

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：37112

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05921

研究課題名（和文）可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料の抗肥満作用のメカニズム解明

研究課題名（英文）The mechanism elucidation of anti-obesity effect about tea beverage containing soluble hesperidin

研究代表者

長谷 静香（Hase, Shizuka）

福岡工業大学・工学部・准教授

研究者番号：10448821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：温州ミカンの生産過程で間引き・放置廃棄される未熟果と、劣質で在庫を抱える緑茶三番茶葉とを混合発酵したミカン混合発酵茶葉を製造・開発した。本茶葉の熱水抽出物（ミカン茶飲料）は、未利用資源を有効活用し、カテキン類やその重合体との共存により未熟ミカン由来のヘスペリジンの不溶性を改善した新しいタイプの紅茶である。

本研究にて、ミカン茶飲料を摂取したマウスにおいて明らかな抗肥満作用が確認された。また、マウスやラットにおける肝臓脂質蓄積抑制作用についても明らかとなった。作用機序として、インスリンやレプチンの感受性向上、リパーゼ活性の抑制、糖質のエネルギーとしての消費促進などが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

規格外の野菜・果実などは、食用と同等もしくはそれ以上に栄養豊富であるにも関わらずその多くが産業廃棄物として処理されている。本研究では、未利用資源である摘果（未熟）ミカンと緑茶三番茶葉を有効活用し、かつ健康効果を見出した点において、産業廃棄物の削減ならびに肥満に関わる諸疾患の予防による国の医療費負担軽減につながる。さらに、地元特産品を用いた加工食品の製造開発により新事業が創出され、地域活性化につながる。これらの社会的意義に加え、学術的意義としては、これまで不溶性のヘスペリジンは人工的な糖転移により可溶化していた所、本研究では化学反応によらず天然成分の共存により可溶化させた点が意義深い。

研究成果の概要（英文）： We have manufactured and developed novel tea leaves made by mixing and fermenting of unripe, inedible, and wasted Satsuma mandarin and poor quality third cropped green tea leaves. The hot water extract of the mixing and fermenting tea leaves (mandarin mixed tea beverage, MTB) is a new type of black tea that makes effective use of unused resources and improves the insolubility of hesperidin derived from unripe mandarin oranges by coexisting with catechins and their polymers.

In this study, we investigated the effect of administration of MTB on obesity and lipid metabolism in mice and rats. Obvious anti-obesity effect was observed in C57BL/6J mice and SD rats drinking MTB. Hepatic lipid lowering activity was also suggested. These effects were exerted though, in part, the improvement of insulin and leptin sensitivity, suppression of lipase activity, and expenditure of carbohydrate as energy.

研究分野：食品栄養学

キーワード：未利用資源の有効活用 緑茶三番茶葉 未熟温州ミカン ヘスペリジンの可溶化 紅茶 肥満・脂肪肝・脂質異常症の改善 ラット マウス

1．研究開始当初の背景

我々は、緑茶三番茶葉をベースとする異種作物混合発酵法に関する技術特許を取得している。例えば、緑茶三番茶葉をベースとして、副産物（未利用資源）であるピワ葉を混合発酵させた茶葉や、同じく廃棄されるツバキ葉を混合発酵させた茶葉を製造している。前者は中性脂肪低減作用、後者は血糖上昇抑制作用に焦点を当て、製造条件の検討、作用の検討およびメカニズムの解明、有効成分の探索、臨床試験を経て、いずれもすでにティーパックの形態で商品化・販売に至っている。このように、我々は未利用資源の有効活用による健康食品の開発・評価を行ってきた。

本研究では、緑茶三番茶葉をベースとして、温州ミカンの生産過程で間引き・放置廃棄される未熟果を細分化して混合発酵させた茶葉を製造した。本茶葉の熱水抽出物（ミカン茶飲料）は、カテキン類やその重合体との共存により未熟ミカン由来のヘスペリジンの不溶性が改善された「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」であり、新しいタイプの紅茶である。ヘスペリジンは脂質代謝改善作用を有することが報告されているが、水に極めて難溶であるため、水溶性および吸収性を高めた「糖転移ヘスペリジン」が開発・利用されている。しかし、ヘスペリジンはエタノールを用いて抽出されるため高コストであり、コスト削減のため原料のミカンは国内でなく中国で生産されている。一方、「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」は、国内生産の摘果ミカンと三番茶生葉を萎凋、揉捻、混合し、酸化発酵することにより製造され、未利用資源を用いるため低コストである。さらに本茶飲料は、製造過程で摘果ミカンと茶本来の酵素の働きにより、茶カテキンが酸化重合して紅茶ポリフェノールが生成され、摘果ミカンのヘスペリジン自体は変化しないが、紅茶ポリフェノールと会合することでその難水溶性が改善される。

2．研究の目的

これまで、「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」の食品としての有用性について検討するため、本茶飲料の凍結乾燥粉末を食餌に混合・摂取させる方法で動物実験を行ってきたが、苦味による摂食量の低下が懸念された。ヘスペリジンの可溶性による有用性を評価するには、実際にヒトが摂取する形態である「茶飲料」として摂取させる必要がある。

そこで本研究では、「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」の抗肥満作用ならびに脂質代謝改善作用について、ラットやマウスに飲料（液体）として摂取させることで検討した。

3．研究の方法

【可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料ならびに一般的な紅茶葉の製造】

はじめに緑茶三番茶生葉を温度 26℃、湿度 55%で 24 時間静置し、萎凋（いちょう）を行った。次に、丸ごと 3～4mm に細分化した未熟ミカン果実（10 kg）と萎縮した茶葉（30 kg）を 1：3 の割合で揉捻（じゅうねん）機に入れ、20 分間混合揉捻することで酸化を行った。最後に透気式乾燥機で 110℃、30 分間の熱風処理を行い、茶葉の酸化停止と乾燥を行い、ミカン茶葉とした。一般的な紅茶葉は、未熟ミカンを含まず緑茶三番茶葉のみを同様に発酵させ製造した。各茶葉 2 g に対して熱湯 100 mL を加え、5 分間抽出した溶液（紅茶飲料、ミカン茶飲料）を動物実験に使用した。

【実験 1】C57BL/6J マウスにおける「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」の自由摂取による抗肥満作用

脂肪蓄積に対して応答性の良い C57BL/6J マウス（雄、5 週齢）を用いた。食餌は AIN-93G 組成に基づき、肥満を誘発させるため 15%高脂肪食を調製し、自由摂食させた。水もしくはミカン茶飲料を給水器にて自由に与えた。摂取および摂食期間は 2、4 もしくは 6 週間とし、2～4 日毎に体重、摂食量、摂取量を測定した。飼育終了前 5 日間の糞を回収した。飼育終了後、摂取および摂食下で解剖を行い、血液、肝臓、脾臓、腎臓、睪丸、各白色脂肪組織、盲腸を採取した。血液は遠心分離により血清を得て、血清の糖質、脂質、ホルモン濃度、抗酸化活性を測定した。肝臓は、Folch らの方法により総脂質を抽出し、各脂質濃度および脂肪酸組成を測定した。また、糞の排泄量、見かけの遊離脂肪酸、総胆汁酸排泄量を測定した。データは平均値 ± 標準誤差 (n=6) で示し、統計処理は飲料の違いおよび摂取期間の違いを因子とする二因子分散分析 (two way-ANOVA) を行い、危険率 5%未満で有意差ありとした。白色脂肪組織重量と各種血清ホルモン濃度との相関は、ピアソンの積率相関係数 (r) を用いて分析を行い、危険率 5%未満で有意な相関とし

た。

【実験2】Sprague-Dawley ラットにおける「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」の定量投与がエネルギー消費に及ぼす影響

脂肪蓄積に対して応答性の良い Sprague-Dawley ラット（雄、4 週齢）を用いた。食餌は AIN-93G 組成に基づき、肥満を誘発させる 15%高脂肪・0.5%高コレステロール食を調製し、自由摂食させた。水を給水器にて自由に与え、ミカン茶飲料群には、2 日毎に体重 100 g あたり 2.5 mL のミカン茶飲料を、胃ゾンデを用いて定量経口投与した。飼育期間は 31 日間とし、2 日毎に体重および摂食量を測定した。飼育終了 4 日前に生体ガス分析用質量分析装置（アルコシステム）を用いて、生体ガス分析による 24 時間のエネルギー消費量および呼吸基質燃焼量を測定した。飼育終了前 2 日間の糞を回収し、飼育終了後の解剖や分析項目は実験 1 に準じた。データは平均値 ± 標準誤差 (n=6) で示し、統計処理は Student's t-test による 2 群間比較を行い、危険率 5% 未満で有意差ありとした。

【実験3】C57BL/6J マウスにおける「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」と一般的な紅茶飲料との作用程度の比較・検討

C57BL/6J マウス（雄、5 週齢）を用い、3 日間の予備飼育後、水投与群、紅茶飲料投与群、ミカン茶飲料投与群に分けた。マウスは個別飼いで、AIN-93G 組成に基づく飼料に 15%脂肪および 0.5%コレステロールを添加した飼料および水を自由に与え 34 日間飼育した。飼育期間中 2 日毎に水、紅茶飲料もしくはミカン茶飲料を胃ゾンデを用いて約 1.67 mL/100 g 体重の用量で経口投与した。飼育期間中、2 日毎に体重および摂食量を測定した。飼育終了前 3 日間の糞を回収した。飼育終了後の解剖や分析項目は実験 1 に準じた。データは平均値 ± 標準誤差 (n=5~6) で示し、統計処理は Tukey-Kramer による多重比較を行い、危険率 5%未満で有意差ありとした。

4. 研究成果

【実験1】C57BL/6J マウスにおける「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」の自由摂飲による抗肥満作用

終体重、体重増加量、白色脂肪組織重量において、飲料の違いおよび摂飲期間の違いの両因子の影響が見られ、いずれの期間においてもミカン茶飲料の摂飲により低値を示した。摂食量には飲料の違いによる影響が観察されなかったが、摂飲量においては両因子の影響が観察され、いずれの期間においてもミカン茶飲料の摂飲により高値を示した。このように、マウスは摂食量の低下を伴うことなくミカン茶飲料をよく摂飲し、そのことによる明らかな抗肥満作用（体重および体脂肪の低減）が示唆された。

血清脂質濃度において、飲料の違いによる影響は観察されなかった。一方、肝臓トリグリセリド濃度において、両因子の影響が見られ、ミカン茶飲料の摂飲により低値を示した。肝臓コレステロール濃度において、飲料の違いによる影響が観察され、ミカン茶飲料の摂飲により低値を示した。糞重量において、両因子の影響が見られ、ミカン茶飲料の摂飲により高値を示した。糞中への見かけの脂肪排泄量においては、飲料の違いによる影響が観察され、ミカン茶飲料の摂飲により高値を示したが、糞中への総胆汁酸排泄量にはミカン茶飲料の摂飲によりむしろ低値を示した。このように、ミカン茶飲料は肝臓脂質濃度低下作用を発揮した。また、肝臓トリグリセリド濃度の低下は糞中への脂肪排泄が一因と考えられたが、肝臓コレステロール濃度の低下は糞中へのステロイド排泄以外の要因によるものであると考えられた。

血清レプチン濃度において、両因子の影響が見られ、いずれの期間においてもミカン茶飲料の摂飲により低値を示した。さらに、白色脂肪組織重量とレプチン濃度は有意な正の相関を示した。よって、ミカン茶飲料の抗肥満作用は、レプチン濃度低下による感受性向上が一因と考えられた。

【実験2】Sprague-Dawley ラットにおける「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」の定量投与がエネルギー消費に及ぼす影響

終体重、体重増加量において、群間で有意な差異は見られなかったがミカン茶飲料群で低下傾向を示した。白色脂肪組織重量においても群間で有意な差異は見られなかった。ラットではミカン茶飲料の定量投与のため摂飲量が少なく、マウスのような明確な抗肥満作用は観察されなかった。

血清パラメータにおいては、ミカン茶飲料によるコレステロール濃度の有意な低下と総胆汁酸濃度の低下傾向、ならびにリパーゼ活性の有意な低下が観察された。しかし、レプチン濃度の

低下は観察されなかった。肝臓脂質濃度においてはミカン茶飲料群で有意に低下したため、少量の摂飲であっても肝臓脂質蓄積抑制が示唆された。また、盲腸重量が有意に増加したことから腸内環境改善の可能性が示されたが、糞重量の増加や脂質排泄促進については明確ではなかった。

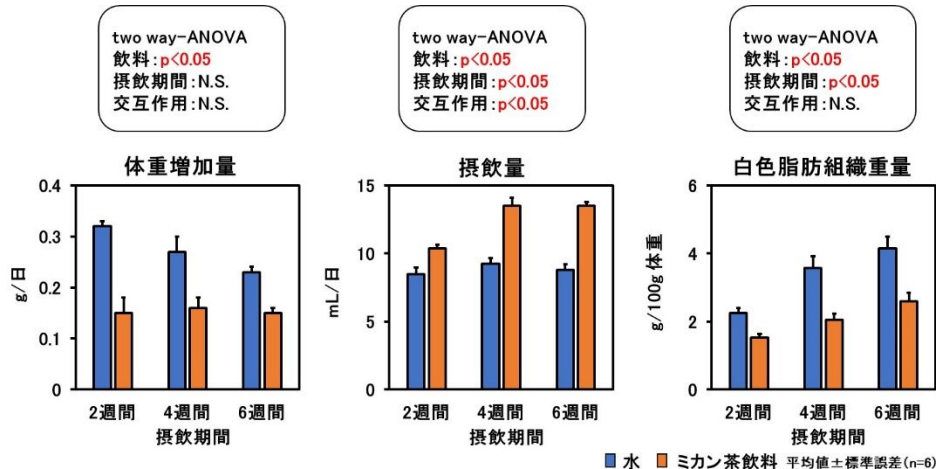
エネルギー消費量は群間で有意な差異は観察されなかったが、ミカン茶飲料の摂飲により、暗期の時間帯（活動・摂食時）に炭水化物燃焼量は有意に高値を示し、脂質燃焼量は有意に低値を示した。よって、摂食時における炭水化物のエネルギー消費促進が抗肥満作用の一因であると考えられた。

【実験3】C57BL/6J マウスにおける「可溶性ヘスペリジン高含有茶飲料」と一般的な紅茶飲料との作用程度の比較・検討

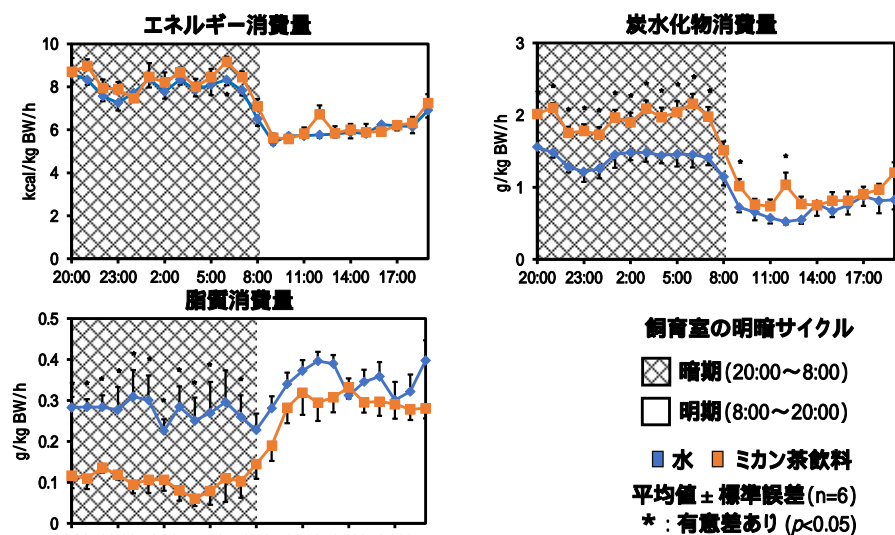
終体重や体重増加量に各群間で有意な差は見られず、白色脂肪組織重量においても同様であった。各血清パラメータにおいても明確な影響は観察されなかった。今後、肝臓パラメータを測定する予定である。

紅茶飲料およびミカン茶飲料の経口投与量は、実験2にて肝臓脂質濃度低下に有効であった2.5 mL/100 g 体重/2 日とする予定であったが、本実験ではその3分の2程度の量（約1.67 mL/100 g 体重/2 日）しか経口投与できなかったため、十分な作用を見出すことができず、よってミカン茶飲料と紅茶飲料の作用程度を比較するまでに至らなかった。

【実験1】明らかな抗肥満作用



【実験2】炭水化物のエネルギーとしての消費促進



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shizuka Hase-Tamaru, Ayaka Okushima, Yu Miyata, Hisayuki Makayama, Sadayuki Aragaki, Yuji Miyata, Yasuo Nagata, and Kazunari Tanaka	4. 巻 25(5)
2. 論文標題 Unripe and discarded Satsuma Mandarin (Citrus Unshiu MARC.) improved lipid metabolism in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 705-713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.25.705	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daiki Umeda, Komei Hotta, Shizuka Hase-Tamaru, Aoi Tsuchihashi, Bungo Shirouchi, and Kazunari Tanaka
2. 発表標題 Lipid metabolism improving effect of fermented tea made by mixing of unripe Satsuma mandarin (Citrus unshiu) and third cropped green tea leaves in rats
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀田孔明、長谷（田丸）静香、下川未智
2. 発表標題 未熟ミカン混合発酵茶飲料のマウス抗肥満作用
3. 学会等名 令和2年度（公社）日本食品科学工学会 西日本支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀田孔明、川野恭平、木村星斗、長谷（田丸）静香、宮崎瞳、田中一成
2. 発表標題 生体内の酸化ストレス環境下における未熟ミカン摂取の影響
3. 学会等名 2019 年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部および日本食品科学工学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------