

サルナシの抗生活習慣病食品素材・成分  
としての開発と作用機構

2011. 3

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻  
(山形大学)

倉 兼 静 江

## 目 次

序論	1
第 1 章 サルナシ果実の特性	6
緒言	
第 1 節 サルナシ中のポリフェノール成分の分析	
1.1. サルナシポリフェノールの抽出と分析方法	
第 2 節 サルナシの総ポリフェノール量と DPPH ラジカル消去活性	
1.2.1. 総ポリフェノール量の定量方法	
1.2.2. DPPH ラジカル消去活性の測定方法	
第 3 節 サルナシ中のアミノ酸成分の分析	
1.3.1. 方法	
1.4. 結果	
1.5. 考察	
1.6. 小括	
第 2 章 サルナシポリフェノール画分がラットまたはマウスの糖・脂質吸収に及ぼす影響	16
緒言	
第 1 節 糖質または脂質の吸収阻害試験 ( <i>in vivo</i> )	
2.1.1. 糖質の吸収阻害試験方法	
2.1.2. 脂質の吸収阻害試験方法	
2.1.3. 結果	
第 2 節 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害試験 ( <i>in vitro</i> )	
2.2.1. サルナシポリフェノールの $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害試験	
2.2.2. $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害を示す有効成分の探索	
2.2.3. 結果	
2.3. 考察	
2.4. 小括	
第 3 章 サルナシポリフェノール画分の食餌誘導性肥満モデルマウスにおける抗肥満作用	30
緒言	

- 3.1. 方法
- 3.2. 結果
- 3.3. 考察
- 3.4. 小括

第4章 サルナシポリフェノールの2型糖尿病モデルマウスにおける抗糖尿病作用・・・・・・・・・・・・・・・・・・44

緒言

第1節 KK-A<sup>y</sup>マウスにおけるサルナシポリフェノール画分の抗糖尿病作用

- 4.1.1. 方法
- 4.1.2. 結果

第2節 KK-A<sup>y</sup>マウスにおけるイソケルシトリンの抗糖尿病作用

- 4.2.1. 方法
- 4.2.2. 結果

- 4.3. 考察
- 4.4. 小括

第5章 サルナシの血圧降下作用・・・・・・・・・・・・・・・・・・80

緒言

第1節 サルナシのACE（アンジオテンシン変換酵素）阻害作用

- 5.1.1. サルナシ分画部でのACE阻害活性の比較
- 5.1.2. ACE阻害作用を示す有効成分の探索
- 5.1.3. 結果

第2節 高血圧自然発症モデルラット（SHR）におけるサルナシの血圧降下作用

- 5.2.1. 方法
- 5.2.2. 結果

- 5.3. 考察
- 5.4. 小括

総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・93

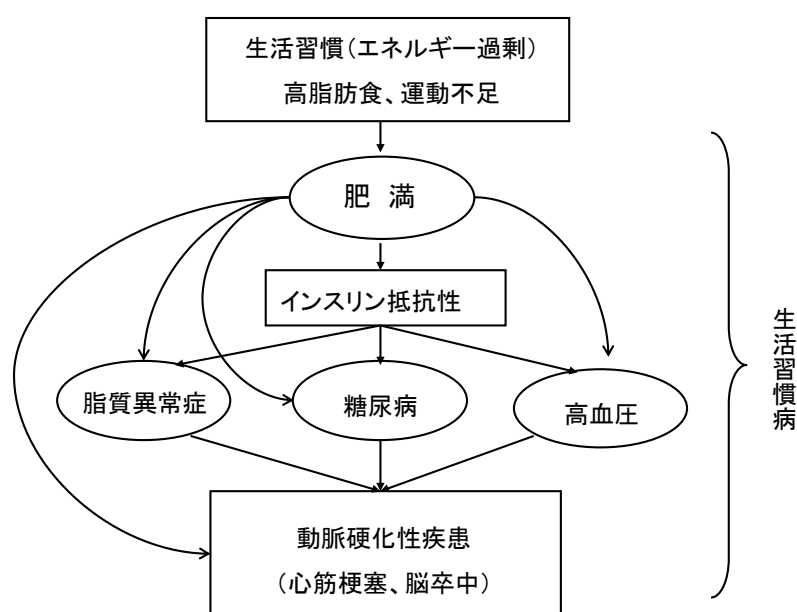
参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・97

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・107

## 序 論

糖尿病，脂質異常症，高血圧，肥満症は代表的な生活習慣病であり、食習慣、運動習慣、喫煙、飲酒などの生活習慣がその発症・進行に関与する。また、これらの病態は一個人に重積して起こりやすく、重積すると動脈硬化症を発症するリスクが非常に高くなることから、メタボリックシンドロームとして問題となっている。

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与することが明らかになっており、肥満がメタボリックシンドロームの発症基盤と考えられ、その下流にインスリン抵抗性が存在する。



概略図．メタボリックシンドロームの病態

上記の概略図に示したとおり、肥満によって生じたインスリン抵抗性により、糖尿病、脂質異常症、高血圧が生じ、これらが動脈硬化症の発症・進展に大きく関わっている。肥満つまり内臓脂肪が蓄積することは白色脂肪細胞が肥大化し、アディポサイトカインと呼ばれる各種の生理活性物質や遊離脂肪酸（FFA）を分泌することが明らかになってきた<sup>1)</sup>。アディポサイトカインである TNF- $\alpha$  (Tumor

necrosis factor  $\alpha$ ) や IL-6 (Interleukin-6) などの炎症性サイトカインや MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) などのケモカインの分泌が増加し、インスリン抵抗性を発症させるとともに脂肪組織の炎症を誘導する。FFA やレジスチンも肝臓などのインスリン感受性臓器のインスリン抵抗性を誘導する。一方、アディポネクチンの分泌は、インスリン抵抗性や動脈硬化症の発症を予防する<sup>2)</sup>。

最近では、肥満がインスリン抵抗性を介さずに高血圧などの各病態と動脈硬化症の発症・進展に直接関わっている可能性が明らかになってきた。脂肪細胞から分泌される悪玉アディポサイトカインである PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) は血栓形成に関わり、レプチンは高血圧に関与する<sup>3)</sup>。

平成 20 年 国民健康・栄養調査によると、40-74 歳でメタボリックシンドロームが強く疑われる者が男性 27.0%、女性 11.9%だった。また、予備軍と考えられる者が男性 24.5%、女性 8.1%だった。男性に関しては合わせて 51.5%もの人がメタボリックシンドロームの危険があり、2 人に 1 人が肥満の恐れがある。平成 19 年 国民健康・栄養調査によると、40-74 歳でメタボリックシンドロームまたはその予備軍に該当するのは、約 2,010 万人だった。また、糖尿病あるいはその予備軍と推定される人は約 2,210 万人、平成 18 年 国民健康・栄養調査によると糖尿病の疑われる人は約 1,870 万人、高血圧症の疑われる人は約 5,490 万人だった。

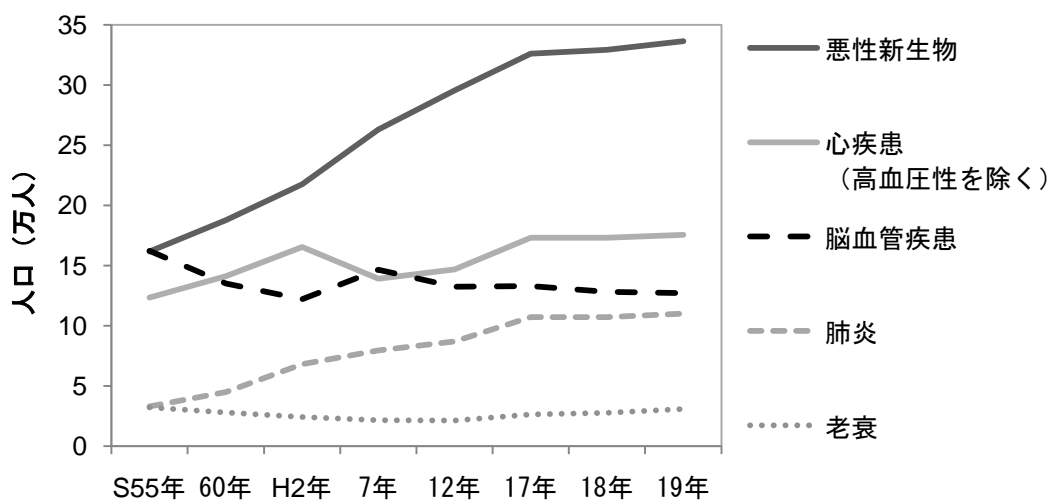


図 主要死因別死亡者数

(総務省 統計局 グラフでみる日本の統計より)

上記の図に示すとおり生活習慣病が直接の死因となるわけではないが、生活習慣病つまりメタボリックシンドロームが、死因 2 位と 3 位の心疾患や脳血管疾患の発症リスクを高めている。また、悪性新生物も生活習慣病の一つである。これらのことから、生活習慣病が原因となる死亡割合は全体の 60%となる。さらに医療費の約 30%を生活習慣病が占めており、このまま罹患者が増大すれば、人々の健康被害だけでなく、医療費の負担も増大する。以上のことから、生活習慣病を予防・改善することは重要な課題であり、日常から予防することが大切である。そこで、日常手軽に摂取できる食品に機能性を見出し、より効率的かつ効果的に予防する食品開発が期待されている。厚生労働省が認可する特定保健用食品を含む機能性食品の市場は年々増大しており、2015 年には 5 兆円の巨大市場になることが予想されている。

特に機能性成分として、ポリフェノールはその多彩な機能に注目を浴びている。ポリフェノールはあらゆる植物に含まれており、病原菌や植物などが生長過程で遭遇する外的ストレスから生物自身を守るために存在する重要な色素である。8,000 種類以上のポリフェノールが存在すると言われ<sup>4)</sup>、抗酸化、抗菌剤、抗アレルギー、抗ウイルス、抗腫瘍作用、脂質上昇抑制、血糖値上昇抑制、血圧降下、抗動脈硬化などさまざまな機能性が見出されている<sup>5-13)</sup>。最近では、赤ワインに含まれるレスベラトロールが長寿遺伝子サーチュインのアクティベーターとして発見され<sup>14, 15)</sup>、また食品のもつ新たな一面が明らかとなった。

そこで本研究では、サルナシ (*Actinidia arguta*) 果実に注目した。サルナシは日本全土、朝鮮半島、中国の中山間地域に原生分布するマタタビ科、マタタビ属のつる性落葉植物である。サルナシの名は、果実がナシに似ており、サルが好んで食べることにちなんであり、地域によって、コクワ、コクワヅル、シラクチカズラ、シラクチヅルとも呼ばれている。貝原益軒著書の大和本草 (1708) には「味甘シ食スヘシ小兒好ンテ食フ」という記述があり、サルナシが約 300 年前より食されていることがわかる<sup>16)</sup>。もともとは自生種なので山で収穫し、生食や果実酒にして食されていたが、近年、町おこしの一環として栽培されるようになってきた。特に山形県西川町と飯豊町では、活発に栽培されている。サルナシの栽培と

生産量に関する調査は1995年に農林水産省が行ったデータのみであるが、当時、山形県は日本一の栽培県であった。現在では、岩手県軽米町や福島県玉川村でもサルナシの商品が販売され、栽培が行われている。流通形態としては、ジュース、ワイン、ジャム等の加工品がほとんどである。

サルナシ果実の成分は下記に示したとおりである。同じマタタビ科のキウイフルーツと比較すると、いくつかのビタミン、ミネラル類はサルナシの方に多く含まれていることが分かる。特に、ビタミン類が豊富に含まれ、ビタミンCに関しては、キウイフルーツの約2.5倍含まれている。五訂食品成分表<sup>17)</sup>に記載されている果実と比べると、ビタミンC豊富な果実として知られるアセロラが果実100gあたり1700mg、グアバが220mgで、その次がサルナシの180mgだった。レモンのビタミンCは100mgとなっている。ビタミンEはキウイフルーツの約3.5倍量含まれ、果実の中で最も多い量となっている。以上のことから、サルナシは豊富なビタミン源であると考えられる。また、マタタビ科の果実間のビタミンC含量を比較した報告もあり、その中でもサルナシの品種のビタミンC含量が高い<sup>18)</sup>。

表. サルナシとキウイフルーツ果実の成分比較

成分 (/100g)	サルナシ <sup>1)</sup>	キウイ フルーツ <sup>2)</sup>
カルシウム (mg)	41	33
リン (mg)	49	32
カリウム (mg)	320	290
β-カロテン当量 (μg)	230	66
ビタミン B <sub>2</sub> (mg)	0.03	0.02
ビタミン C (mg)	180	69
ビタミン E (mg)	4.6	1.3
食物繊維 (g)	2.2	2.5

<sup>1)</sup> 飯豊町コクワ生産組合より提供 (日本冷凍食品検査協会分析)

<sup>2)</sup> 五訂食品成分表<sup>14)</sup> 参照

これまで、サルナシの食品化学的機能、生理機能に関する報告は少ないが、サルナシ果実抽出エキス PG102 による抗アレルギー作用、抗炎症作用<sup>19, 20)</sup>、サルナシ根茎中の(+)-カテキンと(-)-エピカテキンによる骨髄細胞増殖促進作用<sup>21)</sup>、ウルソール酸による *in vitro* での膵リパーゼ阻害作用<sup>22, 23)</sup>、ラクタム結合フラバノールによる糖化最終産物の形成阻害作用<sup>24)</sup>などが明らかにされている。しかしながら、サルナシポリフェノール画分、カテキン類以外の個々ポリフェノールに注目し、それぞれの特徴と生理機能との関連に関する研究は少ない。本研究は、サルナシポリフェノール画分に含まれる主要なポリフェノールの肥満、糖尿病、高血圧に対する効果に焦点をあて、その作用機序の解明を含めて明らかにすることを目的として行った。



# 第 1 章 サルナシ果実の特性

## 緒 言

サルナシ (*Actinidia arguta*) の成分に関する報告は少ない。そこで、サルナシの特性を明らかにする目的で、本章では、ポリフェノール成分とアミノ酸の分析を行った。また、ポリフェノールの抗酸化能力を DPPH ラジカル消去活性で評価した。

## 第 1 節 サルナシ中のポリフェノール成分の分析

### 1.1. サルナシポリフェノールの抽出と分析方法

サルナシを熱 MeOH で抽出し、ろ過後濃縮した。CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 2 になるように調製し、振とう抽出することで脂質を除去した。上層 (MeOH + H<sub>2</sub>O) は濃縮後、EtOAc で振とう抽出し、EtOAc 層を分析に用いた。分析には、HPLC-DAD (株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本) を用いた。HPLC 分析条件は、カラムは Develosil C30-UG-5 (4.6 × 250 mm i.d., 野村科学株式会社, 愛知, 日本) を用いた。流速は 0.8 ml/ml、展開は 5%アセトニトリル/1%酢酸 (A) と 40%アセトニトリル (B) を使い、0-180 分で B が 100%になるような直線勾配で行った。検出はフォトダイオードアレイ (DAD) により行った。既知成分の HPLC 上での保持時間および UV スペクトルと各ピークのそれらを比較し、各ピークの構造の推定を行った。また、LC/MS (Xevo QTof MS; Waters Co., Milford, USA) を用いて含まれる主要成分の質量分析を行った。LC/MS 分析条件は、カラムは ODS を使い、0.1%ギ酸 (A) と 0.1%ギ酸/アセトニトリルの直線勾配によって展開した。

## 第 2 節 サルナシの総ポリフェノール量と DPPH ラジカル消去活性

### 1.2.1. 総ポリフェノール量の定量方法

試料にはサルナシと、比較として同じマタタビ科の果実である緑色果肉キウイフルーツ (*Actinidia deliciosa*) と黄色果肉キウイフルーツ (*Actinidia chinensis*)

を用いた。各果実 50 g を MeOH 200 ml で粉碎後、30 分間煮沸抽出した。その後、遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) により、上清を得た。さらに残渣を MeOH で再抽出し、得られた上清を先に得られた上清と合わせて、MeOH で 500 ml にメスアップしたものを MeOH 抽出液 (100 mg/ml) とした。分析には、5 倍、10 倍、50 倍に希釈して用いた。総ポリフェノールの定量は Folin-Denis 法<sup>25)</sup>により定量し、検量線はクロロゲン酸を用いて作成した。測定方法は、各 MeOH 抽出液 1 ml と Folin 試薬 (タングステン酸ナトリウム・2 水和物 100 g、リンモリブデン酸 20 g、リン酸 50 ml/L) 1 ml を混合した後、3 分間室温で放置した。その後、10%炭酸ナトリウム溶液 1 ml 加え、30 分間室温で放置した後、700 nm における吸光度を測定した。検量線より総ポリフェノール量を算出した。

### 1.2.2. DPPH ラジカル消去活性の測定方法<sup>26)</sup>

400  $\mu$ M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)溶液と 200 mM MES buffer (pH 6.0)と 20% EtOH (もしくは 50% EtOH)を 1 : 1 : 1 に混合した。その混液を 0.9 ml ずつ試験管に分注し、80% EtOH(もしくは 50% EtOH)を各試験管に b  $\mu$ l (300、270、240、180、120、60  $\mu$ l)ずつ加えた。次に、分析試料 a  $\mu$ l (0、30、60、120、180、240  $\mu$ l)を 30 秒おきに順に加え、よく混合した。なお、分析試料は 1.2.1.で調製した MeOH 抽出液を使用した。また、Trolox についても a  $\mu$ l (0、30、60、90、120、150  $\mu$ l)を順に加えた。分析試料を加えてから 20 分後に 520 nm の吸光度を順次測定した。Trolox の吸光度を用いて検量線を作成し、サンプルあたりの DPPH ラジカル消去能を Trolox 相当量として求めた。

## 第 3 節 サルナシ中のアミノ酸成分の分析

### 1.3. 方法

サルナシ果実に 80%EtOH となるように EtOH を加え、1 時間煮沸抽出した。その後、CHCl<sub>3</sub> : EtOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 2 になるように調製し、振とう抽出することで脂質を除去した。上層 (EtOH + H<sub>2</sub>O) は濃縮後、蒸留水に溶解した。その後、Dowex 50W-X8 (室町化学工業株式会社, 東京, 日本) カラムに供し、アミノ基をもつ成分を吸着させた後、蒸留水で十分に洗浄した。2N NH<sub>4</sub>OH で溶出し、

濃縮乾固後、0.1N HCl で溶解後、フィルター濾過し、アミノ酸分析（日立高速アミノ酸分析計；株式会社日立ハイテクノロジーズ，東京，日本）を行った。

#### 1.4. 結果

##### サルナシ果実中の総ポリフェノール量と DPPH ラジカル消去活性

サルナシ果実の総ポリフェノール量と DPPH ラジカル消去活性を Fig. 1-1 に示した。その際、同じマタタビ科のキウイフルーツ 2 種類と比較した。

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。

##### サルナシ果実中のポリフェノール成分

サルナシ果実を熱 MeOH 抽出し、脂質を除去した後、酢酸エチルで分配した酢酸エチル層を HPLC-DAD (280nm) で分析した結果を Fig. 1-2 に示した。既知成分と同一条件下で分析し、保持時間を比較するとともに UV スペクトルの比較も行い、成分の同定を行った。その結果、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。HPLC クロマト上ではルチンが検出されなかったが、LC/MS で分析したところ、ルチンと同じ精密質量数を持つピークが観測された。保持時間も既知化合物と同じことからルチンと同定された。ハイペロサイドとイソケルシトリンの存在は LC/MS による精密質量の測定においても再度確認された (Table 1)。

また、ハイペロサイドとイソケルシトリンは、サルナシ果実 100 g 中に各々  $0.73 \pm 0.18$ 、 $2.37 \pm 1.12$  mg 含まれていた。

##### サルナシ果実に含まれるアミノ酸

アミノ酸分析結果を Fig.1-3 に示した。サルナシには、グルタミン、アラニン、

GABA が多く含まれることが明らかとなった。また、ニコチアナミンも微量ではあるが含まれていた。サルナシ果実 100 g あたり GABA は 5.3 mg 含まれており、ニコチアナミンは 0.49 mg 含まれていた。

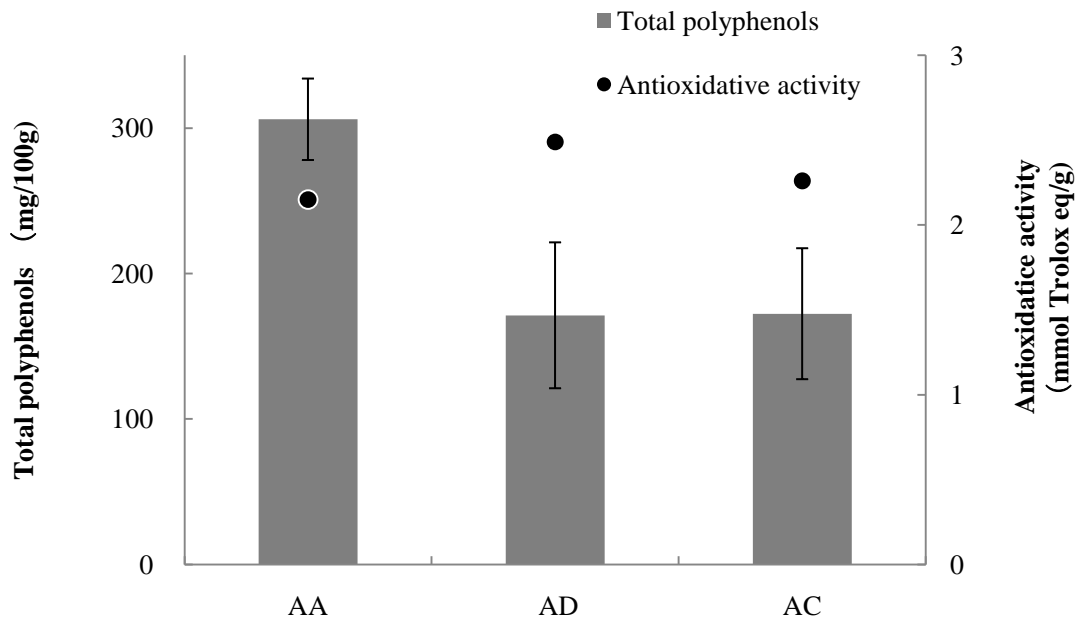


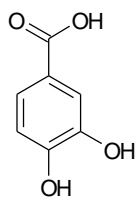
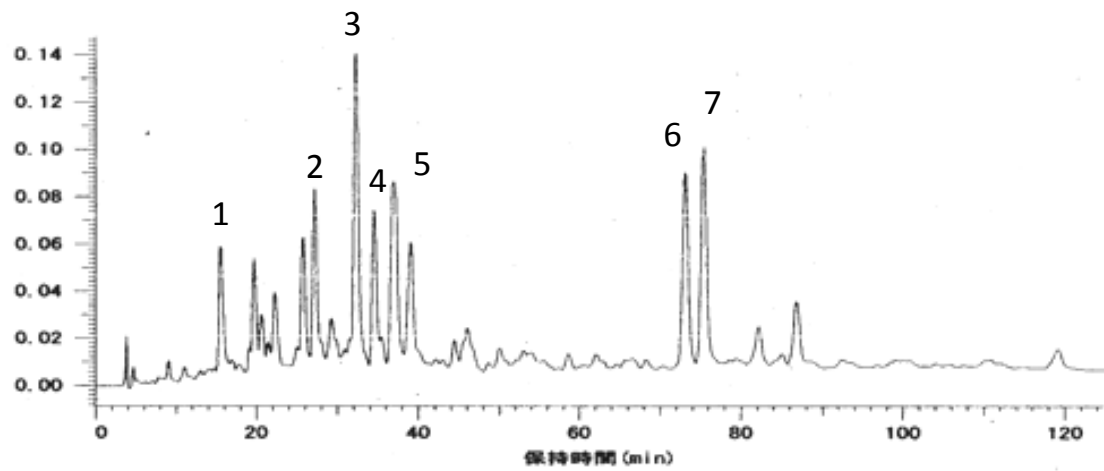
Fig. 1-1. Total polyphenols content and antioxidative activity of *Actinidia* species.

AA: *Actinidia arguta*

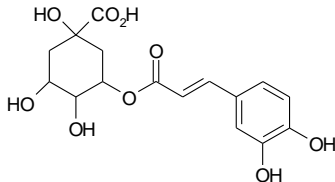
AD: *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit)

AC: *Actinidia chinensis* (ZESPRI GOLD Kiwifruit)

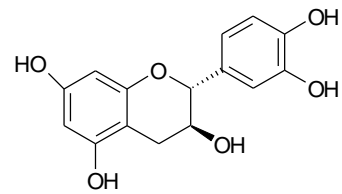
Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM



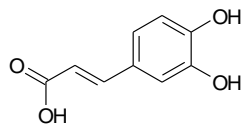
1. Protocatechuic acid



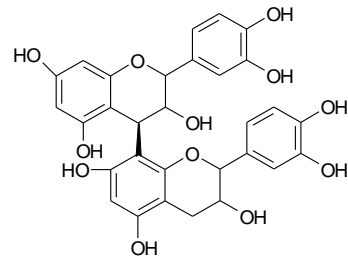
2. Chlorogenic acid



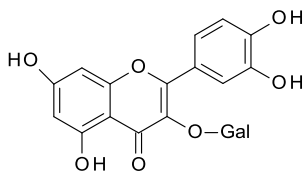
3. (+) Catechin



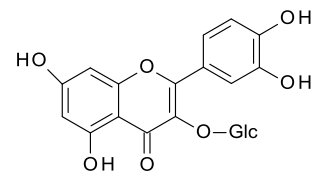
4. Caffeic acid



5. Procyanidin B2



6. Hyperoside



7. Isoquercitrin

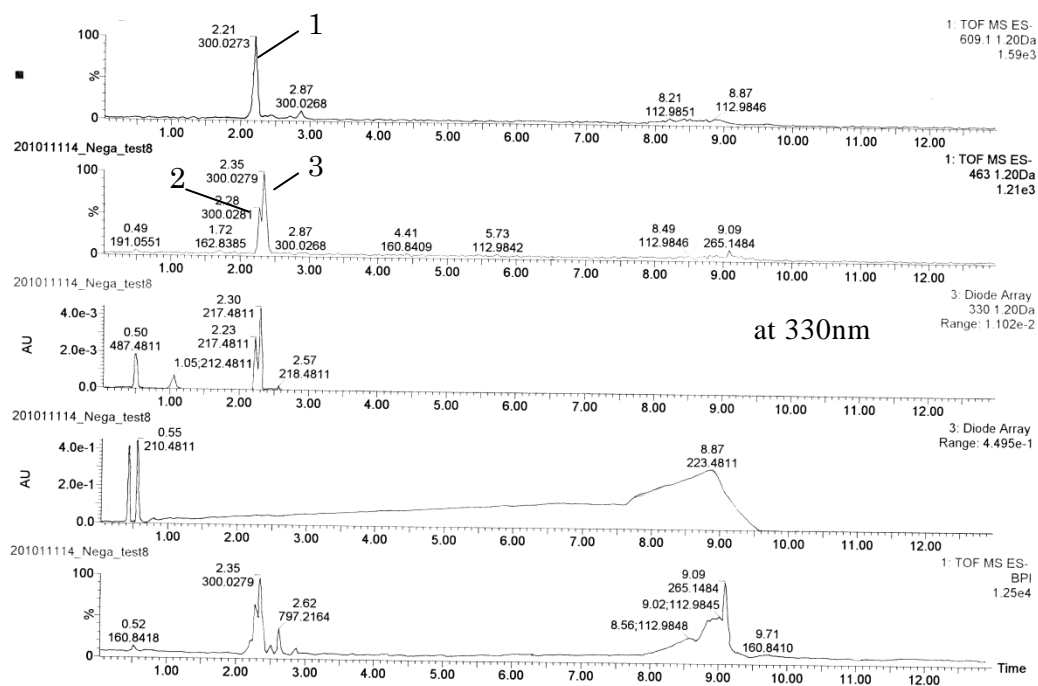
Fig. 1-2. HPLC chromatogram of *Actinidia arguta* polyphenols and the chemical structures.

Column, Develosil C-30-UG-5 (4.6 × 250 mm); Solvent A, 5% MeCN/1% AcOH; Solvent B, 40% MeCN. Program: A linear gradient of 0-100% of B in A over the course of 180 min at a flow rate of 0.8 ml/min. Detection, 280 nm.

Table 1. Molecular weights of components corresponding to each peak.

		[M-H] <sup>-</sup>		
		Measured m/z	Calc. mass	Formula
Peak 3	Hyperoside	463.0898	463.0877	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>
Peak 2	Isoquercitrin	463.0887	463.0877	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>
Peak 1	Rutin	609.1458	609.1456	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>

Molecularweight was measured by LC/MS.



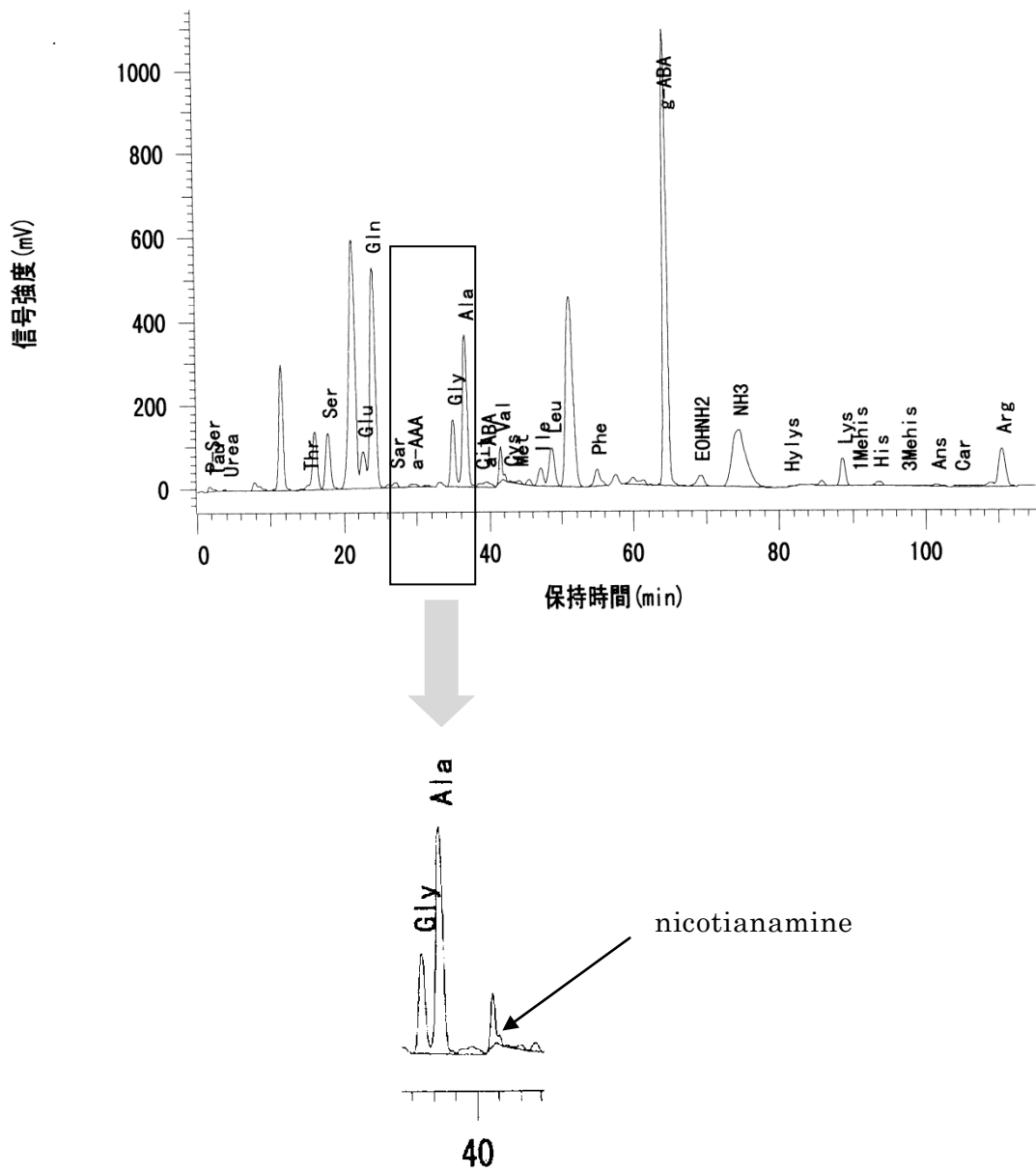


Fig. 1-3. Chromatogram of amino acids contained in *Actinidia arguta*.

Amino acids were analyzed by amino acid analyzer (Hitachi High-technologies Co.). Li<sup>+</sup>-type column and detection by ninhidrin method were used.



## 1.5. 考察

サルナシの総ポリフェノール量は、緑色果肉キウイフルーツ（AD）と黄色果肉キウイフルーツ（AC）に比べて約2倍量含まれていたが、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。このことから、サルナシとキウイフルーツにおける抗酸化成分の組成の違いが考えられた。キウイフルーツには、サルナシに比べ強い抗酸化作用を示す成分が含まれていることが推察された。

サルナシには、豊富なポリフェノールが含まれていることが明らかとなった。桂皮酸類、カテキン類、フラボノイド類と多様なポリフェノールから構成されていた。これまで、サルナシに含まれるポリフェノールとしては、(+)カテキン、クロロゲン酸、(-)エピカテキン、コーヒー酸、クマル酸、ルチン、ケルセチンが報告されている<sup>27)</sup>。本実験においても、結果は示していないが、(-)エピカテキンとケルセチンが含まれることを確認している。ルチンに関しては、極微量であり、かつHPLCのスペクトルパターンをみると、ハイペロサイドとルチンのピークはほぼ重なって観察されたため、ハイペロサイドのピークをルチンと間違えてしまうこともあるかもしれない。また、サルナシの品種や栽培地域によっても成分に違いがあると推察されるため、本実験で用いたサルナシにはルチンが極微量しか検出されなかった可能性も考えられる。ケルセチン、カテキン類には、様々な生理機能が見出されており、特に、糖・脂質代謝改善作用や抗酸化作用などの報告がある<sup>28, 29)</sup>。

アミノ酸に関しては、特にGABAが多く含まれていた。GABAには、血圧降下作用<sup>30)</sup>や抗不安作用<sup>31)</sup>が知られており、また、血圧降下作用を示すニコチアミン<sup>32)</sup>も微量ではあるが含まれていた。そのため、サルナシ果実には血圧降下作用が期待された。

## 1.6. 小括

サルナシ (*Actinidia arguta*) の成分に関する報告は少ない。そこで、サルナシの特性を明らかにする目的で、本章では、ポリフェノール成分と遊離アミノ酸の分析を行った。また、ポリフェノール画分の抗酸化能力を DPPH ラジカル消去活性で評価した。

サルナシ中の総ポリフェノール量はクロロゲン酸量として約 0.3%含まれており、同じマタタビ科のキウイフルーツの約 2 倍量だった。抗酸化能力はキウイフルーツと同程度だった。ポリフェノール成分として、プロトカテキユ酸、クロロゲン酸、(+) カテキン ( $1.35 \pm 0.71$  mg / 100g)、コーヒー酸、プロシアニジン B2 ( $2.10 \pm 0.66$  mg / 100g)、ハイペロサイド ( $0.73 \pm 0.18$  mg / 100g)、イソケルシトリン ( $2.37 \pm 1.12$  mg / 100g) が含まれていることが明らかとなった。これまでに、(+) カテキン、クロロゲン酸、(-) エピカテキン、コーヒー酸、クマル酸、ルチン、ケルセチンの含まれていることが報告されており<sup>27)</sup>、本研究では、新たにプロトカテキユ酸、プロシアニジン B2、ハイペロサイド、イソケルシトリンがサルナシに含まれることが明らかにされた。

サルナシ中のアミノ酸に関する報告はなく、本研究で GABA を多く含むこと ( $5.3$  mg/100 g)、強力な血圧降下作用を有するニコチアナミン ( $0.49$  mg/100 g) が微量に含まれていることが明らかとなった。

## 第2章 サルナシポリフェノール画分がラットまたはマウスの糖・脂質吸収に及ぼす影響

### 緒言

糖尿病の予防または治療の一つに食後高血糖の抑制がある。食事からの糖の吸収を抑制または遅延させることで、血糖値の急上昇を抑え、さらにインスリン分泌を緩慢にすることで糖尿病の発症や悪化を防ぐ。食後高血糖を抑制するために、臨床においてはアカルボースやボグリボースなどの $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬<sup>33-35)</sup>が用いられており、耐糖能異常者に対してボグリボースを48週間服用させたところ、2型糖尿病の発症を40.5%抑制したという報告がある<sup>36)</sup>。食品ではグァバ葉ポリフェノールやヤーコンポリフェノールに $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用が見出されている<sup>37-39)</sup>。また、糖の吸収抑制は、脂質合成の抑制にも関与し、肥満予防にも繋がる。

肥満は、糖や脂質の吸収を抑制することで予防可能なことが指摘されている。ウーロン茶重合ポリフェノール<sup>40, 41)</sup>やサポニン<sup>42, 43)</sup>は、膵リパーゼ阻害作用を介して脂質の吸収を抑制することがマウスやラットで確認されている。このような研究成果を背景に、糖や脂質の吸収を緩和する食品には肥満予防の点から大きな期待が寄せられている。そこで、本章では、サルナシポリフェノール画分の糖と脂質吸収に及ぼす影響を検討した。

### 第1節 糖質または脂質の吸収阻害試験 (*in vivo*)

#### 2.1.1. 糖質の吸収阻害試験方法

##### 1) 試料調製

サルナシ果実に MeOH を加え、煮沸抽出し、ろ過後濃縮した。CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 2 になるように調製し、振とう抽出することで脂質を除去した。上層 (MeOH + H<sub>2</sub>O) は濃縮後、DIAION HP-20 (三菱化学株式会社, 東京, 日本) カラムクロマトグラフィーに供した後、水で十分に洗浄し、その後 MeOH で溶出し、サルナシポリフェノール画分 (AP) を得た。濃縮後、凍結乾燥により粉末化した。

## 2) 実験方法

7週齢のSD雄性ラット（日本クレア，東京，日本）を1週間予備飼育し16時間絶食後、空腹時血糖値が同等になるように各群6匹ずつ群分けした。

対照群には水を、サルナシポリフェノール画分投与（AP）群にはサルナシポリフェノール粉末（0.2g/kg BW）を蒸留水1mlに懸濁したものをそれぞれ経口投与した。5分後に1g/kg BWとなるように調製した可溶性デンプン、マルトースまたはグルコース溶液1mlを経口投与した。投与前、投与後30分、60分、90分、120分に尾静脈から採血し、グルテストセンサー（三和化学研究所，愛知，日本）を用いて血糖値の測定を行った。

### 2.1.2. 脂質の吸収阻害試験方法

#### 1) 試料調製

2.1.1.と同様の方法でサルナシポリフェノール画分を得た。

#### 2) 実験方法

5週齢のICR雄性マウス（日本クレア，東京，日本）を16時間絶食後、平均体重が同等になるように対照群とサルナシポリフェノール群の2群に分けた。

対照群（n=10）にはコーン油（5ml/kg BW）と蒸留水（0.1ml）を、サルナシポリフェノール投与（AP）群（n=11）にはコーン油（5ml/kg BW）とサルナシポリフェノール粉末（0.2g/kg BW）を蒸留水0.1mlに懸濁した溶液を経口投与した。投与前、投与後2、3、4、6時間後に尾静脈からヘマトクリット管を用いて採血し、遠心分離後血清を得た。血清トリグリセライド濃度の測定には、トリグリセライドE-テストワコー（和光純薬工業株式会社，大阪，日本）を用いた。

#### 2.1.3. 結果

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 Fig. 2-1-1 に示した。デン

ブレ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 (Fig. 2-1-1. 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 (Fig.2-1-1. 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 (Fig.2-1-1. 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 Fig.2-1-2 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 (Fig.2-1-2. A)。そこで、Fig.2-1-2. 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 (Fig.2-1-2. 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。

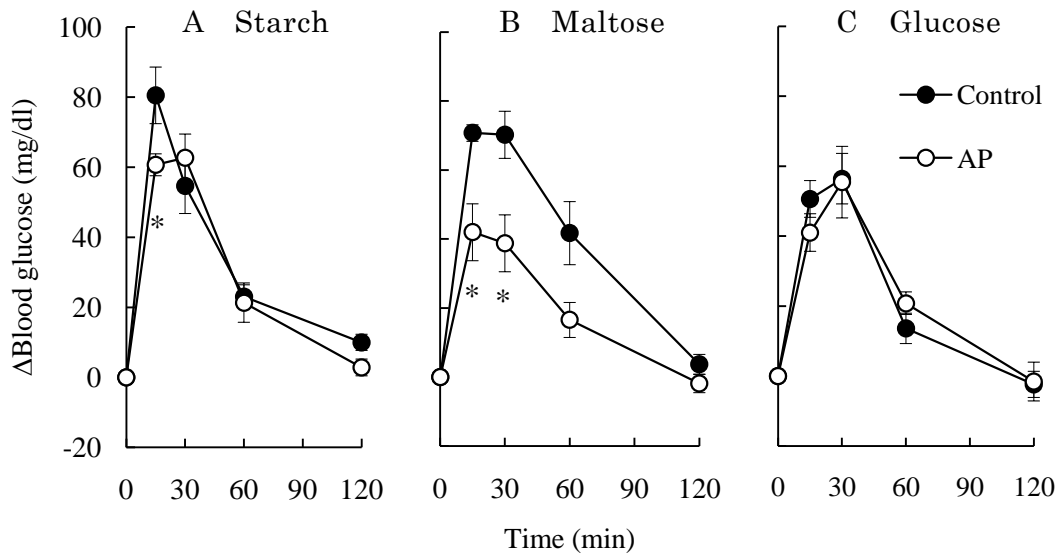


Fig. 2-1-1. Effects of the co-administration of *Actinidia arguta* polyphenols fraction (AP) with sugars on the postprandial blood glucose level in rats.

Eight week-old male SD rats were orally administered with starch (A), maltose (B) or glucose (c) at 1 g/kg of body weight, and distilled water or AP at 0.2 g/kg of body weight. The blood glucose level was measured at 0, 15, 30, 60 and 120 min after the sugar was administrated. Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6). \*Significantly different from the Control at each time-point ( $p < 0.05$ ).

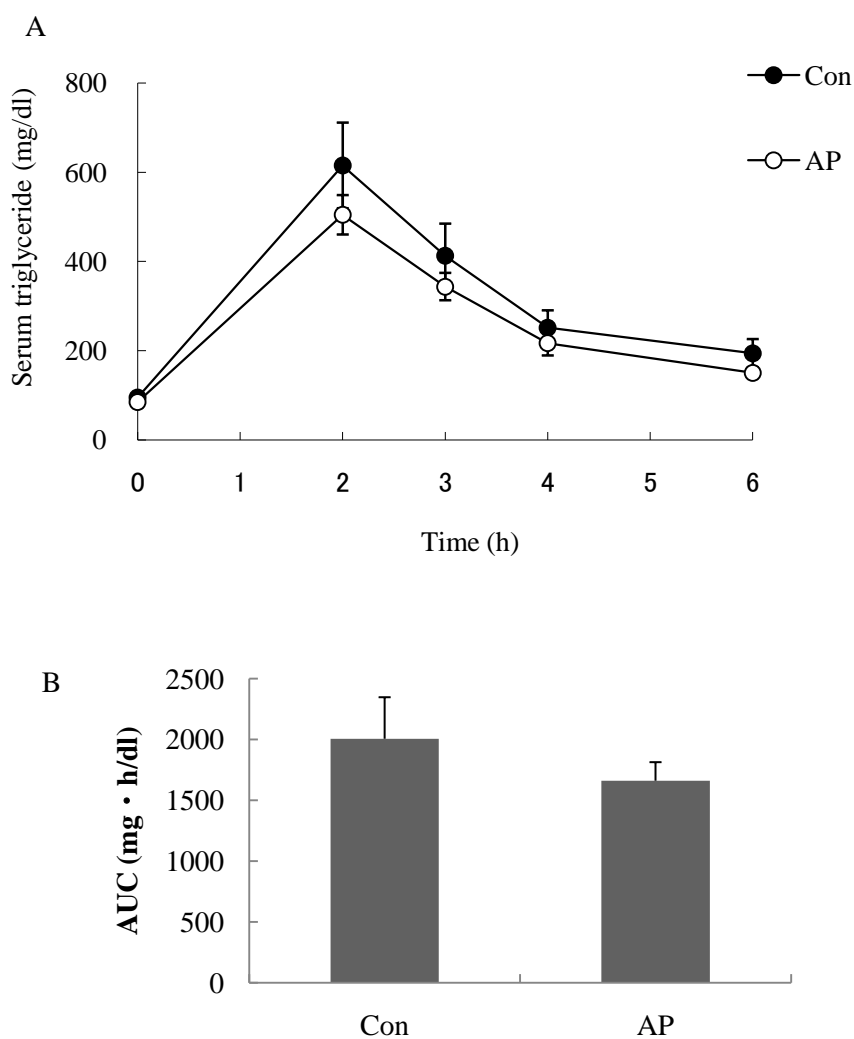


Fig. 2-1-2. Effects of the *Actinidia arguta* polyphenols fraction (AP) on mice serum triglyceride level after oral administration of a corn oil.

Five week-old male ICR mice were orally administered with a corn oil at 5 ml/kg of body weight, and distilled water or AP at 0.2 g/kg of body weight. The serum triglyceride level was measured at 0, 2, 3, 4 and 6 h after oral administration of a corn oil (A) and the area under the curve (AUC) (B). Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=10-11).

## 第2節 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害試験 (*in vitro*)

### 2.2.1. サルナシポリフェノール画分の $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害試験

#### 1) 試料および試薬調製

試料はサルナシポリフェノール粉末を 50 mg / ml となるように 2% DMSO 溶液で溶解し、さらに 5、10、25 mg / ml となるように 2% DMSO 溶液で希釈して用いた。対照には 2% DMSO 溶液を用いた。

基質には、2%マルトース溶液または 2%スクロース溶液を用いた。

酵素は、ラット腸管アセトン粉末 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 0.5 g を 0.05 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) 4.5 ml に添加し、ホモジナイズした。遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 4°C) 後、上清を粗酵素液とし、マルターゼ活性の測定では 20 倍希釈溶液を使用し、スクラーゼ活性の測定では原液を用いた。

#### 2) 測定方法

出口らの方法<sup>44)</sup>を改変して行った。基質溶液 0.1 ml に試料を等量添加し、37°C で 5 分間前処理後、粗酵素液を 0.1 ml 加え 37°C で 90 分間反応させた。対照には蒸留水を用いた。95°C で 10 分間加熱し反応を停止させ、5 分間氷冷した。遠心 (3000rpm, 5min, 4°C) 後の上清 0.02 ml を採取し、生成したグルコース量をグルコース CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を用いて測定し、計算式より阻害率 (%) を算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = (\text{Control OD} - \text{Sample OD}) / \text{Control OD} \times 100$$

### 2.2.2. $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害を示す有効成分の探索

#### 1) 試料調製

サルナシポリフェノール溶液 (0.1 g/2 ml 50% EtOH) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーに供し、50% EtOH で展開した後、2 g ずつ分取した。この分取したフラクション溶液を試料とした。対照には 50% EtOH 溶液を用いた。

イソケルシトリン (Extrasynthese, Genay, France) とハイペロサイド (常盤薬品工業株式会社, 大阪, 日本) は 10% DMSO 溶液に溶解し、希釈系列を調製した。対照には 10% DMSO 溶液を用いた。



## 2)測定方法

2.2.1.と同様の方法で、各フラクションのマルターゼ活性阻害率を算出し、阻害率の高いフラクションは、HPLC-DADによるスペクトル分析を行った。分析条件は、第1章1.1.に記載したとおりである。

### 2.2.3. 結果

*in vitro* において、サルナシポリフェノール画分 (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 Fig.2-2-1 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 IC<sub>50</sub> を算出したところ、マルターゼに対する AP の IC<sub>50</sub> は 0.083mg/ml であり、スクラーゼに対する IC<sub>50</sub> 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、強い阻害活性を示す 4 つのフラクション①、②、③、④が得られた (Fig.2-2-2)。そこで、①から④のスペクトル分析を HPLC-DAD を用いて行ったところ、最も強い阻害活性を示した④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。また、②以外はフラボノイドの UV スペクトルを示した (Fig.2-2-3)。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 IC<sub>50</sub> はそれぞれ 0.20 mM、0.11 mM だった (Fig.2-2-4)。

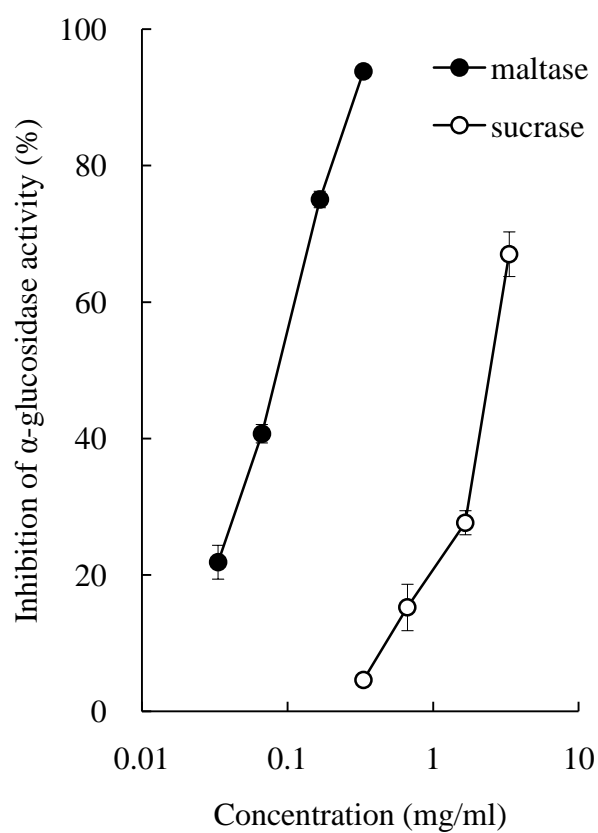


Fig. 2-2-1. Effects of *Actinidia arguta* polyphenols fraction (AP) on maltase and sucrase activities *in vitro*.

The activities of maltase (●) and sucrase (○) were determined over 90 min after the addition of AP to the reaction mixture. The percentage inhibition is defined as that compared with the Control reaction being 100%.

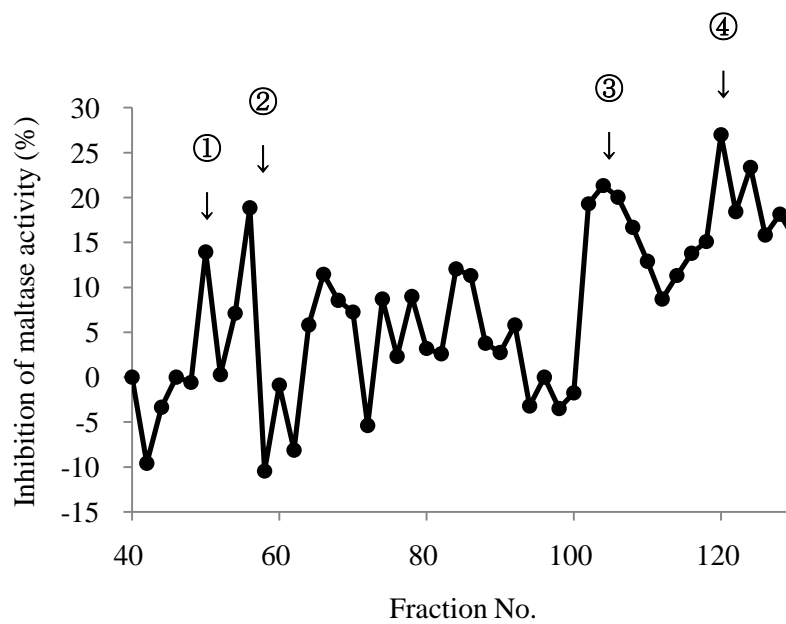
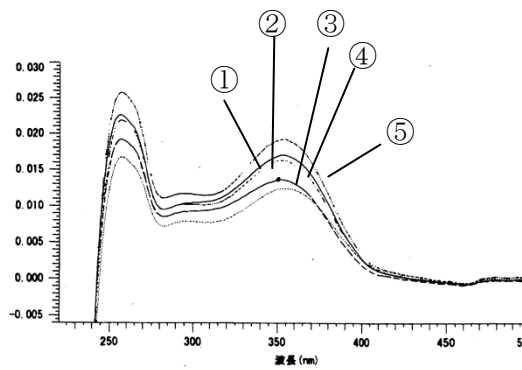
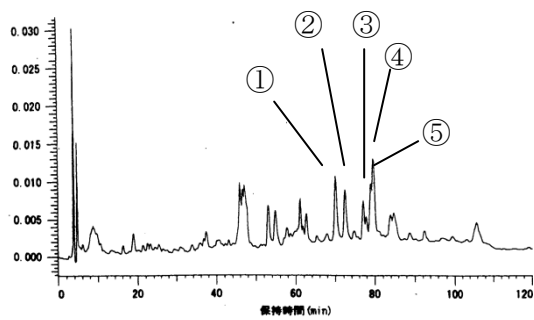


Fig. 2-2-2. Effects of fractionated-AP on maltase activity *in vitro*.

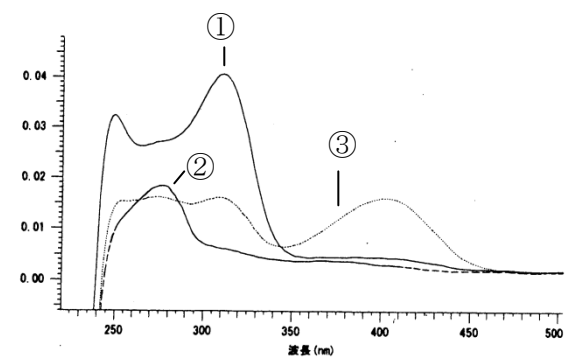
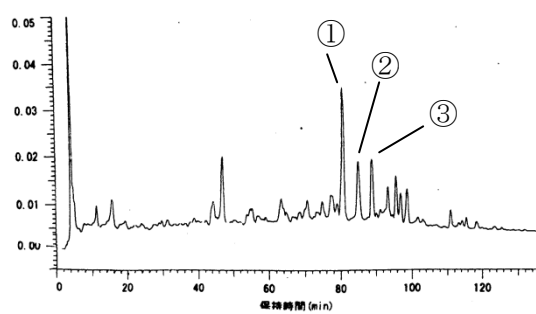
The percentage inhibition is defined as that compared with the control reaction being 100%. The AP was fractionated by Sephadex LH-20 column chromatography using 50% EtOH as eluent.

- ①, ③ : flavonoid
- ② : unidentified
- ④ : Hyperoside and Isoqercitrin

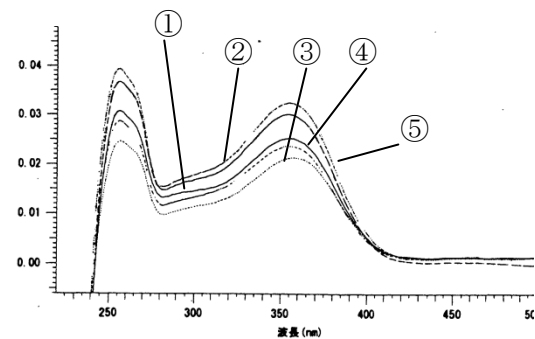
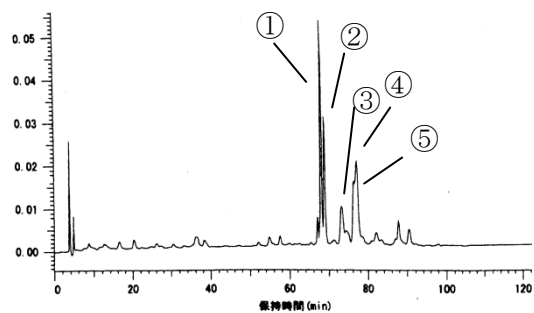
① Fraction No. 50



② Fraction No. 56



③ Fraction No. 104



④ Fraction No. 120

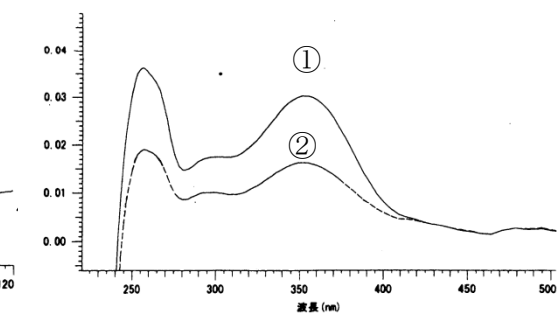
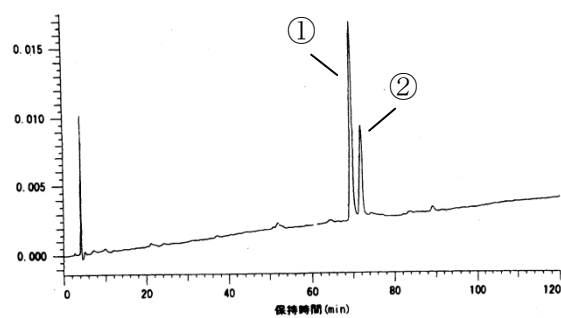


Fig. 2-2-3. HPLC chromatograms and spectrums of the most strong inhibitory activity fractions.

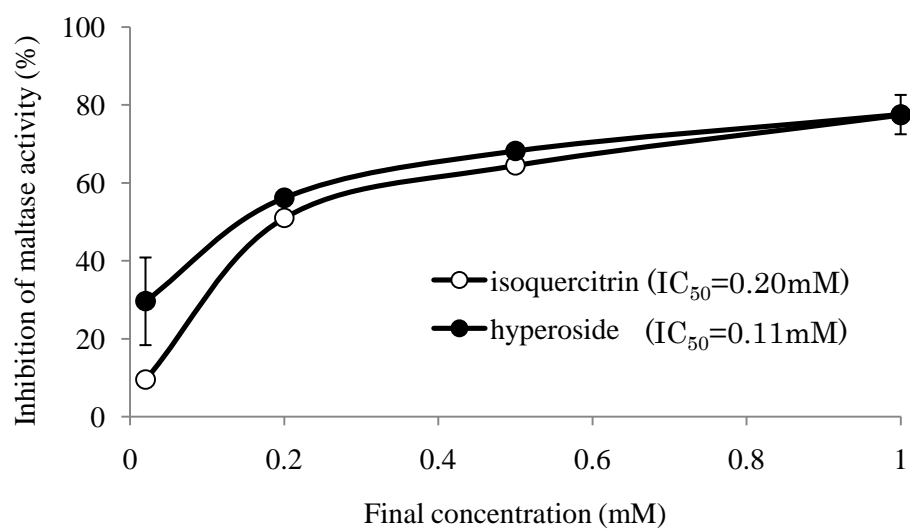


Fig. 2-2-4. Inhibitory activity of isoquercitrin and hyperoside on maltase *in vitro*.

The percentage inhibition is defined as that compared with the control reaction being 100%.

### 2.3. 考察

サルナシポリフェノール画分 (AP) の糖と脂質吸収ならびに食後血糖値上昇に及ぼす影響を消化酵素阻害に注目し検討した。

各種糖質 (デンプン、マルトース、グルコース) と AP をラットに同時投与した結果、デンプンまたはマルトース負荷時の食後血糖値上昇が有意に抑制された。しかし、グルコースと同時に負荷した際は、血糖値の上昇に有意な差がなかったことから、AP の血糖値上昇抑制作用は、小腸でのグルコースの直接的な吸収阻害ではなく、多糖や二糖類の消化酵素を阻害することによる糖の吸収抑制によることが示唆された。そこで、マルトース負荷試験で、血糖値上昇が最も抑制されたので、AP が二糖類消化酵素であるマルターゼとスクラーゼ活性に及ぼす影響を *in vitro* で検討した。その結果、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た。特に、マルターゼ活性阻害作用が強く、その IC<sub>50</sub> は 0.083 mg/ml であった。また、その作用成分を同定するために AP を分画し、マルターゼ活性阻害作用を測定したところ、イソケルシトリンとハイペロサイドを約 80%含む画分が最も強い阻害作用を示した。阻害作用の高い他の画分も②Fraction 56 以外は、全ての画分にフラボノイドが含まれていた。よって、マルターゼ活性阻害には、フラボノイドが大きく関与することが示唆された。また、その二つの成分のマルターゼに対する IC<sub>50</sub> を測定したところ、イソケルシトリンが 0.20 mM、ハイペロサイドが 0.11 mM であった。AP 中には多くの種類のポリフェノールが含まれているが、イソケルシトリンとハイペロサイドはその中でも含量の割合が高い。特に、AP 中の他の成分の含有率が 1%以下 (例えば、(+ )カテキンは 0.31 %) であるのに対して、イソケルシトリンは 2.3 %含まれていた。ハイペロサイドは 0.97 %であった。

グアバ葉、桑葉など様々な植物の抽出液の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用が明らかとなっており、その作用成分にポリフェノールが関与しているという報告が多い<sup>38,45,46</sup>。イソケルシトリンに関する報告は少なく、dayflower (*Commelina communis L.*)から単離されたイソケルシトリンは、強い $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を示す 1-deoxynojirimycin に近い阻害活性を示した<sup>47</sup>。また、イソケルシトリンは、アロキサン誘発 1 型糖尿病ラットにおいて、インスリン合成/分泌と/または G6Pase 活性の低下によって空腹時血糖値を抑制し、糖尿病を改善した<sup>48</sup>。

ストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病マウスでは、イソケルシトリンを主成分とする画分で血糖降下作用が認められた<sup>49)</sup>と報告されている。以上のことから、イソケルシトリンは 1 型糖尿病改善作用を有し、その作用機序として、強い $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用、インスリン分泌能改善、G6Pase の活性阻害と糖新生抑制作用などが推測される。しかし、日本における罹患者の 95%を占める 2 型糖尿病に対するイソケルシトリンの効果については詳細な報告がない。

脂質の吸収抑制に関しては、コーン油とともに AP を投与し、食後の血中中性脂肪上昇に及ぼす作用を検討したが、有意な血中中性脂肪低下作用は見られなかった。しかし、採血のどの時点でも血中中性脂肪値は若干低く、AUC においても低い傾向が見られたので、AP はわずかではあるが脂質の吸収を緩和する効果も有することが示唆された。

AP は脂質の吸収阻害よりも糖質の吸収阻害作用の方が強く、それはマルターゼ活性阻害作用によることが示唆された。また、その作用成分としてイソケルシトリンとハイペロサイドが考えられた。 $\alpha$ -グルコシダーゼ（マルターゼ）と $\alpha$ -アミラーゼのような消化酵素は炭水化物の消化と吸収に重要な役割を果たしており、その阻害は、炭水化物の消化と吸収を阻害することとなり、糖尿病と肥満予防につながることを期待される。このようなことから、AP にも十分、抗糖尿病、抗肥満作用が期待される。

## 2.4. 小括

食後高血糖や肥満の予防の一つは、食事中の糖や脂質の吸収を抑制することで可能なことが指摘されている。そこで、本章では、サルナシポリフェノールの糖と脂質吸収に及ぼす影響について検討した。

各種糖質（デンプン、マルトース、グルコース）とサルナシポリフェノール画分（AP）をラットに同時投与した結果、デンプンまたはマルトース負荷時の食後血糖値上昇が有意に抑制された。しかし、グルコースと同時に負荷した際は、血糖値の上昇に有意な差がなかったことから、APの血糖値上昇抑制作用は、小腸でのグルコースの直接的な吸収阻害ではなく、マルターゼ、スクラーゼ活性を阻害することによる糖の吸収抑制によることが示された。イソケルシトリンとハイペロサイドを約80%含む画分が最も強い阻害作用を示したことから、AP中のマルターゼ活性阻害活性には、イソケルシトリンとハイペロサイドを主としたフラボノイドが大きく関与することが示唆された。さらに、サルナシポリフェノールはわずかではあるが脂質の吸収を緩和する効果も有することが示唆された。

APの $\alpha$ -グルコシダーゼ（マルターゼ）と $\alpha$ -アミラーゼの活性阻害と糖質の吸収阻害から抗糖尿病、抗肥満作用が期待された。



### 第3章 サルナシポリフェノール画分の食餌誘導性肥満モデルマウスにおける抗肥満作用

#### 緒言

糖尿病、脂質異常症、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与す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脂肪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<sup>50-52)</sup>。そのため発症基盤である内臓脂肪蓄積型の肥満を予防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<sup>53)</sup>。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に変化し、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<sup>54-56)</sup>。

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・吸収を抑制することが重要と考えられる。

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血中中性脂肪低下作用、血糖値上昇抑制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、抗肥満作用の機序として $\beta$ 酸化亢進や脂肪酸合成阻害などが明らかとなっている<sup>57, 58)</sup>。

第2章では、サルナシポリフェノールが糖質消化酵素であるマルターゼの活性阻害作用を示すとともに、糖の吸収を阻害し、食後の血糖値上昇を抑制したことから、肥満や糖尿病予防効果が期待された。そこで、本研究ではサルナシに含まれる豊富なポリフェノールに注目し、サルナシポリフェノール画分の食餌誘導性肥満モデルマウスにおける抗肥満作用を検討した。

### 3.1. 方法

#### 1) 実験方法

実験動物は、4週齢の C57BL/6J 雄性マウス（日本クレア，東京，日本）を用いた。飼育条件は、室温  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクル（8:00-20:00）とし、プラスチックケージで個別飼育した。予備飼育期間は市販固形飼料 CE-2（日本クレア，東京，日本）と水を自由摂取させた。1週間予備飼育後、平均体重が同等になるように 4-5 匹ずつ 3 群に分け、95 日間本飼育を行った。飼育期間中、1 週間ごとに体重を、2 日間ごとに飼料摂取量を測定し、飲料水および飼料は自由摂取とした。

実験群は、普通食（LF）群、高脂肪・高ショ糖食（HF）群、高脂肪・高ショ糖食にサルナシポリフェノール粉末を 1% 添加した（HFS）群の 3 群とした。実験終了 3 日前に 2 日分の糞を採取した。実験終了時は 12 時間絶食後、エーテル麻酔下で後大静脈より採血し、各組織（肝臓、腎臓、白色脂肪組織）を摘出した。血液は遠心分離後、血清を得、各臓器とともに分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### 2) 実験飼料

飼料組成を Table 3-1 に示した。LF 群は AIN-93G に準じて作成した基準飼料であり、HF 群には LF 食に牛脂粉末 30% とスクロース 15% を添加し、その量をコーンスターチで補正した高脂肪・高ショ糖食を用いた。HFS 群は HF 食に 1% のサルナシポリフェノール粉末を添加し、その量をコーンスターチで補正した。

Table 3-1. Composition of the experimental diets (%).

	LF	HF	HFS
Casein	20.0	20.0	20.0
Cornstarch	39.8	-	-
$\alpha$ -Cornstarch	13.2	8.0	7.0
Sucrose	10.0	25.0	25.0
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0
Soybean oil	7.0	7.0	7.0
Lard powder	-	30.0	30.0
Mineral mixture (AIN-93G-MX) <sup>a</sup>	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93-VX) <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
<i>A. arguta</i> polyphenols powder	-	-	1.0
Total (%)	100.0	100.0	100.0

<sup>a</sup> AIN-93G-MX and <sup>b</sup>AIN-MX were obtained from Clea Japan, Tokyo, Japan.

### 3) 測定

#### 3-1) 血液

血液は遠心分離（3000rpm、4°C、15分）により血清を得て、分析まで-80°Cで凍結保存した。

血清中の各成分は以下の市販キットを用いて測定した。トリグリセライド、総コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸、グルコース、総胆汁酸（和光純薬株式会社、大阪、日本）、インスリン、レプチン（株式会社シバヤギ、群馬、日本）、アディポネクチン（大塚製薬株式会社、東京、日本）の測定を行った。

#### 3-2) 肝臓脂質

肝臓脂質の抽出は Folch らの方法<sup>59)</sup>に従って行った。肝臓 0.5 g にメタノール 3 ml を加えホモジナイズし、クロロホルム 6 ml を加え、振とうした。その後、ホモジネートを濾紙（TOYO No.2）で濾過し、残渣を共栓付試験管

に再び戻した後クロロホルム：メタノール＝2：1 混液を 11 ml 加え、振とう抽出した。再び濾過し、得られた濾液に 0.88%塩化カリウム溶液を 5 ml 加え、振とう抽出し、上層と下層に分離した後、下層（クロロホルム層）を採取した。上層には、クロロホルム 20 ml を加え、再度振とう抽出し、分離後下層を得た。先の下層と合わせて、減圧下で蒸発乾燥させ、一晚真空下で乾燥後、総脂質重量の測定を行った。得られた脂質はイソプロピルアルコール 1 ml に溶解させ、トリグリセライド、総コレステロール、リン脂質の測定を行った。測定には血中脂質と同様に和光純薬株式会社の測定キットを用いた。

### 3-3) 糞脂質

凍結乾燥し粉碎した糞 0.1 g にエタノール 2 ml を加え、80℃で煮沸抽出した。3000rpm、4℃、10 分間遠心分離して上清を得た。沈殿物には再度エタノール 2 ml を加え、振とう抽出し、遠心分離により上清を得た。この操作をもう一度繰り返し、得られた上清は全て、窒素ガス充填下で蒸発乾固させた。その後一晚真空下で乾燥させ、総脂質重量の測定を行った。得られた脂質はエタノール 2 ml に溶解させ、トリグリセライド、総コレステロール、胆汁酸の測定を行った。測定には和光純薬株式会社の測定キットを用いた。

### 3-4) DNA マイクロアレイによる肝臓の遺伝子発現解析

肝臓は解剖時に摘出後直ちに約 30 mg 切り分け、RNAlater 200  $\mu$ l に浸漬し、4℃で一晩放置後、-80℃で保存した。

DNA マイクロアレイ解析に使用する個体は、各群 3 個体とし、RNA 抽出を行い、網羅的遺伝子発現解析を行った。使用したチップは、クラボウ（倉敷紡績株式会社）社製の GeneSQUARE®生活習慣病研究用マウスで 321 遺伝子が搭載されている。また、DNA マイクロアレイ解析は倉敷紡績株式会社に委託した。

### 3-5) 統計

測定値は平均値±標準誤差で示した。各群間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後に Tukey-Kramer test にて多重比較検定を行った。

$p < 0.05$  を統計学的に有意とし、アルファベットの異なる群間において有意差ありとした。HF 群に対する HFS 群の 2 群間の有意差は Student's *t*-test を用いて検定した。統計処理は、エクセル統計 2008（株式会社社会情報サービス，東京，日本）を用いた。

### 3.2. 結果

#### 体重、摂取量、臓器重量、腹腔内白色脂肪量

Table 3-2 に体重、摂取量、臓器重量、内臓白色脂肪量の結果を示した。また、体重の推移を Fig. 3-1 に示した。HF 群では LF 群に対して、飼育 2 週目から高脂肪食を摂取することで体重が有意に増加した (Fig. 3-1)。体重増加量において、HF 群に対して HFS 群で体重増加が抑制される傾向にあった ( $p = 0.065$ )。HF 群と HFS 群の両群間における摂餌量とエネルギー摂取量に有意差は認められなかった。

肝臓、腎臓ともに、LF 群に対して HF 群で有意に重量が増加し、HF 群に対して HFS 群で、肝臓においては有意に重量が低かったが、腎臓重量は有意な差が認められなかった。腹腔内白色脂肪は、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪の重量を各々測定し合計した。その結果、腎周囲脂肪と精巣周囲脂肪は LF 群に対して、HF 群で有意に重量が増加し、HF 群と HFS 群では有意な差が認められなかった。腸間膜脂肪においては、3 群間に有意差は認められなかった。腹腔内白色脂肪量は、HF 群と HFS 群で有意差は認められなかったが、HFS 群で蓄積が抑制される傾向があった。

#### 血清脂質、血糖値、インスリン、アディポサイトカイン

血清脂質、血糖値、インスリン、アディポサイトカイン濃度の結果を Table 3-3 に示し、血清脂質は Fig. 3-2 にも図示した。血中総コレステロール、遊離脂肪酸量は、LF 群に対し HF 群で有意に上昇した。HF 群に対して HFS 群では、中性脂肪、遊離脂肪酸量が有意に低下した。リン脂質量は 3 群間で有意差は認められなかった。

血糖値は、LF 群に対し HF 群で有意に上昇し、HF 群に対して HFS 群では、

その上昇が有意に抑制された。インスリン値において、LF 群と HF 群間で有意な差は認められなかったが、HFS 群では HF 群に対して有意に上昇した。

アディポサイトカインであるレプチン、アディポネクチン、TNF- $\alpha$ の結果は以下のとおりであった。アディポネクチンは 3 群間で有意な差は認められなかったが、レプチンと TNF- $\alpha$ は、LF 群に対して HF 群で有意に上昇し、TNF- $\alpha$ に関しては、HF 群に対して HFS 群でその上昇が有意に抑制された。レプチンは HFS 群で低値を示す傾向がみられた。

### 肝臓脂質

肝臓脂質量の結果を肝臓 1 g あたりの量として Table 3-4 に示した。総脂質量、中性脂肪量は 3 群間で有意差は認められなかったが、LF 群に対して、HF 群で上昇する傾向がみられた。総コレステロール量とリン脂質においては、LF 群に対して、HF 群で有意に上昇したが、HF 群と HFS 群間に有意な差は認められなかった。

### 糞中脂質

2 日間で排泄された糞量と糞中脂質量を Table 3-5 に示した。糞排泄量ならびに糞中脂質として総脂質量、中性脂肪量、総コレステロール量、総胆汁酸量、全てにおいて 3 群間で有意な差は認められなかった。

### DNA マイクロアレイによる肝臓の網羅的遺伝子発現解析

Table 3-6 に結果を示した。チップに搭載されている糖・脂質代謝関連の 321 遺伝子のうち 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。その結果、HF 群の各遺伝子発現を 1 とした時に、1 遺伝子 (Fabp5) の発現が 1.8 倍上昇し、Ccl2 (0.3 倍)、Cfd (0.4 倍)、Jun (0.5 倍)、Cdk1na (0.5 倍) の 4 遺伝子の発現が抑制された。

Table 3-2. Effects of dietary polyphenols from *A. arguta* on body weight, food intake, organ weight, and abdominal adipose tissue weight.

	LF	HF	HFS
Initial body weight (g)	17.4 ± 0.8	17.2 ± 0.8	17.4 ± 0.6
Final body weight (g)	30.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	40.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	37.3 ± 1.2 <sup>a</sup>
Body weight gain (g)	13.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	23.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	19.9 ± 1.3 <sup>a</sup>
Food intake (g)	356.2 ± 14.7 <sup>b</sup>	291.7 ± 7.8 <sup>a</sup>	285.4 ± 7.2 <sup>a</sup>
Energy intake (kcal)	1478.4 ± 61.0	1648.1 ± 43.8	1612.5 ± 40.9
Organ weight (g)			
Liver	1.03 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.23 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.04 <sup>b</sup>
Kidney	0.40 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.01 <sup>ab</sup>
Abdominal adipose tissue (g)	1.06 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.63 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.24 <sup>a</sup>
Perirenal fat	0.22 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.59 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.06 <sup>a</sup>
Epididymal fat	0.63 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.69 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.18 <sup>a</sup>
Mesenteric fat	0.21 ± 0.06	0.36 ± 0.06	0.26 ± 0.03

Each value is expressed as mean ± SEM (n=5-6). Values without a common letter differ significantly ( $p<0.05$ ).

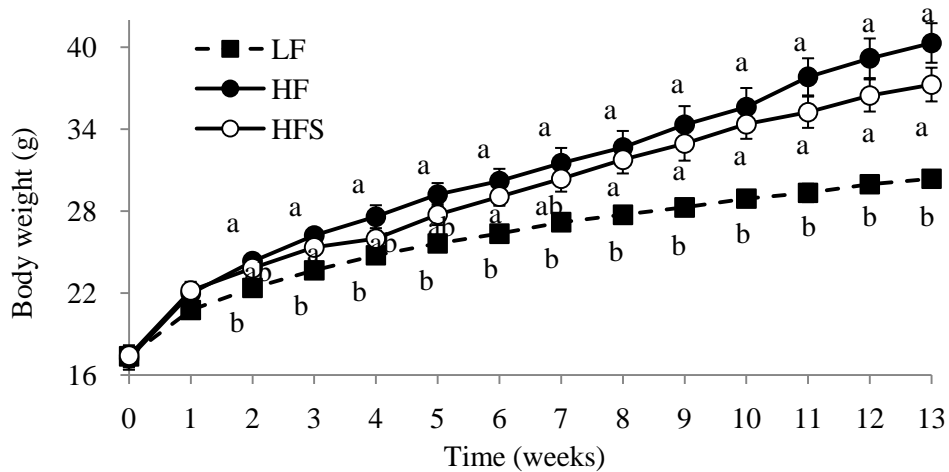


Fig. 3-1. Changes in body weights during feeding periods.

Each value is expressed as mean ± SEM (n=5-6). Values without a common letter differ significantly ( $p<0.05$ ).

Table 3-3. Effects of dietary polyphenols from *A. arguta* on serum lipids, glucose, insulin, and adipocytokines.

	LF	HF	HFS
<b>Serum lipids</b>			
Triglyceride (mg/dl)	62.0 ± 3.3	64.7 ± 2.1	55.4 ± 1.8 *
Total cholesterol (mg/dl)	101.8 ± 3.2 <sup>b</sup>	123.8 ± 4.7 <sup>a</sup>	118.3 ± 5.5 <sup>a</sup>
Phospholipid (mg/dl)	221.5 ± 6.1	237.1 ± 10.0	228.3 ± 10.5
Free fatty acid (mEq/l)	1.22 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>c, *</sup>
Glucose (mg/dl)	102.5 ± 7.1 <sup>b</sup>	141.7 ± 4.7 <sup>a</sup>	118.8 ± 8.4 <sup>a, *</sup>
Insulin (ng/ml)	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.21 ± 0.02 *
<b>Adipocytokines</b>			
Leptin (ng/ml)	5.6 ± 1.0 <sup>b</sup>	19.4 ± 3.8 <sup>a</sup>	14.3 ± 1.9 <sup>ab</sup>
Adiponectin (µg/ml)	26.4 ± 0.3	25.2 ± 1.1	26.9 ± 0.8
TNF-α <sup>1</sup> (pg/ml)	9.1 ± 2.4 <sup>b</sup>	21.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	7.2 ± 1.3 <sup>b, *</sup>

<sup>1</sup>TNF-α ; tumor necrosis factor α

Each value is expressed as mean ± SEM (n=5-6). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , HFS vs. HF by Student's *t*-test.

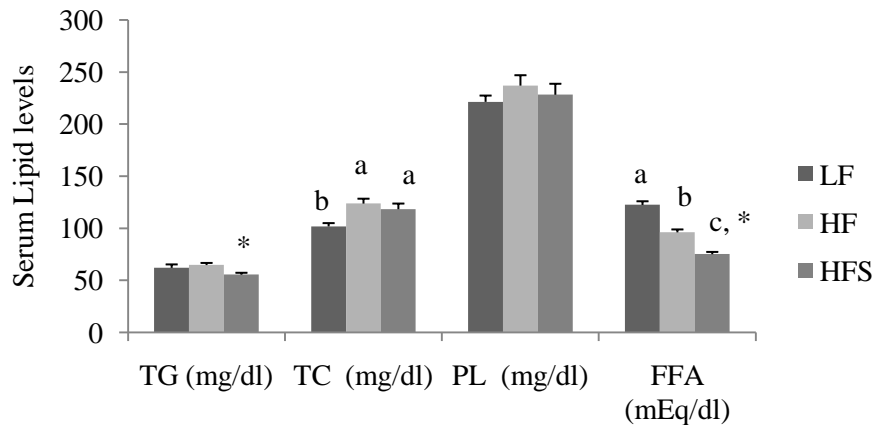


Fig. 3-2. Effects of dietary polyphenols from *A. arguta* on serum lipids.

Each value is expressed as mean ± SEM (n=5-6). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , HFS vs. HF by Student's *t*-test.

TG; Triglyceride, TC; Total cholesterol, PL; Phospholipid, FFA; Free fatty acid.



Table 3-4. Effects of dietary polyphenols from *A. arguta* on liver lipids.

	LF	HF	HFS
Liver lipids (mg/g liver)			
Total lipid	73.6 ± 2.1	111.0 ± 22.0	95.4 ± 8.2
Triglyceride	46.8 ± 4.9	61.9 ± 4.5	60.8 ± 5.6
Total cholesterol	4.5 ± 1.7 <sup>b</sup>	7.0 ± 0.4 <sup>ab</sup>	7.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
Phospholipid	14.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	19.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	18.3 ± 1.4 <sup>ab</sup>

Each value is expressed as mean ± SEM (n=5-6).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 3-5. Effects of dietary polyphenols from *A. arguta* on feces dry weight and feces lipids for 2days.

	LF	HF	HFS
Feces dry weight (g/2 d)	0.44 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.41 ± 0.04
Feces excretion (mg/2 d)			
Total lipid (mg/2 d)	22.9 ± 3.3	33.3 ± 3.0	34.6 ± 2.4
Triglyceride (mg/2 d)	4.9 ± 0.3	5.3 ± 0.6	4.9 ± 0.5
Total cholesterol (mg/2 d)	1.9 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.2 ± 0.2
Total bile acid (μmol/2 d)	0.34 ± 0.14	1.13 ± 0.28	1.45 ± 0.31

Feces were collected for 2 days during experimental period.

Each value is expressed as mean ± SEM (n=5-6).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 3-6. Effects of dietary polyphenols from *A. arguta* on hepatic gene expression assayed by DNA microarray (n=3).

<b>Gene symbol</b>	<b>fold</b>	<b>Description</b>	<b>pathway</b>
Fabp5	1.8	fatty acid binding protein 5-like 1	PPAR signaling pathway
Ccl2	0.3	chemokine (C-C motif) ligand 12, MCP1	Cytokine-cytokine receptor interaction
Cfd	0.4	complement factor D (adipsin)	Complement and coagulation cascades
Jun	0.5	transcription factor AP-1	Regulation of cell cycle
Cdkn1a	0.5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Regulation of cell cycle

Chips with 321 genes was used.

### 3.3. 考察

サルナシポリフェノール画分 (AP) の抗肥満作用を食餌誘導性肥満モデルマウスを用いて検討した。

食餌誘導性肥満モデルマウスに AP を 3 カ月摂取させることにより体重増加が抑制される傾向にあった。HF 群と HFS 群両群間において、摂取量、摂取エネルギー量に有意な差がないことから、体重増加抑制傾向は AP を摂取したことによる効果と推察される。腹腔内白色脂肪量に有意な差は認められなかったが、AP を摂取することで抑制される傾向にあった。また、いわゆる内臓脂肪と呼ばれ、各種アディポサイトカインを分泌している腸間膜脂肪量も抑制される傾向がみられた。

内臓脂肪 (腸間膜脂肪) は、単なるエネルギー貯蔵庫ではなく、様々な生理活性物質であるアディポサイトカインを分泌する<sup>60, 61)</sup>。このアディポサイトカインは、脂肪細胞のサイズによって、分泌される物質が変わってくる。肥満にともなって、脂肪細胞が肥大化すると、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )、IL-6 (Interleukin-6)、MCP-1 (Monocyte chemoattractant Protein 1) や血圧上昇酵素である ACE (Angiotensin-converting enzyme)、血栓溶解阻害物質である PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1) といった悪玉アディポサイトカインが分泌され、抗糖尿病や抗動脈硬化作用を持つ善玉アディポサイトカインであるアディポネクチンの分泌が抑制される。また、遊離脂肪酸 (FFA) も分泌され、TNF- $\alpha$  などと同様にインスリン抵抗性を悪化させる原因の一つとされている。以上のことから、内臓脂肪の蓄積と/または脂肪細胞の肥大化を防止することは、インスリン抵抗性を改善し、肥満や糖尿病、高血圧といった生活習慣病予防になるため、とても重要である。

本実験では、高脂肪・高ショ糖食を摂取させたマウスの体重、内臓脂肪量が有意に増加し、血中の FFA、血糖値、レプチン、TNF- $\alpha$  値も有意に上昇した。このことから、高脂肪・高ショ糖食を摂取することで、肥満となり、内臓脂肪の蓄積から悪玉アディポサイトカインが分泌され、インスリン抵抗性を発症したと考えられる。そのため、肥満にともなう血糖値の上昇も観察された。しかし、AP を摂取させることで、体重増加、内臓脂肪の蓄積抑制傾向の他に、血中の中性脂肪、FFA、血糖値、TNF- $\alpha$  値が有意に抑制された。なお、肝臓脂質や糞脂質排泄量に与える影響は少なかったことから、AP の摂取は肝臓への脂質蓄積抑制にはあまり効果を示さず、食餌由来の脂質の吸収を阻害することによる脂質排泄促進作用も示さないことが推察された。

生活習慣病などの長期的な代謝の制御が必要な場合、遺伝子の発現レベルでの調節が重要となってくる。そこで、AP の効果をさらに明らかにするため、どのような遺伝子の発現が変化しているかを網羅的に検討するために DNA マイクロアレイを用いて、絶食下での肝臓中の遺伝子発現の網羅的解析を行った。今回は、糖・脂質代謝に特化したフォーカスアレイを用いた。搭載された 321 遺伝子中、1.5 倍以上に発現したのは 1 遺伝子 (Fabp5) のみで、0.5 倍以下は 4 遺伝子 (Ccl2、Cfd、Jun、Cdkn1a) であった。Fabp5 (Fatty acid binding protein 5-like 1) は脂肪酸結合蛋白質 (FABP) であり、FFA とその誘導体だけでなくコレステロールエステルや胆汁酸などの細胞内輸送を司ることが知られている。また、細胞膜において受動輸送もしくはトランスポーターによる輸送にて取り込まれた FFA に結合し、細胞内部にシフトさせる拡散機能を有すると考えられている。この機能により、脂肪酸成分の取り込み効率を上げることが想定されている。一方、結合した FFA を核内に運搬し、PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) シグナル経路に関わることが報告されている<sup>62)</sup>。そのため、FABP の発現が上昇すると PPAR $\alpha$  の発現が上昇することから、脂肪酸代謝が活性化する。HMG-CoA 還元酵素阻害によりコレステロールを低下させる薬剤であるスタチンが FABP の遺伝子発現を誘導し、PPAR $\alpha$  の転写を誘導するという報告もある<sup>63)</sup>。AP 摂取による血中中性脂肪と FFA の減少は、Fabp5 が FFA の細胞への取り込み効率を上昇させるとともに、PPAR $\alpha$  のプロモーター領域に結合し、脂肪酸 $\beta$ 酸化、抗炎症作用、酸化ストレス、細胞増殖のような標的遺伝子を発現させた結果によると推察された。

また、炎症性サイトカインである Ccl2 (Chemokine ligand 12, MCP-1) と Jun (Transcription factor AP-1) の発現が低下したことで、その下流にある TNF- $\alpha$  の上昇が抑制されたと考えられる。MCP-1 はケモカインの一種であり、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<sup>64)</sup>。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。Cdkn1a (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21) もサルナシポリフェノールの摂取によって発現が抑制されていた。細胞増殖を抑制する腫瘍抑制遺伝子がインスリン抵抗性に関与しており、肥満モデルマウスの脂肪と肝臓において、腫瘍抑制因子 p53 およびその下流の p21 が活性化されており、p21 をノックアウトすると肥満やインスリン抵抗性が改善されるという報告がある<sup>65, 66)</sup>。なぜ

なら、SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) が p21 のプロモーター領域に結合し、脂肪酸合成やインスリン抵抗性、コレステロール合成に関わる標的遺伝子を活性化するためである<sup>67, 68)</sup>。よって、p21 の発現抑制は、SREBPs (特に SREBP-1a) の活性化を抑制し、脂肪酸合成阻害やインスリン抵抗性の改善をもたらしているものと考えられる。

以上のことから、AP の摂取によって、FABP の発現が上昇し、FFA の細胞内への取り込みが促進され、PPAR のリガンドとして作用し、脂肪酸消費、抗炎症作用、酸化ストレス、細胞増殖のような標的遺伝子の発現が調節されたことが考慮される。さらに、炎症性サイトカインの MCP-1 と AP-1 (Activator protein 1) の発現が抑制されたことにより、その下流の TNF- $\alpha$  の産生が抑制されたこと、また、脂肪酸合成やインスリン抵抗性に関わる SREBPs が結合するプロモーター領域を持つ p21 の発現が抑制されていることにより、これらが原因となって血中の中性脂肪、FFA 値に低下が生じたものと考えられる。このようなことから、AP は脂質代謝やインスリン抵抗性を遺伝子レベルにおいても制御し、脂質代謝およびインスリン抵抗性改善作用を示すことが示唆された。

### 3.4. 小括

第 2 章では、サルナシポリフェノール画分 (AP) が糖質消化酵素のマルターゼ活性を阻害し、また糖の吸収を阻害と食後の血糖値上昇を抑制したことから、肥満や糖尿病予防効果が期待された。そこで、本章ではサルナシに含まれる豊富なポリフェノールに注目し、AP の食餌誘導性肥満モデルマウスにおける抗肥満作用を検討した。

高脂肪・高シヨ糖食を摂取したマウスの体重、内臓脂肪量は有意に増加し、血中の FFA、血糖値、レプチン、TNF- $\alpha$  値も有意に上昇した。このことから、高脂肪・高シヨ糖食では、肥満となり、内臓脂肪の蓄積とともに悪玉アディポサイトカインの分泌が起こり、インスリン抵抗性が增強しているものと考えられた。そのため、肥満にもなう血糖値の上昇も観察された。AP の 1% 添加食では、体重増加と内臓脂肪の蓄積に抑制傾向がみられる他、血中の中性脂肪、FFA、血糖値、TNF- $\alpha$  値に有意な抑制がみられた。また、肝臓の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した結果、FABP の遺伝子発現が上昇したことから、AP が FFA の細胞内への取り込みを促進するとともに、FFA が PPAR のリガンドとして作用し、脂肪酸の $\beta$ 酸化、抗炎症作用、酸化ストレス、細胞増殖に関わる標的遺伝子の発現を制御している可能性が推察された。AP の摂取により、AP-1 と炎症性サイトカインの MCP-1 の遺伝子発現が抑制されたことから、その下流の TNF- $\alpha$  の産生が抑制されている可能性、また、脂肪酸合成やインスリン抵抗性に関わる SREBPs が結合するプロモーター領域を持つ p21 の発現が抑制されていることが、血中の中性脂肪、FFA 値の低下と関わっている可能性が推察された。このようなことから、AP は脂質代謝やインスリン抵抗性を遺伝子レベルでも制御し、脂質代謝およびインスリン抵抗性改善作用を有していることが示唆された。

## 第4章 サルナシポリフェノールの2型糖尿病モデルマウスにおける抗糖尿病作用

### 緒言

2型糖尿病はメタボリックシンドロームの構成因子の一つであり、インスリン分泌低下またはインスリン抵抗性による糖・脂質代謝異常を伴う耐糖能異常症である。メタボリックシンドロームにおける糖・脂質代謝異常は内臓脂肪の蓄積が引き起こすインスリン抵抗性が原因であるとされている。肥大化した肥満細胞から分泌されるTNF- $\alpha$ やFFAは末梢器官でのインスリン感受性を低下させることで高血糖状態となり、インスリン分泌をさらに促すという悪循環が糖尿病を発症する原因の一つである。糖尿病ならびにメタボリックシンドローム罹患者が年々増加しており、大きな社会問題となっている。特に、日本における糖尿病患者のうち95%が2型糖尿病であり、食生活や運動不足などの生活習慣の乱れが主な原因とされるため、生活習慣を見直し、予防・改善することが重要とされている。その手段の一つに機能性食品が注目を集め、年々市場が拡大している。特定保健用食品の中でも、近年、その売り上げを伸ばしているのが、血糖値や中性脂肪、コレステロールが気になる人用の商品である。食品は副作用もなく、医療機関を受診せずにスーパーなどで購入できるため、日常から気軽に予防することが出来る。

第3章では、食餌誘導性肥満モデルマウスにサルナシポリフェノール画分(AP)を12週間摂取させたところ、血中の中性脂肪と遊離脂肪酸、血糖値、TNF- $\alpha$ が有意に抑制された。これらのことより、APは、抗糖尿病、抗肥満作用を有することが示唆された。また、その作用は、第2章の結果より、糖質の吸収阻害によることが示唆された。食餌誘導性肥満の場合、その食餌中に含まれる糖質や脂質の吸収を抑制することで、ある程度予防することができると考えられる。そこで、本章では、遺伝的に2型糖尿病を発症するKK-A<sup>y</sup>マウスを用いて、第1節ではサルナシポリフェノール画分(AP)が、第2節では最も強いマルターゼ活性阻害作用を示した成分の一つであるイソケルシトリンとそのアグリコン(ケルセチン)が各種糖尿病関連マーカーに及ぼす影響について検討した。

## 第1節 KK-A<sup>y</sup>マウスにおけるサルナシポリフェノール画分の抗糖尿病作用

### 4.1.1. 方法

#### 1) 実験方法

実験動物は、5週齢の C57BL/6J 雄性マウス(日本クレア, 東京, 日本)と 2型糖尿病モデルマウスである KK-A<sup>y</sup>雄性マウス(日本クレア)を用いた。飼育条件は、室温 23 ± 1°C、湿度 55 ± 5%、12時間の明暗サイクル (8:00-20:00) とし、プラスチックケージで個別飼育した。予備飼育期間は市販固形飼料 CE-2 (日本クレア) と水を自由摂取させた。1週間予備飼育後、KK-A<sup>y</sup>マウスは平均体重および平均空腹時血糖値が同等になるように 7匹ずつ 2群に分け、C57BL/6J マウス (7匹) とともに、6週間 (38日間) 本飼育を行った。飼育期間中は1週間ごとに体重、空腹時血糖値、随時血糖値を、また2日間ごとに飼料摂取量と飲水量を測定した。飲料水および飼料は自由摂取とした。実験開始時と終了時には尾静脈より採血しヘモグロビン A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) の測定を行った。飼育3週目 (21日目) と5週目 (36日目) に耐糖能試験 (OGTT) を行った。

実験群は、正常 (C57) 群、対照 (Con) 群、サルナシポリフェノール粉末を 0.5% 摂取させた (AP) 群の3群とした。実験終了時は12時間絶食後、エーテル麻酔下で後大静脈より採血し、各組織 (肝臓、腎臓、膵臓、白色脂肪組織) を摘出した。血液は遠心分離後、血清を得、各臓器とともに分析まで -80°C で保存した。

#### 2) 実験飼料

飼料組成を Table 4-1-1 に示した。実験飼料は AIN-93G に準じて作成した基準飼料であり、AP 群は基本食に 0.5% のサルナシポリフェノール粉末を添加し、その量をコーンスターチで補正した。



Table 4-1-1. Composition of the experimental diets (%).

	C57	Con	AP
Casein	20.0	20.0	20.0
Cornstarch	39.8	39.8	39.3
$\alpha$ -Cornstarch	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0	10.0
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0
Soybean oil	7.0	7.0	7.0
Mineral mixture (AIN-93G-MX) <sup>a</sup>	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93-VX) <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
<i>A. arguta</i> polyphenol powder	-	-	0.5
Total (%)	100.0	100.0	100.0

<sup>a</sup> AIN-93G-MX and <sup>b</sup>AIN-MX were obtained from Clea Japan, Tokyo, Japan.

### 3) 耐糖能試験 (OGTT)

飼育 3 週目 (21 日目) と 5 週目 (36 日目) には OGTT を行った。12 時間絶食後、1 g / kg BW になるように調製したグルコース溶液 1 ml を経口投与し、投与前、投与後 30、60、120 分ごとに尾静脈より採血し、グルテストセンサーを用いて血糖値を測定した。また、5 週目の OGTT の際に、投与前、投与後 30 分、60 分には尾静脈より採血し、遠心分離後、血清を採取し、レビスインスリン-マウスキット(株式会社シバヤギ, 群馬, 日本)を用いて、ELISA 法によりインスリン濃度を測定した。

### 4) 測定

#### 4-1) 血液

血液は遠心分離 (3000rpm、4°C、15 分) により血清を得て、分析まで -80°C で凍結保存した。

トリグリセライド、総コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質、遊

離脂肪酸、グルコース、総胆汁酸 (和光純薬株式会社, 大阪, 日本)、インスリン、レプチン (株式会社シバヤギ, 群馬, 日本)、アディポネクチン (大塚製薬株式会社, 東京, 日本)、高分子アディポネクチン (株式会社シバヤギ, 群馬, 日本) はカッコ内に示した市販のキットを用いて測定した。

#### 4-2) 肝臓脂質

肝臓脂質の抽出は Folch らの方法<sup>59)</sup>に従って行った。第 3 章 3-2) と同様の方法で行った。

#### 4-3) 肝臓糖・脂質代謝関連酵素活性

##### 4-3-1) 酵素源の調製

肝臓0.3 gを氷冷下で0.25 M ショ糖と1 mM EDTAを含む10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) 3 mlでホモジナイズした。その後、500 × g、4°Cで10 分間遠心分離して核を沈殿させ、上清を得た。これをアシルCoA オキシダーゼ (ACO) 活性の測定に用いた。次に、9000 × g、4°Cで10 分間遠心分離してミトコンドリア画分を沈殿として除去し、得られる上清を、脂肪酸合成酵素 (FAS)、グルコキナーゼ (GK)、グルコース 6-ホスファターゼ (G6Pase) 活性測定に使用した。各測定サンプルは、測定までに-80°Cで保存した。

##### 4-3-2) タンパク質の定量

タンパク量はLowry 法<sup>69)</sup>で測定した。試料または標準溶液 (ウシ血清アルブミン) 2 μlに銅試薬 (2%炭酸ナトリウム/0.1N 水酸化ナトリウム : 0.5%硫酸銅/1%酒石酸カリウムナトリウム = 50 : 1) 100 μlを加え、混合した。室温で10分間放置後、10倍に希釈したフェノール試薬を50 μl加え、混合した。室温で30分間放置後、640nmの吸光度を測定した。

##### 4-3-3) 脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性

FAS活性はKelleyらの方法<sup>70)</sup>で分析した。最終濃度0.05 mM アセチルCoA、0.3 mM NADPH および0.2 mM EDTA を含む100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に9000 × g 上清画分を添加し、NADPH の減少を30°C、340 nm で

1.5分間追跡し（ブランク）、その後マロニルCoA（最終濃度0.2 mM）を加えて混合し、さらに4分間追跡した（総容量1 ml）。得られた吸光度変化値からブランクの吸光度変化値を差し引くことにより、測定時間当たりのNADPHの減少量を求めた（NADPHの分子吸光係数6,220）。

#### 4-3-4) アシルCoA オキシダーゼ (ACO) 活性

ACO活性はHashimotoらの方法<sup>71)</sup>で分析した。最終濃度0.1 mM パルミトイルCoA、10.6 mM フェノール、0.82 mM 4-アミノアンチピリン、10  $\mu$ M FAD、4 U ペルオキシダーゼ（ホースラディッシュ）および0.2 mg ウシアルブミン（フラクションV、脂肪酸フリー）を含む50 mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.4）に500  $\times$  g 上清画分を添加し（総容量1ml）、30 $^{\circ}$ C、500 nm で6分間吸光度を追跡し、得られた吸光度変化値から過酸化水素の生成量を求めた（過酸化水素とフェノール、4-アミノアンチピリン、ペルオキシダーゼによって生じる紅色色素のモル吸光係数6,390）。

#### 4-3-5) グルコキナーゼ (GK) 活性

GK活性はDavidsonらの方法<sup>72)</sup>で分析した。50 mM HEPES バッファー（pH 7.4、100 mM 塩化カリウム、7.5 mM 塩化マグネシウム、2.5 mM ジチオエリトリールを含む）300  $\mu$ l、10 mg/ml BSA 100  $\mu$ l、0.5 mM または 100 mM グルコース 100  $\mu$ l、4 U/ml G6PD (*Leuconostoc mesenteroides*) 100  $\mu$ l、0.5 mM NAD<sup>+</sup> 100  $\mu$ l、9000  $\times$  g 上清画分 200  $\mu$ l を加え、最後に 5 mM ATP 100  $\mu$ l を添加して反応を開始した。27 $^{\circ}$ C、340 nm で 5 分間吸光度の変化を追跡した。なお、ヘキソキナーゼ活性を考慮して 100 mM グルコース添加時の吸光度変化値から 0.5 mM グルコース添加時の吸光度変化値を差し引き、G6PD による共役反応によって生成する NADH の生成量を求めた（NADH の分子吸光係数 6,300）。

#### 4-3-6) グルコース 6-ホスファターゼ (G6Pase) 活性

G6Pase 活性は Lange らの方法<sup>73)</sup>に従った。試験管に蒸留水 1 ml、10 mM G6P 50  $\mu$ l、9000  $\times$  g 上清画分 10  $\mu$ l を加えて 37 $^{\circ}$ C、20 分間インキュベートし、270 mM 硫酸（3.7 mM モリブデン酸アンモニウム、240 mM ドデシル硫酸ナトリウム

(SDS) 含) 220  $\mu$ l を加えて反応を停止した。次いで 1.2 M アスコルビン酸 50  $\mu$ l 加えて室温 30 分放置後吸光度 (820 nm) を測定した。検量線の作成には、0.1、1、3、5、10 M のリン酸を用いた。

#### 4-4) 統計

測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。各群間の比較は一元配置分散分 (ANOVA) を行った後に Tukey-Kramer test にて多重比較検定を行った。 $p<0.05$  を統計学的に有意とし、アルファベットの異なる群間において有意差ありとした。Con 群に対する AP 群の 2 群間の有意差は Student's *t*-test を用いて検定した。統計処理は、エクセル統計 2008 (株式会社社会情報サービス, 東京, 日本) を用いた。

#### 4.1.2. 結果

##### 体重、摂取量、飲水量、臓器重量、内臓総白色脂肪量

結果を Table 4-1-2 に示した。初体重、最終体重、体重増加量ともに C57 群に対して Con、AP 群で有意に高値を示したが、Con 群に対して AP 群に有意差は認められなかった。摂取量においては、3 群間に有意差は認められなかった。飲水量については、C57 群に対して Con、AP 群で有意に高値を示したが、Con 群に対して AP 群に有意差は認められなかった。

肝臓、腎臓重量ともに C57 群に対して Con、AP 群で有意に高値を示したが、Con 群に対して AP 群に有意差は認められなかった。膵臓重量は 3 群間に有意差は認められなかったが、C57 < Con < AP 群の順に重量が増加する傾向がみられた。内臓総白色脂肪は、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪の重量を各々測定し合計した。その結果、全ての項目において C57 群に対して、Con 群で有意に重量が増加し、Con 群と AP 群では有意な差が認められなかった。

##### 実験期間中の随時血糖値、空腹時血糖値、HbA<sub>1c</sub> 値

Fig. 4-1-1 に結果を示した。実験期間中は 1 週間に 1 回、随時血糖値 (A)、空腹時血糖値 (B) の測定を行った。C57 群に対して Con、AP 群でともに有意に高値を示した。HbA<sub>1c</sub> (C) においては実験開始前である 0 週目では、3 群間に有意差は認めら

れなかったが、実験終了時である 6 週目では C57 群に対して Con、AP 群で有意に上昇した。Con 群と AP 群の比較では、随時血糖値、空腹時血糖値、HbA<sub>1c</sub> 値のいずれも有意な差が認められなかった。

#### 耐糖能試験 (OGTT)

3 週目と 5 週目に行った OGTT の結果とその血糖値曲線下面積 (AUC)、5 週目に行った OGTT の際のグルコース投与 0、30、60 分後の血清インスリン値の結果を Fig. 4-1-2 に示した。3 週目に行った OGTT の結果、C57 群に対して Con、AP 群でグルコース投与後の血糖値が有意に上昇した (A)。AUC については C57 群に対して Con 群で有意に上昇したが、Con 群に対して AP 群では有意な差は認められなかった (C)。5 週目に行った OGTT の結果、C57 群に対して Con 群でグルコース投与後の血糖値が有意に上昇し、Con 群に対して AP 群では、投与後 30、60 分の血糖値の上昇が有意に抑制された (B)。AUC については C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して AP 群では有意に低値を示した (D)。インスリン値は、C57 群に対して Con、AP 群で有意に上昇したが、Con 群に対して AP 群で有意な差は認められなかった (E)。

#### 血清脂質、血糖値、インスリン、アディポサイトカイン

血清脂質、血糖値、インスリン、アディポサイトカインの結果を Table 4-1-3 に示した。血中中性脂肪 (トリグリセライド) 値は C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して AP 群では有意に低下した。総コレステロール値においては、C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群と AP 群では有意な差が認められなかった。HDL コレステロールと LDL コレステロール値においては、いずれも 3 群間に有意な差は認められなかった。また、算出したアテローム指数については、C57 群に対して Con 群で有意に高値を示し、Con 群に対して AP 群で低値を示す傾向がみられた。リン脂質値は 3 群間で有意差は認められなかった。遊離脂肪酸においては、C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して AP 群で有意に低下した。

血糖値は、C57 群に対し Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して AP 群で、その上昇が抑制される傾向がみられた。インスリン値については、C57 群に対し Con 群で有意に上昇し、Con 群と AP 群に有意な差は認められなかった。

アディポサイトカインであるレプチン、アディポネクチン、高分子量アディポネクチン、TNF- $\alpha$ の結果は以下のとおりであった。レプチンは、C57 群に対し Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して AP 群では低下する傾向がみられた。アディポネクチンは、C57 群に対して Con、AP 群で有意に減少した。高分子量アディポネクチンは Con 群と比べて AP 群で上昇する傾向にあった ( $0.05 < p < 0.1$ )。TNF- $\alpha$ については 3 群間に有意差は認められなかったが、Con 群に対して AP 群で上昇が抑制される傾向がみられた。

### 肝臓脂質

肝臓 1 g あたりの脂質量を Table 4-1-4 に示した。総脂質量、中性脂肪量、総コレステロール量、リン脂質量ともに C57 群に対して Con 群で有意に上昇した。総コレステロール量においては、Con 群に対して AP 群でその上昇が有意に抑制された。

### 肝臓中の糖・脂質代謝関連酵素

結果を Table 4-1-5 に示した。糖新生の律速酵素であるグルコース 6-ホスファターゼ (G6Pase) 活性は、C57 群に対して Con 群で有意に低下し、Con 群に対して AP 群でも有意に低下した。解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼ (GK) 活性は、C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して AP 群で有意に低下した。脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性は、C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して AP 群で低下する傾向にあった ( $0.05 < p < 0.1$ )。 $\beta$ 酸化酵素であるアシル CoA オキシダーゼ (ACO) 活性は、C57 群に対して Con 群で上昇し、Con 群に対して AP 群でも上昇する傾向にあった ( $0.05 < p < 0.1$ )。

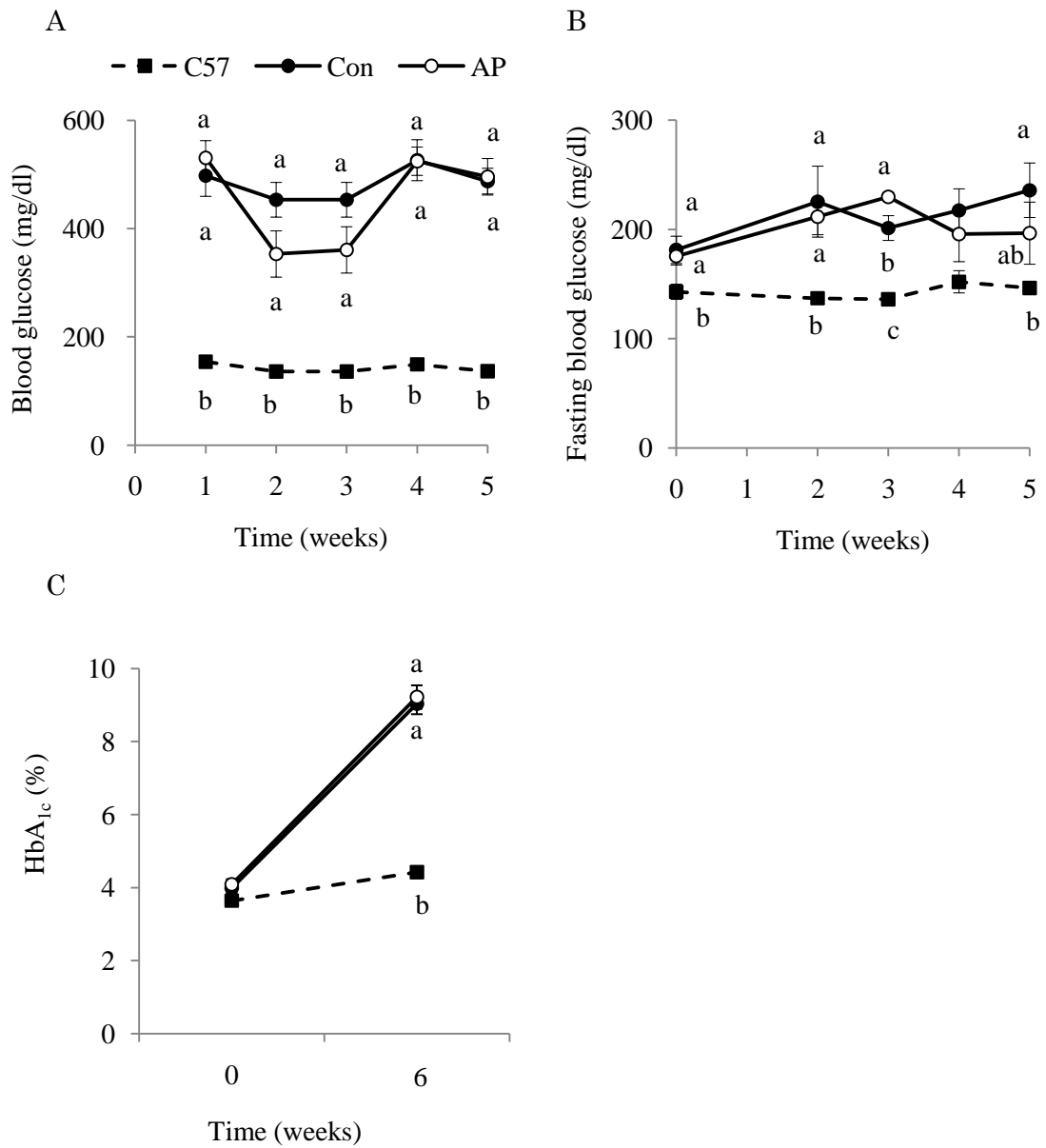


Fig. 4-1-1. Effects of AP on the blood glucose level (A), fasting blood glucose level (B), and HbA<sub>1c</sub> (C) on experimental term in KK-A<sup>y</sup> mice.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=7). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , Con vs AP by Student's *t*-test.

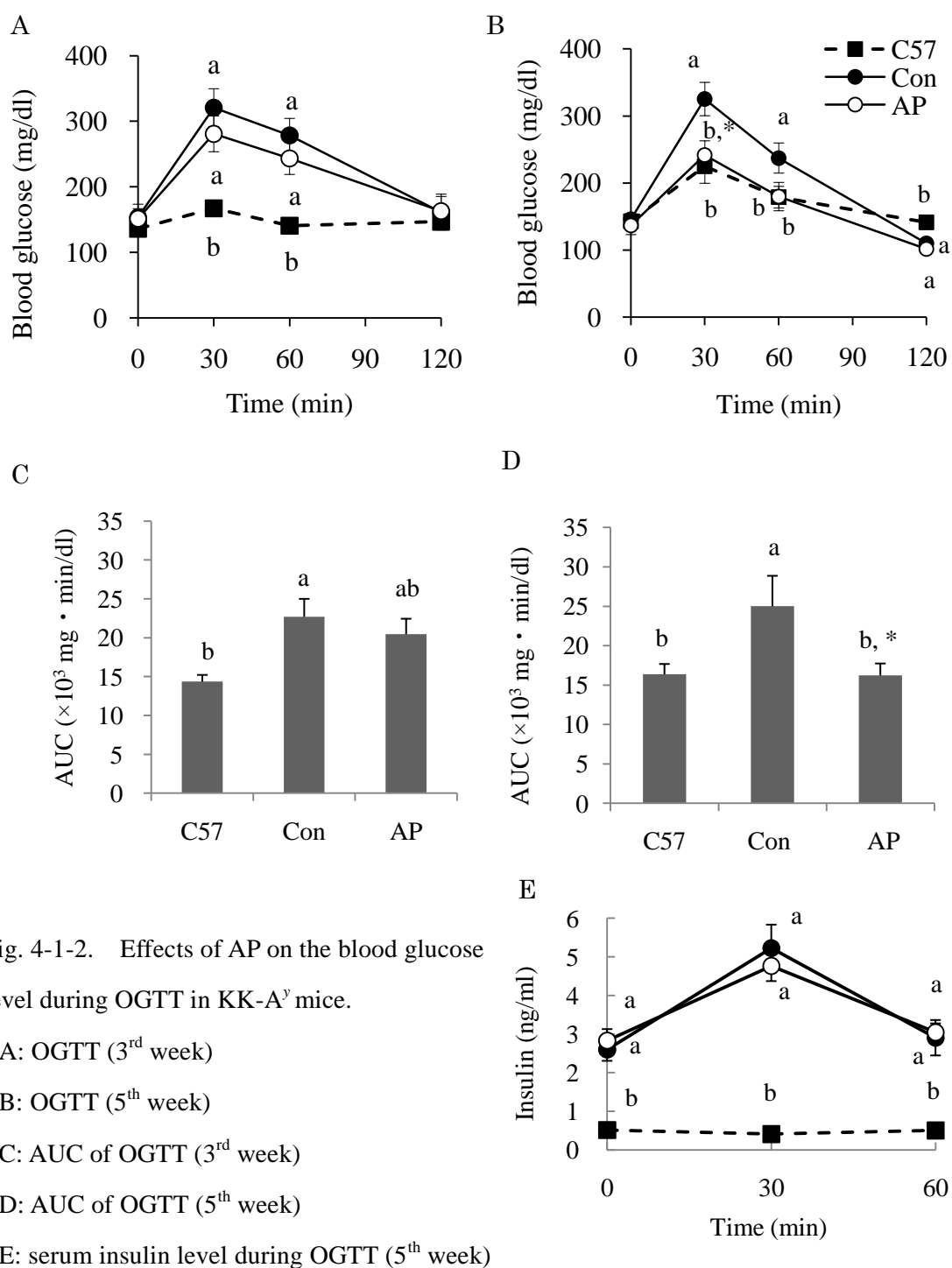


Fig. 4-1-2. Effects of AP on the blood glucose level during OGTT in KK- $A^y$  mice.

A: OGTT (3<sup>rd</sup> week)

B: OGTT (5<sup>th</sup> week)

C: AUC of OGTT (3<sup>rd</sup> week)

D: AUC of OGTT (5<sup>th</sup> week)

E: serum insulin level during OGTT (5<sup>th</sup> week)

OGTT was carried out on 3<sup>rd</sup> week and 5<sup>th</sup> week of the feeding period. All mice fasted for 12 h before OGTT. The blood glucose level was determined using blood collected from the tail vein at 0, 30, 60, and 120 min after the oral administration of glucose (1 g/kg body weight). Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=7). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , Con vs AP by Student's *t*-test.



Table 4-1-2. Effects of AP on food intake, body, organ, and abdominal adipose tissue weight in KK-A<sup>y</sup> mice.

	KK-A <sup>y</sup>		
	C57	Con	AP
Initial body weight (g)	21.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	32.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	31.8 ± 0.6 <sup>a</sup>
Final body weight (g)	25.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	40.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	39.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
Body weight gain (g)	3.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	8.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.4 ± 0.5 <sup>a</sup>
Food intake (g)	154.3 ± 3.1	188.0 ± 15.8	188.1 ± 11.4
Water intake (g)	343.8 ± 24.8 <sup>b</sup>	861.7 ± 47.4 <sup>a</sup>	811.4 ± 27.4 <sup>a</sup>
Organ weight (g)			
Liver	0.96 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.72 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.03 <sup>a</sup>
Kidney	0.37 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.04 <sup>a</sup>
Pancreas	0.17 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.02
Abdominal adipose tissue (g)	0.63 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.89 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.76 ± 0.11 <sup>a</sup>
Perirenal fat	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.588 ± 0.07 <sup>a</sup>
Epididymal fat	0.42 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.10 <sup>a</sup>
Mesenteric fat	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.03 <sup>a</sup>

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 4-1-3. Effects of AP on serum lipids, glucose, insulin, and adipocytokines in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>	
		Con	AP
Triglyceride (mg/dl)	67.0 ± 9.0 <sup>b</sup>	182.7 ± 25.2 <sup>a</sup>	127.3 ± 14.2 <sup>ab, #</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	122.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	163.5 ± 10.8 <sup>a</sup>	150.4 ± 8.3 <sup>a</sup>
HDL cholesterol (mg/dl)	79.8 ± 2.9	88.6 ± 6.9	88.7 ± 6.8
LDL cholesterol (mg/dl) <sup>1</sup>	29.3 ± 2.4	31.3 ± 4.4	32.1 ± 1.0
Atherogenic index <sup>2</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.05 <sup>ab</sup>
Phospholipid (mg/dl)	224.6 ± 4.4	232.0 ± 22.0	203.5 ± 15.4
Free fatty acid (mEq/l)	1.00 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.06 <sup>b, *</sup>
Glucose (mg/dl)	146.3 ± 2.3 <sup>b</sup>	235.8 ± 25.0 <sup>a</sup>	196.5 ± 28.4 <sup>ab</sup>
Insulin (ng/ml)	0.54 ± 0.14 <sup>b</sup>	3.64 ± 0.56 <sup>a</sup>	3.75 ± 0.80 <sup>a</sup>
Leptin (ng/ml)	15.6 ± 1.5 <sup>b</sup>	2204.0 ± 354.0 <sup>a</sup>	1395.3 ± 300.5 <sup>a</sup>
Adiponectin (µg/ml)	14.6 ± 0.57 <sup>b</sup>	9.6 ± 0.51 <sup>a</sup>	8.2 ± 1.1 <sup>a</sup>
HMW adiponectin (µg/ml)	1.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.2 ± 0.2 <sup>a, #</sup>
TNF-α (pg/ml)	14.2 ± 2.0	17.2 ± 3.0	15.2 ± 2.5

<sup>1</sup>LDL cholesterol=Total cholesterol – HDL cholesterol - triglyceride/5

<sup>2</sup> Atherogenic index =(total cholesterol - HDL cholesterol)/ HDL cholesterol

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$ , Con vs AP by Student's *t*-test.

<sup>#</sup> $0.05 < p < 0.1$ , Con vs AP by Student's *t*-test.

Table 4-1-4. Effects of AP on liver lipids in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>	
		Con	AP
Liver lipids (mg/g liver)			
Total lipid	40.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	57.8 ± 5.9 <sup>ab</sup>	58.8 ± 5.3 <sup>a</sup>
Triglyceride	12.7 ± 1.0 <sup>b</sup>	24.4 ± 5.0 <sup>a</sup>	20.4 ± 3.7 <sup>ab</sup>
Total cholesterol	3.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	6.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.9 ± 0.3 <sup>b,*</sup>
Phospholipid	12.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	16.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	15.9 ± 1.0 <sup>ab</sup>

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$ , Con vs AP by Student's *t*-test.

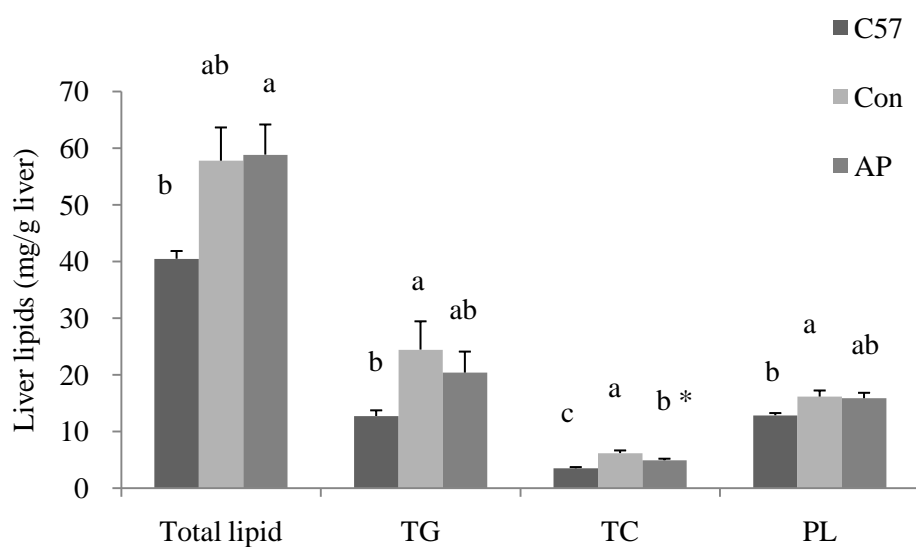


Fig. 4-1-3. Effects of AP on liver lipids in KK-A<sup>y</sup> mice.

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , Con vs AP by Student's *t*-test.

TG; Triglyceride, TC; Total cholesterol, PL; Phospholipid.

Table 4-1-5. Effects of AP on hepatic enzyme activities in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>	
		Con	AP
Hepatic enzyme activities (nmol/min/mg protein)			
G6Pase <sup>1</sup>	280.9 ± 28.3 <sup>a</sup>	116.4 ± 8.0 <sup>b</sup>	72.9 ± 13.1 <sup>c,*</sup>
GK <sup>1</sup>	0.37 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.05 <sup>b,*</sup>
FAS <sup>1</sup>	3.33 ± 0.69 <sup>b</sup>	6.22 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.84 ± 0.46 <sup>ab,#</sup>
ACO <sup>2</sup>	2.02 ± 0.35 <sup>b</sup>	2.51 ± 0.45 <sup>ab</sup>	3.74 ± 0.50 <sup>a#</sup>

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$ , Con vs AP by Student's *t*-test.

# $0.05 < p < 0.1$ , Con vs AP by Student's *t*-test.

<sup>1</sup>Fatty acid synthase (FAS), glucose 6-phosphatase (G6Pase) and glucokinase (GK) activities were measured with the 9,000 × *g* supernatant of liver homogenate.

<sup>2</sup>Acyl-CoA oxidase (ACO) activity was measured with the 500 × *g* supernatant of the liver homogenate.

## 第2節 KK-A<sup>y</sup>マウスにおけるイソケルシトリンの抗糖尿病作用

### 4.2.1. 方法

#### 1) 実験方法

実験動物は、6週齢の C57BL/6J 雄性マウス(日本クレア, 東京, 日本)と 2型糖尿病モデルマウスである KK-A<sup>y</sup>雄性マウス(日本クレア)を用いた。飼育条件は、室温 23 ± 1°C、湿度 55 ± 5%、12時間の明暗サイクル (8:00-20:00) とし、ワイヤーケージで個別飼育した。予備飼育期間は市販固形飼料 CE-2 (日本クレア) と水を自由摂取させた。1週間予備飼育後、KK-A<sup>y</sup>マウスは平均体重および平均空腹時血糖値が同等になるように 7-8匹ずつ 3群に分け、C57BL/6J マウス (6匹) はそのまま、4週間 (30日間) 本飼育を行った。飼育期間中は1週間ごとに体重、空腹時血糖値、随時血糖値を、2日間ごとに飼料摂取量と飲水量を測定した。飲料水および飼料は自由摂取とした。実験開始時と終了時には尾静脈より採血し HbA<sub>1c</sub> の測定を行った。飼育3週目 (18日目) と4週目 (25日目) に耐糖能試験 (OGTT) を行った。

実験群は、正常 (C57) (基本飼料) 群、対照 (Con) (基本飼料) 群、イソケルシトリン 0.15%添加基本飼料を給与する群 (Q3G 群)、ケルセチン 0.11%添加基本飼料を給与する群 (Que 群) の4群とした。実験終了時は12時間絶食後、ネンブタール麻酔下で心臓より直接採血し、各組織 (肝臓、腎臓、膵臓、白色脂肪組織) を摘出した。血液は遠心分離後、血清を得、各臓器とともに分析まで -80°C で保存した。

#### 2) 実験飼料

飼料組成を Table 4-2-1 に示した。実験飼料は AIN-93G に準じて作成した基本飼料であり、Q3G 群は基本食に 0.15%のイソケルシトリンを添加し、Que 群は基本食に 0.11%のケルセチン (2水和物) を添加した。イソケルシトリンとケルセチンは、ケルセチン (MW 302) が 0.10%含まれる場合の分子量に合わせて混餌した。

Table 4-2-1. Composition of the experimental diets (%)

	C57	Con	Q3G	Que
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
Cornstarch	39.8	39.8	39.65	39.69
$\alpha$ -Cornstarch	13.2	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0	5.0
Soybean oil	7.0	7.0	7.0	7.0
Mineral mixture (AIN-93G-MX) <sup>a</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93-VX) <sup>b</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
isoquercitrin (Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside)	-	-	0.15	-
Quercetin	-	-	-	0.11
Total (%)	100.0	100.0	100.0	100.0

<sup>a</sup> AIN-93G-MX and <sup>b</sup>AIN-MX were obtained from Clea Japan, Tokyo, Japan.

### 3) 耐糖能試験 (OGTT)

飼育 4 週目 (25 日目) には OGTT を行った。12 時間絶食後、1 g / kg BW になるように調製したグルコース溶液 1 ml を経口投与し、投与前、投与後 30、60、120 分ごとに尾静脈より採血し、グルテストセンサーを用いて血糖値を測定した。また、投与前、投与後 30 分、60 分には尾静脈より採血し、遠心分離後、血清を採取し、レビスインスリン-マウスキット (株式会社シバヤギ, 群馬, 日本) を用いて、ELISA 法によりインスリン濃度を測定した。

### 4) 測定

#### 4-1) 血液

血液は遠心分離 (3000rpm、4°C、15 分) により血清を得て、分析まで-80°C

で凍結保存した。

トリグリセライド、総コレステロール、HDL-コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸、グルコース、総胆汁酸（和光純薬株式会社，大阪，日本）、インスリン、レプチン（株式会社シバヤギ，群馬，日本）、アディポネクチン（大塚製薬株式会社，東京，日本）、高分子量アディポネクチン（株式会社シバヤギ，群馬，日本）は、カッコ内に示した市販のキットを用いて測定した。

#### 4-2) 肝臓脂質

肝臓脂質の抽出は Folch らの方法<sup>59)</sup>に従って行った。肝臓 0.5 g にメタノール 2.5 ml を加えホモジナイズし、クロロホルム 5 ml を加え、再度ホモジナイズした。その後、ホモジネートを濾紙（TOYO No.2）で濾過し、残渣を共栓付試験管に再び戻した後クロロホルム：メタノール=2：1 混液を 7.5 ml 加え、振とう抽出した。再び濾過し、得られた濾液に 1/4 容の 0.88%塩化カリウム溶液を加え、振とう抽出し、上層と下層に分離した後、下層（クロロホルム層）を採取した。下層はクロロホルムで 10 ml に定容し、このうちの 5 ml を採取し、ドラフト内で蒸発乾固させ、一晚真空下で乾燥後、総脂質重量の測定を行った。得られた脂質はイソプロピルアルコール 1 ml に溶解させ、トリグリセライド、総コレステロール、リン脂質の測定を行った。測定には血中脂質と同様に和光純薬株式会社の測定キットを用いた。

#### 4-3) 糞脂質

凍結乾燥し粉碎した糞 0.1 g にエタノール 2 ml を加え、80°Cで煮沸抽出した。3000rpm、4°C、10 分間遠心分離して上清を得た。沈殿物には再度エタノール 2 ml を加え、振とう抽出し、遠心分離により上清を得た。この操作をもう一度繰り返す、得られた上清は合わせて 10 ml に定容し、その一部である 5.0 ml を採取し、エバポレーターを用いて減圧下で蒸発乾固させた。その後一晚真空下で乾燥させ、総脂質重量の測定を行った。得られた脂質はエタノール 0.25 ml に溶解し、トリグリセライド、総コレステロール、胆汁酸の測定を行った。測定には和光純薬株式会社の測定キットを用いた。

#### 4-4) 肝臓糖・脂質代謝関連酵素活性

##### 4-4-1) 酵素源の調製

肝臓0.5 gを氷冷下で0.25 M ショ糖と1 mM EDTAを含む10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) 5 mlでホモジナイズした。得られた総ホモジネートの一部はカルニチンパルミトイル転移酵素 (CPT) 活性測定に使用した。その後、500 × g、4°Cで10 分間遠心分離し、上清を得、アシルCoA オキシダーゼ (ACO) 活性測定に使用した。上清はさらに、9,000 × g、4°Cで10 分間遠心分離してミトコンドリア画分を沈殿させ、上清を得た。その後、超遠心分離機により、105,000 × g、4°Cで60分間遠心分離して上清をサイトゾル画分として使用した。サイトゾル画分は脂肪酸合成酵素 (FAS)、グルコース 6-ホスファターゼ (G6Pase) 活性の測定に使用した。各測定サンプルは、測定までに-80°Cで保存した。

##### 4-4-2) タンパク質の定量

タンパク量はLowry 法<sup>69)</sup>で測定した。試料または標準溶液 (ウシ血清アルブミン) 2 μlに銅試薬 (2%炭酸ナトリウム/0.1N 水酸化ナトリウム : 0.5%硫酸銅/1%酒石酸カリウムナトリウム=50 : 1) 100 μlを加え、混合した。室温で10分間放置後、10倍に希釈したフェノール試薬を50 μl加え、混合した。室温で30分間放置後、640nmの吸光度を測定した。

##### 4-4-3) カルニチンアシルトランスフェラーゼII (CPT II) 活性

CPT II活性はMarkwellらの方法<sup>74)</sup>で分析した。最終濃度0.25 mM DTNB、1.25 mM EDTA および0.1% Triton-X100を含む58 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) に総ホモジネートを添加し、30°C、412nm で3 分間追跡しODの上昇が認められなくなった時点で、パルミトイルCoA (最終濃度0.04 mM) を添加し、再び、3分間追跡した (ブランク)。その後、L-カルニチン (最終濃度1.25 mM) を添加し、アシルCoAから遊離したCoAの生成を3 分間追跡した (総容量1 ml)。得られた吸光度変化値からブランクの吸光度変化値を差し引くことによりCoAの生成量を求めた (CoA とDTNB から生じる黄色色素TNB のモル吸光係数13,600)。



#### 4-4-4) 脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性

FAS活性はKelleyらの方法<sup>70)</sup>で分析した。最終濃度0.05 mM アセチルCoA、0.3 mM NADPH および0.2 mM EDTA を含む100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に9000 × g 上清画分を添加し、NADPH の減少を30°C、340 nm で2分間追跡し (ブランク)、その後マロニルCoA (最終濃度0.2 mM) を加えて混合し、さらに2分間追跡した (総容量1 ml)。得られた吸光度変化値からブランクの吸光度変化値を差し引くことにより、NADPH の減少量を求めた (NADPH の分子吸光係数6,220)。

#### 4-4-5) グルコース 6-ホスファターゼ (G6Pase) 活性

G6Pase 活性は Lange らの方法<sup>73)</sup>に従った。試験管に蒸留水 1 ml、10 mM G6P 50 μl、9000 × g 上清画分 10 μl を加えて 37°C、20 分間インキュベートし、270 mM 硫酸 (3.7 mM モリブデン酸アンモニウム、240 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 含) 220 μl で反応を停止した。次いで 1.2 M アスコルビン酸 50 μl 加えて室温 30 分放置後吸光度 (820 nm) を測定した。検量線の作成には、0.1、1、3、5、10 M のリン酸を用いた。

#### 4-5) 肝臓の遺伝子発現

肝臓は解剖時に摘出後約 30 mg を切り分け、直ちに RNAlater (Ambion、Austin, USA) に浸漬し 4°C で一晩放置した。その後、分析まで -20°C で保存した。

総 RNA は、Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene An Agilent Technologies Division, Santa Clara, USA) を用いて抽出した。1 μg の総 RNA より AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene An Agilent Technologies Division, Santa Clara, USA) を用いて cDNA の合成を行った後、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix Kit (Stratagene An Agilent Technologies Division, Santa Clara, USA) を用いて、Mx3000P Real-Time QPCR System (Stratagene An Agilent Technologies Division, Santa Clara, USA) による測定を行った。反応条件は、Step 1 ; 95°C 3 min、Step 2 ; (95°C 10 s および 60°C 20 s) × 40 cycles で行った。ハウスキーピング遺伝子である GAPDH を用い、データの補正を行った。測定に用いた遺伝子のプライマ

一配列は Table 4-2-2 に示した。プライマーはタカラバイオ株式会社(滋賀、日本)から購入した。

Table 4-2-2. Sequence of primers used for real-time quantitative PCR

Name		Sequence	Accession
GAPDH	Forward	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	<u>NM_008084.2</u>
	Reverse	TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	
SREBP-1c	Forward	GGGACAGCTTAGCCTCTACACCAA	<u>NM_011480.3</u>
	Reverse	GACTGGTACGGGCCACAAGAA	
SREBP-2	Forward	CCCCTCAGAACACCAAGCAT	<u>NM_033218.1</u>
	Reverse	TGGCAGTAGCTCGCTCTCGT	
PPAR $\alpha$	Forward	ACTGTCCTTGGTGCCATCCTC	<u>NM_011144.6</u>
	Reverse	GCCCTGTATCCACAACAAGCTG	
PPAR $\gamma$	Forward	TGTCGGTTTCAGAAAGTGCCTTG	<u>NM_011146.3</u>
	Reverse	TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG	
HMG-CoA reductase	Forward	CTCGTTAGCACTGGTCCAGGAA	<u>NM_008255.2</u>
	Reverse	GGCTCCATCATTGGCTCTGTAAG	

## 5) 統計

測定値は平均値±標準誤差で示した。各群間の比較は一元配置分散分 (ANOVA) を行った後に Tukey-Kramer test にて多重比較検定を行った。 $p<0.05$  を統計学的に有意とし、アルファベットの異なる群間において有意差ありとした。Con 群に対する Q3G 群または Que 群の 2 群間の有意差は Student's *t*-test を用いて検定した。統計処理は、エクセル統計 2008 (株式会社社会情報サービス, 東京, 日本) を用いた。

#### 4.2.2. 結果

##### 体重、摂取量、飲水量、臓器重量、内臓総白色脂肪量

結果を Table 4-2-3 に示した。初体重、最終体重、体重増加量、摂取量、飲水量、肝臓重量、腎臓重量、内臓白色脂肪重量ともに C57 群に対して Con 群で有意に上昇したが、Con 群に対して Q3G、Que 群に有意差は認められなかった。

##### 耐糖能試験 (OGTT)

3 週目と 4 週目に行った OGTT の結果とその血糖値曲線下面積 (AUC)、4 週目に行った OGTT の際のグルコース投与 0、30、60 分後の血清インスリン値の結果を Fig. 4-2-1 に示した。3 週目に行った OGTT の結果、C57 群に対して Con、Q3G、Que 群でグルコース投与後の血糖値が有意に上昇し、投与 60 分後では Con 群に対して Q3G 群でその上昇が有意に抑制された (A)。AUC については C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して Q3G 群では有意に低値を示し、Que 群では有意差は認められなかった (C)。4 週目に行った OGTT の結果、C57 群に対して Con 群でグルコース投与後の血糖値が有意に上昇し、Con 群に対して Q3G、Que 群では、有意な差は認められなかった (B)。AUC については C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して Q3G 群では低値を示す傾向がみられた (D)。インスリン値は、C57 群に対して Con、Q3G、Que 群で有意に上昇したが、Con 群に対して Q3G、Que 群で有意な差は認められなかった (E)。

##### 血清脂質、血糖値、HbA<sub>1c</sub>、インスリン、アディポサイトカイン

結果を Table 4-2-4 に示した。血中中性脂肪値、総コレステロール、遊離脂肪酸値は C57 群に対して Con 群で上昇し、Con 群に対して Q3G 群では低下する傾向がみられたが、Que 群においては、上昇する傾向がみられた。HDL コレステロール、LDL コレステロール、アテローム指数、リン脂質値において、4 群間に有意な差は認められなかった。

血糖値は、Con 群に対して Q3G 群で、上昇が抑制される傾向がみられた。HbA<sub>1c</sub> においては、C57 群に対して Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して Q3G、Que 群で有意に抑制される傾向にあった ( $0.05 < p < 0.1$ )。インスリン値については、C57 群に対し Con 群で有意に上昇し、Con 群に対して Que 群で低値を示し傾向がみられた。

アディポサイトカインであるレプチン、アディポネクチン、高分子量アディポネクチン、TNF- $\alpha$ においては、Con 群に対して Q3G、Que 群で有意差は認められなかった。

### 肝臓脂質

肝臓 1 g あたりの脂質量を Table 4-2-5 に示し、Fig. 4-2-2 に図示した。総脂質量、中性脂肪量、総コレステロール量、リン脂質量ともに Con 群に対して Q3G 群で有意に減少した。逆に、Que 群では Con 群に比べて、脂質の蓄積が増加傾向または有意に増加した。

### 糞中脂質排泄量

2 日間で排泄された糞量と糞中脂質量を Table 4-2-6 に示した。糞排泄量において、C57 群に対して Con 群で有意に増加したが、Con 群に対して Q3G、Que 群に有意な差は認められなかった。糞中脂質排泄量において、総脂質量、中性脂肪量、総コレステロール量、胆汁酸量はいずれも C57 群に対して Con 群で有意に増加した。Con 群に対して、Q3G 群では増加する傾向にあったが、Que 群では減少する傾向にあった。

### 肝臓中の糖・脂質代謝関連酵素

結果を Table 4-2-7 に示した。糖新生の律速酵素であるグルコース 6-ホスファターゼ (G6Pase) 活性は、Con 群に対して Q3G、Que 群で有意な差は認められなかった。脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性は、Con 群に対して Q3G 群で有意に低下した。 $\beta$ 酸化酵素であるカルニチンパルミトイル転移変換酵素 (CPT) 活性は、Con 群に対して Q3G 群で上昇する傾向にあり ( $0.05 < p < 0.1$ )、Que 群で有意に上昇した。

### 肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の発現解析

Fig. 4-2-3 に結果を示した。Con 群を 1 とした時の相対値で示した。脂質代謝を調節する転写因子である SREBP (Sterol Regulatory Element-binding Protein) と転写因子で核内受容体である PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) とコレステロール代謝関連酵素である HMG-CoA 還元酵素の遺伝子発現解析を行った。Con 群と比較して Q3G 群では PPAR $\alpha$  の発現が有意に上昇した。Que 群においては、

SREBP-1c の発現が有意に減少し、PPAR  $\alpha$  の発現が有意に上昇した。PPAR $\gamma$  の発現は Q3G、Que 群ともに発現が有意に抑制された。SREBP-2 と HMG-CoA 還元酵素に関しては、Q3G、Que 両群で Con 群に対して有意な差が認められなかった。

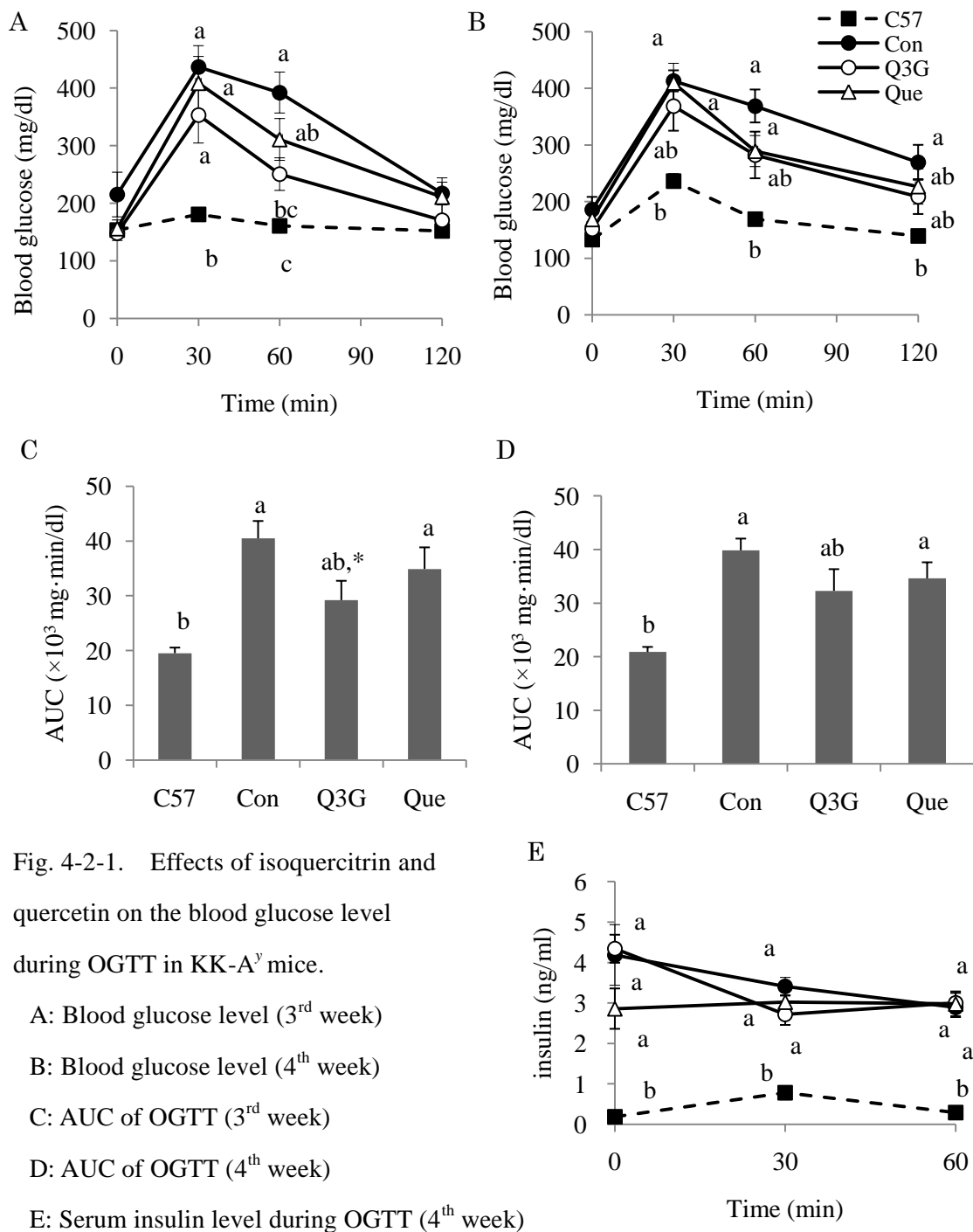


Fig. 4-2-1. Effects of isoquercitrin and quercetin on the blood glucose level during OGTT in KK- $A^y$  mice.

A: Blood glucose level (3<sup>rd</sup> week)

B: Blood glucose level (4<sup>th</sup> week)

C: AUC of OGTT (3<sup>rd</sup> week)

D: AUC of OGTT (4<sup>th</sup> week)

E: Serum insulin level during OGTT (4<sup>th</sup> week)

OGTT was carried out on 3<sup>rd</sup> week and 4<sup>th</sup> week of the feeding period. All mice fasted for 12 h before OGTT. The blood glucose level was determined using blood collected from the tail vein at 0, 30, 60, and 120 min after the oral administration of glucose (1 g/kg body weight). Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=7-8). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , Con vs Q3G or Que by Student's *t*-test.

Table 4-2-3. Effects of isoquercitrin and quercetin on food intake, body, organ, and abdominal adipose tissue weight in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>		
		Con	Q3G	Que
Initial body weight (g)	19.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	28.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	29.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	29.6 ± 0.5 <sup>a</sup>
Final body weight (g)	23.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	36.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	37.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	39.2 ± 1.1 <sup>a</sup>
Body weight gain (g)	4.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	7.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	9.6 ± 0.7 <sup>a</sup>
Food intake (g)	133.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	187.0 ± 2.4 <sup>a</sup>	190.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	186.7 ± 3.8 <sup>a</sup>
Water intake (g)	98.8 ± 5.6 <sup>b</sup>	522.7 ± 30.6 <sup>a</sup>	498.2 ± 31.9 <sup>a</sup>	436.8 ± 36.9 <sup>a</sup>
Organ weight (g)				
Liver	0.86 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.60 ± 0.07 <sup>a</sup>
Kidney	0.28 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.49 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.04 <sup>a</sup>
Abdominal adipose tissue (g)				
Perirenal fat	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.27 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>a</sup>
Epididymal fat	0.44 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.48 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.10 <sup>a</sup>
Mesenteric fat	0.15 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>a</sup>

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7-8).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 4-2-4. Effects of isoquercitrin and quercetin on serum lipids, glucose, HbA<sub>1c</sub>, insulin, and adipocytokines levels in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>		
		Con	Q3G	Que
Triglyceride (mg/dl)	60.5 ± 5.6 <sup>b</sup>	123.0 ± 15.1 <sup>a</sup>	104.0 ± 14.3 <sup>ab</sup>	136.0 ± 14.4 <sup>a</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	131.5 ± 4.0	142.1 ± 7.4	126.4 ± 12.8	148.3 ± 11.3
HDL cholesterol (mg/dl)	97.8 ± 3.4	97.2 ± 9.0	87.8 ± 13.3	103.1 ± 10.1
LDL cholesterol (mg/dl) <sup>1</sup>	21.6 ± 1.0	23.7 ± 6.2	21.1 ± 4.1	18.0 ± 5.0
Atherogenic index <sup>2</sup>	0.35 ± 0.02	0.50 ± 0.08	0.53 ± 0.10	0.47 ± 0.07
Phospholipid (mg/dl)	239.4 ± 4.3	201.3 ± 16.7	201.8 ± 22.1	237.9 ± 22.9
Free fatty acid (mEq/l)	2.80 ± 0.16 <sup>b</sup>	4.02 ± 0.24 <sup>ab</sup>	3.69 ± 0.43 <sup>ab</sup>	4.48 ± 0.38 <sup>a</sup>
Glucose (mg/dl)	288.3 ± 45.4 <sup>ab</sup>	174.6 ± 2.9 <sup>ab</sup>	154.0 ± 8.9 <sup>a</sup>	202.1 ± 11.4 <sup>b</sup>
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	7.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	7.0 ± 0.3 <sup>a,#</sup>	7.0 ± 0.3 <sup>a,#</sup>
Insulin (ng/ml)	0.49 ± 0.11 <sup>b</sup>	4.29 ± 1.01 <sup>a</sup>	4.13 ± 0.78 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.64 <sup>ab</sup>
Leptin (ng/ml)	3.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	198.9 ± 46.9 <sup>a</sup>	200.3 ± 63.8 <sup>a</sup>	329.8 ± 82.9 <sup>a</sup>
Adiponectin (µg/ml)	28.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	9.9 ± 0.6 <sup>b</sup>	8.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	8.9 ± 0.4 <sup>b</sup>
HMW adiponectin (µg/ml)	0.72 ± 0.21	0.81 ± 0.22	0.99 ± 0.11	2.14 ± 0.70
TNF-α (pg/ml)	27.3 ± 14.4	50.7 ± 14.8	50.7 ± 8.7	29.3 ± 7.6

<sup>1</sup>LDL cholesterol=Total cholesterol – HDL cholesterol - triglyceride/5 <sup>2</sup>Atherogenic index =(total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7-8). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). #0.05 <  $p < 0.1$ , Con vs Q3G or Que by Student's *t*-test.



Table 4-2-5. Effects of isoquercitrin and quercetin on liver lipids in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>		
		Con	Q3G	Que
Liver lipids (mg/g liver)				
Total lipid	52.2 ± 3.5 <sup>b</sup>	60.9 ± 3.7 <sup>ab</sup>	47.9 ± 2.5 <sup>b,*</sup>	69.8 ± 6.0 <sup>a</sup>
Triglyceride	16.6 ± 1.6 <sup>ab</sup>	16.3 ± 1.4 <sup>ab</sup>	11.4 ± 1.2 <sup>b,*</sup>	22.0 ± 2.9 <sup>a</sup>
Total cholesterol	0.51 ± 0.08 <sup>b</sup>	3.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.1 <sup>c,*</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>c,*</sup>
Phospholipid	5.7 ± 0.5 <sup>bc</sup>	6.9 ± 0.2 <sup>ab</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>c,*</sup>	7.2 ± 0.4 <sup>a,*</sup>

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7-8).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ). \* $p < 0.05$ , Con vs Q3G or Que by Student's *t*-test.

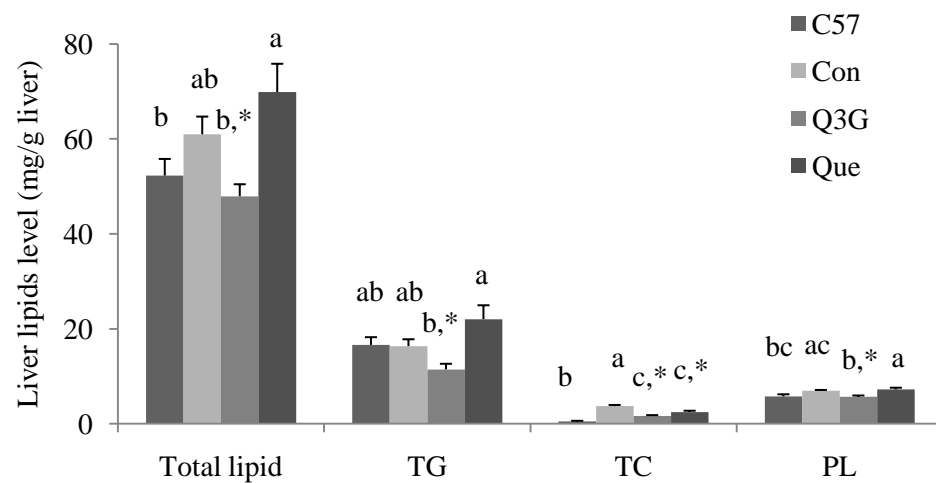


Fig. 4-2-2. Liver lipids

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7-8). Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$ , Con vs Q3G, Que by Student's *t*-test.

TG; Triglyceride, TC; Total cholesterol, PL; Phospholipid.

Table 4-2-6. Effects of isoquercitrin and quercetin on fecal excretion of lipids for 2days in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>		
		Con	Q3G	Que
Feces dry weight (g/2 d)	0.58 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.05 <sup>a</sup>
Feces excretion (mg/2 d)				
Total lipid (mg/2 d)	14.7 ± 0.9 <sup>b</sup>	42.6 ± 3.9 <sup>a</sup>	53.3 ± 8.5 <sup>a</sup>	41.0 ± 8.6 <sup>ab</sup>
Triglyceride (mg/2 d)	1.03 ± 0.18 <sup>b</sup>	3.02 ± 0.54 <sup>ab</sup>	3.76 ± 1.13 <sup>a</sup>	1.50 ± 0.37 <sup>ab,*</sup>
Total cholesterol (mg/2 d)	2.33 ± 0.21 <sup>c</sup>	4.47 ± 0.30 <sup>ab</sup>	5.62 ± 0.88 <sup>a</sup>	3.26 ± 0.35 <sup>bc,*</sup>
Total bile acid (μmol/2 d)	1.83 ± 0.08 <sup>b</sup>	4.41 ± 0.31 <sup>a</sup>	5.41 ± 0.54 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.37 <sup>b,*</sup>

Feces were collected for 2 days.

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7-8).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$ , Con vs Q3G or Que by Student's *t*-test.

Table 4-2-7. Effects of isoquercitrin and quercetin on hepatic enzyme activities in KK-A<sup>y</sup> mice.

	C57	KK-A <sup>y</sup>		
		Con	Q3G	Que
Hepatic enzyme activities (nmol/min/mg protein)				
G6Pase <sup>1</sup>	29.8 ± 8.85 <sup>a</sup>	8.60 ± 0.84 <sup>b</sup>	8.41 ± 0.29 <sup>b</sup>	8.50 ± 1.05 <sup>b</sup>
FAS <sup>1</sup>	1.27 ± 0.32 <sup>ab</sup>	1.08 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>b,*</sup>	0.78 ± 0.27 <sup>ab</sup>
CPT <sup>2</sup>	9.97 ± 0.84	8.97 ± 0.62	10.1 ± 0.69 <sup>#</sup>	11.4 ± 1.09 <sup>*</sup>

Each value is expressed as mean ± SEM (n=7).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$ , Con vs Q3G or Que by Student's *t*-test.

<sup>#</sup> $0.05 < p < 0.1$ , Con vs Q3G or Que by Student's *t*-test.

<sup>1</sup>Fatty acid synthase (FAS) and glucose 6-phosphatase (G6Pase) activities were measured with the 100,000 × *g* supernatant of liver homogenate.

<sup>2</sup>Carnitine palmitoyltransferase (CPT) was measured with the whole liver homogenate.

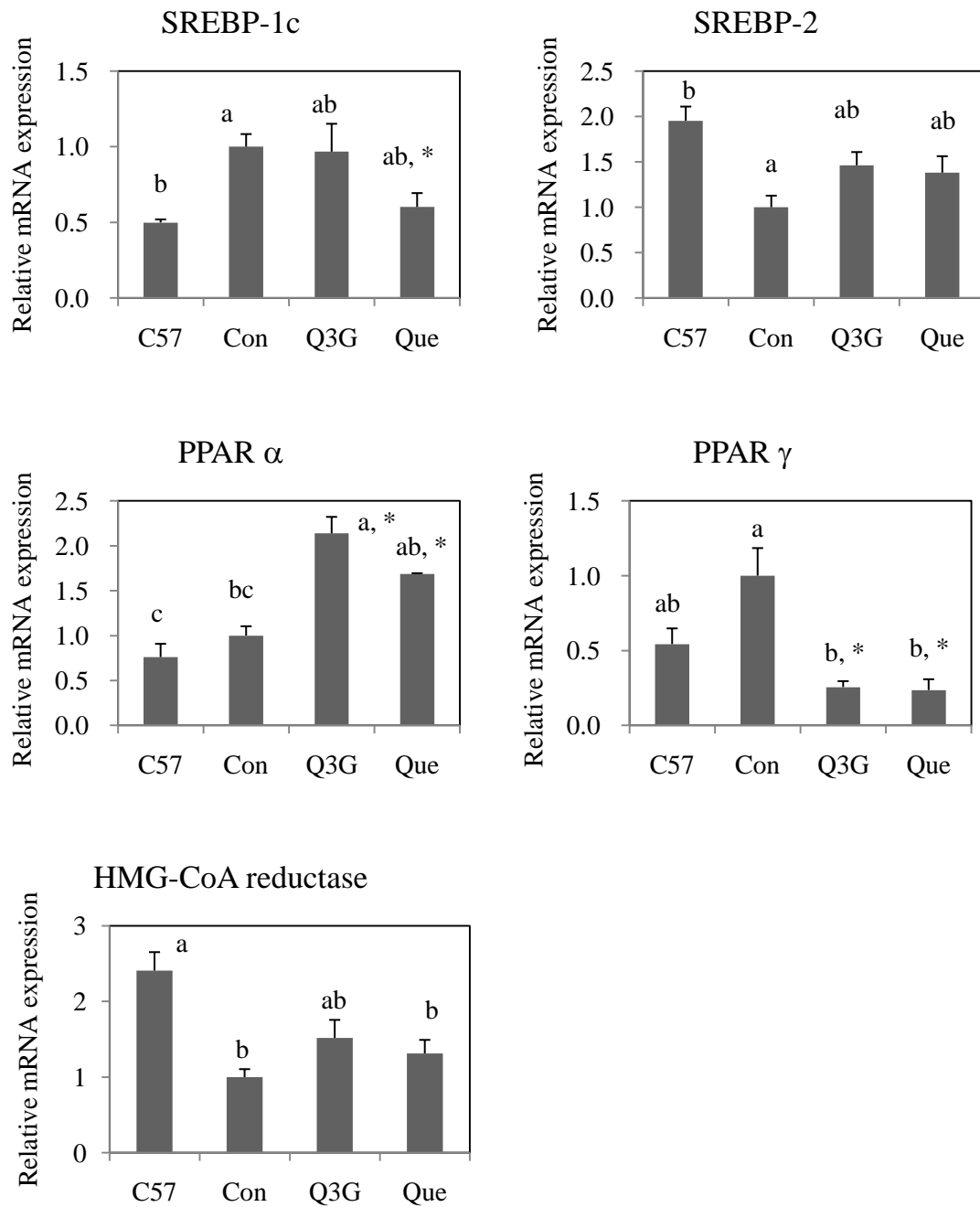


Fig. 4-2-3. Relative hepatic mRNA expression levels of several transcription factors.

These mRNA normalized to Gapdh mRNA levels were determined by real-time PCR.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=4).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

\* $p < 0.05$ , Con vs Q3G or Que by Student's *t*-test.

### 4.3 考察

第3章において、サルナシポリフェノール画分 (AP) の摂取が、空腹時血糖値の上昇を抑制し、インスリン抵抗性の原因となる FFA、TNF- $\alpha$  の産生を抑制したことから、抗糖尿病作用を有することが示唆されたため、本章では、AP の抗糖尿病作用を KK-A<sup>y</sup> マウスを用いて検討した。また、第2章で最も強いマルターゼ阻害活性を示したイソケルシトリンについても、同様に KK-A<sup>y</sup> マウスを用いて抗糖尿病作用を検討した。その際、イソケルシトリンのアグリコンであるケルセチンとの比較も行った。

KK-A<sup>y</sup> マウスは、KK マウスに致死・黄色毛色・肥満などを多面発現する遺伝子 A<sup>y</sup> が導入され、KK マウスより早期 (7-8 週齢) かつ重度に肥満・高血糖を発現する 2 型糖尿病モデルマウスである。また、初めは C57BL/6J に A<sup>y</sup> 遺伝子を導入した C57BL/6J-A<sup>y</sup> と KK マウスを交配させ、KK-A<sup>y</sup> マウスを作製したことから、KK-A<sup>y</sup> マウスの正常対照として C57BL/6J マウスを用いることが多い。肥満だけでなく、ある時期尿糖陽性、高血糖、常に低耐糖能、高インスリン血症、膝ランゲルハンス島肥大などの症状を示すが、*ob/ob* や *db/db* マウスに比べると軽度である<sup>75, 76)</sup>。

第1節において、サルナシポリフェノール画分を摂取した KK-A<sup>y</sup> マウス (AP 群) においては、Con 群に対して経時的な空腹時血糖値、随時血糖値に有意な差は認められなかったが、実験終了時の空腹時血糖値は抑制される傾向にあった。血糖値上昇が抑制されたのは糖新生の律速酵素である G6Pase 活性の抑制が関与することが示唆された。また、飼育 5 週目に行った耐糖能試験 (OGTT) においてはグルコース負荷後の血糖値上昇と血糖値曲線化面積 (AUC) が有意に抑制された。しかし、3 週目に行った OGTT では有意差は認められなかったため、AP のより長期的な摂取によって、耐糖能が改善されることが示唆された。また、5 週目に行った OGTT の際にグルコース負荷後 0、30、60 分後のインスリン量を測定したところ、インスリン分泌においては、Con 群と有意な差は得られなかった。AP 群ではグルコース負荷後の血糖値上昇が有意に抑制されたが、インスリン値の上昇には有意差が認められなかった。以上のことから、インスリン分泌量は同じでも、血糖値の上昇が有意に抑制されたことから、AP はインスリン抵抗性を改善したことが推測された。また、インスリン抵抗性の原因の一つとされる TNF- $\alpha$ <sup>77)</sup> 値の低下と、インスリン抵抗性改善作用のある高分子量アディポネクチン<sup>78)</sup> 値の上昇がインスリン抵抗性の改善に寄与していることが示唆された。脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンには、12-18 量体の高分子 (HMW)、

6 量体の中分子、3 量体の低分子型のアディポネクチンが存在し、抗動脈硬化症、インスリン抵抗性改善作用などの生理作用を示すのは、高分子型である<sup>79)</sup>。

血中中性脂肪と、遊離脂肪酸 (FFA) 値は有意に抑制された。これは、脂肪酸合成酵素 (FAS) 活性の抑制と $\beta$ 酸化酵素であるアシル CoA オキシダーゼ (ACO) 活性の亢進により、肝臓中の脂質代謝が改善されたことが一因であると推察された。コレステロールに関しては、血中のコレステロール値が低下する傾向にあり、アテローム形成指数も低下傾向にあった。それにともない、肝臓中のコレステロールの蓄積も有意に抑制された。これは、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素やコレステロール異化経路において胆汁酸を合成する律速酵素であるコレステロール 7 $\alpha$  ヒドロキシラーゼなどの関与が推察された。

第 2 節では、最も強いマルターゼ活性阻害作用を示した成分の一つであるイソケルシトリンの効果をアグリコンであるケルセチンとともに比較検討した。その際、糖質の吸収阻害だけではなく、生体内での作用を糖・脂質代謝への影響に注目して分析・解析を行った。その結果、飼育 3 週目に行った OGTT では、イソケルシトリン (Q3G) の摂取で、グルコース負荷後の血糖値上昇が有意に抑制され、AUC も低下した。しかし、4 週目に行った OGTT では、血糖値上昇を抑制する傾向はみられたが、有意な差は得られなかった。ケルセチン (Que) の摂取では、4 週目で血糖値の上昇が抑制される傾向にあった。実験終了時の空腹時血糖値は Q3G 群で抑制される傾向にあったが、Que 群では有意な抑制作用は認められなかった。HbA<sub>1c</sub> に関しては、Q3G、Que 群ともに有意に抑制される傾向にあった。そこで、糖新生の律速酵素である G6Pase 活性の測定を行ったところ、有意な差は得られなかったことから、Q3G と Que 群が糖新生の抑制には作用しないことが示唆された。アディポネクチンや TNF- $\alpha$  などのアディポサイトカインにも有意な差はみられなかった。

これまで、ケルセチンの抗糖尿病作用に関してはストレプトゾトシン誘発の 1 型糖尿病モデルラットにおける報告<sup>80-82)</sup>がほとんどであり、酸化ストレスの軽減<sup>83)</sup>や血糖値上昇抑制作用<sup>84, 85)</sup>、インスリン分泌増強作用<sup>86, 87)</sup>などの効果が示されている。しかし、血糖値上昇抑制作用などの効果は実験によっては確認されないケースもあり、要因として、給与量の違いなどが考えられる。本実験でも、ケルセチンの血糖値上昇抑制作用は確認されなかったが、インスリン分泌に関しては有意差はみられないが、増強する傾向にあった。

脂質に関しては、血中の中性脂肪、コレステロール、FFA がイソケルシトリンの摂取で低下する傾向にあったが、ケルセチンの摂取では有意な差がみられなかった。肝臓脂質においても、イソケルシトリンの摂取で総脂質、中性脂肪、総コレステロール、リン脂質の全ての項目で有意に蓄積が抑制されたが、ケルセチンの摂取では総コレステロールとリン脂質のみに蓄積抑制作用がみられた。糞中の脂質排泄量を比較すると、イソケルシトリンの摂取は、脂質排泄を促進する傾向にあったが、ケルセチンは逆に脂質排泄量が少ない傾向にあった。そこで、肝臓中の脂質代謝酵素活性を測定した。イソケルシトリンは FAS 活性を低下させ、 $\beta$ 酸化酵素である CPT 活性を上昇させたことから、肝臓での脂質代謝を活性化し、脂質蓄積を抑制したことが考えられる。ケルセチンでは CPT のみに活性上昇がみられた。

また、肝臓中の脂質低下やインスリン抵抗性の改善には、PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$ ) が関与することが示唆された。PPAR $\alpha$ は FABP (Fatty Acid Binding Proteins)、FATP (Fatty Acid Transport Proteins) などの脂肪酸取り込みに関わるタンパク質、あるいは ACO や CPT などの $\beta$ 酸化酵素などの標的遺伝子の転写を活性化し、脂質代謝を亢進する核内受容体である。イソケルシトリンもケルセチンも有意に PPAR $\alpha$ の遺伝子発現を上昇させた。特に、イソケルシトリンの摂取で遺伝子発現が2倍になった。このことから PPAR $\alpha$ の発現が上昇したことにより、標的遺伝子である CPT の遺伝子発現が誘導され、高い活性を示し、脂質代謝を亢進したことなどが推察された。また、PPAR $\alpha$ の発現上昇は、MCP-1 の発現、マクロファージの浸潤を抑制し、炎症を低減させ、肥満症、メタボリックシンドロームを改善することが知られている。なお、PPAR $\alpha$ は、アディポネクチンがリガンドとして作用し、発現が誘導されることが知られているが、本実験ではアディポネクチンの分泌量が増加していなかったことから、FFA や FABP などがリガンドとして作用していることも考えられる。リガンドは細胞膜、核膜を通過できる脂溶性物質でなければならないため、イソケルシトリンがリガンドとなることは考えにくい。

同じ核内受容体である PPAR $\gamma$ の遺伝子発現が抑制されていた。PPAR $\gamma$ は脂肪組織やマクロファージに高発現しており、主に脂肪細胞の分化、脂質取り込み、抗炎症を誘導する遺伝子である。通常、正常マウスの肝臓では PPAR $\alpha$ が高発現しており、PPAR $\gamma$ の発現は低い。しかし、*db/db* や *KK-A $\nu$* マウスのような 2 型糖尿病モデルマウス、高脂肪食を摂取した食餌誘導性肥満モデルマウスの肝実質細胞において、PPAR $\gamma$ が例外

的に誘導されていることが明らかとなった<sup>88, 89)</sup>。肝臓特異的な PPAR $\gamma$ 欠損 *ob/ob* マウスにおいて、脂肪肝が改善されるが、インスリン抵抗性などの典型的な糖尿病症状は悪化することが報告されている<sup>90)</sup>。イソケルシトリンにおける肝臓脂質の蓄積抑制は、PPAR $\gamma$ の発現が 0.5 倍以下に抑制されていることも一つの要因であることが示唆された。しかし、ケルセチンの摂取で、PPAR $\gamma$ の発現は抑制されたが肝臓の脂質蓄積はコレステロールとリン脂質しか有意に抑制されておらず、逆に総脂質、中性脂肪は若干増加していたため、矛盾が生じる。インスリン抵抗性の悪化は観察されなかった。

脂質代謝を調節する膜結合型転写因子である SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) は 2 つのアイソフォームをもつ。SREBP-1 は脂肪酸代謝関連遺伝子の発現調節を、SREBP-2 はコレステロール代謝関連遺伝子を調節することにより、広範な脂質代謝を調節する。SREBP-1 は主に標的遺伝子である脂肪酸・中性脂肪合成に関わる酵素遺伝子の転写活性を上昇させ、脂質合成を促進する。SREBP-2 は HMG-CoA 合成酵素や還元酵素などの標的遺伝子の転写活性を上昇させ、コレステロール合成を促進する。また、SREBP-1c は、インスリンシグナルの中心的メディエーターである IRS-2 の発現を抑制し、インスリン抵抗性を惹起する<sup>91)</sup>。イソケルシトリンにおいては、SREBP-1c、2 とともに有意な差はなかったが、ケルセチンは SREBP-1c の発現を有意に低下させた。しかし、血中でも肝臓中でも中性脂肪や FFA は低下していないことから、脂質合成に対する SREBP の関与は小さいものと推察された。

肝臓中のコレステロールの蓄積が抑制されていたが、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の遺伝子発現は低下しておらず、他の要因が考えられた。なお、活性値は測定していないので、遺伝子発現は変わらないが、活性自体が低下していることも考えられる。コレステロールはアセチル CoA を原料として、20 数回の酵素反応を経て合成される。アセチル CoA は HMG-CoA 合成酵素により HMG-CoA となり、HMG-CoA 還元酵素によりメバロン酸となる。その後、酵素反応を繰り返し、コレステロールが合成され、肝臓中でコレステロール-7 $\alpha$ ヒドロキシラーゼ (CYP7A1) より胆汁酸に変換される。胆汁酸は胆汁として胆嚢に一時蓄えられ、十二指腸より分泌されて門脈を経て、再び肝臓に戻るという腸肝循環が行われている。肝臓中のコレステロール低下には、おそらく、CYP7A1 が関与しており、CYP7A1 活性が上昇し、合成されたコレステロールの胆汁酸変換も一因であることが推察された。ちなみに、



CYP7A1 の遺伝子発現を上昇させるフラボノイド類は緑茶カテキン<sup>92)</sup>、EGCG<sup>93)</sup>、ブドウ種子プロシアニジン<sup>94)</sup>などがある。しかし、ケルセチンが上昇させるという報告はない。

以上のことから、イソケルシトリンとケルセチンの効果の違いは、ケルセチンの生体内での吸収効率やバイオアベイラビリティがイソケルシトリンなどのケルセチン配糖体よりも低いことが考えられる<sup>95-97)</sup>。ケルセチンに結合する糖の数が増えるほど、親水性が高まるため、吸収率は上がる。そのため、ケルセチンよりもイソケルシトリンのほうが生体内へ吸収されやすいため、様々な効果を発揮すると考えられた。

#### 4.4. 小括

第3章においてサルナシポリフェノール画分 (AP) は、抗糖尿病作用を有することが示唆されたため、本章では、その抗糖尿病作用を **KK-A<sup>y</sup>** マウスを用いて検討した。また、第2章で最も強いマルターゼ阻害活性を示したイソケルシトリンについても、同様に **KK-A<sup>y</sup>** マウスを用いて抗糖尿病作用を検討した。その結果、AP の摂取で、OGTT における血糖値上昇が有意に抑制され、インスリン抵抗性の原因となる **TNF- $\alpha$** 、**FFA** の分泌が抑制され、インスリン抵抗性改善因子である高分子アディポネクチンの分泌が上昇した。また、脂肪酸合成酵素活性の抑制と $\beta$ 酸化酵素である **ACO** 活性が亢進したことから、AP が脂質代謝の改善作用も有する他、その作用がインスリン抵抗性の改善に関わっている可能性が示唆された。

AP 中でも多く含まれ、強いマルターゼ阻害作用をもつイソケルシトリンの摂取では、AP 摂取の場合と同様に OGTT における血糖値上昇抑制と肝臓脂質の蓄積に有意な抑制がみられた。また、肝臓中の脂質低下やインスリン抵抗性の改善には、**PPAR $\alpha$**  が関与することが示唆された。**PPAR $\alpha$**  の遺伝子発現が上昇したことにより、標的遺伝子である **CPT** の遺伝子発現が誘導され、その高い活性により脂質代謝が亢進したと推察された。また、**PPAR $\alpha$**  の活性化は、**MCP-1** の発現とマクロファージの浸潤を抑制し、炎症を低減させ、肥満症、メタボリックシンドロームの改善につながっている可能性が考えられた。なお、第3章において、AP を食餌誘導性肥満モデルに摂取させた実験でも、**FABP** の遺伝子発現上昇による細胞内への **FFA** の取り込み促進によって、**FFA** が **PPAR** のリガンドとして作用し、肝臓脂質の蓄積を抑制し、炎症性サイトカインである **TNF- $\alpha$**  の産生を抑制する可能性のあることを示した。

イソケルシトリン、そのアグリコンであるケルセチンの **KK-A<sup>y</sup>** マウスにおける各種糖尿病マーカーに対する影響の比較では、**HbA<sub>1c</sub>**、OGTT における血糖値上昇などで改善する傾向を示し、これらのフラボノイドが AP の効果成分の一つとなっていることが示唆された。また、イソケルシトリン、ケルセチンの各種マーカーに対する改善効果には大きな違いがみられる場合もあった。特にイソケルシトリンによる改善効果が強く、その要因の一つはイソケルシトリンとケルセチンの吸収性、バイオアベイラビリティの違いによるものと推察された。

## 第5章 サルナシの血圧降下作用

### 緒言

血圧が高くなる原因は、いくつかある。循環血漿量が増加すると心臓に還流する血液量が多くなり、心拍出量が増加することによって血圧が上昇する。 $\text{Na}^+$ は細胞外液のイオン濃度の大部分を占める主要なイオンであり、 $\text{Na}^+$ の体内への蓄積は細胞外液を増加させる。食塩が血圧を高くする主な理由はここにある。食塩摂取によって、何らかの機序で血管平滑筋の緊張度が高まったり、また内因性の昇圧物質に対する反応性が高まったり、あるいは降圧物質に対する感受性が低下したりする可能性がある。末梢血管の太さの変化は、例えば動脈硬化のような器質的な変化によるほか、交感神経の緊張による血管収縮やアンジオテンシンなどの内因性の昇圧物質による血管収縮などの機能的な変化が高血圧に関係する。

高血圧は、メタボリックシンドロームを構成する因子の一つであり、高血圧患者の約半数がインスリン抵抗性を併発する。また、レニン-アンジオテンシンはインスリン抵抗性との間で悪循環を構成し、 $\text{TNF-}\alpha$ やアディポネクチンの異常も関与する。ACE (Angiotensin converting enzyme) 阻害薬や ARB (アンジオテンシン II 受容体拮抗薬) は  $\text{TNF-}\alpha$  上昇を抑制し、さらに  $\text{TNF-}\alpha$  変換酵素阻害薬がインスリン感受性を改善することが報告されている<sup>98,99)</sup>。

アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) は血圧上昇に働く重要な酵素で、アンジオテンシン I に作用し、血圧上昇物質であるアンジオテンシン II を生成すると同時に、血管拡張作用を持ち血圧を低下させるブラジキニンを分解することが知られている。そこで、ACE を阻害することで血圧上昇を抑制することができる。強い ACE 阻害作用を示す成分にニコチアナミンがある。また、オリゴペプチドなどが代表的な ACE 阻剤であり、ラクトリペプチド、かつお節オリゴペプチド、いわしペプチド等がある。また、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は血管弛緩作用<sup>100)</sup>、交感神経抑制作用<sup>101)</sup>、ナトリウム利尿作用<sup>102)</sup>などにより、血圧降下作用を示すことが明らかとなっている。

サルナシには、GABA とニコチアナミンが存在することもあり、高血圧に対する効果が期待された。そこで、ACE 阻害活性を中心にサルナシの血圧降下作用をアミノ酸関連化合物とポリフェノール成分に注目し、検討した。

## 第 1 節 サルナシの ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害作用 (*in vitro*)

### 5.1.1. サルナシ分画部での ACE 阻害活性の比較

#### 1) 試料調製

サルナシ果実 200 g に MeOH 0.5 L を加え、煮沸抽出し、ろ過後濃縮した。CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 2 になるように調製し、振とう抽出することで脂質を除去した。上層 (MeOH + H<sub>2</sub>O) は濃縮後、XAD-2 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) (20 × 90 mm) カラムクロマトグラフィーに供した後、水で十分に洗浄 (SX-W 画分) し、その後 EtOH で溶出し、SX 画分を得た。

2.1.1. で調製されたサルナシポリフェノール画分を SP 画分とした。また、Diaion カラムを水で洗浄して得られた画分を SP-W 画分とした。

#### 2) ACE 阻害活性測定方法

ACE 阻害活性の測定は、試料 30 μl に、125mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.3、608 mM NaCl 含) に溶かした基質溶液 (7.6 mM Hippuryl-His-Leu-OH (Bachem, Bubendorf, Switzerland)) を 250 μl 混合し、37°C で 5 分間プレインキュベートした。その後、60 mU/ml のウサギ肺由来 ACE (Sigma, St. Louis, USA) を 200 μl 加えて、37°C で 30 分間インキュベートした。反応は 1N HCl 250 μl を加え、停止した。遊離した馬尿酸を EtOAc 1.5 ml で振とう抽出し、10 分間遠心 (3,000rpm、15°C) 後、EtOAc 層を 1 ml 採取した。乾固後、蒸留水 200 μl で溶解し、遊離した馬尿酸を HPLC で分析した。分析条件は以下に示した。カラムには、Wakopak Wakosil-5C18 HG (4.6×100 mm i.d.) (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を用いた。展開溶媒は 2-プロパノール : 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.4) = 8 : 92 (6 mM 1-オクタンスルホン酸含) を用い、流速は 1.0 ml/min とした。検出は 225 nm で行った。試料の代わりに 50% EtOH を用いたものを対照とし、下記の式より阻害率を求めた。

$$\text{ACE 阻害率(\%)} = (\text{Control OD} - \text{Sample OD}) / \text{Control OD} \times 100$$

### 5.1.2. ACE 阻害作用を示す有効成分の探索

#### 1) 試料調製

SX 画分 (0.1 g/2 ml 50% EtOH) を Sephadex LH-20 (25 × 400 mm) クロマトグラフィーに供し、50% EtOH で展開した後、2 g ずつ分取した。この分取したフラクション溶液を試料とした。対照には 50% EtOH 溶液を用いた。

## 2) ACE 阻害活性測定方法

5.1.1 と同様の方法で、各フラクションの ACE 阻害率を算出し、阻害率の高い画分は、HPLC-DAD でスペクトル分析を行った。分析条件は、1.1.に記載したとおりである。さらに、各画分の 280nm と 360nm における吸光度の測定を行った。

### 5.1.3. 結果

サルナシを合成吸着樹脂である Diaion カラムによって SP-W と SP 画分に、XAD カラムによって SX-W と SX 画分に分画し、それぞれについて ACE 阻害活性を測定した。結果を Fig. 5-1-1 に示した。SX 画分と SP 画分はほぼ同程度の高い阻害作用を示したが、SX 画分が一番強い ACE 阻害作用を示し、SX-W、SP-W 画分の 2 倍程度の阻害活性であった。

次に、強い阻害作用を示した SX 画分を Sephadex LH-20 を用いて分画し、各画分の ACE 阻害作用を測定した。結果を Fig. 5-1-2 に示した。阻害率の高かった画分の HPLC クロマトグラムとその UV スペクトラムを Fig. 5-1-3 に示した。各画分の吸光度と ACE 阻害作用を比較すると、必ずしも分画画分の吸光度と ACE 阻害作用に比例関係はみられなかった。ACE 阻害作用の高かった画分 I、II、III について HPLC で分析し、主要ピークの測定をしたところ、もっとも阻害作用の高かった画分 I にみられる主要ピークのスペクトルはフラボノイド、桂皮酸類とは異なることが予想され、これらとは異なる成分が阻害作用を示しているものと推察された。また、画分 II には、桂皮酸類に由来する UV スペクトルを示すピークが観察された他、いくつかの特徴的な UV スペクトルを示すピークも観察することが可能であった。画分 III はハイペロサイドとイソケルシトリンがその 78%を占める画分であった。

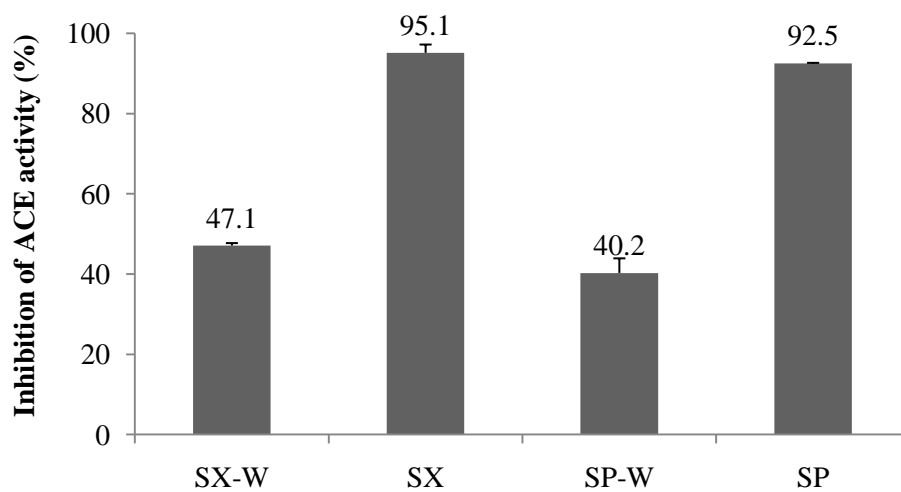
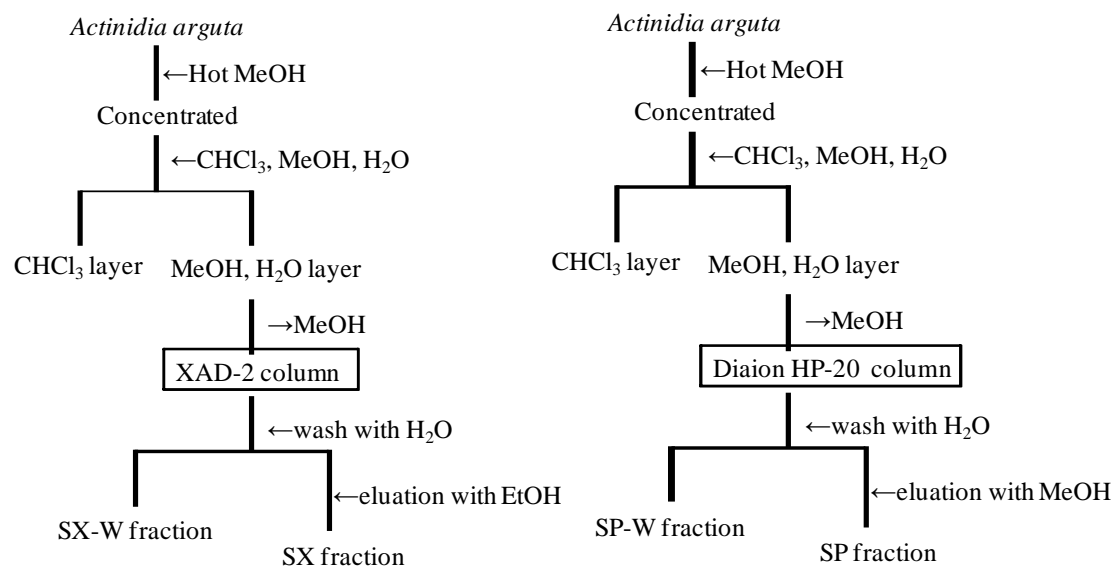


Fig. 5-1-1. Effects of each fractions on ACE activities *in vitro*.

The percentage inhibition is defined as that compared with the Control reaction being 100%. Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3).

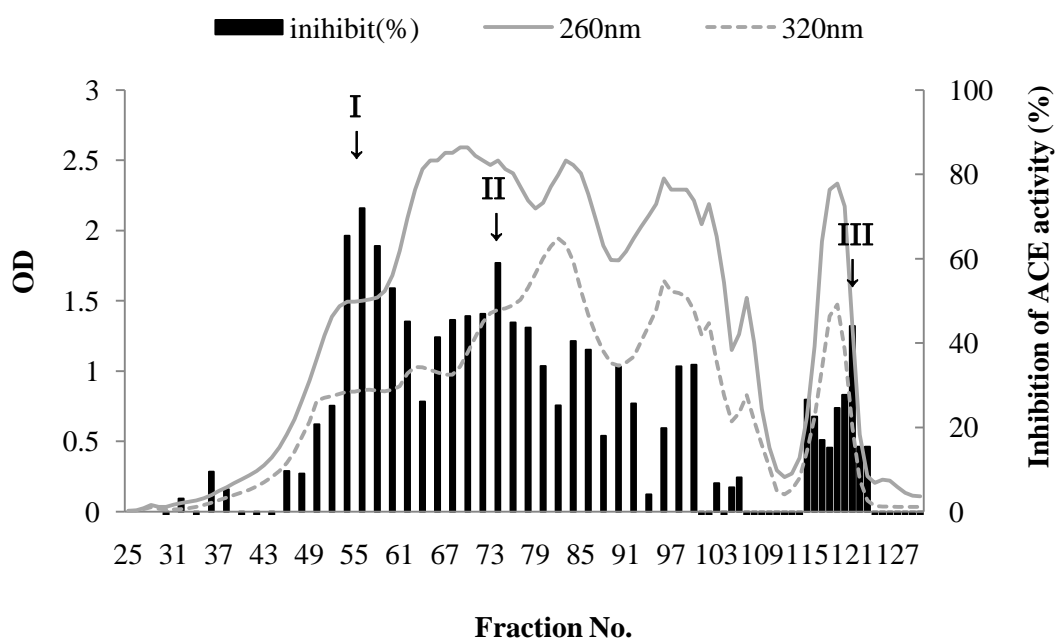


Fig. 5-1-2. ACE-inhibitory activity and optical density (OD) of fractions fractionated by Sephadex LH-20 column.

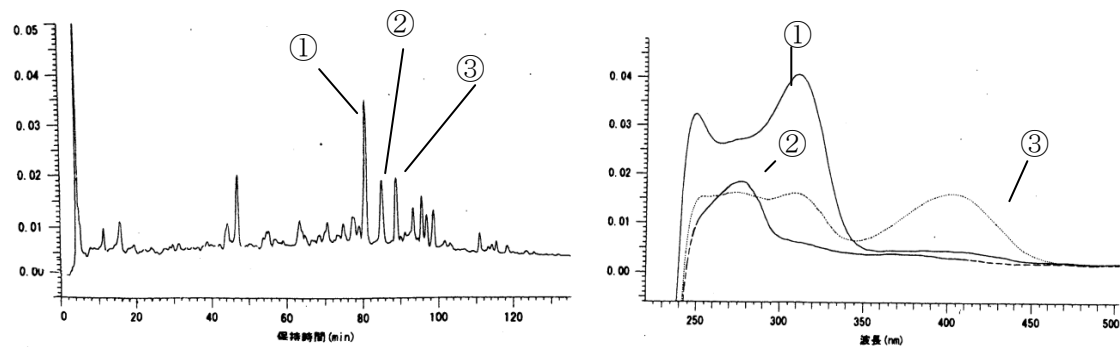
The percentage inhibition is defined as that compared with the control reaction being 100%. The SX was fractionated by Sephadex LH-20 column chromatography using 50% EtOH as eluent.

I : unidentified

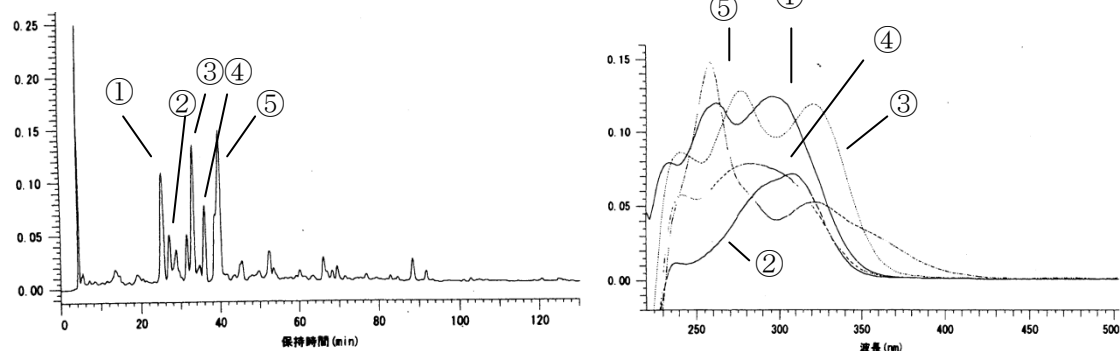
II : unidentified

III : Hyperoside and Isoquercitrin

Fraction No. 56 (I)



Fraction No. 74 (II)



Fraction No. 121 (III)

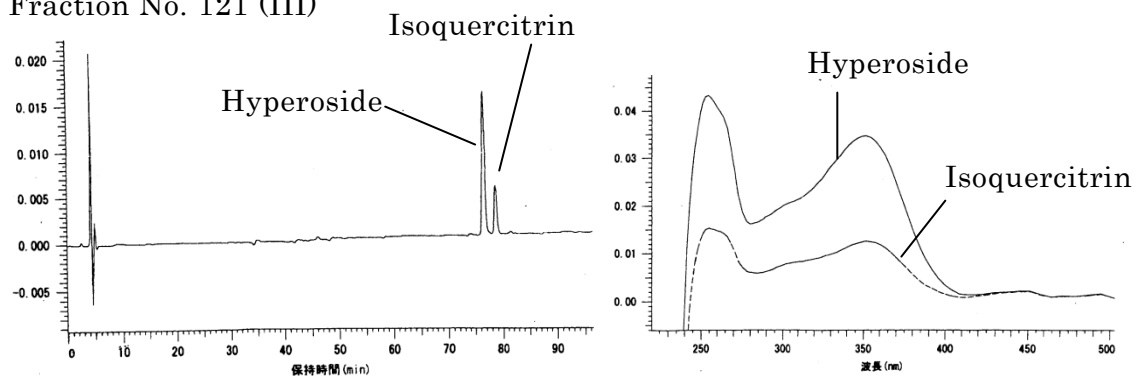


Fig. 5-1-3. HPLC chromatograms of major fractions obtained by Sephadex LH-20 column chromatography and UV-spectra of main peaks on HPLC chromatograms.



## 第 2 節 高血圧自然発症モデルラット(SHR)におけるサルナシの血圧降下作用

### 5.2.1. 方法

#### 1) 試料調製

試料は、5.1.1.で調製された SX 画分と SP 画分を用いた。SX 画分は 10 mg/ml、SP 画分は 30 mg/ml となるように蒸留水に溶解した。

#### 2) 実験方法

10 週齢の雄性 SHR/Izm (日本 SLC, 静岡, 日本; 平均体重  $335 \pm 3.16$  g) を 1 週間予備飼育し 12 時間絶食後、4 匹ずつ 3 群に分け、血圧を株式会社ソフトロン社製の非観血式自動血圧測定装置 BP-98A を用い、Tail-cuff 法で測定した。その後、対照群には水を 1 ml 経口投与した。SX 群には SX 溶液 (10 mg/ml) を 1 ml、SP 群には SP 溶液 (30 mg/ml) を 1 ml 経口投与し、2、4、6 時間後の血圧を測定した。

#### 3) SX と SP 画分のポリフェノール分析とアミノ酸分析

ポリフェノール成分の分析は 1.1.に示した HPLC 条件で行い、アミノ酸分析は 1.3.に示したアミノ酸分析条件下で行った。アミノ酸分析用の試料は、SX 画分 0.6 mg を 0.1N HCl 1ml に、SP 画分は 0.5 mg を 0.1N HCl 1 ml に溶解して調製した。

### 5.2.2. 結果

SHR に SX または SP を経口投与したときの収縮期血圧と拡張期血圧の変化量を Fig. 5-2-1 に示した。Con 群ではほぼ血圧の変化がみられなかった。SP の投与において、投与後 2 時間の血圧が有意に低下した。SX 群では、投与 2、4、6 時間後のいずれの時間においても Con 群に対して有意に低い血圧を示した。そこで、SP と SX 画分に含まれるポリフェノール成分の分析を行ったところ、SP に比べて SX 画分には UV スペクトルを示すピークが多く検出され、SP には検出されなかった (-) エピカテキンなどのピークも検出された。また、ピーク 2、3、4

の含有割合が少ないようにみられた (Fig. 5-2-2)。アミノ酸分析においては、遊離のアミノ酸はほとんど検出されなかったため、加水分解し、再びアミノ酸分析を行った。その結果、多くのアミノ酸が検出されたことから、SP、SX 量画分には、アミノ酸が結合したペプチド類も含まれていることが示唆された (Fig. 5-2-3)。

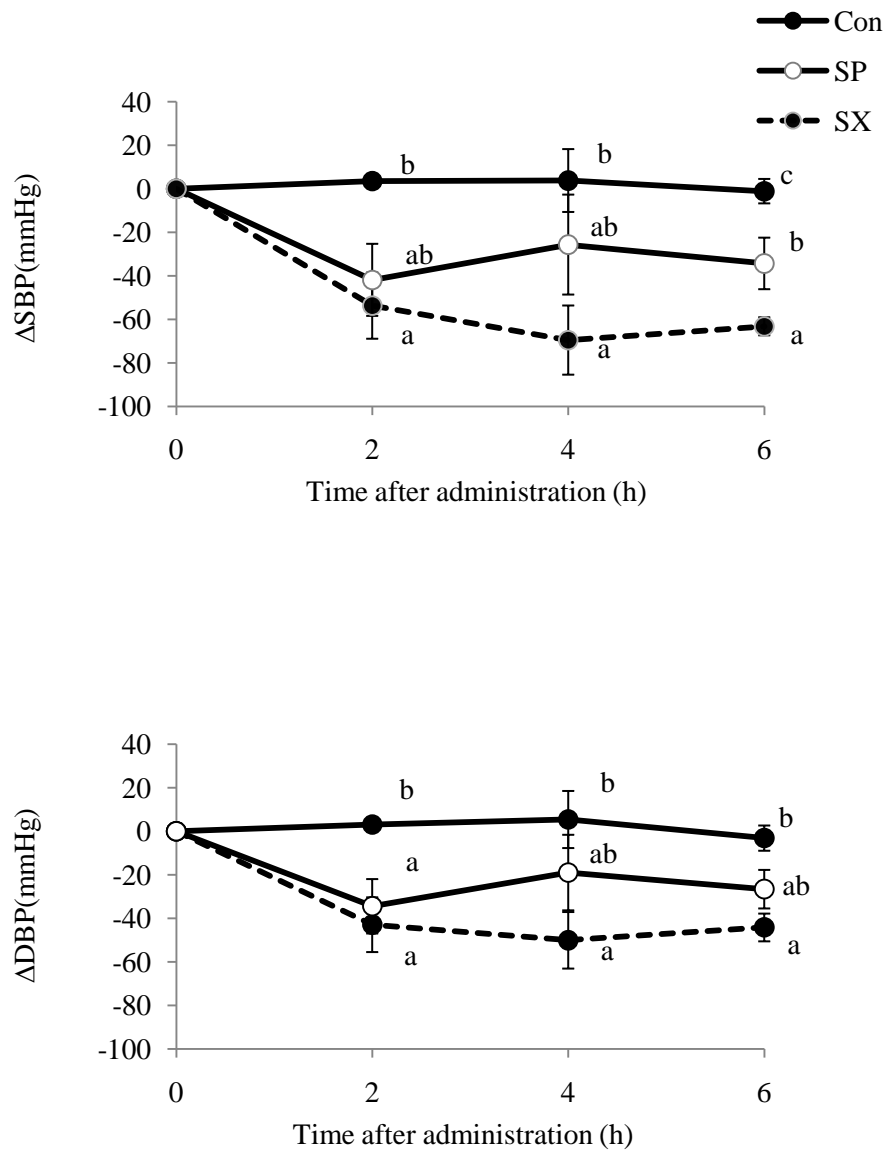
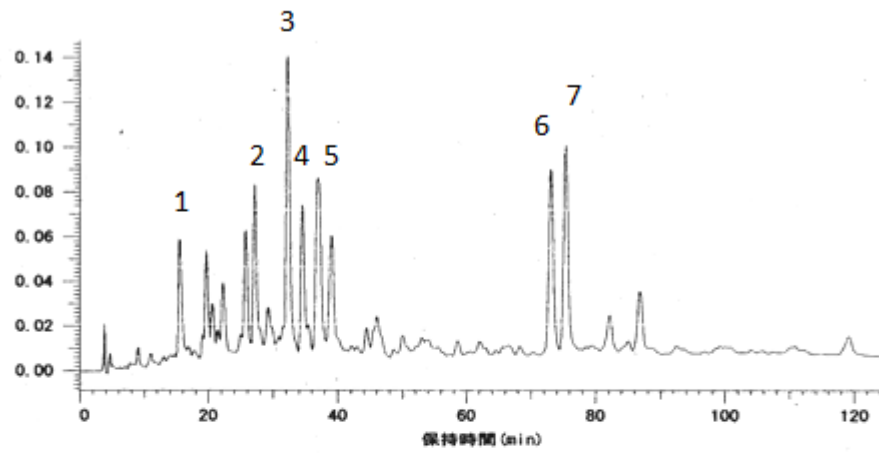


Fig. 5-2-1. Effect of single oral administration of SX or SP on blood pressure in SHR.

Each value is expressed as mean  $\pm$  SEM (n=4).

Values without a common letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

### SP fraction



### SX fraction

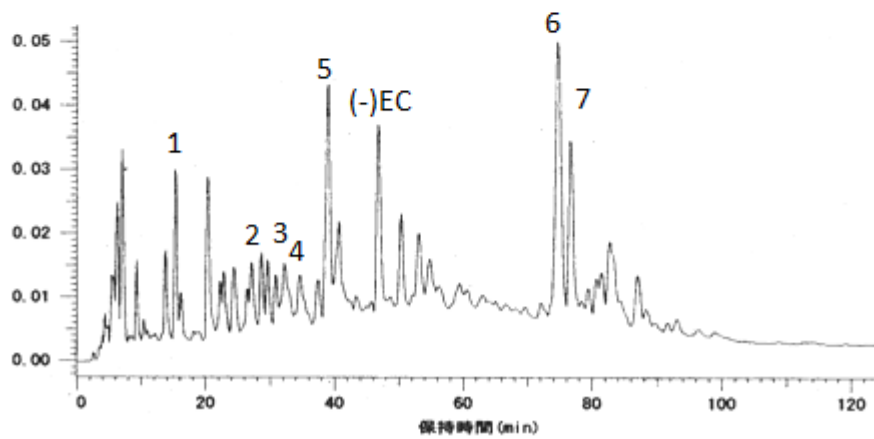


Fig. 5-2-2. HPLC chromatograms of SP and SX fractions.

Column, Develosil C-30-UG-5 (4.6 × 250 mm); Solvent A, 5% MeCN/1% AcOH; Solvent B, 40% MeCN. Program: A linear gradient of 0-100% of B in A over the course of 180 min at a flow rate of 0.8 ml/min. Detection, 280 nm.

1. Protocatechuic acid, 2. Chlorogenic acid, 3. (+) Catechin, 4. Caffeic acid, 5. Procyanidin B2, 6. Hyperoside, 7. Isoquercitrin

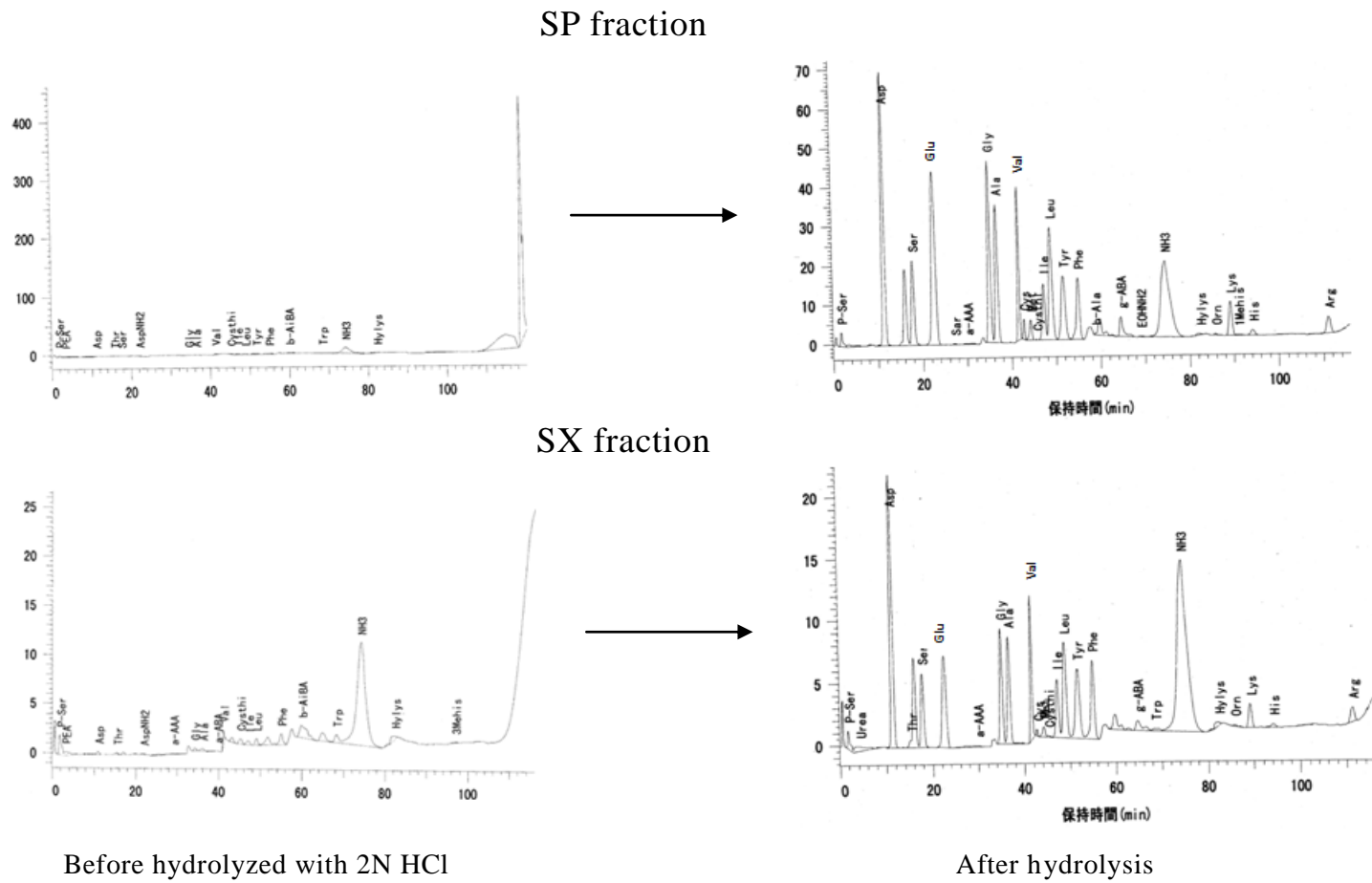


Fig. 5-2-3. Chromatograms of amino acids obtained by amino acid analyzer.

### 5.3 考察

サルナシの ACE 阻害活性と高血圧自然発症ラット (SHR) における血圧降下作用を検討した。

Diaion カラムでは主にポリフェノールが吸着し、アミノ酸や糖類はほとんど吸着しない。XAD カラムは Diaion と比較して、ペプチド等を吸着しやすい。本章では、サルナシの血圧降下作用を Diaion カラムと XAD カラムで分画して得られる画分 (SP、SX) のそれぞれについて検討を行った。いずれのカラム吸着部分に含まれるポリフェノールの HPLC クロマトグラム上の組成、吸着部の加水分解で得られるアミノ酸の組成は大きな違いがみられなかった。SP、SX 画分ともに加水分解後のアミノ酸分析でアスパラギン酸、グルタミン、グリシン、バリンが多く含まれていた。

ACE 阻害活性の高かった SP または SX 画分を SHR に経口投与し、血圧降下作用を検討したところ、Con 群に比べ SX 群では収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP) ともに有意な降下作用を示した。SX 群の投与量が SP 群の 1/3 であったことから、SX 画分はより強い血圧上昇抑制作用を有する物質の含まれることが推察された。また、SX 画分が強い ACE 阻害活性を示したことから、その作用機構の一つとして含有成分による直接的な ACE 阻害が考えられた。

また、本研究で強い ACE 阻害作用を示した画分に含まれていたハイペロサイドとイソケルシトリンには、同時に投与した際に血圧降下作用のあることが報告されている<sup>103)</sup>。その作用機序の一つとして、一酸化窒素 (NO) を介する血管内皮依存性弛緩作用が報告されており<sup>104)</sup>、サルナシにみられる血圧降下作用には、サルナシに含まれているイソケルシトリンとハイペロサイドが関与していることが推察される。また、最も高い ACE 阻害活性を示した画分 I については、カテキン類、フラボノール、桂皮酸類などではないスペクトルを示していることから、未知の成分が含まれている可能性も考えられる。そのため、今後、成分の同定を行う必要がある。

SP、SX 画分の加水分解物には GABA が含まれていたが、その量は少なかった。ニコチアミンは検出することが出来なかった。

以上のことより、サルナシには血圧降下作用を示す成分の一つとして、ハイペロサイドとイソケルシトリンも含まれていること、また SX 画分にはこれらとは異なる成分が含まれていることが示唆された。サルナシは高血圧予防食品として利用が期待された。

#### 5.4. 小括

高血圧は、メタボリックシンドロームを構成する因子の一つであり、高血圧患者の約半数がインスリン抵抗性を併発する。本章では、インスリン抵抗性改善機能を示したサルナシポリフェノールの新たな機能として、その血圧降下作用について *in vitro*、自然発症高血圧ラット (SHR) において検討した。

サルナシメタノール抽出液の Diaion カラム吸着 (ポリフェノールリッチ) 画分 (SP) と XAD カラム吸着 (アミノ酸類リッチ) 画分 (SX) はいずれも、強い ACE 阻害活性を示した。SX 画分、SP 画分のいずれにもポリフェノール類、ペプチド類の含まれること、また SX 画分は強い ACE 阻害活性を示し、その主要成分としてハイペロサイド、イソケルシトリンを含むことが示された。

SP、SX 画分はいずれも SHR において血圧降下作用を示し、SX 画分は SP 画分の 1/3 程度の用量で同程度の効果を示した。SX 画分は、*in vitro* で強い ACE 阻害作用を示したことから、体内で直接的に ACE を阻害し、効果を発揮していることが考えられた。

## 総 括

糖尿病、脂質異常症、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与す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。メタボリックシンドロームの発症要因の一つは肥満であり、肥満の予防・改善は重要な課題となっている。近年、食品中の有用成分にはこれらの生活習慣病を予防・改善する機能が見出されており、特にポリフェノール類は多彩な生理機能を持つことで注目を浴びている。

サルナシ (*Actinidia arguta*) は豊富なビタミン源であるが、食品化学的機能、生理機能に関する報告は少なく、その可能性は未知数である。そこで、近年問題となっている生活習慣病、特に、肥満、糖尿病、高血圧に対する効果を、その作用機序を含めて明らかにする目的で本研究を行った。

第1章では、サルナシ果実の特性を明らかにした。サルナシには、豊富なポリフェノールが含まれていることが明らかとなった。同じマタタビ科のキウイフルーツと比べても2倍程度多く、約0.3%のポリフェノールが含まれていた。桂皮酸類、カテキン類、フラボノイド類など多様なポリフェノールから構成されていた。これまで、サルナシに含まれるポリフェノールとしては、(+) カテキン、クロロゲン酸、(-) エピカテキン、コーヒー酸、*p*-クマル酸、ルチン、ケルセチンが報告されている<sup>27)</sup>。本研究では、プロトカテキユ酸、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、イソケルシトリンの含まれることを明らかにした。その中でも、プロトカテキユ酸、プロシアニジン B2、ハイペロサイド、イソケルシトリンは、これまで、サルナシ中のポリフェノールとしての報告はなく、本研究で新しく報告するものである。また、サルナシ果実中のアミノ酸に関する知見もなく、今回、サルナシ中のアミノ酸としては $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA) の含量が最も多く、最近血圧降下作用で注目されるようになったニコチアミンも微量含まれることが明らかとなった。

第2章では、糖尿病に対する効果を検討した。まず、サルナシポリフェノール画分の食後血糖値上昇抑制作用を検討したところ、サルナシポリフェノール画分はデンプンまたはマルトース負荷時の食後血糖値の上昇を有意に抑制し、糖質消化酵素活性阻害作用が示唆された。そこで、 $\alpha$ -グルコシダーゼに対する阻害作用を検討したところ、



サルナシポリフェノール画分はマルターゼ活性を強く阻害し、イソケルシトリンとハイペロサイドを含む画分でもっとも強い阻害作用を示すことが明らかとなった。

グアバ葉、桑葉など様々な植物の抽出液の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用が明らかとなっており、その作用成分にポリフェノールが関与しているという報告が多い<sup>38, 45, 46)</sup>。このような効果を示す食品または食品成分を摂取することで、過剰な糖の吸収が抑制され、日常から効果的に糖尿病、肥満を予防できると考えられた。

第3章では、前章の結果をうけて、サルナシポリフェノール画分の抗肥満作用を食餌誘導性肥満モデルマウスを用いて検討した。肥満は、メタボリックシンドロームの発症の重要な要因の一つとされ、蓄積した内臓脂肪は肥大化し、悪玉アディポサイトカインの分泌によってインスリン抵抗性を発症し、各疾病を誘発する。従って、肥満の予防は、各種疾病の予防にも繋がる。本実験では、高脂肪・高ショ糖食を摂取させたマウスの体重、内臓脂肪量が有意に増加し、血中の遊離脂肪酸 (FFA)、血糖値、レプチン、TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor - $\alpha$ ) 値が有意に上昇した。このことから、高脂肪・高ショ糖食を摂取することで、肥満となり、内臓脂肪の蓄積によって悪玉アディポサイトカインが分泌され、インスリン抵抗性を発症したと考えられる。そのため、肥満にともなう血糖値の上昇も観察された。しかし、サルナシポリフェノール画分を摂取させることで、体重増加と内臓脂肪の蓄積に抑制傾向がみられた。血中の中性脂肪、FFA、血糖値、TNF- $\alpha$ 値は有意に低値を示した。肝臓についてDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行ったところ、サルナシポリフェノール画分の摂取によって FABP (Fatty acid binding protein) の発現が上昇していた。このことによつて、FFA の細胞内への取り込みが促進され、FFA が PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) のリガンドとして作用し、脂肪酸の $\beta$ 酸化、抗炎症作用、酸化ストレス、細胞増殖などに関わる標的遺伝子の発現を調節している可能性が推察された。また、炎症性サイトカインの MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) と転写因子である AP-1 (Activator protein-1) の発現が抑制されたことにより、その下流の TNF- $\alpha$ の産生が抑制されていること、また、脂肪酸合成やインスリン抵抗性に関わる SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein) が結合するプロモーター領域を持つ p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) の発現が抑制されていることから、このことが血中の中性脂肪、FFA 値の低下と関連していることが推察された。これらのことから、サルナシポリフェノール画分は、脂質代謝やインスリン抵抗性を

遺伝子レベルで制御し、抗肥満作用、インスリン抵抗性改善作用を示していることが示唆された。

第4章では、前章においてポリフェノール画分が抗糖尿病作用を有することが示唆されたため、サルナシポリフェノール画分の抗糖尿病作用を **KK-A<sup>y</sup>** マウスを用いて検討した。また、第2章で最も強いマルターゼ阻害活性を示したイソケルシトリンについても、同様に **KK-A<sup>y</sup>** マウスを用いて抗糖尿病作用を検討した。サルナシポリフェノールの摂取で、耐糖能試験 (OGTT) における血糖値上昇が有意に抑制され、インスリン抵抗性の原因となる **TNF- $\alpha$** 、**FFA** の分泌が抑制され、インスリン抵抗性改善因子である高分子アディポネクチンの分泌が上昇した。また、脂肪酸合成酵素の活性抑制と $\beta$ 酸化酵素である **ACO (acyl-CoA oxidase)** 活性が亢進したことから、脂質代謝の改善作用も有することが示唆された。

サルナシポリフェノール画分中でも多く含まれ、強いマルターゼ阻害作用を示したイソケルシトリンの摂取では、サルナシポリフェノール画分の摂取の場合と同様に **OGTT** における血糖値上昇抑制、肝臓脂質の蓄積抑制を示した。また、肝臓中の脂質低下やインスリン抵抗性の改善に関わることが予想される **PPAR $\alpha$**  の遺伝子発現は、イソケルシトリンの摂取で上昇した。このことが **CPT (Carnitine palmitoyltransferase)** の遺伝子発現を誘導し、**CPT** が高い活性を示し、脂質代謝を亢進していることも推察された。また、**PPAR $\alpha$**  の活性化は、**MCP-1** の発現、マクロファージの浸潤を抑制し、炎症を低減させ、肥満症、メタボリックシンドロームを改善していることが推察される。なお、第3章において、サルナシポリフェノールを食餌誘導性肥満モデルに摂取させた実験でも、**FABP** が **PPAR** のリガンドとして作用し、肝臓脂質蓄積抑制などの効果を発し、炎症性サイトカインである **TNF- $\alpha$**  の産生を抑制する可能性が示されており、同一の知見が得られている。

第5章では、サルナシの血圧降作用の検討を行った。アンジオテンシン変換酵素 (**ACE**) 阻害活性の高かった **Diaion** 吸着部分の **SP** または **XAD** 吸着部分の **SX** 画分を **SHR** に経口投与したところ有意な血圧降下作用を示した。**SX** 群の投与量が **SP** 群の  $1/3$  であったことから、**SX** 画分はより強い血圧上昇抑制作用を有する物質を含むことが推察された。また、**SX** 画分が強い **ACE** 阻害活性を示したことから、その作用機構の一つとして含有成分による直接的な **ACE** の阻害が考えられた。なお、本研究で強い **ACE** 阻害作用を示す画分に含まれているハイペロサイドとイソケルシトリンに

は一酸化窒素（NO）を介する血管内皮依存性弛緩作用が報告されている<sup>104</sup>。サルナシに含まれるイソケルシトリンとハイペロサイドにも同様の経路を介して血圧降下作用を示していることが推察される。

以上のことから、本研究では、サルナシは豊富なビタミン源だけではなく、抗糖尿病、血圧降下と関わる多種多様なポリフェノールを含むことが明らかとなった。また、サルナシポリフェノールとして新たに含まれることが明らかとなったイソケルシトリンとハイペロサイドには、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用、ACE阻害作用が示された。また、これら成分を含むサルナシポリフェノールには、核内受容体であり脂肪酸 $\beta$ 酸化酵素や炎症性サイトカインの制御に関わる遺伝子 PPAR $\alpha$ の発現を上昇させることで、脂質蓄積抑制、さらにはインスリン抵抗性を改善している可能性も示され、これらのことが、抗糖尿病、抗肥満作用を示していることが推察された。また、サルナシは血圧降下作用も有し、生活習慣病を予防する上で効果的な食品であることが示唆された。

## 参 考 文 献

- 1) Després JP, Lemieux I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, **444**, 881-887.
- 2) Fain JN. (2006). Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm.*, **74**, 443-477.
- 3) Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. (2010). Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res.*, **33**, 386-393.
- 4) Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.*, **56**, 317-333.
- 5) C. S. Nergard, D. Diallo, K. Inngjerdingen et al., (2005). Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer-, radical scavenging- and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. *J. Ethnopharmacology*, **96**, 255–269.
- 6) C.-C.Wong, H.-B. Li, K.-W. Cheng, and F. Chen. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, **97**, 705–711.
- 7) P. A. Meléndez and V. A. Capriles. (2006). Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*, **13**, 272–276.
- 8) B. Dzingirai, M. MuChuweti, T. Murenje, C. Chidewe, M. A. N. Benhura, and L. S. Chagonda. (2007). Phenolic content and phospholipids peroxidation inhibition by methanolic extracts of two medicinal plants: *Elionurus muticus* and *Hypoxis hemerocallidea*. *African Journal of Biochemistry Research*, **1**, 137–141.
- 9) P. N. Diouf, T. Stevanovic, and A. Cloutier. (2009). Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, **113**, 897–902.
- 10) Aprikian O, Duclos V, Guyot S, Besson C, Manach C, Bernalier A, Morand C, Rémésy C, Demigné C. (2003). Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more

- effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *J Nutr.*, **133**, 1860-1865.
- 11) Nagao T, Meguro S, Hase T, Otsuka K, Komikado M, Tokimitsu I, Yamamoto T, Yamamoto K. (2009). A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)*, **17**, 310-317.
  - 12) Peng N, Prasain JK, Dai Y, Moore R, Arabshahi A, Barnes S, Carlson S, Wyss JM. (2009). Chronic dietary kudzu isoflavones improve components of metabolic syndrome in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.*, **57**, 7268-7273.
  - 13) Wollin SD and Jones PJH. (2001). Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J Nutr.*, **131**, 1401-1404.
  - 14) Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, **127**, 1109-1122.
  - 15) Baur JA. (2010). Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta.*, **1804**, 1626-1634.
  - 16) 社団法人日本果実種苗協会， 特産のくだもの サルナシ・マタタビ (1998)
  - 17) 実教出版株式会社， オールガイド五訂増補食品成分表
  - 18) Nishiyama I, Yamashita Y, Yamanaka M, Shimohashi A, Fukuda T, Oota T. (2004). Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other actinidia species. *J Agric Food Chem.*, **52**, 5472-5475.
  - 19) Kim, D., Kim, S.H., Park, E.J., Kang, C.Y., Cho, S.H. and Kim, S. (2009). Anti-allergic effects of PG102, a water-soluble extract prepared from *Actinidia arguta*, in a murine ovalbumin-induced asthma model. *Clin Exp Allergy.*, **39**, 280-289.
  - 20) Park, E.J., Kim, B., Eo, H., Park, K., Kim, Y., Lee, H.J., Son, M., Chang, Y.S., Cho, S.H., Kim, S. and Jin, M. (2005). Control of IgE and selective T(H)1 and T(H)2 cytokines by PG102 isolated from *Actinidia arguta*. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **116**, 1151-1157.
  - 21) Takano, F., Tanaka, T., Tsukamoto, E., Yahagi, N. and Fushiya, S. (2003). Isolation of (+)-catechin and (-)-epicatechin from *Actinidia arguta* as bone marrow cell proliferation promoting compounds. *Planta Med.*, **69**, 321-326.

- 22) Kim J, Jang DS, Kim H, Kim JS. (2009). Anti-lipase and lipolytic activities of ursolic acid isolated from the roots of *Actinidia arguta*. *Arch Pharm Res.*, **32**, 983-987.
- 23) Jang DS, Lee GY, Kim J, Lee YM, Kim JM, Kim YS, Kim JS. (2008). A new pancreatic lipase inhibitor isolated from the roots of *Actinidia arguta*. *Arch Pharm Res.*, **31**, 666-670.
- 24) Jang DS, Lee GY, Lee YM, Kim YS, Sun H, Kim DH, Kim JS. (2009). Flavan-3-ols having a gamma-lactam from the roots of *Actinidia arguta* inhibit the formation of advanced glycation end products in vitro. *Chem Pharm Bull (Tokyo).*, **57**, 397-400.
- 25) Folin, O. and Denis, W. (1915). A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.*, **22**, 305-308.
- 26) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編著, 食品機能研究法, 光琳, 218-220, 2000.
- 27) Jin Gook Kim, Kenji Beppu, Ikuo Kataoka. (2008). Varietal difference in phenolic content and astringency in skin and flesh of hardy kiwifruit resources in Japan. *Sci. Hortic.*
- 28) Josic J, Tholen Olsson A, Wickenberg J, Lindstedt S, Hlebowicz J. (2010). Does green tea affect postprandial glucose, insulin and satiety in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Nutr J.*, **9**, 63.
- 29) Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. (2005). Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.*, **5**, 2299-2304.
- 30) Vemulapalli S, Barletta M. (1984). The role of the sympathetic nervous system in the cardiovascular effects of systemically administered gamma-aminobutyric acid. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, **267**, 46-58.
- 31) Frankowska M, Filip M, Przegaliński E. (2007). Effects of GABAB receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. *Pharmacol Rep.*, **59**, 645-55.
- 32) Atsumi Hayashi and Koichi Kimoto. (2007). Nicotianamine Preferentially Inhibits Angiotensin I-Converting Enzyme. *J. Nutr. Sci. Vitam.*, **53**, 331-336 .
- 33) Hanefeld, M. (1998). The role of acarbose in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Diabetes. Complications.*, **12**, 228-237.
- 34) Matsumoto, K., Yano, M., Miyake, S., Ueki, Y., Yamaguchi, Y., Akazawa, S. and Tominaga, Y. (1998). Effects of voglibose on glycemic excursions, insulin secretion, and insulin sensitivity in non-insulin-treated NIDDM patients. *Diabetes Care.*, **21**, 256-260.

- 35) Okada, S., Ishii, K., Hamada, H., Tanokuchi, S., Ichiki, K. and Ota, Z. (1996). The effect of an alpha-glucosidase inhibitor and insulin on glucose metabolism and lipid profiles in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Int. Med. Res.*, **24**, 438-447.
- 36) Kawamori, R., Tajima, N., Iwamoto, Y., Kashiwagi, A., Shimamoto, K. and Kaku, K. (2009). Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance. *Lancet*, **373**, 1607-1614.
- 37) Aybar, M.J., Sánchez, Riera, A.N., Grau, A. and Sánchez, S.S. (2001). Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, **74**, 125-132.
- 38) Deguchi, Y. and Miyazaki, K. (2010). Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. *Nutr. Metab. (Lond)*, **7**:9.
- 39) Miura, T. (2006). Antidiabetic activity of *Fuscoporia oblique* and *Samallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. *J. Trad. Med.*, **24**, 47-50.
- 40) Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, Mitsunaga T, Hashimoto F, and Kiso Y. (2005). Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J Agric Food Chem.*, **53**, 4593-4598.
- 41) Toyoda-Ono Y, Yoshimura M, Nakai M, Fukui Y, Asami S, Shibata H, Kiso Y, and Ikeda I. (2007). Suppression of postprandial hypertriglyceridemia in rats and mice by oolong tea polymerized polyphenols. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **71**, 971-976.
- 42) Han LK, Zheng YN, Xu BJ, Okuda H, and Kimura Y. (2002). Saponins from platycodi radix ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *J Nutr.*, **132**, 2241-2245.
- 43) Yoshizumi K, Hirano K, Ando H, Hirai Y, Ida Y, Tsuji T, Tanaka T, Satouchi K, and Terao J. (2006). Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase. *J Agric Food Chem.*, **25**, 335-341.
- 44) Deguchi, Y., Osada, K., Uchida, K., Kimura, H., Yoshizawa, M., Kudo, T. and Yasui, H. (1998). Effects of extract of guava leaves on the development diabetes in the db/db mouse and on the postprandial blood glucose of human subjects. *Nippon Nôgeikagaku Kaishi* (in Japanese), **72**, 923-931.

- 45) Aybar, M.J., Sánchez, Riera, A.N., Grau, A. and Sánchez, S.S. (2001). Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, **74**, 125-132.
- 46) Miura, T. (2006). Antidiabetic activity of *Fuscoporia oblique* and *Samallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. *J. Trad. Med.*, **24**, 47-50.
- 47) Shibano, M., Kakutani, K., Taniguchi, M., Yasuda, M. and Baba, K. (2008). Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their alpha-glucosidase-inhibitory activity. *J. Nat. Med.*, **62**, 349-353.
- 48) Panda, S. and Kar, A. (2007). Antidiabetic and antioxidative effects of *Annona squamosa* leaves are possibly mediated through quercetin-3-O-glucoside. *Biofactors.*, **31**, 201-210.
- 49) Hnatyszyn, O., Miño, J., Ferraro, G. and Acevedo, C. (2002). The hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in streptozotocin-induced diabetic mice. *Phytomedicine*, **9**, 556-559.
- 50) Reaven GM. (1998). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.*, **37**, 1595–1607.
- 51) Kaplan NM. (1989). The deadly quartet: upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension. *Arch Intern Med.*, **149**, 1514–1520.
- 52) Matsuzawa YM. (1997). Pathophysiology and molecular mechanism of visceral fat syndrome: the Japanese case. *Diabetes Metab Rev.*, **13**, 3–13.
- 53) Havel PJ. (2002). Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol.*, **13**, 51-59.
- 54) Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, and Deitel M. (1995). Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med.*, **1**, 953-956.
- 55) Lönnqvist F, Nordfors L, Jansson M, Thörne A, Schalling M, and Arner P. (1997). Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J Clin Invest.* , **99**, 2398-2404.
- 56) Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, and Hauner H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab.*, **92**, 1023-1033.



- 57) Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, and Tokimitsu I. (2002). Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, **26**, 1459-64.
- 58) Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, and Osawa T. (2003). Dietary cyaniding 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr.*, **133**, 2125-2130.
- 59) Folch, J., Lees, M. and Sloane, Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 60) Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T (1999). Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **892**, 146–154.
- 61) Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, et al. (1999). Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern. Med.*, **38**, 202–206.
- 62) Hostetler HA, McIntosh AL, Atshaves BP, Storey SM, Payne HR, Kier AB, Schroeder F. (2009). L-FABP directly interacts with PPARalpha in cultured primary hepatocytes. *J. Lipid. Res.*, **50**, 1663-1675.
- 63) Landrier JF, Thomas C, Grober J, Duez H, Percevault F, Souidi M, Linard C, Staels B, Besnard P. (2004). Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent. *J. Biol. Chem.*, **279**, 45512-45518.
- 64) Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. (2010). Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm.*, **2010**. pii: 326580.
- 65) Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Nakagawa Y, Ide T, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Gotoda T, Nagai R, Kimura S, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. (2003). p53 Activation in adipocytes of obese mice. *J Biol Chem.*, **278**, 25395-25400.
- 66) Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y, Okazaki S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Inoue N, Nakagawa Y, Takeuchi Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T,

- Nagai R, Kadowaki T, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. (2004). p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J Biol Chem.*, **279**, 20571-20575.
- 67) Inoue N, Shimano H, Nakakuki M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Yamamoto T, Sato R, Takahashi A, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N. (2005). Lipid synthetic transcription factor SREBP-1a activates p21WAF1/CIP1, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cell Biol.*, **25**, 8938-8947.
- 68) Inoue N, Yahagi N, Yamamoto T, Ishikawa M, Watanabe K, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Takeuchi Y, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Hasty AH, Toyoshima H, Yamada N, Shimano H. (2008). Cyclin-dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, is involved in adipocyte differentiation and hypertrophy, linking to obesity, and insulin resistance. *J Biol Chem.*, **25**, 21220-21229.
- 69) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 70) 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.
- 71) Hashimoto, T., Miyazawa, S., Gunarso, D. and Furuta, S. (1981). alpha-Amanitin inhibits the oxidation of long chain fatty acids in mouse liver. *J. Biochem.*, **90**, 415-421.
- 72) Davidson, A.L. and Arion, W.J. (1987). Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **253**, 156-167.
- 73) Lange, A.J., Arion, W.J., Burchell, A. and Burchell, B. (1986). Aluminum ions are required for stabilization and inhibition of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase by sodium fluoride. *J. Biol. Chem.*, **261**, 101-107.
- 74) Markwell MA, McGroarty EJ, Bieber LL, Tolbert NE. (1973). The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. A new peroxisomal enzyme. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426-3432.
- 75) 岩塚寿, 志野幾生, 松尾隆雄, 鈴置二郎. (1972). KK マウスの糖尿病発症因子, 糖尿病, **15**, 431.

- 76) 岩塚寿. (1970). 自然発症糖尿病マウス Yellow KK のインシュリン分泌反応, 日本内分泌学会誌, **45**, 1257.
- 77) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. **259**, 87-91.
- 78) Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. (2003). Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 40352-40363.
- 79) Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE. (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12152-12162.
- 80) Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol, Res.*, **51**, 117-123.
- 81) Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JA. (2006). Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic beta-cells of streptozotocin-treated diabetic rats. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, **28**, 64-74.
- 82) Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y. (2009). Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol. Nutr. Food. Res.*, **53**, 859-868.
- 83) Machha A, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. (2007). Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric. Oxide.*, **16**, 442-447.
- 84) Mahesh T, Menon VP. (2004). Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother. Res.*, **18**, 123-127.
- 85) Vessal M, Hemmati M, Vasei M. (2003). Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **135C**, 357-364.

- 86) Hii CS, Howell SL. (1985). Effects of flavonoids on insulin secretion and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  handling in rat islets of Langerhans. *J. Endocrinol.*, **107**, 1-8.
- 87) Best L, Trebilcock R, Tomlinson S. (1991). Acute stimulation of pancreatic islets by inhibitors of lactic acid transport. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 40540-9.
- 88) Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, Feingold KR. (2000). Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology*. **141**, 4021-4031.
- 89) Bedoucha M, Atzpodien E, Boelsterli UA. (2001). Diabetic KKAY mice exhibit increased hepatic PPARgamma1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J. Hepatol.*, **35**, 17-23.
- 90) Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B Jr, Reitman ML, Gonzalez FJ. (2003). Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.*, **111**, 737-747.
- 91) Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. (2004). Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **13**, 10422-10427.
- 92) Lee MS, Park JY, Freake H, Kwun IS, Kim Y. (2008). Green tea catechin enhances cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression in HepG2 cells. *Br. J. Nutr.*, **99**, 1182-1185.
- 93) Shan D, Fang Y, Ye Y, Liu J. (2008). EGCG reducing the susceptibility to cholesterol gallstone formation through the regulation of inflammation. *Biomed. Pharmacother.*, **62**, 6776-83.
- 94) Del Bas JM, Fernández-Larrea J, Blay M, Ardèvol A, Salvadó MJ, Arola L, Bladé C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB. J.*, **19**, 479-481.

- 95) Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.*, **62**, 1276-1282.
- 96) Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.*, **418**, 152-156.
- 97) Hollman PC, Bijman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res.*, **31**, 569-573.
- 98) Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. (1997). Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest.*, **100**, 2158-2169.
- 99) Togashi N, Ura N, Higashiura K, Murakami H, Shimamoto K. (2000). The contribution of skeletal muscle tumor necrosis factor-alpha to insulin resistance and hypertension in fructose-fed rats. *J Hypertens.*, **18**, 1605-1610.
- 100) Lai FM, Tanikella T, Cervoni P. (1988). Effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on vasodilation in resistance-sized arteries isolated from the monkey, rabbit, and rat. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **12**, 372-376.
- 101) Hayakawa K, Kimura M, Kamata K. (2002). Mechanism underlying gamma-aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.*, **438**, 107-113.
- 102) Yamakoshi J, Fukuda S, Satoh T, Tsuji R, Saito M, Obata A, Matsuyama A, Kikuchi M, Kawasaki T. (2007). Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **71**, 165-173.
- 103) Hoki S., Kimura T., Nagasawa M., Kozaki K., Terashima N., (2004). *Nat. Med.*, **58**, 113-114.
- 104) Taubert D, Berkels R, Klaus W, Roesen R. (2002). Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **40**, 701-713.

## 謝 辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、始終丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました山形大学農学部教授の五十嵐喜治先生に心より感謝申し上げます。五十嵐先生には、学部生時代よりご指導を頂き、たくさんのことを学ばせて頂きました。言葉では言い尽くせないほど感謝致しております。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた山形大学農学部教授 佐藤英世先生、帯広畜産大学食品科学研究部門教授 大西正男先生、岩手大学農学部教授 長澤孝志先生に深く感謝致します。佐藤先生には、修士時代よりご指導頂き、またリアルタイム PCR について基礎から教えて頂きました。大西先生には、DNA マイクロアレイについてご指導頂き、また頂いた多くの資料は本論文作成にあたり大変貴重なものとなりました。長澤先生には、いつもお会いする度に励まし、適切な御助言を頂き、また心配して頂きました。心より感謝申し上げます。

学位論文をまとめるにあたり、多くの時間を費やすことにご理解頂き、見守ってくれた山形県立米沢女子短期大学に御礼申し上げます。名誉教授の山田則子先生には、多くのご支援、ご助言、ご指導を賜りました。これまで、働きながら研究を続けることが出来たのは、山田先生のお力添えのおかげです。また、山田研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。孫誌銜准教授には、学位を取得することの心構えをはじめ、たくさんのことを教えて頂きました。孫先生から頂いたあらゆるものに感謝するとともに、心より御礼申し上げます。加藤守匡准教授には、論文の基礎から教えて頂いたとともに、たくさん議論をさせて頂きました。また、助手の齋藤寛子先生、寺嶋康正先生には、常に温かく見守って頂き、多くのご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。

株式会社龍泉堂 吉成織恵博士には、たくさんのご協力、ご助言を頂きました。楽しく、積極的に研究を続けることが出来たのは吉成さんのおかげです。学部生時代よりともに研究をしてきた高橋朋子さんには、くじけそうな時、悩んだ時、諦めそうな時、いつも励まし、適切なアドバイスを頂きました。心より感謝申し上げます。

研究を遂行するにあたり、協力して頂いた山形大学農学部食品栄養化学研究室の皆様にも感謝申し上げます。また、多くの方の支えと励ましにより本論文をまとめることが出来ました。ご支援いただいた皆様から心から感謝致します。

最後に、長い間学生として勉強・研究することができたのは、何も言わず、常に温かく見守ってくれた両親の支えがあったからです。心より感謝申し上げます。