

# 琉球大学学術リポジトリ

## [報文]糖尿病の予防、病態遅延を目的とした健康補助食品の開発

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): inhibitory activity of glycohydrolase, anti diabetes, blood glucose, health supplement 作成者: 高橋, 誠, 豊川, 哲也, 具志堅, 健作, 赤松, 隆行, TAKAHASHI, Makoto, TOYOKAWA, Tetsuya, GUSIKEN, Kensaku, AKAMATSU, Takayuki メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016603">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016603</a>

## 糖尿病の予防、病態遅延を目的とした健康補助食品の開発

高橋 誠\*, 豊川 哲也\*\*, 具志堅 健作\*, 赤松 隆行\*

\*株式会社 沖縄発酵化学, \*\*沖縄県工業技術センター

### Development of health food for the purpose of diabetes prevention and delay

Makoto TAKAHASHI\*, Tetsuya TOYOKAWA\*\*, Kensaku GUSIKEN\*, and Takayuki AKAMATSU\*

\*Okinawa Fermentative Chemicals Co. Ltd., \*\*Okinawa Industrial Technology Center

Keywords : inhibitory activity of glycohydrolase, anti diabetes, blood glucose, health supplement

#### 緒 言

近年の生活習慣の変化により全国的に糖尿病患者の急増が問題とされている<sup>1)</sup>。その大半がⅡ型糖尿病で、インスリン分泌遅延や肝臓、筋肉、脂肪細胞におけるインスリン抵抗性のための食事摂取後の高血糖が特徴的病態である<sup>2)</sup>。また、沖縄県においても糖尿病・耐糖能異常の有病率・発症率の増加が報告されている<sup>3)</sup>。最近ではⅡ型糖尿病に対して運動療法及び食事療法による血糖コントロールの改善が報告されており、食事療法の1つに食後血糖上昇を抑制する目的で食物繊維や糖質の消化吸収に関わる酵素の阻害薬が用いられており、ベイスン錠(武田薬品株)等がそれにあたる。また、糖尿病による免疫機能の低下、異常も確認されており、このことも合併症の原因になっている。よって、免疫力の賦活も糖尿病改善の重要な要因と想定される。

私たちは、様々な薬草の持つ血糖値上昇抑制効果作用と自社生産しているキノコ菌糸体エキスの持つ免疫力強化作用<sup>4)</sup>の2つの薬理効果に注目して、

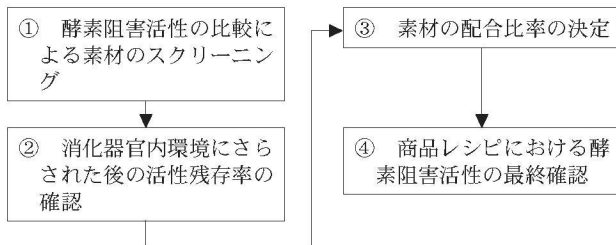
糖尿病予防及び遅延を狙った機能性食品の開発を行った。まず、糖分解酵素阻害活性を示す薬草類の選考を行った。糖分解酵素阻害活性が期待できる薬草類の候補として、沖縄県工業技術センターの所有するデータ<sup>5)~10)</sup>から選択した素材及び糖類分解酵素阻害活性が報告されている<sup>11), 12)</sup>桑及びグアバを検討素材とした。次に、これらの素材を沖縄県工業技術センターの指導の下、糖分解酵素阻害活性試験及びリパーゼ阻害活性試験を行い薬草類を選定した。また、選定した素材の胃と小腸内環境及び消化酵素に対する二糖類分解阻害活性への影響を調べた。その後、素材の配合比率を決定して商品サンプルを作成し、これにおける酵素阻害活性の確認を行った。また糖尿病モデルマウス(STZ投与)を用いてこの商品サンプル、各素材ならびに治療薬であるベイスン錠の6サンプルを長期投与して、血糖値や体重変化の確認を行った。さらに、正常マウスを用いて商品サンプルの摂取のタイミングを検討した。さらに商品レシピに従って打錠品を作成し、当社内健康者を対象に糖負荷試験を行い、食後の血糖値上昇抑制効果の確認を行った。このように *in vitro* 試験、*in vivo* 試験、ヒト負荷試験の流れに沿って商品レシピの決定及び効能効果の確認を行った (Scheme 1、

\*沖縄県糸満市西崎町 5-2-2

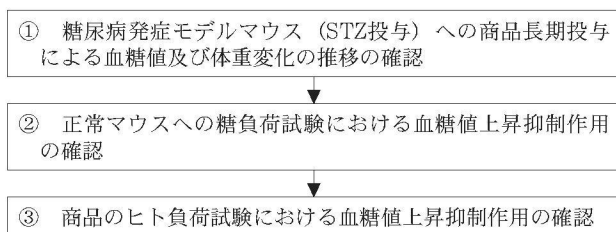
\*\*沖縄県具志川市字州崎 12-2

Scheme 2)。

そこで今回は、*in vitro*、*in vivo*及び当社社員における糖負荷試験の内容及び結果を報告する。



Scheme 1. *in vitro* 試験における商品レシピ決定までの流れ



Scheme 2. *in vivo* 試験及びヒト負荷試験における商品レシピ最終決定までの流れ

## 第1章 *in vitro* 試験による商品レシピの検討

### 1.1 目的

小腸粘膜に存在する二糖類分解酵素及び唾液及び膵の $\alpha$ -アミラーゼの活性を阻害すると、シュクロース、マルトース、デンプンからブドウ糖への分解が抑制されるため、腸管からのブドウ糖の吸収を遅延あるいは抑制する事が期待される。また、糖尿病発症と肥満は密接な関係が有るため、脂肪分解酵素であるリパーゼの活性を阻害する事は糖尿病の治療上有効と考えられる。よって今回、商品のレシピを決定するために、スクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性、リパーゼ阻害活性を指標として、

- ① 素材の選択と抽出方法の検討
  - ② 選択した素材（桑葉及びグアバ葉）の消化酵素処理試験
  - ③ 選択した素材の配合比率の検討
  - ④ 素材の配合比率の検討を踏まえて決定した商品レシピの酵素阻害活性の確認
- を以下のように行った。

### 1.2 実験方法

#### 1. 素材の選択と抽出方法の検討

##### (1) 素材の選択と検討内容

沖縄県工業技術センターの所有するデータからアカメガシワ、エンサイ、ニシヨモギ及び、糖類分解酵素阻害活性作用が報告されている桑及びグアバの計5種類を検討素材として選択した。各素材は全て乾燥品を用いた。アカメガシワ、エンサイ、ニシヨモギについてはスクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性試験、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を、桑葉及びグアバ葉はスクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性、リパーゼ阻害活性を行った。

##### (2) 抽出及び調製方法

それぞれの素材の乾燥粉末（100g）を蒸留水及び50%エタノール2.0ℓで加熱抽出した。抽出温度は蒸留水が95℃、50%エタノールが78℃でそれぞれ1時間抽出した。抽出液を遠心分離した後、吸引濾過で固液分離を行い、その濾液を凍結乾燥して凍結乾燥物粉末を得、これをサンプルとした。このようにして得たサンプルで、アカメガシワ、エンサイ、ニシヨモギについては粉末濃度10mg/mlに、桑葉及びグアバ葉については粉末濃度1、5、10mg/mlに各抽出溶媒で調製した後、酵素阻害活性の比較を行い、商品に用いる素材の検討を行った。

##### (3) スクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性試験

各種酵素活性の測定は、既法<sup>11)</sup>に準じて行った。すなわち、粗酵素液20 $\mu$ lにサンプル溶液を10 $\mu$ l添加し、37℃で5分間保持し、2%スクロース、2%マルトース、あるいは2%デンプン溶液20 $\mu$ lを添加して、37℃で30分間酵素反応を行ない、100℃で15分間保持して酵素を熱失活させ反応を停止した。4,000rpmで5分間遠心した上清中のグルコース濃度をグルコテストC-II（和光純薬工業）を用いて測定し、阻害活性を次式により算出した。

$$\text{阻害活性 (\%)} = 100 \times (1 - \text{サンプル添加時のグルコース生成量} / \text{対照生成グルコース量})$$

##### (4) $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験

$\alpha$ -アミラーゼ活性の測定は、里山、原達の簡易測定方法<sup>12)</sup>の変法によって行った。すなわち、調製した基質プレート<sup>13)</sup>を37℃で10分間プレインキュベートした基質プレートの各ウェルに標準液及び試験

溶液25 $\mu$ lを添加して5分間、30分間、1時間放置後のそれぞれの場合で波長655nmにおける吸光度を測定し、標準用液の測定値から検量線を作成して、各サンプルにおける阻害活性を算出した。

#### (5) リパーゼ阻害活性試験

酵素活性の測定は、市販リパーゼキットS（第二本製薬製）の変法<sup>14)</sup>で行った。すなわち、キット発色液250 $\mu$ lにサンプル液10 $\mu$ l添加し、30℃、5分間保温後、サンプル液に基質溶液25 $\mu$ lを加え、遮光して30分間反応した。サンプル液とブランクに反応停止液500 $\mu$ lを添加して、反応を停止させた後、ブランクに基質溶液25 $\mu$ lを添加した。反応液は波長405nmにおける吸光度を測定し、阻害活性を次式により算出した。

阻害活性 (%) =  $100 \times (1 - \text{サンプル添加時のTNB}^* \text{生成量} / \text{対照生成TNB量})$

※TNB：本法においてリパーゼ反応によって生成される発色物質

## 2. 選択した素材（桑葉及びグアバ葉）の消化酵素処理試験

### (1) 検討目的

本試験で選択した桑葉及びグアバ葉の抽出エキス末は食品への利用を前提としている。従ってこれらが食された場合、胃及び小腸内の過激な環境（消化酵素、pH）において酵素阻害活性が失活する可能性があることから市販酵素であるペプシン及びパンクレアチン処理を行った後、糖類分解酵素阻害活性の残存率を確認する。

### (2) 測定方法

前記の方法で得た桑葉及びグアバ葉の熱水抽出エキス粉末を粉末濃度10mg/mlに蒸留水で調製したものを試料として用いた。

ペプシン（シグマ社製）処理の場合には0.1MHC1・KC1緩衝液（pH2.0）を、パンクレアチン（シグマ社製）処理の場合には0.1Mリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）を用いて試料を10mg/mlに調製し、同じ緩衝液に溶解した0.2%酵素液を試料溶液の10%加えた。（それぞれ2本ずつ用意）一方は酵素液添加後直ちにアルミブロック恒温槽で熱失活させ、糖類分解酵素阻害活性（スクロース、マルトース、デンプン）を測定した。他方は37℃で16時間放置し、その後、同様にアルミブロック恒温槽で酵素を熱失

活させ、糖類分解酵素阻害活性を同じく測定した。両阻害活性率から阻害活性残存率を次式により算出した。

阻害活性残存率 (%) =  $(\text{消化酵素処理後の酵素活性阻害率} / \text{消化酵素処理前の酵素活性阻害率}) \times 100$

## 3. 選択した素材の配合比率の検討

### (1) 検討目的

本試験で確認した桑葉エキス末の二糖類分解酵素阻害活性及びグアバ葉エキス末の $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性、リパーゼ阻害活性が同時に得られるこれら2種類のエキス末の最適配合率を検討することを目的とする。

### (2) 試料の種類及び調製方法

前記の方法で得た桑葉及びグアバ葉の熱水抽出エキス粉末を用いた。これら桑葉エキス末とグアバ葉エキス末の混合比が1:0、3:1、1:1、1:3、0:1（全濃度10mg/ml）に蒸留水で調製し、調整した試料についてスクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性、リパーゼ阻害活性試験を行った。

## 4. 素材の配合比率の検討を踏まえて決定した商品レシピの酵素阻害活性の確認

### (1) 検討目的

商品レシピにおいて本試験で選索された桑葉エキス末とグアバ葉エキス末以外にもキノコ菌糸体エキス末及び賦形剤が添加される。よって、これらの存在によって酵素阻害活性が上昇及び低下する可能性がある。そこで、桑葉エキス末及びグアバ葉エキス末にある酵素阻害活性に影響を与えるか確認するために、商品レシピのサンプルを調製し、スクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性、リパーゼ阻害活性の確認を行った。

### (2) 試料の種類、調製方法及びレシピ

桑葉エキス末、グアバ葉エキス末、アガリクス菌糸体エキス末、シイタケ菌糸体エキス末、レイシ菌糸体エキス末及びパインデックス#2（賦形剤）を試料として用いた。

### (3) 試料の調製

葉草類は前記の方法で得た桑葉及びグアバ葉の熱水抽出エキスにエキス固形量に対して等量の賦形剤を蒸留水で溶かし合わせた液をスプレードライによ



て粉末化したものを用いた。キノコ菌糸体エキス末は当社で栽培、抽出を行ったアガリクス、シイタケ、レイシ菌糸体の抽出エキスをエキス固形量に対して等量の賦形剤を蒸留水で溶かし合わせた液をスプレードライによって粉末化したものを用いた。それぞれの粉末をレシピにしたがって調合し、家庭用ミキサーで均一に混合したものをサンプルとした (Table 1)。

Table 1. 商品レシピ成分表

成分名	配合割合(エキス量として)
桑葉エキス	5%
グアバ葉エキス	15%
アガリクス菌糸体エキス	全体で30%
シイタケ菌糸体エキス	
レイシ菌糸体エキス	
パインデックス#2(賦形剤)	50%

### 1.3 実験結果

#### 1. 素材の選択と抽出方法の検討

アカメガシワ、エンサイ、ニシヨモギの熱水及び50%エタノール抽出サンプルにおいて、期待したほどの糖類分解阻害活性は認められなかった。(Fig. 1)

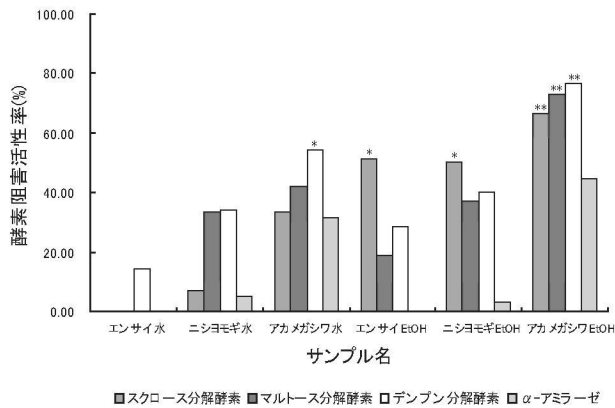


Fig. 1. エンサイ、ニシヨモギ、アカメガシワのスクロース分解酵素、マルトース分解酵素、デンプン分解酵素及びアミラーゼの阻害活性  $P^* < 0.05$ ,  $P^{**} < 0.01$

しかし、桑葉の熱水及び50%エタノール抽出液にスクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性が、グアバ葉の熱水及び50%エタノール抽出液にα-アミラーゼ阻害活性及びリパーゼ阻害活性が、それぞれ阻害率90%以上で確認された (Fig. 2, 3)。

以上の結果から、素材として桑葉及びグアバ葉を、抽出溶媒としてはより簡便で経済的な熱水を用いることになった。

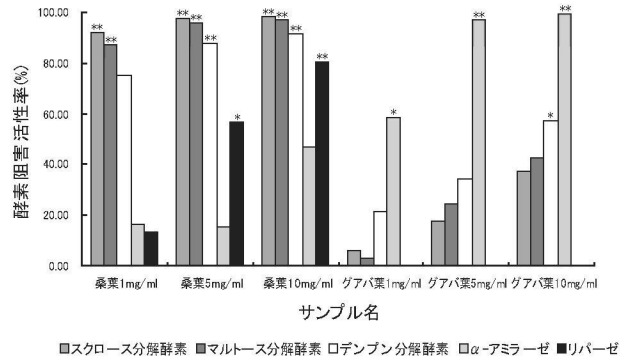


Fig. 2. 桑葉及びグアバ葉熱水抽出液のスクロース分解酵素、マルトース分解酵素、デンプン分解酵素及びアミラーゼ、リパーゼの阻害活性  $P^* < 0.05$ ,  $P^{**} < 0.01$

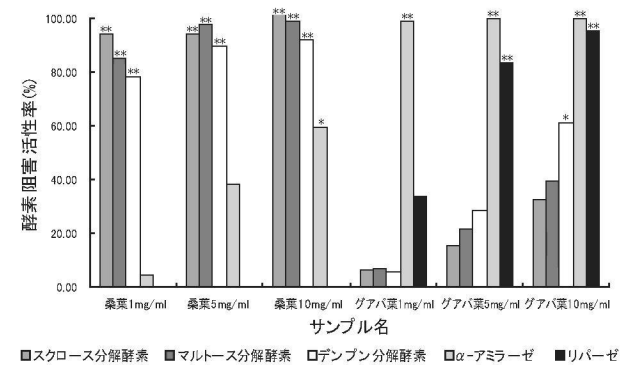


Fig. 3. 桑葉及びグアバ葉エタノール抽出液のスクロース分解酵素、マルトース分解酵素、デンプン分解酵素及びアミラーゼ、リパーゼの阻害活性  $P^* < 0.05$ ,  $P^{**} < 0.01$

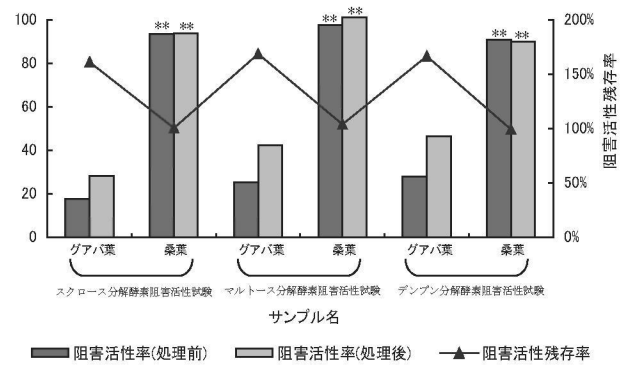


Fig. 4. ペプシン処理におけるスクロース分解酵素、マルトース分解酵素、デンプン分解酵素阻害活性率及び阻害活性残存率  $P^{**} < 0.01$

#### 2. 桑葉及びグアバ葉の消化酵素処理試験

ペプシン処理及びパンクレアチン処理を行った各サンプルにおいて、二糖類分解酵素阻害活性は高い活性率を示し、その阻害活性残存率は90%~100%であった (Fig. 4, 5)。従って、桑葉及びグア

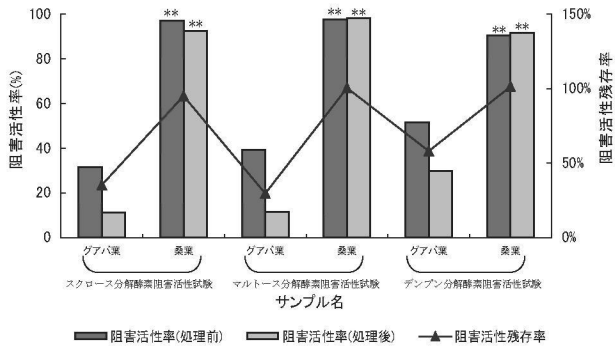


Fig. 5. パンクレアチン処理におけるスクロース分解酵素、マルトース分解酵素、デンプン分解酵素阻害活性率及び阻害活性残存率  $P^{**}<0.01$

バ葉のサンプルを人が経口摂取した場合、消化過程においても糖類分解酵素阻害活性がかなり保持されるものと推定される。

### 3. 選択した素材の配合比率の検討

スクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性についてはすべての検体において有意差を示した。特に1:0、3:1、1:1、1:3のサンプルには80%以上の阻害活性を確認した。また、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験についてはすべての阻害活性に有意差を示した。特に3:1、1:1、1:3、0:1のサンプルには90%以上の阻害活性を確認した。リパーゼ阻害活性試験については3:1、1:1、1:3、0:1のサンプルに阻害活性の有意差を示した。特に、1:3、0:1のサンプルには87%以上の阻害活性を確認した (Fig. 6)。以上の結果より、すべての試験において有意差があり、且つ、阻害活性率80%以上を認めた桑：グアバ=1:3の混合比を商品レシピにおける混合比とした。

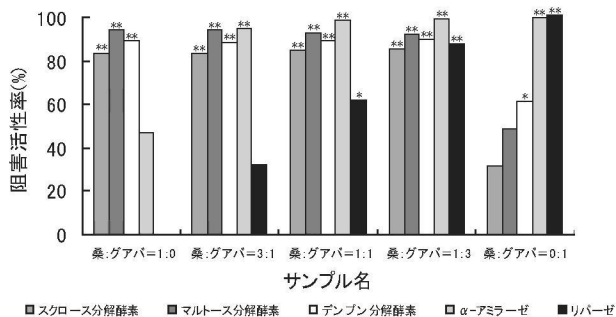


Fig. 6. 桑葉とグアバ葉配合比率の異なったサンプルのスクロース分解酵素、マルトース分解酵素、デンプン分解酵素及びアミラーゼ、リパーゼの阻害活性の違い  $P^{*}<0.05$ ,  $P^{**}<0.01$

### 4. 素材の配合比率の検討を踏まえて決定した商品レシピの酵素阻害活性の確認

スクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性は有意差を示したが、スクロース分解酵素阻害活性試験については阻害率約32%であり、期待していた阻害率よりも低い値を示した。しかし $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験およびリパーゼ阻害活性試験においては阻害活性率の減少はそれほど示さず、有意差を示した (Fig. 7)。スクロース分解阻害活性に著しい活性減少傾向を示したもののそれ以外の酵素阻害活性については活性の残存を確認した。以上の結果から、*in vitro* 試験による葉草類の選策及び配合割合をTable 1に示したものに決定した。

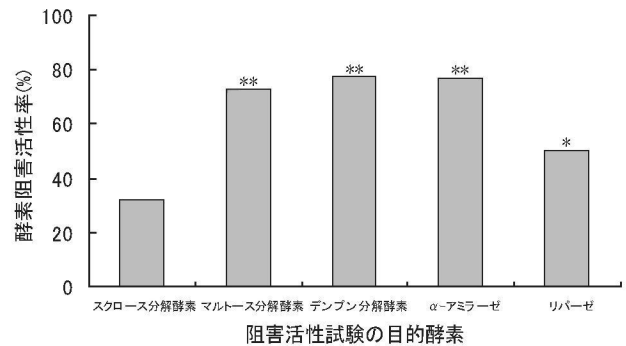


Fig. 7. 商品サンプルのスクロース分解酵素、マルトース分解酵素、デンプン分解酵素及びアミラーゼ、リパーゼの阻害活性  $P^{*}<0.05$ ,  $P^{**}<0.01$

## 第2章 マウス及びヒトを用いた抗糖尿病効果の確認試験

### 2.1 目的

第1章では *in vitro* 試験を行い、商品の各成分配合割合を決定した。そこで、糖尿病モデルマウス (STZ投与) へこの商品サンプル及びキノコ菌糸体複合エキス、桑/グアバ葉エキス複合、グアバ葉エキス、桑エキス、ベイスン錠の長期投与を行い、成分単体の投与と商品サンプルの投与において血糖値や体重変化に違いがあるか確認した。また、正常マウスに糖負荷30分前及び同時に商品サンプルを投与してグルコース及びデンプン摂取後の血糖値上昇抑制作用の違いを確認することで、商品サンプルの摂取のタイミングを検討した。これらの動物実験は実験書<sup>15~17)</sup>及び概法<sup>18)</sup>に準じて行った。さらに商品レシピに従って打錠品を作成し、当社内健常者を対

象に糖負荷試験を行い、食後の血糖値上昇抑制効果があるか確認を行った。

## 2.2 試験方法

### 1. 糖尿病発症モデルマウス (STZ投与) への商品

長期投与による血糖値及び体重変化の推移の確認

#### (1) 被検物質

商品サンプル、キノコ菌糸体複合エキス、桑／グアバ葉エキス複合、グアバ葉エキス、桑エキス、バイン錠の計6サンプル

#### (2) 供試動物

5週齢のICRマウス (日本チャールスリバー株)

#### (3) STZ投与における糖尿病発症モデルマウスの作成方法及び投与時期

供試マウスをMF固形飼料で1週間飼育した後、STZを腹腔内投与した。投与後7日目に血糖値測定にて糖尿病発症を確認した。確認後、ツベルクリー用1mlシリンジ及びマウス用経口ゾンデを用いて強制的に経口投与を行った。血糖値測定は投与後2週間目に行った。

#### (4) 測定方法

マウスを固定器に入れ、25G注射器にて尾静脈を切刺して出血させグルテストエースG1640 (株三和化学研究所製) を用いて血糖値の測定を行った。体重測定は糖尿病発症を確認した日を初日として30日間毎日行った。

### 2. 正常マウスへの糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用の確認

#### (1) 被検物質及び対照物質

被検物質：商品サンプル

対照物質：グルコース及び可溶性デンプン

#### (2) 供試動物

5週齢のICRマウス (日本チャールスリバー株)

#### (3) 群構成及び投与量

それぞれのマウスの群数は4群とし、動物数は1群5匹の計20匹をそれぞれの条件による試験に使用した。30分前投与及び同時投与を行う試験では構成群名および投与量は同じである。ここで構成群名および投与量をTable 2に示す。

#### (4) 投与経路及び方法

5週齢のICRマウス (日本チャールスリバー株) を購入し、MF固形飼料で1週間飼育した後実験に用いた。対照群および投与群6週齢 (体重約40g) で絶食させ、翌朝9時に投与を開始した。投与方法はツベルクリー用1mlシリンジ及びマウス用経口ゾンデを用いて強制的に経口投与を行った。また、被見物質の投与時間は次のように行った。即ち、I対照物質投与30分前に商品サンプルの投与を行った。II対照物質及び商品サンプルを同時に投与を行った。測定方法は、マウスを固定器に入れ、25G注射器にて尾静脈を切刺して出血させグルテストエースG1640 (株三和化学研究所製) を用いて血糖値の測定を行った。血糖値測定は、商品サンプル及び対照物質投与前 (0分)、商品サンプル及び対照物質投与後30分、60分、120分、の計4ポイントで実施した。血糖値測定後、血糖値上昇率を次式より算出し、商品サンプルの食後血糖値上昇抑制効果の評価を行った。

$$\text{血糖値上昇率 (\%)} = (\text{糖負荷後の血糖値} / \text{糖負荷前の血糖値}) \times 100 - 100$$

### 3. 商品のヒト負荷試験における血糖値上昇抑制作用の確認

試験対象者には試験の主旨、試験サンプル、試験方法について事前に説明を行い、被験者の同意を得たうえで本試験を実地した。

#### (1) 被験者

当社社員 男性8名 女性4名 合計12名

#### (2) 被検物質及び対照物質

Table 2. 正常マウスへの糖負荷試験における構成群名および投与量

No.	群名	投与用量 (糖)	投与用量 (商品サンプル)	動物数
1	グルコース投与群	1g/kg		5
2	グルコース+商品サンプル投与群	1g/kg	50mg/kg	5
3	可溶性デンプン投与群	1g/kg		5
4	可溶性デンプン+商品サンプル投与群	1g/kg	50mg/kg	5

Table 3. 糖尿病モデルマウス (STZ) の血中グルコース量

検出	投与期間	グループ							
		STZ投与無し	コントロール	商品サンプル	菌糸体複合	葉草複合	グアバ葉	桑葉	ペイソン錠
血糖値	2週間	82.9±23.0	365.0±83.9	126.7±93.6**	270.9±138.6	164.0±98.6*	283.9±141.3*	324.6±149.9	261.1±146.8*

Values are mean±S.D  
 Significant differences compared with control group  
 P\* < 0.05, P\*\* < 0.01

被検物質：商品レシピに従って作成した打錠品  
 (200mg/粒)

対照物質：米飯200g

(3) 試験方法

対象者は前夜9時以降絶食し、翌朝8時30分～9時の間に空腹時血糖値を測定した。試験は各人につき2回行い、最初は血糖値測定後、直ちに米飯200gを食べ、食後30分、60分、120分、180分まで測定した。2回目は血糖値測定後、直ちに商品打錠品を3.2g (200mg/粒、16粒分) 水で飲用した。飲用して15分後に米飯200gを食べ、食後30分、60分、120分、180分まで測定した。採血は各自ペン型採血針を用いて行い、グルテストエースG1640 (株三和化学研究所製) を用いて血糖値の測定を行った。

2.3 実験結果

1. 糖尿病発症モデルマウス (STZ投与) への商品長期投与による血糖値及び体重変化の推移の確認  
 被検物質投与2週目の空腹時血糖値においてSTZ投与のみのマウスと比較して、葉草複合及び商品サンプル投与マウスに血糖値降下において有意差が確認された (Table 3)。また、体重変化については、コントロールであるSTZ投与のみのマウス及びキノコ菌糸体複合エキス、桑/グアバ葉エキス複合、グアバ葉エキス、桑エキスを投与し続けたマウスについては糖尿病モデルマウスに典型的な症状である体重減少を確認したが、正常マウス及び商品サンプル投与マウスについては測定5日目辺りから体重増加が確認された (Fig. 8)。

2. 正常マウスへの糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用の確認

グルコース負荷30分前に商品サンプルを投与した群について、対照群及び商品サンプル投与群それぞれ

れ血糖値のピークは糖負荷後30分後で、上昇率は対照群で132.3%、商品サンプル投与群で60.3%であり、商品サンプル投与により血糖値の上昇を約72.3%抑制することが確認され、有意差P < 0.01が認められた (Fig. 9)。デンプン負荷30分前に商品サンプルを投与した群について、対照群及び商品サンプル投与群それぞれ血糖値のピークは糖負荷後30分後で、上昇率は対照群で76.3%、商品サンプル投与群で32.6%であり、商品サンプル投与により血糖値の上昇を約43.7%抑制することが確認された。有意差P < 0.05が認められた (Fig. 10)。

グルコース負荷と同時に商品サンプルを投与した群について、対照群及び商品サンプル投与群それぞれ

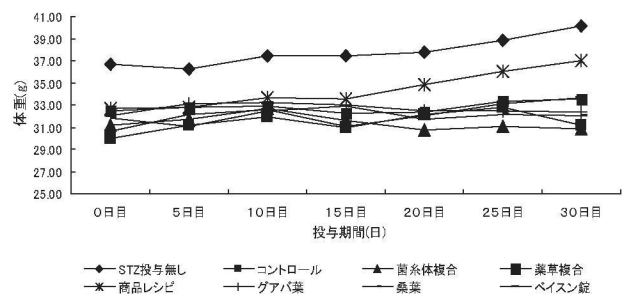


Fig. 8. 試験動物の体重の推移

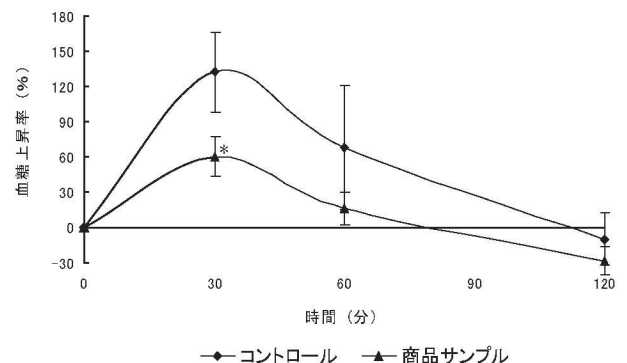


Fig. 9. ICRマウスへのグルコース負荷試験 (商品サンプルを糖負荷30分前に投与)  
 Each symbols are mean±S.D.

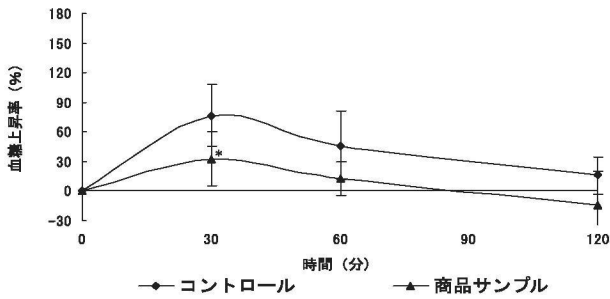


Fig. 10. ICRマウスへのデンプン負荷試験 (商品サンプルを糖負荷30分前に投与)  
Each symbols are mean±S.D.

れ血糖値のピークは糖負荷後30分後で、上昇率は対照群で241.6%、商品サンプル投与群で197.9%であり、商品サンプル投与により血糖値の上昇を約41.7%抑制することが確認された。有意差 $P<0.05$ が認められた (Fig. 11)。デンプン負荷と同時に商品サンプルを投与した群について、対照群及び商品サンプル投与群それぞれ血糖値のピークは糖負荷後30分後で、上昇率は対照群で52.4%、商品サンプル投与群で18.2%であり、商品サンプル投与により血糖

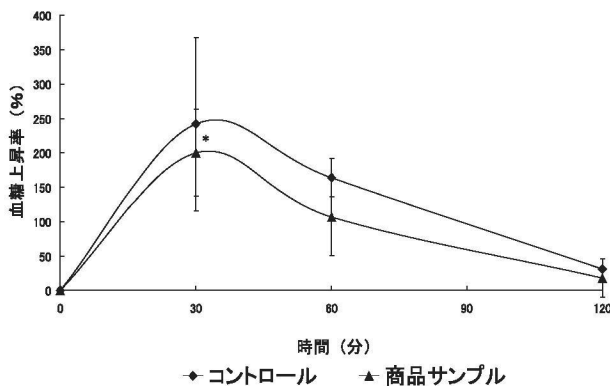


Fig. 11. ICRマウスへのグルコース負荷試験 (商品サンプルを糖負荷時に同時投与)  
Each symbols are mean±S.D.

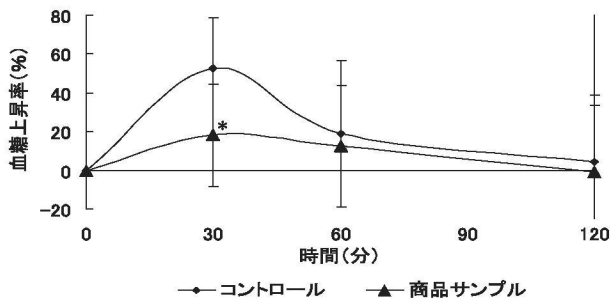


Fig.12. ICRマウスへのデンプン負荷試験(商品サンプルを糖負荷時に同時投与)  
Each symbols are mean±S.D. \* $p<0.05$

値の上昇を約32.4%抑制することが確認されたが有意な差は認められなかった (Fig. 12)。

### 3. 商品のヒト負荷試験における血糖値上昇抑制作用の確認

12名の対象者が食前15分前に商品サンプルを服用した場合、服用しなかった場合に比べて30、60、120、180分において血糖値降下傾向を示し、また血糖値のピークである食後30分の血糖値においては有意差 ( $P<0.05$ ) を示した (Fig. 13)。

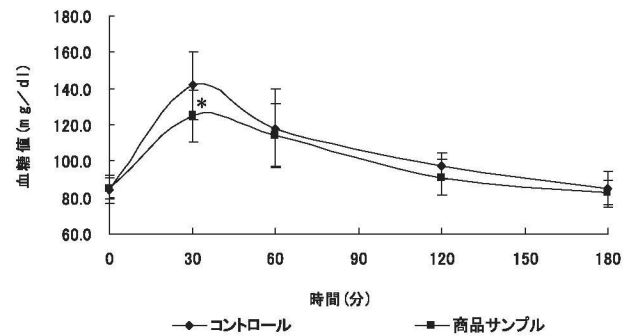


Fig. 13 商品のヒト糖負荷試験における血糖値の経緯  
Each symbols are mean±S.D. \* $p<0.05$

## 2.4 考察

今回われわれは桑及びグアバ葉抽出凍結乾燥混合末に *in vitro* において糖類分解酵素活性阻害及びリパーゼ活性阻害作用を認めた。よって、唾液及び膵の $\alpha$ -アミラーゼ活性、また小腸粘膜に存在する二糖類分解酵素及びリパーゼの活性を阻害することによりデンプン、スクロース、マルトースからブドウ糖への分解を抑制したり脂肪の分解を抑制し、その結果腸管からのブドウ糖及び脂肪の吸収を遅延あるいは抑制する可能性を示した。*in vivo*において、正常マウスを用いた糖負荷試験では商品サンプルに血糖値上昇抑制作用が認められた。特に、糖負荷30分前に商品サンプルを投与した群において有意差がついたことから、商品サンプルは食前30分前に服用することが好ましいと考えられる。糖尿病の軽症期に置いては食後過血糖を抑制するために糖分解酵素阻害剤が使われ、効果が認められている。商品サンプルにも同様の効果を期待し、STZ投与による糖尿病発症モデルマウスへ投与を試みた。体重について、コントロール群は日ごとに体重増加が見られたが、STZ投与による糖尿病発症モデルマウスは糖尿

病類似の病態である体重減少を示した。商品サンプル以外の検体において、同様に体重減少を示したが、商品サンプルは体重増加が見られた。また、各サンプル投与群において投与1週目の随時血糖値には差は見られなかったが、投与2週目においては桑・グアバ葉エキス複合及び商品サンプルで減少、特に商品サンプルで有意な減少を示した。これは桑・グアバ葉エキスの、直接的な血糖値効果作用とキノコ菌糸体複合エキスの免疫力賦活効果に加わることによる相乗効果の結果であると考えられる。また、この結果は商品サンプルに含まれる各成分だけでは抗糖尿病効果がないが、商品サンプルの成分配合によって抗糖尿病効果が期待できることを意味している。

次に商品サンプルのヒトへの服用試験を行い、食後血糖値への影響を調べた。すると、商品サンプル服用によって食後30分の急な血糖値上昇を有意に抑制した。今回健康者を対象とした試験であるが、今後、糖尿病及び糖尿病予備軍に対して飲用試験を行う予定である。

今回われわれは糖尿病進行の抑制作用を動物実験で調べ、ヒト飲用試験で食後血糖値上昇抑制効果を認めた。よって、本試験で調整された商品サンプルが糖尿病予防、進行遅延のための補助食品として有用であることが示唆された。

## 要 約

### 3.1 *in vitro* 試験による商品レシピの検討

アカメガシワ、エンサイ、ニシヨモギ、グアバ葉、桑葉の乾燥粉末(100g)を蒸留水及び50%エタノール2.0ℓで加熱抽出した。抽出温度は蒸留水が95℃、50%エタノールが78℃でそれぞれ1時間抽出した。濾液を凍結乾燥してをサンプルとした。これらを酵素阻害活性を指標として商品に用いる素材の検討を行った。その結果、桑葉抽出エキス末がスクロース、マルトース、デンプン分解酵素阻害活性に、グアバ葉の抽出エキス末が $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性及びリパーゼ阻害活性に対して高い活性を示した。また、熱水及びエタノール抽出液の阻害活性に有意な差が認められなかった。よって、素材としては桑葉及びグアバ葉を、抽出溶媒としてはより簡便で経済的な熱水を用いることになった。

次に、これら素材が食された場合、胃及び小腸内

の過激な環境(消化酵素、pH)において酵素阻害活性が失活する可能性があることから市販酵素であるペプシン及びパンクレアチン処理を行い、これまでの酵素阻害活性試験を行った。その結果、消化酵素にさらされた後でも酵素阻害活性を示した。また、スクロース、マルトース、デンプン分解酵素及び $\alpha$ -アミラーゼ、リパーゼの阻害活性をすべて示す桑葉及びグアバ葉の配合比率を検討した。すべての試験において有意差があり、且つ、阻害活性率80%以上を認めた桑：グアバ=1：3の混合比を商品レシピにおける混合比とした。

次に、葉草類にキノコ菌糸体エキス及び賦形剤を加えた商品形態に近いサンプルを用いて同様の酵素阻害活性を測定したところ、スクロース分解酵素阻害活性以外はすべて高い阻害活性を示した。

### 3.2 *in vivo* 試験及びヒト負荷試験による抗糖尿病効果の確認試験)

*in vitro* 試験で決定したレシピにおける商品サンプル及びキノコ菌糸体複合エキス、桑/グアバ葉エキス複合、グアバ葉エキス、桑エキス、ベイスン錠を糖尿病モデルマウス(STZ投与)へ長期投与を行い、成分単体の投与と商品サンプルの投与において血糖値や体重変化に違いがあるか確認した。その結果、商品サンプルに高い血糖値上昇抑制作用及び体重減少抑制作用を示した。

次に、正常マウスに糖負荷30分前及び同時に商品サンプルを投与してグルコース及びデンプン摂取後の血糖値上昇抑制作用の違いを確認することで、商品サンプルの摂取のタイミングを検討した。その結果、グルコース及びデンプン負荷においてサンプル同時投与よりも糖負荷30分前におけるサンプル投与の方が高い血糖値上昇抑制作用を示した。さらに商品レシピに従って打錠品を作成し、当社内健康者を対象に糖負荷試験を行い、食後の血糖値上昇抑制効果があるか確認を行った。その結果、最も高い血糖値を示す糖負荷30分後の血糖値に対して有意な抑制作用を示した。

### 3.3 今後の展開

*in vitro* 試験で決定したレシピによる錠剤の商品を検討している。錠剤は200mg/粒の三角錠で、葉草類20%、キノコ菌糸体エキス30%を含有する錠剤



としては有効成分を高濃度に含む商品を検討しており、外注試作試験により技術的に商品化可能であることを確認している。

今後は、今年度中の製品販売を目標に、資材及び工場生産の検討を行う予定である。

### 参 考 文 献

- 1) 河田照雄、「脂質と肥満・糖尿病」、食品と開発、CMPジャパン(株)、Vol.37, No.2, pp.8-10 (2002)
- 2) 中川邦夫著、日本の健康機能食品トクホ、ブックマン社、(1999)
- 3) H11年度 琉球大学医学部の健康づくり等調査研究結果報告書 (2000)
- 4) 上原益彦著、糖尿病はキノコ複合菌糸体で治せ、星雲社、(1996)
- 5) 鎌田靖弘、豊川哲也、「県産資源を活用した機能性素材の開発」沖工技セ研究報告第3号 (2001)
- 6) 鎌田靖弘、豊川哲也、市場俊雄、「県産資源を活用した機能性素材の開発ー病体モデル動物を用いた効果確認試験ー」沖工技セ研究報告第4号、(2002)
- 7) 豊川哲也、鎌田靖弘、与座江利子、県産資源を活用した機能性食品素材の開発、工技センター研究報告第2号、(2000)
- 8) 豊川哲也、鎌田靖弘、山城枝利子、比嘉賢一、吉田靖彦、花城薫、選択的細胞毒性を有する亜熱帯生物資源の探索についてー各種ガン細胞に対する県産資源の効果ー、工技センター研究報告第3号、(2001)
- 9) 鎌田靖弘、豊川哲也、照屋正映、吉田靖彦、花城薫、新垣美香、上地美香、県産資源を利用した機能性素材の開発ーin vitro 試験での機能性評価ー、工技センター研究報告第4号、(2002)
- 10) 豊川哲也、吉田靖彦、鎌田靖弘、花城薫、県産資源の有効活用による産業振興を目指してー機能性評価と利用法開発ー、南方資源利用技術研究会誌、Vol17, No.1 9-17 (2001)
- 11) 出口ヨリ子、長田邦子、et.al、「グアバ葉熱水抽出物の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」日本農芸化学会誌、Vol.72, No.8, pp.923-931 (1998)
- 12) 小島芳弘、利根川英一、et.al、「桑葉による1型糖尿病モデルマウス(NODマウス)の糖尿病発症の抑制」日本栄養・食糧学会誌、Vol.54, No.6, pp.361-364 (2001)
- 13) 里山俊哉、原敏夫、et.al、「マイクロプレートを用いる $\alpha$ -アミラーゼ活性の簡易測定法」日本農芸化学会誌、Vol.72, No.8, pp.933-936 (1998)
- 14) 豊川哲也、鎌田靖弘、照屋正映、上地美香、新垣美香、市場俊夫、沖縄県産植物抽出物のリパーゼ阻害活性、工技センター研究報告第5号、(2003)
- 15) 鈴木潔著、動物実験手技Iーマウス・ラットー、講談社、(1996)
- 16) 清野進、岡芳和著、糖尿病研究ストラテジー、秀潤社、(1995)
- 17) 川村一男、遠藤章二、後藤美代子、薩田清明、宮川豊美著、解剖生理学実験、建白社 (1998)
- 18) Yoko Aniya, Yoshihiko Ojiri, Ryuji Sunagawa, et.al、「Glutathione S-Transferases and Chloroform Toxicity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats」J.Pharmacol、50, pp263-269 (1989)