

Original article

Anti-glycative effect of vegetable and fruit extracts on multiple glycation models

Wakako Takabe, Keiko Kitagawa, Kenjiro Yamada, Yuki Noda, Rina Yamamoto, Taiki Yamaguchi, Ryosuke Kannan, Masayuki Yagi and Yoshikazu Yonei

Anti-Aging Medical Research Center and Glycation Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2017; 4 (1): 071-079
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文)

複数の糖化モデルにおける野菜及び果物の抗糖化作用の検証

高部稚子、北川佳瑚、山田健二郎、野田裕生、山本理奈、山口大輝、河南亮介、八木雅之、米井嘉一

同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター

抄録

【目的】 ロコモティブシンドロームは加齢と共に運動器が衰えることにより生じる症状である。骨組織が血中や滑液中の過剰な還元糖により糖化を受けると、蛋白糖化最終産物 (AGEs) を産生する。AGEs の蓄積は骨強度や骨弾性に影響を与え、その結果、骨折や骨粗鬆症、変形性関節症などを引き起こすとされている。本研究では、血液中で最も多く含まれる蛋白であるヒト血清アルブミン (HSA)、骨及び軟骨の主要な構成蛋白である I 型、II 型コラーゲンをを用い、蛋白糖化モデルにおける野菜及び果物の抗糖化作用について検証した。

【方法】 HSA とグルコース、I 型及び II 型コラーゲンとフルクトースを反応させた 3 種の蛋白糖化モデルにおいて、植物の熱水抽出物を終濃度 1 mg/mL の固形分重量濃度で加えた際の抗糖化作用を 73 種の植物について検証した。蛍光性 AGEs は励起波長 370 nm、検出波長 440 nm の蛍光強度で、AGEs 反応中間体である 3-デオキシシグナルコン (3-DG)、グリオキサール (GO)、メチルグリオキサール (MGO) は高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) を用いて測定した。

【結果】 本研究に用いた 3 種の蛋白糖化モデル全てにおいて、9 種の植物に特に強い蛍光性 AGEs 産生抑制作用が認められた。中でも紅蓼と栗の渋皮は蛍光性 AGEs だけでなく AGEs 反応中間体である 3-DG、GO、MGO に対しても強い産生抑制効果を示した。

【結論】 73種の植物由来熱水抽出液のうち、紅蓼と栗の渋皮にHSA及びコラーゲンの糖化に対する強い抑制効果が認められた。

KEY WORDS: 糖化、ロコモティブシンドローム、コラーゲン、植物由来熱水抽出液、
蛋白糖化最終産物 (advanced glycation end products: AGEs)

緒言

筋肉や関節、骨などの運動器は、年齢と主に衰える。日本整形外科学会は2007年に「運動器の障害のために、要介護になったり、要介護になる危険の高い状態」を指す「ロコモティブシンドローム」という概念を提唱した^{1,2)}。ロコモティブシンドロームは人々の運動能を下げ、躓きなどによる転倒・骨折のリスクを上げる。それにより生じる運動動作の停滞が更なる筋力低下に繋がり、益々運動器障害は悪化していく。現在、日本の人口の25%以上が65歳以上の高齢者であることから、ロコモティブシンドロームを含めた加齢に関連する疾患を予防することは、人々の健康や生活の質 (quality of life: QOL) を守るために必須である。

コラーゲンは体内で最も多い蛋白の一つであり、現在までに脊椎動物では28種が報告されている³⁾。I型コラーゲンは骨、角膜、真皮、靭帯に豊富であり、II型コラーゲンは関節の硝子軟骨及び眼球の硝子体の構成成分である。加齢と共に、皮膚コラーゲン量の減少及び骨密度の低下が起こることが報告されていることから⁴⁾、コラーゲンの質を保つことが骨・軟骨の障害を防ぐことに繋がると考えられる。

蛋白糖化最終産物 (advanced glycation end products: AGEs) は非酵素的に蛋白と還元糖が結び付く糖化反応により産生され、その一部は体内に蓄積する。AGEsが結合することで蛋白自体の機能が影響を受けるのみならず、AGEs自身が生体組織に炎症反応を惹起することが報告されている。これまでに、癌⁵⁾や糖尿病⁶⁾、アルツハイマー病^{7,8)}や循環器疾患⁹⁾などの疾病とAGEsの蓄積に相関がみられることが報告されている。それだけでなく、AGEsが骨コラーゲンに不必要な架橋構造を形成することで骨強度や弾性の減弱に関与し、骨粗鬆症¹⁰⁾や変性骨関節炎¹¹⁾に繋がる可能性が示唆されている。生体組織へのAGEs蓄積を抑制するため、いくつかの阻害剤が開発されたものの、重篤な副作用を有するため現在に至るまで日本において認可された薬剤はない。

我々はこれまでに500種以上の植物を含む食品素材を用い、ヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) 蛋白糖化モデルにおける蛍光性AGEs産生抑制作用を評価し、その50%阻害濃度 (IC₅₀) を報告した¹²⁻¹⁶⁾。我々はまた、蛋白の種類により各AGEsの産生量に差異があることから、食品素材の効果はターゲットとなる蛋白ご

とに異なることを報告している¹⁵⁾。本研究では、植物素材のAGEs産生抑制作用について、HSAだけでなく、I型及びII型コラーゲン蛋白糖化モデルを用い検証した。

方法及び材料

材料

HSAはSigma-Aldrich (St. Louis, MO)、I型コラーゲンは株式会社ニッピ (東京都足立区)、II型コラーゲンはElastin Products Company (Owensville, MO) より購入した。他の研究用試薬は全て和光純薬工業株式会社 (大阪市中央区) あるいは株式会社同仁化学研究所 (熊本県益城郡) より購入した。

植物の熱水抽出物の作成

本研究では、以前我々がHSAとグルコースによる蛋白糖化モデルにおける蛍光性AGEs抑制作用を報告した野菜及び果物^{13,14)}のうち、計73種を用いた。素材は乾燥粉末化した後、2gの乾燥粉末を40mLの蒸留水に混合し、80°Cで75分間加温した。得られた抽出液は2,300xgで10分間遠心した後、上清をろ紙を用い濾過した。抽出液中の固形分濃度は、そのうち5mLを乾固させることで算出し、残りの抽出液は固形分濃度10mg/mLになるよう、蒸留水を用いて調製した。

蛋白糖化モデルの作成

蛋白糖化モデルとして、1) HSA-グルコース (以下、glc-HSA)、2) I型コラーゲン-フルクトース (以下、fru-collagen I) 及び3) II型コラーゲン-フルクトース (以下、fru-collagen II) の3種を用いた。glc-HSAは8mg/mL HSA及び0.2mol/Lグルコースを50mmol/Lリン酸バッファ (PB, pH 7.4) 中で60°C 40時間、fru-collagen I及びfru-collagen IIは0.6mg/mLコラーゲン及び0.4mol/LフルクトースをPB中で60°C 24時間反応させた (以下、溶液A)。野菜及び果物の抗糖化作用の評価を行うため、終濃度1mg/mLの固形分濃度になるように反応液

中に加え、同様に反応させた（以下、溶液 B）。抗糖化作用の陽性対照として、アミノグアニジン（AG）を用いた。

蛍光性 AGEs 測定

蛍光性 AGEs 産生は、既報のごとく測定した¹⁷⁾。マイクロプレートに 200 μ L の反応液を加え、マイクロプレートリーダー（Varioscan® Flas, Thermo scientific, Waltham, MA）を用い励起波長 370 nm、検出波長 440 nm の蛍光強度を測定した。素材の抽出液の代わりに等量の精製水を加え反応させた際の蛍光強度の相対値として、各素材の蛍光性 AGEs 阻害率を以下のように算出した。

蛍光性 AGEs 産生阻害率 [%]

$$= [1 - \{ \text{素材添加反応液の蛍光強度 (溶液 B)} / \text{精製水添加反応液の蛍光強度 (溶液 A)} \}] \times 100$$

AGEs 反応中間体測定

3 種の AGEs 反応中間体である 3-デオキシグルコソン (3-DG)、グリオキサール (GO)、メチルグリオキサール (MGO) は高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV、株式会社島津製作所、京都市中京区) を用いて測定した。サンプルの調整は既報の通り行った¹⁷⁾。すなわち、蛋白糖化モデルにて作成した反応液を 6 % 過塩素酸を用いて除蛋白した後、遠心後の上清を飽和炭酸水素ナトリウムを用いて中和した。カルボニル化合物のラベル化剤である 2,3-ジアミノナフタレンを加えた後、4 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させ、20,630 \times g で 10 分間遠心した。得られた上清をサンプルとし、HPLC で解析した。HPLC 条件を以下に示す。カラム: UnisonUK-Phenyl, 75 mm \times 3 mm I.D. column (インタクト株式会社、京都市下京区)、溶離液: 50 mmol/L リン酸: アセトニトリル = 89:11、流速: 1.0 mL/min、検出波長: 268 nm。

各素材の AGEs 反応中間体産生抑制作用は、抽出液の代わりに等量の精製水を加えた際の産生量との相対値から算出した。

統計解析

本研究での測定値は、平均値 \pm 標準偏差で示した。各群比較は Dunnett の多重比較検定により解析した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

ヒト血清アルブミン糖化モデルにおける植物の熱水抽出物の効果

初めに glc-HSA 蛋白糖化モデルを用い、野菜・果物の

抗糖化作用を固形分の終濃度 1 mg/mL における蛍光性 AGEs 産生抑制能で評価した。60 $^{\circ}$ C で 40 時間反応させた後、励起波長 370 nm、検出波長 440 nm の蛍光強度を測定した。全ての 73 種の植物素材が有意に蛍光性 AGEs 産生抑制作用を示した (Table 1)。そのうち、18 種に 40 % 以上、64 種に 20 % 以上の抑制効果が認められた。

コラーゲン糖化モデルにおける植物の熱水抽出物の効果

前項の glc-HSA 蛋白糖化モデルにおける抗糖化作用評価において上位 20 種の植物素材を選定し、fru-collagen I 及び fru-collagen II 蛋白糖化モデルを用いて更なる蛍光性 AGEs 産生抑制作用の検証を行った。20 種全てにおいて有意な抑制作用が認められた (Table 2, 3)。特に上位 9 種である、カリン、栗 (渋皮)、食用菊 (花弁)、ラズベリー、黒米、紅蓼、りんごの皮 (サンジョナゴールド、紅玉、トキ) は、I 型・II 型双方のコラーゲン糖化モデルにおいて 80 % 以上の蛍光性 AGEs 産生抑制作用を示した。

AGEs 反応中間体産生に対する植物の熱水抽出物の効果

上記で示したように我々は 3 種の蛋白糖化モデルを用い、特に強い蛍光性 AGEs 産生抑制作用を示す 9 種の植物素材を選定した。次にこれら 9 種の素材による AGEs 反応中間体産生抑制作用について検証した。AGEs の産生経路は多岐にわたり、様々な反応中間体が知られているが、本研究ではそのうち、3-DG、GO 及び MGO の 3 種について HPLC-UV を用い解析した。Fig. 1-A, 1-B に示した通り、3 種の蛋白糖化モデル全てにおいて、3-DG 及び GO 産生は 9 種全ての植物素材が有意に抑制した。GO 産生に関しては、黒米を除いた 8 種でほぼ完全に抑制した (Fig. 1-B)。MGO 産生に関しては、glc-HSA 蛋白糖化モデルにおいてはいずれも有意な抑制効果を示したが、fru-collagen I 蛋白糖化モデルにおいては、食用菊 (花弁)、ラズベリー、りんご (トキ) の皮には抑制効果は認められなかった (Fig. 1-C)。黒米は glc-HSA では有意な MGO 産生抑制効果を示したが、コラーゲン蛋白糖化モデルにおいては抑制効果がなかった。9 種の植物素材の中でも、特に紅蓼と栗 (渋皮) はいずれの蛋白糖化モデルにおいても、3 種すべての AGEs 反応中間体産生に対して強い抑制効果を示した。

考察

平均寿命は世界中で伸びる傾向にあり、特に世界有数の長寿国である日本においては、2016 年に平均寿命が 83.7 歳に到達した¹⁸⁾。しかしながら、平均寿命と健康寿命の差

Table 1. Inhibitory effect of plant compounds on HSA-derived fluorescent AGE formation

Ranking	English name	Part	Japanese name	Scientific name	Inhibition of fluorescent AGEs [%]
	Aminoguanigine 0.1 mg/ml				53.10 ± 1.46
1	Chestnut	soft layer	Kuri	<i>Castanea crenata</i>	79.73 ± 0.05
2	Chestnut	outer skin	Kuri	<i>Castanea crenata</i>	75.20 ± 0.15
3	Lady's thumb		Tade	<i>Polygonum hydropiper</i>	73.61 ± 0.29
4	Pomegranate	peel	Zakuro	<i>Punica granatum</i>	62.87 ± 0.16
5	Chrysanthemum (yellow)	petal	Shokuyo-kiku	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	62.14 ± 0.09
6	Water chestnut	outer skin	To-Bishi	<i>Trapa bicornis</i>	50.69 ± 0.29
7	Chinese quince		Karin	<i>Pseudocydonia sinensis</i>	49.87 ± 0.26
8	Belvedere fruit		Tonburi	<i>Bassia scoparia</i>	49.32 ± 0.10
9	Malabar spinach		Tsurumurasaki	<i>Basella alba</i>	48.97 ± 0.06
10	Apple : toki	peel	Ringo: Toki	<i>Malus domestica</i>	46.44 ± 0.30
11	Rosemary		Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	45.20 ± 0.36
12	Citrus sudachi	peel	Sudachi	<i>Citrus sudachi</i>	44.69 ± 0.41
13	Apple : san-jyonagold	peel	Ringo: San-jyonagold	<i>Malus domestica</i>	44.34 ± 0.20
14	Citrus sudachi	pulp	Sudachi	<i>Citrus sudachi</i>	43.89 ± 0.39
15	Nalta jute		Moroheiya	<i>Corchorus olitorius</i>	42.86 ± 0.49
16	Apple : kogyoku	peel	Ringo: Kogyoku	<i>Malus domestica</i>	41.59 ± 0.37
17	Lemon		Lemon	<i>Citrus x limonium</i>	41.56 ± 0.41
18	Reddish black rice		Kuro-mai	<i>Oryza sativa</i>	40.14 ± 0.36
19	Raspberry		Raspberry	<i>Rubus idaeus</i>	39.99 ± 0.71
20	Red-kernelled rice		Aka-mai	<i>Oryza sativa</i>	39.66 ± 0.13
21	Ostrich fern		Kogomi	<i>Matteuccia struthiopteris</i>	37.81 ± 0.34
22	Rucola		Rukkora	<i>Eruca vesicaria</i>	37.06 ± 0.52
23	Apple : hokuto	peel	Ringo: Hokuto	<i>Malus domestica</i>	37.03 ± 0.50
24	Red rhubarb		Aka-rubabu	<i>Rheum rhabarbatum</i>	36.81 ± 0.41
25	Lime		Lime	<i>Citrus aurantifolia</i>	35.72 ± 1.94
26	Shirona Chinese cabbage		Shiro-na	<i>Brassica rapa</i>	35.62 ± 0.37
27	Apple : jyonagold	peel	Ringo: Jyonagold	<i>Malus domestica</i>	35.55 ± 0.60
28	Butterbur scape	peel	Fukinotou	<i>Patasites Japonicus</i>	35.49 ± 0.23
29	Pea	pod	Endou-mame	<i>Pisum sativum</i>	35.47 ± 1.09
30	Red giant elephant ear		Beni-zuiki	<i>Colocasia gigantean</i>	34.84 ± 0.36
31	Apple : yoko	peel	Ringo: Youkou	<i>Malus domestica</i>	34.56 ± 0.59
32	Japanese staunton-vine		Mube	<i>Stauntonia hexaphylla</i>	34.55 ± 0.30
33	Apple : san-fuji	peel	Ringo: San-fuji	<i>Malus domestica</i>	34.02 ± 0.26
34	Variety of wild mustard		Mibu-na	<i>Brassica rapa</i>	34.01 ± 0.16
35	Black-eyed pea		Sasage	<i>Vigna unguiculata</i>	33.91 ± 0.55
36	Black soybean		Kuro-mame	<i>Glycine max</i>	33.46 ± 0.79

Table 1. Inhibitory effect of plant compounds on HSA-derived fluorescent AGE formation (continued)

Ranking	English name	Part	Japanese name	Scientific name	Inhibition of fluorescent AGEs [%]
37	Apple : fuji	peel	Ringo: Fuji	<i>Malus domestica</i>	33.36 ± 0.53
38	Pak choy		Chingen-sai	<i>Brassica rapa</i>	33.30 ± 0.45
39	Apple : akibae	peel	Ringo: Akibae	<i>Malus domestica</i>	33.26 ± 0.27
40	Apple : alps-otome	peel	Ringo: Alpus-otome	<i>Malus domestica</i>	32.74 ± 0.52
41	Apple : mutsu	peel	Ringo: Mutsu	<i>Malus domestica</i>	32.60 ± 0.49
42	Saltwort		Wakame-okahijiki	<i>Salsola komarovii</i>	32.24 ± 0.32
43	blueberry		blueberry	<i>Vaccinium corybosum</i>	31.56 ± 0.37
44	Chinese yam		Yamato-imo	<i>Dioscorea batatas</i>	31.41 ± 0.65
45	Azuki bean		Azuki	<i>Vigna angularis</i>	30.19 ± 0.39
46	Apple : orin	peel	Ringo: Ourin	<i>Malus domestica</i>	30.18 ± 0.44
47	Red cabbage		Aka-kyabetu	<i>Brassica oleracea</i>	29.95 ± 1.02
48	Apple : sekaiichi	peel	Ringo: Sekaiichi	<i>Malus domestica</i>	28.75 ± 0.63
49	Passion fruit		Passion fruit	<i>Passiflora edulis</i>	28.62 ± 1.14
50	Strawberries		Ichigo	<i>Fragaria x ananassa</i>	28.11 ± 0.82
51	Scallion		Wakegi	<i>Allium fistulosum</i>	27.57 ± 0.72
52	Citrus hassaku	peel	Hassaku	<i>Citrus haisaku</i>	27.17 ± 0.25
53	Zabon (pomelo)	peel	Zabon	<i>Citrus maxima</i>	26.72 ± 0.96
54	Peach		Momo	<i>Prunus persica</i>	26.49 ± 0.81
55	Wasabi leaves		Wasabi-na	<i>Brassica juncea</i>	26.44 ± 0.50
56	Water chestnut	nut	To-Bishi	<i>Trapa bicornis</i>	25.75 ± 1.30
57	Plum		Sumomo	<i>Prunus domestica</i>	25.30 ± 1.39
58	Red kidney beans		Kintoki-mame	<i>Phaseolus vulgaris</i>	25.24 ± 1.80
59	Mizuna (potherb mustard)		Mizu-na	<i>Brassica rapa</i>	24.97 ± 0.46
60	Chestnut	nut	Kuri	<i>Castanea crenata</i>	23.48 ± 0.58
61	Pecan nuts		Pecan	<i>Carya illinoensis</i>	22.91 ± 0.68
62	Pomegranate	pulp	Zakuro	<i>Punica granatum</i>	22.83 ± 1.39
63	White mushroom		White mushroom	<i>Agaricus bisporus</i>	22.61 ± 2.03
64	Citrus buntan	peel	Buntan	<i>Citrus grandis</i>	21.11 ± 0.82
65	Yuzu	peel	Yuzu	<i>Citrus junos</i>	19.60 ± 0.84
66	Mangosteen	pulp	Mangosteen	<i>Garcinia mangostana</i>	19.16 ± 1.29
67	Pineapple		Pineapple	<i>Ananas comosus</i>	18.70 ± 1.65
68	King oyster		Eringi	<i>Pleurotus eryngii</i>	14.15 ± 1.33
69	Grapefruit (red)		Red grapefruit	<i>Citrus x paradisi</i>	13.69 ± 0.56
70	Spinach		Horenso	<i>Spinacia oleracea</i>	13.00 ± 0.59
71	Mango		Mango	<i>Mangifera indica</i>	12.16 ± 1.57
72	Horseradish		Seiyou-wasabi	<i>Armoracia rusticana</i>	11.28 ± 0.98
73	Soybean		Daizu	<i>Glycine max</i>	9.23 ± 1.67

The results are expressed as mean ± SD of 3 experiments. HSA, human serum albumin; AGEs, advanced glycation end products; SD, standard deviation.

Table 2. Inhibitory effect of plant compounds on type I collagen-derived fluorescent AGE formation

Ranking	English name	Part	Japanese name	Scientific name	Inhibition of fluorescent AGEs [%]
	Aminoguanigine 0.1 mg/ml				56.69 ± 0.58
1	Chinese quince		Karin	<i>Pseudocydonia sinensis</i>	92.71 ± 0.20
2	Apple : san-jyonagold	peel	Ringo: San-jyonagold	<i>Malus domestica</i>	91.65 ± 0.18
3	Apple : kogyoku	peel	Ringo: Kogyoku	<i>Malus domestica</i>	89.77 ± 0.29
4	Apple : toki	peel	Ringo: Toki	<i>Malus domestica</i>	89.48 ± 0.09
5	Chestnut	soft layer	Kuri	<i>Castanea crenata</i>	87.86 ± 0.12
6	Chrysanthemum (yellow)	petal	Shokuyo-kiku	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	85.55 ± 0.23
7	Raspberry		Raspberry	<i>Rubus idaeus</i>	83.42 ± 0.29
8	Reddish black rice		Kuro-mai	<i>Oryza sativa</i>	82.45 ± 0.38
9	Lady's thumb		Tade	<i>Polygonum hydropiper</i>	81.40 ± 0.09
10	Chestnut	outer skin	Kuri	<i>Castanea crenata</i>	77.13 ± 0.80
11	Pomegranate	peel	Zakuro	<i>Punica granatum</i>	74.79 ± 0.28
12	Rosemary		Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	70.79 ± 0.22
13	Nalta jute		Moroheiya	<i>Corchorus olitorius</i>	70.41 ± 0.24
14	Belvedere fruit		Tonburi	<i>Bassia scoparia</i>	69.32 ± 0.29
15	Water chestnut	outer skin	To-Bishi	<i>Trapa bicornis</i>	63.44 ± 0.54
16	Lemon		Lemon	<i>Citrus x limonium</i>	60.69 ± 0.95
17	Citrus sudachi	peel	Sudachi	<i>Citrus sudachi</i>	57.07 ± 0.83
18	Red-kernelled rice		Aka-mai	<i>Oryza sativa</i>	47.22 ± 0.82
19	Malabar spinach		Tsurumurasaki	<i>Basella alba</i>	25.96 ± 1.21
20	Citrus sudachi	pulp	Sudachi	<i>Citrus sudachi</i>	25.86 ± 0.72

The results are expressed as mean ± SD of 3 experiments. AGEs, advanced glycation end products; SD, standard deviation.

Table 3. Inhibitory effect of plant compounds on type II collagen-derived fluorescent AGEs formation

Ranking	English name	Part	Japanese name	Scientific name	Inhibition of fluorescent AGEs [%]
	Aminoguanigine 0.1 mg/ml				60.33 ± 1.06
1	Chinese quince		Karin	<i>Pseudocydonia sinensis</i>	92.47 ± 0.10
2	Apple : toki	peel	Ringo: Toki	<i>Malus domestica</i>	92.26 ± 0.07
3	Apple : san-jyonagold	peel	Ringo: San-jyonagold	<i>Malus domestica</i>	92.21 ± 0.10
4	Apple : kogyoku	peel	Ringo: Kogyoku	<i>Malus domestica</i>	91.07 ± 0.14
5	Chrysanthemum (yellow)	petal	Shokuyo-kiku	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	88.99 ± 0.13
6	Chestnut	soft layer	Kuri	<i>Castanea crenata</i>	87.84 ± 0.12
7	Raspberry		Raspberry	<i>Rubus idaeus</i>	87.19 ± 0.23
8	Lady's thumb		Tade	<i>Polygonum hydropiper</i>	86.09 ± 0.06
9	Reddish black rice		Kuro-mai	<i>Oryza sativa</i>	82.21 ± 0.44
10	Pomegranate	peel	Zakuro	<i>Punica granatum</i>	80.18 ± 0.44
11	Citrus sudachi	pulp	Sudachi	<i>Citrus sudachi</i>	79.50 ± 0.24
12	Lemon		Lemon	<i>Citrus x limonium</i>	78.29 ± 0.54
13	Chestnut	outer skin	Kuri	<i>Castanea crenata</i>	76.20 ± 0.29
14	Rosemary		Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	74.81 ± 0.27
15	Belvedere fruit		Tonburi	<i>Bassia scoparia</i>	72.83 ± 0.42
16	Water chestnut	outer skin	To-Bishi	<i>Trapa bicornis</i>	72.14 ± 0.62
17	Nalta jute		Moroheiya	<i>Corchorus olitorius</i>	71.98 ± 0.28
18	Citrus sudachi	peel	Sudachi	<i>Citrus sudachi</i>	63.97 ± 0.74
19	Red-kernelled rice		Aka-mai	<i>Oryza sativa</i>	32.03 ± 1.47
20	Malabar spinach		Tsurumurasaki	<i>Basella alba</i>	30.48 ± 1.02

The results are expressed as mean ± SD of 3 experiments. AGEs, advanced glycation end products; SD, standard deviation.

は未だ男性で9年余り、女性では12年余りに及ぶ¹⁹⁾。変性骨関節炎(OA)や骨粗鬆症(OP)は骨関節に痛みを生じさせる原因であり、特に高齢者の日常生活動作(activity of daily life: ADL)やQOLに影響を与える。2005年のコホート研究(research on osteoarthritis/osteoporosis against disability: ROAD)によると、潜在的な患者も含めると日本には約4700万人ものOAやOP患者がいるとされる²⁰⁾。従ってOAやOPによる痛みを取り除くことは、健康寿命の延伸を考えるうえで重要なアプローチの1つである。

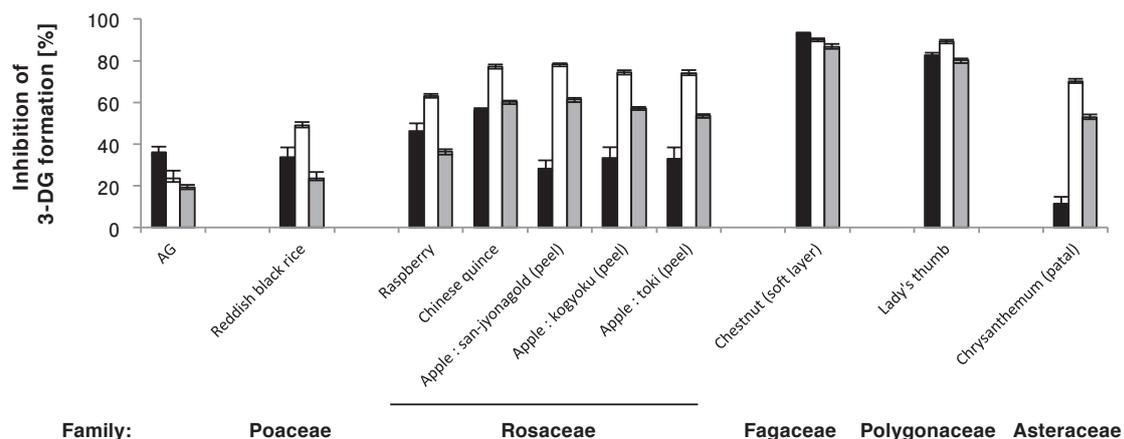
骨コラーゲンの糖化は骨強度や骨弾性の減弱に寄与する。架橋性AGEsの一つであるペントシジンはOP患者の骨に蓄積することが報告されている^{21,22)}。更に人工的なOA発症モデルである前十字靭帯切除モデル(anterior cruciate ligament transection: ACLT)において、関節に還元糖の1種であるリボースを注入するとOAの促進及び

関節液軟骨組織へのAGEs蓄積が生じた²³⁾ことから、骨コラーゲンの糖化を防ぐことがOPやOA予防に繋がる可能性が考えられる。

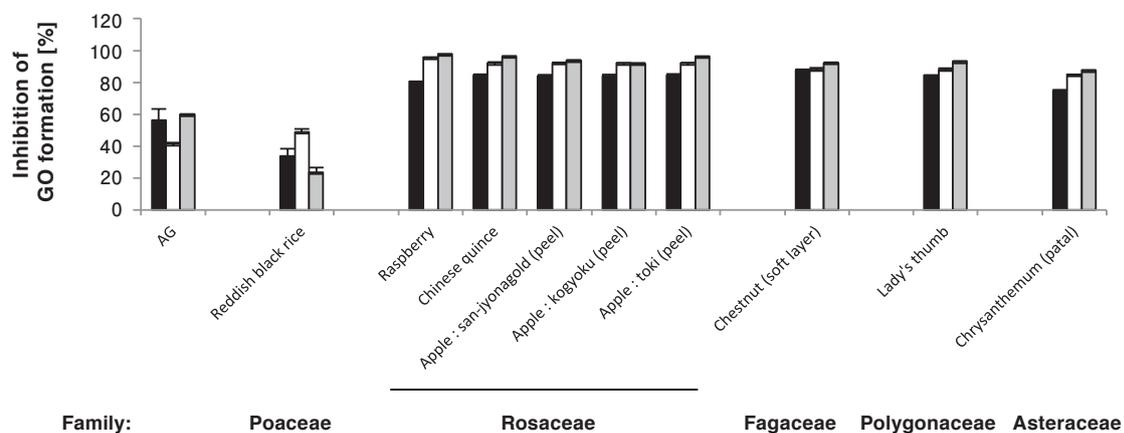
これまでに我々は500種以上の食品素材を用い、HSA蛋白糖化モデルにおける蛍光性AGEs産生抑制作用を評価してきた¹²⁻¹⁶⁾。本研究では73種の植物を用い、HSA並びにコラーゲンの糖化に対する抑制効果を評価した。HSAは血液中に最も多く含まれる蛋白の一つであり、恒常的に血中グルコースにさらされている。Vaculíkらは、血中と骨中のペントシジン濃度には相関があり、更にOA患者の方が健常人に比べ高値であることを報告している²⁴⁾。また、2型糖尿病がOAや骨折の危険因子であることも報告されていることから^{25,26)}、本研究では骨コラーゲンに対する糖化抑制だけでなく、HSAに対する効果も併せて評価した。

野菜・果物の熱水抽出物を終濃度1 mg/mLになるよう加えた際の蛍光性AGEs産生阻害率をTable 1-3に示した。

A. 3-DG



B. GO



C. MGO

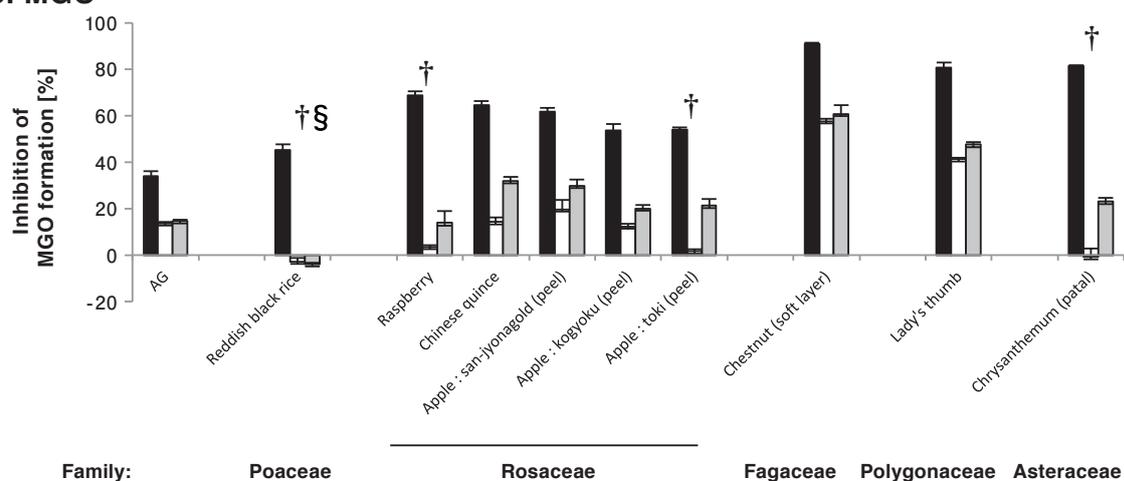


Fig. 1. Effect of plant extracts on the intermediates of AGE formation in various glycation models.

One mg/mL solid content of plant extracts were used to determine the inhibitory effect of plant extracts on the intermediates of AGE formation. HPLC-UV analyses were performed to detect (A) 3-DG (B) GO and (C) MGO. Aminoguanidine (0.1 mg/mL) was used as a positive control. Black bar; glc-HSA model, white bar; fru-collagen I model and grey bar; fru-collagen II model. All data were shown as the mean \pm SD (n = 3) of the inhibition ratios against water. † no significance vs. water in fru-collagen I model, § no significance vs. water in fru-collagen II model and rest of those were p < 0.01 vs. water. AGE, advanced glycation end product; HPLC, high performance liquid chromatography; UV, ultraviolet; 3-DG, deoxyglucosone; GO, glyoxal; MGO, methylglyoxal; glc, glucose; HSA, human serum albumin; fru, fructose; SD, standard deviation.

栗(渋皮)、紅蓼、ザクロ(皮)、食用菊(花弁)はHSA、I型コラーゲン、II型コラーゲン全ての蛋白糖化モデルにおいて強い蛍光性AGEs産生抑制作用を示した。菊には抗糖化作用を有することが既に報告されているフラボン類の一種であるルテオリンが含まれており²⁷⁾、またザクロに含まれるポリフェノールであるエラジタンニン、プニカラギン、ウロリチンなども強い抗糖化作用を示すことが報告されている^{28,29)}。その一方で、バラ科の植物であるカリンやリンゴ(サンジョナゴールド、紅玉、トキ)の皮は、コラーゲンに対する蛍光性AGEs産生抑制作用が、HSAに対する抑制作用に比べ高かった。カリンやリンゴに含まれるプロシアニジンは、カテキンやエピカテキンなどのフラボノイドからなる多量体である。プロシアニジンB2はヤギの水晶体においてAGEs産生を抑制することが報告されており³⁰⁾、また、プロシアニジンがコラーゲン中のペントシジン産生を抑制することも報告されている³¹⁾。バラ科の植物がなぜHSAと比較してコラーゲン蛋白に対する抗糖化能が高いのかは未だ不明であるが、近年、Heらがプロシアニジン自体にコラーゲン構造を安定化させる作用が見られることを報告した³²⁾。これらの結果から、バラ科の植物に多く含まれるプロシアニジンがコラーゲン構造の安定化を通して抗糖化作用を示した可能性も考えられるが、今後詳細なメカニズムを検討する必要がある。

AGEs反応中間体である3-DG、GO及びMGOは、それぞれ異なる反応経路により形成され、様々なAGEsを産生する。本研究において我々は、HSA、I型コラーゲン、II型コラーゲン全ての蛋白糖化モデルにおいて強い蛍光性AGEs産生抑制作用を示した9種の野菜・果物について、AGEs反応中間体産生抑制作用を検証した(Fig. 1)。その結果、特に紅蓼と栗の渋皮が強いAGEs反応中間体産生抑制効果を示した。栗の渋皮は総炭水化物量のうち、71%がポリフェノールであり、その中でも主要成分はタンニンである³³⁾。タデ科に属する紅蓼には、抗酸化物として知

られるカロテノイドの一種、ルテインが含まれている³⁴⁾。AGEs産生経路においては、まずシッフ塩基が生じ、ついでアマドリ転移を経て様々な反応中間体が形成される³⁵⁾。更にこれらの中間体が酸化開裂を受けることで、様々なAGEsが産生される。従って、ポリフェノールやルテインのような抗酸化物には糖化反応経路を抑制する作用を有することが予想される。しかしながら本研究では植物の熱水抽出物を使用しており、ルテインなど、脂溶性の高い物質による寄与は低いと考えられる。紅蓼中の抗糖化作用成分については、今後、更なる検証を行う必要がある。

結語

本研究において、73種の植物由来熱水抽出液のうち、紅蓼と栗の渋皮にHSA及びコラーゲンの糖化に対する強い抑制効果が認められた。

謝辞

本研究は、総合科学技術・イノベーション会議のSIP(戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号14533567)「次世代農林水産業創造技術」(農研機構生研センター委託研究)によって実施された。

利益相反申告

本研究を遂行するにあたり利益相反に該当する事項はない。

References

- 1) 日本整形外科学会(編). ロコモティブシンドローム診療ガイド. 文光堂, 東京, 2010.
- 2) Nakamura KA. "Super-aged" society and the "locomotive syndrome." J Orthop Sci. 2008; 13: 1-2.
- 3) Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. Annu Rev Biochem. 2009; 78: 929-958.
- 4) Castelo-Branco C, Pons F, Gratacós E, et al. Relationship between skin collagen and bone changes during aging. Maturitas. 1994; 18: 199-206.
- 5) Kan H, Yamagishi S, Ojima A, et al. Elevation of serum levels of advanced glycation end products in patients with non-B or non-C hepatocellular carcinoma. J Clin Lab Anal. 2015; 29: 480-484.
- 6) Vlassara H, Striker GE. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. Endocrinol Metab Clin North Am. 2013; 42: 697-719.
- 7) Zakaria MN, El-Bassossy HM, Barakat W. Targeting AGEs signaling ameliorates central nervous system diabetic complications in rats. Adv Pharmacol Sci. 2015; 2015: 346259.
- 8) Takeuchi M, Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Curr Pharm Des. 2008; 14: 973-978.
- 9) Ward MS, Fortheringham AK, Cooper ME, et al. Targeting advanced glycation endproducts and mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. Curr Opin Pharmacol. 2013; 13: 654-661.

- 10) Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr Drug Targets*. 2011; 12: 2096-2102.
- 11) Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, et al. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: A possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 114-123.
- 12) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 135-148.
- 13) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Med*. 2013; 10: 70-76.
- 14) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 22-34.
- 15) Moniruzzaman M, Parengkuan L, Yagi M, et al. Effect of proteins, sugars and extraction methods on the anti-glycation activity of spices. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 129-139.
- 16) Otake K, Yagi M, Takabe W, et al. Effect of tea (*Camellia sinensis*) and herbs on advanced glycation endproduct formation and the influence of post-fermentation. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 156-162.
- 17) Takabe W, Yagi M, Ichihashi M, et al. Anti-glycative effect of palladium and platinum nanoparticle solution. *Glycative Stress Res*. 2016; 3: 222-228.
- 18) World Health Organization. *World Health Statistics 2016: Monitoring health for the SDGs*. 2016.
- 19) Ministry of Health, Labour and Welfare. *Annual Health, Labour and Welfare Report 2013-2014*. 2014.
- 20) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab*. 2009; 27: 620-628.
- 21) Saito M, Fujii K, Soshi S, et al. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int*. 2006; 17: 986-995.
- 22) Saito M, Fujii K, Marumo K. Degree of mineralization related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int*. 2006; 79: 160-168.
- 23) DeGroot J, Verzijl N, Wenting-van Wijk MJ, et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2004; 50: 1207-1215.
- 24) Vaculík J, Braun M, Dungal P, et al. Serum and bone pentosidine in patients with low impact hip fractures and in patients with advanced osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 17: 308.
- 25) Schett G, Kleyer A, Perricone C, et al. Diabetes is an independent predictor for severe osteoarthritis: Results from a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. 2013; 36: 403-409.
- 26) Heilmeyer U, Patsch JM. Diabetes and bone. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2016; 20: 300-304.
- 27) Wu CH, Yen GC. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 3167-3173.
- 28) Ito H, Li P, Koreishi M, et al. Ellagitannin oligomers and a neolignan from pomegranate arils and their inhibitory effects on the formation of advanced glycation end products. *Food Chem*. 2014; 152: 323-330.
- 29) Liu W, Ma H, Frost L, et al. Pomegranate phenolics inhibit formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyl species. *Food Funct*. 2014; 5: 2996-3004.
- 30) Muthenna P, Raghu G, Akileshwari C, et al. Inhibition of protein glycation by procyanidin-B2 enriched fraction of cinnamon: Delay of diabetic cataract in rats. *IUBMB Life*. 2013; 65: 941-950.
- 31) Urios P, Grigorova-Borsos AM, Sternberg M. Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. *Eur J Nutr*. 2007; 46: 139-146.
- 32) He L, Mu C, Shi J, et al. Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *Int J Biol Macromol*. 2011; 48: 354-359.
- 33) 川崎 健司, 白水 智子, 勝井 真紀. クリ皮から抽出されたポリフェノールの脂質吸収抑制効果. *日本食品科学工学会誌*. 2009; 56: 545-548.
- 34) Trevithick-Sutton CC, Foote CS, Collins M, et al. The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxyl radicals: A chemiluminescence and ESR study. *Molecular Vision*. 2006; 12: 1127-1135.
- 35) Nagai R, Shirakawa J, Fujiwara Y, et al. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. *J Clin Biochem Nutr*. 2014; 55: 1-6.