

# 高脂肪食負荷マウスへのカキ果皮抽出物投与による インスリン抵抗性上昇抑制効果

井土 良一

## Inhibitory Effect of Persimmon Peel Extract on Insulin Resistance in High-fat diet-fed Mice

Ryoichi Izuchi

Large amounts of unused rind are discarded during dried persimmon production. Comprehensive gene expression analysis has shown that the consumption of fat-soluble persimmon peel extract (PPE) improves insulin resistance in animal models of diabetes. However, no changes in blood glucose levels and other parameters have been reported to date. Therefore, the purpose of this study is to investigate the effect of PPE on the insulin resistance of male mice fed a high-fat diet (60% fat) with 1.5% PPE for six weeks via glucose tolerance test.

High-fat diet with PPE decreased the blood glucose levels after glucose loading better than the high-fat diet alone. However, no significant decrease in adipose tissue weight was observed, indicating that PPE alleviated high-fat diet-induced insulin resistance.

### 1. 背景・目的

柿は日本でなじみの深い果実である。日本国内において柿の生産量はおよそ 20 万トンであり、そのうちおよそ 2 万トンが干し柿に加工されている。中でも‘市田柿’は最も多く干し柿に加工される品種であるが、その果皮の多くは利用されずに廃棄されている。これまでに、‘市田柿’果皮由来の脂溶性抽出物 (Persimmon peel extract : PPE) (Izuchi *et al.* 2009) は糖尿病モデル動物に対してインスリン受容体のチロシンリン酸化やインスリン刺激の下流で活性化される *Srebp-1* 遺伝子発現の亢進が生じた (Izuchi *et al.* 2011)。PPE 摂取は糖尿病におけるインスリン感受性を改善する可能性があるが、血糖値の変化などは現れていない。PPE の作用はそれほど強くない可能性がある。そのため、摂取量や摂取期間、糖尿病態の重症度などにより、効果が現れにくかった可能性がある。

高脂肪食負荷したマウスでは糖尿病態の発症はないものの、通常食摂取時よりも耐糖能異常が出現することが知られている (Winzell & Ahrén 2004)。PPE の効果は、そのような糖尿病発症前のインスリン抵抗性上昇抑制に対して発揮されるかもしれない。

そこで、PPE のインスリン抵抗性上昇抑制効果を調査するために、高脂肪食誘導性の肥満マウスに対して 1.5%(w/w)PPE 添加飼料を摂取させた時の耐糖能異常に対する効果を調査した。

### 2. 実験材料と方法

#### 2-1. PPE の調製

‘市田柿’の天日乾燥果皮 20 kg を破砕後、95% エタノールで抽出し、10 分の 1 量まで濃縮した。等量の水を加えて攪拌静置後、沈殿物をろ過で回収した。沈殿物を 20% エタノール、水、70% エタノールの順で洗浄して水溶性成分を除去した。沈殿物を再度 95% エタノールに溶解して減圧濃縮後、60°C で乾燥させた。抽出物中のウルソール酸、 $\beta$ -クリプトキサンチン濃度はそれぞれ既報 (Izuchi *et al.* 2009、井土 & 中井 2014) に従って算出した (Table)。

Table Concentrations of ursolic acid and  $\beta$ -cryptoxanthin in the persimmon peel extract (PPE).

Ursolic acid (mg/g)	$\beta$ -Cryptoxanthin (mg/g)
128.10	2.84

#### 2-2. 実験動物

動物は 6 週齢オスの C57BL/6J (ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン) 30 匹を入手し、1 週間の馴化期間を設け、3 日間は固形飼料 CRF1 (オリエンタル酵母工業) を給餌し、4 日目から群分け実施日の間は 10%Fat 脂肪コントロール飼料 (D12450JNM、リサーチダイエット) を給餌した。飼育は室温 22.5 ~ 23.8°C、湿度 50 ~ 68%

の環境下でポリメチルペンテン (TPX) 製ケージで個別に行った。照明時間は12時間/日 (明期: 7~19時、暗期: 19~7時) とした。馴化飼育後は10%Fat 脂肪コントロール飼料 (LD) 群、60%Fat 高脂肪飼料 (HD) 群 (D12492NM、リサーチダイエツト)、1.5%PPE 含有高脂肪食 (HP) 群の3群 (各10匹/群) に分け、6週間飼育試験を行った。飼料と水は自由摂取にて与え、摂餌量は週に2回の頻度で測定した。

本試験の計画は公益財団法人東洋食品研究所の動物実験実施規程に従って動物実験委員会にて承認 (承認番号: A 2024-02) された。また、試験の実施場所であるケー・エー・シーの動物実験規定、動物実験委員会規定及び動物実験承認規定を遵守して行われた (動物実験承認番号: 24-0109)。

### 2-3. 糖負荷試験

糖負荷試験実施前日から16時間の絶食を行い、実施中は絶食状態を維持した。水は自由摂取とした。血糖値測定用採血の最終採血ポイント終了後は各試験飼料を与えた。

グルコース液投与前を0分とし、0.1 g/mL グルコース液を10 mL/kgの用量で単回腹腔内投与した。0分、投与後15、30、60及び120分において、計5回、無麻酔下で尾静脈からヘパリンコーティングのヘマトクリット毛細管を用いて採血を行い、血糖値測定に供した。

採取した血液は、微量高速冷却遠心機によって遠心分離 (1500 × G, 10 min, 4°C) を行って血漿を採取した。血糖値測定まで、超低温フリーザー (MDF-394-PJ、PHC) にて-80°Cで凍結保管した。血漿中の血糖値測定は、グルコース測定キット (グルコースCIIテストワコー、富士フィルム和光純薬) を用いて行った。

### 2-4. 臓器重量の測定

糖負荷試験終了翌日に、小動物用簡易吸入麻酔装置 (NARCOBIT-E (II型)、夏目製作所) を用いたイソフルラン吸入麻酔下で動物の後大静脈よりヘパリン添加シリンジで全採血することで、動物を放血安楽死させた。安楽死後の動物から、肝臓、白色脂肪組織 (腸間膜、精巣周囲) 及び褐色脂肪組織を採取し、電子天秤 (Quintix224-1SJP、ザルトリウス) で臓器重量を秤量した。なお、白色脂肪組織は腸間膜と精巣周囲を分けて秤量した。

### 2-5. 統計学的解析

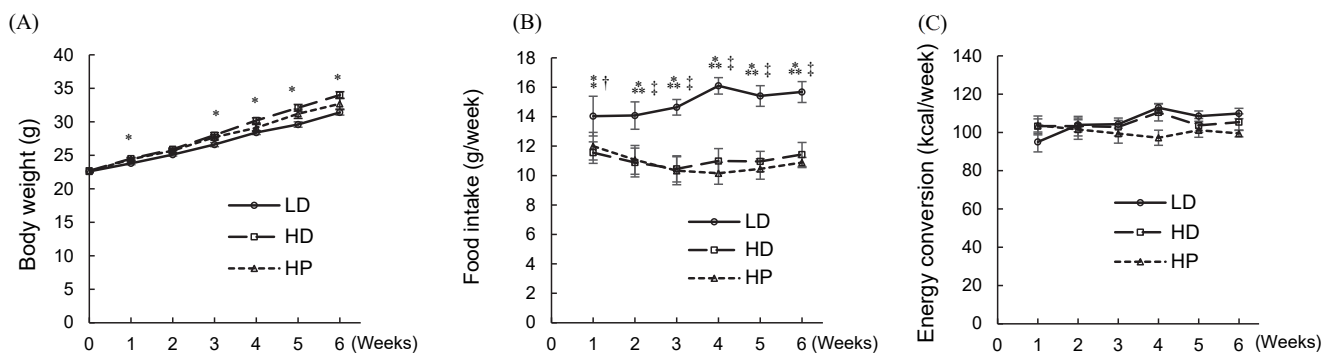
統計学的解析には SAS 9.4 for Microsoft Windows (SAS Institute) 及びその連動システム EXSUS Version 10.1.3 (イーピーエス) を使用し、両側検定、有意水準5%とした。統計学的解析を行う項目は、体重、摂餌量、糖負荷試験時の血糖値、臓器重量とした。

3群間の比較を行う場合は Tukey の多重検定を行った。2群間の比較を行う場合は F 検定を行い、等分散であれば Student's t-test、不等分散であれば Aspin-Welch's t-test を行った。

## 3. 結果

6週間自由摂取にてPPE添加飼料を与えた。1週間でLD群とHD群の間で体重に有意差が現れたが、HD群とHP群、LD群とHP群の間では有意差はなかった (Fig. 1A)。

1週間ごとの摂餌量はLD群に対してHD群とHP群は有意に低かったが、HD群とHP群には違いはなかった (Fig. 1B)。また、摂取エネルギー量換算ではいずれの群も違いはみられなかった (Fig. 1C)。

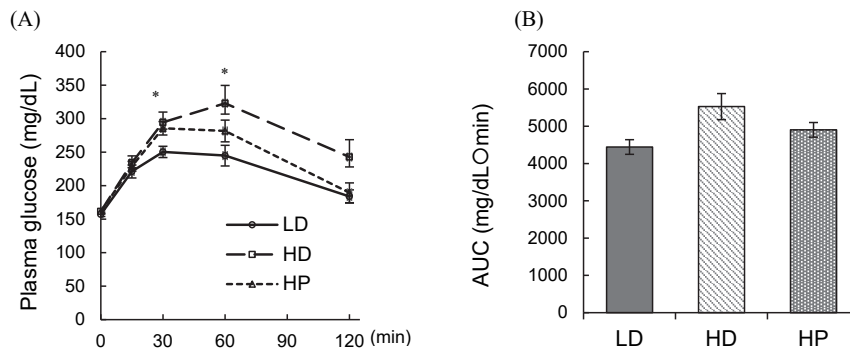


**Fig. 1** Body weight change (A), food intake (B), and energy conversion (C) in mice after six weeks of persimmon peel extract (PPE)-supplemented diet intake. LD: Low-fat diet fed mice, HD: High-fat diet fed mice, HP: PPE-supplemented high-fat diet fed mice. Mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), Tukey's multiple comparison test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.0001$ , LD vs. HD; † $p < 0.01$  and ‡ $p < 0.0001$ , LD vs. HP.

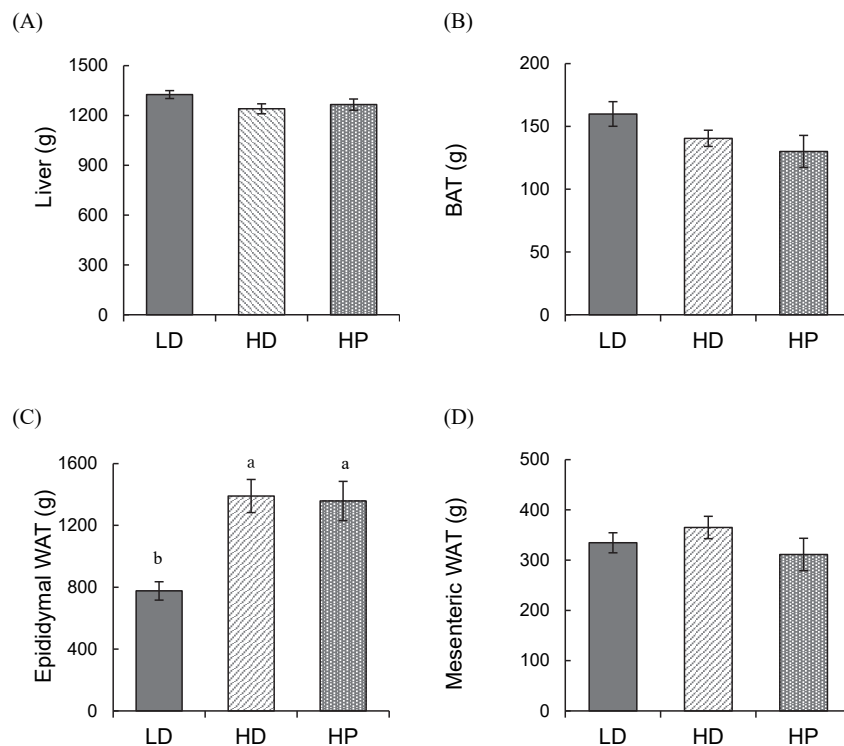
糖負荷試験では投与 30 分後と 60 分後において LD 群と HD 群に有意差があり、HD 群と HP 群の間には有意差はなかった (Fig. 2A)。血糖上昇曲線下面積値 (AUC) は 3 群間に有意差はなかった (Fig. 2B)。

臓器重量は肝臓、褐色脂肪組織、白色脂肪組織 (精巣周

囲、腸間膜周囲) を調べた (Fig. 3)。精巣周囲脂肪組織でのみ LD 群に対して HD 群と HP 群の重量が有意に大きくなった (Fig. 3C)。しかし、HD 群と HP 群間に違いはなかった。また、他の組織では 3 群間に違いはなかった。



**Fig. 2** Blood glucose changes (A) and glucose area under the curve (B) determined via the intraperitoneal glucose tolerance test after six weeks of PPE-supplemented high-fat diet intake in mice. LD: Low-fat diet fed mice, HD: High-fat diet fed mice, HP: PPE-supplemented high-fat diet fed mice. Mean  $\pm$  SEM, Tukey's multiple comparison test, \* $p < 0.05$ , LD vs. HD.



**Fig. 3** Changes in mouse tissue weights after six weeks of feed intake. BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue. LD: Low-fat diet fed mice, HD: High-fat diet fed mice, HP: PPE-supplemented high-fat diet fed mice. Mean  $\pm$  SEM. Different letters on the bars indicate the significant differences among groups about (C) (Tukey's multiple comparison test,  $p < 0.05$ ).

#### 4. 考察

高脂肪食とPPE添加高脂肪食の摂餌量には違いはみられなかった。そのため、体重や組織重量に違いはなかったと思われる。糖負荷試験ではHP群はHD群と有意な差はみられなかったものの、グルコース投与60分、120分後における平均値はLD群とも有意な差はなく、PPE摂取は高脂肪食によって誘導されたインスリン抵抗性上昇を抑制する可能性を示した。

PPEにはトリテルペノイドのウルソール酸とカロテノイドの $\beta$ -クリプトキサンチンが豊富に含まれている。ウルソール酸や $\beta$ -クリプトキサンチンにはインスリン抵抗性の上昇抑制効果が報告されている(Kunkel *et al.* 2012, Ni *et al.* 2015)。そのため、PPEに含まれるウルソール酸と $\beta$ -クリプトキサンチンがインスリン抵抗性上昇抑制に寄与している可能性がある。

本研究では、高脂肪食摂取によって精巣周囲白色脂肪組織が増加したが、PPE摂取では増加を抑制できなかった。PPE摂取によるインスリン抵抗性上昇抑制効果は脂肪細胞の肥大化抑制によるものではなく、別の機構を介している可能性がある。肥満によるインスリン抵抗性の発症は遊離脂肪酸や酸化ストレス、炎症性サイトカインの誘導による炎症により起こる(Ahmed *et al.* 2021)ことから、PPEはこれらの炎症作用を直接的に抑制しているかもしれない。実際に、 $\beta$ -クリプトキサンチンは抗酸化能(Aizawa *et al.* 2011)、ウルソール酸には抗炎症作用(Habtemariam 2019)が報告されている。しかし、これらの成分の関与を証明するためには、各成分の血中濃度や遺伝子発現など詳細な解析が必要である。

PPE摂取は、肥満に伴うインスリン抵抗性上昇を抑制する可能性を示した。廃棄されるカキ果皮を食品素材として利用することで糖尿病発症予防などに役立てることができるとも考えられる。

#### 5. 参考文献

- Ahmed, B.; Sultana, R.; Greene, M. W., 2021, Adipose tissue and insulin resistance in obese., *Biomed. Pharmacoth.*, **137**, p.111315. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111315.
- Aizawa, K.; Iwasaki, Y.; Ouchi, A.; Inakuma, T.; Nagaoka, S.; Terao, J.; Mukai, K., 2011, Development of singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. 2. Measurements of the SOAC values for carotenoids and food extracts., *J. Agric. Food Chem.*, **59**(8), p.3717-3729. DOI: 10.1021/jf104955a.
- Habtemariam, S., 2019, Antioxidant and Anti-inflammatory Mechanisms of Neuroprotection by Ursolic Acid: Addressing Brain Injury, Cerebral Ischemia, Cognition Deficit, Anxiety, and Depression., *Oxidative Med. Cell. Longev.*, **2019**, p.8512048. DOI: 10.1155/2019/8512048.
- Izuchi, R., Takahashi, H.; Inada, Y., 2009, Preparing a carotenoid polyphenol-enriched extract from the peel of persimmon, *Diospyros kaki L.f.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**(12), p.2793-2795. DOI: 10.1271/bbb.90616.
- Izuchi, R.; Nakai, Y.; Takahashi, H.; Ushiyama, S.; Okada, S.; Misaka, T.; Abe, K., 2011, Hepatic gene expression of the insulin signaling pathway is altered by administration of persimmon peel extract: a DNA microarray study using type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, *J. Agric. Food Chem.*, **59**(7), p.3320-3329. DOI: 10.1021/jf102422z.
- 井土 良一, 中井 雄治, 2014, 高脂肪食摂取ラットに対するカキ果皮由来抽出物投与の効果, *東洋食品研究所 研究報告書*, **30**, p.11-17.
- Kunkel, S. D.; Elmore, C. J.; Bongers, K. S.; Ebert, S. M.; Fox, D. K.; Dyle, M. C.; Bullard, S. A.; Adams, C. M., 2012, Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease, *PLoS one*, **7**, e39332. DOI: 10.1371/journal.pone.0039332.
- Ni, Y.; Nagashimada, M.; Zhan, L.; Nagata, N.; Kobori, M.; Sugiura, M.; Ogawa, K.; Kaneko, S.; Ota, T., 2015, Prevention and reversal of lipotoxicity-induced hepatic insulin resistance and steatohepatitis in mice by an antioxidant carotenoid,  $\beta$ -cryptoxanthin, *Endocrinology*, **156**(3), p.987-999. DOI: 10.1210/en.2014-1776.
- Winzell, M. S.; Ahrén, B., 2004, The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes, *Diabetes*, **53**(Suppl 3), S215-219. DOI: 10.2337/diabetes.53.suppl\_3.s215.