

インスリーナ葉抽出物の α -グルコシダーゼ 阻害能の比較

西 川 泰^{*1}, 榎 内 賀 子¹, 高 田 曜 子¹
上中居 和 男¹, 堀 名 恵 美², 松 浦 寿 喜²

(2002年9月24日受付; 2003年7月28日受理)

要旨: 熱帯アメリカ・ブラジルが原産で、民間療法として糖尿病や高血圧症に利用されるインスリーナ (学名: *Cissus sicyoides* L.) の血糖上昇抑制作用を増強させる調製法を、 α -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.20) 阻害活性を指標として検討した。乾燥インスリーナおよび焙煎インスリーナを4, 80, 120°Cの蒸留水で抽出した液を比較すると、抽出温度を高くすることにより活性の上昇が認められた。また、焙煎処理はさらに活性を高めた。さらに、ラット門脈カテーテル法を用いて、スクロースに対する消化吸収阻害効果の持続時間を測定し、その効力を比較した。その結果、焙煎をし120°C 20分間抽出した抽出液は、未焙煎葉を80°Cで30分間抽出した抽出液に比べ、門脈血中グルコース濃度をより低下させた。これらのことから、糖尿病予防に有用なインスリーナの α -グルコシダーゼ阻害活性上昇の要因は焙煎および加熱であることが示唆された。

キーワード: インスリーナ, α -グルコシダーゼ, 糖尿病予防, 門脈カテーテル法, 抽出

インスリーナ (*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¹⁾。インスリーナは、民間的に高血圧、発汗、ひきつけ、糖尿病等に効果があるとされている薬用植物の一つで、抗炎症作用²⁾や細胞増殖抑制活性³⁾など機能性についての報告もなされている。

著者らは、先にインスリーナ葉を80°Cの熱水で30分間抽出した抽出液が α -グルコシダーゼ阻害活性を有し、血糖上昇が抑制されることを報告した⁴⁾。しかし、血糖上昇抑制成分が効果的に抽出されているのかどうかは明らかになっていない。

そこで本研究では、インスリーナの血糖上昇抑制作用を増強させる調製法を、 α -グルコシダーゼ阻害活性を指標として検討した。さらに、ラット門脈カテーテル留置実験モデル⁵⁾を用いて、スクロースに対する消化吸収阻害効果の持続時間を測定し、その効力を比較した。

実験方法

1. 実験材料

1.1 インスリーナ葉の調製 前報⁴⁾にしたがって、ブラジル産の乾燥インスリーナ葉を粉末化したものを用いた。このインスリーナ粉末をさらに140°Cで10分間焙煎したものを焙煎インスリーナ粉末とした。

1.2 抽出方法 インスリーナ粉末を一定温度の蒸留水にて抽出した。4°Cでの抽出には恒温冷水循環機 (タ

イテック社製) を、80°Cでの抽出には恒温槽 (タイテック社製) を、120°Cでの抽出には加圧加熱装置 (三洋電機社製) をそれぞれ用いた。加熱条件の検討には、乾燥インスリーナ粉末1gを、4°C、80°Cの蒸留水200mLで30分または120°Cで20分浸漬抽出後、濾過したそれぞれの抽出液をInN4, InN80, InN120, 焙煎インスリーナ粉末1gを、同様に処理したものをそれぞれInR4, InR80, InR120とした。インスリーナ粉末10gを200mLの蒸留水で80°C 30分間抽出した抽出液、焙煎インスリーナ粉末10gを200mLの蒸留水で120°C 20分間加圧加熱抽出した抽出液を濾過したそれぞれの抽出液をInNE, InRE, 120°Cでの抽出液をさらに酢酸エチルにて分配抽出し、得た酢酸エチル抽出物をInREAとし、IC₅₀の測定と *in vivo* の試験に供した。

2. α -グルコシダーゼ阻害活性測定方法

α -グルコシダーゼ (SIGMA社製, 125 units/mg, 酵母由来) 阻害活性は、前報⁴⁾にしたがって測定した。すなわち、2% マルトース溶液1mLに試料を1mL添加し、37°Cで5分間保温後 α -グルコシダーゼ10 μ L (15 units) を加え37°Cで120分間反応させた。試料溶液の代わりに蒸留水を加えたものを対照とした。いずれの場合も反応液のpHは5.6であり同一であった。1 unitは、37°C1分間にマルトース1 μ molからグルコース2 μ molを生成する酵素量とした。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。加熱

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: research@tamanoi.co.jp)

¹ タマノイ酢株式会社中央研究所 (639-1038 奈良県大和郡山市西町 100)

² 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科 (663-8558 兵庫県西宮市池開町 6-46)

条件検討には、酵素阻害率(%)を、成分検討には酵素を50%阻害するときの乾燥インスリーナ粉末の濃度(mg/mL) IC_{50} を阻害活性の指標とした。

3. 実験動物および飼育方法

4週齢のSprague-Dawley系雄性ラット(Jcl;SD, 日本クレア(株))を購入し、室温 $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm7\%$ 、1日12時間の明暗サイクル(明期8:00-20:00)の条件下で飼育した。固形飼料(MF;オリエンタル酵母工業(株))および水は自由に与え、3週間予備飼育後、実験に供した。

4. 採血方法および血糖測定方法

門脈への門脈血採取用カテーテル留置および胃への試料注入用カテーテルの留置は、既報⁹⁾にしたがって行った。胃および門脈にカテーテルを留置したラットは、無作為抽出にて6匹ずつ3群に分け、ステンレス製代謝ケージ内で24時間個別に飼育し、固形飼料MFおよび水は自由に与えた。これらのラットは16時間絶食後、最も一般的な糖質として15%スクロース溶液を11.25 mL/kg/hの速度で120分間胃に持続投与した後、試料を試料注入用カテーテルより単回胃内投与し、その後10分おきに180分まで門脈カテーテルより門脈血0.05 mLを採取し、血漿とした。血漿中グルコース濃度はグルコースCIIテストワコー(和光純薬工業(株))を用いて測定した。

阻害作用の持続時間は試料投与後各時間の門脈血中グルコース濃度を投与前の門脈血グルコース濃度とBonferroni/Dunnの多重比較検定で比較し、有意差が認められる時間帯とし、作用強度は試料投与前のグルコース濃度と投与後最も低値を示したグルコース濃度の差として表した。

5. 統計処理

実験データはすべて平均値±標準誤差で表した。各群間の有意差検定には、StatView J4.1を用いた。

実験結果

1. インスリーナ葉調製条件の検討

インスリーナ粉末および焙煎インスリーナ粉末を4, 80, 120°Cの各温度の蒸留水で抽出した抽出液の α -グルコシダーゼ阻害活性を測定し、Table 1に示した。インスリーナ葉を焙煎し抽出温度を高くすると阻害活性の

Table 1 Comparison of α -glucosidase inhibitory activity of Insulina extracts prepared from various treatments.

Sample	Roasting (140°C, 10 min)	Water- extraction condition	Inhibitory activity (%)
InN80	—	80°C, 30 min	1
InR80	+	80°C, 30 min	21
InR120	—	120°C, 20 min	22
InR120	+	120°C, 20 min	70
InN4	—	4°C, 30 min	0
InR4	+	4°C, 30 min	2

Each Insulina leave (1 g) sample was extracted with distilled water (200 mL). Inhibitory activity was determined by adding 1 mL extracted sample solution to 1 mL of 2% maltose solution.

上昇が認められた。

2. α -グルコシダーゼ阻害活性成分

インスリーナ葉を140°C、10分間焙煎し120°C、20分加圧加熱抽出した抽出液(InRE)の IC_{50} は2.75 mg/mLであった。これは、前報⁹⁾で報告した抽出液(InNE)の IC_{50} の9分の1であり、活性としては9倍に上昇した(Table 2)。さらに、InREを酢酸エチルで分配したところ、酢酸エチル層(InREA)に強い α -グルコシダーゼ阻害活性成分が移行した。

3. 動物実験

15%スクロース溶液を11.25 mL/kg/hの速度で胃に持続投与すると、投与開始約60分後に門脈血中グルコース濃度は一定になったので、投与開始120分後のラットに、InNE、InREを投与し、それぞれの門脈血漿中グルコース濃度変化を比較した。各抽出液は、20倍に減圧濃縮したものを3 mL/kg投与した。さらに、 α -グルコシダーゼ阻害活性成分が移行したInREA (48 mg/kg)についても試験した。

その結果、焙煎をし120°C 20分間加圧加熱抽出した抽出液(InRE)は、前報⁹⁾で血糖上昇抑制効果を示した未焙煎葉を80°Cで30分間抽出した抽出液(InNE)に比べ強い血糖上昇抑制効果を示した。 α -グルコシダーゼ阻害活性成分が移行した酢酸エチル層(InREA)においては、さらに血糖上昇抑制効果が増した(Figure 1)。

Table 2 Inhibitory effect of α -glucosidase by Insulina extracts.

Sample	Roasting	Water-extraction condition	Ethylacetate extraction	Yield (%)	IC_{50} (mg/mL)
InNE	—	80°C, 30 min	—	5.5	24.90
InRE	+	120°C, 20 min	—	27.2	2.75
InREA	+	120°C, 20 min	+	2.9	0.045

Inhibitory effect of Insulina extract was determined adding 1 mL extracted sample solution to 1 mL of 2% maltose solution. α -glucosidase inhibitory activity expressed as IC_{50} . IC_{50} , concentration of Insulina leaves required to inhibit 50% of the α -glucosidase; InNE, hot water (80°C) extract of Insulina leaves (10 g); InRE, hot water (120°C) extract of Insulina leaves (10 g) after roasting; InREA, ethyl acetate extract of InRE.

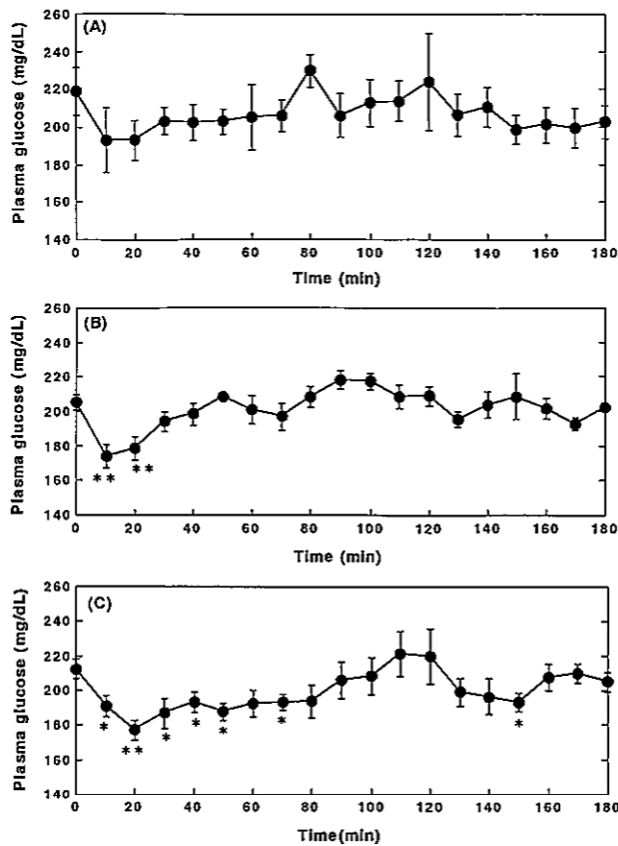


Figure 1 Changes in portal plasma glucose concentration after administration of Insulina extracts (A, InNE; B, InRE; C, InREA) during continuous intragastric infusion of sucrose.

Rats received a continuous intragastric infusion (11.25 mL/kg/h) of 15% sucrose solution. After the portal plasma glucose concentration had become constant, Insulina extract was administered. Each point represents mean $\pm$ SE. Significant values are indicated by asterisks: * p <0.05 and ** p <0.01 versus 0 min in each group.

考 察

一般にお茶や生薬などの成分抽出を行う場合、熱をかけた場合とかけない場合ではその抽出エキスの成分は変化する⁶⁾。そこで、インスリーナ葉の抽出液の α -グルコシダーゼ阻害活性を上昇させるために、葉の焙煎の有無、抽出温度について *in vitro* 実験系で検討した。低温での抽出では α -グルコシダーゼ阻害活性はみられなかったが、熱水抽出によって α -グルコシダーゼ阻害活性が上昇し、焙煎処理によってさらに活性が高まった。また *in vivo* 実験系においても、焙煎・加圧加熱抽出によって血糖上昇抑制効果が増した。このことから、インスリーナの α -グルコシダーゼ阻害活性上昇の要因は加熱と焙煎であることが示唆された。

日本茶では、冷水で抽出したものに活性が強いといわれ、その成分は複合多糖成分であることが報告されてい

る⁶⁾。よって、インスリーナの活性成分は日本茶のそれとはまったく違うと考えられる。

加熱によって α -グルコシダーゼ阻害活性が上昇した理由には、さらに活性成分が抽出されたか、活性成分が変化した、それとも α -グルコシダーゼ阻害活性成分を妨害していた物質が変性した等が考えられる。 α -グルコシダーゼ阻害活性成分は、酢酸エチル層に分配されたので、疎水性の強い物質であることが推察される。今後、上昇した α -グルコシダーゼ阻害活性成分を明らかにしていく必要がある。

一般に、 α -グルコシダーゼ阻害活性の評価は *in vitro* および *in vivo* で行われている⁴⁾⁷⁻⁹⁾が、いずれの場合でも血糖上昇抑制の度合いをみた阻害強度だけが評価されていて、作用持続時間の評価はできない。特に、昨今の血糖値管理において、作用持続時間の評価は必要な項目になると考えられる。今回、*in vivo* の評価に用いた門脈カテーテル留置法による試験は作用持続時間を評価できることから、糖の吸収を遅らせる効果をみるには最適である¹⁰⁾¹¹⁾。この門脈血を測定する方法によって、加熱と焙煎が有効であるとする *in vitro* の結果が *in vivo* においても反映された。

糖尿病に対する長期投与による効果は前報⁴⁾において明らかにしているが、インスリーナ葉の糖尿病に対する作用すべてを腸管における糖吸収抑制作用のみで説明することはできないため、この他にも未知の作用が隠されていると考えられる。今後、 α -グルコシダーゼ阻害活性成分を明らかにするとともに、それ以外の作用機序にも注目して詳細な研究を行う必要があろう。

文 献

- 1) 橋本 梧郎 (1996) ブラジル産薬用植物事典, p. 1221. アボック社, 鎌倉.
- 2) Garcia MD, Quilez AM, Saenz MT, Martinez-Dominguez ME, Puerta R de la (2000) Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 71: 395-400.
- 3) Saenz MT, Garcia MD, Quilez AM, Ahumada MC (2000) Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Phytother Res* 14: 552-4.
- 4) 森 強士, 西川 泰, 高田曜子, 檜内賀子, 石原伸浩 (2001) インスリーナの抗糖尿病作用—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—. *日本栄養・食糧学会誌* 54, 197-203.
- 5) 松浦寿喜, 施 紅雲, 作道忠義, 土生充美, 市川富夫 (1996) ラット門脈カテーテル留置法による消化吸収機能の評価法の開発. *消化と吸収* 19, 56-60.
- 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) 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.
 - 8) 下田博司, 川守秀輔, 河原有三 (1998) スリランカ有用植物サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) 水抽出物のラットおよびヒトの食後過血糖に及ぼす作用. 日本栄養・食糧学会誌 51, 279-87.
 - 9) 鈴木裕子, 林 和彦, 坂根 巖, 角田隆巳 (2001) バナバ (*Lagerstroemia speciosa* L.) 葉抽出物のラットにおける食後血糖上昇抑制作用およびその作用様式. 日本栄養・食糧学会誌 54, 131-7.
 - 10) 松浦寿喜, 市川富夫 (1997) ラット門脈血中グルコース濃度の変化を指標としたD-キシロースの α -グルコシダーゼ阻害作用の評価. 日本栄養・食糧学会誌 50, 363-8.
 - 11) 松浦寿喜, 堀名恵美, 岸本三香子, 市川富夫 (2001) ラットにおける各種糖質の α -グルコシダーゼ活性阻害持続時間の比較. 日本栄養・食糧学会誌 54, 155-60.

J Jpn Soc Nutr Food Sci 56 : 375-378 (2003)

α -Glucosidase Inhibitory Activity of Insulina Leaf Extracts

Yasushi Nishikawa,^{*,1} Noriko Kashiuchi,¹ Yoko Takata,¹ Kazuo Uenakai,¹
Megumi Horina,² and Toshiki Matsuura²

(Received September 24, 2002; Accepted July 28, 2003)

Summary: Insulina (*Cissus sicyoides* L.) has been used as a folk medicine for diabetes and hypertension in Brazil. To clarify the physiological function of Insulina that suppresses the elevation of portal glucose levels, various treatment methods were examined using α -glucosidase inhibitory activity as an *in vitro* index. Insulina leaf extract showed inhibition of α -glucosidase activity after extraction with hot water, and the inhibition was strengthened by additional roasting treatment before heat extraction. Furthermore, the duration and intensity of the α -glucosidase inhibitory activity of Insulina extracts administered to unrestrained, unanesthetized rats with portal vein cannulae were examined. Under continuous intragastric sucrose infusion, Insulina extracts suppressed the elevation of portal glucose levels and extended the duration of the inhibitory effects achieved by roasting and heating treatment. These results suggest that Insulina extract might be useful for prevention of diabetes, at least through the α -glucosidase inhibitory activity that is increased by roasting and heating.

Key words: *Cissus sicyoides*, α -glucosidase, prevention of diabetes, portal cannulation, extraction

* Corresponding author (E-mail: research@tamanoi.co.jp)

¹ Research Center, Tamanoi Vinegar Co., Ltd., 100 Nishi-machi, Yamatokoriyama, Nara 639-1038, Japan

² Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University, 6-46 Ikebiraki-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8558, Japan