

機関番号：41501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700612

研究課題名 (和文) 機能性ポリフェノールが糖・脂質代謝に及ぼす影響

研究課題名 (英文) Preventive effects of functional polyphenols on metabolic disease.

研究代表者

倉兼 静江 (KURAKANE SHIZUE)

山形県立米沢女子短期大学・健康栄養学科・助手

研究者番号：20442014

研究成果の概要 (和文)：本研究は、サルナシ (*Actinidia arguta*) に含まれるポリフェノール成分の2型糖尿病および肥満に対する予防効果を検討した。その結果、サルナシポリフェノールは、*in vitro* において α -グルコシダーゼ阻害作用を示し、ラットにおける食後高血糖を抑制した。また、強いマルターゼ阻害活性を示す画分には、イソケルシトリンとハイペロサイドが含まれていた。KK-AYマウスにおいては、サルナシポリフェノールとイソケルシトリン両方に耐糖能改善とCPT活性の亢進がみられ、糖新生の抑制と β 酸化の亢進もマルターゼ阻害活性同様に抗糖尿病を示す機序に関係していると示唆された。

研究成果の概要 (英文) : *Actinidia arguta* polyphenols (AP) inhibited α -glucosidase activity *in vitro*. The oral administration of AP with maltose and starch suppressed postprandial hyperglycemia involved the intake of the respective sugars by rats. A fraction contained isoquercitrin and hyperoside as major components of AP showed a stronger inhibitory activity for maltase. The improvement of glucose intolerance and increase in the CPT activity in the liver of KK-AY mice fed with AP or isoquercitrin suggested that the suppression of gluconeogenesis and the enhancement of β -oxidation of lipids as well as the inhibition of maltase by AP and isoquercitrin might also be related to their anti-diabetic effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：食品栄養化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ポリフェノール、サルナシ、糖尿病、肥満、 α -グルコシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病の発症や悪化には内臓脂肪の蓄積が大きく関わることが明らかになっており、メタボリックシンドロームと診断される人が近年急増し、大きな社会問題となっている。発症基盤となる内臓蓄積型の肥満は生活習慣の

乱れなどにより内臓肥満、インスリン抵抗性となり、糖・脂質代謝異常を引き起こし、メタボリックシンドロームに繋がっていく。そのため糖・脂質代謝異常を予防・改善することが重要とされる。

近年、肥満研究が進み、脂肪細胞はただのエネルギー貯蔵組織ではなく、アディポサイ

トカインと総称される生理活性物質を分泌する最大規模の内分泌臓器であることが明らかとなった。脂肪細胞はその大きさによって分泌するアディポサイトカインの量が増加し、正常な大きさなら、善玉のアディポサイトカインを多く分泌し、悪玉をあまり分泌しない。しかし、脂肪細胞が大きくなる、つまり内臓肥満になると善玉よりも悪玉を多く分泌するようになり、インスリン抵抗性を発症し、代謝異常を引き起こす。

つまり糖・脂質代謝異常を予防・改善することでアディポサイトカインの分泌異常も予防・改善することができる。脂肪蓄積を防止するためには脂質をカットするだけでなく、糖質からの脂肪合成を防ぐため、糖質の過剰な摂取・吸収を阻止する必要がある。さらに、過剰な糖質は高血糖になりやすく、インスリン抵抗性を発症させる原因になるので、両方の摂取・吸収を阻止することが重要である。

肥満、糖尿病治療薬として消化酵素阻害薬などがあるが、メタボリックシンドローム予備軍などのより多くの人に摂取してもらうためには、食品として日常から摂取し、予防することが理想的である。最近、ポリフェノール類に体脂肪低下作用、血糖値降下作用などが見出されており、ポリフェノール類を多く含む食品が注目されている。その中でも、カテキン類に強い作用が認められており、体脂肪低下作用の機能としてβ酸化亢進や脂肪酸合成阻害などが明らかとなっている。

2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの発症要因の一つとして内臓肥満が問題視され、社会問題となっている。そこで、日常から予防・改善するために、機能性食品が注目され、活発に研究が進んでいる。その中でも、ポリフェノール類には体脂肪低下作用、血糖値降下作用などの抗生活習慣病を示すものが見出されており、特に抗酸化力が強いカテキン類は両作用を示す食品素材成分として注目されている。そこで、本実験では、肥満や糖尿病で起こる糖代謝異常と脂質代謝異常の両面に同時に機能するカテキン類とは異なる新規なポリフェノールをサルナシの多様なポリフェノールに求め、その探索、さらには機能成分の作用機構について解析を行う。

これまでの研究より、私はクロロゲン酸を含むウコギポリフェノールには糖質消化酵素阻害、血糖値降下作用があること、プロシアニジンを含む落花生ポリフェノールには脂質消化酵素阻害、脂質吸収阻害、血中中性脂肪低下作用があることを確認していることから、これらの化合物を含むサルナシ果実中には糖・脂質代謝の両方を改善する作用が

期待できる。サルナシにはその他、ウコギ、落花生にみられない種々のフラボノイドの存在が確認されており、ウコギ、落花生にさらに強力な作用が期待でき、強力な作用を有する化合物の単離とその機能検証、作用機構などの解明を行う。そこで、サルナシを中心に研究を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) サルナシ果実中のポリフェノールの同定

サルナシ果実中の総ポリフェノール量を Folin-Denis 法を用いて測定した。また、サルナシ果実のラジカル消去活性を DPPH を用いて Trolox 当量で算出した。また、その際、同じマタタビ科のキウイフルーツと比較した。

サルナシ果実をメタノール抽出し、Diaion HP-20、シリカゲル、Sephadex LH-20 クロマトグラフィーにより粗分画し、分取 HPLC により精製した。その後、HPLC-DAD、LC/MS により各ポリフェノール成分の同定を行った。

(2) 糖・脂質吸収阻害試験

①各種糖類（グルコース、マルトース、スクロース、デンプン）とともにサルナシ果実粉末またはポリフェノール画分をマウスに単回投与し、経時的（0、15、30、60、90、120分後）に尾静脈より採血し血糖値を測定した。

②脂質（オリーブ油）とともにサルナシ果実粉末またはポリフェノール画分をマウスに単回投与し、経時的（0、1、2、4、6時間後）に尾静脈より採血し、血中の中性脂肪量を測定した。

(3) 糖・脂質消化酵素阻害試験

①糖質消化酵素阻害

マルトース、スクロースをそれぞれ基質として、マルターゼ、スクラーゼの各酵素反応を行い、各酵素活性に及ぼす影響を検討した。

②脂質消化酵素阻害

トリオレインのエマルジョンを基質とし、脂質消化酵素（膵リパーゼ）とポリフェノール画分を加えて反応を行い、消化により生成した遊離脂肪酸を測定し、膵リパーゼ活性に及ぼす影響を検討した。

(4) マウスにおける抗肥満・抗糖尿病作用の検討

①抗肥満作用

4週齢の C57BL/6J 雄マウスを1週間予備飼育した後、平均体重が同等となるように3つの群に分けた。普通食(LF)群には基準食を、高脂肪食(HF)群には、高脂肪・高ショ糖食を、

サルナシポリフェノール(HFS)群には高脂肪食にサルナシポリフェノールを1%添加した食を95日間与えた。その後解剖し、各パラメーターの測定を行った。さらに、肝臓における遺伝子発現の解析をDNAマイクロアレイを用いて分析した。使用したチップは、クラボウ社製のGeneSQUARE®生活習慣病研究用マウスで糖・脂質代謝に関連した321遺伝子が搭載されていた。

②抗糖尿病作用

5週齢のC57BL/6J雄性マウスと2型糖尿病モデルマウスであるKK-A^y雄性マウスを1週間予備飼育した後、C57BL/6Jマウスを基本食(C57)群、KK-A^yマウスは基本食(Con)群と0.5%サルナシポリフェノール添加食(AP)群に分け、38日間飼育した。飼育21日目と36日目に耐糖能試験(OGTT)を行った。

6週齢のKK-A^y雄性マウスを一週間予備飼育した後、対照(Con)群とイソケルシトリン(Q3G)群に分け、25日間飼育した。Q3G群には実験1で最も阻害作用の強かった画分に含まれる主要成分の一つであるイソケルシトリンを0.15%添加した飼料を給餌した。

(5)サルナシポリフェノールの生体内吸収
上記(4)②の血清をHPLC-DADで分析した。また、Wistarラットに、サルナシポリフェノール溶液を経口投与し、60分後に採血し血漿を得た。 β -グルクロナーゼ/スルファターゼ処理し、脱抱合した後、同様に分析した。

4. 研究成果

(1)サルナシポリフェノールの組成

総ポリフェノール量は、果実100g中にサルナシ(AA)306.0mg、緑色果肉キウイフルーツ(AD)171.2mg、黄色果肉キウイフルーツ(AC)172.3mg含まれていた。DPPHラジカル消去活性は、サルナシ2.2 mmol Trolox eq./g、緑色果肉キウイフルーツ2.5 mmol Trolox eq./g、黄色果肉キウイフルーツ2.3 mmol Trolox eq./gであった。サルナシの総ポリフェノール量は、他のキウイフルーツと比べほぼ2倍量であり、DPPHラジカル消去活性は、他のキウイフルーツとほぼ同等であった。

サルナシポリフェノールとして、プロトカテキュ酸、クロロゲン酸、(+)-カテキン、コーヒー酸、プロシアニジンB2、ハイペロサイド、イソケルシトリンが含まれていた。ハイペロサイドとイソケルシトリンは、サルナシ果実100g中に各々 0.73 ± 0.18 、 2.37 ± 1.12 mg含まれていた。

(2)糖・脂質吸収阻害作用

マウスにサルナシポリフェノール画分(AP)とデンプン、マルトースあるいはグル

コースを同時に経口投与した時の血糖値変化量を図1に示した。デンプン負荷後の血糖値上昇はCon群において投与後15分で最高値となり、AP群では有意に低い値を示した(図1.A)。マルトース負荷試験では、AP群はマルトース投与後15、30分で有意に低い値を示した(図1.B)。グルコース負荷試験では、Con群に比べて、AP群で有意な差は認められなかった(図1.C)。

APが脂質負荷後のマウスの血清トリグリセライド値に及ぼす影響を図2に示した。コーン油の負荷によって、負荷後2時間の血清トリグリセライド濃度が大きく上昇し、負荷後6時間で負荷前の血清トリグリセライド値にほぼ戻った。AP群ではCon群に対し、有意差は認められなかったが、血清トリグリセライド値が低値を示す傾向にあった(図2.A)。そこで、図2.Aより、血清トリグリセライド曲線下面積を算出し、トリグリセライドの吸収量を比較した(図2.B)。トリグリセライドの吸収量もCon群に対しAP群で抑制される傾向にあった。

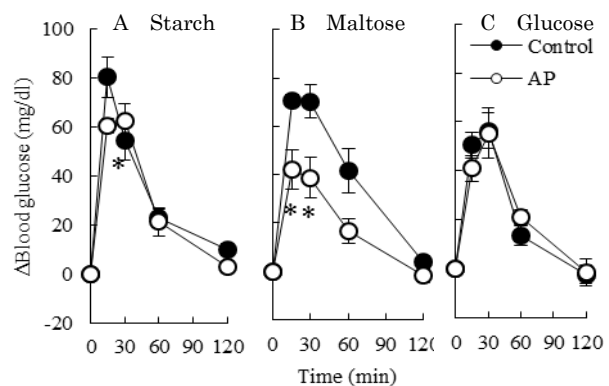


図1. サルナシポリフェノールの各糖質負荷後のラット血糖値上昇に及ぼす影響
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. Control)

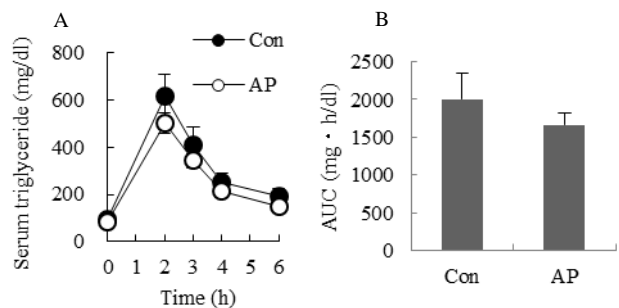


図2. サルナシポリフェノールの脂質負荷後の血清トリグリセライドに及ぼす影響(A)とその血中脂質曲線下面積(B)

(3) 糖・脂質消化酵素阻害作用

in vitro において、サルナシポリフェノール (AP) がマルターゼとスクラーゼ活性に及ぼす影響を検討した結果を図 3 に示した。AP は濃度依存的にマルターゼとスクラーゼ活性を阻害し、特に強いマルターゼ阻害活性を示した。そこで、各酵素に対する IC₅₀ を算出したところ、マルターゼに対する AP の IC₅₀ は 0.083mg/ml であり、スクラーゼに対する IC₅₀ は 7.84mg/ml であった。

次に、マルターゼ阻害活性を示す AP の有効成分の探索を行ったところ、最も強い阻害活性を示した画分はイソケルシトリンとハイペロサイドが合わせて 79.8% を占めるフラクションであった (図 3)。イソケルシトリンとハイペロサイドのマルターゼに対する IC₅₀ はそれぞれ 0.20 mM、0.11 mM だった。

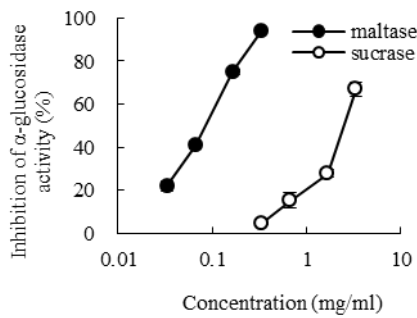


図 2. サルナシポリフェノールがマルターゼとスクラーゼ活性に及ぼす影響

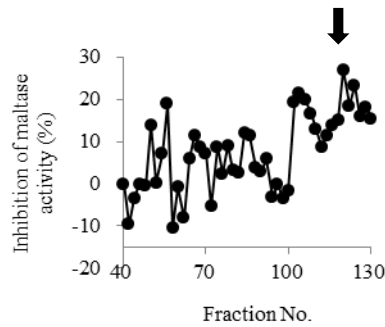


図 3. サルナシポリフェノールを分画した画分中のマルターゼ阻害活性

(4) マウスにおける抗肥満・抗糖尿病作用

①抗肥満作用

HFS 群は HF 群に対して、体重増加と血糖値上昇の抑制傾向を示した (図 4)。白色脂肪組織重量、肝臓脂質、糞排泄量、糞中脂質においては、HF 群に対して HFS 群で有意差は認められなかった。DNA マイクロアレイにより肝臓中の遺伝子発現解析を行った結果、1.5 倍以上、0.5 倍以下の遺伝子発現について

解析を行ったところ、1 遺伝子 (Fabp5) の発現が上昇し、4 遺伝子 (Ccl2、Cfd、Jun、Cdk1na) の発現が抑制されていた。ケモカインである Ccl2 (MCP-1) は炎症性メディエーターとして知られているが、インスリン応答によるグルコース取り込みを減少させ、インスリン抵抗性を引き起こすため 2 型糖尿病促進因子としても注目されている。従って、血糖値上昇抑制の要因のひとつに MCP-1 の発現抑制が考えられた。

A. 体重増加量

B. 空腹時血糖値

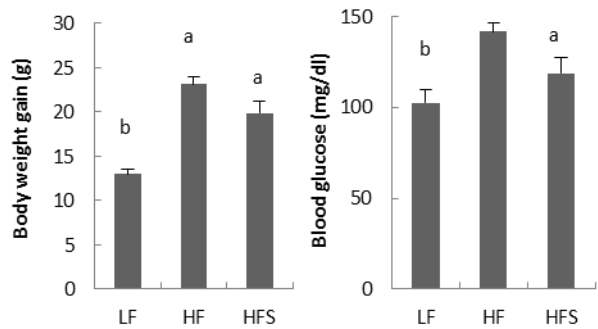


図 4. 食餌誘導性肥満モデルマウスにおけるサルナシポリフェノール摂取時の体重増加量と空腹時血糖値
異なる文字間で有意差あり (p<0.05)

②抗糖尿病作用

AP 群は Con 群に対し体重増加を抑制する傾向にあった。肝臓中脂質および各臓器重量に有意な差は見られなかった。血糖値は、空腹時および随時ともに有意差は見られなかったが、21 日目に行った OGTT では AP 群が Con 群に対し投与後 30 分、60 分の血糖値上昇を抑制する傾向がみられ、36 日目では有意に抑制されていた (図 5)。また、糖新生の律速酵素であるグルコース-6-ホスファターゼ活性が有意に抑制された。以上の結果から、サルナシポリフェノールには血糖値上昇抑制およびインスリン抵抗性改善が認められることから、抗糖尿病作用を有することが示唆された。

A. 21 日目

B. 36 日目

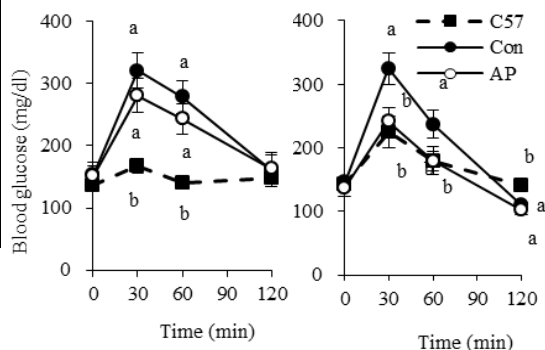


図 5. KK-*A^y*マウスにサルナシポリフェノールを摂取させたときの OGTT
異なる文字間で有意差あり ($p<0.05$)

イソケルシトリンの摂取(Q3G 群)では、空腹時血糖値と HbA1c は Con 群に比べて低い傾向にあった。耐糖能試験では、各採血時点で Con 群より低値を示す傾向にあり、飼育 18 日目に行った OGTT では、投与後 60 分に有意に低値を示した(図 6)。肝臓 TG は対照群に対して有意に低い値を示した。また Q3G 群では肝臓中の脂肪酸合成酵素 (FAS) が有意に抑制され、CPT が亢進する傾向にあった(表 1)。

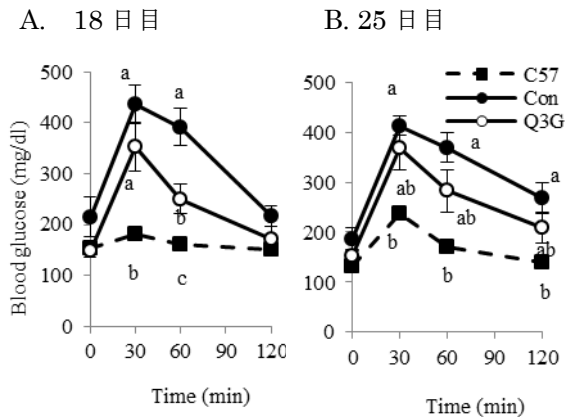


図 6. KK-*A^y*マウスにイソケルシトリンを摂取させたときの OGTT
異なる文字間で有意差あり ($p<0.05$)

表 1. 肝臓脂質と脂質代謝酵素活性

	Con	Q3G
Liver lipid (mg/g liver)		
Triglyceride	16.3 ± 1.4	11.4 ± 1.2 *
Hepatic enzyme activities (nmol/min/mg protein)		
FAS	1.08 ± 0.18	0.21 ± 0.02 *
CPT	8.97 ± 0.62	10.1 ± 0.69

* $p<0.05$ (vs. Con)

(5) 生体内吸収

(4) ②のサルナシポリフェノール (AP) を用いた動物実験での血清を HPLC-DAD で分析したが、ポリフェノール成分は検出されなかった。そこで、抱合化され吸収されたこと考慮し、脱抱合し分析したが、検出されなかった。

次に、AP 溶液を Wistar ラットに経口投与し、投与後 1 時間の血漿成分について同様に

処理し、HPLC-DAD を用いて分析を行ったが、血漿中にサルナシポリフェノール成分は確認されなかった。サルナシポリフェノール成分は多数のポリフェノール成分を含み、そのため個々の成分は濃度が低く、吸収された後の濃度はさらに低くなるため、検出限界で確認できなかったと考えられた。そこで、サルナシポリフェノールをゲルろ過により分画し、各画分を経口投与したところ、サルナシポリフェノール成分である(+)カテキン、(-)エピカテキン、プロシアニジン B2、ハイペリン、イソケルシトリンが脱抱合処理した血漿中に確認された。よって、サルナシポリフェノール中に多く含まれるポリフェノール成分は吸収され、抱合体で血液中に存在することが示唆された。

以上のことから、サルナシポリフェノールは、食餌誘導性肥満モデルマウス、2 型糖尿病モデルマウスのどちらにおいても、血糖値上昇抑制作用が認められ、2 型糖尿病モデルマウスにおいては、肝臓脂質蓄積抑制作用が認められた。特に、抗糖尿病作用は、腸管内での α -グルコシダーゼ阻害と、生体内に吸収されたのちのインスリン抵抗性改善作用の両方によることが推察された。また、その作用成分の一つにイソケルシトリンが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Shizue Kurakane, Noriko Yamada, Hideyo Sato, Kiharu Igarashi, Anti-diabetic effects of *Actinidia arguta* polyphenols on rats and KK-*A^y* mice., Food Science and Technology Research, Vol. 17, No. 2, 2011, pp.93-102, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 倉兼静江、五十嵐喜治、サルナシポリフェノール成分が 2 型糖尿病マウスに及ぼす影響、第 15 回日本フードファクター学会、2010 年 10 月 4 日、宮城・仙台市民会館

② 倉兼静江、山田則子、五十嵐喜治、サルナシの血圧上昇抑制作用、第 43 回日本栄養・食糧学会東北支部大会、2009 年 11 月 7 日、青森・青森県立保健大学

③ Shizue kurakane, Noriko Yamada, Kiharu Igarashi, Effects of *Actinidia Arguta* Polyphenols on Alpha-Glucosidase Activity and Blood Glucose Levels in Mice, 19th

International Congress of Nutrition,
2009年10月6日, Thailand・Bangkok

- ④倉兼静江、山田則子、五十嵐喜治、サルナシの血糖値上昇抑制作用、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月29日、福岡・マリンメッセ福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉兼 静江 (KURAKANE SHIZUE)
山形県立米沢女子短期大学・健康栄養学科・助手
研究者番号：20442014

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし