

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05874

研究課題名(和文) 血糖値上昇抑制成分1-デオキシノジリマイシンの長期摂取による組織移行と代謝の評価

研究課題名(英文) Evaluation of organ accumulation and metabolism of 1-deoxynojirimycin by long-term administration

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・高度分析研究センター・主席研究員

研究者番号：70355303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アザ糖である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、食後の血糖値上昇を抑制する。DNJを機能性食材として展開するためには科学的な安全性の検証が必要である。本課題において、高純度安定同位体<sup>15</sup>Nラベル化DNJを用い、ラットを用い単回投与試験を行った結果、8割以上のDNJが尿とフンから回収された。血糖値上昇抑制の有効性を示す通常の摂取量では組織への移行はないことが確認された。また、ラットを用いた3ヶ月の<sup>15</sup>Nラベル化DNJ長期間投与での組織蓄積の試験を行った。これらについて、2022年度中の報文化を予定している。

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、DNJの機能性食品は現在、市場販売されており、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知見がない。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 high purified <sup>15</sup>N-labelled DNJ to rats and measured <sup>15</sup>N content in urine, feces, and organs. The results showed that approximately 80% or more <sup>15</sup>N was recovered from urine and feces and was not detected in organs. Then, 3 month-administration study of <sup>15</sup>N-labelled DNJ was performed to evaluate organ accumulation. The data is being analyzed.

研究分野：食品分析学

キーワード：1-デオキシノジリマイシン アザ糖 安全性 安定同位体ラベル 長期投与

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における2型糖尿病は、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。

近年の疫学的研究により、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)(図1)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る。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り、我が国においても2018年度に厚労省の通知を受けDNJの機能性表示が可能となっている。今後、DNJを含む食品が我が国のみならず世界で展開すると思われるが、その安全性に関する科学的知見はほとんど無く、十分に科学的に検証する必要がある。

## 2. 研究の目的

これまでDNJはLC-MS/MS分析による血中および尿中のDNJの経時変化が調べられていたが、LC-MS/MS分析では吸収・排出のマスバ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>。我々は、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、<sup>15</sup>Nでラベル化DNJを作成し、<sup>15</sup>N量を定量することで正確なDNJの動態解析を可能とした。本研究では、長期投与での組織への蓄積を解析することを目的とした。

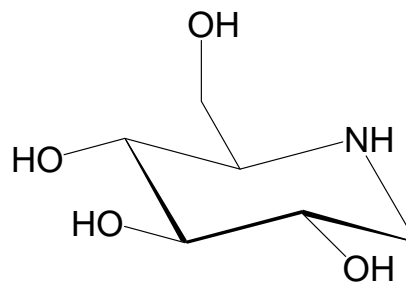


図1 1-deoxynojirimycin (DNJ)の化学構造

## 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>。本研究前の試験で使用した安定同位体ラベル化DNJの純度が82%程度であったことからマスバランス、組織蓄積の評価に夾雑物由来<sup>15</sup>Nの疑問が払拭できないことから精製条件を見直し、安定同位体ラベル化DNJを95%程度まで高純度化を進め、大量精製を行った。

### (2) 単回投与による投与量別吸収・排出評価

7週齢のSDラットを4群に分け(雄性、n=6)を12時間絶食後、水および<sup>15</sup>Nラベル化DNJ水溶液(2, 10, 100 mg/kg体重)をゾンデ投与したのち、0-5時間、5-10時間、10-24時間、24-48時間、48-72時間の尿、0-24時間、24-48時間、48-72時間のフンを採取した後、屠殺し、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、膵臓、脾臓、肺、心臓、脳、精巣、精巣周囲脂肪、腎臓周囲脂肪、腸間脂肪、血球、血漿、と体を採取した。得られたフン、尿、各種臓器は全窒素定量後、<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>Nの比を測定し、<sup>15</sup>Nの回収率を求めた。

### (3) 長期投与による組織蓄積の評価

6週齢のSDラットを2群に分け(雄性、DNJ投与群24頭、対照群2頭)、飲水中に<sup>15</sup>Nラベル化DNJを2mg/日(対照群は0mg/日)となるように溶かし、自由摂取させ飼育した。DNJ群は1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後に各8頭ずつ、対照群は3ヶ月後に2頭を屠殺し、肝臓、腎臓、胃、小腸、大腸、膵臓、脾臓、肺、心臓、脳、精巣、精巣周囲脂肪、腎臓周囲脂肪、腸間脂肪、血球、血漿、と体を採取した。各種臓器は全窒素定量後、<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>Nの比を測定し、<sup>15</sup>Nの回収率を求めた。

### (4) 細胞への添加による代謝物解析

100 mm径のプラスチックディッシュにヒト肝癌由来HepG2細胞をコンフルエントまで培養し、終濃度60 μMになるように<sup>15</sup>Nラベル化DNJを添加した。その後48時間培養し、細胞溶解液を強陽イオン交換固相抽出(strata SCX, phenomenex)で簡易精製し、LC-TOF/MSで解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) <sup>15</sup>Nラベル化DNJの製造については報文にまとめてある<sup>5)</sup>。精製法を再検討した結果、長期投与試験に必要な95%以上の高純度<sup>15</sup>Nラベル化DNJの大量生産に成功した。

(2) 単回投与試験の結果、投与量によらず投与した8割以上のDNJが回収され、そのほとんどが尿とフンに存在していた。2 mg/kg体重投与(小ドーズ)では尿から75%、フンから6%のDNJが回収され、10 mg/kg体重投与(中ドーズ)では尿から50%、フンから38%のDNJが回収



図2 <sup>15</sup>Nラベル化DNJの結晶

され、100 mg/kg 体重投与(大ドーズ)では尿から 34%、フンから 52%の DNJ が回収された。このことから DNJ は投与量により体内への吸収率が異なり投与量が少ない程、吸収率が高いことが判明した。組織からは大ドーズのみ小腸、大腸、盲腸の消化管系、肝臓、腎臓の解毒、排出系の組織に投与量の 0.15% 程度の DNJ が見られたものの、通常の摂取量(中ドーズ)以下では組織への移行は見られなかった。

(3) 単回投与では、ほとんどの DNJ はフン、尿中に排出されたが、一部 DNJ が組織中から検出された報告もあり、また日常的に長期にわたり摂取させた場合の組織蓄積についてはこれまで全く知見がない。長期投与では飲水中に DNJ を溶かし 2mg/日となるように自由摂取させたが、対照群に比較し、特に体重増加、飼育観察において変化は見られなかった。DNJ 投与群は投与開始 1、2、3 ヶ月後に各 8 頭、対照群は 3 ヶ月後に 2 頭を解剖したが組織観察、組織重量において対照群との差は見られなかった。新型コロナウイルスの影響により動物飼育に制限がかかったこともあり、飼育が当初計画より遅れ、解剖が 2021 年 12 月となったため、現在組織中  $^{15}\text{N}$  の測定結果をまとめている。

(4) ヒト肝癌由来 HepG2 細胞の培養液に  $^{15}\text{N}$  ラベル化 DNJ を添加し、細胞溶解液を分析したところ、 $^{15}\text{N}$  ラベル化 DNJ が検出されたことから、DNJ が細胞中に取り込まれることが判明した。現在細胞培養液中から  $^{15}\text{N}$  含有化合物のノンターゲット MS 分析と解析を行っている。

本試験では、単回投与した  $^{15}\text{N}$  ラベル化 DNJ の 80% 以上の  $^{15}\text{N}$  が尿、糞、臓器から回収され、組織中からは検出されなかった。しかしながら、これまでの LC-MS/MS 分析の研究において DNJ は臓器から検出されている<sup>6-8)</sup>ことから、長期摂取では組織への移行が見られると考えられる。長期試験については結果がまとまり次第公表する予定である。DNJ を初めとするアザ糖の代謝系についてはこれまでに科学知見がないことから、今後は DNJ の代謝について詳細な検討が必要であると考えられる。

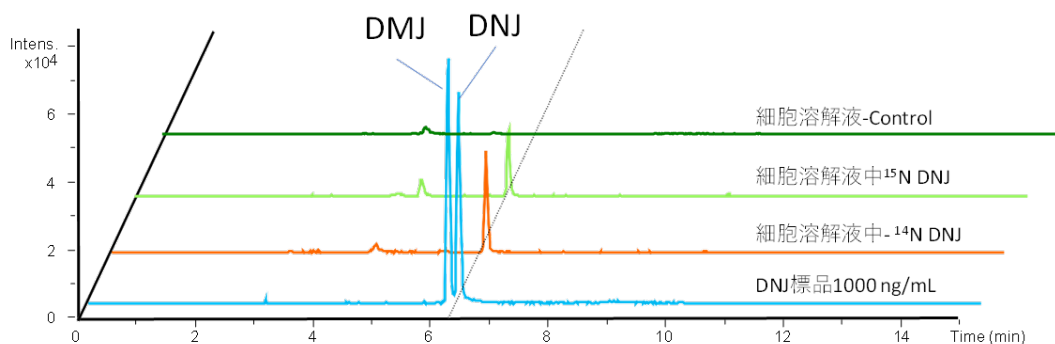


図3 培養細胞中からの DNJ の LC-MS クロマトグラム  
DMJ : 1-deoxymannonojirimycin, DNJ:1-deoxyojirimycin

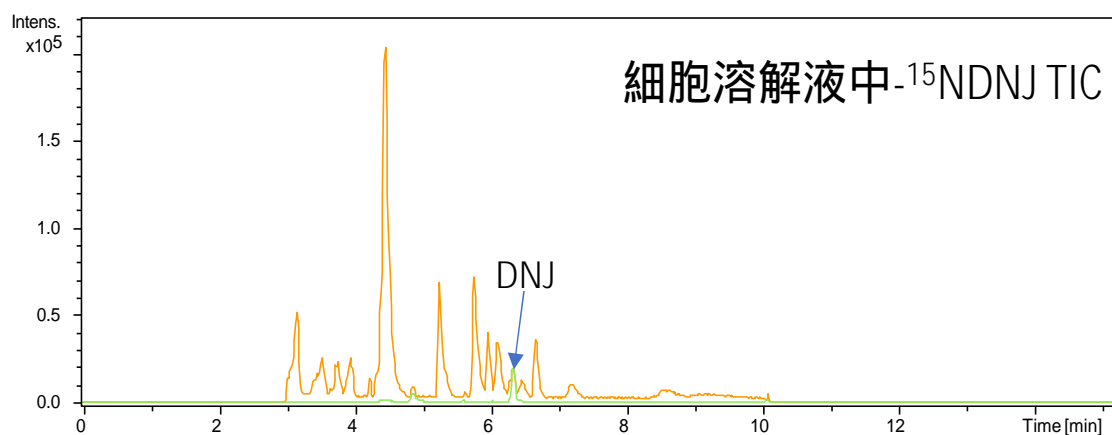


図4 細胞溶解液の LC-TOF/MS クロマトグラム  
オレンジ色 : TIC, 緑色 :  $^{15}\text{N}$  ラベル化 DNJ の抽出 MS

< 引用文献 >

- 1) JL. Chiasson, RG. Josse, R. Gomis, M. Hanefeld, A. Karasik, M. Laakso, *Lancet*, 359, 2072-2077 (2002)
- 2) R. Kawamori, M. Tajima, Y. Iwamoto, A. Kashiwagi, K. Shimamoto, K. Kaku, *Lancet*, 373, 1607-1614 (2009)
- 3) 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)
- 4) K. Nakagawa, H. Kubota, T. Kimura, S. Yamashita, T. Tsuzuki, S. Oikawa, T. Miyazawa, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 8928-8933 (2007)
  - 5) K. Yamagishi, S. Onose, S. Takasu, J. Ito, R. Ikeda, T. Kimura, K. Nakagawa, T. Miyazawa, *Food Sci. Technol. Res.*, **23**, 349-353 (2017)
  - 6) S. Yang, J. Mi, Z. Liu, B. Wang, X. Xia, R. Wang, Y. Liu, Y. Li, *Molecules*, **22**, 1616 (2017)
  - 7) T. Tsuduki, I. Kikuchi, T. Kimura, K. Nakagawa, T. Miyazawa, *Food Chem.* **139**, 16-23 (2013)
  - 8) I. S. Parida, S. Takasu, J. Ito, R. Ikeda, K. Yamagishi, T. Kimura, T. Miyazawa, T. Eitsuka, K. Nakagawa, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* **65**, 157-163 (2019)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takasu Soo, Parida Isabella S, Ito Junya, Kojima Yoshihiro, Eitsuka Takahiro, Kimura Toshiyuki, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 68
2. 論文標題 Intestinal Absorption and Tissue Distribution of Aza-Sugars from Mulberry Leaves and Evaluation of Their Transport by Sugar Transporters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 6656 ~ 6663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c03005	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 -
1. 著者名 Parida Isabella Supardi, Takasu Soo, Ito Junya, Ikeda Ryoichi, Yamagishi Kenji, Kimura Toshiyuki, Eitsuka Takahiro, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Supplementation of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AS385 culture broth powder containing 1-deoxynojirimycin in a high-fat diet altered the gene expressions related to lipid metabolism and insulin signaling in mice epididymal white adipose tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 3926 ~ 3940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0fo00271b	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 -
1. 著者名 Qiao Ying, Nakayama Juri, Ikeuchi Takeaki, Ito Masaaki, Kimura Toshiyuki, Kojima Kenji, Takita Teisuke, Yasukawa Kiyoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Kinetic analysis of inhibition of $\alpha$ -glucosidase by leaf powder from <i>Morus australis</i> and its component iminosugars	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2149 ~ 2156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1783991	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 -
1. 著者名 PARIDA Isabella Supardi, TAKASU Soo, ITO Junya, IKEDA Ryoichi, YAMAGISHI Kenji, KIMURA Toshiyuki, MIYAZAWA Teruo, EITSUKA Takahiro, NAKAGAWA Kiyotaka	4. 巻 65
2. 論文標題 Physiological Effects and Organ Distribution of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AS385 Culture Broth Powder Containing 1-Deoxynojirimycin in C57BL/6J Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 157 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.157	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 -

1. 著者名 高須 蒼生、木村 俊之、伊藤 隼哉、仲川 清隆	4. 巻 58
2. 論文標題 食後高血糖改善成分を含む新規食材の活用 桑葉・微生物によるDNJの生産と機能性・安全性の評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 13-19
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 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 高須 蒼生、Isabella S. Parida、小島 芳弘、伊藤 隼哉、木村 俊之、仲川 清隆
2. 発表標題 桑葉中のアザ糖の吸収性の違いと機能性向上に向けた試み
3. 学会等名 農芸化学会東北支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Isabella Supardi Parida、高須 蒼生、伊藤 隼哉、池田 亮一、山岸 賢治、木村 俊之、永塚 貴弘、仲川 清隆
2. 発表標題 1-Deoxynojirimycin from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AS385 ameliorates high-fat diet-induced metabolic disorders in C57BL/6J mice
3. 学会等名 栄養食糧学会東北支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 喬類、中山珠里、池内健晃、伊東昌章、木村俊之、兒島憲二、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 シマグワ茶およびその成分イミノ糖による $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害効果の速度論的解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高須 蒼生、 Isabella S. Parida、 田中 福代、 山岸 賢治、 伊藤 隼哉、 木村 俊之、 仲川 清隆
2. 発表標題 安定同位体標識による1-デオキシノジリマイシンの吸収・排泄と臓器移行の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 PARIDA Isabella Supardi、 TAKASU Soo、 ITO Junya、 IKEDA Ryoichi、 YAMAGISHI Kenji、 KIMURA Toshiyuki、 MIYAZAWA Teruo、 EITSUKA Takahiro、 NAKAGAWA Kiyotaka
2. 発表標題 Physiological Effects and Organ Distribution of 1-Deoxynojirimycin From Bacillus amyloliquefaciens AS385 in C57Bl/6J Mice
3. 学会等名 Asian Congress of Nutrition 2019 (ACN 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高須 蒼生、 Isabella S Parida、 小島 芳弘、 伊藤 隼哉、 木村 俊之、 仲川 清隆
2. 発表標題 桑葉中の主要なアザ糖の吸収機構の評価・解明
3. 学会等名 栄養食糧学会食品科学工学会合同東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KIMURA Toshiyuki、 TAKASU Soo、 TANAKA Fukuyo、 YAMAGISHI Kenji、 MIYAZAWA Teruo、 NAKAGAWA Kiyotaka
2. 発表標題 Evaluation of the absorption and organ distribution of 1-deoxynojirimycin in rat
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喬 穎、中山珠里、伊東昌章、木村俊之、 兒島憲二、 滝田禎亮、 保川清
2. 発表標題 シマグワ茶に含まれる -グルコシダーゼ阻害成分の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	仲川 清隆 (Nakagawa Kiyotaka)  (80361145)	東北大学・農学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	山岸 賢治 (Yamagishi Kenji)  (80355304)	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  (82111)	
研究分担者	高須 蒼生 (Takasu Soo)  (60908458)	岐阜薬科大学・薬学部・助教  (23701)	

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
---------	---------