

グルコシダーゼ阻害作用を有する桑葉の糖尿病予防食素材への可能性

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	木村,俊之
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	57巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 57-62
発行年月	2010年2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



α グルコシダーゼ阻害作用を有する桑葉の 糖尿病予防食素材への可能性

木村 俊之[§]

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

Development of Mulberry Leaf Product with α -Glucosidase Inhibitor for the Prevention of Type2 Diabetes Mellitus

Toshiyuki Kimura[§]

Agricultural Research Center for Tohoku Region, National Agriculture and Food Research Organization

Epidemiological evidence indicates that postprandial hyperglycemia is an independent risk factor for cardiovascular disease. Improved postprandial glycemic control is promising for decreasing morbidity and mortality of cardiovascular disease in pre-diabetic and diabetic individuals. Recently, clinical trials such as the STOP-NIDDM Trial and Voglibose Ph-3 Study demonstrated that α -glucosidase inhibitor (α GI) reduces progression to type 2 diabetes from impaired glucose tolerance. Much attention has, therefore, been focused on α GI as a preventive and therapeutic agent for type 2 diabetes and its complications. Mulberry leaves have been known to prevent diabetes in Asian countries as traditional medicine. According to a previous study, mulberry leaves have strong α GI activity and its activity is caused by 1-deoxynojirimycin (DNJ), a glucose analogue. We developed an HPLC method to accurately quantify DNJ in mulberry leaves and optimized the process to achieve a DNJ-enriched (1.5%) mulberry leaf extract. We evaluated the effect of the extract on postprandial glycemic control by oral sucrose tolerance test and by a 38-day dietary trial. A dose above 0.8 g of the powder (corresponding to 12 mg DNJ) per, the elevation of postprandial blood glucose and secretion of insulin were suppressed significantly. Hypoglycemia, abnormal lipid profiles, or any other adverse events were not observed during and after the study period. DNJ-enriched mulberry extract may be useful in improving postprandial glycemic control in pre-diabetic or mild diabetic individuals.

(Accepted Sep. 7, 2009)

Keywords : α -glucosidase inhibitor, 1-deoxynojirimycin, diabetes mellitus, mulberry, clinical study

キーワード : α グルコシダーゼ阻害剤, 1-デオキシノジリマイシン, 糖尿病, 桑, 臨床試験

はじめに

近年の疫学的研究により、食後高血糖が心筋梗塞などの動脈硬化性疾患に対する独立した危険因子であることが明らかにされ、食事後の血糖のコントロールが糖尿病予防のターゲットと考えられている。我々が摂取している食品成分の中には食後血糖値の上昇を穏やかにするものがあり、食習慣に取り入れることで糖尿病の予防効果が期待される。

桑葉は古くから糖尿病の予防効果が謳われてきた素材であり、科学的アプローチにより、その有効成分、メカニズム、効能などが解明されつつある。本総説では、桑葉の糖尿病予防食素材への可能性と筆者らの取り組みについて解説する。

1. 糖尿病について

糖尿病は、血中グルコースの値が正常よりも高い状態（高血糖）にある病気である。糖尿病患者の95%を占める2型糖尿病は、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・標的器官の応答機能の低下などが原因とされる生活習慣病である。高血糖によるストレスは網膜症、腎症、神経障害などの深刻な合併症を引き起こし、著しい生活の質（QOL）の低下を招く他、メタボリック症候群の主要な因子としてその後の動脈硬化症の発症へと深く関わる。

我が国における2型糖尿病患者の数は厚生労働省の「平成19年 国民健康・栄養調査」（厚生労働省2008）によれば、「糖尿病が強く疑われる人」は約890万人、「糖尿病の可能性を否定できない人」は約1320万人で、合わせて約

〒960-2156 福島県福島市荒井字原宿南50

[§] 連絡先 (Corresponding author), kmr@affrc.go.jp

2210 万人であり、成人の 5 人に 1 人が糖尿病かその予備軍という状況である¹⁾。この数は、10 年前の調査よりも 1.6 倍に増加しており（「平成 9 年度糖尿病実態調査報告」厚生省 1999）、高齢化社会の進行により今後さらに増えると予想されている²⁾。医療費についても、平成 18 年度の糖尿病の医療費は 1 兆 1342 億円であり、過去よりも増大し医療財政を逼迫させる原因の一つとなっている（「平成 18 年度国民医療費の概況」厚生労働省 2008）³⁾。このように糖尿病をめぐる状況は深刻であり、早急な対策が求められている。

糖尿病予防に関しては、近年の疫学的研究により、食事後の高血糖が心筋梗塞などの心血管イベント発症の独立した危険因子であることが明らかにされ、食後の高血糖状態のコントロールがポイントと考えられるようになってきている^{4)~7)}。我々の摂取エネルギーの約 60% は炭水化物であり、食事により摂取された炭水化物は唾液、膵液中の α アミラーゼにより二糖類まで分解され、小腸粘膜刷子縁にある α グルコシダーゼにより単糖類に分解され、体内に吸収される。食物にはこの α グルコシダーゼの働きを抑える成分 (α -GI) を有するものがあり、 α -GI は糖の吸収を穏やかにし、食後の血糖値の上昇を抑制し、糖尿病を予防すると期待される。このようなコンセプトの下、実際、臨床 α -GI 薬（アカルボースおよびボグリボース）を用いた大規模臨床試験（STOP - NIDDM, Study To Prevent Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, Voglibose Ph-3 Study）が行われ、 α -GI 薬が糖尿病や心筋梗塞、高血圧の発症を抑制することが示されたことから α -GI の糖尿病予防効果が認識されるようになった⁸⁾⁹⁾。このように、 α -GI による食後高血糖の改善は糖尿病予防のひとつの方策として注目されている。

2. 桑アザ糖

桑は落葉性の高木で、古くから養蚕のため広く植栽されてきた。現在は養蚕業の衰退により桑は栽培面積が減少しているが、中山間の傾斜地では今でも広く見ることが出来る。桑は古代から桑の糖尿病予防効果が知られていたようで、我が国では鎌倉時代に中国から茶の文化を我が国に持ち帰った栄西禅師が著した「喫茶養生記」の中に桑の薬効に関する記載がある。そこには桑粥、桑湯を服用すれば飲水病（現代の糖尿病と思われる）に効果があると述べられており、桑は民間伝承的に糖尿病への効用が知られてきたようである。現代に至りその効用が科学的に検証されるようになり、1976 年に、八木らによってアザ糖の一種である 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）が天然物として初めて桑根から単離された¹⁰⁾。DNJ は、グルコースのピラノース環の酸素原子がアミノ基に置換された構造をしたグルコースのアナログである（図 1）。この DNJ は α -グルコシダーゼの活性中心にアミノ基の電荷により電気的に結合し、強力な α -GI 活性を発揮する¹¹⁾。その後、DNJ は葉、実

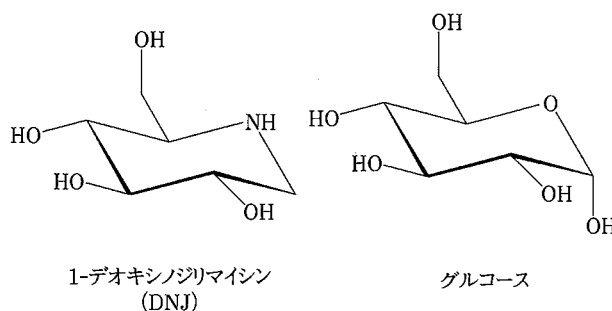


図 1 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) とグルコースの化学構造

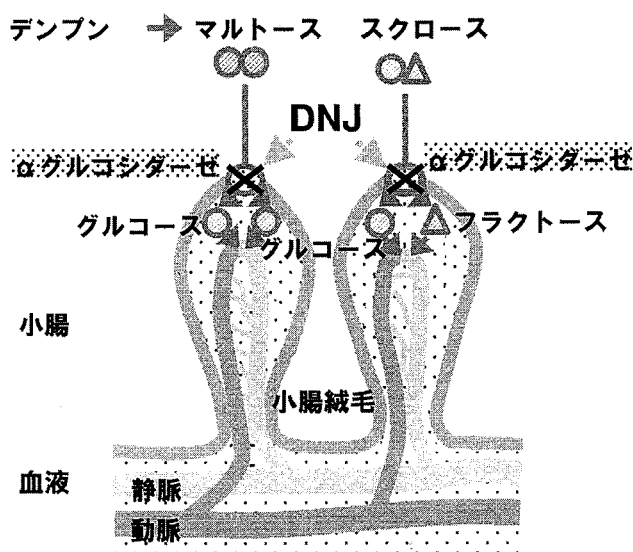


図 2 DNJ の血糖値上昇抑制抑制メカニズムの概念図

（楕）にも存在することが明らかとなり¹²⁾¹³⁾、伝承されてきた桑葉の糖尿病治療効果は桑 DNJ が消化管の糖分解酵素を阻害することにより、食後血糖値上昇が抑制されるためではないかと考えられた（図 2）。以来、桑葉の糖尿病予防に関する研究が盛んに行われている。これまでに、動物への桑葉の投与試験で、食後血糖値の急峻な上昇が抑制されるなど、糖尿病の発症遅延を支持する知見が得られつつあり^{14)~17)}、桑葉 DNJ を活用した糖尿病予防食材の開発が期待されるようになった。

3. 桑 DNJ の測定法の開発

このように桑葉の糖尿病治療効果は DNJ による α -GI 効果によるものと考えられるが、筆者らの研究開始当時、DNJ の定量が困難であったこと、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い問題点があった。そこで、桑葉 DNJ の測定法を確立し、桑葉 DNJ を活かした桑葉食品の開発と評価を行うことが求められていた。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、桑葉の含量が微量な

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 경우가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 の測定が可能なためである。しかし、LC/MS は非常に高価で、安定性・再現性に不安があること、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困難であった。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、これを桑葉 DNJ 食材の開発に活用しようと考えた。種々検討の結果、順相クロマトグラフィーの一種であり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、不揮発性物質を光散乱で感知することから検出範囲が非常に広く感度と安定性

に優れる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^{18)~20)}。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、それまで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)。本法により、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。

4. 桑 DNJ を生かした食材開発

DNJ を高含有する桑葉食材の開発にあたっては、(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 含量は品種により大きく異なり、「鶴田」は、現状の原料に主に使用されている「一ノ瀬」に比べ、約 4 倍 DNJ を高含有していた (図 4)。また、成長点にあたる枝先端部の桑葉は、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、秋には減少することがわかった (図 5)²¹⁾。

(2) DNJ 損失の少ない加工法

桑茶と桑葉の乾燥粉末は、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

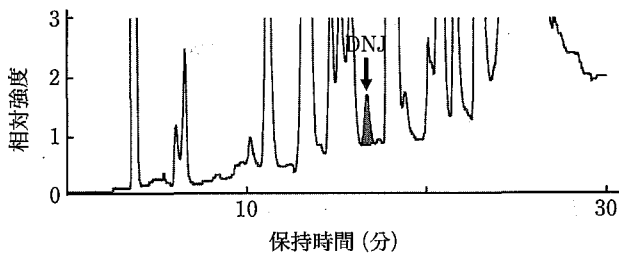
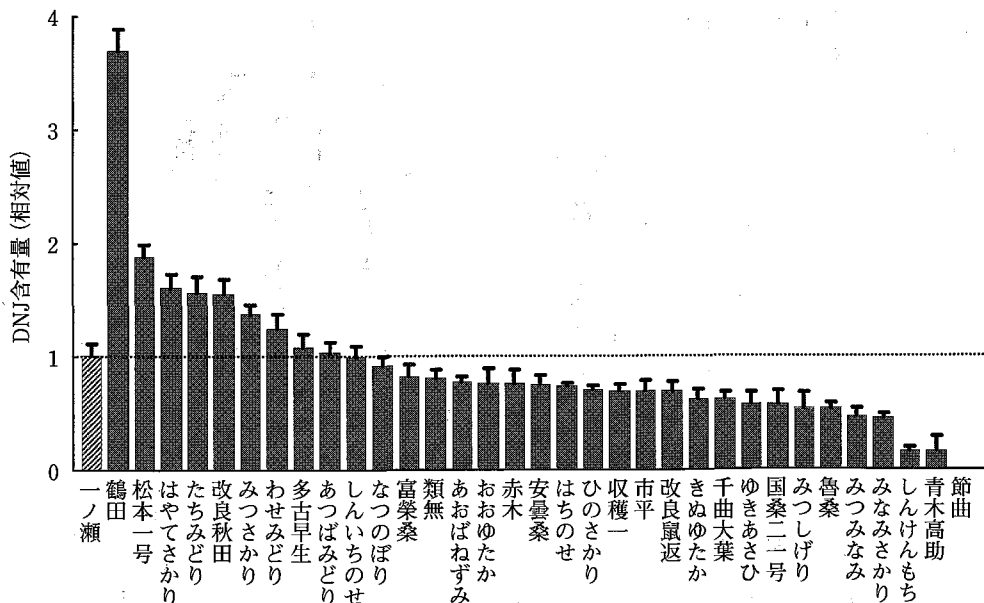


図 3 C18 素通り桑葉抽出物の HILIC-ELSD 分析

C18 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。DNJ は図中矢印部に単独ピークを形成。



平均値±標準偏差 (n=3)

図 4 DNJ 高含有桑葉の条件検討 (品種間差異)

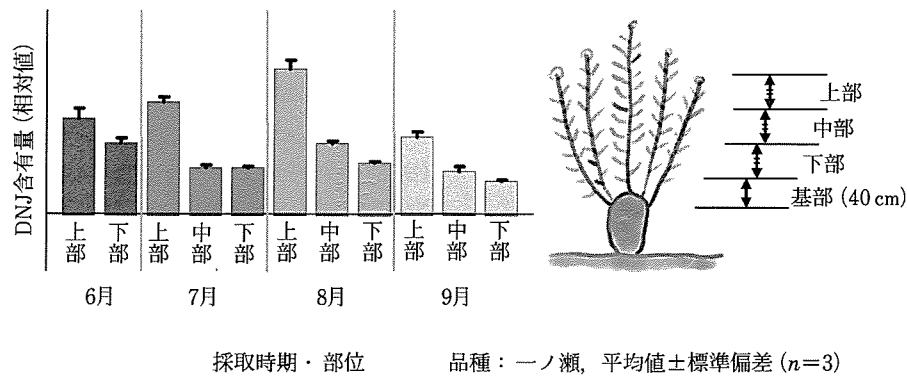


図 5 DNJ 高含有桑葉の条件検討 (採取時期・部位)

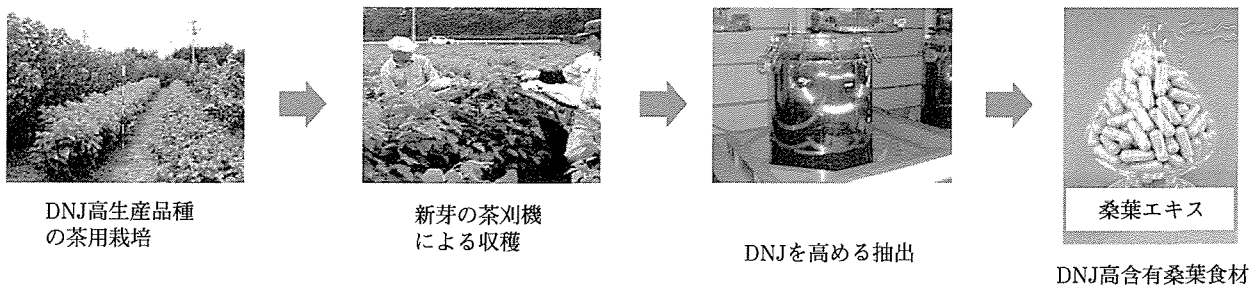


図 6 桑の茶用栽培と DNJ 高含有桑葉食材の製造

煎、殺菌、包装などがあるが、DNJ 含量に関して最も重要な加工工程は、ブランチングと乾燥である。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 は水溶性のため煮沸処理で大きく溶脱することから、高温蒸気処理で短時間のブランチング処理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、低温除湿乾燥を検討した。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比較的 DNJ 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考えられた。抽出条件では、食品での使用が許されるエタノール/水混合溶媒で、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 60% 程度のエタノールが望ましかった。

以上の DNJ 高含有桑葉を使用し、桑葉食材を DNJ 損失の少ない加工法で試作した結果、従来製品 (「一ノ瀬」の全葉、熱風乾燥を使用した桑茶葉) と比較し、「鶴田」のエキスで 50 倍以上 DNJ、汎用品種の「一ノ瀬」でも 10 倍以上 DNJ を高含有し、安定した DNJ 高含有桑葉食材の製造が可能となった (図 6, 7)²¹⁾。

5. DNJ 高含有桑葉食品の評価

試作した DNJ 高含有桑葉食材の α -GI 活性は高く、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、倫理委員会等の承認

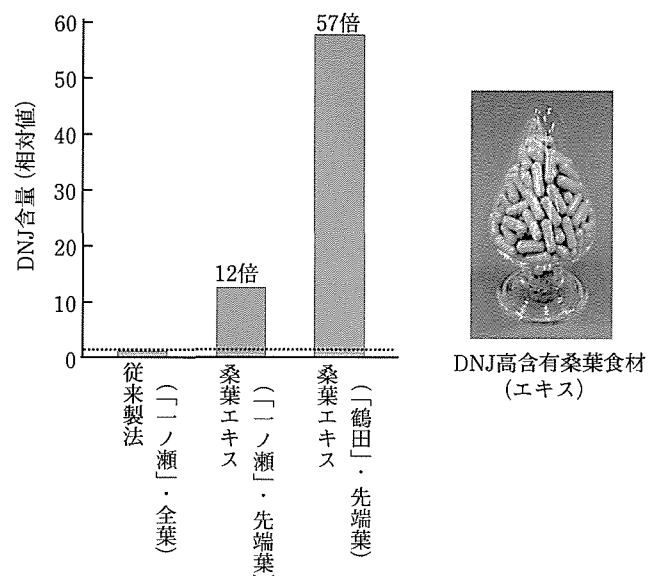


図 7 DNJ 高含有桑葉エキスの DNJ 含有量
従来製品は現在の製法と想定される「一ノ瀬」の全葉、熱風乾燥での値の平均値。既存製品値とほぼ同じ

を得て、医師の管理の下に実施した。健康ボランティアを対象に、作成した 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, 6, 12, 18 mg 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, 18

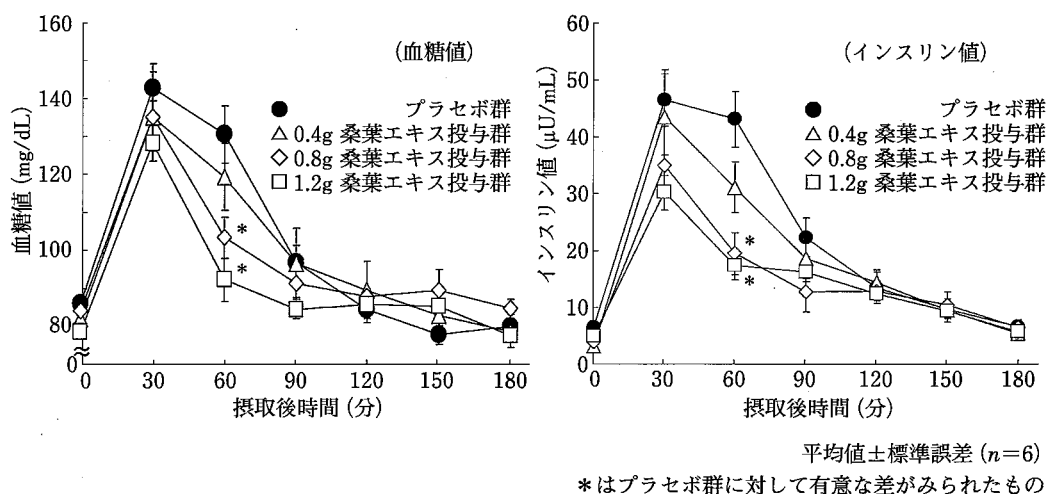


図 8 ショ糖負荷条件における桑葉エキスが血糖値とインスリン値に与える影響

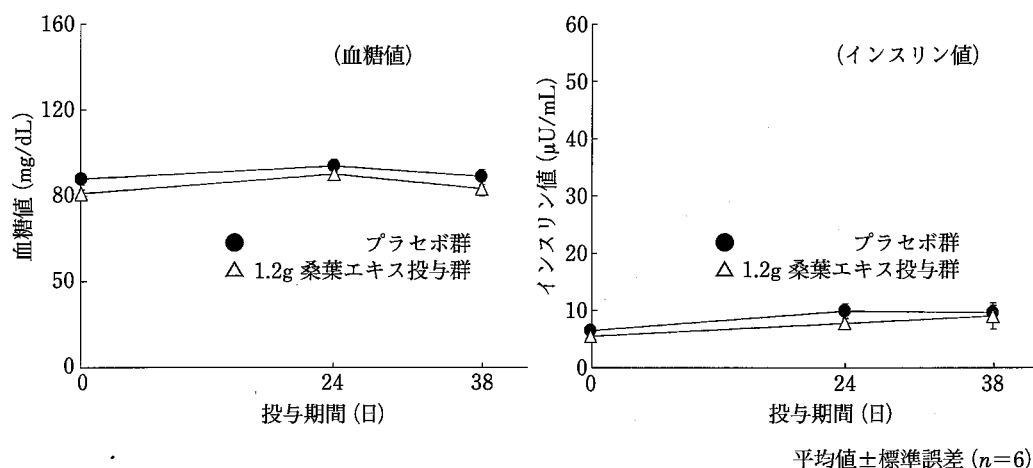


図 9 桑葉エキスの長期間摂取 (38 日間) が血糖値とインスリン値に与える影響

mg) に分け、桑葉製品を一日 3 回食前に与え、投与前と 24、38 日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共に抑制された²¹⁾ (図 8)。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²²⁾ (図 9)。その後、米飯を用い糖尿病境界者への単回投与、3 ヶ月の連続投与試験を実施しており、ともに有効性と安全性を認めた。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できる可能性が示された。

6. 今後の普及を目指した展望・課題

DNJ 高含有桑葉製品の糖尿病予防食素材としての活用策として、例えば特定保健用食品 (トクホ) 展開が考えられる。このためには、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おり、これまでのところ特に有害事象は確認されておらず比較的安全性が高い素材と認識している²³⁾²⁴⁾。

生産現場の普及に関しては、「鶴田」, 「はやてさかり」等の DNJ 高含有品種の普及体制を整えること、生産地における桑茶用の栽培マニュアルの作成など、質の高い原料葉の供給体制の構築が求められる。

7. おわりに

以上、桑 DNJ を活用した糖尿病予防食素材開発の取り組みを簡単に紹介した。桑葉に関しては効果に対し良好なエビデンスを得つつある。しかしながら、桑葉はヒトの食経験に乏しいことから食素材として展開するためには、今後は安全性に関する知見の蓄積が重要である。我々の研究成果が、国民の健康意識を高め、さらには桑樹の新規需要による中山間地域の振興、さらには美しい農村風景の復活な

どにつながることを期待している。

本総説にかかる研究は 2009 年 9 月に「親水クロマトグラフィー-蒸発型光散乱検出 (HILIC-ELSD) 法の開発と桑葉食材への適用に関する研究」として日本食品科学工学会奨励賞をいただきました。本賞にご推薦いただくとともに、研究に際し終始暖かいご助言をいただきました東北大学大学院農学研究科・宮澤陽夫教授に心から感謝いたします。また、本研究の推進にあたり、東北農業研究センターの皆様、東北大学大学院農学研究科・仲川清隆准教授、日本医科大学第三内科・及川眞一教授、浅井明博士、福島県ハイテクプラザ・後藤裕子氏、福島県農業総合センター・野木照修博士、ミナト製菓株式会社・小島芳弘氏、株式会社プロジェクトエム・狩谷純氏の他、関係の方々にご多大なご協力をいただきました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室, 「平成 19 年国民健康・栄養調査」, 厚生労働省 (2008).
- 2) 厚生省保健医療局生活習慣病対策室, 「平成 9 年度糖尿病実態調査報告」, 厚生省 (1999).
- 3) 厚生労働省大臣官房統計情報部, 「平成 18 年度国民医療費の概況」厚生労働省 (2008).
- 4) DECODE study group, Glucose tolerance and mortality : comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet*, **354**, 617-621 (1999).
- 5) Hanefeld, M., Fischer, S., Julius, U., Schulze, J., Schwanebeck, U., Schmechel, H., Ziegler, H.J. and Lindner, J., Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM : the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia*, **39**, 1577-1583 (1996).
- 6) Tominaga, M., Eguchi, H., Manaka, H., Igarashi, K., Kato, T. and Sekikawa, A., Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Disease Study. *Diabetes Care*, **22**, 920-924 (1999).
- 7) Hanefeld, M., Koehler, C., Henkel, E., Fuecker, K., Schaper, F. and Temelkova-Kurktschiev, T., Post-challenge hyperglycemia relates more strongly than fasting hyperglycemia with carotid intima-media thickness : the RIAD Study. Risk Factors in Impaired Glucose Tolerance for Atherosclerosis and Disease. *Diabet. Med.*, **17**, 825-840 (2000).
- 8) Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A. and Laakso, M., Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus : the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, **359**, 2072-2077 (2002).
- 9) Kawamori, R., Tajima, N., Iwamoto, Y., Kashiwagi, A., Shimamoto, K. and Kaku, K., on behalf of the Voglibose Ph-3 Study Group : Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus : a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance. *Lancet*, **373**, 1607-1614 (2009).
- 10) 八木政広, 河野辰彦, 青柳良明, 村井 博, 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 (1976).
- 11) Junge, B., Matzke, M. and Stliefuss, J., Chemistry and structure-activity relationships of glucosidase inhibitors. In "Handbook of experimental pharmacology," Vol. 119. (Springer-Verlag, New York), pp. 411-482 (1996).
- 12) Asano, N., Tomioka, E., Kizu, H. and Matsui, K., Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.*, **253**, 235-245 (1994).
- 13) Asano, N., Yamashita, T., Yasuda, K., Ikeda, K., Kizu, H., Kameda, Y., Kato, A., Nash, R.J., Lee, H.S. and Ryu, K.S., Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4208-4213 (2001).
- 14) Hikino, H., Mizuno, T., Oshima, Y. and Konno, C., Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glyco-protein of *Morus alba* root barks. *Planta. Med.*, **Apr** (2), 159-160 (1985).
- 15) 神奈川県企画部科学技術政策室, 「機能性食品に関する共同研究事業報告 (第 2 号)」(神奈川県), (1996).
- 16) Kong, W.H., Oh, S.H., Ahn, Y.R., Kim, K.W., Kim, J.H. and Seo, S.W., Antiobesity effects and improvement of insulin sensitivity by 1-deoxynojirimycin in animal models. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2613-2619 (2008).
- 17) Kimura, M., Chen, F., Nakashima, N., Kimura, I., Asano, N. and Koya, S., Antihyperglycemic effects of N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozocin-induced diabetic mice. *J. Trad. Med.*, **12**, 214-219 (1995).
- 18) Kimura, T., Nakagawa, K., Saito, Y., Yamagishi, K., Suzuki, M., Yamaki, K., Shinmoto, H. and Miyazawa, T., Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1415-1418 (2004).
- 19) Kimura, T., Nakagawa, K., Saito, Y., Yamagishi, K., Suzuki, M., Yamaki, K., Shinmoto, H. and Miyazawa, T., Simple and rapid determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves. *Biofactors*, **22**, 341-345 (2004).
- 20) 仲川清隆, 木村俊之, 親水性相互クロマトグラフィーによる桑葉 1-デオキシノジリマイシンの新規分析法の開発と展開, ぶんせき, **9**, 437-440 (2006).
- 21) Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S. and Miyazawa, T., Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in human. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5869-5874 (2007).
- 22) Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Yamagishi, K., Oikawa, S. and Miyazawa, T., Long term effect of DNJ-enriched mulberry leaf product. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, 387-389 (2008).
- 23) Nakagawa, K., Kubota, H., Kimura, T., Yamashita, S., Tsuzuki, T., Oikawa, S. and Miyazawa, T., Occurrence of orally administered mulberry 1-deoxynojirimycin in rat plasma. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8928-8933 (2007).
- 24) Nakagawa, K., Kubota, H., Tsuzuki, T., Kariya, J., Kimura, T., Oikawa, S. and Miyazawa, T., Validation of an ion trap tandem mass spectrometric analysis of mulberry 1-deoxynojirimycin in human plasma : application to pharmacokinetic studies. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72** (8), 2210-2213 (2008).

(平成 21 年 9 月 7 日受理)