



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



## リグニンスルホン酸による食後高血糖抑制作用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 室蘭工業大学 公開日: 2017-03-23 キーワード (Ja): $\alpha$ -glucosidase キーワード (En): lignin, diabetes 作成者: 門田, 有起也, 中川, 絵利奈, 川南, 諭, 長谷川, 靖 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10258/00009179">http://hdl.handle.net/10258/00009179</a>

## リグニンスルホン酸による食後高血糖抑制作用

門田 有起也\*<sup>1</sup>, 中川 絵利奈\*<sup>1</sup>, 川南 諭\*<sup>1</sup>, 長谷川 靖\*<sup>2</sup>

## Lignosulfonic acid suppresses postprandial hyperglycemia

Yukiya KADOTA, Erina NAKAGAWA, Satoshi KAWAMINAMI and Yasushi HASEGAWA

(原稿受付日 平成 28 年 11 月 10 日 論文受理日 平成 29 年 2 月 10 日)

## Abstract

Lignosulfonic acid is a waste lignin produced from the sulfite pulping of softwood. We investigated the effect of lignosulfonic acid on  $\alpha$ -glucosidase and found that lignosulfonic acid produced a reversible and non-competitive inhibition of the enzyme activity. Moreover, in human colorectal adenocarcinoma cells, lignosulfonic acid inhibited 2-deoxyglucose uptake, while *in vivo* studies demonstrated a significant reduction in the blood glycemic response to sucrose or glucose ingestion in rats treated with lignosulfonic acid. Feces of rats fed a diet supplemented with 5% lignosulfonic acid had higher sugar content compared to those of rats fed a control diet. These results suggest that lignosulfonic acid suppresses the rise in blood glucose levels through inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity and intestinal glucose absorption. Additionally, lignosulfonic acid suppressed increase of blood glucose level in diabetic KK-Ay mice. These results suggest that lignosulfonic acid may be useful as an anti-diabetes agent.

Keywords : lignin, diabetes,  $\alpha$ -glucosidase

## 1 はじめに

リグニンは 4-ヒドロキシフェニル、4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル、4-ヒドロキシ-3、5-ジメトキシフェニル基を含む複雑な構造をもつポリフェノール高分子であり、植物に多く含まれている。リグニンスルホン酸は、製紙工場からパルプ製造過程において副産物として大量に生成するリグニン分解物であり、リグニンの一部がスルホン化された化合物である。リグニンスルホン酸の一部はコンクリートの可塑剤<sup>(1)</sup>や高分子電解質の分散材<sup>(2)</sup>などとしても有効利用されているものの、その多くが焼却処分されておりその有効利用が望まれている。

リグニンは、野菜や穀物などの食品に含まれる食物繊維としてよく知られている。食品中に含まれる種々の食物繊維には、大腸がんや肥満、糖尿病などの病気を予防する効果が数多く報告されてきた。リグニンもまた、胆汁酸を結合することによる血中コレステロール濃度低下作用<sup>(3)-(4)</sup>、リグニンのポリ

\*1 室蘭工業大学 環境創生工学系専攻

\*2 室蘭工業大学 暮らし環境系領域

フェノール構造による抗酸化作用<sup>(5)-(6)</sup>、発がん物質 3,2-ジメチル-4-アミノビフェニルで誘発されるがん化抑制作用<sup>(7)</sup>などが報告されているが、その報告は非常に少なくその生理活性作用についての十分な知見が得られていない。

糖尿病は、慢性の高血糖状態を示す疾患であり、高血糖が続くと糖尿病性腎症、網膜症、神経障害など眼や腎臓などの様々な臓器に傷害を引き起こす。日本においては300万人以上の患者数、20歳以上の11人に一人が糖尿病と報告されておりその予防が強く求められている。予防、治療のため、糖尿病発症に大きくかかわる食後高血糖を調節する数多くの物質が報告されている。特に、炭水化物を分解する $\alpha$ グルコシダーゼ活性、 $\alpha$ アミラーゼ活性の阻害物質は、グルコースの生体内への吸収を抑制することから、アカルボース（糖尿病治療薬）など多くの化合物が知られている。食品中の成分であるカテキンや種々のフラボノイド類も酵素活性を阻害することが報告されている。

本研究では、リグニンの食後高血糖に対する効果を調べるため、リグニン分解物であるリグニンスルホン酸を用い $\alpha$ グルコシダーゼ活性、および消化管からのグルコース吸収におよぼす影響、糖負荷後の血中グルコース濃度上昇に対する効果について *in vitro*、*in vivo* の両面から検討を行った。さらに糖尿病発症 KK-Ay マウスを用い血中グルコース濃度上昇に対するリグニンの効果についても検討を行った。

## 2 概要

### 2.1 材料と方法

#### 2.1.1 材料

リグニンスルホン酸（平均分子量 8,000）（図 1）、酵母 $\alpha$ グルコシダーゼはシグマ社（St. Louis MO, USA）から購入し実験に使用した。Caco-2 細胞は、理研バイオリソースセンターから購入した。ウイスターラット、KK-Ay マウスは、クレア（東京、日本）から購入した。

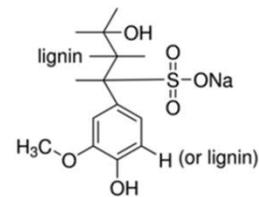


図1. リグニンスルホン酸(ナトリウム塩)の構造 (sigma-Aldrichカタログより引用).  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/471038?lang=ja&region=JP>

#### 2.1.2 $\alpha$ グルコシダーゼ活性測定

$\alpha$ グルコシダーゼ活性は、Lee and Lee<sup>(8)</sup>によって述べられた方法によって測定した。種々の濃度のリグニンスルホン酸を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した $\alpha$ グルコシダーゼ (0.2 U/ml) に添加し、25°C で 30 分間インキュベートした。*p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucoside を 10 mM になるように添加して反応を開始し、1 M の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を添加することによって反応を停止した。酵素活性は 405 nm の吸光度変化を測定することによって決定した。

#### 2.1.3 ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 細胞の培養とグルコース取り込みアッセイ

Caco-2 細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下、20% 牛胎児血清を含むイーグル最小培地で培養した。6 穴プレートに 6 × 10<sup>4</sup> 個の細胞を播種し、80% コンフルエントまで培養後、無血清培地に交換した。6 時間後、クレブス・リンガーリン酸緩衝液 (136 mM NaCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.7 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.0) and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) で 3 回洗浄し、2% 牛血清アルブミンを含む同緩衝液で 37°C、20 分間インキュベートした。種々の濃度のリグニンスルホン酸と 1 mM の 2-デオキシグルコースを添加し、37°C で 20 分間インキュベートした。溶液を除去後、細胞を PBS で洗浄し 10mM Tris-HCl(pH 7.5)の溶液に懸濁した。超音波破碎後 95°C で 15 分間処理し、14,000 回転で 15 分遠心後の上清を回収した。細胞内に取り込まれた 2-デオキシグルコース量を 2-デオキシグルコース取り込み測定キット (コスモバイオ、東京、日本) を用いて測定した。

#### 2.1.4 生細胞数の定量

Caco-2 細胞の生細胞数は MTT 法<sup>(9)</sup>を用いて評価した。Caco-2 細胞を 24 穴プレートに 1 × 10<sup>4</sup> 個で播種しリグニンスルホン酸を 62.5 $\mu$ M、125 $\mu$ M の濃度で添加した。24 時間後、MTT(0.5 mg/mL)を添加し 37°C で 4 時間インキュベートした。培地を注意深く取り除いたのち 20% SDS 200 $\mu$ l を添加してホルマザンを可溶化し、24 時間後 570nm での吸光度を測定した。

#### 2.1.5 糖負荷試験

6 週齢の Wister ラットを購入後、1 週間市販の餌を与え馴化させた。24 時間絶食後、スクロースあるいはグルコース (1.5g/kg) をリグニンスルホン酸 (50 mg/kg、あるいは 100 mg/kg) と一緒に経口投与

した。コントロールのラットにはスクロースあるいはグルコースのみを経口投与した。投与前、投与後30分、60分、120分後に尾静脈より採血しグルコース濃度をグルコメーター（Abott, IL, USA）を用いて測定した。3回の測定の平均値を計算し統計解析を行った。

動物実験は室蘭工業大学動物実験委員会の承認を得たのち、動物実験に関する規則に従い実施した。

### 2.1.6 KK-Ay マウス

4週齢のKK-Ayマウスを購入後、市販の餌を与え1週間飼育した。馴化後、基本食を食餌させるコントロールグループ5匹と2%リグニンスルホン酸を含む基本食を食餌させる試験グループ5匹にわけ4週間飼育した。毎週、体重の測定、血中グルコース濃度の測定を行った。基本食の組成は、20%カゼイン、15%コーンスターチ、5%大豆油、5%AIN-76Aミネラル混合物、5%AIN-76Aビタミン混合物、1%L-システイン、0.3%コリン、20%ラード、23.7%スクロース、3%セルロースを用いた。試験グループではリグニンスルホン酸2%を、コントロールグループではセルロース2%を追加して食餌させた。毎日10gを食べさせ、水は自由飲水させた。

### 2.1.7 統計処理

各実験は少なくとも2回実施した。データは平均値と標準偏差で示し、有意差検定は一次元のANOVAあるいはstudent *t*-testによって実施した。

## 3 結果

### 3.1 αグルコシダーゼ活性に対するリグニンスルホン酸の効果。

リグニンスルホン酸はαグルコシダーゼ活性を濃度依存的に阻害し、3μMの濃度で活性を約50%阻害した(図2A)。両逆数プロットの結果から、リグニンスルホン酸のαグルコシダーゼに対する阻害形式は非拮抗的であり、リグニンスルホン酸が酵素および酵素-基質複合体両方に結合することによって活性を阻害すると考えられた(図2B)。また、データは示さないがDixonプロットから10.6μMの阻害定数をもつことがわかった。

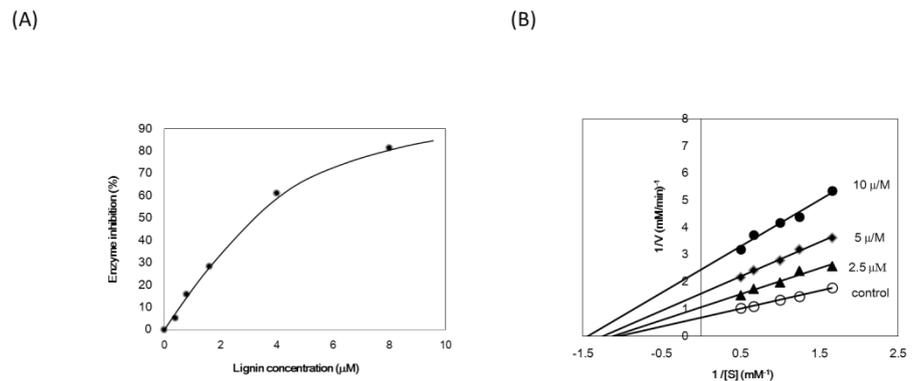


図2. αグルコシダーゼ活性に対するリグニンスルホン酸の効果。  
(A) 0, 0.5, 1, 2, 4, 8μMのリグニンスルホン酸存在下におけるαグルコシダーゼ活性阻害率。  
(B) 0, 2.5, 5, 10μMのリグニンスルホン酸存在下における両逆数プロット。

### 3.1 Caco-2 細胞への2-デオキシグルコース取り込みに対するリグニンスルホン酸の効果。

Caco-2細胞は広くヒト小腸からの栄養吸収のモデル細胞として使用されてきた。2-デオキシグルコースの取り込み量はリグニンスルホン酸の存在下において有意に抑制され62.5μMの濃度においておよそ80%まで取り込みを阻害した(図3A)。一方、この濃度においてリグニンスルホン酸は細胞に障害を与えなかった(図3B)。

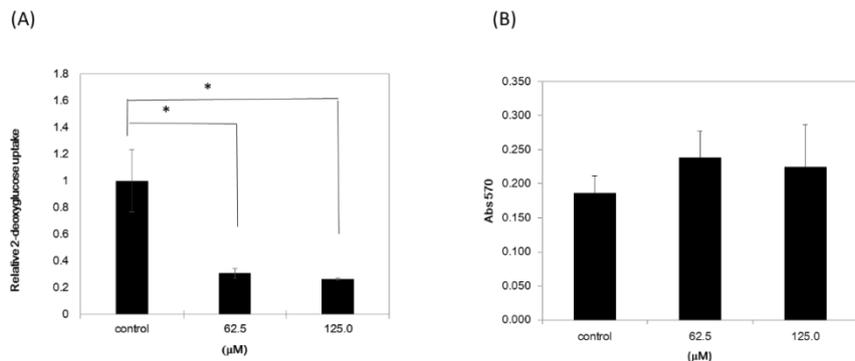


図3. Caco-2細胞への2-デオキシグルコース取り込みに対するリグニンスルホン酸の効果。  
(A) 62.5μM, 125μMのリグニンスルホン酸存在下での2-デオキシグルコース取り込み阻害作用。  
(B) 62.5μM, 125μMのリグニンスルホン酸存在下での細胞毒性評価(MTTアッセイ)

### 3.3 グルコース, スクロースの糖負荷試験に対するリグニンシルホン酸の効果.

リグニンシルホン酸の *in vivo* の効果を調べるため、スクロースあるいはグルコースの投与後におこる血中グルコース濃度の上昇をリグニンシルホン酸が抑制するかどうか検討を行った。スクロースを経口投与後、血中のグルコース濃度はおよそ 30 分で 45 mg/dL から 120 mg/dL に増加し、その後徐々に減少した (図 4A)。しかし、50 mg/kg あるいは 100 mg/kg でリグニンシルホン酸を同時投与することによって血中グルコース濃度の上昇は有意に抑制された。血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) も有意に減少した (図 4B)。グルコースを経口投与したときもまた、リグニンシルホン酸を同時に投与することによって血中グルコース濃度の上昇が抑制された (図 4C)。これらの結果は、リグニンシルホン酸が  $\alpha$  グルコシダーゼ活性を阻害するだけではなく、グルコースの小腸からの吸収も阻害することによって血中グルコース濃度上昇を抑制していることを示している。さらに、データは示さないがリグニンシルホン酸 5% を含む餌をウイスターラットに毎日食餌させたところ、コントロールの餌を食餌させたラットに比べ糞中の糖含量がおよそ 1.7 倍有意に高いことがわかった。この結果もまた、リグニンシルホン酸が糖の分解、吸収を抑制していることを支持している。

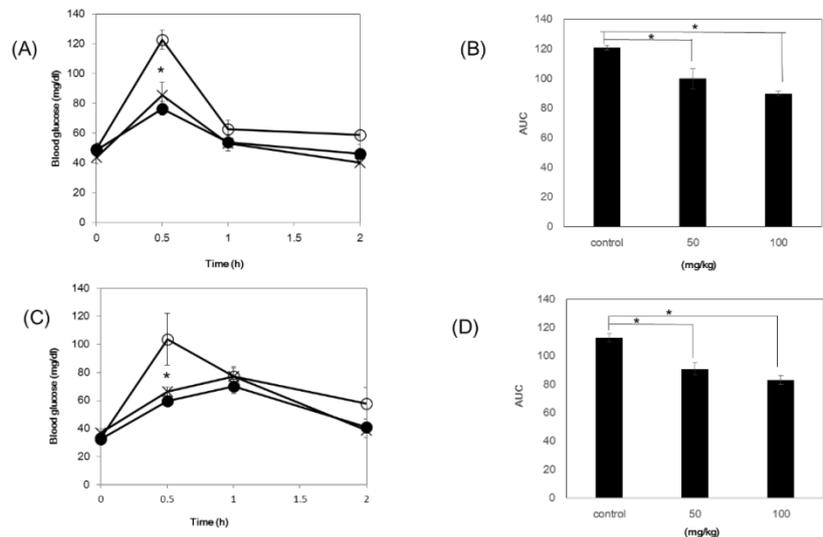


図4. 糖負荷試験に対するリグニンシルホン酸の効果. (A)スクロースの経口投与後の血糖値変化. リグニンシルホン酸50 mg/kg (×), 100 mg/kg (●)の同時投与. コントロール(O). (B) (A)の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC). (C)グルコースの経口投与後の血糖値変化. リグニンシルホン酸50 mg/kg (×), 100 mg/kg (●)の同時投与. コントロール(O). (D) (C)の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC).

### 3.4 KK-Ay 糖尿病発症マウスの血中グルコース濃度に対するリグニンシルホン酸の効果.

上記の実験結果を受け、リグニンシルホン酸を食餌することによって、糖尿病発症マウスの血中グルコース濃度の上昇が抑制されるかどうか検討を行った。基本食を食餌させた KK-Ay マウスでは、最初 60 mg/dL であった血中グルコース濃度が 8 週間後には 160 mg/dL まで増加した (図 5A)。一方、2%リグニンシルホン酸を含む餌を 8 週間毎日食餌させたマウスでは血中グルコース濃度の上昇が有意に抑制された。8 週間後の血中グルコース濃度はコントロール食を食餌させたラットのおよそ半分にまで抑制された。一方、体重、脂肪組織重量は有意な変化を見出すことはできなかった (図 5B, 5C)。この結果もまた、リグニンシルホン酸が血中グルコース濃度の上昇を抑制する有効な物質であることを示している。

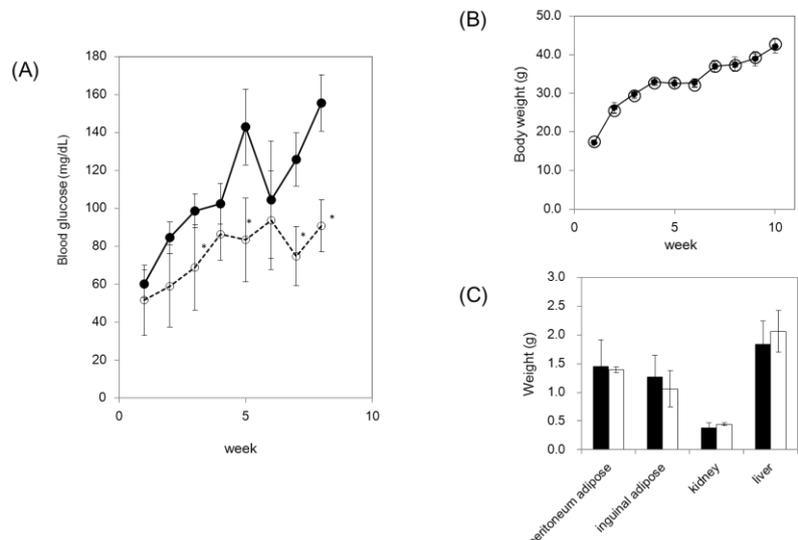


図5. 糖尿病発症KK-Ayマウスに対するリグニンシルホン酸の効果. (A)血糖値の変化. 基本食(●), リグニンシルホン酸食(○). (B)体重の変化. (C)各臓器(後腹膜脂肪組織、鼠蹊部脂肪組織、腎臓、肝臓)重量の変化. 基本食(黒棒), リグニンシルホン酸食(白棒).

#### 4 考察

本研究において、リグニンスルホン酸が  $\alpha$  グルコシダーゼ活性を阻害することを明らかにした。データは示さないが、リグニンスルホン酸の硫酸基がチオール基に置換されたアルカリリグニンもまた同様に酵素活性を阻害することを明らかにしてきた。この結果は、硫酸基、チオール基が阻害活性に寄与していないことを示している。リグニンは 4-ヒドロキシフェニル、4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル、4-ヒドロキシ-3、5-ジメトキシフェニル基を含む複雑な構造をもつポリフェノール高分子である。4-ヒドロキシフェニル、4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニルを含む *p*-クマリン酸、フェルラ酸は  $\alpha$  グルコシダーゼ活性を阻害しないことが報告されていることから<sup>(10)-(11)</sup>、酵素活性の阻害にはリグニンスルホン酸の複雑な構造が寄与していると考えられる。

リグニンは主要な食物繊維の一つであるがその機能については、あまり知られていない。多糖であるキサンタンガムなどの食物繊維では、その粘度によってグルコースが拡散する速度を抑えグルコースの小腸からの吸収を遅延、抑制することが報告されている<sup>(12)</sup>。一方、リグニンスルホン酸は粘性が低くグルコースの拡散速度を抑制しなかった（データは示していない）。グルコースの経口投与後におこる血中グルコース濃度の上昇抑制は、小腸からのグルコース取り込み阻害によるものと考えられる。この結果は、2-デオキシグルコースの Caco-2 細胞への取り込みを阻害した結果からも支持される。

リグニンスルホン酸 2% を含む餌を食餌させた糖尿病発症 KK-Ay マウスでは血中グルコース濃度の上昇が有意に抑制された。リグニンスルホン酸は  $\alpha$  グルコシダーゼ活性を阻害することによって、グルコースの小腸からの取り込みを阻害することによって血中グルコース濃度の上昇を抑制したのと考えられる。これらの結果は、リグニンスルホン酸は食後高血糖を抑える成分として、糖尿病を予防する成分として有効な物質と考えられる。リグニンを豊富に含むゴボウなどの野菜や穀物は糖尿病を予防するために有効な食品と考えられる。

#### 文献

- (1) Zhe W, Jingwen X, Jishi Z, Wenxia L., Concrete superplasticizer prepared from catalytic oxidation of lignosulfonate., *Adv. Mater. Res.* (in ), 424, 2012, p. 1088-1092.
- (2) Glennie DW., Reactions in sulfite pulping. In: Lignin: occurrence, formation., Structure and reactions (Sarkanen KV, Ludwig CH, eds) (in ), 1971, p. 597-637. Willey, New York.
- (3) Eastwood MA, Hamilton D., Studies on the absorption of bile salts to non-absorbed components of diet., *Biochem Biophys Acta* (in ), 152, 1968, p. 165-173.
- (4) Barnard DL, Heaton KW., Bile acids and vitamin A absorption in man : the effects of two bile acid-binding agents, cholestyramine and lignin., *Gut* (in )14, 1973, p. 316-318.
- (5) Dizhbite T, Telysheva G, Jukjane V, Viesturs U., Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants., *Biores Technol* (in ), 95, 2004, p. 309-317.
- (6) Pouteau C, Dole P, Cathala B, Averous L, Boquillon N., Antioxidant properties of lignin in polypropylene., *Polym Degrad Stabil* (in ), 81, 2003, p. 9-18.
- (7) Reddy BS, Maeura Y, Wayman M., Effects of dietary corn bran and autohydrolyzed lignin on 3, 2-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced intestinal carcinogenesis in male F344 rats., *J Natl Cancer Inst* (in ), 71, 1983, p. 419-423.
- (8) Lee DS, Lee SH., Genistein, a soy isoflavone, is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor., *FEBS Lett* Vol.501, 2001, p. 84-86.
- (9) Manthorpe M, Fagnani R, Skaper SD, Varon S., An automated colorimetric microassay for neuronotrophic factors., *Brain Res.* (in ), 390, 1986, p. 191-198.
- (10) Nishioka T, Kawabata J, Niki R., Isolation and activity of *N-p*-coumaroyltyramine, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor in welsh onion (*Allium fistulosum*), *Biosci Biotech Biochem* (in ), 61, 1997, p. 1138-1141.
- (11) Niwa T, Doi U, Osawa T., Inhibitory activity of corn-derived bisamide compounds against alpha-glucosidase., *J Agric Food Chem* (in ), 51, 2003, p. 90-94.
- (12) Ou S, Kwok KC, Li Y, Fu L., In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose., *J Agric Food Chem* (in ), 49, 2001, p. 1026-1029.