

香煎茶の2型糖尿病モデルマウスに対する影響

芳野恭士^{*1}・芳野広起^{*1}・真壁勇那^{*1}・清水 篤^{*2}

Effects of Kosencha on Type 2 Diabetes Mice

Kyoji YOSHINO^{*1}, Hiroki YOSHINO^{*1}, Isana MAKABE^{*1}, Atsushi SHIMIZU^{*2}

Abstract: In this study, we investigated the preventive effects of green tea and Kosencha-processed green tea on a mouse model of type 2 diabetes mellitus (DM) induced by streptozotocin and nicotinamide. Kosencha-processed tea is a secondary fabricated tea product which is made by a treatment with high temperature and high pressure. The oral administrations of water extracts prepared from green tea leaves and Kosencha-processed green tea leaves tended to suppress the elevations of blood glucose levels and pancreas lipid peroxide levels in DM mice. In addition, the elevations of antioxidant activities in the plasma of DM mice were also suppressed by the administrations of the extracts from green tea and Kosencha-processed green tea. These tea extracts would be beneficial food materials for the prevention of DM.

Key Words: *Camellia sinensis*, Leaf, Kosencha, Type 2 diabetes mice

1. はじめに

糖尿病の国内罹患人口は年々増加しており、2014年では316.6万人と、その3年前よりも46万人以上多くなっている[1]。日本における糖尿病患者の90%以上は、生活習慣が原因で起こるものと考えられる2型糖尿病であるとされ、世界的にも高収入の国では糖尿病患者の85-95%はこの型の糖尿病である[2]。2型糖尿病は多くの場合、適度な運動や食事内容の改善など、生活習慣を改善することで予防や治療が可能と考えられる。そのために、糖や脂質の吸収を穏やかにする機能を持つ食品素材の利用が期待される。

茶はツバキ科の常緑樹であるチャ (*Camellia sinensis* L.) の葉から作られる飲料で、世界中で摂取されている。緑茶葉には、糖吸収抑制作用のあるカテキン類が含まれているが[3]、含量が多い(-)-エピガロカテキンガレートなどの没食子酸エステルは茶の渋みを強めるため[4]、多量の摂取は困難である。香煎茶加工は、緑茶のような一次加工茶を飽和水蒸気下で高温(160~200℃)、高圧処理するものである。この二次加工により、没食子酸エステル型のカテキン類の一部が加水分解を受けて渋味が軽減される。

緑茶を香煎茶加工したものには、元の緑茶と同様に糖消化酵素活性の阻害作用や[5]、肥満患者における血中中性脂肪値の低下、体重や肥満度の低下、耐糖能異常の改善、さらには瘦身効果と代謝症候群の抑制といった作用があることが報告されている[6,7]。本研究では、緑茶とその香煎茶の飲用による2型糖尿病モデルマウスに対する影響を検討した。

2. 材料および方法

2.1 茶の試料およびそのエキスの調製

ヤブキタ品種の緑茶とそれを香煎茶加工した茶は、香煎茶研究会より供与された。それぞれの茶葉20gに、2.5Lの熱水を加え10分間抽出した。抽出液をろ紙でろ過後、ろ液を凍結乾燥することでそれぞれのエキスを得た。各抽出物の葉からの収量は、原料緑茶で17.8%(w/w)、香煎茶加工した緑茶では25.5%(w/w)であった。

2.2 実験動物

本実験には、日本SLC社より購入した4週齢の雄性ddY系マウスを用いた。マウスは、12時間間隔で照明が点灯・消灯する25℃の部屋で飼育し、実験中は水道水と実験動物用標準飼料を自由に摂取させた。実験の全期間を通じて、実験動物の取り扱い、文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に準じた「沼津工業高等専門学校における動物実験に関する指針」の規定に従

*1 物質工学科

Department of Chemistry & Biochemistry

*2 サンダイヤ株式会社

Sundia Co., Ltd.

った。

2. 3 マウス 2 型糖尿病モデルの作製

マウスの 2 型糖尿病モデルとして、ストレプトゾトシン (STZ) とニコチンアミドを組み合わせ投与方法を用いた[8,9]。マウスを 24 時間絶食させた後、1.2%(w/v)ニコチンアミド水溶液 0.01 mL/g 体重を腹腔内投与し、その 15 分後に 1.0%(w/v) STZ 水溶液 0.01 mL/g 体重を腹腔内投与した。この操作を 1 日空けて 2 回繰り返した後、通常の飼育条件で 12 日間飼育した。飲料水としては、水道水を自由に与えた。別に、緑茶および香煎茶エキスの 0.05、0.1 および 0.2%(w/v)水溶液を調製し、これらを飲料水として自由摂取させた群を設けた。さらに、STZ、ニコチンアミド、茶エキスを投与せずに飼育した健常群も用意した。各群のマウスは 4 匹とした。飼育終了 20 時間前より絶食させた後、エーテル麻酔下でマウスの心臓から採血すると同時に肝臓と膵臓を採取した。飼育期間中は、マウスの体重と飲水量を測定した。

2. 4 2 型糖尿病モデルマウスの生化学的パラメータの測定

マウスの血糖値や体内酸化ストレスに関連する生化学的パラメータを、次のように測定した。マウスの血液を 3000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離して血漿を得た。血漿を用いて、そのグルコース濃度 (血糖値) を和光純薬工業社製臨床検査用測定キットのグルコース CII-テストワコーを用いて、また、そのインスリンレベルをシバヤギ社製レビス® インスリン-マウス T ELISA キットを用いて測定した。肝臓と膵臓は 0.04 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて 5%または 10%ホモジネートを作製した後、過酸化脂質レベルとしてチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 値を測定した[10]。肝臓の TBARS 値は、緑茶および香煎茶エキスの 0.05 および 0.1%(w/v)水溶液投与群でのみ測定した。さらに、血漿のラジカル捕捉作用を 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) 法[11]を用いて測定した。

2. 5 統計処理

実験データは、平均±標準偏差で表した。実験群間の平均値の差の有意性については、一元配置分散分析法 (one-way ANOVA)で解析し、続けて Tukey の多重比較法を用いて検定した。p<0.05 を統計学的に有意であると見た。

3. 結果および考察

本研究で用いた 2 型糖尿病モデルは、STZ から生成するラジカルによって起こる膵臓細胞の DNA 障害の修復を、ニコチンアミドの前投与により補助することで 2 型糖尿病に類似の症状を起こすものと考えられる。本方法は、安価で簡便な 2 型糖尿病モデルとして使用されている。

この 2 型糖尿病モデルマウスに緑茶および香煎茶のエキスを投与したときの、体重の増加量と飲水量に対する影響を図 1 および図 2 に示す。糖尿病群および各茶エキス投与群の飼育 12 日間での体重増加量は、健常群に比較して低い傾向が見られた。健常群よりも糖尿病群での体重増加量が低かったことは、過去の報告[9]と一致している。茶エキスの濃度の増加とともに体重増加量が低下する傾向が見られ、0.1%および 0.2%の緑茶エキス投与群、さらには 0.1%の香煎茶エキス投与群では、糖尿病群に比較して有意に低い体重増加量であった。糖尿病群および各茶エキス投与群の飼育 12 日間での飲水量は、健常群に比較して高い傾向が見られた。口渇は糖尿病に見られる症状の一つである。茶エキスの濃度の増加とともに飲水量が低下する傾向が見られ、0.2%の緑茶および香煎茶エキス投与群では、糖尿病群に比較して低い飲水量であった。このような飲用水の摂取量の変化には、用いたエキスの味や香りも影響している可能性がある。

2 型糖尿病モデルマウスに緑茶および香煎茶のエキスを投与したときの、血糖値に対する影響を図 3 に示す。糖尿病群および各茶エキス投与群の血糖値は、健常群に比較して高い傾向が見られた。茶エキスの濃度の増加とともに血

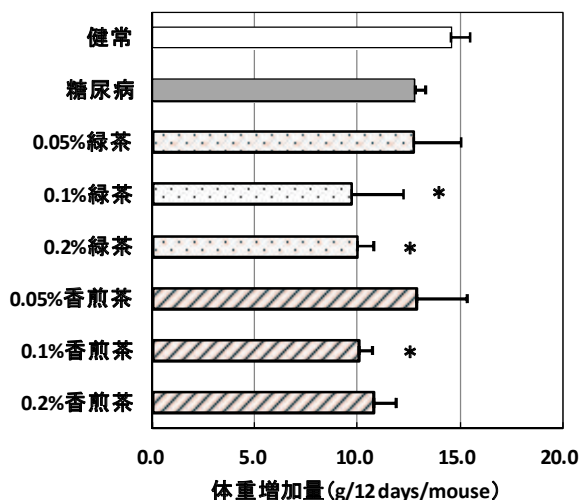


図 1 飼育 12 日間の糖尿病マウス 1 匹あたりの体重増加量に対する緑茶および香煎茶エキスの影響
平均値±標準偏差, N=4. 糖尿病群との有意差, * p<0.05.

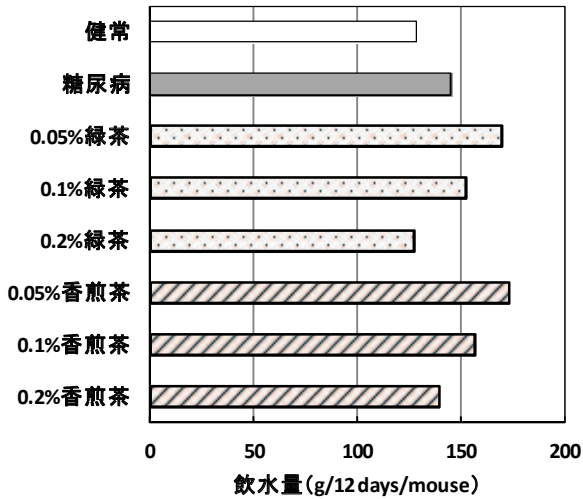


図2 飼育12日間の糖尿病マウス1匹あたりの飲水量に対する緑茶および香煎茶エキスの影響
 平均値, N=4.

糖値は低下する傾向が見られたが、いずれも糖尿病群に対する有意差はなかった。0.1%および0.2%の緑茶エキス投与群で、糖尿病群よりも血糖値が低下する傾向が見られた。2型糖尿病モデルマウスに緑茶および香煎茶のエキスを投与したときの、血漿インスリンレベルに対する影響を図4に示す。糖尿病群および各茶エキス投与群の血漿インスリンレベルは、健常群に比較して高い傾向が見られた。しかし、糖尿病群と健常群の血漿インスリンレベルの差は大きくはなかった。糖尿病群では、STZの投与により膵臓障害が起きて血糖値が上がったものの、障害の程度が軽微なため十分ではないがインスリンの分泌が行われたものと考えられる。

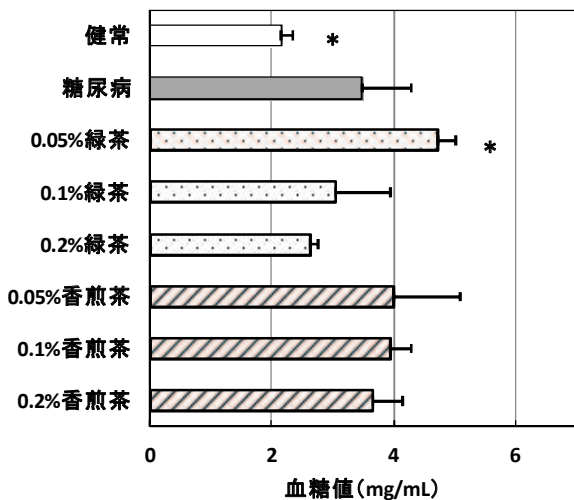


図3 糖尿病マウスの血糖値に対する緑茶および香煎茶エキスの影響
 平均値±標準偏差, N=4. 糖尿病群との有意差, * p<0.05.

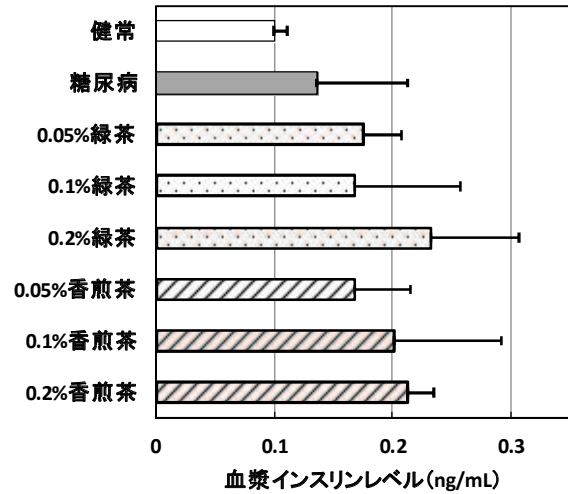


図4 糖尿病マウスの血漿インスリンレベルに対する緑茶および香煎茶エキスの影響
 平均値±標準偏差, N=4.

これに対し、緑茶および香煎茶エキスの投与群では、エキスの濃度にはほぼ依存してインスリンの分泌が糖尿病群よりも高まる傾向を示した。緑茶と香煎茶のエキスの間では、血漿インスリンレベルの上昇作用に著しい差は見られなかった。

糖尿病を発症した場合、体内で細胞中のグルコース濃度が上昇すると、ミトコンドリアの電子伝達系における電子の授受が不全となり、余剰の電子が酸素を還元することでスーパーオキシドアニオンラジカル等の活性酸素が生成し易くなるものと考えられる。また、過剰なグルコースがタンパク質と反応してこれを糖化し、終末糖化産物(AGEs)を生成する過程でも活性酸素種が生成する。生じた活性酸素は、体内酸化ストレスを高めるものと予想される。そこで、本研究で用いたマウスについて、その体内酸化ストレスの状態を検討した。

2型糖尿病モデルマウスに緑茶および香煎茶のエキスを投与したときの、膵臓の過酸化脂質レベルに対する影響を図5に示す。糖尿病群の膵臓過酸化脂質レベルは、健常群に比較して上昇する傾向が見られた。このことは、STZから生成するラジカルにより膵臓で弱い障害が起こったことを示しているものと考えられる。緑茶および香煎茶のエキス投与群では、0.05%香煎茶エキスの場合を除き、糖尿病群よりも過酸化脂質レベルが低い傾向が見られた。緑茶や香煎茶のエキスの摂取は、STZによって起こる膵臓での酸化ストレスを弱いながらも軽減するものと考えられる。2型糖尿病モデルマウスに緑茶および香煎茶のエキスを投与したときの、肝臓の過酸化脂質レベルに対する影響を図6に示す。糖尿病群の肝臓過酸化脂質レベルは、健常群と

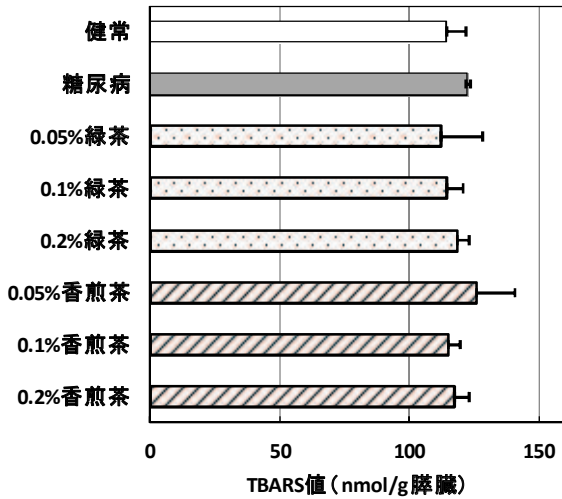


図 5 糖尿病マウスの膵臓過酸化脂質レベルに対する緑茶および香煎茶エキスの影響
 平均値±標準偏差. N=4.

差が見られなかった。STZ の投与による 1 型糖尿病モデルのマウスやラットの場合には、肝臓や脳、腎臓中の過酸化脂質レベルが上昇することが知られているので[12,13]、本実験で作成した 2 型糖尿病モデルマウスでは、体内酸化ストレスの程度が弱いものと思われる。緑茶および香煎茶のエキス投与群でも、肝臓中の過酸化脂質レベルは健常群や糖尿病群と差が見られなかったが、0.1%香煎茶エキス投与群のみ低下する傾向が見られた。

2 型糖尿病モデルマウスに緑茶および香煎茶のエキスを投与したときの、血漿のラジカル捕捉作用に対する影響を図 7 に示す。糖尿病群の血漿ラジカル捕捉力は、健常群と比較して高い傾向が見られ、このことは糖尿病の発症による体内酸化ストレスの上昇に対する防御反応が高まった結果であると考えられる。緑茶および香煎茶のエキスの投

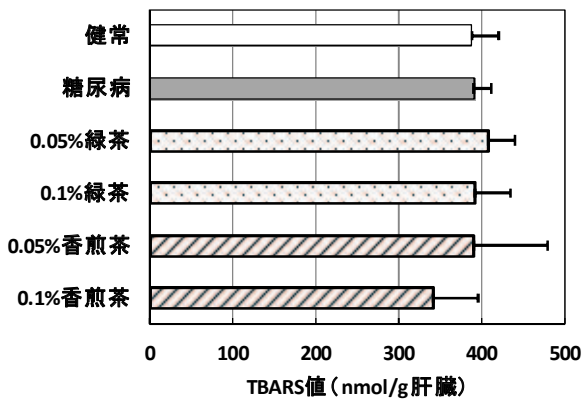


図 6 糖尿病マウスの肝臓過酸化脂質レベルに対する緑茶および香煎茶エキスの影響
 平均値±標準偏差. N=4.

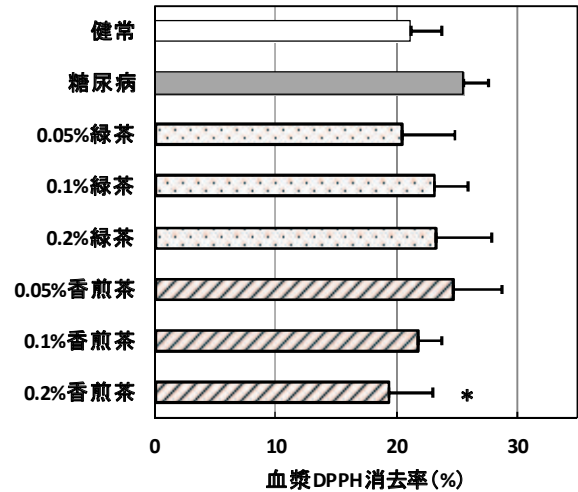


図 7 糖尿病マウスの血漿ラジカル捕捉作用に対する緑茶および香煎茶エキスの影響
 平均値±標準偏差. N=4. 糖尿病群との有意差, *p<0.05.

与群では、糖尿病群と比較して血漿ラジカル捕捉力が低い傾向が見られ、茶エキスを摂取したマウスでは体内酸化ストレスの上昇が弱かったものと考えられる。緑茶および香煎茶のエキスには抗酸化作用があるため[14]、これらを摂取したマウスの体内酸化ストレスは軽減される可能性がある。

以上の結果から、緑茶および香煎茶のエキスの摂取により、糖尿病モデルマウスにおける血糖値と体内の酸化ストレスの上昇が抑制される傾向が認められ、その効果に緑茶と香煎茶の間で明確な差は見られなかった。実際の糖尿病においても、体内酸化ストレスの上昇は白内障、末梢神経障害、腎症、網膜症といった種々の重篤な合併症と関連があり、酸化ストレスを抑制することは糖尿病の予防や治療のために重要であるものと考えられる。通常の煎茶であれば熱湯 100 mL に茶葉 2.3 g 程度を用いるが[15]、これは今回用いたエキスの濃度に換算すると約 0.4%(w/v)に相当する。また、香煎茶は熱湯 100 mL に茶葉 0.5 g を用いることとしているので、エキスの濃度に換算すると約 0.12%(w/v)に相当する。従って、本実験で用いた茶エキスの濃度 0.05%~0.1%(w/v)は、ヒトが普段飲む茶の濃度とほぼ変わらない。緑茶とその香煎茶のエキスは、2 型糖尿病の予防に効果的な食品素材であることが期待される。

4. 参考文献

[1] 厚生労働省 (2014) :平成 26 年患者調査.
 [2] International Diabetes Federation (2009): IDF

Diabetes Atlas 4th edition.

- [3] Y. Hara, M. Honda (1990): *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1939-1945.
- [4] 西條了康 (1983): *化学と生物*, **21**, 426-428.
- [5] 芳野恭士, 清水康夫, 他 (2015): *New Food Industry*, **57**, 1-10.
- [6] 刀坂泰史, 砂川陽一, 他 (2013): *日本薬理学会部会(日本薬理学雑誌)*, **142**, 5.
- [7] 清水康夫 (2014): *交流*, **53**, 20-21.
- [8] T. Nakamura, T. Terajima, *et al.* (2007): *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1167-1174.
- [9] 芳野恭士, 中戸川 奨, 他 (2013): *沼津高専研究報告*,

47, 23-28.

- [10] 真杉文紀, 中村哲也 (1997): *ビタミン*, **51**, 21-29.
- [11] 戸高大介, 竹中陽子, 他 (1999): *食科工誌*, **46**, 34-36.
- [12] K. Yoshino, Y. Miyauchi, *et al.* (2009): *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 1096-1104.
- [13] A. Dogan, I. Celik, *et al.* (2015): *J. Ethnopharmacol.*, **176**, 243-251.
- [14] 芳野恭士, 杉本奈央, 他 (2018): *技術・教育研究論文誌*, **25**, 37-45.
- [15] 茶のいれかた研究会 (1973): *茶業研究報告*, **40**, 58-66.