

ローゼル蓼による2型糖尿病モデルマウスの 肝臓の糖質代謝に与える影響

岩本 直樹

ローゼル蓼による2型糖尿病モデルマウスの血糖低下作用を明らかにするために、肝臓での糖質代謝について検討した。まず、ddY マウスと KK-Ay マウスにローゼル蓼 100 mg/kg を4週間毎日経口投与し、それぞれ蒸留水を経口投与した対照群と、血糖値の変化を比較した。その結果、KK-Ay マウスにおいては、ローゼル蓼投与4週間後に有意な血糖値上昇抑制作用が見られた。その後、4週間ローゼル蓼を投与した ddY マウスおよび KK-Ay マウスに対して糖負荷試験を行ったが、KK-Ay マウスでは血糖値上昇を抑制する傾向が見られた。さらにインスリン負荷試験を実施したが、有意な差は認められなかった。また、投与4週間後の KK-Ay マウスの肝グリコーゲン量は有意に増加していた。以上の結果より、ローゼル蓼の4週間投与は、KK-Ay マウスの血糖上昇を抑制し、肝臓のグリコーゲン量を増加させる作用を有することが示唆された。

キーワード：ローゼル 蓼 2型糖尿病モデルマウス 血糖値 肝グリコーゲン

1. 緒言

現在、我が国では糖尿病に罹患する人が増加しており、2016年国民健康・栄養調査によると「糖尿病が強く疑われる者」は約1,000万人とされ、「糖尿病の可能性を否定できない者」を含めると約2,000万人に達するといわれている¹⁾。糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病は、インスリン分泌量低下、もしくはインスリン抵抗性を有することで高血糖となり、その治療には、血糖値を下げる必要がある²⁾。

ローゼルはハイビスカスの一種で、世界各地の熱帯地方で栽培されており、国内では沖縄での栽培が盛んであるが、雪深い新潟県南魚沼市でも栽培が可能となった³⁾。ローゼルは主に蓼を収穫するため栽培されており⁴⁾、その蓼および苞は「ハイビスカス・ティー」に利用される。ローゼルの蓼は栄養価が高く、アントシアニン、ビタミンC、カリウム、有機酸類（クエン酸、リンゴ酸など）

等の有効成分を含む^{4,5)}。そのため、クエン酸による疲労回復効果や、カリウムによる利尿作用、ビタミンCによる便秘や肌荒れ予防効果等が一般的に知られており、古くから食用や薬用として用いられている⁶⁾。我が国では、1964年の東京オリンピックのマラソン競技で連覇を成し遂げた金メダリストのアベベ選手が、ハイビスカス・ティーをスポーツドリンク代わりに飲んでいて一躍知られるようになった⁷⁾。

ローゼル蓼の抽出物は毒性が報告されているが、その程度は低い(LD50 = 5g/kg)⁸⁾。その蓼および花や種子の抽出物においては、ラットやマウス、ウサギ等の様々なモデル動物で降圧作用や抗コレステロール血症作用等の作用が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。ローゼル種子は2型糖尿病モデル動物において、小腸の α -グルコシダーゼの作用を阻害し、血糖値の上昇を抑制するという報告^{11,12)}や、ローゼルの花抽出物は、インスリンを介さない血糖低下作用があるという報告¹³⁾もある。さらに、ローゼルの「蓼」は、1型糖尿病モデル動物にお

いてインスリン分泌を増強させ血糖を低下させる作用を有するという報告¹⁴⁾がある一方で、2型糖尿病モデル動物での血糖低下作用の報告は少ない。

そこで著者は、ローゼルの蓍は2型糖尿病モデル動物においても同様に血糖を低下させるのではないかと考え、2型糖尿病モデルマウス(KK-Ayマウス)を用いて、ローゼルの蓍を6週間長期投与し、血糖値を調べた。そして、既報¹⁵⁾で、2型糖尿病モデルマウスにおいてもローゼル蓍の6週間長期投与が、血糖低下作用および耐糖能改善に影響をおよぼす可能性があることを報告した。

本研究では、2型糖尿病モデルマウス(KK-Ayマウス)を用い、更に短い期間である4週間の投与での抗糖尿病作用を検討した。また、ローゼルの蓍投与4週間後の、肝臓の糖質代謝に及ぼす影響についても検討した。

2. 方法

2-1 実験試料

ローゼルの蓍は市販の微粉末(インターウィンドウ(株))を蒸留水に溶解して使用した。

2-2 実験動物および飼育条件

正常モデル動物として5週齢 ddY 雄性マウスを15匹(対照群8匹、ローゼル蓍投与群7匹)日本エスエルシー(株)から購入し、遺伝的2型糖尿病モデル動物としては5週齢 KK-Ay 雄性マウスを15匹(対照群8匹、ローゼル蓍投与群7匹)日本クレア(株)より購入した。それぞれ7日間予備飼育して実験に供した。マウスは予備飼育期間および実験期間を通して室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $45 \pm 10\%$ の12時間明暗サイクルの環境下で飼育した。ddY マウスは5匹/ケージ、KK-Ay マウスは1匹/ケージとし水道水を給水瓶にて、またマウス用固形飼料(CE-2;日本クレア(株))を給餌器にて、それぞれ自由に与えた。

なお、本実験は東京家政学院大学動物実験委員会の審査に合格し実施した。すべての動物は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日、環境省告示第88号)に従い取り扱った。

2-3 動物の処置

ddY マウスおよび KK-Ay マウスのローゼル蓍投与群に、蒸留水で溶解したローゼル 100 mg/kg を4週間毎日、経口投与針((株)夏目製作所)を用いて経口投与し、それぞれ蒸留水のみを経口投与した対照群と比較した。また、採血は0、1、2、3および4週間後にイソフルラン(ファイザー(株))を用いた吸入麻酔による麻酔下で眼窩から行い、血糖値を測定した。

次に4週間経口投与した ddY マウスに対して経口糖負荷試験(OGTT)、そして4週間経口投与した KK-Ay マウスに対しては OGTT とインスリン負荷試験(ITT)を実施した。ITTを行うにあたり血糖値を安定させるため、OGTTの3日後に実施した。その間、毎日ローゼル蓍および蒸留水の経口投与を続けた。

それぞれ18時間絶食した後、OGTTはグルコース(和光純薬工業(株))1.5 g/kgを経口投与し、ITTはインスリン(ヒューマリンN注U-40;日本イーライリリー(株))0.5 U/kgを皮下投与し投与直前と、投与30、60、90、120分後に眼窩から採血し、血糖値を測定した。血糖値の測定には小型血糖測定器(グルテスト neo アルファ; (株)三和化学研究所)を用いた。

最後に全てのマウスを解剖し、肝臓を取り出し、体重比重量を算出した。また、肝臓は30% KOHで加熱溶解後、エタノールでグリコーゲンを沈澱させ、精製後フェノール・硫酸法¹⁶⁾でグリコーゲン量を測定した。

2-4 統計学的分析

結果は全て平均値 \pm 標準誤差にて示した。各群間の有意差検定は、Studentのt検定を用いた。有意差は $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

3. 結果

3-1 ddY マウスに対する影響

実験期間中の体重増加量を Table 1 に示した。

Table 1 Effect of Roselle calyx on body weight gain in ddY mice.

	Control	Roselle calyx
Body weight gain (g/4 weeks)	7.9 ± 0.4	8.0 ± 0.8

Mean ± S.E.

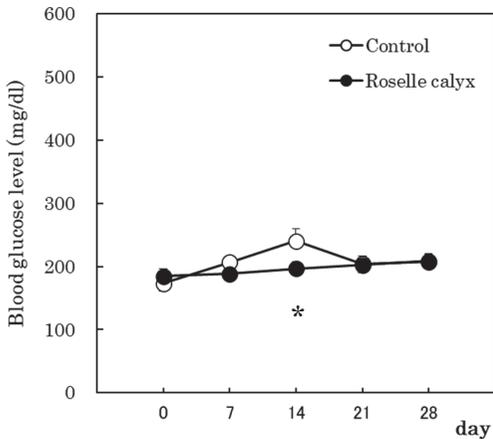


Fig. 1 Effect of Roselle calyx on blood glucose level in ddY mice.

Closed circle : Roselle calyx-treated ddY mice (100 mg/kg body weight) , open circle : control mice. Each point indicates the mean ± S.E. from 7 mice. Significantly different from the control, *p<0.05.

ローゼル萼投与群と対照群の間で、実験期間中の体重増加量は有意な差は認められなかった。

実験期間中の血糖値の変化を Figure 1 に示した。ローゼル萼を 4 週間投与した結果、ddY マウスでは 14 日目に対照群とローゼル萼投与群の間に有意な差が認められた。

また、投与 4 週間後に行ったグルコース負荷後の血糖値変化を Figure 2 に示した。ローゼル萼投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。また、投与 4 週間後の各群マウスの肝臓 / 体重比を Figure 3 に示した。しかし、ローゼル萼投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

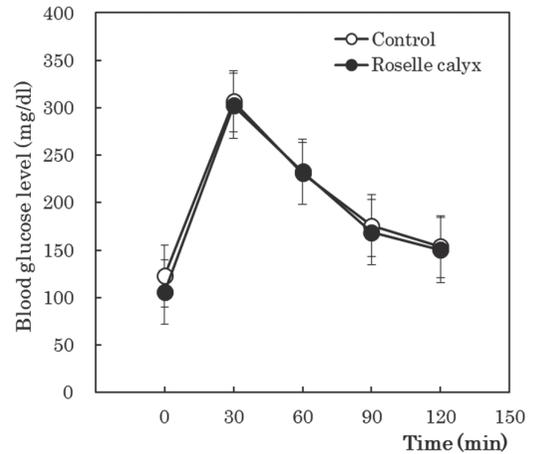


Fig. 2 Effect of Roselle calyx on glucose tolerance test in ddY mice.

Closed circle : Roselle calyx-treated ddY mice (100 mg/kg body weight) , open circle : control mice. Each point indicates the mean ± S.E. from 7 mice.

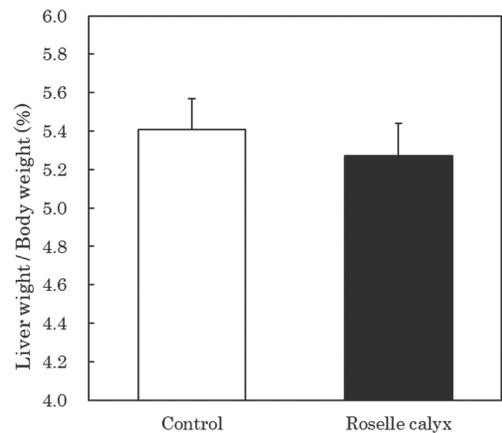


Fig. 3 Effect of Roselle calyx on Liver weight / Body weight in ddY mice.

Closed bar : Roselle calyx-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight) , open bar : control mice. Each point indicates the mean ± S.E. from 7~8 mice.

3-2 KK-Ayマウスに対する影響

実験期間中の体重増加量を Table 2 に示した。

ローゼル萼投与群と対照群の間で、実験期間中の体重増加量は有意な差は認められなかった。

Table 2 Effect of Roselle calyx on body weight gain in KK-Ay mice.

	Control	Roselle calyx
Body weight gain (g/4 weeks)	5.3 ± 0.4	5.2 ± 0.2

Mean ± S.E.

実験期間中の血糖値の変化を Figure 4 に示した。ローゼル萼を4週間投与した群は、3週間目で低値傾向を示し (p=0.16)、4週間目で、対照群に比べて有意に血糖値の上昇を抑制した。

投与4週間後に行ったグルコース負荷後の血糖値変化を Figure 5 に示した。ローゼル萼投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった。しかし、グルコース負荷90分後、120分後の血糖値は、対照群に比べてそれぞれ低下傾向を示した (90分後: p=0.12, 120分後: p=0.15)。

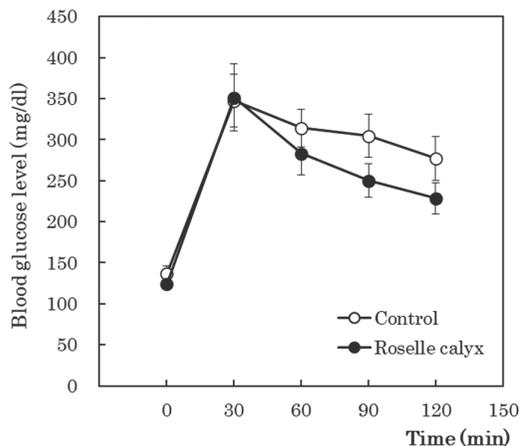


Fig. 5 Effect of Roselle calyx on glucose tolerance test in KK-Ay mice.

Closed circle : Roselle calyx-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight), open circle : control mice. Each point indicates the mean ± S.E. from 7-8 mice.

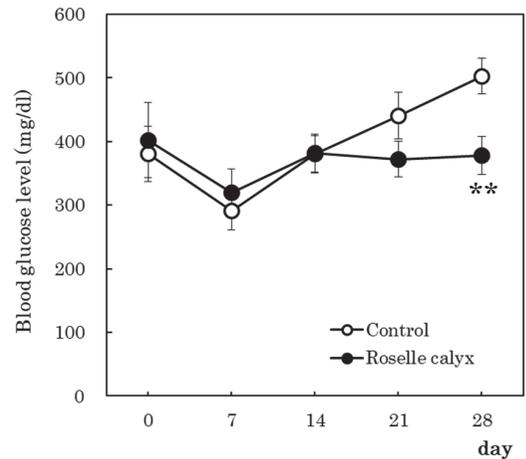


Fig. 4 Effect of Roselle calyx on blood glucose level in KK-Ay mice.

Closed circle : Roselle-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight), open circle : control mice. Each point indicates the mean ± S.E. from 7-8 mice. Significantly different from the control, **p<0.01.

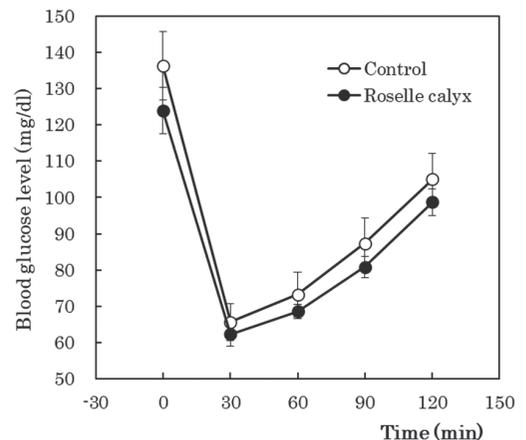


Fig. 6 Effect of Roselle calyx on insulin tolerance test in KK-Ay mice.

Closed circle : Roselle calyx-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight), open circle : control mice. Each point indicates the mean ± S.E. from 7-8 mice.

インスリン負荷後の血糖値変化を Figure 6 に示した。ローゼル萼投与群のインスリン負荷後の血糖値は、対照群に比べてそれぞれ有意な差は認められなかった。

投与 4 週間後の各群マウスの肝臓 / 体重比を Figure 7 に示した。投与 4 週間後の対照群の肝臓 / 体重比 $4.9 \pm 0.1 \%$ に対し、ローゼル萼投与群の肝臓 / 体重比は、 $5.4 \pm 0.1 \%$ となり、有意な差が認められた。

投与 4 週間後の各群マウスの肝臓のグリコーゲン量を Figure 8 に示した。投与 4 週間後の対照群の肝グリコーゲン量は $92.2 \pm 7.3 \text{ mg/g}$ だったのに対し、ローゼル萼投与群の肝グリコーゲン量は、 $112.1 \pm 5.1 \text{ mg/g}$ となり、有意な差が認められた。

4. 考察

ローゼル萼の血糖低下作用を検討するため、まず正常マウスの血糖値におよぼす影響を検討した。その結果、ローゼル萼は 4 週間の投与期間中、14 日目で有意な差は認められたものの、4 週間後の正常マウスの血糖値を変化させなかった (Fig. 1)。

次に 2 型糖尿病モデルマウスである KK-Ay マウスを用いて検討した。KK-Ay マウスは、8 週齢頃からインスリン抵抗性により高血糖となり 2 型糖尿病を発症するとされている^{17, 18)}。本研究では KK-Ay マウスに対して、6 週齢からローゼル萼の投与を開始し、9 週齢にあたる投与 3 週間目で血糖値上昇抑制の傾向が見られ、10 週齢にあたる 4 週間後では、血糖値上昇抑制作用を示した (Fig. 4)。これらの結果からローゼルの萼は正常マウスの血糖値には影響をおよぼさず、2 型糖尿病モデルマウスにおいて血糖値上昇抑制作用を有することを確認した。なお、ローゼル萼を使用した投与量の範囲ではマウスの行動および体重に明らかな変化は認められなかった。

次にローゼル萼が、耐糖能におよぼす影響を検討する目的で OGTT を行った。耐糖能とは、血糖値を正常に保つためのグルコース処理能力のことである。正常マウスでは、両群ともに空腹時からグルコースを投与した後、30 分をピークに下降している (Fig. 2)。これは血糖上昇に反応して膵臓からインスリンが分泌され、血中のグルコースが処理されていると考えられる。正常マウスで

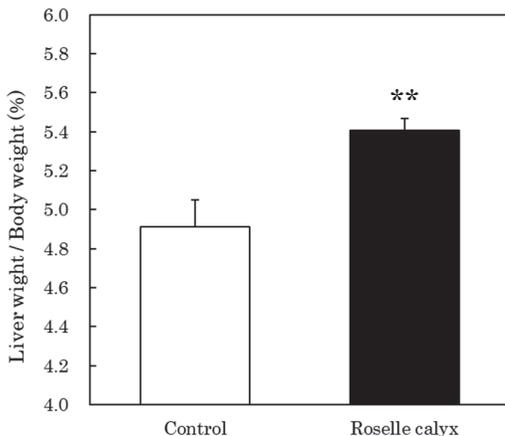


Fig. 7 Effect of Roselle calyx on Liver weight / Body weight in KK-Ay mice.

Closed bar : Roselle calyx-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight), open bar : control mice. Each point indicates the mean \pm S.E. from 7~8 mice. Significantly different from the control, ** $p < 0.01$.

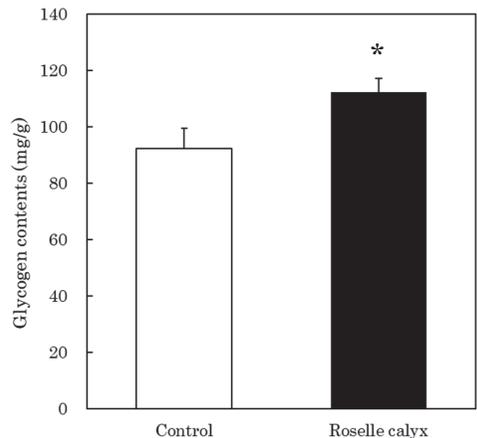


Fig. 8 Effect of Roselle calyx on glycogen contents in KK-Ay mice.

Closed bar : Roselle calyx-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight), open bar : control mice. Each point indicates the mean \pm S.E. from 5~8 mice. Significantly different from the control, * $p < 0.05$.

は、グルコース負荷後の血糖値において、ローゼル萼投与群と対照群との差はなく、耐糖能に影響をおよぼさなかったと考えられる。また、KK-Ay マウスにおける OGTT でも有意な差を示すほどの影響は認められなかったが、低下傾向を示した (Fig. 4)。著者が行ったローゼル萼の6週間投与後の OGTT でも同様に、ローゼル萼投与群で低下傾向を示している¹⁵⁾。加えて、Wisetmuenら¹⁴⁾は、1型糖尿病モデルマウスにローゼル萼を投与することで、インスリン分泌が増強されることを示唆している。今回の KK-Ay マウスで見られたローゼル萼の4週間投与による血糖値の上昇抑制は、インスリン分泌能が増強したことによる可能性も推察される。今後はインスリン値を測定するなど、さらに検討する必要がある。

次に、KK-Ay マウスを用いてローゼル萼のインスリン感受性におよぼす影響を ITT により検討した。前述のように KK-Ay マウスは、主にインスリン抵抗性により高血糖を示す。通常、インスリンを投与すると、直後に血糖値は低下するものの、徐々に上昇していく。しかし、KK-Ay マウスのような2型糖尿病では、インスリンに対する感受性が低いため、インスリン投与後の血糖低下が小さくなる。ローゼル萼の4週間投与後の KK-Ay マウスの ITT では、インスリン投与後、対照群と比較し有意な差は見られなかった (Fig. 5)。このことから、ローゼル萼4週間投与では、インスリンの感受性を高める可能性は低いと考えられる。

次に肝グリコーゲン量におよぼす影響を検討した。肝臓の糖代謝は主にグリコーゲン分解、グリコーゲン合成、糖新生から成り立っている。飽食時はグリコーゲン合成が、空腹時にはグリコーゲン分解および糖新生がはたらき血糖値を調節している。そして、2型糖尿病の病態には、肝臓からのグルコース放出増加がある¹⁹⁾。これは、インスリン抵抗性により、細胞内に取り込まれたグルコースをリン酸化する酵素のグルコキナーゼ活性の低下やホスホフルクトキナーゼ活性の上昇などによるためと考えられている。また、2型糖尿病患者では、肝臓からのグルコース放出を促すグルカゴンが血中で増加するとされている。これら

のことから、肝臓でのグルコース放出増加を抑制することが糖尿病治療や予防の重要な要素の一つと考えられている。既報¹⁵⁾ではローゼル萼は、6週間投与後の KK-Ay マウスにおいてグルコース負荷前の空腹時血糖値を有意に低下させた。このことから、ローゼル萼を6週間投与することにより、肝臓からのグルコース放出を抑制させる可能性があると考えられた。そこで、肝臓からのグルコース放出が抑制され、グリコーゲンとして貯蔵されているのであれば肝臓の重量が増えていると考え、投与4週間後の肝臓の体重比重量について検討した。その結果、KK-Ay マウスにおいてローゼル萼投与群は、対照群と比較し有意な増加が認められた (Fig. 7)。しかし、正常マウスでは有意な差が認められなかった (Fig. 3)。KK-Ay マウスにおけるローゼル萼投与での肝臓の体重比重量の増加は、肝グリコーゲン量も増加している可能性があると考えられた。さらにそれを確認するため、肝臓の体重比重量で有意な差があった投与4週間後の KK-Ay マウスの肝臓のグリコーゲン量を測定した。その結果、対照群と比較し有意な増加が認められた (Fig. 8)。このことから、ローゼル萼は肝臓でのグリコーゲン量を増加させ、グルコース放出抑制作用を有する可能性があると考えられ今後さらに検討する必要があると考えている。

以上の結果より、ローゼル萼の4週間投与は、KK-Ay マウスの血糖上昇を抑制し、肝臓のグリコーゲン量を増加させる作用を有することが示唆された。

謝辞

本研究遂行にあたっては、令和元年度東京家政学院大学若手研究者研究費助成を頂いた。

参考文献

- 1) 厚生労働省：平成28年国民健康・栄養調査の概要。(2016)
- 2) 日本糖尿病学会：糖尿病治療ガイド2018-2019。(文光堂, 2018)
- 3) 『新潟日報』2015年6月16日、ローゼル南魚沼の特産に

- 4) Pragma Singh, Mahejbin Khan, Hailu Hailemariam. Nutritional and health importance of Hibiscus sabdariffa: a review and indication for research needs. *J. Nutr. Health Food Eng.*, 6: 125-128 (2017)
 - 5) 大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫: アントシアニン—食品の色と健康—. (建帛社, 2000)
 - 6) 辻調理師専門学校: ティー & コーヒー大図鑑: カフェ・マルシェ. p.213 (講談社, 2005)
 - 7) 榎田千佳子, 渡辺肇子: いちばんわかりやすいハーブティー大事典. p.82 (ナツメ社, 2011)
 - 8) Ali BH, Al Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. *Phytother Res.*, 19 (5) : 369-375 (2005)
 - 9) Asgary S, Soltani R, Zolghadr M, Keshvari M, Sarrafzadegan N. Evaluation of the effects of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) on oxidative stress and serum levels of lipids, insulin and hs-CRP in adult patients with metabolic syndrome: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *J Complement Integr Med.*, 13 (2) : 175-180 (2016)
 - 10) Kao ES, Yang MY, Hung CH, Huang CN, Wang CJ. Polyphenolic extract from Hibiscus sabdariffa reduces body fat by inhibiting hepatic lipogenesis and preadipocyte adipogenesis. *Food Funct.*, 7 (1) :171-182 (2016)
 - 11) 松坂彰毅, 坂本優蔵, 藤野秀樹: ケナフ類種子の血糖値低下作用について. *FOODFUNCTION* 5 (2) : 44-51 (2009)
 - 12) Adisakwattana S, Ruengsamran T, Kampa P, Sompong W. In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *BMC Complement Altern Med.*, 12: 110-118 (2012)
 - 13) Pillai SS, Mini S. Petals Modulates Glycogen Metabolism and Glucose Homeostasis Signalling Pathway in Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes. *Plant Foods Hum Nutr.*, 71 (1) : 42-48 (2016)
 - 14) Wisetmuen E, Pannangpetch P, Kongyingyoes B, Kukongviriyapan U, Yutanawiboonchai W, Itharat A. Insulin secretion enhancing activity of roselle calyx extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res.*, 5 (2) : 65-70 (2013)
 - 15) 岩本直樹: 2型糖尿病モデル雄性マウスにおけるローゼル萼の血糖低下作用. 北里大学保健衛生専門学院紀要 22: 45-48 (2017)
 - 16) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry.*, 28 (3) : 350-356 (1956)
 - 17) 武富滋久: 肥満2型糖尿病モデル動物. 新時代の糖尿病学 (2). pp.38-44 (日本臨床社, 2002)
 - 18) Yu, PH, Wang, M., Deng, YL., Fan, H. and Shira-Bock, L. Involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase mediated deamination in atherogenesis in KKAY diabetic mice fed with high cholesterol diet. *Diabetologia.*, 45: 1255-1262 (2002)
 - 19) 小川渉: 肝におけるインスリン作用, *糖尿病* 52 (5) : 321-323 (2009)
-
- (受付 2020.3.25 受理 2020.7.13)