

カリンポリフェノールによる  
抗糖尿病作用のメカニズム解明と  
類似プロシアニジンの比較

2014.3

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻  
(岩手大学)

長洞 希

## 目次

第1章	緒論	— 1
第2章	カリンエタノール抽出物の2型糖尿病マウスにおける効果	
第1節	目的	— 11
第2節	方法	— 12
	1. カリンエタノール抽出物 (CE)	
	2. 動物実験	
	3. 血清成分分析	
	4. 肝臓中脂質の測定	
	5. 糞中脂質および胆汁酸の測定	
	6. 統計処理	
第3節	結果	— 21
第4節	考察	— 26
第3章	カリンポリフェノールの成分分析	
第1節	目的	— 28
第2節	方法	— 29
	1. 研究試料とカリンポリフェノールの調製	
	2. Folin-Denis 法による総ポリフェノール量の測定	
	3. Dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) 法による総プロシアニジン 量の測定	
	4. HPLC によるポリフェノールの成分分析	

第3節	結果	— 35
第4節	考察	— 40
第4章	カリンポリフェノールの抗酸化活性と抗グリケーション活性	
第1節	目的	— 43
第2節	方法	— 44
	1. 抗酸化活性の評価	
	2. 抗グリケーション活性の評価	
第3節	結果	— 54
第4節	考察	— 58
第5節	カリンポリフェノールおよび緑茶抽出物、ライチ低分子化プロシアニジンの2型糖尿病マウスにおける効果の比較	
第1節	目的	— 60
第2節	方法	— 61
	1. 動物実験	
	2. 血清成分分析	
	3. 肝臓中脂質の測定	
	4. 糞中脂質および胆汁酸の測定	
	5. 尿中成分の分析	
	6. リアルタイム RT-PCR による肝臓における各種遺伝子の発現解析	
	7. グリケーション反応中間体 ( $\alpha$ -ジカルボニル化合物) の定量	
	8. Western blotting による AGEs の検出	
	9. 統計処理	

第3節	結果	— 77
第4節	考察	— 94
第6節	カリンポリフェノールの腸管吸収	
第1節	目的	— 103
第2節	方法	— 104
1.	動物実験	
2.	腸管ループ内に残存したポリフェノール量の測定	
3.	門脈血中ポリフェノールの HPLC による分析	
4.	統計処理	
第3節	結果	— 109
第4節	考察	— 116
第7節	総合考察	— 120
要約		— 125
謝辞		— 128
引用文献		— 129

## 第1章 緒論

### 1. 糖尿病の現状

糖尿病は、血液中のグルコース濃度が高い状態（高血糖）が持続する病気で、代表的な分類には1型糖尿病と2型糖尿病がある。インスリンは生体内で唯一の血糖値降下作用をもつ内分泌ホルモンであるが、1型糖尿病はインスリンが分泌されない状況＝“インスリンの絶対的な不足”によって高血糖を生じる。その成因は、インスリン分泌を担う膵臓β細胞の先天的または後天的な破壊による。1型糖尿病の患者数は、日本においては糖尿病患者数の約1%である。もう一方の2型糖尿病は、インスリン分泌低下あるいは標的臓器におけるインスリン抵抗性によりインスリンが効かない状況＝“インスリン作用の相対的不足”によって高血糖を生じる。2型糖尿病の発症には、生活習慣やストレスといった環境要因と複数の遺伝素因が関与しており、日本における2型糖尿病患者数は糖尿病患者全体の90%以上を占めている。[1,2]

日本における糖尿病患者数は、2007年に実施された厚生労働省の調査による推計では、「糖尿病が強く疑われる人」が890万人、「糖尿病の可能性を否定できない人」は1320万人に上った[3]。この数字は過去の統計調査時よりも増加しており、糖尿病患者または糖尿病予備軍は、今後も増え続けると懸念されている。また、日本以外の国でも糖尿病患者の増加は深刻であり、全世界の糖尿病患者数は1980年には1億5300万人であったのが、2008年には3億4700万人となり、世界的に糖尿病患者数が膨れ上がっている現状にある[4]。なかでも、2型糖尿病患者数の増加が深刻で、その増加の背景には食生活の乱れや運動不足といった、悪い生活習慣が大きく影響している。このことから、糖尿病は代表的な生活習慣病の一つとして知られている。

高血糖の持続は、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経障害などの糖尿病合併症を招く。たとえば、糖尿病性腎症を発症すると腎臓の血液を濾過する機能に異常をきたすため、人工透析が必要となる。また、糖尿病性網膜症を発症すると視力の低下を招き、最悪の場合には失明するおそれがあり、糖尿病性神経障害は自立神経が侵され胃腸障害を誘発したり、感覚神経が侵されて末梢の痺れや痛みを感じたりする

など、生活の質（Quality of life ; QOL）を著しく低下させる。また、糖尿病は糖尿病合併症以外にも、微小血管障害、心筋梗塞、脳卒中などの多くの疾患のリスクを高めることから、糖尿病の持続は QOL 低下の引き金となるのみならず、生命の危機を招くことにもなる。糖尿病の主病態である高血糖は無症状であるため自覚することは難しく、気付いた時には既に重篤な状態に陥っていることは珍しくない。このため、早期診断により病態を把握し、血糖値をコントロールすることが重要となる。[5]

## 2. 過剰な脂肪蓄積とインスリン抵抗性

2型糖尿病において、肥満は危険因子の一つとなる。脂肪細胞は、脂肪を貯蔵する以外に内分泌器官としての機能を有しており、アディポサイトカインと呼ばれるアディポネクチン、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、遊離脂肪酸 (FFA)、インターロイキン-6 (IL-6) などを血中へ分泌する[6]。アディポネクチンはインスリン感受性を増強するが、その反対に、TNF- $\alpha$ 、FFA などは末梢組織や肝臓でのインスリン伝達を阻害し、インスリン抵抗性を惹起する[7,8]。肥満のように、脂肪細胞への過剰な脂肪蓄積が生じると、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは減少し、その他のアディポサイトカインは増加する[9,10]。このように、肥満によってインスリン抵抗性が憎悪することが示唆されていることから、肥満の抑制は高血糖の改善につながる。

肝臓における過剰な脂肪蓄積も、糖尿病を悪化させる一因となる。非アルコール性の脂肪肝では、肝細胞内において中性脂肪が増加するのに伴って FFA が増加する。過剰な FFA は、肝細胞のミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソームにストレスを与え、スーパーオキシドアニオン ( $O_2\cdot^-$ ) やヒドロキシラジカル ( $HO\cdot$ ) などの活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) を生じさせる。この ROS と、ROS から生じた過酸化脂質により、炎症を誘導したり、抗酸化能を有するグルタチオンを失活させたりする[11]。そして、最終的に炎症によって、肝臓のインスリン抵抗性を生じると考えられている[12]。

### 3. グリケーション反応

タンパク質が糖によって非酵素的に修飾される反応のことをグリケーション反応 (glycation reaction) という。また、この反応は、食品の加工で生じる褐色物質がアミノ酸やタンパク質と糖の非酵素的化学反応による産物であることが Maillard により発見されたので、メイラード反応とも呼ばれている[13]。

生体内におけるグリケーション反応は、3段階の過程に分けられており、概略図を Fig 1-1 に示した。まず、前期段階ではタンパク質の N 末端やリジン残基、アルギニン残基の  $\epsilon$ -アミノ基の窒素が還元糖のカルボニル基とアミノ-カルボニル反応を起こし、脱水縮合後にシッフ塩基を形成する。ちなみに、この前期段階の反応は可逆的であるが、それより後の反応は不可逆的である。次の中期段階で、シッフ塩基は構造的に不安定であるためにアマドリ転移を起こし、安定な構造体のアマドリ転移化合物を形成する。そして、後期段階でアマドリ転移化合物が酸化、脱水、縮合といった反応を経て最終的に生成される化合物をグリケーション後期段階生成物 (Advanced Glycation Endproduct : AGE) と称する。代表的な AGE は、 $N^{\epsilon}$ -カルボキシメチルリジン ( $N^{\epsilon}$ -carboxymethyl lysine : CML) やペントシジン (pentosidine) が挙げられ、他にも 10 種類以上の異なる AGE があり、褐色、蛍光、架橋形成などの特性を有しているものもある。[14]

グリケーション反応は上に述べた非酵素的な経路の他に、ポリオール経路を介した反応も存在する (Fig 1-1 の右上)。ポリオール経路では、アルドース還元酵素 (AR) とソルビトール脱水素酵素 (SDH) による酵素反応を経て、グルコースがフルクトースへと変換される。このフルクトースがさらにリン酸化や加水分解を受け、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物と総称される 3-デオキシグルコソン (3-deoxyglucosone : 3-DG) が生成される[15]。 $\alpha$ -ジカルボニル化合物は 3-DG の他にも、グルコースから解糖系を経て形成されるメチルグリオキザール (methylglyoxal : MG)、グルコースの自動酸化または多価不飽和脂肪酸から形成されるグリオキザール (glyoxal : GO) など複数の種類がある[16]。この  $\alpha$ -ジカルボニル化合物は、タンパク質のアミノ基と反応することにより AGE を形成する (Fig. 1-1)。

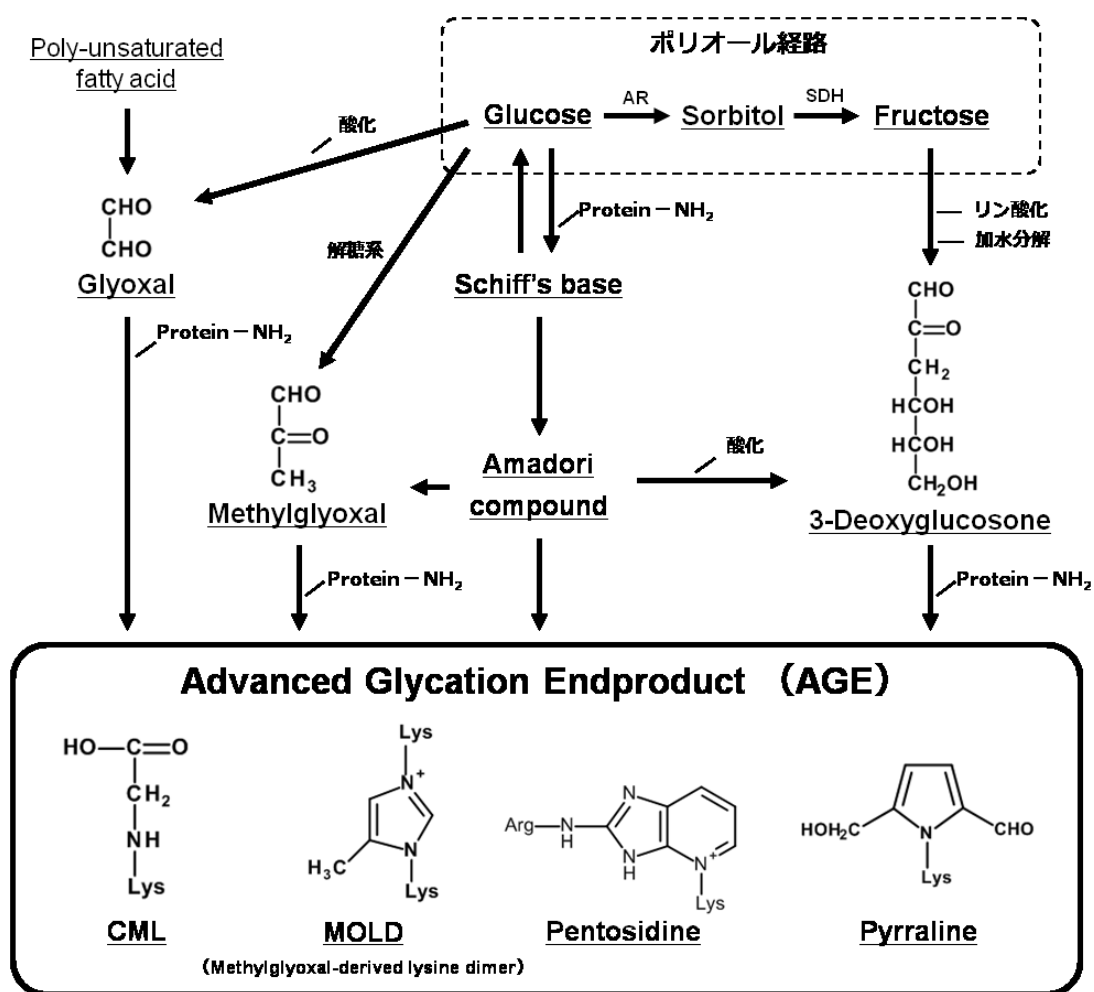


Fig. 1-1 非酵素的グリケーション反応とポリオール経路を介した AGE 形成の流れ

#### 4. AGE と糖尿病合併症

グリケーション反応は、糖尿病のように生体内のグルコースが過剰に存在する状況では反応が充進し、AGE の蓄積量が増加する。グリケーションの反応過程において、糖の自己酸化や  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の形成時に、ROS やフリーラジカルが生じる [17-19]。さらに、抗酸化酵素 (superoxide dismutase : SOD など) がグリケーション反応によって不活化され、生体の抗酸化システムが減弱され、ROS の量が増加す



る可能性も指摘されている[20]。発生した ROS は脂質を過酸化し、炎症機構を誘導してインスリン標的臓器に対してインスリン抵抗性を引き起こす。つまり、高血糖によってグリケーションが亢進し、糖尿病が悪化するという悪循環に陥ってしまう。また、AGE 化そのものによって、タンパク質構造が変化したり、タンパク質分子が架橋したり、細胞膜や細胞マトリクスが変化して血管透過性が異常になったりする[21] ことによって、糖尿病合併症が発症していく。実際に、AGE は、糖尿病性腎症を発症した糖尿病患者の腎臓や糖尿病ラットの網膜での増加が示されている[22,23]ので、AGE が糖尿病合併症の発症と進行を誘導する物質である可能性が高い。一方で、糖尿病に関係がないアルツハイマー病の脳神経細胞や高齢者の皮膚に存在する AGE は健常者や若年者よりも多いことが報告されているため、AGE の蓄積は加齢やその他の疾病にも関連すると考えられている[24]。

グリケーション反応の中間体である 3-DG や MG は、グルコースよりもタンパク質との反応性が高い[25]ことが分かっている。この  $\alpha$ -ジカルボニル化合物によるタンパク質傷害をカルボニルストレスといい、糖尿病性腎症とカルボニルストレスおよび酸化ストレスとの因果関係が指摘されている[26]。また、糖尿病性網膜症や腎症の患者の血中 3-DG が増加し[27]、糖尿病ラットの血中でも AGE とともに増加した[28]ことなどから、AGE と同様に糖尿病合併症との関連性が重要視されている。他方で、3-DG の形成に関わるポリオール経路は、高血糖下で亢進し、細胞内の酸化還元状態を変化させることにより糖尿病合併症を誘発する要因の一つとされている[15]。 $\alpha$ -ジカルボニル化合物以外のグリケーション中間体の一つに、中期段階で生成されるアマドリ転移化合物の糖化ヘモグロビン (HbA1c) がある。HbA1c は、臨床における糖尿病の診断マーカーとなっており、血糖状態を知るための重要な指標である[29]。

以上のことから、グリケーションで形成される中間体、AGE、その経路に関わる酵素や酸化ストレスを抑制することは、糖尿病合併症の発症および進行を抑制することにつながる。糖尿病合併症の予防手段としては、高血糖の解消が第一であるが、無自覚のうちに高血糖状態を放置している場合には、直接的に糖尿病合併症リスクを低減できる食品由来成分の摂取が有効となり得る。

## 5. ポリフェノールとその有効性

ポリフェノール (polyphenol) とは、その分子構造に 2 個以上 (poly-) のフェノール性水酸基 (ベンゼン環、ナフタリン環などの芳香族環に結合した水酸基) をもつフェノール類 (phenol) の総称である[30]。多くの種類のポリフェノールが植物に広く分布しており、ポリフェノールは太陽光中の紫外線による DNA 損傷の防止や昆虫の忌避など植物の防御物質として重要な役割を果たしている[31]。ポリフェノールは、大別して単量体 (モノマー) と重合体 (ポリマー) がある。モノマーポリフェノールのフラボノイドは、側鎖構造の違いなどによりフラボン、フラボノール、フラバノン、フラバノールなどに分類され、4000 種類以上の化合物が知られている[32]。フラボノイド以外のモノマーのポリフェノールには、コーヒー豆に含まれるクロロゲン酸、赤ワインに含まれるレスベラトロール、ウコンに含まれるクルクミンなどがある。ポリマーのポリフェノールはカテキン類が重合したもので、タンニンとも呼ばれ、縮合型と加水分解型の 2 つに分類される。縮合型のタンニンがプロアントシアニジンで、さらにプロシアニジンとプロデルフィニジンに分けられる。ちなみに、タンニンは赤ワインやカリン、渋柿の渋味の原因となる成分である[33]。(Fig. 1-2)

近年、ポリフェノールは機能性成分として注目を集めており、一般ではサプリメントといった形態で、多様なポリフェノールを含んだ商品が市場で展開されている。研究の面では、フラボノイドの健康効果が多数報告されており、それらの健康効果とポリフェノールが有する抗酸化活性との関わりが示唆されている[34]。ポリフェノールがもたらす抗酸化性は、フェノール性水酸基の還元性による ROS の直接消去[35,36]の他、生体内抗酸化能の誘導作用[37,38]によるものが報告されている。

ポリフェノールの疾患に対する効果は、相当量を摂取すれば病気の治療薬と同等の効果を示す場合もあるため、新薬の開発につながる可能性もある。また、日常的に食品から摂取しているポリフェノールの量では、疾患に対する作用は穏やかになって薬のような作用は期待できないが、多くのポリフェノールは食経験のある植物に含まれているため、薬のような副作用を起こすリスクは格段に低いというメリットがある。

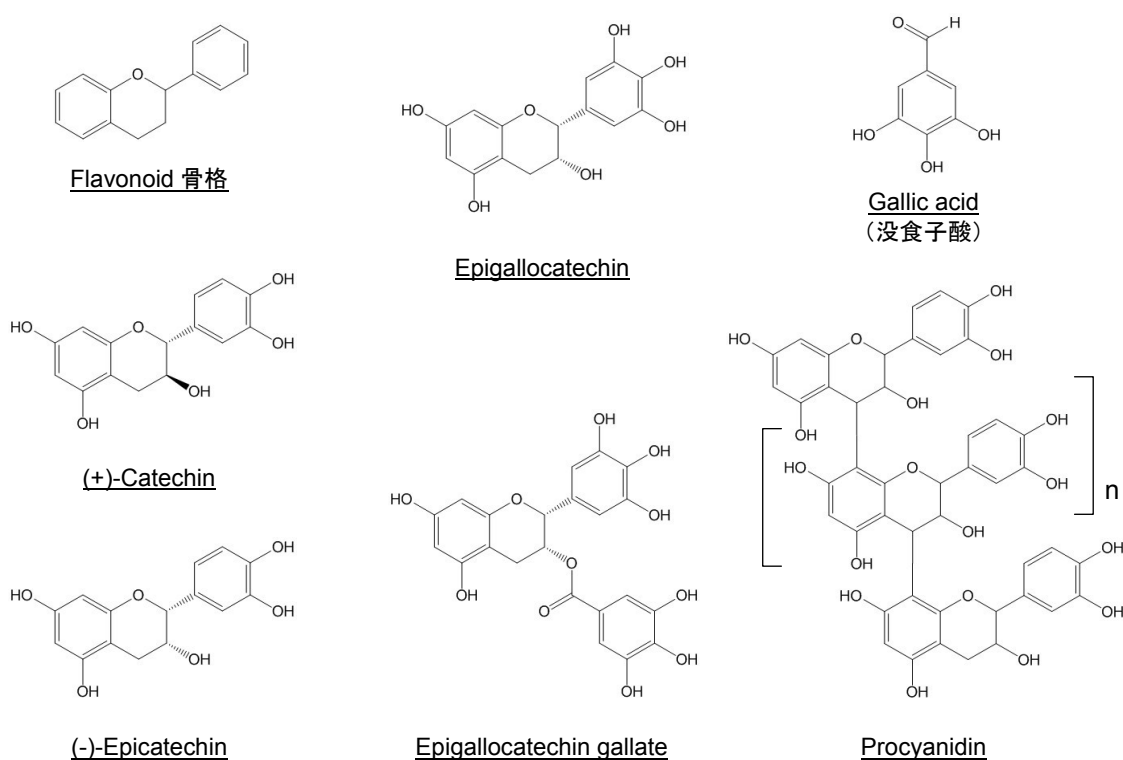
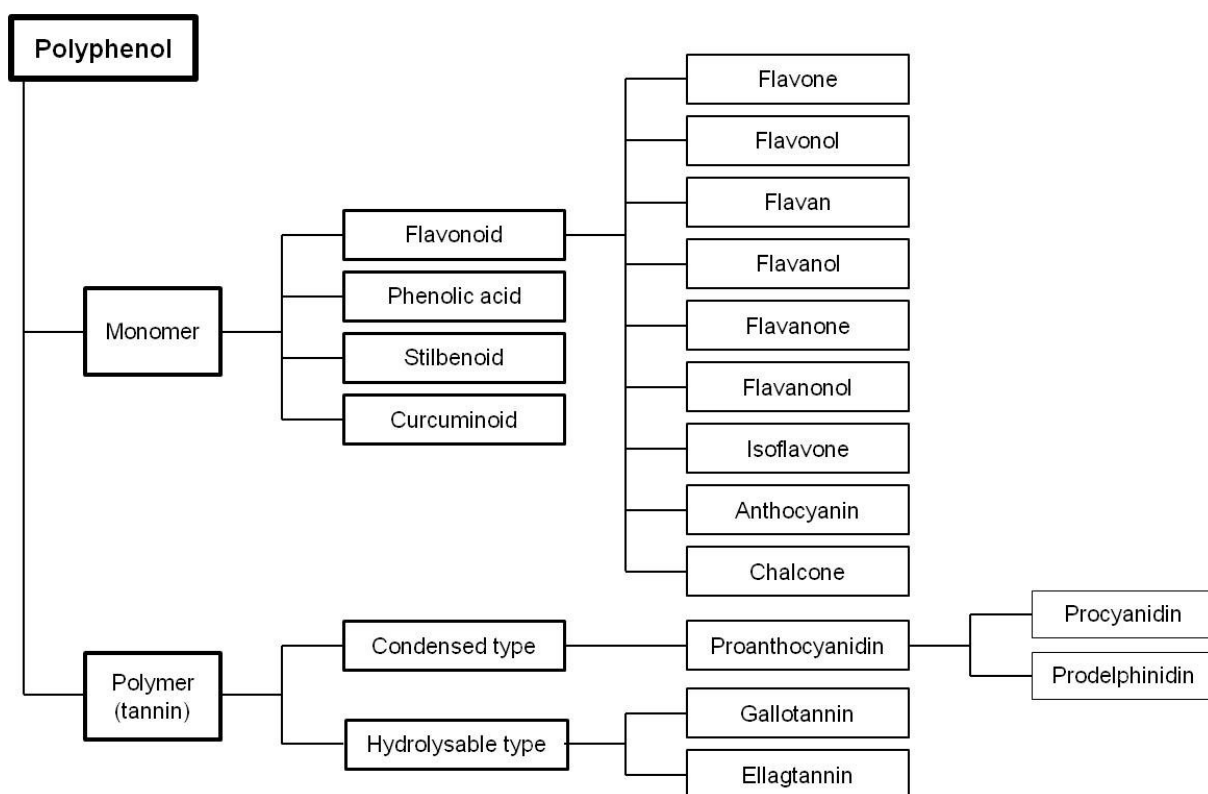


Fig. 1-2 ポリフェノールの分類および本研究に登場するポリフェノールとその構造

単量体ポリフェノールの中でも、最も研究が行われているものの一つに緑茶ポリフェノールがある。緑茶ポリフェノールは、抗酸化活性[39]の他、血糖値低下作用[40-42]、インスリン感受性増強作用[43]、抗肥満作用[44]、抗炎症作用[45]、抗グリケーション作用[41]などの抗糖尿病作用につながる報告が多くされている。一方、重合体ポリフェノールであるプロシアニジンにも、抗酸化活性[46]の他、血糖値低下作用[47]、インスリン抵抗性改善作用[48]、抗炎症作用[49]、抗グリケーション作用[50,51]、脂肪蓄積抑制作用[52,53]などの糖尿病の改善に寄与する作用が示されている。

食事から摂取したポリフェノールのほとんどは糞中に排泄されるが、一部は腸管粘膜細胞内でグルクロン酸と硫酸で抱合体化されてから吸収される。腸管の細胞を通り抜けると腸間膜静脈、門脈を経て肝臓でメチル化される。そこから一部は、胆汁に混ざって腸管に排出され、再吸収されるか糞中に排泄される。また一部は、肝静脈を通過して末梢組織に運ばれ、再度肝臓に戻ってくるものもあれば、腎臓を経て尿中に排泄されるものもある。[54] プロシアニジンはその分子量の大きさゆえ、フラボノイドなどのモノマーポリフェノールに比べると腸管からの吸収性に乏しいと言われている[55]。そのため、上に述べた糖尿病の改善に寄与する作用は、プロシアニジンが吸収されて生じたのではなく、消化管腔内で消化酵素の阻害[56,57]、あるいは腸内細菌叢によるプロシアニジンの分解産物からもたらされるという可能性が考えられている[58,59]。

緑茶ポリフェノールはメタボリックシンドロームの抑制効果も報告されており[60]、いわばポリフェノールの優等生であり、既に実用化もされている。しかし、Seeramらの *in vitro* における検討[61]では、プロシアニジンを含む飲料が、緑茶と比べて同等かそれ以上の抗酸化活性を示した。これに加え、上記のとおり、プロシアニジンには、世界的に問題となっている糖尿病や糖尿病合併症を抑制する力があることからプロシアニジンに対する期待は高まっている。また、プロシアニジンは複数種類あり、その抗糖尿病作用も異なる。たとえば、同じシナモンでも種が異なれば含有されるプロシアニジンが違い、示す抗糖尿病作用もそれぞれ異なる[62]。そのため、個々のプロシアニジンについて抗糖尿病作用のメカニズムを検証することは、そのプロシアニジン含有するポリフェノール試料を特徴づける点で有意義と言える。

## 6. カリンポリフェノール

カリン（英語表記；Chinese quince、学名；*Chaenomeles sinensis*）は中国原産のバラ科の落葉高木である。カリンの成熟果実は黄色で大きな洋梨の形に近い形をしており、果糖、ビタミン C、リンゴ酸、クエン酸、タンニン、アミグダリンなどを含む。日本では、長野県や香川県で栽培が盛んであり、耐寒性があることから本学の所在地である岩手県においても栽培を行う農家がある。しかし、その果実は非常に固い上に渋みや酸味が強いので生食には向かず、砂糖漬けや漢方薬、果実酒にされることが多く、カリン浸漬酒には疲労回復に効果があるということで飲用されている。[63]

このように、カリンには加工食品や漢方薬として摂取されてきた背景があり、通常摂取する範囲の量での毒性に関する報告はない。また、カリン果実はプロシアニジンも多く含有することや、*in vitro* で強い抗酸化活性と抗インフルエンザ活性、抗潰瘍活性などをもつことが報告されている[64,65]。また、Sancheti らが、1 型糖尿病モデル動物を用いて、カリン含有ポリフェノールの摂取効果を検討した結果、生体内での抗酸化作用および血糖値低下作用が認められた[66,67]。これらの点から、カリンに含まれるポリフェノールは注目すべきポリフェノールであると言える。

カリン果実には高分子量のプロシアニジンが非常に多く含まれるが[64]、前出のようにプロシアニジンポリマーのような高分子量のポリフェノールは、カテキンなどの低分子量のポリフェノールと比べて腸管からの吸収が極めて困難であるとされている[55]。しかし、カリンのポリフェノール成分による抗糖尿病効果は、ポリフェノール成分の中でも量的な観点からプロシアニジンによりもたらされていると考えられる。そこで、本研究では、いまだ報告がされていない 2 型抗糖尿病に対するカリンのポリフェノール成分の作用を詳細に検討することにした。さらに、カリンのプロシアニジンと、類似した構造をもつカテキンを豊富に含む緑茶抽出物およびプロシアニジンの低分子化処理を行ったライチ低分子化プロシアニジンと抗糖尿病作用やそのメカニズムの比較し、カリンに含有されるプロシアニジンの優位性を探索することにした。

本研究では、カリンポリフェノールが2型糖尿病に対して抗糖尿病作用を示すことを確認し、さらにその作用およびメカニズムを他のポリフェノールと比較することを目的として研究を行った。

第2章では、カリンエタノール抽出物（CE）の抗糖尿病作用について検討した。一般にはカリンが浸漬酒として用いられていることから、カリン果実をエタノールによって抽出し、CEを調製した。筆者の以前の検討においてCEのプロシアニジン画分は抗糖尿病作用を示したが、ポリフェノール以外の夾雑物も含むCEが抗糖尿病作用を示すかは不明であったため、2型糖尿病モデル動物であるKK-*Ay*マウスに摂取させ、その抗糖尿病作用の有無を調べた。

第3章では、第2章の検討からCEに含まれる糖がカリン含有ポリフェノールによる抗糖尿病作用を阻害する可能性が示唆されたため、CEから糖を取り除いたカリンポリフェノール（CP）を調製し、CPの成分分析を行った。また、既製品である緑茶抽出物（GE）とライチ由来低分子化プロシアニジン（OL）を用いて、総ポリフェノール量などを測定し、CPとの含有成分の違いを検討した。

第4章では、CP、GE、OLの抗酸化活性および抗グリケーション活性を比較した。糖尿病と糖尿病合併症の発症、悪化には酸化ストレスとグリケーションが密接に関わることから、*in vitro*におけるDPPHラジカル消去活性およびH-ORAC法、フルクトースと牛血清アルブミンをインキュベートするAGE形成法を用いて抗糖尿病作用に寄与する活性の評価を行った。

第5章では、2型糖尿病モデル動物であるKK-*Ay*マウスにCP、GE、OLを等ポリフェノール量添加した高脂肪食を与え、それぞれのポリフェノール試料の抗糖尿病作用を比較した。血糖値に関連する指標、脂質、グリケーションに関連する指標を調べ、それらに変化をもたらすメカニズムを検証した。

第6章では、CP、GE、OLの空腸からの吸収を検討した。第5章の動物実験の結果を受けて、消化管からの吸収の差異がポリフェノールの抗糖尿病作用に影響していることが推察された。実際に腸管からポリフェノール試料が吸収されているのか調べることを目的に、空腸を結紮して作製した空腸ループにCP、GE、OLをそれぞれ注入してポリフェノール成分の吸収状況を観察した。

## 第2章 カリンエタノール抽出物の2型糖尿病マウスにおける効果

### 第1節 目的

食品の機能性成分は、分画などの精製過程を必要とせず、抽出物そのものの状態で摂取することで健康効果が発揮される方が、実用化の観点から都合が良い。

カリンについては、Sancheti らがストレプトゾトシン誘導 1 型糖尿病モデルラットを用いてメタノール抽出物[66]およびエタノール抽出物の酢酸エチル画分[67]による血糖値抑制作用を報告している。しかし、カリンが糖を多く含むためか、分画を行っていないエタノール抽出物の摂取による効果については述べられていない。

筆者は以前、カリンエタノール抽出物を Sephadex LH-20 カラムを用いて低分子量プロシアニジンと高分子量プロシアニジンに粗分画し、抗糖尿病作用の寄与成分について検討を行った。カリンエタノール抽出物全体に占めるポリフェノールの割合は、非吸着画分が約 5%、低分子量プロシアニジンが約 1%、高分子量プロシアニジンが約 80%であった。このため、主成分である高分子量プロシアニジンが抗糖尿病作用を有すると想定していたが、高分子量プロシアニジンを添加した高脂肪食を 2 型糖尿病モデル動物である KK-*Ay* マウスに摂取させたところ、糖尿病に対する効果は認められなかった。一方、低分子量プロシアニジンを用いた同様の実験では、血糖値抑制傾向および  $\alpha$ -ジカルボニル化合物減少作用などの抗糖尿病作用が認められた。先に述べたように、低分子量プロシアニジンは抽出物全体における割合が小さいこともあり、実用性は乏しい。また、Sephadex LH-20 カラムで分画した各画分が相互作用を有する可能性や非吸着成分およびレジンから回収しきれなかった成分が抗糖尿病作用を有する可能性が考えられた。

以上をふまえ、本章ではカリンエタノール抽出物そのものが、2 型糖尿病モデル動物にどのような効果をもたらすか検証することとした。

## 第2節 方法

本論文中に記載されている抽出物の調製や試薬調製などで使用した水は脱イオン水（以下、水と表記する）を用い、特に明記をしていない試薬については和光純薬工業株式会社（大阪）の特級試薬を用いた。

## 1. カリンエタノール抽出物（CE）

## (1) カリンエタノール抽出物（CE）の調製

カリンは、岩手県工業技術センターから提供された輪切り状の冷凍果実を使用した。カリン果実を半解凍した状態で種を取り除き、約 5 mm 角にカットした。次に、5 L 容のステンレス製の鍋にカットしたカリン 200 g を量り入れ、その 10 倍量 (w/v) のエタノール 2 L を加えて一晩スターラーで攪拌し、抽出した。この抽出液を濾紙 (No.2、ADVANTEC) で濾過し、ロータリーエバポレーター (EYELA Type N-1N、東京理化学器械株式会社；東京) を用いて濃縮した。濃縮物は粘性が高かったため、水で薄めて回収し、カリンエタノール抽出物 (CE) を得た。CE は  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存をした。

総ポリフェノール量測定の際には、CE に高い粘性があったために正確な液量が測りとれなかった。そのため、100 mg を秤量して水に溶解し、100 mL 容メスフラスコで定容にした 1 mg/mL 水溶液を総ポリフェノール量の測定での試料溶液とした。

## (2) Folin-Denis 法による総ポリフェノール量の測定 [68]

## 【試薬】

- ・ 1N フェノール試薬

2N フェノール試薬 (Folin-Ciocalteu 試薬) を水で 2 倍に希釈した。

- ・ 10% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液



## 【標準物質】

- ・ gallic acid (特級、ナカライテスク株式会社 ; 京都)

## 【操作】

水で希釈した試料 100  $\mu\text{L}$  と水 900  $\mu\text{L}$  を試験管に分注し、混和した後に 1N フェノール試薬 500  $\mu\text{L}$  を加えて攪拌した。室温で 3 分間放置した後、10 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液を 1.5 mL 加えて攪拌し、室温で 30 分間静置した。この溶液の波長 760 nm における吸光度を、分光光度計 (UV-1200、島津製作所 ; 京都) で測定した。ブランクには純水、標準溶液には 0.1 mg/mL gallic acid を用い、総ポリフェノール量は gallic acid 当量として表した。

## 2. 動物実験

## (1) 実験飼料の調製

動物実験に使用した AIN93-G 準拠 20% カゼイン飼料 (20C) [69]、高脂肪食 (HF)、CE 添加高脂肪食 (HF+CE) の組成は Table 2-1 に示した。HF+CE は Folin-Denis 法により求めた総ポリフェノール量 (gallic acid 相当量) で 0.5% (w/w) となるように CE を添加した。なお、粘性が高い CE (1 g あたり総ポリフェノール量を 50 mg gallic acid 当量に調製したもの) は水溶液の状態で、HF 1 kg につき 100 g 添加した。これに合わせ、20C および HF には飼料調製の最後に CE の溶媒である水を、飼料 1 kg につき 100 g 加え、いずれの飼料も 15 分間よく混合することで試料の重量を揃えた。

Table 2-1 実験飼料（20C、HF および HF+CEC）の組成

	20C	HF	HF + CE
α - コーンスターチ <sup>1)</sup>	529.5	307	307
カゼイン <sup>1)</sup>	200	200	200
ラード <sup>2)</sup>	—	200	200
ショ糖 <sup>3)</sup>	100	100	100
大豆油 <sup>4)</sup>	70	70	70
セルロース粉末 <sup>1)</sup>	50	62	62
AIN93-G 塩類混合物 <sup>1)</sup>	35	43	43
AIN93 ビタミン混合物 <sup>1)</sup>	10	12	12
シスチン <sup>5)</sup>	3	3	3
コリン重酒石酸塩 <sup>4)</sup>	2.5	3	3
カリンエタノール抽出物 (CE)	—	—	100*
脱イオン水	100	100	—
Total (g)	1100	1100	1100

1) オリエンタル酵母工業（東京）、2) Sigma-Aldrich（USA）、3) 東洋精糖（東京）、  
4) 和光純薬株式会社（大阪）5) 味の素（東京）

\* Folin-Denis 法により求めた gallic acid 5 g 相当のポリフェノールを含有

## （2）実験動物および飼育方法

実験動物は、5 週齢 C57BL/6J 雄マウス（18～20 g、日本クレア株式会社；東京）6 匹、5 週齢 KK-Ay/TaJcl 系雄マウス（22～25 g、日本クレア株式会社）12 匹を用いた。マウスは個別にステンレスケージに収容し、恒温（22±1 °C）、恒湿（50±10 %）に保った動物室内で、午前 6 時から午後 6 時までを明期とした明暗 12 時間周期で飼育した。予備飼育の最初の 4 日間は固形飼料（マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料 CE-2、日本クレア株式会社）、続く 5 日間は 20C（Table 2-1）を自由摂食させた。20C を摂食させてから 6 日目の朝 8 時より 5 時間絶食させ、マウスの尾静

脈血を用いてオートディスクセンサー（アセンシア ブリーズ、Bayel AG；ドイツ）により血糖値を測定した。その血糖値と体重を基に、*KK-A<sup>y</sup>* マウスを糖尿病対照群（DC）、糖尿病カリン抽出物摂取群（DCE）に群分けした。また、C57BL/6J マウスは正常対照群（C）とした。群分け以降、Cには20C、DCにはHF、DCEにはHF+CEをそれぞれ自由摂食させ、31日間飼育した（飼料組成はTable 2-1参照）。水は水道水を自由に飲水させた。群分けから7、14、21日目に朝8時より5時間の絶食、27日目のみ朝8時より1時間の絶食をさせて、マウスの尾静脈血を用いてオートディスクセンサーにより血糖値を測定した（絶食時間が変更された理由については、下記の「※絶食時間の設定について」を参照）。また、30日目に尾静脈血をDCA2000 HbA1c カートリッジに採取し、DCA2000 システム（Siemens；ドイツ）によりHbA1c値を測定した。群分け28～30日目にかけて代謝ケージを設置し、糞を回収した。31日目の朝8時より1時間の絶食させた後、マウスをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、下大静脈から採血した後に屠殺した。採血した全血はベノジェットⅡ真空採血管（VP-ASO54、テルモ；東京）に移し、遠心分離した血清は-80℃で保存した。生理食塩水を用いて灌流をした肝臓を摘出した他、腎臓、腎臓周囲脂肪、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪、後肢筋（腓腹筋）を採取した。各臓器は重量測定後、ただちに液体窒素で凍結して分析まで-80℃で保存した。

#### ※絶食時間の設定について

以前に行った週齢と飼育条件が同じ *KK-A<sup>y</sup>* マウスを用いた実験では、絶食5時間後の血糖値は、群分け後0日目から28日目までの間に段階的に上昇した。しかし、今回の実験では、21日目まで *KK-A<sup>y</sup>* マウスの血糖値は上昇しなかった。原因としては、絶食時間が負担になり、*KK-A<sup>y</sup>* マウスの血糖値が正常値まで低下したことが予想された。そのため、27日目には絶食時間を1時間に短縮して血糖値を測定したところ、*KK-A<sup>y</sup>* マウスの血糖値は正常マウスの2倍以上高い値を示した。以上のことから、入荷したマウスのロットによって絶食耐性が異なることが予想されたため、27日目と解剖時の血糖値評価は絶食1時間で行うことになった。

### 3. 血清成分分析

#### (1) 血清グルコース濃度の測定

酵素法によるキット（グルコース CII - テストワコー、和光純薬株式会社；大阪）を用いて行った。操作は、取扱説明書の通りに行った。ただし、取扱説明書では血清 20  $\mu\text{L}$  に対し発色試薬を 3 mL 使用して反応させるところを、血清の使用量を 10  $\mu\text{L}$ 、発色試薬を 1.5 mL として反応を行った。スタンダードはキット中のグルコース標準液を用い、ブランクには血清を加えずに同様の操作を行った。

#### (2) 血清インスリン濃度の測定

モリナガマウスインスリン測定キット（株式会社森永生化学研究所；神奈川）により測定した。2 型糖尿病モデルマウスは、高インスリン血症をきたすことから、DC および DCE の血清はキット付属の検体希釈液で 5 倍希釈したものの検体とし、C の血清は希釈をせず、それぞれ 5  $\mu\text{L}$  使用した。操作は取扱説明書の通りに行った。

#### (3) 血清アディポネクチン濃度の測定

マウス/ラット アディポネクチン ELISA キット（大塚製薬株式会社；東京）により測定した。取り扱い説明書に従い、血清 10  $\mu\text{L}$  をキット付属の検体希釈液 1 mL と混合した。さらに、この希釈血清 10  $\mu\text{L}$  をキット付属の検体希釈液 1 mL と混合し、最終希釈倍数 10,201 倍に希釈した血清を試料として用いた。操作は取扱説明書の通りに行った。

#### (4) 血清トリグリセリド (TG) 濃度の測定

酵素法によるキット（トリグリセライド E-テストワコー、和光純薬株式会社；大阪）を用いて行なった。操作は、キット付属の取扱説明書の通りに行った。ただし、血清グルコース濃度の測定と同じく、血清と発色試液の使用量は半量とした。スタンダードはキット中のグリセリン標準液を用い、ブランクには血清を加えずに同様の操作を行った。

## (5) 血清総コレステロール (TC) 濃度の測定

酵素法によるキット (コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業株式会社 ; 大阪) を用いて行なった。ただし、血清グルコース濃度の測定と同じく、血清と発色試液の使用量は半量とした。スタンダードはキット中のコレステロール標準液を用い、ブランクには血清を加えずに同様の操作を行った。

## (6) 血清 HDL-コレステロール (HDL-C) 濃度の測定

リントングステン酸・マグネシウム塩沈殿法を利用したキット (HDL-コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業株式会社 ; 大阪) を用いて行なった。ただし、取扱説明書では血清 200  $\mu\text{L}$  に対して沈殿試液 200  $\mu\text{L}$  を加えるところを、血清 100  $\mu\text{L}$  に沈殿試液を 100  $\mu\text{L}$  加えて沈殿操作を行なった。その上清と発色試液は血清グルコース濃度の測定と同じく、説明書に記載された量の半量にして、測定を実施した。スタンダードはキット中のコレステロール標準液を用い、ブランクには血清を加えずに同様の操作を行った。

## 4. 肝臓中脂質の測定

## (1) 肝臓の脂質抽出 [70]

## 【試薬】

- ・クロロホルム : メタノール = 2 : 1 (v/v) 溶液
- ・0.88% 塩化カリウム溶液

塩化カリウム 0.88 g を秤量し、水で溶解し全量を 100 mL にした。

- ・クロロホルム
- ・イソプロピルアルコール

## 【操作】

肝臓約 200 mg を 30 mL 容遠沈管 (3119 オークリッジ遠沈管、Nalgene ; 東京)

に精秤し、クロロホルム：メタノール＝2：1 (v/v) 溶液 4 mL を加え、ポリトロンホモジナイザーPCU-2 (KINEMATICA ; スイス) を用いてホモジナイズした (ダイヤル 4、20 秒)。チューブのクロロホルム：メタノール＝2：1 (v/v) 溶液を加えて重さを揃えた後、4°C、9,800 × g で 20 分間遠心分離 (KOKUSAN H-9R、株式会社コクサン ; 東京) し、上清を分液漏斗へ移した。その沈殿にクロロホルム：メタノール＝2：1 (v/v) 溶液 4 mL を加え、上記と同様に操作した。2 回目の上清も分液漏斗へ入れ、0.88% 塩化カリウム水溶液 2 mL を加え、攪拌し、境界面がはっきりするまで静置した。クロロホルム層である下層を 10 mL 容メスフラスコに回収し、クロロホルムによりフィルアップした。脂質抽出液はネジ蓋付き試験管に移し、冷暗所にて保存した。脂質抽出液 150 μL を 80°C のブロックヒーターを用いて乾固させ、イソプロピルアルコール 75 μL に溶解したものを肝臓中脂質測定試料として用いた。

#### (2) 肝臓中トリグリセリド (TG) の定量

肝臓中脂質測定試料の TG 濃度を、血清 TG 濃度の測定 (本章第 2 節 - 3 - (3) ) と同様の方法で求めた。測定した試料のトリグリセリド濃度、溶媒変換時の濃縮倍数 (2 倍)、脂質抽出液量 (10 mL)、精秤した肝臓重量をもとに肝臓 1 g 当たりのトリグリセリド量を算出した。

#### (3) 肝臓中総コレステロール (TC) の定量

肝臓中脂質測定試料の TC 濃度を、血清 TC 濃度の測定 (本章 第 2 節 - 3 - (4) ) と同様の方法で求めた。測定した試料のトリグリセリド濃度、溶媒変換時の濃縮倍数 (2 倍)、脂質抽出液量 (10 mL)、精秤した肝臓重量をもとに肝臓 1 g 当たりのコレステロール量を算出した。

## 5. 糞中脂質および胆汁酸の測定

## (1) 糞中脂質の抽出 [71]

## 【試薬】

・エタノール

## 【操作】

採取した糞は凍結乾燥機 (FDU-830、東京理化学器械株式会社；東京) を用いて凍結乾燥し、乾燥重量を測定した後、乳鉢で糞を粉碎した。粉碎した糞は 0.5 g を精秤し、50 mL 容三角フラスコに入れ、70 °C に加温したエタノールを 10 mL 加えた。三角フラスコをパラフィルムで密封し、ウォーターバスを用いて 70 °C、振盪速度 100 /min で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、30 mL 容遠沈管に移して 23,500×g、4 °C で 10 分間遠心分離 (KOKUSAN H-9R、株式会社コクサン；東京) し、上清を濾紙 (No.2、ADVANTEC；東京) で濾過した。得られた濾液を 10 mL 容メスフラスコに回収し、エタノールでフィルアップしたものを糞中脂質抽出液としてネジ蓋付き試験管に移し、冷暗所にて保存した。この糞中脂質抽出液はそのままトリグリセリド、コレステロール、胆汁酸の測定サンプルとして用いた。

## (2) 糞中トリグリセリド (TG) の測定

糞脂質抽出液中 TG の測定は、血清 TG の測定と同じキットを用いて行なった。液量を試料は 100  $\mu$ L、発色試液は 1.5 mL に変更し、その他の操作は取扱説明書に従って行った。また、試料中のエタノールの影響を考慮するために、スタンダードはキット中の標準液 10  $\mu$ L にエタノール 100  $\mu$ L を加え、ブランクはエタノール 100  $\mu$ L を用いた。求めた糞脂質抽出液のトリグリセリド濃度、抽出液量 (10 mL) および糞量をもとに 1 日分の糞中に含まれるトリグリセリド量を算出した。

## (3) 糞中コレステロールの測定

糞脂質抽出液中コレステロールの測定は、血清 TC 濃度の測定と同じキットを用い

て行なった。キットの操作は、上記の糞中 TG の測定と同様に液量や標準液の希釈を変更した。求めた糞脂質抽出液のコレステロール濃度、抽出液量 (10 mL) および糞量をもとに 1 日分の糞中に含まれるコレステロール量を算出した。

#### (4) 糞中総胆汁酸の測定

糞脂質抽出液中総胆汁酸の測定は、酵素法による総胆汁酸測定用キット (総胆汁酸-テストワコー、和光純薬工業株式会社 ; 大阪) を用いて行なった。ただし、取扱説明書に記載の試料、酵素液、反応停止液の液量を全て半量に変更した。また、試料中のエタノールの影響を考慮するため、スタンダードはキット中のグリココール酸標準液 100  $\mu$ L (ブランクは水 100  $\mu$ L) にエタノール 100  $\mu$ L を加えたものを用いた。スタンダードの反応系に含まれる水を考慮し、試料の反応系には水を 100  $\mu$ L 添加した。求めた糞脂質抽出液の胆汁酸濃度、抽出液量 (10 mL) および糞量をもとに 1 日分の糞中に含まれる胆汁酸量を算出した。

## 6. 統計処理

得られた測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。各群間の比較は分散分析 (ANOVA) を行った後に、Tukey multiple comparison test で多重比較検定を行った。P<0.05 を有意と判定した。統計処理には InStat3.0 (GraphPad Software ; USA) を使用した。



## 第3節 結果

## 1. 飼育期間中および解剖時のデータ

## (1) 体重および飼料摂食量

体重および摂食量に関するデータを Table 2-2 に示した。群分け時体重および解剖時体重のいずれも、正常マウス (C) より糖尿病マウス (DC および DCE) で重かった。体重増加量で見ると、糖尿病マウスは正常マウスに比べて 2.5~3 倍増加しており、肥満が亢進していた。また、有意ではなかったものの、体重増加量は DC に比べて DCE で低い傾向を示した。一日の平均摂食量は 3 群間に差がなかったため、体重増加量を摂食量で割った摂食効率は、体重増加量と同様に C に対して DC および DCE で増加していた。

**Table 2-2** 正常対照マウス、2 型糖尿病対照マウスおよび 2 型糖尿病カリン抽出物摂取マウスの群分け時と解剖時の体重、一日の平均摂食量および摂食効率

	C	DC	DCE
群分け時体重 (g)	21.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	30.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	30.4 ± 0.4 <sup>b</sup>
解剖時体重 (g)	26.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	45.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	43.1 ± 0.9 <sup>b</sup>
体重増加量 (g/31 days)	5.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	14.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	12.7 ± 0.5 <sup>b</sup>
平均摂食量 (g/day)	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1
摂食効率 (mg/g diet)	49 ± 5 <sup>a</sup>	128 ± 7 <sup>b</sup>	111 ± 3 <sup>b</sup>

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=6)。異なる記号間における有意差は p<0.05。

各群の略号は以下の通り。

C : 正常対照群 (C57BL/6J マウス)

DC : 2 型糖尿病対照群 (KK-A<sup>y</sup>/TaJCl マウス)

DCE : 2 型糖尿病カリン抽出物摂取群 (KK-A<sup>y</sup>/TaJCl マウス)

## (2) 解剖時の臓器重量

解剖時に測定した肝臓、腎臓、腎臓周囲脂肪、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪および腓腹筋の臓器重量、それらと解剖時の体重をもとに計算した体重 100 g 当たりの相対重量をそれぞれ Table 2-3 に示す。肝臓、腎臓および各脂肪組織の実測重量は、正常マウス (C) に比べて糖尿病マウス (DC および DCE) で増加していたが、DC と DCE に有意な差はなかった。腓腹筋の重量は、C と DC の間に差はなく、DCE で減少した。体重 100 g 当たりの相対重量は、腎臓のみ 3 群間の差がなかったが、その他は正常マウスに比べて糖尿病マウスで増加していた。しかし、いずれの相対重量も DC と DCE の間に差はなかった。

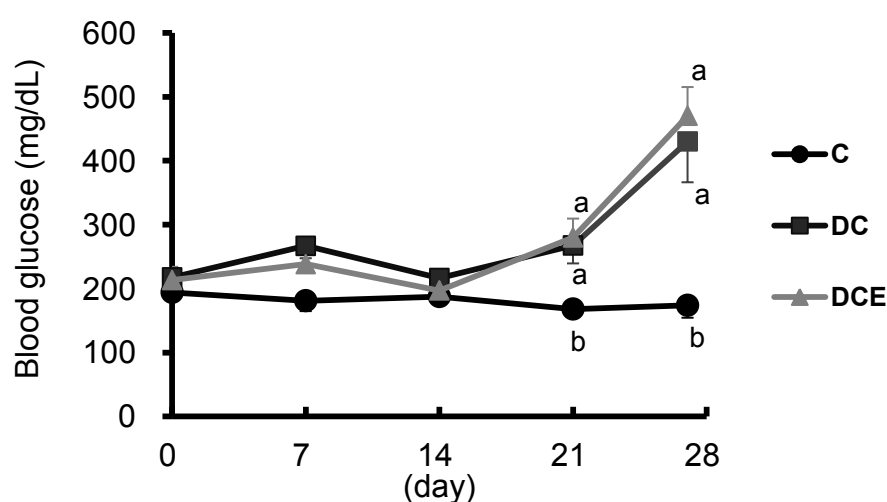
**Table 2-3** 正常対照マウス、2 型糖尿病対照マウスおよび 2 型糖尿病カリン抽出物摂取マウスの解剖時における臓器重量

	C	DC	DCE
臓器重量 (実測値) (g)			
肝臓	1.21 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.59 ± 0.07 <sup>b</sup>
腎臓	0.327 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.567 ± 0.017 <sup>b</sup>	0.555 ± 0.021 <sup>b</sup>
腎臓周囲脂肪	0.260 ± 0.037 <sup>a</sup>	0.943 ± 0.069 <sup>b</sup>	0.837 ± 0.030 <sup>b</sup>
精巣周囲脂肪	0.660 ± 0.058 <sup>a</sup>	1.983 ± 0.125 <sup>b</sup>	1.864 ± 0.125 <sup>b</sup>
腸間膜脂肪	0.525 ± 0.018 <sup>a</sup>	1.711 ± 0.115 <sup>b</sup>	1.542 ± 0.113 <sup>b</sup>
腓腹筋	0.288 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.284 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.261 ± 0.007 <sup>b</sup>
体重 100 g 当たりの相対重量 (g/100 g body weight)			
肝臓	4.53 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.61 ± 0.14 <sup>b</sup>	6.10 ± 0.18 <sup>b</sup>
腎臓	1.22 ± 0.02	1.28 ± 0.05	1.31 ± 0.07
腎臓周囲脂肪	0.96 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.06 <sup>b</sup>
精巣周囲脂肪	2.47 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.44 ± 0.21 <sup>b</sup>	4.38 ± 0.24 <sup>b</sup>
腸間膜脂肪	1.96 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.82 ± 0.17 <sup>b</sup>	3.62 ± 0.21 <sup>b</sup>
腓腹筋	1.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>b</sup>

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=6)。異なる記号間における有意差は p<0.05。各群の略号は、Table 2-2 に同じ。

## (3) 飼育期間中の血糖値の変化と HbA1c

飼育 0、7、14、21、27 日目の血糖値を Fig. 2-1 に示す。飼育期間中、DC の血糖値は 200 mg/dL 程度と一定であった。それに対して、DC および DCE は 21 日目から有意に増加し、27 日目では約 2 倍であった。過去 1 カ月間の平均血糖値を反映する HbA1c は、C に対して DC および DCE で増加していた。(Table 2-4) 飼育期間中に、カリン抽出物を摂取した DCE での血糖値抑制効果は認められなかった。



**Fig. 2-1** 正常対照マウス、2 型糖尿病対照マウスおよび 2 型糖尿病カリン抽出物摂取マウスの飼育期間中における血糖値の変化 (ただし、0、7、14、21 日目の絶食時間は 5 時間、27 日目のみ絶食時間は 1 時間) 値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す (n=6). 異なる記号間における有意差は  $p < 0.05$ . 各群の略号は、Table 2-2 に同じ.

**Table 2-4** 正常対照マウス、2 型糖尿病対照マウスおよび 2 型糖尿病カリン抽出物摂取マウスの飼育 30 日目の HbA1c 値

	C	DC	DCE
HbA1c (%)	4.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	8.0 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>

値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す (n=6). 異なる記号間における有意差は  $p < 0.05$ . 各群の略号は、Table 2-2 に同じ.

## 2. 血清成分

糖尿病マウス (DC および DCE) の血糖値および血中インスリン濃度は、正常マウス (C) より有意に増加しており、糖尿病マウスは高血糖、高インスリン血症を生じていた。インスリン抵抗性を改善する作用を有する血中アディポネクチン濃度は、糖尿病マウスで正常マウスよりも減少していた。また、糖尿病マウスの血清 TG は、正常マウスの 2 倍以上増加した。TC および HDL-C も正常マウスと比べて糖尿病マウスで増加していた。いずれの血清中の指標においても、カリン抽出物の摂取による影響は見られなかった。(Table 2-5 血清の項目)

## 3. 肝臓中脂質

肝臓中の TG 量は、糖尿病マウス (DC および DCE) において正常マウス (C) の 3 倍となった。糖尿病マウスにおける肝臓中のコレステロール量は、正常マウスよりも 4 倍増加していた。肝臓中脂質において、カリン抽出物の摂取による影響は見られなかった。(Table 2-5 肝臓の項目)

## 4. 糞中脂質および胆汁酸

糖尿病マウス (DC および DCE) の糞の乾燥重量は、正常マウス (C) の 2 倍以上であった。一日当たりの糞中への TG およびコレステロールの排泄は、高脂肪食を摂取していた糖尿病マウスの 2 群で増加していた。糞中総胆汁酸量も、糖尿病マウスの 2 群で正常マウスの 3 倍ほどまで増加していた。糞中の脂質および胆汁酸において、カリン抽出物の摂取による影響は見られなかった。

(Table 2-5 糞の項目)

**Table 2-5** 正常対照マウス、2型糖尿病対照マウスおよび2型糖尿病カリン抽出物摂取マウスの解剖時に採取した血清の各指標、肝臓脂質、糞中脂質および胆汁酸

	C	DC	DCE
<b>血清</b>			
グルコース (mg/dL)	296 ± 11 <sup>a</sup>	576 ± 29 <sup>b</sup>	623 ± 42 <sup>b</sup>
インスリン (ng/mL)	1.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	32.6 ± 3.2 <sup>b</sup>	26.1 ± 3.0 <sup>b</sup>
アディポネクチン (µg/mL)	35.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	16.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	11.9 ± 1.5 <sup>b</sup>
トリグリセリド (mg/dL)	107 ± 8 <sup>a</sup>	204 ± 22 <sup>b</sup>	221 ± 31 <sup>b</sup>
総コレステロール (mg/dL)	105 ± 2 <sup>a</sup>	137 ± 8 <sup>b</sup>	151 ± 8 <sup>b</sup>
HDL-コレステロール (mg/dL)	80 ± 3 <sup>a</sup>	106 ± 5 <sup>b</sup>	110 ± 8 <sup>b</sup>
<b>肝臓</b>			
トリグリセリド (mg/g liver)	18.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	64.7 ± 5.2 <sup>b</sup>	68.8 ± 1.7 <sup>b</sup>
総コレステロール (mg/g liver)	2.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	8.6 ± 1.0 <sup>b</sup>	9.8 ± 1.1 <sup>b</sup>
<b>糞</b>			
乾燥重量 (mg/day)	217 ± 16 <sup>a</sup>	514 ± 29 <sup>b</sup>	530 ± 34 <sup>b</sup>
トリグリセリド (mg/day)	0.41 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.97 ± 0.58 <sup>b</sup>	3.61 ± 1.05 <sup>b</sup>
コレステロール (mg/day)	0.57 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.17 <sup>b</sup>
総胆汁酸 (µmol/day)	0.29 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.97 ± 0.10 <sup>b</sup>

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=6). 異なる記号間における有意差は p<0.05. 各群の略号は、Table 2-2 に同じ.

## 第4節 考察

2型糖尿病モデルである *KK-A<sup>y</sup>* マウスは、過食、肥満、高血糖を呈する特徴があり、高脂肪食を摂取することでより糖尿病を発症する。本実験では、*KK-A<sup>y</sup>* マウスに対する正常対照として *C57BL/6J* マウスを用い、高血糖や肥満の状態を比較しながらカリエンタノール抽出物 (CE) の摂取効果を検討した。

*KK-A<sup>y</sup>* マウスは過食を呈する特徴があるが、Table 2-2 に示した正常マウスと糖尿病マウスの摂食量に差はなかった。しかし、Table 2-5 に示した糞の乾燥重量が明らかに糖尿病群で増加していたことから、実際には糖尿病マウスの方が正常マウスより2倍以上多く摂食していたと考えられる。(飼育時の観察では、*C57BL/6J* マウスの餌鉢の外への食べこぼしも多かった。) また、CE は糖を含み芳香性があり、酸味と渋みの呈味を有する抽出物であったものの、*KK-A<sup>y</sup>* マウスの摂食量に影響を及ぼすことはなかった。

解剖時において、体重および脂肪組織重量、血糖値、インスリンのいずれも C より DC および DCE で増加していたことから、*KK-A<sup>y</sup>* マウスは明らかに肥満と高血糖を呈する 2型糖尿病を発症していた。また、*KK-A<sup>y</sup>* マウスは脂肪組織への脂肪蓄積が亢進していたため、脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンが血中で減少していた。Sancheti らは、カリンの抽出物の糖尿病抑制効果を示した[66,67]。Montagut らは、肥満誘導したラットにおいてブドウ種子プロシアニジンが、インスリン抵抗性を改善することで高インスリン血症を改善したと報告している[48]。その他に、シャルドネ種のブドウ種子プロシアニジンには、高脂肪食を与え肥満を誘導したハムスターの血中アディポネクチンを増加させるという報告がある[72]。しかし、プロシアニジンを含む CE の摂取では、高血糖、高インスリン血症、血中アディポネクチンの減少は改善されなかった。一方、解剖時の体重および脂肪組織重量は、DC と比べて DCE で減少する傾向を示した。これと同様の傾向が、CE に含まれる低分子量プロシアニジンの摂取時においても確認されていたことから、CE 中のプロシアニジン成分による弱い肥満抑制作用が示唆された。

正常マウスと比較して高脂肪食を摂取した *KK-A<sup>y</sup>* マウスでは、肝臓重量および肝

中脂質の増加と併せて血清脂質の増加が見られたが、CEの摂取による抑制効果は認められなかった。糞中に含まれる脂質も、CEの摂取によって変化することはなかった。つまり、CEは脂質の吸収や代謝に影響を与える能力を有していなかった。

今回のカリンエタノール抽出物(CE)の摂取は、2型糖尿病モデルあるKK-A<sup>y</sup>マウスに対して有益な作用を見せなかった。これには、CEに含まれる糖が大きく影響したことが予想された。CEに含有される糖の種類については主に果糖であると考えられるが、補足実験でグルコース測定キット(グルコースCII-テストワコー、和光純薬株式会社)を用いてCE中のグルコースを測定したところ、8mM前後のグルコースが検出された。果糖やグルコースといったCE中の糖類が、カリンプロシアニジンの有する抗糖尿病作用を打ち消していた可能性が大きい。具体的には、CE由来の糖が増えたことによる生体への糖吸収の増加や、糖がポリフェノールの吸収を阻害するなどの現象などが予測されるが、詳細を知るためにはさらなる検討が必要である。また、カリンを用いた過去の報告[66,67]において、エタノール抽出物の酢酸エチル画分やメタノール抽出物を用いていたのは、糖の影響を取り除く目的があったと考えられた。

以上のことから、カリンエタノール抽出物そのものには糖尿病に対する効果はなく、含有される糖成分を除去することで、抗糖尿病作用が発揮されると考えられた。

## 第3章 カリンポリフェノールの成分分析

### 第1節 目的

カリンが一般的に浸漬酒として利用されている背景から、第2章ではエタノール抽出物(CE)を2型糖尿病マウスに与えたが、有益な作用は認められなかった。これはCEに含まれる糖が悪影響を及ぼしたことが原因と考えられた。しかし、カリンに含まれるポリフェノール成分には過去の報告[66,67]から抗糖尿病作用が期待できるため、CEから糖を除去したカリンポリフェノール(CP)の使用を考えた。また、カリンに含まれるポリフェノールは、他のポリフェノールと糖尿病に対する作用を比較した前例はない。そこで、最終的には2型糖尿病モデル動物での作用比較を行うことを視野に入れ、CPのほかに緑茶抽出物およびライチ由来低分子化プロシアニジン本章以降で試料として用いることにした。

カリンアセトン抽出物のポリフェノールには、カテキンを基本骨格とするプロシアニジンのオリゴマーまたはポリマーが主成分で、その他にカテキンやエピカテキン、ヒドロキシ桂皮酸も含まれている[73]。本研究で用いたCPに含まれる成分も、プロシアニジンが主成分であることが想定される。緑茶抽出物は、代表的なポリフェノール含有物として多くの製品が市場に展開されており、主成分がエピガロカテキンガレート(EGCG)で、抗肥満作用や抗糖尿病作用の複数の研究結果が示されている[44,60]。ライチ由来のプロシアニジンを低分子化处理したオリゴノール®は、ヒトでの内臓肥満緩和効果[74]、抗酸化作用と脂質代謝改善作用による糖尿病誘導腎臓傷害および肝臓傷害の改善[75,76]が報告されている。これらに加え、緑茶抽出物は基本骨格がカテキンでモノマーのみを含有する点、ライチ低分子化プロシアニジンは由来の異なるプロシアニジンを含有する点で、それぞれCPとの比較が有用であると考えた。

以上のことを受け、本研究で調製したCPに含まれるポリフェノールの総量、プロシアニジンの重合度やポリエチレングリコール(PEG)カラムでの分離について、緑茶抽出物およびライチ低分子化プロシアニジンと比較した。



## 第2節 方法

## 1. 研究試料とカリンポリフェノールの調製

本章以降、試料として以下の3種類のポリフェノール試料を用いた。

- ・カリンポリフェノール (CP)
- ・緑茶抽出物 (GE)

サンフェノン BG-3 (太陽化学株式会社 ; 三重) を使用した。

(組成) 48.8% epigallocatechin gallate, 17.8% epigallocatechin, 7.6% epicatechin, 7.6% epicatechin gallate, 4.0% gallocatechin, 1.8% catechin, 1.5% gallocatechin gallate, 1.4% gallic acid (メーカー添付資料に記載)

- ・ライチ由来低分子化プロシアニジン (OL)

オリゴノール (アミノアップ化学 ; 北海道) を使用した。

(組成) 16.3% monomers (8.2% (+)-catechin and (-)-epicatechin; 2.1% epicatechin gallate; 6% epigallocatechin gallate), 13.8% dimers (5% procyanidin A2; 4.1% procyanidin A1; 3.1% procyanidin B2; 1.6% other dimers), 3.8% trimers and 58.6% larger procyanidins [77]

## &lt;カリンポリフェノール (CP) の調製方法&gt;

カリン抽出物 (CE) に含まれる糖類除去のため、Sephadex LH-20 (GE Healthcare ; USA) を用いたバッチ法を採用した。CE は、第2章 - 第2節 - 1 - (1) に記載の通り調製した。なお、生カリン 1 g からのポリフェノールの抽出量は、gallic acid 当量で 3.96 mg であった。

膨潤させた Sephadex LH-20 を 400 mL、ビーカーに入れ、CE 50 mL を加えて 15 分毎にガラス棒で攪拌しながら 1 時間吸着させた。その後、Sephadex LH-20 レジンは濾過し、2.5 L の純水で洗浄した。レジンに吸着したポリフェノールは、70% (v/v) アセトン 400 mL を加えて攪拌し、溶出させた。溶出の操作は 3 回行い、計 1.2 L の溶出液を得た。溶出液はロータリーエバポレーター (EYELA TypeN-N、東京理化工器

械株式会社；東京）により濃縮した。濃縮物を水で溶解し、冷凍庫で凍結した後、凍結乾燥機にかけ粉末化した。この粉末をカリンポリフェノール（CP）とし、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 2. Folin-Denis 法による総ポリフェノール量の測定

第2章 - 第2節 - 1 - (2) と同様に行った。

## 3. Dimethylaminocinnamaldehyde (DMAC) 法によるプロシアニジンの定量 [78,79]

DMAC 法は、カテキン分子が重合したプロシアニジンの末端 flavan-3-ol 骨格に特異的に反応して青緑色（吸収波長 640 nm）に発色することを利用したプロシアニジンの定量方法である。この方法を用いて、試料中のプロシアニジン量を定量した。

### 【試薬】

#### ・アッセイ溶液 A

エタノール、メタノール、2-プロパノールを体積比 90 : 5 : 5 で混合した。

#### ・アッセイ溶液 B

アッセイ溶液 A と水を体積比 95 : 5 で混合した。

#### ・DMAC 溶液

アッセイ溶液 A 27 mL に塩酸 3 mL を加え、冷蔵庫内にて 15 分間静置した。この溶液に、4-Dimethylaminocinnamaldehyde（東京化成工業株式会社；東京）30 mg を秤量して溶解した。使用するまで  $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### ・(+)-カテキン標準溶液

D-(+)-カテキン水和物（ナカライテスク株式会社；京都）11.3 mg を精秤し、アッセイ溶液 B でメスフラスコを用いて 25 mL にフィルアップした。これを標準原液とした。

## 【標準液のカテキン濃度の求め方】

標準原液をメタノールで10倍希釈し、波長280 nmにおける吸光度を分光光度計（UV-1200、島津製作所；京都）で測定した。この吸光度をもとに、標準原液の(+)-カテキン濃度を下記の式に従って求めた。

$$C = \frac{A_{std} \times MW \times 10^4}{\epsilon \times l}$$

$C$ : (+)-カテキン標準原液の濃度 (mg/L)

$MW=290.27$ : (+)-カテキンの分子量 (g/mol)

$A_{std}$ : 希釈した標準液の280 nmにおける吸光度

$\epsilon$ : メタノール中での(+)-カテキンのモル吸光係数 (L/mol·cm)

$l$ : 光路長 (1 cm)

希釈した標準液2本の $A_{std}$ は、0.578、0.599であった。上記計算式に代入して求めた標準原液の(+)-カテキン濃度の平均は428.34 mg/Lであった。

## 【操作】

試料中の水分含量が測定結果に影響するため、試料の水分濃度が5% (w/w) となるようアッセイ溶液AまたはBで調製する必要がある。そのため、CP、GE、OLは10 mgを精秤し、アッセイ液B 1 mLで溶解した。(+)カテキン標準溶液は原液をアッセイ溶液Bで20倍希釈し、これを3/4、1/2、1/4、1/8、1/16の濃度に希釈した。

透明96穴マイクロプレート（マイクロタイタープレート平底、Greiner；ドイツ）に試料溶液または希釈した(+)-カテキン標準溶液40  $\mu$ L分注し、ブランクにはアッセイ溶液Bを40  $\mu$ L分注した。そこへDMAC溶液を200  $\mu$ L添加し、ピペッティングにより攪拌した。プレートフィルムを貼り、マイクロプレートリーダー（Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN HT、DSファーマバイオメディカル株式会社；大阪）を用いて30°Cで波長640 nmにおける吸光度を30秒毎に10分間測定し、プロシアニジン量の算出には測定中の最大吸光度値を用いた。(+)カテキン標準溶液の吸光度をもとに検量線を作成し、プロシアニジン量は(+)-カテキン当量で表した。

## 4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による成分分析

## (1) ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) カラムによる HPLC 分析 [80]

ポリフェノール性水酸基が GPC 担体に親和性を示し、本来の保持時間が遅れるため、試料中のポリフェノール性水酸基をアセチル基に置換するアセチル誘導体化の前処理を施し、分析を行った。

## &lt;試料のアセチル誘導体化処理&gt;

## 【試薬】

- ・ピリジン
- ・無水酢酸
- ・酢酸エチル
- ・飽和食塩水

室温の水 50 ml に NaCl を 20 g 加えてよく攪拌し、静置した上清を用いた。

- ・テトラヒドロフラン (THF) (高速液体クロマトグラフ用、和光純薬；大阪)

## 【標準物質】

- ・Polystyrene Standard, for GPC 13000 (PS-13 k) (Sigma-Aldrich ; USA)
- ・Polystyrene Standard, for GPC 4000 (PS-4 k) (Sigma-Aldrich)
- ・Polystyrene Standard, for GPC 2500 (PS-2.5 k) (Sigma-Aldrich)
- ・Polystyrene Standard, for GPC 800 (PS-800) (Sigma-Aldrich)
- ・(+)-カテキン (CA) (クリタ高純度試薬、クリタ分析センター株式会社；茨城)
- ・エピガロカテキンガレート (EGCG) (三井農林株式会社；東京)

## 【操作手順】

各ポリフェノール試料 0.5 mg を蓋付き試験管に秤量し、ピリジン 1 mL と無水酢酸 1 mL を添加した。試験管の蓋をしてよく攪拌し、室温で一晩静置して反応させた。反応後、水と酢酸エチルを 3 mL ずつ加えてよく攪拌し、4°C、3,550×g で 1 分間遠

心して上層の酢酸エチル層を別の蓋付き試験管に移した。移した上層に水を 3 mL 加えてよく攪拌し、遠心分離後に上層を別の蓋付き試験管に移した。この操作をさらに 2 回繰り返した。得られた酢酸エチル層に飽和食塩水 3 mL を加えてよく攪拌し、4°C、3,550×g で 1 分間遠心して上層の酢酸エチル層を別の蓋付き試験管に移した。この操作を計 3 回繰り返し、最終的に得られた酢酸エチル層をロータリーエバポレーターにより溶媒を飛ばし、さらにデシケーターで一晩乾固させた。乾固させたサンプルを 1 mL の THF に溶解し、フィルター (Millex-LH 0.45 μm、4 mm、Merck Millipore ; USA) で濾過して、GPC 分析用サンプルとした。ブランクは、ポリフェノール試料を入れない試験管で誘導体化処理を施した。CA と EGCG はサンプル同様、アセチル誘導体化処理を行った。

#### <HPLC 分析>

標準物質のポリスチレンスタンダード PS-13 k、PS-4 k、PS-2.5 k、PS-800 をそれぞれ 1 mg 程度秤量し、濃度が 5 mg/mL となるように THF に溶解した。HPLC の分析条件は Table 3-1 に示した。

**Table 3-1** HPLC 分析条件

ポンプ	LC-10AT VP (株式会社島津製作所 ; 京都)
流速	1 mL/min
カラム	TSKgel Multipore H <sub>XL</sub> -M 5 μm 300 mm×7.8 mm (東ソー株式会社 ; 東京)
カラム温度	40°C (CTO-20 A、株式会社島津製作所)
移動相	THF (高速液体クロマトグラフ用、和光純薬)
検出器	SPD - 10A <sub>VP</sub> (株式会社島津製作所)
検出	254 nm
Inject volume	5 μL
データ処理	Lab Solution (株式会社島津製作所)

## (2) ポリエチレングリコール (PEG) カラムによる HPLC 分析 [81]

## 【移動相】

- ・ A 液 (0.1%ギ酸 - メタノール)

ギ酸 500  $\mu\text{L}$  をメタノール (高速液体クロマトグラフ用) に 500 mL に添加した。

- ・ B 液 (0.1%ギ酸水溶液)

ギ酸 500  $\mu\text{L}$  を超純水 (PURELAB Ultra、ELGA 社) 500 mL に添加した。

## 【標準物質】

- ・ エピガロカテキンガレート (EGCG) (三井農林株式会社 ; 東京)

濃度が 0.1 mg/mL となるようにメタノールで溶解した。

## 【分析用サンプルの調製】

CP、GE、OL は、それぞれ 0.5 mg マイクロチューブに秤量し、メタノールで溶解し、フィルター (Millex-LH 0.45  $\mu\text{m}$ 、4 mm) でろ過して HPLC 分析用サンプルとした。HPLC の分析条件は、Table 3-2 に示した。

Table 3-2 HPLC 分析条件

ポンプ	LC-10AT VP (株式会社島津製作所 ; 京都)
流速	1 mL/min
カラム	Discovery HS PEG 250 mm $\times$ 4.6 mm、5 $\mu\text{m}$ (Sigma-Aldrich ; USA)
カラム温度	40°C (CTO-20 A、株式会社島津製作所)
移動相	40% B 液
検出器	SPD - 10A <sub>VP</sub> (株式会社島津製作所)
検出	280 nm, 350 nm
Inject volume	5 $\mu\text{L}$
データ処理	Lab Solutions (株式会社島津製作所)

## 第3節 結果

## 1. 試料のポリフェノール含量とプロシアニジン含量

Folin-Denis 法により測定した乾燥粉末 1 g 当たりの総ポリフェノール量は、CP では没食子酸当量で  $0.357 \pm 0.017$  g であった。それに対し、GE では没食子酸当量で  $1.175 \pm 0.037$  g と CP の 3.3 倍となり、OL では没食子酸当量で  $0.983 \pm 0.022$  g と CP の 2.7 倍であった。(Fig. 3-1-A)

DMAC 法により測定した乾燥粉末 1 g 当たりのプロシアニジン量は、CP ではカテキン当量で  $0.114 \pm 0.005$  g であった。それに対し、GE ではカテキン当量で  $0.669 \pm 0.049$  g という CP の約 6 倍ものプロシアニジン量を含有しており、OL では  $0.258 \pm 0.015$  g と CP の約 2 倍であった。(Fig. 3-1-B)

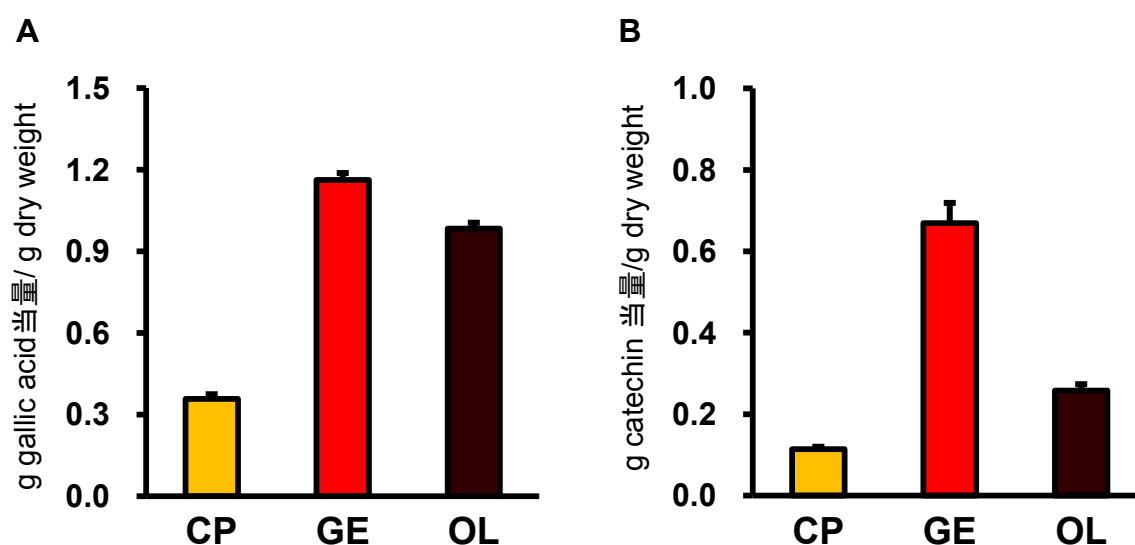


Fig. 3-1 カリンポリフェノール (CP) および緑茶抽出物 (GE)、ライチ低分子化プロシアニジン (OL) の乾燥粉末 1 g に含まれる総ポリフェノール量 (A) とプロシアニジン量 (B).

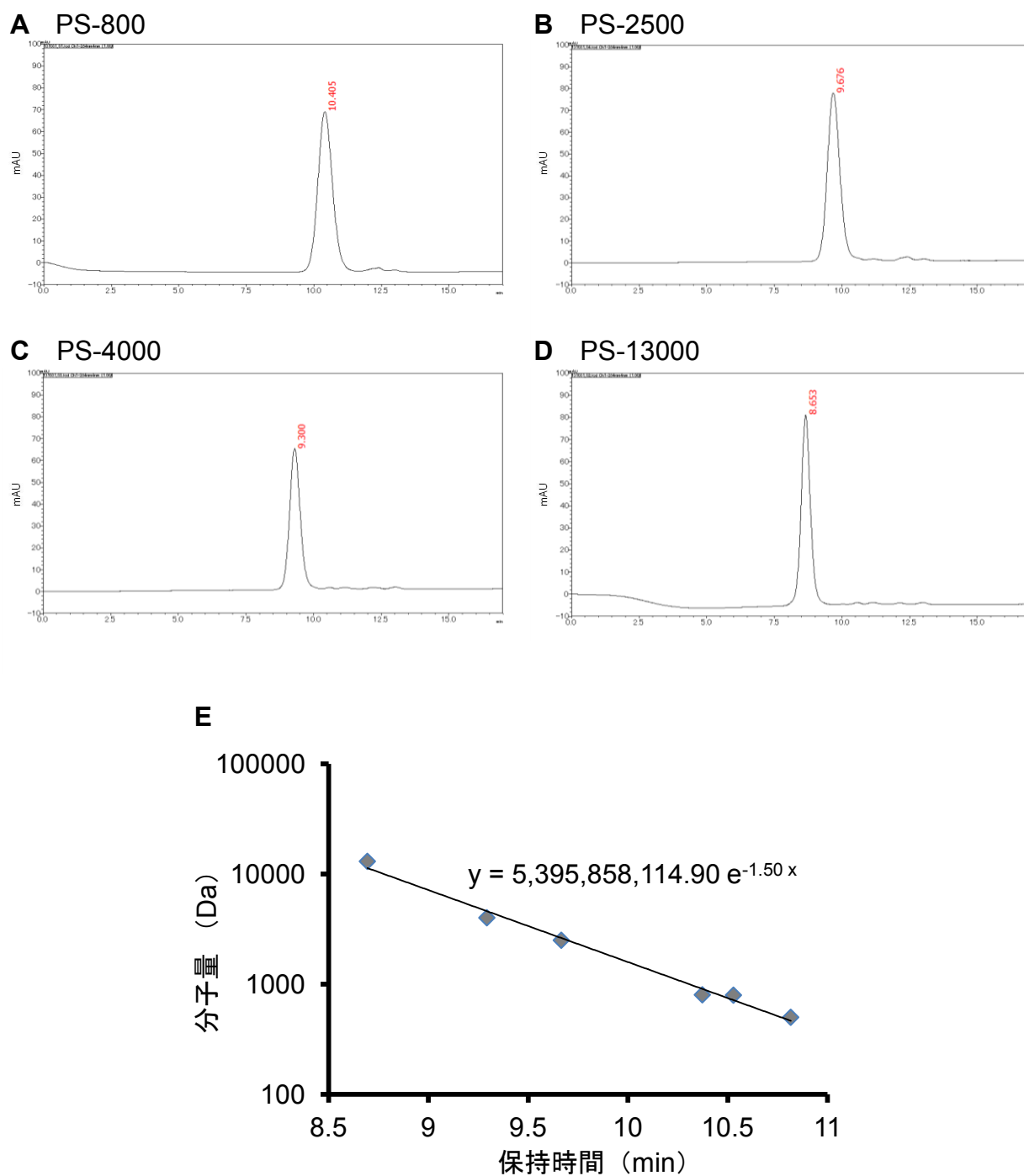
## 2. GPC カラムを用いた成分分析

GPC カラムにインジェクトしたポリスチレンスタンダード PS-13000、PS-4000、PS-2500、PS-800 のピークは、8.65 min から 10.41 min の間に検出された (Fig.3-2-A、B,C,D)。カテキンおよび EGCG の-OH 基が全てアセチル化された場合の推定分子量はそれぞれ 500、795 となり、保持時間はそれぞれ 10.82 min、10.53 min であった。以上の結果より、対数表示にした縦軸に分子量をとり、横軸に保持時間をとった検量線を作成した (Fig. 3-2-E)。この検量線の最も早い保持時間 (8.65 min) から最も遅い保持時間 (10.82 min) までの範囲を定量範囲とした。

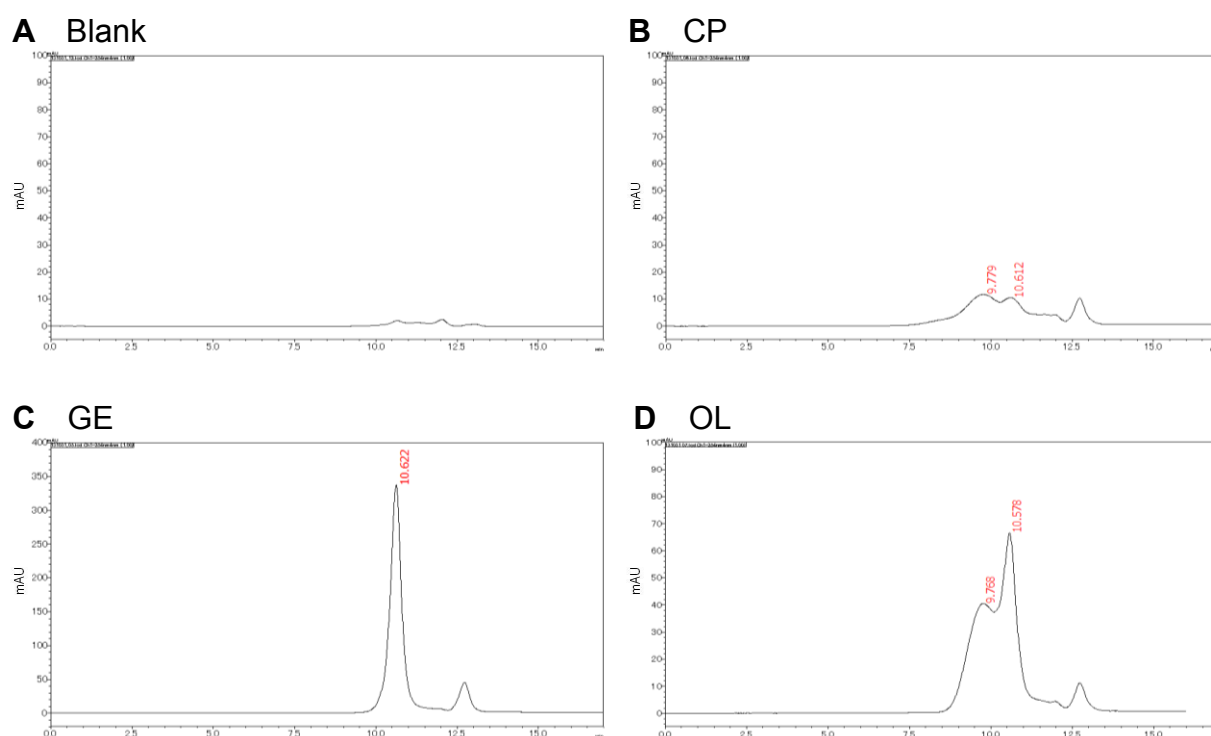
カリンポリフェノール (CP)、緑茶抽出物 (GE) およびライチ低分子化プロシアニジン (OL) のクロマトグラムを Fig. 3-3-B, C, D に示した。CP はピークが 2 つ検出され、保持時間は 9.78 min と 10.61 min であった。これに対し、GE では検出されたピークは 1 つで、保持時間は 10.62 min であった。OL はピークが 2 つ検出され、保持時間は 9.77 min と 10.58 min であった。なお、いずれのポリフェノール試料のクロマトグラムにも 12.7 min に検出されたピークは、定量範囲外であるために除外した。

以上の CP、GE および OL の GPC カラム分析において検出されたピークの保持時間 ( $x$  min) を Fig. 3-2-E に示した検量線の式に代入することにより、ピーク成分の平均分子量 ( $y$ ) を求めた。また、ピーク含有成分がカテキン分子のみで構成されていると仮定した時の平均重合度 (mean degree of polymerization : mDP) を、平均分子量をアセチル誘導体化カテキンの分子量 500 で割ることにより求めた。CP 含有成分の平均分子量は 2299 および 659、mDP は 4.6 および 1.3 となったのに対し、GE 含有成分の平均分子量は 649、mDP は 1.3 となり、OL 含有成分の平均分子量は 2338 および 694、mDP は 4.7 および 1.4 となった。(Table 3-3)





**Fig. 3-2** ポリスチレンスタンダード PS-800 (A), PS-2500 (B), PS-4000 (C), PS-13000 (D) のクロマトグラム (検出波長は 254 nm). GPC カラムを通した各スタンダードの分子量と保持時間を基に作成した検量線 (E). アセチル誘導体化 EGCG は推定分子量 795、アセチル誘導体化カテキンは推定分子量 500.



**Fig. 3-3** GPC カラムを通したブランク (A)、カリンポリフェノール (CP) (B)、緑茶抽出物 (GE) (C)、ライチ低分子化プロシアニジン (OL) (C) のクロマトグラム (検出波長は 254 nm).

**Table 3-3** GPC カラム分析において CP、GE および OL のクロマトグラムに検出されたピークの保持時間、および保持時間より算出した平均分子量と平均重合度 (mDP)

	保持時間 (min)	平均分子量	平均重合度 (mDP)
<b>CP</b>	9.78	2299	4.6
	10.61	659	1.3
<b>GE</b>	10.62	649	1.3
<b>OL</b>	9.77	2338	4.7
	10.58	694	1.4

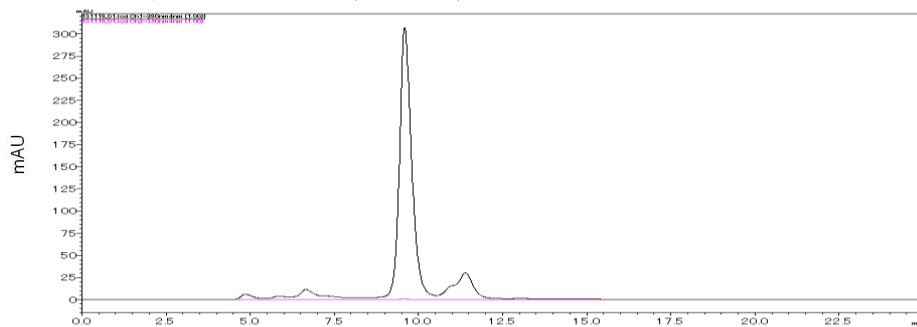
### 3. ポリエチレングリコール (PEG) カラムによる HPLC 分析

PEG カラムは、フェノール性水酸基と特異的な親和性を示すことから、ポリフェノールの -OH 基の数に応じた分離が可能であるという特徴を持つ。これにより、本章で用いた各種ポリフェノール試料に含まれる成分の差異を調べることにした。PEG カラムにより分離した EGCG、CP、GE、OL のクロマトグラムを Fig. 3-3 に示した。ちなみに、黒い線がカテキン骨格を検出する波長 280 nm で、赤い線がフラボノイド骨格を検出する 350 nm で検出したクロマトグラムとなっている。

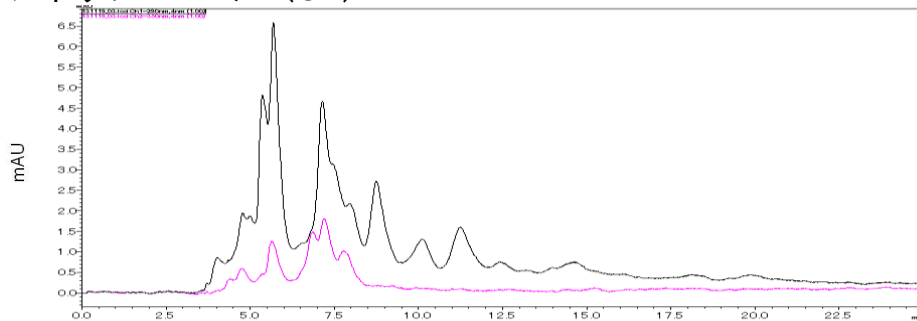
EGCG のピーク検出時間(9.56 min)に GE と OL のメインピークが検出されたが、CP には同じ時間にピークは検出されなかった。CP と OL の 7~9 min のクロマトグラムを比較すると検出波長 280 nm のピークはどちらも複数存在するが、それらのピークは CP では波長 350 nm においても吸収があったのに対し、OL では波長 350 nm における吸収はなかった。

Fig. 3-3 に示した他に (+)-カテキン、エピカテキン、プロシアニジン B1、プロシアニジン B2 を同条件で PEG カラムにより分離したが、いずれも、5.5 min 付近にピークが検出され、混合物のピーク分離は困難だった (data not shown)。PEG カラムの特徴である -OH 基の数に応じた分離が可能であるが、分離条件の参考にした文献 [81] では 3 量体以上のプロシアニジンの分離が成功していたことから、本章で実施した PEG カラム分析の条件は、カテキンモノマーやプロシアニジンダイマー (プロシアニジン B1 や B2 など) の分離には適さないことが分かった。カテキンモノマーおよびプロシアニジンダイマーは、ODS カラムによる分離が適しており、その結果は第 6 章-第 3 節-3 の Fig. 6-3 に示した。

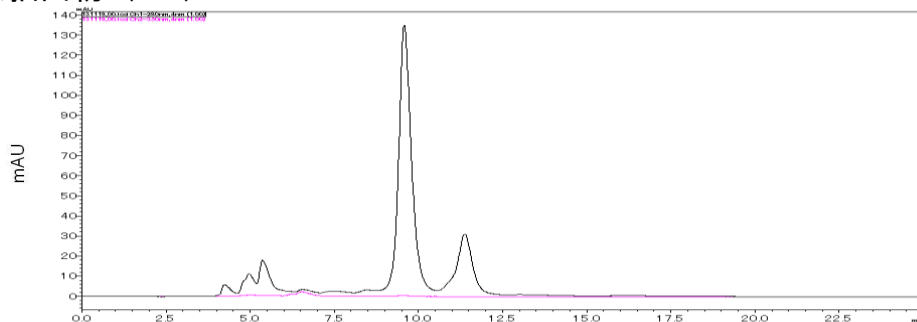
## A エピガロカテキングレート (EGCG)



## B カリンポリフェノール (CP)



## C 緑茶抽出物 (GE)



## D ライチ低分子化プロシアニジン (OL)

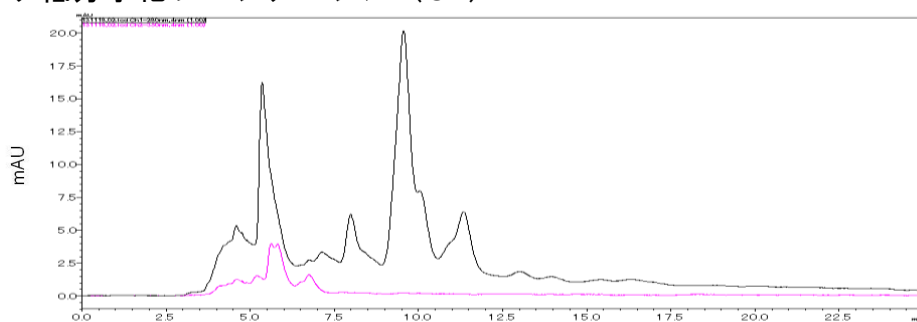


Fig. 3-3 PEG カラムにより分離したエピガロカテキングレート (EGCG) カリンポリフェノール (CP)、緑茶抽出物 (GE)、ライチ低分子化プロシアニジン (OL) のクロマトグラム. 検出波長は 280 nm (黒線)、350 nm (赤線).

## 第4節 考察

本章では、カリンポリフェノール (CP) の成分を緑茶抽出物 (GE) およびライチ由来低分子化プロシアニジン (OL) の成分と比較することを目的とし、総ポリフェノールおよびプロシアニジン量の定量、ゲル濾過カラム分析、PEG カラム分析を行った。

Folin-Denis 法により粉末 1 g あたりの総ポリフェノール量を測定すると、CP は GE や OL と比べて 3~4 分の 1 のポリフェノールしか含有していなかった。この原因として、GE や OL は精製されている製品を使用したのに対し、本章で使用した CP は、糖を除くことを目的として Sephadex LH-20 でバッチ法により粗精製したものであることから、夾雑物が含有されており相対的にポリフェノール含量が低くなったことが考えられた。また、Folin-Denis 法はフェノール性水酸基によりフェノール試薬中の金属イオンが還元されることで発色しているが、CP 中に発色を阻害する物質が存在する可能性、あるいは CP に含まれるプロシアニジン中のフェノール性水酸基が還元能を示さない部分がある可能性も推測された。

プロシアニジン量を測定したところ、CP は、OL の約 1/2 量、GE の 1/6 量と、総ポリフェノール量と同じように 3 種の試料のうち最も少なかった。測定に用いた DMAC 法は、プロシアニジンの末端の flavan-3-ol 骨格のみに特異的に反応して発色する原理[79]であるため、試料中の flavan-3-ol 骨格を有するカテキンモノマーやプロシアニジンの分子数を反映していると考えられる。また、含有成分の平均分子量が大きいほど、質量単位 (1 g) あたりの分子数は少なくなる。さらには、ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) で検出されたピークから、CP と OL はともに平均重合度 (mDP) が 4.6 程度の高分子量のプロシアニジン成分を含有していることが示唆された (Table 3-3)。これらのことから、DMAC 法で検出した CP や OL のプロシアニジン量が GE と比較して少なかったのは、高重合度のプロシアニジンを多く含んでいることから、粉末重量あたりの分子数がモノマーのみで構成されている GE よりも少なかったためと推測された。前出の通り、製品である GE や OL と比べると、CP のポリフェノール純度が低いことが影響している可能性も十分に考えられた。

GPCの分析により、CP、GE、OLに共通してmDPが1.3~1.4の成分の存在が示され、これはカテキンモノマーやそれらの配糖体、あるいはCPやOLではプロシアニジンダイマーを含んでいることが想定された。さらに、CPとOLではmDPが4.6程度のプロシアニジン成分が共通して検出され、GPCによる平均重合度を比較することでCPとOLの違いを確認することは出来なかった。

PEGカラムを用いて分離したCPのクロマトグラム (Fig. 3-3-B) には、標準物質として用いたEGCGと同じ時間にピークは検出されず、他のエピカテキンやプロシアニジン B2などは分離が困難であったため、CP中成分の詳細に関して情報は得られなかった。また、EGCGのピーク検出時間 (9.56 min) にOLのメインピークが検出されたが、オリゴノール中に含まれるEGCGは6%と記した報告[77]があることから、分離しきれていない成分が重複している可能性も考えられた。以上のことから、PEGカラムの分析はメタノール濃度を下げるなど、分離条件の再検討が必要と判断された。しかしながら、CPおよびOLのクロマトグラム (Fig.3-3-BおよびD) を比較すると、ピークの溶出時間、数、ピーク高の大小が異なることから、2者は組成が異なると推測できた。

本章における成分の比較によって、糖の除去を目的として調製したCPは、精製度が不十分であったこともあり、GEやOLと比べるとポリフェノールの含有率は低いことが分かった。そして、CPには低分子量から高分子量のプロシアニジンが含有されていることが示され、カテキンモノマーで構成されるGEと異なることはもちろんのこと、プロシアニジンを含むOLとも組成が異なることがPEGカラム分析の結果により示唆された。

## 第4章 カリンポリフェノールの抗酸化活性と抗グリケーション活性

### 第5節 目的

カリンに含まれるポリフェノールは抗酸化活性を有している。また、動物が摂取した時に認められる抗糖尿病作用[67]、消化管内での抗潰瘍作用[64]、インフルエンザ吸着阻害作用[73]などと、抗酸化活性との関連性が示唆されている。第2章で用いたカリン抽出物(CE)も、筆者の先行研究において *in vitro* での抗酸化活性が示されており、第3章より使用したカリンポリフェノール(CP)もCEと同等の抗酸化活性があると考えられる。一方、緑茶抽出物(GE)はEGCGをはじめとしたカテキン類の抗酸化物質を含んでいることで有名であり[82]、ライチ低分子化プロシアニジン(OL)も抗酸化活性を有することが明らかとなっている[83]。

プロシアニジン[51]や緑茶抽出物[36]は、*in vitro* で抗AGE形成作用も発揮するため、それらの摂取によって糖尿病合併症リスクが低減されると期待できる。*in vitro* におけるグリケーションによって形成される最終糖化生成物(AGE)は、フルクトースと牛血清アルブミン(BSA)をインキュベーションすることでグルコースとBSAの組み合わせよりも効率的に形成される[84]。これを利用して、ポリフェノール試料をフルクトースとBSAの反応系に添加することにより、AGEの形成阻害作用を調べることができる。

第3章の成分分析により、CPに含まれるプロシアニジンはOLとは組成が異なることが示された。含有されるポリフェノールの種類が異なると、発揮される抗酸化活性や抗グリケーション活性に差異が生じると予想される。しかし、由来が異なるポリフェノールの抗酸化性や抗グリケーション活性を比較した研究は少ない。以上のことから、本章ではCPの抗酸化活性および抗グリケーション活性をGE、OLと比較することを目的とし、実験を行った。

## 第2節 方法

## 1. 抗酸化活性の評価

## (1) DPPH ラジカル消去活性 [85]

## 【試薬】

- ・ A 液 : 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Trizma base) (SIGMA-ALDRICH; USA)

1.21 g を 90 mL 程度の純水に溶かして、塩酸で pH 7.4 に調整し、それを純水で全量を 100 mL にした。

- ・ B 液 : 500  $\mu$ M DPPH エタノール溶液

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (和光純薬株式会社 ; 大阪) 10 mg をエタノールに溶かして 50 mL にした。

- ・ DPPH 混合液

A 液 40 mL と B 液 50 mL を混和し、DPPH 混合液を調製する。

## 【実験コントロール物質】

- ・ 12.5、25、50、75、100、150、200、300  $\mu$ g/mL gallic acid 溶液

没食子酸(Gallic acid)(ナカライテスク株式会社、京都) 1mg 程度を正確に秤量し、水に溶かして 10mL にした。

## 【操作手順】

CP、GE および OL は、ポリフェノール濃度が gallic acid 当量で 12.5、25、50、75、100、150、200、300  $\mu$ g/mL となるように水で 8 段階に希釈した。透明 96 穴マイクロプレート (マイクロタイタープレート平底、Greiner ; ドイツ) のウェルに水で希釈した各試料を 20  $\mu$ L 分注し、DPPH 混合液 180  $\mu$ L を添加した。各ウェルをピペティングで混和し、暗所室温で 20 分間インキュベーションした後、マイクロプレートリーダー (Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN HT、大日本住



友製薬株式会社；大阪）を用いて波長 517nm における吸光度を測定した。ブランクには水、実験コントロール物質として gallic acid 溶液を用いた。また、DPPH ラジカルを 50% 減少させるのに必要なポリフェノール濃度および試料重量濃度で表した IC<sub>50</sub> 値を用い、抗酸化活性を評価した。

## (2) H-ORAC 法 (Hydrophilic - oxygen radical absorbance capacity 法) [86]

### 【試薬】

- ・ 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を 5.225 g 秤量し、水で溶解し全量を 400 mL にした。また、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 1.0207 g 秤量し、水で溶解し全量を 100 mL にした。75 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液に 75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液を加え、pH 7.4 に調整した。

- ・ 31.7 mM AAPH 溶液

2,2'-azobis (2-methyl-propanimidamide) dihydrochloride (AAPH、一級、和光純薬株式会社；大阪) 86 mg を 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解して全量を 10 mL にした。

- ・ 110.7 nM Fluorescein (FL) 溶液

Fluorecein を 18.4 mg とり、75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 50 mL に溶解して 1.107 mM FL 溶液を調製した。これをさらに 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で 10,000 倍希釈して 1.107 nM FL 溶液とした。

### 【標準物質】

- ・ Trolox 溶液

Trolox (Calbiochem ; USA) を 10 mg 秤量し、75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 2 mL に溶解し、20 mM Trolox 溶液を調製した。

### 【操作手順】

CP、GE および OL は、ポリフェノール濃度が gallic acid 当量で 0.625、1.25、2.5、

5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で希釈して使用した。黒色 96 穴 (Nunc; USA) マイクロプレートの各ウェルに試料または標準物質を 20  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、さらに 110.7 nM FL 溶液を 115  $\mu\text{L}$  ずつ分注した後、予備加温しておいたマイクロプレートリーダー (Multi-Detection Microplate Reader POWERSCAN HT) に入れ、37°C で 10 分間反応させた。その後、31.7 mM AAPH 溶液を 50  $\mu\text{L}$  加え、プレートリーダーで励起波長 485 nm、蛍光波長 528 nm における蛍光強度を 90 分まで 2 分毎に測定した。ブランクには試料の代わりに 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を用い、標準物質には 6.25、12.5、25、50  $\mu\text{M}$  に希釈した Trolox 溶液を用いた。ちなみにプレートリーダーにおける温度ムラの影響を抑えるため、プレートの左右両端の 1 列ずつには 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を添加した。

#### <ORAC のデータ処理>

横軸を時間 (min)、縦軸を蛍光強度とし経時変化をプロットしたグラフを作成し、x 軸と y 軸および曲線に囲まれた面積 (Area Under Curve ; AUC) をブランクおよび試料毎に算出する。なお、AUC 値は 0~90 分に測定した蛍光強度の総和に 2 を掛けて求めることができる。各試料の AUC 値からブランクの AUC 値を引いた値が、net AUC 値 (Fig 4-1 の横縞で示した部分の面積) である。6.25、12.5、25、50  $\mu\text{M}$  Trolox 溶液の net AUC 値を縦軸に、Trolox 濃度を横軸にとり、検量線は 2 次近似の式を採用した。試料の各濃度における net AUC 値から試料のポリフェノール量あたりの Trolox 当量を求め、それらの平均値を試料の Trolox 当量とした。

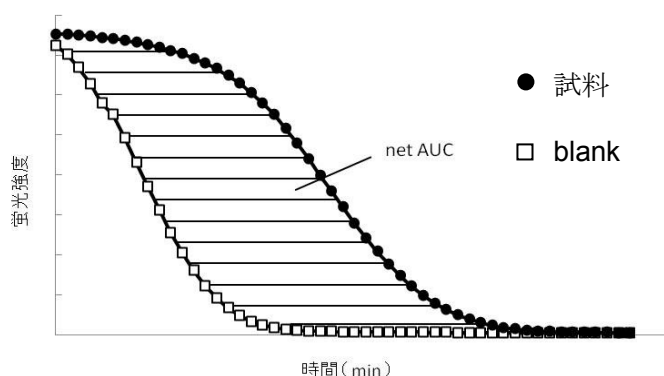


Fig. 4-1 蛍光強度の経時変化のプロットと net AUC [87]

## 2. 抗グリケーション活性の評価 [84,88]

## (1) BSA のグリケーション反応

## 【試薬】

- 222 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)

$K_2HPO_4$  を 3.866 g 秤量し、水で溶解し全量を 100 mL にした。また、 $KH_2PO_4$  を 0.755 g 秤量し、水で溶解して全量を 25 mL にした。 $K_2HPO_4$  溶液と  $KH_2PO_4$  溶液を 8 : 2 程度の比率で混合し、pH 7.4 に調製した。

- AGE 反応液

牛血清アルブミン (ALBUMIN,BOVINE,Fr.V、Sigma Chemical Co. ; USA) を 2 g、D-フルクトースを 9.008 g、それぞれ秤量して 222 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解して反応液を調製した。

- 100% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) 水溶液

TCA を 10 g 秤量し、水に溶解し全量を 10 mL とした。

- 10% (w/v) TCA 水溶液

100%TCA を水で 10 倍希釈した。

- 200mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)

222 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を水で 1.11 倍希釈した。

## 【標準物質】

- gallic acid (ナカライテスク株式会社 ; 京都)

## 【測定サンプル】

試料の濃度は水で溶解し、gallic acid 当量で 50、100、200、400  $\mu\text{g/mL}$  に調製して使用した。AGE 反応液中の濃度は、それぞれ gallic acid 当量で 5、10、20、40  $\mu\text{g/mL}$  であった。

## 【操作手順】

AGE 反応液をマイクロチューブに 900  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、測定サンプルを 100  $\mu\text{L}$  加えてよく混和し、37°C の恒温槽で 5 日間インキュベーションした。ポジティブコントロール(=AGE 形成が一切阻害されない)は、AGE 反応液 900  $\mu\text{L}$  に水 100  $\mu\text{L}$  を加えた。ネガティブコントロール(=AGE が形成されない)は、BSA 20 mg を 222 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 900  $\mu\text{L}$  に溶解し、水 100  $\mu\text{L}$  を加えた。標準物質の gallic acid は 50、100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように水を溶媒として調製し、測定サンプルと同様に AGE 反応液に加えて処理をした(終濃度は gallic acid は 5、10、20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。インキュベーション終了後、100% TCA 水溶液を 110  $\mu\text{L}$  加えてよく攪拌し、氷中に 1 時間静置した。4°C、3,550 $\times$ g で 10 分間遠心分離して上清を取り除き、沈殿に 10% TCA 水溶液 1 mL を加えてよく攪拌し、再度 4°C、3,550 $\times$ g で 10 分間遠心分離して上清を取り除いた。この操作を再度繰り返して得た沈殿を 200 mM リン酸カリウム緩衝液 1 mL に溶解して AGE 形成サンプルとした。

## (2) タンパク質濃度測定

タンパク質濃度の測定は、Lowry 法変法[89]により行った

## 【試薬】

・ A 液 (2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、0.4% (w/v) NaOH、0.16% (w/v) 酒石酸ナトリウム・2水和物、1% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液)

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  を 20 g、NaOH を 4 g、酒石酸ナトリウム・2水和物 1.86 g、SDS を 10 g、それぞれ秤量し、水に溶解して全量を 1 L とした。

・ B 液 (4% 硫酸銅五水和物水溶液)

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  を 4 g 秤量し、水に溶解して全量を 100 mL とした。

・ C 液 (A 液 : B 液 = 100 : 1)

・ D 液 (1N フェノール試薬)

フェノール試薬 (Folin-Ciocalteu 試薬、Wako ; 大阪) を水で 2 倍希釈した。

**【操作手順】**

試験管に水で 200 倍希釈した AGE 形成サンプル 0.5 mL を分注し、C 液 1.5 mL を加えてよく攪拌し、15 分間室温で反応させた。その後、D 液を 0.15 mL ずつ添加してよく混和した後、30 分間室温で反応させた。この溶液の波長 750 nm における吸光度を分光光度計を用いて測定した。標準タンパク質溶液に 0.1 mg/mL BSA を用いて標準曲線を作成し、サンプルのタンパク質濃度を求めた。

**(3) 蛍光検出による AGE の定量**

BSA とフルクトースのインキュベーションによりペントシジンなどの蛍光性を有する AGE が形成され、蛍光分光光度計を用いた検出が可能[19]である。これを利用して、各試料を添加した AGE 形成サンプルの蛍光強度を測定することで求めた。

**【操作手順】**

AGE 形成サンプルを、Lowry 法で求めたタンパク質濃度で 2 mg/mL となるように水を用いて希釈した。希釈した AGE 形成サンプルを蛍光分光光度計 (Spectrofluorophotometer RF-5300PC、株式会社島津製作所；京都) を用い、励起波長 350 nm、蛍光波長 425 nm で測定を行った。結果は、ポジティブコントロール (阻害物質なしで AGE 形成) を 100%、ネガティブコントロール (BSA のみのインキュベーションで AGE 形成なし) を 0% とした場合の AGE 形成率で表した。

## (4) Western blotting による AGE の定量

<電気泳動用試料の調製>

## 【試薬】

・2×Laemmli's Buffer (126 mM Tris-HCl (pH 6.8)、4% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、20% (w/v) グリセロール、2% (w/v) 2-メルカプトエタノール (2-ME)、ブロムフェノールブルー (BPB))

Tris (Trizma base、SIGMA-ALDRICH ; USA) 0.7625 g、SDS 2 g を秤量し、30 mL 程度の水に溶解して HCl で pH 6.8 に調整した。グリセロールを 10 g 添加し、さらに水で全量を 49mL にした。2-ME を 1 mL 添加して、BPB を適量加えて濃青色にした。

## 【操作手順】

AGE 形成サンプルを水でタンパク質濃度 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、さらに当量の 2×Laemmli's Buffer を加えて攪拌した後にブロックヒーターで 100°C、5 分間加熱して電気泳動用試料とした。

## &lt;SDS-PAGE&gt;

## 【試薬】

・A液：分離ゲル用緩衝液 (0.4% (w/v) SDS / 1.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8))

SDS を 2.0 g、Tris を 90.9 g を秤量し、水に溶解して pH 8.8 に調製し、全量を 500mL にした。

・B液：濃縮ゲル用緩衝液 (0.4% (w/v) SDS / 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8))

SDS を 2.0 g、Tris (Trizma base、Sigma Aldrich ; USA) を 30.3 g を秤量し、水に溶解して 1 M HCl で pH 6.8 に調製した後、全量を 500mL にした。

・C液：30%アクリルアミド混合液 (29% (w/v) アクリルアミド / 1% (w/v) *N,N*-メチレンビスアクリルアミド)

*N,N*-メチレンビスアクリルアミド 2 g、アクリルアミド 58 g を秤量し、水で溶解

して全量を 200 mL にした。

- ・濃縮ゲル溶液

B 液 50 mL と C 液 24 mL を混和し、水で全量を 200 mL にした。

- ・ *N,N,N,N*-テトラメチルエタン-1,2-ジアミン (TEMED)

- ・ 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム (APS)

APS を 0.1 g 秤量し、水を 1 mL 加えた。

- ・ 2 - プロパノール

- ・ 10×電気泳動用緩衝液

Trizma base (Sigma Aldrich ; USA) を 30.3 g、グリシンを 144.1 g、SDS を 10 g、それぞれ秤量して水で溶解して全量を 1 L にした。

- ・電気泳動用緩衝液

10×電気泳動用緩衝液を水で 10 倍に希釈した。

### 【操作手順】

ゲル板はメタノールで清拭してから組み立て、コームを差し込み、コーム下端から 1 cm のところに印を付けた。ゲル 1 枚あたり A 液 2 mL、C 液 2.67 mL、水 3.33 mL、10% APS 30  $\mu$ L、TEMED 10  $\mu$ L (10% 分離ゲルの組成) をビーカーに入れて混和し、印の高さまでピペットで静かに流し入れた。その上に 2-プロパノールを静かに重層し、室温で静置して重合させた。次に固まった分離ゲルに対し、水で 2-プロパノールを洗い流し、余分な水分を取り除いた。濃縮ゲルは、ゲル 1 枚あたり A 液 3 mL、10% APS 18  $\mu$ L、TEMED 12  $\mu$ L をビーカーに入れて混和して分離ゲルの上に重層し、コームを差し込み、室温で静置した。濃縮ゲルが重合したら、コーム、クリップ、シリコンパッキンを外し、ゲル板を泳動槽にセットした。泳動槽に電気泳動用緩衝液を注いだ後、ウェルを整え、電気泳動用サンプルを 5  $\mu$ L/well (タンパク質量 0.1  $\mu$ g/well) でアプライした。泳動槽を電源装置につなぎ、ゲル 1 枚あたり 20 mA の定電流で電気泳動を行った。

## &lt;Western blotting&gt;

## 【試薬】

## ・セミドライ式転写用緩衝液

Tris 1.5 g、グリシン 7.2 g、SDS 0.1 g を秤量し、水で溶解して全量を 500 mL にした。

## ・10×TBS

Tris 24.2 g、NaCl 80 g、EDTA-2Na 3.72 g を秤量し、水で溶解して塩酸で pH 7.6 に調整し、全量を 500 mL にした。

## ・TBS-T

ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノウラレート (Tween20) (化学用、和光純薬株式会社；大阪) を 1 g 秤量し、10×TBS 100 mL に加えて全量を 1 L にした。

## ・1%ブロッキング溶液

スキムミルク粉末を 1 g 秤量し、TBS-T 20 mL に溶解した。

## ・一次抗体溶液

Anti AGE (CML) Monoclonal Antibody (Clone No.6D12) (株式会社トランスジェニック；熊本) を TBS-T で 1000 倍希釈した。

## ・二次抗体溶液

抗マウス IgG-HRP (Anti- IgG (H+L), Mouse, Goat-Poly, HRP, SeraCare Life Sciences；USA) 2 μL を TBS-T で 10,000 倍希釈した。

## ・ECL 試薬 (ECL Western Blotting Detection Reagents、GE Healthcare；USA)

ECL 1 液 1 mL と ECL 2 液 1 mL を混和した。

## 【操作手順】

電気泳動終了後の分離ゲルを切り出し、セミドライ式転写用緩衝液に浸して 20 分以上振盪させた。ゲルの寸法に合わせて PVDF 膜 (Bio Trace™ PVDF 45 μm、PALL corporation；USA) を切り、メタノールで活性化後、水で洗浄し、セミドライ式転写緩衝液に浸して片面 10 分間ずつ振盪した。転写用濾紙 (No.526、ADVANTEC；東京) は PVDF 膜と同じ寸法で 4 枚切った。PVDF 膜とゲルの振盪が完了後、セミ



ドライ式電気泳動転写装置 (AE6675 型、Atto ; 東京) の+極にセミドライ式転写緩衝液に浸した転写用濾紙を 1 枚のせ、表面にガラス棒を転がし気泡を除いた。同じ要領で濾紙、PVDF 膜、ゲル、濾紙、濾紙の順に重ねた。余分な緩衝液はペーパーで拭き、リアルパワーBP-5 型 (バイオクラフト株式会社 ; 東京) を用いて PVDF 膜の面積 1 cm<sup>2</sup>あたり 1.5 mA の定電流で 1 時間転写を行った。転写終了後、PVDF 膜を TBS-T に入れ 5 分間振盪させ、5% ブロッキング溶液に移して 1 時間振盪させた。ブロッキング後、PVDF 膜を TBS-T で 2 回すすぎ、TBS-T で 5 分間×2 回振盪させながら洗浄した。洗浄後の膜は TBS-T をよく切り、4 mL 程度の一次抗体溶液とともに塩化ビニル樹脂製のフィルムでパッキングして室温で 1 時間振盪した。反応後、一次抗体溶液を除き、PVDF 膜は TBS-T で 2 回すすぎ、TBS-T で 5 分間×2 回振盪させながら洗浄した。その後、新たな TBS-T 20 mL に二次抗体を 2  $\mu$ L 添加して 1 時間振盪した。反応後、二次抗体溶液を捨て、PVDF 膜は TBS-T で 2 回すすいで 15 分間振盪し洗浄した。さらに 5 分×3 回の TBS-T による洗浄を行った後、膜の水気をよく切ってから ECL 試薬に片面 1 分間ずつ浸して両面を反応させた。反応終了後、PVDF 膜を塩化ビニル樹脂製のフィルムにパッキングして Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare ; USA) を用いて検出した。

#### <バンドの定量>

Image Quant LAS 4000 で検出されたバンドの検出および定量は、Image J (National Institutes of Health ; USA) を用いて行った。結果は、蛍光による検出の時と同様にポジティブコントロールを 100%、ネガティブコントロールを 0%とした場合の AGE 形成率で表した。

## 第3節 結果

## 1. 抗酸化活性の評価

## (1) DPPH ラジカル消去活性

DPPH ラジカル消去活性  $IC_{50}$  値は、ポリフェノール濃度と粉末重量濃度の2通りで表した (Table 4-1)。実験コントロールに使用した gallic acid の  $IC_{50}$  値は、54  $\mu\text{g/mL}$  となり、過去の DPPH ラジカル消去活性を測定した実験とほぼ同値で実験系が安定していることが確認できた。ポリフェノール濃度で表した  $IC_{50}$  値は、CP で 141  $\mu\text{g/mL}$ 、GE で 110  $\mu\text{g/mL}$ 、OL で 134  $\mu\text{g/mL}$  となり、GE が CP や OL と比べると低い値を示した。ポリフェノール試料の粉末重量濃度に換算すると  $IC_{50}$  値は、CP で 395  $\mu\text{g/mL}$ 、GE で 94  $\mu\text{g/mL}$ 、OL で 136  $\mu\text{g/mL}$  となり、CP のポリフェノール含有量の少なさが影響していた。

Table 4-1 DPPH ラジカル消去活性の  $IC_{50}$  値

$IC_{50}$ 値 ( $\mu\text{g/mL}$ )	GA	CP	GE	OL
ポリフェノール濃度	54	141	110	134
粉末重量濃度	54	395	94	136

各略号は以下の通り。

GA : gallic acid

CP : カリンポリフェノール

GE : 緑茶抽出物

OL: : ライチ低分子化プロシアニジン

## (2) H-ORAC

総ポリフェノール量あたり (gallic acid 当量として 1 g あたり) の H-ORAC 値は、CP で 8.52 mmol Trolox equivalent (TE)、GE で 7.89 mmol TE となり、OL では CP や GE よりもやや高い 11.09 mmol TE となった (Fig. 4-1-A)。

試料の粉末重量あたりの H-ORAC 値は、CP はポリフェノール含量が低いことが影響して 3.04 mmol TE/g となり、GE で 9.27 mmol TE/g、OL では 10.91 mmol TE/g となった (Fig. 4-1-B)。

以上をまとめると、H-ORAC 値は、総ポリフェノール量あたりでは CP および GE と比べると OL の方が 2 割ほど大きかったが、粉末重量あたりでは CP よりも GE および OL で 3 倍以上大きかった。

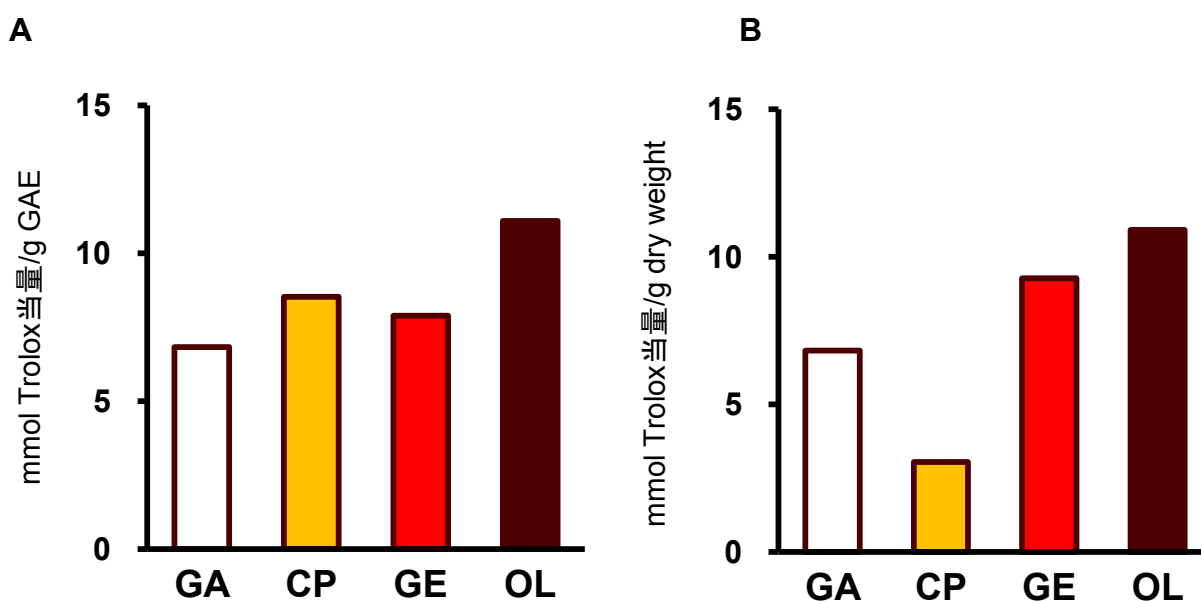


Fig. 4-1 H-ORAC 法により求めた gallic acid 当量 (GAE) として 1 g あたりの H-ORAC 値 (A) および粉末重量 1 g あたりの H-ORAC 値 (B)

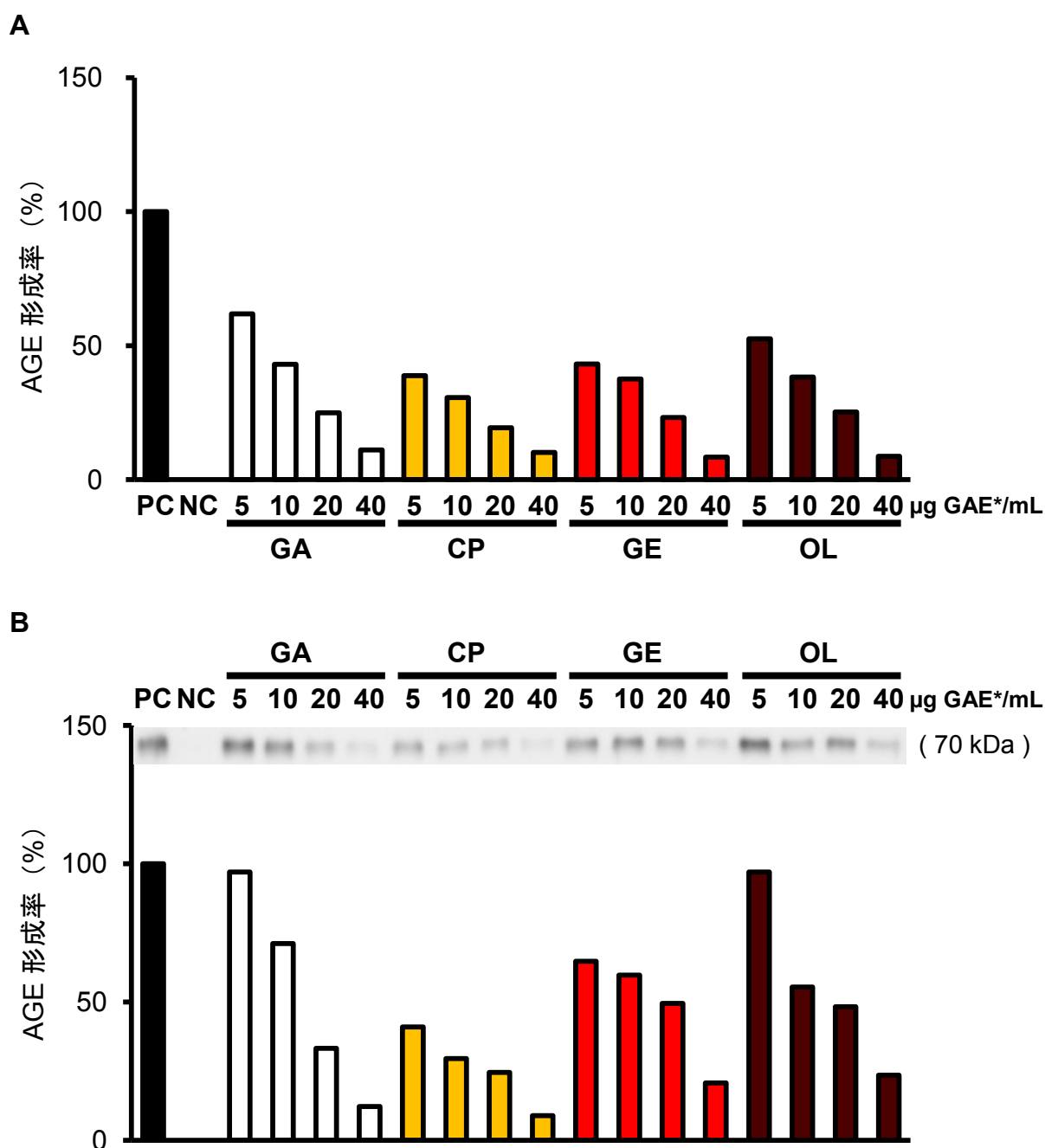
各略号は、Table 4-1 と同じ。

## 2. 抗グリケーション活性

AGE形成サンプルの蛍光強度を測定して求めたAGE形成率をFig. 4-2-Aに示した。GA、CP、GE、OLのいずれにおいても、ポリフェノール濃度が高くなるほどAGE形成率が低下した。また、CP、GE、OLは5 µg/mLのポリフェノール濃度においても蛍光性を有するAGEの形成を50%以上阻害していた。40 µg/mLのポリフェノール濃度では、CPのAGE形成率はGEやOLのAGE形成率と同程度であった。

N-カルボキシメチルリジン (CML) を特異的に認識する抗AGE抗体によりAGEを検出して求めたAGE形成率をFig. 4-2-Bに示した。この場合のAGE形成率も蛍光強度で求めたAGE形成率と同様に、GA、CP、GE、OLのいずれにおいても、ポリフェノール濃度に依存して低下していた。また、AGE形成率は蛍光強度をもとに求めた値に比べ、抗AGE抗体で検出した方がGA、GE、OLにおいては高い値を示していた。同じポリフェノール濃度におけるAGE形成率は、CPと比べると、GEおよびOLで高くなっていた。

以上をまとめると、蛍光性を有するAGEの形成阻害活性はCP、GE、OLの3者で大きな差がなかったが、CMLの形成阻害活性はCP、GE、OLの中でCPが最も強かった。



**Fig. 4-2** 各ポリフェノール試料をフルクトースとBSAとともに5日間インキュベートしてAGEを形成させ、蛍光分光光度計により検出したAGE形成率 (A)、または抗AGE抗体により検出したAGE形成率 (B)

\*GAE : Folin-Denis 法により求めた gallic acid 当量

略号は、PC ; positive control、NC ; negative control、その他の略号は、Table 4-1 と同じ。

## 第4節 考察

2型糖尿病において、酸化によるストレスは発病や病態の進行に深く関係している。たとえば、高血糖状態が持続することによりグリケーションが亢進すると、反応の過程で酸化ストレスが生じる[90]。2型糖尿病では過剰栄養による肥満も悪化因子であり、脂肪を蓄積した脂肪細胞から炎症性サイトカインの放出が起こり、炎症が誘導されて酸化ストレスが増大する[91]。発生した酸化ストレスは、インスリン分泌を担う膵臓β細胞へのダメージ[92]や末梢組織のインスリン抵抗性を誘発する[91]。このように、酸化ストレスにより糖尿病の病態が悪化するため、抗酸化活性を有する物質は糖尿病の予防や抑制に役立つと期待されている。緑茶ポリフェノールおよびオリゴノールはともに抗酸化活性が報告されている[82,83]。本章では、カリンポリフェノール(CP)の抗酸化活性を、緑茶抽出物(GE)およびライチ低分子化プロシアニジン(OL)と比較した。抗酸化活性とポリフェノール濃度には相関関係があると報告されている[93]。これを受け、全試料をFolin-Denis法で求めたポリフェノール濃度(gallic acid当量)を基準に希釈し、各測定に用いた。今回実施したDPPHラジカル消去活性とH-ORAC法において、CP、GE、OLは、ポリフェノール濃度に依存した抗酸化活性を示した(data not shown)。また、抗酸化の測定方法によって試料の活性の大小関係が入れ替わっていたが、これは一つに各試料が複数のポリフェノール物質の混合物であるために抗酸化能を発揮する化合物が相互作用を示す可能性があること、もう一つには測定方法によって抗酸化機構が異なることが理由として考えられた。比較の結果として、CPの抗酸化活性は、gallic acid当量で表したポリフェノール濃度(ポリフェノール量)あたりで見ると、GEやOLとほぼ同程度の活性を示した。既に、抗酸化活性と様々な健康効果との関連が示唆されている緑茶ポリフェノール[60]と同程度の抗酸化活性を有するという事は、CPにも抗酸化に関与した健康効果を期待出来る。

生体では過剰な糖の存在によりグリケーションが亢進し、AGE形成が増加する。AGEそのものに加え、AGEの形成過程で発生する反応性の高いカルボニル化合物が、糖尿病合併症の発症と進行の原因になると考えられている。

本章では、フルクトースと BSA による反応系を用いて抗グリケーション活性を調べた。その結果、蛍光性を有する AGE の形成率も CML を特異的に検出する抗体を用いた場合の AGE 形成率も、CP は GE や OL より低い値を示し、優れた抗グリケーション活性を示した (Fig. 4-2-A および B)。Wang ら[50]は、ブドウやベリー類に含まれるプロシアニジンの抗グリケーション活性のメカニズムとして、カテキン分子がグリケーション中間体であるメチルグリオキザールと付加体を形成することにより、AGE 形成を阻害することを主張している。また、シナモンのプロシアニジンも同様に、メチルグリオキザールを消去することで AGE 形成を阻害することが示されている[94]。このため、本章で示された CP、GE、OL が示した抗グリケーション活性においても、グリケーション中間体の形成抑制があった可能性が考えられた。

CP は、抗酸化活性および抗グリケーション活性を有しており、総ポリフェノール量が同じ時、それらの活性の強さは GE や OL と同程度またはそれ以上となった。すなわち、CP を摂取することにより、生体で抗酸化活性および抗グリケーション活性が発揮され、糖尿病や糖尿病合併症の進行抑制や発症予防に役立つ可能性が示唆された。

## 第5章 カリンポリフェノールおよび緑茶抽出物、ライチ低分子化プロシアニジンの2型糖尿病マウスにおける効果の比較

### 第1節 目的

カリンポリフェノール (CP) に加え、既に抗糖尿病作用が報告されている緑茶抽出物 (GE) [60]およびライチ低分子化プロシアニジン (OL) [75]を用いて *in vivo* における抗糖尿病作用を比較することを前提とし、第3章では CP、GE および OL との成分比較を行った。CP の調製は糖を取り除く目的の粗精製であったため、製品化されている GE や OL と比べると試料粉末 1 g あたりの総ポリフェノール含量は 1/3 程度となった。また、CP と OL に含まれるプロシアニジンは組成が異なること、GE は EGCG といったカテキンモノマーが主成分であることが分かった。第4章では、*in vitro* における抗酸化活性や抗グリケーション活性を比較したが、それらの活性の強さは総じてポリフェノール濃度に依存していた。また、ポリフェノール濃度を基準にして比較すると、CP は GE や OL に匹敵する抗酸化活性を持ち、抗グリケーション活性については GE や OL より CP は優れた活性を有していることが分かった。

第2章の *in vivo* における検討の際には、ポリフェノール量 (gallic acid 当量) として 0.5% の CE を飼料に添加した。CE から糖を除去した CP には 2 型糖尿病モデル動物に対して抗糖尿病作用が期待されたことから、CE と同じ条件で CP の摂取効果を検討する必要があると考えた。

以上をふまえ、本章では CP、GE、OL をそれぞれポリフェノール量 (gallic acid 当量) として 0.5% 添加した高脂肪食を 2 型糖尿病モデル動物である KK-*Ay* マウスに摂取させ、糖尿病に対して示す作用とその作用メカニズムについて比較することを目的とした。



## 第2節 方法

## 1. 動物実験

## (1) 実験飼料の調製

動物実験に用いた高脂肪食 (HF)、CP 添加高脂肪食 (HF+CP)、GE 添加高脂肪食 (HF+GE)、OL 添加高脂肪食 (HF+OL) の組成を Table 5-1 に示した。Folin-Denis 法により求めた総ポリフェノール量 (gallic acid 相当量) として 0.5% (w/w) の割合で各種ポリフェノール試料を添加した。

Table 5-1 実験飼料 (HF および HF+CP, HF+GE, HF+OL) の組成 [g / kg]

	HF	HF+CP	HF+GE	HF+OL
α - コーンスターチ <sup>1)</sup>	307	292.7	302.8	301.8
カゼイン <sup>1)</sup>	200	200	200	200
ラード <sup>2)</sup>	200	200	200	200
ショ糖 <sup>3)</sup>	100	100	100	100
大豆油 <sup>4)</sup>	70	70	70	70
セルロース粉末 <sup>1)</sup>	62	62	62	62
AIN93-G 塩類混合物 <sup>1)</sup>	43	43	43	43
AIN93-G ビタミン混合物 <sup>1)</sup>	12	12	12	12
シスチン <sup>5)</sup>	3	3	3	3
コリン重酒石酸塩 <sup>4)</sup>	3	3	3	3
CP *	—	14.3	—	—
GE †	—	—	4.2	—
OL ‡	—	—	—	5.2

1) オリエンタル酵母工業 (東京)、2) Sigma-Aldrich (USA)、3) 東洋精糖 (東京)、  
4) 和光純薬株式会社 (大阪)、5) 味の素 (東京)

\* CP : カリンポリフェノール

† GE : 緑茶抽出物

‡ OL : ライチ低分子化プロシアニジン

## (2) 実験動物および飼育方法

実験動物は、5週齢 KK-A<sup>y</sup>/TaJcl 雄マウス (22~25 g、日本クレア株式会社；東京) 20匹を用いた。マウスは個別にステンレスケージに収容し、恒温 (22±1°C)、恒湿 (50±10%) に保った動物室内で、午前6時から午後6時までを明期とした明暗12時間周期で飼育した。予備飼育の最初の4日間は固形飼料 (マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料 CE-2、日本クレア株式会社) を自由摂食させ、続く10日間は AIN-93G に準じた 20%カゼイン飼料 (組成は Table 2-1 の 20C を参照) を自由摂食させた。20%カゼイン飼料摂食10日目の朝8時から1時間絶食させ、マウスの尾静脈血を用いてオートディスクセンサー (アセンシア ブリーズ 2、Bayel AG；ドイツ) により血糖値を測定した。その血糖値と体重を基に、糖尿病対照群 (DC)、糖尿病 CE 摂取群 (DP)、糖尿病 GE 摂取群 (DG)、糖尿病 OL 摂取群 (DO)、の4群に群分けした。群分け以降、DC には HF、DP には HF+CP、DG には HF+GE、DO には HF+OL をそれぞれ自由摂食させ、30日間飼育した (飼料組成は Table 5-1 に記載)。水は水道水を自由に飲水させた。群分けから7、14、21、29日目には朝8時より1時間絶食させ、マウスの尾静脈血を用いてオートディスクセンサーにより血糖値を測定した。また、29日目には尾静脈血を DCA2000 HbA1c カートリッジに採取し、DCA2000 システム (Siemens；ドイツ) により HbA1c 値も測定した。群分け25~27日目にかけて代謝ケージを設置し、糞と尿を回収した。28日目には経口グルコース負荷試験 (OGTT) を行った。(詳細については、次ページの (3) 経口グルコース負荷試験 に記載) 解剖は、30日目の朝8時より1時間の絶食をかけ、マウスをジェチルエーテル麻酔下で開腹し、下大静脈から採血した後に屠殺した。採取した血液はベノジェット II 真空採血管 (VP-ASO54、テルモ；東京) に移し、遠心分離した血清は-80°C で保存した。生理食塩水を用いて灌流をした肝臓を摘出した他、腎臓、腎臓周囲脂肪、精巣周囲脂肪、腸間膜脂肪、後肢筋 (腓腹筋) を採取した。各臓器は重量測定後、ただちに液体窒素で凍結して分析まで-80°C で保存した。

### (3) 経口グルコース負荷試験 (OGTT)

マウスには、群分けより 28 日目の 0 時から 12 時間絶食させ、OGTT を実施した。経口負荷するグルコースは、投与量を 2 g/kg body weight に設定し、グルコース 10 g と塩化ナトリウム 0.45 g を水 50 mL に溶解して調製した。いずれの個体においても経口投与液量は、500  $\mu$ L 以下とした。負荷前 (0 min) の血糖値を測定後、グルコースを経口投与し、15, 30, 60, 120 min の血糖値を測定した。血糖値の測定は、尾静脈血を用いてオートディスクセンサー (アセンシア ブリーズ 2) で行った。なお、OGTT 実施前の血糖値測定においてオートディスクセンサーの測定上限を超える個体が頻発したため、全個体の血液を生理食塩水で 2 倍希釈してから測定した。

## 2. 血清成分分析

### (1) 血清グルコース濃度の測定

第 2 章 - 第 2 節 - 3 - (1) と同様に行った。

### (2) 血清インスリン濃度の測定

第 2 章 - 第 2 節 - 3 - (2) と同様に行った。

### (3) 血清アディポネクチン濃度の測定

第 2 章 - 第 2 節 - 3 - (3) と同様に行った。

### (4) 血清トリグリセリド濃度の測定

第 2 章 - 第 2 節 - 3 - (4) と同様に行った。

### (5) 血清総コレステロール濃度の測定

第 2 章 - 第 2 節 - 3 - (5) と同様に行った。

(6) 血清 HDL-コレステロール濃度の測定

第2章-第2節-3-(6)と同様に行った。

### 3. 肝臓中脂質の測定

(1) 肝臓の脂質抽出

第2章-第2節-4-(1)と同様に行った。

(2) 肝臓中トリグリセリドの定量

第2章-第2節-4-(2)と同様に行った。

(3) 肝臓中コレステロールの定量

第2章-第2節-4-(3)と同様に行った。

### 4. 糞中脂質および胆汁酸の測定

(1) 糞中脂質の抽出

第2章-第2節-5-(1)と同様に行った。

(2) 糞中トリグリセリドの測定

第2章-第2節-5-(2)と同様に行った。

(3) 糞中コレステロールの測定

第2章-第2節-5-(3)と同様に行った。

(4) 糞中総胆汁酸の測定

第2章-第2節-5-(4)と同様に行った。

## 5. 尿中成分の分析

## (1) 尿糖の測定

尿は2日間分を採取し、代謝ケージを洗浄した水と合わせて定容した。定容後の尿サンプルは、一部をチューブに移して $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。尿糖測定時は、尿サンプルを融解し、よく攪拌してから $20\ \mu\text{L}$ をマイクロチューブにとり、水 $480\ \mu\text{L}$ を加えて25倍希釈した(尿希釈液)。尿中のグルコース量は、第2章-第2節-3-(1)と同様に測定した。ただし、尿希釈液 $10\ \mu\text{L}$ に発色試液 $1.5\ \text{mL}$ を加えて反応させた。

## (2) 尿中アルブミンの定量

糖尿病が進行すると、腎臓の糸球体が傷害を受けて濾過機能が低下することにより血液中のアルブミンが尿中に漏れだす。このため、尿中のアルブミン量は糖尿病による腎臓傷害の程度を知る指標の一つとなる。本実験では、牛アルブミン血清(BSA)をスタンダードとして用いてSDS-PAGEによる尿中アルブミンの定量を行った。

## &lt;電気泳動サンプルの調製&gt;

## 【試薬】

- ・100% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) 水溶液  
トリクロロ酢酸を $20\ \text{g}$ 秤量し、水に溶解して全量を $20\ \text{mL}$ とした。
- ・電気泳動用サンプルバッファー  
 $1\times$ Laemmli's Buffer、 $2\times$ Laemmli's Buffer

## 【標準物質】

Bovine serum albumin (Sigma Aldrich ; USA) を水に溶かし $10$ 、 $20$ 、 $30$ 、 $40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

## 【操作手順】

尿サンプルは室温で融解し、攪拌したのちに $250\ \mu\text{L}$ をマイクロチューブにとり、

100 % TCA 水溶液 25  $\mu\text{L}$  を加えてボルテックスでよく混和し、1 時間水中に静置してから 4°C、3,550 $\times$ g で 15 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿に 1 $\times$ Laemmli's Buffer を 200  $\mu\text{L}$  加え、ピペッティングで溶解した。この時、溶液の色が黄色に変色したものには 1M NaOH を少量ずつ加え pH を調整し、変色していないものには同量の水を加えた。これをブロックヒーターで 100°C、5 分間加熱処理したものを電気泳動サンプルとした。検量線作成のためのスタンダードは 2 $\times$ Laemmli's Buffer と当量で希釈し、ブロックヒーターで 100°C、5 分間加熱処理した（終濃度は 5、10、15、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

#### <SDS-PAGE>

電気泳動は、第4章 - 第2節 - 2 - (4) - <SDS-PAGE>と同様の方法で行った。全ての試料の SDS-PAGE での泳動量は 1 ウェル当たり 10  $\mu\text{L}$  とした。

#### <CBB 染色>

##### 【試薬】

- ・クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色液

クマシーブリリアントブルー(CBB) R-250 を 0.5 g 秤量し、メタノールを 250 mL と酢酸を 35 mL を加えて攪拌し、水で全量を 500 mL にした。

- ・脱色液 (25%メタノール、7.5%酢酸水溶液)

メタノール 250 mL、酢酸 75 mL を水で希釈し、全量を 1 L にした。

##### 【操作手順】

SDS-PAGE の泳動終了後、濃縮ゲルを除いた分離ゲルを CBB 染色液に 1 時間浸して染色した。その後、脱色液に交換して一晩浸漬することで脱色した。

#### <アルブミンバンドの定量>

バンドの検出と定量はインフラレッドイメージングシステム ODYSSEY INFRARED IMAGER (LI-COR Biosciences ; USA) を用いた。

## 6. リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

## (1) 肝臓組織からの RNA 抽出

## 【試薬】

・ solution D (4M グアニジンチオシアン酸塩, 25 mM クエン酸ナトリウム緩衝液, pH7.0, 0.1 M 2-メルカプトエタノール, 0.15% N-ラウロイルサルコシンナトリウム)

グアニジンチオシアン酸塩 47.3 g、N-ラウロイルサルコシンナトリウム 0.5 g を水に溶解し、1M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 2.5 mL を加えて全量を 100 mL にした。この溶液 50 mL に対し、2-メルカプトエタノール 350  $\mu$ L を加えてよく混合した。

・ 水飽和フェノール

フェノール (500 g) の試薬瓶に秤量した 8-ヒドロキシキノリン 0.5 g を加え、オートクレーブ済み (121°C、20 分間) の水を 400 mL 程度入れ、65°C の温水中で時々攪拌しながら完全に溶解させた。溶解後は 30 分程度静置し、上層の水を取り除いた。再度、オートクレーブ済みの水を適量加えて混和し、上層の水を取り除く作業を 2 回繰り返し水飽和させた。調製後は、4°C で保存した。

・ 2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)

酢酸ナトリウム 3 水和物 54.4 g を 20 mL 程度の水に溶解し、酢酸で pH 4.0 に調整した後、全量を 200 mL にした。その後、オートクレーブ (121°C、20 分間) で滅菌処理した。

・ クロロホルム+イソアミルアルコール (IAA)

クロロホルムと IAA を容積比 49 : 1 で混合した。

・ 2-プロパノール

・ 4 M 塩化リチウム

塩化リチウム 33.912 g を秤量し、水に溶解して全量を 200 mL にした後、オートクレーブ (121°C、20 分間) で滅菌処理した。

・ 10 mM Tris (pH 7.5) / 1 mM EDTA / 0.5% SDS

1 M Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液 1 mL に 250 mM EDTA -2Na 0.4 mL、10% (w/v)

SDS 5mL を混和し、全量を水で 100 mL にし、オートクレーブ (121°C、20 分間) で滅菌処理した。

・75%エタノール

エタノール 30 mL と滅菌超純水 10 mL を混合した。

#### 【操作手順】

オートクレーブした試験管を氷中に差し、solution D を 800  $\mu$ L を分注した。その試験管に 100 mg 程度を量り取った肝臓を入れ、ホモジナイザー (POLYTRON homogenizer、Kinematia ; スイス) でホモジナイズした (ダイヤル 4 で 5 秒 $\times$ 2 回)。ホモジネートサンプル全量を 2 mL 容マイクロチューブに移し、水飽和フェノール 800  $\mu$ L、2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 80  $\mu$ L、クロロホルム+イソアミルアルコール (IAA) 160  $\mu$ L を加えて白濁するまで良くボルテックスで攪拌した。その後、氷中で 15 分間静置してから、4°C、15,000 $\times$ g で 10 分間遠心した。遠心により分離した上層を新しい 2 mL 容マイクロチューブに移し、2-プロパノール 900  $\mu$ L を加えてよくボルテックスで攪拌してから-20°C で 15 分間静置した。その後、4°C、15,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、沈殿を残して上清を取り除き、沈殿には 4 M 塩化リチウム 200  $\mu$ L を加えてピペッティングにより懸濁させた。この懸濁液を 1.5 mL 容マイクロチューブに移し、4°C、15,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、沈殿を残して上清を取り除き、沈殿には 10 mM Tris (pH 7.5) / 1 mM EDTA / 0.5% SDS を 200  $\mu$ L を加えてピペッティングにより懸濁させた。さらに、この懸濁液にクロロホルム+IAA を 200  $\mu$ L 加えてボルテックスで白濁するまで攪拌し、4°C、15,000 $\times$ g で 10 分間遠心した。遠心後の上層を新しい 1.5 mL 容マイクロチューブに回収し、2-プロパノール 200  $\mu$ L と 2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 20  $\mu$ L を加えてボルテックスで攪拌してから-20°C で 15 分間静置した。その後、4°C、15,000 $\times$ g で 10 分間遠心し、上清を取り除いた。チューブに残った沈殿に 75%エタノール 300  $\mu$ L を加えてボルテックスし、4°C、15,000 $\times$ g で 10 分間遠心した。遠心後は、沈殿に触れないように上清を極力取り除き、チューブに残った沈殿はデシケーター内で減圧乾固させた。乾固した沈殿は RNase free 滅菌水 100  $\mu$ L で再溶解し、total RNA 溶液とした。



## (2) RNA の定量

抽出した total RNA 溶液中の RNA 濃度は、分光光度計（日本分光株式会社 V-530；東京）を用いて測定した。核酸は 260 nm、タンパク質は 280 nm にそれぞれ吸収極大を持つことから、total RNA 溶液を RNase free 滅菌水で 50 倍に希釈して 260 nm の吸光度 (O.D. 260) および 280 nm の吸光度 (O.D. 280) を測定した。O.D. 260 と O.D. 280 の比から RNA の純度を確認し、O.D. 260 が 1.0 の時に 1 本鎖核酸濃度が 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となることを利用して total RNA 溶液の O.D. 260 から RNA 濃度を求めた。

## (3) Complementary DNA (cDNA) の作製

PrimeScript® RT reagent kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ株式会社；滋賀) を使用して、逆転写反応により RNA の相補鎖 DNA を合成した。

## 【操作手順】

PrimeScript® RT reagent kit (Perfect Real Time) 中の EASY dilution を用いて total RNA 溶液 2  $\mu\text{L}$  を 10 倍希釈し、RNA 量として 0.5  $\mu\text{g}$  含まれる液量 (x  $\mu\text{L}$ ) を計算して以下の反応系に用いた。

## 反応系

0.5 $\mu\text{g}$ total RNA	x $\mu\text{L}$
RNase free dH <sub>2</sub> O	8-x $\mu\text{L}$
5×PrimeScript RT Master Mix	2 $\mu\text{L}$
<hr/> Total	<hr/> 10 $\mu\text{L}$

上記の反応系を 1.5 mL 容マイクロチューブに分注し、ピペッティングで混和した後、37°C で 15 分間の逆転写反応を行った。その後、速やかに 85°C に 5 秒間入れて酵素反応を停止し、氷中で急冷した。合成した cDNA は RNase free dH<sub>2</sub>O で 10 倍希釈し、リアルタイム PCR に使用するまで -20°C で保存した。

## (4) リアルタイム PCR (relative quantification)

SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNase H Plus) (タカラバイオ株式会社) の推奨プロトコルに従い、目的遺伝子の PCR Forward primer および PCR Reverse primer を用いて、リアルタイム PCR の反応系を調製した。反応系は、以下に示した。

## 反応系

cDNA 溶液 (10 倍希釈済み)	2 µL
PCR Forward primer (10 µM)	0.5 µL
PCR Reverse primer (10 µM)	0.5 µL
RNase free dH <sub>2</sub> O	9.5 µL
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> ™ II (Tli RNase H Plus)	12.5 µL
<b>Total</b>	<b>25 µL</b>

反応系の調製は、氷上に差した 8 連 PCR チューブ中で行った。ブランクには cDNA 溶液の代わりに RNase free dH<sub>2</sub>O を用い、スタンダードには任意の total RNA サンプルを逆転写反応させて合成した cDNA を RNase free dH<sub>2</sub>O と等量希釈し、2~128 倍の 7 段階に希釈したものを用いた。各サンプルは 2 連でリアルタイム PCR を実施し、平均データを使用した。

リアルタイム PCR には Thermal Cycler Dice® Real Time System Single TP850 (タカラバイオ株式会社) を用い、以下のように PCR cycle condition を設定した。

PCR cycle condition		
Hold	95°C	10 秒
2 step PCR	95°C	5 秒
	60°C	30 秒
Dissociation	95°C	15 秒
	60°C	30 秒
	95°C	15 秒

30 ~ 40 cycle

定量には 2nd Derivative Maximum 法を採用し、スタンダードの発現量を基に作成した検量線から、各サンプルの Ct 値 (一定の発現量に達するまでのサイクル数)

を求めた。データは、糖尿病対照群 (DC) の平均 Ct 値を 100%とした時の相対値として表した。Table 5-2 に使用したプライマーの配列を示す。

**Table 5-2** リアルタイム PCR に使用したプライマーの塩基配列

Glucose 6-phosphatase (G6Pase)	Forward	5'—	TCCGTGCCTATAATAAAGCAGTT	—3'
	Reverse	5'—	GTAGAAGTGACCATAACATAGTA	—3'
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pepck)	Forward	5'—	GCCTGGATGAAGTTTGATGC	—3'
	Reverse	5'—	TAAACACCCCATCGCTAGT	—3'
Acetyl-CoA carboxylase (Acc)	Forward	5'—	GCCTCTTCCTGACAAACGAG	—3'
	Reverse	5'—	TGACTGCCGAAACATCTCTG	—3'
Acyl-CoA oxydase (Aco)	Forward	5'—	GCACCATTGCCATTCGATACA	—3'
	Reverse	5'—	CCACTGCTGTGAGAATAGCCGT	—3'
Carnitine palmitoyl transferase 1 (Cpt-1)	Forward	5'—	CTGTTAGGCCTCAACACCGAAC	—3'
	Reverse	5'—	CTGTCATGGCTAGGCGGTACAT	—3'
Cytochrome P450 7A1 (Cyp7a1)	Forward	5'—	GGATCAAGAGCAACTAAACAACCT	—3'
	Reverse	5'—	GCTATGATGTCATCTTTTCGAATG	—3'
Fatty acid synthetase (Fas)	Forward	5'—	GGGTTCTAGCCAGCAGAGTC	—3'
	Reverse	5'—	TCAGCCACTTGAGTGTCTC	—3'
HMG-CoA reductase (HMG-CoA R)	Forward	5'—	TGGAGATCATGTGCTGCTTC	—3'
	Reverse	5'—	TTCTCACAAGCAGAGGCTCA	—3'
Stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd-1)	Forward	5'—	GCCTCTGGAGCCACAGAA	—3'
	Reverse	5'—	GCCATTTCGTACACGTCATTC	—3'
Sterol regulatory element-binding protein 1c (Srebp-1c)	Forward	5'—	GATCAAAGAGGAGCCAGTGC	—3'
	Reverse	5'—	TAGATGGTGGCTGCTGAGTG	—3'
Sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp-2)	Forward	5'—	GTGCGCTCTCGTTTTACTGAAGT	—3'
	Reverse	5'—	GTATAGAAGACGGCCTTCACCAA	—3'
β-actin	Forward	5'—	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	—3'
	Reverse	5'—	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	—3'

7. グリケーション反応中間体 ( $\alpha$ -ジカルボニル化合物) の定量 [28]

グリケーション反応中間体 ( $\alpha$ -ジカルボニル化合物) には、代表的なものにグリオキザール (GO) やメチルグリオキザール (MG)、3-デオキシグルコゾン (3-DG) があり、それら  $\alpha$ -ジカルボニル化合物は生体内のタンパク質の Lys や Arg 残基と反応し、N<sup>ε</sup>-カルボキシメチルリジンやピラリンなどの AGE を形成する。 $\alpha$ -ジカルボニル化合物は不安定な物質であるため、2,3-diaminonaphthalene (DAN) と反応させ安定な誘導体とし、逆相 HPLC で分離した。

(1)  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の蛍光誘導体化

## 【試薬】

- ・ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O を 0.179 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を 0.068 g、それぞれ秤量して水に溶解し全量を 50 mL ずつにした。2つの水溶液を混合し、pH 7.4 に調整した。

- ・ 0.005% 2,3-pentanedione

97% 2,3-pentanedione (Aldrich Chemical ; USA) を 5.15  $\mu$ L 取り、水で希釈し全量を 100 mL にした。

- ・ 6% 過塩素酸

70% 過塩素酸 875  $\mu$ L を水で希釈し全量を 10 mL にした。

- ・ 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液

- ・ 0.1% 2,3-diaminonaphthalene (DAN)

2,3-diaminonaphthalene (株式会社同仁化学研究所 ; 熊本) を 1 mg 秤量し、メタノール 1 mL に溶解させた。

- ・ 酢酸エチル

## 【標準物質】

- ・ 3-Deoxyglucosone / 2,3-diaminonaphthalene adduct (3-DG/DAN adduct)

3-Deoxyglucosone Detection Reagent (株式会社同仁化学研究所) に付属の 3-DG/DAN adduct 1 mg をメタノール 1 mL に溶解し、1、5、10  $\mu$ M となるようメ

タノールで希釈して HPLC 用サンプルとした。

・ Glyoxal / 2,3-diaminonaphtalene adduct (GO/DAN adduct)

40% グリオキザール (分子生物学用、和光純薬株式会社 ; 大阪) を水で 1 mM に希釈し、蛍光誘導体化処理を行った。

・ Methylglyoxal / 2,3-diaminonaphtalene adduct (MG/DAN adduct)

40% メチルグリオキザール (Sigma Aldrich ; USA) を水で 1 mM に希釈し、蛍光誘導体化処理を行った。

【操作手順】

肝臓 (または腎臓) を 100 mg 秤量してから氷冷した試験管に入れた。10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 1 mL 加え、試験管を氷冷しながらホモジナイザー (POLYTRON homogenizer、Kinematia ; スイス) を用いてホモジナイズした (ダイヤル 4 で 5 秒×2 回)。ホモジネート溶液を 1.5 mL 容のマイクロチューブに移して 4°C、14,000 × g で 15 分間遠心した後、上清を試験管に取り、0.005% 2,3-pentanedione を 50 μL と 6% 過塩素酸を 1 mL 加えてよく攪拌し、4°C、3,350 × g で 20 分間遠心した。遠心後、上清を蓋付き試験管に移し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を 2 mL と 0.1% DAN を 100 μL 添加してよく攪拌し、4°C で 16 時間静置して反応させた。反応終了後、酢酸エチルを 4 mL 加え蓋をしっかりと閉め、シェイカー (ダイヤル 6、RECIPRO SHAKER SR-IN、タイテック株式会社 ; 埼玉) で 5 分間振盪し、4°C、3,550 × g で 1 分間遠心して上清の酢酸エチル層を回収した。この操作を計 3 回行い、回収した酢酸エチル層はまとめて 100 mL 容のナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーター (EYELA Type N-N、東京理化工機株式会社 ; 東京) を用いて乾固した。ナス型フラスコにメタノールを 200 μL 入れてサンプルを再溶解させ、回収した。メタノールに溶解したサンプルはフィルター (Millex-LH 0.45 μm、4 mm、Merck Millipore ; USA) を通し、HPLC 分析用サンプルとした。また、スタンダードである GO および MG は、臓器試料のホモジネート上清の回収後の操作から同様に処理し、誘導体化後はメタノールで希釈して 1、10、100 μM GO/DAN adduct または MG/DAN adduct とした。



## 7. Western blotting による AGEs の検出 [95]

正常な生体内でも AGE は常に微量ずつ形成されているが、糖尿病のように高血糖状態ではより多くの AGE が形成される。AGE の蛍光性を用いた検出法も存在するが、本研究では生体内の AGE をより特異的かつ鋭敏に検出する方法としてウェスタンブロットリングを採用した。この方法により、肝臓および腎臓、血清中の AGE の形成率を調べた。

### (1) 電気泳動サンプルの調製

#### 【試薬】

- ・リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (10 mM リン酸緩衝液/150 mM NaCl)

NaCl を 4.383 g 秤量し、水で溶解して全量を 500 mL にして食塩水とした。別々のビーカーに  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  を 0.895 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を 0.39 g 秤量し、食塩水に溶解してそれぞれの全量を 250 mL とした。この 2 つの溶液を混合し pH 7.4 に調整した。

- ・電気泳動用サンプルバッファー (1×Laemmli's Buffer、2×Laemmli's Buffer)

#### 【操作手順】

肝臓 (または腎臓) は、100 mg 程度を切りとり、正確に秤量してから氷中に差しおいたホモジナイズ用試験管に入れた。氷冷した PBS 1 mL を入れ、試験管を氷冷しながらホモジナイザー (POLYTRON homogenizer、Kinematia) を用いてホモジナイズした (ダイヤル 4、5 秒×2 回)。このホモジナイズ溶液の一部を 200 倍希釈し、Lowry 法変法 (第 4 章 - 第 2 節 - 2 - (4) に記載) でタンパク質濃度を測定した。これにより求められたタンパク質濃度をもとに、8 mg/mL となるように PBS でホモジナイズ溶液を希釈し、さらに等量の 2×サンプルバッファーを加え (サンプル終濃度は 4 mg/mL)、よく攪拌した後ブロックヒーター (ホットドライバス、アズワン株式会社; 大阪) で 100°C、5 分間加熱して電気泳動用試料とした。

血清は 2  $\mu\text{L}$  を 1×サンプルバッファー 98  $\mu\text{L}$  と混合し、よく攪拌してから 100°C、5 分間加熱して電気泳動用試料とした。

## (2) SDS-PAGE

SDS-PAGE は、第4章 - 第2節 - 2 - (4) - <SDS-PAGE>と同様に行った。ただし、肝臓および腎臓の電気泳動用試料は1 ウェルにつき 5  $\mu$ L、血清の電気泳動試料は1 ウェルにつき 10  $\mu$ L アプライした。

血清サンプルは、電気泳動を行った後に CBB 染色でタンパク質を染色するゲルと Western blotting に使用するゲルの2枚分作製し、電気泳動を行った。CBB 染色は、本章-第2節-5- (2) の<CBB 染色>に記載した方法と同様に行った。

## (3) AGE (CML) の検出

### 【抗体溶液】

- ・ Anti AGE Monoclonal Antibody (Clone No.6D12), Peroxidase conjugated  
(株式会社トランスジェニック ; 熊本)

TBS-T により抗体濃度を 0.25  $\mu$ g/mL に希釈して用いた。

### 【操作手順】

AGE (CML) の検出は、第4章 - 第2節 - 2 - (4) - <Western blotting>と同様に行った。ただし、使用した抗体は HRP-conjugate 抗体であるため、抗体反応を室温で1時間行った後、TBS-T による洗浄を5分間×4回行い、2次抗体反応は行わずに直接 ECL 試薬により発光させた。

## 8. 統計処理

得られた測定値は平均値±標準誤差で示した。各群間の比較は分散分析 (ANOVA) を行った後に、Tukey multiple comparison test で多重比較検定を行った。P<0.05 を有意と判定した。統計処理には InStat3.0 (GraphPad Software ; USA) を使用した。



## 第3節 結果

## 1. 体重および飼料摂食量

実験食を30日間与えたKK-*A<sup>y</sup>*マウスの解剖時体重は、DCに対してDGで有意に減少しており、DPおよびDOで減少傾向を示した。体重増加量は、DCと比較してDGで41%、DOで30%、それぞれ体重増加を抑制しており、DPでは体重増加を25%抑えたもののDCとの有意差はなかった。(Table 5-4)

体重に影響を与える摂食量は、DCと比較するとDOのみ有意に低くなっていた。30日間の飼育期間中の体重増加量を総摂食量で割って求められる摂食効率に関しては、DCと比べるとDGでは減少しており、DPおよびDOでは有意差はないものの減少傾向が見られた。

**Table 5-4** 2型糖尿病対照KK-*A<sup>y</sup>*マウスおよび各種ポリフェノール摂取KK-*A<sup>y</sup>*マウスの群分け時と解剖時の体重、一日の平均摂食量および摂食効率

	DC	DP	DG	DO
群分け時体重 (g)	33.0 ± 1.0	32.3 ± 0.7	31.9 ± 0.7	32.0 ± 0.7
解剖時体重 (g)	45.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	41.6 ± 1.4 <sup>ab</sup>	39.3 ± 1.0 <sup>b</sup>	40.8 ± 1.6 <sup>ab</sup>
体重増加量 (g/30 day)	12.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	9.4 ± 0.9 <sup>ab</sup>	7.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	8.8 ± 0.9 <sup>b</sup>
平均摂食量 (g/day)	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>	3.7 ± 1.0 <sup>b</sup>
摂食効率 (mg/g diet)	97 ± 3 <sup>a</sup>	78 ± 7 <sup>ab</sup>	60 ± 6 <sup>b</sup>	79 ± 7 <sup>ab</sup>

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=5、ただし DC ; n=4)。異なる記号間における有意差は p<0.05。各群の略号は以下の通り。

DC : 2型糖尿病対照群

DP : 2型糖尿病カリンポリフェノール (CP) 摂取群

DG : 2型糖尿病緑茶抽出物 (GE) 摂取群

DO : 2型糖尿病ライチ低分子化プロシアニジン (OL) 摂取群

## 2. 解剖時臓器重量

実験食を与えて 30 日間飼育した KK-*A<sup>y</sup>* マウスの解剖時に測定した臓器重量を Table 5-5 に示した。肝臓重量（実測値）は、DC と比べて DP、DG、DO のいずれにおいても減少し、肝臓の体重 100 g 当たりの相対重量も実測値と同様の動きを示した。腎臓重量は、DC に対して DG で減少したが、DP および DO では減少傾向に留まった。しかし、腎臓の相対重量は 4 群間に差がなかった。腎臓周囲脂肪の脂肪組織重量（実測値）は 4 群間に差はなく、精巣周囲脂肪および腸間膜脂肪の脂肪組織重量については有意な差はないものの、DC と比べて DG で減少する傾向があった。

**Table 5-5** 2型糖尿病対照 KK-*A<sup>y</sup>* マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK-*A<sup>y</sup>* マウスの解剖時臓器重量

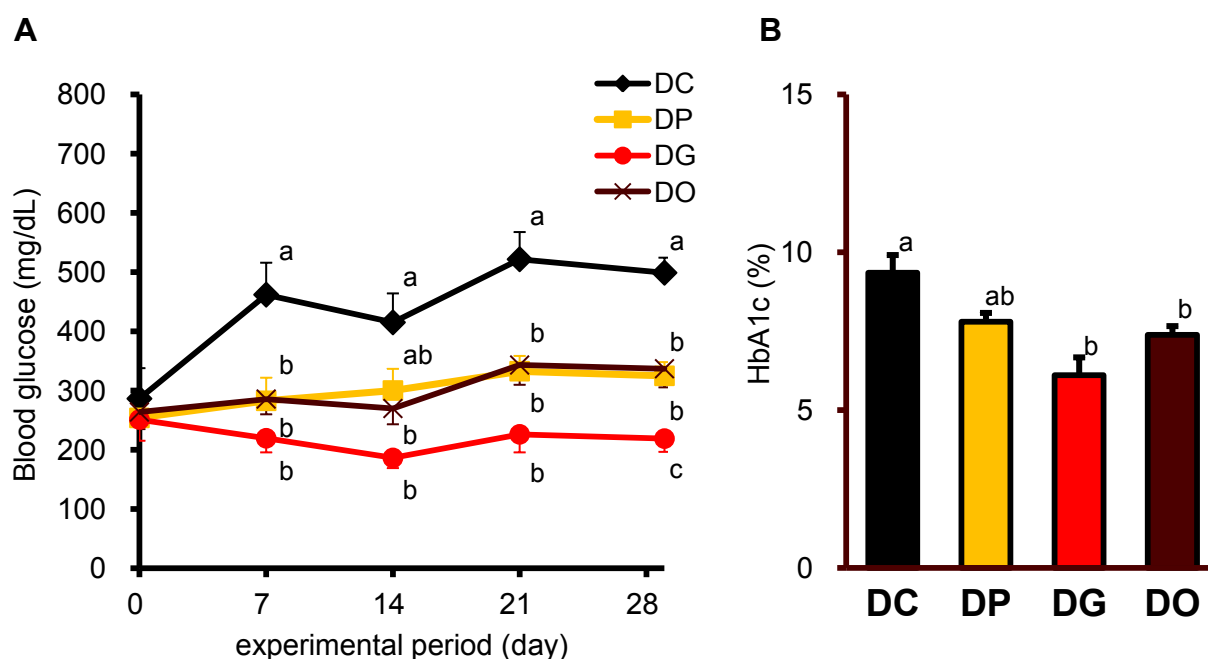
	DC	DP	DG	DO
臓器重量（実測値）（g）				
肝臓	2.86 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.84 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.04 <sup>b</sup>
腎臓	0.576 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.527 ± 0.025 <sup>ab</sup>	0.489 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.518 ± 0.006 <sup>ab</sup>
腎臓周囲脂肪	0.868 ± 0.050	0.839 ± 0.052	0.890 ± 0.040	0.924 ± 0.095
精巣周囲脂肪	1.91 ± 0.08	1.89 ± 0.06	1.74 ± 0.06	2.06 ± 0.24
腸間膜脂肪	1.78 ± 0.08	1.57 ± 0.11	1.37 ± 0.07	1.61 ± 0.14
腓腹筋	0.287 ± 0.011	0.271 ± 0.012	0.274 ± 0.004	0.265 ± 0.004
体重 100 g 当たりの相対重量（g/100 g body weight）				
肝臓	6.29 ± 0.16 <sup>a</sup>	5.09 ± 0.27 <sup>b</sup>	4.67 ± 0.22 <sup>b</sup>	4.76 ± 0.13 <sup>b</sup>
腎臓	1.27 ± 0.03	1.27 ± 0.03	1.25 ± 0.04	1.28 ± 0.04
腎臓周囲脂肪	1.90 ± 0.08	2.01 ± 0.09	2.27 ± 0.09	2.24 ± 0.14
精巣周囲脂肪	4.20 ± 0.14	4.55 ± 0.15	4.43 ± 0.19	4.99 ± 0.40
腸間膜脂肪	3.90 ± 0.13	3.76 ± 0.18	3.48 ± 0.10	3.91 ± 0.20
腓腹筋	0.630 ± 0.025	0.650 ± 0.015	0.699 ± 0.016	0.652 ± 0.028

値は平均値 ± 標準誤差を示す（n=5、ただし DC ; n=4）。異なる記号間における有意差は p<0.05。各群の略号は、Table 5-4 に同じ。

## 3. 飼育期間中の血糖値変化と HbA1c

群分け時および飼育期間中 1 週間ごとに測定した血糖値を Fig. 5-1-A に示した。DC は飼育期間の経過とともに血糖値が上昇おり、最終的に 500 mg/dL まで達した。DC と比べると、DP および DO では飼育期間中は緩やかに血糖値が上昇しており、最終週では DC とは有意に低い値だった。一方、DG では群分け時から最終週までの血糖値がほぼ一定であり、DC とは群分け時以外は有意差を持って血糖値が推移し、それに加えて最終週では DP および DO とも有意差が認められた。

飼育 29 日目に測定した HbA1c は、DC が 9.4% と高値を示したのに対し、DG では 6.1%、DO では 7.4% と減少していたが、DP では 7.8% と減少傾向 ( $p < 0.1$ ) となった。(Fig. 5-1-B)



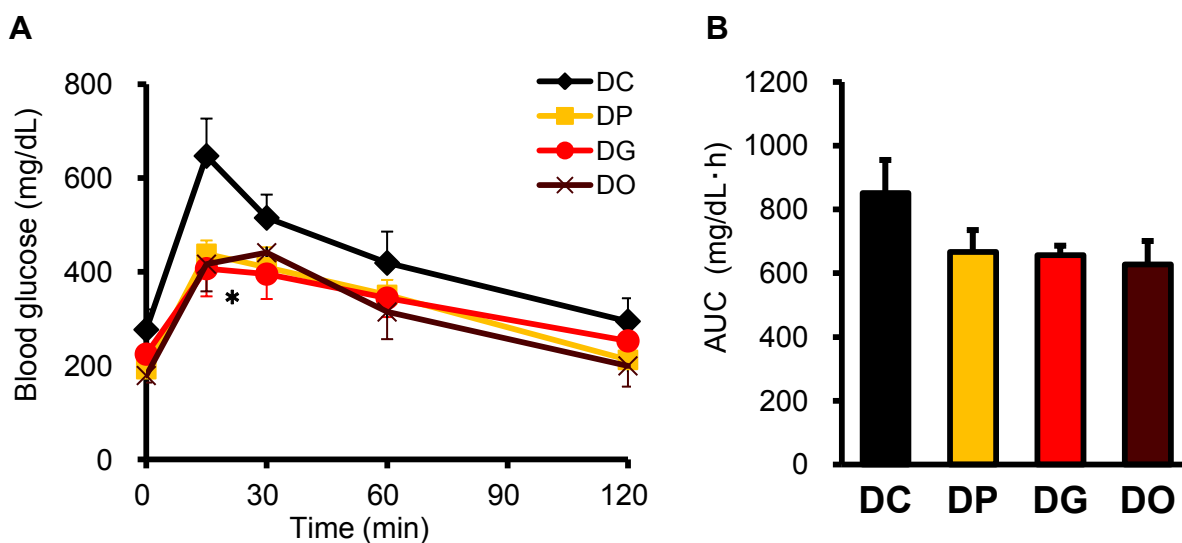
**Fig. 5-1** 2 型糖尿病対照 KK- $A^y$  マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK- $A^y$  マウスの飼育期間中の血糖値変化 (A) と飼育 29 日目の HbA1c (B)。

値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す ( $n=5$ 、ただし DC ;  $n=4$ )。異なる記号間における有意差は  $p < 0.05$ 。各群の略号は、Table 5-4 に同じ。

## 4. OGTT

飼育 27 日目に実施した OGTT において、グルコースを経口投与してから 0~120 min までの血糖値の時間変化を Fig. 5-2- A に示した。DC の血糖値は、投与 15 min 後には最大値 600 mg/dL を示し、その後は時間経過とともに緩やかに減少していき、投与 120 min 後には 0 min の値まで戻った。ポリフェノール試料を各々与えた DP、DG および DO は、OGTT 実施の全体を通して DC よりも低い値で推移していたが、有意な差が認められたのは投与 15 min 後の DG においてのみであった。

OGTT で測定した血糖値の時間変化をもとにグラフの曲線下面積 (AUC) を求めた結果、DC に対して DP、DG、DO の 3 群で減少傾向となったものの有意な差はなかった。(Fig. 5-2- B)



**Fig. 5-2** 2型糖尿病対照 KK- $A^y$  マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK- $A^y$  マウスにおいて OGTT を実施した時の血糖値の時間変化 (A) と曲線下面積 (AUC) (B).

\* 負荷後 15 min の血糖値は、DC に対して DG のみ有意差があった ( $p < 0.05$ ).

値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す ( $n=5$ 、ただし DC ;  $n=4$ ). 各群の略号は、Table 5-4 に同じ.

## 5. 血清成分

解剖時の血清成分に関するデータを Table 5-6-血清の項目に示した。

血清グルコース濃度は、高い値を示した DC ( $560 \pm 5$  mg/dL) に対し、DP ( $438 \pm 55$  mg/dL) および DO ( $514 \pm 40$  mg/dL) では有意差は認められなかったが、DP で減少傾向が認められた。DG ( $362 \pm 43$  mg/dL) では、DC の血糖値より 35%も減少していた。また、血清インスリン濃度は、個体差が大きかったために 4 群間で有意差は認められなかったが、DC ( $43.7 \pm 5.0$  ng/mL) に対して DG が減少傾向を示した ( $21.7 \pm 8.6$  ng/mL)。インスリン感受性を改善する因子であるアディポネクチンの血清中濃度は、DC ( $9.7 \pm 0.3$   $\mu$ g/mL) と比べて DP および DG では差がなかったが、DO では増加していた ( $24.7 \pm 3.6$   $\mu$ g/mL)。以上から、DC に対する動きをまとめると、DP では高血糖が抑制傾向にあり、DG では高血糖および高インスリン血症が改善されており、DO では血中アディポネクチンが増加していた。

血中脂質に関しては、血清トリグリセリド濃度は 4 群間に有意差がなかったものの、DC ( $283 \pm 53$  mg/dL) に対し、DO ( $186 \pm 35$  mg/dL) で減少傾向が見られた。総コレステロール、HDL-コレステロールにはいずれも 4 群間で差はなかった。

## 6. 肝臓中脂質

解剖時の肝臓中脂質に関するデータを Table 5-6-肝臓の項目に示した。

肝臓 1 g 中のトリグリセリド量を調べたところ、DC ( $115 \pm 19$  mg/g) に対して DG ( $37 \pm 6$  mg/g) および DO ( $58 \pm 8$  mg/g) は減少していたが、DP は減少傾向となった ( $61 \pm 17$  mg/g)。また、肝臓 1 g 中の総コレステロール量は、DC ( $8.0 \pm 1.3$  mg/g) に対して DP および DG では半分以下の値に減少しており、DO でも  $5.1 \pm 0.6$  mg/g と有意に減少していた。以上のように、DP、DG、DO のいずれのマウスについても肝臓脂質の減少が示された。

## 7. 糞中脂質および糞中胆汁酸

群分け後 25～27 日目に設置した代謝ケージで回収した糞のデータを Table 5-6 糞の項目に示した。1 日あたりの糞の排泄量（乾燥重量）は 4 群間に差がなかった。糞中トリグリセリド量は 4 群間に差がなかったが、糞中コレステロール量は DC ( $1.6 \pm 0.1$  mg/day) に対し、DP ( $3.6 \pm 0.5$  mg/day) で 2 倍以上も増加していた。糞中総胆汁酸量は、DP、DG、DO のいずれについても DC ( $1.59 \pm 0.05$   $\mu$ mol/day) の約 1/3 まで減少していた。

## 8. 尿糖と尿中アルブミン

群分け後 25～27 日目に設置した代謝ケージで回収した尿のデータを Table 5-6 尿の項目に示した。糖尿病状態の進行状態を反映する尿に関するデータ（尿量、尿糖、尿中アルブミン）は、いずれも個体差が非常に大きく、群間に差が認められなかった。しかしながら、尿量が DC ( $17.1 \pm 4.3$  mL) よりもポリフェノールを摂取した DP ( $9.0 \pm 1.6$  mL)、DG ( $3.9 \pm 2.6$  mL)、DO ( $5.1 \pm 1.3$  mL) で減少する傾向があった。尿糖および尿中アルブミンについても同様の減少傾向があった。

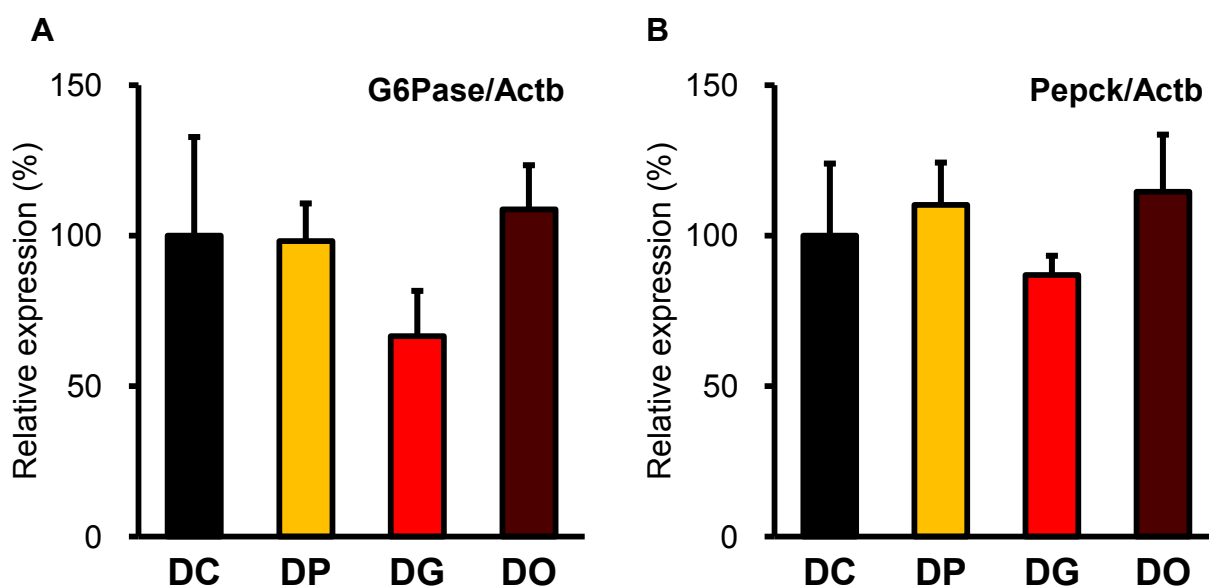
**Table 5-6** 2型糖尿病対照KK-A<sup>y</sup>マウスおよび各種ポリフェノール摂取KK-A<sup>y</sup>マウスの解剖時に採取した血清の各指標、肝臓中脂質、糞中脂質と糞中胆汁酸および尿のデータ

	DC	DP	DG	DO
<b>血清</b>				
グルコース (mg/dL)	560 ± 5 <sup>a</sup>	438 ± 55 <sup>ab</sup>	362 ± 43 <sup>b</sup>	514 ± 40 <sup>ab</sup>
インスリン (ng/mL)	43.7 ± 5.0 <sup>a</sup>	43.6 ± 10.5 <sup>a</sup>	21.7 ± 8.6 <sup>b</sup>	47.4 ± 4.6 <sup>a</sup>
アディポネクチン (µg/mL)	9.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	11.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	15.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	24.7 ± 3.6 <sup>b</sup>
トリグリセリド (mg/dL)	283 ± 53	226 ± 46	209 ± 35	186 ± 35
総コレステロール (mg/dL)	147 ± 8	133 ± 8	145 ± 3	140 ± 4
HDL-コレステロール (mg/dL)	107 ± 7	100 ± 11	110 ± 3	106 ± 4
<b>肝臓</b>				
トリグリセリド (mg/g liver)	115 ± 19 <sup>a</sup>	61 ± 17 <sup>ab</sup>	37 ± 6 <sup>b</sup>	58 ± 8 <sup>b</sup>
総コレステロール (mg/g liver)	8.0 ± 1.3 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.6 <sup>b</sup>
<b>糞</b>				
乾燥重量 (mg/day)	539 ± 29	592 ± 34	588 ± 29	536 ± 14
トリグリセリド (mg/day)	3.6 ± 1.2	2.5 ± 0.3	3.3 ± 0.5	1.9 ± 0.2
コレステロール (mg/day)	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.3 ± 1.1 <sup>ab</sup>	1.9 ± 0.2 <sup>a</sup>
総胆汁酸 (µmol/day)	1.59 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.15 <sup>b</sup>
<b>尿</b>				
尿量 (mL)	17.1 ± 4.3	9.0 ± 1.6	3.9 ± 2.6	5.1 ± 1.3
尿糖 (mg/day)	876 ± 146	436 ± 123	150 ± 123	230 ± 61
尿中アルブミン (mg/day)	1.15 ± 0.81	0.23 ± 0.06	0.20 ± 0.16	0.12 ± 0.02

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=5、ただし DC ; n=4)。異なる記号間における有意差は p<0.05。各群の略号は、Table 5-4 に同じ。

## 9. 糖新生関連酵素の遺伝子発現

解剖時に採取した KK-*A<sup>y</sup>*マウスの肝臓における glucose 6-phosphatase (G6Pase) および phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の遺伝子発現を Fig 5-3-A および B に示した。糖新生の律速酵素である G6Pase や PEPCK は、4 群間に有意差が認められなかった。ただし、解剖時に著しい血糖値の低下が認められた DG の G6Pase は、DC と比較して減少する傾向があった。以上のことから、摂取した CP や OL は糖新生を調節せず、GE の摂取が G6Pase を減少させる可能性が示された。



**Fig. 5-3** 2型糖尿病対照 KK-*A<sup>y</sup>*マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK-*A<sup>y</sup>*マウスの肝臓における G6Pase の遺伝子発現 (A) および PEPCK の遺伝子発現 (B).

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=5、ただし DC ; n=4). 各群の略号は、Table 5-4 に同じ.



## 10. 脂質代謝関連酵素の遺伝子発現

コレステロール合成・代謝関連酵素および調節タンパク質

肝臓におけるコレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA reductase の遺伝子発現は、DC に対して DP で 3 倍以上増加していた (Fig.5-4-A)。肝臓における胆汁酸合成の律速酵素となる Cytochrome P450 7A1 (Cyp7a1) の遺伝子発現は、4 群間に差がなかった (Fig.5-4-B)。肝臓の細胞内コレステロール量に応じて発現が変化する Srebp2 の遺伝子発現についても 4 群間に差はなかった (Fig.5-4-C)。

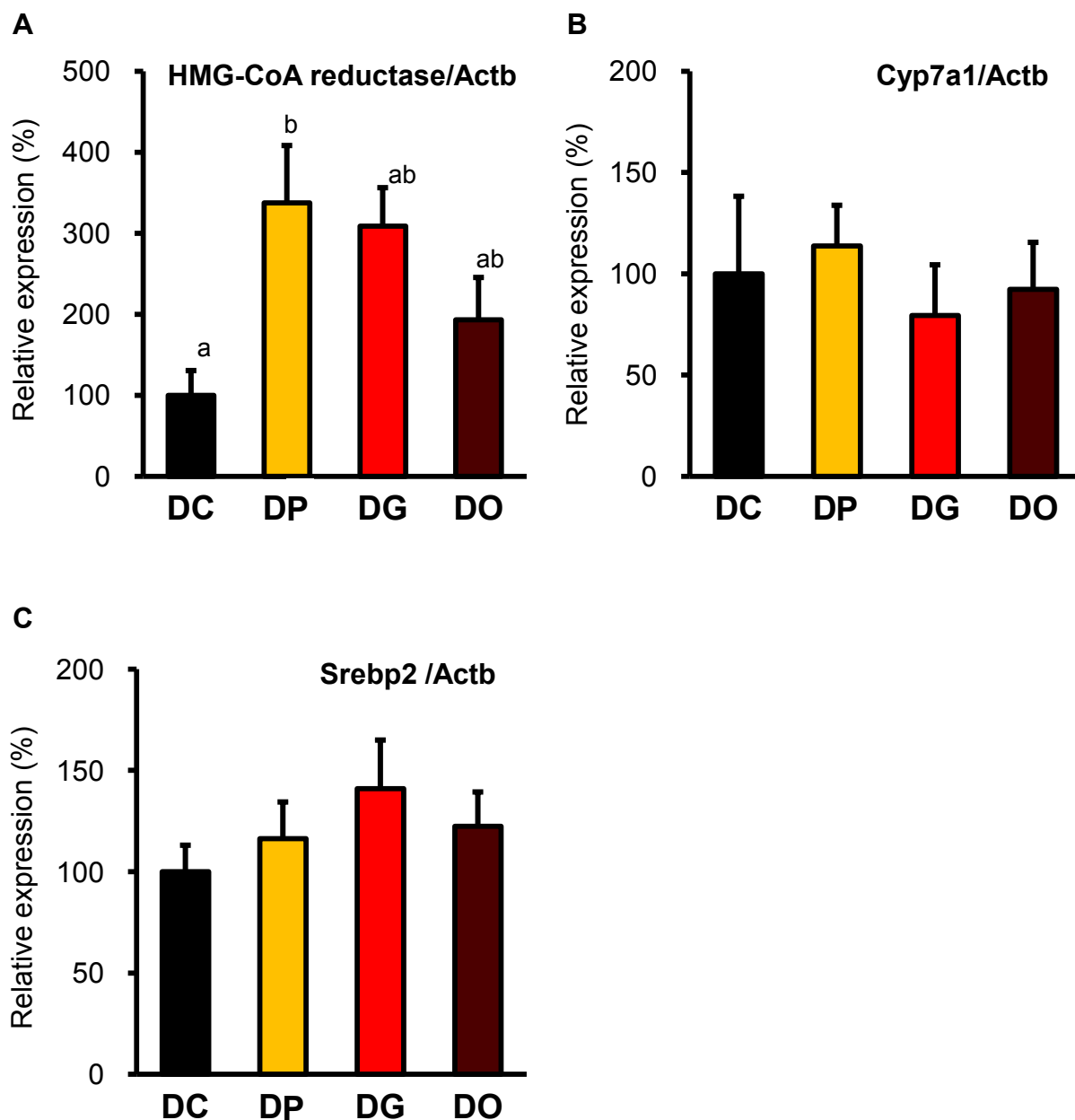
脂肪酸合成関連酵素および調節タンパク質

肝臓の細胞内コレステロール量に応じて変化する sterol regulatory element-binding protein 1c (Srebp1c) の遺伝子発現は、DP および DG において DC の約 1/4 まで発現が減少していたが、有意差は認められなかった (Fig.5-5-A)。Srebp1c の核内移行により制御される酵素で、脂肪酸を合成する経路に関与する acetyl CoA carboxylase (Acc) と fatty acid synthase (Fas) があるが、それらの遺伝子発現に 4 群間で差はなかった (Fig.5-5-B および C)。脂肪酸を不飽和脂肪酸へと変換する酵素 stearoyl-CoA desaturase 1 (Scd1) の発現も 4 群間で差はなかった (Fig.5-5-D)。

β酸化関連酵素

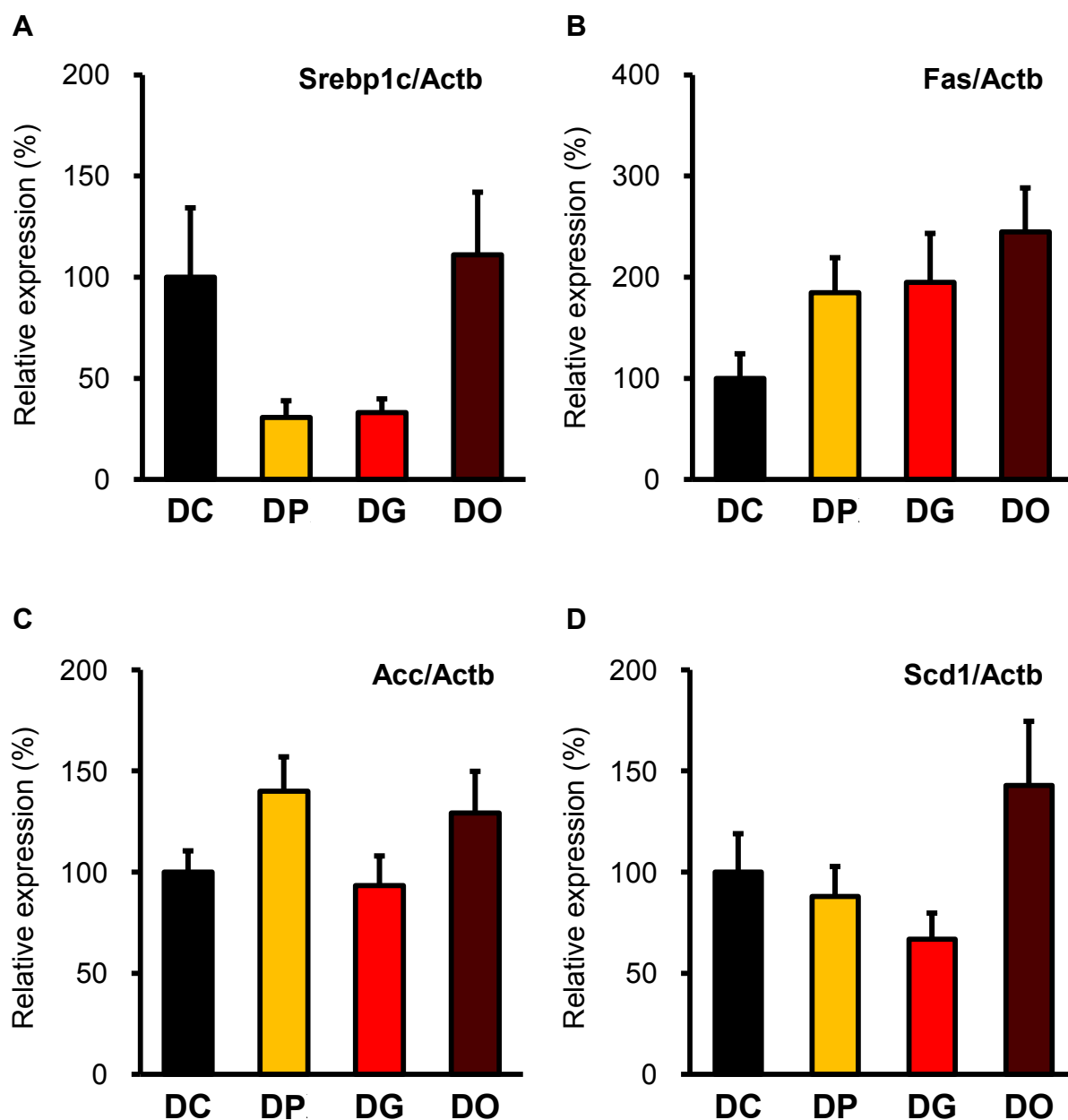
脂肪酸をミトコンドリア内部に移行可能な形態に変換する酵素である Carnitine palmitoyl transferase 1 (Cpt1) の遺伝子発現は、DC に対して DG で減少していた (Fig.5-6-A)。また、ペルオキシソームで行われる β酸化の律速酵素である acyl CoA oxidase (ACO) の遺伝子発現は、DC に対して DP で増加傾向があった (Fig.5-6-B)。

肝臓における脂質蓄積抑制作用が DP、DG、DO のポリフェノールを摂取した 3 群で認められたため、肝臓における脂肪酸およびコレステロールの生合成の抑制やコレステロール異化および β酸化の亢進が予想された。しかし、それらに関連する酵素やタンパク質の遺伝子発現には、予想された方向への増減はなかった。



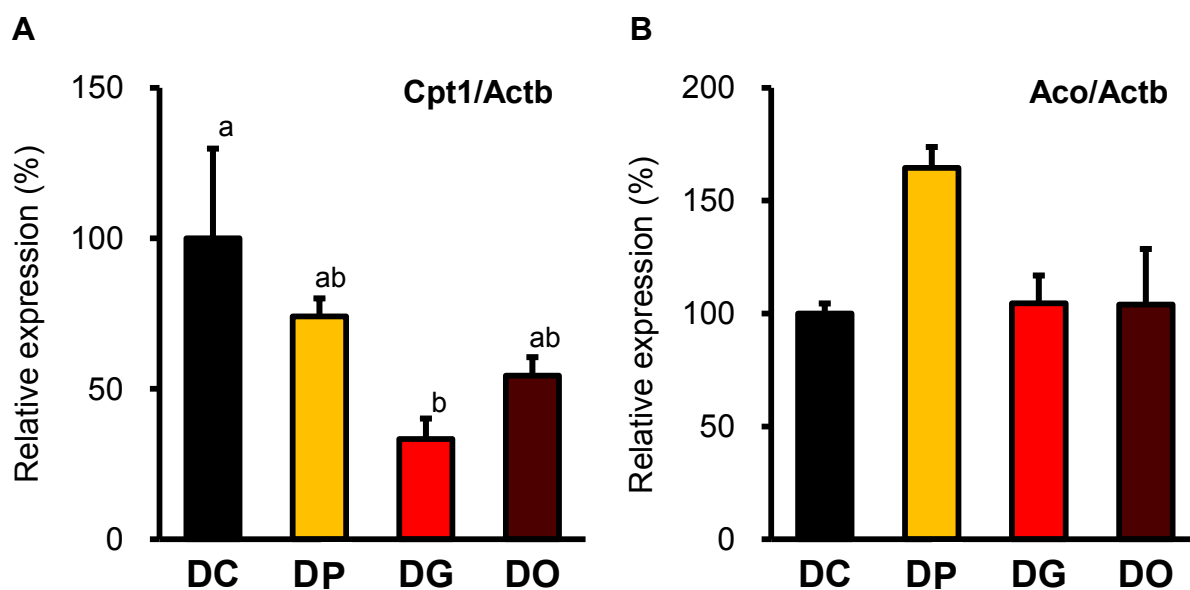
**Fig. 5-4** 型糖尿病対照 KK-A<sup>y</sup> マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK-A<sup>y</sup> マウスの HMG-CoA reductase の遺伝子発現 (A) および Cyp7a1 の遺伝子発現 (B)、SREBP2 の遺伝子発現 (C).

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=5、ただし DC ; n=4). 異なる記号間における有意差は  $p < 0.05$ . 各群の略号は、Table 5-4 に同じ.



**Fig. 5-5** 2型糖尿病対照 KK- $A^y$  マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK- $A^y$  マウスの SREBP1c の遺伝子発現 (A) および FAS の遺伝子発現 (B)、ACC の遺伝子発現 (C)、SCD1 の遺伝子発現 (D).

値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す (n=5、ただし DC ; n=4). 各群の略号は、Table 5-4 に同じ.



**Fig. 5-6** 2型糖尿病対照 KK- $A^y$  マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK- $A^y$  マウスの CPT1 の遺伝子発現 (A) および ACO の遺伝子発現 (B).

値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す. (n=5、ただし DC ; n=4) 異なる記号間における有意差は  $p < 0.05$ . 各群の略号は、Table 5-4 に同じ.

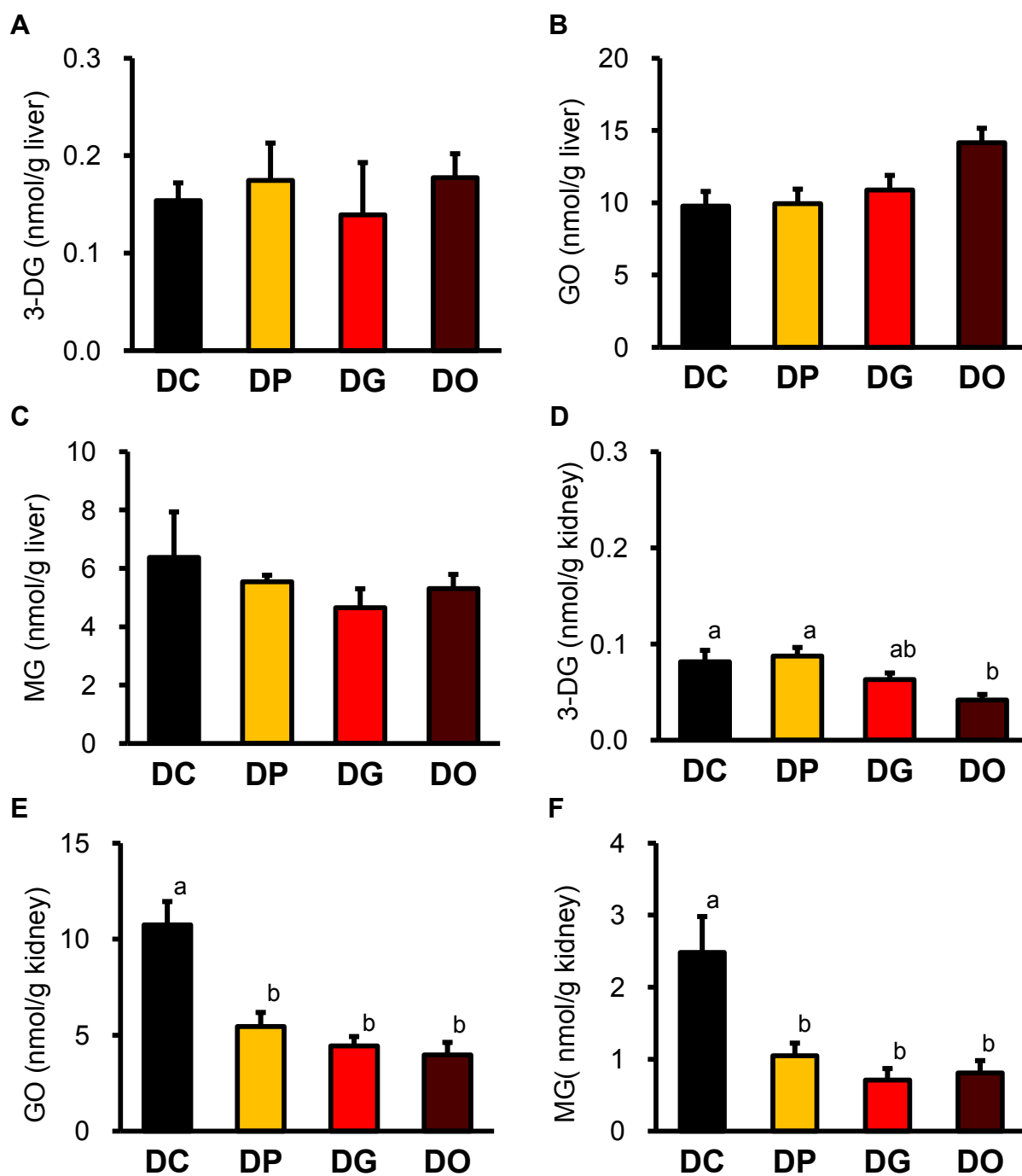
1 1.  $\alpha$ -ジカルボニル化合物

グリケーションの中間生成物である  $\alpha$ -ジカルボニル化合物は、蛍光誘導体化をして HPLC により分離することで測定した。肝臓および腎臓の臓器 1 g あたりに含まれる 3-デオキシグルコソン (3-DG)、グリオキザール (GO)、メチルグリオキザール (MG) の 3 種類の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物量を Fig. 5-7-A~F に示した。肝臓と腎臓に共通して、3 種類の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の中で 3-DG の含有量が最も少なく、最も含有量の多かった GO と比較すると 3-DG は 1/50~1/100 程度となっていた。

肝臓中の 3-DG、GO、MG は、全て 4 群間に有意差は認められなかった (Fig. 5-7-A, B, C)。しかし、DG で MG の量が減少する傾向にあった。

腎臓中の 3-DG は、DC ( $0.081 \pm 0.012$  nmol/g kidney) に対して DP や DG では差がなかったが、DO では有意に減少していた ( $0.042 \pm 0.006$  nmol/g kidney) (Fig. 5-7-D)。腎臓中の GO、MG は、ポリフェノールを摂取した DP、DG、DO において、DC と比べると 1/2 以下と有意な減少が見られた。(Fig. 5-7-E, F)

以上をまとめると、DP、DG、DO が摂取したポリフェノール試料 (それぞれ CP、GE、OL) は、肝臓で生じた  $\alpha$ -ジカルボニル化合物への影響を示さなかったが、腎臓で生じた  $\alpha$ -ジカルボニル化合物に対して減少作用を示していた。



**Fig. 5-7** 2型糖尿病対照 KK-A<sup>y</sup> マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK-A<sup>y</sup> マウスの肝臓 1g あたりの 3-DG (A)、GO (B)、MG (C)、腎臓 1g あたりの 3-DG (D)、GO (E)、MG (F) の量.

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=5、ただし DC のみ n=4)。異なる記号間における有意差は p<0.05。各群の略号は、Table 5-4 に同じ。

## 1 2. Western blotting による AGEs の検出

### (1) 血清中 AGE

Western blotting で膜に転写した血清中の AGE を抗 AGE (CML) 抗体により検出したバンドを Fig.5-8-A に示し、それと同じ分子量範囲の SDS-PAGE 後のゲルを CBB 染色した結果を Fig.5-8-B に示した。抗 AGE (CML) 抗体により検出したバンドは、CBB 染色で検出した血清中タンパク質における 71 kDa、67 kDa、60 kDa、55 kDa の位置のバンドに対応していた。

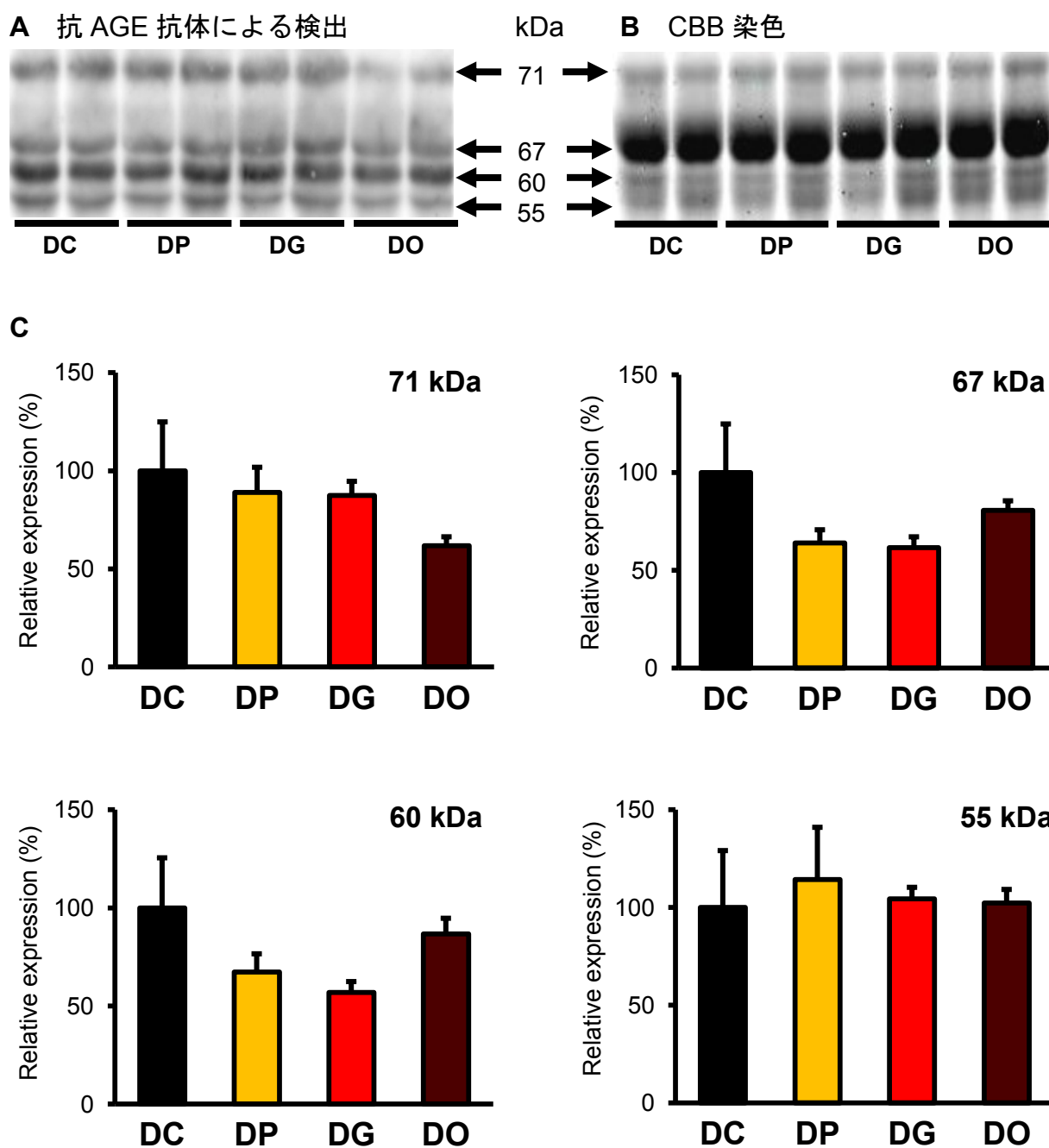
抗 AGE (CML) 抗体により検出した 71 kDa、67 kDa、60 kDa、55 kDa のバンドを定量したところ、いずれのバンドについても DC の群内でのバラつきが大きかったため、4 群間に有意差が認められなかった (Fig.5-8-C)。しかし、67 kDa と 60 kDa の分子量のバンドについて、DC と比較すると DP および DG で減少する傾向 ( $p < 0.1$ ) が見られた。

### (2) 肝臓中 AGE および腎臓中 AGE

肝臓中の AGE を抗 AGE (CML) 抗体で検出した結果、得られたバンドの多くが、4 群間に差がなかった。Fig. 5-9-A の 45 kDa のバンドのグラフに一例を示した。しかし、有意差が生じたバンドもあり、40 kDa のバンドは DC に対して DG で有意に減少していた。(Fig. 5-9-A)

腎臓中の AGE に関しては、60 kDa のバンド (Fig. 5-9-B) で DC と比べて DP および DG で減少する傾向が見られたものの、有意差は認められなかった。その他のバンドに関しても同様に 4 群間に有意差はなかった。Fig. 5-9-B の 43 kDa のバンドのグラフに一例を示した。

グリケーション中間体の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物のようにポリフェノールを摂取した DP、DG、DO の 3 群で AGE の有意な減少が生じることが予測された。しかし、血清中、肝臓中および腎臓中の AGE を定量したところ、DC に対して DG は有意に減少した結果があったものの、DP や DO は減少傾向を示すに留まった。

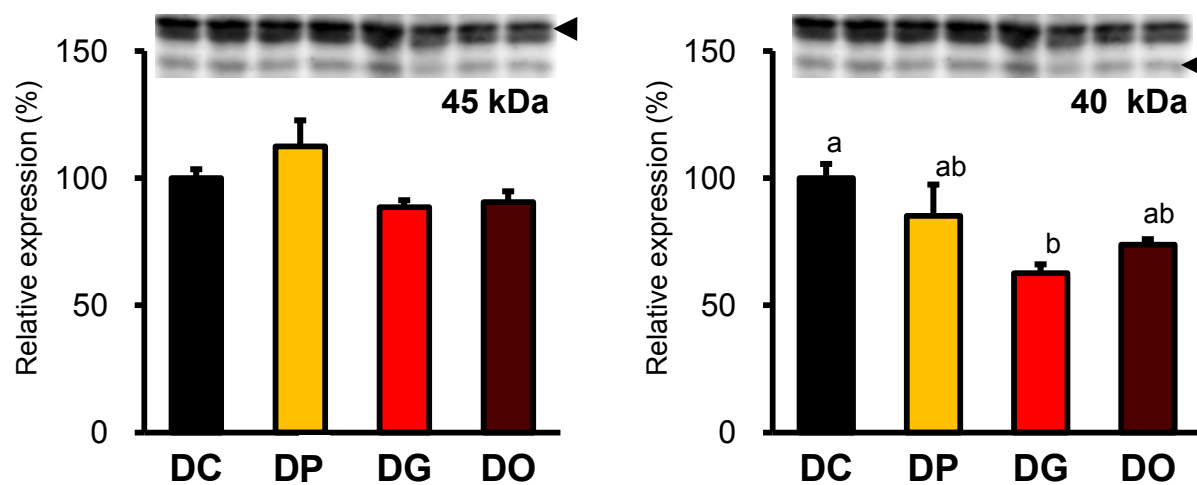


**Fig. 5-8** 2型糖尿病対照 KK- $A^y$  マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK- $A^y$  マウスの血清中 AGE を抗 AGE (CML) 抗体により検出したバンド (A)、血清中タンパク質を CBB 染色で検出したバンド (B)、各 AGE の定量結果 (C)

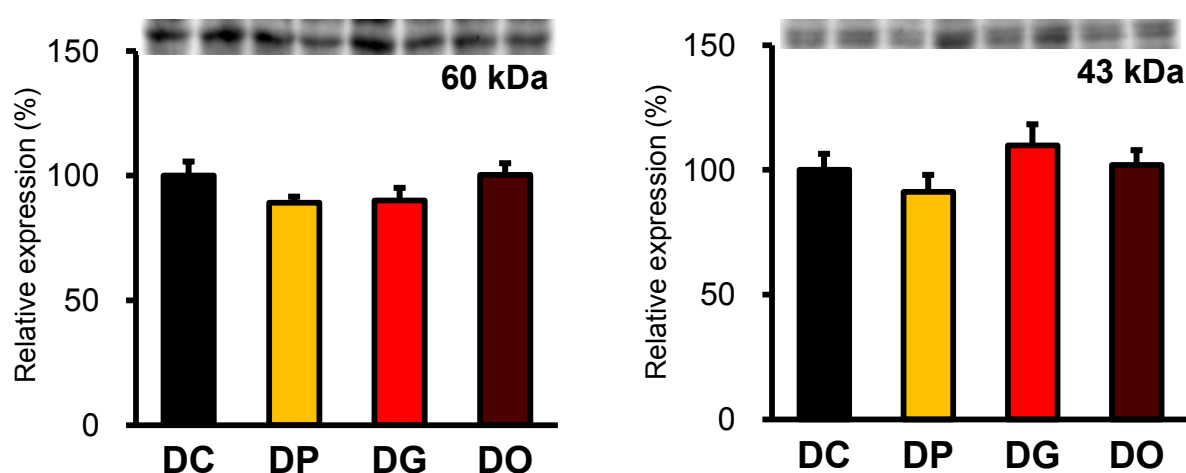
値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す (n=5、ただし DC のみ n=4)。各群の略号は、Table 5-4 に同じ。



## A 肝臓中 AGE



## B 腎臓中 AGE



**Fig. 5-9** 2型糖尿病対照 KK-A<sup>y</sup> マウスおよび各種ポリフェノール摂取 KK-A<sup>y</sup> マウスの肝臓中 AGE を抗 AGE (CML) 抗体により検出したバンドおよび定量結果 (A)、腎臓中 AGE を抗 AGE (CML) 抗体により検出したバンドおよび定量結果 (B)

値は平均値 ± 標準誤差を示す (n=5、ただし DC のみ n=4)。異なる記号間における有意差は  $p < 0.05$ 。各群の略号は、Table 5-4 に同じ。

## 第4節 考察

カリンポリフェノール (CP) にはプロシアニジンが豊富に含まれており、抗糖尿病作用が期待できる。カリンポリフェノールと他の抗糖尿病作用が報告されているポリフェノールについて 2 型糖尿病モデル動物における摂取効果の比較例は少なく、本研究で初めて検討した。比較ポリフェノール試料には、カテキンモノマーを豊富に含む緑茶抽出物 (GE)、プロシアニジンを低分子化処理したライチ低分子化プロシアニジン (OL) を使用した。CP、GE、OL を gallic acid 当量で 0.5% となるようそれぞれを添加した高脂肪食を 2 型糖尿病 KK-*Ay* マウスに摂食させ、糖尿病や肥満に関わる指標にどのような変化が現れ、作用機序にどういった違いが生じるのかを検討した。

高脂肪食を 30 日間摂食した 2 型糖尿病対照 KK-*Ay* マウス (DC) の体重増加に対し、CP が添加された高脂肪食を 30 日間摂食した KK-*Ay* マウス (DP) では体重増加の抑制作用が認められた。GE を摂取した KK-*Ay* マウス (DG)、OL を摂取した KK-*Ay* マウス (DO) でも同様に体重増加が抑制されていた。この要因の一つとして、肝臓脂質蓄積の抑制による肝臓重量の減少が挙げられる。また、測定した脂肪組織重量に群間差はなかった。プロシアニジンが主成分のリンゴポリフェノールやブドウ種子プロシアニジン抽出物など複数の由来の異なるプロシアニジンの摂取によって脂肪組織重量が減少することが報告されている [52,53,72,96]。今回の実験で脂肪組織が減少しなかったのは、実験に使用した動物の種類や飼料の組成、飼育期間が異なることが影響していると考えられる。また、測定しなかった皮下脂肪などの脂肪組織が減少し、体重減少に寄与した可能性がある。

飼育期間中の血糖値は高脂肪食の摂食開始以降、DC では血糖値が 1 週間後には 200 mg/dL 以上も急上昇をし、4 週間後も高値のままであったのに対して、DP および DO ではわずかずつ上昇しながら推移し、DG に至っては飼育期間の 4 週間で減少すら見せた。この血糖値の測定では絶食 1 時間後に尾静脈血を用いたが、同じ絶食 1 時間後の解剖では胃に摂取した飼料が残っていた。つまり、飼育期間中の血糖値は、食事直後の血糖値と考えてよい。食直後の血糖値が抑制されたことは、ポリフェノール試料による吸収阻害作用の可能性を強く示唆している。それを支持するように、カリ

ンプロシアニジンには糖質分解酵素である  $\alpha$ -アミラーゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼの阻害活性が報告されており [67]、本研究で用いたカリンエタノール抽出物 (CE) にも *in vitro* における酵素阻害活性を確認している (他の物質と比較していないので、詳細は示さない)。Gonçalves[56]らは、プロシアニジンの消化酵素阻害機構として酵素タンパク質とポリフェノールの結合であると結論付けており、CE を用いた *in vitro* の検討の際にもポリフェノールと糖質消化酵素をインキュベートすると凝集が生じていた (data not shown)。また、カリンだけでなく、他の植物由来のプロシアニジンにも  $\alpha$ -アミラーゼおよび  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性が多数報告されている [97-100]。緑茶含有ポリフェノールにも糖質消化酵素の阻害活性が示されている [100-102]。

マウスに 12 時間の絶食をさせて OGTT を実施した際、糖負荷後 15 min の血糖値は DC に対して DP および DO で抑制傾向、DG では抑制が認められ、AUC 値もポリフェノールを摂取した 3 群で減少傾向を見せた。この時、ポリフェノール試料は消化管に存在しないので、吸収阻害作用は無関係である。以上のことから、CP、GE、OL の継続摂取により末梢または肝臓における糖取り込み能が改善されていたと考えられる。Pinent ら [103] は、ブドウ種子由来プロシアニジン (GSPE) にはインスリン様作用による脂肪および筋細胞での糖取り込み能を増加させる効果があることを見出した。また、Montagut ら [104] は GSPE がインスリンとは無関係の MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) を介した経路から Akt をリン酸化することにより脂肪細胞における糖取り込み能を回復させたと説明した。今回の実験の DP および DO においても、CP および OL に含まれるプロシアニジンによる糖取り込みの改善作用があったと推測された。ここで、DP ではなかった変化として、DO はインスリン感受性を正常化させるアディポネクチンが DC よりも上昇していた (Table 5-8)。これと同じように、*db/db* マウスにオリゴノールを摂取させた実験でも血中アディポネクチンの上昇が認められ [75]、ヒトの摂取実験でも内臓脂肪低下とともに血中アディポネクチンが上昇するという結果が得られている [74]。以上のことから、OL が脂肪細胞のアディポネクチン分泌を増加させ、インスリン抵抗性改善作用に寄与したと考えられた。一方、緑茶に含有される EGCG の摂取により脂質蓄積が抑制されることで悪玉アディポサイトカインが減少して肝臓でのインスリン抵抗性の改善作用を

示すという報告[45]の他、緑茶の摂取により脂肪細胞へのインスリン結合と糖取り込みを増加させるといった報告もある[43]。以上のように、緑茶ポリフェノールとプロシアニジンがもたらす耐糖能改善作用は、そのメカニズムが異なっている可能性がある。その作用メカニズムの差異が、DP、DG、DOで見られた血糖値低下作用の強弱を生じているとも考えられた。

ここまでは食後の血糖値について述べたが、絶食時であった OGTT 実施時（12 時間の絶食）の 0 min の血糖値では 4 群間に差がなかったことから、摂取した CP、GE、OL は空腹時の血糖値に影響を与えなかったと言える。一方、直前の摂食に影響されない糖化ヘモグロビン HbA1c は、過去 1 カ月の血糖値の平均を反映する。本章で測定した KK-*A*マウスの HbA1c 値から、飼育期間を通して DG、DP および DO の血糖値が抑制されたことが分かった。摂取した各種ポリフェノール試料によって、これまでに述べた吸収阻害作用と耐糖能の改善作用の両方が発揮され、摂取期間中の血糖値を抑制していたと考えられるが、中でも GE を摂取した DG の HbA1c が最も減少していた（Table 5-8）。DG における HbA1c の著減、すなわち、DG の血糖値が飼育期間中低く抑えられていたために、膵  $\beta$  細胞から血糖値に応じたインスリン分泌が行われ、解剖時の血清インスリン濃度が DC と比べて DG で半減したと考えられた。

血糖値は、肝臓における糖新生が重要なカギを握る。糖新生の律速酵素である G6Pase と PEPCK は、正常であれば、食後膵臓から分泌されるインスリンによって発現が抑制される。しかし、正常時は食後にインスリンシグナルを介して Akt の制御を受けるはずの Foxo1 が、2 型糖尿病のようにインスリン抵抗性が生じると、Akt からの制御が効かなくなるために核内へと移行し、標的遺伝子である G6Pase および PEPCK の発現を増加させる。このため、インスリン抵抗性を獲得すると、肝臓における糖新生が亢進され、血中へ放出されるグルコースが増加して高血糖が悪化する。本章では、DP および DO では KK-*A*マウスの肝臓 G6Pase および PEPCK の遺伝子発現を変化していなかった。一方、DG において G6Pase の減少傾向が見られたことは、肝臓における糖新生を GE が抑制していた可能性を示している。Waltner-Low ら [105] は、EGCG が肝臓細胞中の酸化還元状態を調節することで、インスリンと同じ経路を介して G6Pase と PEPCK の発現を抑制していると報告した。また、前出のよ

うに EGCG 摂取による脂質蓄積抑制効果がインスリン抵抗性を改善させる[45]という報告もあり、今回の DG における肝臓脂質減少と一致する。これら、インスリン経路を介した刺激とインスリン抵抗性改善作用の両方が、GE による G6Pase 抑制作用として有力である。

血中トリグリセリド (TG) は、食事の影響を受けやすい。このため、ポリフェノール試料を摂取した DP、DG、DO では DC と比べて、個体差も大きく血清 TG 濃度に差は認められなかった。DO では有意差が出なかったものの DC とは平均値が 100 mg/dL もの差があり、Noh ら[75]がオリゴノール (=OL) を摂取させた db/db マウスでは血中 TG 低下が認められていることから、絶食時間を長くすることで DO での TG 抑制が確認出来る可能性は高い。一方、血中総コレステロール (TC)、HDL-コレステロール (HDL-C) 改善する作用は CP、GE、OL には認められなかった。過去の報告では、オリゴノールとカキプロシアニジンが血中 TC を減少させ[76,106]、リンゴプロシアニジンの場合では TC は変化せずに善玉コレステロールである HDL-C の濃度を上昇させていた[107]。今回使用した高脂肪食摂取 KK-A<sup>y</sup> マウスは、血中 TC が大きく上昇しなかった (以前の検討において通常食と高脂肪食を摂取した 2 型糖尿病マウスを比較すると、血中 TC の差はなかった) ために、ポリフェノールによる改善効果も発生しなかったと考えられた。

本章の実験において、脂質に関してポリフェノール試料の効果が顕著に表れていたのが、肝臓であった。肝臓中 TC の減少の理由として、コレステロール合成の抑制または胆汁酸への異化の促進が想定されたが、HMG-CoA reductase の遺伝子発現は DC と比べると DP で増加し、CYP7A1 の遺伝子発現は 4 群に差がなかったため、合成の抑制も異化の促進も否定された。これは、HMG-CoA reductase が DP で上昇したというよりも、肝臓コレステロールが過剰になっている DC において、HMG-CoA reductase がコレステロールによるフィードバック制御を受けた結果と考えられた。HMG-CoA reductase の転写を促すタンパク質である SREBP2 の遺伝子発現は、細胞内コレステロール量の減少により上昇する[108]。Lee ら[106]や Baselga-Escudero ら[109]の報告によると、SREBP2 遺伝子発現がプロシアニジンによって下方制御されることで、肝臓脂質の低下作用をもたらす。また、オリゴノールについても弱いな

がらも SREBP2 のタンパク質発現抑制が認められている[76]。しかしながら、今回のポリフェノール試料を摂取したマウスにおいて肝臓脂質は低下していたものの、CP や OL による SREBP2 の遺伝子発現抑制作用はなかった。

その次に、肝臓 TC が減少する原因として腸管腔におけるコレステロールの吸収阻害と胆汁酸の排泄促進（再吸収阻害）が考えられた。しかし、CP、GE、OL を摂取した KK-A<sup>y</sup> マウスの胆汁酸排泄は減少していた。これには、糞中胆汁酸の測定方法（酵素法を用いたキットによる定量）が関係していると考えられ、胆汁酸抽出物を液体クロマトグラフィーによって分離し、胆汁酸の種類別に定量を行うことで本章と異なる結果が得られる可能性は高い。一方で、リンゴプロシアニジンには、コレステロールと胆汁酸の吸収阻害作用が報告されている[107]。また、Osakabe ら[110]は、プロシアニジンの重合度が大きくなるほどミセルへのコレステロール溶解度が減少することを示した。これらの報告から、糞中コレステロールが DC と比べて DP で増加していたが DO では増加しなかったのは、DP の摂取した CP の方が、DO の摂取した OL（低分子化プロシアニジン）よりも高分子量のプロシアニジンを豊富に含んでいたことが要因であると予想された。また、緑茶ポリフェノールによるコレステロール吸収阻害効果は生体コレステロール減少のメカニズムとして既に知られている[111]。以上より、腸管からのコレステロールの吸収を CP および GE が阻害していたことが、DP および DG における肝臓 TC 減少の主因となったことが示唆された。OL については、コレステロールの合成阻害や異化促進、吸収阻害といった作用も見られなかったことからメカニズムは CP や GE とは異なるが、詳細についてはさらなる検証が必要である。

続いて、肝臓 TG の減少のメカニズムを考えた時、試料中のポリフェノール成分が吸収された場合に肝臓内で起きる変化としては脂肪酸合成の抑制、 $\beta$ 酸化の亢進が予想された。オリゴノールやブドウ種子プロシアニジン抽出物の摂取により脂肪酸の合成過程ではたらく FAS の遺伝子発現を抑制するとの報告[76,109]がある。しかし、脂肪酸合成に関わる ACC および FAS の遺伝子発現は CP、GE、OL の摂取により抑制されなかった。ただ、ACC や FAS の転写因子である SREBP1c は DP と DG で抑制傾向を見せた。Yokozawa ら[112]は、肝臓における SREBP1c をはじめとした脂質代

謝調節因子をプロシアニジンが制御することで肝臓脂質を抑制すると報告している。SREBP1c は脂質代謝のみならず、インスリン抵抗性とも関与しているため[113]、今回の CP や GE の摂取で認められた SREBP1c の抑制傾向は脂肪酸合成の調節と連動していなかったが、肝臓でのインスリン抵抗性の改善に部分的に関与した可能性が考えられた。β酸化については、ミトコンドリアでのアシル CoA の輸送に関わる CPT1 が、ポリフェノール試料の摂取によって増加すると推察されたが、むしろ低下する結果となった。一方、ACO は DP で増加傾向があったことから、小胞体における β酸化が増加して肝臓 TG の減少の一因になった可能性がある。もう一つ、肝臓外での肝臓 TG の減少要因として、吸収される前あるいは吸収されない形態のポリフェノール成分による腸管からの TG 吸収阻害作用が考えられた。TG 吸収阻害作用は、カリンのポリフェノール[67]、プロシアニジン[57]、緑茶ポリフェノール[114]などで報告されているが、今回ポリフェノール試料をマウスに与えた場合では認められなかった。以上のように、肝臓における TG 減少作用の理由について特定に至らず、更なる検討が必要であると考えられた。特に遺伝子発現解析では、解剖のタイミング(絶食時間)が影響与えている可能性が高く、詳細なメカニズムは細胞を用いた実験方法を用いた方が明解な結果が得られるだろう。今回、CP、GE、OL による肝臓脂質減少メカニズムは明らかにならなかったものの、肝臓脂質が減少したこと自体が、肝臓での過剰脂肪蓄積による炎症誘導とそれに伴う酸化ストレスを軽減させ[76,106,112]、肝臓でのインスリン抵抗性の緩和に貢献した可能性がある。

グリケーションは糖尿病などで亢進し、形成された AGE は糖尿病合併症や血管傷害を招く。AGE の形成過程で生じる α-ジカルボニル化合物は、それ自体に高い反応性がある物質なので、AGE とともに生体内での存在量を抑制することが重要になる。今回採取した KK-*Ay*マウスの尿のデータ (Table 5-8) では、尿中アルブミンが減少傾向であったことから、DP、DG、DO における腎臓の状態は DC よりも改善されていた可能性が高く、腎臓中 AGE の抑制を期待できた。ルチン[95]、緑茶茶葉[42]には、糖尿病動物における腎臓 AGE 量を抑制する効果が認められている。Noh ら[75]は、オリゴノールが腎臓脂質の減少と抗酸化活性を介して AGE を減少させたと述べた。また、第4章で示したように、CP は GE や OL 以上の抗 AGE 形成作用を *in vitro*

において発揮したことから、生体内においても AGE の抑制作用が見込まれた。しかしながら、AGE が糖尿病性腎症の発症と関連が深い[115]とされる腎臓において、AGE は今回の CP、GE、OL の摂取によって減少しなかった。

AGE と同じように糖尿病性腎症との関与が指摘されている  $\alpha$ -ジカルボニル化合物 [22,26] の形成は、腎臓において DP、DG、DO で GO および MG が減少し、さらに DO のみで 3-DG が減少した。グルコースは、グリケーションの最初の物質であるため、摂取したポリフェノールによる血糖値抑制効果も腎臓における  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の減少に寄与していると考えられた。また、シナモンプロシアニジンが *in vitro* において MG 消去能を発揮して AGE 形成を阻害する[38,39]ことが報告されており、Wang ら[50]は *in vitro* においてベリー類のポリフェノールによる  $\alpha$ -ジカルボニル化合物形成阻害活性を示し、メカニズムとしてポリフェノール分子と MG、GO との複合体形成があったと記している。他の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の減少メカニズムとしては、レスベラトロールに MG や GO を消去する酵素のグリオキザラーゼを誘導する作用が報告されている[116]。それ以外にも、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物の生成は活性酸素種 (ROS) が一因となる[18]ことから、生体内に元々存在する抗酸化機構をポリフェノールが活性化させることで ROS が減少し、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物の形成が減ったことも考えられる。それを支持するように、カリン含有ポリフェノール[67]やオリゴノール[75]、または緑茶[82]の摂取により、血中での抗酸化指標の増加や過酸化物の減少が報告されている。これには、吸収されて血中に存在しているポリフェノール自体が抗酸化能を発揮していた可能性も考えられる。抗酸化能が CP、GE、OL を摂取したマウスにおいても生じていれば、血中抗酸化能の増加が血中の一部 AGE を減少傾向へ導いたと考えられるので、血中の酸化ストレスに対する指標を今後測定することが重要である。非酵素的な経路であるグリケーションとは別に、3-DG やメチルグリオキザールの生成経路には酵素的な経路であるポリオール経路が存在する[15]が、その律速酵素であるアルドース還元酵素の活性は、今回の KK-*Ar* マウスの腎臓においてポリフェノールの摂取の影響を受けていなかった (data not shown)。

肝臓においては、GE が一部 AGE を減少させていたが、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物の形成 (MG) の抑制傾向が関連した可能性がある。本章で得られた結果より、GE は



血糖値の抑制作用が最も強く、摂取させたポリフェノールにおいて唯一肝臓での糖新生も抑えられる傾向にあったため、肝臓におけるグリケーションを抑制させることができたと考えられる。また、肝臓での AGE 減少はオリゴノール[76]で報告されているが、今回の OL の摂取では肝臓 AGE は減少しなかった。これは、動物実験の条件、摂取するポリフェノール試料の量が AGE 減少作用の有無を左右したと考えられた。

以上のように、実験データを元に検証した結果、CP、GE、OL による  $\alpha$ -ジカルボニル化合物抑制の作用機序の特定はできなかったが、前述した考察を総合すると、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物が腎臓中では減少し、血中では減少傾向となったメカニズムとして、血糖値抑制作用の 2 次的作用に加え、摂取したポリフェノールによる直接的あるいは間接的な抗酸化作用が貢献した可能性が高い。なお、今回の実験では、グリケーションの中間体 ( $\alpha$ -ジカルボニル化合物) と最終生成物 (AGE) の減少が連携していなかったが、AGE の検出にトータルホモジネートを使用したことが不一致の一因となったと予想された。CML は Lys 残基をもつあらゆるタンパク質が反応して形成される可能性があるため、今回の実験で検出したバンド上に複数の AGE が重なり、増減を相殺したおそれがあるため、膜画分や細胞質画分といった分画を行うことにより CML について  $\alpha$ -ジカルボニル化合物と同様な変化を検出できるかもしれない。

ここまで述べた血糖値低下、肝臓 TG 低下作用および抗糖尿病合併症作用のメカニズムは、GE の主成分であるカテキンモノマーであれば吸収されて血中に相当量存在する[117]ことが可能だが、腸管からの吸収が乏しく血中での存在量は極めて微量とされるプロシアニジン (特に 3 量体以上のプロシアニジン) [55,118]では現実的ではないかもしれない。仮に、CP や OL の消化管を経た吸収が非常に困難であったとしても、消化管内において AGE を捕捉する能力、あるいは抗酸化性を発揮する可能性は、第 4 章での *in vitro* における検証から判断して十分にあり得る。

本章で実施した 2 型糖尿病モデル動物を用いた実験により、CP を摂取すると、肥満および肝臓脂質抑制作用、血糖値抑制作用、さらに腎臓中 GO および MG 量の減少作用が発揮された。血糖値抑制作用は、糖質吸収阻害および肝臓脂質低下によるインスリン抵抗性改善が主因と考えられ、CP による糖尿病の悪化を緩和する効果が示唆された。肝臓 TC の低下要因として、コレステロール吸収阻害が実験データから示さ

れたが、肝臓 TG 減少は原因の推測ができなかった。腎臓中 GO および MG 量は、血糖値抑制作用の他、CP がもたらす抗酸化作用によって減少した可能性が示唆され、腎臓でのグリケーションによる傷害を軽減していたと考えられた。これにより糖尿病性腎症の進行抑制効果が期待できた。一方、GE の摂取では、既に述べた CP の摂取効果に加えて、肝臓における糖新生抑制作用が示唆され、血糖値の低下に寄与したと考えられた。また、GE を摂取した KK-*A* マウスでは CP や OL と比べると肥満抑制作用や血糖値抑制作用が強く、血中へのインスリン分泌が抑えられていたことから、全身のインスリン抵抗性が悪化していなかったと考えられる。以上のことから、GE の摂取による 2 型糖尿病の進行抑制効果とそれに伴う合併症や疾病リスクの低減効果が期待できた。もう一つの比較物質である OL の摂取では、CP の摂取効果に加えて、血中のアディポネクチンを上昇させる効果が認められた。このアディポネクチンの増加によって肝臓や末梢組織におけるインスリン抵抗性が改善され、血糖値低下の一因になったと考えられる。このことから、OL も CP と同様に糖尿病の悪化を緩和する効果、糖尿病性腎症の進行抑制効果を有すると期待できた。ここで示したように、CP の抗糖尿病作用は GE、OL の抗糖尿病作用と共通した部分が多くあったが、異なる部分もいくつか存在した。由来の異なるポリフェノールとの異なる抗糖尿病作用のメカニズムを明らかにすることで、カリンに含まれるポリフェノール成分の差別化を図ることができるため、さらなる研究により CP の抗糖尿病作用のメカニズムを解明していくべきだろう。

## 第6章 カリンポリフェノールの腸管吸収

### 第1節 目的

カリンポリフェノール (CP) は、緑茶抽出物 (GE) およびライチ低分子化プロシアニジン (OL) と *in vitro* における抗酸化活性と抗グリケーション活性を比較し、同等かそれ以上の活性が認められた。第5章では、同じ総ポリフェノール量で KK-A<sup>y</sup> マウスに摂取させたところ、CP または OL の摂取により血糖値抑制傾向が認められたが、GE の摂取による血糖値抑制作用の方が上回っていた。これに対し、腎臓中  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の減少や肝臓脂質減少の作用は CP、OL、GE のいずれを摂取したマウスでも同程度であった。このような作用の差異は、各種ポリフェノール試料の作用成分が異なることが原因である他に、ポリフェノール成分が腸管から吸収されて作用する場所まで到達するかといった生物利用能が異なることが原因として考えられた。

GE の主成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) やカテキンモノマーを摂取すると、消化管から吸収されて血中に検出される[119]。CP や OL の主成分であるプロシアニジンは、重合度が大きくなるほど吸収が難しいと考えられているが、2~3量体であれば抱合体化を受けずに血中で微量に検出されている[118,120]。その他に、プロシアニジンは盲腸を中心に存在する腸内細菌で代謝を受けてフェノール酸となり、吸収されるとの報告もある[55,121]。しかしながら、プロシアニジンの小腸からの吸収を生体で直接的に示した報告は少なく、由来の異なる複数のプロシアニジン試料を用いた比較はいまだ行われていない。

以上をふまえ、上部消化管である空腸に腸管ループを作製し、CP、GE および OL を注入した後の門脈血と腸管内残存ポリフェノールを調べることにより、ポリフェノール成分の吸収を比較することにした。

## 第2節 方法

### 1. 動物実験

#### (1) 実験動物および飼育条件

実験動物は、5週齢 Wistar 系雄性ラット (90~110 g、日本エスエルシー株式会社；静岡) 20 匹を用いた。個別にステンレスケージに収容し、恒温 (22±1 °C)、恒湿 (50±10 %) に保った動物室内で、午前 6 時から午後 6 時までを明期とした明暗 12 時間周期で飼育した。予備飼育の最初の 4 日間は固形飼料 (マウス、ラット、ハムスター用飼育繁殖固形飼料 CE-2、日本クレア株式会社) を与え、その後は AIN-93G に準じた 20%カゼイン飼料 (組成は Table 2-1 の 20C を参照) を自由摂食させ、体重が 160 g 程度になるまで飼育した。飼育期間中を通して、水道水を自由に飲水させた。

#### (2) 空腸ループの作製 [122]

解剖前日の 21 時から 16 時間絶食させ、生理食塩水投与群 (S)、カリンポリフェノール投与群 (C) 緑茶抽出物投与群 (G)、ライチ低分子化プロシアニジン投与群 (O) の 4 群に群分けした。腸管ループへの投与量は、ポリフェノール濃度 (gallic acid 当量 ; GAE) で 300 mg GAE /kg body weight とした。各試料溶液は、ポリフェノール濃度で 150 mg GAE/mL となるよう生理食塩水にそれぞれ溶解または懸濁し、腸管ループへの投与液量は、300  $\mu$ L とした。

ラットへの麻酔は、ケタラル (第一三共株式会社；東京) およびセラクター (バイエル薬品株式会社；ドイツ) を容積比 100 : 16 で混合し、体重 100 g 当たり 188  $\mu$ L を腹腔内投与した。腹部中央部分の正中線上を必要最小限だけ開腹し、腸管を傷つけないように綿棒で空腸部分を引き出した。空腸を探す際には、十二指腸曲部で腸管を固定しているトライツ靭帯を目印にした。トライツ靭帯から 5 cm 下流を 70% エタノールに浸漬しておいた絹製縫合糸 (No. 3、株式会社夏目製作所；東京) で空腸ループ上端を結紮した。腸管に 10 cm 長の紐を添わせ、ループ上端の結紮部分より 10 cm 下流をループ上端と同様に結紮した (空腸ループの下端)。生理食塩水に完全に

溶解している試料は、空腸ループの下端側より、ループを作製した腸管内に 27 G の注射針を用いて注入した。生理食塩水に懸濁している試料（CP および OL）は、空腸ループ下端側に切り込みを入れて 18 G の注射針（先端は腸管を傷つけないよう、やすりで丸くした）を用いて注入した。（Fig. 6-1 参照）試料注入後は、慎重に腸管を腹腔内に戻してクリップで開腹部分の皮を挟み、タオルをかけて保温した状態で 30 分間静置した。

試料注入より 30 分経過後に門脈血からの採血を開始した。まず、腹部のクリップを外し、採血作業の視界が確保できるように腹部を開いた。採血は、ヘパリン処理をした 23 G 注射針を付けた 5 mL 容シリンジを用い、肝臓内の血液を吸わないように少しずつ内筒を引いて行った。採血後のラットは、下大動脈より放血して屠殺した。その後、腸管ループ部分を切り出してループの長さを測った。続いて、腸管内に残った試料を回収するため、15 mL 容プラスチックチューブの上部で腸管ループの上下端を切り取り、腸管内にゾンデを差し込み 5 mL の生理食塩水で腸管ループ内を洗浄した液を回収した。この腸管洗浄液は、10 mL 容メスフラスコに移して全量を 10 mL にし、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。門脈血はヘパリナイズした試験管に移し、遠心して分離した血漿は $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

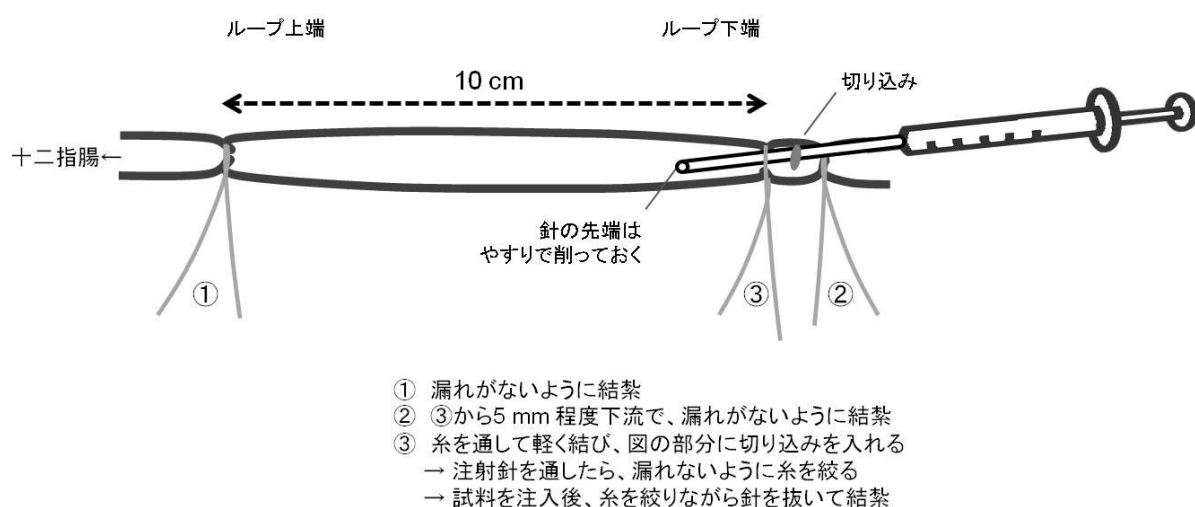


Fig. 6-1 腸管ループ作製方法（懸濁試料を注入する場合）

## 2. 腸管ループ内のポリフェノール量の測定

### (1) 総ポリフェノール量

腸管内に残存したポリフェノールの総ポリフェノール量は、Folin-Denis 法により求めた。操作は、第2章 - 第2節 - 1 - (2)と同様に行った。ただし、腸管内に投与する前の各ポリフェノール試料は1,500倍に、腸管ループから回収した洗浄液の試料は20倍に、それぞれ水を用いて希釈したものを測定試料とした。また、生理食塩水投与群は、投与前試料（生理食塩水）および投与後試料の希釈は行わず、原液を測定試料とした。

### (2) プロシアニジン量

腸管内に残存したポリフェノールのプロシアニジン量は、DMAC法により求めた。操作は、第3章 - 第2節 - 3と同様に行った。ただし、腸管内に投与する前のCPは2,000倍、GEは8,000倍、OLは4,000倍、腸管ループから回収した洗浄液の試料は全て60倍に、それぞれアッセイ溶液Aとアッセイ溶液Bを用いて、最終的な測定試料の水分含有率が5%となるように希釈したものを測定試料とした。また、生理食塩水投与群は、Folin-Denis法で検出されなかったことから測定を行わなかった。

## 3. 門脈血中ポリフェノールの HPLC による分析 [123]

小腸で吸収される場合、ポリフェノールは小腸上皮細胞内でグルクロン酸抱合体化や硫酸抱合体化を受ける。今回は、門脈血中のグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体に  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase を作用させて抱合体を外してから、HPLC 分析を行った。

## &lt;分析サンプルの調製&gt;

## 【試薬】

- ・ 175 mM 酢酸

酢酸 1 mL を水で希釈し、100 mL とした。

- ・ 6 N 塩酸

塩酸 49.58 mL を水で希釈し、100 mL とした。

- ・  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase (EC 3.3.1.31, Sigma Aldrich ; USA)

## 【操作】

門脈血の血漿 300  $\mu$ L が入ったマイクロチューブに  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase 10  $\mu$ L を添加し、175 mM 酢酸 120  $\mu$ L 程度で pH 4~5 になるよう pH 試験紙を用いて調整した。よく混和してから、37°C で 45 分間インキュベーションした。インキュベーションの終了とともに 6 N 塩酸 100  $\mu$ L を加えて酵素反応を停止させ、さらに 4°C に 1 時間静置してタンパク質を沈殿させた。その後、4°C、5,000 $\times$ g で 10 分間遠心した上清を固相抽出カートリッジ (Sep-Pak Plus C18 cartridge, Waters ; USA) に通した。カートリッジはメタノール 2.5 mL と 0.1%ギ酸 2.5 mL でコンデューションを行い、血漿サンプルの上清を通した後、0.1%ギ酸 5 mL で洗浄し、100%メタノール 5 mL で溶出させた。カートリッジより溶出したサンプルは、ロータリーエバポレーター (EYELA Type N-1N) を用いて溶媒を乾固し、メタノール 250  $\mu$ L に再溶解した。メタノールに溶解したサンプルを 4°C、15,000 $\times$ g で 5 min 遠心後、上清をフィルター (Millex-LH 0.45  $\mu$ m, 4 mm, Merck Millipore ; USA) に通し、HPLC 分析用サンプルとした。

### <HPLC 分析>

#### 【ポリフェノール試料】

- ・ 500 µg/mL カリンポリフェノール (CP)
- ・ 50 µg/mL 緑茶抽出物 (GE)
- ・ 500 µg/mL ライチ低分子化プロシアニジン (OL)

各試料はメタノールに溶解後、フィルター (Millex-LH 0.45 µm, 4 mm, Merck Millipore) に通し、HPLC 分析用サンプルとした。(なお、CP および OL の濃度は当初 50 µg/mL で調製したものの、ピークの S/N 比が不良であったため濃度を上げ、500 µg/mL で実施した。)

#### 【標準物質】

- ・ 50 µg/mL エピガロカテキンガレート (EGCG) (三井農林株式会社 ; 東京)
  - ・ 100 µg/mL (+)-カテキン (クリタ高純度試薬、クリタ分析センター株式会社 ; 茨城)
  - ・ 100 µg/mL (-)-エピカテキン (クリタ高純度試薬、クリタ分析センター株式会社)
  - ・ 100 µg/mL エピガロカテキン (クリタ高純度試薬、クリタ分析センター株式会社)
  - ・ 100 µg/mL プロシアニジン B1 (クリタ高純度試薬、クリタ分析センター株式会社)
  - ・ 100 µg/mL プロシアニジン B2 (クリタ高純度試薬、クリタ分析センター株式会社)
- 各標準物質はメタノールに溶解した。

#### 【移動相】

- ・ アセトニトリル (E CHROMASOLV®, Sigma Aldrich ; USA)
- ・ 0.1% ギ酸水溶液

超純水にギ酸 (HPLC 用、和光純薬株式会社) 1 mL を加え、全量を 1 L とした。

#### 【操作】

HPLC 分析は Table 6-1 に示した条件で行った。



Table 6-1 HPLC 分析条件

ポンプ	LC-10AT VP (日本分光株式会社 ; 東京)
流速	1 mL/min
カラム	Lichrosphere 100 RP-18e (5 $\mu$ m) (ODS カラム) (Agilent Technologies ; USA)
カラム温度	40°C (CO-2065 Plus、日本分光株式会社)
移動相	A 液 : 0.1%ギ酸水溶液 B 液 : アセトニトリル
グラジエント	0-32 min : 5 - 33% B 液
検出器	UV-2075 Plus (日本分光株式会社)
検出波長	280 nm
Inject volume	5 $\mu$ L

#### 4. 統計処理

得られた測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。各群間の比較は分散分析 (ANOVA) を行った後に、Tukey multiple comparison test で多重比較検定を行った。P<0.05 を有意と判定した。統計処理には Instat3.0 (GraphPad Software ; USA) を使用した。

## 第3節 結果

## 1. ラット空腸ループの長さ（実測値）

ラットの空腸に作製した腸管ループの実際に測定した長さを Table 6-2 に示した。操作上、誤差は生じたが各群間に有意差はなかった。

**Table 6-2** 生理食塩水および各種ポリフェノール試料を注入したラット空腸ループの実際の長さ（cm）

	S	C	G	O
ループの長さ（cm）	11.5 ± 0.7	10.5 ± 0.6	12.7 ± 1.2	12.0 ± 0.7

値は平均値 ± 標準誤差を示す。（n=5）

各群の略号は、以下の通り。

S：生理食塩水投与群

C：カリンポリフェノール（CP）投与群

G：緑茶抽出物（GE）投与群

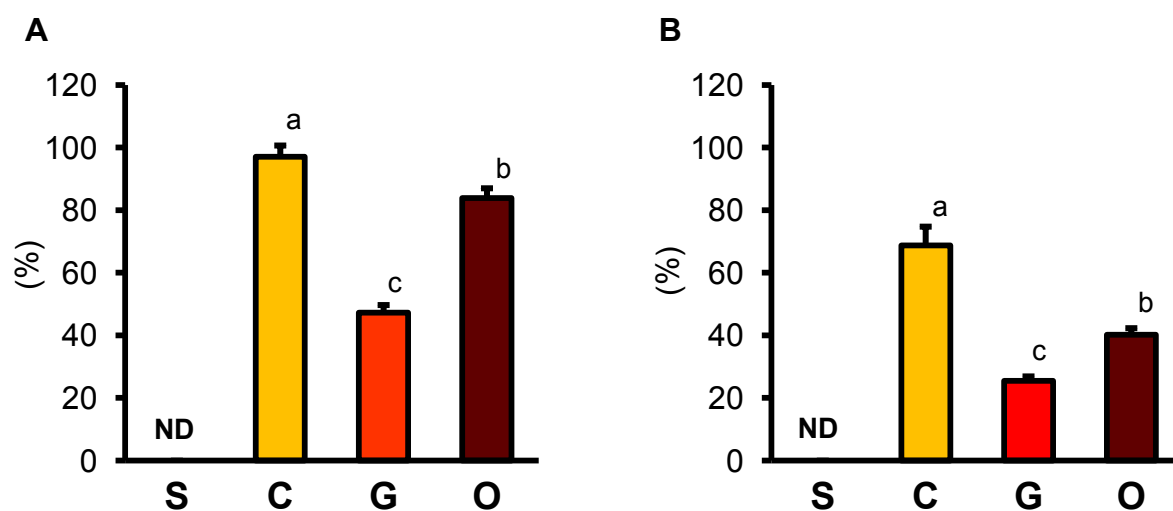
O：ライチ低分子化プロシアニジン（OL）投与群

## 2. ラット空腸ループに投与したポリフェノールの残存率

ラットの腸管ループに注入後、回収したサンプル 10 mL 中の総ポリフェノール量（またはプロシアニジン量）を、腸管ループに注入する前のポリフェノール試料 300  $\mu$ L 中の総ポリフェノール量（またはプロシアニジン量）で割り、百分率でポリフェノールの残存率を表した。

総ポリフェノール量としての腸管への残存率は、S（生理食塩水を注入）では注入前後のサンプルでポリフェノールの検出はなく、C（カリンポリフェノールを注入）では 97.0%、G（緑茶抽出物を注入）では 47.2%、O（ライチ低分子化プロシアニジンを注入）では 83.8% だった（Fig. 6-2-A）

プロシアニジン量としての腸管への残存率は、S では注入前後のサンプルでプロシアニジンの検出はなく、C では 68.7%、G では 25.5%、O では 40.2% となった。（Fig. 6-2-B）



**Fig. 6-2** ラット空腸ループ内に残存した各種ポリフェノール試料の総ポリフェノール量 (A) とプロシアニジン量 (B). ND=no detectable.

値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す. (n=5) 異なる記号間における有意差は  $p < 0.05$ . 各群の略号は、Table 6-2 に同じ.

### 3. 門脈血中ポリフェノールの HPLC 分析

空腸ループに注入する前の CP、GE および OL を ODS カラムで分離したときのクロマトグラムを、それぞれ Fig. 6-3-A、B、C に示した。各標準物質のクロマトグラムにおいてピークが検出された時間は、EGCG で 14.7 min、カテキンで 11.8 min、エピカテキンで 14.3 min、エピガロカテキンで 10.5 min、プロシアニジン B1 で 10.1 min、プロシアニジン B2 で 13.1 min であった (Fig. 6-3-D ~ I)。CP のクロマトグラムでは、最も高さが大きいピークがプロシアニジン B2 の溶出時間と同じになり、他にはプロシアニジン B1、エピカテキンと同じ時間にピークが検出された。また、主成分が EGCG であることが明らかな GE のクロマトグラムでは、メインピークの溶出時間が EGCG の溶出時間と一致し、その他のピークはエピガロカテキン、カテキン、エピカテキンの溶出時間と同じであった。OL のクロマトグラムでは、プロシアニジン B2、エピカテキン、EGCG と同じ時間にピークが検出された。

空腸ループに生理食塩水、CP、GE および OL を注入後、採取した門脈血の血漿サンプルを ODS カラムで分離したときのクロマトグラムはそれぞれ Fig. 6-4-A~D に示した。生理食塩水を注入した群 (S) と比較すると、CP を注入した群 (C) では同一のピークパターンとなり、CP 由来のピークは一切検出されなかった (Fig. 6-4-B)。また、プロシアニジン B2 と同じ溶出時間 (13.1 min) に検出された CP の主要ピークは、C のクロマトグラムにおいて血漿由来のピークと同一の保持時間だったため、吸収の有無を確認出来なかった。GE を注入した群 (G) は、Fig. 6-4-C に示したように、10.5 min (エピガロカテキン) および 11.8 min (カテキン) に比較的小さなピークに加え、15 min 前後にはピーク高の大きい 2 つのピーク (エピカテキンおよび EGCG) が検出され、GE 由来の成分の吸収が確認された。OL を注入した群 (O) には、Fig. 6-4-D に示したように 14.3 min (エピカテキン) のピークがいずれの個体でも検出されたが、OL の主要ピークであった EGCG と同じ溶出時間 (14.7 min) のピークは 1 個体のみを確認された (Fig. 6-4-D 上から 4 番目のクロマトグラム)。

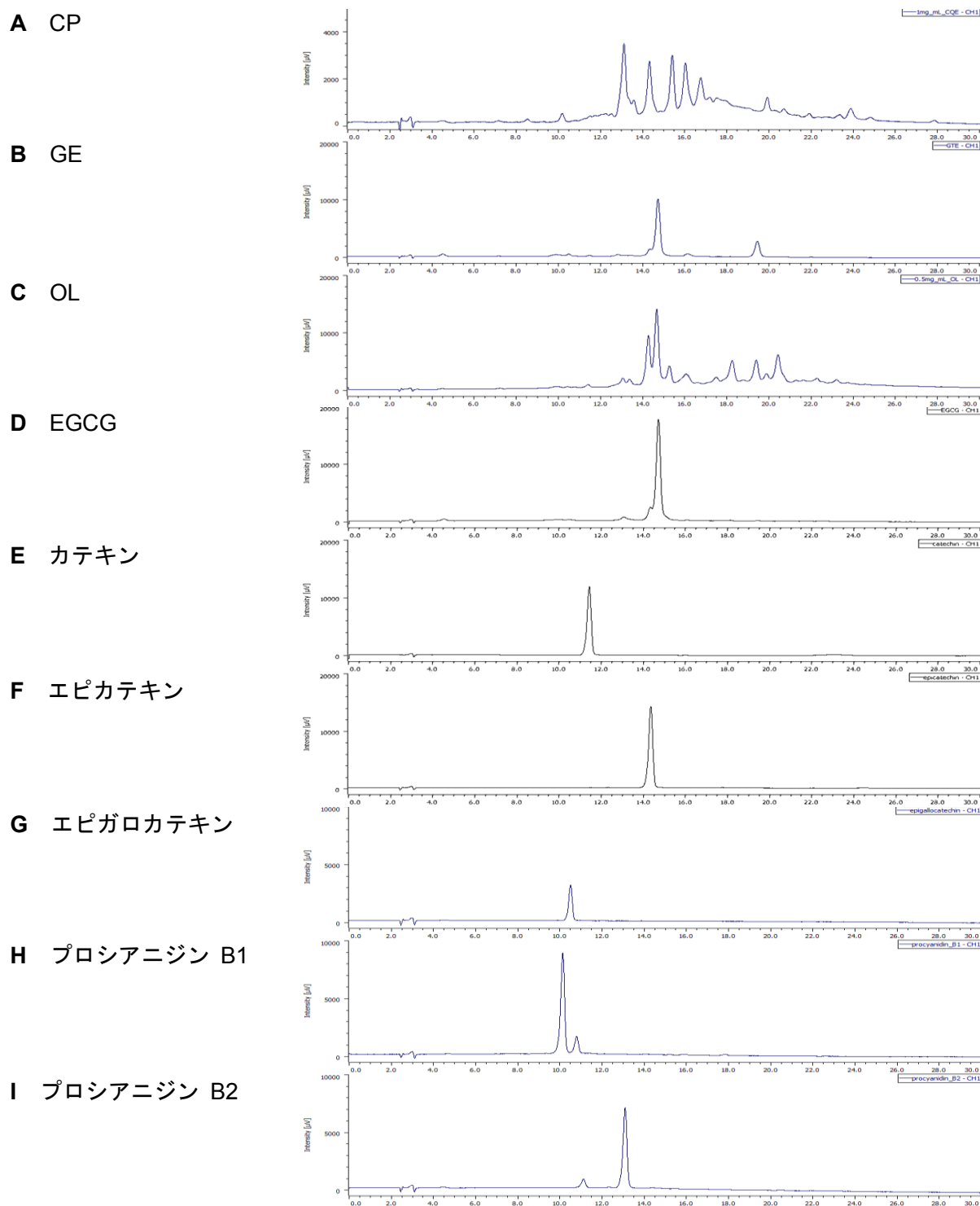
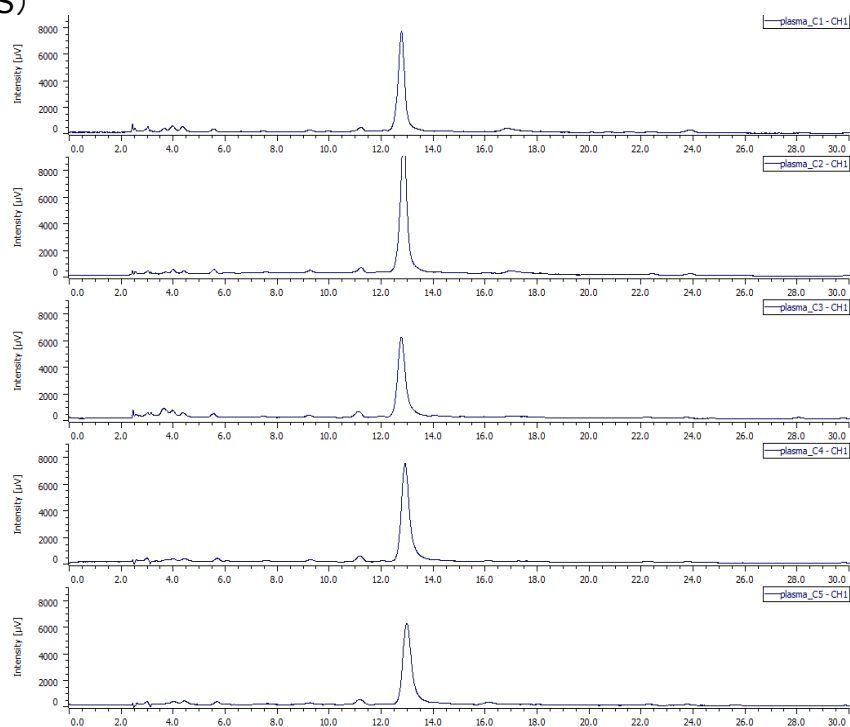


Fig. 6-3 ODS カラムで分離したラット空腸ループ内に注入する前の CP (A)、GE (B)、OL (C) のクロマトグラムおよび EGCG (D)、カテキン (E)、エピカテキン (F)、エピガロカテキン (G)、プロシアニジン B1 (H)、プロシアニジン B2 (I) のクロマトグラム。

## A 生理食塩水注入群 (S)



## B カリンポリフェノール (CP) 注入群 (C)

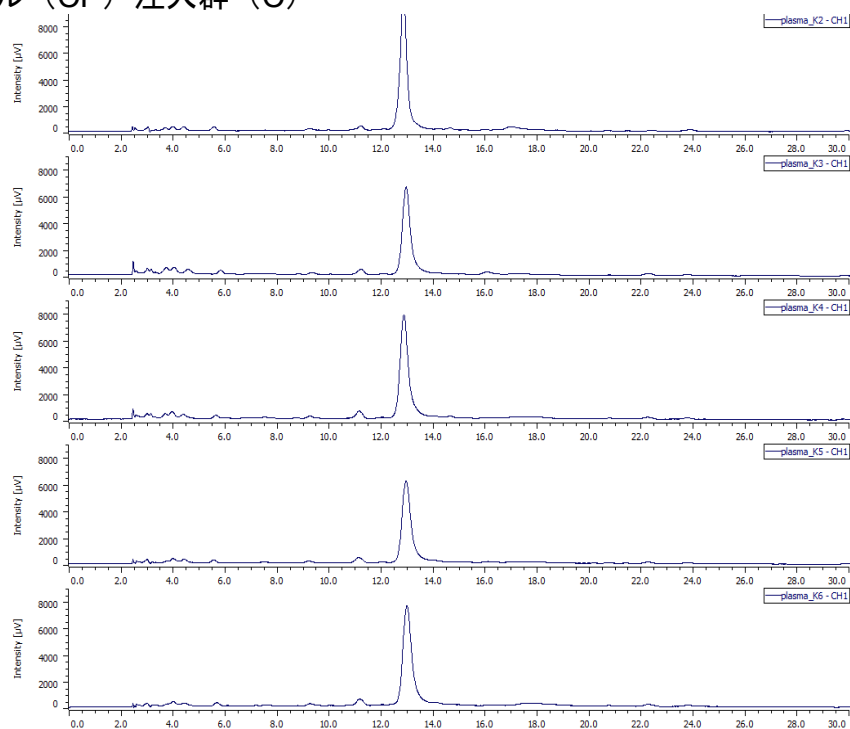
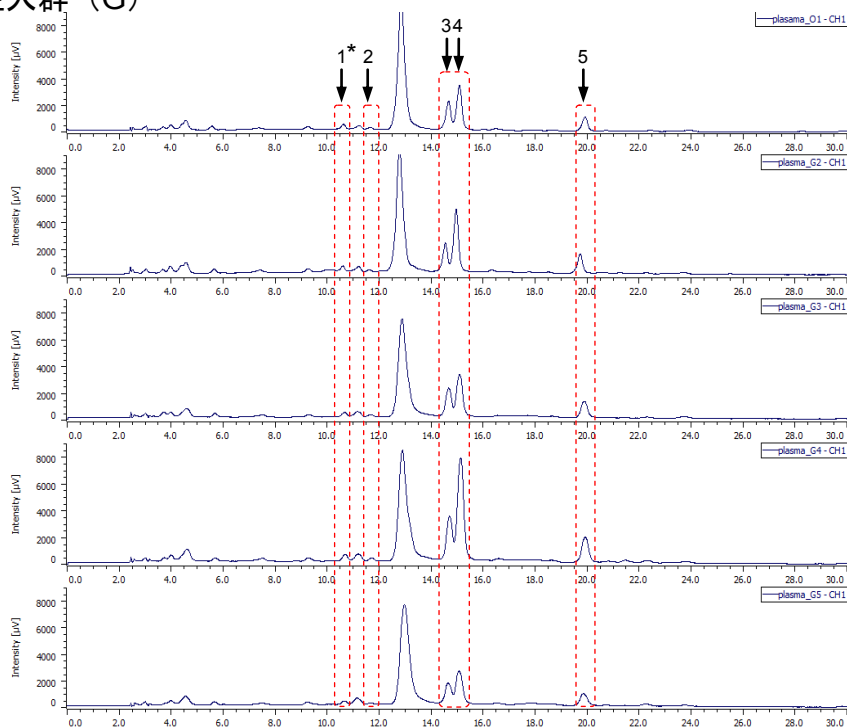
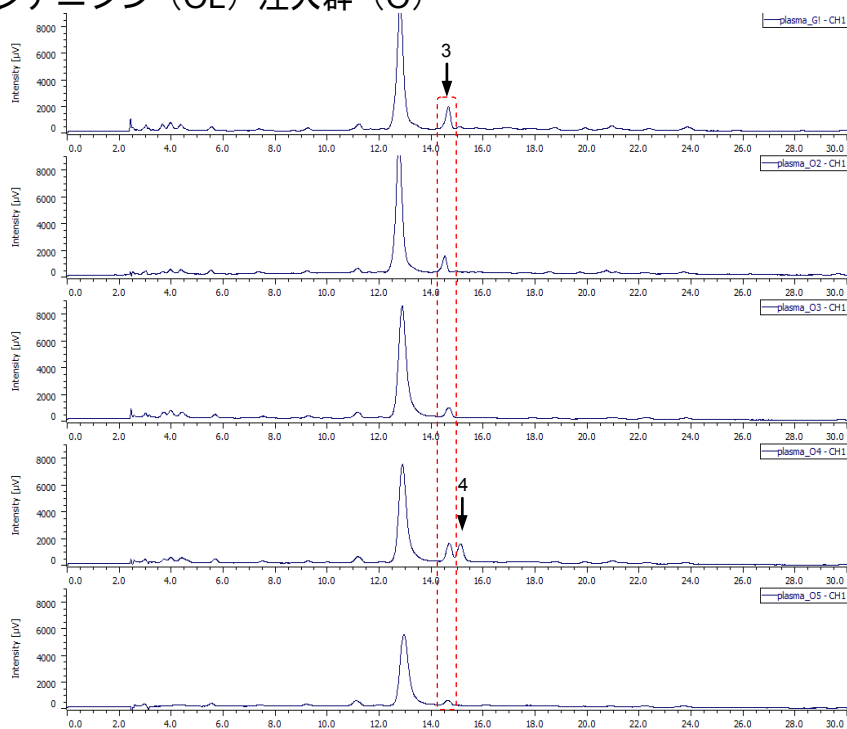


Fig. 6-4 ODS カラムで分離したラット空腸ループ内に試料を注入した後の門脈血漿のクロマトグラム. 注入試料は生理食塩水 (A)、カリンポリフェノール (B).

## C 緑茶抽出物 (GE) 注入群 (G)



## D ライチ低分子化プロシアニジン (OL) 注入群 (O)



**Fig. 6-4** ODS カラムで分離したラット空腸ループ内に試料を注入した後の門脈血血漿のクロマトグラム. 注入試料は緑茶抽出物 (C)、ライチ低分子化プロシアニジン (D).

\*1.エピガロカテキン、2.カテキン、3.エピカテキン、4.EGCG、5.Unknown (GE 中に検出)

## 第4節 考察

第5章で、CP、GEおよびOLをそれぞれ2型糖尿病マウスに摂取させると、血糖値低下作用、肝臓脂質抑制作用、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物（グリオキザールやメチルグリオキザール）の減少作用といった抗糖尿病作用を示した。これら作用のメカニズムを知るには、投与したポリフェノールの吸収がどの程度あるか、どのような形で吸収されるかが重要な要素となる。そこで、本章では上部消化管である空腸からの吸収を検証することにした。なお、カリンポリフェノール（CP）は高分子量のプロシアニジン豊富に含んでおり、ライチ低分子化プロシアニジン（OL）は低分子化したプロシアニジンの比率が高い。それらに対して、緑茶抽出物（GE）の組成はカテキンモノマーで構成されている。こうした含有ポリフェノールの分子量の大きさから、消化管から吸収されやすいのはGE、OL、CPの順と推定された。

本章では空腸からの吸収を検討したが、胃内の酸性条件下でプロシアニジンの構造が壊れるという *in vitro* の検討例があった[124]。しかし、生体を用いた実験で胃内の構造は安定であるとした報告[125]があるため、上部消化管内での構造は変化がないと想定し、CP、GE、OLを直接空腸ループ内へ注入して吸収を調べることにした。

空腸ループ内へのCPの残存率は、Folin-Denis法で測定した総ポリフェノール量ではほぼ100%に近い値となり、DMAC法により測定したプロシアニジン量では、約70%であった。こうした測定方法による残存率の差は、GEやOLの場合にも見受けられ、Folin-Denis法の特異性が低いため正誤差を生じる原因物質（還元性を有する物質など）が空腸ループ内に存在した可能性が高い。また、腸管腔内に存在する腸内細菌によってカテキンやプロシアニジンは分解を受け、flavan-3-ol骨格を持たないフェノール酸に代謝されるとの報告[55]があることから、分解により還元性が増したことも考えられた。一方のDMAC法はプロシアニジンに高い特異性を示す方法である[78]が、空腸ループ内のプロシアニジンの残存率のみで吸収率を求めることは出来ない。なぜなら、ポリフェノールが門脈血中へ移行した場合の他に、空腸の粘膜細胞内に留まっている場合も含まれるからである。さらには、前出の通り腸内細菌による分解も十分考えられるため、一部がDMAC法で検出されない構造に変化していた可能



性も考えられた。これらを念頭に置き、空腸ループ内への残存率は、ポリフェノール試料の注入後 30 分間に空腸において吸収または変化した量を知る指標として考えることにした。

空腸ループに CP を注入した C 群のプロシアニジン量の残存率から考えると、CP の空腸からの吸収は GE や OL と比べて少ない。注入後 30 分の門脈血中のクロマトグラムには、ポリフェノール由来のピークは検出されず、生理食塩水を注入した S 群と同じピークパターンを示した (Fig. 6-4-B)。プロシアニジンは吸収されるとしても、カテキンモノマーと比べると血中濃度は 1/10 以下である [118,120]。また、CP に含まれるプロシアニジンは、クロマトグラムを見ると複数のピークが存在していることから、各成分の量が分散している (Fig. 6-3-A)。よって、腸管ループ内に注入された CP 中の低分子量のプロシアニジン (吸収が可能だとされている分子の大きさ) の存在量が少なかった上に、吸収されていたとしても極めて微量であることから、今回の実験に用いた方法では検出に至らなかった可能性は高い。加えて、CP のメインピーク (Fig. 6-3-A において 13.1 min のピーク) が血漿成分由来のピークと分離ができず、検出が不可能だったことも影響した。今後、CP の腸管での吸収を調べる場合には、CP を分画するなどして画分に含まれるポリフェノール濃度を上げ、タンパク質の除去方法や高感度な測定方法を検討することによって、CP 成分の検出が可能になるかもしれない。本章では、CP のポリフェノール成分の吸収、とりわけプロシアニジンの吸収を証明することは出来なかった。しかし、プロシアニジン量の残存率の結果より、試料注入後 30 分間で腸管腔内から 3 割程度 CP のプロシアニジン成分が減少していることから、空腸粘膜細胞内への輸送、腸管内微生物による分解が生じたことが考えられた。さらに、プロシアニジンはタンパク質と結合して凝集させる能力を持つ (CP 注入後の腸管内洗浄液には、凝集した白い沈殿物が生じていた) が、小腸粘膜表面に存在する消化酵素や分泌液と結合したことにより、プロシアニジンとして検出されない状態になったことも考えられた。

GE を注入した G 群において、腸管ループ内への試料の残存率が総ポリフェノール量、プロシアニジン量ともに最小となっており、特にプロシアニジン量の残存率は C 群と比べて 1/3 となっていた (Fig. 6-2-B)。このことから、CP と同様の吸収以外に

よるポリフェノールの損失（前述）があったことを考慮しても、注入から 30 分間で空腸から GE の成分が半分以上吸収されたと考えられた。また、CP を注入した時のように、G 群の腸管洗浄液にも白い沈殿物があったことから、消化酵素の凝集作用が予想された。そして、試料注入 30 分後に採取した門脈血のクロマトグラムには、GE 由来の EGCG を主要ピークに、他はエピカテキン、エピガロカテキン、カテキンが検出された（Fig. 6-4-C）。これらのことから、GE は空腸より吸収され、門脈血を経て肝臓へ運ばれたことが明確となった。

空腸ループに OL を注入した O 群は、腸管ループ内へのプロシアニジン量の残存率が 40%となった（Fig. 6-2-B）。GE の場合と同じように考えると、ポリフェノール成分の半分程度が吸収された可能性が非常に高い。また、ポリフェノールによる消化酵素の凝集作用と考えられる O 群の腸管洗浄液にも白い沈殿物があった。試料注入 30 分後に採取した門脈血のクロマトグラムを確認すると、エピカテキンのピークが検出され、1 個体で EGCG と同じ時間にピークが検出された（Fig. 6-4-D）。このピークは、OL 中の EGCG と考えられ、他の 4 個体では EGCG は 30 分の間に吸収され尽くして検出されなかったが、1 個体だけ EGCG の吸収が遅かったため検出されたというように、個体差により生じたものと考えられた。

以上のように、本章で行った吸収の検証実験から、CP の空腸からの吸収は確認できず、仮に CP のプロシアニジン成分が空腸から吸収されていたとしても GE や OL よりも劣るということが結論づけられた。吸収のされやすさは想定していたように、GE、OL、CP という順であり、ポリフェノール成分の違いが吸収を左右していた。プロシアニジンダイマーの吸収は複数報告されている[120,121,126]。他には、プロシアニジン摂取後のラット血中に 5 量体までプロシアニジンの存在を示した報告もある[127]。一方では、プロシアニジンの吸収は下部消化管における微生物分解が主で、特に盲腸が発達したラットでは盲腸発酵が重要な役割を果たすとしている報告もある。また、プロシアニジンが分解されて生じたプロトカテキユ酸をはじめとしたフェノール酸が腸管内での抗酸化活性を示す可能性[128]の他、それらが腸管から吸収されて健康効果を発揮する[118]ことも示唆されている。CP のプロシアニジン成分も、そのままの構造あるいは分解産物が吸収されるのかもしれない。今回は空腸のみの検

討に留まったが、カリンに含まれるポリフェノールの健康効果のメカニズムを解明するためには、今後、下部消化管でのより詳細な検討が必要である。

## 第7章 総合考察

カリンエタノール抽出物 (CE) は、プロシアニジンだけでなく糖を多く含む。CE を調製した際に高い粘性を持っていたのは、フルクトースとグルコースを相当量含んでいたためである。そして、この2つの糖はいずれも高血糖を憎悪させるおそれがある。その理由には、グルコースの摂取は直接的に血糖値を上昇させること、グリケーションの開始点がグルコースであること[21]、フルクトースはグルコースよりも効率的に AGE 形成をすること[19,25]が挙げられる。そのため、CE を摂取した KK-A<sup>m</sup>マウスでは、カリンポリフェノール (CP) によってもたらされる抗糖尿病作用が CE 中の糖によって打ち消された可能性が高いと考えられた。しかし、第5章において CP の摂取で見られた肝臓脂質量低下作用やコレステロール排泄増加作用が、CP を包含するはずの CE では認められなかった。これには、CE 中の糖が肝臓脂質量低下作用やコレステロール排泄増加作用に直接影響を与えたとは考えにくい。それゆえ、CE 中の低分子化合物が、腸管腔内でのポリフェノールとコレステロールの相互作用を阻害したり、腸管からのポリフェノール吸収を阻害したりするなどして、CP 成分による作用をキャンセルしたことが仮説として推測された。

本研究で CE に含まれる糖を除去した CP を調製するために、Sephadex LH-20 を使用したが、この担体は高価で実用化には向かないため、より低コストかつ簡便な糖の除去方法を考えなければならない。たとえば、糖が水にしか溶けないことを利用して水と混ざらない有機溶媒 (酢酸エチルなど) と混和して分液する方法、透析膜によりプロシアニジンのみを透析チューブ内に残す方法、エタノールに抽出物を溶解させたまま放置して糖を沈殿させる方法 (重合を防止する条件が必要) などが手段として考えられる。また、本研究で調製した CP は糖を除く目的の粗分画であったため、精製度は低く、含有されるポリフェノール量は既製品である緑茶抽出物 (GE) やライチ低分子化プロシアニジン (OL) と比べると少なかった。もし、CP の実用化を目指すのであれば、サプリメントのような形態で摂取することになると想定され、その場合は CP をより精製してポリフェノール含有率を上げるが必要になり、CP に含まれるポリフェノール以外の夾雑物の正体を調べ、分離方法を考えなければならない。

各種試料のポリフェノール成分をゲル濾過カラムによって分離したところ、当然 GE はモノマーの組成で、検量範囲に検出されたピークは1つのみであった。それに対して、CP と OL は検量範囲に検出されたピークが2峰性を示し、片方は1~3 量体程度のプロシアニジン（あるいはフラボノイドモノマー）を含んでいることが予想され、もう片方は比較的高分子量の平均重合度で表すと約 4.6 量体の大きさであった。これは予想していなかった結果で、その理由は、OL は低分子化された低分子量プロシアニジンの比率が多くなるはずなので、平均分子量に差が生じると予想していたからである。ただし、Fig. 3-3 に示した CP と OL のクロマトグラムを比べてみると、2 つあるピークの大きさが CP では同じ程度の高さであるのに対し、OL では遅い保持時間のピークの方が大きい。ゲル濾過クロマトグラフィーでは保持時間が遅いほど分子量が小さい物質であると言えるので、OL は小さい分子を比率として多く含んでいるかもしれない。しかし、検出波長の 254 nm は、ベンゼン環を検出する波長なので、必ずしも実際の量がピーク高（面積）に反映されるとは言えない。そのため、Sephadex LH-20 などにより分子量に依存した分画を行い、高分子量のプロシアニジンを含む画分のプロシアニジン量を測定し、ゲルろ過クロマトグラフィーで分離することで詳細なプロシアニジンの存在量と平均分子量が求められるだろう。

2 型糖尿病モデル動物である KK-*Ay* マウスに等ポリフェノール量の CP、GE、OL を摂取させた実験で得られたデータから、各ポリフェノール試料による抗糖尿病作用と糖尿病発症のメカニズムの概略を Fig. 7-1 に示した。CP を摂取したマウスで血糖値が抑制されていたのは、肝臓脂質量低下によるインスリン抵抗性改善が主因であった。この肝臓脂質量の低下要因として、コレステロール吸収阻害作用が示されたものの、トリグリセリド量の減少については不明なままである。また、CP は腎臓中の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物である MG と GO の量を抑制しており、これは血糖値抑制作用と CP がもたらす抗酸化作用によってもたらされたと考えられた。一方、GE は CP と同じような箇所で作作用していたが、直接的にインスリン抵抗性を抑制していることが示唆された点で CP との違いがあった。また、OL に特徴的だったのは血中アディポネクチンの上昇作用で、これにより肝臓や末梢組織におけるインスリン抵抗性が改善され、血糖値低下に寄与したとみられた。このように、カテキンおよびカテキン分子の

重合体であるプロシアニジン、それぞれのもつ抗糖尿病作用のメカニズムは異なるが、糖尿病合併症のリスク低減効果が期待された。

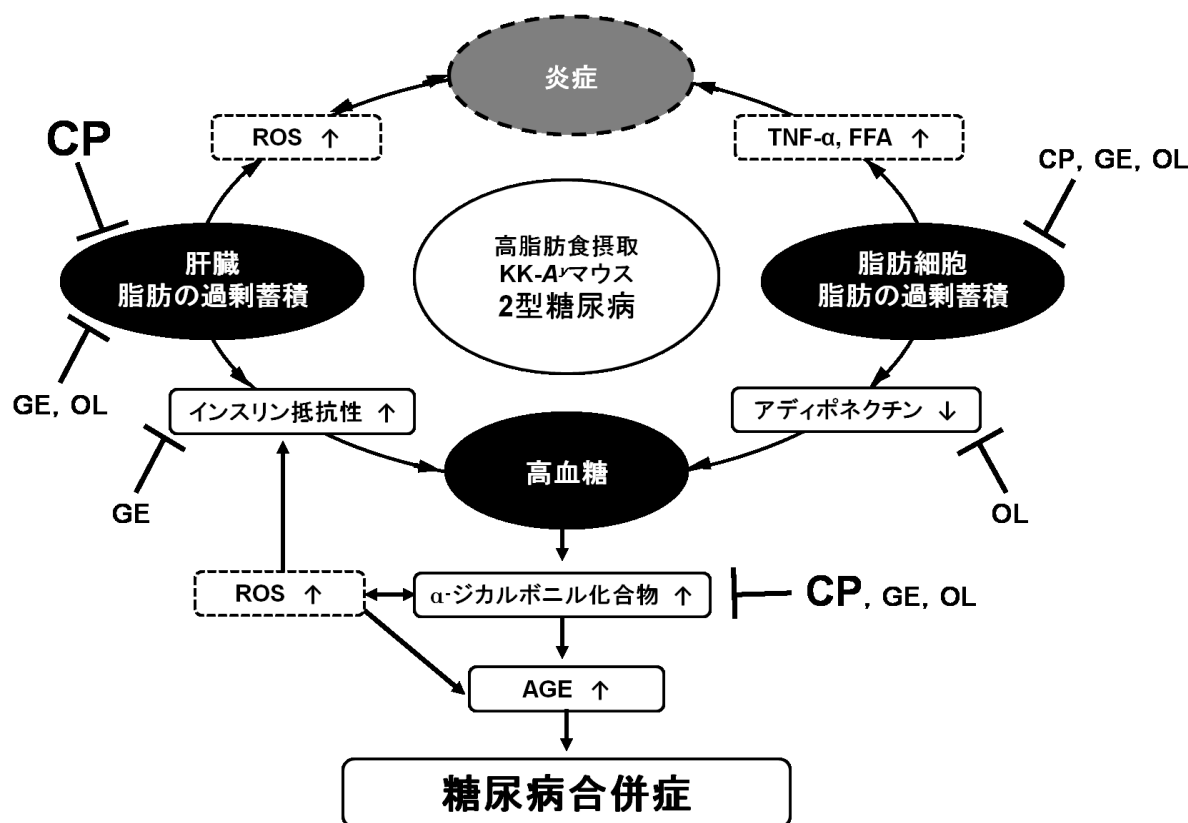


Fig. 7-1 本研究の2型糖尿病 KK-A<sup>y</sup>マウスのポリフェノール摂食実験で認められた作用の模式図 (CP: カリンポリフェノール、GE: 緑茶抽出物、OL: ライチ低分子化プロシアニジン)

今回の動物実験では、Fig. 7-1 中の点線で囲んだ糖尿病と関連する因子(炎症、ROS、アディポサイトカインの TNF-α、遊離脂肪酸 FFA など)に関するデータについて、実際に測定を行ってはいない。また、図中に示していないものでは、AGE 受容体 (receptor of AGE: RAGE) が、糖尿病合併症との関連が深いとされている [115]。細胞膜表面に発現した RAGE に AGE が結合することにより、細胞内酸化ストレスの

増大や炎症が生じることが明らかになっている[129]ので、RAGE も注目すべき対象である。今後、これら未測定の因子を調べることで、より明確に CP の抗糖尿病作用メカニズムを示すことが可能になり、GE や OL との差別化を図ることができるかもしれない。

腸管ループを作製して空腸からの吸収を確認した実験では、CP を門脈血中に確認することは出来なかった。腸管ループ内に残った CP のプロシアニジン量も OL より多かったことから、同じプロシアニジンでも低分子化処理を行っている OL の方が吸収性に優れていたと判断できる。OL は、人工的に高分子量プロシアニジンを低分子化することで、5 量体までのプロシアニジンの比率を増やしてある[130]。これに倣って、カリンプロシアニジンも低分子化を図ることで消化管からの吸収性が向上し、より強い抗糖尿病作用が示されるかもしれない。しかし、EGCG のように過剰摂取によって肝臓毒性や変異原性などのリスクがある場合[131-133]を考えると、CP の吸収されにくさは生体にとってはメリットとなることもある。なお、オリゴノールの安全性試験では、*in vitro* の検討において変異原性は確認されず、体重 1 kg あたり 200 mg を毎日投与して 4 週間飼育した健常マウスで生化学的に異常は見られなかった（異常行動や脱毛といった副作用もなし）との報告がある[130]。プロシアニジンの 3 量体までは吸収が多く報告されている[120,123,126,134]が、それ以上の重合度のプロシアニジンについては吸収の有無が分かれている[127]。また、プロシアニジンは腸内微生物によって、3-（または 4-）ヒドロキシフェニル酢酸や 3-（または 4-）ヒドロキシフェニルプロピオン酸などのフェノール酸に代謝されて吸収されるか[59,118]、あるいはそれら代謝物が腸管内で抗酸化性を発揮する可能性が報告されている[128]。一方で、胃を通過した後のプロシアニジンの構造は無傷なまま保たれ[125]、プロシアニジンが糞中にそのまま排泄される[135]といった報告が示されていることから、微生物代謝を受けずにそのままの構造物が消化管腔内に存在することにより抗酸化活性などによる健康効果がもたらされるという考え方もある[58]。ちなみに、カリンにはプロシアニジン以外にカフェオイルキナ酸が含まれているが、カリン含有ポリフェノールをラットに経口投与した 90 分後の血漿中には、フェノール酸やエピカテキン、カテキンの代謝物、カフェオイルキナ酸は検出されなかった[136]。このように、

カリンポリフェノールに含まれるプロシアニジンの吸収については、そのままの構造体や微生物による代謝物といった構造が複数想定されるだけでなく、腸管腔内・粘膜細胞内または血管内といった作用を発揮する場所も複数考えられる。構造や作用を発揮する場所は、用いる動物の消化管の状態（pH や腸内細菌叢など）によっても異なる可能性があるため、実際に情報を得たい動物あるいはヒトで生体利用能を調べるのが重要となるだろう。

本研究で得られた結果から、エタノールで抽出されるカリンポリフェノールが、肝臓脂質量の強い抑制作用を示した。それにより、インスリン抵抗性が改善され、血糖値の緩やかな抑制作用を示したことに加え、腎臓中の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物を抑制した。このことから、カリンポリフェノールは高血糖の緩和と糖尿病合併症の予防や改善に有効であることが示された。また、カリンポリフェノールは空腸からの吸収が困難であったのは、含有されるプロシアニジンの分子量が大きかったためと推察された。そのような高分子量のプロシアニジンの吸収は、下部消化管においても吸収困難と予想されるが、カリンポリフェノールは抗糖尿病作用を示したことから、構造を保ったままのプロシアニジンによる消化管腔内における糖尿病抑制に寄与する作用があったか、あるいは微生物分解を受けた代謝物が吸収された上で抗糖尿病作用が発揮されたと推察された。

2型糖尿病は大部分が生活習慣に起因していることから、病気の改善と発症の予防に最も必要なことは生活習慣の改善である。サプリメントだけで解決を図ることは難しいが、生活習慣の改善と組み合わせることで糖尿病合併症などのリスクは大きく低減できるだろう。また、ポリフェノールのような食品中の機能性成分による抗糖尿病作用が明らかとなることで、普段の食生活の中で多種多様な果物や野菜を一定量摂取することの重要性を再認識することにつながる。本研究が、糖尿病や糖尿病合併症の予防・改善を目指す研究の一助となり、糖尿病を発症する者や糖尿病合併症で苦しむ患者が一人でも減ることを希望している。



## 要約

糖尿病は、高血糖の持続により糖尿病合併症や冠動脈疾患などの発症リスクを高める深刻な病気である。また、高血糖によって亢進するグリケーション反応は、糖尿病合併症の発症と進行に關与している。一方、ポリフェノールの一種であるプロシアニジンは、高血糖およびグリケーションの抑制作用（抗糖尿病作用）が示されている。カリンの果実にはプロシアニジンが豊富に含まれ、その抽出物には 1 型糖尿病動物に対する血糖値抑制作用が報告されている。そこで、本研究はカリン含有ポリフェノールの 2 型糖尿病動物に対する抗糖尿病作用を明らかにし、その作用および作用メカニズムを類似ポリフェノールと比較することにより、カリン含有ポリフェノールの特徴を見出すことを目的とした。

カリンエタノール抽出物（CE）は、ポリフェノール以外の夾雑物を含むが、実用性を考慮して抗糖尿病作用を調べた。CE の摂取により 2 型糖尿病 KK-*Ay* マウスの高血糖、肥満、脂質代謝異常は、改善されなかった。この原因として、CE 中の糖がポリフェノール成分による抗糖尿病作用を阻害した可能性が考えられたため、次に CE から糖を Sephadex LH-20 カラムで除去したカリンポリフェノール（CP）を調製し、以後の実験に用いた。

CP の比較試料として、プロシアニジンの構造骨格であるカテキンモノマーで構成される緑茶抽出物（GE）、低分子化により低分子量プロシアニジンの比率を向上させたライチ低分子化プロシアニジン（OL）を用いて成分を比較した。既製品である GE や OL と比べて、CP のポリフェノール含量は低かった。また、GE はモノマーのみで構成されているのに対し、CP と OL は重合度の高いプロシアニジンを含むものの、2 者は組成が異なることが示唆された。

糖尿病と糖尿病合併症の発症、進行には酸化ストレスとグリケーションが密接に關わる、CP、GE、OL の抗酸化活性および抗グリケーション活性を *in vitro* において

評価したところ、同じ総ポリフェノール量では、CPはGEおよびOLと同程度の抗酸化活性を示した。また、抗グリケーション活性に関しては、CPはGEおよびOLよりも強い活性を示していたことから、*in vivo*における抗糖尿病作用に貢献することが期待された。

KK-A<sup>y</sup>マウスに総ポリフェノール量として同量のCP、GE、OLを摂取させて、2型糖尿病における抗糖尿病作用と作用メカニズムを比較した。CPを摂取したマウスで血糖値が抑制されており、糖質吸収阻害および肝臓脂質含量低下によるインスリン抵抗性改善が主因と考えられた。肝臓脂質含量の低下要因として、コレステロール吸収阻害作用が示されたが、トリグリセリド量の減少については原因が不明だった。CPは、腎臓中のグリケーション中間体を抑制しており、これは血糖値抑制作用と、CPがもたらす抗酸化作用によって減少した可能性が考えられた。また、OLの摂取では、CPの摂取時と同じ作用に加えて、血中のアディポネクチンを上昇させる効果が認められ、この増加により肝臓や末梢組織におけるインスリン抵抗性が改善され、血糖値低下の一因になったと考えられた。以上のことから、CPおよびOLは、穏やかな血糖値抑制効果および糖尿病性腎症の進行を抑制する効果が期待できた。一方、GEの摂取では、CPやOLと比べると肥満抑制作用や高血糖抑制作用が強く、血中へのインスリン分泌が抑えられていたことから、全身のインスリン抵抗性が悪化していなかったと考えられる。以上のことから、カテキンおよびカテキンオリゴマーであるプロシアニジン、それぞれ抗糖尿病作用のメカニズムは異なるが、糖尿病合併症のリスク低減効果が期待された。

CP、GE、OLを糖尿病動物に同量与えたにも関わらず発揮された抗糖尿病作用の強さに違いがあった。このため消化管からの吸収の差異がポリフェノールの抗糖尿病作用に影響していると推察されたことから、空腸からの吸収について検証した。その結果、CPのポリフェノール成分の吸収は認められなかったが、GEは主成分であるエピガロカテキンガレートを始めとしてほとんどのポリフェノール成分の吸収が確認でき、OLについてもGEと比べると少なかったものの、一部ポリフェノールの吸収が確認できた。

本研究により、CPは、①糖質吸収阻害作用と肝臓脂質抑制作用を介し

た肝臓でのインスリン抵抗性を減弱させることにより穏やかな高血糖抑制作用を示すこと、②抗酸化活性による腎臓中のグリケーション中間体量の抑制作用から、糖尿病性腎症の発症および進行の抑制に貢献する可能性、以上の2点の特徴が示唆された。また、CPの吸収が乏しいためにGEやOLとの抗糖尿病作用に差が生じたことが示唆された。

## 謝辞

本論文は、岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻の在籍中に栄養化学研究室において行った研究を基に作成しました。

本研究の遂行および論文作成においてご指導ご鞭撻を賜り、5年間の大学院生活でお世話になりました。本学 長澤孝志教授に心より御礼申し上げます。同じく、本学 伊藤芳明准教授にも細やかなご指導を賜り、多くのご助言をいただきましたことを深謝いたします。

本論文を査読してくださり、ご助言くださいました 帯広畜産大学 福島道広教授ならびに 弘前大学 前多隼人先生に御礼申し上げます。腸管ループ実験の技術をご教授くださいました 本学 西向めぐみ先生に御礼申し上げます。

本研究試料のカリンは岩手県工業技術センターよりご提供いただきました。岩手県工業技術センター 小浜恵子様、山口佑子様に、この場をお借りして御礼申し上げます。

実験を手伝ってくれた後輩の皆様、学生生活をサポートしてくださった連大事務室の皆様へ感謝いたします。また、長い学生生活を見守り、支えてくれた長洞家松田家の家族へ感謝の意を表します。

最後になりましたが、本研究のために尊い命をいただきましたマウスとラットたちに感謝しております。

ありがとうございました。

平成 26 年 3 月

長洞 希

## 引用文献

- [1] 門脇孝, 石橋俊, 佐倉宏, 戸邊一之, 野田光彦. (2007) 糖尿病学. 西村書店.
- [2] 菅野剛史, 松田信義. (1999) 医学概論・臨床医学総論・臨床病理学総論 第2版, 医学概論・臨床医学総論・臨床病理学総論, pp 101–102. 医学書院.
- [3] 厚生労働省. (2007) 平成19年国民健康・栄養調査報告.
- [4] Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Lin, J. K., Farzadfar, F., Khang, Y.-H., Stevens, G. A., Rao, M., Ali, M. K., Riley, L. M., Robinson, C. A., Ezzati, M. (2011) National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants, *Lancet* **378**, 31–40.
- [5] 佐藤隆一郎, 今川正良. (2007) 生活習慣病の分子生物学, pp 127–141. 三共出版.
- [6] Scherer, P. E. (2006) Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ., *Diabetes* **55**, 1537–1545.
- [7] Meshkani, R., Adeli, K. (2009) Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease, *Clin. Biochem.* **42**, 1331–1346.
- [8] Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., Tobe, K. (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome., *J. Clin. Invest.* **116**, 1784–1792.
- [9] Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y. (2000) Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients, *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1595–1599.

- [10] Chen, X., Xun, K., Chen, L., Wang, Y. (2009) TNF- $\alpha$ , a potent lipid metabolism regulator., *Cell Biochem. Funct.* **27**, 407–416.
- [11] Browning, J. D., Horton, J. D. (2004) Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury., *J. Clin. Invest.* **114**, 147–152.
- [12] Chou, C.-H., Chang, Y.-Y., Tzang, B.-S., Hsu, C.-L., Lin, Y.-L., Lin, H.-W., Chen, Y.-C. (2012) Effects of taurine on hepatic lipid metabolism and anti-inflammation in chronic alcohol-fed rats, *Food Chem.* **135**, 24–30.
- [13] Maillard, L. C. (1912) Action des acides aminés sur les sucres: formation des melanioidines par voie méthodique., *C. R. Acad. Sci.* **154**, 66–68.
- [14] 米井嘉一. (2010) 糖化による疾患と抗糖化食品・素材. シーエムシー出版.
- [15] Yabe-Nishimura, C. (1998) Aldose Reductase in Glucose Toxicity: A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications, *Pharmacol. Rev.* **50**, 21–34.
- [16] Thornalley, P.J., Langborg, A., Minhas, H. (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **344**, 109–116.
- [17] Baynes, J. W. (1991) Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes, *Diabetes* **40**, 405–412.
- [18] Hunt, J. V., Smith, C. C. T., Wolff, S. P. (1990) Autoxidative Glycosylation and Possible Involvement of Peroxides and Free Radicals in LDL Modification by Glucose, *Diabetes* **39**, 1420–1424.
- [19] Sakai, M., Oimomi, M., Kasuga, M. (2002) Experimental studies on the role of fructose in the development of diabetic complications., *Kobe J. Med. Sci.* **48**, 125–136.
- [20] Arai, K., Maguchi, S., Fujii, S., Ishibashi, H., Oikawa, K., Taniguchi, N. (1987) Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase.

- Identification of the in vitro glycated sites., *J. Biol. Chem.* **262**, 16969–16972.
- [21] Singh, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L. (2001) Advanced glycation end-products: a review., *Diabetologia* **44**, 129–146.
- [22] Suzuki, D., Miyata, T., Saotome, N., Horie, K., Inagi, R., Yasuda, Y., Uchida, K., Izuhara, Y., Yagame, M., Sakai, H., Kurokawa, K. (1999) Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions, *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 822–832.
- [23] Hammes, H. P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K., Brownlee, M. (1991) Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy., *P. Natr. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 11555–11558.
- [24] Brownlee, M. (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging., *Annu. Rev. Med.* **46**, 223–234.
- [25] Hamada, Y., Araki, N., Koh, N., Nakamura, J., Horiuchi, S., Hotta, N. (1996) Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 539–543.
- [26] Beisswenger, P. J., Drummond, K. S., Nelson, R. G., Howell, S. K., Szwegold, B. S., Mauer, M. (2005) Susceptibility to diabetic nephropathy is related to dicarbonyl and oxidative stress, *Diabetes* **54**, 3274–3281.
- [27] Kusunoki, H., Miyata, S., Ohara, T., Liu, B.-F., Uriuhara, A., Kojima, H., Suzuki, K., Miyazaki, H., Yamashita, Y., Inaba, K., Kasuga, M. (2003) Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy, *Diabetes Care* **26**, 1889–1894.
- [28] Yamada, H., Miyata, S., Igaki, N., Yatabe, H., Miyauchi, Y., Ohara, T., Sakai, M., Shoda, H., Oimomi, M., Kasuga, M. (1994) Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific in vivo

- determination of intermediate in advanced Maillard reaction., *J. Biol. Chem.* **269**, 20275–20280.
- [29] 柏木厚典. (2010) 新しい糖尿病診断基準, 臨床栄養 **117**, 736–741.
- [30] 吉田勉. (2007) わかりやすい食物と健康, pp 66–72. 三共出版.
- [31] Kootstra, A. (1994) Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids., *Plant Mol. Biol.* **26**, 771–774.
- [32] 武田幸作, 齋藤規夫, 岩科司. (2013) 植物色素フラボノイド.
- [33] 財団法人日本食品科学研究振興財団. (2004) Technical reports 酸化防止剤としてのフラボノイド (1), *F.F.I. J. Japan* **209**, 441–446.
- [34] Galleano, M., Calabro, V., Prince, P. D., Litterio, M. C., Piotrkowski, B., Vazquez-Prieto, M. A., Miatello, R. M., Oteiza, P. I., Fraga, C. G. (2012) Flavonoids and metabolic syndrome., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1259**, 87–94.
- [35] Alasalvar, C., Karamać, M., Kosińska, A., Rybarczyk, A., Shahidi, F., Amarowicz, R. (2009) Antioxidant activity of hazelnut skin phenolics., *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4645–4650.
- [36] Nakagawa, T., Yokozawa, T., Terasawa, K., Shu, S., Juneja, L. R. (2002) Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage., *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2418–2422.
- [37] Zhang, T., Jiang, S., He, C., Kimura, Y., Yamashita, Y., Ashida, H. (2013) Black soybean seed coat polyphenols prevent B(a)P-induced DNA damage through modulating drug-metabolizing enzymes in HepG2 cells and ICR mice, *Mutat. Res.* **752**, 34–41.
- [38] Wu, L., Huang, Z., Qin, P., Yao, Y., Meng, X., Zou, J., Zhu, K., Ren, G. (2011) Chemical characterization of a procyanidin-rich extract from sorghum bran and its effect on oxidative stress and tumor inhibition in vivo., *J. Agric. Food Chem.* **59**, 8609–8615.



- [39] Majchrzak, D., Mitter, S., Elmadfa, I. (2004) The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas, *Food Chem.* **88**, 447–451.
- [40] Ortsäter, H., Grankvist, N., Wolfram, S., Kuehn, N., Sjöholm, Å. (2012) Diet supplementation with green tea extract epigallocatechin gallate prevents progression to glucose intolerance in db/db mice, *Nutr. Metab.* **9**, 11.
- [41] Vinson, J. A., Zhang, J. (2005) Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes., *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3710–3713.
- [42] Yamabe, N., Kang, K. S., Hur, J. M., Yokozawa, T. (2009) Matcha, a powdered green tea, ameliorates the progression of renal and hepatic damage in type 2 diabetic OLETF rats., *J. Med. Food* **12**, 714–721.
- [43] Wu, L.-Y., Juan, C.-C., Ho, L.-T., Hsu, Y.-P., Hwang, L. S. (2004) Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats., *J. Agric. Food Chem.* **52**, 643–648.
- [44] Rains, T. M., Agarwal, S., Maki, K. C. (2011) Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review., *J. Nutr. Biochem.* **22**, 1–7.
- [45] Chen, Y.-K., Cheung, C., Reuhl, K. R., Liu, A. B., Lee, M.-J., Lu, Y.-P., Yang, C. S. (2011) Effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on newly developed high-fat/Western-style diet-induced obesity and metabolic syndrome in mice., *J. Agric. Food Chem.* **59**, 11862–11871.
- [46] Li, W., Liang, H., Zhang, M.-W., Zhang, R.-F., Deng, Y.-Y., Wei, Z.-C., Zhang, Y., Tang, X.-J. (2012) Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) fruit pericarp from different commercially available cultivars., *Molecules* **17**, 14954–14967.
- [47] Yokozawa, T., Cho, E. J., Park, C. H., Kim, J. H. (2012) Protective effect of proanthocyanidin against diabetic oxidative stress., *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, doi: 10.1155/2012/623879.

- [48] Montagut, G., Bladé, C., Blay, M., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, M. J., Arola, L., Pinent, M., Ardévol, A. (2010) Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance., *J. Nutr. Biochem.* **21**, 961–967.
- [49] Ogasawara, J., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Sakurai, T., Kizaki, T., Izawa, T., Ishida, H., Tanno, M., Ohno, H. (2010) Oligonol, an oligomerized lychee fruit-derived polyphenol, activates the Ras/Raf-1/MEK1/2 cascade independent of the IL-6 signaling pathway in rat primary adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 554–559.
- [50] Wang, W., Yagiz, Y., Buran, T. J., Nunes, C. do N., Gu, L. (2011) Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end - products by scavenging reactive carbonyls, *Food Res. Int.* **44**, 2666–2673.
- [51] Peng, X., Cheng, K.-W., Ma, J., Chen, B., Ho, C.-T., Lo, C., Chen, F., Wang, M. (2008) Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts., *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1907–1911.
- [52] Terra, X., Pallarés, V., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Arola, L., Blay, M. (2011) Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats., *J. Nutr. Biochem.* **22**, 380–387.
- [53] Nakazato K, Song H, W. T. (2006) Effects of dietary apple polyphenol on adipose tissues weights in Wistar rats, *Expl. Anim.* **55**, 383–389.
- [54] 宮澤陽夫, 仲川清隆, 浅井明. (2000) 天然抗酸化物質の吸収と代謝, *化学と生物* **38**, 104–114.
- [55] Gonthier, M.-P., Donovan, J. L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C., Scalbert, A. (2003) Metabolism of dietary procyanidins in rats, *Free Radic. Biol. Med.* **35**, 837–844.

- [56] Gonçalves, R., Mateus, N., de Freitas, V. (2011) Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins, *Food Chem.* **125**, 665–672.
- [57] Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T., and Ohtake, Y. (2007) Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption., *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4604–4609.
- [58] Tsang, C., Auger, C., Mullen, W., Bornet, A., Rouanet, J.-M., Crozier, A., Teissedre, P.-L. (2005) The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats, *Br. J. Nutr.* **94**, 170–181.
- [59] Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., Scalbert, A. (2000) Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids, *J. Nutr.* **130**, 2733–2738.
- [60] Sae-tan, S., Grove, K., Lambert, J. D. (2011) Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea., *Pharmacolo. Res.* **64**, 146–154.
- [61] Seeram, N. P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S. M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D. (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States., *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1415–1422.
- [62] Chen, L., Sun, P., Wang, T., Chen, K., Jia, Q., Wang, H., Li, Y. (2012) Diverse mechanisms of antidiabetic effects of the different procyanidin oligomer types of two different cinnamon species on db/db mice., *J. Agric. Food Chem.* **60**, 9144–9150.
- [63] 伊沢和男. (2003) ポケット版日本の薬草 437 種 初めてでも迷わず採取できる, p 52. 主婦の友社.

- [64] Hamauzu, Y., Irie, M., Kondo, M., Fujita, T. (2008) Antiulcerative properties of crude polyphenols and juice of apple, and Chinese quince extracts, *Food Chem.* **108**, 488–495.
- [65] Sawai, R., Kuroda, K., Shibata, T., Gomyou, R., Osawa, K., Shimizu, K. (2008) Anti-influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis*., *J. Ethnopharmacol.* **118**, 108–112.
- [66] Sancheti, S., Sancheti, S., Bafna, M., Seo, S.-Y. (2010) Antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant effects of *Chaenomeles sinensis* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats, *Eur. Food Res. Tech.* **231**, 415–421.
- [67] Sancheti, S., Sancheti, S., Seo, S.-Y. (2013) Antidiabetic and antiacetylcholinesterase effects of ethyl acetate fraction of *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne fruits in streptozotocin-induced diabetic rats., *Exp. Toxicol. Pathol.* **65**, 55–60.
- [68] Folin, O., Boston, M. (1912) A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine, *J. Biol. Chem.* **22**, 305–308.
- [69] Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet., *J. Nutr.* **123**, 1939–1951.
- [70] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues., *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.
- [71] Sautier, C., Doucet, C., Flament, C., Lemonnier, D. (1979) Effects of soy protein and saponins on serum, tissue and feces steroids in rat, *Atherosclerosis* **34**, 233–241.
- [72] Décordé, K., Teissèdre, P.-L., Sutra, T., Ventura, E., Cristol, J.-P., Rouanet, J.-M. (2009) Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation

- prevents high-fat diet-induced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers., *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 659–666.
- [73] Hamauzu, Y., Yasui, H., Inno, T., Kume, C., Omanyuda, M. (2005) Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits., *J. Agric. Food Chem.* **53**, 928–934.
- [74] Nishihira, J., Sato-Ueshima, M., Kitadate, K., Wakame, K., Fujii, H. (2009) Amelioration of abdominal obesity by low-molecular-weight polyphenol (Oligonol) from lychee, *J. Func. Food.* **1**, 341–348.
- [75] Noh, J. S., Kim, H. Y., Park, C. H., Fujii, H., Yokozawa, T. (2010) Hypolipidaemic and antioxidative effects of oligonol, a low-molecular-weight polyphenol derived from lychee fruit, on renal damage in type 2 diabetic mice., *Br. J. Nutr.* **104**, 1120–1128.
- [76] Noh, J. S., Park, C. H., Yokozawa, T. (2011) Treatment with oligonol, a low-molecular polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced hepatic damage through regulation of oxidative stress and lipid metabolism., *Br. J. Nutr.* **106**, 1013–1022.
- [77] Kalgaonkar, S., Nishioka, H., Gross, H. B., Fujii, H., Keen, C. L., Hackman, R. M. (2010) Bioactivity of a flavanol-rich lychee fruit extract in adipocytes and its effects on oxidant defense and indices of metabolic syndrome in animal models., *Phytother. res.* **24**, 1223–1228.
- [78] Wallace, T. C., Giusti, M. M. (2010) Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins., *J. Food Sci.* **75**, C619–625.
- [79] Oki, T., Sugawara, T., Sato-Furukawa, M., Suda, I. (2013) DMAC法による豆類中の総プロアントシアニジンの定量法, 日本食品科学工学会誌 **60**, 301–309.

- [80] Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Suda, I., Sato, T. (2002) Polymeric Procyanidins as Radical-Scavenging Components in Red-Hulled Rice, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7524–7529.
- [81] Sasaki, K., Matsukura, Y., Shijima, K., Miyake, M., Fujiwara, D., Konishi, Y. (2009) High-performance liquid chromatographic purification of oligomeric procyanidins, trimers up to nonamers, derived from the bark of Jatoba (*Hymenaea courbaril*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1274–1279.
- [82] Xu, J. Z., Yeung, S. Y. V., Chang, Q., Huang, Y., Chen, Z.-Y. (2004) Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers., *Br. J. Nutr.* **91**, 873–881.
- [83] Nishioka, H., Fujii, H., Sun, B., Aruoma, O. I. (2006) Comparative efficacy of oligonol, catechin and (-)-epigallocatechin 3-O-gallate in modulating the potassium bromate-induced renal toxicity in rats., *Toxicology* **226**, 181–187.
- [84] Suarez, G., Rajaram, R., Oronsky, A. L., Gawinowicz, M. A. (1989) Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose., *J. Biol. Chem.* **264**, 3674–3679.
- [85] 藤田修三, 山田和彦. (2002) 食品学実験書, pp 146–147. 医歯薬出版.
- [86] Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Yamazaki, K., Tsushida, T. (2010) Interlaboratory study of hydrophilic-oxygen radical absorbance capacity, a method for measuring antioxidant capacity, *日本食品科学工学会誌* **57**, 525–531.
- [87] Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Prior, R. L. (2002) High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4437–4444.

- [88] Nagasawa, T., Tabata, N., Ito, Y., Nishizawa, N., Aiba, Y., Kitts, D. D. (2003) Inhibition of glycation reaction in tissue protein incubations by water soluble rutin derivative., *Mol. Cell. Biochem.* **249**, 3–10.
- [89] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, R. A., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- [90] Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., Aldini, G. (2013) Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation., *Free Radic. Res.* **47** Suppl 1, 3–27.
- [91] Hajer, G. R., van Haefen, T. W., Visseren, F. L. J. (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases., *Eur. Hear. J.* **29**, 2959–2971.
- [92] Guillausseau, P.-J., Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Médeau, V., Kevorkian, J.-P. (2008) Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus, *Diabetes Metab.* **34**, Suppl 2, S43–S48.
- [93] Takebayashi, J., Oki, T., Watanabe, J., Yamasaki, K., Chen, J., Sato-Furukawa, M., Tsubota-Utsugi, M., Taku, K., Goto, K., Matsumoto, T., Ishimi, Y. (2013) Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods, *J. Food Comp. Anal.* **29**, 25–31.
- [94] Peng, X., Ma, J., Chao, J., Sun, Z., Chang, R. C.-C., Tse, I., Li, E. T. S., Chen, F., Wang, M. (2010) Beneficial effects of cinnamon proanthocyanidins on the formation of specific advanced glycation endproducts and methylglyoxal-induced impairment on glucose consumption., *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6692–6696.

- [95] Nagasawa, T., Tabata, N., Ito, Y., Aiba, Y., Nishizawa, N., Kitts, D. D. (2003) Dietary G-rutin suppresses glycation in tissue proteins of streptozotocin-induced diabetic rats, *Mol. Cell. Biochem.* **252**, 141–147.
- [96] Shimada, T., Tokuhara, D., Tsubata, M., Kamiya, T., Kamiya-Sameshima, M., Nagamine, R., Takagaki, K., Sai, Y., Miyamoto, K.-I., Aburada, M. (2012) Flavangenol (pine bark extract) and its major component procyanidin B1 enhance fatty acid oxidation in fat-loaded models., *Eur. J. Pharmacol.* **677**, 147–153.
- [97] Horigome, T., Kumar, R., Okamoto, K. (1988) Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats, *Br. J. Nutr.* **60**, 275–285.
- [98] Park, J. M., Bong, H. Y., Jeong, H. I., Kim, Y. K., Kim, J. Y., Kwon, O. (2009) Postprandial hypoglycemic effect of mulberry leaf in Goto-Kakizaki rats and counterpart control Wistar rats., *Nutr. Res. Pr.* **3**, 272–278.
- [99] Schäfer, A., Högger, P. (2007) Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase., *Diabetes Res. Clin. Pr.* **77**, 41–46.
- [100] Yilmazer-Musa, M., Griffith, A. M., Michels, A. J., Schneider, E., Frei, B. (2012) Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity., *J. Agric. Food Chem.* **60**, 8924–8929.
- [101] Matsumoto, N., Ishigaki, F., Ishigaki, A., Iwashina, H., Hara, Y. (1993) Reduction of blood glucose levels by tea catechin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 525–527.
- [102] Kamiyama, O., Sanae, F., Ikeda, K., Higashi, Y., Minami, Y., Asano, N., Adachi, I., Kato, A. (2010) In vitro inhibition of  $\alpha$ -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea, *Food Chem.* **122**, 1061–1066.



- [103] Pinent, M., Blay, M., Bladé, M. C., Salvadó, M. J., Arola, L., Ardévol, a. (2004) Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines., *Endocrinology* **145**, 4985–4990.
- [104] Montagut, G., Onnockx, S., Vaqué, M., Bladé, C., Blay, M., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, M. J., Arola, L., Pirson, I., Ardévol, A., Pinent, M. (2010) Oligomers of grape-seed procyanidin extract activate the insulin receptor and key targets of the insulin signaling pathway differently from insulin., *J. Nutr. Biochem.* **21**, 476–481
- [105] Waltner-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., Hall, R. K., Nawano, M., Granner, D. K. (2002) Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production., *J. Biol. Chem.* **277**, 34933–34940.
- [106] Lee, Y. A., Cho, E. J., Yokozawa, T. (2008) Effects of proanthocyanidin preparations on hyperlipidemia and other biomarkers in mouse model of type 2 diabetes., *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7781–7789.
- [107] Ogino, Y., Osada, K., Nakamura, S., Ohta, Y., Kanda, T., Sugano, M. (2007) Absorption of dietary cholesterol oxidation products and their downstream metabolic effects are reduced by dietary apple polyphenols., *Lipids* **42**, 151–161.
- [108] Raghov, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E. A., Elam, M. B. (2008) SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis, *Trends Endocrin. Met.* **19**, 65–73.
- [109] Baselga-Escudero, L., Arola-Arnal, A., Pascual-Serrano, A., Ribas-Latre, A., Casanova, E., Salvadó, M.-J., Arola, L., Blade, C. (2013) Chronic administration of proanthocyanidins or docosahexaenoic acid reverses the increase of miR-33a and miR-122 in dyslipidemic obese rats., *PLoS One* **8**, e69817.

- [110] Osakabe, N., Yamagishi, M. (2009) Procyanidins in *Theobroma cacao* reduce plasma cholesterol levels in high cholesterol-fed rats, *J. Clin. Biochem. Nutr.* **45**, 131–136.
- [111] Koo, S. I., Noh, S. K. (2007) Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect., *J. Nutr. Biochem.* **18**, 179–183.
- [112] Yokozawa, T., Kim, H. J., Cho, E. J. (2008) Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats., *J. Agric. Food Chem.* **56**, 5026–5032.
- [113] Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yamamoto, T., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., Toyoshima, H., Fukamizu, A., Yamada, N. (2004) SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver., *Nat. cell biol.* **6**, 351–357.
- [114] Ikeda, I., Tsuda, K., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Unno, T., Tomoyori, H., Goto, H., Kawata, Y., Imaizumi, K., Nozawa, A., Kakuda, T. (2005) Tea Catechins with a Galloyl Moiety Suppress Postprandial Hypertriacylglycerolemia by Delaying Lymphatic Transport of Dietary Fat in Rats, *J. Nutr.* **135**, 155–159.
- [115] Busch, M., Franke, S., Rüster, C., Wolf, G. (2010) Advanced glycation end-products and the kidney., *Eur. J. clin. invest.* **40**, 742–755.
- [116] Cheng, A.-S., Cheng, Y.-H., Chiou, C.-H., Chang, T.-L. (2012) Resveratrol upregulates Nrf2 expression to attenuate methylglyoxal-induced insulin resistance in Hep G2 cells., *J. Agric. Food Chem.* **60**, 9180–9187.
- [117] Lee, M.-J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F. Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S., Yang, C. S. (2002) Pharmacokinetics of Tea Catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by

- Humans: Formation of Different Metabolites and Individual Variability, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **11**, 1025–1032.
- [118] Serra, A., Macià, A., Rubió, L., Anglès, N., Ortega, N., Morelló, J. R., Romero, M.-P., Motilva, M.-J. (2012) Distribution of procyanidins and their metabolites in rat plasma and tissues in relation to ingestion of procyanidin-enriched or procyanidin-rich cocoa creams., *Eur. J. Nutr.* **52**, 1029–1038.
- [119] Chen, L., Lee, M.-J., Li, H., Yang, C. S. (1997) Absorption, Distribution, and Elimination of Tea Polyphenols in Rats, *Drug Metab. Dispos.* **25**, 1045–1050.
- [120] Appeldoorn, M. M., Vincken, J.-P., Gruppen, H., Hollman, P. C. H. (2009) Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats., *J. Nutr.* **139**, 1469–1473.
- [121] Stoupi, S., Williamson, G., Viton, F., Barron, D., King, L. J., Brown, J. E., Clifford, M. N. (2010) In vivo bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [<sup>14</sup>C]procyanidin B2 in male rats., *Drug metab. dispos.* **38**, 287–291.
- [122] Kitts, D. D., Yuan, Y. V., Nagasawa, T., Moriyama, Y. (1992) Effect of casein, casein phosphopeptides and calcium intake on ileal Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Br. J. Nutr.* **68**, 765–781.
- [123] Li, S., Sui, Y., Xiao, J., Wu, Q., Hu, B., Xie, B., Sun, Z. (2013) Absorption and urinary excretion of A-type procyanidin oligomers from Litchi chinensis pericarp in rats by selected ion monitoring liquid chromatography–mass spectrometry, *Food Chem.* **138**, 1536–1542.
- [124] Spencer, J. P., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E., Rice-Evans, C. (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 236–241.

- [125] Rios, L. Y., Bennett, R. N., Lazarus, S. A., Rémésy, C., Scalbert, A., Williamson, G. (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans., *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 1106–1110.
- [126] Holt, R. R., Lazarus, S. A., Cameron Sullards, M., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., Hammerstone, J. F., Fraga, C. G., Schmitz, H. H., Keen, C. L. (2002) Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa, *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 798–804.
- [127] Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Akiyama, H., Kanda, T., Ohtake, Y., Goda, Y. (2006) Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration: analysis of procyanidins in plasma using the porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry., *J. Agric. Food Chem.* **54**, 884–892.
- [128] Ishimoto, H., Tai, A., Yoshimura, M., Amakura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H. (2012) Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 395–399.
- [129] Yamagishi, S. (2011) Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes, *Exp. Gerontol.* **46**, 217–224.
- [130] Fujii, H., Sun, B., Nishioka, H., Hirose, A., Aruoma, O. I. (2007) Evaluation of the safety and toxicity of the oligomerized polyphenol Oligonol, *Food Chem. Toxicol.* **45**, 378–387.
- [131] Lambert, J. D., Kennett, M. J., Sang, S., Reuhl, K. R., Ju, J., Yang, C. S. (2010) Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice, *Food Chem. Toxicol.* **48**, 409–416.
- [132] Isbrucker, R. A., Edwards, J. A., Wolz, E., Davidovich, A., Bausch, J. (2006) Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2:

- Dermal, acute and short-term toxicity studies, *Food Chem. Toxicol.* **44**, 636–650.
- [133] Isbrucker, R. A., Bausch, J., Edwards, J. A., Wolz, E. (2006) Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: Genotoxicity, *Food Chem. Toxicol.* **44**, 626–635.
- [134] Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo da Silva, J. M. (2003) Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon., *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6475–6481.
- [135] Choy, Y. Y., Jagers, G. K., Oteiza, P. I., Waterhouse, A. L. (2013) Bioavailability of intact proanthocyanidins in the rat colon after ingestion of grape seed extract., *J. Agric. Food Chem.* **61**, 121–127.
- [136] Hamauzu, Y., Inno, T., Kume, C., Irie, M., Hiramatsu, K. (2006) Antioxidant and antiulcerative properties of phenolics from Chinese quince, quince, and apple fruits., *J. Agric. Food Chem.* **54**, 765–772.