小豆ポリフェノールの単回および継続投与が 血中グルコース濃度に及ぼす影響

小嶋道之[§], 西 繁典, 齋藤優介, 弘中和憲,
小嶋 浩, 前田龍一郎*

帯広畜産大学食料生産科学
* 帯広畜産大学基礎獣医学

Effects of Short-Term and Continuous Administration
of Adzuki Polyphenol on Blood Glucose Concentration

Michiyuki Kojima[§], Sigenori Nishi, Yusuke Saito,
Kazunori Hironaka, Hiroshi Koaze and
Ryuichiro Maeda*

Food Production Science, Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine,
11, Nishi-2-sen, Inada-cho, Obihiro 080-8555

* Basic Veterinary Science, Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine,
11, Nishi-2-sen, Inada-cho, Obihiro 080-8555

Mice which were tube-administered a single dose of Adzuki polyphenol (APP) showed significantly lower blood glucose levels than the control group after feeding with potato starch, saccharose or maltose. However, no significant differences between the experimental and control groups were observed when glucose was given to the mice. When approximately 40% of the single-dose amount of APP was administered to mice daily for two weeks before feeding them with saccharose, blood glucose levels were significantly lower in the experimental group than in the control group. In streptozotocin-induced diabetic mice (STZ-DM), blood glucose levels after saccharose ingestion were significantly lower in mice which were administered a single dose of APP than in control mice. Also, *in vitro* experiments showed that α -amylase and α -glucosidase activities were suppressed depending on the concentration of the APP dose, and that when the APP-E and APP-M subfractions of APP were added to enzyme solutions, APP-M suppressed the activity of α -amylase and α -glucosidase. These results indicate that the suppression effect of APP-M on blood-sugar levels may be attributed to the suppression of activity of glycolytic enzymes.

(Received Jul. 19, 2006 ; Accepted Oct. 16, 2006)

Keywords : postprandial blood glucose, adzuki polyphenol, α -amylase, α -glucosidase, inhibition

キーワード : 食後血糖値, 小豆ポリフェノール, α -アミラーゼ, α -グルコシダーゼ, 阻害

食事として摂取したデンプンやショ糖などは、唾液や膵

液から分泌される α -アミラーゼや小腸微柔毛の膜酵素である α -グルコシダーゼ等の働きにより単糖に分解後、小腸から吸収され、生体のエネルギー代謝に利用されている。通常、食後に上昇した血糖値は、恒常性維持作用によりすみやかに一定値まで低下する。しかし、糖尿病もしくはその予備軍の人は、食事による急激な血糖値上昇やその後の血中グルコース代謝不良などにより高血糖状態が継続し、網膜症、神経症および腎障害などの糖尿病二次症状を引き起こす。このように血糖値の恒常性維持作用は、糖尿病や生活習慣病の改善に重要な項目の一つと考えられ、血糖値改善作用のある植物成分の探索が進められている。これまでにグァバ葉やマテ葉の水抽出液¹⁾²⁾、緑茶カテキンやポリフェノール³⁾⁴⁾およびイチョウ葉フラボノイド⁵⁾、白インゲン豆の α -アミラーゼインヒビター⁶⁾などに血糖値改善作用のあることが報告されている。本研究では、抗酸化活性や肝臓保護作用⁷⁾など機能性の高い食品素材⁸⁾である小豆のポリフェノールをマウスに継続的および単回投与した時の血糖値に及ぼす影響および小豆ポリフェノール (APP) の糖分解酵素活性 (*in vitro* 実験) に及ぼす影響を明らかにした。

1. 実験方法

(1) APP と重画分の調製

APP の調製および定量は前報と同様の方法で行った⁷⁾。また、APP はゲルろ過カラムであるセファデックス LH20 (ファルマシア社製) に供して、エタノールで溶出した APP-E、その後にメタノールで溶出した APP-M の各濃縮物も、酵素活性抑制実験の試料として用いた。

(2) APP の継続的及び単回投与

マウスは、市販の固形飼料 CE-2 (日本クレア) と自由給水で飼育し、その取り扱いには Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に従った。APP 継続投与実験では、10 週齢の ddY 雄マウス (チャールズ・リバーより購入) を一週間の馴化後に使用した。APP 溶液はポリフェノール量 64 mg/kg/d を毎朝 10 時頃、2 週間継続してゾンデ投与した。最終日の 17 時から 16 時間絶食させ、0.5 ml のショ糖 (2.0 g/kg 体重) 水溶液をマウスの胃にゾンデ投与して、その後の血糖値変動を測定した。

単回投与実験には、7 週齢の ddY 雄マウス (チャールズ・リバーより購入) を一週間の馴化後に使用した。16 時間絶食させたマウスに、ポリフェノール 168 mg/kg 体重に調製した 0.5 ml の APP 水溶液を胃にゾンデ投与し、30 分後に 0.5 ml の 3 種類の糖水溶液 (各 2.0 g/kg 体重に調製) ; ジャガイモデンプン液、マルトース液およびグルコース液を胃にゾンデ投与して、その後の血糖値変動を測定した。また、4 週齢のマウスにストレプトゾトシン (65 mg/kg 体重) を皮下注射⁹⁾して、4 週間後に測定した血糖値が 250 mg/dl 以上のマウスをストレプトゾトシン誘発糖尿病マウス (STZ-DM) として使用した。0.5 ml の APP

〒080-8555 帯広市稲田町西 2 線 11 番地

* 〒080-8555 帯広市稲田町西 2 線 11 番地

[§] 連絡先 (Corresponding author), kojima@obihiro.ac.jp

水溶液（ポリフェノール 168 mg/kg 体重）を STZ-DM の胃にゾンデで単回投与し、30 分後に 0.5 ml のショ糖液（2.0 g/kg 体重に調製）を胃にゾンデ投与して、その後の血糖値変動を測定した。年齢/性をマッチさせた対照（CONT）マウスをコントロール群とした。

(3) 血中グルコース濃度の測定

糖水溶液を投与後、傷をつけたマウス尾端より 15 分間隔で採取した血液をプレシジョン電極に少量取り、プレシジョン QID（ロート製薬）を用いてグルコース濃度を測定した。

(4) アミラーゼおよびグルコシダーゼ活性の測定³⁾

市販の豚膵臓由来 α -アミラーゼ酵素粉末（EC 3.2.1.1, SIGMA）1 mg は、10 ml のリン酸カリウム緩衝液（pH 6.7）を加え酵素液とした。また、普通食 CE-2 を 2 週間与えた 13 週齢のマウス小腸内容物は 5 倍量のリン酸カリウム緩衝液（pH 6.7）を加えてホモジナイズ後、470 xg で 3 分間遠心し、その上清をリン酸カリウム緩衝液（pH 6.7）で 200 倍に希釈して実験に用いた。 α -アミラーゼ活性の測定は以下に行った。すなわち、2.5 ml の 0.5% 水解デンプン（和光純薬）溶液、1 ml の 0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.7）、500 μ l の 1% 塩化ナトリウム溶液を試験管に加えて反応混液を作成した。また、別のチューブに 100 μ l の α -アミラーゼ溶液と同量の APP 溶液（最終濃度 10~45 ppm に調製）もしくは蒸留水（コントロール）の酵素混合液を作り、37°C でプレインキュベートした。続いて 4 ml の反応混液とプレインキュベートした 200 μ l の酵素混合液を合わせて、37°C、10 分間インキュベートした。500 μ l の 2 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて反応を停止して、500 μ l の 1% ジニトロサリチル酸水溶液を加え沸騰浴中で 10 分間加熱発色後、540 nm の吸光値から還元糖量を測定し、アミラーゼ活性を算出した。

市販の酵母由来 α -グルコシダーゼ（EC 3.2.1.20, SIGMA）粉末 3 mg は、10 ml のリン酸カリウム緩衝液（pH 6.7）を加えて酵素液とした。また、マウス小腸粘膜に 4 倍量のリン酸緩衝液（pH 6.8）を加えてホモジナイズ後、470 xg で 3 分間遠心し、その上清を酵素液として用いた。 α -グルコシダーゼ活性の測定は以下に行った。試験管に 680 μ l の蒸留水、100 μ l の 0.4 M ショ糖水溶液、800 μ l の 0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.8）、220 μ l の 1% 塩化ナトリウム溶液を加えた反応混液を作成した。また、別のチューブに 200 μ l の α -グルコシダーゼ溶液と 100 μ l の APP 溶液（最終濃度 2.5~25.0 ppm に調製）もしくは蒸留水（コントロール）を加えて作成した酵素混合液は、37°C でプレインキュベートした。続いて 1.8 ml の反応混液と 300 μ l の酵素混合液を合わせて、37°C、30 分間反応後、アミラーゼ活性と同様の方法により活性を算出した。

(5) 統計処理

それぞれのデータは平均±標準偏差で表した。データ間

の有意差検定は T-test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

2. 実験結果および考察

(1) APP の継続投与および単回投与が血中グルコース濃度に及ぼす影響

マウスに APP を 2 週間継続投与しても、体重と肝臓重量の有意差は認められず、また肝臓障害の指標である血中のラクトースデヒドロゲナーゼ、グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、アルカリフォスファターゼ、コリンエステラーゼなどの各種酵素活性値にも有意差は認められなかった。また、APP の単回投与においても、上記の血清指標に有意差は認められなかった。

マウスに APP を 2 週間継続投与もしくは単回投与して、ショ糖水溶液を添加した場合、ともに血糖値の上昇速度および血糖最高値はコントロールマウスのそれらよりも有意に低い値を示した（Table 1）。APP の継続投与量は単回投与量の約 40% 量を用い、単回投与量はゲバ葉熱水抽出物やイチョウ葉抽出物で効果が報告されている量を目安に決定した¹⁾⁵⁾。また APP を単回投与して、ジャガイモデンプン、マルトースおよびグルコースの糖水溶液を添加した時の血糖最高値は、前 2 者では有意に抑制された。しかし、グルコースを与えた場合にはコントロールのそれとほぼ同程度であった（Table 2）。この結果から、APP による血糖値の上昇抑制は、デンプン、ショ糖およびマルトースの酵素分解を抑制することにより起きているため、グルコース投与では効果がみられないものと推察した。

STZ-DM に APP を単回投与して、ショ糖水溶液を投与した時の血糖値上昇は、有意に抑制された（Table 1）。STZ-DM は、膵臓ランゲルハンス島の B 細胞が脱落したことにより起こる 1 型糖尿病⁹⁾ 症状を示すので、血中インスリン濃度はかなり低レベル（未測定）と推測される。この結果から、APP はインスリン分泌に作用するのではなく、ショ糖の消化・吸収を抑制することにより血糖値の上昇抑制が起きていると推察した¹⁰⁾。

また、APP を単回投与した通常マウスに、ショ糖、マルトースおよびグルコースを与えた場合、投与 30 分後に血糖最高値を示し、ジャガイモデンプン水溶液を与えた場合は、投与後 60 分に示した。しかし、APP を 2 週間継続投与したマウスにショ糖水溶液を与えた場合の血糖最高値は 60 分後に認められ、単回投与の場合よりも 30 分遅延していた。この結果は、APP の継続投与は、糖の吸収機構に影響を与えることを示唆するものと考えられる。茶カテキン類には、インスリン活性¹¹⁾¹²⁾ やグルコース輸送タンパク質（GLUT）の発現量¹³⁾ に影響を及ぼすことが報告されている。APP 継続投与の場合については、糖の吸収機構、インスリン活性や GLUT 発現量に及ぼす影響など今後さらに検討する必要があると考えている。

(2) APP の糖分解酵素活性に及ぼす影響

Table 1 Blood glucose levels (mg/dl) in mice undergoing continuous and short-term administration of APP after feeding with sucrose

Time (min)	CAM ¹		STAM ²		STAM (STZ-DM) ³	
	CONT	APP	CONT	APP	CONT	APP
0	77.8±28.8	73.2± 9.0	92.8±16.2	108.0±23.3	93.3±41.3	88.5±18.0
15	160.7±39.4	112.3±15.5*	226.1±36.8	166.4±52.4*	—	—
30	210.5±66.7	144.7±12.7*	219.5±38.0	171.8±35.6*	297.5±36.1	190.3±46.6*
60	175.7±62.1	173.8±14.1	178.1±40.2	141.0±17.6*	307.8±55.0	218.3±68.9*
120	123.3±38.4	107.2±15.0*	138.9±35.1	97.6±21.5*	280.0±90.7	167.3±79.3

Abbreviations : CAM, continual administration mice ; STAM, short-term administration mice ; STAM (STZ-DM), short-term administration and streptozotocin diabetic mice ; CONT, control ; APP, Adzuki polyphenol.

¹ Values are means±standard deviations for 6 mice.

² Values are means±standard deviations for 12 mice.

³ Values are means±standard deviations for 4 mice of cardioprotection by streptozotocin-induced diabetes.

* $p < 0.05$.

Table 2 Blood glucose levels (mg/dl) in mice undergoing temporary daily administration of APP after feeding with starch, maltose or glucose

Time (min)	Starch administration		Maltose administration		Glucose administration	
	CONT	APP	CONT	APP	CONT	APP
0	67.3±14.2	52.3±15.6	83.3±22.8	75.5± 5.4	50.0±12.3	50.7±23.2
30	178.7±10.8	141.0± 8.2*	245.8±34.0	193.8± 9.4*	180.0±26.1	170.7±47.1
60	201.3±10.0	141.3±34.0*	168.0±15.4	138.0±22.5*	123.3±45.0	128.0±25.1
120	106.3±12.7	76.3±14.0*	89.5±22.6	78.5±31.0	57.3±25.0	56.7±10.7

Abbreviations : CONT, control ; APP, Adzuki polyphenol.

¹ Values are means±standard deviations for 4 mice.

Sugar dosage was 2 g/kg weight. Adzuki polyphenol dosage was 250 mg/kg weight.

* $p < 0.05$.

Fig. 1 Inhibition ratios (means ; bars=SD) of mouse α -amylase activity (A) and α -glucosidase activity (B) by Adzuki bean polyphenol

α -Amylase is from porcine pancreas and α -glucosidase is from bakers yeast.

市販の α -アミラーゼ酵素液に10~45 ppmの範囲でAPPを添加したところ、添加濃度に依存してアミラーゼ活性が抑制された (Fig. 1A)。また、市販の α -アミラーゼ酵素液にLH20カラムで調製したAPP亜画分；APP-EおよびAPP-Mを20 ppm添加して活性を測定したところ、APP-E添加による活性抑制はほとんど認められなかった

が、APP-M添加により活性が $69.8 \pm 6.9\%$ 抑制された。また、マウス小腸内容物のホモジネートを酵素源として、APPを20 ppmまで添加して α -アミラーゼ活性を測定したところ、ポリフェノール濃度 (X) と活性阻害率 (Y) との関係は $Y = 4.17X - 6.40$ の式で表され、添加濃度に比例して活性が抑制された。マウス小腸内容物にAPP-Eを20

ppm 添加しても α -アミラーゼ活性の抑制はほとんど認められなかったが、同濃度の APP-M を添加すると、活性は $84.2 \pm 3.8\%$ 抑制された。また、マウス小腸粘膜ホモジネートに APP を 20 ppm 添加して α -グルコシダーゼ活性を測定したところ、顕著な活性抑制は認められなかった。しかし、市販の α -グルコシダーゼ酵素液に 2.5~19.0 ppm の範囲で APP を添加したところ、濃度依存的に活性抑制が認められた (Fig. 1B)。また、市販の α -グルコシダーゼ酵素液に APP-E を 20 ppm 添加するとわずかに活性が抑制 ($0.8 \pm 4.0\%$) され、同濃度の APP-M を添加すると、活性は $49.1 \pm 2.4\%$ 抑制された。これらの結果は、APP、特に亜画分である APP-M が、 α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性を抑制することを示唆している。

糖分解酵素の活性抑制剤を使用したヒト臨床試験では、糖尿病予防や肥満に効果のあることが報告されている¹⁴⁾。今回の実験結果から、APP には血糖値上昇抑制作用および糖分解酵素の活性抑制作用があり、生活習慣病の予防に有用であることが期待される。

3. 要 約

小豆ポリフェノール (APP) をマウスにゾンデで単回投与して、その後、ジャガイモデンプン、ショ糖およびマルトースをそれぞれ与えると、すべてのマウス群の血中グルコース濃度はコントロール群に比べ有意に低い値を示した。しかし、グルコースを与えた場合に有意差は認められなかった。また、1 日に与える APP 量を単回投与の約 40% 量として 2 週間継続投与後、ショ糖を与えた場合にも、血中グルコース濃度はコントロール群のそれに比べ有意に低い値を示した。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウス (STZ-DM) に APP を単回投与してショ糖を与えると、血中グルコース濃度はコントロール値よりも有意に低い値を示した。また、*in vitro* 実験により、APP の添加濃度に依存して α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性が抑制されること、および APP 亜画分 (APP-E および APP-M) の特に APP-M が、 α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性を抑制することを明らかにした。これらの結果は、APP による血糖値上昇抑制作用は、主に APP-M の糖分解酵素の活性抑制作用に起因することを示唆している。

小豆エタノール抽出物を調製していただいた北海道立十勝農業試験場の加藤淳主任研究員および北海道立中央農業試験場の相馬ちひろ研究員に感謝します。この研究は日本豆類基金協会の資金援助を受け、帯広畜産大学 21 世紀

COE プログラム研究の一環として行った。

文 献

- 1) 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, グアバ葉熱水抽出物の 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, 農化誌, **72**, 923-93 (1998).
- 2) Teramoto, T., Oki, N. and Kusano, S., Mate leaf inhibits the activity of saccharide hydrolyzing enzymes and suppresses the increase in blood glucose levels after sugar loading in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **58**, 17-21 (2005).
- 3) Matsumoto, M., Ishigaki, F., Ishigaki, A., Iwashina, H. and Hara, Y., Reduction of blood glucose level by Tea catechin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 525-527 (1993).
- 4) Honda, M. and Hara, Y., Inhibition of Rat Small Intestinal Sucrase and α -Glucosidase Activities by Tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 123-124 (1993).
- 5) Tanaka, S., Han, L.K., Zen, Y.N. and Okuda, H., Effects of flavonoid fraction from *Ginkgo biloba* extract on the postprandial blood glucose elevation in rats. *Yakugaku-zasshi*, **124**, 605-611 (2004).
- 6) Tormo, M.A., Gil-Exojo, I., Romero, T.A. and Campillo, J. E., Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *Br. J. Nutr.*, **92**, 785-790 (2004).
- 7) 小嶋道之, 山下慎司, 西繁典, 齋藤優介, 前田龍一郎, 小豆ポリフェノールの生体内抗酸化活性と肝臓保護作用, 食科工, **53**, 386-392 (2006).
- 8) Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-4037 (2004).
- 9) Rakieten, N., Rakieten, M.L. and Nadkarni, M.R., Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.*, **29**, 91-98 (1963).
- 10) 小高裕之, 松尾隆夫, 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, 栄食誌, **45**, 33-38 (1992).
- 11) Anderson, R.A. and Polansky, M.M., Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7182-7186 (2002).
- 12) Wu, L.Y., Juan, C.C., Ho, L.T., Hsu, Y.P. and Hwang, L.S., Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 643-648 (2004).
- 13) Waltner-Law, M.E., Wang, X.L., Law, B.K., Hall, R.K., Nawano, M. and Granner, D.K., Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.*, **277**, 34933-34940 (2002).
- 14) Lankisch, M., Layer, P., Rizza, R.A. and DiMagno, E.P., Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor (WAI) in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas*, **17**, 176-181 (1998).

(平成 18 年 7 月 19 日受付, 平成 18 年 10 月 16 日受理)