や玄米食が健康に寄与するとして広く認知されている。玄米発酵抽出エキスは、焙煎した玄米を麹菌（*Aspergillus oryzae*）にて 48 時間発酵させたのち、アルコール抽出して得られた物質であり、100g 当たり 5g の核酸成分を含んでいることが特徴である。筆者らは、核酸成分を主体とする玄米発酵食品の摂取による肝障害軽減効果について、四塩化炭素によるマウス肝障害モデルを用いて検討を行い、玄米発酵食品の摂取による肝障害軽減効果があることを明らかにしている。このことを踏まえ、本研究では、食餌中の核酸成分の機能性について、ラットの肝機能に玄米発酵抽出エキスが影響を及ぼすか否かについて検討した。また、玄米発酵抽出エキスと試薬核酸とを比較して、玄米発酵抽出エキスの機能成分が核酸のみであるか否かについても調べた。

3 週齢の Wistar 系雄ラット 27 匹を、コントロール（無核酸）群（CON）、核酸群（NA、Nucleic acid）、玄米発酵抽出エキス群（ER、Extract of the fermented brown rice）の 3 群に分け、各実験食を与えて 3 週間飼育した。その結果、単位重量当たりの肝臓中性脂肪含量には各群間で有意差を認めなかったが、肝臓当たりの中性脂肪含量は CON 群に比べて ER 群で有意に低値であった。また、単位重量当たりの肝臓コレステロール含量は CON 群および NA 群に比べて ER 群で有意に低値であり、肝臓当たりのコレステロール含量は CON 群に比べて ER 群で有意に低くなった。以上の結果より玄米発酵抽出エキスは、肝臓脂肪蓄積抑制効果を有することが推察された。

はじめに

近年、発酵食品や玄米食が健康に寄与するとして広く認知されている。その一つである玄米発酵抽出エキスは、玄米を発酵させ得られた物質であり、多くの核酸を含んでいる。核酸は遺伝情報の伝達には不可欠の物質である。かつては核酸の構成物質として含まれるプリン体を代謝することで尿酸を生じることから、核酸の過剰摂取は高尿酸血症（痛風）を引き起こすことが問題視されていたが、必ずしも発症するわけではないことも報告されている[1)]。一方、核酸の摂取により、免疫能の増強効果[2-7)]や抗アレルギー効果[8)]、加齢に伴う記憶力減退の防止効果[9,10)]なども報告されている。さらには腸管生理機能改善や腸

[1)] 山陽学園短期大学　食物栄養学科
[2)] 香川大学　農学部

管損傷の治癒促進効果[11-13]、70%肝切除ラットにおける実験によるたんぱく質合成能力の増強効果[14]、術後回復の促進効果[15]などの報告もある。

筆者らは、これまでに核酸高含有玄米発酵食品の健康効果について、四塩化炭素によるマウス肝障害モデルを用いて検討を行い、玄米発酵食品には肝障害軽減効果があることを明らかにした[16]。また、これに関連して、低たんぱく質離乳ラットにおける成長改善効果、完全非経口栄養によるラット小腸粘膜萎縮抑制効果、若年ラットの成熟と成長率増加効果、慢性下痢後の腸管変化の改善効果などが報告されている[17-20]。しかし、食事由来核酸に関する先行研究では健常ラットではなく、低タンパク質状態や腸管傷害モデルを使用したものが多い。そこで、本研究では、育児用粉乳への核酸添加が再び話題になりつつある現状を踏まえて、通常の離乳ラットを用い、食餌中の核酸成分の機能性について基礎的資料を得ることを目的とした。特に肝機能について発酵玄米エキスが影響を及ぼすか否かについて検討した。また、発酵玄米エキスと試薬核酸とを比較して、発酵玄米エキスの機能成分が核酸のみであるか否かについても検討した。

実験方法

実験動物および飼育環境

実験動物は、3 週齢の Wistar 系雄ラット 27 匹（日本 SLC 株式会社）を用い、個別にステンレスケージで飼育した。飼育環境については、明期を 8:00~20:00 とする 12 時間の明暗サイクルとし、室温を 22±2℃、湿度 50%に設定した。ラットが届いてから 5 日間を予備飼育期間とし、市販粉末飼料 CE-2（日本クレア株式会社）と水を自由に摂取させた。

その後の 3 週間を本飼育期間とし、ラットをコントロール（無核酸）群（CON：9 匹）、核酸群（NA：Nucleic acid 9 匹）、玄米発酵抽出エキス群（ER：Extract of the fermented brown rice 9 匹）の 3 群に分けた。各群の実験食の組成を表 1 に示した。各実験食に含まれるタンパク質量、脂質量および炭水化物量が等しくなるように調製した。また、ER 群に使用した玄米発酵抽出エキスは、焙煎した玄米を麹菌（*Aspergillus oryzae*）にて 48 時間発酵させたのち、アルコール抽出して得られた物質であり、100g 当たり 5g の核酸成分を含んでいる。NA 食と ER 食に含まれる核酸塩基量が等しくなるように調製し、窒素量を等しくするために CON 食にはグリシンおよびアラニンを加えた。食餌および水は自由に摂取させ、本飼育期間中の体重および食餌摂取量を毎日記録した。

本飼育期間終了日に 12 時間絶食させた後、断頭屠殺し、血液を採取した後、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、消化管組織、副睾丸脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出し、分析までの間、肝臓および各消化管組織を-80℃で保存した。血液は 3000rpm で 15 分間遠心分離し、得られた血清を分析まで-20℃で保存した。

本研究における動物実験は、予め香川大学動物実験委員会の承認を受け（承認番号 16603）、香川大学動物実験規則（平成 19 年 2 月 1 日施行）に従って、香川大学農学部にて実施した。

表 1　実験食餌組成 (g/kg)

	CON				NA				ER			
	g/kg	P	F	C	g/kg	P	F	C	g/kg	P	F	C
カゼイン	200.0	172.4	3.0	0.0	200.0	172.4	3.0	0.0	142.2	122.6	2.1	0.0
ER									128.2	49.9	0.3	24.7
Glycine	2.2	0.0	0.0	0.0								
L-Alanine	2.8	0.0	0.0	0.0								
DNA					1.3	0.0	0.0	0.0				
RNA					3.8	0.0	0.0	0.0				
コーンスターチ	497.9	0.5	3.5	429.7	497.9	0.5	3.5	429.7	469.3	0.5	3.3	405.0
大豆油	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0	50.8	0.0	50.8	0.0
セルロース	150.0	0.0	0.0	150.0	150.0	0.0	0.0	150.0	150.0	0.0	0.0	150.0
ミネラル混合	35.0	0.0	0.0	4.1	35.0	0.0	0.0	4.1	35.0	0.0	0.0	4.1
ビタミン混合	10.0	0.0	0.0	9.9	10.0	0.0	0.0	9.9	10.0	0.0	0.0	9.9
セルロース	50.0	0.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	12.4	0.0	0.0	0.0
塩化コリン	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
BHT※	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
	1000.0	172.9	56.5	593.8	1000.0	172.9	56.5	593.8	1000.0	172.9	56.5	593.8

※ BHT：ジブチルヒドロキシトルエン

血清および肝臓分析

1)　血清成分測定

①　血清グルコース濃度測定（ABTS 法）

血清グルコース濃度を Bergmeyer ら[21]の方法で測定した。

②　血清中性脂肪（TG）濃度測定（GPO・DAOS 法）

血清 TG 濃度の測定には、市販キット（トリグリセライド E-テストワコー、和光純薬）を用いた。

③　血清総コレステロール濃度測定（コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法）

血清総コレステロール濃度の測定には、市販キット（コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業）を用いた。

④　血清 HDL コレステロール濃度測定（リンタングステン酸マグネシウム塩沈殿法）

血清 HDL コレステロール濃度の測定には、市販キット（HDL-コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業）を用いた。

2)　肝臓 DNA および RNA 量定量

DNA および RNA の抽出は、Schmidt – Thannhauser - Schneider 法[22]で実施し、抽出 DNA の定量はジフェニルアミン法[23]を、RNA 定量はオルシノール法[24]を用いた

3)　肝臓 TG およびコレステロールの測定

肝臓組織を液体窒素中に入れて凍結粉砕し、Folch 法[25]を用い抽出し、TG およびコレステロールの定量に用いた。

①　肝臓 TG の測定（アセチルアセトン法）

試料 50μL を試験管に分注後に溶媒を除去し、イソプロパノール 1.5mL を加えて混和し、活性アルミナを 1/2 さじを加えて懸濁後、さらに 5 分おきに 3 回十分に混和した。2000rpm で 10 分間遠心分離した上清 25μL を分注し、5%KOH を 1 滴加えて混和し、37℃で 15 分間加温した後、250μL の緩衝液（2.4M 酢酸アンモニウム緩衝液、11w/w%イソプロパノール：pH5.5）と酸化剤としての 50mmol/L メタ

化ヨウ素酸ナトリウム25μLを加えて混和して、室温にて15分間放置した。次いで、発色試薬（97mmol/L アセチルアセトン、65w/w%イソプロパノール）500μL を加えて 37℃で 40 分間加温した。氷水で 3 分間冷却後、試験盲検を対照として 410nm における吸光度を測定した。なお、標準液には、トリグリセリド基準液（グリセリン 31.2mg/dL、トリオレイン 300mg/dL 相当）を用いた。

② 肝臓コレステロールの測定

試料 100 μL を試験管に分注後に溶媒を除去し、100 μL の脂質溶解液（ブタノール：メタノール：トリトン X-100＝50：25；25 v/v）を加えて撹拌後、血清コレステロール濃度と同様に分析を行った。

4) 肝臓グリコーゲン量測定

肝臓グリコーゲン含量を Lo ら[26] の方法により測定した。

5) 肝臓タンパク質定量

肝臓タンパク質を、ケルダール分析装置（Kjeltec ™ 2400、フォス・ジャパン）で定量した。

統計分析

すべての測定値を平均値±標準偏差で表した。有意差分析には、統計ソフト（エクセル統計 2008、社会情報サービス）を用いて Tukey 法で調べ、P<0.05 で有意差ありとした。

実験結果

1) 体重および食餌摂取量（表 2）

体重および食餌摂取量には、各群間に有意な差は見られなかった。

2) 肝臓重量（図 1）

肝臓重量は CON 群に比べて NA 群で有意に小さかったが、CON 群と ER 群間および ER 群と NA 群間には有意な差を認めなかった。なお、今回データは示していないが、心臓、腎臓および脾臓重量には各群間に有意な差は見られなかった。

表2 体重・食餌摂取量

	CON	NA	ER
初体重 (g)	65.0 ± 6.3	64.4 ± 6.1	65.1 ± 5.8
最終体重 (g)	163 ± 12	156 ± 12	156 ± 11
食餌摂取量 (g/day)	13.9 ± 1.3	13.4 ± 1.0	14.2 ± 1.0

データ：平均値±SD
群間の有意差：異なる上付きラテン文字（一元分散分析およびTukey法：p＜0.05）

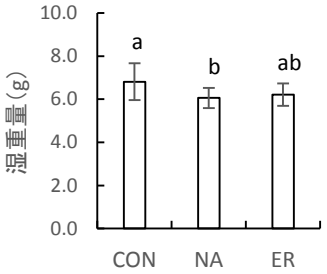

図１ 肝湿重量
データ：平均値±SD
群間の有意差：異なる上付きラテン文字（一元分散分析およびTukey法：p＜0.05）

3) DNA・RNA 量およびタンパク質量（表 3）

単位重量当たりの肝臓 DNA 含量は CON 群に比べて ER 群で有意に高く、NA 群で高値を示す傾向にあった。また、単位重量当たり肝臓 RNA 含量は、有意ではないものの CON 群に比べて NA 群および ER 群で高値を示す傾向にあった。また、肝臓タンパク質量は、CON 群に比べて NA 群で有意に高値であった。

表3 肝臓 DNA・RNA・タンパク質

	CON	NA	ER
DNA (mg/g liver)	1.07 ± 0.15[b]	1.17 ± 0.11[ab]	1.23 ± 0.09[a]
RNA (mg/g liver)	1.68 ± 0.1	1.79 ± 0.19	1.85 ± 0.15
Protein (mg/g liver)	228 ± 5[b]	233 ± 3[a]	230 ± 4[ab]

データ：平均値±SD
群間の有意差：異なる上付きラテン文字（一元分散分析およびTukey法：$p<0.05$）

4) 肝臓 TG、コレステロールおよびグリコーゲン（表 4）

単位重量当たりの肝臓 TG 含量およびグリコーゲン含量には、各群間に差を認めなかったが、CON 群に比べて NA 群と ER 群で低値を示す傾向にあった。また、肝臓当たりのコレステロール含量は CON 群に比べて ER 群で有意に低く、NA 群で低い傾向にあった。

表 4 肝臓中性脂肪・コレステロール・グリコーゲン

	CON	NA	ER
中性脂肪(mg/g liver)	6.69 ± 1.8	5.1 ± 1.8	4.61 ± 2.1
コレステロール(mg/g liver)	5.04 ± 0.4[a]	5.17 ± 0.6[a]	3.14 ± 5.1[b]
グリコーゲン(μg/g liver)	5.10 ± 1.8	4.10 ± 1.6	3.86 ± 0.9

データ：平均値±SD
群間の有意差：異なる上付きラテン文字（一元分散分析およびTukey法：$p<0.05$）

5) 血液生化学検査値（表 5）

今回測定したすべての項目について各群間に有意差は見られなかった。

表 5 血液生化学検査値

	CON	NA	ER
Glu (mg/dL)	107 ± 10	97 ± 8	97 ± 6
TG (mg/dL)	126 ± 50	128 ± 45	168 ± 48
T-Cho (mg/dL)	114 ± 13	102 ± 14	101 ± 8
HDL (mg/dL)	82 ± 12	73 ± 11	76 ± 8
LDL (mg/dL)	32 ± 5	30 ± 7	25 ± 4
T-Pro (g/dL)	6.47 ± 0.30	6.39 ± 0.33	6.39 ± 0.34
Alb (g/dL)	4.47 ± 0.22	4.45 ± 0.27	4.39 ± 0.28
グロブリン（g/dL）	2.01 ± 0.46	1.94 ± 0.23	1.86 ± 0.42
A/G比	2.29 ± 0.46	2.33 ± 0.38	2.49 ± 0.66
GOT(karmen単位)	287 ± 68	254 ± 63	260 ± 29
GPT(karmen単位)	28 ± 5	23 ± 4	26 ± 4

データ：平均値±SD
群間の有意差：異なる上付きラテン文字（一元分散分析およびTukey法：$p<0.05$）

考察

本研究の目的は、育児用粉乳への核酸添加も視野に入れ、核酸量が増幅された発酵玄米エキスの摂取が、離乳間もないラットの肝臓機能に影響を及ぼすのかについて、試薬レベルの核酸と比較し、検討することであった。

その結果、肝重量は CON 群に比べて NA 群および ER 群で小さい傾向にあったが、単位重量当たり肝臓 DNA・RNA 量およびたんぱく質量は高値を示す傾向にあり、肝機能については増強されている可能性が示唆された。このことは、Ogoshi らの 70%肝切除ラットにおけるたんぱく質合成能力の増強効果に関する報告[14]を支持している。

単位重量当たりの肝臓 TG 含量には、各群間に有意差は認められなかったが、CON 群に比べて NA 群および ER 群で低値を示す傾向にあり、コレステロール量については、CON 群に比べて ER 群で有意に低く、NA 群で低い傾向にあった。これらのことから、特に肝臓脂質代謝に対して核酸摂取あるいは ER 摂取で悪影響はないと考えられる。さらに ER 摂取により、肝臓における脂肪蓄積抑制が推察された。

一方、単位重量当たり肝臓グリコーゲン量には有意な差は認められず、血液生化学検査値においても各群間に有意差は認められなかった。

育児用粉乳への核酸添加については、ヒト母乳には核酸が含有されている一方で、粉乳の原材料となる牛乳には含まれていないことに着目している。このことは、母乳栄養と比較して人工栄養による免疫能の低さやアレルギー疾患発生率の高さの対策が発端とされる。実際、核酸摂取による免疫増強効果[26-28]や抗アレルギー効果の可能性[29]について報告されている。本実験の結果、核酸が増幅された ER（玄米発酵エキス）および ER と同等レベルの化成品核酸を添加した飼料で飼育した幼若ラットにおいて、とくに肝臓代謝に悪影響を与えた傾向は認められず、むしろ肝機能をバックアップする可能性が認められた。また、血液生化学検査値においても悪い影響は認められなかった。現在、工業的利用あるいはサプリメントとして市販される核酸関連食品の多くは鮭白子核酸が大多数を占めるが、この核酸物質の多くは DNA である。一方、育児用粉乳に添加される核酸物質の多くは RNA であることから、効率よく RNA を増幅させる黒麹を使用した玄米発酵抽出エキスが素材として適しており、日本の農産業の代表である米の有効利用になると考えられる。

謝辞

本研究は、(株)核酸の研究助成金によって実施された。(株)核酸代表取締役、山中郁夫氏および関係各位に感謝いたします。

引用文献

1) 山本茂: 核酸の栄養学的意義., 日本医事新報, No.3755, p.116 (1998)
2) Kulkarni AD, Yamauchi K, Hales NW, Ramesh V, Ramesh GT, Sundaresan A, Andrassy RJ, Pellis NR : Nutrition beyond nutrition: plausibility of immunotrophic nutrition for space travel, *Clin Nutr*, **21**, 231 – 238 (2002)
3) Jyonouchi H, Zhang SL, Tomita, Y, Yokoyama H: Nucleotide - free diet impairs T-helper cell functions in antibody production in response to T-dependent antigens in normal C57B1/6 mice., *J Nutr*, **124**(4), 475 – 484 (1994)
4) Van Buren CT, Kulkarni AD, Rudolph FB: The role of nucleotides in adult

nutrition., *J Nutr*, **124**(1 Suppl), 160S – 164S (1994)

5) Kulkarni AD, Rudolph FB, Van Buren CT: The role of dietary sources of nucleotides in immune function., *J Nutr*, **124**(8 Suppl), 1442S – 1446S (1994)

6) Kulkarni AD, Fanslow WC, Rudolph FB, Van Buren CT: Effect of dietary nucleotides on response to bacterial infections., *J Parenter Enteral Nutr*, **10**, 169 – 171 (1986)

7) Fanslow WC, Kulkarni AD, Van Buren CT, Rudolph FB: Effect of nucleotide restriction and supplementation on resistance to experimental murine candidiasis., *J Parenter Enteral Nutr*, **12**, 49 – 52 (1998)

8) Almansouri HM, Yamamoto S, Kulkarni AD, Ariizumi M, Adjei AA, Yamauchi K: Effect of dietary nucleosides and nucleotides on murine allergic rhinitis., *Am J Med. Sci*, **312**(5), 202 – 205 (1996)

9) Sato N, Murakami Y, Nakano T, Sugawara M, Kawakami H, Idota T, Nakajima I: Effects of dietary nucleotides on lipid metabolism andlearning ability of rats., *Biosci Biotechnol Biochem*, **59**, 1267 – 1271 (1995)

10) Chen TH, Huang HP, Matumoto Y, Wu SH, Wang MF, Chung SY, Uezu K, Moriyama T, Uezu E, Korin T, Sato S, Yamamoto S: Effects of dietary nucleoside - nucleotide mixture on memory in aged and young memory deficient mice., *Life Sci*, **59**, 325 – 330 (1996)

11) Uauy R, Stringel G, Thomas R, Quan R: Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat., *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **10**, 497 – 503 (1990)

12) Ortega MA, Nunez, MC, Gil A, Sanchez PA: Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats., *J Nutr*, **125**, 1413 – 1418 (1995)

13) Quan R, Gil A, Uauy R: Effect of dietary nucleotides on intestinal growth and maturation after injury from radiation (abstract)., *Pediatr Res*, **29**, 111 (1991)

14) Ogoshi S, Mizobuchi S, Iwasa M, Tamiya T: Effect of a nucleoside-nucleotide mixture on protein metabolism in rats after seventy percent hepatectomy., *Nutrition*, **5**(3), 173 – 178 (1989)

15) Daly JM, Lieberman MD, Goldfine J, Shou J, Weintraub F, Rosato EF, Lavin P: Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA, and omega - fatty acids in patients after operation: immunologic, metabolic, and clinical outcome., *Surgery*, **112**, 56 – 67 (1992)

16) 稲井玲子，多賀昌樹，佐藤かおり，檜垣俊介，熊崎貴仁：玄米核酸摂取マウスにおける四塩化炭素誘起肝障害の軽減.，名古屋経済大学　自然科学研究会会誌，45(3・4)，11－28（2011）

17) Paul György: Biochemical aspects., *Am J Clin Nutr*, **24**, 970-975 (1971)

18) Iijima S, Tsujinaka T, Kido Y, Hayashida Y, Ishida H, Homma T, Yokoyama H, Mori T: Intravenous administration of nucleosides and a nucleotide mixture diminishes intestinal

mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition., *J Parenter Enteral Nutr*, **17**, 265-270 (1993)

19) Ricardo U, Gustavo S, Rita T, Richard Q: Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the diveloping gut in the rat., *J Pediatr Gastroentero Nutr*, **10**, 497-503 (1990)
20) Maria CN, Maria VA, Daniel M, Maria DS, Angel G: Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea., *J Parenter Enteral Nutr*, **14**, 598-604 (1990)
21) Burgmeyer HU, Bernt E: Method of enzymatic analysis., *Acad Press N.Y.*, **3**, 1205-1215 (1974)
22) Schmidt G, Thannhauser SJ: A method for the determination if deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues., *J Biol Chem*, **161**, 83-89 (1945)
23) Richards GM: Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA., *Anal Biochem*, **57**, 369-376 (1974)
24) Almog R, Shirey TL: A modified orcinol test for the specific determination of RNA., *Anal Biochem*, **91**, 130-137 (1978)
25) Folch J, Lees M, Stanley GHS: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues., *J Biol Chem*, 2**26**, 497-509 (1957)
26) Lo S, Russel JC, Taylor AW: Determination of glycogen in small tissue sample., *J Appl Physiol*, **28**, 234-236 (1970)
27) Yamauchi K, Adjei AA, Ameho CK, Chan YC, Kulkarni AD, Sato S, Okamoto K, Yamamoto S: A nucleoside-nucleotide mixture and its components increase lymphoproliferative and delayed hypersensitivity responses in mice., *J Nutr*, **126**, 1571 – 1577 (1996)
28) Jyonouchi H: Nucleotide actions on humoral immune responses., *J Nutr,* **124S**, 138S – 143S (1994)
29) Almansouri HM, Yamamoto S, Kulkarni AD, Ariizumi M, Adjei AA, Yamauchi K: Effect of dietary nucleosides and nucleotides on murine allergic rhinitis., *Am J Med Sci*, **312** (5), 202-205 (1996)