

氏名	内田 菜穂子 Naoko Uchida		
所属	総合生活専攻 Graduate School of Human Ecology		
学位の種類	博士(学術)		
学位記番号	甲第5号		
学位授与年月日	2013年9月20日		
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	紅茶およびアマニの耐糖能改善効果と作用機序に関する研究 Study on effect and mechanism of glucose tolerance improvement by intake of black tea and flaxseed		
論文審査委員	主査	金子 健彦 (和洋女子大学 教授)	
	副査	湊 久美子 (和洋女子大学 教授)	柳沢 幸江 (和洋女子大学 教授)
		橋詰 直孝 (人間総合科学大学 教授)	矢澤 一良 (東京海洋大学 特任教授)

要旨

本研究では、紅茶およびアマニの耐糖能改善効果について検討を行った。ICR マウスおよび健康女性に対する試験において、紅茶投与が食後血糖上昇抑制に有用であることが示された。また、2型糖尿病モデルマウスに対する紅茶の抗糖尿病作用を検討した結果、紅茶摂取による体重増加抑制および内臓脂肪蓄積抑制効果が認められた。また、インスリン抵抗性改善作用が確認された。加えて、DNA マイクロアレイ解析および Real-time PCR 解析により肝臓の遺伝子発現を検討した結果、紅茶摂取による Fos および Jun の発現減少が認められ、紅茶の摂取が糖尿病病態の増悪を抑制したことが示唆された。健康女性および糖尿病傾向者に対するアマニの食後血糖上昇抑制作用を検討した結果、健康女性および耐糖能異常者を対象とした試験のいずれにおいても、アマニ摂取による食後血糖上昇抑制効果が認められた。健康女性に対する紅茶とアマニの同時摂取による食後血糖上昇抑制作用を検討した結果、紅茶とアマニを同時に摂取した場合、紅茶およびアマニを単独に摂取した場合と比較し、食後すぐの血糖上昇を有意に抑制した。食後の急激な血糖上昇を抑制することは糖尿病の予防や糖尿病合併症予防に効果的であるとされている。従って本研究の結果より、紅茶とアマニの同時摂取が糖尿病の予防および進展抑制に有用であることが示唆された。

キーワード

紅茶、アマニ、血糖値、糖尿病、AP-1

Abstract

The aim of this study was investigation of the effect of impaired glucose tolerance amelioration by black tea and flaxseed. The black tea depressed the postprandial blood glucose (PBG) elevation in ICR mice and healthy woman subjects. As the result of study on anti-diabetic effects of black tea in mice model of type 2 diabetes, the visceral fat accumulation and body weight gain was suppressed by intake of black tea. In addition, it was confirmed that insulin resistance improving by intake of black tea. Moreover, in DNA microarray analysis and in Real-time PCR analysis, it was indicated that the intake of black tea decreased expression of Fos and Jun. It was suggested that progression of diabetic pathological conditions may suppressed by intake of black tea. Flaxseed intake was effective in suppressing the PBG elevation in healthy woman subjects, and it significantly suppresses the PBG elevation in subjects with impaired glucose tolerance. In addition, it was suggested that the flaxseed might ameliorate insulin resistance. As the result of study on suppressing the PBG elevation in healthy woman subjects, the PBG elevation was suppressed by the combination of black tea and flaxseed. These results of this study suggest that the combination of black tea and flaxseed was beneficial for the impaired glucose tolerance amelioration.

Key words

black tea, flaxseed, blood glucose, diabetes, AP-1

第I章 序論

現在、糖尿病の増加が社会的にも大きな問題となっており、糖尿病の予防に有用な機能性食品の研究開発が求められている。また、紅茶とアマニが糖尿病の予防に有用である可能性が見出されつつあり、ヒトに対する有用性等について詳細な研究が必要とされている。そこで本研究では、日常飲用されている紅茶の糖尿病に対する基礎的知見を得、それをもとに紅茶とアマニの糖尿病予防効果や糖尿病病態の進行抑制効果、すなわち、耐糖能改善効果に着目し、検討を行った。

紅茶には *in vitro* における糖質消化酵素活性抑制作用が報告されているが、紅茶の種類による糖質消化酵素活性抑制作用の違いやその関与成分に関する検討は未だ不十分である。また、実際に摂取した場合の効果についても十分な検討がなされていない。そこで本研究では、紅茶の糖質消化酵素活性抑制作用について、紅茶の種類による比較や、関与成分について検証し、また、正常マウスおよび健常女性を対象に、紅茶摂取が食後の血糖上昇に及ぼす影響について検討した。さらに、紅茶の糖尿病の進行予防効果について検討する目的で、2型糖尿病モデルマウスによる長期摂取試験を行った。また、DNA マイクロアレイ解析および定量 PCR 解析を行い、紅茶の糖尿病の進行予防効果について遺伝子レベルでの検討を行った。

アマニは α -リノレン酸やリグナンの含有量が多いことから、健康の維持・増進への活用が期待されている。アマニの糖代謝に関する研究では、これまでにヒトを対象とした検討が多く報告されているが、さらに詳細な検討が必要と考えられている。また、日本人を対象とした報告はみられないことから、本研究では、まず日本の健常女性を対象にアマニ摂取による食後血糖上昇抑制作用について検討した。次に、アマニの糖尿病の進行予防効果について検討する目的で、耐糖能異常のヒトを対象に試験を行い、アマニが食後血糖値およびインスリンに与える影響について検討した。

また、食品の組み合わせにより、栄養成分の分解や吸収阻害が起こることがあり、紅茶とアマニそれぞれの糖尿病予防効果や糖尿病の進行予防効果が、紅茶とアマニを組み合わせる事で相殺される可能性も考えられた。そこで、紅茶とアマニを組み合わせる事で摂取した場合の食後血糖上昇抑制作用についても検討を行った。

第II章 *in vitro* における紅茶の糖質消化酵素活性抑制作用の検討

II-1 方法

II-1-1 酵素の調整

ラット小腸アセトン粉末 (SIGMA 社製) に9倍量 (w/v) の 56mM マレイン酸緩衝液 (pH6.0) を加え、氷冷しながらホモジナイザーで均質化した後、遠心分離 (3000rpm, 10min, 4°C) し、上清を粗酵素液とした。マルターゼの活性評価には粗酵素液を 20 倍希釈になるように、スクラーゼの活性評価には粗酵素液を 2 倍希釈になるように、それぞれ 56mM マレイン酸緩衝液 (pH6.0) を用いて調製したものを活性評価用酵素液とした。

II-1-2 24種紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の比較

ダーズリン、ウバ、アッサム、キーマンについてそれぞれ6社から購入した合計24種の紅茶を用い、茶葉 3.0 g に沸騰させた蒸留水 200 mL 加え室温で3分間抽出後、濾過時間を一定にして濾紙 (No.2, 110 mm, 東洋濾紙株式会社) にて濾過したものを各種紅茶試料として用いた。

2%マルトース溶液 0.5 mL に、紅茶試料を 0.5 mL 添加し、マルターゼ酵素液を 0.5 mL 加え、37°C で 90 分間反応させた。対照には紅茶試料の代わりに緩衝液を 0.5 mL 添加した。反応後、沸騰水浴中で 10 分間加熱して酵素を失活させ、反応を停止した。また、37°C での酵素反応を行わずに酵素添加後直ちに沸騰水中で 10 分間加熱し、酵素を失活させたものを盲検とした。反応停止後、上清のグルコース量をグルコース CII テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。次式により測定したグルコース量から酵素活性抑制率を算出した。

$$\text{酵素活性抑制率 (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A: 対照時生成グルコース量
B: 紅茶添加時生成グルコース量

スクラーゼの活性評価では、2%スクロース溶液とスクラーゼ酵素液を用いて同様に行った。

II-1-3 24種紅茶のテアフラビン類の測定

HPLC 法により 24 種の紅茶に含まれるテアフラビン類の測定を行った。標品として tea extract (SIGMA-ALDRICH 社) を用い、テアフラビン、テアフラビン-3-モノガラート、テアフラビン-3'-モノガラート、テアフラビン-3,3'-ジガラートの 4 種のテアフラビン類のピーク面積を算出した。HPLC システムは、東ソーUV-8020、RI-8020、CCPS、SD-8022、CO-8010 (東ソー株式会社) を用い、375nm で検出した。データ分析は、クロマト・PRO (Ver. 3.0) データ解析ソフトウェア (株式会社ランタイムインストルメンツ) を用いて行った。カラムは、TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm×φ250 mm、東ソー株式会社) を用い、移動相は水、アセトニトリル、リン酸 (76:23:1) とし、流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 40°C とした。また、遊離型テアフラビン量の測定では、標品として Theaflavin (和光純薬株式会社) を用い、作成した検量線から遊離型テアフラビン量を算出した。

II-1-4 統計処理

有意差検定には SPSS (Ver. 20) を用い、 α -グルコシダーゼ活性抑制作用に関する検討では Tukey の検定を行い、 α -グルコシダーゼ活性抑制作用とテアフラビン類との相関は Pearson の相関係数を用いた。いずれの場合も $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

II-2 結果

II-2-1 24種紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の比較

ダーズリン、ウバ、アッサム、キーマンの 4 種をそれぞれ 6 社から購入した合計 24 種の紅茶におけるマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率を比較した結果、6 種のうち 4 種において、ウバが特に高いマルターゼ活性抑制率を示し、次いでダーズリン、アッサム、キーマンの順に並ぶ傾向がみられた。中でも A 社のウバが最も高いマルターゼ活性抑制率を示し、A~F の 6 社全てにおいて、キーマンが最も低値であった。スクラーゼ活性抑制率においてもマルターゼ活性抑制率と同様の傾向がみられ、A 社のウバに最も高いスクラーゼ活性抑制作用がみられた。

II-2-2 α -グルコシダーゼ活性抑制作用の作用成分の検討

24 種紅茶について、HPLC 法により 4 種テアフラビン類のピーク面積を算出した結果、最も面積が高いのは遊離型テアフラビンで、テアフラビン-3-モノガラート、テアフラビン-3,3'-ジガラート、テアフラビン-3'-モノガラートの順に高値を示した。また、4 種のテアフラビンのピーク面積とマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率との相関を検討した結果、4 種テアフラビンのうち、遊離型テアフラビンについてのみ、マルターゼ活性抑制率 ($p < 0.001$) およびスクラーゼ活性抑制率 ($p < 0.01$) との間に関連を示した。

第三章 正常マウスおよび健康女性に対する紅茶の食後血糖上昇抑制作用の検討

III-1 方法

III-1-1 実験動物および飼育条件

実験動物としては体重 35~40g の正常マウス (ICR 雄マウス、日本クレア株式会社) を用いた。室温 23 ± 1°C、湿度 55 ± 5% で 12 時間の明暗周期の環境下において、固形飼料 CE-2 (日本クレア株式会社) を用いて飼育を行った。また、飼料、飲料水ともに自由摂取とした。なお、動物実験は内閣府告示の動物実験の飼養および保管等に関する基準に従い、実験動物に十分に配慮した上で行った。また、本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り、和洋女子大学動物を対象とする生物学的研究・疫学的研究に関する倫理委員会の審議、承認を経て実施した。

III-1-2 マウスにおける各種糖質負荷試験

沸騰させた蒸留水 100 mL に対してウバ (スリランカ) の茶葉を 4.0 g 使用し、3 分間抽出後、濾紙 (No.2、110 mm、東洋濾紙株式会社) で自然濾過したものを試料として用いた。糖質としては、可溶性デンプン、マルトース、スクロース (いずれも関東化学株式会社) の 3 種を用いた。マウスを 18 時間絶食させた後、空腹

時血糖値を測定し、それらが平均化されるように水群と紅茶群に群分けした (n=5)。水群には蒸留水、紅茶群には紅茶をそれぞれ0.6 mL経口投与し、その30分後に糖質 (2 g/kg body weight) を負荷した。糖質負荷前、負荷後15、30、60、120分に尾静脈より採血し、小型自己血糖測定器グルテストエース R (株式会社三和化学研究所) を用いて血糖値を測定した。

III-1-3 マウスにおける紅茶投与タイミングの検討

沸騰させた蒸留水 100 mL に対してウバ (の茶葉を 4.0 g 使用し、3 分間抽出後、濾過したものを試料として用いた。糖質は可溶性デンプン (2 g/kg body weight) (関東化学株式会社) を用いた。マウスを 18 時間絶食後、6 群に分け (各群 n=6)、紅茶 0.6 mL をデンプン負荷前 30 分に投与する群 (食前投与群)、紅茶をデンプンと同時に投与する群 (同時投与群)、デンプン負荷 15 分後に投与する群 (食後投与群) とした。また、それぞれの群に対して蒸留水 0.6 mL を投与する対照群を設けた。糖質負荷前、負荷後 15、30、60、120 分に尾静脈より採血し、小型自己血糖測定器グルテストエース R (株式会社三和化学研究所) を用いて血糖値を測定した。

III-1-4 健常女性を対象とした摂取試験

試験は健常女性 (18~20 歳) を対象に行った。紅茶は、沸騰させた飲料水 100 mL に対してウバの茶葉を 3.0g 使用し、3 分間抽出後、濾過したものを試料として用いた。被験者を 2 グループに分け、飲料水 (n=54) と紅茶 (n=53) のいずれか 300 mL とパンを摂取させた際の血糖値の変化を比較した。被験者には試験開始 6 時間前からの水以外の飲食を禁止し、試験飲料とパンを 15 分間かけて摂取させた。パンは 1 個当たりのエネルギー 320 kcal、タンパク質 6.0 g、脂質 15.6 g、炭水化物 36.5 g になるように均一に調整した。なお、パンの作製は日本製粉株式会社に依頼した。パン摂取前、摂取後 30、60、90、120 分に被験者自ら指先より採血し、小型自己血糖測定器 (グルコカードダイアメーター GT-1641、アークレイ株式会社) を用いて血糖値を測定した。

III-1-5 統計処理

2 群間比較には t 検定を行い、検定の結果は $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

III-2 結果

III-2-1 紅茶の投与が各種糖負荷後の血糖値に及ぼす影響

デンプン投与の場合、30 分後の血糖値において、紅茶群は水群に比べて有意に低値を示した ($p < 0.05$)。マルトース投与の場合、120 後の血糖値において、紅茶群は水群に比べて有意に低値を示した ($p < 0.05$)。スクロース投与の場合では、投与後 15、30 分値において、紅茶群は水群に比べ、有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

III-2-2 紅茶の投与タイミングの違いが糖負荷後の血糖値に及ぼす影響

水または紅茶をデンプン負荷の 30 分前に投与したときのデンプン負荷後 30 分の血糖値は、紅茶群が水群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。水または紅茶をデンプンと同時に投与したときのデンプン負荷後 30 分の血糖値は、紅茶群が水群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$)。水または紅茶をデンプン負荷の 15 分後に投与したときのデンプン負荷後 30 分、60 分の血糖値は、紅茶群が水群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

III-2-3 紅茶の摂取がヒトの食後血糖値に及ぼす影響

パン食摂取後 30 分、60 分の血糖値において、紅茶群は水群と比較して有意に低値を示した (30 分 : $p < 0.001$ 、60 分 : $p < 0.01$)。パン食摂取後 90 分、120 分の血糖値においては、両群に有意差は認められなかった。

第IV章 2型糖尿病モデルマウスに対する紅茶の抗糖尿病作用の検討

IV-1 方法

IV-1-1 紅茶抽出液の調整

茶葉は市販のウバを用いた。マウス長期試験では、自主的飲用が可能な濃度を考慮した上で、沸騰させた蒸留水 100 mL に対して茶葉 2.0 g 使用し、3 分間抽出後、濾紙 (No.2、110 mm、東洋濾紙株式会社) で濾過したものを用いた。

IV-1-2 実験動物および飼育条件

体重 35~40 g の雄性 KK-Ay/Tajcl マウス (KK-Ay マウス) (日本クレア (株)) を購入し、固形飼料 CE-2 (日本クレア) を用いて 1 週間予備飼育後、実験に供した。実験動物は個別ケージに入れ、室温 23±1°C、湿度 55±5% で 12 時間の明暗周期の環境下で飼育した。予備飼育後、コントロール群 (n=7)、紅茶群 (n=6) の 2 群に分け、脂肪エネルギー比率 60% の高脂肪食餌 HFD-60 (オリエンタル酵母, 東京) を摂取させ、コントロール群には水道水、紅茶群には紅茶を飲料として摂取させた。群間の摂餌量に差が出ないようにペアフィードリングで 3 週間飼育した。

IV-1-3 体重、臓器重量測定および血液検査

飼育期間中、毎週体重を測定した。3 週間飼育後にイソフルラン麻酔下で全採血後、精巣上体脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腸間膜周囲脂肪組織を摘出し、重量を測定した。採取した血液から血糖値およびインスリンを測定した。血糖値は生化学自動分析装置 DRI-CHEM4000 (富士フィルム株式会社) にて測定し、インスリン値はレビス®インスリン-マウス (H タイプ, 株式会社シバヤギ) を使用し測定した。また、測定した血糖値およびインスリンからインスリン抵抗性の指標となる HOMA-R を算出した。

$$\text{HOMA-R} = \frac{\text{空腹時血糖値(mg/dL)} \times \text{空腹時インスリン}(\mu\text{U/mL})}{405}$$

IV-1-4 DNA マイクロアレイ解析法

NucleoSpin® RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) を用い、定法に従ってマウスの肝臓から RNA の抽出を行った。

抽出した総 RNA をコントロール群、紅茶群の各群それぞれ 2 グループに分け、総 RNA を等量ずつ混合し、各群 2 グループの総 RNA サンプルを DNA マイクロアレイ解析に用いた。DNA マイクロアレイ解析法は、Agilent 社の方法に準じて行った。総 RNA サンプルを Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて T7-oligo プライマーで逆転写し、Cyamin3 にてラベル化された cDNA を作製した。Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイスライド (4x44K) (Agilent Technologies, Inc., U.S.A.) へのハイブリダイゼーションは G2545A (Agilent) で 10rpm、65°C、17 時間行った。マイクロアレイスキャナ (Agilent) で蛍光シグナルを測定し Feature Extraction Software (v10.5) (Agilent Technologies, Inc., U.S.A.) にて解析処理を行った。紅茶群の遺伝子発現量の値は、コントロール群の値と相対比較した。

IV-1-5 Real-time PCR 解析法

総 RNA を逆転写し cDNA を作製した。すなわち、Mastercycler (Eppendorf Co., Ltd., Germany) を用いて SuperScript® III のプロトコールに従い、Oligo (dT)12-18 プライマーで逆転写し、RNase 処理後、cDNA を作製した。FBJ osteosarcoma oncogene (Fos) および Jun oncogene (Jun) の発現量検出は、QuantiFast SYBR® Green PCR Kit (Quiagen, Germany) に準じて行った。また、遺伝子発現量が普遍的なことが知られている Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) QuantiTect® Primer Assays (Quiagen, Germany) を標準遺伝子として用いた。遺伝子の増幅および測定には、Mastercycler® ep realplex (Eppendorf Co., Ltd., Germany) を用いた。95°C、5 分で活性化後、(95°C、10 秒-65°C、30 秒) × 40 サイクルで PCR を行い、発現量を測定し、GAPDH に対する相対的な遺伝子発現量を求めた。

IV-1-6 統計処理

2 群間比較には t 検定を行い、検定の結果は $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

IV-2 結果

IV-2-1 紅茶の長期摂取が体重増加および内臓脂肪蓄積に及ぼす影響

紅茶群はコントロール群に比べ飼育 1 週目より体重の増加抑制傾向がみられ、飼育 2 週目、3 週目では紅茶群はコントロール群に比べ有意に低い値を示した (2 週目 : $p < 0.05$ 、3 週目 $p < 0.01$)。

IV-2-2 紅茶の長期摂取が耐糖能に及ぼす影響

3 週間飼育後の血糖値およびインスリンは紅茶群がコントロール群に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$)。HOMA-R においても紅茶群がコントロール群に比べ有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

IV-2-3 紅茶の長期摂取による肝臓の遺伝子発現パターンの変化

DNA マイクロアレイ解析において、AP-1 の二量体構成たんぱく質である Fos と Jun の発現量は紅茶群がコントロール群に比べて顕著に減少していた。

IV-2-4 紅茶の長期摂取による肝臓の炎症関連遺伝子発現への影響

Fos の発現量は、紅茶群がコントロール群に比べて減少する傾向が確認された。Jun においては、紅茶群がコントロール群に比べて有意に減少していた ($p < 0.05$)。

第V章 健常女性および耐糖能異常者に対するアマニの食後血糖上昇抑制作用の検討

V-1 方法

V-1-1 試験食品の調整

試料として用いたローストアマニ粉末は、100 g あたり、エネルギー 607 kcal、タンパク質 22.7 g、脂質 44.6 g (うち 21.3 g が α -リノレン酸)、炭水化物 28.5 g (うち 21.3 g が食物繊維) およびリグナンは 770 mg であった。

アマニを添加したアマニパンとゴマを添加したゴマパン、何も添加しないコントロールパンの 3 種のパンを作製した。アマニパンにはパン 1 個あたり 12.3 g のアマニが含まれており、ゴマパンにはパン 1 個あたり 12.0 g のゴマが含まれている。また、ゴマおよびアマニはローストし、粉末化したものを用いた。コントロールパン、アマニパン、ゴマパンのいずれも同じエネルギー 240 kcal になるように調整した。

V-1-2 健常女性を対象とした負荷試験

試験は、健常女性 (年齢 19~21 歳、BMI 19~24) を対象に行った。被験者を無作為に 3 群に分け、コントロール群 (n=88)、アマニ群 (n=89)、ゴマ群 (n=90) とした。被験者には夕食後以降水以外の飲食を禁止し、翌朝パンを水とともに 15 分間かけて摂取させた。パン摂取前、摂取後 20 分、40 分、60 分、90 分、120 分に被験者自ら指先より採血し、小型自己血糖測定器 (グルコカードダイアメーター GT-1641、アークレイ株式会社) を用いて血糖値を測定した。

V-1-3 耐糖能異常者を対象とした負荷試験

HbA1c が 6.4% 以上かつ BMI が 25 以上の耐糖能異常を示す被験者を対象に行った。

試験食はコントロールパンとアマニパンの 2 種類とした。被験者 6 名を無作為に 2 群に分け、1 群にはコントロールパンを、もう一方の群にはアマニパンを摂取させ、1 週間以上のウォッシュアウト期間を経た後、同一被験者に 1 回目とは異なるパンを摂取させるクロスオーバー法により試験を行った。被験者は朝食を抜いた状態で採血を行い、その後試験食を摂取し、摂取後 30、60、90、120 分の計 5 回採血を行った。採取した血液から血糖、インスリン、TG、NEFA を測定した。なお、本試験は臨床試験機関 (株式会社 RD サポート、東京) に依頼して行った。

V-1-4 統計処理

2 群間比較には t 検定を行い、3 群間以上の比較には多重比較検定 (Dunnett) を行って群間の差の有意性を検定した。また、統計解析には SPSS(ver. 20)を用いた。検定の結果は $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

V-2 結果

V-2-1 健常女性を対象とした負荷試験における血糖値の変化

空腹時血糖値を 100 とした血糖変化率を比較した結果、ゴマ群は摂取 20 分後にコントロール群と比較し高値傾向がみられた。アマニ群は摂取 60 分から 120 分後においてコントロール群と比較し有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

V-2-2 耐糖能異常者を対象とした負荷試験における血糖、インスリン、TG および NEFA の変化

空腹時血糖値を 100 とした血糖変化率を比較した結果、摂取 30、60、90 分後においてアマニパン摂取時がコントロールパン摂取時に比べ有意に低値を示した (摂取 30 分後: $p < 0.05$ 、摂取 60、90 分後: $p < 0.01$)。TG の変化率では、摂取 90、120 分後においてアマニパン摂取時がコントロールパン摂取時に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$)。インスリン、NEFA の変化率はアマニパン摂取時ではコントロールパン摂取時に比べて低値を示す傾向が認められた。

第VI章 紅茶とアマニの同時摂取による食後血糖上昇抑制作用の検討

VI-1 方法

VI-1-1 試験飲料の調整

試験飲料は、水と紅茶の 2 種類を用意した。水は市販の飲料水を用いた。紅茶は、飲料水を加熱し、熱水 (80°C) 100 mL に対してウバ (スリランカ) の茶葉を 3.0 g 使用し、3 分間抽出後、自然濾過したものを試料として用いた。いずれの試験飲料も 1 人当たり 300 mL を飲用させた。

VI-1-2 試験食品の調整

試験食は、コントロールパンとアマニパンの 2 種類を用意した。コントロールパンは 1 個あたりのエネルギーを 320 kcal、タンパク質 6.0 g、脂質 15.6 g、炭水化物 36.5 g、食物繊維 1.2 g になるように均一に調整した。アマニパンは 1 個あたりに 16.4 g のローストアマニ粉末が含まれ、エネルギー 320 kcal、タンパク質 9.6 g、脂質 13.5 g、炭水化物 36.5 g、食物繊維 4.5 g になるように均一に調整した。2 種類のパンのエネルギーおよび炭水化物量に差が無いように調製した。なお、パンの作製は日本製粉株式会社に依頼した。

VI-1-3 健常女性を対象とした摂取試験

試験は健常女性 (18~20 歳) を対象に行った。被験者を 4 群に分け、試験飲料と試験食品の組み合わせにより、コントロール群 (水とコントロールパン: $n=54$)、紅茶群 (紅茶とコントロールパン: $n=53$)、アマニ群 (水とアマニパン: $n=59$) および紅茶アマニ群 (紅茶とアマニパン: $n=52$) とした。被験者には試験開始 6 時間前からの水以外の飲食を禁止し、試験飲料とパンを 15 分間かけて摂取させた。パン摂取前、摂取後 30、60、90、120 分に被験者自ら指先より採血し、小型自己血糖測定器 (グルコカードダイアメーター、GT-1641、アークレイ株式会社製) を用いて血糖値を測定した。測定した空腹時の値をベースラインとし、血糖値曲線下面積を算出した。

VI-1-4 統計処理

解析には SPSS (Ver.20) を用いた。各群間の有意差検定は、一元配置の分散分析法により血糖値の変化における検定では Dunnett の多重比較を行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

VI-2 結果

紅茶とアマニの同時摂取が食後血糖値に及ぼす影響

紅茶群および紅茶アマニ群はコントロール群と比較して食後 30 分の血糖値の上昇を有意に抑制した（紅茶群： $p < 0.01$ 、紅茶アマニ群： $p < 0.001$ ）。紅茶群およびアマニ群がコントロール群と比較して食後 60 分の血糖値の上昇を有意に抑制した（紅茶群： $p < 0.05$ 、紅茶アマニ群： $p < 0.01$ ）。食後 90 分および 120 分の血糖値において、4 群間に有意な差は認められなかった。

食後 30 分の血糖値曲線下面積では、紅茶アマニ群は、コントロール群、紅茶群、アマニ群のいずれの群と比較しても、有意に低値を示した（コントロール群、アマニ群： $p < 0.001$ 、紅茶群： $p < 0.01$ ）。このことから、4 群のうち紅茶アマニ群が最も食後 30 分の血糖上昇を抑制したことが示された。食後 120 分の血糖値曲線下面積では、紅茶群、アマニ群、紅茶アマニ群のいずれもコントロール群に比べ有意に低値を示した（ $p < 0.05$ ）。

第七章 考察および総括

日本において、糖尿病の予防および糖尿病合併症の予防は、健康の維持・増進や医療費の削減のために重要な課題である。糖尿病の予防および糖尿病合併症の予防には、運動や食事などの生活習慣の是正が重要とされているが、その実践が難しく、実際の糖尿病患者数は年々増加している。本研究では、糖尿病の予防および糖尿病合併症の予防に有用な新規機能性をもつ食品を見出すことを目的とし、紅茶およびアマニの機能性に着目し、その耐糖能改善効果について検討を行った。

紅茶の糖尿病予防効果に関する研究は、これまで *in vitro* での検討がなされている程度で、作用機序や生体に与える効果については検討が不十分であった。本研究において、紅茶の α -グルコシダーゼ抑制作用に関与する成分や、マウスおよび健常女性に対する紅茶の耐糖能改善効果について多くの知見を得た。加えて、2 型糖尿病モデルマウスの試験において、紅茶摂取により肝臓細胞での AP-1 合成が抑制されることが示され、紅茶が糖尿病合併症予防に有用である可能性を見出した。紅茶摂取により AP-1 合成が抑制されるという報告はこれまでに無く、今後、糖尿病予防への応用が期待される新たな知見を見出した。また、アマニの糖尿病予防効果に関する研究は、海外での検討がいくつか見られるが、一定の科学的根拠が得られるには至っておらず、日本人を対象とした試験は行われていない。本研究において、健常女性および耐糖能異常者に対するアマニの耐糖能改善効果が明らかとなった。さらに、紅茶およびアマニを組み合わせることで、より効果的に耐糖能改善効果が期待できることを新たに見出した。紅茶は食事や間食時に日常的に飲用されており、非常に身近な食品である。また、アマニはゴマと同様に料理にふりかけたり、パンやクッキー等に加えたり、ゴマ和えの様に調理したりと料理への応用が容易な食材である。従って、日常的に摂取しやすい紅茶とアマニに関する本研究の新規知見は、糖尿病の予防および糖尿病病態の進行抑制のために有益な研究成果であると考えられる。また、本研究では薬剤やサプリメントとしてではなく、あくまでも食品として摂取した場合での効果を明らかにしており、食生活を大きく変化させずに糖尿病の予防および糖尿病病態の進行抑制が期待でき、国民の健康の維持・増進に幅広く貢献し得ると考えられる。

倫理的配慮

本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り、和洋女子大学動物およびヒトを対象とする生物学的研究・疫学的研究に関する倫理委員会の審議、承認を経て実施した。動物実験は内閣府告示の動物実験の飼養および保管等に関する基準に従い、実験動物に十分に配慮した上で行った。また、ヒトを対象とする試験では、対象者に試験プロトコールについて書面および口頭にて十分に説明し、書面による同意を得た者を被験者とした。なお、個人情報の取り扱いに十分配慮し、実験により得られたデータはすべて匿名化し ID 管理により秘密を厳守した。

[本論文に関する業績]

I 有審査原著論文

- 1) Difference of Inhibitory Effect of α -Glucosidase by Tealeaves Species and Extraction Condition and Effect of Black Tea on Postprandial Blood Glucose Level Elevation in ICR Mice: Naoko UCHIDA, Nao YOSHIMOTO, Asae NAKAMURA, Ayumi TAKAGI, Kayoko HONDA, Mihoko MOTO, Kaname KATSURAYA, Naotaka HASHIZUME. *Journal of Analytical Bio-Science*, Vol.36(2), p193-202, March 2013
- 2) マウスおよび健常女性に対する紅茶の食後血糖上昇抑制作用: 内田菜穂子, 吉本奈央, 仲村麻恵, 高木亜由美, 本田佳代子, 本三保子, 鬘谷要, 橋詰直孝. 臨床栄養協会誌(*New Diet Therapy*), Vol.28(4), p11-19, 2013年3月
- 3) Consumption of flaxseed bread inhibits elevation of postprandial blood glucose levels in humans: Naoko UCHIDA, Kaname KATSURAYA, Mihoko MOTO, Hidemaru UMEMOTO Naotaka HASHIZUME. 臨床栄養協会誌(*New Diet Therapy*), Vol.29(1), p11-22, June 2013