

プロアントシアニジン類による糖質と脂質の消化吸収抑制に関する食品機能性研究

横田一成・小川智史

目 的

日本産のトチノキ (*Aesculus turbinata* BLUME) 種子は、トチノミと呼ばれ、縄文時代の住居跡遺跡から多数、出土されていることからわかるように、古くから貴重な食糧として利用されていたと考えられる。現在では、トチノミは、栃餅や栃の実団子等の製菓原料として主に使用されている。トチノミは苦味が強いので、まず、その種皮をむき、中身を木灰などでアクを抜いて利用される。我々は、食品残渣として廃棄されているトチノキ種皮に含まれている食品機能性因子の検索を行っている。最近、その研究に関連して、トチノキ種皮には、高分子の重合性ポリフェノール類が高濃度に含まれていることが見いだされた。我々は、種々の機器分析により、トチノキ種皮の主要成分が、(+)-カテキンや(-)-エピカテキンを構成単位として、単結合のB型のインターフラバン結合に加えて、二重の結合を有するA型の結合を多数、分子内に有するプロアントシアニジン重合体であることを報告した (Ogawa et al. 2008)。本研究では、トチノキ種皮由来の重合性プロアントシアニジン類による糖質と脂質の消化吸収抑制に関する食品機能性研究に取り組んだ結果を以下に報告する (Ogawa et al. 2009 ; Kimura et al. 2009 ; Yokota et al. 2009)。

実験方法

トチノキ種皮からポリフェノール類を抽出して分画するために、まず、トチノキ種皮の粉碎したものを、蒸留水中で加熱還流を行った。抽出液を濾過し、減圧濃縮して粗抽出物を得た。この抽出物を、Diaion HP-20 を用いたカラムクロマトグラフィーにかけて、蒸留水で洗浄することで糖やタンパク質を除去した。さらに、メタノールでポリフェノール類を溶出し、得られた溶出画分を減圧濃縮した。この成分を逆相の Chromatorex ODS 1024T カラムクロマトグラフィーに供し、5% メタノールで洗浄後、50% メタノールで溶出してポリフェノール類を回収した。さらに、これらを Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにかけて、エタノール、メタノール、70% アセトンの順に溶出して、重合度の低いポリフェノールから先に溶出した。それらの溶出する順番に、F1, F2, そしてF3 のフラクションに分画し、糖質消化酵素に対する阻害活性を測定した。 α -アミラーゼに対するポリフェノール画分の阻害活性を *in vitro* で評価した。試料と基質

の澱粉の混合液にブタ膵臓もしくはヒト唾液 α -アミラーゼを加えて反応後、生成した還元糖とジニトロサリチル酸を反応させ、540 nm の吸光度を測定した。次に、 α -グルコシダーゼに対する阻害活性を検討した。試料と基質のマルトースもしくはスクロースとの混合液を、あらかじめ加温後、ラット小腸アセトン粉末より調製した粗酵素を加え、遊離するグルコース量を測定した。糖質消化酵素に対し、強い阻害作用を示したものについては、マウスを用いた動物実験で、澱粉もしくはグルコースの負荷による血糖値上昇の抑制効果を確認した。16時間絶食したマウスに、まず、トチノキ種皮由来のプロアントシアニジンを経口投与し、その20分後に、澱粉溶液を同様に投与し経時的に採血して、血中のグルコース濃度を調べた。さらに、脂質消化酵素の阻害試験では、*in vitro* での膵臓リパーゼ活性の阻害試験や *in vivo* の実験としてマウスでの油脂負荷試験を行った。

結果と考察

トチノキ種皮由来のポリフェノール抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにかけて、エタノール、メタノール、そして、70% アセトンで溶出すると、重合度の低い方から先にポリフェノールが溶出した。それらの溶出の順番に、F1, F2, そしてF3 のフラクションに分画した。糖質消化酵素の膵液あるいは唾液由来の α -アミラーゼや、小腸由来の α -グルコシダーゼ、すなわち、マルターゼやスクラーゼに対する阻害活性を *in vitro* の系で測定した。まず、 α -アミラーゼに対する阻害活性を評価したところ、その結果、F2 およびF3 において、強い阻害活性が確認された。特に重合度の高いF3 では、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で糖尿病治療薬であるアカルボースに匹敵する強い阻害活性を示した。また、重合度が高いポリフェノール画分で、より強い阻害活性が観察された。一方、小腸の α -グルコシダーゼ活性の阻害試験の結果、トチノキ種皮由来のポリフェノール成分のF1, F2, そしてF3 は、いずれも、アカルボースよりは弱いものの、マルターゼ、スクラーゼに対し有意な阻害活性を示した。

α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼに対し強い阻害活性を示したF2 およびF3 は、これまでのゲル浸透クロマトグラフィーおよびマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析やエレクトロスプレーイオン化質量分析などの機器分析の結果、(+)-カテキン

と (−)−エピカテキンの重合体のプロアントシアニジンであることが明らかになっている。F2 には重合度 45, F3 には重合度 108 程度のプロアントシアニジンが、それぞれ含まれている。その結合様式について解析したところ、通常の B 型のインターフラバン結合に加えて、二重に結合した A 型の結合が多数存在していた (Ogawa et al. 2008)。

次に、糖質消化酵素に対し、強い阻害作用を示した F2 および F3 による、マウスを用いた動物実験で、澱粉負荷による血糖値上昇の抑制効果を確認した。澱粉と共に、F2 もしくは F3 を経口投与したマウス群では、血糖値の上昇が有意に抑制された。F2 においては、1000 と 1500 mg/kg 体重での投与量で、投与 30 分後と 60 分後に、また、F3 においては、500 と 750 mg/kg 体重での投与量で、投与 30 分後に、コントロール群と比べ、血中グルコース濃度の上昇が有意に抑制された。一方、グルコースを用いた同様の糖負荷試験では、F2 と F3 による抑制効果は確認されなかった。これらの結果から、トチノキ種皮由来のプロアントシアニジンは、動物体内の消化管での α -アミラーゼや α -グルコシダーゼなどの糖質消化酵素を阻害することにより、糖質の吸収を緩和し、血中グルコース濃度の上昇を抑制するものと考えられた。

さらに、上記の F2 と F3 の画分は、ブタ由来の膵液リパーゼを濃度依存的に阻害した。他のポリフェノール関連物質について、膵液リパーゼに対する阻害活性を調べたところ、低分子の (+)−カテキン、(−)−エピカテキン、(−)−ガロカテキンに関しては、有意な阻害活性は認められなかった。また、プロシアニジン B₂ とプロシアニジン A₂ を比較すると、二重に結合した A 型のインターフラバン結合を有する A₂ が、プロシアニジン B₂ よりも明らかに強力なリパーゼの阻害活性を示した。このことは、今回のプロアントシアニジン画分の F2 と F3 において、A 型の結合の存在と重合度が高いことが、リパーゼ活性の阻害に有効であると考えられた。また、マウスでの油脂負荷試験による脂肪の消化吸収の阻害実験で、トチノキ種皮由来のプロアントシアニジンが、動物の消化管内に分泌されるリパーゼを有意に阻害することが確認された。

以上より、トチノキ種皮のプロアントシアニジンは、

in vitro の酵素反応系で、糖質消化酵素の膵液あるいは唾液の α -アミラーゼと小腸の α -グルコシダーゼ類、さらに、脂質消化酵素の膵液リパーゼを有意に阻害することがわかった。そして、マウスを用いた in vivo の動物実験により、澱粉あるいは油脂負荷による血糖値上昇や血中トリアシルグリセロールレベルの増加の有意な抑制効果も確認された。この効果は、プロアントシアニジンが動物体内の消化管内で糖質及び脂質の消化酵素のいずれも有意に阻害できることを示している。このように、トチノキ種皮由来のプロアントシアニジンは、糖尿病や肥満の発症を予防する観点で、潜在的に有用な機能性食品素材といえる。

引用文献

- Kimura, H., Ogawa, S., Niimi, A., Jisaka, M., Katsube, T., and Yokota, K. (2009) Inhibition of fat digestion by highly polymeric proanthocyanidins from seed shells of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME). J. Jpn. Food Sci. Technol., 56 : 483-489.
- Ogawa, S., Kimura, H., Niimi, A., Katsube, T., Jisaka, M., and Yokota, K. (2008) Fractionation and structural characterization of polyphenolic antioxidants from seed shells of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* BLUME). J. Agric. Food Chem., 56 : 12046-12051.
- Ogawa, S., Kimura, H., Niimi, A., Jisaka, M., Katsube, T., and Yokota, K. (2009) Inhibitory effects of polyphenolic compounds from seed shells of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata* Blume) on carbohydrate-digesting enzymes. J. Jpn. Food Sci. Technol. 56 : 95-102.
- Yokota, K., Chowdhury, A. A., Chu, X., Syeda, P. K., Hosain, M. S., Ogawa, S., Kimura, H., Nishimura, K., Jisaka, M., and Nagaya, T. (2009) Control of adipogenesis and obesity by dietary lipids and nutraceutical factors. Current Topics on Bioprocesses in Food Industry 3 : 140-149.