

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 杉本 圭一郎
学位授与の日付	平成22年9月30日
論文名	ユーカリ (<i>Eucalyptus globulus</i>) 葉抽出物の生理機能と含有成分に関する研究
論文審査委員	主査 乾 博 副査 宮武 和孝 副査 北村 進一

論文要旨

ユーカリはフトモモ科に属するオーストラリア原産の常緑高木であり、600におよぶ品種が存在する。産業上有用なことから、世界各地で栽培され、幹は紙の原料や木材として利用されている。葉には1,8-シネオールを主要とするテルペン化合物が豊富に含まれ、その精油(ユーカリオイル)は抗菌活性、消炎作用、清涼感を有し、気管支治療や含嗽剤、去痰薬、軟膏、香料、アロマセラピーに用いられてきた。葉の非揮発性成分は、ワックス成分としてポリプレノール類および β -ジケトン類が、極性成分として加水分解性タンニンやフラボノール配糖体、フロログルシノール誘導體等が見出され、生理活性として抗酸化作用、抗糖尿病作用、抗ウイルス作用、抗齶蝕作用等が報告されている。本研究に用いた *Eucalyptus globulus* は、煎じてハーブ茶として飲用され、南米やアフリカでは民間薬として糖尿病に利用されている。ユーカリ葉抽出物(ELE)の機能性食品素材としての可能性を明らかにすることを目的として、本研究では、第1章、第2章においてELEの抗肥満作用について検討し、腸管フルクトース吸収阻害作用を見いだした。第3章ではELEの抗酸化成分を検索し9種類の加水分解性タンニンを単離した。また *in vivo* での抗酸化作用を明らかにするため四塩化炭素(CCl_4)誘導肝臓障害に対する効果を検討した。第4章ではグラム陰性細菌が産生するリポ多糖(LPS)誘導肝臓障害に対する抑制作用を検討した。

第1章 ユーカリ葉抽出物の腸管フルクトース吸収阻害活性と抗肥満作用

フルクトースはグルコースに比べて脂質合成に向かいやすいため、スクロースやフルクトースを多量摂取すると高中性脂肪 (TG) 血症や脂肪肝、肥満等を引き起こす。またインスリン抵抗性の原因ともなり、糖尿病合併症への関与も指摘されている。

Wistar 系雄性ラットにスクロースを 70%含む飼料を与えて 5 週間飼育したところ、スターチ食ラットに比べ体重増加および内臓脂肪の蓄積が亢進し、血漿 TG、肝臓 TG が上昇した。スクロース食飼料に ELE を 1%添加すると、体重増加や内臓脂肪の蓄積、血漿および肝臓 TG レベルの上昇が有意に抑制された。一方スターチ食では ELE はまったく影響を与えなかった。また、スクロース食を摂取すると、フルクトース代謝に関与するケトヘキソキナーゼと脂肪酸合成に関係するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性の上昇が見られたが、この上昇は ELE の摂取によって有意に抑制された。なお、スクロース食のかわりにフルクトース食を与えたラットでも ELE は肥満を抑制し、血漿および肝臓 TG レベルを低下させた。

ELE の抗肥満作用についてメカニズムを検討したところ、腸管フルクトース吸収阻害活性を見いだした。すなわち絶食ラットにフルクトースを経口投与すると (2 g/kg body weight) 門脈血のフルクトース濃度は 0.02 mM から 30 分後には 1.5 mM まで上昇したが、フルクトース投与 10 分前に ELE を与えると用量依存的にフルクトース濃度の上昇が抑制された。一方グルコースを経口投与した場合には、その吸収に ELE はまったく影響を与えなかった。小腸上皮細胞では、グルコースは Na⁺/グルコース共輸送担体 (SGLT1) を介して能動輸送で吸収され、フルクトースは特異的な輸送担体であるグルコーストランスポーター 5 (GLUT5) によって受動輸送で取り込まれる。したがって、ELE 中には SGLT1 に作用せず GLUT5 を特異的に阻害する物質が存在するものと考えられる。なお、フルクトースの吸収を特異的に阻害する食品成分はこれ以外に例はない。現在、フルクトース吸収阻害物質の単離・同定を進めている。

第2章 ヒトを対象とするユーカリ葉抽出物の腸管フルクトース吸収阻害活性

第1章において、ラットを用いた実験により ELE に腸管フルクトース吸収阻害活性を見だし、スクロースおよびフルクトース過剰摂取に起因する高 TG 血症や脂肪肝を抑制することを明らかにした。本章ではヒトでの有効性を明らかにすることとした。

空腹時血糖値が 100~140 mg/mL である未治療の一般公募ボランティア 18 名を対象にスクロース負荷試験を行った。ELE 3 g (高用量群) または 1 g (低用量群) をカプセルに封入し、プラセボには乳糖を封入した。ランダム化二重盲検プラセボ対照・単回摂取クロスオーバー試験 (3 試験区) とし、2 週間ごとに試験を実施した。絶食した被験者に、水とともにカプセル (ELE 0, 1, 3g) を服用させた。5 分後に 25 g のスクロースを摂取させ、30 分ごとに肘静脈より採血した。血清のフルクトース濃度、血糖値およびインスリン値を測定した。その結果、絶食時の各群の血清フルクトース濃度は約 19 μM であった。スクロース摂取後フルクトース濃度は顕著に増加し、30 分後にプラセボ群は 228.5 ± 13.8 (mean ± SEM) μM まで上昇した。高用量群は 202.1 ± 11.9 μM と有意に低い値を示し、低用量群でも低い傾向が認められた。血糖値とインスリン値では 3 群間に有意な差異は認められなかった。以上、ELE はヒトでも腸管フルクトース吸収阻害活性が期待されることが判明した。

第3章 ユーカリ葉抽出物の抗酸化作用と抗酸化成分の探索

ELE は食品衛生法において酸化防止剤として既存添加物名簿に記載されているが、抗酸化成分として β -ジケトン類や没食子酸 (GA) およびエラグ酸 (EA) が報告されている程度であり、活性成分を追跡した研究は行われていない。

本研究ではスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性 (SOD 様作用) を指標に、活性画分の精製を進めた。ELE の 50% 消去濃度 (EC_{50}) は $1.02 \mu\text{g/mL}$ を示した。ジエチルエーテル、酢酸エチル (AcOEt)、*n*-ブタノール (BuOH) にて順次液々抽出すると、BuOH ($0.77 \mu\text{g/mL}$) および AcOEt ($0.96 \mu\text{g/mL}$) 抽出物に強い活性を認めた。各種クロマトグラフィを用いて強い抗酸化作用を示す画分を分画・精製したところ、9 種の加水分解性タンニンと 2 種のアグリコンを単離・構造決定した。すなわち BuOH 抽出物から pedunculagin (1) および tellimagrandin I (2) を、AcOEt 抽出物から tellimagrandin I (2)、II (3)、heterophyllin A (4)、1,3-di-*O*-galloyl-4,6-HHDP- β -D-glucose (5)、1,2,4-tri-*O*-galloyl- β -D-glucose (6)、1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (7)、1,2,4,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (8)、1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose (9) およびそれらのアグリコンとして GA (10) と EA (11) を単離した。化合物 1~9 はポジティブコントロールであるアスコルビン酸 ($2.61 \mu\text{M}$) よりも低い EC_{50} 値を示し、とくに化合物 1 と 7 は $0.2 \mu\text{M}$ 未満と強い抗酸化力を示した。

つぎに、ラットを用いて CCl_4 誘導肝臓障害に対する作用を検討した。ELE を 1% 含む飼料をラットに 7 日間与え、 CCl_4 を皮下投与し 24 時間後に解剖した。 CCl_4 を与えると肝臓に著しい障害が生じ、炎症マーカーである血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) とアラニントランスアミナーゼ (ALT) 活性は顕著に上昇した。肝臓の過酸化脂質 (TBARS) も高レベルであった。一方 ELE 群ではそれらの上昇は抑制された。*in vitro* で強い活性が示された ELE の抗酸化作用は、*in vivo* でも確認された。

第4章 ユーカリ葉抽出物のリポ多糖 (LPS) 誘導肝臓障害に対する作用

腸管バリアーの変調による LPS の流入は、腸の変調、飲酒、重度の火傷のほか慢性疲労症候群や高脂肪食の継続的摂取によっても生じ、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) や炎症性サイトカインの活性化等により肝臓に炎症をもたらす。さらに最近の研究では、LPS はインスリン抵抗性や高脂肪食、フルクトース過剰摂取に起因した非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) にも関与することが示されている。

ELE を 1% 含む飼料を balb/c 雄性マウスに 10 日間与え、LPS を腹腔内投与し 6 時間後に解剖した。LPS 投与により血清 AST および ALT 活性、肝臓 TBARS、肝臓 iNOS 発現量は顕著に上昇したが、ELE 群では抑制され、用量依存性も認められた。マクロファージ様細胞株 RAW 264.7 を用いて、ELE が LPS による iNOS の誘導を抑制することを見いだした。さらに加水分解性タンニンのアグリコンである GA や EA に強い iNOS 誘導抑制作用が認められた。そこで両化合物を 0.1% ずつ含む飼料をマウスに 10 日間与え、それらの作用を調べたところ、両方とも血清 AST および ALT 活性、肝臓 TBARS、肝臓 iNOS 発現量の上昇を強く抑制した。ELE 中の加水分解性タンニンは消化管内で容易に分解されるので、生成した GA や EA が体内に取り込まれ、LPS による障害を抑制すると考えられる。

総括

以上、ELE はフルクトース吸収阻害活性を有し、スクロースやフルクトース過剰摂取による肥満や糖尿病などの予防に有用な機能性食品素材であることが明らかとなった。また、ELE 中には抗酸化成分として各種加水分解性タンニンが含まれるが、消化管内で GA や EA に分解され、NASH など LPS に起因する様々な疾患の予防に働く可能性が示された。

審査結果の要旨

ユーカリ (*Eucalyptus globulus*) はタスマニア原産のフトモモ科に属する常緑広葉樹であり、現在は世界中で広く栽培されている。ユーカリの葉を水蒸気蒸留して得られる精油成分は、のど飴などの食品香料やうがい薬さらに香粧品用香料として広く利用されている。一方、ユーカリ葉の含水アルコール抽出物は強い抗酸化活性を有しており、食品の抗酸化に用いる添加物として認可されている。また、このユーカリ葉抽出物には抗ウイルス作用や抗糖尿病効果などが報告されている。本研究は、ユーカリ葉抽出物を機能性食品素材として応用することを目的として、その機能性と活性成分について明らかにすることを目的として行った。

ユーカリ葉抽出物の抗肥満作用について検討した。スクロースやフルクトースを過剰に摂取すると肝臓における脂肪酸合成が活性化され肥満の原因となる。そこでスクロースを主要なエネルギー源とする飼料を与えラットを飼育し、ユーカリ葉抽出物の肥満に及ぼす影響を調べた。その結果、飼料中にユーカリ葉抽出物を 1% 添加すると、副睾丸周辺脂肪組織 (内蔵脂肪) 重量や肝臓トリグリセリド量の増加が有意に抑制された。このようなユーカリ葉抽出物の効果は、スクロースの代わりにフルクトースを与えたラットでも観察された。しかし、スターチを与えるとユーカリ葉抽出物の影響は全く見られなくなった。次にユーカリ葉抽出物の作用メカニズムについて検討したところ、腸管におけるフルクトース吸収を特異的に阻害することが分かった。フルクトースは、SGLT1 によって取り込まれるグルコースとは異なり、GLUT5 の作用で吸収される。したがって、ユーカリ葉抽出物は、小腸上皮細胞の GLUT5 を特異的に阻害することで、スクロースやフルクトース過剰摂取に起因した脂肪肝や内蔵脂肪の蓄積を抑制することが明らかになった。このような GLUT5 を特異的に阻害する物質は他にほとんど報告がなく、極めて興味深い生理作用であり、新規な機能性食品素材として有望である。

次にヒトでの有効性を確認する目的でヒト試験を実施した。すなわち、あらかじめユーカリ葉抽出物を投与した後にスクロースを摂取させその後の静脈血中のフルクトース濃度を測定した。その結果、スクロース摂取後フルクトース濃度は急激に上昇したが、ユーカリ葉抽出物の投与によりこの上昇は用量依存的に有意に抑制された。一方、グルコース濃度やインスリン値の変動には影響が見られなかった。したがって、ヒトにおいてもユーカリ葉抽出物は腸管におけるフルクトース吸収を特異的に阻害することが確認された。

ユーカリ葉抽出物の抗酸化作用について検討した。抗酸化物質について、SOD 様活性を指標に精製を進めたところ、9種の加水分解性タンニンとそのアグリコン2種（没食子酸、エラグ酸）が得られた。これらの加水分解性タンニンのなかにはポジティブコントロールとしたアスコルビン酸に比べ明らかに強い抗酸化活性を示すものが多く存在した。さらに、ラットに四塩化炭素を投与し肝臓に酸化障害を起こさせたところ、ユーカリ葉抽出物を摂取させたラットでは肝臓障害が明らかに抑制されていた。

ユーカリ葉抽出物の抗炎症作用について、リポ多糖誘導性肝臓障害におよぼす影響を調べた。その結果、ユーカリ葉抽出物を摂取したマウスではリポ多糖による肝常在性マクロファージの活性化が抑制され、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現レベルが低下しており、肝臓障害が明らかに軽減されることが示された。活性成分について調べたところ、加水分解性タンニンのアグリコンである没食子酸とエラグ酸がリポ多糖によるマクロファージの活性化を抑制し iNOS の誘導レベルを低下させることが明らかになった。最近の研究では、リポ多糖はインスリン抵抗性や高脂肪食やフルクトース過剰摂取に起因した非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) にも関与することが示されている。したがって、ユーカリ葉抽出物はこのようなリポ多糖が関与する様々な疾患の予防に有効であると期待される。

以上、本研究では、ユーカリ葉抽出物にフルクトース吸収阻害作用を見だし、スクロースやフルクトース過剰摂取に起因した肥満を予防する機能性食品素材としての有用性を明らかにした。さらに、ユーカリ葉抽出物に含まれる加水分解性タンニンやそのアグリコンは強い抗酸化作用を有するとともにリポ多糖によるマクロファージの活性化を抑制することを見だし、様々な肝臓障害の予防に有用であることを示した。これらの成果は、栄養科学や食品科学さらに天然物化学などの分野に多大な貢献をするものと考えられ、最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。