

インスリーナ葉の抗糖尿病作用

—正常ラット, ストレプトゾトシン糖尿病ラット

および自然発症糖尿病マウスに対する作用比較—

森 強 士, 西 川 泰*, 高 田 曜 子
檜 内 賀 子, 石 原 伸 浩

(2000年6月19日受付; 2001年4月24日受理)

要旨: ブラジルで民間療法として用いられているインスリーナは, 糖尿病や高血圧症に効果があるといわれている。そこでインスリーナの抗糖尿病作用を評価するための試験を行った。*in vitro* の試験として, マルターゼ, α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性の阻害能を調べ, *in vivo* の試験として, 自然発症糖尿病マウスに対する連続摂取での作用と正常ラットおよびストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットに対する血糖値上昇への影響を調べた。その結果, インスリーナはマルターゼおよび α -グルコシダーゼに阻害活性を示した。また, 4週間連続摂取後の自然発症糖尿病マウスの随時血糖値を有意 ($p < 0.001$) に低下させた。正常ラットおよびSTZラットの糖負荷後の血糖値への影響は, 正常ラットシヨ糖負荷後30分値で有意 ($p < 0.01$) に血糖上昇を抑制し, STZラットシヨ糖負荷後60分値で有意 ($p < 0.05$) に抑制した。これらの結果から, インスリーナ葉は糖尿病の予防に有効であることが予想された。

キーワード: インスリーナ, α -グルコシダーゼ, 糖尿病予防

近年, 日本における糖尿病患者数は増加の傾向にあり, その数は600万人以上といわれている。また, 糖尿病の95%以上は2型糖尿病であり, その大部分はインスリン非依存状態下にある。糖尿病は「死の四重奏」などとも呼ばれ, 動脈硬化, 網膜症, 腎症などの血管障害あるいは神経障害などの合併症を引き起こすため, 糖尿病の治療と合併症の防止が重要な課題となっている。多くの2型糖尿病患者では末梢組織でのインスリン抵抗性と膵 β 細胞よりの相対的なインスリン分泌能の低下を背景とした食後の高血糖が特徴的であり, この治療が糖尿病の管理上重要である。

インスリーナ (学名: *Cissus sicyoides* L.) は熱帯アメリカ・ブラジルが原産で, 二次林や原野に広く自生するブドウ科の植物である。葉は外用として, リューマチ, 腫れ物および筋肉の腫れに用い, 葉と茎は乾燥粉末を内服したり, 茶剤や煎剤として高血圧, ひきつけおよび糖尿病の治療に有効であるとされ, ブラジルでは民間療法として用いられている¹⁾。一方, 植物界では, 白甘藷²⁾, オオバナサルスベリ³⁾, ギムネマ茶⁴⁾, 日本茶⁵⁾, その他⁶⁻⁹⁾ 多くの植物に血糖上昇抑制作用が報告されているが, インスリーナに関しての正確な報告はなされていない。そこで本研究は, インスリーナに抗糖尿病予防作用を期待し, まず, インスリーナの熱水抽出物の糖類

消化分解酵素阻害活性を *in vitro* で調べた。次いで自然発症糖尿病マウスにインスリーナ粉末の連続摂取後の作用と正常ラット, ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットにインスリーナ熱水抽出物を単回投与後の血糖値上昇への影響を調べた。

実験方法

1. 実験材料

1.1 インスリーナ抽出物の調製 乾燥インスリーナ葉をボールミル微粉碎器 (榑寺田製作所製) で粉末 (145 mesh pass) 化 (InPo) した。InPo 10 g を 200 mL の蒸留水で 80°C, 30 分間抽出後ガーゼおよび濾紙で濾過し, その抽出液 (InEx) を *in vitro* の各種消化酵素阻害試験および動物試験に用いた。

2. InEx の各種消化酵素阻害試験 (*in vitro*)

2.1 酵素 ヒトだ液由来の α -アミラーゼ (SIGMA 社製), プタすい臓由来の α -アミラーゼ (SIGMA 社製) および酵母由来の α -グルコシターゼ (SIGMA 社製) を使用した。さらにマルターゼについては, 市販ラット腸管アセトン粉末 (SIGMA 社製) に9倍量の56 mM マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) を加え, 水中にてホモジナイズし均質化した後, 遠心分離 (3,000 rpm, 10 min, 4°C) し出口らの方法に従い精製¹⁰⁾ した。上清を粗酵素

* 連絡・別刷請求先
タマノイ酢株式会社中央研究所 (639-1038 大和郡山市西町 100)

液とし、マルターゼ反応には粗酵素液を20倍希釈して使用した。

2.2 活性測定方法 α -アミラーゼ活性の測定は市販のアミラーゼテストワコー(和光純薬工業(株)製)を参考にして行った。4%デンプン溶液1 mLにInExを1 mL添加し、37°Cで5分間保温する。その後、 α -アミラーゼ溶液(ヒトだ液由来:20 μ L, プタすい臓由来:5 μ L)を加え、37°Cで30, 60, 90および120分間反応させた。対照は蒸留水とし、反応停止は沸騰水中で10分間加熱して酵素を失活させることで行った。 α -グルコシダーゼ(酵母由来)活性の測定は、2%マルトース溶液にInExを1 mL添加し、37°Cで5分間保温。その後、 α -グルコシダーゼ10 μ Lを加え、37°Cで30, 60, 90および120分間反応させた。対照は蒸留水とし、反応停止は沸騰水中で10分間加熱して酵素を失活させることで行った。マルターゼ活性の測定は、2%マルトース溶液0.6 mLにInExを等量添加し、37°Cで5分間保温後上記粗酵素液を0.6 mL加え、同様に酵素反応を行った。各反応で生成されたマルトースおよびグルコース量を高速液体クロマトグラフィーで測定し、酵素活性を測定した。阻害活性は、阻害(%)=[(対照生成グルコース量-InEx添加時生成グルコース量)/(対照生成グルコース量)] \times 100の式により算出した。高速液体クロマトグラフィーの条件は、カラム:Shodex Asahipak NH2P-50 4 E (4.6 \times 250 mm), カラム温度:35°C, 溶媒:アセトニトリル/水=(75/25), 検出器:示差屈折計, 試料注入量:10 μ L, グルコースおよびマルトースを標準品とし検量線を作成し定量した。そして、阻害活性の指標として、各酵素を50%阻害するときのInPo濃度(mg/mL)をIC₅₀として求めた。

3. InExの動物に対する影響 (*in vivo*)

4週齢KK-A^y/Ta雄性マウスは日本クレア(株)より購入し、4~6週齢Wistar/ST雄性ラットは日本SLC(株)より購入した。これらの動物は室温24 \pm 1°C, 明暗サイクル12時間の部屋で飼育した。餌(日本クレア(株)の実験動物固形飼料CE-2)および水は自由摂取とし1週間の予備飼育の後実験に供した。

3.1 自然発症糖尿病マウスに対する作用 5週齢KK-A^y/Ta雄性マウスを用いて対照群とInPo群の2群に分けた。被験物を500 mg/kg体重/dayになるように餌に混ぜて与え、対照群には通常の餌を与え水は自由摂取とした。試験開始4週間後非絶食下に心臓採血し、6,000 rpm, 10分間の遠心分離により血漿を得て、血糖値を測定した。血糖値の測定はグルコースオキシダーゼ法による酵素法で行い、グルコースC IIテストワコー(和光純薬工業(株)製)の方法に従って測定した。

3.2 正常ラットに対する経口糖負荷試験 5週齢Wistar/ST雄性ラットを使用した。ショ糖負荷量は1 g/kg体重とし、InExは5 mL/kg体重でショ糖負荷30分前に経口投与した。対照は30分前に水を経口投与し

た場合と比較した。ショ糖投与0, 30, 60および90分後に尾静脈より採血し同様に血糖値を測定した。また、5週齢Wistar/ST雄性ラットを使用しブドウ糖負荷試験をした。ブドウ糖負荷量は0.5 g/kg体重と同様にInExおよびブドウ糖を負荷し血糖値を測定した。

3.3 STZ糖尿病ラットに対する経口糖負荷試験 7週齢Wistar/ST雄性ラットにSTZ(使用直前に50 mMクエン酸緩衝液pH 4.5に溶解)70 mg/kg体重を腹腔内投与した。投与3日後の朝9:00から10:00の血糖値が、300 mg/dL以上を示したもの(平均556 \pm 72 mg/dL)を使用し翌日に試験を行った。実験3.2と同様にショ糖負荷およびブドウ糖負荷試験を行い、血糖値を測定した。

4. 統計処理

各測定値は、平均値(means) \pm 標準誤差(SE)で示した。各群の平均値はANOVAにより解析し、有意差が認められた場合にはSuper ANOVAのcontrast法およびStatView 4.0のScheffe's F法により対照群との有意差を検定、 $p < 0.05$ で有意と判定した。

実験結果

1. InExの糖類分解酵素阻害

InExの*in vitro*における糖類分解酵素阻害について調べた。Figure 1に示すように、InExはヒトだ液およびプタすい臓由来 α -アミラーゼに対して阻害反応を示さず、 α -グルコシダーゼおよびマルターゼに対して阻害反応を示した。InExの α -グルコシダーゼおよびマルターゼに対するIC₅₀は、それぞれ24.9 mg/mL, 28.4 mg/mLであった(Figure 2)。

2. InExの動物に対する影響

2.1 自然発症糖尿病マウスに対する作用 KK-A^yマウスにInPoを500 mg/kg体重/day連続摂取させ、4週間後の9:30-10:30の間採血し血糖値を測定した結果をFigure 3に示した。InPo摂取群の血糖値は476.7 \pm 11.3 mg/dLと対照群の580.6 \pm 17.9 mg/dLと比較して有意に低値であった($p < 0.001$)。また、Table 1には実験期間中のマウスの体重、飼料摂取量および飲水量を示した。マウスは摂食阻害や摂水阻害を起こすこともなく順調に生育し排泄物にも異常はみられず、InPo摂取群と対照群の間に有意差はみられなかった。

2.2 正常ラットに対する経口糖負荷試験 ショ糖およびブドウ糖をそれぞれ負荷したときのInExの血糖値上昇抑制作用について調べた。ショ糖負荷前の対照群、InEx投与群の血糖値は、それぞれ127.3 \pm 2.6, 132.4 \pm 4.0 mg/dLで、ショ糖を1.0 g/kg体重負荷した場合のInEx投与群の血糖上昇値は、負荷後30分値で48.8 \pm 4.2 mg/dLと対照群の69.5 \pm 4.4 mg/dLと比較して有意($p < 0.01$)な上昇抑制を示した(Figure 4A)。一方、ブドウ糖0.5 g/kg体重負荷では、糖負荷前の対

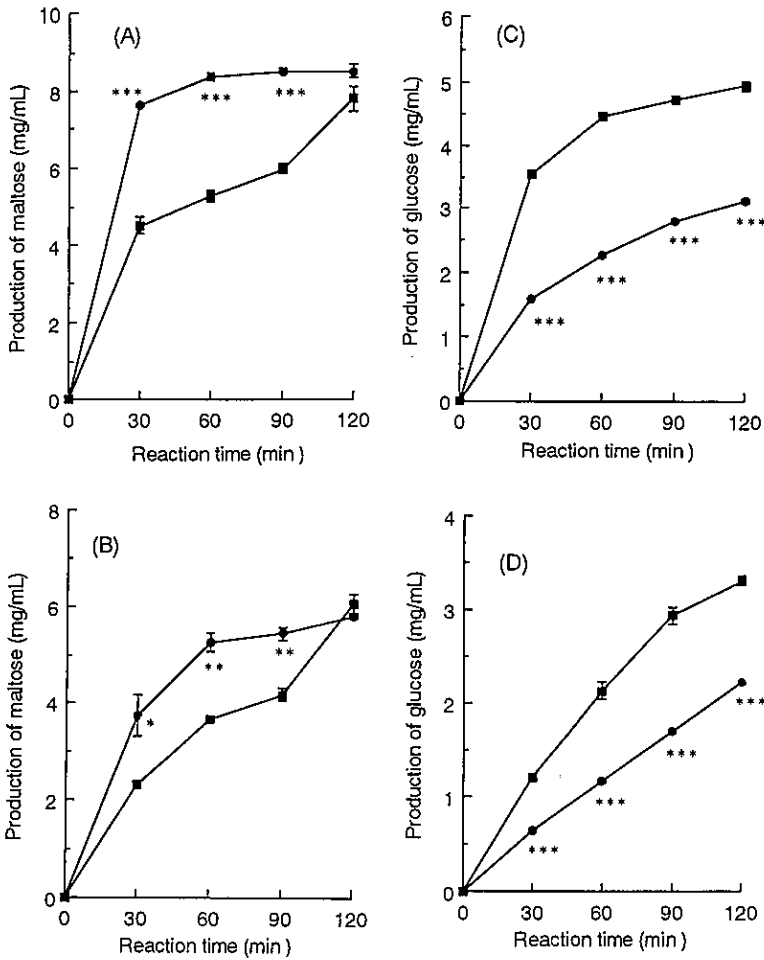


Figure 1 Inhibitory effect of the InEx on the activity of α -amylase (from human saliva: A, porcine pancreas: B), α -glucosidase (from yeast: C) and maltase (from rat intestine: D).

Inhibitory effect of InEx on each enzyme activity was determined by measuring comparatively with (●) or without (■) InEx added to the corresponding enzyme reaction mixtures. α -amylase and maltase degrading activity were determined by increase of the concentration of maltose and glucose produced during degradation reaction of soluble starch and maltose.

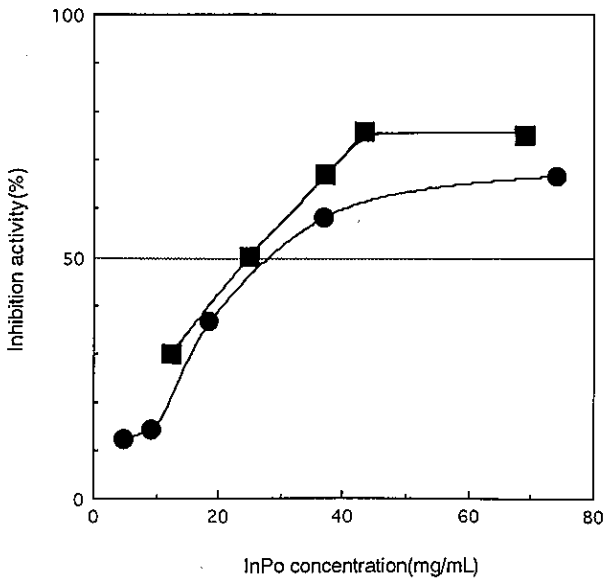


Figure 2 Dose response curves of inhibitory effect of InEx on the activities of α -glucosidase (from yeast) and maltase (from rat intestine).

Inhibitory effect of InEx on the activities of these enzymes was determined same as described in Figure 1. Inhibition percent was defined as compared with control reaction in which glucose produced was 100%. Symbols: ■, α -glucosidase; ●, maltase.

照群, InEx 投与群の血糖値は, それぞれ 132.3 ± 4.3 , 132.5 ± 6.0 mg/dL で, 負荷後についても InEx の投与群と対照群の間に差異はなく血糖値上昇は同様の傾向を示した (Figure 4 B).

2.3 STZ 糖尿病ラットに対する経口糖負荷試験
シヨ糖およびブドウ糖をそれぞれ負荷したときの InEx

の血糖値上昇抑制作用について調べた。シヨ糖負荷前の対照群, InEx 投与群の血糖値は, それぞれ 426.2 ± 11.0 , 441.8 ± 16.3 mg/dL で, シヨ糖を 1.0 g/kg 体重負荷した場合の InEx 投与群の血糖上昇値は, 負荷後 60 分値で 107.9 ± 10.7 mg/dL と対照群の 153.9 ± 15.5 mg/dL と比較して有意 ($p < 0.05$) に抑制した (Figure 5 A)。

Table 1 Body weight, food intake and water intake in mice fed the InPo for 4 weeks.

Dietary group	Body weight (g)		Food intake (g)	Water intake (mL)
	Initial	Final		
Control	21.2±0.1	40.5±0.5	149.1±7.6	294.6±29.4
InPo	21.5±0.1	40.2±0.4	151.0±6.8	275.7±27.7

Values are mean±SE for 6 mice. All data in the same column were not significantly different each other.

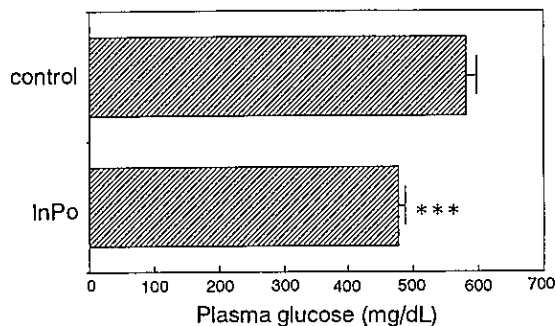


Figure 3 Effect of InPo feeding for 4 weeks on plasma glucose in KK-A^y mice.

Each column represents mean±SE from 6 subjects. InPo was mixed into basal diet and administered at a dose of 500 mg/kg/day. Blood samples were taken at the fed condition. *** $p < 0.001$ vs. control group.

一方、ブドウ糖 0.5 g/kg 体重負荷の場合は、糖負荷前の対照群、InEx 投与群の血糖値は、それぞれ 459.6 ± 32.0 , 444.0 ± 14.7 mg/dL で、糖負荷後についても InEx の投与群と対照群の間に差異はなく血糖値上昇は同様の傾向を示した (Figure 5 B)。

考 察

糖尿病治療として開発され医分野の臨床で用いられている薬品には、二糖類水解酵素阻害剤であるアカルボース¹¹⁻¹⁴⁾ およびボグリボース¹⁵⁾ などがある。また、食品分野では食品添加物である D-キシロースがスクラーゼ阻害剤として注目され、血糖値上昇抑制作用があるとされ¹⁶⁾、植物由来の α -グルコシダーゼ阻害物質¹⁷⁻²¹⁾ の研究も盛んに行われており、糖質の消化の遅延および抑制作用を期待する糖尿病予防という観点からは、 α -グルコシダーゼのような二糖類水解酵素を阻害する物質が非常に有効であると思われる。今回、InEx に *in vitro* において、 α -グルコシダーゼ阻害作用を認めた。今後 InEx の α -グルコシダーゼ阻害作用成分が糖尿病の予防の一つになりうると思われる。

正常ラットへのショ糖負荷試験において InEx 投与群の糖負荷後の血糖値上昇抑制が確認された。また、ブドウ糖負荷試験において InEx 投与群と対照群の血糖値変化は同様の傾向を示したので InEx にはブドウ糖吸収阻害作用はないと考えられる。これらのことから、正常ラットに対してのショ糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用は、二糖類水解酵素活性阻害の関与が示唆された。

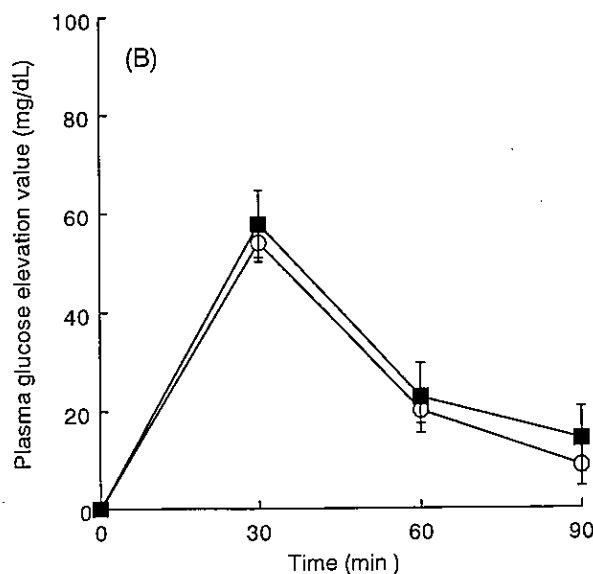
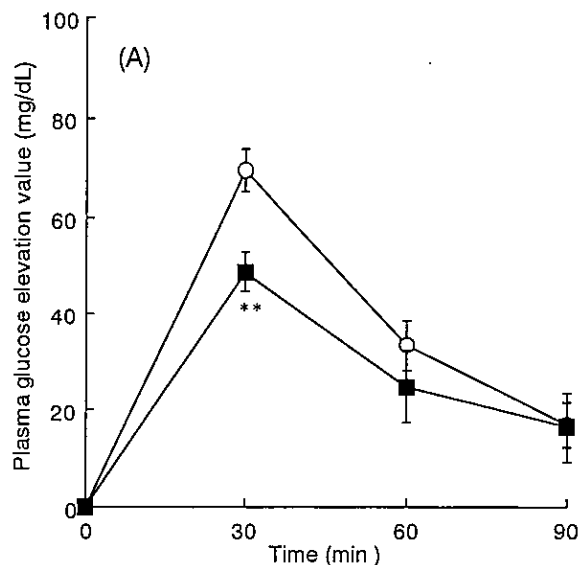


Figure 4 Effect of InEx on plasma glucose after 1.0 g/kg sucrose (A) and 0.5 g/kg glucose (B) load in normal rats.

Each point represents mean±SE from 9 subjects. Blood samples were taken at 0, 30, 60, and 90 min after the loading. InEx was loading before the sucrose and glucose loading. ○, control; ■, InEx 5 mL/kg, ** $p < 0.01$ vs. control group.

一方、InEx は STZ 糖尿病ラットに対してもショ糖負荷後の血糖値上昇を抑制し、ブドウ糖負荷後の血糖値上昇は抑制しなかった。STZ 糖尿病ラットは膵臓の β 細胞を選択的に損傷することにより高血糖を呈するインスリン欠

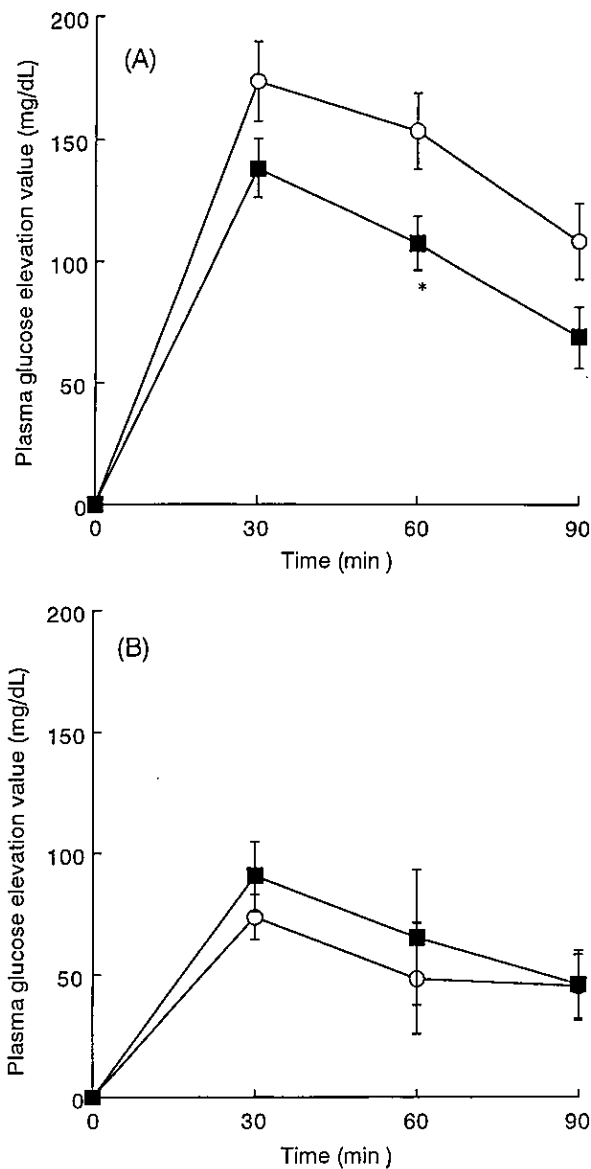


Figure 5 Effect of InEx on plasma glucose after 1.0 g/kg sucrose (A) and 0.5 g/kg glucose (B) load in STZ rats.

Each point represents mean±SE from 16 subjects. Blood samples were taken at 0, 30, 60, and 90 min after the loading. InEx was loading before the sucrose and glucose loading. ○, control; ■, InEx 5 mL/kg. * $p < 0.05$ vs. control group.

乏性の実験的な糖尿病モデルである²²⁾。よって、InEx投与群の血糖値上昇抑制は二糖類水解酵素阻害作用が関与しているが、インスリン分泌促進作用はなく、ブドウ糖負荷では血糖上昇抑制が認められないことからインスリン増強作用はないと考えられる。

InPoは自然発症糖尿病マウスであるKK-A^yマウスに対して、随時血糖値の上昇抑制作用を示した。KK-A^yマウスは遺伝的にインスリン抵抗性を示すことにより高血糖を呈する疾患モデルである²³⁾。InPoの連続摂取によるKK-A^yマウス随時血糖値低下は、この糖尿病

モデルに対する影響からインスリン抵抗性が改善したことにより、血糖値が低下した可能性が考えられる。その可能性として血糖の低下による糖毒性の解除が考えられる。一方、 α -グルコシダーゼ阻害薬には α -グルコシダーゼによって消化阻害された食物の一部が結腸に達し、腸内細菌による発酵を起して腹鳴、下痢および放屁などの不快な症状をきたすという難点が指摘されている²⁴⁾が、InPo投与群において下痢といった症状は確認されなかったため、InPoの有効性が示唆された。

インスリーナ葉はブラジルにおいて糖尿病の民間療法として用いられているが、これまでは正確な科学研究はなされていなかった。今回の報告によりインスリーナに含まれている何らかの成分が糖尿病の改善作用を有することがわかった。なお、今回はデータを示していないが、InPoのマウスに対しての急性毒性試験は経口投与でLD₅₀は5.0 g/kg以上ということがわかった。この有効成分の特定、構造決定ならびに生理作用の調査と臨床試験の実施が今後の研究課題であるが、機能的食品や薬品開発素材としての可能性は大きいと思われる。

文 献

- 1) 橋本 悟郎 (1996) ブラジル産薬用植物事典, p. 1221. アボック社, 鎌倉.
- 2) 草野 崇一, 阿部 浩之, 岡田 篤典 (1998) 白甘藷 (*Ipomoea batatas* L.) の抗糖尿病作用—正常ラット, ストレプトゾトシン糖尿病ラットおよび自然発症糖尿病マウスに対する作用比較—. 日本農芸化学会誌 **72**, 1045-52.
- 3) Kakuda T, Sakane I, Takihara T, Ozaki Y, Takeuchi H, Kuroyanagi M (1996) Hypoglycemic effect of extracts from *Lagerstroemia speciosa* L. leaves genetically diabetic KK-A^y mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **60**: 204-8.
- 4) 笠木 健, 三好美智夫, 市川 修, 池田正樹 (1987) 各種ギムネマ茶にみられる血糖値上昇抑制効果と抗う蝕性効果. 米子医誌 **38**, 138-45.
- 5) 平田 成正, 安陪 隆明, 井元 敏明 (1992) ヒトにおける粗ギムネマ酸の糖負荷試験におよぼす効果. 米子医誌 **43**, 392-6.
- 6) 清水 岑夫, 和田 修治, 林 利光, 有澤 宗久, 池ヶ谷 賢次郎, 大角 誠治, 矢野 三郎, 森田 直賢 (1988) 日本茶の血糖降下作用成分に関する研究. 薬学雑誌 **108**, 964-70.
- 7) EL-Hawary ZM, Kholief TS (1990) Biochemical studies on hypoglycemic agents (I) Effect of *Azadirachta indica* leaf extract. *Arch Pharm Res* **13**: 108-12.
- 8) Clifford JB, Caroline D (1989) Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* **12**: 553-64.
- 9) 袁 佐民, 何 普明, 竹内 久直 (1998) 新生児期ストレプトゾトシンを投与して誘発した糖尿病ラットにおけるキクラゲ (*Auricularia auricula-judas* Quel.) の血糖値およびインスリン分泌に及ぼす改

- 善効果. 日本栄養・食糧学会誌 51, 129-33.
- 10) 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 (1998) グアバ茶熱水抽出の 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, 923-31.
 - 11) Puls W, Keup U, Krause HP, Muller L, Schmidt DD, Thomas G, Truchheit E (1980) Pharmacology of a glucosidase inhibitor. *Front Hormone Res* 7: 235-47.
 - 12) Hanozet G, Pircher HP, Vanni P, Oesch B, Semenza G (1981) An example of enzyme hysteresis. *J Biol Chem* 256: 3703-11.
 - 13) 坂本信夫, 柴田昌雄, 堀田 饒, 角田博信, 富田明夫, 土田 勇, 長嶋 誠, 勝又一夫 (1989) インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) に対する BAYg5421 (Acarbose) の臨床的検討. 薬理と治療 17, 285-91.
 - 14) 藤原豊博 (1993) 新たな治療概念を導入した糖尿病用薬アカルボース (グルコバイ) の基礎と臨床. 基礎と臨床 27, 6337-51.
 - 15) 小高裕之, 三木七美, 池田 衡, 松尾隆夫 (1992) 二糖類水解酵素阻害剤 AO-128 のラットにおける食後血糖抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌 45, 27-31.
 - 16) 浅野敏彦, 吉村康美, 櫻田清彦 (1996) ラットにおけるD-キシロースのスクラーゼ阻害作用と血糖上昇抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌 49, 157-62.
 - 17) 吉川秀樹, 小垂 真, 田中千栄, 池内常朗, 河端信 (2000) トラムメ α -アミラーゼインヒビターの熱安定性と消化性. 日本食品科学工学会誌 47, 158-62.
 - 18) Honda M, Hara Y (1993) Inhibition of rat small intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 123-4.
 - 19) 山本万里 (1996) 茶の体調調節機能. 日本食品科学工学会誌 43, 653-62.
 - 20) 野田信三 (1998) 糖尿病予防と桑の葉茶の利用. *Food Style* 21, 2, 50-5.
 - 21) Yoshikuni Y (1988) Inhibition of intestinal by moranoline and its *N*-Alkyl derivatives. *Agric Biol Chem* 52: 121-8.
 - 22) 岩島保法 (1998) ケミカル物質による誘発性糖尿病 (ストレプトゾトシン単回投与, 頻回投与). 日本臨床 56, 732-7.
 - 23) 西村正彦 (1998) KK系およびKK-A^y系マウス. 日本臨床 56, 708-13.
 - 24) 坂本信夫, 宇野智子 (1997) 経口血糖降下薬一概論一. 基礎と臨床 55, 94-8.

J Jpn Soc Nutr Food Sci 54 : 197-203 (2001)

Effect of Insulina Leaf Extract on Development of Diabetes — Comparison between Normal, Streptozotocin-induced Diabetic Rats and Hereditary Diabetic Mice —

Tsuyoshi Mori, Yasushi Nishikawa,* Yoko Takata,
Noriko Kashiuchi, and Nobuhiro Ishihara

(Received June 19, 2000 ; Accepted April 24, 2001)

Summary : To clarify the anti-diabetic effect of Insulina (*Cissus sicyoides*), currently used as a folk medicine in Brazil for diabetes and hypertension, several administration experiments were done using mice and rats. Previously, the inhibitory effect of Insulina on the sugar-degrading enzymes maltase [3.2.1.20], α -amylase [3.2.1.1], and α -glucosidase [3.2.1.20] was evaluated *in vitro*. Insulina was found to inhibit the activities of maltase and α -glucosidase, and the inhibitory effect on the latter was higher than on the other two enzymes. Insulina was found to have potential hypoglycemic activity in hereditary diabetic mice, normal rats and rats with streptozotocin (STZ)-induced diabetes by oral administration. Insulina feeding for 4 weeks significantly lowered the mean plasma glucose level of mice under fed conditions, and single oral administration of Insulina significantly lowered the mean plasma glucose level 1 h after sucrose loading in normal rats ($p < 0.01$) and rats with STZ diabetes ($p < 0.05$). These results suggest that intake of Insulina prevents the increase in the blood glucose level after a meal. Consequently, daily intake of Insulina might be useful for prevention of diabetes.

Key words : *Cissus sicyoides*, sugar-degrading enzymes, prevention of diabetes

* Corresponding author

Research Center, Tamanoi Vinegar Co., Ltd., 100 Nishimachi, Yamatokoriyama 639-1038,
Japan