

## 食品の生理機能に関する研究 —メラノイジンと野菜を中心として—

三 浦 理 代\*

### Studies on the Physiological Functions of Food — Focus on Melanoidins and Vegetables —

Masayo MIURA\*

#### Abstract

The authors' research field has expanded to the functionality of plant-derived foods, starting with the biological actions of melanoidins. Our research is summarized as follows.

#### (1) Study of the characteristics of melanoidins and their biological actions

Maillard reaction products exist widely in prepared and processed foods. Melanoidins are indigestible, high-molecular weight compounds. Their physicochemical properties allow them to play various physiological roles in the processes of digesting and absorbing the nutrients in the foods that contain them. When melanoidins were ingested by rats, fluctuation in the intestinal flora was observed. A significant increase in lactobacilli was seen. Decreased intestinal retention time and serum cholesterol level were also observed. From this, melanoidins were predicted to have some kind of function in the body.

#### (2) Effect of miso on postprandial blood glucose

Using several types of miso specimen, we investigated the relationship between miso intake and postprandial blood glucose levels. In a human interventional trial, the glycemic index (GI) was measured after the intake of white rice, and the relationship between the effects of miso on carbohydrate digestion enzyme activity ( $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase), the degree of brownness of the miso, and postprandial blood glucose control was investigated. Trypsin inhibitor (TI), which blocks trypsin activity, is contained in soybeans, which are a raw ingredient of miso. Ingestion of trypsin is reported to be involved in the secretion of insulin, a key hormone in blood glucose control. Therefore, we also tested the effects of the miso specimens on trypsin activity and quantified TI in miso. A GI-reducing effect was observed for some of the miso specimens. *In vitro*, all miso specimens were found to inhibit the activity of various digestive enzymes ( $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and trypsin), and minute quantitative values of TI were obtained as a new finding. Also, trypsin activity tended to be more strongly inhibited with miso that was browner in color.

#### (3) Effect of the ingestion of vegetables on oxidative stress levels in the body and antioxidants

Dietary intervention trials were conducted using bok-choy and garland chrysanthemum, or broccoli, cabbage, and Japanese mustard spinach. The subjects ingested the designated vegetables for 7 days. Blood and urine were collected before and after the trials, and the levels of reactive oxygen metabolites (ROM), isoprostanes, and biological antioxidant power (BAP) were assessed.

ROM levels significantly decreased with the ingestion of garland chrysanthemum and Japanese mustard spinach. A significant decrease of urinary isoprostanes was observed after the ingestion of garland chrysanthemum and broccoli, while there was a significant increase in the BAP level.

#### (4) Assessment of glycemic index with noninvasive blood glucose measurement using near-infrared spectroscopy

In diabetic patients, maintaining glycemic control and self-monitoring of blood glucose (SMBG) using GI

\* 食品栄養学研究室, 女子栄養大学 : Laboratory of Food and Nutrition, Kagawa Nutrition University

measurements involve blood collection and are a huge burden on users. Thus, a blood glucose measurement method that is safe and less burdensome is desired. In this study, we measured GI with the intake of five plant-derived food dishes (Japanese mustard spinach, cabbage, tomato, soybeans, and Chinese yam) in an investigation of side dishes likely to suppress GI in combination with cooked rice, the staple food of the Japanese diet. Noninvasive blood glucose measurements using near-infrared spectroscopy and SMBG were performed simultaneously. In the noninvasive measurements, the diffuse reflectance spectrum (700–1,050 nm) was measured and a calibration model was constructed from a single regression analysis focused on the change in blood glucose from fasting to obtain the estimated blood glucose level. The results showed that GI was  $\leq 100$  with all five types of food tested. Based on actual blood glucose levels from SMBG, it was found that the noninvasive measurements could estimate blood glucose satisfactorily.

**Keywords:** Melanoidin, Miso, GI, Vegetable, ROM, BAP, NIR

## 緒言

「食品の機能」という言葉が1984年から1955年に現文部科学省(旧文部省)の重点領域「機能性食品」研究班,すなわち,農・医学の学識領域の大勢の研究者で考えられた言葉として誕生して以来,30年以上が経過した。その間,「医食同源」を基盤とする食品の機能に関するさまざまな研究が産・学・官で一斉にスタートし,「機能性食品」が誕生した<sup>1)</sup>。これはやがて健康の維持・増進に役立つことが期待される「特定保健用食品」へと展開されることになる。食品の機能は3つに分類される。すなわち①1次機能(栄養機能,栄養面での働き),②2次機能(感覚機能,嗜好面での働き),③3次機能(生体調節機能,予防面での働き)である。

著者は昭和44年に本学の食品栄養学研究室に助手補として任務についてから,五明紀春教授の下でMelanoidinの理化学的性質について日々研鑽に励んできた。Melanoidinの理化学的性質は食物繊維に似ていることに着目し,Melanoidinにも食物繊維類似の作用があること突き止めた。研究はMelanoidinの生物作用を

きっかけに,やがて領域を植物性食品及び加工品の機能性へと展開してきた。

著者の研究内容を時代に沿って以下のようにまとめた。

1. Melanoidinの特性ならびに生物作用に関する研究
2. 植物性食品及び加工品の機能について
  - 1) 味噌の食後血糖に及ぼす影響
  - 2) 野菜類の摂取が生体内の酸化ストレスレベルに及ぼす影響と抗酸化物質
3. グリセミック・インデックスの近赤外分光法を用いた非侵襲血糖測定の評価

### 1. Melanoidin 特性ならびにその生物作用に関する研究<sup>2)</sup>

Melanoidinは褐色色素であり,アミノ化合物とカルボニル化合物とのアミノ・カルボニル反応による複雑な反応を経て生成した最終生産物である。アミノ・カルボニル反応により食品は茶色に変化し,同時に香ばしい香気を発生する。食品の加熱・調理・保存中に普遍的に起こる成分間反応であり,食品の色,味,香りなどの嗜好性

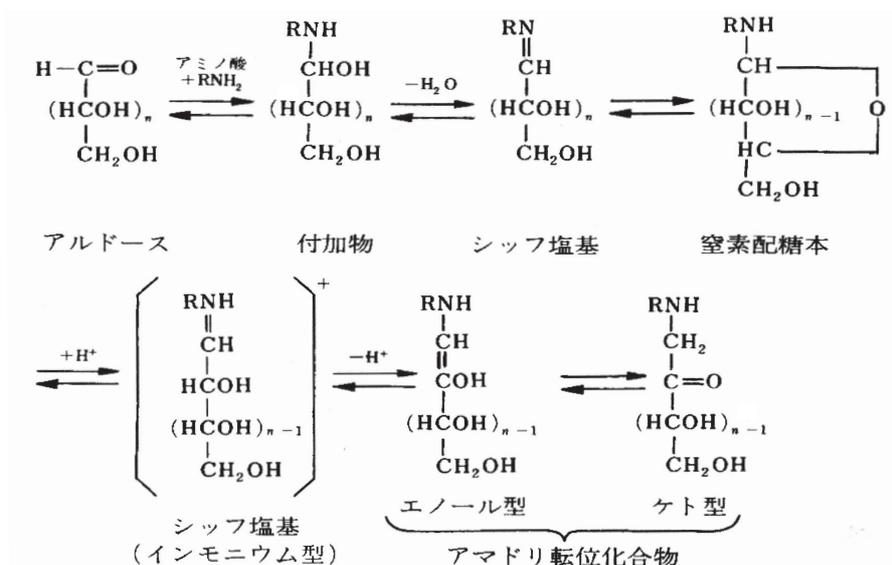


Fig. 1 窒素配糖体およびアマドリ転位化合物の生成

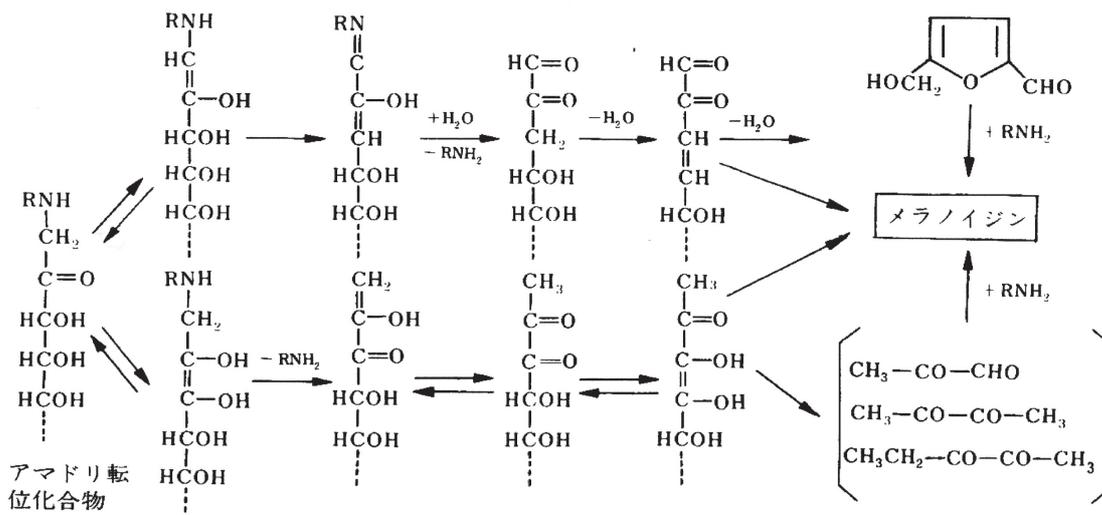


Fig. 2 アマドリ転位化合物の分解とメラノイジン (Melanoidin) の生成

に決定的な影響を及ぼす。みそ、しょうゆ、クッキー、パン、コーヒーなどはこの反応を積極的に利用したものである。

1912年、L.C. Maillardがアミノ酸と還元糖による褐色化反応について報告して以来<sup>3)</sup>、この反応に関する研究はおびただしい数に上り、総説も少なくない<sup>3-5)</sup>。その内容も他方面にわたって展開されている。

アミノ・カルボニル反応の主要な経路はHodgeにより提示されている。Fig. 1に示すが、3段階で進行する<sup>5-7)</sup>。まず、初期段階はカルボニル基とアミノ基が縮合して窒素配糖体を形成しアマドリ転位化合物を生成する。

次に中期段階であるが、アマドリ転位化合物がフルフラール誘導体を生成、やがてジカルボニル化合物を生成する。

最後にFig. 2に示すように終期段階の、ジカルボニル化合物やフルフラールなどがアミノ化合物と反応し重合することによって不規則構造の高分子化合物である褐色色素のMelanoidinを生成する。Melanoidinの化学構造については未だ、はっきりと解明はされていない。

著者らも構造未確定ではあるが、反応の途中でキシロースとグリシン系から推定分子量800, 1,200, 1,600の3種の青色色素が生成することを発見、分離し、Melanoidin生成の主要な中間体と推定した<sup>8)</sup>。

#### 1) Melanoidinの調製と特性

グルコース/グリシン系より得られた褐変溶液をpH2.5に調節、遠心分離し、得られたMelanoidinを凍結乾燥した。このMelanoidinの元素組成、分子量分布を調べ、たんぱく質のオボアルブミン、牛血清アルブミン、リゾチームとの相互作用についても検討した。

その結果、

①D-グルコース/グリシン系により生成するMelanoidinは金属イオン(Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, M<sup>2+</sup>)

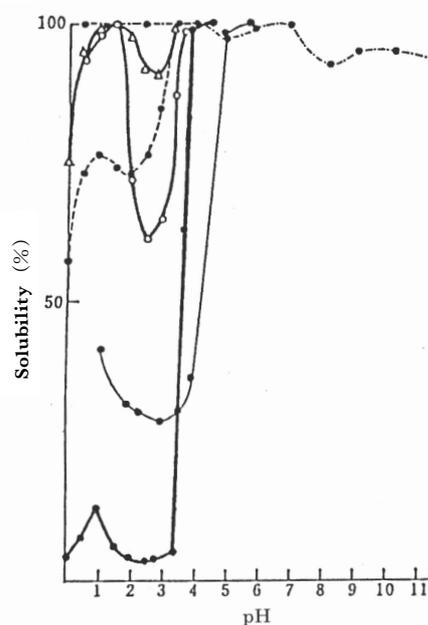


Fig. 3 pH Profiles of Solubility of Melanoidin

Aliquots of browning reaction solution were adjusted to various pH with HCL or NaOH, and centrifuged to obtain the supernatants whose absorbance at 470 nm was measured. Reaction mixture: amino acid 1M, D-glucose 1M, NaHCO<sub>3</sub> 0.1M, Heated at 95°C, —●—, glycine; —■—, L-valine; - - - △, L-glutamic acid; ····, L-arginine; △, 24hr; ○, 36hr; ●, 90hr.

に対して陰イオン性親水性コロイドとしてふるまい、沈でんを形成する。

②MelanoidinはFig. 3に示すように、pH2.5付近に等電点を有する両性多価電解質であり、滴定曲線の解析の結果、Melanoidinの酸性基は主に、原料アミノ酸に由来するカルボキシル基と推定された。

③平衡透析により、Fe<sup>3+</sup>又はCu<sup>2+</sup>との結合に対する安定定数(log K)は一般の金属キレート剤に比べて著しく高く、Melanoidinは強力な金属イオン(多価)封鎖効果を有することが確認された。

④Melanoidin の等電点とタンパク質の等電点の間のpH領域において、両者は顕著に相互作用し、沈でんを形成する。

#### 2) ラット腸内菌叢に及ぼすMelanoidinの影響

従来、Maillard 反応生成物は微生物の育成に対して一定の影響を及ぼすことが知られている。Einarsson ら<sup>9)</sup> は Maillard 反応生成物を分画し、*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* および *staphylococcus aureus* の生育について調べた結果、高分子画分（分子量1,000以上）は低分子画分（分子量1,000以下）に比べ生育をより強く抑制することを認めている。著者らの研究ではラットを用いてMelanoidinの腸内菌叢に及ぼす影響について調べた。褐変溶液はD-グルコース1mol, グリシン1mol, NaHCO<sub>3</sub>の混合液90°C, 48hr加熱褐変させた。得られた褐変溶液を凍結乾燥した。ラットの飼料組成はTable 1に示す。

Table 1. Composition of Diet

Ingredients	%
Casein	10
Corn starch	70
Sucrose	8
Salt mixture <sup>1</sup>	4
Fibre	2
Choline chloride	0.15
Soy bean oil	4.1
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1.75
Total	100

<sup>1</sup>Harper's mixture.

<sup>2</sup>A PANVITAN powder from Takeda Chemical Industries Ltd., Tokyo.

試験群には毎日、給餌直前に、生理食塩水に20%濃度になるように褐変溶液を溶解させ、初めの70日間は1mlずつ、胃ゾンデで強制投与し、それ以降は2mlを増やし4か月間飼育した。対照群にはD-グルコースとグリシンを試験群と同じ濃度を含む生理食塩水を投与し、同様に飼育した。

4か月飼育後、ラットは開腹し、回腸、盲腸、結腸—直腸部位3か所を摘出し6種の菌群について生菌数を調べた。結果をTable 2に示す。

Table 2. Effect of Administration of Browning Products on the Number of Viable Cells in the Intestinal Contents

Bacterial group	Ileum		Caecum		Colon-Rectum	
	Control	Test	Control	Test	Control	Test
Enterococci	4.9±1.3	5.2±1.0	6.7±0.5	6.6±0.5	7.0±0.4	6.6±0.4
Staphylococci	5.2±1.9	5.2±1.0	6.3±0.4	6.1±1.8	5.3±1.4	6.5±0.6
Coliforms	4.8±1.6	5.6±0.6	6.7±0.9	6.5±1.1	6.2±0.7	6.1±1.0
Clostridia	6.7±0.9	7.4±0.4	7.4±0.6	8.0±0.3	7.2±0.9	7.6±0.9
Lactobacilli (anaerobic)	5.8±0.4	7.0±0.6 <sup>c)</sup>	7.6±1.0	6.8±1.7	6.4±0.9	6.6±1.1
Lactobacilli (aerobic)	4.5±0.4	5.8±1.0 <sup>a)</sup>	4.8±0.7	5.7±0.5 <sup>a)</sup>	4.5±0.7	5.7±0.4 <sup>b)</sup>

The values are Means±SD of logarithmic counts of viable cells per gram of the intestinal contents. N=8.

a) Significantly different from control at p=0.05.

b) Significantly different from control at p=0.025.

c) Significantly different from control at p=0.01.

乳酸菌群で好気性・嫌気性ともに試験群では対照群に比べ、有意に生菌数の増加が認められた。回腸において試験群では対照群に比べおよそ10倍の増菌があった。他方、好気性乳酸菌群については消化管部位にかかわらず、試験群では対照群の10倍の増菌が有意に認められた。Table 3に示すように試験群の回腸部位において乳酸が増え、内容物のpH低下が認められた。

Table 3. Effects of Browning Products on the Yield of Lactic Acid in the Ileum of Rat

Group	Conc. of lactic acid (mg/g contents)	pH
Control	1.03±0.22	8.1±0.4
Test	1.56±0.14 <sup>1</sup>	7.0±0.5 <sup>1</sup>

The values are means±SD. N=8.

<sup>1</sup>Significant difference from control at p=0.05.

回腸部においてはMelanoidin投与により乳酸が増え、その内容物のpHは対照群の8.1±0.4に対し、試験群では7.0±0.5と有意に低値となり、乳酸菌群の増殖を支持した。

#### 3) ラット滞腸時間に及ぼすMelanoidinの飼料添加の影響

ある種の食物繊維は食物の滞腸時間（腸内通過時間）を短縮させることが知られている<sup>10)</sup>。

Melanoidinの調製はD-グルコース1M, グリシン1M, NaHCO<sub>3</sub>0.1Mを蒸留水1lに溶解し、90°C, 96時間加熱し、pH2.5~3.5に調節、形成したゲルを-40°Cで一晩凍結後、解凍、脱水させ、沈でん物をろ別した。こ

Table 4. Diet Composition

Ingredients	basal	test I	test II
Casein	20 per cent	20	20
Corn oil	5	5	5
Salt mix. <sup>a</sup>	4	4	4
Vitamin mix. <sup>b</sup>	1	1	1
Choline Cl	0.2	0.2	0.2
Melanoidin	0	2	4
Sucrose-alpha starch (1:1)	69.8	67.8	65.8

<sup>a</sup>Harper's mixture.

<sup>b</sup>PANVITAN powder from Takeda Chemical Industries Ltd.

の沈でん物に蒸留水を加え、セロファンチューブに入れ、水道水で流水透析し脱塩した。続けて濃縮・凍結乾燥し、褐色粉末を得た。

ラットの飼育は平均体重40gのWistar系雄ラットを20匹用いてTable 4に示した飼料組成に基づいて飼育した。

基礎飼料群 (Melanoidin 非投与), 試験飼料群 I (Melanoidin 2% 投与), 試験飼料群 II (Melanoidin 4% 投与) の3群に分け, 各群6匹ずつとした。給餌様式は間欠給餌とし1日4時間以内に所定の餌を摂取し終わるようにした。

滞腸時間の測定は実験飼料による飼育開始後21日目に20時間絶食させた後, マーカーとして赤色素カルミンレッドを用い, 1% W/Wの割合で飼料に混合し, 30分間投与した。投与30分後に色素混合飼料をぬき, その後, 通常の実験飼料を3時間30分与えた。色素混合飼料投与時から1時間おきに50時間まで1ずつ個別に糞を採取した。

糞は乳パチで磨砕, 蒸留水5mlと共に3分間振とうした。振とう後, 3,000rpmで10分間遠心分離を行い, 上清について肉眼的観察を行った。肉眼的観察によって上清に最初の赤色の認められた糞の採取時点, すなわち赤色素カルミンレッドの出始める時間を滞腸時間 (腸内通過時間) とした。

Table 5に示すように, 基礎飼料群 (Melanoidin 非投与) に対して, 試験飼料群 I (Melanoidin 2% 投与), 試験飼料群 II (Melanoidin 4% 投与) は滞腸時間が短縮されることが認められた。

Table 5. Effects of Melanoidin on the Gastro-intestion Transit Time of Rats (n : 7)

Diet	basal	test I	test II
Transit time (hour)	48±6	36±4 <sup>a</sup>	27±3 <sup>b</sup>

a and b indicate significant differences from basal at 5 at percent, respectively.

Melanoidinの消化管内移送に伴う物理的性状の変化について, Melanoidin溶液を強制投与した後, 継時的に開腹し, 消化管内のMelanoidinの物理的状態を観察した。消化管内のpHに対応して, 胃内で速やかに硬いゲルを形成し, 十二指腸でやや軟化, 回腸下部で流動化した。また, Melanoidinは消化管内を移送される間に小腸粘膜に不可逆的に吸着した。

食物繊維と同様に内容物の移送速度を速めることが推察された。

小腸粘膜へのMelanoidinの不可逆的に吸着は粘膜組織の剥落が観察され, 空腸断面図をFig. 4とFig. 5に示す。

Fig. 4は対照群, Fig. 5は投与群 (Melanoidin 4%) である。空腸断面図より飼料投与により, 小腸粘膜に著しい形態学的変化が観察された。腸内壁は薄く, 壁面は扁平となり, 管腔内表面積の縮小が観察された。さらに絨

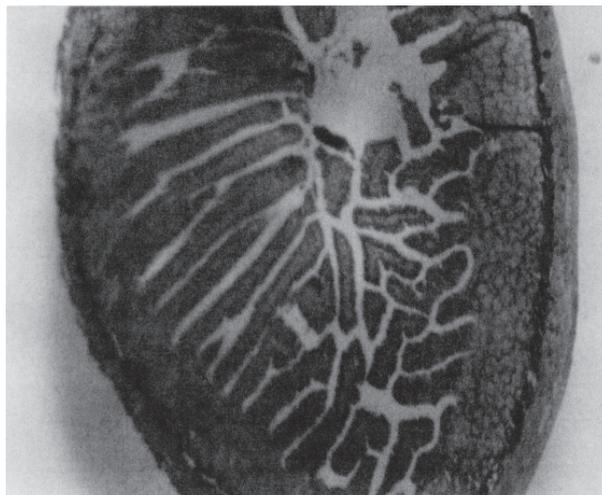


Fig. 4 The Cross Section of Jejunum from the Rat Fed Basal Diet Stained with hematoxylin and eosin. (×150)

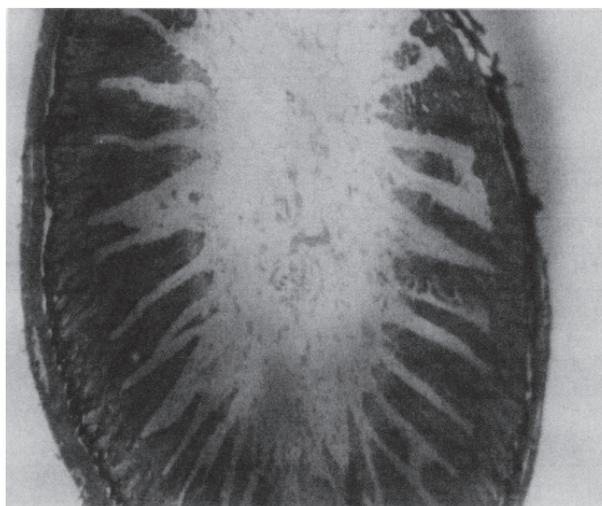


Fig. 5 The Cross Section of Jejunum from the Rat Fed Test II Diet Stained with hematoxylin and eosin. (×150)

毛先端の壊死と上皮の剥離が認められた。壊死は状態から見て, 炎症性の壊死ではなく, 腸管内を移送される食塊の摩擦による損傷か, あるいはMelanoidinと腸粘膜表面との不可逆的吸着など, 何らかの相互作用によりもたらされるものと考えた。

#### 4) ラットによる二糖類の消化吸収に及ぼすMelanoidinの影響

ラットを用いた糖負荷に伴う血糖値上昇に及ぼす影響, ラットの反転小腸による二糖類の消化吸収, および小腸粘膜の二糖類分解酵素の活性に及ぼす影響について検討した。

ラットの飼育は平均体重70gのWistar系雄ラット10匹をTable 6に示すように, シュークローズを含まない飼料で8日間飼育した。

1日絶食させ, 飼育方法は重量比で飼料10に対して水8を混合し団子状にしたものを自由摂取させた。ラットは2群に分け, 対照群には10%シューク

Table 6. Diet Composition for Glucose Tolerance Test

Ingredient	%
Corn starch	67 per cent
Casein	21
Corn oil	7
Salt mix. <sup>a</sup>	4
Vitamin mix. <sup>b</sup>	1

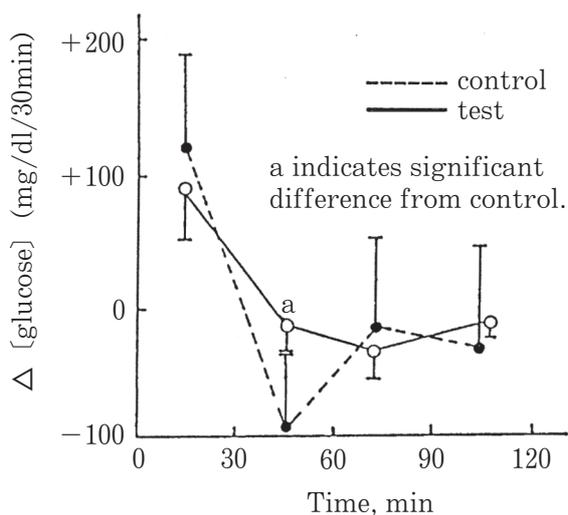
<sup>a</sup>Harper's mixture.<sup>b</sup>PANVITAN powder from Takeda Chemical Industries Ltd.

Fig. 6 Effect of Melanoidin on the Rates of Changes in Blood Sugar Level after The Injection of a Sucrose Solution through Stomach Probe.

ローズ溶液, 試験群には10%シュークロースに対してMelanoidinを1%になるように加えた溶液を用い, 胃ゾンデで2 ml あて強制投与した。空腹時から尾静脈よりガラスキャピラリーで採血した後, すぐに糖溶液を強制投与し30分ごとに120分間に渡り採血した。3,000回転5分, 遠心したのち, 上清の血糖値を酵素法で測定した。

糖負荷後の血糖値の変化率をFig. 6に示した。

30分から60分の間の変化率に对照群と試験群間では5%で有意差が認められ, 試験群の方が血糖値の上昇速度, 下降速度のいずれも抑えられることが認められた。すなわち, Melanoidinは血糖値の変動抑制因子として働くことが結論づけられた。Melanoidinのゲル化により糖の胃から小腸への移送が減速し, 糖吸収に要する時間が延長されたためであると考えられる。この作用は水溶性食物繊維にも同様に認められている<sup>10)</sup>。

Table 7. Effect of Melanoidin Added to the Incubation Medium on the Uptake<sup>a</sup> of Sugars through the Everted Jejunum Sac (n : 5)

Melanoidin	not added	added
Sucrose	6.8±2.3	2.2±0.6 <sup>b</sup>
D-glucose	18.2±7.9	17.2±3.3

<sup>a</sup>The amounts of uptake were the concentration of D-glucose in the sac after incubation.<sup>b</sup>Indicates significant differences from not added at 1 per cent. The values are average±standard deviations.

反転小腸による二糖の消化吸収を調べた。

固型飼料で飼育したラットの反転小腸を用い, シュークロース及びグルコースを基質として粘膜側外液にMelanoidinを添加した場合と, 添加しない場合との基質の消化吸収に及ぼす影響を調べた。結果をTable 7に示す。

シュークロースの吸収はMelanoidinの存在により有意に阻害された。一方, グルコースについてはMelanoidinの影響はみられなかった。このことよりMelanoidinは小腸壁からの糖の輸送よりも, むしろ粘膜中に存在するシュークラゼの活性を抑制することが示唆された。Melanoidinの糖吸収抑制作用は胃内でのゲル化による糖の移送の遅延及び小腸粘膜の二糖類水解酵素作用の阻害という2つの要因によるものと考えられた。

#### 5) 高コレステロール食飼育ラットに対するMelanoidin添加飼料の降コレステロール作用

高コレステロール食飼育ラットの血液・肝臓中のコレステロール値上昇に対する難消化性水溶性多糖類の抑制作用については, すでによく知られている。多糖類は酸性領域において粘性を示し, ゲルを形成するが, Melanoidinも不溶性高分子化合物であり, 胃の酸によりゲルを形成するので, 消化管において何らかの生理作用が発揮されると予想される。

著者らは高コレステロール食飼育ラットでMelanoidinを添加し, 肝臓・血液, 糞中のコレステロールについて調べた。

Wistar系雄ラット28匹をTable 8に示す基礎飼料群, 对照群, 試験群I, 試験群IIの7匹ずつ4群に分け, 15日間飼育した。对照群, 試験群I, IIの各群にコレス

Table 8. Diet Composition

Ingredients	Basal	Control	test I	test II
Casein	20%	20	20	20
Olive oil	5	5	5	5
Salt mixture <sup>a</sup>	4	4	4	4
Vitamin mixture <sup>b</sup>	1	1	1	1
Choline Cl	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	—	0.5	0.5	0.5
Melanoidin	—	—	2	4
Sucrose/ $\alpha$ -corn starch (1 : 1)	incorporated to make 100%			

<sup>a</sup>Harper's mixture.<sup>b</sup>PANVITAN powder from Takeda Chemical Industries Ltd., Tokyo.

Table 9. Effects of Melanoidin on the Cholesterol Level of Feces

	mg/head/day	mg/g of feces	Excretion (%)
Basal	2±1	7±5	—
Control	33±5	109±13	54±8
Test I	26±2**	57±5**	42±5**
Test II	21±3**	31±5**	34±7**

\*\* is significantly different from the control diet at  $p=0.01$ .

Test I : Mel 2%, Test II : Mel 4%

テロールを0.5%添加, また試験群 I, II に Melanoidin を 2% 及び 4% を添加した。Table 9 に示すように糞重量については試験群で有意の増加が確認された。別途, Melanoidin の添加により, 血中および肝臓中のコレステロール値の上昇を有意に抑制することを確認している。

以上の結果から Melanoidin は一定の生物作用を有することが明らかとなった。難消化性高分子化合物として食物繊維に類似した特性, 生物作用を有する事実から, 日常の食生活に置いて Melanoidin の果たす栄養学的な役割は高いことが推定される。

日ごろの食生活で食品素材に存在する一次成分は調理・加工・貯蔵の過程で起こる成分間反応により, 新たに二次成分が生成, 代表的な Melanoidin は栄養素の消化・吸収過程で何らかの関与をしている可能性が明らかにされた。

## 2. 植物性食品及び加工品の機能について

### 1) 味噌の食後血糖に及ぼす影響<sup>11)</sup>

糖尿病は代表的な生活習慣病であり, その大部分を占める 2 型糖尿病患者は著しく増加している。

日本食の中核的調味品である味噌は, すでにヒト唾液アミラーゼ活性を阻害することが確認されており, 摂取により糖質栄養素の消化吸收遅延の可能性が報告されている<sup>12)</sup>。

ヒト介入試験として, 味噌のグリセミック・インデックス (GI) への影響について検討した。また, 味噌中の食後血糖上昇抑制の可能性がある因子を検討するため, *in vitro* において, 糖質の消化酵素であるヒト唾液及びブタ膵液の  $\alpha$ -アミラーゼ, ブタ小腸  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性に及ぼす味噌の影響について検討した。一方, 味噌の原料大豆にはトリプシン活性阻害因子であるトリプシンインヒビター (TI) が含まれる。TI の摂取は血糖制御に重要なホルモンであるインスリンの産生に関連し, また糖尿病発症ラットにおいて膵臓内・外分泌及び高血糖が改善し, 糖尿病の治療や予防に役立つことが期待されている<sup>13)</sup>。

#### ①ヒト介入試験について

日常摂取頻度の高い米味噌 5 種類, 豆味噌 3 種類と麦味噌 1 種類の計 9 種類を用いた。供試食として, 基準食は包装米飯 147g (糖質 50g 相当量, サトウのご飯, サトウ食品) と食塩水 (食塩 1.8g を温湯 150ml に溶解) を用い, 検査食は基準食と同様の包装米飯 147g と味噌汁 (各供試味噌 30kcal 相当量となる 15g 程度を秤量し, 温湯 150ml に懸濁) とした。

GI 測定方法の結果, 味噌によっては通常のみそ汁の摂取により, Table 10 に示すように, 食後血糖上昇抑制に一定の影響を及ぼすことが示唆された。

供試味噌の違いによる GI 平均値の差について, 分散分析と多重比較を行い, 米味噌 1 と最も低 GI であった豆味噌 1 との間で有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。

Table 10. Influence to give to GI of test miso

miso (soybean pastes)	n	Glycemic Index	Standard deviation
kome miso 1*	13	104	19
kome miso 2	18	97	19
kome miso 3	12	96	20
kome miso 4	13	94	26
kome miso 5	19	96	18
mame miso 1*	12	84	10
mame miso 2	13	98	27
mame miso 3	19	95	31
mugi miso 1	17	91	21

\*  $p < 0.05$

One-way analysis of variance and multiple comparison by LSD.

Table 11. Effect of test miso (soybean pastes) on the activity of Trypsin in vitro.

miso (soybean pastes)	IC <sub>50</sub> (%)	TI equivalent
TI*	0.00029	1000
kome miso 1	13.1	0.02
kome miso 2	16.6	0.02
kome miso 3	19.4	0.02
kome miso 4	28.0	0.01
kome miso 5	32.8	0.01
kome miso 6	25.7	0.01
kome miso 7	21.3	0.01
kome miso 8	20.4	0.01
kome miso 9	49.9	0.01
kome miso 10	47.1	0.01
mame miso 1	2.2	0.13
mame miso 2	3.8	0.08
mame miso 3	7.0	0.04
mugi miso 1	38.7	0.01
mugi miso 2	33.0	0.01

\*: Trypsin Inhibitor (TI, from soybean, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) was used for experiment.

GI の低い食事は食後血糖の急激な上昇を抑え, 糖尿病の予防に寄与する可能性が示唆されている<sup>14)</sup>。味噌は抗糖尿病食として利用可能な食品であると考えられた。

#### ②消化酵素試験管試験について

トリプシン活性測定試験においては, Table 11 に示すように 15 種類のすべての供試味噌でトリプシン活性阻害がみられた。

供試味噌の IC<sub>50</sub> (%) を比較し, 豆味噌がその最小値を占めた。これより, 豆味噌は他の味噌に比べ, 特に強いトリプシン活性阻害作用があることが示唆された。また, 供試味噌の TI 当量を評価し, Table 11 に示した。市販の純粋な TI を指標として用いた結果, 供試味噌のトリプシン阻害の程度は指標である TI に比べ弱かった。

$\alpha$ -アミラーゼ活性測定試験について, IC<sub>50</sub> (%) よりすべての供試味噌において, ヒト唾液  $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害が認められ, ブタ膵液  $\alpha$ -アミラーゼではヒ

Table 12. Effect of test miso (soybean pastes) on the activity of  $\alpha$ -Amylase in vitro.

miso (soybean pastes)	$\alpha$ -Amylase (from human saliva) IC <sub>50</sub> (%)	$\alpha$ -Amylase (from porcine pancreas) IC <sub>50</sub> (%)
kome miso 1	8.5	1.0
kome miso 2	14.1	1.3
kome miso 3	12.0	1.2
kome miso 4	8.8	1.5
kome miso 5	51.3	1.3
kome miso 6	10.2	2.9
kome miso 7	7.8	1.4
kome miso 8	37.4	0.5
kome miso 9	15.1	1.7
kome miso 10	13.2	1.2
mame miso 1	5.4	5.4
mame miso 2	14.4	10.5
mame miso 3	18.0	8.6
mugi miso 1	85.1	1.9
mugi miso 2	6.9	0.8

Table 13. Effect of miso (soybean pastes) on the activity of  $\alpha$ -Glucosidase in vitro.

miso (soybean pastes)	IC <sub>50</sub> (%)	Acarbose equivalent
Acarbose*	0.0026	1000
kome miso 1	1.7	1.6
kome miso 2	2.5	1.1
kome miso 3	1.3	2.0
kome miso 4	2.4	1.1
kome miso 5	1.8	1.5
kome miso 6	1.2	2.3
kome miso 7	0.1	26.3
kome miso 8	2.8	0.9
kome miso 9	0.6	4.3
kome miso 10	1.7	1.5
mame miso 1	5.9	0.4
mame miso 2	10.1	0.3
mame miso 3	3.1	0.9
mugi miso 1	1.9	1.4
mugi miso 2	1.5	1.8

\*: Glucobay 100 (Bayer Co. Ltd.) containing 100mg/tablet of acarbose was used for experiment.

ト唾液  $\alpha$ -アミラーゼに比較して Table 12 に示すように、活性阻害は顕著であった。

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性測定試験においては IC<sub>50</sub>(%) より、すべての供試味噌で強い  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性阻害が認められた。また、供試味噌のアカルボース当量を評価し、結果は Table 13 に示した。

味噌の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害の程度は、アカルボースに比べて弱いことが確認された。また、味噌の摂取によって GI が低下した要因について、*in vitro* における結果から、供試味噌15種類すべてにおいて、糖質消化酵素のヒト唾液及びブタ膵液  $\alpha$ -アミラーゼ、ブタ小腸  $\alpha$ -グルコシダーゼに対して強い活性阻害が認められた。

Table 14. Trypsin inhibitor content of test miso (soybean pastes) assayed by ELISA.

miso (soybean pastes)	TI content of miso (TI $\mu$ g/miso g)
kome miso 1	0.10 $\pm$ 0.001
kome miso 2	1.17 $\pm$ 0.02
kome miso 3	0.56 $\pm$ 0.02
kome miso 4	1.09 $\pm$ 0.13
kome miso 5	0.28 $\pm$ 0.01
kome miso 6	0.10 $\pm$ 0.001
kome miso 7	0.12 $\pm$ 0.02
kome miso 8	0.05 $\pm$ 0.001
kome miso 9	2.89 $\pm$ 0.08
kome miso 10	5.45 $\pm$ 0.18
mame miso 1	0.05 $\pm$ 0.01
mame miso 2	0.27 $\pm$ 0.03
mame miso 3	1.19 $\pm$ 0.01
mugi miso 1	0.71 $\pm$ 0.01
mugi miso 2	16.42 $\pm$ 4.28

Experimental data were given as the means  $\pm$  standard deviation.

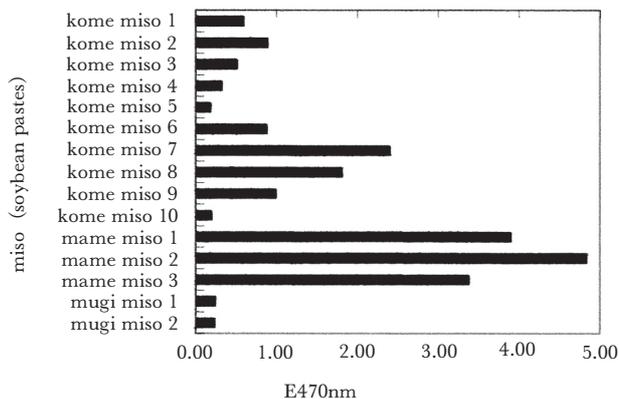


Fig. 7 Brown degree of miso in E470nm

また、全ての供試味噌においてトリプシン活性阻害作用が認められた。更に ELISA 法により、味噌中のトリプシンインヒビター (TI) を定量した。味噌中 TI 換算量 (TI  $\mu$ g/味噌g) を Table 14 に示した。

供試味噌に含まれる TI 量は味噌の種類によって異なり、味噌 g 当たりの TI 含量は (0.05 ~ 16.42)  $\mu$ g であった。数値上は、全体的に味噌中の TI 含量は微量であった。

### ③味噌の褐色度測定

味噌の褐色度を E470nm で測定したが、Fig. 7 に示すように豆味噌で褐色度が大きいことが確認された。

また、消化酵素試験管試験結果の IC<sub>50</sub> (%) と褐色度 (E470nm) との関係を図 8 に示した。

トリプシンは両者の相関係数  $r = -0.733$  ( $P < 0.01$ ) であり、味噌の褐色度が大きいほどトリプシン活性を強く阻害する傾向にあることが認められた。ブタ膵液  $\alpha$ -アミラーゼは両者の相関係数  $r = 0.855$  ( $P < 0.01$ )、 $\alpha$ -グルコシダーゼは両者の相関係数  $r = 0.775$  ( $P < 0.01$ ) であり、これら 2 つの酵素活性に対し、味噌の褐色度が小

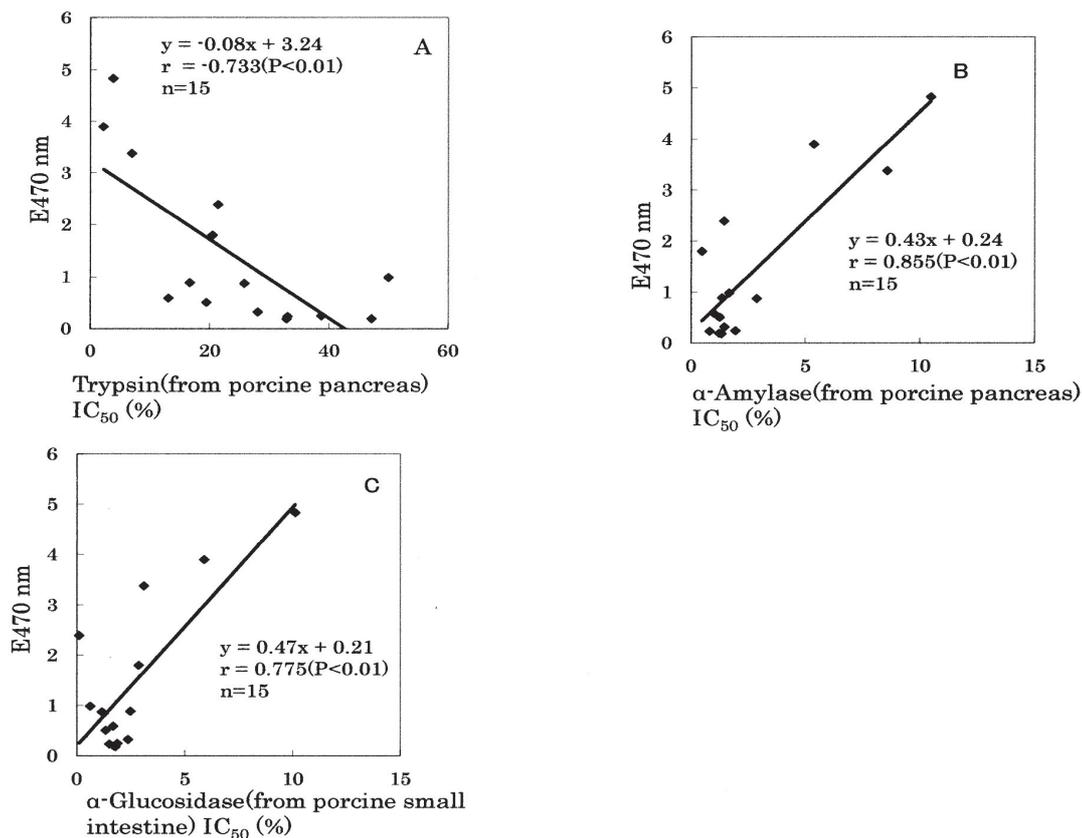


Fig. 8 Correlation between E470 nm and enzyme-inhibiting ability (IC<sub>50</sub>).

(A): Correlation with E470 nm and IC<sub>50</sub> (%) of Trypsin (from porcine pancreas).

(B): Correlation with E470 nm and IC<sub>50</sub> (%)  $\alpha$ -Amylase (from porcine pancreas).

(C): Correlation with E470 nm and IC<sub>50</sub> (%)  $\alpha$ -Glucosidase (from porcine small intestine).

さいほど酵素活性を強く阻害する可能性が示唆され、なお、ヒト唾液  $\alpha$ -アミラーゼ及びGIについては褐色度 (E470nm) との関連は認められなかった。

これにより味噌の摂取によって膵酵素分泌を刺激し、インスリン分泌に寄与する可能性が推測された。味噌の褐色度と食後血糖上昇抑制との関連は認められなかった。

これより、味噌が食後血糖上昇抑制に一定の影響を及ぼすことが示唆され、今後味噌を応用した抗糖尿病食の開発が期待される。

また、味噌の食後血糖上昇抑制因子として、味噌原料由来のTI、味噌の褐色度に寄与する成分 (Melanoidinを含む)、その他味噌中の機能性成分等、複数の影響因子の作用が複合して関与する可能性が考えられた。

## 2) 野菜類の摂取が生体内の酸化ストレスレベルに及ぼす影響と抗酸化物質<sup>15, 16)</sup>

酸化ストレスとは、何らかの要因でROSの生成が増大し、抗酸化防御系が破壊され、たんぱく質、脂質およびDNAに対して酸化的傷害となった状態と定義される<sup>17)</sup>。

多くの知見から酸化ストレスに関連する疾病予防因子に野菜摂取が有効であると示されている。近年、酸化ス

トレスを反映するバイオマーカー (酸化ストレスマーカー) が数多く開発されており、抗酸化物質を含む食品の摂取による評価指標として臨床や疫学の分野で広く用いられている。

### ① [実験1] と【実験2】の2つの実験を行った。

[実験1] では健康人を対象に野菜類を一定期間負荷することにより酸化ストレスレベルが改善されるかを3つの酸化ストレスマーカーから分析し、その効果がより期待できる野菜を検索した。

【実験2】負荷した野菜類に含まれる抗酸化物質およびラジカル消去能の分析を行った。

### ②実験方法

[実験1] 女子大学生を対象として一定量の野菜類を7日負荷し、ウォッシュアウト後に同じ被験者群に対して異なる試料を同様の方法で負荷した。各試験の負荷前後における酸化ストレスレベルの変化および野菜の種類による影響の違いを観察した。負荷試料は生産量が日本において比較的多く、著者らの *in vitro* の先行研究よりスクリーニングした野菜類から、チンゲンサイ、シュンギク、ブロッコリー、キャベツおよびコマツナの5品目を選択した。研究期間は、はじめの6日間を準備期間とし、続く7日目から13日目の毎夕食時に野菜試料を負荷した。また、負荷試料以外の食事による

影響を少なくするために7日目からは被験者全員の食事を統一メニューとした。野菜試料の負荷前後に採血し、酸化ストレス度測定 (BAP Test) および抗酸化力測定 (d-ROMs Test) を行った。さらに24時間採尿より尿中 8-isoprostane 濃度を分析した。これらのバイオマーカーから酸化ストレスレベルについて評価を行った。

【実験2】[実験1] で用いた5品目の野菜類について、Folin-Ciocalteu 法による総ポリフェノールの定量、HPLC 法によるアスコルビン酸およびβ-カロテンの分析を行った。さらに、DPPH ラジカル消去能を測定し、抗酸化物質との関連を検討した。

【結果】[実験1] 2008年度に被験者14名で①チンゲンサイおよび②シュンギク負荷試験を行った。2009年度は被験者15名で③ブロッコリー、④キャベツ、⑤コマツナ負荷試験を実施した。血中酸化ストレス度はシュンギクおよびコマツナ試験においては有意な低下が認められた。血中抗酸化力の上昇はコマツナ試験を除くすべての野菜類に観察され、シュンギクおよびブロッコリー試験では有意な上昇がみられた (Table 15, 16)。

尿中バイオマーカーについては負荷前後の分析値とその変化率を Table 17 に示す。分析した4種の野菜類すべてにおいて尿中 8-isoprostane レベルの低下がみられた。

負荷前後の変化率はブロッコリー試験 (-14.5%)、シュンギク試験 (-13.7%)、コマツナ試験 (-9.0%)、キャベツ試験 (-6.7%) の順で大きく、ブロッコリーおよびシュンギク試験では有意な低下が認められた。

野菜の負荷によって生体内の酸化ストレスが低下し、抗酸化力が上昇することが推定されるため、バイオマーカー間の相関分析を行った。d-ROMs, BAP および 8-isoprostane について介入前後における変化率の関連を分析した結果を Table 18 に示す。

d-ROMs と尿中 8-isoprostane 間では酸化ストレスレベルの改善により、どちらも低下するという正の相関が考えられた。ブロッコリー負荷試験のみに、その傾向があったものの有意な関連はなかった。d-ROMs と BAP の関係と同様に BAP と 8-isoprostane 間にも野菜負荷により負の相関がみられると予想された。ブロッコリー試

Table 15. 野菜負荷による血中酸化ストレス度 (d-ROMs) heno 影響

Sample	Trial day			
	day 1	day 7	day 10	day 14
チンゲンサイ	350.0 (43.4)	346.8 (36.9)	349.0 (37.5)	372.0 (33.2)
シュンギク	323.3 (30.3)	309.8 (32.1)	304.0 (38.6)	288.0 (36.6)
ブロッコリー	287.0 (23.8)	307.0 (30.0)	311.5 (38.0)	306.0 (35.3)
キャベツ	315.0 (41.0)	321.0 (40.3)	318.5 (44.3)	316.5 (42.0)
コマツナ	297.0 (27.0)	309.0 (18.5)	317.0 (37.5)	290.0 (22.3)

Table 16. 野菜負荷による血中抗酸化力 (BAP) への影響

Sample	Trial day			
	day 1	day 7	day 10	day 14
チンゲンサイ	2180 (100)	2095 (123)	2204 (165)	2102 (179)
シュンギク	2079 (128)	2063 (120)	2184 (120)	2127 (113)
ブロッコリー	2122 (174)	1986 (142)	2081 (134)	2077 (120)
キャベツ	1957 (51)	1986 (84)	1972 (137)	1969 (103)
コマツナ	2032 (77)	2021 (102)	1999 (75)	2012 (73)

Median (Quartile deviation), 単位: d-ROMs, U. CARR, BAP,  $\mu\text{mol/L}$ .

Wilcoxon signed rank test および Friedman test による検定結果. <sup>1</sup>Friedman test, <sup>2</sup>キャベツを対照として Wilcoxon signed rank test で検定後, Bonferroni の補正を行い  $p$  value:  $0.05/2=0.025$ ,  $0.01/2=0.005$  とした. \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$

2008年度実施チンゲンサイ・シュンギク負荷試験  $n=14$ , 2009年度実施ブロッコリー・キャベツ・コマツナ負荷試験  $n=15$ .

Table 17. 野菜負荷前後における尿中 8-isoprostane の変化

Sample	Pre-intake	Post-intake	Change (%) <sup>1</sup>	$p$ value <sup>2</sup>
チンゲンサイ <sup>3</sup>	—	—	—	—
シュンギク	1.13 (0.39)	0.83 (0.30)	-13.74 (11.60)	0.006
ブロッコリー	0.96 (0.54)	0.77 (0.27)	-14.50 (23.35)	0.013
キャベツ	1.13 (0.34)	1.01 (0.25)	-6.66 (37.48)	0.910
コマツナ	1.15 (0.43)	0.89 (0.19)	-9.03 (27.41)	0.088

Median (Quartile deviation), 単位:  $\mu\text{g/day}$ .

<sup>1</sup>Change (%) = (Post/Pre)  $\times$  100 - 100. <sup>2</sup>Wilcoxon signed rank test による検定結果. <sup>3</sup>未測定のためデータなし.

2008年度実施チンゲンサイ・シュンギク負荷試験  $n=14$ , 2009年度実施ブロッコリー・キャベツ・コマツナ負荷試験  $n=15$ .

Table 18. 負荷試験前後におけるバイオマーカー変化率の関連性

Sample	d-ROMs vs. BAP		d-ROMs vs. 8-isoprostane		BAP vs. 8-isoprostane	
	r <sup>1</sup>	p value <sup>2</sup>	r	p value	r	p value
チンゲンサイ	0.21	0.474	— <sup>3</sup>		— <sup>4</sup>	
シュンギク	0.13	0.667	-0.25	0.383	-0.29	0.311
ブロッコリー	0.06	0.830	0.17	0.541	0.33	0.237
キャベツ	0.07	0.810	-0.26	0.355	-0.23	0.405
コマツナ	0.40	0.140	-0.14	0.612	-0.48	0.069

<sup>1,2</sup>Spearman rank correlation coefficient による検定結果。<sup>3,4</sup>8-isoprostane 未測定のためデータなし。

2008年度実施チンゲンサイ・シュンギク負荷試験 n=14, 2009年度実施ブロッコリー・キャベツ・コマツナ負荷試験 n=15.

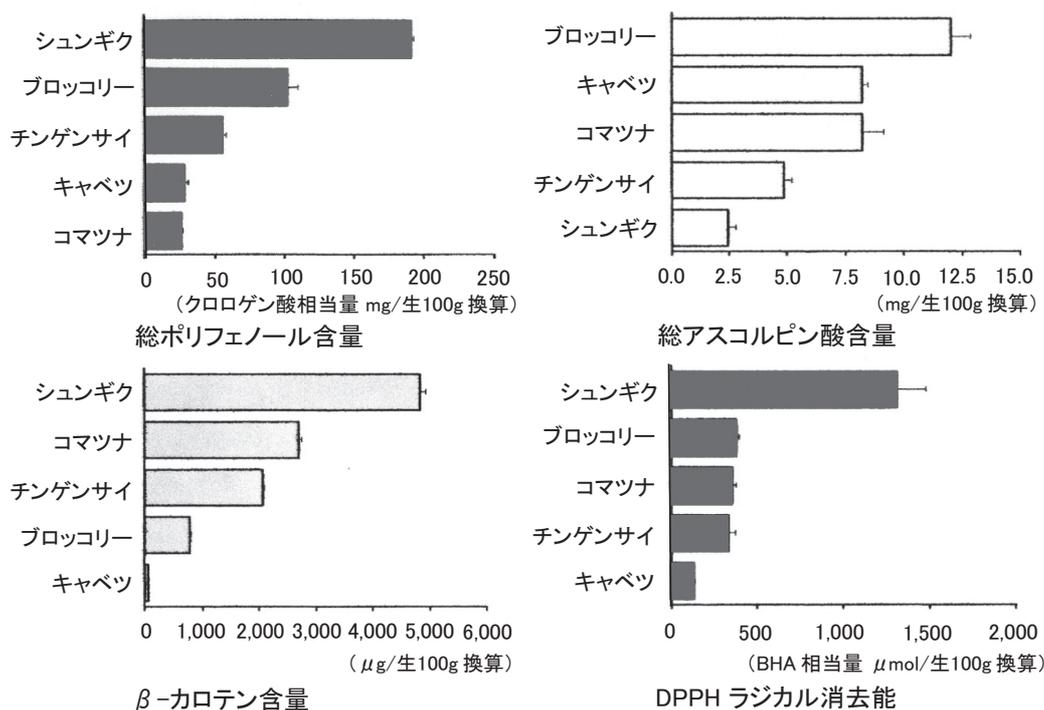


Fig. 9 野菜類に含まれる抗酸化物質およびラジカル消去能

Table 19. 統一メニュー期間の1日平均総ポリフェノール含量およびラジカル消去能

	チンゲンサイ負荷試験	シュンギク負荷試験	2009年度実施試験	p value <sup>1</sup>
総ポリフェノール量 (クロロゲン酸相当量 mg)	556 ± 176	552 ± 91	530 ± 83	0.897
DPPH ラジカル消去能 (BHA 相当量 μmol)	1118 ± 491	1089 ± 309	967 ± 185	0.919

Mean ± SD. <sup>1</sup>Kruskal Wallis test による検定結果.

験以外で負の相関がみられ、コマツナ試験において  $r = -0.48$  ( $p = 0.07$ ) という結果を得たが明確な相関は認められなかった。

【実験2】では、[実験1]で用いた野菜5品目について抗酸化物質であるポリフェノール、総アスコルビン酸およびβ-カロテンの3つを測定した。そしてラジカル補足活性として、DPPHラジカル消去能について測定した。結果はFig. 9に示す。

総ポリフェノールはシュンギクとブロッコリーに多く含まれ、β-カロテンはシュンギク、コマツナおよびチ

ンゲンサイに多い。総アスコルビン酸はブロッコリー、キャベツおよびコマツナに多い。DPPHラジカル消去能はシュンギクが群を抜いて高く、次のブロッコリー、コマツナおよびチンゲンサイはほぼ同程度であった。

また、[実験1]で用いた統一メニューの食事試料について、総ポリフェノールおよびDPPHラジカル消去能を測定し、食事からの各試験間における結果に影響するような偏りがなかったかを確認した。結果をTable 19に示した。

統一メニューの総ポリフェノールおよびラジカル消去

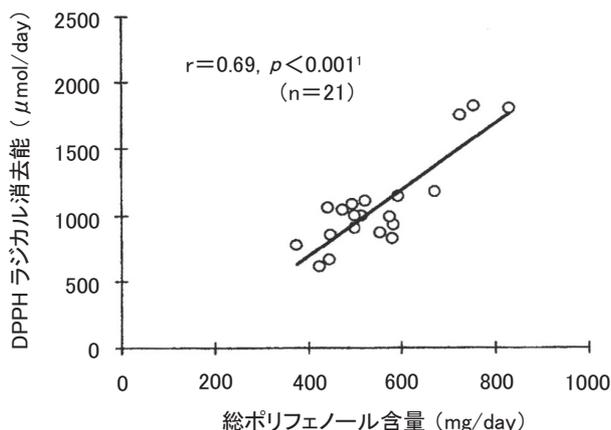


Fig. 10 統一メニューの総ポリフェノール含量およびラジカル消去能の関連

能の関連は Fig. 10 に示す。ラジカル消去能に対する総ポリフェノール含量には有意な正の相関がみられた。

統一メニュー期間（7日間）の食事試料の1日平均総ポリフェノール含有量およびラジカル消去能を示す。内容の異なる3つの統一メニュー間にはこれらの有意な差は認められなかった。実験1の結果より、シュンギクの負荷は血中および尿中の酸化ストレスと抗酸化力の両面を改善することが示唆された。

ブロッコリーは抗酸化力および尿中8-isoprostane レベルの改善が観察された。コマツナにおいては血中酸化ストレス度の低下がみられた。さらに、バイオマーカー間の明確な相関性が認められなかった要因として、野菜類に含まれる栄養素や生理活性物質等の違いとともに試験期間や実施時期などの影響が推察された。夏季に実施した負荷試験は他の試験と比べて介入前の血中酸化ストレス度が有意に高いことが観察された。環境温度の違いが影響を及ぼした要因の1つである可能性が示唆された。

実験2の結果より、ラジカル消去能にはポリフェノールおよびβ-カロテンの関与が考えられたが、明確な関連性はみられなかった。

### 3. グリセミック・インデックスの近赤外分光法を用いた非侵襲血糖測定の評価<sup>18)</sup>

食後高血糖は糖尿病の発症や治療の増悪、循環器疾患発症のリスクファクターであることが報告されている<sup>19-22)</sup>。

日本食の主食である米飯との組合せにより、GIを低下させるような副菜の検討を行った。合わせてGIに影響を及ぼすことが示唆される食品機能性成分の分析も行った。

一方、糖尿病患者の血糖管理やGI測定において用いられる血糖自己測定（SMBG）は、採血を伴う上に測定回数が頻回であることから、より安全で負担の伴わない方法が求められる。これまでに採血を必要としない非侵襲的な血糖測定法として、光の透過性の高い短波長領域（700～1,100nm）を用いた近赤外分光法による検討が重ねられてきた。しかし、個人差、日間差等の影響から不特定多数のヒトに適用可能な汎用型測定法の開発に成功した例はなく、未だ実用化には至っていない<sup>23-27)</sup>。今回前述のGI測定のために実施した400回近い試験食負荷試験において、SMBGと合わせて生体の近赤外スペクトルを測定し負荷試験中の両者の相関関係について解析した。

#### 1) GI測定

対象者の概要は Table 20 に示す。

GI測定は日本GI研究会のプロトコール<sup>28)</sup>に準拠して行った。対象者は健康女性36名（年齢20.7±0.5

Table 20. 対象者の概要

項目	mean±SD
人数 (n)	36
性別	女性
年齢 (歳)	20.7±0.5
身長 (cm)	158.2±5.2
体重 (kg)	50.9±5.4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.3±1.8
空腹時血糖値 (mg/dL)	82±9
75g OGTT 2時間値 (mg/dL)	116±14

Table 21. 試験食の構成食品および栄養成分組成\*

	基準食	検査食 (こまつな)	検査食 (キャベツ)	検査食 (だいず)	検査食 (トマト)	検査食 (ながいも)
米飯 (g)	149	146	140	141	135	117
検査食品 (g)	—	120 (可食部/生/相当量)	120 (可食部/生/相当量)	55 (水車)	120 (可食部/生/相当量)	80 (可食部/生/相当量)
ゆかり (g)	1	1	1	1	1	1
水 (mL)	150	150	150	150	150	150
エネルギー (kcal)	221	232	229	289	226	226
炭水化物 (g)	50.9	53.1	52.8	54.5	52.0	51.3
たんぱく質 (g)	3.2	4.9	4.0	10.0	4.0	4.4
脂質 (g)	0.0	0.1	0.2	3.8	0.2	0.2
糖質 (g)	50.4	50.0	50.1	50.0	50.0	50.0
食物繊維 (g)	0.5	3.1	2.6	4.5	2.0	1.2
食塩相当量 (g)	0.4	0.41	0.41	0.61	0.41	0.41

\* 栄養価計算は市販品は栄養成分表示を参考にし、その他は五訂増補食品成分表より計算した。

歳, BMI  $20.3 \pm 1.8$ ) であり, 日本糖尿病学会による糖代謝異常の判定基準に従い, 75g 経口ブドウ糖負荷試験 (oral glucose tolerance test: OGTT) により糖代謝異常が認められないことを確認した。

## 2) 試験食

基準食は包装米飯【質 50g 相当量, サトウのごはん, サトウ食品 (株)】とし, 検査食は基準食と同様の包装米飯と検査食品一品の組み合わせとした。検査食品には一般に入手可能な植物性食品 5 種類 (こまつな, キャベツ, トマト, だいず, ながいも) を選択した。各試験食の構成食品及び栄養成分組成を Table 21 に示した。

検査食品のこまつな, キャベツ, トマトの 3 種類の摂取量は健康日本 21 (第二次) の 1 日の野菜平均摂取量 350g の目標値より, その約 1/3 量 (120g) を 1 食の摂取量とし, 120g (生) 相当量に設定した。だいずは糖尿病食事療法のための食品交換表 (第 7 版)<sup>29)</sup> 四群点数法<sup>30, 31)</sup> より, 約 1 点 (80kcal) 分の摂取量として市販品の栄養成分表示より算出して水煮 55g とした。なお, 四群点数法では豆類は第 2 群の食品であり主菜として用いられるが, 一方で副菜としても使用されることがある。ながいも (生) は, 食事バランスガイド<sup>32)</sup> 副菜 1SV を参考に 80g (生) に設定した。

こまつな, キャベツは可食部 (生) 120g 相当量をプランチング後, 凍結保存し摂取直前に電子レンジ解凍した。トマトは可食部 (生) 120g 相当量について外果皮を除去し凍結保存, 摂取直前に半解凍した。だいずは市販品の水煮 55g を水切りした。ながいもは可食部 (生) 80g を摂取直前に棒状にカットした。各検査食 1 食が糖質 50g 相当量となるよう米飯量を調節した。

## 3) GI 測定方法

GI 測定に当たり, 測定前日の夕食は統一食を摂取した。測定当日は, 測定前日から 10 時間以上の絶食後, 午前 9 時までに測定を開始し, 空腹時血糖を SMBG により測定した。その後, 基準食または検査食を水 150ml と共に摂取 (一口の咀嚼回数 30 回程度, 摂取時間 5 ~ 10 分とし, 検査食については米飯と検査食品を一口ずつ交互に食べ摂取順序も統一) した後, 2 時間 (摂取開始, 15, 30, 45, 60, 90, 120 分後) の血糖を測定した。対象者はランダムに 3 グループに分け (1 グループ 10 名以上), グループ毎に摂取する検査食を割り振った。また, 日本 GI 研究会のプロトコールに従って, 試験食毎に血糖上昇曲線下面積 (the incremental area under the blood glucose response curve: IAUC) を算出し, その差が 25% 以内となる平均値を各対象者の GI 算出に用いる基準値として採用した。

## 4) 統計処理

GI の値は平均 ± 標準偏差 (mean ± SD) で示した。基準食に対する各検査食の摂取後 2 時間の最高血糖値および IAUC の比較は, paired t-test にて各検査食のデータと同対象者の基準食のデータとの平均値の差を検定し, 有意差は  $p < 0.05$  を統計的に有意と判定した。解析

には SPSS Ver.19.0 J for Windows (IBM Japan, Ltd.) を使用した。

## 5) 検査食品の成分分析

検査食品 5 種類について, 加熱による酵素失活後, 凍結乾燥し, ポリフェノール量は津志田ら<sup>33)</sup> 法に準じ, Folin-Ciocalteu 法にて測定した。クロロゲン酸当量で算出した。食物繊維量は (一財) 日本食品分析センターへ依頼した。

## 6) 近赤外分光法を用いた非侵襲血糖測定法

測定は生体組織に対して透過性が高く, 真皮組織や皮下組織内の細胞間質液や毛細管血中のグルコース関連の情報が得られるとされる近赤外短波長領域 (700 ~ 1,100nm) を用いて行った<sup>34, 35)</sup>。

①対象者は GI 測定と同様の対象者 36 名とした。

②測定装置

近赤外血糖測定装置は, 先行報告より<sup>35, 36)</sup>, Fig. 11 に示したように, インタラクタンス方式の既存装置を基に血糖測定用に改良した装置を用いた。

手の平が接触する測定プローブ裏面にラバーヒーターを内蔵し, 測定プローブの温度を  $36.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  に保持した。

また, 測定位置を一定にするために対象者 (個人用) の石膏手形を作成し, 測定時にスペクトル測定部へ設置した。

③測定方法

測定は, 前述の GI 測定における負荷試験中の SMBG と同様のタイミングで行い, SMBG 後, 直ちに装置に設置した。石膏手形へ手の平をセットし, 小指球部の近赤外拡散反射スペクトル (700 ~ 1,100 nm) を測定した。

④解析方法

より多くのデータを用いて解析することに重点を置き, GI 測定で得た全てのデータを採用した。各負荷試験において, 空腹時からの血糖値変化量 ( $\Delta BG_i$ ,  $t =$

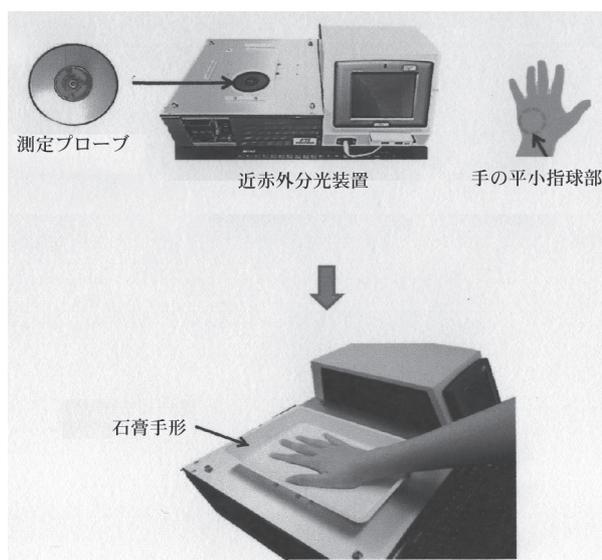


Fig. 11 近赤外分光装置および測定部位, 石膏手形を用いた測定の位置関係

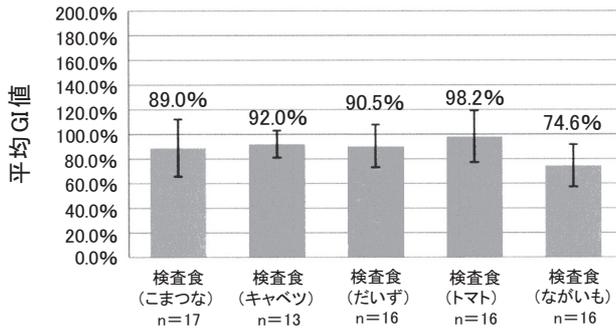


Fig. 12 検査食品のGIに及ぼす影響

Table 22. GI測定2時間における基準食および検査食摂取後の最高血糖値

	n	平均最高血糖値 (mg/dL) mean±SD	最大値 (mg/dL)	最小値 (mg/dL)
基準食	17	139±15	172	113
検査食 (こまつな)	17	136±14	172	114
基準食	13	148±15	175	120
検査食 (キャベツ)	13	142±15*	172	117
基準食	16	138±14	172	113
検査食 (だいず)	16	136±13	173	107
基準食	16	145±16	175	119
検査食 (トマト)	16	145±14	167	109
基準食	16	141±17	175	113
検査食 (ながいも)	16	124±14****	153	97

\*: p&lt;0.05, \*\*\*\*: p&lt;0.001 (paired t-test)

0, 15, 30, 45, 60, 90, 120) および、空腹時からの波長λにおける2次微分吸光度変化量 ( $\Delta I_{\lambda t}$ ) から、両者の相関係数  $r_{\lambda}$  を計算し、相関係数が最大となる波長を\*とした。更に、目的変数を血糖値変化量 ( $\Delta BG_t$ )、説明変数を波長λ\*における吸光度変化量 ( $\Delta I_{\lambda^*}$ ) として単回帰分析を行い ( $\Delta BG_t = a \cdot \Delta I_{\lambda^*} + b \rightarrow a$  及び  $b$  を推定)、吸光度変化量 ( $\Delta I_{\lambda^*}$ ) から血糖推定値を得た。また、血糖推定値とSMBGによる血糖実測値を用いてIAUCおよびGIを算出した。

## 7) 結果

### ① GI測定

Fig. 12に示したように、GI測定に用いた検査食5種類全てにおいて、平均GIは100以下となり、基準食よりも摂取後2時間の血糖上昇を抑える傾向があることを確認した。

また、Table 22に示すように、試験食摂取後、2時間の最高血糖値を平均値と比較すると、基準食に対し、キャベツ、ながいもの検査食は有意に ( $p<0.05$ ) 低値を示し、特にながいもについては顕著 ( $p<0.001$ ) であった。

また、Fig. 12に示したように、摂取後、2時間のIAUC

を基準食と比較すると、こまつな、だいず、ながいもの検査食で有意に低値を示し、特にこまつな、ながいもにおいては顕著であった。

以上より、糖質を一定量に統一した試験食において、米飯を主食として副菜(検査食品)一品を組み合わせることで、検査食品によっては米飯単品よりも食後血糖上昇を抑える効果があることが明らかとなった。この要因としては、検査食品中の食物繊維の胃排出遅延および拡散阻害による腸管での吸収遅延<sup>37)</sup>や糖質消化酵素活性阻害作用<sup>38)</sup>が、糖質の消化・吸収を抑制したものと考えられる。しかしながら、基準食と比較して摂取後2時間の血糖値のピークおよびIAUCが顕著に低値であったながいもは他の検査食品に比べてその食物繊維含有量は少なく、食物繊維による食後血糖上昇抑制作用は小さいと考えられた。

一方で、先行研究より粘性をもつ食品は胃からの排出を遅らせ、血糖上昇を抑制することが示唆されている<sup>39, 40)</sup>ことから、ながいもの粘性物質であるマンナンによる吸収遅延作用が、食後血糖上昇抑制に大きく関与したと推察された。

### ③検査食品の成分分析

食後血糖制御に関与することが示唆される総ポリフェノールと食物繊維量<sup>41, 42)</sup>について、検査食品5種類の含有量を分析したが、有意な相関は認められなかった。

先行研究より、クロロゲン酸では糖質消化酵素であるα-グルコシダーゼ活性阻害作用が認められている<sup>43)</sup>。また、食物繊維は糖質の消化・吸収を抑制することにより食後血糖上昇を抑制することが知られており、特に水溶性食物繊維は、粘性があり、胃排出や小腸での吸収を遅延させ、血糖反応を穏やかにすることが知られている<sup>44)</sup>。本研究では、総ポリフェノール量および食物繊維量以外の他の成分や糖質構成による影響が複合的に作用したのと考えられた。

### ④近赤外分光法を用いた非侵襲血糖測定法の検討

全負荷試験の約95%において、波長λ\*における血糖変化量と吸光度変化量の相関係数  $r_{\lambda^*}$  は0.6以上であった(0.7以上: 約84%, 0.8以上: 約65%)。波長λ\*は個人間や、同一個人の間でも全波長領域に渡り変動した。λ\*は糖の吸収だけでなく、代謝成分に由来する可能性も高く、このためブドウ糖の吸収バンド近傍に限らず、寄与する波長が変動すると考えた。血糖変化量と吸光度変化量の相関に関する詳しい情報や波長λ\*の度数分布は先行文献<sup>45)</sup>に記載されている。各対象者のSMBGの血糖実測値と非侵襲血糖測定法の血糖推定値に基づくIAUCをプロットしたFig. 13より推定値のIAUCと実測値のIAUCは高い相関を示した。

また、同じようにGI値をプロットしたFig. 14より推定値のGI値と実測値のGI値とは高い相関を示した。

波長λ\*が負荷試験ごとに変動することは、汎用性の高い検量モデルを構築する上で障壁となるが、単回帰分析により個人の検量モデルを測定日ごとに構築する手法

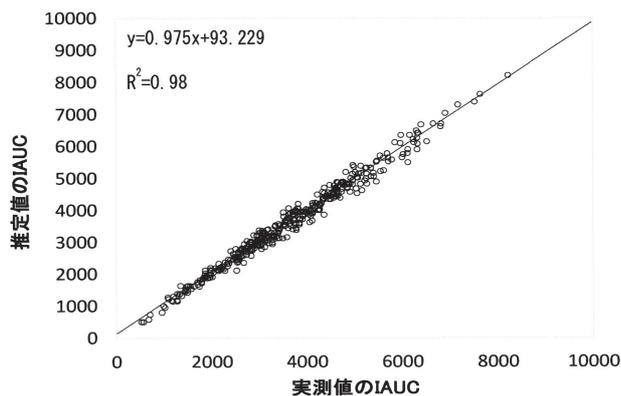


Fig. 13 実測値と推定値に基づく IAUC の散布図

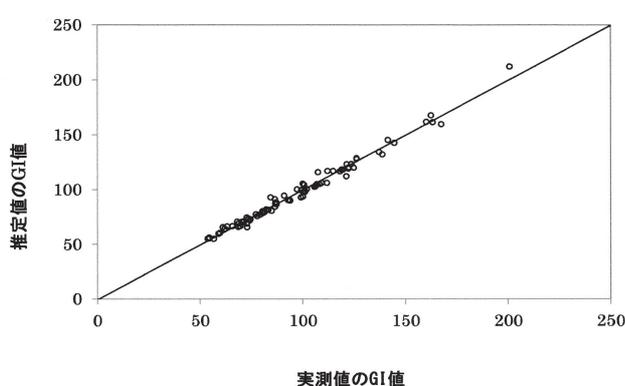


Fig. 14 実測値と推定値に基づく GI 値の散布

は、負荷試験中の採血回数を低減することができる。今後、検量モデル構築時に用いる血糖実測値の最小サンプル数や有効測定時間の延長を検討することにより、GI測定だけでなく糖尿病患者における血糖連続モニタリングへの応用が期待される<sup>46)</sup>。

## 結 語

調理・加工した食物中には Maillard 反応生成物が広く存在する。日頃の食事では食材の一次成分同士の反応により生成した二次成分をある程度摂取しているが、この中には多くの生理機能成分が存在することが解明された。この反応の最終産物である Melanoidin は高分子化合物であり、その理化学的性質から、一緒に食べた食物の栄養成分の消化・吸収過程で、さまざまな生理機能を発揮する。ラットが摂取した場合、その腸内菌叢の変動が観察され、乳酸菌群の有意の増加が認められ、滞腸時間の短縮、血清コレステロールの低下などが認められた。Melanoidin は生体に対して何らかの機能を及ぼすことが予想された。

また、日本食の中心的な調味料である味噌の血糖値に及ぼす影響を調べた。通常の味噌汁の摂取により食後血糖の急激な上昇を抑えることが示され、糖尿病予防の可能性が示唆された。血糖上昇抑制因子として、主に味噌中のトリプシンインヒビター、味噌の色の

Melanoidin、その他の機能性成分が複合的に関与していると考察した。

また、野菜の機能性についてヒト試験を通して、いくつかの野菜摂取により血中酸化ストレス度と抗酸化力に与える影響を調べた。特にシュンギクでは用いたバイオマーカーのすべてから酸化ストレスレベルの改善が認められた。抗酸化物質の含有量も多く、ラジカル消去能も高かった。野菜には機能性成分の種類も多く、さまざまな生理機能が期待される。

さらにヒト試験を実施し、日本の主食である米飯との組み合わせにより、GI を低下の可能性がある副菜を検討した。中でも、ながいもは血糖上昇曲線下面積を顕著に低下させた。ながいもの粘性物質マンナンの効果によるものと推定した。

合わせて GI 測定に応用可能な近赤外分光法による非侵襲血糖測定法の確立を試みた。血糖自己測定と近赤外スペクトルとの相関において血糖変化量と吸光度変化量には相関があり、単回帰分析により算出した推定血糖変化量から求めた血糖上昇曲線下面積及び GI は血糖自己測定による血糖実測値に基づく結果をよく再現できた。今後、この研究は血糖測定の採血回数を減らす可能性と糖尿病患者の血糖連続モニタリングへの応用が期待される。

## 引用文献

- 1) 荒井総一, 阿部啓子, 吉川敏一, 金沢和樹, 渡邊 昌: 機能性食品の事典. 4-5, 朝倉書店 (2007)
- 2) 三浦理代: 博士論文, Melanoidin の特性ならびにその生物作用に関する研究. (1986)
- 3) Maillard, L.C., Action des acides amines sur les sucres; Formation des Melanoidines par voie methodique. C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. **154**, 66-68 (1912)
- 4) Hodge, J.E.: Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems. J. Agric. Food. Chem. **1**: 928-943, 1953
- 5) Reynolds, T.M.: Chemistry of non-enzymic browning I. The reaction between aldoses and amines. Adv. Food. Res., **12**, 1-52 (1963)
- 6) 加藤博通: 食糧保蔵学 (藤巻正生編). 164-173 (1980) 朝倉書店 (東京)
- 7) 五明紀春, 品川弘子, 前田安彦, 吉田企世子, 古我可一: 食品加工学. p35-36, 学文社 (2003)
- 8) 五明紀春, 三浦理代; D-キシロース-グリシン系の褐変初期段階における青色色素の生成. 日本農芸化学会誌, **56**, 417-425 (1982)
- 9) Einarsson, H., Goran, S.B. and Eriksson, C.: The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology. J. Agric. Chem., **31**, 1043-1047 (1983)
- 10) 印南 敏, 桐山修八 編: 食物繊維. 227, 第一出版株式会社 (1982)
- 11) 百瀬晶子, 早瀬文孝, 五明紀春, 三浦理代: 味噌の食後血糖に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌, **57** (2), 63-69 (2010)

- 12) 三浦理代, 五明紀春: 唾液  $\alpha$ -アミラーゼ活性測定法の開発およびその褐変食品への応用. 日本栄養食糧学会雑誌, **47**, 35-41 (1994)
- 13) Fujita, T., Matsunari, Y., Sato, K., Hayashi, M. and Koga, Y.: Effects of Oral Administration of Trypsin Inhibitor and Glucagon Content of Rat Pancreas. *Endocrinol. Japan.*, **26**, 35-39 (1979)
- 14) Willet, W., Manson, J. and Liu, S.: Glycemic index. Glycemic load. And risk of type 2 diabetes, *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 274-280 (2002)
- 15) 市川 優: 修士論文, 野菜類の摂取が生体内の酸化ストレスに及ぼす影響と抗酸化物質. (2009)
- 16) Ichkawa, Y., Gomyo, T., Miura, M.: Effects of Vegetable Intake on Biomarkers Related to Oxidative Stress in Healthy Young Females, *Anti-Aging Medicine*, **9** (5), 155-160 (2012)
- 17) 國友 勝: 酸化ストレスと動脈硬化. *YAKUGAKU ZASSHI*, **127** (12), 1997-2014 (2007)
- 18) 百瀬晶子: 博士論文, グリセミック・インデックス (GI) 測定における血糖自己測定と近赤外分光法を用いた非侵襲性血糖測定との比較検討. (2016)
- 19) Qiao, Q., Hu, G., Tuomilehto, J., *et al.*: Age and sex specific prevalence of diabetes and impaired glucose regulation in 11 Asian cohorts. *Diabetes Care.*, **26**, 1770-1780 (2003)
- 20) DECODE Study Group.: Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med.* **161**, 397-405 (2001)
- 21) Nakagami, T., Qiao, Q., Tuomilehto, J. *et al.*: Screen-detected diabetes, hypertension and hypercholesterolemia as predictors of cardiovascular mortality in five population of Asian origin: the DECODA study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.*, **13**, 555-561 (2006)
- 22) Levian, E.B., Song, Y., Ford, E.S. *et al.*: Is non-diabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of prospective studies. *Arch. Intern. Med.*, **164**, 2147-2155 (2004)
- 23) Salmeron, J., Ascherio, A., Rimm, EB., Colditz, GA, Spiegelman, D., Jenkins, DJ., Stampfer, MJ., Wing, AL., Willett, WC.: Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care*, **20**, 545-550 (1997)
- 24) Robinson, M.R., Eaton, R.P., Haaland, D.M., Koeppe, G.W., Thomas, E.V., Stallard, B.R. and Robinson, P.L.: Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: a preliminary evaluation. *Clin. Chem.*, **38**, 1618-1622 (1992)
- 25) Fischbacher, Ch., Jagemann, K.-U., Danzer, K., Müller, U.A., Papenkordt, L. and Schüller, J.: Enhancing calibration models for non-invasive near-infrared spectroscopical blood glucose determination. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **359**, 78-82 (1997)
- 26) Sälmann, A., Fischbacher, Ch., Jagemann, K.U., Danzer, K., Schüller, J., Papenkordt, L. and Müller, U.A.: Non-invasive blood glucose monitoring by means of near infrared spectroscopy : investigation of long-term accuracy and stability. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, **108**, 406-413 (2000)
- 27) Uwadaira, Y., Shimotori, A., Ikehata, A., Fujie, K., Nakata, Y., Suzuki, H., Shimano, H. and Hashimoto, K.: Logistic regression analysis for identifying the factors affecting development of non-invasive blood glucose calibration model by near-infrared spectroscopy. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, **148**, 128-133 (2015)
- 28) 杉山みち子, 若木陽子, 中本典子, 小山和作, 他: ごはん食と Glycemic Index に関する研究. 日本健康・栄養システム学会誌, **3**, 1-15 (2003)
- 29) 糖尿病食事療法のための食品交換表 第7版. (日本糖尿病学会 編著), p58, 文光堂, 東京 (2004)
- 30) 四群点数法のすべて 4つの食品群でバランス栄養食. (香川 綾, 香川芳子 監修), p161, 女子栄養大学出版部, 東京 (1993)
- 31) 食品成分表 2015資料編. (香川芳子 監修), p84, 女子栄養大学出版部, 東京 (2015)
- 32) 厚生労働省・農林水産省決定 食事バランスガイド - フードガイド (仮称) 検討会報告書 - (第一出版編集部 編集), p11, 第一出版, 東京 (2006)
- 33) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉: 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定. **41**, 611-618 (1994)
- 34) Golic, M., Walsh, K., and Lawson, P.: Short-wave-length near-infrared spectra of sucrose, glucose, and fructose with respect to sugar concentration and temperature. *Appl. Spectrosc.*, **57**, 139-145 (2003)
- 35) Uwadaira, Y., Adachi, N., Ikehata, A. and Kawano, S.: Factors affecting the accuracy of non-invasive blood glucose measurement by short wavelength near infrared spectroscopy in the determination of the glycemic index of foods. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **18**, 291-300 (2010)
- 36) 上平安紘, 足立憲彦, 池羽田晶文, 河野 澄: 短波長域を用いた近赤外分光法による非侵襲血糖値測定装置の開発とその応用. 日本食品科学工学会誌, **58**, 97-104 (2011)
- 37) Jenkins, D.J.A., Wolever, T.M.S., Jenkins, A.L., Taylor, R.H.: Dietary fibre, carbohydrate metabolism and diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*, **9**, 97-112 (1987)
- 38) Ou, S., Kwok, Kin-chor., Li, Yan., Fu, Liang.: In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose., *J Agric Food Chem*, **49**, 1026-1029 (2001)
- 39) Wolf, BW., Wolever, TM., Lai, CS., *et al.*: Effects of a beverage containing an fiber, with or without fructose, on the postprandial glycemic response to a high glycemic index food in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **57**, 1120-1127 (2003)
- 40) Sanggaard, KM., Holst, JJ., Rehfeld, JF., *et al.*: Different effects of whole milk and a fermented milk with the same fat and lactose content on gastric emptying and postprandial lipaemia, but not on glycemic response and appetite. *Br. J. Nutr.*, **92**, 447-459 (2004)
- 41) 立石絵美, 韓立坤, 奥田拓道: ラットにおける食後の血糖値に及ぼすコーヒー豆の熱水抽出物の影響. 栄養学雑誌, **62**, 323-327 (2004)
- 42) Jenkins, D.J., Wolever, T., Ocana, A.M., *et al.*: Dietary fibers, fibre analoges, and glucose tolerance : important of viscosity. *Br. Med.*, **27**, 1392-1394 (1978)
- 43) Uwadaira, Y., Ikehata, A., Momose, A. and Miura, M.:

Identification of informative bands in the short-wavelength NIR region for non-invasive blood glucose measurement., *Biomed. Opt. Express*, **7**, 2729-2737 (2016).

- 44) 百瀬晶子, 池羽田晶文, 上平安紘, 三浦理代: グリセミック・インデックスの近赤外分光法を用いた非侵襲血糖測定の評価. 日本食品科学工学会誌, **63** (11), 538-544 (2016).

