新生児期にストレプトゾトシンを投与して誘発した糖尿病ラット におけるキクラゲ (*Auricularia auricula-judae* Quel.) の 血糖値およびインスリン分泌に及ぼす改善効果

袁 佐 民*, 何 普 明**, 竹 内 久 直**

*岐阜大学大学院連合農学研究科

**静岡大学農学部応用生物化学科

Ameliorating Effects of *Auricularia auricula-judae* Quel. on Blood Glucose Level and Insulin Secretion in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Zuomin YUAN,* Puming HE** and Hisanao TAKEUCHI**

*United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu 501-1193

**Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture,
Shizuoka University, Shizuoka 422-8529

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., 51, 129~133 (1998)

The effect of *Auricularia auricula-judae* Quel. in ameliorating the symptoms of diabetes was investigated in rats with streptozotocin-induced diabetes. Rats were made diabetic by injection of 80 mg/kg streptozotocin into 2-day-old neonates. From 9 weeks of age, the diabetic rats were given the fruit bodies of *A. auricula-judae* (Jew's-ear in English, and Kikurage in Japanese) as a dietary admixture at 5% food weight for 8 weeks. The fasting plasma glucose concentration, glucose tolerance, postprandial plasma glucose level and insulin secretion in diabetic rats fed the fruit bodies of *A. auricula-judae* were significantly improved to normal values without any effect on food intake, water intake, or body weight gain. These results suggest that *A. auricula-judae* contains some bioactive substances that can ameliorate the symptoms of diabetes.

Key Words *Auricularia auricula-judae* Quel. (Kikurage), streptozotocin-induced diabetes, rat, blood glucose, insulin secretion.

(Received December 19, 1997)

糖尿病患者は、今世界的な傾向として増加の一途をたどる。最近の調査によれば、日本には500~600万人おり、40歳以上の成人では10人に1人は糖尿病で加齢とともに増加することが報告されている¹⁾。インスリン非依存型糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM) は糖尿病患者では全体の約95%を占めるといわれている。糖尿病の治療と合併症の防止などが重要な研究課題となっている。

近年、食品の新しい生体調節機能に対する関心が高まってきて、活発な研究が進められている。その一つに、天然物からの経口血糖降下剤の探索がある。数種のキノコに血糖値降下作用のあることが報告された^{2)~5)}。キノコの一つであるキクラゲ (*Auricularia auricula-judae*

Quel.) は抗腫瘍作用、コレステロール減少作用⁶⁾ および抗炎症作用⁷⁾ などが認められているが、キクラゲの糖尿病に関する研究はほとんどない。キクラゲはキクラゲ科に属する担子菌の一種で、李時珍の『本草綱目』にはキクラゲが収載され、古くから、止血薬として用いられ、また薬膳料理に使われて、滋養強壮の目的として中国、日本などで食用に供せられている⁸⁾。キクラゲにも他のキノコと同様多量の食物繊維が含まれている。このことから、糖尿病の改善に役立つと期待できる。

本研究はNIDDMモデルである neonatally streptozotocin diabetic rat (n-STZ ラット)⁹⁾¹⁰⁾ を用いて、キクラゲの糖尿病改善効果について検討した。

実験方法

1. 動物、飼料および飼育方法

出生後2日目のWistar ラット雄新生仔に0.1 M クエ

* 〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1

** 〒422-8529 静岡市大谷 836

Table 1. Composition of the experimental diets.

Ingredient	Basal diet	Kikurage diet
	(g/kg diet)	
Casein	200	200
DL-Methionine	3	3
Sucrose	200	200
Corn oil	50	50
Mineral mixture*	35	35
Vitamin mixture*	10	10
Choline chloride	2	2
α -Corn starch	450	450
Cellulose	50	0
Kikurage	0	50

* AIN-76™.

ン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶かしたストレプトゾトシン (STZ, シグマ社) 80mg/kg を皮下注射し、n-STZ ラットを作成した。対照ラットには同じく出生後 2 日目の雄新生仔にクエン酸緩衝液のみを等量皮下注射した (正常ラット)。注射後の個体数は親 1 匹につき 7~8 匹に調整して 4 週間母乳で飼育した。ラットは 4 週齢で離乳し、市販の固形飼料 (CE-2: 日本クレア) および飲料水 (水道水) を自由に与えて 4 週間飼育した。

8 週齢より AIN-76 飼料組成⁽¹⁾⁽¹²⁾ を基準とした基本食 (Table 1) で 1 週間予備飼育した後、9 週齢のラットを空腹血糖値と体重に基づき、一群 7 匹、正常ラットからなる正常群および n-STZ ラットからなるセルロースを 5% 添加した基本食投与群 (n-STZ-C 群) とキクラゲをセルロースの代りに 5% 添加したキクラゲ食投与群 (n-STZ-A 群) に分け、それぞれ基本食、基本食およびキクラゲ食 (Table 1) を与えてさらに 8 週間飼育した。

ラットの飼育は 1 匹ずつ金網製懸垂飼育ケージに入れ、室温 23~25°C、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクル (明: 6:00~18:00) の動物室で飼育し、飼料と飲料水は自由摂取させた。

試料に用いたキクラゲは中国から輸入した市販の乾燥品で、70°C で通風乾燥後、粉碎された微粉末を用いた。

2. 空腹血糖値の測定

実験食投与直前 (9 週齢) および投与後 2 週目 (11 週齢)、4 週目、6 週目、8 週目にラットを朝から 5 時間絶食した後、無麻酔下で尾静脈よりヘパリンを含むヘマトクリット毛細管に採血した。ヘマトクリット遠心機で分離して得た血漿を用いてグルコース濃度を測定した。

3. 耐糖能試験

実験食を投与してから 4 週目 (13 週齢) にラットを 20 時間絶食した後、無麻酔下で 1 g/kg 体重のグルコースを経口投与した。グルコース投与前および投与後 30, 60, 120 分のときに尾静脈より採血し、血漿グルコース濃度を測定した。

4. 実験食負荷後の血糖値およびインスリン値の測定

実験終了直前 (17 週齢) にラットを 20 時間絶食した後、30 分間 2 g/kg 体重の糖質に相当するそれぞれの実験食を摂取させた。実験食摂取前および摂取開始後 30, 60, 120 分のときに尾静脈より採血し、血漿グルコースおよび血漿インスリン濃度を測定した。

5. 測定方法

実験食投与期間の体重、飼料摂取量および飲水量は毎日を測定した。血漿グルコースはグルコースオキシダーゼ法⁽¹³⁾に基づくグルコース C II-テストワコー (和光純薬) を、また血漿インスリンはワンステップ酵素免疫測定法⁽¹⁴⁾に基づくグラザイム Insulin-EIA test (和光純薬) を用いて測定した。

6. 統計処理

実験結果は、各実験群の平均値±標準誤差で表した。分散分析による検定後、Duncan の多重比較検定法⁽¹⁵⁾で検定した。有意水準は 5% 以下とした。

実験結果

1. 体重、体重増加量、飼料摂取量および飲水量

Table 2 には実験食投与期間中のラットの体重、体重増加量、飼料摂取量および飲水量を示した。体重増加量、飼料摂取量および飲水量は 3 群間で有意差はなかった。

2. 空腹血糖値

Fig. 1 には実験食投与前後における血糖値の変化を

Table 2. Body weight, food intake, and water intake in rats fed the experimental diets in Table 1 for 56 days.

Dietary group	Body weight (g)			Food intake (g)	Water intake (g)
	Initial	Final	Gain		
Normal (basal diet)	257±9*	386±13	130±5	911±26	1303±98
n-STZ-C (basal diet)	269±9	389±19	120±11	914±40	1315±111
n-STZ-A (Kikurage diet)	267±17	396±21	128±6	915±31	1324±59

*Values are mean±SEM for 7 rats. All data in the same column were not significantly different from each other.

Fig. 1. Effect of Kikurage on plasma glucose concentration in 5 h fasted rats.

The rats were fed a basal diet (normal group and n-STZ-C group) or Kikurage diet (n-STZ-A group) in Table 1 for 8 weeks. The symbols and bars represent the mean and SEM, respectively, for 7 rats. At each time, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

示した。実験食投与後2週目、4週目、6週目、8週目の血糖値における正常群とn-STZ-C群は実験開始時の血糖値に比べ、ほとんど変わらなかった。正常群に比べてn-STZ-C群は有意に高い血糖値を示した。キクラゲを添加した飼料を与えたn-STZ-A群はn-STZ-C群に比べて2週目から血糖値が低下する傾向を示し、4週目から有意に低下し、8週目に正常群の血糖値に近い値を示した。

3. 耐糖能試験

Fig. 2には耐糖能試験の結果を示した。0時間での血糖値は3群間で有意差はみられなかったが、グルコース負荷後30分に血糖値が3群ともにピークに達し、その後、血糖値は低下した。n-STZ-C群では正常群より、グルコース負荷後30、60、120分で血糖値が有意に高い値を示した。キクラゲを投与したn-STZ-A群では、グルコース負荷後30、60、120分の血糖値は正常群と差はなかった。グルコース負荷時の総血糖面積 (Σ BS)¹⁰⁾は、n-STZ-C群では 745.3 ± 35.5 (mg/mL), n-STZ-A群では 607.2 ± 14.4 (mg/mL), 正常群では 575.5 ± 9.9 (mg/mL)であった。正常群に比べ、n-STZ-C群では有意に高い値を示したが ($p < 0.05$), n-STZ-A群では有意差が認められなかった。またn-STZ-A群ではn-STZ-C群より有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

4. 実験食摂取後の血糖値および血漿インスリン値

Fig. 3には実験食を8週間投与した後実施した実験

Fig. 2. Effect of Kikurage on plasma glucose response to oral glucose tolerance testing in rats.

After being fed a basal diet (normal group and n-STZ-C group) or Kikurage diet (n-STZ-A group) in Table 1 for 4 weeks, 20 h fasted rats were given 1 g/kg glucose orally. The symbols and bars represent the mean and SEM, respectively, for 7 rats. At each time, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

食負荷試験の血糖値および血漿インスリン濃度変化を示した。実験食を摂取する直前での血糖値は3群間で有意差はみられなかったが、実験食摂取開始後60分に血糖値が3群ともにピークに達し、その後、血糖値は低下した。実験食摂取開始から30、60、120分では、基本食を摂取したn-STZ-C群では正常群に比べて血糖値は有意に高く、キクラゲ食を摂取したn-STZ-A群ではn-STZ-C群により食後の血糖上昇は有意に抑制され、その値は正常群の血糖値とほとんど同じレベルであった (Fig. 3A)。このときの総血糖面積は、n-STZ-C群では 617.7 ± 8.5 (mg/mL), n-STZ-A群では 546.5 ± 10.7 (mg/mL), 正常群では 535.1 ± 5.2 (mg/mL)であった。正常群に比べ、n-STZ-C群では有意に高い値を示し ($p < 0.05$), n-STZ-A群では有意差が認められなかった。またn-STZ-A群ではn-STZ-C群より有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

同時に測定したインスリンの分泌量は実験食摂取直前では3群間で差がなかったが、実験食摂取開始後30分で3群ともにピークに達し、その後低下した。摂食開始後30分および60分では、n-STZ-C群のインスリン分泌量は正常群に比べて有意に低値を示し、キクラゲ添加した飼料を投与したn-STZ-A群ではn-STZ-C群より食後のインスリン分泌量が有意に増加し、正常群に比べて有意

Fig. 3. Effect of Kikurage on postprandial plasma glucose level (A) and plasma insulin response (B) in rats.

After being fed a basal diet (normal group and n-STZ-C group) or Kikurage diet (n-STZ-A group) in Table 1 for 8 weeks, 20 h fasted rats were given a basal diet (normal group and n-STZ-C group) or Kikurage diet (n-STZ-A group) containing 2 g/kg of available carbohydrate, respectively. The symbols and bars represent the mean and SEM, respectively, for 7 rats. At each time, values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

差がみられなかった。しかし摂食開始後 120 分では 3 群間に有意差が認められなかった (Fig. 3B)。実験食負荷時の総インスリン面積 (ΣIRI)¹⁶⁾ は、n-STZ-C 群では $89.3 \pm 4.6 (\mu U/mL)$ 、n-STZ-A 群では $115.2 \pm 5.6 (\mu U/mL)$ 、そして正常群では $110.7 \pm 4.3 (\mu U/mL)$ であった。正常群に比べ、n-STZ-C 群ではインスリン分泌の有意な低下が認められたが ($p < 0.05$)、n-STZ-A 群ではほぼ同程度のインスリン分泌がみられた。また n-STZ-A 群では n-STZ-C 群より有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。実験食負荷後のインスリン初期分泌反応を負荷後 30 分の insulinogenic index ($\Delta IRI/\Delta BS$)¹⁷⁾ として計算してみると、n-STZ-C 群では 0.54 ± 0.05 、n-STZ-A 群では 1.29 ± 0.09 、正常群では 1.44 ± 0.13 であった。正常群に比べ、n-STZ-C 群では食後の血糖上昇に対する明らかなインスリンの初期分泌反応の欠如を示し、有意に低値であったが ($p < 0.01$)、n-STZ-A 群では有意差が認められなかった。また n-STZ-A 群では STZ-C 群より有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

考 察

出生直後 1~2 日目の新生児期ラットに STZ を投与して、作製した n-STZ ラットは膵 β 細胞がまだ一部には再生能を有しているので、生後 8 週目ごろには軽度の空腹時高血糖と、明らかな耐糖能の低下を示し、膵インスリン量は正常ラットの約 50% に減少する。このような病態はヒトの非肥満型の軽度の糖代謝異常を有する NIDDM に類似している¹⁸⁻²⁰⁾。本研究で作製した n-

STZ ラットは糖尿病特有多飲、多食、多尿の症状は示さず、実験期間中、体重増加量、飼料摂取量および飲水量に 3 群間の差はなかったが、実験開始時において、空腹時血糖値が正常群に比べて有意に高くなり、糖尿病症状を弱いながらも示しており、n-STZ ラットの膵 β 細胞が STZ の投与によって部分的に破壊されているものと考えられる。

n-STZ ラットにキクラゲを投与することで糖尿病の諸症状を改善する。キクラゲ食を投与した n-STZ ラットでは空腹血糖値が低下し、実験終了時には正常群のそれと変わらなくなった。またキクラゲ投与 4 週目時の耐糖能試験の結果から、正常群のレベルまで明らかに改善された。さらに実験終了直前に行った実験食負荷後の血糖値上昇が有意に抑制され、総血糖面積は明らかな低値を示した。そのときの血中インスリンの分泌量も有意に増加して、総インスリン面積および負荷後 30 分の insulinogenic index は明らかに高い値を示し、いずれも正常群との差は認められなくなった。それに対して、基本食を投与した n-STZ-C 群では n-STZ-A 群に比べて、高い血糖値、低いインスリンレベル、加えてその耐糖能の悪化を示した。これらの結果から、n-STZ ラットにおいて損傷を受けた膵 β 細胞機能の異常がキクラゲの投与によってある程度修復されて、インスリンの分泌能力が高められ、食後の血糖上昇に対するインスリンの初期分泌反応の欠如が回復されたと思われる。その結果、耐糖能異常が改善されたと考えられる。本研究の結果から、キクラゲの投与により非肥満型の NIDDM において糖

尿病症状の改善作用が認められた。

キノコは地球上に 4,000 種以上存在するといわれている。機能性食品と薬品開発素材としての価値が大きく、特異な構造や機能をもつ生理活性物質が発見される可能性は高いと考えられる。キクラゲはタンパク質、灰分およびビタミンのほかに、脂質が少なく、非デンプン系多糖成分が主体で独特の物性と食感を示したものである。糖尿病の改善作用はキクラゲに存在する何らかの活性物質の効果であると考えて、その活性物質の解明とともに生体にどのような機構によって影響されるかさらに検討を続ける必要がある。

要 約

糖尿病に対する、キクラゲの改善作用を明らかにするために、実験の糖尿病発症ラットを用いて検討した。

糖尿病ラットは、ストレプトゾトシンを出生後 2 日目に 80 mg/kg 皮下注射して、作製した。9 週齢より基本食に 5% キクラゲ粉末を添加した実験食で 8 週間飼育した。

その結果、

- 1) 体重増加量、飼料摂取量および飲水量は正常ラットに比べて差はなかった。
- 2) キクラゲの投与で空腹時高血糖が有意に低下した。
- 3) グルコース負荷時の耐糖能の改善がみられた。
- 4) 食後の血糖の上昇が抑制され、インスリン分泌量が有意に増加した。

以上の結果から、キクラゲに非肥満型の NIDDM において改善効果が認められた。

文 献

- 1) 中井継彦 (1996) 糖尿病と動脈硬化。糖尿病記録号 **1996**, 12-20.
- 2) 堀尾拓之, 大鶴 勝 (1995) 実験的糖尿病発症ラットにおいてマイタケ投与が耐糖能および尿糖排泄に及ぼす効果について。日本栄養・食糧学会誌 **48**, 299-305.
- 3) 木方 正, 辻村裕美子, 佐久嶋美穂, 臼井茂之, 鶴飼茂夫 (1994) 菌類中の多糖類に関する研究 (第 33 報) シロキクラゲ酸性多糖 (AC) の血糖降下作用。薬学雑誌 **114**, 308-15.
- 4) Kiho T, Sobue S, Ukai S (1994) Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *Agrocybe cylindracea*. *Carbohydr Res* **251**: 81-7.
- 5) Hikino H, Mizuno T (1989) Hypoglycemic actions of some heteroglycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med* **55**: 385.
- 6) 三崎 旭, 角田万里子 (1992) キクラゲおよび類縁担子菌類: キノコの化学・生化学, 初版, (水野 卓, 川合正允編著), p. 269-74, 学会出版センター, 東京.
- 7) Ukai S, Morisaki S, Goto M, Kiho T, Hara C, Hirose K (1982) Polysaccharides in fungi. VII. Acidic heteroglycans from the fruit bodies of *Auricularia auricula-judae* Quel. *Chem Pharm Bull* **30**: 635-43.
- 8) 難波恒雄 (1992) 漢方で用いる“薬用キノコ”: キノコの化学・生化学, 初版, (水野 卓, 川合正允編著), p. 251-67, 学会出版センター, 東京.
- 9) Thorens B, Weir GC, Leahy JL, Lodish HF, Weir, SB (1990) Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6492-6.
- 10) Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, Bailbe D (1989) The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabetes Metab* **15**: 61-75.
- 11) American Institute of Nutrition (1977) Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* **107**: 1340-8.
- 12) American Institute of Nutrition (1980) Second report of the ad hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* **110**: 1726.
- 13) Miwa I, Okuda J, Maeda K, Okuda G (1972) Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucose with β -D-glucose oxidase. *Clin Chim Acta* **37**: 538-40.
- 14) 石川栄治, 河合 忠, 宮井 潔編 (1982) 酵素免疫測定法, 第 2 版, p. 211. 医学書院, 東京.
- 15) Duncan, DB (1957) Multiple range tests for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* **13**: 164-76.
- 16) 清野 裕, 宇佐美勝, 黄 堯範, 大藺恵一, 服部昌子, 津田謹輔 (1992) 食品成分および食事因子と糖代謝: 食品の生体調節機能, 初版, (千葉英雄監修), p. 166-75. 学会出版センター, 東京.
- 17) 金井 泉原著 (1983) 臨床検査法提要, 第 29 版, (金井正光編著), p. 628. 金原出版, 東京.
- 18) 清野 裕, 田港朝彦, 辻 和雄, 宇佐美勝, 井村裕夫 (1987) STZ による NIDDM モデル動物作製の試み: 糖尿病動物, 初版, (後藤由夫編) 第 1 巻, p. 168-79. 医薬ジャーナル社, 大阪.
- 19) 小高裕之, 松尾隆夫 (1992) ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける二糖類水解酵素阻害剤 AO-128 の改善作用。日本栄養・食糧学会誌 **45**, 33-8.
- 20) 石田 均 (1995) 動物実験モデル n-STZ ラット: 糖尿病研究ストラテジー, (清野 進, 岡 芳知監修), p. 385-7. 秀潤社, 東京.

(1997 年 12 月 19 日受理)