

ヒトまたは動物の脂質組成に及ぼす植物性食品成分の影響 に関する研究

—脂質代謝に影響を及ぼす杜仲茶成分の探索—

松田恵理子 吉澤結子*¹ 横澤友希*¹ 川井 悟*² 室伏 旭*¹

脂質代謝の評価系として用いられているマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用い、脂肪蓄積に与える影響を指標に活性成分の探索をおこなった。杜仲茶抽出液として煮沸抽出液、熱水抽出液、エタノール抽出液の3種を調製し、3T3-L1 活性を測定した。いずれも脂肪蓄積抑制活性を示したが、最も活性の強かった煮沸抽出液を HPLC 測定し、杜仲茶に含まれるピロガロール、プロトカテキ酸、(+)-カテキン、クロロゲン酸を同定定量した。これらの標準品を用いて 3T3-L1 活性を測定したところ、(+)-カテキンのみが弱い抑制活性を示したが、他に強い抑制活性物質の存在が予想されたので、活性を指標に探索をおこなった。杜仲茶煮沸抽出液の酢酸エチル(EtOAc)抽出部より強い抑制活性物質として、5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド(HMF)を単離同定し、杜仲茶煮沸抽出液の強い抑制活性は主に HMF が寄与していると推定した。

1. はじめに

食生活が欧米化し、脂質摂取量の増加とエネルギーの過剰摂取傾向により、肥満者が増加している。なかでも、内臓脂肪蓄積型肥満は生活習慣病のリスクファクターであり、糖尿病、高脂血症、高血圧を伴う場合が多い。糖尿病は重篤な合併症を、高脂血症、高血圧症は動脈硬化症を経て、脳・心臓血管障害を導くことから、肥満および脂質・糖質代謝の制御が生活習慣病予防のキーポイントとなっている。肥満および脂質・糖質代謝に的を絞り、これらの評価するための実験系とされるマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1¹⁾ を用い、生活習慣病の予防や改善に有効な成分の探索をおこなった。

「杜仲」はトチュウ科トチュウ属トチュウ (*Eucommia ulmoides* Oliver) の樹皮を乾燥した生薬で、古くから滋養強壮や高血圧症の治療に用いられてきた。また、最近の健康食品ブームの中、葉に着目して加工された杜仲茶が秋田県大仙市の特産品となっている。一般に飲用とされる杜仲茶は樹皮以外の葉や葉柄を焙煎したもので、高血圧や動脈硬化に有効とされ、血圧降下作用を示すことが知られている²⁾。脂質代謝

に効果があるとされているが³⁾、活性物質の報告はない。

そこで、杜仲茶抽出エキスがマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の脂肪蓄積に及ぼす影響を指標に生理活性物質の探索をおこなった。その結果について報告する。

2. 材料および方法

2.1 杜仲茶抽出液の調製 (予備試験)

杜仲茶は(有)物産中仙(大仙市)より購入した。煮沸抽出液、熱水抽出液、エタノール (EtOH) 抽出液の3種を調製した。煮沸抽出液は 50 g の杜仲茶に熱水 (100℃の水) を加えて 5 分間煮沸した後、ろ過して 500ml とした。熱水抽出液は 50 g の杜仲茶に熱水 500ml を加えて 5 分間静置し、ろ過後 500ml とした。EtOH 抽出液は 50 g の杜仲茶に EtOH 500ml を加えて室温で一夜静置し、ろ過後に減圧濃縮して 100ml の水溶液とした。

2.2 杜仲茶酢酸エチル抽出物の調製 (本試験)

杜仲茶 500 g に熱水 2L を加えて 5 分間煮沸後ろ過した。ろ液を酢酸エチル (EtOAc) 500ml で 2 回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水して減圧濃縮し、EtOAc 抽出物とした。水層は減圧濃縮し、500ml の水抽出液とした。

*1 秋田県立大学生物資源科学部

*2 東京電機大学理工学部

2.3 3T3-L1 細胞の継代培養

継代培養は Dulbecco modified Eagle's medium, high modified glucose and pyruvate (DMEM) に 10% 子牛血清を加えた培地 (CS 培地) に抗生物質としてペニシリン 10000units/ストレプトマイシン 10mg/ml 溶液 (SIGMA) を 1% 加えておこなった。対数増殖期の細胞 (10^6 cells/ml) を 5.0×10^4 に希釈して 5% CO₂, 飽和水蒸気下, 37°C で培養し, 培地交換は 3~4 日ごとにおこなった。

2.4 脂肪蓄積活性試験

図 1 に示したように 3T3-L1 細胞 (5×10^4 cells/ml) を 12 ウェルマイクロプレートに分注し, CS 培地で 3 日間培養してコンフルエントとした後, 分化誘導用培地 (FBS 培地: DMEM に 10% 牛胎児血清, 1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液, 0.25mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン, 0.5 μ M デキサメタゾン, 5 μ g/ml インスリンになるように調製) に換え, 2 日間培養した。その後, 被検試料を加えた FBS 培地で 3 日ごとに 3 回培地交換をした。水溶性抽出物は PBS (phosphated buffer saline, Ca²⁺Mg²⁺-free, pH7.1) で 10mg/ml に溶解した後, フィルター滅菌 (0.2 μ m) し, 培地最終濃度 100 μ g/ml になるように加えた。水不溶抽出物はジメチルスルフォキシド (DMSO) で 10mg/ml に溶解した後, 培地最終濃度 10 μ g/ml になるように加えた。また, DMSO は培地に 0.1% 添加しても分化誘導への影響はなかった。標準品は培地最終濃度 100 μ M で活性試験をおこなった。

2.5 脂肪蓄積量の測定

脂肪量の測定はオイルレッド O 染色によりおこなった。被検試料を加えて培養 10 日後に, 10% グルタルアルデヒド/PBS を 200 μ l 加え, 30 分放置して細胞を固定した。培地を除去後, さらに 10% グルタルアルデヒド/PBS を 500 μ l 加え, 1 時間放置した。水で 2 回洗浄後, 0.5% オイルレッド O/2-プロパノールを加え, 1 時間放置して蓄積した脂肪を染色した。3 回の水洗い後, 500 μ l の 2-プロパノールを加えて細胞内の色素を溶出した。このうち 200 μ l を 96 ウェルマイクロプレートに分取し, マイクロプレートリーダーを用いて検出波長 570nm で吸光度を測定した。3 回測定し, 脂肪量を脂肪蓄積率 (%) に換算した。

2.6 脂肪蓄積率の算出方法

脂肪蓄積率の算出は, 次のようにおこなった。CS 培地のみで 14 日間培養した細胞の脂肪量を 0%, CS 培地で 3 日間培養後に FBS 培地で 11 日間培養した細胞の脂肪量を 100% とした時の被検試料を加えた培地で培養した細胞の脂肪量を脂肪蓄積率に換算した (図 2)。3T3-L1 細胞は長期間培養すると分化誘導処理をしなくても脂肪を蓄積し始める。そのため, 被検試料を加えた細胞の正味の脂肪量は分化誘導しない細胞の脂肪量を差し引いて求め, 脂肪蓄積率に換算した。

2.7 杜仲茶抽出液の HPLC 分析

杜仲茶煮沸抽出液を HPLC/DAD で分析した。ポンプは JASCO PU-2080, 検出器は JASCO MD-2010 plus を用いた。カラムは Cadenza CD-18 (150mm \times 4.6mm i.d.: Imtact), 流速は 1ml/min, 注入量は 100 μ l, 定量波長は 280nm を用いた。溶離液は A 液を 5% 酢酸, B 液をメタノールとしたグラジエント分析でおこなった。グラジエント条件は 0 分 (B:5%), 20 分 (B:15%), 30 分 (B:40%), 50 分 (B:99%), 60 分 (B:99%) である。クロマトグラムより標準品とリテンションタイム (Rt) が一致したものを混合して HPLC に注入して分析する方法 (コ・クロマトグラフィー) により確認し, さらに標準品を用いた検量線から定量した。

2.8 活性物質の分離方法

活性物質を探索するために, 煮沸抽出液の EtOAc 抽出物を別に大量に調製し, 3T3-L1 の脂肪蓄積抑制活性を指標に, シリカゲル (SiO₂) カラムクロマトグラフィーで活性物質の単離精製を試みた。分離方法は図 3 に示したように SiO₂ カラムクロマトグラフィー (シリカゲル G60; 100 g, 70 \times ϕ 4.5cm) で分画し, そのうち抑制活性を示した 80~100% 酢酸エチル/*n*-ヘキサン (EtOAc/Hex) 分画を再度 SiO₂ カラムクロマトグラフィーで精製し, 60% EtOAc/Hex 分画を薄層クロマトグラフィー (TLC) により分取した。

2.9 乾燥杜仲葉・その他茶類抽出液の調製およびその活性測定

乾燥杜仲葉, 杜仲茶, ほうじ茶, 緑茶, 紅茶, ウーロン茶, プーアル茶, コーヒー, ハトムギ茶, 麦茶, そば茶, 韃靼そば茶, グアバ茶, 甜

茶，ルイボスティーの抽出液を調製し，茶類の 3T3-L1 活性を測定した。茶抽出液の調製は実際にお茶を飲用する場合に近い条件として，熱水抽出とした。それぞれの茶 10 g を熱水で 5 分抽出後，ろ過して 100ml とした。乾燥杜仲葉は 10 g を EtOH で一夜静置し，ろ過して 100ml とした。活性試験は各抽出液を培地最終濃度として 10 μ l/ml FBS 培地になるように添加しておこなった。併せて，同定した脂肪蓄積抑制物質を前述した HPLC 条件で測定した。

3. 結果と考察

3.1 杜仲茶成分の定量および脂肪蓄積活性

予備試験として煮沸抽出物，熱水抽出物，EtOH 抽出物の 3 種について 3T3-L1 活性を測定したところ，脂肪蓄積率は $-55 \pm 23\%$ ， $-10 \pm 4\%$ ， $80 \pm 32\%$ といずれも抑制活性を示した。さらに，杜仲茶煮沸抽出液を調製し，HPLC 測定し（図 4），文献⁴⁾を参考に標準品と比較定量した。その結果，杜仲茶煮沸抽出液には茶葉 1 g あたりに換算すると，ピロガロール 0.8 mg，プロトカテキ酸 0.3 mg，(+)-カテキン 1.8 mg，クロロゲン酸 9.6 mg を確認し，併せて，これら標準品の 3T3-L1 活性を測定した（表 1，図 5）。ピロガロール以外は抑制傾向を示したが，杜仲茶煮沸抽出液の強い抑制活性はこれだけでは説明できず，また，フェノール類と思われる未同定ピークも多くあったので，さらに活性を指標に単離精製を試みた。

3.2 活性成分の単離

EtOAc 抽出後の水層を多孔性樹脂 HP-20 を用いて分画すると活性が失われ，有効成分の同定は困難と考えられた。一方，HPLC で確認したところ UV 吸収のある成分の脂溶性分画への移行率はそれぞれ 10~50% 程度あったことから，次に脂溶性分画を SiO₂ カラムクロマトグラフィーで分画した。強い抑制活性を示した 80~100% EtOAc/ Hex 分画を再度 SiO₂ カラムクロマトグラフィーにより分画し，60% EtOAc/ Hex 分画を TLC により分取した。その結果，得られた分画が分画前に比べて 3T3-L1 に対する活性がそれぞれ強く，そのなかで NMR 測定の結果より単一化合物と思われる分画を『化合物 A』とし，構造決定を試みた。

3.3 活性成分の同定

『化合物 A』は IR と NMR の解析結果より，5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド（HMF）と推定し，標準品の NMR と比較したところ，完全一致したので構造を確定した（図 6）。HMF は既知の化合物で，グルコースやフルクトース等の還元糖を加熱したときに得られる化合物である。焙煎の際に生じたと考えられ，含有量は杜仲茶 1 g あたりに換算すると 4.7mg，HMF の活性は -21% と強く，杜仲茶の 3T3-L1 に対する脂肪蓄積抑制活性には HMF が大きく寄与していると推定した（表 1）。また，HMF が焙煎によって生成したことを確認するために，杜仲茶熱水抽出液と乾燥杜仲葉 EtOH 抽出液を調製し，HMF 量を測定した。その結果，HMF 量は乾燥杜仲葉で 0.15mg/100ml，焙煎後の杜仲茶では 3.4mg/100ml と約 20 倍に増加し，脂肪蓄積抑制活性は 49.5% から 25.2% に増加した。杜仲茶に含まれる HMF は主に焙煎工程で生成したものと考えられた（表 2）。

3.4 その他健康茶類の HMF 量および 3T3-L1 活性

健康茶を含めたその他茶類について HPLC により HMF 量を定量し，3T3-L1 活性を比較した（表 2）。緑茶やウーロン茶等の *Camellia sinensis* を原料とする日本茶や中国茶は 3T3-L1 抑制活性が強く，エピガロカテキンガレート等のガレート類によるとの報告がある⁵⁾。しかし，杜仲茶煮沸抽出液の HPLC 分析によりガレート類は検出されず，杜仲茶の 3T3-L1 活性は主に HMF によると推定した。その他の健康茶では，甜茶の HMF 量が多く，他の抑制物質との総合作用として活性に寄与していると推定した。また，ルイボスティー，グァバ茶が強い抑制活性を示したが，活性成分については今後の課題である。健康茶類の 3T3-L1 活性と HMF 量の関連について調べたのははじめての報告である。

3.5 HMF の活性

これまで HMF の活性としては，ラットにおける血球凝集抑制⁶⁾，ショウジョウバエ幼虫に対する殺虫効果⁷⁾，ハチミツ中の抗酸化活性⁸⁾ が報告されているが，3T3-L1 細胞の脂肪蓄積抑制活性ははじめての報告である。HMF はパン，ハチミツ，コーヒー，リンゴジュース，シェリー酒，ビール，ドライフルーツ等の我々が日常一般に摂取している食品に含まれる成分であり

9), 食品の加熱加工や保存によっても生成し¹⁰⁾, 毒性はないと考えられる。これまでの報告では, 細胞毒性, 変異原性, DNA 損傷等を調べることにより, 健康に深刻な影響を及ぼさないとされており¹¹⁾, また, 発がん性も否定されている¹²⁾。杜仲茶中の血圧降下成分に加えて, 本実験で肥満をコントロールする成分として HMF が同定されたことは, 杜仲茶が肥満を基盤とする高脂血症や動脈硬化症の予防や改善に有効であることを裏付けるものである。普段の食事内容に反映させ, 生活習慣病の予防や改善を図るためには有効な食品素材であると考えた。

4. まとめ

杜仲茶抽出液を3種調製し, 3T3-L1 脂肪蓄積活性を測定したところ, 活性の強さは煮沸抽出液, 熱水抽出液, EtOH 抽出液の順であった。最も強い活性を示した杜仲茶煮沸抽出液より, 強い脂肪蓄積抑制活性を示す HMF を単離同定した。焙煎前後の HMF 量と脂肪蓄積活性を比較することにより, HMF は焙煎によって生成し, 杜仲茶の脂肪蓄積抑制活性の活性本体であると推定した。

参考文献

- 1) Green H., Meuth M.: An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture, *Cell*, **3**, 1974, 127-133.
- 2) 川崎晃一, 上園慶子, 中沢慶久: 特定保健用食品“杜仲葉配糖体”の降圧機序とその臨床応用. *J. Health Sci.*, **22**, 2000, 29-36.
- 3) 仲佐輝子, 山口真由美, 沖中靖, 目鳥幸一, 高橋周七: 高脂肪高コレステロール食投与ラットの血漿および肝臓中の脂質に及ぼす杜仲葉抽出液の影響, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **69**, 1995, 1491-1498.
- 4) Deyama T., Nishibe S., Nakazawa Y.: Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Siberian ginseng, *Acta Pharmacol. Sin.*, **22**, 2001, 1057-1070.
- 5) Watanabe J., Kawabata J., Niki R.: Isolation and identification of acetyl-CoA carboxylase inhibitors from green tea (*Camellia sinensis*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1998, 532-534.
- 6) Matsuda H., Tsukioka Y., Moriyama K., Shintani T., Asano T., Shiimoto H., Kubo M.: Studies on *Rehmanniae radix*. V. 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, active constituent of the steamed root of *Rehmannia glutinosa* having increasing activity of erythrocyte deformability in rats, *Nat. Med.*, **58**, 2004, 34-37.
- 7) Miyazawa M., Anzai J., Fujioka J., Ishikawa Y.: Insecticidal compounds against *Drosophila melanogaster* from *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc, *Nat. Prod. Res.*, **17**, 2003, 337-339.
- 8) Gheldof N., Wang X.H., Engeseth N.J.: Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 5870-5877.
- 9) Schultheiss J., Jensen D., Galensa R.: Determination of aldehydes in food by high-performance liquid chromatography with biosensor coupling and micromembrane suppressors, *J. Chromatogr. A.*, **880**, 2000, 233-242.
- 10) 木村進, 中林敏郎, 加藤博通編著: 食品の変色の化学, 光琳, 1995, pp.291-321.
- 11) Janzowski C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Eisenbrand G.: 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione, *Food Chem. Toxicol.*, **38**, 2000, 801-809.
- 12) Corpet D.E., Cassand P.: Lack of aberrant crypt promotion and of mutagenicity in extracts of cooked casein, a colon cancer-promoting food, *Nutr. Cancer*, **24**, 1995, 249-256.

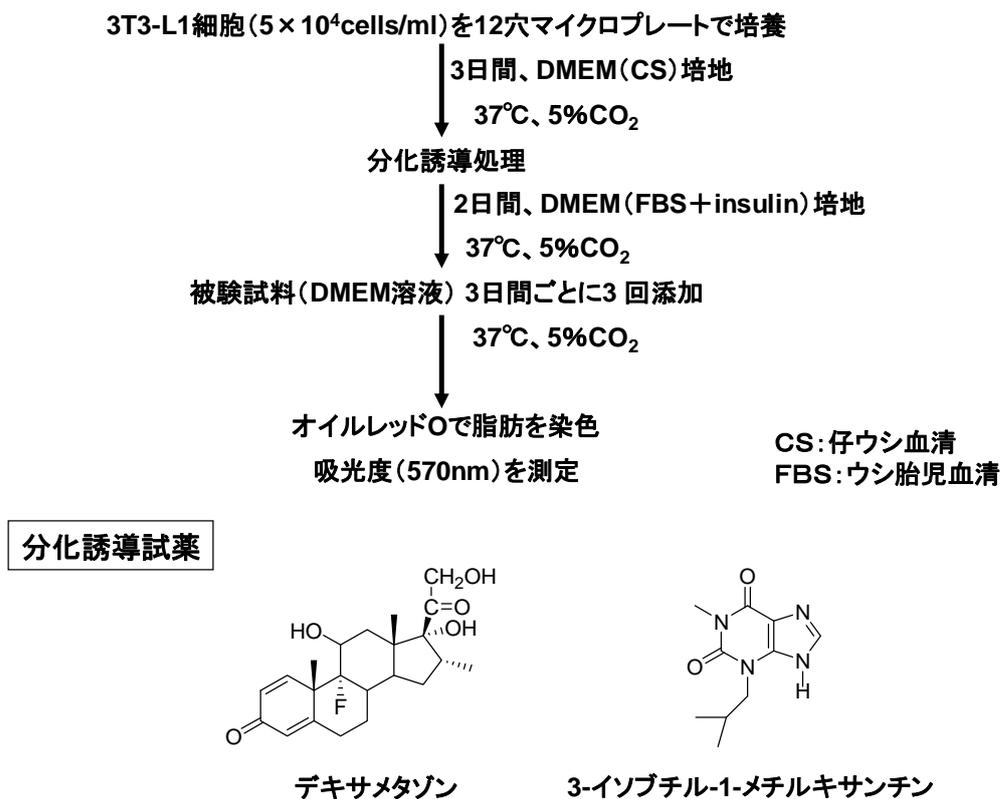


図1 3T3-L1 活性測定方法

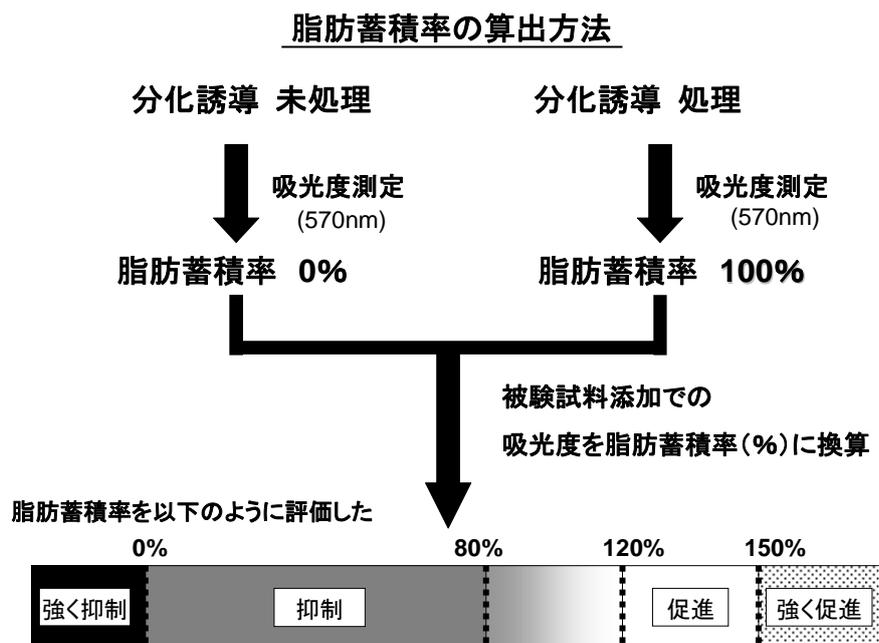


図2 脂肪細胞における脂肪蓄積率 (%) の算出方法と評価

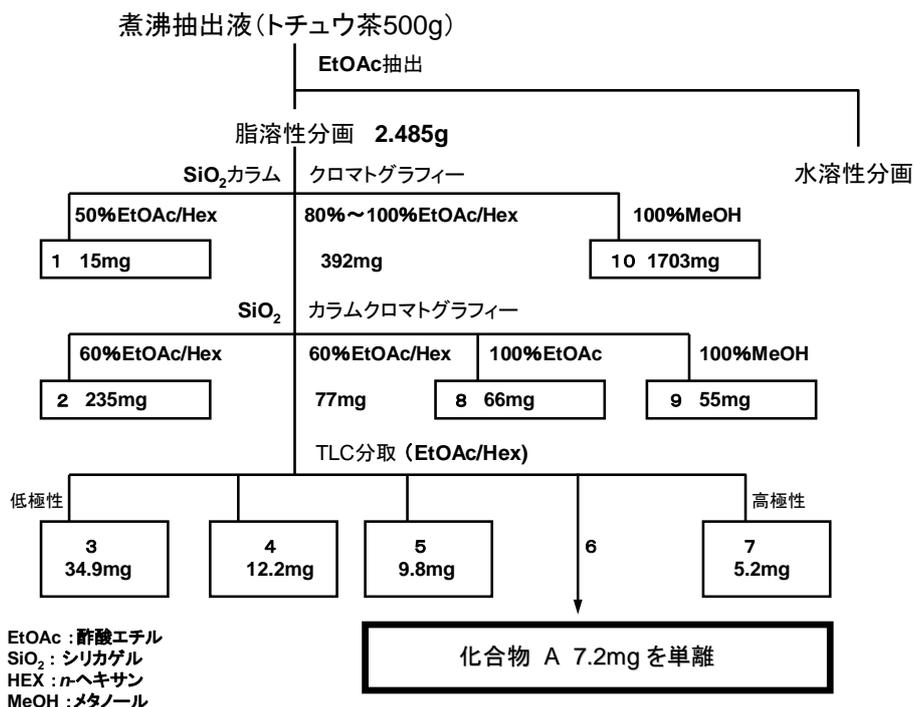


図3 活性物質の分離方法

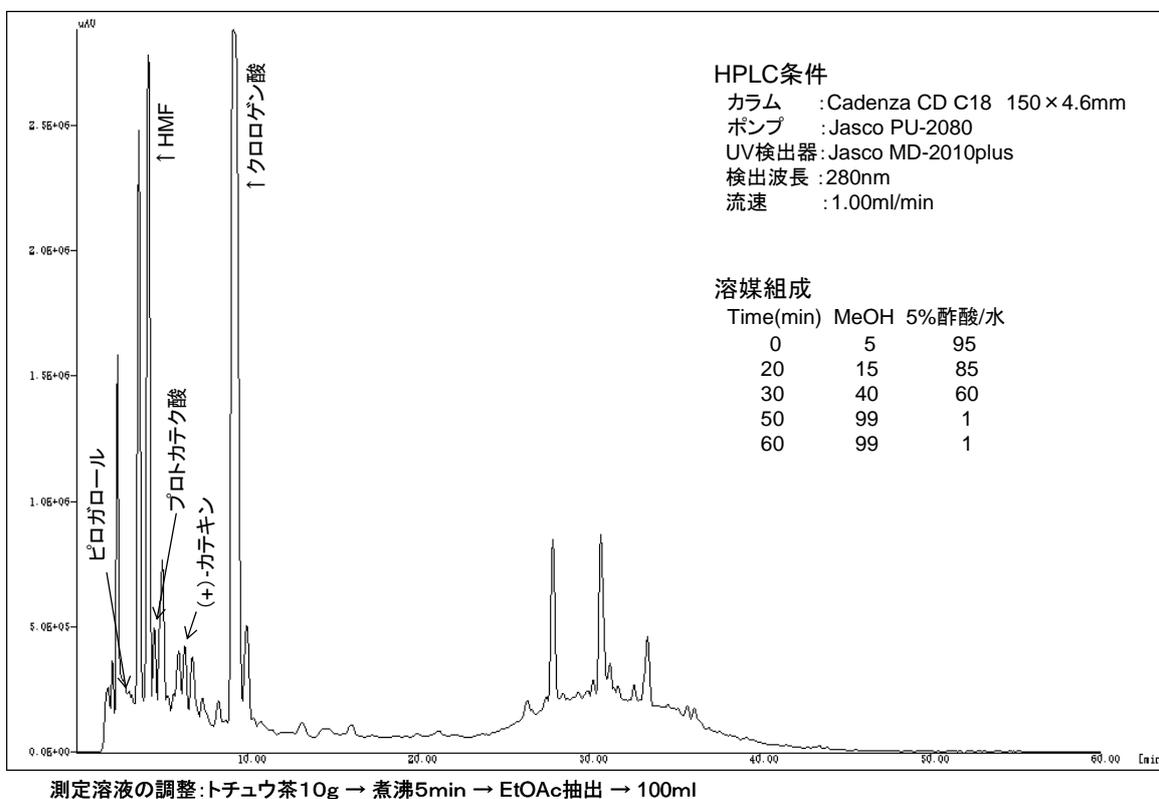


図4 杜仲茶煮沸抽出液の HPLC クロマトグラム

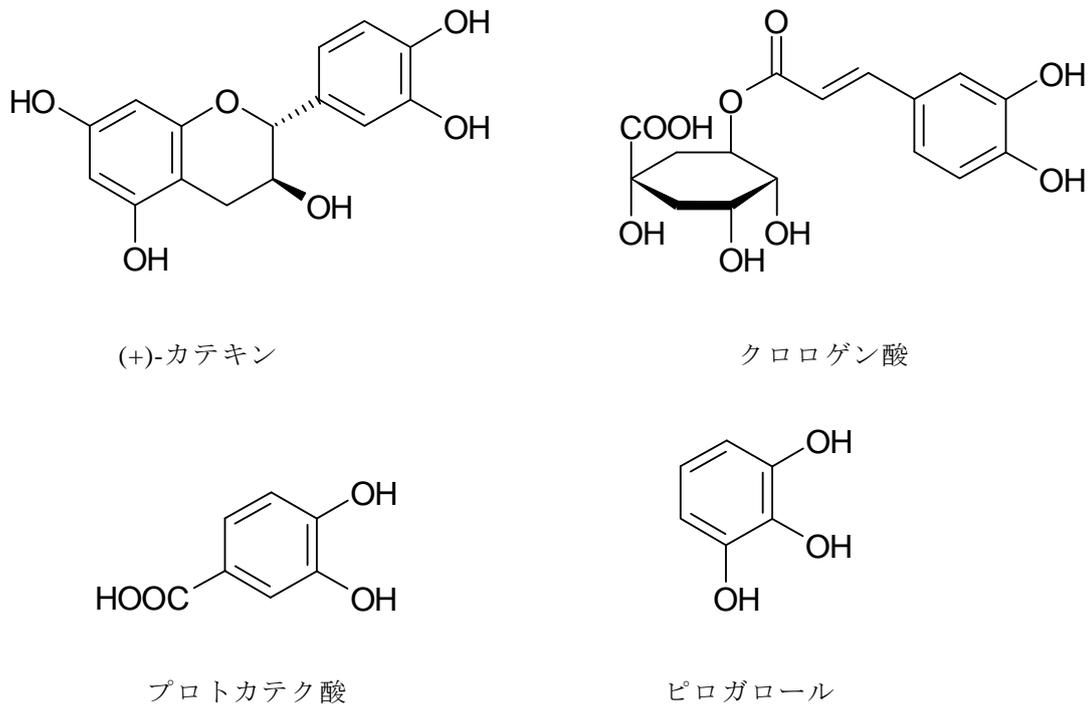


図5 HPLC分析により杜仲茶より同定した化合物

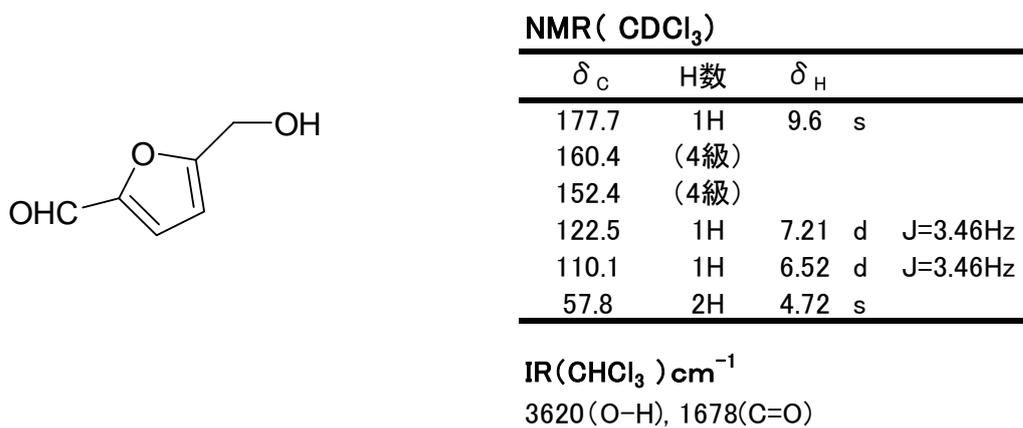


図6 5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒド(HMF)およびNMR, IRデータ

表1 杜仲茶成分および3T3-L1細胞に対する脂肪蓄積活性

ピーク No.	Rt (min)	化合物名	杜仲茶含有量 (mg/g 茶葉)	3T3-L1 活性 脂肪蓄積率(%) [†]
1	2.3	unknown 1		
2	3.0	ピロガロール	0.8	102 ± 2
3	3.6	unknown 2		
4	4.2	HMF	4.7	-21 ± 12 *
5	4.5	プロトカテキ酸	0.3	89 ± 3
6	6.3	(+)-カテキン	1.8	74 ± 7 *
7	9.1	クロロゲン酸	9.6	94 ± 2
8	27.9	unknown 3		
9	30.7	unknown 4		
10	33.4	unknown 5		

* 平均値 ± 標準誤差, n=3, p<0.05

† 活性試験は最終濃度100μM/mlでおこなった

表2 乾燥杜仲葉・その他健康茶のHMF量および3T3-L1脂肪蓄積活性

茶*の種類	原材料植物学名	HMF (mg/100ml)	3T3-L1 活性*** (%)
杜仲茶	<i>Eucommia ulmoides</i> . Oliver	3.40	25.2
乾燥杜仲葉**	<i>Eucommia ulmoides</i> . Oliver	0.15	49.5
緑茶	<i>Camellia sinensis</i>	0.16	-36.6
ほうじ茶	<i>Camellia sinensis</i>	0.45	-13.6
ウーロン茶	<i>Camellia sinensis</i>	0.37	-31.8
プーアル茶	<i>Camellia sinensis</i>	0.01	-14.1
紅茶	<i>Camellia sinensis</i>	1.73	-18.3
コーヒー	<i>Coffea arabica</i> L.	0.24	83.4
むぎ茶	<i>Hordeum vulgare</i> L.	3.60	80.1
ハトムギ茶	<i>Coix lacryma-jovi</i> var. <i>frumentacea</i>	2.72	79.9
ソバ茶	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench	0.84	70.3
ダツタンソバ茶	<i>Fagopyrum tartaricum</i>	0.04	85.9
レイボスティー	<i>Aspalathus Linearis</i>	0.02	-10.4
甜茶	<i>Rubus suavissimus</i> S. Lee	6.21	-27.2
グアバ茶	<i>Psidium guajava</i> L.	0.65	-30.0

*茶は10gを熱水100ml(5分間)で抽出した。

**乾燥杜仲葉10gをEtOH100ml(一夜)で抽出した。

***活性試験は茶抽出液 10 μ l/ml 培地でおこなった。