

〈平成17年度〉

香辛料Fenugreek Seedの生活習慣病予防および改善効果機序に関する研究

村木悦子・千葉大成

(城西大学薬学部医療栄養学科)

1. 緒 言

現代を取り巻く食環境は、飽食化、グルメ化、インスタント化した食生活や運動不足、ストレスなどの影響によって、肥満や2型糖尿病、高血圧、高脂血症、骨粗鬆症などの生活習慣病が日々増大している。生活習慣病の予防および治療の基本は食生活の改善と運動量の増加であるが、習慣を変えることは容易なことではない。その為、近年では個人の行動変容を補助してくれる機能性食品が注目されている。香辛料は古来より食用としてだけでなく、薬用としても利用されているが、近年、その機能性の生活習慣病に果たす補助食品としての役割が注目され、数多くの香辛料が研究対象となっている。このような天然の植物製品は、単独のメカニズムではなく、耐糖能、脂質代謝、抗酸化および毛細血管拡張、さらには骨代謝に至るまで、総合的に生活習慣病を改善することが考えられている。

本研究で着目したフェヌグリーク (*Trigonella foenum-graecum* L.) の種子 (フェヌグリークシード) は、西アジアから南東ヨーロッパが原産のマメ科トリゴネラ属の1年生草本で、古来より生薬や食品として用いられる香辛料の1つである。フェヌグリークシードの機能性に関して、多くの知見は得られていないが、含有成分の1つである4-ヒドロキシイソロイシン (4OH-Ile; 図1-A) や、水溶性食物繊維であるガラクトマンナン (図1-B) が、血糖上昇抑制^{1~9)} や脂質代謝改善^{2,4,10~12)}

に参与しているという報告がなされている。また、フェヌグリークシードにはステロイドサポニン骨格を有するジオスシン (図1-C) が主成分として含まれ、そのアグリコンであるジオスゲニンは女性ホルモン様の作用を示すことが考えられる。

そこで本研究では、実験1および2では、正常ラットおよび食餌によって軽度の生活習慣病を誘導したラットにおけるフェヌグリークシード摂取による耐糖能および脂質代謝に及ぼす影響を検討し、実験3では、閉経後骨粗鬆症動物である卵巣摘出マウスを用いて、フェヌグリークシードによる骨代謝調節作用について検討した。

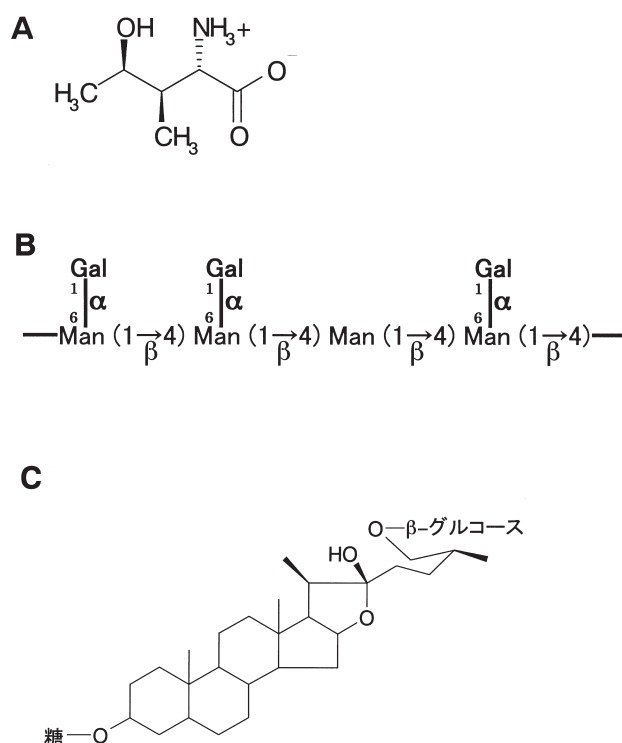


図1 フェヌグリークシード含有成分の構造式
A: 4-ヒドロキシイソロイシン B: ガラクトマンナン
C: ジオスシン (フェヌグリークサポニン)

2. 方 法

2.1 正常ラットにおける生活習慣病予防効果

(1) 実験方法

実験動物として、SD系の3週齢雄性ラット（日本クレア(株)）を用いて、市販の飼育用固形飼料（CE-2；日本クレア(株)）および純水を、1週間自由摂取させて予備飼育した。その後、各群のラットの平均体重がほぼ等しくなるように4群に分け、それぞれの実験食をペアフィーディング、純水を自由摂取させて7週間飼育した。実験食はAIN-93G組成を基準とした標準食、50%脂質エネルギー比・25%砂糖エネルギー比に調整した高脂肪・高砂糖食の2種類をコントロール食とし、これらに各々フェヌグリークシードを1.0g/kg BW/day添加してフェヌグリーク食とした合計4種類（表2-1）を使用した。実験食開始後5週目に経口糖負荷試験（2.0g/kg BW）、6週目にインスリン負荷試験（750mU/kg BW）を施行し、尾細動脈より簡易血糖測定システム（デキスターZ II；バイエルメディカ(株)）にて血糖を測定した。飼育終了後には、ペントバルビタール（100mg/kg BW）で麻酔して解剖を行い、腹部大動脈より採血した。血液はヘパリン処理したスピッツに取り、直ちに血漿を遠心分離（3,000rpm, 20min, 4℃）した。

血中成分については、中性脂肪濃度をトリグリセライドE-テストワコー、総コレステロール濃度をコレステロールEテストワコー、HDL-コレステロール濃度をHDL-コレステロールE-テストワコー、遊離脂肪酸濃度をNEFA C-テストワコー、レプチン濃度をラットレプチンELISAキットワコー（いずれも和光純薬工業(株)）、インスリン濃度をレビスインスリン-ラットT（株シバヤギ）、アディポネクチン濃度をマウス/ラットアディポネクチンELISAキット（大塚製薬(株)）を用いて

測定した。

(2) 統計処理

実験より得られたデータは、平均±標準誤差で表示し、データ解析においては、SPSS12.0J for Windowsソフトパッケージを使用し、一元配置分散分析を行い、Levene法で等分散の検定を行った後、等分散性が成り立っている場合には、Tukey HSD法で多重比較を行った。等分散性が成り立っていない場合には、Kruskal Wallis検定後、Bonferroniの不等式による修正を行い、Mann-Whitney検定を行った。また、推計学的有意水準は危険率5%を基準とした。

2.2 ラット食餌性生活習慣病モデルにおける生活習慣病改善効果

(1) 実験方法

実験動物として、SD系の3週齢雄性ラット（日本クレア(株)）を用いて、市販の飼育用固形飼料（CE-2；日本クレア(株)）および純水を、1週間自由摂取させて予備飼育した後、50%脂質エネルギー比・25%砂糖エネルギー比に調整した高脂肪・高砂糖食と純水を12週間自由摂取させて軽度の生活習慣病を誘導した（誘導期）。その後、各群のラットの平均体重および空腹時血糖値等がほぼ等しくなるように4群に分け、それぞれの実験食をペアフィーディング、純水を自由摂取させて12週間飼育した（実験期）。実験食はAIN-93Gを基準とした標準食、50%脂質エネルギー比・25%砂糖エネルギー比に調整した高脂肪・高砂糖食の2種類をコントロール食とし、これらに各々フェヌグリークシードを0.5g/kg BW/day添加してフェヌグリーク食とした合計4種類（表3-1）を使用した。また、誘導期、実験期を通して標準食（ノーマル食）および純水を自由摂取させた正常群をポジティブコントロールとした。

誘導期および実験期10週目に経口糖負荷試験（2.0g/kg BW）、誘導期12週目、実験期11週目に

インスリン負荷試験 (750mU/kg BW) を施行し、尾細動静脈より簡易血糖測定システム (デキスターZII ; バイエルメディカ株) にて血糖を測定した。誘導期終了時には、尾細動静脈より採血を行い、血中成分を測定することにより病態誘導を確認した。実験期終了後、ペントバルビタール (100mg/kg) で麻酔して解剖を行い、腹部大動脈より採血した。血液はヘパリン処理したスピッツに取り、直ちに血漿を遠心分離 (3,000rpm, 20min, 4 °C) した。また、血中成分については、2.1(1)同様に測定を行った。

(2) 統計方法

2.1(2)と同様に行った。

2.3 卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおける骨代謝調節作用

(1) 実験方法

被験動物として8週齢ddY雌性マウス (SLC株, 静岡) 28匹を用い、偽手術 (Sham) または卵巣摘出術 (OVX) を施した。2日間、基準食であるAIN93G組成 (表4-1) にて予備飼育を行い下記の4群に分けた。すなわち、基準食を投与させたSham群, OVX群, さらにOVX群に対し、基準食に0.28%フェヌグreekシード添加させた (FN) 群およびポジティブコントロールとして0.001%ジオスゲニン添加 (DG) 群に分け、8週間飼育した。なお、フェヌグreekシードはGABAN社製 (東京) の製品を使用し、日本食品分析センター(財)にて含有量を測定依頼した (表

1)。フェヌグreekシードに含有されるフェヌグreekサポニンが全てアグリコンに置換されたと想定し、DG群の飼料を作製した。

(2) 測定項目

大腿骨骨密度および骨質の評価をするためにqCT (LaTheta LCT-100, ALOKA, Japan) にて測定を行うとともに、大腿骨中カルシウムを原子吸光光度計 (AA220FS, VARIAN, Australia) で測定した。また、血中骨代謝マーカーは骨吸収マーカーとしてI型コラーゲンC末端テロペプチド (CTX; Ratlaps, Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Herlev, Denmark), 骨代謝マーカーとしてオステオカルシン (Oc; Amarsham Bioscience, Buckinghamshire, UK) も測定した。さらに、骨リモデリング動態を組織学的に検討するために、脛骨近位部海綿骨における骨形態計測を行い、フェヌグreekシード投与による骨代謝への影響を多角的に検討した。一方、血中ホルモンを評価するために血清中デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) 濃度 (Assay Designs, USA), エストロゲン濃度 (Cayman Chemical, USA) をELISAキットにて測定した。

(3) 統計処理

統計解析はSPSS10.0J統計ソフトを用いて行った。一元配置分散分析 (ANOVA) を行い、データの分散を検討後、等分散性が認められたものにFisherのPLSD検討を、認められないものはKruskal-Wallis検討後、Mann-Whitney-U検定を行った。危険率5%以下 ($p < 0.05$) を有意とし、結果は全て平均値 ± 標準誤差で示した。

3. 実験結果

3.1 正常ラットにおける生活習慣病予防効果

体重、肝臓重量、腎臓重量は、フェヌグreekシードの投与による影響はみられなかった。肩甲骨間褐色脂肪組織重量は、高脂肪・高砂糖食にお

表1 フェヌグreekシード成分組成

(%)	
炭水化物	16.5
脂肪	6.7
たん白質	27.1
ミネラル	3.1
繊維	41.0
水分	5.6
ジオスシン (配糖体)*	520mg/100g

*実験3の試験食において配糖体が全てアグリコンに変換したと仮定してDG群の飼料を作製した。

いて、フェヌグリークシード添加によって増加傾向がみられ、精巢周囲白色脂肪組織重量は減少傾向がみられた(表2-2)。

経口糖負荷試験においては、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、フェヌグリークシード添加によって空腹時血糖値の上昇を抑制する傾向がみられたが(表2-2, 図2-1A), 糖負荷後30分血糖値では、上昇を抑制する傾向がみられなかった(図2-1A)。また、経口糖負荷試験時のインスリン量は、フェヌグリークシード添加による顕著な影響はみられなかった(図2-1B)。インスリン負荷試験においては、フェヌグリークシード添加によって、標準食ではインスリン負荷後速やかな血糖値の低下を示したが、高脂肪・高砂糖食では逆にインスリン負荷による血糖

値低下が遅延した(図2-2)。さらに、インスリン抵抗性指標であるHOMA-Rは、高脂肪・高砂糖食において、フェヌグリークシード添加によって低下する傾向がみられた(表2-2)。

また、血漿中の中性脂肪量、総コレステロール量、レプチン量、アディポネクチン量は、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、フェヌグリークシード添加によって減少する傾向がみられ(図2-3A, B, E, F), HDLコレステロールおよび遊離脂肪酸量は、フェヌグリークシード添加によって、標準食においては減少する傾向、高脂肪・高砂糖食においては増加する傾向がみられた(図2-3C, D)。

表2-1 食餌組成(実験1)

(g/kg)	標準食		高脂肪・高砂糖食	
	コントロール	フェヌグリーク ⁶	コントロール	フェヌグリーク ⁶
ラード ¹	0.000	0.000	260.000	253.000
大豆油 ²	70.000	70.000	0.000	0.000
ミルクカゼイン ¹	200.000	197.000	258.000	250.000
ショ糖 ¹	102.500	100.963	312.000	300.000
β -コーンスターチ ¹	529.486	518.749	43.528	53.199
ビタミン混合 ³	10.000	9.850	12.900	12.500
ミネラル混合 ⁴	35.000	34.475	45.150	43.750
セルロース ¹	50.000	49.250	64.500	62.500
L-シスチン ²	3.000	2.955	3.870	3.750
t-ブチルヒドロキノン ²	0.014	0.014	0.052	0.051
フェヌグリーク ⁵	0.000	16.745	0.000	21.250

¹オリエンタル酵母(株)製, ²和光純薬(株)製, ³オリエンタル酵母(株)製ビタミン混合(酒石酸コリン添加), ⁴オリエンタル酵母(株)ミネラル混合, ⁵(株)ギャバン製フェヌグリークシードパウダー, ⁶フェヌグリーク添加

表2-2 最終体重, 屠殺後の臓器重量および耐糖能関連指標

	標準食		高脂肪・高砂糖食	
	コントロール	フェヌグリーク ¹	コントロール	フェヌグリーク ¹
最終体重 (g)	370.6 ± 11.2	388.0 ± 7.9	399.9 ± 3.4	385.5 ± 2.3
肝臓重量 (g)	12.7 ± 0.64	13.04 ± 0.48	14.47 ± 0.55	14.25 ± 1.12
腎臓重量 (g)	2.37 ± 0.11	2.55 ± 0.07	2.56 ± 0.11	2.57 ± 0.08
肩甲骨間褐色脂肪組織重量 (g)	0.57 ± 0.04	0.55 ± 0.07	0.59 ± 0.04	0.66 ± 0.02
精巢周囲白色脂肪組織重量 (g)	6.68 ± 0.55 ^a	6.91 ± 0.43 ^{ab}	8.53 ± 0.13 ^b	7.34 ± 0.51 ^{ab}
総摂取エネルギー量 (kcal)	3344	3344	3375	3391
空腹時血糖値 (mg/dl)	110.0 ± 4.5	105.0 ± 3.0	107.8 ± 0.9	103.6 ± 3.4
随時血糖値 (mg/dl)	107.0 ± 3.3	121.6 ± 19.2	101.8 ± 4.1	111.5 ± 6.2
空腹時インスリン値 (μ U/ml)	35.18 ± 3.52	37.60 ± 7.18	36.54 ± 7.19	31.48 ± 2.53
HOMA-R	9.69 ± 1.41	9.67 ± 1.76	9.73 ± 1.93	8.05 ± 0.67

¹フェヌグリーク添加

平均 ± 標準偏差で表示。異なるアルファベット間で $p < 0.05$ の有意差ありスグリーク添加

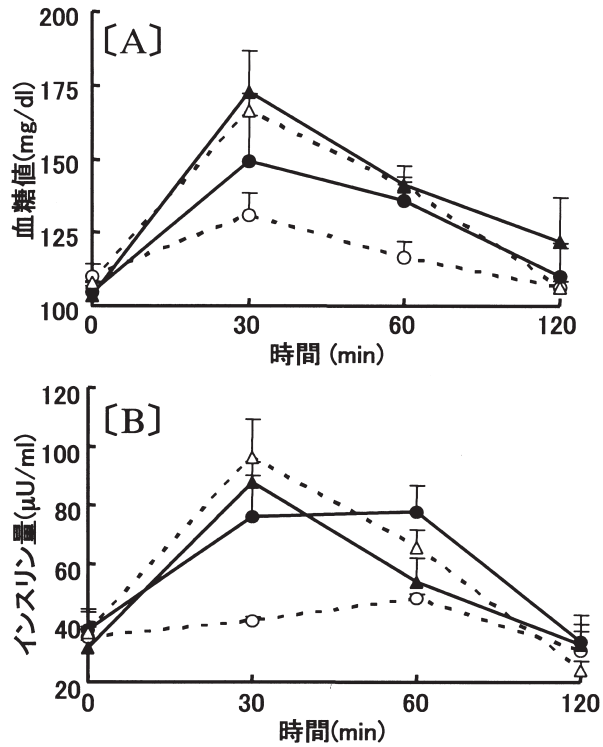


図 2-1 経口糖負荷試験における血糖値 [A] および血漿中インスリン量 [B]
標準食コントロール (○), 標準食+フェヌグreek添加 (●), 高脂肪・高砂糖食コントロール (△), 高脂肪・高砂糖食+フェヌグreek添加 (▲), 平均±標準誤差で表示

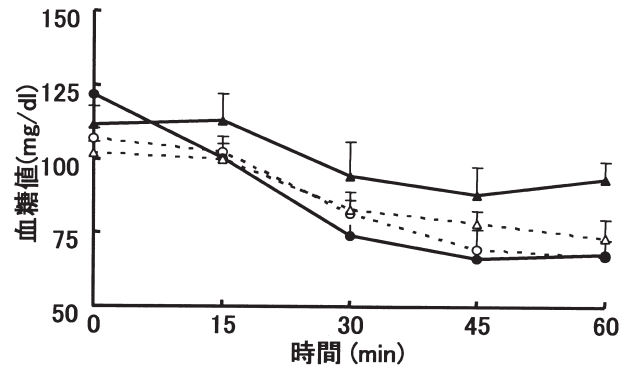


図 2-2 インスリン負荷試験における血糖値
標準食コントロール (○), 標準食+フェヌグreek添加 (●), 高脂肪・高砂糖食コントロール (△), 高脂肪・高砂糖食+フェヌグreek添加 (▲), 平均±標準誤差で表示

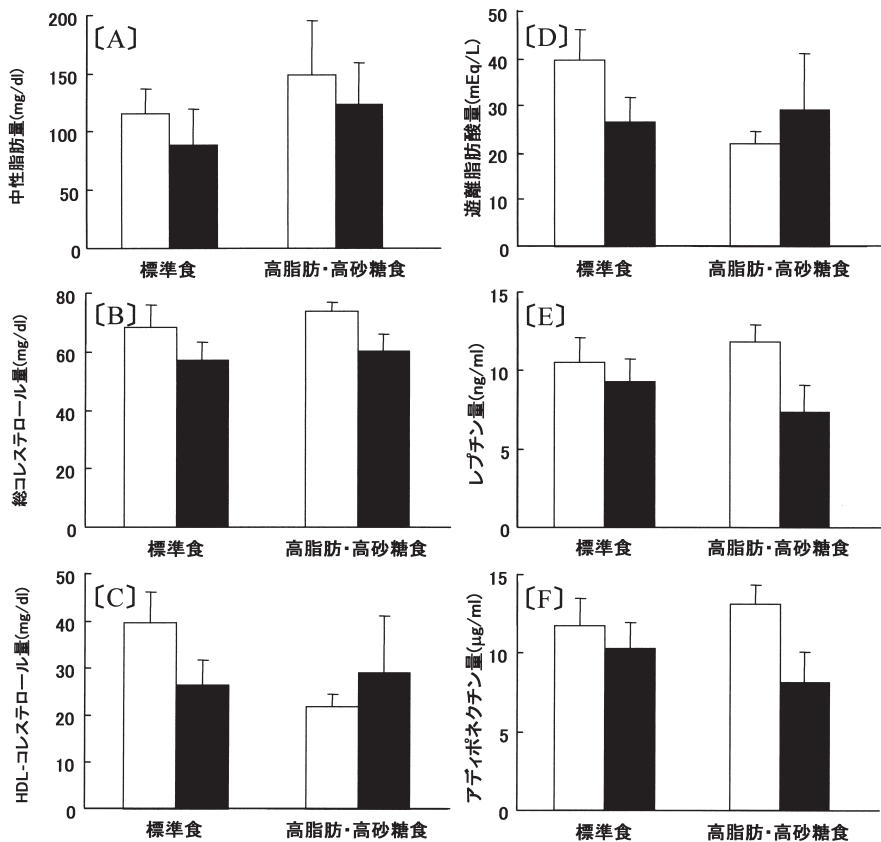


図 2-3 血漿中の脂質代謝関連因子; 中性脂肪量 [A], 総コレステロール量 [B], HDL-コレステロール量 [C], 遊離脂肪酸量 [D], レプチン量 [E], アディポネクチン量 [F] コントロール (□), フェヌグreek添加 (■), 平均±標準誤差で表示

3.2 ラット食餌性生活習慣病モデルにおける生活習慣病改善効果

体重は、高脂肪・高砂糖食において、フェヌグリークシード添加によって減少する傾向がみられた。肝臓重量は、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、フェヌグリークシード添加によって減少する傾向がみられたが、腎臓重量は、フェヌグリークシード添加による影響はみられなかった。また、肩甲骨間褐色脂肪組織重量は、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、フェヌグリークシード添加によって減少する傾向がみられ、精巣周囲白色脂肪組織重量は、高脂肪・高砂糖食においてのみ減少する傾向がみられた(表3-2)。

経口糖負荷試験時の血糖値は、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、フェヌグリークシード添加によって、空腹時血糖値の上昇を抑制する傾向がみられたが(表3-2, 図3-1A), 糖負荷後30分の血糖値では、上昇を抑制する傾向はみられなかった(図3-1A)。また、経口糖負荷試験時のインスリン量は、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、フェヌグリークシード添加によって減少する傾向がみられ(図3-1B), 特に空腹時インスリン量は、高脂肪・高砂糖食において、フェヌグリークシード添加によって、有意に減少した(表3-2)。さらに、インスリン抵抗性指標であるHOMA-Rは、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、フェヌグ

表3-1 食餌組成(実験2)

(g/kg)	ノーマル食 ⁷	標準食		高脂肪・高砂糖食	
		コントロール	フェヌグリーク ⁸	コントロール	フェヌグリーク ⁸
ラード ¹	0.000	0.000	0.000	259.738	257.628
大豆油 ²	70.000	69.930	67.820	0.000	0.000
ミルクカゼイン ¹	200.000	199.799	193.517	199.799	193.517
ショ糖 ¹	102.500	102.397	102.397	311.686	311.686
α -コーンスターチ ¹	529.486	528.953	519.275	0.000	0.000
β -コーンスターチ ¹	0.000	0.000	0.000	129.817	120.138
ビタミン混合 ³	10.000	9.990	9.990	9.990	9.990
ミネラル混合 ⁴	35.000	34.965	30.481	34.965	30.481
セルロース ¹	50.000	49.950	49.534	49.950	49.535
L-シスチン ²	3.000	2.997	2.997	2.997	2.997
<i>l</i> -ブチルヒドロキノン ²	0.014	0.014	0.014	0.052	0.052
フェヌグリーク ⁵	0.000	0.000	23.976	0.000	23.976
水 ⁶	0.000	1.007	0.000	1.007	0.000

¹オリエンタル酵母(株)製, ²和光純薬(株)製, ³オリエンタル酵母(株)製ビタミン混合(酒石酸コリン添加), ⁴オリエンタル酵母(株)ミネラル混合, ⁵(株)ギャバン製フェヌグリークシードパウダー, ⁶超純水(水分補正用), ⁷ポジティブコントロール用標準食, ⁸フェヌグリーク添加

表3-2 最終体重, 屠殺後の臓器重量及び耐糖能関連指標

	ノーマル食 ¹	標準食		高脂肪・高砂糖食	
		コントロール	フェヌグリーク ²	コントロール	フェヌグリーク ²
最終体重 (g)	588.1 ± 37.2 ^b	585.9 ± 22.3 ^b	598.4 ± 3.1 ^{ab}	692.7 ± 13.7 ^a	657.3 ± 26.0 ^{ab}
肝臓重量 (g)	17.19 ± 1.40 ^{ab}	14.74 ± 1.64 ^{ab}	14.56 ± 0.66 ^b	19.43 ± 0.64 ^a	18.31 ± 0.83 ^{ab}
腎臓重量 (g)	3.09 ± 0.24	2.84 ± 0.18	2.94 ± 0.17	2.75 ± 0.11	2.88 ± 0.15
肩甲骨間褐色脂肪組織重量 (g)	0.47 ± 0.11 ^b	0.49 ± 0.01 ^{ab}	0.44 ± 0.08 ^b	0.82 ± 0.07 ^a	0.76 ± 0.07 ^{ab}
精巣周囲白色脂肪組織重量 (g)	6.07 ± 1.00 ^b	4.87 ± 0.30 ^b	5.70 ± 0.38 ^b	9.19 ± 0.68 ^a	6.86 ± 0.32 ^{ab}
総摂取エネルギー量 (kcal)	6866 ± 335	6118	6118	7641	7641
空腹時血糖値 (mg/dl)	92.5 ± 3.1 ^a	93.3 ± 4.8 ^{ab}	90.0 ± 5.7 ^b	103.5 ± 4.3 ^{ab}	96.2 ± 3.1 ^b
随時血糖値 (mg/dl)	93.0 ± 2.5	103.8 ± 6.6	112.3 ± 5.1	104.2 ± 5.7	105.0 ± 3.1
空腹時インスリン値 (μ U/ml)	74.55 ± 9.62 ^b	76.16 ± 7.52 ^{ab}	64.08 ± 9.86 ^{ab}	130.14 ± 6.03 ^a	91.74 ± 10.15 ^b
HOMA-R	17.24 ± 2.29 ^b	17.38 ± 1.61 ^{abc}	14.44 ± 2.81 ^{abc}	33.21 ± 2.01 ^a	21.68 ± 2.23 ^c

¹ポジティブコントロール用標準食, ²フェヌグリーク添加
平均 ± 標準誤差で表示。異なるアルファベット間で $p < 0.05$ の有意差あり

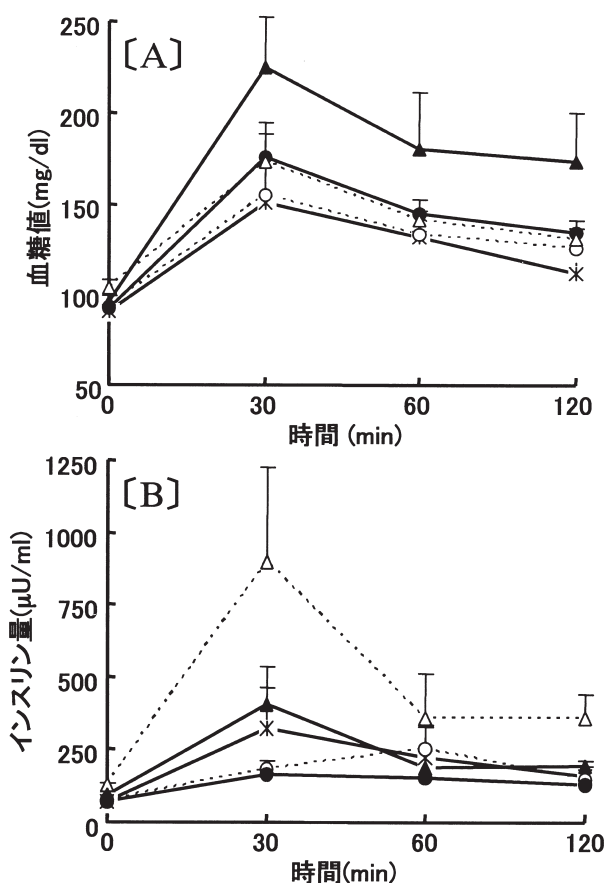


図3-1 経口糖負荷試験における血糖値〔A〕及び血漿中インスリン量〔B〕
 ノーマル食 (*), 標準食コントロール (○), 標準食+フェヌグリーク添加 (●), 高脂肪・高砂糖食コントロール (△), 高脂肪・高砂糖食+フェヌグリーク添加 (▲), 平均±標準誤差で表示

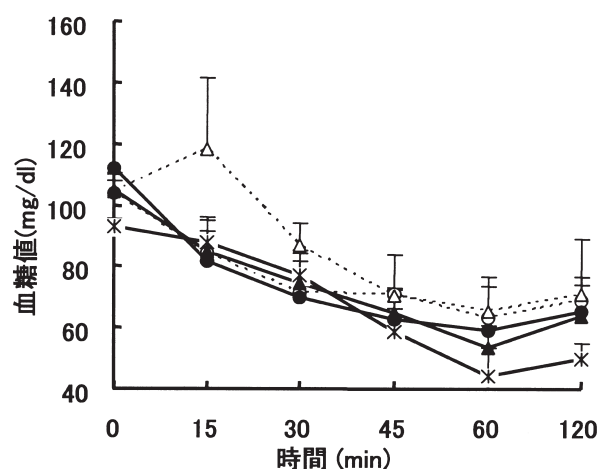


図3-2 インスリン負荷試験における血糖値
 ノーマル食 (*), 標準食コントロール (○), 標準食+フェヌグリーク添加 (●), 高脂肪・高砂糖食コントロール (△), 高脂肪・高砂糖食+フェヌグリーク添加 (▲), 平均±標準誤差で表示

リークシード添加によって低下する傾向がみられ、特に高脂肪・高砂糖食において、フェヌグリークシード添加によって有意に低下した (表3-2)。

血漿中の中性脂肪量、総コレステロール量、HDLコレステロール量、アディポネクチン量は、標準食および高脂肪・高砂糖食の双方において、レプチン量は高脂肪・高砂糖食でのみ、フェヌグリークシード添加によって減少する傾向がみられ (図3-3 A, B, C, E, F), 遊離脂肪酸量は、フェヌグリークシード添加によって、標準食においてのみ増加する傾向がみられた (図3-3 D)。

3.3 卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおける骨代謝調節作用

卵巣摘出 (OVX) 実験モデルは閉経後骨粗鬆症モデルとして広く利用され、OVX動物においてエストロゲンが欠乏すると破骨細胞形成を促進するような骨髓造血環境の変化がされるとされている。そこでフェヌグリークシードによる閉経後骨粗鬆症モデルに及ぼす効果について検討した。

最終体重および飼料摂取量はフェヌグリークシードおよびジオスゲニン投与に関わらず影響はみられなかった (表4-2)。子宮重量はOVXにより著しく低下したが、フェヌグリークシードおよびジオスゲニン投与による影響はみられなかった (表4-2)。

大腿骨骨密度 (BMD) はOVXにより低下したが、フェヌグリークシードおよびジオスゲニン投与により、OVXに比べ有意に高値を示した (図4-1 A)。また、力学的指標となる最小断面二次モーメントはOVX群に比較し、フェヌグリークシードおよびジオスゲニン投与によって高値を示し、曲げに対する強さが増強されることが確認できたが、断面二次極モーメントは顕著な差がみられなかったことから、ねじれに対する強さに関しては影響がないことが観察された (図4-1 B,

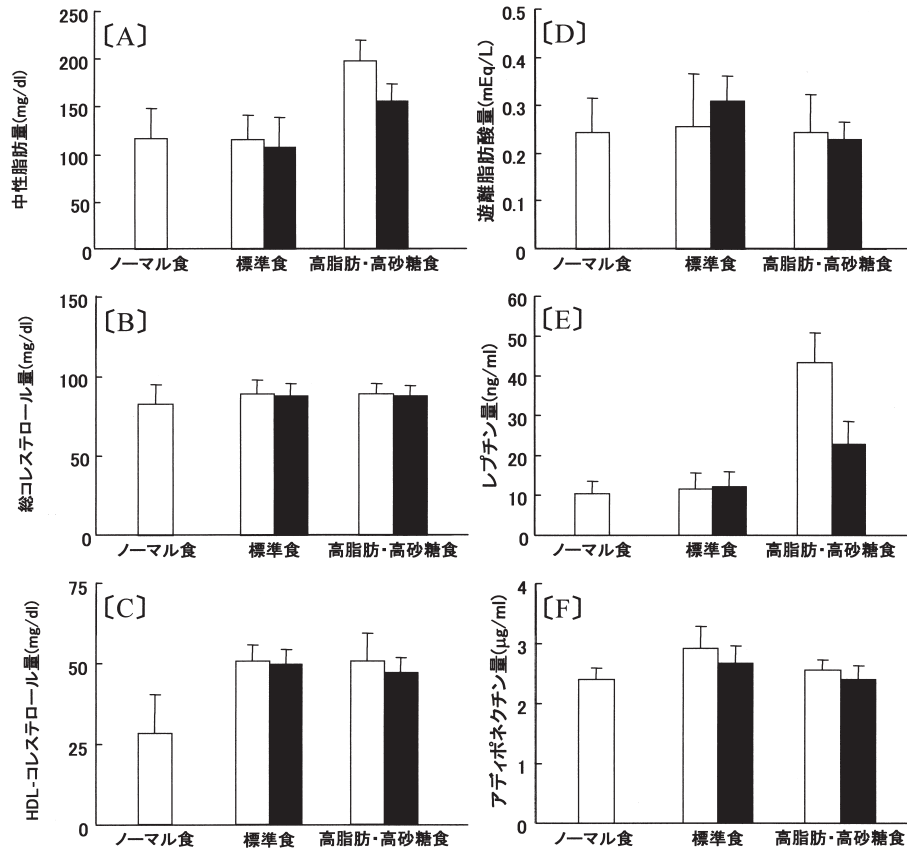


図 3-3 血漿中の脂質代謝関連因子；中性脂肪量 [A]，総コレステロール量 [B]，HDL-コレステロール量 [C]，遊離脂肪酸量 [D]，レプチン量 [E]，アディポネクチン量 [F]
コントロール (□)，フェスグリック添加 (■)，平均±標準誤差で表示

表 4-1 飼料組成 (実験 3)

成分	Normal	FN	DG
	g/kg diet		
ミルクカゼイン	200	192	200
α コーンスターチ	132	131.9	132
β コーンスターチ	397.5	397.1	397.5
スクロース	100	99.9	100
コーンオイル	70	69.8	70
セルロース	50	48.8	50
ミネラル混合 ¹⁾	35	35	35
ビタミン混合 ¹⁾	10	10	10
コリン	2.5	2.5	2.5
L-シスチン	3.0	3.0	3.0
フェスグリックシード ²⁾	-	2.8	-
ジオスゲニン ³⁾	-	-	0.01

1) AIN93G組成に基づき作製した。2) GABAN社製 (表1) を用いた。3) SIGMA社製を用いた。 FN: フェスグリックシード, DG: ジオスゲニン

表 4-2 最終体重, 飼料総摂取量, 子宮重量¹

	最終体重 g	飼料総摂取量 g	子宮重量 mg
Sham	39.1 ± 1.9	233 ± 9.7	180 ± 26 ^a
OVX	43.9 ± 2.1	248 ± 8.3	21.7 ± 1.8 ^b
OVX+FN	43.0 ± 1.9	244 ± 8.8	24.9 ± 1.4 ^b
OVX+DG	41.6 ± 1.6	233 ± 8.6	23.9 ± 1.8 ^b

¹ 表示は平均値±標準誤差とし、異なるアルファベットを有意差ありとして表現した (n = 7, P < 0.05)。Sham: 偽手術+標準食群, OVX: 卵巣摘出群, FN: 0.28%フェスグリック投与群, DG: 0.001%ジオスゲニン投与群

表 4-3 大腿骨Ca, 血中骨代謝マーカー¹

	Ca	CTx	OC
	mmol/g dry bone	ng/ml serum	
Sham	7.14 ± 0.05 ^a	5.72 ± 0.77 ^b	114 ± 6.7 ^b
OVX	6.33 ± 0.04 ^c	9.32 ± 1.28 ^a	297 ± 40 ^a
OVX+FN	6.54 ± 0.05 ^b	6.22 ± 0.86 ^b	164 ± 21 ^b
OVX+DG	6.53 ± 0.03 ^b	7.43 ± 0.88 ^{ab}	209 ± 15 ^{ab}

¹ 表示は平均値±標準誤差とし、異なるアルファベットを有意差ありとして表現した (n = 7, P < 0.05)。Sham: 偽手術+標準食群, OVX: 卵巣摘出群, FN: 0.28%フェスグリック投与群, DG: 0.001%ジオスゲニン投与群
CTx: I型コラーゲンテロペプチド, OC: オステオカルシン

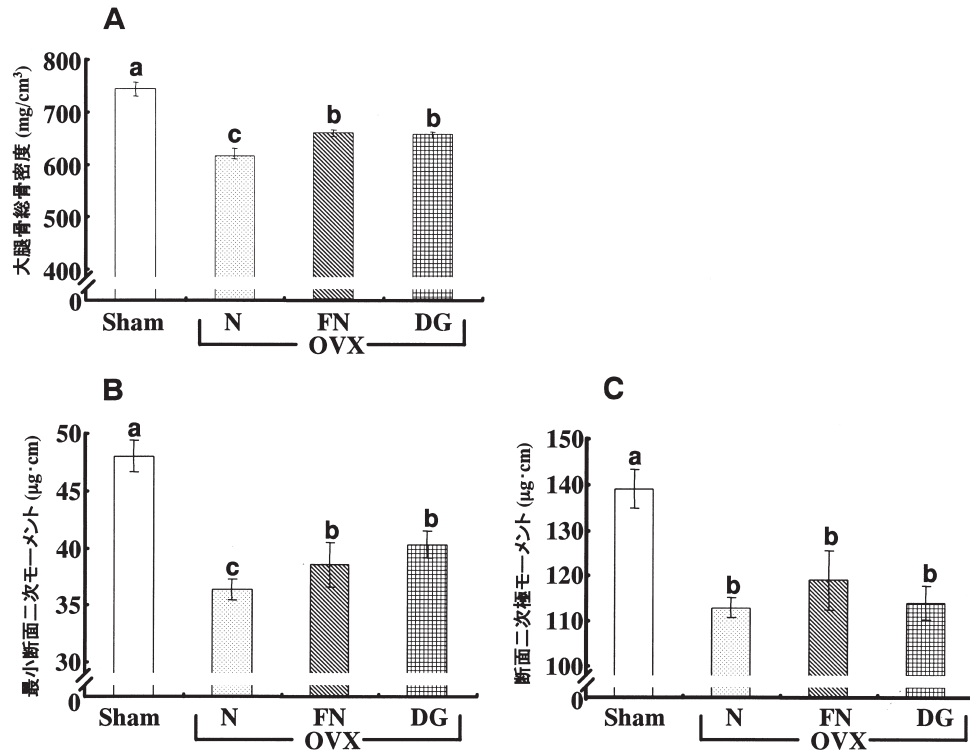


図 4-1 大腿骨骨密度および力学的指標
 A, 大腿骨総骨密度 (BMD), B, 最小断面二次モーメント (曲げに対する強さ), C, 断面二次極モーメント (ねじれに対する強さ)
 Sham; 偽手術+標準食群, OVX; 卵巣摘出群, N; 標準食群, FN; OVX+0.28%フェヌグreek投与群, DG; OVX+0.001%
 ジオスゲニン投与群
 表示は平均値±標準誤差とし、異なるアルファベットを有意差ありとして表現した (n = 7, P < 0.05)。

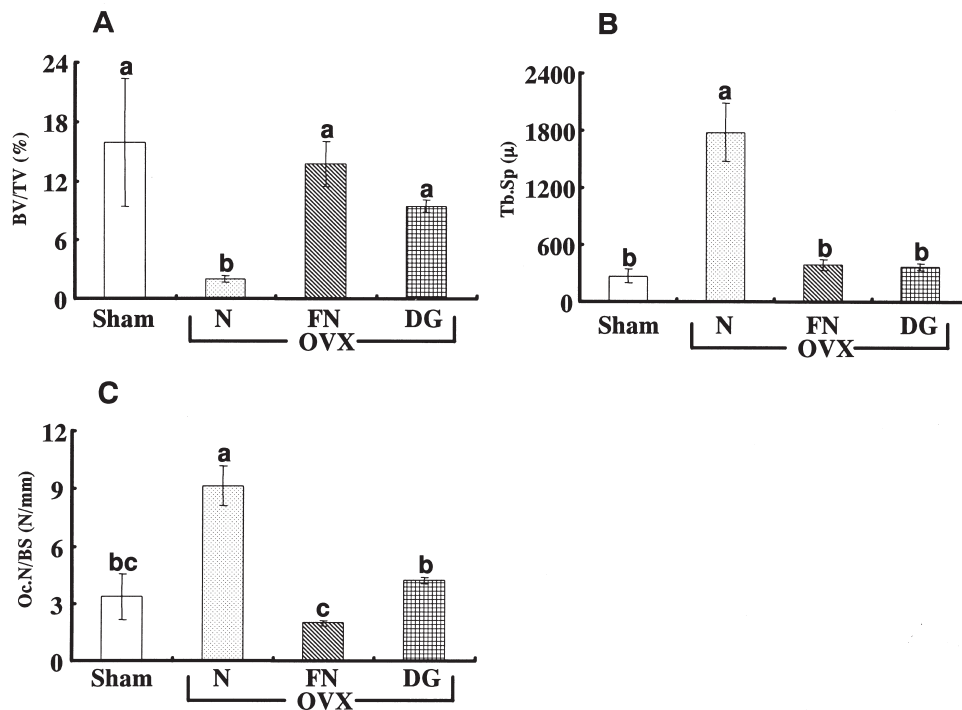


図 4-2 大腿骨遠位部海綿骨形態計測
 A, 骨量 (BV/TV), B, 骨梁間隙 (Tb.Sp), C, 破骨細胞数 (Oc.N/BS)
 Sham; 偽手術+標準食群, OVX; 卵巣摘出群, N; 標準食群, FN; OVX+0.28%フェヌグreek投与群, DG; OVX+0.001%
 ジオスゲニン投与群
 表示は平均値±標準誤差とし、異なるアルファベットを有意差ありとして表現した (n = 7, P < 0.05)。

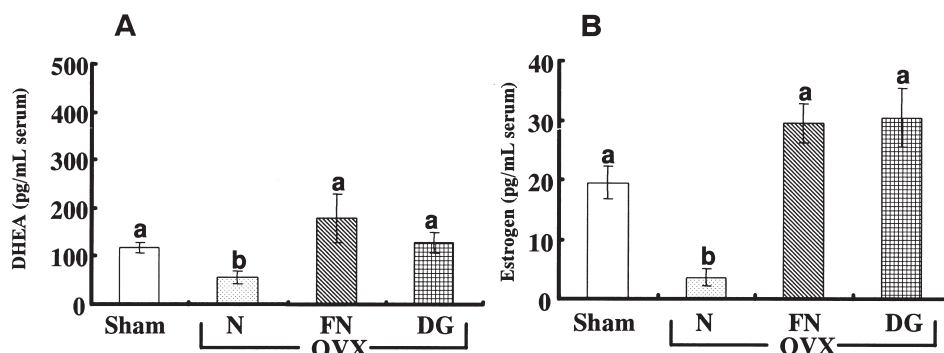


図4-3 血中ホルモン濃度

A, デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) B, エストロゲン濃度

Sham; 偽手術+標準食群, OVX; 卵巣摘出群, N; 標準食群, FN; OVX+0.28%フェヌグリーク投与群, DG; OVX+0.001%ジオスゲニン投与群

表示は平均値±標準誤差とし、異なるアルファベットを有意差ありとして表現した (n = 7, P < 0.05)。

C)。大腿骨Ca含量はフェヌグリークシード投与により、Sham群およびOVX群に比べ有意に高値を示した(表4-3)。骨吸収マーカーである血中I型コラーゲンC末端テロペプチドおよび骨形成マーカーである血中オステオカルシンはOVXにより増加したが、フェヌグリークシードおよびジオスゲニン投与により、その増加が抑制された(表4-3)。骨形態計測について、骨量(BV/TV)はOVXにより著しく低下し、フェヌグリークおよびジオスゲニン投与により増加した(図3-2 A)。また、骨梁間距離(Tb.Sp)はOVXによって著しく増加したが、フェヌグリークシードおよびジオスゲニン投与によって増加が抑制された(図4-2 B)。さらに、破骨細胞数(Oc.N/BS)はフェヌグリーク摂取により、Sham群レベルまで回復した(図4-2 C)。血清中DHEA、エストロゲン濃度はフェヌグリークシードおよびジオスゲニン投与によりOVXと比較し、有意に増加した(図4-3 A, B)。

4. 考 察

正常ラットおよび食餌によって軽度の生活習慣病を誘導したラットにおけるフェヌグリークシード摂取による耐糖能および脂質代謝に及ぼす影響

本研究から、フェヌグリークシード摂取によ

て、血漿中の各種脂質成分の蓄積と、インスリン抵抗性が改善されたが、血漿中アディポネクチン量の減少がみられることから、インスリン抵抗性改善には、アディポネクチンを介さない機序が働いていると考えられる。

フェヌグリークシードに含まれる4-OH-Ileは、薬物投与や遺伝的な疾患モデル動物において、糖尿病の症状を軽減することが報告されており^{5-9,12,13}、さらに、血糖¹⁻⁹、総コレステロール¹⁰⁻¹²、中性脂肪^{2,4,12}、遊離脂肪酸¹²を減少させ、HDL-コレステロール⁴と膵β細胞からのインスリン分泌¹⁴を増加させることが報告されている。また、フェヌグリークシードはインスリンの細胞シグナル伝達経路に影響し^{15,16}、インスリン感受性組織でブドウ糖取り込みを増加させることが示されている。これは、代謝酵素のアップレギュレーション⁵⁻⁹と、筋肉および肝臓のグリコーゲン貯蔵量の増加^{6,8,17}によるものであることも報告されている。

加えて、フェヌグリークシードに含まれるガラクトマンナンは、膵β細胞でのインスリン分泌を刺激せずに肝臓と血漿でコレステロールを低下させると報告されているが¹⁸、これは肝臓でのコレステロール合成阻害によるもの¹⁹と、小腸での脂質吸収阻害によるもの²⁰が考えられる。脂質同様に糖質についても小腸で吸収を阻害する為、

空腹時血糖値の上昇を抑制しないが、食後血糖値の上昇を抑制することは可能である。また、水溶性食物繊維はリポ蛋白の代謝を変化させることによってLDLコレステロールを低下させるとも報告されている²¹⁾。

さらに、フェヌグreekシードに含まれるステロイドサポニンであるジオスゲニン²²⁾は、VLDLコレステロールは変化させないが、LDLコレステロールを低下させると報告されている²²⁾。また、ジオスゲニンはデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) と類似骨格の構造を持っているが、DHEAには胆汁酸の排泄を増加させ、糞中へのコレステロール排泄を促す作用が報告されている²³⁾。

以上のことから、欧米型の食事 (高脂肪・高砂糖食) によって引き起こされる血糖値の上昇を、糖の取り込みを促進させることによって抑制させる経路と、脂質代謝異常を抑制又は改善することによって、インスリンの感受性を改善して血糖値の上昇を抑制する経路が考えられる。しかしながら、フェヌグreekシード抽出物と、フェヌグreekシードそのものの作用に少なからず違いがみられることから、今後も詳細に検討を行ってきたい。

閉経後骨粗鬆症動物である卵巣摘出マウスにおけるフェヌグreekシードによる骨代謝調節作用

閉経期骨粗鬆症では卵巣の機能低下により骨代謝回転が高まり、骨吸収が骨形成を上回り、骨量が急激に減少することが知られている。エストロゲン欠乏によって発症する閉経後骨粗鬆症ではエストロゲン補充療法によって骨量減少を改善することが臨床的に確認^{24,25)} されているが、生殖器官への影響が懸念されている。一方、フェヌグreekシードはDHEA様骨格を持つジオスゲニン (配糖体: ジオスシン) を含有しているが、Hindon *et al*²⁶⁾ は卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットにおいてDHEA投与によって、生殖器に作用することな

く、骨量減少を抑制することを報告している。本研究において、骨密度や軟X線写真の結果をみると、フェヌグreekシードおよびジオスゲニン投与によって骨量の増加が観察され、血中DHEAおよびエストロゲンの増加もみられた。これまでの報告^{27~31)} によると、DHEAは骨芽細胞に存在するアロマトーゼの作用によって、エストロゲンに変換される細胞内分泌を刺激し、骨量維持に関与することを推測している。また、高齢女性においてDHEAの補充療法によって骨吸収マーカーである血中CTX濃度の低下と骨量を増加させる報告²⁵⁾ や初経女性において血中DHEA-Sと骨密度が正の相関を示した報告³²⁾ などから、DHEA様骨格を含有するフェヌグreekシードは低エストロゲン状態を呈する卵巣摘出動物においてエストロゲンの主要な性ホルモンの供給源であることが推測され、骨量維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

ところで、骨形態計測法は骨の形態を理解するために骨の状態を数値化し、評価する方法^{33,34)} である。本研究の骨形態計測の結果から、フェヌグreekシードが大腿骨遠位海綿骨の骨梁幅の減少と骨梁間隙の増加を抑制し、海綿骨中の破骨細胞数を減少することが明らかとなった。また、血中骨吸収マーカーであるI型コラーゲンC末端テロペプチドがフェヌグreekシード投与によってOVX群に比べ、低下したことから、フェヌグreekシードによる骨量減少抑制作用は骨吸収の抑制によるものであることが示唆された。

以上のことより、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおけるフェヌグreekシードによる骨量減少抑制効果はDHEAからエストロゲン経路を介して、骨吸収を抑制することが示唆された。また、DHEAの骨吸収作用においてIL-6などのサイトカインが関わることも報告^{27,35)} されており、今後はフェヌグreekシード投与による骨吸収サイトカ

インへの影響も含め検討し、フェヌグリークシードによる骨代謝調節機構について明らかにしていきたい。

5. 結 語

本研究によって、生活習慣病予防関連した脂質代謝、糖代謝および骨代謝調節に及ぼす香辛料フェヌグリークシードによる効果を見出し、フェヌグリークシードの新規機能性について明らかにした。生活習慣病の改善のためには、副作用の可能性のある薬剤投与に代わって、古来より食用としているようなフェヌグリークシードを日常の食生活に取り入れて、予防・改善できれば理想的である。しかしながら、フェヌグリークシードの作用発現機序については、明瞭でない部分が多いため今後の検討課題として研究成果の集積を行っていききたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なる研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Madar Z., Abel R., Samish S., Arad J.: Glucose-lowering effect of fenugreek in non-insulin dependent diabetics. *Eur J Clin Nutr* 42: 51-54, 1988.
- 2) Sharma R.D., Raghuram T.C., Rao N.S.: Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes. *Eur J Clin Nutr* 44: 301-306, 1990.
- 3) Abdel-Barry J.A., Abdel-Hassan I.A., Jawad A.M., al-Hakim M.H.: Hypoglycemic effect of aqueous extract of the leaves of *Trigonella foenum-graecum* in healthy volunteers. *East Mediterr Health J* 6: 83-88, 2000.
- 4) Gupta A., Gupta R., Lal B.: Effect of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study. *J Assoc Physicians India* 49: 1057-1061, 2001.
- 5) Raju J., Gupta D., Rao A.R., Yadava P.K., Baquer N.Z.: *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reversing the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes. *Mol Cell Biochem* 224: 45-51, 2001.
- 6) Vats V., Yadav S.P., Grover J.K.: Effect of *T. foenum-graecum* on glycogen content of tissues and the key enzymes of carbohydrate metabolism. *J Ethnopharmacol* 85: 237-242, 2003.
- 7) Mohamad S., Taha A., Bamezai R.N., Basir S.F., Baquer N.Z.: Lower doses of vanadate in combination with *trigonella* restore altered carbohydrate metabolism and antioxidant status in alloxan-diabetic rats. *Clin Chim Acta* 342: 105-114, 2004.
- 8) Gad M.Z., El-Sawalhi M.M., Ismail M.F., El-Tanbouly N.D.: Biochemical study of the anti-diabetic action of the Egyptian plants Fenugreek and Balanites. *Mol Cell Biochem* 281: 173-183, 2006.
- 9) Mohammad S., Taha A., Akhtar K., Bamezai R.N., Baquer N.Z.: In vivo effect of *Trigonella foenum graecum* on the expression of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and distribution of glucose transporter (GLUT4) in alloxan-diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 647-654, 2006.
- 10) Sharma R.D., Raghuram T.C., Rao N.S.: Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes. *Eur J Clin Nutr* 44: 301-306, 1990.
- 11) Sowmya P., Rajyalakshmi P.: Hypocholesterolemic effect of germinated fenugreek seeds in human subjects. *Plant Foods Hum Nutr* 53: 359-365, 1999.
- 12) Narender T., Puri A., Shwet T., Khaliq T., Saxena R., Bhatia G., Chandra R.: 4-Hydroxyisoleucine an unusual amino acid as antidiabetic and antihyperglycemic agent. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 293-296, 2006.
- 13) Thakran S., Siddiqui M.R., Baquer N.Z.: *Trigonella foenum graecum* seed powder protects against histopathological abnormalities in tissues of diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 266: 151-159, 2004
- 14) Sauvare Y., Petit P., Broca C., Manteghetti M., Baissac Y., Fernandez-Alvarez J., Gross R., Roye M., Leconte A., Gomis R., Ribes G.: 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. *Diabetes* 47: 206-210, 1998.
- 15) Broca C., Breil V., Cruciani-Guglielmacci C., Manteghetti M., Rouault C., Derouet M., Rizkalla S., Pau B., Petit

- P., Ribes G., Ktorza A., Gross R., Reach G., Taouis M.: Insulinotropic agent ID-1101 (4-hydroxyisoleucine) activates insulin signaling in rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E463-E471, 2004.
- 16) Vijayakumar M.V., Singh S., Chhipa R.R., Bhat M.K.: The hypoglycaemic activity of fenugreek seed extract is mediated through the stimulation of an insulin signalling pathway. *Br J Pharmacol* 146: 41-48, 2005.
- 17) Ruby B.C., Gaskill S.E., Slivka D., Harger S.G.: The addition of fenugreek extract (*Trigonella foenum-graecum*) to glucose feeding increases muscle glycogen resynthesis after exercise. *Amino Acids* 28: 71-76, 2005.
- 18) Rokeya B., Hannan J.M.A., Haque S., Ali L., Nahar N., Mosihuzzaman M., Azad Khan A.K.: Retardation of intestinal carbohydrate digestion and absorption by an antihyperglycemic plant material extract. *Diabetologia* 41, A237, 1998.
- 19) Evans A.J., Hood R.L., Oakenfull D.G., Sidhu G.S.: Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat. *Br J Nutr* 68 (1) :217-229, 1992
- 20) Boban P.T., Nambisan B., Sudhakaran P.R.: Hypolipidaemic effect of chemically different mucilages in rats: a comparative study. *Br J Nutr* 96 (6) :1021-1029, 2006
- 21) Shen H., He L., Price R.L., Fernandez M.L.: Dietary soluble fiber lowers plasma LDL cholesterol concentrations by altering lipoprotein metabolism in female guinea pigs. *J Nutr* 128 (9) :1434-1441, 1998.
- 22) Petit P.R., Sauvaire Y.D., Hillaire-Buys D.M., Leconte O.M., Baissac Y.G., Ponsin G.R., Ribes G.R.: Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. *Steroids* 60 (10) :674-680, 1995.
- 23) Yamaguchi A., Tazuma S., Ochi H., Nishioka T., Yasumiba S., Sunami Y., Asamoto Y., Tsuboi K., Nakai K., Sakomoto M., Kanno K., Numata Y., Chayama K.: Effects of Diosgenin on the bile flow and canalicular membrane fluidity and canalicular membrane protein in rats. *Jpn Pharmacol Ther* 29: S239-S240, 2001.
- 24) Labrie F., Diamond P., Cusan L., Gomez J.L., Belanger A., Candas B.: Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 82 (10) : 3498-3505, 1997.
- 25) Baulieu E.E., Thomas G., Legrain S., Lahlou N., Roger M., Debuire B., Fauconau V., Girard L., Hervy M.P., Latour F., Leaud M.C., Mokrane A., Pitti-Ferrandi H., Trivelle C., de Lacharrie O., Nouveau S., Rakoto-Arison B., Souberbielle J.C., Raison J., Le Bouc Y., Raynaud A., Girerd X., Forette F.: Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci U S A* .97 (8) : 4279-4284, 2000.
- 26) Higdon K., Scott A., Tucci M., Benghuzzi H., Tsao A., Puckett A., Cason Z., Hughes J.: The use of estrogen, DHEA, and diosgenin in a sustained delivery setting as a novel treatment approach for osteoporosis in the ovariectomized adult rat model. *Biomed Sci Instrum.* 37: 281-286, 2001.
- 27) Bellido T., Jilka R.L., Boyce B.F., Girasole G., Broxmeyer H., Dalrymple S.A., Murray R., Manolagas S.C.: Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest.* 95 (6) : 2886-2895, 1995.
- 28) Purohit A., Flanagan A.M., Reed M.J.: Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *Endocrinology.* 131 (4) : 2027-2029, 1992.
- 29) Tanaka S., Haji M., Takayanagi R., Tanaka S., Sugioka Y., Nawata H.: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the enzymatic activity and expression of the messenger ribonucleic acid for aromatase cytochrome P450 synergistically with dexamethasone depending on the vitamin D receptor level in cultured human osteoblasts. *Endocrinology.* 137 (5) :1860-1869, 1996.
- 30) Shimodaira K., Fujikawa H., Okura F., Shimizu Y., Saito H., Yanaihara T.: Osteoblast cells (MG-63 and HOS) have aromatase and 5 alpha-reductase activities. *Biochem Mol Biol Int.* 39 (1) :109-116, 1996.
- 31) Fujikawa H., Okura F., Kuwano Y., Sekizawa A., Chiba H., Shimodaira K., Saito H., Yanaihara T.: Steroid sulfatase activity in osteoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 231 (1) :42-47, 1997.
- 32) Bonfiglio D., Garofalo C., Catalano S., Marsico S., Aquila S., Ando S.: Low calcium intake is associated with decreased adrenal androgens and reduced bone age in premenarcheal girls in the last pubertal stages. *J Bone Miner Metab.* 22 (1) : 64-70, 2004.
- 33) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中 栄, 中村浩彰,

- 森 諭史 編著. 第10章 骨のリモデリングとモデリング.
「新骨の科学」pp213-246, 医歯薬出版, 東京, 2007.
- 34) 伊藤明美, 山本智章, 高橋榮明. 骨形態計測の現状と将来.
THE BONE 20 (5) : 673-683, 2006.
- 35) Haden S.T., Glowacki J., Hurwitz S., Rosen C., LeBoff M.S.:
Effects of age on serum dehydroepiandrosterone sulfate,
IGF-I, and IL-6 levels in women. *Calcif Tissue Int.* 66 (6) :
414-418, 2000.

Preventive effects of *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugreek) seeds on the lifestyle-related diseases

Etsuko Muraki and Hiroshige Chiba

(Department of Clinical Dietetics & Human Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University)

Trigonella foenum-graecum L. (Fenugreek) seeds have been described earlier, and its use in ancient medical practice is well known. In this study, we examined whether Fenugreek seeds supplementation affects the life style-related diseases, such as diet-induced metabolic diseases and bone metabolism in animal models.

Diets used in the experiment 1 and 2 were a standard diet or a high-fat high-sucrose (HFS) diet containing 3g/kg/d fenugreek seeds based on the modified version of the AIN-93G purified diet. Rats fed with diets contained with fenugreek seeds showed for 12 wks significantly lower fasting blood glucose level and insulin concentrations than rats fed with control diets. Therefore, fenugreek seeds might improve insulin sensitivity in rats, and the effect was supported by the decreased HOMA-R in the rats fed with HFS diet containing fenugreek seeds. The cholesterol and triglyceride levels were significantly lower in fenugreek seeds-treatment groups. Moreover, a distinct reduction of total lipids, total cholesterol and triglyceride and bile acid concentrations in the liver was found in the rats fed with the HFS diets containing fenugreek seeds. These results suggest that fenugreek seeds increased insulin sensitivity at least partly by improvement of lipid metabolism disorders in the plasma and the liver in rats fed with HFS diet. These effects on lipid metabolism disorders were similar to the actions of 4-hydroxyisoleucine or galactomannan included in fenugreek seeds.

In the experiment 3, twenty-eight, 8-wks old female mice divided into four groups: sham-operated group, OVX group, OVX+FN (0.28% fenugreek seeds) group and OVX+DG (0.001% diosgenin) group. Eight weeks after the investigation, the uterine weight strikingly decreased in the three OVX groups. It was indicated that the supplementation of fenugreek seeds or diosgenin did not affect the uterus. The femoral whole BMD and calcium contents were significantly reduced by OVX, and bone loss prevented by the intake of diet containing fenugreek seeds or diosgenin. Histomorphometric analysis showed that bone volume (BV/TV) and osteoclast number/bone surface (Oc/BS) in distal femoral cancellous bone were significantly lower in the OVX group than that in the sham group, and they were restored in the fenugreek seeds or diosgenin supplementation group, as the sham group. These

results suggest that fenugreek seeds inhibit bone loss apparently without estrogenic activity in the reproductive organs of OVX mice.

In conclusion, these findings propose the possibility that a spice, fenugreek seeds can be one of the candidates for treatment or prevention of lifestyle-related diseases, such as lipid metabolism, glucose tolerance and osteoporosis.