

I-2 加工食品材料の機能性確認～生体への影響～

I-2-1 「ダリア塊根の安全性評価と食品利用への検討」

Investigation to the safety assessment and food use of Dahlia tuber

本田 望 伏脇 裕一

要旨

ダリア(学名：*Dahlia*)は南米原産の植物で、ダリア塊根に含まれるイヌリンが機能性食品として注目されている。水溶性食物繊維のイヌリンは、コレステロールの低下や血糖値の上昇抑制効果なども期待される。そこで本研究では、ダリア塊根を粉末状に処理したものを飼料へ添加し動物実験を行った。結果、5%Dahlia 群において成長への影響は観察され食しても問題はないことが確認された。Control 群および 5%ダリア添加群、5%ダリア添加+15%高脂肪群において肝臓中コレステロール値が低値を示した。このことからダリア塊根にはコレステロール低下能があることが示唆された。CYP7a1 においては、いずれの群でも正常に発現していることを確認した。対象群に対して 5%ダリア添加群において薄いバンドが観察された。このことからダリア塊根中には有害物質は含まれず安全であることが確認された。

目次

1. はじめに	37
2. 実験方法	39
(1) 動物実験	40
(2) 生化学的検査	41
(3) 肝臓中総脂質	42
(4) PCR 法	43
3. 結果	46
4. 考察	51
(1) ダリア塊根の安全性について	51
(2) ダリア塊根の機能性について	53
5. 結論	57
6. 参考文献	58

1. はじめに

ダリア(学名：*Dahlia*)は、中央アメリカからメキシコにかけて原産のキク科ダリア属の植物である。塊根はサツマイモに似ており、塊根自体に発芽性はない。主に観賞用の華として育てられており、春から秋にかけて色とりどりの大輪の華を咲かす。しかしながら原産国の一部地域では一般的にダリア塊根を根菜として食している地域もある。

多くの植物が光合成より得るエネルギー源として、でんぷんが連なったグルコースの形で貯蔵するが、ダリア塊根はフルクトースが連なったイヌリンの形で貯蔵する。ダリア塊根にはこのイヌリンの他に、リンゴ酸、クエン酸、脂肪油などの成分を含む。ダリアの成長時期は雨季であり、成長期には塊根中に貯蔵されているイヌリンがフルクトースに分解される。その為にこの時期に塊根を収穫し食すると甘く感じる。しかし成長期の終わりごろに塊根を収穫すると、イヌリンは果皮部にあるため塊根部に集まっておらず塊根は無味となり、果皮部からは不快臭がする¹⁾。

イヌリンはβ-2,1結合で連なる分子量5000程度の白色球状結晶をしており²⁰⁾、フルクトースの連なった5単糖の形をしている。水溶性食物繊維に分類され、ダリア塊根のほかにゴボウ、キクイモといったキク科塊茎植物に多く含まれている。船木らの報告によればダリア塊根の約70%がブドウ糖、果糖、ショ糖、オリゴ糖、イヌリン様多糖類およびセルロースと言った炭水化物で構成されており、中でもイヌリン様多糖類が占める割合は約60%とされる²¹⁾。キクイモ塊茎に含まれるイヌリンは約12%とされることから²⁰⁾、ダリア塊根中には多くのイヌリンが貯蔵されていることが判る。しかしながら、ヒトはイヌリンを分解できる酵素を持っていないために、イヌリンは消化されず大腸まで達する。大腸で腸内細菌により一部が分解されフルコース、フラクトオリゴ糖を生じるものの、この代謝の過程で二酸化炭素とメタンが生成される。その為に稀ではあるものの、多量に摂取すると腹部膨張などを起こす可能性がある。しかしながら、適量を摂取することで整腸作用が期待される。イヌリンの摂取量基準は日本で設けられてはいないが、アメリカやヨーロッパでの摂取状況より、1食分当たりの最大添加量は10g程度とされており、生理学的効果を得るためには1食分当たり2~6gが使われているようである¹⁴⁾。

イヌリンの添加量を検討した実験が寺部らにより報告されている。重合度の異なる合成イヌリンを使用した実験ではあるが、各重合度のイヌリンを2.5%、5%、10%、20%の量で添加させWister系ラットを用いての検討を行っている。それによればイヌリン添加量10%以上では軟便もしくは下痢の状態

であり、さらにイヌリン添加量が多いほど盲腸内にガスが留まり内容物は液状であったとのことである。以上のことから 10%以上のイヌリン添加は適切でないと考えられた¹⁰⁾。

イヌリンは他の炭水化物と比較すると 3 分の 1 程度、脂肪と比較すると 6 分の 1 程度のエネルギーしか含まない。さらに消化されず食物繊維様の働きをすることから、コレステロールの吸収を抑制することでコレステロール値の低下¹²⁾、ブドウ糖の吸収を抑制させ食後血糖の上昇抑制効果⁴⁾などが期待される。摂取により高脂肪食傾向にある現代日本人において、高血圧・糖尿病・肥満などの予防に効果が期待される。食物繊維の過剰摂取はミネラル吸収阻害が懸念されてきた。しかし最近では水溶性食物繊維によるミネラル吸収促進作用も報告されており、動物実験を行った結果、水溶性食物繊維を摂取するほどカルシウム、マグネシウム、亜鉛、鉄の吸収量が上がったということである²⁶⁾。

近年、イヌリンはこれら栄養上の性質に注目されて食品に使用されることが増えてきている。実際に地域の特産品としての食品開発も行われ、ダリア塊根からイヌリンを抽出して食品へ添加して商品開発を行っているようである¹¹⁾。水溶性食物繊維は水に非常にとく溶け、また粘性が増す特徴を持っていることからダリア塊根中のイヌリンを脂肪の代替品として使用とする研究も行われている⁷⁾。先述したようにダリア塊根中に含まれるイヌリンの割合は約 60%とされるため、効率が良く、安全かつ精度の高い抽出法が確率されれば多くの食品への利用が容易になると考えられる。

機能性に期待が出来るダリア塊根ではあるが、昔からダリアには毒があると言われてきた。このことからダリア塊根を食用とすることは一般的ではなかった。また日本で実際にダリア毒が問題とされた過去の事例としては、1964年に群馬県高崎市で報告された一件のみである。自宅の畑からゴボウと間違えてダリア塊根を収穫して食したところ、手足のしびれや眩暈、幻覚、意識障害と言った症状が起り、視力障害は数日続いたと報告されている。この時、実際に食したものがダリア塊根という確認はされていないという¹⁾。しかしこのときの症状がナス科の植物に含まれるアトロピン(**Atropine : 3-hidroxy-2-phenylpropanoate**)に似ていたことから、野口ら⁵⁾によりダリア塊根中のアトロピンを測定した報告がある。ダリア塊根より得た抽出液を薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に掛け、アトロピンの検討を行う実験である。結果はダリア塊根にはアトロピンは含有されていないとのことであった⁵⁾。

本研究の実験試料として使用した福島県塙町産のダリア塊根においても、荒木らによる研究報告ではアトロピンは含有されず安全であると報告されて

いる²⁾。

以上のことから、本研究では福島県埴町産のダリア塊根を使用し、ダリア塊根の安全性と機能性、特に高脂肪食時におけるコレステロール低下能に着目し研究を行うことにした。また現在までの研究報告にはダリア塊根を用いて行った遺伝子レベルの評価は行われて居なかったため、薬物代謝に関わる **CYP7a1(Cholesterol 7-alpha-hydroxylase)** に着目し評価を行い、コレステロール代謝に関わる **HMG-CoA reductase** も同時に検討を行うこととした。動物実験の際に使用する飼料へ添加するダリア塊根粉末量は過去の研究報告を参考に 5%とし¹⁰⁾、実験を行うことにした。

2. 実験方法

(1) 動物実験

1) ダリア塊根粉末の調製

今回の試料は本学が産学連携事業を行っている、福島県塙町産のダリア塊根を使用した。ダリア塊根の表皮を水で洗い流した後、皮付きのままにスライスして凍結乾燥を行った。その後にフードプロセッサーで粉末状に加工し、実験試料として使用した(Figure 1)。



Figure 1. Dahlia tuber powder.

2) 飼育条件

実験動物は4週齢のSD (Sprague Dawley)雄ラット24匹を日本チャールズ・リバー社(株)より購入したものを使用した。予備飼育は1週間、AIN-93Gを飼料して与えた。予備飼育後は体重に差が出ないように分け、対照群(Control)、5%ダリア添加群(5%Dahlia)、対照+15%高脂肪群 (Cont+15%High fat)、5%ダリア添加+15%高脂肪群 (5%Dahlia+15%High fat)と各群6匹の計4群に分けた。飼料はAIN-93Gを基本とした改変飼料を与え、飼料組成を

Table 1に示した。飼料は総計が100になるように、 α コーンスターチで調製を行った。飼育は本学1号館5階の動物実験室にて行った。ステンレス製個飼いの6連ゲージを使用し、飼料、給水は自由摂取させた。飼料および給水は毎日交換を行った。体重、飼料は1日おきに重量を測った。飼育4週目からは出納ゲージに移し、毎日糞尿の採取を行った。飼育室の設定温湿度は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 5\%$ とした。照明は12時間自動点灯・消灯方式(8:00a.m.~ 8:00p.m.点灯)を採用した。飼育終了後、解剖直前まで飼料を自由摂取させた。

解剖は、ジエチルエーテル麻酔下にて開腹し心臓採血を行った後、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、大腿骨、体内脂肪を摘出して重量の測定を行った。

Table 1. Diet composition.

parameter (%)	Control	5%Dahlia	Control	5%Dahlia
			+ 15%High fat	+ 15%High fat
Dahlia tuber powder	-	5	-	5
Cellulose powder	5	5	5	5
Casein	20	20	20	20
Pork lard	-	-	15	15
Soybean oil	5	5	5	5
AIN-93G mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93G vitamin mixture	1	1	1	1
L-cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
α -corn starch	65.20	60.20	50.20	45.20
Total	100	100	100	100

(2) 生化学的検査

解剖時に得られた血液を、ベノジェクト II 真空採血管(血清分離剤入採血管オートセップ)(TERUMO(株)製)へと採取した。後に遠心分離機に 1200g, 15 分掛け、得られた上澄み液を血清試料として ELISA キットを用いて以下の項目について測定を行った。測定は各キットの説明書を参照した。

- 1) 総コレステロール：コレステロールE-テストワコー(和光純薬(株)製)
- 2) トリアシルグリセロール：トリグリセライドE-テストワコー(和光純薬

(株製)

- 3) HDL-Cholesterol : HDL-コレステロール E-テストワコー(和光純薬(株)製)
- 4) 血糖値 : グルコース CII テストワコー(和光純薬(株)製)
- 5) SOD 活性 : SOD テストワコー(和光純薬(株)製)

(3) 肝臓中総脂質

肝臓試料より Folch 法を用いて総脂質を得た後に、ELISA キットを用いて以下の項目について測定を行った。

1) Folch 法(総脂質の抽出)

- ① 肝臓試料を約 1g 測り取る。
- ② 乳鉢にクロロホルム : メタノール(2:1)溶液を 5mL 加えよくすり潰した。
- ③ さらにクロロホルム : メタノール(2:1)溶液を 5mL 加えよくすり潰した後に 50mL メスシリンダーへろ過をした。
- ④ 残渣にクロロホルム : メタノール(2:1)溶液を 5mL 加えよくすり潰した後に先ほどを同じメスシリンダーへろ過を行った。
- ⑤ 抽出液にクロロホルム : メタノール(2:1)を加え 50mL とし、転倒混和させ、脂質抽出液とした。
- ⑥ 脂質抽出液 10mL を供栓付試験管へ計り取った。
- ⑦ 0.1M KCl 溶液を 2mL 加えて激しくボルテックスを行い、室温にて静置させた。
- ⑧ 下層のみをパスツールピペットで 30mL ビーカーへ採取した。
- ⑨ ホットプレート上で約 70℃で加熱し乾固させた。
- ⑩ クロロホルム : メタノール(2:1)溶液 2mL で溶解させた。
- ⑪ ①～⑨までの同様の操作を行い、イソプロパノール溶液 2mL で溶解させた。
- ⑫ ⑩,⑪を試験溶液とした。

2) 総コレステロール : コレステロール E-テストワコー(和光純薬(株)製)

検量線作成にはイソプロパノール、試験溶液はイソプロパノール溶

解脂質抽出液で行った。

- 3) トリアシルグリセロール：トリグリセライドE-テストワコー(和光純薬株製)

検量線作成にはクロロホルム：メタノール(2:1)、試験溶液はクロロホルム：メタノール(2:1)溶解脂質抽出液で行った。

(4) PCR 法

1) RNA 抽出

使用した試薬：RNAiso plus (タカラバイオ株製)

- ① 肝臓約 0.2 g を計り取った。
- ② RNAiso plus を 1mL 加えホモジナイズを行い、室温で 5min 静置した。
- ③ 120×100g で 5min 遠心分離した。
- ④ 上清を採取し、クロロホルム 200μl 加えボルテックス後、室温で 5min 静置した。
- ⑤ 120×100g で 15min 遠心分離した。
- ⑥ 上清を採取し、イソプロパノール 1mL を加え転倒混和、室温で 10min 静置した。
- ⑦ 120×100g で 10min 遠心分離した。
- ⑧ チューブの底にあるペレット状になった RNA を流出させないように溶液を破棄させ、75%エタノール 1mL を加え転倒混和させた。
- ⑨ 75×100g で 5min 遠心分離した。
- ⑩ エタノールを破棄、冷風で中を乾燥させた後に DEPC 水 200μl で溶解し RNA 溶液とした。
- ⑪ -30℃で冷凍保存した。

2) RNA 濃度の測定

- ① 抽出した RNA 溶液 10μl を TE buffer 990μl を加え 100 倍希釈をした。
- ② 希釈 RNA 溶液をマイクロセルに全量入れ、TE buffer をブランク試料として ABS230,260,280,320 で吸光度測定を行った。
- ③ ABS280/260 から RNA 純度を求め、1.8~2.0 の間に入っていることを確認した。
- ④ 以下の式で Total RNA(ng/μl)を求めた。

$$\text{Total RNA(ng/}\mu\text{l)}=(\text{ABS260}-\text{ABS320})\times\text{希釈倍率}\times 40$$

- ⑤ 最終 RNA 濃度が 500ng/μl になるように以下の式で dH₂O 量を求め、調製を行った。

$$dH_2O(\mu l) = \frac{10(\mu l) \times (Total\ RNA(ng/\mu l) - 500(ng/\mu l))}{500(ng/\mu l)}$$

3) 逆転写反応

試薬：PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time) (タカラバイオ 株製)

- ① 以下のように試薬を調製した。

試薬(1 反応あたり)	使用量	最終濃度
5×Primer Script Master Mix	2 μl	×1
Total RNA(~500ng/μl)	1 μl	
RNAase free dH ₂ O	up to 10μl	

- ② PCR 反応は以下の条件で行った。

37°C 15min → 85°C 5sec → 4°C forever

4) PCR(Polymerase Chain Reaction)法

本実験で使用したプライマーは以下の通りである。

CYP7a1 Forward (mouse)	TGGTGGTGAGAGCTTGAAAATG
CYP7a1 Reverse (mouse)	TGGTGTGGTTCTTGGAGGTG
HMG-CoA reductase Forward (rats)	TCACCCTTGACGCTCTGGTG
HMG-CoA reductase Reverse (rats)	GCAAGCACGGACATACAGCC

試薬：Emerald amp Master Mix (タカラバイオ株製)

- ① 以下のように試薬を調製した。

試薬(1 反応あたり)	使用量	最終濃度
2×Emerald amp Master Mix	10μl	×1
Primer Forward	0.4μl	0.2μM
Primer Reverse	0.4μl	0.2μM
RNAase free dH ₂ O	up to 20μl	
cDNA	2μl	

② 以下の条件で PCR 反応を行った。

98°C	30min	
98°C	10sec	} β-actin : 30cycle HMG-CoAr : 26cycle CYP7a1 : 30cycle
60°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	1min	
4°C	forever	

5) アガロースゲル電気泳動

使用した試薬：SYBR green I (タカラバイオ㈱製)

- ① アガロース 0.9g を 100mL 三角フラスコに測り取った。
- ② 1×TAE buffer 30mL を加え、加熱して完全に溶解させた。
- ③ 粗熱を取った後にゲル用の型へ静かに流し込み、固まるまで静置させた。
- ④ 電気泳動装置に 1×TAE buffer をゲル板が浸るまで入れた。
- ⑤ PCR 反応液中に SYBR Green I を 0.4μl 入れ混合させた。
- ⑥ ⑦の PCR 反応液をコームに 10μl ずつ、マーカ―3μl を静かにアプライさせた。
- ⑦ 100V で 20min 泳動を行った。
- ⑧ 泳動を行ったゲル板をトランスイルミネーターで観察を行った。

(5) データ処理

得られたデータはエクセル統計 2012 を用いて、グラブス・スミノルフ棄却検定を行った後に二元配置分散分析を行った。各群の比較には危険率 5% で多重比較法の Tukey-HSD 検定を用いて統計処理を行った。全ての表は平均値±標準誤差で表した。

3. 結果

(1) 動物実験

Table 2 に終体重、1日あたりの体重増加量、1日あたりの食事摂取量、飼料効率を示した。終体重を見るとダリア塊根粉末を飼料添加したいずれの群でも問題なく成長していることが判った。終体重では Control 群, 5%Dahlia 群と Cont+15%High fat 群, 5%Dahlia+15%High fat 群の間でそれぞれ有意差が見られた。1日あたりの体重増加量、試料効率でも Control 群, 5%Dahlia 群と Cont+15%High fat 群, 5%Dahlia+15%High fat 群の間でそれぞれ有意差が見られた。しかし、1日あたりの食事摂取量では差は見られなかった。

Table 2. Growth parameter, rats fed on experimental diet.

	Control	5%Dahlia	Cont+ 15%High fat	5%Dahlia+ 15%High fat
Final body weight (g)	260±5.2 ^a	255±4.4 ^a	319±5.2 ^b	298±9.8 ^b
Body weight gain (g/day)	9.29±0.19 ^a	9.09±0.16 ^a	11.38±0.19 ^b	10.64±0.35 ^b
Food intake (g/day)	17.19±0.49	16.63±0.43	17.99±0.21	17.77±0.67
Feed efficiency (%)	0.54±0.01 ^a	0.55±0.01 ^a	0.63±0.00 ^b	0.60±0.02 ^b

Differently superscript letter are significantly different. (p<0.05)

Values are means ± SEM

次に、解剖時に摘出した各臓器の重量と体内総脂肪重量を Table 3 に示した。心臓、脾臓、大腿骨の重量では差は見られなかった。一方、肝臓、腎臓、カーカス重量、体内総脂肪重量では Control 群, 5%Dahlia 群と Cont+15%High fat 群, 5%Dahlia+15%High fat 群の間でそれぞれ有意差が見られた。さらに体内総脂肪重量では Control 群と 5%Dahlia 群の間でも有意差が認められたので、ダリア塊根粉末投与の有無と脂肪量についての交互作用が示唆された。

Table 3. Organ weight and Total body fat weight of rats fed on experimental diet.

	Control	5%Dahlia	Cont+ 15%High fat	5%Dahlia+ 15%High fat
Heart weight (g)	0.92±0.05	0.87±0.04	1.07±0.18	1.00±0.03
Liver weight (g)	7.82±0.26 ^a	8.74±0.68 ^a	11.54±0.38 ^b	11.57±0.80 ^b
Kidney weight (g)	1.01±0.05 ^a	1.12±0.04 ^a	1.32±0.05 ^b	1.35±0.06 ^b
Spleen weight (g)	0.54±0.03	0.48±0.03	0.60±0.04	0.54±0.04
Thighbone weight(g)	1.05±0.14	0.94±0.11	0.91±0.15	1.05±0.14
Carcass weight (g)	155±4.1	156±3.0	187±4.2	174±6.8
Total Body Fat mass (g)	63.08±2.05 ^a	54.77±1.51 ^c	77.90±2.82 ^b	72.89±0.71 ^b

Differently superscript letter are significantly different. (p<0.05)
Values are means ± SEM

(2) 血清試料

血清試料を測定した結果を

Table 4 に示した。血糖値では各群間で差は見られなかった。Cont+15%High fat 群, 5%Dahlia+15%High fat 群では高値を示したが飼料によるものであると考えられる。トリグリセライドでは Control 群に対していずれの群で低値を示したものの、差は見られなかった。総コレステロール、HDL-コレステロール(High density lipoprotein-cholesterol)でもトリグリセライドと同様に Control 群に対していずれの群で低値を示したものの差は見られなかった。SOD 活性(Superoxide dismutase)では Control 群と 5%Dahlia+15%High fat 群間で有意差が見られた。5%Dahlia+15%High fat 群では Cont+15%High fat 群に対して低値を示した。

Table 4. Biochemical test of rats serum.

	Control	5%Dahlia	Cont+ 15%High fat	5%Dahlia+ 15%High fat
Glucose (mg/dL)	62.8±4.8	67.8±4.5	79.8±13.8	92.9±3.2
Triglyceride (mg/dL)	100.6±18.3	80.0±10.8	67.8±9.5	66.5±17.3
T-cholesterol (mg/dL)	75.7±6.3	51.1±5.9	53.3±9.7	53.6±7.4
HDL-cholesterol (mg/dL)	44.0±3.7	42.3±3.1	47.1±6.1	51.9±4.7
Superoxide dismutase (mg/dL)	36.5±3.2 ^a	31.1±1.8	34.0±2.4	25.8±2.5 ^b

Differently superscript letter are significantly different. (p<0.05)

Values are means ± SEM

(3) 肝臓試料

肝臓試料から総脂質を抽出し、測定を行った結果を Table 5 に示した。肝臓中トリグリセライドでは他の群より 5%Dahlia 群が低値を示した。Cont+15%High fat 群, 5%Dahlia+15%High fat 群は Control 群よりも高値を示したが、いずれも差は見られなかった。肝臓中総コレステロールでは Control 群よりも 5%Dahlia 群が高値を示したが、差は見られなかった。また Cont+15%High fat 群に対して 5%Dahlia+15%High fat 群が低値を示したがこちらも差は見られなかった。

Table 5. T-cholesterol and Triglyceride of rats liver.

	Control	5%Dahlia	Cont+ 15%High fat	5%Dahlia+ 15%High fat
Triglyceride (mg/g Liver)	11.12±1.7	8.90±0.4	14.11±1.9	14.97±2.4
T-cholesterol (mg/g Liver)	26.59±4.2	34.86±1.9	42.49±6.9	32.19±1.6
Triglyceride (mg/Liver)	71.81±15.4	64.83±12.4	161.05±15.2	172.16±27.3
T-cholesterol (mg/Liver)	211±36.6	303±24.0	481±65.9	371±26.6

Differently superscript letter are significantly different. (p<0.05)

Values are means ± SEM

(4) PCR

PCR 産物の電気泳動後ゲル写真を Figure 2~4 に示した。まず Figure 2 のハウスキーピング遺伝子である β -actin がいずれの群でも正常に発現していることを確認した。次に Figure 3 に HMG-CoA reductase の結果を示した。当初、CYP7a1 と同様に 30cycle での検討を行ったがバンド差が見られず、26cycle で再検討を行った。Control 群に対して 5%Dahlia 群で濃いバンドが見られたために、コレステロールの合成が促進されていることが観察された。Cont+15%High fat 群で最も濃いバンドが見られ、コレステロール合成が最も盛んに行われていることが観察された。一方、個体差が見られたものの 5%Dahlia+15%High fat 群では Control 群と同じくらいのバンドが見られた。Figure 4 には CYP7a1 の PCR 結果を示した。CYP7a1 は胆汁酸合成の律速酵素である。5%Dahlia 群では Control 群と同じくらいか薄いバンドが見られたため、胆汁酸合成が亢進または下がっていることが観察された。また 5%Dahlia+15%High fat 群でも Control 群と同じくらいか薄いバンドが見られたので胆汁酸合成が亢進または下がっていることが観察された。一方、Cont+15%High fat 群では Control 群よりも薄いバンドが見られたため、胆汁酸合成が下がっていることが観察さ

れた。

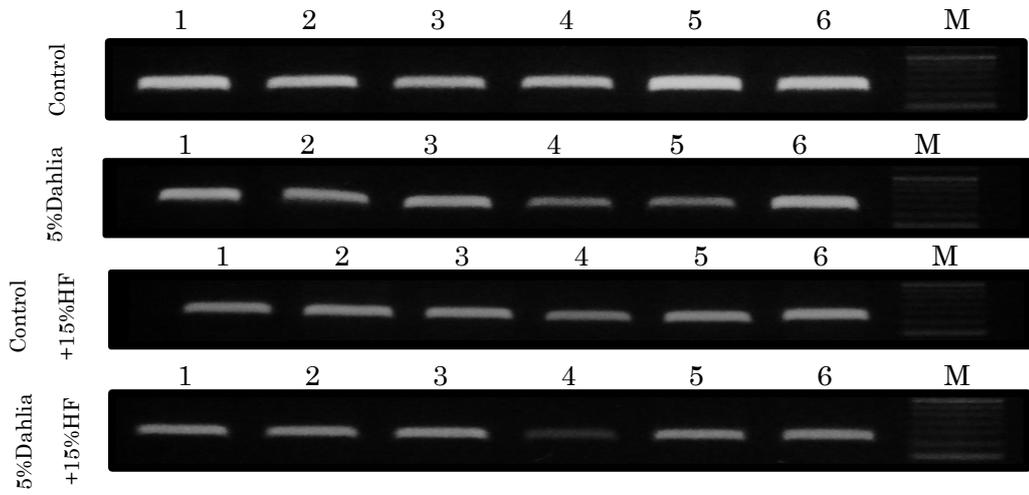


Figure 2. β -actin PCR.

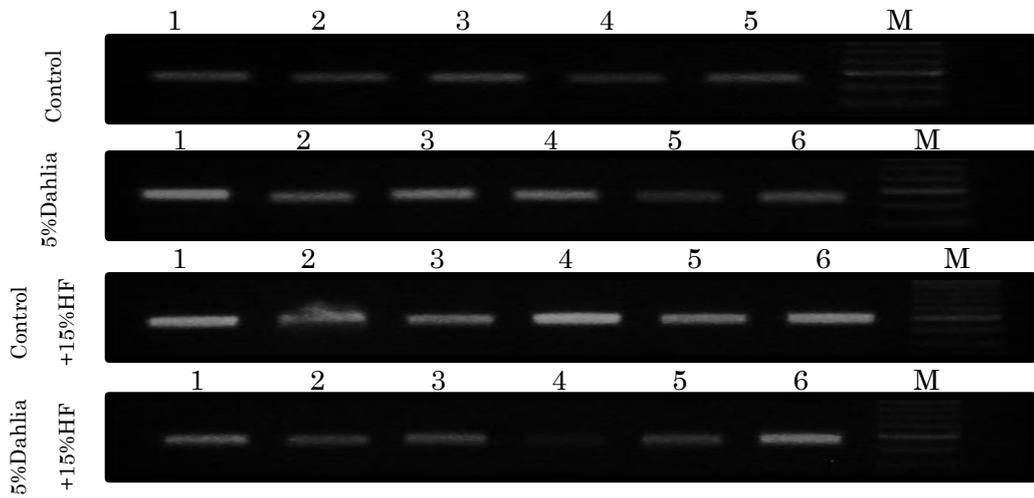


Figure 3. HMG-CoA reductase PCR.

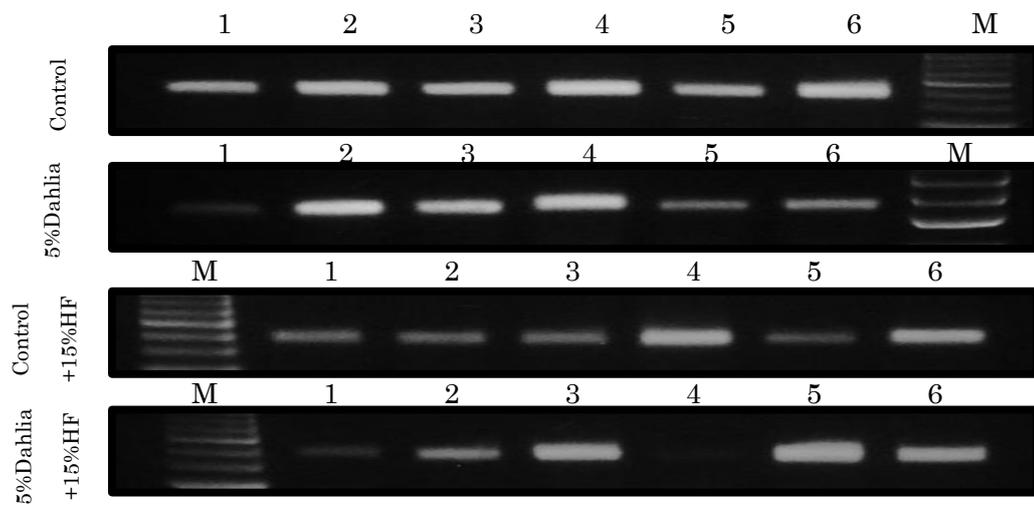


Figure 4. CYP7a1 PCR.

4. 考察

(1) ダリア塊根の安全性評価

本研究ではダリア塊根の安全性評価を行うために、対照群に対して 5%ダリア塊根粉末を飼料中に添加させた群を、また高脂肪食時における検討を行うために対照群よりも 15%ラードを多く添加させた Cont+15%High fat 群、さらにダリア塊根粉末を添加させた 5%Dahlia+15%High fat 群を設定し検討を行った。

まず、Table 2 よりいずれの群においても順調に体重が増え、終体重において Control 群, 5%Dahlia 群間と Cont+15%High fat 群, 5%Dahlia+15%High fat 群間では差が見られなかった。日本チャールズ・リバー(株)による SD 系ラットのモニタリングデータ²³⁾より、SD 系の雄ラットの体重推移を比較しても大きな差は見られない。また、臓器の中でも肝臓、腎臓は体内の代謝に大きく関わっている臓器である。何らかの有害成分が含まれた場合、いずれの臓器にも影響が見られると考えられたが Table 3 より、通常食群間と高脂肪食群間のいずれにも差は見られなかった。これらのことからダリア塊根を摂取しても成長への影響はないと見られる。

飼料摂取量に関しては有意差は見られなかった。本研究では SD 系ラットを使用した。SD 系ラットは大型に成長するモデルであるため高脂肪食を与えても高脂肪食群においても Control 群, 5%Dahlia 群と同量の飼料摂取をしたと考えられる。しかしながら、飼料効率による差が Control 群, 5%Dahlia 群に対して高脂肪食を与えた群において約 0.1%程度大きく見られた。これらのことから、終体重、さらには 1 日当たりの体重増加量、臓器の中では肝臓と腎臓にも影響が出たものと考えられる。

本研究では安全性評価を行う為に薬物代謝に関わる CYP7a1 に着目し実験を行った。

代謝とは異化と同化の 2 つに分類されるが、薬物代謝はまた少し異なる。外部から取り込んだ薬物や毒物と言った異物の親水性を高めることで体外への排出をし易くするための代謝反応である。薬物代謝に働く酵素は外部の多種多様な異物に対応する必要があるために、基質特異性が低いという特徴がある³⁾。薬物代謝酵素は主に肝臓中に存在しており、中でもシトクロム P450(CYP)は重要な酵素である。薬物代謝の 8~9 割に関わっており、それ以外にもステロイドの生合成やビタミン D の活性化、胆汁酸の合成などにも関与しており、多くの分子種が存在している²⁵⁾。

CYP7a1 はシトクロム P450 に含まれる薬物代謝酵素であり、胆汁酸合

成の律速酵素である。胆汁酸(Bile Acid)は肝臓でコレステロールを基に合成され、体外から入ってきた脂溶性物質を小腸で取り込み、また体外へ排出する役割を担っている。胆汁酸は腸管循環を経て肝臓へ再吸収され、そのほとんどが再利用される。排出された量に応じて新たな合成が行われる⁹⁾。

CYP7a1 は不活性化状態の SHP(Small Heterodimer Partner)が LRH-1(Liver Receptor Homolog-1)に結合することで LRH-1 が活性化され、LRH-1 により CYP7a1 の発現を促すことで胆汁酸合成を促進する。胆汁酸が豊富になると、胆汁酸は FXR(Farnesoid X Receptor)へ結合し、SHP の活性化シグナルを出す。活性化された SHP が LRH-1 にすると CYP7a1 の発現を抑制させ、胆汁酸合成が抑制される⁸⁾。以上のような反応を経て、フィードバック調節が行われている(Figure 5)。

Figure 4 から個体差が見られるものの、Control 群より 5%Dahlia 群では胆汁酸合成が亢進または下がっていることが示唆された。ならびに Cont+15%High fat 群では全体的に Control 群よりも薄いバンドが見られ、発現が下がっているものと考えられる。HMG-CoA reductase の発現が上がっていることからコレステロールが不足気味だと考えられるが、胆汁酸合成が促進されてはいないので胆汁酸は不足していないと思われる。一方、5%Dahlia+15%High fat 群では Control 群と同じくらいのバンドが見られたので胆汁酸合成の亢進考えられた。しかし 5%Dahlia 群とは異なり HMG-CoA reductase の発現は下がっており、コレステロールも胆汁酸も不足はしていないものと考えられる。これらのことから、ダリア塊根を摂取しても過剰な発現は見られず、Control 群と CYP7a1 の発現が同等もしくは低くなっていたこと、また CYP7a1 が正常に発現していたことからダリア塊根を食しても安全であると考えられる。

ダリア塊根粉末に何らかの有害物質が含まれた場合、CYP7a1 の発現が上昇すると考え今回の検討に至ったが、食物繊維を食べることで胆汁酸を再吸収する際に腸で阻害するという報告もあるようだが²⁵⁾、今回の結果からは見出せなかった。しかしながらイヌリンを摂取させても、糞便中のイヌリン量に変化はなかったという報告もあり真偽は未だ不明である¹⁰⁾。本実験では電気泳動を用いての検討のみを行ったため、今後 RealTimePCR 等で発現量の比較を行い、また糞便中の胆汁酸量の比較を行うことも必要だと考えられる。

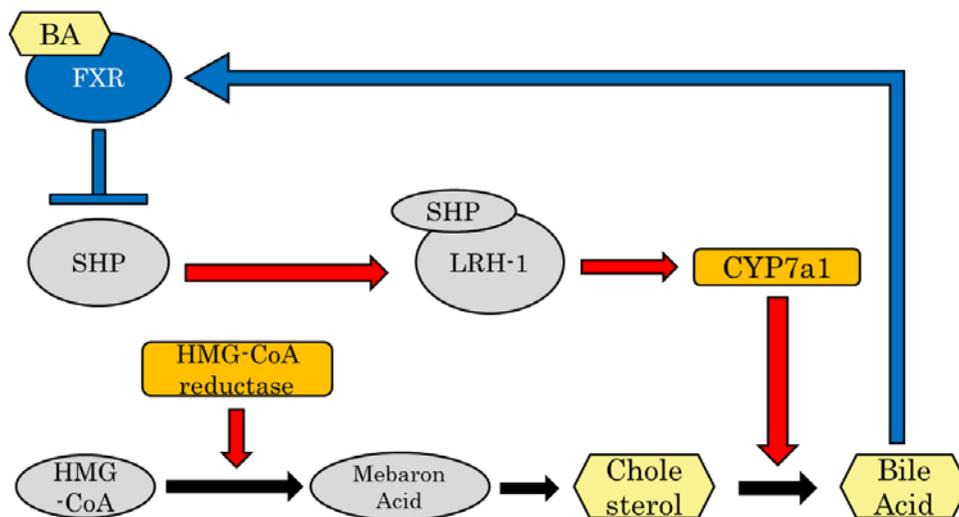


Figure 5. Regulation on CYP7a1 metabolism by SHP.

(2) ダリア塊根の機能性について

現代日本人の食生活は食事の欧米化が進んだことで高脂肪食傾向にあり、食事から得るエネルギー源の20%は脂肪からとされる。このような生活環境により、生活習慣病やメタボリックシンドロームが問題となっている。中でも食物繊維の目標摂取量は、18歳以上では1日あたり男性19g以上、女性17g以上とされている。しかしながら十分に摂取しているのは60代以上であるという報告がある²⁷⁾。食物繊維には血糖値の上昇抑制やコレステロール値低下作用、整腸作用などが期待され、現代日本人に必要な食事因子であると考えられる。

本実験で使用したダリア塊根にも水溶性食物繊維であるイヌリンが非常に多く含まれており、上記の効果が期待される。今回は高脂肪食時におけるダリア塊根の機能性について検討を行った。

ダリア塊根粉末の調製を行った際、皮付きのまま調製を行った方がイヌリンの回収量が多かったという報告より、今回は皮付きのままダリア塊根粉末の調製を行った¹¹⁾。

まずTable 2に示した成長記録より、Control群、5%Dahlia群に対して高脂肪食を与えた群間においての差は見られたが、ダリア塊根粉末の有無による要因による有意差は見られなかった。Table 3に示した臓器重量においても同様のことが言える。しかしながら、体内総脂肪重量ではダリア塊根の有無による有意差が見られた。成長の要因へは大きく影響は見られないが、脂肪への影響は示唆された。

Table 4 に示した生化学的検査結果では、血糖値の差がダリア塊根の有無では差は見られなかった。ダリア塊根抽出物を Wister 系ラットへ与え、血糖値の抑制について検討行った報告によれば、ダリア塊根抽出物を与えた群において、食後の血糖値上昇が与えていない群よりも緩やかになったという報告がある。ダリア塊根抽出物添加量に依存して血糖値上昇が低下し、またその作用は同じく水溶性食物繊維の難消化性デキストリンよりも強いということであった⁴⁾。本実験では解剖直前まで飼料を与えて絶食をさせなかったこともあり、血糖値の差が見られなかったのではないかと考えられる。

次に、普段トリグリセライドは脂肪細胞の中に貯えられており、必要に応じて脂肪酸になりエネルギーとして使われる。また血清トリグリセライド濃度が高くなると動脈硬化になる危険が高まり、肝臓中トリグリセライドが高くなると脂肪肝になる危険性がある。しかし、今回の結果では全ての群において正常値範囲内となっており、また Control 群に対して他群で低値を示したがいずれも有意差は見られなかった。解剖時に摘出した肝臓においても、脂肪肝の特徴である白い肝臓になっておらず、いずれの群も肝臓は赤色になっていたことから問題ないと言える。しかしながら通常食に対してイヌリンを添加しラットへ与えた実験報告では、血清および肝臓中トリグリセライドが有意に低下したという報告がある¹⁰⁾。本実験では有意差は見られなかったものの、血清および肝臓中トリグリセライドで Control 群に対して 5%Dahlia 群が低値を示したことから同様の機能があるのではないかと示唆されるが、高脂肪食を与えた場合では大きな差はなく、通常食時において差が見られるのではないかと考えられる。また、HDL-コレステロールは血中のコレステロールなどを肝臓へ運ぶ役割を持っており、よく善玉コレステロールなどと呼ばれている。HDL の割合が少ないと、遊離コレステロールなどが肝臓へ輸送されず、結果的に動脈硬化と言った病気の原因となる。HDL-コレステロールの基準値は 40~59 mg/dL とされており、Table 4 よりいずれの群においても正常値範囲内と言える。SOD 活性は体内に入ってくる活性酸素を分解する抗酸化活性値になるが、Control 群、5%Dahlia+15%High fat 群において有意差が見られた。しかしながら Control 群、5%Dahlia 群および高脂肪食群間では差は見られず、またダリア塊根の有無による影響は見られないために、ダリア塊根粉末は SOD への影響はないと考えられる。

次に総コレステロールであるが、水溶性食物繊維についての研究報告は多くされており、水溶性食物繊維の添加によりコレステロール値が下がったという報告もある¹⁷⁾¹⁸⁾。またそのメカニズムについては、水溶性食物繊維が水分を含み粘性を増すことで小腸内において胆汁酸の再吸収を阻害する、大腸において腸内細菌による発酵で生産される酢酸・プロピオン酸・酪酸によるコレステロールの合成阻害、インスリンの分泌減少と言ったことが挙げられている¹²⁾。一方で水溶性食物繊維を与えてもコレステロール値に差は見られなかったという報告もされている¹⁰⁾。本実験でも血清中総コレステロールでは **Control** 群に対して **5%Dahlia** 群が低値を示し、肝臓中総コレステロールでは **Cont+15%High fat** 群に対して **5%Dahlia+15%High fat** 群で低値を示したがどちらも有意差は見られなかった。

PCR を行った **HMG-CoA reductase** においては、**Figure 3** に示した結果より、**5%Dahlia** 群では **Control** 群よりも濃いバンドが見られたことからコレステロール合成が促進されていることが考えられる。同様の結果が **Cont+15%High fat** 群でも見られ、前者では **Table 4** より血清コレステロール値が低値を示したことからコレステロールが不足しているために合成促進されていることが示唆される。後者も **5%Dahlia** 群と同様に見られるが、高脂肪食を与えているためにコレステロールが不足しているとは考え難い。また **Figure 4** より **CYP7a1** において **Control** 群より **5%Dahlia** 群ならびに **Cont+15%High fat** 群では胆汁酸合成が促進または亢進していることが示唆された。

本実験では糞便の測定は実施出来なかったが、回収を行った際、**Control** 群と比べると白っぽく脂肪交じりの便が観察された。このことから過剰になった脂肪を排出していることが考えられるが、今後のさらなる検討が必要だと思われる。しかしながら **5%Dahlia+15%High fat** 群は **Cont+15%High fat** 群と同じくらいのコレステロール値を示していること、**5%Dahlia** 群では **Control** 群よりもコレステロールが低値を示したことからダリア塊根粉末摂取によりコレステロール値が低下したと考えられる。

食物繊維によるコレステロールの低下作用には上記に挙げた以外にも、リポタンパク質代謝の変化によるものという報告もされている¹²⁾。リポタンパク質は、血中の脂質成分を運搬する役割を担っており、その比重ごとに、キロミクロン・**VLDL**・**LDL**・**HDL**-コレステロールと分けることが可能となっている。**HDL**-コレステロールに対して、**LDL**-コレステロールは悪玉コレステロールとも呼ばれている。その原因として、**LDL**-コレス

テロールはリポタンパク質の中でも最も多くコレステロールを含み、運搬するためである。しかしながら LDL-コレステロールは肝臓で異化され、胆汁酸へなることも知られている¹⁶⁾。そのため、LDL-コレステロールの減少によりコレステロールの低下作用が見られ、コレステロールの低下により HMG-CoA reductase の発現が上昇し、かつ CYP7a1 の発現も上昇し分解系も促進されているとのことである¹⁶⁾。Cont+15%High fat 群で同様の結果が見られれば、LDL-コレステロールの異化が促進されているもの考えられるが、今回の結果から見出すことは出来なかった。また、本実験では総コレステロール、HDL-コレステロールについての検討しか行っていない。これらの報告より、今後血清の分画と言った検討も行っていかなければならないと考える。

結論

(1) ダリア塊根の安全性評価

ダリア塊根の摂取は胆汁酸合成の律速酵素である **CYP7a1** の発現量に大きな変化が見られなかったため、遺伝子レベルにおいて安全性が認められた。

(2) ダリア塊根の機能性

ダリア塊根を摂取するとコレステロール合成の律速酵素である **HMG-CoA reductase** 発現量が増加したにも関わらず、血清中ならびに肝臓中コレステロール値の低下傾向が見られた。したがって、ダリア塊根にはコレステロール低下能が示唆された。

5. 参考文献

- 1) 日本ダリア学会編『ダリア百科』(2009) 誠文堂新光社.
- 2) 荒木裕子ほか(2015) ダリア塊根の安全性と調理特性, 東京聖栄大学紀要, **7**, 39.
- 3) 中村成夫(2013)薬物代謝の化学反応 シトクロム P450 反応を中心として, 日医大医会誌, **9**(1), 25-30.
- 4) 奥和之ほか(2011)ダリア塊根抽出物の食後血糖値抑制作用, 大阪青山大学紀要, **4**, 71-75.
- 5) 野口聡裕, 山本愛次郎(2006)ダリア球根からのイヌリンの調製とアトロピンを含まないことの確認, 日本食品科学工学会誌, **53**(5), 308-311.
- 6) 横井健二, 今井修(2008)キクイモを原料とした機能性に富む加工食品の製造技術の開発, 富山県食品研究所研究報告, **6**, 15-23.
- 7) 田中彰裕(2013)食物繊維イヌリンによる脂肪代替, 日本調理科学会誌, **46**(4), 312-313.
- 8) 大野雅恵(2008)コレステロール代謝に関わる核内受容体 Farnesoid X Receptor の解析, 薬学雑誌, **128**(3), 343-345.
- 9) 古屋徳彦, 佐藤隆一郎(2006)胆汁酸の新たな生理機能と脂質代謝, 化学と生物, **44**(11)767-773.
- 10) 寺部茜ほか(2005)重合度の異なるイヌリンの食物繊維としての効果, 日本食物繊維学会誌, **9**(2), 93-99.
- 11) 山本愛次郎ほか(2003)ダリア球根からのイヌリン調製—宝塚の名物・名産づくりに参加して—, 甲子園大学紀要 栄養学部編, **31**(A), 9-16.
- 12) 池本信二(2000)食物繊維と脂質代謝, 日本食物繊維研究会誌, **4**(1), 1-8.
- 13) 太田篤胤(1999)難消化性糖質(フラクトオリゴ糖)のミネラル吸収促進作用, 日本栄養・食糧学会誌, **52**(6), 387-395.
- 14) Coussement P(1999)Inulin and Oligofructose : Safe Intake and Legal Status. *J.Nutr.* **129**, 1412S-17S.
- 15) Christine M(1999)Effects of Inulin on Lipid Parameters in Humans. *J.Nutr.* **129**, 1471S-1473S.
- 16) Vergara-Jimenez M1, Conde K, Erickson SK, Fernandez ML. (1998)Hypolipidemic mechanisms of pectin and psyllium in guinea pigs fed high fat-sucrose diets: alterations on hepatic cholesterol metabolism. *J Lipid Res.* **39**(7), 1455-65.
- 17) 古市幸生ほか(1994)トウモロコシ外皮より調製した水溶性食物繊維のラット脂質代謝に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会誌, **47**(1), 29-34.

- 18) 若林茂ほか(1991)ラットのコレステロール代謝に及ぼす難消化性デキストリンの影響, 日本栄養・食糧学会誌, **44(6)**, 471-478.
- 19) 三浦敏明(1990)肝チトクローム P-450 による異物の代謝活性化, 北海道大学医療技術短期大学部紀要, **3**, 1・-14.
- 20) 林敏子(1974)イヌリンおよび菊芋の栄養価, 家政学雑誌, **25(5)**, 73-76.
- 21) 船木幸子, 高野克夫(1967)ダリアの炭水化物について (第1報), 東京家政大学研究紀要, **7**, 25-30.
- 22) Shizuo Hattori, Mitsuhiko Sato(1963)Oligosaccharides in Dahlia Tuber. *Rot. Mag.* Tokyo, **76**, 273-278.
- 23) 日本チャールズ・リバー株式会社(2009)「SD ラット長期モニタリングデータ」
[online]http://www.crj.co.jp/cms/pdf/info_common/62/3971076/survival_data_SD_mar_2009ca.pdf
- 24) 難消化性デキストリンを知る!
[online]<http://www.matsutani.co.jp/product/kinousei/dextrin/07.html>
- 25) 代謝酵素(シトクロム P450 : CYP)と抱合反応
[online]<http://kusuri-jouhou.com/pharmacokinetics/cyp.html>
- 26) お腹を元気にする水溶性食物繊維ガイド
[online] <http://www.suiyousei-fiber.com/effect/cholesterol.html>
- 27) 必要な食物繊維摂取量はどれくらい?
[online]
http://www.otsuka.co.jp/health_illness/fiber/take_fiber/daily_amount/