

報 告

シマグワ葉パウダーの血糖値上昇抑制効果

久米大祐^{1,2}, 深水愛理³, 藏屋英介⁴,
島尻佳典⁵, 伊東昌章^{3*}

¹ 沖縄工業高等専門学校総合科学科
² 沖縄大学人文学部健康スポーツ福祉専攻
³ 沖縄工業高等専門学校生物資源工学科
⁴ 沖縄工業高等専門学校技術室
⁵ 医療法人太平洋会キンザー前クリニック

Inhibitory Effect of Powdered *Morus australis* Leaves on Postprandial Elevation of Blood Glucose

Daisuke Kume^{1,2}, Arisa Fukami³, Eisuke Kuraya⁴,
Yoshinori Shimajiri⁵ and Masaaki Ito^{3*}

¹ Department of Integrated Arts and Science, National
Institute of Technology, Okinawa College,
905, Henoko, Nago, Okinawa 905-2192
² Department of Health, Sports and Welfare, Faculty of
Humanities, Okinawa University, 555,
Kokuba, Naha, Okinawa 902-8521
³ Department of Bioresources Engineering, National
Institute of Technology, Okinawa College, 905,
Henoko, Nago, Okinawa 905-2192
⁴ Science and Technology Division, National Institute of
Technology, Okinawa College, 905, Henoko,
Nago, Okinawa 905-2192
⁵ Shimajiri Kinsermae Diabetes Care Clinic, 1-29-1,
Miyagi, Urasoe, Okinawa 901-2126

The aim of this study was to determine the inhibitory effect of powdered *Morus australis* leaves on postprandial elevation of blood glucose. First, we evaluated the functionality of the powdered leaves. Second, we examined the inhibitory effect of the powdered leaves on blood glucose elevation in healthy volunteers after administrating sucrose. Although 1-deoxyojirimycin content was lower and the median inhibitory concentration against sucrase was higher for the powdered leaves than for the raw leaves, the powdered leaves retained sucrase inhibitory activity. In addition, ingestion of the powdered leaves suppressed sucrose-induced elevation of blood glucose and insulin levels. Thus, we conclude that powdered *M. australis* leaves have an inhibitory effect on postprandial elevation of blood glucose.

(Received Jan. 29, 2018; Accepted Sep. 14, 2018)

Keywords : *Morus australis*, 1-deoxyojirimycin, Sucrase, Blood glucose, Insulin

キーワード : シマグワ, 1-デオキシノジリマイシン, スクララーゼ, 血糖値, インスリン

食後高血糖は、糖尿病患者のみならず非糖尿病患者においても心血管疾患のリスクファクターとなる¹⁾。また最近では、食後の大きな血糖変動による酸化ストレスが、血管内皮障害を引き起こし、将来的な心血管疾患のリスク増大に繋がる可能性が指摘されている²⁾。そのため、食後の血糖値を適切にコントロールすることは、疾病予防の観点から大変重要である。

食事によって摂取された糖質は、唾液および唾液中の消化酵素の働きにより二糖類に分解され、次いで小腸に存在するマルターゼやスクラーゼなどの二糖類分解酵素によって単糖類にまで分解された後、吸収される。桑葉には、二糖類分解酵素の阻害物質のひとつである1-デオキシノジリマイシン (1-DNJ) およびその誘導体が存在する³⁾。そのため、桑葉成分は、糖の吸収を穏やかにし、食後の急激な血糖値上昇を抑えることで、糖尿病を予防・改善すると期待されている⁴⁾。実際に、桑葉エキスを摂取することにより、スクロース負荷後の血糖値上昇を抑制できることが報告されている^{5)~7)}。また、桑葉エキスを添加したデンプン食品でも同様に血糖値上昇抑制効果が認められている⁷⁾⁸⁾。このように、食後の血糖コントロールにおける桑葉成分の有用性が示されている。

現在、沖縄県浦添市は、南西諸島周辺に分布する桑品種であるシマグワ (*Morus australis*) を用いた地域振興事業を進めている。我々のグループは、シマグワ葉の1-DNJ含有量およびマルターゼ阻害活性が本土品種よりも高いことを見出した⁹⁾。また我々は、この機能性の高いシマグワ葉を原料とした風味の良い茶パウダーの製造方法¹⁰⁾を開発し、これに準じて製造したシマグワ葉パウダーを製品化した。

本研究では、我々が開発したシマグワ葉パウダーの血糖値上昇抑制効果を明らかにすることを目的とした。実験1では、シマグワ葉パウダーの機能性評価として、1-DNJ含有量および先行研究^{5)~7)}で糖負荷に用いられているスクロースの分解酵素であるスクラーゼの阻害活性を同パウダーと原料葉と比較した。実験2では、健常成人を対象としてスクロース負荷後の血糖値上昇に対する同パウダーの抑制効果を検証した。

1. 実験方法

(1) 実験1

i) 材料

原料葉とシマグワ葉パウダーを同パウダーの製造元である浦添市シルバー人材センターから入手し、材料として用いた。入手した原料葉は、次の通りである。品種：久米島

¹ 〒905-2192 沖縄県名護市辺野古 905, ² 〒902-8521 沖縄県那覇市字国場 555, ³ 〒905-2192 沖縄県名護市辺野古 905

⁴ 〒905-2192 沖縄県名護市辺野古 905, ⁵ 〒901-2126 沖縄県浦添市宮城 1-29-1

*連絡先 (Corresponding author), ma-itou@okinawa-ct.ac.jp

で栽培されていた在来種、樹齢：4年、栽培地：沖縄県浦添市牧港、収穫日：2016年4月27日、収穫部位：枝条先端で完全展開した葉から下方に連続5枚、シマグワ葉パウダーの製造方法は、次の通りである。収穫した原料葉を流水にて洗浄した後、65℃で10時間、さらに75℃で2時間乾燥を行った。次に、乾燥した原料葉を170℃で5秒間の条件で殺菌を行い、100メッシュバスに微粉碎加工し、得られた粉末をシマグワ葉パウダーとした。測定サンプル数については、1-DNJ含有量測定は $n=3$ 、スクラーゼ阻害活性評価は $n=5$ とした。グルコースC II-テストワコーは、和光純薬工業社製を用いた。ラット腸管アセトンパウダーは、Sigma-Aldrich社製を用いた。

ii) 試料の調製

入手した原料葉は、直ちに -30°C で冷凍保存した。その後、凍結乾燥機(FDU-1100, 東京理化学器械社製)で一晩凍結乾燥後、ピーズ式破碎装置(MB755HS, 安井器械社製)を用いて3000rpm, 10秒間破碎することにより粉末化し、これを試料(原料葉凍結乾燥粉末)とした。シマグワ葉パウダーは、製品をそのまま試料として用いた。

iii) 1-DNJ含有量の測定

各試料中の1-DNJ含有量の測定は、前処理を行った後、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法を用いて行った。分析操作条件は、次の通りである。カラム：TSKgel Amide-80 ($\Phi 4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$ ・粒径 $5\mu\text{m}$)、移動相：水、アセトンニトリルおよび酢酸混液、流量： $1.0\text{mL}/\text{min}$ 、カラム温度： 40°C 、イオン化法：エレクトロスプレー(正イオン検出モード)、設定質量数(m/z)： $164.3 \rightarrow 109.9$ 。本測定は、日本食品分析センターにて行った。

iv) 抽出液の調製

各試料500mgに沸騰水50mLを加え、5分間静置後、吸引濾過した濾液を抽出液(10mg原料葉凍結乾燥粉末またはシマグワ葉パウダー/mL(w/v))とした。

v) スクラーゼ阻害活性の評価

酵素液の調製方法は、次の通りである。まず15mL遠沈管にラット腸管アセトンパウダー1gと純水10mLを加え懸濁し、水冷しながら1分間の超音波処理を3回繰り返した。この懸濁液を遠心分離機で $14355 \times g$, 15分間遠心分離して得られた上清を酵素溶液として用いた。失活酵素は、酵素溶液を0.2mLチューブに分注後、 100°C に設定したアルミブロック恒温槽(CTU-Mini, タイテック社製)で10分間加熱して得た。各酵素溶液ともに -30°C で凍結保存し、使用時に融解して使用した。スクラーゼ阻害活性の評価法は、次の通りである。まず0.2mLチューブに、0.1Mマレイン酸緩衝液(pH6.0)70 μL 、0.5Mスクロース溶液10 μL 、さらに0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5および1.0mg/mL(w/v)の各濃度に純粋で希釈した原料葉凍結乾燥粉末またはシマグワ葉パウダー抽出液検体10 μL を加え混合した。対照溶液は、抽出液検体の代わりに0.1Mマレイン酸

緩衝液(pH6.0)10 μL を加えた。これを 38°C に設定したアルミブロック恒温槽で10分間ブレインキュベートした後、酵素溶液10 μL を添加し 37°C で1時間反応させた。ブランクには失活酵素溶液を用いた。反応液に1M Tris-マレイン酸-NaOH緩衝液(pH7.4)100 μL を加えて反応を停止させた。遊離したグルコースの定量にはグルコースC II-テストワコーを用い、波長505nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Infinite M200, TECAN社製)で測定した。阻害率(%)を次式により算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = \frac{\{(A-B) - (C-D)\}}{(A-B)} \times 100$$

A: 対照溶液の吸光度 B: 対象溶液のブランクの吸光度
C: 試料溶液の吸光度 D: 試料溶液のブランクの吸光度
各濃度の試料溶液の阻害率から阻害曲線を作成し、50%阻害濃度(IC₅₀)の値を求めた。

(2) 実験2

i) 対象者

健常成人15名(男性6名・女性9名、年齢： 40.5 ± 7.8 歳、身長： $165.8 \pm 9.6\text{cm}$ 、体重： $63.6 \pm 16.1\text{kg}$ 、BMI： $22.8 \pm 3.8\text{kg}/\text{m}^2$)を対象とした。本実験では、同一対象者が異なる2条件下、すなわち、シマグワ条件とコントロール条件で測定を行うクロスオーバーデザインを採用した。対象者には予め、本実験の目的や実験内容等を口頭と書面にて十分に説明し、研究参加の同意を得た。本実験は、キンザー前クリニック倫理審査委員会の承認(承認番号：2016-01)を得て実施した。対象者には、実験前日からのアルコール類の摂取、実験当日のカフェイン類の摂取および激しい運動を禁止した。また、実験前日午後9時以降からの水以外の飲食を禁止した。

ii) 実験手順

本実験は、キンザー前クリニックにおいて医師の管理の下に実施した。空腹時採血(pre)を行った後、シマグワ条件ではシマグワ葉パウダー2gを白湯250mLで溶かした溶液を摂取させた。なお、シマグワ葉パウダーと白湯の配合量は、日常的に茶飲料として摂取することを想定し、茶飲料としての嗜好性および摂取量に基づいて決定した。コントロール条件では同量の白湯のみを摂取させた。その15分後、スクロース75gを水200mLで溶かしたスクロース溶液を負荷した。スクロース負荷後30分、60分および120分において上腕静脈から採血を行った。実験中、対象者は座位安静を保った。コントロール条件とシマグワ条件の実施順序は対象者間で釣り合うよう振り分け、約1週間の間隔を空けて行った。血液サンプルの分析項目は、血糖値(ヘキソキナーゼUV法)およびインスリン濃度(CLIA法)とし、分析はビー・エム・エル社に依頼した。

iii) 解析

血糖値およびインスリン濃度の経時変化から最高値および最高値到達時間を求めた。また、血糖最高値およびイン

スリン最高値の条件間の差分(コントロール条件—シマグワ条件)を算出した。さらに、血糖値およびインスリン濃度の pre 値をベースラインとする上昇曲線下面積を台形法により算出した。

iv) 統計処理

各条件における血糖値およびインスリン濃度の経時変化は、2要因(時間×条件)の分散分析により解析した。有意な交互作用が認められた場合、Bonferroni法を用いて多重比較検定を行った。血糖値およびインスリン濃度の最高値、最高値到達時間および上昇曲線下面積の条件間の比較には、対応のあるt検定を用いた。血糖最高値の条件間の差分とインスリン最高値の条件間の差分の関係は、Pearsonの積率相関分析によって評価した。以上の統計処理はSPSS ver. 23.0を用いて行い、有意水準はいずれも5%未満($P < 0.05$)とした。

2. 実験結果

(1) 実験1

原料葉凍結乾燥粉末およびシマグワ葉パウダーの1-DNJ含有量は、 $6.19 \pm 0.02 \text{ mg/g}$ および $2.50 \pm 0.01 \text{ mg/g}$ (各乾燥重量)であった。シマグワ葉パウダーの1-DNJ含有量は、原料葉凍結乾燥粉末のその40.4%であった。

原料葉凍結乾燥粉末抽出液およびシマグワ葉パウダー抽出液のスクラーゼに対する IC_{50} 値は、 $8.6 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ (w/v) および $11.8 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ (w/v)であった。シマグワ葉パウダー抽出液の IC_{50} 値は、原料葉凍結乾燥粉末抽出液のその1.37倍であった。

(2) 実験2

スクロース負荷試験における血糖値およびインスリン濃度の経時変化を図1に示す。血糖値に関しては、シマグワ条件では負荷後120分においてもpre値よりも高い値を示す傾向がみられた。コントロール条件と比較し、負荷後30分ではシマグワ条件の方が有意に低値を示し、負荷後120分ではシマグワ条件の方が有意に高値を示した。インスリン濃度に関しては、コントロール条件と比較し、負荷後30分ではシマグワ条件の方が有意に低値を示し、負荷後120分ではシマグワ条件の方が有意に高値を示した。

スクロース負荷試験における血糖値およびインスリン濃

度の最高値、最高値到達時間および上昇曲線下面積を表1に示す。血糖値に関しては、コントロール条件と比較して、最高値はシマグワ条件の方が有意に低く、最高値到達時間はシマグワ条件の方が有意に長くなった。インスリン濃度に関しては、最高値はシマグワ条件の方がコントロール条件よりも有意に低値を示した。

血糖最高値の条件間の差分とインスリン最高値の条件間の差分の間には有意な正の相関関係($r=0.53$)が認められた。

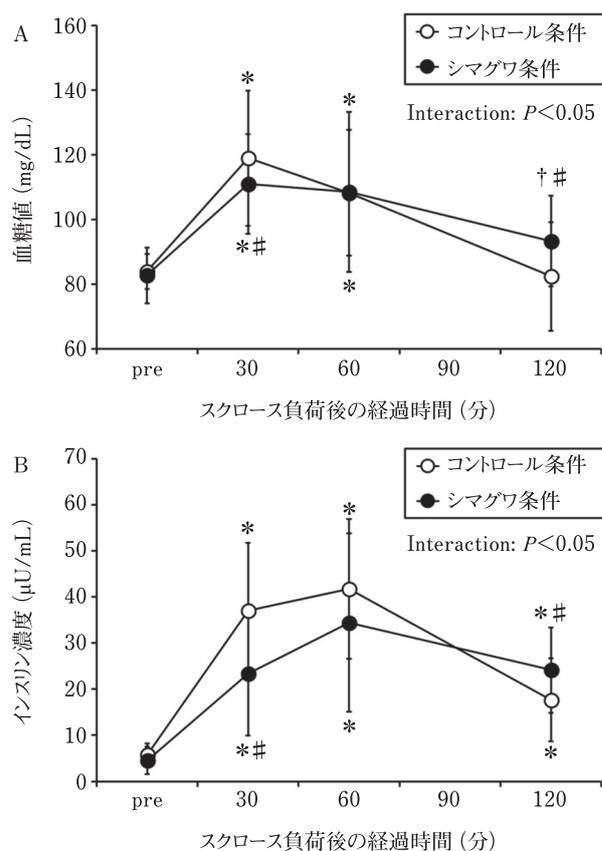


図1 スクロース負荷試験における血糖値(A)およびインスリン濃度(B)の経時変化($n=15$)

測定値は平均値±標準偏差で表示。*, $P < 0.05$ vs. pre.

†, $P < 0.1$ vs. pre. #, $P < 0.05$ vs. コントロール条件.

表1 スクロース負荷試験における血糖値およびインスリン濃度の最高値、最高値到達時間および上昇曲線下面積($n=15$)

	コントロール条件	シマグワ条件
血糖最高値 (mg/dL)	123 ± 19	$116 \pm 20^{\#}$
血糖最高値到達時間 (分)	38 ± 14	$54 \pm 26^{\#}$
血糖値上昇曲線下面積 (mg/dL×分)	2229 ± 1300	2500 ± 1136
インスリン最高値 (μU/mL)	43 ± 11	$34 \pm 17^{\#}$
インスリン最高値到達時間 (分)	62 ± 27	70 ± 27
インスリン上昇曲線下面積 (μU/mL×分)	2912 ± 754	2497 ± 1206

平均値±標準偏差で表示。#, $P < 0.05$ vs. コントロール条件.

3. 考察

(1) 実験1

シマグワ葉パウダーは、原料葉と比較して、1-DNJ 含有量は低値を、スクラーゼに対する IC₅₀ 値は高値を示したものの、スクラーゼ阻害活性を保持していることが示された。

シマグワ葉パウダーの1-DNJ 含有量は、原料葉の40.4%にまで低下していた。先に我々は、シマグワ葉を用い、製造工程中に160℃で7分間、さらに170~180℃で7分間焙煎を行った焙煎茶中の1-DNJ 含有量が原料葉のその1/3以下に低下していることを報告した⁹⁾。このことから、シマグワ葉パウダーは、製造時の高熱をかける殺菌工程(170℃, 5秒間)において、1-DNJの損失が生じたものと推察する。一方で、大幅な1-DNJ 含有量の低下が生じたにも関わらず、シマグワ葉パウダーのスクラーゼに対するIC₅₀ 値の増加は、原料葉の1.37倍に留まった。この要因としては、1-DNJ 以外の阻害成分¹¹⁾ が関与している可能性が考えられる。

(2) 実験2

シマグワ葉パウダーの摂取により、スクロース負荷後30分の血糖値上昇は抑制され、試験中の血糖最高値も同様に抑制された。また、血糖最高値到達時間は延長し、血糖値の低下が遅延する傾向があったため、血糖値上昇曲線下面積には影響はみられなかった。これらの結果は、シマグワ葉パウダーを摂取することによって、スクロース負荷後の血糖値の上昇が遅延し、それにより、急激な上昇が抑えられたことを意味する。また、対象者毎に検討してみると、15名中12名において同パウダーによる血糖最高値の低下がみられた。以上から、スクロース負荷後の血糖値上昇に対するシマグワ葉パウダーの抑制効果が示された。作用機序については、1-DNJ などの阻害物質による糖吸収の遅延だと考えられる⁴⁾。近年、血糖値上昇曲線下面積よりも食後の大きな血糖変動の方が、血管内皮機能障害を介した心血管疾患の発症リスクを増大させる可能性が指摘されている²⁾。実際、血糖クランプ法を用いた研究¹²⁾において、血糖変動に伴う酸化ストレスの増大は慢性的に持続する高血糖よりも血管内皮障害を進行させることが示されている。これらのことから、シマグワ葉パウダーの摂取によって食後の血糖変動の幅を小さく保つことは、疾病予防の観点から大きな意義があると考えられる。

本研究では、インスリン濃度についても血糖値と同様にシマグワ葉パウダーによる抑制がみられ、インスリン最高値は15名中11名で低下した。また、シマグワ葉パウダーによる血糖最高値およびインスリン最高値の低下に関連性が認められたことから、シマグワ葉パウダーによる血糖値上昇抑制はインスリン分泌の節減にも繋がるものと考えられる。

4. 要約

本研究では、我々が開発したシマグワ葉パウダーの血糖値上昇抑制効果を明らかにすることを目的とした。実験の結果、シマグワ葉パウダーは、その製造過程において、1-DNJ 含有量は低下、スクラーゼに対するIC₅₀ 値は増加するものの、スクラーゼ阻害活性を保持していることが示された。また、同パウダーを摂取することで、スクロース負荷後の血糖値上昇を抑制でき、それに伴い、インスリン分泌を節減できることが示唆された。本研究から、シマグワ葉パウダーの血糖値上昇抑制効果が明らかとなった。

本研究を遂行するにあたり、御協力を頂きました浦添市役所 大塚京平氏、(公社)浦添市シルバー人材センター 比嘉秀三氏に心より感謝申し上げます。また、実験1の遂行に御協力を頂きました沖縄工業高等専門学校生物資源工学科 平川大成氏、実験2の遂行に御協力を頂きました浦崎淳氏および対象者の皆様に心より感謝申し上げます。

文 献

- O'Keefe, J.H. and Bell, D.S. (2007). Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.*, **100**, 899-904.
- 岡田洋右 (2014). 血糖変動の血管内皮機能への影響を捉える (特集 食後高血糖治療を極める), *Life Style Medicine*, **8**, 14-20.
- Asano, N., Oseki, K., Kizu, H., and Matsui, K. (1994). Nitrogen-in-the-ring pyranoses and furanoses: structural basis of inhibition of mammalian glycosidases. *Med. Chem.*, **37**, 3701-3706.
- Kimura, T. (2007). Development of mulberry leaf product with α -Glucosidase inhibitor for the prevention of type2 diabetes mellitus. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **57**, 57-62 (木村俊之. 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, 日本食品科学工学会誌).
- Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S., and Miyazawa, T. (2007). Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5869-5874.
- Mudra, M., Ercan-Fang, N., Zhong, L., Furne, J., and Levitt, M. (2007). Influence of mulberry leaf extract on the blood glucose and breath hydrogen response to ingestion of 75g sucrose by type 2 diabetic and control subjects. *Diabetes Care.*, **30**, 1272-1274.
- Nakamura, M., Nakamura, S., and Oku, T. (2009). Suppressive response of confections containing the extractive from leaves of *Morus Alba* on postprandial blood glucose and insulin in healthy human subjects. *Nutr. Metab. (Lond.)*, **6**, 29.
- 中村まり子, 橋口(石黒)美智留 (2010). α -グルコシダーゼ阻害作用をもった桑葉エキス末添加デンプン食品のヒトにおける食後血糖上昇抑制効果, 栄養学雑誌, **68**, 351-358.
- 深水愛理沙, 藏屋英介, 島袋雅矢, 大塚京平, 伊東昌章 (2015). シマグワの1-デオキシノジリマイシン含量と α -グルコシダーゼ阻害能に関する研究, 日本食品科学工学会

- 第 62 回大会講演, pp. 123.
- 10) 普天間樹, 伊東昌章, 藏屋英介 (2017). 桑茶の製造方法. 特許第 6096546 号, 3 月 15 日.
- 11) Asano, N., Oseki, K., Tomioka, E., Kizu, H., and Matsui, K. (1994). N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.*, **259**, 243-255.
- 12) Ceriello, A., Esposito, K., Piconi, L., Ihnat, M.A., Thorpe, J.E., Testa, R., Boemi, M., and Giugliano, D. (2008). Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes.*, **57**, 1349-1354.
(平成 30 年 1 月 29 日受付, 平成 30 年 9 月 14 日受理)
-