

南瓜に含まれる高血圧・糖尿病  
改善機能物質の探索とその作用解析

2009. 9

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻  
(山形大学)  
吉成 織恵

# 目次

略語一覧 .....	1
第 1 章 序説 .....	4
1.1 本研究の背景	
1.2 本研究の目的	
1.3 南瓜成分の既往の研究	
1.4 論文構成	
第 2 章 野菜の ACE 阻害活性測定 .....	9
2.1 緒言	
2.2 実験方法	
2.3 結果・考察	
第 3 章 南瓜の血圧降下作用検討	
第 1 節 単回投与の効果検討 .....	12
3.1.1 緒言	
3.1.2 実験方法	
3.1.3 結果・考察	
第 2 節 症状別 SHR における効果の比較検討 .....	15
3.2.1 緒言	
3.2.2 実験方法	
3.2.3 結果・考察	
第 3 節 連続投与での効果検討 .....	18
3.3.1 緒言	
3.3.2 実験方法	
3.3.3 結果	
3.3.4 考察	

第 4 章 南瓜からの血圧降下作用物質の同定 .....	25
4.1 緒言	
4.2 実験方法	
4.3 結果	
4.4 考察	
第 5 章 南瓜の抗糖尿病効果 .....	29
5.1 緒言	
5.2 実験方法	
5.3 結果	
5.4 考察	
第 6 章 南瓜からの抗糖尿病物質の探索・同定 .....	40
6.1 緒言	
6.2 実験方法	
6.3 結果・考察	
第 7 章 ニコチン酸とトリゴネリンの抗糖尿病効果検討	
第 1 節 非糖尿病ラットによる検討 .....	47
7.1.1 緒言	
7.1.2 実験方法	
7.1.3 結果	
7.1.4 考察	
第 2 節 非肥満 2 型糖尿病モデル(GK)ラットによる検討 .....	58
7.2.1 緒言	
7.2.2 実験方法	
7.2.3 結果	
7.2.4 考察	

第 3 節 肥満 2 型糖尿病モデル(KK- <i>A<sup>y</sup></i> )マウスによる検討 .....	81
7.3.1 緒言	
7.3.2 実験方法	
7.3.3 結果	
7.3.4 考察	
第 8 章 ピログルタミン酸の抗糖尿病効果検討	
第 1 節 非糖尿病ラットによる検討 .....	100
8.1.1 緒言	
8.1.2 実験方法	
8.1.3 結果	
8.1.4 考察	
第 2 節 非肥満 2 型糖尿病モデル(GK)ラットによる検討 .....	105
8.2.1 緒言	
8.2.2 実験方法	
8.2.3 結果	
8.2.4 考察	
第 3 節 肥満 2 型糖尿病モデル(KK- <i>A<sup>y</sup></i> )マウスによる検討 .....	117
8.3.1 緒言	
8.3.2 実験方法	
8.3.3 結果	
8.3.4 考察	
第 9 章 総括 .....	127
参考文献 .....	128
謝辞 .....	143

## 略語一覧

本論文で用いた略語を以下にまとめた。

ACE	angiotensin I-converting enzyme (アンギオテンシン I 変換酵素)
Acly	gene symbol of ATP citrate lyase (ATP シトレートリアーゼの遺伝子シンボル)
AGEs	advanced glycation endproducts (糖化最終産物)
Akt	protein kinase B (プロテインキナーゼ B)
ALT	alanine amino transferase (アラニンアミノトランスフェラーゼ)
Angptl4	gene symbol of angiopoietin-like 4 (アンジオポエチン様タンパク質 4 の遺伝子シンボル)
AST	aspartate amino transferase (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)
AUC	area under the curve (曲線下面積)
CAT	catalase (カタラーゼ)
CPT	carnitine palmitoyl transferase (カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ)
Cyp7a1	gene symbol of cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 (シトクローム P450, ファミリー7, サブユニット a, ポリペプチド 1 の遺伝子シンボル)
Cyp17a1	gene symbol of cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1 (シトクローム P450, ファミリー17, サブユニット a, ポリペプチド 1 の遺伝子シンボル)
Cyp51	gene symbol of cytochrome P450, subfamily 51 (シトクローム P450, サブファミリー51 の遺伝子シンボル)
DBP	diastolic blood pressure (拡張期血圧)
DEPC	diethyl pyrocarbonate (ジエチルピロカーボネート)
dNTP	2'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate (デオキシヌクレオシド 3 リン酸)
DTNB	dithio bis -2- nitorobenzoic acid (2-ニトロ安息香酸)
DTT	dithiothreitol (ジチオトレイトール)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
ENaC	epithelial Na <sup>+</sup> channel (上皮型ナトリウムチャンネル)
FAS	fatty acid synthase (脂肪酸合成酵素)
FAB/MS	fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (高速原子衝撃質量分析装置)

Fdft1	gene symbol of farnesyl disphosphate farnesyl transferase 1 (ファルネシル 2 リン酸ファルネシルトランスフェラーゼ 1 の遺伝子シンボル)
FFA	free fatty acid (遊離脂肪酸)
Foxo1	gene symbol of forkhead box o1 (フォークヘッド転写因子の遺伝子シンボル)
Gck	gene symbol of glucokinase (グルコキナーゼの遺伝子シンボル)
GK rat	Goto-Kakizaki rat (後藤-柿崎ラット)
GLK	glucokinase (グルコキナーゼ)
GLUT4	glucose transporter 4 (グルコース輸送担体 4 型)
G6Pase	glucose-6-phosphatase (グルコース-6-フォスファターゼ)
G6pc	gene symbol of glucose-6-phosphatase (グルコース-6-フォスフェートデヒドロ ゲナーゼの遺伝子シンボル)
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase (グルコース-6-フォスフェートデヒドロ ゲナーゼ)
GPDH	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (グリセロール 3 フォスフェートデヒドロ ゲナーゼ)
GPx	glutathione peroxidase (グルタチオンペルオキシダーゼ)
GSH	reduced glutathione (還元型グルタチオン)
GSSG	oxide glutathione (酸化型グルタチオン)
HbA <sub>1c</sub>	hemoglobin A <sub>1c</sub> (ヘモグロビン A <sub>1c</sub> )
HEPES	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid (4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジンエタン sulfon 酸)
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol (高密度リポタンパクコレステロール)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hydrogen peroxide (過酸化水素)
HPLC	high Performance Liquid Chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
Hnf4 $\alpha$	hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ (肝細胞核因子 4 $\alpha$ の遺伝子シンボル)
HSL	hormone sensitive lipase (ホルモン感受性リパーゼ)
LC/MS	liquid chromatography electrospray ionization / mass spectrometric (液体ク ロマトグラフ質量分析装置)
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol (低密度リポタンパクコレステロール)
LPL	lipoprotein lipase (リポ蛋白質リパーゼ)

MeCN	acetonitrile (アセトニトリル)
MeOH	methanol (メタノール)
NA	nicotinic acid (ニコチン酸)
NMR	nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)
OGTT	oral glucose tolerance test (経口グルコース耐性試験)
8-OHdG	8-hydroxydeoxyguanosine (8-ヒドロオキシグアノシン)
P	pyroglutamic acid (ピログルタミン酸)
Pdk4	gene symbol of pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 4 (ピルベートデヒドロゲナーゼキナーゼアイソザイム 4 の遺伝子シンボル)
Pfkfb1	gene symbol of 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-biphosphatase (6-フォスフォフルクト-2-キナーゼ/フルクトース-2,6-ピフォスファターゼの遺伝子シンボル)
6PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase (6-フォスフォグルコネートデヒドロゲナーゼ)
PL	phospholipid (リン脂質)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase (ホスホイノシチド 3-キナーゼ)
PI (3,4,5)P3	phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate (フォスファチジルイノシトール (3,4,5) 3 リン酸)
Pten	phosphatase and tensin homolog (フォスファターゼとテンシンの相同蛋白の遺伝子シンボル)
SBP	systolic blood pressure (収縮期血圧)
SHR	spontaneously hypertensive rat (高血圧自然発症ラット)
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances (チオバルビツール酸反応物)
T-Chol	total cholesterol (総コレステロール)
TG	triglyceride (トリグリセリド)
TFA	trifluoroacetic acid (トリフルオロ酢酸)
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$ (腫瘍壊死因子 $\alpha$ )
TRG	trigonelline (トリゴネリン)

## 第1章 序説

### 1.1 本研究の背景

厚生労働省から発表された「平成18年 国民健康・栄養調査の概要」によると、「高血圧症有病者」は約3970万人、「正常高値血圧者」は約1520万人で、合計すると約5490万人であり、生活習慣病のなかでは最も頻度の高い病気である。一方で、高血圧は脳血管障害や冠動脈疾患など重要な心血管疾患の最も強く重要な危険因子となり、2008年4月より開始された特定健診・特定保健指導の基本コンセプトであるメタボリックシンドロームの構成因子としても高血圧は重要な構成基礎疾患となっている。このように、わが国において高血圧は、心血管疾患の直接的な原因基礎疾患として重要であり、加えて糖尿病、慢性腎臓病など代謝性疾患とも密接な関連を有して、間接的にも心血管疾患発症に与っている。高血圧は、まさに生活習慣病の中心として、その管理がわが国において大きな課題である。それにも関わらず、40~74歳での「高血圧症有病者」の中で薬物療法を受けている人は半数弱と報告され、たかが高血圧と侮られがちであるが、血圧を適正値にすることで合併症は抑える事ができる。

また糖尿病も年々増加している。下表は平成19年度 国民健康・栄養調査結果の概要をまとめた一部である。

	平成9年	平成14年	平成19年
「糖尿病が強く疑われる人」	約690万人	約740万人	約890万人
「糖尿病の可能性が否定できない人」	約680万人	約880万人	約1320万人
「糖尿病が強く疑われる人」と「糖尿病の可能性が否定できない人」	約1370万人	約1620万人	約2210万人

(平成19年国民健康・栄養調査結果の概要より)

平成19年度では、糖尿病が強く疑われる人は約890万人、可能性が否定できない人を合わせると約2,210万人と推計されている。一方10年前の平成9年度の調査では糖尿

病が強く疑われた人が約 690 万人、可能性を否定できない人と合わせると約 1370 万人であったことを考えると、10 年前よりも確実に増加している。

こうした背景でいかに健康に生活の質を保ちながら生き抜くか、それが今後のテーマとなりえるだろう。医食同源とは中国の『体によい食材を日常的に食べて健康を保てば、特に薬など必要としない』という薬食同源の考えをもとにした言葉である。日常の食事で忍び寄る病を予防もしくは改善することが出来れば、テーマに沿えるのではないだろうか。

## 1.2 本研究の目的

本研究での目的は 2 つある。ひとつは、身近な野菜の中からアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性が高いものをスクリーニングする事である。背景でも述べたように高血圧患者は生活習慣病の中でも占める割合が高いため、ACE の働きを阻害するような成分を含む食品素材の日常における摂取は高血圧症患者の減少、ひいては生活習慣病の予防に有効であると期待できる。

スクリーニングの結果、南瓜に高い ACE 阻害活性が確認されたので、さらに南瓜について他の機能性を探索する目的で抗糖尿病効果に注目して検討を行った。

## 1.3 南瓜成分の既往の研究

今回実験に用いた南瓜は、高血圧を抑制する ACE 阻害活性を測定したところ、高い阻害率を示した事から実験テーマとしたものである。

南瓜の食の歴史は古く、天文 10 年 (1541 年) に大分に漂着したポルトガル船が、大名の大友宗麟にカンボジア産の南瓜を贈ったのが日本での最初とされている。南瓜はウリ科であり、甘味が少なく繊維の多い日本かぼちゃと、甘味が強くほくほくした西洋かぼちゃの 2 種があり、野菜の中では、もっともデンプンに富んでいるために、カロリー源として利用されることもある。このデンプン含量が南瓜の風味と密接な関係があり、デンプン含量が多いものほど品質がよいといわれている (1)。成分としては、βカロテ

ンが多く含まれる (700~3900 mg/可食部 100 g) 他、Ca (15~20 mg/100 g) 、Mg (15~25 mg/100 g) 、 K (400~450 mg/100 g) が多いのも特徴である(2) 。また冬至に南瓜を食べる習慣は日本各地で伝承されていて、冬至に食べると中風にかからないとの俗信があるが、定かではない。

南瓜の代表的成分としてのβカロテンは、抗酸化作用や癌の予防効果を有することが報告されている (3-5) 。βカロテンを多く摂取する国では肺、結腸、前立腺、子宮頸部、乳癌などの罹患率が低いとされている (6) 。また高血圧において報告があるγ-アミノ酪酸(GABA) も南瓜に含まれているが (7) 、この血圧降下作用は、末梢の交感神経系の亢進の抑制によるものと推察されている (8) 。1型糖尿病において南瓜中のタンパク結合ポリサッカライドは血清インスリンレベルを上げるという報告 (9) や pumpkin-seed oil が血圧降下作用 (10) 、脂質低下作用 (11) を有するという報告もある。しかし、2型糖尿病における効果については報告がみられない。

本研究の目的のひとつは高い ACE 阻害活性を有する野菜を見出すことであるが、南瓜の ACE 阻害活性についてはこれまでに著者らの報告以外見られない。南瓜から ACE 阻害物質を探索したところ、効果成分としてニコチアミンが単離・同定された。本物質はすでにモロヘイヤや明日葉、大豆、ハヤトウリからも血圧降下作用物質として単離同定されている (12-16) 。

またニコチン酸やトリゴネリン、そしてピログルタミン酸の抗糖尿病作用について、詳細な報告はない。ニコチン酸は抗高脂血症薬として臨床でも使用されているが、その作用機序にまだ不明な点が多い。現在のところニコチン酸には肝臓でのコレステロール合成の抑制や中性脂肪の分解の促進作用が機構のひとつとして考えられている (17,18) 。またこれらの効果は低密度リポタンパクコレステロール値を上昇させ (19) 、高脂血症の予防に有効であり、長期投与ではインスリン感受性に保つとの報告もある (20) 。一方、トリゴネリンは認知機能改善作用 (21,22) や抗癌作用 (23) のあること等が報告されている。トリゴネリンについてはコーヒーにも含まれているが、2008 年に糖尿病マウスの聴覚性神経障害をコーヒーが改善し、その有効成分がトリゴネリンで

ある可能性が報告された (24) 。しかし作用機序も含め明確にトリゴネリンの抗糖尿病効果の検討はされていない。ニコチン酸とトリゴネリンは構造が類似しており、メチル基とプラス荷電を有する点で異なっている。コーヒーでは焙煎によりトリゴネリンの一部がニコチン酸へと変化することが知られているが (25) 、インスタントコーヒー2 g には、トリゴネリン 5~15 mg、ニコチン酸が 0.2~1.2 mg 含まれているとの報告もある (26) 。一方、人体ではニコチン酸は体内で主に N1-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (NMPC) と N1-メチルニコチンアミドに変換され排泄されるが、一部はトリゴネリンに変換されると報告されている (27-30) 。湯山らはヒト及びラットにおける NMPC の排泄量とトリゴネリンの体内動態について検討し、普通食でもトリゴネリンが尿中に排泄されること、またニコチン酸、トリゴネリンを投与すると NMPC、トリゴネリンの排泄量が増加することを報告した (30-32) 。これらのことから、ニコチン酸とトリゴネリンのどちらがより効力を持つのか大変興味のあるところである。しかし効力の違いを示したデータは少なく、*in vitro* における水酸ラジカル (OH $\cdot$ ) 、一酸化窒素ラジカル (NO $\cdot$ ) 、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルラジカル (DPPH $\cdot$ ) に対するラジカル消去能の比較では、トリゴネリンがニコチン酸よりも低い結果が得られている (33) 。

ピログルタミン酸はグルタミン酸のカルボキシル基とアミノ基が分子内縮合反応を起こして、ラクタム (カルボキシル基とアミノ基が分子内において脱水縮合し、環を形成した化合物の総称) 構造のアミノ酸である。このアミノ酸は、様々なタンパク質で見られており、現在知られている機能性としては、神経障害防止 (34) 、抗腫瘍、抗転移作用 (35) が挙げられている。しかしながらその糖尿病改善作用や脂質代謝への影響に関する報告はなされていない。

このようなこれまでの報告や本研究において明らかにされた南瓜成分に関わる研究から、南瓜の血圧上昇抑制作用、糖尿病の亢進制御作用、さらにはこれらに関わる成分の同定と作用機序の解明は生活習慣病の予防に寄与する点が大きいと考え、1.4 で述べる一連の研究を行った。

#### 1.4 論文構成

本論文は以下の9章から構成され、論が展開されている。

第1章「序説」では、本研究を行うに至った背景、既往の研究、目的および論文構成について記述した。

第2章「野菜のACE阻害活性測定」では普段食卓にのぼる身近な野菜の中から高血圧の上昇抑制に有効なものを見出すことを目的とし、それら *in vitro* におけるACE阻害活性を測定した。

第3章「南瓜の高血圧降下作用検討」では第2章で高いACE阻害活性を持つことが明らかになった南瓜濃縮物について、その単回投与が高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧に及ぼす影響、および症例別に分けた場合の影響の違いについて検討した。さらには連続投与が血圧に及ぼす影響について、血清脂質レベルへの影響も合わせてSHRを用いて検討した。

第4章は南瓜から血圧降下作用物質の探索・単離・同定を行った。

第5章では南瓜濃縮物の糖尿病の亢進に対する抑制作用の有無について、非肥満糖尿病モデル、Goto-Kakizaki (GK) ラットを用いて検討した。

第6章は南瓜から糖尿病の亢進に対する抑制物質 (抗糖尿病作用物質) の探索・単離・同定を行った。

第7章では第6章で単離・同定されたニコチン酸 (NA)、トリゴネリン (TRG) について糖尿病の亢進抑制作用 (抗糖尿病効果) を非糖尿病ラットや非肥満2型糖尿病モデルとしてのGKラット、また肥満糖尿病モデルであるKK-*A<sup>y</sup>*マウスを用いて検討を行った。

第8章では南瓜に見出されたピログルタミン酸 (P) の抗糖尿病効果とその作用機構について第7章と同様にWistarラット、GKラット、KK-*A<sup>y</sup>*マウスを用いて検討した。

第9章「総括」では、本論文の内容を総括して考察を加えた。

## 第2章 野菜の ACE 阻害活性測定

### 2.1 緒言

ACE は、レニン-アンジオテンシン系において不活性なアンジオテンシン I の C 末端側の His-Leu を切断し、血管収縮などの強い血圧上昇作用を有するアンジオテンシン II を生じさせ、また同時にカリクレイン-キニン系においては強い血管拡張作用を有するブラジキニンを分解に関わる昇圧系酵素である (参照 Fig.2-1-1) 。この ACE の働きを阻害することにより高血圧を防ぐ事が期待できる。

そこで日常摂取する機会の多い野菜の中から、まずは高い ACE 阻害活性を有する野菜のスクリーニングを行った。ACE 阻害活性をもつ臨床薬であるラミプリルやカプトプリルは副作用として空咳が挙げられる (36,37) 。ACE 阻害活性を有し高血圧降下作用を示す食品は多く報告がされているが (38-41) 、この活性の高い野菜を摂取することは高血圧の予防のみならず、副作用を回避する上でも効果的と考えられる。

### 2.2 実験方法

アスパラガス、ナス、セロリ、トマト、ニラ、南瓜は市販品を使用した。可食部 50 g に蒸留水 200 g を添加してホモジナイズし、遠心分離 (900 × g, 30 min, 室温) 後の上清を測定サンプルとした。ポジティブコントロールとして ACE 阻害医薬品であるカプトプリル (50 nM) を使用した。

ACE 阻害活性は Cushman&Cheung (42) の変法で測定した。測定サンプル 15  $\mu$ l に 125 mM ホウ酸バッファー (pH 8.3, 608 mM NaCl 含む) に溶かした基質 (7.6 mM Hippuryl-L-histidyl-L-leucine) 125  $\mu$ l を加え、5 分間 37°C で加温した。次いでホウ酸バッファーに溶解した 60 mM の ACE 溶液 50  $\mu$ l を添加し、37°C で 30 分インキュベートした。反応は 1N HCl 125  $\mu$ l を加えて停止し、その後酢酸エチル 750  $\mu$ l を加え生成した馬尿酸を振とう抽出した。遠心分離 (900 × g, 10 min, 15°C) で上清の酢酸エチル層を 250  $\mu$ l 採取し、完全に乾固した後、蒸留水 1 ml 加えて攪拌して馬尿酸を溶解

し、228 nm で吸光度 (UV-1200 SHIMADSU) を測定した。測定サンプルに 228 nm の吸収を示す化合物が含まれる場合のあることを考慮し、予め反応停止液の HCl を添加して同様に処理し得られた測定値をブランクとした。

阻害率は 3 回測定して得られる値の平均±SEM として示した。

### 2.3 結果・考察

高血圧を食品、なかでも日常摂取しやすい野菜の摂取によって改善することを目的として、身近な野菜の *in vitro* における ACE 阻害活性について検討を行った。

可食部 50 g についてみると、アスパラガスと南瓜に 89.03%、83.07% と高い ACE 阻害活性がある事が分かった (Fig.2-1-2)。アスパラガスは南瓜よりわずかに高活性であったが、50 g の摂取を考えるとより南瓜の方が容易と考え、本研究では特に南瓜に注目し、その高血圧作用 (降下作用) について検討を進めた。

## Renin-Angiotensin System

## Kinin - Kallikrein System

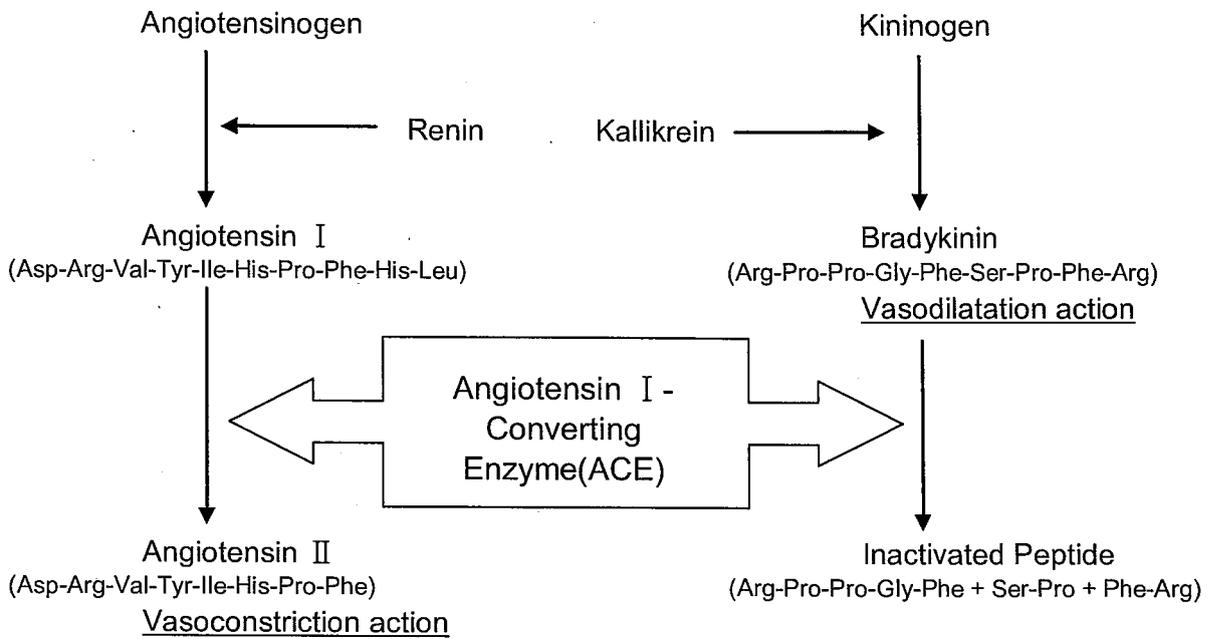


Fig.2-1-1 Action mechanism of the angiotensin I converting enzyme.

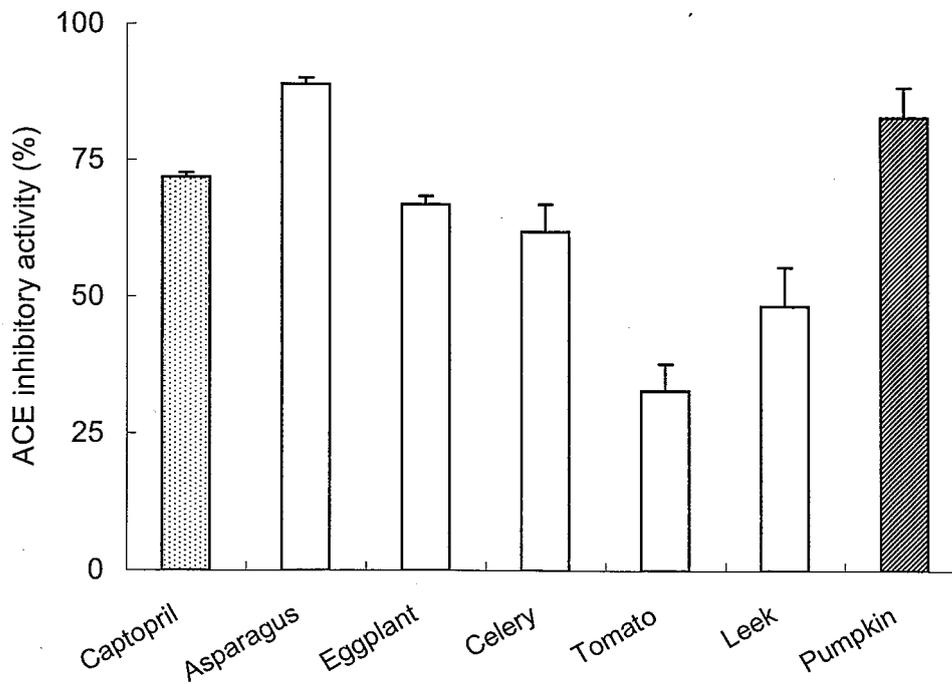


Fig.2-1-2 ACE inhibitory activities of vegetables.

## 第3章 南瓜の高血圧降下作用検討

### 第1節 単回投与の検討

#### 3.1.1 緒言

第2章において南瓜が他の野菜よりも高いACE阻害活性を示したので、本章では動物における高血圧降下作用の有無について検討した。

#### 3.1.2 実験方法

サンプルは株式会社 龍泉堂から提供された南瓜濃縮物を使用した。皮、種子、ワタを除いた南瓜可食部に2倍量の水を加え、マスコロイダー(回転石臼)でペースト状にした後、スクリュウデカンターで搾った。搾汁液を99℃、10分間加熱処理を行い、減圧下加熱にて濃縮し150メッシュのストレーナーでろ過したものを南瓜濃縮物とした。南瓜600g(brix 6%)から濃縮物100g(brix 36%)が得られた。南瓜濃縮物の成分は100g中、水分33g、タンパク質12g、脂質0.6g、炭水化物50.2g、灰分4.2gであった。

本態性高血圧モデルとしてのSHR/Izm(日本SLC 9週令オス 体重220-250g)15匹を用いて南瓜濃縮物の単回投与実験を行った。飼育環境は室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  湿度40~60% 明暗周期12時間(明期6:00-18:00)とし、個別ワイヤーケージで飼育を行った。水は自由摂取とした。ラットは収縮期血圧(SBP)の平均が等しくなるように4群に分けた。南瓜濃縮物0、6.25、12.5、25.0mg(0.5%カルボニルメチルセルロース(CMC)1mlに溶解)を経口投与した(0mg投与群はn=3、他濃度群はn=4)。血圧は、10時間の絶食後、投与直前(0h)と投与後2、4、6、8時間に測定をした。

血圧測定には株式会社ソフトロン社製の非観血式自動血圧測定装置BP-98Aを用い、Tail cuff法により行った。ラットは血圧測定前に37℃で約10分間の予備保温し、血圧は連続して3回測定した。測定値は3回の平均値として示し、統計処理には一元配置分散分析(ANOVA)を用い、有意水準は $p<0.05$ とした。

### 3.1.3 結果・考察

第2章でのスクリーニングにおいて、高いACE阻害活性を示した南瓜の *in vivo* における血圧降下作用を検討するため、4つの濃度に調製したサンプルの単回投与を行いその効果を検討した。

その結果、南瓜濃縮物を投与しなかった群 (0 mg) において CMC 投与後大きな変動がみられなかったが、6.25 mg、12.5 mg、25 mg 群では投与2時間後に有意に低下し、4時間後では6.25 mg 群が低下傾向、12.5 mg、25 mg 群が有意な低下を示した。6、8時間後には群間に差は見られなかった (Fig. 3-1)。また拡張期血圧においても同じように濃度依存的に血圧の低下が見られた。

南瓜にはカリウム (K) が豊富に含まれており、K のナトリウム (Na) 再吸収抑制による尿中への Na 排泄増加で血圧降下作用が得られた可能性がある。しかし K の摂取量増加に伴う血圧降下については多くの臨床研究において報告されているが、食品のみからではかなり大量の K を摂取しなければならないこと、また血圧降下の程度が低いことから (43)、本章で用いた量では降圧効果が K による可能性は小さいと考えられた。

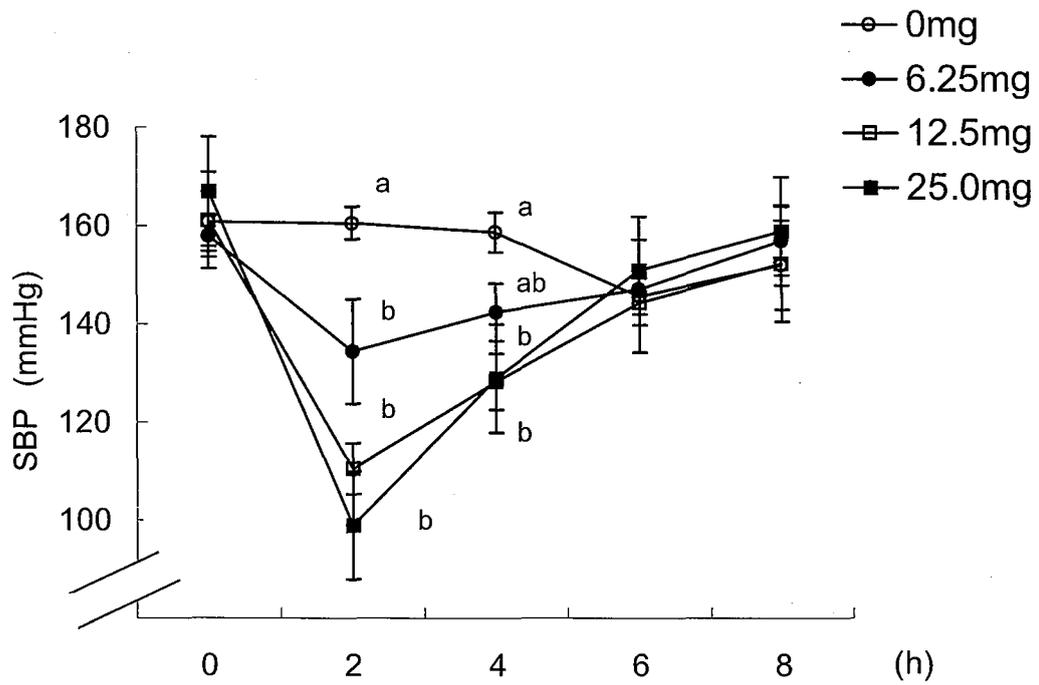


Fig.3-1 Changes in systolic blood pressure after oral administration of pumpkin paste concentrate. Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

## 第3章 第2節 症状別 SHR における効果の比較検討

### 3.2.1 緒言

本章第1節により南瓜濃縮物が血圧を下げること、また効果は濃度依存的であることが明らかにされた。そこで本節では使用実験動物を SBP の高低に基づいて分け、使用する動物の血圧と血圧降下作用との関連について検討した。

ヒトでは、SBP が 140 mmHg 以上、拡張期血圧 (DBP) が 90 mmHg 以上は高血圧とされている。さらに高血圧の中でも SBP を 3 段階に分け、140~159 mmHg の軽症高血圧、160~179 mmHg の中等症高血圧、180 mmHg 以上の重症高血圧としている。本節でもこの分類を採用し、SHR を絶食時 SBP に基づいて 4 段階に分け、それぞれにおいて南瓜濃縮物の血圧降下作用の効果について検討した。

### 3.2.2 実験方法

SHR/Izm (9 週令オス 体重 220~250 g) 15 匹を用いて南瓜濃縮物の症状別に対する効果の違いを単回投与によって検討した。ラットの飼育環境と血圧測定法は 3.1.2 と同様に行った。投与サンプルは、南瓜濃縮物 12.5 mg を 0.5%CMC 1 ml に懸濁して調製した。動物は、10 時間絶食後測定した SBP をもとに 4 群 (正常域 (~139 mmHg) (n=3)、軽症域 (140~159) (n=4)、中等症域 (160~179) (n=4)、重症域 (180~) (n=4)) に分けて使用した。サンプルの経口投与後 2、4、6 時間に血圧を測定した。

各群における投与前 (0 時間) と投与 2、4 あるいは 6 時間との差の比較は t 検定によって行い、同経過時間における群間の有意性は一元配置分散分析 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher'sPLSD 法を用いて検討した。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 3.2.3 結果・考察

前節にて、南瓜濃縮物が *in vivo* において血圧降下作用を有することが明らかとなった。本節では 10 時間絶食後ラットの SBP を測定し、その値に基づいて正常域、軽症域、

中等症域、重症域の 4 群に分け、それぞれの群に南瓜濃縮物の単回投与を行い、高血圧症状と効果との関連について検討を行った。

症状別に分けると、投与前に血圧が正常域にある群では経過時間による血圧の大きな違いは見られなかった。軽症域 群においては 2 時間後に低下が見られたが、統計的な差はみられなかった。中等症域 群と重症域 群においては投与前に比べると、中等症域 群では 2 時間後、重症域 群では 4 時間後に有意な低下が見られた (Fig.3-2-A)。投与直前 (0 時間) を 0 mmHg とした時の群間での差をみると、2 時間後に正常域 群に比して軽症域 群、中等症域 群、重症域 群が有意な低下を示し、4 時間後においては中等症域 群、重症域 群が有意な低下を示した (Fig.3-2-B)。尚、正常域 群では血圧の低下が見られず、絶食時の SBP が高血圧であるほど、顕著な降下作用が観察された。

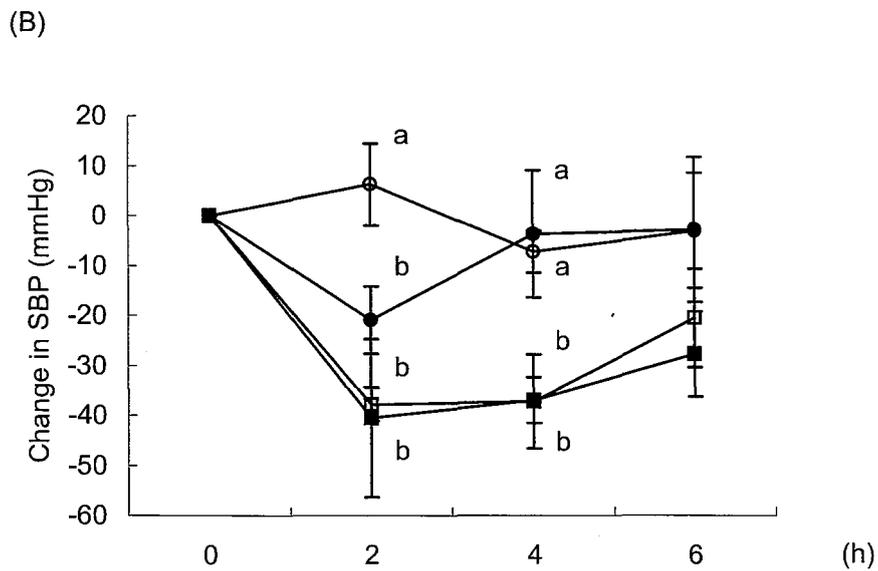
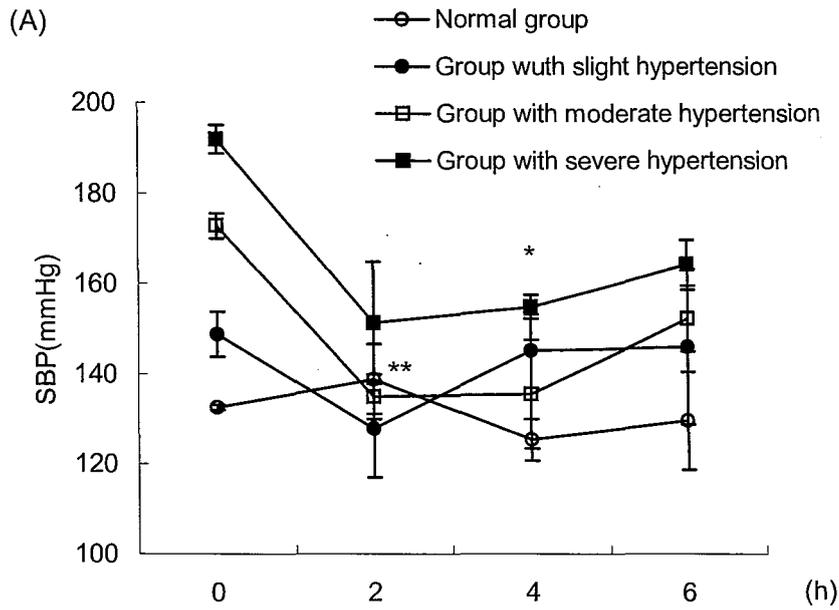


Fig.3-2 Changes in systolic blood pressure (SBP) after oral administration of pumpkin paste concentrate in SHR groups with different SBP.  
 (A) Relationship between SBP of SHR and SBP-depressing effects of pumpkin. Normal group (n=3) ; in SHR with SBP less than 139mmHg. Group with slight hypertension (n=4) ; in SHR with 140~159mmHg of SBP. Group with moderate hypertension (n=4) ; in SHR with 160~179mmHg of SBP. Group with severe hypertension (n=4) ; in SHR with SBP higher than 180mmHg. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. value before the dosage (0h) of same group.  
 (B) Blood pressure expressed as differences between SBP at 0h and that at 2, 4 or 6h. Value without a common letter at the same time differ significantly (p<0.05).

### 第3章 第3節 連続投与の効果

#### 3.3.1 緒言

本章第1、2節の単回投与実験で、南瓜濃縮物が高血圧ラットの血圧降下作用を有するのが明らかになった。そこで本節では、1週間飼育し、連続投与が血圧に及ぼす影響とその作用機構について検討を行った。

#### 3.3.2 実験方法

食餌は南瓜濃縮物を凍結乾燥したものをを用いた。濃縮物 100 g から 37.5 g の乾燥物を得た。

動物は SHR/Izm (10 週令オス 体重 250-280 g) を用い、飼育環境は 3.1.2 と同様にした。ラットは 5 匹ずつ CON 群、+NaCl 群、+NaCl+Pumpkin 群の 3 群に分け、7 日間飼育を行った。食餌組成は Table 3-3-1 に示す。カゼイン (オリエンタル酵母工業株式会社) 15%、 $\alpha$ -コーンスターチ (オリエンタル酵母工業株式会社) : スクロース (日新製糖株式会社) = 2 : 1 混合 70.5%、コーンオイル (味の素株式会社) 5%、セルロース (オリエンタル酵母工業株式会社) 5%、ミネラル混合 (American Institute of Nutrition (AIN) -93G、オリエンタル酵母工業株式会社) 3.5%、ビタミン混合 (AIN-93G、オリエンタル酵母工業株式会社) 1% からなる飼料を基本食とし、これを CON 群に給与した。+NaCl 群のサンプルには高血圧発症を促進するために NaCl 1% 加え、+NaCl+Pumpkin 群にはさらに南瓜濃縮物凍結乾燥物 0.08% (濃縮物で換算すると 213 mg/100 g) 加えた飼料を与えた。+NaCl 群、+NaCl+Pumpkin 群の飼料は  $\alpha$ -コーンスターチ : スクロース = 2 : 1 混合を差し引いて全体で 100% となるように補正した。食餌は水同様に自由摂取とした。

食餌摂取量、体重は毎日測定し、血圧は飼育 1、3、5、7 日目に測定した。10 時間絶食後、ネンブタール麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取した。続いて心臓、左腎臓を摘出し、秤量後液体窒素により凍結し、測定まで -80°C 下に凍結保存した。

Table3-3-1 Composition of the diets (%)

Constituent	CON	+NaCl	+NaCl+Pumpkin
Casein	15	15	15
$\alpha$ -Cornstarch : sucrose=2:1	70.5	69.5	69.42
Corn oil	5	5	5
Celulose	5	5	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1	1	1
NaCl		1	1
Pumpkin			0.08
	100	100	100

1AIN-93G-MX and 2 AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co, Ltd.

### 3.3.2.1 血圧測定

血圧測定は 3.1.2 と同様に行った。

### 3.3.2.2 血清脂質、アルドステロン測定

血清の調製は、心臓より直接採取した血液を遠心分離 (1,000 × g, 15 min, 15°C) することを得た。

血清総コレステロール (T-Chol) 、高密度リポタンパクコレステロール (HDL-C) 、トリグリセリド (TG) 、リン脂質 (PL) はそれぞれ和光純薬工業株式会社のコレステロール E-テストワコー、HDL-コレステロール E テストワコー、トリグリセライド E-テストワコー、リン脂質 B-テストワコーを用いて測定した。低密度リポタンパクコレステロール (LDL-C) (44) とアテローム形成指数 (45) は以下の様に算出した。

$$\text{LDL-C} = (\text{T-Chol}) - (\text{HDL-C}) - (\text{TG}/5)$$

$$\text{アテローム形成指数} = \{ (\text{T-Chol}) - (\text{HDL-C}) \} / (\text{HDL-C})$$

血清アルドステロン測定には Cayman Chemical 社の Aldosterone EIA Kit を用いた。

### 3.3.2.3 ACE 活性測定

血清、心臓、そして腎臓の ACE 活性を測定した。心臓と腎臓は 10 倍量のホウ酸バッファー (125 mM, pH 8.3) でホモジナイズし、遠心分離 (1,300 × g, 30 min, 4°C) し、上清を測定用サンプルとした。

測定法は Lieberman の方法 (46) に従い行った。測定サンプル 15 μl に 125 mM ホウ酸バッファー (pH 8.3、608 mM NaCl 含む) に溶かした 7.6 mM の Hippuryl-L-histidyl-L-leucine 125 μl を加え、37°C、30 分間反応させた。反応は 1 N HCl 125 μl を加えて停止させ、その後酢酸エチル 750 μl を加えて振とうし馬尿酸の抽出を行った。遠心分離 (900 × g, 10 min, 15°C) で上清の酢酸エチル層を 250 μl 採取し、乾固した後、蒸留水 1 ml 加えて攪拌して馬尿酸を溶解し、228 nm における吸光度を測定した。測定サンプルに 228 nm における吸収を示す物質が含まれる可能性も考慮し、

ブランク値を求めるため反応停止液の HCl を予め反応溶液に加え同様に操作を行った。

#### 3.2.2.4 統計分析

データは平均±SEM で表した。データは、一元配置分散分析法 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher's PLSD 法を用いた。統計的有意水準は  $p<0.05$  とした。

#### 3.3.3 結果

飼育期間中に測定した SBP、DBP はいずれも CON 群に比べて、1% NaCl を添加した飼料を給与した+NaCl 群で有意に上昇するが、+NaCl+Pumpkin 群では上昇抑制、または抑制傾向がみられた (Fig.3-3-1)。

初体重、最終体重、総食餌摂取量、解剖後摘出した心臓、腎臓の重量において群間における有意な差はなかった (Table3-3-2)。

血清 T-Chol、LDL-C、アテローム形成指数は+NaCl 群に比べて、+NaCl+Pumpkin 群において有意に低い値を示した。これらの結果より南瓜には血清コレステロール改善機能のあることが明らかとなった (Table3-3-2)。

副腎皮質ホルモンであり、腎臓の尿細管などに作用して、ナトリウムや水分の再吸収、カリウム再吸収の抑制などを促し、体液の浸透圧調節に関与しているアルドステロンの血清レベルを調べた結果、CON 群に比べて+NaCl 群で低値を示し、また+NaCl+Pumpkin 群では CON 群レベルまで回復している値を示した (Table3-3-2)。

また南瓜が高血圧降下作用を有する原因を探るために、血清、心臓そして腎臓のホモジネートを調製しその ACE 活性を測定した。血清や心臓では群間において活性の差が認められなかったが、腎臓では+NaCl+Pumpkin 群が+NaCl 群に比べて、有意に低い活性を示した (Fig.3-3-2)。

#### 3.3.4 考察

本節では南瓜濃縮物の凍結乾燥物を混餌で連続投与し、その血圧への影響、さらには

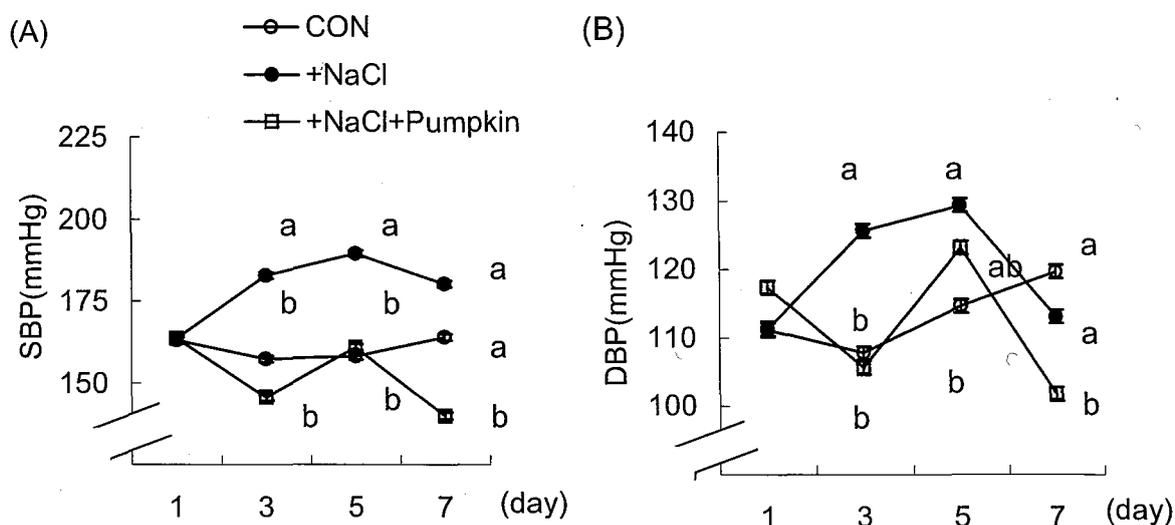


Fig.3-3-1 Changes over time in SBP and DBP levels of SHR fed dietary pumpkin paste concentrate. (A) Changes in SBP. (B) Changes in DBP. Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table3-3-2 Effect of dietary pumpkin paste concentrate on organs weight, serum lipid and aldosterone levels.

Dietary group	CON	+NaCl	+NaCl+Pumpkin
Initial body weight (g)	266 ± 5	270 ± 5	267 ± 2
Final body weight (g)	272 ± 4	283 ± 4	279 ± 3
Total food intake (g)	107 ± 3	111 ± 2	112 ± 1
Organs weight (% of body weight)			
Heart	0.384 ± 0.007	0.391 ± 0.013	0.387 ± 0.008
Kidney, left	0.412 ± 0.005	0.406 ± 0.004	0.416 ± 0.009
Serum lipid			
T-Chol (mg/dl)	115 ± 16 <sup>ab</sup>	133 ± 23 <sup>a</sup>	79.7 ± 12.5 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dl)	52.1 ± 3.4	57.6 ± 3.7	63.2 ± 3.1
LDL-C (mg/dl)	42.5 ± 5.56 <sup>a</sup>	62.8 ± 13.8 <sup>a</sup>	5.92 ± 2.6 <sup>b</sup>
Atherogenic index	1.18 ± 0.23 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.13 <sup>b</sup>
TG (mg/dl)	168 ± 15 <sup>a</sup>	134 ± 15 <sup>b</sup>	124 ± 10 <sup>b</sup>
PL (mg/dl)	197 ± 10	183 ± 25	146 ± 17
Hormone			
Serum aldosterone (pg/ml)	5.75 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.43 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.79 ± 0.06 <sup>a</sup>

Values are the mean ± SEM. Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

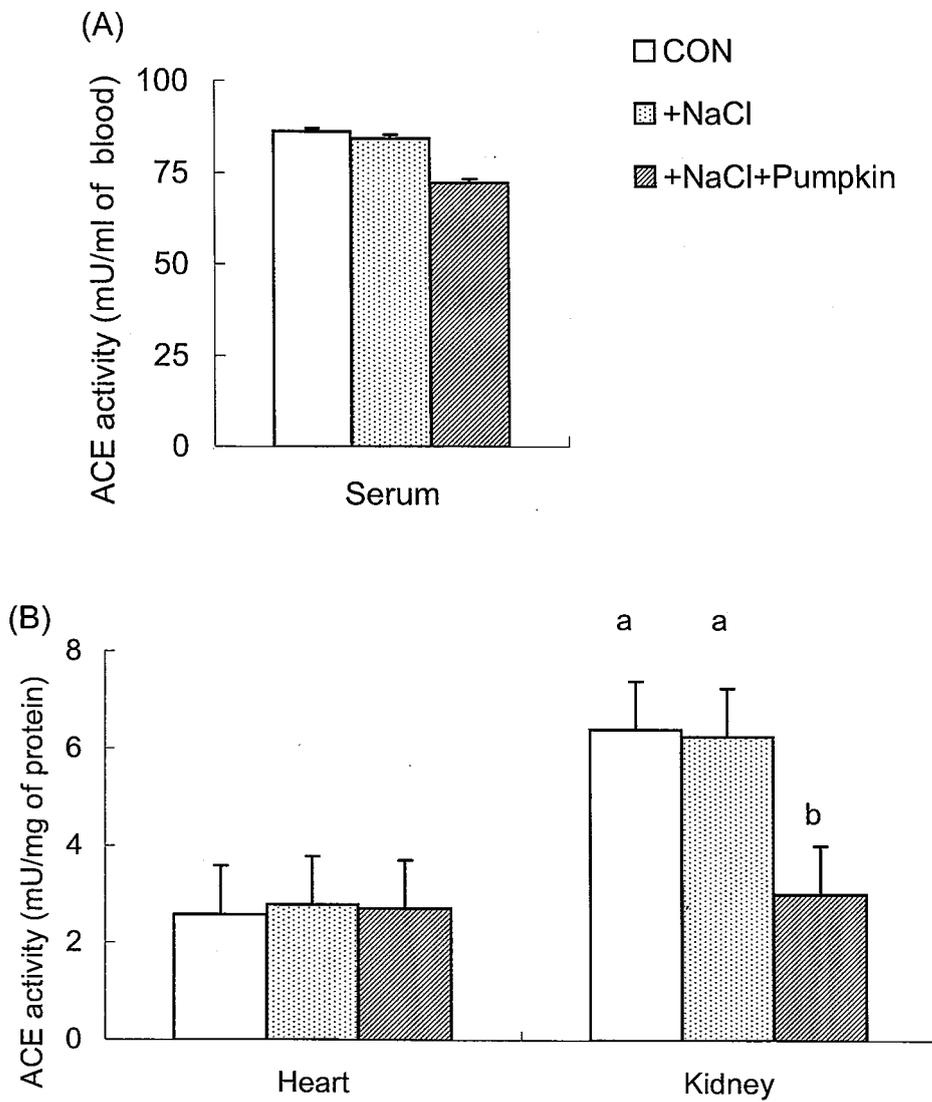


Fig.3-3-2 ACE activities of serum, heart and kidney.  
 (A) Serum ACE activity. (B) ACE activities of Heart and Kidney.  
 Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

その機構のひとつについて検討を行った。

南瓜の連続投与においても SBP、DBP が低下または低下の傾向を示し、その機構のひとつは腎臓の ACE 活性の低下によることが推察された。尚、血圧調節機構との関わりについては不明であるが、今回の実験では+NaCl+Pumpkin 群で血清コレステロールの有意な低下が観察されたのは興味深い。

一般に、過剰な食塩を摂取すると、体液量 (血圧) の増大にตอบสนองしてアルドステロン分泌が抑えられ、これにより制御を受ける上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) 遺伝子の発現が低下し、ナトリウムの再吸収が減少して正常な体液量 (血圧) が維持されるとされている。しかし食塩感受性高血圧症においては、アルドステロン分泌制御が正常であるにも関わらず、アルドステロンによる ENaC の遺伝子発現制御が破綻し、体液量が増大して血圧が上昇することが報告されている (47)。本実験でも+NaCl 群で血圧が上昇したにも関わらず、血清アルドステロン値は低値を示した。このことから+NaCl 群では ENaC 遺伝子発現の異常とそれによる体内ナトリウムバランスの異常が一因となり高血圧を引き起こしたのではないかと推察される。

南瓜には $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) が含まれており、GABA には血圧を下げる効果が報告されている (48-50)。本章第 1、2 節で使用した南瓜濃縮物、また本節で使用した南瓜濃縮物の凍結乾燥物にも GABA が含まれ、示された結果は GABA による可能性も十分考慮される。しかし GABA は ACE 阻害活性率が低く、血圧低下作用は末梢臓器血管にある交感神経系の神経末端の神経伝達を抑制して、血管収縮を緩和することであると推察されている (51,52)。しかしながら南瓜濃縮物による血圧降下作用は ACE 阻害活性のみによるとは考えがたく、GABA との相乗効果も考慮する必要があると思われる。

## 第4章 南瓜の高血圧降下作用を有する物質の同定

### 4.1 緒言

第2章で野菜のACE阻害活性を比較し、南瓜は他の野菜に比して高い阻害活性を有することを示した。第3章では実際に本態性高血圧モデルとしてSHRを用い、南瓜濃縮物の高血圧降下作用について検討を行った。その結果、南瓜濃縮物の投与量が多いほど、またSHRの血圧が高いほど降下作用の強いことが明らかとなった。さらに連続給与されたSHRでは、腎臓のACE活性が低く、そのことが血圧を低くした一因であると推察した。

そこで本章では南瓜からACE阻害活性を示す物質の単離・同定を行った。また同定した化合物の南瓜中における分布もあわせて検討した。

### 4.2 実験方法

南瓜約75 kgを5倍量熱水で抽出し、そのDOWEX50W-4X (5.5 cm × 12 cm)を1 N、2 N HClを用いて溶出した。それぞれについて濃縮乾固後、セファデックス G15で分画し、そのうち高いACE阻害活性を示した画分を、液体クロマトグラフィー(HPLC) (カラム; DEVELOSIL ODS-HG5 20 × 250 mm 野村化学株式会社)を用いて精製した。尚展開溶媒にはA液 (0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA)) B液 (0.1% TFA in 20% アセトニトリル (MeCN)) を用い、Aに対しBが90分で100%となるように直線勾配で行った。流速は2.0 ml/minとした。次いで強いACE阻害活性を示した画分についてはDEVELOSIL 300 Diol (8.0 × 300 mm 野村化学株式会社、展開溶媒; 蒸留水)を用いる分取HPLCで精製し化合物Iを得た。ACE阻害活性の測定は2.2と同様にして行った。

質量の測定には液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS)を用い、エレクトロスプレーによってイオン化を行った。LCにはAgilent 1100 series HPLC system、カラムにはZorbax SB-C18 (2.1 × 50 mm)、展開溶媒には1% 酢酸水を用いた。また検出

は陽イオンモードで行った。

同定した化合物 I の南瓜中の分布を測定するためにアミノ酸分析計による定量を行った。南瓜 0.4 g に蒸留水 4 ml を加え、100℃で 6 時間加熱し、遠心分離 (1,000 × g, 20 min, 室温) 後の上清 1 ml に 32% スルホサリチル酸 0.2 ml を加え、さらに遠心分離 (15,000 × g, 20 min 室温) した。得られた上清を 0.45 μm フィルターでろ過後、分析は日立 L-8800 アミノ酸アナライザーにより生体成分分析法 (53) にて定量した。カラムには日立 2650L を用い、検出はニンヒドリン法による。標品としてのニコチアナミンは長谷川香料株式会社より購入した。

#### 4.3 結果

化合物 I のマススペクトル分析の結果、 $m/z$  303.3 に分子イオンが観察されたこと、またアミノ酸分析において既知のニコチアナミンと同じ保持時間を示すことから、ニコチアナミンと同定された (Fig.4-1~4-2)。ニコチアナミンについて含量 (100 g 中の含量) を測定した結果は、Table4-1 に示した。ニコチアナミンは皮よりも種子において高く、種子においても種皮とその他に分けて分析すると 90%近くが種皮に含まれている事が判明した (Table4-2)。

またこのニコチアナミンの ACE 阻害活性  $IC_{50}$  は 84 nM であり、ACE 阻害剤として臨床で用いられているカプトプリル ( $IC_{50}$  72 nM) と同等の高い活性を持つ事が分かった。

#### 4.4 考察

第 3 章での SHR において血圧降下作用を示した南瓜濃縮物について、効果成分の探索とその同定を行った。その結果効果成分のひとつとしてニコチアナミンを見出すことができた。ニコチアナミンはモロヘイヤや明日葉、大豆、ハヤトウリからも単離同定されており、血圧降下作用を示すことが報告されている (12-16)。

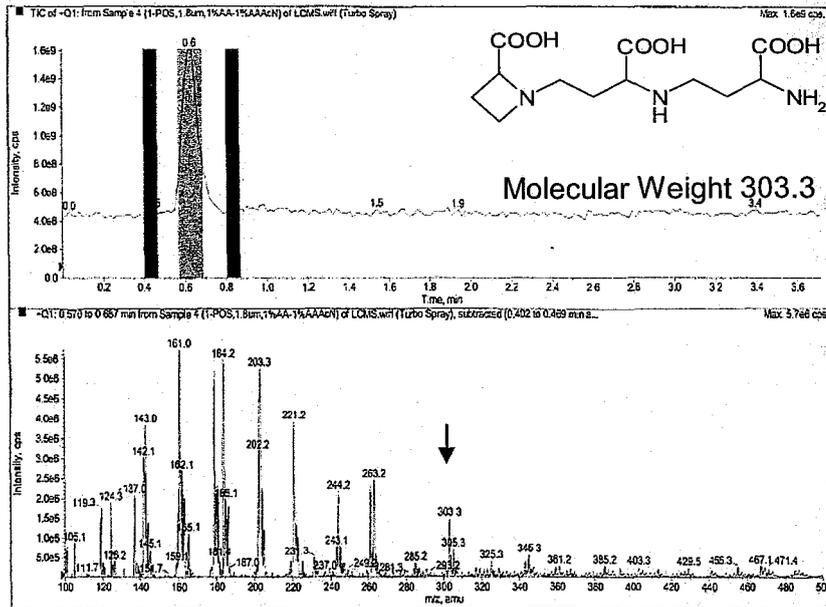


Fig.4-1 LC/MS spectrum of isolated compound I and its chemical structure.

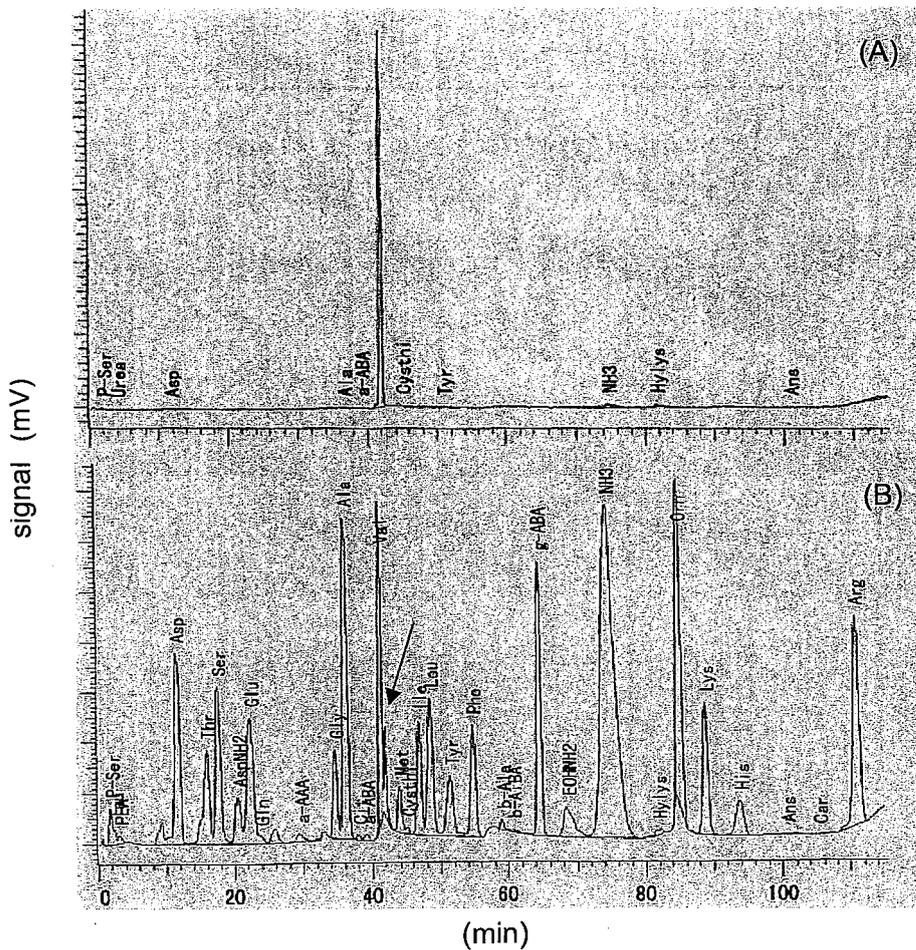


Fig.4-2 Chromatograms of authentic nicotianamine (A) and pumpkin extract(B) in amino acid analysis. The arrow shows nicotianamine.

Table4-1 Nicotianamine content in the part of the pumpkin.

parts	mg/100g	
Seed	6.56	
		{ Seed skin 89.93%
		Others 10.07%
Entrails*	4.24	
Fruit	3.05	
Peel	2.09	

\* It is around the seed, and is said "wata" in Japanese.

## 第5章 南瓜の抗糖尿病効果

### 5.1 緒言

これまで南瓜の高血圧降下作用について、またその有効成分の単離・同定について検討を行った。第3章第3節においては、南瓜濃縮物の給与はコレステロール等の血清脂質に影響を及ぼすことが明らかにされたので、その血清、肝臓脂質レベルへの影響、さらには脂質レベルとの関連が指摘されるようになった糖尿病に対する改善機能などについて検討を行うこととした。

日常食す機会の多い南瓜についての機能性食品としての報告はそれほど多くはない。1型糖尿病に対して南瓜中のタンパク結合ポリサッカライドが血清インスリンレベルを上げるという報告(9)や pumpkin-seed oil が血圧降下作用(10)、脂質低下作用(11)を有するという報告もあるが、2型糖尿病における効果についての報告はみられない。本章では、南瓜が2型糖尿病に及ぼす影響について研究を行った。

世界保健機関(WHO)によると、2006年の時点で世界には少なくとも1億7100万人の糖尿病患者がいるという。患者数は急増しており、2030年までにこの数は倍増すると推定されている。平成19年度の国民健康・栄養調査の結果は、日本国内で糖尿病の疑いが強い人は推計約890万人であり、糖尿病の可能性が否定できない人も含めると約2210万人にもものぼる。先進国の糖尿病は、都市化とライフスタイルの変化にともない増加する傾向があり、食生活の「西欧化」と関連している可能性がある。このことから糖尿病には(食事など)環境の変化が大きく関わってくると考えられているが、食事との関連についてはまだ詳細な研究が行われていない。

GKラットは非肥満の2型糖尿病モデルであり、血糖値200~300 mg/dlの軽症糖尿病に相当すると考えられるが、糖負荷後の血糖上昇は高く、重度な耐糖能異常を示す(54)。

### 5.2 実験方法

### 5.2.1 実験動物

動物は GK ラット (GK/Slc 8 週令 雄) を用いた。飼育環境は 3.1.2 と同様とした。3 日間の馴化飼育後、5 匹ずつ対照 (CON) 群、南瓜濃縮物添加 (Pumpkin) 群の 2 群に分け、76 日間飼育した。食餌組成は Table5-1 に示す。Pumpkin 群には南瓜濃縮物凍結乾燥物 1%を加えた飼料を与え、添加した量を $\alpha$ -コーンスターチ : スクロース = 2 : 1 混合を差し引くことで補正した。

飼育 49 日目に耐糖能試験を行い、最終日には 10 時間絶食後ネンブタール麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取した。

### 5.2.2 耐糖能試験

10 時間の絶食後、血糖値を測定し (0 分) 、次いで 2 g/kg (体重) の D-グルコース水溶液を胃ゾンデにて経口投入後 15、30、60、120、180 分に血糖値の測定を行った。血糖値はメディセーフミニ GR-102 (テルモ株式会社) を用いて、穿刺ペンにより尾静脈部から採血し測定した。また非糖尿病モデルとして、同じ週令 (15 週令) の Wistar ラットを用い同様の実験を行った。

### 5.2.3 血清インスリン、アディポネクチン、TNF- $\alpha$ 濃度測定

血清の調製は 3.3.2.2 と同様に行った。

血清インスリン値は市販キット、レビスインスリン-ラット U-E (株式会社シバヤギ) を使用して測定した。血清アディポネクチン、TNF- $\alpha$ 濃度の測定は市販のキットを用いた。アディポネクチンは大塚製薬株式会社製マウス/ラットアディポネクチン ELISA キットを、TNF- $\alpha$ は Amersham Biosciences 製の Tumour Necrosis Factor Alpha[ (r) TNF $\alpha$ ],Rat,Biotrak ELISA system を使用した。

### 5.2.4 血清脂質濃度測定

血清 T-Chol、HDL-C、TG は 3.3.2.2 と同様にして、また遊離脂肪酸 (FFA) は和光

Table 5-1 Composition of the diets (%)

Constituent	CON	Pumpkin
Casein	15	15
$\alpha$ - Cornstarch:sucrose=2:1	69.5	68.5
Corn oil	5	5
Celulose	5	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1	1
NaCl	1	1
Pumpkin		1
	100	100

1 AIN-93G-MX and 2 AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co.,Ltd.

純薬工業株式会社製 NEFA C-テストワコーを用いて測定した。

## 5.2.5 過酸化脂質の測定

### 5.2.5.1 血中過酸化脂質

血中過酸化脂質は八木らの蛍光法 (TBA 法) (55) を用いて測定し、脂質の過酸化に伴って生成したチオバルビツール酸反応物 (TBARS) 値として示した。測定は以下のように行った。

血液 0.1 ml を生理食塩水 1.9 ml にとり、静かに攪拌した後遠心分離 (1,000 × g, 10 min, 4℃) して得られた上清を測定用サンプルとした。サンプル 0.5 ml に 1/12 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.0 ml を加え混合した後、10% リンタングステン酸 0.5 ml を加えて十分に攪拌した。室温で 5 分間放置した後、遠心分離 (1,000 × g, 10 min 室温) し、上清をデカンテーションで除き、残った上清もろ紙で吸い取り除去した。この沈殿に 1/12 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 ml、10% リンタングステン酸 0.3 ml を加え、白い沈殿を充分懸濁させた。さらに遠心分離 (1,000 × g, 10 min 室温) し、前述した方法で上清を除去後、蒸留水を 4.0 ml 加えて充分懸濁し、以後の操作に用いた。これらにチオバルビツール酸 (TBA) 試薬 (0.67% TBA 溶液) 1.0 ml を加えて十分に混合し、沸騰湯浴中で 60 分間加温した。その後流水下で 5 分間冷却し、n-ブタノール 5.0 ml を加え、攪拌し抽出を行った。これを遠心分離 (400 × g, 10 min 室温) し、得られた上清の蛍光を励起波長 (Ex) 515 nm、蛍光波長 (Em) 553 nm で測定した。標準には 5 nmol/ml 1,1,3,3,テトラエトキシプロパン溶液 (生理食塩水) 0.1 ml に蒸留水 3.9 ml を加えたもの、ブランクには蒸留水 4.0 ml を用い測定用サンプルと同様に操作した。

### 5.2.5.2 肝臓過酸化脂質測定

肝臓過酸化脂質は内山、三原らの方法 (56) に従って測定用サンプルを調製し、脂質過酸化物と TBA との反応物 TBARS の蛍光を測定して定量した。肝臓 0.2 g をテフロン製ホモジナイザーにて 5 倍量の 0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.4, 1 mM

EDTA 含有) と 4 倍量の 2.3% KCl を加えてホモジナイズを行った。ホモジネート液 0.5 ml を過酸化脂質測定サンプルとした。

測定用サンプル 0.5 ml に 1% リン酸 0.3 ml、TBA 試薬 1.0 ml を加え、十分に混合後、沸騰湯浴中 45 分加温し流水下で 5 分間冷却した。n-ブタノール 4.0 ml を加え、攪拌して抽出し、遠心分離 (400 × g, 10 min, 15°C) 後の上清を励起波長 (Ex) 515 nm、蛍光波長 (Em) 553 nm で測定した。尚、標準には 10 nmol/ml 1,1,3,3,テトラエトキシプロパン溶液 (生理食塩水) を、ブランクには生理食塩水をそれぞれホモジネート液の代わりに用い、同様に操作した。

## 5.2.6 溶血赤血球、肝臓および腎臓におけるカタラーゼ (CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性測定

### 5.2.6.1 溶血赤血球サンプルの調製

採血した血液 0.1 ml を生理食塩水 1.9 ml に入れ攪拌した後、遠心分離 (1,000 × g, 5 min, 4°C) を行った。得られる沈殿に生理食塩水を加えて懸濁し、再度遠心分離処理をした。同操作を 3 回繰り返した後、洗浄した赤血球に蒸留水 2.9 ml を加え攪拌し、溶血赤血球を調製した。この溶血赤血球を測定サンプルとし、CAT 活性の測定に用いた。

またヘモグロビン 1 mg あたりの酵素活性を求めるために、溶血赤血球のヘモグロビン量を和光純薬工業株式会社製のキット、ヘモグロビン B-テストワコーを用いて測定した。

### 5.2.6.2 肝臓および腎臓サンプルの調製

肝臓および腎臓は、心臓からの採血後直ちに摘出した。摘出した肝臓および腎臓 0.6 g を管型ガラス製ホモジナイザーにとり、5 倍量の 0.1M リン酸カリウムバッファー (pH 7.4 1 mM EDTA 含む) 及び 2 倍量の 2.3% KCl を添加しホモジナイズした。これを遠心分離 (1,000 × g, 10 min, 4°C) し、上清を 2 分間超音波処理した。その後再度遠

心分離 (10,000 × g, 20 min 4°C) を行い、得られた上清を、CAT 及び GPx 活性の測定に用いた。

各種酵素活性をタンパク質 1 mg あたりで求めるために、O.H.Lowry らの方法 (57) によりタンパク質を定量した。測定用サンプル 10 µl に 0.2 N NaOH 10 µl を加えて混合し、これに銅試薬 (2% NaCO<sub>3</sub> 含有 0.1 N NaOH : 2% 酒石酸カリウム : 1% CuSO<sub>4</sub>=50 : 1 : 1) 3.0 ml を加え攪拌後、室温で 10 分間放置した。次いで Folin-Ciocalteuphenol 試薬 0.6 ml を加え直ちに攪拌し、室温で 30 分放置後、吸光度 (660 nm) を測定した。

#### 5.2.6.3 CAT の活性測定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の分解に基づく 240 nm の吸光度の減少を紫外外部吸収法 (58) で経時的に測定した。

測定用のセルに 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) 2.0 ml、30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 ml、サンプル (溶血赤血球サンプル 50 µl、肝・腎サンプル 20 µl) を入れ、混合した後、経時的に 240 nm における吸光度を測定した。バッファーと H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は 25°C でプレインキュベートし、サンプルの代わりにバッファーを用いて同様に測定したものを補正值とした。

溶血赤血球の CAT 活性は、1 分間に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1 µmol 分解する酵素量を 1 U として表示し、ヘモグロビン 1 mg あたりで算出した。肝臓および腎臓のカタラーゼ活性は、1 分間に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 1 µmol 分解する酵素量を 1 U として表示し、タンパク質 1 mg あたりで算出した。

#### 5.2.6.4 GPx の活性測定

肝臓および腎臓の測定サンプルを用いて、NADPH の減少量から GPx 活性を測定した (59,60)。

測定用のセルに 25°C でプレインキュベートした 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー

(pH 7.0, 4 mM EDTA 含有) 1.0 ml、0.01 M  $\text{NaN}_3$  0.2 ml、0.01 M 還元型グルタチオン (GSH) 0.2 ml、1.5 M NADPH 0.2 ml、蒸留水 1.0 ml を順次入れ、混合した。次いで 0.3% 酸化型グルタチオン (GSSG-R、酵母製 200 U/mg) 0.2 ml、サンプル 50  $\mu\text{l}$ 、70% *tert*-ブチルヒドロペルオキド 20  $\mu\text{l}$  を入れ、同様に混合した後、340 nm で経時的に吸光度を測定した。また *tert*-ブチルヒドロペルオキド自体による NADPH の減少も無視できないため、サンプルの代わりにバッファーを用いて測定し、補正值を求めた。

GPx 活性は、1 分間に NADPH を 1  $\mu\text{mol}$  分解する酵素量を 1 U とし、タンパク質 1 mg あたりで算出した。

### 5.2.7 統計分析

データは平均 $\pm$ SEM で表した。統計処理は 2 群間の有意性は t 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意性があるとした。

## 5.3 結果

飼育 49 日目に行った D-グルコースの耐糖能試験は、同じ週令の非糖尿病の Wistar ラットに比べると、グルコース投与後有意に高い値を示した。しかし CON 群と比較すると投与 15 分後に Pumpkin 群で上昇傾向が観察され、30 分後では有意な上昇抑制効果が観察された (Fig.5)。60、120 分後に群間に有意な差は見られなかったが 180 分後には低下傾向を示した。耐糖能試験時の曲線下面積 (AUC) を計算すると、CON 群よりも有意に低い値になった。

76 日間基本食と南瓜添加食で飼育した結果、食餌総摂取量や体重増加量には 2 群間における差が見られなかった (Table.5-2)。空腹時の血糖値と血清インスリン値にも差が見られなかった。脂肪細胞から分泌されるサイトカインである、アディポネクチンと TNF- $\alpha$  濃度においては、アディポネクチン濃度は Pumpkin 群で CON 群に比べ上昇傾向を示したが、TNF- $\alpha$  濃度では 2 群間に差がなかった (Table.5-2)。

血清 T-Chol、LDL-C 濃度、アテローム形成指数において CON 群に比べ Pumpkin 群

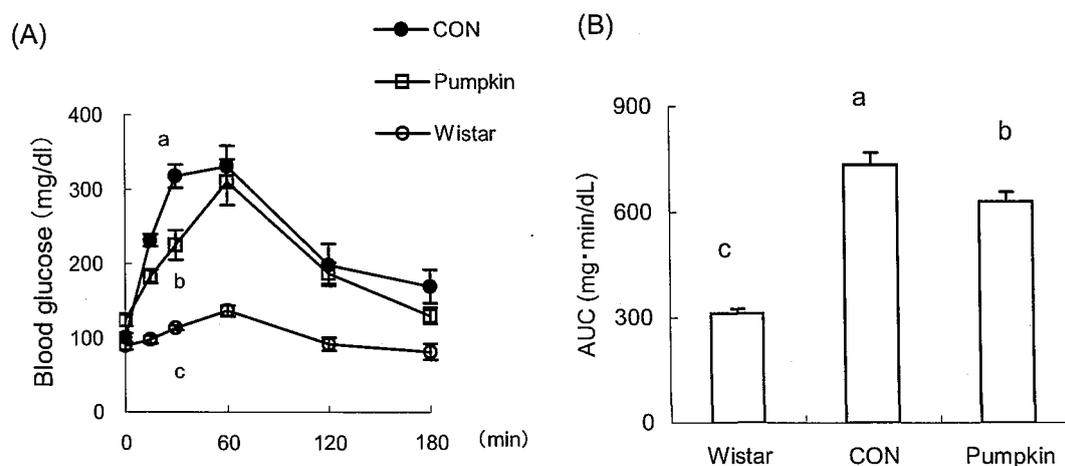


Fig.5 Effect of pumpkin on blood glucose levels during oral glucose tolerance test (OGTT).

(A) OGTT was carried out (15wk-old) in GK rats fed a diet with or without pumpkin for 49d. Normal wistar strain rats (15wk-old) fed a commercial diet were also measured for OGTT in the same way as the GK rats. Values without a common letters at the same time differ significantly ( $p < 0.05$ ). (B) Area under the curve(AUC) of blood glucose. Values without a common letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 5-2 Effects of pumpkin on serum glucose, insulin, adiponectin, TNF- $\alpha$  and lipid levels of GK rats.

Dietary group	CON	Pumpkin
Initial body weight (g)	142 $\pm$ 4	138 $\pm$ 5
Food intake (g/76d)	799 $\pm$ 17	812 $\pm$ 10
Body weight gain (g)	191 $\pm$ 7	196 $\pm$ 3
Blood glucose (mg/dl)	216 $\pm$ 23	223 $\pm$ 8
Serum		
Insulin (pg/ml)	75.6 $\pm$ 0.4	76.5 $\pm$ 0.9
Adiponectin (ng/ml)	90.9 $\pm$ 4.0	97.5 $\pm$ 2.3
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	89.4 $\pm$ 2.0	88.5 $\pm$ 0.4
Serum lipid		
T-Chol (mg/dL)	109 $\pm$ 4	93.6 $\pm$ 3.1 *
HDL-C (mg/dL)	63.6 $\pm$ 4.6	66.5 $\pm$ 2.6
LDL-C (mg/dl)	36.3 $\pm$ 2.9	18.0 $\pm$ 2.8 **
Atherogenic index	0.74 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.04 *
TG (mg/dL)	47.9 $\pm$ 6.7	45.7 $\pm$ 4.6
FFA (mEq/L)	0.68 $\pm$ 0.17	0.11 $\pm$ 0.06 *

\* Significantly different from the control group,  $p < 0.05$ .

Table5-3 Effects of pumpkin on TBARS and antioxidant enzyme levels of GK rats.

Dietary group	CON	Pumpkin
TBARS		
Serum (nmol/ml)	7.52 ± 0.51	6.10 ± 0.84
Liver (nmol/g)	127 ± 8	123 ± 8
Kidney (nmol/g)	139 ± 5	150 ± 10
CAT		
Blood (U/ml)	2.69 ± 1.10	3.48 ± 0.51
Liver (U/mg of protein)	122 ± 6	91.5 ± 12.4 *
Kidney (U/mg of protein)	97.0 ± 5.9	77.5 ± 7.6
GPx		
Liver (U/mg of protein)	0.436 ± 0.035	0.450 ± 0.007
Kidney (U/mg of protein)	0.255 ± 0.032	0.148 ± 0.018 *

\* Significantly different from the control group,  $p < 0.05$ .

で有意に低い値が見られた (Table.5-2)。中性脂肪の TG 濃度に群間に差がないが、FFA 濃度は Pumpkin 群で有意に低い値を示した。

過酸化の脂質のマーカーとしての TBARS 値を血清、肝臓、腎臓において測定した結果、いずれにおいても南瓜濃縮物添加による大きな変化は見られなかった (Table.5-3)。

今回 CAT 活性は溶血赤血球、肝臓および腎臓において、また GPx 活性は肝臓および腎臓において測定した。肝臓 CAT 活性は CON 群に比べ Pumpkin 群で有意に低く、腎臓 CAT 活性では低下傾向にあった (Table.5-3)。また GPx 活性は肝臓において 2 群間で有意な差は見られなかったが、腎臓において Pumpkin 群が有意な低下がみられた。

#### 5.4 考察

本節では、南瓜濃縮物の凍結乾燥物の 2 型糖尿病モデル、GK ラットにおける抗糖尿病効果について検討を行った。

OGTT で、糖負荷 30 分後に CON 群に比べて血糖値の上昇が有意に抑制されることから、Pumpkin 群は糖の取り込みが改善されていることが推察できる。糖の取り込み改善には、インスリンの感受性の改善や直接の糖の取込み亢進が大きく関わっている。飼育最終日にみられる空腹時血糖値と血清インスリンに 2 群間に大きな差がなかったことから、Pumpkin 群においてインスリンの感受性が改善されていたとは考えにくい。糖の取込みが亢進されているのかも知れない。

血清 T-Chol や LDL-C、FFA 値が CON 群に比べて Pumpkin 群が有意に低いことから南瓜濃縮物が脂質代謝に影響を与えている可能性が推察された。高脂血症は高血圧や糖尿病とともに生活習慣病のひとつであり、これらの症状が重なり動脈硬化を引き起こしていくことは多く報告されている (61-63)。動脈硬化指数 (アテローム形成指数) との関連や糖尿病が進行した状態では LDL-C 値が増加することが指摘されているが、Pumpkin 群ではその増加が有意に抑制されていた。このことから Pumpkin 群では糖尿病や脂質代謝異常を改善している可能性が考えられる。今回の研究では血清脂質の低下が糖尿病の軽減を導いたのか、それとも糖尿病の軽減が血清脂質の低下を促したの

かは不明である。しかしいずれにしろ南瓜の給与により耐糖能改善と血清脂質とりわけ血清コレステロール、FFA レベルの低下という現象が観察された。

酸化ストレスマーカーとして血液や肝臓、腎臓の TBARS を測定したが、いずれも南瓜濃縮物添加による影響は見られなかった。しかし肝臓 CAT 活性は CON 群に比べて Pumpkin 群で有意に低下し、腎臓 CAT 活性でも Pumpkin 群で低下の傾向が見られた。肝臓 GPx 活性は南瓜濃縮物添加による影響は見られなかったが、腎臓 GPx 活性は Pumpkin 群で有意な低下を示した。これらは南瓜中にβカロテン等の抗酸化物が含まれ、酵素の活性を必要としないためとも考えられるが、詳細については検討が必要とされる。

## 第 6 章 南瓜からの抗糖尿病効果物質の探索・同定

### 6.1 緒言

第 5 章において南瓜濃縮物の凍結乾燥物を給与した 2 型糖尿病ラットは、耐糖能が改善されたことを示した。そこでこの章では南瓜から糖尿病を改善する効果のある物質の単離・同定を行った。

### 6.2 実験方法

南瓜 5 kg を 5 倍量の熱メタノール (MeOH) で 3 時間抽出し、その可溶画分についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5.5 cm × 38 cm、展開溶媒; CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 9 : 1、7 : 3、5 : 5、MeOH 100%) によって分画した。次いで目的物質が含まれる画分について HPLC (カラム; DEVELOSIL ODS-UG5 (20 × 250 mm; 野村化学株式会社) 流速; 2.5 ml/min) で精製した。展開溶媒は A 液 (5% MeCN in 1% 酢酸) B 液 (40% MeCN) を用い、B 液が 180 分で 100% となるように直線勾配によって行い化合物 II、III を得た。

また南瓜約 75 kg を 5 倍量熱水で抽出し、そのアンバーライト CG120 (ローム・アンド・ハース社、5.5 cm × 12 cm) 吸着画分を 2N HCl で溶出した。さらに溶出画分を DOWEX50W-X4 (H<sup>+</sup> form、Bio-Rad 社、5.5 cm × 12 cm) に供し、その吸着画分を 1 N、2 N HCl で溶出を行った。次いで濃縮乾固して HCl を除去し、その水可溶画分についてセファデックス G15 (ファルマシアバイオテック社) を用いて分画を行った。目的物質が含まれる画分を分取し HPLC (DEVELOSIL ODS-HG5 (20 × 250 mm; 野村化学株式会社) によりさらに精製を行った。展開溶媒には A 液 (0.1%TFA)、B 液 (0.1%TFA in 20%MeCN) を用い、90 分で B が 100% となる直線勾配で行った。流速は 2.0 ml/min とした。その後 DEVELOSIL 300 Diol (8.0 × 300 mm、野村化学株、展開溶媒; 蒸留水、流速; 1.0 ml/min) で精製し、単一成分化合物 IV を得た。

それぞれの化合物の <sup>1</sup>H-、<sup>13</sup>C-NMR、FAB-MS 分析等により検討を行った。各試料

は D<sub>2</sub>O に溶解して NMR 分析を行った。NMR 測定においては JEOL JNM-EX 400FT-NMR スペクトロメーターで、FAB-MS 測定は JEOL JMX-D 300 スペクトロメーターを用いた。

また南瓜を種子、ワタ、可食部、皮に分け、それぞれの各部位に含まれる量を定量した。その際各部位 1 g を水もしくはメタノール 1 ml に可溶性画分について HPLC 分析を行った。南瓜濃縮物においても各化合物の分析を行った。

### 6.3 結果・考察

MeOH で抽出した化合物Ⅱ、Ⅲは、ニコチン酸、トリゴネリンと同定された (Fig. 6-1~6-3)。熱水抽出から単離された化合物Ⅳは、NMR 分析結果から既知物質であるピログルタミン酸と同定された (Fig. 6-4~6-5)。

ニコチン酸、トリゴネリン、ピログルタミン酸について南瓜の各部位別 (皮、可食部、ワタ、種子) に、含量の測定を行った結果を Table 6 に示す。ニコチン酸はワタに多く、可食部と皮においては大差がなかった。トリゴネリンについては種子に少なく、ワタ、可食部、皮においては同程度の含量であった。ピログルタミン酸は種子に特に多く、ワタ、可食部、皮と外側ほど含量が少なかった。尚、南瓜濃縮物中の各化合物の含量は可食部の約 6 倍であり、これは南瓜濃縮物 100 g が南瓜の可食部 600 g から得られるためだと思われる。

南瓜のメタノール抽出物や南瓜濃縮物の HPLC 分析から、その含量が比較的多いニコチン酸は、抗高脂血症薬として臨床でも使用されており、脂質代謝やインスリン抵抗性の改善機能が見出されている (20)。一方、構造の類似しているトリゴネリンについては、南瓜からの同定や抗糖尿病 (2 型糖尿病) 効果についての報告はない。そこでトリゴネリンもニコチン酸と同じような効果、もしくはより強い効果を持つ可能性が考えられ、次章では個々の化合物の効果について比較しながら検討を行った。

また南瓜からのピログルタミン酸の同定とその抗糖尿病効果についても報告がないことから、第 8 章においては糖尿病モデルラット・マウスを用い、その抗糖尿病効果に

ついて検討を行った。

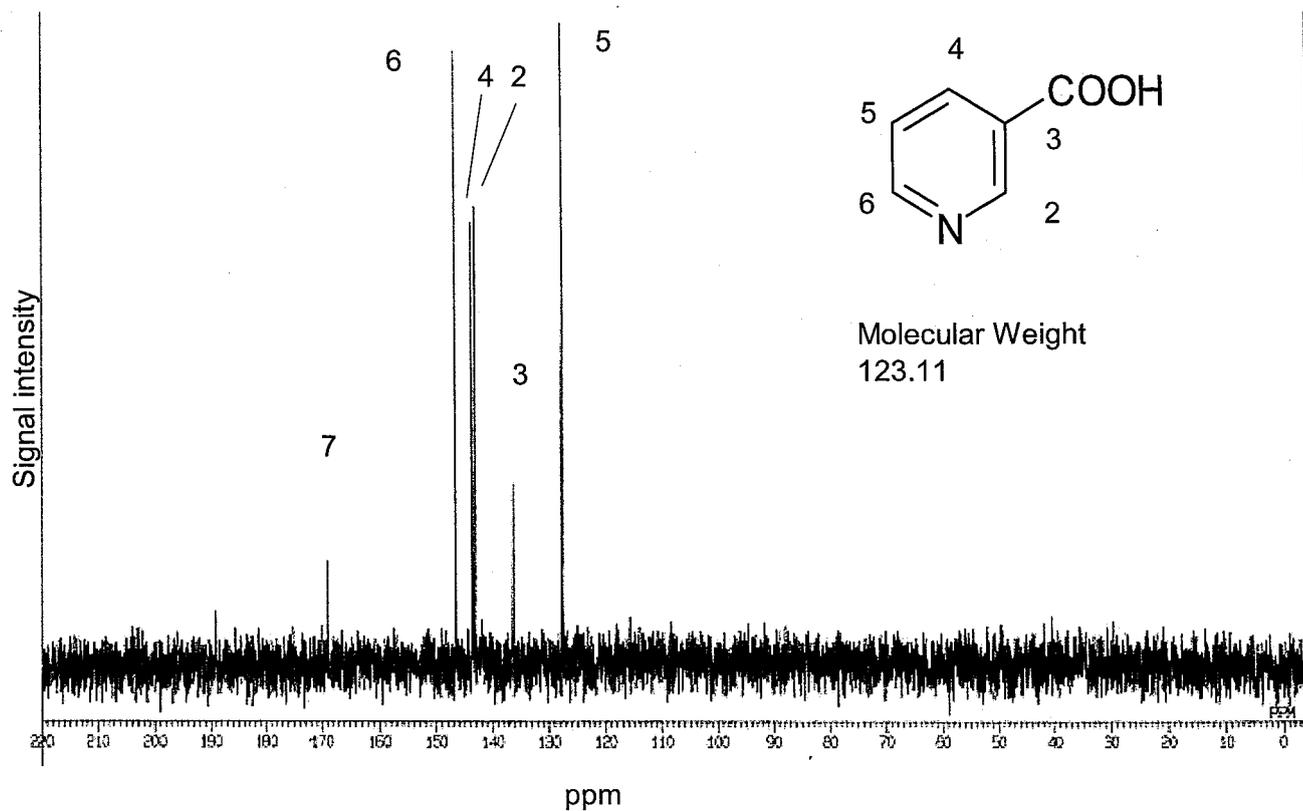


Fig.6-1  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of isolated compound II and its chemical structure.

Carbon signals of isolated compound II: 128.3(C-5), 136.9(C-3), 143.8(C-2), 144.4(C-4), 147.3(C-6), 169.7(C-7)

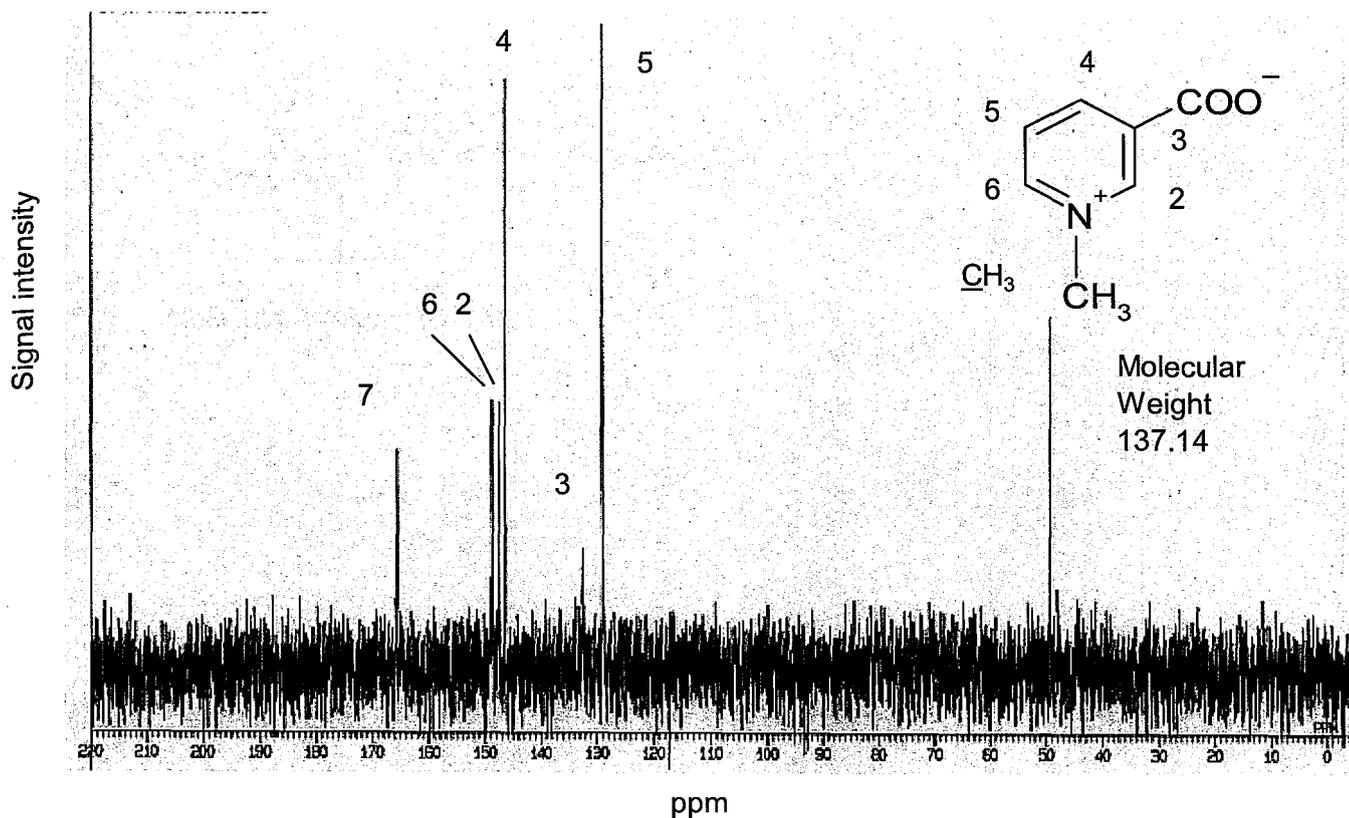


Fig. 6-2  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of isolated compound III and its chemical structure. Carbon signals of isolated compound III: 49.0(CH<sub>3</sub>), 128.4(C-5), 137.5(C-3), 145.6(C-4), 146.6(C-2), 146.8(C-6), 168.4(C-7)

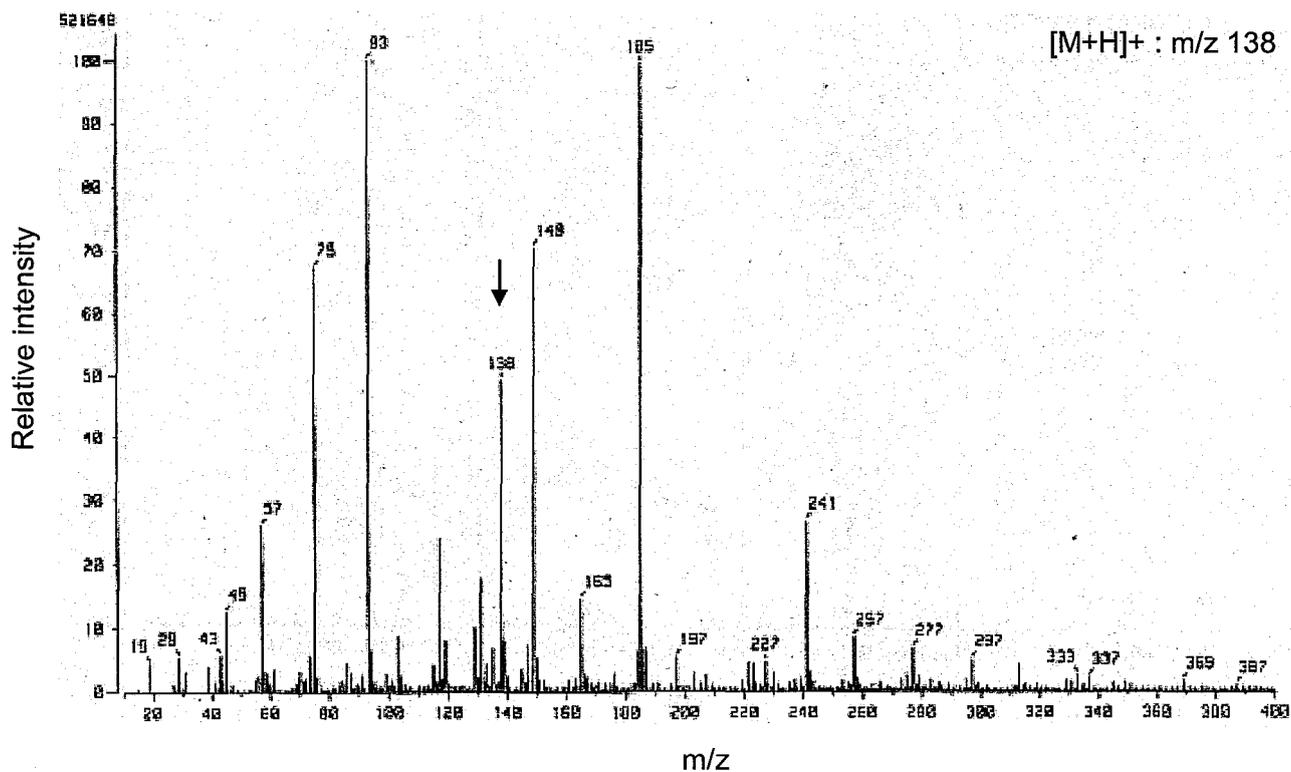


Fig. 6-3 FAB-MS spectrum of isolated compound III.

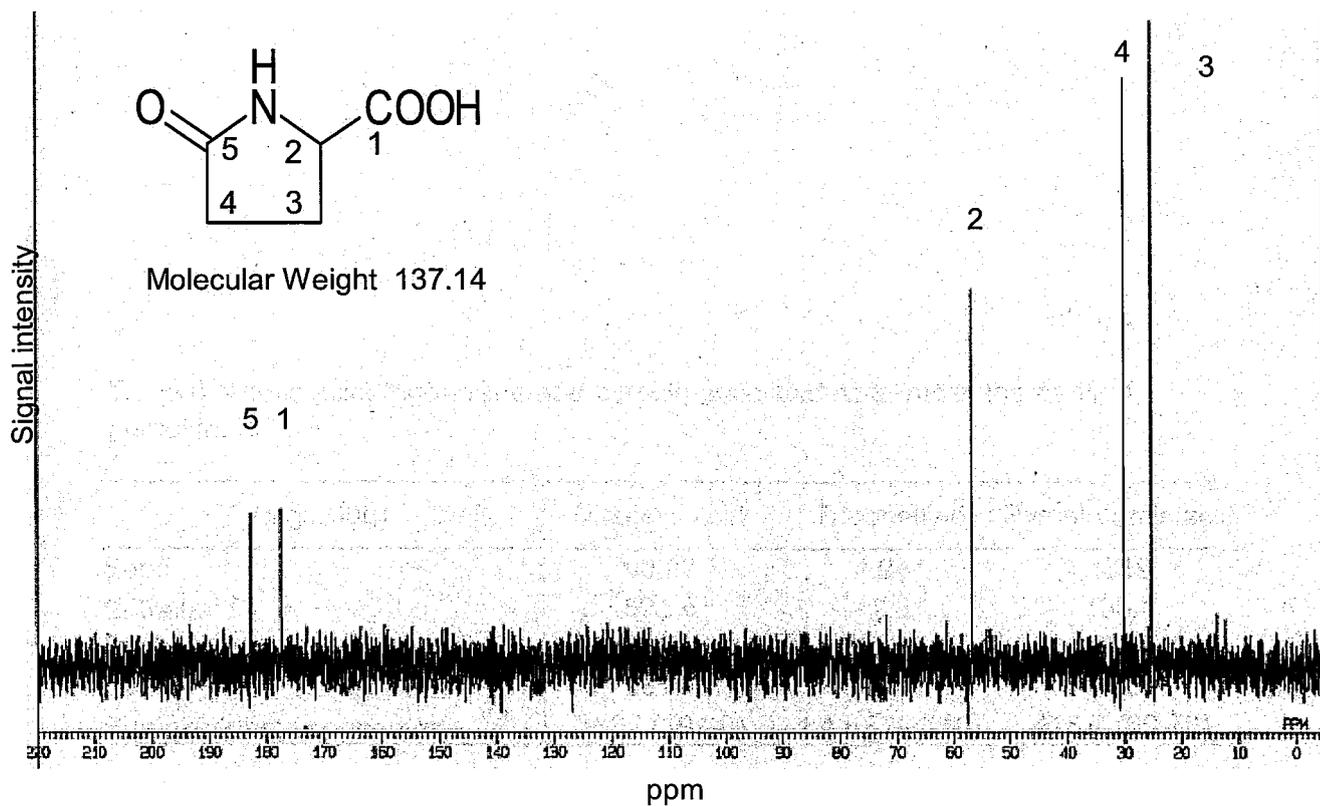


Fig. 6-4 <sup>13</sup>C-NMR spectrum of isolated compound IV and its chemical structure .  
Carbon signals of isolated compound IV: 25.2(C-3), 30.1(C-4), 56.8(C-2), 177.5(C-

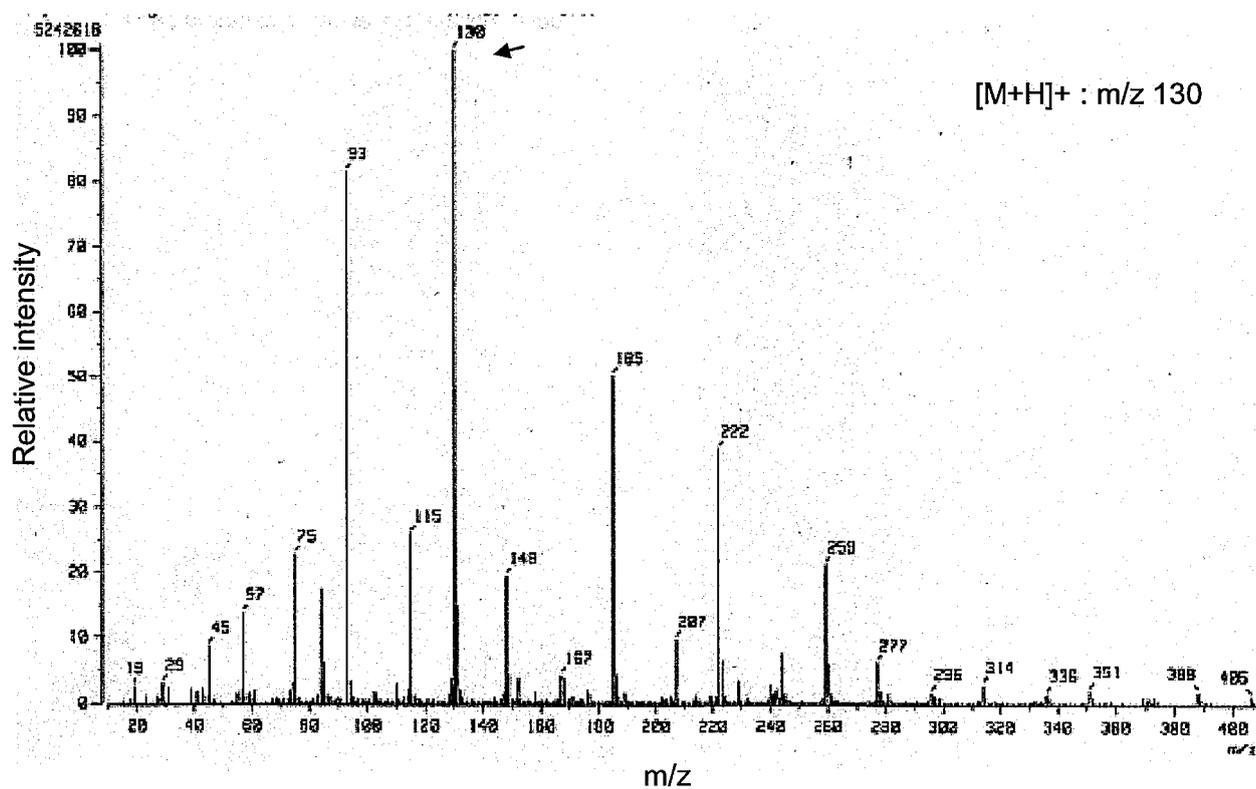


Fig. 6-5 FAB-MS spectrum of isolated compound IV.

Table 6 Nicotic acid, trigonelline and pyroglutamic acid contents in the parts of pumpkin.

(mg/100g)	Nicotinic acid	Trigonelline	Pyroglutamic acid
Seed	90.97	4.941	1319
Entrails <sup>1</sup>	521.6	12.87	109.1
Fruit	210.8	11.97	65.85
Peel	231.1	10.81	37.59
Pumpkin paste concentrate <sup>2,3</sup>	1182 (197.0)	84.62 (14.10)	418.7 (69.79)

1 It is around the seed, and is said "wata" in Japanese.

2 The edible portion of raw pumpkin homogenized with 2 volumes of water by a Mascolloider was centrifuged with a screw decantor to remove the large particles. The supernatant was boiled at 99 C° for 10 min and then concentrated under reduced pressure. The concentrate passed through a filter with 150- µm pores (the pumpkin paste concentrate). The Concentration 100g were provided from pumpkin 600g.

3 The parenthesis shows a one-sixth value.

## 第7章 ニコチン酸とトリゴネリンの抗糖尿病効果検討

### 第1節 非糖尿病ラットによる検討

#### 7.1.1 緒言

前章で単離同定したニコチン酸 (NA) とトリゴネリン (TRG) について、本節では非糖尿病モデルである Wistar ラットにおける影響を検討した。

NA はビタミンの一種であり 1 日の必要量は 10~20 mg であるが、500 mg/日 以上摂取するとビタミン作用とは別の脂質代謝改善効果が現れる。そのため NA は 1950 年代から高脂血症治療薬として臨床に応用されてきたが、その脂質低下作用の機構については、まだ不明な点が多い。現在のところ肝臓でのコレステロール合成の抑制や中性脂肪の分解の促進がメカニズムのひとつとして考えられている (17,18)。またこれらの効果により HDL-C 値を上昇させ (19)、高脂血症を予防し、長期投与ではインスリン感受性に保つとの報告もある (20)。

一方、TRG には認知機能改善作用 (21,22) や抗癌作用 (23) を有することが報告されている。また TRG はコーヒーにも含まれていて、コーヒーが抗糖尿病効果を持つという報告はなされているが、寄与している物質が TRG であると明記されている報告はない (24)。

この NA と TRG は構造が類似しているが、TRG はメチル基とプラス電荷を有する点で異なる。その構造の違いがどのような影響をもたらすのか、本章では非糖尿病の Wistar ラットを用い、糖尿病や酸化ストレスマーカー、脂質レベルを分析し影響の違いを検討した。

#### 7.1.2 実験方法

##### 7.1.2.1 サンプル

実験に用いた NA は関東化学株式会社、TRG は Sigma-Aldrich から購入した。

#### 7.1.2.2 実験動物

Wistar系ラット(日本エスエルシーより購入 8週令雄)を用いた。飼育環境は3.1.2と同じである。ラットは3日間馴化飼育した後、5匹ずつ対照(CON)群、NA添加群(NA 0.05%、0.1%添加群:NA①、NA②群)、TRG添加群(TRG 0.056%、0.112%添加群:TRG①、TRG②群)の5群に分け、46日間飼育した。食餌組成はTable7-1-1に示す。

食餌摂取量、体重は毎日測定し、空腹時、随時の血糖値、ヘモグロビンA<sub>1c</sub>(HbA<sub>1c</sub>)は飼育1、6週目に測定した。糞の採取は34-36日目に行い、使用時まで-80℃で保存した。飼育最終日には、10時間絶食後ネンブタール麻酔下で開腹し、心臓より直接採血、その後肝臓、左腎臓、白色脂肪細胞(腸間膜、左腎周囲、左精巣周囲)を取り出し、重量測定後液体窒素で凍結し、使用時まで-80℃で保存した。

#### 7.1.2.3 血糖値測定

空腹時血糖は10時間絶食後に、随時血糖は摂食後1時間後にメディセーフミニGR-102(テルモ株式会社)を用いて、穿刺ペンにより尾静脈部で採血、測定した。

#### 7.1.2.4 血中HbA<sub>1c</sub>測定

尾静脈から穿刺ペンにより採血し、Bio-Rad社のMicromat IIを使用し測定した。

#### 7.1.2.5 血清、肝臓、糞中の脂質濃度測定

血清の調製は3.3.2.2に従って行った。

肝臓脂質の抽出はFolchらの方法(64)によって行った。即ち、凍結保存した肝臓約0.5gを管型ガラスホモジナイザーにとり、MeOH 5mlを入れてホモジナイズした。さらにCHCl<sub>3</sub> 10mlを加えホモジナイズした。これをNo.2ろ紙で濾過し、ろ液を共栓付試験管に入れた。ろ紙に残った残渣を再びホモジナイザーに移し、MeOH-CHCl<sub>3</sub>溶液(1:2, v/v) 15mlを加えてさらにホモジナイズした。同様に濾過し、前に抽出したろ液

Table 7-1-1 Composition of the experimental diets (%)

Constituent	CON	TRG ①	TRG ②	NA ①	NA ②
Casein	15	15	15	15	15
α-Cornstarch:sucrose=2:1	70.5	70.444	70.388	70.45	70.4
Corn oil	5	5	5	5	5
Celulose	5	5	5	5	5
Vitamin mixture <sup>1</sup>	1	1	1	1	1
Mineral mixture <sup>2</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Trigonelline		0.056 <sup>*</sup>	0.112 <sup>**</sup>		
Nicotinic acid				0.05	0.1
	100	100	100	100	100

<sup>1</sup> AIN-93G-MX and <sup>2</sup> AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co, Ltd. \* 0.056% Trigonelline and 0.05% nicotinic acid were same in their molar concentration in the diet. \*\* 0.112% Trigonelline and 0.1% nicotinic acid were same in their molar concentration in the diet.

と合一した。これらのろ液の約 1/4 溶の 0.88% KCl を加えて振とうし、一晩放置して、上層(MeOH 層) と下層 (CHCl<sub>3</sub> 層) に分離した。上層を除去した後、下層を CHCl<sub>3</sub> で 20 ml に定容した。このうち 5 ml は 10 ml サンプル瓶に採取し、濃縮乾固した後、さらに真空乾燥を行い、その重量を測定して総脂質量を求めた。

糞脂質も Folch らの方法に従って行った。凍結した糞を凍結乾燥した後、ミルで細かく粉碎し、ここから 0.5 g を試験管に採取後、MeOH-CHCl<sub>3</sub> 溶液 (1 : 2) 10 ml を加えて一晩抽出した。ついで No.2 ろ紙で濾過し、MeOH-CHCl<sub>3</sub> 溶液 (1 : 2) 20 ml に定容した。抽出液 5 ml を取り、濃縮乾固した後真空乾燥を行い、重量を測定した。

血清、肝臓、糞中の T-Chol、HDL-C、TG、FFA は前述の和光純薬工業株式会社製キットを用い、総胆汁酸は和光純薬工業株式会社製のキット総胆汁酸-テストワコーを用いて測定した。

#### 7.1.2.6 過酸化脂質の測定

血液過酸化脂質は 5.2.5 と同じ方法で測定した。

#### 7.1.2.7 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) ・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性測定

ALT 活性と AST 活性の測定は紫外部測定 (65,66) を一部変更して行った。

ALT および AST 活性測定用試薬は下記に示した。測定に際し、測定試薬ⅡとⅢ液をⅡ : Ⅲ = 1 : 6 の割合で混合した。また測定試薬Ⅰ液およびⅡ + Ⅲ混液をあらかじめ 30℃で加温し、石英セルに試薬Ⅰ 500 μl、サンプル 10 μl、Ⅱ + Ⅲ混液 175 μl を順次加え混合した。UV-VIS 分光光度計を用い、340 nm の吸光度を経時的に測定した。

##### ALT 測定

[試薬Ⅰ液] 88 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) (0.27 mM β-NADH および 56.25 U/l LDH 含む) . 5 N KOH を用い pH 調整

[試薬Ⅱ液] 300 mM α-ケトグルタル酸 in 176 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)

[試薬Ⅲ液] 1.25 M L-アラニン in 88 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)

AST 測定

[試薬Ⅰ液] 88 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) (0.27 mM  $\beta$ -NADH および 28.13 U/l MDH 含む). 5 N KOH を用いて pH 調製

[試薬Ⅱ液] 300 mM  $\alpha$ -ケトグルタル酸 in 176 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)

[試薬Ⅲ液] 1.0 M L-アスパラギン酸 in 88 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)

#### 7.1.2.8 血清 TRG、NA 分析

食餌由来の TRG や食餌あるいは体内由来の NA について、血清を用いて測定した。

解剖後心臓から直接採取した血液を 3.3.2.2 に従い血清に調製し、Sep-Pak Plus C18 カートリッジ (Waters 社) に添加した。その後通過液をナノセップ・遠心ろ過デバイス 3K (和光純薬工業株式会社) に移し、遠心分離 ( $14,000 \times g$ , 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) を行ってからろ過液を測定サンプルとした。

分析は HPLC で行った。カラムには Wako Sil- II 5 C18 HG 250 mm  $\times$  4.6 mm i.d. (和光純薬工業株式会社) を  $40^{\circ}\text{C}$  に保温して用い、移動相には 10 mM リン酸二水素カリウムバッファー (pH 2.4) とイソプロパノール (92 : 8) に、6 mM オクスタンスルホン酸ナトリウム溶解し、0.20  $\mu\text{m}$  メンブレンフィルターでろ過したものを用了。流速 0.8 ml/min、検出は 225 nm で行った。TRG、NA の標品は Sigma-Aldrich、関東化学株式会社製を用了。

#### 7.1.2.9 統計分析

データは平均  $\pm$  SEM で表した。データは、一元配置分散分析法 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher's PLSD 法を用了。統計的有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 7.1.3 結果

飼育 46 日間の食餌摂取量、体重増加量はいずれも群間に差がなかった (Table 7-1-2)。

空腹時や随時血糖値においても各群間に差がみられなかった (Table7-1-2)。また臓器重量や血液 TBARS、肝障害マーカーとしての血清 ALT、AST 活性においても同様に群間での差がみられなかった (Table7-1-2)。HbA<sub>1c</sub> 値は CON 群のみで 1 週目に比べて 6 週目で増加の傾向 ( $0.05 < p < 0.1$ ) を示したが、TRG や NA 群ではそのような現象は見られなかった (Fig.7-1-1)。NA② 群は肝臓の T-Chol、TG 値が上昇した (Table7-1-3)。血清中の TRG、NA 分析の結果、TRG① 群や TRG② 群は CON 群にはないピークが見られ、また 0.05% 混餌の TRG① 群よりも 0.1% 混餌した TRG② 群の方が高いピークを示した (Fig.7-1-2)。標品と混ぜて分析したところ、ピークが重なる事からこのピークは TRG と同定した。しかし NA① 群、② 群には標品 NA と同じ保持を持つピークは見られなかった (Fig.7-1-2)。

#### 7.1.4 考察

TRG、NA の糖尿病モデル動物への影響を検討する前に、それらの非糖尿病モデルラットへの影響を検討するため、本章ではそれらを Wistar ラットに給与し糖尿病マーカーや酸化ストレスマーカー、脂質レベル等の影響を比較、検討した。

その結果、食餌摂取量や体重増加量、血液 TBARS 値、血清 ALT・AST 活性値には群間における有意な差がなかった。しかし NA 群においては、肝臓の T-Chol や TG 値の上昇が見られた。NA は高脂血症薬であり、肝臓でのコレステロール合成の抑制や中性脂肪の分解の促進により、血液中のコレステロールと中性脂肪を減らし、HDL-C 値を上げることが知られている (19)。しかし本章での結果はこれとは異なるものとなった。TRG 群では 0.1% 給与群において血清 T-Chol が有意な高値を示した。その要因のひとつには TRG 群における HDL-C の増加が考えられた。肝臓脂質においては群間で差はなかった。

糖尿病のマーカーである HbA<sub>1c</sub> の CON 群における値は、飼育 1 週目に比べて 6 週目で増加したが ( $p < 0.1$ )、TRG、NA 群においてはその増加が観察されなかった。糖化については糖尿病動物におけるよりもむしろ高い値を示し、老化の進行に従って増加

Table 7-1-2 Effects of trigonelline and nicotinic acid on organ weights, blood glucose and TBARS levels, and serum enzyme activities.

Dietary group	CON	TRG ①	TRG ②	NA ①	NA ②
Initial body weight (g)	179 ± 3	181 ± 3	184 ± 2	181 ± 2	183 ± 4
Final body weight (g)	284 ± 4	278 ± 8	293 ± 3	279 ± 5	281 ± 3
Total food intake (g)	722 ± 6	719 ± 8	720 ± 6	720 ± 9	708 ± 11
Fasting blood glucose (mg/dl)					
1st week	68.4 ± 4.0	67.4 ± 3.7	71.0 ± 1.9	71.4 ± 5.5	68.6 ± 4.2
6th week	93.8 ± 2.7	80.4 ± 6.1	89.8 ± 3.6	92.8 ± 6.0	96.6 ± 1.8
Fed blood glucose (mg/dl)					
1st week	110 ± 2	115 ± 5	110 ± 4	111 ± 2	106 ± 6
6th week	120 ± 4	116 ± 3	115 ± 4	109 ± 4	117 ± 3
Organ weights (% of body weight)					
Liver	3.14 ± 0.08	3.00 ± 0.10	3.13 ± 0.08	3.13 ± 0.05	3.16 ± 0.05
Kidney	0.333 ± 0.004	0.331 ± 0.006	0.317 ± 0.009	0.340 ± 0.008	0.343 ± 0.008
White fat					
Mesentery	1.36 ± 0.07	1.28 ± 0.13	1.46 ± 0.13	1.41 ± 0.24	1.36 ± 0.16
Pararenal	0.331 ± 0.027	0.280 ± 0.027	0.348 ± 0.032	0.281 ± 0.035	0.295 ± 0.018
Epididymal	1.24 ± 0.11	1.23 ± 0.16	1.38 ± 0.08	1.12 ± 0.08	1.17 ± 0.04
Blood TBARS (nmol/ml)	0.905 ± 0.090	0.798 ± 0.076	0.885 ± 0.047	0.831 ± 0.056	0.826 ± 0.080
Serum enzyme					
ALT (μmol/min/L)	44.5 ± 10.2	43.3 ± 8.7	37.8 ± 8.0	45.9 ± 6.4	43.6 ± 10.3
AST (μmol/min/L)	74.9 ± 6.7	70.2 ± 6.1	64.1 ± 4.79	77.2 ± 5.0	73.6 ± 7.2

Values are means±SEM, n=5 (all groups). Means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

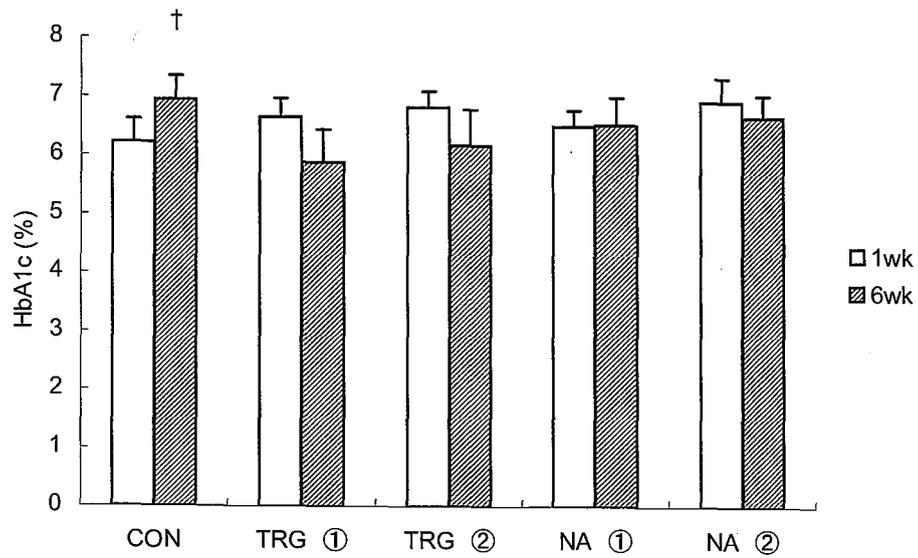


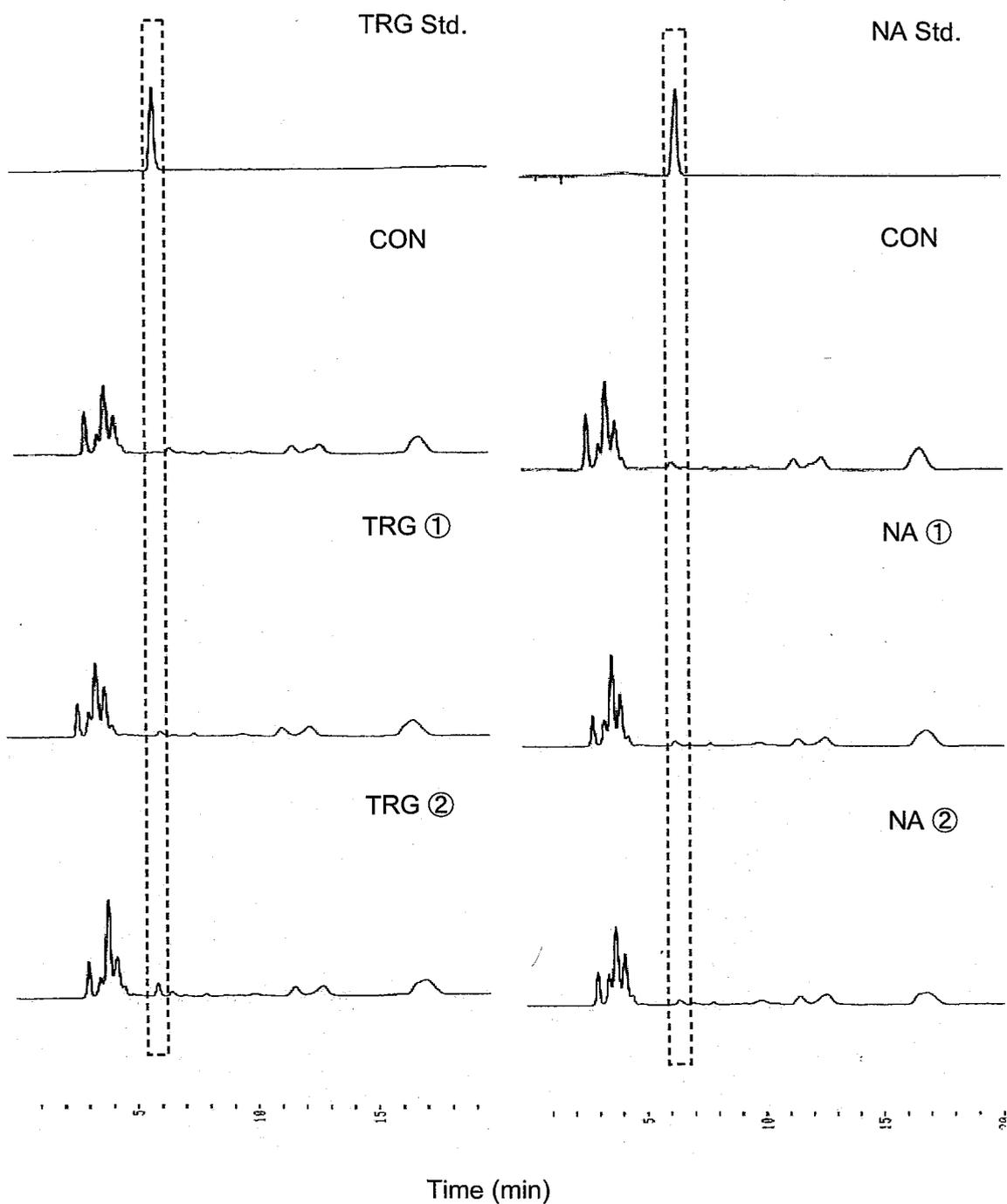
Fig. 7-1-1 Effects of trigonelline and nicotinic acid on hemoglobin A<sub>1c</sub> levels in the experimental animals.

† Significantly differ from the value at 1week in each group,  $p < 0.1$ .

Table 7-1-3 Effects of trigonelline and nicotinic acid on serum, and liver and feces lipid levels in the experimental rats.

Dietary group	CON	TRG ①	TRG ②	NA ①	NA ②
<b>Serum</b>					
T-Chol (mg/dL)	107 ± 6 <sup>b</sup>	103 ± 3 <sup>b</sup>	124 ± 5 <sup>a</sup>	115 ± 5 <sup>ab</sup>	116 ± 4 <sup>a</sup>
HDL-C (mg/dL)	40.5 ± 4.0 <sup>b</sup>	37.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	48.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	45.2 ± 2.2 <sup>ab</sup>	45.5 ± 2.8 <sup>ab</sup>
LDL-C (mg/dL)	46.4 ± 3.9	45.0 ± 6.1	52.6 ± 1.8	53.4 ± 3.2	52.5 ± 1.8
Atherogenic index	0.622 ± 0.016	0.630 ± 0.021	0.604 ± 0.012	0.604 ± 0.020	0.610 ± 0.015
TG (mg/dL)	97.7 ± 14.9	99.9 ± 24.2	110.9 ± 10.6	79.8 ± 11.8	91.6 ± 16.6
FFA (mEq/L)	0.180 ± 0.010	0.215 ± 0.014	0.286 ± 0.019	0.224 ± 0.021	0.247 ± 0.011
<b>Liver</b>					
Total lipid (mg/g of liver)	45.2 ± 1.1 <sup>bc</sup>	39.5 ± 1.8 <sup>c</sup>	41.5 ± 2.2 <sup>c</sup>	57.9 ± 9.2 <sup>ab</sup>	59.6 ± 7.6 <sup>a</sup>
T-Chol (mg/g of liver)	1.31 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.27 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.41 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.41 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.55 ± 0.06 <sup>a</sup>
TG (mg/g of liver)	8.95 ± 1.15 <sup>b</sup>	8.57 ± 0.85 <sup>b</sup>	10.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	16.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	17.3 ± 1.4 <sup>a</sup>
FFA (mEq/mg of liver)	15.1 ± 0.9 <sup>c</sup>	16.7 ± 1.0 <sup>bc</sup>	18.3 ± 0.8 <sup>bc</sup>	22.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	20.4 ± 0.5 <sup>ab</sup>
<b>Feces</b>					
Total excretion (g/40h)	2.14 ± 0.01	2.08 ± 0.12	2.10 ± 0.10	2.33 ± 0.06	2.15 ± 0.08
Total lipid (mg/g of total feces)	27.0 ± 1.6	30.0 ± 3.4	27.6 ± 2.9	27.0 ± 3.9	24.6 ± 1.7
T-Chol (mg/g of total feces)	6.41 ± 0.31 <sup>b</sup>	6.61 ± 0.27 <sup>b</sup>	7.44 ± 0.46 <sup>ab</sup>	6.58 ± 0.25 <sup>b</sup>	8.70 ± 1.11 <sup>a</sup>
TG (mg/g of feces)	16.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	14.1 ± 0.7 <sup>ab</sup>	14.5 ± 0.7 <sup>ab</sup>	13.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	12.6 ± 0.8 <sup>b</sup>

Values are means±SEM, n=5 (all groups). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).



The amounts of whole blood was calculated as 6% of the body weight.

	TRG in serum ( $\mu\text{g/ml}$ )	whole blood (ml)	TRG in whole blood ( $\mu\text{g/whole}$ blood)	TRG in food (mg)	The amounts recovered in blood (%)
TRG①	4.21	16.7	70.0	7.75	0.903
TRG②	7.51	17.6	132	15.7	0.839

Fig. 7-1-2 HPLC chromatograms of trigonelline and nicotinic acid contained in the serum.

することが明らかになった。

TRG、NA 給与ラットの血清中における TRG、NA の分析を行った結果、絶食 10 時間後の血清中でも TRG は混餌した濃度に比例して見られたが、NA のピークはクロマトグラムでは観察されなかった。TRG① 群の血清には 4.2  $\mu\text{g/ml}$ 、TRG② 群では 7.5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で存在することが分った。ラットの全血液は体重の約 6% であるので (67)、計算すると TRG① 群では全血液中に 70.01  $\mu\text{g}$ 、TRG② 群で 131.99  $\mu\text{g}$  含まれていることになる。絶食前に摂取した食餌中の TRG 含量は TRG① 群が 7.75 mg、TRG② 群で 15.72 mg なので、吸収され血液中を滞留しているのは 0.903%、0.839% になる。

## 第7章 第2節 非肥満2型糖尿病モデル (GK) ラットによる検討

### 7.2.1 緒言

本章第1節では非糖尿病ラットにおいてNAとTRGが各種糖尿病マーカー等に及ぼす影響について検討を行った結果、TRG群では各分析項目において群間における差が見られなかった。しかしながらNA群は血清や肝臓の脂質 (T-Chol、TG値) においてCON群に比べ、変動する傾向を示した。

本節は非肥満の2型糖尿病モデルGKラットを用いて、前節で影響が小さかった低濃度のNA、TRG (NA 0.05%、TRG 0.056%) を用い、それらが糖尿病や酸化ストレスマーカー、脂質レベルに及ぼす影響を検討した。

### 7.2.2 実験方法

#### 7.2.2.1 サンプルと動物実験

実験には7.1.2.1と同じTRG、NAを用いた。

非肥満2型糖尿病モデルGK (GK/Slc 8週令 雄) ラットを用いて検討を行った。飼育は3.1.2と同じ環境下で行った。ラットは4日間馴化飼育後、6匹ずつ対照 (CON) 群、NA添加群 (NA群)、TRG添加群 (TRG群) の3群に分け、43日間飼育した。GKラットの対照として同週令のWistarラットを用いた。食餌組成をTable7-2-1に示した。NA、TRG群にはNA、TRGをそれぞれ0.05%、0.056%添加した飼料を与えた。尚、添加した量は $\alpha$ -コーンスターチ:スクロース=2:1混合から差し引いて飼料調整した。また、NAとTRGの添加量は同モル濃度とした。

食餌摂取量、体重は毎日測定した。空腹時の血糖値、随時血糖値は飼育開始1、3、5週目に測定した。HbA<sub>1c</sub>は1、4、6週目に測定した。OGTTは飼育26-27日目に、糞と尿の採取は34-35日目に行い、使用時まで-80℃で保存した。飼育最終日には、10時間絶食後ネブタール麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取した。その後肝臓、左腎臓、左精巣周囲白色脂肪を取り出し、重量測定後液体窒素で凍結し、使用時まで-80℃で保

Table7-2-1 Composition of the experimental diets (%)

Constituent	Wistar CON	TRG	NA
Casein	15	15	15
α- Cornstarch:sucrose=2:1	70.5	70.444	70.45
Corn oil	5	5	5
Celulose	5	5	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1	1	1
trigonelline		0.056	
nicotinic acid			0.05
	100	100	100

1 AIN-93G-MX and 2 AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co,Ltd.

\* Trigonelline and nicotinic acid were added so that molecular weight agreed.

存した。

#### 7.2.2.2 血糖値測定、OGTT

空腹時、随時血糖は 7.1.2.3 と同様に行った。

OGTT は 10 時間絶食した後、血糖値を測定し (0 分)、その後 2 g/kg (体重) の D-グルコースを胃ゾンデにて経口強制投入し 15、30、60、120 分に血糖値を測定して行った。

#### 7.2.2.3 血清インスリン濃度、血中 HbA<sub>1c</sub>測定

OGTT (飼育 26-27 日目) 時のインスリン値測定は尾静脈より、解剖 (飼育 43 日目) 後のインスリン値は心臓より直接採血した血液を用い、5.2.3 と同様に測定した。

血中 HbA<sub>1c</sub> は 7.1.2.4 のとおり測定した。

#### 7.2.2.4 血清、肝臓、糞中の脂質濃度測定

肝臓と糞中脂質の抽出法は 7.1.2.5 と同じである。

血清、肝臓、糞中の T-Chol、HDL-C、TG、PL、FFA の測定には 3.3.2.2 で使用したキットを用い、総胆汁酸の測定には和光純薬工業株式会社製のキット総胆汁酸-テストワコーを用いた。

#### 7.2.2.5 血清アディポネクチン、TNF- $\alpha$ 、尿中 8-OHdG 濃度測定

血清アディポネクチン、TNF- $\alpha$ 濃度は 5.2.3 と同様に測定した。

尿中 8-OHdG 濃度の測定は、凍結しておいた尿を遠心分離 (1,000 × g, 20 min, 室温) して得られる上清を用いた。測定は日本老化制御研究所製の ELIZA キット New 8-OHdG Check を使用して行った。また和光純薬工業株式会社製クレアチンキット (クレアチニン-テストワコー) を用いてクレアチニン量を測定し、8-OHdG 量はクレアチニン当りの値として示した。

#### 7.2.2.6 過酸化脂質の測定

血液、肝臓過酸化脂質は 5.2.5 と同じ方法で測定した。

#### 7.2.2.7 肝臓還元型グルタチオン (GSH)、酸化型グルタチオン (GSSG) の測定

採取後-80℃で凍結保存しておいた肝臓 0.5 g に 10 倍量の 0.4 N 過塩素酸を加え、氷令下においてホモジナイズした。このホモジネートを遠心分離 (13,500 × g, 5 min 4℃) して除タンパク後、この上清を 0.20 μm フィルターろ過し、測定サンプルとした。また標準物質として GSH (100 μg/ml 0.2 N 過塩素酸) : GSSG (100 μg/ml 0.2 N 過塩素酸) = 1:1 を調製し、5 μl を HPLC に注入した。この標準物質の濃度とピーク面積、及びサンプルによるピーク面積から、それぞれのサンプル中の GSH、GSSG 量を算出した。

HPLC のカラムには 250 nm × 4.6 mm i.d. C18 DF-5-120A MCM カラム (MC MEDICAL, INC) を用い、検出には Coulochem II 電気化学検出器 (MC MEDICAL, INC) を用いた。移動相には 0.1 M リン酸二水素ナトリウムと 0.15 mM オクタンスルホン酸ナトリウムの混合液 (リン酸で pH 2.7 に調製) : CH<sub>3</sub>CN = 98 : 2 1 L 当り、酸化防止剤として 50 μl の Reagent MB を添加した溶液を用いた。

#### 7.2.2.8 溶血赤血球、肝臓の抗酸化酵素活性測定

溶血赤血球と肝臓サンプル調製法、また CAT や GPx 活性の測定法は 5.2.6 で述べた通りに行った。

#### 7.2.2.9 肝臓脂肪酸合成、分解酵素測定

##### 7.2.2.9.1 脂肪酸合成酵素 (FAS) 測定

測定サンプルの調製は Burton らの方法 (68) によって行った。活性測定は Fsu, Carey らの方法 (69,70) に従った。

凍結保存しておいた肝臓 2 g 程度を精秤し、1.5 倍量の 0.1M リン酸カリウムバッファ (pH 7.0 1 mM EDTA, 1 mM 2-メルカプトエタノール含) を加え、ホモジナイズし、遠心分離 (1,000 × g, 15 min, 4°C) した。さらにその上清を遠心分離 (100,000 × g, 45 min, 4°C) し、その上清を測定に用いた。

活性測定は 30°C 下で行った 1 ml の石英セルの中に 143 mM リン酸カリウムバッファ (pH 7.0 1.43 mM EDTA, 7.15 mM 2-メルカプトエタノール含) 0.7 ml、2.5 mM アセチル CoA 20 µl、10 mM マロニル CoA 20 µl、10 mM NADPH 30 µl、蒸留水 0.21 ml を加え 5 分間プレインキュベート後、測定サンプル 20 µl を添加して反応を開始した。NADPH の吸収波長 340 nm で 3 分間測定した。

#### 7.2.2.9.2 グルコース 6-フォスフェートデヒドロゲナーゼと 6-フォスフォグルコネートデヒドロゲナーゼ (G6PD + 6PGD) 活性測定

肝臓サンプルの調製、測定には BIOXYTECH G6PD/6PGD-340 キット (OXIS international 社) を使用した。

#### 7.2.2.9.3 カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) 活性測定

活性測定用のサンプルは、肝臓 0.5 g に 6 倍量の 3 mM Tris-HCl (0.25 M スクロース 1 mM EDTA 含) を加えてホモジナイズし、調製とした。

測定は Guglielmo らの方法 (71) に従った。活性測定は 30°C 下で行った。1 ml の石英セルの中に 116 mM Tris-HCl バッファ (pH 8.0 2.5 mM EDTA 0.2% TritonX-100, 5 µmol DTNB 含) 0.5 ml、測定サンプル 10 µl、蒸留水 0.46 ml を加え 412 nm で 3 分間吸光度を測定し、吸光度の上昇が見られなくなったら、2 mM パルトミール-CoA 20 µl 加え、さらに 3 分間吸光度の測定を行った。吸光度が一定に達した後、1.25 mM I-カルニチン溶液 10 µl を加え、さらに 3 分間の測定を行った。

#### 7.2.2.10 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

CON 群、TRG 群の肝臓における遺伝子発現量を評価するために、DNA マイクロアレイ分析を行った。

#### 7.2.2.10.1 肝臓 RNA サンプルの調製

肝臓からのトータル RNA 抽出は市販キット RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。抽出したトータル RNA サンプルは分光光度計を用いて収量を測定し、Agilent2100 Bioanalyzer (Agilent technology 社) を用いて純度検定を行った。またサンプルは使用するまで-80℃で保存した。

#### 7.2.2.10.2 発現解析

WT Sense Target Labeling Kit (NuGEN 社) を用いて cDNA 増幅を行い、Affymetrix 社 GeneChip Array (Rat Gene 1.0 ST Array 遺伝子数 29215) にハイブリダイゼーションを行った。GeneChip 3000 Scanner による Array のスキャンと画像データを取得した。cDNA 増幅工程から Array のスキャンまでは、NuGEN 社および Affymetrix 社のプロトコールに従った。

データ解析システム GeneChip® Operating Software を用いて、取得したサンプルの Array 画像データを確認した。GeneChip データ解析ソフトウェア Expression Console を用いて、遺伝子発現量を数値として抽出した txt ファイルへ変換した。標準化の設定は Expression Console に設定されている解析アルゴリズム RMA を使用した。

CON 群 (n=3) と TRG (n=3) 群の肝臓における遺伝子発現量を比較した。

#### 7.2.2.10.3 RT-PCR による遺伝子発現比の確認

Real-timePCR 装置を用いた RT-PCR 法により鍵となる遺伝子発現量を測定した。

トータル RNA サンプル 1 µg を DEPC 水で 8.5 µl に調整し、ランダムヘキサマー 1 µl を加え、72℃、10 分間加温しその後氷中で冷やした。さらに 5 × RT-buffer 4 µl、dNTP 4 µl、100 mM DTT 2 µl、ReverTra-Ace 0.5 µl (100 units/µl 東洋紡株式会社) を加え、42℃、1 時間の伸長反応後 cDNA サンプルを得た。

PCR 反応は、ミリ Q3.2  $\mu$ l、SYBERGreen Real-Time PCR Master Mix 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M 5'プライマー 0.4  $\mu$ l、10  $\mu$ M 3'プライマー 0.4  $\mu$ l さらに cDNA 1  $\mu$ l を専用の 96 穴マイクロプレートに入れ、分析した。反応条件は 95°C (30 sec)  $\rightarrow$  \*95°C (5 sec)  $\rightarrow$  55°C (15 sec)  $\rightarrow$  72°C (15 sec) \*\* $\rightarrow$  95°C (5 sec)  $\rightarrow$  65°C (1 min)  $\rightarrow$  98°C (continuous)  $\rightarrow$  50°C (30 sec) とし、\*から\*\*までを 45 サイクルとした。装置は LightCycler®480 System (Roche Applied Science 社) を使用した。発現量は、グルコース-6-フォスファターゼ (Gene symbol; G6pc, sense, 5'-CTACCTTGCGGCTCACTTTC-3'; antisense, 5'-ATCC AAGTGCGAAACCA AAC-3')、アンジオポエチン様タンパク質 4 (Angptl4, sense, 5'-CAGAACAGCAAGATCCAGCA-3'; antisense, 5'-CCTCTTTCCCCTCGAAGTCT-3'), シトクローム P450, サブファミリー-51 (Cyp51, sense, 5'-GTGCCAAATGCAGTT TTCCT-3'; antisense, 5'-TCAGACAGCGCTTCAAACA C-3') について検討した。内部標準に $\beta$ -アクチン (sense, 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3', antisense, 5'-CGTCA CACTTCATGATG-3') を用い、遺伝子発現量を補正した。実験に用いたプライマーはシグマ アルドリッチ ジャパン株式会社より合成したものを購入し使用した。

#### 7.2.2.11 統計分析

データは平均 $\pm$ SEM で表した。データは、一元配置分散分析法 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher's PLSD 法を用いた。統計的有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 7.2.3 結果

飼育中の体重増加量は CON 群で 42 日間にわたって増加を示したのに対し、TRG、NA 群では 21 日目以降にその増加に抑制傾向が見られた。37 日目以降では NA 群において有意な増加の抑制が見られた。飼育中の食餌摂取量には群間における有意差がなかった (Fig.7-2-1)。

飼育開始時、3、5 週目に測定した空腹時血糖値は非糖尿病の Wistar 群が GK ラット群に比して、明らかに低い値を示したが、GK ラットの CON 群、TRG 群および

NA 群の間では、有意な差は見られなかった。摂食 1 時間後における随時血糖値は、各群において実験開始時と 3 週目の間には有意な違いがなかったが、TRG 群においては 5 週目に開始時に比べ有意な低下を示した。NA 群においては低下傾向が見られた (Fig.7-2-2)。

飼育 26-27 日目に行った OGTT においては、糖投与後 60、120 分で CON 群に比べて TRG 群が有意な上昇の抑制を示した (Fig.7-2-3)。しかし、NA 群においては抑制が見られなかった。OGTT の AUC においても、同じように CON 群に比べて TRG 群において有意に低い値を示したが、NA 群においては低下が見られなかった。またこの OGTT 時の血清 FFA 濃度を測定したところ、Wistar 群と TRG 群においては糖負荷時以降値が低くなるが、CON 群と NA 群においては 15 分後が最も高値になりその後低下した。OGTT 前には 10 時間の絶食があり、その後糖を投与すると Wistar 群と TRG 群では、糖のエネルギー源としての利用と平行して脂肪酸の利用も円滑に行われるのに対し、CON 群と NA 群では脂肪酸の利用が円滑に行われていないことが推察された。

43 日後の解剖で摘出した肝臓重量には GK ラットで群間に有意差はなかったが、腎臓、精巣周囲白色脂肪細胞重量は CON 群において高く、TRG、NA 群では低いまたは低い傾向にあった (Table7-2-2)。飼育 4 週目に行った OGTT での糖投与前 (空腹時) でも同じ傾向が観察されたが、血清インスリン値は CON 群に比べて、TRG 群において低く、NA 群と CON 群間には差がなかった (Table7-2-2)。脂肪細胞由来のサイトカイン、アディポネクチンでは CON 群のばらつきが大きく各群間における統計的差異は見られなかった (Table7-2-2)。TNF- $\alpha$  は CON 群に比べて TRG 群で低く、NA 群では CON 群と差がなかった。アディポネクチンと TNF- $\alpha$  はお互いの作用を抑制し合い、脂肪組織においては転写レベルでそれぞれの産生が抑制されていることが知られている (72,73)。

血清 T-Chol、TG、FFA 値は非糖尿病の Wistar 群に比べて CON 群で高い、または高い傾向を示したが、TRG、NA 群では有意に低下した (Table7-2-3)。また TRG 群と NA 群の 2 群間において差は見られなかった。肝臓 T-Chol、TG、FFA も Wistar 群

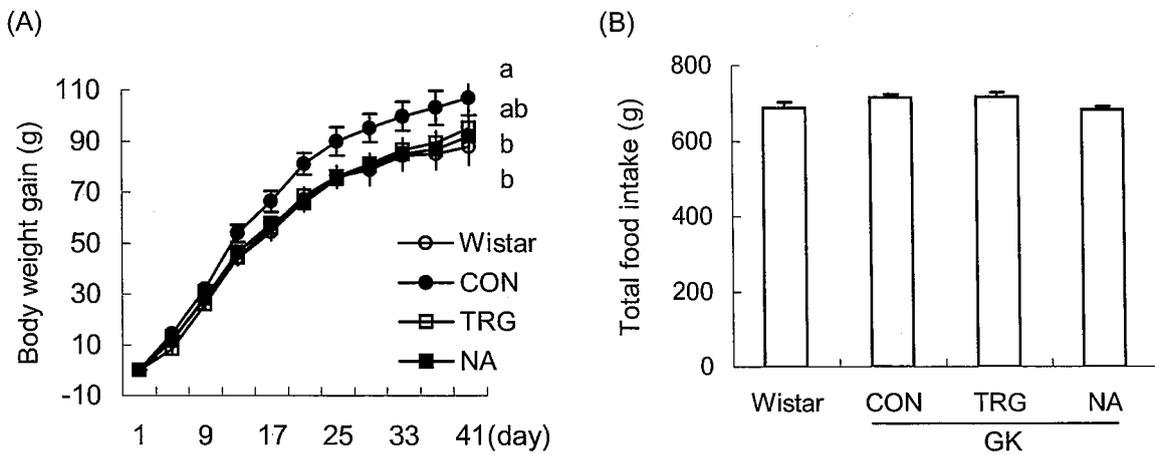


Fig. 7-2-1 Body weight gain and total food intake .  
 (A) Body weight gain. (B) Total food intake for 43 d.

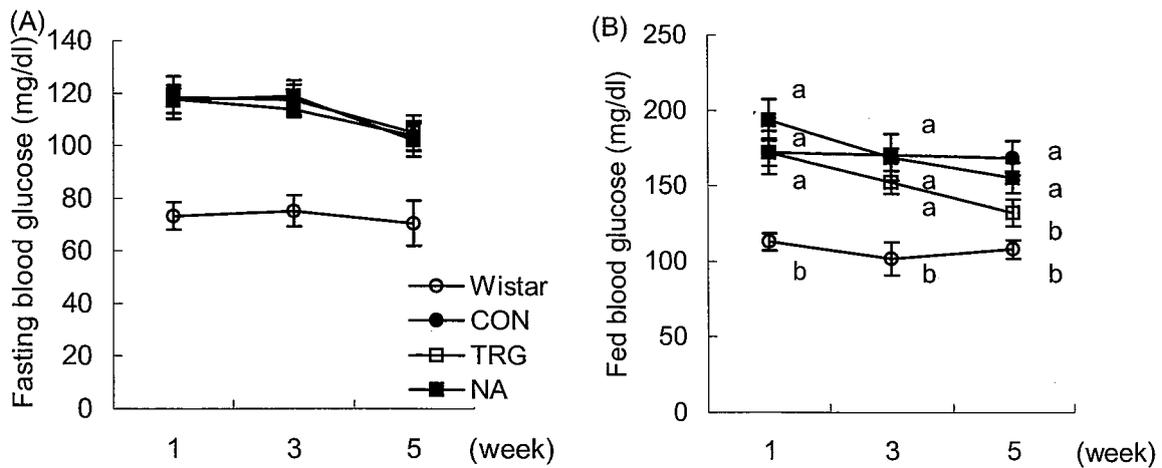


Fig.7-2-2 Fasting and fed blood glucose levels.  
 (A) Fasting blood glucose was measured after 10h of fasting at 1, 3 and 5 week. (B) Fed blood glucose was measured 1h after diet intake at 1, 3 and 5 week. Values are means±SEM. Values without a common letter at the same week differ significantly.

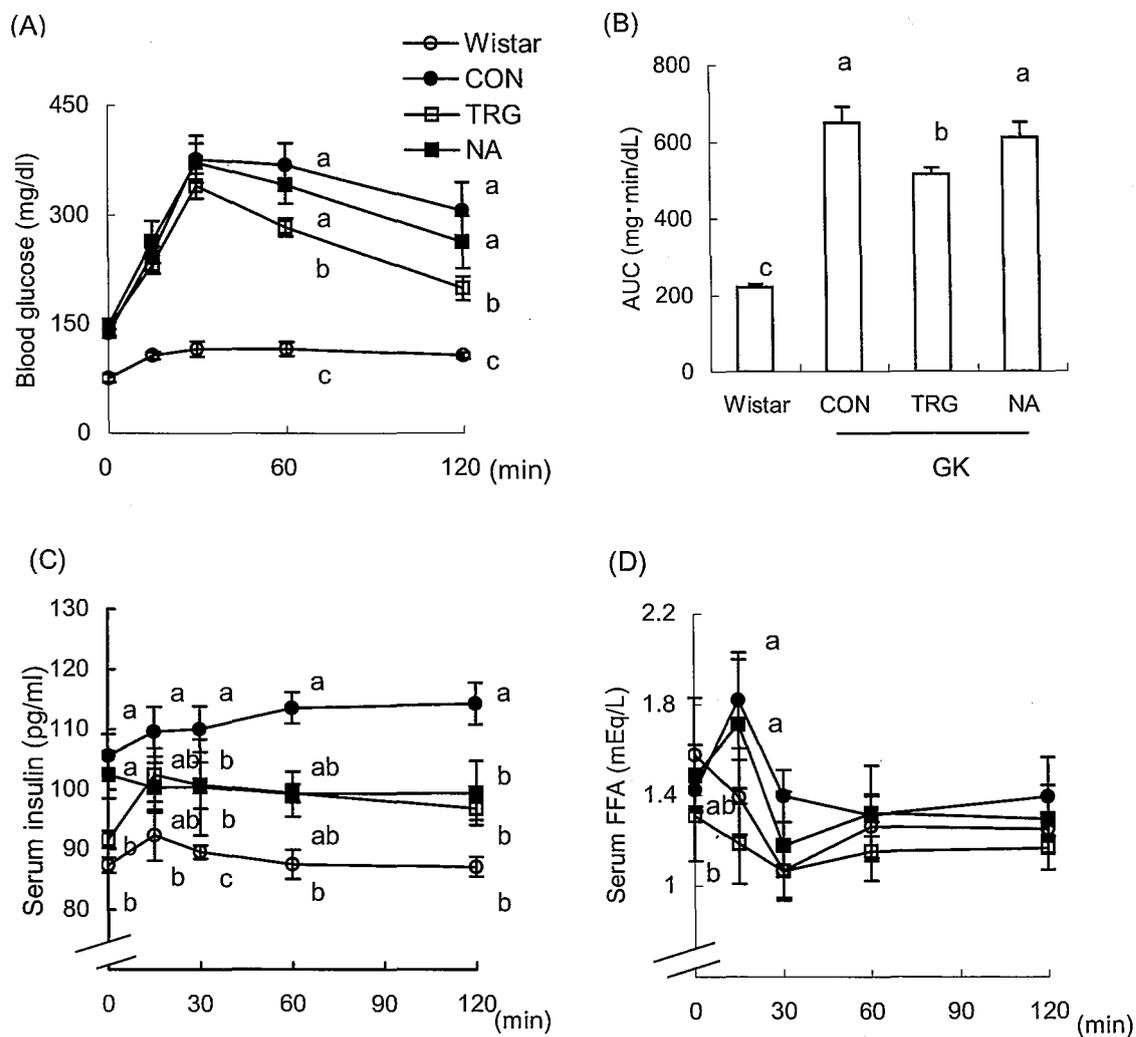


Fig.7-2-3 Effect of trigonelline or nicotinic acid on OGTT in experimental animals. (A) Glucose loading was carried out (12wk old) in experimental GK rats on days 26-27. (B) Calculated areas under the curve (AUC) of the OGTT. (C) Serum insulin concentration before and after glucose administration. (D) Serum free fatty acid concentration before and after glucose administration. Values are means $\pm$ SEM, n=5 (Wistar), n=6 (CON, TRG, NA group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-2-2 Effects of trigonelline and nicotinic acid on serum insulin and adiponectin, and TNF- $\alpha$  levels.

Dietary group	Wistar	GK		
		CON	TRG	NA
Organs weight (% of body weight)				
Liver	3.19 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	3.44 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	3.32 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	3.27 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
Kidney	0.312 $\pm$ 0.006 <sup>c</sup>	0.424 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	0.411 $\pm$ 0.010 <sup>ab</sup>	0.393 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>
Fat tissue				
Mesentery	0.251 $\pm$ 0.055	0.355 $\pm$ 0.042	0.284 $\pm$ 0.031	0.316 $\pm$ 0.031
Pararenal	1.09 $\pm$ 0.10	1.16 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.05
Epididymal	0.751 $\pm$ 0.050 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.686 $\pm$ 0.040 <sup>b</sup>	0.736 $\pm$ 0.019 <sup>b</sup>
Serum				
Insulin (pg/ml)	87.2 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	116.9 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	103.7 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	118.5 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>
Adiponectin (ng/ml)	96.3 $\pm$ 6.4	82.4 $\pm$ 25.8	92.8 $\pm$ 19.1	100.9 $\pm$ 2.4
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	121 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	123 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	111 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	116 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>

Values are means $\pm$ SEM, n=5 (Wistar, NA group), n=6 (CON, TRG group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-2-3 Effects of trigonelline and nicotinic acid on serum, liver and feces lipid levels.

Dietary group	Wistar	GK		
		CON	TRG	NA
Serum				
T-Chol (mg/dL)	66.0 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>	123.3 $\pm$ 21.5 <sup>a</sup>	87.7 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	83.6 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dL)	45.2 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	72.7 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	67.4 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	66.3 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
LDL-C (mg/dL)	10.4 $\pm$ 4.7 <sup>c</sup>	66.9 $\pm$ 16.7 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	8.3 $\pm$ 1.1 <sup>bc</sup>
Atherogenic index	0.451 $\pm$ 0.076	0.680 $\pm$ 0.271	0.334 $\pm$ 0.092	0.263 $\pm$ 0.023
TG (mg/dL)	82.2 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	90.9 $\pm$ 16.6 <sup>a</sup>	43.8 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	45.3 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
FFA (mEq/L)	0.629 $\pm$ 0.040 <sup>b</sup>	0.705 $\pm$ 0.045 <sup>a</sup>	0.567 $\pm$ 0.060 <sup>b</sup>	0.724 $\pm$ 0.106 <sup>b</sup>
Total Bile Acid ( $\mu$ mol/l)	1.84 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	7.25 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	3.72 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>	3.78 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>
Liver				
Total lipid (mg/g of liver)	51.7 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	58.7 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>	37.0 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>	45.1 $\pm$ 2.4 <sup>ab</sup>
T-Chol (mg/g of liver)	3.15 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	4.96 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	2.90 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	2.79 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
TG (mg/g of liver)	16.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	52.2 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	15.6 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	18.4 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>
PL (mg/g of liver)	16.5 $\pm$ 1.6	23.0 $\pm$ 3.5	19.5 $\pm$ 2.1	16.1 $\pm$ 2.4
FFA (mEq/g of liver)	65.1 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup>	66.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	57.5 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	61.9 $\pm$ 4.6 <sup>ab</sup>
Feces				
Total excretion (g/40h)	1.96 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	2.50 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
Total lipid (mg/g of total feces)	35.1 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	40.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	32.4 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	34.4 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
T-Chol (mg/g of total feces)	0.809 $\pm$ 0.039	0.883 $\pm$ 0.081	0.878 $\pm$ 0.075	0.755 $\pm$ 0.085
TG (mg/g of feces)	13.5 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	57.1 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	18.5 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>	31.8 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>

Values are means $\pm$ SEM, n=5 (Wistar, NA group), n=6 (CON, TRG group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

に比べて CON 群が高い値を示し、TRG、NA 群において CON 群に比べて低下または低下傾向を示した。飼育 6 週目で採取した糞を分析した結果、総脂質排泄量 (mg/g of total feces) は Wistar 群に比べ CON 群で高い値を示したが、TRG 群、NA 群においては CON 群に比べて有意に低下した。TG 排泄量においても同様な結果を示した。尚、糞中への T-Chol 排出量には群間における大きな違いはなかった。

各群の HbA<sub>1c</sub> 値の比較は、各群の 4、6 週目の値をそれぞれ 1 週間目の値と比較して行った (Fig.7-2-4)。Wistar 群、CON 群は 1 週目と比較して 4 週目で上昇傾向、6 週目で有意な上昇が観察された。しかし TRG 群、NA 群は 4 週目で有意に上昇が見られたが、6 週目には低下し 1 週目とほぼ同じレベルに達した。

肝臓の脂肪酸合成系酵素の 1 つである FAS と脂肪酸合成に必要な NADPH の 60% をまかなっている G6PD と 6PGD (74)、そして脂肪酸のβ酸化系の酵素 CPT 活性測定の結果を Fig.7-2-5 に示す。FAS、G6PD + 6PGD 活性ともに TRG 群のみが有意に低値を示した。一方、CPT 活性は NA 群のみが高い活性値を示した。

血清と肝臓の TBARS 値はともに CON 群に比して TRG 群において有意に低い値を示した (Table7-2-4)。NA 群の血清 TBARS 値は CON 群に比べて低い傾向を示したが、肝臓 TBARS 値は群間による違いが見られなかった。

酸化ストレスのマーカーである尿中 8-OHdG は Wistar 群より CON 群で高い傾向を示し、TRG 群においては CON 群より低い値を示した。NA 群では CON 群よりもむしろ高い傾向にあった (Table7-2-4)。

酸化ストレスの状態を知るために肝臓での GSH、GSSG の測定を行った (Table7-2-5)。Wistar 群に比べ、CON 群、TRG 群で高い値を示した GSH 量は、NA 群において低下を示した。一方、GSSG も CON 群で高い値を示したが、サンプル添加群ではその上昇に抑制が見られた。総グルタチオン中の GSH の割合は、CON 群で低下したが、サンプル給与群では Wistar 群のレベルと同等であった。

溶血赤血球の CAT、GPx 活性は Wistar 群に比べ、CON 群で高い値を示したが、TRG、NA 群では上昇抑制または抑制傾向が見られた (Table7-2-6)。肝臓でのこれら

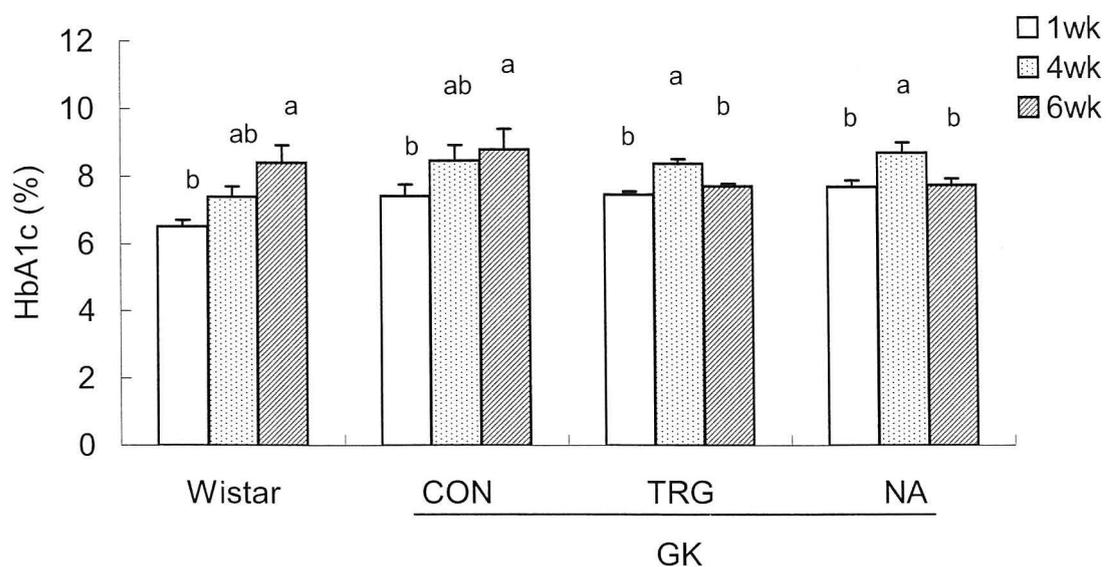


Fig.7-2-4 Effect of trigonelline and nicotinic acid on hemoglobin A<sub>1c</sub> levels in experimental animals. Means with different letters among the same group differ significantly ( $p < 0.05$ ).

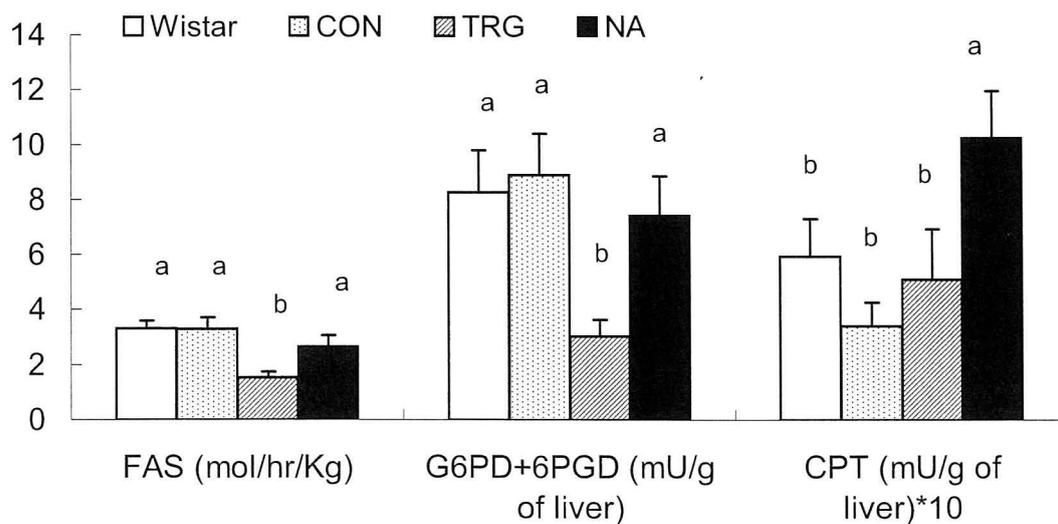


Fig.7-2-5 Effect of trigonelline and nicotinic acid on liver FAS, G6PD+6PGD and CPT activities. Liver fatty acid synthase (FAS), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) + 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) and carnitine palmitoyl transferase (CPT) activities. Values are means  $\pm$  SEM,  $n=5$  (Wistar, NA group),  $n=6$  (CON, TRG group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-2-4 Effects of trigonelline and nicotinic acid on oxidative status and urea creatinine levels.

Dietary group	Wistar	GK		
		CON	TRG	NA
<b>TBARS</b>				
Blood (nmol/ml)	1.32 ± 0.35 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.46 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.25 <sup>ab</sup>
Liver (nmol/g of liver)	172 ± 14 <sup>ab</sup>	178 ± 5 <sup>a</sup>	148 ± 6 <sup>b</sup>	188 ± 16 <sup>a</sup>
<b>Urea</b>				
8-OHdG (ng/g of creatinine)	442 ± 85 <sup>a</sup>	665 ± 158 <sup>a</sup>	239 ± 59 <sup>b</sup>	727 ± 185 <sup>a</sup>
Creatinine (g/40h)	0.701 ± 0.111	0.933 ± 0.098	1.002 ± 0.088	0.849 ± 0.114

Values are means±SEM, n=5 (Wistar, NA group), n=6 (CON, TRG group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-2-5 Effects of trigonelline and nicotinic acid on liver glutathione levels.

Dietary group	Wistar	GK		
		CON	TRG	NA
GSH (mmol/kg of liver)	3.72 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.27 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.16 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.67 ± 0.19 <sup>b</sup>
GSSG (mmol/kg of liver)	0.0196 ± 0.0064 <sup>b</sup>	0.0592 ± 0.0123 <sup>a</sup>	0.0239 ± 0.0054 <sup>b</sup>	0.0269 ± 0.0069 <sup>b</sup>
GSH/ (GSH+GSSG) ratio	0.995 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.986 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.994 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.992 ± 0.0023 <sup>a</sup>

Values are means±SEM, n=5 (Wistar, NA group), n=6 (CON, TRG group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-2-6 Effects of trigonelline and nicotinic acid on blood and liver antioxidant enzymes activities.

Dietary group	Wistar	GK		
		CON	TRG	NA
<b>Blood</b>				
CAT (U/mg of Hb)	4.74 ± 0.72 <sup>b</sup>	7.96 ± 1.21 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.38 <sup>ab</sup>	6.75 ± 0.73 <sup>ab</sup>
GPx (U/mg of Hb)	27.6 ± 4.2 <sup>ab</sup>	34.0 ± 3.3 <sup>a</sup>	24.8 ± 2.0 <sup>b</sup>	23.9 ± 2.6 <sup>b</sup>
<b>Liver</b>				
CAT (U/mg of protein)	70.8 ± 3.5 <sup>a</sup>	76.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	50.5 ± 6.3 <sup>b</sup>	64.4 ± 4.4 <sup>ab</sup>
GPx (U/mg of protein)	1.04 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.06 <sup>a</sup>

Values are means±SEM, n=5 (Wistar, NA group), n=6 (CON, TRG group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-2-7 Gene expression profiles in the liver of GK rat fed trigonelline.

	Gene name	Gene symbol	Genbank no.	function	Fold change *	p
Upregulated	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	Pdk4	AF034577	acetyl CoA synthesis inhibitor	2.78	<0.01
	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	BC062079	calcium ion binding	2.11	<0.01
	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hnf4a	D10554	transcription factor(G6Pase,PEPCK)	0.50	<0.01
	<b>glucose-6-phosphatase, catalytic subunit</b>	<b>G6pc</b>	<b>BC090067</b>	<b>gluconeogenesis</b>	<b>0.50</b>	<b>&lt;0.01</b>
	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal	Smpd1	BC083780	ceramide synthesis	0.50	<0.05
	E1A binding protein p300	Ep300	XM_576312	PPAR binding	0.49	<0.05
	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide	Cyp17a1	X14086	steroid synthesis	0.49	<0.01
	LAG1 homolog, ceramide synthase 2	Lass2	BC101876	ceramide synthesis	0.48	<0.01
	phosphatase and tensin homolog	Pten	AF017185	insulin signal	0.48	<0.01
	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	Herpud1	AB033771	response to stress	0.48	<0.01
Downregulated	<b>angiopoietin-like 4</b>	<b>Angptl4</b>	<b>BC078944</b>	<b>LPL activity inhibitor</b>	<b>0.47</b>	<b>&lt;0.05</b>
	patatin-like phospholipase domain containing 8	Pnpla8	CH473947	calcium-independent phospholipase A2 activ	0.47	<0.05
	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	Fdft1	BC081810	squalene synthesis	0.46	<0.01
	ATP citrate lyase	Acly	BC100618	acetyl CoA synthesis	0.45	<0.01
	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase	Pfkfb1	Y00702	glycolysis	0.44	<0.05
	forkhead box O1	Foxo1	NC_005101	transcription factor(G6Pase,PEPCK)	0.42	<0.01
	<b>cytochrome P450, subfamily 51</b>	<b>Cyp51</b>	<b>BC087033</b>	<b>cholesterol synthesis</b>	<b>0.42</b>	<b>&lt;0.01</b>
	choline phosphotransferase 1	Chpt1	BC082074	phosphatidylcholine synthesis	0.41	<0.01
	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit(basic helix-loop-helix transcription factor)	Hif1a	AF057308	calcium ion binding	0.36	<0.01
	glucokinase	Gck	X53588	glycolysis	0.33	<0.01
	lipin 1	Lipin1	BC083651	phosphatidate phosphatase activity	0.28	<0.05
	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	Cyp7a1	J05460	Bile acid synthesis	0.19	<0.01

\* Relative value to control group. Expression of genes with **bold-font** letters was also checked by RT-PCR.

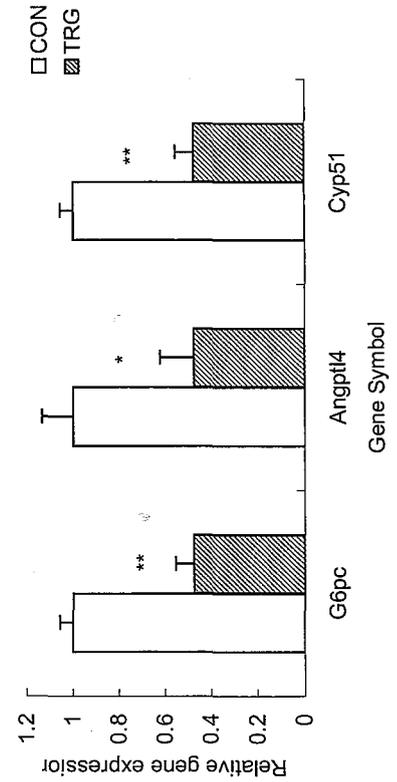


Fig. 7-2-6 Changes in liver gene expression levels of glucose-6-phosphatase (G6pc), angiopoietin-like 4 (Angptl4) and cytochrome P450 subfamily 51 (Cyp51) in trigonelline-fed rats. Normalization was performed with respect to  $\beta$ -actin. Values are expressed as relative value to the control group. Values are means $\pm$ SEM of four animals. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs. CON group.

の酵素活性は、赤血球の場合と違って Wistar 群と CON 群との間に差がなかったが、TRG、NA 群では CON 群に比べ有意に低い、または低い傾向にあった。

DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現変化を解析したところ、2 倍以上に上昇した遺伝子数は 369、低下した遺伝子数は 669 であった。中でも今回の実験に関連のある糖代謝と脂質代謝に絞って検索したものを、Table7-2-7 に示す。G6pc、フォークヘッド転写因子 (Foxo1)、肝細胞核因子 4 $\alpha$  (Hnf4 $\alpha$ ) 等の糖新生に関わる遺伝子発現が低下しており、TRG による糖代謝の制御がインスリン抵抗性の改善と強く関連していることが支持された。アセチル CoA の合成に関わる ATP シトレート リアーゼ (Acly) の発現低下、合成を阻害するピルベートデヒドロゲナーゼキナーゼアイソザイム 4 (Pdk4) の発現増加によりアセチル CoA 合成が抑制されていた。さらにコレステロール合成酵素の Cyp51 や LPL 活性を抑制する Angptl4 の発現低下が見られた。また real-timePCR で定量した遺伝子 G6pc、Angptl4、Cyp51 の CON 群と TRG 群の発現結果を Fig.7-2-6 に示す。いずれもマイクロアレイの結果と同じ傾向を示している事がわかった。

#### 7.2.4 考察

本節では TRG と NA が同モルになる食餌を GK ラットに 43 日間給与した実験を行った。

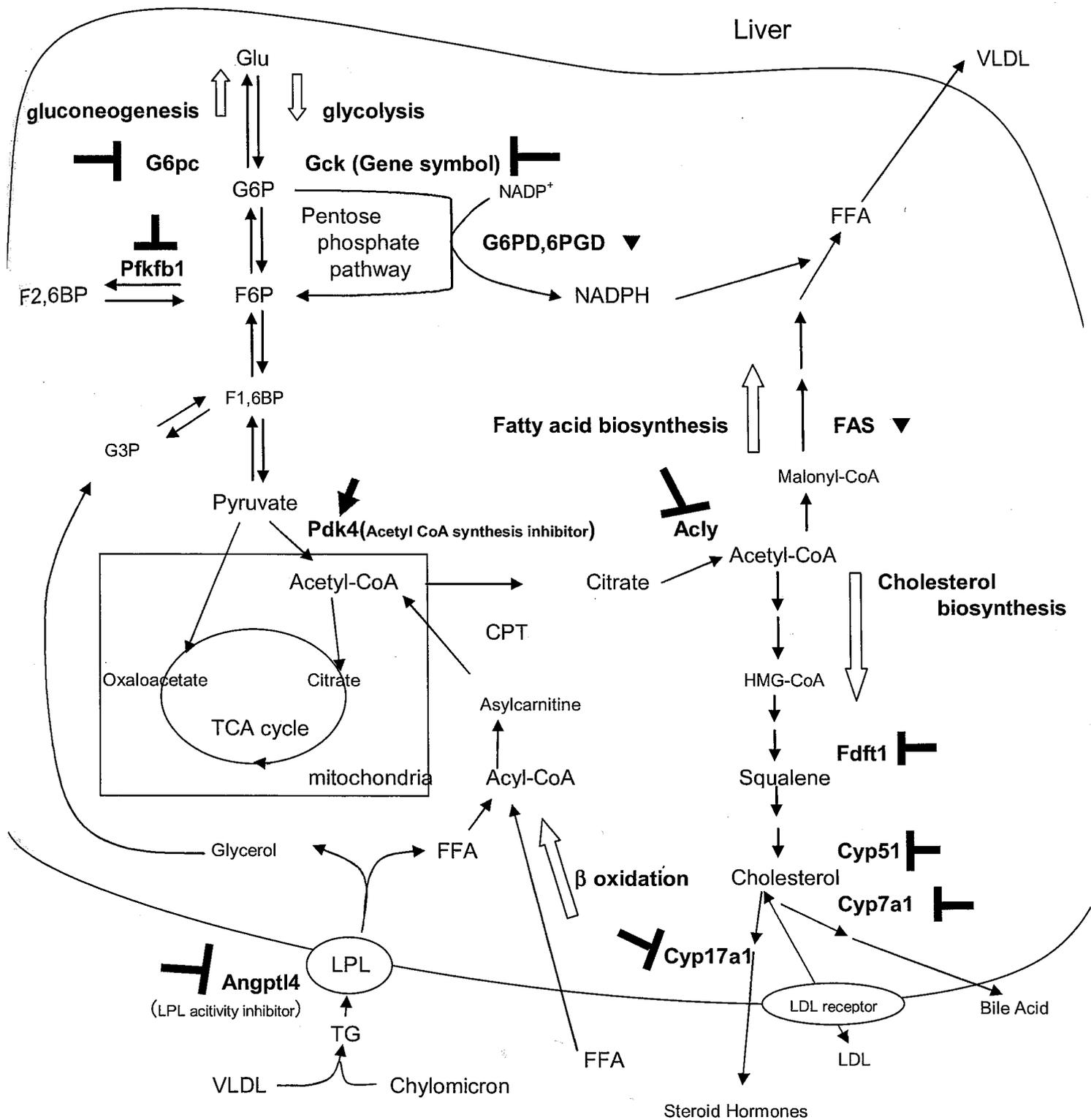
OGTT の結果から、CON 群はインスリンの分泌が多いにも関わらず血糖値が低下しないことからインスリン抵抗性になっていると考えられる。TRG を与えたラットにおいては耐糖能に改善が見られたが、NA 群では改善が見られなかった。しかし両群とも血清インスリン値が CON 群より低い値になっている。つまり TRG 群は OGTT 時の血糖、インスリン値が低く、NA 群は高血糖だがインスリン値が低い。この 2 群間を比較すると、より TRG 群はインスリン感受性が良いと考えられる。TRG 群における遺伝子の応答を DNA マイクロアレイで検討した結果、CON 群に比して TRG 群では、主に糖新生のキー酵素である G6pc とフォスファターゼとテンシンの相同タンパク

(Pten) の発現が低下しており、その低下がインスリン抵抗性改善の一要因になっていることが考えられた (参考 Fig.7-2-7~7-2-9)。

核内転写因子である Foxo1 や Hnf4 $\alpha$  の発現が低下していることから、その低下に伴って G6pc の発現に見られるものと考え、TRG の給与はこれらの発現を抑制し、糖新生を抑制しているものと考えられる (参考 Fig.7-2-8)。また Foxo1 はインスリンの制御を受けており、インスリン存在下ではフォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) / プロテインキナーゼ B (Akt) によりリン酸化を受け Foxo1 は核外へ移動し転写活性は発揮されず、G6pc の発現は低下する。しかしインスリン抵抗性である場合、Foxo1 が核内に残存し、糖新生系酵素の遺伝子発現が維持され、高血糖に傾く事が報告されている (75)。TRG 群はこのインスリンシグナルが円滑に行われることで糖新生を抑制していると推察される。尚、解糖系酵素であるグルコキナーゼ (Gck) の発現量が CON 群よりも低下していたのは、臓器の摘出が絶食 10 時間後に行われた為、TRG 群では血中の糖濃度が CON 群よりも低くなっていたことが原因のひとつと考えられる。

Pten はインスリンの代謝において、中心的な役割を担う PI3K 産物フォスファチジルイノシトール (3,4,5) 3リン酸 (PI (3,4,5) P3) を代謝し、インスリンシグナルを負に調節する。PI (3,4,5) P3 は Akt を活性化することでグルコース輸送担体 4 型 (GLUT4) を細胞膜まで輸送する (76)。TRG 群における Pten の低発現は、PI (3,4,5) P3 濃度を上げて GLUT4 のトランスロケーションを誘導し、糖の取込みが促進したと考えられる (参考 Fig.7-2-9)。絶食 10 時間にも関わらず、TRG 群の方が糖の取込みを亢進したとすれば摂食時での糖取込みは TRG 群で CON 群よりも、より円滑に行われていることが推察できる。

通常取り込まれるグルコースの多くは、解糖系から TCA 回路を経て ATP 産生に利用されるが、高血糖状態ではポリオール経路等の迂回経路を通るようになる。グルコースはポリオール経路によりソルビトール、フルクトースに変換されるが、この変換時に NADPH が大量に消費されるため、NO や GSH の合成が低下し、酸化ストレスが亢進



G6P	glucose 6-phosphate
F6P	Fructose 6-phosphate
F1,6BP	Fructose 2,6-bisphosphate
F2,6BP	Fructose 1,7-bisphosphate
FFA	Free fatty acid
TG	Triglyceride
LPL	Lipoprotein lipase

Fig.7-2-7 Effect of trigonelline on glucose and lipid metabolism.

↑ ; Promotion.

⊥ ; Suppression.

▼ ; Enzyme decreased its activity in TRG-fed group.

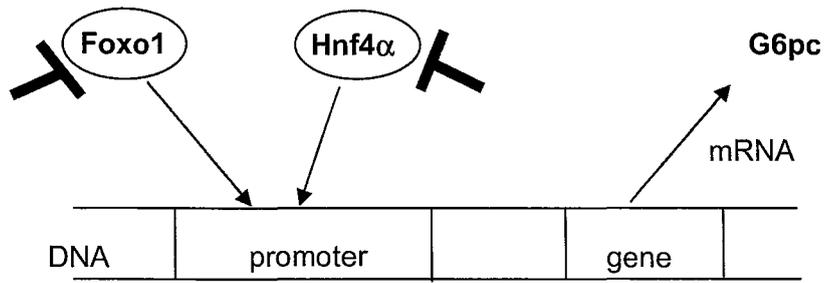
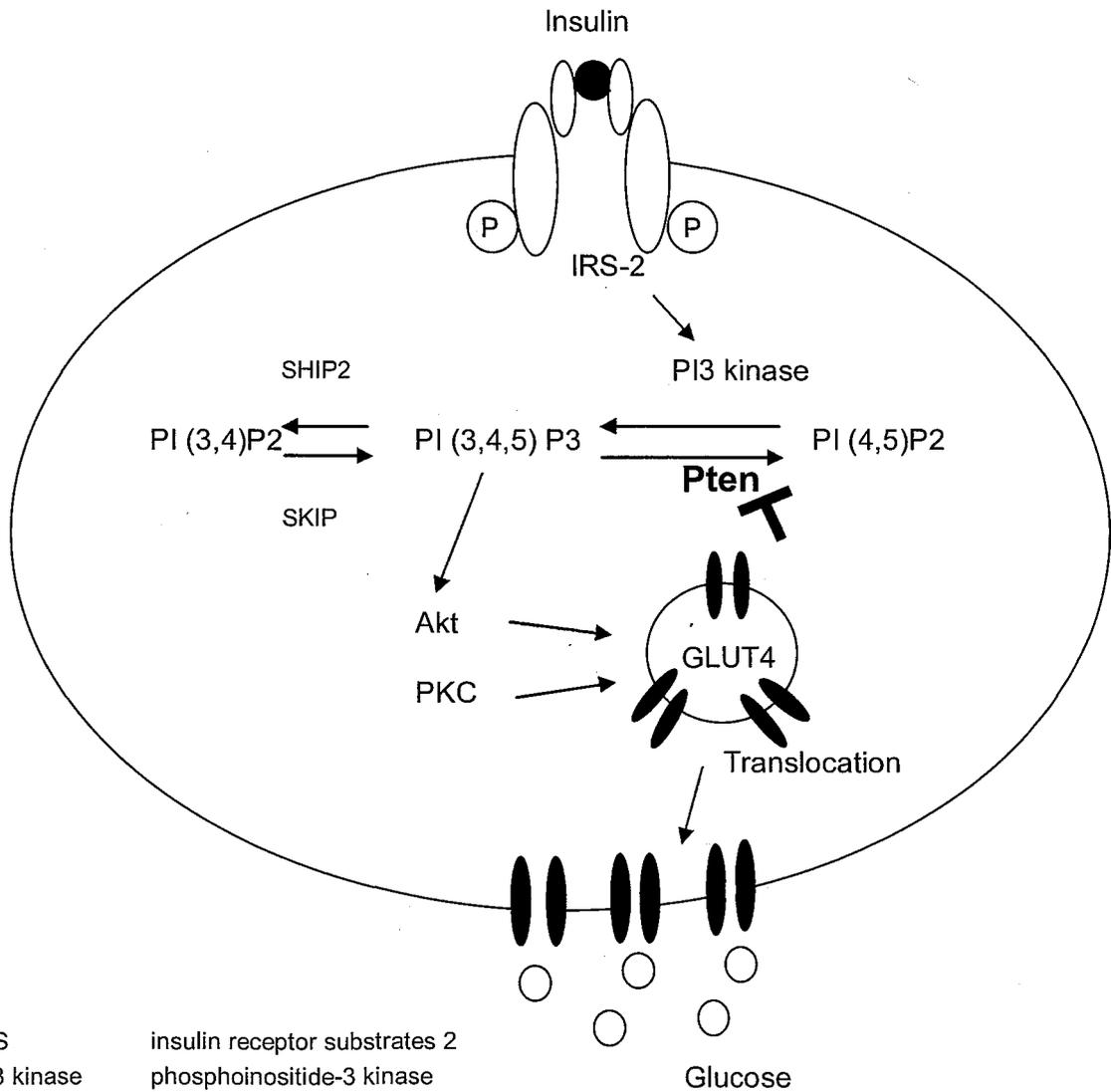


Fig 7-2-8 Trigonelline restrained expression of Foxo1 and Hnf4 which is transcription factor of G6pc.

⊥; Suppression.



- IRS                    insulin receptor substrates 2
- PI3 kinase            phosphoinositide-3 kinase
- PI (3,4)P2            phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate
- PI (3,4,5)P3          phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate
- PI (4,5)P2            phosphatidylinositol (4,6) bisphosphate
- Akt                    Protein Kinase B
- PKC                    protein kinase C

Fig.7-2-9 Effect of trigonelline on glucose uptake in the liver.

⊥; Suppression.

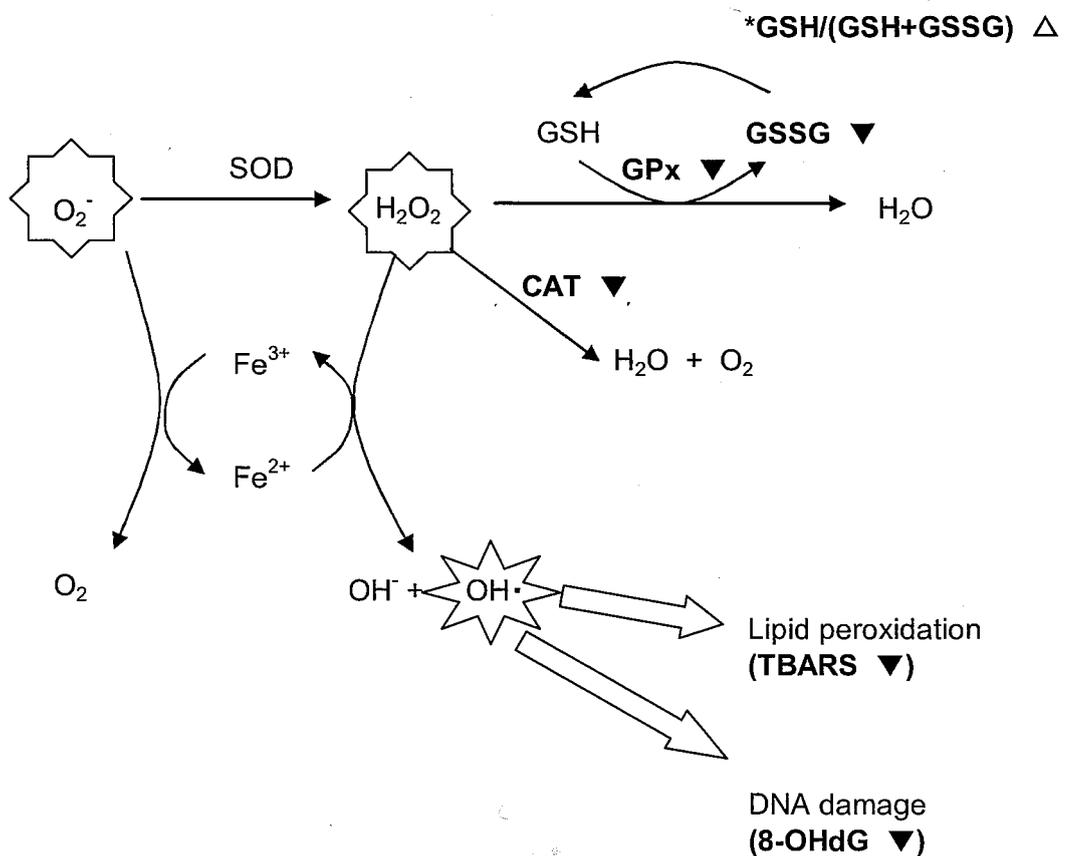
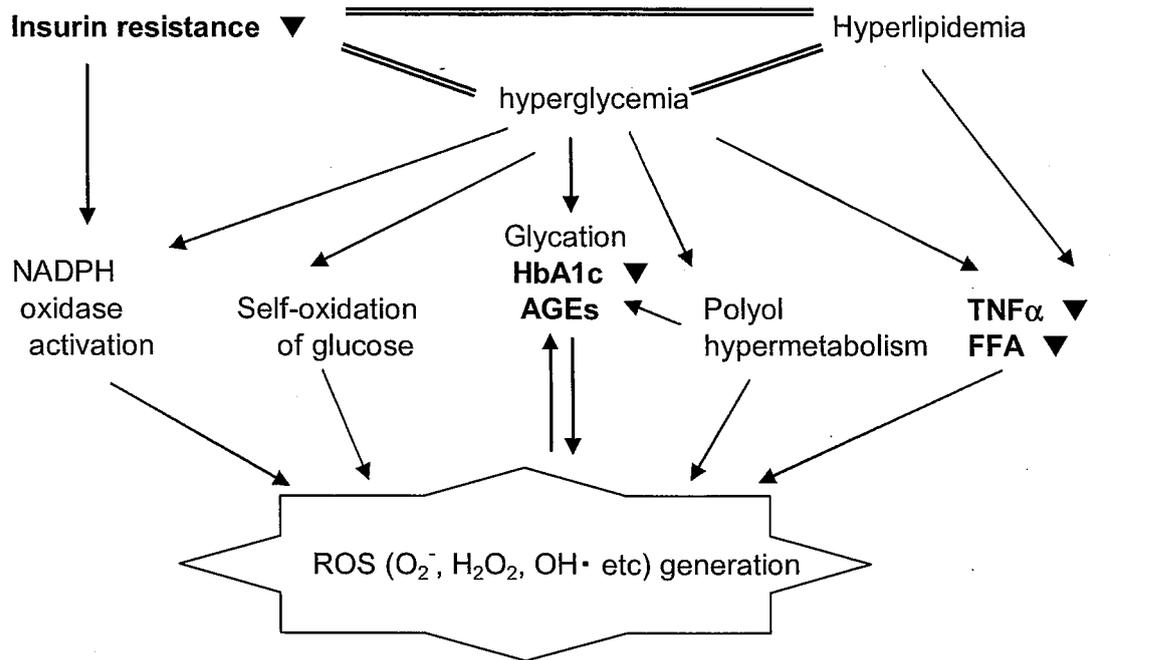


Fig.7-2-10 Generation of ROS in vivo and its regulation by TRG.

Δ; Activity or concentration was increased in TRG-fed group, compared to the CON group,. ▼; Activity or concentration was decreased in TRG-fed group, compared to the CON group.

すると考えられている。またフルクトースはグルコースに比べ、糖化や酸化ストレスをより引き起こし易いことが報告されている (77)。さらには糖尿病の進行にともない、TNF- $\alpha$  (78) や糖化最終産物 (AGEs) (79,80) の産生が増加し、それに伴って ROS の産生増加が報告されている (参照 Fig.7-2-10)。そこで今回の実験では酸化ストレスマーカーとして TBARS や 8-OHdG レベル、抗酸化系酵素の応答、体内の抗酸化物質としての GSH、糖化ヘモグロビン濃度を測定した。

ROS に関わる測定項目の中でも、血液、肝臓 TBARS や肝臓 8-OHdG、肝臓の抗酸化系酵素 (CAT、GPx) は CON 群に比して有意差があり、かつ NA 群よりも低い値となった。過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) や過酸化脂質を還元する CAT や GPx の低い活性は、体内過酸化の低いレベルでの維持によるものと考えられる。糖尿病ラットでは体内での  $H_2O_2$  レベルが上昇し、その除去のために CAT 活性上昇が起こるといった報告もなされている (81)。また *in vitro* での実験では、NA が TRG よりも OH $\cdot$  NO $\cdot$  DPPH $\cdot$  を消去する作用が強いとの報告があるが (33)、TRG が NA より体内酸化に抑制的に作用すると推察される本実験の結果とは異なる。TRG は活性酸素の消去よりむしろ体内での抗酸化酵素への影響を通して酸化の亢進を抑制していることが考えられる。

Wistar 群、CON 群の HbA<sub>1c</sub> は、飼育 1、4、6 週目にわたって次第に上昇しているが、TRG、NA 群においては 4 週目には上昇するものの 6 週目には低下し 1 週目との有意差がなかった。マウスの赤血球の寿命は約 50 日であり糖尿病マウス C57BL/KsJ-db/db における HbA は 2-3 週間後に HbA<sub>1c</sub> へで急激に変化する (82)。ラットの赤血球の寿命は約 60 日であり、HbA が糖化される時間がマウスと変わらないものとする、今回の実験で測定した 4 週間目の HbA<sub>1c</sub> は実験開始 1 週間後の血糖レベルを反映しているものと考えられる。6 週目の値は TRG、NA が長期給与された時の血糖レベルであり、その低下はこれら物質の長期にわたる給与がヘモグロビンの糖化に抑制的に働くことを示唆している。

今回の実験では TBARS と同じように HbA<sub>1c</sub> も CON 群に比べ TRG、NA 群において低い値を示唆しており、TBARS と HbA<sub>1c</sub> は正の相関を示すとする報告と一致する

(83-85)。マロンジアルデヒド (MDA) の添加がヘモグロビンの糖化に影響を及ぼすと報告されている (86,87)。従って酸化条件下で赤血球の膜は酸化され、生成した MDA によってより糖化されやすくなり、HbA<sub>1c</sub> の上昇を引き起こしたことが考えられる。また HbA<sub>1c</sub> などのアマドリ化合物以降におけるグリケーション後期段階反応 (AGEs 産生) を TRG や NA が制御し、糖尿病の亢進を抑制することも考慮されるが、これら化合物の活性酸素消去能は小さいことから、この経路の制御による抗糖尿病効果は小さいと考えられる。

TRG、NA はともに血清、肝臓の脂質レベルを改善すること、脂質の糞中排泄を増加させることが示唆された。肝臓では脂肪酸合成系酵素の活性抑制とβ酸化の亢進が見られた。TRG 群においては、アセチル CoA の合成を担う ATP シトレート リアーゼ (Acly) やスクワレン合成酵素ファルネシルニリン酸ファルネシルトランスフェラーゼ (Fdft1)、コレステロール合成酵素のシトクローム P450 サブファミリー51 (Cyp51)、LPL 活性を抑制するアンギオポイエチン様蛋白 4 (Angptl4) が関連している事が挙げられる (参考 Fig.7-2-7)。特に Angptl4 の発現低下により LPL が活性化することで超低密度リポタンパクコレステロール (VLDL-C) や LDL-C などのリポタンパクの異化が促進している可能性が考えられ、血清中の LDL-C 値が CON 群よりも有意に低下している一因とも考えられる。NA は脂肪細胞の膜タンパクである G タンパク質への作用を介して、細胞内 cAMP の活性を抑制し、その結果ホルモン感受性リパーゼ (HSL) の活性化が阻害を受けて、TG の分解が抑制されるとの報告がある (88,89)。また 2 型糖尿病においても、TG の減少を引き起こし、結果として FFA が減少し、糖の取り込みの促進および糖新生抑制の報告がある (90)。今回の結果では NA 摂取による糖の取り込み亢進や糖新生の抑制は見られなかったが、NA が TG や FFA に影響を及ぼしている点では一致している。今回投与した NA 投与量ではグルコースレベルを変化させるのに十分でなかったことが推察され、臨床でも少量の投与ではグルコースレベルに影響しないとしている (91)。

TRG と NA は構造が類似物質で、メチル基とプラス荷電の有無だけの違いである。

しかし今回の実験結果では、2つの物質の効果の違いが明らかになった。どちらも脂質レベルに影響を与えるが、血糖値および体内抗酸化物質のレベル、酵素活性には、NAよりTRGの方がより効果大きいことが示された。TRGはNAに比べて脂溶性が高く、細胞膜の親和性が高いかもしれない。それによって体内への取込みや細胞への拡散において差が生じ、効果の違いとして現れたのかもしれない。

NAは体内で代謝され主にN1-メチル-2-ピリドン-5-カルボキサミド (NMPC) とN1-メチルニコチンアミドとして排泄されるが、一部TRGへ代謝変換されることが知られている(27-30)。湯山らはNMPCの排泄量の動態と生体内でのTRGの行方について、ヒト及びラットについて検討し、普通食でもTRGが尿中に排泄されていること、またNA、TRGを投与するとTRG、NMPCの排泄量が増加することを示した(30-32)。これらからNAの有用性は一部代謝されたTRGが寄与しているのかもしれない。

## 第7章 第3節 肥満2型糖尿病モデル (KK-A<sup>y</sup>) マウスによる検討

### 7.3.1 緒言

第2節で、TRGとNAの非肥満2型糖尿病モデルGKラットにおける抗糖尿病効果を検討した。結果、TRG群では耐糖能が改善されることを示したが、NA群での改善は見られなかった。しかし両群とも脂質代謝には影響を及ぼし、血清、肝臓のTGレベルはCON群よりも低い値を示した。GKラットでは6~13週令の若年期に特異的に過食と内臓肥満を呈する事が報告されていることを考え合わせると(92)、TRG、NAは代謝異常の改善効果を持つことが十分期待できる。より肥満度が進む2型糖尿病ではNAの脂質代謝異常改善を介して、糖尿病を軽減する可能性も考えられ、本節ではTRG、NAの肥満2型糖尿病モデルにおける検討を行った。

1997年アメリカ糖尿病協会(American-Diabetes-Association; ADA)のワークグループが示した新しい糖尿病の分類では、インスリン非依存性糖尿病は「インスリン抵抗性を主たる基盤とし」とはじめに記載されているが(93)、1999年の日本糖尿病学会の病型分類では「インスリン分泌不全がある」ことが先になっている(94)。これは、コーカサス系欧米白人の膵β細胞のインスリン分泌能が、モンゴル系の東アジアに住む民族のそれに比べて著しく高いという遺伝的な人種差に基づくものである。一般的に欧米人には肥満の2型糖尿病患者が多く、日本人には非肥満の例が多い。つまり、日本人はインスリン分泌不全という遺伝素因をもつ個体が多いうえ、わずかな内臓脂肪の増加に対してインスリン抵抗性を帯びやすく(95)、2型糖尿病になりやすい宿命をもつ人種であると言える。

前節に用いた非肥満2型糖尿病GKラットの特徴は、糖負荷後の血糖上昇は高く糖に対するインスリン分泌不全を示すと同時に、飽食時の血清インスリン値はむしろ高めで軽度のインスリン抵抗性も見られ、日本人に多い非肥満2型糖尿病モデルラットと言える。インスリン分泌不全である原因として、胎生時より膵ランゲルハンス島の形成不全やβ細胞数減少が報告されており、加齢とともに繊維化の進行、末梢神経障害や軽度の

腎障害、細小血管障害などの合併症が見られる (96)。

本節で使用した肥満 2 型糖尿病 KK-*A<sup>y</sup>*マウスは重度な肥満・高血糖を発現することから、欧米型の肥満 2 型糖尿病に対応すると考えられている。このマウスは多食、多飲、多尿、尿糖陽性、高血糖、高インスリン血症、インスリン抵抗性、腓ランゲルハンス島肥大を呈し、6 週齢から尿糖陽性となり、雄の糖尿病発症率が 100%に達する (97,98)。

本節では TRG、NA の肥満型糖尿病への影響を KK-*A<sup>y</sup>*マウスを用いて検討した。

### 7.3.2 実験方法

#### 7.3.2.1 サンプル、実験動物

実験に用いた NA と TRG は 7.1.2.1 と同じものを用いた。

肥満 2 型糖尿病モデル KK-*A<sup>y</sup>* (KK-*A<sup>y</sup>*/TaJcl 6 週令 雄) マウスを用いて検討を行った。飼育環境は 3.1.2 と同じである。マウスは 2 日間馴化飼育後、対照 (CON) 群 (n=8)、NA 群 (n=7)、TRG 群 (n=7) の 3 群に分け、28 日間飼育した。同週令の C57BL/6J (n=7) を KK-*A<sup>y</sup>*の対照群 (C57BL 群) とした。食餌組成は Table 7-3-1 に示す。

食餌摂取量、体重、飲水量は毎日測定した。空腹時、随時血糖値は隔週測定した。HbA<sub>1c</sub> は 1、4 週目に測定した。耐糖能試験は飼育 22-23 日目に行った。糞の採取は 23-27 日目に行い、使用時まで-80℃で保存した。飼育最終日には、12 時間絶食後ネンブタール麻酔下で開腹し、心臓より血液を採取した。その後肝臓、左腎臓、左腎周囲白色脂肪、左精巣周囲白色脂肪、肩甲骨間褐色脂肪を取り出し、重量測定後液体窒素で凍結し、使用時まで-80℃で保存した。

#### 7.3.2.2 血糖値測定、OGTT

空腹時血糖は 12 時間絶食後、随時血糖は摂食後 1 時間後にケアシスト (株式会社堀場製作所製 一般医療器グルコース分析装置) を使用して測定した。

OGTT は 12 時間絶食後、7.2.2.2 と同じ方法で行った。グルコース投与 0、30、60、

Table7-3-1 Composition of the experimental diets(%)

Constituent	C57BL CON	TRG	NA
Casein	15	15	15
$\alpha$ - Cornstarch:sucrose=2:1	70.5	70.444	70.45
Corn oil	5	5	5
Celulose	5	5	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1	1	1
trigonelline		0.056	
nicotinic acid			0.05
	100	100	100

1 AIN-93G-MX and 2 AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co,Ltd.

\* Equimolar trigonelline and nicotinic acid (0.406mmole) were added to respective diets.

120 分に血糖値測定した。

#### 7.3.2.3 血清インスリン濃度、血中 HbA<sub>1c</sub> の測定

OGTT (飼育 22-23 日目) 時と解剖時 (飼育 28 日目) のインスリン値は株式会社シバヤギ製のキット、レビスインスリンキット-マウス S を用いて測定した。

血中 HbA<sub>1c</sub> 濃度測定は 7.1.2.4 と同じである。

#### 7.3.2.4 血清、肝臓、糞中の脂質濃度測定

血清の調製、肝臓・糞中脂質の抽出、また測定も 3.3.2.2、7.1.2.5 に従って行った。白色脂肪細胞の TG についても肝臓での抽出、測定と同様である。

#### 7.3.2.5 血清 TNF- $\alpha$ 濃度測定

TNF- $\alpha$  の定量は Mouse TNF- $\alpha$  Immunoassay Kit (Biosource 社) を用いて行った。

#### 7.3.2.6 肝臓酵素活性測定

##### 7.3.2.6.1 肝臓 FAS、G6PD+6PDG、CPT 活性

測定サンプルの調製は肝臓 0.2 g を 10 倍量の 3 mM Tris-HCl (0.25 M スクロース 1 mM EDTA 含) を加えて管型ガラスホモジナイザーでホモジナイズし、次いで得られたホモジネートを遠心分離 (1,000  $\times$  g, 15 min, 4°C) した。さらに上清を遠心分離 (100,000  $\times$  g, 45 min, 4°C) した後、その上清を FAS、G6PD+6PDG の活性測定に使用した。

CPT、FAS、G6PD+6PDG の活性測定は 7.2.2.9 の方法で行った。

##### 7.3.2.6.2 肝グルコースキナーゼ (GLK)、グルコース 6-フォスファターゼ (G6Pase) 活性測定

GLK、G6Pase 測定サンプルの調製は FAS や G6PD + 6PDG 測定用サンプルの場合

と同じようにして行った。

GLK 測定法は Davidson らの方法に従った (99) 。活性測定は 27℃ 下で行った。吸光度計の 1 ml の石英セルの中に 50 mM HEPES バッファー (pH 7.4、100 mM KCl、7.5 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 mM ジチオエリスリトールを含む) 300 μl、10 mg/ml BSA 100 μl、0.5 mM または 100 mM グルコース 100 μl、4 U/ml G6PD (*Leuconostoc mesenteroides*) 100 μl、0.5 mM NAD<sup>+</sup> 100 μl、測定サンプル 200 μl を加え、最後に 5 mM-ATP 100 μl を添加して反応を開始した。340 nm で 5 分間測定した。尚、ヘキソキナーゼ活性を考慮して 100 mM グルコース添加時の吸光度変化値から 0.5 mM グルコース添加時の吸光度変化値を差し引いて補正した。

G6Pase 測定は Lange らの方法に従った (100) 。試験管に蒸留水 1 ml、10 mM G6P 50 μl、測定サンプル 10 μl を入れて 37℃、20 分間インキュベートし、270 mM 硫酸 (3.7 mM モリブデン酸アンモニウム、240 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 含) 220 μl で反応を停止した。次いで 1.2 M アスコルビン酸 50 μl 加えて室温 30 分放置後吸光度 (820 nm) を測定した。0.1、1、3、5、10 M のリン酸を測定サンプルの代わりに加え検量線を作成した。

#### 7.3.2.7 白色脂肪酵素活性測定

白色脂肪は -80℃ で凍結保存しておいた精巢周囲脂肪を使用した。

リポプロテインリパーゼ (LPL) 活性測定時の白色脂肪細胞の調製は Bergö らの方法で行った (101,102) 。白色脂肪を 0.025 M アンモニアバッファー (pH 8.2、1 mg/ml BSA、10 μg/ml ロイペプチン、1 μg/ml ペプスタチン、25 IU/ml トライゾール、5 mM EDTA、5 IU/ml ヘパリン、1% Triton-X-100、0.1% SDS を含む) でホモジナイズ後、遠心分離 (700 × g、15 min、4℃) し、上清を測定サンプルとした。測定は Roar Biomedical, Inc. 製の Roar LPL-Activity-Assay Kit を用いた。測定時に必要な LPL は Merck&Co., Inc. 製 *Pseudomonas sp* 由来を使用した。

グリセロール 3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ (GPDH) 活性測定時の調製は 4

倍量の 0.25 M ショ糖溶液でホモジナイズ後遠心分離 (700 × g, 10 min, 4°C) し、その上清をさらに遠心分離 (54,000 × g, 1 h, 4°C) した上清を測定サンプルとして用いた。測定は株式会社セルガレージ製の GPDH 活性測定キットを用いた。

#### 7.3.2.8 凍結切片作成

解剖時に臓器を取り出し PBS (-) で洗った後、15% ショ糖溶液に漬け 4°C で一晩脱水し、さらに 30% ショ糖溶液で 4°C で一晩脱水を行った。次いで O.C.T. コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社) で包埋し切片作成まで -80°C で凍結保存した。

凍結切片はクライオスタット (LEICA CM 1850) を使用し、10 μm の厚さに切り、ヘマトキシリン-エオジン染色をした。4% パラホルムアルデヒドで固定し、マイヤー・ヘマトキシリン (和光純薬工業株式会社) 5 min → 温水 (色出し) 5 min → 1% エオシン Y 溶液 (和光純薬工業株式会社) 5 min → 95% エタノール 3 min → 95% エタノール 3 min → 95% エタノール 3 min → 100% エタノール 3 min → 100% エタノール 3 min → 100% エタノール 3 min の手順で染色を行った。その後、顕微鏡 (NIKON ECLIPSE 55i) 下で観察を行った。

#### 7.3.2.9 統計分析

データは平均 ± SEM で表した。データは、一元配置分散分析法 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher's PLSD 法を用いた。統計的有意水準は  $p < 0.05$  とした。

#### 7.3.3 結果

体重増加量、食餌摂取量は TRG 群で高い傾向を示したが群間における差はなかった (Fig. 7-3-1)。また糖尿病に伴って水摂取量の増加が知られているが、総飲水量は C57BL 群に比べ CON 群で有意に高く、NA 群で低下傾向、TRG 群で低下が見られた。

空腹時血糖値は飼育 2、3 週目では KK-A<sup>y</sup> 群間で差が見られなかったが、4 週目には CON 群に比べ、サンプル添加群でともに有意な上昇抑制が観察された (Fig. 7-3-2)。

随時血糖値は1週目を0 mg/dlとした変化量で見ると、2、3週目にCON群における高値がTRG群で抑制される傾向、NA群では抑制が示されたが、4週目には使用したKK-A<sup>y</sup>いずれの群においても差はなくなった。

OGTTでの血糖値においては、CON群が常に高い値であり、TRGやNA群ではその上昇が抑制されている (Fig.7-3-3)。NA群の糖負荷120分後における血糖値はC57BL群の値とほぼ同程度の低値を示した。OGTT時直前の血清インスリン値はすでにCON群がTRG、NA群より高い、あるいは高い傾向にあったが、糖負荷60分後において差が認められなかった。これらのことからCON群は空腹時でも血糖値とインスリン値が高く、インスリン抵抗性になっていることが示唆された。

精巣周囲の白色脂肪細胞重量を測定したところ、C57BL群に比べてCON群は有意に高くなり、TRG、NA群はそれを抑制した (Table7-3-2)。また血清TNF- $\alpha$ 値はCON群で有意に高く、TRG、NA群で上昇が抑制された (Table7-3-2)。

血清T-Chol値はCON群に比べ、NA群でC57BL群と同程度の低下、TRG群で低下傾向を示した (Table7-3-3)。LDL-C値は、C57BL群に比べてCON群で高値を示すが、TRG、NA群ではその上昇に有意な抑制がみられ、C57BL群のレベルに近い値を示した。血清TG値もまたCON群で高値を示したが、NA群で上昇抑制、TRG群で抑制傾向であった。肥満者に対してインスリン抵抗性の指標となりうると報告されているTG/HDL値も (103)、CON群で高値でありTRG、NA群で有意に抑制された。肝臓脂質においては、T-Chol、TG値はC57BL群に比べてCON群で上昇し、TRG群で有意に低下、NA群で低下傾向が見られた (Table7-3-3)。糞脂質排泄量はKK-A<sup>y</sup>マウス間では差が見られず、総脂質、T-Chol、TG、総胆汁酸値でも同じ現象であった (Table7-3-3)。

HbA<sub>1c</sub>値は飼育1週目に比べて4週目に増加を示したが、TRG群での増加の割合はCON、NA群に比べて小さかった (Fig.7-3-4)。

脂肪酸合成関連酵素 (FAS、G6PD + 6PGD)、 $\beta$ 酸化のキー酵素としてのCPTの活性を肝臓において測定した結果、FAS活性でCON群と比較してTRG群で有意な抑

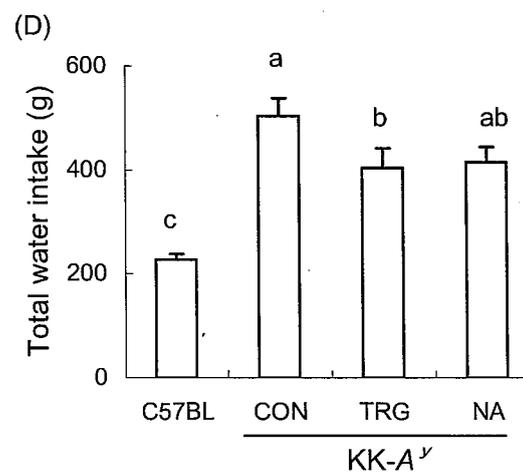
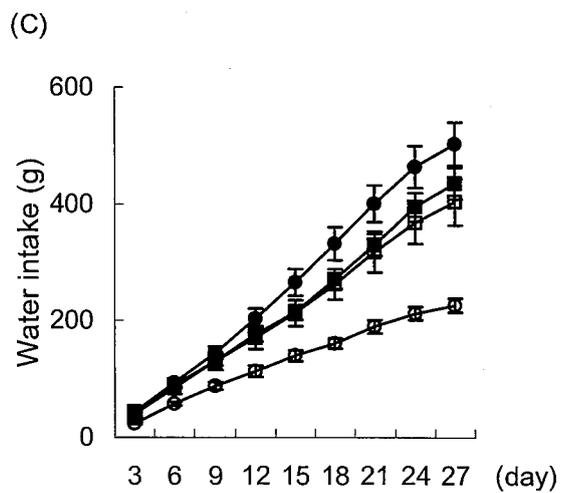
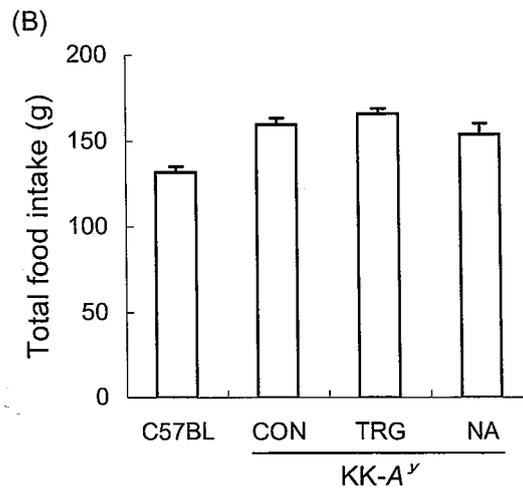
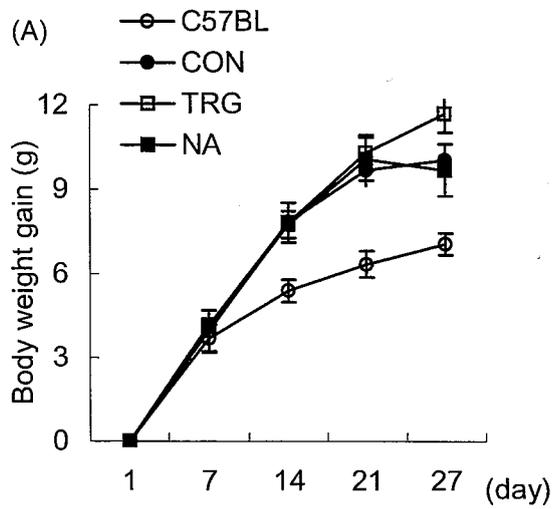


Fig.7-3-1 Body weight gain(A), total food intake(B) and water intake(C,D).

Means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

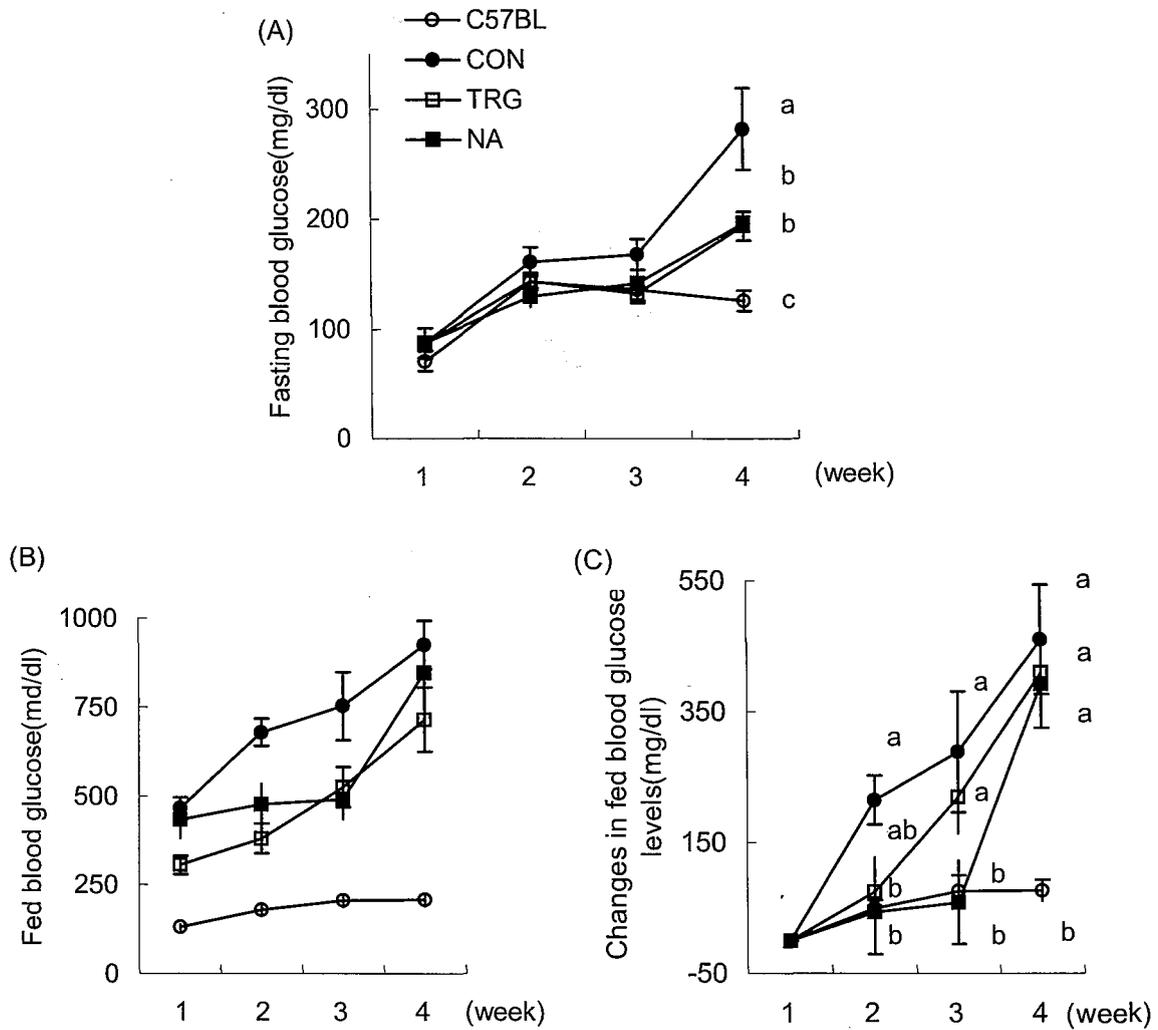


Fig.7-3-2 Fasting(A) and fed(B,C) blood glucose levels.  
 (A) Blood glucose level after 10h fasting. (B) Blood glucose level after 1h feeding. (C) Changes in fed blood glucose levels. Values without a common letter at the same week differ significantly ( $p < 0.05$ ).

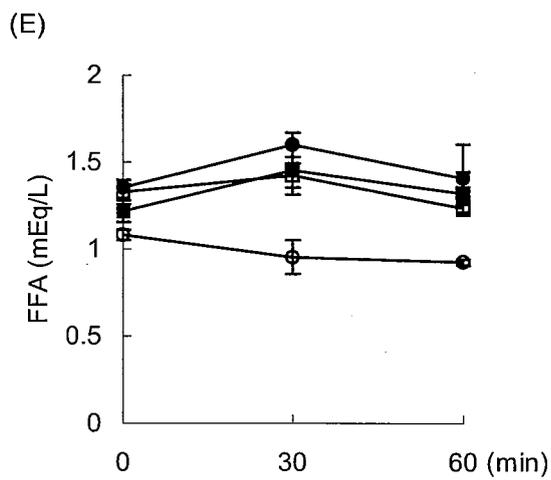
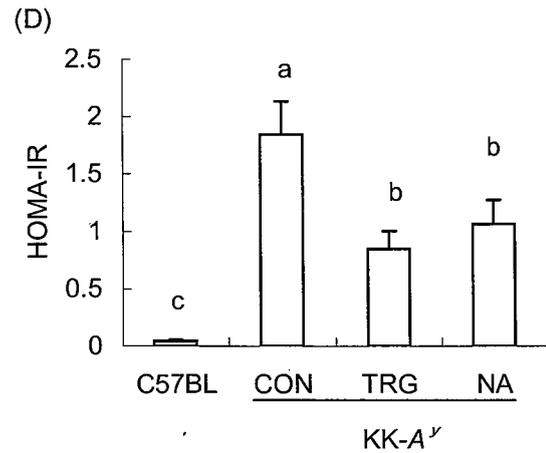
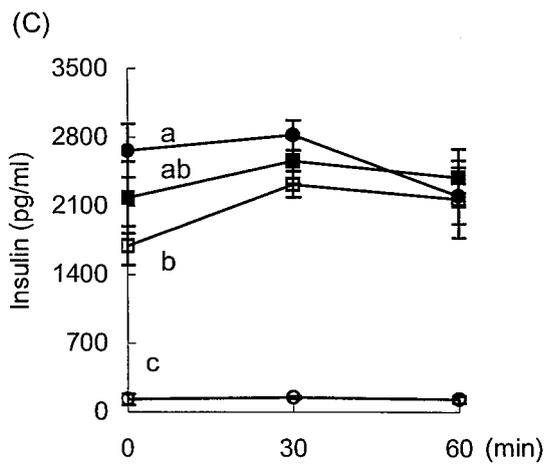
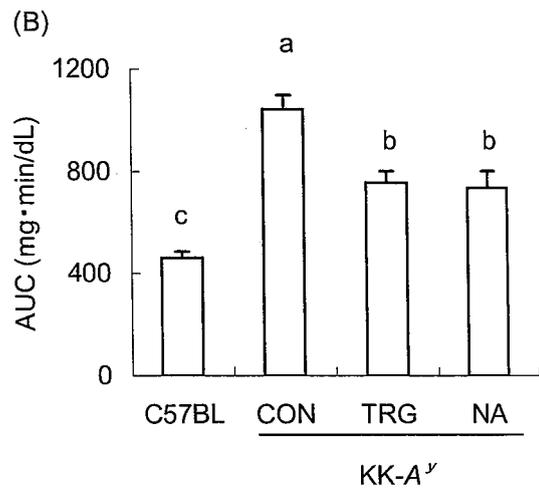
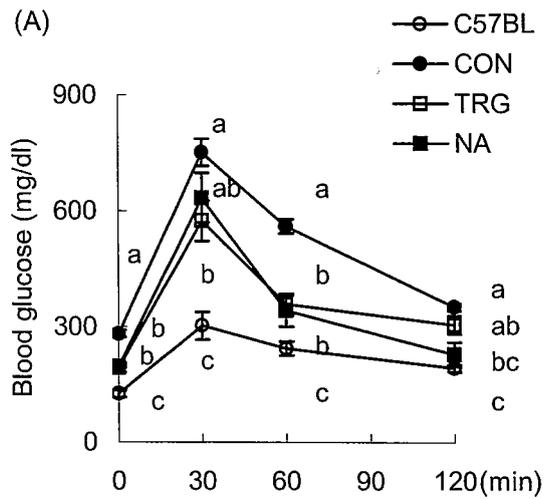


Fig.7-3-3 Effects of trigonelline and nicotinic acid on OGTT in experimental animals. (A) Glucose loading was carried out (9wk old) in C57BL and KK-A<sup>y</sup> mice at 22-23d after start of feeding. (B) An area under the curve (AUC) of the OGTT. (C) Serum insulin concentration before and after glucose administration. (D) HOMA-IR was calculated from { (fasting blood glucose × fasting serum insulin) / 405 }. (E) Serum free fatty acid concentration before and after glucose administration. Values are means ± SEM, n=6 (NA group), n=7 (C57BL, TRG group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-3-2 Effects of trigonelline and nicotinic acid on serum insulin and TNF- $\alpha$  levels.

Dietary group	C57BL	KK-A <sup>y</sup>		
		CON	TRG	NA
<b>Organs (% of body weight)</b>				
Liver	4.23 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	4.58 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>	4.13 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	4.07 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
Kidney	0.606 $\pm$ 0.023 <sup>b</sup>	0.704 $\pm$ 0.017 <sup>b</sup>	0.691 $\pm$ 0.015 <sup>b</sup>	0.784 $\pm$ 0.023 <sup>a</sup>
<b>White adipo tissue</b>				
Pararenal	0.391 $\pm$ 0.122 <sup>b</sup>	0.715 $\pm$ 0.080 <sup>a</sup>	0.652 $\pm$ 0.059 <sup>a</sup>	0.755 $\pm$ 0.084 <sup>a</sup>
Epididymal	1.04 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	2.13 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.70 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.90 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
<b>Brown adipo tissue (between scapula)</b>				
	0.363 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>	0.807 $\pm$ 0.068 <sup>b</sup>	0.957 $\pm$ 0.056 <sup>a</sup>	0.756 $\pm$ 0.045 <sup>b</sup>
<b>Serum</b>				
Insulin (pg/ml)	483.5 $\pm$ 103.3 <sup>c</sup>	2328 $\pm$ 304 <sup>a</sup>	1335 $\pm$ 297 <sup>b</sup>	1802 $\pm$ 299 <sup>ab</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	6.89 $\pm$ 2.16 <sup>c</sup>	34.1 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	16.4 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	14.8 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>

C57BL and KK-A<sup>y</sup> mice (10wk old) were given the each diet for 28d. Values are means $\pm$ SEM, n=6 (NA group), n=7 (C57BL, TRGgroup), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 7-3-3 Effects of trigonelline and nicotinic acid on serum, liver and feces lipid levels.

Dietary group	C57BL	KK-A <sup>y</sup>		
		CON	TRG	NA
<b>Serum</b>				
T-Chol (mg/dL)	108 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	164 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	121 $\pm$ 12 <sup>ab</sup>	95.0 $\pm$ 16.6 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dL)	26.8 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	27.8 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	48.0 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	43.2 $\pm$ 8.7 <sup>a</sup>
LDL-C (mg/dL)	73.5 $\pm$ 17.5 <sup>b</sup>	124 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	61.0 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>	51.5 $\pm$ 9.7 <sup>b</sup>
Atherogenic index	3.18 $\pm$ 0.81 <sup>ab</sup>	5.86 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	1.59 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	1.37 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>
TG (mg/dL)	38.8 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>	63.3 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	60.5 $\pm$ 5.2 <sup>ab</sup>	44.9 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>
FFA (mEq/L)	0.843 $\pm$ 0.028	0.939 $\pm$ 0.058	0.890 $\pm$ 0.034	0.764 $\pm$ 0.132
TG/HDL	1.61 $\pm$ 0.41 <sup>ab</sup>	2.71 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	1.29 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.932 $\pm$ 0.141 <sup>b</sup>
<b>Liver</b>				
Total lipid (mg/g of liver)	178 $\pm$ 15	186 $\pm$ 19	175 $\pm$ 13	187 $\pm$ 24
T-Chol (mg/g of liver)	0.478 $\pm$ 0.160 <sup>c</sup>	2.80 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	2.36 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>
TG (mg/g of liver)	13.9 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	26.2 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	20.2 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>	21.4 $\pm$ 2.37 <sup>ab</sup>
FFA (mEq/g of liver)	4.91 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	9.26 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	8.84 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	10.0 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>
<b>Feces</b>				
Total excretion (g/40h)	0.845 $\pm$ 0.058 <sup>b</sup>	1.35 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
Total lipid (mg/g of feces)	19.0 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	25.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	25.4 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	29.6 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>
T-Chol (mg/g of feces)	3.56 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	4.92 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	4.92 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	5.24 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
TG (mg/g of feces)	9.81 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	7.02 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	7.02 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	6.96 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>
Total bile acid (mg/g of feces)	0.463 $\pm$ 0.097 <sup>c</sup>	0.757 $\pm$ 0.070 <sup>a</sup>	0.725 $\pm$ 0.079 <sup>ab</sup>	0.790 $\pm$ 0.046 <sup>a</sup>

Serum, liver and feces lipid levels were measured in C57BL and KK-A<sup>y</sup> mice (10wk old) frd each diet for 28d. Values are means $\pm$ SEM, n=7 (C57BL, TRG, NAgroup), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

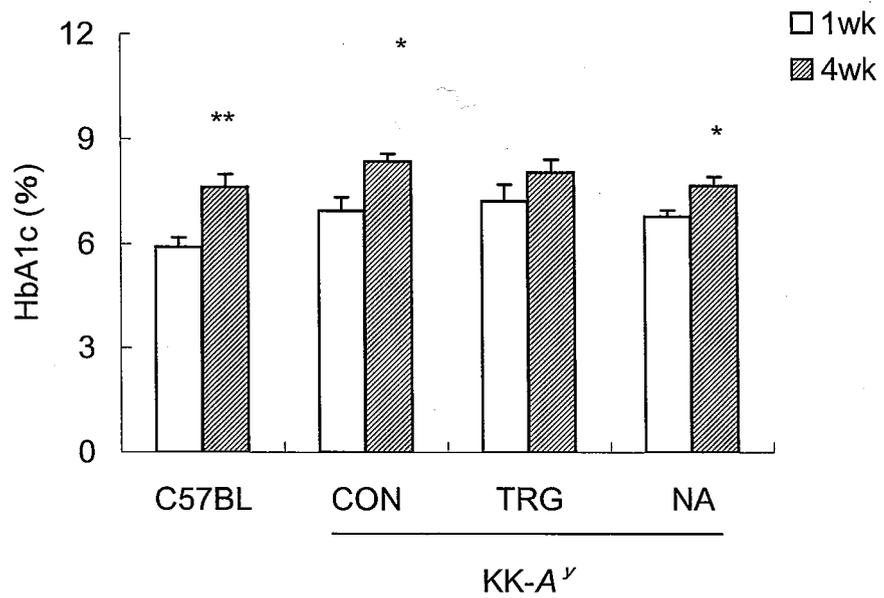


Fig.7-3-4 Effects of trigonelline or nicotinic acid on hemoglobin A<sub>1c</sub> levels.

\*, \*\* differ significantly when compared to the value at 1st week in the same group ( $p < 0.05, 0.01$ ).

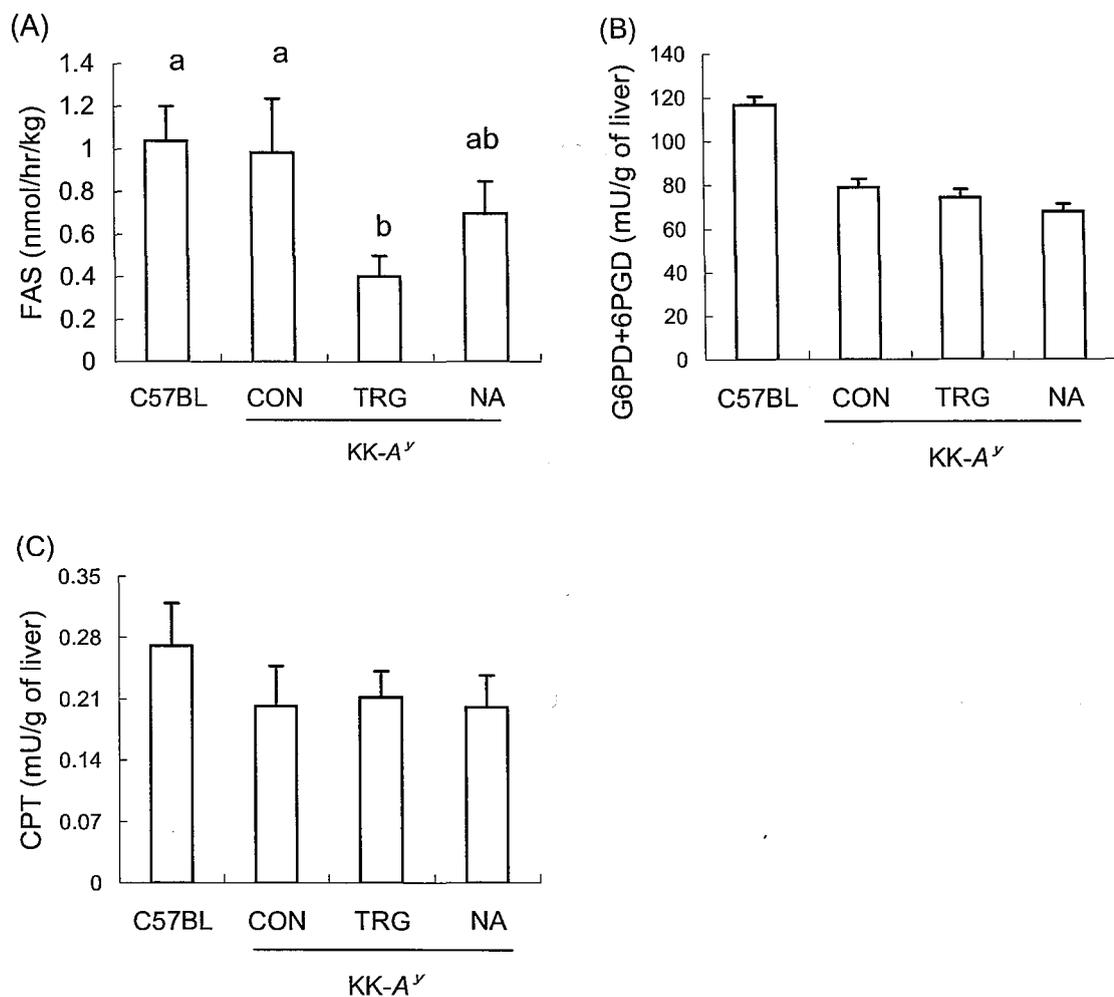


Fig. 7-3-5 Effects of trigonelline and nicotinic acid on liver FAS, G6PD+6PGD and CPT activities in experimental animals.

(A) Liver fatty acid synthase (FAS) activity. (B) Sum of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activity. (C) Carnitine palmitoyl transferase (CPT) activities. Values are means $\pm$ SEM, n=6 (NA group), n=7 (C57BL, TRG group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

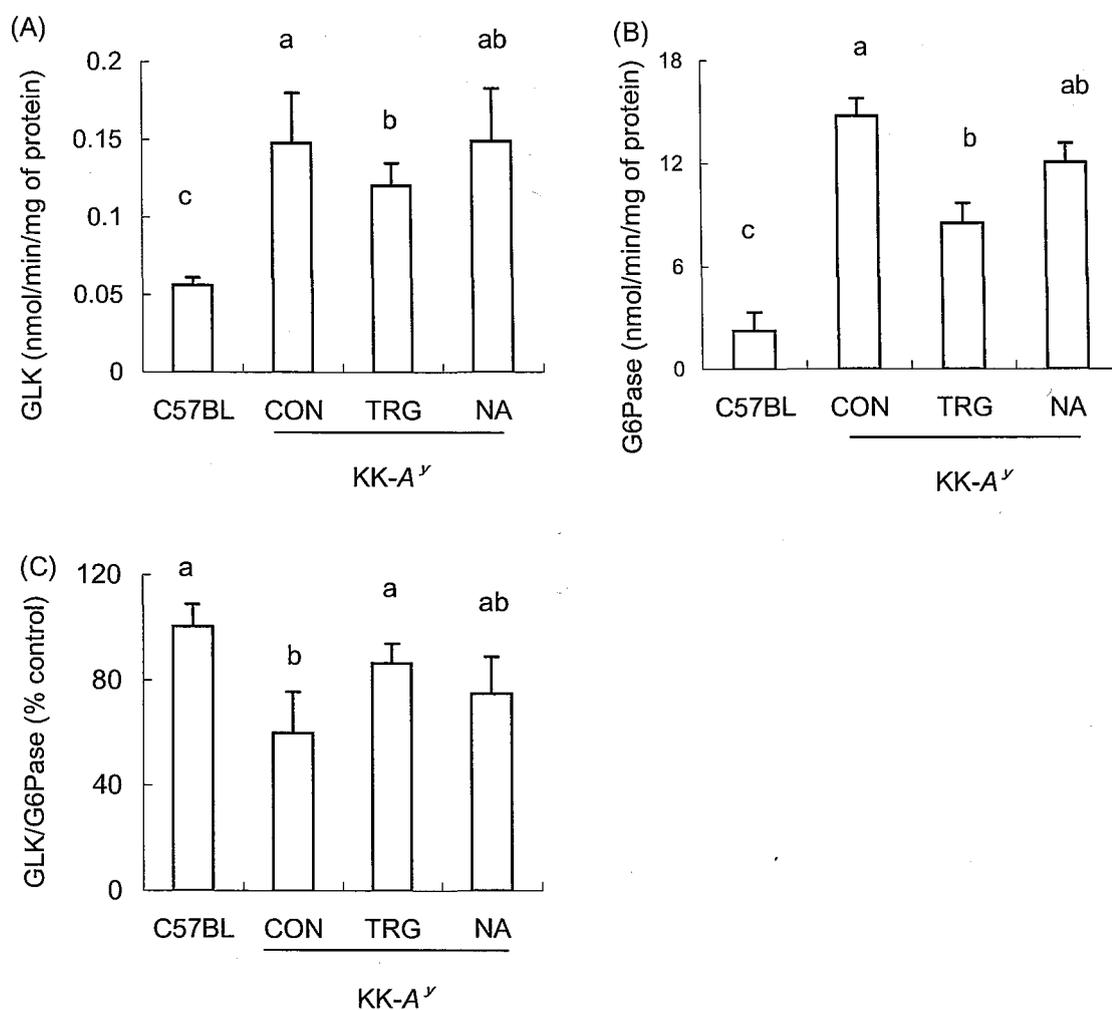


Fig.7-3-6 Effects of trigonelline and nicotinic acid on liver GLK, G6Pase and GLK/G6Pase activities in experimental animals. (A) Glukokinase (GLK) acitivity (B) Glucose 6-phosphatase (G6Pase) activity. (C) Activity ratio of GLK/G6Pase. Values are means±SEM, n=6 (NA group), n=7 (C57BL, TRG group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

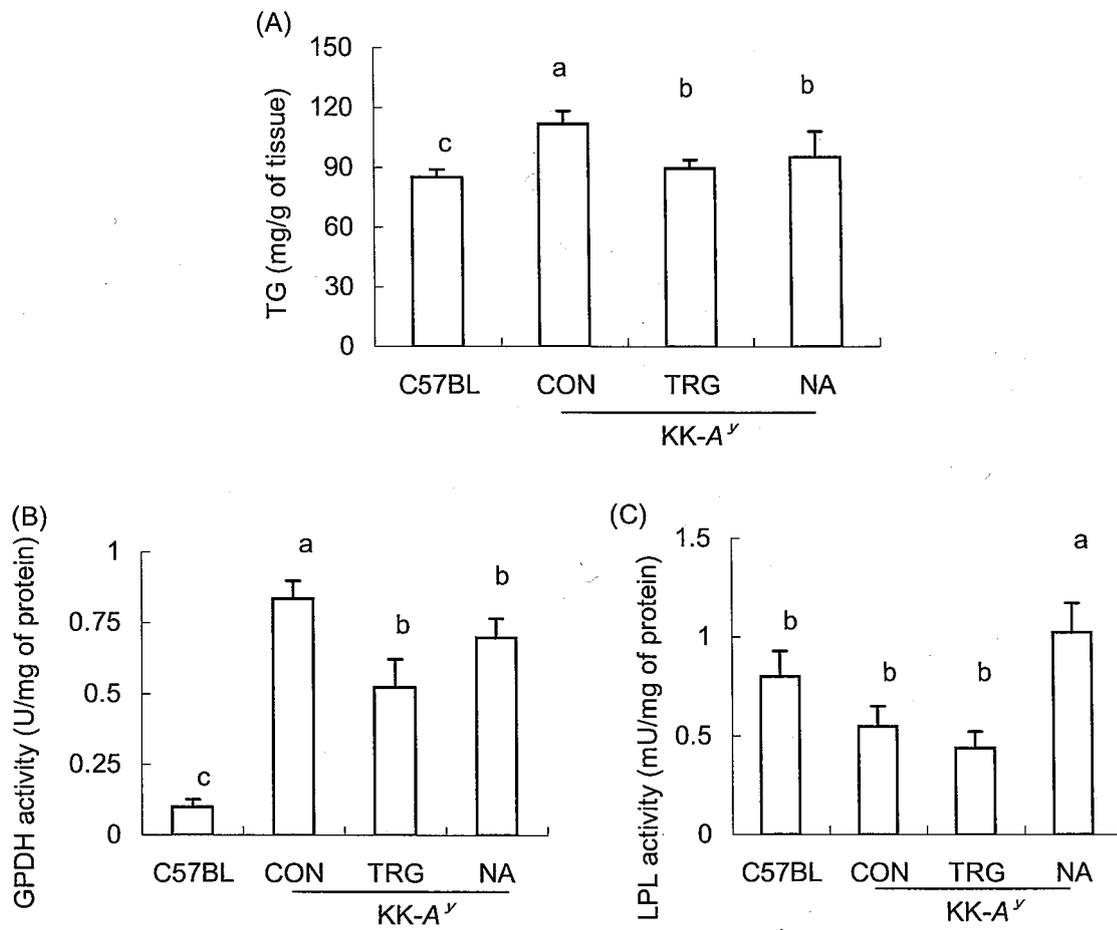


Fig.7-3-7 Effects of trigonelline and nicotinic acid on epididymal TG levels, and GPDH and LPL activities in experimental animals. (A) TG levels. (B) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) activity. (C) Lipoprotein lipase(LPL) activity. Values are means $\pm$ SEM, n=6 (NA group), n=7 (C57BL, TRG group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

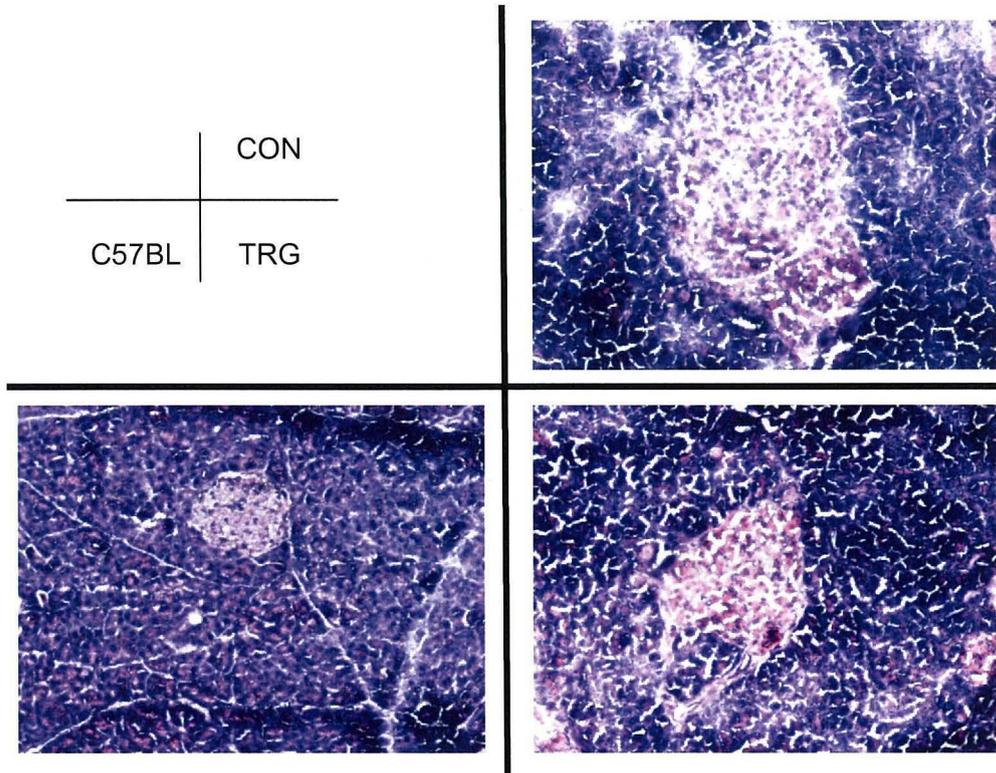


Fig.7-3-8 Micrographs of pancreas islets (×200).  
Islets were stained with hematoxylin and eosin.

制、NA 群で抑制傾向が観察された (Fig.7-3-6)。しかし G6PD + 6PGD や CPT 活性では、KK-*A*マウス間では群間に差は見られなかった (Fig.7-3-5)。

また解糖系酵素の GLK 活性、糖新生系の G6Pase 活性は CON 群に比して TRG、NA 群で低下、低下傾向を示し、解糖系と糖新生系のバランス指標としての GLK/G6Pase は CON 群に比べて TRG、NA 群が高値を示した (Fig.7-3-6)。

精巣周囲白色脂肪細胞の TG 濃度は CON 群に比べて TRG、NA 群で有意に低下した (Fig.7-3-7)。サンプル給与群の細胞内にある TG 濃度の変化を突き止めようと、FFA の入り口、LPL 活性と GPDH 活性を測定することとした。GPDH 活性は C57BL 群に比べて CON 群は高値を示し、TRG、NA 群は有意に低下した。LPL 活性において TRG 群は CON 群と差が認められなかったが、NA 群は有意に高値を示した。

また TRG 群マウスの膵臓のランゲルハンス氏島の顕微鏡写真を見ると、CON 群では変形、肥大が見られたが、TRG 群ではこれらの現象が見られなかった (Fig.7-3-8)。また CON 群にはランゲルハンス氏島と外分泌部との境界が不明瞭であったが、TRG 群では明瞭であった。

#### 7.3.4 考察

肥満 2 型糖尿病モデルとして KK-*A*マウスを用い、南瓜成分の TRG、NA の抗糖尿病効果について、血糖値、インスリンや HbA<sub>1c</sub>、また脂質マーカーへの影響を検討した。

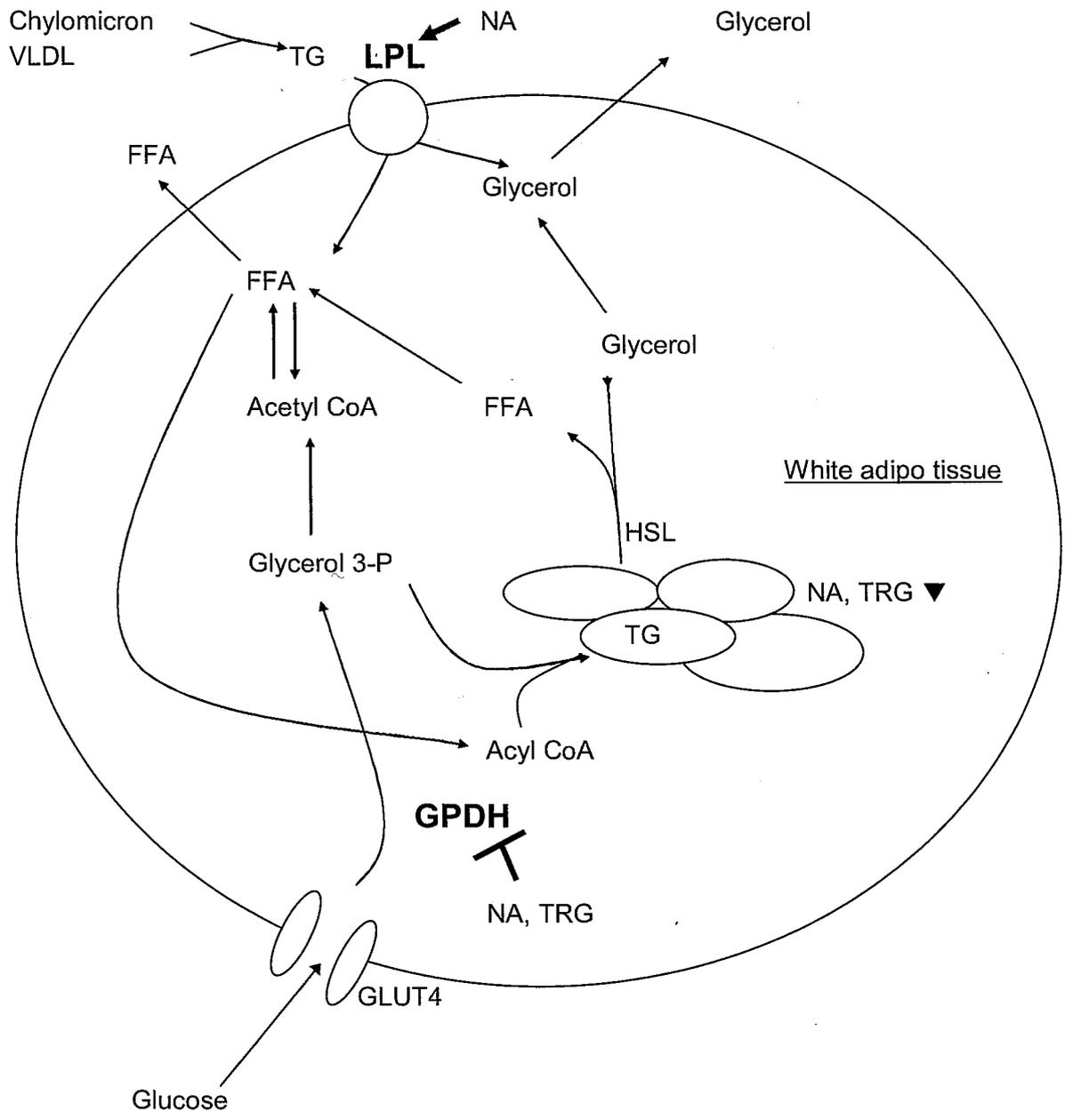
空腹時のインスリン値や HOMA-IR 値を C57BL 群と比較すると、CON 群は極めて重度なインスリン抵抗性の状態にあるが、TRG、NA 群ではその軽減が見られる。しかし 4 週目において空腹時血糖値は TRG、NA 群で CON 群よりも低い値を示すが、摂食 1 時間後の血糖値には、サンプル給与による効果が見られなくなる程 KK-*A*マウスではインスリン抵抗性がさらに進んでいることが推察された。

KK-*A*マウスにおける TRG、NA 群の作用機構を検討するため、肝臓の GLK や G6Pase 活性を測定したところ、両酵素とも CON 群に比べて TRG 群で有意に低下、NA 群で低下傾向を示した。この糖代謝に関わる酵素の活性の違いが血糖値にも影響し、

インスリンの感受性に差が生じたと推察できる。本章第2節の結果と同じ様に、CON 群は血糖値が高いにも関わらず、糖新生のキー酵素である G6pc が高発現し、その活性が高く維持されていることが推察される。また CON 群ではインスリンは十分量分泌されているが、インスリン受容体もしくは GLUT のトランスロケーションまでのシグナルが障害を受け、サンプル給与群はそれらの障害を軽減しているのかも知れない。Hotamisligil らは肥満ラットにおいて TNF- $\alpha$ がインスリン抵抗性を惹起すること、その機序は TNF- $\alpha$ によるインスリン受容体基質 (IRS) -1 のセリンリン酸であることを報告した (104)。IRS のセリンリン酸化は、インスリンによるチロシンリン酸化に拮抗し、さらに IRS-1 そのものの分解を促進することでインスリン抵抗性を引き起こすメカニズムのひとつとして考えられている (105)。本節でも血清 TNF- $\alpha$ 濃度の増加と HOMA-IR 値の増加は比例することから、CON 群でのインスリン抵抗性の TRG、NA 給与による改善は、TNF- $\alpha$ の産生抑制と関係しているのかも知れない。

また脂肪組織由来 TNF- $\alpha$ 遺伝子発現が肥満者で 2 倍以上亢進しており、肥満の軽減によってその発現の低下が見られることが報告されている (106)。精巣周囲の白色脂肪細胞の重量や TG 含量は CON 群よりも TRG、NA 群で低値であることから、脂肪細胞の数や大きさに差があり、それが TNF- $\alpha$ 産生にも影響しているのかも知れない。脂肪細胞の大きさとそれにより産出されるサイトカインについての報告は多数されている (107-111)。また精巣周囲脂肪細胞の TG 蓄積には、グルコースを TG に変換する GDPH 活性の違いと関連している事が推察された。

背中の中肩甲骨間の褐色脂肪細胞重量は、CON 群や NA 群に比べて TRG 群が有意に高値を示した。白色脂肪細胞がエネルギー源としての余分な脂肪酸を蓄える臓器であるのに対して、褐色脂肪細胞は体熱生産に関わる脱共役タンパク (uncoupling protein; UCP) を有する。UCP は脂肪酸を細胞内に取り込み、熱を放散し体を恒温に保っている。TRG 群においては、CON、NA 群より褐色脂肪細胞重量が有意に大きいことから、CON 群や NA 群よりも熱産生が盛んに行われているのかも知れない (112)。



HSL hormone-sensitive lipase  
 GLUT4 glucose transporter 4

Fig.7-3-9 The metabolism of lipids in white adipose tissue.

↑; Promotion  
 T; Suppression  
 ▼; Decrease

## 第 8 章 ピログルタミン酸の抗糖尿病効果検討

### 第 1 節 非糖尿病ラットによる検討

#### 8.1.1 緒言

本節では第 6 章で単離同定したピログルタミン酸の非糖尿病モデルラット、Wistar ラットへの影響について検討した。

ピログルタミン酸 (P) はグルタミン酸のカルボキシル基とアミノ酸が分子内縮合反応を起こして、ラクタムを形成したアミノ酸である。このアミノ酸は、様々な加熱加工を施した食品に見出されており、生理機能として神経障害防止 (34)、抗腫瘍、抗転移作用 (35) などが知られている。しかし 2 型糖尿病との関係についての報告は見られない。本章では非糖尿病動物として Wistar ラットおよび 2 型糖尿病モデル動物として GK ラット、KK-*A* マウスを使用して、P がそれらの糖尿病関連各種マーカーに及ぼす影響について検討した。第 1 節では Wistar ラットによる P の及ぼす影響を見た。

#### 8.1.2 実験方法

実験に用いたピログルタミン酸は、関東化学の DL-ピログルタミン酸 カルボン酸分析用 (>98.0%) を使用した。

Wistar 系ラット (日本エスエルシーより購入 8 週令 雄) を用いて P が糖尿病マーカーや血清、肝臓脂質レベルに及ぼす影響を検討した。飼育環境は 3.1.2 と同じ。ラットは 3 日間馴化飼育後、対照 (CON) 群 (n=5)、ピログルタミン酸添加群 (P 0.05%、0.1% 添加群:P①、P② 群、各 n=6) の 3 群に分け、46 日間飼育した。食餌組成は Table 8-1-1 に示す。P 群にはピログルタミン酸 0.05%、0.1% を加えた飼料を与え、添加した量を  $\alpha$ -コーンスターチ : スクロース = 2 : 1 混合を差し引き、全量を 100% になるようにした。

各種測定項目 (糖尿病マーカー、各種脂質レベル、酸化ストレスマーカーなど) や測

Table8-1-1 Composition of the experimental diets (%)

Constituent	CON	P ①	P ②
Casein	15	15	16
α- Cornstarch:sucrose=2:1	70.5	70.45	69.4
Corn oil	5	5	5
Celulose	5	5	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1	1	1
Pyroglutamic acid		0.05	0.1
	100	100	100

1 AIN-93G-MX and 2 AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co,Ltd.

定方法は 7.1.2.3~7.1.2.7 と同様である。

データは平均±SEM で表した。データは、一元配置分散分析法 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher's PLSD 法を用いた。統計的有意水準は  $p<0.05$  とした。

### 8.1.3 結果

飼育 46 日間の食餌摂取量は群間で差はなく、体重増加量に関しても群間に差はなかった (Table8-1-2)。空腹時や随時血糖値においてもばらつきがあるものの統計的な差はなかった (Table8-1-2)。また臓器重量や血液 TBARS、肝障害マーカーとして測定した血清 ALT、AST 活性においても群間に差がなかった (Table8-1-2)。HbA<sub>1c</sub> 値は CON 群のみで 1 週目に比べて 6 週目で 10% の検定で増加が見られたが、P①、P② 群においては増加が見られなかった (Fig.8-1)。飼育最終日に採血、調製した脂質についてみると、P② 群において CON 群に比べ、血清 LDL-C 値が有意低い値を示した (Table8-1-3)。肝臓脂質の P 摂取による変化は見られなかったが、糞中の TG 排泄量値は P② 群において有意な低下が見られた。

### 8.1.4 考察

本章では P 給与が非糖尿病モデルラットにおいて糖尿病各種マーカー、血清、肝臓の脂質レベル等に及ぼす影響について検討した。

食餌摂取量や体重増加量、血液 TBARS 値、血清 ALT、AST 活性値において群間に有意な差はなかった。しかし血清脂質においては CON 群に比べ P② 群において LDL-C 値が低値を示した。

糖尿病のマーカーとしての HbA<sub>1c</sub> 値においては、CON 群において飼育 1 週目に比べて 6 週目に増加したが ( $p<0.1$ )、P 群においてはその増加が観察されなかった。これらのことから非糖尿病ラットにおいても、老化の進行に従ってヘモグロビンの糖化が進むこと、また P は糖化を抑制することが明らかになった。

Table8-1-2 Effects of pyroglutamic acid on organ weights, blood glucose and TBARS levels, and liver enzyme activities.

Dietary group	CON	P ①	P ②
Initial body weight (g)	179 ± 3	183 ± 2	180 ± 2
Final body weight (g)	284 ± 4	292 ± 5	286 ± 5
Total food intake (g/46d)	722 ± 6	724 ± 5	706 ± 8
Feeding Blood glucose (mg/dl)			
1st week	68.4 ± 8.0	70.7 ± 5.5	70.7 ± 4.0
6th week	93.8 ± 2.7	92.5 ± 5.7	94.5 ± 6.1
Fed Blood glucose (mg/dl)			
1st week	110 ± 2	104 ± 4	120 ± 4
6th week	120 ± 4	113 ± 4	117 ± 6
Organ (% of body weight)			
Liver	3.14 ± 0.08	3.12 ± 0.08	3.99 ± 0.10
Kidney	0.333 ± 0.004	0.324 ± 0.009	0.312 ± 0.004
White fat			
Mesentery	1.36 ± 0.07	1.41 ± 0.11	1.39 ± 0.03
Pararenal	0.331 ± 0.027	0.333 ± 0.026	0.343 ± 0.023
Epididymal	1.24 ± 0.11	1.26 ± 0.06	1.28 ± 0.05
Blood			
Glucose (mg/dL)	118 ± 7	114 ± 5	107 ± 4
TBARS (nmol/ml)	0.905 ± 0.090	0.927 ± 0.032	0.741 ± 0.040
Serum enzyme			
ALT (μmol/min/L)	44.5 ± 10.2	42.0 ± 7.9	39.3 ± 11.9
AST (μmol/min/L)	74.9 ± 6.7	79.5 ± 5.9	65.0 ± 4.49

Values are means±SEM, n=5 (CON groups), n=6 (P ①, ② group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

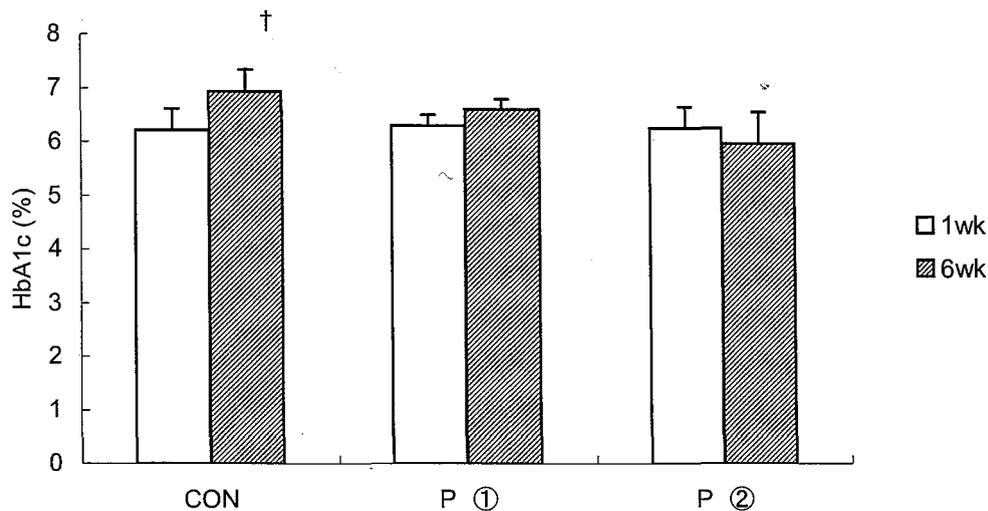


Fig.8-1 Effect of pyroglutamic acid on hemoglobin A<sub>1c</sub> levels in experimental animals.

† vs. value at 1st week,  $p < 0.1$ .

Table 8-1-3 Effects of pyroglutamic acid on serum, liver and feces lipid level of experimental rats.

Dietary group	CON	P ①	P ②
<b>Serum</b>			
T-Chol (mg/dL)	107 ± 6 <sup>ab</sup>	114 ± 5 <sup>a</sup>	98.1 ± 2.3 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dL)	40.5 ± 4.0 <sup>ab</sup>	38.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	46.0 ± 3.0 <sup>a</sup>
LDL-C (mg/dL)	46.4 ± 3.9 <sup>a</sup>	54.4 ± 3.2 <sup>a</sup>	30.4 ± 6.4 <sup>b</sup>
Atherogenic index	0.623 ± 0.016	0.660 ± 0.020	0.532 ± 0.022
TG (mg/dL)	97.7 ± 14.9	105 ± 17	108 ± 29
FFA (mEq/L)	0.180 ± 0.009	0.247 ± 0.011	0.222 ± 0.014
<b>Liver</b>			
Total lipid (mg/g of liver)	45.2 ± 1.1	40.7 ± 2.4	43.2 ± 2.3
T-Chol (mg/g of liver)	1.31 ± 0.09	1.39 ± 0.04	1.34 ± 0.06
TG (mg/g of liver)	8.95 ± 1.15	9.77 ± 0.71	8.33 ± 1.14
FFA (mEq/mg of liver)	15.1 ± 0.9	16.4 ± 1.8	15.4 ± 0.7
<b>Feces</b>			
Total excretion (g/40h)	2.14 ± 0.01	2.25 ± 0.12	2.17 ± 0.11
Total lipid (mg/g of total feces)	27.0 ± 1.6	27.6 ± 4.8	32.4 ± 3.1
T-Chol (mg/g of total feces)	6.41 ± 0.31	7.17 ± 0.10	6.95 ± 0.33
TG (mg/g of feces)	16.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	14.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	11.5 ± 0.8 <sup>b</sup>

Values are means ± SEM, n=5 (CON group), n=6 (P ①, ② group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

## 第 8 章 第 2 節 非肥満 2 型糖尿病モデル (GK) ラットによる検討

### 8.2.1 緒言

本章第 1 節で P の摂取が非糖尿病ラットの糖尿病各種マーカー、血清、肝臓脂質レベル、肝臓障害のマーカーなどに及ぼす影響を検討した。その結果 P を 0.1% の割合で添加した飼料は、血清 LDL-C 値を減少させること、また 0.05% P 群での影響は小さいことが明らかになった。

本節は、P を 0.05% の割合で添加した飼料の給与が、非肥満 2 型糖尿病モデルとしての GK ラットに及ぼす影響を検討した。

### 8.2.2 実験方法

非肥満 2 型糖尿病モデル GK (GK/Slc 8 週令 雄) ラットを用いて抗糖尿病効果の検討を行った。

サンプルは 8.1.2 と同じである。また動物の飼育環境も 3.1.2 と同様である。ラットは 4 日間の馴化飼育後、対照 (CON) 群 (n=6)、0.05% P 添加群 (n=5) の 2 群に分け、43 日間飼育した。食餌組成は Table 8-2-1 に示す。非糖尿病モデル群には Wistar ラット (n=5) を使用した。飼育最終日に 10 時間絶食後ネンブタール麻酔下で採血と各種臓器の採取を行い分析に用いた。分析項目や方法は 7.2.2.2~7.2.2.9 と同様である。

データは平均±SEM で表した。データは、一元配置分散分析法 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher's PLSD 法を用いた。統計的有意水準は  $p<0.05$  とした。

### 8.2.3 結果

CON 群における体重は 43 日間にわたって増加したが、P 群での 21 日目からの増加は CON 群に比べ少なく、Wistar 群と同じ増加曲線を描いた (Fig. 8-2-1)。

飼育開始時、3、5 週目に測定した空腹時血糖値は非糖尿病の Wistar 群では GK ラットに比しては明らかに低い値を示したが、GK ラットの群間で有意な差は見られなか

Table8-2-1 Composition of the experimental diets (%)

Constituent	Wistar CON	P
Casein	15	15
$\alpha$ - Cornstarch:sucrose=2:1	70.5	70.45
Corn oil	5	5
Celulose	5	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1	1
Pyroglutamic acid		0.05
	100	100

1 AIN-93G-MX and 2 AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co,Ltd.

った (Fig.8-2-2)。摂食 1 時間後に測定した随時血糖値は、開始時の値がばらついたため、同じ群での経時的変化量 (1 週目と 3、5 週目の差) を群間で比較した。Wistar、CON 群は 1 週と 3、5 週との間で変化がなかったが、P 群では 1 週目と比較すると、3、5 週目の値が低下を示した。随時血糖値の 1 週目を 0 mg/dl として 3、5 週目の変化量を群間で比較すると、3、5 週目に CON 群に比べて P 群は有意に低かった。

飼育 26-27 日目に行った OGTT は、糖負荷後 60 分で CON 群に比べて P 群で有意な上昇抑制が見られた (Fig.8-2-3)。得られた血糖値において AUC 面積を計算すると、P 群で CON 群に比べて有意に低い値だった。またこの OGTT でのインスリン濃度の経時変化は CON 群で常に高値を示したのに対し、P 群では糖負荷 30 分後を除いて有意な上昇の抑制を示した。

解剖後に摘出した肝臓重量および精巣周囲の白色脂肪細胞重量は、CON 群に比べて P 群で低い傾向、有意な低値を示した (Table8-2-2)。解剖時の血清インスリン値でも、Wistar 群に比べて CON 群で有意に高い値を示し、P 群は CON 群に比べて有意に低い値を示した (Table8-2-2)。脂肪細胞由来のサイトカインであるアディポネクチンは CON 群のばらつきが大きく統計的差異は見られなかった。TNF- $\alpha$ 濃度においても GK ラット群間に有意な差は見られなかった (Table8-2-2)。

血清の T-Chol、LDL-C 濃度は非糖尿病の Wistar 群に比べて CON 群で高い値を示し、P 群で有意な低値、または低くなる傾向を示した (Table8-2-3)。肝臓の TG レベルは CON 群で Wistar 群より高い値を示したが、P 群では CON 群より有意に低い値を示した。飼育 6 週間目で採取した糞中における TG 排泄量も CON 群に比べ、P 群が有意に低い値を示した。

HbA<sub>1c</sub> の測定結果について、各群で 4、6 週目と 1 週間目の値について有意差検定を行った結果を Fig.8-2-4 に示した。Wistar 群、CON 群において 1 週目と比較して 4 週目で上昇傾向、6 週目で有意な上昇が観察された。しかし P 群において 4 週目で有意な上昇が見られたが、6 週目には低下を示した。

肝臓の脂肪酸合成系酵素の 1 つである FAS と脂肪酸合成に必要な NADPH を産生す

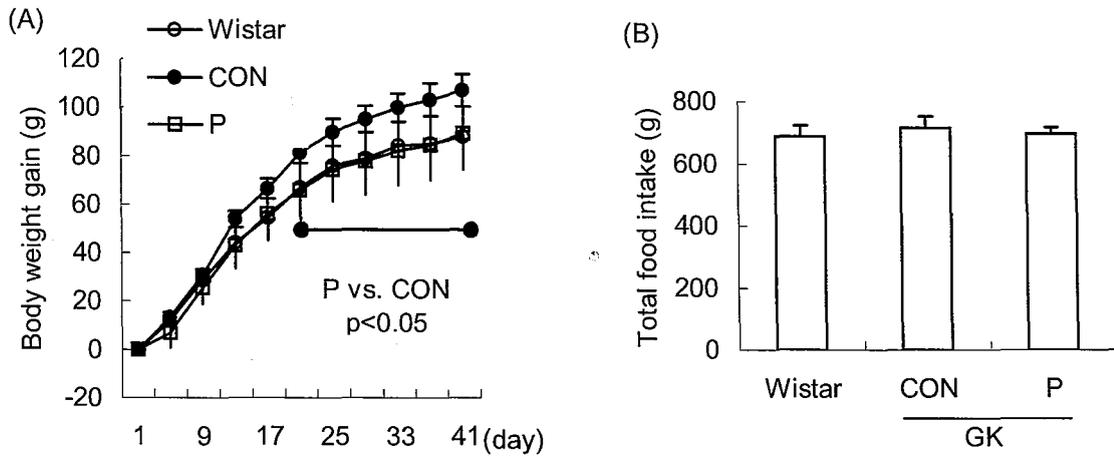


Fig.8-2-1 Body weight gain (A) and total food intake (B).

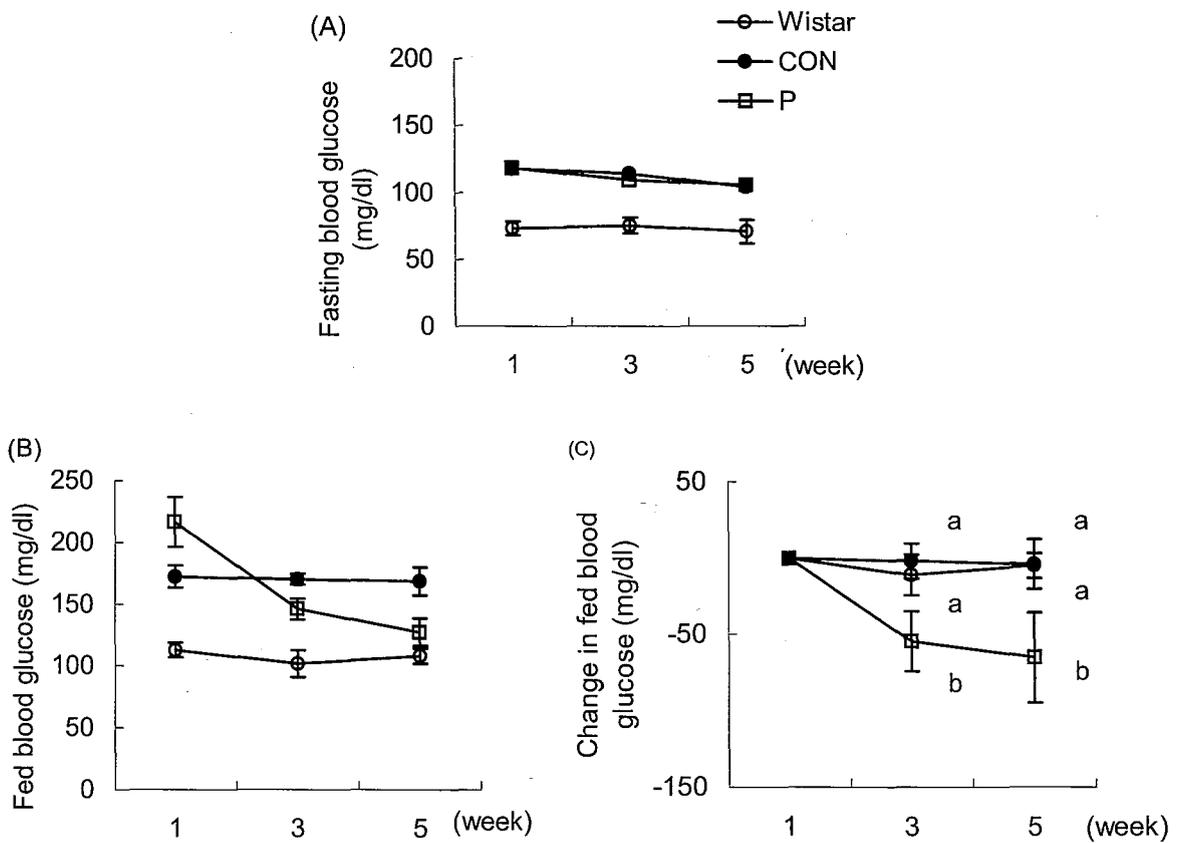


Fig.8-2-2 Fasting and fed blood glucose levels.

(A) Blood glucose after 10h fasting. (B) Blood glucose after 1h feeding. (C) Change in fed blood glucose levels. Values without a common letter at the same week. Values are means  $\pm$  SEM, n=5 (Wistar,P), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

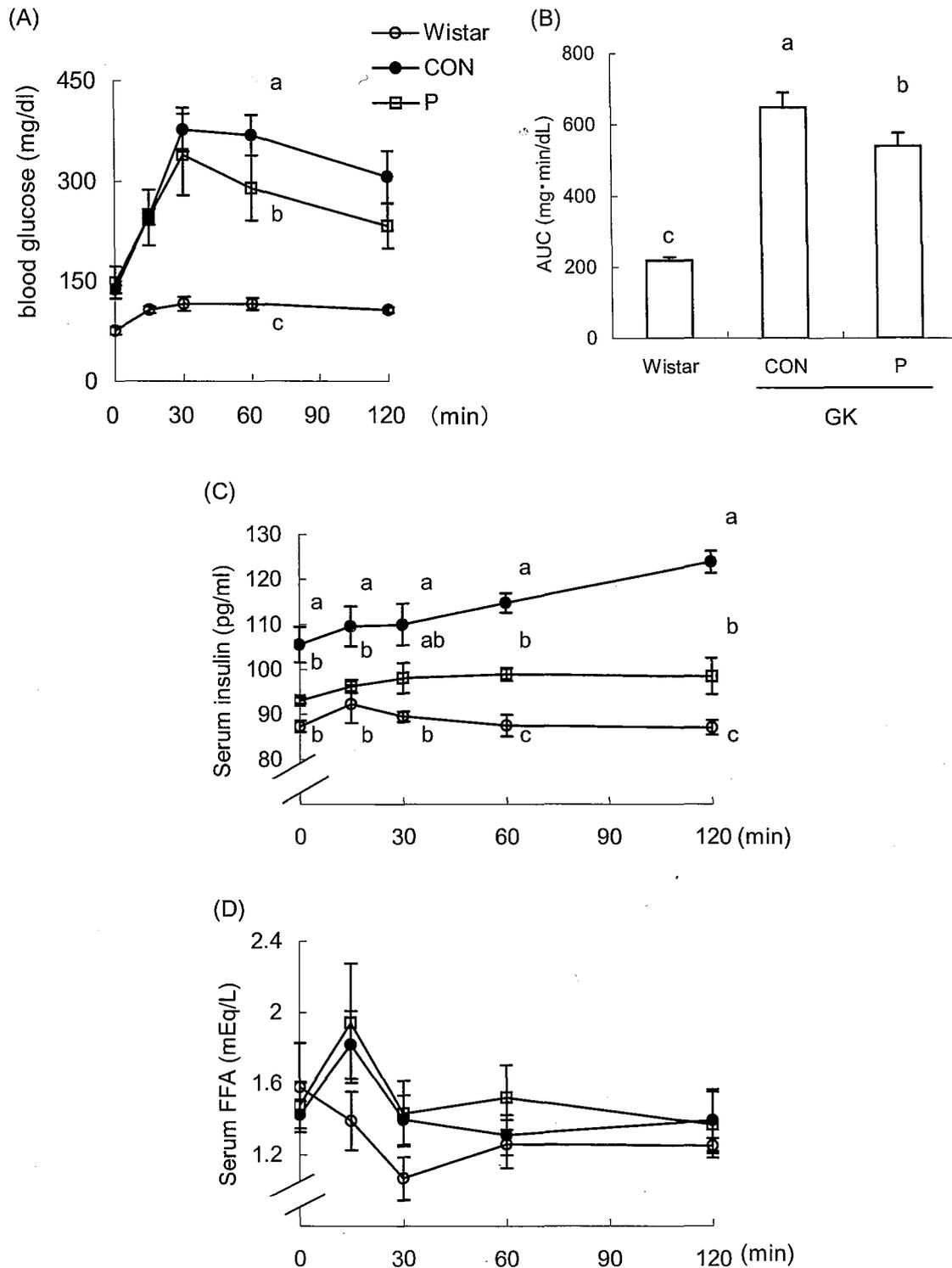


Fig.8-2-3 Effects of pyroglutamic acid on OGTT in experimental animals. (A) Glucose loading was carried out at 26-27d (10wk old) after feeding of the experimental diet. (B) An area under the curve (AUC) of the OGTT. (C) Serum insulin concentrations before and after glucose loading. (D) Serum free fatty acid concentrations before and after glucose loading. Values are means $\pm$ SEM, n=5 (Wistar,P), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table8-2-2 Effects of pyroglutamic acid on serum insulin and adiponectin, and TNF- $\alpha$  levels of experimental rats.

Dietary group	Wistar	GK	
		CON	P
Organ (% of body weight)			
Liver	3.19 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	3.44 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	3.28 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>
Kidney	0.312 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.424 $\pm$ 0.007 <sup>a</sup>	0.405 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>
Epidimal adipo tissue	0.751 $\pm$ 0.049 <sup>c</sup>	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.577 $\pm$ 0.093 <sup>b</sup>
Serum			
Insulin (pg/ml)	87.2 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	116.9 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	99.0 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>
Adiponectin (ng/ml)	96.3 $\pm$ 6.4	82.4 $\pm$ 25.8	90.0 $\pm$ 5.7
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	121 $\pm$ 1	123 $\pm$ 4	115 $\pm$ 1

Values are means $\pm$ SEM, n=5 (Wistar, P group), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table8-2-3 Effects of pyrogutamic acid on serum and liver lipid levels, and fecal excretion of lipids in the experimental rats.

Dietary group	Wistar	GK	
		CON	P
Serum			
T-Chol (mg/dL)	66.0 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>	123.3 $\pm$ 21.5 <sup>a</sup>	93.8 $\pm$ 3.6 <sup>ab</sup>
HDL-C (mg/dL)	45.2 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	72.7 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	66.2 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>
LDL-C (mg/dL)	10.4 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>	66.9 $\pm$ 16.7 <sup>a</sup>	20.4 $\pm$ 6.2 <sup>b</sup>
Atherogenic index	0.451 $\pm$ 0.076	0.680 $\pm$ 0.271	0.438 $\pm$ 0.142
TG (mg/dL)	82.2 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	90.9 $\pm$ 16.6 <sup>a</sup>	35.8 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>
FFA (mEq/L)	0.629 $\pm$ 0.040	0.705 $\pm$ 0.046	0.671 $\pm$ 0.860
Total bile acid ( $\mu$ mol/l)	1.84 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	7.25 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	6.70 $\pm$ 0.59 <sup>ab</sup>
Liver			
Total lipid (mg/g of liver)	51.7 $\pm$ 5.5	58.7 $\pm$ 5.6	44.7 $\pm$ 7.7
T-Chol (mg/g of liver)	3.15 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	4.96 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	3.91 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>
TG (mg/g of liver)	16.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	52.2 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	18.8 $\pm$ 5.8 <sup>b</sup>
PL (mg/g of liver)	16.5 $\pm$ 1.6	23.0 $\pm$ 3.5	17.0 $\pm$ 0.8
FFA (mEq/g of liver)	65.1 $\pm$ 1.4	66.8 $\pm$ 2.0	66.2 $\pm$ 0.4
Feces			
Total excretion (g/40h)	1.96 $\pm$ 0.17	2.03 $\pm$ 0.11	2.14 $\pm$ 0.11
Total lipid (mg/g of total feces)	35.1 $\pm$ 1.4	40.5 $\pm$ 1.7	38.1 $\pm$ 2.2
T-Chol (mg/g of total feces)	0.809 $\pm$ 0.039	0.883 $\pm$ 0.081	0.996 $\pm$ 0.080
TG (mg/g of feces)	13.5 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	57.1 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	15.7 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>

Values are means $\pm$ SEM, n=5 (Wistar,P group), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

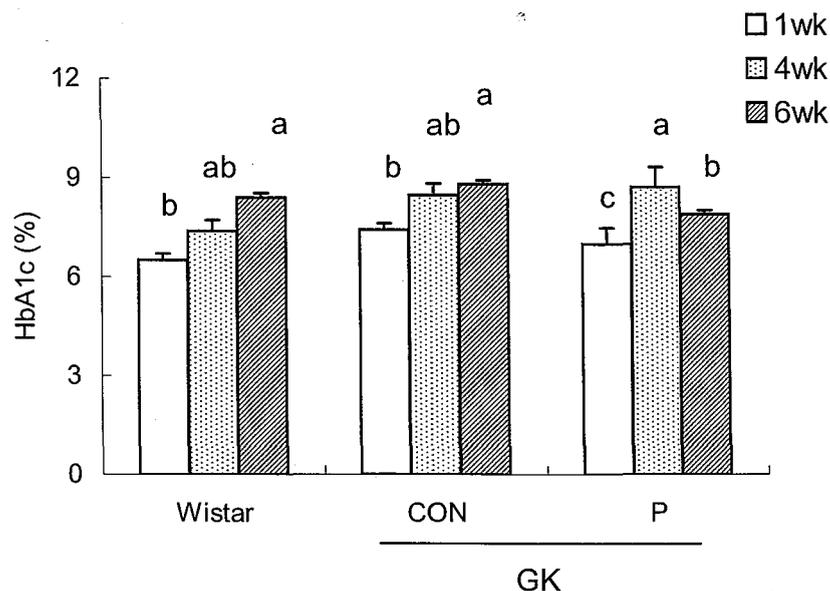


Fig.8-2-4 Effects of pyroglutamic acid on hemoglobin A<sub>1c</sub> levels in experimental animals.

Values are means±SEM, n=5 (Wistar, P group), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

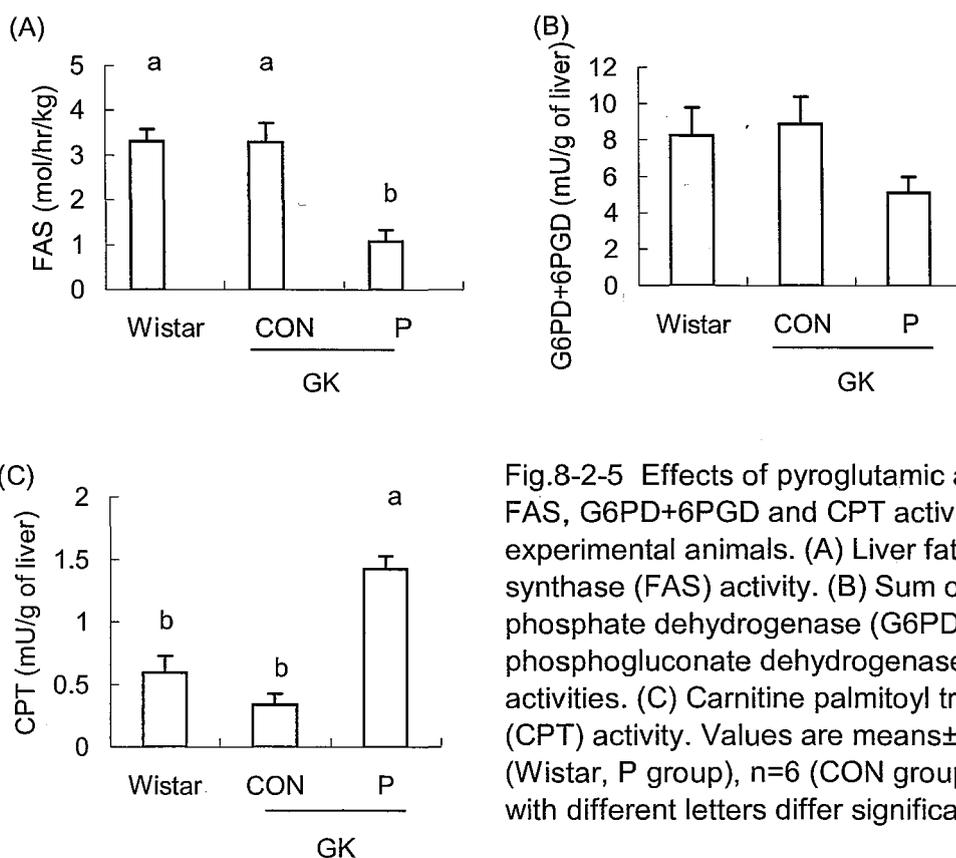


Fig.8-2-5 Effects of pyroglutamic acid on liver FAS, G6PD+6PGD and CPT activities in experimental animals. (A) Liver fatty acid synthase (FAS) activity. (B) Sum of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activities. (C) Carnitine palmitoyl transferase (CPT) activity. Values are means±SEM, n=5 (Wistar, P group), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

る G6PD と 6PGD、そして脂肪酸のβ酸化系の酵素 CPT 活性について測定した結果を Fig.8-2-5 に示した。FAS 活性は CON 群に比べ P 群で有意に低下し、CPT 活性では高い活性値を示した。G6PD + 6PGD 活性は群間に有意差が認められなかった。

血液と肝臓の TBARS 値は群間に有意な差はなかった (Table8-2-4)。酸化ストレスのマーカーとしての尿中 8-OHdG 量についても GK ラット間では有意な差がなかった (Table8-2-4)。

グルタチオンについては、GSH と GSSG 値が Wistar 群よりも CON 群は高くなり、P 群では低下傾向を示した。GSH / (GSH + GSSG) 比は CON 群に比べて P 群が高い傾向を示した (Table8-2-5)。

また赤血球 CAT 活性と肝臓 CAT、GPx 活性は CON 群で Wistar 群より高いまたは高い傾向にあり、P 群では CON 群より有意に低い値を示した (Table8-2-6)。

DNA マイクロアレイ法を使い、P 給与による影響を受けた遺伝子について検討したところ、発現が 2 倍以上に上昇した遺伝子数は 105、低下した遺伝子数は 179 であった。中でも今回の実験に関連のある糖代謝と脂質代謝に絞って検索したものを、Table8-2-7 に示した。G6pc、Foxo1、Hnf4α等の糖新生に関わる遺伝子発現が低下しており、P による糖代謝の制御がインスリン抵抗性の改善と強く関連していることが支持された。またアセチル CoA の合成を阻害する Pdk4 の発現増加、LPL 活性を抑制する Angptl4 の発現低下が見られた。

#### 8.2.4 考察

今回の実験は P を GK ラットに給与し、その給与が糖尿病各種マーカー、血清、肝臓脂質レベル等に及ぼす影響について検討した。

その結果 CON 群に比べて P 群では、①体重増加量が低い ②摂食時や耐糖能試験時の血糖値が低い ③HbA<sub>1c</sub> が低い ④酸化ストレスマーカーが低値を示す などが分かった。

①については肝臓や白色脂肪等の重量が CON 群よりも P 群で低下、または低下傾

Table8-2-4 Effects of pyroglutamic acid on oxidative status of experimental rats.

Dietary group	Wistar	GK	
		CON	P
<b>TBARS</b>			
Blood (nmol/ml)	1.32 ± 0.35	1.46 ± 0.46	1.29 ± 0.29
Liver (nmol/g of liver)	172 ± 15	178 ± 5	195 ± 14
Urea 8-OHdG (ng/g of creatinine)	442 ± 85	665 ± 158	678 ± 173

Values are means±SEM, n=5 (Wistar, P group), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table8-2-5 Effects of pyroglutamic acid on liver glutathione levels of experimental rats.

Dietary group	Wistar	GK	
		CON	P
GSH (mmol/kg of liver)	3.72 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.27 ± 0.11 <sup>a</sup>	4.25 ± 0.26 <sup>ab</sup>
GSSG (mmol/kg of liver)	0.0196 ± 0.0064 <sup>b</sup>	0.0592 ± 0.0123 <sup>a</sup>	0.0381 ± 0.0019 <sup>ab</sup>
GSH/ (GSH + GSSG) ratio	0.995 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.986 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.991 ± 0.004 <sup>ab</sup>

Wistar and GK rats (14wk old) were given the each diet for 43d. Values are means±SEM, n=5 (Wistar, P group), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table8-2-6 Effects of pyroglutamic acid on blood and liver antioxidant enzymes activities of experimental rats.

Dietary group	Wistar	GK	
		CON	P
<b>Blood</b>			
CAT (U/mg of Hb)	4.74 ± 0.72 <sup>b</sup>	7.96 ± 1.21 <sup>a</sup>	4.91 ± 0.69 <sup>b</sup>
GPx (U/mg of Hb)	27.6 ± 4.2	34.0 ± 3.3	26.2 ± 1.8
<b>Liver</b>			
CAT (U/mg of protein)	70.8 ± 3.5 <sup>ab</sup>	76.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	60.8 ± 7.7 <sup>b</sup>
GPx (U/mg of protein)	1.04 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.15 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.08 <sup>b</sup>

Wistar and GK rats (14wk old) were given the each diet for 43d. Values are means±SEM, n=5 (Wistar, P group), n=6 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table8-2-7 Gene expression profiles in liver of GK fed pyroglutamic acid.

	Gene name	Gene symbol	Genbank no.	function	Fold change *	p
Upregulated	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	Pdk4	AF034577	acetyl CoA synthesis inhibitor	3.90	<0.01
	angiopoietin-like 4	Angptl4	BC078944	LPL activity inhibitor	0.50	<0.05
Downregulated	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit	G6pc	BC090067	gluconeogenesis	0.47	<0.01
	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hnf4a	D10554	transcription factor(G7Pase,PEPCK)	0.46	<0.01
	forkhead box O1	Foxo1	NC_005101	transcription factor(G6Pase,PEPCK)	0.42	<0.01
	glucokinase	Gck	X53588	glycolysis	0.39	<0.01
	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	Cyp7a1	J05460	Bile acid synthesis	0.24	<0.01

\* Relative value to control group.

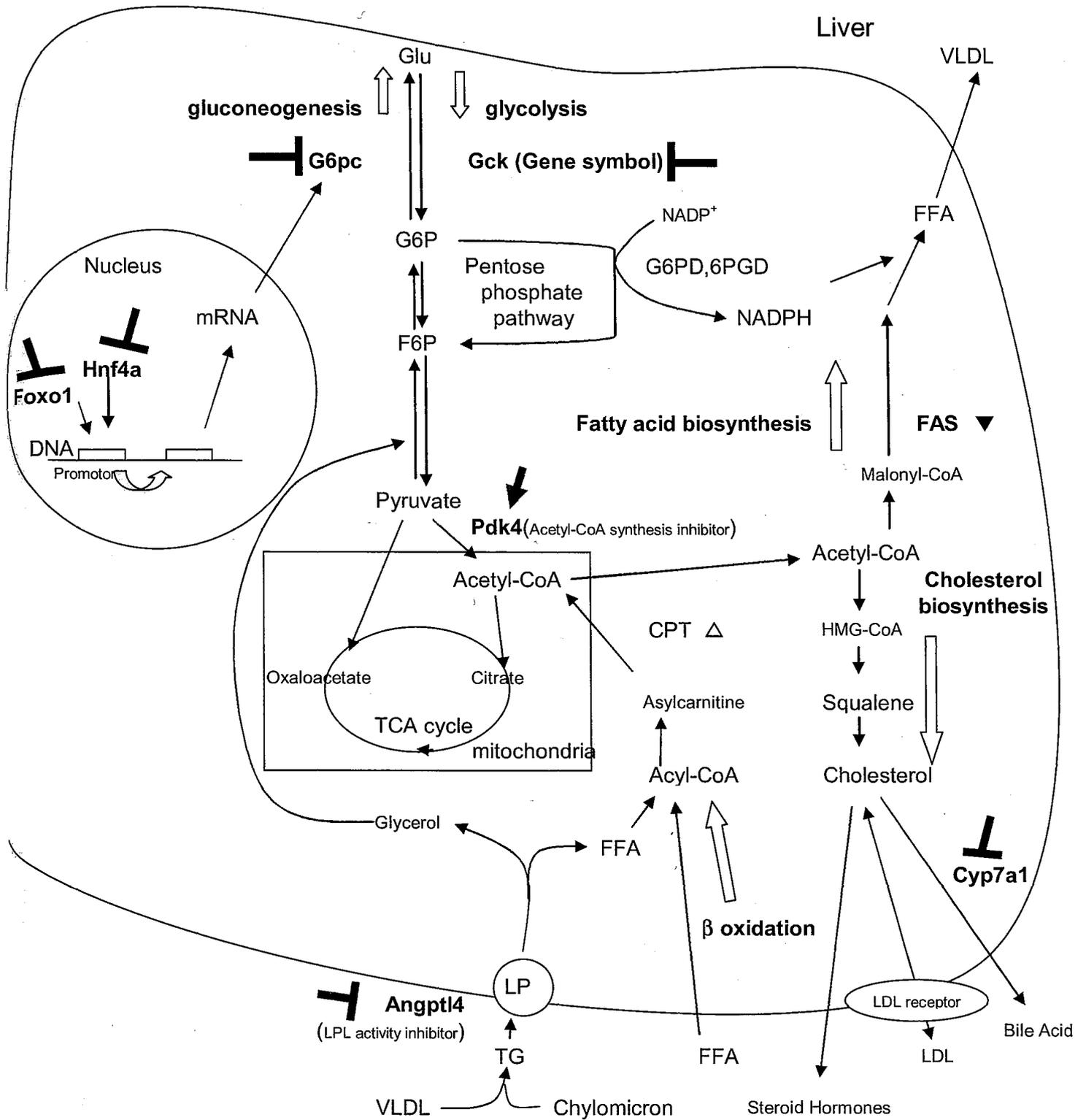


Fig.8-2-6 Effects of pyroglutamic acid on glucose and lipid metabolism in the liver.

↑; Promotion.

⊥; Suppression.

Δ; Enzyme activated in P-fed group.

▼; Enzyme decreased its activity in P-fed group.

向にあること、また肝臓 TG 濃度が CON 群よりも低いことなどから、P による臓器の脂肪蓄積抑制が要因のひとつになっていることが推察される。肝臓における脂肪酸合成系酵素の FAS やβ酸化系酵素の CPT 活性を測定したところ、P 群で CON 群に比べ FAS 活性が低下し、CPT 活性が高くなった。つまり、P 給与により脂肪酸合成は低下し、脂肪酸分解は亢進することとなり、P が脂肪の蓄積を抑制していることが示唆された。

②については、OGTT の結果より、P を与えたラットはインスリン抵抗性が改善されていることが要因のひとつと考えられる。DNA マイクロアレイ解析においても、解糖系酵素 Gck と糖新生系酵素 G6pc の発現の低下が見られた。また第 7 章第 2 節と同様に、G6pc 発現は Foxo1 や Hnf4α が P の影響を受けたことにより低下していることが推察された (参照 Fig.8-2-7)。

③の P 給与による HbA<sub>1c</sub> の低下については、P の給与によってインスリン感受性が改善され、その結果血糖値の上昇が緩和されて糖化が抑制されたことが要因のひとつとして考えられる。

最後に④の酸化ストレスマーカー等の改善については、TBARS や 8-OHdG においては群間に差は見られなかったが、P 群では体内の総グルタチオン中の GSH 値が CON 群より高い傾向を示していること、また赤血球、肝臓 GPx 活性が CON 群より低い値で維持されていることが関連していることが推察できる。P 群では CON 群に比べて体内酸化が抑制されており、結果として酸化に抑制的に働く GSH が節約され、GSH/(GSH + GSSG) の高い値、GSH の産生に必要な GPx の低い活性が認められたものと推察される。

## 第 8 章 第 3 節 肥満 2 型糖尿病モデル (KK-*A<sup>y</sup>*) マウスによる検討

### 8.3.1 緒言

本章第 2 節で、ピログルタミン酸 (P) の非肥満 2 型糖尿病モデル GK ラットにおける抗糖尿病効果を検討した。その結果 P 群は耐糖能を改善する作用を有し、また血清、肝臓などの TG レベルを低下させることを示した。本節では、より肥満 2 型糖尿病モデル、KK-*A<sup>y</sup>* マウスを用い、P が糖尿病各種マーカー、血清、肝臓脂質濃度に及ぼす影響などについて検討した。

### 8.3.2 実験方法

KK-*A<sup>y</sup>* (KK-*A<sup>y</sup>*/TaJcl 6 週令 雄) マウスを用いて検討を行った。マウスは 2 日間馴化飼育後、CON 群 (n=8)、P 添加群 (n=7) の 2 群に分け、28 日間飼育した。同週令の C57BL/6J (n=7) を KK-*A<sup>y</sup>* の対照群とした。食餌組成は Table8-3-1 に示す。実験に用いた P は関東化学株式会社から購入し純度 98% 以上のものを使用した。飼育最終日に 12 時間絶食後、ネンブタール麻酔下採血、臓器の採取を行い、各種測定に用いた。測定項目や方法は 7.3.2.2~7.3.2.6 と同様に行った。

データは平均±SEM で表した。データは、一元配置分散分析法 (ANOVA) を使用し、事後分析として Fisher's PLSD 法を用いた。統計的有意水準は  $p<0.05$  とした。

### 8.3.3 結果

総食餌摂取は KK-*A<sup>y</sup>* マウス間で差はないが、体重増加量は CON 群よりも P 群で飼育 27 日目に有意に高い値を示した (Table8-3-1)。総飲水量は C57BL 群に比べ、CON 群で有意に高く P 群で低下傾向を示したが、有意な差はない。

空腹時血糖値は飼育 2、3 週目で群間に有意な差が見られなかったが、4 週目には P 群が CON 群より低い値を示した (Fig.8-3-2)。随時血糖値は 1 週目を 0 mg/dl とした時の各週の血糖値を群間で比較すると、2、3 週目に P 群が CON 群より低い傾向にあ

Table8-3-1 Composition of the experimental diets(%).

Constituent	C57BL CON	P
Casein	15	15
$\alpha$ - Cornstarch:sucrose=2:1	70.5	70.45
Corn oil	5	5
Celulose	5	5
Mineral mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1	1
Pyroglutamic acid		0.05
	100	100

<sup>1</sup> AIN-93G-MX and <sup>2</sup> AIN-93-VX which contained 25g bitartrate per 100g were obtained from Oriental Yeast Co.,Ltd.

った。しかしながら 4 週目には KK-*A*マウスのいずれの群においても血糖値が急上昇し群間に差がなくなった。

OGTT での血糖値においては、糖負荷後 30、60、90、120 分のいずれにおいても CON 群に比べて、P 群の血糖値は低い値を示した (Fig.8-3-3)。糖負荷 120 分後には P 群の血糖値は C57BL 群の値と差がない程度に低下した。OGTT 測定 0 分における血清インスリン値は CON 群に比べ P 群で低い値を示したが、糖負荷後では群間に有意な差は見られなかった (Fig.8-3-3)。これらのことから CON 群は空腹時でも血糖値とインスリン値が高く、インスリン抵抗性になっているのが示唆された。インスリン抵抗性の指標となる HOMA-IR 値からも CON 群におけるインスリン抵抗性の上昇が示唆される (Fig.8-3-3)。OGTT 測定時の血清 FFA 濃度は KK-*A*マウスで群間に有意な差が見られなかった。

腎周囲と精巣周囲の白色脂肪細胞の重量を測定したところ、群間に差がなかった (Table8-3-2)。しかし血清 TNF- $\alpha$ 値は CON 群で有意に高く、P 群で上昇が抑制された。白色脂肪細胞が肥大化することにより分泌される TNF- $\alpha$ であるが、脂肪量は変化しないにも関わらず血清に放出されている量に各群間で差がみられるのは、脂肪細胞の大きさが異なるのかも知れない。

血清 T-Chol 値においては CON 群で有意に高く、また P 群では C57BL 群と同等まで低下した (Table8-3-3)。逆に HDL-C 値は CON 群で減少し P 群で有意に増加している。LDL-C 値は CON 群が有意に増加し、P 群においてはその増加の抑制が見られた。TG や FFA 値への P 給与による変動は見られなかった。肥満タイプのインスリン抵抗性の指標となる TG/HDL 値は CON 群で上昇し、P 群で低下した。肝臓 T-Chol は血清と同様に、C57BL 群に比べ CON 群は高い値を示し、P 群は CON 群よりも低い値を示した。また肝臓 TG や FFA 値も血清同様、群間における差が見られなかった (Table8-3-3)。糞脂質においては糞 1 g 中の T-Chol や TG、総胆汁酸値は群間に差はないが、総排泄量は P 群が CON 群に比べて有意に低い値を示した (Table8-3-3)。

Wistar、CON 群において、HbA<sub>1c</sub>値は飼育 1 週目に比べて 4 週目に上昇を示した

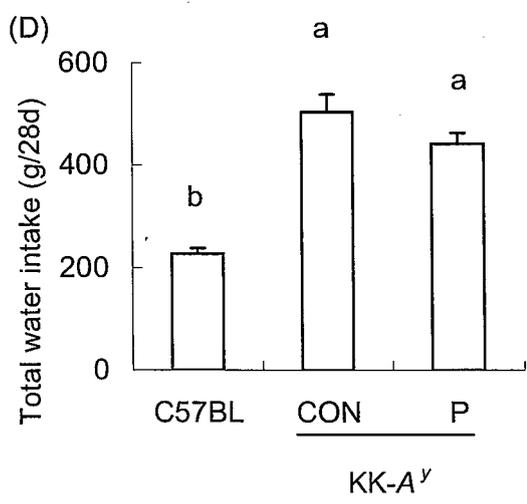
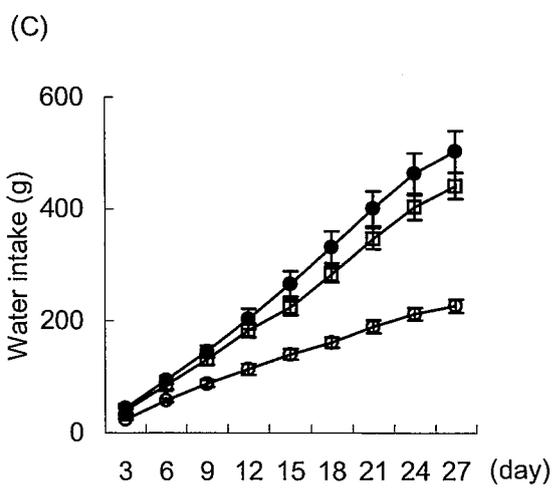
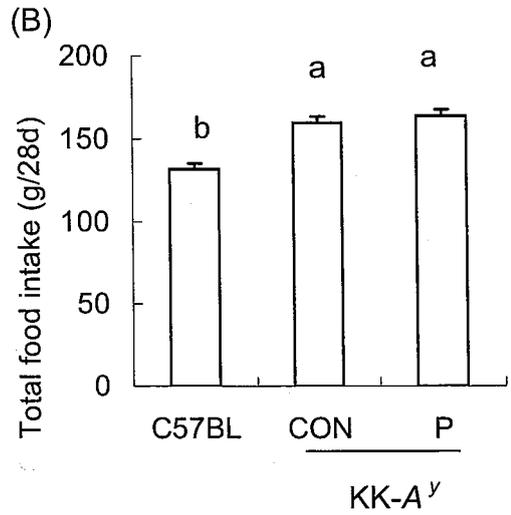
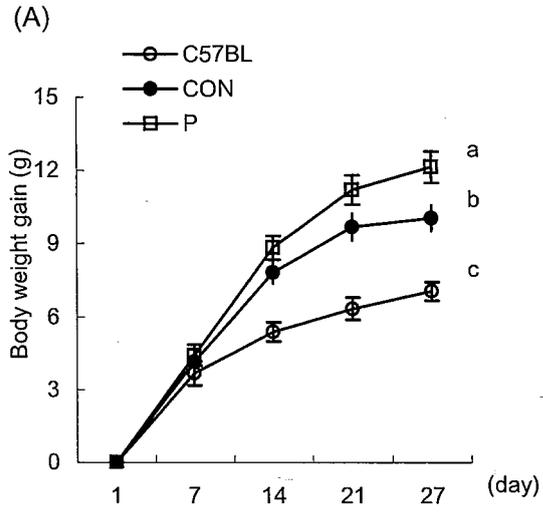


Fig.8-3-1 Body weight gain(A), total food intake(B) and water intake(C,D). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

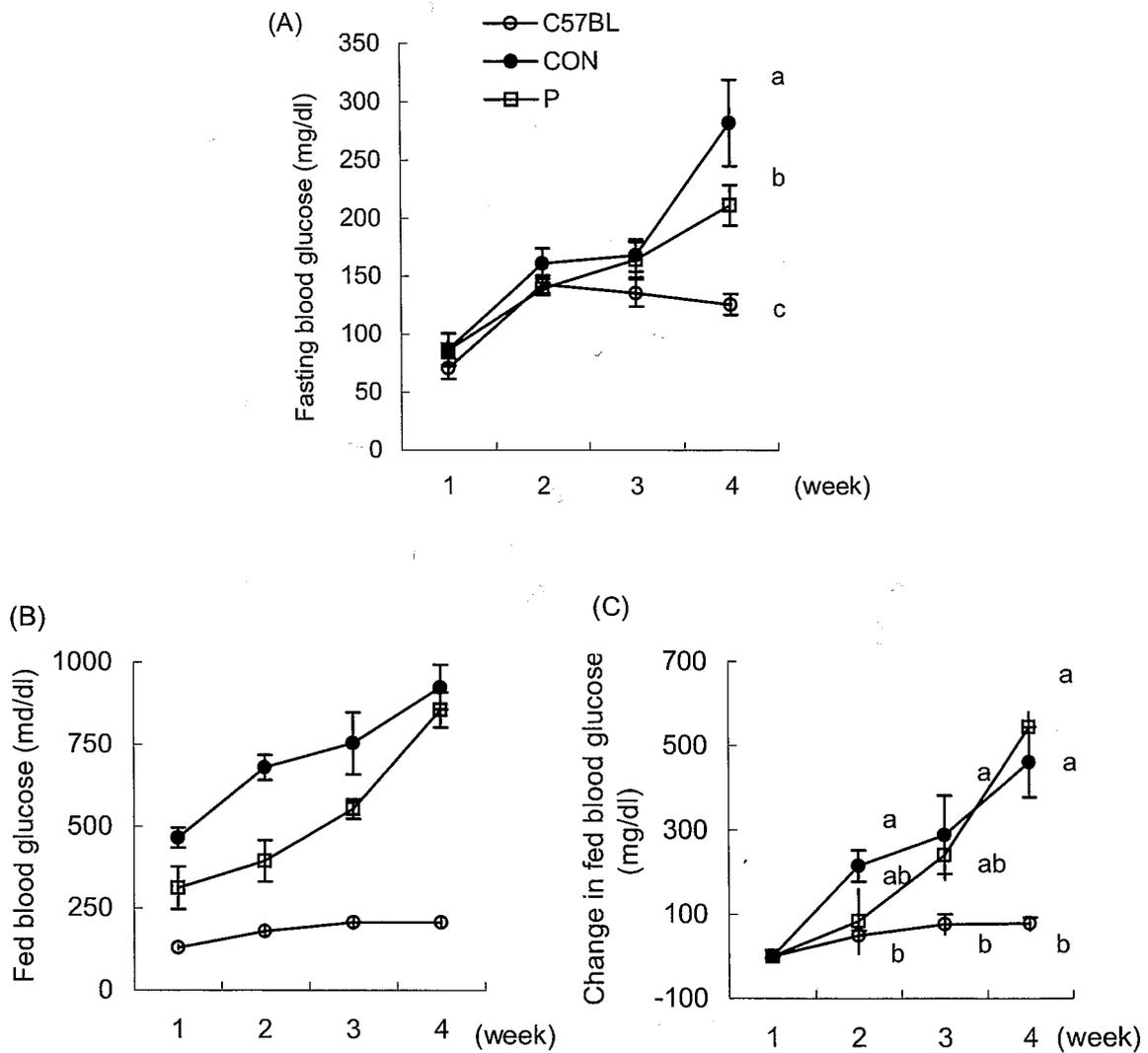


Fig.8-3-2 Fasting (A) and fed (B,C) blood glucose. (A) Blood glucose level after 10h fasting. (B) Blood glucose level after 1h feeding. (C) Changes in fed blood glucose levels. Values that obtained by subtracting the value at 1 week from that at 2,3 or 4 week, are shown. Means with different letters at same week differ significantly ( $p < 0.05$ ).

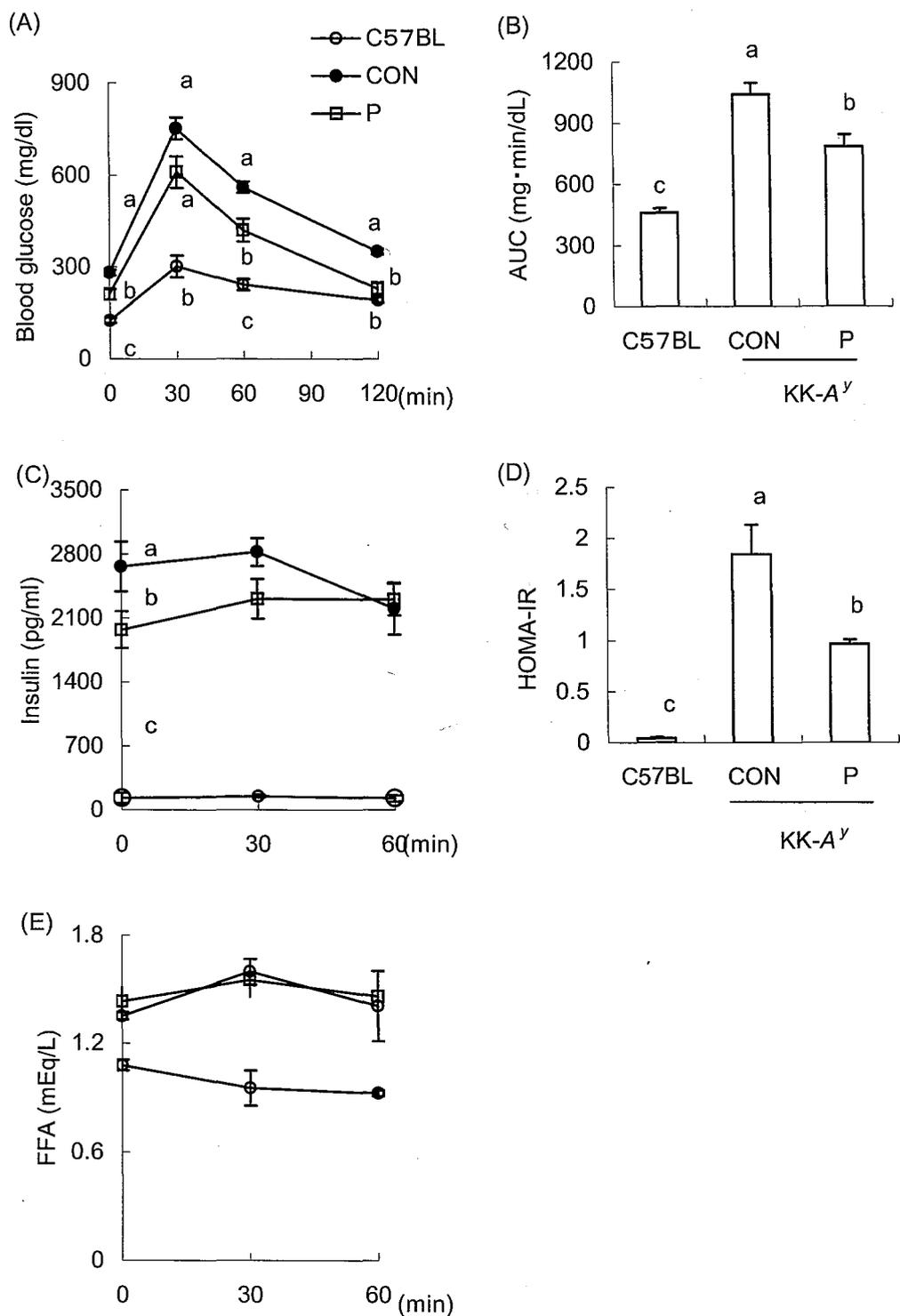


Fig.8-3-3 Effects of pyroglutamic acid on OGTT in experimental animals.

(A) Glucose loading was carried out in C57BL and KK-A<sup>y</sup> mice (9wk old) at 22-23d after start of feeding the experimental diet. (B) Area calculated under the curve (AUC) of the OGTT. (C) Serum insulin concentrations just before and after glucose loading. (D) HOMA-IR was calculated by following formula { (fasting blood glucose × fasting serum insulin) / 405 }. (E) Serum free fatty acid just before and after glucose loading. Values are means ± SEM, n=7 (C57BL, P group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table8-3-2 Effects of pyroglutamic acid on serum insulin and TNF- $\alpha$  levels of experimental

Dietary group	C57BL	KK-A <sup>y</sup>	
		CON	P
Organs (% of body weight)			
Liver	4.23 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	4.58 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>	4.35 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>
Kidney	0.606 $\pm$ 0.023 <sup>b</sup>	0.704 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	0.727 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>
White adipo tissue			
Pararenal	0.391 $\pm$ 0.122 <sup>b</sup>	0.708 $\pm$ 0.080 <sup>a</sup>	0.812 $\pm$ 0.088 <sup>a</sup>
Epididymal	1.04 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.92 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.13 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
Brown adipo tissue	0.363 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>	0.807 $\pm$ 0.068 <sup>a</sup>	0.761 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>
Serum			
Insulin (pg/ml)	483.5 $\pm$ 103.3 <sup>c</sup>	2328 $\pm$ 304 <sup>a</sup>	1308 $\pm$ 267 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	6.89 $\pm$ 2.16 <sup>c</sup>	34.1 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	15.8 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>

C57BL and KK-A<sup>y</sup> mice (10wk old) were given the each diet for 28d. Values are means $\pm$ SEM, n=7 (C57BL, P group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table8-3-3 Effects of pyroglutamic acid on serum, liver and feces lipid levels of experimental

Dietary group	C57BL	KK-A <sup>y</sup>	
		CON	P
Serum			
T-Chol (mg/dL)	108 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	164 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	108 $\pm$ 10 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dL)	26.8 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	27.8 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	49.7 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>
LDL-C (mg/dL)	73.5 $\pm$ 17.5 <sup>b</sup>	124 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	46.3 $\pm$ 13.4 <sup>b</sup>
Atherogenic index	3.18 $\pm$ 0.81 <sup>ab</sup>	5.86 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	1.36 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>
TG (mg/dL)	38.8 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>	63.3 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	57.3 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>
FFA (mEq/L)	0.844 $\pm$ 0.027	0.939 $\pm$ 0.058	0.918 $\pm$ 0.081
TG/HDL	1.61 $\pm$ 0.41 <sup>ab</sup>	2.71 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	1.18 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
Liver			
Total lipid (mg/g of liver)	178 $\pm$ 15	186 $\pm$ 19	159 $\pm$ 20
T-Chol (mg/g of liver)	0.48 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	2.80 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	2.18 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
TG (mg/g of liver)	13.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	26.2 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	21.5 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
FFA (mEq/g of liver)	4.91 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	8.84 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	9.38 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>
Feces			
Total excretion (g/40h)	0.845 $\pm$ 0.058 <sup>c</sup>	1.35 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Total lipid (mg/g of total feces)	19.0 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	25.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	27.7 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>
T-Chol (mg/g of feces)	3.56 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>	4.92 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	5.03 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
TG (mg/g of feces)	9.81 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	7.02 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	6.57 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
Total bile acid (mg/g of feces)	0.463 $\pm$ 0.097 <sup>b</sup>	0.757 $\pm$ 0.070 <sup>a</sup>	0.901 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup>

Serum and liver lipid levels, and fecal lipid were measured in C57BL and KK-A<sup>y</sup> mice given the each diet for 28d. Values are means $\pm$ SEM, n=7 (C57BL, P group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

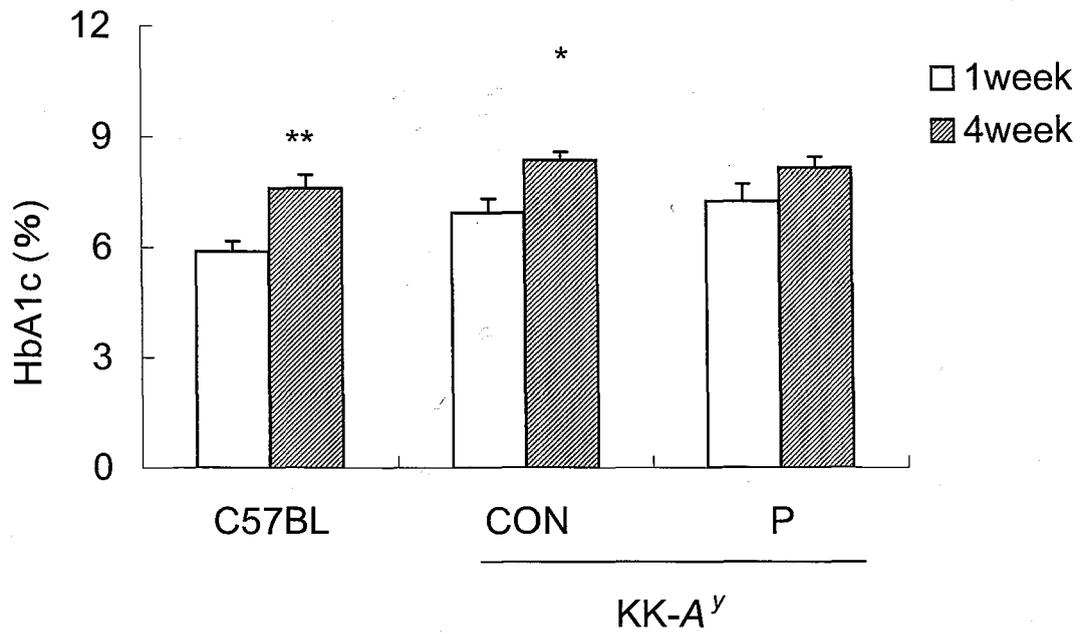


Fig.8-3-4 Effect of pyroglutamic acid on hemoglobin A<sub>1c</sub> in experimental animals.

Significantly different from 1 wk,  $p < 0.05$ .

が、P 群では統計的な有意な上昇が見られなかった (Fig.8-3-4)。

脂肪酸合成酵素 FAS と合成に必要な NADPH 産生酵素 G6PD、6PGD、そしてβ酸化のキー酵素となる CPT を肝臓において測定した結果、FAS 活性は CON 群と比較して TRG 群で有意に低い値を示した (Fig.8-3-5)。しかし G6PD + 6PGD や CPT 活性では、KK-*A*マウス間では群間に差が見られなかった。

また解糖系酵素の GLK 活性、糖新生系の G6Pase 活性の測定結果は、両酵素とも CON 群に比して P 群で有意に低値を示し、解糖系と糖新生系のバランスをみた GLK/G6Pase は P 群で有意な上昇を示した (Fig.8-3-6)。この解糖系と糖新生のバランスが、血糖値や耐糖能に影響を及ぼしている一因と考えられる。

#### 8.3.4 考察

肥満 2 型糖尿病モデルの KK-*A*マウスを用いて、南瓜成分として見出された P についての抗糖尿病効果を、血糖値、インスリンや HbA<sub>1c</sub>、また血清、肝臓の脂質濃度を測定して検討した。

総食餌摂取量に変化はないにも関わらず、CON 群に比べて P 群が有意に高い体重の増加を示した。P 群で有意に体重が低下した非肥満糖尿病 GK ラットでの結果 (本章第 2 節) との違いは何であろうか。Hofmann らはインスリン抵抗性を発症している KK-*A*マウスの体重が減少すること、またそれは糖尿病治療薬のピオグリタゾン投与により体重の増加を示すことを報告している (113)。本来エネルギー源となる糖がインスリン抵抗性により各細胞で使用できず、タンパク質や脂質をエネルギー源として分解しているためと考えられるが、今回の結果も同じ事が言えるのではないだろうか。本節の KK-*A*は 2 節の GK ラットとは異なり、高血糖、高インスリン血症が見られ重度なインスリン抵抗性を示す動物である。GK ラットで見られた P 給与による耐糖能改善や白色脂肪細胞の減少 (体重増加の低下) が、KK-*A*では耐糖能のみが改善されているのは、両動物における 2 型糖尿病の症状の進行度合いの違いによるのではないかと思われる。

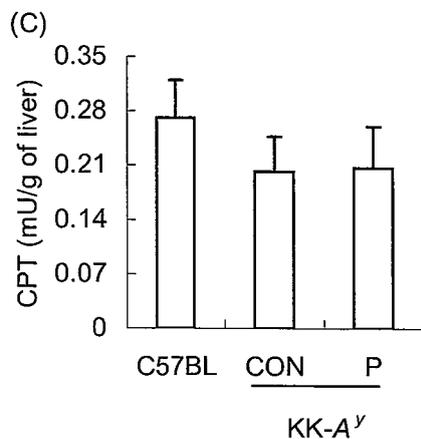
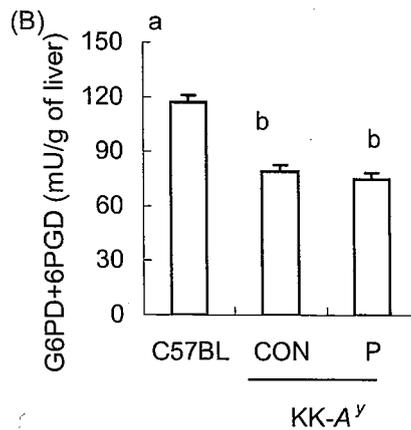
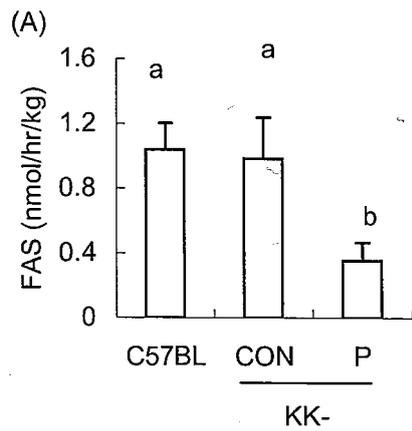


Fig.8-3-5 Effects of pyroglutamic acid on liver FAS, G6PD+6PGD and CPT activities in experimental animals.

(A) Liver fatty acid synthase (FAS) activity. (B) Sum of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) activities. (C) Carnitine palmitoyl transferase (CPT) activity. Values are means $\pm$ SEM, n=7 (C57BL, P group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

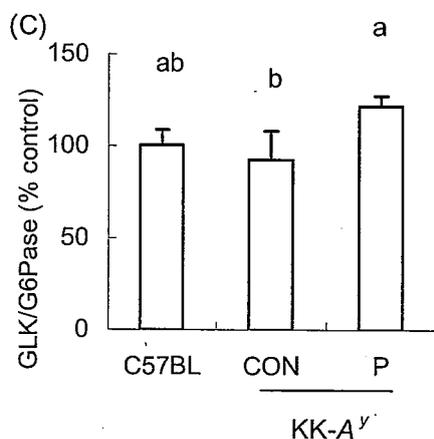
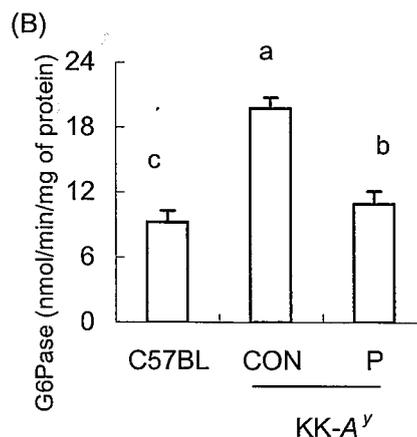
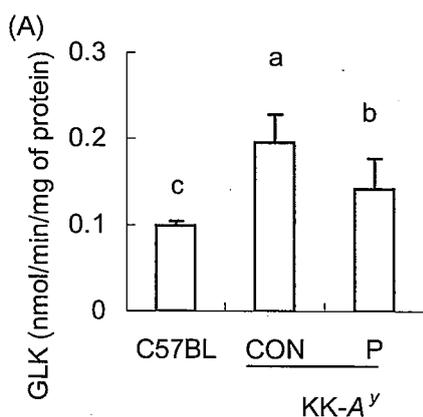


Fig.8-3-6 Effects of pyroglutamic acid on liver GLK and G6Pase activities, and relative activity of GLK to G6Pase (GLK/G6Pase) in experimental animals.

(A) Glukokinase (GLK) activity. (B) Glucose 6-phosphatase (G6Pase) activity. (C) Relative activity of GLK/G6Pase. Values are means $\pm$ SEM, n=7 (C57BL, P group), n=8 (CON group). Means with different letters differ significantly ( $p < 0.05$ ).

## 第9章 総括

本研究は、野菜の中から高血圧降下作用を有するものを探索、同定することを目的として、アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 活性を阻害する物質の探索から開始した。身近な野菜をサンプルとしたが、中でも高い ACE 阻害率を持つ南瓜について、高血圧自然発生ラット (SHR) を用いて血圧降下作用の検討を行った。

南瓜の SHR における単回投与が血圧に及ぼす影響については、収縮期血圧 (SBP) が 160 mmHg 程度の SHR に 3 段階に濃度調整をした南瓜濃縮物を投与し、血圧の変動を経時的に測定して検討した。結果は濃度依存的に血圧降下作用が認められ、その効果は摂取 2 時間後まで続くことが明らかにされた。またラットの空腹時 SBP を 4 段階の症状に分けて (正常 (~139 mmHg) 群、軽症 (140~159 mmHg) 群、中等症 (160~179 mmHg) 群、そして重症 (180 mmHg~) 群)、単回投与を行ったところ、正常群では投与後も低下が見られず一定血圧を保っているのに対して、空腹時血圧が高い群では、症状が悪化しているものほど南瓜濃縮物の投与により血圧の降下割合は高く、その効果は 6 時間にわたって観察された。

続いて 1 週間食餌に添加して連続投与を行い検討したところ、SBP、拡張期血圧 (DBP) とともに NaCl 添加群 (+NaCl 群) に比べ NaCl と南瓜濃縮物を添加した群 (+NaCl+Pumpkin 群) は低下を示した。腎臓の ACE 活性を測定したところ、+NaCl 群に比べて +NaCl+Pumpkin 群で有意に低下していることが分かった。このことより高血圧降下の要因のひとつは、腎臓での ACE 活性が阻害されたことによる可能性が考えられた。また血清脂質を測定したところ、+NaCl+Pumpkin 群では総コレステロール (T-Chol)、低密度リポタンパクコレステロール (LDL-C) が有意に低下しており、南瓜には脂質代謝の正常化にも有効な可能性を推察するに至った。

南瓜が高血圧降下作用を有する事が明らかになったことを受け、次に ACE 阻害活性を有する物質の探索を行った。南瓜の熱水抽出物のうち DOWEX カラムに吸着される画分を HPLC で分画、分取し、それぞれの画分の ACE 阻害活性の測定を行った。高活

性成分についてさらに精製し、最終的にはアミノ酸分析や LC/MS によるスペクトル分析によって目的物質の同定を行った。単離・同定した物質は既知物質であり、他の植物から抽出・単離され高血圧降下作用が確認されているニコチアナミンであった。

さらに南瓜の新たな機能性を探索する目的で、最近急激な増加を見せている糖尿病に着目し、南瓜の糖尿病軽減作用の有無を、糖尿病モデル Goto-Kakizaki (GK) ラットを用いて検討した。南瓜濃縮物の凍結乾燥物を混餌で飼育した GK ラットについて、飼育 48 日目に経口グルコース耐性試験 (OGTT) の測定、また 76 日目に解剖後血液・臓器の採取をし、脂質や糖尿病関連マーカーの測定を行った。その結果、OGTT において糖負荷 30 分後で CON 群に比べて南瓜給与群で有意な上昇抑制が見られた。血糖値の曲線下面積 (AUC) においても CON 群に比して南瓜給与群は有意に上昇抑制効果を示し、南瓜には GK ラットにおいて糖尿病を軽減する作用のあることが推察された。

次に南瓜から糖尿病軽減に有効と考えられる物質の探索を行った。南瓜熱メタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC で分画し、含量の多いピークについて精製を行った。得られた物質について NMR や FAB-MS 等による各種スペクトル分析を行ったところ、ニコチン酸 (NA) とトリゴネリン (TRG) と同定された。また熱水抽出物のうち DOWEX 吸着部分を分取、HPLC で精製し、ピログルタミン酸 (P) を同定した。

TRG、NA の糖尿病動物における効果を検討する前に、非糖尿病 Wistar ラットにおける影響について、血糖値、肝障害マーカー、酸化ストレスマーカー、血清、肝臓脂質レベル等分析し検討した。飼育期間中に測定した空腹時、随時血糖値や肝障害のマーカーとして ALT や AST 値、酸化ストレスマーカーとしての血液 TBARS 値には TRG、NA 給与の影響が見られなかった。TRG 群の脂質レベルへの影響は見られなかったが、NA 群においては肝臓 T-Chol、TG および遊離脂肪酸 (FFA) 値がむしろ上昇を示した。この節では非糖尿病ラットにおいて TRG 給与は大きな影響がなく、NA 給与では血清や肝臓の脂質代謝に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

続いて 2 型糖尿病モデル動物として GK ラットを用い、TRG、NA 給与が糖尿病各種

マーカー、酸化ストレスマーカー、血清、肝臓脂質レベル等に及ぼす影響について検討した。TRG と NA を 0.056%、0.05% 混ぜた餌で、43 日間飼育した。飼育 4 週目には OGTT を行った。その結果、OGTT における血糖値は NA 給与による改善が見られなかったが、TRG 群では CON 群に比べ、糖負荷 60、120 分後に有意な低下を示した。同時に測定した血清インスリン値は 0 分の時点で CON 群が有意に高く、その後も低下することなく高値を示したが、TRG や NA 群では低い値を示し、CON 群に見られるインスリン抵抗性が緩和されている可能性が考えられた。TRG 給与による改善のメカニズムは DNA マイクロアレイ解析から、糖代謝の遺伝子グルコース-6-フォスファターゼ (G6pc)、フォークヘッド転写因子 (Foxo1)、肝細胞核因子 4 $\alpha$  (Hnf4 $\alpha$ )、フォスファターゼとテンシンの相同蛋白 (Pten) の発現低下が関わっていることが推察された。G6pc 発現に関しては転写因子 Foxo1 と Hnf4 の発現抑制を介して、低発現していると推察された。また糖の取込みに関わる Pten の発現が低下していることから、グルコース輸送担体 4 型 (GLUT4) がトランスロケーションし、糖の取り込みを促進していると予想することができる。

また TRG、NA 群は CON 群に比べ、血清、肝臓 T-Chol、TG 値を有意に低下させた。これは脂肪酸合成酵素 (FAS)、グルコース-6-ファスフェートデヒドロゲナーゼ (G6PD)、6-ファスファグルコネートデヒドロゲナーゼ (6PGD) 活性の抑制やカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) 活性の上昇、TRG 給与による ATP シトレートリアーゼ (Acly) やファルネシル 2 リン酸ファルネシルトランスフェラーゼ 1 (Fdft1)、シトクローム P450 サブファミリー-51 (Cyp51) の発現低下に関わりあると示された。また TRG 群で LDL-C 値が有意に低下しているのも、アンジオポエチン様タンパク質 4 (Angptl4) の発現低下により LPL が活性化している可能性が考えられる。以上の事から TRG の給与は糖尿病各種マーカーの発現抑制、血清、肝臓の各種脂質レベルの改善を通して抗糖尿病効果を示す可能性が示唆された。NA の給与は血糖値の改善には効果を示さなかったが、脂質レベルの改善には有効なことが推察された。

続いて肥満 2 型糖尿病モデル KK-*A* マウスによる TRG、NA の糖尿病に対する抑制

について検討を行った。GK ラットによる実験と同濃度の TRG、NA を餌に混ぜ 4 週間の飼育を行った。空腹時、随時血糖は各週測定をし、最終週 OGTT を行った。空腹時血糖値は飼育 4 週目で CON 群において急激な上昇が見られたが、TRG、NA 群においては上昇が抑制された。随時血糖値では 2、3 週目において NA 群で有意な上昇抑制、TRG 群で上昇抑制傾向が観察された。OGTT における血糖値も TRG、NA 群は CON 群に比べ低い値での推移を示した。血清インスリン値は糖負荷 0 分の空腹時で CON 群に比べて NA 群が低下傾向、TRG 群が有意な低下を示した。GK ラットにおいては NA 群による血糖値の改善が明確に見られなかったが、KK-*A* マウスにおいては NA 群により空腹時や随時血糖値の改善、OGTT における血糖値の上昇抑制が観察された。膵臓β細胞の顕微鏡写真において、CON 群で細胞の肥大が観察されたが、TRG 群ではそれが抑制されているようだ。空腹時のインスリン濃度は CON 群に比して TRG 群が有意な低下を示していることから、CON 群ではインスリンの大量分泌のため膵臓β細胞が肥大したこと、TRG 摂取ではインスリン分泌が抑えられるため細胞の肥大化が抑制されているものと考えられる。TRG による肝臓の GLK や G6pase 活性の抑制は GK ラットにおける場合と同様であり、糖代謝の制御が TRG の効果に密接に関わっていることが推察された。

南瓜から単離同定したもうひとつの物質 P についても Wistar ラット、GK ラット、KK-*A* マウスにおいて糖尿病関連各種マーカーや脂質レベルへの影響を通して検討した。GK ラットにおける検討では 0.05% の P を混餌し、7 週間飼育した。食餌摂取量に有意な差はなかったが、体重増加量では 3 週目以降 CON 群に比して上昇に抑制が見られ、同週令の Wistar ラットと同じような増加曲線を描いた。解剖後に採取した精巢周囲脂肪量が CON 群よりも P 群で小さいことから、体重差には脂肪量の差が反映されているのではないかと考えられた。空腹時血糖値は GK ラット群間において差は見られなかったが、P 群の随時血糖値は飼育開始時に比べて 3、5 週目に有意な低下を示した。また OGTT の血糖値においても、糖負荷 60 分後で CON 群に比べて P 群が有意な低い値を示し、P 摂取が耐糖能を改善している事が示唆された。肝臓の DNA マイク

ロアレイ解析や FAS、G6PD + 6PGD、CPT 酵素の活性測定結果においても、TRG 給与の場合と同じような結果を示し、P も TRG と同じような機構で耐糖能の改善に関わっていることが推察できた。

P の KK-*A* マウスにおける影響についても 0.05% の P を添加した飼料を 4 週間給与し検討した。4 週目の空腹時血糖値および 2、3 週目の随時血糖値はいずれも CON 群に比べ P 群は低い値を示した。OGTT における血糖値は CON 群に比して P 群が常に低く推移し、また OGTT における糖負荷直前の血清インスリン値は、P 群が CON 群より低い値を示した。血清、肝臓 T-Chol 値は CON 群に比して P 群が有意に低い値を示した。GK ラットによる場合と同様に P による糖新生系酵素 G6pc と解糖系 Gck が血糖値制御と密接に関わっていることが推察された。

南瓜の原産地について、メキシコの洞窟で紀元前 7000 年~5500 年の地層からカボチャの種が発見され、中南米が原産地とされるようになった。日本には天文 10 年 (1541 年) に大分に漂着したポルトガル船が、大名の大友宗麟にカンボジア産のカボチャを贈って伝来されたと言われている。この時にカンボジアから持って来たのでカンボジアがなまってカボチャと呼ぶようになり、南瓜と書くのは『南蛮国からきた瓜』が語源とされている。長い食経験を持つ南瓜であるが、機能的成分についてはあまり知られていなかった。血圧を下げると言われている GABA や抗酸化能が高いβカロテンは代表する南瓜の成分であるが、本研究でそれ以外の成分とその機能について注目し研究を行った。その結果ニコチアミンやニコチン酸、トリゴネリン、ピログルタミン酸が、高血圧や糖尿病に有効な成分として見出すことが出来た。

## 引用文献

- (1) シリーズ食品の科学 野菜の科学 高宮和彦編 株式会社 朝倉書店発行 p190-101 (1997)
- (2) 五訂増補食品成分表 2006 香川芳子監修 女子栄養大学出版部発行 (2005)
- (3) Smith AH, Waller KD. Serum beta-carotene in persons with cancer and their immediate families. *Am J Epidemiol.* 133, 661-71 (1991)
- (4) Harris RW, Key TJ, Silcocks PB, Bull D, Wald NJ. A case-control study of dietary carotene in men with lung cancer and in men with other epithelial cancers. *Nutr Cancer.* 15, 63-8 (1991)
- (5) Potischman N, McCulloch CE, Byers T, Nemoto T, Stubbe N, Milch R, Parker R, Rasmussen KM, Root M, Graham S, et al. Breast cancer and dietary and plasma concentrations of carotenoids and vitamin A. *Am J Clin Nutr.* 52, 909-15 (1990)
- (6) ビタミン研究の新しい 波平山雄 中外医薬 45 45 (1992)
- (7) Liu HW. Determination of 4-aminobutyric acid in pumpkin powder by high performance liquid chromatography. *Se Pu.* 19, 532-3 (2001)
- (8) Fujimura S, Shimakage H, Tanioka H, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Satoh S. Effects of GABA on noradrenaline release and vasoconstriction induced by renal nerve stimulation in isolated perfused rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 127, 109-114 (1999)
- (9) Quanhong, L. I., Caili, F. U., Yukui, R. U. I., Guanghui, H. U., Tongyi, C. A. I. Effects of protein-bound polysaccharide isolated from pumpkin on insulin in diabetic rats. *Plant Foods Hum. Nutr.* 60, 13-16 (2005)
- (10) Zuhair, H. A. L., El-Fattah, A. A. A, El-Sayed, M. I. Pumpkin-seed oil modulates the effect of felodipine and captopril in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res.* 41, 555-563 (2000)
- (11) Al-Zuhair, H, El-Fattah, A. A. A, Latif, H. A. A. E. Efficacy of simvastatin and pumpkin-seed oil in the management of dietary-induced hypercholesterolemia. *Pharmacol. Res.* 35, 403-408 (1997)
- (12) Kimoto K, Kuroda Y, Saito Y, Yamamoto J, Murakami T, Aoyagi Y. Purification and

- identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from Moroheiya ( *Corchorus olitorius*) . *Food Sci Technol Int Tokyo*. 4, 223-6 (1998)
- (13) Shimizu E, Hayashi A, Takahashi R, Aoyagi Y, Murakami T. Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from Ashitaba ( *Angelica keiskei*) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 45, 375-83 (2000)
- (14) Kataoka S. Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (shoyu) and its components, *J. Biosci. Bioeng.* 100, 227-234 (2005)
- (15) 林あつみ、山中知子、青柳康夫、木元幸一 ハヤトウリからのニコチアナミン単離精製とその定量法の確立. *日本食品科学工学会誌* 52, 154-159 (2005)
- (16) 林あつみ、山中知子、村上和雄、青柳康夫、木元幸一 つくば高血圧マウスの血圧に及ぼすニコチアナミンの影響. *日本食品科学工学会誌* 58, 315-21 (2005)
- (17) Schlierf G. Dorow E. Diurnal patterns of triglycerides, free fatty acids, blood sugar, and insulin during carbohydrate-induction in man and their modification by nocturnal suppression of lipolysis. *J. Clin. Invest.* 52, 732-740 (1973)
- (18) Karpe F. Frayn KN. The nicotinic acid receptor-a new mechanism for an old drug. *Lancet*. 363, 1892-1894 (2004)
- (19) Vogt A. Kassner U. Hostalek U. Steinhagen-Thiessen E. Prolonged-release nicotinic acid for the management of dyslipidemia: an update including results from the NAUTILUS study. *Vasc Health Risk Manag.* 3, 467-479 (2007)
- (20) Guyton JR. Niacin in cardiovascular prevention: mechanisms, efficacy, and safety. *Curr Opin Lipidol.* 18, 415-420 (2007)
- (21) Tohda C. Kuboyama T. Komatsu K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. *Neurosignals* 14, 34-45 (2005)
- (22) Tohda C. Nakamura N. Komatsu K. Hattori M. Trigonelline- induced neurite outgrowth in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Biol Pharm Bull.* 22, 679-682 (1999)
- (23) Hirakawa N. Okauchi R. Miura Y. Yagasaki K. Anti-invasive activity of niacin and

- trigonelline against cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69, 653-658 (2005)
- (24) Hong BN. Yi TH. Park R. Kim SY. Kang TH. Coffee improves auditory neuropathy in diabetic mice. *Neurosci Lett.* 29;441, 302-306 (2008)
- (25) Macrae R, in *Coffee*, Vol.1 chemistry, Eds R. J. Clarke and R. Macrae, Elsevir Applied Science Publishers, London, p127-136 (1985)
- (26) Taguchi H, Sakaguchi M, and Shimabayashi Y. *Agric. Biol. Chem.* 49 3467-3471 (1985)
- (27) Mason BJB. Kodicek E. The metabolism of niacytin in the rat: studies of the excretion of nicotinic acid metabolites. *Biochem. J.* 120, 509-513 (1970)
- (28) Mason BJB. Kodicek E. The metabolism of niacytin in the rat: trigonelline as a major metabolite of niacytin in the urine. *Biochem. J.* 120, 515-521 (1970)
- (29) Sandhu JS. Fraser DR. The metabolic origin of trigonelline in the rat. *Biochem. J.* 200, 495-500 (1981)
- (30) Yuyama S. Suzuki T. Isolation and identification of N1- methylnicotinic acid (trigonelline) from rat urine. *J Nutr Sci Vitaminol.* 31, 157-167 (1985)
- (31) Yuyama S. Suzuki T. The excretion of N1-methyl-2-pyridone-5- carboxylic acid and related compounds in human subjects after oral administration of nicotinic acid, trigonelline and N1-methyl-2- pyridone-5-carboxylic acid. *Adv Exp Med Biol.* 294, 475-9 (1991)
- (32) Yuyama S. Kawano Y. Urinary excretion of N1-methyl-2-pyridone- 5-carboxylic acid and the fate of remaining of trigonelline. *Adv Exp Med Biol.* 398, 599-603 (1996)
- (33) Ogata S. Takeuchi M. Teradaira S. Yamamoto N. Iwata K. Okumura K. Taguchi H. Radical scavenging activities of niacin-related compounds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 641-645 (2002)
- (34) Silva AR. Silva CG. Ruschel C. Helegda C. Wyse AT. Wannmacher CM. Wajner M. Dutra-Filho CS. L-pyroglutamic acid inhibits energy production and lipid synthesis in cerebral cortex of young rats in vitro. *Neurochem. Res.* 26, 1277-1283 (2001)
- (35) Kimura Y. Kido T. Takaku T. Sumiyoshi M. Baba K. Isolation of an anti-angiogenic substance

- from *Agaricus blazei* Murill: its antitumor and antimetastatic actions. *Cancer Sci.* 95, 758-764 (2004)
- (36) Doering W, Maass L, Irmisch R, König E. Pharmacokinetic interaction study with ramipril and digoxin in healthy volunteers. *Am J Cardiol.* 59, 60-64 (1987)
- (37) Robertson JJ, Tillman DM, Ball SG, Lever AF, Angiotensin converting enzyme inhibition in hypertension. *J Hypertens Suppl.* 5, 19-25 (1987)
- (38) Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M, Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56, 1541-1545 (1992)
- (39) 藤田裕之、安本良一、長谷川昌康、大嶋一徳、かつお節オリゴペプチドによるヒトボランティアに対する血圧降下作用 (I) 薬理と治療 25 (8) (1997)
- (40) Suetsuna K, Purification and identification of angiotensin I -converting enzyme inhibitors from the red algae *Porphyra yezoensis*. *J Marine Biotechnology* 6, 163-167 (1998)
- (41) 斉藤雅信、長屋恵子、萩野浩志、川合正充、中道昇、海苔オリゴペプチドの正常および高血圧者に対する影響 医学と薬学 44, 297-306 (2000)
- (42) Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.* 20, 1637-1648 (1971)
- (43) Whelton PK, He J, Cutler JA, Brancati FL, Appel LJ, Follmann D, Klag MJ. Effects of oral potassium on blood pressure. Meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *JAMA.* 277, 1624-1632 (1997)
- (44) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18, 499-502 (1972)
- (45) Choi JS, Yokozawa T, Oura H, Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *J Nat Prod.* 54, 218-24 (1991)
- (46) Lieberman J. Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am J Med.* 59, 365-72 (1975)

- (47) Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 19;315, 892-896 (2004)
- (48) Takahashi H, Tiba M, Iino M & Takayasu T. The effect of g-aminobutyric acid on blood pressure. *Jpn. J. Physiol.* 5, 334-341 (1955)
- (49) Elliott KAC & Hobbiger F. Gamma aminobutyric acid: circulatory and respiratory effects in different species: re-investigation of the anti-strychnine action in mice. *J. Physiol.* 146, 70-84 (1959)
- (50) Stanton HC. Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 143, 195-204 (1963)
- (51) Hayakawa K, Kimura M, Kamata K. Mechanism underlying gamma-aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmac.* 438, 107-113 (2002)
- (52) Fujimura S, Shimakage H, Tanioka H, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Satoh S. Effects of GABA on noradrenaline release and vasoconstriction induced by renal nerve stimulation in isolated perfused rat kidney. *Br. J. Pharmacol.* 127, 109-114 (1999)
- (53) L-8800 形高速アミノ酸分析計 ( 本体編集) 取扱説明書 5 章 応用分析法, 改訂第 2 版 ( 日立製作所, 東京) 日立製作所編集 p1-24 (1997)
- (54) 細胞工学別冊 医学実験マニュアルシリーズ 糖尿病研究ストラテジー 清野進、岡芳知監修 秀潤社出版 (1995)
- (55) Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 15, 212-216 (1976)
- (56) Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 86, 271-278 (1978)
- (57) Lowry O.H. Rosenbrough N.J., Farr A.J., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)

- (58) Chance B. Meahly A.C. Assay of Catalase and peroxidase. *Academic press* Vol.2.764-775 (1955)
- (59) Paglia D.E. Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J.Lab.Clin.Med.* 70, 158-169 (1967)
- (60) Whanger P.D. Weswing P.H. Schmitz J.A. Oldfield J.E. Effects of selenium and vitamin E on blood selenium levels, tissue glutathione peroxidase activities and white muscle disease in sheep fed purified or hay diets. *J.Nutr.* 107, 1298-1307 (1977)
- (61) Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37, 1595-1607 (1988)
- (62) Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med.* 149, 1514-1520 (1989)
- (63) DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 14, 173-194 (1991)
- (64) Folch J. Lees M. Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226, 497-509 (1957)
- (65) 日本臨床分析談話会勧告案法に準ずる 日本臨床化学分析談話会酵素委員会 (1979)
- (66) 蛋白質核酸酵素 別冊 共立出版 No. 24 p94-96 (1955)
- (67) 基礎生化学実験法 1 生物材料の取扱い方 阿南功一、紺野邦夫、田村善蔵、松橋通生、松本重一郎編集 丸善株式会社 p40 (1974)
- (68) Burton DN. Haavis AG. Potter JW. Comparative studies of the rat and pigeon liver fatty acid synthetases. *Arch Biochem. Biophys.* 126, 141-154 (1968)
- (69) Kumar S. Dorsey JA. Muesing RA. Porter JW. Comparative studies of the pigeon liver fatty acid synthetase complex and its subunits. Kinetics of partial reactions and the number of binding sites for acetyl and malonyl groups. *J. Boil. Chem.* 245, 4732-4744 (1970)
- (70) Carey EM. Dils R. Fatty acid biosynthesis. V. Purification and characterisation of fatty acid

- synthetase from lactating-rabbit mammary gland. *Biochem. Biophys. Acta.* 210, 371-387 (1970)
- (71) Guglielmo CG. Norbert NH. Hochachka PW. Williams TD. Seasonal dynamics of flight muscle fatty acid binding protein and catabolic enzymes in a migratory shorebird. *Am J Physiol.* 282, 1405-1413 (2002)
- (72) Yamauchi T. Kamon J. Waki H. Terauchi Y. Kubota N. Hara K. Mori Y. Ide T. Murakami K. Tsuboyama-Kasaoka N. Ezaki O. Akanuma Y. Gavrilova O. Vinson C. Reitman ML. Kagechika H. Shudo K. Yoda M. Nakano Y. Tobe K. Nagai R. Kimura S. Tomita M. Froguel P. Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat. Med.* 7, 941-946 (2001)
- (73) Berg AH. Combs TP. Du X. Brownlee M. Scherer PE. The adipocyte-secreted protein acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 7, 947-953 (2001)
- (74) コーン・スタンプ生化学 第5版 田宮信雄/八木達彦訳 東京化学同人出版 p381 (1992)
- (75) Altomonte J. Richter A. Harbaran S. Suriawinata J. Nakae J. Thung NS. Meseck M. Accili D. Dong H. Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, 718-E728 (2003)
- (76) Butler M. McKay AR. Popoff JI. Gaarde AW. Witchell D. Murray FS. Dean MN. Bhanot S. Monia PB. Specific Inhibition of PTEN Expression Reverses Hyperglycemia in Diabetic Mice. *Diabetes*, 51, 1028-1034 (2002)
- (77) Srivastava SK. Ramana KV. Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev.* 26, 380-392 (2005)
- (78) Imoto K. Kukidome D. Nishikawa T. Matsuhisa T. Sonoda K. Fujisawa K. Yano M. Motoshima T. Taguchi T. Tsuruzoe K. Matsumura T. Ichijo H. Araki E. Impact of mitochondrial reactive oxygen species and apoptosis signal-regulating kinase 1 on insulin signaling. *Diabetes*, 55, 1197-1204 (2006)

- (79) Suzuki D. Miyata T. Saotome N. Horie K. Inagi R. Yasuda Y. Uchida K. Izuhara Y. Yagame M. Sakai H. Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 822-832 (1999)
- (80) Wautier MP. Chappet O. Corda S. Stern DM. Schmidt AM. Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by age links oxidant stress to altered gene expression via rage. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 280, 685-694 (2001)
- (81) Langenstroer P. Pieper GM. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* 263, 257-265 (1992)
- (82) Koenig RJ. Cerami A. Synthesis of hemoglobin a<sub>1c</sub> in normal and diabetic mice: potential model of basement membrane thickening. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 3687-3691 (1975)
- (83) Jain Sk. Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin e on glycosylation of proteins. *Free Radic. Boil. Med.* 22, 593-596 (1997)
- (84) Mendez JD. Balderas FL. Inhibition by l-arginine and spermidine of hemoglobin glycation and lipid peroxidation in rats with induced diadetes. *Biomed. Pharmacother* 60, 26-31 (2005)
- (85) Mohamadin AMA. Hammad LNA. El-Bab MF. Gawad HAS. Can nitric oxide-generating compounds improve the oxidative stress response in experimentally diabetic rat? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 586-593 (2007)
- (86) Jain Sk. Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin e on glycosylation of proteins. *Free Radic. Boil. Med.* 22, 593-596 (1997)
- (87) Mendez JD. Balderas FL. Inhibition by l-arginine and spermidine of hemoglobin glycation and lipid peroxidation in rats with induced diadetes. *Biomed. Pharmacother*; 60, 26-31 (2005)
- (88) Wise A. Foord SM. Fraser NJ. Barnes AA. Elshourbagy N. Eilert M. Ignar DM. Murdock PR. Steplewski K. Green A. Brown AJ. Dowell SJ. Szekeres PG. Hassall DG. Marshall FH. Wilson S. Pike N. Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotic acid. *J. Boil. Chem.* 278, 9869-9874 (2003)

- (89) Tunaru S. Kero J. Schaub A. Wufka C. Blaukat A. Pfeffer K. Offermanns S. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat. Med.* 9, 352-355 (2003)
- (90) Hawkins M. Tonelli J. Kishore P. Stein D. Ragucci E. Gitig A. Reddy K. Contribution of elevated free fatty acid levels to the lack of glucose effectiveness in type 2 diabetes. *Diabetes*. 52, 2748-2758 (2003)
- (91) Hevener AL. Reichart D. Janez A. Olefsky J. Thiazolidinedione treatment prevents free fatty acid-induced insulin resistance in male wistar rats. *Diabetes* 50, 2316-2322 (2001)
- (92) Maekawa F. Fujiwara K. Kohno D, Kuramochi M. Kurita H. Yada T. Young adult-specific hyperphagia in diabetic Goto-kakizaki rats is associated with leptin resistance and elevation of neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J. Neuroendocrinol* 18, 748-756 (2006)
- (93) The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20, 1183-1197 (1997)
- (94) 糖尿病診断基準検討委員会 (委員長 葛谷 健) 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病*, p385-401 (1999)
- (95) Tanaka Y. Atsumi Y. Asahina T. Hosokawa K. Matsuoka K. Kinoshita J. Onuma T. Kawamori R. Usefulness of revised Fasting plasma glucose criterion and characteristics of the insulin response to an oral glucose load in newly diagnosed Japanese diabetic subjects. *Diabetes Care* 21, 1133-1137 (1998)
- (96) 日本クレア株式会社 GK/Jcl ラットデータ集
- (97) Iwatsuka H. Shino A. Suzuoki Z. General survey of diabetic features of yellow KK mice. *Endocrinol Jpn.* 17, 23-35 (1970)
- (98) 2型糖尿病 (NIDDM) モデル KK<sup>ay</sup>/Ta Jcl マウスデータ集 CREA JAPAN, INC
- (99) Davidson AL. Arion WJ. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: physiological implications of higher cellular activity. *Arch.*

*Biochem. biophys.* 253, 156-167 (1987)

- (100) Lange AJ. Arion WJ. Burchell A. Burchell B. Aluminum ions are required for stabilization and inhibition of hepatic microsomal glucose-6-phosphatase by sodium fluoride. *J Biol Chem.* 261, 101-107 (1986)
- (101) Bergö M. Olivecrona G. Olivecrona T. Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem J.* 313, 893-898 (1996)
- (102) Bergö M. Wu G. Ruge T. Olivecrona T. Down-regulation of adipose tissue lipoprotein lipase during fasting requires that a gene, separate from the lipase gene, is switched on. *J Biol Chem.* 277, 11927-11932 (2002)
- (103) Reaven G. D. The insulin resistance syndrome: Definition and dietary approaches to treatment. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 391-406 (2005)
- (104) Hotamisligil GS. Shargill NS. Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91 (1993)
- (105) Taniguchi CM. Emanuelli B. Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin-action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 85-96 (2006)
- (106) Hotamisligil GS. Arner P. Caro JF. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 95, 2409-2415 (1995)
- (107) 脂肪細胞と肥満研究の最前線と醜陋味 森脇孝 実験医学 20, 1730-1733 (2002)
- (108) インスリン抵抗性改善薬と肥満 酒井謙、野見山崇、河盛隆造 肥満研究 7, 9-14 (2001)
- (109) マルチプルリスクファクターと高脂血症 小竹英俊、及川眞一 Mebio 19, 92-97 (2002)
- (110) Okuno A. Tamemoto H. Tobe K. Ueki K. Mori Y. Iwamoto K. Umesono K. Akanuma Y. Fujiwara T. Horikoshi H. Yazaki Y. Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J. Clin. Invest.* 101, 1354-1361 (1998)
- (111) Suganami T. Nishida J. Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ .

*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2062-2068 (2005)

- (112) 生物化学実験法 38 食品中の生体機能調節物質研究法 川岸舜朗編著 学会出版センター  
p144 (1997)
- (113) Hofmann C. Lorenz K. Braithwaite SS. Colca JR. Palazuk BJ. Hotamisligil GS. Spiegelman  
BM. Altered gene expression for tumor necrosis factor-alpha and its receptors during drug  
and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology*. 134, 264-270 (1994)

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり終始ご指導、ご鞭撻を賜りました山形大学農学部 五十嵐喜治教授に心より感謝申し上げます。また岩手大学農学部 長澤孝志教授、山形大学農学部 佐藤英世准教授、帯広畜産大学食品科学研究部門 福島道広教授にも心よりお礼申し上げます。多くのご指導、ご協力いただきました明治大学農学部 竹中麻子准教授、文京第一医院 斉藤嘉美院長、日本新薬株式会社 坂口博英氏、山形県立米沢女子短期大学 倉兼静江助手、日本医科大学 川原百代氏、山形大学農学部 桑田一步氏に感謝致します。また山形大学農学部食品栄養化学研究室の皆様、そして学位取得の機会を与えてくれ 4 年半も自由に実験させてくれた株式会社 龍泉堂の関係各位に心より感謝申し上げます。最後にたくさんの心配をかけ、精神的な支えとなってくれた家族にも感謝致します。

この 4 年半は多くのを失い、よく躓き、挫けたりもしたけれど、今振り返ると楽しい道のりでした。