

## 学位論文の内容の要旨

学位論文題目 ジャワ島産紅茶の糖質吸収抑制効果に関する研究

指導教員 渡辺 一弘

学位申請者 五十嵐将樹

2型糖尿病はインスリン分泌低下やインスリン抵抗性を来す素因を含む複数の遺伝因子に、過食、運動不足、肥満、ストレスなどの環境因子及び加齢が加わり発症する。平成23年国民健康・栄養調査報告によると「糖尿病が強く疑われる人」と「糖尿病の可能性が否定できない人」の総和は国民の27.1%と推計されている。糖尿病の9割が2型糖尿病であり、食事由来の糖の吸収を抑制することが予防あるいは進展抑制に有効と考えられている。食事から摂取された炭水化物は、唾液や膵臓から分泌される $\alpha$ -アミラーゼ(AM)によって多糖類あるいは二糖類に分解され、ついで小腸上皮細胞に存在する $\alpha$ -グルコシダーゼ(GL)によってグルコースに分解された後、主にグルコーストランスポーター2(GLUT2)によって吸収される。

2型糖尿病の境界型は生活習慣の改善、すなわち食事量の制限や清涼飲料水由来の糖質制限等の食事療法や運動療法が指導される。身近な食品の中から糖質吸収を抑制する3次機能を有する食品素材の探索は、境界型の食事療法を行う際に有用であると考え、本研究に着手した。紅茶は水について世界で最も多く摂取されている飲料で、その喫飲量と2型糖尿病有病率は負の相関関係にあることが知られている。しかしながら、その詳細な作用機序は未だ不明である。そこで、消化管における糖質吸収過程に及ぼす紅茶の影響に着目し、紅茶が2型糖尿病に機能性食品素材として有用であるか検討した。

一方、抗糖尿病薬の一部は主に薬物代謝酵素CYPで代謝されることが知られているが、紅茶と医薬品の併用による思わぬ食-薬間相互作用が発現する可能性が懸念された。そこで安全性の観点から紅茶のCYPに及ぼす影響も併せ

て検討した。

### 1. 検体の調製およびカテキン、テアフラビン類の確認

市販ジャワ島産紅茶飲料の凍結乾燥品 (JAT) を各試験に供した。なお、JAT 1 g は 約 4 g の茶葉に相当し、数種のカテキンおよび紅茶の特有成分であるテアフラビン類の含有を確認している。

### 2. AM 活性に及ぼす JAT の影響

AM 活性に及ぼす JAT の影響を Fig. 1 に示した。JAT は用量依存的に AM 活性を阻害し、その 50 % 阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) は 2.90 mg/mL であった。陽性対照として用いた特定保健用食品、蕃爽麗茶の凍結乾燥品 (BAS) および 食後過血糖改善薬、アカルボース (ACA) の IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 159 μg/mL および 1.79 μg/mL であった。IC<sub>50</sub> 値の比較から、JAT の阻害強度は BAS の約 1/18、ACA の約 1/1600 と弱く、JAT は AM 活性に影響を及ぼさないと考えられた。

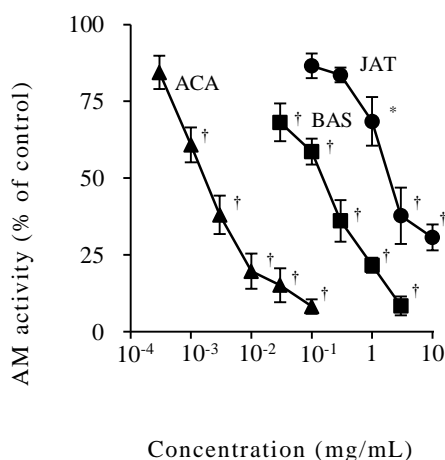


Fig. 1 Effects of JAT, BAS and ACA on porcine pancreatic AM activity

Porcine pancreatic AM was incubated with starch in the presence of various concentrations of JAT, BAS and ACA for 15 min at 37 °C. Each value represents the mean ± S.D. of 3-4 experiments. Significantly different from the control, \* $p < 0.05$ , † $p < 0.001$ .

### 3. GL 活性に及ぼす JAT の影響

GL 活性に及ぼす JAT の影響を Fig. 2 に示した。JAT、BAS および ACA は用量依存的にスクラーゼおよびマルターゼ活性を阻害した。IC<sub>50</sub> 値より、JAT の阻害強度は BAS の約 5~7 倍、ACA の約 1/170 ~ 1/80 であり、弱いなが

らも GL 活性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

そこで GL に対する JAT の阻害様式を検討した (Fig. 3)。JAT の添加によりスクラーゼおよびマルターゼの  $V_{max}$  値はいずれも有意に低下したが、 $K_m$  値に変化は認められなかったことから、非競合型阻害であることが示唆された。

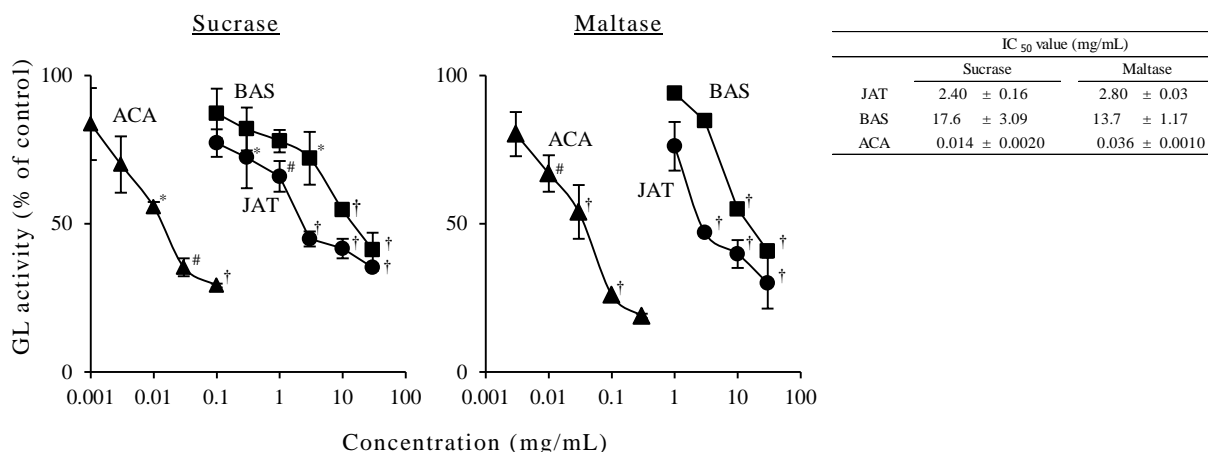


Fig. 2 Effects of JAT, BAS and ACA on rat small intestinal sucrase and maltase activities

Rat small intestinal sucrase and maltase were incubated with sucrose and maltose in the presence of various concentrations of JAT, BAS and ACA for 10 min at 37 °C. Each value represents the mean ± S.D. of 3-4 experiments. Significantly different from the control, \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$ , † $p < 0.001$ .

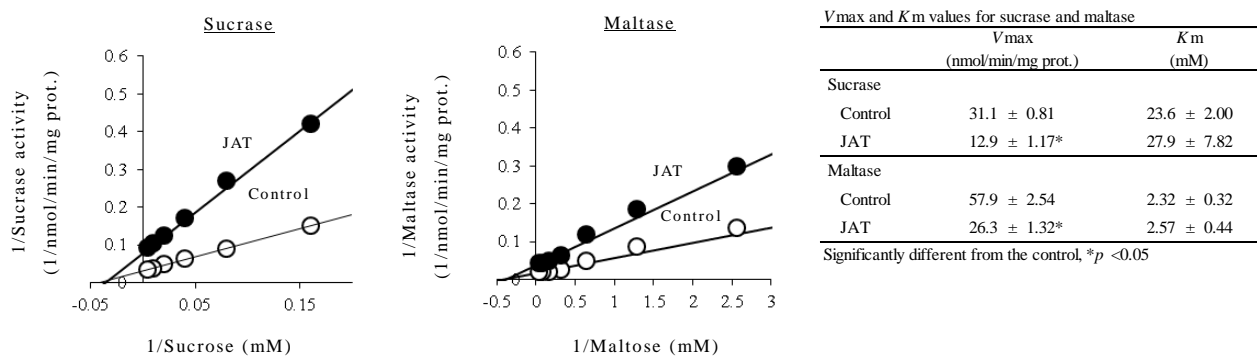


Fig. 3 Lineweaver-Burk plots for rat small intestinal sucrase and maltase

Rat small intestinal sucrase and maltase were incubated with sucrose (6.25 ~ 200 mM) and maltose (0.39 ~ 25 mM) in the presence or absence of JAT (3 mg/mL) for 10 min at 37 °C. Each value represents the mean ± S.D. of 3-4 experiments.

#### 4. グルコースの取込みに及ぼす JAT の影響

次に Caco-2 細胞における GLUT2 の特異的基質である 2'-デオキシグルコース (DG) の取込みに及ぼす JAT の影響を検討した (Fig. 4)。GLUT2 の特異的阻害剤フロレチンは用量依存的に DG の取込み量を低下させたのに対し (IC<sub>50</sub> 値 : 75.6 μg/mL)、JAT は最大 1 mg/mL を添加しても取込み量に変化は認

められなかった。従って、JAT は小腸上皮細胞刷子縁膜上の GLUT2 が介在するグルコースの吸収には関与しないことが示唆された。

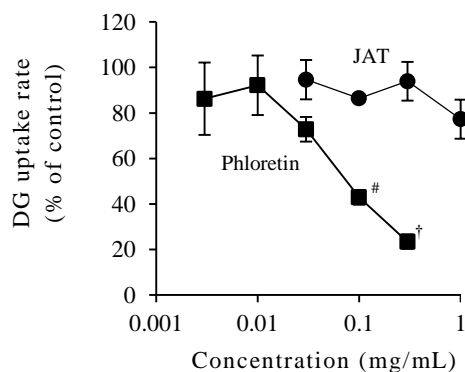


Fig. 4 Effects of JAT and phloretin on DG uptake in Caco-2 cell monolayers

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 3 monolayers. Significantly different from the control, <sup>#</sup> $p < 0.01$ , <sup>†</sup> $p < 0.001$ .

## 5. 糖負荷後血糖値に及ぼす JAT の影響

上述した *in vitro* の実験結果から、JAT は GL 阻害作用を有する可能性が示唆された。そこで肥満 2 型糖尿病モデル動物 C57 BLKS/JIar-+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup> (*db/db*) マウスを用い、スクロース負荷後の血糖値に及ぼす JAT 経口投与の影響を検討した (Fig. 5)。2 型糖尿病を呈しない *db/+* マウスの血糖値は、糖負荷により幾分上昇したに過ぎなかった (211 mg/dL)。これに対し *db/db* マウスのコントロール群の血糖値は、スクロース負荷後 30 分で最高値 (825 mg/dL) に達し、その後漸減した。JAT 投与群では用量依存的な血糖値の低下を示し、500 mg/kg で 30、60 および 120 分後の血糖値がいずれもコントロール群に比べ有意に低下し、BAS 500 mg/kg 投与群とほぼ同様の血糖曲線を示した。また、ACA 投与群においても、用量依存的に血糖値の上昇が抑制された。なお、インスリン値はいずれの投与群においても有意な変化はみられなかった。

次に最高血糖値を示した 30 分後における JAT、BAS および ACA 投与後の小腸 GL 活性を検討した (Fig. 6)。コントロール群と比較して、JAT および ACA 投与群は有意な低下が認められ、JAT 投与群で *db/+* 群の活性とほぼ同程度であった。一方、BAS 投与群に有意な低下は認められなかった。

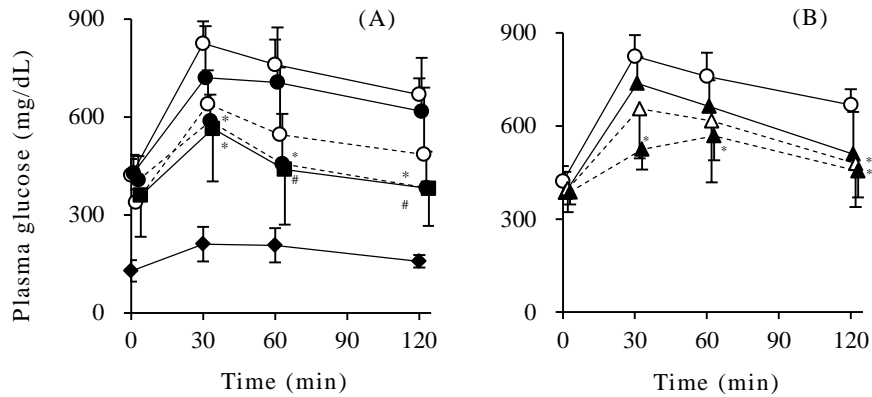


Fig. 5 Effects of JAT, BAS and ACA oral administration on plasma glucose levels after sucrose loading in *db/db* mice

Plasma glucose levels were measured in control *db/db* mice (—○—), *db/db* mice administered JAT (100 mg/kg, —●—; 250 mg/kg, —○—; 500 mg/kg, —●—) and BAS (500 mg/kg, —■—), and reference *db/+* mice (—◆—) (A); and in control *db/db* mice (—○—) and *db/db* mice administered ACA (10 mg/kg, —▲—; 25 mg/kg, —△—; 100 mg/kg, —▲—) (B) after sucrose loading. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 5-6 mice. Significantly different from the control, \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$ .

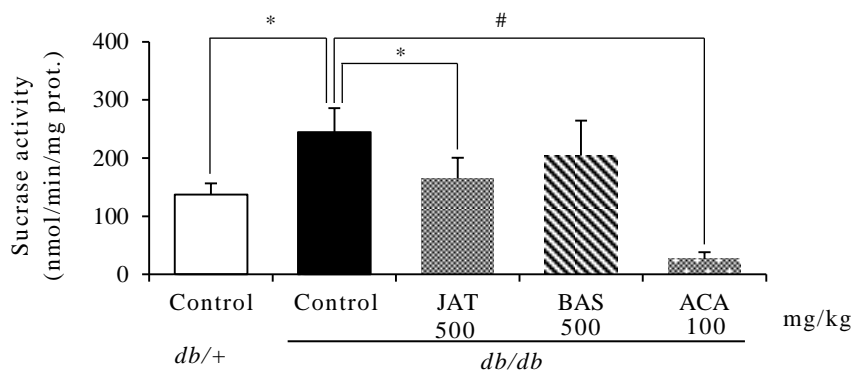


Fig. 6 Effects of JAT, BAS and ACA oral administration on small intestinal sucrase activities in *db/db* mice. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 4 mice. Significantly different from the control, \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$ .

以上の *db/db* マウスでの検討から、JAT は GL 活性の阻害に基づく食後過血糖改善効果を有する可能性が示唆された。そこでインスリン分泌が不全であり、日本人の 2 型糖尿病に近い非肥満 2 型糖尿病モデル動物 GK ラットを用い、糖負荷後血糖値に及ぼす JAT の影響を詳細に検討した。スクロースを負荷した GK ラットに、JAT、BAS および ACA を投与したときの血糖値の経時変化を Fig. 7 に示した。コントロール群の血糖値は負荷後 30 分で最高値 (299 mg/dL) に達し、その後漸減した。JAT 投与群は用量依存的に血糖値上昇抑制効果を示し、投与 30 分後の血糖値は 62.5 mg/kg 以上でコントロール群

に比べ有意に低値を示し、250 mg/kg 投与群の血糖値は 221 mg/dL まで低下した。BAS および ACA 投与群も同様に用量依存的な血糖値上昇抑制効果を示し、BAS 250 mg/kg は投与 30 分後、ACA 3.0 mg/kg は 30 分および 60 分後で有意に低下した。一方、JAT 31.3 mg/kg および ACA 0.3 mg/kg の各投与群は、いずれも血糖値に有意な変化を認めなかったが、これらの併用群では投与 30 分および 60 分後の血糖値が有意に低下し、ACA 3.0 mg/kg 投与群とほぼ同じ血糖値上昇抑制効果となった。なお、いずれの投与群もインスリン値に変化は見られなかった。

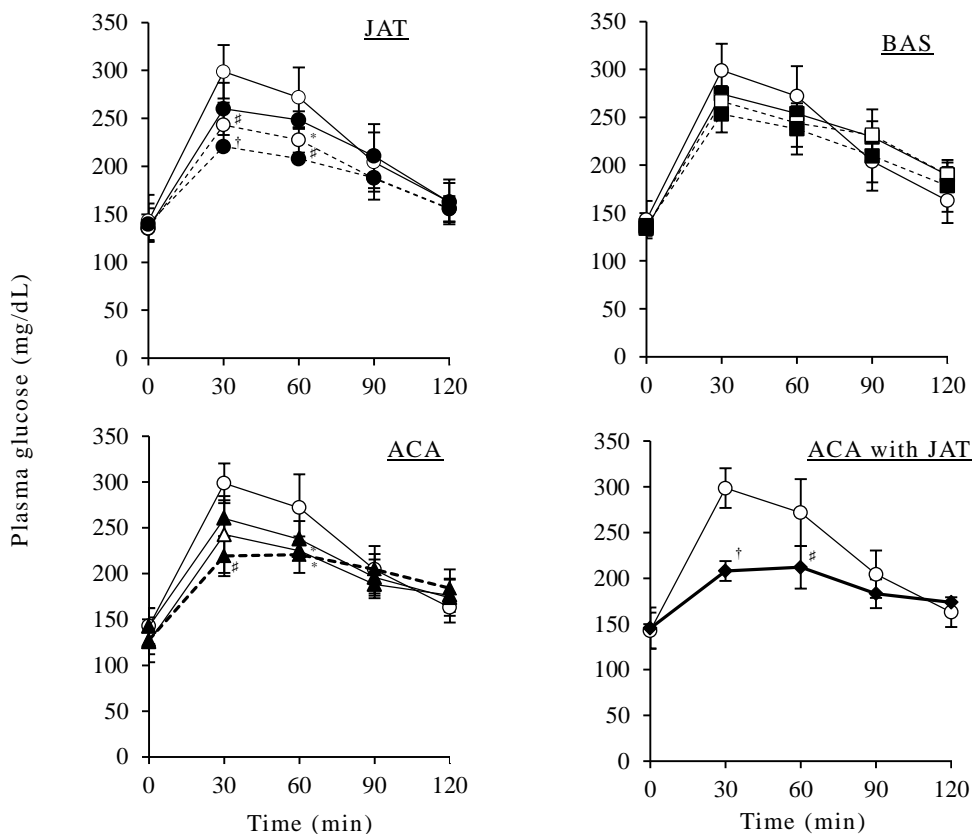


Fig. 7 Effects of JAT, BAS and ACA oral administration on plasma glucose levels after sucrose loading in GK rats

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 5-6 rats. Significantly different from the control, \* $p < 0.05$ , # $p < 0.01$ , † $p < 0.001$ .

またグルコースを負荷した GK ラットの JAT、BAS および ACA 投与群は、いずれの時間においても、コントロール群と比べ、血糖値に何ら変化は見られなかった (Fig. 8)。

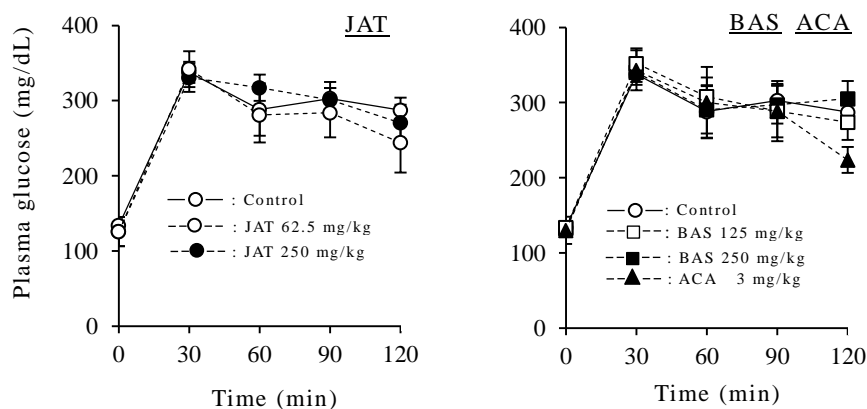


Fig. 8 Effects of JAT, BAS and ACA oral administration on plasma glucose levels after glucose loading in GK rats  
Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 5-6 rats.

さらに GK ラットにおいても JAT、BAS および ACA を投与した 30 分後における小腸 GL 活性を検討した (Fig. 9)。コントロール群と比較して、いずれも用量依存的に GL 活性は低下し、高用量群で有意となった。一方、有意な低下を認めなかった JAT および ACA の低用量群を併用したところ、ACA の高用量群に相当する小腸 GL 活性の低下が認められた。

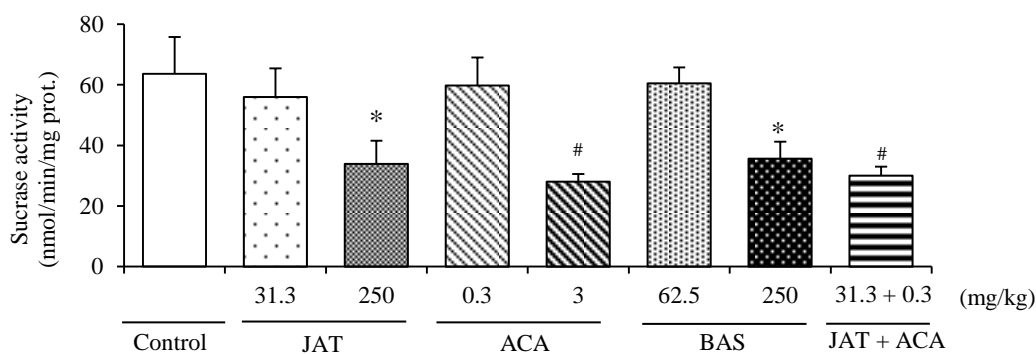


Fig. 9 Effects of JAT, BAS and ACA oral administration on small intestinal sucrase activities in GK rats  
Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 5-6 rats. Significantly different from the control, \* $p$  < 0.05, # $p$  < 0.01.

## 6. 薬物代謝酵素 CYP に及ぼす JAT の影響

ヒト肝ミクロソームにおける主な CYP 活性に対する JAT 添加の影響を検討した (Fig. 10)。CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 活性に用量依存的な低下が認められ、これらの IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 46.5、21.5 および 45.4 μg/mL であった。

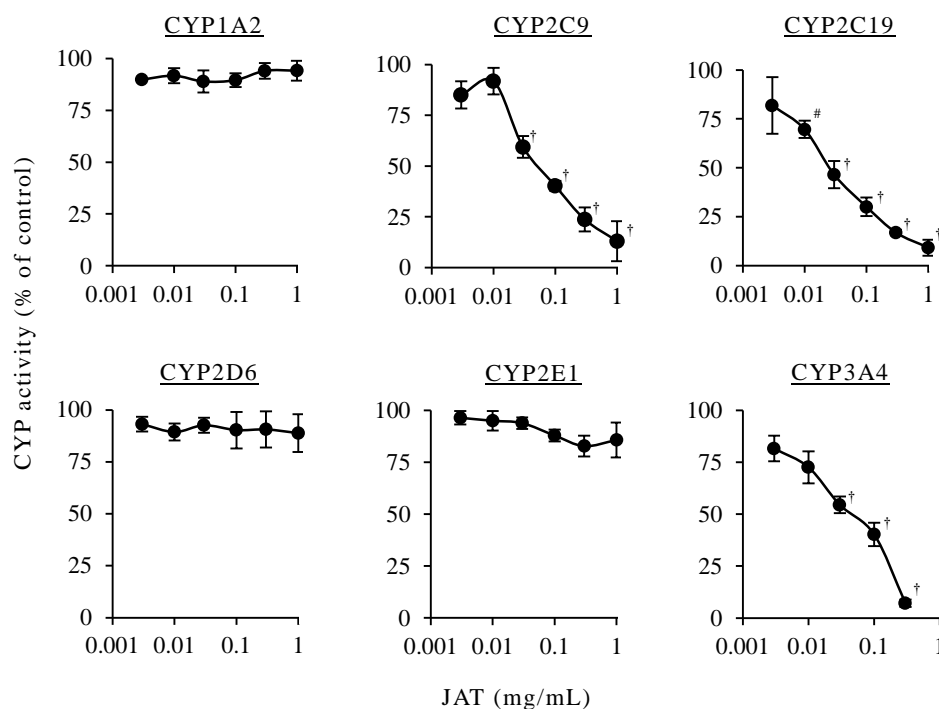


Fig.10 Effects of JAT addition on various CYPs activities in human liver microsomes  
Human liver microsomes were incubated with specific substrate in the presence or absence of JAT (0.003 ~ 1.0 mg/mL) for 60 min at 37 °C. Each value represents the mean ± S.D. of 4 experiments. Significantly different from the control, <sup>#</sup> $p < 0.01$ , <sup>†</sup> $p < 0.001$ .

### まとめ

食事より摂取した炭水化物は主に AM および GL によってグルコースに分解された後、GLUT2 によって吸収される。JAT は AM に対し、何ら影響することはなかったが、スクロース負荷後の血糖値上昇を抑制することが、肥満および非肥満の 2 型糖尿病モデル動物の実験から明らかとなった。非肥満型において、より低用量で有意な効果を示したことから、重度な病態よりも軽症において効果的と示唆された。また、この効果は *in vitro* 実験および JAT 投与 30 分後の摘出小腸 GL 活性を検討した *ex vivo* 実験から、GL 活性の阻害に基づくと考えられた。一方、GK ラットにグルコースを負荷した場合、JAT は血糖



値上昇抑制効果を示さなかった。これは Caco-2 細胞を用いた GLUT2 による DG 取込み実験においても、JAT は何ら関与しなかったことから裏付けられた。

一方、食事療法や運動療法を 2~3 ヶ月継続しても目標の血糖コントロールを達成できない場合は、薬物療法が開始されることとなるが、JAT は ACA と併用することで、GL 活性を相加的に阻害することが確認された。この時の ACA の投与量はヒトの 1 日量の約 1/3、JAT は約 5 杯分に相当する。

また JAT は、他の抗糖尿病薬と併用する機会も少なくないと考えられる。従って JAT の GL 活性阻害に加え、他剤による血糖低下効果が同時に起きた場合、低血糖等の有害事象の発現が懸念される。そこで JAT の CYP 活性に及ぼす影響を検討した結果、CYP2C および CYP3A を阻害したことから、これらの酵素で代謝される糖尿病治療薬と紅茶の併用には注意が必要であると示唆された。

以上より、紅茶は 2 型糖尿病の境界型での食事療法の際、食後過血糖上昇を抑制する可能性を有した機能性食品素材であり、一部の医薬品との併用には注意が必要であると考えられた。