

自然発症 2 型糖尿病モデルラットに対する ココナッツ酵素製剤の抗糖尿病作用

江頭伸昭¹⁾，淵上裕子¹⁾，高垣祐紀¹⁾，西田 翔²⁾，吉田 都²⁾，藤岡稔大²⁾，三島健一¹⁾，岩崎克典¹⁾，中村陽介³⁾，持田 肇³⁾，藤原道弘¹⁾

Antidiabetic effect of Coconuts product in diabetic Goto-Kakizaki rats

Nobuaki EGASHIRA, Hiroko FUCHIGAMI, Yuki TAKAGAKI,
Sho NISHIDA, Miyako YOSHIDA, Toshihiro FUJIOKA,
Kenichi MISHIMA, Katsunori IWASAKI, Yosuke NAKAMURA,
Hajimu MOCHIDA, Michihiro FUJIWARA

- 1) 福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室
- 2) 福岡大学薬学部機器分析学教室
- 3) (株)虹のはし

はじめに

近年、高齢化や生活習慣の変化に伴って悪性新生物、心疾患、脳血管疾患という3大死因の全死亡に占める割合は増大している。その3大死因と深く関わり死の四重奏と呼ばれる高血圧症、糖尿病、高脂血症、肥満は、総エネルギー、脂肪、塩分の過剰摂取といった食生活、運動不足、喫煙、過剰な飲酒、過度のストレスなどのいわゆる生活習慣がリスク要因となって発症することが多く、その対策は大きな課題となっている¹⁾。特に糖尿病患者は増加傾向にあり、厚生労働省が平成14年度に行った糖尿病実態調査によると、糖尿病が強く疑われるヒトは約740万人、糖尿病の可能性を否定できないヒトを合わせると約1620万人に及んでいる²⁾。その理由として糖尿病は合併症を発症するまで目立った自覚症状がないこと、良好な食生活を長期間継続することが困難であることが考えられる。これらの問題を解決するために糖質の消化や吸収さらには血糖の上昇を抑制する健康食品や機能性食品などの研究開発が盛んに行われている。しかしながら、有効性の裏付けを持たないままに健康食品の宣伝や販売がさ

れている例も見受けられる。

そこで今回、我々は糖尿病などに効果があるとされるココナッツ酵素製剤の抗糖尿病作用について、日本人に多いとされる2型糖尿病（インスリン非依存性）のモデル動物である自然発症2型糖尿病ラット（Goto-Kakizakiラット、GKラット）^{3,4)}を用いて検討を行った。

1. 実験材料ならびに実験方法

実験試料

ココナッツ酵素製剤（商品名：虹の源、虹のはしより供与）は、主原料であるココナッツに、さらに天然メシマコブ等のキノコ類、ニンニク、松の実、海藻および果物など14種類の素材を加えて発酵させた酵素飲料である（表1）。

蛋白質定量（Bradford法⁵⁾）

酵素水中の蛋白質濃度をプロテインアッセイキット（Bio-Rad Laboratories, California, USA）を用いて定量

した。

還元糖の同定

6穴プレートに精製水、酵素水、0.1% BSA、13.3%グルコースをそれぞれ1 mLずつ入れ、そこにビウレット試薬4 mLずつを混ぜ、よく攪拌し室温で放置して試料の色の変化を観測した。一方、酵素水720 mLに4倍量のエタノール(2880 mL)を加え、80%エタノール溶液とした。80%エタノール溶液を4°C、6000 rpm、15 minの条件で遠心分離した。上清を濃縮乾固したものを水に溶かし、水と同量のヘキサンを加え3回分配した。同様にクロロホルム、酢酸エチル、n-ブタノールの順に分配し、それぞれを濃縮乾固した。さらに、酵素水を標品のグルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、サッカロースおよびトレハロースとともにクロロホルム：メタノール：水 = 6 : 4 : 1 を展開溶媒として、薄層クロマトグラフィーで展開した。

ポリフェノールの定量 (Folin-Denis 法)

Folin-Denis 法⁶⁾に準じ、酵素水中のポリフェノール含量の定量を行った。

実験動物ならびに飼育方法

実験動物は、4週齢の雄性GK/Jclラット(日本クレア株式会社、東京)を用いた。飼育方法はプラスチックケージの中に、室温23±2°C、絶対湿度60±2%、および12時間の明暗サイクル(AM7:00点灯)の動物室で飼育した。なお、餌(CE-2; 日本クレア株式会社、東京)と水(蒸留水または3%酵素水)は自由に摂取できるようにした。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験委員会(Experimental animal care and use committee)に準じた。

実験スケジュール

動物入荷日から1週間飼育(餌:CE-2 および水を自由摂取)したのち、蒸留水投与群と3%酵素水投与群の2群(蒸留水投与群 $n=7$, 3%酵素水投与群 $n=8$)に群分けし、4週齢からそれぞれの自由摂取を開始した。3%酵素水は給水瓶に入れ持続的に自由摂取させた。体重測定は約7日おきに行い、血糖値測定を酵素水投与5日目と21日目に行った。さらに投与開始から約6週間後に糖負荷試験、血液生化学検査および肝臓重量の測定を行った。

血糖値測定

血糖値測定は投与5日目と21日目の午後に行った。測定日の午前中から絶食を行った。採血は尾静脈から行い、小型血糖測定機(グルテストエースR、株式会社三和化学研究所)で計測を行った。

糖負荷試験

さらに抗糖尿病作用を検討するために糖負荷試験を行った。糖負荷試験は、酵素水投与開始から約6週間後に行った。糖負荷試験の前日に、約20時間の絶食(飲料水は自由摂取)を行った。20%グルコースを各実験動物に経口投与し、投与開始直後および30分後にそれぞれ測定を行った。採血は尾静脈から行い、小型血糖測定機(グルテストエースR、株式会社三和化学研究所)で計測を行った。

血液生化学検査

実験最終日の前日に絶食させ、最終日に麻酔下(pentobarbital 50 mg/kg)で開腹し後大静脈から、予め血液の凝固を防ぐためにヘパリン(扶桑薬品工業)を通したシリンジ(テルモ、1 mL)を用いて採血した。採血した血液はシリンジについている注射針(テルモ、20G×3/4)を外してゆっくり専用のチューブに移し、それを小型遠心分離機にかけた後、得られた血漿を臨床化学自動分析装置(スポットケムEZ SP-4430, ARKRAY 株式会社、京都)で分析を行った。また、肝臓重量の測定も併せて行った。

統計処理

得られた測定値は、平均値±標準誤差で表した。対照群と処置群との間の有意差はunpaired t -検定を用いて検定し、 $P<0.05$ を有意差とみなした。

2. 実験結果

蛋白質濃度

酵素水中に12.34 μ g/mLの蛋白質が含まれていた。

還元糖の同定

酵素水および13.3%グルコースではビウレット試薬中の硫酸銅が還元され、亜酸化銅が生成され色が変化した(図1)。このことから、酵素水中に還元糖が含まれることが考えられた。さらに薄層クロマトグラフィーの結果から、酵素水中にグルコースならびにフルクトースが含まれることがわか

った (図2).

ポリフェノール含量

酵素水中に 99.7-102.5 $\mu\text{g/mL}$ のタンニン酸に相当するポリフェノール成分が含有されていた.

体重

酵素水は、体重の変化に影響しなかった (図3). また、摂水量や摂食量に対しても特に変化はみられなかった.

血糖値

通常 Wistar ラットの血糖値は 100 mg/dL 程度であるが、今回使用した GK ラットの血糖値は 150-200 mg/dL であり、高血糖を示した. 酵素水は、この GK ラットの高血糖に対して有意に血糖値を低下させた (図4).

糖負荷試験

糖負荷試験では前日から絶食させていることから、GK ラットの血糖値は 100 mg/dL 程度と通常の時に比べて低下していた (負荷前、蒸留水群: 108 ± 6.5 dL, 酵素水群: 81.3 ± 5.0 dL). これに対して 20%グルコースの経口投与を行うと、30 分後には血糖値が上昇し、高血糖状態がみられた (負荷後、蒸留水群: 155.3 ± 9.9 dL, 酵素水群: 123.7 ± 3.8 dL). 一方、酵素水投与群では、グルコースによる血糖値の上昇はみられるものの糖負荷前および負荷後に有意な血糖値の低下がみられた ($P < 0.05$., 図5).

血液生化学検査値

肝臓重量、肝機能 (GOT および GPT)、総コレステロール値および HDL コレステロール値は、酵素水によって特に変化はみられなかった (表2). また、酵素水投与群においてトリグリセリド (中性脂肪) の有意な低下が観察された.

3. 考察

ココナッツ酵素製剤は、GK ラットの高血糖に対して抑制作用を示し、投与5日目まで有意に血糖値を低下させた. さらに、ココナッツ酵素製剤は、20%グルコースの経口投与による血糖値の上昇に対しても有意な抑制作用を示した. これらのことから、ココナッツ酵素製剤は、2型糖尿病モデル (インスリン非依存性) である GK ラットの高血糖に対して抗糖尿病作用を有していることが示唆された. 糖尿病は初期段階とし

て食後高血糖が観察され、慢性的な食後高血糖を経て空腹時血糖値の上昇へと進展すると考えられている⁷⁾. したがって、ココナッツ酵素製剤は食後の血糖上昇を抑制することで糖尿病の発症や進展を軽減する可能性が示唆された.

今回、ココナッツ酵素製剤に含まれる成分について検討を行ったところ、蛋白質、還元糖およびポリフェノール成分が含まれることが明らかとなった. ポリフェノールの抗糖尿病作用についてはいくつか報告があり、赤ワインや白ワインポリフェノールはストレプトゾトシン誘発の糖尿病ラットに対して抗糖尿病作用を有することが報告されている^{8,9)}. また、緑茶ポリフェノールはアロキサン誘発の糖尿病ラットに対して抗糖尿病作用を有し、この作用に抗酸化作用が関係していることが報告されている¹⁰⁾. これらのことから、ココナッツ酵素製剤の抗糖尿病作用において含有するポリフェノールの関与が示唆された.

一方、ココナッツ酵素製剤によって、体重、肝機能 (肝臓重量、GOT、GPT) および総コレステロール値などには特に変化がみられないことから、ココナッツ酵素製剤の抗糖尿病作用は、これらの要因によるものではないことが考えられた. また、今回興味深いことに、ココナッツ酵素製剤によってトリグリセリド (中性脂肪) の有意な低下が観察された. このことから、ココナッツ酵素製剤は、抗糖尿病作用の他に中性脂肪を減少させる作用も有している可能性が示唆された.

表1に示すように、ココナッツ酵素製剤には様々な原料が使用されている. その中でもにんにくやその中に含まれるアリシンが体内で変化したジアリルトリスルフィドあるいはバナナは抗糖尿病作用を示すことが報告されている¹¹⁻¹³⁾. さらに、さるのこしかけ (霊芝) は、日本では民間薬として高脂血症や糖尿病など種々の疾病に用いられており、近年、霊芝の研究から、血漿コレステロール低下や血糖降下、抗腫瘍作用などの薬理作用を示すことがわかってきている. 特に霊芝の多糖類は抗高血圧、抗腫瘍、血糖降下作用がある. 一方、松の実に含まれるトコフェノール、ビタミン B1 およびビタミン E も糖尿病に効果があるとされている. その他、糖蜜、バナナおよびにんにくに含まれるオリゴ糖、りんごに含まれるカテキンやペクチン、バナナやにんにくに含まれるカリウムやビタミン B6、にんにくに含まれる硫化アリルなども糖尿病に効果がある食品成分である. これらのことから、ココナッツ酵素製剤の抗糖尿病作用にはこれらの成分が関与しているものと考えられる. また、主原料であるココナッツはラット肝臓において peroxisome proliferators-activated

receptor (PPAR) alpha mRNA を増加することが報告されており¹⁴⁾、この PPAR alpha に対する活性作用が中性脂肪の減少に関与しているのかもしれない。

今回、ココナッツ酵素製剤の抗糖尿病作用を調べるために血糖値および糖負荷後の測定を2回だけ実施した。しかしながら、より詳細な血糖の変化を調べるために測定回数が不十分であったと思われる。さらに血糖値だけではなく、HbA1C 値の測定も実施すべきであったと思われる。今後さらに検討を行う必要がある。また、データには示していないが、ココナッツ酵素製剤は、ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウス（インスリン依存性糖尿病モデル）の高血糖には影響しなかった。このことから、ココナッツ酵素製剤の抗糖尿病作用は、インスリン非依存性糖尿病に対して有効であると考えられた。今後、本製剤の抗糖尿病作用の作用機序について検討する必要がある。

以上のことから、ココナッツ酵素製剤は、糖尿病の95%以上を占める2型糖尿病患者における高血糖に有用である可能性が示唆された。しかしながら、ココナッツ酵素製剤は糖尿病のリスクを軽減する効果を有する可能性はあるが、あくまでも食品であり、医薬品と同等の効果を期待するものではないことを十分に認識し、適切に使用することが大切であると思われる。

結語

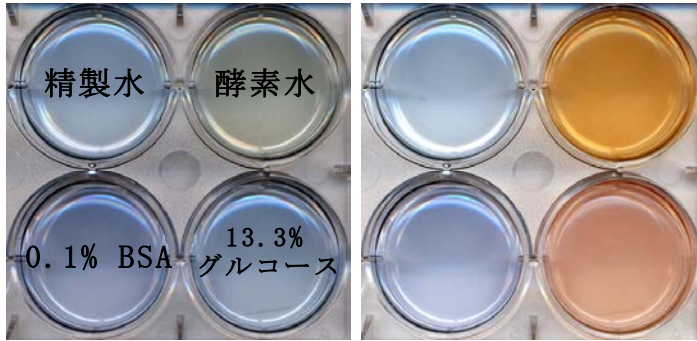
ココナッツ酵素製剤は、2型糖尿病モデル（インスリン非依存性）である GK ラットの血糖に対して抗糖尿病作用を有していることがわかった。このことから、ココナッツ酵素製剤の摂取は2型糖尿病患者における高血糖に有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 津田謹輔, 清野裕: 食生活と糖尿病 Diabetes Frontier 7: 18-22, 1996
- 2) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室: 平成14年度糖尿病実態調査(速報) 臨床栄養 103(5): 607-612, 2004
- 3) Suzuki KI, Toyota T: Spontaneously diabetic GK (Goto Kakizaki) rats, in Shafir E (ed): Animal Diabetes IV. London, UK, Libbey: 107-115, 1992
- 4) Goto Y, Suzuki K, Ono T, et al.: Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). Adv. Exp. Med. Biol. 246: 29-31, 1988
- 5) Bradford MM: 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
- 6) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一: 食品機能研究法. 320-322, 2000
- 7) 伴野祥一, 宇都木敏浩: 耐糖能異常(境界型)をどのようにフォローするか. 変貌する生活習慣病(片山茂裕編). 175-181, メディカルレビュー社, 2000
- 8) Landrault N, Poucheret P, Azay J, et al.: Effect of polyphenols-enriched Chardonnay white wine in diabetic rats. J. Agric. Food Chem. 51: 311-318, 2003
- 9) Al-Awwadi N, Azay J, Poucheret P, et al.: Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol, or both in streptozotocin-treated rats. J. Agric. Food Chem. 52: 1008-1016, 2004
- 10) Sabu MC, Smitha K, Ramadasan K, et al.: Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. J. Ethnopharmacol. 83: 109-116, 2002
- 11) Baluchnejadmojarad T, Roghani M: Garlic extract attenuates time-dependent changes in the reactivity of isolated aorta in streptozotocin-diabetic rats. Life Sci. 73: 2281-2289, 2003
- 12) Liu C-T, Hse H, Lii C-K, Chen P-S, Sheen L-Y: Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats. Eur. J. Pharmacol. 516: 165-173, 2005
- 13) Pari L, Maheswari JU: Hypoglycaemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 68: 321-325, 1999
- 14) Bonilla S, Redonnet A, Noel-Suberville C, Pallet V, Garcin H, Higuieret P: High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. Br. J. Nutr. 83: 665-671, 2000

(A) 0分後

(B) 20分後



(C) 40分後

(D) 60分後



図1 ビューレット試薬の変化

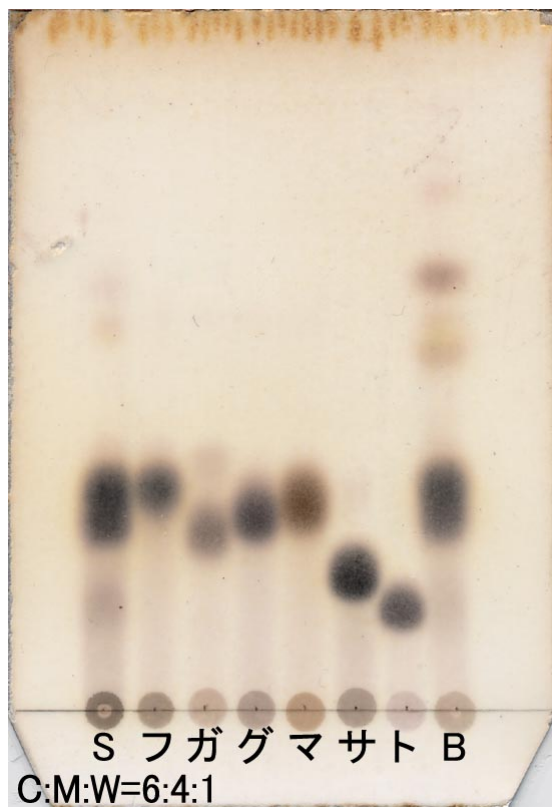


図2 還元糖の同定

C:M:W : クロロホルム : メタノール : 水

S : 酵素水

フ : フルクトース

ガ : ガラクトース

グ : グルコース

マ : マンノース

サ : サッカロース

ト : トレハロース

B : n-ブタノール層

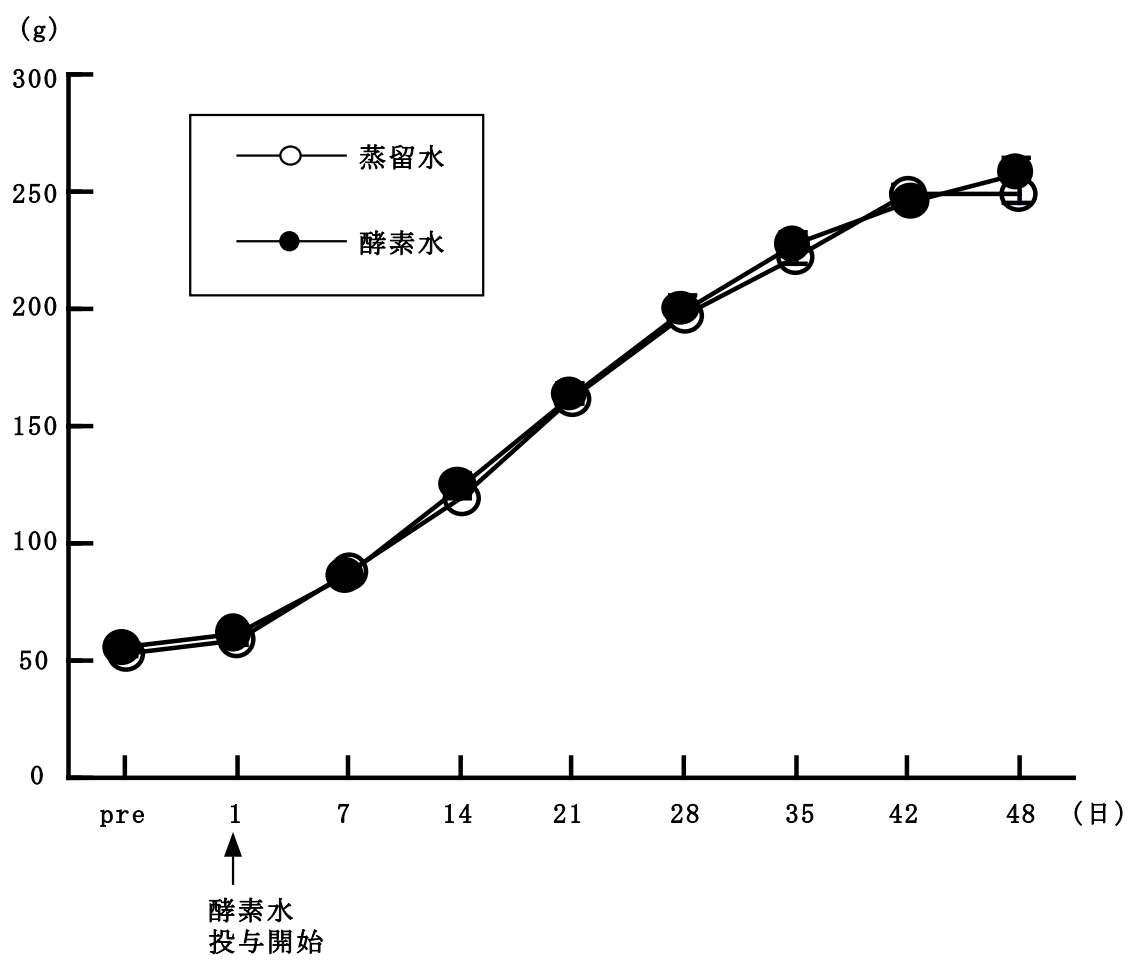


図3 体重の変化

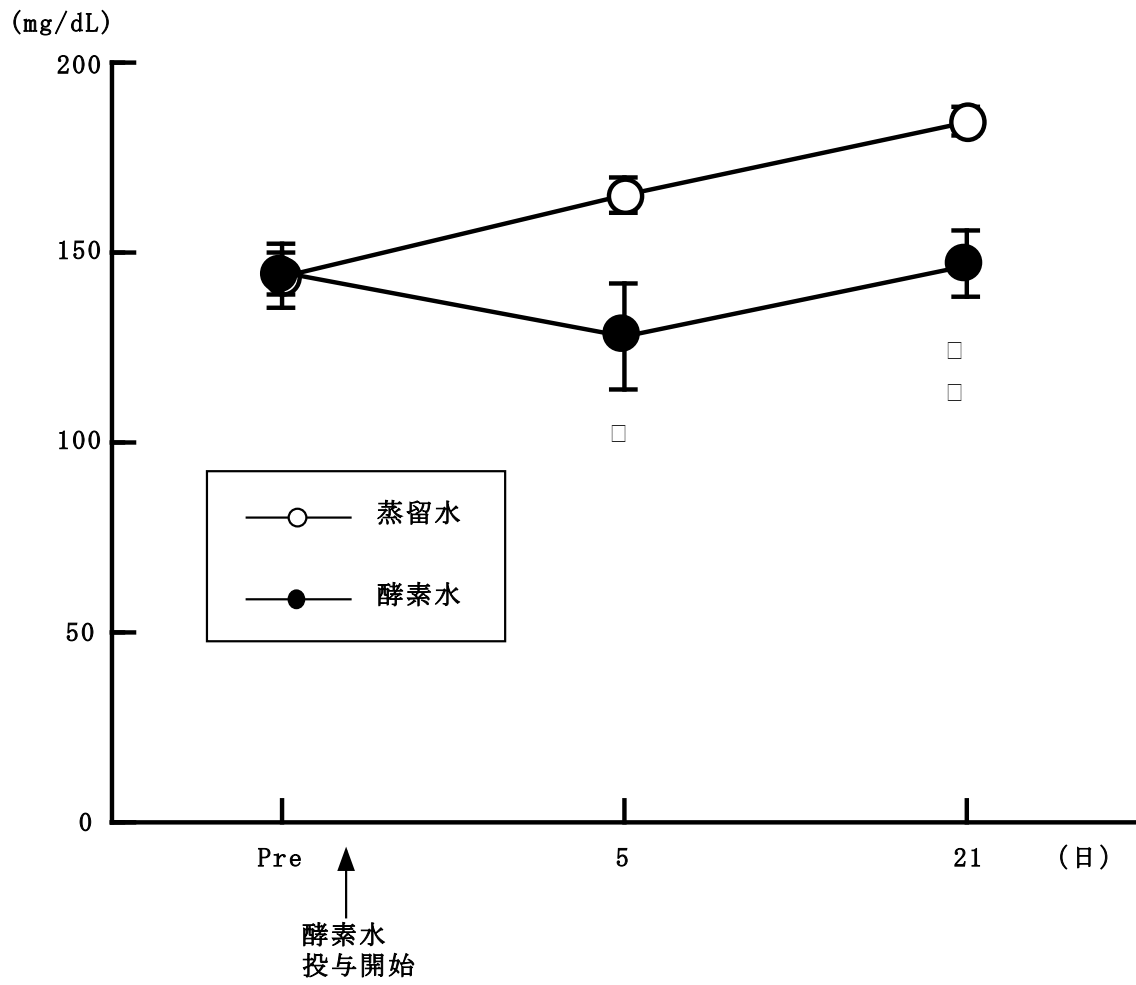


図4 血糖の変化
 *P<0.05, **P<0.01 vs. 蒸留水 (unpaired *t*-test)

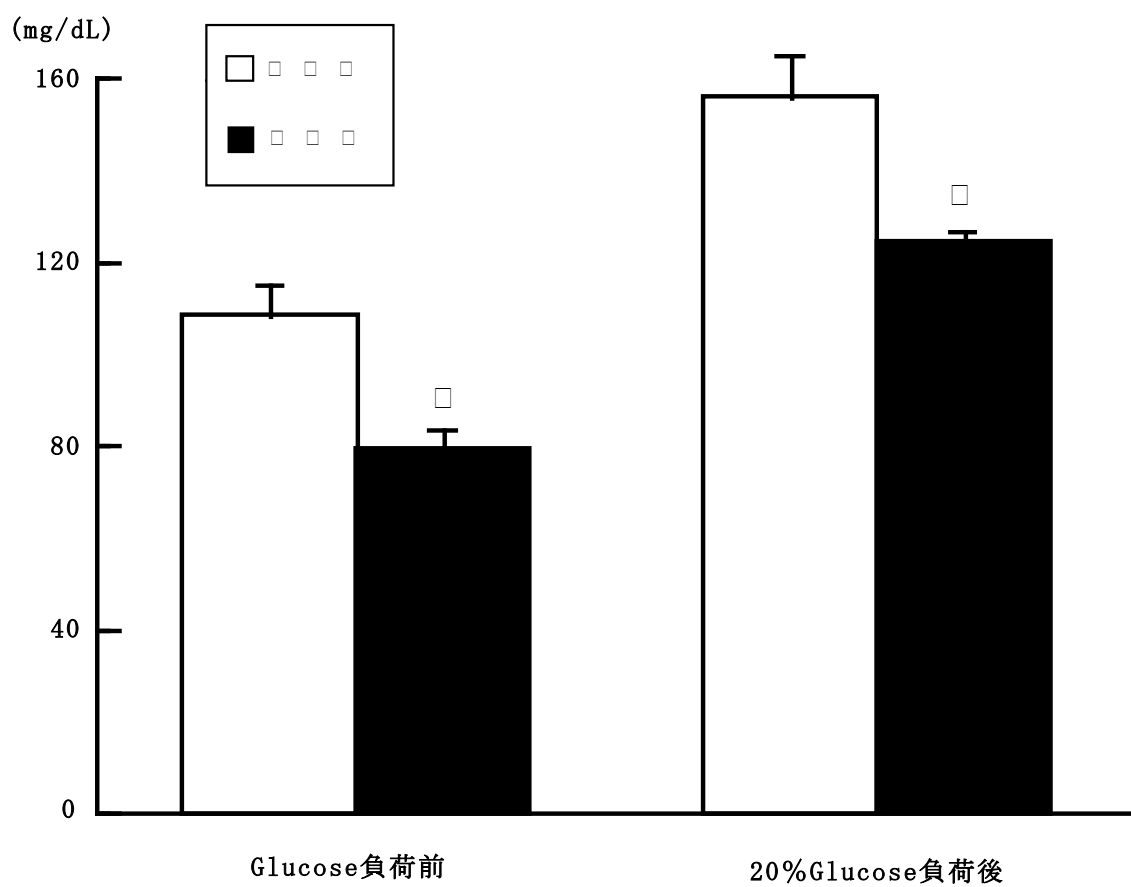


図5 Glucose負荷における血糖の変化
*P<0.05 vs. 蒸留水 (unpaired *t*-test)

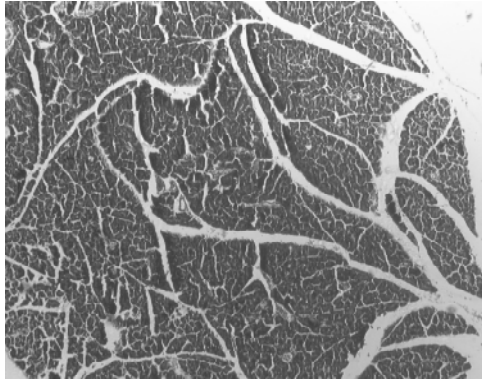
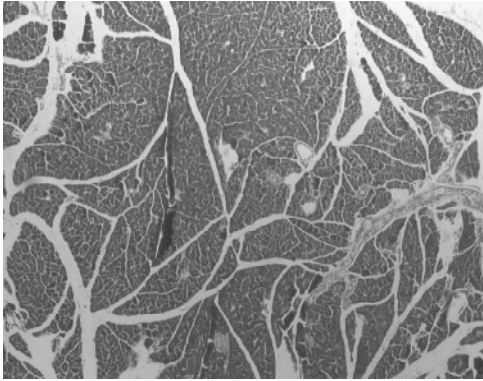


表1 ココナッツ酵素製剤の原料

1 ココナッツ (主原料)	9 わかめ
2 糖蜜	10 もずく
3 にんにく	11 カブ
4 胡椒	12 メシマコブ
5 無花果 (イチジク)	13 さるのこしかけ
6 松の実	14 あけび
7 バナナ	15 やまもも
8 りんご	

表 2 血液生化学検査の結果

測定項目	蒸留水	酵素水
肝臓重量 (g)	10.3±1.0	10.3±0.2
Total cholesterol (mg/dL)	57.0±3.0	69.7±0.9
HDL-cholesterol (mg/dL)	37.3±2.6	42.3±2.7
TG (mg/dL)	19.3±2.7	10.0±0.0*
GOT (IU/L)	21.0±1.7	23.7±2.8
GPT (IU/L)	17.0±4.0	15.3±5.4

*P<0.05 vs. 蒸留水 (unpaired *t*-test)