

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：27401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02329

研究課題名(和文) 経口摂取可能なインスリン代替機能性成分の実用化に向けた研究

研究課題名(英文) Research on the practical application of orally insulin alternative functional ingredients

研究代表者

友寄 博子(Hiroko, Tomoyori)

熊本県立大学・環境共生学部・准教授

研究者番号：10347700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、のり低分子画分の糖負荷試験での血糖降下作用ならびに長期摂取での高インスリン血症改善作用についてこれまで明らかにしてきた。作用機序として消化酵素阻害作用はないことを明らかにしていたが、本研究で吸収にも影響を及ぼさないことを明らかにすることができた。さらに、マウス脂肪前駆細胞ではのり低分子画分がインスリンと同程度脂肪を蓄積することを明らかにできたため、細胞での糖の取り込みを促進する可能性が示唆された。また、その作用成分の抽出はこれまで煩雑な前処理と工程であったが、本研究で大幅に改善することができた。今後も引き続き作用機序解明を進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海苔の養殖漁業者は生産の不安定さから他へ転換する地域も出始めており、海苔の安定供給が危ぶまれ始めている。我々の研究では品質の低い海苔の方が血糖降下作用を有する成分が多く含まれていることを報告してきている。本研究では成分抽出方法の効率化を進め、実用化に大きく近づくことができた。糖尿病は一般的に血糖値とHbA1cにより診断される疾病であるが、進行の前段として高インスリン血症と膵臓の疲弊が挙げられる。のり低分子画分は高インスリン血症を改善する効果を有していることから、今回細胞で糖の取り込みを促進する可能性が明らかできたことはその作用機序解明に近づくことができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In previous studies, we demonstrated the hypoglycemic effect of low molecular weight fraction of edible purple laver, *Porphyra* sp. (Nori) using a glucose tolerance test, and hyperinsulinemia improvement after long-term ingestion. Previous studies exhibited no effect on digestive enzymes, and this study further confirmed that there was no effect on absorption. Furthermore, we demonstrated that the Nori low molecular weight fraction group accumulated the same amount of fat as the insulin group in 3T3-L1 adipocytes, suggesting that glucose uptake by the cells may be enhanced. The pretreatment and extraction of active components are complicated processes, which were considerably improved in this study. We plan to further elucidate the action mechanism in future studies.

研究分野：食品栄養機能学

キーワード：糖尿病 インスリン 機能性食品 海藻 海苔 のり 血糖降下作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海苔(のり)は古来より日本人に食されてきた食材であるが、近年の気象の変動・海況の変化によりその収量や品質は一定しない。特に色落ちのりは品質が悪いとされ、廃棄処分の対象となるが、それらの活用方法は見出されていない。一方、これまでの我々の研究では低品質の海苔に糖尿病予防効果が期待されるインスリン様作用成分がより多く含まれる可能性が示されている。つまり廃棄海苔の有効活用法が見出されつつある。

実用化を考えると大規模・簡略な抽出方法の確立が必要となるため、本研究では簡便で効率よく抽出できる方法について検討を行った。また、のり低分子画分(以下、のり成分)の作用機序に想定しているインスリンは経口負荷により消化されて血糖低下作用を得ることができない。我々の成分は経口摂取により血糖降下ならびに高インスリン血症改善効果を動物で確認している。しかし、血糖降下作用に関してはインスリン様作用以外に消化酵素阻害作用、吸収阻害作用、尿への排泄促進作用などが実用化されている。そこで、本研究では動物を用いて各作用への影響について検討を行った。

2. 研究の目的

(1) のり由来インスリン様作用成分簡易抽出方法の検討

のりはその生育環境において、潮の満ち引きにより海水に浸らない時間もあることから、生存のために非常に強固な細胞壁を持っていることが知られている。一般にこの細胞壁が強固であることから、成分抽出には細胞を破壊する必要があると考えられていた。したがって、これまでの我々の抽出では、のりの細胞サイズより小さなサイズに微粉末化し抽出試料としてきた。この微粉末作業には非常に時間と手間がかかっており、事業化には障害となっていた。また、抽出工程には熱水を用いていたが、のりに含まれる水溶性食物繊維により抽出工程が煩雑なものとなっていた。そこで、これらの工程をすべて見直し、工業化可能な簡便な簡易抽出方法について検討を行った。

(2) のり由来インスリン様作用成分の糖質吸収への影響

これまでの研究で動物での糖負荷試験で、のり成分を経口摂取させた群で有意に血糖値が低下し、長期に同じのり成分を経口投与した研究でも高インスリン血症を改善する可能性が示されている。その作用機序としてこれまで糖質消化酵素(α -アミラーゼ、 α -グリコシダーゼ)を阻害しないことを明らかにしている。そこで、本研究では吸収段階で阻害するかどうかについて確認を行うことで、体内でのり成分はインスリン様に機能するか、裏付けを得る目的で行った。

(3) のり由来インスリン様作用成分の動物細胞での糖取り込みへの影響

インスリンは細胞内へグルコースを効率よく取り込むために重要なホルモンである。本研究ではのり成分が細胞へグルコースの取り込みを促進するか確認するために動物細胞を用いて検討を行った。脂肪細胞は取り込んだグルコースを脂肪滴として体内に取り込んで蓄積する。本研究ではこの蓄積された脂肪量を指標としてのり成分のグルコース取り込み促進作用を確認する目的で行った。

3. 研究の方法

(1) のり由来インスリン様作用成分簡易抽出方法の検討

板海苔試料の微粉末化工程の簡略化および時間の短縮を行うべく、板海苔のシュレッダー裁断物を用いて抽出を行い、抽出率、不純物測定、脂肪分解抑制率のうち2項目で比較を行った。また、抽出工程の見直しのために、幅広いアルコール濃度でシュレッダー裁断のり試料から抽出を行い、先に示した3指標を比較した。

(2) のり由来インスリン様作用成分の糖質吸収への影響

のり成分の吸収過程への影響を検討するために、正常ラットを用いて *in situ* 小腸灌流実験を行った。実験ではグルコース吸収への影響を検討するために、以下の3群(グルコース投与群、グルコース+のり成分投与群、のり成分投与群)で実験を行った。

(3) のり由来インスリン様作用成分の動物細胞での糖取り込みへの影響

実験にはマウス由来脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させたのちに比較試験を行った。脂肪細胞は分化させたのちにインスリンまたはのり成分を添加して培養を行った。本研究では、のり成分がインスリンと同様に糖の取り込みを促進するかを確認するために、培

地中にインスリンを添加しない群、インスリンを添加する群、のり成分を添加する群、インスリンとのり成分を添加する群の4群で実験を行った。本研究では糖取り込みの指標として、蓄積した脂肪滴の蓄積率を比較した。

4. 研究成果

(1) のり由来インスリン様作用成分簡易抽出方法の検討

これまでの研究では75%エタノール抽出で作用成分が回収できることを明らかにしてきたことから、その回収率ならびにその画分を用いて脂肪分解抑制作用について比較を行った。図1に示す通り微粉末加工とシュレッダー裁断加工ではその差はあまりなかったことに加えて、図2に示す通り脂肪分解抑制作用も同程度であったことから、シュレッダー裁断加工でも十分に抽出することが可能であることが確認できた。

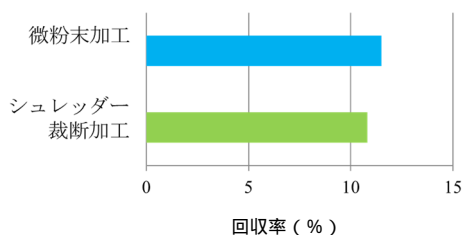


図1 75%エタノール可溶性画分の回収率

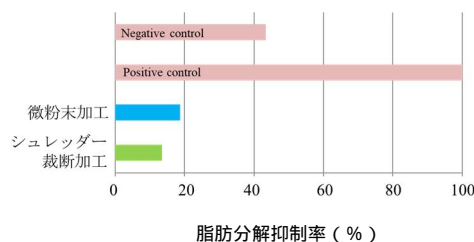


図2 75%エタノール可溶性画分脂肪分解率の比較

続いて抽出工程の見直しのために、抽出溶媒濃度の検討を行った。結果は図3に示す通り回収率では70~80%エタノールが多く、脂肪分解抑制作用ではいずれの画分も十分な抑制作用が見られた(図5)。回収率で高い値を示した70~80%エタノールにおいて不純物である糖含有量が少ないことが明らかになったため(図4)、抽出には70~80%エタノールが適している可能性が示された。

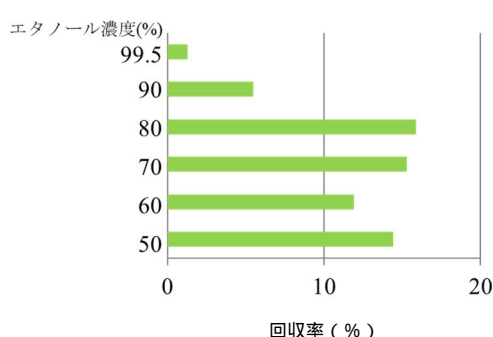


図3 異なるエタノール濃度で抽出した画分の回収率

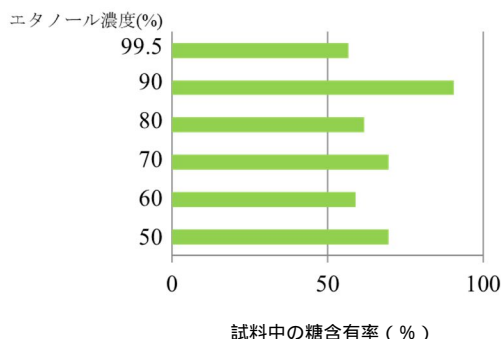


図4 異なるエタノール濃度で抽出した画分の糖含有率比較

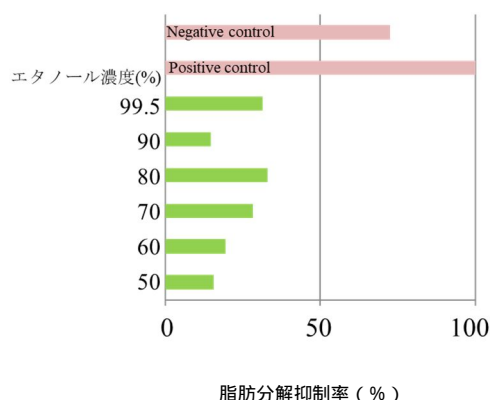


図5 異なるエタノール濃度で抽出した画分の脂肪分解抑制率の比較

(2) のり由来インスリン様作用成分の糖質吸収への影響

のり成分が先の研究の糖負荷試験で血糖降下作用を示した。そこで、その際に投与した濃度を

考慮して調製した灌流液を用いて in situ 小腸灌流試験を行い、グルコース吸収に及ぼすのり成分の影響を検討した結果を図 6 に示す。グルコースのみを投与した群とグルコースとのりを投与した群では有意な差はなかった。また、のり成分を投与した群で検出されたグルコース量はわずかであり、のり成分はグルコースの吸収に影響を及ぼさない可能性が示された。

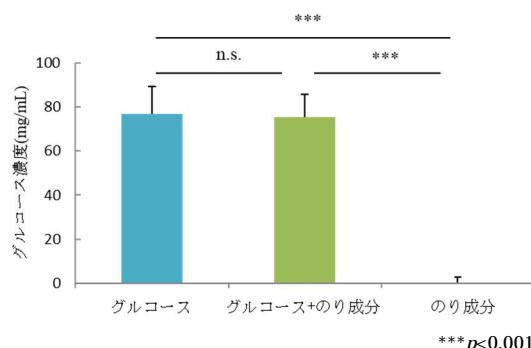


図 6 in situ 小腸灌流実験によるのり成分のグルコース吸収への影響評価

(3) のり由来インスリン様作用成分の動物細胞での糖取り込みへの影響

糖取り込みの指標として、蓄積した脂肪滴の蓄積率を比較した結果、無添加群に比較してインスリン添加群で有意に脂肪滴が蓄積しており、インスリンによって糖の取り込みが促進され、余剰の糖が脂肪滴として蓄積していたことが確認できた(図 7)。のり成分添加群ではインスリン添加群に比較して 5 mg/mL 添加群のみ有意に低値であったものの、それ以外の添加群では有意差はなかった。さらに、無添加群に比べて 500 mg/mL のり成分添加群で有意に高値を示した。以上の事から、のり成分はインスリンと同程度脂肪を蓄積し、糖の取り込みを促進している可能性が示された。なお、のり成分とインスリンを添加した群においては、無添加より有意に高値を示したものの、インスリン添加群とは有意な差はなかった。このことから、のり成分はインスリンの作用を増強するほどではないことが示された。今後は直接的に糖の取り込みに及ぼす影響について検討するとともにその作用機序についても確認していく予定である。

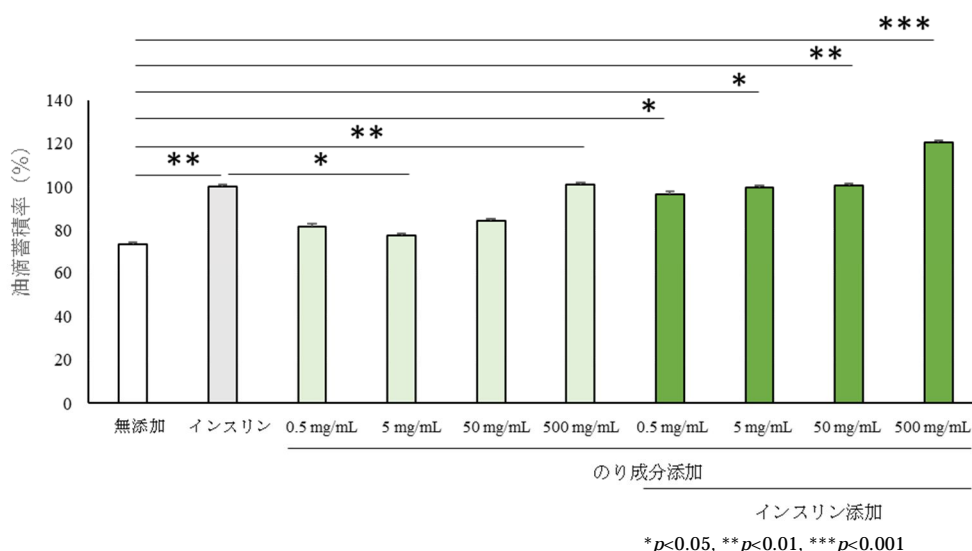


図 7 3T3-L1 細胞におけるのり成分添加による油滴蓄積率の比較

以上の結果をまとめると、関与成分抽出の簡素化については、板のりをシュレッダー裁断加工することと抽出時の抽出ステップの省略により、関与成分抽出の手間や作業時間の短縮につながることができた。

また、これまでの研究ではのり成分は消化酵素阻害作用を有しないことを明らかにしていたが、本研究でさらに吸収も阻害しないことを明らかにすることができた。この結果を受けて、のり成分が糖の取り込みを促進しているかについて 3T3-L1 細胞で糖の取り込みの度合いについて細胞内に蓄積した脂肪滴で比較を行った。結果はのり成分は脂肪滴をインスリンと同程度蓄積することが明らかになり、細胞内への糖の取り込みを促進している可能性が示唆された。本研究では事業化に向けた抽出方法の簡略化ならびに作用成分のメカニズムを明らかにしてきた。今後は社会実装に必要な情報収集も含めて研究を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 友寄 博子, 阿蘇品 里紗, 市木 美帆, 岸田 翔太, 野坂 瑠璃子, 西岡 美里, 山元 涼子, 白土 英樹	4. 巻 86(5)
2. 論文標題 乾のりのたんぱく質含量, 抗酸化能, 水溶性食物繊維含量およびインスリン様作用の品質による相違	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本水産学会誌	6. 最初と最後の頁 427-429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2331/suisan.20-00021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomoyori H, Kondo S, Asakawa M	4. 巻 15
2. 論文標題 The low molecular fraction of Pyropia spp. improves hyperinsulinemia in KK-Ay mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Algal Resources	6. 最初と最後の頁 9-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 友寄博子, 阿蘇品理沙, 市木美穂, 岸田翔太, 野坂瑠璃子, 西岡美里, 山元涼子, 白土英樹
2. 発表標題 たんぱく質含量を指標とした乾のりの品質評価
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

令和2年7月 2021年度熊本テックプランター トイメディカル賞（チーム名 ポルフィラ）
令和2年10月 第1回フードテックグランプリ 吉野家賞（チーム名 ポルフィラ）
令和3年7月 熊本県立大学研究活動表彰（自然科学系）

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池田 剛 (Ikeda Tsuyoshi) (80295138)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------