

令和元年6月25日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07750

研究課題名(和文) 血糖上昇抑制成分1-デオキシノジリマイシンのラベル化体調製と吸収・動態解明

研究課題名(英文) Preparation of 15N labeled 1-deoxynojirimycin and evaluation of its absorption and organ migration

研究代表者

木村 俊之 (KIMURA, Toshiyuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：70355303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1-デオキシノジリマイシン(DNJ)は桑葉や大豆発酵食品などに含まれ消化管でグルコシダーゼ阻害を示すことにより、食後の血糖値の上昇を抑制する。DNJは機能性表示食品の関与成分として認められているが、更なる科学的な安全性の検証が必要である。  
本課題において、15Nラベル化DNJを作成し、それを動物に経口摂取させ、経時的に尿と糞を採取後、各種臓器を採取し、15Nを測定することで、DNJの吸収、排出と組織への移行を明らかにした。その結果、DNJは約半量が吸収され、24時間以内にすみやかに排出された。また、微量ながら臓器への移行が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1-デオキシノジリマイシン(DNJ)は桑葉や大豆発酵食品などに含まれる天然の機能性成分であり、食後の血糖値の上昇を抑制する。2018年度に機能性表示食品の関与成分として表示が認められたことから今後さらに商品が出てくると思われる。DNJはある程度体内に吸収されるが、その後の排出や組織への蓄積や影響はほとんど研究がない。このため、DNJの安全性と機能性メカニズムを解明することで国民に安心して提供できることが期待される。これにより、糖尿病の予防する食事の提言が可能となる。

研究成果の概要(英文)：1-Deoxynojirimycin (DNJ) is a natural occurring potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor containing in mulberry leaves or some soybean fermented food. DNJ reduces the elevation of postprandial glycemic response after meal. Therefore, DNJ is expected to prevent diabetes and various mulberry leaf related foods have been developed and currently available for the market in Japan. Whereas there have been many reports of efficacy of DNJ, few reports of safety. So, it required to clarify absorption kinetics of DNJ. In this study, we orally administered 15N-labelled DNJ to rats and measured 15N content in urine, feces and organs. The results showed that approximately 50% or more 15N was absorbed into the body and rapidly excreted within 24 hours. Although the amount was very low, 15N was detected in organs, that suggest that DNJ migrated to organs.

研究分野：食品科学

キーワード：DNJ 吸収、排出 組織移行 安定同位体ラベル トレーサー

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における2型糖尿病患者は、成人の5人に1人が罹患し、高齢化社会の進行により今後さらに糖尿病患者数が増えると予想されている。医療費についても、糖尿病の医療費は1兆2,000億円を超え医療財政を逼迫させる原因の一つとなっている。このように糖尿病をめぐる状況は深刻であり、グローバルな課題としても早急な対策が求められている。

近年の疫学的研究より、食事後の血糖値の上昇スパイクが心筋梗塞などの心血管イベント発症の独立した危険因子であることが明らかにされ、食後高血糖のコントロールが糖尿病予防と治療のポイントと考えられるようになってきている<sup>1,2)</sup>。桑や枯草菌などが産生するアザ糖の一種である1-デオキシノジリマイシン(DNJ)は強力なグルコシダーゼ阻害作用を有し、ヒトにおいて10mg程度の食前の摂取で有意に食後血糖値の上昇を抑制する<sup>3)</sup>。これまでの研究でDNJは糖尿病予防に対し有効なエビデンスを得つつあり、世界中でDNJを含む種々の食品が開発されている状況にある。今後、DNJを含む食品が世界で展開すると思われるが、その安全性と効能発現メカニズムを十分に科学的に検証する必要がある。

## 2. 研究の目的

過去の研究で、DNJのLC-MS/MS分析による血中および尿中のDNJの経時的変化が調べられていたが、LC-MS/MS分析では吸収・排出のマスマランスが合わないため、精度の高い方法が求められていた<sup>4)</sup>。本研究では、DNJの分子内に窒素が含まれることに着目し(図1) DNJの窒素を安定同位体の<sup>15</sup>Nでラベル化することで、DNJの正確な吸収および排出、さらには組織への移行を解析することを目的とした。

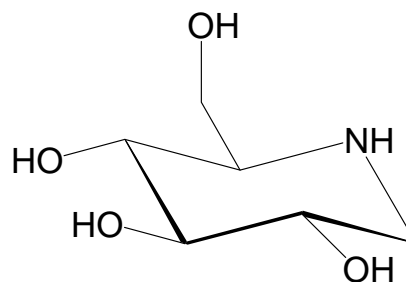


図1 1-deoxynojirimycin (DNJ)の化学構造

## 3. 研究の方法

### (1)<sup>15</sup>Nラベル化DNJの調製

DNJ産生菌である*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7株を<sup>15</sup>Nラベルした硫酸アンモニウムを唯一の窒素源とする完全合成培地で培養することで、<sup>15</sup>Nラベル化DNJを生産させた。得られた培養上清はエタノールを添加し沈殿を除去後、強陽イオン交換樹脂と強陰イオン交換樹脂によって、<sup>15</sup>Nラベル化DNJを調製した<sup>5)</sup>。

### (2)安定同位体ラベルによるDNJのトレーサー試験

6週齢の雄性のSDラットを4匹ずつ2群に分けた。DNJ投与群は、1匹あたり10mgの<sup>15</sup>Nラベル化DNJ経口投与した。対照群は水を経口投与した。投与後、0-24時間と24-48時間の尿と糞を採取した。48時間後、屠殺し、小腸、大腸、胃、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪、脳、心臓、肺、精巣を採取した。尿、糞および各種臓器の<sup>15</sup>Nは総N量と<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N比から求めた。総N量は全窒素測定装置(Sumigraph NCH-22)を用いて測定し、<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N比は安定同位体質量分析計(ANCA-GSL)を使用し求めた。

## 4. 研究成果

(1)*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7株を、C源をラクトース、N源を硫酸アンモニウムにし、C/N比を6.25に培地を調製し、37℃、5日間振とう培養することで、培養上清1Lあたり1140mg/LのDNJの生産を達成した。この条件で4Lの培養上清から3.8gの精製<sup>15</sup>Nラベル化DNJを得た。<sup>1</sup>H-NMR解析から<sup>15</sup>Nラベル化DNJの精製度は約82%であった<sup>5)</sup>。

(2)尿および糞中の<sup>15</sup>Nの回収率を図3Aに示す。対照群の<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N比は自然界の存在比率と同等であった。個体による差は見られるものの10mgのDNJの経口投与に対し、50%以上の<sup>15</sup>Nが尿から回収された。このことから経口摂取したDNJの半分以上が体内に吸収されることが分かった。また、48時間後までの尿と糞の<sup>15</sup>Nの回収率は約80%に達した。各臓器における<sup>15</sup>Nの回収率を図3Bに示す。DNJの投与群の<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N比の値は低いものの、対照群の<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N比の値に比べ確かに高い値となっており、体内に吸収されたDNJは臓器に移行していることが判明した。臓器の比較では、小腸や大腸といった消化器や、肝臓や腎臓といった解毒、排出系に<sup>15</sup>Nが多く、反対に脂肪組織にはほとんど<sup>15</sup>Nは移行していないことが分かった。

本試験では、投与した<sup>15</sup>Nの80%が尿、糞、臓器から回収された。残りの20%に関しては現在のところ不明であるが、体全体に低いレベルで分布していることが推察される。これまでのLC-MS/MS分析の研究においてもDNJは臓器から検出されている<sup>6,7)</sup>ことから、体内に吸収されたDNJのうち一部は器官に移行すると考えられる。

桑葉茶などDNJに関する食品は市場に各種販売されており、また機能性表示も認められることになったことから今後ますます市場が拡大すると予想される。DNJに関して、これまでのと



図2 <sup>15</sup>Nラベル化DNJの結晶

ころ有害事象は報告されていないが、DNJ が臓器に移行することから長期摂取における臓器への影響等を、今後詳細に検討する必要があるものと考えられる。

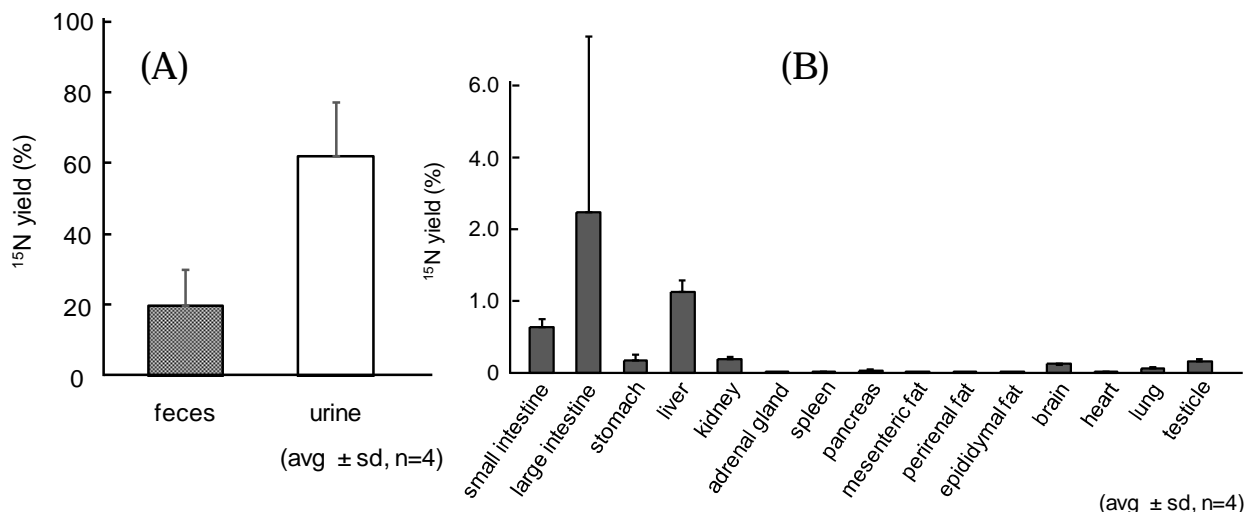


図3  $^{15}\text{N}$  ラベル化 DNJ 経口投与後 48 時間までの  $^{15}\text{N}$  回収率  
(A)糞および尿 (B) 臓器

< 引用文献 >

- JL. Chiasson, RG. Josse, R. Gomis, M. Hanefeld, A. Karasik, M. Laakso, *Lancet*, **359**, 2072-2077 (2002)
- R. Kawamori, M. Tajima, Y. Iwamoto, A. Kashiwagi, K. Shimamoto, K. Kaku, *Lancet*, **373**, 1607-1614 (2009)
- T. Kimura, K. Nakagawa, H. Kubota, Y. Kojima, Y. Goto, K. Yamagishi, S. Oita, S. Oikawa, T. Miyazawa, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 5869-5874 (2007)
- K. Nakagawa, H. Kubota, T. Kimura, S. Yamashita, T. Tsuzuki, S. Oikawa, T. Miyazawa, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8928-8933 (2007)
- K. Yamagishi, S. Onose, S. Takasu, J. Ito, R. Ikeda, T. Kimura, K. Nakagawa, T. Miyazawa, *Food Sci. Technol. Res.*, **23**, 349-353 (2017)
- S. Yang, J. Mi, Z. Liu, B. Wang, X. Xia, R. Wang, Y. Liu, Y. Li, *Molecules*, **22**, 1616 (2017)
- T. Tsuduki, I. Kikuchi, T. Kimura, K. Nakagawa, T. Miyazawa, *Food Chem.* **139**, 16-23 (2013)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Soo Takasu, Isabella S Parida, Shinji Onose, Junya Ito, Ryoichi Ikeda, Kenji Yamagishi, Oki Higuchi, Fukuyo Tanaka, Toshiyuki Kimura, Teruo Miyazawa, Kiyotaka Nakagawa, Evaluation of the anti-hyperglycemic effect and safety of microorganism 1-deoxynojirimycin, *Pros One*, 査読有り, e0199057, (2018)
- Shuang E, Kazushi Yamamoto, Yu Sakamoto, Yui Mizowak, Yui Iwagaki, Toshiyuki Kimura, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa, Tsuyoshi Tsuduki, Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents colorectal cancer in mice, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 査読有り, **61(1)**, 47-52 (2017)
- Kenji Yamagishi, Shinji Onose, Soo Takasu, Junya Ito, Ryoichi Ikeda, Toshiyuki Kimura, Kiyotaka Nakagawa, Teruo Miyazawa, Lactose increases the production of 1-deoxynojirimycin in *Bacillus amyloliquefaciens*, *Food Sci. Technol. Res.*, 査読有り, **23**, 349-353 (2017)

〔学会発表〕(計 12 件)

- Toshiyuki Kimura, Soo Takasu, Kiyotaka Nakagawa, Masuko Kobori, Evaluation of the absorption and organ migration of 1-deoxynojirimycin in rat, Evaluation of the absorption and organ migration of 1-deoxynojirimycin in rat, 47th Annual Meeting of Food and Agriculture Panel, US-Japan Cooperative Program in Natural Resources (UJNR2018), 2018
- 高須蒼生、 Isabella S Parida、 木村俊之、 山岸賢治、 伊藤隼哉、 池田亮一、 宮澤陽夫、 仲川清隆、 桑葉中のアザ糖の吸収と臓器への移行の評価、 食品科学工学会東北支部大会、

2018

Isabella Supardi Parida、高須蒼生、伊藤隼哉、池田亮一、山岸賢治、木村俊之、宮澤陽夫、仲川清隆、Metabolic effect and organ distribution of microbial 1-deoxynojirimycin in C57BL/6J mice、日本農芸化学会 2018 年度 北海道支部・東北支部 合同支部大会、2018  
Isabella S Parida, Soo Takasu, Junya Ito, Ryoichi Ikeda, Kenji Yamagishi, Toshiyuki Kimura, Teruo Miyazawa, Takahiro Eitsuka, Kiyotaka Nakagawa, Evaluation of the absorption and organ migration of 1-deoxynojirimycin in rat, Asia-Pacific Nutrigenomics and Nutrigenetics Organization (APNNO), 2018

Isabella Parida、高須蒼生、伊藤隼哉、池田亮一、山岸賢治、木村俊之、宮澤陽夫、仲川清隆、微生物由来 1-デオキシノジリマイシンの継続摂取がマウスの食後高血糖に与える影響、第 72 回栄養・食料学会、2018

高須蒼生、木村俊之、田中福代、山岸賢治、伊藤隼哉、池田亮一、宮澤陽夫、仲川清隆、<sup>15</sup>N ラベル化 1-デオキシノジリマイシンを利用した吸収排泄動態の解明、日本農芸化学会 2018 年度大会大会、2018

高須蒼生、山岸賢治、小野瀬晋司、伊藤隼哉、池田亮一、樋口央紀、木村俊之、宮澤陽夫、仲川清隆、微生物由来 1-デオキシノジリマイシンの機能性及び吸収排泄動態の評価、日本農芸化学会 2017 年度 東北支部支部大会、2017

高須蒼生、山岸賢治、小野瀬晋司、伊藤隼哉、池田亮一、樋口央紀、木村俊之、宮澤陽夫、仲川清隆、微生物由来 1-デオキシノジリマイシンの食後高血糖改善作用評価、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017

山岸賢治、高須蒼生、伊藤隼哉、池田亮一、木村俊之、仲川清隆、宮澤陽夫、食後高血糖抑制物質 DNJ 及び他アザ糖生産量の、菌株間における差異、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017

木村俊之、高須蒼生、伊藤隼哉、山岸賢治、田中福代、小堀真珠子、宮澤陽夫、仲川清隆、<sup>15</sup>N ラベル化 1-デオキシノジリマイシンを用いたラットへの吸収・排出バランス、組織移行の評価、日本食品科学工学会第 64 回大会、2017

高須蒼生、山岸賢治、小野瀬晋司、伊藤隼哉、池田亮一、樋口央紀、木村俊之、仲川清隆、宮澤陽夫、1-デオキシノジリマイシンの高生産培養：成分プロファイルと機能性の評価、2016 年度 日本農芸化学会 東北支部大会、2016

山岸賢治、小野瀬晋司、高須蒼生、伊藤隼哉、池田亮一、木村俊之、仲川清隆、宮澤陽夫、*Bacillus amyloliquefaciens* における、ラクトースを基質とした DNJ の高生産、日本応用糖質科学会平成 28 年度大会、2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：仲川 清隆

ローマ字氏名：NAKAGAWA, Kiyotaka

所属研究機関名：東北大学大学院

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：80361145

研究分担者氏名：山岸 賢治

ローマ字氏名：YAMAGISHI, Kenji

所属研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：食品研究部門

職名：上級研究員

研究者番号(8桁)：80355304

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。