

エンサイの血糖値上昇抑制効果に関する研究

湧田裕子、豊川哲也、奥平留美子¹、市場俊雄、市村年昭²、丸山 進²

沖縄の伝統的食材であるエンサイは、当センターのこれまでの研究で血糖値上昇抑制作用を有することが明らかとなっている。そこで、その作用成分を明らかにするため、 α -グルコシダーゼ阻害活性を指標にクロマトグラフィーによる成分の精製を行い、3種のイソクロゲン酸類を単離・同定した。またエンサイを原料に抗糖尿病作用を有する機能素材を開発するため、 α -グルコシダーゼ阻害成分の効率的な精製方法を確立した。さらに精製物について糖尿病モデルマウスを用いた確認試験を行った結果、血糖値の低下傾向が認められた。またラット膵臓B株細胞を用いた細胞試験によりエンサイ抽出物にインスリン分泌促進効果が認められた。

1 はじめに

エンサイ (*Ipomoea aquatica* Forsk) は、東南アジア原産の植物で別名ヨウサイと呼ばれ、サツマイモと同じヒルガオ科サツマイモ属に属するつる性の多年草である。主に食用として栽培され、中国やインドネシアでは、鼻血、不眠などの民間薬として用いられている¹⁾。沖縄では5月から11月頃までの夏場の葉野菜の少ない時期に市場に出回る食材として知られ、炒め物や和え物に調理して食されている。当センターはこれまでの研究で、エンサイに α -グルコシダーゼ阻害作用を見いだした²⁾。 α -グルコシダーゼ阻害剤は糖尿病や肥満の治療または予防薬として利用されており、その作用機序は摂取した麦芽糖の分解を抑制し、腸管でのブドウ糖の吸収を遅延させ血糖値の上昇を抑制するものである。医薬品ではボクリボースが糖尿病の治療薬として用いられている。エンサイを原料に抗糖尿病剤や抗肥満剤を開発するためには、その作用成分に関する知見が必要とされるが、エンサイの血糖値上昇抑制成分に関する研究はこれまでに行われていない。そこで本研究ではエンサイに含まれる α -グルコシダーゼ阻害成分を解明することを目的とした。さらにエンサイを新しい機能性素材として健康食品産業へ展開していくため、 α -グルコシダーゼ阻害成分の効率的な抽出法、分離法を検討し、有効成分を効率的に大量精製する方法を確立した。そこでエンサイ由来の α -グルコシダーゼ阻害成分を粗精製し、動物試験により血糖値上昇抑制効果の確認を行った。またラット膵臓B株細胞を用いた細胞試験によりエンサイ抽出物のインスリン分泌促進効果について検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 有効成分の単離・精製

(1) 試料の乾燥・粉砕

4月下旬に購入した県産のエンサイ5kgを、定温乾燥機にて約60℃で一晩乾燥した。乾燥物は1.0mmの篩の付いた粉砕機(ウイレー型1029B 吉田製作所)を用いて粉砕し、エンサイ乾燥粉末366gを得た。

(2) 50%エタノールによる抽出

エンサイ乾燥粉末130gに1.3Lの50%エタノールを加えステンレス製の密閉容器に封入し80℃の湯煎で1時間抽出を行った。抽出液は高速遠心機を用いて12,600×gで30分間遠心分離した後、ガーゼでろ過し上清を回収した。残渣は130mlの50%エタノールで洗浄して洗浄液を回収し、エンサイ抽出液1.23Lを得た。

(3) 成分の分画・精製、構造解析

エンサイ抽出液を吸着カラムクロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーにより分画し、 α -グルコシダーゼ阻害活性を指標に活性成分を精製した。構造解析はUV、NMR、MSスペクトルを測定し文献値と比較した。

2-2 α -グルコシダーゼ阻害活性の測定

活性の測定は出口らの方法³⁾に準じ、以下の方法で行った。

(1) 酵素液、基質溶液の調製

ラット腸管アセトンパウダー(SIGMA社)に10倍量の0.1Mクエン酸緩衝液(pH6.0)を加え水中で1時間攪拌した後、15,000rpm、4℃で45分間遠心分離を行い、上清を緩衝液で3倍希釈し酵素液として凍結保存した。基質溶液はマルトース一水和物を2%の濃度になるように緩衝液に溶解した。

(2) 活性の測定

酵素液20 μ lにサンプル10 μ lを添加して37℃で5分間保持し、さらに2%マルトース溶液20 μ lを添加して30分間酵素反応を行った。対照は50%エタノール溶液を添加した。

1 有限会社 アロエース、2 独立行政法人 産業技術総合研究所

100℃で15分間保持して酵素を熱失活させ反応を停止させた。反応停止後、10,000rpmで10分間遠心分離し、その上清中のグルコース生成量をグルコースC-IIテストワコー（和光純薬工業）により定量した。 α -グルコシダーゼの阻害率は次式により算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(\text{対照のグルコース生成量}) - (\text{サンプル添加時のグルコース生成量})}{(\text{対照のグルコース生成量})} \times 100$$

2-3 α -グルコシダーゼ阻害物質大量調製法の検討

(1) 乾燥条件の検討

エンサイを葉及び茎に分け、50、60、80℃で24時間乾燥した。各サンプルについて高速溶媒抽出機（ダイオネクスASE-200）を用いて抽出し、抽出液の α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。（抽出条件：試料2g、抽出溶媒50%エタノール、抽出温度80℃、抽出時間10min、溶媒量25ml、抽出回数2回）

(2) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒にはエタノールを使用し、エタノールの濃度を段階的に変え、高速溶媒抽出機を用いて抽出した。各抽出液について α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。

（抽出条件：60℃乾燥試料 2g、抽出温度80℃、抽出時間10min、溶媒量25ml、抽出回数2回）

(3) 抽出温度及び時間の検討

図1に示す抽出装置を用いて実験を行った。抽出槽にエンサイ乾燥粉末300g及び50%エタノール3Lを添加し、所定温度に設定後、3時間置きにサンプリングを行った。各々の抽出液について α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。

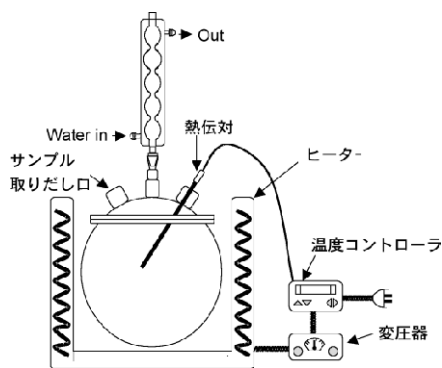


図1 抽出装置

(4) 粗精製条件の検討

高分子画分の除去を目的として、限外ろ過（分画分子量10kDa）を行った。さらに合成樹脂のHP20を用いた吸着カラムクロマトグラフィーにより成分の分離を検討した。

2-4 動物試験

(1) サンプルの調製

エンサイ生葉を50℃で24時間乾燥後、粉碎した。乾燥

粉末を50%エタノールを用いて60℃で3時間抽出し、抽出液をろ過、水で5倍希釈した後、HP20を用いて0%～80%エタノールで分画した。20%エタノール溶出面分を濃縮・凍結乾燥し、投与サンプルとした。エンサイ生葉100kgから投与サンプル38gを得た。

(2) 投与試験

糖尿病モデルマウス（日本クレア KK-Ay ♂）を用いた長期投与試験を行った。KK-Ayマウスはコントロール群、低用量群、高用量群、各10匹、各ケージ1匹飼いで6週齢から実験をスタートした。投与飼料はコントロール群が日本クレアCE-2固形飼料を使用し、低用量群はCE-2粉末飼料にサンプルを0.8mg/g（サンプル/CE-2）、高用量群はサンプルを3mg/g（サンプル/CE-2）混合し、CE-2固形飼料と同様に固体成形した。2週間の予備飼育後、自由摂食でサンプル配合飼料を投与した。血糖値の測定は測定日の前日より12時間絶食させ、尾静脈より採血し、バイエルデキスターZIIにて測定した。体重測定は血糖値測定時に行った。

2-5 インスリン分泌促進効果

(1) 試料の調製

エンサイの葉及び茎を凍結乾燥し粉碎した試料0.5gに25mlの蒸留水を加え、60分間攪拌した。次いで、15,000rpmで20分間の遠心分離を行い不溶物を沈殿させ、上清を回収した。この上清を濃縮、減圧下で乾燥させ、活性測定用試料とした。

(2) インスリン分泌促進活性の測定

ラットの膵臓B株細胞株RINm5FをRPMI1640培地に2g/l 炭酸水素ナトリウム、10% 非働化処理ウシ胎児血清、100 μ g/ml ストレプトマイシン、100 units/ml ペニシリンを添加した培地で、24穴（1穴2cm²）のマイクロプレートにて、5%CO₂存在下、37℃で3日間の培養を行った。次いで、古い培地を捨て、各穴当たり1 mlの新しい培地を加え更に1日間培養した。次にプレートの各穴の培地を捨て、1 ml のクレブス-リンゲル重炭酸(KRB) 緩衝液にて各穴を2回洗浄した。その後、360 μ l のKRB緩衝液に40 μ lの試料を加えた溶液400 μ lを各穴に添加し、5% CO₂存在下、37℃で0～180分間静置培養した。上清200 μ lを回収して、遠心により混入した細胞を除去し、試料を希釈後、上清中のインスリン濃度をレビス インスリン-ラットELISAキット（シバヤギ社）を用いた酵素免疫測定法により測定した。

2-6 統計処理

データは、平均値±標準誤差で表示した。統計処理は、EXCEL（マイクロソフト社）およびEXCEL統計（エスミ社）を使用し、t検定ならびにTukeyの群多重検定を行った。

3 結果及び考察

3-1 エンサイの有効成分の分離

活性成分の分離スキームを図2に示す。50%エタノール抽出液1.23Lを珪藻土を用いてろ過した。合成吸着剤のDIAION HP20（三菱化学）を用いた吸着カラムクロマトグラフィーで分画を行うため、小スケールでの前試験を行った。その結果、抽出液中のエタノール濃度を10%以下にすることで活性成分がHP20に吸着され効率的に分離できることが分かったため、抽出液を水で5倍に希釈した。HP20を充填したカラム（φ8cm×25cm）に希釈液を添加し、水、20%エタノール、40%エタノール、60%エタノール、80%エタノール、各2.5Lで順次溶出させた。溶出液の濃縮・乾燥は減圧下、45℃以下で行った。

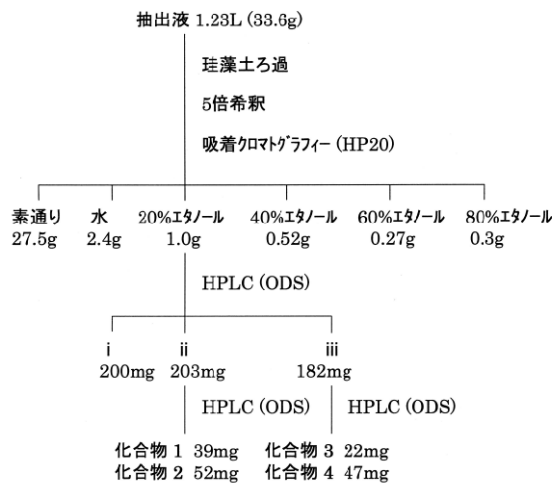


図2 エンサイ中のα-グルコシダーゼ阻害成分の分離スキーム

各画分の収量と試料濃度5mg/mlでのα-グルコシダーゼ阻害率を表1に示す。20%エタノール溶出画分は阻害率が89%、収量が1gで、活性成分を最も多く含んでいることが示唆された。

表1 HP20分画のα-グルコシダーゼ阻害活性と収量

	阻害率(%) (試料濃度 5mg/ml)	収量(g)
素通り	0	27.5
水	16	2.4
20%エタノール	89	1.0
40%エタノール	85	0.52
60%エタノール	59	0.27
80%エタノール	4	0.3
抽出液	38	33.6

そこで20%エタノール溶出画分中の活性成分の分離を行った。HPLC（日本分光PU-2086、UV-2075）により逆相系

のカラム（YMC-Pack ODS-A S-5mm 250×20mm I.D.）を用いてメタノール-水の直線勾配で分画し、（移動相：1%酢酸を含む15%～60%メタノール、40分の直線グラジエント、流速：10ml/min、検出：UV254nm）、各フラクション毎にα-グルコシダーゼ阻害活性を測定した。そのクロマトグラムと阻害活性を図3に示す。溶出時間23～25分のピーク（フラクションii）と29～30分のピーク（フラクションiii）に活性がみられたのでこれらを回収した。

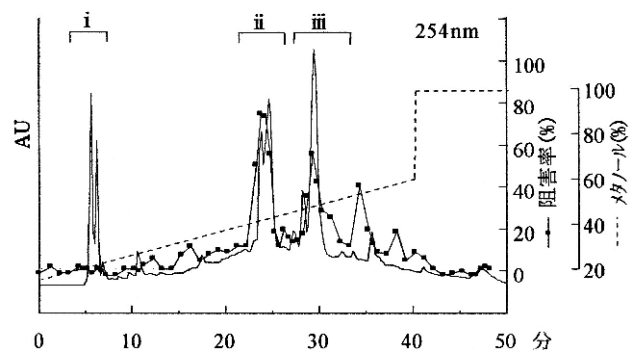


図3 20%エタノール溶出画分の逆相HPLCによるクロマトパターン

さらにフラクションiiとiiiについて、同様のカラムを用いて移動相にアセトニトリル-水を使用し成分の分離を行った（フラクションiiについて、移動相：1%酢酸を含む17%アセトニトリル、流速：125ml/min、検出：UV254nm、フラクションiiiについて、移動相：1%酢酸を含む15%～22%アセトニトリル、60分の直線グラジエント、流速：10ml/min、検出：UV254nm）。その結果、フラクションiiより化合物1（39mg）と2（52mg）、iiiより3（22mg）と4（47mg）を単離した。化合物1～4の試料濃度200μg/mlでのα-グルコシダーゼ阻害活性を表2に示す。化合物1が阻害率61%と最も強い阻害活性を示した。

表2 単離した化合物のα-グルコシダーゼ阻害活性

	阻害率(%) (試料濃度 200μ/ml)
化合物1	61
化合物2	22
化合物3	11
化合物4	34

3-2 構造解析

UVスペクトル、MSスペクトル（FAB-MS、質量分析計：日本電子 JMS-700）および¹H-NMR、¹³C-NMRスペクトル（核磁気共鳴装置：日本電子 JNM-LA400）を測

定し構造解析を行った。化合物1、2、4は330nm付近に吸収極大を持つカフェー酸残基に由来する特徴的なUVスペクトルの吸収を示し、カフェー酸誘導体である可能性が示唆された(図4)。

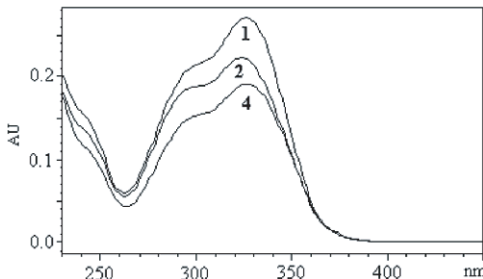
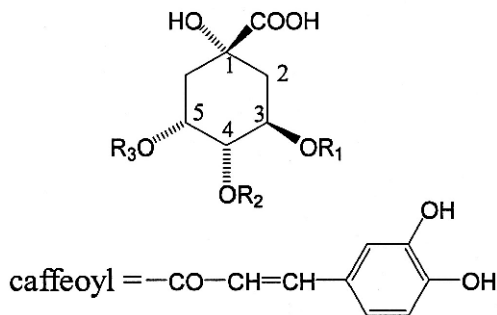


図4 化合物1、2、4のUVスペクトル

またFAB-MSにより3化合物とも同じ m/z 515 (M-H)⁻の分子イオンピークが観察されたため、これらの化合物はキナ酸のジカフェオイル誘導体(分子量516)と推定され、エステル結合の位置が異なる異性体と考えられた。¹H-NMR、¹³C-NMRスペクトルを文献値^{4,5)}と比較したところ良く一致し、化合物1をイソクロロゲン酸c(4,5-ジカフェオイルキナ酸)、2をイソクロロゲン酸a(3,5-ジカフェオイルキナ酸)、4をイソクロロゲン酸b(3,4-ジカフェオイルキナ酸)と同定した。化合物の構造式を図5に示す。



イソクロロゲン酸c (1) R₁ = H R₂, R₃ = caffeoyl
 イソクロロゲン酸a (2) R₁, R₃ = caffeoyl R₂ = H
 イソクロロゲン酸b (4) R₁, R₂ = caffeoyl R₃ = H

図5 エンサイから単離した化合物

化合物のMSおよびNMRの測定データを以下に示す。

イソクロロゲン酸c (1) FAB-MS (negative mode) m/z 515 [M-H]⁻, ¹H NMR (CD₃OD) δ ppm 2.0-2.4 (4H), 4.36 (1H), 4.99 (1H, dd, $J=3, 9$ Hz), 5.63 (1H), 6.25, 6.28 (each 1H, d, $J=16$ Hz), 6.72, 6.77 (each 1H, d, $J=8$ Hz), 6.87, 6.92 (each 1H, dd, $J=2, 8$ Hz), 7.01, 7.04 (each 1H, d, $J=2$ Hz), 7.54, 7.57 (each 1H, d, $J=16$ Hz), ¹³C NMR(CD₃OD) δ ppm 37.0, 41.9, 65.8, 70.1, 75.2, 76.5, 114.97, 115.02, 115.2, 115.3, 116.50, 116.54, 123.1, 123.2, 127.7, 127.8, 146.76, 146.79, 147.29, 147.33, 149.6, 168.5, 168.6, 178.0

イソクロロゲン酸a (2) FAB-MS (negative mode) m/z 515 [M-H]⁻, ¹H NMR (CD₃OD) δ ppm 2.1-2.3 (4H), 3.96 (1H, dd, $J=3, 7$ Hz), 5.38 (1H), 5.42 (1H), 6.26, 6.34 (each 1H, d, $J=16$ Hz), 6.772, 6.774 (each 1H, d, $J=8$ Hz), 6.96, 6.97 (each 1H, dd, $J=2, 8$ Hz), 7.06 (2H), 7.57, 7.61 (each 1H, d, $J=16$ Hz), ¹³C NMR (CD₃OD) δ ppm 36.0, 37.7, 70.7, 72.1, 72.6, 74.7, 115.2, 115.3, 115.6, 116.5, 122.98, 123.04, 127.8, 127.9, 146.8, 147.0, 147.2, 149.5, 149.6, 168.3, 168.9, 177.4

イソクロロゲン酸b (3) FAB-MS (negative mode) m/z 515 [M-H]⁻, ¹H NMR (CD₃OD) δ ppm 2.0-2.3 (4H), 4.36 (1H), 5.11 (1H, dd, $J=3, 9$ Hz), 5.61 (1H), 6.18, 6.28 (each 1H, d, $J=16$ Hz), 6.73, 6.74 (each 1H, d, $J=8$ Hz), 6.90, 6.91 (each 1H, dd, $J=2, 8$ Hz), 6.99, 7.01 (each 1H, d, $J=2$ Hz), 7.51, 7.59 (each 1H, d, $J=16$ Hz), ¹³C NMR(CD₃OD) δ ppm 38.4, 39.3, 69.0, 69.3, 75.7, 76.0, 114.7, 114.8, 115.20, 115.23, 116.5, 123.1, 127.65, 127.71, 146.7, 147.6, 147.7, 149.7, 168.2, 168.5, 176.8

3-3 エンサイに含まれる α -グルコシダーゼ阻害成分について

今回、エンサイから単離したイソクロロゲン酸類はキク科のヨモギ類⁶⁾やエンサイと同属のサツマイモの葉⁴⁾に含まれていることが知られている。またACE阻害作用⁷⁾、抗変異原性作用⁸⁾のあることが報告されている。当センターでもこれまでにニシヨモギ⁹⁾およびベニバナボロギク¹⁰⁾からイソクロロゲン酸類を単離しており、抗酸化作用および α -グルコシダーゼ阻害作用を有することを確認している。表3にエンサイの抽出物、20%エタノール溶出画分、イソクロロゲン酸類および市販品のクロロゲン酸の α -グルコシダーゼ阻害活性(IC₅₀値)を示した。

表3 精製物質の α -グルコシダーゼ阻害活性

	阻害活性 IC ₅₀ (μ g/ml)
抽出物	7700
20%エタノール溶出画分	570
イソクロロゲン酸 a (2)	610
イソクロロゲン酸 b (4)	470
イソクロロゲン酸 c (1)	96
クロロゲン酸 (市販品)	2200

イソクロロゲン酸類の α -グルコシダーゼ阻害作用はカフェー酸がキナ酸の4、5位に結合したイソクロロゲン酸cが他と比べ5倍以上の活性を示し、阻害活性はカフェー酸の結合位置により異なることが分かった。さらにカフェー酸がキナ酸の3位に結合したクロロゲン酸(図6)の活性はイソクロロゲン酸類と比べて弱く、カフェー酸エステ

ルの数も阻害活性に関与していると考えられた。

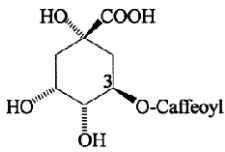


図6 クロロゲン酸

エンサイに含まれる α -グルコシダーゼ阻害成分は、表2から分かるようにHP20での分画で得た40%エタノール溶出画分中にも比較的強い α -グルコシダーゼ阻害活性が見られた。そこでHPLCによる分析を行ったところ20%エタノール溶出画分と主成分が異なることが分かり、今回単離したイソクロロゲン酸類以外の活性成分の存在が考えられた。

3-4 乾燥条件の検討

エンサイに含まれる α -グルコシダーゼ阻害成分を効率的に大量調製するため、乾燥条件の検討を行った。各処理により得られたエンサイ乾燥物の50%エタノール抽出物の α -グルコシダーゼ阻害活性を表4に示した(試料濃度5mg/ml)。分散分析及び母平均の多重比較検定の結果、部位に関しては葉の阻害活性の高いことが認められた。また乾燥温度は50℃で処理した場合に阻害活性の高いことが認められた。

表4 乾燥温度及び部位の違いによる α -グルコシダーゼ阻害活性の変化 (%)

	50℃	60℃	80℃
葉	67.3 ± 4.8 ^c	46.2 ± 7.0 ^b	27.8 ± 1.3 ^{ab}
茎	46.5 ± 5.3 ^b	45.6 ± 11.0 ^b	11.9 ± 10.9 ^a

数値は平均値±標準偏差を表す。
異なる文字間には有意差(P<0.05)が認められたことを表す。

50℃で乾燥を行った場合の重量変化を図7に示す。エンサイの乾重量は12時間でほぼ定常状態に達した。また、この時点の水分含量は6%であった。以上の結果より、エンサイ原料の前処理は、乾燥温度50℃、乾燥時間は作業性を考慮して24時間、部位については葉を使用することで、高い阻害活性を有する乾燥物が得られると判断した。

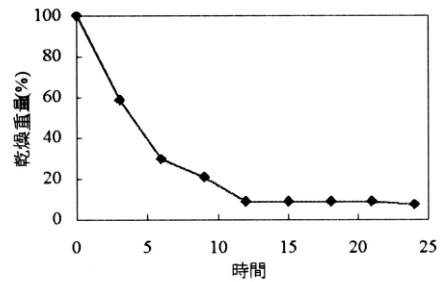


図7 エンサイ生葉を50℃で乾燥処理した場合の重量変化

3-5 抽出溶媒の検討

エタノールの濃度を変えて抽出を行い、各抽出液について α -グルコシダーゼ阻害活性測定した(試料濃度5mg/ml)。結果を表5に示した。水抽出よりもエタノールとの混合溶液の方が抽出効率も格段に向上することが分かった。各抽出液の阻害率について、母平均の多重比較検定を行った結果、40~80%エタノール間に差は認められなかった。しかし、40%エタノール抽出液は粘性が高いためろ過がしづらく、またエタノールは抽出溶媒としては高価であるため、50%エタノール抽出が適当と判断した。以後は、抽出溶媒として50%エタノールを用いることとした。

表5 抽出溶媒の違いによる α -グルコシダーゼ阻害活性の変化

エタノール濃度 (%)	阻害率 (%)
0	2.0 ± 3.9 ^d
20	37.7 ± 3.4 ^{bc}
40	47.5 ± 3.6 ^{ab}
50	52.3 ± 1.7 ^a
60	50.6 ± 2.3 ^{ab}
80	51.0 ± 1.4 ^{ab}
100	32.7 ± 4.0 ^c

数値は平均値±標準偏差を表す。
異なる文字間には有意差(P<0.05)が認められたことを表す。

3-6 抽出時間及び温度の検討

抽出温度を30℃~80℃、抽出時間を3時間から9時間に設定し、各処理で得られた抽出液の α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した(表6)。各サンプルの α -グルコシダーゼ阻害率について、分散分析を行った結果、抽出時間による差は認められなかった。抽出温度に関しては母平均の多重比較検定を行ったところ、60℃と80℃で阻害活性が他よりも高くなることが認められた(p<0.05)。以上の結果より、抽出温度は60℃、抽出時間は最短の3時間が最適条件と判断した。

表6 抽出温度と時間の違いによるα-グルコシダーゼ阻害活性の変化 (%)

	3時間	6時間	9時間
30℃	36.8 ± 4.0	31.7 ± 1.7	27.4 ± 2.7
40℃	42.8 ± 0.2	34.8 ± 10.4	40.9 ± 0.5
60℃	53.0 ± 1.9	54.7 ± 0.5	56.7 ± 2.6
80℃	55.3 ± 2.7	56.5 ± 2.7	55.6 ± 4.7

数値は平均値±標準偏差を表す。

3-7 精製条件の検討

前述の結果から最適条件で得られた抽出液を用いてα-グルコシダーゼ阻害成分の粗精製条件の検討を行った。まず分子量による分画を検討するため、抽出液を分画分子量10kDaで限外ろ過し、α-グルコシダーゼ阻害活性を測定した。その結果、処理前後で差が認められなかったため、限外ろ過の工程を省略して粗精製を行うこととした。

次に合成樹脂のHP20による分離を行った。溶出はエタノール濃度を順次変えて行った。各溶出画分のα-グルコシダーゼ阻害活性を測定したところ、結果は示さないが、20%エタノール溶出画分に強い阻害活性が見られた。HPLCで分析を行った結果、保持時間の早いピークから順に、イソクロロゲン酸c、イソクロロゲン酸a、イソクロロゲン酸bであることを確認した(図8)。クロマトパターンより共雑ピークがほとんど見られないことから、HP20による分画でエンサイ中のイソクロロゲン酸類を効率よく粗精製できることが分かった。

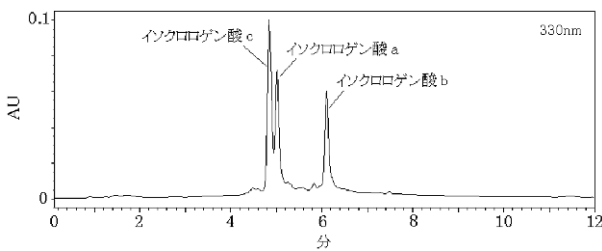


図8. 20%エタノール溶出画分のクロマトパターン

3-8 動物試験

投与試料の諸特性を表7に示す。投与試料は、イソクロロゲン酸類を63%の高濃度で含有し、溶液の状態では120℃、20分の熱処理に対しても、α-グルコシダーゼ阻害活性に変化は認められなかった。また、緑茶のようなさわやかな苦味を呈した。

表7. 投与試料の諸物性

成分	イソクロロゲン酸 a	18 %
	イソクロロゲン酸 b	16 %
	イソクロロゲン酸 c	29 %
	その他	37 %
性状	褐色粉末	
風味	さわやかな苦味を呈す	
溶解性	水、50%エタノールに可溶	
液性	pH 5.9	
熱安定性	120℃, 20分で安定	

KK-Ayマウスにサンプルを8週齢から低用量0.8mg/g (サンプル/CE-2) 及び高用量3mg/g (サンプル/CE-2) で自由給餌させた時の血糖値変化を図9に、体重変化を図10に示した。血糖値はコントロール群と比較して低用量群では11週齢 (p<0.17) と12週齢 (p<0.25) で低下傾向を示した。高用量群は14週齢時 (p<0.19) に低下傾向を示した。体重についてはコントロール群と比較して高用量群で12週齢 (p<0.18)、15週齢 (p<0.29) で低下傾向を示した。

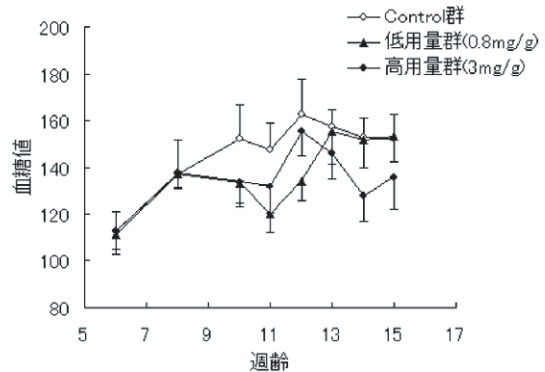


図9 エンサイ粗精製物を自由給餌したKK-Ayマウスの血糖値に与える影響

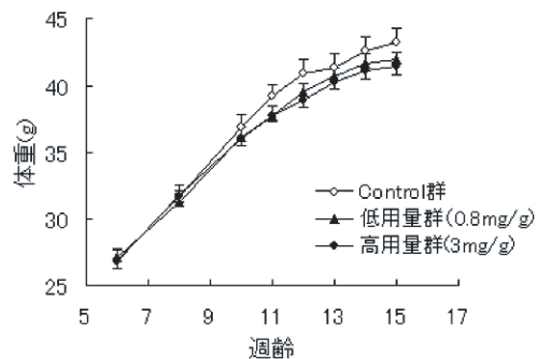


図10 エンサイ粗精製物を自由給餌したKK-Ayマウスの体重に与える影響

3-9 インスリン分泌促進効果

試料添加120分後のKRB緩衝液中インスリン濃度を表8に示した。n=3、数値は平均値±標準偏差で示し、群間に有意差が認められた場合は*(p<0.05)、**(p<0.01)、*** (p<0.001)で示した。エンサイ抽出物は表8の濃度範囲で有意にインスリンの分泌を促進することが認められた。また試料濃度0.35mg/ml以上ではインスリン分泌促進物質であるグルカゴン1μMよりも高いインスリン濃度を示した。

表8. 各濃度のエンサイ抽出物あるいはグルカゴン添加120分後のRINm5F細胞におけるKRB緩衝液中のインスリン濃度

添加試料 (反応液中濃度)	インスリン濃度 (ng/ml)
対照	16.5 ± 1.5
グルカゴン 1μM	51.6 ± 1.8***
エンサイ抽出物 0.088 mg/ml	25.6 ± 1.8**
エンサイ抽出物 0.175 mg/ml	36.2 ± 3.9**
エンサイ抽出物 0.35 mg/ml	59.9 ± 9.4**
エンサイ抽出物 0.7 mg/ml	77.3 ± 5.1***

図11はエンサイ抽出物0.18mg/ml添加後の各時間におけるKRB緩衝液中のインスリン濃度を示した。表8と同じくn=3の平均値で示した。今回の試料添加量ではグルカゴン1μMよりもインスリン濃度は少ない値を示したが、対照と比較すると有意にインスリン分泌を促進することが認められた。

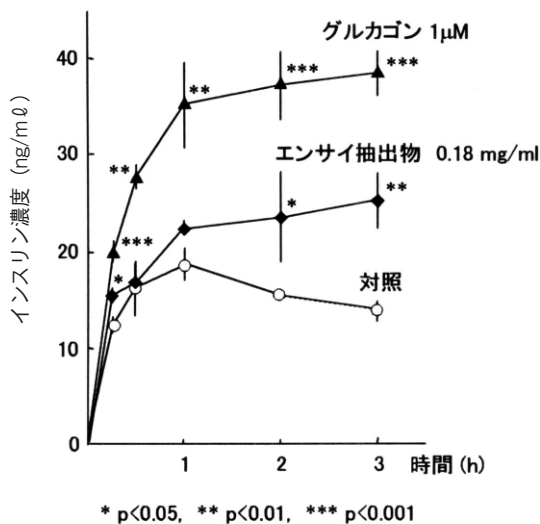


図11 エンサイ抽出物を添加した場合のRINm5F細胞におけるKRB緩衝液中のインスリン濃度変化

またMTT (臭化3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウム) キット (Roche) により細胞増殖に対するエンサイ抽出物の影響を検討したところ、表8及び図11の濃度範囲では細胞増殖に対して影響のないことが確認できた。

エンサイの血糖値上昇抑制効果はこれまでに動物実験で確認されており¹¹⁾、二糖類分解酵素の阻害作用以外にもエンサイ抽出物のインスリン分泌促進効果が示唆されていた¹²⁾。しかし実際にインスリン分泌促進効果を実験で証明したものはなく、産総研の研究で今回初めてエンサイ抽出物のインスリン分泌促進効果が明らかとなった。またエンサイは食物繊維を多く含んでいることが知られており、これらのことから、エンサイの血糖値上昇抑制効果にはいくつかの要因が関与しているのではないかと考えられた。

4 まとめ

- ①エンサイの血糖値上昇抑制成分を明らかにするため、 α -グルコシダーゼ阻害活性を指標に各種クロマトグラフィーによる成分の精製を行った。その結果、阻害活性を有する3種の化合物を単離し、これらの化合物をイソクロロゲン酸c、イソクロロゲン酸a、イソクロロゲン酸bと同定した。
- ②エンサイの α -グルコシダーゼ阻害物質を効率的に大量調製するため、乾燥条件、抽出条件、精製方法を討した。エンサイを50℃で24時間乾燥し、50%エタノールで60℃、3時間抽出した抽出液をHP20により分画することでエンサイの α -グルコシダーゼ阻害成分であるイソクロロゲン酸類を効率的に粗精製できることが分かった。
- ③糖尿病モデルマウスで血糖値上昇抑制効果の実証試験を行った結果、エンサイ粗精製物の投与群で血糖値の低下傾向が認められた。
- ④血糖値上昇抑制効果の指標の一つであるインスリン分泌促進効果を検討した結果、エンサイ抽出物に効果が認められた。

なお、この研究は独立行政法人産業技術総合研究所の地域中小企業支援型研究開発 (技術シーズ持込評価型) の委託研究事業により行われたものです。

5 参考文献

- 1) 世界有用植物事典 平凡社 p.555 1989
- 2) 鎌田靖弘、豊川哲也、照屋正映、吉田安彦、花城薫、新垣美香、上地美香 沖縄県工業技術センター研究報告第4号 77-84 (2002)
- 3) 出口ヨリ子、長田邦子、内田和美、木村広子、芳川雅樹、工藤辰幸、保井久子、錦貫雅章 日本農芸化学会誌 72 (8) 923-931 (1998)
- 4) M. S. Islam, M. Yoshimoto, S. Yahara, S. Okuno, K. Ishiguro, O. Yamakawa : *J. Agric. Food Chem.* 50 3718-3722 (2002)

- 5) T. Tatefuji, N. Izumi, T. Ohta, S. Arai, M. Ikeda, M. Kurimoto : *Biol. Pharm. Bull.* **19** (7) 966-970 (1996)
- 6) 奥田拓男、波多野力、縣功、西辺三省、木村康一
薬学雑誌 106 (10) 894-899 (1986)
- 7) H. Oh, D. Kong, S. Lee, H. Lee : *J.Ethnopharmacol.* **83** 105-108 (2002)
- 8) M. Yoshimoto, S. Yahara, S. Okuno, M. S. Islam, K. Ishiguro, O. Yamakawa : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (11) 2336-2341 (2002)
- 9) 市場俊雄、喜屋武裕子 沖縄県工業技術センター研究報告第2号 1-22 (2000)
- 10) 市場俊雄、安仁屋洋子 沖縄県工業技術センター研究報告第3号 71-75 (2001)
- 11) 鎌田靖弘、豊川哲也、市場俊雄 沖縄県工業技術センター研究報告第4号 85-92 (2002)
- 12) T. S. Malalavidhane, S. M. D. N. Wickramasinghe, E. R. Jansz : *J.Ethnopharmacol.* **72** 293-298 (2000)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。