

酸化ストレスで発症するマウス糖尿病への醗酵ごぼうの効果

土居 若菜・竹本 和憲*・安斉 和之・石原 浩二

村上 崇幸**・井上 淳詞**・織田 銃一・益岡 典芳

岡山理科大学大学院理学研究科

*加計学園医用科学教育センター

**株式会社あじかん研究開発センター

(2013年9月30日受付、2013年11月5日受理)

1. 緒言

日常の刺激により生体は種々の酸化ストレスを受けている。過度のストレスは動脈硬化や心筋梗塞などの疾患の原因とされ、その酸化ストレスの軽減、予防として抗酸化化合物の摂取が役立つと考えられている。抗酸化化合物を多く含む食品として果物や野菜、お茶、コーヒー、ごぼうなどがあるが、これらの抗酸化化合物を多く含む食品摂取による酸化ストレスの軽減作用については、まだ充分明確にされていない。

動物体内で活性酸素の一つである過酸化水素を分解する抗酸化酵素カタラーゼが極めて低い動物が知られており、無カタラーゼ血液症(アカタラセミア)と呼ばれている。このマウスにアロキサンを投与すると生体内に生じる過酸化水素により酸化ストレス傷害を受けやすく、我々はこれまでに、正常マウスに比べてアカタラセミアマウスではより糖尿病を発症しやすいことを報告した¹⁾。この結果は Goth の報告²⁾「アカタラセミアのヒトでは糖尿病の発症率が高い」ことと一致する。この酸化ストレスで発症するマウス糖尿病は抗酸化活性を持ったビタミン E を摂取させることで、発症の予防と糖尿病の症状改善を示した³⁾。近年、低カロリーで食物繊維を多く含む健康的な食品としてごぼうは注目され、その成分にはカフェ酸、クロロゲン酸などを含むことが報告されている^{4,5)}。本研究では、ごぼうを醗酵させた醗酵ごぼうで、酸化ストレス負荷により起こるマウス糖尿病を予防できるかを調べた。

2. 材料と実験方法

2-1 実験動物と実験材料

Feinstein⁶⁾らにより確立されたアカタラセミアマウス(C3H/AnlCS^bCS^b)と正常マウス(C3H/AnlCS^aCS^a)を使用した。これらのマウスは岡山大学医歯薬学総合研究科公衆衛生学分野の荻野景規教授の好意により譲与され、本学で繁殖させた。醗酵ごぼうはヤエガキ醗酵(姫路)が *Aspergillus awamori* で醗酵させたもの(タンパク質 17.7%, 食物繊維 47.9%)を使用した⁷⁾。コントロール飼料は AIN-93M⁸⁾ の組成で作製し、醗酵ごぼう飼料はコントロールに醗酵ごぼう 5%を加え調製した(表 1)。飼料は円筒状(Φ 1.2 X 2.5 cm)に加工し、使用まで-20℃に保存した。アロキサン、その他の試薬(特級)は和光純薬より購入した。

2-2 動物実験

正常マウスとアカタラセミアマウス(10週齢)を各2群に分け、各群にそれぞれに15週間醗酵ごぼう飼料とそのコントロール飼料と水を自由摂取させた。飼育14週目に各飼料摂取群にそれぞれ0.106 M アロキサン(200 mg/ 体重 kg)と生理食塩水を腹腔内投与し、5日後に血糖値の測定とグルコース負荷試験、7日後に血液および膵臓を採取した。血中のインスリン・C-ペプチド・過酸化脂質・8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の測定、及び膵臓切片の作製を行った。

表1 飼料組成表(% w/w)

	コントロール飼料 (AIN-93M)	醗酵ごぼう飼料
コーンスターチ	46.5692	41.5692
ミルクカゼイン	14.0	14.0
アルファ化コーンスターチ	15.5	15.5
グラニュー糖	10.0	10.0
精製大豆油	4.0	4.0
セルロースパウダー	5.0	5.0
ミネラルミックス (AIN-93M)	3.5	3.5
ビタミンミックス (AIN-93VX)	1.0	1.0
L-シスチン	0.18	0.18
重酒石酸コリン	0.25	0.25
第3ブチルヒドロキノン	0.0008	0.0008
醗酵ごぼう	0.0	5.0
	100.00	100.00

2-3 血糖値

血糖値はマウスを20時間絶食させた後、尾静脈より採血(5 µl)しグルテスト Neo センサー(三和化学研究所)で3回測定し平均した。

2-4 グルコース負荷試験

20時間絶食後、40%グルコース溶液を腹腔内(200 mg/ 体重 kg)に投与し血糖値の変動を測定した。測定は30分前の安静時(-30分)、グルコース投与直前(0分)、以降グルコース投与から15分、30分、60分、90分、120分の血糖値を測定した。

2-5 採血

ヘパリンを抗血液凝固剤として使用し、マウスの心臓を穿刺し採血した。血液は遠心(3000rpm, 10min)して、血漿を分離し分析した。

2-6 インスリン濃度測定

レビス インスリン-マウス(Uタイプ) ELISA キット(シバヤギ, 群馬) で測定した。抗インスリンモノクローナル抗体固相化した96穴マイクロプレートウエルにビオチン結合抗インスリン抗体 45 µl と血漿サンプル 5 µl を加え、室温で2時間インキュベートした。洗浄後ペルオキシダーゼ・アビジン結合物 50 µl を加え、室温で30分インキュベートし、再度洗浄後、ペルオキシダーゼ発色液(TMB)を加えた。反応は1M H₂SO₄ 50 µl で停止させ、反応で生じた黄色の産物を450nm(副波長 620nm)で比色測定した。標準曲線を作製し、インスリン濃度を決定した。

2-7 C-ペプチド濃度測定

レビス C-ペプチド-マウス(Uタイプ) ELISA キット(シバヤギ)で測定した。抗C-ペプチド抗体固相化マイクロプレート(96穴)ウエルに血漿サンプル 50 µl を加え室温で2時間インキュベートした。洗浄後ビオチン結合抗C-ペプチド抗体 50 µl を加え室温で2時間インキュベート後、洗浄しペルオキシダーゼ・アビジン結合物 50 µl を加え、室温で30分インキュベートした。ペルオキシダーゼ発色液(TMB)と反応させ、1M H₂SO₄ (50 µl)で反応を停止させた。450nm(副波長 620nm)で比色測定した。標準曲線を作製し、C-ペプチド濃度を求めた。

2-8 過酸化脂質濃度測定

Biotech Kit LPO-586 (OXIS-Health Product Inc, CA, USA)で過酸化脂質を測定した。過酸化脂質から生

じる malondialdehyde と 4-hydroxyalkenal を同時に検出するため、血漿サンプル(20 μ l) に N-methyl-2-phenylindolein acetonitrile(65 μ l) と methanesulfonic acid (15 μ l)を加えて発色させた。45°C で1時間インキュベートしたのち 586nm の吸光度を測定した。

2-9 8-OHdG 濃度測定

高感度 8-OHdG Check ELISA キット(日本老化制御研究所, 静岡)で測定した。8-OHdG を固相化した 96 穴マイクロプレートに血漿サンプル(50 μ l)と抗 8-OHdG モノクローナル抗体(50 μ l)を加え一晩反応させたのち、洗浄した。酵素標識抗体(100 μ l)を加え室温で1時間インキュベート後、洗浄し 3,3',5,5'- tetramethyl benzidine 発色液(100 μ l)を加え遮光し室温で15分反応させた。1M リン酸で反応を止め、450nm の吸光度を測定し、8-OHdG 濃度を決定した。

2-10 膵臓組織インスリン免疫染色

マウスから膵臓を摘出して、10%ホルマリン液で固定後にパラフィンで包埋した。6 μ m に薄切しパラフィン切片を作製した。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色とウサギ IgG を使用したインスリン免疫染色 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) を行った。FX380 CCD カメラ付き顕微鏡(オリンパス, 東京)で観察記録した。

2-11 統計解析

測定値は 平均 \pm 標準偏差で表した。有意差は Welch's t-test で行った。P<0.05 を有意な差とした。

3. 実験結果

3-1 血糖値

アロキサン投与後の5日後の高血糖発症率(%)を表2に示した。(高血糖>126 mg/dl)

表2 アロキサン投与後の高血糖発症率 (n=マウス数)

	正常マウス	アカタラセミアマウス
醗酵ごぼう食	7% (n=14)	43% (n=7)
コントロール食	25% (n=16)	75% (n=8)

尚、これまでの研究^{1,3)}と比べて高血糖発症率が高いのは飼料の違い(AIN-93G から AIN-93M に変更:タンパク含量の減少)によると推定した。

また、アロキサン投与後5日目の平均血糖値を図1に示す。アカタラセミアのアロキサン投与群では、醗酵ごぼう食・コントロール食ともに解剖時の血糖値は増加傾向にあるが、特にコントロール食では投与前の血糖値に比べ有意な増加(*: p=0.017)を示した。

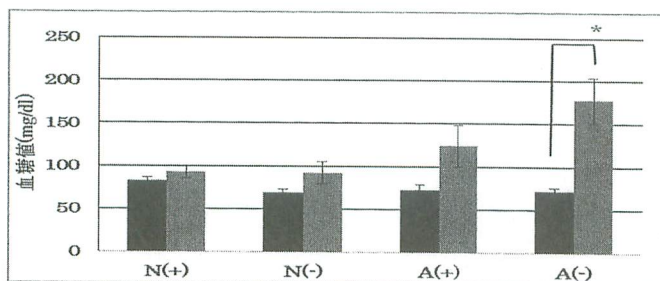


図1 アロキサン投与前と投与後5日目の血糖値

黒色:アロキサン投与前, 灰色:アロキサン投与後

N: 正常マウス, A:アカタラセミアマウス (+):醗酵ごぼう食摂取, (-):コントロール食摂取群を示す。

N(+): n(マウス数)=7, N(-): n=7, A(+): n=7, A(-): n=8.

3-2 グルコース負荷試験

アロキササン投与後のグルコース負荷試験では、正常マウスでは飼料に関係なくほぼ正常な耐糖曲線を示した（データは示していない）。アカタラセミアマウスのコントロール食では糖尿病様曲線を示したが、醗酵ごぼう食では糖代謝の改善が示唆された。（図2）

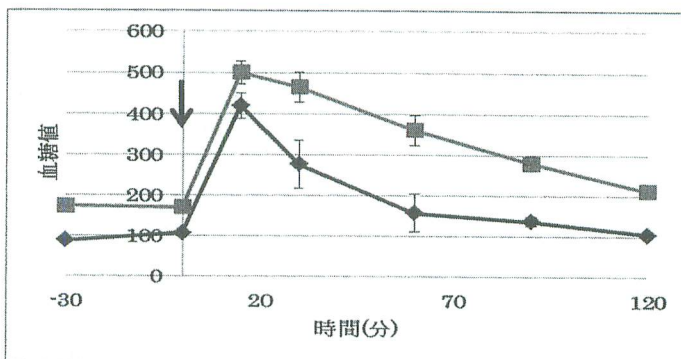


図2 アカタラセミアマウスのグルコース負荷試験

矢印の時間(0分)にグルコースを腹腔内に投与した。

菱形(黒色)：醗酵ごぼう食摂取群(n=7)，四角(灰色)：コントロール食摂取群(n=8)

3-3 血中インスリン・C-ペプチド濃度

マウスにアロキササン投与後7日目の血中インスリン濃度は醗酵ごぼう食群に比べて、コントロール食群では低下していた。アカタラセミアマウスでは、有意な減少を示した(図3, *: p=0.049)。C-ペプチドはプロインスリンからインスリン生成する時インスリンと同量生じる。そのC-ペプチドはインスリンより安定であるため測定した。ごぼう食摂取群の正常マウスのアロキササン投与後のC-ペプチド濃度を100%とすると、コントロール食摂取群ではその濃度は92.6%であった。一方、アカタラセミアマウスのコントロール食摂取群のC-ペプチド濃度は、ごぼう食摂取群の59.7%であった。

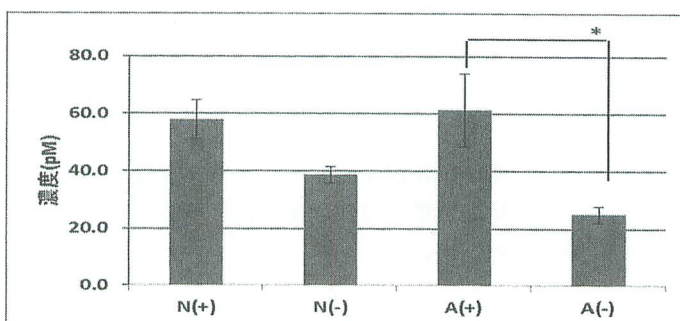


図3 アロキササン投与後の血中インスリン濃度

N：正常マウス，A：アカタラセミアマウス，(+)：醗酵ごぼう食摂取，

(-)：コントロール食摂取群を示す。N(+): n(マウス数)=7, N(-): n=7,

A(+): n=7, A(-): n=8.

3-4 血中過酸化脂質

正常マウスとアカタラセミアマウスではアロキササンを投与することで血中過酸化脂質濃度が上昇した（データは示していない）。また、アロキササン投与後の過酸化脂質を比べると、醗酵ごぼう群と比べて、コントロール群は有意に増加していた(*: p=0.031, **: p=0.015)。

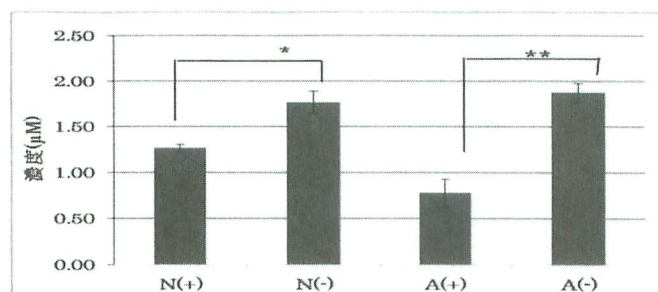


図4 アロキササン投与後の血中過酸化脂質濃度

N: 正常マウス, A: アカタラセミアマウス, (+): 醗酵ごぼう食摂取,
(-): コントロール食摂取群を示す。N(+): n(マウス数)=7, N(-): n=7,
A(+): n=7, A(-): n=8.

3-5 血中 8-OHdG 濃度

アロキササン投与後の血中 8-OHdG 濃度は正常マウス、及びアカタラセミアマウス群とも、摂取飼料の影響がほとんどなかった。(図 5)

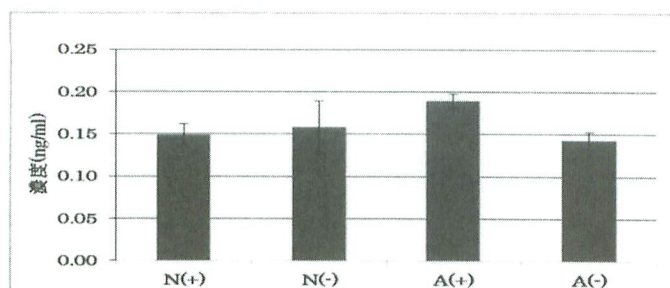


図5 アロキササン投与後の血中 8-OHdG 濃度

N: 正常マウス, A: アカタラセミアマウス, (+): 醗酵ごぼう食摂取,
(-): コントロール食摂取群を示す。N(+): n(マウス数)=7, N(-): n=7,
A(+): n=7, A(-): n=8.

3-6 膵臓組織インスリン免疫染色

正常マウス膵臓 β 細胞のインスリン免疫染色像には摂取飼料による変化はなかった(データは示していない)が、アカタラセミアマウスでは β 細胞のインスリン免疫染色像(図 6)に違いがみられた。

(a) 醗酵ごぼう摂取

(b) コントロール食摂取

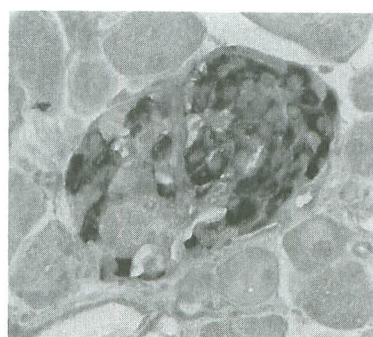
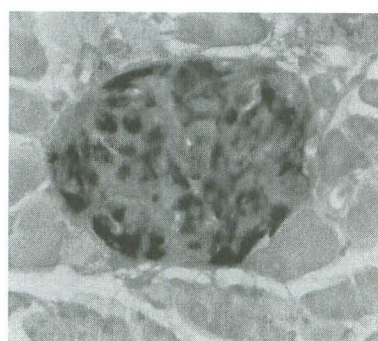


図6 アカタラセミアマウス膵臓 β 細胞のインスリン免疫染色像

(a) は醗酵ごぼう食摂取のアカタラセミアマウスにアロキササンを投与後7日目の膵臓 β 細胞のインスリン免疫染色像で、(b) はコントロール食摂取のアカタラセミアマウスの染色像である。

生理食塩水投与のインスリン陽性率を 100%とすると、アロキサンの投与した正常マウスの醗酵ごぼう食とコントロール食はそれぞれ 64.5 ± 3.9 と 71.5 ± 3.7 %で、アカタラセミアマウスのごぼう食では 71.0 ± 3.3 %、コントロール食では 49.7 ± 1.5 %であった。

4. 考察

血糖値、グルコース負荷試験の結果より、コントロール食のアカタラセミアマウスにアロキサンを投与すると糖代謝異常を発症するが、醗酵ごぼう食を摂取することで改善することが示された。また、インスリンは、醗酵ごぼう食と比べてコントロール食では低下し、アカタラセミアマウスでは有意な低下が起こっていた。C-ペプチド濃度についても、アカタラセミアマウスのコントロール食で有意に減少していた。そこで、膵臓β細胞への影響を明確にするためアロキサン投与したマウスの組織像を調べた。アロキサン投与した正常マウスの両飼料群とアカタラセミアマウスのごぼう食群ではインスリン陽性率に差はなかったが、コントロール食では有意に低下していた。酸化ストレスマーカーの過酸化脂質はごぼう食に比べてコントロール食で2倍に増加していた。これらの結果は、コントロール食摂取のアカタラセミアマウスで発症した糖尿病は、血中インスリン濃度低下によるものであり、酸化ストレス増加とβ細胞のインスリン陽性率の減少が関連していることが推定された。醗酵ごぼうを摂取したマウスではビタミンEの場合と同様に酸化ストレスによる糖代謝の異常が改善されたので、現在ビタミンEと醗酵ごぼうの違い、また、醗酵ごぼうの成分と抗酸化活性について研究を進めている。

5. まとめ

醗酵ごぼうを摂取した時の効果を *in vivo* で明らかにするため、酸化ストレスで容易に糖尿病を発症するマウスに摂取させ、発症に対する効果を調べた。アロキサン投与で醗酵ごぼう無添加食では血糖値の増加と糖負荷試験で異常を認めたが、醗酵ごぼう添加食では高血糖発症率が減少し糖代謝が改善される効果があることを明らかにした。

参考文献

- 1) Takemoto K, Tanaka M, Iwata H, Nishihara R, Ishihara K, Wang DH, Ogino K, Taniuchi K, Masuoka N. Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan. *Clin. Chim. Acta.* 2009;407:43-46.
- 2) Goth L, Eaton JW. Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *Lancet* 2000; 356:1820-1
- 3) Kamimura W, Doi W, Takemoto K, Ishihara K, Wang DH, Sugiyama H, Oda S, Masuoka N. Effect of vitamin E on alloxan-induced mouse diabetes. *Clin. Biochem.* 2013;46:795-8.
- 4) Maruta Y, Kawabata J, Niki R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.) *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 2592-2595.
- 5) Lin L-Z, Harnly JM. Identification of hydroxycinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 10105-10114
- 6) Feinstein RN, Braun JT, Howard JB. Acatalsemic and hypocathalasemic mouse mutants. II. Mutational variations in blood and solid tissue catalases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967;120:165-9.
- 7) 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 cecum Bifidobacterium, and reduces fecal deoxycholic acid and adipose tissue weight in rats fed a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013; 77: 120551-1-5.
- 8) Reeves PG, Nielson FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and hoc writing committee on the reformulation of the AIN-73A rodent diet. *J. Nutr.* 1993; 123: 1939-51.

Effect of fermented-burdock on alloxan-induced mouse diabetes

Wakana DOI, Kazunori TAKEMOTO*, Kazuyuki ANSAI,
Kohji ISHIHARA, Takayuki MURAKAMI**, Junji INOUE**,

Sen-ichi ODA and Noriyoshi MASUOKA

Graduate School of Science, Okayama University of Science

**Kake Medical Science Education Center*

1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan

***Ahjikan Co., Ltd.*

3-9 Nana-chome, Nishi-ku, Hiroshima 739-8528, Japan

(Received September 30, 2013; accepted November 5, 2013)

This study investigated the effect of dietary supplementation with *Aspergillus awamori*-fermented burdock powder at 5 % on alloxan-induced mouse diabetes. Mice fed a fermented-burdock diet and the control diet for 14 weeks. Then, alloxan (200 mg/ kg of body weight) was administered to each mouse. After 5 days from the administration, blood glucose assay and glucose tolerance test were carried out. Incidence of hyperglycemia decreased and the glucose metabolism was improved when mice fed the fermented-burdock diet. Insulin, C-peptide and biomarkers of oxidative stress in plasma were examined and compared to those obtained from mice fed the control diet. From these results, it is deduced that alloxan-induced diabetes is caused to lower insulin concentration and a fermented-burdock supplementation improves the diabetes as same as vitamin E one.

Keywords: fermented-burdock; diabetes; insulin; oxidative stress; alloxan.