

# シアニジン-3,5-ジグルコシド摂取による 血糖値上昇抑制と脂肪蓄積抑制の検討

山根拓也<sup>1,2,3</sup>、今井ももこ<sup>4,5</sup>、小塚美由記<sup>6</sup>、飯田聡史<sup>1,2</sup>、山田恵子<sup>1</sup>  
石田哲夫<sup>7</sup>、阪本龍司<sup>1,2</sup>、乾博<sup>1,4</sup>、中垣剛典<sup>3</sup>、中野長久<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪府大・生資セ、<sup>2</sup>生命環境、<sup>4</sup>栄養、<sup>3</sup>中垣技術士事務所・食科研、  
<sup>5</sup>相愛大・発達栄養、<sup>6</sup>北海道文教大・健康栄養、<sup>7</sup>琉球大・理

# 日本栄養・食糧学会 COI 開示

発表の連絡責任者名： 山根 拓也

演題発表に関連し、開示すべきCOI 関係にある  
企業などはありません。

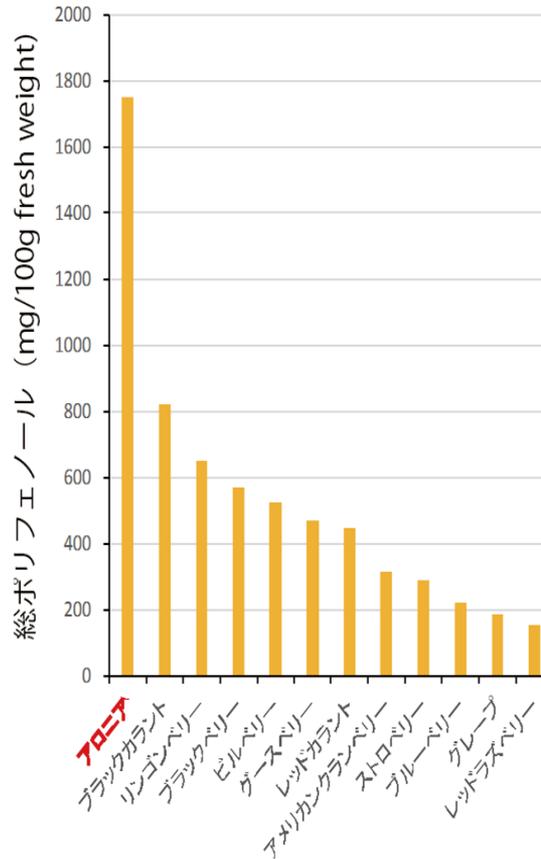
# アロニア

Aronia (アロニア)

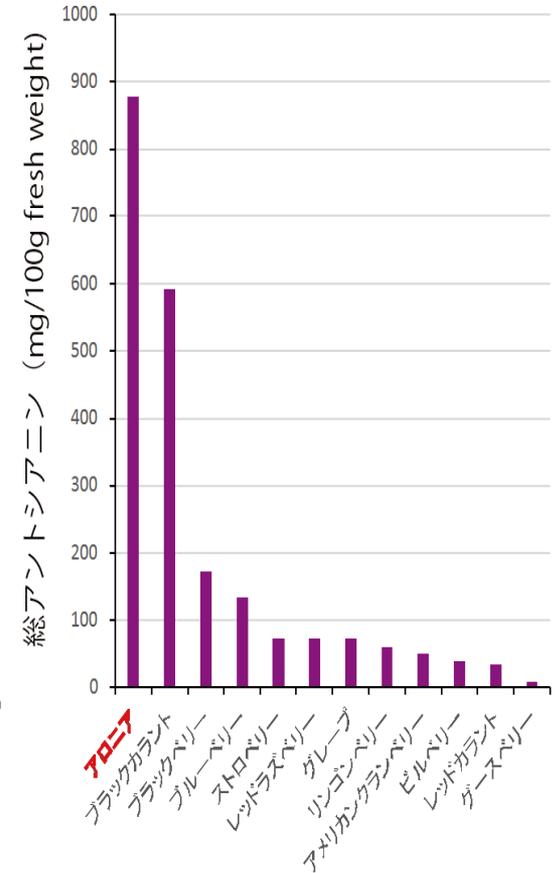


- ・北米原産のバラ科に属する黒紫色の果実
- ・ロシア、ポーランド、ブルガリアで広く生産
- ・日本では北海道や東北で栽培

総ポリフェノール量



総アントシアニン量



# アロニアによる健康効果

**2型糖尿病改善効果**  
・血糖値上昇抑制



**高脂血症改善効果**  
・中性脂肪上昇抑制  
・LDL-コレステロール  
上昇抑制



**高血圧改善効果**  
・血圧上昇抑制



**肥満改善・肝臓保護効果**  
・脂肪蓄積抑制  
・肝線維化抑制

# アロニアによる2型糖尿病改善効果

## <動物試験>

糖尿病モデルラットにアロニア抽出物、アロニア果汁を摂取させると血糖値上昇が抑制される [Oprea et al., Revista Farmacia (2014), Valcheva-Kuzmanova et al., Methods Find Exp Clin Pharmacol (2007)]。

糖尿病・肥満モデルマウスにアロニア果汁を摂取させると血糖値上昇が抑制 [Yamane et al., J Nutr Biochem (2016)]。

## <臨床試験>

アロニア果汁を飲用した2型糖尿病患者の空腹時血糖が低下 [Simeonov et al., Folia Med (2002), Kulling et al., Planta Med (2008)]。

# これまでの研究成果

## < *In vitro* 試験 >

アロニア果汁中に存在するcyanidin 3,5-diglucosideがジペプチジルペプチダーゼIV活性を阻害する (BBRC 2015)。

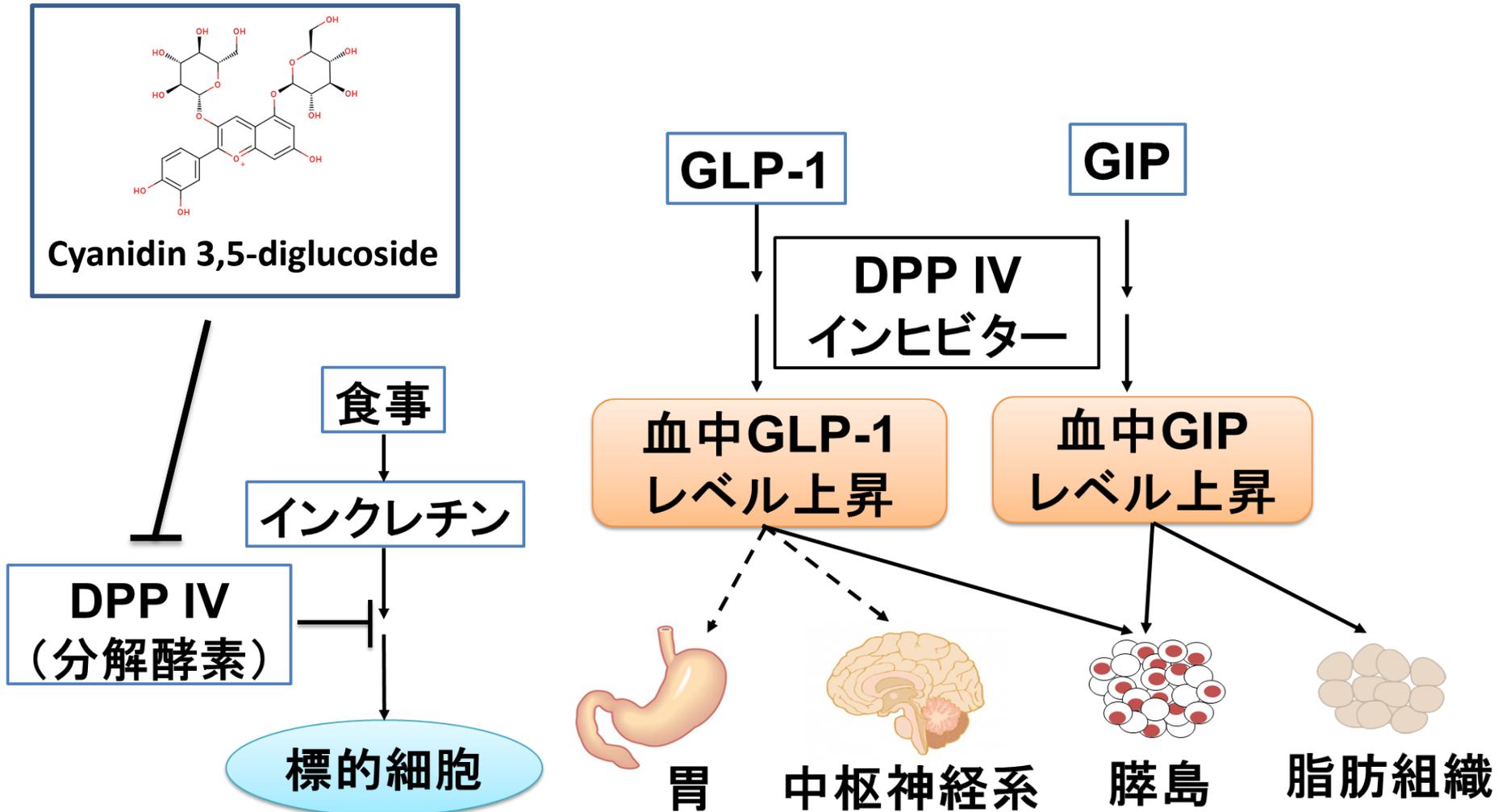
## < 動物試験 >

アロニア果汁を糖尿病・肥満モデルKKAYマウスに28日間摂取させると、血糖値上昇および内臓脂肪蓄積の抑制が起こる。さらに小腸において $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を阻害する (J Nutr Biochem 2016)。

## < 臨床試験 >

アロニア果汁を食前に飲用すると、食後の血糖値上昇が低下する (Clin Nutr Exp 2017) 。

# DPP IVインヒビターの機能



# 本研究に用いたアロニア果汁

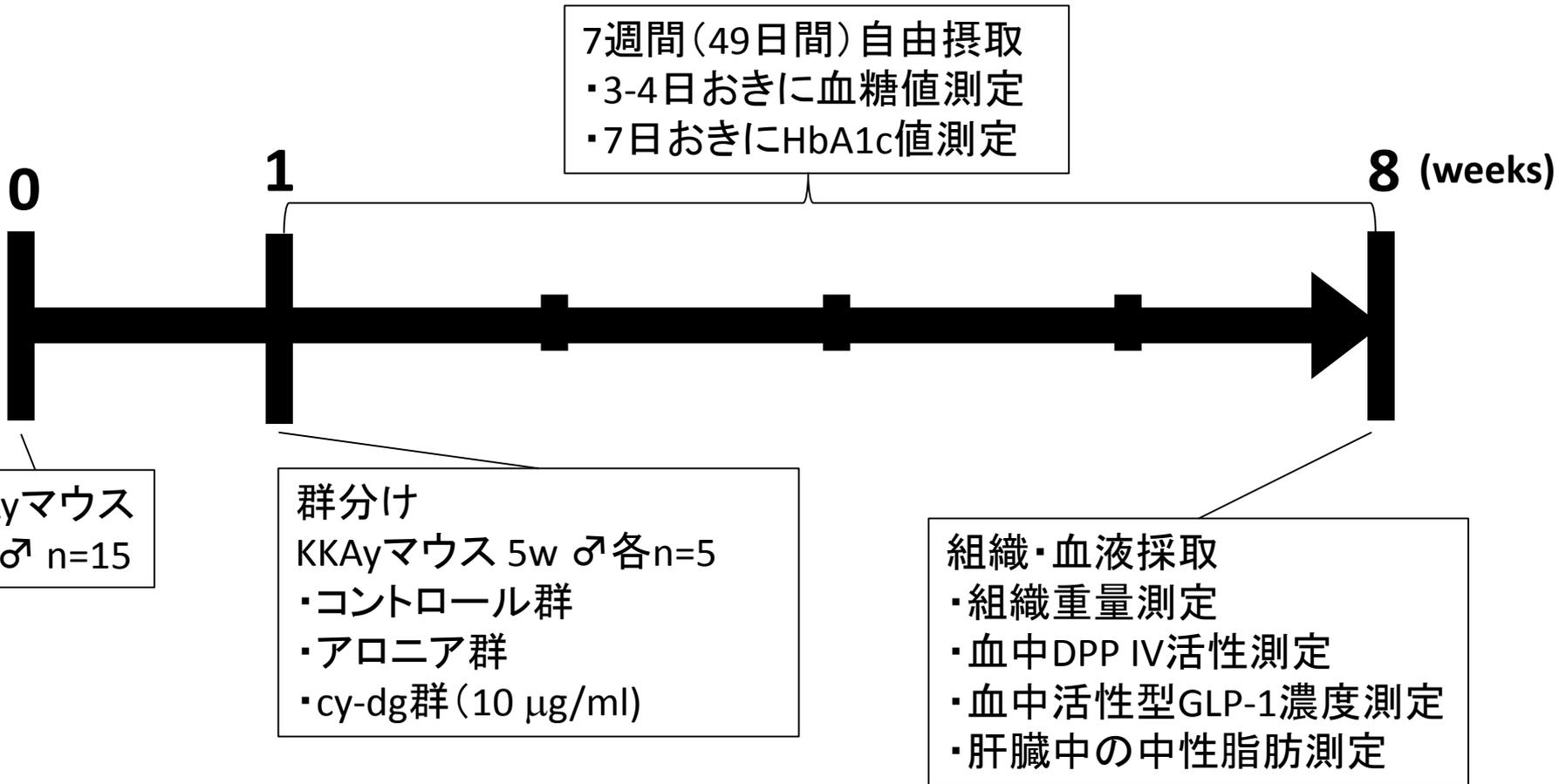
組成	アロニア果汁 (g/100 g)
タンパク質	0.2
炭水化物	17.9
脂質	<0.1
ミネラル	0.5
食物繊維	0.3
エネルギー (kcal/100 g)	73

組成	アロニア果汁 (g/100 g)
グルコース	4.25
フルクトース	3.87
ソルビトール	7.39

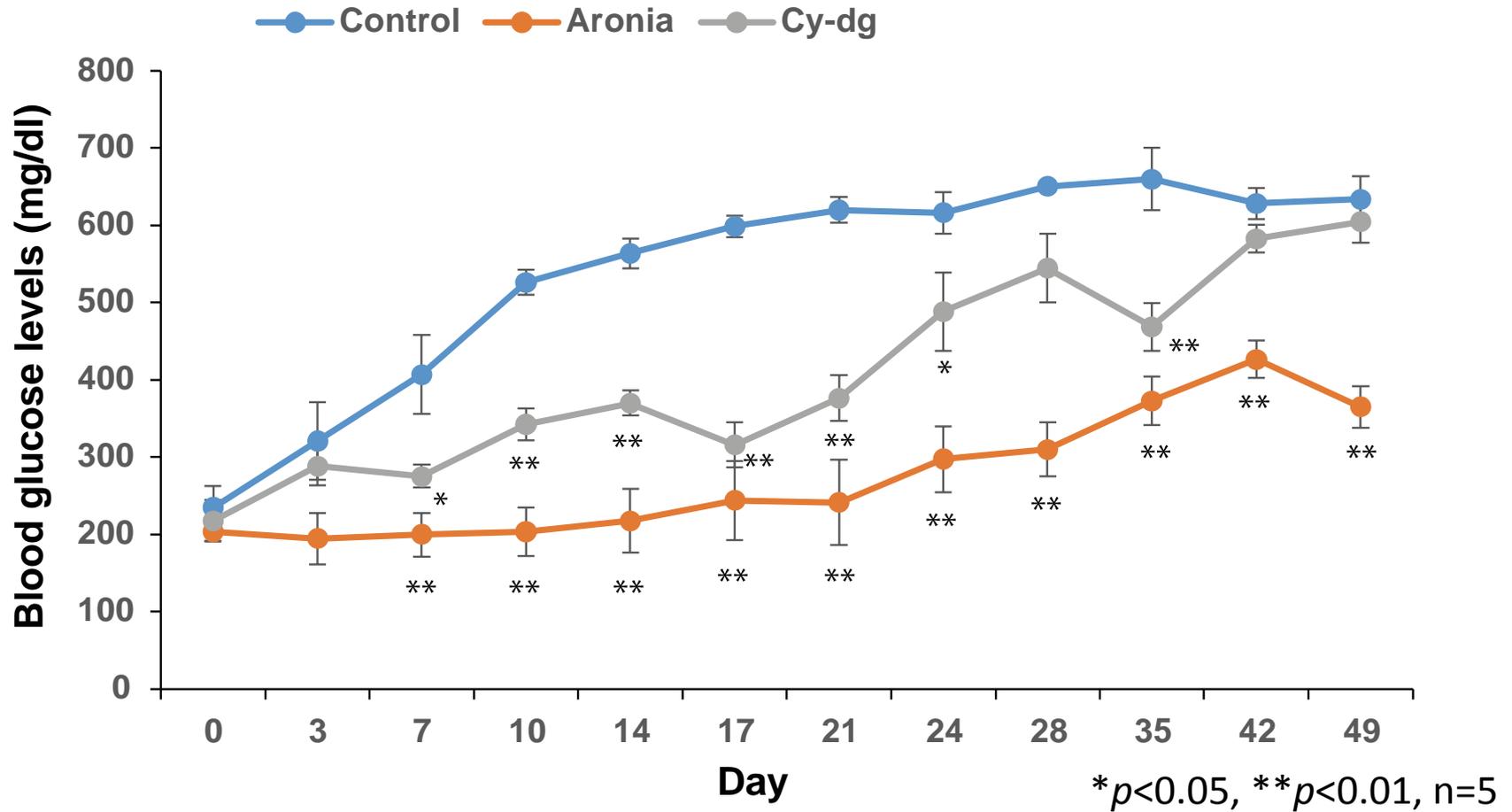
組成	アロニア果汁 (g/100 g)
ORAC	100 $\mu\text{mol TE} / \text{g}$
総アントシアニン	0.014
ポリフェノール	0.99



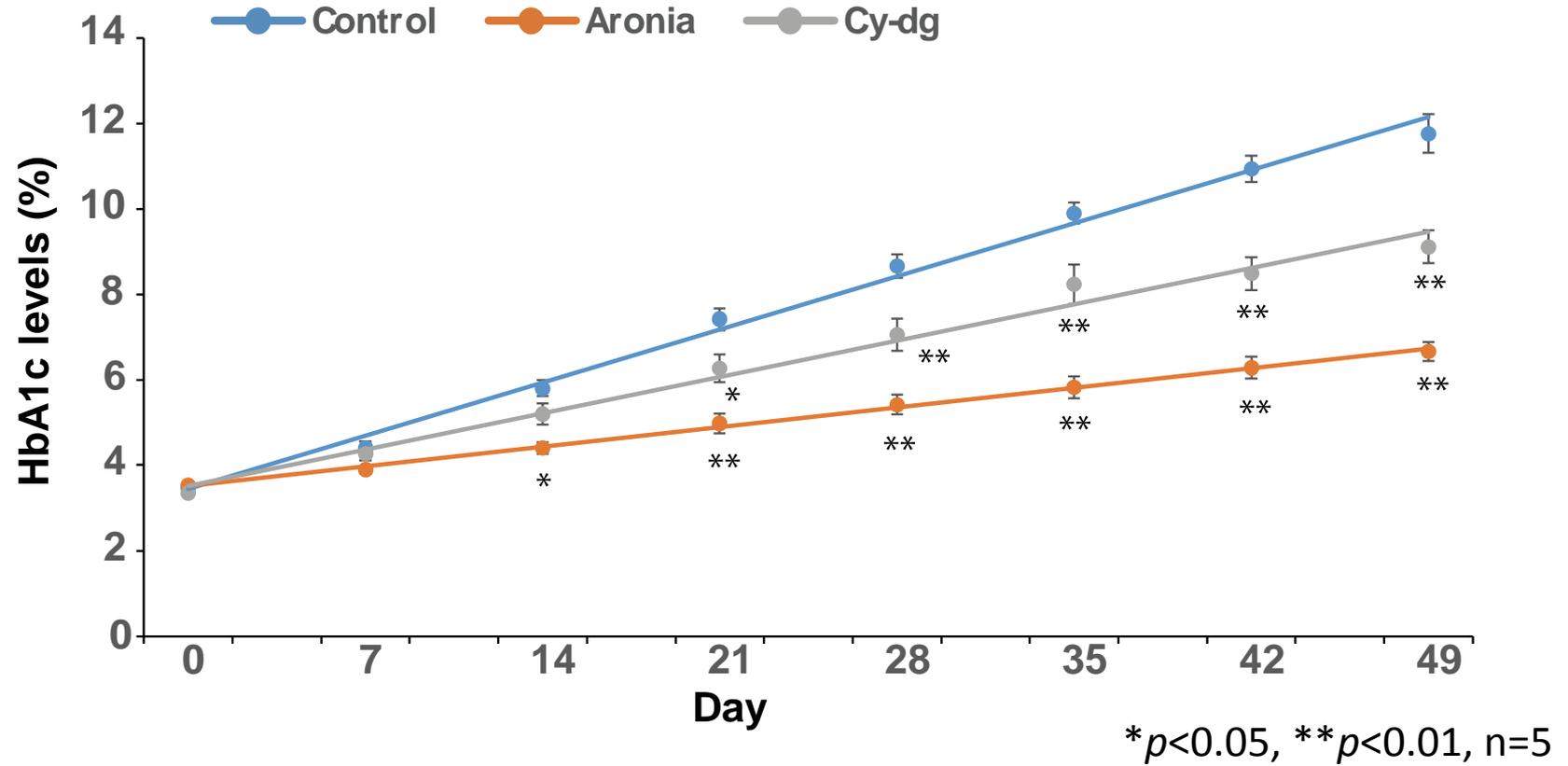
# 実験方法



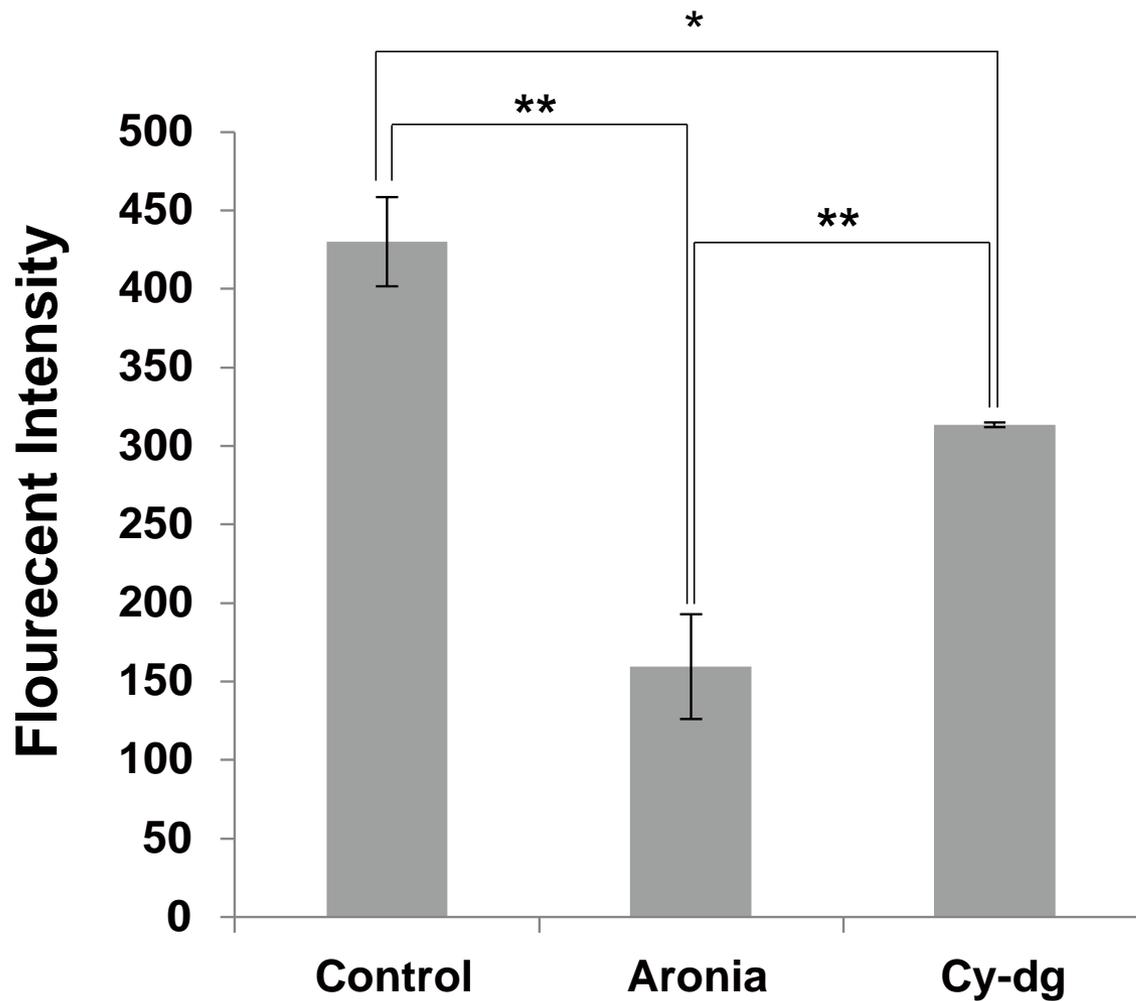
# Cyanidin 3,5-diglucoside 摂取で血糖値上昇は抑制される



# Cyanidin 3,5-diglucoside 摂取で HbA1c 値上昇は抑制される

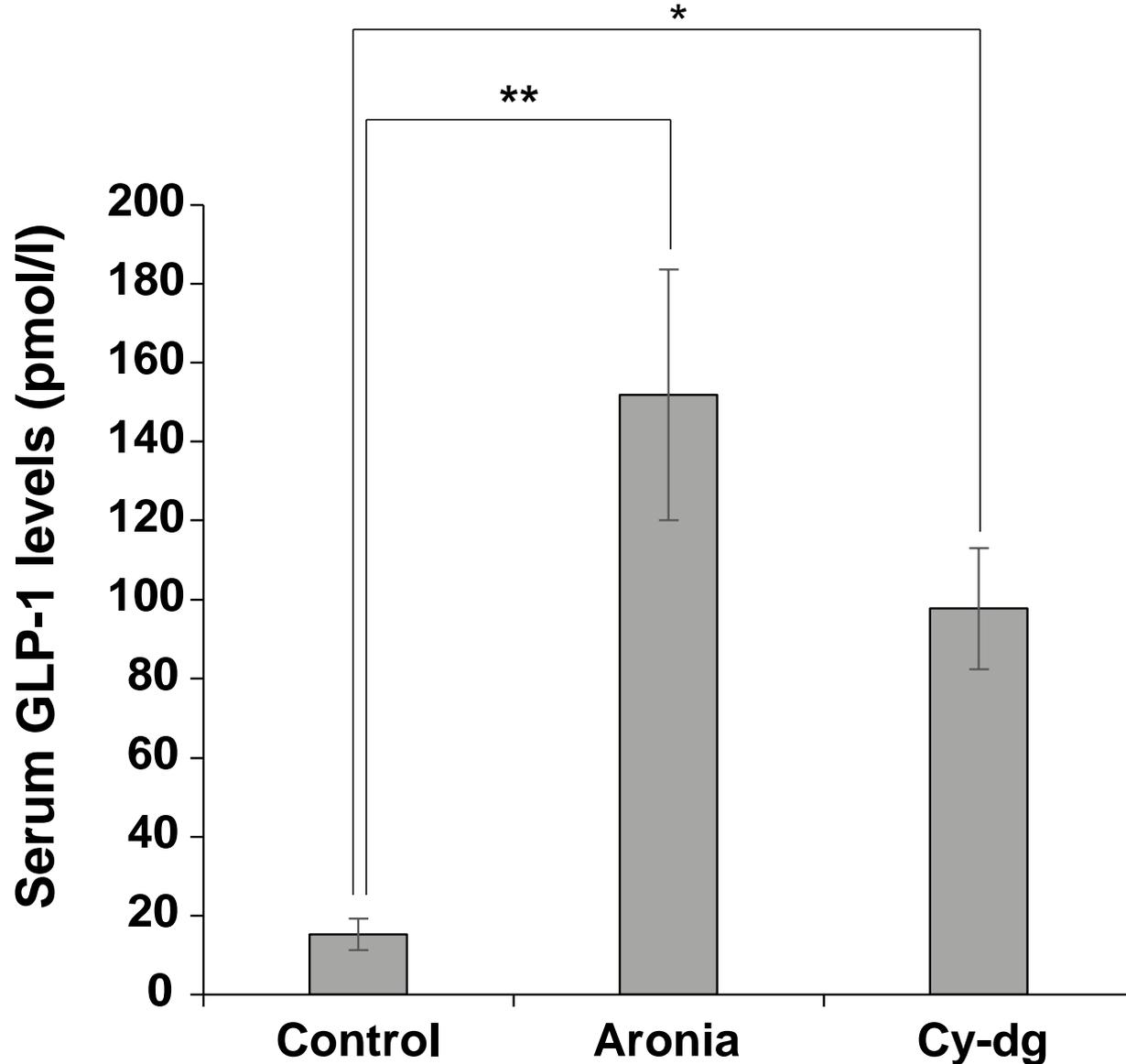


# Cyanidin 3,5-digluconide摂取で血中DPP IV活性は阻害される



\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 5$

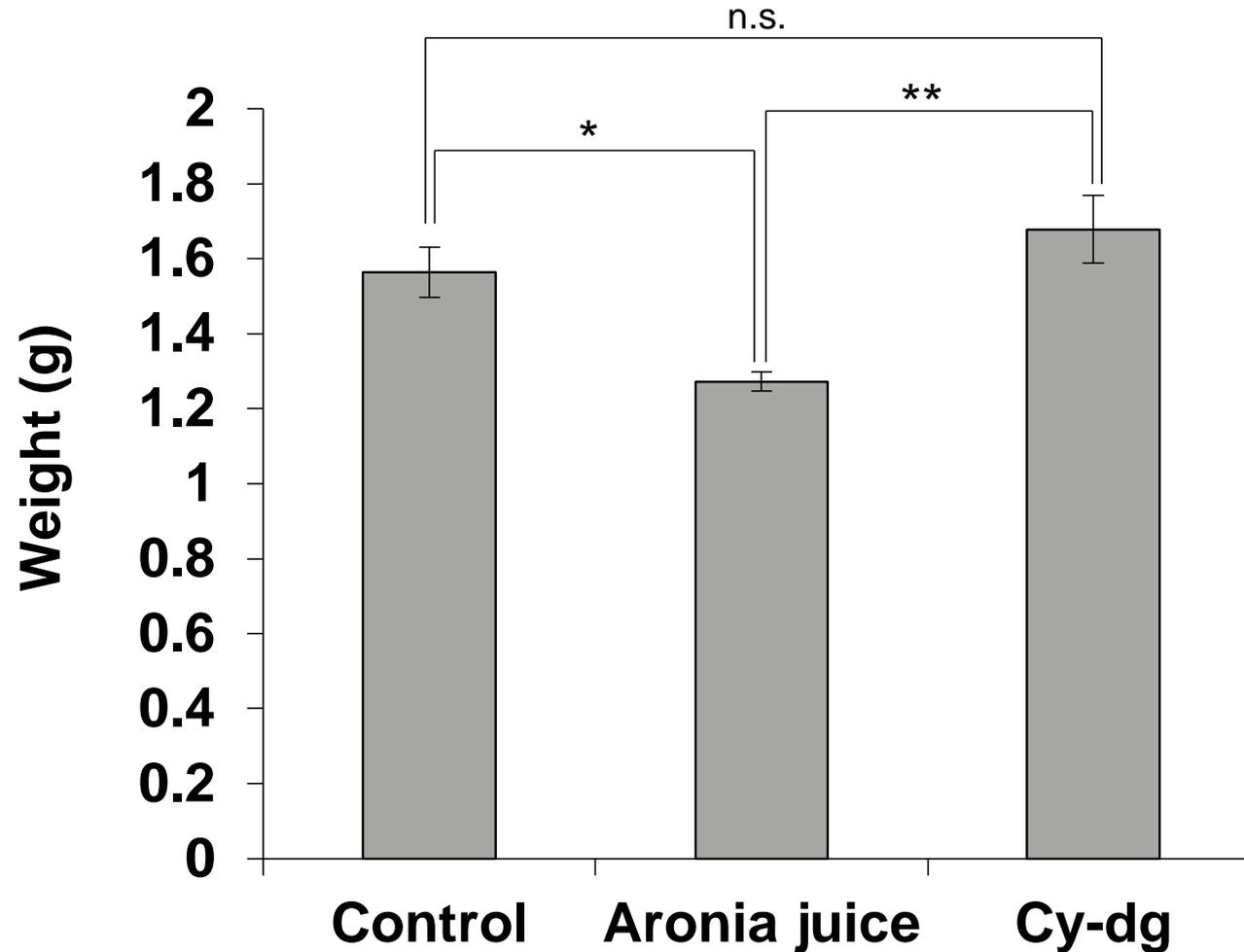
# Cyanidin 3,5-diglucoside 摂取で血中GLP-1濃度は上昇する



\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 5$

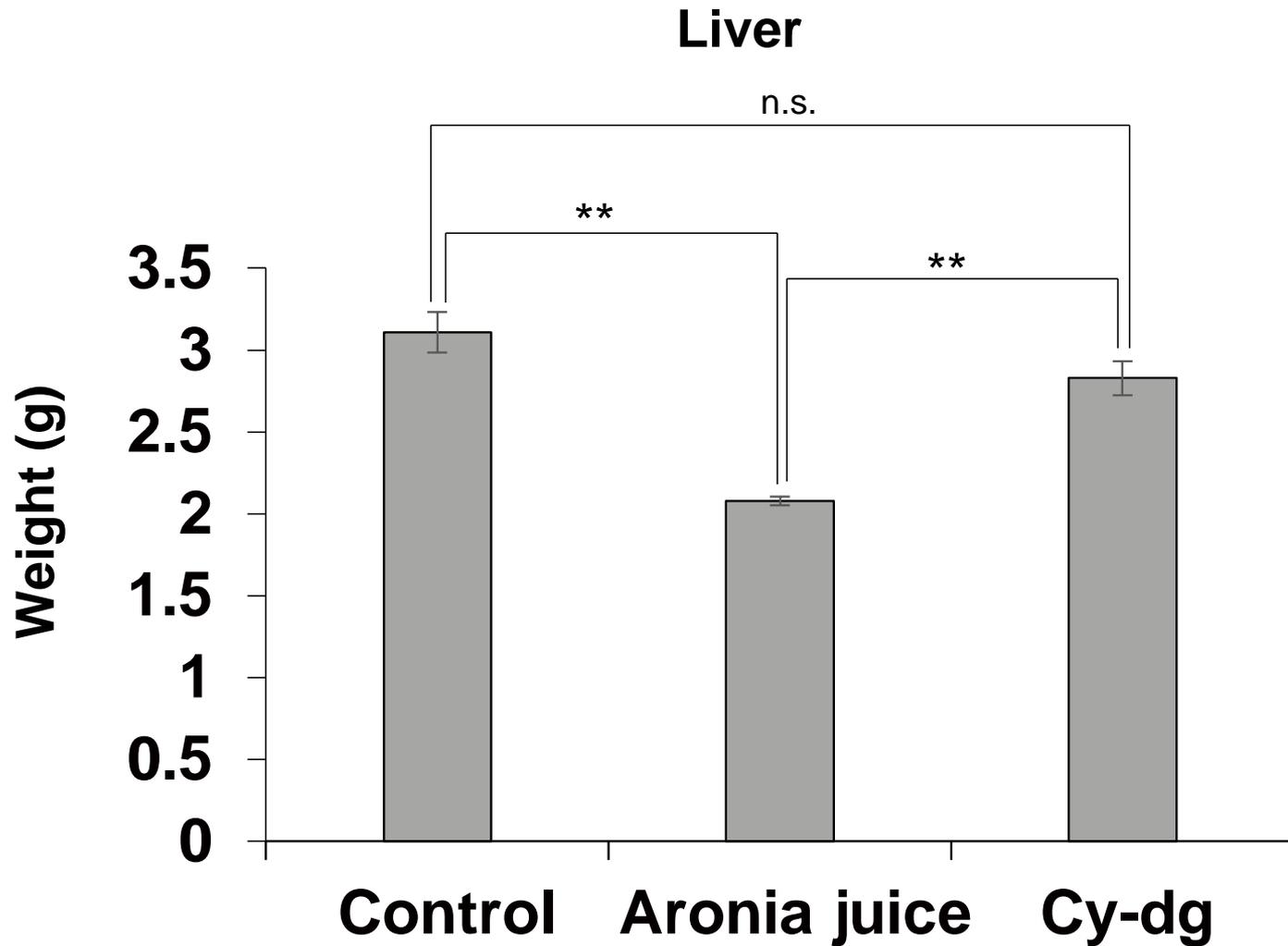
# Cyanidin 3,5-diglucoside 摂取で脂肪重量は減少しない

## Epididymal white adipose tissue



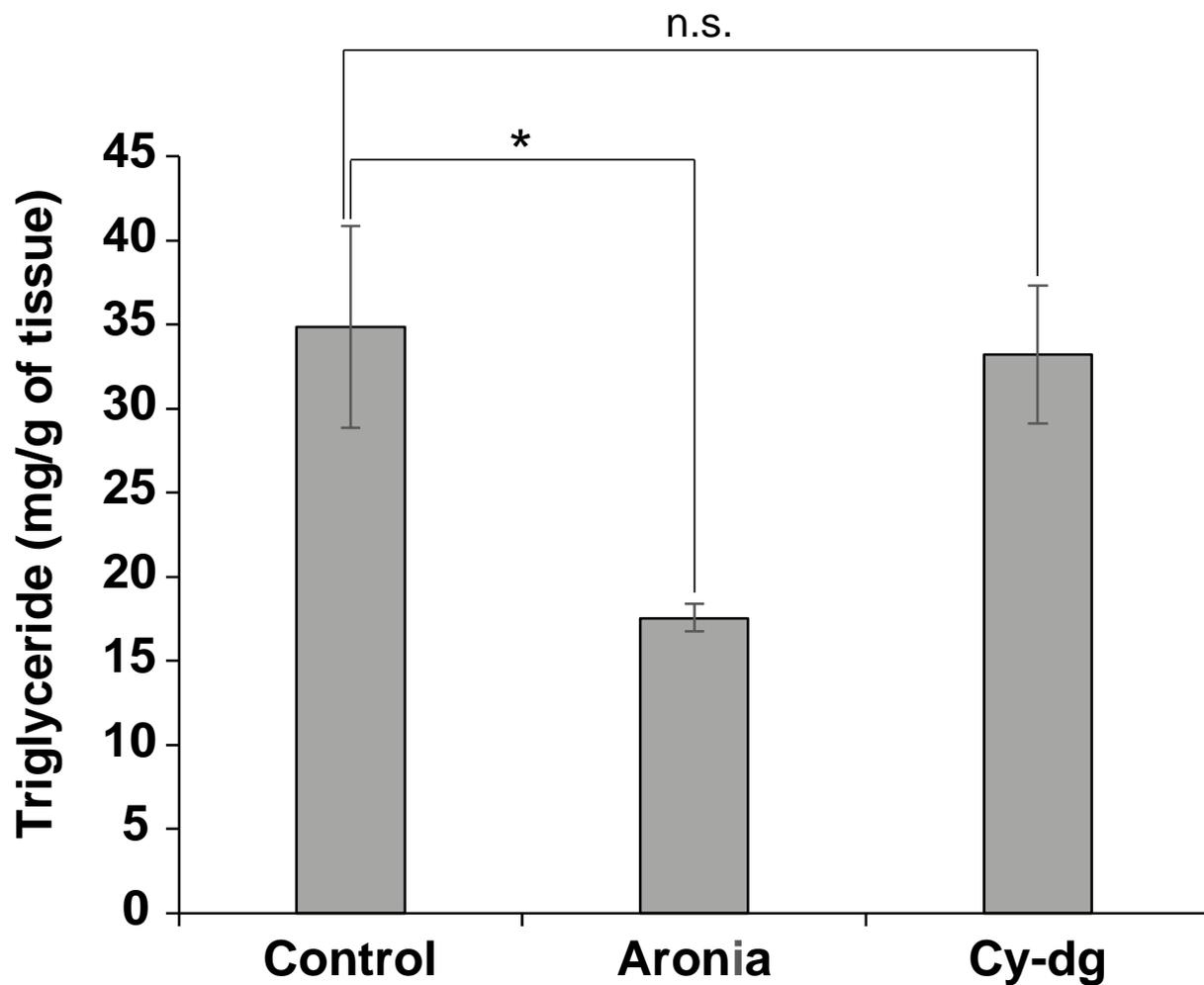
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  
n.s.: not significant,  $n = 5$

# Cyanidin 3,5-diglucoside 摂取で肝臓重量は減少しない



\*\* $p < 0.01$ , n.s.: not significant,  $n = 5$

# Cyanidin 3,5-diglucoside 摂取で肝臓中の中性脂肪は減少しない



\* $p < 0.05$ , n.s.: not significant, n=5

## 結果

Cyanidin 3,5-diglucoside摂取により、血糖値およびHbA1c値の上昇は抑制されたが、アロニア果汁摂取と比較してその効果は低かった。

Cyanidin 3,5-diglucoside摂取により、DPP IV活性の低下とGLP-1濃度の増加が認められたが、アロニア果汁摂取と比較してその効果は低かった。

アロニア果汁摂取で見られた白色脂肪組織重量の減少および肝臓の中性脂肪減少はcyanidin 3,5-diglucoside摂取では起こらなかった。

## まとめ

Cyanidin 3,5-diglucoside 摂取はアロニア果汁摂取と比較して糖尿病の予防・改善効果が低いことが示された。この結果はアロニア果汁中にcyanidin 3,5-diglucoside以外のDPP IV阻害物質が存在することを示唆している。さらに、cyanidin 3,5-diglucoside 摂取は脂肪蓄積抑制に効果がないことが明らかとなった。

今後の課題として、アロニア果汁中に含まれるcyanidin 3,5-diglucoside以外のDPP IV阻害物質、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質そして脂肪蓄積抑制物質の同定が必要である。

# アロニア摂取による腸内細菌叢変化

小塚美由記<sup>1</sup>、山根拓也<sup>2,3,5</sup>、今井ももこ<sup>2,4,6</sup>、竹中重雄<sup>4</sup>、石田哲夫<sup>7</sup>、  
阪本龍司<sup>2,3</sup>、乾博<sup>2,4</sup>、山本好男<sup>8</sup>、大久保岩男<sup>9</sup>、中垣剛典<sup>5</sup>、中野長久<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>北海道文教大・健康栄養、大阪府大・<sup>2</sup>生資セ、<sup>3</sup>生命環境、<sup>4</sup>栄養、<sup>5</sup>中垣技術士事務所・食科研、  
<sup>6</sup>相愛大・発達栄養、<sup>7</sup>琉球大・理、<sup>8</sup>三重大・地域拠点、<sup>9</sup>市立三笠総合病院

# 日本栄養・食糧学会

## COI開示

小塚美由記

演題発表内容に関連し、開示すべき  
COI関係にある企業などはありません。

# アロニア

- ◆分類：バラ目 バラ科 ナシ亜科 アロニア属
- ◆学名：Aronia
- ◆和名：アロニア、アローニヤ、セイヨウカマツカ
- ◆英名：Chokeberry、Aronia



## 特徴的なAronia果汁の栄養成分

成分 (100g中)	アロニア	ブルーベリー
アントシアニン	1480mg	487mg
β-クリプトキサンチン	463μg	0
αカロテン	7.5μg	0
βカロテン	771μg	55μg

1) Data from Takenori Nakagaki(Nakagaki Consulting engineer & Co,Ltd)

豊富な栄養素により様々な健康効果がうたわれるようになったアロニアです。近年、健康果実として広まってきている。

## 主に栽培されている地域



道内生産量  
48.0 t



Sample: aronia juice  
提供: 中垣技術士事務所

- 黒いナナカマドともいわれている。
- 寒さに強い果実のため北海道のような寒冷地での栽培が適している。
- 糖度はイチゴと同じくらいの甘みを持つが渋みが強い。
- 加工用として使用されている割合が高い。
- 苗木を植えた翌年から実をつける強い果実といわれるため、栽培しやすいとされる。

# アロニア果実や果汁が持つ健康機能

抗酸化作用	心臓血管系への効果	血圧の正常化
脂質低下作用	抗糖尿病活性	抗がん活性
神経系への効果	抗炎症活性・抗菌作用	胃保護作用

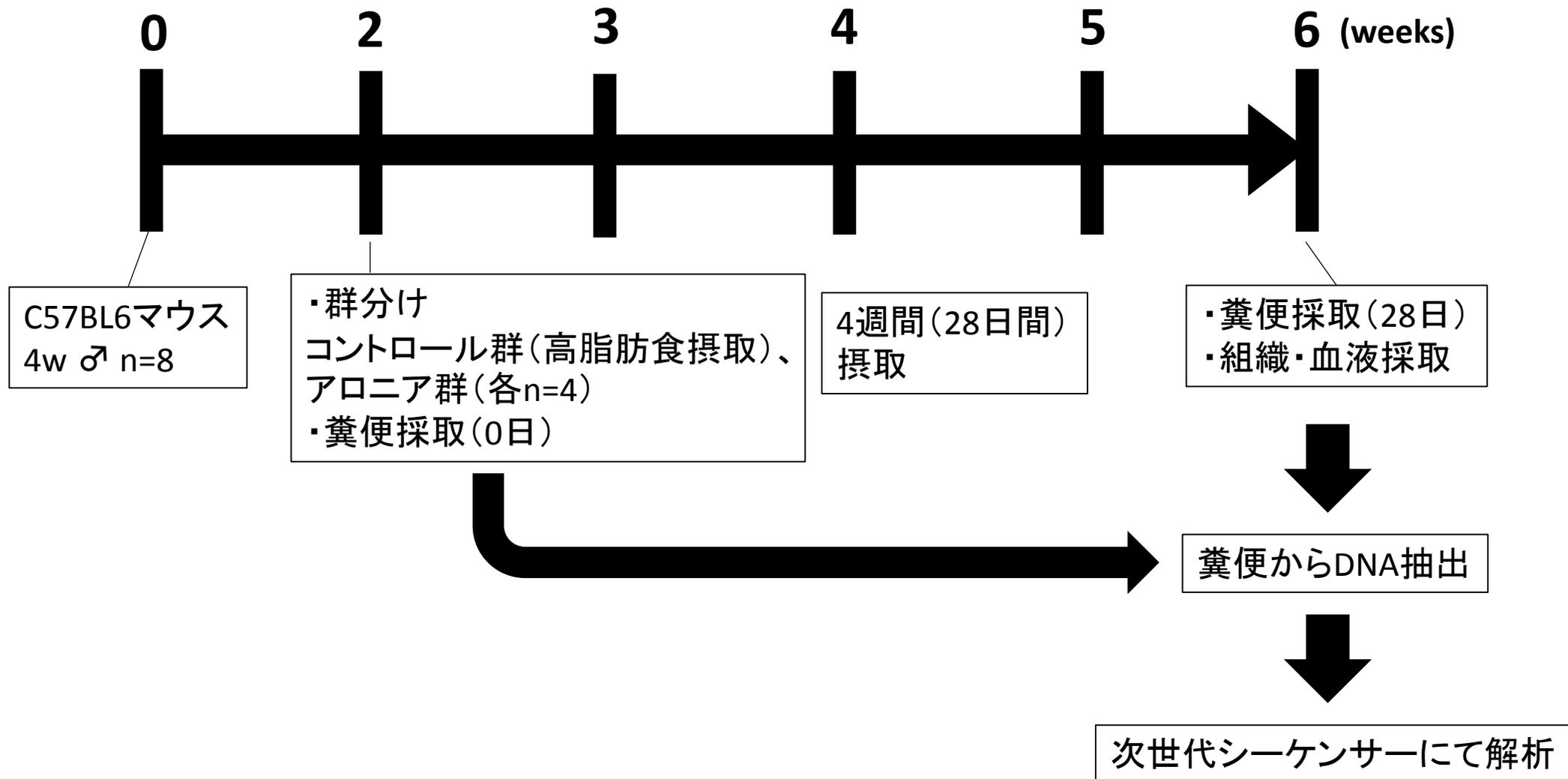
Kokotkiewicz A et al., J Med Food 2010より抜粋

## 研究背景と目的

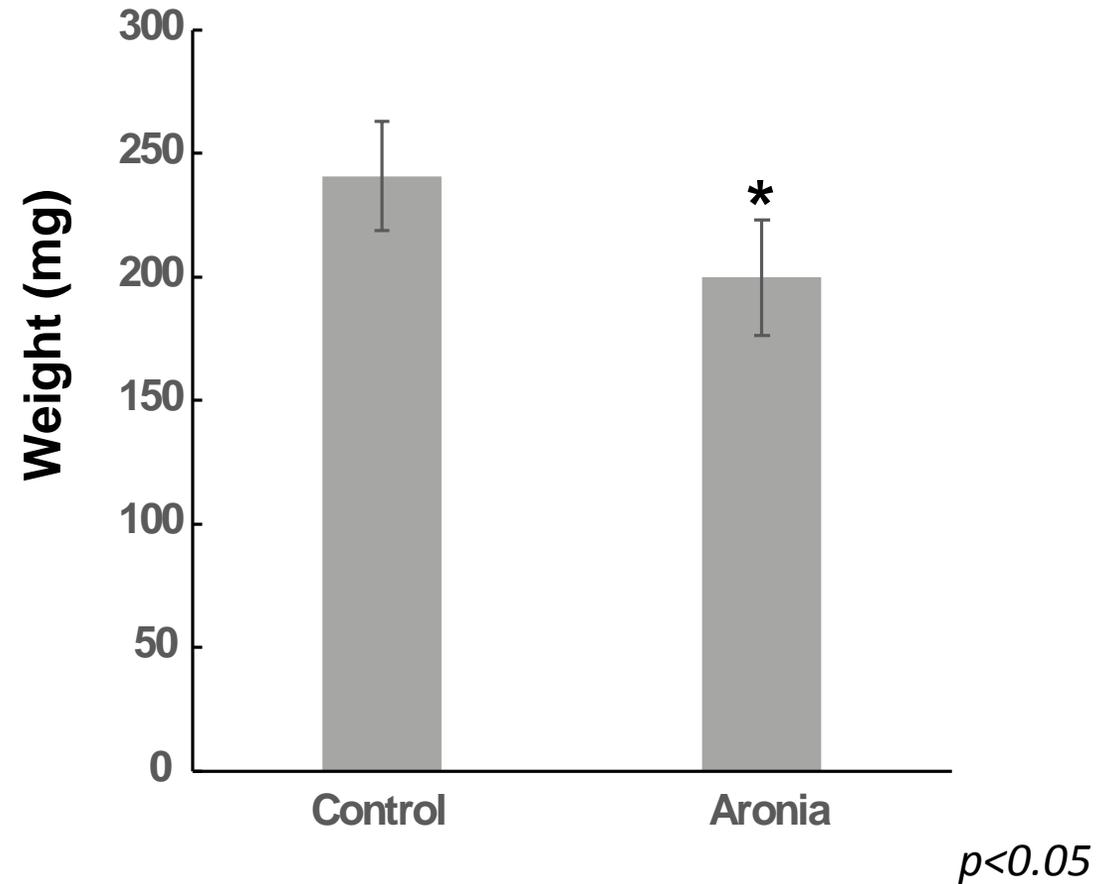
- アロニアにはポリフェノールが豊富に含まれる (Proc Nutr Soc. 2016)。
- 摂取したポリフェノールの多くは小腸においてあまり吸収されず、90%以上が大腸へ入る (American J Clin Nutr 2005, Nutrients 2016)。
- 高脂肪食摂取で増加するFirmicutes/Bacteroidetes比はアロニア摂取により増加が抑制される (J Clin Biochem Nutr 2015)。

本研究では、アロニア摂取による腸内細菌叢変化について、より詳細な解析を行なった。

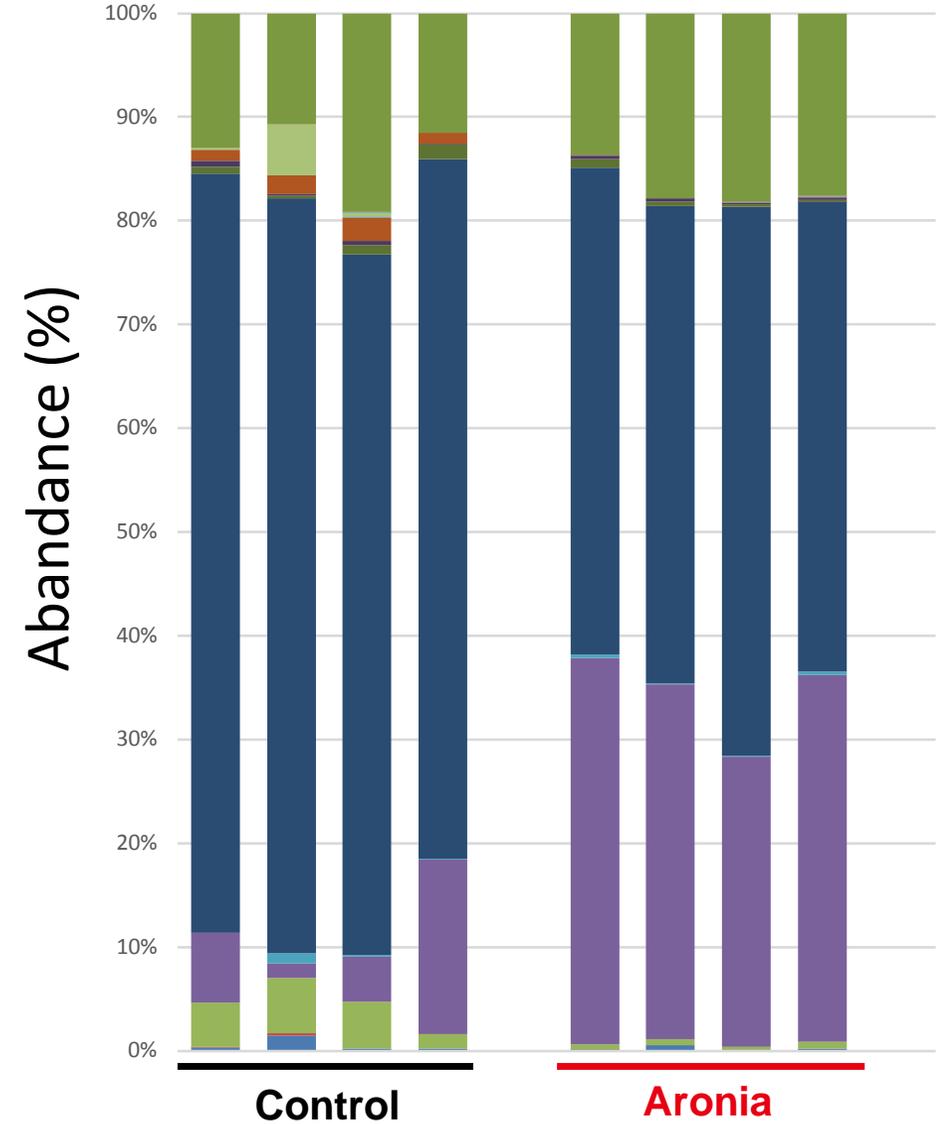
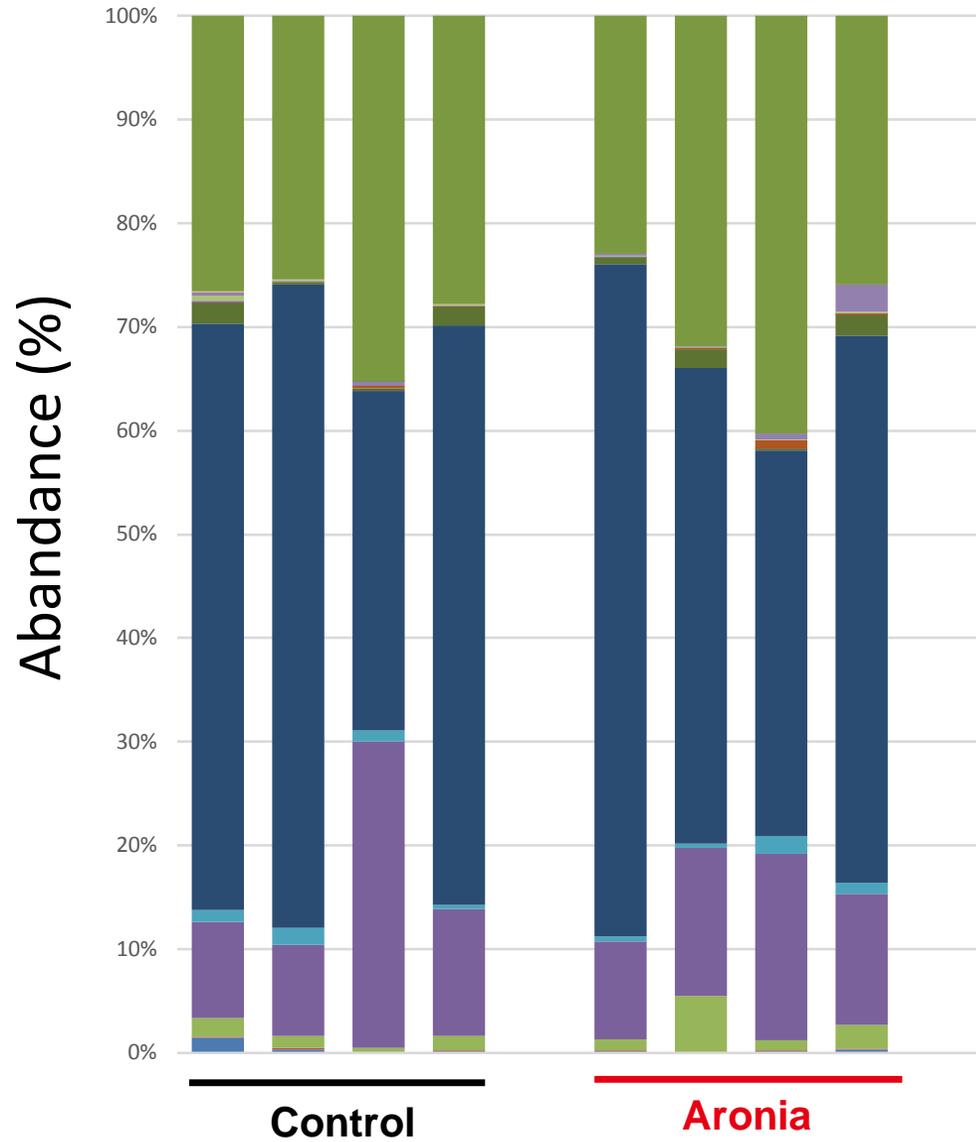
# 実験方法



# アロニア摂取により腸間膜脂肪は減少する

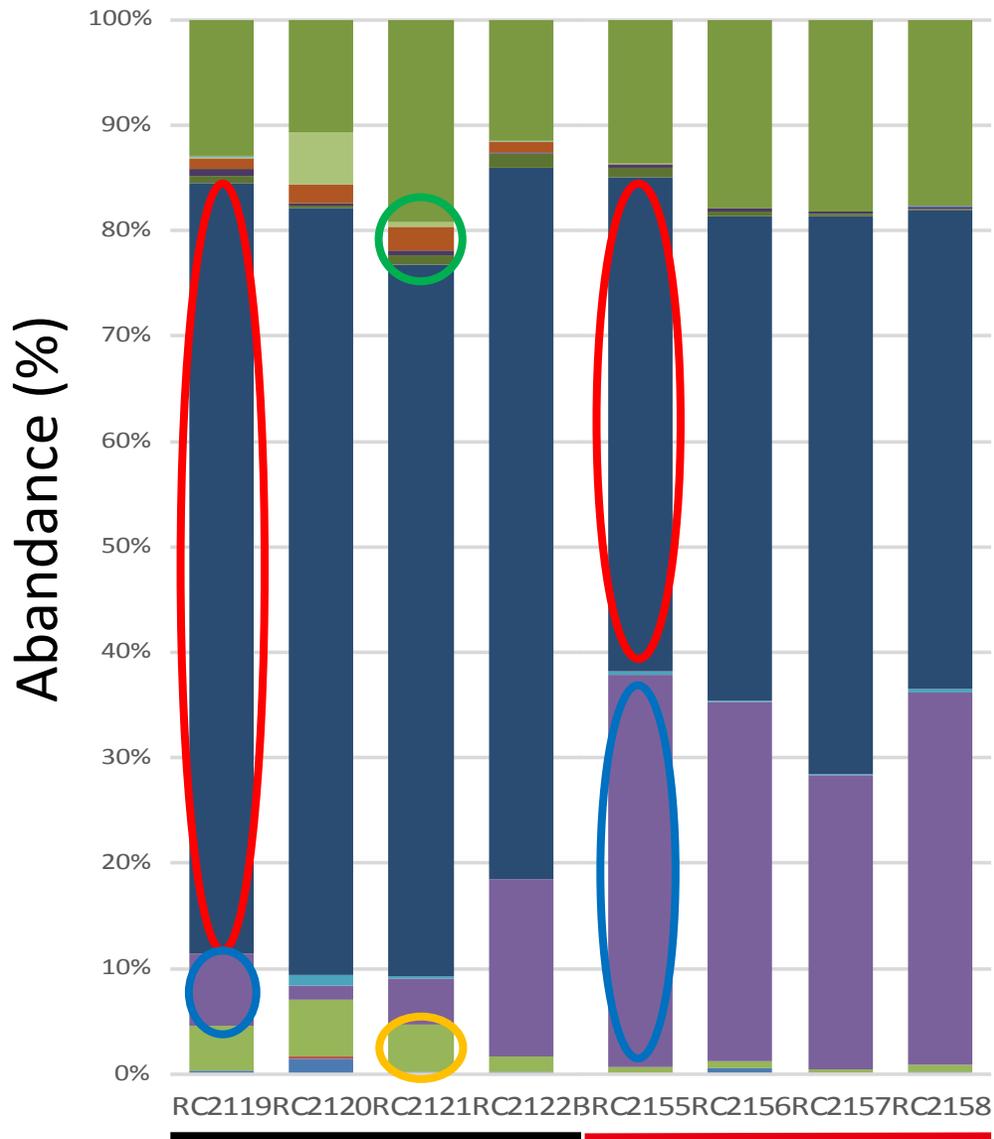


# アロニア摂取による腸内細菌叢変化(綱)



# アロニア摂取による腸内細菌叢変化(綱)

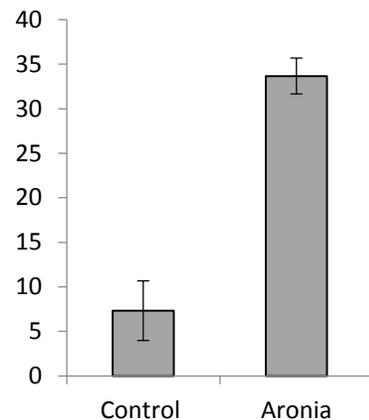
摂食後



**Control**

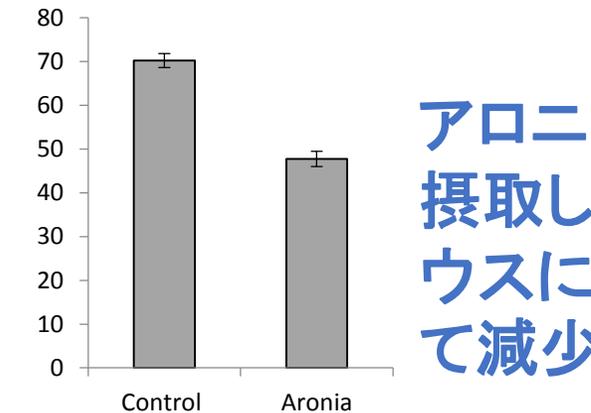
**Aronia**

**Bacteroidia**  
(バクテロイデス門バクテロイデス綱)



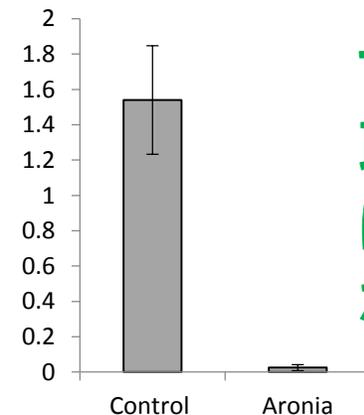
アロニアを  
摂取したマ  
ウスにおい  
て増加

**Clostridia**  
(フィルミクテス門クロストリジウム綱)



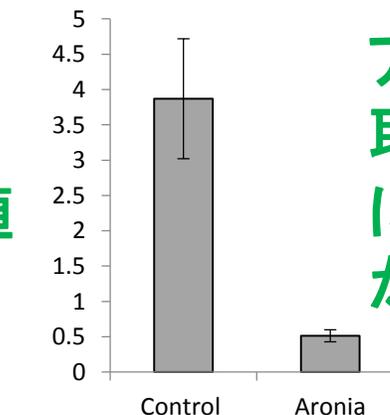
アロニアを  
摂取したマ  
ウスにおい  
て減少

**Erysipelotrichi**  
(フィルミクテス門エリシペロトリクス綱)



アロニアを摂  
取したマウス  
において増殖  
が抑制

**Bacilli**  
(フィルミクテス門バシラス綱)

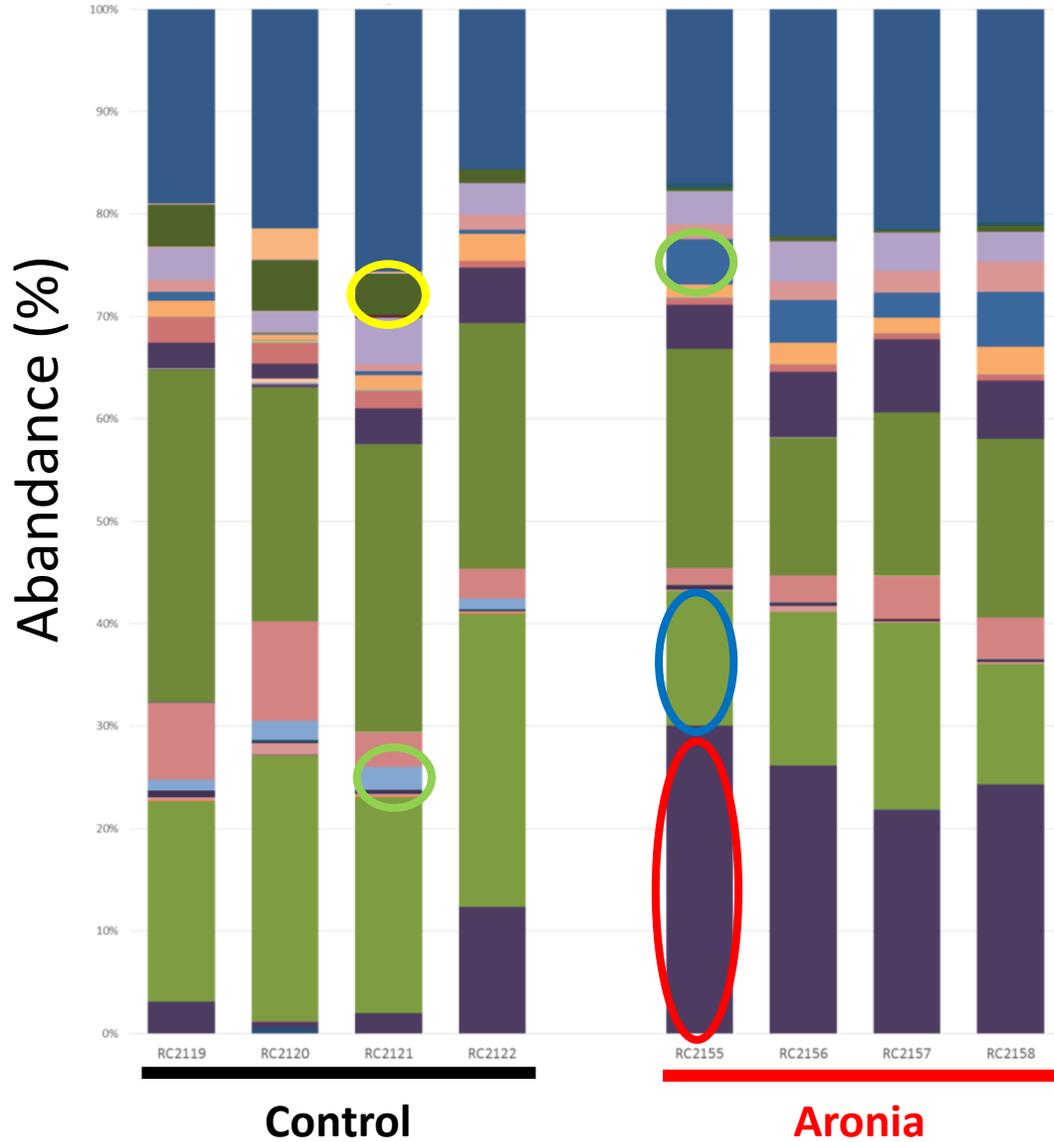


アロニアを摂  
取したマウス  
において増殖  
が抑制



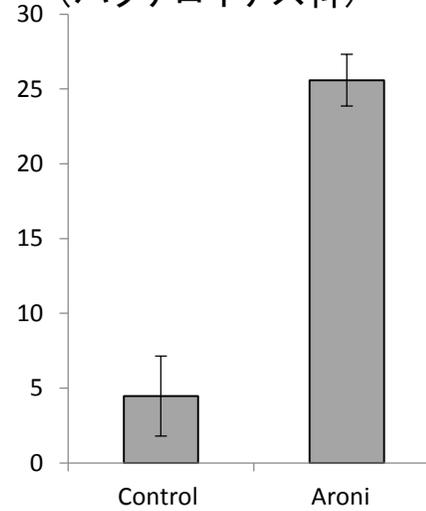
# アロニア摂取による腸内細菌叢変化(科)

摂食後



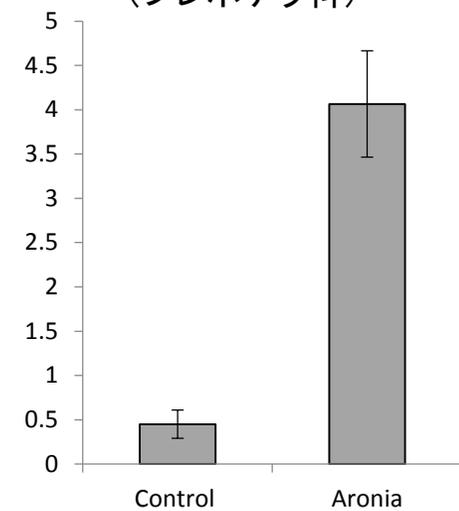
■ Bacteroidaceae

(バクテロイデス科)



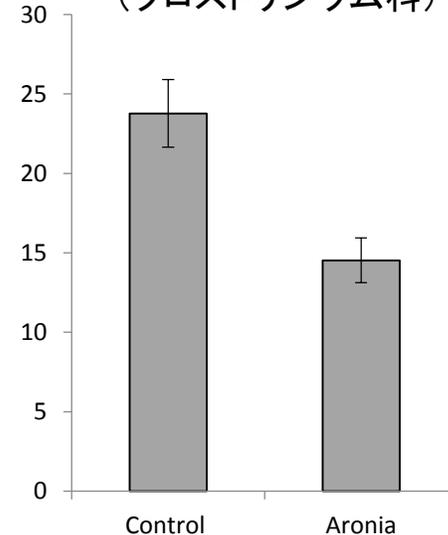
■ Prevotellaceae

(プレボテラ科)



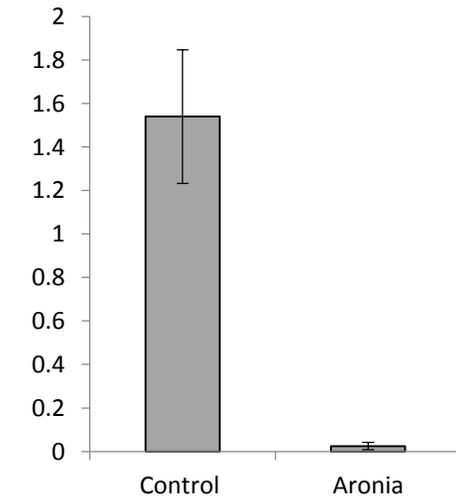
■ Clostridiaceae

(クロストリジウム科)



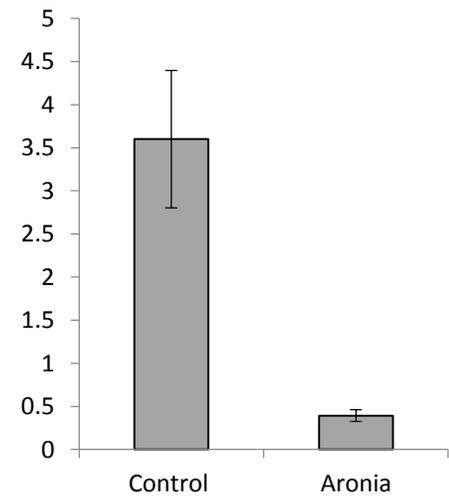
■ Erysipelotrichaceae

(エリシペロトリクス科)



■ Streptococcaceae

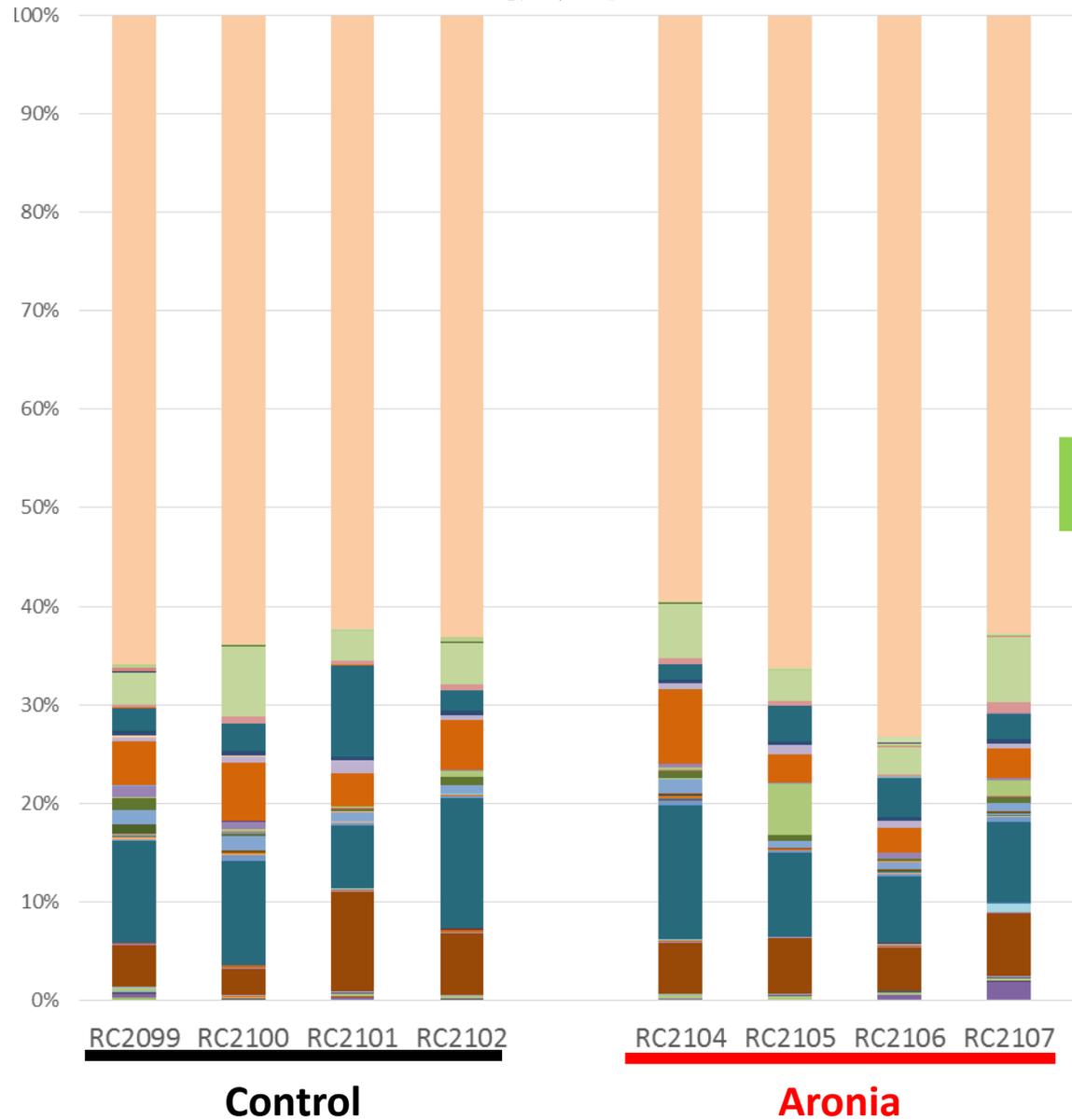
(ストレプトコッカス科)



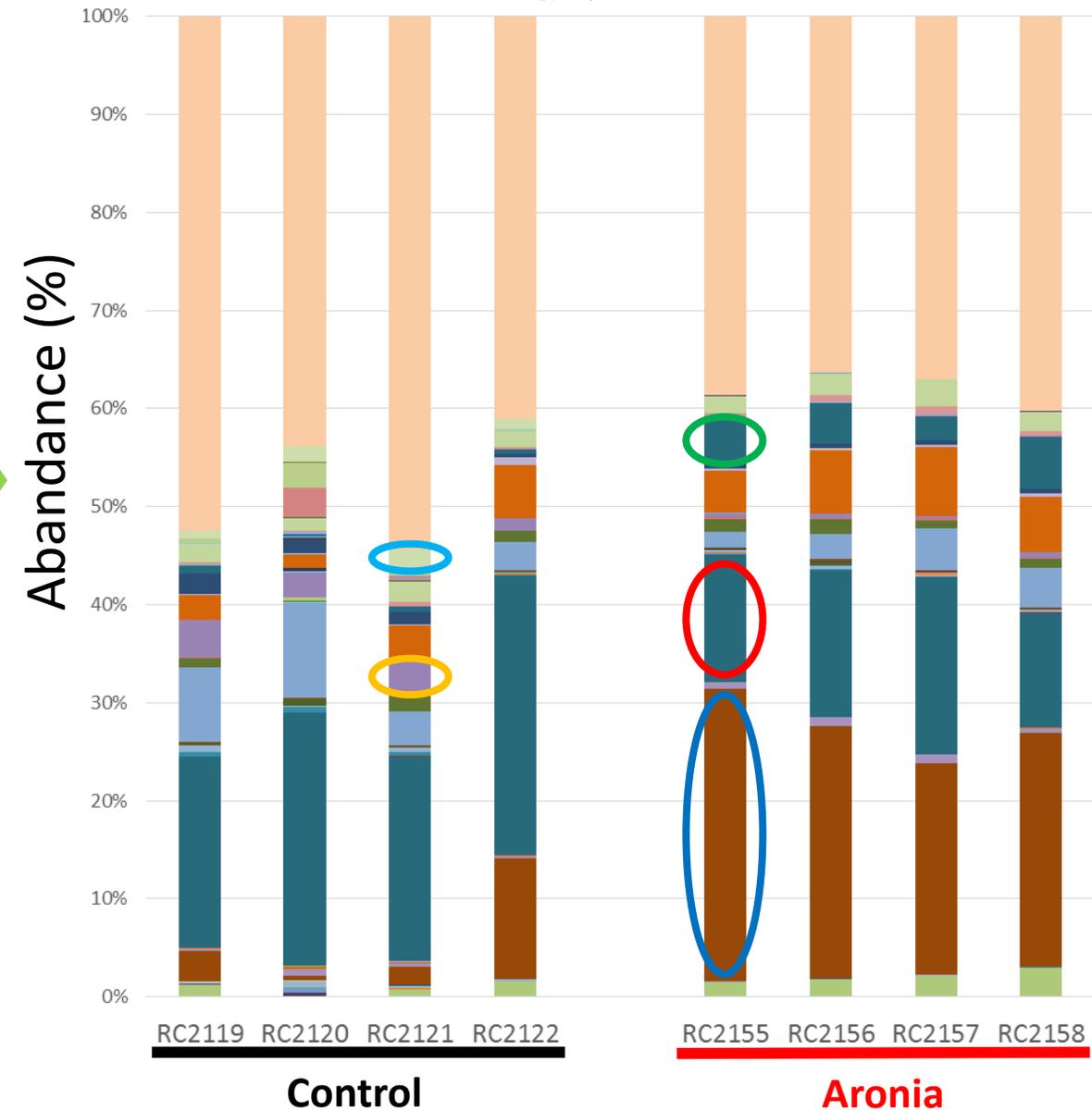
- Bacteroidaceae (バクテロイデス科)  
アロニアを摂取したマウスにおいて増加
- Prevotellaceae (プレボテラ科)  
アロニアを摂取したマウスにおいて減少抑制
- Clostridiaceae (クロストリジウム科)  
アロニアを摂取したマウスにおいて増加抑制
- Erysipelotrichaceae (エリシペロトリクス科)  
アロニアを摂取したマウスにおいて増加抑制
- Streptococcaceae (ストレプトコッカス科)  
アロニアを摂取したマウスにおいて増加抑制

# アロニア摂取による腸内細菌叢変化(属)

摂食前

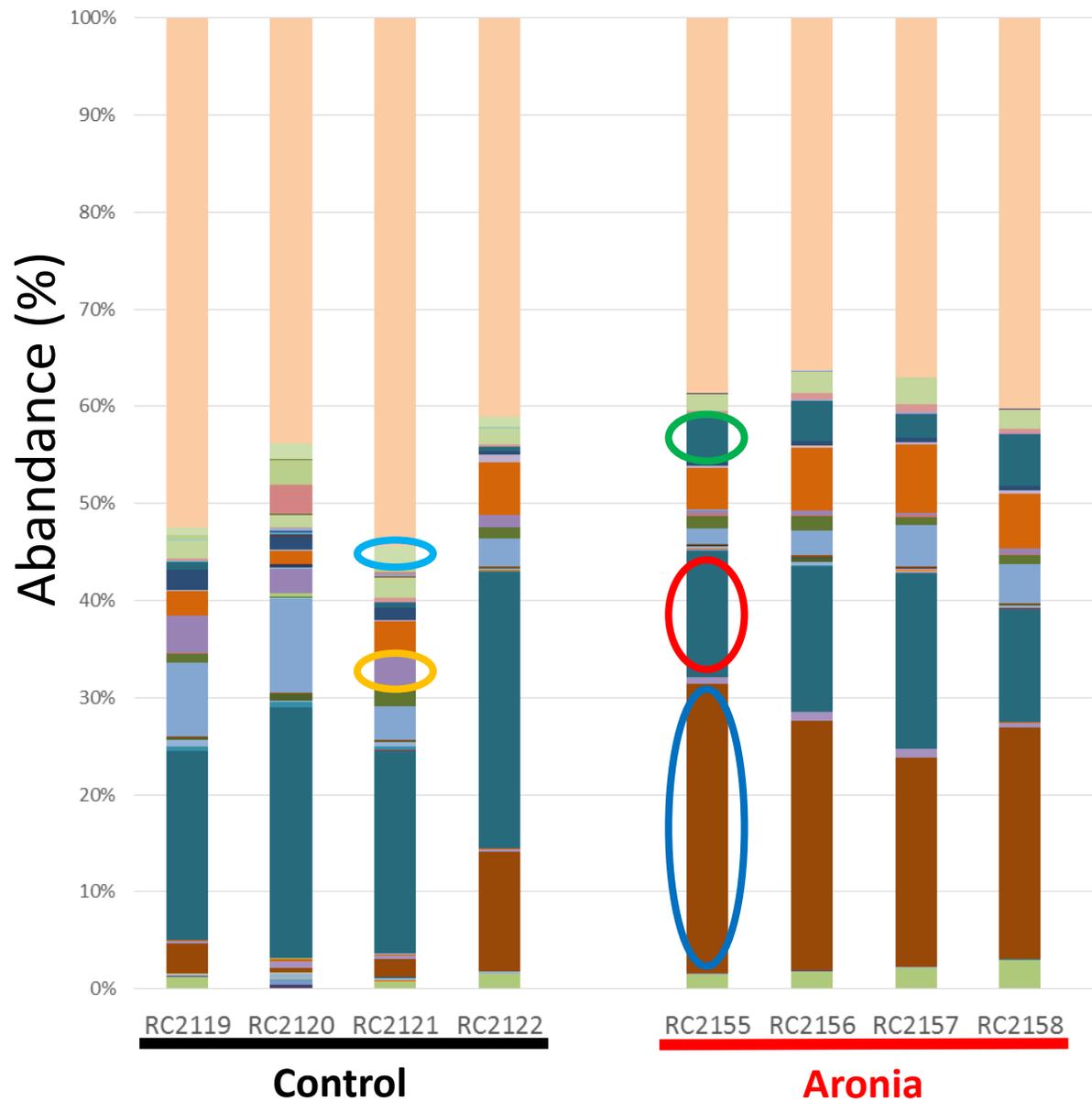


摂食後

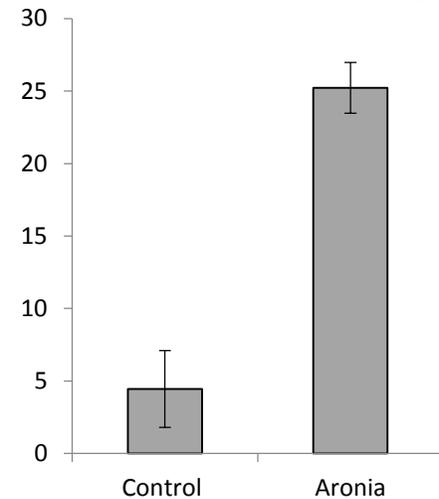


# アロニア摂取による腸内細菌叢変化(属)

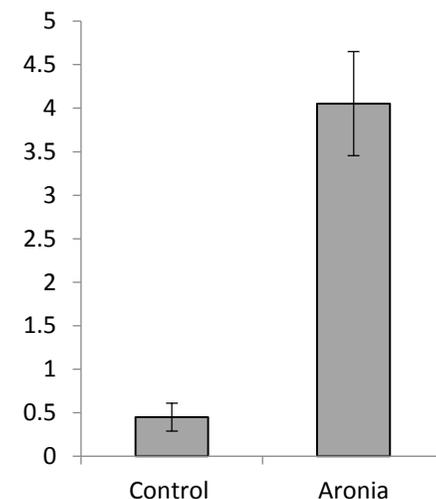
摂食後



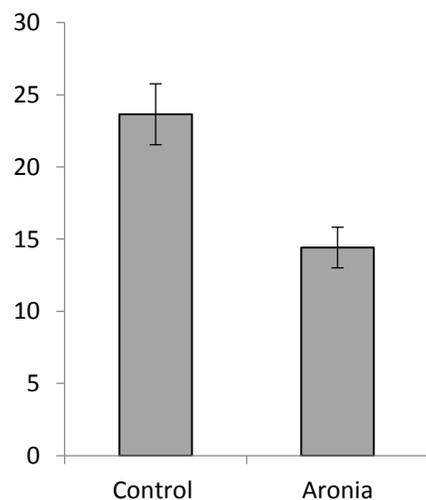
Bacteroides  
(バクテロイデス属)



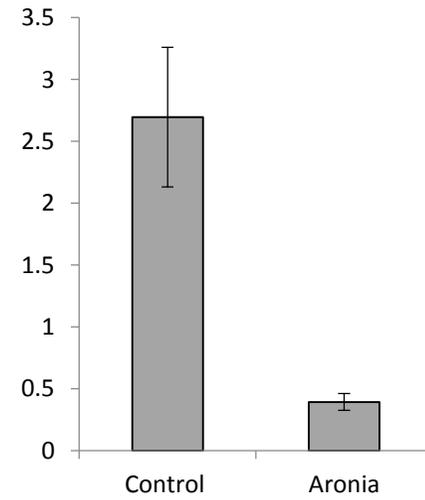
Prevotella  
(プレボテラ属)



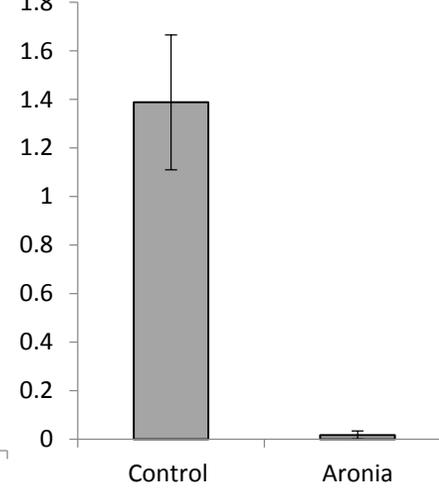
Clostridium  
(クロストリジウム属)



Lactococcus  
(ラクトコッカス属)



Turicibacter  
(ツリキバクター属)



■ Bacteroides (バクテロイデス属)

アロニアを摂取したマウスにおいて増加

■ Prevotella (プレボテラ属)

アロニアを摂取したマウスにおいて減少抑制

■ Clostridium (クロストリジウム属)

アロニアを摂取したマウスにおいて増加抑制

■ Lactococcus (ラクトコッカス属)

アロニアを摂取したマウスにおいて増加抑制

■ Turicibacter (ツリキバクター属)

アロニアを摂取したマウスにおいて増加抑制

# アロニア摂取により変化した腸内細菌叢

バクテロイデス門

バクテロイデス綱

バクテロイデス科

バクテロイデス属

プレボテラ科

プレボテラ属



アロニアを摂取した  
マウスにおいて増加

アロニアを摂取した  
マウスにおいて減少抑制

全体として増加

フィルミクテス門

クロストリジウム綱

クロストリジウム科

クロストリジウム属

バシラス綱

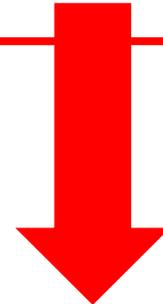
ストレプトコッカス科

ラクトコッカス属

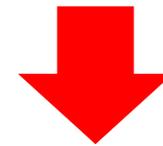
エリシペロトリクス綱

エリシペロトリクス科

ツリキバクター属



アロニアを摂取したマウスにおいて増加抑制



全体として減少

## まとめ

- 高脂肪食摂取によってバクテロイデス門に属するプレボテラ属は減少するが、アロニア摂取によりその減少は抑制された。
- アロニア摂取によってバクテロイデス属は増加した。
- フィルミクテス門に属するクロストリジウム属、ラクトコッカス属、ツリキバクター属は高脂肪食摂取により増加するが、アロニア摂取によりその増加は抑制された。
- 今後、これらの腸内細菌によるポリフェノールの代謝について検討し、アロニア摂取による腸間膜脂肪減少との関連性について明らかにする。

# アロニア果汁中に存在する 血糖値及びHbA1c値 上昇抑制物質の探索

○今井ももこ<sup>1,2,4)</sup>、山根拓也<sup>1,3,5)</sup>、小塚美由記<sup>6)</sup>、石田哲夫<sup>7)</sup>、竹中重雄<sup>2)</sup>、  
阪本龍司<sup>1,3)</sup>、乾博<sup>1,2)</sup>、大久保岩男<sup>8)</sup>、中垣剛典<sup>5)</sup>、中野長久<sup>1)</sup>

1)大阪府大・生資セ、2)大阪府大・栄養、3)大阪府大・生命環境、  
4)相愛大・発達栄養、5)中垣技術士事務所・食科研、  
6)北海道文教大・健康栄養、7)琉球大・理、8)市立三笠総合病院

# 日本栄養・食糧学会 COI 開示

発表の連絡責任者名： 今井 ももこ

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある  
企業などはありません。

# アロニアの効能

*Aronia* (アロニア)



- ・アロニアは北米原産のバラ科に属する黒紫色の果実
- ・ロシア、ポーランド、ブルガリアで広く生産
- ・日本では北海道や東北で栽培

抗酸化作用

心臓血管系への効果

血圧の正常化

脂質低下作用

抗糖尿病活性

抗がん活性

神経系への効果

抗炎症活性・抗菌作用

胃保護作用

# 研究背景と目的

アロニア果汁中にはジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV)阻害物質と $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質が存在しており、DPP IV阻害物質の1つがcyanidin 3,5-diglucosideであることを同定した。

アロニア果汁中に存在する血糖値及びHbA1c値上昇抑制物質としてcyanidin 3,5-diglucosideを同定しているが、アロニア果汁摂取に比べ抑制効果が低く、他のインヒビターの存在が示唆されている。

そこで本研究では $\alpha$ -グルコシダーゼもしくはcyanidin 3,5-diglucoside以外のDPP IV阻害物質を探索することを目的に実験を行った。

# 酵素阻害による血糖値上昇抑制

## $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害

$\alpha$ -グルコシダーゼ: 糖質分解酵素

阻害

糖質の分解抑制



糖質の吸収抑制

血糖値上昇抑制

## DPP-IV阻害

DPP-IV: インクレチン分解酵素

阻害

⇒インスリン分泌促進

グルカゴン分泌抑制

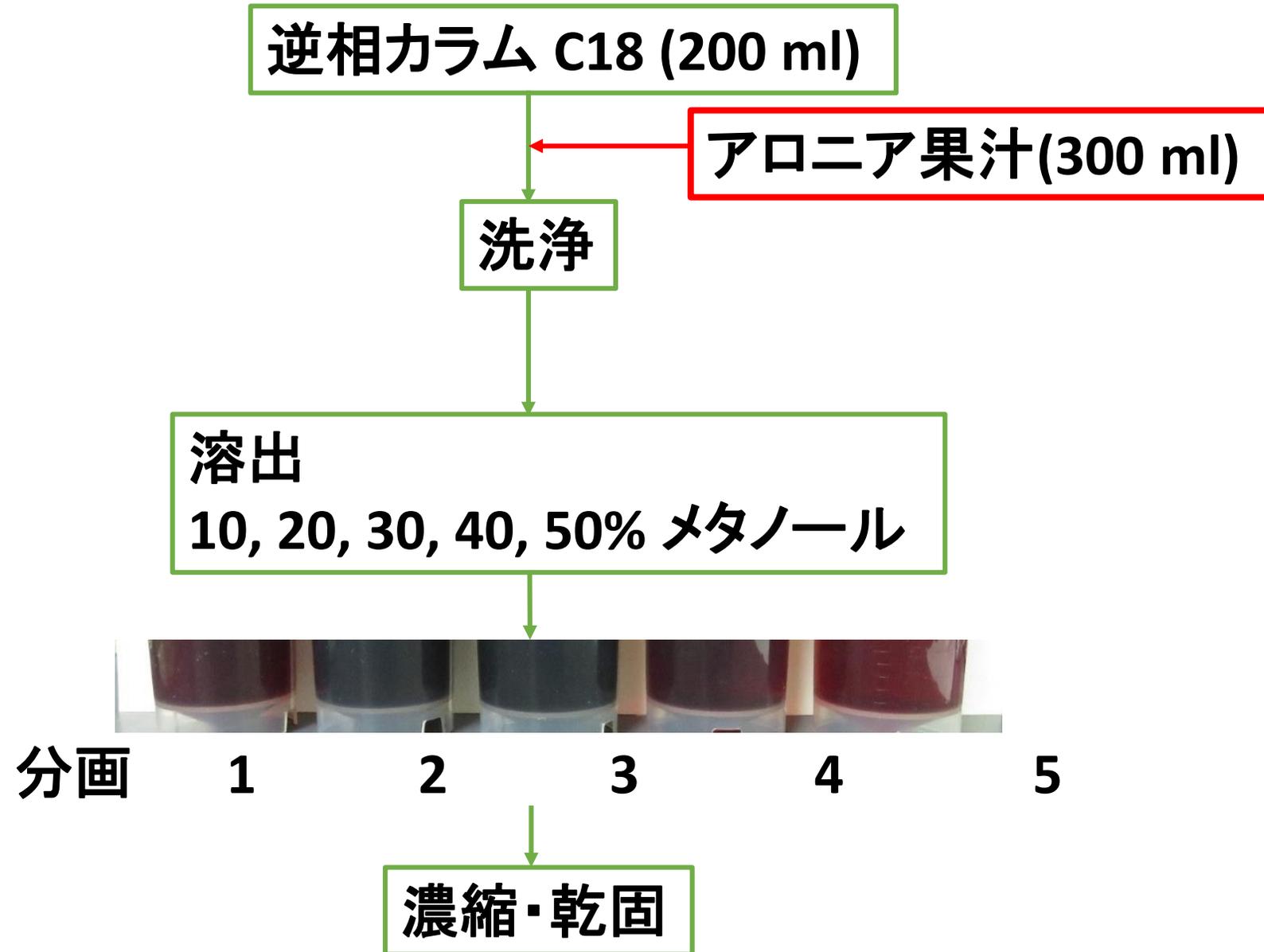
インクレチン分解抑制



インスリンが分泌促進

血糖値上昇抑制

# アロニア果汁の分離とメタノール分画調製

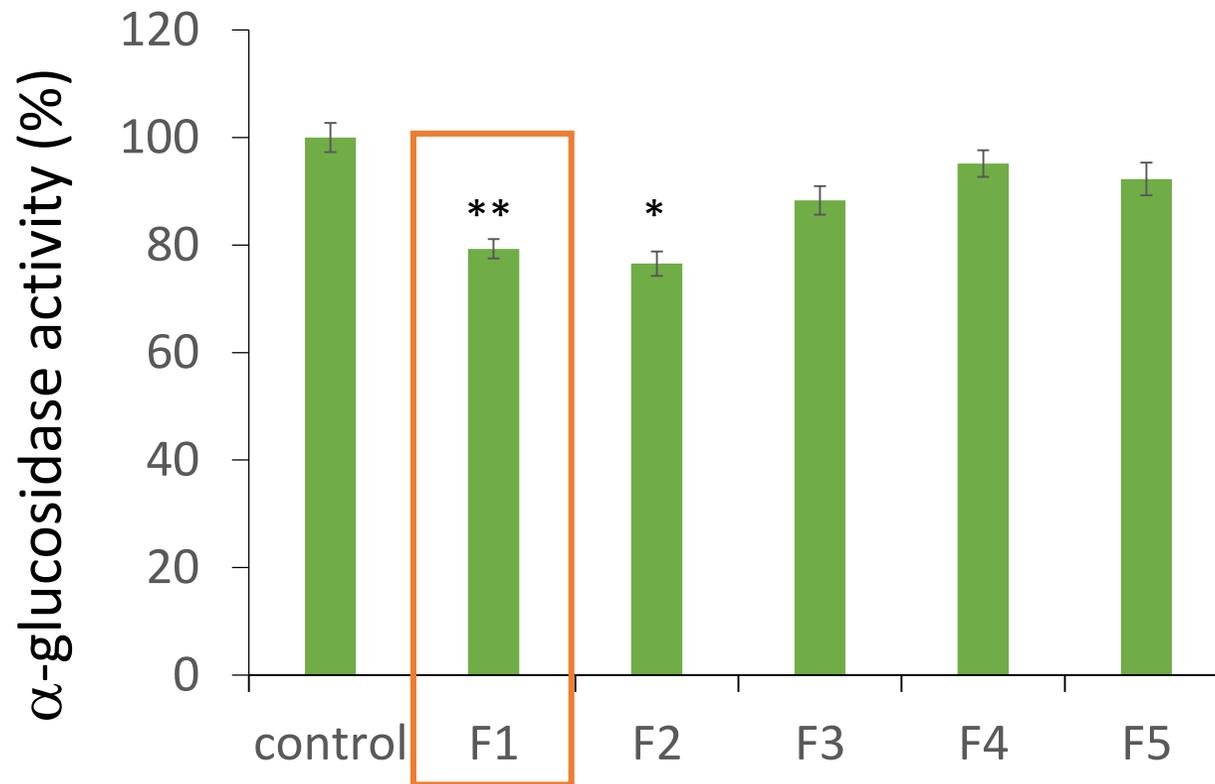


# $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性

150mM Phosphate buffer(pH7.0)	50 $\mu$ l
DW	40 $\mu$ l
Sample(Control; DW)	5 $\mu$ l
20mM p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucoside	50 $\mu$ l
enzyme solution	5 $\mu$ l
total	150 $\mu$ l

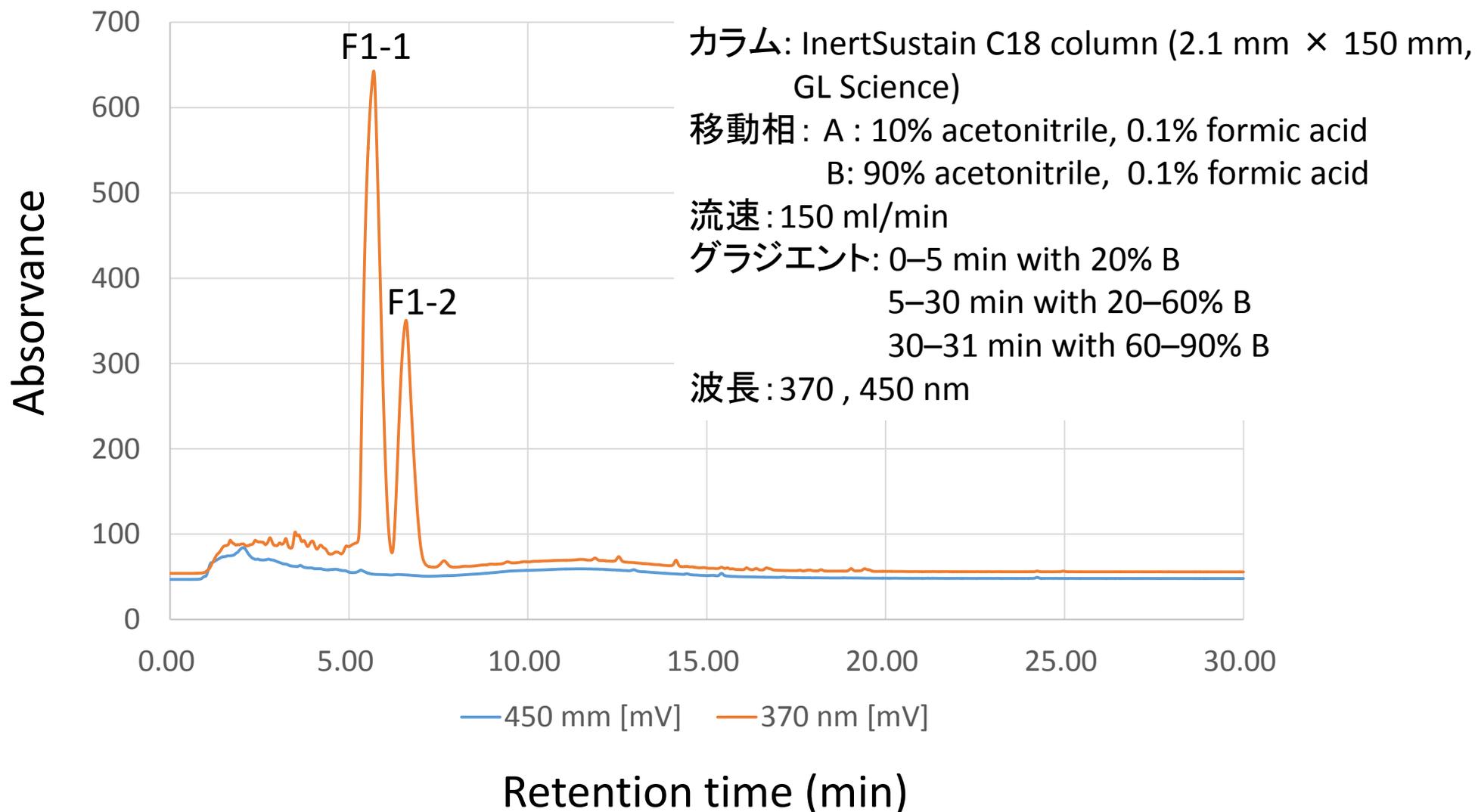


37°C × 30分反応後、吸光度(410nm)測定

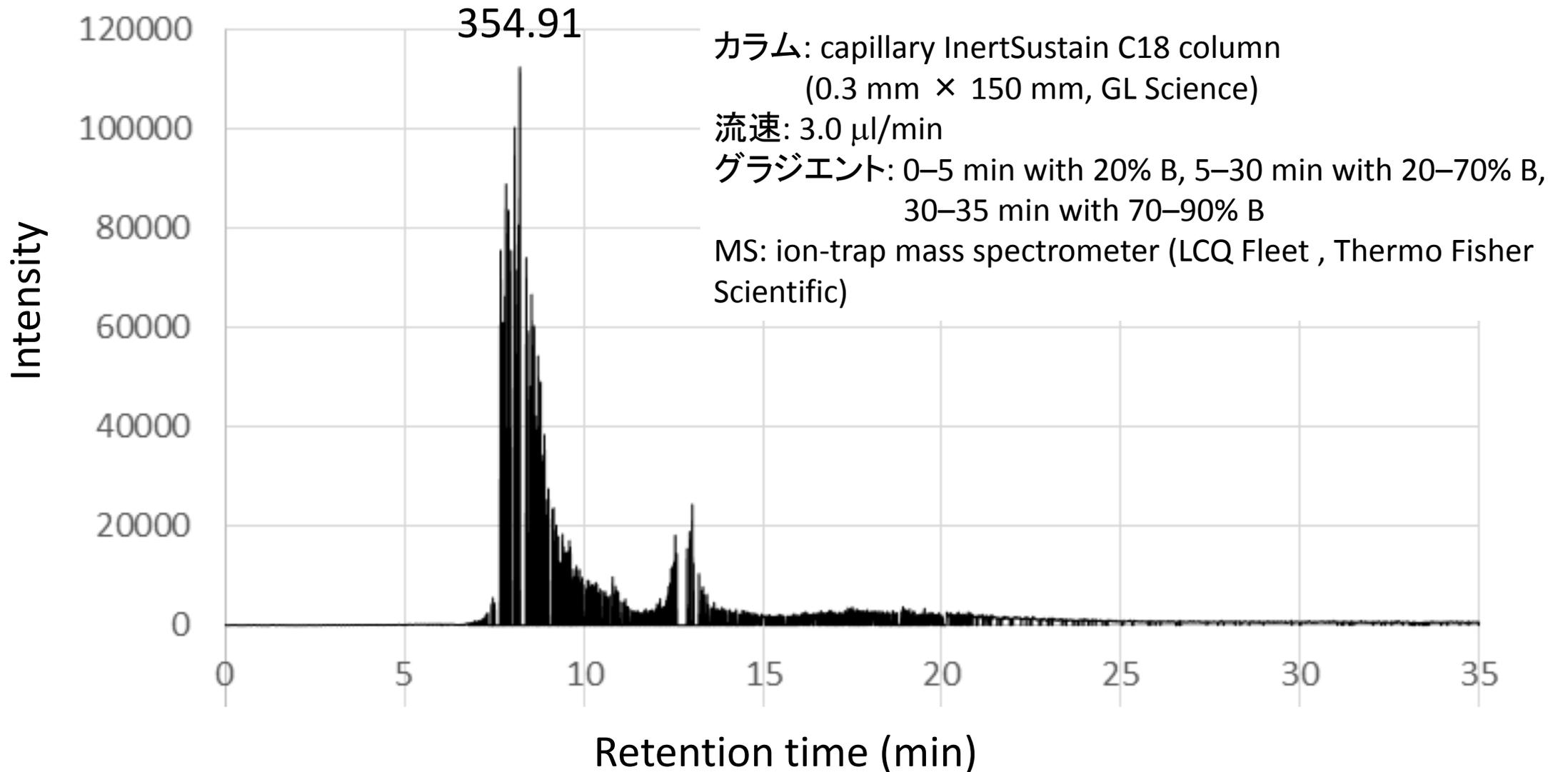


F1: 10% MeOH Frc., F2: 20% MeOH Frc.,  
F3: 30% MeOH Frc.,  
F4: 40% MeOH Frc., F5: 50% MeOH Frc.

# 分画(F1)の分離および分取

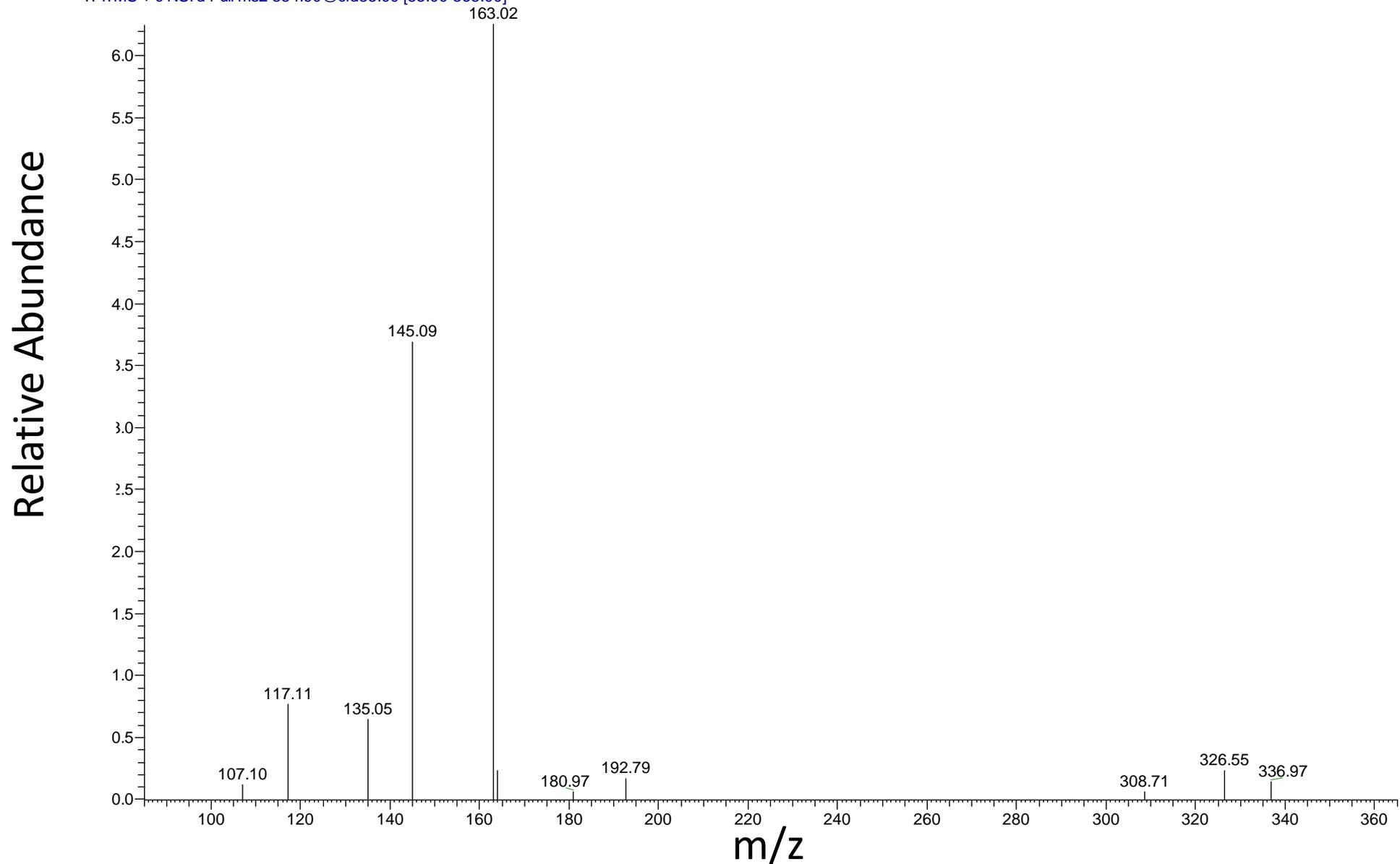


# F1-1のLC/MS分析

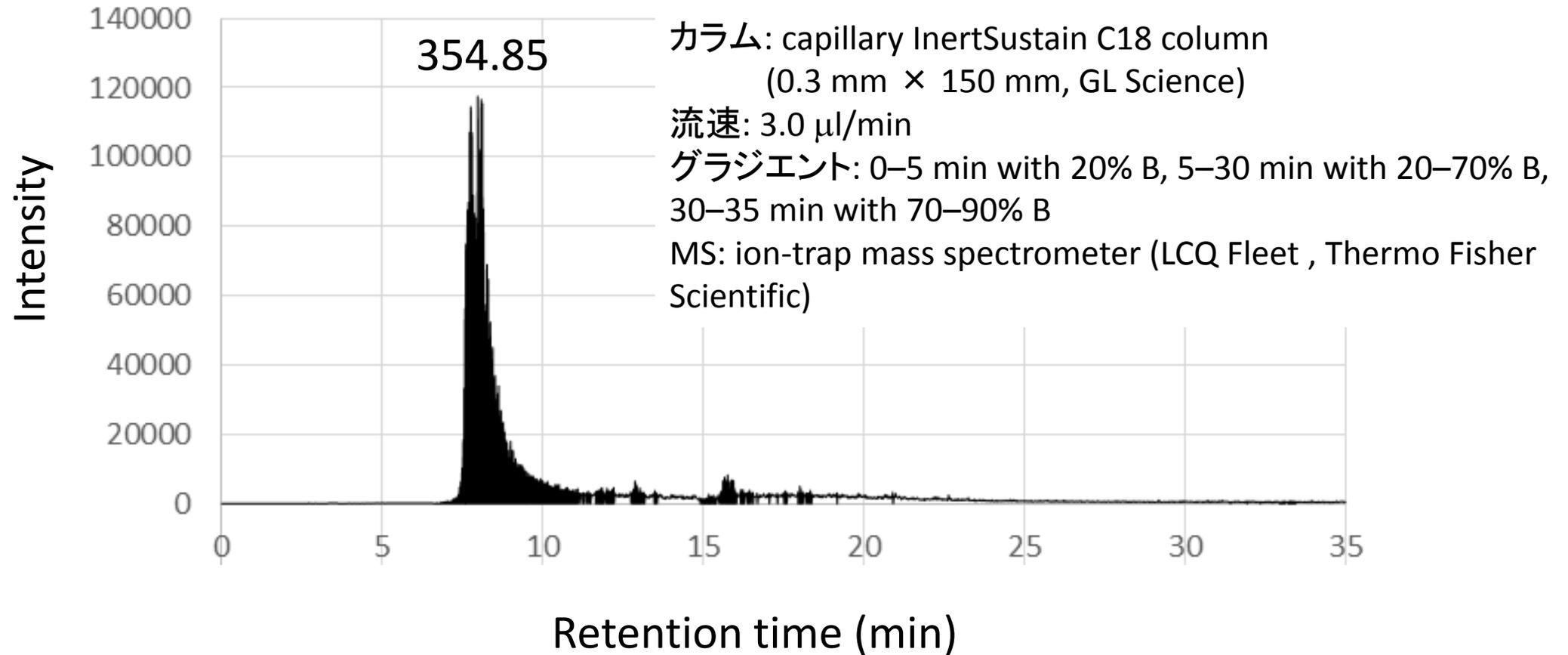


# F1-1のMS/MS分析

ey6\_F1-1re\_2018110401 #701 RT: 7.88 AV: 1 NL: 5.92E4  
T: ITMS + c NSI d Full ms2 354.90@cid35.00 [85.00-365.00]

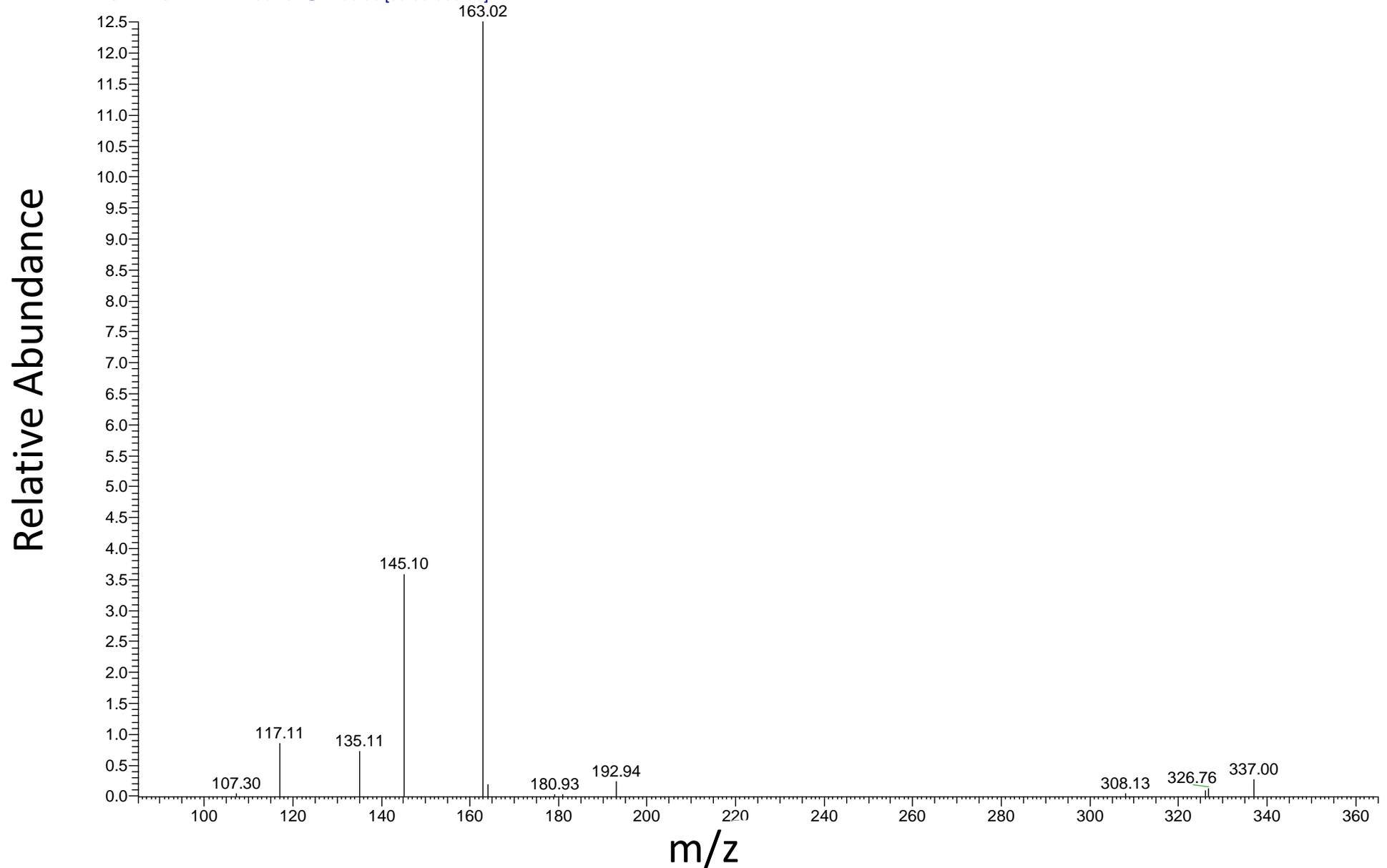


# F1-2のLC/MS分析

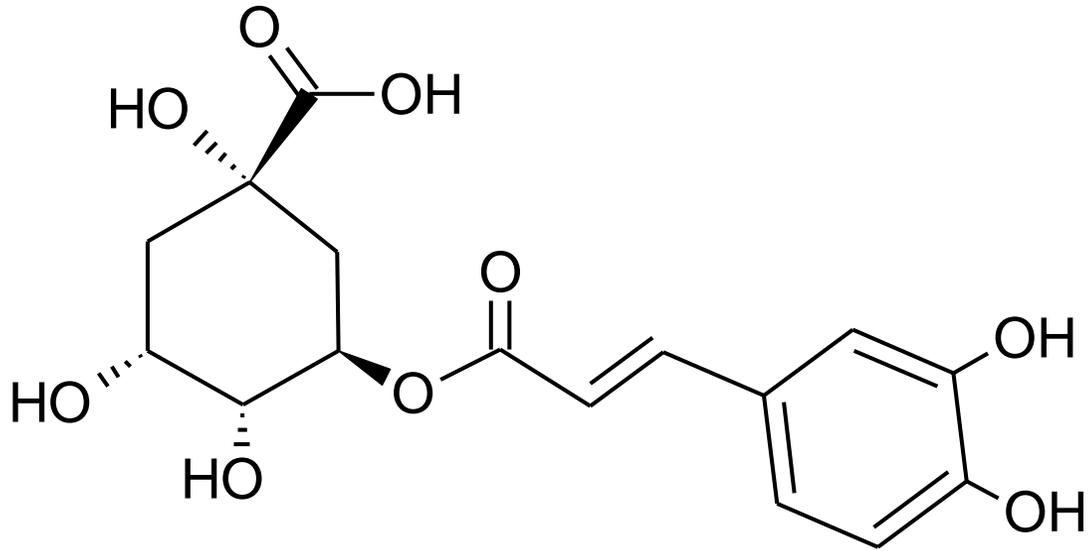


# F1-2の MS/MS分析

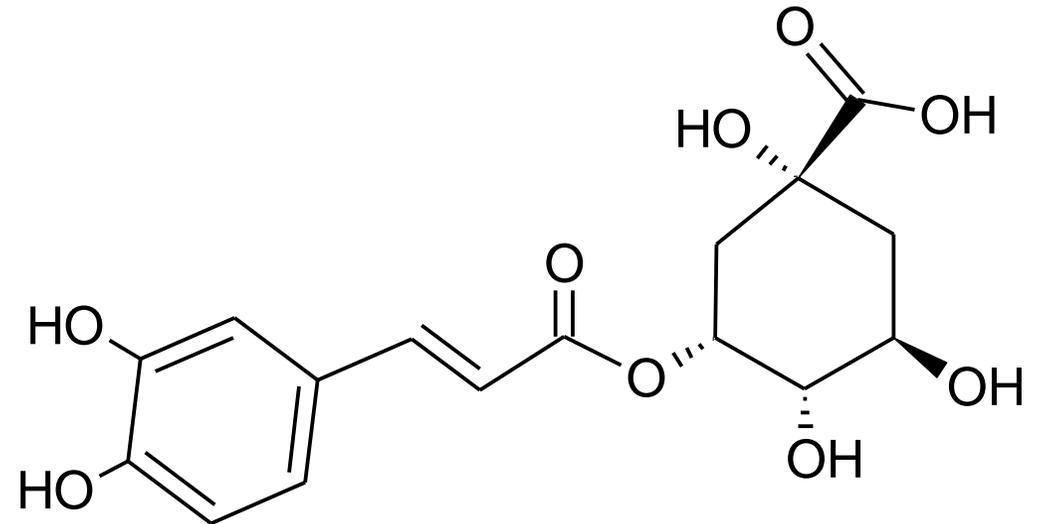
ey7\_F1-2re\_2018110401 #667 RT: 7.63 AV: 1 NL: 4.24E4  
T: ITMS + c NSI d Full ms2 354.87 @cid35.00 [85.00-365.00]



# 推定された $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質

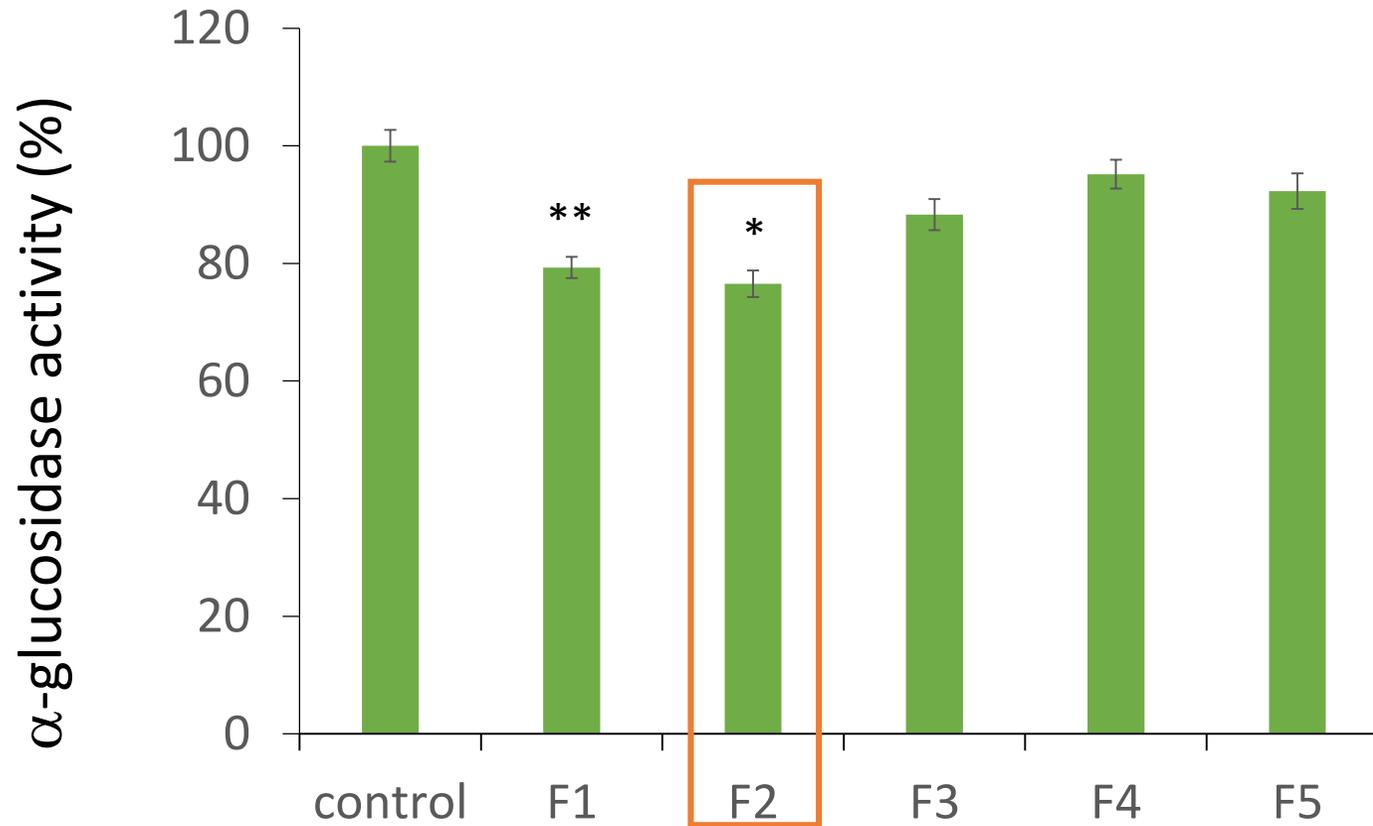


**Chlorogenic acid**



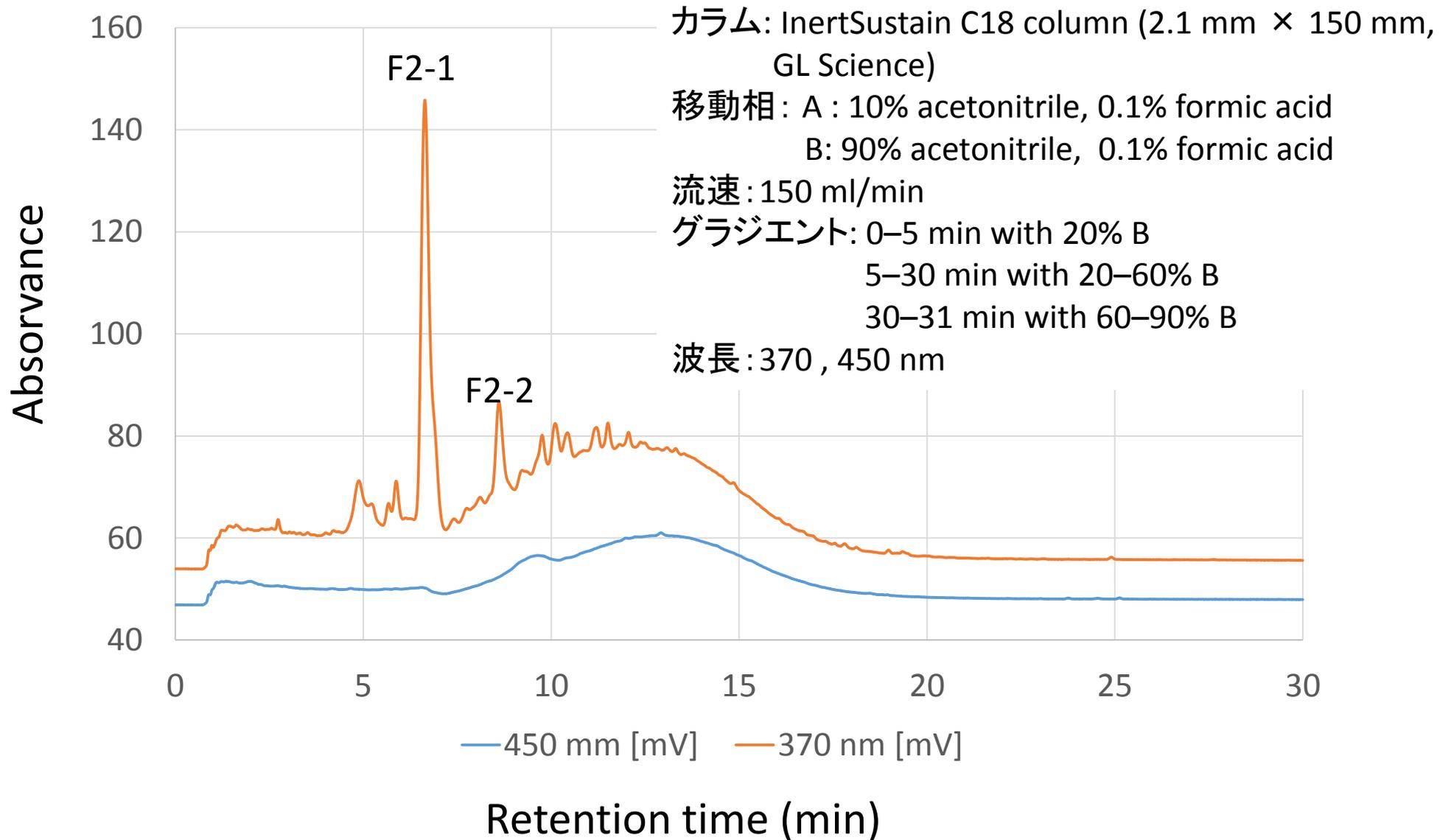
**Neochlorogenic acid**

# $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性

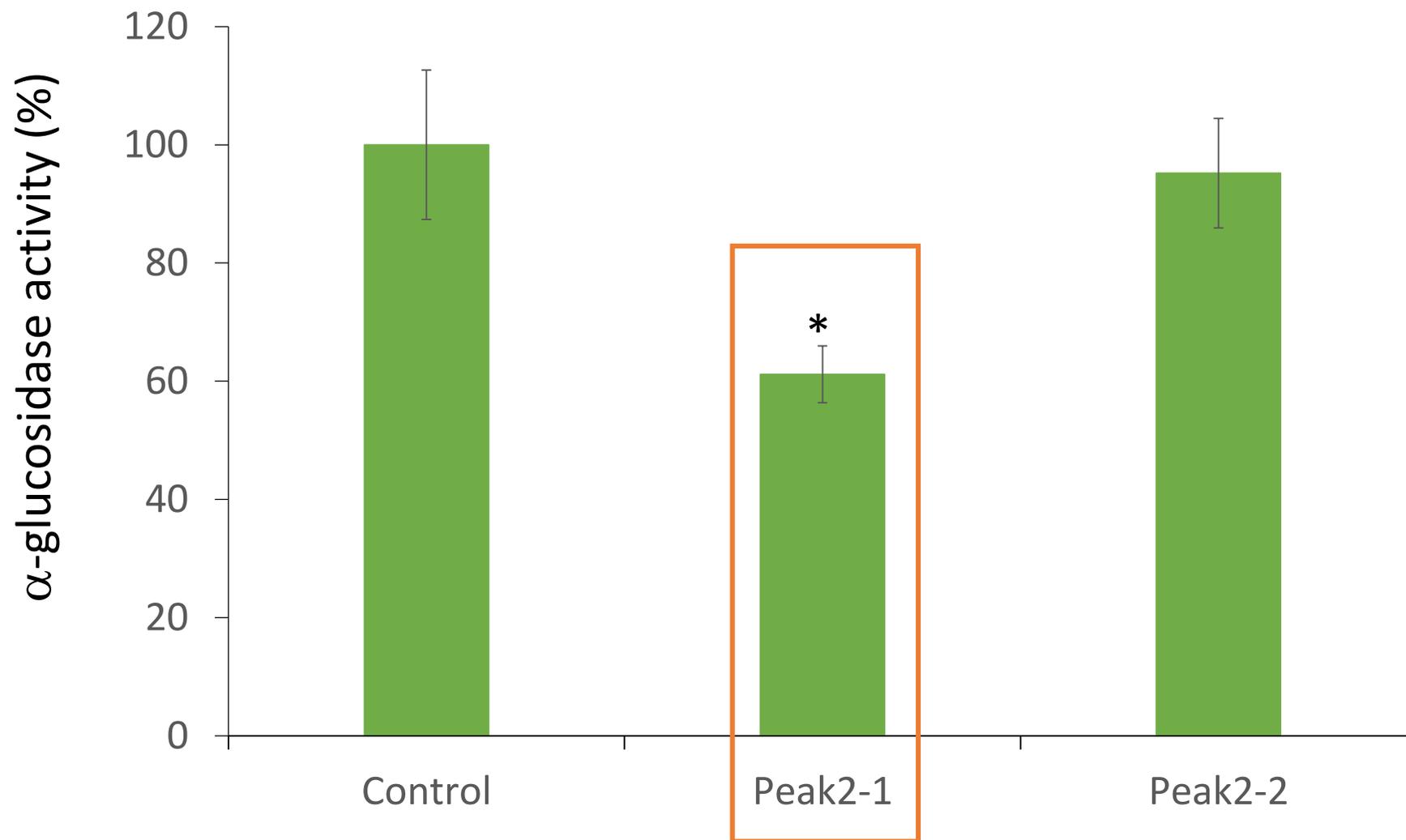


F1: 10% MeOH Frc., F2: 20% MeOH Frc., F3: 30% MeOH Frc.,  
F4: 40% MeOH Frc., F5: 50% MeOH Frc.

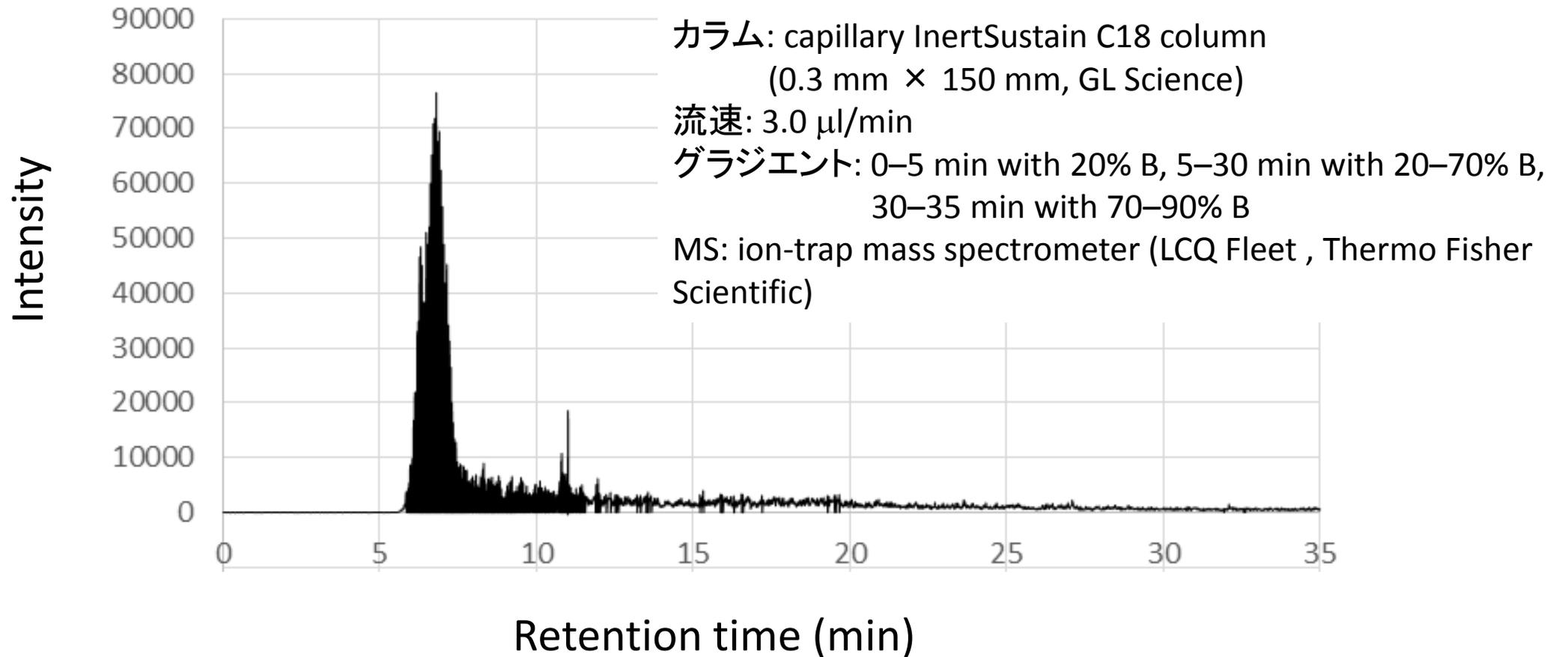
# 分画(F1)の分離および分取



# α-グルコシダーゼ阻害活性

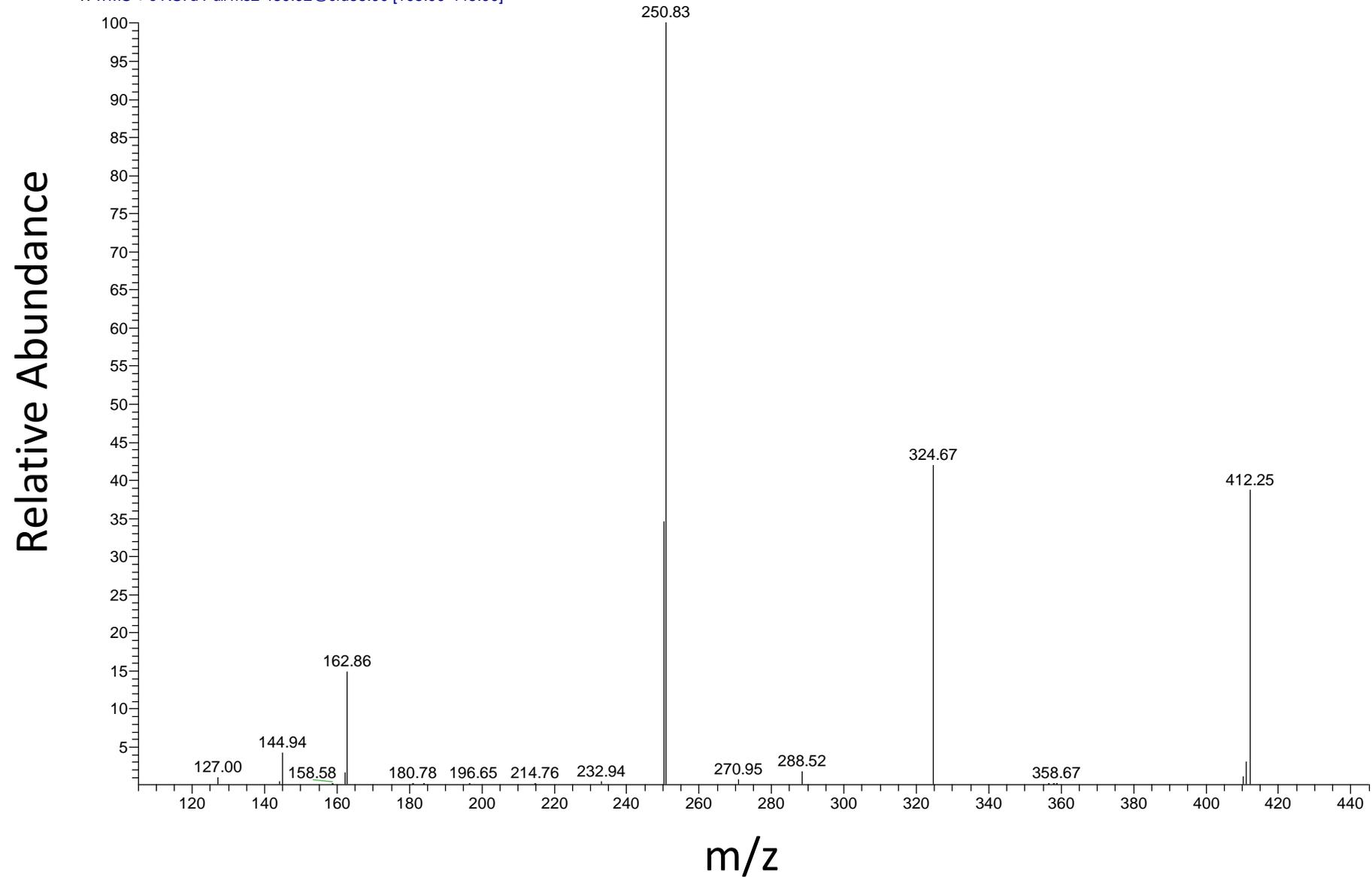


# F2-1のLC/MS分析



# F2-1の MS/MS分析

ey2\_F2-1re\_2018110401 #513 RT: 6.13 AV: 1 NL: 3.32E3  
T: ITMS + c NSI d Full ms2 430.02@cid35.00 [105.00-445.00]

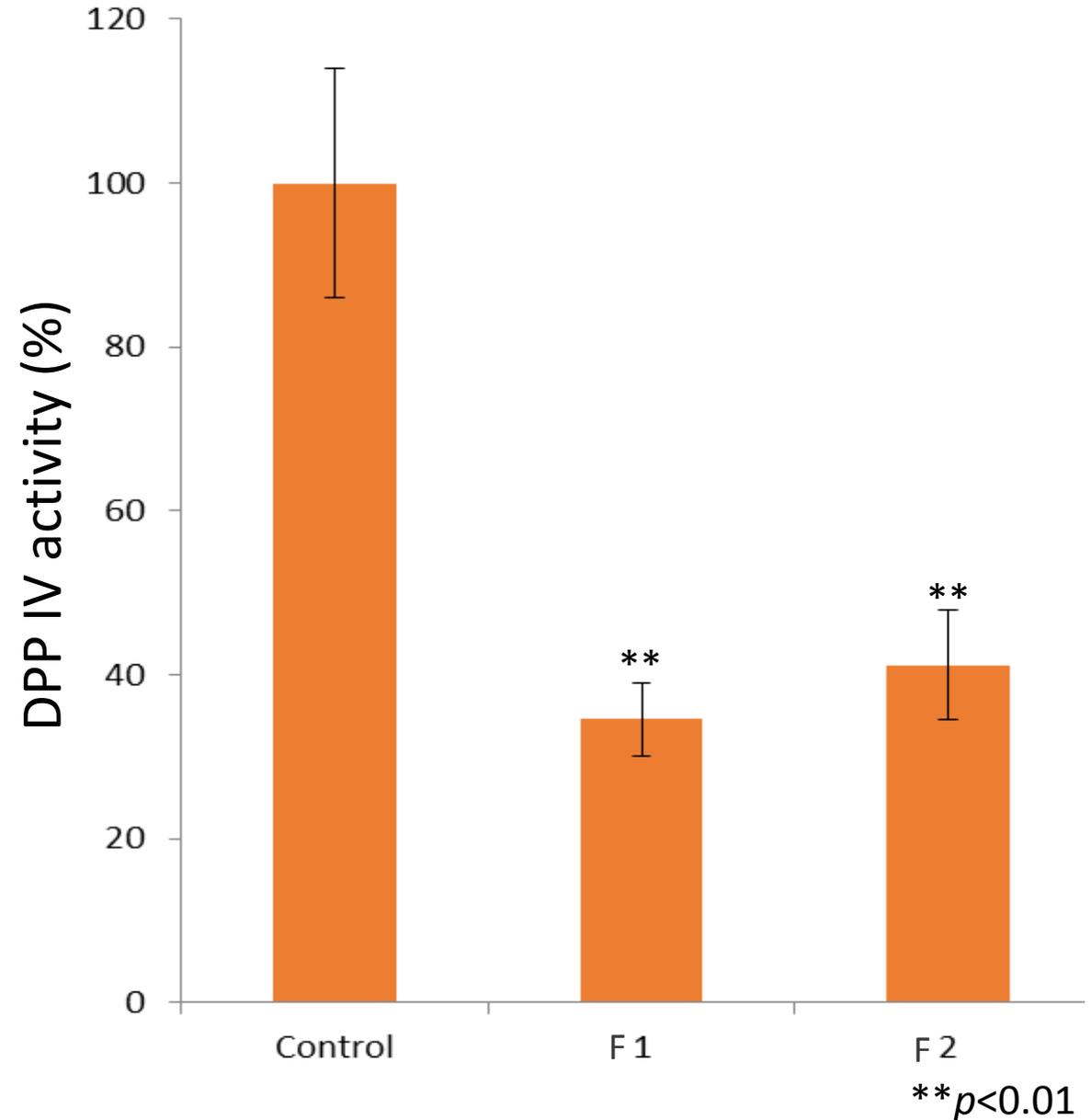


# DPPIV阻害活性

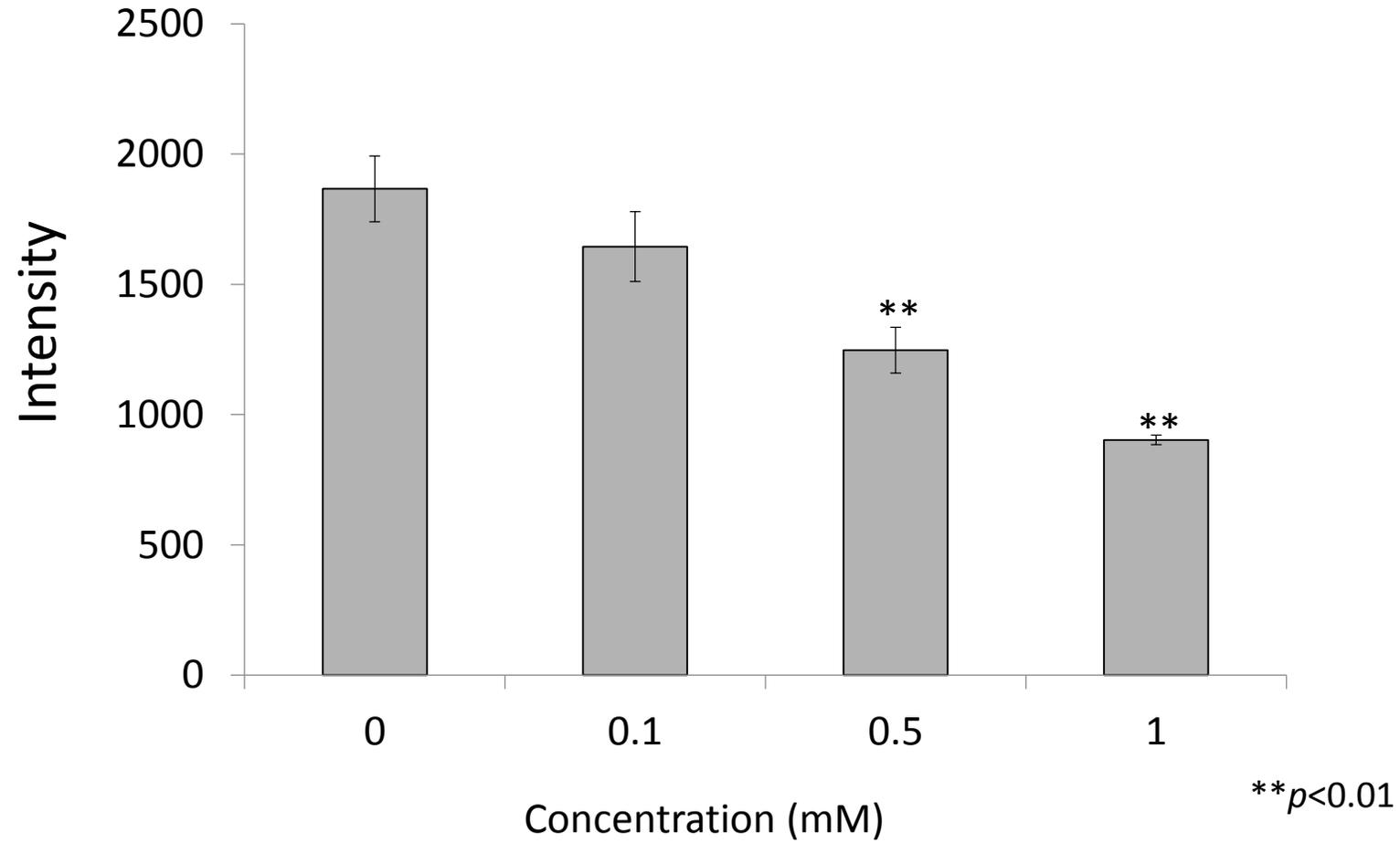
Enzyme solution	5 $\mu$ l
0.5M Tris HCl (pH7.5)	100 $\mu$ l
DW	875 $\mu$ l
Sample (Control: DW)	10 $\mu$ l
<hr/>	
total	990 $\mu$ l

室温で30分反応後、基質 (10mM Gly-Pro-MCA) 10 $\mu$ l加える

37°Cで30分反応後、0.1M CH<sub>3</sub>COOH 2ml加え、蛍光測定 (Ex: 380nm, Em: 440nm)



# クロロゲン酸によるDPPIV阻害活性



# まとめ

---

- アロニア果汁中に含まれる $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害物質が、Chlorogenic acid及び、Neochlorogenic acidであることが明らかになった。
- Chlorogenic acidによって濃度依存的にDPPIV活性が阻害されることから、Chlorogenic acidは、 $\alpha$ -グルコシダーゼとDPPIVの両方に対して阻害反応があることが判明した。
- 今後、これらの物質とcyanidin 3,5-diglucosideを併せて、血糖値上昇抑制及び、HbA1c値上昇抑制について、糖尿病肥満モデルマウスを用いて、明らかにしたいと考える。