

## 論文要旨

### 杜仲葉の抗肥満作用と有効成分に関する研究

平田哲也

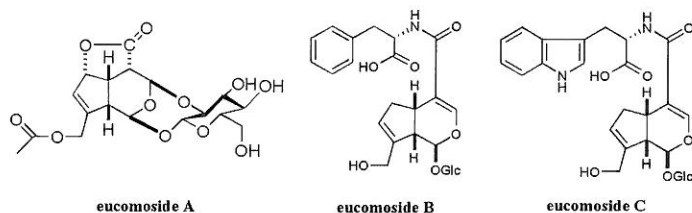
杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) は中国中央部起源の 1 属 1 種の落葉性木本類で、樹高は 20 m に達する中高木である。樹皮は生薬・杜仲で、中国最古の薬物書である「神農本草経」に、長く服用しても副作用がなく長寿を助ける「上品」に分類・収載されている。また、数百年前に出版された「本草綱目」には、高血圧症など具体的な疾患に対する有効性が記載されているほか、葉を「野菜として食する」とする記述がある。一方、我が国では葉を焙煎により茶用として 1970 年代に発案された「杜仲茶」が、健康維持の目的で幅広く飲用されている。近年、葉について成分探索の研究が進み、乾燥葉および焙煎葉など原葉の成分探索が行われ、*geniposidic acid* を含む 8 種のイリドイド化合物のほか、14 種の化合物が得られている。さらに、薬理試験が進み、副交感神経を介した血圧降下作用が明らかとなり、*geniposidic acid* を主成分とする杜仲葉配糖体飲料が、「血圧が高めの方に適した食品」の表示許可を得、特定保健用食品として市販されるに至っている。一方、欧米型中心の食事と標準的な摂取カロリーを超える食生活の変化に伴い、我が国ではメタボリックシンドローム (MS) が問題視されている。高血圧、脂質代謝異常、耐糖能異常を伴う動脈硬化易発症病態を包括的に捉えた疾患観念である MS は、病態の基盤に内臓脂肪蓄積が存在するとされている。すなわち、内臓脂肪より分泌される善悪の様々なアディポサイトカインが MS に関与することが解明されてきている。本論文では、杜仲葉の食経験と研究データの再解析から導き出された内臓脂肪減少による抗肥満作用の仮説に基づき、杜仲葉の MS に対する保健用途への適合を計画した。まず、加工方法の異なる杜仲葉原料について、抗肥満作用に対する有効性の確認および作用機序を明らかにし、次に、効果の高かった杜仲緑色葉の成分探索および有効成分を特定する薬理試験を行い興味深い知見を得た。以下に得られた知見を概説する。

第 1 章では、まず、加工方法の異なる杜仲葉の抗肥満試験を実施した。採取した生薬を乾燥・焙煎後に熱水抽出処理した杜仲葉エキス (ELE) および生薬を乾燥処理後に粉末にした杜仲緑色葉粉末 (EGLP) を被験物質として、高脂肪食 (HFD) および普通食 (ND) に混餌し、それぞれを 4 週齢の SD 雄性ラットに 90 日間の経口投与を実施した。その結果、HFD に ELE および EGLP を混餌して摂取することにより体重および白色脂肪組織 (WAT) 重量の増加を有意に抑制し、その効果はいずれも濃度依存的であった。一方、ND 混餌群ではこれらを抑制する効果がみられなかったことから、HFD が起因する肥満に対して杜仲葉は、高い効果があることが示唆され、ND においては影響が少ないことが考えられた。HFD の実験において、血中脂質は、いずれの被験物質でも中性脂肪 (TG) 濃度が減少した。血糖は、いずれの投与群でグルコース値を正常値に維持しながらインスリン濃度の低下を示し、インスリン抵抗性の改善が確認された。アディポサイトカインは、アディポネクチン濃度の上昇、TNF- $\alpha$  およびレジスチンの低下と、MS に関与する生理活性物質のバランスが整うことが示唆された。これらの抗肥満作用は、加工方法の異なる被験物質に共通性があることから、どちらにも共通して含有する成分が関与していることが示唆された。次に、投与終了後のラットの組織を摘出し、リアルタイム PCR 法で定量し、遺伝子発現量

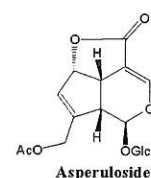
の増減より、脂質、糖質の代謝メカニズムを予測した。ELE および EGLP を摂取することによって、肝臓における  $\beta$  酸化 (carnitine palmitoyltransferase 1 $\alpha$ 、および 2 の mRNA 発現増加) の活性化が認められた。また、その作用は ND および HFD いずれでも維持された。このことから、生成されたケトン体は骨格筋で積極的に利用 (succinyl-CoA synthetase および peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase の mRNA 発現増加) されているとことが示唆された。また、骨格筋において糖を利用した TCA サイクル (isocitrate dehydrogenase 3 (NAD<sup>+</sup>)  $\alpha$  および dihydrolipoamide succinyltransferase の mRNA 発現増加) と電子伝達系 (NADH dehydrogenase flavoprotein 1 および 5: Comp. I および Comp. V の mRNA 発現増加) の活性化を認め、この作用は EGLP では HFD 負荷下でも維持された。腎周囲 WAT に対する ELE および EGLP の効果は、被験食の脂質負荷状態によって異なり、HFD 条件下は WATp 細胞内に TG の貯蔵を増加させ、大きな脂肪細胞を形成させる。一方、ELE および EGLP は脂肪細胞での ATP 産生を低下 (Comp. I、V の mRNA 発現低下) させ、大きな脂肪細胞の形を維持するのに必要な ATP 不足による脂肪細胞の崩壊を誘導していることが推測された。以上の結果、杜仲葉は全身レベルでの代謝の活性化 (肝臓や白色脂肪組織での脂質代謝の促進及び骨格筋での糖の利用促進) により、内臓脂肪の蓄積を抑制していると推察された。

第2章では、抗肥満作用が確認された成分未検索の EGLP の分離精製を行い、6 種のイリドイド化合物 (asperuloside、asperulosidic acid、scandoside 10-*O*-acetate、deacetyl asperulosidic acid、geniposidic acid、aucubin)、5 種のフラボノイド化合物 (isoquercitrin、quercetin 3-*O*-sambubioside、rutin、astragaln、kaempferol 3-*O*-rutoside) および chlorogenic acid を含む 12 種の既知化合物ならびに 3 種の新規イリドイドを得た。そのうち 2 種 (eucomoside B、eucomoside C) は、イリドイドのカルボン酸とアミノ酸のアミド基が縮合した化合物、1 種 (eucomoside A) は、

イリドイドの 3 位とグルコースの 2 位がアセタール結合を持つ、何れも天然物最初の例である。



第3章では、EGLP を熱水抽出し、エキスを high porous polystyrene gel によるカラムクロマトにより5つに分画、各画分の抗肥満試験を実施した。その結果、30% MeOH 画分に強い抗肥満効果が認められ、その効果は、エキ스에類似していた。また、この画分の主要物質はイリドイド化合物 asperuloside であった。次に、単離精製された asperuloside を HFD 負荷マウスに投与すると強い体重および内臓脂肪蓄積抑制効果が確認された。さらに、asperuloside を HFD 負荷ラットに投与すると、基礎代謝量増加および脂肪燃焼亢進が高められたことから、脂肪を積極的にエネルギーとして消費していることが示唆された。



以上、これまでの杜仲研究の集大成として、杜仲緑色葉の抗肥満作用を動物実験で明らかにし、有効成分として杜仲緑色葉の主要成分 asperuloside を同定した。本研究で asperuloside に抗肥満作用が認められたことはイリドイド化合物として最初の例である。本研究の知見は、特定保健用食品として開発されている杜仲葉に新たな保健用途への応用が可能なものとして期待される。