

〈原著論文〉

コレステロール添加食投与ラットの肝脂肪蓄積に及ぼす焙煎度の異なるコーヒー豆抽出物の影響

Effects of the extracts of coffee beans roasted at different degrees on liver fat accumulation in rats fed cholesterol-added diets

仲 佐 輝 子 泉 谷 祐 希* 坂 野 友 香*
(Teruko NAKASA) (Yuki IZUTANI) (Tomoka SAKANO)

塚 本 万 智* 川 上 小 百 合** 高 田 智 美***
(Machi TSUKAMOTO) (Sayuri KAWAKAMI) (Satomi TAKATA)

Abstract : We examined the effects of the extracts of coffee beans roasted at different degrees on the lipid metabolism of rats fed cholesterol (Cho)-added diets. Fatty livers along with a significant increase in triacylglycerol (TG) and Cho levels were observed in rats belonging to the C (Cho-added diet) group. Although the Cho level was slightly decreased in the S group, with the addition of shallow-roasted coffee bean extract to Cho-added diet, carnitine palmitoyltransferase activity showed a significantly high value, and the amount of TG was significantly reduced. In contrast, with the addition of deep-roasted coffee bean extract to Cho-added diet in the D group, fatty acid synthase activity showed a significantly lower value, TG and Cho levels were significantly reduced, and a reduction in fatty liver was observed. Moreover, since the levels of lipid peroxide in plasma and liver decreased in both S and D groups, compared to the C group, there is a possibility that roasted coffee bean extracts may suppress the progression to nonalcoholic steatohepatitis.

Key words : コーヒー豆抽出物, 非アルコール性脂肪肝, コレステロール添加食, 脂質代謝

緒 言

脂肪肝はアルコール性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝に分類される。さらに、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) は、組織学的に大滴性の肝脂肪変性を基盤に発症して病態のほとんど進行しない非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と、進行性で肝硬変や肝癌の発症母地にも

なる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に分けられる。NAFLD の多くは、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などを基盤に発症することから、メタボリックシンドロームの肝病変として捉えられている¹⁾。NAFLD の有病率は、最新の大規模疫学調査で 29.7% と報告されており (*J. Gastroenterol.* 2012; 47, 586-595)、肥満との関連が強いことから肥満人口の増加に伴って年々増加している。一方、NASH の有病率は最近では 3~5% と推定されている²⁾。脂肪肝治療の原則は食事療法と運動療法であり、生活習慣を改善することが、肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常症の是正を促すことになる。薬物療法など

同志社女子大学生生活科学部

*同志社女子大学生生活科学部 2011 年度卒業生

**同志社女子大学生生活科学部 2010 年度卒業生

***同志社女子大学生生活科学部 2016 年度卒業生

コレステロール添加食投与ラットの肝脂肪蓄積に及ぼす焙煎度の異なるコーヒー豆抽出物の影響

の確立した治療法は特になく、ストレスが多く不規則な生活習慣が先行する現代社会において脂肪肝を予防することは困難であるため、日常的に摂取可能な機能的食品素材の開発が期待されている。

コーヒーは世界中で最も広く飲用されている飲み物である。全日本コーヒー協会の統計資料によると、わが国のコーヒー消費量は昭和50年代半ばに緑茶を上回り、その後もコーヒー飲料を含め増加しており、2018年には生豆換算で47万トンに達している。また、「コーヒーの需要動向に関する基本調査」によると、コーヒーの飲用状況は1人あたり(12歳以上79歳まで)1週間に10.6杯である。コーヒーに含まれる主な生理活性物質は、クロロゲン酸類とカフェインである。コーヒーポリフェノールであるクロロゲン酸類は、ラットの血中および肝臓中のトリアシルグリセロール(TG)とコレステロール(Cho)の減少作用³⁾、抗肥満作用⁴⁾、抗酸化作用⁵⁾、血糖降下作用⁶⁾など、カフェインは抗肥満作用^{7,8)}などが報告されている。クロロゲン酸類はコーヒー生豆に多く含まれるが、熱に弱いため焙煎する時間が長くなるほど減少する。一方、カフェインは熱に強く、焙煎されてもほとんどコーヒー豆に残る上、焙煎によるコーヒー豆中の水分減少により相対的にカフェイン含有割合が増加する⁹⁾。Budrynら¹⁰⁾は、生豆および焙煎コーヒー豆抽出物に含まれるクロロゲン酸類やメイラード反応生成物が、脂肪蓄積の抑制や抗酸化ストレスとしての活性をもつことを報告している。

そこで本研究では、焙煎度の異なる2種類の市販コーヒー豆粉末を用い、その抽出物を0.5% Cho食に添加してラットに投与し、肝脂肪の蓄積に及ぼす影響について検討した。

実験方法

1. 実験材料および飼料

実験材料として生産量が多く、一般に広く飲用されているブラジル(アラビカ種)、コロンビア(アラビカ種)、ジャワ(ロブスタ種)の3種類のコーヒー豆を用いた。焙煎の基本8段階のうち、2段階目(シナモンロースト)を浅煎り、7段階目(フレンチロースト)を深煎りとして、それぞれのコーヒー豆を焙煎し、ブラジル、コロンビア、ジャワを5:3:2の割合で混合して粉末化したものを(株)大洋堂珈琲(京都)より購入した。コーヒー豆粉末50gを750mLの沸騰水中で10分間抽出した後、さらして濾過し、得られた濾液を凍結乾燥機で55gになるまで濃縮したものをコーヒー豆抽出

Table 1 Composition of experimental diets (%)

Ingredients	N diet	Cho-added diet
Casein	20.0	20.0
L-Cystine	0.3	0.3
Corn starch	41.7986	41.1736
α -Corn starch	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0
Corn oil	5.0	5.0
Cellulose	5.0	5.0
Mineral mixture (AIN-93 G)	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93 G)	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.0014	0.0014
Cholesterol	—	0.5
Sodium cholate	—	0.125

物とした。なお、コーヒー豆抽出物中のクロロゲン酸類量をアンモニア発色法¹¹⁾により測定した結果、抽出物1gあたり浅煎りコーヒー豆には 22.4 ± 0.3 mg、深煎りコーヒー豆には 3.4 ± 0.3 mg含まれていた。

飼料組成をTable 1に示した。AIN-93 Gの組成をもとに7%大豆油を5%コーン油に換え、デンプンで重量補正したものをN食とした。N食にCho 0.5%、コル酸ナトリウム0.125%を添加しデンプンで重量補正したものをCho添加食とし、これに浅煎りコーヒー豆抽出物を1%添加したものをS食、深煎りコーヒー豆抽出物を1%添加したものをD食とした。また、Cho添加食にはコーヒー豆抽出物と同量の水を添加した。

2. 実験動物および飼育条件

清水実験材料(株)より購入した4週齢SD系雄ラット(SPF)を実験動物として用いた。7日間N食で馴化飼育したのち、群間で同等な平均体重になるようにN群を6匹、他の3群を7匹ずつの4群に分け、N群には引き続きN食を、C群にはCho添加食を、S群にはS食を、D群にはD食を自由摂取させた。ラットを個別のケージに入れ、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、8-20時(明期)の12時間ごとの明暗サイクル、無菌環境下で28日間飼育した。体重および摂食量を2日に1回測定した。飼育終了後8時間絶食させ、ソムノペンチル(40 mg/kg/8 mL)を腹腔内に投与して麻酔した。腹部大動脈より採血した血液を12,000 rpm、 4°C で15分間遠心分離して血漿を得、実験に供するまで -80°C で保存した。採血後直ちに肝臓、腎周囲脂肪組織、精巣周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織を摘出して重量を測定した。肝臓を0.25 M Sucrose・5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)で灌

流した後、一部を用いて直ちに酵素液の調製を行い、残りの肝臓を脂質量および過酸化脂質量の測定に供するまで -80°C で保存した。

なお、「動物実験の飼育および保管等に関する基準」を遵守し、事前に同志社女子大学動物実験委員会の承認を得て動物実験を実施した。

3. 血漿および肝臓中の脂質量の測定

血漿中の TG, Cho, HDL Cho, リン脂質 (PL) および遊離脂肪酸 (FFA) をそれぞれ和光純薬工業 (株) 製の測定キットを用いて測定した。

凍結した肝臓から Folch ら¹²⁾の方法に準じて脂質を抽出し、得られた抽出液の一定量を N_2 ガス気流中で減圧濃縮乾固した後、重量を測定して総脂質量とした。さらに、肝臓抽出液の乾固物を 10% TritonX-100 含有イソプロパノールに溶解して TG, Cho, PL および FFA を血漿と同様の測定キットを用いて測定した。

4. 血漿中のグルコース量およびインスリン量の測定

血漿中のグルコースを和光純薬工業 (株) 製の測定キットを用いて測定した。また、インスリンをシバヤギ (株) 製の測定キットを用いて ELISA サンドイッチ法で測定した。

5. 血漿および肝臓中の過酸化脂質量の測定

血漿中の過酸化脂質を八木法¹³⁾から改変し、反応中の酸化を防ぐために反応液中にブチルヒドロキシルエンを加えて蛍光法で測定した。

肝臓中の過酸化脂質を Ohkawa 法から Kosugi ら¹⁴⁾が改変した方法で測定し、赤色素の分子吸光係数 $156,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ より赤色素量を求めて TBARS 量として表した。

6. 肝臓中の fatty acid synthase (FAS) 活性の測定

肝臓を 0.25 M Sucrose · 1 mM EDTA · 2 Na を含む 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) で磨砕して核画分を分離後、上清を $105,000 \times g$, 4°C , 60 分間遠心分離し、得られた上清を粗酵素液として用いた。

FAS 活性を Nepokroeff ら¹⁵⁾の方法を改変した方法に準じて測定し、NADPH の分子吸光係数 $6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ によって減少量を求めて FAS 活性とした。本酵素の 1 unit を 30°C で 1 分間に 1 nmol の NADPH を減少させるのに要する酵素量として表した。

7. 肝臓中の glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) 活性の測定

酵素液として FAS 活性測定に用いたものと同じ粗酵素液を用い、G6PDH 活性を Davidson ら¹⁶⁾の方法に準じて測定し、NADPH の分子吸光係数 $6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ によって増加量を求めて G6PDH 活性とした。本酵素の 1 unit を 30°C で 1 分間に 1 nmol の NADPH を増加させるのに要する酵素量として表した。

8. 肝臓中の carnitine palmitoyltransferase (CPT) 活性の測定

肝臓を 0.25 M Sucrose · 1 mM EDTA · 2 Na を含む 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) で磨砕し、核画分を分離後、上清を $9,000 \times g$, 4°C , 10 分間遠心分離し、得られた沈殿を上記の buffer で懸濁して粗酵素液として用いた。

CPT 活性を Markwell ら¹⁷⁾の方法に準じて測定し、反応によって生じた黄色色素の分子吸光係数 $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ によって活性度を求めた。本酵素の 1 unit を 30°C で 1 分間に 1 nmol のアシルカルニチンを生成するのに要する酵素量として表した。

9. 酵素液中のタンパク質の定量

各酵素活性の測定に用いた酵素液中のタンパク質量を Lowry ら¹⁸⁾の方法に準じて測定し、比活性を求めた。

10. 統計処理

実験結果を mean \pm SD で示した。各群間の有意差検定について、SPSS 25 を用いて一元配置分散分析による検定後、Tukey の多重比較検定を行い $p < 0.05$ で有意と判定した。

実験結果

1. 体重、摂食量および組織重量

飼育最終日の体重、総摂食量および組織重量を Table 2 に示した。体重および総摂食量は 4 群間に有意な差はみられなかった。C 群の肝臓重量は N 群に比べ有意に増加し、コーヒー豆抽出物を投与した S 群、D 群の肝臓重量も N 群に対して有意に増加したが、C 群よりも低値であった。C 群の脂肪組織重量は、腎周囲、精巣周囲、腸間膜脂肪組織とも有意差はなかったが N 群よりも低値であった。コーヒー豆抽出物投与群の脂肪組織重量は、C 群よりも少なく、腎周囲、精巣周囲脂肪組織重量では N 群との間に有意差も認められた。

Table 2 Effects of shallow and deep roasted coffee bean extracts on body weight, food intake, liver weight, and adipose tissues weight in SD rats fed on the experimental diet for 28 days.

	Groups			
	N (n=6)	C (n=7)	S (n=7)	D (n=7)
Initial body weight (g)	130.6 ± 5.8	131.0 ± 3.6	130.5 ± 4.4	130.1 ± 4.5
Final body weight (g)	337.6 ± 16.5	342.0 ± 12.3	328.6 ± 21.1	322.9 ± 21.0
Body weight gain (g)	207.0 ± 12.2	211.0 ± 11.6	200.2 ± 18.0	191.2 ± 19.2
Total food intake (g)	623.6 ± 46.2	597.3 ± 37.1	599.0 ± 44.4	578.5 ± 69.3
Liver weight (g)	11.67 ± 1.45 ^a	16.79 ± 1.66 ^b	16.00 ± 2.40 ^b	14.98 ± 2.20 ^b
Perirenal adipose tissue weight (g)	8.59 ± 1.54 ^a	7.24 ± 1.12 ^{a, c}	4.79 ± 1.37 ^b	5.30 ± 1.30 ^{b, c}
Epididymal adipose tissue weight (g)	7.32 ± 2.14 ^a	6.01 ± 1.34 ^{a, b}	4.54 ± 1.00 ^b	4.32 ± 0.51 ^b
Mesentery adipose tissue weight (g)	4.41 ± 1.05	4.21 ± 0.77	3.43 ± 0.91	3.24 ± 0.68

Values are presented as means ± SD. Values in the same line with different superscript letters are significantly different ; $p < 0.05$.

Table 3 Effects of shallow and deep roasted coffee bean extracts on plasma lipid, glucose, and insulin concentrations in SD rats fed on the experimental diet for 28 days.

	Groups			
	N (n=6)	C (n=7)	S (n=7)	D (n=7)
Triacylglycerol (mg/dL)	128.3 ± 39.0	104.7 ± 42.6	97.4 ± 23.6	126.9 ± 20.8
Cholesterol (mg/dL)	119.7 ± 18.2 ^a	104.9 ± 27.3 ^{a, b}	90.0 ± 12.1 ^b	92.2 ± 14.3 ^{a, b}
HDL Cholesterol (mg/dL)	76.4 ± 10.3 ^a	44.6 ± 9.2 ^b	44.5 ± 11.8 ^b	47.7 ± 8.7 ^b
non-HDL Cholesterol (mg/dL)	43.3 ± 16.1	60.3 ± 20.1	45.5 ± 8.3	44.5 ± 8.6
Phospholipids (mg/dL)	159.9 ± 30.7	128.0 ± 38.4	135.0 ± 9.7	147.8 ± 11.4
Free fatty acids (mEq/dL)	84.4 ± 26.3 ^{a, b}	85.3 ± 16.4 ^a	58.6 ± 9.75 ^{b, c}	57.7 ± 12.8 ^c
Glucose (mg/dL)	142.6 ± 9.3	155.2 ± 16.2	153.9 ± 17.7	155.0 ± 13.7
Insuline (ng/mL)	10.7 ± 2.3	11.0 ± 2.9	9.4 ± 2.0	10.0 ± 3.1

non-HDL Cholesterol = Cholesterol - HDL Cholesterol

Values are presented as means ± SD. Values in the same line with different superscript letters are significantly different ; $p < 0.05$.

2. 血漿中の脂質量, グルコース量およびインスリン量

血漿中の脂質量を Table 3 に示した。C 群の TG 量は N 群に対して若干低かった。C 群の TG 量に対して S 群はさらに低く、D 群は若干高かったが、いずれにおいても有意な差は認められなかった。C 群において、Cho 量は N 群に対して若干低値であったが、HDL Cho 量は N 群の約 60% にまで有意に低下し、non-HDL Cho 量は高値であった。コーヒー豆抽出物投与群の Cho 量は C 群より低く、HDL Cho 量は C 群との間に差はなかったが、non-HDL Cho 量は N 群と同レベルであった。C 群の PL 量は N 群より低く、コーヒー豆抽出物投与群の PL 量は、N 群の値には至らないものの C 群より高かった。C 群の FFA 量は N 群とほとんど同値であったが、コーヒー豆抽出物投与群の FFA 量は C 群より有意に低かった。また、グルコース量およびインスリン量を Table 3 に示した。Cho 添加食 3 群のグルコース

量は N 群より若干高値であった。C 群のインスリン量は N 群に対して若干高値を、コーヒー豆抽出物投与群のインスリン量は N 群、C 群より若干低値を示した。

3. 肝臓中の脂質量

肝臓中の脂質量を Table 4 に示した。C 群の総脂質量は、N 群より g 肝臓中で約 2 倍、総肝臓中で約 3 倍高値であった。コーヒー豆抽出物投与群の総脂質量は C 群より有意に低く、特に D 群において低値であり、S 群との間に有意差も認められた。C 群の TG 量、Cho 量は N 群より著しく高く、g 肝臓中で TG 量は約 5 倍、Cho 量は約 7 倍に、総肝臓中で TG 量は約 7 倍、Cho 量は約 9 倍に増加した。コーヒー豆抽出物投与群の TG 量、Cho 量はいずれも C 群より低値であり、S 群と C 群の Cho 量の間に有意差は認められなかったが、S 群の TG 量は C 群より有意に低く、D 群の TG 量、Cho

Table 4 Effects of shallow and deep roasted coffee bean extracts on hepatic lipid contents in SD rats fed on the experimental diet for 28 days.

	Groups			
	N (n=6)	C (n=7)	S (n=7)	D (n=7)
Total lipids (mg/g)	47.5 ± 2.8 ^a	104.7 ± 18.5 ^b	82.1 ± 6.5 ^c	55.4 ± 7.3 ^a
(mg/whole)	551.4 ± 46.3 ^a	1648.2 ± 136.4 ^b	1316.9 ± 244.7 ^c	823.8 ± 151.8 ^d
Triacylglycerol (mg/g)	10.0 ± 1.1 ^a	51.9 ± 12.1 ^b	33.0 ± 4.7 ^c	12.4 ± 4.2 ^a
(mg/whole)	115.7 ± 11.3 ^a	810.5 ± 76.7 ^b	532.6 ± 135.6 ^c	186.4 ± 61.8 ^a
Cholesterol (mg/g)	3.5 ± 0.3 ^a	24.2 ± 5.7 ^b	20.0 ± 2.5 ^b	7.9 ± 1.5 ^a
(mg/whole)	40.3 ± 4.1 ^a	379.4 ± 57.3 ^b	318.3 ± 54.1 ^b	115.6 ± 21.1 ^c
Phospholipids (mg/g)	19.0 ± 1.6 ^a	16.7 ± 1.1 ^b	18.1 ± 1.5 ^{a, b}	18.4 ± 0.9 ^{a, b}
(mg/whole)	220.3 ± 16.8 ^a	265.8 ± 26.3 ^{a, b}	286.2 ± 56.4 ^b	271.7 ± 37.7 ^{a, b}
Free fatty acids (μEq/g)	4.3 ± 0.5 ^a	9.8 ± 2.3 ^b	6.8 ± 2.2 ^{a, c}	5.8 ± 0.8 ^{a, c}
(μEq/whole)	49.7 ± 4.4 ^a	153.8 ± 20.3 ^b	103.1 ± 33.3 ^c	85.8 ± 22.2 ^c

Values are presented as means ± SD. Values in the same line with different superscript letters are significantly different; $p < 0.05$.

Table 5 Effects of shallow and deep roasted coffee bean extracts on plasma and hepatic lipid peroxide levels in SD rats fed on the experimental diet for 28 days.

	Groups			
	N (n=6)	C (n=7)	S (n=7)	D (n=7)
Plasma				
MDA (nmol/dL)	702.4 ± 55.9 ^a	675.1 ± 47.6 ^{a, b}	611.5 ± 56.7 ^b	639.9 ± 48.7 ^{a, b}
Liver				
TBARS (nmol/g)	129.8 ± 32.8	165.8 ± 17.8	137.7 ± 9.2	132.6 ± 35.5
(nmol/whole)	1509.1 ± 374.6 ^a	2695.5 ± 356.4 ^b	2120.5 ± 198.4 ^c	2023.2 ± 360.4 ^c

Values are presented as means ± SD. Values in the same line with different superscript letters are significantly different; $p < 0.05$.

Table 6 Effects of shallow and deep roasted coffee bean extracts on activity of hepatic fatty acid synthase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and carnitine palmitoyltransferase in SD rats fed on the experimental diet for 28 days.

	Groups			
	N (n=6)	C (n=7)	S (n=7)	D (n=7)
FAS activity* ¹				
(unit/g)	619.0 ± 116.2 ^a	298.2 ± 37.8 ^b	276.1 ± 64.6 ^b	241.6 ± 49.8 ^b
(unit/whole)	7181.6 ± 1405.5 ^a	4904.7 ± 1071.6 ^b	4483.8 ± 1354.8 ^b	3628.0 ± 673.0 ^b
(unit/mg protein)	13.80 ± 1.25 ^a	8.69 ± 1.43 ^b	7.05 ± 1.36 ^{b, c}	6.50 ± 1.20 ^c
G6PDH activity* ²				
(unit/g)	5.5 ± 0.7 ^a	2.0 ± 0.7 ^b	2.2 ± 0.8 ^b	1.7 ± 0.5 ^b
(unit/whole)	65.0 ± 14.5 ^a	33.3 ± 10.8 ^b	36.1 ± 15.1 ^b	24.8 ± 6.7 ^b
(unit/mg protein)	118.9 ± 15.8 ^a	56.3 ± 15.6 ^b	59.0 ± 9.4 ^b	47.1 ± 6.9 ^b
CPT activity* ³				
(unit/g)	135.8 ± 29.0 ^{a, b}	117.3 ± 42.1 ^b	194.3 ± 56.1 ^a	204.2 ± 47.8 ^a
(unit/whole)	1561.2 ± 261.1 ^a	1917.9 ± 673.9 ^{a, b}	3125.4 ± 1271.5 ^c	2958.2 ± 628.8 ^{b, c}
(unit/mg protein)	9.83 ± 0.60 ^a	11.12 ± 1.37 ^{a, c}	15.06 ± 1.60 ^b	12.37 ± 0.88 ^c

*¹One unit of FAS was expressed as the amount of enzyme required to metabolize 1 nmol of NADPH/min at 30° C.

*²One unit of G6PDH was expressed as the amount of enzyme required to metabolize 1 nmol of NADPH/min at 30° C.

*³One unit of CPT was expressed as the amount of enzyme required to produce 1 nmol of acyl carnitine/min at 30° C. Values are presented as means ± SD. Values in the same line with different superscript letters are significantly different; $p < 0.05$.

量はともに著しく低値であり、S群との間にも有意差が認められた。C群のg肝臓中PL量はN群より有意に低かったが、コーヒー豆抽出物投与群のPL量はC群より高く、N群との間に有意差は認められなかった。C群のFFA量はN群より有意に高く、総肝臓あたりでは約3倍量に増加した。コーヒー豆抽出物投与群のFFA量はC群より有意に低く、D群でより低値であった。

4. 血漿および肝臓中の過酸化脂質量

血漿および肝臓中の過酸化脂質量をTable 5に示した。血漿中において、C群の過酸化脂質(MDA)量はN群より若干低い値を示し、コーヒー豆抽出物投与群のMDA量はC群よりさらに低値であった。肝臓中において、C群の過酸化脂質(TBARS)量はN群より高く、総肝臓中では有意差も認められた。コーヒー豆抽出物投与群のTBARS量はN群より高かったが、C群より低く、総肝臓中ではC群との間に有意差も認められた。

5. 肝臓中のFAS活性、G6PDH活性およびCPT活性

肝臓中の脂肪酸合成系および分解系の酵素活性をTable 6に示した。脂肪酸合成系において、C群のFAS比活性、G6PDH比活性はいずれもN群より有意に低値であった。コーヒー豆抽出物投与群では、FAS比活性はC群よりさらに低下し、C群とD群の間に有意差も認められたが、G6PDH比活性ではC群との間に有意な差はなかった。一方、脂肪酸分解系において、C群のCPT比活性はN群に対して若干高かったが、コーヒー豆抽出物投与群のCPT比活性はC群よりさらに高く、N群との間に有意差も認められ、S群ではC群、D群との間にも有意差が認められた。

考 察

本研究では、軽度の脂肪肝を発症させるために脂肪5%、Cho 0.5%、コール酸Na 0.125%添加食を実験食として用い、これに同じ配合割合のコーヒー豆で焙煎度のみが異なる浅煎りと深煎りのコーヒー豆抽出物を添加してラットに投与し、肝脂肪の蓄積に及ぼす影響について検討した。総摂取量および体重増加量は各群間に大差は認められなかった。しかし、Cho添加食を与えたC群の肝臓は肥大し、その重量はN群の約1.4倍で、C群の肝臓中の総脂質量、TG量、Cho量ともに高値であり、特にTGとChoを合わせると肝重量の約7.3%を占める脂肪肝が確認された。それに対し、コーヒー豆抽

出物を同時に投与した群のTG、Cho合計量は、S群で肝重量の約5.3%、D群で約2%にまで減少しており、D群では肉眼的にも脂肪肝の抑制が認められた。

血漿中において、C群のTG量、Cho量はN群に対して有意差は認められなかったが低値であった。肝臓に過剰の脂肪が蓄積されると、肝機能が低下し、リポタンパク質分泌能力が低下して、血液中のTG濃度はかえって低下するといわれている^{19,20)}。C群の血漿中TG量、Cho量がN群より低かったのは、肝臓での脂質蓄積が著しかったためと考えられた。しかし、コーヒー豆抽出物投与群では肝臓中のTG、Cho量が著しく低かったにも関わらず、血漿中においてもN群より低値であった。また、コーヒー豆抽出物投与群のHDL Cho量はC群と変わらなかったが、non-HDL Cho量はC群より低く、N群のレベルに近かった。さらに、動脈硬化指数(non-HDL Cho / HDL Cho)を算出したところ、N群 0.58 ± 0.24 、C群 1.34 ± 0.35 、S群 1.12 ± 0.46 、D群 0.96 ± 0.22 であり、C群はN群に対して有意に高かった。しかし、コーヒー豆抽出物投与群の動脈硬化指数はC群より低値であったことから、コーヒー豆抽出物には抗動脈硬化作用がある可能性が示唆された。

肝臓への脂肪蓄積の原因は、糖質や脂質の過剰摂取に加え、脂肪組織からの脂肪酸の流入増加、脂肪合成の促進、脂肪酸 β 酸化の抑制、リポタンパク質の分泌抑制などが考えられる。脂肪肝の形成は、内臓脂肪の蓄積で惹起されるインスリン抵抗性を基盤とした代謝異常によることが指摘されている²¹⁾が、本実験では、内臓脂肪組織である腸間膜脂肪組織重量、血漿中のグルコース量、インスリン量ではC群とN群でほとんど差がなく、インスリン抵抗性は示されなかった。しかしC群において、肝臓での脂肪酸合成に関わるFAS活性、G6PDH活性は、N群と比べて有意に低かったにも関わらず、肝臓中のFFA量はN群の約3倍多かった。このことから、脂肪組織でのhormone sensitive lipase (HSL)活性が亢進し、脂肪の分解により生じた脂肪酸が肝臓に運び込まれて肝臓での脂肪合成が高まったことにより、著しいTG蓄積による脂肪肝がみられたのではないかと思われる。Tanakaら²²⁾は、10%カフェインと27%クロロゲン酸類を含む生コーヒー豆抽出物を1%添加した高Cho食を与えたラットにおいて、血清と肝臓中のTG濃度の著しい減少効果を認め、これには肝臓におけるFAS活性の抑制、CPT活性の促進が関与していることを示唆している。本実験において、コーヒー豆抽出物投与群ではC群と比べてD群のFAS活性は有意に低く、S群

の CPT 活性は有意に高かったことから、異なる作用で肝臓への TG 蓄積を抑制しているのではないかと考えられた。

コーヒー豆に含まれるクロロゲン酸類は、焙煎することで減少する。実験に用いたコーヒー豆においても、浅煎りコーヒー豆抽出物中のクロロゲン酸類は、深煎りコーヒー豆抽出物中に比べて約 6.6 倍多く含まれていた。焙煎によるカフェイン量の変化はあまりないが、コーヒー豆中の水分減少により相対的に深煎りコーヒー豆中のカフェイン含有割合は高くなるといわれている。今回、抽出物中のカフェイン量を測定していないが、別の実験結果より、同法で調製したコーヒー豆抽出物中のカフェイン量は、コーヒー豆粉末 1g 中に浅煎りコーヒー豆抽出物で 19.5 ± 0.6 mg、深煎りコーヒー豆抽出物で 24.0 ± 0.1 mg であったので、本実験で使用した抽出物でも深煎りコーヒー豆にカフェインが多く含まれていたと推測された。前述したように、コーヒー豆抽出物による肝臓への脂肪蓄積の抑制効果が認められ、さらに D 群の効果が S 群よりも大きかったことより、カフェインによる影響もあったのではないかと考えられた。Kobayashi-Hattori ら⁷⁾は、高脂肪食投与ラットにおいて、カフェインの摂取がカテコールアミンの血清レベルを高めることで脂肪分解が促進されると推定している。また、カフェインには褐色脂肪組織におけるカテコールアミンを介した脱共役たんぱく質 (UCP-1) の発現を促進する作用があることも報告²³⁾されている。したがって、コーヒー豆抽出物中のカフェインが、カテコールアミン分泌を刺激して脂肪組織における脂肪分解を促進し、放出された脂肪酸は UCP-1 によって熱として放散されることで、体脂肪および肝脂肪の蓄積が抑制されたと思われる。

Ichimura ら²⁴⁾は、高脂肪 (パーム油 30%) 食に Cho とコロール酸を添加することで、肝臓への TG と Cho の顕著な蓄積と肝線維化を伴う NASH を発症すると報告している。本実験で用いた 0.5% Cho、0.125% コロール酸 Na 添加食は 5% の脂肪を含む飼料であったが、C 群の肝臓には N 群の約 7 倍量の TG と約 9 倍量の Cho が蓄積され、約 3 倍量の FFA が含まれていた。今回、肝線維化をみる実験はしていないが、飼育期間を延長すれば肝線維化の病変もみられる可能性もあるのではないかと考えられる。また、石井ら²⁵⁾は、肝臓における過剰な FFA は過酸化脂質へと代謝され、星細胞を活性化することでコラーゲンを産生して肝線維化を引き起こすこと、肝臓中の FFA 量の増加により、活性酸素種の産生が促進されることで肝線維化が惹起されることを報告し

ている。このように、肝線維化には過剰な FFA 量が大きく関与している。本実験では、C 群の FFA 量は N 群の約 3 倍にまで達したが、S 群では約 2.2 倍に、D 群では約 1.7 倍にまで抑制されていた。長谷川ら²⁶⁾は、ヒト血管内皮細胞を用い、コーヒーが LDL の酸化を抑制することを報告している。また Zhang ら²⁷⁾は、高脂肪食で誘導したラットの非アルコール性脂肪肝に対して、果実由来のフラボノイドが活性酸素消去系の酵素活性とグルタチオン量を高め、酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド (MDA) を低下させると報告している。本実験においても、C 群の総肝臓中過酸化脂質量が N 群の約 1.7 倍と有意に増加したのに対し、コーヒー豆抽出物投与群では C 群より有意に少なく、酸化亢進の抑制が認められた。そして、FFA 蓄積量が S 群より有意に低値であった D 群において過酸化脂質量も少なくなっていたことから、深煎りコーヒー豆抽出物の方により多くの抗酸化物質が含まれていたと思われる。

ラットの肝臓への脂肪蓄積に対して、浅煎りコーヒー豆抽出物は肝臓での脂肪酸分解系を亢進し、深煎りコーヒー豆抽出物は脂肪酸合成系を抑制することにより、肝脂肪蓄積を抑制することが示された。コーヒーポリフェノールとして知られているクロロゲン酸類は焙煎によって減少することから、浅煎りコーヒー豆抽出物に肝脂肪蓄積の抑制効果を期待したが、むしろ深煎りコーヒー豆抽出物の方が効果が大きかった。コーヒー生豆にはカフェオイルキナ酸、フェルロイルキナ酸、ジカフェオイルキナ酸などのクロロゲン酸類が多く含まれており、焙煎によっていずれも減少するが、ポリフェノールの総量としてはあまり変化がないとされている²⁸⁾。したがって、コーヒー豆を焙煎することで生じたクロロゲン酸類の変化体やメイラード反応生成物であるメラノイジンなど、焙煎過程で生じた様々な生成物による効果ではないかと思われる。

本実験はラットを用いて行った動物実験の結果であり、ヒトにおいて同様の効果があるとは一概には言えないが、以上のことより、日常的にコーヒーを飲むことは、肝臓への脂肪の蓄積を抑制するとともに、蓄積した脂肪の酸化をも抑制することが期待され、今後ますます増加するであろう NAFLD の予防のために有効であると思われる。

参考文献

- 1) 日本消化器病学会編：NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014, 南江堂 (東京), 2014

- 2) 宮城琢也, 竹原徹郎: 疫学が示す臨床へのインパクト, 日内会誌, **105**(1), 9-14 (2016).
- 3) Rodriguez de Sotillo, D. V. and Hadley, M.: Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats, *J. Nutr. Biochem.*, **13**(12), 717-726 (2002).
- 4) Choi, B. K., Park, S. B., Lee, D. R., Lee, H. J., Jin, Y. Y., Yang, S. H. and Suh, J. W.: Green coffee bean extract improves obesity by decreasing body fat in high-fat diet-induced obese mice, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **9**(7), 635-643 (2016).
- 5) Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M. and Iseki, K.: In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid, *Int. J. Pharm.*, **403**, 136-138 (2011).
- 6) Iwai, K., Narita, Y., Fukunaga, T., Nakagiri, O., Kamiya, T., Ikeguchi, M. and Kikuchi, Y.: Study on the postprandial glucose responses to a chlorogenic acid-rich extract of decaffeinated green coffee beans in rats and healthy human subjects, *Food Sci. Technol. Res.*, **18**(6), 849-860 (2012).
- 7) Kobayashi-Hattori, K., Mogi, A., Matsumoto, Y. and Takita, T.: Effect of caffeine on the body fat and lipid metabolism of rats fed on a high-fat diet, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**(11), 2219-2223 (2005).
- 8) Xu, Y., Zhang, M., Wu, T., Dai, S., Xu, J. and Zhou, Z.: The anti-obesity effect of green tea polysaccharides, polyphenols and caffeine in rats fed with a high-fat diet, *Food Funct.*, **6**(1), 297-304 (2015).
- 9) 中林敏郎, 箴島, 本間清一, 中林義春, 和田浩二: コーヒー焙煎の化学と技術, 1995, p 20, pp 57-58, 弘学出版 (神奈川).
- 10) Budryn, G., Zakłós-Szyda, M., Zaczyńska, D., Żyżelewicz, D., Grzelczyk, J., Zduńczyk, Z., Juśkiewicz, J.: Green and roasted coffee extracts as antioxidants in β TC3 cells with induced oxidative stress and lipid accumulation inhibitors in 3T3L1 cells, and their bioactivity in rats fed high fat diet, *Eur. Food Res. Technol.*, **243**(8), 1323-1334 (2017).
- 11) 中林敏郎, 真野三蔵: コーヒーの品質に関する化学的研究 (第2報) 焙煎コーヒー中のクロロゲン酸類の新定量法, 日本食品工業学会誌, **22**(11), 545-548 (1975).
- 12) Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 13) Yagi, Y.: Assay for blood plasma or serum, *Methods Enzymol.*, **105**, 328-331 (1984).
- 14) Kosugi, H., Kojima, T., Yamaki, S., and Kikugawa, K.: Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid, *Anal. Biochem.*, **202**, 249-255 (1992).
- 15) Nepokroeff, C. M., Lakshmanan, M. R., and Porter, J. W.: Fatty acid synthase from rat liver, *Methods Enzymol.*, **35**, 37-44 (1975).
- 16) Davidson, R. G., Ntowsky, H. M., and Childs, B.: Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 481-485 (1963).
- 17) Markwell, M. A. K., McGroarty, E. J., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E.: The Subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426-3432 (1973).
- 18) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. Farr, A. J., and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 19) Liu, C. H., Huang, M. and Huang, P. C.: Sources of triacylglycerol accumulation in livers of rats fed a cholesterol-supplemented diet, *Lipids*, **30**(6), 527-531 (1995).
- 20) Wang, X., Cao, Y., Fu, Y., Guo, G., and Zhang, X.: Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease, *Lipids in Health and Disease*, **10**, 234-240 (2011).
- 21) Hamaguchi, M., Kojima, T., Takeda, N., Nakagawa, T., Taniguchi, H., Fujii, K., Omatsu, T., Nakajima, T., Sarui, H., Shimazaki, M., Kato, T., Okuda, J., and Ida, K.: The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease, *Ann. Intern. Med.*, **143**(10), 722-728 (2005).

- 22) Tanaka, K., Nishizono, S., Tamaru, S., Kondo, M., Shimoda, H., Tanaka, J. and Okada, T.: Anti-obesity and hypotriglyceridemic properties of coffee bean extract in SD rats, *Food Sci. Technol. Res.*, **15** (2), 147-152 (2009).
- 23) Kogure, A., Sakane, N., Takakura, Y., Umekawa, T., Yoshioka, K., Nishino, H., Yamamoto, T., Kawada, T., Yoshikawa, T. and Yoshida, T.: Effects of caffeine on the uncoupling protein family in obese yellow KK mice, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **29**, 391-394 (2002).
- 24) Ichimura, M., Kawase, M., Masuzumi, M., Sakaki, M., Nagata, Y., Tanaka, K., Suruga, K., Tamaru, S., Kato, S., Tsuneyama, K. and Omagari, K.: High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats, *Hepatol. Res.*, **45**(4), 458-468 (2015).
- 25) 石井幸仁, 本橋雄, 村松真, 勝田佳明, 美谷島克宏, 笹瀬智彦, 久米新一, 山田宣永, 太田毅: SDT fatty ラットを用いた脂肪性肝疾患に関する研究-新規 NASH モデルの確立に向けて-, 栄養生理研究会報, **59**(2), 97-107 (2015).
- 26) 長谷川麻衣子, 柳沢千恵, 岸本良美, 町田尚子, 吉岡絵理, 谷真理子, 宇都春美, 貴堂としみ, 近藤和雄: コーヒーによる LDL 酸化変性の抑制に関する検討, 日本未病システム学会雑誌, **12** (1), 83-85 (2006).
- 27) Zhang, S., Zheng, L., Dong, D., Xu, L., Yin, L., Qi, Y., Han, X., Lin, Y., Liu, K. and Peng, J.: Effects of flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit against high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats, *Food Chem.*, **141** (3), 2108-2116 (2013).
- 28) 河野洋一, 藤田和弘: コーヒー豆中のクロロゲン酸類と総ポリフェノールの分析, 分析化学, **65** (6), 331-334 (2016).

(2019年10月17日受理)
(2019年12月2日採択)