〈平成18年度〉

「かまぼこ」の血糖値上昇抑制作用の解明と糖尿病予防への応用

矢　澤　一　良
（東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科）

1.　はじめに

糖尿病とはインスリン分泌不全やインスリン抵抗性が生ずることにより高血糖状態が持続する疾患であり，様々な合併症を伴う。特に網膜症，腎症，末梢神経障害は三大合併症とよばれており，糖尿病性の網膜症は失明の原因の第一位に挙げられている。また人工透析を必要とする腎症の原因疾患の第一位でもある。さらに末梢神経障害はもっとも頻繁に起こる合併症であり，手足のしびれや麻痺などが見られ更には末梢組織の壊疽を引き起こす[1～3]。このように糖尿病は血糖値が上昇するだけでなく，合併症によるQOL（生活の質）の低下や，生死に関わることもある疾患であることから，その予防はとても重要である[4,5]。

2002年の厚生労働省糖尿病実態調査によると，糖尿病が強く疑われる人は740万人，予備軍もあわせると1,620万人と言われており，成人の6.3人に１人が糖尿病またはその可能性があるということになる[6]。この糖尿病を予防することは社会的にも大きな意義を持ち，特に薬品を用いて治療するのではなく，日常的に摂取する食品によって糖尿病の発症を予防することが非常に重要であるといえる。

私たちの研究グループでは，動物実験を指標として生活習慣病を予防するための食品素材を探索している。さまざまなスクリーニングソースを対象とした研究の一環として，これまでに日本古来の水産加工食品「かまぼこ」が糖類摂取後の血糖値上昇を顕著に抑制することを見出した。これまでの研究から，以下の点を解明してきた。①血糖値上昇抑制作用は生の魚のすり身には確認されず，蒸した魚のすり身およびかまぼこに見られること。②原料となる魚種による違いはほとんどないこと。③トリプシン処理で失活すること。以上のことから，活性本体は白身魚に一般的に含まれるタンパク質成分だと予想している。本研究では，この「かまぼこ」の血糖値上昇抑制作用について，作用メカニズムおよび有効成分の解明を目的として研究を行った。本研究の成果が，「かまぼこ」を糖尿病予防に応用するための一助となると考えている。

2.　方　　法

2.1　かまぼこの調製

生マダラ魚肉を原料として，以下の手順でかまぼこを作製した。皮，骨を取り除き，大まかに切って水晒し操作後，10℃以下に保ったすり鉢上ですり潰し，魚肉の２％（w／w）のNaClを加えてさらに混ぜて成型した。その後室温で１時間放置した後，蒸し器で蒸して「かまぼこ」とした。砂糖を含有したものは血糖値に影響がでるため無糖のかまぼことして調製し，実験に用いるまで－20℃で凍結保存した。投与の際は必要量を解凍し，すり潰してペースト状にしたものを「かまぼこペースト」として投与した。

2.2　実験動物

雄性Std:ddYマウス（５から７週齢）を日本

SLC社から購入し，一週間飼育環境に馴化させて実験に使用した。実験前に24時間絶食させた後，体重をもとに群分けした。

2.3　かまぼこペーストの糖負荷試験[7)]

マダラを原料とした「かまぼこ」を用いて，血糖値上昇抑制作用をマウス糖負荷試験で確認した。マウスを6から8匹ずつ二群に分け，コントロール群には糖質のみを，もう一方には「かまぼこペースト」と糖質を混ぜたものを強制経口投与した。糖質としては，溶性デンプン（1,000mg/kg），マルトース（1,000mg/kg），スクロース（2,000mg/kg），グルコース（1,000mg/kg）のいずれかを用い，かまぼこペーストの投与量は8,000mg/kgとした。投与前，投与30，60，90，120，240分後に尾部より採血し，グルコースCⅡテストワコー（Wako）を用いて血糖値を測定した。

2.4　酵素阻害活性の測定

α－アミラーゼ阻害活性試験はXiaoらの方法を改良して以下の手順で行った[8)]。豚膵臓由来α－アミラーゼ（EC3.2.1.1）を用いて，一定時間の反応ののち分解されずに残存したデンプンをヨウ素デンプン反応により定量して評価した（600nm）。基質として100℃で加熱してα化させたデンプンを用いた。反応は酵素を100μl加えることによって開始し，37℃で10分間インキュベーションした。サンプルを添加しないコントロールの残存デンプン量を0％として，残存量が増加した場合に阻害が見られたと判断した。

α－グルコシダーゼ（マルターゼ，スクラーゼ）活性の測定にはマウスの小腸上皮から回収した粗酵素液を用いた。α－グルコシダーゼ阻害活性はスクロースを基質としてDahlqvistらの方法を改良して行った[9)]。基質としてマルトースまたはスクロースを用い，グルコースCⅡテストワコーを用いて，一定時間内に生成したグルコース量を吸光度492nmで定量した。各々の阻害活性はサンプルを添加しないコントロールの酵素活性を100％として，阻害率（％）で表した。

2.5　腸管吸収抑制試験

ペントバルビタールで麻酔したマウスを開腹し，十二指腸から10cm程度下流にあたる小腸の一部を結紮した。さらに，胃の一部を小切開して幽門部へ挿入したゾンデにより，十二指腸に向けてグルコース（1,000mg/kg）とサンプルの混合液を注入した。30分後に十二指腸から小腸の結紮部までを摘出し，腸の内部を5.0mlの生理食塩水で洗浄し，内容物を全て回収して遠心し，上清中のグルコース量をグルコースCⅡテストワコーで定量した。グルコース溶液に5.0mlの生理食塩水を加えたもののグルコース濃度を100％として，腸内の残存グルコース量を回収率（％）で表示した。

2.6　かまぼこペースト負荷時の血中インスリン濃度の測定

インスリン測定キット（森永生化学研究所）を用いてグルコース投与前および投与10，20，30，60分後の血中インスリン濃度を測定した。また同時に得られた血漿を用いて，グルコースCⅡテストワコーにより血糖値を測定した。

2.7　かまぼこ水晒し溶液を用いた血糖値上昇抑制試験

水晒し溶液とは，かまぼこの製造過程である水晒し操作によって生じる廃棄物である。今回の一連の実験で，かまぼこペーストの遠心上清にも血糖値上昇抑制作用が確認されたことから，この水晒し溶液にも同じ活性があると予想して同様の方法でグルコース負荷時の血糖値上昇抑制作用をマウスにおいて確認した。

2.8　固形成分の糖質吸着試験

かまぼこペーストの遠心操作により得られたかまぼこ沈殿に，非特異的な糖質の吸着能があるかどうかを確認するためにin vitroでの吸着試験を行った。2.5mlのグルコース溶液（2,160mg）と2.5ml

のサンプル溶液を試験管内で混合した。30分間静置後，上清のグルコース濃度をグルコースCⅡテストワコーで測定して，吸着によって除去された糖質量を予測した。

2.9　水溶性成分の分離精製

かまぼこペーストを出発原料として，遠心分離（3,000rpm，10分）によりかまぼこ上清とかまぼこ沈殿に分離して実験に用いた。上清部分については，さらにクロマトグラフィーによる活性成分の分離を試みた。マウス糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用を精製の指標とした。ゲルろ過クロマトグラフィーは（Sephadex G-15，内径3×60cm）は，蒸留水を移動相として流速25m*l*/hで分離し，1フラクションの容量を5m*l*としてタンパク定量はCoomassie（Bradford）Protein Assay Kit（PIERCE社）を用いてBradford法で行った。

2.10　統計処理

結果の数値は平均±標準誤差で表した。各群間の有意差はStudent's *t*-testによって評価し，$p<0.05$ を統計的に有意であるとした。

3.　結　　果

3.1　かまぼこペーストの血糖値上昇抑制作用

「かまぼこペースト」の糖質負荷時における血糖値上昇抑制作用を調べた結果を**図1**に示した。各試験のコントロールにおける血糖値については，糖質負荷30分後に最大値を示し，240分後には正常レベルに戻った。これに対して，各試験のかまぼこペースト投与群では，糖負荷30分後においてコントロール群に対し血糖値上昇が有意に抑制された。この抑制効果はでんぷん，スクロース，マルトース，グルコースの各試験において同様に見られたことから，糖による区別はないものと判断された。

3.2　酵素阻害活性試験

α－アミラーゼ阻害試験の結果を**図2**に，α－グルコシダーゼ阻害試験の結果を**図3**にそれぞれ

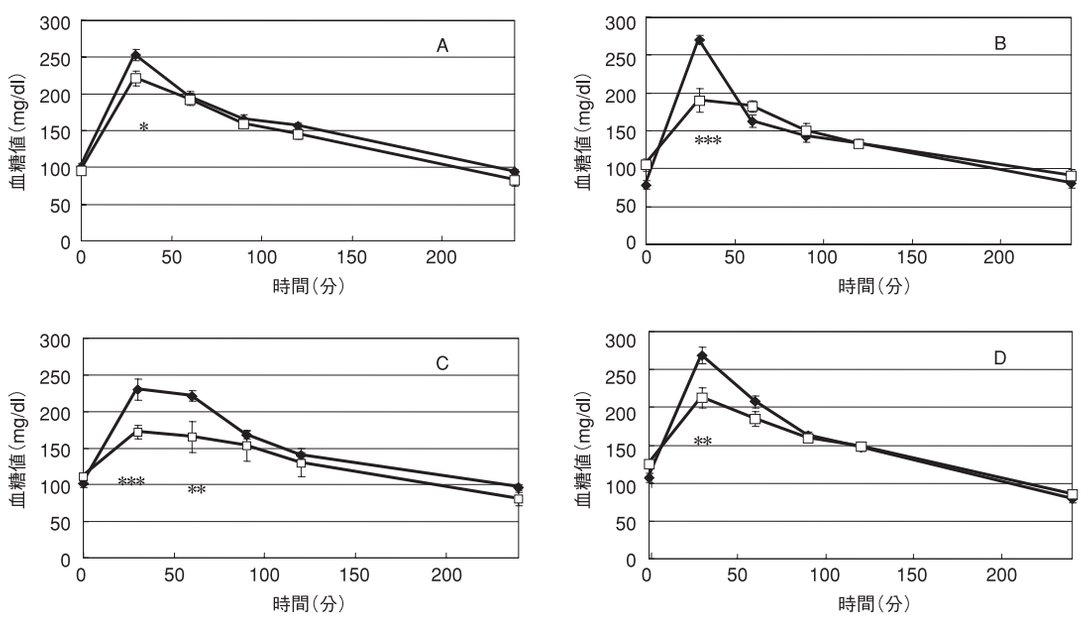


図1　かまぼこペーストの血糖値上昇抑制作用
A：デンプン1,000mg/kg，B：マルトース1,000mg/kg，C：スクロース2,000mg/kg，D：グルコース1,000mg/kg
◆：コントロール群（糖のみ），□：かまぼこ投与群（糖＋かまぼこ8,000mg/kg）
データは平均値±標準誤差で表した（n＝8）。
*：p＜0.05，**：p＜0.01，***：p＜0.005 vs control.

示した。α－アミラーゼ阻害試験では，かまぼこペースト，上清，沈殿のいずれも１から100mg/ml の濃度範囲において残存デンプン量（%）に有意な変化を与えなかったことから，かまぼこはα－アミラーゼの阻害作用を有さないことが示された。また，α－グルコシダーゼ阻害試験においては，かまぼこペーストもかまぼこ上清も１から100mg/ml の濃度範囲においてグルコシダーゼ活性に有意な変化を与えなかった。この変化は，基質としてマルトースを用いた場合もスクロースを用いた場合も同様であった。かまぼこペーストには，これら糖質分解酵素の阻害活性は見られなかった。

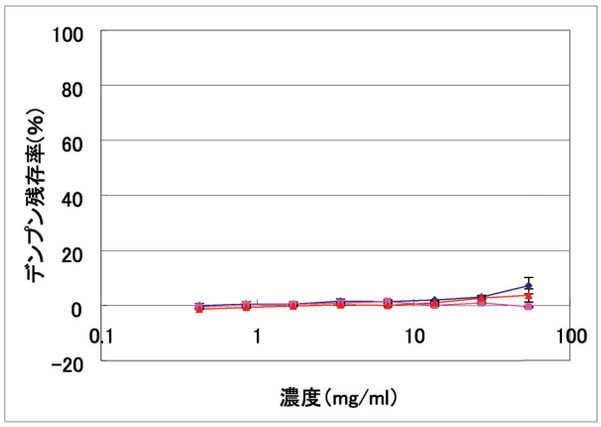


図２　α－アミラーゼ阻害活性試験
◆：かまぼこペースト，□：かまぼこ上清，▲：かまぼこ沈殿
データは平均値±標準誤差で表した（n＝3）。

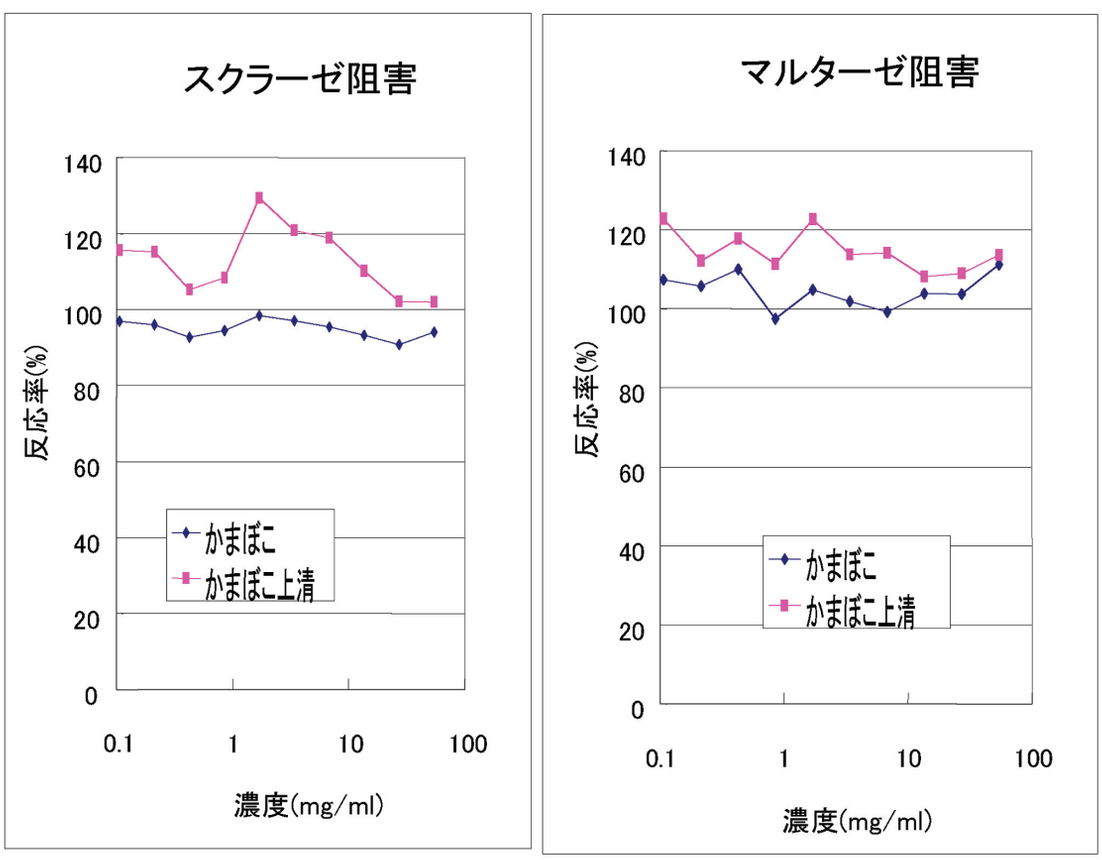


図３　α－グルコシダーゼ阻害活性試験
◆：かまぼこペースト，□：かまぼこ上清
基質はスクロースまたはマルトースを用いた。サンプルを入れずに反応させたものを100%としてα－グルコシダーゼ活性を評価した。
データは平均値で表した（n＝2）。

3.3　腸管吸収抑制試験

マウス腸管における吸収試験の結果を**図 4** に示した。コントロール（A）の測定値が18.5%であったことからマウスの腸の内部に30分間とどまることによって，グルコースの80%以上が腸管から吸収されていることが示された。一方で，かまぼこペーストを同時に投与した場合には，残率はやや増加して24.0%を示したが，コントロールと比べて有意な変化ではなかった。よって，かまぼこペーストはグルコースの腸管からの吸収を阻害しないことが示された。

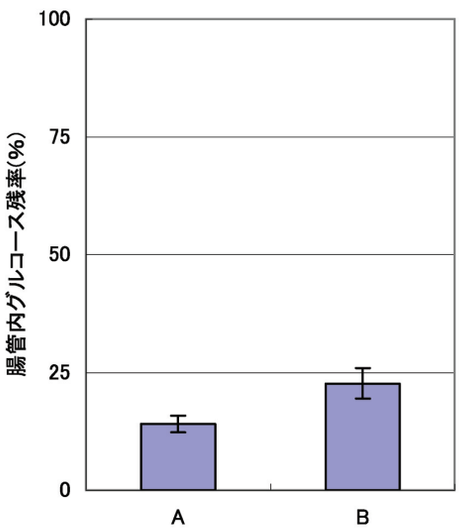


図 4　腸管吸収抑制試験
A：コントロール群，B：かまぼこ上清投与群
グルコースは1,000mg/kg，サンプルはかまぼこペーストに換算して10,000mg/kgを使用した。データは平均値±標準誤差で表した（n＝8）。

3.4　かまぼこペースト負荷時の血中インスリン濃度の測定

かまぼこペーストを投与した際の血糖値および血中インスリン濃度の変化を**図 5** に示した。かまぼこペースト投与群の血中インスリン濃度は投与後10分後に有意にインスリンの分泌を促進していた。血糖値の上昇もそれに伴い有意に抑制されていた（**図 5**）。

3.5　かまぼこの分画物の活性試験

分画の手順を**図 6**，活性試験の結果を**図 7** に示した。かまぼこペーストからの分離操作を以下に示した。かまぼこペーストを水に懸濁し，3,000rpm，4 ℃，10分間の遠心操作を行うことで「上清」部分と「沈殿」部分に分画した。さらに上清部分については分画分子量3,000の限外ろ過膜を用いて，「分子量3,000以下の画分」と3,000以上の「高分子量画分」の 2 つに分画した。こ

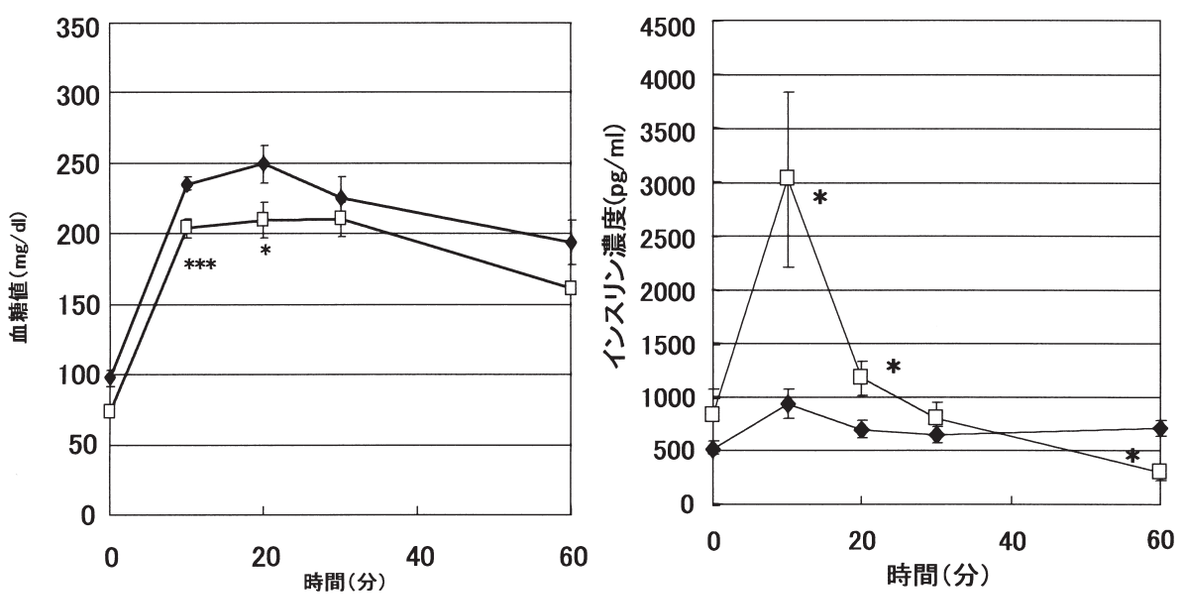


図 5　血糖値および血中インスリン濃度に及ぼす影響
◆：コントロール群（グルコース1,000mg/kg）　□：かまぼこ投与群（かまぼこペースト8,000mg/kg＋グルコース1,000mg/kg）
データは平均値±標準誤差で表した（n＝8）。（***：p＜0.005，**：p＜0.01 vs control）

のうち活性の見られた分子量3,000以下の画分を，ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより４つの画分に分画した。

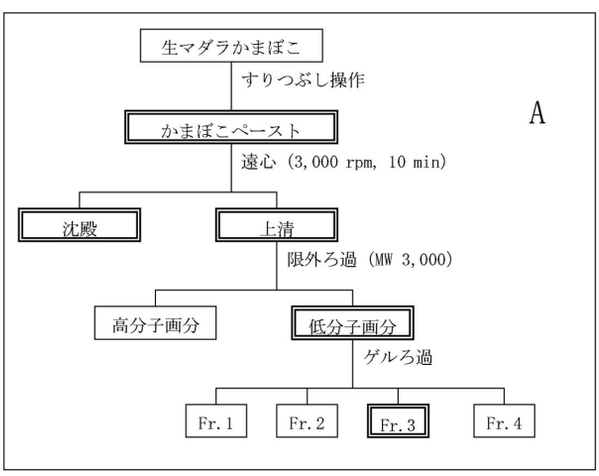
それぞれの画分の活性をマウスグルコース負荷試験で評価したところ，上清と沈殿に関しては両方の画分に活性が確認された。上清を分子量で分けた場合には3,000以下の画分に有意な血糖値上昇抑制が確認されたことから，この画分をゲルろ過に供した。得られた４つの画分に関してはFr.3において血糖値上昇が最も抑制されることがわかった。今回の一連の操作により，活性の低下が見られていることから精製により活性物質の安定性が損なわれる可能性が示された。

3.6　固形成分の糖質吸着能

この実験では溶液中のグルコースがかまぼこの沈殿に含まれる固形成分に非特異的に吸着されるかどうかを*in vitro*の条件で確認し，その結果を**図８**に示した。かまぼこペースト，上清，沈殿ともに，溶液中のグルコースをコントロールのレベルから変化させなかったことから，この条件下ではかまぼこに糖を直接吸着する性質は確認できなかった。

3.7　水晒し溶液の活性

水晒し溶液の活性試験の結果を**図９**に示した。コントロール群ではグルコース負荷の30分後に血糖値は301.5±3.7に達し，その後経時的に低下して240分後には正常レベルに戻った。一方で水晒



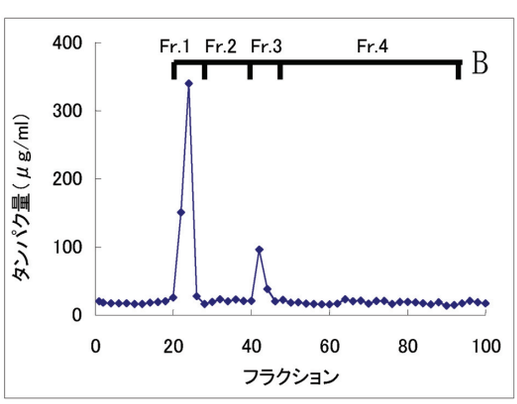


図６　分画の手順（A）とゲルろ過クロマトグラフィー（B）
A：詳細な分離条件は結果に示した。B：ゲルろ過条件はSephadex G-15（3×60cm），蒸留水25ml/h，各フラクションは５mlとした。タンパク定量の結果から，Fr.1からFr.４の４つのフラクションに分画した。

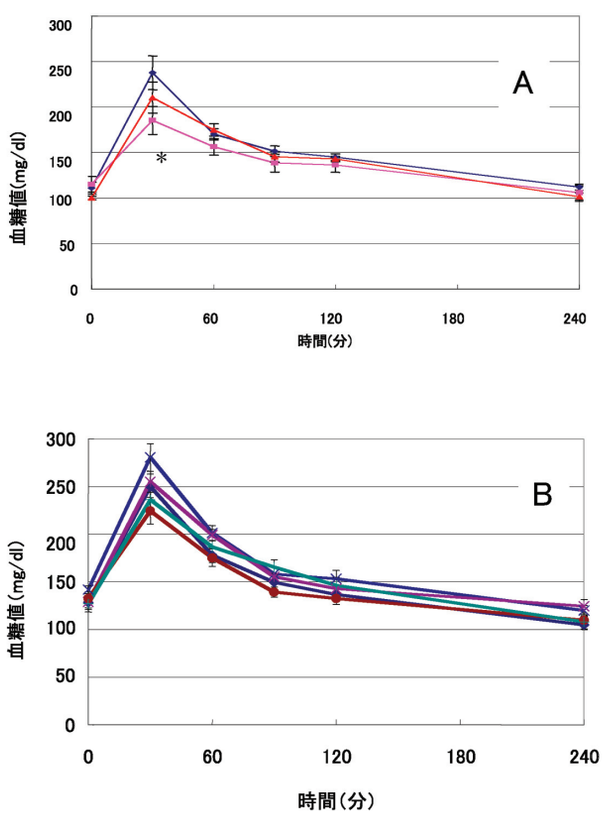
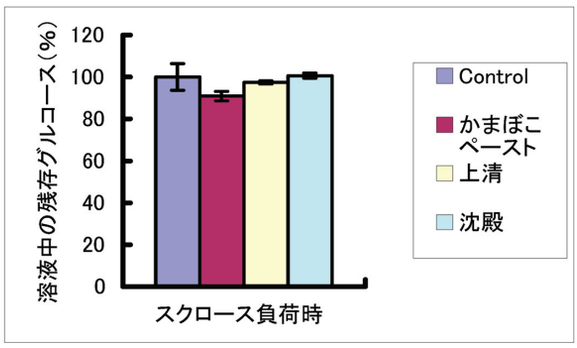


図７　分画物の活性試験結果
A：コントロール（◆），分子量3,000以下（□）と高分子3,000以上（△）の血糖値上昇抑制作用。
B：ゲルろ過分画後のFr.１（×），Fr.２（–），Fr.３（○），Fr.４（＋）の血糖値上昇抑制作用。
グルコース負荷量は1,000mg/kgで行い，サンプル投与量はかまぼこペーストに換算して10,000mg/kg，コントロールには蒸留水を用いた。
データは平均値±標準誤差で表した（n＝8）。*：$p<0.05$ vs control.



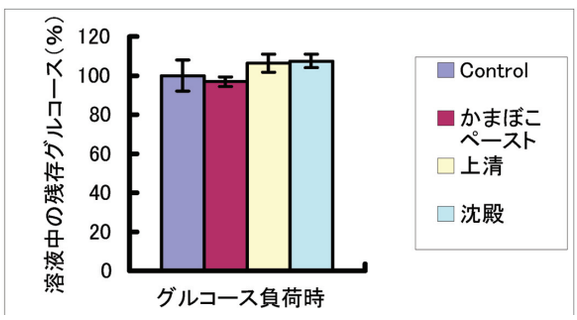


図 8　固形成分の糖質吸着試験
グルコース（180mg）またはスクロース（360mg）をサンプルと混合して30分間静置した。コントロールにはサンプルの代わりに蒸留水を使用した。各サンプルは，分離前のかまぼこペーストに換算して1,080mgを用いた。
データはコントロールに対する%で表示し，平均値±標準誤差で表した（n＝4）。

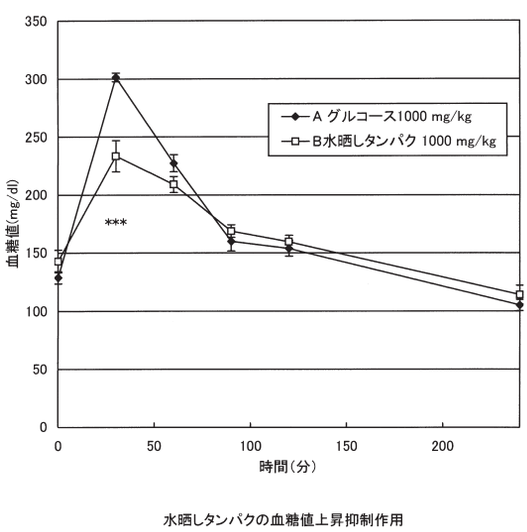


図 9　水晒し溶液の血糖値上昇抑制作用
◆：コントロール群（グルコース1,000mg/kg）
□：水晒し溶液投与群（水晒し溶液1,000mg/kg＋グルコース1,000mg/kg）
データは平均値±標準誤差で表した（n＝8）。*：p＜0.05 vs control.

し溶液投与群では，グルコース負荷30分後の血糖値は233.5±13.5に達し，この時点でコントロールに対して有意な抑制を示した。60分以降ではコントロールとの間に有意な変化は見られなかった。

4.　考　　察

本研究において，「かまぼこ」の血糖値上昇抑制メカニズムを推定するための実験として，糖負荷試験（**図 1**），酵素阻害活性（**図 2**，**図 3**），腸管吸収阻害活性（**図 4**），血中インスリンの変化（**図 5**）を調べた。その結果，マウスを用いた糖質負荷試験において，デンプン，マルトース，スクロース，グルコースのどの糖を負荷した場合も一様に有意な血糖値上昇抑制作用が見られ，なおかつ*in vitro*試験においてα－アミラーゼおよびα－グルコシダーゼに対する酵素阻害活性が見られなかった。このことから，かまぼこの血糖値上昇抑制作用のメカニズムは，糖質分解酵素によりグルコースを生成する段階の阻害によるものではなく，生成したグルコースが腸管から吸収される段階もしくはそれ以降に作用しているものと考えられた。次に実施した腸管吸収阻害試験においては腸内に残存するグルコース量がコントロールのレベルと有意な変化を示さなかったことから，かまぼこの成分は腸管からのグルコース吸収には影響を与えていないことが示された。このことより，かまぼこの成分はグルコースが腸管から吸収された後に血糖値を低下させていることが示唆された。次に，血中インスリン濃度を測定したところ，グルコース負荷の10分後から有意な上昇が見られ，血糖値の上昇抑制作用が確認された。このことから，かまぼこの成分はインスリン分泌を増加させることにより，血中のグルコース濃度をすみやかに減少させている可能性が示唆された。

次に，活性成分の特定を試みてかまぼこの分離を行った結果，遠心上清に含まれる水溶性の成分

と，沈殿に含まれる不溶性の固形成分の両方に血糖値上昇抑制作用が見られた（**図6**，**図7**）。固形成分については，熱変性したタンパク質が網目状構造をとり，糖質を吸着することで腸管からの吸収を阻害するメカニズムが予想される。今回，*in vitro*試験でかまぼこペーストにはグルコースの非特異的な吸着能が示されなかったことから，この糖質吸着によるメカニズムを介する可能性は低いと考えられる。これまでの研究により，かまぼこのトリプシン処理によりその血糖値上昇抑制作用が失われることから，タンパク質成分であると考えているが，消化酵素によりタンパク質が分解を受けて活性成分が生成される可能性も考えられる。一方で，上清の水溶性成分については，分画分子量3,000フィルターを素通りする画分に活性がみられたことから，ペプチド性の物質であることが予想された。今回の分離条件で，ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによりFr.3として精製が可能であるが，まだ数種類の成分が存在している。このFr.3に含まれる成分は，分離を進める段階で経時的に失活する傾向が見られたために単離同定には至らなかったが，水溶性の成分に血糖値の上昇抑制作用が存在することは非常に興味深く，食品としての応用範囲も広いと考えられる。

水溶性の成分に活性があるとすれば，かまぼこ製造工程中の水晒し操作において，大量に生じる排水（水晒し溶液）も，血糖値上昇抑制作用を有する可能性があると考えられる。今回のかまぼこ調製時に得られた水晒し溶液の活性を確認したところ，非常に強い活性を確認することができた（**図9**）。この事実は，これまで廃棄物として扱われていた「水晒し溶液」に新しい機能性を見いだし，その有効利用の可能性を示したという点と，この水晒し溶液を原料として水溶性成分の精製・同定を行うことができる可能性を示したという点で重要であると考えている。

5.　ま　と　め

以上をまとめると，かまぼこの血糖値上昇抑制の作用メカニズムには，少なくともインスリン分泌促進作用が深く関わっていることが示唆された。また，活性成分については，上清部分に見られる水溶性成分のおよび沈殿部分に見られる不溶性成分といった複数成分の存在が予想されたが，今回は水溶性成分について成分の特定を試みた結果，活性本体は分子量3,000以下のペプチド成分である可能性を示すことができた。しかし，分離精製に伴い活性の消失が見られたため物質の特定には至なかったため，失活を防ぐための安定性試験や濃縮法の確立などが新たな課題として残された。今後はこれらの課題を克服する条件を見いだし，物質の単離と構造解析を完了させたいと考えている。また，今回の研究において，水晒し溶液にも血糖値上昇抑制作用が確認されたことから，今後はこの原料を用いたメカニズム解明と活性成分の同定についても検討を加えていきたい。

日本の伝統的な加工食品である「かまぼこ」の血糖値上昇抑制作用には複数の成分が関わると示唆され，学術的にも非常に興味深い。食材として日常的に食生活に取り入れることが可能であり，顕著な血糖値上昇抑制作用が科学的に証明された「かまぼこ」は，広く糖尿病の予防に貢献しうる代表的なヘルスフードのひとつである。

謝　辞

本研究の遂行にあたり，研究助成金を供与頂きました財団法人浦上食品・食文化振興財団に対し厚く御礼申し上げます。

文　献

1）Gross, J.L., de Azevedo, M.J., Silveiro, S.P., Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment.

Diabetes Care, **28** , 164-176（2005）.

2）Tesfaye, S., Chaturvedi, N., Eaton, E.M.S., Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N. Engl. J. Med.*, **352** , 341-350（2005）.

3）Shankar, S.S., Steinberg, H.O., FFAs: do they play a role in vascular disease in insulin resistance syndrome? *Curr. Diab. Rep.*, **5** , 30-35（2005）.

4）矢澤一良, ヘルスフード科学概論, 成山堂書店（東京）, pp. 128（2003）.

5）矢澤一良, ヘルスフード科学講座, 食品化学新聞社（東京）, pp. 197（2007）.

6）厚生労働省 平成14年糖尿病実態調査（2003）.

7）Karato, M., Yamaguchi, K., Takei, S., Kino, T., Yazawa, K., Inhibitory effects of pasuchaca（Geranium dielsiaum）extract on alpha-glucosidase in mouse. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1482-1484（2006）.

8）Mai, TT., Chuyen, NV., Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of Cleistocalyx operculatus（Roxb.）Merr and Perry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 69-76（2007）.

9）Nishiyama, I., Yamashita, Y., Yamanaka, M., Shimohashi, A., Fukuda, T., Oota, T., Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other actinidia species. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5472-5475（2004）.

Elucidation of anti-hyperglycemic effects of boiled fish paste "Kamaboko" for application to diabetes prevention

Kazunaga Yazawa

(Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods Science, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology)

In our preliminary study, anti-hyperglycemic effects of boiled fish paste "Kamaboko", which is traditional food in Japan, have been shown in mice. To clarify mechanism of action and active components of it, we examined as described below. The crude paste of Kamaboko was found to suppress blood glucose elevation after oral administration of sucrose, maltose, starch, and glucose, in mice. And Kamaboko did not shown inhibitory effects on alpha-amylase and alpha-glucosidase activities in vitro and on absorption of glucose from intestine in vivo. On the other hand, Kamaboko showed a transit elevation of blood insulin level in mice. After processing with ultrafiltration and gel-filtration of Kamaboko, we found the suppressing effect on blood glucose elevation after glucose loading in the fraction including low-molecular-weight molecules. These results suggest that the suppressive effect of Kamaboko on blood glucose might be caused by insulin secretagogue activity by water-soluble and low-molecular-weight molecules. Kamaboko will be a potential health food leading to prevention and cure of diabetes.