

ポリフェノール高含有素材に含まれる血糖値上昇抑制成分の探索

平成 29 年 3 月

河 邊 聡 子

岡山県立大学大学院

保健福祉学研究科

ポリフェノール高含有素材に含まれる血糖値上昇抑制成分の探索

目次

総論の部

緒言	1
----	---

第1章 ザクロ葉エキスの血糖上昇抑制作用とその関与成分

1-1 植物エキスの α -Glucosidase 阻害活性について	3
1-1-1 各植物エキスの α -Glucosidase 阻害活性率	3
1-1-2 α -Glucosidase 阻害薬の阻害活性率の測定	5
1-2 ザクロ葉について	7
1-3 ザクロ葉エキスの α -Amylase 阻害活性について	7
1-4 ザクロ葉エキスの血糖値に及ぼす影響	7
1-4-1 糖負荷試験におけるザクロ葉エキスの影響	8
1-5 ザクロの α -Glucosidase 阻害活性成分の探索	10
1-6 ザクロ葉エキス単離化合物の α -Glucosidase 阻害活性	14
1-7 ザクロ葉エキス中成分の α -Amylase 阻害活性	14
1-8 ザクロ葉エキスの α -Glucosidase 阻害様式について	15
1-9 小括	17

第2章 ヒシ中の機能成分の探索

2-1	ヒシの α -Glucosidase 阻害活性成分の探索	19
2-2	ヒシ皮エキスの α -Glucosidase 阻害活性成分の探索	23
2-3	ヒシ皮酢酸エチルエキスの探索	25
2-4	ヒシ皮成分の構造解析	27
2-5	小括	29

第3章 イタドリにおける主要なポリフェノール成分の分析および α -Glucosidase 阻害活性成分の探索

3-1	イタドリ根エキスのポリフェノール化合物の分析	31
3-2	イタドリ茎エキスのポリフェノール化合物の分析	34
3-3	イタドリ葉エキスのポリフェノール化合物の分析	34
3-4	イタドリエキスの化合物の α -Glucosidase 阻害活性	35
3-5	小括	36
	結語	37
	実験の部	41
	謝辞	49
	参考文献	50
	本研究に関する論文および学会発表	53

総論の部

緒言

ポリフェノールは、植物や食品に多く含まれ、その作用が注目されている。緑茶に含まれる緑茶タンニンは、(-)-Epigallocatechin や (-)-Epicatechin gallate で抗酸化作用や発がん抑制の効果が報告されている。ブドウ果実の皮や種子に含まれるプロアントシアニジンは、抗酸化作用や動脈硬化抑制作用が明らかとなっている。イチヨウ葉に含まれるフラボノイドがドイツで脳血流を増大させ、脳障害改善薬、喘息治療薬として開発されている。グアバ葉に含まれるグアバ葉ポリフェノールは、血糖値上昇抑制効果が期待されている。そして、これらのポリフェノールを成分として食品や特定保健用食品、機能性表示食品として日常的に摂取しやすい形で店頭に出回っている。中でもその関与成分として近年注目されているものとして、糖尿病の有病率の上昇に伴い、それに関連する α -グルコシダーゼ阻害活性成分を含むポリフェノールが多数研究されている¹⁾。

この特定保健用食品や、機能性表示食品は、医薬品や医薬部外品とは異なるが一般の食品ともことなりなんらかの機能性を食品に表示することができる。そのため、関与成分についての科学的根拠が医学的、栄養学的に明らかにされている必要がある。特定保健用食品は、国が有効性及安全性を個別に審査するため、許可のハードルが非常に高い。そこで、2015年4月より事業者の責任において許可することができる機能性表示食品の分類が新設された⁶⁾。

また、糖尿病は、日本人の食生活の変化、生活の変化、ストレスの多い社会、運動不足等が原因で、罹患率が急激に増加している。厚生労働省の平成26年(2014年)「国民健康・栄養調査」によると、糖尿病有病者(糖尿病が強く疑われる人)の割合は、男性で15.5%、女性で9.8%であった。2006年の調査では、男性で12.3%、女性で8.2%であり、男女ともに増加傾向にある。これを改善するために生活スタイルを変化させること、特に、食生活を改善し、食後の急激な血糖値の上昇を抑制する必要があるが、糖尿病の初期段階として手に取りやすいサプリメントや健康食品を利用する場合もある。

現在、糖尿病に使用される薬剤は、食事療法や運動療法により十分な血糖コントロールが得られない場合、または食事療法・運動療法に加えて経口血糖降下薬もしくはインスリン製剤を使用している患者で十分な血糖コントロールが得られない場合、食後過血糖の改善の目的で α -Glucosidase阻害薬が使用される²⁾。これは、食事により摂取された炭水化物が、小腸で α -Glucosidaseにより二糖類に分解、さらに小腸粘膜上皮細胞の刷子縁に存在

する α -Glucosidaseにより単糖まで分解され吸収されるが、 α -Glucosidaseの作用を阻害剤により阻害することで、糖の分解・吸収を遅らせる医薬品である。臨床の医薬品としては、VogliboseやAcarboseが使用されている。

すでに植物由来のポリフェノールで α -Glucosidase阻害活性効果があるものとしていくつか報告がある。グアバ葉³⁻⁵⁾に含まれるグアバ葉ポリフェノール、Pedunculagin、Tellimagrandin I、Casuarinin、Stachyurin¹⁾が、糖の吸収をおだやかにするため、食後の血糖値が気になる方に適した飲料として、特定保健用食品で販売されている。桑の葉⁶⁻⁸⁾は、それに含まれる1-Deoxynojirimycinがブドウ糖に類似した窒素含有糖構造を持つため、消化管の糖質分解酵素である α -Glucosidaseを競合的に阻害し、食後の血糖値の上昇を抑制するとされている。月見草エキス⁹⁻¹¹⁾は、それに含まれる、Proanthocyanidinが α -Glucosidaseが血糖上昇抑制作用を有していると示唆されている。サラシア^{12,13)}は、それに含まれSalacinolが α -Glucosidase阻害活性成分として含まれ作用していると示唆されている。また、コーヒー豆抽出物についても血糖値の上昇抑制作用について研究されている¹⁴⁾。

そこで特定保健用食品や機能性表示食品の関与成分として効果を発揮できるようなポリフェノールを多く含む素材を探索するために、 α -Glucosidase阻害活性を指標に、ポリフェノールを多く含む様々な植物エキスについてスクリーニングを行い、血糖値上昇抑制成分を有する素材および成分を探索することとした。

本研究では、ザクロについて、マウスにおける糖負荷後の血糖値上昇抑制作用および α -Glucosidase阻害活性成分の探索を目的として実験を行った。また、ヒシについても α -Glucosidase阻害活性成分の探索を目的として実験を行った。イタドリについても主要なポリフェノール成分の分析および α -Glucosidase阻害活性成分の探索を行った。

第1章 ザクロ葉エキスの血糖上昇抑制作用とその関与成分

本章では、さまざまな植物エキス、特にポリフェノール高含有植物エキスについて α -Glucosidase 阻害活性のスクリーニングを行った。そのうち、ザクロ葉エキスに強い阻害活性を有することを見出したため、マウスにおける糖負荷後のザクロ葉エキスの血糖値上昇抑制活性およびザクロ葉に含まれる α -Glucosidase 阻害活性成分の探索を行った。

1-1 植物エキスの α -Glucosidase 阻害活性について

ポリフェノールを多く含む植物も合わせてさまざまな植物エキスについて α -Glucosidase 阻害活性の測定を行った。測定を行った植物は、赤米、イタドリ、いちご、うど、おかわかめ、カカオ、かつおぶし、かぶ、かぼちゃ、キウイ、きくらげ、きなこ、キャベツ、きゅうり、銀梅花、コーヒー、ゴーヤ、ココア、ゴボウ、ザクロ、しそ、しめじ、じゃがいも、そば、そらまめ、たまねぎ、チェリー、チシャトウ、つるむらさき、トキワレンゲ、トマト、ドラゴンフルーツ、なす、にんにく、のり、バジル、バナナ、ピーマン、ヒシ、ひじき、ふき、ブドウ、ブルーベリー、ブロッコリー、ベニカナメモチ、ほうれん草、みょうが、やなぎたで、ラデッシュ、ランブータン、リンゴ、ルバーブ、レッドキャベツ、レモン、れんこん、ワイン、わさび、わらび、黄ニラ、黄パプリカ、紅たで、黒豆、昆布、小豆、青梗菜、大根、日本茶、白菜である。

1-1-1 各植物エキスの α -Glucosidase 阻害活性率

ポリフェノール高含有植物エキスの $100\mu\text{g/mL}$ の α -Glucosidase 阻害活性を表1に示す。 $100\mu\text{g/mL}$ の濃度で阻害活性率を示した植物は、ザクロ、イタドリ、ヒシ、ベニカナメモチ、カカオなどであった。

表 1-1 植物エキス 100 μ g/mL 当たりの α -Glucosidase 阻害活性

阻害活性 (%)	阻害活性 (%)	阻害活性 (%)			
ブドウ (種)	82.7	キウイー	0	ふき (葉)	0
日本茶	75.5	きくらげ	0	ブドウ (ピオーネ)	0
イタドリ	69.2	きなこ	0	ブドウ (藤稔)	0
ザクロ (葉)	54.5	きゃべつ	0	ブドウ (皮)	0
ブルーベリー (皮)	41.7	きゅうり	0	ブルーベリー (実)	0
ザクロ (花)	35.6	ゴーヤ	0	プルーン (茎)	0
ワイン	24.7	ココア	0	プルーン (皮)	0
紅たで	15.8	ごぼう	0	ほうれん草	0
ランブータン (皮)	15.8	しそ	0	みょうが	0
ヒシ (皮)	14.3	しめじ	0	やなぎたで (茎)	0
コーヒー	9.40	じゃがいも	0	やなぎたで (葉)	0
ベニカナメモチ	7.20	そば	0	ラデッシュ (根)	0
トキワレンゲ (花)	6.37	そらまめ	0	リンゴ	0
ラデッシュ (葉)	5.75	たまねぎ	0	ルバーブ	0
銀梅花	5.16	チェリー	0	レッドキャベツ	0
レモン	4.76	チチャトウ	0	れんこん	0
カカオ (皮)	3.20	つるむらさき	0	わさび	0
ブロッコリー	3.17	トマト	0	わらび	0
カカオ (実)	3.00	ドラゴンフルーツ	0	赤米	0
ヒシ (実)	3.00	なす	0	黄ニラ	0
黄パプリカ	1.01	にんにく	0	黒豆	0
いちご	0	のり	0	昆布	0
うど	0	バジル	0	小豆	0
おかわかめ	0	バナナ	0	青梗菜	0
かつおぶし	0	ピーマン	0	大根	0
かぶ	0	ひじき	0	白菜	0
かぼちゃ	0	ふき (茎)	0		

1-1-2 α -Glucosidase 阻害薬の阻害活性の測定

糖尿病治療薬として用いられている α -Glucosidase 阻害薬である Acarbose について、植物エキスと同様の方法を用いて阻害活性を測定し、 IC_{50} の算出を行った。 IC_{50} とは、50%阻害濃度のことで、化合物の阻害作用の有効度を示す値のことである。標的としている物の半数の働きを阻害できるかを示す濃度のことを言う。0.391 μ M から 0.1 mM の Acarbose の α -Glucosidase 阻害活性を測定し、シグモイド曲線を描いた (図 1-1)。これらの近似曲線より Acarbose の IC_{50} を算出した。算出された IC_{50} は、4 μ M であった。

Acarbose 以外の植物エキス等の IC_{50} の算出は、 α -Glucosidase 阻害活性 50%を挟む 2 点の濃度とその時の阻害活性から直線式を作成し、算出を行った。

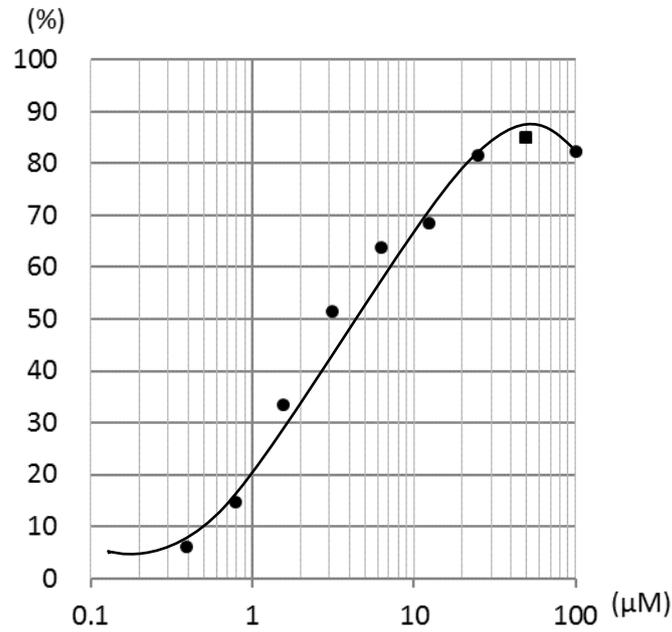


図 1-1 Acarbose の α -Glucosidase 阻害活性のシグモイド曲線

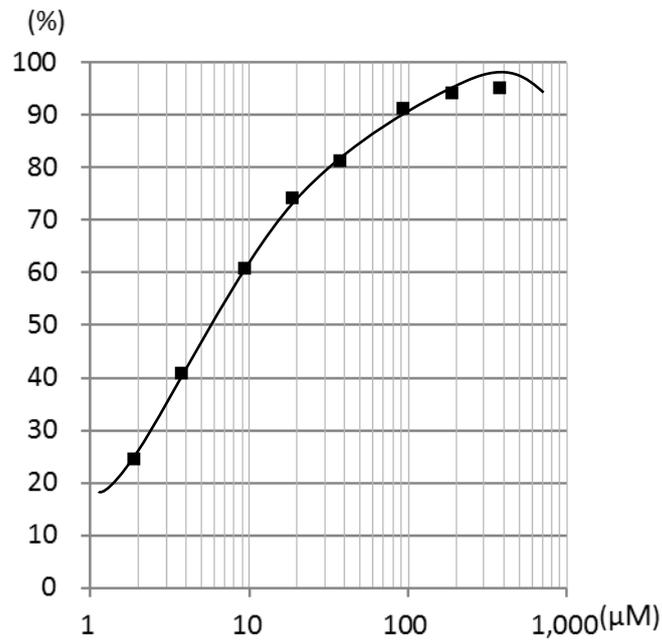


図 1-1-1 Voglibose の α -Glucosidase 阻害活性のシグモイド曲線

同じく糖尿病治療薬として用いられている α -Glucosidase 阻害薬である Voglibose の α -Glucosidase 阻害活性の IC_{50} は、 $6.7 \mu M$ (図 1-1-1) で、Acarbose の方が強い阻害活性を

示した。

Acarbose の作用機上は、小腸粘膜微絨毛膜に存在するグルコ Amylase、スクラーゼ、マルターゼなどの α -Glucosidase 活性を用量依存的に阻害するほか、膵液及び唾液の α -Amylase を阻害し、食後の著しい血糖値上昇を抑制する。

Voglibose の作用機上は、腸管において二糖類から単糖への分解を担う二糖類水解酵素 (α -Glucosidase) を阻害し、糖質の消化・吸収を遅延させることにより食後の過血糖を改善する²⁾。

1-2 ザクロ葉について

ザクロ (学名: *Punica granatum*、英名: Pomegranate) は、フトモモ目、ミソハギ科、ザクロ属の植物であり、食用、薬用、観賞用として何世紀にもわたり熱帯から亜熱帯の国々で栽培されている。果実は直径 6~10 cm、重さ 100~300 g 前後である。種子の外皮は透明な淡紅色、多汁質で甘酸っぱく、生で食べたり清涼飲料の原料としたりする。花は、生薬の石榴花として鼻出血、中耳炎、傷による出血の薬効、根は、生薬の石榴根として駆虫作用があり、常駐に対する殺虫作用がきわめて強い。また、花には、 α -Glucosidase 阻害作用があることが報告されている¹⁵⁾。皮は、生薬の石榴皮として整腸作用がある。葉は、生薬の石榴葉として打撲傷に薬効があるといわれている¹⁶⁾。また、ザクロの葉には Ellagic acid、Gallic acid、Corilagin、Punicafolin、Pentagalloylglucose などが含まれていることが知られており¹⁶⁾、抗酸化作用、脂質調節作用、胃保護作用が確認されている¹⁶⁾。しかし、ザクロの葉についての血糖値上昇抑制作用については研究報告がない。

1-3 ザクロ葉エキスの α -Amylase 阻害活性について

ザクロ葉の 100 μ g/mL の α -Amylase 阻害活性は、25.5%であった。 α -Glucosidase 阻害活率が 54.5%であることから、 α -Glucosidase による阻害活性の方が強いのではないかと考えられる。

1-4 ザクロ葉エキスの血糖値に及ぼす影響

In vitro 試験による結果から、ザクロ葉エキスの α -Glucosidase を阻害する可能性が示唆された。次に、In vitro 試験からの考察により血糖値との関係について検討する目的で、マウスを用いた糖負荷試験を試みた。

実験動物には、BALB/C マウス（生後 6 週間目、22 - 27g、日本クレア社株製）を用いた。それらをザクロ葉エキス群、ポジティブコントロール群、対照群の 3 つのグループ（各々の n = 5）に無作為に分けた。ポジティブコントロール群には、 α -Glucosidase 阻害薬である Voglibose を 5%アラビアゴム液で懸濁したものを用いた。実験開始の 24 時間以上前より絶食し、糖負荷試験を行った。各々のマウス（n=5）は、胃管による栄養チューブを用いて水、ザクロ葉エキスと Voglibose を経口投与後、10 分後にマルトース溶液 2g/kg を経口投与した。その後、尾静脈より 30、60、90、120 分血糖値を Freestyle Freedom Life（Nipro 社）を用いて測定した（図 1-2）。

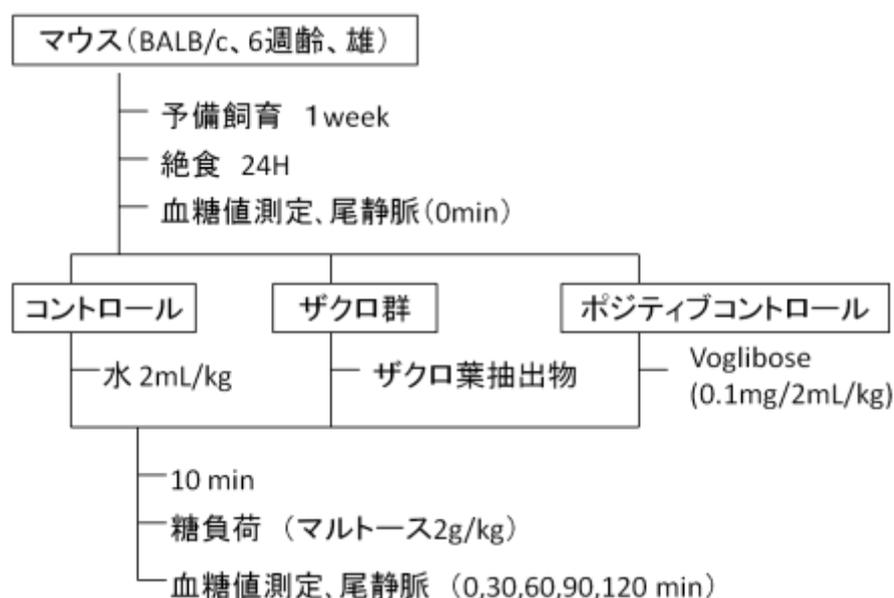


図 1-2 ザクロ葉抽出物を用いたマウス糖負荷試験

1-4-1 糖負荷試験におけるザクロ葉エキスの影響

各実験において、サンプル投与前の血糖値は、59.0~67.8 mg/dL で差はみとめられなかった。図 1-3 に示すように、マルトース 2 g/kg を負荷したラットの 30 分後の血糖値は、コントロールと比較して有意に上昇を抑制した。またその値は、ザクロ葉エキスの用量依存的な抑制作用を示した。そして、マルトース負荷後の最大血糖値は、ボクリボースを投与したポジティブコントロール群とザクロは抽出物 125 mg/kg で 60 分後であった。

血糖値曲線下面積（AUC : min・mg/dl）は、図 1-4 に示す。ザクロ葉抽出物の濃度が高く

なるほど血糖値の抑制作用が示されることから、濃度依存的に血糖値の上昇抑制作用が示された。

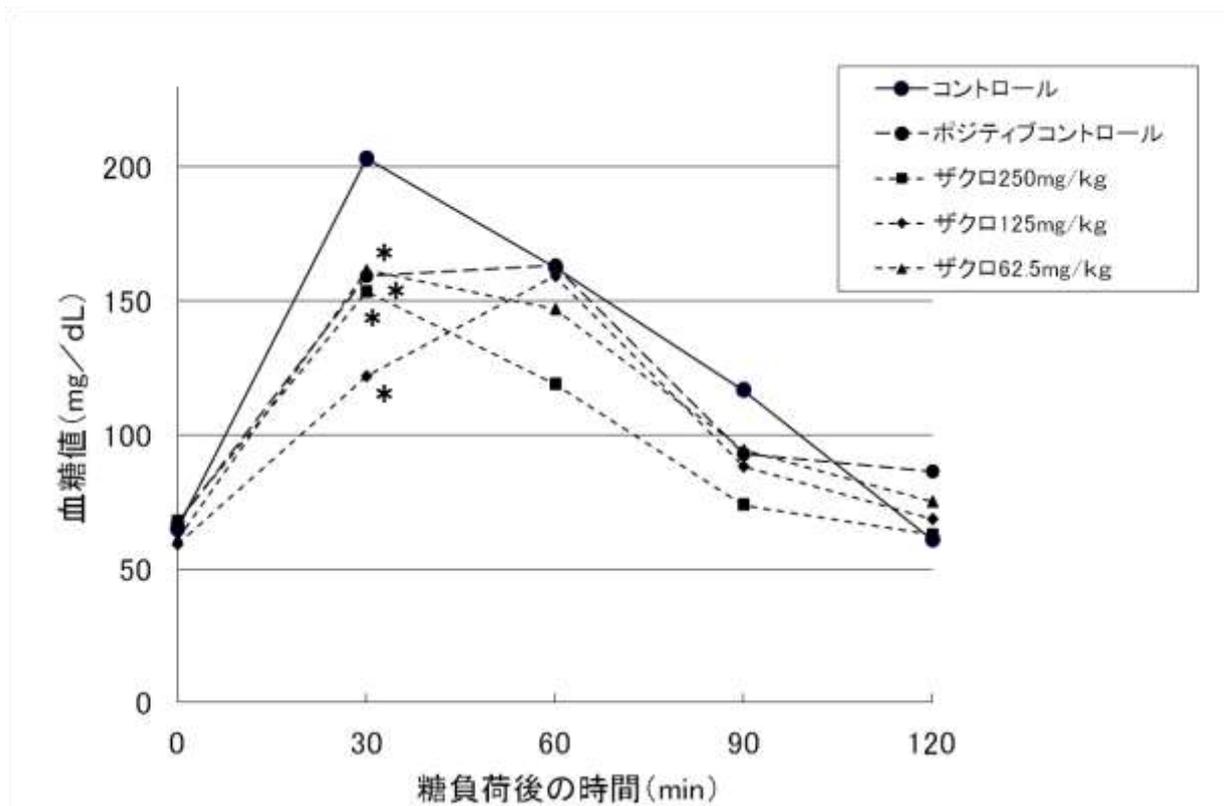


図 1-3 ザクロ葉を用いた糖負荷試験 * : $p < 0.05$ 、 $n = 5$

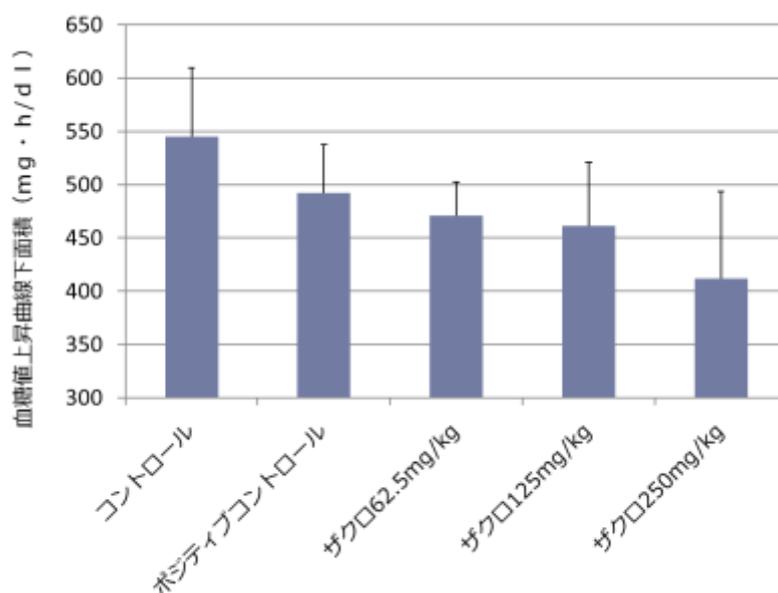


図 1-4 ザクロ葉エキスの糖負荷後の血糖値上昇曲線下面積に及ぼす影響

1-5 ザクロの α -Glucosidase 阻害活性成分の探索

ザクロ葉のエキスは、岡山県御門の乾燥ザクロ葉 (589.4 g) を枝より取り外し、70%アセトンで3回抽出し、濾過、乾燥してエキスとした。エキスの重量は、149.7 gであった。

ザクロ葉エキス (20 g) は、ジエチルエーテル、酢酸エチル、*n*-ブタノール水に液液分配を行った。それぞれのエキス重量は、ジエチルエーテルエキスが 163 mg、酢酸エチルエキスが 6.1 g、*n*-ブタノールエキスが 5.8 g、水エキスが 25.1 gであった (図 1-5)。

各エキスの α -Glucosidase 阻害活性は、酢酸エチルエキスが 55.5%、*n*-ブタノールエキスが 42.6%、水エキスが 25.1%であった。これらのことから、酢酸エチルエキスが最も高い α -Glucosidase 阻害活性を示したことからザクロ葉中に α -Glucosidase 阻害活性成分が存在する可能性が考えられる。

次に分画したエキスの中で最も α -Glucosidase 阻害活性が強かった酢酸エチルエキス中の成分の探索を行った (図 1-5)。

酢酸エチルエキス 5.2 g を TOYOPEARL HW-40C を用いてカラムクロマトを行った。50%、60%、70%メタノールにより分離し、50%メタノール溶出部において2つの化合物を単離、60%メタノール溶出部に1つの化合物を単離した。また、50%メタノール、60%メタノール溶出部をさらに分画するため、50%メタノール溶出部は Sephadex LH-20 カラムクロマト

グラフィーにより、60%メタノール溶出部は MCI gel CHP 20P カラムクロマトグラフィーによる分画を行った。MCI gel CHP 20P カラムクロマトにおいて 30%メタノールから 60%まで 10%刻みでメタノール濃度を増し、分離を行った。その結果、30%メタノール溶出部において化合物が単離できた。Sephadex LH-20 カラムクロマトにおいてエタノールとメタノールにより分離し、エタノール溶出部において化合物を単離した。これら単離した化合物についてそれぞれ NMR 分析を行い同定した (図 1-6、図 1-7)。

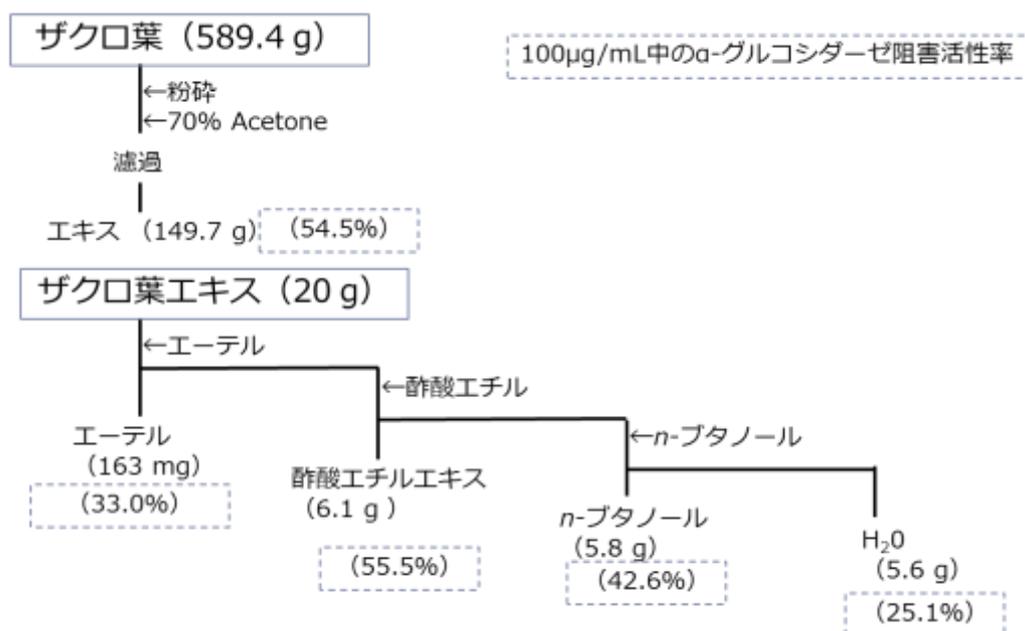


図 1-5 ザクロ葉の抽出方法と α -Glucosidase 阻害活性

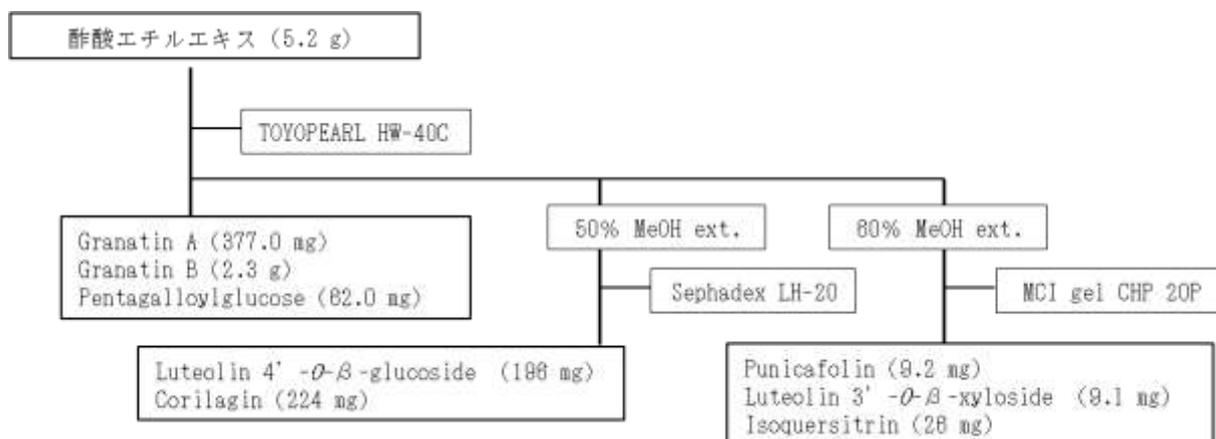
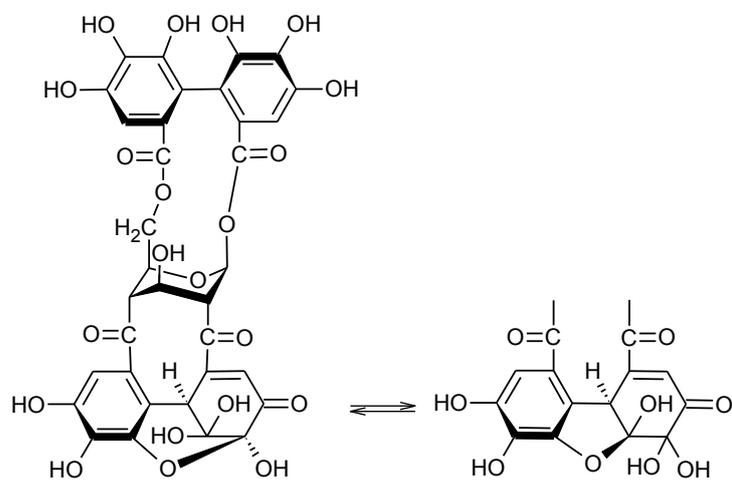
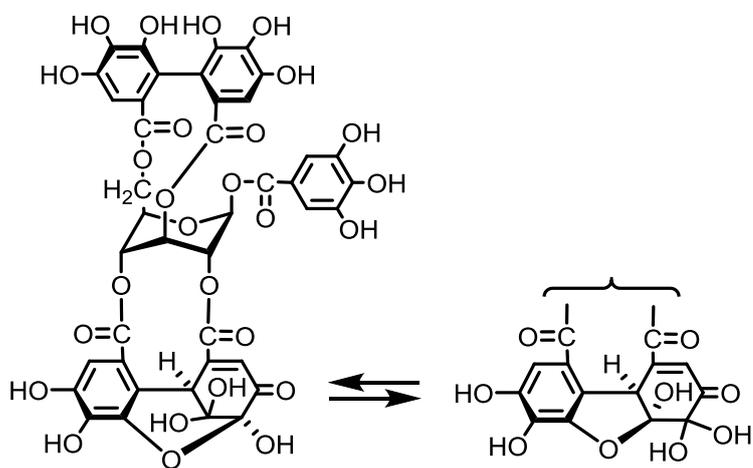


図 1-6 ザクロ葉酢酸エチルエキスの抽出方法



Granatin A



Granatin B

図 1-7 (1) 単離した化合物の構造式

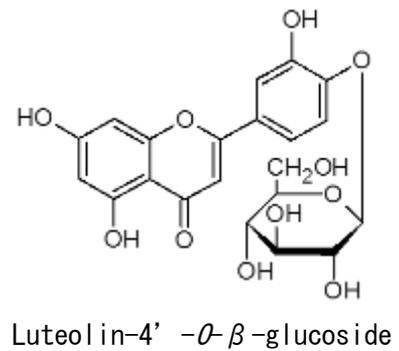
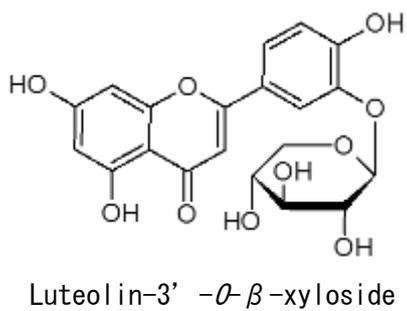
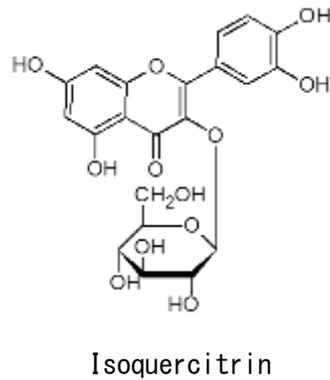
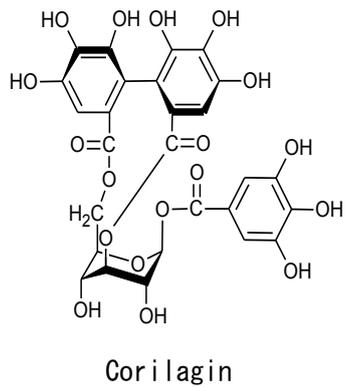
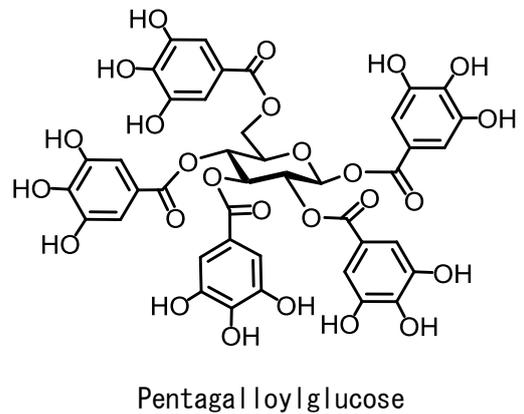
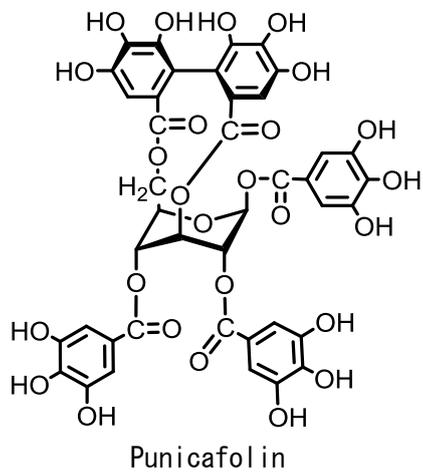


図 1-7 (2) 単離した化合物の構造式

1-6 ザクロ葉エキス単離化合物の α -Glucosidase 阻害活性

ザクロ葉エキスに高い α -Glucosidase 阻害活性を示した結果より、ザクロ葉エキス中より単離された化合物について阻害活性の測定を行った。ザクロ葉エキスより単離された化合物の α -Glucosidase 阻害活性を表 1-2 に示す。 α -Glucosidase 阻害活性の IC_{50} は、Pentagalloylglucose、Punicaforin、Colirasin の順で高い α -glucosidase 阻害活性を示した。

これらの結果より、ザクロ葉における血糖値上昇抑制は、Pentagalloylglucose などの複数の加水分解性タンニンが相加的、相乗的に作用しているのではないかと考えられる。

表 1-2 ザクロ葉エキス中成分の α -Glucosidase 阻害活性

	IC_{50} (μ M)
Granatin A	396 \pm 68
Granatin B	264 \pm 12
Pentagalloylglucose	59 \pm 0.4
Punicafolin	86 \pm 0.9
Coliragin	199 \pm 7
Isoquercitrin	>500
Luteolin 3'- <i>O</i> - β -xyloside	>500
Luteolin 4'- <i>O</i> - β -glucoside	>500
Acalbose	4.0 \pm 0.1
Voglibose	6.8 \pm 0.4

Means \pm S. E. (n= 3)

1-7 ザクロ葉エキス中成分の α -Amylase 阻害活性

ザクロ葉およびザクロ葉エキスから単離された化合物について α -Amylase 阻害活性の測定を行った。ザクロ葉エキスおよび単離された化合物の阻害活性を表 1-3 に示す。その結果、すべてのエキス成分においても α -Glucosidase 阻害活性のほうが高いことが明らかとなった。

表 1-3 ザクロ葉エキス中成分の α -Amylase 阻害活性

	100 μ g/mL (%)
Pomegranete leaf extract	25.5 \pm 3.0
Granatin A	0
Granatin B	16.5 \pm 3.9
Pentagalloylglucose	0
Punicafolin	0
Coliragin	2.0 \pm 0.7
Isoquercitrin	21.8 \pm 2.9
luteolin-3'- <i>O</i> - β -xyloside	0
luteolin-4'- <i>O</i> - β -glucoside	1.0 \pm 0.3
Acalbose	34.0

Means \pm S. E. (n= 3)

1-8 ザクロ葉エキス単離化合物の α -Glucosidase 阻害様式の検討

図 1-8 に基質濃度を変化させてザクロ葉エキス単離化合物の阻害様式を速度論的解析で行った。Lineweaver-Burk プロットの L-B プロットの形状より、各ザクロ葉エキス単離化合物は、マルトースの α -Glucosidase 阻害を競合的に阻害することを明らかとした。

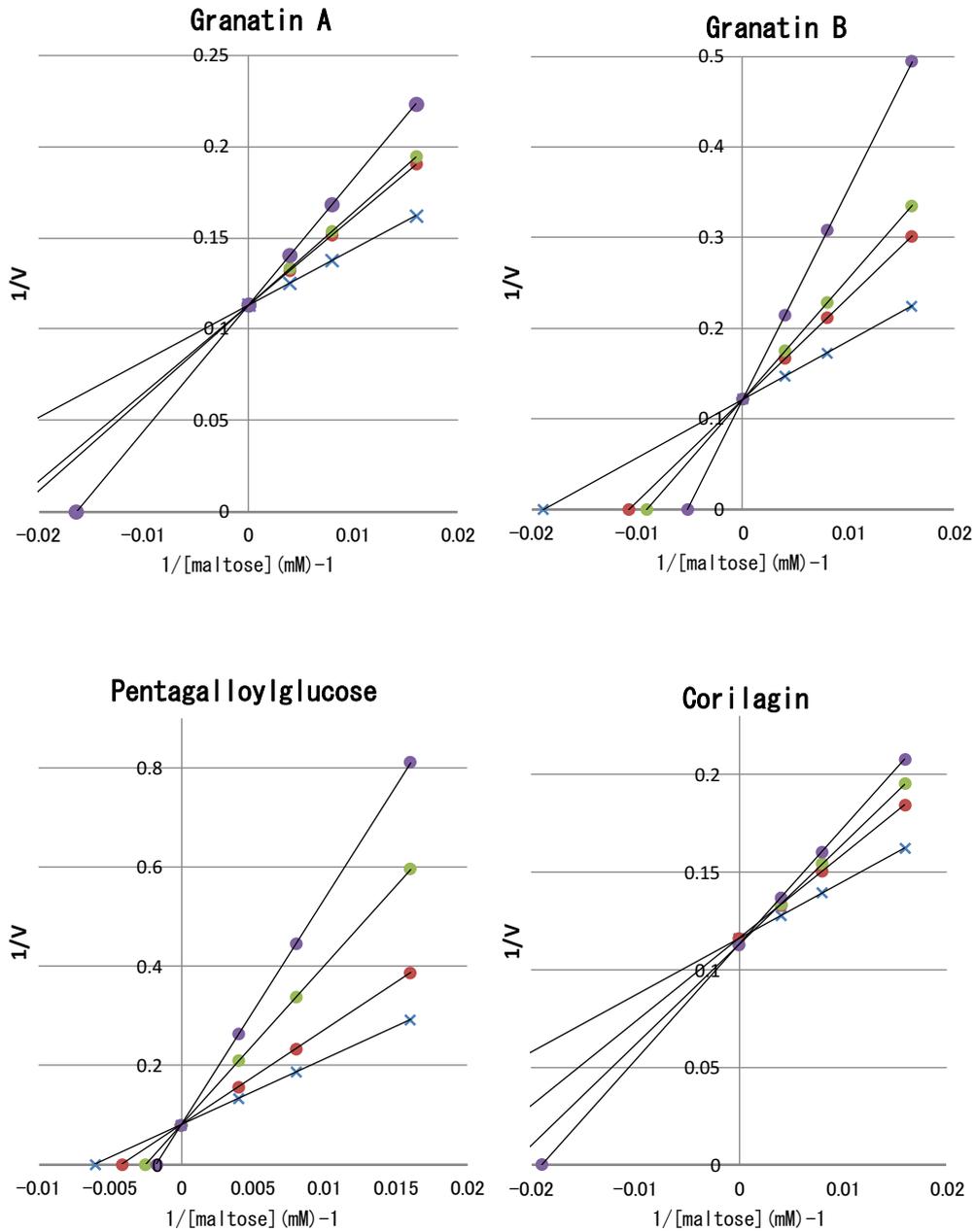


図 1-8 ザクロ葉エキス単離化合物における α -Glucosidase 阻害様式の検討に

関する Lineweaver-Burk Plot

各化合物の濃度 Granatin A、Granatin B、Corilagin : 130-640 μ M、

Pentagalloylglucose : 5-20 μ M

× : Control、● : α -Glucosidase 阻害

1-9 小括

ザクロおよびザクロ葉エキス、ザクロ葉エキスから単離された化合物について α -Glucosidase 阻害活性および α -Amylase 阻害活性について測定をした。 α -Glucosidase 阻害活性についてザクロについては、ザクロの花および葉について測定を行ったが、ザクロ葉が最も阻害活性が高かった。また、その α -Amylase 阻害活性については、 α -Glucosidase 阻害活性より低かったことから、ザクロ葉については、 α -Glucosidase 阻害活性作用による血糖値上昇抑制が期待できるのではないかと考える。

また、マウスにおける糖負荷試験では、 α -Glucosidase 阻害活性を有するザクロ葉エキス投与群では、ボクリボースと同様に対照群よりも有意な血糖値上昇抑制作用を示した。

そして、ザクロ葉の α -Glucosidase 阻害活性成分を探索するために、ザクロ葉を含水アセトンでホモジナイズを行い、濃縮後、各種有機溶媒による抽出を行い、各エキスを得た。各エキスの α -Glucosidase 阻害活性を測定した結果、酢酸エチルエキスに最も強い阻害活性が示された。その酢酸エチルエキスについて各種カラムクロマトにより分離、精製を行い、5 種の加水分解性タンニン、すなわち Granatin A、Granatin B、Punicafolin、Pentagalloylglucose、Corilagin、3 種のフラボノイド配糖体、Isoquercitrin、Luteolin-3'-O- β -xyloside、Luteolin-4'-O- β -glucoside を単離した。

Pentagalloylglucose、Corilagin、Granatin B が α -Glucosidase 阻害活性を示し、その阻害様式は、競合阻害であることが明らかとなった。

ザクロ葉は、複数の加水分解性タンニンが相加的、相乗的に α -Glucosidase 阻害活性に寄与している可能性が示唆されたことから、ザクロ葉が血糖上昇抑制の関与成分として特定保健用食品や機能性表示食品へ応用できる有用な知見を提示できた。

第2章 ヒシ中の機能成分の探索

第1章では、さまざまな植物エキスの α -Glucosidase 阻害活性を測定した結果、ヒシに高い阻害活性を示した。そのため、ヒシになんらかの阻害活性機能を有するのではないかと考えられるため、機能成分の探索を行った。

ヒシは、ミソハギ科ヒシ属の1年草の水生植物で、池や沼に生息している。同族植物数種が日本をはじめ、東アジアに分布している。葉は、ヒシ形で水面に放射状に広がり多数の葉を集まってつける。葉柄がふくらみ中空の空気袋がある。ヒシの種子にはでん粉が含まれており、ゆでて食用にしたり、焼酎の原料にしたりして用いられている（ヒシ娘・佐賀県）。また、生物学的研究では、抗酸化作用¹⁷⁾、抗糖尿病性¹⁸⁾、糖分解阻害効果¹⁹⁾があることから抗肥満²⁰⁾等の効果が報告されている。これまでにヒシの葉から Trapanin A、Trapanin B²¹⁾、1, 2, 3, 6-tetragalloyl-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose、tellimagrandin II (eugeniin) が確認されている。Trapanin A、Trapanin B は、ヒシの果皮からも確認されている²²⁾。

これらヒシについて、エキスを抽出し、HPLC 分析および α -Glucosidase 阻害活性の測定を行い、ヒシ中の成分の探索を行う。

2-1 ヒシの α -Glucosidase 阻害活性成分の探索

ヒシの抽出物は、前忠（奈良）から購入した乾燥ヒシを皮（77g）と実（188g）の部分に分け、それぞれ粉碎し、70%アセトンで3回抽出し、濾過、乾燥してエキスとした。それぞれのエキスの重量は、皮が10.4 g、実が4.1 gであった。

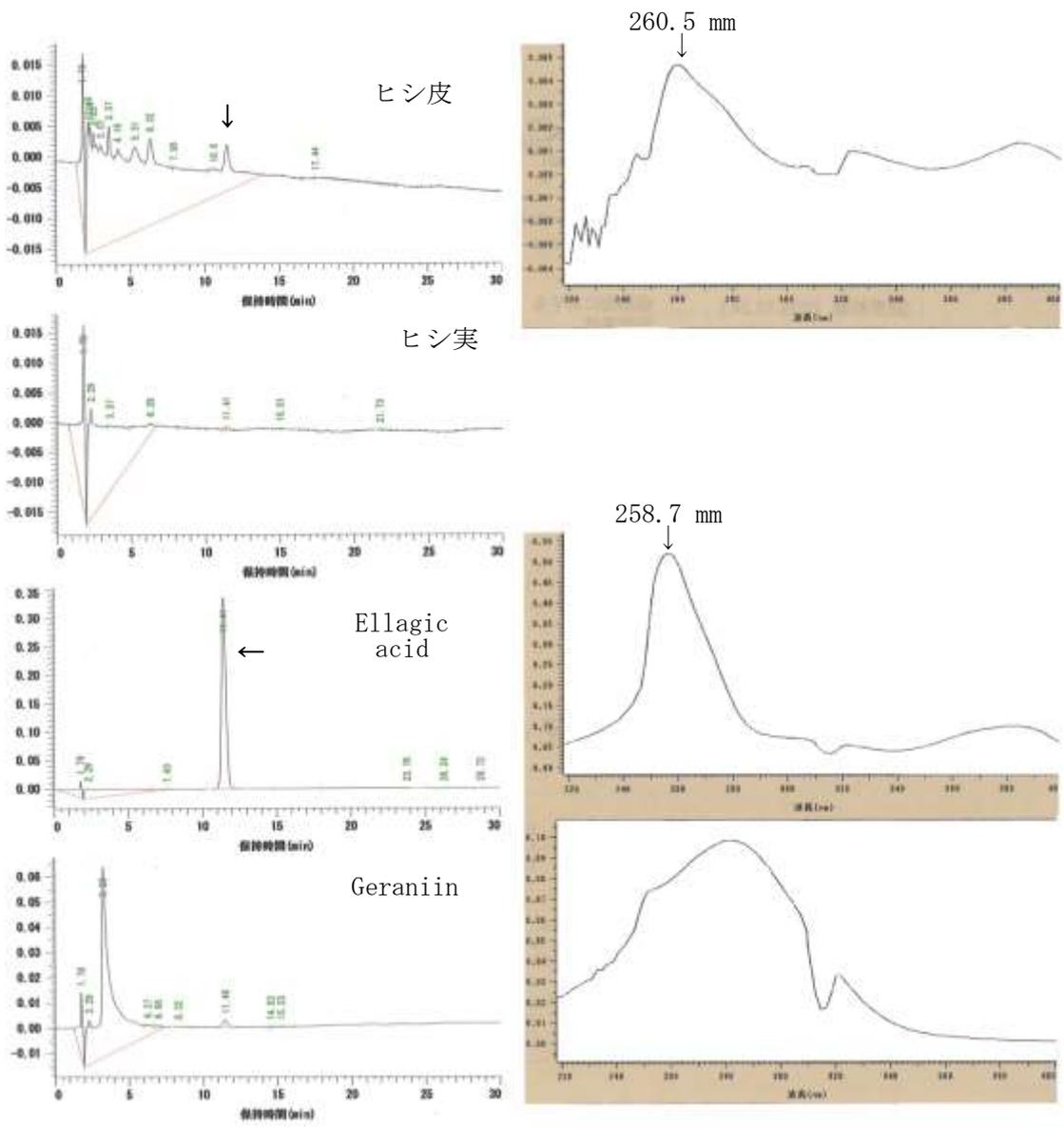
それぞれのエキスについて α -Glucosidase 阻害活性の測定を行い、100 μ g/mL 中ヒシ皮が14.3%、ヒシ実が3.0%であった。ザクロ葉が54.5%と最も高いが、それに次いで高い阻害活性を示した（図2-1）。

そのため、ヒシ中の α -Glucosidase 阻害活性成分を探索するためヒシ皮とヒシ実エキスの逆相系および順相系高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を行った。逆相系 HPLC 結果を図2-2に示す。ヒシ皮エキスにおけるピーク（11.52 min）は、逆相系 HPLC における標準品の吸収スペクトルとリテンションタイムから比較して Ellagic acid であることが明らかとなった。また、ヒシ皮エキスおよびヒシ実エキスのピーク（3.57 min）は、標準品の Geraniin とリテンションタイムや吸収曲線から考えられるが、逆相系 HPLC ではピークが混在しているため、順相系 HPLC で明らかにする。

順相系 HPLC 結果を図 2-3 に示す。異なる移動相を用いてヒシ皮エキスおよびヒシ実エキスの分析を行ったところ、モノマー移動相においてヒシ皮エキスのピークは、標準品との比較からエラグ酸であることが明らかになった。しかし、Ellagic acid は、 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ で 0.3% の α -Glucosidase 阻害活性を示す程度のため、ヒシにおける α -Glucosidase 阻害活性成分ではないと考えられる。



図 2-1 ヒシの α -Glucosidase 阻害活性
(各エキス濃度 : $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $n=3$)



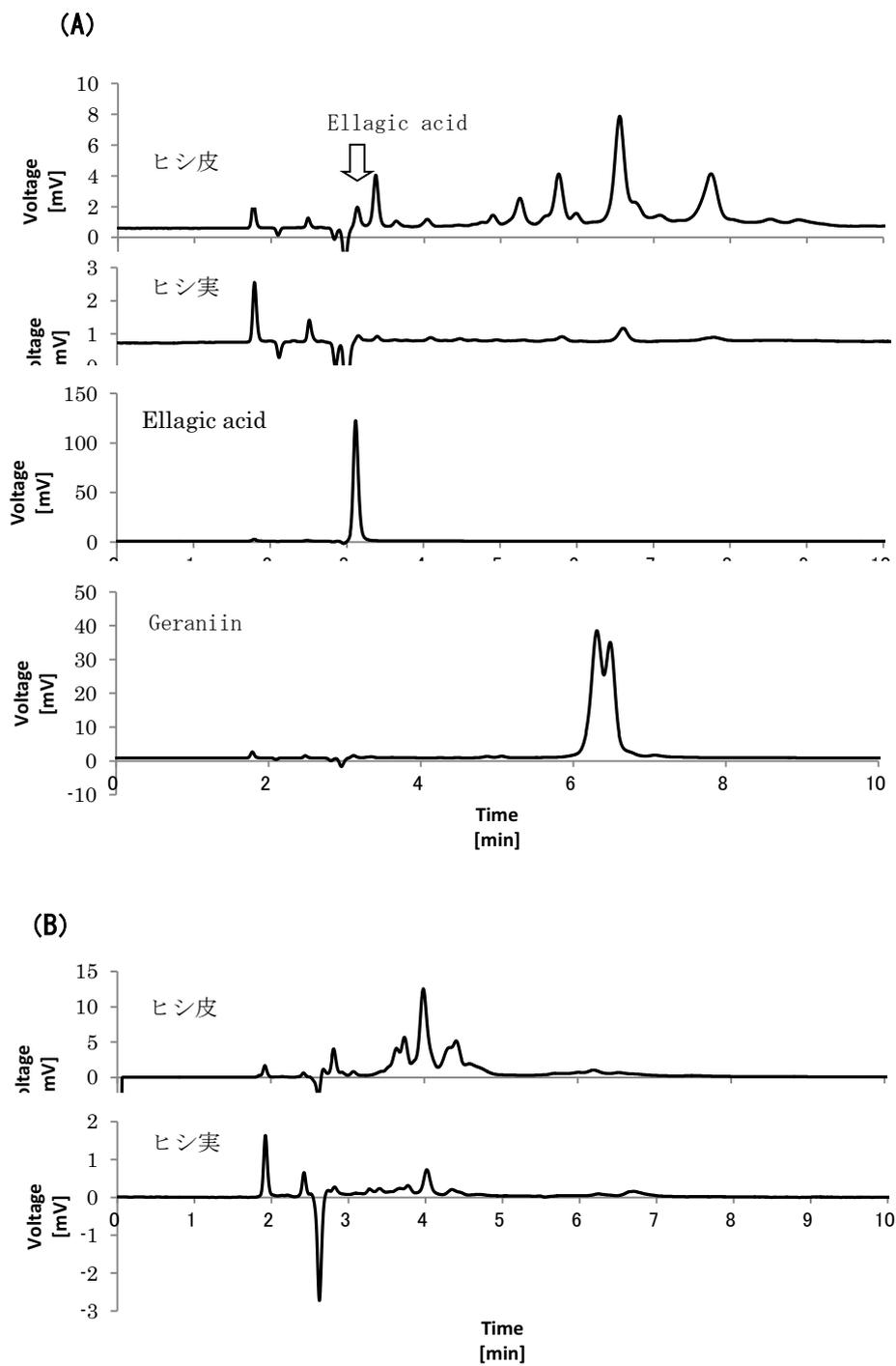


図 2-3 ヒシエキスの順相系 HPLC クロマトグラム

(A) : HPLC 条件 1、(B) : HPLC 条件 2

2-2 ヒシ皮エキスの α -Glucosidase 阻害活性成分の探索

ヒシ皮の α -Glucosidase 阻害活性が高く、活性成分を有するのではないかと考え、皮について分離・精製を行い、 α -Glucosidase 阻害活性成分の探索を行った (図 2-4)。

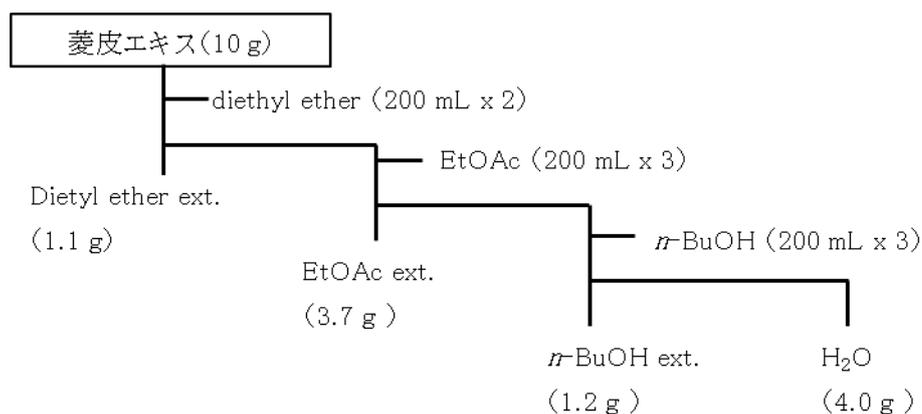


図 2-4 ヒシ皮の分画のチャート

() : エキス重量

表 2-1 ヒシエキスの α -Glucosidase 阻害活性

Extracts (100 μ g/mL)	Inhibition (%)
Pericarps	14.3 \pm 1.2
Fruits	3.0 \pm 1.1
Diethyl ether	32.6 \pm 0.8
EtOAc	38.1 \pm 0.7
<i>n</i> -BuOH	16.6 \pm 4.2
Water soluble portion	3.0 \pm 0.8

means \pm S.E. (n = 3)

ヒシ皮エキス (10 g) は、ジエチルエーテル、酢酸エチル、*n*-ブタノール、水に順次分配をおこなった。それぞれのエキス重量は、ジエチルエーテルエキスが 1.1 g、酢酸エチルエキスが 3.7 g、*n*-ブタノールエキスが 1.2 g、水エキスが 4.0 g であった (図 2-4)。

各エキスの α -Glucosidase 阻害活性は、ジエチルエーテルエキスが 32.6%、酢酸エチルエキスが 38.1%、*n*-ブタノールエキスが 16.6%、水エキスが 3.0% であった (表 2-1)。こ

これらのことから、酢酸エチルエキスが最も高い α -Glucosidase 阻害活性を示したことからヒシ皮中に α -Glucosidase 阻害活性成分が存在する可能性が考えられる。

そこで、ヒシ皮の各エキスに含まれる α -Glucosidase 阻害活性成分を明らかにするために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により各エキスの成分分析を行った (図 2-5)。

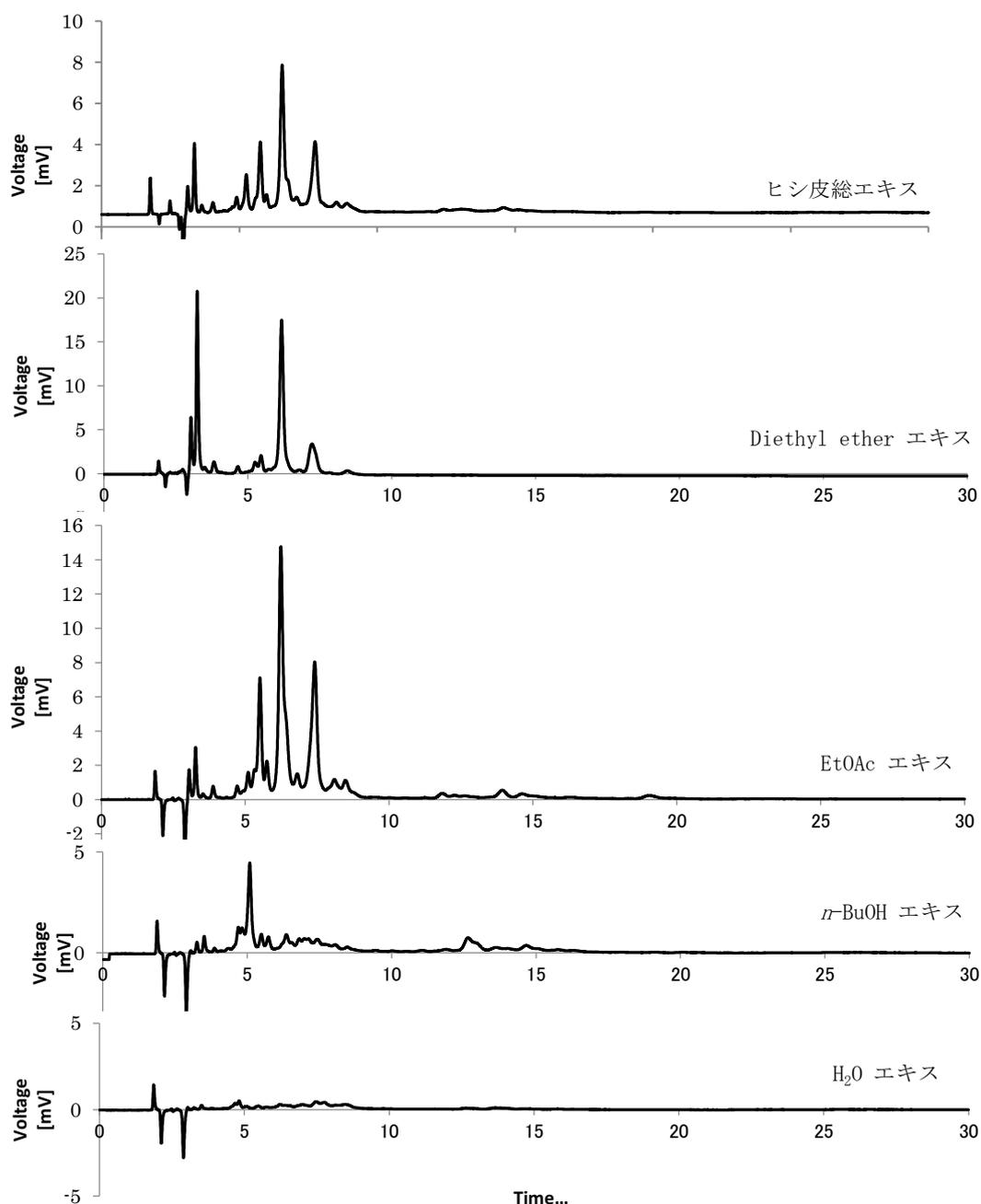


図 2-5 ヒシ皮エキスの各分画の順相系 HPLC クロマトグラム (HPLC 条件 1)

2-3 ヒシ皮酢酸エチルエキスの探索

酢酸エチルエキスの 3.5 g を TOYOPEARL HW-40 を用いてカラムクロマトを行った(表 2-2)。これらエキスの順相系 HPLC 分析を行った結果、7つの化合物が得られた(図 2-6)。またエキスについて HPLC 分析の保持時間やこれまでの解析結果から、同定を行い、30%メタノールエキスから Gallic acid、50%メタノールエキスから 1, 2, 3-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (1)²³⁾、1, 2, 6-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (2)²⁴⁾、60%メタノールエキスから 1, 2, 3, 6-Tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (3)²⁴⁾、70%メタノールエキスから Tellimagrandin II (4)^{25, 26)}、メタノール : Aceton : H₂O = 7 : 1 : 2 エキスから Cornusiin G (5)、メタノール : Aceton : H₂O = 7 : 2 : 1 のエキスから Rugosin D が同定された。ガロタンニンや Tellimagrandin II は、これまでに同じ植物から単離された報告がある²²⁾。また、Hatano らの^{27, 28)} 物理化学的なデータと分光器データ (MS、1D-と 2D-NMR) の標品報告されたデータから Cornusiin G (5)²⁷⁾、Ellagitannin の二量体の Rugosin D (6)²⁸⁾ であると同定された。Cornusiin G は、これまでサンシュユ (山茱萸)、学名:*Cornus officinalis* (Cornaceae) のみから単離された報告がある²⁷⁾。また、Rugosin D は、サンザシ (山査子、学名:*Crataegus cuneata*) から単離され²⁹⁾、Rosaceae と Coriariaceae plants³⁰⁾ に広く配布している。しかし、Cornusiin G も Rugosin D もヒシからの単離の報告はわれわれが初めてである(図 2-6)。

表 2-2 ヒシ皮酢酸エチルエキスの分画エキス重量

	エキス重量 (g)
30%メタノール	0.1502
40%メタノール	0.1254
50%メタノール	0.7098
60%メタノール	0.6332
70%メタノール	0.3931
100%メタノール	0.3824
メタノール : Aceton : H ₂ O = 7 : 1 : 2	0.1875
メタノール : Aceton : H ₂ O = 7 : 2 : 1	0.0550
70%Aceton	0.0250
合計	2.6616
回収率	83.4%

- 1, 2, 3-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (1) R = galloyl、R' =H
 1, 2, 6-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (2) R = H、R' =galloyl
 1, 2, 3, 6-Tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (3) R = R' =galloyl

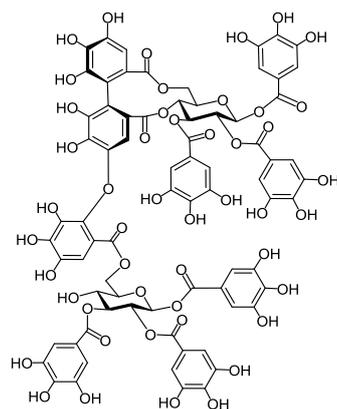
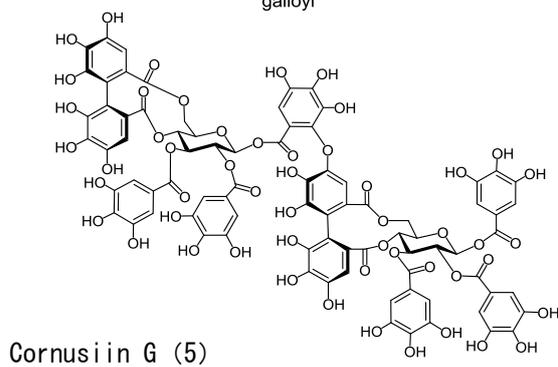
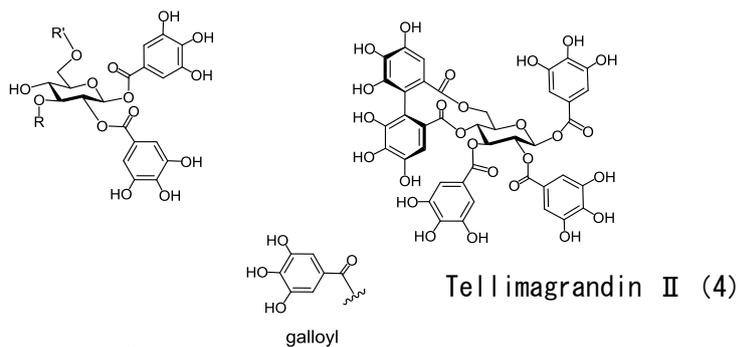


図 2-6 単離した化合物の構造式

2-4 ヒシ皮酢酸エチルエキスの α -Glucosidase 阻害活性化合物の探索

ヒシ皮酢酸エチルエキスから単離された化合物について α -Glucosidase 阻害活性を測定した (表 2-3)。 α -Glucosidase 阻害活性が各成分濃度 $100 \mu\text{g/mL}$ 中 50%以上を示した成分については、 IC_{50} の測定を行った (表 2-4)。これまでの研究報告よりヒシから単離された 1, 2, 3, 6-Tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (3) と Tellimagrandin II (4) について、 α -Glucosidase 阻害活性があることが報告されている²⁰⁾ が、本研究でも活性があることが見られた。また、本研究では、新たにヒシから単離された Cornusiin G と Rugosin D がそれぞれ IC_{50} が $6.3 \mu\text{M}$ と $5.1 \mu\text{M}$ と高い値を示し、この値は、すでに α -Glucosidase 阻害活性薬として使用されている Acarbose の IC_{50} $4.0 \mu\text{M}$ に相当する値と考えられる。

表 2-3 ヒシから単離した化合物の α -Glucosidase 阻害活性 ($100 \mu\text{g/mL}$ 中)

Compounds	阻害活性 (%)	単離量 (mg)
Gallic acid	0.06	125.3
1, 2, 3-Tri- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose (1)	15.03	38.6
1, 2, 6-Tri- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose (2)	12.32	52.3
1, 2, 3, 6-Tetra- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose (3)	36.57	263.2
Tellimagrandin II (4)	53.35	134.7
Cornusiin G (5)	68.62 ($10 \mu\text{g/mL}$ 中)	36.3
Rugosin D (6)	69.36 ($10 \mu\text{g/mL}$ 中)	36.5

表 2-4 ヒシから単離した化合物の α -Glucosidase 阻害活性

Compounds	IC ₅₀ (μ M)
Gallic acid	>100
1,2,3-Tri- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose (1)	>100
1,2,6-Tri- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose (2)	>100
1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloyl- β -D-glucose (3)	>100
Tellimagrandin II (4)	>100
Cornusiin G (5)	6.3 \pm 0.1
Rugosin D (6)	5.1 \pm 0.1
Acarbose	4.0 \pm 0.1

means \pm S. E. (n=3)

2-5 小括

第1章でさまざまな植物エキスの α -Glucosidase 阻害活性率を測定した結果、ヒシに高い阻害活性を示した。そのため、ヒシになんらかの阻害活性機能を有するのではないかと考えられるため、機能成分の探索を行った。

ヒシの皮及び実に分け、 α -Glucosidase 阻害活性を測定した結果、ヒシ皮エキスで 100 μ g/ml の濃度で 14.3%の阻害活性を示した。そこで、ヒシ皮について、単離・精製を行うために液液分配を行い、各エキスについても阻害活性を測定したところ、ジエチルエーテルエキスが 32.6%、酢酸エチルエキスが 38.1%、*n*-ブタノールエキスが 16.6%、水エキスが 3.0%で、酢酸エチルエキスが最も高い阻害活性を示したことから、このエキスに α -Glucosidase 阻害活性成分があると考えた。

そこでヒシ皮酢酸エチルエキスについて、TOYOPEAR HW-40 を用いてカラムクロマトを行った。カラムクロマトからのエキスを順相系 HPLC で分析を行った結果、7つの化合物が得られた。エキスについて HPLC 分析のリテンションタイムやこれまでの解析結果から、同定を行い、Gallic acid、50%メタノールエキスから 1,2,3-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (1)、1,2,6-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (2)、60%メタノールエキスから 1,2,3,6-Tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (3)、メタノール : Aceton : H₂O = 7 : 2 : 1 のエキスから Tellimagrandin II (4) と同定された。また、物理化学的なデータと分光器データ (MS、1D-と 2D-NMR) の標品報告されたデータから Cornusiin G (5)、Rugosin D (6) であると同定された。Cornusiin G は、これまでサンシュユ (山茱萸)、学名 : *Cornus officinalis* (Cornaceae) のみから分離された報告があった。また、Rugosin D は、サンザシ (山査子、学名 : *Crataegus cuneata*) から最初に分離されている。しかし、Cornusiin G、Rugosin D とともにヒシからの単離の報告はわれわれが初めてである。

以上の結果より、ヒシ皮は、 α -Glucosidase 阻害活性に基づく血糖値上昇抑制作用を有し、ヒトにおいても食後の血糖値上昇を抑制することが明らかになったことから、糖尿病患者の食事療法に応用できる有望な食品素材であると考えられる。

第3章 イタドリにおける主要なポリフェノール成分の分析および α -Glucosidase 阻害活性成分の探索

第1章では、さまざまな植物エキスの α -Glucosidase 阻害活性率を測定した結果、イタドリに高い阻害活性を示した。そのため、イタドリになんらかの阻害活性機能を有するのではないかと考えられるため、機能成分の探索を行った。

イタドリは、タデ科の多年生植物で日本、韓国、中国に自生している。日本では、その茎を山菜として食用しており、中国では、乾燥した根を抗炎症疾患や肝炎、下痢症などの漢方薬として利用されている³¹⁾。

イタドリ根には、ポリフェノールの一種の Resveratrol を多く含むことが知られており³²⁾、抗酸化作用、抗ガン作用、抗炎症作用、脂質代謝改善作用が報告されている³³⁻³⁵⁾。

このイタドリおよび含まれる Resveratrol においては、その全体像の詳細は解明されておらず、理解も十分でない。

本研究では、岡山県産のイタドリにおけるポリフェノール化合物の全体像を明らかにするために、根、葉、茎の各部分からポリフェノール化合物を単離し、逆相 HPLC で Resveratrol を含むポリフェノールを分析し、各部位におけるポリフェノール化合物の実態を明らかにした。また、ポリフェノール化合物のうち、主要な成分の α -Glucosidase 阻害活性を明らかにした。

3-1 イタドリ根エキスのポリフェノール化合物の分析

イタドリ根エキスは、岡山県産の根 (2 g) を液体窒素で凍結し、70%エタノール 100 mL で攪拌し遠心分離後、得られた沈殿物を 70%エタノール 50 mL を加え同様の操作を行った。得られた上清を合わせ、ろ過後、減圧下 38°C で濃縮乾固し、残渣を 100%エタノール 7.5 mL に溶解し、イタドリ根エキスとした。

イタドリ根エキスにおけるポリフェノール化合物の分析は、逆相 HPLC を用いて行った(図 3-1)。

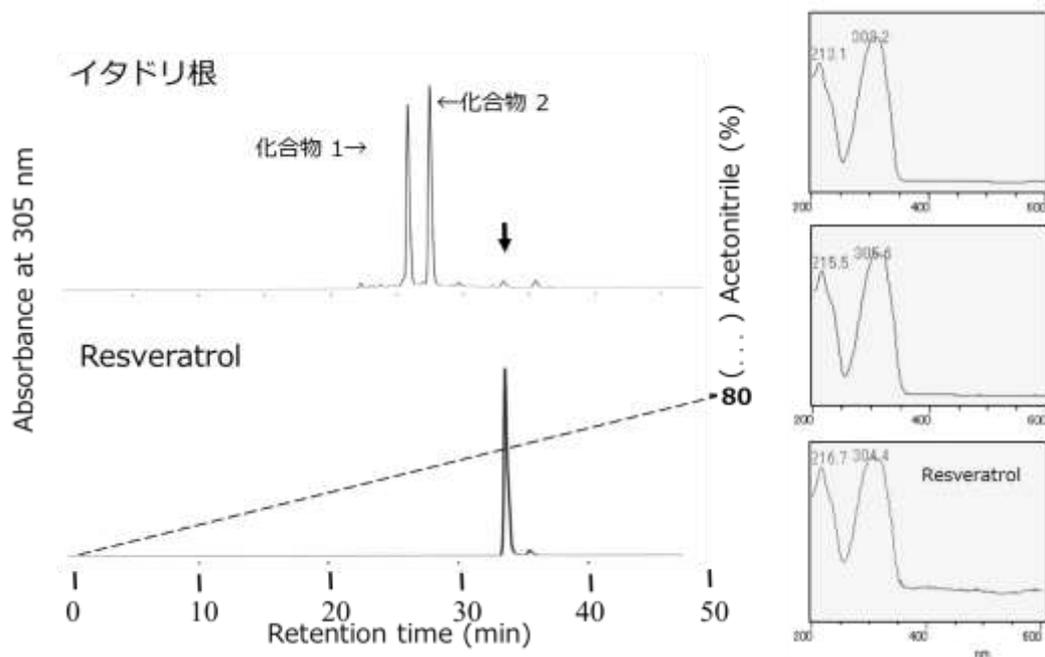


図 3-1 イタドリ根エキスの HPLC 分析

標準の Resveratrol は、リテンションタイムが 33 分付近に検出された。その吸収極大波長は、305 nm であった。イタドリ根エキスにおいてもリテンションタイム 33 分あたりにピークを確認することができた。また、リテンションタイムが 26 分 (化合物 1) おおび 28 分 (化合物 2) 付近に 2 つの主要なピークが検出され、その吸収スペクトルが標準の Resveratrol と極めて類似していることからこれらの化合物が Resveratrol 関連化合物であることが示唆される。

そこで、これら 2 つの化合物の HPLC 分取を行い、プロトン NMR の分析を行った (図 3-2)。結果、単離した 2 つの化合物をプロトン NMR 分析した結果をここに示します。

この結果、化合物 1 が Resveratrol に 4' 位に D-Glucose が β 結合したレスベラトロロシド、化合物 2 が Resveratrol に 3 位に D-Glucose が β 結合した Polydatin であると同定した。

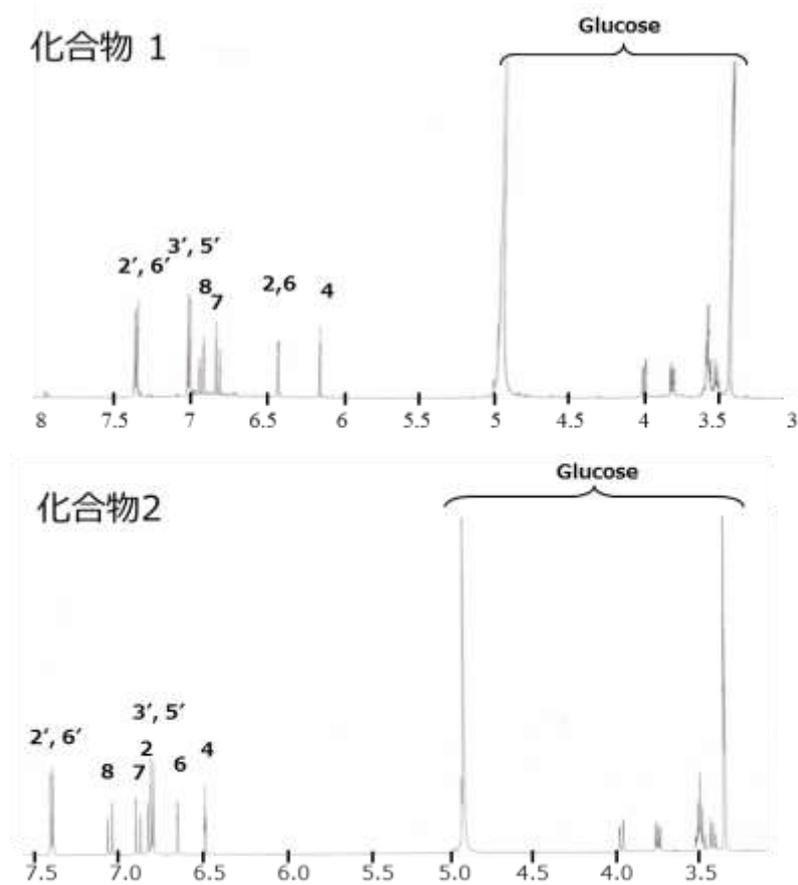


表 3-2 イタドリ根エキスのプロトン NMR 分析

また、TOF-MS の化合物 1 および化合物 2 の分子量が 391.1387 を示し、標準の Resveratrol と D-Glucose がそれぞれ 1 分子脱水縮合した $C_{20}H_{23}O_8$ の分子式と一致していた (図 3-2)。

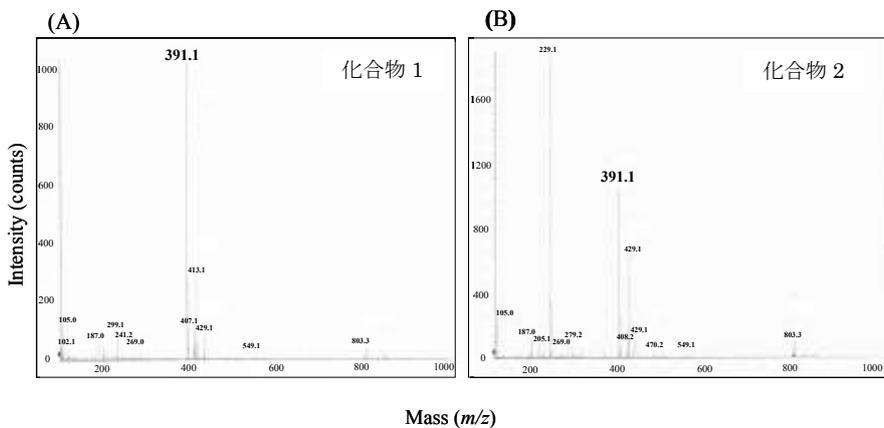


図 3-2 イタドリ根エキスから分取した化合物の TOF-MS 分析
Fig. 3

3-2 イタドリ茎エキスのポリフェノール化合物の分析

イタドリ茎エキスは、イタドリ茎（各 10 g）に水 100 mL で攪拌し遠心分離後、得られた上清を減圧下 38°C で濃縮乾固し、残渣を 100%エタノール 10 mL に溶解しそれぞれ、イタドリ葉および茎エキスとした。

得られたエキスを逆相 HPLC で分析したところ（図 3-3）、水およびエタノールエキスのどちらにもリテンションタイム 33 分付近に Resveratrol は検出されなかった。しかし、リテンションタイム 22 分付近に最大吸収波長 325 nm のピークが検出された。

この吸収スペクトルは、標準の Chlorogenic acid と極めて類似していたことから、同じ条件で分析をしたところ、リテンションタイムが同じ場所にピークを検出した。

以上のことからイタドリ茎の主要な化合物は、Chlorogenic acid であることが示唆された。

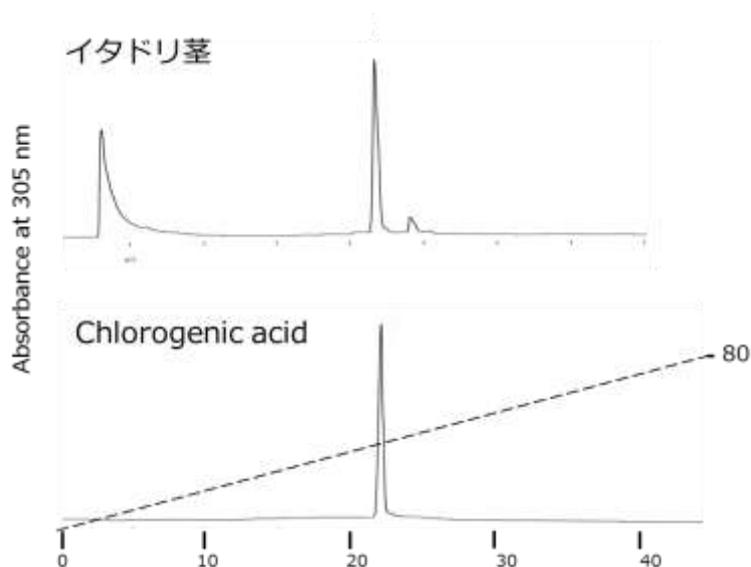


図 3-3 イタドリ茎エキスの HPLC 分析

3-3 イタドリ葉エキスのポリフェノール化合物の分析

イタドリ葉エキスは、イタドリ葉（各 10 g）に水 100 mL で攪拌し遠心分離後、得られた上清を減圧下 38°C で濃縮乾固し、残渣を 100%エタノール 10 mL に溶解しそれぞれ、イタドリ葉および茎エキスとした。

得られたエキスを逆相 HPLC 分析したところ（図 3-4）、リテンションタイム 33 分付近には Resveratrol は検出されなかった。一方、リテンションタイム 17 分から 23 分付近にいくつかのピークが検出された。なかでも図中 A で示すピークは、吸収スペクトルも類似し、

最大吸収波長もほぼ同じであることから、イタドリ葉エキスの主要な成分は、Chlorogenic acid であると示唆される。

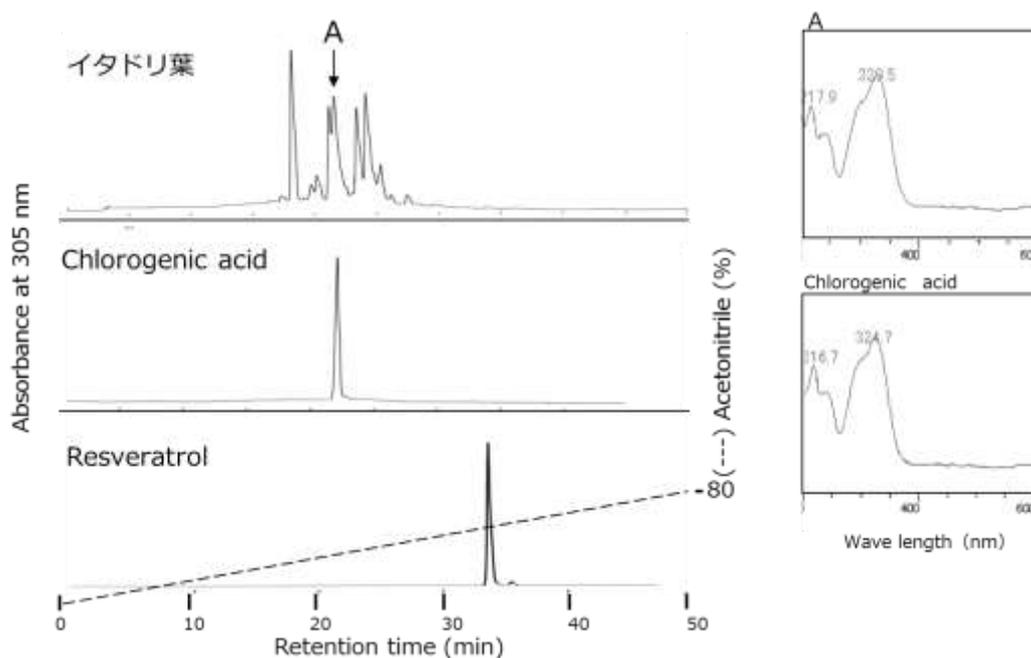


図 3-4 イタドリ葉エキスの HPLC 分析

3-4 イタドリエキスの化合物の α -Glucosidase 阻害活性

イタドリ葉、茎、葉より単離した化合物の α -Glucosidase 阻害活性の測定を行った (表 3-1)。2 種類のレスベラトロール配糖体はいずれも α -Glucosidase 阻害活性を示し、標準の Resveratrol よりも高い阻害活性をしめした。

表 3-1 イタドリエキスから単離した化合物の α -Glucosidase 阻害活性

Compounds	IC ₅₀ (μ M)
Resveratrol	*1 -
Resveratrolside	0.56 \pm 0.01
Polydatin	*2 -
Chlorogenic acid	2.99 \pm 0.39

Means \pm SD (n = 3)

*¹。 One mM resveratrol showed 15% α -Glucosidase inhibitory activity against maltase.

*²。 One mM polydatin showed 40% α -Glucosidase inhibitory activity against maltase

3-5 小括

第1章では、さまざまな植物エキスの α -Glucosidase阻害活性率を測定した結果、イタドリに高い阻害活性を示した。そのため、イタドリになんらかの阻害活性機能を有するのではないかと考えられるため、機能成分の探索を行った。

イタドリを根、葉、茎に分け、エキスを調整したところ、イタドリ根において、Resveratrolに加えその配糖体であるPolidatinおよびResveratrolosideを同定した。また、イタドリ葉及び茎において、Resveratrolは検出さなかったが、クロロゲン酸関連化合物の存在が明らかとなった。

イタドリにおけるレスベラトロール誘導体とChlorogenic acidは、 α -Glucosidase阻害活性を有した。これらのことから、イタドリが血糖上昇抑制の関与成分として特定保健用食品や機能性表示食品として応用できる有用な知見を提示することができた。

結語

特定保健用食品や機能性表示食品の関与成分として効果を発揮できるようなポリフェノールを多く含む素材を探索するために、 α -Glucosidase 阻害活性を指標に、ポリフェノールを多く含む様々な植物エキスについてスクリーニングを行い、血糖値上昇抑制成分を有する素材および成分を探索することとした。

約 77 種類の植物エキス、特にさまざまな機能性が報告されているポリフェノール高含有食品について α -Glucosidase 阻害活性の測定を行った。このうち、ザクロ、ヒシ、イタドリにおいて高い阻害活性を示したため、今回の実験材料とした。

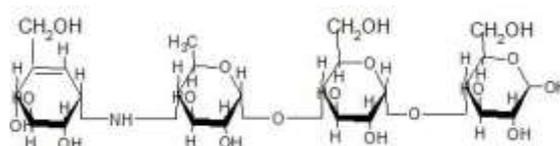
ザクロにおいては、ザクロ葉エキスの動物による血糖値上昇抑制作用が確認された。また、5 種の加水分解性タンニンと 3 種のフラボノイド配糖体物を同定した。このうち、Pentagalloylglucose、Corilagin、Granatin B が α -Glucosidase 阻害活性を示し、その阻害様式は、競合阻害であることが明らかとなった。ザクロ葉は、複数の加水分解性タンニンが相加的、相乗的に α -Glucosidase 阻害活性に寄与している可能性が示唆された。

ヒシにおいては、我々との共同研究先によりヒトによる血糖値上昇抑制作用が確認されている。また、ヒシ皮酢酸エチルエキスから 7 つの化合物を単離した。これら化合物のうち Cornusiin G、Rugosin D は、ヒシからの単離の報告は初めてである。それぞれの α -Glucosidase 阻害活性の IC_{50} は、ポジティブコントロールの Acarbose と同様に高く、Cornusiin G が $6.3 \mu M$ 、Rugosin D が $5.1 \mu M$ であった。

イタドリにおいては、イタドリを根、葉、茎に分け、エキスを調整した。イタドリ根において、Resveratrol に加えその配糖体である Polidatin および Resveratrol oside を同定した。また、イタドリ葉及び茎において、Resveratrol は検出さなかったが、クロロゲン酸関連化合物の存在が明らかとなった。イタドリにおけるレスベラトロール誘導体と Chlorogenic acid は、 α -Glucosidase 阻害活性を有した。

α -Glucosidase は、基質の非還元末端の α -1,4 グリコシド結合を加水分解することが知られている。また、 α -Glucosidase の起源の違いによって多様な鎖長特異性を示す。しかし、これらの活性部位をたんぱく質構造から説明できるようになったのはごく最近のことである。今回実験で使用した α -glucosidase は、ラット由来のものである。田上³⁶⁾の研究では、テンサイ α -グルコシダーゼ、ヒト小腸グルコアミラーゼ、ヒト小腸マルターゼにおいて α -glucosidase 阻害剤の Acarbose の結合位置から活性部位を検討している。 α -glucosidase では、Acarbose の C 環、D 環周辺、中でもアミノ酸配列保存性が低い N-loop

が鎖長特異性に密接に関連していると考えられている。今回見出した α -Glucosidase 阻害活性物質の立体構造はまだ明らかにされていないが、いずれの化合物も α -Glucosidase に対して競合的な阻害を示したことから、これらの活性化合物のアシル基の一部が N-loop 付近にはまりこみ阻害している可能性が考えられる。



Acarbose の構造

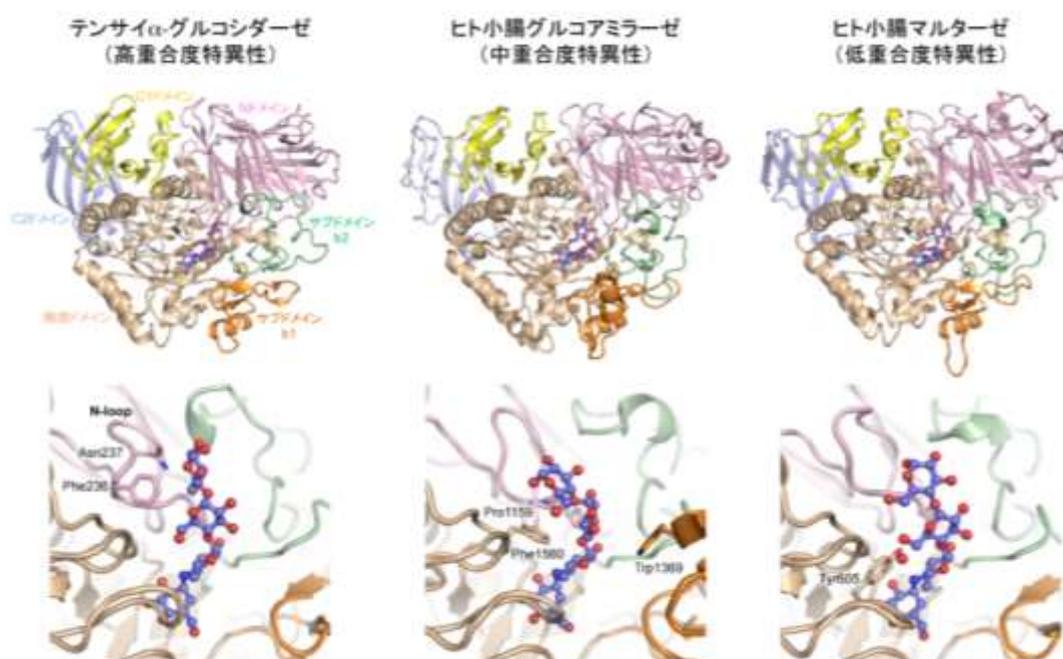


図1 鎖長特異性の異なる糖質加水分解酵素ファミリー31 α -glucosidase の立体構造比較³⁶⁾

本研究によりこれらの素材、ザクロ、ヒシ、イタドリが血糖値上昇抑制作用を用途とする特定保健用食品や機能性表示食品の開発に向けた科学的基礎データを提示することができた。

実験の部

1 研究試薬および機器

Maltose、ラット小腸アセトン粉末、 α -Amylase (ブタ膵臓由来)、Acarbose、Tetrahydrofuran、ギ酸、シュウ酸、アセトン、*n*-ブタノール、ジエチルエーテル、酢酸エチル、アセトニトリル、メタノールおよび Resveratrol は、Sigma Aldrich 株式会社製を使用する。リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、でんぷん (溶性) およびアラビアゴムは、和光純薬工業株式会社製を使用する。HPLC 用アセトニトリルは、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製を使用する。ジメチルスルホオキドおよびトリフルオロ酢酸は、ナカライテスク株式会社製を使用する。Chlorogenic acid は、東京化成工業株式会社製を使用する。Voglibose は、沢井製薬株式会社製を使用する。HPLC 用メタノール、アセトン-D6 および Deuterium oxide は、メルク社製を使用する。

NMR [hetero-nuclear single quantum coherence (HSQC), hetero-nuclear multiple-bond connectivity (HMBC), NOE-correlated spectroscopy (NOESY), および ^1H - ^1H correlation spectroscopy (COSY) を含む] は、Varian INOVA 600AS (600MHz for ^1H , 150 MHz for ^{13}C) を用いて測定した。使用した測定溶媒のケミカルシフトはそれぞれ、[Acetone- d_6 (δ_{H} 2.04, δ_{C} 29.8)] であった。High-resolution electrospray-ionization (HR-ESI) -MS data は Bruker micrOTOF II spectrometer を用いて測定した。

2 α -Glucosidase 阻害活性測定方法

α -Glucosidase 阻害活性は、F-キット D-グルコース、株式会社 J. K. インターナショナル製を用いて行った (図 1)。反応の溶液は以下の通りに調製した。溶液 I : Triethanolamine buffer、pH 7.6、NADP 110 mg、ATP 260 mg、使用前に溶液 I のビン内容物を 45 mL の蒸留水に溶解する。溶液 II : HK 約 320 U、G6P-DH 約 160 U、基質 : Maltose 250 mM、pH 7.0。 α -Glucosidase 酵素液 : ラット小腸アセトン粉末 (Sigma Aldrich Co., Steinheim, Germany) に 15 倍量の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を添加し、均質化した後、遠心分離 (15,000rpm、20 min、4°C) した上清を酵素液とした。

阻害活性は、使用する試薬をすべて 4 倍に希釈して実験を行った。まず阻害物質 160 μL と基質である 250 mM マルトース溶液 (pH 7.0) 20 μL を混合し、37°C で 3 分間プレインキュベート後、酵素液 20 μL と混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。酵素反応後、ただちに 100°C で 5 分間加熱して酵素を失活した。次いで、生成したグルコースを F-キット D-グルコースを用いてグルコースを定量した。酵素反応を起こした阻害物質入りのサンプル

200 μ L にそれぞれ溶液 I を 250 μ L 加え混和し、340 nm の吸光度を測定した。その反応液それぞれに溶液 II を 20 μ L 加え 37°C で 20 分間インキュベートし、340 nm の吸光度を測定した。 α -Glucosidase 活性の阻害率は、阻害物質を含まないリン酸緩衝液のみで行った対照群を 100% とし、その比率から算出した。

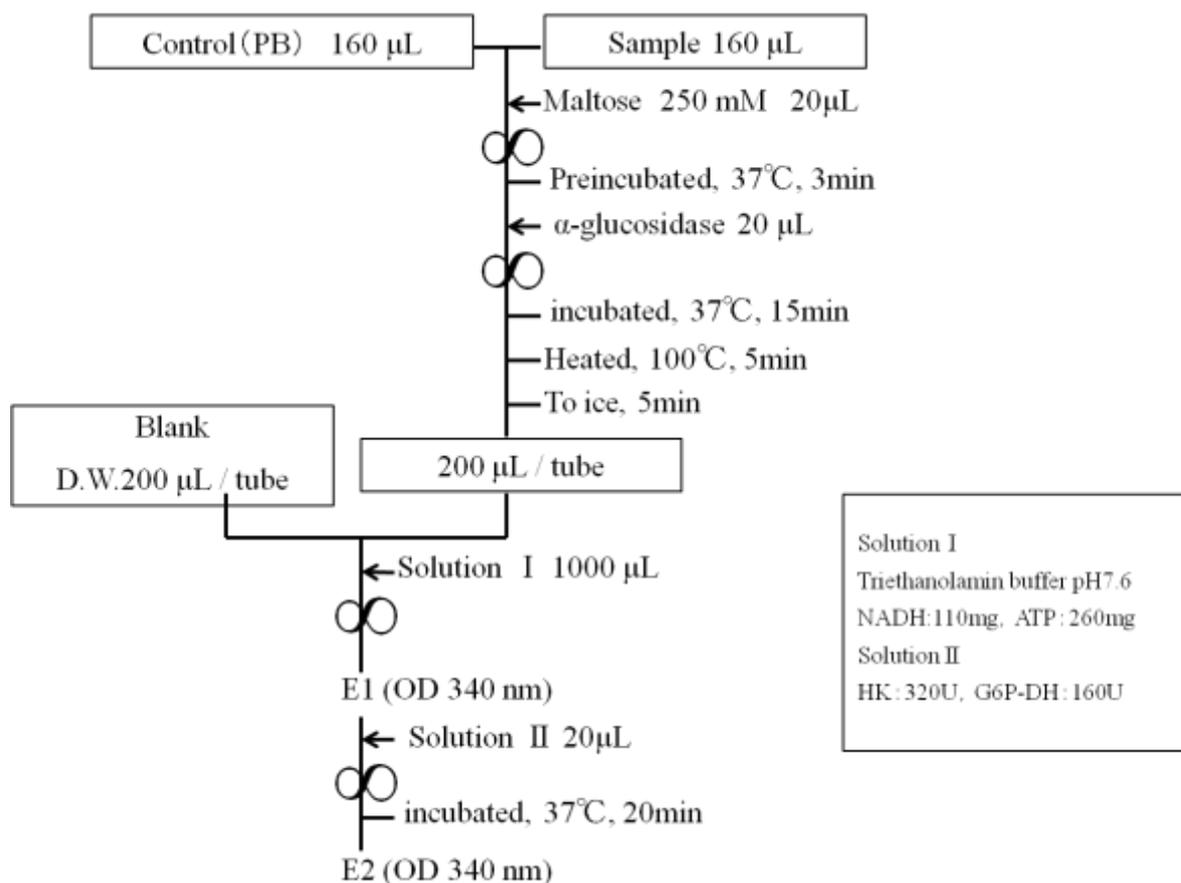


図 1 α -Glucosidase 阻害活性測定フローシート

3 α -Amylase 阻害活性測定方法

α -Amylase 阻害活性の測定方法は、酵素としてブタ膵臓由来の α -Amylase を、また、基質に 4% でんぷん溶液 (0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.0) を用いた。4% でんぷん溶液 500 μ L に阻害物質 500 μ L を加え混和、37°C で 5 分間プレインキュベート後、酵素液 10 μ L と混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。酵素反応後、ただちに 100°C で 10 分間加熱して酵素を失活した (図 2)。

酵素液の代わりに緩衝液を加えたものをブランク、また、阻害物質の代わりに緩衝液を

加えたものを対照とした。

反応で生成したマルトースを高速液体クロマトグラフィーで測定し、対照におけるマルトース生成量を 100% として各物質による酵素阻害活性 (%) を算出した。

高速液体クロマトグラフィーの条件を下記に示す。HPLC 装置、SHIMADZU LC-10AV ; カラム、TSK gel Amido-80 (5 μ m、4.6 mm i. d. \times 250 mm) (東ソー株式会社) ; 記録装置、sic μ 7 Plus (システムインストルメンツ株式会社) ; 検出器、示唆屈折計 Shodex RI-101 ; 流速、0.5 mL/min ; 注入量、20 μ L ; 溶媒、60%aqueous acetonitrile、カラム温度 ; 40 $^{\circ}$ C。

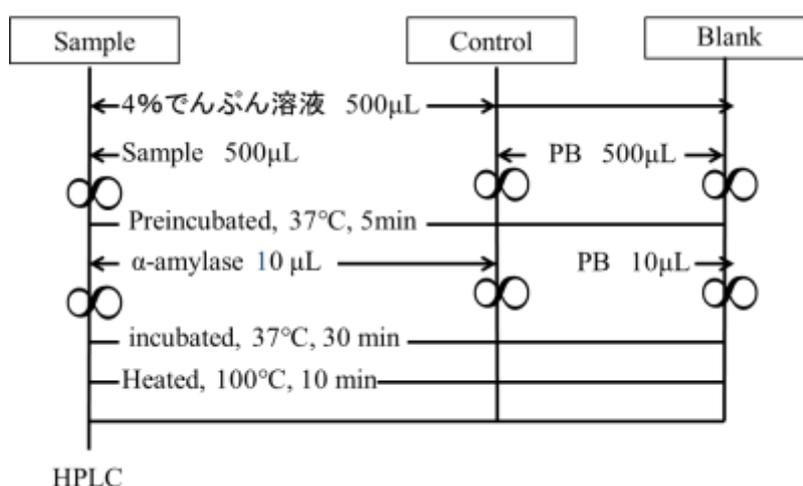


図2 α -Amylase 阻害活性測定フローシート

4 HPLC の分析

順相系 HPLC 分析は次の条件で行った。HPLC 装置、SHIMADZU LC-10AD ; カラム、YMC-pack SILA-003 (4.6 mm i. d. \times 250 mm) (YMC) ; 記録装置、clarity ; 検出器、SHIMADZU UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR SPD-10AV ; 流速、1.5 mL/min ; 注入量、10 μ L ; 波長、280 nm、380nm ; 温度、室温 ; 移動相、(条件 1) *n*-Hexane : メタノール : THF : HCOOH+ (COOH)₂=55 : 33 : 11 : 1+450 mg/mL、(条件 2) *n*-Hexane : メタノール : THF : HCOOH+ (COOH)₂=47 : 39 : 24 : 1+450 mg/mL。

逆相系 HPLC 分析は次の条件で行った。HPLC 装置、HITACHI L-2130 ; オートサンプラー、HITACHI L-2200、検出器、HITACHI L-7455、カラム、InertSustain C18 (5 μ m、4.6 mm i. d. \times 150 mm) (GL Sciences) ; 流速、1.0 mL/min ; 注入量、1 μ L ; 温度、40 $^{\circ}$ C ; 移動相、H₂O : CH₃CN : HCOOH=80 : 10 : 10。

イタドリ分析用逆相 HPLC 分析は次の条件で行った。HPLC 装置、SHIMAZU LC-10AT ; カラム、Atlantis dC₁₈ (5 μm, 3.9 mm i.d×150 mm) (Waters) ; 流速、0.5 mL/min ; 温度、35°C ; 移動相、0.05%TFA、CH₃CH (0 - 80%)。

5 抽出、単離

ヒシ皮の粉末 (77.18 g) を室温下、70%Acetone (1L) 中で攪拌し、抽出した。70%Acetone 溶液を濃縮し得られたエキス (10.4 g) をジエチルエーテル (2×200 mL)、酢酸エチル (3×200 mL) および *n*-ブタノール (3×200 mL) に順次分配し、ジエチルエーテルエキス (1.1 g)、酢酸エチルエキス (3.7 g)、*n*-ブタノールエキス (1.2 g)、水エキス (4.0 g) を得た。次に、酢酸エチルエキス 3.5 g を TOYOPEARL HW-40 を用いてカラムクロマトグラフィーに付し、30%メタノールエキス (0.1502 g)、40%メタノールエキス (0.1254 g)、50%メタノールエキス (0.7098 g)、60%メタノールエキス (0.6332 g)、70%メタノールエキス (0.3931 g)、100%メタノールエキス (0.3824 g)、メタノール : アセトン : H₂O = 7 : 1 : 2 エキス (0.1875 g)、メタノール : アセトン : H₂O = 7 : 2 : 1 エキス (0.055 g)、70%アセトンエキス (0.025 g) を得た。30%メタノールエキスから Gallic acid (125.2 mg)、50%メタノールエキスから 1, 2, 3-Tri-*O*-galloyl-β-D-glucose (38.6 mg)、1, 2, 6-Tri-*O*-galloyl-β-D-glucose (52.3 mg)、60%メタノールエキスから 1, 2, 3, 6-Tetra-*O*-galloyl-β-D-glucose (263.2 mg)、70%メタノールエキスから Tellimagrandin II (134.7 mg)、メタノール : Aceton : H₂O = 7 : 1 : 2 エキスから Cornusiin G (36.5 mg)、メタノール : Aceton : H₂O = 7 : 2 : 1 のエキスから Rugosin D (36.3 mg) が同定された。

ヒシ実の粉末 (187.79 g) を室温下、70%Acetone (200 mL) 中で攪拌し、70%Acetone 溶液を濃縮しエキス (10.4 g) を得た。

6 単離した化合物の構造決定

1, 2, 3-Tri-*O*-galloyl-β-D-glucose (1)

淡黄色の粉末。HR-ESI-MS *m/z* 635.0908 [M-H]⁻ (calcd for C₂₇H₂₄O₁₈-H, 635.0890)。¹H-NMR [acetone-*d*₆-D₂O (9:1)] : 7.08、7.06、6.98 (2H each, s, galloyl-H)、6.07 (1H, d, *J*=7.8 Hz, Glc H-1)、5.59 (1H, t, *J*=9.6 Hz, Glc H-3)、5.39 (1H, dd, *J*=7.8、9.6 Hz, Glc H-2)、3.99 (1H, t, *J*=9.6 Hz, Glc H-4)、3.90 (1H, dd, *J*=1.8、12 Hz, Glc H-6)、3.81 (1H, dd, *J*=4.2、12 Hz, Glc H-6)、3.77 (1H, ddd, *J*=1.8、

4.2、9.6 Hz、Glc H-5)。

1, 2, 6-Tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (2)

淡黄色の粉末。HR-ESI-MS m/z 635.0866 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{27}H_{24}O_{18}$ -H, 635.0890)。 1H -NMR [acetone- d_6 -D₂O (9:1)] : 7.14、7.08、7.06 (2H each、s、galloyl-H)、5.96 (1H、d、 $J=7.8$ Hz、Glc H-1)、5.24 (1H、t、 $J=9.6$ Hz、Glc H-2)、4.56 (1H、dd、 $J=1.8$ 、12 Hz、Glc H-6)、4.47 (1H、dd、 $J=4.2$ 、12 Hz、Glc H-6)、3.96 (1H、t、 $J=9.6$ Hz、Glc H-4)、3.91 (1H、br dd、 $J=4.2$ 、9.6 Hz、Glc H-5)、3.74 (1H、br t、 $J=9.6$ Hz、Glc H-3)。

1, 2, 3, 6-Tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (3)

淡黄色の粉末。HR-ESI-MS m/z 787.0962 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{34}H_{28}O_{22}$ -H, 787.0999)。 1H -NMR [acetone- d_6 -D₂O (9:1)] : 7.17、7.09、7.08、7.00 (2H each、s、galloyl-H)、6.17 (1H、d、 $J=7.8$ Hz、Glc H-1)、5.68 (1H、t、 $J=9.6$ Hz、Glc H-3)、5.47 (1H、dd、 $J=7.8$ 、9.6 Hz、Glc H-2)、4.61 (1H、dd、 $J=1.8$ 、12 Hz、Glc H-6)、4.56 (1H、dd、 $J=4.2$ 、12 Hz、Glc H-6)、4.15 (1H、ddd、 $J=1.8$ 、4.2、9.6 Hz、Glc H-5)、4.10 (1H、t、 $J=9.6$ Hz、Glc H-4)。

Tellimagrandin II (4)

淡黄色の粉末。HR-ESI-MS m/z 937.0951 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{41}H_{30}O_{26}$ -H, 937.0953)。 1H -NMR [acetone- d_6 -D₂O (9:1)] : 7.09、6.99、6.95 (2H each、s、galloyl-H)、6.63、6.48 (1H each、hexahydroxydiphenoyl (HHDP)-H)、6.17 (1H、d、 $J=7.8$ Hz、Glc H-1)、5.81 (1H、t、 $J=9.6$ Hz、Glc H-3)、5.59 (1H、dd、 $J=7.8$ 、9.6 Hz、Glc H-2)、5.32 (1H、dd、 $J=6.6$ 、13.2 Hz、Glc H-6)、5.20 (1H、t、 $J=9.6$ Hz、Glc H-4)、4.56 (1H、br dd、 $J=6.6$ 、9.6 Hz、Glc H-5)、3.87 (1H、d、 $J=13.2$ Hz、Glc H-6)。

Cornusiiin G (5)

薄茶色の粉末。HR-ESI-MS m/z 1723.1868 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{75}H_{56}O_{48}$ -H, 1723.1868)。 1H -NMR [acetone- d_6 -D₂O (9:1)] : 7.13、7.07、7.05、7.03、6.97、6.88 (2H each、s、galloyl-H)、7.06、6.62、6.19 (1H each、valneoyl-H)、6.15 [1H、d、 $J=8.4$ Hz、Glc(B) H-1]、6.04 [1H、d、 $J=8.4$ Hz、Glc(A) H-1]、5.59 [2H、t、 $J=9.6$ Hz、Glc(A、

B) H-3]、 5.53 [1H, br t, $J=9.6$ Hz、 Glc(B) H-2]、 5.40 [1H, dd, $J=8.4$ 、 9.6 Hz、 Glc(A) H-2]、 5.37 [1H, dd, $J=6$ 、 13.8 Hz、 Glc(A) H-6]、 5.07 [1H, t, $J=9.6$ Hz、 Glc(A) H-4]、 4.70 [1H, br d, $J=13.8$ Hz、 Glc(B) H-6]、 4.48 [1H, dd, $J=6.6$ 、 13.8 Hz、 Glc(A) H-5]、 4.37 [1H, dd, $J=6.6$ 、 13.8 Hz、 Glc(B) H-6]、 4.07 [1H, br dt, $J=6.6$ 、 9.6 Hz、 Glc(B) H-5]、 3.87 [1H, d, $J=13.8$ Hz、 Glc(A) H-6]、 3.78 [1H, t, $J=9.6$ Hz、 Glc(B) H-4]。 ^{13}C -NMR [acetone- d_6 -D₂O (9:1)]: 168.4、 167.7、 167.1、 166.5、 166.2、 166.1、 165.7、 165.4、 165.3、 147.1、 146.04 (3C)、 145.98 (2C)、 145.90 (2C)、 148.85 (4C)、 145.5 (2C)、 145.3、 144.9、 144.5、 143.1、 140.3 (2C)、 139.9、 139.7、 139.4 (2C)、 139.1、 139.0、 136.7、 136.6、 136.2、 125.7、 125.6、 121.0、 120.1、 120.0、 119.8、 119.5、 119.3、 117.4、 115.3、 114.3、 110.2、 110.11 (3C)、 110.10 (3C)、 109.9 (2C)、 109.8 (3C)、 107.7、 105.1、 93.5 [Glc(B) C-1]、 93.3 [Glc(A) C-1]、 76.1 [Glc(B) C-5]、 75.6 [Glc(B) C-3]、 73.0 [Glc(A) C-3]、 72.8 [Glc(A) C-5]、 72.1 [Glc(A) C-2]、 71.6 [Glc(B) C-2]、 71.0 [Glc(A) C-4]、 69.3 [Glc(B) C-4]、 64.5 [Glc(B) C-6]、 63.2 [Glc(A) C-6]。

Rugosin D (6)

薄茶色の粉末。 HR-ESI-MS m/z 1873.1840 [M-H]⁻ (calcd for C₈₂H₅₈O₅₂-H, 1873.1821). ^1H -NMR [acetone- d_6 -D₂O (9:1)]: • 7.09、 7.00、 6.99、 6.98、 6.95 (2H each, s, galloyl-H)、 7.12、 6.48、 6.46 [1H each, valoneoyl-H]、 6.63、 6.17 (1H each, HHDP-H)、 6.14 [1H, d, $J=8.4$ Hz、 Glc(A) H-1]、 6.05 [1H, d, $J=8.4$ Hz、 Glc(B) H-1]、 5.80 [1H, t, $J=9.6$ Hz、 Glc(A) H-3]、 5.76 [1H, t, $J=9.6$ Hz、 Glc(B) H-3]、 5.58 [1H, dd, $J=8.4$ 、 9.6 Hz、 Glc(B) H-2]、 5.53 [1H, dd, $J=8.4$ 、 9.6 Hz、 Glc(A) H-2]、 5.27 [1H, dd, $J=7.2$ 、 13.8 Hz、 Glc(A) H-6]、 5.25 [1H, dd, $J=7.2$ 、 13.8 Hz、 Glc(B) H-6]、 5.16 [1H, t, $J=9.6$ Hz、 Glc(B) H-4]、 5.14 [1H, t, $J=9.6$ Hz、 Glc(A) H-4]、 4.49 [1H, dd, $J=7.2$ 、 9.6 Hz、 Glc(A) H-5]、 4.43 [1H, dd, $J=7.2$ 、 9.6 Hz、 Glc(B) H-5]、 3.78 [1H, d, $J=13.8$ Hz、 Glc(A) H-6]、 3.77 [1H, d, $J=13.8$ Hz、 Glc(B) H-6]。 ^{13}C -NMR [acetone- d_6 -D₂O (9:1)]: • 168.2、 167.9、 167.8、 167.7、 166.5、 166.5、 166.1、 166.0、 165.1、 162.3、 146.5、 146.0 (3C)、 145.9 (2C)、 145.8 (3C)、 145.7 (3C)、 145.2、 145.1、 145.1、 144.9、 144.6、 144.3 (2C)、 143.2、 141.2、 140.4、 139.8、 139.5、 139.4、 139.21、 139.19、 137.8、 137.1、 136.6、

136.5、136.2、126.2、125.7、125.5、125.2、120.2、120.1、119.8、119.8、119.4、117.7、115.9、115.60、115.57、112.5、110.2 (3C)、110.1 (4C)、109.9 (3C)、108.0、107.7、107.6、104.7、93.5 [Glc(A) C-1]、93.1 [Glc(B) C-1]、73.3 [Glc(B) C-3]、73.2 [Glc(A) C-3]、72.9 [Glc(B) C-5]、72.8 [Glc(A) C-5]、71.7 (2C) [Glc(A、B) C-2]、70.6 [Glc(A) C-4]、70.5 [Glc(B) C-4]、63.0 [Glc(A) C-6]、62.9 [Glc(B) C-6]。

7 動物実験

7-1 実験動物

実験動物には、BALB/C マウス (生後 6 週間目、22 - 27 g、日本クレア社株製) を用いた。1 週間から 2 週間予備飼育を行い、この間固形飼料 (MF、オリエンタル酵母工業製) と水を自由摂取させた。それらをザクロ葉エキス群、ポジティブコントロール群、対照群の 3 つのグループ (各々の n = 5) に無作為に分けた。ポジティブコントロール群には、 α -Glucosidase 阻害薬であるボクリボースを 5%のアラビアゴム液で懸濁したものをを用いた。実験開始の 24 時間以上前より絶食し、糖負荷試験を行った。各々のマウス (n=5) は、胃管による栄養チューブを用いて水、ザクロ葉エキスとボグリボースを経口投与後、10 分後にマルトース溶液 2 g/kg を経口投与した。

7-2 採血と血糖値の測定

糖負荷後 30、60、90、120 分に尾静脈より採血を行い、Freestyle Freedom Life (Nipro 社) を用いて血糖値を測定した。

7-3 投与サンプルの調製

投与サンプルのザクロ葉エキスは、ザクロ葉抽出物を各濃度に 5%アラビアゴム懸濁液に懸濁させた。

8 統計計算

データの数値は、すべて平均値 \pm S.E. で表した。対象群間との有意差は、Student' s t-test により検定した。p 値は、0.05 を有意差の判定基準とした。

謝辞

本研究の終わりに臨み、研究室配属時より、研究するための環境を整えていただき、研究の進め方等的確な考察、御助言を賜りました、岡山県立大学学長辻英明教授に厚く感謝申し上げます。そして、配属途中より、急きょご指導いただくことになったにも関わらず、本論文を作成するにあたり研究の方針、研究への心構え、実験においての手法等丁寧にご指導いただき、国際学会での発表等貴重な経験をさせていただきました、岡山県立大学伊東秀之教授に深く感謝いたします。また、折にふれ御助言や励ましを賜りました岡山県立大学我如古菜月助教に感謝いたします。

そして、本研究を遂行するにあたり、測定機器を使わせていただいた、岡山大学、川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科に深く感謝いたします。

また、 α -Glucosidase 阻害活性、イタドリ分析等の方法にご助力いただきました、くらしき作陽大学桐野颯子博士、ザクロ葉エキス抽出や分析等でご助力いただきました、伊東研究室金田真央修士、博士前期課程赤井衣里阿氏、ヒシ分析にご助力いただきました博士前期課程加藤奈々氏に感謝いたします。

最後になりましたが、公私にわたり苦楽を共にし、温かく見守り、支え、励ましてくださいました伊東研究室の諸先輩方、後輩の皆様にご心よりお礼申し上げます。

参考文献

第1章

- 1) 廣川書店, 天然物化学, 247-248, 2007.
- 2) 医学書院, 治療薬マニュアル 2013, 904-908, 2013.
- 3) Yoriko Deguchi, Kuniko Osada, Kazumi Uchida, Hiroko Kimura, Masaki Yoshikawa, Tatsuyuki Kudo, KIsako Yasui, Masaaki Watanuki. Effects of extract of guava leaves on the development of diabetetes in the db/db mouse and on the postprandial blood glucose of human subjects. *Nippon Nogeikagaku kaishi* 72(8), 1998, 923-931.
- 4) Takuo Okuda, Takashi Yshida, Tsumomu Hatano, Kazufumi Yazaki, Yukihiro Ikegami, Tetsuro Shingu. Guavins A, C and D, comples tannins from psidium guajava. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35(1), 1987, 443-446.
- 5) Yoriko Degushi, Kouji Miyazaki. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effect of guavaleaf extract. *Nutrition and Metabolism*. 7 (9), 5-10, 2010.
- 6) Kim HJ, Yoon KH, Kang MJ, Yim HW, Lee KS, Vuksan V, Sung MK. A Six-Month Supplementation of Mulberry, Korean Red Ginseng, and Banaba Decreases Biomarkers of Systemic Low-Grade Inflammation in Subjects with Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8, 2012.
- 7) 勝部拓矢, 杉山万理, 小山朗夫. クワの健康機能性研究の最前線. 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー, 80 (1), 19-27, 2011.
- 8) S. V. Evans, L. E. Fellows, T. K. M. Shing, G. W. J. Fleet. Glycosidase inhibition by plant alkaloids which are structural analogues of monosaccharides. *Phytochemistry*. 24. 1953-1955, 1985.
- 9) Michio Aitani, Hiroyuki Kimura, Yasuhiro Abiru, Hiroko Soyama, Hiroko Murakami, Hui Li Zhang, Tomoko Sugishita, Yotaro Konishi. Effect of an Extract from evening-primrose seeds on postprandial blood glucose level and its active components. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 50(4), 180-187, 2003.
- 10) 有賀敏明, 細山浩, 徳武昌一, 山越純. プロアントシアニジンの機能性解明と開発. *Nippon Ngeikagaku Kaishi*. 74 (1) , 1-8, 2000.

- 11) 藍谷教谷, 西村明, 濱田浩一郎, 木場孝繁, 小西洋太郎. 月見草エキスの人における食後血糖値上昇抑制作用. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 50 (10), 451-456, 2003.
- 12) Hiroshi Shimoda, Shusuke Kawamori, Yuzou Kawahara. Effect of an aqueous extract of *Salacia reticulata*, a useful plant in Sri Lanka, on postprandial hyperglycemia in rats and humans. *日本栄養・食糧学会誌*. 51(5), 279-287, 1998.
- 13) Masayuki Yoshikawa, Toshiyuki Murakami, Hiromi Shimada, Hisashi Matsuda, Johji Yamahara, Genzou Tanabe, Osamu Muraoka. Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the Ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India. *Tetrahedron Letters*. 38, 8367-70. 1997.
- 14) Yuji Kamitani, Kazuya Iwai, Taiji Fukunaga, Ryotaro Kimura, Osamu Nakagiri. In vitro analysis on inhibitory activity of amylolytic enzymes in decaffeinated green coffee bean extracts and contributions of chlorogenic acids. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 56(6), 336-342, 2009.
- 15) Tao Yuan, Yuanqing Ding, Chunpeng Wan, Liya Li, Jialin Xu, Ke Liu, Angela Slitt, Daneel Ferreira, Ikhlas A Khan, Navindra P Seeram. Antidiabetic ellagitannins from pomegranate flowers : Inhibition of α -Glucosidase and lipogenesis gene expression. 14(20), 5358-5361, 2012.
- 16) 上海化学技術出版社, *中薬大辞典* 第3巻, 1455-1461, 1985.

第2章

- 17) Kim Y. S., Hwang J. W., Han Y. K., Kwon H. J., Kim M. J., Jang J. S., Lee J. H., and Kim J. I., *Food Chem. Toxicol.*, **64**, 49-56, 2014.
- 18) Kang M. J., Lee S. K., Song J. H., Kim M. E., Kim M. J., Jang J. S., Lee J. H., Kim J. I., *Food Sci. Biotech.*, **18**, 808-812, 2009.
- 19) Yasuda M., Yasutake K., Hino M., Ohwatari H., Ohmagari N., Takedomi K., Tanaka T., Nonaka G., *Food Chem.*, **165**, 42-49, 2014.
- 20) Kim M. J., Im K. R., Yoon K-S., *Am. J. Mol. Biol.*, **5**, 32-41, 2015.
- 21) Hatano T., Okonogi A., Yazaki K., Okuda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2707-2711,

1990.

- 22) Nonaka G., Matsumoto Y., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1184-1187, 1981.
- 23) Okuda T., Hatano T., Yazaki K., Ogawa N., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4230-4233, 1982.
- 24) Haddock E. A., Gupta R. K., Al-Shafi S. M. K., Haslam E., Magnolato D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 2515-2524, 1982.
- 25) Wilkins C. K., Bohm B. A., *Phytochemistry*, **15**, 211-214, 1976.
- 26) Okuda T., Yoshida T., Ashida M., Yazaki K., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1983, 1765-1772.
- 27) Hatano T., Yasuhara T., Abe R., Okuda T., *Phytochemistry*, **29**, 2975-2978, 1990.
- 28) Hatano T., Ogawa R., Shingu T., Okuda T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3341-3346, 1990.
- 29) Okuda T., Hatano T., Yazaki K., Ogawa N., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4234-4237, 1982.
- 30) Okuda T., Yoshida T., Hatano T., *Phytochemistry*, **32**, 507-521, 1993.

第3章

- 31) Sukala KB., Katta VK., Gottumukkala VS., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 691-693 (2005).
- 32) Blanka B., Maritin A., Katerina O., Josef K., Milan K., *J Sep Sci.*, **31**, 2404-2409, 2008.
- 33) Qian G., Leung S. Y., Lu G., Leung K. S. Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1179-1186, 2006.
- 34) Juhasz B., Varga B., Gesztelyi R., Kemeny-Beke A., Zsuga J., Tosaki A., *Chem. Pharm. Bioychnol.*, **11**, 810-818, 2010.
- 35) Mattivi F., *Z Lebensm Unters Forsch.*, **196**, 522-525, 1982.
- 36) 田上 貴祥, 化学と生物, **52** (4), 205-207, 2014.

本研究に関する論文および学会発表

本研究に関する論文発表

- 1) Satoko Kawabe, Natsuki Ganeko, Hideyuki Ito. Ellagitannin Dimers from the Pericarps of *Trapa japonica*. *The Japanese Journal of Pharmacognosy*. 71 (1)
- 2) Akiko Kirino, Yuka Takasuka, Asami Nishi, Satoko Kawabe, Hiromi Yamashita, Masumi Kimoto, Hideyuki Ito, Hideaki Tsuji. Analysis and Functionality of Major Polyphenolic Components of *Polygonum cuspidatum* (Itadori) . *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 58, 278–286, 2012.

本研究における学会発表

- 1) 河辺聡子、赤井衣里阿、加藤奈々、我如古菜月、伊東秀之. ザクロ葉エキスの血糖値上昇抑制作用とその作用成分、P89、日本農芸化学会 2015 年会、Okayama、Japan、2015、March.
- 2) Satoko Kawabe、Iria Akai、Nana Kato、Natsuki Ganeko、Hideyuki Ito. Inhibitory effect of the leaf extract of pomegranate on postprandial glucose level in mice. P153、The 7th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2015)、Paris、France、2015、October.
- 3) 高須賀由佳、河辺聡子、西麻実、鈴木麻希子、伊東秀之、山下広美、木本眞順美、辻英明. イタドリにおけるポリフェノール化合物の分析、P20、第 43 会日本栄養・食糧学会中国・四国支部大会、Kouchi、Japan、2010、November.

