あく抜き処理したトチノキ種子から単離されたサポニン成分の 血糖値上昇抑制作用と苦味の低減化

木村英人^{*1,*2,§}, 地阪光生^{*1,*3}, 木村靖夫^{*1,*4}, 勝部拓矢^{*5}, 横田一成^{*1,*3}

^{*1} 鳥取大学大学院連合農学研究科

^{*2} 寿製菓株式会社

^{*3} 島根大学生物資源科学部生命工学科

^{*4} 鳥取大学農学部生物資源環境学科

^{*5} 島根県産業技術センター

Attenuating Effect of Saponins Isolated from Edible Horse Chestnuts (*Aesculus turbinata* BL.) on Increasing Blood Glucose Levels and Their Reducing Bitter Taste

Hideto Kimura^{*1,*2,§}, Mitsuo Jisaka^{*1,*3}, Yasuo Kimura^{*1,*4},
Takuya Katsube^{*5} and Kazushige Yokota^{*1,*3}

^{*1} The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University,
4-101 Koyama-Minami, Tottori-shi, Tottori 680-8553

^{*2} Kotobuki Seika Co., Ltd., 2028 Hatagasaki, Yonago, Tottori 683-0845

^{*3} Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Life and Environmental Science,
Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504

^{*4} Department of Biological and Environmental Chemistry, Faculty of Agriculture,
4-101, Koyama-Minami, Tottori-shi, Tottori 680-8553

^{*5} Shimane Institute for Industrial Technology, 1 Hokuryo-cho, Matsue, Shimane 690-0816

Recently, we identified novel saponins from edible seeds of Japanese horse chestnuts (*Aesculus turbinata* BL.) obtained during processing of the seeds with wooden ashes which was intended to remove harshness. In the present study, we isolated saponins and related compounds from natural and edible seeds, and examined the attenuating effect on increasing levels of blood glucose using male ICR mice. All of the deacetylescins Ia, IIa, Ib, and IIb were similarly effective in attenuating glucose levels and were less potent than the natural escins. Experiments on escins and related derivatives revealed that the potency of the compounds in the attenuation was in the order of escins > deacetylescins > desacylescins. The findings suggest that the acyl moiety at C-21 and the acetyl moiety at C-22 are important in attenuating increasing levels of blood glucose. Escin and related substances exhibited much weaker inhibitory activities on α -amylases as compared with (–)-epigallocatechin gallate. In addition, those compounds showed almost no inhibition of intestinal α -glucosidase activity. The results indicate that escins and their derivatives have little ability to inhibit the digestive enzymes for saccharides. The saponin fraction which includes deacetylescins and desacylescins as major components obtained from edible seeds was much less bitter taste than escins from natural seeds at the same concentrations. Taken together, deacetylescins and desacylescins from edible seeds seem to be useful as sources of nutraceutical foods because of their activity in attenuating increasing levels of blood glucose as well reducing the bitter taste.

(Received Jun. 20, 2005 ; Accepted Oct. 14, 2005)

日本産のトチノキ (*Aesculus turbinata* BL.) の種子であるトチノミには、サポニンの一種のエスシンと呼ばれるト

リテルペノイド配糖体の混合物が大量に含まれている¹⁾。このエスシンは、西洋トチノキ (*Aesculus hippocastanum* L.) の種子にも見いだされており、血糖値上昇抑制^{1)~4)}、アルコール吸収抑制¹⁾²⁾、抗炎症⁵⁾⁶⁾、抗腫脹⁶⁾⁷⁾などの種々の薬理活性を示す。西洋トチノキの種子に由来する抽出物は、実際に炎症や腫脹の治療を目的とする医薬品や化粧品原料として利用されている。

^{*1} 〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101 番地

^{*2} 〒683-0845 鳥取県米子市旗ヶ崎 2028

^{*3} 〒690-8504 島根県松江市西川津町 1060

^{*4} 〒680-8553 鳥取市湖山町南 4-101 番地

^{*5} 〒690-0816 島根県松江市北陵町 1

[§] 連絡先 (Corresponding author), h-kimura@chukai.ne.jp

日本各地でトチノミは、栃餅や栃の実団子のような食品原料として広く利用されている⁷⁾。しかし、エスシンのようなサポニンが大量に存在するために、そのままでは苦味が非常に強い。トチノミを食用とするには、苦味を低減化するための、あく抜き処理が必須となる。あく抜き処理の代表的な方法として、水晒した後、煮熟し、そして木灰液に浸漬する工程が一般的に使われている。著者らは、前報⁸⁾で、トチノミをあく抜き処理することにより、エスシンの化学変換産物が生成することを報告した。すなわち、それらは、エスシン I a, II a, I b, II b のオレアネン骨格の C-22 位のアセチル基が加水分解されたデアセチルエスシン I a, II a, I b, II b であることを同定した。また、これらのデアセチルエスシン類を含むサポニン画分が血糖値の上昇を抑制することも明らかにした。これらのデアセチルエスシンは、実際に食用とされているトチノミに相当量、含まれていた。これまで、それらのデアセチルエスシン画分に含まれている個々の成分の食品機能性は研究されていない。今回の報告では、単離されたデアセチルエスシン I a, II a, I b, II b やそれらの関連物質を用いて、マウスの糖負荷試験における構造活性相関について検討した。さらに、トチノミ由来サポニン類の示す血糖値上昇抑制作用に、多糖や二糖類を基質とする消化酵素に対する阻害作用が関与する可能性についても研究した。

以前に、著者らは、あく抜き処理後のトチノミには、あく抜き処理前に比べ、約 30% のサポニン類が残存していることを報告している⁸⁾。そこで、あく抜き処理による食用トチノミの苦味の減少が、サポニン量の減少だけによるものなのか、あるいは、あく抜き処理によるエスシン類の化学構造変化も寄与しているのかを明らかにするため、Dianion HP-20 カラムと Chromatorex ODS 1024T カラムを組み合わせ、あく抜き処理前のサポニン画分と、あく抜き処理後のものを回収して、それらの苦味を比較した。

実 験 方 法

1. 実験材料

兵庫県美方郡周辺の山林で、2003 年に採取されたトチノミを使用した。標準品としての β -エスシンと (−)-エピガロカテキンガレートは、和光純薬 (大阪) から購入した。その他の試薬は、ナカライテスク (京都) または和光純薬 (大阪) から入手した。ブタ膵臓の α -アミラーゼ IV-B、ヒト唾液 α -アミラーゼ、ラット小腸アセトン粉末は Sigma (St. Louis, USA) から購入した。

2. トチノミからのサポニンの抽出、分離、精製

あく抜き処理前の皮剥トチノミから、Yoshikawa らの方法²⁾ に準じてサポニン類の抽出、分離、精製を行った。すなわち、乾燥トチノミを、4 日間、水に浸漬して皮をやわらかくした後皮を除去した。このトチノミ 4 kg をさらに 1 週間メタノールに浸漬した後濾過した。得られた濾液の

メタノール抽出物を濃縮乾固して乾燥物 154 g を得た。この抽出物を Dianion HP-20 カラム (長さ 500 mm × 内径 60 mm, 日本錬水製, 東京) に供し、蒸留水 3 000 ml で糖類画分を、メタノール 3 000 ml でサポニンを含む画分を、そして、酢酸エチル 3 000 ml で脂質画分を溶出した。このカラムでのメタノール溶出画分を濃縮乾固することで、粗製のサポニン画分の 56 g を得た。この粗製サポニン 10 g を Chromatorex ODS 1024T カラム (長さ 320 mm × 内径 32 mm, 富士シリシア化学製, 愛知) にかけて、40% メタノール 1 000 ml, 90% メタノール 1 000 ml, 100% メタノール 1 000 ml の順に溶出した。90% メタノール溶出画分を減圧乾固すると 8.45 g の粗結晶が得られた。この操作を 6 回繰り返して、あく抜き処理前のトチノミ 4 kg からサポニン類 47 g を得た。あく抜き処理後のトチノミ 4 kg についても同様の方法により、サポニン類 11 g を得た。

これらのサポニン画分から個々の成分を精製するために、逆相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけて、あく抜き処理前のサポニン画分 3 g から、エスシン I a 255 mg, II a 126 mg, I b 169 mg, II b 149 mg を単離した。また、あく抜き処理後のサポニン画分 3 g から、デアセチルエスシン I a 58 mg, II a 34 mg, I b 102 mg, II b 80 mg を得た。HPLC 分析には、島津製作所製の LC-2010A システムとクロマトパック CR-3A を用いた。この分析装置に、ワイエムシィ製の YMC-Pack ODS AM (AM 322) カラム (長さ 150 mm × 内径 10 mm) を装着し、メタノール/10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.7) (62 : 38, v/v) を移動相とし、3 ml/min の溶出速度で溶出し、203 nm の波長で検出した。

単離物の化学構造は、¹H-NMR, ¹³C-NMR, 正イオンモードのエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization, ESI) 法による質量分析により確認した⁸⁾。

3. トチノミサポニンの薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析

サポニン類の分離には、シリカゲル 60F₂₅₄ の TLC プレート (Merck 製, Darmstadt, Germany) を使用し、クロロホルム/メタノール/水 (65 : 35 : 10, v/v) の混合液の下層を展開溶媒とした。TLC プレート上での化合物の検出には、10% 硫酸溶液を噴霧し、150°C で加熱することで発色させた。TLC の標準物質として、市販の β -エスシン (Rf 値 0.24), あるいは Yoshikawa らの方法²⁾ で β -エスシンをアルカリ加水分解して得たデサシルエスシン (Rf 値 0.12) を用いた。

4. 糖負荷試験に用いるデサシルエスシン (I + II) の調製

試薬の β -エスシンを、上記に述べた逆相の HPLC にかけて、溶出されるエスシン I a, II a, I b, II b を回収し、Yoshikawa らの方法²⁾ でアルカリ加水分解することによりデサシルエスシン (I + II) を得た。

図 1 天然および食用のトチノミ由来のサポニン類の化学構造と名称

5. マウスによる糖負荷試験

実験動物として、日本エスエルシー（静岡）から購入した雄の ICR マウスを用いた。生後 6 週齢のマウスを用い、飼料としてオリエンタル酵母工業（東京）の実験動物用固型飼料 MF を給餌して、1 週間、予備飼育後、グルコース糖負荷試験に用いた。16 時間絶食したマウスの尾静脈から採血して血糖値を測定した後、被検物として、あく抜き処理前、あく抜き処理後のトチノミ由来するサポニン画分、そして単離した各成分を投与した。投与量はマウス体重 1 kg あたり、あく抜き処理前とあく抜き処理後のサポニン画分では 200 mg、デサシルエスシン（I + II）では、100 mg と 200 mg となるようにした。また、単離した精製標品のエスシン I a, II a, I b, II b, デアセチルエスシン I a, II a, I b, II b では、それぞれ、投与量が、マウス体重 1 kg あたり 100 mg となるように調製した。それぞれの調製品を生理食塩水 0.3 ml に懸濁し、胃ゾンデを用いて経口投与した。なお、各試験では、1 群あたり 5 匹のマウスを用いた。試料を投与した 30 分後に、マウスの体重 1 kg あたり、グルコース 0.5 g を含む生理食塩水 0.1 ml を胃ゾンデを用いて経口投与した。このグルコース負荷の 0.5, 1, 2 時間後

に、マウスの尾静脈から採血し、グルテストエース R（三和化学研究所、愛知）を用いて血糖値を測定した。血糖の上昇値は、グルコース負荷後の試料の採取時の血糖値から、サポニン類を投与する前の血糖値を差し引いたものである。そして、対照となる被検物 0 mg/kg 体重群に対する各サポニン投与群の血糖の上昇値を比較し、Dunnett 法により有意差を検定した。データは、平均値 ± 標準誤差で示している。P < 0.05 の場合を有意差ありとした。

6. 糖質分解酵素の阻害活性測定用試料の調製

エスシン I a, II a, I b, II b の混合物の調製には、あく抜き処理前のトチノミのサポニン画分から、前述の HPLC の条件で、エスシン I a, II a, I b, II b に相当するピークをまとめて回収した。エスシン I a, II a, I b, II b の混合比率は 35 : 30 : 23 : 12 であった。また、あく抜き処理後のサポニン画分からデアセチルエスシン I a, II a, I b, II b に相当する HPLC のピークをまとめて回収した。デアセチルエスシン I a, II a, I b, II b の混合比率は、13 : 13 : 50 : 24 となった。デサシルエスシン（I + II）は、前述の通り調製した。なお、デサシルエスシン I と II の混合比率は 58 : 42 であった。

7. α -アミラーゼ阻害活性測定法

Shimizu らの方法⁹⁾を一部改変して行った。用いた酵素はブタ膵臓とヒト唾液由来のものである。これらの酵素標品は、20℃で pH 6.9 の条件の下に、3 分間あたり 1 mg のマルトースを生成する酵素量を 1 U とした場合、ブタ膵臓 α -アミラーゼ IV-B が 19.5 U/mg、また、ヒト唾液 α -アミラーゼが 30.3 U/mg の比活性を示した。基質の 0.4% 可溶性澱粉と 5 mM CaCl_2 を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 300 μl に、種々のトチノミ由来のサポニンを 70% メタノールに溶解した溶液 50 μl を加えた。さらに、基質溶液と同じ緩衝液で溶解したブタ膵臓 α -アミラーゼ IV-B 0.2 U、または、ヒト唾液 α -アミラーゼ 0.2 U を含む上記緩衝液 150 μl を加え、30℃で 5 分間反応させた。沸騰水中で 10 分間、加熱することで酵素反応を停止させた。その反応液に 0.5 M 酢酸水溶液 1 ml を加え、さらに 0.015% ヨウ素と 0.15% ヨウ化カリウムを含む水溶液 3 ml を加えた後、よく攪拌し、基質の澱粉濃度を反映する 700 nm の吸光度の減少を測定した。ブランクには、各試料について、沸騰水中で 10 分間加熱して失活させた酵素を用いた。コントロールとなる阻害剤無添加の場合の酵素活性は、5 分間の反応時間あたりの 700 nm の吸収の減少で測定した場合、ブタ膵臓 α -アミラーゼ IV-B で 1.13、ヒト唾液 α -アミラーゼで 1.03 であった。なお、対照試薬として、(-)-エピガロカテキンガレートを用いた。

8. α -グルコシダーゼ (マルターゼ、スクラーゼ) 阻害活性測定法

酵素は、出口ら¹⁰⁾の方法で調製した。ラット小腸アセトン粉末 (Sigma 製) 1 g に、50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6) 9 ml を加え、水中にてガラスホモジナイザーにて攪拌した後、3000 rpm、4℃で 10 分間、遠心分離した上清を粗酵素液とした。マルターゼの活性測定では、粗酵素液を 50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) で 3 倍希釈したものを使用した。酵素阻害活性測定は、吉川ら¹¹⁾により行った。マルターゼとスクラーゼの基質溶液には、それぞれ、74 mM マルトースと 74 mM スクロースを含む 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた。この基質溶液 100 μl に、種々の量のトチノミ由来サポニンをジメチルスルホキシドに溶解した液 5 μl と 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) 45 μl の混合液を加えて混合した後、37℃で 3 分間、予備加温した。そして、酵素液 50 μl を加えて全容量 200 μl として 30 分間、酵素反応させた。反応後、水 800 μl を加えた後、沸騰水中で 2 分間加熱することで、酵素反応を停止した。別に、各試料について酵素液を加えた後、直ちに水を加えて沸騰水中で 2 分間加熱し、酵素を失活させたものをブランクとした。生成したグルコース量を、グルコース CII テストワコー (和光純薬、大阪) により測定した。コントロールとなる阻害剤無添加のマルターゼ活性は、30 分で 0.80 μmol のグルコースを、また、スクラーゼ活性は、0.31 μmol

のグルコースを生成した。対照試薬としては、(-)-エピガロカテキンガレートを用いた。

9. あく抜き処理前後のトチノミのサポニン画分の官能検査

Dianion HP-20 カラムと Chromatorex ODS 1024T カラムで精製したあく抜き処理前のトチノミサポニン (A)、あるいは、あく抜き処理後のトチノミサポニン (B) を蒸留水に溶解し、1.2 mg/ml の濃度に合わせた。このサポニン溶液を、寿製菓 (株) 研究開発室 6 名および品質管理室 2 名の合計 8 名のスタッフで、この溶液を 500 μl ずつ舌に滴下し、報告されている採点法¹²⁾にて苦味の程度を判定した。被験者にはサンプル名をふせて食味をしてもらった後、調査票の 5 項目「1) A の方がかなり苦い、2) どちらかといえば A が苦い、3) かわらない、4) どちらかといえば B が苦い、5) B の方がかなり苦い」のいずれかを選択してもらった。また、別の実験として、あく抜き処理前のサポニン溶液で 1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のものと同程度の苦味を示す溶液を、あく抜き処理後のサポニン溶液 1.2, 2.4, 12, 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度のものから選択してもらった。なお、被験者には、試験の目的と方法を説明し、本人の了承を得て行った。

実験結果および考察

1. トチノミのサポニン類の TLC 分析

あく抜き処理前後のトチノミをメタノール抽出し、得られた抽出物を Dianion HP-20 と Chromatorex ODS 1024T カラムにより精製した。これらのサポニン画分の純度をシリカゲル 60F₂₅₄ の TLC により分析した (図 2)。あく抜き処理前のトチノミからは、標準品の β -エスシンに相当するスポットが確認された。一方、あく抜き処理後では、デアセチルエスシンとデサチルエスシンが主要産物として認められ、天然のトチノミの主要成分であるエスシンも、微量検出された。

糖質分解酵素の阻害活性測定に用いるため、逆相の HPLC で回収したトチノミ由来のエスシンとデアセチルエスシンは、TLC プレート上で、それぞれ単一のスポットを示した (図 2)。

2. トチノミより単離されたサポニン成分による血糖値上昇抑制作用

糖負荷試験をする 30 分前に、あらかじめ、種々の量のトチノミ由来のサポニン成分をマウスに経口投与し、その後、グルコースを投与することで、血糖値上昇の抑制効果を調べた。図 3 は、糖負荷後の 30 分後において、サポニンを投与していない群に対する各投与群の血糖値の上昇率を示したものである。あく抜き処理前後のサポニン画分の投与群は、いずれも、サポニン無投与群に比べて、有意に血糖値の上昇抑制作用を示した (図 3 A)。200 mg/kg の投与で両者を比較すると、あく抜き処理前の天然トチノミ由来するサポニン画分は、あく抜き処理後の食用トチノミに

図 2 あく抜き処理前後のトチノミ由来サポニン類の TLC 分析

1, 標準品の β -エスシン; 2, 精製されたデサシルエスシン; 3, あく抜き処理前のサポニン画分; 4, あく抜き処理後のサポニン画分; 5, HPLC から回収したエスシン; 6, HPLC から回収したデアセチルエスシン

由来するサポニン画分に比べ、より強い抑制効果であった。また、デアシルエスシン (I + II) については、100 mg/kg の投与では Yoshikawa らの報告²⁾³⁾ に一致して有意な抑制効果は得られなかった。しかし、200 mg/kg の投与では有意に血糖値の上昇が抑制された。次に、種々のクロマトグラフィーと HPLC により単離したあく抜き処理後の食用トチノミ由来の 4 種類のデアセチルエスシン (図 3B) と、あく抜き処理前の天然トチノミ由来の 4 種類のエスシン (図 3C) の作用を検討した。デアセチルエスシン I a, II a, I b, II b, および、エスシン I a, II a, I b, II b の各単離物を、それぞれ 100 mg/kg で投与したとき、糖負荷後 30 分後の血糖値の上昇率は、サポニン無投与群を 100% とした場合、デアセチルエスシン I a, II a, I b, II b では、それぞれ 85, 84, 75, 71% となり、一方、エスシン I a, II a, I b, II b では、それぞれ 46, 53, 71, 46% の上昇率となった。このことにより、デアセチルエスシン類は、エスシン類に比べて阻害活性は弱いものの、有意に血糖値の上昇を抑制する作用を持つことが明らかとなった。これまでの他の研究で、あく抜き処理された食用トチノミに由来するデアセチルエスシン類の単離成分を用いて血糖値上昇の抑制作用を調べた報告はない。以上の結果から、トチノミのサポ

図 3 あく抜き処前後のトチノミ由来単離サポニン成分による血糖値上昇抑制作用

マウスに種々のサポニンを経口投与した 30 分後に、グルコース液を経口投与した。そして、そのグルコース負荷の 30 分後にマウスの血糖値を測定した。

A, サポニンの投与量は、左から、あく抜き処理前のサポニン画分 200 mg/kg 体重、あく抜き処理後のサポニン画分 200 mg/kg 体重、デアシルエスシン (I と II の混合物) 100 mg/kg 体重、デアシルエスシン (I と II の混合物) 200 mg/kg 体重である。対照 100% の値は、サポニンを投与しない時のグルコース負荷後の 30 分での血糖値で 112.0 ± 4.3 mg/dl であった。

B, 単離した個々のデアセチルエスシン成分を用いて、A と同様に試験を行った。マウスには 100 mg/kg 体重で投与した。対照 100% の値は、 93.4 ± 0.9 mg/dl であった。

C, 単離した個々のエスシン成分を用いて、A と同様に試験を行った。マウスには 100 mg/kg 体重で投与した。対照 100% の値は、 109.4 ± 2.5 mg/dl であった。

有意差の検定は Dunnett 法により、サポニン無投与群に対して行った。

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ とした。

図 4 エスシン，デアセチルエスシン，デサシルエスシンのブタ膵臓 α -アミラーゼ (A) とヒト唾液 α -アミラーゼ (B) に対する阻害活性

○，エスシン ●，デアセチルエスシン △，デサシルエスシン ▲，(-)-エピガロカテキンガレート

図 5 ラット小腸 α -グルコシダーゼ活性に対するサポニン類の作用

(A) マルターゼ活性，(B) スクララーゼ活性

○，エスシン ●，デアセチルエスシン △，デサシルエスシン ▲，(-)-エピガロカテキンガレート

ニン類の血糖値上昇の抑制作用の強い順に，エスシン類＞デアセチルエスシン類＞デサシルエスシン類となり，エスシンの 21 位のアシル基と 22 位のアセチル基は，血糖値の上昇抑制作用を発揮するのに必須であることがわかった。なお，糖負荷後の 1 時間と 2 時間では，いずれの投与群においても，無投与群に比べて有意な差は認められなかった。

3. 糖質分解酵素の α -アミラーゼと α -グルコシダーゼに対するサポニン類の阻害作用

マウスでのグルコースを投与する今回の糖負荷試験で，エスシンとデアセチルエスシンの示す血糖値上昇の抑制作用が確認された。このことにより，エスシンとその関連物質は，小腸におけるグルコースの吸収を阻害していると推察される。それに加えて，これらのサポニン類が，糖質分解に関与する酵素を阻害して，血糖値上昇の抑制をする可能性を考えて，ブタ膵臓，あるいは，ヒト唾液の α -アミラーゼと，ラット小腸の α -グルコシダーゼに対するサポニン類の阻害活性の測定を行った。すなわち，あく抜き処理前の主要トチノミサポニンであるエスシン，あく抜き処理後の食用トチノミから得たデアセチルエスシンとデサシ

ルエスシンについて，それぞれ，HPLC で回収した標品を用いて， α -アミラーゼ，あるいは， α -グルコシダーゼ（マルターゼ，スクラーゼ）に対する阻害活性を測定した。この結果，エスシンとその関連化合物は，いずれも，ブタ膵臓の α -アミラーゼ（図 4 A）とヒト唾液 α -アミラーゼ（図 4 B）を有意に阻害した。しかし，それらの阻害活性は， α -アミラーゼ阻害活性が既に報告¹³⁾ されている対照物質となる (-)-エピガロカテキンガレートに比べて，かなり弱いものであった。一方，ラット小腸の α -グルコシダーゼを用いて，マルターゼ（図 5 A）とスクラーゼ（図 5 B）に対するエスシン類の作用を調べたところ，2 mg/ml の濃度においても認められなかった。対照物質の (-)-エピガロカテキンガレートは，以前の報告¹⁴⁾ のとおり， α -グルコシダーゼに対して強い阻害活性を示した。吉川らは，西洋トチノキ種子から得たエスシンの血糖値上昇抑制活性の作用機序について検討している⁴⁾。その報告によると，エスシンは，小腸の α -グルコシダーゼに対して有意な阻害活性を確認できなかったという。この結果は，今回の我々の実験に一致するものであった。また，吉川らは，エスシンにより用

表 1 あく抜き処理前後のトチノミサポニンの苦味比較 (その 1)

選択肢	人数
(1) Aの方がかなり苦い	8
(2) どちらかといえばAが苦い	0
(3) 変わらない	0
(4) どちらかといえばBが苦い	0
(5) Bの方がかなり苦い	0
A, あく抜き処理前のサポニン画分 (1.2 mg/ml)	
B, あく抜き処理後のサポニン画分 (1.2 mg/ml)	

量依存的に小腸組織片におけるグルコースの取り込みが阻害されたと報告している。これらの報告と合わせて考えると、今回のトチノミに由来するエスシン類やデアセチルエスシン類は、 α -アミラーゼ阻害活性を示すものの、その阻害活性は非常に弱い。マウスを用いた動物実験で観察された血糖値上昇の抑制の主な作用機序は、小腸におけるグルコース吸収の阻害であると思われる。

4. あく抜き処理前後のトチノミサポニンの苦味比較

食用トチノミを得るための、あく抜き処理により、トチノミのサポニン量は減少して、苦味が低減化すると考えられる。また、苦味の低減化の別の可能性として、あく抜き処理によって、エスシンが、デアセチルエスシンやデサシルエスシンに変換されることによって、苦味が低減化されることも考えられる。そこで、あく抜き処理前とあく抜き処理後のサポニン画分について同じ濃度の溶液 (1.2 mg/ml) を調製し官能検査を行った。その結果、すべての被験者が調査票の 1) 「Aの方がかなり苦い」を選択し、あく抜き処理前のサポニン画分が、あく抜き処理後のサポニン画分に比べ、苦味がかなり強いことが確認された (表 1)。被験者が苦味を判別できる濃度を調べたところ、あく抜き処理前の 1.2 mg/ml のサポニン溶液の 1000 倍希釈液、すなわち 1.2 μ g/ml の濃度までは、すべての被験者が識別できた。そこで、あく抜き処理前の 1.2 μ g/ml のサポニン溶液と同程度の苦味の溶液について、あく抜き処理後の 1.2 mg/ml のサポニン溶液を、順次、希釈して調製した溶液、すなわち、1.2, 2.4, 12, および 120 μ g/ml の溶液から食味により選択してもらった (表 2)。その結果、あく抜き処理前 1.2 μ g/ml のサポニン溶液と、あく抜き処理後の 2.4~12 μ g/ml の間のサポニン溶液の苦味が同等とした人が 8 人中 1 人、あく抜き処理後の 12 μ g/ml のサポニン溶液と同等とした人が 8 人中 3 人、さらに、あく抜き処理後の 12~120 μ g/ml の間のサポニン溶液の苦味と評価した人が 8 人中 4 人であった。あく抜き処理後のサポニン画分には、デアセチルエスシンとデサシルエスシンが主要成分として含まれていることから、エスシンの C-21 位のアシル基や C-22 位のアセチル基のような有機酸エステル側鎖がアルカリ加水分解されると、苦味がおよそ 10 分の 1 以上に低減化されることが明らかとなった。以上より、食品加工的な

表 2 あく抜き処理前後のトチノミサポニンの苦味比較 (その 2)

あく抜き処理後のサポニン画分の水溶液の濃度 (μ g/ml)	人数 ^a
1.2	0
1.2~2.4 ^b	0
2.4	0
2.4~12 ^b	1
12	3
12~120 ^b	4
120	0

^a あく抜き処理前のサポニン画分の水溶液 (1.2 μ g/ml) と同じ苦味を示すと感じられるあく抜き処理後のサポニン溶液を選択した被験者の人数。

^b 各溶液の中間を示すものもいた。

観点から見ると、食用トチノミを得るためのあく抜き処理による苦味の低下の機構は、2つの要因により説明される。すなわち、第一に、水晒し、煮熟、そして木灰液への浸漬の過程で、酸性サポニンであるエスシン類がアルカリ性の木灰液中に溶出されることで、サポニンの残存量が減少したことである。第二に、木灰のアルカリ性成分により、エスシンの有機酸エステルが加水分解されることによって、生成物の苦味の低減化がもたらされていると考えられた。あく抜き処理後の食用トチノミ由来サポニンは、あく抜き前のものと比べて、血糖値上昇の抑制作用が弱めであるが、苦味がかなり低減化されているという点を考えると、機能性食品素材として大きなメリットがあるといえる。

要 約

(1) あく抜き処理前、あるいは、あく抜き処理後のトチノミ由来の各サポニン成分の単離物を用いて、マウスでの糖負荷試験を行ったところ、あく抜き処理後の食用トチノミに存在する 4 種類のデアセチルエスシンは、いずれも同程度の血糖値上昇の抑制活性を示した。エスシン関連物質の血糖値の上昇抑制活性は、エスシン類>デアセチルエスシン類>デサシルエスシン類の順に高い傾向になった。このことより、エスシン類の 21 位のアシル基と 22 位のアセチル基が、血糖値上昇の抑制活性の強さに大きく関係していることが明らかとなった。

(2) エスシン、デアセチルエスシン、および、デサシルエスシンは α -アミラーゼに対して弱い阻害活性を示したが、小腸の α -グルコシダーゼ (マルターゼ、スクラーゼ) に対しては、ほとんど阻害効果は示さなかった。

(3) あく抜き処理前の天然トチノミに由来するサポニン画分に比較して、あく抜き処理後の食用トチノミに由来するサポニン画分では、同一濃度において明らかに苦味の低減化が認められた。

(4) 食用トチノミに含まれるエスシンの有機酸エステルが加水分解されたサポニン類は、エスシンに比べて苦味が大きく低減化されており、また、血糖値の上昇抑制作用を

保持しているので、機能性食品素材としてより好ましい。

文 献

- 1) 山原條二, 松田久司, 村上敏之, 島田ひろみ, 吉川雅之, 薬用植物の血糖値上昇抑制作用と作用成分—トリテルペン配糖体の構造と活性—. 和漢医薬学雑誌, **13**, 295-299 (1996).
- 2) Yoshikawa, M., Murakami, T., Matsuda, H., Yamahara, J., Murakami, N. and Kitagawa, I., Bioactive saponins and glycosides. III. horse chestnut. (I): The structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of Escins Ia, IIa, Ib, IIb and IIIa from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1454-1464 (1996).
- 3) Yoshikawa, M., Harada, E., Murakami, T., Matsuda, H., Wariishi, N., Yamahara, J., Murakami, N. and Kitagawa, I., Escins Ia, IIa, Ib, IIb and IIIa, bioactive triterpene oligoglycosides, from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L.: Their inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity on glucose tolerance test. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1357-1359 (1994).
- 4) 吉川雅之, 薬用植物の糖尿病予防成分 医食同源の観点から. 化学と生物, **40**, 172-178 (2002).
- 5) Guillaume, M. and Padioleau, F., Veintomic effect, vascular protection, antiinflammatory and free radical scavenging properties of horse chestnut extract. *Arzneimittelforschung*, **44**, 25-35 (1994).
- 6) Sirori, C.R., Aescin: Pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research*, **44**, 183-193 (2001).
- 7) 松山利夫, 野生堅果類とくにトチノミとドングリ類のアク抜き技術とその分布. 国立民族学博物館研究報告, **2**, 498-528 (1977).
- 8) 木村英人, 渡邊あい, 地阪光生, 山本達之, 木村靖夫, 勝部拓矢, 横田一成, あく抜き処理トチノキ種子のサポニン成分の化学構造と血糖値上昇抑制作用, 食科工, **51**, 672-679 (2004).
- 9) Shimizu, M., Kanno, M., Tamura, M. and Suekane, M., Purification and some properties of a novel α -amylase of *Thermoactinomyces vulgans*, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1681-1688 (1978).
- 10) 出口ヨリ子, 長田邦子, 内田和美, 木村広子, 芳川雅樹, 工藤辰幸, 保井久子, 綿貫雅章, グァバ茶熱水抽出物の db/db マウスにおける抗糖尿病効果およびヒト飲用試験による食後血糖値上昇抑制効果, 農化, **72**, 923-931 (1998).
- 11) 吉川雅之, Yutana Pongpiriyadacha, 來住明宣, 蔭浦禎士, 王 涛, 森川敏生, 松田久司, タイ産 *Salacia chinensis* の生物活性: α -グルコシダーゼ阻害活性を指標とした品質評価, 薬誌, **123**, 871-880 (2003).
- 12) 真部孝明, 食味および個別分析「フローチャートで, 見る食品分析の実際—植物性食品を中心に」, 幸書房, 東京, pp. 185-187 (2003).
- 13) Hara, Y. and Honda, M., The inhibition of α -amylase by tea polyphenols, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1939-1945 (1990).
- 14) Honda, M. and Hara, Y., Inhibition of rat intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 123-124 (1993).

(平成 17 年 6 月 20 日受付, 平成 17 年 10 月 14 日受理)