

ジャワ島産紅茶の糖質吸収抑制効果に関する研究

平成 25 年度

北海道薬科大学大学院薬学研究科
生物薬学専攻博士後期課程
五十嵐 将樹

目次

略語表

諸言

1	紅茶の糖質吸収抑制効果の検討	3
1.1	序論	3
1.2	実験方法	3
1.2.1	実験材料	3
1.2.2	検体の調製	4
1.2.3	JAT 中のカテキン類およびテアフラビン類の定量	4
1.2.4	細胞の培養条件	7
1.2.5	AM 活性の測定	7
1.2.6	GL 活性の測定	8
1.2.6.1	酵母由来 GL 活性	8
1.2.6.2	ラット小腸アセトンパウダー由来 GL 活性	8
1.2.6.3	Caco-2 細胞由来 GL 活性	9
1.2.7	2'-デオキシ-D-グルコースおよび α -メチル-D-グルコースの uptake 試験	9
1.2.8	動物実験	10
1.2.8.1	実験動物	10
1.2.8.2	db/db マウスを用いた検討	11
1.2.8.2.1	スクロース負荷耐糖能試験	11
1.2.8.2.2	マウス小腸 GL 活性の測定	11
1.2.8.3	GK ラットを用いた検討	12
1.2.8.3.1	スクロースあるいはグルコース負荷耐糖能試験	12
1.2.8.3.2	ラット小腸 GL 活性の測定	12
1.2.9	統計処理	12
1.3	結果	13
1.3.1	JAT 中の成分定量	13
1.3.2	AM 活性に及ぼす JAT の影響	14
1.3.3	JAT の各種 GL 活性に及ぼす影響	16

1.3.3.1	酵母由来 GL	16
1.3.3.2	ラット小腸由来 GL 活性に及ぼす JAT の影響	18
1.3.3.3	Caco-2 細胞由来 GL 活性に及ぼす影響	22
1.3.4	グルコースの取込みに及ぼす JAT の影響	23
1.3.4.1	DG 取込み活性に及ぼす JAT の影響	23
1.3.4.2	AMG 取込み活性に及ぼす JAT の影響	24
1.3.5	動物実験	25
1.3.5.1	<i>db/db</i> マウスによる検討	25
1.3.5.1.1	スクロース負荷後血糖値およびインスリン値に及ぼす JAT の影響	25
1.3.5.1.2	小腸 GL 活性に及ぼす JAT の影響	27
1.3.5.2	GK ラットによる検討	28
1.3.5.2.1	スクロース負荷後血糖値等に及ぼす JAT の影響	28
1.3.5.2.2	小腸 GL 活性に及ぼす JAT の影響	31
1.3.5.2.3	グルコース負荷後血糖値に及ぼす JAT の影響	32
1.4	考察	33
2	紅茶の各種 CYP 活性に及ぼす影響	37
2.1	序論	37
2.2	実験方法	37
2.2.1	実験材料	37
2.2.2	HPLC	37
2.2.3	各種 CYP 活性の測定	38
2.2.4	統計処理	39
2.3	結果	39
2.3.1	各種ヒト CYP 活性に及ぼす JAT の影響	39
2.4	考察	41
3	まとめ	43
4	謝辞	45
5	引用文献	46

略語表

ABC = ATP-binding cassette

ACA = アカルボース (acarbose)

AM = α -アミラーゼ (α -amylase)

AMG = α -メチル-D-グルコース (α -methyl-D-glucose)

BAS = 蕃爽麗茶の凍結乾燥品

β -NADP⁺ = β -nicotineamide-adenine dinucleotide phosphate sodium salt

C = (+) - カテキン ((+) - catechin)

CG = (-) - 3-O-没食子酸カテキン ((-) - catechin-3-O-gallate)

CMC = carboxymethyl cellulose

CYP = シトクローム P450 (cytochrome P450)

db/+ = C57BLKS/J Iar-m^{+/+}Lepr^{db}

db/db = BKS.Cg-m⁺Lepr^{db/+}Lepr^{db}/Jcl

DG = 2'-デオキシ-D-グルコース (2'-deoxy-D-glucose)

DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium

EC = (-) - エピカテキン ((-) - epicatechin)

ECG = (-) - 3-O-没食子酸エピカテキン ((-) - epicatechin-3-O-gallate)

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid

EGC = (-) - エピガロカテキン ((-) - epigallocatechin)

EGCG = (-) - 3-O-没食子酸エピガロカテキン ((-) - epigallocatechin-3-O-gallate)

Em = 蛍光波長 (emission wavelength)

Ex = 励起波長 (excitation wavelength)

FBS = ウシ胎児血清 (fetal bovine serum)

FL = 蛍光 (fluorescence)

G-6-P = D-glucose 6-phosphate sodium salt

G6PDH = glucose-6-phosphate dehydrogenase

GC = (-) - ガロカテキン ((-) - gallocatechin)

GCG = (-) - 3-O-没食子酸ガロカテキン ((-) - gallocatechin-3-O-gallate)

GK = Goto-Kakizaki

GL = α -グルコシダーゼ (α -glucosidase)

GLUT2 = グルコーストランスポーター 2 (glucose transporter 2)

HBSS = Hank's-balanced salt solution

HEPES = *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid

HLM = ヒト肝ミクロソーム (human liver microsomes)

IC₅₀ = 50 % 阻害濃度 (fifty percent inhibitory concentration)

JAT = 市販ジャワ島産紅茶飲料の凍結乾燥品

LC/MS = 液体クロマトグラフ質量分析計 (liquid chromatography mass spectrometry)

MS = 質量分析 (mass spectrometry)

m/z = 質量電化比 (mass-to-charge ratio)

NEAA = 非必須アミノ酸 (non-essential amino acids)

PBS = リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline)

S.D. = 標準偏差 (standard deviation)

SGLT1 = ナトリウム依存性グルコーストランスポーター1 (sodium dependent glucose transporter 1)

SLC = solute carrier

TF = テアフラビン (theaflavin)

TF3G = 3-*O*-没食子酸テアフラビン (theaflavin-3-*O*-gallate)

TF3'G = 3'-*O*-没食子酸テアフラビン (theaflavin-3'-*O*-gallate)

TFDG = 3,3'-ジ-*O*-没食子酸テアフラビン (theaflavin-3,3'-di- *O*-gallate)

Tris = トリス塩基 (tris (hydroxymethyl) aminomethane)

諸言

糖尿病実態調査および国民健康栄養調査によると、「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、平成 23 年度まで年々増加しており、国民の 27.1 % と推計されている¹⁻⁴⁾。平成 24 年度の調査ではこれらの総和が初めて減少したが、「糖尿病が強く疑われる人」の割合は増加している⁵⁾。糖尿病の患者に要する医療費はおよそ 1.2 兆円と国民医療費の約 4.4 % を占めており、その割合は年々増加している⁶⁾。また、2012 年の糖尿病治療薬の市場規模は 3,688 億円であったが、2021 年には 5,522 億円に拡大すると予測されている⁷⁾。糖尿病の 9 割を占める 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および加齢が加わり発症する。2 型糖尿病の発症や進展には、食後高血糖が関わっており⁸⁻¹⁰⁾、これによりインスリン抵抗性の憎悪をきたすことが知られている¹¹⁾。そのため、食事由来の糖の小腸からの吸収を抑制することが糖尿病の予防あるいは進展抑制に有効と考えられている¹²⁾。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 α -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 α -グルコシダーゼ (GL) によって単糖に分解された後、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¹³⁻¹⁷⁾。

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¹⁸⁾。身近な食品の中から嗜好性を損なうことなく 2 次機能を有し、かつ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。

茶は水について世界で最も多く摂取されている飲料であり、その生産量は紅茶が 75 % を占め、次いで緑茶の 23 %、烏龍茶の 2 % である¹⁹⁾。いずれもチャノキ (*Camellia sinensis*, ツバキ科) の茶葉を原料とし、葉組織に含まれるポリフェノール酸化酵素による酸化工程 (発酵) を経ない緑茶、半発酵の烏龍茶および完全発酵の紅茶の 3 種類に分類される。紅茶は様々な臨床研究より、抗パーキンソン作用²⁰⁾、抗心血管疾患作用²¹⁾、抗冠動脈疾患作用²²⁾、抗卒中作用²³⁾および抗 2 型糖尿病作用²⁴⁾が報告されている。Odegaard らは 1 日 1 杯以

上の紅茶の喫飲によって、喫飲しない場合に比べ 2 型糖尿病発症比が 14 % 低下すると報告している²⁵⁾。また、スリランカの伝統医療では、糖尿病予備群あるいは中程度の糖尿病患者に対し、1 日 6 ~ 10 杯と大量の紅茶喫飲が推奨されている²⁶⁾。しかしながら、紅茶による 2 型糖尿病の治療・予防効果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 型糖尿病の進展抑制に有用な機能性食品素材であるか検討した。なお、食事療法を継続するには、嗜好性も重要となる。そこで検体には苦味、渋みが少ない 2 次機能を有するジャワ島産紅茶を実験に供した。

本論文の構成は次のとおりである。第 1 章では、小腸における糖質吸収過程に及ぼす紅茶の影響を *in vitro*、*ex vivo* および *in vivo* で検討した。抗糖尿病薬の一部は主に薬物代謝酵素シトクローム P450 (CYP) で代謝されることが知られており、紅茶と医薬品の併用による低血糖などの食-薬間相互作用が発現する可能性が懸念された。そこで第 2 章では、機能性を有する食品と医薬品の適正使用の視点から紅茶の CYP に及ぼす影響について検討した。

1 紅茶の糖質吸収抑制効果の検討

1.1 序論

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 AM によって多糖類、ついで二糖類に分解され、生成された二糖類はさらに小腸上皮細胞に存在する GL 等によって単糖に分解された後、主に GLUT2 に、一部は Na-依存性グルコーストランスポーター1 (SGLT1) によって吸収される¹³⁻¹⁷⁾。この消化吸収の過程において、AM 活性、GL 活性あるいは小腸細胞内への糖取り込みに関わる GLUT2 あるいは SGLT1 活性を阻害すると、食直後の急激な血糖値上昇の抑制が期待される。これまでに紅茶が2型糖尿病の発症を抑制した報告があるが²⁵⁾、その詳細な作用機序は不明のままである。

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型糖尿病に適応する機能性食品素材として有用であるか検討した。具体的には、AM 活性と GL 活性および小腸細胞におけるグルコーストランスポーター介在の糖取り込み、さらに糖負荷による血糖上昇に及ぼす影響について検討した。なお、比較対照に AM および GL 阻害作用を有する食後過血糖改善薬のアカルボース (ACA) および特定保健用食品の蕃爽麗茶を用いた。血糖値が気になり始めた方の食品である蕃爽麗茶は AM および GL 阻害作用を有し^{27, 28)}、その関与成分はエラジタンニンの重合により生成されるグァバ葉ポリフェノールである²⁹⁾。本章では、これらの検討結果について詳述する。

1.2 実験方法

1.2.1 実験材料

ACA、スクロース、マルトース、デンプン、2'-デオキシ-D-グルコース (DG)、 α -メチル-D-グルコース (AMG)、フロレチン、フロリジン、tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)、(-) - エピカテキン (EC)、(-) - 3-O-没食子酸エピカテキン (ECG)、(-) - エピガロカテキン (EGC)、(-) - 3-O-没食子酸エピガロカテキン (EGCG)、(-) - 3-O-没食子酸カテキン (CG)、(-) - ガロカテキン (GC)、(-) - 3-O-没食子酸ガロカテキン (GCG)、テアフラビン (TF) およびグルコース C II テストワコーは和光純薬工業 (大阪) より購入したものを用いた。酵母由来 GL はオリエンタル酵母 (東京) から購入したものを用いた。

N-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES) は同仁化学研究所 (熊本) より購入したものをを用いた。DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、非必須アミノ酸 (non essential amino acids, NEAA)、ペニシリン G-ストレプトマイシン溶液、0.25 %トリプシン/EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、ブタ膵臓由来 AM およびラット小腸アセトンパウダーは Sigma Aldrich (St.Louis, MO, U.S.A.) より購入したものをを用いた。3-*O*-没食子酸テアフラビン (TF3G)、3'-*O*-没食子酸テアフラビン (TF3'G)、3,3'-ジ-*O*-没食子酸テアフラビン (TFDG) およびクリアゾル-2 はナカライテスク (京都) より購入したものをを用いた。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) は Biowest (Nuaille, France) より購入したものをを用いた。(+) - カテキン (C) は ChromaDex (Irvine, CA, U.S.A.) より購入したものをを用いた。2'-デオキシ-D-グルコース ([1,2-³H](N)-2'-Deoxy-D-glucose ; 1.48 TBq/mmol) および α-メチル-D-グルコース ([glucose-¹⁴C] (U)-α-methyl -D-glucopyranoside, ; 10.7 GBq/mmol) は PerkinElmer (Waltham, MA, U.S.A.) より購入したものをを用いた。レビスインスリンマウス (Uタイプ) およびレビスインスリンラット (RTU タイプ) はシバヤギ (群馬) から購入したものをを用いた。市販ジャワ島産紅茶飲料 (スダップ! ジャワティーストレート) はジャワティー・ジャパン (札幌) より恵与いただいた。蕃爽麗茶 (ヤクルト本社, 東京) およびその他の試薬はすべて市販品を用いた。

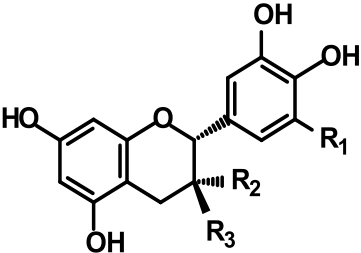
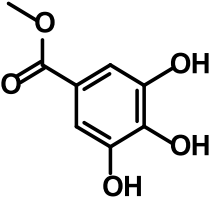
1.2.2 検体の調製

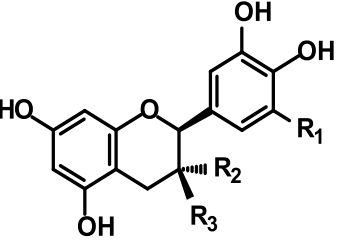
市販ジャワ島産紅茶飲料および蕃爽麗茶を凍結乾燥器 (FDU-2100 型 ; EYELA, 東京) で凍結乾燥したものを実験に供した。以下、これらをそれぞれ JAT および BAS とする。なお JAT 1 g は市販ジャワ島産紅茶飲料 650 mL、乾燥茶葉に換算すると約 4 g に相当する。また BAS 1 g は蕃爽麗茶 400 mL に相当する。JAT および BAS は実験に使用するまで - 30 °C で保存した。

1.2.3 JAT 中のカテキン類およびテアフラビン類の定量

JAT 中のカテキン類およびテアフラビン類³⁰⁾ (Fig. 1) は、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) を用いて定量した。装置は、ポンプ (LC-20AD ; 島津

製作所, 京都)、質量分析 (MS) 検出器 (LCMS-2020 ; 島津製作所, 京都) 、カラムオーブン (CTO-20A ; 島津製作所, 京都) および逆相カラム (SHIMPACK XR-ODS ; 2.2 μ m, 50 \times 2.0 mm, i.d ; 島津製作所, 京都) を装備した LC/MS システムを用いた。LC/MS により測定されるカテキン類およびテアフラビン類のイオンの質量電化比 (m/z) は既報³¹⁾を参考に Fig. 1 のとおり設定し、エレクトロスプレーイオン化法で脱プロトン化により生じたイオンを、ネガティブモードで検出した (-3.5 kV)。また、移動相に (A) 0.1 % ギ酸/5 % アセトニトリル/94.9 % 水 (v/v/v)、(B) 0.1 % ギ酸/95 % アセトニトリル/4.9 % 水 (v/v/v) (0-3 分, 0-10 % B ; 3-7 分, 10 % B ; 7-15 分, 10-50 % B) を用いて、流速は 0.4 mL/分、カラム温度は 40°C とした。

				
 Galloyl moiety				
	R ₁	R ₂	R ₃	<i>m/z</i>
(+) - Catechin (C)	H	H	OH	289
(-) - Epicatechin (EC)	H	OH	H	289
(-) - Epicatechin-3- <i>O</i> -gallate (ECG)	H	Gallate	H	441
(-) - Epigallocatechin (EGC)	OH	OH	H	305
(-) - Epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallate (EGCG)	OH	Gallate	H	457

				
	R ₁	R ₂	R ₃	<i>m/z</i>
(-) - Catechin-3- <i>O</i> -gallate (CG)	H	Gallate	H	441
(-) - Gallocatechin (GC)	OH	OH	H	305
(-) - Gallocatechin-3- <i>O</i> -gallate (GCG)	OH	Gallate	H	457

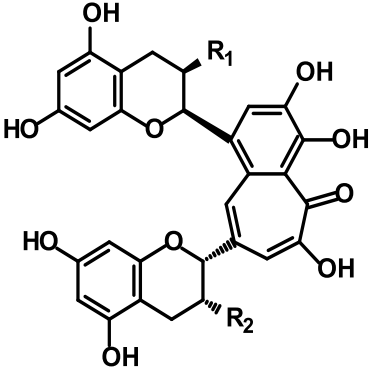
				
	R ₁	R ₂	<i>m/z</i>	
Theaflavin (TF)	OH	OH	563	
Theaflavin-3- <i>O</i> -gallate (TF3G)	Gallate	OH	715	
Theaflavin-3'- <i>O</i> -gallate (TF3'G)	OH	Gallate	715	
Theaflavin-3,3'-di- <i>O</i> -gallate (TFDG)	Gallate	Gallate	867	

Fig. 1 Chemical Structures and Their Corresponding *m/z* of Catechins and Theaflavins

1.2.4 細胞の培養条件

Caco-2 細胞 (第 46 継代) は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター (茨城) から購入し、実験には第 48~59 継代のものを使用した。培養は 75 cm² の培養フラスコ (Corning, NY, U.S.A.) を用い、37 °C、5 % CO₂-95 % Air 通気下インキュベーター (MCO-18AIC (UV) 型 ; 三洋電機, 大阪) 内で行った。培養液は 10 % FBS、ストレプトマイシン (100 µg/mL)、ペニシリン G (100 U/mL)、1 % NEAA およびグルタミン (2 mmol/L) を含む DMEM を使用した。なお、FBS は非働化 (56 °C, 30 分) したものをを用いた。培養液は 2~3 日毎に交換し、細胞がほぼコンフルエントに達した播種後 10~12 日目に継代を行った。培養液を吸引除去し、0.25 %トリプシン/EDTA を 6 mL 加え、5 分間、37°C で放置し、トリプシン/EDTA を吸引除去した。培養液 5 mL で細胞を 2 度洗浄し、培養液 5 mL で細胞を遊離させた。終了後、遠心分離 (1,500 rpm, 3 分, CN-820 : New Taipei City, Taiwan) し、培養液を吸引除去した。継代培養には、細胞を培養液で懸濁後、21 G の注射針付き注射筒を用いて分散し、その一部を用いた。保存には細胞を細胞保存液のセルバンカータイプ 1 (三菱化学メディエンス, 東京) で懸濁し、- 80 °C で保存した。

1.2.5 AM 活性の測定

AM 活性の測定は、Phan ら³²⁾ および Watanabe ら³³⁾の方法を若干改変して行った。すなわち phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄) に溶解した JAT (終濃度 100 ~ 10,000 µg/mL) 50 µL と基質のデンプン (終濃度 4 mg/mL) 100 µL を混合し、全量 150 µL でプレインキュベート (37 °C, 5 分) した。これに PBS で希釈したブタ膵臓由来 AM (終濃度 0.1 unit/mL) 50 µL を添加し全量 200 µL で 37°C にて 15 分間インキュベートし、1 M 塩酸 200 µL を添加して反応を停止させた。96 ウェルプレートに反応液 50 µL を採取し、PBS 150 µL および 0.1 N ヨウ素液 10 µL を添加し攪拌後、マイクロプレートリーダー (Model 680 ; Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A) にて 655 nm における吸光度を測定した。比較対照として ACA (終濃度 0.3 ~ 100 µg/mL) および BAS (終濃度 30 ~ 3,000 µg/mL) を用い同様に測定した。

1.2.6 GL 活性の測定

1.2.6.1 酵母由来 GL 活性

酵母由来 GL 活性測定は、Nishioka ら³⁴⁾の方法を若干改変して行なった。すなわち、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解した JAT (終濃度 3 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$) 40 μL と基質 (終濃度 100 mM スクロースおよびマルトース) 40 μL を混合し、80 μL でプレインキュベート (37°C, 5 分) した。これに酵母由来 GL (終濃度 1 unit/mL) 20 μL を添加し全量 100 μL で、37°C にて 10 分間インキュベートした。反応は等量の 2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) を添加して停止させた。その後遠心分離 (10,000 rpm, 5 分, Centrifuge 5415 D : Eppendorf, Hamburg, Germany) し、得られた上清 5 μL を用いて、生成したグルコース量をムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ法 (グルコース CII テストワコー, 和光純薬工業) により吸光度をマイクロプレートリーダー (主波長 490 nm, 副波長 595 nm) にて測定した。比較対照として ACA (終濃度 30 ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$) および BAS (終濃度 3 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$) を用い同様に測定した。

上記の方法を基に、スクロースおよびマルトース (20 ~ 400 mM) に JAT 20 $\mu\text{g/mL}$ を添加してインキュベートし、得られた結果を Michaelis-Menten 式に従い、各種パラメーターを算出した。

1.2.6.2 ラット小腸アセトンパウダー由来 GL 活性

ラット小腸アセトンパウダー由来 GL 活性測定は、氷冷下、Deng ら³⁵⁾の方法を若干改変して行った。すなわちラット小腸アセトンパウダー 500 mg に 0.1 M マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.9) 10 mL を加え、Omni μH 型ホモジナイザー (Omni international ; Marietta, GA, U.S.A.) で 5 w/v% のホモジネート液を調製した。ホモジネート液は遠心分離 (7,980 rpm, 4°C, 15 分, CR21GIII ; 日立, 東京) し、その上清を酵素反応に供した。

上清 50 μL と緩衝液に溶解した JAT (終濃度 0.1 ~ 30 mg/mL) 100 μL を混合し、150 μL でプレインキュベートした後 (37°C, 5 分)、基質 (終濃度 20 mM スクロースあるいは 2 mM マルトース) 50 μL を添加し全量 200 μL で 37°C にて 10 分間インキュベートした。反応後、沸騰水浴中に 5 分間浸漬し、酵素反応を停止させ、その後遠心分離 (10,000 rpm, 5 分, Centrifuge 5415 D : Eppendorf,

Hamburg, Germany) し、得られた上清 5 μ L を用いてグルコース C II-テストワコーで生成したグルコース量を測定した。なお、GL 活性値は、別途ホモジネート液の一部を用いて、Bradford ら³⁶⁾の方法に基づく Bio-Rad Protein Assay Kit にてタンパク定量を行い、タンパク質量あたりに換算して算出した。以下、標準物質にはウシ血清アルブミンを用いた。比較対照として ACA (終濃度 0.001 ~ 0.1 mg/mL) および BAS (終濃度 0.1 ~ 30 mg/mL) を用い同様に測定した。

上記の方法を基に、スクロース (6.25 ~ 200 mM) およびマルトース (0.39 ~ 25 mM) に 3 mg/mL JAT を添加してインキュベートし、得られた結果を Michaelis-Menten 式に従い、各種パラメーターを算出した。

1.2.6.3 Caco-2 細胞由来 GL 活性

Caco-2 細胞由来 GL 活性試験は、Liu ら³⁷⁾の方法を若干改変しておこなった。すなわち、10 ~ 12 日間培養した Caco-2 細胞を用い、ウェル内の培養液を吸引除去し、細胞を 37 °C PBS 5 mL で 2 回洗浄後、Hank's-balanced salt solution (HBSS; pH 7.4, 137 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.33 mM Na₂HPO₄, 4.2 mM NaHCO₃) 5 mL を加え、細胞をセルスクレーパーで掻きとり、氷冷下、Omni μ H 型ホモジナイザーを用いて均一化した。タンパク量として 1.0 mg prot./mL のホモジネート液 400 μ L に、基質 (終濃度 56 mM スクロースあるいはマルトース) 200 μ L および HBSS に溶解した JAT (終濃度 30 ~ 10,000 μ g/mL) 200 μ L を添加し、全量 800 μ L で 37°C にて 60 分間インキュベートした。反応後、沸騰水浴中に 5 分間浸漬し、酵素反応を停止させ、遠心分離 (10,000 rpm, 5 分, Centrifuge 5415 D : Eppendorf, Hamburg, Germany) し、得られた上清 5 μ L を用いて、グルコース C II-テストワコーで生成したグルコース量を測定した。なお、活性値は、ホモジネート液の一部を用いて、Bio-Rad Protein Assay Kit にてタンパク定量を行い、タンパク質量あたりに換算して算出した。比較対照として ACA (終濃度 0.01 ~ 3 mg/mL) を用いた。

1.2.7 2'-デオキシ-D-グルコースおよび α -メチル-D-グルコースの uptake 試験

2'-デオキシ-D-グルコース (DG) および α -メチル-D-グルコース (AMG) の

uptake 試験は、Caco-2 細胞を用いてそれぞれ Watanabe ら³³⁾ および Bissonnette ら³⁸⁾ の方法を若干改変して行った。すなわち、 1×10^5 cells /well の密度で播種した Caco-2 細胞を培養プレート (12 wells, 培養面積 3.8 cm^2 , コラーゲン I コート) 上で 10~13 日間培養し、コンフルエントに達した後、uptake 試験に用いた。ウェル内の培養液を吸引除去し、細胞を HEPES 緩衝液 (pH 7.2; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgSO_4 , 4 mM glutamine, 10 mM HEPES) 1.0 mL で 2 回洗浄後、緩衝液 1 mL を加え、プレインキュベーションした (37°C , 1 時間, 5 % CO_2 -95 % Air)。終了後、緩衝液を吸引除去し、緩衝液 1.0 mL を用いて 2 回洗浄した。次いで、緩衝液に溶解した $[1,2\text{-}^3\text{H(N)}]$ - DG (0.25 μCi , 10 μM) あるいは $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ - AMG (0.1 μCi , 10 μM) と JAT (終濃度 0.03 ~ 1.0 mg/mL) を混合し、全量 600 μL で 5 % CO_2 -95 % Air 下、 37°C にて 10 分間インキュベートした。終了後、直ちに緩衝液を吸引除去し、氷冷 HEPES 系緩衝液 1 mL で 2 回洗浄した。洗浄後 1 M NaOH 0.4 mL で細胞を溶解し、次いで 1 M HCl 0.4 mL を加え中和した。反応液 0.6 mL をバイアルに採取し、クリアゾル-2 を 3.0 mL 加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-6100 ; ALOKA, 東京) で放射能を測定した。また反応液の一部を用い、Bio-Rad Protein Assay Kit にてタンパク定量を行った。DG および AMG uptake の JAT による阻害を調べる際の比較対照として GLUT2 および SGLT1 それぞれの阻害剤であるフロレチン³⁹⁾ (終濃度 0.003 ~ 0.3 mg/mL) およびフロリジン⁴⁰⁾ (終濃度 0.03 ~ 1.0 mg/mL) を用いた。

1.2.8 動物実験

1.2.8.1 実験動物

飼育および実験は、北海道薬科大学実験動物センター運営委員会の承認を受け (No. 12-004)、「動物実験の実施に関わる基本要綱 (動物実験指針)」および環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守し実施した。

雄性 BKS.Cg-m+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/Jcl マウス (*db/db* マウス) および雄性 C57BLKS/J Iar-m+/+Lepr^{db} マウス (*db/+* マウス) はそれぞれ 10 週齢で、雄性 Goto-Kakizaki ラット (GK ラット) は 9 週齢で、三協ラボサービス (東京) よ

り入手した。飼育は、本学の実験動物センター（室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、照明 06:00～18:00）で行い、予備飼育後実験に使用した。固形あるいは粉末飼料（MF；オリエンタル酵母，東京）および水は自由に摂取させた。

1.2.8.2 *db/db* マウスを用いた検討

1.2.8.2.1 スクロース負荷耐糖能試験

予備飼育後の 10 週齢 *db/db* マウスを 15 時間絶食後、血糖値および体重を測定し、各群 5-6 匹で群分けした。メノウ製乳鉢で微粉化した JAT は 100 ~ 500 mg/kg となるよう 0.5 % カルメロース (CMC) 水溶液に懸濁し、胃ゾンデを用いて 1 mL を経口投与した。その後直ちにスクロース (2 g/kg) 1 mL を経口投与し、投与 30、60 および 120 分後に尾静脈より採血した。血糖値およびインスリン値は、それぞれグルコース C II -テストワコーおよびレビスインスリンマウス (U タイプ)を用いて測定した。比較対照として ACA 10 ~ 100 mg/kg および BAS 500 mg/kg 投与群についても同様に検討した。またスクロースのみを投与した *db/+* マウス群についても同様に検討した。

1.2.8.2.2 マウス小腸 GL 活性の測定

10 週齢 *db/db* マウスに 1.2.8.2.1 と同様の方法で JAT 500 mg/kg を投与し、その 30 分後に小腸を摘出した。得られた小腸は Lee ら⁴¹⁾の方法を若干改変してホモジネート液を調製した。以下の操作はすべて氷冷下で行った。小腸は 10 cm 間隔でカットし、内腔を氷冷 0.9 % NaCl 液 20 mL で穏やかに洗浄後、ピンセットで小腸内腔の粘膜組織を搾り取り、氷冷 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、ポッター・エルベンハイム型テフロン付きホモジナイザーを用いて、ホモジネート液 (湿重量として 10 w/v%) を調製した。

ホモジネート液 (終濃度 5.0 w/v%) 150 μL に 0.1 M リン酸カリウム緩衝液およびスクロース (終濃度 100 mM) 150 μL を添加し、全量 300 μL で 37°C にて 20 分間インキュベートした。反応後、沸騰水浴中に 5 分間浸漬し酵素反応を停止させ、遠心分離 (10,000 rpm, 5 分, Centrifuge 5415 D : Eppendorf, Hamburg, Germany) し、得られた上清 5 μL を用いて、グルコース C II -テストワコーで生成したグルコース量を測定した。なお、活性値はホモジネート液の一部を用

いて Bio-Rad Protein Assay Kit にてタンパク定量を行い、タンパク質量当りに換算して算出した。比較対照として ACA 100 mg/kg および BAS 500 mg/kg 投与群についても同様に検討した。

1.2.8.3 GK ラットを用いた検討

1.2.8.3.1 スクロースあるいはグルコース負荷耐糖能試験

12 週齢 GK ラットに JAT 31.3 ~ 250 mg/kg、1 mL を経口投与し、直ちにスクロースまたはグルコース (いずれも 2 g/kg) 1 mL を投与し、30、60、90 および 120 分後に採血を行い、レビスインスリンラット (RTU タイプ) を用いてインスリン値を測定した以外は、1.2.8.2.1 と同様に行った。比較対照として ACA 0.1 ~ 3.0 mg/kg および BAS 62.5 ~ 250 mg/kg 投与群についても同様に検討した。

1.2.8.3.2 ラット小腸 GL 活性の測定

12 週齢 GK ラットに JAT 31.3 ~ 250 mg/kg を経口投与した以外は 1.2.8.2.2 と同様に行った。比較対照として ACA 0.3 ~ 3.0 mg/kg および BAS 62.5 ~ 250 mg/kg 投与群についても同様に検討した。

1.2.9 統計処理

測定値は、平均値 \pm S.D. で示した。また、独立した 2 群間の検定は、F 検定を行い、等分散の場合は、Student の t 検定を、不等分散の場合は Mann-Whitney の U 検定を行った。

独立した 3 群以上の検定は、Bartlett の等分散検定を行い、等分散が認められた場合で、群間の例数が等しい場合は Dunnett の多重検定を行い、群間の例数が異なる場合は Scheffe の多重比較検定を行った。不等分散の場合で、Kruskal-Wallis 検定により有意差が認められた場合、Scheffe の多重比較検定を行った。 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。なお、統計解析ソフトは Stat Flex (Ver. 6, アーテック, 大阪) を用いた。

1.3 結果

1.3.1 JAT 中の成分定量

LC/MS による JAT 中成分を分析した MS クロマトグラムを Fig. 2 に示した。いずれの成分も十分に分離されており定量するのに支障がないことが明らかとなった。JAT 中の各成分の定量値を Table 1 に示した。緑茶、烏龍茶および紅茶に含有することが知られている³⁰⁾ CG の含量が最も多く、ついで GCG、GC、EGCG、C の順であった。一方、紅茶の発酵過程において、カテキン類が酸化および重合化することにより生成される TF およびそのガレート体⁴²⁾の含量は、いずれもカテキン類のおよそ約 1/10 程度であった。

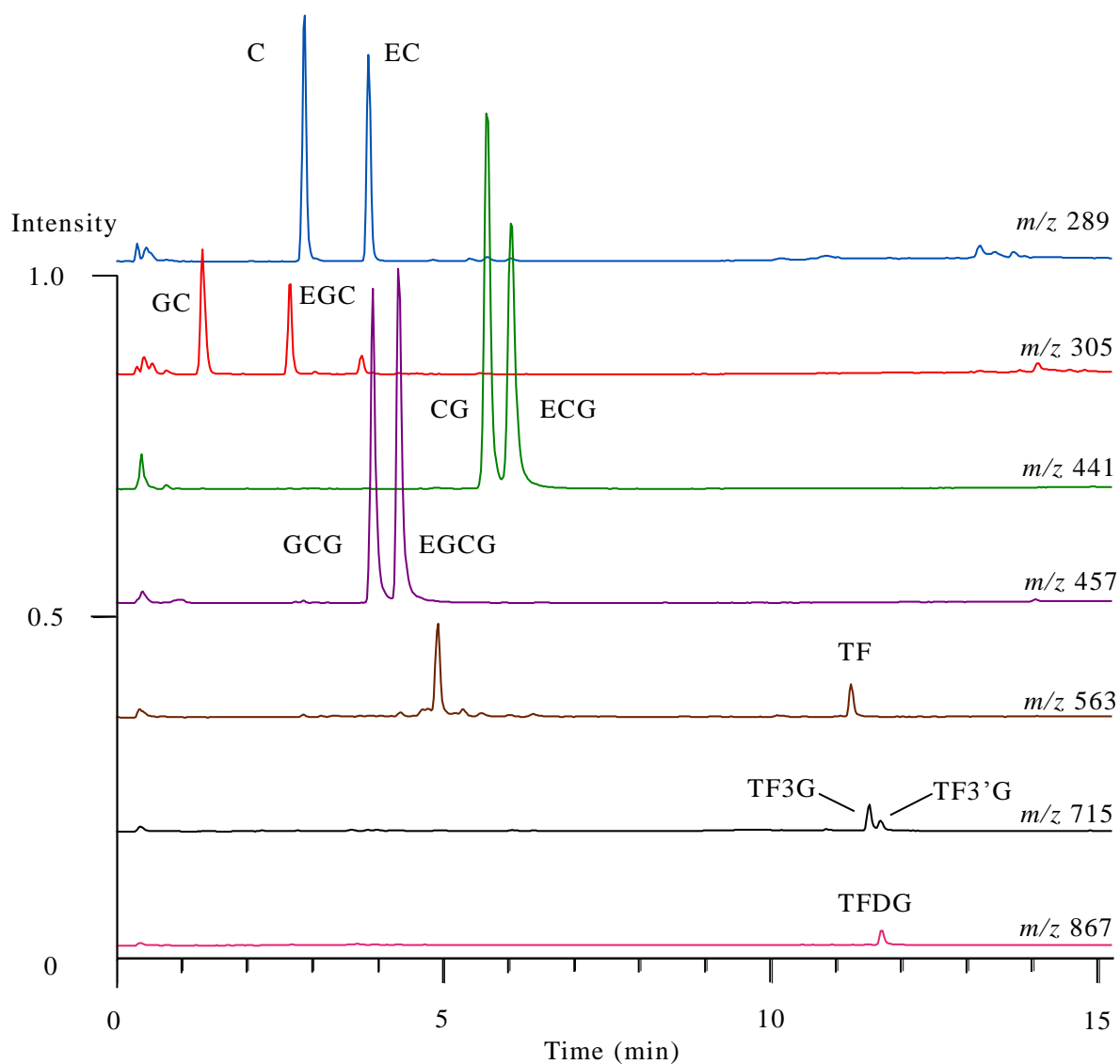


Fig. 2 Representative MS Chromatograms of JAT

Selective ion monitoring mode was employed to detect $[M-H]^-$ ions for all analytes.

Table 1 Contents of Catechins and Theaflavins in JAT

Components		Contents	
		mg/g dry leaf	mg/g JAT
Catechins	(+) - Catechin (C)	1.72 \pm 0.07	6.88 \pm 0.29
	(-) - Epicatechin (EC)	1.21 \pm 0.01	4.84 \pm 0.05
	(-) - Epicatechin-3- <i>O</i> -gallate (ECG)	0.99 \pm 0.03	3.97 \pm 0.11
	(-) - Epigallocatechin (EGC)	0.64 \pm 0.03	2.55 \pm 0.10
	(-) - Epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallate (EGCG)	1.74 \pm 0.14	6.96 \pm 0.54
	(-) - Catechin-3- <i>O</i> -gallate (CG)	2.62 \pm 0.22	10.5 \pm 0.87
	(-) - Gallocatechin (GC)	2.09 \pm 0.18	8.37 \pm 0.71
	(-) - Gallocatechin-3- <i>O</i> -gallate (GCG)	2.26 \pm 0.11	9.03 \pm 0.45
Theaflavins	Theaflavin (TF)	0.25 \pm 0.01	1.02 \pm 0.02
	Theaflavin-3- <i>O</i> -gallate (TF3G)	0.17 \pm 0.003	0.69 \pm 0.01
	Theaflavin-3'- <i>O</i> -gallate (TF3'G)	0.08 \pm 0.004	0.33 \pm 0.01
	Theaflavin-3,3'-di- <i>O</i> -gallate (TFDG)	0.13 \pm 0.02	0.50 \pm 0.08

Each value represents the mean \pm S.D. of 3 experiments.

1.3.2 AM 活性に及ぼす JAT の影響

AM 活性に及ぼす JAT の影響を Fig. 3 に示した。JAT は 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 以上で濃度依存的かつ有意に AM 活性を阻害し、その 50 % 阻害濃度 (IC_{50} 値) は 2,900 $\mu\text{g/mL}$ であった。比較対照として用いた ACA および BAS の IC_{50} 値は、それぞれ 1.79 $\mu\text{g/mL}$ および 159 $\mu\text{g/mL}$ であった。 IC_{50} 値の比較から、JAT の阻害強度は ACA の約 1/1,600、BAS の約 1/18 であった。

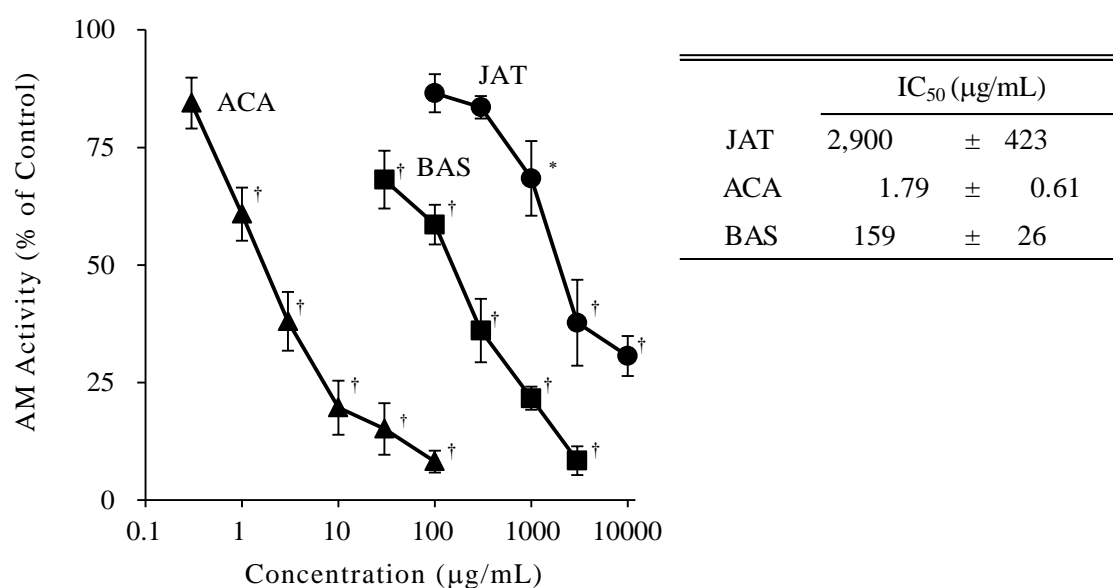


Fig. 3 Effects of JAT, ACA and BAS on Porcine Pancreatic AM Activity

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

次に、ACA を服用している糖尿病患者が紅茶を同時に喫飲するケースも想定されることから、Fig. 3 で有意な低下を認めなかった JAT (100 μg/mL) および ACA (0.3 μg/mL) のいずれも添加してインキュベーションしたが、AM 活性に何ら変化は認められなかった (Fig. 4)。

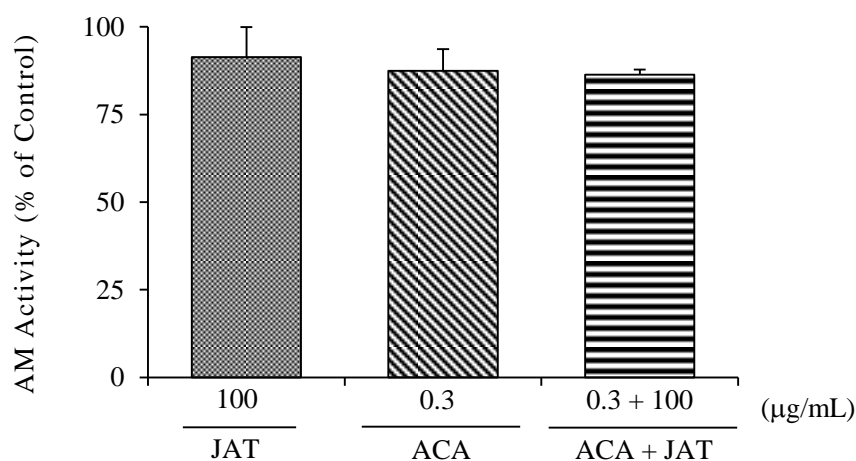


Fig. 4 Effects of JAT, ACA and Their Combination on Porcine Pancreatic AM Activity

Porcine pancreatic AM was incubated with starch in the presence of JAT and ACA for 15 min at 37 °C. Each value represents the mean \pm S.D. of 3-4 experiments.

1.3.3 JAT の各種 GL 活性に及ぼす影響

1.3.3.1 酵母由来 GL

酵母由来 GL 活性に及ぼす JAT の影響を Fig. 5 に示した。JAT はスクラーゼ活性およびマルターゼ活性をいずれも 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、濃度依存的かつ有意に阻害した。比較対照の ACA および BAS は、両活性をそれぞれ 100 $\mu\text{g/mL}$ および 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上で有意に阻害した。これらより算出した IC_{50} 値 (Table 2) を比較した結果、JAT の阻害強度は BAS とほぼ同等で、ACA の約 14 ~ 21 倍であった。

GL 活性の阻害が認められたことから、阻害様式の検討のため速度論的解析を行った (Fig. 6)。 IC_{50} 値より設定した 20 $\mu\text{g/mL}$ の JAT 添加により、スクラーゼ活性およびマルターゼ活性はいずれも有意に低下した。Lineweaver-Burk プロットより V_{max} 値および K_m 値を算出したところ (Table 3)、スクラーゼ活性およびマルターゼ活性の 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。このことから、JAT はスクラーゼ活性およびマルターゼ活性をいずれも非競合的に阻害すると考えられた。

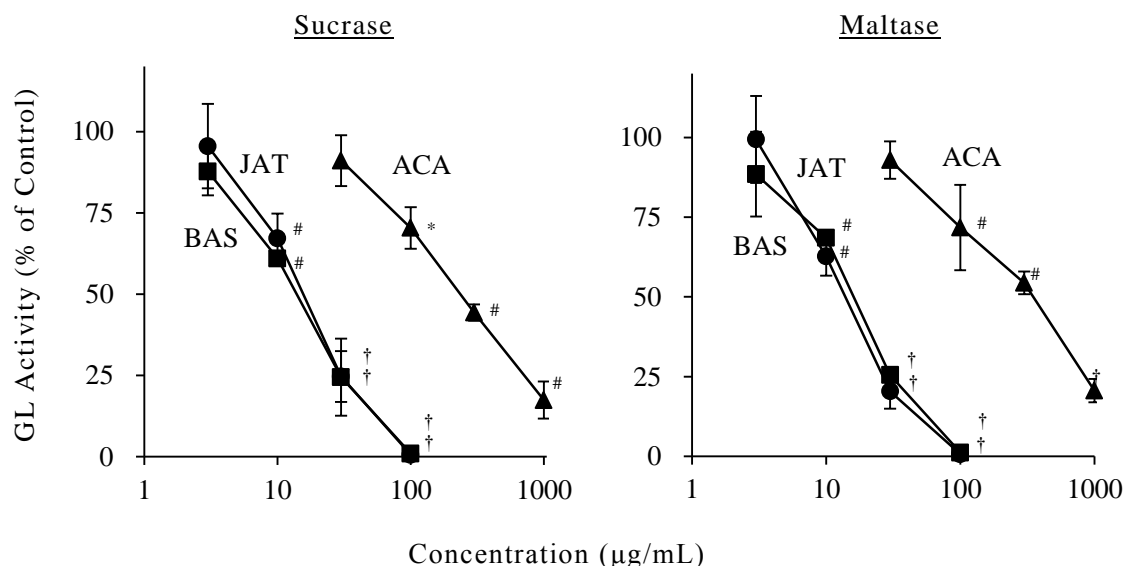


Fig. 5 Effects of JAT, ACA and BAS on Yeast GL Activity

Yeast GL was incubated with sucrose and maltose in the presence of various concentrations of JAT, ACA and BAS for 10 min at 37 °C. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 experiments. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, † $p < 0.001$.

Table 2 IC₅₀ values for JAT, ACA and BAS on Yeast GL Activity

	IC ₅₀ value (μg/mL)	
	Sucrase	Maltase
JAT	16.8 ± 4.0	16.6 ± 3.9
ACA	235 ± 23.0	347 ± 29.0
BAS	14.4 ± 1.5	16.1 ± 0.5

Each value represents the mean ± S.D. of 3 experiments.

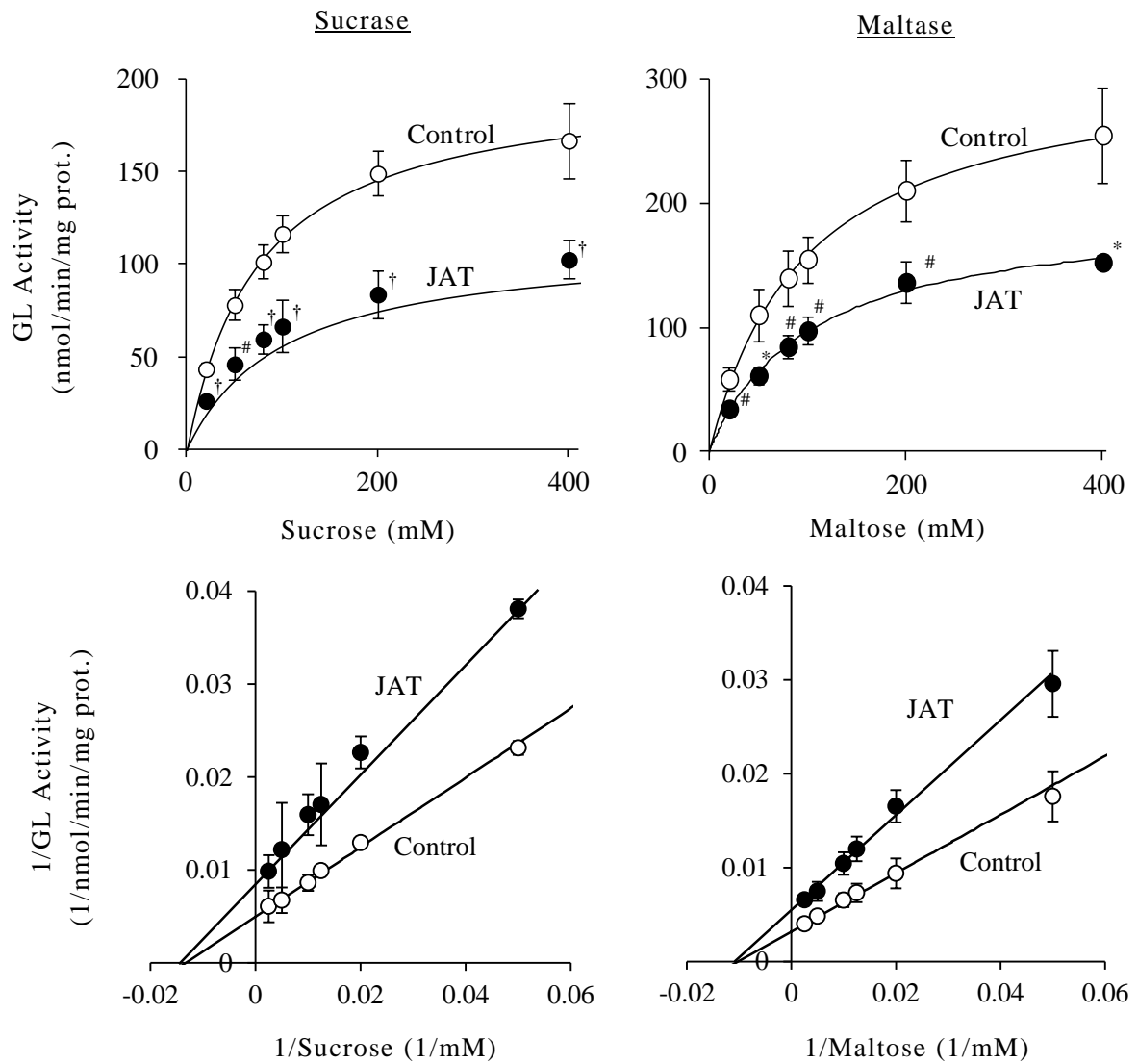


Fig. 6 Michaelis-Menten Plots and Their Corresponding Lineweaver-Burk Plots on Yeast GL Activity

Yeast GL was incubated with sucrose and maltose (20 ~ 400 mM) in the presence or absence of JAT (20 μg/mL) for 10 min at 37 °C. Each value represents the mean ± S.D. of 3-4 experiments. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, † $p < 0.001$.

Table 3 Kinetic Parameters for Yeast GL

Component	Sucrase					Maltase				
	Vmax			K m		Vmax			K m	
Control	189	±	15.4	67.6	±	5.5	284	±	35.6	79.1 ± 9.9
JAT (20 µg/mL)	126	±	24.1 [#]	75.8	±	13.0	199	±	32.3 [*]	85.9 ± 16.6

Each value represents the mean ± S.D. of 3-4 experiments. Significantly different from the control,

* $p < 0.05$, [#] $p < 0.01$. Vmax : nmol/min/mg prot., K m : mM.

1.3.3.2 ラット小腸由来 GL 活性に及ぼす JAT の影響

ラット小腸由来 GL 活性に及ぼす JAT の影響を Fig. 7 に示した。JAT はスクラーゼ活性およびマルターゼ活性をそれぞれ 0.3 mg/mL および 3 mg/mL 以上で、濃度依存的かつ有意に阻害した。比較対照の ACA はスクラーゼ活性およびマルターゼ活性をいずれも 0.01 mg/mL 以上で有意に阻害した。また、BAS はスクラーゼ活性およびマルターゼ活性を、それぞれ 3 mg/mL および 10 mg/mL 以上で有意に阻害した。これらより算出した IC₅₀ 値 (Table 4) より、JAT の阻害強度は BAS の約 5~7 倍、ACA の約 1/170 ~ 1/80 であった。

GL 活性の阻害が認められたことから、阻害様式の検討のため速度論的解析を行った (Fig. 8)。3 mg/mL JAT の添加により、スクラーゼ活性およびマルターゼ活性はいずれも有意に低下した。Lineweaver-Burk プロットより、Vmax 値および Km 値を算出したところ (Table 5)、スクラーゼおよびマルターゼの Vmax 値はいずれも有意に低下したが、Km 値に変化は認められなかった。このことから、JAT はスクラーゼ活性およびマルターゼ活性をいずれも非競合的に阻害すると考えられた。

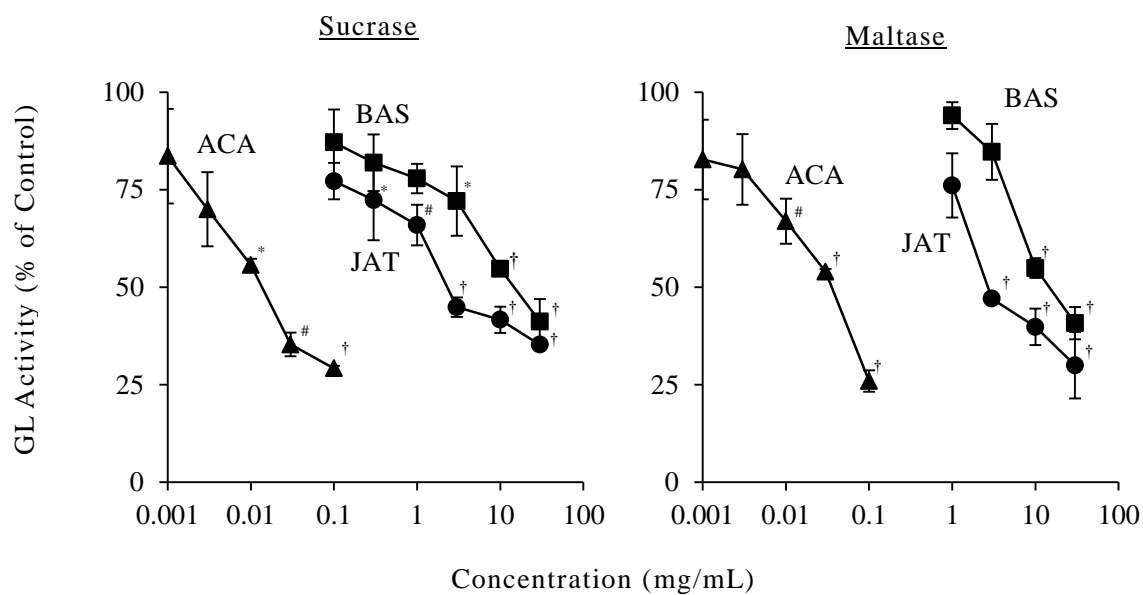


Fig. 7 Effects of JAT, ACA and BAS on Rat Small Intestinal GL Activity

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

Table 4 IC₅₀ Values for JAT, ACA and BAS on Rat Small Intestinal GL Activity

	IC ₅₀ (mg/mL)	
	Sucrase	Maltase
JAT	2.40 \pm 0.16	2.80 \pm 0.03
ACA	0.014 \pm 0.002	0.036 \pm 0.001
BAS	17.6 \pm 3.09	13.7 \pm 1.17

Each value represent the mean \pm S.D. of 3-4 experiments.

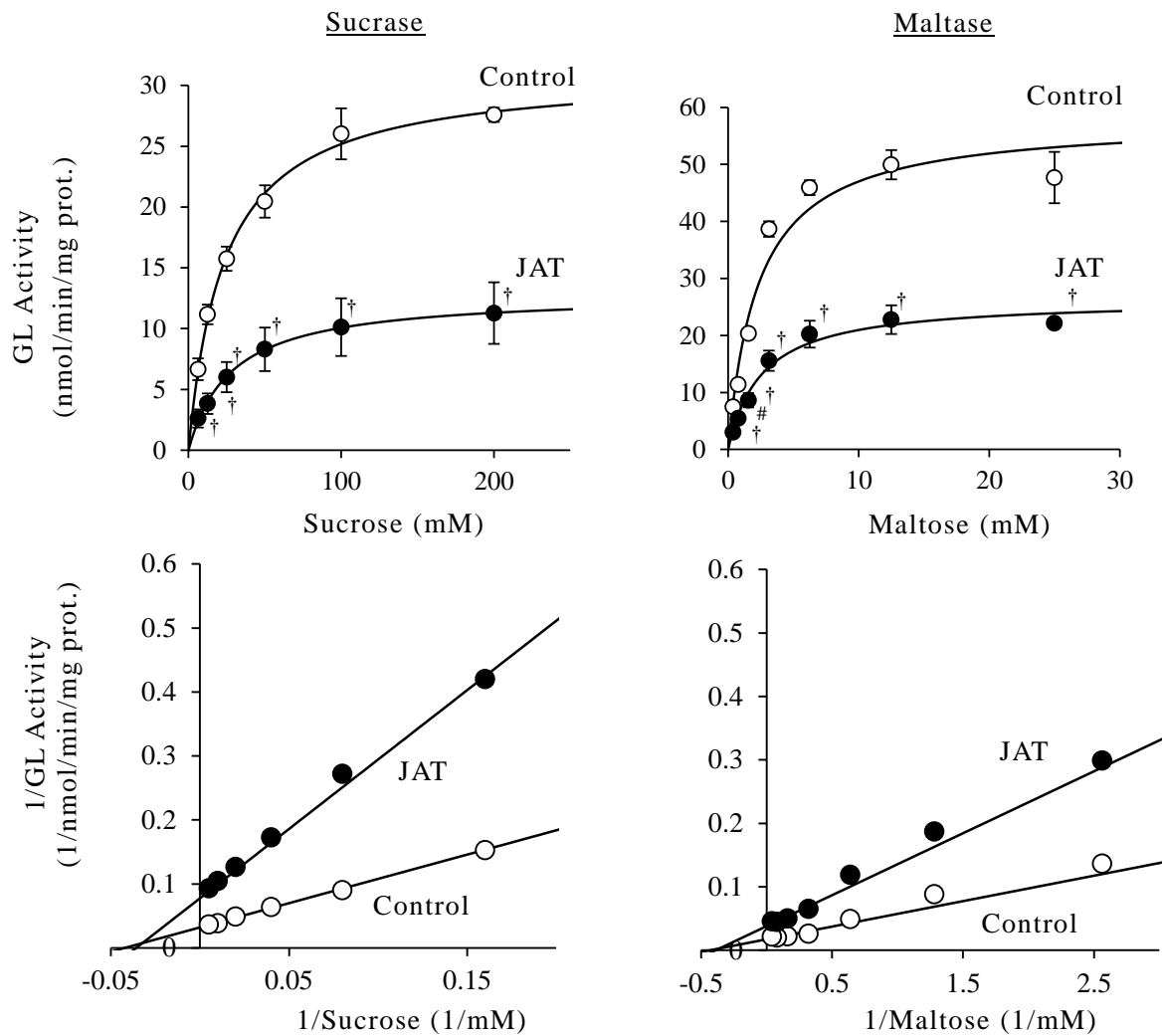


Fig. 8 Michaelis-Menten Plots and Their Corresponding Lineweaver-Burk Plots on Rat Small Intestinal GL Activity

Rat small intestinal GL was 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 \pm S.D. of 3-4 experiments. Significantly different from the control, [#] $p < 0.01$, [†] $p < 0.001$.

Table 5 Kinetic Parameters for Rat Small Intestinal GL

Component	Sucrase		Maltase	
	Vmax	Km	Vmax	Km
Control	31.1 \pm 0.81	23.6 \pm 2.00	57.9 \pm 2.54	2.32 \pm 0.32
JAT (3 mg/mL)	12.9 \pm 1.17*	27.9 \pm 7.82	26.3 \pm 1.32*	2.57 \pm 0.44

Each value represents the mean \pm S.D. of 3-4 experiments. Significantly different from the control,

* $p < 0.05$. Vmax : nmol/min/mg prot., Km : mM.

次に、Fig. 7 でスクラーゼおよびマルターゼ活性に有意な影響を認めなかった低濃度の JAT (スクラーゼ ; 0.1 mg/mL、マルターゼ ; 1.0 mg/mL) および ACA (スクラーゼ ; 0.003 mg/mL、マルターゼ ; 0.001 mg/mL) のいずれも添加した場合の結果を Fig. 9 に示した。その結果、JAT と ACA のいずれも添加した群において両酵素活性は、有意に低下し、それらの阻害の程度はスクラーゼで ACA 0.01 mg/mL に、マルターゼで ACA 0.03 mg/mL に相当した。

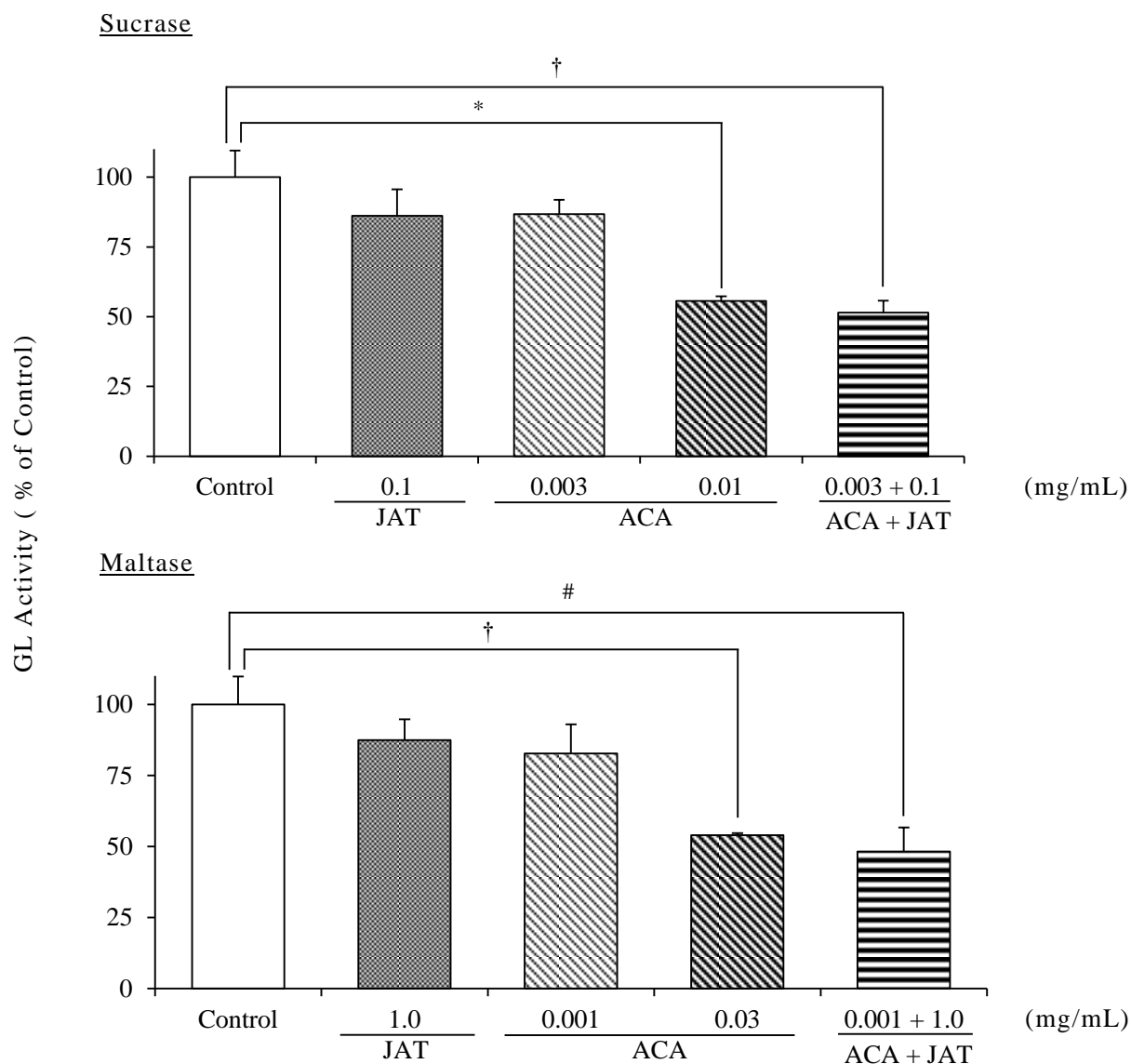


Fig. 9 Effects of JAT, ACA and Their Combination on Rat Small Intestinal GL Activity

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

1.3.3.3 Caco-2 細胞由来 GL 活性に及ぼす影響

JAT の GL 活性に及ぼす影響をさらに検討するため、ヒト小腸 Caco-2 細胞を用いて検討した (Fig. 10)。JAT はスクラーゼ活性およびマルターゼ活性をそれぞれ 300 $\mu\text{g/mL}$ および 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 以上で濃度依存的かつ有意に阻害した。ACA は両活性をそれぞれ 100 $\mu\text{g/mL}$ および 30 $\mu\text{g/mL}$ 以上で有意に阻害した。これらより算出した IC_{50} 値より、JAT の阻害強度は ACA の約 1/12 ~ 1/5 であった (Table 6)。

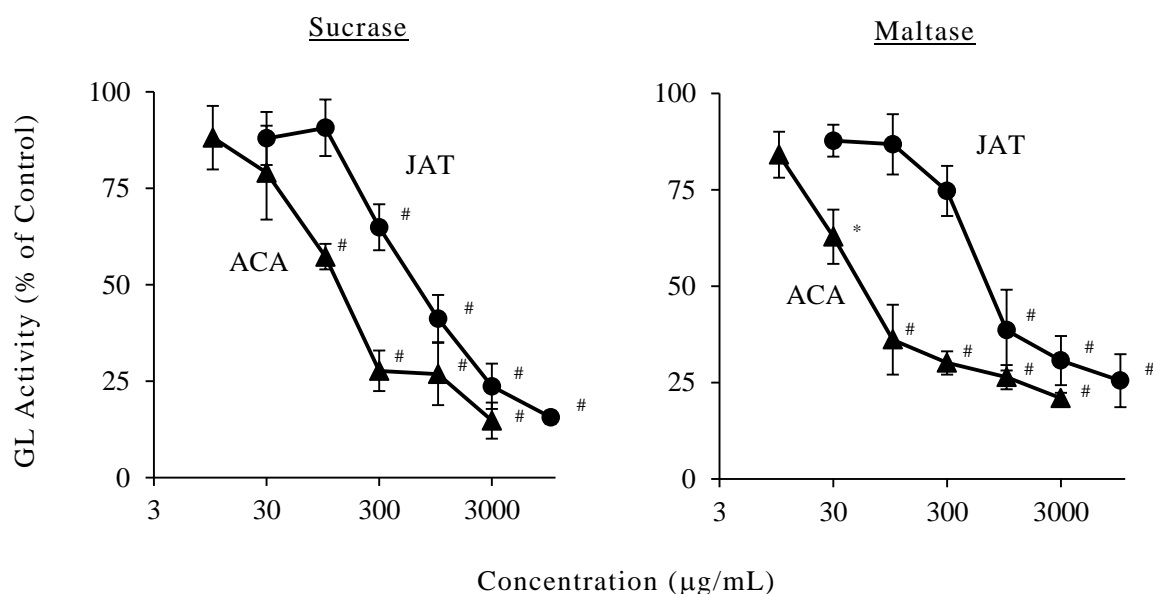


Fig. 10 Effects of JAT and ACA on Caco-2 Cell GL Activity

Caco-2 cell GL was incubated with sucrose and maltose in the presence of various concentrations of JAT and ACA for 60 min at 37 °C. Each value represents the mean \pm S.D. of 3-4 experiments. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$.

Table 6 IC_{50} values of JAT and ACA on Caco-2 Cell GL

	IC_{50} value ($\mu\text{g/mL}$)	
	Sucrase	Maltase
JAT	715 \pm 159	708 \pm 153
ACA	131 \pm 13.6	56.1 \pm 18.5

Each value represent the mean \pm S.D. of 3-4 experiments.

1.3.4 グルコースの取込みに及ぼす JAT の影響

1.3.4.1 DG 取込み活性に及ぼす JAT の影響

Caco-2 細胞を用いて、GLUT2 の基質である DG の取込みに及ぼす JAT の影響を検討した (Fig. 11)。GLUT2 の阻害剤であるフロレチンは DG の取込みを 0.1 mg/mL 以上で濃度依存的かつ有意に阻害したのに対し、JAT は最大 1.0 mg/mL 添加しても DG の取込みに何ら影響を与えなかった。

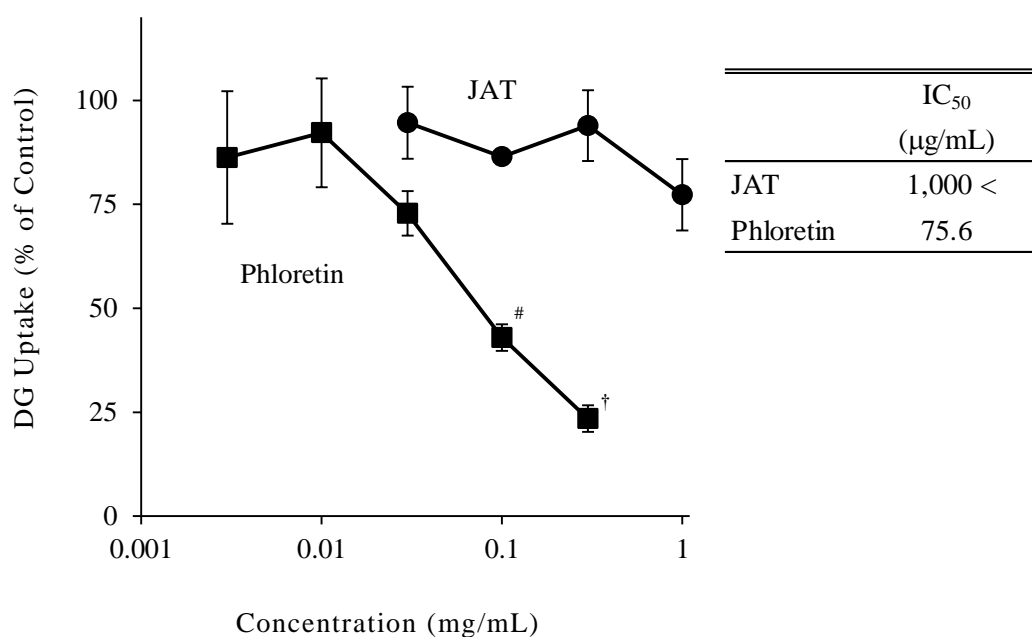


Fig. 11 Effects of JAT and Phloretin on DG Uptake in Caco-2 Cell Monolayers

Caco-2 cell monolayers were incubated with [³H]-DG at 37 °C for 10 min. Each value represents the mean ± S.D. of 3 monolayers. Significantly different from the control,

[#] $p < 0.01$, [†] $p < 0.001$.

1.3.4.2 AMG 取込み活性に及ぼす JAT の影響

Caco-2 細胞を用いて、SGLT1 の基質である AMG の取込みに及ぼす JAT の影響を検討した (Fig. 12)。SGLT1 の阻害剤であるフロリジンは AMG の取込みを 0.1 mg/mL 以上で濃度依存的かつ有意に阻害したのに対し、JAT は最大 1.0 mg/mL 添加しても AMG の取込みに何ら影響を与えなかった。

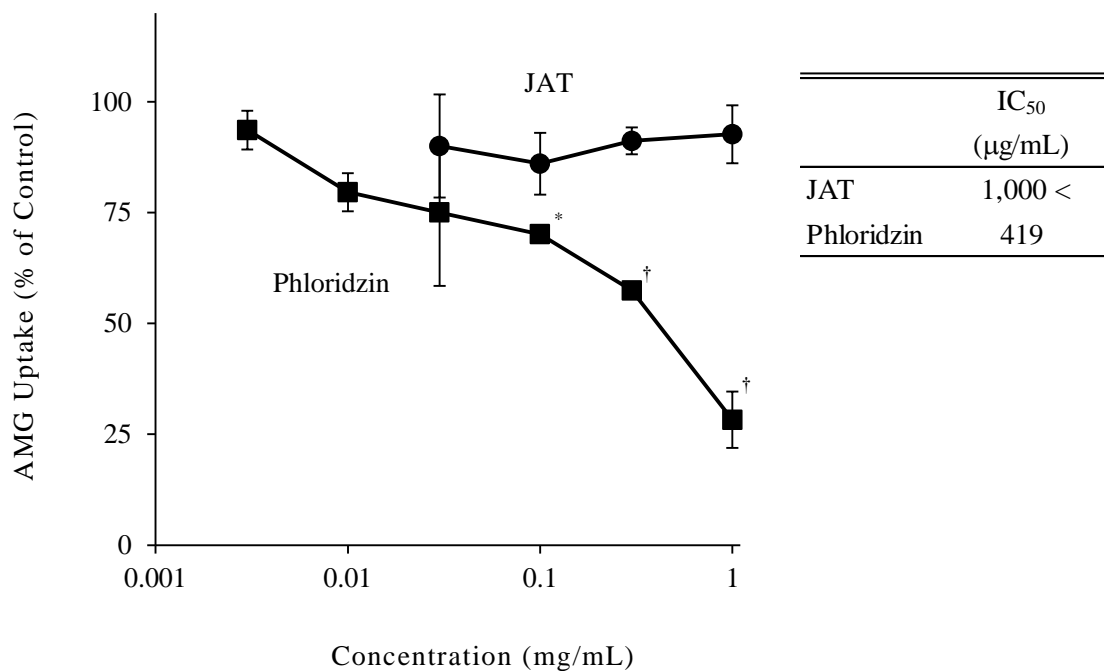


Fig. 12 Effects of JAT and Phloridzin on AMG Uptake in Caco-2 Cell Monolayers

Caco-2 cell monolayers were incubated with [¹⁴C]-AMG at 37 °C for 10 min. Each value represents the mean ± S.D. of 3 monolayers. Significantly different from the control,

* $p < 0.05$, † $p < 0.001$.

1.3.5 動物実験

1.3.5.1 *db/db* マウスによる検討

1.3.5.1.1 スクロース負荷後血糖値およびインスリン値に及ぼす JAT の影響

肥満 2 型糖尿病モデル動物 *db/db* マウスに JAT、ACA および BAS を投与した後、直ちにスクロースを負荷した血糖値の経時変化を Fig. 13 に示した。JAT 投与量は、ACA の臨床用量、ラット小腸 GL 活性および Caco-2 細胞由来 GL 活性に対する JAT の阻害強度が 1/100 ~ 1/6 程度であったことおよび予試験から 100 ~ 500 mg/kg に設定した。

糖尿病状態を呈しない *db/+* マウスの血糖値は、スクロース負荷により若干上昇し、30 分後で最高値に達し、その後漸減した。*db/db* マウスでは、スクロース負荷後 30 分で血糖値は最高値 (825 mg/dL) に達し、その後同様に漸減した。JAT 投与群ではコントロール群と比較し、用量依存的な血糖値の低下が見られ、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た。また、ACA 投与群では JAT よりも低用量で、用量依存的な血糖値の低下が認められ、100 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た。BAS 500 mg/kg 投与群の血糖曲線は JAT 500 mg/kg 投与群とほぼ同様の血糖曲線を示した。なお、いずれの投与群においてもインスリン値に有意な変化は見られなかった (Fig. 14)。

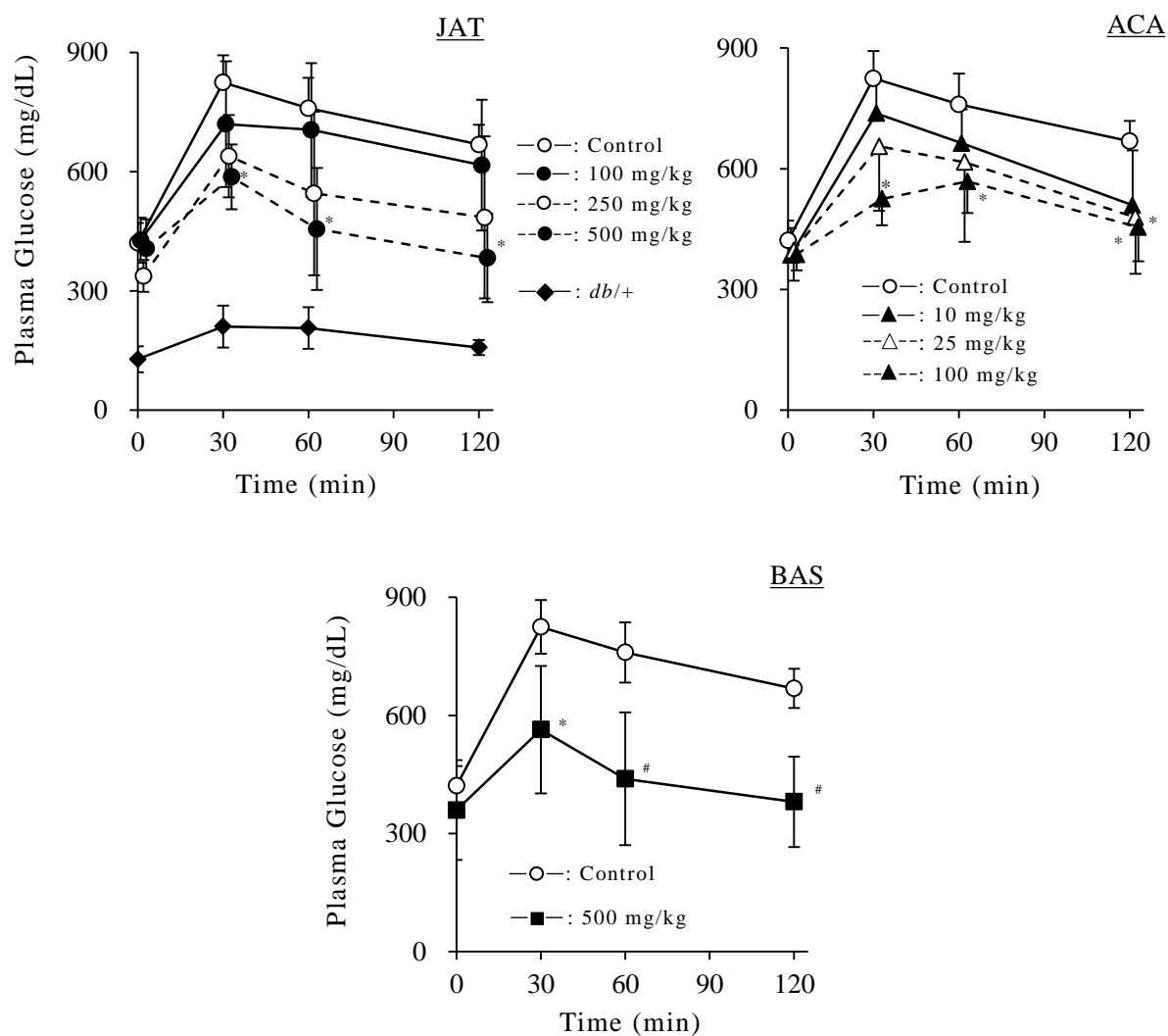


Fig. 13 Effects of JAT, ACA and BAS Oral Administration on Plasma Glucose Levels after Sucrose Loading in *db/db* Mice

After 15 hr fasting, JAT, ACA and BAS with sucrose (2 g/kg) were orally administered to the mice. Each value represents the mean \pm S.D. of 5-6 mice. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$.

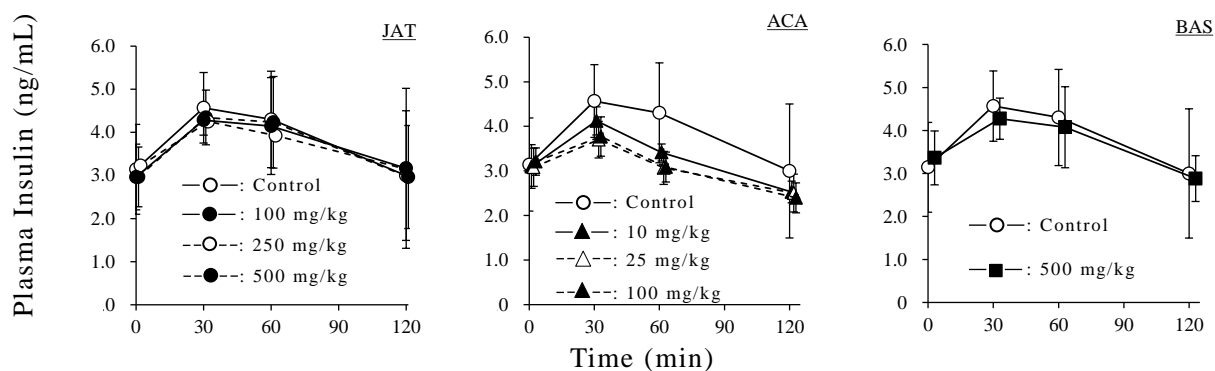


Fig. 14 Effects of JAT, ACA and BAS Oral Administration on Plasma Insulin Levels after Sucrose Loading in *db/db* Mice

The mice were treated in the same manner as shown in the legend in Fig.13. Each value represents the mean \pm S.D. of 5-6 mice.

1.3.5.1.2 小腸 GL 活性に及ぼす JAT の影響

JAT、ACA および BAS を投与後、Fig. 13 で最高血糖値に達した 30 分における *db/db* マウスの小腸 GL 活性を測定した (Fig. 15)。スクラーゼ活性はコントロール群と比較して JAT 500 mg/kg および ACA 100 mg/kg 投与群で有意に低下し、JAT 投与群では *db/+* 群とほぼ同程度であり、また ACA 投与群では *db/+* 群より低い値となった。一方、BAS 500 mg/kg 投与群では有意な低下は認められなかった。

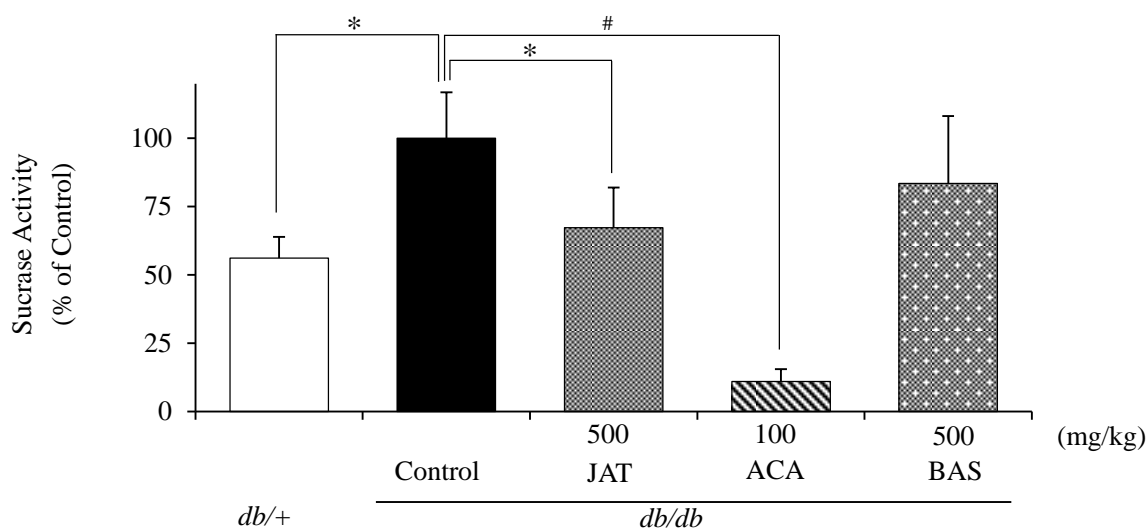


Fig. 15 Effects of JAT, ACA and BAS Oral Administration on Small Intestinal Sucrase Activities in *db/db* Mice

After 15 hr fasting, JAT, ACA and BAS were orally administered to the mice. Thirty min later, small intestinal sucrase activity was determined. Each value represents the mean \pm S.D. of 4 mice. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$.

1.3.5.2 GK ラットによる検討

1.3.5.2.1 スクロース負荷後血糖値等に及ぼす JAT の影響

インスリン分泌不全を呈し、日本人の 2 型糖尿病態に近い非肥満 2 型糖尿病モデル GK ラット^{43,44)}を用いて、スクロース負荷後の血糖値に及ぼす JAT の影響を検討した。JAT 投与量は *db/db* マウスの結果を基に 31.3 ~ 250 mg/kg に設定した。GK ラットに JAT、ACA および BAS を投与した後、直ちにスクロースを負荷した血糖値の経時変化を Fig. 16 に示した。コントロール群の血糖値は負荷後 30 分で最高値に達し、その後漸減した。JAT 投与群ではコントロール群と比較し、用量依存的な血糖値の低下が見られ、62.5 mg/kg 以上で投与 30 分後の血糖値は有意に低値を示し、250 mg/kg 投与群で最も低い値となった。ACA および BAS 投与群においても同様に用量依存的な耐糖能改善効果を示し、ACA 3.0 mg/kg は 30 分および 60 分後、BAS 250 mg/kg は投与 30 分後で有意に低下した。JAT 31.3 mg/kg および ACA 0.3 mg/kg の併用群では投与 30 および 60 分後の血糖値は有意に低下し、血糖値の推移は ACA 3.0 mg/kg 投与群とほぼ同程度であった。また、それぞれ有意な耐糖能改善効果を示した JAT 62.5 mg/kg と ACA 3.0 mg/kg の併用群においても、血糖値の推移は ACA 3.0 mg/kg 投与群とほぼ同程度であり、過度な血糖値の低下は認められなかった（データ未掲載）。一方、スクロース負荷後の血中インスリン値に各群で何ら変化は認められなかった（Fig. 17）。

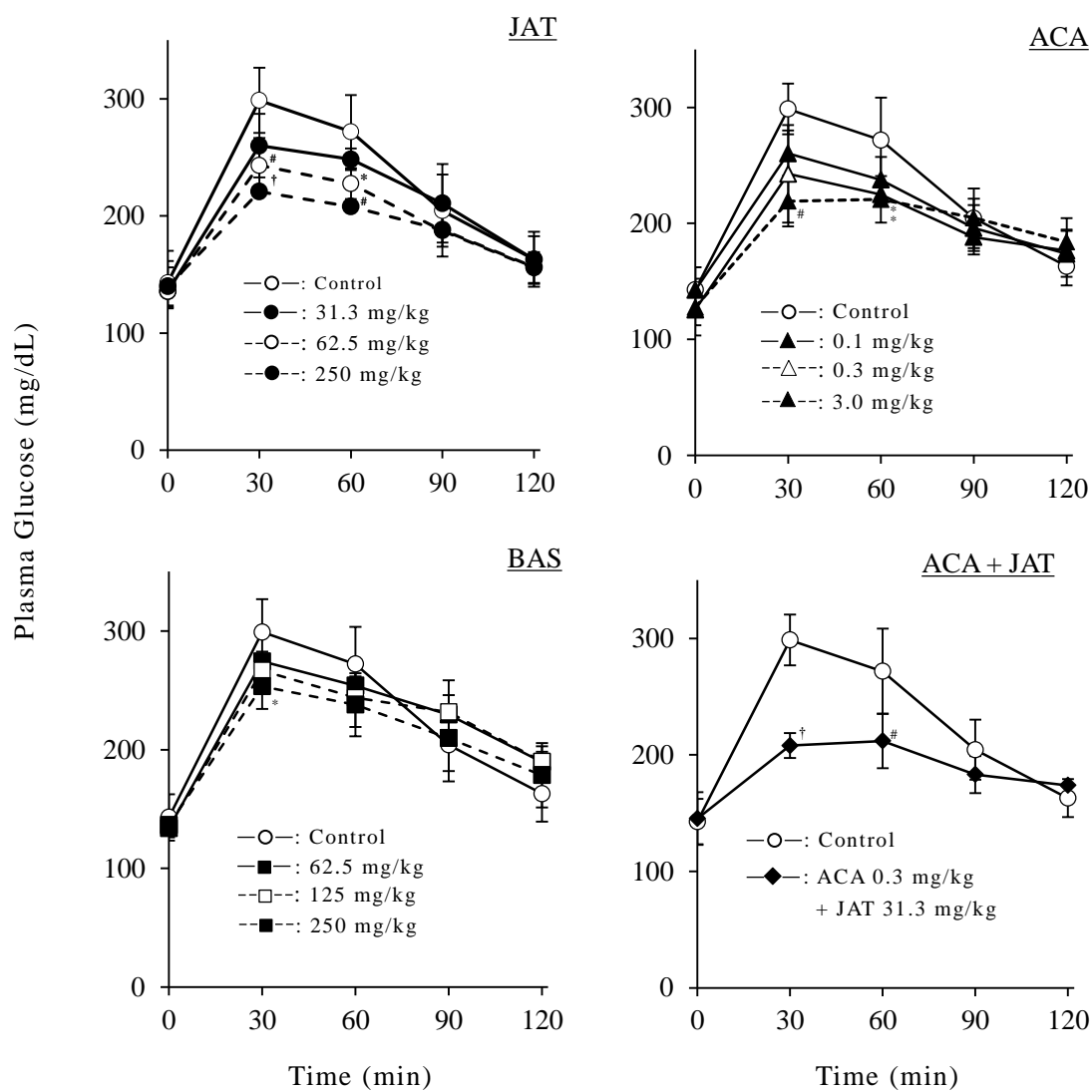


Fig. 16 Effects of JAT, ACA and BAS Oral Administration on Plasma Glucose Levels after Sucrose Loading in GK Rats

After 15 hr fasting, JAT, ACA and BAS with sucrose (2 g/kg) were orally administered to the rats. Each value represents the mean \pm S.D. of 5-6 rats. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, † $p < 0.001$.

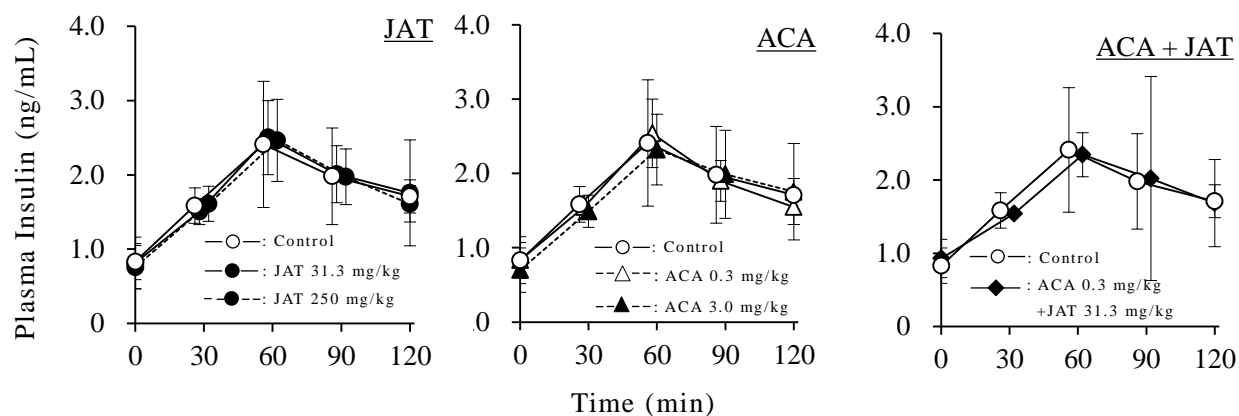


Fig. 17 Effects of JAT and ACA Oral Administration on Plasma Insulin Levels after Sucrose Loading in GK Rats

The rats were treated in the same manner as shown in the legend in Fig.16. Each value represents the mean \pm S.D. of 5-6 rats.

1.3.5.2.2 小腸 GL 活性に及ぼす JAT の影響

JAT、ACA および BAS 投与 30 分後の GK ラット小腸 GL 活性を測定した (Fig. 18)。コントロール群と比較して、いずれの投与群においても用量依存的に GL 活性は低下し、JAT 250 mg/kg、ACA 3 mg/kg および BAS 250 mg/kg 投与群で有意であった。一方、有意な低下を認めなかった JAT 31.3 mg/kg および ACA 0.3 mg/kg の併用群では、有意な小腸 GL 活性の低下が認められ、その低下の程度は ACA 3.0 mg/kg 投与群と同等であった。

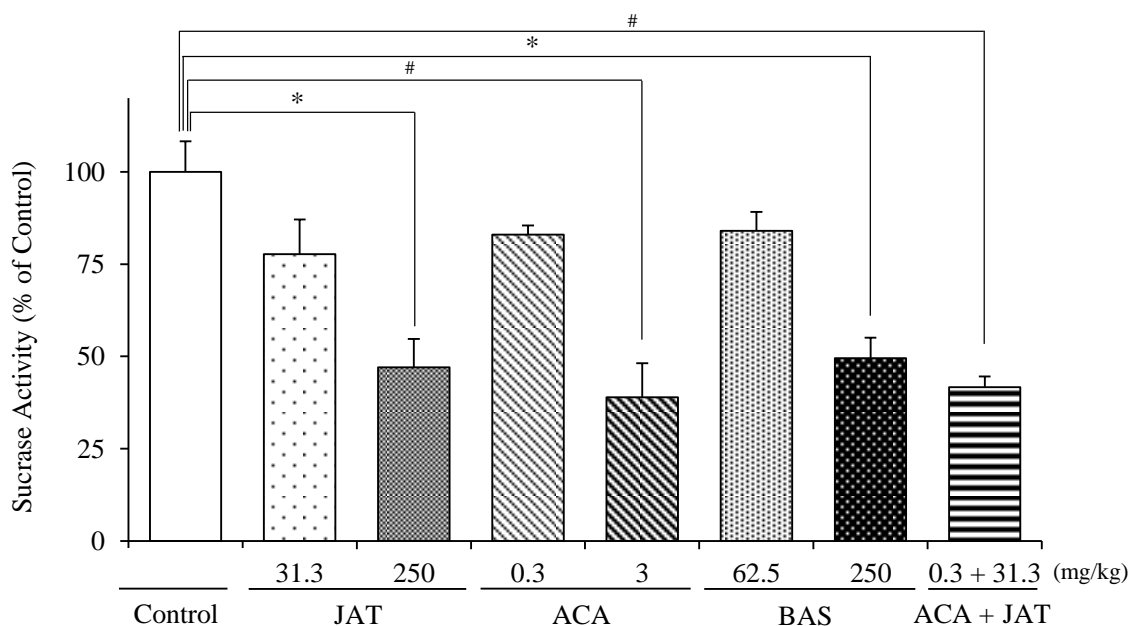


Fig. 18 Effects of JAT, ACA and BAS Oral Administration on Small Intestinal Sucrase Activities in GK Rats

After 15 hr fasting, JAT, ACA and BAS were orally administered to the rats. Thirty min later, small intestinal sucrase activity was determined. Each value represents the mean \pm S.D. of 4 rats. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, # $p < 0.01$.

1.3.5.2.3 グルコース負荷後血糖値に及ぼす JAT の影響

GK ラットに JAT、ACA および BAS を投与した後、直ちにグルコースを負荷した血糖値の経時変化を Fig. 19 に示した。なお、各投与量はスクロースを負荷した時に有意に血糖値を低下させた投与量 (Fig. 16) に設定した。コントロール群の血糖値は負荷後 30 分で最高値 (338 mg/dL) に達し、その後漸減した。JAT、ACA および BAS 投与群ではいずれの投与群においても、コントロール群と比較し、血糖値に何ら変化は認められなかった。

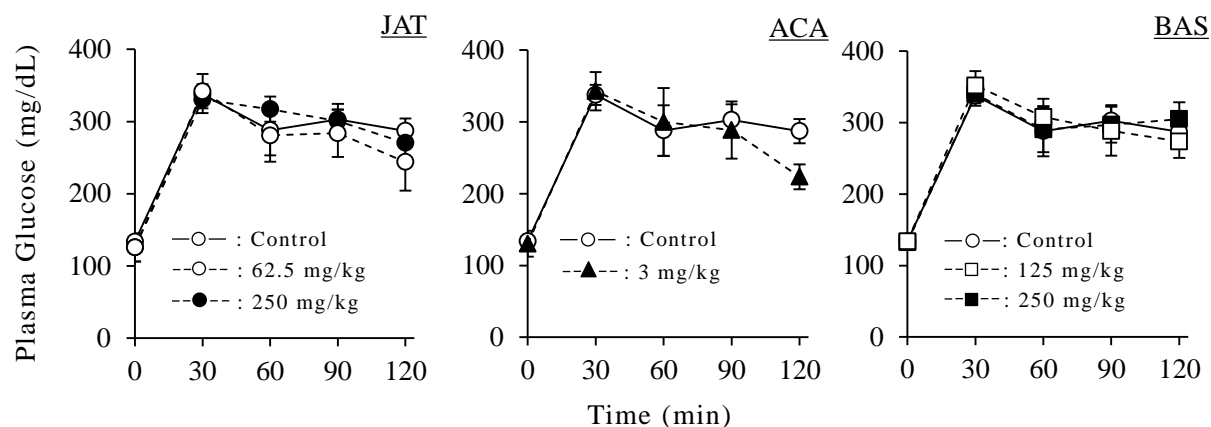


Fig. 19 Effects of JAT, ACA and BAS Oral Administration on Plasma Glucose Levels after Glucose Loading in GK Rats

After 15 hr fasting, JAT, ACA and BAS with glucose (2 g/kg) were orally administered to the rats. Each value represents the mean \pm S.D. of 5-6 rats.

1.4 考察

はじめに、JAT 中のカテキン類 8 種およびテアフラビン類 4 種の含量を測定した。その結果、いずれの化合物も既報⁴⁵⁻⁴⁸⁾とほぼ同様の値であったことから、本研究で用いた検体は、調製および保管工程において成分の分解や重合による損失などの懸念はないことを確認した (Table 1)。

食事由来の炭水化物の消化過程を想定して、AM 活性に及ぼす JAT の影響について検討した。その結果、JAT は濃度依存的に AM 活性を阻害したものの、その IC₅₀ 値は ACA の 1/1,600 であった (Fig. 3)。従って JAT は多糖類の二糖類への分解にはほとんど関与しないことが示唆された。AM の阻害によって、未消化の糖質が大腸に到達し、腸内細菌により発酵すると腹部膨満感、放屁等の消化器症状が現れることが知られているが⁴⁹⁾、JAT はそのような症状が発現しにくいと考えられた。

食事由来の炭水化物は、AM により二糖類にまで分解される。スクロースやマルトースなどの二糖類は小腸の GL によってグルコース等の単糖類に分解され小腸から吸収される¹³⁻¹⁶⁾。そこで、JAT の GL 活性に及ぼす影響について検討した。GL 活性の測定には酵母由来 GL やラット小腸 GL が酵素源として繁用されているが、本研究ではこれらに加えヒト小腸モデルの Caco-2 細胞の GL 活性も検討した³⁷⁾。いずれの酵素源を用いた場合も、JAT は濃度依存的かつ有意にスクラーゼおよびマルターゼ活性を阻害した。しかしながら、JAT の阻害強度は酵素源によって大きく異なり、酵母由来 GL では ACA よりも強く、BAS とほぼ同等であった (Table 2)。一方、ラット小腸 (Table 4) および Caco-2 細胞 (Table 6) において、JAT の阻害強度は ACA より弱かった。酵素源によって阻害強度に差がみられたのは、酵母由来 GL は GL ファミリー I に、哺乳動物由来 GL (ラット小腸および Caco-2 細胞由来 GL) はファミリー II に分類され⁵⁰⁾、ACA に対する感受性が異なること^{51, 52)}が原因と考えられる。次に、JAT の阻害形式を明らかにするために酵母由来 (Fig. 6、Table 3) およびラット小腸由来 (Fig. 8、Table 5) GL を用い、速度論的解析を行った。その結果、いずれの場合も、JAT は GL を非競合的に阻害した。従って、JAT は GL の基質結合部位とは異なる部位に JAT 由来の何らかの成分が結合し、酵素活性を阻害すると考えられた。このことから、ACA と JAT を同時に併用した場合、

ACA と JAT の相乗効果が期待されたため、ラット小腸由来 GL に有意な活性低下が認められなかった ACA (スクラーゼ ; 0.003 mg/mL、マルターゼ ; 0.001 mg/mL) と JAT (スクラーゼ ; 0.1 mg/mL、マルターゼ ; 1.0 mg/mL) を同時に添加したところ、両酵素活性は有意に低下し、期待されたとおり相乗効果が確認された (Fig. 9)。

小腸におけるグルコースの細胞内取り込みは、受動拡散とトランスポーターを介した輸送で行われ、後者が主である⁵³⁾。トランスポーター介在による糖輸送は、食直後のように小腸管腔内の糖濃度が高い場合、高親和性で低輸送能力を有する SGLT1 より低親和性で高輸送能力を有する GLUT2 の関与が優位となる¹⁶⁾。そこで小腸細胞内へのトランスポーターが関与するグルコースの取り込みに対する JAT の影響を検討した。なお、グルコース類似物質である DG および AMG は、それぞれ GLUT2 および SGLT1 の基質である。細胞内に取り込まれた後、解糖系において、DG は DG-6-リン酸までの代謝で留まり、AMG は代謝されないため^{54, 55)}、グルコースの小腸細胞内の取り込みを検討する際の指標として繁用されている。いずれのトランスポーターも発現している Caco-2 細胞⁵⁶⁾を用いて検討した結果、フロレチンおよびフロリジンは濃度依存的に DG および AMG 取込みを阻害したのに対し (Fig. 11, 12)、JAT はそれぞれの基質の Caco-2 細胞内への取り込みに、何ら影響を与えなかった。したがって、JAT は小腸上皮細胞刷子縁膜上の GLUT2 活性および SGLT1 活性には影響を与えないものと考えられる。

以上より、JAT は小腸 GL 活性阻害作用を有することから、耐糖能改善作用が期待された。そこで次に、高血糖・肥満・高インスリン血症などの 2 型糖尿病の特徴を有し、耐糖能が著しく悪化している糖尿病モデル動物である *db/db* マウスを用いて⁵⁷⁾ *in vivo* および *ex vivo* における JAT の効果について検討した (Fig. 13)。スクロース負荷による耐糖能試験の結果、コントロール群と比較して、JAT 投与群では用量依存的な血糖値の上昇抑制が観察され、JAT 500 mg/kg では ACA 100 mg/kg および BAS 500 mg/kg とほぼ同等の耐糖能改善効果を示した。ACA 投与群も用量依存的な血糖値上昇抑制が観察された。この JAT の効果は、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、消化管における GL 活性の阻害に基づくことが示唆された (Fig. 15)。なお、

BAS 投与群では、小腸 GL 活性の有意な低下は認められなかったが、血糖値の上昇抑制が観察された。このことから、BAS による耐糖能改善には小腸 GL 活性の阻害に加え、グルコーストランスポーターの阻害などが関与していると考えられる。一方、JAT 投与によるインスリン値に対する影響は認められず (Fig. 14)、JAT に由来する成分が膵臓に作用し、インスリン分泌を促進させるような効果はないと考えられた。

次に、インスリン分泌不全を呈し、日本人の 2 型糖尿病態に近い非肥満 2 型糖尿病モデル GK ラット^{43, 44)}を用いて、糖負荷後血糖値に及ぼす JAT の影響を詳細に検討した (Fig. 16)。コントロール群と比較して、スクロース負荷後の血糖値上昇は、JAT 投与群では用量依存的に抑制された。紅茶約 10 杯に相当する JAT 62.5 mg/kg 以上で、負荷 30 および 60 分後の血糖値は有意に低下し、JAT 250 mg/kg では ACA 3.0 mg/kg と同等で、BAS 250 mg/kg より若干強い耐糖能改善効果を示した。また、有意な血糖値の低下を認めなかった ACA 0.3 mg/kg および JAT 31.3 mg/kg を併用することによって、ACA 3.0 mg/kg とほぼ同じ耐糖能改善効果を示した。この結果は、ACA と JAT との併用により、GL 活性が相乗的に阻害されたためと考えられた。一方、有意な血糖値の低下を認めた ACA 3.0 mg/kg および JAT 62.5 mg/kg を同時に投与しても ACA 3.0 mg/kg とほぼ同じ耐糖能改善効果を示したことから、これらの投与群における併用では、GL 活性の阻害が飽和したものと考えられる。また、GK ラットにおいても JAT 投与によるインスリン値に対する影響は認められなかった (Fig. 17)。JAT あるいは BAS 投与後 30 分に測定した小腸 GL 活性の結果から JAT および BAS の耐糖能改善効果は、*db/db* マウスと同様に、小腸 GL 活性の阻害に起因すると考えられた (Fig. 18)。なお、BAS 投与後の小腸 GL 活性に *db/db* マウスと GK ラットで違いが見られた (Fig. 15, 18)。この相違は、*db/db* マウスのように糖尿病が進行すると小腸 GL 活性が上昇しているためと考えられた^{37, 58, 59)}。また、*db/db* マウスと GK ラットのインスリン値挙動にも違いが見られた (Fig. 14, 17)。このことは、*db/db* マウスおよび GK ラットはそれぞれ高インスリン血症⁵⁷⁾およびインスリン分泌不全⁴⁴⁾であるためと考えられる。

GK ラットにおいて、JAT はグルコース負荷後の血糖値に何ら影響を及ぼさ

なかった (Fig. 19)。先の *in vitro* の検討で、JAT は GLUT2 および SGLT1 関与の糖取込みに影響しないことを明らかにしたが (Fig. 11, 12)、GK ラットにおけるこの結果は、これら *in vitro* の結果を反映するものであった。

以上、JAT 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として有用と考えられる。

2 紅茶の各種 CYP 活性に及ぼす影響

2.1 序論

紅茶中に含まれるカテキン類あるいはその他のフラボノール類は CYP 活性を阻害することが報告されている⁶⁰⁻⁶²⁾。このことから、CYP により代謝される医薬品と紅茶を同時に服用した場合、食-薬間相互作用発現の可能性が考えられた。また、JAT はスクロース負荷後の血糖値上昇を抑制したことから、CYP で代謝される抗糖尿病薬との併用において、低血糖のリスクが考えられた。そこで、JAT の CYP 活性に及ぼす影響を、肝臓で発現比率が高い CYP1A2、2C9、2D6、2E1 および 3A4、また発現比率は低いが多く医薬品の代謝に関わっている CYP2C19⁶³⁾について検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 実験材料

テストステロン、6 β -ヒドロキシテストステロン、ジクロフェナクナトリウム、デキストロメトロファンおよびデキストロファン は Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA) より購入したものをを用いた。ヒト肝ミクロソーム (150 donors pooled)、4'-ヒドロキシジクロフェナクおよび 6'-ヒドロキシクロルゾキサゾン は日本ベクトンディキンソン (東京) より購入したものをを用いた。 β -nicotineamide-adenine dinucleotide phosphate sodium salt (β -NADP⁺)、D-glucose 6-phosphate sodium salt (G-6-P) および glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) はオリエンタル酵母 (東京) より購入したものをを用いた。フェナセチン、クロルゾキサゾンおよびオメプラゾールは和光純薬工業 (大阪) より購入したものをを用いた。5-ヒドロキシオメプラゾールは Toronto Research Chemicals 社 (North York, ON, Canada) より購入したものをを用いた。その他の試薬は全て市販品を用いた。

2.2.2 HPLC

各種薬物の定量には、ポンプ (LC-10AT 形 ; 島津製作所, 京都)、UV 検出器 (SPD-10AT 形 ; 島津製作所, 京都)、蛍光検出器 (L7480 形 ; 日立, 東京)、カラムオーブン (C0-8010 形 ; 東ソー, 東京) および逆相カラム (TOSOH

Tsk-gel ODS-100v ; 3 μ m, 150 \times 4.6 mm, i.d. ; 東ソー, 東京) を装備した HPLC システムを用いた。

2.2.3 各種 CYP 活性の測定

各種 CYP 活性の測定は、Table 7 に示した反応を指標に、既報^{64, 65)}を若干改変して行った。すなわち、NADPH 生成系 (5 mM β -NADP⁺、0.5 mM G-6-P、1 unit/mL G-6-PDH および 5 mM MgCl₂) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 90 μ L に、HLM (終濃度 0.1 mg prot./mL) 10 μ L および JAT (3~1000 μ g/mL) 100 μ L を加え、全量 200 μ L で 37 $^{\circ}$ C で 5 分間プレインキュベートした。その後、各種 CYP の特異的な基質 2 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。反応は等量の氷冷メタノールを加えることにより停止させた。遠心分離 (10,000 rpm, 5 分, Centrifuge 5415 D : Eppendorf, Hamburg, Germany) 後、上清をメンブランフィルター Millex-LG (0.45 μ m, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) でろ過し、ろ液 20 μ L を HPLC に注入した。

各種 CYP の代謝物の定量は既報⁶⁶⁻⁷¹⁾を若干改変して行った。2.2.2 HPLC のシステムを用い、移動相および測定波長は Table 8 に示した条件で行い、流速は 0.7 mL/分、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C で行った。

Table 7 Measurement of Various CYP Activity

CYP	Substrate	Metabolite	Reaction	Reference
1A2	Phenacetin	Acetoaminophen	Phenacetin <i>O</i> -deethylation	64
2C9	Diclofenac	4-OH-diclofenac	Diclofenc 4-hydroxylation	65
2C19	Omeprazole	5-OH-omeprazole	Omeprazole 5-hydroxylation	64
2D6	Dextromethorphan	Dextrophan	Dextromethorphan <i>O</i> -deetylation	64
2E1	Chlorzoxazone	6-OH-chlorzoxazone	Chlorzoxazone 6-hydroxylation	64
3A4	Testosterone	6 β -OH-testosterone	Testosterone 6 β -hydroxylation	65

Table 8 HPLC Conditions for Various Metabolites Detections

CYP	Detection	Mobile Phase (v/v)	Reference
1A2	UV (254 nm)	CH ₃ OH : PB (pH4.5) = 5 : 95	66
2C9	UV (272 nm)	CH ₃ OH : PB (pH4.5) = 50 : 50	67
2C19	UV (302 nm)	CH ₃ OH : PB (pH7.5) = 35 : 65	68
2D6	FL (Ex : 280 nm, Em : 310 nm)	CH ₃ CN : PB (pH4.5) = 20 : 80	69
2E1	UV (280 nm)	CH ₃ CN : PB (pH4.0) = 15 : 85	70
3A4	UV (242 nm)	CH ₃ OH : PB (pH6.0) = 60 : 40	71

FL : Fluorescence Ex : Excitation Em : Emission PB : 20 mM Phosphate Buffer.

2.2.4 統計処理

1.2.9 に準じて行った。

2.3 結果

2.3.1 各種ヒト CYP 活性に及ぼす JAT の影響

ヒト肝ミクロソームを用いて、各種 CYP 活性に対する JAT 添加の影響を検討した (Fig. 20)。CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 活性は、それぞれ JAT 30、10 および 30 $\mu\text{g/mL}$ 以上の添加で濃度依存的かつ有意に低下した。JAT の CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 活性に対する IC₅₀ 値はそれぞれ 46.5、21.5 および 45.4 $\mu\text{g/mL}$ であった。一方、CYP1A2、2D6 および 2E1 活性に対しては、JAT を最大 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 添加しても有意な変化は見られなかった。

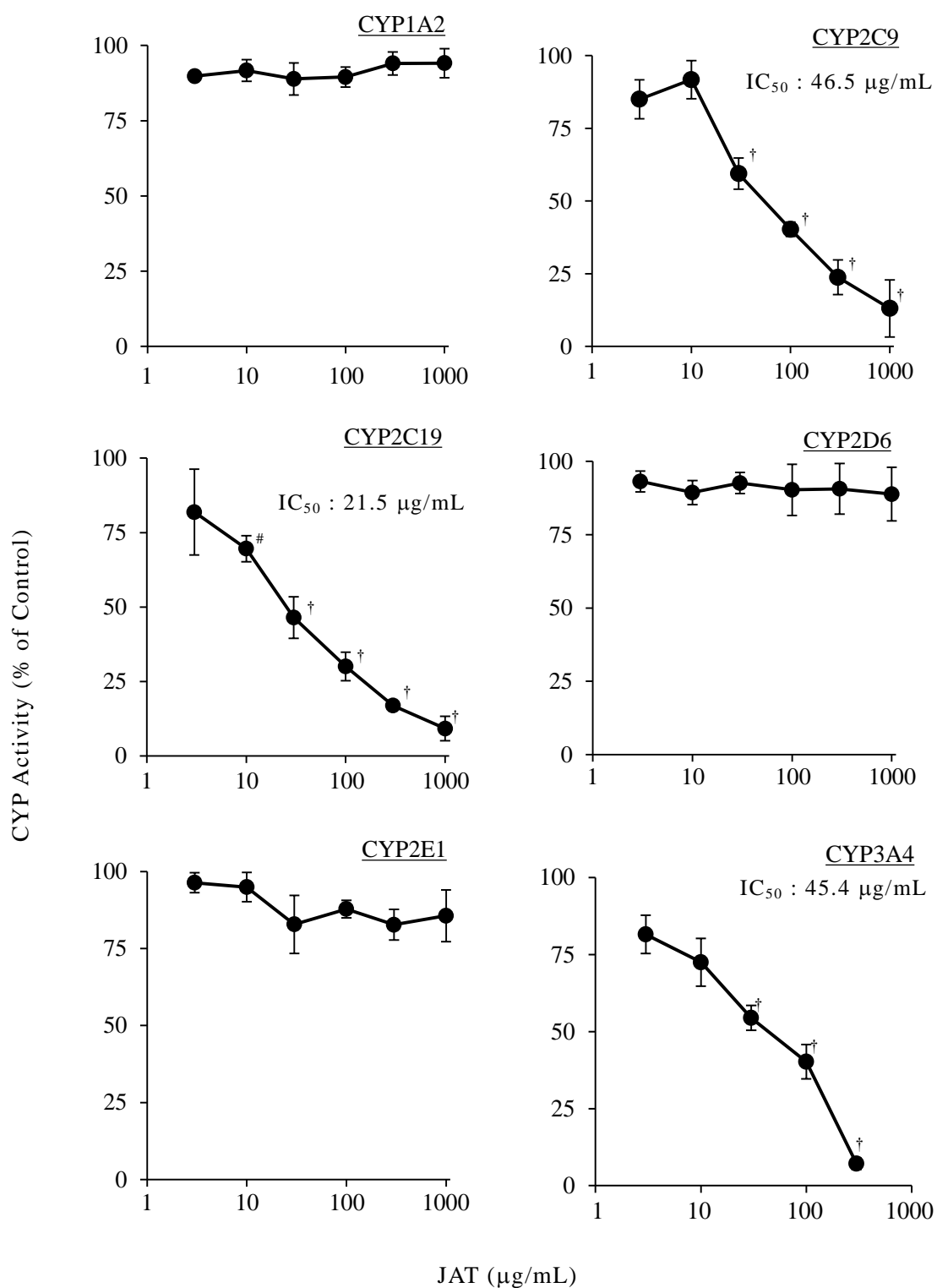


Fig. 20 Effects of JAT on CYPs Activities in Human Liver Microsomes

Human liver microsomes were incubated with specific substrate in the presence or absence of JAT (3 ~ 1000 μg/mL) for 60 min at 37 °C. Each value represents the mean ± S.D. of 4 experiments. Significantly different from the control, [#] $p < 0.01$, [†] $p < 0.001$.

2.4 考察

Table 1 で示したとおり、紅茶は EGCG をはじめとする複数種のカテキン類を含有するが、そのうち C、EC および EGCG は CYP2C9 および CYP3A4 活性を阻害することが Kimura らによって報告されている⁶⁰⁾。CYP2C9 および CYP3A4 で代謝される抗糖尿病薬は、それぞれトルブタミド⁷²⁾およびピオグリタゾン⁷³⁾が知られている。仮にこれらの CYP で代謝される抗糖尿病薬を紅茶で服用した場合、低血糖などの有害事象の発現の可能性が考えられる。また、紅茶特有成分の TF 等のテアフラビン類の CYP 活性に及ぼす報告では CYP1A1 が誘導されると報告⁷⁴⁾されている。このようなことから、CYP 活性に及ぼす JAT の影響を確認することは、食一薬間相互作用発現の予測に寄与すると考え、本章の実験を行った。その結果、JAT は CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 活性を濃度依存的に阻害し、それぞれ 30 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ および 30 $\mu\text{g/mL}$ 以上で有意な低下を認めた (Fig. 20)。JAT 中では CG の含量が最も多く、ついで GCG、GC、EGCG の順であり、テアフラビン類はいずれもカテキン類のおよそ 1/10 程度であったこと (Table 1) および Kimura らの報告⁶⁰⁾から、JAT による 各種 CYP の阻害は主にカテキン類による阻害の可能性が考えられた。

カテキン類およびテアフラビン類は主に Solute carrier (SLC) トランスポーターである SLC16A1 のモノカルボン酸トランスポーターによって、またその一部は受動拡散によって小腸細胞内に取り込まれる⁷⁵⁾。しかし、小腸細胞に取り込まれた多くは ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターである ABCB1 の P-糖タンパク質⁷⁶⁾によって小腸管腔側へ排泄される。さらに肝においては、グルクロン酸抱合や硫酸抱合によって速やかに代謝されるため⁷⁷⁾、カテキン類およびテアフラビン類のバイオアベイラビリティは低いことが知られている⁷⁸⁾。本研究の動物実験での最大投与量である JAT 500 mg/kg をラット (体重 300 g) に経口投与した場合、Table 1 から、カテキン類およびテアフラビン類としてそれぞれ約 5.84 mg および 0.28 mg が投与されると推定される。Szachowicz-Petelska らは、カテキン類およびテアフラビン類のラット肝臓への移行率はそれぞれおよそ 0.004 % および 0.002 % であると報告しており⁷⁹⁾、ラットの血液量は体重の約 7.5 %⁸⁰⁾である。これらのことから、カテキン類お

よびテアフラビン類の肝臓中推定濃度は、それぞれ 10.4 ng/mL および 0.25 ng/mL と見積もられる。Fig. 20 より JAT の CYP 2C9、2C19 および 3A4 活性に対する IC₅₀ 値は、それぞれ 46.5、21.5 および 45.4 µg/mL であることから、見積もられた肝臓中推定濃度のおよそ 1,000～10,000 倍に相当する。テアフラビン類は CYP1A1 を誘導することも報告されており⁷⁴⁾、JAT 投与による各種 CYP 活性の誘導の有無を検討する必要性は残っているが、JAT を服用した場合、CYP 活性の阻害に起因する食－薬間相互作用が発現する可能性は低いと考えられた。

3 まとめ

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。これまでに紅茶の2型糖尿病の予防・進展抑制に関する報告例はあるが²⁵⁾、その詳細な作用は不明のままである。本研究は、小腸における糖質吸収過程に及ぼす紅茶の影響を *in vitro*、*ex vivo* および *in vivo* で評価し、JAT が2型糖尿病の予防・進展抑制のための機能性食品素材として有用であるか否かを検討した。また、紅茶に含有される一部のカテキン類は CYP2C9 および CYP3A4 活性を阻害することが報告されており⁶⁰⁾、紅茶と医薬品の併用による食-薬間相互作用が発現する可能性が推察された。そこで機能性を有する食品と医薬品の適正使用の視点から JAT の CYP に及ぼす影響も検討した。以下にその結果をまとめる。

- 1) JAT は AM 活性を濃度依存的かつ有意に阻害したが、その阻害強度は ACA および BAS よりも弱く、多糖類の二糖類への分解には影響しないと示唆された。
- 2) JAT は濃度依存的かつ有意に GL 活性を阻害し、その阻害形式は非競合型であった。
- 3) JAT は GLUT2 および SGLT1 が介在するグルコースの吸収に何ら影響を与えなかった。
- 4) 2型糖尿病モデル動物を用いたスクロース負荷試験より、JAT は耐糖能改善効果を示したが、グルコース負荷後の耐糖能に何ら影響を与えなかった。JAT 投与後に摘出した小腸の GL 活性を調べたところ活性の低下を認めた。従って、JAT の耐糖能改善効果は GL 活性の阻害を機序とすると考えられた。
- 5) JAT は肝 CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 活性を濃度依存的かつ有意に阻害したが、JAT 由来成分の肝臓への移行が僅かと推定されることから、肝 CYP 活性の阻害にもとづく食-薬間相互作用発現の可能性は低いと考えられた。

以上より、JAT は 2 型糖尿病の境界型での食事療法の際、耐糖能を改善する可能性を有した機能性食品素材として有用と考えられ、一部の CYP により代謝される医薬品との併用によっても食－薬間相互作用が発現する可能性は低いものと考えられる。

4 謝辞

本研究を遂行するに際し、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道薬科大学薬剤学分野 渡辺一弘教授に深甚なる感謝を申し上げます。また、実験の細部を御指導、御助言を賜りました北海道薬科大学 佐藤重一名誉教授に心より深謝いたします。また、本研究の遂行に際し、有益な御示唆をいただきました北海道薬科大学医薬化学分野 山下浩准教授に深謝いたします。また、多くの有益なる御助言、様々な面で援助と励ましを戴きました北海道薬科大学薬剤学分野 佐藤隆司講師に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究の一部にご協力いただきました内澤香奈子学士、服部達哉学士、金岡樹輝氏（北海道薬科大学 6 年生）、千葉洋平氏、林晋太郎氏、山田将吾氏（北海道薬科大学 5 年生）に感謝いたします。

引用文献

- 1) 平成 9 年糖尿病実態調査報告, 厚生省 (1997).
http://www.mhlw.go.jp/toukei/kouhyo/indexkk_14_4.html
- 2) 平成 14 年糖尿病実態調査報告, 厚生労働省 (2002).
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2003/12/h1224-4.html>
- 3) 平成 19 年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省 (2007).
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou09/01.html>
- 4) 平成 23 年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省 (2011).
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h23-houkoku.html>
- 5) 平成 24 年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省 (2012).
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000032074.html>
- 6) 平成 23 年国民医療費の概況, 厚生労働省 (2011).
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/11/index.html>
- 7) 2013 医療用医薬品データブック No.4, 富士経済 (2013).
<https://www.fuji-keizai.co.jp/market/13036.html>
- 8) Cavalot, F., Pagliarino, A., Valle, M., Di Martino, L., Bonomo, K., Massucco, P., Anfossi, G., Trovati, M., Postprandial blood glucose predicts cardiovascular events and all-cause mortality in type 2 diabetes in a 14-year follow-up: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study. *Diabetes Care*, **34**, 2237-2243 (2011).
- 9) Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., STOP-NIDDM Trial Research Group, Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in

- patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA*, **290**, 486-494 (2003).
- 10) Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., STOP-NIDDM Trial Research Group, Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, **359**, 2072-2077 (2002).
 - 11) Ceriello, A., The glucose triad and its role in comprehensive glycaemic control: current status, future management. *Int. J. Clin. Pract.*, **64**, 1705-1711 (2010).
 - 12) Psaltopoulou, T., Ilias, I., Alevizaki, M., The role of diet and lifestyle in primary, secondary, and tertiary diabetes prevention: a review of meta-analyses. *Rev. Diabet. Stud.*, **7**, 26-35 (2010).
 - 13) Oboh, G., Ademiluyi, A. O., Akinyemi, A. J., Henle, T., Saliu, J. A., Schwarzenbolz, U., Inhibitory effect of polyphenol-rich extracts of jute leaf (*Corchorus olitorius*) on key enzyme linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting) in vitro. *J. Func. Foods.*, **4**, 450-458 (2012).
 - 14) Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., Van Weel, C., Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **(2)**, CD003639 (2005).
 - 15) Fatmawati, S., Shimizu, K., Kondo, R., Ganoderol B: A potent α -glucosidase inhibitor isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Phytomedicine*, **18**, 1053-1055 (2011).

- 16) Kellett, G. L., Brot-Laroche, E., Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes*, **54**, 3056-3062 (2005).
- 17) Leturque, A., Brot-Laroche, E., Le Gall, M., GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, E985-E992 (2009).
- 18) 日本糖尿病学会 "科学的根拠に基づく糖尿病診断ガイドライン 2013," 1, 南江堂, 東京, 2013.
- 19) US Department of agriculture. "Brewing up the latest tea research." 2013; <<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/sep03/tea0903.htm>>
- 20) Tan, L. C., Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R., Au, W. L., Tan, J. H., Tan, E. K., Yu, M. C., Differential effects of black versus green tea on risk of Parkinson's disease in the Singapore Chinese Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, **167**, 553-560 (2008).
- 21) Grassi, D., Mulder, T. P., Draijer, R., Desideri, G., Molhuizen, H. O., Ferri, C., Black tea consumption dose-dependently improves flow-mediated dilation in healthy males. *J. Hypertens.*, **27**, 774-781 (2009).
- 22) Gardner, E. J., Ruxton, C. H., Leeds, A. R., Black tea--helpful or harmful? A review of the evidence. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **61**, 3-18 (2007).
- 23) Arab, L., Liu, W., Elashoff, D., Green and black tea consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *Stroke*, **40**, 1786-1792 (2009).
- 24) Zhong, L., Furne, J. K., Levitt, M. D., An extract of black, green, and mulberry teas causes malabsorption of carbohydrate but not of

- triacylglycerol in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, **84**, 551-555 (2006).
- 25) Odegaard, A. O., Pereira, M. A., Koh, W. P., Arakawa, K., Lee, H. P., Yu, M. C., Coffee, tea, and incident type 2 diabetes: the Singapore Chinese Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **88**, 979-985 (2008).
- 26) Abeywickrama, K. R. W., Ratnasooriya, W. D., Amarakoon, A. M. T., Oral hypoglycaemic, antihyperglycaemic and antidiabetic activities of Sri Lankan Broken Orange Pekoe Fannings (BOPF) grade black tea (*Camellia sinensis* L.) in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **135**, 278-286 (2011).
- 27) Deguchi, Y., Osada, K., Uchida, K., Kimura, H., Yoshikawa, M., Kudou, T., Yasui, H., Watanuki, M., Effects of Extract of Guava Leaves on the Development of Diabetes in the db/db Mouse and on the Postprandial Blood Glucose of Human Subjects. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci.*, **72**, 923-931 (1998).
- 28) Deguchi, Y., Osada, K., Watanuki, M., Effect of Guava Leaf Extract in Combination with Acarbose or Voglibose on Increased Blood Glucose Level in Sugar-loaded Normal Mice. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci.*, **77**, 207-212 (2003).
- 29) Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., Kakehi, K., Nakamura, J., High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *Anal. Biochem.*, **180**, 351-357 (1989).

- 30) Sang, S., Lambert, J. D., Ho, C., Yang, C. S., The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol. Res.*, **64**, 87-99 (2011).
- 31) Gondoin, A., Grussu, D., Stewart, D., McDougall, G. J., White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. *Food Res. Int.*, **43**, 1537-1544 (2010).
- 32) Phan, M. A. T., Wang, J., Tang, J., Lee, Y. Z., Ng, K., Evaluation of α -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*. *LWT - Food. Sci. Technol.*, **53**, 492-498 (2013).
- 33) Watanabe, K., Kamata, K., Sato, J., Takahashi, T., Fundamental studies on the inhibitory action of *Acanthopanax senticosus* Harms on glucose absorption. *J. Ethnopharmacol.*, **132**, 193-199 (2010).
- 34) Nishioka, T., Kawabata, J., Aoyama, Y., Baicalein, an α -glucosidase inhibitor from *Scutellaria baicalensis*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 1413-1415 (1998).
- 35) Deng, Y., Zhang, X., Shi, Q., Chen, Y., Qiu, X., Chen, B., Anti-hyperglycemic effects and mechanism of traditional Chinese medicine Huanglian Wan in streptozocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, **144**, 425-432 (2012).
- 36) Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 37) Liu, L., Yu, Y. L., Yang, J. S., Li, Y., Liu, Y. W., Liang, Y., Liu, X. D., Xie, L., Wang, G. J., Berberine suppresses intestinal

- disaccharidases with beneficial metabolic effects in diabetic states, evidences from in vivo and in vitro study. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **381**, 371-381 (2010).
- 38) Bissonnette, P., Gagne, H., Coady, M. J., Benabdallah, K., Lapointe, J. Y., Berteloot, A., Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.*, **270**, G833-G843 (1996).
- 39) Nistor Baldea, L. A., Martineau, L. C., Benhaddou-Andaloussi, A., Arnason, J. T., Lévy, É., Haddad, P. S., Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. *J. Ethnopharmacol.*, **132**, 473-482 (2010).
- 40) Yu, L. C. H., Huang, C., Kuo, W., Sayer, H., Turner, J. R., Buret, A. G., SGLT-1-mediated glucose uptake protects human intestinal epithelial cells against *Giardia duodenalis*-induced apoptosis. *Int. J. Parasitol.*, **38**, 923-934 (2008).
- 41) Lee, S. M., Bustamante, S., Flores, C., Bezerra, J., Goda, T., Koldovsky, O., Chronic effects of an alpha-glucosidase inhibitor (Bay o 1248) on intestinal disaccharidase activity in normal and diabetic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 132-137 (1987).
- 42) Tanaka, T., Chemical studies on plant polyphenols and formation of black tea polyphenols. *YAKUGAKU ZASSHI*, **128**, 1119-1131 (2008).
- 43) Speck, M., Cho, Y. M., Asadi, A., Rubino, F., Kieffer, T. J., Duodenal-jejunal bypass protects GK rats from β -cell loss and aggravation of hyperglycemia and increases enteroendocrine cells

- coexpressing GIP and GLP-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **300**, E923-E932 (2011).
- 44) de Luis, D., Domingo, M., Romero, A., Gonzalez Sagrado, M., Pacheco, D., Primo, D., Conde, R., Effects of duodenal-jejunal exclusion on beta cell function and hormonal regulation in Goto-Kakizaki rats. *Am. J. Surg.*, **204**, 242-247 (2012).
- 45) Nishiumi, S., Bessyo, H., Kubo, M., Aoki, Y., Tanaka, A., Yoshida, K., Ashida, H., Green and black tea suppress hyperglycemia and insulin resistance by retaining the expression of glucose transporter 4 in muscle of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 12916-12923 (2010).
- 46) Rahim, A. A., Nofrizal, S., Saad, B., Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Food Chem.*, **147**, 262-268 (2014).
- 47) Bansal, S., Choudhary, S., Sharma, M., Kumar, S. S., Lohan, S., Bhardwaj, V., Syan, N., Jyoti, S., Tea: A native source of antimicrobial agents. *Food Res. Int.*, **53**, 568-584 (2013).
- 48) Nishimura, M., Ishiyama, K., Watanabe, A., Kawano, S., Miyase, T., Sano, M., Determination of theaflavins including methylated theaflavins in black tea leaves by solid-phase extraction and HPLC analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7252-7257 (2007).
- 49) Rosenstock, J., Brown, A., Fischer, J., Jain, A., Littlejohn, T., Nadeau, D., Sussman, A., Taylor, T., Krol, A., Magner, J., Efficacy and safety of acarbose in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **21**, 2050-2055 (1998).

- 50) Chiba, S., Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1233-1239 (1997).
- 51) Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., Zito, S. W., α -Glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr. Res.*, **343**, 1278-1281 (2008).
- 52) Liu, T., Yip, Y. M., Song, L., Feng, S., Liu, Y., Lai, F., Zhang, D., Huang, D., Inhibiting enzymatic starch digestion by the phenolic compound diboside A: A mechanistic and in silico study. *Food Res. Int.*, **54**, 595-600 (2013).
- 53) Kellett, G. L., Brot-Laroche, E., Mace, O. J., Leturque, A., Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.*, **28**, 35-54 (2008).
- 54) Jerrold M.Olefsky, Mechanism of ability of insulin to activate the glucose-transport system in rat adipocytes. *Biochem. J.*, **172**, 137-145 (1978).
- 55) Matosin-Matekalo, M., Mesonero, J. E., Delezay, O., Poiree, J. C., Ilundain, A. A., Brot-Laroche, E., Thyroid hormone regulation of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 in Caco-2 cells. *Biochem. J.*, **334** (Pt 3), 633-640 (1998).
- 56) Mahraoui, L., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Zweibaum, A., Rousset, M., Brot-Laroche, E., Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem. J.*, **298** (Pt 3), 629-633 (1994).

- 57) Surwit, R. S., Seldin, M. F., Kuhn, C. M., Cochrane, C., Feinglos, M. N., Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes*, **40**, 82-87 (1991).
- 58) Dyer, J., Wood, I. S., Palejwala, A., Ellis, A., Shirazi-Beechey, S. P., Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **282**, G241-G248 (2002).
- 59) Deng, Y. X., Chen, Y. S., Zhang, W. R., Chen, B., Qiu, X. M., He, L. H., Mu, L. L., Yang, C. H., Chen, R., Polysaccharide from *Gynura divaricata* modulates the activities of intestinal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Nutr.*, **106**, 1323-1329 (2011).
- 60) Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R., Hatano, T., Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 429-435 (2010).
- 61) Misaka, S., Kawabe, K., Onoue, S., Werba, J. P., Girolì, M., Tamaki, S., Kan, T., Kimura, J., Watanabe, H., Yamada, S., Effects of green tea catechins on cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A activities in human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28**, 244-249 (2013).
- 62) Choi, J. S., Burm, J. P., Effects of oral epigallocatechin gallate on the pharmacokinetics of nicardipine in rats. *Arch. Pharm. Res.*, **32**, 1721-1725 (2009).

- 63) Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H., Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch. Toxicol.*, **82**, 667-715 (2008).
- 64) Robert L. Walsky and R. Scott Obach, Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab. Dispos*, **32**, 647-660 (2004).
- 65) Obach, R. S., Zhang, Q. Y., Dunbar, D., Kaminsky, L. S., Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome p450s. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 347-352 (2001).
- 66) Kim, D., Kim, K., Isin, E. M., Guengerich, F. P., Chae, H. Z., Ahn, T., Yun, C., Heterologous expression and characterization of wild-type human cytochrome P450 1A2 without conventional N-terminal modification in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, **57**, 188-200 (2008).
- 67) Tang, C., Fang, Y., Booth-Genthe, C., Kuo, Y., Kuduk, S. D., Rushmore, T. H., Carr, B. A., Diclofenac hydroxylation in monkeys: Efficiency, regioselectivity, and response to inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 880-890 (2007).
- 68) Shimizu, M., Uno, T., Niioka, T., Yau-Furukori, N., Takahata, T., Sugawara, K., Tateishi, T., Sensitive determination of omeprazole and its two main metabolites in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography: Application to pharmacokinetic study in relation to CYP2C19 genotypes. *J. Chromatogr. B*, **832**, 241-248 (2006).
- 69) Quintieri, L., Fantin, M., Palatini, P., De Martin, S., Rosato, A., Caruso, M., Geroni, C., Floreani, M., In vitro hepatic conversion of

- the anticancer agent nemorubicin to its active metabolite PNU-159682 in mice, rats and dogs: A comparison with human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 784-795 (2008).
- 70) Khemawoot, P., Nishino, K., Ishizaki, J., Yokogawa, K., Miyamoto, K., Circadian rhythm of cytochrome P4502E1 and its effect on disposition kinetics of chlorzoxazone in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **574**, 71-76 (2007).
- 71) Baltes, M. R. H., Dubois, J. G., Hanocq, M., Ethyl acetate extraction procedure and isocratic high-performance liquid chromatographic assay for testosterone metabolites in cell microsomes. *J. Chromatogr. B : Biomed. Sci. Appl.*, **706**, 201-207 (1998).
- 72) Nagata, M., Hidaka, M., Sekiya, H., Kawano, Y., Yamasaki, K., Okumura, M., Arimori, K., Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 2C9 and tolbutamide pharmacokinetics in rats. *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 302-305 (2007).
- 73) Jaakkola, T., Laitila, J., Neuvonen, P. J., Backman, J. T., Pioglitazone is metabolised by CYP2C8 and CYP3A4 in vitro: potential for interactions with CYP2C8 inhibitors. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **99**, 44-51 (2006).
- 74) Feng, Q., Torii, Y., Uchida, K., Nakamura, Y., Hara, Y., Osawa, T., Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P450 1A1 in cell cultures. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 213-220 (2002).
- 75) Vaidyanathan, J. B., Walle, T., Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 745-752 (2003).

- 76) Jodoin, J., Demeule, M., Beliveau, R., Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochim. Biophys. Acta*, **1542**, 149-159 (2002).
- 77) Chu, K. O., Wang, C. C., Chu, C. Y., Rogers, M. S., Choy, K. W., Pang, C. P., Determination of catechins and catechin gallates in tissues by liquid chromatography with coulometric array detection and selective solid phase extraction. *J. Chromatogr. B*, **810**, 187-195 (2004).
- 78) da Silva Pinto, M., Tea: A new perspective on health benefits. *Food Res. Int.*, **53**, 558-567 (2013).
- 79) Szachowicz-Petelska, B., Skrzydlewska, E., Figaszewski, Z., Protective effect of black tea on integral membrane proteins in rat liver. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **65**, 173-179 (2013).
- 80) Argent, N. B., Liles, J., Rodham, D., Clayton, C. B., Wilkinson, R., Baylis, P. H., A new method for measuring the blood volume of the rat using $^{113\text{m}}$ Indium as a tracer. *Lab. Anim.*, **28**, 172-175 (1994).