

機関番号：33708

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20780103

研究課題名 (和文) 清酒濃縮物による肌質・高尿酸血漿状態の改善

研究課題名 (英文) Improvement of skin condition and hyperuricemia by sake concentrate

研究代表者

三嶋智之 (MISHIMA TOMOYUKI)

岐阜医療科学大学・保健科学部・衛生技術学科・講師

研究者番号：00434522

研究成果の概要 (和文)：清酒濃縮物を摂取した被験者では、含まれる ethyl  $\alpha$ -D-glucoside の約 80% が 24 時間後までに尿中に排泄されていた。角層水分量については清酒濃縮物を皮膚に塗布した被験者では 120 分後まで高値を示していた。また清酒濃縮物を飲用した被験者では 60 分後までには変化が認められなかったが、続けて 7 日間、毎日摂取した場合、上昇傾向が見られた。正常ラットに清酒濃縮物を投与した場合、血漿尿酸値が低下した。しかし高尿酸モデルラットにおける高尿酸血漿状態に及ぼす影響については更なる検討の必要性がある。

研究成果の概要 (英文)：Approximately 80% of ethyl  $\alpha$ -D-glucoside was excreted into urine within 24 h after single oral ingestion of sake concentrate in human. The level of moisture content of the stratum corneum was kept a higher level within 120 min after single topical application of sake concentrate to the antebrahium of the volunteers. In terms of single oral ingestion, there was no significant deference in the moisture content of the stratum corneum for 60 min. On the other hand, the moisture content of the stratum corneum was slightly increased in the volunteer who had taken single daily ingestion of sake concentrate for 7 days. Plasma uric acid was decreased by ingestion of sake concentrate in the normal rats. We need further investigation about the effect of sake concentrate on hyperuricemia in the hyperuricemia rat model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21 年度	800,000	240,000	1,040,000
22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：食品機能学，食品栄養学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：清酒濃縮物, ethyl  $\alpha$ -D-glucoside, 尿排泄, 角層水分量, 尿酸

## 1. 研究開始当初の背景

清酒は米を原料として、麴菌と酵母を使う並行複発酵で製造されるため、様々な生成物が含まれる。 $\alpha$ -EG は 1971 年に Imanari と Tamura によって清酒中に認められた配糖体である。1976 年には Oka らにより麴菌の  $\alpha$ -glucosidase によって生成することが示され

た。 $\alpha$ -EG は清酒に特異的な成分として 0.2～0.6% 程度含まれている。機能性については、1976 年に Oka らが呈味性の点で報告し、1997 年に Kitamura らはマウスの皮膚への塗布により UV 照射後の荒れた皮膚の保湿性が高められることを示した。これまでに我々はラットを用いた実験において、 $\alpha$ -EG が小腸の

$\alpha$ -glucosidaseにより加水分解されること、小腸においてSGLT1を介して吸収されることを示してきた。またラットへ $\alpha$ -EGを経口投与した実験では投与量の60%以上が尿中に排泄されることも明らかにした。さらに多量の $\alpha$ -EGを経口投与すると腎臓の尿細管が拡張するが、それは腎臓の細胞や組織への悪影響によるものではないことも示した。それに併せて $\alpha$ -EGが浸透圧性の利尿作用を示すことも報告した。また我々と同時期にTeagueらは清酒を摂取したヒトにおいて $\alpha$ -EGが尿中へ排泄されていることを報告し、生理作用の点ではHirotsumeらはマウスへの $\alpha$ -EG経口投与でもUV照射後の荒れた皮膚の保湿性を高める効果があることを報告した。また2007年にはIzuらは $\alpha$ -EGを経口投与したマウスでのガラクトサミン誘発肝臓障害に対する抑制作用を報告した。こういった背景の中、我々は、2007年に $\alpha$ -EGを皮膚へ塗布したマウスの皮膚状態に与える生理作用について脂質合成の観点などからその一部を明らかとした。

## 2. 研究の目的

本研究の全体構想は、日本人が古くから飲み親しんでいる「清酒」の生理作用を明らかにしようとするものである。古くから清酒はアルコール飲料としての嗜好品の役割だけでなく、「酒は百薬の長」といわれるように様々な薬理・薬効があるといわれてきた。最近になって様々な報告がされており、抗酸化作用、美肌効果、肝機能保護作用がいられている。本研究期間内にはこれまで得られた清酒濃縮物の生理効果に関する研究結果を踏まえ、以下の点について研究を進展させることとした。

(1) 清酒濃縮物摂取後の $\alpha$ -EGの尿中排泄; これまでの動物実験では、経口摂取された $\alpha$ -EGは血中へ吸収され、さらに大部分が速

やかに尿中へ排泄された。生理作用の作用時間等に関わる知見を得るため、ヒトにおいて清酒濃縮物摂取後の $\alpha$ -EGの尿中排泄量の経時的変化を観察した。

(2) 清酒濃縮物塗布および摂取後の角層水分量への影響; 以前の研究では、清酒濃縮物や $\alpha$ -EGをマウスの皮膚へ塗布すると表皮の状態が良好に保たれる作用があることが示された。そこでヒトにおいて清酒濃縮物を経口摂取もしくは表皮塗布した後の角層水分量に与える影響について調べた。

(3) ラットにおける清酒濃縮物投与による影響; ラットに清酒濃縮物を投与し、臓器や血漿成分に及ぼす影響について検討した。また $\alpha$ -EGが利尿作用を示すことから、高尿酸血症モデル動物に清酒濃縮物を投与して尿酸排泄の促進作用について検討した。

## 3. 研究の方法

本実験ではエタノールを含まない清酒濃縮物(減圧濃縮物)を使用した。清酒濃縮物中には20%程度の $\alpha$ -EGが含まれており、適宜蒸留水にて希釈して使用した。実験に関してはヘルシンキ宣言の精神に則って行い、岐阜医療科学大学実験倫理委員会、岐阜大学医学部実験倫理審査委員会の承認を得て行った。被験者には健康であること、医薬品、アルコール等の常用がないことを確認し、未成年を選択しなかった。また意識しない $\alpha$ -EGの摂取を避けるために、清酒濃縮物の投与48時間前から試験期間中にはすべてのアルコール飲料や清酒を使用した食事、ならびに清酒を材料とした食品を摂取しないように制限した。すべての被験者には本研究で得られた結果を研究以外には使用しない点、個人情報保護について説明したうえで同意書を得た。

(1) 清酒濃縮物摂取後の $\alpha$ -EGの尿中排泄; 実験協力者は男女各3名(n=6, 22.0 $\pm$ 0.3歳)であった。実験前に尿試験紙(Diagnostics K.K.)を

用いて尿検査(urobilinogen, protein, pH, glucose, and occult blood)を行い、すべての協力者は健康であり重大な疾病を有していないことを確認した。試験日にはすべての協力者に 5.7g の清酒濃縮物( $\alpha$ -EG 1.0g; 4.8 mmol)を摂取していただいた。尿はブランク(0h)として清酒濃縮物摂取の30分前に、さらに1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48 h 後に続けて回収した。尿は分析まで $-40^{\circ}\text{C}$ で保存した。尿にエタノールを加え、遠心分離にてタンパク質を除いた。得られた上清に buffer ( $\text{CH}_3\text{CN}$ :0.05% ammonia, 7:3)を加え、試料溶液とした。分離には Shodex NH2P-4D column (2.0 $\times$  150 mm, 4  $\mu\text{m}$ ; Showa Denko Co.)を備えた Agilent 1200 series chromatograph (Agilent Technologies)を用い、分析は Quadrupole LC/ESI-MS 6130 (Agilent Technologies)にて行った。

(2) 清酒濃縮物塗布および摂取後の角層水分量への影響

① 皮膚への塗布による角層水分量への影響; 実験協力者は男性 8 名, 女性 5 名 ( $n=13$ ,  $21.7\pm 0.2$  歳)であった。測定環境は室温  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $48\pm 3\%$  で一定にし, 20 分間の馴化時間をとった。実験中は試験室より退室せず, 安静な条件下とした。20%の  $\alpha$ -EG を含む清酒濃縮物を蒸留水にて 10 倍( $\alpha$ -EG 2%), 100 倍( $\alpha$ -EG 0.2%), 1000 倍( $\alpha$ -EG 0.02%)希釈したものを前腕に塗布し, 5, 10, 15, 30, 60, 120 分後に SKICON-200-EX (I. B. S. Co. Ltd.) を用いて角層水分量(伝導度)を測定した。塗布直前の値を 0 分(blank)とした。塗布量は  $10\mu\text{L}$  とし, 半径 1cm にうすく塗り広げた。

② 清酒濃縮物摂取による角層水分量への影響; 男性 4 名, 女性 3 名 ( $n=7$ ,  $32.3\pm 2.0$  歳)を被験者とした。20%の  $\alpha$ -EG を含む清酒濃縮物 5g を経口摂取した 30, 60 分後に角層水分量を測定した。塗布直前の値を 0 分(blank)とした。また, ベッドサイドモニター BSM-2301

(Nihon Kohden Co.)を用い, 前額部温度, 血圧, 心拍数, 呼吸数を測定した。末梢部位の温度変化については, サーモグラフィー

(INFRA-EYE 2000, Fujitsu Tokki Systems Ltd.)を用いて, 左手手背及び第一指の表面温度を測定した。また男性 3 名, 女性 2 名 ( $n=5$ ,  $33.2\pm 2.7$  歳) に対して, 清酒濃縮物の摂取(5g)を毎日繰り返し, 4, 8 日後に角層水分量を測定した。測定は 13:00 に行い, 摂取前の値を 0 日(blank)とした。

(3) ラットにおける清酒濃縮物投与による影響

① 清酒濃縮物投与による影響(正常ラット); 実験動物として Wistar/ST rat (male, 4wks, Japan SLC Inc.)を Control 群と Sake 群に分けた ( $n=6$ )。本飼育期間中は粉末 MF 食 (Oriental Yeast Co.) を与え, 飲料水として Control 群に蒸留水, Sake 群には清酒濃縮物( $\alpha$ -EG 5%)を自由摂取させた。飼育室は温度  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 湿度 60%, 明暗 12 時間サイクル(8:00- 20:00)に設定した。また本飼育 0, 3, 7 日目に尿を, また 1, 4 日目に, 尻静脈より血液を採取した。8 日目に麻酔下にて解剖し, 腹部大動脈より採血をした。肝臓と腎臓は, 重量を測定した。腎臓はホルマリン固定後, 包埋, 薄切し, HE 染色を行ったものを病理組織学的検査に供した。血液には 1%ヘパリン Na を加えて遠心分離し, 血漿を採取し, 分析まで $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。血漿中トリアシルグリセロール(TG), 総コレステロール, HDL-コレステロール, 尿酸, 尿素窒素(BUN), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)活性は各テストキット (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)にて測定した。

② 清酒濃縮物投与による影響(高尿酸血漿モデルラット); Wistar/ST rat (male, 4wk)を実験動物として粉末 MF 食を与えた。本飼育では

高尿酸血症にするために、粉末 MF 食に 2.5% のオキソソ酸(Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.)と 2% の RNA(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を混合した高尿酸血症誘導食を用いた。清酒濃縮物および飼育方法は(3)-①に準じた。ラットは高尿酸食投与群(HU 群)、高尿酸食+清酒濃縮物投与群(HU-sake 群)に分け(n=6)、高尿酸血漿誘導期として 3 日間、高尿酸血症誘導食と蒸留水を自由摂取させた。その後本飼育は 7 日間行い、飲料水として HU 群には引き続き蒸留水を与え、HU-sake 群には清酒濃縮物( $\alpha$ -EG 5%)を自由摂取させた。0, 3, 7 日目に採尿し、-3(高尿酸血漿誘導食投与前), 0, 4 日目に尾静脈より採血した。本飼育開始 8 日目に麻酔下にて解剖し、血液、肝臓、腎臓を採取した。血漿中の各成分は(3)-①と同様に分析し、腎臓は病理組織学的検査に供した。

(4)統計処理;データは平均 $\pm$ SE で表し、(1), (3)においては student t-test により、また(2)においては paired t-test (v.s. 0 h or v.s. 0 day) により有意差を判定し、\*\*は  $p<0.01$ , \*は  $p<0.05$ , #は  $p<0.1$  にて有意差があることを示す。

#### 4. 研究成果

(1) Fig.1 に清酒濃縮物経口摂取後の尿中  $\alpha$ -EG 排泄量について示す。すべての 0h 尿に排泄は認められなかった。清酒濃縮物摂取後 6 時間までに、摂取した  $\alpha$ -EG の約 50%が、さらに 24 時間までに  $80.1 \pm 5.4\%$  ( $3.85 \pm 0.26$  mmol)が排泄されており、24-48 時間ではわずかであった( $0.232 \pm 0.078$  mmol)。尿中への排泄から推測した血中濃度半減期は  $7.29 \pm 1.16$  h であり、 $\alpha$ -EG が速やかに尿中へ排泄されていることが示された。

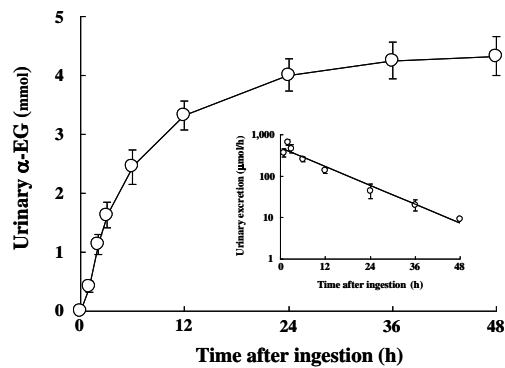


Fig.1 清酒濃縮物摂取後の尿中  $\alpha$ -EG 排泄量の変化

(2)-① 清酒濃縮物塗布後の角層水分量(伝導度)の経時的变化を Fig.2 に示す。10, 100, 1000 倍希釈液すべてにおいて、塗布の 5 分後にピークを示し、blank (0 分)に対して有意に高値を示した。その後、値は低下したものの、120 分後まで高値を示した。本実験における塗布 5 分後の高値は清酒濃縮物の水分による一時的なものであるが、清酒濃縮物の塗布により 120 分程度まで保湿性が高く保たれることが分かった。これは清酒濃縮物中の成分が皮膚表面の密閉性を高めて保護したり、水と結合して角層に保持される事で角層水分を長時間保持できる性質を有しているためと考えられる。

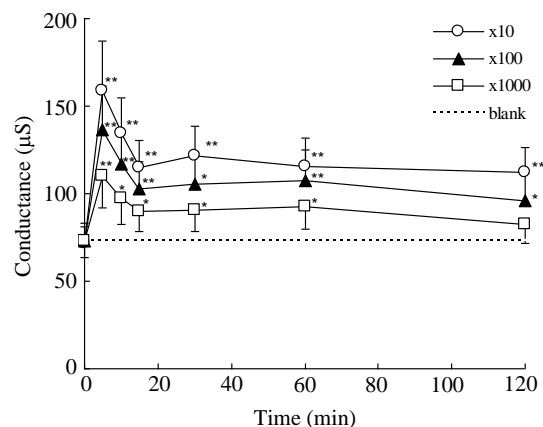


Fig. 2 清酒濃縮物塗布後の角層水分量の経時的变化

(2)-② 次に清酒濃縮物の単回摂取後の角層水分量の変化について Fig.3 に示す。その結果、30 分後および 60 分後とも有意な変化は認められなかった。前額部温度、血圧、心拍数、呼吸数、手指の表面温度に関しては顕著

な変動はなかった。一方、長期投与後の角層水分量の変化を Fig.4 に示すが、清酒濃縮物摂取により角層水分量の上昇傾向があり、8 日目には高値(p<0.1)を示した。これらの結果から清酒濃縮物摂取の継続的な摂取が角層水分量に影響を与えらる。

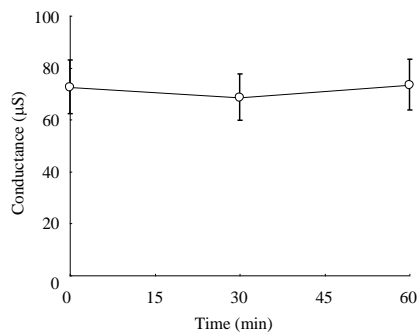


Fig. 3 清酒濃縮物単回摂取後の角層水分量の変化

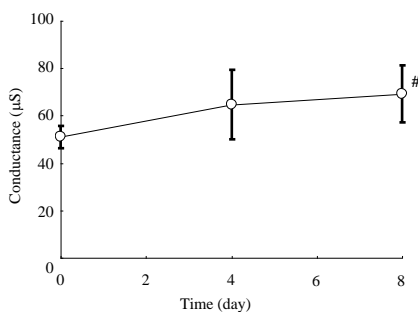


Fig. 4 清酒濃縮物長期摂取後の角層水分量の変化

(3)-① 実験期間中の体重、摂食量、飲水量、臓器重量を Table1 に、血漿の成分値を Table2 に示した。飲水量には有意差が見られ、Sake 群ではその甘みなどに誘引され摂取量が増加したと考えられる。また Sake 群では飼料摂取量が有意に低値を示したが、体重増加量に差は認められなかった。これは清酒濃縮物に糖質、アミノ酸などが多く含まれているためである。血漿 AST, ALT 活性は Sake 群で有意に低値を示しており、これは Izu らが報告したように、清酒濃縮物中の成分(α-EG など)が肝臓に対して保護的に働いた結果と推測される。一方で腎臓の重量が増加したが、これは α-EG 単独で投与した際にも認められ、α-EG の排泄に伴う腎臓における水分の保持量の増加であると考えられた。腎臓の組織切

片からの病理所見については Sake 群の一匹のラットにおいて、一部にごく軽度の皮質尿細管の拡張を認めたものの、細胞の障害は認められなかった。腎機能の指標としての血漿 BUN 濃度の低下と病理組織学的検査の結果より、清酒濃縮物が腎臓への病態的障害を与えることはないと考えられる。またコレステロールは HDL-, 総コレステロールともに Sake 群で高値を示した。これも α-EG 単独で投与した過去の結果と同様であり、コレステロールの合成やリポタンパク質の合成亢進が考えられたが、詳細な理由は現在のところ不明である。血漿中尿酸濃度の推移を Fig.5 に示した。解剖時には Sake 群で有意に低値を示した。血漿尿酸濃度が低下したのは、清酒濃縮物を投与することで、尿量が増加し(結果は示していない)、尿中への尿酸排泄が増加したためであると考えられる。これらより、清酒濃縮物は尿量増加に伴う尿酸濃度低下に作用する可能性が示唆された。

Table 1 飼育データ

	Control	Sake
Body weight gain (g/7d)	54.2±1.3	48.2±3.8
Final body weight (g)	181.2±4.1	176.4±5.0
Total food intake (g/7d)	120.4±3.1	88.0±5.2**
Total drink intake (g/7d)	199.7±8.7	220.5±5.2*
Liver (g/100gBW)	3.87±0.05	4.11±0.07**
Kidney (g/100gBW)	0.83±0.02	0.88±0.01*

Table 2 血漿中成分データ

	Control	Sake
TG (mg/dl)	86.7±5.4	101.7±10.0
Total chol (mg/dl)	58.8±2.5	69.4±2.6**
HDL-chol (mg/dl)	31.4±1.3	36.5±1.7*
BUN (mg/dl)	14.8±1.0	12.5±0.6*
AST (Karmen)	82.5±4.9	64.6±6.5*
ALT (Karmen)	11.8±0.7	10.2±0.6*

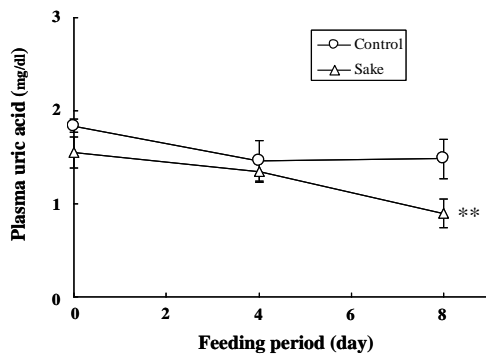


Fig. 5 飼育期間中の血漿尿酸値の変化

(3)-② 実験期間中の体重, 摂食量, 飲水量, 体重当たりの臓器重量を Table3 に示した。また血漿の成分値を Table4 に示した。HU-Sake 群では飼料摂取量, 飲料水摂取量が有意に低値を示しており, その結果, 体重増加量や肝臓重量も低値であった。これはオキソン酸を加えた飼料と, 清酒濃縮物の溶液を飲料水として投与した事で, ラットが十分な摂取をしていなかった可能性が挙げられる。しかしながら, 血漿中の TG, 総コレステロールでは有意に高値を示し, HDL-コレステロールでは有意傾向( $p<0.1$ )にて高値を示していた。これらは(3)-①と同様に清酒濃縮物の影響であると考えられる。血漿の ALT, AST 活性についても(3)-①の実験と同様に低値を示しており, 肝臓に対して保護的に働いたと推測される。Fig.6 に示したように血漿の尿酸値については, HU-Sake 群で低値を示したが, これはこの群の飼料摂取量が少なく, オキソン酸と核酸の摂取量が少ないためと考えられる。したがって, 本実験ではこの点について十分な目的を達成できていなかった。腎臓の病理組織学的検査の結果は, 尿細管に上皮扁平化や好塩基性変化が認められ, 一部間質の浮腫と硝子化および好酸球を混じた炎症細胞浸潤巣が認められるなど, オキソン酸や多量の尿酸の影響により障害を受けたと考えられる。HU 群に比べ, HU-Sake 群では総じて組織の異常が軽度であったが, これはオキソン酸等の摂

取量が少ないことに起因すると考えられる。以上の結果から清酒濃縮物投与による高尿酸血症の改善と結論づけることはできず, 飼料の投与方法などにおいて再検討の必要があると考えられる。

取量が少ないことに起因すると考えられる。以上の結果から清酒濃縮物投与による高尿酸血症の改善と結論づけることはできず, 飼料の投与方法などにおいて再検討の必要があると考えられる。

Table 3 飼育データ

	HU	HU+Sake
Body weight gain (g/7d)	51.5±3.5	24.0±5.8**
Final body weight (g)	173.6±4.6	149.4±5.2**
Total food intake (g/7d)	114.0±3.6	55.4±5.6**
Total drink intake (g/7d)	340.3±11.5	213.1±39.8**
Liver (g/100gBW)	3.90±0.14	3.64±0.07*
Kidney (g/100gBW)	0.95±0.03	0.98±0.07

Table 4 血漿中成分データ

	HU	HU+Sake
TG (mg/dl)	91.7±3.4	108.0±9.1*
Total chol (mg/dl)	57.6±1.3	73.0±6.0**
HDL-chol (mg/dl)	30.1±1.0	32.6±2.3#
BUN (mg/dl)	19.8±0.6	12.5±1.2**
AST (Karmen)	88.5±13.1	60.1±4.2*
ALT (Karmen)	11.3±0.7	10.4±0.9

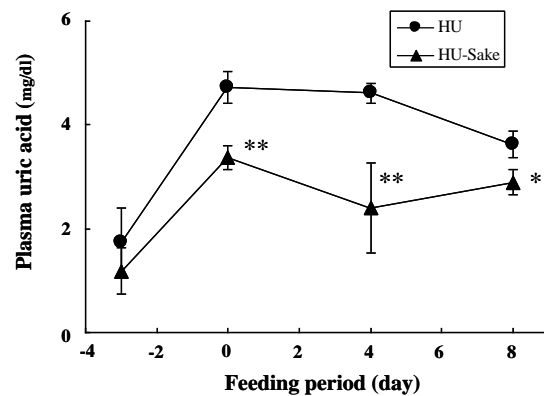


Fig. 6 飼育期間中の血漿尿酸値の変化

5. 主な発表論文等  
現在のところなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三嶋 智之

岐阜医療科学大学・保健科学部・衛生技術  
学科・講師

研究者番号：00434522