

ヤマブドウ搾りかす抽出物の抗糖尿病作用

長澤 孝志*¹ 澤井 秀幸*² 小浜 恵子*³

*¹ NAGASAWA Takashi, *² SAWAI Hideyuki (岩手大学 農学部)

*³ KOHAMA Keiko (地方独立行政法人 岩手県工業技術センター)

Key Words : 糖尿病・グリケーション・ポリフェノール・ヤマブドウ

はじめに

2009年現在、国際糖尿病連合の調査によると全世界の糖尿病患者数は2億8,500万人と報告されており、2006年の発表から3年で約4,000万人も増加しさらに増える可能性が強く指摘されている。わが国においても食や生活の欧米化に伴い糖尿病患者数は増加傾向にある。厚生労働省の国民健康・栄養調査によると糖尿病が強く疑われる人は890万人、可能性が否定できない人を合わせると2,210万人と推定されている。平成9年の調査では1,370万人であったので、10年間で1.5倍以上の患者数の増加があったことになる。

糖尿病は高血圧、脂質異常症とならぶ代表的な生活習慣病である。血糖値を低下させるホルモンであるインスリンの作用不全による疾病であり、その原因はインスリン生産細胞である膵臓β細胞数の減少による1型糖尿病と、過剰なエネルギー摂取や運動不足などが複合的に作用してインスリン標的組織においてインスリンが作用しないインスリン抵抗性を起こす2型糖尿病があり、後者の患者数の増加が大きな問題となっている。

糖尿病においては、血糖値の増加により誘発される合併症も問題となる。糖尿病性網膜症、

糖尿病性腎症(腎不全)および糖尿病性末梢神経障害(ニューロパチー)を三大合併症と呼ぶが、これらは失明や透析など患者の生活の質(QOL)を著しく低下させる。したがって、合併症を誘発しないように血糖値をコントロールすることが糖尿病の治療では重要である。これらの合併症の原因の一つとして、タンパク質の非酵素的糖化反応(グリケーション)がある。食品化学の分野で知られる還元糖とタンパク質やアミノ酸のアミノ基の間でおこる褐変反応であるMaillard反応が、生体内においても起こっていることを糖化ヘモグロビンの存在から示され、さらにその結果生成した蛍光物質の蓄積も糖尿病患者で増加することが1980年代に明らかにされた¹⁾。

グリケーションは大きく分けて前期、中期、後期段階があり(図1)、前期段階により生成した Schiff塩基が、中期段階でアマドリ転移生成物となる。さらにこれらから非可逆的に酸化、脱水、縮合、開裂などの反応を経て、褐色、蛍光、架橋形成などの特徴をもつグリケーション後期段階生成物(AGE)が生成し蓄積される。これらの一連の反応では活性酸素の発生とそれによる反応の進行が起こる。グリケーションを抑制する物質としてはアミノグアニジンが知られ

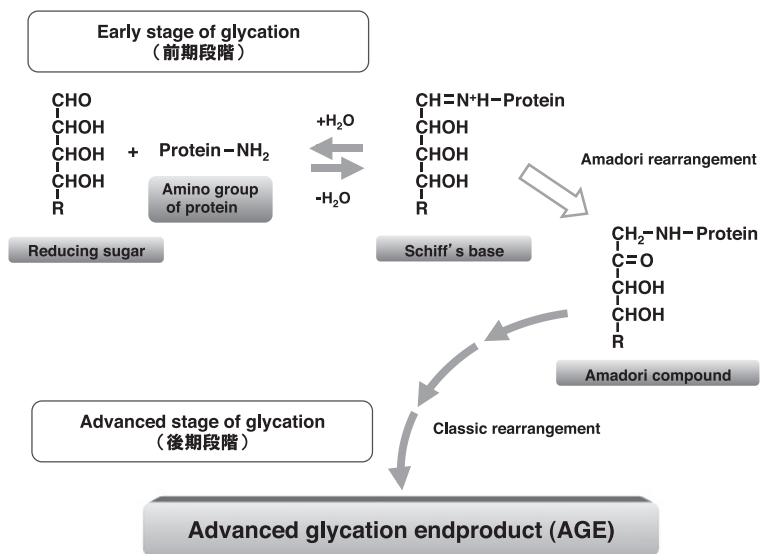


図1 グリケーションの概略

ているが、副作用のため臨床的には使用されていない。グリケーションに活性酸素がかかわることから、抗酸化物質によるグリケーションの抑制などが報告されている^{2,3)}。私たちは、ソバなどに多く含まれるルチンにグリケーション抑制活性があることを見いだした^{4,5)}。ポリフェノールは代表的な食事由来の抗酸化物質であることから、それらにグリケーションを抑制する作用がある可能性が考えられる。

ヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) は、一般的なブドウと異なり日本に自生する固有の種である。ヤマブドウ果実は種子が大きく、実と皮の分離も難しいことから生食よりも果汁などの加工食品として利用されてきた。全国ヤマブドウの生産量の60%は岩手県で生産されており、現在300t程度が生産されている。ヤマブドウ果汁は酸味が強いが、酒石酸とリンゴ酸が豊富に含まれるためである。また、ポリフェノールが2g/L程度含まれており、これはブドウ果汁に比べ数倍の含有量である。このようなことから、ヤマブドウ果汁は健康飲料として、あるいはワインとして利用されているが、全国的な

認知度は低いのが現状である。

私たちは、ヤマブドウ果汁の搾汁率が50-60%と低く、搾りかすが大量に廃棄されていることから、搾りかすをポリフェノール素材として利用できないか検討を行ってきた。興味深いことに、搾りかすから熱水でかなり高濃度のポリフェノールを抽出することができることが明らかになった⁶⁾。これはヤマブドウの搾りかすに含まれる種子や皮に果汁では抽出しきれなかったポリフェノールが多量に存在するためと考えられる。そこで本研究では、ヤマブドウ搾りかすの熱水抽出物の抗糖尿病作用について検討を行った。

1. 実験方法

ヤマブドウの果汁(葛巻高原食品加工株式会社)の製造で残る搾りかすに70~100℃の熱水を加え1時間抽出し、遠心分離上清をろ過したる液を凍結乾燥することにより得た。このヤマブドウ搾りかす抽出物のポリフェノール含量は、Folin-Denis法によりD-(+)-カテキンを標

準物質として求めた。

In vitro の AGE 生成抑制は、牛血清アルブミン (BSA) とフルクトースをインキュベーションして生成する AGE の生成阻害から評価した⁴⁾。BSA とフルクトースをそれぞれ 20 mg/mL, 500 mM となるように 200 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に溶解し、それにヤマブドウ搾りかす抽出物を 0.1 から 1 mg/mL になるように加えた。また、アミノグアニジン塩酸塩を 10 から 100 μ M になるように加えた。各試験物質を添加した BSA-フルクトース溶液を 37°C で 5 日間インキュベーションし、インキュベーション終了後、終濃度が 10% になるようにトリクロロ酢酸を加えてタンパク質を沈殿させて反応を停止した。遠心分離により得られた沈殿をリン酸カリウム緩衝液に溶解し、AGE 測定の試料とした。

AGE はウエスタンブロットにより解析した⁴⁾。試料のタンパク質濃度を測定した後に、10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離した。泳動終了後、ニトロセルロース膜に転写し、次いでスキムミルク懸濁液で一晩ブロッキング処理した。ブロッキング後ニトロセルロース膜を洗浄してから抗 AGE 抗体 (株式会社トランスジェニック, 熊本) と反応させた。洗浄後、抗マウス IgG 抗体と反応させ、ECL 試薬 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社, 東京) と反応させて X 線フィルムに感光させた。

In vivo の AGE 生成抑制効果は、ヤマブドウ搾りかす抽出物を摂取したストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットを用いて検討した⁵⁾。5 週齢の Wistar 系雄ラット (日本エスエルシー株式会社, 静岡) 22 匹を 3 群に分け、C 群と DC 群には AIN-93G 組成に基づいた 20% カゼイン飼料を給与し、DV 群には 20% カゼイン飼料にヤマブドウ搾りかす抽出物を 2.5% (ポリフェノールとして 0.2%) となるように添加した飼料を

給与した。飼料給与 5 日後に DC 群と DV 群のラットにはストレプトゾトシン (STZ) を体重 100 g 当たり 50 mg 尾静脈より投与した。STZ 投与 30 日後にラットをジエチルエーテルで麻酔してと殺し、血液、肝臓、腎臓を得た。

血糖値はグルコース CII-テストワコー (和光純薬株式会社, 大阪) を用いて測定した。肝臓、腎臓の AGE は、PBS でホモジナイズした組織を抗 AGE 抗体あるいは抗ペントシジン抗体 (株式会社トランスジェニック, 熊本) を用いた上記と同様のウエスタンブロットにより解析した。肝臓の 3-デオキシグルコソンは、肝臓の可溶性画分を 2,3-ジアミノナフタレン (株式会社同仁化学研究所) と反応させて生じた 3-デオキシグルコソンの蛍光誘導体を HPLC で分離、定量した⁷⁾。HPLC のカラムは LiChrosphere 100RP18e (4.6 x 250 mm) (Merck, Germany) を用い、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリル、メタノールのグラデーション溶出 (1 mL/min) を行い、励起波長 271 nm, 蛍光波長 503 nm で検出した。

2. 結果

凍結乾燥したヤマブドウ搾りかす抽出物のポリフェノール含量は 78 mg/g であった。架橋性の AGE では蛍光を発するので^{1,8)}、BSA とフルクトースをインキュベーションして生成した蛍光を測定したところ (励起波長 350 nm, 蛍光波長 425 nm)、ヤマブドウ搾りかす抽出物では 1 mg/mL の濃度で 50% 程度の蛍光の減少が認められたが、アミノグアニジンでは 1 mM 以上で蛍光の減少が認められた。しかし、この AGE の蛍光は非特異的なものであるため、特異性の高い抗 AGE 抗体を用いたウエスタンブロットで AGE の生成抑制を検討した。図 2 には 69 kDa の AGE のバンドを示した。アミノグアニジンは 100 μ M においても有意な AGE 生

成抑制効果は示さなかったが、ヤマブドウ搾りかす抽出物は0.1から1 mg/mLの濃度で濃度依存的にAGEの生成を抑制した。また、フルクトースとインキュベーションすると表れる150kDa以上のAGEのバンドにおいても同様の結果が得られた。以上から、ヤマブドウ搾りかす抽出物のポリフェノールをAGEの生成を抑制する可能性が強く示唆されたので、次に1型糖尿病モデルラットを用いた検討を行った。

ストレプトゾトシンは膵臓β細胞を破壊することでインスリンの分泌低下を招き、高血糖を

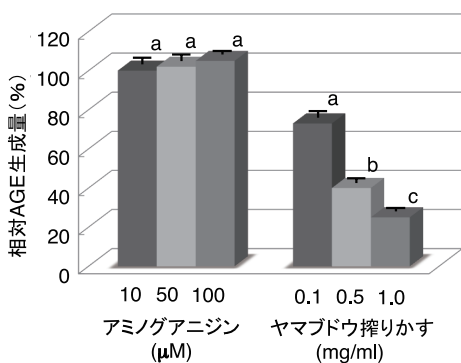


図2 ヤマブドウ搾りかす抽出物の *in vitro* におけるAGEの生成抑制

値は平均±標準誤差 異なる符号 $p > 0.05$

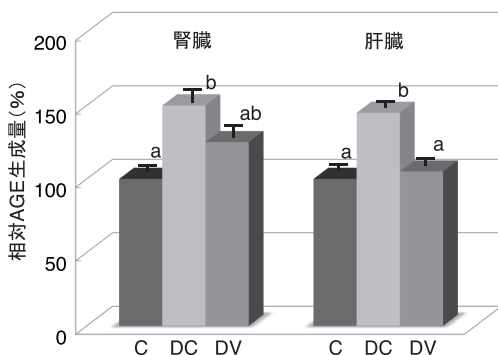


図3 ヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取による糖尿病ラットの腎臓と肝臓AGEの生成抑制

C: 健常ラット, DC: 糖尿病ラット, DV: ヤマブドウ搾りかす抽出物添加食摂取糖尿病ラット
値は平均±標準誤差 異なる符号 $p > 0.05$

誘発させる1型糖尿病モデルで使われる試薬である。飼育最終日の血糖値はC群が170 mg/dLであったのに対し、糖尿病を誘発させたDC群では430 mg/dLに上昇した。ヤマブドウ搾りかす抽出物を摂取させたDV群の血糖値は470 mg/dLであり、ヤマブドウ搾りかす抽出物の血糖値低下作用は認められなかった。

腎臓のAGEは70 kDaのバンドを定量化した(図3)。DC群で有意にC群に対して増加したが、ヤマブドウ搾りかす抽出物を摂取したDV群では有意な差ではないが低下傾向が示された。この他のAGEのバンドにおいても同様の結果であった(データは示していない)。肝臓のAGE(70 kDa)では、DC群で1.5倍程度の増加が認められたが、DV群ではC群のレベルまで低下した(図3)。肝臓においては、低分子のAGEにおいてより顕著にヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取によるAGE生成抑制作用が認められた(データは示していない)。本実験で用いた抗AGE抗体はAGEの一つである非架橋性のカルボキシメチルリジンを認識する。架橋性のAGEとしてペントシジンの生成もウエスタンブロットで検出したが、抗AGE抗体と同様にヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取によ

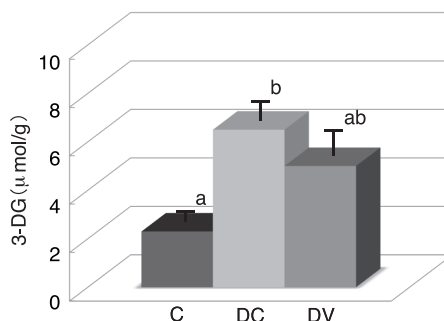


図4 ヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取による糖尿病ラット肝臓の3-デオキシグルコソン(3-DG)含量

C: 健常ラット, DC: 糖尿病ラット, DV: ヤマブドウ搾りかす抽出物添加食摂取糖尿病ラット
値は平均±標準誤差 異なる符号 $p > 0.05$

り糖尿病で増加した AGE の生成が抑制される傾向が示された。

肝臓の 3-デオキシグルコソソ濃度は糖尿病により 3 倍程度に増加したが、ヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取で低下する傾向が認められた (図 4)。

3. 考察

ヤマブドウにはリンゴ酸と酒石酸がブドウの 2~3 倍程度含まれているが、ポリフェノールも非常に多く含まれているという特徴がある⁶⁾。本実験では搾りかす抽出物を凍結乾燥したものを使用したが、およそ 8% 程度のポリフェノール含量であり、別の実験で測定したヤマブドウ果汁のポリフェノールの 3 倍程度の値であった。最近、ブドウ、柑橘類、ベリー類、リンゴなど多くの果実からポリフェノールが抽出され、その機能性が研究されている。ブドウにおいても果汁より搾りかすである種子から抽出されるポリフェノールの方が量は多く、高い機能性があることが示されている⁹⁾。ヤマブドウ搾りかすのポリフェノールもブドウ種子由来のポリフェノールと同等かそれ以上含まれている。ヤマブドウ搾りかす抽出物は濃い赤紫色をしており、アントシアニンが豊富に含まれるが、Sephadex LH-20 を用いたクロマトグラフィーによる検討から主成分はプロシアニジンであることが示唆されている⁶⁾。

グリケーションは還元糖とアミノ基の反応であるが、反応後期段階においては活性酸素との関係も深い^{2,3)}。我々は代表的なポリフェノールであるルチンの水溶性誘導体がグリケーションを *in vitro*, *in vivo* で抑制することを認めており^{4,5)}、ポリフェノールの摂取がグリケーション抑制をできる可能性が考えられた。BSA とフルクトースをインキュベーションする系で、AGE の生成をヤマブドウ搾りかす抽出物が抑

制できた。本実験からはその作用が抗酸化性に基づくかどうかは明確ではないが、少なくとも一部は抗酸化性によるものと考えられる。この阻害効果はアミノグアニジンより強かったが、アミノグアニジンは反応の後期段階に作用する可能性があり¹⁰⁾、単純に効果の比較は難しい。

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいてもヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取は肝臓や腎臓の AGE の生成を抑制したことから、*in vitro* の結果を合わせて考えるとヤマブドウ搾りかすのポリフェノールが AGE の蓄積を抑制した可能性が強く示唆される。一方、ヤマブドウ搾りかす抽出物は血糖値を低下させることはなかったので、アミラーゼやマルターゼなどの消化酵素の阻害や吸収阻害作用はないと考えられる。本実験はインスリンの分泌が著しく低下する 1 型糖尿病モデルで行っているため、インスリン抵抗性の改善作用は不明であり、今後 2 型モデルで検討する必要があるだろう。ルチンの AGE 生成抑制作用においては、前期段階 (アマドリ転移生成物) 阻害よりも後期段階に作用するので⁴⁾、ヤマブドウ搾りかすのポリフェノールも、*in vivo* においてはおそらくグリケーション後期段階の反応に作用するものと考えられる。

AGE は還元糖だけではなく、むしろ非常に反応性の高いグリオキザール、メチルグリオキザールおよび 3-デオキシグルコソソのような α -ジカルボニル化合物からの生成が多いと考えられている^{2,11)}。これらの物質は通常の代謝でも生成するが、糖尿病により亢進するポリオール経路で生成するフルクトースから容易に作られる¹²⁾。本実験において肝臓の 3-デオキシグルコソソ含量を測定したところ、糖尿病で顕著に増加し、ヤマブドウ搾りかすの摂取で低下傾向が認められたことから、ヤマブドウ搾りかすポリフェノールが α -ジカルボニル化合物の生成を阻害したことが考えられる。ポリオー

ル経路の律速段階はアルドース還元酵素であり、最近いくつかのフラボノイドにアルドース還元酵素の阻害活性が見いだされている¹³⁾。したがって、ヤマブドウ搾りかすポリフェノールも糖尿病により活性が増加したアルドース還元酵素を阻害することで α -ジカルボニル化合物の生成が減少し、AGEの蓄積が低下した可能性も示唆された。

以上より、ヤマブドウ搾りかす抽出物は抗酸化のおよび α -ジカルボニル化合物生成抑制

を通じて高血糖により増加したAGEの生成を減少させることが示された。さらに長期の摂取で糖尿病合併症の発症を抑制することが考えられ、糖尿病の進展に対して効果的な素材であると考えられる。現在、我々は農林水産省の「新たな農林水産政策を推進する実用化技術開発事業」によりヤマブドウ搾りかすからポリフェノール含量の高い素材（エヴィノール：ヤエガキ醗酵技研株式会社）を開発し、その作用を検討している。

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

- 1) Monnier, V. M., Kohn, R. R., and Cerami, A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 583-587, 1984.
- 2) Giacco, F, Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **107**: 1058-1070, 2010.
- 3) Singh, R. Barden, A., Mori, T. *et al.* Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**: 129-146, 2001.
- 4) Nagasawa, T., Tabata, N, Ito, Y. *et al.* Inhibition of glycation reaction in tissue proein incubations by water soluble rutin derivative. *Mol. Cell. Biochem.* **249**: 3-10, 2003.
- 5) Nagasawa, T., Tabata, N, Ito, Y. *et al.* Dietary G-rutin suppresses glycation in tissue proteins of streptozotoin-induced diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* **252**: 141-147, 2003.
- 6) 長澤孝志, 小浜恵子, 山下和彦: ヤマブドウ機能性成分の新規抽出法による食品素材の開発, 食品工業, **51**(12): 20-25, 2008.
- 7) Yamada, H, Miyata, S., Igaki, N. *et al.* Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific *in vivo* determination of intermediate in advanced Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **269**: 20275-20280, 1994.
- 8) Birlouez-Aragon, I., Pischetsrieder, M., Leclere, J. *et al.* Assessment of protein glycation markers in infant formulas. *Food Chem.* **87**: 253-259, 2004.
- 9) Leifert, W. R. and Abeywardena, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr. Res.* **28**: 729-737, 2008.
- 10) Thornalley, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **419**: 31-40, 2003.
- 11) Ramasamy, R., Yan, S. F. and Schmidt, A. M. Methylglyoxal comes of AGE. *Cell* **124**: 258-260, 2006.
- 12) Schalkwijk, C. G., Stehouwer, C. D. and Hinsbergh, V. W. Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev* **20**: 369-82, 2004
- 13) Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchida, I. *et al.* Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. *Chem. Pharm. Bull.* **50**: 788-795, 2002.