

血糖値改善機能を有する醗酵グアバの開発

鎌田靖弘、豊川哲也、比嘉賢一、藤野哲也¹、有銘興博¹、与那覇 恵¹

1 はじめに

糖尿病で現在、入院や通院している患者の総数は糖尿病予備軍を含めると、1370万人にのぼると考えられていることから、糖尿病病態改善機能を有する食品素材の市場および対象消費者の規模はとてつもなく巨大なものである¹⁾。この病態改善はデンプン分解酵素の α -アミラーゼや2糖類分解酵素の α -グルコシダーゼを阻害することにより達成可能であり、これらの阻害剤が糖尿病の治療薬として臨床で用いられている。

工業技術センターでは平成11年度より、健康増進に資する機能性食品素材を開発することを最終目標にし、①県内に存在する生物資源の総合的な収集・保管・管理、②生物資源の機能性評価マップの作成とデータベース化、③商品化を見据えた生物資源の選択と加工法の開発という3段階が必要であると考え、試験研究を行ってきた^{2,3)}。

本報告では③のステップへの展開として、これまで糖尿病の病態改善の指標として行ってきた糖類分解酵素阻害活性の試験結果^{2,3)}を基に、グアバを素材として選択した。グアバは和名でバンシロウ (*Psidium guajava* L.)

と呼ばれ、南アメリカ原産の約3mになるフトモモ科の果樹である。用途は主に青果・ジュースとしてハワイ等で盛んに用いられ、台湾では葉をお茶として用いられている⁴⁾。このように食経歴もあり、資源量も県内に存在する。

今回、厚生労働省の特定保健用食品の認可取得を目指して、(株)琉球バイオリソース開発と共同でグアバの製品化を行い、“醗酵グアバ”を開発した(図1)。そこで、プラントレベルで製造した試作品を用いて動物試験を行い、血糖値上昇抑制効果(糖尿病予防)を確認した。

2 実験方法

2-1 試料の調製

熱風乾燥したグアバ葉を粉碎し、水、精製廃糖蜜、乳酸菌群を添加して嫌氣的発酵を行った。発酵後、熱風乾燥機にて乾燥したものを約1mm角に粉碎して醗酵グアバを調製した。



特徴：

1. 嗜好性の改善
2. 抗酸化性の維持
3. ミネラル増加

主として乳酸菌発酵による
高付加価値化



図1 醗酵グアバの開発

¹株式会社 琉球バイオリソース開発

醱酵グアバ50%エタノール抽出物 (F.G.-EtOH Ext.) は、醱酵グアバ1gに対し50%エタノール10mLを添加し、室温下12時間静置して抽出を行い、抽出液を遠心エバポレーターで乾固した後、所定の濃度になるように蒸留水で懸濁した溶液を実験に供した。

醱酵グアバ熱水抽出物 (F.G.-H.W.Ext.) は、醱酵グアバ10kgを蒸留水100Lで100℃、1時間の熱水抽出を行い、放冷後、珪藻土濾過した上清を、スプレードライヤーにて乾燥し、蒸留水で適宜再溶解した。また、比較対照としてグアバ葉50%エタノール抽出物 (G.-EtOH Ext.) も同様に調製した。

2-2 糖類分解酵素阻害活性試験

F.G.-EtOH Ext.とF.G.-H.W.Ext.について α -アミラーゼ阻害活性試験は既報²⁾の通り行い、 α -グルコシダーゼおよびスクラーゼ阻害活性試験は別報³⁾の通り行った。なお、50%阻害率(IC₅₀)は各抽出液の希釈系列について阻害率を求め、阻害率が50%になる時の濃度(mg/ml)とした。

2-3 動物試験

正常マウスへの経口糖負荷による単回投与試験は、5および6週齢のICRマウス (日本チャールス・リバー株式会社) を1週間馴化飼育した後に行った。血糖値は12時間絶食させた後に胃ゾンデを用いて各抽出物を単回経口投与し、その30分後に負荷物質を投与して尾静脈血の血糖値を血糖値測定装置(デキスターZII、バイエルメディカル社)により経時的に測定した。

病態モデル動物を用いた長期投与試験は、4週齢のII型糖尿病(NIDDM)モデル動物 (KK-Ay Ta Jel, SPF、日本クレア社) を1から2週間馴化した後、醱酵グアバを餌に配合して自由給餌あるいは連日経口投与にて摂取させ、2週間毎に所定時間絶食時の尾静脈血の血糖値を測定した。糖化ヘモグロビン値を尾静脈血について小型HbA1c, Malb/Cアナライザー (DCA2000システム、バイエルメディカル株式会社)にて測定した。剖検は全例について、飼育最終日の翌日に実施し、主要臓器について肉眼的に観察した。肝臓および腎臓(両腎)については臓器重量を測定し、静脈毛細管血の血漿中インスリン濃度、総コレステロール濃度、中性脂肪濃度およびトランスアミナーゼ活性を、各々Mouse Insulin ELISA Kit (フナコシ社)、T-CHOキット (カイノス社)、TG-ENキット (カイノス社) およびTA-LNキット (カイノス社)を用いて測定した。

なお、動物飼育条件は実験期間中を通じて温度25±1℃、相対湿度55±10%、換気回数15回/時、明暗時間12

時間に設定した飼育室で、滅菌したポリカーボネート製ケージ(215×320×130mm)を用いて1匹ずつ飼育した。飼料は調製した半精製飼料または市販の固形飼料CE-II (日本クレア社製)を、飲料水は公共水道水を各々自由摂取させた。

2-4 統計学的処理

すべての測定値の比較はSASプログラムを用いてダンカンの新多重範囲検定およびTukeyの多重比較により行った。

3 結果と考察

3-1 糖類分解酵素阻害活性

F.G.-EtOH Ext.について各糖類分解酵素に対するIC₅₀を測定した結果、いずれの酵素も強く阻害を受けることが認められた(表1)。また、 α -アミラーゼ阻害活性のIC₅₀は α -グルコシダーゼおよびスクラーゼと比較して約140倍の強度を示した。

表1 F.G.-EtOH Ext.における各種糖類分解酵素阻害活性のIC₅₀

酵素名	IC ₅₀ (mg/ml)
α -アミラーゼ	0.13
α -グルコシダーゼ	18.40
スクラーゼ	18.63

3-2 動物試験

3-2-1 単回投与試験

可溶性デンプン、マルトースおよびスクロースを負荷した場合の、血糖値変化をF.G.-EtOH Ext.およびF.G.-H.W.Ext.について検討した。

F.G.-EtOH Ext.の投与条件を表2に、血糖値変化を図2に示す。負荷物質投与直後(0分値)の血糖値を1としたときの割合で示した。その結果、可溶性デンプン負荷試験(A)での血糖値は、有意な低下作用は認められなかった。

マルトース負荷試験(B)での血糖値は、投与60分後のG.-EtOH Ext.投与群の血糖値は、対照群と比較して有意(P<0.05)に低下し、F.G.-EtOH Ext.投与群の血糖値では、低下傾向(P<0.20)を示した。

スクロース負荷試験(C)では、対照群と比較してG.-EtOH Ext.投与群の血糖値は投与後60、90および120分後で有意(P<0.05)に高値を示し、F.G.-EtOH Ext.投与

表2 単回投与試験における50%エタノール抽出物の投与条件

各負荷試験における投与群	投与量 (mg/kg B.W.)	糖質負荷量 (mg/kg B.W.)	動物数
可溶性デンプン負荷試験			
対照群	0	2000	3
F.G.-EtOH Ext.投与群	250	2000	3
G.-EtOH Ext.投与群	250	2000	3
マルトース負荷試験			
対照群	0	2000	3
F.G.-EtOH Ext.投与群	500	2000	3
G.-EtOH Ext.投与群	500	2000	3
スクロース負荷試験			
対照群	0	2000	3
F.G.-EtOH Ext.投与群	500	2000	3
G.-EtOH Ext.投与群	500	2000	3

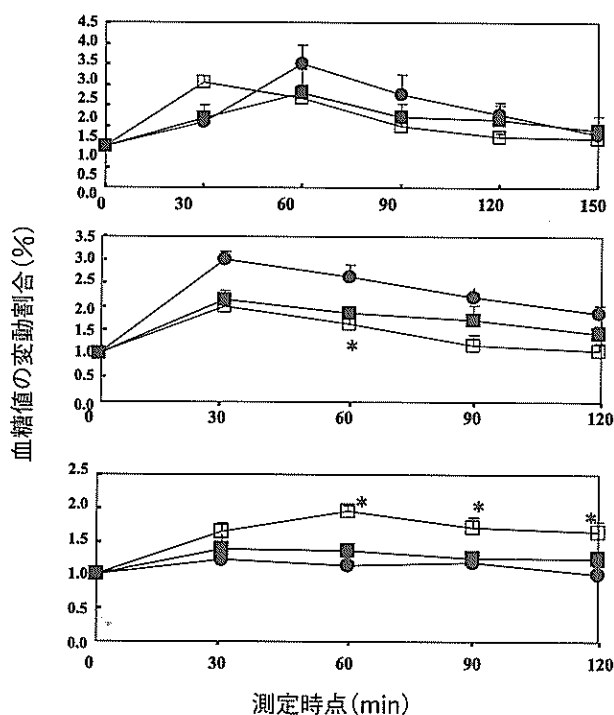


図2 単回投与試験においてF.G.-EtOH Ext.が血糖値変動に与える影響

(A) 可溶性デンプン負荷試験
 (B) マルトース負荷試験
 (C) スクロース負荷試験
 ● 対照群, ■ F.G.-EtOH Ext. 投与群
 □ G.-EtOH Ext. 投与群
 値は平均値(n=3)を示し、エラーバーは標準誤差を示す。
 *: 対照群に対し有意差 (P < 0.05) が認められる。

群では対照群との間に変化が見られなかった。

これらの結果より、G.-EtOH Ext.およびF.G.-EtOH Ext.には、マルトース負荷試験での血糖値上昇抑制効果

が確認でき、その主な作用点は α -グルコシダーゼによるマルトースからグルコースへの分解過程を阻害することによって達成されたことが示唆された。

*in vitro*での α -アミラーゼ阻害活性試験では、強い阻害活性を示したのにもかかわらず、*in vivo*での可溶性デンプン負荷試験では顕著な効果が見られなかった。これは α -アミラーゼ阻害物質が消化管内におけるpH変動や胆汁酸とのエマルジョン形成等によって活性が低下したものと推察された。

F.G.-H.W.Ext.の投与条件を表3に、血糖値変化を図3に示す。可溶性デンプン負荷試験(A)では、いずれの測定点においても血糖値上昇抑制効果は認められず、逆に投与120分後の低用量投与群の血糖値が対照群および高用量投与群と比較して有意(P<0.05)に高値を示した。一方、マルトース負荷試験(B)では、対照群との間に有意差は認められなかった。

スクロース負荷試験(C)では、負荷後30分から120分間で、いずれの群においても対照群と比較して低値を示し、負荷後90分時の低用量投与群は、対照群に対してP<0.05で有意に低下し、血糖値上昇抑制効果が認められた。このことから、F.G.-H.W.Ext.の血糖上昇抑制作用は、スクラーゼを阻害することにより達成されるものと推察された。

以上の結果より、醗酵グアバは*in vivo*において、消化吸収の過程で主に α -グルコシダーゼおよびスクラーゼを阻害することにより血糖値上昇抑制効果を発揮することが示唆された。

3-2-2 長期投与試験

糖尿病自然発症マウス (KK-Ay) を長期飼育し、F.G.-H.W.Ext.強制経口投与(60日間) および粉末醗酵グアバ

表3 単回投与試験におけるF.G.-H.W.Ext.の投与条件

各負荷試験における投与群	投与量 (mg/kg B.W.)	糖質負荷量 (mg/kg B.W.)	動物数
可溶性デンプン負荷試験			
対照群	0	2000	3
低用量投与群	250	2000	3
高用量投与群	250	2000	3
マルトース負荷試験			
対照群	0	2000	3
低用量投与群	500	2000	3
高用量投与群	500	2000	3
マルトース負荷試験			
対照群	0	2000	3
低用量投与群	500	2000	3
高用量投与群	500	2000	3

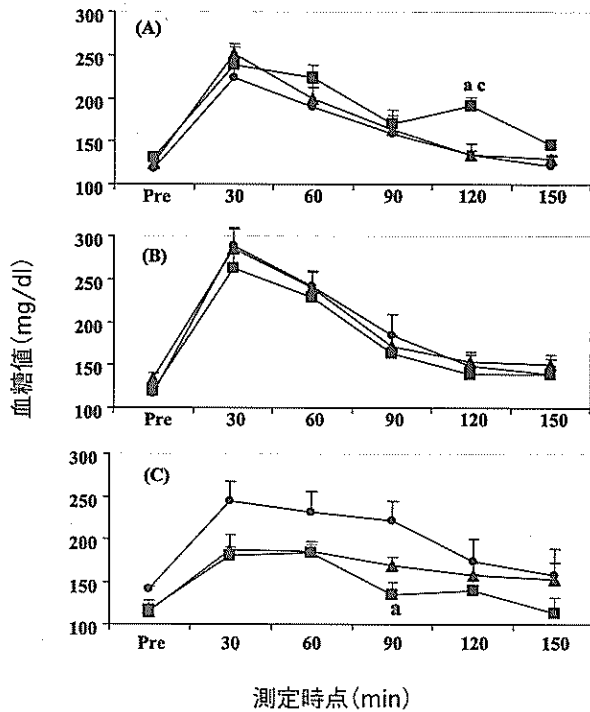


図3 単回投与試験においてF.G.-H.W.Ext.投与量の変化が血糖値変動に与える影響

(A) 可溶性デンプン負荷試験
 (B) マルトース負荷試験
 (C) スクロース負荷試験
 ●-対照群, □-低用量投与群
 ▲-高用量投与群
 値は平均値 (n=3) を示し、エラーバーは標準誤差を示す。
 a : 対照群に対し有意差 (P < 0.05) が認められる。
 c : 高用量投与群に対し有意差 (P < 0.05) が認められる。

自由給餌 (8週間) が血糖値に与える影響を検討した。

F.G.-H.W.Ext.を胃ゾンデにより強制経口投与 (低用量(250mg/kg B.W.)および高用量(500 mg/kg B.W.))した場合の血糖値変化を図4に示す。なお、血糖値は12時間絶食時の値である。低用量群での血糖値は対照群と比較して有意差は見られなかった。一方、高用量群での血糖値は、投与21日目(P=0.15)で対照群と比較して低下傾向を示した。この事から、F.G.-H.W.Ext.を摂取することで、糖尿病病態である空腹時血糖値の高値改善効果が期待できた。

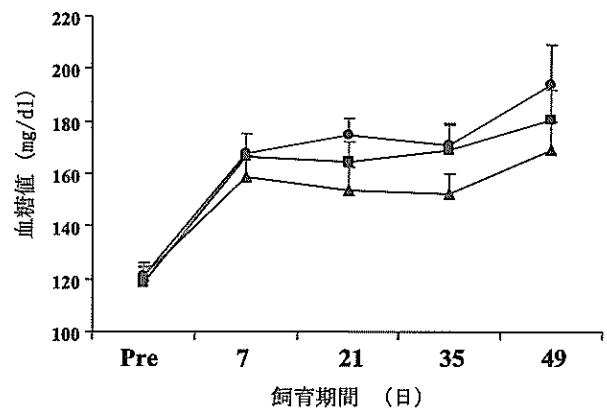


図4 長期投与試験においてF.G.-H.W.Ext.の経口投与がKK-Ayマウスの空腹時血糖値に与える影響

●-対照群, □-低用量投与群 ▲-高用量投与群
 値は平均値 (n=8) を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

また、摂水量の推移を図5に示した。低用量投与群では投与第4日目および33日に、高用量投与群では投与第4および20日に、各々対照群に対して $P < 0.05$ で有意に低値を示した。このことから、F.G-H.W.Ext.摂取により、糖尿病疾患の症状である多飲の改善が認められた。データは示さないが、一日平均の体重増加量および摂餌量、また体重当たりの肝臓重量は3群間に差は認められなかった。腎臓重量は対照群($12.3 \pm 0.3 \text{ mg/gB.W.}$)と比較して、低用量群($11.7 \pm 0.2 \text{ mg/gB.W.}$)、高用量群($11.6 \pm 0.3 \text{ mg/gB.W.}$)で低下傾向($P < 0.20$)を示した。また血漿インスリン量は群間で差はなかったが、糖化ヘモグロビン量は対照群($10.05 \pm 0.43\%$)と比較して、低用量群($8.03 \pm 0.72\%$)、高用量群($8.54 \pm 0.54\%$)で低下傾向($P < 0.22$)を示した。この事からも醗酵グアバのF.G-H.W.Ext.には糖尿病予防効果が推察された。

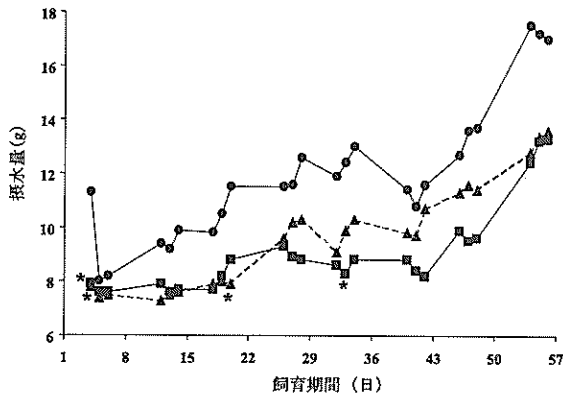


図5 長期投与試験においてF.G.-H.W.Ext.の経口投与がKK-Ayマウスの摂水量に与える影響

●-対照群, ■-低用量投与群 ▲-高用量投与群
値は平均値(n=8)を示す。
*対照群に対し有意差 ($P < 0.05$) が認められる。

醗酵グアバ配合飼料を自由給餌させ長期飼育して、血糖値変化を測定した。常法⁹⁾に準じて測定したグアバの栄養成分組成を表4に、配合飼料の食餌組成を表5に示す。今回は、醗酵グアバの配合量を飼料として置換できる最大量の8%に設定した。

表4 醗酵グアバおよびグアバ葉の栄養成分組成 (%)

	醗酵グアバ	グアバ葉
水分	8.65	6.42
タンパク質	5.89	6.11
脂質	2.39	2.32
灰分	3.47	3.43
繊維	59.61	59.61
糖質	19.99	22.11
合計	100.00	100.00

表5 醗酵グアバおよびグアバ葉配合飼料の食餌組成 (%)

	対照群	醗酵グアバ配合飼料群	グアバ葉配合飼料群
カゼイン	22.00	21.79	21.79
ラード	6.00	5.70	5.71
ミネラル類	3.50	3.01	3.00
ビタミン類	1.00	1.00	1.00
塩化コリン	0.10	0.10	0.10
セルロース	5.00	-	-
β -コーンスターチ	62.40	60.40	60.40
醗酵グアバ	-	8.00	-
グアバ葉	-	-	8.00
合計	100.00	100.00	100.00

6時間絶食時の血糖値の変化を図6に示す。測定開始21日目には、醗酵グアバ配合飼料群およびグアバ葉配合飼料群共に血糖値が対照群の50%以下に有意($P < 0.01$)に低下し、以後実験終了8週目までその空腹時の血糖値上昇抑制効果が持続した。

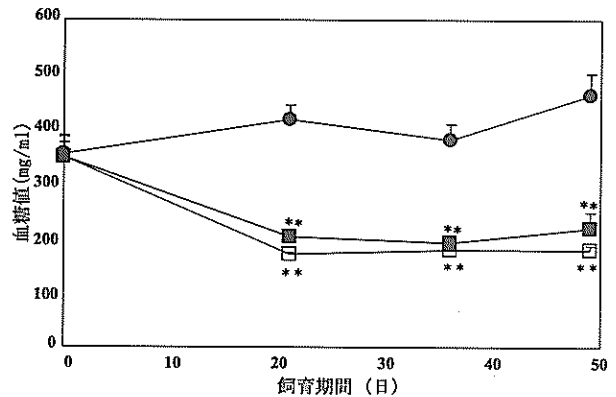


図6 長期投与試験において醗酵グアバ配合飼料の自由摂餌がKK-Ayマウスの空腹時血糖値に与える影響

●-対照群, ■-醗酵グアバ配合飼料群
□-グアバ葉配合飼料群
値は平均値(n=10)を示し、エラーバーは標準誤差を示す。
**対照群と比較し、有意差 ($P < 0.01$) が認められる。

また、摂食量は共に全群間に有意差は認められなかったが、一日体重増加量は対照群と比較して両配合飼料群で共に低下傾向($P = 0.25$)を示した。このことから、グアバにはダイエット効果が期待できた。一方、摂水量について、対照群は糖尿病疾患に特徴的な多飲の症状がみられたが、醗酵グアバ配合飼料群およびグアバ葉配合飼料群を摂取した2群では、試験開始時直後から摂水量が対照群と比較して有意($P < 0.01$)に低下しており、試験終了時の時点でも摂水量が対照群の約40%と有意($P < 0.01$)な低下が持続していた(表6)。これらのことから、糖尿病疾

表6 長期投与試験において醗酵グアバ配合飼料の自由給餌がKK-Ayマウスの摂水量 (ml/mouse/day) に与える影響

	対照群	醗酵グアバ 配合飼料群	グアバ葉 配合飼料群
実験開始時	22.8±3.2	9.5±1.2**	6.8±0.9**
実験終了時	25.0±1.1	10.2±0.5**	8.0±0.6**

平均値±標準誤差を示す。**対照群に対して、有意差(p<0.01)が認められる。

患である多飲の改善が認められた。

さらに、糖化ヘモグロビン量 (図7) も対照群と比較して醗酵グアバ配合飼料群で34.9%、グアバ葉配合飼料群で39.5%と共に有意に(P<0.01)低下し、血糖値の低下状況をよく反映していた。血漿インスリン濃度 (図8) は対照群と比較して醗酵グアバ配合飼料時に34.5%へ、グアバ葉配合飼料時には40.2%へ、共に有意(P<0.01)に低下した。肥満型糖尿病モデルKK-Ayマウスは血中インスリンの上昇、末梢組織のインスリン抵抗性 (インスリンレセプター機能低下による高血糖) が早期に且つ高率に発症すると報告されている⁷⁾。本試験ではグアバの摂取によって、血漿インスリン濃度は低下していながら血糖値も低下する事から、インスリン抵抗性の改善が認められた。

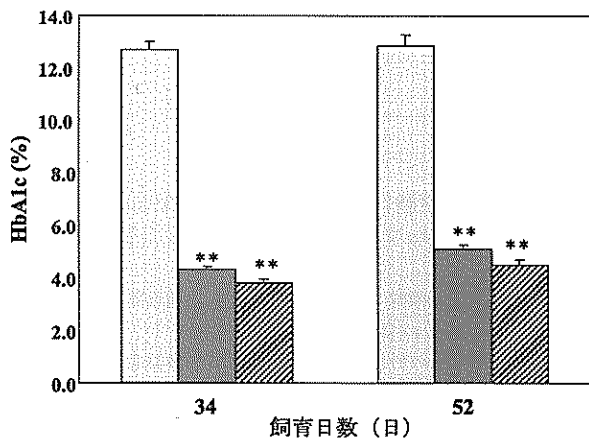


図7 各配合飼料給餌後34日目および52日目における糖化ヘモグロビン量

□ 対照群 ▨ 醗酵グアバ配合飼料群 ▩ グアバ葉配合飼料群
 値は平均値(n=10)を示し、エラーバーは標準誤差を示す。
 **対照群に対し有意差 (P < 0.01) が認められる。

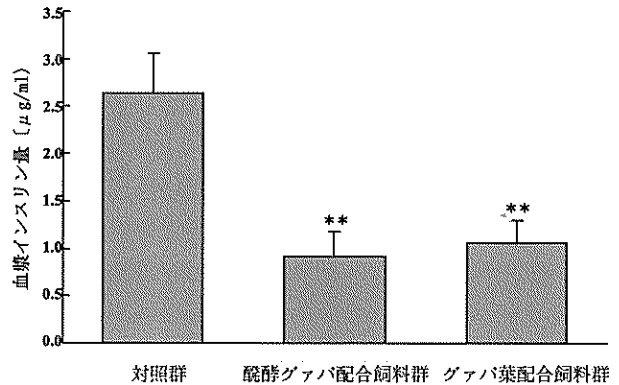


図8 長期投与試験において醗酵グアバ配合飼料の自由給餌がKK-Ayマウスの血漿インスリン量に与える影響

値は平均値(n=10)を示し、エラーバーは標準誤差を示す。
 **対照群に対し有意差 (P < 0.01) が認められる。

体重当たりの腎重量は対照群と比較してグアバ葉配合飼料群で75%、醗酵グアバ配合飼料群で76%の有意(p<0.05)な低下が認められた。血漿中性脂肪量、血漿総コレステロール量および肺重量に変化は認められなかった。体重当たりの肝重量では、対照群と比較して醗酵グアバ配合飼料群で150%、グアバ葉配合飼料群で133%の重量増加が認められた。剖検においても、両配合飼料群の肝臓はグアバ葉粉末の類似の灰色を呈しており、グアバ葉成分の代謝が追いつかずに、蓄積されているものと考えられた。そこで血漿GPT活性を調べたが、両群で若干の上昇は認められたが有意差はなかった。本実験はグアバ葉の配合量を最大置換量である8%で検討したが、今後配合量を低下させ再試験を行いたい。

4 まとめ

以上、醗酵グアバの動物試験における機能性評価結果をまとめると、まず正常マウス(ICR)でのマルトースおよびスクロース負荷試験による血糖値上昇抑制効果の傾向があり、次に自然発症糖尿病マウス(KK-Ay)での空腹時高血糖値の改善、インスリン抵抗性の改善、血中糖化

ヘモグロビンの低下および多飲の改善が認められたことから、醗酵グアバには糖尿病の予防・遅延効果を有することが明らかになった。

今後は、有効成分の同定・定量化および臨床試験での効能実証を行っていく予定である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なご指導・ご鞭撻を下さいました、琉球大学医学部保健技術学講座臨床病理学分野の真栄平房子教授並びに保健生物学分野の高嶺房枝助教授に深く心から感謝致します。

参考文献

- 1) 中川邦男、日本の健康機能食品 トクホ[特定保健用食品] ブックマン社 (1999)
- 2) 豊川哲也、鎌田靖弘、与座江利子 沖縄県工業技術センター研究報告第2号 pp.35-57 (2000)
- 3) 鎌田靖弘、豊川哲也 沖縄県工業技術センター研究報告第3号、pp.77-89 (2001)
- 4) 堀田満他 世界有用植物事典 平凡社 p.868 (1996)
- 5) 鎌田靖弘、豊川哲也、照屋正映、吉田安彦、花城薫、新垣美香、上地美香 沖縄県工業技術センター研究報告第4号 pp.77-84 (2002)
- 6) 科学技術庁資源調査会食品分析部会編、五訂 日本食品標準分析表分析マニュアル (社)資源協会 pp.1-43 (1997)
- 7) 小川佳宏、中尾一和 生化学 72 (7) pp.554-558 (2000)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。