

月見草エキスの血糖値上昇抑制作用とその関与成分

日本食品科学工学会誌 Vol. 50 No.4 2003

藍谷教夫, 木村弘之, 阿比留康弘, 曾山裕子, 村上裕子, 張 慧利,
杉下朋子, 小西洋太郎

オリザ油化株式会社

2003年5月2日

月見草エキスの血糖値上昇抑制作用とその関与成分

藍谷教夫[§], 木村弘之*, 阿比留康弘*, 曾山裕子**, 村上裕子**, 張 慧利,
杉下朋子, 小西洋太郎**

オリザ油化株式会社

* 大塚製薬株式会社佐賀栄養製品研究所

** 大阪市立大学大学院生活科学研究科

Effect of an Extract from Evening-Primrose Seeds on Postprandial Blood Glucose Level and Its Active Components

Michio Aitani[§], Hiroyuki Kimura*, Yasuhiro Abiru*, Hiroko Soyama**, Hiroko Murakami**,
Hui Li Zhang, Tomoko Sugishita and Yotaro Konishi**

ORYZA OIL & FAT CHEMICAL CO., LTD., 1 Numata Kitagata-cho, Ichinomiya, Aichi 493-8001

* Saga Nutraceuticals Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., LTD.,
Higashi-sefuri, Kanzaki, Saga 842-0195

** Graduate School of Human Life Science, Osaka City University, 3-3-138,
Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585

An ethanol extract (EPE) was prepared from defatted seeds of Evening-primrose (*Oenothera biennis* L.). In this study, we examined the effect of EPE on postprandial blood glucose level and its active components. Detected polyphenol components of EPE were penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) 2.7%, gallic acid 3.1%, (+)-catechin 3.4%, procyanidin B1 and procyanidin B3 1.5%. 41.4% of the total proanthocyanidin (PAC) was contained in EPE. Then, we examined the effect of these components of EPE on inhibitory action against α -glucosidase *in vitro* and on the postprandial blood glucose level using rats. The results suggested that 1) the suppression of postprandial hyperglycemia was caused by inhibition of α -glucosidase activity due to EPE, 2) PAC was the main active component of EPE. (Received Nov. 21, 2002; Accepted Jan. 21, 2003)

日本人の糖尿病患者はその予備軍も含めると1370万人にもものぼるといわれ、およそ国民の10人に1人が該当する¹⁾。糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病の初期段階として一過的な食後高血糖が観察され、慢性的な食後高血糖の過程を経てやがて空腹時血糖の上昇へと増悪すると考えられている²⁾。このため、糖尿病発症の一次予防には、まず食後血糖の上昇を正常化することが重要である。臨床的にも二糖類から単糖類への分解を抑制することにより食後の急激な血糖値の上昇を抑制する薬剤(α -グルコシダーゼ阻害剤)の有用性が知られている³⁾。

月見草(*Oenothera biennis* L.)は北アメリカ原産のアカバナ科マツヨイグサ属の植物であり、根は酢漬けや煮物にして食欲増進のために用いられている⁴⁾。最近では、その種子から搾油した月見草油に γ -リノレン酸が多く含有さ

れていることがわかっており、肥満、糖尿病、月経前症候群などに効果があるといわれてきている⁵⁾。月見草の油脂以外の成分についてはこれまであまり関心が払われていなかったが、最近の新しい機能として月見草種子に含まれるポリフェノール類の抗酸化能に関する報告がいくつかなされている^{6)~10)}。

一方、植物由来のポリフェノールの新しい機能として、 α -グルコシダーゼなどの糖質消化酵素阻害作用が最近注目を集めている¹¹⁾¹²⁾。糖尿病予防という観点から、このような作用を有する食品を食事の時に摂取することは有効と考えられるため、盛んに研究が行われており、一例としてはグァバ葉中のポリフェノールが α -グルコシダーゼ阻害作用を介して食後の血糖値上昇を抑制することが報告されている¹¹⁾。著者らは、月見草脱脂種子の含水エタノール抽出物を濃縮乾燥することにより得た月見草種子抽出物(月見草エキス)が、高濃度のポリフェノールを含有することを確認している。このため、月見草エキスは、ポリフェノール成分による α -グルコシダーゼ阻害作用を介して食

〒493-8001 愛知県一宮市北方町沼田 1

* 〒842-0195 佐賀県神埼郡東脊振村大字大曲字東山 5006-5

** 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

§ 連絡先(Corresponding author), kaihatu@mri.biglobe.ne.jp

後の血糖値上昇抑制作用を示す可能性がある。

そこで本研究は、月見草エキスの血糖値上昇抑制作用とその関与成分を明らかにすることを目的とし、月見草エキス中のポリフェノール成分の組成を分析し、月見草エキスおよびそのポリフェノール成分が α -グルコシダーゼ阻害作用を有するかどうかを *in vitro* の試験系で検討した。さらに、月見草エキスおよび α -グルコシダーゼ阻害作用が確認された成分について、ラット糖質負荷試験を行い、糖質負荷後の血糖値上昇を抑制するかどうかを検討した。

実験方法

1. 実験材料

月見草エキスは、月見草 (*Oenothera biennis* L.) 種子からエタノール抽出した素材を用いた (製品名：月見草エキス-P, オリザ油化製)。抽出方法は脱脂月見草種子粉碎物 100 g に対して 500 ml の 70% エタノールを加え、50°C で 4 時間攪拌後ろ過を行い、ろ液を濃縮乾固し、月見草エキス約 6 g を得た。月見草エキス 100 g 中にはポリフェノール以外の成分として水分 1.5 g, タンパク質 6.6 g, 脂質 4.9 g, 灰分 3.7 g, 食物繊維 1.0 g を含む (日本食品分析センターに分析依頼; 分析試験報告書 第 300080303-002 号)。

2. 月見草エキス中のポリフェノール成分分析

(1) 総ポリフェノールの定量

月見草エキス中の総ポリフェノール量は、Folin-Ciocalteu 法¹³⁾を用いて分析した。月見草エキス溶液 (100 μ g/ml, 10% メタノール溶液) 0.5 ml に 10 倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬 (キシダ化学製) 2.5 ml を加え、これに 30 秒以上 8 分以内に 7.5% 炭酸ナトリウム溶液 2 ml を加えてよく攪拌した。室温にて 2 時間放置後、765 nm の吸光度を測定 (日立製作所製 U-3200 分光光度計) し、没食子酸 (SIGMA 製) 相当量として総ポリフェノール量を求めた。

(2) 総プロシアニジン (PAC) の定量

月見草エキス中の総 PAC 量の分析は、Porter 法¹⁴⁾を改変して行った。月見草エキス溶液 (100 μ g/ml, メタノール溶液) 1 ml に n-ブタノール-濃塩酸 (95:5) 6 ml, 2% Fe (NH₄) (SO₄)₂·12H₂O 溶液 (2N 塩酸にて調製) 0.2 ml を順次加え、攪拌した。混合液は、蓋付試験管内で 95°C, 40 分間加熱後、冷却し、550 nm の吸光度を測定 (日立製作所製 U-3200 分光光度計) し、プロシアニジン B2 (PB2, アサヒビール製) 相当量として総 PAC 量を求めた。なお、対照には各試料の非加熱品を用いた。

(3) 月見草エキス中の単一ポリフェノール成分の分析

月見草エキス中の没食子酸, (+)-カテキン, ペンタグロイルグルコース (PGG) は、Yoshida ら¹⁵⁾の方法を改変し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析した。HPLC の分析条件を以下に示した。

検出器: SPD-10A 検出器 (島津製作所製)

データ処理装置: C-R7Aplus (島津製作所製)

カラム: Develosil ODS-UG-5 カラム (4.6 mm×250 mm 野村化学製)

移動相: 0.05 M H₃PO₄/0.05 M Na₂HPO₄/エタノール/酢酸エチル=40/40/15/5

流速: 0.5 ml/min, 検出波長: 280 nm, カラム槽温度: 40°C

試料注入量: 5 μ l (各試料は、80% エタノールにて調製)

没食子酸, (+)-カテキンの同定には、市販の標準品 (SIGMA 製) を用いた。PGG の同定には、Yoshizawa ら¹⁶⁾の方法に準じて合成したものを使用した。なお、この合成品の主成分は、機器分析により、月見草エキスから分取した PGG と同一物質であることを確認している (東レリサーチセンターに分析依頼; 報告書 No. S105010-01)。

上記以外の単一ポリフェノール成分は、Yanagida ら¹⁷⁾の方法に準じ、HPLC を用いて分析した。HPLC の分析条件を以下に示した。

検出器: L-7420 UV-VIS 検出器 (日立製作所製)

データ処理装置: D-7000 HPLC システムマネージャ (日立製作所製)

カラム: Inertsil ODS-3 カラム (4.6 mm I.D.×150 mm ジーエルサイエンス製)

移動相: A 液: 0.01 M KH₂PO₄ (H₃PO₄ にて pH2.0 に調製) /メタノール=80/20

B 液: 0.01 M KH₂PO₄ (H₃PO₄ にて pH2.0 に調製) /メタノール=50/50

グラジエント条件: 0→10 min A 液: 100%, 10→50 min

A 液: 100%→B 液: 100%, 50→65 min B 液: 100%

流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 280 nm, カラム槽温度: 30°C

試料注入量: 10 μ l (各試料は、50% メタノールにて調製)

各ポリフェノール成分の同定には、市販の標準品として (-)-エピカテキン (SIGMA 製), エラグ酸 (和光純薬工業製), プロシアニジン B1 (PB1, アサヒビール製), PB2 (アサヒビール製), プロシアニジン B3 (PB3, SIGMA 製) およびプロシアニジン C1 (PC1, アサヒビール製) を用いた。

3. PAC 高濃度含有画分 (PAC 画分) の調製

in vitro 試験で用いた PAC 画分は、以下の操作により調製した。月見草エキス約 150 mg に蒸留水 6 ml を加え、懸濁溶解状態にした。これに酢酸エチル 6 ml を加え、攪拌、遠心分離後、酢酸エチル層を除去した。さらに、酢酸エチル 6 ml を加え、同様の操作を 2 回行った。得られた水層を予め 60% アセトン 15 ml, 次に蒸留水 15 ml で前処理した Sep-Pak Plus tC18 ENV cartridge (Waters 製) に吸着させた。蒸留水 15 ml で洗浄後、60% アセトン 10 ml で溶出させ、濃縮乾固して PAC 画分を得た (収率 19%)。PAC 画分中の総ポリフェノール量および総 PAC 量の測定を月見草エキスと同様に行った。また、PAC 画分中の単一ポリフェノールの成分分析についても月見草エキスと同様に

行った。なお、ラットショ糖負荷試験で用いた PAC 画分は、月見草エキス 60 g より、上記と同様の操作を行って調製した。

4. 月見草エキスおよびそのポリフェノール成分の α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

(1) α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

Konishi ら¹⁸⁾の方法を改変して行った。ラット小腸アセトン粉末 (SIGMA 製) に、約 10 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 pH7.0 (和光純薬工業製) を加え、超音波処理および遠心分離した上清を酵素液とした。4-メチルウンベルフェリル- α -D-グルコピラノシド (SIGMA 製) を、リン酸緩衝液で 0.2 mM に希釈し基質液とした。検体として、月見草エキス、PAC 画分、合成 PGG、没食子酸 (SIGMA 製)、(+)-カテキン (SIGMA 製) および PB1 (アサヒビール製) を用いた。各種検体はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して検体原液とし、4% DMSO 含有リン酸緩衝液となるように 2 倍ずつ 5 濃度の検体希釈液を調製した。酵素反応は、蛍光測定用 96 穴プレート (NUNC 製) を用いて以下の方法で行った。検体希釈液 (50 μ l/well) に基質液 (25 μ l/well) を添加して 37°C、10 分間の予備加熱を行った後、酵素液 (25 μ l/well) を添加し、37°C、30 分間の酵素反応を行った (酵素最終濃度: 1 mg protein/ml, 基質最終濃度: 0.05 mM)。反応後、停止液 (0.2 M Na₂CO₃ Buffer, 100 μ l/well) を添加して反応を停止させ、マイクロプレート分光蛍光光度計 (Molecular Device 製 SPECTRA MAX GEMINIXS) を用いて蛍光値 (励起波長 366 nm, 発光波長 450 nm) を測定した。

(2) データ処理

各検体液および対照液 (4% DMSO 含有リン酸緩衝液) を用いて上述の酵素反応を行った場合の蛍光値を各々 L_x および L₀ とした。ブランク (B₀) は、検体として対照液を用い、酵素液添加の時期を停止液添加後に遅らせた場合の蛍光値とした。各検体液の阻害率は、(L₀-L_x) / (L₀-B₀) と定義した。IC₅₀ 値は統計解析ソフト SAS (Statistical Analysis System) を用いて算出した。なお、活性寄与率は、(月見草エキスの IC₅₀ 値) × (ポリフェノール成分の含量 (%)) / (ポリフェノール成分の IC₅₀ 値) として算出した。

5. ラットを用いた糖質負荷試験

(1) 実験動物

生後 5 週齢の Wistar 系雄性ラットを 1~2 週間予備飼育後、糖質負荷試験 (6 匹/群) に用いた。

(2) ショ糖負荷試験

16 時間絶食したラットの尾静脈から採血後、被験物として蒸留水に懸濁した月見草エキス (0, 500, 1000 mg/10 ml) または PAC 画分 (0, 100, 500, 1000 mg/10 ml) または合成 PGG (0, 100, 500 mg/10 ml) を体重 kg 当たり 10 ml となるよう胃ゾンデにて経口投与し、その 5 分後に糖質として蒸留水に溶解したショ糖 2 g/5 ml を体重 kg 当

たり 5 ml となるよう経口投与した。ショ糖負荷後 30 分、60 分、90 分、120 分に採血を行い、血糖値を測定した。採血は無麻酔下で尾静脈よりヘパリン処理したヘマトクリット毛細管を用いて行い、遠心分離後、血漿を得た。血漿は測定まで水中で保存した。血糖値の測定にはデタミナー GL-E (協和メディックス製) を用いた。なお、試験は、月見草エキス、PAC 画分、合成 PGG と、被験物毎に分けて実施した。

(3) グルコース負荷試験

被験物として月見草エキス (0, 500, 1000 mg/10 ml)、糖質としてグルコース 2 g/5 ml を用いた以外はショ糖負荷試験と同様の操作にて試験を行った。

(4) 統計解析

血糖値は平均値 ± 標準偏差で表した。被験物 0 mg/kg 投与群に対する各濃度投与群の血糖値の比較は、Dunnett 法を用いて行った。有意差検定は、両側検定で有意水準を危険率 5% 以下とした。

実験結果

1. 月見草エキス中のポリフェノール成分組成

月見草エキス中に含まれるポリフェノール成分の含量を表 1 に示した。月見草エキス中の総ポリフェノール量は 63.1% であり、総 PAC 量は 41.4% であった。単一ポリフェノール成分としては、PGG 2.7%、没食子酸 3.1%、(+)-カテキン 3.4% の存在が確認された。図 1 にその HPLC クロマトグラムを示した。これ以外の単一ポリフェノール成分としては、PB1 と PB3 合わせて 1.5% の存在が確認されたが、エラグ酸、(-)-エピカテキン、PB2 および PC1 は確認できなかった。

2. 月見草エキスおよびそのポリフェノール成分の α -グルコシダーゼ阻害活性

α -グルコシダーゼ阻害活性の測定は、月見草エキスおよび月見草エキス中に確認されたポリフェノール成分について

表 1 月見草エキス中のポリフェノール成分含量

成分	月見草エキス中含量 (%)
PGG	2.7
没食子酸	3.1
(+)-カテキン	3.4
(-)-エピカテキン	— ^{a)}
エラグ酸	—
PB1+PB3	1.5 ^{b)}
PB2	—
PC1	—
総 PAC	41.4
総ポリフェノール	63.1

^{a)}: 検出限界以下

^{b)}: PB1 と PB3 のピークは分離不可能であったため、合計値で表した。

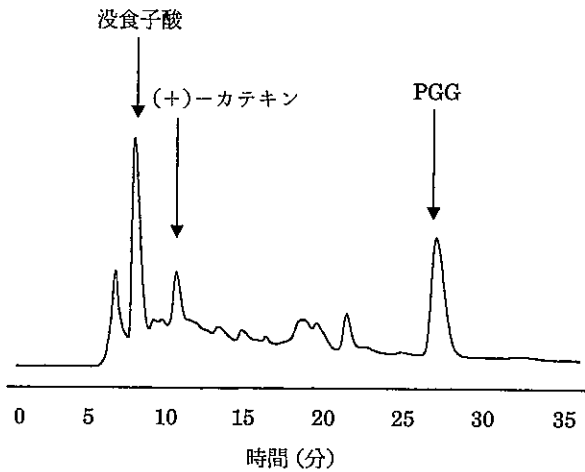


図1 月見草エキスのHPLCクロマトグラム
PGG: penta-*o*-galloyl- β -D-glucose

て行った。月見草エキスおよびそのポリフェノール成分の α -グルコシダーゼ活性に対する IC_{50} 値を表2に示した。その結果、月見草エキスの IC_{50} 値は0.34 mg/mlであった。最も高い α -グルコシダーゼ阻害活性を示したポリフェノール成分はPGGであり、その強さは月見草エキスの3.4倍であった。PAC画分の α -グルコシダーゼ阻害活性の強さは、月見草エキスの1.3倍であった。なお、PAC画分の総ポリフェノール量、総PAC量および総PACの総ポリフェノールに占める割合は、各々85.1%、80.8%および94.9%であり、PAC画分中には、今回月見草エキス中に確認された単一ポリフェノール(PGG, 没食子酸, (+)-カテキン, PB1およびPB3)は含まれていなかった。

次に、月見草エキス中の含量と α -グルコシダーゼ阻害活性より、各ポリフェノール成分の活性寄与率を算出した(表2)。その結果、最も高い活性寄与率を示した成分はPAC画分であり、その値は52.4%であった。単一ポリフェノール成分として最も強い活性寄与率を示した成分はPGGであり、その値は9.3%であった。

3. ラットを用いた糖質負荷試験

(1) 月見草エキスがショ糖負荷後の血糖値に及ぼす影響(図2A)

月見草エキス 500 mg/kg 投与群はショ糖負荷 30 分後 ($P < 0.05$) において、1000 mg/kg 投与群はショ糖負荷 30 分後 ($P < 0.01$) および 60 分後 ($P < 0.05$) において、0 mg/kg 投与群に対し有意な低値を示した。

(2) 月見草エキスがグルコース負荷後の血糖値に及ぼす影響(図2B)

月見草エキス 1000 mg/kg 投与群はグルコース負荷 30 分後 ($P < 0.01$) および 60 分後 ($P < 0.01$) において、0 mg/kg 投与群に対し有意な低値を示した。また、500 mg/kg 投与群はグルコース負荷 120 分後 ($P < 0.05$) において、0 mg/kg 投与群に対し有意な高値を示した。

(3) PAC画分がショ糖負荷後の血糖値に及ぼす影響(図3)

PAC画分 500 mg/kg 投与群はショ糖負荷 30 分後 ($P < 0.05$) において、1000 mg/kg 投与群はショ糖負荷 30 分後 ($P < 0.01$) および 60 分後 ($P < 0.05$) において、0 mg/kg 投与群に対し有意な低値を示した。500 mg/kg 投与群はショ糖負荷前 ($P < 0.05$) において、0 mg/kg 投与群に対し有意な高値を示した。なお、PAC画分の総ポリフェノール量、総PAC量は各々67.3%、59.7%であり、総PACの総ポリフェノールに占める割合は88.7%であった。PAC画分中には、今回月見草エキス中に確認された単一ポリフェノール(PGG, 没食子酸, (+)-カテキン, PB1およびPB3)は含まれていなかった。

(4) PGGがショ糖負荷後の血糖値に及ぼす影響(図4)

PGG 100 mg/kg 投与群はショ糖負荷 30 分後 ($P < 0.01$) において、500 mg/kg 投与群はショ糖負荷 30 分後 ($P < 0.01$) および 60 分後 ($P < 0.01$) において、0 mg/kg 投与群に対し有意な低値を示した。また、500 mg/kg 投与群はショ糖負荷 120 分後 ($P < 0.05$) において、0 mg/kg 投与群に対し有意な高値を示した。

考 察

糖尿病の代謝異常の初期段階として一過的な食後高血糖が観察され、慢性的な食後高血糖の過程を経てやがて空腹時血糖の上昇へと増悪すると考えられている²⁾。このため、糖尿病発症の一次予防には、まず、食後血糖の上昇を正常

表2 月見草エキスおよびそのポリフェノール成分の α -グルコシダーゼ阻害活性寄与率

成分	月見草エキス中含量(%)	IC_{50} (mg/ml)	寄与率 (%)
月見草エキス	100.0	0.34	100.0
PGG	2.7	0.10	9.3
没食子酸	3.1	0.19	5.5
(+)-カテキン	3.4	6.5	0.18
PB1+PB3	1.5 ^{a)}	>2.0 ^{b)}	<0.26
総PAC	41.4	0.27 ^{c)}	52.4

a): PB1とPB3のピークは分離不可能であったため、合計値で表した。

b): 検体としてPB1を用いた。

c): 検体としてPAC画分を用いた。

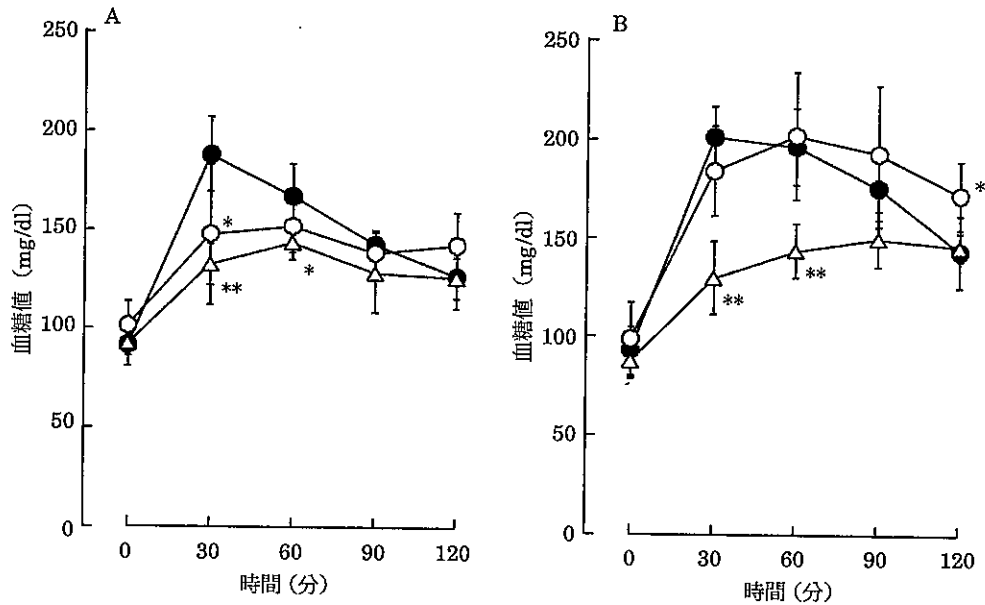


図 2 月見草エキスがラットにおけるショ糖負荷後 (A) およびグルコース負荷後 (B) の血糖値に及ぼす影響
 平均値±標準偏差 (n=6)
 *: P<0.05 (0 mg/kg に対する有意差) **: P<0.01 (0 mg/kg に対する有意差)
 月見草エキス投与 (●, 0 mg/kg; ○, 500 mg/kg; △; 1,000 mg/kg)

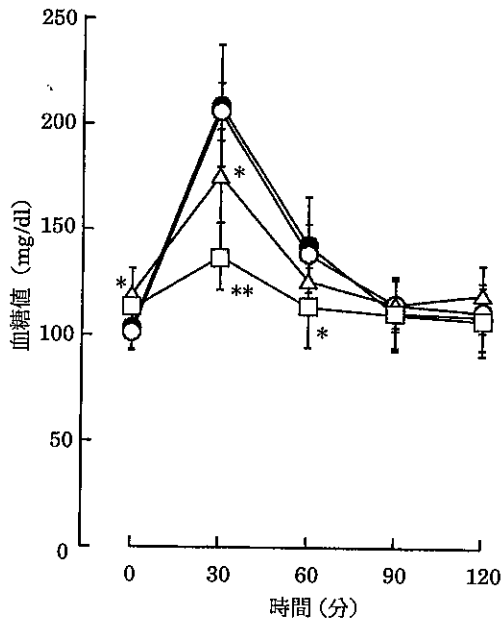


図 3 PAC 画分がラットにおけるショ糖負荷後の血糖値に及ぼす影響
 平均値±標準偏差 (n=6)
 *: P<0.05 (0 mg/kg に対する有意差)
 **: P<0.01 (0 mg/kg に対する有意差)
 PAC 画分投与 (●, 0 mg/kg; ○, 100 mg/kg; △; 500 mg/kg; □, 1,000 mg/kg)

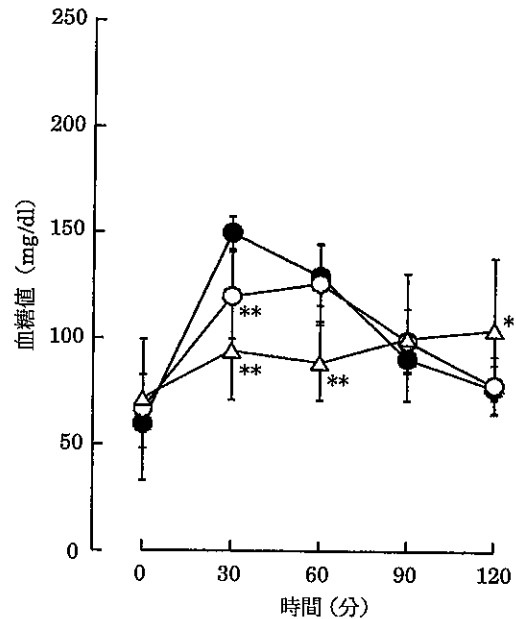


図 4 PGG がラットにおけるショ糖負荷後の血糖値に及ぼす影響
 平均値±標準偏差 (n=6)
 *: P<0.05 (0 mg/kg に対する有意差)
 **: P<0.01 (0 mg/kg に対する有意差)
 PGG 投与 (●, 0 mg/kg; ○, 100 mg/kg; △; 500 mg/kg)

化することが重要である。

食後血糖の上昇を抑制する食品素材は、これまでにいくつか見出されており、これらの食品素材の作用メカニズム

の多くは糖類消化酵素の阻害作用である^{19)~21)}。いくつかの植物由来のポリフェノールが α -グルコシダーゼ阻害活性を有することが知られているため¹¹⁾¹²⁾、著者らは月見草

エキス中に高濃度存在するポリフェノールが α -グルコシダーゼ阻害活性を有するのではないかと考えた。本研究では、月見草エキスの血糖値上昇抑制作用とその関与成分を明らかにすることを目的とした。

まず、月見草エキス中のポリフェノール成分の組成を分析した。その結果、単一ポリフェノール成分として、PGG、没食子酸、(+)-カテキン、PB1 および PB3 の存在が確認された。最も高い含量を示した成分はPACであった(41.4%)。PACはカテキンの重合体の総称であり、PB1 および PB3 を含め、多分子種から構成されている²²⁾。PACは、月見草エキスのポリフェノール成分中の6割以上を占めていることから月見草エキス中の主要なポリフェノール成分であることが明らかになった。

今回月見草エキス中に確認された没食子酸、(+)-カテキン、PACは、食品素材中に広く存在していることが知られている^{22)~24)}。一方、PGGは、染料や収れん薬等に用いられる五倍子中に存在することが知られているもの²⁵⁾、食品素材中のPGGの測定はほとんど報告されていない。今回著者らは月見草エキス中にPGGが存在することを確認したことから、PGGが月見草エキスに特徴的な成分である可能性が考えられた。

次に、月見草エキスおよび今回確認されたポリフェノール成分の α -グルコシダーゼ阻害活性を*in vitro*の試験系で検討した。その結果、月見草エキスは α -グルコシダーゼ阻害作用を有しており、月見草エキスの主要ポリフェノール成分であるPACは、月見草エキスに対する α -グルコシダーゼ阻害活性寄与率が50%以上であったことから、活性本体はPACであることが明らかになった。また、今回確認された単一ポリフェノール成分中では、PGGが最も高い活性寄与率を示した。ポリフェノール以外の成分としてはタンパク質や脂質が各々数%存在しているが、その含量がPAC含量と比較して低値であること、PACの活性寄与率が50%以上であることを併せて考えると、タンパク質や脂質の活性寄与率は、PACの活性寄与率よりも低いことが推察された。

α -グルコシダーゼ阻害作用を有する食品素材としてグアバ葉抽出物がこれまでに報告されている。出口らはマウスにグアバ葉抽出物を体重当たり500 mg/kgを経口投与し、ショ糖負荷試験を行った結果、ショ糖負荷後の血糖値の上昇が有意に抑制されたことを報告している²⁶⁾。今回、著者らがラットを用いて行ったショ糖負荷試験においても、月見草エキスを体重当たり500 mg/kgを経口投与することによってショ糖負荷後の血糖値の上昇を抑制することが確認された。*in vitro*の試験系で月見草エキスが α -グルコシダーゼ阻害作用を有することが確認されたことから、グアバ葉抽出物と同様にこの血糖値上昇抑制作用は α -グルコシダーゼ阻害作用が関与しているものと推察された。また、今回のショ糖負荷試験で月見草エキスを体重当たり

0, 500, 1000 mg/kgの用量でラットに投与した結果、用量依存的にショ糖負荷後の血糖値の上昇を抑制することが確認された。このため、これらの用量は有効性をみるための濃度としては問題ないものと思われた。

月見草エキスの血糖値上昇抑制作用の作用機序としては、月見草エキスの α -グルコシダーゼ阻害作用が考えられる。ショ糖は、 α -グルコシダーゼにより単糖類に分解され吸収されることから、月見草エキスが*in vivo*でも α -グルコシダーゼ阻害作用を発揮していれば、ショ糖負荷試験で認められた血糖値上昇抑制作用が、グルコース負荷試験ではみられないと予想される。そこで、ラットを用いてショ糖負荷試験とグルコース負荷試験との比較を行った。その結果、500 mg/kgの用量においては、ショ糖負荷試験で認められた血糖値上昇抑制作用が、グルコース負荷では認められなかった。このことから、月見草エキスの血糖値上昇抑制作用の作用機序は α -グルコシダーゼ阻害に基づいていることが明らかとなった。しかし、1000 mg/kgでは、グルコース負荷後の血糖値上昇を有意に抑制したことから、月見草エキスは、グルコース吸収抑制作用を有することも示された。グルコース吸収抑制の作用機序の一つとして小腸上皮細胞のglucose transporter阻害が挙げられ、茶ポリフェノールは小腸上皮細胞のglucose transporter阻害作用を有することが報告されている²⁷⁾。月見草エキスはポリフェノールを高濃度含有することから、glucose transporter阻害を介したグルコース吸収抑制作用を有している可能性も考えられた。また、月見草エキスのグルコース吸収抑制作用は、 α -グルコシダーゼ阻害作用よりも高用量で認められたことから、血糖値上昇抑制への関与は α -グルコシダーゼ阻害作用よりも少ないことが示唆された。

次に、 α -グルコシダーゼ阻害活性寄与率の高かったPAC画分およびPGGについて、ラットでのショ糖負荷試験を行った。その結果、PAC画分およびPGG投与によりショ糖負荷後の血糖値の上昇が有意に抑制されたことから、PAC画分およびPGGが月見草エキスと同様に血糖値上昇抑制作用を有することが明らかとなった。

ショ糖負荷試験での最小有効用量は、月見草エキスで500 mg/kgであり、PAC画分およびPGGで、各々500 mg/kgおよび100 mg/kgであった。このため、血糖値上昇抑制作用の強さを比較すると、PAC画分は月見草エキスと同程度であり、PGGは月見草エキスよりも強いことが示唆された。一方、*in vitro*での α -グルコシダーゼ活性のIC₅₀値は、月見草エキスで0.34 mg/mlであり、PAC画分およびPGGで、各々0.27 mg/mlおよび0.10 mg/mlであった。このため、 α -グルコシダーゼ阻害活性の強さを比較すると、PAC画分は月見草エキスと同程度であり、PGGは月見草エキスよりも強いことが示された。*in vivo*での血糖値上昇抑制作用と*in vitro*での α -グルコシダー

ゼ阻害活性において、月見草エキス、PAC画分およびPGGの強さの関係が同じであったことは、これらの物質の血糖値上昇抑制作用が α -グルコシダーゼ阻害によって起こるといふ考えを支持するものであった。

*in vivo*試験に用いたPAC画分は大量に必要であったため、その調製は*in vitro*試験に用いたPAC画分の方法をスケールアップして行った。抽出効率の違いにより、*in vivo*試験に用いたPAC画分の総ポリフェノール量および総PAC量は各々67.3%および59.7%となり、*in vitro*試験に用いたPAC画分(85.1%および80.8%)に比べて低めの値を示した。しかしながら、これら2つの画分は、ともに今回月見草エキス中に確認された単一ポリフェノール(PGG, 没食子酸, (+)-カテキン, PB1およびPB3)を含んでおらず、総ポリフェノールに占める総PACの割合はともに高かった(90%前後)。したがって、上記2つのPAC画分中のポリフェノールが有する生理活性の大部分は、ともにPACが担っていると考えられた。2つの画分では抽出効率の違いにより、活性の強さに多少の違いが生じる可能性はあるものの、ともにPACが活性を担っているという点では同じであり、質的な違いはほとんどないと考えている。

また、*in vivo*での月見草エキスの活性成分については、PAC画分の血糖値上昇抑制作用の強さが月見草エキスとほぼ同程度であったこと、PACは月見草エキス中で最も高い含量を示したこと、その値は今回月見草エキス中に確認された単一ポリフェノールの含量と比較して著しく高値であったことを併せて考えると、PAC以外のポリフェノール成分がPAC以上の寄与を示すとは考えにくいため、血糖値上昇抑制においてもPACが最も重要な活性成分である可能性が示唆された。

以上のことから、月見草エキスは α -グルコシダーゼ阻害を作用機序とした血糖値上昇抑制作用を示し、その活性本体はPACであることが示唆された。

要 約

本研究は、脱脂した月見草(*Oenothera biennis* L.)種子からエタノール抽出することにより得られた月見草エキスの血糖値上昇抑制作用とその関与成分を明らかにすることを目的として行った。

(1) 月見草エキス中には、単一ポリフェノール成分として、PGG 2.7%、没食子酸 3.1%、(+)-カテキン 3.4%、PB1およびPB3合わせて1.5%の存在が確認された。

(2) 総PAC量は41.4%であった。

(3) これらの成分について、*in vitro*での α -グルコシダーゼ阻害活性の測定およびラットを用いた糖質負荷試験を行った結果、月見草エキスは α -グルコシダーゼ阻害活性に基づく血糖値上昇抑制作用を有しており、その活性本体はPACであることが示唆された。

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました、大阪市立大学大学院生活科学研究科 中谷延二教授、菊崎泰枝講師、久本雅嗣氏(大学院生)、岡山大学薬学部 吉田隆志教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省保健医療局生活習慣病対策室, 平成9年糖尿病実態調査, (1999).
- 2) 岩本安彦, 食後過血糖の管理, 日本臨床, 55増刊, 721-726 (1997).
- 3) 池田義雄, 糖尿病の薬物療法, (株式会社日本メディカルセンター, 東京), pp. 52-75 (1996).
- 4) 薬用ハーブの機能研究, 健康産業新聞社, pp. 29-33(1999).
- 5) 井手 隆, γ -リノレン酸の代謝調節機能, 日本農芸化学会誌, 62, 46-49 (1988).
- 6) Wettasinghe, M., Shahidi, F. and Amarowicz, R., Identification and quantification of low molecular weight phenolic antioxidants in seeds of evening primrose (*Oenothera biennis* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1267-1271 (2002).
- 7) Wettasinghe, M. and Shahidi, F., Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1801-1812 (1999).
- 8) Wettasinghe, M. and Shahidi, F., Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70, 17-26 (2000).
- 9) Balasinska, B. and Troszynska, A., Total antioxidative activity of evening primrose (*Oenothera paradoxa*) cake extract measured in vitro by liposome model and murine L1210 cells. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3558-3563 (1998).
- 10) Birch, A., Fenner, G., Watkins, R. and Boyd, L., Antioxidant Properties of evening primrose seed extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4502-4507 (2001).
- 11) 出口ヨリ子, 長田邦子, 長南 治, 小林邦子, 大橋あけみ, 橋川俊明, 綿貫雅章, 大荷満生, 中島久実子, 秦 葭哉, ヒト対象者におけるグァバ葉熱水抽出物の継続飲用および過剰摂取の有効性と安全性, 日本食品新素材研究会誌, 3, 19-28 (2000).
- 12) Honda, M. and Hara, Y., Inhibition of rat small intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 123-124 (1993).
- 13) Singleton, V. L., Joseph, A. and Rossi, JR., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158 (1965).
- 14) Porter, L.J., Hrstich, L.N. and Chan, B.G., The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230 (1986).
- 15) Yoshida, T., Chou, T., Nitta, A., Miyamoto, K., Koshiura, R. and Okuda, T., Woodfordin C, a macro-ring hydrolyzable tannin dimer with antitumor activity, and accompanying dimers from *Woodfordia fruticosa* flowers. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1211-1217 (1990).
- 16) Yoshizawa, S., Horiuchi, T., Sukanuma, M., Nishiwaki, S., Yatsunami, J., Okabe, S., Okuda, T., Muto, Y., Frenkel, K. and Troll, W., *cancer Preventative Agents, ACS Symposium Series*, 507, 316-325 (1992).

- 17) Yanagida, A., Kanda, T., Shoji, T., Ohnishi-Kameyama, M. and Nagata, T., Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 855, 181-190 (1999).
- 18) Konishi, Y., Aitani, M., Nakatani, N., Effects of Bay m 1099, α -glucosidase inhibitor, on starch degradation in germinating mung beans. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62, 142-144 (1998).
- 19) 森本聡尚, 田中俊一, 宮崎俊之, 児玉俊明, 北村育夫, 井上修二, 軽症 NIDDM 患者における小麦アルブミン長期摂取の効果と安全性, 日本栄養・食糧学会誌, 52, 293-300 (1999).
- 20) 讃井和子, 田中裕子, 世利謙二, 井上修二, 健康人における L-アラビノース添加テーブルシュガー摂取後の血糖値変化, 健康・栄養食品研究, 4, 13-18 (2001).
- 21) Fujita, H., Yamagami, T. and Ohshima, K., Long-term ingestion of a fermented soybean-derived touchi-extract with α -glucosidase inhibitory activity is safe and effective in humans with borderline and mild type-2 diabetes. *J. Nutr.*, 131, 2105-2108 (2001).
- 22) 有賀敏明, 細山 浩, 徳武昌一, 山越 純, プロアントシアニジンの機能性解明と開発, 日本農芸化学会誌, 74, 1-8 (2000).
- 23) Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G. and Teissedre, PL., Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 3341-3348 (2001).
- 24) De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C., Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish food-stuffs and beverages *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5331-5337 (2000).
- 25) 天然医薬資源学, 第1版 (廣川書店, 東京), pp. 222 (1997).
- 26) 出口ヨリ子, 長田邦子, 内田和美, 木村広子, 芳川雅樹, 工藤辰幸, 保井久子, 綿貫雅章, グアバ葉熱水抽出物の db/db マウスにおける抗糖尿病効果およびヒト飲用試験による食後血糖値上昇抑制効果, 日本農芸化学会誌, 72, 923-931 (1998).
- 27) Kobayashi, Y., Suzuki, M., Satsu, H., Arai, S., Hara, Y., Suzuki, K., Miyamoto, Y. and Shimizu, M., Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 5618-5623 (2000).

(平成 14 年 11 月 21 日受付, 平成 15 年 1 月 21 日受理)