1 - デオキシノジリマイシンを活用した血糖値上昇抑制桑葉製品の開発

誌名	農業および園芸 = Agriculture and horticulture
ISSN	03695247
著者名	木村,俊之
発行元	養賢堂
巻/号	81巻9号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1001-1007
発行年月	2006年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

1-デオキシノジリマイシンを活用した血糖値上昇抑制桑葉製品の開発

木村 俊之*

〔キーワード〕：桑，糖尿病，1-デオキシノジリマイシン（DNJ），中山間振興，α-グルコシダーゼ阻害剤（α GI）

1．はじめに

近年，α-グルコシダーゼ阻害剤（α GI）が，食後の高血糖およびインスリン過分泌を抑制することで2型糖尿病発症を予防しうることが示され，α GI食品が注目されている．桑葉は1-デオキシノジリマイシン（DNJ）と呼ばれるブドウ糖（グルコース）の構造類似物質を含み，強力なα GI作用を有するため，α GI食品素材として注目される．DNJはこれまで，定量が困難であり，DNJを生かす桑葉の商品開発が十分には行われていなかったが，われわれがDNJの測定法を開発したことにより，DNJ高含有桑葉製品の開発が可能となった．本稿では，桑と糖尿病に関する社会背景と桑DNJを活用した問題解決への取り組みを簡単に紹介する．

2．糖尿病の現状

(1) 糖尿病について

糖尿病とは，血液に含まれるグルコースの濃度が正常値よりも高い（高血糖）状態にある病気である．高血糖の状態が長く続くと，網膜症，腎症，神経障害などの深刻な合併症を引き起こす．

われわれは米飯等の炭水化物を食べて生活エネルギーを得ている．米飯（デンプン）は口，胃，十二指腸を経て消化され，小腸にあるグルコシダーゼと呼ばれる酵素で最終的にグルコース（単糖）に分解され体内に吸収される．そのため，米飯を食べれば血液中のグルコースの濃度（血糖値）は高まる．健常であれば，高血糖情報によりインスリンと呼ばれるホルモンが膵臓のランゲルハンス島β細胞から分泌され，その作用により過剰な糖分は骨格筋，肝臓，脂肪組織などに送り込まれ，血糖はすみやかに正常な状態に戻る．このシステムに何らかの異常がおきると，高血糖状態が維持されることにより，糖尿病となる．

(2) 糖尿病は生活習慣病

糖尿病は2つに大別される．ひとつは自己免疫や感染性疾患などによりインスリン産生細胞が破壊されインスリンの絶対量が不足する1型と，インスリンの分泌量の低下およびインスリンの標的組織である骨格筋，肝臓，脂肪組織でのインスリンの作用が低下する2型の糖尿病である．2型糖尿病は糖尿病患者の95％を占め，過食やストレスなどの生活習慣や老化によるインスリン産生機能の低下などが原因とされる生活習慣病であり，食習慣の改善により予防が可能である．

わが国における2型糖尿病患者数は厚生労働省の「平成14年度糖尿病実態調査報告」（厚生労働省 2004）によれば，「糖尿病が強く疑われる人」は約740万人，「糖尿病の可能性を否定できない人」は約880万人で，合わせて約1,620万人である．その数は成人の6人に1人が糖尿病かその予備軍という状況である．この数は，過去の調査よりも増加しており（「平成9年度糖尿病実態調査報告」厚生省 1999），今後，高齢化社会を迎えるにあたり，さらに増えると予想される．医療費についてみると，平成15年度の糖尿病の医療費は1兆1,465億円であり，やはり過去よりも増大している（「平成15年度国民医療費の概況」厚生労働省 2005）．このように糖尿病の現状はかなり深刻であり，その対策は国民的関心事であるとともに，急務である．

(3) αグルコシダーゼ阻害剤（α GI）

2型糖尿病の治療には，食事療法，運動療法，薬物療法がある．これらは摂取カロリーを制限し，食後血糖値上昇を抑制したり，グルコースの異化を促進し，血糖値を下げようとするものである．糖尿病の治療薬には膵臓インスリン産生細胞に働

* 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
東北農業研究センター（Toshiyuki Kimura）

0369－5247/06/¥500/1論文/JCLS

きかけインスリン分泌を促すもの（スルホニル尿素薬），小腸粘膜上に存在するα-グルコシダーゼの作用を阻害することにより，糖質の消化・吸収を遅延させ食後過血糖を抑制するα-グルコシダーゼ阻害剤（α GI）がある．

近年，α GIであるアカルボースを用いたSTOP-NIDDM（Study To Prevent Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus）と呼ばれる大規模介入試験が行われ，2型糖尿病の発症を予防，もしくは遅延させるという報告がなされ注目されている（Chiassonら 2002）．報告では，1,429人の耐糖能異常者を対象に，アカルボースの2型糖尿病発症予防効果を検討している．その結果，アカルボースは，糖尿病への移行を減らしただけではなく，多くの症例で耐糖能異常の状態を正常の耐糖能レベルまで戻した．実際，アカルボース群で患者が正常の耐糖能状態に戻る割合は，プラセボ（偽薬）群と比べて30％も高かったとしている．これは，食後の急激な血糖値の上昇を抑えることで，インスリンを節約し，インスリン産生細胞の負担を軽減し，高血糖を改善できたためと思われる．このようにα GIは食後高血糖のコントロールをすることにより糖尿病の発症を遅延できるとして期待される．

3．桑について

(1) 桑の現状

古来，桑は養蚕のため植栽されてきた．とくに明治から昭和にかけては，養蚕業はわが国の主産業であり広大な桑園面積を維持してきた．しかし，昭和の高度成長期を経て，産業構造変化による軽工業の衰退，和装から洋装による需要の減少，海外からの安い絹の流入などの理由により，わが国の絹産業は後退した．平成に入ってからは，従事者が高齢化により引退する時期を迎えるようになり，桑園管理は放棄され遊休化が急速に進行している．桑は中山間傾斜地に広範に植栽されているが，これらの地域には桑に代わる適当な農産物がないことから，養蚕に代わる桑樹の有効利用と産業創出が切望されている．これまで，桑椹（桑の実，くわご），桑の芽，桑の葉等を生かした商品開発の取り組みが，国，県，生産者，加工業者等を問わず盛んに試みられてきた（木村2000，2004）他，桑の葉は近年さまざまな健康機能性が検討されたことから健康ブームにのり，最近ではスーパー等の店頭で見かけるようになっている．

(2) 桑葉の機能性

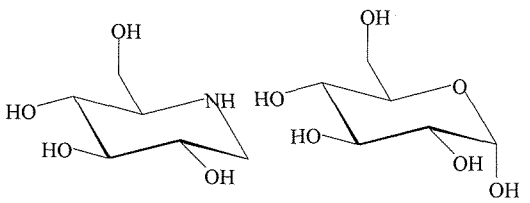
桑葉の機能性についてはさまざまに検討がされている．ミネラル含量において，カルシウム，鉄，亜鉛に富んでいること，食物繊維量は52.9％と多く，食物繊維に富むゴボウ（51.0％乾燥重当たり）ゼンマイ（53.5％乾燥重当たり）に匹敵すると報告している．この他，高血圧抑制効果，血中脂質抑制効果，便通改善効果が報告されている（「機能性食品に関する共同研究事業報告」神奈川県1992，1996）．

(3) 血糖値改善効果

桑は鎌倉時代に栄西禅師が著した「喫茶養生記」に桑粥，桑湯を服用すれば飲水病（糖尿病と思われる）に効果があると述べられており，古くからその効果が知られていたようである．近年では，桑に抗高血糖作用があることが報告され（Hikinoら 1985），宮原ら（1996）は自然発症糖尿病モデルラット（WBN/Kobラット，雄）における，桑葉の効果を検討している．WBN/Kobラットに桑葉混合飼料（2.5％，5％）で飼育を行い経時的に血糖値の測定を行った結果，桑葉を摂食していないコントロール群は40週齢あたりから血糖値が上昇し，糖尿病態を呈したが，桑摂食群では有意に抑制された．また46週齢にブドウ糖を経口負荷した後の血糖値においても，桑摂食群はコントロール群に比べ有意に血糖値の上昇率が低く，血漿インスリン値は桑摂食群においてコントロール群に比べ有意に高い値を示した．これらのことから，桑を活用することにより糖尿病の予防につながる食品開発が期待された．

(4) 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）

桑の健康機能成分を語る際に，1-デオキシノジリマイシン（DNJ）という言葉が欠かせない．上述したように，桑は強力なα GI活性を示すが，DNJはその活性成分として桑根皮（桑白皮）から天然物より初めて単離された（八木ら 1976）．DNJはグルコースのアナローグで環内酸素原子が窒素に置換した構造をしており（図1），強力なα GI活性を示す（Niwaら 1970，Jungeら 1996）．



1-デオキシノジリマイシン (DNJ)　　グルコース

図1　1-デオシキノジリマイシンの化学構造

このような糖類似物質はアザ糖と呼ばれ1966年にInoueら(1966)により放線菌より抗生物質として得られたノジリマイシンに端を発し，現在では100種を数える化合物が発見されている(Asano 2003)．DNJは桑根皮から初めて分離されたが，葉，実（椹）にも存在する(Asanoら 2001)．また桑の他にツユクサ(Kimら 1999)などの植物，枯草菌(Schmidtら 1979)，放線菌(Ezureら 1985) 細菌等からの報告がある．

桑葉は約0.1％(乾燥重当たり)のDNJを含むほか，10種のアザ糖を有する(Asanoら 1994，2001)．Kimuraら(1995)は，糖尿病誘起物質であるストレプトゾトシン投与による糖尿病マウスに各アザ糖を腹腔内投与した実験を行い，各アザ糖に用量依存的な血糖値抑制効果作用を認めている．これはアザ糖によるインスリン放出促進作用のためと考察している．一方，小島（2002）はDNJが消化管で糖を吸収阻害する可能性を検討している．空腹時のヒトにショ糖液を投与した直後に桑葉を摂取してもらい，経時的に血糖値を測定した．その結果，血糖値の上昇を有意に抑制した．また空腹時の桑葉の単独摂取では血糖値，インスリン値に変化が見られなかったことから，糖の消化管内での消化，吸収阻害によると推察している（図2)．

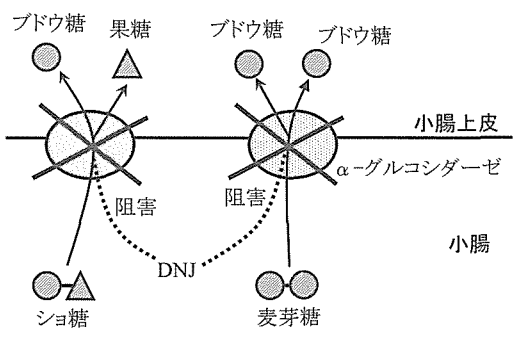


図2　DNJの血糖値上昇抑制抑制メカニズムの概念図

4．桑葉を活用した糖尿病予防をめざした食品開発

このように桑は強力なα GI活性を有し，DNJは糖尿病の治療薬として期待された．その後，DNJよりも強力なアカルボース，ボグリボース，DNJの誘導体で効果を高めたミグリトールが開発され，臨床薬として使用されている（Jungeら 1996，Asanoら 2003)．そのため上述したような桑および，糖尿病に関する社会背景を受け，DNJを活用し，糖尿病予防をめざす桑食品を開発することが望ましいと考えられた．

(1) DNJを活かす桑葉食品開発の問題点

DNJを活かす桑葉食品開発を行うにあたっては，①DNJの定量が困難であったこと，②被験桑製品のDNJ含量が不明であり，DNJ含量と血糖値改善効果の関係を科学的に検討することができなかった問題点があった．

DNJは親水性が極端に高く有効に保持できるカラムがないこと，検出可能な官能基をその分子中にもたないこと，含有量が微量なことから示差屈折計が使用できない等の理由で定量が非常に困難であった．従来，こうした場合は液体クロマトグラフィー-質量分析法（LC/MS）で測定する場合が多い．これは分離が不完全であってもDNJの分子イオンピークを測定することでDNJの測定が可能である．しかしながら，LC/MSは非常に高価で，安定性再現性に劣ること，桑葉エキスのようなクルードなサンプルはMSの導入部を汚すため頻繁な清掃が必要なこと，クルードな条件と精製標品でのイオン化条件が同一であるとは限らないこと等の問題があり，実際の開発現場でルーチンに使用することができなかった．

このため筆者らは簡易かつ安定性，再現性に優れるDNJ定量法の開発を行い，これを商品開発に活用しようと考えた．検討の結果，極性の高いものほど良好に保持する親水クロマトグラフィー（Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC）と感度，安定性に優れ選択性の非常に低い

蒸発型光散乱検出器(Evaporative Light Scattering Detector, ELSD)を組み合わせた新しい分析法(HILIC-ELSD法)の開発に成功した(Kimuraら 2004). これによりDNJのルーチン測定が可能となった. 本法はDNJ以外にも, 従来分析の難しかったアザ糖, 糖, アミノ酸などの分析にも適用が可能で, 汎用性のある高極性物質の分析法として注目される (図3).

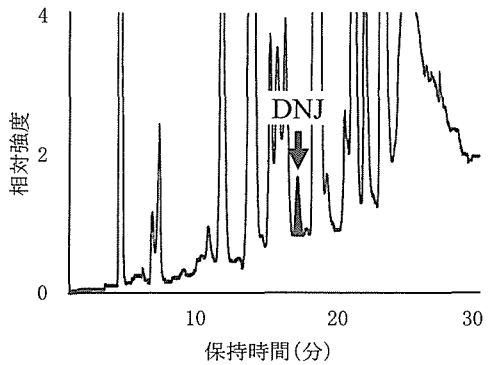


図3　C_{18}素通り桑葉抽出物のHILIC-ELSD分析
C_{18}に保持されない高極性成分は多数存在し, これらの物質はHILICカラムにより良好に保持, 分離される.

市販の桑茶や桑サプリメント製品を分析したところ, 製品やロット間でDNJ含量は大きく異なり, DNJがほとんど含まれていないものさえあった. このため, DNJを安定して高含有する製品を開発する必要が認められた.

(2) DNJを高含有する桑葉食品開発

DNJを高含有する桑葉製品開発にあたっては, 1) DNJを高含有する桑葉原料素材の検討, 2) DNJ損失の少ない加工法の検討を行った.

1) DNJを高含有する桑葉原料素材の検討

同一条件で栽培された桑樹(34品種, 前年夏切, 樹齢10～15年)を対象とし, 品種, 部位, 季節変動を検討した. 品種の検討では, DNJ含量は品種ごとで大きく異なり, 「鶴田」は, 通常原料に使用される「一ノ瀬」に比べ, 約4倍DNJを高含有して

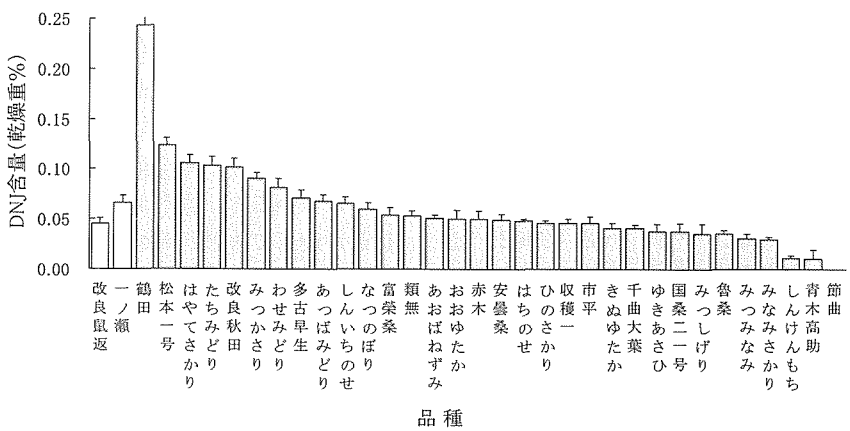


図4　DNJ高含有桑葉の条件検討(品種)　　平均値±標準偏差 (n = 3).

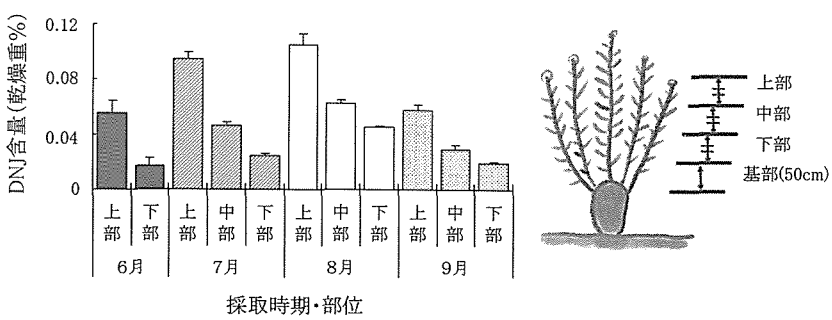


図5　DNJ高含有桑葉の条件検討(採取部位)　　品種：改良鼠返, 平均値±標準偏差 (n = 3).

いた（図4）．また，枝先端部の桑葉は，枝の付け根（基部）付近の葉よりDNJ量が多いこと，春から夏にかけて葉のDNJ含有量は増大し，秋にはまた減少することなどを見出した（図5，図6）（木村ら 2005）．

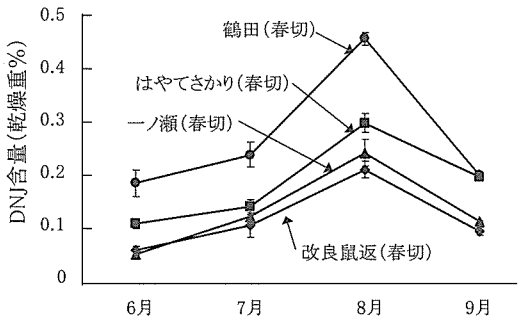


図6　DNJ高含有桑葉の条件検討（採取時期）
平均値±標準偏差（n＝3）．

2）DNJ損失の少ない加工法

桑茶と桑葉の乾燥粉末は，もっとも主要な桑葉製品である．これらの製造工程には，洗浄，抽出，ブランチング，乾燥，焙煎，殺菌，包装などがある．DNJ含量に関して，このうち最も重要な加工工程は，ブランチングと乾燥と思われた．そのため，ブランチング法および乾燥法，さらにエキス化する際の抽出条件について検討を行った．ブランチングでは，DNJは溶脱しやすく煮沸処理では大きく損失することから，高温蒸気処理で短時間の処理ブランチングを行うことが望ましかった．乾燥法は熱風乾燥，真空凍結乾燥，低温除湿乾燥が検討された．その結果，真空凍結乾燥が最もDNJ量を保持した，しかしながら熱風乾燥であっても十分にDNJ量を保持していたことから産業的にはコストの安い熱風乾燥で十分であると思われた．抽出条件では，食品での使用が許可される

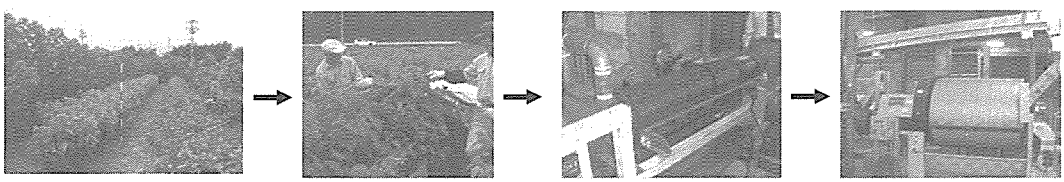


図7　DNJ高含有桑葉製品の工程（桑茶）

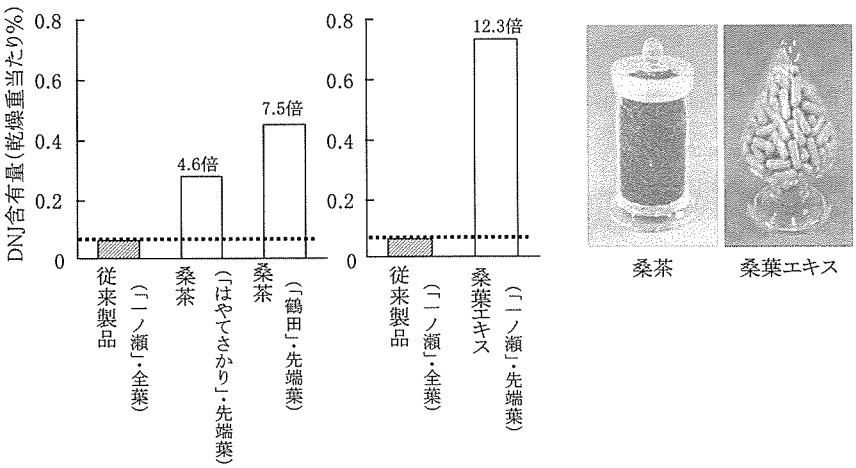


図8　DNJ高含有桑葉製品のDNJ含有量（桑茶，桑葉エキス）
従来製品は現在の製法と想定される「一ノ瀬」の全葉，熱風乾燥での値の平均値．既存製品値とほぼ同じ．

エタノール/水が検討され，DNJは水の割合が多いほどDNJの抽出効率がよいが，夾雑物も抽出されるため20％程度のエタノールが望ましいことなどが明らかとなった．

以上のDNJ高含有桑葉を使用し，DNJを損失の少ない加工法で桑葉製品を試作した結果，従来製品の製法と想定される「一ノ瀬」の全葉，熱風乾燥を使用した場合と比較し，茶で約5倍，エキスで10倍以上DNJを高含有しており，安定したDNJ高含有桑葉製品の製造が可能となった（図7，図8）（木村ら 2005）．

(3) DNJ高含有桑葉食品の評価

試作されたDNJ高含有桑葉製品のα GI活性は高かったことから，ヒトへの投与試験を行い桑製品の効能評価を開始した．ヒト試験は，ヘルシンキ宣言の精神に則り，常に被験者の人権保護に配慮し，倫理委員会等の承認を得て，医師の管理の下に実施された．健常ボランティアを対象に作成されたDNJ高含有製品の単回投与試験と長期投与試験を実施した．単回投与試験は，1群6名とし4群（DNJ量として0，3，6，9mg含有）に分け，糖負荷後30分おきに採血し，血糖とインスリン値を測定した．長期投与試験では，1群6名とし2群（DNJ量として0，9mg）に分け，桑葉製品を1日3回食前に与え，投与前と4週間後に採血し血液生化学的パラメータの測定，ボランティアへの聞き取り調査を行った．その結果，単回投与試験において，桑DNJの摂取により糖負荷後の血糖値とインスリンの上昇がともに抑制された（図9）．長期投与試験ではDNJ摂取による異常はとくに認められなかった．今後さらに詳細な検討が必要であるが，DNJ高含有桑葉エキス1g程度で食後血糖値上昇を抑え，過剰なインスリン分泌を抑制する可能性が示された．

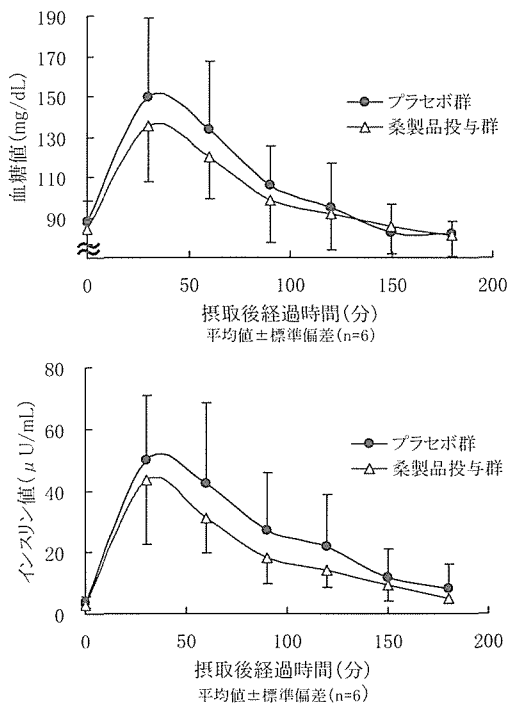


図9　DNJ高含有桑葉製品の血糖値上昇抑制とインスリン分泌抑制効果

5．今後の普及をめざした展望・課題

DNJ高含有桑葉製品が糖尿病予防を期待できる食材として今後展開するためには，現行では特定保健用食品（トクホ）の認定が必要である．そのため，今後はトクホ認定の基準に沿った試験（効能試験，安全性試験），具体的には用量設定試験，有効性単回投与試験，有効性反復投与試験，過剰摂取単回投与試験，過剰摂取反復投与試験が必要となる．また，安全性に絡み作用機序の解明と体内への吸収，動態，排出の検討が必要である．これらの課題については現在研究に取り組んでいる．

生産現場の普及に関しては，「鶴田」，「はやてさかり」等の高含有品種については，普及体制を整えること，栽培条件に関しては，桑茶用の栽培，生産地における桑茶用の栽培マニュアルの作成が求められる．

6．まとめ

以上，桑と糖尿病に関する社会背景と桑DNJを活用した問題解決への取り組みを簡単に紹介した．もちろん，桑茶により遊休桑園，糖尿病のすべての問題が解決するわけではないが，われわれの研究成果が，健康意識，中山間の地域振興，さらには美しい農村風景の復活などに対する問題意識をもつ人々の一助となることを期待している．

本研究は農林水産省の「平成16年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」の助成をうけ，東北農業研究センター，東北大学大学院農学研究科，福島県ハイテクプラザ，福島県農業試験場，ミナト製薬株式会社の共同研究で実施された．

参考文献

Asano, N., E. Tomioka, H. Kizu and K. Matsui 1994. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of Morus bombycis. Carbohydr. Res. 253:235 – 245.

Asano, N., T. Yamashita, K. Yasuda, K. Ikeda, H. Kizu, Y.Kameda, A. Kato, R.J. Nash, H.S. Lee and K.S. Ryu 2001. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morusalba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). J. Agric. Food Chem. 49:4208 – 4213.

Asano, N. 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. Glycobiology 13:93 – 104.

Chiasson, J.-L., R.G. Josse, R. Gomis, M. Hanefeld, A. Karasik and M. Laakso 2002. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOPNIDDM randomised trial. Lancet 359:2072 – 2077.

Ezure, Y., S. Murao, K. Miyazaki and M. Kawamata 1985. Molanoline (1-deoxynojirimycin) fermentation and its improvement. Agric. Biol. Chem. 49:1119 – 1125.

Hikino, H., T. Mizuno, Y. Oshima and C. Konno 1985. Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glycoprotein of Morus alba root barks. Planta Med. Apr(2):159 – 160.

Inoue, S., T. Tsuruoka and T. Niida 1966. The structure of nojirimycin, a piperidinose sugar antibiotic. J. Antibiot. 19:288 – 292.

Ishida, N., K. Kumagai, T. Niida, K. Hamamoto and T. Shomura 1967. Nojirimycin, a new antibiotic. I. Taxonomy and fermentation. J. Antibiot. 20:62 – 65.

Junge, B., M. Matzke and J. Stltefuss 1996. Chemistry and structureactivity relationships of glucosidase inhibitors. In Kuhlmann, J. and Puls, W. (Eds.), Handbook of experimental pharmacology. 119. Springer-Verlag. New York. 411 – 482.

神奈川県企画部科学技術政策室 1992. 機能性食品に関する共同研究事業報告（第1号）. 神奈川県.

神奈川県企画部科学技術政策室 1996. 機能性食品に関する共同研究事業報告（第2号）. 神奈川県.

Kim, S.K., Y.H. Kim, Y.S. Hong, N.S. Peak, S.L. Lee, K.W. Kim and J.J. Lee 1999. Alpha-glucosidase inhibitors from Commelina communis. Planta Med. 65:437 – 439.

Kimura, M, F. Chen, N. Nakashima, I. Kimura, N. Asano and S. Koya 1995. Antihyperglycemic effects of N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozocin-induced diabetic mice. J. Trad. Med. 12:214 – 219.

木村俊之 2000. 第5節福島県 桑の実. 津志田・安井・東尾・関谷・須田（共編）. 地域農産物の品質・機能性成分総覧. サイエンスフォーラム社, 東京. 456 – 459.

木村俊之 2004. 第7節福島県 桑葉茶. 津志田・新本・須田・関谷・矢野（共編）. 地域農産物の生理機能・活用便覧. サイエンスフォーラム社, 東京. 91 – 97.

Kimura, T., K. Nakagawa, Y. Saito, K. Yamagishi, M. Suzuki, K. Yamaki, H. Shinmoto and T. Miyazawa 2004. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. J. Agric. Food Chem. 52:1415 – 1418.

木村俊之・仲川清隆・宮澤陽夫・齋藤裕子・野木照修・小島芳弘 2005. 1-デオキシノジリマイシンを高含有する組成物の製造方法. 特願2005 – 254708.

小島芳弘 2002. 桑葉の保健機能. 食品と開発 37(10):54 – 56.

厚生労働省健康局 2004. 平成14年度糖尿病実態調査報告. 厚生労働省.

厚生労働省大臣官房統計情報部 2005. 平成15年度国民医療費の概況. 厚生労働省.

厚生省保健医療局 1999.平成9年度糖尿病実態調査報告.厚生省.

宮原智江子・佐藤修二・宮澤眞紀・堀口佳哉・清水昭男・原田昌興 1996. 自然発症糖尿病ラットにおける桑葉の血糖制御作用について. 神奈川県企画部科学技術政策室編 機能性食品に関する共同研究事業報告（第2号）. 神奈川県. 52 – 59.

Niwa, T., S. Inoue, T. Tsuruoka, Y. Koaze, T. Niida 1970. "Nojirimycin" as a potent inhibitor of glucosidase. Agri. Biol. Chem. 34:966 – 968.

Schmidt, D.D., W. Frommer, L. Müller and E. Truscheit 1979. Glucosidase inhibitors from bacilli. Naturwissenshaften 66:584 – 585.

八木政広・河野辰彦・青柳良明・村井博 1976. 桑のピペリジン型アルカロイド moranoline の構造について. 農化 50:571 – 572.