

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：43602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500947

研究課題名(和文) 蚕サナギの栄養特性および糖尿病予防効果に関する研究

研究課題名(英文) Study on nutritional property and diabetes prevention effects of Silkworm pupae (*Bombyx mori*)

研究代表者

友竹 浩之 (Tomotake, Hiroyuki)

飯田女子短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：90300136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、蚕サナギの栄養価、生理活性成分および糖質分解酵素阻害活性について調べた。蚕サナギ粉末の熱水抽出物はアンギオテンシン変換酵素、糖質分解酵素、そしてラットの血糖上昇を阻害した。また、蚕サナギ粉末のリン酸緩衝液抽出物は、DPPHラジカル補足活性を示した。さらに、蚕サナギ粉末のメタノール抽出物は、黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を示した。これらの結果により、蚕サナギは糖質分解酵素阻害作用およびその他の生理活性を有する新規素材となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to evaluate the nutritional value and bioactive component of silkworm pupase (*Bombyx mori*) and the alfa-glucosidase inhibitory effect of water extracts of that. Hot water extract of silkworm pupase inhibited angiotensin-converting enzyme, porcine pancreatic alfa-glucosidase and an increase of blood glucose level in rats. Phosphate buffer extract of silkworm pupase has DPPH radical scavenging activity. Methanol extract of silkworm pupase has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. These results suggest that silkworm pupase is a new source of bioactive components and alfa-glucosidase inhibitor.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：蚕サナギ 糖質分解酵素阻害作用 血糖上昇抑制作用

## 1. 研究開始当初の背景

国連の世界人口長期予測によると、世界の人口は 21 世紀半ばには現在の約 1.5 倍になるといわれている。この増加する人口に必要なタンパク質を供給するためには、従来の家畜、家禽、魚類などのタンパク質源だけでは、不十分であり、新しいタンパク質源が必要になる。食用昆虫はその候補の 1 つとして考えられており、未来のタンパク質源になる可能性がある。

長野県の伊那、木曾、佐久地域には、古くから昆虫を食べる文化（昆虫食文化）が根付いている。具体的には、イナゴ、蚕のサナギ、ザザムシ、蜂の子などが挙げられるが、これらはかつて山間地域におけるタンパク質源として欠かせないものだった。

これまで、我々は、長野県内で古くから食われてきた昆虫に注目し、成分分析を行ってきた。その結果、蚕サナギは非常に良質のタンパク質を含んでおり、未来のタンパク質源となる可能性を見出した<sup>(1)</sup>。蚕サナギ乾燥粉末のタンパク質含量は 55.6% で、バリン、メチオニン、フェニルアラニンなどの必須アミノ酸を多く含んでおり、2007 年 FAO/WHO/UNU 報告の 18 歳以上のアミノ酸必要量を満たしていた。また、タンパク質以外に注目すべき点は脂肪酸組成であり、乾燥粉末の脂質（32.2%）のうち、主要脂肪酸として n-3 系の  $\omega$ -3 系脂肪酸を 36.3% 含んでいた。

一方、桑葉は強い  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害成分である 1-デオキシノジリマイシン(DNJ)を多量に含み、糖尿病予防効果をもつことが知られている<sup>(2)</sup>。また、桑葉を食べる蚕幼虫は DNJ を 2.7 倍濃縮することが報告されている<sup>(3)</sup>。最近我々は、蚕サナギにも DNJ が含まれることを報告し、蚕サナギは良質のタンパク質と脂質および  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害成分を有する新規素材となる可能性を見出した<sup>(1)</sup>。

群馬県の製糸工場では、繭から糸をとった残りのサナギは、食用として年間 500 kg 程度長野県へ出荷しているが、他は鯉の飼料などとして利用している。製糸工場の副産物である蚕サナギは、その一部が食用として利用されているにすぎない。具体的にはサナギを砂糖と醤油で煮た食品であるが、現在では信州南部の珍味としての位置づけである。日本国内で古くから食されているにもかかわらず、蚕サナギの栄養学的な研究は、これまでほとんど行われてこなかった。したがって、蚕サナギが、栄養学的に良質なタンパク質源や脂質源となることを科学的に証明する必要がある。また、蚕サナギは桑葉と同様に DNJ を含むため、糖尿病予防効果をもつ可能性が高い。

<sup>(1)</sup> Silkworm pupae (*Bombyx mori*) are new sources of high quality protein and lipid.

Tomotake H, Katagiri M, Yamato M. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2010;56(6):446-8.

<sup>(2)</sup> グルコシダーゼ阻害作用を有する桑葉の糖尿病予防食素材への可能性 木村俊之 日本食品科学工学会誌, 57 巻, 2 号, 57-62, (2010)

<sup>(3)</sup> Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). Asano N, Yamashita T, Yasuda K, Ikeda K, Kameda Y, Kato A. J Agric Food Chem 49: 4208-4213, (2001).

## 2. 研究の目的

本研究では、蚕サナギの更なる栄養機能性を把握するため、ビタミン、ミネラル、食物繊維等の成分分析を行う。また、繭の品種別にサナギの栄養成分および DNJ 含量を分析する。さらに、蚕サナギ乾燥粉末を用いた飼料で、2 型糖尿病ラットを飼育し、糖尿病予防効果を確認する。最終的には、製糸工場の副産物である蚕サナギを粉末化し、高い栄養価と糖尿病予防効果を併せ持つ、食品素材としての利用法を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 蚕サナギの粉末化処理

長野県飯田市内の錦食品（有）より、「甘露煮」の原材料として用いられている蚕サナギを購入した。蚕サナギは、ポリエチレンの袋に入れ、沸騰水浴中で間接加熱を行った。その後、凍結乾燥し、すり鉢で粉末状にした。

### (2) 蚕サナギタンパク質の SDS-PAGE 分析

蚕サナギ粉末を尿素と SDS を含む緩衝液または 3%NaCl 中で加熱抽出した（60℃、1 時間）後、SDS-PAGE 用サンプル処理液を加え（1:1）、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて、電気泳動を行った。

### (3) 蚕サナギタンパク質の消化性試験

試料（タンパク質として 150mg）を水にけん濁し、6N 塩酸で pH 2.0 に調整した。37℃ に保温し、ペプシン 1.5mg を添加した。攪拌しながら時間毎にサンプリングした。その後、10%水酸化ナトリウムで pH8.5 に調整し、パンクレアチン 4.5mg を添加した。同様に攪拌しながら時間毎にサンプリングした。

サンプルは 30%トリクロロ酢酸を添加後、遠心した。上清に 7%炭酸水素ナトリウムと 0.1%TNBS を添加し、420nm の吸光度を測定した。

### (4) 蚕サナギ抽出物のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害試験

蚕サナギの熱水抽出物を試料として用いた。ACE 阻害活性はキットを用いて測定した。付属の 96 穴プレートに段階希釈したサンプルを入れ、Substrate buffer を 20  $\mu$ l ずつ加

えた。Enzyme working solution を 20  $\mu$ l ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。各ウェルに Indicator working solution を 200  $\mu$ l ずつ加え、室温で 10 分間インキュベートした後、450nm の吸光度を測定した。

#### (5) 蚕サナギ抽出物の抗酸化性試験

蚕サナギのリン酸緩衝液抽出物を試料として用いた。試料に 0.1M Tris-HCl (pH 6.8) 1.8 mL と 0.1 mM DPPH 2.0 mL を加え、暗所で 30 分放置した後、517nm の吸光度を測定した。

#### (6) 蚕サナギ抽出物の抗菌性試験

蚕サナギのリン酸緩衝液抽出物または有機溶媒抽出物を試料として用いた。96 穴プレートに *S. aureus* ATCC 25923 菌液 300  $\mu$ l を入れ、試料 30  $\mu$ l を加えた後、655 nm の吸光度を経時的に測定した。抗菌成分の分離には薄層クロマトグラフィーを用いた。(吸着剤：シリカゲル、展開溶媒：石油E-テル：イソL-テル：酢酸 = 80 : 20 : 1 (v/v/v)、検出：ヨウ素)

#### (7) 蚕サナギ抽出物の糖質分解酵素阻害試験

蚕サナギの熱水抽出物を試料として用いた。0.5M マルトースまたはスクロース 50  $\mu$ l に 0.1M マレイン酸 300  $\mu$ l、試料液 100  $\mu$ l を加え、37  $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。その後、酵素液 50  $\mu$ l (ラット小腸アセトンパウダー) を加え、37  $^{\circ}$ C で 1~3 時間インキュベートした。沸騰水浴中で反応を停止させ、生成したグルコースをキットを用いて定量した。

#### (8) 蚕サナギ抽出物のラット血糖上昇抑制試験

SD 雄ラットにスクロース 2g/kg を水 3ml に溶解して経口投与した (対照群)。また、蚕サナギ熱水抽出物 50mg を水 3ml に溶解して経口投与し、30 分後、スクロース 2g/kg を水 3ml に溶解して経口投与した (蚕サナギ群)。15、30、60 分後の各群のラットの血糖値を簡易血糖測定装置を用いて測定した。

#### (9) 蚕サナギ抽出物の 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) 分析

蚕サナギのエタノール抽出物を試料として用いた。乾燥試料 500 mg に 50% エタノール 5 ml を加え、超音波処理をした後、加熱抽出した (60、30 分間)。この処理を 2 回行い、遠心分離した上清をロータリーエバポレーターにより溶媒を留去した。その後、10mM 炭酸アンモニウム含有アセトニトリル：水 (50 : 50) 1mL に溶解し、HPLC にて分析した。HPLC の条件は以下のとおりである。カラム：Unison UK-Amino column (250 mm  $\times$  4.6 mm) (Imtakt)

移動相：10mM 炭酸アンモニウム含有アセトニトリル：水 (50 : 50)

流速：0.8mL/min

試料量：10  $\mu$ L

検出：示唆屈折計

#### (10) 蚕サナギの食経験調査

18~20 歳の女性 131 名に対して、食用昆虫または蚕サナギの食経験について質問した。

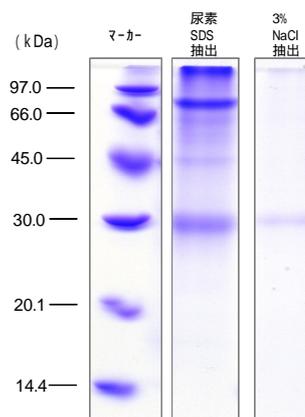
### 4. 研究成果

#### (1) 蚕サナギ粉末

蚕サナギ乾燥粉末のタンパク質含量は 55.6%、脂質含量は 32.2% だった。乾燥前の水分含量は、51.9% であった。乾燥粉末の性状は、やや粗く繊維質が混じっていた。食用粉末として利用するには、ミル等でさらに細かくした後、ふるいにかける必要がある。

#### (2) 蚕サナギタンパク質の組成

蚕サナギのタンパク質組成を分析した結果、80kDa 付近と 30kDa 付近に濃いバンドが見られた。

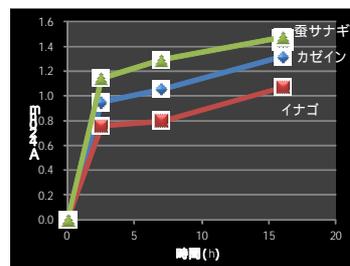


3%NaCl 抽出ではバンドが薄いことから、蚕サナギタンパク質の水への溶解性は低いことがわかった。また、尿素と SDS で抽出したタンパク質の中には、重合した高分子のタンパク質が含まれており、泳動されなていなかった。これらのことより、蚕サナギタンパク質はこれまでに報告されている繭タンパク質の組成とは異なると考えられる。

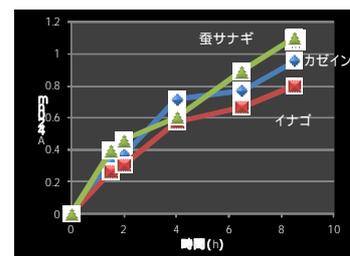
#### (3) 蚕サナギタンパク質の消化性

インビトロ消化実験の結果、蚕サナギタンパク質は、ペプシンおよびパンクレアチンにより、経時的に加水分解されることがわかった。

##### ペプシン消化



##### パンクレアチン消化



ペプシンによる消化では、同時に比較した、カゼインやイナゴのタンパク質よりも、消化性がよかった。このことより、蚕サナギには、消化酵素を阻害するような物質は含まれていないことがわかった。データには示さないが、経時的なサンプルを SDS-PAGE で分析した結果、時間とともにバンドが消失していた。

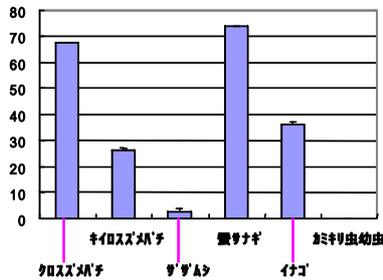
**(4) 蚕サナギ抽出物のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性**

蚕サナギの熱水抽出液は、濃度依存的に ACE を阻害した。(原液: 83.06%, 5 倍希釈: 98.2%, 25 倍希釈: 65.35%, 125 倍希釈: 17.22%) 蚕サナギの ACE 阻害作用は過去に報告があるが、今回調整した試料にも明らかに活性がみられた。今後活性成分の探索や吸収の問題が出てくるが、血圧降下作用に期待がもてる。

**(5) 蚕サナギ抽出物の抗酸化性**

蚕サナギのリン酸緩衝液抽出物に強いラジカル捕捉活性がみられた。一方、メタノール抽出物の活性は低く、抗酸化成分は、ポリフェノール以外の水溶性の物質である可能性が示唆された。

リン酸緩衝液抽出物



蚕サナギリン酸緩衝液抽出物の抗酸化成分

薄層クロマトグラフィー

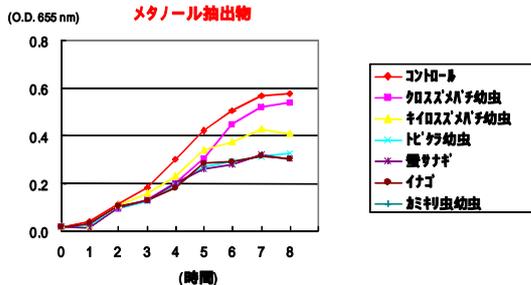


**(6) 蚕サナギ抽出物の抗菌性**

蚕サナギのメタノール抽出物に黄色ブドウ球菌に対する増殖阻害作用がみられた。蚕サナギの抗菌成分は、エーテルで抽出される脂溶性の物質である可能性が示唆された。昆虫の体内に抗菌成分が存在することは興味深い。

**食用昆虫抽出物の抗菌作用**

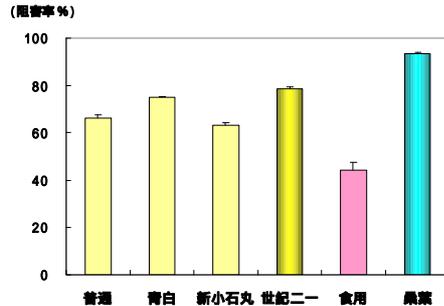
(*S. aureus* ATCC 25923)



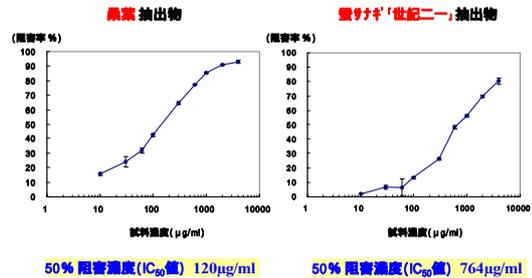
**(7) 蚕サナギ抽出物の糖質分解酵素阻害試験**

蚕サナギの熱水抽出物に強い二糖類分解酵素阻害活性がみられた。飯田地域で食用としているサナギ抽出物の活性よりも、乾燥まゆから取り出したサナギ抽出物の活性の方が強かった。サナギの品種別に活性を比較した結果、「青白」および「世紀二」の抽出物に強い活性がみられた。サナギ抽出物の活性は桑葉抽出物の活性よりも弱かった。

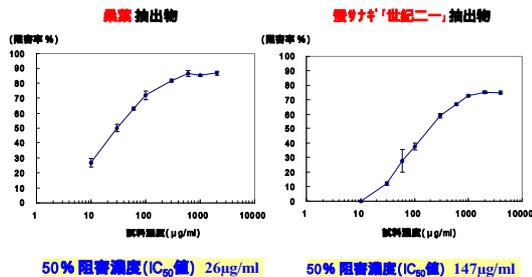
**蚕サナギ抽出物の二糖類分解酵素阻害作用**



**蚕サナギ抽出物「世紀二」と桑葉粉末抽出物の二糖類分解酵素阻害作用(マルターゼ)**

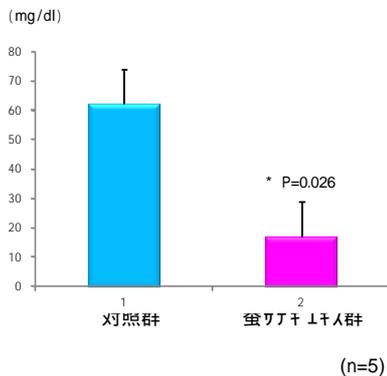


**蚕サナギ抽出物「世紀二」と桑葉粉末抽出物の二糖類分解酵素阻害作用(スクラーゼ)**



**(8) 蚕サナギ抽出物のラット血糖上昇抑制試験**

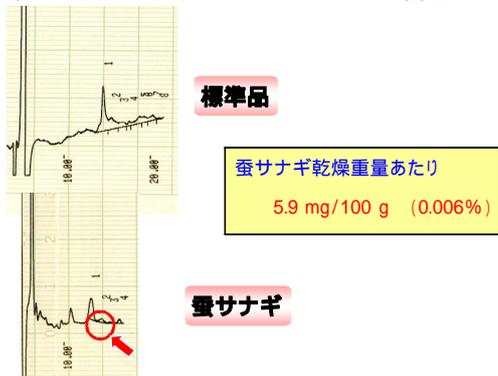
蚕サナギ抽出物は、スクロース負荷 15 分後のラット血糖値の上昇を抑制した。今回、かなり濃い濃度の試料を用いたが、試験管内の酵素阻害実験の結果を裏づけることができた。当初予定していた、2 型糖尿病ラットを用いた実験は、実施できなかったが、蚕サナギは良質のタンパク質源、脂質源であると同時に血糖上昇抑制効果をもつことがわかった。



### (9) 蚕サナギ抽出物の 1-デオキシノジリマイシン (DNJ) 分析

蚕サナギの DNJ 含量は桑葉や蚕幼虫の DNJ 含量よりも少なかった。Asano らは、蚕幼虫は桑葉の DNJ を約 2.7 倍濃縮することを報告している。しかしながら、今回したサナギの DNJ 含量はかなり低かった。製糸作業では、繭を湯につけるために、DNJ を流れ出している可能性も考えられる。

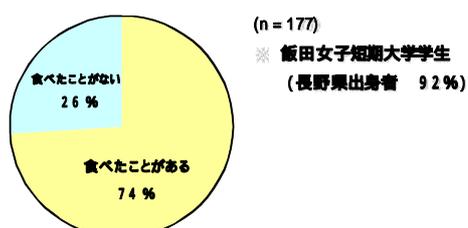
#### 蚕サナギの1-デオキシノジリマイシン含量



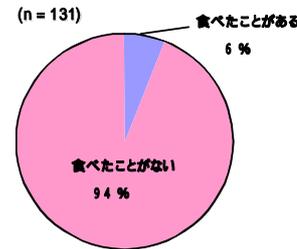
### (9) 蚕サナギの食経験調査

長野県出身短期大学生の多くに昆虫摂取経験があった。しかしながら、蚕サナギを食べたことのある学生は 6% にすぎず、若い年齢の学生にはなじみのない食材であることがわかった。蚕サナギ粉末は、サナギの形はなくなるが、においは強かった。エタノールによる脱脂処理により、においは抑えられるものの、コストやその後の利用のことを考えると現実的ではなかった。今後は、においを抑えるための研究が必要である。したがって、今回、当初予定していた、菓子類や麺類、パンへの利用について検討する段階まで至らなかった。

#### 食用昆虫の摂取経験



#### 蚕サナギの摂取経験



最近、国連食糧農業機関 (FAO) は「昆虫は有望な食料」報告書を発表した。報告書では、1kg の牛肉を生産するために 8kg の飼料が必要なのに対し、食用昆虫は 1kg を 2kg の飼料で生産できることから生産効率が高いとしている。

蚕サナギがさまざまな食品形態で日常の食事の中に取り入れられるようになれば、栄養素の補給および糖尿病の予防が容易となり、疾病を一次予防することにより、医療費を低減化できる。蚕サナギを利用した新しい機能性食品の開発は、信州の郷土食品の価値を大きく高めるとともに、衰退する養蚕業界の発展、荒廃桑園の再生、地域食品産業の新しい進出分野として期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- Hosaka T, Sasaga S, Yamasaka Y, Nii Y, Edazawa K, Tsutsumi R, Shuto E, Okahisa N, Iwata S, Tomotake T, Sakai T  
Treatment with buckwheat bran extract prevents the elevation of serum triglyceride levels and fatty liver and in KK-Ay mice  
J Med Inves 2014;61(3-4) 印刷中
- Tomotake H, Yamazaki R, Yamato M.  
An autoclave treatment reduces the solubility and antigenicity of an allergenic protein found in buckwheat flour.  
J Food Prot. 2012 Jun;75(6):1172-5.  
doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-368.
- Okazaki Y, Utama Z, Suidasari S, Zhang P, Yanaka N, Tomotake H, Sakaguchi E, Kato N.  
Consumption of vitamin B<sub>6</sub> reduces fecal ratio of lithocholic acid to deoxycholic acid, a risk factor for colon cancer, in rats fed a high-fat diet.  
J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2012;58(5):366-70.
- Okazaki Y, Sitanggang NV, Sato S, Ohnishi N, Inoue J, Iguchi T, Watanabe T, Tomotake H, Harada K, Kato N.  
Burdock fermented by Aspergillus

- awamori elevates cecal Bifidobacterium, and reduces fecal deoxycholic acid and adipose tissue weight in rats fed a high-fat diet. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77(1):53-7. Epub 2013 Jan 7.
- 5 Okazaki Y, Tomotake H, Tsujimoto K, Sasaki M, Kato N. Consumption of a resistant protein, sericin, elevates fecal immunoglobulin A, mucins, and cecal organic acids in rats fed a high-fat diet. J Nutr. 2011 Nov;141(11):1975-81. doi: 10.3945/jn.111.144246. Epub 2011 Sep 21.2
- 6 Hosaka T, Nii Y, Tomotake H, Ito T, Tamanaha A, Yamasaka Y, Sasaga S, Edazawa K, Tsutsumi R, Shuto E, Okahisa N, Iwata S, Sakai T. Extracts of common buckwheat bran prevent sucrose digestion. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2011;57(6):441-5.

〔学会発表〕(計9件)

- 1 友竹浩之、片桐充昭  
蚕サナギの1-デオキシノジリマイシン含量および糖質分解酵素阻害作用  
日本農芸化学会学術総会 2013 年度大会  
(2014 年 3 月 29 日：明治大学)
- 2 友竹浩之、千裕美  
ヤーコン粉末の特徴と利用  
第 60 回日本栄養改善学会学術総会  
(2013 年 9 月 14 日：神戸国際会議場)
- 3 友竹浩之、柴田あずさ、長谷部遥、花井希、望月希代、柴本むつ美  
小麦アレルギー対応に向けた米粉およびホワイトソルガム粉の利用  
第 67 回日本栄養食糧学会  
(2013 年 5 月 26 日：名古屋大学)
- 4 友竹浩之、片桐充昭、柴本むつ美  
蚕サナギおよびイナゴタンパク質の栄養特性  
日本農芸化学会学術総会 2013 年度大会  
(2013 年 3 月 27 日：東北大学)
- 5 友竹浩之、柴本むつ美、富口由紀子  
高圧加熱処理がそばタンパク質の溶解性と抗原性に及ぼす影響  
第 59 回日本栄養改善学会学術総会  
(2012 年 9 月 13 日：名古屋国際会議場)
- 6 友竹浩之、牛山瑞穂、園原一吉  
キクイモ粉末の特徴と利用  
第 66 回日本栄養食糧学会  
(2012 年 5 月 20 日：東北大学)
- 7 友竹浩之、柴本むつ美、新居 佳孝  
高蛋白質そば粉抽出物の血糖上昇抑制作用  
日本農芸化学会学術総会 2012 年度大会

- (2012 年 3 月 25 日：京都女子大学)
- 8 友竹浩之、柴本むつ美、富口由紀子  
黒ソバ粉が肥満・糖尿病マウスの血糖上昇に及ぼす影響  
第 58 回日本栄養改善学会学術総会  
(2011 年 9 月 9 日：広島国際会議場)
- 9 友竹浩之、Yunkyung Han, 原口智, 松本やよい, Yonghui Xu, 岡崎由佳子, 峰尾茂, 森山明穂, 井上淳詞, 加藤範久  
ポリフェノール摂取は高脂肪食摂取ラットの糞中ステロール組成を改善する  
第 65 回日本栄養食糧学会  
(2011 年 5 月 15 日：お茶の水女子大学)

〔図書〕(計0件)  
〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし  
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
友竹 浩之 (TOMOTAKE HIROYUKI)  
飯田女子短期大学・家政学科・教授  
研究者番号：90300136

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号：