

和洋女子大学大学院

博士論文

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

指導教員 鬘谷要教授

総合生活研究科 総合生活専攻

博士後期課程

1142201 内田菜穂子

—目次—

第 I 章 序論

1. 糖尿病の現状	1
2. 機能性食品の現状	2
3. 茶ポリフェノールの特徴	3
4. 紅茶の特徴	6
5. アマニの特徴	8
6. DNA マイクロアレイ解析法	9
7. 本研究の目的	10
引用文献	12

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

1. 緒言	25
2. 方法	
2-1 酵素の調整	26
2-2 24 種紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の比較	26
2-3 24 種紅茶の総ポリフェノール量の測定	27
2-4 24 種紅茶のテアフラビン類の測定	27
2-5 紅茶の抽出温度の検討	28
2-6 紅茶の茶葉量の検討	28
2-7 紅茶の抽出時間の検討	29
2-8 統計処理	29
3. 結果	
3-1 24 種紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の比較	29

3-2	α-グルコシダーゼ活性抑制作用の作用成分の検討	31
3-3	紅茶の抽出温度の検討	34
3-4	紅茶の茶葉量の検討	36
3-5	紅茶の抽出時間の検討	38
4.	考察	40
	引用文献	43

第三章 正常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の検討

1.	緒言	45
2.	方法	
2-1	実験動物および飼育条件	46
2-2	マウスにおける各種糖質負荷試験	46
2-3	マウスにおける紅茶投与タイミングの検討	47
2-4	健常女性を対象とした摂取試験	47
2-5	倫理的配慮	48
2-6	統計処理	48
3.	結果	
3-1	紅茶の投与が各種糖負荷後の血糖値に及ぼす影響	49
3-2	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	51
3-3	紅茶の摂取がヒトの食後血糖値に及ぼす影響	53
4.	考察	55
	引用文献	59

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

1. 緒言	61
2. 方法	
2-1 紅茶抽出液の調整	62
2-2 実験動物および飼育条件	62
2-3 体重、臓器重量測定および血液検査	63
2-4 DNA マイクロアレイ解析法	64
2-5 Real-time PCR 解析法	64
2-6 倫理的配慮	65
2-7 統計処理	65
3. 結果	
3-1 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	66
3-2 紅茶の長期摂取が耐糖能に及ぼす影響	68
3-3 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	69
3-4 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	71
4. 考察	72
引用文献	76

第V章 健常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の検討

1. 緒言	80
2. 方法	
2-1 試験食品の調整	81
2-2 健常女性を対象とした負荷試験	83

2-3 耐糖能異常者を対象とした負荷試験	83
2-4 倫理的配慮	86
2-5 統計処理	86
3. 結果	
3-1 健常女性を対象とした負荷試験における血糖値の変化	87
3-2 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	89
4. 考察	92
引用文献	95

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

1. 緒言	100
2. 方法	
2-1 試験飲料の調整	101
2-2 試験食品の調整	101
2-3 健常女性を対象とした摂取試験	102
2-4 倫理的配慮	103
2-5 統計処理	103
3. 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	104
4. 考察	106
引用文献	108

第Ⅶ章 総括	109
引用文献	112
謝辞	114
資料	115

第 I 章 序論

1. 糖尿病の現状

糖尿病は 1 型、2 型、その他の型（遺伝因子として遺伝子異常が同定されたものや他の疾患によるもの）、妊娠糖尿病に分類され、このうち 2 型糖尿病はインスリン分泌低下を主体とするものと、インスリンの感受性低下（インスリン抵抗性）を主体とするものに分類される¹⁻³⁾。

2 型糖尿病ではインスリン分泌低下やインスリン抵抗性のために、食後に血中に増加したグルコースを末梢組織に取り込んで血糖値を一定に保とうとする能力（耐糖能）が低下する（耐糖能異常）^{4,5)}。その結果、2 型糖尿病では健常者に比べて食後の血糖値が上がりやすく、食前の血糖値まで戻るのに時間がかかる。食後の高血糖は心筋梗塞や脳梗塞等の血管疾患発症のリスクを高める⁶⁻⁸⁾と考えられており、糖尿病の予防は健康寿命に大きく関与する因子である。

2 型糖尿病の予防や進行の抑制には運動習慣^{9,10)}や食習慣¹¹⁾などの生活習慣の是正が効果的とされているが、その実践が難しいのが現状である¹²⁾。国際糖尿病連合（IDF: International Diabetes Federation）の発表によると、2011 年現在での世界の糖尿病有病者数は 3 億 6600 万人とされ、2030 年までに 5 億 5200 万人に増加すると予測されており¹³⁾、糖尿病の増加は世界的な問題となっている。その中でわが国の糖尿病患者数も増加しており、厚生労働省の平成 23 年患者調査¹⁴⁾では、糖尿病の総患者数は約 270 万人で、前回（平成 20 年）の患者調査と比較し、約 33 万人増加したと報告されている。また、わが国の国民医療費は増加の一途をたどっており、厚生労働省の調査¹⁵⁾では平成 22 年度の国民医療費は前年度の調査よりも 3.9% 増加していると報告されている。また、入院・入院外の医療費において、

内分泌・栄養及び代謝疾患での医療費は約 2 兆円で、そのうちの約 60% である 1.2 兆円を糖尿病の医療費が占めている。従って、糖尿病の増加は国民の健康の維持・増進に関する事だけでなく、経済的な観点からも重大な問題とされ、糖尿病の予防は大きな課題となっている。

2. 機能性食品の現状

食品には、第 1 次機能（栄養特性）、第 2 次機能（嗜好特性）、第 3 次機能（生理調整機能）があると考えられている¹⁶⁾。この第 3 次機能を利用したものが健康食品やサプリメントと呼ばれるものである。健康食品・サプリメントの推定市場規模は 2012 年の調査¹⁷⁾でおよそ 1.5 兆円とされ、需要の高さが伺える。しかし、需要の高まりの中で様々な健康食品やサプリメントが氾濫し、健康食品やサプリメントの摂取による健康被害が報告されている^{18,19)}。このような背景から、健康食品やサプリメントの氾濫を是正するため国が制度化したものが保健機能食品であり、保健機能食品には栄養機能食品と特定保健用食品(トクホ)がある。特定保健用食品は、一定の条件を満たした食品として国で認められた食品であり、保健機能成分を含み、食生活において特定の保健の目的で摂取をする者に対し、その摂取により当該保健の目的が期待できる旨の表示が許可された食品である²⁰⁻²²⁾。特定保健用食品のうち、生活習慣病の 1 つである糖尿病に関連した表示に「血糖値が高めの方に適する」という表示があり²³⁾、難消化性デキストリン²⁴⁻²⁶⁾、グァバ葉ポリフェノール²⁷⁾、小麦アルブミン^{28,29)}、豆鼓エキス^{30,31)}等がある。

糖尿病の予防、合併症の進展防止には食後の高血糖の是正が有用であることが、臨床的に示されている³²⁾。このため、糖尿病の栄養指導においてもエネルギー管理中心の指導から、エネルギー管理に加え食後の高血糖を

是正する指導に変化し始めている。我々が日常摂取する糖質の大部分は、デンプンや二糖類であり、これらは糖質消化酵素の働きによって単糖に分解され吸収される〔図 1-1〕。このため、 α -アミラーゼや α -グルコシダーゼ等の糖質消化酵素の働きを抑制する事により、糖質の消化吸収を抑制し、食後血糖値の上昇を穏やかにするという考え方が重要視されるようになった。これまでマテ葉³³⁾、ウコギ葉^{34,35)}、桑葉³⁶⁾、インスリーナ³⁷⁾、イチヨウ葉³⁸⁾、白インゲン豆³⁹⁾等の抽出物や抽出液について、アミラーゼや α -グルコシダーゼであるマルターゼやスクラーゼの抑制作用が報告されており、糖尿病予防を目的とした食品の機能性について、動物実験やヒト試験による検討が盛んに行われている。

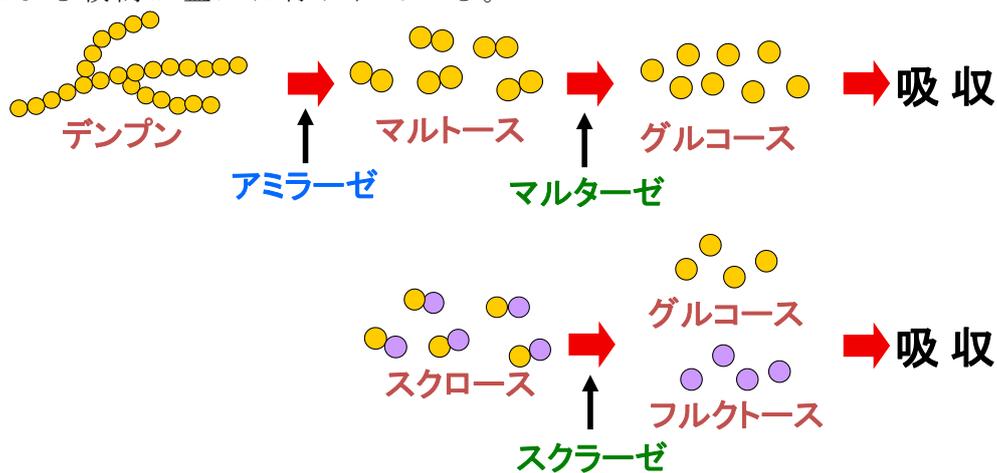


図 1-1. デンプン、マルトースおよびスクロースの消化の流れ

3. 茶ポリフェノールの特徴

紅茶、ウーロン茶、緑茶は共に同じ茶の木 (*Camellia sinensis*) の葉を原料として製造される⁴⁰⁾。生葉は 75～80%の水分を含み、その残りの 20～25%が固形分で、固形分の中にはタンパク質、アミノ酸、タンニン、糖類、デキストリン、デンプン、セルロース、有機酸、核酸系化合物、葉緑素、カロテノイド、ポリフェノール類、樹脂類、精油成分、酵素、ビタミン、ミネラルなどを含み、一般の植物成分に比べ、テアニン、カフェインを多く含み、タンニン、マンガン、フッ素含有量が多いという特徴がある⁴¹⁾。

紅茶、ウーロン茶、緑茶は、製造工程の中でも主に発酵の程度に違いがあることから、紅茶は発酵茶、ウーロン茶は半発酵茶、緑茶は不発酵茶と呼ばれている。紅茶は茶葉中の酸化酵素、加水分解酵素などの活性を活用し、茶葉成分を化学変化させて作られる。緑茶は、製造の第一段階で加熱（蒸す、煮る、炒る）ことで茶葉中の酸化酵素、加水分解酵素などの活性を抑え、茶葉成分を化学変化させないことで作られている。ウーロン茶は、紅茶ほど発酵が進まないうちに茶葉成分の化学変化を途中で止めることで作られる〔図 1-2〕。

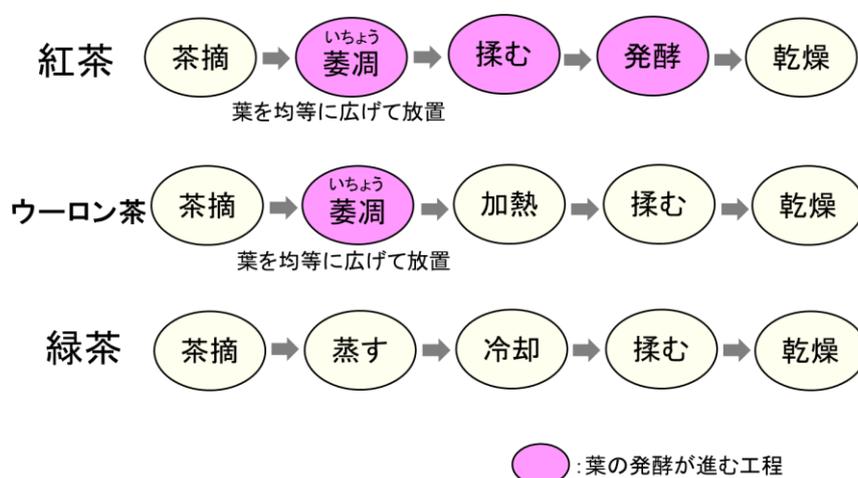


図 1-2. 紅茶・ウーロン茶・緑茶の製造工程

伊奈和夫, 坂田完三, 鈴木壯幸, 南条文雄, 郭飛: 緑茶・中国茶・紅茶の化学と機能⁴²⁾を一部改変

この化学変化（発酵）の度合いによって紅茶、ウーロン茶、緑茶の茶葉中の成分に違いが生じる。茶葉には様々な茶ポリフェノール類が含まれており、主要なものとしてカテキン類が挙げられる⁴³⁾。カテキン類としては(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキンとこれらにガロイル基のついた(-)-エピカテキンガレート、(-)-エピガロカテキンガレートのエピカテキン 4 種類と、それらのエピマーである(+)-カテキン、(+)-ガロカテキン、(-)-カテキンガレート及び(-)-ガロカテキンガレートが既に多くの研究により報告されている⁴⁴⁻⁴⁸⁾〔図 1-3〕。

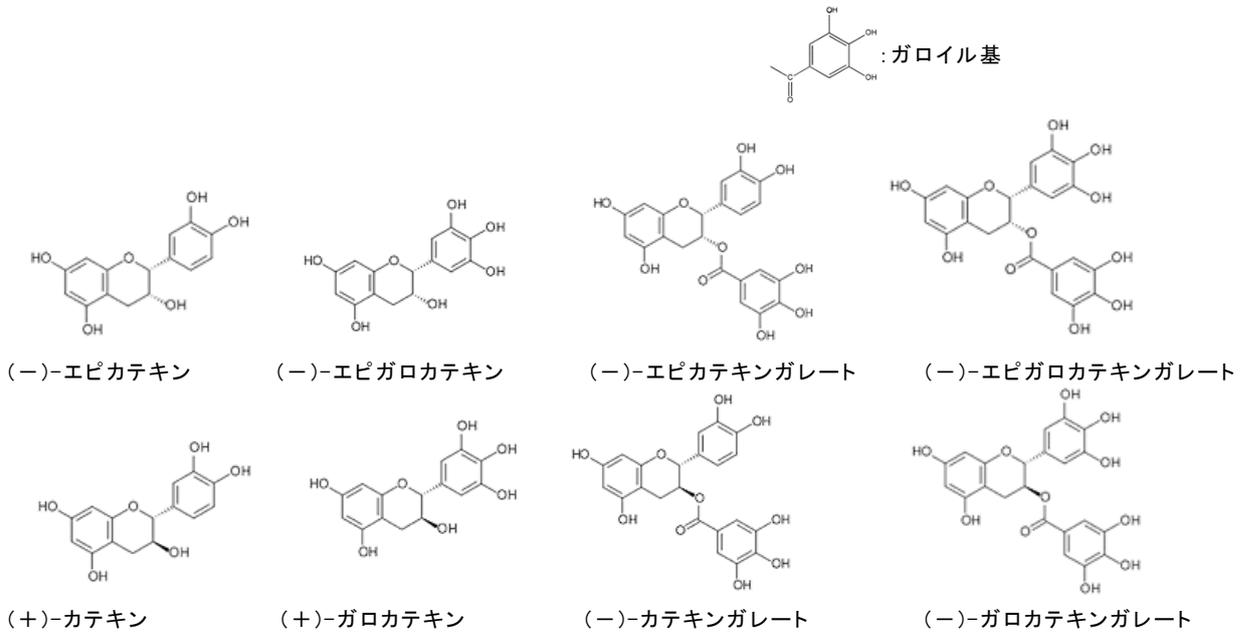


図 1-3. カテキン類の構造

ウーロン茶ではカテキン量が緑茶に対して約 30~40%減少し、紅茶ではさらに減少して緑茶の約 20~30%となる^{40,49)}。この減少は、ウーロン茶および紅茶の製造工程における発酵に大きく関与している。茶葉を発酵させることで、ポリフェノールオキシダーゼが働き、茶葉中のカテキン類が重合し、テアフラビン類等の重合体が生成される⁵⁰⁻⁵²⁾。テアフラビン類は赤褐色色素であり、紅茶の水色に大きく影響を及ぼしている物質である⁵³⁻⁵⁵⁾。テアフラビン類には遊離型テアフラビン、テアフラビン-3-ガレート、テアフラビン-3'-ガレート、テアフラビン-3,3'-ジガレートの4種が知られている^{56,57)} [図 1-4]。

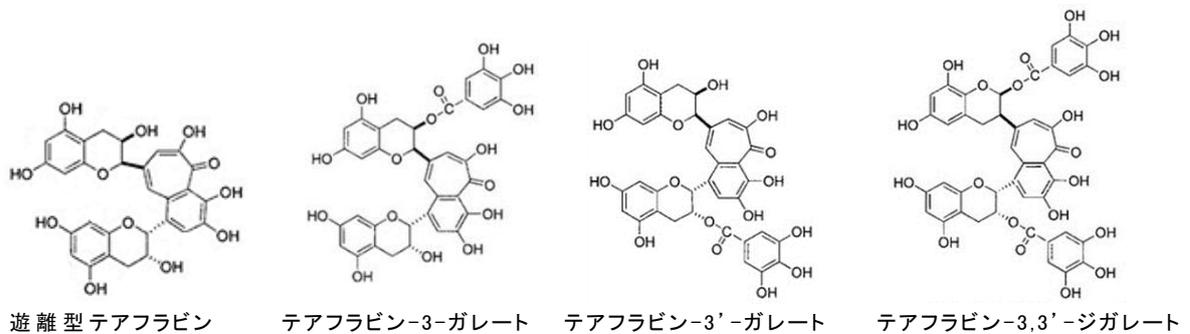


図 1-4. テアフラビン類の構造

4. 紅茶の特徴

日本で茶といえば緑茶が主流であるが、世界的にみると茶の生産の7割以上は紅茶であり⁵⁸⁾ [図 1-5]、その歴史は400年以上前に遡る⁴⁰⁾。従って、紅茶は世界的に身近な飲料であり、紅茶の新規機能性を見出すことは非常に意義のあることと考えられる。また、紅茶消費量の高い国では2型糖尿病の有病率が低いことを示唆する疫学的研究結果が報告されており、紅茶の機能性についての関心が高まっている⁵⁹⁾。

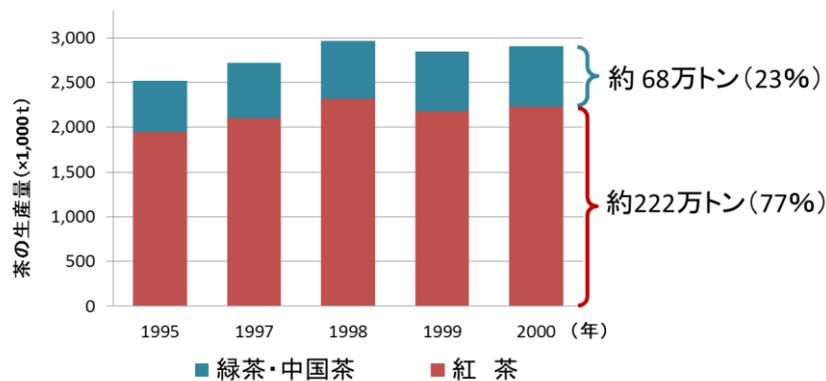


図 1-5. 世界の茶生産統計

「独立行政法人農畜産業振興機構ホームページ(紅茶市場の概要)」⁵⁸⁾より作成

緑茶には抗酸化作用⁶⁰⁾や抗アレルギー作用⁶¹⁾に加え、血糖上昇抑制作用⁶²⁾やインスリン感受性亢進作用⁶³⁾が報告されており、茶ポリフェノールの糖尿病予防作用が期待されている。そこで、本研究では緑茶と同じ茶の葉から作られる紅茶の機能性に着目した。紅茶は *in vitro* において、 α -アミラーゼ⁶⁴⁻⁶⁷⁾や α -グルコシダーゼ^{68,69)}等の糖質消化酵素の働きを抑制する事がすでに報告されており、作用成分に関する検証等、今後の検討が必要とされている。

そこでまず予備的知見を得るため、同じ茶の木の葉から作られる紅茶、ウーロン茶、緑茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の比較を行った。市販の紅茶(ウバ, スリランカ産)、ウーロン茶(水仙, 中国産)、緑茶(やぶ

きた、静岡産)について熱水 100mL あたり茶葉を 1.5g 使用し、3 分間抽出後濾紙にて自然濾過した試料の α -グルコシダーゼであるマルターゼおよびスクラーゼの活性抑制作用を *in vitro* において比較した。その結果、紅茶がウーロン茶や緑茶と比較して、有意に高いマルターゼおよびスクラーゼの活性抑制作用を示した〔図 1-6〕。予備試験では紅茶、ウーロン茶、緑茶をそれぞれ 1 品ずつ用いて比較したため、全ての紅茶がウーロン茶や緑茶よりも高い糖質消化酵素活性抑制作用を有しているとは断定できないが、紅茶にも糖尿病予防作用が期待されている緑茶と同様あるいはそれ以上の効果が期待できる可能性が示唆された。

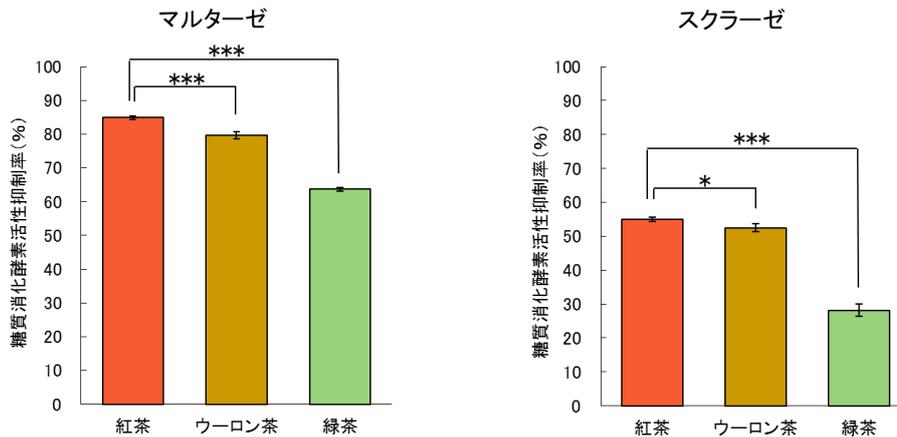


図 1-6. 紅茶、ウーロン茶、緑茶の糖質消化酵素活性抑制作用の比較

*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ (紅茶との差を示す).

紅茶の種類は主として産地により分類され、各産地により気候や土壌、土地の高低差や傾斜による日照時間の違いや製造方法に違いがある。中でも、ウバ、ダージリン、キーマンは世界 3 大銘茶と呼ばれており⁴⁰⁾、これにアッサムを加えた 4 種の紅茶が日本では一般的に販売されている。ウバの原産国はスリランカ、ダージリンおよびアッサムの原産国はインド、キーマンの原産国は中国である。また、抽出液の色調は、ウバが濃い赤色、ダージリンが薄いオレンジ色、キーマンとアッサムは濃い赤褐色であり、香味にもそれぞれの特徴がある⁴⁰⁾。このような特徴の違いが産地や製造工

程により生じたとすると、それぞれに含まれる成分にも違いが生じていると考えられ、糖質消化酵素活性抑制作用にも差が生じている可能性が考えられた。このため、紅茶の糖質消化酵素活性抑制作用を検討する上で、産地の異なる紅茶による比較が必要であると考えられた。

5. アマニの特徴

アマニとは中央アジア原産の亜麻 (*Linum usitatissimum*) の黄褐色で表面がつるつるした種子である。アマニは日本ではなじみの薄い食材であるが、欧州では古くから食されている食材である。アマニは炒った状態で市販されており、サラダや料理にふりかけて食したり、シリアルやパン、マフィンに入れて食したりと、日本食におけるゴマのような用途で食されている。このため、日本食への展開がし易い食材であると考えられ、本研究ではこのアマニの機能性に着目することとした。

アマニは欧州においては古くから食されており、科学的な根拠が議論される以前から健康上有益な食材とされてきた⁷⁰⁾。近年、アマニの食品機能に関する研究が盛んに行われており、健康増進を目的とした利用が注目されている。アマニの一般分析では、およそ脂肪が 40%、たんぱく質が 20%、食物繊維が 28%、水分が 7.7%、その他に灰分が含まれると報告されている⁷¹⁾。また、アマニの全脂質のうちの 57%が n-3 系脂肪酸である α -リノレン酸であることや⁷²⁾、他の穀類と比較してリグナン含量が多い⁷³⁾という特徴がある。リグナンは、ポリフェノールの一種で⁷⁴⁾、大豆に含まれるイソフラボンと同様に植物性エストロゲンとも呼ばれ、抗酸化作用⁷⁵⁾や脂肪酸の β 酸化亢進作用⁷⁶⁾等、生体への効果が注目されている物質である。アマニに含まれるリグナンのほとんどは secoisolariciresinol diglucoside (SDG) であり、これまでに SDG の長期摂取による抗酸化作用^{77,78)}、血中脂質低

下作用⁷⁹⁾が報告されている。また、n-3系脂肪酸である α -リノレン酸の心筋梗塞⁸⁰⁾、脳卒中⁸¹⁾のリスク低減作用が報告されている。また、アマニ摂取による抗酸化作用⁸²⁾や血清脂質および心血管保護^{83,84)}作用が報告されており、健康の維持・増進への利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、アマニ摂取による抗糖尿病効果が確認された報告⁸⁵⁻⁸⁸⁾と、明らかな効果が確認できなかった報告⁸⁹⁻⁹¹⁾があり、信頼性に足る臨床データが必要とされている。また、これまでに日本人を被験者とした報告は見当たらない。臨床的な効能を検討する場合、人種による差異が問題となる場合があり、薬物を評価するためには、患者の体質等の遺伝的要因を検討する必要があるとされ、遺伝子多型については薬物動態に違いが生じるとの報告もある⁹²⁻⁹⁴⁾。本研究は、薬物の開発を目的とした研究ではないが、遺伝子多型により食品の吸収、分布、代謝、排泄に違いが生じる可能性は十分に考えられる。そのため、日本人を被験者とした試験による検討が必要と考えられた。

6. DNA マイクロアレイ解析法

近年、食品が生体に与える効果を評価する手法としてニュートリゲノミクスが注目されている。ニュートリゲノミクスは、食品の摂取による遺伝子の発現を比較、検討することで、食品の新規機能性をよりエビデンスに基づいたかたちで評価するという遺伝子工学的な手法である⁹⁵⁾。ニュートリゲノミクスの手法により、確立された実験系がDNA マイクロアレイ解析法である^{96,97)}。DNA マイクロアレイ解析法は、数万個の遺伝子配列が並んだ基盤とサンプルから抽出したmRNAを反応させ、サンプルのmRNAと基盤上の配列が相補的に2本鎖を形成することによって遺伝子発現情報を網羅的に観測する方法である⁹⁸⁾。

遺伝子の発現パターンは、生活習慣や疾病等によって変化する⁹⁹⁾。このため、DNA マイクロアレイ解析は特に医学の分野での応用が期待されている。また、DNA マイクロアレイ解析は、明らかにされていない食品の機能性や作用機序について遺伝子レベルで網羅的探索を行う場合にも非常に適した方法であり、最新の研究においては、マイクロアレイ解析を用いて食品の機能性を評価した報告がみられるようになった¹⁰⁰⁻¹⁰⁷⁾。現在流通している「いわゆる健康食品」は多種多様であり、中には健康食品による健康被害や不適切な情報の氾濫が生じている^{108,109)}。そのため、信頼できるエビデンスに基づいた正確な食品の機能性評価が求められている。*in vitro* における検討や血液データ等の生化学的検討に加え、ヒトを対象とした試験や遺伝子発現レベルの検討を行うことで、より信頼性の高いエビデンスをもった食品の機能性評価が可能になると期待されている。

7. 本研究の目的

前述の背景から、糖尿病の増加が問題視されており、糖尿病の予防に有用な機能性食品の研究結果が求められている。また、紅茶とアミニが糖尿病の予防に有用である可能性が考えられ、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研究を行い、それをもとに紅茶とアミ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。他の消化酵素の影響や、pH の変動により、*in vitro* での現象が必ずしも生体内で起こるとは限らず、*in vivo* による

検討が必要である。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することを目的に実験を計画した。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、マイクロアレイ解析および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。

アマニには 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、一定の根拠を得るには至っておらず、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、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。加えて、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¹¹⁰⁾や吸収阻害¹¹¹⁾が起こることがあり、本研究により検討した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その作用が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ことで摂取した場合の食後血糖上昇抑制作用について検討することを目的として、健常女性を対象とした試験を行った。

引用文献

- 1) 清野裕：糖尿病の診断と治療 - 現状と展望 - . 日本内科学会雑誌, 98(4): 1-4 (2009).
- 2) 葛谷健, 中川昌一, 佐藤譲, 金澤康徳, 岩本安彦, 小林正, 南條輝志男, 佐々木陽, 清野裕, 伊藤千賀子, 島健二, 野中共平, 門脇孝: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病, 42(5): 385-404 (1999).
- 3) 清野裕, 南條輝志男, 田嶋尚子, 門脇孝, 柏木厚典, 荒木栄一, 伊藤千賀子, 稲垣暢也, 岩本安彦, 春日雅人, 花房俊昭, 羽田勝計, 植木浩二郎: 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告(国際標準化対応版). 糖尿病, 55 (7): 485-504 (2012).
- 4) 医療情報科学研究所: 病気がみえる -代謝・内分泌疾患-. MEDIC MEDIA, 第5版: 16-18 (2004).
- 5) 清野裕: 2型糖尿病の病態と発症機構. 日本内科学会雑誌, 93: 48-51 (2004).
- 6) 中神朋子, 岩本安彦: 糖尿病と動脈硬化症 食後高血糖と動脈硬化性疾患. 糖尿病, 46(12): 907-909 (2003).
- 7) 塩飽邦憲, 山崎雅之, 岩本麻実子, 池西瑠美, 米山敏美, 李麗梅, 王莉, 乃木章子: メタボリックシンドロームの疾病概念とその対策. 日本農村医学会雑誌, 54(4) 605-617 (2007).
- 8) DECODE Study Group, the European Diabetes Epidemiology Group: Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch. Intern. Med.*, 161(3): 397-405 (2001).
- 9) Manson JE, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE: Physical activity and incidence

- of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet*, 338(8770): 774-778 (1991).
- 10) 眞鍋康子, 藤井信晴: 筋収縮が糖尿病を予防・改善することの分子スポーツ医学的考察. *医学のあゆみ*, 243(10): 918-922 (2012).
 - 11) 松井淳, 中村光男, 長谷川範幸, 小川吉司, 須田俊宏: 高齢脂肪肝患者の食習慣および臨床的背景についての検討 - 2型糖尿病患者での検討. *老年消化器病*, 11(3): 243-249 (1999).
 - 12) 山本壽一, 石井均, 古家美幸, 岡崎研太郎, 辻井悟: 糖尿病教育後患者における食事療法妨害要因の解析. *糖尿病*, 43(4): 293-299 (2000).
 - 13) 国際糖尿病連合(International Diabetes Federation: IDF) Home Page
<http://www.idf.org/new-idf-data-reveals-diabetes-epidemic-continues-escalate> (2013/6/8 現在)
 - 14) 「厚生労働省平成 23 年患者調査の概況」 Home Page
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/11/index.html> (2013/6/8 現在)
 - 15) 「厚生労働省平成 22 年度 国民医療費の概況」 Home Page
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/10/dl/data.pdf> (2013/6/8 現在)
 - 16) 滝波弘一: 食品の特性・特質. *日本農芸化学会誌*, 7(6): 560-562 (2003).
 - 17) 内閣府 Homepage
http://www8.cao.go.jp/kisei-kaikaku/kaigi/meeting/2013/wg/kenko/130419/item2-2_4.pdf#page=1 (2013/6/8 現在)
 - 18) 小池麻由, 大津史子, 榊原仁作, 後藤伸之: 健康食品・サプリメントによる健康被害の現状と患者背景の特徴. *医薬品情報学*, 14 (4): 134-143 (2013).
 - 19) 佐田通夫, 久顕子, 中沼安二, 鹿毛政義, 各務伸一, 沖田極: 痩せ

- 薬・健康食品による薬物性肝障害 2 次全国調査集計結果 (日本肝臓学会主催). 肝臓, 45(2): 96-408 (2004).
- 20) 林浩孝, 大野智, 太田康之, 新井隆成, 鈴木信孝: 特定保健用食品の許認可について. 日本補完代替医療学会誌, 4(3): 103-112 (2007).
- 21) 山田和彦: 見直された保健機能食品の新制度. 日本食物繊維学会誌, 9(2): 85-91 (2005).
- 22) 日本サプリメントアドバイザー認定機構: 日本臨床栄養協会サプリメントアドバイザー必携. 薬事日報社, 東京, 第 3 版: 161-188 (2008).
- 23) 林浩孝, 大野智, 新井隆成, 仲井培雄, 加藤佳子, 鈴木信孝: 特定保健用食品「食後の血糖値の上昇を緩やかにする」表示をした食品について. 日本補完代替医療学会誌, 5(2): 123-134 (2008).
- 24) 林範子, 大賀浩史, 岸本由香, 田上廣幸: 還元難消化性デキストリンの食後血糖値に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌, 59(5) 247-253 (2006).
- 25) 2 近藤敦, 栗原昭一, 佐藤紘子, 石谷邦彦: 難消化性デキストリン添加飲料の健常人食後血糖値に与える影響. 日本食生活学会誌, 14(3): 221-225 (2003).
- 26) 別府秀彦, 渡邊治夫: 難消化性デキストリンの血糖値抑制効果と糖負荷の関係. 生活衛生, 55(1): 3-14 (2011).
- 27) 出口 ヨリ子, 長田 邦子, 内田 和美, 木村 広子, 芳川 雅樹, 工藤辰幸, 保井 久子, 綿貫 雅章: グァバ葉熱水抽出物の 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, 72: 923-931 (1998).
- 28) Kodama T, Miyazaki T, Kitamura I, Suzuki Y, Namba Y, Sakurai J, Torikai Y, Inoue S: Effects of single and long-term administration of wheat

- albumin on blood glucose control: randomized controlled clinical trials. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 59(3): 384-92 (2005).
- 29) 森本聡尚, 宮崎俊之, 村山隆二, 児玉俊明, 北村育夫, 井上修二: ヒトにおける小麦アルブミンの単回投与による食後血糖上昇抑制作用と安全性. *日本栄養・食糧学会誌*, 52(5): 285-291 (1999).
- 30) Fujita H, Yamagami T, Ohshima K: Fermented soybean-derived water-soluble Touchi extract inhibits alpha-glucosidase and is antiglycemic in rats and humans after single oral treatments. *J. Nutr.*, 131(4): 1211-3 (2001).
- 31) Fujita H, Yamagami T: Fermented soybean-derived Touchi-extract with anti-diabetic effect via alpha-glucosidase inhibitory action in a long-term administration study with KKAY mice. *Life Sci.*, 70(2): 219-27 (2001).
- 32) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M: Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet*, 359: 2072-2077 (2002).
- 33) 寺本哲子, 沖直子, 草野崇一: マテ (*Ilex paraguariensis*) 葉抽出物の糖質分解酵素阻害作用およびラットにおける糖負荷後の血糖上昇抑制作用. *日本栄養・食糧学会誌*, 58(1): 17-21 (2005).
- 34) 田淵三保子, 田村朝子, 松葉滋, 小野寺準一, 山田則子: ウコギ (*Acanthopanax sieboldianus*) 葉のラットにおける食後血糖上昇抑制作用. *日本栄養・食糧学会誌*, 57(6): 271-275 (2004).
- 35) 本三保子, 田村朝子, 山田則子: ヒメウコギ葉茶のラットおよびヒトにおける食後血糖上昇抑制作用. *日本栄養・食糧学会誌*, 61: 111-117 (2008).
- 36) 阿武尚彦, 田村幸一, 大野紘美, 富裕孝: 桑 (*Morus alba L.*) 葉エキスの

- マルターゼ，スクラーゼおよび α -アミラーゼ阻害作用について．日本食品保蔵科学学会誌，30(5): 223-229 (2004).
- 37) 森強士，西川泰，高田曜子，樫内賀子，石原伸浩：インスリーナ葉の抗糖尿病作用．日本栄養・食糧学会誌，54(4): 197-203 (2001).
- 38) 田中忍，韓立坤，鄭毅男，奥田拓道：ラットにおける食後の血糖上昇に及ぼすイチョウ葉由来フラボノイドフラクションの抑制作用．薬学雑誌，124: 605-611 (2004).
- 39) Tormo MA, Gil-Exojo I, Romero TA, Campillo JE: Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wister rats. *Br. J. Nutr.*, 92: 785-790 (2004).
- 40) 佐野満昭，斉藤由美：紅茶の保健機能と文化．アイ・ケイ コーポレーション，東京，第 1 版：58-75 (2008).
- 41) 前田清一：緑茶の化学．調理科学，2(2): 73-77 (1969).
- 42) 伊奈和夫，坂田完三，鈴木壯幸，南条文雄，郭飛：緑茶・中国茶・紅茶の化学と機能．アイ・ケイコーポレーション，東京，第 1 版：11-21 (2007).
- 43) 西条了康，武田善行：HPLC による各種緑茶に含まれるカテキン類の分析．日本食品科学工学会誌，46(3): 138-147 (1999).
- 44) 黄素梅，井上和美，李岩，田中隆，石丸幹二：オートクレーブ処理した茶葉および茶ドリンクのカテキン成分．日本食品化学学会誌，11(2): 99-102 (2004).
- 45) 佐野満昭：茶カテキンの機能と調理時における構造的変化．日本調理科学会誌，40(4): 223-230 (2007).
- 46) 西条了康，加藤みゆき：カテキン化学の研究史 - 特に茶に含まれるカテキン類について - . 茶業研究報告，107: 1-18 (2009).

- 47) 木幡 勝則, 峰 伸一, 氏原 ともみ, 堀江 秀樹: ペットボトルおよび缶入り緑茶飲料の加温保存中における各種カテキン類および抗酸化能の変化. 茶業研究報告, 96: 69-74 (2003).
- 48) 東海林敦, 柳田顕郎, 神藤平三郎, 渋沢庸一: 高速液体クロマトグラフィーと高速向流クロマトグラフィーにおけるカテキン類の溶出挙動の比較. 分析化学, 53(9) 953-958 (2004).
- 49) 寺田志保子, 前田有美恵, 増井俊夫, 鈴木裕介, 伊奈和夫: 各種茶(緑茶,半発酵茶,紅茶)浸出液およびティードリンクス中のカフェイン,カテキン組成. 日本食品工業学会誌, 34(1): 20-27 (1987).
- 50) 西川研次郎, 食品機能性の科学編集委員会: 食品機能性の科学. 編集産業技術サービスセンター, 東京, 第1版: 360-362 (2008).
- 51) 原征彦: 茶カテキン類の機能性とそれらの応用例. 日本食品保蔵学会誌, 26(1): 47-54 (2000).
- 52) Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka Itsuo: Tannins and Related Compounds. CXIV. Structure of Novel Fermentation Products, Theogallinin, Theaflavonin and Desgalloyl Theaflavonin from Black Tea, and Changes of Tea Leaf Polyphenols during Fermentation. *Chem. Pharm. Bull.*, 40(6): 1383-1389 (1992).
- 53) 田中隆: 緑茶カテキンの酸化と紅茶色素の生成. 化学と生物, 40(8): 513-518 (2002).
- 54) 坂本 裕, 中田 典男: 紅茶の水色と Theaflavins と Thearubigins 量との相関について. 茶業研究報告, 20: 55-60 (1963).
- 55) 中川 致之: 紅茶の品質とくに水色とテアフラビン,テアルビジンの含量. 茶業研究報告, 32: 72-77 (1970).
- 56) 坂本彬, 井上博之, 中川致之: 12 種類の紅茶の化学成分, 日本食品科

- 学工学会誌, 59(7): 326-330 (2012).
- 57) 阿南豊正, 高柳 博次, 池ヶ谷 賢次郎 高速液体クロマトグラフィーによる紅茶のテアフラビン類の定量法. 日本食品工業学会誌, 35(7): 487-490 (1988).
- 58) Beresniak A, Duru G, Berger G, Bremond-Gignac D: Relationships between black tea consumption and key health indicators in the world: an ecological study. *BMJ Open*, 2: e000648 (2012).
- 59) 独立行政法人農畜産業振興機構 (紅茶市場の概要) Home Page
http://sugar.alic.go.jp/japan/view/jv_0111a.htm#4 (2013/6/9 現在)
- 60) Rietveld A, Wiseman S: Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials. *J. Nutr.*, 133 (10): 3285-3292 (2003).
- 61) 山本(前田)万里, 永井寛, 江間かおり, 神田えみ, 岡田典久, 安江正明: 季節性アレルギー性鼻炎有症者を対象とした「べにふうき」緑茶の抗アレルギー作用評価とショウガによる増強効果. 日本食品科学工学会誌, 52(12): 584-593 (2005).
- 62) Ortsäter H, Grankvist N, Wolfram S, Kuehn N, Sjöholm A: Diet supplementation with green tea extract epigallocatechin gallate prevents progression to glucose intolerance in db/db mice. *Nutr. Metab.*, 9(11) doi: 10.1186/1743-7075-9-11 (2012).
- 63) Cao H, Hininger-Favier I, Kelly MA, Benaraba R, Dawson HD, Coves S, Roussel AM, Anderson RA: Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet. *J. Agric. Food. Chem.*, 55(15): 6372-6378 (2007).
- 64) 田中伸子, 岡村浩: 唾液中 α -アミラーゼにおよぼす紅茶抽出益虫活性

- 変動因子の検討. 学苑, 570: 9-15 (1987).
- 65) 田中伸子, 岡村浩: 紅茶中の唾液 α -アミラーゼ阻害物質 (ポリフェノール) に関する検討. 学苑, 624: 26-30 (1991).
- 66) 田中伸子, 岡村浩: 唾液中 α -アミラーゼ活性におよぼす紅茶タンニン (ポリフェノール) の影響. 日本家政学会誌, 40: 587-592 (1989).
- 67) Hara Y, Honda M: The Inhibition of α -amylase by Tea Polyphenols. *Agric. Biol. Chem.*, 54(8): 1939-1945 (1990).
- 68) Toshiro Matsui, Takashi Tanaka, Satoshi Tamura, Asami Toshima, Kei Tamaya, Yuji Miyata, Kazunari Tanaka and Kiyoshi Matsumoto: α -Glucosidase inhibitory profile catechins and theaflavins. *J. Agric. Food. Chem.*, 55: 99-105 (2007).
- 69) Honda M, Hara Y: Inhibition of rat Small Intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(1): 123-124 (1993).
- 70) Muir AD, Westcott ND: History of the cultivation and use of flaxseed. In: Flax: The genus *Linum* (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles), *Taylor and Francis Inc.*, New York, 1-21 (2003).
- 71) Anonymous: Nutritional profile of no. 1 Canada Western flaxseed and of yellow flaxseed samples. *Canadian Grain Commission*, Winnipeg, MB. (2001).
- 72) Morris DH: Flax-A health and nutrition primer. *Flax council of Canada*, Manitoba, 13 (2007).
- 73) Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N: Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutr. Cancer.*, 54(2):184-201 (2006).

- 74) 寺尾純二, 芦田均: 機能性ポリフェノール. 化学と生物, 44(10): 688-698 (2006).
- 75) 大澤 俊彦: 酸化ストレス制御を中心とする食品機能因子の化学と作用機構に関する研究. 日本農芸化学会誌, 76(9): 804-813 (2002).
- 76) 井手隆: 食品成分と脂質代謝. オレオサイエンス, 7(2): 51-60 (2007)
- 77) 山下貴稔, 橋本堂史, 金沢和樹: 微粉碎低温圧搾亜麻仁粕の食品原料としての利用と亜麻仁リグナンの抗酸化性. 日本調理科学会誌, 40(2): 74-81 (2007).
- 78) Prasad K: Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *Int. J. Angiol.* 9(4): 220-225 (2000).
- 79) Prasad K: Hypocholesterolemic and antiatherosclerotic effect of flax lignan complex isolated from flaxseed. *Atherosclerosis*, 79(2): 269-275 (2005).
- 80) Singh RB, Niaz MA, Sharma JP, Kumar R, Rastogi V, Moshiri M: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival-4. *Cardiovasc. Drugs. Ther.*, 11(3): 485-491 (1997).
- 81) Simon JA, Fong J, Bernert JT Jr, Browner WS: Serum fatty acids and the risk of stroke. *Stroke*, 26(5): 778-782 (1995).
- 82) J. David Spence, MD, Tanya Thornton, MD, Alister D. Muir, PhD and Neil D. Westcott, PhD: The Effect of Flax Seed Cultivars with Differing Content of α -Linolenic Acid and Lignans on Responses to Mental Stress. *J. Am. Coll. Nutr.*, 22(6): 494-501 (2003).
- 83) Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Juma S, Daggy BP, Stoecker

- BJ, Arjmandi BH: Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(4): 1527-1532 (2002).
- 84) Jenkins DJ, Kendall CW, Vidgen E, Agarwal S, Rao AV, Rosenberg RS, Diamandis EP, Novokmet R, Mehling CC, Perera T, Griffin LC, Cunnane SC: Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69(3): 395-402 (1999).
- 85) Rhee Y, Brunt A: Flaxseed supplementation improved insulin resistance in obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. *Nutr. J.*, 10(44): doi: 10.1186/1475-2891-10-44 (2011).
- 86) Abuelgassim AO: Effect of flax seeds and date palm leaves extracts on serum concentrations of glucose and lipids in alloxan diabetic rats. *Pak. J. Biol. Sci.*, 13(23): 1141-1145 (2010).
- 87) Mohamed DA, Al-Okbi SY, El-Hariri DM, Mousa II: Potential Health Benefits of Bread Supplemented with Defatted Flaxseeds under Dietary Regimen in Normal and Type 2 Diabetic Subjects. *Pol. J. Food. Nutr. Sci.*, 62(2): 103-108 (2012).
- 88) Prasad K: Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed delays the development of type 2 diabetes in Zucker rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 138(1): 32-39 (2001).
- 89) Cunnane SC, Hamadeh MJ, Liede AC, Thompson LU, Wolever TM, Jenkins DJ: Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61(1): 62-68 (1995).

- 90) Barre DE, Mizier-Barre KA, Griscti O, Hafez K: High Dose Flaxseed Oil Supplementation May Affect Fasting Blood Serum Glucose Management in Human Type 2 Diabetics. *J. Oleo. Sci.*, 7(5): 269-273 (2008).
- 91) Taylor CG, Noto AD, Stringer DM, Froese S, Malcolmson L: Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status, and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.*, 29(1): 72-80 (2010).
- 92) 安原一: 薬効と薬物動態の個人差・人種差のポイント. 臨床薬理, 26(2): 625-630 (1995).
- 93) Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT, Chen CH, Motsinger-Reif A, Sagreiya H, Liu N, Wu AH, Gage BF, Jorgensen A, Pirmohamed M, Shin JG, Suarez-Kurtz G, Kimmel SE, Johnson JA, Klein TE, Wagner MJ; International Warfarin Pharmacogenetics Consortium: Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood*, 115(18): 3827-3834 (2010).
- 94) 千葉寛: P450 の遺伝子多型と薬物動態. 薬物動態, 16(5): 461-465 (2001).
- 95) 松本一朗, 阿部啓子: ニュートリゲノミクス. 化学と生物, 45(4): 246-251 (2007).
- 96) 勝間進, 辻本豪三: マイクロアレイ技術を用いた機能ゲノム科学研究. 化学と生物, 41(3): 172-178 (2003).
- 97) 辻本豪三: 網羅的遺伝子発現解析 (DNA チップ, マイクロアレイ) とそのゲノム創薬への応用. 日本薬理学雑誌, 125(3): 153-157 (2005).
- 98) 山本一彦: DNA チップの臨床免疫学への応用-オーバービュー. 日本

- 臨床免疫学会会誌, 28(2): 63-66 (2005).
- 99) 渡辺光博: 胆汁酸による脂質代謝・エネルギー代謝調節. 臨床化学, 36(3): 215-227 (2007).
- 100) 真野博, 清水純, 任良赫, 中谷祥恵, 野口有希, 増田和成, 和田政裕: DNA マイクロアレイ解析を用いた沖縄伝統野菜ニガナ (*Crepidiastrum lanceolatum*) の食品機能性評価, 日本栄養・食糧学会誌, 59(3): 177-183 (2006).
- 101) 清水純, 小澤真理子, 真野博, 岡安重次, 和田政裕: DNA マイクロアレイ解析を用いたコメ糠由来スフィンゴ糖脂質画分の食品機能評価, 日本食品科学工学会誌, 54(12): 546-552 (2007).
- 102) 高橋陽子: ニュートリゲノミクスによる食品の機能性解析. 脂質栄養学, 21(1): 51-57 (2012).
- 103) 織谷幸太, 松井悠子, 栗田 郁子, 木下洋輔, 川上晋平, 柳江高次, 西村栄作, 加藤正俊, 齋政彦, 松本一朗, 阿部啓子, 山本(前田)万里, 亀井優徳: 「べにふうき」緑茶による脂肪蓄積抑制の作用機序. 日本食品科学工学会誌, 56(7): 412-418 (2009).
- 104) 都築毅, 武鹿直樹, 中村祐美子, 仲川清隆, 五十嵐美樹, 宮澤陽夫: 現代日本食と現代米国食を給与したラットの肝臓における網羅的遺伝子発現解析. 日本栄養・食糧学会誌, 61(6): 255-264, (2008).
- 105) Choi EH, Yang HP, Chun HS: Chitooligosaccharide ameliorates diet-induced obesity in mice and affects adipose gene expression involved in adipogenesis and inflammation. *Nutr Res*, 32(3): 218-228 (2012).
- 106) Tachibana N, Matsumoto I, Fukui K, Arai S, Kato H, Abe K, Takamatsu K: Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats. *J. Agric. Food. Chem.*, 53(10): 4253-4257 (2005).

- 107) Matsui N, Ito R, Nishimura E, Yoshikawa M, Kato M, Kamei M, Shibata H, Matsumoto I, Abe K, Hashizume S: Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition*, 21(5): 594-601 (2005).
- 108) 中西朋子, 佐藤陽子, 千葉剛, 横谷馨倫, 狩野照誉, 梅垣敬三: サプリメントに関する基礎知識の認識実態とその知識普及ツールのユーザビリティ. *臨床栄養*, 121(2): 239-246 (2012).
- 109) 田内一民, 松浦成子, 佐藤祐司, 谷崎隆行, 児玉由美子: 健診受診者のサプリメント摂取の現状と問題点. *総合健診*, 30(3): 334-338 (2003).
- 110) 水上久枝: もみじ卸栄養価の再評価. *家政学雑誌*, 10(4): 226-228 (1960).
- 111) 右田節子: ラットの無機鉄腸管吸収に及ぼす食品の影響ならびに分離大豆蛋白の鉄吸収阻害作用について. *日本医科大学雑誌*, 55(6): 555-563 (1988).

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

1. 緒言

紅茶は茶の木 (*Camellia sinensis*) を原料とし、茶葉の酸化酵素や加水分解酵素により茶葉成分に生化学的変化を生じさせることで作られる。この生化学的変化を発酵と呼び、この発酵が起こる事で緑色の茶葉が褐色に変化する¹⁾。紅茶のなかでも、ダージリン、ウバ、キーマンは世界3大銘茶と呼ばれており、それにアッサムを加えた4種が日本では多く流通している。

近年、糖尿病の予防・進展防止には食後の過血糖の是正が有用であることが臨床的に示されており²⁾、 α -アミラーゼや α -グルコシダーゼ（マルターゼおよびスクラーゼ）等の糖質消化酵素の働きを抑制する事により、糖質の消化吸収を抑制し、食後血糖値の上昇を穏やかにするという考え方が重要視されるようになってきている³⁻⁶⁾。これまでに、グアバ葉³⁾、マテ葉⁴⁾、ウコギ葉⁷⁾、桑葉⁸⁾等の抽出物や抽出液について、アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性の抑制作用が報告されており、紅茶についても *in vitro* 系において、アミラーゼ活性抑制作用⁹⁻¹¹⁾や、 α -グルコシダーゼ抑制作用を有することが報告^{12,13)}がされており、作用成分に関する検証等、詳細な検討が必要とされている。

本章では、まず紅茶の産地や生産者による違いを調べる目的で *in vitro* において紅茶24種の α -グルコシダーゼ抑制作用を比較した。次に、HPLC法を用いて紅茶に含まれるテアフラビン量と α -グルコシダーゼ活性抑制作用との関係を検証し、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用に最も大きく関与する作用成分について検討を行った。さらに、紅茶の抽出条件の違いが α -グルコシダーゼ抑制作用に及ぼす影響についても検討した。

2. 方法

2-1 酵素の調整

マルターゼおよびスクラーゼの調製は、出口ら³⁾の方法に準じて行った。すなわち、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て用いた。

2-2 24 種紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の比較

ダージリン (インド)、ウバ (スリランカ)、アッサム (インド)、キーマン (中国) 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、田中ら⁹⁾の方法を参考に、茶葉 3.0 g に沸騰させた蒸留水 200 mL 加え室温環境下にて 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) にて自然濾過したものを各種紅茶試料として実験に用いた。

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 C II 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: 対照生成時グルコース量

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。また、同様の試験を6回行い、その平均値と標準誤差を算出した。

2-3 24種紅茶の総ポリフェノール量の測定

総ポリフェノール量を酒石酸鉄比色法¹⁴⁾により測定した。酒石酸鉄試薬は硫酸(Ⅱ)鉄七水和物(和光純薬工業株式会社) 100 mgと酒石酸カリウムナトリウム(和光純薬工業株式会社) 500 mgを蒸留水に溶解し、全量が100 mLになるように調製した。各種紅茶試料 50 μLに酒石酸鉄試薬 50 μL、次いで M/15 リン酸緩衝液 150 μLを加え混合し、540 nmの波長にて吸光度を測定した。対照には蒸留水を用いた。

茶のカテキン類は、(-)-エピガロカテキン、(+)-カテキン、(-)-エピカテキン、(-)-エピガロカテキンガレートの4つに大きく分けられるが、本試験では、最もよく用いられている(+)-カテキン(和光純薬工業株式会社)を標準試薬として用い、濃度の異なる7点で検量線を作成し、各試料の総ポリフェノール量を算出した。

2-4 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-モノガレート、テアフラビン-3'-モノガレート、テアフラビ

ン-3,3'-ジガレート)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 (いずれも東ソー株式会社) を用い、紫外領域の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ツルメンツ) 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℃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。

2-5 紅茶の抽出温度の検討

蒸留水 100 mL に対してウバの茶葉を 1.5 g 使用し、冷水 (3℃)、室温水 (19℃)、熱水 (沸騰させた蒸留水: 80℃) によって抽出後、濾過時間を一定にして濾紙 (No.2、110 mm、東洋濾紙株式会社) で自然濾過したものを紅茶試料として用いた。なお、抽出の際、冷蔵庫やホットプレートを用いて、30 分間水温を一定に保った。遊離型テアフラビン量は前述と同様の条件で HPLC 法により求めた。また、マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率も前述と同様の方法で算出した。

2-6 紅茶の茶葉量の検討

沸騰させた蒸留水 100mL に対してウバの茶葉を 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 g 使用し、80℃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) で自然濾過したものを紅茶試料として用いた。遊離型

テアフラビン量の定量は前述と同様の条件で HPLC 法により行った。また、マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率も前述と同様の方法で算出した。

2-7 紅茶の抽出時間の検討

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、10 秒、1 分、3 分、30 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) で自然濾過したものを紅茶試料として用いた。なお、30 分の抽出ではホットプレートを用いて、水温を一定に保った。遊離型テアフラビン量は前述と同様の条件で HPLC 法により行った。また、マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率も前述と同様の方法で算出した。

2-8 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。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ポリフェノール類との相関は 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。

3. 結果

3-1 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図 2-1 に示した。マルターゼ活性抑制率が高い順に並べたところ、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 社すべてにおい

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。

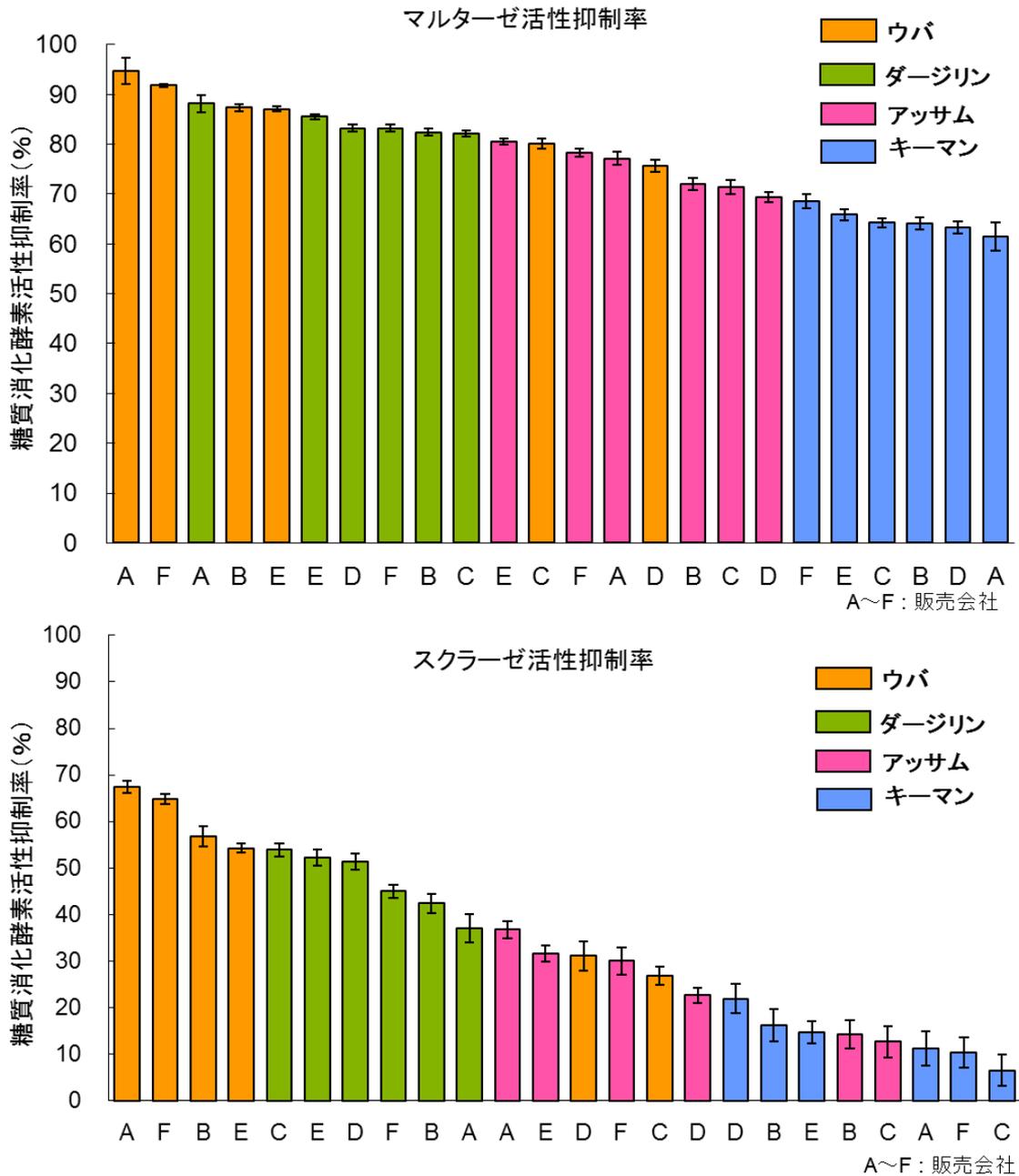


図 2-1. 24 種紅茶のマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率

ウバ、ダーズリン、アッサム、キーマンを 6 社(A~F)から購入した 24 種の紅茶の *in vitro* におけるマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率を示す。

糖質消化酵素活性抑制率は、紅茶無添加の場合の消化率を 100%として算出した。

平均値 ± 標準誤差 (n=6).

3-2 α -グルコシダーゼ活性抑制作用の作用成分の検討

酒石酸鉄比色法により測定した 24 種の紅茶の総ポリフェノール量とマルターゼ活性抑制率およびスクラーゼ活性抑制率との関係を図 2-2 に示した。総ポリフェノール量はマルターゼ活性抑制率 ($r = 0.893$; $p < 0.001$) およびスクラーゼ活性抑制率 ($r = 0.882$; $p < 0.001$) との間に有意な正の相関を示した。この結果から、紅茶のマルターゼ活性抑制作用およびスクラーゼ活性抑制作用にポリフェノールが関与していることが示唆された。

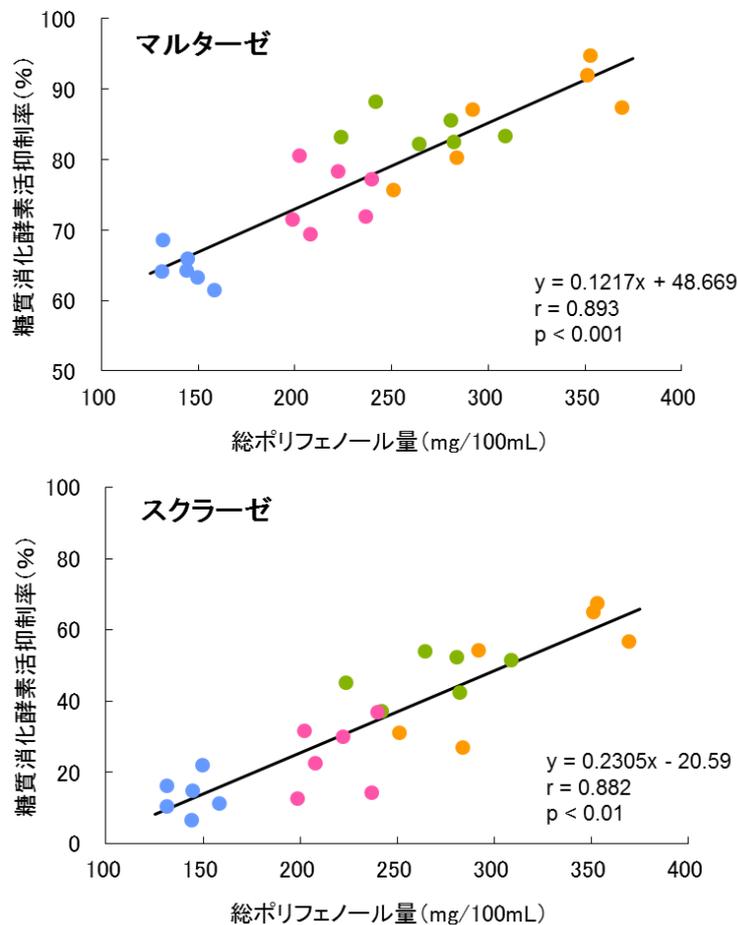


図 2-2. 24 種紅茶の糖質消化酵素活性抑制率と総ポリフェノール量との関係

ウバ、ダージリン、アッサム、キーマンを 6 社 (A~F) から購入した 24 種の紅茶の *in vitro* におけるマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率と総ポリフェノール量との関係を示す。

●: ウバ, ●: ダージリン, ●: アッサム, ●: キーマン.

さらに関与成分を絞りこむため、紅茶に特有のポリフェノールであるテアフラビン類の測定を行った。24種の紅茶について、HPLC法により4種のテアフラビン類のピーク面積を算出し、表2-1に示した。最も含有量が多いのは遊離型テアフラビンで、ピーク面積の平均が 53030 ± 6930 であり、テアフラビン-3-モノガレート 37240 ± 4450 、テアフラビン-3,3'-ジガレート 35290 ± 4700 、テアフラビン-3'-モノガレート 19520 ± 2550 の順に高い値を示した。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、遊離型テアフラビンとの相関係数が最も高く、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 ($p < 0.01$) との間に有意な正の相関を示した。テアフラビン-3-モノガレート、テアフラビン-3'-モノガレート、テアフラビン-3,3'-ジガレートとマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率との間には有意な相関は認められなかった。

表 2-1. 24 種紅茶におけるテアフラビン類のピーク面積と糖質消化酵素活性抑制率との関係

テアフラビン類	ピーク面積	相関係数	
		マルターゼ 活性抑制率	スクラーゼ 活性抑制率
遊離型テアフラビン	53,030 ± 6,930	0.656***	0.616**
テアフラビン-3-モノガレート	37,240 ± 4,450	0.149	0.006
テアフラビン-3'-モノガレート	19,520 ± 2,550	0.329	0.194
テアフラビン-3,3'-ジガレート	35,290 ± 4,700	-0.038	-0.235
合計	145,080 ± 16,440	—	—

平均値 ± 標準誤差.

相関係数はピアソンによる相関係数を示す.

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

そこで、遊離型テアフラビンの標品を用いて検量線を作成し、24種紅茶の遊離型テアフラビン量を算出した。算出した遊離型テアフラビン量と糖質消化酵素活性抑制作用の関係を図 2-3 に示した。

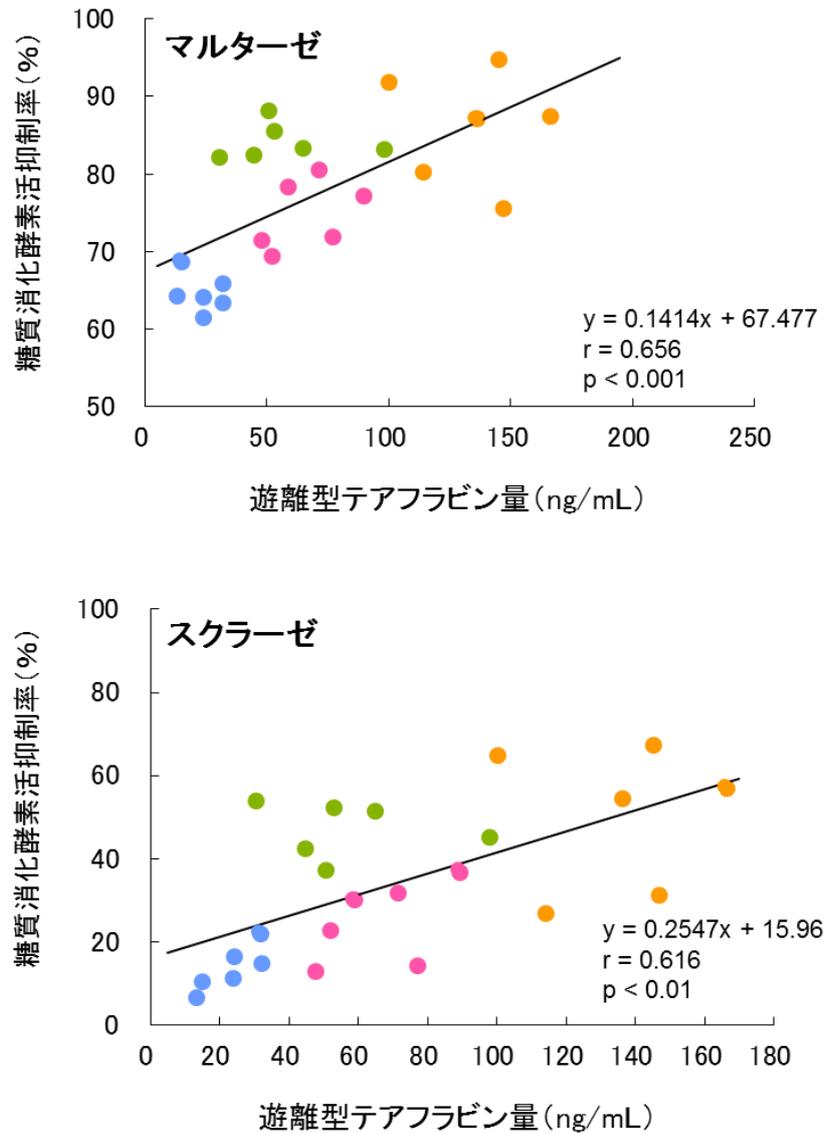


図 2-3. 24 種紅茶の糖質消化酵素活性抑制率と遊離型テアフラビン量との関係

ウバ、ダージリン、アッサム、キーマンを 6 社(A~F)から購入した 24 種の紅茶の *in vitro* におけるマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率と遊離型テアフラビン量との関係を示す。

●: ウバ, ●: ダージリン, ●: アッサム, ●: キーマン.

3-3 紅茶の抽出温度の検討

冷水（3℃）、室温水（19℃）、熱水（80℃）を用い 30 分間抽出したときの遊離型テアフラビン濃度を図 2-4 に示した。遊離型テアフラビン濃度は熱水で抽出したときに最も高く 147.3 ng/mL であった。次いで室温 64.4 ng/mL、冷水 15.6 ng/mL となり、抽出温度が高いほど、遊離型テアフラビンが高濃度で抽出されることが示された。

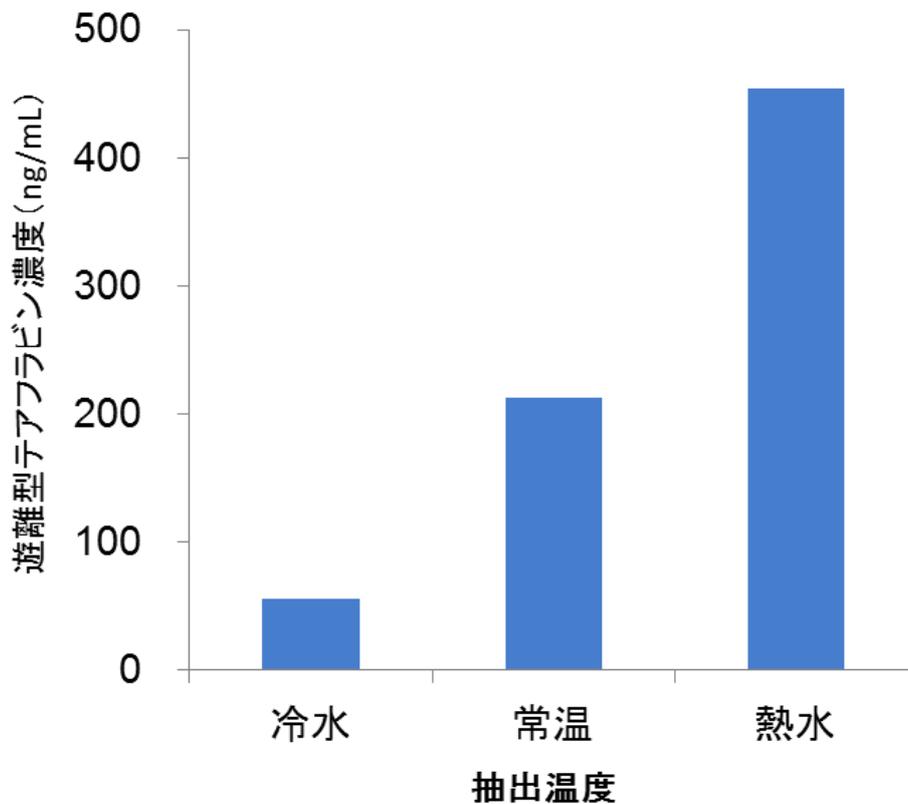


図 2-4. 抽出温度の違いが遊離型テアフラビン量に及ぼす影響

また、この抽出条件でのマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率を図 2-5 に示した。マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率は熱水で抽出したときに最も高く 96.8±1.2%、98.0±1.3%であった。次いで室温 90.6±0.8%、70.0±3.6%、冷水 75.9±1.1%、30.7±3.3%となり、抽出温度が高いほど α -グルコシダーゼ活性抑制率が高くなることが示された。

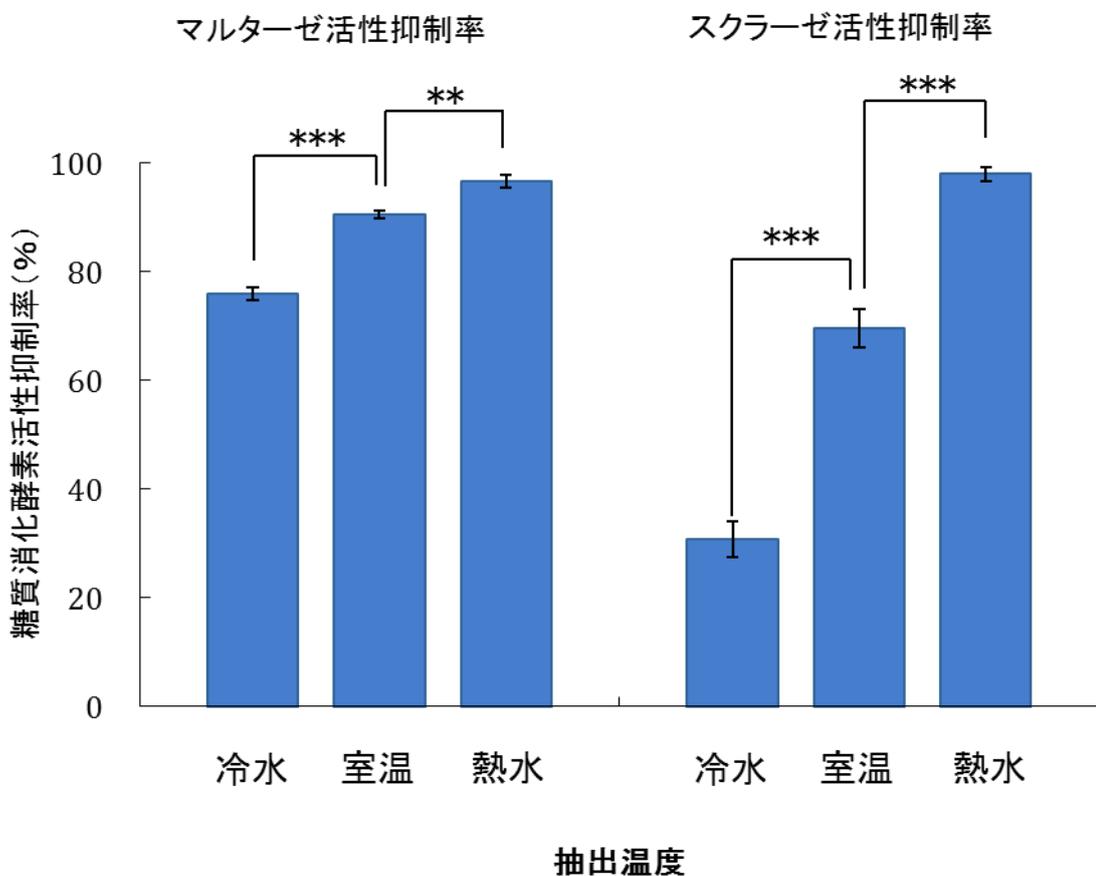


図 2-5. 抽出温度の違いがマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率に及ぼす影響

平均値±標準誤差(n=6).

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$.

3-4 紅茶の茶葉量の検討

熱水（80℃）100 mL に対して茶葉を 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 w/w% になるように使用し、3 分間抽出したときの遊離型テアフラビン濃度を図 2-6 に示した。遊離型テアフラビン濃度は 0.5 w/w% では 29.6 ng/mL、1.0 w/w% では 142.2 ng/mL、2.0 w/w% では 264.6 ng/mL、4.0 w/w% では 610.1 ng/mL となり、茶葉濃度に依存して、順次遊離型テアフラビン濃度が上昇した。しかし、5.0 w/w% では遊離型テアフラビン濃度が 574.7 ng/mL となり、4.0 w/w% で抽出したときと同程度であった。

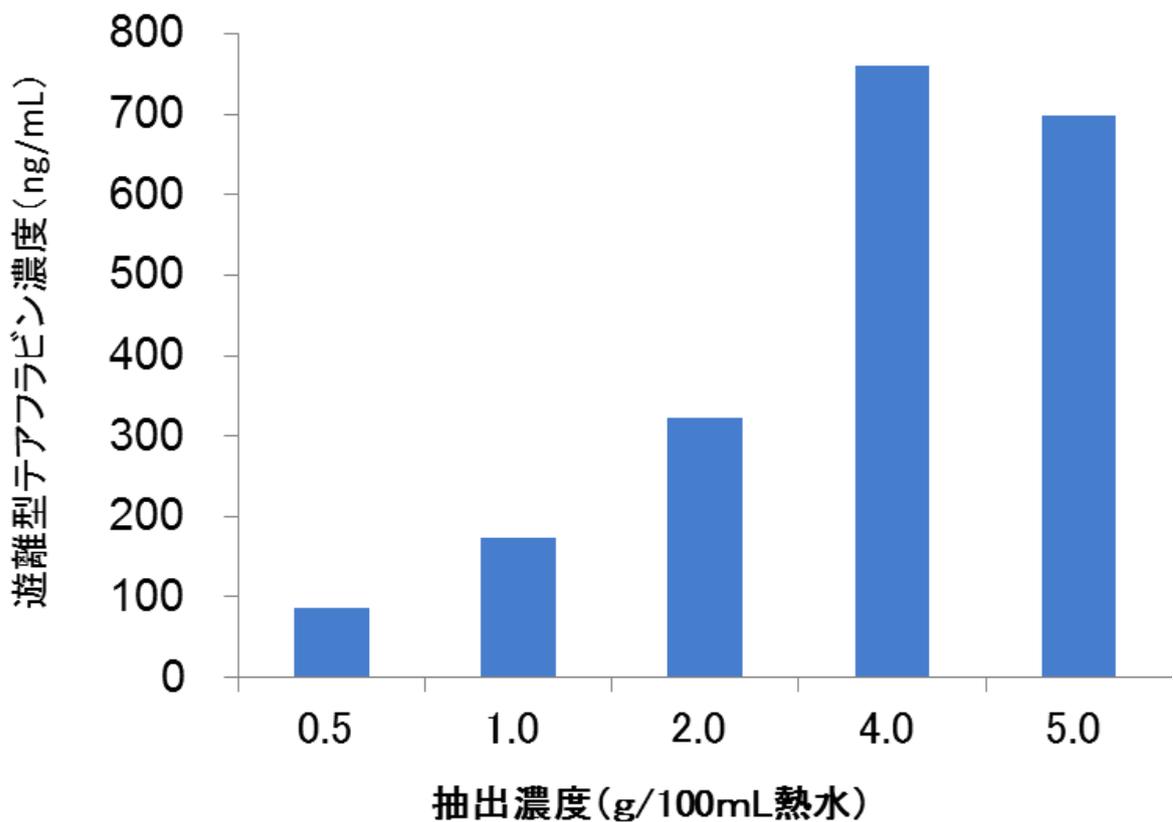


図 2-6. 抽出濃度の違いが遊離型テアフラビン量に及ぼす影響

また、この抽出条件でのマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率を図 2-7 に示した。マルターゼ活性抑制率は 0.5 w/w% では $66.5 \pm 1.3\%$ 、1.0 w/w% では $76.8 \pm 1.0\%$ 、2.0 w/w% では $85.2 \pm 0.6\%$ 、4.0 w/w% では $96.9 \pm 0.3\%$ となり、茶葉濃度に依存して、順次活性抑制率が上昇した。しかし、5.0 w/w% では $97.7 \pm 0.3\%$ となり、4.0 w/w% で抽出したときと同程度であった。スクラーゼ活性抑制率は 0.5 w/w% では $30.3 \pm 2.1\%$ 、1.0 w/w% では $58.3 \pm 2.2\%$ 、2.0 w/w% では $91.1 \pm 0.3\%$ となり、茶葉濃度に依存して、順次活性抑制率が上昇した。しかし、4.0 w/w% では $99.2 \pm 0.2\%$ となり、2.0 w/w% で抽出したときと有意差がなく、5.0 w/w% では $99.7 \pm 0.1\%$ となり、4.0 w/w% で抽出したときと同程度であった。

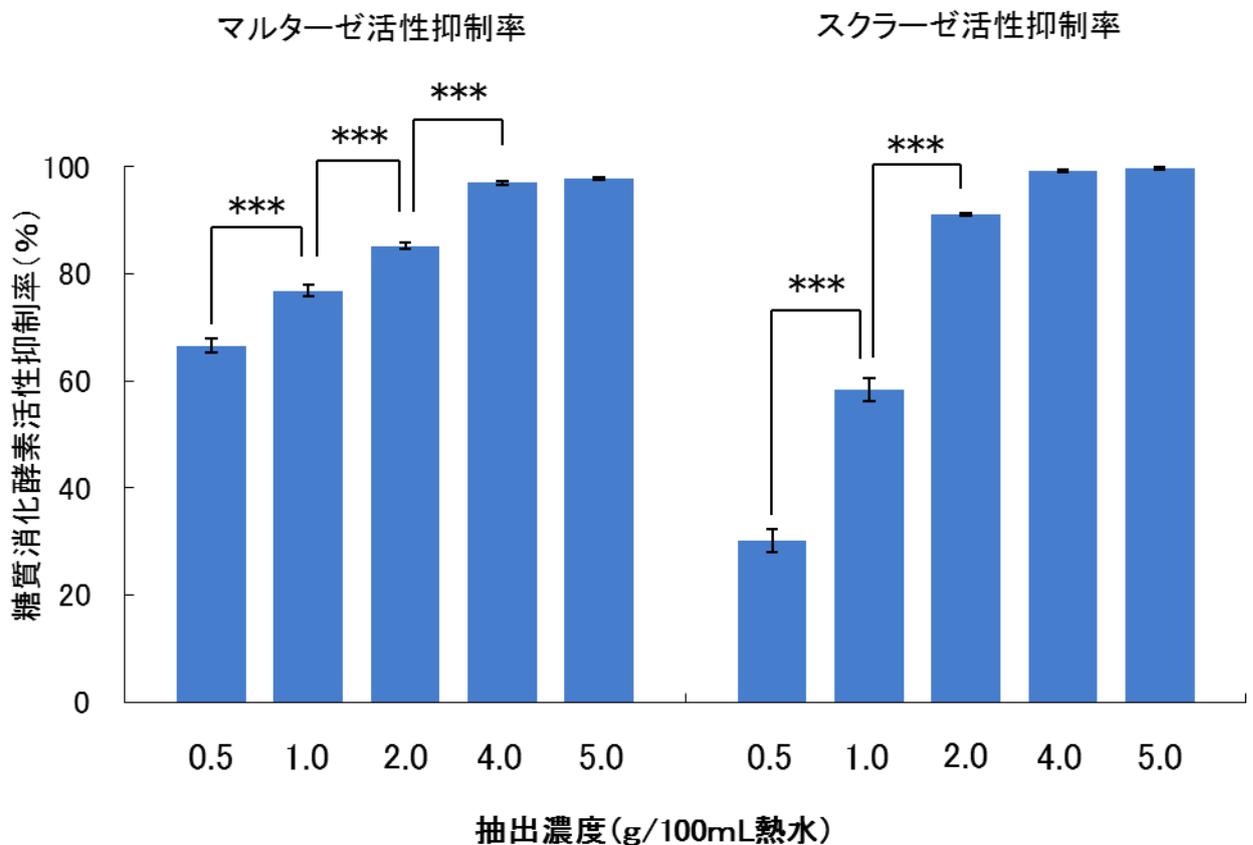


図 2-7. 抽出濃度の違いがマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率に及ぼす影響

平均値 ± 標準誤差 (n=6).

***: $p < 0.001$.

3-5 紅茶の抽出時間の検討

熱水 100 mL (80℃) に対して茶葉 4.0 g を使用し、10 秒、1 分、3 分、30 分間抽出したときの遊離型テアフラビン濃度を図 2-8 に示した。遊離型テアフラビン濃度は、抽出時間 10 秒では 36.6 ng/mL、1 分では 60.0 ng/mL、3 分では 92.8 ng/mL となり、抽出時間が長いほど遊離型テアフラビンが高濃度で抽出されることが示された。しかし、30 分間抽出したときの遊離型テアフラビン濃度は 84.8 ng/mL であり、3 分間抽出したときと同程度であった。

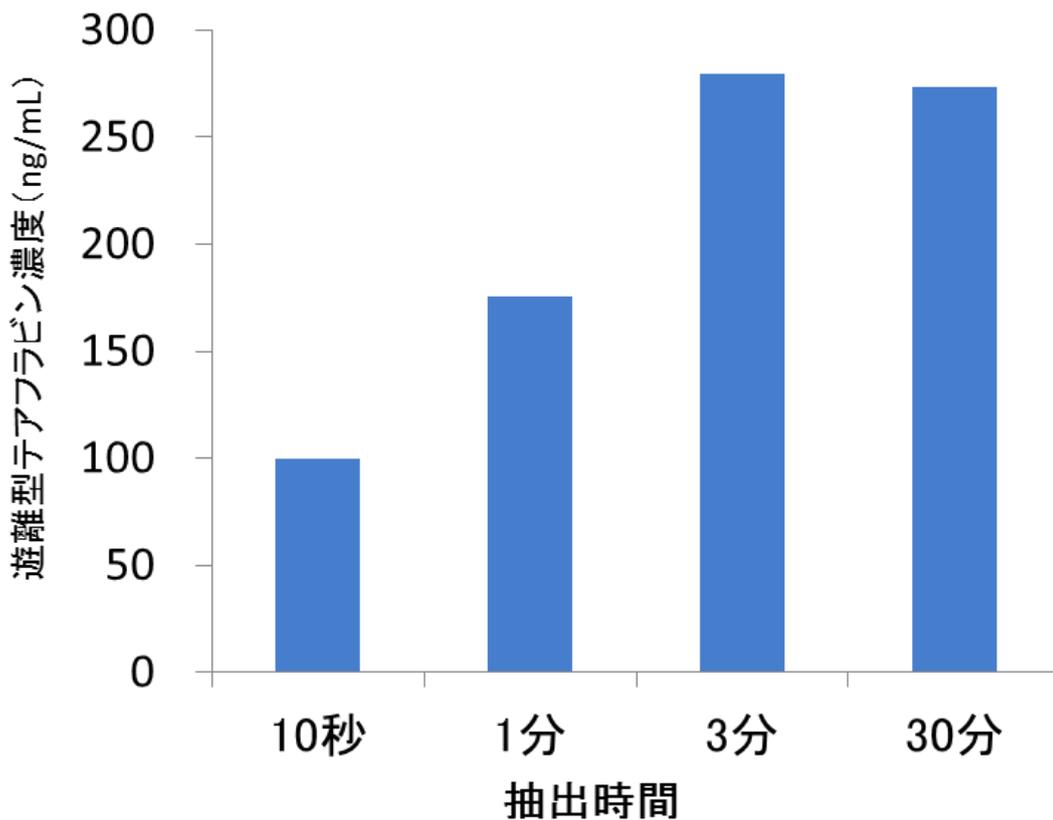


図 2-8. 抽出時間の違いが遊離型テアフラビン量に及ぼす影響

また、この抽出条件でのマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率を図 2-9 に示した。マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率はそれぞれ抽出時間 10 秒では $82.8 \pm 0.7\%$ 、 $73.3 \pm 1.0\%$ 、1 分では $90.6 \pm 0.4\%$ 、 $94.5 \pm 0.2\%$ 、3 分では $96.9 \pm 0.3\%$ 、 $99.2 \pm 0.2\%$ となり、抽出時間が長いほどマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率が高くなることが示された。しかし、30 分間抽出したときのマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率は $95.6 \pm 0.2\%$ 、 $98.6 \pm 0.1\%$ であり、3 分間抽出したときと同程度であった。

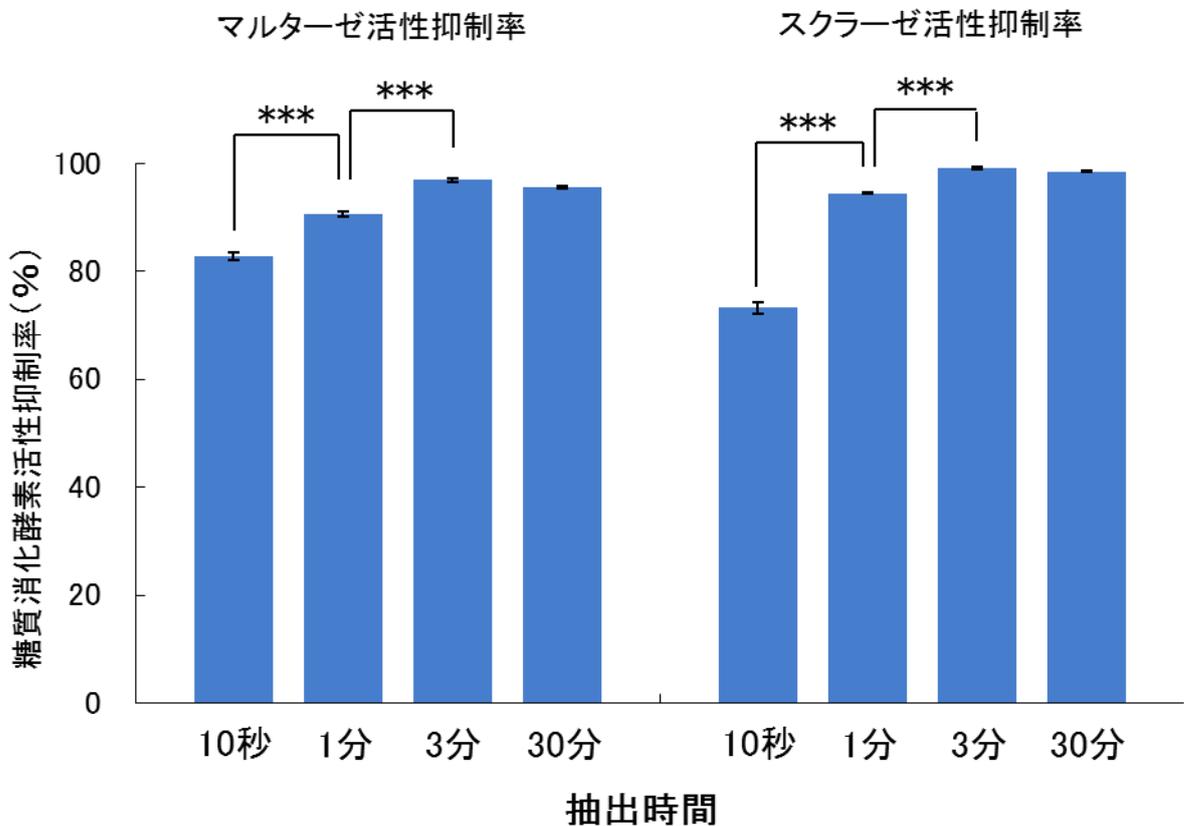


図 2-9. 抽出時間の違いがマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率に及ぼす影響

平均値 ± 標準誤差 (n=6).

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$

4. 考察

in vitro での試験において、ダーズリン、ウバ、アッサム、キーマンの 4 種を 6 社から購入し、合計 24 種紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用を比較した結果、ウバが最も高い α -グルコシダーゼ活性抑制作用を示した。従って、紅茶の品種に加えて生産環境等の違いにより α -グルコシダーゼ活性抑制作用に差が見られる事が示唆された。

また、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用と総ポリフェノール量との間に相関が認められ、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の作用成分としてポリフェノール類が関与している可能性が考えられた。紅茶には様々なポリフェノールが含まれているため、ポリフェノール類のうちどの成分が主に紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用に関わっているのかを検討する必要がある。そこで、紅茶に特有のポリフェノールであるテアフラビン濃度を測定した。テアフラビン類には遊離型テアフラビン、テアフラビン-3-モノガレート、テアフラビン-3'-モノガレート、テアフラビン-3,3'-ジガレートの 4 種が存在する。ポリフェノールの測定法として、近年では HPLC 法と質量分析法 (MS) を組み合わせた LC/MS 法も用いられるようになってきているが、本研究では標的物質の標準品が市販されていたことから、HPLC 法により測定を行った。紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の関与成分を検討した結果、遊離型テアフラビン濃度とマルターゼ活性抑制率およびスクラーゼ活性抑制率との間に有意な正の相関が認められた。しかし、他のテアフラビン誘導体であるテアフラビン-3-モノガレート、テアフラビン-3'-モノガレート、テアフラビン-3,3'-ジガレートとマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率との間には有意な相関は認められなかった。この結果から、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用には主に遊離型テアフラビンが関与していることが示唆された。Hara ら¹¹⁾は、4 種のテアフラ

ビン類のうち、テアフラビン-3,3'-ジガレートが最も高い α -アミラーゼ活性抑制作用を示したと報告している。また、Hondaら¹³⁾は、これら4種のテアフラビン類のうち、テアフラビン-3,3'-ジガレートが最も高い α -グルコシダーゼ活性抑制作用を示したと報告している。そのため、 α -グルコシダーゼ活性抑制作用に最も強く関与しているのは、テアフラビン-3,3'-ジガレートであると予想されたが、本研究では、遊離型テアフラビンが紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用に最も強く関与していることが示された。その理由として、紅茶中のテアフラビン類の含有量が関係していると考えられる。HPLC法において紅茶24種のテアフラビン類を測定した結果、遊離型テアフラビンの含有量が他のテアフラビン誘導体に比べて明らかに多い傾向がみられた。 α -グルコシダーゼ活性抑制作用が最も強いとされているテアフラビン-3,3'-ジガレートは、遊離型テアフラビンと比較して10%ほど含有量が少ないため、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の主たる作用成分とはならなかった可能性が考えられる。しかし、テアフラビン-3,3'-ジガレートの含有量が遊離型テアフラビン含有量と比較して劇的に少ないわけではないため、テアフラビン-3,3'-ジガレートの効果がもう少し強く見られても良いと思われる。従って、今回測定したテアフラビン類以外の有効成分が遊離型テアフラビン量に比例して存在している可能性も考慮する必要があり、今後検討する必要があると考えられた。

これらの結果から、関与成分の検討には、成分単体での α -グルコシダーゼ活性抑制作用の強さだけでなく、食品の中のその成分の含有量も考慮して検討する必要があると考えられた。また、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の主たる関与成分の1つとして、遊離型テアフラビンが強く関与していることが示唆された。

抽出温度について検討する目的で、紅茶を冷水(3℃)、室温(19℃)、熱

水（80℃）で、温度を保って 30 分間抽出し、抽出された紅茶の遊離型テアフラビン濃度、マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率を測定した。その結果、抽出温度が高いほど遊離型テアフラビンが高濃度で抽出され、マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率が高くなることが示された。次に紅茶の抽出濃度および抽出時間について検討した。その結果、茶葉の抽出濃度および抽出時間に依存して遊離型テアフラビン濃度は高い値を示し、マルターゼおよびスクラーゼ活性抑制率も高くなったが、濃度 4.0 w/w% 以上、抽出時間 3 分以上では差が見られなかった。同様に田中ら¹⁰⁾は、紅茶の α -アミラーゼ活性抑制作用は抽出時間 3 分と 2 時間で差がみられなかったことを報告している。従って、茶葉濃度 4.0 w/w% で 3 分間の抽出により、 α -グルコシダーゼ活性抑制に関与している成分が十分に抽出されると考えられた。この抽出濃度は通常飲用する場合よりもおよそ 2 倍濃い条件であるが少量であれば飲用可能な濃度であると考えられる。

以上の結果より、紅茶の種類によりマルターゼおよびスクラーゼ活性抑制作用に違いが見られ、その主な作用成分が遊離型テアフラビンであることが示唆された。また、紅茶の成分は茶葉の抽出濃度および抽出時間の増加に伴って上昇を示したが、熱水 100mL に対し茶葉 4.0g 以上、抽出時間 3 分間以上ではほぼ飽和となることが示された。

本章の結果より、A 社のウバに、より高い α -グルコシダーゼ活性抑制作用が期待できると判断し、以下の実験には A 社のウバを使用することとした。また、紅茶試料 100mL あたり茶葉を 4.0g 使用し、3 分間熱水で抽出することで、 α -グルコシダーゼ活性抑制成分がより効率的に抽出されると判断し、この方法で抽出した紅茶を III 章の動物試験に用いることとした。

引用文献

- 1) 佐野満昭, 斉藤由美: 紅茶の保険機能と文化. アイ・ケイ コーポレーション, 東京, 第1版: 58-75 (2008).
- 2) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M: Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet*, 359: 2072-2077 (2002).
- 3) 出口ヨリ子, 長田邦子, 内田和美, 木村広子, 芳川雅樹, 工藤辰幸, 保井久子, 綿貫雅章: グァバ葉熱水抽出物の 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, 72: 923-931 (1998).
- 4) 寺本哲子, 沖直子, 草野崇一: マテ (*Ilex paraguariensis*) 葉抽出物の糖質分解酵素阻害作用およびラットにおける糖負荷後の血糖上昇抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌, 58(1): 17-21 (2005).
- 5) 田中忍, 韓立坤, 鄭毅男, 奥田拓道: ラットにおける食後の血糖上昇に及ぼすイチョウ葉由来フラボノイドフラクションの抑制作用. 薬学雑誌, 124: 605-611 (2004).
- 6) Tormo MA, Gil-Exojo I, Romero TA, Campillo JE: Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *Br. J. Nutr.*, 92:785-790 (2004).
- 7) 本(田)三保子, 田村朝子, 山田則子: ヒメウコギ葉茶のラットおよびヒトにおける食後血糖上昇抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌, 61(3): 111-117 (2008).
- 8) 阿武尚彦, 田村幸一, 大野弘美, 富裕孝: 桑(*Morus alba* L.)葉エキスのマルターゼ, スクララーゼおよび α -アミラーゼ阻害作用について. 日本食品保蔵学会誌, 30(5): 223-229 (2004).

- 9) 田中伸子, 岡村浩: 紅茶中の唾液 α -アミラーゼ阻害物質(ポリフェノール)に関する検討. 学苑, 624: 26-30 (1991).
- 10) 田中伸子, 岡村浩: 唾液中 α -アミラーゼ活性におよぼす紅茶タンニン(ポリフェノール)の影響. 日本家政学会誌, 40: 587-592 (1989).
- 11) Hara Y, Honda M: The Inhibition of α -amylase by Tea Polyphenols. *Agric. Biol. Chem.*, 54(8): 1939-1945 (1990).
- 12) Toshiro Matsui, Takashi Tanaka, Satoshi Tamura, Asami Toshima, Kei Tamaya, Yuji Miyata, Kazunari Tanaka and Kiyoshi Matsumoto: α -Glucosidase inhibitory profile catechins and theaflavins. *J. Agric. Food.Chem.*, 55: 99-105 (2007) .
- 13) Honda M, Hara Y: Inhibition of rat Small Intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(1): 123-124 (1993).
- 14) Turkmen N, Sari F, Velioglu YS: Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food. Chem.*, 99(4): 835-841 (2006).

第三章 正常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 の検討

1. 緒言

糖尿病の予防、合併症の進展防止には食後の高血糖の是正が有用であることが、臨床的に示されている¹⁾。このため、 α -アミラーゼや α -グルコシダーゼ等の糖質消化酵素の働きを抑制する事により、糖質の消化吸収を抑制し、食後血糖値の上昇を抑制するという考え方が支持されるようになった²⁻⁵⁾。II章において紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用が確認され、紅茶摂取による食後血糖上昇抑制作用が期待されるが、動物実験やヒトの臨床試験による検討が未だ不十分である。また、紅茶は日常生活において食事と一緒に摂取する場合や食後に摂取する場合があります、紅茶の α -グルコシダーゼ抑制作用がより効果的に発現できる摂取タイミングを把握することは実用的な利用を考える上で重要である。しかし、紅茶の摂取タイミングについては、これまでほとんど検討が行われていない。また、紅茶摂取が糖代謝に及ぼす影響についてヒトを対象とした報告は不十分である。

そこで本章では正常マウスおよび健常女性を対象とした紅茶の摂取試験を行った。まず、正常マウスであるICR雄マウスにおける糖負荷試験により、紅茶が可溶性デンプン、マルトースおよびスクロースを負荷した際の血糖上昇に及ぼす影響をそれぞれ検討した。次に、糖質に対する紅茶の摂取タイミングを検討する目的で、正常マウスにおける糖負荷試験を行った。さらに、ヒトを対象とした紅茶の食後血糖上昇抑制作用を検証する目的で、健常女性を対象にパンと紅茶を用いた摂取試験を行った。

2. 方法

2-1 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 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 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。

2-2 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（ $n=5$ ）。出口ら²⁾の方法に準じ、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。

2-3 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（スリランカ）の茶葉を 4.0 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。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 時間絶食させた後、6 群に分け（各群 n=6）、出口ら²⁾の方法に準じて紅茶 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。

2-4 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（スリランカ）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。その際、飲料のみまたはパンのみを先に摂取するのではなく、飲料をパンと同時に摂取するように指示した。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。これは、糖尿病食事療法のための食品交換標表 1 の約 4 単位分に相当し、朝食主食 1 回分を想定して設定した。パン摂取前、摂取後 30 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。
なお、パンの作製は日本製粉株式会社に依頼した。

2-5 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(動物試験:承認番号第709号、ヒト試験:承認番号第714号)。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。ヒトを対象とする試験では、対象者に試験プロトコ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。また、プロトコルを厳守できなかった被験者のデータは統計データから除外した。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。

2-6 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。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。

3. 結果

3-1 紅茶の投与が各種糖負荷後の血糖値に及ぼす影響

マウスに紅茶 0.6 mL を経口投与し、30 分後に可溶性デンプン、マルトース、スクロースを投与した際の血糖値の変化を図 3-1 に示した。デンプン投与の場合、30 分後の血糖値が水群では 281.4 ± 18.6 mg/dL であるのに対し、紅茶群では 226.6 ± 16.3 mg/dL となり、紅茶群は水群に比べて有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。マルトース投与の場合、血糖値の変化は、紅茶群が投与後 30 分以降水群に比べ低値を示す傾向が見られ、120 分後では水群が 175.5 ± 21.9 mg/dL であるのに対し、紅茶群は 112.4 ± 12.2 mg/dL となり、有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。スクロース投与の場合では、投与後 15 分、30 分値において水群がそれぞれ 174.8 ± 17.5 mg/dL、 224.2 ± 29.1 mg/dL であったのに対し、紅茶群は 130.6 ± 9.8 mg/dL、 145.8 ± 11.0 mg/dL となり、スクロース投与の場合においても紅茶群は水群に比べ、有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

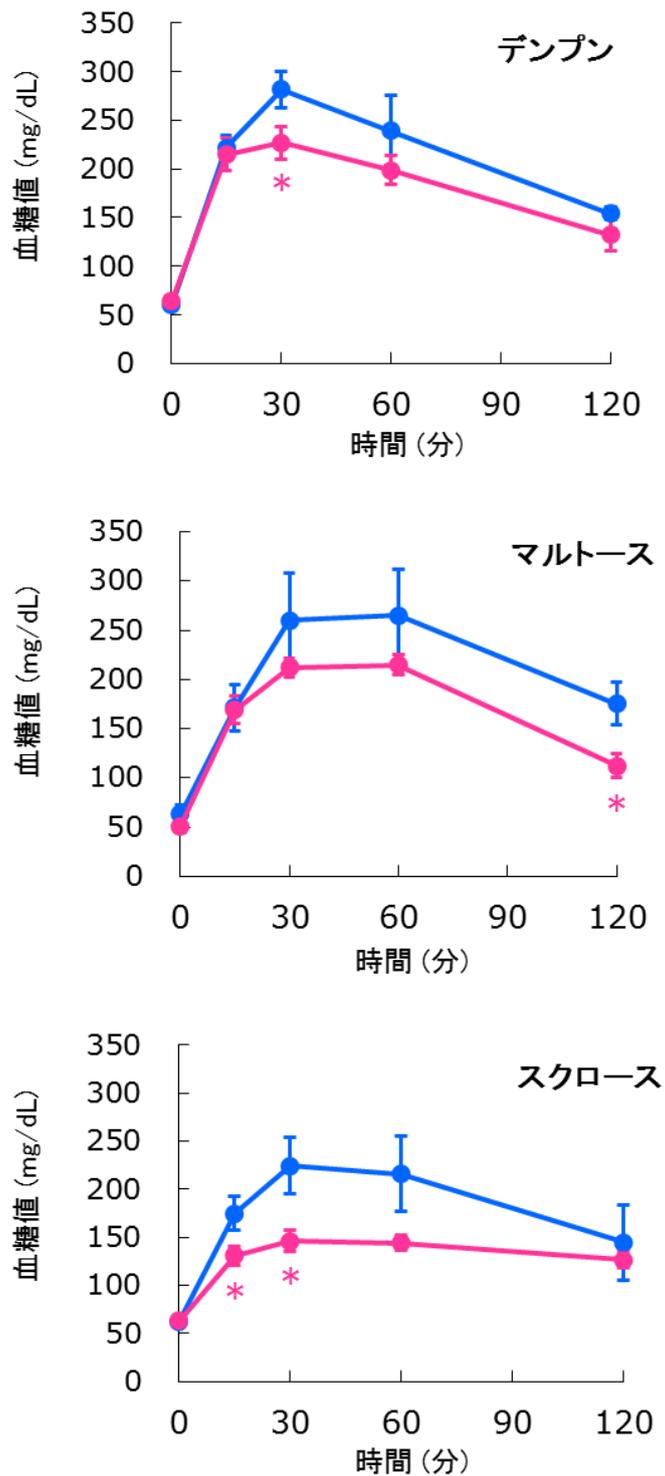


図 3-1. ICR マウスにおけるデンプン、マルトースおよびスクロース投与後の血糖値の変化

平均値±標準誤差.

●: 水群 (n=5), ●: 紅茶群 (n=5).

*: $p < 0.05$ (水群との差を示す).

3-2 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

マウスに水または紅茶をデンプン負荷の 30 分前、同時、15 分後に投与したときの血糖値の変化を表 3-1 に示した。食後血糖値は、すべての群においてデンプン負荷 30 分後に最大値を示した。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 220 ± 13 mg/dL で、水群 267 ± 16 mg/dL 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 200 ± 9 mg/dL で、水群 247 ± 17 mg/dL 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、紅茶群がそれぞれ 240 ± 17 mg/dL、 199 ± 6 mg/dL で、水群の 292 ± 15 mg/dL、 246 ± 19 mg/dL と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

表 3-1. ICR マウスにおけるデンプン負荷試験後の血糖値の変化

投与 タイミング	試料	血糖値(mg/dL)				
		0分	15分	30分	60分	120分
食前	水	55.8 ± 5.1	212.5 ± 13.5	267.0 ± 15.6	232.4 ± 34.4	141.7 ± 13.1
	紅茶	67.0 ± 5.6	227.5 ± 18.7	$220.3 \pm 13.4^*$	194.4 ± 13.6	130.6 ± 14.7
同時	水	59.7 ± 5.4	188.0 ± 18.2	247.2 ± 17.0	187.0 ± 14.5	115.3 ± 6.9
	紅茶	62.7 ± 5.5	151.2 ± 9.7	$200.3 \pm 9.2^{**}$	177.3 ± 11.0	107.1 ± 10.3
食後	水	71.7 ± 6.5	205.3 ± 16.4	291.5 ± 14.5	246.2 ± 18.9	133.2 ± 17.3
	紅茶	63.2 ± 6.7	193.7 ± 13.5	$240.0 \pm 17.1^*$	$198.5 \pm 5.7^*$	123.2 ± 8.3

平均値 ± 標準誤差 (n=6).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (コントロール群との差を示す).

このときの血糖値曲線下面積を図 3-2 に示した。デンプン負荷の 30 分前投与の血糖値曲線下面積において、紅茶群が 13760 ± 880 mg/dL \cdot 120min で、水群 17410 ± 1650 mg/dL \cdot 120min に比べ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血糖値曲線下面積は紅茶群が 11060 ± 410 mg/dL \cdot 120min で、水群の 13970 ± 310 mg/dL \cdot 120min に比べ有意に低値を示した ($p < 0.001$)。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血糖値曲線下面積は、紅茶群が 13830 ± 870 mg/dL \cdot 120min で、水群 16650 ± 1530 mg/dL \cdot 120min と比較して低値を示す傾向がみられた。どの投与タイミングにおいても、血糖値曲線下面積は紅茶群が水群に比べ低値を示したが、紅茶をデンプンと同時に投与したときに最も低値を示す傾向がみられた。そのため、ヒトを対象とした摂取試験では試験食と紅茶を同時に摂取させることとした。

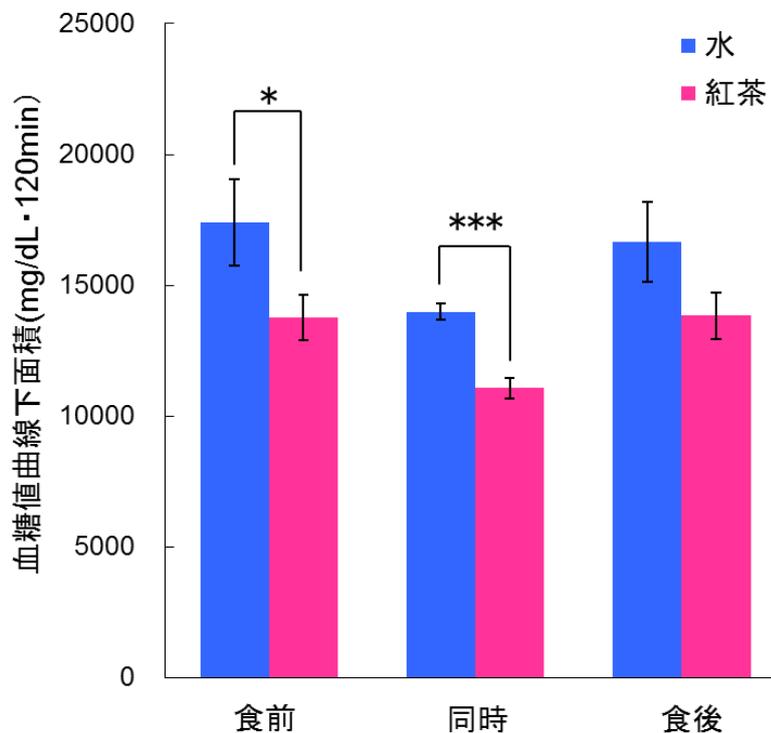


図 3-2. ICR マウスにおけるデンプン負荷後の血糖値曲線下面積

デンプン投与前からデンプン投与 120 分までの血糖値曲線下面積を示す。平均値 \pm 標準誤差 (n=6)。

*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ (水群との差を示す)。

3-3 紅茶の摂取がヒトの食後血糖値に及ぼす影響

健常女性を対象としたパン摂取試験における血糖値の変化を図 3-3 に示す。パン摂取前の血糖値は、水群が 74 ± 1 mg/dL、紅茶群が 72 ± 1 mg/dL であり、両群に差は認められなかった。紅茶群のパン食摂取後 30 分、60 分の血糖値はそれぞれ 111 ± 3 mg/dL、 116 ± 3 mg/dL であり、水群のパン食摂取後 30 分、60 分の血糖値 124 ± 3 mg/dL、 125 ± 3 mg/dL 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、水群が 107 ± 3 mg/dL、 91 ± 2 mg/dL、紅茶群は 106 ± 3 mg/dL、 92 ± 2 mg/dL であり、両群に有意差は認められなかった。

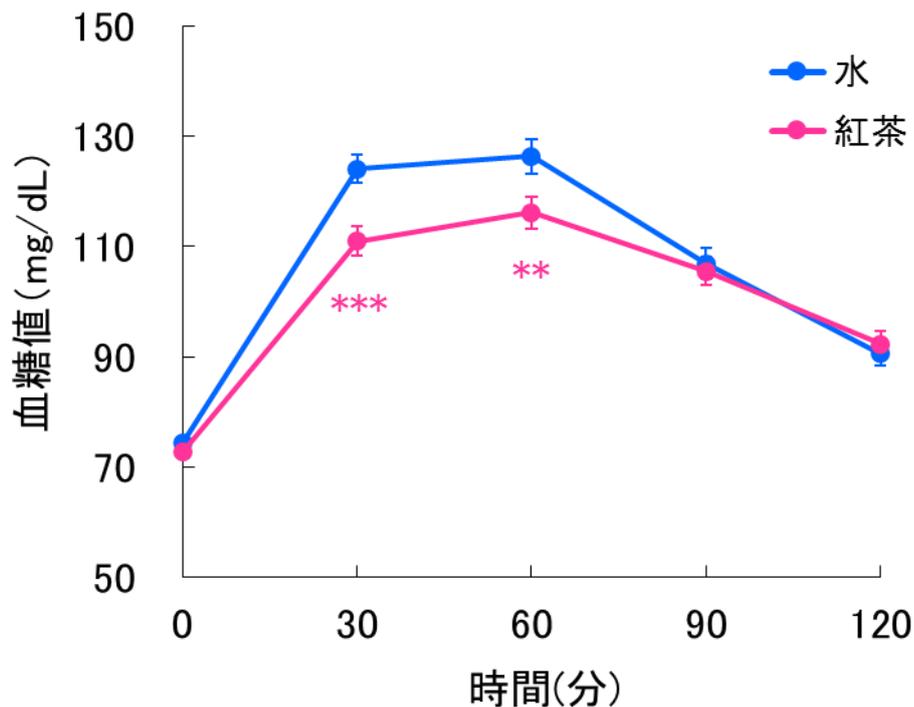


図 3-3. 健常者における食後血糖値の変化

平均値 ± 標準誤差.

●: 水群 (n=54), ●: 紅茶群 (n=53).

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ (水群との差を示す).

パン食摂取前から摂取後 120 分までの血糖値曲線下面積を図 3-4 に示す。
 紅茶群の血糖値曲線下面積は 3750 ± 190 mg/dL \cdot 120min で、水群 4270 ± 230 mg/dL \cdot 120min と比較して有意に低値であった ($p < 0.05$)。

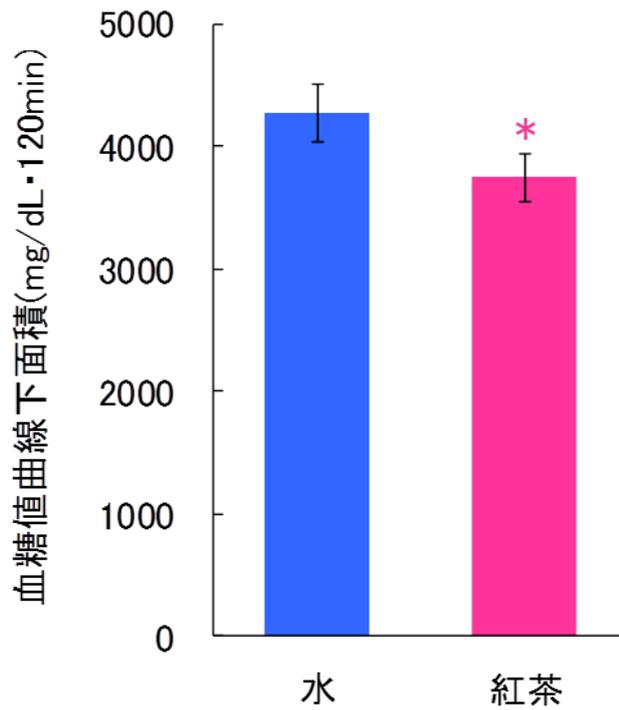


図 3-4. 健常女性における食後の血糖値曲線下面積

デンプン投与前からデンプン投与 120 分までの血糖値曲線下面積を示す。
 平均値 \pm 標準誤差。

水群 (n=54), 紅茶群 (n=53)。

*: $p < 0.05$ (水群との差を示す)

4. 考察

マウスのデンプン負荷試験において、負荷する糖質をデンプン、マルトースおよびスクロースとした糖負荷試験を行った。その結果、どの糖質を負荷した場合においても、紅茶投与群は水投与群と比較し、負荷後の血糖上昇を抑制することが確認された。我々が日常摂取する糖質の大部分はデンプン、マルトースおよびスクロースである。これらのどの糖質においても紅茶の食後血糖上昇抑制効果が確認されたことから、紅茶が食後血糖上昇抑制に有用である可能性が強く示された。本研究では紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用に着目して血糖上昇抑制作用を検討したため、単糖であるグルコースの投与試験は行わなかったが、ラットを用いたグルコース投与試験において紅茶の投与が血糖上昇を抑制する傾向を確認している（データには示していない）。このことは、紅茶の血糖上昇抑制作用には α -グルコシダーゼ活性抑制作用が大きく関与しているが、その他の作用機序も存在する可能性を示唆している。Nishiumi ら⁶⁾は、緑茶や紅茶がグルコースの筋肉への取り込みを促進することを報告しており、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制用以外の作用機序についても今後検討していく必要がある。

紅茶は食事と一緒に飲用したり、食後に単独で飲用したりと摂取タイミングが様々である。また、 α -グルコシダーゼ阻害剤として糖尿病の治療に用いられているアカルボース⁷⁾やボグリボース^{8,9)}、ミグリトール¹⁰⁾は、二糖類と競合する事で α -グルコシダーゼが二糖類を単糖へ分解するのを妨げ、食後の血糖値の急激な上昇を抑制すると考えられている。このため、二糖類と競合できるよう、食事直前に服用することとされている。このことから、糖質に対する紅茶の摂取タイミングを検討することが作用機序を考える上で有用であると考えられた。そこで、食後血糖上昇抑制効果が最も期

待できる紅茶の摂取タイミングを検討する目的で、食前、食事と同時、食後の3つのタイミングを設定して正常マウスにおけるデンプン負荷試験を行った。出口ら²⁾は、デンプン投与の30分前に α -グルコシダーゼ活性抑制作用を有するグアバ葉抽出物を投与し、グアバ葉抽出物の食後血糖上昇抑制効果を確認している。そのため、今回の試験では食前をデンプン投与の30分前とした。紅茶の投与をデンプン投与の30分前、同時、15分後に設定した結果、どの投与タイミングにおいても水投与群と比較して紅茶投与群の食後血糖値は有意に低値を示した。また、同時投与で食後血糖上昇が最も抑制される傾向がみられたことから、紅茶は食事中に摂取することで血糖上昇抑制作用が最も期待できると考えられた。さらに、水摂取群においても、同時摂取の場合に30分前摂取、15分後摂取に比べて食後血糖上昇を抑えられる傾向がみられた。この要因として、糖質と水を一緒に摂取することで、糖質の腸管通過速度が速まり、腸管での吸収率を低下させたものと考えられる。従って、糖質と一緒に水分を摂取すること自体も血糖上昇抑制に関与している可能性が示唆された。食後血糖上昇抑制作用を示す茶ポリフェノールについては多くの報告^{11,12)}があるが、糖質と茶の摂取タイミングの違いが食後血糖上昇抑制作用に及ぼす影響についてはこれまで検討されていない。本研究における紅茶摂取タイミングの検討は、日常生活において紅茶の食後血糖上昇抑制効果を有効に利用するために重要な因子であるとともに、紅茶成分の血糖上昇抑制作用のメカニズムの解明にも有益であると考えられる。糖尿病治療薬である α -グルコシダーゼ阻害剤は二糖類と競合できるよう、食事直前に服用することとされている。本研究において、紅茶を糖質と同時に摂取することで食後血糖上昇抑制効果がより明確に認められたことから、紅茶に含まれる成分が α -グルコシダーゼ阻害剤と同様に α -グルコシダーゼ活性を抑制し、その結果、食後の血糖上

昇を抑制したと考えられる。また、本研究の結果より、糖質摂取の 30 分前に紅茶を投与した場合でも、食後血糖上昇抑制効果が確認され、糖質摂取の 15 分後に紅茶を投与した場合でも食後血糖上昇抑制効果が確認された。この結果は、 α -グルコシダーゼ抑制作用だけでは十分な説明が難しく、紅茶の α -グルコシダーゼ抑制作用以外の作用機序が存在する可能性が示唆された。最近緑茶や紅茶のグルコースの筋肉取込み促進作用など α -グルコシダーゼ活性抑制作用以外の作用機序が明らかにされ始めており¹³⁾、今後作用機序についてさらに詳細な検討が必要である。

食後の高血糖は糖尿病へと進展するリスクを高める大きな要因の一つであり、糖尿病の予防や進展防止には食後の高血糖の是正が効果的であることが臨床的に証明されている¹⁾。本研究において、正常マウスにおける紅茶の食後血糖上昇抑制効果が確認されたことから、紅茶の食後血糖上昇抑制効果のヒトへの応用が期待される。そこで、ヒトに対する紅茶の食後血糖上昇抑制効果を確認する目的で、健常女性を対象にパン食負荷試験を行った。ICR マウスの負荷試験において、紅茶を糖質と同時に投与することで食後血糖上昇を最も効果的に抑制する傾向がみられたことから、健常女性を対象とした試験では、紅茶とパンを一緒に摂取させた。その結果、パン食摂取 30 分後、60 分後の血糖値は紅茶摂取群が水摂取群と比較して有意に低値を示し、紅茶摂取による食後血糖上昇抑制効果が認められた。高血糖状態が続くことで、糖尿病に進展するリスクが高まることが知られており¹⁾、本研究において、健常者に対する食後血糖上昇抑制効果が認められたことから、紅茶が糖尿病予防に有用であることが期待される。今後、血糖値が軽度高値を示す被験者を対象としたヒト試験などを行い、ヒトに対する効果をさらに検討する必要がある。

本章の正常マウスおよび健常女性を対象とした試験において、紅茶の食

後血糖上昇抑制効果が食後 30 分において有意に認められ、マウスの試験では食後 120 分まで紅茶の食後血糖上昇抑制傾向がみられた。食事と同時、または食後に摂取する機会の多い紅茶に食後血糖上昇抑制効果が認められたことから、日常的な食後の高血糖の是正に紅茶が有用であることが示唆された。

以上の結果より、ICR マウスの負荷試験において、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。さらに糖質と紅茶を同時に投与した場合に食後血糖上昇が最も抑制される傾向がみられたことから、紅茶は食事中に摂取することで血糖上昇抑制作用がより期待できる可能性が示された。加えて、健常女性を対象にしたパン食摂取試験において、紅茶を飲用することで、食後の血糖上昇を抑制することが認められた。

引用文献

- 1) Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M: Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet*, 359: 2072-2077 (2002).
- 2) 出口ヨリ子, 長田邦子, 内田和美, 木村広子, 芳川雅樹, 工藤辰幸, 保井久子, 綿貫雅章: グァバ葉熱水抽出物の 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*, 72: 923-931 (1998).
- 3) 寺本哲子, 沖直子, 草野崇一: マテ (*Ilex paraguariensis*) 葉抽出物の糖質分解酵素阻害作用およびラットにおける糖負荷後の血糖上昇抑制作用. *日本栄養・食糧学会誌*, 58(1):17-21 (2005).
- 4) 田中忍, 韓立坤, 鄭毅男, 奥田拓道: ラットにおける食後の血糖上昇に及ぼすイチョウ葉由来フラボノイドフラクションの抑制作用. *薬学雑誌*, 124: 605-611 (2004).
- 5) Tormo MA, Gil-Exojo I, Romero TA, Campillo JE: Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *Br. J. Nutr.*, 92:785-790 (2004).
- 6) Nishiumi S, Bessyo H, Kubo M, Aoki Y, Tanaka A, Yoshida K, Ashida H: Green and black tea suppress hyperglycemia and insulin resistance by retaining the expression of glucose transporter 4 in muscle of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *J. Agric. Food. Chem.*, 58: 12916-12923 (2010).
- 7) Klocke K.R., Stauch K, Landen H: Effect of Add-On Acarbose to Insulin Therapy in Routine Clinical Practice. *Clin. Drug. Investig.*, 23(10): 621-627 (2003).

- 8) 池本久美子, 小野久美子, 高田薫, 江渡康子, 小林美登里: ボグリボース服用 4 時間後の血糖上昇抑制効果-低血糖対策への 1 考察. *糖尿病*, 4: 315-317 (1999).
- 9) 河盛隆造, 石田均, 柏木厚典, 岸川秀樹: 2 型糖尿病患者におけるボグリボース長期投与の臨床効果—糖尿病合併症に対するボグリボースの効果—. *糖尿病*, 53(5): 331-340 (1992).
- 10) 久保山昇, 林一郎, 山口忠志: 新規 α -グルコシダーゼ阻害薬ミグリトール(セイブル®錠)の薬物動態学および薬理学的特徴と臨床試験成績. *日薬理誌*, 127: 223-232 (2006).
- 11) Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T: Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol*, 52(2): 149-153 (2006)
- 12) Josic J, Olsson AT, Wickeberg J, Lindstedt S, Hlebowicz J: Does green tea affect postprandial glucose, insulin and satiety in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Nutr. J.*, 9(63): doi: 10.1186/1475-2891-9-63 (2010).
- 13) Nishiumi S, Bessyo H, Kubo M, Aoki Y, Tanaka A, Yoshida K, Ashida H: Green and black tea suppress hyperglycemia and insulin resistance by retaining the expression of glucose transporter 4 in muscle of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *J. Agric. Food. Chem.*, 58: 12916-12923 (2010)

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

1. 緒言

糖尿病は心血管疾患、神経障害、網膜症、腎症、足病変といった合併症のリスクを高め、生活の質に大きく影響を及ぼす¹⁾。そのため、厚生労働省は国民の健康づくりの指針となる2013～2022年度の第2次「健康日本21」の中で糖尿病や糖尿病合併症（糖尿病腎症による年間新規透析導入患者数）の減少を目標項目として掲げており²⁾、糖尿病や糖尿病合併症の予防はわが国の大きな課題とされている。Ⅲ章において、正常マウスおよび健常女性に対して紅茶の摂取が食後血糖値の上昇を抑制することを確認した。このことから、紅茶の摂取が糖尿病予防に有用であることが示唆された。しかし、これまでに糖尿病病態に対する紅茶の有用性についてはほとんど検討がなされていない。

また、茶の摂取による糖尿病病態軽減作用メカニズムについて、Uedaら³⁾は、緑茶や紅茶に含まれる茶ポリフェノールであるエピガロカテキンガレート（EGCG）が筋肉細胞でのGLUT4の膜移行を促進させることを報告している。しかし、その他のメカニズムが平行して作用している可能性は十分に考えられ、紅茶の糖尿病病態軽減作用メカニズムについて、更に詳細な検討が必要とされている。

近年、食品が生体に与える効果を評価する手法としてニュートリゲノミクスが注目されている^{4,5)}。ニュートリゲノミクスは、食品の摂取による遺伝子の発現を比較、検討することで、食品の新規機能性をよりエビデンスに基づいたかたちで評価するという遺伝子工学的な手法である。ニュートリゲノミクスの手法であるDNAマイクロアレイ解析法は、遺伝子の発現を網羅的に解析し、食品（成分）を摂取した時に起こる生体内の代謝変動

を、遺伝子発現（mRNA）レベルで解析する方法である⁶⁾。

本章では2型糖尿病自然発症モデルマウスであるKK-A^yマウスに紅茶を長期間摂取させ、糖尿病病態に与える効果やそのメカニズムについてについて検討した。加えて、DNAマイクロアレイ解析法およびReal-time PCR法により肝臓細胞における遺伝子発現を解析し、紅茶摂取が糖尿病病態に与える効果を遺伝子発現レベルで検討した。

2. 方法

2-1 紅茶抽出液の調整

茶葉は市販のウバ（スリランカ）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）で自然濾過したものを紅茶試料として用いた。

2-2 実験動物および飼育条件

実験動物としては体重 35~40 g の雄性 KK-A^y/Tajcl マウス（KK-A^y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℃、湿度 55±5% で 12 時間の明暗周期の環境下で飼育した。飲料は自由摂取とし、飼料は 17 時から翌日 9 時まで与えた。予備飼育後、体重および空腹時血糖値に差が無いようコントロール群（n=7）、紅茶群（n=6）の 2 群に分け、表 4-1 に示す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ディングで 3 週間飼育した。

表 4-1. 高脂肪食餌 100g 中の試料組成

成分	含有量 (g)
ミルクカゼイン	25.60
L-シスチン	0.36
大豆油	2.00
ラード(豚脂)	33.00
マルトデキストリン	6.00
α -コーンスターチ	16.00
スクロース	5.50
粉末セルロース	6.61
ビタミン混合(AIN93G)	1.00
重酒石酸コリン	0.25
ミネラル混合(AIN93G)	3.50
炭酸カルシウム	0.18
合計	100.00

2-3 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、精巢上体脂肪組織、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。採取した血液を遠心分離 (3,000rpm、15min) し、得られた血清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) を使用して測定した。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。

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

2-4 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 RNase-free water に溶解し、260 および 280 nm の紫外領域の吸光度を測定して RNA の量と質を確認した。

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、アジレントハイブリダイゼーションオープン G2545A (Agilent) で 10rpm、65°C、17 時間行った。蛍光シグナルはマイクロアレイスキャナ (Agilent) により測定し、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。

2-5 Real-time PCR 解析法

総 RNA を SuperScript[®] III (Life Technologies Co., U.S.A.) と Oligo (dT) 12-18 プライマー (Life Technologies Co., U.S.A.) を用いて逆転写し、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) の発現量は、QuantiFast SYBR[®] Green PCR

Kit (Quiagen, Germany) に準じて行った。Fos および Jun のプライマーは QuantiTect® Primer Assays (Quiagen, Germany) を用いた。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。

2-6 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（承認番号第 1120 号）。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。

2-7 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。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。

3. 結果

3-1 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

KK-A^y マウスの飼育 3 週間の体重変化を図 4-1 に示す。飼育開始時の体重は、コントロール群が 21.4 ± 0.3 g、紅茶群は 21.6 ± 0.2 g であった。その後飼育 3 週目までのコントロール群の体重は 29.6 ± 0.3 g、 34.9 ± 0.6 g、 37.5 ± 0.7 g であったのに対し、紅茶群の体重は 28.7 ± 0.6 g、 33.0 ± 0.7 g、 34.2 ± 0.9 g であった。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(飼育 2 週目: $p < 0.05$ 、飼育 3 週目 $p < 0.01$)。

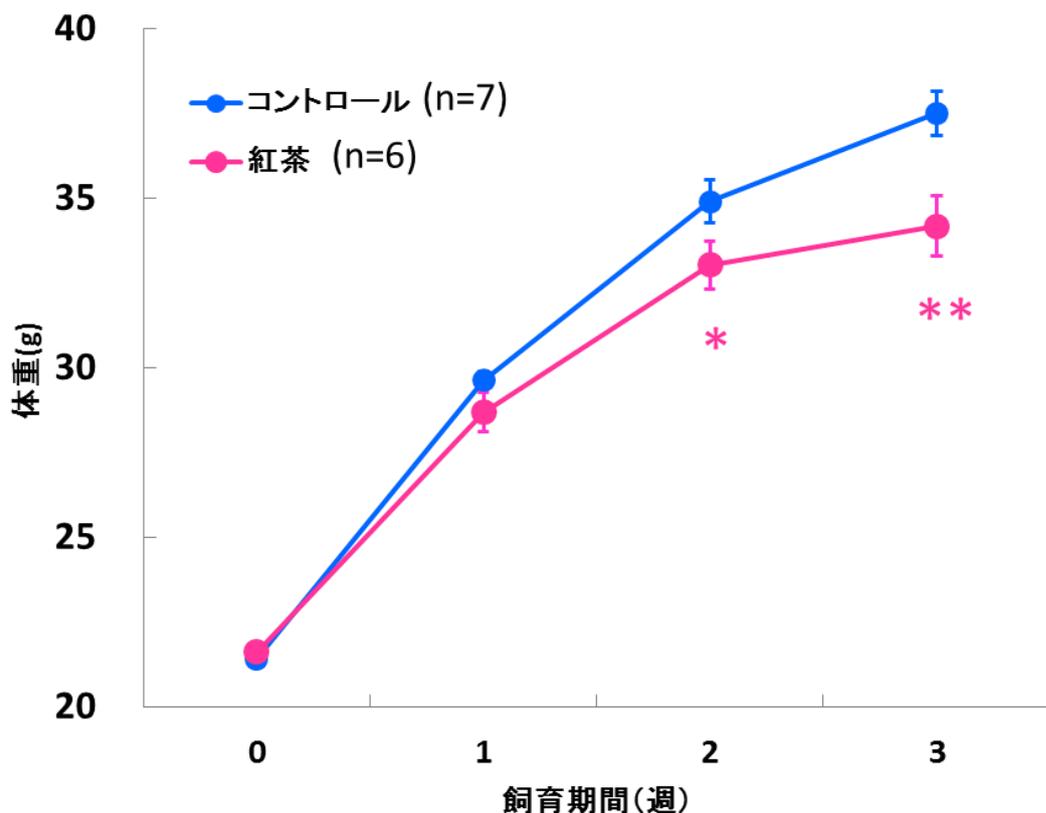


図 4-1. 紅茶摂取が KK-A^y マウスの体重増加に及ぼす影響

平均値 ± 標準誤差.

●: 水群(n=7), ●: 紅茶群(n=6).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (コントロール群との差を示す).

3 週間飼育後の腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪および腸管膜周囲脂肪の体重 100g あたりの重量比を表 4-2 に示す。腎周囲脂肪重量比は、コントロール群が 1.98 ± 0.07 g/B.W.、紅茶群が 1.74 ± 0.07 g/B.W. で、紅茶群がコントロール群に比べ有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。精巣周囲脂肪組織および腸管膜周囲脂肪組織の重量比は、コントロール群が 4.50 ± 0.15 g/B.W.、 3.86 ± 0.10 g/B.W. 紅茶群が 4.28 ± 0.29 g/B.W.、 3.56 ± 0.15 g/B.W. であり、紅茶群がコントロール群に比べて低値を示す傾向が認められた。

表 4-2. 紅茶摂取が KK-A^y マウスの内臓脂肪蓄積に及ぼす影響

	腎周囲脂肪重量比 (%)	精巣周囲脂肪重量比 (%)	腸間膜周囲脂肪重量比 (%)
コントロール (n=7)	1.98 ± 0.07	4.50 ± 0.15	3.86 ± 0.10
紅茶 (n=6)	$1.74 \pm 0.07^*$	4.28 ± 0.29	3.56 ± 0.15

値は体重 100g あたりの重量比 (%) で示す。

平均値 ± 標準誤差。

*: $p < 0.05$ (コントロール群との差を示す)。

3-2 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、インスリンおよびHOMA-Rを図4-2に示す。血糖値はコントロール群が 552 ± 35 mg/dL、紅茶群が 409 ± 46 mg/dLであり、紅茶群がコントロール群に比べて有意に低値を示した ($p < 0.05$)。インスリンはコントロール群が 158.8 ± 25.8 μ U/mL、紅茶群が 80.9 ± 11.4 μ U/mLであり、紅茶群がコントロール群に比べて有意に低値を示した ($p < 0.05$)。HOMA-Rはコントロール群が 228.5 ± 44.7 、紅茶群が 76.5 ± 8.6 であり、紅茶群がコントロール群に比べて有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

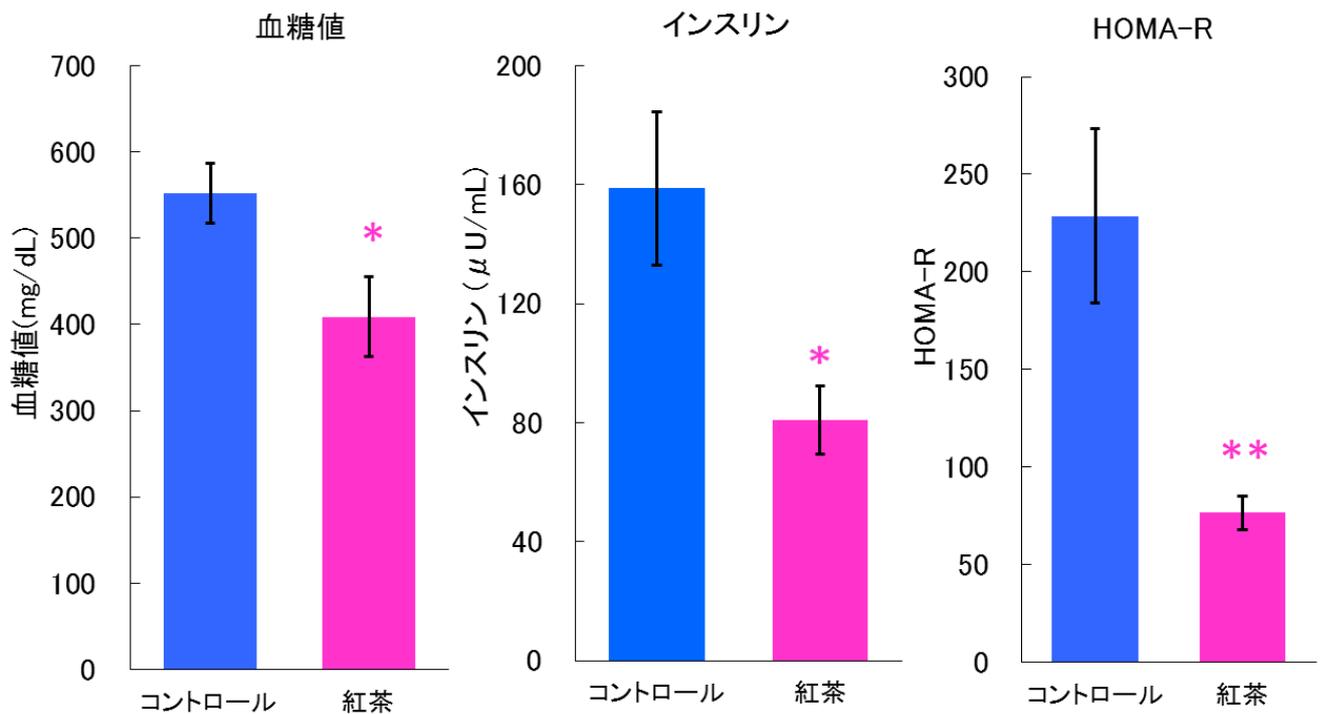


図 4-2. 紅茶の摂取が KK-A^y マウスの血糖値、インスリンおよび HOMA-R に及ぼす影響

平均値 ± 標準誤差.

コントロール群: n=7, 紅茶群: n=6.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (コントロール群との差を示す).

3-3 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 マイクロアレイの結果を表 4-3 に示す。DNA マイクロアレイ解析で調べた 45,220 個の遺伝子のうち、45,180 個の遺伝子において肝臓での発現が検出された。紅茶群はコントロール群と比較して、233 個の遺伝子発現量が 2 倍以上に増加し、403 個の発現量が 0.5 倍以下に減少した。これらの遺伝子を各カテゴリーに分類し、紅茶群がコントロール群と比較して 2 倍以上または 0.5 倍以下に変動した遺伝子を表 4-3 に示す。カテゴリー名の後の数値は、本研究で使用した DNA マイクロアレイチップに搭載されている遺伝子の中でカテゴリーに該当した遺伝子の総数である。

遺伝子の転写に関与する遺伝子は、5682 個のうち 29 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が増加し、37 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が減少していた。エネルギーに関与する遺伝子の発現に、顕著な変化は認められなかった。電子伝達系に関与する遺伝子は、174 個の遺伝子うち 2 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が減少していた。脂質代謝に関与する遺伝子は、1622 個のうち 9 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が増加し、12 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が減少していた。糖代謝に関与する遺伝子は、685 個のうち 2 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が増加し、9 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が減少していた。免疫に関与する遺伝子は、962 個のうち 9 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が増加し、7 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が減少していた。炎症に関与する遺伝子は、778 個のうち 7 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が増加し、4 個の遺伝子において紅茶群がコントロール群と比較して発現が減少していた。

表 4-3. 紅茶の摂取が KK-A ν マウスの遺伝子発現に及ぼす影響

カテゴリー	発現が確認された 遺伝子数	紅茶	
		発現が増加した 遺伝子数 ^a	発現が減少した 遺伝指数 ^a
合計 (45,220)	45,180	233	403
転写	5682	29	37
エネルギー	48	0	0
電子伝達	174	0	2
脂質	1622	9	12
グルコース	685	2	9
免疫	962	9	7
炎症	778	7	4

^a: コントロール群と比較して紅茶群で増加および減少した遺伝子の数を示す

特に発現の減少が顕著であった炎症に関与する遺伝子の発現状況を表 4-4 に示す。この結果から activator protein 1 (AP-1) を構成するたんぱく質である Fos や Jun、また、AP-1 に関与する Activating transcription factor 2 (Atf2) や Activating transcription factor 3 (Atf3) の発現が顕著に減少したことが分かる。

表 4-4. 紅茶の摂取が KK-A ν マウスの炎症に関する遺伝子発現に及ぼす影響

遺伝子名	配列データベース No.	遺伝子発現量	
		コントロール	紅茶
FBJ osteosarcoma oncogene	NM_010234	1.05	0.59
Fos-like antigen 1	NM_010235	1.00	0.65
Jun oncogene	NM_010591	1.02	0.51
Jun proto-oncogene related gene d	NM_010592	1.00	0.70
Jun dimerization protein 2	NM_030887	1.01	0.68
Activating transcription factor 2	NM_001025093	1.00	0.65
Activating transcription factor 3	NM_007498	1.01	0.29

3-4 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

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る事がわかった。そこで、Fos と Jun の発現レベルを確認するため、定量性に優れた方法である Real-time PCR 解析を行った。Fos と Jun の GAPDH に対する相対的な遺伝子発現量を図 4-3 に示す。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 ($p < 0.05$)。

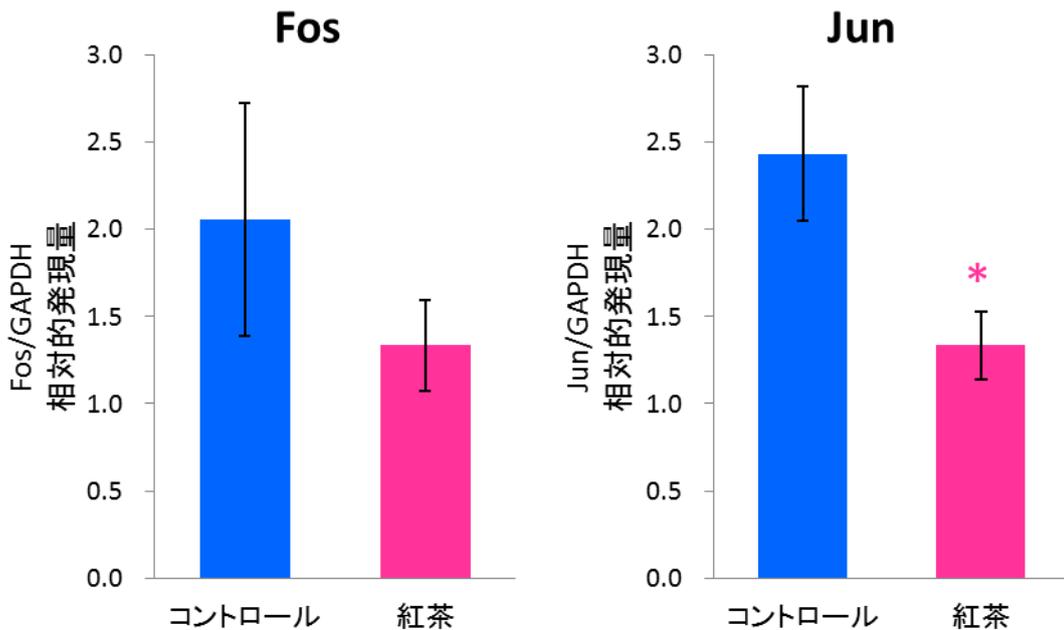


図 4-3. 紅茶の摂取が KK-A γ マウスの Fos および Jun 発現量に及ぼす影響

平均値 ± 標準誤差.

コントロール群 (n=7), 紅茶群 (n=6).

*: $p < 0.05$ (コントロール群との差を示す).

4. 考察

2型糖尿病自然発症モデルマウスである **KK-A^y/Tajcl** マウス (**KK-A^y** マウス) は、高脂肪食下で早期かつ重度に肥満、インスリン抵抗性を主体とする糖尿病、高脂血症を自然発症する 2型糖尿病モデルマウスである^{7,8)}。そのため、2型糖尿の予防作用に関する研究に多く用いられている⁹⁻¹¹⁾。本研究では、この 2型糖尿病モデルマウスである **KK-A^y** マウスに 3週間紅茶を飲用させ、体重増加および糖尿病病態に与える影響を検討した。その結果、紅茶を摂取した紅茶群は、水を摂取したコントロール群に比べて飼育 2週目から有意に体重の増加を抑制した。また、体重あたりの脂肪重量比率では、精巣周囲脂肪、腸間膜周囲脂肪組織のいずれにおいても紅茶摂取による蓄積抑制傾向が認められ、特に腎周囲脂肪においては有意な蓄積抑制が認められた。Ito ら¹²⁾は、正常ラットにおいて茶カテキンの摂取による体重増加抑制、脂肪蓄積抑制を報告している。また、Kajimoto ら¹³⁾は、健康な成人を対象にガロイル基を持つ茶カテキン含有飲料を摂取させた結果、体重増加および内臓脂肪蓄積を抑制したと報告している。紅茶のカテキンにはガロイル基を持つカテキンが含まれており¹⁴⁾、本研究における紅茶摂取による体重増加抑制および脂肪蓄積抑制作用は、紅茶のカテキン類、特にガロイル基をもつカテキン類が関与した可能性が示唆される。

紅茶を 3週間摂取させた後に血糖値およびインスリンを測定した。その結果、紅茶摂取により血糖値およびインスリンの上昇を有意に抑制した。また、**HOMA-R** において、紅茶群がコントロール群と比較し有意に低値を示した。**HOMA-R** はインスリン抵抗性の指数とされており¹⁵⁾、紅茶の摂取がインスリン抵抗性を低下させたことが確認された。Wu ら¹⁶⁾は、正常ラットに緑茶を 12週間飲用させた結果、インスリン抵抗性の改善が認められたと報告している。また、Ueda ら³⁾は、緑茶や紅茶に含まれる茶ポリフェ

ノールであるエピガロカテキンガレート (EGCG) が筋肉細胞での GLUT4 の膜移行を促進させることを報告している。インスリンは細胞膜にある受容体に結合し、その刺激により GLUT4 が細胞膜へ移動し、血液中のグルコースを細胞内に取り込む¹⁷⁾。従って、本研究において紅茶の長期摂取がインスリン抵抗性を改善させた要因の一つとして、紅茶の EGCG が筋肉細胞での GLUT4 の膜移行を促進させた可能性が考えられる。

さらに、紅茶摂取が糖尿病病態に与える効果やそのメカニズムについて検討する目的で、DNA マイクロアレイ解析を行い、肝臓細胞における遺伝子発現を解析し、検討を行った。DNA マイクロアレイ解析法は、数万個の遺伝子発現情報を一度に取得できる方法である。そのため、食品の機能性について網羅的に解析することが可能である。食後の高血糖調整は肝臓を中心に行われるため¹⁸⁾、本研究では肝臓細胞における遺伝子発現量を検討することにした。本研究において、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、紅茶群においてコントロール群と比較して Fos および Jun の遺伝子の発現が約 40% 減少していた。Fos および Jun は AP-1 二量体を構成するタンパク質である^{19,20)}。また、AP-1 に関与する Atf2 および Atf3 においても紅茶群がコントロール群と比較して遺伝子発現が顕著に減少していた。そこで、Fos と Jun の発現レベルを確認するため、定量性に優れた方法である Real-time PCR 解析を行った。Real-time PCR 解析法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅を経時的に測定し、増幅率に基づいて DNA の定量を行う方法で DNA マイクロアレイ解析法の確認実験として信頼性の高い優れた手法ある。Real-time PCR 解析を行った結果、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、Jun においては、紅茶群がコントロール群に比べて有意に発現量が減少していた。この結果から、紅茶摂取により Fos および Jun の発現が減少していることが観察さ

れた。Fos および Jun は AP-1 を構成するタンパク質であることから、紅茶摂取が AP-1 の発現を減少させた可能性が示唆される。AP-1 はサイトカインや成長因子、ストレス、バクテリアやウイルスの感染など様々な刺激に応答している転写因子であり、炎症や免疫制御に関わるケモカイン²¹⁾にも関与している²²⁾。慢性炎症は2型糖尿病の誘発因子とされており²³⁾、Eguchi ら²⁴⁾は、膵臓の β 細胞の炎症が惹起されると、炎症性サイトカインがさらにケモカインの分泌を促進し、膵臓の β 細胞の炎症を増悪させると報告している。本研究において、紅茶の摂取により炎症に関与する AP-1 を形成する Fos と Jun の発現が減少したことから、紅茶の摂取が糖尿病病態の増悪化を抑制したことが示唆された。また、糖尿病による高血糖状態では Fos や Jun の発現増加が認められると報告されている^{25,26)}。Shankland ら²⁷⁾は糖尿病性腎肥大の前段階に Fos や Jun の発現増加が見られると報告している。糖尿病性腎肥大は糖尿病性腎症の特徴的な症状であることから^{28,29)}、Fos や Jun の発現増加を抑制することは、糖尿病合併症である糖尿病性腎症の予防につながると考えられる。従って、紅茶の摂取が糖尿病性の合併症予防に有用である可能性が示唆された。Shimizu ら³⁰⁾は、ヒト細胞株において、EGCG 存在下で AP-1 の転写活性が低下したと報告している。また、Nomura ら³¹⁾は、JB6 マウス上皮細胞株において、テアフラビン類と EGCG が AP-1 の転写活性を低下させ、その効果はテアフラビン類の方が強いことを報告している。テアフラビン類と EGCG は、紅茶に含まれるポリフェノールである³²⁾。II 章の検討において、紅茶の中でもテアフラビン類含有量の多い紅茶を選抜し、本試験に用いている。従って、本研究における紅茶摂取による AP-1 の発現減少は、紅茶中のテアフラビン類および EGCG によるものである可能性が示唆される。今後、紅茶の抗糖尿病作用のメカニズムや作用成分については更に詳細な検討が必要である。

以上のことから、2型糖尿病モデルマウスにおける紅茶の長期摂取により、体重増加抑制および内臓脂肪蓄積抑制が認められた。また、血糖値およびインスリンの上昇を抑制し、インスリン抵抗性改善作用が確認された。さらに、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、紅茶の長期摂取により AP-1 を構成するタンパク質である Fos および Jun の発現の減少が新規に認められた。このことから、紅茶の長期摂取が Fos および Jun の遺伝子発現量を減少させ、この事が糖尿病病態の増悪抑制に関与していることが示唆された。

引用文献

- 1) 西尾善彦, 柏木厚典: 2 糖尿病に合併する血管病変の特徴と発症機序.
脈管学, 50(5): 533-539 (2010).
- 2) 厚生労働省: 健康日本 21 (第 2 次) Home Page
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkounippon21.html>
- 3) Ueda M, Nishiumi S, Nagayasu H, Fukuda I, Yoshida K, Ashida H:
Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 377(1): 286-290 (2008).
- 4) 真野博, 清水純, 任良赫, 中谷祥恵, 野口有希, 増田和成, 和田政裕:
DNA マイクロアレイ解析を用いた沖縄伝統野菜ニガナ(*Crepidiastrum lanceolatum*)の食品機能性評価. 日本栄養・食糧学会誌, 59(3): 177-183 (2006).
- 5) 清水純, 小澤真理子, 真野博, 岡安重次, 和田政裕: DNA マイクロアレイ解析を用いたコメ糠由来スフィンゴ糖脂質画分の食品機能評価. 日本食品科学工学会誌, 54(12): 546-552 (2007).
- 6) 高橋陽子: ニュートリゲノミクスによる食品の機能性解析. 脂質栄養学, 21(1): 51-57 (2012).
- 7) Kitazawa N, Miura T, Kako M, Usami M, Tanigawa K, Ishida H, Seino Y:
Determination of hemoglobin A1C in normal and diabetic mice: neonatal streptozotocin-induced diabetic mice and KK-Ay mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 19(8):1078-1079 (1996).
- 8) Okazaki M, Saito Y, Udaka Y, Maruyama M, Murakami H, Ota S, Kikuchi T, Oguchi K: Diabetic Nephropathy in KK and KK-Ay Mice. *Experimental Animals.*, 451(2): 191-196 (2002).
- 9) Miura T, Kurata M, Takagi S, Ishibashi C, Ishihara E, Ishida T: Effect of

- Fuscoporia obliqua with exercise on blood glucose and lipid in type 2 diabetic mice. *J. Trad. Med.*, 24(4): 137-139 (2007).
- 10) 本三保子, 内田菜穂子, 倉兼静江, 山田則子: ヒメウコギ葉茶の2型糖尿病モデルマウスに対する抗糖尿病作用. *日本家政学会誌*, 61(10): 647-653 (2010).
- 11) Ohshima K, Mogi M, Jing F, Iwanami J, Tsukuda K, Min LJ, Ogimoto A, Dahlöf B, Steckelings UM, Unger T, Higaki J, Horiuchi M: Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation ameliorates insulin resistance in type 2 diabetes mice with PPAR γ activation. *PLoS One*, 7(11): e48387 (2012).
- 12) Ito Y, Ichikawa T, Morohoshi Y, Nakamura T, Saegusa Y, Ishihara K: Effect of tea catechins on body fat accumulation in rats fed a normal diet. *Biomed. Res.*, 29(1): 27-32 (2008).
- 13) Kajimoto O, Kajimoto Y, Yabune M, Nakamura T, Kotani K, Suzuki Y, Nozawa A, Nagata K, Unno T, Mitane (Sagesaka) Y, Kakuda T, Yoshikawa T: Tea catechins with a galloyl moiety reduce body weight and fat. *J. Health Sci.*, 51(2): 161-171 (2005).
- 14) Khokhar S, Venema D, Hollman PC, Dekker M, Jongen W: A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Lett.*, 114(1-2): 171-172 (1997).
- 15) Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C: Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *J. Amer. Pediatrics.*, 115(4): 500-503 (2005).

- 16) Wu LY, Juan CC, Hwang LS, Hsu YP, Ho PH, Ho LT: Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Eur. J. Nutr.*, 43(2): 116-24 (2004).
- 17) Haga Y, Ishii K, Suzuki T: N-glycosylation is critical for the stability and intracellular trafficking of glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.*, 286(36): 31320-31327 (2011).
- 18) 河盛隆造: “糖のながれ” の中心にある肝. *医学のあゆみ*, 229(12): 1101-1106, (2009).
- 19) Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M: AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell. Sci.*, 117: 5965-5973 (2004).
- 20) Glover JN, Harrison SC: Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, 373(6511): 257-261 (1995).
- 21) Feng L: Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. *Immunol. Res.*, 21(2-3): 203-210 (2000).
- 22) Ramnath RD, Sun J, Adhikari S, Bhatia M: Effect of mitogen-activated protein kinases on chemokine synthesis induced by substance P in mouse pancreatic acinar cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 11(6): 1326-1341 (2007).
- 23) Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM: Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*, 51(4): 1131-1137 (2002).
- 24) Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, Ohsugi M, Kono N, Ogata F, Yagi N, Ohto U, Kimoto M, Miyake K, Tobe K, Arai H, Kadowaki T, Nagai R: Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet

- inflammation. *Cell Metab.*, 5(4): 518-533 (2012).
- 25) Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y, Koide H: Alteration of growth-related proto-oncogene expression in diabetic glomeruli by a specific endothelin receptor A antagonist. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 11(8): 1528-1531 (1996).
- 26) Kreisberg JI, Radnik RA, Ayo SH, Garoni J, Saikumar P: High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int.*, 46(1): 105-112 (1994).
- 27) Shankland SJ, Scholey JW: Expression of growth-related protooncogenes during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int*, 47(3): 782-788 (1995).
- 28) 猪股茂樹，羽田勝計，守屋達美，片山茂裕，岩本安彦，堺秀人，富野康日己，松尾清一，浅野泰，榎野博史：糖尿病性腎症の新しい早期診断基準．日本腎臓学会誌，47(7): 767-769 (2005).
- 29) 岡田震一，四方賢一，榎野博史：糖尿病性腎症の発症・進展における炎症機転の関与．岡山医学会雑誌第，117: 9-15 (2005).
- 30) Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB: (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 11(7): 2735-2746 (2005).
- 31) Nomura M, Ma WY, Huang C, Yang CS, Bowden GT, Miyamoto K, Dong Z: Inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activation by theaflavins from black tea. *Mol. Carcinog.*, 28(3): 148-155 (2000).
- 32) Liang Y, Lu J, Zhang L, Wu S, Wu Y: Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions. *Food Chemistry*, 80(2): 283-290 (2003).

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

1. 緒言

アマニとは中央アジア原産の亜麻 (*Linum usitatissimum*) の種子である。アマニの一般分析では、およそ脂肪が 40%、たんぱく質が 20%、食物繊維が 28%、水分が 7.7%、その他に灰分が含まれると報告されている¹⁾。また、アマニの全脂質のうちの 53-57%が n-3 系脂肪酸である α -リノレン酸であることや²⁾、他の穀類と比較してリグナン含量が多い^{3,4)}という特徴がある。アマニにはリグナンや必須脂肪酸である α -リノレン酸の含有量が多いことから、アマニの抗酸化作用⁵⁾や血清脂質および心血管保護^{6,7)}作用が報告されている。これまでに、ヒトを対象とした検討によりアマニ摂取による抗糖尿病効果が確認された報告⁸⁻¹⁰⁾と、明らかなアマニ摂取の効果が確認できなかった報告¹¹⁻¹³⁾があり、更なる臨床データが必要とされている。

糖尿病の予防、悪化防止には食後の高血糖の是正が有用であることが臨床的に示されており¹⁴⁾、糖尿病が心血管疾患の大きなリスクファクターであるとされている¹⁵⁾。そのような中、近年、食後の血糖上昇を抑える方法として低グリセミックインデックス (GI) の概念¹⁶⁾が特に注目されている。国際糖尿病連合が発表している食後の血糖コントロールに関するガイドライン¹⁷⁾では、低 GI 食品が食後の血糖コントロールに有益であるとしている。そのため、食後血糖値の上昇を穏やかにする食材の探索が求められており、血糖コントロールに有益でかつ日常生活に取り入れやすい食品の提供が求められている。

そこで、本章では食後の高血糖抑制に有用な食品を検討する目的で、アマニをパンに練り込んだアマニパンを作製し、以下に述べる 2 つの試験を

行った。まず、健常日本人女性におけるアマニパンの食後血糖上昇に及ぼす影響を検討した。アマニは日本では馴染みの浅い食材であるが、日本ではアマニと類似の食材としてゴマを食している。ゴマには n-6 系脂肪酸のリノール酸が総脂肪酸 100g あたり約 45% 含まれているのが特徴である¹⁸⁾。一方、アマニには n-3 系脂肪酸である α -リノレン酸が総脂肪酸 100g あたり約 60% 含まれているという特徴がある²⁾。このように、ゴマとアマニでは含有成分に違いがある。そこで、日本人にとってアマニよりも食経験があるゴマを含んだパンも同様に作製し、アマニパンとの比較を併せて行った。

次に、耐糖能異常を示す被験者を対象とした摂取試験を行い、アマニパン摂取による食後血糖、インスリン、中性脂肪 (TG) および遊離脂肪酸 (NEFA) に及ぼす影響について検討し、アマニ摂取の耐糖能異常のヒトにおける有効性を確かめた。

2. 方法

2-1 試験食品の調整

ローストし、粉末化したアマニの含有成分を表 5-1 に示す。ローストアマニ粉末 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。タンパク質はケルダール法、脂質はソックスレー抽出法、 α -リノレン酸は GC 法、食物繊維は酵素-重量測定法、リグナンは HPLC 法により測定した。炭水化物は、総重量から脂質、タンパク質、灰分と水分を減じて算出した。ロースト粉末アマニのエネルギー、タンパク質、脂質、 α -リノレン酸、炭水化物の測定は、日本食品分析センターに依頼した。リグナンの測定は日本製粉株式会社に依頼した。

表 5-1. ローストアマニ粉末 100g あたりの栄養成分

栄養成分	含有量(100g)あたり
エネルギー	607 (kcal)
総たんぱく質	22.7 (g)
総脂質	44.6 (g)
α-リノレン酸	21.3 (g)
総炭水化物	28.5 (g)
食物繊維	21.3 (g)
リグナン	770 (mg)

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。3種のパンの組成を表 5-2 に示す。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、ゴマパンいずれも同じエネルギー240 kcal になるように調整した。これは、糖尿病食事療法のための食品交換標表1の約3単位分に相当する。なお、パンの作製は日本製粉株式会社に依頼し、アマニは日本アマニ協会から提供されたローストされたアマニを用いた。

表 5-2. コントロールパン、アマニパンおよびゴマパンの組成

	重量 (g)	アマニ (g)	ゴマ (g)	強力粉 (g)	エネルギー (kcal)	炭水化物 (g)	油脂 (g)	蛋白質 (g)	食物繊維 (g)
コントロールパン	67.0	-	-	32.4	240	27.4	11.7	4.5	0.9
アマニパン	69.1	12.3	-	30.7	240	27.4	10.1	7.2	3.4
ゴマパン	66.8	-	12.0	29.2	240	27.4	11.5	6.7	2.4

数値はパン1個あたりの値を示す。

2-2 健常女性を対象とした負荷試験

試験は、健康な女子大学生（年齢 19～21 歳、BMI19～24）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。測定は、被験者自身が行い、記録した値を著者が点検した上で、統計処理を行った。測定した空腹時血糖値をベースラインとし、空腹時から摂取後 120 分までの血糖値変動曲線との間の面積を積算し、血糖値曲線下面積とした。

なお、本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、和洋女子大学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（承認番号第 912 号）。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。また、プロトコールを厳守できなかった被験者のデータは統計データから除外した。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。

2-3 耐糖能異常者を対象とした負荷試験

耐糖能異常を示す被験者において、アマニ摂取が食後血糖値やインスリンに及ぼす影響を検討するため、以下の実験を行った。被験者は、ヘモグロビン A1c (HbA1c) が 6.4% 以上かつ BMI が 25 以上の者とした。被験者の基礎データを表 5-3 に、臨床検査データを表 5-4 に示した。1 例高血圧が認められたが、他に特別な疾患は認められなかった。表 5-5 に被験者の空腹時血糖値、空腹時インスリン値およびその積である HOMA-R を示す。

表 5-3. 耐糖能異常の被験者 6 名の体組成データ

被験者 ID	性別	年齢	身長 (cm)	体重 (kg)	BMI (kg/m ²)	体脂肪率 ^a (%)	筋肉量 ^a (kg)	除脂肪量 ^a (kg)
A	男	39	161.0	71.5	27.58	29.7	47.5	50.2
B	男	46	169.0	96.3	33.72	31.8	62.2	65.7
C	男	44	163.0	86.7	32.63	32.9	55.1	58.2
D	男	62	167.0	80.1	28.73	27.7	54.9	58.0
E	女	50	153.0	60.5	25.84	34.7	37.2	39.5
F	女	52	147.0	57.2	26.49	32.7	36.3	38.5

BMI: Body Mass Index.

^a: インピーダンス法による数値.

表 5-4. 耐糖能異常の被験者 6 名の血圧および生化学データ

被験者 ID	性別	年齢	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	HbA1c (NGSP) (%)	TG (mg/dL)	Total-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	NEFA (mEq/L)
A	男	39	135	78	6.9	271	265	50	182	1.02
B	男	46	139	106	6.7	217	231	54	148	0.64
C	男	44	108	69	6.8	127	131	39	81	0.48
D	男	62	124	77	6.9	124	265	57	176	0.67
E	女	50	126	80	7.1	137	211	40	148	0.64
F	女	52	118	75	6.4	306	215	60	91	0.96

SBP: 収縮期血圧, DBP: 収縮期血圧, HbA1c: ヘモグロビン A1c(NGSP),
 TG: 中性脂肪, Total-C: 総コレステロール, HDL-C: HDL-コレステロール,
 LDL-C: LDL-コレステロール, NEFA: 遊離脂肪酸.

表 5-5. 耐糖能異常の被験者 6 名のインスリン抵抗性

被験者 ID	空腹時血糖値 (mg/dL)	空腹時インスリン (μ U/mL)	HOMA-R
A	127	16.6	5.2
B	128	13.3	4.2
C	108	22.6	6.0
D	125	11.5	3.6
E	134	9.4	3.1
F	136	15.7	5.3

HOMA-R: インスリン抵抗性指数.

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

HOMA-R が 2.5 以上の場合にインスリン抵抗性があると考えられている¹⁹⁾。そのため、6名の被験者 (3.1~6.0) はいずれも肥満に加えインスリン抵抗性が疑われる状態にあると判断できる。この6名の被験者は軽度糖尿病または糖尿病の疑いがある者であると考えられる。従って、本試験ではこれらの被験者を耐糖能異常者と称することとした。

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分、60分、90分、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、中性脂肪 (TG)、遊離脂肪酸 (NEFA) を測定した。血糖はグルコース脱水素酵素法、インスリンは化学発光免疫測定法

(CLIA)、TGは遊離グリセロール消去法、NEFAは酵素-UV法を用いて測定した。測定した空腹時の値をベースラインとし、空腹時から摂取後120分までの変動曲線との間の面積を積算し、血糖値曲線下面積(area under the curve: AUC)とした。加えて、インスリン抵抗性と相関する指数とされている $AUC_{insulin} \times AUC_{glucose}^{20)}$ を、インスリンの曲線下面積に血糖値曲線下面積を乗じて算出した。

2-4 倫理的配慮

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。ヘルシンキ宣言の精神に則り、被験者に十分な説明を行い、同意を得た上で実施した。和洋女子大学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(承認番号第919号)。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。また、プロトコールを厳守できなかった被験者のデータは統計データから除外した。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。

2-5 統計処理

データは平均値±標準誤差で示した。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。

3. 結果

3-1 健常女性を対象とした負荷試験における血糖値の変化

健常女性を対象に行った負荷試験において、空腹時血糖値を 100 とした血糖変化率を図 5-1 に示した。ゴマ群は摂取 20 分後に $129.6 \pm 2.7\%$ であり、コントロール群の $123.4 \pm 52.5\%$ と比較し高い傾向がみられたが、その後 40 分から 120 分まではゴマ群 (141.3 ± 2.8 、 130.3 ± 2.8 、 116.6 ± 2.2 、 $108.1 \pm 1.8\%$) とコントロール群 (141.0 ± 3.7 、 133.3 ± 3.1 、 119.1 ± 2.8 、 $110.8 \pm 2.1\%$) は有意差のない値を示した。アマニ群は摂取 60 分から 120 分後 (123.9 ± 2.7 、 110.9 ± 2.2 、 $104.5 \pm 1.7\%$) においてコントロール群 (133.3 ± 3.1 、 119.1 ± 2.8 、 $110.8 \pm 2.1\%$) と比較し有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

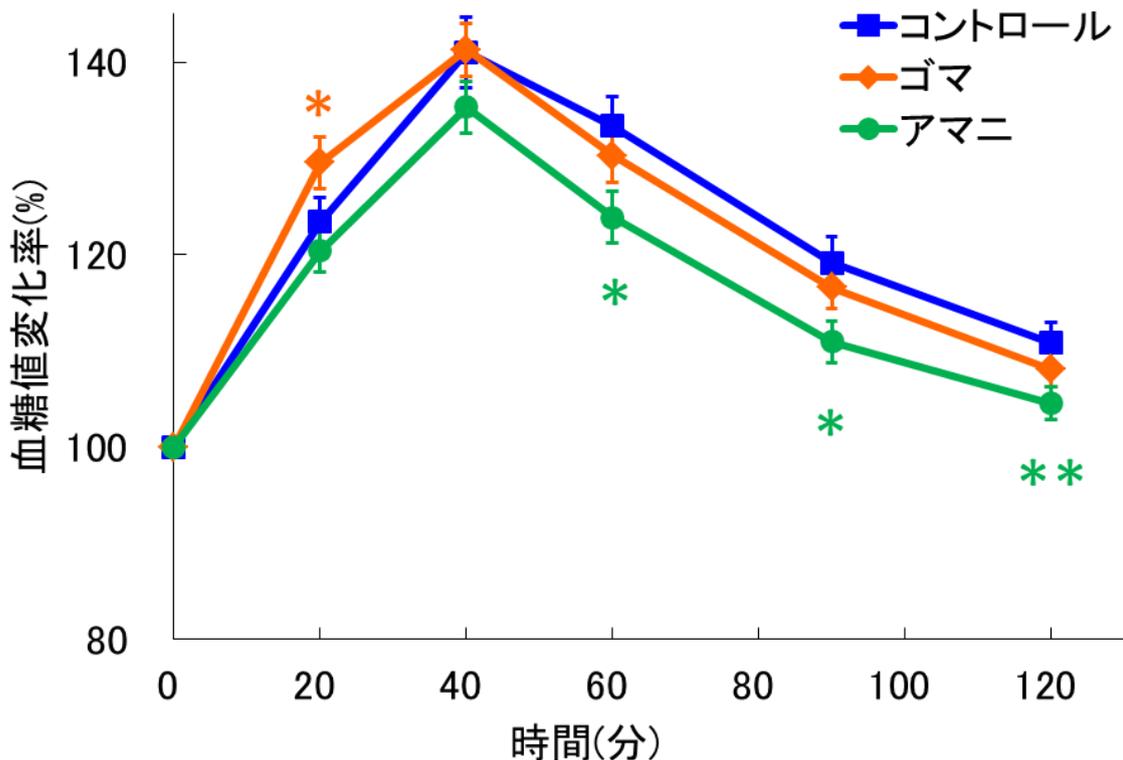


図 5-1. 健常女性におけるコントロールパン、ゴマパンおよびアマニパン摂取後の血糖値の変化

平均値 ± 標準誤差.

コントロール群 (■: n=88), アマニ群 (●: n=89), ゴマ群 (◆: n=90).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (コントロール群との差を示す).

血糖値曲線下面積を図 5-2 に示した。血糖値曲線下面積では、ゴマ群 (2,160 ± 120 mg/dL・120 min)、コントロール群 (2,090 ± 140 mg/dL・120 min)、アマニ群 (1,720 ± 110 mg/dL・120 min) の順に高い値を示した。コントロール群とゴマ群の間には有意差はなかったが、アマニ群はコントロール群およびゴマ群と比較し、いずれに対しても有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

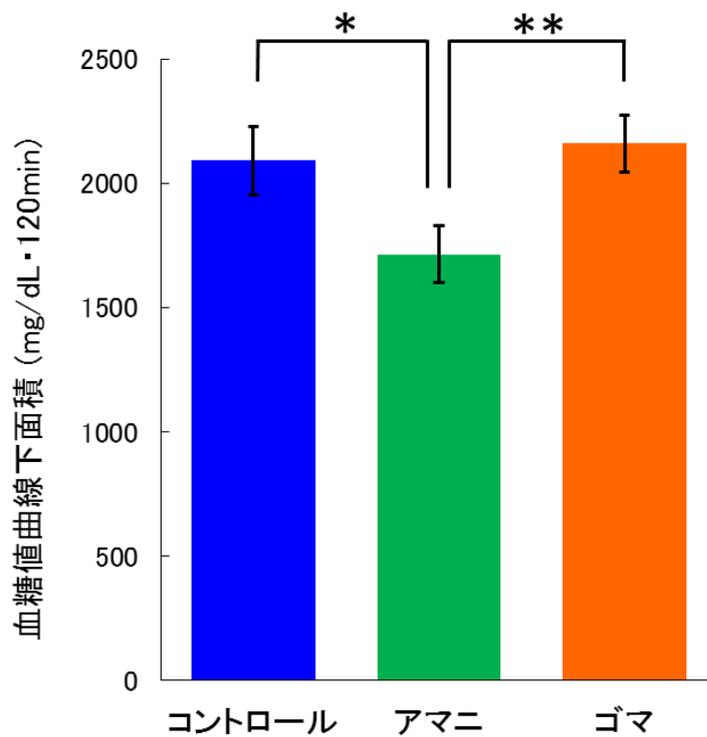


図 5-2. 健常女性におけるコントロールパン、ゴマパンおよびアマニパン摂取後の血糖値曲線下面積

平均値 ± 標準誤差.

コントロール群 (n=88), アマニ群 (n=89), ゴマ群 (n=90).

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

3-2 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

図 5-3 に示す血糖値の変化率では、摂取 30 分、60 分、90 分後においてアマニパン摂取時が $117\pm 5\%$ 、 $136\pm 5\%$ 、 $132\pm 2\%$ であり、コントロールパン摂取時の $133\pm 3\%$ 、 $167\pm 6\%$ 、 $154\pm 6\%$ に比べ有意に低い値を示した（摂取 30 分後： $p < 0.05$ 、摂取 60 分および 90 分後： $p < 0.01$ ）。TG の変化率では、摂取 90 分、120 分後においてアマニパン摂取時が $109\pm 7\%$ 、 $112\pm 6\%$ であり、コントロールパン摂取時の $132\pm 7\%$ 、 $129\pm 6\%$ に比べ有意に低い値を示した（ $p < 0.05$ ）。インスリン、NEFA の変化率においてはコントロールパン摂取時とアマニパン摂取時で有意な差は認められなかったが、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インスリン、NEFA とともに低値を示す傾向が認められた。

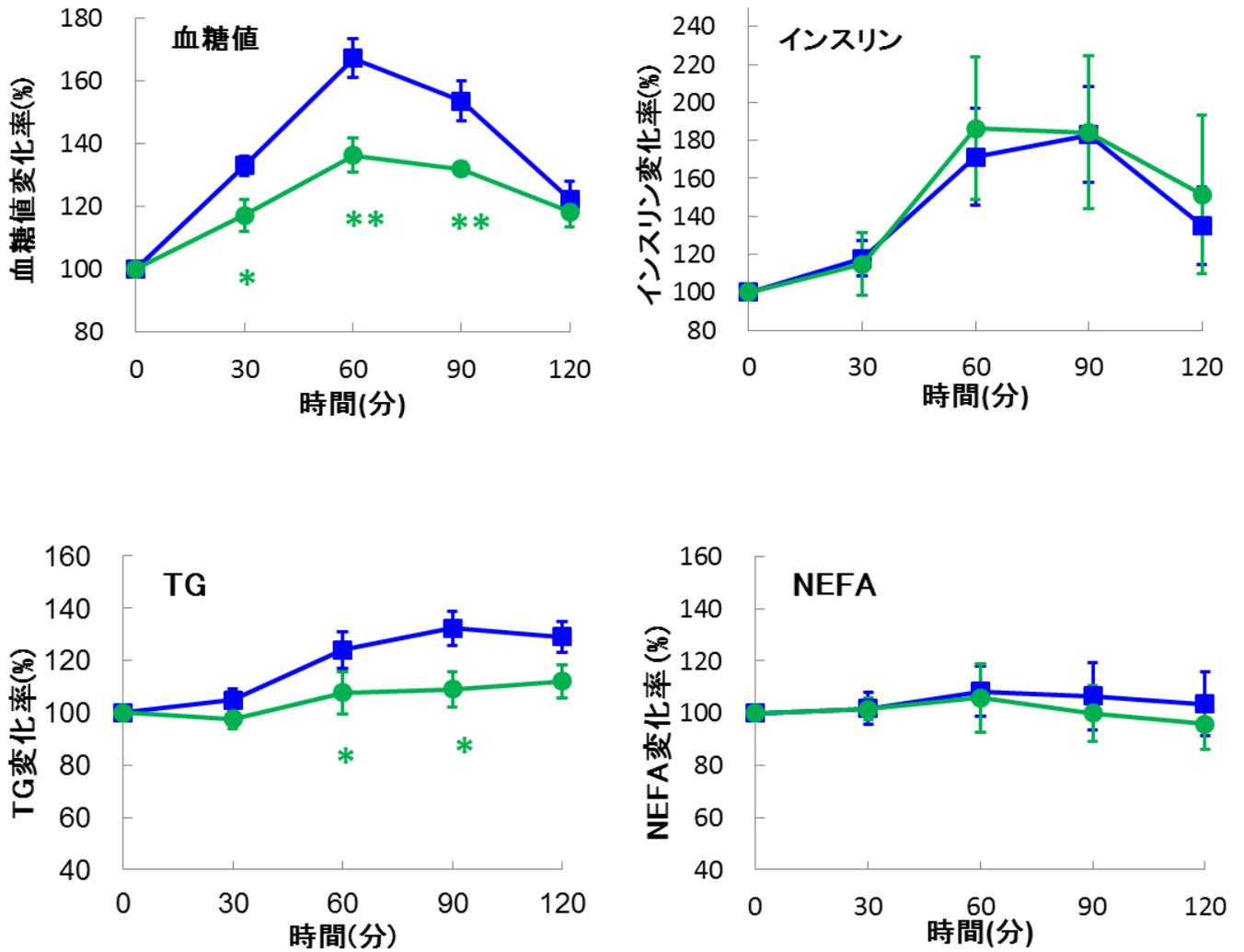


図 5-3. 耐糖能異常者におけるコントロールパンおよびアマニパン摂取後の血糖値、インスリン、中性脂肪および遊離脂肪酸の変化

TG: 中性脂肪, NEFA: 遊離脂肪酸.

平均値±標準誤差.

コントロール群 (■: n=6), アマニ群 (●: n=6).

*: p<0.05, **: p<0.01(コントロール群との差を示す).

図 5-4 に AUC insulin×AUC glucose を示す。AUC insulin×AUC glucose はアマニパン摂取時では $3,110,320 \pm 938,500$ ($\mu\text{U}/\text{mL} \times \text{mg}/\text{dL} \cdot 120\text{min}$)であり、コントロールパン摂取時の $4,496,930 \pm 1,085,060$ ($\mu\text{U}/\text{mL} \times \text{mg}/\text{dL} \cdot 120\text{min}$)と比較して低い値を示す傾向がみられた。

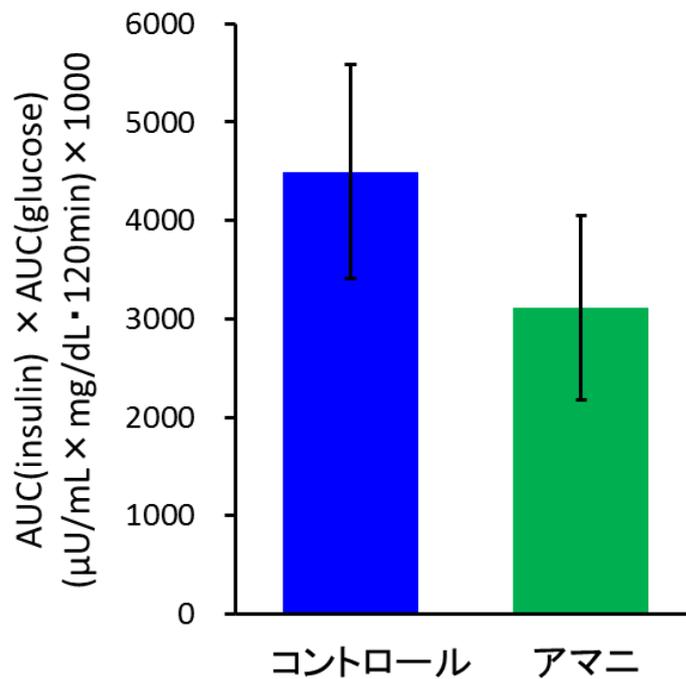


図 5-4. 耐糖能異常者におけるコントロールパンおよびアマニパン摂取後のインスリン抵抗性指数

平均値 ± 標準誤差.

コントロール群 (n=6), アマニ群 (n=6).

4. 考察

健康女性を対象とした負荷試験において、アマニパン摂取による血糖上昇抑制作用を検討した。空腹時血糖値の値を 100 とした変化率で比較した結果、アマニパン摂取群の摂取後 60 分から 120 分における血糖値の変化率がコントロールパン摂取群と比較し有意に低い値を示した。コントロールパンとアマニパンのエネルギー量および炭水化物量は等しく設計されているため、本試験の結果より、食後血糖値の上昇を緩やかにする食材として、アマニが有用である可能性が強く示唆された。

ゴマパン摂取群はコントロールパン摂取群に比べ、食後 20 分の血糖値において高値を示す傾向が見られ、血糖値曲線下面積ではゴマパン摂取群はアマニパン摂取群に比べ有意に高い値を示した。今回の試験で、アマニパン摂取とゴマパン摂取における食後血糖値の推移に違いが見られた原因として、リグナン含有量の違いが考えられる。リグナンとは、イソフラボン (isoflavone) やクメスタン (coumestan) と同様に、エストロゲン様作用を有する植物性エストロゲンの 1 種である。アマニには特に secoisolariciresinol diglucoside (SDG) が多く含まれている。Thompson ら²¹⁾は、1 g 当たりの総リグナン含有量を比較すると、アマニはゴマの 47 倍以上のリグナンが含まれていると報告している。矢ヶ崎ら²²⁻²⁴⁾は大豆イソフラボン的一种であるゲニステインがインスリンと同様に GLUT4 の膜移行を促進する可能性があるとして報告している。このような報告から、イソフラボンと同様に植物性エストロゲンであるリグナンにもインスリン感受性を高める作用やインスリン様作用が期待される。今後インスリン抵抗性改善作用についての詳細な検討が必要である。

耐糖能異常者に対する試験を行った結果、摂取 30 分、60 分、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血糖値が

低く、アマニパン摂取による食後血糖上昇抑制効果が確認された。一方、食後の血中インスリン値ではアマニパンとコントロールパン摂取時に有意差は認められなかった。通常、グルコース吸収が抑制されると、それに伴ってインスリン分泌も抑制される。本研究においてインスリン分泌の抑制が認められなかったことから、アマニ摂取によりグルコース吸収抑制以外の作用で血糖上昇が抑制されたと推察される。 $AUC_{insulin} \times AUC_{glucose}$ は、インスリン抵抗性の指標とされており、高値であるほどインスリン抵抗性が疑われる²⁰⁾。耐糖能異常者を対象とした試験において、この $AUC_{insulin} \times AUC_{glucose}$ が、アマニパン摂取時にコントロールパン摂取時と比べて低値を示す傾向がみられた。このことから、アマニパン摂取がインスリン感受性に影響を及ぼし、その結果食後の血糖上昇が抑制された可能性が示唆される。今後はグルカゴンや GLP-1 等の測定を行い、さらに詳細な作用メカニズムについて検討する必要がある。

耐糖能異常者に対する試験において、摂取 90 分、120 分後の TG がアマニパン摂取時にコントロールパン摂取時に比べて有意に低値を示し、アマニパン摂取による食後 TG 上昇抑制効果が確認された。アマニにはその重量の約 28% の食物繊維が含まれており、本研究で作製したアマニパンにはパン 1 個当たり食物繊維が 3.4g と、コントロールパン 1 個当たりの食物繊維 0.9g に比べ、約 4 倍含まれている。食物繊維には脂質の吸収を抑制し、食後の TG 上昇を抑制する効果があることが報告されている^{25, 26)}。これらの報告から、耐糖能異常者を対象とした本研究においてアマニパン摂取時に食後 TG の上昇が抑えられたのは、アマニに含まれる食物繊維の吸収抑制によるものと考えられる。また、アマニには、n-3 系脂肪酸である α -リノレン酸が高い割合で含まれている。 α -リノレン酸やエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの、n-3 系脂肪酸には血中脂

質低下作用や抗炎症作用があり^{27,28)}、心疾患や脳梗塞などを予防するとされており²⁹⁾、n-3系脂肪酸は脂肪酸合成を抑制することにより血中TGを低下させると考えられている³⁰⁾。しかし、食後60-90分で吸収された α -リノレン酸により血中のTGが低下するとは考えにくく、本試験におけるアマニ摂取による食後のTG低下は、n-3系脂肪酸ではなくむしろ食物繊維によるものと考えられる。

以上本研究の結果から、健常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、アマニパン摂取による食後血糖上昇抑制効果が認められた。また、耐糖能異常者を対象とした試験の方が、健常女性を対象とした試験よりもアマニパン摂取による食後血糖上昇抑制効果が顕著に認められた。このことから、アマニパン摂取による食後血糖上昇抑制作用は、糖尿病傾向者により効果的に作用することが示唆され、アマニパンが日常的に血糖コントロールに有用な食品となることが期待される。さらに、耐糖能異常者を対象とした試験において食後血糖上昇を有意に抑制し、食後血中TGの上昇も有意に抑制されたため、アマニパンが食後血糖値のコントロールだけでなく、脂質代謝のコントロールにも有用であることが示唆された。今後は試験者数を増やした試験や長期摂取試験を行ってアマニの作用をさらに検証するとともに、作用メカニズムの解明を行う必要がある。

また、一般的に天然物は栽培条件や収穫時期によって含有成分にバラツキがみられる。そのため、作用成分を特定し、再現性の検証を行う必要がある。

引用文献

- 1) Anonymous: Nutritional profile of No. 1 Canada Western flaxseed and of yellow flaxseed samples. *Canadian Grain Commission*, Winnipeg, MB. (2001).
- 2) Morris DH: Flax-A health and nutrition primer. *Flax council of Canada*, Manitoba, 4: 13 (2007).
- 3) Muir AD, Westcott ND: History of the cultivation and use of flaxseed. In: Flax: The genus *Linum* (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles). *Taylor and Francis Inc.*, New York, 1-21 (2003).
- 4) Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N: Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr. Cancer*, 54(2): 184-201 (2006).
- 5) Prasad K: Antioxidant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *Int. J. Angiol.*, 9(4): 220-225 (2000).
- 6) Lucas EA, Wild RD, Hammond LJ, Khalil DA, Juma S, Daggy BP, Stoecker BJ, Arjmandi BH: Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(4): 1527-1532 (2002).
- 7) Jenkins DJ, Kendall CW, Vidgen E, Agarwal S, Rao AV, Rosenberg RS, Diamandis EP, Novokmet R, Mehling CC, Perera T, Griffin LC, Cunnane SC: Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.*, 69(3): 395-402 (1999).
- 8) Rhee Y, Brunt A: Flaxseed supplementation improved insulin resistance in

- obese glucose intolerant people: a randomized crossover design. *Nutr. J.*, 10(44) (2011).
- 9) Abuelgassim AO: Effect of flax seeds and date palm leaves extracts on serum concentrations of glucose and lipids in alloxan diabetic rats. *Pak. J. Biol. Sci.*, 13(23): 1141-1145 (2010).
- 10) Mohamed DA, Al-Okbi SY, El-Hariri DM, Mousa II: Potential Health Benefits of Bread Supplemented with Defatted Flaxseeds under Dietary Regimen in Normal and Type 2 Diabetic Subjects. *Pol. J. Food. Nutr. Sci.*, 62(2): 103-108 (2012).
- 11) Cunnane SC, Hamadeh MJ, Liede AC, Thompson LU, Wolever TM, Jenkins DJ: Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61(1): 62-68 (1995).
- 12) Barre DE, Mizier-Barre KA, Grisetti O, Hafez K: High Dose Flaxseed Oil Supplementation May Affect Fasting Blood Serum Glucose Management in Human Type 2 Diabetics. *J. Oleo. Sci.*, 7(5): 269-273 (2008).
- 13) Taylor CG, Noto AD, Stringer DM, Froese S, Malcolmson L: Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status, and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.*, 29(1): 72-80 (2010).
- 14) Bischoff H: Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur. J. Clin. Invest.*, 24(3): 3-10 (1994).
- 15) The DECODE study group, on behalf of the European diabetes epidemiology group: Glucose tolerance and cardiovascular mortality: Comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch. Intern. Med.*, 161(3): 397-405 (2001).

- 16) Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV: Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34(3): 362-366 (1981).
- 17) International Diabetes Federation: Guideline for Management of Postprandial Glucose in Diabetes 2011. Home Page
<http://www.idf.org/2011-guideline-management-postmeal-glucose-diabetes>
(accessed 12 Dec 2012)
- 18) STANDARD TABLES OF FOOD COMPOSITION IN JAPAN Fifth Revised and Enlarged Edition. *Ishiyaku Publishers, Inc.*, Tokyo, 5(2): 268-269 (2006).
- 19) Keskin M, Kurtoglu S, Kendirci M, Atabek ME, Yazici C: Homeostasis model assessment is more reliable than the fasting glucose/insulin ratio and quantitative insulin sensitivity check index for assessing insulin resistance among obese children and adolescents. *J. Am. Pediatrics.*, 115(4): 500-503 (2005).
- 20) Takeuchi M, Kanazawa A, Suzuki M, Hasegawa M, Kimura Y, Kodama K, Ryomoto K, Hattori Y, Harano Y: Evaluation of factors during OGTT to correlate insulin resistance in non-diabetic subjects. *Endocr. J.*, 47(5): 535-542 (2000).
- 21) Thompson LU Cunnane SC: Analysis and bioavailability of lignans. In: Flaxseed in human nutrition, Thompson LU and Cunnane SC, 2nd ed, *AOCS Press*, Campaon, 92-116 (2003).
- 22) 矢ヶ崎一三, 末安俊明, 河乗瑾, 長岡真聡, 米澤貴之, 加藤久典:大豆イソフラボンによるインスリン抵抗性の克服とトランスクリプトームお

- よびプロテオーム解析による機構解明(第一報). 大豆たん白質研究, 12: 22-26 (2009).
- 23) 矢ヶ崎一三, 末安俊明, 河秉瑾, 伊東克晃, 米澤貴之, 加藤久典: 大豆イソフラボンによるインスリン抵抗性の克服とトランスクリプトームおよびプロテオーム解析による機構解明(第二報). 大豆たん白質研究, 13: 23-29 (2010).
- 24) 矢ヶ崎一三, 末安俊明, 河秉瑾, 伊東克晃, 米澤貴之, 加藤久典. 大豆イソフラボンによるインスリン抵抗性の克服とトランスクリプトームおよびプロテオーム解析による機構解明(第三報). 大豆たん白質研究, 14: 1-6 (2011).
- 25) Sandström B, Hansen LT, Sørensen A: Pea fiber lowers fasting and postprandial blood triglyceride concentrations in humans. *J. Nutr.*, 124(12): 2386-2396 (1994).
- 26) Lecumberri E, Goya L, Mateos R, Alía M, Ramos S, Izquierdo-Pulido M, Bravo L: A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*, 23(4): 332-41 (2007).
- 27) Kuriki K, Wakai K, Matsuo K, Hiraki A, Suzuki T, Yamamura Y, Yamao K, Nakamura T, Tatematsu M, Tajima K: Gastric cancer risk and erythrocyte composition of docosahexaenoic acid with anti-inflammatory effects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 16: 2406-2415 (2007).
- 28) Degirolamo C, Kelley KL, Wilson MD, Rudel LL: Dietary n-3 LCPUFA from fish oil but not α -linolenic acid-derived LCPUFA confers atheroprotection in mice. *J. Lipid. Res.*, 51(7): 1897-1905 (2010).
- 29) Marckmann P, Gronbaek M: Fish consumption and coronary heart disease

mortality. A systematic review of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53: 585-590 (1999).

- 30) Mochi Y, Tsunoda N, Shiba S, Muraki E, Kasono K: Fish oil suppresses weight gain and fat accumulation in the Liver on weight rebound in KK-A^y mice. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 63(2): 69-77 (2010).

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

1. 緒言

わが国において糖尿病予防は国民の健康維持・増進の観点から非常に重要な課題とされている。糖尿病の予防、増悪化防止には食後の過血糖の是正が有用であることが臨床的に示されており¹⁻³⁾、食後血糖値の上昇を穏やかにする食材の探索が求められている。また、食品の組み合わせによる食事療法について注目され始めている。

日々の生活のなかで常に理想的な食生活や生活リズムを意識することは極めて困難である。任ら⁴⁾は、87名の糖尿病患者のうち60%以上の者が食事療法や日常生活が変わることに対するストレスを抱えていると報告している。従って、日々の血糖コントロールに貢献するためには、食品の機能性を探求するだけでなく、日常生活に取り入れやすいスタイルで持続可能なものであるかという点についても十分に考慮する必要がある。

これまでの研究において、正常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について検討し、紅茶摂取による食後血糖上昇抑制効果を確認した(III章)。また、健常女性および耐糖能異常者に対してアマニパン摂取による食後血糖上昇抑制効果を確認した(V章)。紅茶とパンの組み合わせは一般的であり、日常生活に取り入れやすいスタイルであると考えられる。また、これら2つの食後血糖上昇抑制効果を有する食品を組み合わせることで、食後血糖上昇抑制作用がより効果的に発揮されることが期待される。一方、複数の機能性食品を組み合わせることで、互いの作用を阻害する事も危惧される。

そこで、本章では、紅茶とアマニの同時摂取による食後血糖上昇抑制効果を確認することを目的に健常女性を対象に摂取試験を行った。

2. 方法

2-1 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℃）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。なお、自主飲用が可能であることを考慮した上で紅茶の濃度を設定した。いずれの試験飲料も 1 人当たり 300 mL を飲用させた。

2-2 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。2種類のパンの組成を表 6-1 に示す。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。これは、糖尿病食事療法のための食品交換標表 1 の約 4 単位分に相当し、朝食主食 1 回分を想定して設定した。なお、パンの作製は日本製粉株式会社に依頼した。

表 6-1. コントロールパンおよびアマニパンの組成

	重量 (g)	アマニ (g)	強力粉 (g)	エネルギー (kcal)	炭水化物 (g)	油脂 (g)	蛋白質 (g)	食物繊維 (g)
コントロールパン	89.4	-	43.2	320	36.5	15.6	6.0	1.2
アマニパン	92.1	16.4	41.0	320	36.5	13.5	9.6	4.5

数値はパン 1 個あたりの値を示す。

アマニパンに使用したローストアマニ粉末の成分組成を表 6-2 に示す。ローストアマニ粉末 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）およびリグナンが 770 mg であった。タンパク質はケルダール法、脂質はソックスレー抽出法、 α -リノレン酸は GC 法、食物繊維は酵素-重量測定法、リグナンは HPLC 法により測定した。炭水化物は、総重量から脂質、タンパク質、灰分と水分を減じて算出した。ロースト粉末アマニのエネルギー、タンパク質、脂質、 α -リノレン酸、炭水化物の測定は、日本食品分析センターに依頼した。リグナンの測定は日本製粉株式会社に依頼した。

表 6-2. ローストアマニ粉末 100g あたりの栄養成分

栄養成分	含有量(100g)あたり
エネルギー	607 (kcal)
総たんぱく質	22.7 (g)
総脂質	44.6 (g)
α -リノレン酸	21.3 (g)
総炭水化物	28.5 (g)
食物繊維	21.3 (g)
リグナン	770 (mg)

2-3 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 グループに分け、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。試験食摂取後の血糖値の変化を4つのグループ間で比較した。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。その際、飲料のみまたはパンのみを先に摂取するのではなく、飲料をパンと同時に摂取するように指示した。パン摂取前、摂取後30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、空腹時から摂取後120分までの変動曲線との間の面積を積算し、血糖値曲線下面積とした。

2-4 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（承認番号第1012号）。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。また、プロトコールを厳守できなかった被験者のデータは統計データから除外した。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。

2-5 統計処理

実験結果各群の平均値±標準誤差で示した。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コントロール群を基準としたDunnnettの多重比較を行い、食後30分の血糖値変化率における検定では紅茶アマニ群を基準としたDunnnett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。

3. 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

試験飲料および試験食摂取後の血糖値の変化を図 6-1 に示す。試験飲料および試験食摂取前の血糖値は、コントロール群が 74.4 ± 0.9 mg/dL、紅茶群が 72.7 ± 0.8 mg/dL、アマニ群が 73.1 ± 0.9 mg/dL、紅茶アマニ群が 73.2 ± 1.0 mg/dL であった。食後 30 分の血糖値はコントロール群が 124.1 ± 2.5 mg/dL、紅茶群が 111.0 ± 2.6 mg/dL、アマニ群が 120.3 ± 2.3 mg/dL、紅茶アマニ群が 99.3 ± 2.8 mg/dL であり、紅茶群および紅茶アマニ群が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： $p < 0.001$ ）。食後 60 分の血糖値は、コントロール群が 126.4 ± 3.1 mg/dL、紅茶群が 116.2 ± 2.9 mg/dL、アマニ群が 112.6 ± 3.1 mg/dL、紅茶アマニ群が 121.1 ± 2.9 であり、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 分の血糖値は、コントロール群が 106.9 ± 2.2 mg/dL、紅茶群が 105.6 ± 2.6 mg/dL、アマニ群が 99.1 ± 2.3 mg/dL、紅茶アマニ群が 109.2 ± 3.5 であった。食後 120 分の血糖値は、コントロール群が 90.6 ± 2.2 mg/dL、紅茶群が 92.4 ± 2.3 mg/dL、アマニ群が 85.6 ± 1.6 mg/dL、紅茶アマニ群が 94.5 ± 2.4 mg/dL であった。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。

食前の値から食後 30 分および 120 分における血糖値曲線下面積を図 6-2 に示す。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（ $p < 0.05$ ）。

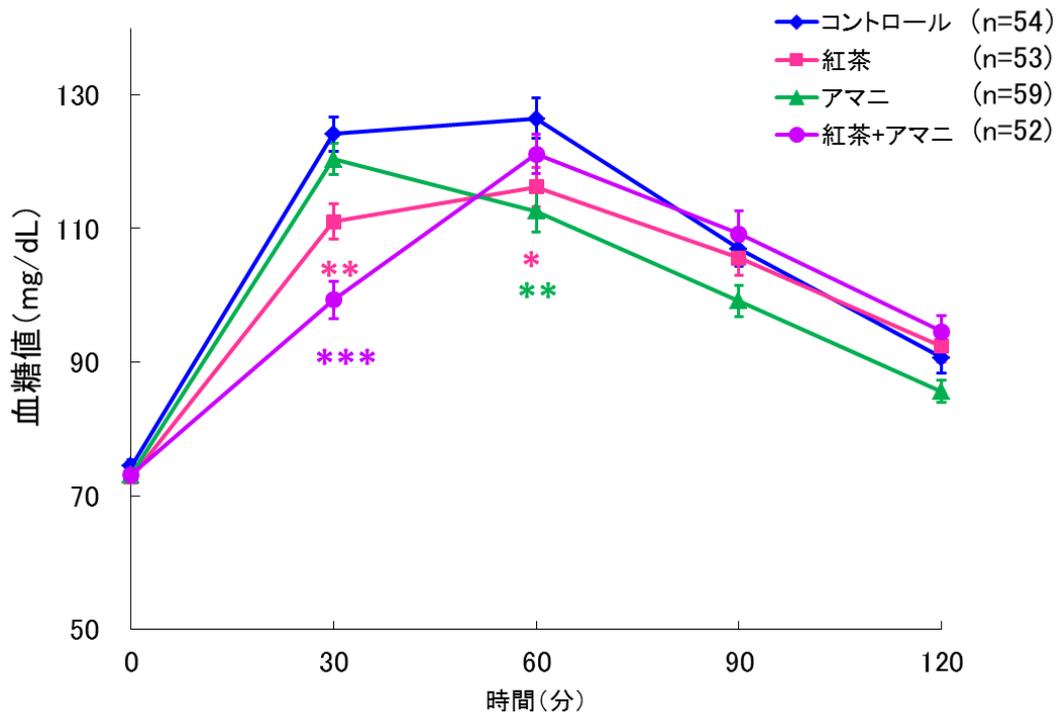


図 6-1. 試験飲料および試験食摂取後の血糖値の変化

平均値±標準誤差.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (コントロール群との差を示す).

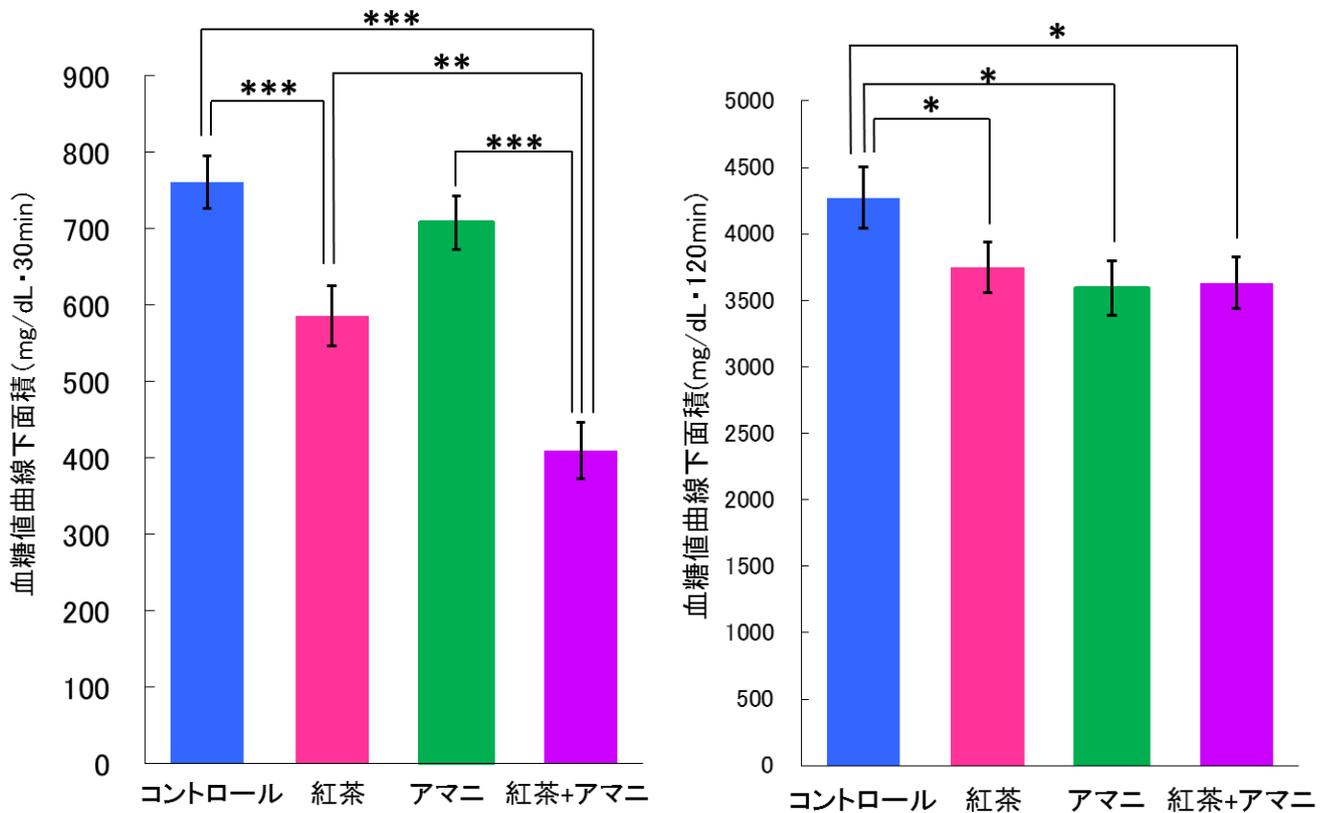


図 6-2. 食後 120 分および 30 分における血糖値曲線下面積

平均値±標準誤差.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4. 考察

Ⅲ章において、正常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について検討し、紅茶に食後血糖上昇抑制効果があることが確認された。また、Ⅴ章において、健常女性および糖尿病傾向者に対してアマニパン摂取による食後血糖上昇抑制効果を確認した。そこで、本章では、紅茶とアマニの組み合わせによる食後血糖上昇抑制効果を確認することを目的に健常女性を対象に摂取試験を行った。

健常女性を4グループに分け、水とコントロールパンを摂取するコントロール群、紅茶とコントロールパンを摂取する紅茶群、水とアマニパンを摂取するアマニ群、紅茶とアマニパンを摂取する紅茶アマニ群とした。試験飲料および試験食を15分間かけて摂取させ、その後の血糖値の変化を比較した結果、紅茶群はコントロール群と比較して食後30分、60分の血糖値の上昇を有意に抑制した。アマニ群はコントロール群と比較して食後60分の血糖上昇を有意に抑制した。Ⅴ章においてもアマニ群では食後60分の血糖上昇を抑制しており、アマニ摂取による食後血糖上昇抑制効果についての再現性が確認された。紅茶アマニ群はコントロール群と比較して食後30分の血糖上昇を有意に抑制した。特に紅茶アマニ群は、食後30分の血糖上昇をアマニ群、紅茶群よりも顕著に血糖上昇を抑制していることが確認された。

Woerleら²⁾は血糖値管理の指標として用いられているHbA1cの値を目標値に調節するには食後の血糖上昇の是正が重要であると報告している。また、Shiraiwaら³⁾は、2型糖尿病患者を対象に横断的研究を行った結果、食後血糖値の急激な上昇を抑えることはHbA1cや空腹時血糖値の管理よりも糖尿病合併症予防に重要であると報告している。従って、食後の急激な血糖上昇を抑制することは糖尿予防や糖尿病合併症予防に極めて効果的な

方法である。本研究において、紅茶アマニ群は、他の3群と比較して有意に食後30分の血糖上昇を抑制した。このことから、紅茶のみ、アマニパンのみよりも紅茶とアマニパンを組み合わせて摂取することで、より効果的な食後血糖上昇抑制が期待できることが示された。この結果から、紅茶の食後血糖上昇抑制作用とアマニの食後血糖上昇抑制作用は拮抗せずに働いた可能性が示唆される。今後、紅茶とアマニの食後血糖上昇抑制効果に関する作用メカニズムの違いについて更に検討していく必要があると考えられる。

以上のことから、健常女性を対象に、紅茶とアマニパンの組み合わせによる食後血糖上昇抑制効果を比較した結果、紅茶とアマニパンを共に摂取した場合、紅茶およびアマニパン単独に摂取した場合と比較し、食後30分における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ことから¹⁻³⁾、紅茶とアマニパンの組み合わせが糖尿病の予防および増悪化の軽減に有用であることが示唆された。

引用文献

- 1) Bischoff H: Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur. J. Clin. Invest.*, 24 (3): 3-10 (1994).
- 2) Woerle HJ, Neumann C, Zschau S, Tenner S, Irsigler A, Schirra J et al. Impact of fasting and postprandial glycemia on overall glycemic control in type 2 diabetes Importance of postprandial glycemia to achieve target HbA1c levels. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77: 280-285 (2007).
- 3) Shiraiwa T, Kaneto H, Miyatsuka T, Kato K, Yamamoto K, Kawashima A et al. Post-prandial hyperglycemia is an important predictor of the incidence of diabetic microangiopathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336(1): 339-345 (2005).
- 4) 任和子, 中井義勝, 森本昌親: 糖尿病に関連した日常生活のストレス原因と燃えつき状態について. *コメディカルコーナー*, 43 (11): 983-987 (2000).

第Ⅶ章 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¹⁾。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。

まず、紅茶の有用性について検討を行った。Ⅱ章において、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用を確認し、紅茶の種類や抽出条件により α -グルコシダーゼ活性抑制作用に違いが生じることを明らかにした。また、紅茶の α -グルコシダーゼ活性抑制作用の主な作用成分として遊離型テアフラビンの関与が考えられた。Ⅲ章において、紅茶の摂取により、食後の血糖上昇が抑制されることを正常マウスおよび健常女性における摂取試験で明らかにした。また、紅茶を食前や食後に摂取するよりも、糖質と紅茶を同時に摂取した場合により効果的に食後の血糖上昇を抑制することが示唆された。Ⅳ章では、2型糖尿病モデルマウスの試験において、紅茶摂取による血糖値およびインスリンの上昇抑制効果を確認し、紅茶がインスリン抵抗性抑制効果を有することが示唆された。加えて、DNAマイクロアレイ解析およびReal-time PCR解析から、紅茶摂取による肝臓細胞でのFosやJunの発現減少がみられ、これらが会合してAP-1を形成することから、AP-1の発現減少が示唆された。糖尿病による高血糖がFosやJunの発現量を増加させるとの報告があり^{2,3)}、このFosやJunの発現量の増加が糖尿病性腎肥大の初期段階で起こると報告されている⁴⁾。そのため、紅茶摂取が糖尿

病性腎症への進行を抑制する可能性が示唆された。

次に、アマニの有用性について検討を行った。V章において、健常女性を対象とした試験を行い、アマニの摂取が食後の血糖上昇を抑制することを確認した。また、ゴマ摂取では食後の血糖上昇抑制効果が見られなかったことから、アマニ特有のリグナンであるSDGの関与が考えられた。また、耐糖能異常の男女を対象とした試験において、アマニ摂取による食後血糖上昇抑制効果および食後TG上昇抑制効果を確認した。さらに、インスリン分泌の抑制効果は見られなかったことから、アマニがインスリン感受性を高める可能性が示唆された。

VI章において紅茶とアマニの組み合わせが食後血糖上昇に与える影響について検討する目的で健常女性を対象に試験を行った。その結果、紅茶とアマニを組み合わせることで、紅茶およびアマニの単独摂取よりも食直後の血糖上昇を顕著に抑制することが示唆された。

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⁵⁻⁸⁾、いかに食直後の急激な血糖上昇を抑制するかが課題とされている。本研究において紅茶とアマニの同時摂取が、単独摂取よりも食直後の血糖上昇を明確に抑制したことから、紅茶とアマニを同時に摂取する事で、より効果的に糖尿病の予防および糖尿病病態の進行抑制が可能となることが示唆された。また、糖尿病では食後の高血糖が起りやすく、高血糖状態が継続することで、糖尿病の病態が進行し、合併症発症リスクが高まる^{9,10)}。本研究において、2型糖尿病モデルマウスや耐糖能異常者に対して、紅茶およびアマニの血糖上昇抑制効果が確認された。このことから、紅茶およびアマニが糖尿病予防だけでなく、糖尿病病態の進行を抑制し、糖尿病合併症の予防に有用であることが示唆された。

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について明らかとなった。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いる。このため、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。

引用文献

- 1) 「厚生労働省平成 23 年(2011)患者調査の概況」 Home Page
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/11/index.html> (2013/6/6 現在)
- 2) Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y, Koide H: Alteration of growth-related proto-oncogene expression in diabetic glomeruli by a specific endothelin receptor A antagonist. *Nephrol. Dial. Transplant*, 11(8): 1528-1531 (1996).
- 3) Kreisberg JI, Radnik RA, Ayo SH, Garoni J, Saikumar P: High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int.*, 46(1): 105-112 (1994).
- 4) Shankland SJ, Scholey JW: Expression of growth-related protooncogenes during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.*, 47(3): 782-788 (1995).
- 5) Bischoff H: Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur. J. Clin. Invest*, 24(3): 3-10 (1994).
- 6) Woerle HJ, Neumann C, Zschau S, Tenner S, Irsigler A, Schirra J et al. Impact of fasting and postprandial glycemia on overall glycemic control in type 2 diabetes Importance of postprandial glycemia to achieve target HbA1c levels. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 77(2): 280-285 (2007).
- 7) Shiraiwa T, Kaneto H, Miyatsuka T, Kato K, Yamamoto K, Kawashima A et al. Post-prandial hyperglycemia is an important predictor of the incidence of diabetic microangiopathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 336(1):339-345 (2005).
- 8) 田しま尚子: 軽症糖尿病-治療から予防への発想転換-. 東京内科医学会誌, 19(2): 63-68 (2003).
- 9) 東隆行, 西川武志, 荒木栄一: 経口ブドウ糖負荷試験による負荷後血糖値と脈波伝播速度および冠動脈疾患リスクとの相関. 糖尿病,

47(10): 807-814 (2004).

- 10) 秋山俊治, 上田城久朗, 吉川裕之, 広畑佳秀, 木原康之, 中村早人, 大槻眞: α -グルコシダーゼインヒビターによる糖尿病発症抑制の可能性. 糖尿病, 45(11): 791-795 (2002).

謝辞

本研究の遂行および本論分の執筆にあたり、終始御指導、ご教授賜りました和洋女子大学大学院総合生活研究科教授鬘谷先生に深甚なる謝意を表します。

本論文の執筆にあたり御校閲、御指導賜りました和洋女子大学大学院総合生活研究科教授金子健彦先生、柳沢幸江先生、湊久美子先生、人間総合科学大学教授橋詰直孝先生、東京海洋大学教授矢澤一良先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行、さらに本論文の執筆にあたり深いご理解と親身な御指導、御助言頂きました和洋女子大学大学院総合生活研究科准教授本三保子先生に謹んで深謝いたします。また、本研究の実験を遂行するにあたり、協力を頂いた人間栄養学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

本研究の DNA マイクロアレイ解析を実施するにあたりご助言をいただきました城西大学薬学部教授和田政裕先生、助手中谷祥恵先生に深謝申し上げます。

アマニの評価についてご支援を頂いた日本アマニ協会および試験食の作製をして頂いた日本製粉株式会社に心より御礼申し上げます。

なお、本論文 V 章の研究はエリザベス・アーノルド富士財団の学術研究助成によって遂行されたものであり、同財団に感謝の意を表します。

また、多くの励ましのお言葉をくださいました和洋女子大学の先生方、助手・実験助手の皆様にご心より感謝申し上げます。

さらに、犠牲になった動物たちに謝意を表します。

最後に、私の意志を尊重し、いつも暖かく見守り応援してくれた家族、友人の皆様にご心より感謝致します。

資料



写真 1. コントロールパン(320kcal)



写真 2. アマニパン(320kcal)