

ダッタンソバの α -グルコシダーゼ活性阻害効果の測定法

作成者： 北海道立工業技術センター研究員 鳥海 滋
科長 大坪 雅史
天使大学看護栄養学部 教授 荒川 義人
toriumi@techakodate.or.jp

1. ダッタンソバについて

1. 1 概要

ダッタンソバ (*Fagopyrum tataricum*) はタデ科に属する一年生草本であり、その主要な生産地は中国雲南省を中心とする高原地帯である。ダッタンソバはその苦みから「苦ソバ」と呼ばれ、日本ではこれまであまり食されてこなかった。しかし近年、その機能性への期待からダッタンソバが注目されている。ダッタンソバ原穀に多く含まれるポリフェノールの1種であるルチンは高血圧症、血管障害、高脂血症等の予防や治療に有効であると考えられている¹⁾。

北海道はその冷涼な気候により、日本におけるソバの主要産地の一つとなっている。ダッタンソバは1990年代に北海道南部の森町に導入されたのを契機に、道内において次第に作付け面積が拡大された。またダッタンソバを特産品化しようとする動きも活発化しており、現在ダッタンソバは蕎麦屋のメニューのみならず、生麺、乾麺、お茶、ふりかけ、クッキー等として商品開発が行われ販売されている（図1-1）。



図1-1 ダッタンソバのソバ原穀と生麺（商品）

1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

ダツタンソバはルチン、ケルセチンの含有量が普通ソバより多く含まれ、機能性が期待されている。ダツタンソバ原穀には、ルチンが普通ソバの約 60～100 倍 (1658.8mg/100g) 含まれると報告されている²⁾。ポリフェノールの 1 種であるルチンは高血圧症、血管障害、高脂血症等の予防や治療に有効であると考えられている。また中国においてダツタンソバは、機能性食品として糖尿病予防の漢方薬・食事療法に利用されてきた³⁾。なおルチンの分析方法等については、本マニュアル集の「ソバ粉のルチン(徳島県立工業技術センター)」を参照のこと。

1. 2. 1 α -グルコシダーゼ活性阻害効果を有する食品

血糖値上昇抑制に関与する α -グルコシダーゼ活性阻害効果を有する食品類としては杜仲葉、桑葉等が挙げられる。また、特定保健用食品(トクホ)で作用機序を α -グルコシダーゼ活性阻害とするものには、関与成分としてグアバ葉ポリフェノールを含むお茶や、豆豉(中国の伝統的な大豆発酵食品)エキスをを用いたサプリメントがある。

<引用・参考文献>

1. Benavente-García, O. and Castillo, J.: Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity., *J Agric Food Chem*, 56 (15), 6185-205 (2008)
2. 松本憲一: ダツタンソバの特性とその現状, *食品工業*, 43 (6), 25-30 (2000)
3. 片山虎之介: 不老長寿のダツタン蕎麦, p.10 (2001) 株式会社小学館, 東京

2. α -グルコシダーゼ活性阻害効果についての説明

糖尿病は糖代謝の異常により高血糖状態が持続し、血管障害によるさまざまな合併症をきたす疾病である。高血糖状態には生活習慣が大きく影響しており、日常的な血糖値のコントロールが重要とされる。 α -グルコシダーゼは小腸上皮細胞において糖の α -グルコシド結合を加水分解する酵素の複合体であり、二糖類の消化と吸収(血糖値の上昇)に関与する。糖尿病の予防的な対策方法として食品中の成分により α -グルコシダーゼ活性を阻害し、糖質の消化吸收を遅らせることにより食後の血糖値の急激な上昇を抑えることが期待される。

3. 測定方法について

α -グルコシダーゼ活性はラット腸管アセトンパウダーを粗酵素として用い、マルトースを基質とした試験管内の酵素反応(マルターゼ反応)において、生成するグルコースを定量することにより測定する。 α -グルコシダーゼ活性の阻害効果は、食品成分等により同酵素反応におけるグルコース生成量が減少することから算出される。

3. 1 準備する器具など

1. 恒温装置(37℃で使用。例えばウォーターバス)

2. ホモジナイザー
3. 分光光度計（測定波長 505nm）

[試薬]

1. メタノール（試薬特級）
2. マルトース（試薬特級）
3. 炭酸ナトリウム（試薬特級）
4. グルコースキット グルコース CII-テストワコー（和光純薬（株））
5. ラット腸管アセトンパウダー（シグマ社）

[α -グルコシダーゼ粗酵素液の調製]

ラット腸管アセトンパウダー1gを0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）10mlに懸濁し、氷冷しながら超音波破碎処理を行う。遠心分離（3,000rpm、10分）の後、上清を分取して-70℃以下に保存する（100mg/ml）。

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

1. 食品試料を凍結乾燥し、破碎して粉末にする。
2. 70%メタノールを加えてホモジナイズした後、定容する。
（濃度は任意に設定してよい。）
3. 遠心分離する（10,000rpm、10分）。
4. 上清をろ紙ろ過により分離して測定用試料とする。

3. 3 測定方法

(1) α -グルコシダーゼ反応

試料存在下において α -グルコシダーゼ粗酵素を添加し反応を行うものを「試験区」、反応終了後に粗酵素を添加するものを「空試験区」、また試料非添加区（試料の代わりに抽出溶媒 70%メタノール 500 μ l 添加するもの）を「対照区」とする。試験区の酵素反応方法は以下の通りである。

1. 試験管（150mm 長以上が適当）に試料 500 μ l、250mM マルトース 2ml、蒸留水 2.4ml を添加する。
2. 37℃で5分間保温する。
3. α -グルコシダーゼ粗酵素液（100mg/ml）100 μ l を添加する。
4. 37℃で40分間保温する（酵素反応）。
5. 0.2M 炭酸ナトリウム 5ml を添加して反応を停止する。

(2) グルコース定量

グルコース CII-テストワコー（ムタローゼ・GOD法）を使用して行う。本法において試料中のグルコースは、発色剤に含まれるムタローゼ、グルコースオキシダーゼ（GOD）、およびペルオキシダーゼ等の作用により赤色の色素を生じ、この赤色の吸光度を測定することにより試料中のグルコースを定量する。方法は取り扱い説明書に準じるが、概要は以下の通りである。

1. キット付属の発色剤 3.0ml を試験管に採る。
2. (1) α -グルコシダーゼ反応を行った試料 0.02ml を試験管に加える。

3. よく混合して 37℃で 5 分間加温する。
4. 分光光度計で 505nm の吸光度を測定する。
5. キット付属のブドウ糖標準液からあらかじめ検量線を作成しておき、反応試料の吸光度からグルコース濃度を求める。

(3) α-グルコシダーゼ活性阻害率の算出

試験区、空試験区、および対照区のグルコース量から、次式により α-グルコシダーゼ活性阻害率を求める。

$$\alpha\text{-グルコシダーゼ活性阻害率}(\%) = 100 - (A - B) / C \times 100$$

A：試験区生成グルコース、B：空試験区生成グルコース量、C：対照区生成グルコース量

4. 測定例

アカルボースは α-グルコシダーゼの阻害剤（基質のアナログ）として、糖尿病予備群や軽度の患者に対して食後の血糖値の急激な上昇を抑えるために用いられる医薬品である。陽性対照として、本方法によりアカルボースの α-グルコシダーゼ活性阻害効果を測定した。試料は水に溶解し、異なる濃度において活性阻害率を求めた。その結果、50%阻害濃度（IC₅₀）は 3.0μg/ml であった（図 4-1）。

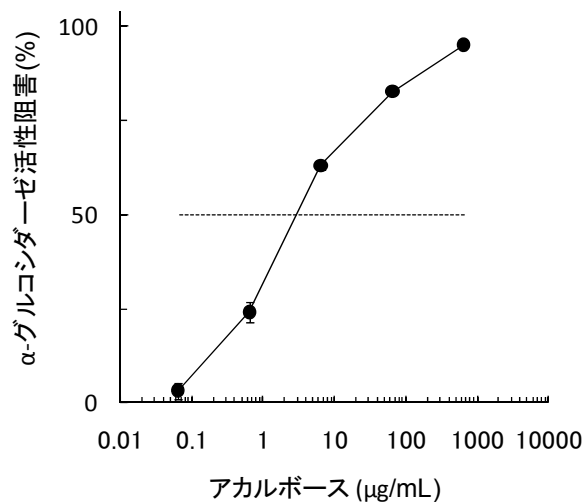


図 4-1 アカルボースの α-グルコシダーゼ活性阻害

5. 食品の測定結果例

食品試料として、ダッタンソバの実際に食する形態である「茹麺」を用いて測定を行った。ダッタンソバ生麺は北海道森町産ダッタンソバ粉を用いて製造されたものを用いた（ダッタンソバ粉 50%含有）。生麺は 10 倍量の沸騰水中で 2.5 分間茹で、湯切りしてダッタンソバ茹麺とした。茹麺は凍結乾燥後に粉砕し、粉末 30g に 70%メタノールを加えてホモジナイズし、同液で 100ml に定容して試料とした（300mg/ml）。試料の 70%メタノール抽出液希釈系列を調製し、α-グルコシダーゼ活性の阻害効果を測定した。その結果、濃度依存的な α-グルコシダーゼ活性阻害が認められ、30%阻害濃度（IC₃₀）は 23.0mg/ml

であった (図 5-1)。

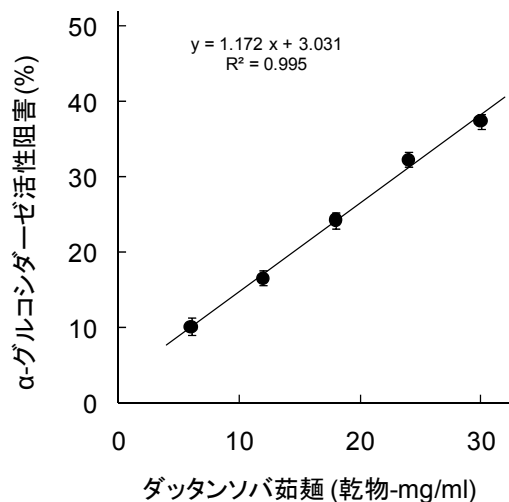


図 5-1 ダットンソバ抽出物の α-グルコシダーゼ活性阻害

6. 測定上の留意、注意点

試料の調製に用いる溶媒 (70%メタノール) は、酵素活性に影響を与える。したがって空試験区の測定は使用した溶媒を用いて行い、酵素活性阻害率算出の際に補正する必要がある。

また、試料自体の吸光度や試料に含まれる基質の影響を補正するために、反応終了後に粗酵素を添加する空試験区を必ず設定する。

7. その他

α-グルコシダーゼ活性阻害は、あくまでも血糖値上昇抑制に関連する *in vitro* の評価指標である。実際の生体内における血糖値上昇抑制効果については、実験動物やヒトを対象とした糖負荷試験等において効果を検証する必要がある。

8. 測定法に関する引用・参考文献

1. 出口ヨリ子, 長田邦子, 内田和美, 木村広子, 芳川雅樹, 工藤辰幸, 保井久子, 綿貫雅章: グアバ葉熱水抽出物の db/db マウスにおける抗糖尿病効果およびヒト飲用試験による食後血糖値上昇抑制効果, 日本農芸化学会誌, 72 (8), 923-931 (1998)
2. 大坪雅史, 筆村千恵子, 荒川義人, 剣持美帆, 清水健志, 青木央, 宮崎俊一: 北海道立工業技術センター研究報告 No.8, pp. 52-56 (2004), 北海道立工業技術センター

-以上-