

in vitro 及び *in vivo* におけるミヤマタバタ根の抽出物の抗糖尿病効
果

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
持続環境学専攻
博士（環境学）学位論文

胡 選生

概 要

近年，糖尿病は高齢化，肥満，過食，運動不足，ストレス，飲酒などにより急速に増加している。国際糖尿病連合(IDF)の最新データによれば，世界中においては 2.85 億人の糖尿病患者がおり，2030 年には 4.35 億人に増えると推定されている。日本において糖尿病は生活習慣病の中核として近代の国民病と呼ばれている。このような状況のもと糖尿病に対する有効な予防と治療法の開発は急務の課題となっている。

このため，天然植物の抗糖尿病作用についての研究が盛んに行われ，多くの植物が抗糖尿病効果を持つことが報告されている。本研究で使用したミヤママタタビ (*Actinidia kolomikta*) は別名深山木天蓼と呼ばれ，マタタビ科マタタビ属に属する。従来の研究として，ミヤママタタビ根抽出物の抗酸化作用，抗増殖作用，抗癌作用，免疫調節作用が検討されていた。また，ラオスでは数百年前から糖尿病を治すためにミヤママタタビ (*Actinidia kolomikta*) の根を水で煎じ，お茶のように飲んでいる。しかし，その抗糖尿病効果に関して科学的な研究はまだ行われていない。

そこで本研究の目的は以下の 2 点である。(1) ミヤママタタビ根は民間療法で糖尿病治療に用いられていることから，その科学的な根拠を探し，抗糖尿病効果のメカニズムを解明する。(2) ミヤママタタビ根に含まれる主要成分を分析し，その構造

を明らかにする。

本研究では、まず、ミヤマタタビ根の有効成分の抽出を行った。次に、得られた有効成分を用いてマルトース及びスクロースを基質とするラット小腸由来のマルターゼ阻害活性、スクラーゼ阻害活性について *in vitro* 試験を行った。そして、正常ラットにミヤマタタビ根のエタノール抽出物、マルトース、スクロース、グルコースを投与し、その血糖上昇抑制作用について *in vivo* 試験を行った。また、ミヤマタタビ根の熱水抽出物及びミヤマタタビ根のエタノール抽出物を用いて正常ラットによる急性経口毒性試験を行った。さらに、STZ を注射することによって糖尿病ラットを作製した、ミヤマタタビ根のエタノール抽出物を作製した糖尿病ラットに4週間連続経口投与し、血糖値、インスリン、TG、TCHO、HDL-C、GOT/AST、GPT/ALT、TP、UA、BUN、電解質（Na・Cl・K）、TNF- α など各種糖尿病マーカーに及ぼす影響について検討した。最後に、ミヤマタタビ根抽出物の総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量ならびに FT-IR、HPLC、UPLC-PDA を用いてミヤマタタビ根抽出物の主要有効成分を測定した。

酵素を用いた *in vitro* 試験より以下の主な結果を得た。酵母由来 α -グルコシダーゼに対するミヤマタタビ根の熱水抽出物及びアカルボースの50%阻害濃度はそれぞれ 0.94 mg/mL、1.08 mg/mL であった、ミヤマタタビ根の熱水抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性は糖尿病治療薬であるアカルボースよ

りも高かった。ラット小腸由来マルターゼに対するミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 の IC_{50} はそれぞれ 4.96 mg/mL, 3.34 mg/mL であった。これは血糖降下作用を持つとされるモリンガ葉抽出物のマルターゼ阻害活性 ($IC_{50} > 5$ mg/mL) より高い。ラット小腸由来スクラーゼに対するミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 の IC_{50} はそれぞれ 4.80 mg/mL, 2.98 mg/mL であった。従って,ミヤマタタビ根各抽出物は α -グルコシダーゼ活性に影響を与えるという新しい知見を得ることができた。特に,ミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 は小腸に存在するマルターゼ及びスクラーゼ活性を阻害し,マルトース,スクロースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖の改善に効果が期待される。その作用機序は糖尿病治療薬である経口血糖降下薬の α -グルコシダーゼ阻害剤と一致であった。

正常ラットを用いた *in vivo* 試験より以下の主な結果を得た。正常ラットにマルトースを投与した 30 分,60 分後,コントロールと比較してミヤマタタビ根のエタノール抽出物投与群の血糖値は統計学的に有意に低下した ($p < 0.05$)。また,マルトース負荷後 0 分から 120 分までの血糖値曲線下面積も約 10% 減少したことが分かった ($p < 0.05$)。正常ラットにスクロースを投与した 30 分後,コントロールと比較してミヤマタタビ根のエタノール抽出物投与群の血糖値は統計学的に有意に低下した ($p < 0.05$)。また,スクロース負荷後 0 分から 120 分ま

での血糖値曲線下面積も約 10%統計学的に有意に減少したが、統計学的に有意差は認められなかった。正常ラットにグルコースを投与した 30 分,60 分,90 分後,コントロールと比較してミヤマタタビ根のエタノール抽出物投与群の血糖値は統計学的に有意な低下が認められた ($p<0.05$),投与群(400 mg/kg)の血糖値曲線下面積は対照群と比較して約 12%減少した($p<0.01$)。ミヤマタタビ根の熱水抽出物及びミヤマタタビ根のエタノール抽出物の半数致死量 (LD_{50}) は 5 g/kg 以上で,急性毒性はないことが分かった。結論として,ミヤマタタビ根のエタノール抽出物はマルターゼ及びスクラーゼ活性を阻害し,マルトース及びスクロースがグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖の改善が期待できる。この結果は *in vitro* 試験のマルターゼ阻害活性試験及びスクラーゼ阻害活性試験の結果と一致している。また,抽出物 2 は小腸でのグルコースの吸収を阻害し,血糖値の上昇を統計学的に有意に抑え,耐糖能改善機能を有することが示唆された。

糖尿病ラットを用いた *in vivo* 試験より以下の主な結果が得られた。ミヤマタタビ根のエタノール抽出物は糖代謝機能,脂質代謝,肝機能,腎機能,インスリン抵抗性を改善し,優れた抗糖尿病効果を有することが明らかになった。さらに,抽出物 2 には腎機能改善作用と共に抗痛風作用を示した。

総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量の測定

結果により、ミヤマタタビ根抽出物2, 抽出物8, 抽出物11は1 gあたりの総ポリフェノール量がそれぞれ 80.49 ± 0.05 mg, 94.69 ± 0.00 mg, 94.81 ± 0.05 mgであった。これらの値はRaja cultivar抽出物(76.37 ± 1.79 mg GAE/g d.w.)と比べ高く,ミヤマタタビ根抽出物が高い総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量を持つことが判明した。IR測定の結果により,ミヤマタタビ根抽出物8,抽出物11にはフェノール性OH基を持ち,ポリフェノール化合物が存在することが認められた。HPLCによるスペクトル分析を行った結果から,ミヤマタタビ根抽出物2,抽出物8,抽出物11はルチンを含有し,含有量はそれぞれ0.6%,2.8%,3.2%であった,これらの値は抗糖尿病活性を持つマルベリーの葉抽出物(2.2%)と比べて高かった。

以上のことから,ミヤマタタビ根のエタノール抽出物は強い α -グルコシダーゼ阻害活性を持ち,食後高血糖の改善が期待できることが示された。また,ミヤマタタビ根のエタノール抽出物は糖代謝機能,脂質代謝,肝機能,腎機能,インスリン抵抗性を改善し,優れた抗糖尿病効果を有することが明らかになった。これまでミヤマタタビ根は糖尿病治療に使用されている民間療法の科学的な根拠が明らかになった。また,ミヤマタタビ根の熱水抽出物及びミヤマタタビ根のエタノール抽出物は急性毒性がないことが示された。従って,ミヤマタタビ根抽出物は安全性及び有効性に優れ,抗糖尿病薬の素材として有望であることといえる。特に,ミヤマタタビ根抽出物に

は豊富なポリフェノール,フラボノイドが多く含まれているから,将来,健康飲料として利用することが期待される。

目次

概 要	I
目 次	VII
表目録	XI
図目録	XII
略語一覧	XIV
第 1 章 序 論	1
1.1 研究の背景	1
1.1.1 糖尿病について	1
1.1.2 糖尿病の治療法について	2
1.1.3 ミヤマタタビに関する既往の研究	4
1.2 本研究の目的	5
1.3 本論文の構成	5
第 2 章 ミヤマタタビ根抽出物の A-グルコシダーゼ阻害活 性	10
2.1 はじめに	10
2.2 材料及び方法	12
2.2.1 ミヤマタタビ根各抽出物の調製	12
2.2.2 酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性	14
2.2.3 ラット小腸由来マルダーゼ阻害活性	15
2.2.4 ラット小腸由来スクラーゼ阻害活性	16

2.2.5	統計処理	18
2.3	結果	18
2.3.1	ミヤマタタビ根各抽出物の収率	18
2.3.2	酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性	18
2.3.3	ラット小腸由来マルターゼ阻害活性	19
2.3.4	ラット小腸由来スクラーゼ阻害活性	20
2.4	考察	21
2.5	まとめ	22
第 3 章	正常ラットにおけるミヤマタタビ根抽出物の血糖 上昇抑制作用	34
3.1	はじめに	34
3.2	材料及び方法	35
3.2.1	実験動物の取り扱い	35
3.2.2	正常ラットに対するマルトース負荷試験	35
3.2.3	正常ラットに対するスクロース負荷試験	36
3.2.4	正常ラットに対するグルコース負荷試験	37
3.2.5	急性経口毒性試験	38
3.2.6	統計処理	40
3.3	結果	40
3.3.1	正常ラットに対するマルトース負荷試験	40
3.3.2	正常ラットに対するスクロース負荷試験	41
3.3.3	正常ラットに対するグルコース負荷試験	43
3.3.4	急性経口毒性試験	44

3.4	考察	44
3.5	まとめ	46
第 4 章	糖尿病ラットにおけるミヤマタタビ根抽出物の抗 糖尿病効果	56
4.1	はじめに	56
4.2	材料及び方法	57
4.2.1	実験動物の取り扱い	57
4.2.2	糖尿病ラットの作製	57
4.2.3	実験動物の群分け	58
4.2.4	血清の調製	58
4.2.5	糖代謝に関連する指標の測定	59
4.2.6	脂質代謝に関連する指標の測定	59
4.2.7	肝機能に関連する指標の測定	60
4.2.8	腎機能に関連する指標の測定	60
4.2.9	TNF- α の測定	60
4.2.10	統計処理	61
4.3	結果	62
4.3.1	糖代謝に関連する指標の測定	62
4.3.2	脂質代謝に関連する指標の測定	62
4.3.3	肝機能に関連する指標の測定	64
4.3.4	腎機能に関連する指標の測定	65
4.3.5	TNF- α の測定	66
4.4	考察	66

4.5	まとめ	68
第5章	ミヤママタタビ根抽出物の有効成分の分析	83
5.1	はじめに	83
5.2	材料及び方法	83
5.2.1	総ポリフェノール含量の測定	83
5.2.2	総フラボノイド含量の測定	84
5.2.3	FT-IR 分析	85
5.2.4	HPLC 分析	86
5.2.5	UPLC-PDA 分析	87
5.2.6	統計処理	87
5.3	結果	88
5.3.1	総ポリフェノール含量	88
5.3.2	総フラボノイド含量	88
5.2.3	FT-IR 分析	88
5.3.4	HPLC 分析	89
5.3.5	UPLC-PDA 分析	90
5.4	考察	90
5.5	まとめ	91
第6章	総括	98
謝辞		102
参考文献		104
これまでの研究業績		123

表目録

表 2-1	ミヤママタタビ根各抽出物の収率	24
表 2-2	ミヤママタタビ根各抽出物の小腸由来マルターゼ阻害活性 (1 mg/mL).....	25
表 2-3	ミヤママタタビ根各抽出物の小腸由来スクラーゼ阻害活性 (1 mg/mL).....	26
表 3-1	毒性分類標準	48
表 5-1	ミヤママタタビ根抽出物 2,抽出物 8,抽出物 11 の総ポリフェ ノール含有量及び総フラボノイド含有量.....	93

図目録

図 1-1	世界の成人の糖尿病人口	7
図 1-2	糖尿病の臨床診断のフローチャート	8
図 1-3	ミヤマタタビ根の写真	9
図 2-1	α -グルコシダーゼ阻害薬の作用機序	27
図 2-2	ミヤマタタビ根熱水抽出物の調製方法	28
図 2-3	有機溶媒によるミヤマタタビ根各抽出物の調製方法	29
図 2-4	HP-20 樹脂によるミヤマタタビ根各抽出物の調製方法	30
図 2-5	ミヤマタタビ根熱水抽出物の酵母由来の α -グルコシダーゼ阻害活性	31
図 3-1	筑波大学動物資源センターのラット飼育室の写真	49
図 3-2	正常ラットにおけるマルトース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用	50
図 3-3	正常ラットにおけるマルトース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用 : AUC	51
図 3-4	正常ラットにおけるスクロース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用	52
図 3-5	正常ラットにおけるスクロース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用 : AUC	53
図 3-6	正常ラットにおけるグルコース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用	54
図 3-7	正常ラットにおけるグルコース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用	54

る抽出物 2 の作用 : AUC	55
図 4-1 血清中グルコース濃度に対する抽出物 2 の影響	69
図 4-2 血清中インスリン濃度に対する抽出物 2 の影響	70
図 4-3 血清中 TG に対する抽出物 2 の影響	71
図 4-4 血清中 TCHO に対する抽出物 2 の影響	72
図 4-5 血清中 HDL-C に対する抽出物 2 の影響	73
図 4-6 血清中 GOT/AST に対する抽出物 2 の影響	74
図 4-7 血清中 GPT/ALT に対する抽出物 2 の影響	75
図 4-8 血清中 TP に対する抽出物 2 の影響	76
図 4-9 血清中 UA に対する抽出物 2 の影響	77
図 4-10 血清中 BUN に対する抽出物 2 の影響	78
図 4-11 血清中 Na に対する抽出物 2 の影響	79
図 4-12 血清中 K に対する抽出物 2 の影響	80
図 4-13 血清中 Cl に対する抽出物 2 の影響	81
図 4-14 血清中 TNF- α に対する抽出物 2 の影響	82
図 5-1 ミヤマタタビの根抽出物 8 の IR スペクト	94
図 5-2 ミヤマタタビの根抽出物 11 の IR スペクト	95
図 5-3 没食子酸の IR スペクトル	96
図 5-4 ミヤマタタビ根抽出物 11 の全波長吸収	97

略語一覧

本研究で使用した略語は以下の通りであった。

AUC	Area Under Curve(血糖値曲線下面積)
BUN	Blood Urea Nitrogen(尿素窒素)
CMC-Na	Sodium Carboxymethyl Cellose (カルボキシメ チルセルロースナトリウム)
Extract 1	ミヤマタタビ根の熱水抽出物(抽出物 1)
Extract 2	ミヤマタタビ根の 70%エタノール抽出物(抽 出物 2)
GOT/AST	Glutamic-oxaloacetic transaminase (グルタミ ン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)
GPT/ALT	Glutamic pyruvic transaminase (グルタミン酸 ピルビン酸トランスアミナーゼ)
HDL-C	High Density Lipoprotein Cholesterol(高密度リ ポ蛋白コレステロール)
STZ	Streptozotocin (ストレプトゾトシン)
TCHO	Total Cholesterol(総コレステロール)
TG	Triglyceride(中性脂肪)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha(ヒト腫瘍壊死因 子- α)
TP	Total Protein(総たんぱく)
UA	Uric Acid(尿酸)

第1章 序 論

1.1 研究の背景

1.1.1 糖尿病について

糖尿病は世界規模の健康問題のひとつであった (King et al.,1998; Chandramohan et al., 2008)。近年, 生活習慣病としての糖尿病は高齢化, 肥満, 過食, 運動不足, ストレス, 飲酒などにより世界全体で爆発的な急増しており, 世界の成人人口の約5~6%が糖尿病を抱えている。2000年の全世界の糖尿病人口は1億7,100万人であり, 2030年では3億6,600万人になると予想されている (Sarah et al., 2004)。図1-1に世界の成人糖尿病人口の推移を示した。図1-1に示すように,中国では世界一の糖尿病患者を抱えている。米国では成人の糖尿病有病率が10%であり,2050年では33%に達すると予想されている (Boyle et al.2010)。日本において糖尿病は生活習慣病の中核として近代の国民病と呼ばれている。McNeely and Boyko (2004)によれば, アジア人は β 細胞を増やす能力やその機能を高めるような能力が欧米人に比べ少ないとされており,糖尿病になりやすいと言われている。これは近年アジア地域の糖尿病患者急増の1つ原因であると考えられる。

米国糖尿病学会 (2005) により, 糖尿病は1型糖尿病及び2型糖尿病に分類されている (American Diabetes Association, 2005)。そのうち,2型糖尿病患者が糖尿病患者の90%以上を占

めている。1型糖尿病は体の中で血糖を下げる唯一のホルモンであるインスリンの産生細胞膵臓β細胞が完全に破壊され、インスリンが絶対的な欠乏となるために発症する糖尿病である。2型糖尿病はインスリン分泌低下及びインスリン感受性低下の二つを原因とする糖尿病である（Gispén et al., 2000）。1型糖尿病及び2型糖尿病の共通な特徴は高血糖であり、高血糖症状が持続するとさまざまな合併症が起こりやすくなった。例えば腎症、神経障害、大血管障害、網膜症、足病変などがある。しかしながら、糖尿病の初期段階では自覚症状が見られないため、日常から予防的に定期的検査は非常に大切であった。糖尿病の臨床診断のフローチャート図 1-2 の通りであった。

1.1.2 糖尿病の治療法について

今までの糖尿病の治療方法には運動療法、食事療法、経口血糖降下薬、膵臓移植、膵島移植などの方法がある（河盛, 2001）。そのうち、運動療法、食事療法は基本的な糖尿病治療法である。運動療法はインスリン抵抗性を改善できる。食事療法はインスリン作用不足を解消できる。また、経口血糖降下薬は糖尿病治療の主な手段であった。現在臨床で使用されている経口血糖降下薬はスルホニル尿素薬、ビグアナイド薬、 α -グルコシダーゼ阻害薬、速効型インスリン分泌促進薬、DPP-4 阻害薬、チアゾリジン薬六種類がある（Mizuno et al., 2008）。現在の技術で iPS 細胞からインスリン分泌組織の作成が可能であることから、1型

糖尿病を根本的に治療できる可能性があるが、その安全性についての検討がまだ行われていないこともあり、現時点では臨床で使用されていない。

近年、伝統的な薬用植物が安全、有効、無毒などの利点を有していることが判明してきていることから、糖尿病治療に広く使用されている (Clifford and Caroline, 1989)。アジアの多くの国では数百年前から伝統的な漢方薬が糖尿病治療に用いられた (Yang et al., 2010)。現在、1200 種類以上の植物が民間療法として糖尿病治療に使用されている (Marles and Farnsworth, 1995)。この中で、136 種類の植物について抗糖尿病効果を有することが明らかにされている (Kavishankar et al., 2011)。西洋人参 (Xie et al., 2004)、緑茶 (Chen et al., 2005)、タイツリオウギ (Zhou et al., 2005; Guo et al., 2007)、サナギタケと冬虫夏草 (Kim and Yun, 2005) など二十種類以上の薬用植物が抗糖尿病効果を持つことが報告されている。さらに、60 種以上の漢方薬は血糖降下作用を持つことが明らかになっている。今後、薬用植物、漢方薬などの天然植物が糖尿病治療薬の開発に大きく貢献することが期待される。

今まで、天然植物から発見された血糖値降下成分には、フラボノイド (Chen et al., 2013; Kalailingam et al., 2013)、テルペノイド (Jung et al., 2006)、ステロイド (Jung et al., 2006)、アルカロイド (Patel et al., 2011)、フラボン (Nazreen et al., 2012)、フラバノン (Ren et al., 2011)、多糖類 (Zhao et al., 2011; Li et al.,

2006), トリテルペン(Ha et al., 2012)などがある。これらの成分の多くは性質が比較的安定しており,一般的に毒性が極めて低く,作用も穏やか,ゆるやかで効き目に持続性がある。そこで,薬用植物を中心とする天然植物から抗糖尿病薬についての研究開発が多数実施される様になっている。

1.1.3 ミヤママタタビに関する既往の研究

ミヤママタタビ (*Actinidia kolomikta*) は別名深山木天蓼と呼ばれ,マタタビ科マタタビ属に属する。ミヤママタタビは海拔 1600m-2900m の深い山に多く自生している。朝鮮半島,中国,東南アジアには広く分布している。図 1-3 はミヤママタタビ根の写真である。

これまでにミヤママタタビの品種改良,人工栽培についての研究が行われている(劉ら, 1998)。さらに,ミヤママタタビの果実は甘酸っぱく生食に利用され,果実酒の原料としても利用されている。しかしながら,ミヤママタタビ根は林業廃棄物としてあまり利用されていない。所属する研究室では,子宮頸がん細胞株 ME-180 を用いてミヤママタタビ根の熱水抽出物の抗酸化及び抗増殖作用について検討した(Liu et al., 2010),その結果,ミヤママタタビ根の熱水抽出物の抗酸化及び抗増殖作用が明らかになった。また,ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 を用いてミヤママタタビ根のエタノール抽出物の抗癌作用も検討された(Guan et al.,2011),その結果,ミヤママタタビ根のエ

タノール抽出物が抗酸化及び抗癌作用を持つことが明らかになっていった。さらに、ミヤママタタビ根抽出物についてマクロファージ細胞 RAW 264.7 に対する免疫調節活性も検討され (Sun et al.,2013), その結果, ミヤママタタビ根抽出物が強い免疫調節活性を持つことは明らかになった。

Montonen (2004)らは抗酸化作用のある食品は糖尿病の進展または合併症の発症, 進展防止に役立つと報告された。従って, ミヤママタタビ根抽出物が抗糖尿病効果を持つ可能性は高いと考えられる。ラオスでは数百年前から糖尿病を治すために, ミヤママタタビ (*Actinidia kolomikta*) の根を水で煎じ, お茶のように飲んでいる。しかし, その抗糖尿病効果についての科学的な研究はまだ行われていない。

1.2 本研究の目的

本研究の目的は以下の2点である：(1) ミヤママタタビ根は民間療法で糖尿病治療に用いられていることから, その科学的な根拠を探し, 抗糖尿病効果のメカニズムを解明する。(2) ミヤママタタビ根に含まれる主要成分を分析し, その構造を明らかにする。

1.3 本論文の構成

本論文は六つの章により構成されている。各章の内容は以下の通りであった。

第 1 章では研究背景,研究目的および論文の構成などを記した。

第 2 章では異なる溶媒を用いてミヤマタタビ根の有効成分を抽出し,その抽出物を用いて酵母由来の α -グルコシダーゼ阻害活性を検討した。また,ミヤマタタビ根各抽出物を用いてラット小腸由来マルターゼ阻害活性及びスクラーゼ阻害活性を検討した。

第 3 章ではミヤマタタビ根のエタノール抽出物を用いてラットにマルトール負荷試験,スクロース負荷試験,グルコース負荷試験を行い,血糖上昇抑制作用を検討した。また,ミヤマタタビ根の熱水抽出物及びミヤマタタビ根のエタノール抽出物を用いて急性経口毒性試験を行った。

第 4 章では作製した糖尿病ラットにミヤマタタビ根のエタノール抽出物を長期投与し,各種糖尿病マーカーなどに及ぼす影響について検討した。

第 5 章ではミヤマタタビ根抽出物の総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量ならびに FT-IR,HPLC,UPLC-PDA を用いてミヤマタタビ根抽出物の主要有効成分を測定した。

第 6 章では第 2 章,第 3 章,第 4 章及び第 5 章の研究結果をもとに,総合考察を行った。そして,残した課題および今後の展望について述べた。

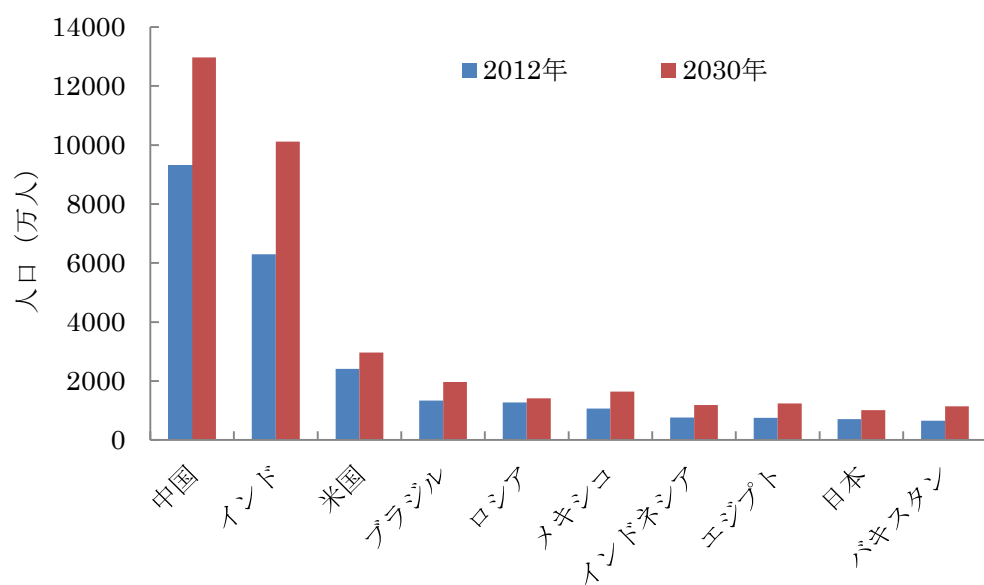


図 1-1 世界の成人の糖尿病人口 (Diabetes Atlas 2012 update)

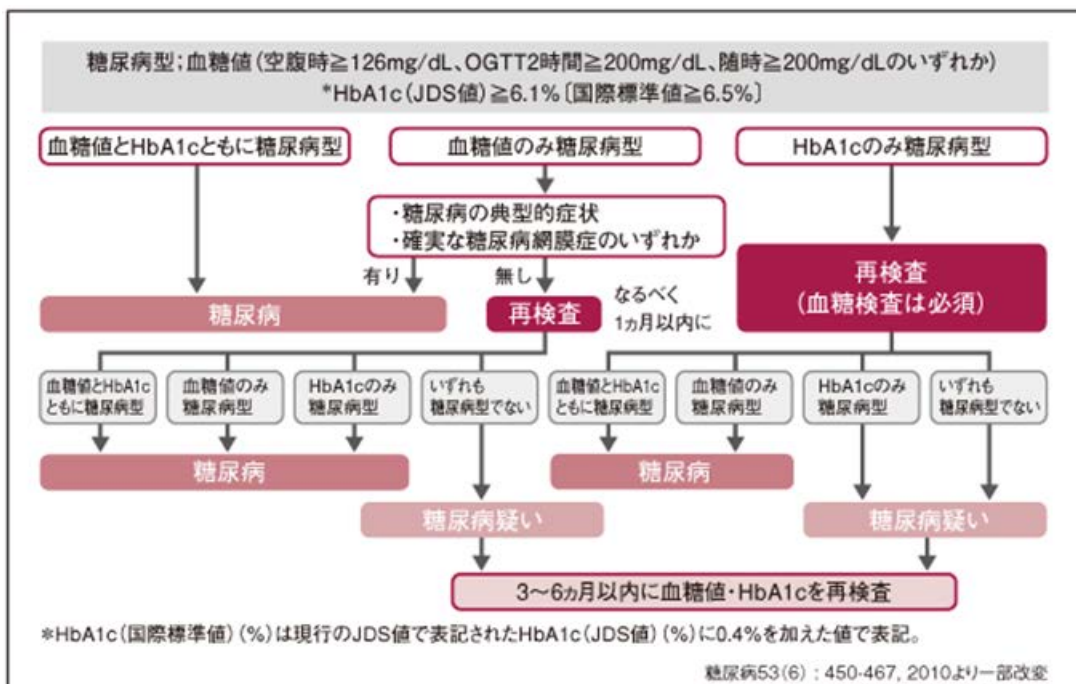


図 1-2 糖尿病の臨床診断のフローチャート(糖尿病 2010, 53(6):450-467).



図 1-3 ミヤマタタビ根の写真

第2章 ミヤマタタビ根抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性

2.1 はじめに

糖尿病は高血糖が引き起こす慢性代謝病であった(Lin & Sun, 2010)。従って,糖尿病の早期治療において食後高血糖をコントロールするのは非常に重要である。小腸 α -グルコシダーゼ阻害剤は糖質の消化及び吸収を遅延し,食後高血糖を改善できる(Jong-Anurakkun et al., 2007)。 α -グルコシダーゼ活性の阻害によって食後高血糖を低下させるのは糖尿病予防及び治療の一つの手段である(Megh et al., 2008; Jo et al., 2011)。

近年,植物抽出物及び食品から新しい α -グルコシダーゼ阻害剤の探索が盛んに行われている(Chan et al., 2010; Kim et al., 2013)。糖質消化酵素は α -アミラーゼと α -グルコシダーゼ二種類がある。 α -アミラーゼは唾液や膵液に存在し, α -グルコシダーゼは小腸上部粘膜上皮細胞刷子縁に存在する。 α -グルコシダーゼはマルターゼ,スクラーゼ,イソマルターゼ,ラクターゼ,トレハラーゼ及びグルコアミラーゼなど六つの種類がある。 α -アミラーゼは澱粉をマルトース及びイソマルトースに加水分解して小腸に達する。 α -グルコシダーゼはマルトース,スクロースなどの二糖類をグルコースなどの単糖類に加水分解して小腸壁で吸収される。

近年,様々な食品素材について糖質消化酵素の阻害作用により摂取した糖質の分解を抑制し小腸管でのブドウ糖などの吸収を遅延させて血糖値の急激な上昇を抑制するという報告がなされている(出口ら, 1998; 立石ら, 2004; 小川ら, 2009; 齋藤ら, 2007; Tadera et al., 2006)。図 2-1 のように α -グルコシダーゼ阻害薬作用機序は α -グルコシダーゼ活性を阻害し, 二糖類の単糖への分解を抑制して血糖値の上昇を抑え, 食後高血糖を改善することであった。Welborn (1998) によれば, α -グルコシダーゼ阻害薬は 20 世紀後半に開発した新しい糖尿病治療薬であり, 臨床で広く使用されている(弘世ら, 2008)。 α -グルコシダーゼ阻害薬は微生物, 植物, 海の無脊椎動物などの天然物由来の化合物であった。そのうち, アカルボース (Wehmeier et al., 2004), ボグリボース (Luo et al., 2001) は微生物由来の, Nojirimycin (Reese et al., 1971) 及び 1-deoxynojirimycin (Asano et al., 1994) は植物由来の α -グルコシダーゼ阻害薬であった。 α -グルコシダーゼ阻害薬は食後の急激な血糖上昇を抑制できることから, 高血糖に起因する糖尿病, 肥満症等の生活習慣病の予防, 治療に有用であるとして注目されている。

しかしながら, 現在臨床で広く用いられている α -グルコシダーゼ阻害薬はアカルボース, ボグリボース, ミグリトールなど数種類しかないである (Ana et al., 2012)。そして, α -グルコシダーゼ阻害薬に肝毒性, 腹痛, 鼓腸, 下痢, 低血糖症など重大

な副作用があるとの報告(Coniff et al., 1995; Carrascosa et al.,1997; Charpentier et al.,2000)があり, 安全性に問題が指摘されている。さらに, α -グルコシダーゼ阻害薬の阻害活性が強いほど副作用が強く発生することから,血糖値上昇抑制作用を有する,安全かつ有効な α -グルコシダーゼ阻害薬の開発が強く望まれている。

Bhandari (2008) らは天然素材から α -グルコシダーゼ阻害活性を持つ,より有効で安全な機能性食品の開発が盛んに行われていると報告した。一方,伝統的な薬用植物及びその製品は世界中で糖尿病の治療に広く使用されたがその機能の科学的な根拠についてはあまり知られてない(Patwardhan et al., 2008 ; Said et al., 2007)。

上述の背景から,本研究では異なる溶媒を用いてミヤマタタビ根の有効成分を抽出し,その抽出物を用いて酵母由来の α -グルコシダーゼ阻害活性,ラット小腸由来のマルダーゼ阻害活性,ラット小腸由来のスクラーゼ阻害活性を評価し,糖代謝への影響を解析した。

2.2 材料及び方法

2.2.1 ミヤマタタビ根各抽出物の調製

ミヤマタタビ根各抽出物の調製方法は図 2-2, 図 2-3, 図 2-4 のとおりであった。本実験に使用したラオス産ミヤマタタビ根は天然物産業つくば株式会社及び大生工業株式会社よ

り提供していただいた。まず、ミヤマタタビ乾燥根を粉碎して粉末を得た（図 2-2）。得られた粉末 50 g に 500 mL の蒸留水を加え、100℃で 2 時間熱水抽出した。上記と同様の操作を 3 回繰り返した。抽出後、固液分離して抽出液を減圧濃縮し、さらに凍結乾燥によって乾燥物を得た。得られた乾燥物（抽出物 1）は約 5 g であった。得られた乾燥物は次の実験まで-20℃で冷凍保存した。次に、有機溶媒を用いて抽出を行った（図 2-3）（Wu et al., 2011）。ミヤマタタビ乾燥根を粉碎し、70%エタノールを加えて室温で 3 日間抽出を行った。抽出液をガラス繊維ろ紙（GF/A 47 mm）（ワットマン）用いてろ過後、残渣に 70%エタノールを加え、同様の抽出操作を計 3 回繰り返した。抽出液を合わせて 40℃で減圧下溶媒留去して 70%メタノール抽出物（抽出物 2）を得た。次に、抽出物（抽出物 2）を石油エテル、酢酸エチル、ブタノールを用いて順次抽出し、凍結乾燥し、抽出物 3、抽出物 4、抽出物 5 を得た。最後に残存水層について減圧濃縮し、さらに凍結乾燥によって乾燥物（抽出物 6）を得た。この抽出物 6 をダイヤイオン HP 20 カラムクロマトグラフィー（三菱化学）に付し、10%のメタノール、50%のメタノール、100%のメタノールを用いて分画し、抽出物 7、抽出物 8、抽出物 9 を得た。

また、最も α -グルコシダーゼ活性阻害成分を探すため、本研究では図 2-4 に従って抽出物 2 をさらに分画した。即ち、抽出物 2 を合成吸着樹脂のダイヤイオン HP-20（三菱化学）に通液

した後,まずは水で洗浄し,糖質などを除去した。その後 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99.5%のエタノールで順次溶出し,溶出液を濃縮,乾燥し,抽出物 10 から抽出物 20 までの抽出物を得た。

2.2.2 酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性

最初に酵母由来 α -グルコシダーゼ酵素液を調製した。その調製方法以下のとおりであった。1 mg 活性値が 76 U/mg の酵母由来の α -グルコシダーゼ粉末(酵母由来, オリエンタル酵母工業社製)に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) を添加し, 活性値が 1 U/mL の酵素液を作成した。作成した酵素液は -20°C で冷凍保存した。

次に酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。測定方法は文献を参考にした (Apostolidis et al., 2011; Wan et al., 2012)。即ち, 0.156 mg/mL, 0.3125 mg/mL, 0.625 mg/mL, 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL 濃度のミヤマタタビ根の熱水抽出物 0.05 mL を 96 穴プレートに添加し, 0.05 mL 5 mM の p-nitrophenyl- α -d-glucopyranoside (PNPG, SIGMA 社製)を基質として添加した後, 吸光度(492nm)を測定した (Biotrak II plate reader, Biochrom, Cambridge, UK)。37°C で 5 分間加熱した後, 試料の吸光度を分光光度計で 492 nm の波長で測定し, 吸光値の変化により, 試料の α -グルコシダーゼ阻害活性を計算した。

各試料溶液の α -グルコシダーゼ阻害活性は次式を用いて算

出し，阻害率（％）として表した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left[1 - \frac{\Delta \text{試料 A492 nm 値}}{\Delta \text{対照 A492 nm 値}} \right] \times 100$$

2.2.3 ラット小腸由来マルターゼ阻害活性

最初にラット小腸由来マルターゼ酵素液を調製した。調製は Ikarashi (2011) の方法を参考にした。即ち，ラット腸管アセトンパウダー (SIGMA 社製) 1 g を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 10 mL に懸濁し，氷冷しながらホモジナイズを行った。遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間, 4°C) の後，上清を分取して -80°C で保存した。測定時に解凍した上澄み (100 mg/mL) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) で 20 倍希釈したものをマルターゼ酵素液として使用した。

次にラット小腸由来マルターゼ阻害活性を測定した。本実験は Ikarashi ら (2011) の方法を参考にして行った。即ち，96 穴プレートを用意し，ミヤマタタビの各抽出物を 10% DMSO に溶解し，0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL 濃度の希釈溶液を作成した。そして，作成した異なる濃度のミヤマタタビ根各抽出物 0.02 mL を 96 穴プレートに添加し，0.02 mL マルトース (2%) を基質として添加した後，37 °C で 5 分間予備加熱した。その後，ラット小腸由来のマルターゼ酵素液 0.02 mL を添加し 37 °C で 60 分間正確に酵素反応を行った後，反応液 0.01 mL を別の 96 穴

プレート (1-6776-03,アズワン) に入れ, 発色試薬液(グルコース CII -テスト,和光製薬)0.2 mL を添加し,よく混合した後,37 °C で 5 分間加温した。その後, 試薬盲検を対照として試料の吸光度 492 nm を分光光度計 (Biotrak II plate reader, Biochrom, Cambridge, UK) で測定し, 試料のスクラーゼ阻害活性を計算した。

各試料溶液の阻害活性は次式を用いて算出し, 阻害率 (%) として表した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left[1 - \frac{\text{試料 A492 nm 値} - \text{試料盲検 A492 nm 値}}{\text{対照 A492 nm 値} - \text{対照盲検 A492 nm 値}} \right] \times 100$$

試料 : 試料,マルトース,マルターゼ酵素液

試料盲検 : 試料,マルトース,リン酸緩衝液

対照 : リン酸緩衝液,マルトース,マルターゼ酵素液

対照盲検 : リン酸緩衝液,マルトース,リン酸緩衝液

本実験では各試料溶液 1 種類につき 3 検体 (n=3) で酵素反応を行った。

2.2.4 ラット小腸由来スクラーゼ阻害活性

まずはラット小腸由来スクラーゼ酵素液を調製した。その調製は Sakulnarmrat and Konczak (2012) の方法を参考にして行われた。即ち,ラット腸管アセトンパウダー(SIGMA 社製) 1 g を 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 10 mL に懸濁し,氷冷しながら

ホモジナイズを行った。遠心分離（3,000 rpm,10 分間,4℃）の後、上澄みを分取して-70℃以下に保存する（100 mg/mL）。上清を 0.1 M リン酸緩衝液（pH7.0）で 2 倍希釈したものはスクラーゼ酵素液として使用した。

次はラット小腸由来スクラーゼ阻害活性を測定した。本実験は Sakulnarmrat and Konczak（2012）の方法を参考にして行われた。即ち、96 穴プレート（1-6776-03,アズワン）を用意し、ミヤマタタビの各抽出物を 10% DMSO に溶解し、0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL 濃度の希釈溶液を作成した。そして、作成した異なる濃度のミヤマタタビ熱水抽出物 0.02 mL を 96 穴プレート（1-6776-03,アズワン）に添加し、0.02 mL スクロース（2%）を基質として添加した後、37 °C で 5 分間予備加熱した。その後、0.02 mL ラット小腸由来のスクラーゼ酵素液を添加して 37 °C で 60 分間正確に酵素反応を行った後、反応液 0.01 mL を別の 96 穴プレートに入れ、発色試薬液（グルコース CII -テスト,和光製薬）を 0.2mL 添加し、よく混合した後、37 °C で 5 分間加温した。その後、試薬盲検を対照として試料の吸光度を分光光度計（ Biotrak II plate reader, Biochrom, Cambridge, UK）で 492 nm の波長で測定し、試料のスクラーゼ阻害活性を計算した。

各試料溶液の阻害活性は次式を用いて算出し、阻害率（%）として表した。

$$\text{阻害率(\%)} = \left[1 - \frac{\text{試料 A492 nm 値} - \text{試料盲検 A492 nm 値}}{\text{対照 A492 nm 値} - \text{対照盲検 A492 nm 値}} \right] \times 100$$

試料：試料,スクロース,スクラーゼ酵素液

試料盲検：試料,スクロース,リン酸緩衝液

対照：リン酸緩衝液,スクロース,スクラーゼ酵素液

対照盲検：リン酸緩衝液,スクロース,リン酸緩衝液

本実験では各試料溶液 1 種類につき 3 検体 (n=3) で酵素反応を行った。

2.2.5 統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。データは一元配置分散分析 (ANOVA) を使用し, 事後分析として Duncan's multiple range test (DMRT)を用いた, 統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

2.3 結果

2.3.1 ミヤマタタビ根各抽出物の収率

表 2-1 はヤマタタビの各抽出物の収率を示した。表 2-1 に示すように, 抽出物 1 及び抽出物 2 の収率が一番高い, 約 10%であった。ミヤマタタビ根抽出物 8, 抽出物 11 の収率はそれぞれ 0.92%, 0.83%であった。

2.3.2 酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性

ミヤマタタビ根の熱水抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活

性を図 2-5 に示した。図 2-5 に示すように、酵母由来 α -グルコシダーゼに対するミヤママタタビ根の熱水抽出物は高い α -グルコシダーゼ阻害活性を持つことが判明した。ミヤママタタビ根の熱水抽出物及びアカルボースの 50%阻害濃度 (IC₅₀) はそれぞれ 0.94 mg/mL, 1.08 mg/mL であった。ミヤママタタビ根の熱水抽出物の阻害活性は用量依存的に増加し、糖尿病治療薬であるアカルボースよりも強い。

他の研究と比べると,1.25 mg/mL の同じ濃度で, ミヤママタタビ根の熱水抽出物, *Gynura divaricata*(L.)DC の熱水抽出物の阻害率はそれぞれ 66%, 38.9%であった。ミヤママタタビ根の熱水抽出物は *Gynura divaricata*(L.)DC の熱水抽出物より高い阻害率を示した (Wu et al., 2011)。

2.3.3 ラット小腸由来マルターゼ阻害活性

ミヤママタタビ根各抽出物のマルターゼ阻害活性を表 2-2 に示した。表 2-2 に示すように, ミヤママタタビ根各抽出物のマルターゼ阻害活性比較の結果, ミヤママタタビ根抽出物 1, 抽出物 8, 抽出物 11, 抽出物 12 は強いマルターゼ阻害活性を示した。そのうち,ミヤママタタビ根抽出物 11 (1 mg/mL) のマルターゼ阻害率は $46.3 \pm 0.6\%$ であった。さらに, ミヤママタタビ根抽出物 11, 抽出物 8 の阻害活性は図 2-6 に示すのように濃度依存的に増加した。8 mg/mL の同じ濃度で, ミヤママタタビ根抽出物 8,抽出物 11, アカルボース(和光純薬) の阻害率

はそれぞれ $56.9 \pm 1.4\%$, $67.4 \pm 2.3\%$, 100% であった。

ラット小腸由来マルターゼに対するミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 の 50%阻害濃度 (IC_{50}) はそれぞれ 4.96 mg/mL , 3.34 mg/mL であった。これは血糖効果作用を持つと言われたモリンガ葉抽出物 ($IC_{50} > 5 \text{ mg/mL}$) より高いマルターゼ阻害活性を示した (Adisakwattana and Chanathong, 2011)。

2.3.4 ラット小腸由来スクラーゼ阻害活性

ミヤマタタビ根各抽出物のスクラーゼ阻害活性を表 2-3 に示した。表 2-3 に示すように、ミヤマタタビ根各抽出物のスクラーゼ阻害活性比較の結果、抽出物 8,抽出物 11,抽出物 12 は強いスクラーゼ阻害活性を示した。そのうち、ミヤマタタビ根抽出物 11 (1 mg/mL) のマルターゼ阻害率は $51.4 \pm 1.5\%$ であった。さらに、その阻害活性は図 2-7 に示すのように濃度依存的に増加した。 8 mg/mL の同じ濃度で、ミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11, アカルボース(和光純薬) の阻害率はそれぞれ $59.1 \pm 0.9\%$, $70.8 \pm 3.3\%$, $78.8 \pm 0.6\%$ であった。抽出物 11 とアカルボースは同じ濃度 (8 mg/mL) ではほぼ同じスクラーゼ阻害作用を示した。

ラット小腸由来スクラーゼに対するミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 の 50%阻害濃度 (IC_{50}) はそれぞれ 4.80 mg/mL , 2.98 mg/mL であった。

2.4 考察

ダイヤイオン HP-20 は分子量 1000 以上のペプチド,蛋白質,ポリフェノールなどの吸着精製に適した芳香族系合成吸着剤であった。近年,ポリフェノール類が抗糖尿病効果を有することが報告されている。そこで,本研究では本製品を用いて,ミヤマタタビ根の活性成分の分離を行った(Gao et al., 2007)。

10%のエタノールを用いて HP-20 カラムで分画したミヤマタタビ根抽出物 11 は一番高いマルターゼ阻害活性及びスクラーゼ阻害活性を示した。HP-20 などのカラムはコストが安い,標的物質が回収易いなど利点を持っているから工業で大量に使用している。従って,将来,ミヤマタタビ根抽出物 11 は抗糖尿病素材として大量生産が可能であった。

Shai (2010) らはアカルボースの α -グルコシダーゼ阻害活性は濃度依存的増加すると証明した。ミヤマタタビ根の熱水抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性は糖尿病治療薬のアカルボースより強い。しかしながら,本実験に使用した α -グルコシダーゼは酵母から抽出したものであった。ラットの小腸に存在する α -グルコシダーゼではない。これらの研究(Yoshikawa et al., 2003) は α -グルコシダーゼ阻害活性試験に繁用されているパン酵母由来の α -グルコシダーゼは小腸内での糖質加水分解酵素への影響を調べるには適していないと報告した。そこで,本研究ではミヤマタタビ根の熱水抽出物だけの酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性を検討し, さらに,ラット小腸由来のマ

ルターゼ及びスクラーゼを用いて,ミヤマタタビ根各抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性をさらに検討した。

in vitro 試験において α -グルコシダーゼ阻害活性は血糖上昇抑制作用のひとつ評価指標であった。本章では *in vitro* 試験よりミヤマタタビ根各抽出物は血糖上昇抑制作用を持つことが確認された。今後,実験動物あるいはヒトによる血糖上昇抑制作用をさらに検討する必要がある。

将来,ミヤマタタビ根は抗糖尿病薬として開発が可能であると考えられる。糖尿病の予防,治療に少しでも貢献できることを期待している。

2.5 まとめ

本章では *in vitro* でミヤマタタビ根各抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性を初めて検討した。

酵母由来 α -グルコシダーゼ阻害活性の結果より,酵母由来 α -グルコシダーゼに対する抽出物 1 は高い α -グルコシダーゼ阻害活性を持つことが判明した。抽出物 1 及びアカルボースの 50%阻害濃度 (IC₅₀) はそれぞれ 0.94 mg/mL, 1.08 mg/mL であった。

ラット小腸由来マルターゼ阻害活性の結果より,ミヤマタタビ根抽出物 8 及び抽出物 11 は強いマルターゼ阻害活性が見られた。さらに,その阻害活性は図 2-9 に示すのように濃度依存的に増加した。ラット小腸由来マルターゼに対するミヤママ

タタビ根抽出物 8,抽出物 11 の 50%阻害濃度 (IC₅₀) はそれぞれ 5.77 mg/mL,4.66 mg/mL であった。

ラット小腸由来スクラーゼ阻害活性の結果より,ミヤママタタビ根抽出物 8 と抽出物 11 は強いスクラーゼ阻害活性が見られた。ラット小腸由来スクラーゼに対するミヤママタタビ根抽出物 8,抽出物 11 の 50%阻害濃度 (IC₅₀) はそれぞれ 5.55 mg/mL,4.44 mg/mL であった。

以上のことから,ミヤママタタビ根各抽出物は α -グルコシダーゼ活性に影響を与えるという新しい知見を得ることができた。特に,ミヤママタタビ根抽出物 8,抽出物 11 は小腸に存在するマルターゼ及びスクラーゼ活性を阻害し,マルトース,スクロースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖を改善できることが認められた。その作用機序は糖尿病治療薬である経口血統降下薬の α -グルコシダーゼ阻害剤と一致であった。これはミヤママタタビ根抽出物の抗糖尿病効果を初めて検討した。

表 2-1 ミヤママタタビ根各抽出物の収率

抽出物	収率 (%)	抽出物	収率 (%)
Extract 1	10	Extract 11	0.83
Extract 2	10	Extract 12	0.25
Extract 3	0.68	Extract 13	0.39
Extract 4	0.35	Extract 14	0.36
Extract 5	0.71	Extract 15	0.38
Extract 6	4.8	Extract 16	0.16
Extract 7	1.35	Extract 17	0.11
Extract 8	0.92	Extract 18	0.08
Extract 9	0.31	Extract 19	0.08
Extract 10	1.35	Extract 20	0.05

表 2-2 ミヤママタタビ根各抽出物の小腸由来マルターゼ阻害活性(1 mg/mL)。すべての値は平均値±標準偏差で示した (n=3)

抽出物	阻害率(%)	抽出物	阻害率(%)
Extract 1	35.2±2.0	Extract 11	46.3±0.6
Extract 2	25.9±1.8	Extract 12	32.3±4.0
Extract 3	0	Extract 13	25.4±1.7
Extract 4	22.9±3.2	Extract 14	15.5±2.7
Extract 5	23.8±4.7	Extract 15	22.7±1.6
Extract 6	9.9±1.6	Extract 16	15.1±2.0
Extract 7	18.0±1.2	Extract 17	7.5±1.9
Extract 8	34.0±1.6	Extract 18	20.7±1.4
Extract 9	0	Extract 19	0
Extract 10	9.9±1.6	Extract 20	0

表 2-2 ミヤママタタビ根各抽出物の小腸由来スクラーゼ阻害活性 (1 mg/mL)。測定値は平均値±標準誤差で示した (n=3)

抽出物	阻害率 (%)	抽出物	阻害率 (%)
Extract 1	21±2.0	Extract 11	51.4±1.5
Extract 2	22.1±1.5	Extract 12	40.4±1.2
Extract 3	0	Extract 13	22.5±1.7
Extract 4	28.2±4.0	Extract 14	10.5±2.1
Extract 5	18.3±3.8	Extract 15	12.3±4.8
Extract 6	0	Extract 16	13.0±4.4
Extract 7	14.4±6.8	Extract 17	14.6±2.7
Extract 8	30.3±2.0	Extract 18	19.1±4.5
Extract 9	0	Extract 19	0
Extract 10	0	Extract 20	0

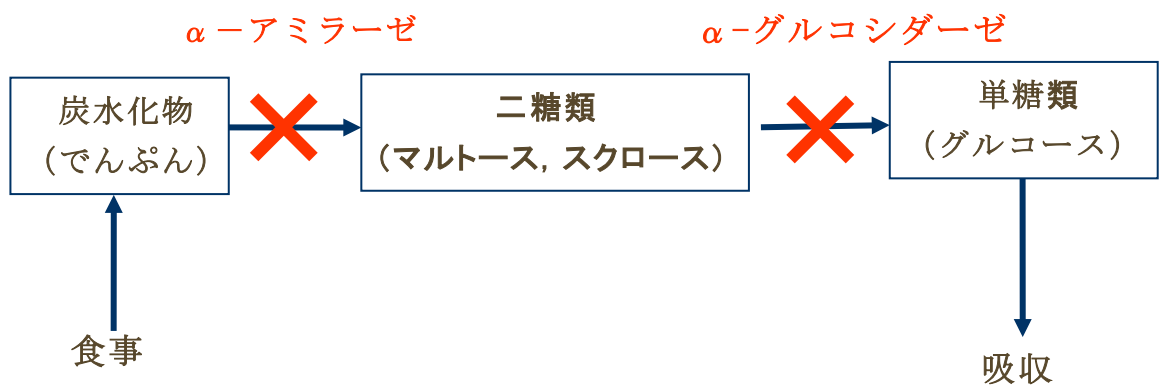
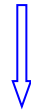


図 2-1 α-グルコシダーゼ阻害薬の作用機序

Actinidia kolomikta root



Break into pieces



100°C, 2h



Solid-liquid separation



Concentration



Freeze-drying



Extract 1

図 2-2 ミヤマタタビ根熱水抽出物の調製方法

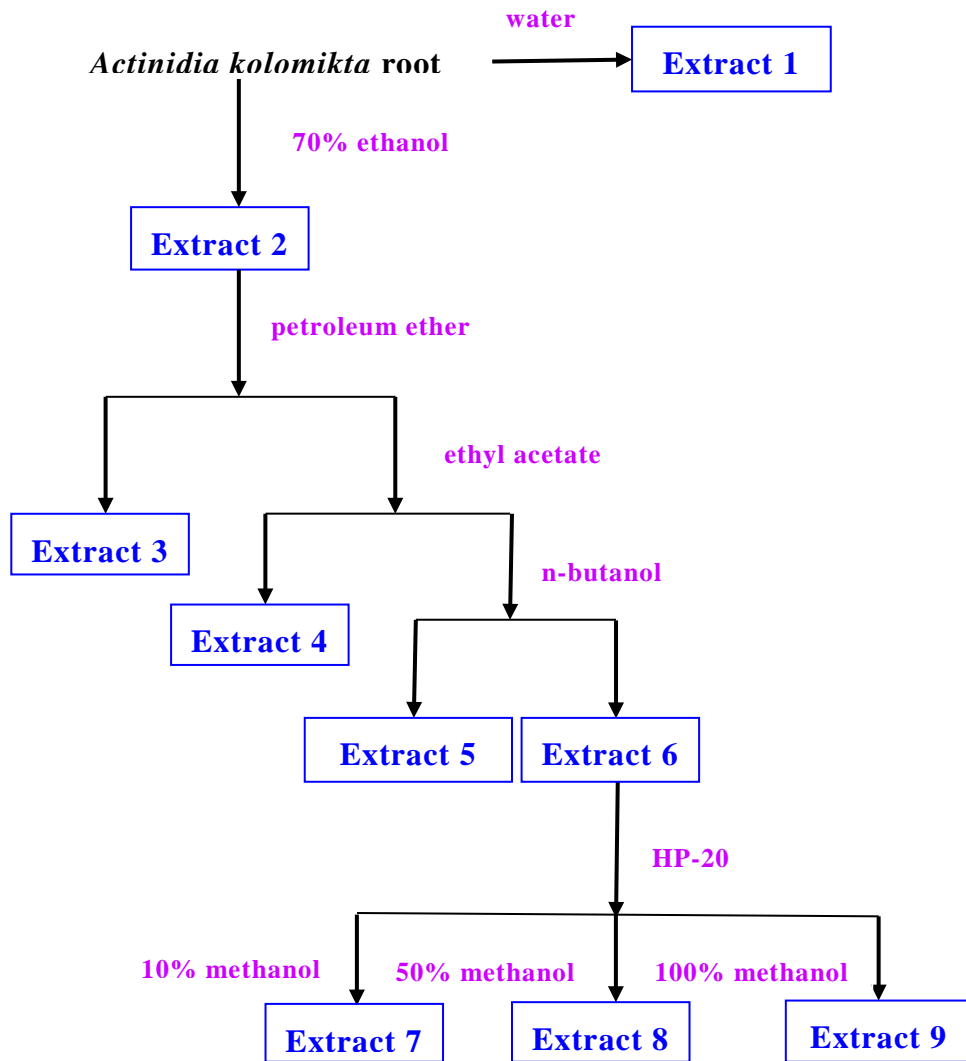


図 2-3 有機溶媒によるミヤマタタビ根各抽出物の調製方法

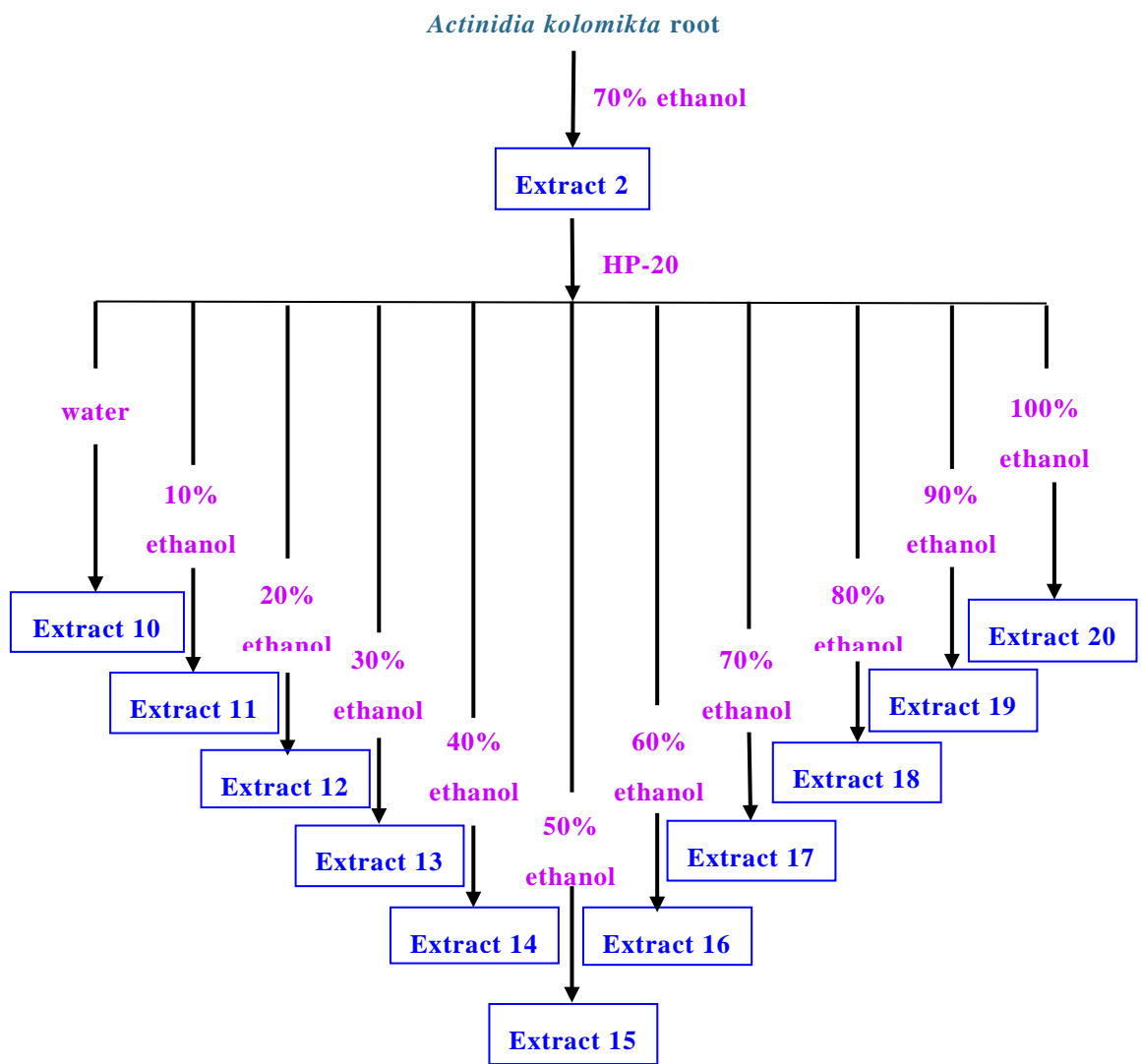


図 2-4 HP-20 樹脂によるミヤマタタビ根の各抽出物の調製方法

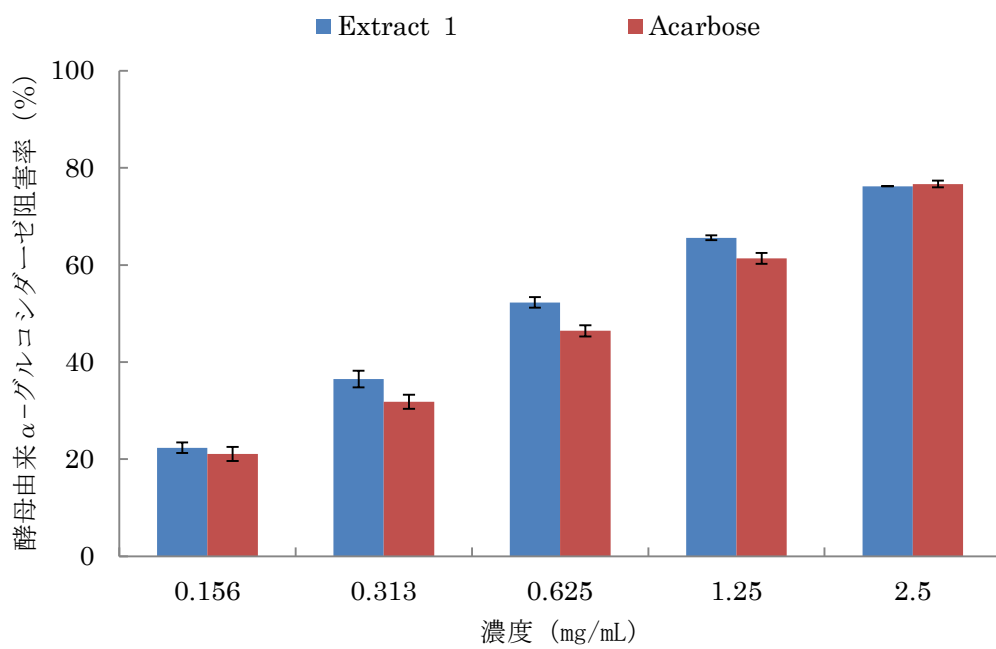


図 2-5 ミヤマタタビ根熱水抽出物の酵母由来の α -グルコシダーゼ阻害活性。測定値は平均値 \pm 標準誤差で示した (n=3)

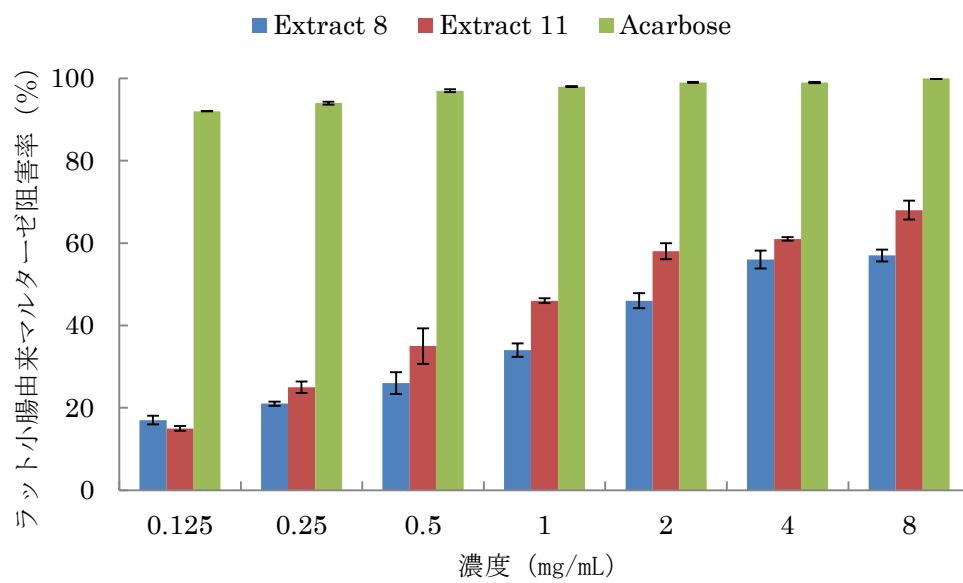


図 2-5 ラット小腸由来マルターゼ活性に対するミヤマタタビ根抽出物 8 及び抽出物 11 の阻害作用。Acarbose は陽性対照。測定値は平均値±標準誤差で示した (n=3)

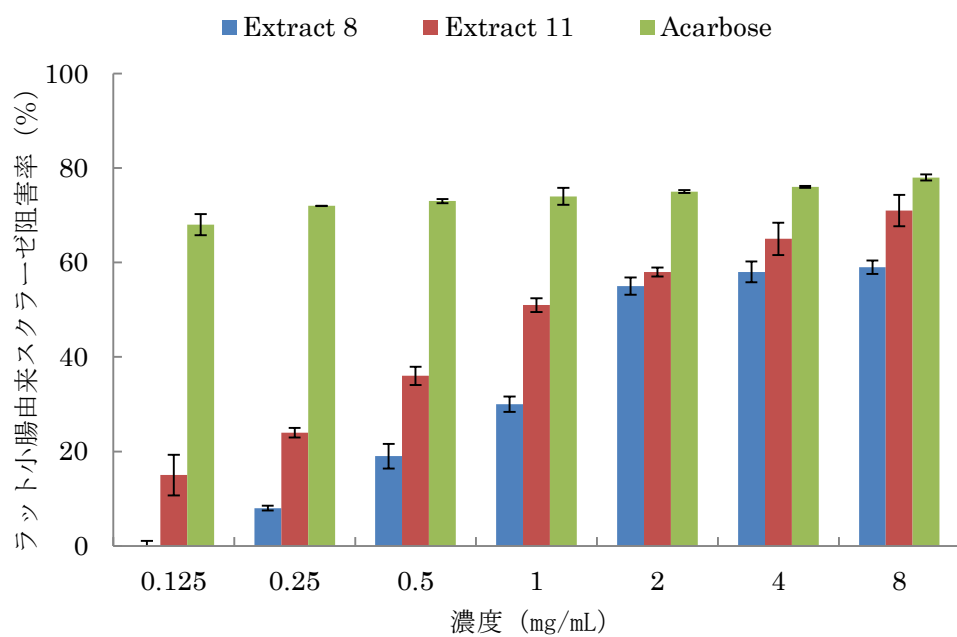


図 2-6 ラット小腸由来スクラーゼ活性に対するミヤマタタビ根抽出物 8 及び抽出物 11 の阻害作用。測定値は平均値±標準誤差で示した (n=3)

第3章 正常ラットにおけるミヤマタタビ根抽出物の血糖 上昇抑制作用

3.1 はじめに

近年、動物に経口糖負荷試験による α -グルコシダーゼ阻害薬の開発についての研究は広く展開している。

動物実験は医薬品、食品などの開発に重要な研究手法であった。多くの研究では正常動物及び糖尿病モデル動物を用いて抗糖尿病効果を評価した (Salahuddin et al., 2010; Oliveira et al., 2008; Singh et al., 2007)。そして、SD 系ラットは糖尿病モデルラットによく使用されていた (Zheng et al., 2011; Xing et al., 2011; Wang et al., 2010)。

第2章では *in vitro* 実験でミヤマタタビ根抽出物がマルターゼ活性及びスクラーゼ活性を阻害し、血糖上昇抑制作用を有することが認められた。しかし、実験動物あるいはヒトによるミヤマタタビ根抽出物の血糖上昇抑制作用についての研究が行われていない。

そこで、本章の目的では正常ラットに対するミヤマタタビ根抽出物の血糖上昇抑制作用のメカニズムを明らかにし、その毒性を解明することであった。

本章では第2章の *in vitro* 試験をさらに進め、*in vivo* 試験を行った。まずは正常ラットによるマルトース負荷試験、スクロース負荷試験、グルコース負荷試験を行った。また、急性経口毒性

試験も行った。

3.2 材料及び方法

3.2.1 実験動物の取り扱い

本実験に使用した動物は5週齢SD系雄成熟白色ラット(日本エスエルシー,日本)であった。5週齢のSD系雄ラットの体重は165-185gであった。

実験期間を通じて室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 8\%$ 、12時間明暗周期(7:00-19:00 明期)照明下で筑波大学動物資源センターに飼育し、固形飼料(MF.オリエンタル酵母工業)及び水(水道水)を自由摂取とした。飼育ケージは2週間1回で新しいケージと交換した。ラットを1週間予備飼育した後実験に使用した。ラットの体重は160-190gであった、合計30匹のラットを使用した。

本実験の計画書は「筑波大学動物実験取扱規程」に基づき、動物実験委員会の承認を受けたものであった。

図 3-1 は筑波大学動物資源センターのラット飼育室の写真であった。

3.2.2 正常ラットに対するマルトース負荷試験

抽出物 2 の血糖上昇抑制作用を調べるために、正常ラットを用いて、マルトース負荷試験を行った。実験方法は文献を参考にした(Mai et al.,2007)。具体的な実験方法は以下のとおり

であった。

13週齢のSD系ラットを1週間予備飼育した後、体重が均等となるように三群に分けた。群分けは以下の通りであった。

(1)対照群 (6匹) : 蒸留水+マルトース (2 g/kg)

(2)投与群 (6匹) : 抽出物(300 mg/kg) +マルトース (2 g/kg)

(3)陽性対照群 (6匹) : アカルボース(10 mg/kg) +マルトース (2 g/kg)

13週齢のSD系ラットは16時間絶食した後、蒸留水に溶解した抽出物 2(300 mg/kg)を胃ゾンデによって経口投与した。陽性対照群には同じ方法でアカルボース(10 mg/kg)を投与した、対照群には同じ方法で蒸留水を投与した。投与30分後、各群にマルトース(2 g/kg)を胃ゾンデによって経口投与した(10 mL/kg 体重)。マルトースを投与する直前(0分)及びマルトース投与30,60,90,120分後、尾静脈から採血して血糖値を簡易型血糖値測定器(グルテスト Neoa アルファ, 三和化学研究所, 名古屋)を用いて測定した。また、線形台形法によりマルトース負荷後0分から120分までの血糖値曲線下面積(area under the curve: AUC)を算出した。

3.2.3 正常ラットに対するスクロース負荷試験

抽出物 2 の血糖上昇抑制作用を調べるために、正常ラットを用いて、スクロース負荷試験を行った。実験方法は Honma (2010) の方法を参考にした。具体的な実験方法は以下のとお

りであった。

14 週齢の S D 系ラットを体重が均等となるように三群に分けた。群分けは以下の通りであった。

(1)対照群 (6 匹) : 蒸留水+スクロース (2 g/kg)

(2)投与群 (6 匹) : 抽出物(300 mg/kg) +スクロース (2 g/kg)

(3)陽性対照群 (6 匹) : acarbose (10 mg/kg) +スクロース (2 g/kg)

14 週齢の S D 系ラットは 16 時間絶食した後,蒸留水に溶解した抽出物 2(300 mg/kg)を胃ゾンデによって経口投与した。陽性対照群には同じ方法でアカルボース(10 mg/kg) (和光純薬)を投与した,対照群には同じ方法で蒸留水を投与した。投与 30 分後,各群にスクロース (2 g/kg)を胃ゾンデによって経口投与した (10 mL/kg 体重)。スクロースを投与する直前 (0 分) 及びスクロース投与 30,60,90,120 分後,尾静脈から採血して血糖値を簡易型血糖値測定器 (グルテスト Neoa アルファ, 三和化学研究所, 名古屋) を用いて測定した。また,線形台形法によりスクロース負荷後 0 分から 120 分までの血糖値曲線下面積 (area under the curve: AUC) を算出した。

3.2.4 正常ラットに対するグルコース負荷試験

グルコース負荷試験 (OGTT), 別名耐糖能試験は糖代謝機能を調べ,糖尿病の診断方法の一つであった。本研究では抽出物 2 の耐糖能改善機能を調べのため, 正常ラットを用いて, グル

コース負荷試験を行った。実験方法は文献を参考にした (Deng et al., 2012; Orhan et al., 2013)。具体的な実験方法は以下のとおりであった。

15 週齢の S D 系ラットを体重が均等となるように四群に分けた。群分けは以下の通りであった。

(1) 対照群 (6 匹) : 蒸留水 + グルコース (2 g/kg)

(2) 投与群 (6 匹) : 抽出物 (100 mg/kg) + グルコース (2 g/kg)

(3) 投与群 (6 匹) : 抽出物 (200 mg/kg) + グルコース (2 g/kg)

(4) 投与群 (6 匹) : 抽出物 (400 mg/kg) + グルコース (2 g/kg)

15 週齢の S D 系ラットを対照群と抽出物 2 投与群に分け、各群 6 匹のラットを 16 時間絶食した後、対照群には蒸留水、ミヤマタタビ根抽出物投与群には抽出物 2 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg を胃ゾンデによって経口投与した。30 分後、各群にグルコース (2 g/kg) を投与した (10 mL/kg 体重)。グルコースを投与する直前 (0 分) 及びグルコースを投与した 30, 60, 90, 120 分後、尾静脈から採血して血糖値を簡易型血糖値測定器 (グルテスト Neoa アルファ, 三和化学研究所, 名古屋) を用いて測定した。また、線形台形法によりグルコース負荷後 0 分から 120 分までの血糖値曲線下面積 (area under the curve: AUC) を算出した。

3.2.5 急性経口毒性試験

ラオスでは数百年前から糖尿病を治すためにミヤマタタ

ビ根を水で煎じて,お茶のように飲んでいる。しかしながら,この植物の毒性についてはまだ検討されていない。そこで,本研究では最初段階からラットを用いてミヤマタタビ根の毒性を検討した。

毒性試験は急性毒性試験と慢性毒性試験二種類がある,本研究ではミヤマタタビ根の急性毒性試験を検討した。急性毒性試験とは動物が化学物質に 1 回あるいは短時間曝露された場合の毒性を評価する実験。実験動物に比較的に大量の化学物質の投与によって,毒性症状の種類,程度,持続時間や死亡の有無などを観察し,致死量などを算出する。

現在, OECD (経済協力開発機構) で定められている急性経口毒性試験は, OECD TG420(固定用量法), OECD TG423(毒性等級法)及び OECD TG425(up-and-down 法)など 3 つの方法がある (Organization for Economic Co-operation and Development,2001)。

本実験において急性経口毒性試験方法は 10 週齢の正常ラットを用いて固定用量法 (OECD TG420) を参考にした。すなわち, 10 週齢の正常ラット(6 匹)を 16 時間絶食した後, 抽出物 1 (5 g/kg 体重) または抽出物 2 (5 g/kg 体重) を 1 回投与し(10 mL/kg 体重), 投与後 2 週間の死亡数, 一般状態, 体重, 解剖検査より毒性を解明する。そして,1 日 1 回で以下の症状を観察する: 1,外観および立毛,脱毛などの被毛状態。2,行動,発声,睡眠などの活動状況。3,振戦,痙攣などの神経反応。4,呼吸数の

異常。5,体,四肢などの状態。6,音に対する驚き反応。

図 3-2 は毒性分類標準である。

3.2.6 統計処理

すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) 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 Duncan's multiple range test (DMRT)にて多重比較検定を行った>(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)。

3.3 結果

3.3.1 正常ラットに対するマルトース負荷試験

13週齢の正常ラットにおいてマルトース負荷した場合,抽出物 2投与群(300 mg/kg)および対照群の血糖上昇抑制作用を図 3-2に示した。図3-2に示すように,正常ラットにマルトースを投与した30分後,コントロール,抽出物 2投与群(300 mg/kg),アカルボース投与群(10 mg/kg)の血糖値はそれぞれ116±5 mg/dL, 104±1 mg/dL, 105±2 mg/dLであった,コントロールと比較して抽出物 2投与群及びアカルボース投与群の血糖値は統計学的に有意な低下が見られた (p<0.05)。さらに,正常ラットにマルトースを投与した60分後,コントロール,抽出物 2投与群(300 mg/kg),アカルボース投与群(10 mg/kg)の血糖値はそれぞれ144±5 mg/dL, 106±1 mg/dL, 116±3 mg/dLであった,コントロールと比較して抽出物 2投与群 (p<0.01) 及びアカルボ

ース投与群 ($p<0.05$) の血糖値は統計学的に有意な低下が見られた。

図3-3は抽出物 2がマルトース投与後の正常ラットの血糖値曲線下面積 (AUC) に及ぼす影響を示した。図3-3に示すように、コントロール,抽出物 2投与群(300 mg/kg),アカルボース投与群(10 mg/kg)においてマルトース負荷後0分から120分までの血糖値曲線下面積 (AUC) はそれぞれ 14173 ± 476 mg.min/dL, 12748 ± 150 mg.min/dL, 13106 ± 188 mg.min/dLであった,抽出物 2投与群の血糖値曲線下面積 (AUC) は対照群に比較して約10%統計学的に有意な減少が認められた ($p<0.05$)。

以上の結果より,抽出物 2はマルターゼ活性を阻害し,マルトースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖を改善できることが認められた。この結果は第2章のマルターゼ阻害活性試験の結果と一致であった。

3.3.2 正常ラットに対するスクロース負荷試験

14週齢の正常ラットにおいてスクロース負荷した場合,抽出物 2(300 mg/kg)投与群および対照群の血糖上昇抑制作用を図3-4に示した。図3-4に示すように、正常ラットにスクロースを投与した30分後,コントロール,抽出物 2投与群(300 mg/kg),アカルボース投与群(10 mg/kg)の血糖値はそれぞれ 152 ± 1 mg/dL, 124 ± 7 mg/dL, 119 ± 2 mg/dLであった, コントロールと比較し

て抽出物 2投与群 ($p<0.05$) 及びアカルボース投与群 ($p<0.01$) の血糖値は統計学的に有意な低下が見られた。さらに,正常ラットにスクロースを投与した60分後,コントロール,抽出物 2投与群(300 mg/kg),アカルボース投与群(10 mg/kg)の血糖値はそれぞれ 138 ± 3 mg/dL, 121 ± 5 mg/dL, 119 ± 2 mg/dLであった,コントロールと比較して抽出物 2投与群(300 mg/kg)の血糖値は低下傾向が見られたが,統計学的に有意差が認められない。アカルボース投与群(10 mg/kg)の血糖値は統計学的に有意な低下が見られた ($p<0.01$)。

図3-5は抽出物 2がスクロース投与後の正常ラットの血糖値曲線下面積 (AUC) に及ぼす影響を示した。図3-5に示すように,コントロール,抽出物 2投与群(300 mg/kg),アカルボース投与群(10 mg/kg)においてスクロース負荷後0分から120分までの血糖値曲線下面積 (AUC) はそれぞれ 16148 ± 84 mg.min/dL, 14538 ± 565 mg.min/dL, 13915 ± 301 mg.min/dLであった,抽出物 2投与群の血糖値曲線下面積 (AUC) は対照群比較して約10%減少が示したが,統計学的に有意差が認められない。アカルボース投与群(10 mg/kg)のAUCは対照群比較して統計学的に有意な減少が見られた ($p<0.01$)。

以上の結果より,抽出物 2 はスクラーゼ活性を阻害し,スクロースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖を改善できることが認められた。この結果は第2章のスクラーゼ阻害活性試

験の結果と一致であった。

3.3.3 正常ラットに対するグルコース負荷試験

15週齢の正常ラットにおいてグルコース負荷した場合,抽出物 2投与群および対照群の血糖降下作用を図3-6に示した。図3-6に示すように,正常ラットにグルコースを投与した30分後,コントロールと比較して抽出物 2投与群の血糖値は統計学的に有意な低下が見られた ($p<0.05$)。さらに,正常ラットにグルコースを投与した60分,90分後,コントロールの血糖値はそれぞれ 133 ± 5 mg/dL, 129 ± 3 mg/dLであった,抽出物2投与群(400 mg/kg)の血糖値はそれぞれ 113 ± 1 mg/dL, 105 ± 1 mg/dLであった,コントロールと比較して抽出物 2投与群(400 mg/kg)の血糖値は統計学的に有意な低下が見られた ($p<0.05$)。

図3-7は抽出物 2がグルコース投与後の正常ラットの血糖値曲線下面積 (AUC) に及ぼす影響を示した。図3-7に示すように, コントロール,抽出物 2投与群(100 mg/kg),抽出物 2投与群(200 mg/kg),抽出物 2投与群(400 mg/kg)においてグルコース負荷後0分から120分までの血糖値曲線下面積 (AUC) はそれぞれ 14958 ± 270 mg.min/dL, 14320 ± 290 mg.min/dL, 13959 ± 155 mg.min/dL, 13194 ± 115 mg.min/dLであった,投与群(200 mg/kg)の血糖値曲線下面積 (0分から120分まで) は対照群と比較して約6.6%統計学的に有意に減少した ($p<0.05$)。投与群(400 mg/kg)の血糖値曲線下面積 (0分から120分まで) は対照群と比較して

約12%統計学的に有意に減少した ($p<0.01$)。そして,抽出物 2 投与群のAUCは用量依存的に減少した。

以上の結果より,抽出物 2は小腸でのグルコースの吸収を阻害し,血糖値の上昇を統計学的に有意に抑え,耐糖能改善機能を有することが示唆された。

3.3.4 急性経口毒性試験

急性経口毒性試験の結果より,10週齢の正常ラットの実験群(各群3匹)に抽出物1または抽出物2 5 g/kgの用量を投与しても観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった,半数致死量(LD₅₀)は5 g/kg以上と考えられた,人間(60 kg)に換算すると致死量は300 g以上であった。それによって,抽出物1及び抽出物2の急性毒性がないことが分かった。図3-2は毒性分類標準であった。

3.4 考察

第2章では α -グルコシダーゼについての *in vitro* 実験を行った。その結果,ミヤマタタビ根各抽出物は強い α -グルコシダーゼ阻害活性を持つことが確認された。その作用メカニズムが二糖類水解酵素阻害作用であることが明らかにした。

本章では動物実験を行い,ミヤマタタビ根抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性をさらに検討し,その血糖上昇抑制作用を評価した。第2章より,ミヤマタタビ根抽出物 8 及び抽出物

11 が強い α -グルコシダーゼ阻害活性を持っていた。しかし、その収率が非常に低い、現有の原料で動物実験の必要量が足りないから、動物実験レベルの検討が行わなかった。今後は検討すべきであった。

本章では正常ラットによる急性経口毒性試験だけを行った、ラットに長期投与した場合、抽出物 1 及び抽出物 2 の毒性についての研究はまだ行われていない、そのため、慢性経口毒性試験が必要であった。

多くの植物由来の抽出物はデンプン負荷試験、マルトース負荷試験、スクロース負荷試験を行うところ、統計学的に有意な血糖上昇抑制活性を示唆した。しかし、グルコース負荷試験を行うところ血糖上昇抑制活性を示唆しなかった (Kasabria et al., 2011; Honma et al., 2010)。本研究に使う抽出物 2 はグルコース負荷試験を行うところ血糖上昇抑制作用を示唆し、正常ラットのグルコース耐糖能を改善できた。

グルコース負荷試験 (OGTT) 糖尿病の診断に用いられている、膵臓 β 細胞機能の評価にも使用されている (Rijkkelijkhuizen et al., 2010)。本研究に使う抽出物 2 はグルコース負荷試験を行うところ血糖値は用量依存的に減少させた。 α -グルコシダーゼ阻害薬は直接インスリン分泌を促進して血糖値を下げる作用はないと報告されている (Zhang et al., 2012)。これに従って、抽出物 2 は膵臓 β 細胞機能を改善し、正常ラットのグルコース耐糖能を改善できた、今後、膵臓 β 細胞機能の改

善についてさらに検討する必要がある。

本実験において、抽出物 1 及び抽出物 2 には α -グルコシダーゼ活性に影響を与えるという新しい知見を得ることができた。今後、ミヤマタタビが糖尿病の予防、治療に少しでも貢献できることを期待する。

3.5 まとめ

本章では *in vivo* 試験で抽出物 2 の糖代謝に及ぼす影響をさらに検討した。

正常ラットに対するマルトース負荷試験及びスクロース負荷試験の結果より、抽出物 2 はマルターゼ及びスクラーゼ活性を阻害し、マルトース、スクロースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され、食後高血糖を改善できることが認められた。この結果は第 2 章のマルターゼ阻害活性試験及びスクラーゼ阻害活性試験の結果と一致であった。

正常ラットに対するグルコース負荷試験の結果より、抽出物 2 は小腸でのグルコースの吸収を阻害し、血糖値の上昇を統計学的に有意に抑え、膵臓 β 細胞機能を改善できることが示唆された。

急性経口毒性試験の結果より、抽出物 1 及び抽出物 2 の急性毒性がないことが分かった。

以上のことから、ミヤマタタビ根抽出物は安全性及び有効

性に優れ,抗糖尿病素材として有望であることが示唆された。
これまでミヤマタタビ根は糖尿病治療に用いられていると
いう民間療法の科学的な根拠が求められた。

表 3-1 毒性分類標準 (出典:Hodge and Sterner, 1949)

毒性の程度	半数致死量 (LD ₅₀)
極めて大	1 mg/kg
大	1-50 mg/kg
中程度	50-500 mg/kg
小	0.5-5 g/kg
実質上無毒	5-15 g/kg
無毒	15 g/kg



図 3-1 筑波大学動物資源センターのラット飼育室の写真

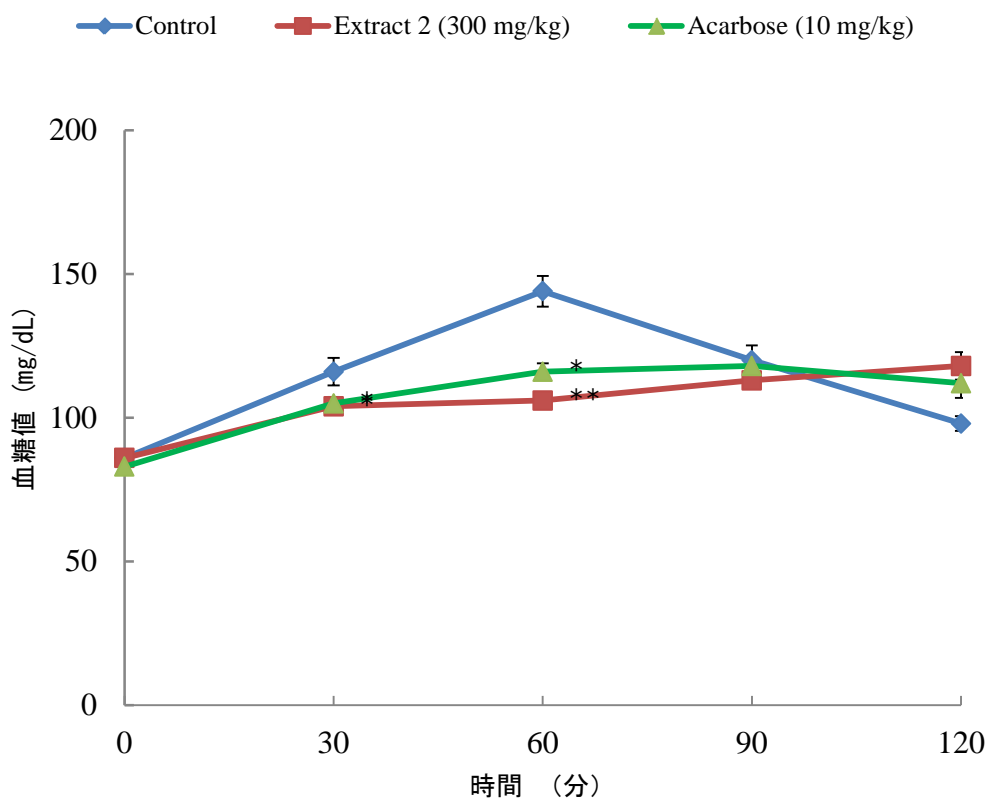


図 3-2 正常ラットにおけるマルトース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, 対照群に対する Duncan の多重比較検定)

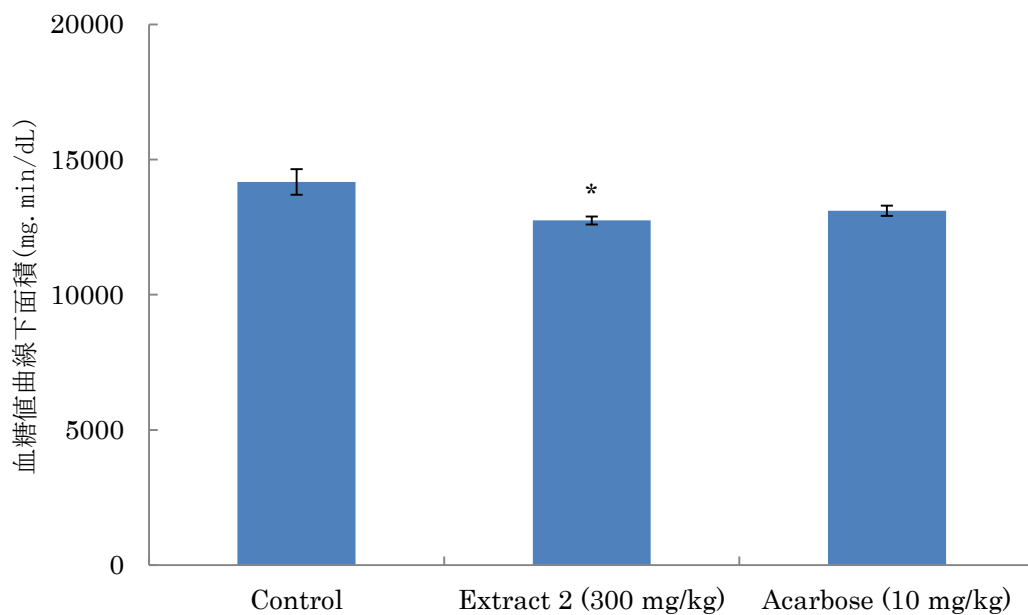


図 3-3 正常ラットにおけるマルトース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用： AUC。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, 対照群に対する Duncan の多重比較検定)

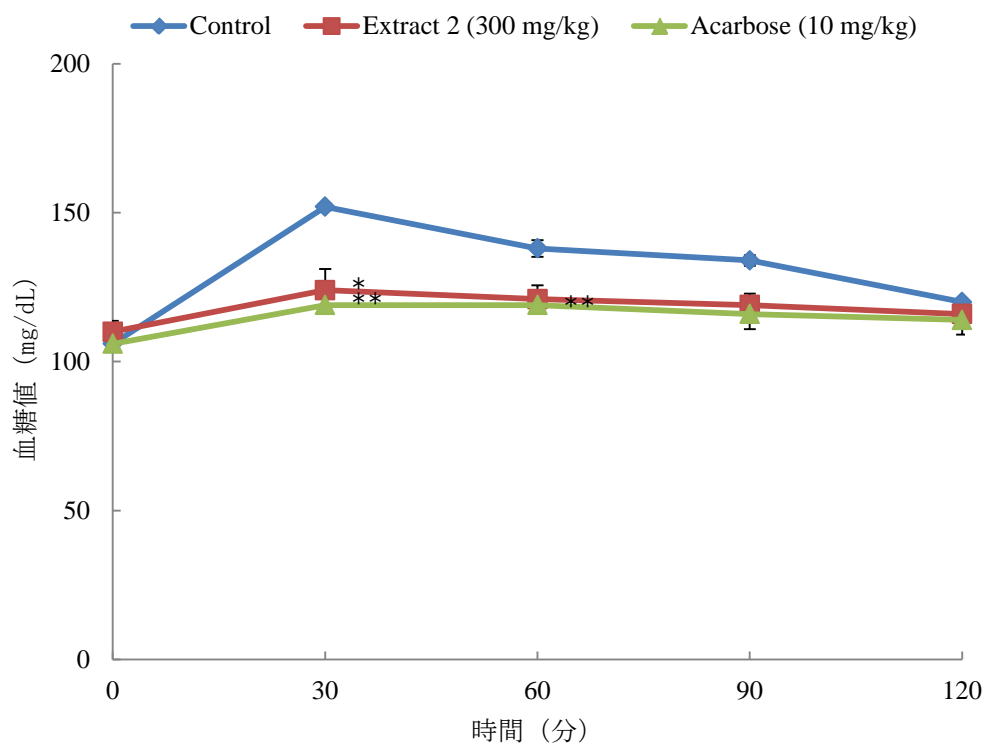


図 3-4 正常ラットにおけるスクロース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, 対照群に対する Duncan の多重比較検定)

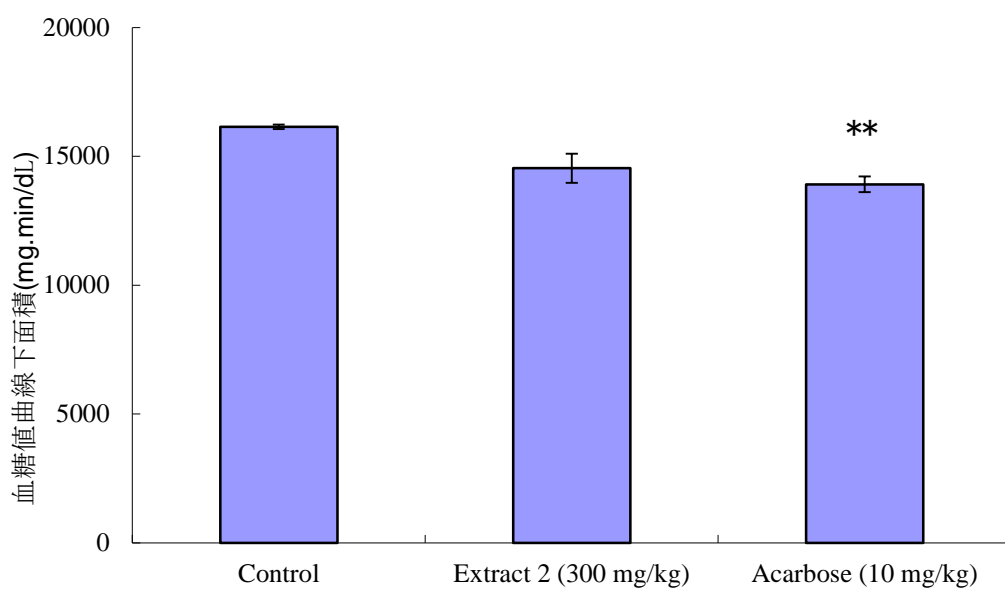


図 3-5 正常ラットにおけるスクロース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用： AUC。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, 対照群に対する Duncan の多重比較検定)

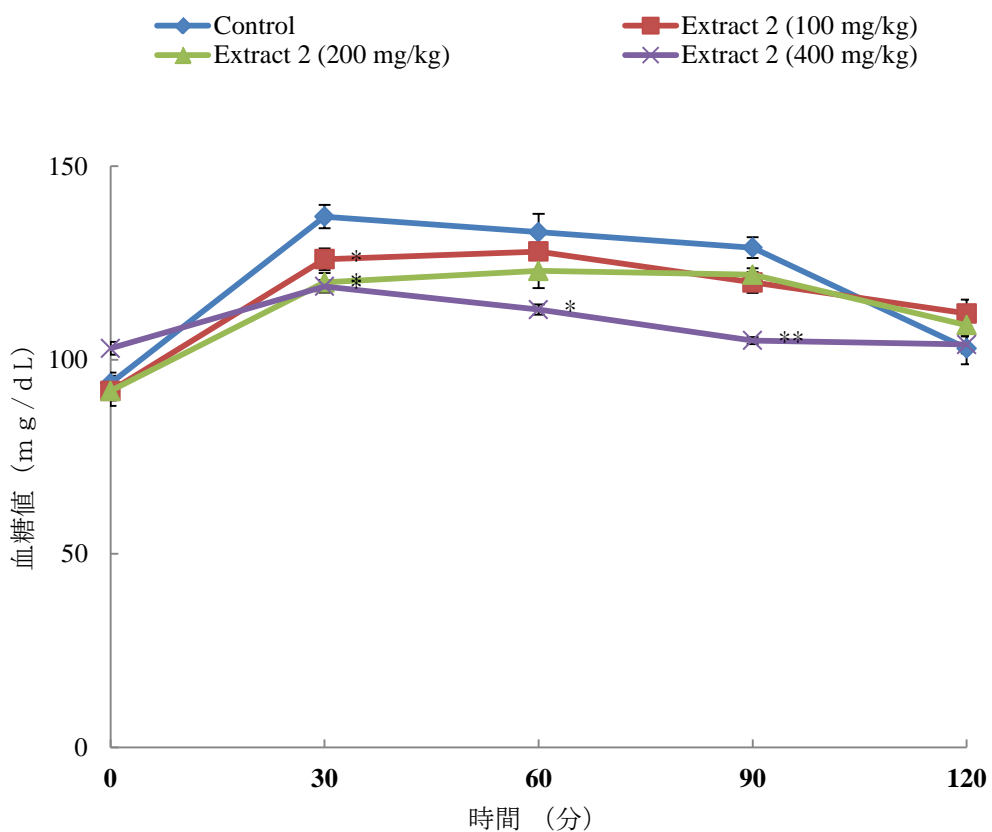


図 3-6 正常ラットにおけるグルコース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, 対照群に対する Duncan の多重比較検定)

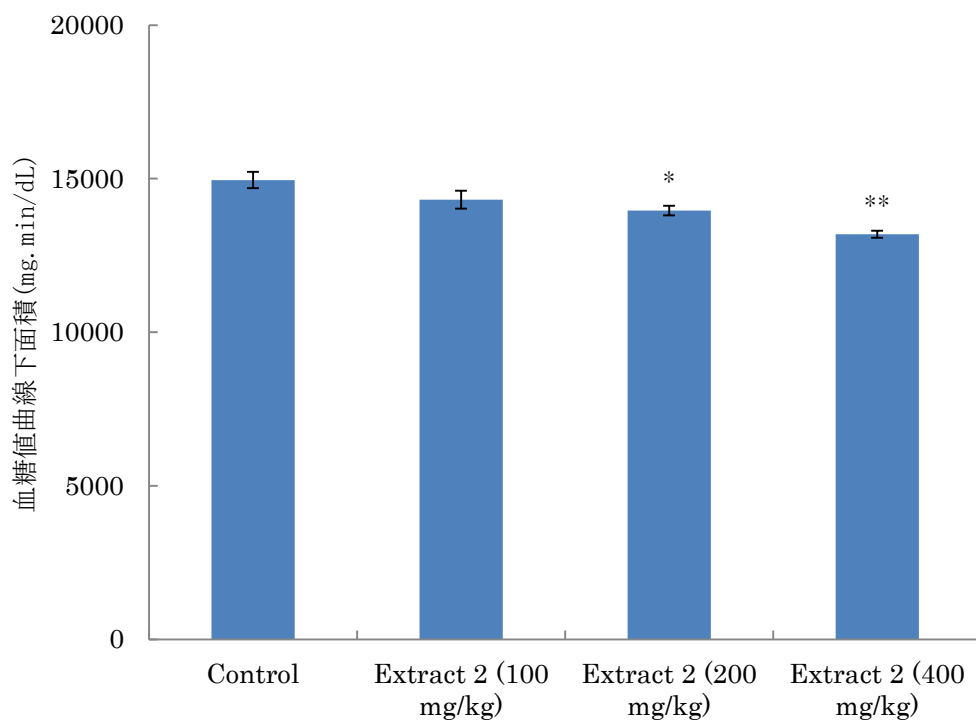


図 3-7 正常ラットにおけるグルコース負荷後の血糖値上昇に対する抽出物 2 の作用：AUC。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, 対照群に対する Duncan の多重比較検定)

第4章 糖尿病ラットにおけるミヤマタタビ根抽出物の抗糖尿病効果

4.1 はじめに

糖尿病は慢性高血糖を主徴とし,脂質代謝異常,糖代謝異常などを伴う慢性内分泌疾患である(Kuzuya et al., 2002)。糖尿病の高血糖は体の肝,腎などの器官,組織にダメージを与え,様々な合併症をを引き起こした。例えば腎症,神経障害,大血管障害,網膜症,足病変などがある。従って,内臓器官,組織への評価は抗糖尿病効果評価の必要な手段であると考えられている。

第3章で行ったグルコース負荷試験の結果より,抽出物2は膵臓 β 細胞機能を改善できることが示唆された。これにより,抽出物2は食後高血糖を改善できるだけでなく,インスリン分泌能あるいはインスリンの抵抗性を改善し,抗糖尿病効果を有する可能性が示唆された。

そこで,本章の目的ではミヤマタタビ根の抗糖尿病効果をさらに検討し,そのメカニズムを明らかにすることであった。

本章では,まず,STZによる誘発型糖尿病モデルラットを製作した。また,抽出物2を糖尿病ラットに4週間連続経口投与し,糖尿病と関連する糖代謝(血糖,インスリン),脂質代謝(TG,TCHO,HDL-C),肝機能(GOT/AST,GPT/ALT,TP),腎機能(UA,BUN,Na,K,Cl)などに及ぼす影響について検討した。

4.2 材料及び方法

4.2.1 実験動物の取り扱い

実験動物の取扱いは 3.2.1 と同じであった。合計 50 匹のラットを使用した。

4.2.2 糖尿病ラットの作製

糖尿病モデルラットはラットの膵臓の切除, 化学方法などの手段によって作製された報告がある。そのうち, 化学方法は絶食したラットにストレプトゾトシン(STZ), アロキササンなどを注射するによって糖尿病を誘発した方法がある(Eliza et al., 2009; Kumar et al., 2012)。

STZ 糖尿病ラットは膵臓の β 細胞を選択的に損傷することにより高血糖を示すインスリン欠乏性の実験的糖尿病モデルラットであった(Wakabayashi et al., 1995; Ishihara et al., 2007)。

本実験に使用した糖尿病モデルラットの作製方法は文献を参考にした(Tsuchihashi et al., 1985)。ストレプトゾトシン(STZ) (Enzo Life Sciences) に少量の生理食塩液を加えて混合し, 0.05 M クエン酸溶液 (pH4.5) をストレプトゾトシン 100 mg 当たり 50 μ l 加えて溶解させ, 最終的に 10 mg/mL の溶液を作製した。この溶液を調製後, 5 分以内に 12 時間絶食させた 6 週齢の S D 系雄ラット(SLC)の腹腔内に 50 mg/kg の用量で 24 G 注射針を用いて投与し, 糖尿病を誘発した。3 日後, 空腹時血糖値が 200 mg/dL 以上を示したラットが糖尿病モデルラット

として本実験に使用した。

1週間毎に血糖と体重の測定を行い,糖尿病状態を確認した。血糖値は簡易型血糖値測定器(グルテスト Neoa アルファ, 三和化学研究所, 名古屋)を用いて測定した。

4.2.3 実験動物の群分け

4.2.2 に作製した糖尿病ラットを空腹時血糖値が均等となるように四群に分けた,正常ラット(6匹)は対照として使用した,群分けは以下の通りであった。

- (1) 正常ラット対照群(6匹): 0.5% CMC-Na 水溶液
- (2) 糖尿病ラット対照群(6匹): 0.5% CMC-Na 水溶液
- (3) 糖尿病ラット投与群(6匹): 抽出物 2(200 mg/kg)
- (4) 糖尿病ラット投与群(6匹): 抽出物 2(400 mg/kg)
- (5) 糖尿病ラット投与群(6匹): Glibenclamide (1 mg/kg)

抽出物2及びGlibenclamideは投与当日に0.5% CMC-Na溶液に懸濁させた。各群には1日1回で4週間連続経口投与した。

4.2.4 血清の調製

4週間飼育した後,ラットが14時間絶食させた。その後,イソフルラン(和光,日本)による吸入麻酔下でヘパリンナトリウム添加の注射筒を用いて心臓から採血を行った,採取した血液は30分間室温に静置した後,4°C,3000 rpm,15分間遠心分離して得られた上清を検体とし,血液生化学パラメータの測定に提供

した。

4.2.5 糖代謝に関連する指標の測定

血糖値及びインスリンは糖尿病の治療において非常に重要な指標である。本研究では血糖値及びインスリン濃度を測定し、抽出物 2 の糖代謝に及ぼす影響を検討した。

血糖値の測定は動物用生化学自動分析装置(富士ドライケム 7000V 筑波大学生命科学動物資源センター)を用いて行った。

インスリン濃度の測定はラットインスリン測定キット(Mercodia 社, スウェーデン)を用いて ELISA 法により行った。即ち, Calibrator 標準液及び検体を 96 穴プレートに 10 μ l ずつ分注し, その後,各穴に Enzyme conjugate 1 \times 溶液を 100 μ l ずつ加えた後,クロプレート振とう器を用いて 800 rpm,2 時間,室温(18-25 $^{\circ}$ C)で攪拌した。反応終了後,反応液を捨て 350 μ l 洗浄液で各穴を 6 回洗浄した。その後,各穴に Substrate TMB 溶液を 200 μ l ずつ分注して 15 分間室温(18-25 $^{\circ}$ C)で静置した。次に,各穴に反応停止液を 50 μ l ずつ分注後 5 秒間攪拌し,発色反応を停止した。マイクロプレート用分光光度計(BIO-RAD Model 550, 日本)で 450 nm における吸光度を測定した。Calibrator 標準液を用いて作成した検量線よりインスリン濃度(μ g/l)を求めた。

4.2.6 脂質代謝に関連する指標の測定

2 型糖尿病の脂質代謝の障害は HDL-C の減少及び TG,TCHO

の増加であった(Wang et al., 2013)。脂質代謝の異常は冠状動脈性心臓病の危険因子である(Sakatani et al.,2005)。本研究では動物用生化学自動分析装置(富士ドライケム 7000V 筑波大学生命科学動物資源センター)を用い脂質代謝に関連するTG,TC及びHDL-Cを測定し,抽出物2の脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

4.2.7 肝機能に関連する指標の測定

GOT/AST,GPT/ALT は主に肝臓に含まれている酵素である,その活性は肝機能障害評価の指標である(Hultcrantz et al.,1986)。本研究では動物用生化学自動分析装置(富士ドライケム 7000V 筑波大学生命科学動物資源センター)を用い肝機能に関連するGOT/AST,GPT/ALT 及び TP を測定し,抽出物2の肝機能に及ぼす影響を検討した。

4.2.8 腎機能に関連する指標の測定

糖尿病性腎症は糖尿病の3大合併症の一つである。本研究では動物用生化学自動分析装置(富士ドライケム 7000V 筑波大学生命科学動物資源センター)を用い腎機能に関連するUA,BUN 及び電解質 (Na・Cl・K) を測定し,抽出物2の腎機能に及ぼす影響を検討した。

4.2.9 TNF- α の測定

TNF- α はインスリンの働きを悪くし,グルコースの細胞内へ

の取り込みを抑制し糖尿病を誘発する。TNF- α 高値はインスリン抵抗性の原因の一つであった(Hotamisligil et al., 1993)。そこで、本研究では TNF- α 濃度を測定し、抽出物 2 のインスリン抵抗性の改善作用について検討した。

TNF- α 濃度の測定は EIA TNF- α キット (Immunotech 社, フランス) のマニュアルに従って行った。即ち, conjugate 溶液を 96 穴プレートに 100 μ l ずつ分注し, 標準品及び検体を 96 穴プレートに 100 μ l ずつ加えた後, マイクロプレート振とう器を用いて室温 (18~25 $^{\circ}$ C) で 2 時間攪拌した。反応終了後, 反応液を捨て洗浄液で各穴を洗浄した。その後, 各穴に基質溶液を 200 μ l ずつ分注し, マイクロプレート振とう器を用いて室温 (18~25 $^{\circ}$ C) , 暗所で 45 分間攪拌した。最後に, 各穴に反応停止液を 50 μ l ずつ分注し, 発色反応を停止した。マイクロプレート用分光光度計で 405 nm における吸光度を測定した。TNF- α 標準液を用いて作成した検量線より TNF- α 濃度 (pg/ml) を求めた。

4.2.10 統計処理

すべての値は平均値 \pm 標準誤差 (n=6) 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 Duncan's multiple range test (DMRT)にて多重比較検定を行った。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)。

4.3 結果

4.3.1 糖代謝に関連する指標の測定

血糖値及びインスリン濃度の測定結果をそれぞれ図 4-1, 図 4-2 に示した。図 4-1 示すように, 4 週間連続経口投与した後, 正常ラットと比べて糖尿病ラットの血糖値が著しく増加した。抽出物 2 (200 mg/kg), 抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の血糖値は用量依存的な低下傾向を示した。抽出物 2 (200 mg/kg), 抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群は糖尿病ラット対照群と比較して血清中の血糖値が統計学的に有意に低下した ($p < 0.001$)。

インスリン濃度の検量線データから求められた一次回帰式は $y = 0.3707x - 0.0384$ $R^2 = 0.9925$ であった。図 4-2 示すように, 4 週間連続経口投与した後, 正常ラットと比べて糖尿病ラットのインスリン濃度が著しく減少した。抽出物 2 (200 mg/kg), 抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群, Glibenclamide 投与群は糖尿病ラット対照群と比較して血清中のインスリン濃度がほぼ同じであった。

以上の結果より, 抽出物 2 はインスリンの分泌を促進できないにも関わらず, 糖代謝機能を改善できることが明らかになった。

4.3.2 脂質代謝に関連する指標の測定

TG, TCHO, HDL-C は脂質異常症の重要な指標であった。その測定結果をそれぞれ図 4-3, 図 4-4, 図 4-5 に示した。

TGは糖尿病の一つ原因である肥満と強く関連している。図4-3示すように、4週間連続経口投与した後、正常ラットと比べて糖尿病ラットのTGが著しく増加した。抽出物2(200 mg/kg),抽出物2(400 mg/kg)投与群のTGは用量依存的な低下傾向を示した。抽出物2(200 mg/kg),抽出物2(400 mg/kg)投与群は糖尿病ラット対照群と比較して血清中のTGが統計学的に有意に低下した($p<0.001$)。従って、抽出物2は肥満改善効果を有することが分かった。

図4-4示すように、4週間連続経口投与した後、正常ラットと比べて糖尿病ラットのTCHOが著しく増加した。抽出物2(200 mg/kg),抽出物2(400 mg/kg)投与群のTCHOは用量依存的な低下傾向を示した。抽出物2(200 mg/kg),抽出物2(400 mg/kg)投与群は糖尿病ラット対照群と比較して血清中のTCHOが統計学的に有意に低下した($p<0.001$)。従って、抽出物2は肥満改善効果を有することが分かった。

近年,HDL-Cが心血管疾患リスクと逆相関することが明らかになった(Hausenloy and Yellon,2009)。HDL-Cが上昇すると心血管疾患リスクが低下した。図4-5示すように、4週間連続経口投与した後、正常ラットと比べて糖尿病ラットのHDL-Cが著しく減少した。抽出物2(200 mg/kg),抽出物2(400 mg/kg)投与群のHDL-Cは用量依存的な増加傾向を示した。抽出物2(200 mg/kg),抽出物2(400 mg/kg)投与群は糖尿病ラット対照群と比較して血清中のHDL-Cが統計学的に有意に増加した

(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.001$)。従って,抽出物 2 が糖尿病合併症の心血管疾患を改善できることが分かった。

以上の結果より,抽出物 2 は脂質代謝改善作用を有することを示し,糖尿病合併症の予防及び治療に有用であることが示唆された。

4.3.3 肝機能に関連する指標の測定

GOT/AST,GPT/ALT,TP の測定結果をそれぞれ図 4-6,図 4-7,図 4-8 に示した。

図4-6に示すように,4週間連続経口投与した後,正常ラットと比べて糖尿病ラットの GOT/AST が著しく増加した。抽出物 2 (200 mg/kg),抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の GOT/AST は用量依存的な低下傾向を示した。糖尿病ラット対照群に比較して抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の GOT/AST は統計学的に有意な低下が見られた ($p < 0.001$)。

図 4-7 に示すように,4週間連続経口投与した後,正常ラットと比べて糖尿病ラットの GPT/ALT が著しく増加した。抽出物 2 (200 mg/kg),抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の GPT/ALT は用量依存的な低下傾向を示した。糖尿病ラット対照群に比較して抽出物 2 (200 mg/kg),抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の GPT/ALT は統計学的に有意な低下が見られた(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$)。

図 4-8 に示すように,4週間連続経口投与した後,正常ラットと比べて糖尿病ラットの TP が著しく減少した。抽出物 2

(200 mg/kg) ,抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の TP は用量依存的な増加傾向を示した。糖尿病ラット対照群に比較して抽出物 2 (200 mg/kg) ,抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の TP は統計学的に有意な増加が見られた (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$)。

以上の結果より,抽出物 2 は肝臓組織障害の指標となる GOT/AST,GPT/ALT を低下し,肝障害保護作用を示した。従って,抽出物 2 が肝機能を改善できることが明らかになった。

4.3.4 腎機能に関連する指標の測定

UA, BUN 及び電解質 (Na・Cl・K) の測定結果をそれぞれ図 4-9,図 4-10,図 4-11,図 4-12,図 4-13 に示した。

図 4-9 に示すように, 4 週間連続経口投与した後, 正常ラットと比べて糖尿病ラットの UA が著しく増加した。抽出物 2 (200 mg/kg) ,抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の UA は用量依存的な低下傾向を示した。抽出物 2 (200 mg/kg),抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群は糖尿病ラット対照群と比較して血清中の UA が統計学的に有意に低下した (それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$)。尿酸値が高い状態 (高尿酸血症) は痛風の原因である。従って,抽出物 2 は抗痛風作用を有することが示唆された。

図 4-10 に示すように, 4 週間連続経口投与した後, 正常ラットと比べて糖尿病ラットの BUN が著しく増加した。抽出物 2 (200 mg/kg) ,抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の BUN は用量依存的な低下傾向を示した。抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群は糖尿病

ラット対照群と比較して血清中の BUN が統計学的に有意に低下した ($p < 0.01$)。

図 4-11, 図 4-12, 図 4-13 すように, 4 週間連続経口投与した後, 正常ラットと比べて糖尿病ラットの電解質 (Na・Cl・K) が減少した。抽出物 2 (200 mg/kg), 抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群は糖尿病ラット対照群と比較して血清中の電解質 (Na・Cl・K) が増加したが, 統計学的に有意差が認められなかった。

以上の結果より, 抽出物 2 は腎機能を改善できることが明らかになった。糖尿病性腎症予防及び治療に有用であることが示唆された。

4.3.5 TNF- α の測定

TNF- α 濃度の検量線データから求められた一次回帰式は $y = 0.0015x + 0.1648$ $R^2 = 0.9998$ であった。図 4-14 に示すように, 4 週間連続経口投与した後, 正常ラットと比べて糖尿病ラットの TNF- α 濃度が著しく増加した。抽出物 2 (200 mg/kg), 抽出物 2 (400 mg/kg) 投与群の TNF- α 濃度は減少傾向を示した。TNF- α 濃度が高いほどインスリン抵抗性が高いことが報告された (Plomgaard et al., 2007)。従って, 抽出物 2 は TNF- α 濃度を減少させ, インスリン抵抗性を改善できることが分かった。

4.4 考察

第 2 章及び第 3 章で抽出物 2 はマルターゼ及びスクラーゼ活

性を阻害し,マルトース,スクロースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖を改善できることが認められた。本章では糖尿病モデルラットによる抽出物 2 の抗糖尿病効果をさらに検討した。

電解質 (Na・Cl・K) は腎臓機能検査の一つ指標であり,細胞内液と細胞外液のバランスを維持できる。しかし,本研究ではヘパリンナトリウムを用いて心臓から採血を行ったから,ヘパリンナトリウムに含まれるナトリウムが電解質 (Na・Cl・K) の測定結果に影響を及ぼす可能性がある。今後は他の血液凝固阻止剤を使うべきである。

本研究では STZ をラットの腹腔内に注射して糖尿病ラットを誘発した。しかし,注射の部位,ラットの個体差などの原因で誘発した糖尿病ラットの血糖値は 400 mg/dL であった。今後は適当な血糖値を有する糖尿病ラットの作製方法の検討が必要である。

これまでにインスリン抵抗性の改善についての評価指標が多くある,例えば遊離脂肪酸 (FFA) ,TNF- α ,単球走化活性因子 (MCP-1) ,レジスチン,アディポネクチンなどがある,しかし,本研究では TNF- α 濃度の測定によりミヤマタバ根のインスリン抵抗性の改善作用を検討した,今後は他の評価指標についての検討が必要である。

4.5 まとめ

本章では *in vivo* 試験で抽出物 2 の各種糖尿病マーカーに及ぼす影響について研究を行った。

血糖値及びインスリンの測定結果を踏まえ,抽出物 2 が血糖値を減少させ,インスリンを増加させ,糖代謝機能を改善できることが明らかになった。

TG,TC,HDL-C,LDL-C の測定結果を踏まえ,抽出物 2 が TG,TCHO を減少させ,HDL-C を増加させ,肥満改善効果を有することが分かった。

GOT/AST,GPT/ALT,TP の測定結果を踏まえ,抽出物 2 が GOT/AST,GPT/ALT を減少させ,TP を増加させ,肝機能を改善できることが明らかになった。

UA,BUN 及び電解質 (Na・Cl・K) の測定結果を踏まえ,抽出物 2 が UA,BUN 及び電解質 (Na・Cl・K) を減少させ,腎機能を改善できることが明らかになった。さらに,UA の統計学的に有意な減少による,抽出物 2 は抗痛風作用を有することが示唆された。

TNF- α の測定結果を踏まえ,抽出物 2 が TNF- α 濃度を減少させ,インスリン抵抗性を改善できることが分かった。

以上の結果から,抽出物 2 は糖尿病ラットの糖代謝機能,脂質代謝,肝機能,腎機能,インスリン抵抗性を改善し,優れた抗糖尿病効果を有することが明らかになった。食品素材として将来は糖尿病予防及び治療に貢献できることを確認した。

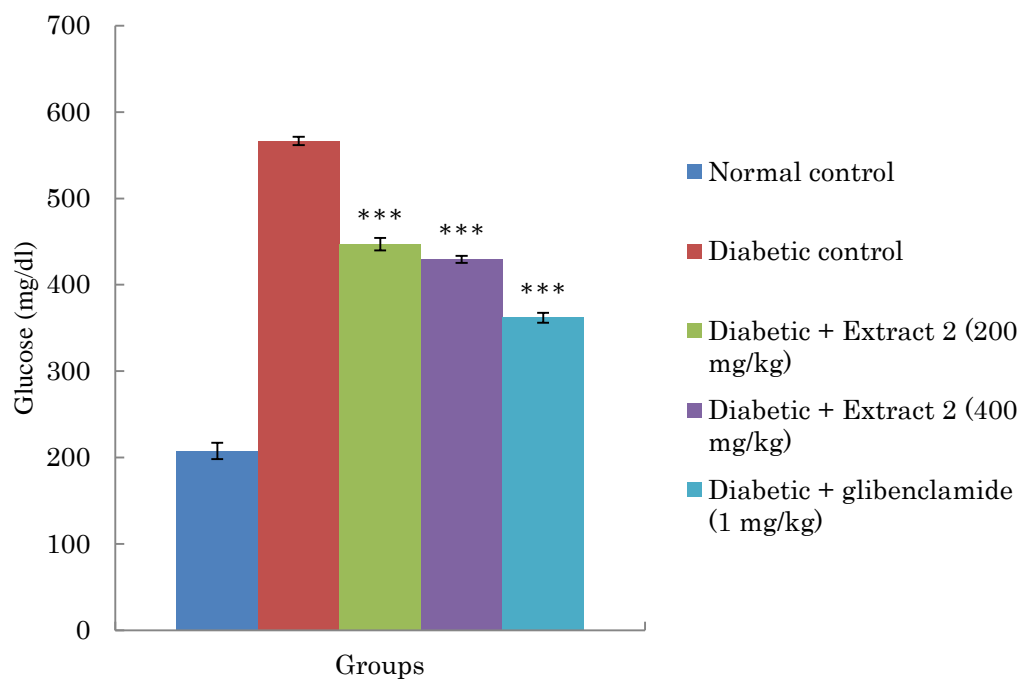


図 4-1 血清中グルコース濃度に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

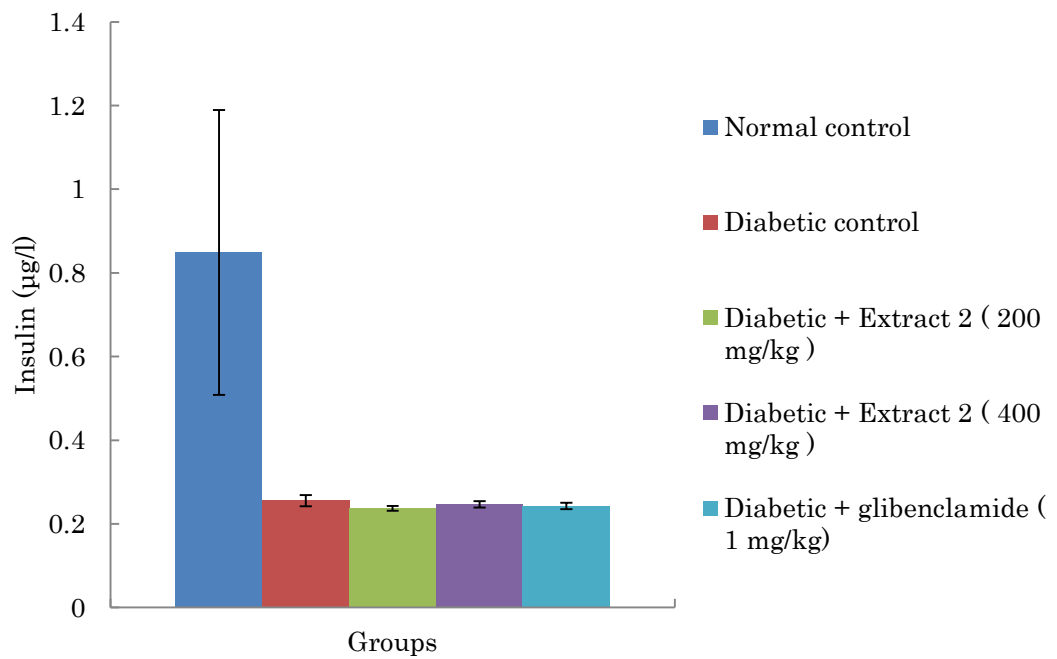


図 4-2 血清中インスリン濃度に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

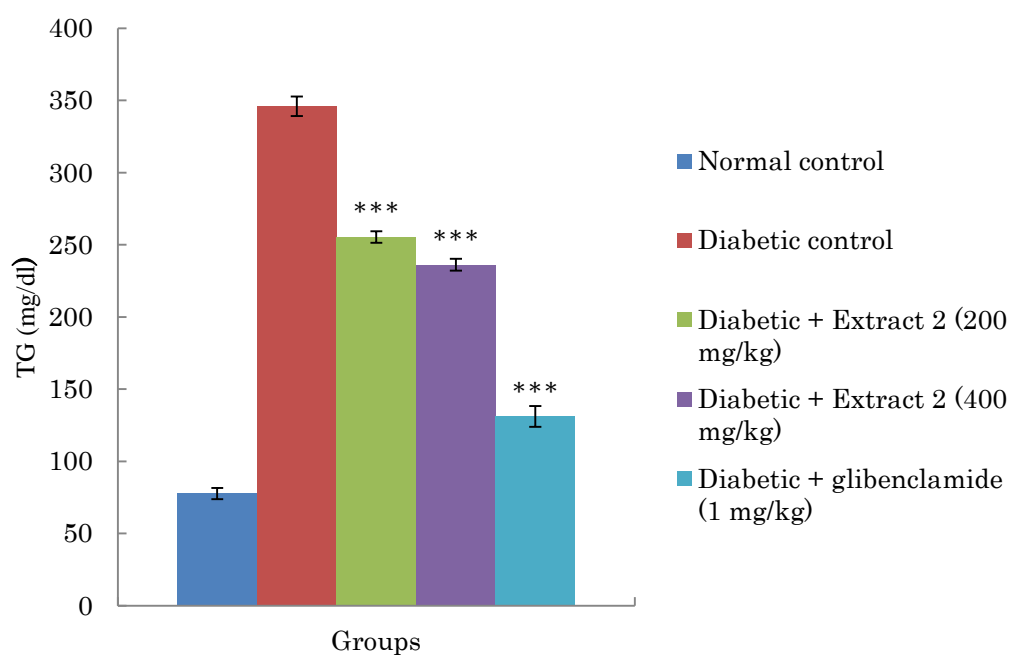


図 4-3 血清中 TG に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

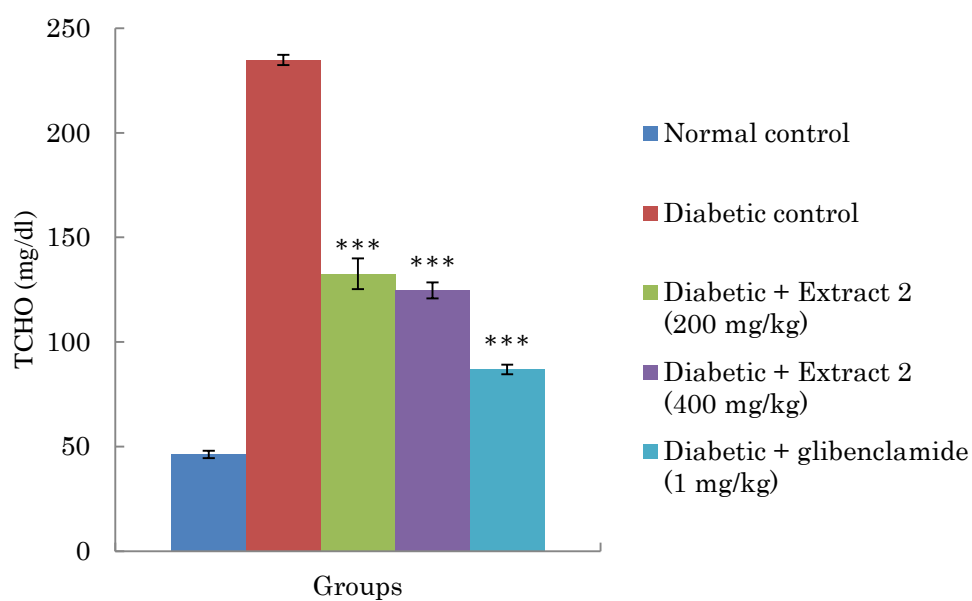


図 4-4 血清中 TCHO に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

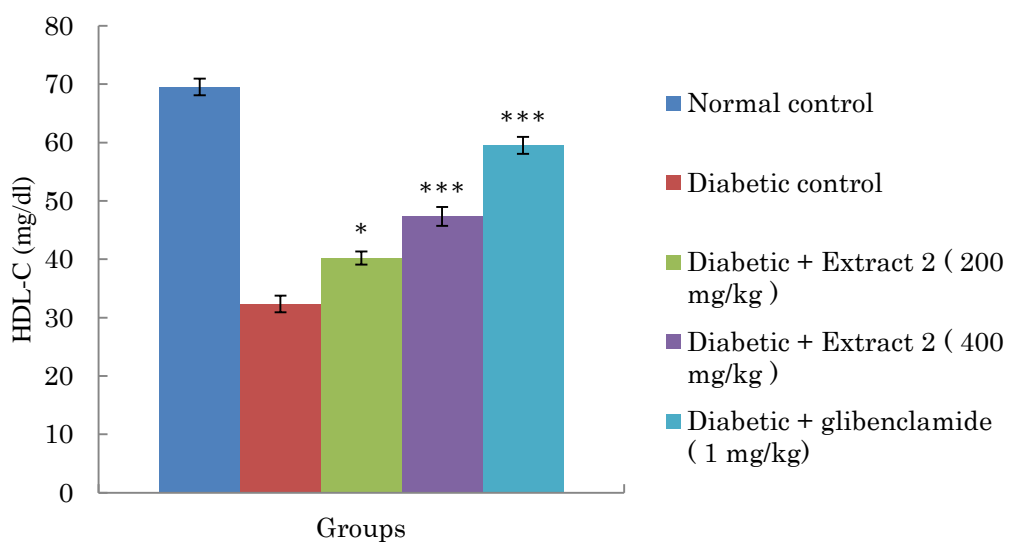


図 4-5 血清中 HDL-C に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

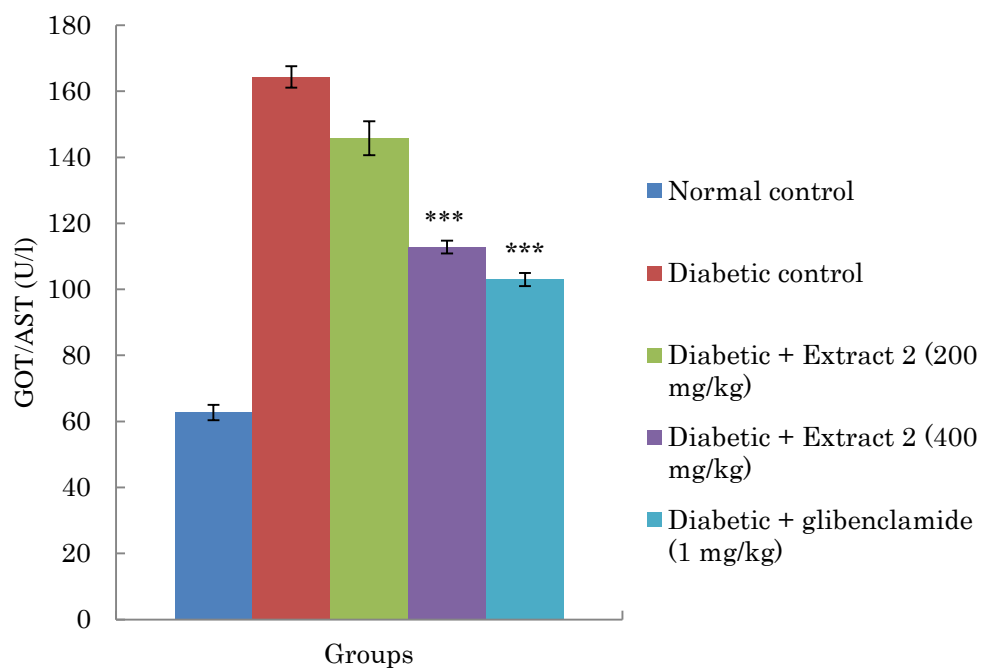


図 4-6 血清中 GOT/AST に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

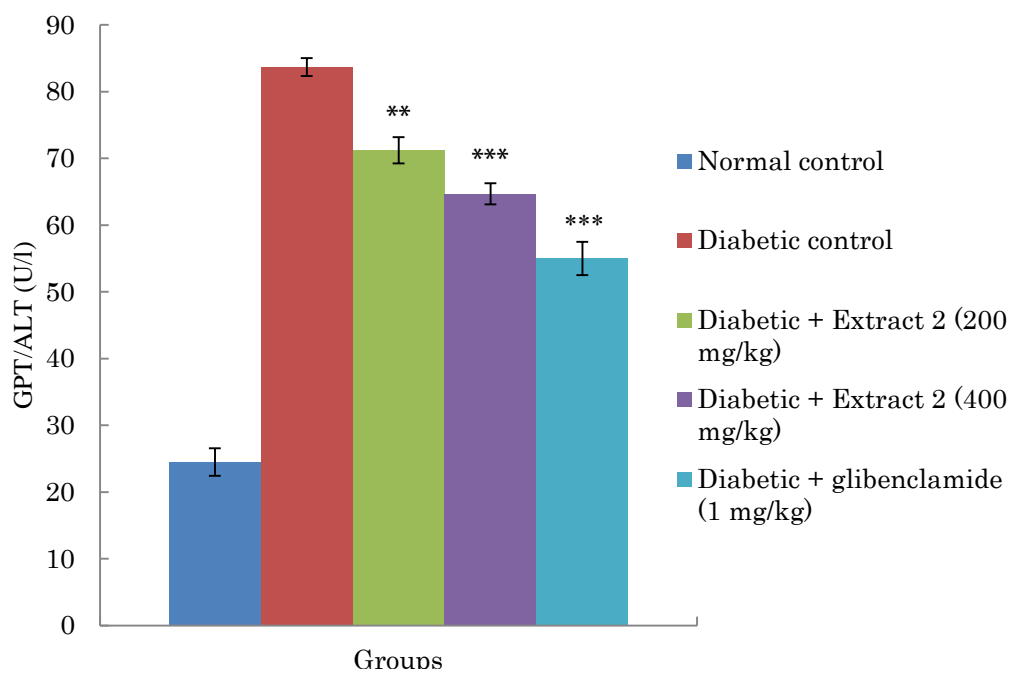


図 4-7 血清中 GPT/ALT に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

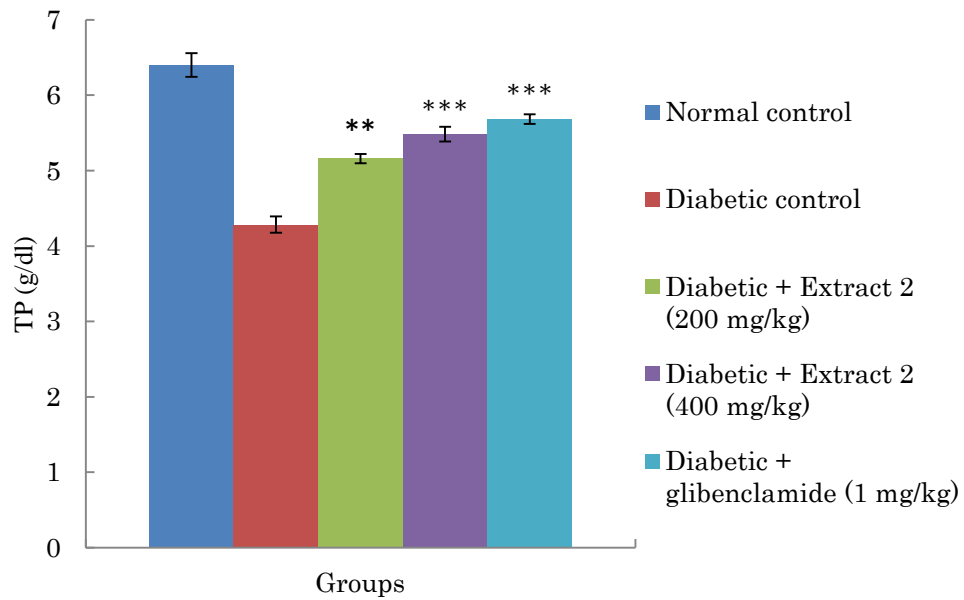


図 4-8 血清中 TP に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

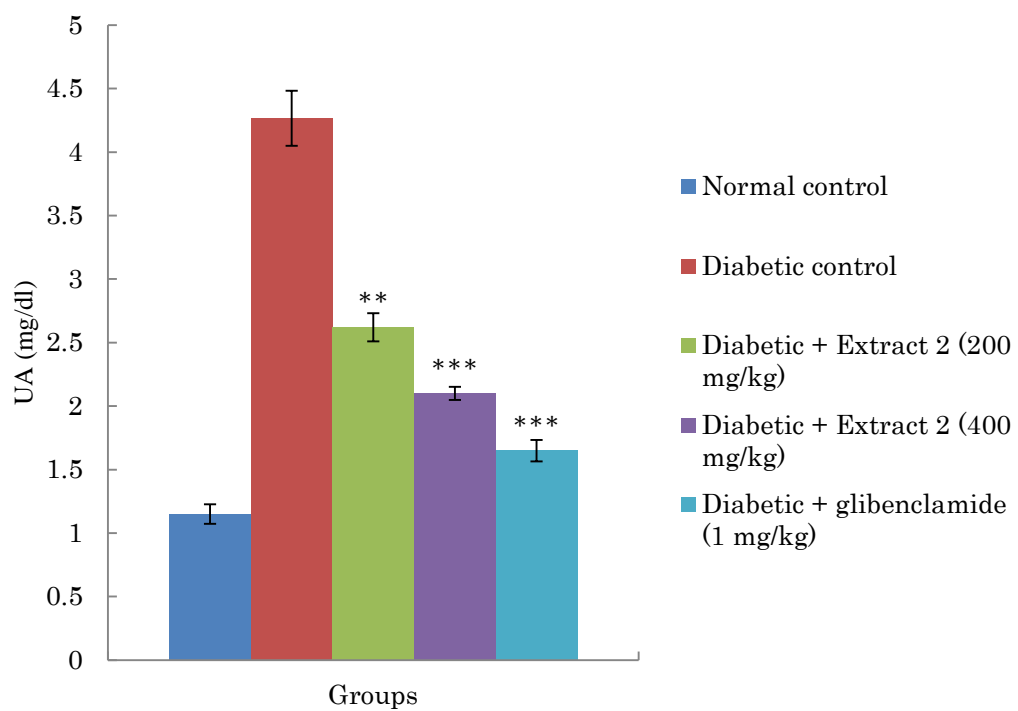


図 4-9 血清中 UA に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

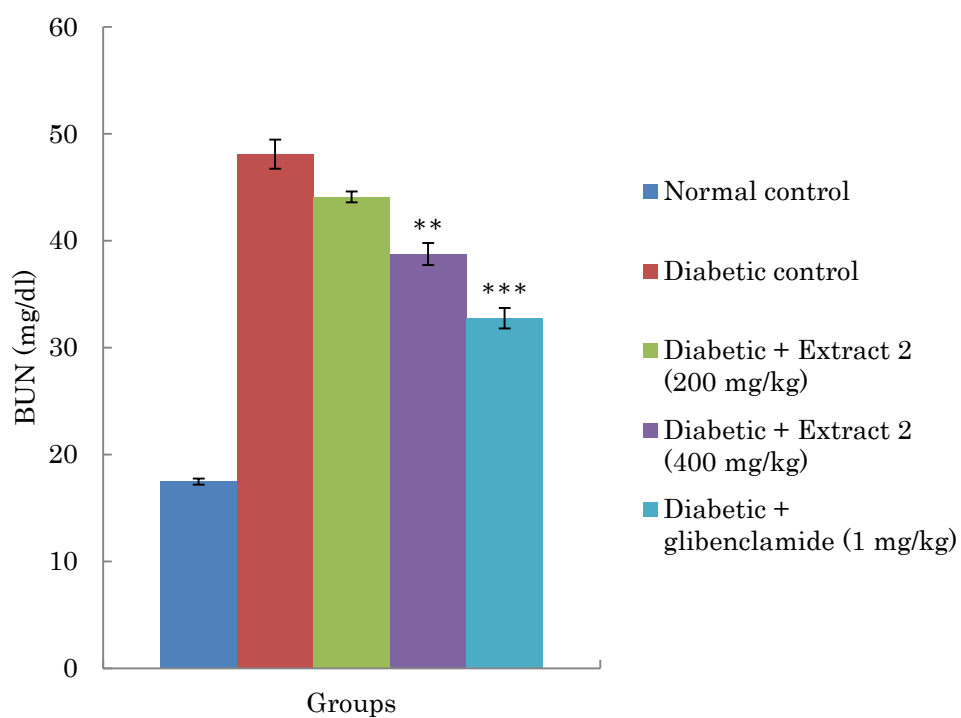


図 4-10 血清中 BUN に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値±標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

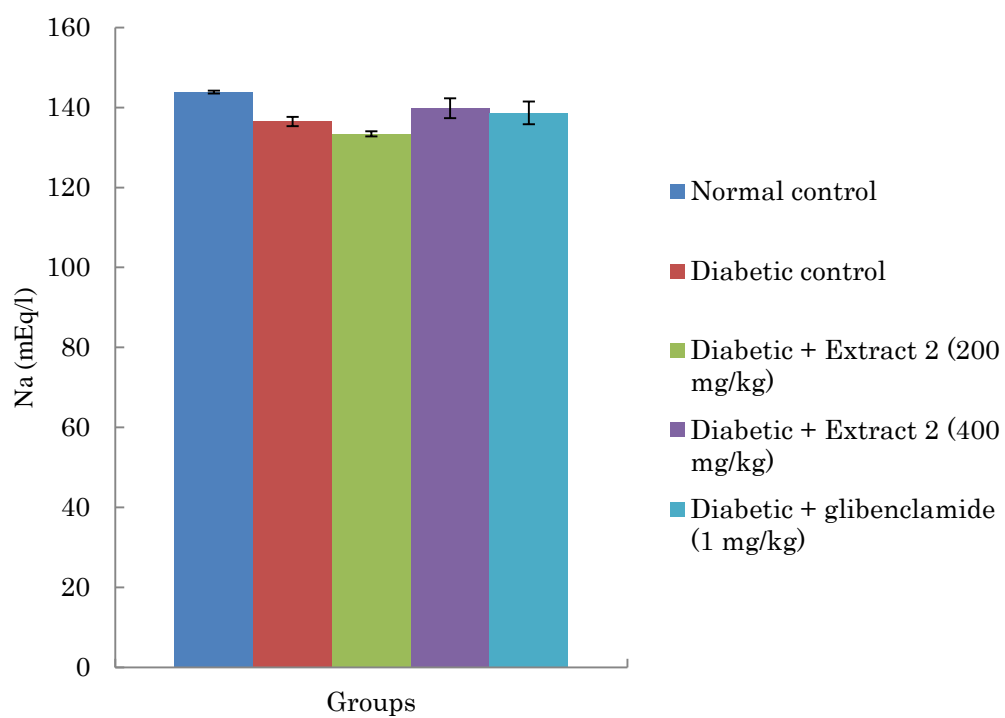


図 4-11 血清中 Na に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

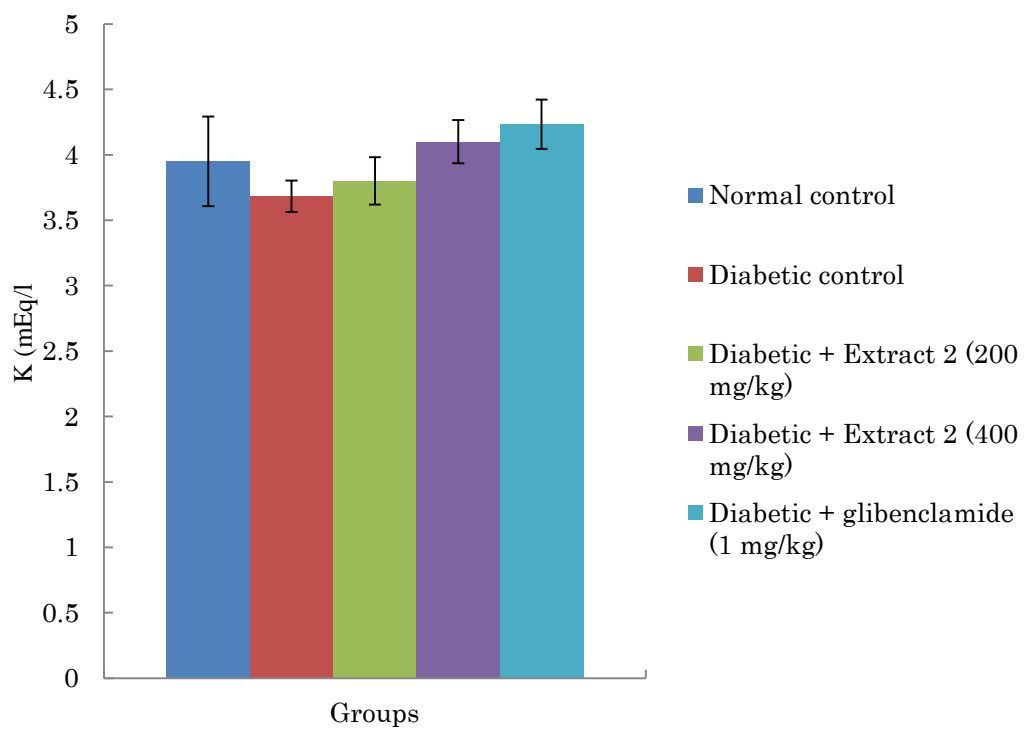


図 4-12 血清中 K に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

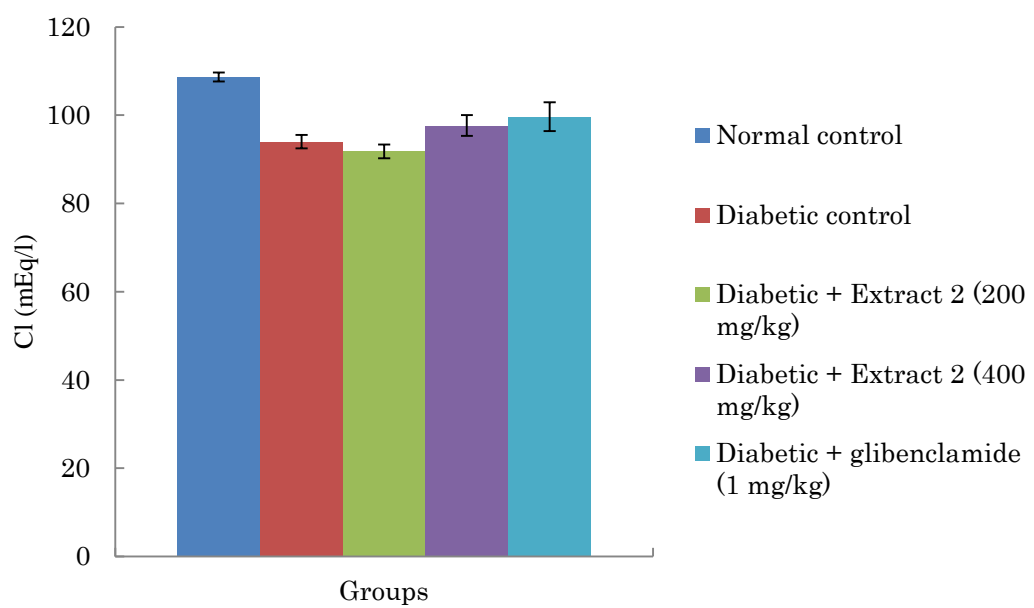


図 4-13 血清中 C1 に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

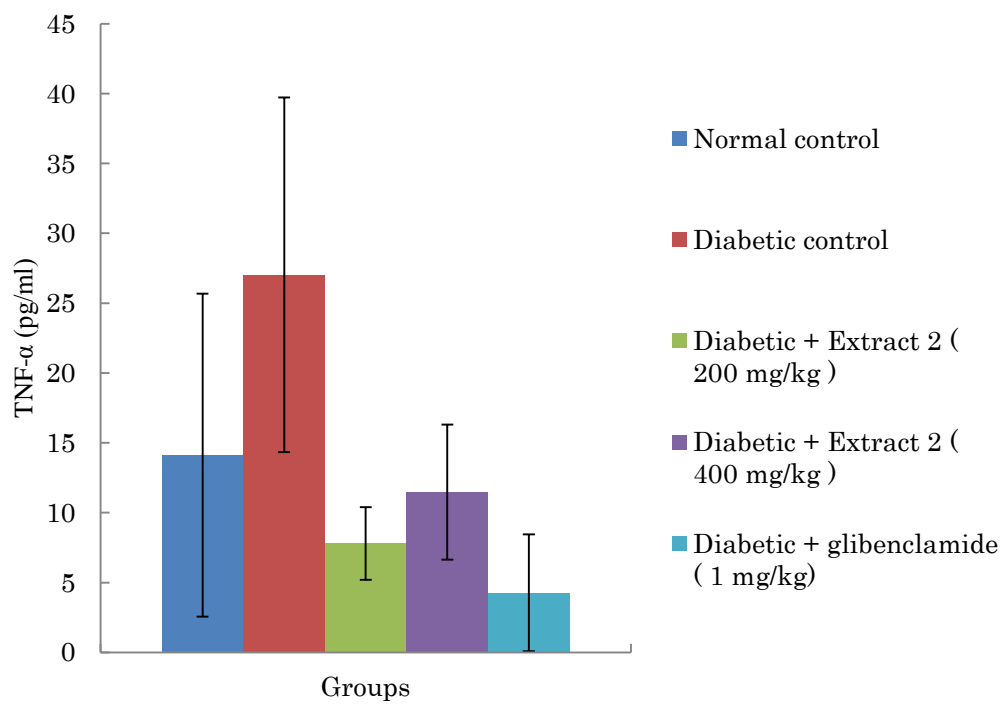


図 4-14 血清中 TNF- α に対する抽出物 2 の影響。すべての値は平均値 \pm 標準誤差 (n=6) で示した。(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, 糖尿病ラット対照群に対する Duncan の多重比較検定)

第5章 ミヤマタタビ根抽出物の有効成分の分析

5.1 はじめに

第2章,第3章,第4章の結果より,ヤマタタビの根の抽出物に含まれている何らかの成分が抗糖尿病効果を有することが確認された。しかしながら,その有効成分についての研究はまた行われていない。そこで,本章ではヤマタタビの根の抽出物に含まれる主な成分を探索し,その構造を明らかにするを目的として行った。

本章では,まず,ミヤマタタビ根抽出物 2,抽出物 8,抽出物 11 の総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量を測定した。また,ミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 の官能基の定性分析を行った。次に,HPLC 用いてミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 はルチンの定性定量分析を行った。最後に,UPLC-PDA を用いてミヤマタタビ根抽出物 11 の主な有効成分の種類について検討した。

5.2 材料及び方法

5.2.1 総ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール化合物は植物界に広く分布している。8,000種以上のポリフェノール化合物が植物に含まれると言われた (Bravo et al.,1998)。近年,ポリフェノール化合物はさまざまな生理活性を持つため注目されている,例えば,抗炎症活性,エ

ストロゲン活性,酵素阻害活性,抗菌活性(Cushnie et al.,2005) ,
抗アレルギー活性,抗酸化活性,抗腫瘍活性(Harborne et
al.,2000),糖代謝改善作用(Josic et al.,2010 ; Dias et al.,2005)。

ポリフェノール化合物の種類が多すぎるため,一つずつの定
性分析,定量分析は大変難しいであった,それに代わり,多くの
研究は総ポリフェノール含量を測定し,植物の機能性を評価し
た(Kiss et al., 2012; Hossain et al., 2011)。

本実験では Folin-Ciocalteu 法によりミヤマタタビ根抽出
物 2,抽出物 8,抽出物 11 のポリフェノール含量を測定した
(Saeed et al., 2012; Kim et al., 2003)。すなわち,分析試料溶液 1
mL に Folin-Ciocalteu 試薬(シマヅ社製) 1 mL を加え,5 分間室
温で放置した。その後,7%炭酸ナトリウム溶液 10 mL 加え,90
分間室温で遮光保存した後,分光光度計(UV-1600 シマヅ社製)
で 750 nm の吸光度を測定した。

分析用標準品は没食子酸(和光純薬)を用い,20,40,60,80
μg/mL 溶液で検量線を作成し,ミヤマタタビ根抽出物 2,抽出
物 8,抽出物 11 の総ポリフェノール含量を没食子酸相当量
(mg/g) で算出した。

5.2.2 総フラボノイド含量の測定

フラボノイドはポリフェノール化合物の一種であった。多く
の研究はフラボノイドが抗糖尿病効果を有することを証明し
た(Chen et al., 2013; Kalailingam et al., 2013)。フラボノイド

を定量分析する時,総フラボノイド含量の測定はよく使用されていた(Liu et al., 2013; Cao et al., 2013)。

本実験ではミヤマタタビ根抽出物2,抽出物8,抽出物11のフラボノイド含量を測定した。測定方法は文献を参考にした(Yao et al., 2013)。すなわち,分析試料溶液1 mLに対し70%エタノール4 mLを加えて希釈し,5%亜硝酸ナトリウム溶液0.5 mLを加えてよく混和し,室温で6分間放置した後,10%塩化アルミニウム溶液0.5 mLを加えた。さらに室温で6分間放置した後,1 mol/l水酸化ナトリウムを3 mL加え,蒸留水を1 mL加えた,15分間放置した後,分光光度計(UV-1600 シマヅ社製)で510 nmにおける吸光度を測定した。

分析用標準品はルチン(和光純薬)を用い,100,200,300,400,500,600 µg/mL溶液で検量線を作成し,ミヤマタタビ根抽出物2,抽出物8,抽出物11の総フラボノイド含量をルチン相当量(mg/g)で算出した。

5.2.3 FT-IR 分析

本研究ではフーリエ変換赤外分光光度計(FT/IR -300 JASCO社製)を用い,ミヤマタタビ根抽出物8,抽出物11の官能基の定性分析を行った。実験方法はVijayalakshmi(2012)の方法を参考にして行われた(Vijayalakshmi et al., 2012)。

測定方法は以下のとおりであった:分析試料1-3 mgに臭化カリウム100-300 mgを加え,瑪瑙製乳鉢でよく混和し粉碎し

た。作った混和物は真空加圧錠剤成型器による薄い円盤状固体を得た。ブランクは臭化カリウムを用いて同じ操作を行った。分析試料とブランクの吸収スペクトルは $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲で測定した。

没食子酸（和光純薬）が標準品として使用された。

5.2.4 HPLC 分析

多くの研究ではフラボノイド類は α -グルコシダーゼ阻害活性を持つことが報告された (Gholamhoseinian et al., 2009; Feng et al., 2011; Pereira et al., 2011)。本研究では高い α -グルコシダーゼ阻害活性を持つミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 を用い, フラボノイド類であるルチンの定性, 定量分析を行った。実験方法は文献を参考にした (Wang et al., 2010)。分析条件は以下のとおりであった。

HPLC 分析では高速液体クロマトグラフ (JASCO 1580, 日本分光社製) を用い, 検出器として UV 検出器 (UV-1570) を使用した。カラムとして 5C18-AR-II ($5\text{ }\mu\text{ m}$, $4.6\times 250\text{ mm}$) (Cosmosil 社製) を用い, カラム温度 25°C , 移動相として 44% メタノールを使用し, 流速 1 mL/min , 注入量は $10\text{ }\mu\text{ l}$, 測定波長は 360 nm にて分析を行った。ルチン（和光純薬）は標準品として使用した。

定性分析ではミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 はルチンと同一条件下で保持時間を比較し, 成分の同定を行った。

標準品ルチンのピーク面積及び濃度から検量線を作成した。検量線データから一次回帰式を求め、ミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 のルチン含有量を計算した。

5.2.5 UPLC-PDA 分析

分析試料としてミヤマタタビ根抽出物 11 を用い、UPLC-PDA 分析測定を行った。

UPLC 分析では高速液体クロマトグラフ (UPLC/Synapt G2 HDMS, ウォータース社製) を用い、検出器として PDA を使用した。カラムとして ACQUITY BEH C18 ($1.7\ \mu\text{m}$, $2.1 \times 50\ \text{mm}$) (ウォータース社製) を用い、カラム温度 30°C , 移動相として A: 超純水, B: アセトンニトリル (LC/MS 用, 和光純薬) を使用し、グラゼント条件は 0 分 A : B = 95 : 5, 12 分 A : B = 0 : 100, 12-13 分 A : B = 0 : 100, 13-15 分 A : B = 95 : 5, 流速 $0.3\ \text{mL/min}$, 注入量は $5\ \mu\text{L}$, 測定波長は $210\ \text{nm}$ - $400\ \text{nm}$ にて測定を行った。

ミヤマタタビ根抽出物 11 はピーク保持時間及び UV スペクトルを比較し、可能の分類を分析した。

5.2.6 統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。データは一元配置分散分析 (ANOVA) を使用し、事後分析として Duncan's multiple range test (DMRT) を用いた、統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

5.3 結果

5.3.1 総ポリフェノール含量

没食子酸の検量線データから求められた一次回帰式は $y = 0.0054x - 0.0113$ $R^2 = 0.946$ であった。これにより,ミヤママタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 は 1 g あたり総ポリフェノール量はそれぞれ 80.49 ± 0.05 mg, 94.69 mg, 94.81 ± 0.05 mg 含まれていた。Raja cultivar 抽出物 (76.37 ± 1.79 mg GAE/g d.w.) と比べ高いであった (Sulaiman et al., 2011)。ミヤママタタビ根抽出物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。

本研究において,抽出物1及び抽出物2には高濃度のポリフェノールが含まれており,健康飲料として利用開発できる素材として有望と思われる。

5.3.2 総フラボノイド含量

ルチンの検量線データから求められた一次回帰式は $y = 0.0012x - 0.0115$ $R^2 = 0.9991$ であった。これにより,ミヤママタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 は 1 g あたり総フラボノイド量はそれぞれ 43.69 ± 0.91 mg, 149.47 ± 4.99 mg, 152.31 ± 5.67 mg 含まれていた。ミヤママタタビ根抽出物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。

5.2.3 FT-IR 分析

図 4-1, 図 4-2, 図 4-3 はそれぞれミヤマタタビ根抽出物 8, 抽出物 11, 没食子酸の IR スペクトルを示した。図に示すように, ミヤマタタビ根抽出物 8, 抽出物 11, 没食子酸は 3400 cm^{-1} - 3200 cm^{-1} で幅広い吸収を示し, 水酸基を持っていると示唆された。 1625 cm^{-1} - 1575 cm^{-1} , 1525 cm^{-1} - 1475 cm^{-1} で幅広い吸収を示し, 芳香族 C=C 振動を持っていると示唆された。

IR スペクトルの比較結果より, ミヤマタタビ根抽出物 8, 抽出物 11 には没食子酸と同じフェノール性 OH 基を持っていると示唆された。従って, ミヤマタタビ根抽出物にはポリフェノール化合物が存在することが認められた。

5.3.4 HPLC 分析

HPLC によるスペクトル分析を行った結果, ミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 とルチンはほぼ同じ保持時間 (10.6min) を持っていた。従って, ミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 はルチンを含有することが分かった。

ルチンの検量線データから求められた一次回帰式は $y = 12725x + 2076.2$ $R^2 = 0.9972$ であった。これにより, ミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 のルチンの含有量はそれぞれ 0.6%, 2.8%, 3.2% であった, 抗糖尿病活性を持つマルベリーの葉抽出物 (2.2%) と比べ, 高いルチン含有量を有することが示した (Wang et al., 2010)。

5.3.5 UPLC-PDA 分析

図4-4に示すように、280 nm,360 nmの吸収波長にミヤママタタビ根抽出物11に含まれる有効成分(5.95分)のUV吸収スペクトルを示した、これはフラボノイドの特徴であった、従来の研究より、フラボノイドのUV吸収スペクトルは二つの吸収波長を持ち、バンドIは300 nm-380 nm、バンドIIは240 nm-280 nmであった(Anouar et al.,2012; Aragao et al.,2000; Vila et al.,2008)。これに従って、ミヤママタタビ根抽出物11がフラボノイド類を含有することが示唆した。

そして、4.07分,5.95分,9.61分に出る成分は280 nmでUV吸収スペクトルを示したが、360 nmでUV吸収スペクトルを示しなかった。フェノール酸である可能性が示唆された。従来の研究より、フェノール酸の極大吸収波長は270-290 nmであった(Kiss et al.,2012;Tuominen et al.,2013)。これに従って、ミヤママタタビ根抽出物11がフェノール酸を含有することが示唆した。

5.4 考察

IR 測定結果から、ミヤママタタビ根抽出物 8,抽出物 11 にはポリフェノール化合物が存在することが認められた。これはミヤママタタビ根抽出物の豊富なポリフェノール含有量をさらに証明した。

本研究では UPLC-PDA-MS 用いてミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 の構造を明らかにしたいが,分析条件がうまく行かないから,MS スペクトルが得られなかった。今後は UPLC-PDA-MS の測定条件,特に MS の分析条件をさらに検討することが必要であった。

5.5 まとめ

本研究でははじめでミヤマタタビ根抽出物の有効成分について検討した。

まず,ミヤマタタビ根抽出物 2,抽出物 8,抽出物 11 の総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量を測定した。その結果,ミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 は 1 g あたり総ポリフェノール量はそれぞれ 80.49 ± 0.05 mg, 94.69 mg, 94.81 ± 0.05 mg 含まれていた。Raja cultivar 抽出物 (76.37 ± 1.79 mg GAE/g d.w.) と比べ高いポリフェノール量が得られた(Sulaiman et al., 2011)。ミヤマタタビ根抽出物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。

ミヤマタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 は 1 g あたり総フラボノイド量はそれぞれ 43.69 ± 0.91 mg , 149.47 ± 4.99 mg, 152.31 ± 5.67 mg 含まれていた。ミヤマタタビ根抽出物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。

IR 測定の結果より,ミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 は

没食子酸と同じフェノール性 OH 基を持っていると示唆された。ポリフェノール化合物がミヤマタタビ根抽出物には存在したことが認められた。

HPLC によるスペクトル分析を行った結果より,ミヤマタタビ根抽出物 2,抽出物 8,抽出物 11 はルチンを含有し,そのルチンを含有量はそれぞれ 0.6%,2.8%,3.2%であった。

ミヤマタタビ根抽出物 8 抽出物 11 はフェノール酸である可能性が高いと考える。

本研究において,ミヤマタタビ根抽出物 8 及び抽出物 11 にはポリフェノール,フラボノイドが多く含まれていることが明らかになった。将来,健康飲料として利用開発できる素材として有望と思われる。

表 5-1 ミヤママタタビ根抽出物 2, 抽出物 8, 抽出物 11 の総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量

抽出物	総ポリフェノール含有量 (mg/g)	総フラボノイド含有量 (mg/g)
Extract 2	80.49 ± 0.05	43.69 ± 0.91
Extract 8	94.69 ± 0.00	149.47 ± 4.99
Extract 11	94.81 ± 0.05	152.31 ± 5.67

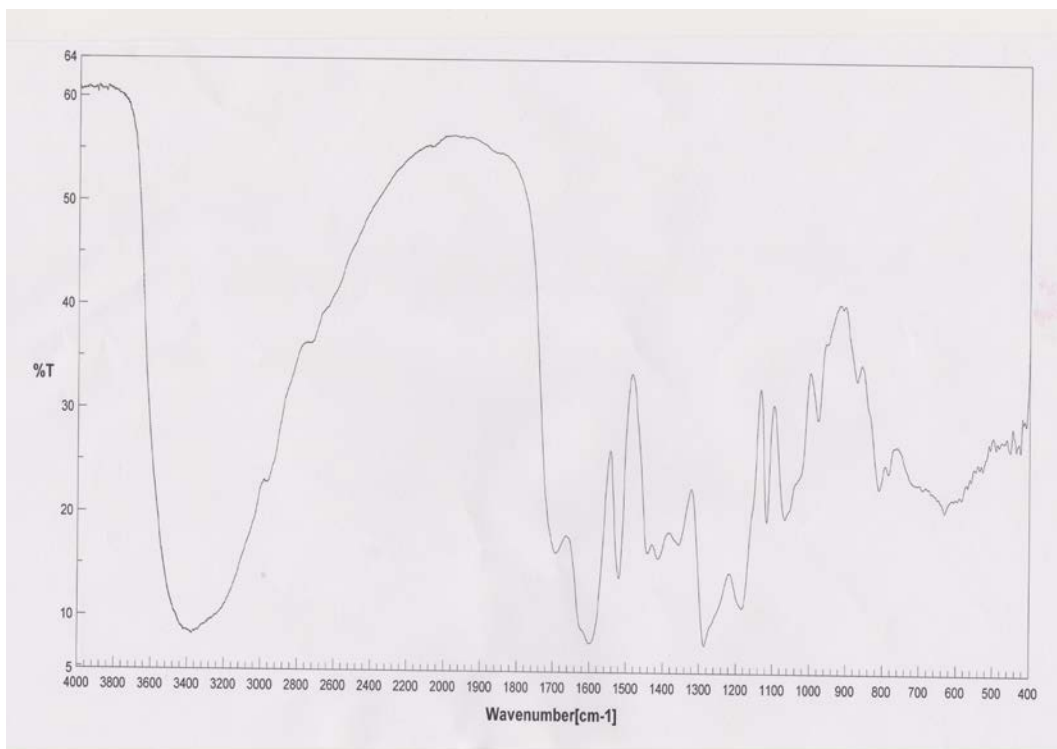


図 5-1 ミヤマタタビの根抽出物 8 の IR スペクト

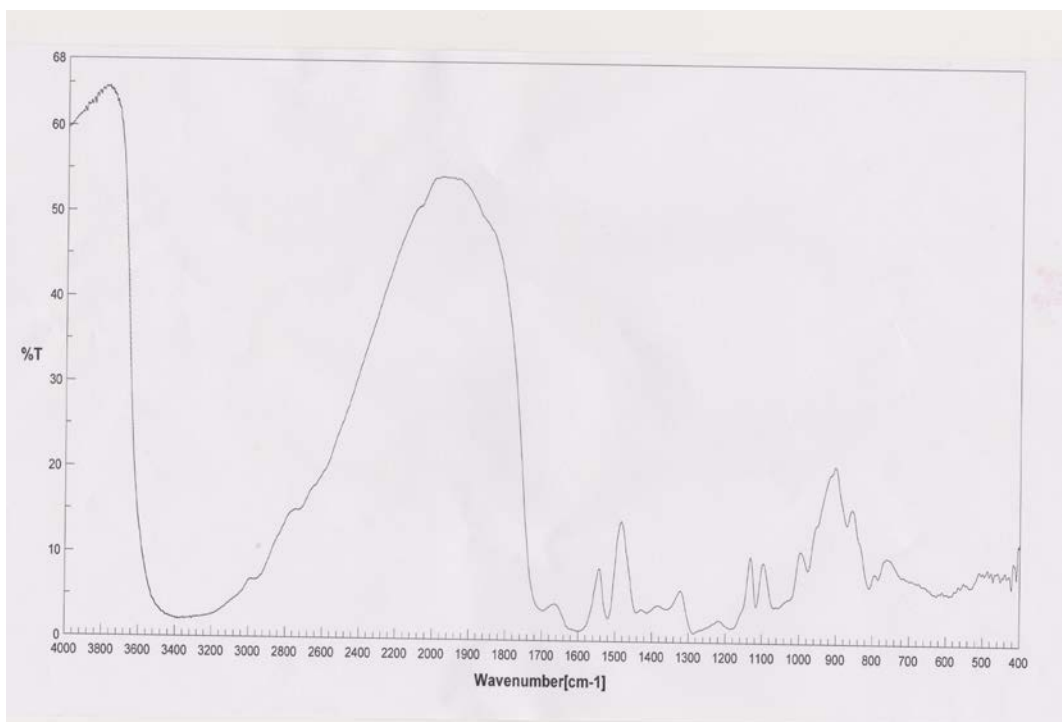


図 5-1 ミヤマタタビの根抽出物 11 の IR スペクト

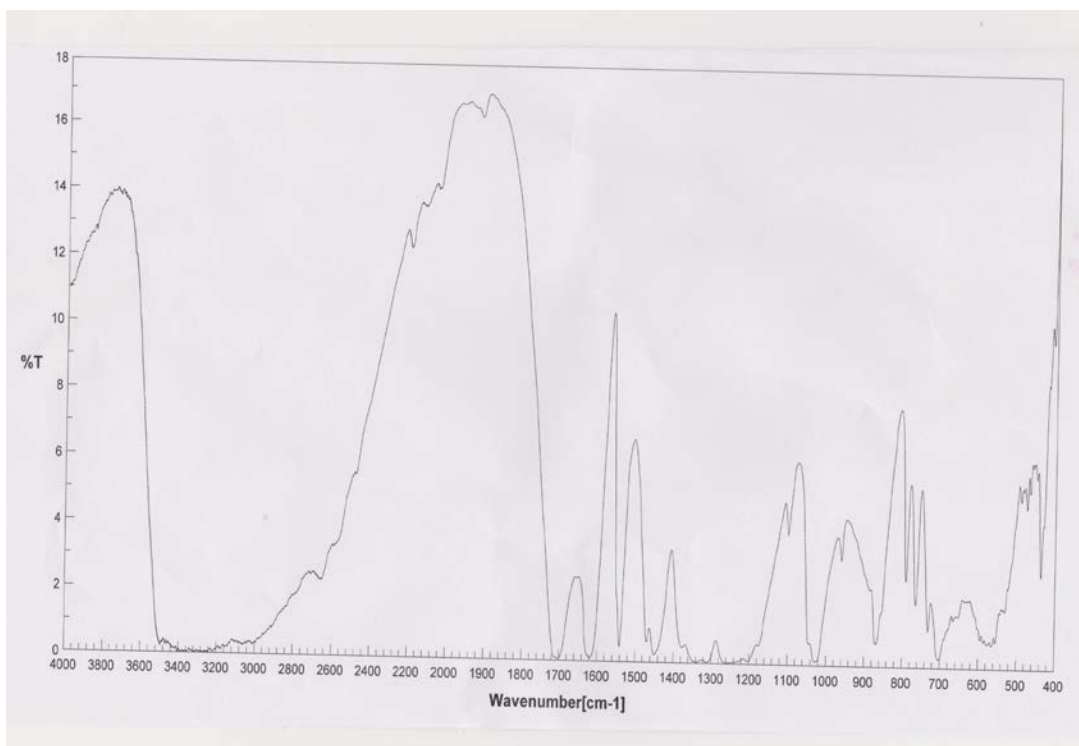


図 5-2 没食子酸の IR スペクトル

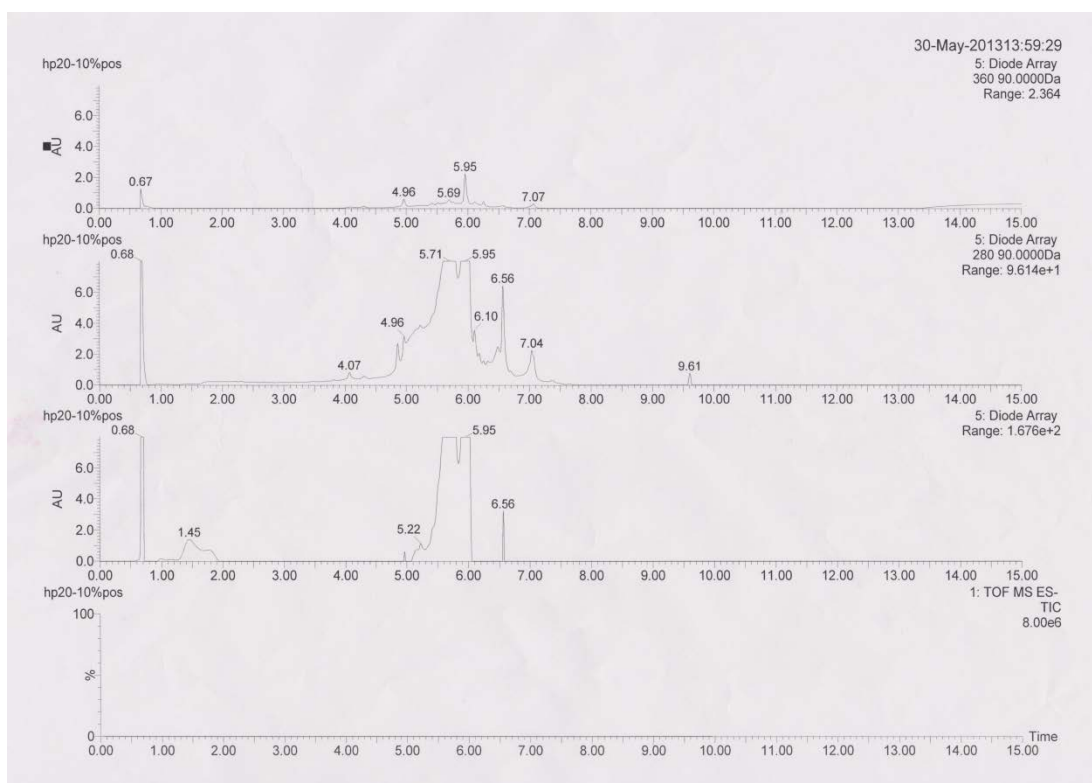


図 5-3 ミヤマタビ根抽出物 11 の全波長吸収

第 6 章 総 括

ミヤママタタビ (*Actinidia kolomikta*) は別名深山木天蓼と呼ばれ, マタタビ科マタタビ属に属する。東南アジアには広く分布している。その根はラオスにおいて糖尿病の民間療法として用いられている。しかし, その抗糖尿病効果についての科学的な研究はまだ行われていない。本研究はミヤママタタビ根に含まれる成分及びその抗糖尿病効果のメカニズムを解明することを目的とし, その抗糖尿病効果を初めて検討した。

第1章では糖尿病の現状, 糖尿病の治療方法, ミヤママタタビに関する既往の研究, 研究目的, 研究方法および論文の構成について述べた。

第 2 章ではミヤママタタビ根各抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性を検討した。まず, 異なる溶媒を用いてミヤママタタビ根の有効成分を抽出した。そして, その抽出物を用いて酵母由来の α -グルコシダーゼ阻害活性を検討した。また, ミヤママタタビ根各抽出物を用いてラット小腸由来のマルターゼ阻害活性及びスクラーゼ阻害活性を検討した。その結果, ミヤママタタビ根熱水抽出物は高い α -グルコシダーゼ阻害活性を持つことが認められた。特に, 抽出物 8 と抽出物 11 は高いマルターゼ阻害活性及びスクラーゼ阻害活性を持つことが分かった。以上のことから, ミヤママタタビ根各抽出物は α -グルコシダーゼ活性に影響を与えるという新しい知見を得ることができた。

特に、ミヤマタタビ根抽出物 8,抽出物 11 は小腸に存在するマルターゼ及びスクラーゼ活性を阻害し,マルトース,スクロースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖を改善できることが認められた。その作用機序は糖尿病治療薬である経口血糖降下薬の α -グルコシダーゼ阻害剤と一致であった。

第 3 章では抽出物 2 を用いてラットにマルトール負荷試験,スクロース負荷試験,グルコース負荷試験を行い,血糖上昇抑制作用を検討した。また,抽出物 1 及び抽出物 2 を用いて急性経口毒性試験を行った。その結果,抽出物 2 はマルターゼ及びスクラーゼ活性を阻害し,マルトース,スクロースのグルコースへの分解を抑制して血糖値の上昇を統計学的に有意に抑えることが示唆され,食後高血糖を改善できることが認められた。抽出物 2 は小腸でのグルコースの吸収を阻害し,血糖値の上昇を統計学的に有意に抑え,耐糖能改善機能を有することが示唆された。抽出物 1 及び抽出物 2 の急性毒性がないことが分かった。正常ラットにおけるミヤマタタビ根抽出物は抗糖尿病活性を有することが示唆された。

第 4 章では STZ の注射による誘発した糖尿病ラットに抽出物 2 を 4 週間連続経口投与し,血糖値,インスリン,TG,TC, HDL-C,GOT/AST, GPT/ALT,TP,UA,BUN,電解質 (Na・Cl・K),TNF- α など各種糖尿病マーカーに及ぼす影響について検討した。その結果,抽出物 2 は糖代謝機能,脂質代謝,肝機能,腎

機能,インスリン抵抗性を改善し,優れた抗糖尿病効果を有することが明らかになった。さらに,抽出物 2 には腎機能改善作用と共に抗痛風作用を示した。

第5章ではミヤマタタビ根抽出物2,抽出物8,抽出物11の総ポリフェノール含有量及び総フラボノイド含有量を測定した。また,ミヤマタタビ根抽出物8,抽出物11は没食子酸と比較し,官能基の定性分析を行った。次に,HPLCを用いてミヤマタタビ根抽出物8,抽出物11はルチンの定性定量分析を行った。最後に,UPLC-PDAを用いてミヤマタタビ根抽出物11の主な有効成分の種類について検討した。その結果,ミヤマタタビ根抽出物2,抽出物8,抽出物11は高いフラボノイド含有量を持つことが示唆された。ミヤマタタビ根抽出物8,抽出物11は没食子酸と同じフェノール性OH基を持っていることが示唆された。ミヤマタタビ根抽出物2,抽出物8,抽出物11は高いルチン含有量を有することが認められた。ミヤマタタビ根の主な有効成分はフラボノイド,フェノール酸である可能性が示唆された。

以上のことから,抽出物 2 は強い α -グルコシダーゼ阻害活性を持ち,食後高血糖を改善できることが認められた。また,抽出物 2 は糖代謝機能,脂質代謝,肝機能,腎機能,インスリン抵抗性を改善し,優れた抗糖尿病効果を有することが明らかになった。これまでミヤマタタビ根は糖尿病治療に用いられているという民間療法の科学的な根拠が解明された。また,抽出物 1 及び抽出物 2 は急性毒性がないことが示唆された。従って,ミ

ヤマタタビ根抽出物は安全性及び有効性に優れ,抗糖尿病素材として有望であることが示唆された。特に,ミヤマタタビ根抽出物には豊富なポリフェノール,フラボノイドが多く含まれているから,将来,健康飲料として利用することが期待される。

今後の課題とは以下のものであった：

まず,抽出物 1 及び抽出物 2 を用い,インスリン抵抗性の改善作用及び血糖降下作用の機構についてさらに検討する必要がある。

また,ミヤマタタビ根抽出物の有効成分をさらに検討していきたい。

謝 辞

本研究は、筑波大学生命環境科学研究科の張振亜教授のご指導のもとに行われ、ご助言およびご教示をいただきましたこと、心より感謝の意を表します。

また、筑波大学生命環境科学研究科の楊英男准教授には本稿の執筆にあたり、懇切にご指導賜りました。ここに深甚なる感謝の意を表するとともに、厚く御礼申し上げる次第であります。

そして、本論文を作成するにあたり懇篤なるご指導とご高閲を承りました筑波大学生命環境科学研究科の雷中方准教授に心より御礼申し上げます。

そして、論文審査において大変お世話になり、懇切なご助言と教示をいただきました筑波大学生命環境科学研究科の内海真生准教授に心より御礼申し上げます。

さらに、研究活動において多大なご協力をいただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科張研究室の皆様に対して心より深く感謝いたします。

最後に、ずっと励ましそして物質的にも及び精神的にも支えてくれた両親および家族の張培哲、胡嘯峰に心から深く感謝いたします。

本研究において、ミヤマタタビ根および葉を提供いただきました天然物産業つくば株式会社に感謝の意を表します。

また，本研究は大生工業株式会社と共同研究として行われたものであることを付記するとともに，改めて厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 河盛隆造.糖尿病の血糖コントロール戦略, 糖尿病 2001 (赤沼安夫編), p.86-91, 日本評論社, 東京, 2001。
- 弘世貴久, 荒川将之, 河盛隆造. 抗糖尿病薬 (α -グルコシダーゼ阻害薬を中心に). 糖尿病, 2008; 51:833-836.
- 出口ヨリ子, 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.日本農芸化学誌,1998; 72:923-931.
- 小川智史, 木村英人, 新見愛, 地阪光生, 勝部拓矢, 横田一成. トチノキ種皮ポリフェノール成分の糖質消化酵素に対する阻害作用. 日本食品科学工学会誌, 2009; 56 : 95-102.
- 立石絵美, 韓立坤, 奥田拓道. ラットにおける食後の血糖値に及ぼすコーヒー豆の熱水抽出物の影響. 栄養学雑誌,2004; 62:321-327.
- 劉永立, 増田清, 原田隆. ミヤマタタビ (*Actinidia kolomikta*) 培養体由来根組織からの器官形成, 不定胚誘導ならびに植物体再生. 園芸学会雑誌,1998; 67:734-738.
- 齋藤優介, 西繁典, 小疇浩, 弘中和憲, 小嶋道之. 豆類ポリフェノールの抗酸化活性ならびに α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性. 日本食品科学工学会誌, 2007; 54 : 563-567.

- Adisakwattana S, Chanathong B. α -glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of *Moringa oleifera* leaf extract. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2011; 15: 803-808.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2005; 28:37-42.
- Ana T, Amadeu L. A prospect for pyrrolidine iminosugars as antidiabetic α -Glucosidase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012; 55:10345-10346.
- Anouar EH, Gierschner J, Duroux JL, Trouillas P. UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry*, 2012; 131:79-89.
- Apostolidis E, Li LY, Lee C, Seeram NP. In vitro evaluation of phenolic-enriched maple syrup extracts for inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes relevant to type 2 diabetes management. *Journal of Functional Foods*, 2011; 3:100-106.
- Aragao DM, Guarize L, Lanini J, Juliana C, Da Costa JC, Garcia RM, Scio E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 128:629-633.
- Asano N, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydrate Research*, 1994; 253:235-245.

- Bhandari MR, Nilubon JA, Gao H, Kawabata J. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed (*Bergenia ciliata* Haw.). *Food Chemistry*, 2008; 106: 247-252.
- Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul Health Metr*, 2010; 8:29. doi: 10.1186/1478-7954-8-29.
- Brain R, Margaret CC, Jian K, Ramesh KG, John HM. Strain differences in susceptibility of streptozotocin-induced diabetes: effect on hypertriglyceridemia and cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, 1997; 34:199-205.
- Bravo Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 1998; 56: 317-333.
- Carrascosa M, Pascual F, Arest S. Acarbose-induced acute severe hepatotoxicity. *Lancet*, 1997; 349:698-699.
- Chan HH, Sun HD, Reddy MVB, Wu TS. Potent α -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. *major*. *Phytochemistry*, 2010; 71:1360-1364.
- Chandramohan G, Ignacimuthu S, Pugalendi KV. A novel compound from *Casearia esculenta* (Roxb.) root and its effect on carbohydrate metabolism in streptozotocin-diabetic rats. *Eu-*

ropean Journal of Pharmacology, 2008; 590:437-443.

Charpentier G, Riveline JP, Varroud-Vial M. Management of drugs affecting blood glucose in diabetic patients with renal failure. *Diabetic Medicine*, 2000; 26:73-85.

Chen F, Xiong H, Wang J, Ding X, Shu G, Mei Z. Antidiabetic effect of total flavonoids from *Sanguis draxonis* in type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacol*, 2013; 149:729-736.

Chen HX, Zhang M, Xie BJ. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. *Food Chemistry*, 2005; 90:17-21.

Clifford B, Caroline D. Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. *Diabetes Care*, 1989; 12:553-564.

Coniff RF, Shapiro JA, Seaton TB, Bray GA. Multicenter, placebo-controlled trial comparing acarbose (BAY g 5421) with placebo, tolbutamide, and tolbutamide-plus-acarbose in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Medicine*, 1995; 98:443-451.

Coniff RF, Shapiro JA, Seaton TB, Hoogwerf BJ, Hunt JA. A doubleblind placebo-controlled trial evaluating the safety and efficacy of acarbose for the treatment of patients with insulin-requiring type II diabetes. *Diabetes Care*, 1995; 18:928-932.

Cushnie TPP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *In-*

- ternational Journal of Antimicrobial Agents, 2005; 26:343- 356.
- Deng YF, He K, Ye XL, Chen X, Huang J, Li XG, Yuan LJ, Jin YL, Jin Q, Li PP. Saponin rich fractions from *Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce with more potential hypoglycemic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012; 141:228-233.
- Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, González-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutrition*, 2005; 5:2299-2304.
- Eliza J, Daisy P, Ignacimuthu S, Duraipandiyan V. Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.) Sm., in STZ-induced diabetic rats. *Chemico Biological Interactions*, 2009; 182:67-72.
- Endrenyi L, Fritsch S, Yan W. C_{max}/AUC is a clearer measure than C_{max} for absorption rates in investigations of bioequivalence. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 1991; 29(10):394-399.
- Feng J, Yang X, Wang R. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry*, 2011; 72:242-247.
- Gao H, Huang YN, Xu PY, Kawabata J. Inhibitory effect on α -glucosidase by the fruits of *Terminalia chebula* Retz. *Food*

- Chemistry, 2007; 105:628-634.
- Cao JG, Xia X, Dai XL, Xiao JB, Wang QX, Andrae-Marobela K, Okatch K. Flavonoids profiles, antioxidant, acetylcholinesterase inhibition activities of extract from *Dryoathyrium boryanum* (Willd.) Ching. Food and Chemical Toxicology, 2013; 5:121-128.
- Gholamhoseinian A, Fallah H, Sharififar F. Inhibitory effect of methanol extract of *Rosa damascena* Mill. Flowers on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia in normal and diabetic rats. Phytomedicine, 2009; 16:935-941.
- Gispén WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci, 2000; 23(11):542-549.
- Guan D, Zhang ZY, Yang YN, Sugiura N, Hu HH, Xing GQ, Liu JQ, Zu XY, Zhang Y. Antioxidant and antitumor activities of water extracts from the root of *Actinidia kolomikta*. Experimental and Therapeutic Medicine, 2011; 2:33-39.
- Guan D, Zhang ZY, Yang YN, Xing GQ, Liu JQ. Immunomodulatory Activity of Polysaccharide from the Roots of *Actinidia kolomikta* on Macrophages. International Journal of Biology, 2011; 3:2.
- Guo P, Ouyang JP, Mao XQ, Zhang JF. Effects of Astragalus polysaccharide on renal pathological changes in the early period of Type 2 diabetic KKAY mice model. Medical Journal of

Wuhan University, 2007; 28:74-76.

Ha DT, Tuan DT, Thu NB, Nhiem NX, Ngoc TM, Yim N, Bae K. Palbinone and triterpenes from *Moutan Cortex* (*Paeonia suffruticosa*, Paeoniaceae) stimulate glucose uptake and glycogen synthesis via activation of AMPK in insulin-resistant human HepG2 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009; 19:5556-5559.

Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000; 55:481-504.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Enhancing cardiovascular disease risk reduction: raising high-density lipoprotein levels. *Curr Opin Cardiol*, 2009; 4(5):473-482.

Hodge HC, Sterner JH. Tabulation of Toxicity Classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*, 1949; 10:93-96.

Honma A, Koyama T, Yazawa K. Anti-hyperglycemic effects of sugar maple *Acer saccharum* and its constituent acertannin. *Food Chemistry*, 2010; 123:390-394.

Hossain MA, Rahman SMM. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 2011; 44:672-676.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993; 259:87-91.

- Hultcrantz R, Glaumann H, Lindberg G. Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. *Scand J Gastroenterol*, 1986; 21:109–113.
- Ikarashi N, Takeda R, Ito K, Ochiai W, Sugiyama K. The inhibition of lipase and glucosidase activities by acacia polyphenol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011; ID 272075, doi:10.1093/ecam/nea043.
- Ishihara S, Kawata A, Inoue M, Watanabe T, Tsuji K. Hypoglycemic effect of *glechoma hederacea* extract on blood glucose level in rats. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2007; 54(9):412-414.
- Jo SH, Ha KS, Moon KS, Lee OH, Jang HD, Kwon YI. In Vitro and in Vivo Anti-hyperglycemic effects of omija (*Schizandra chinensis*) fruit. *International Journal of Molecular Science*, 2011; 12:1359-1370.
- Jong-Anurakkun N, Bhandari MR, Kawabata J. α -Glucosidase inhibitors from *Devil tree* (*Alstonia scholaris*). *Food Chemistry*, 2007; 103(4):1319-1323.
- Josic J, Olsson AT, Wickenberg J, Lindstedt S, Hlebowicz J. Does green tea affect postprandial glucose, insulin and satiety in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 2010; 9:63.
- Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK. Antidia-

betic agents from medicinal plants. *Current Medicinal Chemistry*, 2006; 13:1203-1218.

Kadnur SV, Goyal RK. Comparative antidiabetic activity of methanolic extract and ethyl acetate extract of *Zingiber officinale* Roscoe. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005; 67:453-457.

Kalailingam P, Balasubramanian K, Kannaian B, Mohammed AKN, Meenakshisundram K, Tamilmani E, Kaliaperumal R. Isolation and quantification of flavonoids from ethanol extract of *Costus Igneus* rhizome (CiREE) and impact of CiREE on hypoglycaemic, electron Microscopic studies of pancreas in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2013; 3:285-297.

Kasabria V, Afifib FU, Hamdanb I. In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 133:888-896.

Kavishankar GB, Lakshmidēvi N, Murthy SM, Prakash HS, S.R. Niranjana SR. Diabetes and medicinal plants-A review. *International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences*, 2011; 2(3):65-80.

Kim D, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food*

Chemistry, 2003; 81:321-326.

Kim HO, Yun JW. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 2005; 99: 728-738.

Kim SD. α -Glucosidase inhibitor from *Buthus martensi* Karsch. *Food Chemistry*, 2013; 136:297-300.

King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025; prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 1998; 21:1414-1431.

Kiss AK, Naruszewicz M. Polyphenolic compounds characterization and reactive nitrogen species scavenging capacity of *Oenothera paradoxa* defatted seed extracts. *Food Chemistry*, 2012; 131:485-492.

Kumar BSA, Lakshman K, Jayaveea KN, Shekar DS, Saleemulla Khan S, Thippeswamy BS, Veerapur VP. Antidiabetic, anti-hyperlipidemic and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus viridis* Linn in alloxan induced diabetic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2012; 64:75-79.

Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabe-

- tes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002; 55(1):65-85.
- Li SP, Zhang GH, Zeng Q, Huang ZG, Wang YT, Dong TTX, Tsim WK. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with anti-oxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phyto-medicine*, 2006; 13:428-433.
- Lin Y, Sun ZJ. Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*, 2010; 204(1):1-11.
- Liu JQ, Zhang ZY, Xing GQ, Hu HH, Sugiura N, Intabon K. Potential antioxidant and antiproliferative activities of a hot-water extract from the root of *Tonh khidum*. *Oncology letters*, 2010; 1:383-387.
- Liu S, Li D, Huang B, Chen YX, Lu XC, Wang YW. Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013; 149:263-269.
- Luo H, Imoto T, Hiji Y. Inhibitory effect of voglibose and gymnemic acid on maltose absorption *in vivo*. *World Journal of Gastroenterology*, 2001; 7:270-274.
- Mai TT, Chuyen NV. Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007; 71(1): 69-76.
- Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 1995; 2(2):137-89.

- McNeely MJ, Boyko EJ. Type 2 Diabetes Prevalence in Asian Americans: Results of a national health survey. *Diabetes Care*, 2004; 27(1):66-69.
- Mizuno CS, Chittiboyina AG, Kurtz TW, Pershadsingh HA, Avery MA. Type 2 diabetes and oral antihyperglycemic drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 2008; 15:61-74.
- Montonen J. Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004; 27(2):362-366.
- Muruganandan S, Srinivasan K, Gupta S, Gupta PK, Lal J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 97:497-501.
- Nazreen S, Kaur G, Alam MM, Shafi S, Hamid H, Ali M, Alam MS. New flavones with antidiabetic activity from *Callistemon lanceolatus* DC. *Fitoterapia*, 2012; 83:1623-1627.
- Nimal CIV, Praveen KP, Sunil C, Vajravijayan S, Lakshmi SR, Jenifer SS, Agastian P. In vitro studies on α -glucosidase inhibition, antioxidant and free radical scavenging activities of *Hedyotis biflora* L. *Food Chemistry*, 2013; 138:1689-1695.
- Oliveira HC, dos Santos MP, Grigulo R, Lima LL, Martins DT, Lima JC, Stoppiglia LF, Lopes CF, Kawashita NH. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008; 115:515-519.

- Organization for Economic Co-operation and Development. OECD guideline 425 for testing of chemicals: Acute oral toxicity Up-and-down procedure, 2001; 1:1-26.
- Orhan N, Aslan M, Süküroğlu M, Orhan D. *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effect of *Cistus laurifolius* L. and detection of major phenolic compounds by UPLC-TOF-MS analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013; 146:859-865.
- Patel MB, Mishra S. Hypoglycemic activity of alkaloidal fraction of *Tinospora cordifolia*. *Phytomedicine*, 2011; 18:1045-1052.
- Patwardhan B, Vaidya ADB, Chorghade M. Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science*, 2004; 86:789-799.
- Pereira DF, Cazarolli LH, Lavado C, Mengatto V, Figueiredo MSRB, Guedes A, Pizzolatti MG, Silva FRMB. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition*, 2011; 27:1161-1167.
- Plomgaard P, Nielsen AR, Fischer CP, Mortensen OH, Broholm C, Penkowa M, Krogh-Madsen R, Erikstrup C, Lindgaard B, Pedersen AM, Taudorf S, Pedersen BK. Associations between insulin resistance and TNF- α in plasma, skeletal muscle and adipose tissue in humans with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2007; 50:2562-2571.
- Reese ET, Parrish FW. Nojirimycin and d-glucose-1,5-lactone as inhibitors of carbohydrases. *Carbohydrate Research*, 1971; 18:

381-388.

Ren S, Xu DD, Pan Z, Gao Y, Jiang ZG, Gao QP. Two flavanone compounds from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seeds, one previously unreported, and appraisal of their α -glucosidase inhibitory activities. *Food Chemistry*, 2011; 127:1760-1763.

Rijkelijhuizen JM, Girman CJ, Mari A, Alsema M, Rhodes T, Nijpels G, Kostense PJ, Stein PP, Eekhoff EM, Heine RJ, Dekker JM. Classical and model-based estimates of beta-cell function during a mixed meal vs. an OGTT in a population-based cohort. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009; 83(2):280-288.

Saeed N, Khan MR, Shabbir M. Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complement Altern Med*, 2012; 12:221.

Said O, Fulder S, Khalil K, Azaizeh H, Kassis E, Saad B. Maintaining a physiological blood glucose level with 'Glucoselevel', a combination of four anti-diabetes plants in the traditional Arab herbal medicine. *Evid Based Complement Alternat Medicine*, 2007; 5:421-428.

Sakatani T, Shirayama T, Suzaki Y, Yamamoto T, Mani H, Kawasaki T, Sugihara H, Matsubara H. The association between cholesterol and mortality in heart failure. Comparison between patients with and without coronary artery disease. *International Heart Journal*, 2005; 46(4):619-629.

- Sakulnarmrat K, Konczak I. Composition of native Australian herbs polyphenolic-rich fractions and in vitro inhibitory activities against key enzymes relevant to metabolic syndro. Food Chemistry, 2012; 134:1011-1019.
- Salahuddin M, Jalalpure SS. Antidiabetic activity of aqueous fruit extract of *Cucumis trigonus* Roxb. In streptozotocin-induced -diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 2010; 127: 565-567.
- Sarah W, Gojka R, Anders G, Richard S, Hilary K. Global Prevalence of Diabetes. Diabetes Care, 2004; 27:1047-1053.
- Shai LJ, Masoko P, Mokgotho MP, Magano SR, Mogale AM, Bado N, Eloff JN. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwa, South Africa. South African Journal of Botany, 2010; 76:465-470.
- Singh SK, Kesari AN, Gupta RK, Jaiswal D, Watal G. Assessment of antidiabetic potential of *Cynodon dactylon* extract in streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 2007; 114:174-179.
- Sulaiman SF, Yusoff NAM, Eldeen IM, Seow EM, Sajak AAB, Supriatno, Ooi KL. Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). Journal of Food Composition and Analysis,

2011; 24:1-10.

Sun HY, Wang SF, Li SH, Yuan X, Ma J, Zhang ZY. Antioxidant activity and Immunomodulatory of Extracts from Roots of *Actinidia kolomikta*. International Journal of Biology, 2013; 5:3.

Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2006; 52:149-153.

Tsuchihashi N, Watanabe T, Arai K, Saho E, Nishimaki Y, Yokoyama N. Studies on Production of Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. Bulletin of Chiba College of Health Science, 1985; 4(2):25-28.

Tuominen A, Toivonen E, Mutikainen P, Salminen JP. Defensive strategies in *Geranium sylvaticum*. Part 1: Organ-specific distribution of water-soluble tannins, flavonoids and phenolic acids. Phytochemistry, 2013; 95:394–407.

Vijayalakshmi R, Ravindhran R. Comparative fingerprint and extraction yield of *Diospyros ferrea (willd.) Bakh.* root with phenol compounds (gallic acid), as determined by uvvis and ft-ir spectroscopy. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012 ; S1367-S1371.

Vila FC, Colombo R, De Lira TO, Yariwake JH. HPLC micro-fractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum*L. Journal of the Brazilian

Chemical Society, 2008; 19:903-908.

Wakabayashi S, Kishimoto Y, Matsuoka A. Effect of indigestible dextrin on glucose tolerance in rats. *Journal of Endocrinol*, 1995; 144:533-538.

Wan CP, Yuan T, Cirello AL, Seeram NP. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers. *Food Chemistry*, 2012; 135:1929-1937.

Wang QQ, Jiang CH, Fang SZ, Wang JH, Ji Y, Shang XL, Ni YC, Yin ZQ, Zhang J. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of ethanol and aqueous extracts of *Cyclocarya paliurus* leaves in type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013; 150(3):1119-1127.

Wang T, Zhang DQ, Li YH, Liu HG, Liu ZB, Zhao CF, Hu LM, Gao XM. Regulation effects on abnormal glucose and lipid metabolism of TZQ-F, a new kind of Traditional Chinese Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 128:575-582.

Wehmeier UF, Piepersberg W. Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. *Microbiol Biotechnol*, 2004; 63:613-625.

Welborn TA. Acarbose, an alpha-glucosidase inhibitory for non-insulin-dependent diabetes. *Med J Aust*, 1998; 168(2):76-78.

Wu TT, Zhou XT, Deng YF, Jing Q, Li M, Yuan LJ. *In vitro* studies of *Gynura divaricata* (L.) DC extracts as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. *Journal of*

Ethnopharmacology, 2011; 136:305-308.

Xie JT, Wu JA, Mehendale S, Aung HH, Yuan CS. Anti-hyperglycemic effect of the polysaccharides fraction from American ginseng berry extract in *ob/ob* mice. *Phytomedicine*, 2004; 11:182-187.

Xing XH, Zhang ZM, Hu XZ, Wu RQ, Xu C. Antidiabetic effects of *Artemisia sphaerocephala* Krasch.gum, a novel food additive in China, on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009; 125:410-416.

Yang CY, Wang J, Zhao Y, Shen L, Jiang X, Xie ZG, Liang N, Zhang L, Chen ZH. Anti-diabetic effects of *Panax notoginseng* saponins and its major anti-hyperglycemic components. *Journal of Ethnopharmacol*, 2010; 130(2):231-236.

.Yao XC, Zhu L, Chen YX, Tian J, Wang YW. *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. *Food Chemistry*, 2013; 139:59-66.

Yoshikawa M, Pongpiriyadacha Y, Kishi A, kaeura T, Wang T, Morikawa T, Matsuda H. Biological activities of *Salacia chinensis* originating in Thailand: The quality evaluation guided by α -glucosidase inhibitory activity. *Yakugaku Zasshi*, 2003; 123:871-880.

Zhang AJ, Rimando AM, Fish W, Mentreddy SR, Mathews ST.

Serviceberry [*Amelanchier alnifolia* (Nutt.) Nutt.ex. M. Roem (Rosaceae)] leaf extract inhibits mammalian α -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in a mouse model of diet-induced obesity and hyperglycemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012; 143:481-487.

Zhao LY, Lan QJ, Huang ZC, Ouyang LJ, Zeng FH. Antidiabetic effect of a newly identified component of *Opuntia dillenii* Polysaccharides. *Phytomedicine*, 2011; 18:661-668.

Zheng XK, Li YJ, Zhang L, Feng WS, Zhang X. Antihyperglycemic activity of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 133:531-537.

Zhou YF, Wu Y, Ouyang JP. Effects of *Astragalus* polysaccharide on insulin signal transduction in renal tissue of Type 2 diabetic rats. *Medical Journal of Wuhan University*, 2005; 26:139-142.

これまでの研究業績

1.原著論文

1. **Xuansheng Hu**, Shuhong Li, Linbo Wang, Dan Zhu, Yuepeng Wang, Yiting Li, Yingnan Yang, Zhenya Zhang, Delin Cheng. Anti-diabetic activities of aqueous extract from *Actinidia kolomikta* root against α -glucosidase. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013; 2 (4): 53-57.
2. Shuhong Li, Linbo Wang, Chunfeng Song, **Xuansheng Hu**, Hongyi Sun, Yingnan Yang, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang (2013). Utilization of soybean curd residue for polysaccharides by *Wolfiporia extensa* (Peck) Ginns and the antioxidant activities in vitro. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, In press, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice>.
3. Min Shi, Yingnan Yang, **Xuansheng Hu**, Zhenya Zhang (2014). Effect of ultrasonic extraction conditions on antioxidative and immunomodulatory activities of a *Ganoderma lucidum* polysaccharide originated from fermented soybean curd residue. *Food Chemistry*, 2014; 155: 50-56.
4. Shuhong Li, **Xuansheng Hu**, Kejuan Li, Xi Yuan, Zhenya Zhang (2013). Effect of fermentation by *Morchella esculenta* on the physicochemical properties of soybean curd

residue. Food Hydrocolloids, Under review.

5. **Xuansheng Hu**, Shuhong Li, Kejuan Li, Linbo Wang, Yuepeng Wang, Delin Cheng, Yingnan Yang, Zhenya Zhang. Antioxidant activity and alpha-glucosidase inhibitory activity of *Actinidia kolomikta* Maxim Leaves aqueous extract. Industrial Crops and Products. (schedule)

2.学会発表

1. **Xuansheng Hu**, Yingnan Yang, Shuhong Li, Linbo Wang, Dan Zhu, Yu Liu, Takamitsu Yoshimura, Delin Cheng, Zhenya Zhang. Alpha-glucosidase inhibitory activity and bioactive compounds from extract of *Actinidia kolomikta*. 65th SBJ Annual Meeting, September 18-20, Hiroshima, Japan (2013).
2. **Xuansheng Hu**, Yingnan Yang, Yiting Li, Jian Ma, Shuhong Li, Zhenya Zhang. Alpha-glucosidase and Alpha-amylase inhibitory activity of aqueous extract of *Actinidia kolomikta* leaves. 64th SBJ Annual Meeting, October 23-26, Kobe, Japan (2012).
3. 胡選生,楊英男,周舫,劉繼強,張穎,鉅曉艷,張振壘.ミヤママタタビ根抽出物の抗糖尿病効果,日本食品工学会第11回(2010年度)年次大会.