報 文

ニガウリ果汁末のラット脂質代謝に及ぼす影響

西園祥子^{1*}, 野村篤志², 日高美晴², 千住香織², Gamarallage V.K. Senanayake²,
福田亘博³, 柚木崎千鶴子⁴, 瓜生圭介⁵

¹ 崇城大学生物生命学部

² 宮崎大学農学部

³ 宮崎国際大学教育学部

⁴ 宮崎県食品開発センター

⁵ 備前化成株式会社

Effects of Bitter Melon (*Momordica charantia*) Juice Powder on Lipid Metabolism in Rats

Shoko Nishizono^{1*}, Atsushi Nomura², Miharuru Hidaka², Kaori Senju², Senanayake V.K. Gamarallage²,
Nobuhiro Fukuda³, Chizuru Yukizaki⁴ and Keisuke Uryu⁵

¹ Faculty of Biotechnology and Life Science, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Nishi-ku, Kumamoto, Kumamoto 860-0082

² Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen Kibanadai-nishi, Miyazaki, Miyazaki 889-2192

³ School of Education, Miyazaki International College, 1405 Kano, Kiyotake-cho, Miyazaki, Miyazaki 889-1605

⁴ Miyazaki Prefecture Food Development Center, 16500-2 Higashikaminaka, Sadowara, Miyazaki, Miyazaki 880-0303

⁵ Bizen Chemical Co., Ltd., 363 Tokutomi, Akaiwa, Okayama 709-0716

We examined the effects of dietary bitter melon juice (BMJ) freeze-dried powder (BMJ-F) on lipid metabolism in rats fed diets with low fat (Experiment 1) as well as of spray-dried powder of a mixture of BMJ and dextrin (1:1, w/w, BMJ-S) on lipid metabolism in rats fed diets with different levels of dietary fats (Experiment 2) and in those fed diets with or without dietary cholesterol (Experiment 3). In Experiment 1, we found that feeding BMJ-F markedly decreased triglyceride (TG) levels in the serum and liver of rats, while the residual fiber fraction lowered cholesterol levels in the serum of these animals. Next, the BMJ and residual fiber fractions thus obtained were freeze dried, powdered (Experiment 2), and evaluated. We confirmed in Experiment 2 that feeding BMJ-S markedly decreased hepatic TG levels, although the reduction was greater in animals fed high fat-containing diets than in those fed low fat-containing diets. In addition, BMJ-S significantly enhanced the serum levels of high-density-lipoprotein cholesterol in animals fed different levels of dietary fat. In Experiment 3, we also examined the effect of dietary BMJ-S on lipid metabolism in rats fed diets with or without cholesterol, and found that BMJ-S markedly decreased hepatic TG levels in rats fed diets without dietary cholesterol; this was not apparent in animals fed diets with dietary cholesterol. With regard to the mechanism(s) responsible for hepatic triglyceride, we found that feeding BMJ-S considerably upregulated the mRNA expression of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) enzyme, but there were no effects on enzyme activity in the synthesis and oxidation of fatty acids. These results suggest that the active component(s) in BMJ may be resistant to hydrothermal treatment and is therefore useful as a functional ingredient in dietary supplements to ameliorate lipid-related metabolic disorders.

(Received May 1, 2017; Accepted Sep. 8, 2017)

Keywords : bitter melon (*Momordica charantia*), lipid metabolism, liver triglyceride, liver cholesterol, functional food

キーワード : ニガウリ, 脂質代謝, 肝臓トリグリセリド, 肝臓コレステロール, 食品の機能性

ニガウリ (*Momordica charantia*) はインド原産ウリ科の一年生植物で、東南アジアを始めとしてわが国では温暖な地域である沖縄県、九州南部の鹿児島県や宮崎県などで栽培されている。ニガウリは東南アジアでは古くより野菜・食材として、またその果実や種子は血糖低下作用を有する

ことから糖尿病治療の伝統的な食品あるいは漢方薬として利用されてきた^{1)~3)}。最近、ニガウリの糖尿病改善作用について、ラットなどの実験動物^{4)~7)} やヒトにおける小規模の介入試験^{8)~11)} により、有効であることを支持する報告がされている。著者らは、先に特定品種のニガウリの可食部凍

¹ 〒860-0082 熊本県熊本市西区池田 4-22-1, ² 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1, ³ 〒889-1605 宮崎県宮崎市清武町加納丙 1405

⁴ 〒880-0303 宮崎県宮崎市佐土原町東上那珂 16500-2, ⁵ 〒709-0716 岡山県赤松市徳富 363

*連絡先 (Corresponding author), nshoko@bio.sojo-u.ac.jp

結乾燥粉末が血糖値の低下に加えて、脂質代謝改善作用を有することをラットおよびハムスターを用いて明らかにした^{12)~15)}。これらの結果は、ニガウリが血糖値低下および脂質代謝改善の 2 つの機能を有する成分を含み、生活習慣病である糖尿病や脂質代謝異常症に有効な農作物であることを示している。

宮崎県では、ニガウリの特徴的な苦味を軽減した消費者のニーズにあった品種、流通時に傷がつきにくい品種や小型の食べやすい品種などの多様な品種を開発してきた¹³⁾¹⁴⁾。我々はこれらの品種についても可食部の凍結乾燥粉末が、ラットの脂質代謝改善作用を発揮するが、その効果には差異があることを報告した¹³⁾¹⁴⁾。

一方、ニガウリの生産高の増加は、生鮮野菜としての流通・消費を超えて、過剰生産物が出始めたことから、これらを果汁ジュースなどの加工品へ利用されるように検討された。著者らは、果汁ジュースとして生産された一部について、凍結乾燥により粉末化しサプリメント等の加工品への利用を検討した¹³⁾¹⁴⁾。一方、果汁工場において生産される果汁ジュースは、工場に搬入されたニガウリ数品種から製造されることから、これらのニガウリジュースが先の凍結乾燥粉末と同等の脂質代謝改善作用を発揮するかについて検討する必要がある。また、果汁工場において製造されるニガウリ果汁は、数品種のニガウリにより製造されていることに加えて、1) 全果をまるごと搾汁するため、種子や胎座の成分が含有されていること、2) 果汁製造時に食物繊維に相当する搾汁残渣が分別されていること、また 3) ブランピングや殺菌などの加熱処理が行われていること、および 4) 本研究において調製した粉末試料が加熱噴霧乾燥法を採用していることなどから、それぞれの処理段階における調製品がすでに報告したニガウリ可食部凍結乾燥粉末と同等の脂質代謝改善作用^{12)~15)}を発揮するかを確認する必要がある。本研究では、まずニガウリ果汁製造時に得られる果汁部分と残渣部分のラット脂質代謝に及ぼす影響を調べた。ついで、果汁とデキストリンを等量混合し、加熱噴霧乾燥法によりニガウリ果汁噴霧乾燥粉末 (Bitter melon juice spray-dried powder : BMJ-S と略) を調製し、脂肪レベルを異にした食餌条件および高コレステロール食条件で、脂質代謝調節作用が発揮されるかをラットを用いて検討した。

実 験 方 法

1. ニガウリ試料の調製法

ニガウリは、平成 19 年宮崎県内において栽培され、宮崎県農協果汁株式会社 (工場、宮崎) へ果汁原料として搬入された佐土原 3 号を主原料とし、つやみどり、パワフルレイシおよび宮崎 N1 号が一部含まれたものを材料とした。実験 1 では、可食部を原料として製造される果汁とその搾汁残渣を宮崎県農協果汁株式会社から供与された後、それ

Table 1 Composition of bitter melon juice and residual fraction

	BMJ-F	Residue
Energy (kcal/100 g)	309	390
	(g/100 g)	
Protein	16.2	13.7
Crude fat	2.9	4.0
Ash	16.3	4.7
Moisture	10.0	2.8
Carbohydrate	54.6	74.8
Dietary fiber	11.1	68.0
Water soluble	7.8	16.6
Water insoluble	3.3	51.4

BMJ-F; Bitter melon juice freeze-dried powder.

ぞれ凍結乾燥し、粉末化したものを実験試料とした (前者の果汁凍結乾燥粉末は Bitter melon juice freeze-dried powder : BMJ-F と略)。BMJ-F および搾汁残渣の一般組成分析結果を Table 1 に示す。なお、タンパク質はケルダール法、粗脂肪はソックスレー抽出法、灰分は直接灰化法、食物繊維はプロスキー法²⁰⁾により測定した。炭水化物は 100% からタンパク質、脂質、水分、灰分を差し引いて算出した。

一方、上記の果汁は、機能性食品素材として利用することを目的とし、粉末化方法として噴霧乾燥法を適用することとした。そのため、滅菌 (ヘリコイド式瞬間滅菌機) 処理後、デキストリンと等量混合し、95℃で熱風噴霧乾燥することにより粉末化し、動物実験用のニガウリ果汁噴霧乾燥品 (BMJ-S) とした。

2. 供試動物

実験 1~3 において、実験動物として Sprague-Dawley (SD) 系雄ラットを九動株式会社 (熊本) より購入し、飼育室の温度 23±1℃、7:00 から 19:00 の間を明期とする環境下で市販飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) を摂取させ、4~7 日間予備飼育した。なお、予備飼育および本試験期間中、飼料および水は自由に摂取させた。

飼料組成は、Table 2 に示すように実験 1~3 において、AIN76 組成に準じて調製した²¹⁾。実験 1 では、ラット (5 週齢、体重 100 g 前後) は予備飼育後、平均体重が等しくなるように、コントロール群、BMJ-F3% 添加群、搾汁残渣 1% 群、搾汁残渣 3% 群の 4 群に分けた (各群 6~7 頭)。その後、Table 2 に示す飼料を 2 週間摂取させた後、断頭屠殺し、血清および肝臓を採取した。血清および肝臓は分析に供するまで -80℃で保存した。

実験 2 では、ラット (4 週齢、体重 90 g 前後) は、予備飼育後、平均体重が等しくなるように低脂肪食群と高脂肪食群に分け、さらにコントロール群と BMJ-S 群に分けた (各群 6~7 頭)。なお、低脂肪食では脂肪 5% (コーン油 1% +

Table 2 Composition of Diets (%)

	Experiment 1				Experiment 2				Experiment 3			
	Control	BMJ-F 3%	Residue		5% fat		15% fat		Cholesterol-free		Cholesterol-enriched	
			1%	3%	Control	BMJ-S	Control	BMJ-S	Control	BMJ-S	Control	BMJ-S
Casein	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Corn oil	5	5	5	5	1	1	1	1	5	5	5	5
Lard	—	—	—	—	4	4	14	14	—	—	—	—
β -Corn starch	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mineral mixture (AIN-76)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-76)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5
Sodium cholate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.3	0.3
Test material	—	3	1	3	—	2	—	2	—	2	—	2
Dextrin	—	—	—	—	2	2	2	2	2	2	2	2
Sucrose	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

BMJ-F; Bitter melon juice freeze-dried powder.

BMJ-S; Bitter melon juice spray-dried powder.

ラード4%)を含むように、また高脂肪食は脂肪15%(コーン油1%+ラード14%)を含むように調製した。また、BMJ-S群は4%添加(果汁末:デキストリン, 1:1(w/w))し、対応するコントロール群には2%デキストリンを添加した。ラットはこれらの飼料を4週間摂取させた後、断頭屠殺し、血液を採取した。血清および肝臓は分析に供するまで -80°C に保存した。

実験3では、ラット(4週齢, 90g前後)は予備飼育後、平均体重が同じになるように無コレステロール(CHOL)食群、高CHOL食群に分け、さらにそれぞれコントロール群とBMJ-S群の4群(各群6~7頭)に分けた。なお、高CHOL食群には、CHOLを0.5%およびCHOLの吸収を促進するためにコール酸ナトリウムを0.15%添加した。BMJ-Sは、実験2と同じものを使用し、BMJ-S添加群には4%添加(果汁末:デキストリン, 1:1(w/w))し、対応するコントロール群には2%デキストリンを添加した。ラットはこれらの飼料を2週間摂取させた後、断頭屠殺し、血液を採取した。血清および肝臓を採取し、分析に供するまで -80°C に保存した。

3. 血清脂質の分析法

血清のトリグリセリド(TG)濃度はトリグリセリド-テストワコー(GPO・DAOS法, 和光純薬工業, 大阪)、血清総CHOL濃度はCHOL-テストワコー(CHOLオキシダーゼ・DAOS法, 和光純薬工業, 大阪)、血清リン脂質(PL)はリン脂質E-テストワコー(コリンオキシダーゼ・DAOS法, 和光純薬工業, 大阪)を用いて測定した。高密度リポタンパク質(HDL)CHOLはHDL-C・2「第一」(リンスタングステン酸マグネシウム沈殿法, 第一化学薬品, 東京)を用いてHDL画分を分画した後、総CHOL濃度と同様に

測定した。また、血清のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)およびアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性はトランスアミナーゼC II-テストワコー(POP.TOOS法, 和光純薬工業, 大阪)を用いて測定した。

4. 肝臓脂質の分析法

肝臓脂質の抽出はFolchらの方法²²⁾に準じて行った。脂質抽出液を用いて、肝臓TGはFletcher法²³⁾、総および遊離CHOLはSperry & Webb法²⁴⁾²⁵⁾、PLはRouser法²⁶⁾によりそれぞれ定量した。なお、CHOLエステル(CE)量は総CHOL量から遊離CHOL量を差し引いて算出した。

5. 肝臓小器官画分の調製法²⁷⁾

肝臓(2g)は、屠殺後直ちに氷冷した緩衝液(0.25Mスクロース, 10mM Tris-HCl (pH7.4), 1mM Na-EDTA)6倍量を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジナイズ後、 4°C 、 $830\times\text{g}$ で10分間遠心分離して核および残渣を除去し、ついで 4°C 、 $11000\times\text{g}$ で10分間遠心分離して沈殿と上清に分けた。沈殿には緩衝液を2.5ml加えて懸濁し、ミトコンドリア画分とした。上清は、さらに超遠心分離機(BECKMAN, Optima TLX)を用いて 4°C 、 $420000\times\text{g}$ で60分間遠心分離し、上清を細胞上清画分とした。沈殿には緩衝液を加えて懸濁し、ミクロソーム画分とした。各画分は、酵素活性測定に供するまで -80°C で保存した。

6. 肝臓小器官画分のタンパク質濃度の測定法

タンパク質濃度は、Protein Assay Kit (Bio Lad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて測定した。なお、スタンダードは牛血清アルブミンを用いた。

7. 脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase ; FAS) 活性測定法

FAS 活性は, Kelley らの方法²⁸⁾ に準じて測定した. すなわち, 0.2 M KH_2PO_4 -0.4 mM Na_2EDTA 緩衝液 (pH 7.0), 水, アセチル-CoA を含む溶液 20 μl (反応液終濃度; 50 μM), NADPH を含む溶液を 20 μl (反応液終濃度; 300 μM) および細胞上清画分 50 μl を添加・混合し, 30°C, 340 nm で吸光度の変化を追跡した. ついで, マロニル CoA を含む溶液を 20 μl (反応液終濃度; 200 μM) を添加・混合し, 30°C, 340 nm で吸光度の変化を追跡した. FAS 活性は, 脂肪酸合成に伴い減少した NADPH 量をモル吸光係数 ($6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) から算出した.

8. カルニチンパルミトイルアシルトランスフェラーゼ (Carnitine palmitoyltransferase ; CPT) 活性測定法

CPT 活性は, Markwell らの方法²⁹⁾ に準じて測定した. すなわち, 0.25 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) を溶かした 58 mM Tris-HCl, 1.25 mM Na_2EDTA , 0.1 % Triton-X100 緩衝液 (pH 8.0) 940 μl に, 37.5 μM パルミトイル-CoA 20 μl およびミトコンドリア画分 20 μl を添加・混合し, 27°C の恒温下, 412 nm で吸光度の変化を追跡した. この吸光度の変化をカルニチン非依存性反応速度とした. ついで, L-カルニチン 20 μl (L-カルニチン濃度 1.25 mM) を添加し, 27°C の恒温下, 412 nm で吸光度の変化を追跡した. この吸光度の変化をカルニチン依存性反応速度とした. カルニチン依存性反応速度よりカルニチン非依存性反

応速度を差し引き, 生じた補酵素 (CoA) 量をパルミトイル-CoA のモル吸光係数 ($13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) から算出し, CPT 活性とした.

9. mRNA 発現の解析法

RNA は肝臓 0.1 g からトリゾール試薬 (Invitrogen, 東京) で抽出した. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, 神奈川) を用いて逆転写し, cDNA を得た. TaqMan Gene Expression 測定法に基づき, リアルタイム PCR 解析システム (日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ, MiniOpticon, 東京) を用いて, FAS, CPT1 α , CPT2 の mRNA の発現量を測定した. なお, 得られた結果は, β -アクチンで補正し, 算出した.

10. 統計処理法

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した. 得られた実験結果は, 実験 1 では, Tukey-Kramer による多重比較により解析し, また実験 2 および 3 では二因子分散分析 (ANOVA) で解析し, ともに $P < 0.05$ で統計的に有意差ありと判定した. また, 必要に応じて一元分散分析を行い, 有意差検定を行った.

実験結果

1. ニガウリ果汁の BMJ-F 食およびその搾汁残渣食のラット血清および肝臓脂質濃度に及ぼす影響 (実験 1)

Table 3 に成長パラメーター, 血清および肝臓脂質濃度を示す. 終体重および摂食量には各群間で明確な差異は観察されなかった. 一方, 肝重量は, コントロール食に比べ,

Table 3 Effects of BMJ-F on growth parameters and lipid parameters of serum and liver in rats (Experiment 1)

	Control	BMJ-F 3%	Residue	
			1%	3%
Growth parameters				
Initial body weight (g)	163±3	163±3	161±3	169±3
Final body weight (g)	274±4	275±8	270±5	265±76
Food intake (g/day)	21.9±0.4	21.1±0.8	22.1±0.6	21.0±0.5
Liver weight (g/100 g BW)	5.82±0.11 ^a	5.32±0.12 ^b	5.67±0.13 ^{ab}	5.40±0.11 ^{ab}
Serum lipids (mg/dl)				
Triglyceride	360±45	280±37	447±30	347±63
Total cholesterol	132±9 ^a	120±4 ^{ab}	97.4±7.5 ^b	102±7 ^b
Phospholipid	236±18	236±30	227±11	199±15
Liver lipids (mg/g)				
Triglyceride	80.5±19.8 ^a	22.9±2.9 ^b	51.8±16.0 ^{ab}	42.0±9.3 ^b
Total cholesterol	3.81±0.26 ^a	3.55±0.20 ^{ab}	3.21±0.19 ^{ab}	3.01±0.13 ^b
Phospholipid	24.1±0.6	26.5±0.9	25.2±0.8	25.7±0.5

BMJ-F; Bitter melon juice freeze-dried powder.

The values are means $\pm$ SE for 6 to 7 rats per group.

^{ab} Values not sharing common superscript letters in the same column are significantly different at $P < 0.05$.

Table 4 Effect of BMJ-S on growth parameters and the lipid parameter levels of serum and liver in rats fed low fat and high fat diets (Experiment 2)

	Low fat		High fat		ANOVA		
	Control	BMJ-S	Control	BMJ-S	Fat	BMJ-S	Interaction
Growth parameters							
Initial body weight (g)	120±3	118±3	121±2	118±3	NS	NS	NS
Final body weight (g)	354±12	375±6	378±13	382±11	NS	NS	NS
Food intake (g/day)	22.4±0.6	24.1±0.6	21.2±0.7	21.5±0.6	NS	NS	NS
Liver weight (g/100 g BW)	4.95±0.14	4.91±9.12	4.73±0.19	4.63±0.18	NS	NS	NS
Serum lipids (mg/dL)							
Triglyceride	314±74	367±42	516±90	345±26	NS	NS	NS
Total cholesterol	119±8	107±6	111±14	101±5	NS	NS	NS
HDL-cholesterol	46.7±1.6	54.9±2.1	56.0±3.0	64.9±5.3	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	NS
Phospholipids	241±13	231±9	242±23	219±8	NS	NS	NS
Liver lipids (mg/g liver)							
Triglyceride	47.1±9.3	19.0±1.4	42.5±2.8	25.9±1.2	NS	<i>P</i> <0.05	NS
Total cholesterol	3.72±0.28	2.66±0.15	4.07±0.21	3.19±0.18	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	NS
Free cholesterol	1.67±0.05	1.60±0.04	1.64±0.03	1.64±0.04	NS	NS	NS
Cholesteryl ester	2.05±0.25	1.06±0.14	2.43±0.18	1.55±0.16	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	NS
Ester (%)	54.2±2.4	38.8±3.5	59.4±1.3	47.7±2.7	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	NS
Phospholipids	27.0±0.5	27.2±0.7	26.3±0.6	28.3±0.5	NS	NS	NS

BMJ-S; Bitter melon juice spray-dried powder.

The values are means±SE for 6 to 7 rats per group.

3% BMJ-F 食で有意に低下した。また、搾汁残渣食においても添加量依存的に低下する傾向を示した。

血清 TG, CHOL および PL 濃度に及ぼす BMJ-F 食の影響は明確でなかったが、血清 CHOL 濃度は搾汁残渣 1% 以上の添加でコントロール食に比べ有意に低下した。一方、血清 PL 濃度に及ぼす搾汁残渣食の影響は明確でなかった。

肝臓 TG 濃度は、コントロール食に比べ、3%BMJ-F 食で有意に低下した (71.6% 低下)。また、搾汁残渣食では添加量依存的に低下する傾向 (それぞれ 35.7% および 47.8% 低下) を示した。肝臓 CHOL 濃度は、コントロール群に比べ、BMJ-F 食で低下 (6.8% 低下) し、また、搾汁残渣食でも添加量依存的に低下し、3% 搾汁残渣食でその低下は有意であった (21.0% 低下)。PL 濃度は、各群間で明確な差異は観察されなかった。

2. ニガウリ果汁の BMJ-S 食の低脂肪 (5% 脂肪) および高脂肪 (15% 脂肪) 食ラットの血清および肝臓脂質濃度に及ぼす影響 (実験 2)

Table 4 に成長パラメーター、血清および肝臓脂質濃度を示す。終体重および摂食量には各群間で有意な差異は認められなかった。また肝重量には食餌脂肪レベルおよび BMJ-S 食による影響は観察されなかった。

血清の TG, 総 CHOL および PL 濃度には、各群間で有意な差異は認められなかったが、HDL-CHOL 濃度は、両脂

肪レベルで BMJ-S 食により有意に増加した。増加の程度はともに同程度であった。

肝臓 TG 濃度は、BMJ-S 食により、低脂肪および高脂肪群でともに有意に低下した。低下の程度は低脂肪食群で 59.8%, 高脂肪食で 39.1% であり、前者の低下割合が後者に比べて大であった。総 CHOL 濃度は、高脂肪食で低脂肪食に比べ有意に増加し、一方 BMJ-S 食によりともに有意に低下した。遊離 CHOL 濃度は各群間で明確な差異は観察されなかった。従って、エステル比は、摂取脂肪レベルの増加に伴い有意に上昇し、一方 BMJ-S 食は逆に有意に低下した。これらの結果は、BMJ-S 食による肝臓総 CHOL 濃度の低下は、主に CHOL エステルの低下によることを示唆している。肝臓 PL 濃度に及ぼす脂肪レベルおよび BMJ-S 食の影響は明確でなかった。

3. ニガウリ果汁の BMJ-S 食の高 CHOL 食ラットの血清および肝臓脂質濃度に及ぼす影響 (実験 3)

Table 5 に成長パラメーター、血清および肝臓脂質濃度を示す。終体重および摂食量には各群間で有意な差異は認められなかった。肝臓重量は、無 CHOL 食に比べ、高 CHOL 食で有意に増加したが、BMJ-S 食は逆に無 CHOL 食において肝臓重量を有意に低下させた。BMJ-S 食および CHOL 食の血清 AST, ALT に及ぼす影響は観察されなかった (結果は省略)。

血清 TG 濃度は無 CHOL 食に比べ高 CHOL で有意に低

Table 5 Effect of BMJ-S on growth parameters and the lipid parameter levels of serum and liver in rats fed cholesterol-free and -enriched cholesterol diets (Experiment 3)

	Cholesterol-free		Cholesterol-enriched		ANOVA		
	Control	BMJ-S	Control	BMJ-S	Cholesterol	BM	Interaction
Growth parameters							
Initial body weight (g)	118±1	116±1	115±2	116±1	NS	NS	NS
Final body weight (g)	269±5	273±6	265±2	267±4	NS	NS	NS
Food intake (g/day)	20.4±0.5	21.4±0.6	20.2±0.6	20.0±0.7	NS	NS	NS
Liver weight (g/100 g BW)	5.32±0.10 ^a	4.53±0.06 ^b	5.91±0.17 ^c	5.98±0.08 ^c	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05
Serum lipids (mg/dL)							
Triglyceride	330±55 ^a	160±13 ^b	210±35 ^c	206±31 ^c	NS	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05
Total cholesterol	93.2±5.5	114±9	166±14	180±10	<i>P</i> <0.05	NS	NS
HDL-cholesterol	49.8±2.8 ^a	61.7±3.0 ^c	29.3±1.0 ^b	30.7±1.9 ^b	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05
Phospholipids	237±3	243±10	206±7	220±10	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Liver lipids (mg/g liver)							
Triglyceride	50.2±12.4	21.1±2.1	44.7±5.5	41.2±3.6	NS	<i>P</i> <0.05	NS
Total cholesterol	2.59±0.15	2.46±0.09	41.2±1.0	37.4±2.1	<i>P</i> <0.05	NS	NS
Phospholipids	29.0±0.5 ^a	34.5±1.4 ^b	29.4±0.9 ^a	28.3±1.2 ^a	<i>P</i> <0.05	NS	<i>p</i> <0.05

BMJ-S; Bitter melon juice spray-dried powder.

The values are means±SE for 6 to 7 rats per group.

^{abc} Values not sharing common superscript letters in the same column are significantly different at *P*<0.05.

下した。BMJ-S 食は無 CHOL 食において血清 TG 濃度を有意に低下させた。血清総 CHOL 濃度は、無 CHOL 食に比べ高 CHOL 食で有意に増加したが、BMJ-S 食の影響は観察されなかった。血清 HDL-CHOL 濃度は、無 CHOL 食に比べ高 CHOL 食で有意に減少し、一方 BMJ-S 食は無 CHOL 食において有意に増加させた。血清 PL 脂質濃度は無 CHOL 食に比べ高 CHOL 食で有意に減少したが、BMJ-S 食による影響は明確でなかった。

肝臓 TG 濃度に及ぼす CHOL 食の影響は明確でなかったが、BMJ-S 食により有意に低下した。肝臓総 CHOL 濃度は、高 CHOL 食で無 CHOL 食に比べ有意に増加した（15.9 倍）が、BMJ-S 食による影響は無 CHOL および CHOL 食とともに明確でなかった。PL 濃度は無 CHOL 食で BMJ-S 食により有意に増加したが、高 CHOL 食ではそのような影響はなかった。

Table 6 に脂肪酸合成関連酵素活性およびこれら酵素の mRNA レベルを示す。FAS 活性は高 CHOL 食で無 CHOL 食に比べ有意に減少したが、BMJ-S 食による影響は無 CHOL および高 CHOL 食とともに観察されなかった。CPT 活性は各群間で差異はなかった。一方、FAS および CPT2 の mRNA レベルには各群間で明確な差異はなかったが、CPT1 α の発現は高 CHOL 食で無 CHOL 食に比べ有意に低下（47.3% 低下）し、一方 BMJ-S 食は無および高 CHOL 食でいずれでも有意に亢進した（それぞれ、2.1 倍および 3.0 倍の亢進）。

考 察

著者らは、先に、ニガウリの三次機能についてニガウリの可食部凍結乾燥粉末が種々の食餌条件下のラットやハムスターにおいて成長パラメーターに何ら悪影響を与えずに糖尿病改善作用に加えて、脂質代謝調節作用、とくに肝 TG および CHOL 濃度低下作用を有することを報告した^{12)~15)}。本研究では、実際に生産されるニガウリ果汁末が可食部凍結乾燥粉末と同等レベルの効果を発揮するかを確認するために、降 TG 活性を指標にしてラットで摂食実験を行なった。

一般に、ラットなどの実験動物に特定の食餌条件下で、試験試料を摂取させ、脂質代謝などの生体反応を調べる実験では、コントロール群に比べ試料摂食群で摂食量や体重増加量、糞便の性状（下痢等の有無）などのパラメーターに変化が起こらないことが必要である。本実験において種々の食事条件下でラットに BMJ-F や BMJ-S を摂取させたが、摂食量や体重増加量、糞便の性状などのパラメーターに及ぼす影響は明確でなかった。また、肝機能の指標である AST、ALT 活性に及ぼす BMJ-S および食事 CHOL の影響は明確でなかった。これらの結果は、ニガウリが食生活上、とくに生理障害などを引き起こす可能性が低いことを示している。一方、BMJ-F（実験 1）および BMJ-S（実験 3）は、無 CHOL 食で肝臓重量を有意に減少させた。これらの結果は、後述するニガウリ摂取による肝臓 TG 濃度低下がその一因となっていると考えられる。

Table 6 Effect of BMJ-S on the enzyme activities and mRNA abundant involved in fatty acid metabolism in rats fed cholesterol-free and -enriched cholesterol diets (Experiment 3)

	Cholesterol-free		Cholesterol-enriched		ANOVA		
	Control	BMJ-S	Control	BMJ-S	Cholesterol	BM	Interaction
Enzyme activities (nmol/min/mg protein)							
Fatty acid synthase	36.3±3.3	31.4±3.6	15.8±2.1	13.1±1.5	$p<0.05$	NS	NS
Carnitine palmitoylacyltransferase	4.49±0.31	4.58±0.66	4.46±0.37	3.42±0.27	NS	NS	NS
mRNA levels (Arbitrary unit)							
Fatty acid synthase	1.00±0.27	0.175±0.047	0.391±0.100	1.05±0.73	NS	NS	NS
Carnitine palmitoylacyltransferase 1 α	1.00±0.16	2.12±0.19	0.527±0.074	1.56±0.33	$p<0.05$	$p<0.05$	NS
Carnitine palmitoylacyltransferase 2	1.00±0.15	1.08±0.11	0.487±0.063	1.85±0.98	NS	NS	NS

BMJ-S; Bitter melon juice spray-dried powder.

The values are means±SE for 6 to 7 rats per group.

実験1において、ニガウリは前処理後、搾汁残渣を分別して果汁を得ることから、果汁および搾汁残渣のいずれの画分に降TG活性を有する成分が分配されたかを肝臓脂質、とくにTG濃度の低下を指標として実験を行った。その結果、Table 2に示すように、BMJ-F画分は肝臓TG濃度低下効果を有しており、一方搾汁残渣は肝臓および血清におけるCHOL濃度低下に効果的であった。これらの結果は、肝臓TG濃度低下効果を発揮する成分は果汁画分へ、一方CHOL濃度低下効果に有効である成分は搾汁残渣画分に分配されたことを示唆している。さらに、本実験におけるBMJ-F食による肝臓TG濃度低下は、コントロール群に比べ71.6%だった。この低下は、先の実験におけるニガウリ凍結乾燥粉末低下の肝臓TG濃度低下の程度と同等であったことから、本実験においてBMJ-Fを製造する際の高温殺菌処理がニガウリの降TG活性に何ら影響していないことを示唆しており、生理活性物質は熱処理に対して安定であると考えられた。

ニガウリ果汁はさらにデキストリンと等量混合し、加熱噴霧乾燥法により粉末化しニガウリ果汁末を調製した。デキストリンは、それ自体が食物繊維の効果をもつと同時に低粘性、低甘味、熱や酸に対する安定性、保存性にも優れていることから食品添加物として広範囲に利用されている。また、デキストリンは、マスキング効果があり、ニガウリ中の特徴的な苦みを緩和する効果が期待される。BMJ-S食は、実験2において、5%（低脂肪）および15%（高脂肪）の脂肪レベルの条件下で、また実験3において、無CHOLおよび高CHOL食の条件下でBMJ-S食の降TG効果を調べた。その結果、BMJ-S食は、無CHOL食・低脂肪食の条件下ではデキストリンを同量摂取したコントロール食に比べ、肝臓TG濃度は有意に低下した（60%低下）。一方、無CHOL食・高脂肪食あるいは高CHOL食・低脂肪食を組み合わせた条件下ではBSJ-S食の降TG効果は低脂肪食下におけるそれに比べ軽減されるようであった。この

ように果汁を殺菌し、その後デキストリンと等量混合し、さらに加熱噴霧乾燥処理により調製したBMJ-Sはニガウリ可食部凍結乾燥粉末と同等の降TG低下効果を発揮することが示された。これらの結果は、ニガウリ中の生理活性物質が高温下における殺菌操作や噴霧乾燥においてほとんど失活しないことを示唆している。

肝臓脂質、とくにTG濃度は、肝臓において合成された内因性脂肪酸と肝外組織（血清）から取り込まれた外因性脂肪酸のエステル化系あるいは酸化系への代謝や合成されたTGのリポタンパク質への組み込みと肝外（血中）への搬出などの複雑な代謝過程により調節されることが知られている³⁰⁾。ニガウリの降TG作用に関する機序について、著者らが知る限り現在まで一連の系統だった研究結果は見当たらず、断片的な報告が多い。Nerukarらは、ニガウリジュース上清をHepG2細胞に添加した実験系で細胞内TG合成が阻害され、さらにアポBタンパク質の集合と輸送に関与するMicrosomal transfer protein (MTP)の遺伝子発現も抑制され、結果的に培地中へのTG分泌が抑制されることを報告している¹⁶⁾。また、彼らはその後C56BL/6マウスにニガウリジュース凍結乾燥粉末を摂取させた場合、血漿アポB含有タンパク質が低下することを報告している¹⁷⁾。最近、ChaoらはH4IIEC3細胞を用いた細胞培養系でニガウリ抽出物が脂質とグルコースの恒常性における転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α を活性化し、アシルCoAオキシダーゼ遺伝子の発現を増加させることを報告している¹⁸⁾。著者らは、最近、ニガウリ凍結乾燥粉末からメタノール抽出した画分を摂取させたラットの肝臓を用いたin vitroにおける肝切片および肝細胞を用いた実験で[1(2)-¹⁴C]-酢酸の脂肪酸画分への取り込みには変化は見られないが、TG画分への取り込みが減少すること、また同じラットから調製した肝細胞培養系で[1-¹⁴C]-オレイン酸のTG画分への取り込みが有意に低下することを報告した³¹⁾。一方、この食餌条件下で

はラット肝臓では CPT1 α 酵素の遺伝子発現 (mRNA) は有意に増加し、脂肪酸酸化は亢進する可能性を報告した。これらの観察はニガウリ摂取による肝臓 TG 濃度の低下が de novo の脂肪酸合成には影響せずに、TG 合成のための脂肪酸のエステル化への取込みの低下と脂肪酸酸化系の代謝亢進により引き起こされている可能性を示している。

本研究では、さらに脂肪酸合成と酸化に関与する酵素活性およびその遺伝子発現レベルを調べた (Table 6)。その結果、FAS 活性は、CHOL 食により有意に低下したが、BMJ-S 添加による影響は観察されなかった。また、CPT 酵素活性に及ぼす高 CHOL 食あるいは BMJ-S 添加の影響も観察されなかった。また、FAS および脂肪酸のミトコンドリアへの搬入を調節する律速酵素である CPT1 α の遺伝子発現を測定した結果、FAS の mRNA レベルは食餌 CHOL や BMJ-S に対して一貫した応答を示さなかったが、CPT1 α の mRNA 発現は高 CHOL 食により減少し、BMJ-S 摂取により無・高 CHOL 食のいずれでも有意に亢進した。著者らは先にニガウリ可食部凍結乾燥粉末より調製したメタノール抽出画分を摂取したラットでは、CPT1 α mRNA レベルが低脂肪 (5% 脂肪) 食で有意に亢進することを報告しており、これらの結果¹⁴⁾ と良く一致した。一方、ミトコンドリア内膜に局在する CPT2 の mRNA レベルに及ぼす影響は各群間で明確な差異は観察されなかった。このような観察は、BMJ-S 摂取が低脂肪食では CHOL の添加の有無にかかわらず、脂肪酸酸化の律速酵素である CPT1 α 酵素の遺伝子発現を亢進させることを示唆しており、また BMJ-S が加熱加工処理する製造工程ではその生理活性物質はほとんど失活していないことを示唆している。しかしながら、このような脂肪酸酸化の律速酵素である CPT1 α の遺伝子発現の亢進は、酵素活性には直接的に関連していないようであった。その理由は不明である。さらに検討する必要がある。

CHOL 代謝に関連して、ニガウリ可食部やメタノール抽出物凍結乾燥粉末を用いて食餌脂肪レベルおよびコレステロール添加の有無などの食餌条件を変えてラットを用いて実験を行った¹³⁾ 結果、血清総 CHOL 濃度は一貫した応答を示さなかったが、血清リポタンパク質画分の HDL-CHOL 濃度は有意に上昇した (Table 4 および 5)。これらの結果は、先のニガウリ可食部凍結乾燥粉末が無および高 CHOL 食条件下で HDL-CHOL 濃度をともに増加させた結果¹³⁾ と良く一致した。詳細な機序は不明であるが、BMJ-S は総 CHOL 濃度に影響を及ぼさないが、HDL-CHOL 濃度を増加させることが追認された。一方、肝臓 CHOL 濃度は、実験 2 において食事脂肪レベルを異にした条件では BMJ-S 摂取により有意に低下した (Table 4) が、CHOL 添加の有無の食餌条件下の実験では必ずしも明確な応答を示さなかった。著者らは先に後者の実験条件でも肝臓総 CHOL 濃度は有意に低下することを明らかにし

た¹²⁾ が、一致した結果が得られなかった。

一方、血清あるいは肝臓 CHOL 濃度低下の機序は、肝臓における CHOL 合成と胆汁酸への異化、肝臓から血流中への分泌、糞中への中性および酸性ステロイドとしての排泄などが、複雑に組み合わさっていることが知られている³²⁾³³⁾。著者らは先にニガウリのメタノール抽出画分が、肝臓切片および肝細胞において [1(2)-¹⁴C]-酢酸の CHOL 画分への取り込みに何ら影響を及ぼさないこと、コレステロールの糞中への中性ステロールとしての排泄を増加させることおよび肝臓 CHOL 濃度の低下は CHOL の糞中への排泄増加がその一因であることを報告した²⁵⁾。本実験における肝臓 CHOL 濃度の BMJ-S 摂取による低下はおそらくメタノール抽出画分において観察された結果と同様の機序によるものと推察されたが、さらなる検討が必要である。

ニガウリの血糖低下に関連する生理活性成分は、サポニンである可能性が指摘されている³⁴⁾ が、現在まで単離・同定した報告はない。その他、著者らは脂質濃度低下作用に関連する生理活性成分について、単離・同定を進めており、特定の有機溶媒抽出物として局在する画分の分離には成功している^{34)~38)} が、複数の成分が共存しているため、さらに単離・同定を進めている。

本研究では、ニガウリのサプリメントなどの加工品として利用することを目指して、搾汁残渣を除去し、得られた果汁にデキストリンを等量混合し、さらに加熱噴霧乾燥法により調製した BMJ-S が、先に報告したニガウリ可食部凍結乾燥粉末と同等の脂質代謝改善能を有することを確認した。従って、ニガウリ中の脂質代謝調節機能を有する生理活性物質が加熱処理等に対しても強い抵抗性を有していることが示され、今後サプリメント等の形で商品化できる可能性が示された。

要 約

ニガウリの果汁ジュースや加熱条件等がラットにおける脂質代謝改善効果に及ぼす影響などについて調べた。まず、JA 果汁工場において製造されるニガウリ果汁 (Bitter melon juice : BMJ) の凍結乾燥粉末 (BMJ-F) の脂質代謝に及ぼす影響およびそのデキストリンとの混合物の加熱噴霧乾燥粉末 (BMJ-S) の影響について調べた。BMJ-F は肝臓トリグリセリド (TG) 濃度低下効果を有し、一方搾汁残渣画分は血清コレステロール (CHOL) 濃度低下効果を有することが確認された。ついで、BMJ-S について、異なる脂肪レベルおよび CHOL 添加の有無の食餌条件下で脂質代謝に及ぼす影響を調べた。その結果、脂肪レベルを異にした条件下では、BMJ-F の肝臓 TG 濃度低下効果は低脂肪食で高脂肪食に比べ大であった。また、BMJ-S は両脂肪レベルで血清高密度リポタンパク質 CHOL 濃度上昇効果を有することが確認された。一方、高コレステロール食下における BMJ-S 食の肝臓 TG 濃度低下効果は明確でなく、

無 CHOL 食においてのみ TG 濃度低下効果が確認された。本研究において、肝臓 TG 濃度低下の機序に関連して、脂肪酸の合成と酸化に関連する酵素活性及び遺伝子発現を調べた結果、BMJ-S の影響はカルニチンパルミトイルアシルトランスフェラーゼ 1 α 酵素の遺伝子発現を有意に増加させるようであった。以上のように、BMJ-F の脂質濃度低下効果を発揮するニガウリ中の生理活性物質は食品加工で汎用される加熱操作に対して安定であることが明らかとなり、従ってニガウリ果汁末は機能性食品素材としてサプリメント等に利用できる可能性が示唆された。

文 献

- Meir, P. and Yaniv, Z. (1985). An in vitro study on the effect of *Momordica charantia* on glucose uptake and glucose metabolism in rats. *Planta Med.*, **51**, 12–16.
- Raman, A. and Lau, C. (1996). Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomed.*, **2**, 349–362.
- Platel, K. and Srinivasan, K. (1997). Plant foods in the management of diabetes mellitus: vegetables as potential hypoglycemic agents. *Nahrung*, **41**, 68–74.
- Sitasawad, S.L., Shewade, Y., and Bhonde, R. (2000). Role of bittergourd fruit juice in stz-induced diabetic state *in vivo* and *in vitro*. *J. Ethnopharmacol.*, **73**, 71–79.
- McCarty, M.F. (2004). Does bitter melon contain an activator of AMP-activated kinase? *Med. Hypotheses*, **63**, 340–343.
- Ahmed, I., Lakhani, M.S., Gillett, M., John, A., and Raza, H. (2001). Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karella) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **51**, 155–161.
- Chen, Q., Chan, L.L.Y., and Li, E.T.S. (2003). Bitter melon (*Momordica charantia*) reduces adiposity, lower serum insulin and normalizes glucose tolerance in rats fed a high fat diet. *J. Nutr.*, **133**, 1088–1093.
- Krawinkel, M.B. and Keding, G.B. (2006). Bitter gourd (*Momordica charantia*) : A dietary approach to hyperglycemia. *Nutr. Rev.*, **64**, 331–337.
- Yin, J.Y., Zhang, H., and Ye, J. (2008). Traditional chinese medicine in treatment of metabolic syndrome. *Endo. Metab. Immune. Disord. Drug Targets.*, **8**, 99–111.
- Grover, J.K. and Yadav, S.P. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J. Ethnopharmacol.*, **93**, 123–132.
- Fuangchan, A., Sonthisombat, P., Seubnukarn, T., Chanouan, R., Chotchaisuwat, P., Sirigulsatien, V., Ingkaninan, K., Plianbangchang, P., and Haines, S.T. (2011). Hypoglycemic effect of bitter melon compared with metformin in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *J. Ethnopharmacol.*, **134**, 422–428.
- Jayasooriya, A.P., Sakono, M., Yukizaki, C., Kawano, M., Yamamoto, K., and Fukuda, N. (2000). Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *J. Ethnopharmacol.*, **72**, 331–336.
- Senanayake, G.V.K., Maruyama, M., Shibuya, K., Sakono, M., Fukuda, N., Morishita, T., Yukizaki, C., Kawano, M., and Ohta, H. (2004). The effect of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **91**, 257–262.
- Yukizaki, C., Aoki, K., Honda, K., Takaji, S., Ino, H., Akagi, I., Sakono, M., and Fukuda, N. (2008). Novel Varieties of bitter melon (*Momordica charantia*) in Miyazaki reduced rat liver lipids. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **55**, 323–329 (柚木崎千鶴子, 青木宏太, 本田加奈, 高司清香, 井野寿俊, 赤木 功, 窄野昌信, 福田亘博. 宮崎県産ニガウリのラット脂質代謝に及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌).
- Senanayake, G.V.K., Maruyama, M., Sakono, M., Fukuda, N., Morishita, T., Yukizaki, C., Kawano, M., and Ohta, H. (2004). The effects of Bitter Melon (*Momordica charantia*) extracts on serum and liver lipid parameters in hamsters fed cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 253–257.
- Nerurkar, P.V., Pearson, L., Efrid, J.T., Adeli, K., Therault, A. G., and Nerurkar, V. R. (2005). Microsomal triglyceride transfer protein gene expression and apo B secretion are inhibited by bitter melon in HepG2 cells. *J. Nutr.*, **135**, 702–705.
- Nerurkar, P.V., Lee, Y.K., Motosue, M., Adeli, K., and Nerurkar, V.R. (2008). *Momordica charantia* (bitter melon) reduces plasma apolipoprotein B-100 and increases hepatic insulin receptor substrate and phosphoinositide-3 kinase interactions. *Brit. J. Nutr.*, **100**, 751–759.
- Chao, C.Y. and Huang, C.J. (2003). Bitter gourd (*Momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma cells. *J. Biome. Sci.*, **10**, 782–791.
- Oishi, Y., Sakamoto, T., Udagawa, H., Taniguchi, H., Kobayashi-Hattori, K., Ozawa, Y., and Takita, T. (2007). Inhibition of increases in blood glucose and serum neutral fat by *Momordica charantia* saponin fraction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 735–740.
- Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., DeVries, J.W., Schweizer, T. F., and Harl and B.F. (1985). Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 677–679.
- American Institute of Nutrition. (1977). Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340–1348.
- Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497–509.
- Fletcher, M.J. (1968). A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta*, **22**, 393–397.
- Sperry, W.M. and Webb, M. (1950). A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, **187**, 97–106.
- Fukuda, N., Azain, M.J., and Ontko, J.A. (1982). Altered hepatic metabolism of free fatty acids underlying hypersecretion of very low density lipoproteins in the genetically obese Zucker rat. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14066–14072.
- Rouser, G., Siakotos, A.N., and Fleischer, S. (1966). Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids*, **1**, 85–86.
- Seglen, P.O. (1973). Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp. Cell. Res.*, **82**, 391–398.
- Kelley, D.S., Nelson, G.J., and Hunt, J.E. (1986). Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in

- primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **235**, 87–90.
- 29) Markwell, M.A.K., McGroarty, E.J., Bieber, L.L., and Tolbert, N. E. (1986). The Subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426–3432.
- 30) Fukuda, N. and Ontko, J.A. (1984). Interactions between fatty acid synthesis, oxidation, and esterification in the reduction of triglyceride-rich lipoproteins by the liver. *J. Lipid. Res.*, **25**, 831–842.
- 31) Senanayake, G.V.K., Fukuda, N., Nishizono, S., Wang, Y.M., Nagano, K., Yanagita, T., Iwamoto, M., and Ohta, H. (2012). Mechanisms underlying decreased hepatic triacylglycerol and cholesterol by dietary bitter melon extract in the rat. *Lipids*, **47**, 495–503.
- 32) Dietschy, J.M. and McGarry, J.D. (1974). Limitations of acetate as a substrate for measuring cholesterol synthesis in liver. *J. Biol. Chem.*, **249**, 52–58.
- 33) Fears, R. and Morgan, B. (1976). Studies on the response of cholesterol biogenesis to feeding in rats. Evidence against the existence of diurnal rhythms. *Biochem. J.*, **158**, 53–60.
- 34) Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1986). A steryl glycoside fraction from *Momordica charantia* seeds with an inhibitory action on lipid metabolism in vitro. *Biochem. Cell. Biol.*, **64**, 766–771.
- 35) Shih, C. C., Lin, C. H., Lin, W. L., and Wu, J. B. (2009). *Momordica charantia* extract on insulin resistance and the skeletal muscle GLUT4 protein in fructose-fed rats. *J. Ethnopharmacol.*, **123**, 82–90.
- 36) Matsuda, H., Shimoda, H., Uemura, T., and Yoshikawa, M. (1999). Preventive effect of sesquiterpenes from bay leaf on blood ethanol elevation in ethanol-loaded rat: Structure requirement and suppression of gastric emptying. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 2647–2652.
- 37) Malinow, M.R., McLaughlin, P., Papworth, L., Stafford, C., Kohler, G.O., Livingston, A.L., and Cheeke, P.R. (1977). Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, **30**, 2061–2067.
- 38) Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., and Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.*, **88**, 587–605.

(平成 29 年 5 月 1 日受付, 平成 29 年 9 月 8 日受理)