

ヤーコン地上部の α -グルコシダーゼ阻害活性成分と血糖上昇抑制活性

寺田澄男*, 伊藤紀久夫, 高道宏, 生越直仁, 野口直人, 小出裕治
全薬工業株式会社 中央研究所

**α -Glucosidase Inhibitory Active Components and Glucose Level Lowering Effect
of Yacon Aerial Part Extract**

Sumio Terada*, Kikuo Ito, Michihiro Taka, Naohito Ogose,
Naoto Noguchi, Yuji Koide

Research Laboratory, Zenyaku Kogyo Co. Ltd., 33-7, Ohizumi-Machi 2, Nerima-Ku, Tokyo 178-0062, Japan

(Received December 10, 2002)

Hot water extract of the aerial parts of Yacon (*Smallanthus sonchifolia*, Compositae) suppressed the elevation of glucose levels after loading starch in normal rats. Activity-guided fractionation of the extract for maltase inhibition resulted in the isolation of three known dicaffeoylquinic acids. The structure of the compound showing the most potent activity (IC_{50} : $26 \mu\text{g/mL}$) was determined as 3,4-dicaffeoylquinic acid (3,4-DCQA) by spectroscopic evidence. These dicaffeoylquinic acids also showed α -amylase inhibitory activities. 3,4-DCQA and 3,5-DCQA dose-dependently exhibited hypoglycemic activities after loading starch indicating that dicaffeoylquinic acids in the Yacon extract are the main active components related to the reduction in blood glucose levels.

Keywords: Yacon, *Smallanthus sonchifolia*, hypoglycemic activity, α -glucosidase inhibitory activity, dicaffeoylquinic acid

緒言

ヤーコン (*Smallanthus sonchifolia*) はアンデス山地原産のキク科植物である。地下部には甘藷状の塊根があり、アンデスでは“apple of the earth”と呼ばれ、生食されている他、若葉はスープやサラダにして食されている¹⁾。日本には1985年にニュージーランドを経て導入され、Ohyamaら²⁾により多量のフラクトオリゴ糖を含むことが明らかにされたことを契機に利用研究が進み現在では国内各地で栽培されている。

我々はヤーコン地上部の熱水抽出エキスを血糖上昇抑制活性を見出し、また肥満を伴わないII型糖尿病モデルであるKKマウスを用いたブドウ糖負荷試験において、食後過血糖抑制作用を有することを確認している。このヤーコン地上部の

血糖上昇抑制活性発現には胃内グルコース排出速度の遅延効果、 α -グルコシダーゼ阻害など複数の機序が関与していることを報告している³⁾。

最近、Aybarら⁴⁾もヤーコン葉の熱水エキスを血糖値を下げることを報告しているが、その活性本体は未だ明らかではない。今回、ヤーコン地上部熱水エキスをマルターゼ阻害活性を指標に分離を進めた結果、3,4-ジカフェオイルキナ酸が強力かつ選択的なマルターゼ阻害活性を有することを見出した。また、共存するジカフェオイルキナ酸の位置異性体にアミラーゼ阻害活性が認められ、これらのジカフェオイルキナ酸は糖負荷試験においても有意な血糖上昇抑制作用を示したので報告する。

結果

1. ヤーコン熱水エキスのデンプン負荷血糖上昇抑制作用

正常ラットにデンプン 2 g/kg と同時にヤーコン熱水エキス (YWE) を経口投与した時の血糖値の推移を Fig.1 に示した。

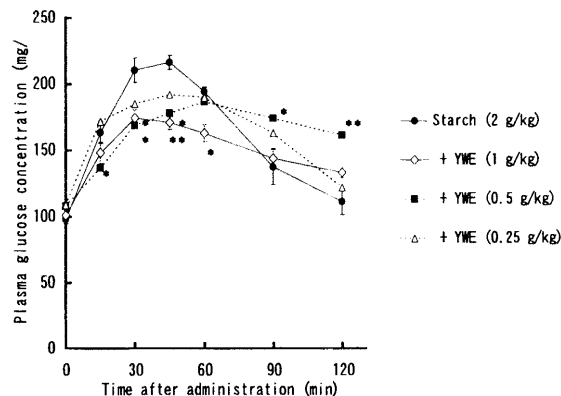


Fig. 1. Effects of YWE on the glycemic response after starch loading in normal rats. Sample was administered orally together with loading of starch (2 g/kg). Each point shows the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$ versus controls

対照群に比べ、YWE 0.5 g/kg 投与により 30 分及び 45 分後の血糖値が有意に低値を示した ($P < 0.05$)。また、YWE 1 g/kg 投与群では 15 分後から 60 分後までの血糖値が対照群に比べ有意に低値を示した ($P < 0.05$, 45 分のみ $P < 0.01$)。

2. α -グルコシダーゼ阻害活性成分の分離

YWE の各種の α -グルコシダーゼに対する阻害活性を検討したところ、YWE は糖尿病予防に有用とされている桑葉よりは弱いもののウーロン茶 (ヒト唾液アミラーゼ)⁵⁾ や緑茶エキス (パン酵母由来 α -グルコシダーゼ)⁶⁾ と同等の α -グルコシダーゼ阻害活性を示した。そこでラット小腸粘膜由来マルターゼ阻害活性 IC_{50} (inhibitory concentration, 50%) を指標として YWE (IC_{50} : 9.8 mg/mL) の分画を進めたところ、n-ブタノール可溶部に活性 (IC_{50} : 6.5 mg/mL) が移行した。これを HP20 カラムクロマトグラフィーに付し、水、50%MeOH/水、MeOH で順次溶出させると、マルターゼ阻害活性は 50%MeOH/水 (IC_{50} : 2.7 mg/mL) 溶出画分に濃縮された。この画分をセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーに付して各フラクション毎にマルターゼ阻害活性を測定したところ、Fig.2 に示す様に MeOH-水 (5:5) で溶出される P-1 及び MeOH-水 (6:4) で溶出される P-2 に阻害活性のピークが認められた。P-1 は NMR 及び FAB-MS よりカフェー酸と同定したが、使用したグ

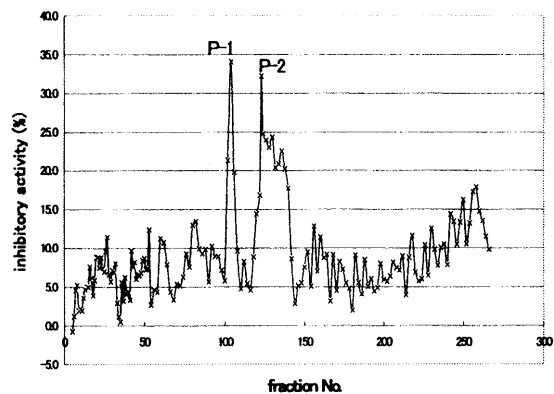
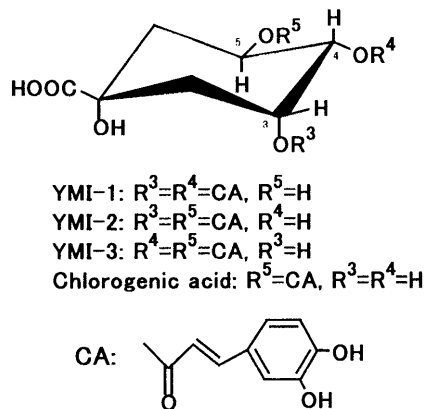


Fig. 2. Maltase inhibitory activities of Sephadex LH-20 chromatography fractions

ルコース測定キットの測定原理⁷⁾であるグルコースオキシダーゼ-パーオキシダーゼ系を阻害しており P-1 のマルターゼ阻害活性は見かけ上のものであった。マルターゼ阻害活性画分 P-2 は淡黄色で塩化第二鉄試液陽性であり、UV スペクトルではカフェー酸残基に由来する特徴的な吸収を示すことから、320 nm を検出波長として HPLC により分離精製し、YMI-1, YMI-2, YMI-3 及び YMI-4 と仮称する成分を得た。

3. マルターゼ阻害活性成分の構造



YMI-4 は NMR, 高分解能 FAB-MS によりイソケルシトリン⁸⁾と同定した。また、YMI-1, YMI-2 及び YMI-3 は高分解能 FAB-MS から何れも分子式 $C_{25}H_{23}O_{12}$ が与えられ、UV スペクトルにおいても 244 及び 328 nm にカフェー酸に由来する吸収を共通に示した。これらの物質はキナ酸のジカフェオイル誘導体と推定され、YMI-1, YMI-2 及び YMI-3 はエステル結合の位置が異なる関係にあると考えられた。ジカフェオイルキナ酸はコーヒー豆やキク科植物に見出されており、それらの NMR データ⁹⁾との比較により、YMI-1, YMI-2 及び YMI-3 は各々 3,4-ジカフェオイルキナ酸 (3,4-DCQA), 3,5-ジカフェオ

イルキナ酸 (3,5-DCQA), 4,5-ジカフェオイルキナ酸 (4,5-DCQA) と同定した。これらの物質の α -グルコシダーゼ阻害活性を測定したところ, YMI-1 (3,4-DCQA) は最も強いマルターゼ阻害活性 (IC_{50} : $26 \mu\text{g/mL}$) を示し, その阻害様式は非拮抗的であった (Fig.3)。また, 位置異性体の 3,5- 並びに 4,5-DCQA を含む 3 種の DCQA は, ほぼ同等の α -アミラーゼ阻害活性を示した (Table 1)。

Table 1. α -Glucosidase inhibitory activities

	IC_{50} : $\mu\text{g/mL}$		
	amylase	maltase	sucrase
YWE		9.8*	11.3*
Chlorogenic acid	4500	>1000	>1000
3,4-DCQA	220	26	850
4,5-DCQA	150	380	2400
3,5-DCQA	250	470	1400
Isoquercitrin	2700	1000	>1000
Caffeic acid	1600	>300	>300
Quinic acid	-	>300	>1000
Acarbose	0.42	2.6	4.0

*:mg/mL

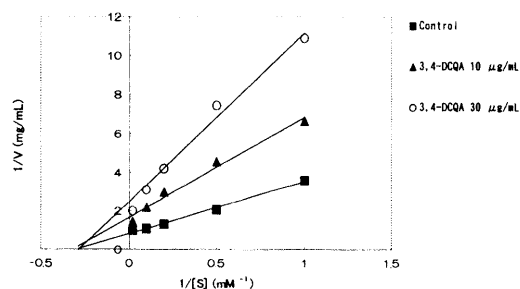


Fig. 3. Lineweaver-Burk plots of the inhibitory effects of 3,4-DCQA on maltase

以上の様にヤーコン熱水エキス (YWE) の α -グルコシダーゼ阻害活性は DCQA 類によることが明らかとなった。カフェー酸及びクロロゲン酸は α -グルコシダーゼ阻害活性を示さないことから活性の発現や強さにカフェー酸エステルの数や結合位置が重要であることが明らかとなった。

なお, これらの物質に α -グルコシダーゼ阻害が見出されたこと, 並びにヤーコンよりの単離は何れも今回の報告が最初である。

4. マルターゼ阻害活性成分の *in vivo* 活性試験

α -グルコシダーゼ阻害薬は, 食前或いは食直前に投与される¹⁰⁾ことが多いことから, 検体投与をデンプン負荷 30 分前

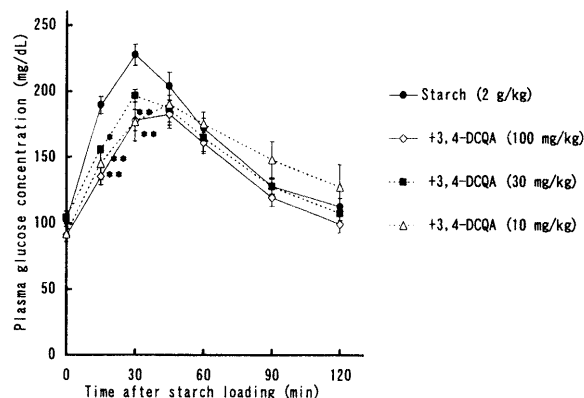


Fig. 4. Effects of 3,4-DCQA on the glycemic response after starch loading in normal rats. Sample was administered orally before loading of starch (2 g/kg). Each point shows the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. *:P<0.05 and **:P<0.01 versus controls

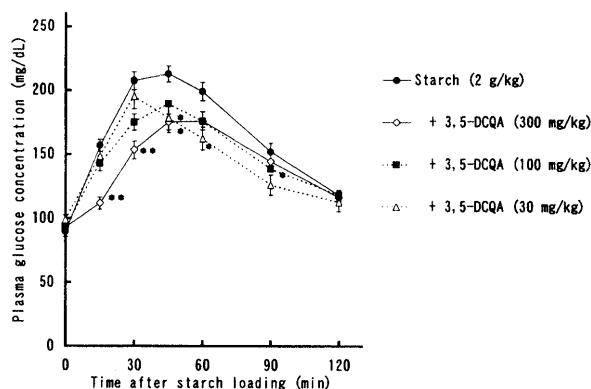


Fig. 5. Effects of 3,5-DCQA on the glycemic response after starch loading in normal rats. Sample was administered orally before loading of starch (2 g/kg). Each point shows the mean $\pm$ S.E. of 5 animals. *:P<0.05 and **:P<0.01 versus controls

に設定した。

YMI-1 (3,4-DCQA) をラットに経口投与し, その 30 分後にデンプンを経口負荷した場合の血糖値の推移を Fig.4 に示した。30 mg/kg の投与量で C_{max} (最高血中濃度) に有意差 ($P<0.05$) が認められ, 更に 100 mg/kg 投与により C_{max} と AUC (血中濃度曲線下面積) が有意に (各々 $P<0.01$, $P<0.05$) 低値を示した。

また 3,5-DCQA では 300 mg/kg ($P<0.01$) 及び 100 mg/kg ($P<0.05$) の経口投与で対照群に比べ AUC に有意差が認められたことから, 3,5-DCQA は 100 mg/kg 以上の投与量で血糖上昇抑制活性を示すことが明らかとなった (Fig.5)。

次に今回単離された 3 種の DCQA の内, 最も含量の高い 3,5-DCQA について産地の異なるヤーコンから調製したエキ

ス中の含量とマルターゼ阻害活性を測定した (Table 2). この数値を基に相関を調べたところ, 3,5-DCQA 含量とマルターゼ阻害活性には相関係数 $r = -0.906$, 有意水準 $\alpha = 0.001$ で強い相関が認められた (Fig.6).

Table 2. The contents of 3,5-DCQA and maltase inhibitory activities of Yacon extracts¹⁾

Producing District	Part	Contents of 3,5-DCQA (μ g/g)	Maltase inhibitory activities (IC_{50} , mg/mL)
Kyoto	Leaf	136.5	13.2
	Stem	27.7	20.9
Hokkaido	Leaf	295.4	9.8
	Stem	102.1	16.8
Niigata	Leaf	30.8	27.8
	Stem	59.4	14.4
	Petiole	9.0	69.4
Unknown	Leaf	4.6	56.8
	Stem	34.3	18.8
Korea	Leaf	14.3	31.1
	Stem	9.7	26.0

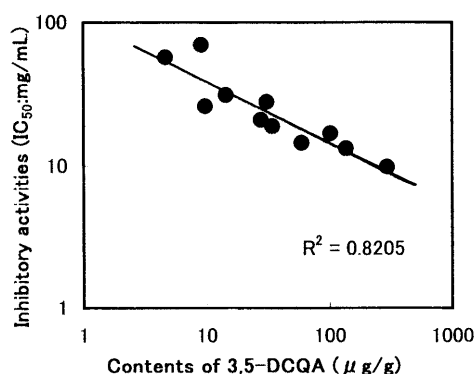


Fig. 6. The correlation between contents of 3,5-DCQA and maltase inhibitory activities

以上の結果から, これらの DCQA 類がヤーコン地上部熱水エキスの α -グルコシダーゼ阻害活性に関する重要な成分であることが証明された。

5. ヤーコン熱水エキスの安全性試験

ICRマウスを用いた単回投与安全性試験においてヤーコン熱水エキスを技術的に投与可能な最大量である 8 g/kg を投与しても毒性徴候および死亡例は認められなかった。

8 日間反復投与安全性試験においても一般状態, 血液生化学検査値, 病理学的検査に特記すべき毒性所見は認められず, ヤーコン熱水エキスは高い安全性を有すると考えられた。また観察期間終了後の生存動物についても病理解剖学的検査を行ったが, 異常所見は認められなかった。

実験の部

NMR は GX400 (JEOL), 高分解能 FAB-MS は JMS-SX102A (JEOL) にて測定した。UV スペクトルは UV-2100S (Shimadzu) により測定した。HPLC は Waters 600 Multisolvant Delivery System (Millipore) を用いた。

1) 実験動物

動物は Wistar 系雄性ラット (7 週齢), ICR 系雄性マウス (6 週齢) を用いた。いずれもチャールスリバー社より購入し, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$, 換気 13 回/時間, 12 時間明暗サイクル (明期: 7:00~19:00, 暗期: 19:00~7:00) に設定された飼育室で一週間馴化した後実験に用いた。動物はポリカーボネートケージ (ラット用: $W22 \times D38 \times H18$ cm; マウス用: $W16 \times D27 \times H13$ cm) に収容し, オートクレーブ滅菌 (121°C , 15 min) した飼料 (CRF-1: オリエンタル酵母株) 及び水を自由摂取させた。実験は 1 群 5 匹で行った。

2) ヤーコン地上部熱水エキスの調製

ヤーコンは 1994 年東京都練馬区大泉町 4 丁目の全薬工業 (株) 中央研究所圃場にて, 茨城大学農学部月橋輝男教授より恵与頂いたペルー A 系の種芋を用いて栽培した。乾燥したヤーコン地上部 100 g を 2.5 L の沸騰水で 10 分間抽出し, ガーゼ濾過後濾液を減圧濃縮した後, 終夜凍結乾燥し, 21.5 g のヤーコン熱水エキス (YWE) を得た。

3) 投与検体の調製

YWE 及びデンプンは蒸留水に溶解し, DCQA は少量のマクロゴール 400 に溶解し, 蒸留水で希釈して投与した。

4) 正常ラットデンプン負荷試験

一晩絶食させた 7 週齢のラットに, 2 g/kg のデンプンと YWE を同時に経口投与した後, 尾静脈より経時的 (投与前, 投与後 15, 30, 45, 60, 90, 120 分) に採血し, グルコース濃度をグルコースオキシダーゼ法により測定した。

5) α -アミラーゼ阻害活性

α -アミラーゼ阻害活性は Dahlqvist の方法¹²⁾を改変して行い, 生成した還元糖をジニトロサリチル酸 (DNS) 法で定量した。IC₅₀ は試料添加の場合のマルトース単位 (Sa), 試料未添加時の Blank のマルトース単位 (Sb), Control 及び Blank のマルトース単位 (C 及び B) から次式により求めた。

$$\text{阻害活性}(\%) = 100 - \{(Sa - Sb) / (C - B)\} \times 100$$

6) マルターゼ及びスクラーゼ阻害活性

粗酵素画分は Wistar 系雄性ラット (10～15 週齢) の小腸粘膜より Yoshikuni¹³⁾の方法により調製し, 1 分間に $1\ \mu\text{mol}$ の基質を消費する酵素活性を 1 unit とし, マルターゼ活性測定には 1 unit, スクラーゼ活性測定には 0.15 unit の酵素量を用いた。阻害活性は Horii ら¹⁴⁾の方法により測定した。

7) α -グルコシダーゼ阻害活性成分の分離

YWE 200 g を 2 L の水に溶解し水飽和 n-ブタノールで抽出 (500 mL $\times$ 4 回) 後, 濃縮乾燥し 5.21 g の淡褐色残渣を得た。n-ブタノール可溶部をダイアイオン HP-20 (三菱化学) カラム (35 ϕ $\times$ 120 mm) クロマトグラフィーに付し, 水, 50%MeOH/水, MeOH で各々 500 mL 溶出後, 濃縮乾燥し 50%MeOH/水溶出部 1.15 g を得た。この内, 1 g を Sephadex LH-20 (ファルマシア) カラム (25 ϕ $\times$ 360 mm) クロマトグラフィーにかけ, MeOH-水 (3:7) 700 mL, MeOH-水 (5:5) 500 mL, MeOH-水 (6:4) 1000 mL, MeOH-水 (7:3) 700 mL で順次溶出し, 各分画 (10 mL) のマルターゼ阻害活性を測定した。活性を示した MeOH-水 (6:4) 溶出部の Fr.130～Fr.135 を集めマルターゼ阻害画分 P-2, 100 mg を得た。P-2 は HPLC [カラム: YMC-Pack ODS-A (10 ϕ $\times$ 250 mm), 移動相: MeOH-5%AcOH/水 (2:8 $\rightarrow$ 3:7, 1.6 mL/min, linear, 30 min)] で精製し, YMI-1 (2 mg), YMI-2 (12 mg), YMI-3 (2 mg) 及び YMI-4 (4 mg) を得た。

YMI-1 (3,4-ジカフェオイルキナ酸)⁹⁾

黄色粉末

High Resolution FAB-MS (negative) m/z : 515.1200 ($M^+ - H$) for $C_{25}H_{23}O_{12}$

UV λ max (EtOH) nm (log ϵ): 244 (4.28), 328 (4.50)

YMI-2 (3,5-ジカフェオイルキナ酸)⁹⁾

黄色粉末

High Resolution FAB-MS (negative) m/z : 515.1214 ($M^+ - H$) for $C_{25}H_{23}O_{12}$

UV λ max (EtOH) nm (log ϵ): 244 (4.27), 328 (4.51)

YMI-3 (4,5-ジカフェオイルキナ酸)⁹⁾

黄色粉末

High Resolution FAB-MS (negative) m/z : 515.1228 ($M^+ - H$) for $C_{25}H_{23}O_{12}$

UV λ max (EtOH) nm (log ϵ): 244 (4.29), 328 (4.52)

YMI-4 (イソクエルシトリン)⁸⁾

淡黄色粉末

High Resolution FAB-MS (negative) m/z : 463.0891 ($M^+ - H$) for $C_{21}H_{20}O_{12}$

UV λ max (EtOH) nm (log ϵ): 260 (4.29), 362 (4.22)

8) 3,5-DCQA の定量

YWE の酢酸エチル可溶部を, 移動相: リン酸 (1 $\rightarrow$ 1000)-THF (31:9), 流速: 1.0 mL/min., カラム: YMC-GEL ODS-A 120-S5 (4.6 ϕ $\times$ 150 mm), 検出: UV 320 nm の HPLC 条件で 3,5-DCQA (保持時間 24 min) を面積法により定量した。

9) 単回投与安全性試験

ICR マウスは被験物質投与前 17 時間と投与後 5.5 時間は絶食させた。YWE の投与量は 2, 4, 8 g/kg とし水に懸濁後 20 mL/kg の割合で強制経口投与した。なお, 8 g/kg は技術的に投与可能な最大量であった。7 日間の観察期間を設けその間, 一般状態の観察と累積死亡数を求めた。また観察期間終了後の生存動物は剖検して病理解剖学的検査を行った。

10) 8 日間反復投与安全性試験

ICR マウスを用いて YWE (0.3, 1, 3 g/kg) を 1 日 1 回, 8 日間反復経口投与して一般症状を観察した。最終投与 24 時間後には動物を剖検して血液生化学的検査及び病理学的検査を実施した。

11) 統計処理

本試験で得られた測定値は平均値及び標準誤差を算出した後, Barlett 法により測定値の分散を 95%信頼限界で検定して等分散性を確認し, 2 群の場合は Student's *t*-test により, 多群の場合には Dunnett 法により平均値の比較を行った。AUC は各時間の血糖値から投与前の血糖値を差し引き, 0 から最終測定時間までの値を台形式により算出した。なお, $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

考察

YWE の血糖上昇抑制活性には既に報告した胃から腸への糖輸送遅延効果³⁾に加え, 今回見出された α -グルコシダーゼ阻害活性も関与していることが明かとなった。

YWE とデンプンの同時投与試験 (Fig.1) において, 低投与量の場合に 90 分以降に血糖上昇が認められたことについては, クロロゲン酸をラットに経口投与した場合, 1 時間後には

投与したクロロゲン酸の 43%が小腸から回収され、以後も漸減したとする Terao らの報告¹⁵⁾や、3,5-DCQA を皮下投与した場合は血漿中に検出されるのに対し、経口投与では検出出来ないとする Takenaka らの報告¹⁶⁾を考え合わせると YWE に含まれる 3,4-DCQA などの DCQA 類は小腸に到達後、小腸粘膜に存在するマルターゼを阻害し、血糖上昇抑制作用をもたらすが、徐々に代謝を受け、投与1時間後以降、特に低用量の場合には糖の分解を十分に抑制しきれない程度に小腸粘膜における濃度が低下したために起きたものと考えられた。

また、共存する3,5-, 並びに4,5-DCQAにもアミラーゼ及びマルターゼの阻害活性があり、ヤーコンの α -グルコシダーゼ阻害活性はこれらの DCQA 類に由来することが明らかとなった。DCQA 類は春菊¹⁷⁾、ヨモギなど多くのキク科植物やコーヒー豆に含まれていることが知られているが、 α -グルコシダーゼ阻害活性が見出されたのは今回が最初である。また、クロロゲン酸には Na^+ 依存性のグルコース取りこみを阻害する作用のあることが報告¹⁸⁾されており、ヤーコン中のクロロゲン酸類は糖質の分解及び吸収阻害に重要な役割を担っていると考えられる。以上のような結果からヤーコン地上部は糖尿病発症予防に有用な素材と考えられた。

引用文献

- 1) "Lost Crops of the Incas- Report of an Ad Hoc Panel of the advisory committee on technology innovation board on science and technology for international development national research council", National Academy Press, Washington D.C. 1989, pp. 115-123.
- 2) Ohshima K., Ito O., Yasuyoshi T., Ikarashi T., Minamizawa K., Kubota M., Tsukihashi T., Asami T., *Soil Sci. Plant Nutr.*, **36**, 167-171 (1990).
- 3) Taka M., Kondo H., Ohsawa H., Obata A., Ito K., Koide Y., Terada S., Sakato M., *Wakan-iyakugaku Zasshi*, **14**, 352-353 (1997).
- 4) Aybar J. M., Piera Sanchez N. A., Grau A., Sanchez S. S., *J. of Ethnopharmacology*, **74**, 125-131 (2001).
- 5) Nakahara K., Izumi R., Kodama T., Kiso Y., Tanaka T., *Phytotherapy Research*, **8**, 433-435 (1994).
- 6) Matsui T., Yoshimoto C., Osajima K., Oki T., Osajima Y., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 2019- 2022 (1996).
- 7) Specifications of Glucose-B Test Wako (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan).
- 8) Takagi S., Yamaki M., Masuda Y., Nishihama S., Kubota M., Lu T-S., *Yakugaku Zasshi*, **101**, 482-484 (1981).
- 9) Tatefuji T., Izumi N., Ohta T., Arai S., Ikeda S., Kurimoto M., *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 966-970 (1996); Basnet P., Matsushige K., Hase K. C., Kuo Y-C., Chou C-J., *J. Nat. Prod.*, **62**, 405- 408 (1999).
- 10) Hillebrand I., Boehme K., Frank G., Fink H., Berchtold P., *Res. Exp. Med. (Berl)*, **175**, 81-86 (1979); O' Dea K. and Turton J., *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**, 511-516 (1985).
- 11) Yacon extracts were prepared by Matsuura Yakugyo Co. Ltd.(Nagoya, Japan).
- 12) A. Dahlqvist, *Anal. Biochem.*, **7**, 18-25 (1964).
- 13) Yoshikuni Y., *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 121-128 (1988).
- 14) Horii S., Fukase H., Matsuo T., Kameda Y., Asano N., Matsui K., *J. Med. Chem.*, **29**, 1038-1046 (1986).
- 15) Azuma K., Ippoushi K., Nakayama M., Ito H., Higashio Terao J., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5496-5500 (2000).
- 16) Takenaka M., Nagata T., Yoshida M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2689-2691(2000)
- 17) Chuda Y., Suzuki M., Nagata T., Tsushida T., *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1437-1439 (1998).
- 18) Welsch A. C., Lachance A. P., Wasserman B. P., *J. Nutr.* **119**, 1698-1704 (1989).