

日本栄養・食糧学会誌

Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science

Vol.51 5 1998

219-53



社団法人 日本栄養・食糧学会

建帛社の新刊専門書

KENPAKUSHA

〒112-0011 東京都文京区千石4-2-15

☎03(3944)2611 FAX03(3946)4377

価格は税別本体価格

日本栄養・食糧学会 監修 学会大会シンポジウムに基づき編集

世界の食事指針の動向

坂本元子・木村修一・五十嵐 脩 共編 A5/164頁 本体 2,300円

*新しい食事指針の動き/FBDGに関するWHO・FAOの指針/アメリカの新食事指針作成の背景と普及/アジア諸国のFBDGの現状/日本の食生活指針の評価とこれから/世界各国の食事指針ほか

栄養学と成人病

吉村 学・清野 裕・糸川嘉則 共編

各成人病の栄養指導を記述。疾病ごとにその病態、栄養療法の意義、食事療法の実際に分けて解説。

A5/272頁 本体 4,000円

フリーラジカルと疾病予防

吉川敏一・五十嵐 脩・糸川嘉則 共編

フリーラジカルの発生、反応、調節機構の詳細を明らかにし、疾病の予防に役立つように解説した。

A5/200頁 本体 2,900円

分子栄養学概論

田中武彦・野口 忠・武藤泰敏 共編

栄養学への分子生物学的方法の導入を試みる分子栄養学の現状と将来についてをまとめた一冊。

A5/288頁 本体 4,200円

英和・和英

好評既刊 日本栄養・食糧学会創立50周年記念出版

栄養・食糧学用語集

日本栄養・食糧学会 編

B6/612頁 本体 3,800円

*栄養学・食糧学とその周辺の領域に関する用語13,500余語を英和編・和英編それぞれに収録。食品成分表記載の学名はすべて収載した。英論文の翻訳、執筆に十分な内容。見出し語の注記なども豊富。

最新刊 (社)日本家政学会創立50周年記念出版

日本人の生活 —50年の軌跡と21世紀への展望—

(社)日本家政学会 編 B5/494頁 本体 12,000円

*第1編・論集(50余名執筆)、第2編・年表、日本人の生活—50年の歩み—、第3編・資料、データに見る日本人の生活の3部構成。日本家政学会が創立50周年を記念して、戦後の生活と新世紀への展望をまとめる。

健康・栄養選書

栄養所要量・基準量と食生活ガイドライン

小林修平 編著

A5/320頁 本体 4,700円

*各国の栄養所要量と食生活ガイドラインについて、最新の資料から現状を分析し、今後のあり方を展望。

東南アジア植物性食品図鑑

菅原龍幸 編集代表

B5/152頁 本体 7,500円

*インドネシア、タイを中心に食用とする植物約160種、発酵食品9種をカラー写真と共に英・和文で解説。

Present Knowledge in Nutrition

最新栄養学 第7版

—専門領域の 木村修一・小林修平 翻訳監修

最新情報— B5/658頁 本体 14,000円

好評既刊

建帛社のホームページ新規開設! <http://www.kenpakusha.co.jp> [ご注文もできます]

本研究を遂行するに当り、カボス果汁粕をご供与いただきました八鹿酒造(株)専務取締役の善光則之氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生統計協会(編)(1997) 国民衛生の動向, 厚生指針・臨時増刊, Vol 44, p. 48-61. 厚生統計協会, 東京.
- 2) 望月 聡, 山元亜弥子, 高橋美香 (1996) カボスがラットの血清および肝臓コレステロールレベルに及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌 49, 331-6.
- 3) 望月 聡, 山元亜弥子, 高橋美香 (1996) カボス果汁の沈澱画分がラットのコレステロール代謝に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌 49, 337-41.
- 4) Prosky L, Asp NG, Furda I, DeVries JW, Schweizer TF, Harland BF (1984) Determination of total dietary fiber in foods, food products, and total diets—Interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 67: 1044-52.
- 5) Hatch FT, Lee RS (1968) Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* 6: 1-68.
- 6) Lusk LT, Walker LF, Dubien LH, Getz GS (1979) Isolation and partial characterization of high-density lipoprotein HDL₁ from rat plasma by gradient centrifugation. *Biochem J* 183: 83-90.
- 7) Mahley RW, Holcombe KS (1977) Alterations of the plasma lipoproteins and apoproteins following cholesterol feeding in the rat. *J Lipid Res* 18: 314-24.
- 8) Laurell CB (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose-gel containing antibodies. *Anal Biochem* 15: 45-52.
- 9) Ogawa H, Shiota C, Nishikawa T, Fukushima S, Sasagawa S (1986) Age-related changes in serum concentrations of apolipoproteins A-I, E and A-IV

in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 4 (Suppl. 3): s429-31.

- 10) Folch J, Lee M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- 11) Ogishima T, Okuda K (1986) An improved method for assay of cholesterol 7 α -hydroxylase activity. *Anal Biochem* 158: 228-32.
- 12) Einarsson K, Benthin L, Ewerth S, Hellers G, Stahlberg D, Angelin B (1989) Studies on acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity in human liver microsomes. *J Lipid Res* 30: 739-46.
- 13) Yamori Y, Horie R, Ohtaka M, Nara Y, Fukase M (1976) Effect of hypercholesterolemic diet on the incidence of cerebrovascular and myocardial lesions in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 3 (Suppl.): 205-8.
- 14) Quarfordt SH, Jain RS, Jakoi L, Robinson S, Shelburne F (1978) The heterogeneity of rat high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 83: 786-93.
- 15) Dallinga-Thie GM, Groot PHE, Von Tol A (1985) Distribution of apolipoprotein A-IV among lipoprotein subclasses in rat serum. *J Lipid Res* 26: 970-6.
- 16) Lasser NL, Roheim PS, Edelstein D, Eder HA (1973) Serum lipoproteins of normal and cholesterol-fed rats. *J Lipid Res* 14: 1-18.
- 17) Myant NB, Mitropoulos KA (1977) Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res* 18: 135-53.
- 18) Goodman DS, Deykin D, Shiratori T (1964) The formation of cholesterol esters with rat liver enzymes. *J Biol Chem* 239: 1335-45.

(1998年4月27日受理)

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

下田 博 司, 川 守 秀 輔, 河 原 有 三

森下仁丹株式会社マーケティング開発本部

Effects of an Aqueous Extract of *Salacia reticulata*, a Useful Plant in Sri Lanka, on Postprandial Hyperglycemia in Rats and Humans

Hiroshi SHIMODA, Shusuke KAWAMORI and Yuzou KAWAHARA

Department of Marketing and Development, Morishita Jintan Co., Ltd.,
Chuoh-ku, Osaka 540-8566

J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci., 51, 279~287 (1998)

Salacia reticulata is a plant commonly used in Sri Lanka for the prevention of hyperglycemia. The inhibitory effects of an aqueous extract from the stem of *Salacia reticulata* Wight (SRE) (Celastraceae) on postprandial hyperglycemia in rats and humans were investigated. SRE dose-dependently suppressed elevation of the serum glucose level induced by sucrose, maltose and α -starch, but not by glucose or lactose. The suppressive effect of SRE was more potent against sucrose-induced hyperglycemia than against hyperglycemia induced by the other sugars. In addition, we investigated the effects of SRE on activities of various glucosidases and α -amylase. The results showed that SRE strongly inhibited the activities of α -glucosidases prepared from yeast and rat jejunum (IC₅₀: 5 and 8 μ g/mL, respectively). SRE also inhibited the activity of α -amylase (IC₅₀: 35 μ g/mL), but not that of β -glucosidase. The relative inhibitory effects of SRE against partially purified α -glucosidases from rat jejunum showed the order: sucrose=ismaltase (IC₅₀: 15 μ g/mL, respectively) > maltase (IC₅₀: 70 μ g/mL). Moreover, in a sucrose tolerance test performed on human volunteers, 5 min pretreatment with SRE (200 mg) prior to sucrose (50 g) loading significantly suppressed postprandial hyperglycemia. These results demonstrate that, based on its inhibition of α -glucosidases and α -amylase, SRE has anti-hyperglycemic activity, and may be a useful natural material for the prevention and therapy of diabetes.

Key words *Salacia reticulata*, postprandial hyperglycemia, α -glucosidase inhibitor, rat, oral sugar tolerance test.

(Received May 19, 1998)

サラシア・レティキュラータ(*Salacia reticulata* Wight, 以下サラシア)は、スリランカに自生するニシキギ科(Celastraceae)のツル性樹木で、その基原植物としては、島中央部の山間部に生育する *S. reticulata* と、熱帯雨林に自生する *S. reticulata* var. *diandra* の2種類の存在が、報告されている¹⁾。古来サラシアの樹皮は、スリランカの降雨量の少ない一部の地域において、湯水により塩分濃度が上昇した井戸水の飲用が原因で引き起こされる腎障害を予防する目的で、薬草茶として飲用されてき

た。また今日、サラシアの根皮や樹皮は、糖尿病を予防する効能をもった食材として、ハーブティー等に使用される他、市場ではその幹を加工して作ったコップや瓶が売られており、これらに水を入れ、日常の飲用水として使用することで、含有成分が徐々に溶け出し、血糖値を下降させる作用があるといわれている。さらに、インドやスリランカの医学療法であるアユルヴェーダにおいても、糖尿病患者の喉の渇きを鎮める目的で、その根の浸出液が使用されている。一方、サラシアの化学的研究に関しては、アントシアニン、カテキン、フェノール化合物、キノン、マンギフェリン(mangiferin)、グッタペ

ルカなどの植物の普遍成分の他に, *S. reticulata* var. *diandra* について, 樹皮や根皮よりフリードオレアナン (*fried oleanane*) 型トリテルペンが¹¹⁾, また根皮よりキノンメチド (quinonemethide) トリテルペンが報告されている¹²⁾。一方, 生理活性に関する研究では, 根皮の熱水抽出液が高用量で, 正常ラットに対して血糖低下作用を³⁾, また, ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットに対して, 熱水抽出物 5 g/kg の投与で同様の作用を示すことが報告されている⁹⁾。さらに最近, Yoshikawa *et al.* によって, サラシアのメタノール抽出物の水溶性分画より, チオ糖骨格を有する二糖類水解酵素阻害成分 salacinol が, 新規に構造決定されている⁷⁾。今回著者らは, 現地でハーブとして食用に供されるサラシアの一連の血糖降下作用に着目し, サラシアより抽出した水エキス (以下 SRE) の血糖抑制作用の作用特性, および糖質の消化に関与する酵素に対する阻害作用について検討を行い, さらにヒトにおける食後の過血糖状態に対する作用についても評価を行ったので報告する。

実験動物および材料

1. 実験動物

Wistar 系雄性ラットを紀和実験動物(株) (和歌山) より購入し, 1~3 日間, 室温 20~24°C, 明暗サイクル 12 時間の環境で予備飼育後, 実験に使用した。糖質負荷試験には, 体重 120~150 g のラットを, α -グルコシダーゼの調製には 200~300 g のラットを使用した。飼料は MF (オリエンタル酵母(株)) を, 飲用水は水道水を自由摂取させた。

2. 実験材料

2.1 サラシア水抽出物 (SRE) スリランカより購入した乾燥サラシア (*Salacia reticulata* Wight) の幹部を粉碎し, 3 倍量の水を加えて浸漬後, 80°C で 3 時間加熱抽出を行った。抽出物を温時濾別後, 残渣に 2.5 および 2 倍量の水を順次加えて同様の操作でさらに 2 回抽出を行った後, 濾液を合わせ 40°C 以下の減圧下で濃縮乾固を行った。得られた水抽出物の収率は 6.9% であった。

2.2 ラット空腸由来 α -グルコシダーゼ *p*-nitrophenyl D-glucopyranoside を基質とした酵素阻害試験に使用した粗 α -グルコシダーゼは, 以下の手順で調製した。ラットをエーテル麻酔により安楽死させた後, 空腸部をトライツの靱帯から下方へ 20 cm にわたって摘出した。切開した空腸内部を冷生理食塩水で洗浄後, 粘膜をスライドガラスのエッジを用いてこそぎとり, 4 倍量の 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて, 氷冷しながらテフロンホモジナイザーを用いて微細化した。これを遠心分離 ($\times 9,000 g$, 4°C, 15 min) して得た上清を, 粗 α -グルコシダーゼとして, 酵素阻害試験に供するまで

-40°C で保存した。

また, ショ糖や麦芽糖などを基質とした酵素阻害試験に使用した部分精製 α -グルコシダーゼは, Kessler *et al.*⁹⁾ の方法に準じて調製した。すなわち, 前述の方法に従って採取した空腸粘膜に, 50 mM マンニトール含有 2 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.1) を加えて, 氷冷しながらホモジネートした。ここに, 塩化カルシウムを 10 mM になるように添加し, 4°C で 15 分放置後, 遠心分離 ($\times 3,000 g$, 4°C, 15 min) を行った。得られた上清を, さらに遠心分離 ($\times 27,000 g$, 4°C, 30 min) を行った後, 沈澱部を 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁した。このようにして得られた部分精製 α -グルコシダーゼは, Lowly 法でタンパク量を測定した後, 500 μg protein/mL になるように希釈して, 試験に供するまで -40°C で保存した。

実験方法

1. 各種糖質負荷後の血糖上昇抑制作用の検討

20~24 時間絶食したラットから無麻酔拘束下で採血を行った後, 5% (w/v) アラビアガム (和光純薬工業社) で懸濁した SRE を経口投与し, その 30 分後に各種糖質 (ショ糖: 1 または 4 g/kg, 麦芽糖: 0.5 または 2 g/kg, α 化デンプン: 1 g/kg, ブドウ糖: 0.5 g/kg, 乳糖: 1 g/kg) を経口投与した。その後経時的に, 無麻酔拘束下で頸静脈より採血を行って血清を分離し, 血中グルコース濃度 (血糖値) をムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ法 (グルコース CII テストワコー, 和光純薬工業社) を用いて測定した。

2. 血糖上昇抑制作用の持続性および投与時期の違いによる効果に及ぼす影響の検討

SRE の血糖上昇抑制作用の持続性の検討は, ショ糖 (1 g/kg) を用いて実施した。ラットを無麻酔拘束下で採血を行った後, SRE (100~400 mg/kg) を単回投与し, 0.5, 2.5, および 5.5 時間後にそれぞれショ糖を投与し, おのおの 30 分後に採血を行って血糖値を測定した。

また, 投与時期の違いによる効果に及ぼす影響は, SRE 200 mg/kg を, ショ糖 (1 g/kg) 投与と同時に, 5 分前, および 30 分前にそれぞれ投与して, ショ糖投与 30 分後の血糖値を測定した。

3. 各種グルコシダーゼおよび α -アミラーゼ阻害試験

α -グルコシダーゼに対する阻害活性は, 以下の手順で検討した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 段階希釈したサンプル溶液 (100 μL) と, 0.01 M *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (50 μL , 和光純薬工業社) を混合し, 37°C で 5 分間プレインキュベーションを行った。ここに, あらかじめ反応生成物 *p*-nitrophenol の吸光度と酵素活

性 (pH 7.0, 37°C の条件下で, 1 分間に 1 μM の *p*-nitrophenol を生成する酵素量を 1 unit とする) をプロットした検量線より, 0.02 unit/mL (400 nm における吸光度: 0.66) に調製した α -グルコシダーゼ (50 μL) を添加し, 15 分間反応させた。次に, 0.2 M Na₂CO₃ (200 μL) を添加して反応停止後, 400 nm における吸光度を測定し, 対照群との比較で酵素阻害率を算出した。なお, α -グルコシダーゼは前述のラット空腸由来の粗 α -グルコシダーゼの他に, 酵母由来 (和光純薬工業社) の酵素も同様の方法で調製して使用した。また, アーモンド由来 β -グルコシダーゼ (オリエンタル酵母社) に対する阻害活性試験は, 緩衝液の pH を 5.0 に, また基質を *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (和光純薬工業社) に変え, 同条件下で酵素濃度を 0.02 unit/mL に調製し, α -グルコシダーゼ阻害試験と同様の操作を行った。

α -アミラーゼ阻害試験は, 酵素としてヒト唾液由来 α -アミラーゼを, また基質に carboxymethyl amylose を用いた市販のアミラーゼ測定キット (アミラーゼ B-テストワコー, 和光純薬工業社) を利用して測定した。これらの酵素阻害試験においては, 比較対照としてボグリボース (voglibose, 武田薬品工業社) を使用した。

4. ラット空腸由来 α -グルコシダーゼ阻害試験

0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) で 2 段階希釈したサンプル溶液 50 μL と, 基質 (ショ糖: 74 mM, 麦芽糖: 74 mM, イソマルトース: 7.4 mM) 100 μL を混合し, 37°C で 3 分間プレインキュベーションを行った。ここに, 緩衝液で希釈したラット空腸由来部分精製 α -グルコシダーゼ (スクラーゼ: 250 μg protein/mL, マルターゼおよびイソマルターゼ: 50 μg protein/mL) 50 μL を添加し, 30 分間反応させた。次に, 沸騰水浴中に試験管を 2 分間浸漬して反応停止後, 試験管を氷冷し, 生成したグルコース量をムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ法を用いて測定した。酵素阻害率は, 対照群との比較で算出した。酵素反応速度定数 (V_{max} , K_m) および SRE の阻害定数 (K_i) 算出の際には, SRE の濃度をスクラーゼの場合 20 $\mu g/mL$, マルターゼ: 120 $\mu g/mL$, イソマルターゼ: 28 $\mu g/mL$ とし, 基質濃度をショ糖および麦芽糖の場合 9.2~74.0 mM, イソマルトースの場合は 0.92~7.40 mM に変化させて, Lineweaver-Burk プロットを作製後, 各定数を算出した。

5. ヒトにおける血糖上昇抑制作用の検討

22~35 歳の男子健康人ボランティア 7 名を, 試験前日より 10~12 時間絶食させ, 第 1 日目にショ糖源として上白糖 (大日本製糖社) 50 g を 100 mL の水とともに服用させ, その 30, 60 および 120 分後に, 簡易血糖測定器 (タイド™, バイエル・三共社) に付属の穿刺器 (ユニフレクター用ランセット II) を用いて, 手指より採血を行い, 前

述の簡易血糖測定器を用いて血糖値を測定した。第 2 日目および 3 日目には, SRE 100 および 200 mg を, それぞれ上白糖服用の 5 分前に 100 mL の水とともに服用し, その後, 第 1 日目と同様に経時的に採血を行い, 血糖値を測定した。なお, 試験はヘルシンキ宣言の精神に則って実施した。

6. 統計処理

有意差検定には市販のソフトウェア「Super ANOVA Version I. 11」を使用して, 分散分析の後, Dunnett の多重比較検定⁹⁾¹⁰⁾を用いて評価を行った。

実験結果

1. SRE の各種糖質負荷後の血糖上昇抑制作用

各実験において, サンプル投与前の血糖値は 64.0~90.5 mg/dL で, 群間に有意差は認められなかった。また, 採血時の拘束ストレスによる血糖値の変動は軽微であった。Table 1 に示すように, ショ糖 1 g/kg (ブドウ糖換算で 0.5 g) を負荷したラットの血糖値は 30 分後にピークに達した。この上昇に対して, SRE は 25~200 mg/kg の投与で対照群に対して用量依存的な抑制作用を示した。次に 4 g/kg のショ糖負荷においては, 血糖値は 2 時間後まで高値 (約 200 mg/dL) を示し, その後徐々に低下した。これに対して SRE は, 100~200 mg/kg の投与により, ショ糖負荷の 2 時間後まで有意な抑制作用を示した。しかし 100 mg/kg 投与群の 3, 4 時間目における血糖値は, 2 時間目と比較して高い値であった。さらに 400 mg/kg の投与では, 長時間作用が持続したが, 4 時間目における血糖値は, 正常群の血糖値 (89.9 mg/dL) に対して, より低値 (66.4 mg/dL) を示した。

Table 2 には, 麦芽糖負荷による血糖上昇に対する SRE の作用を示した。ショ糖 1 g/kg 負荷時と同様に, 血糖値は麦芽糖 (0.5 g/kg) 負荷の 30 分後にピークに達し, その後速やかに低下した。これに対し SRE は, 50~400 mg/kg の投与で, 糖負荷 30 分後の血糖値を用量依存的に抑制した。その効果はショ糖 (1 g/kg) 負荷時の, およそ 1/2 の強度であった。また, 2 g/kg 負荷においては, 血糖値は 1 時間後にピークに達し, その後速やかに低下した。これに対して SRE は, 0.5~1 時間後の血糖値を 100~400 mg/kg の投与で用量依存的に抑制した。またショ糖 (4 g/kg) 負荷時にみられた 4 時間目における低血糖は観察されなかった。

さらに SRE は, 多糖類の α 化デンプン (1 g/kg) によって惹起された, 投与 1 時間後をピークとする血糖上昇に対しても, Table 3 に示すように 200 mg/kg 以上の投与で明らかな抑制作用を示した。

一方, Table 4 および Table 5 に示したように, ブドウ糖や乳糖による血糖値の上昇に対しては, 400 mg/kg

Table 1. Effects of an aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE) on hyperglycemia in sucrose-loaded rats. Sucrose (1 g/kg)

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)			
		0.5 h	1	2	
Control	—	3	178.2±3.7	163.8±7.8	130.6±2.1
Normal	—	3	76.6±0.9**	85.4±9.1**	86.8±8.4**
SRE	10	3	167.1±10.1	163.0±11.6	125.0±5.0
	25	3	139.3±7.3**	152.1±6.6	123.9±4.1
	50	3	127.7±4.1**	147.3±0.7	128.3±8.1
	100	3	116.1±1.2**	125.4±2.1	114.6±2.8
	200	3	96.6±2.5**	112.1±3.4*	99.9±7.0

Sucrose (4 g/kg)

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)					
		0.5 h	1	2	3	4	
Control	—	6	203.1±13.6	216.4±9.9	197.4±6.0	145.0±1.7	152.2±11.6
Normal	—	6	78.9±3.0**	88.2±3.6**	78.8±2.3**	88.8±3.0**	89.9±1.3**
SRE	100	6	144.3±5.4**	151.9±13.6**	131.4±9.2**	165.8±15.8	158.0±26.5
	200	6	121.4±11.6**	153.1±6.7**	131.4±9.2**	132.2±6.1	125.7±7.7
	400	6	99.5±5.0**	121.1±7.3**	105.3±5.1**	103.2±3.0*	66.4±3.7**

Male Wistar rats were fasted for 20–24 h, and SRE was administered orally. Thirty minutes thereafter, sucrose solution was loaded. Blood samples were collected intermittently from cervical vein. Each value represents the mean with the SE. Asterisks denote significant differences from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respectively.

Table 2. Effects of an aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE) on hyperglycemia in maltose-loaded rats. Maltose (0.5 g/kg)

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)			
		0.5 h	1	2	
Control	—	5	152.1±1.9	130.4±8.4	101.2±4.3
Normal	—	5	75.3±5.2**	87.8±6.1**	83.2±3.8*
SRE	10	6	148.3±6.0	122.9±6.7	105.2±2.8
	25	4	146.2±7.1	137.7±10.3	106.8±12.0
	50	4	132.0±3.1*	124.0±5.7	98.2±4.2
	100	4	128.7±8.0**	124.6±4.8	110.0±5.3
	200	4	110.3±6.0**	120.2±12.2	106.0±8.6
	400	4	87.8±4.0**	100.5±3.7*	96.7±2.5

Maltose (2 g/kg)

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)					
		0.5 h	1	2	3	4	
Control	—	4	208.0±11.2	218.9±16.5	140.3±8.0	130.1±10.6	114.9±13.8
Normal	—	4	78.2±5.9**	90.3±5.7**	96.0±6.1**	98.1±4.0*	90.0±3.1
SRE	100	4	156.6±6.9**	184.3±9.7*	141.0±7.0	122.9±5.0	109.1±5.1
	200	4	138.9±10.6**	167.1±12.3*	154.7±2.2	144.0±3.8	128.7±4.9
	400	4	121.4±9.4**	132.0±9.8**	124.4±0.6	130.0±11.9	121.3±5.4

Male Wistar rats were fasted for 20–24 h, and SRE was administered orally. Thirty minutes thereafter, maltose solution was loaded. Blood samples were collected intermittently from cervical vein. Each value represents the mean with the SE. Asterisks denote significant differences from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respectively.

Table 3. Effects of an aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE) on hyperglycemia in α -starch-loaded rats.

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)			
		0.5 h	1	2	
Control	—	6	169.2±5.7	175.1±10.9	127.7±5.8
Normal	—	6	82.2±4.4**	93.6±7.3**	90.2±4.7**
SRE	50	6	141.7±9.1*	146.1±6.9	120.9±3.5
	100	3	145.9±11.8	144.8±2.9	110.6±4.0
	200	4	121.1±7.6**	138.1±8.6*	116.9±8.1
	400	4	99.1±6.6**	113.8±7.3**	106.4±4.5*

Male Wistar rats were fasted for 20–24 h, and SRE was administered orally. Thirty minutes thereafter, α -starch suspension (1 g/kg) was loaded. Blood samples were collected intermittently from cervical vein. Each value represents the mean with the SE. Asterisks denote significant differences from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respectively.

Table 4. Effects of an aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE) on hyperglycemia in glucose-loaded rats.

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)			
		0.5 h	1	2	
Control	—	4	164.4±4.6	135.6±2.2	112.1±3.6
Normal	—	5	86.4±4.9**	115.2±2.5	97.2±3.5
SRE	200	5	167.4±3.3	139.9±7.0	116.8±8.1
	400	5	152.7±7.8	125.0±11.4	113.4±7.6

Male Wistar rats were fasted for 20–24 h, and SRE was administered orally. Thirty minutes thereafter, glucose solution (0.5 g/kg) was loaded. Blood samples were collected intermittently from cervical vein. Each value represents the mean with the SE. An asterisk denotes significant difference from the control, ** $p < 0.01$.

Table 5. Effects of an aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE) on hyperglycemia in lactose-loaded rats.

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)			
		0.5 h	1	2	
Control	—	5	114.6±7.1	139.0±6.7	92.9±7.2
Normal	—	5	81.1±5.8**	99.6±2.5**	95.9±5.4
SRE	200	5	116.9±4.2	150.7±4.6	100.5±3.7
	400	5	112.4±4.9	143.0±10.5	97.3±2.0

Male Wistar rats were fasted for 20–24 h, and SRE was administered orally. Thirty minutes thereafter, lactose solution (1 g/kg) was loaded. Blood samples were collected intermittently from cervical vein. Each value represents the mean with the SE. An asterisk denotes significant difference from the control, ** $p < 0.01$.

Table 6. Persistence of the anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE) in sucrose-loaded rats.

Dose (mg/kg)	n	Serum glucose level (mg/dL)			
		1 h	3	6	
Control	—	6	168.3±5.0	175.2±5.3	160.7±6.5
Normal	—	5	77.4±4.8**	75.3±2.6**	77.4±4.8**
SRE	100	5	92.4±4.0**	171.0±8.3	172.8±4.9
	200	4	88.7±12.4**	137.3±11.6**	183.4±18.6
	400	4	81.1±5.2**	107.9±9.6**	142.5±13.3

Male Wistar rats were fasted for 20–24 h, and SRE was administered orally. Sucrose solution (1 g/kg) was loaded at 0.5, 2.5, and 5.5 h following administration of SRE. Blood samples were collected from cervical vein at 1, 3 and 6 h following administration of SRE. Each value represents the mean with the SE. An asterisk denotes significant difference from the control, ** $p < 0.01$.

の投与でも血糖値に影響を及ぼさなかった。

2. SREの血糖上昇抑制作用の持続性および投与時期の違いによる効果に及ぼす影響

Table 6に、ショ糖 (1 g/kg) を経時的 (SRE 投与の0.5, 2.5, 5.5 時間後) に負荷し、おのおの30分後の血糖値を測定することで検討したSREの血糖上昇抑制作用の持続性を示した。その結果、SRE100 mg/kgの作用は3時間後に消失した。一方、200 mg/kg 投与では、3時間後においても約40%の抑制作用を示したが、6時間後にはその作用は消失した。さらに400 mg/kgの投与では、6時間後においても有意ではないものの約20%の抑制作用を示した。なお、サンプル投与前の血糖値は70.1~88.1 mg/dLであり、各群間に有意差は認められなかった。Table 7にはSRE (200 mg/kg) の投与時期

Table 7. The influence of the anti-hyperglycemic activity of *Salacia reticulata* (SRE) on the differential medication time before sucrose loading.

	n	The time of SRE administration (min, before sucrose loading)	Serum glucose level (mg/dL)
Control	4	—	162.0±7.7
Normal	3	—	69.5±4.4**
SRE (200 mg/kg)	4	0	81.9±2.7**
	4	5	89.1±2.1**
	4	30	87.6±5.0**

Male Wistar rats were fasted for 20-24 h, and SRE (200 mg/kg) were administered orally at various times before loading of sucrose solution (1 g/kg). Blood samples were collected every 30 min thereafter from cervical vein. Each value represents the mean with the SE. An asterisk denotes significant difference from the control, ***p*<0.01.

Table 8. Inhibitory effects of aqueous extract from *Salacia reticulata* (SRE) and voglibose on various glucosidases and an α -amylase.

Enzymes	Source	IC ₅₀ (μ g/ml)	
		SRE	Voglibose
α -glucosidase	Yeast	5	300<
α -glucosidase	Rat jejunum	8	0.3
β -glucosidase	Almond	500<	500<
α -amylase	Human salivary	35	600
Sucrase (62.5 μ g protein/ml)	Rat jejunum	15	0.03
Maltase (12.5 μ g protein/ml)	Rat jejunum	70	0.35
Isomaltase (12.5 μ g protein/ml)	Rat jejunum	15	0.70

の違いによる、ショ糖 (1 g/kg) 負荷30分後の血糖値に及ぼす影響を示した。その結果SREは、ショ糖負荷の30分前から、同時投与に至るまでのいずれの投与時期においてもほぼ同等の血糖上昇抑制作用を示した。

3. SREの各種グルコシダーゼおよび α -アミラーゼに対する阻害作用

Table 8にSREとボグリボースの、*p*-nitrophenyl D-glucopyranosideを基質として検討したグルコシダーゼに対する阻害作用を示した。SREは、酵母およびラット空腸由来の α -グルコシダーゼに対して阻害作用を示し、IC₅₀はそれぞれ5, 8 μ g/mLと、とくに酵母由来の α -グルコシダーゼに対して強い阻害活性を示した。一方ボグリボースは酵母由来の α -グルコシダーゼに対して阻害作用を示さず、ラット空腸由来の α -グルコシダーゼに対してのみ強い阻害作用を示した (IC₅₀: 0.3 μ g/mL)。次にアーモンドを起源とする β -グルコシダーゼに対しては、SRE、ボグリボースともに阻害活性を示さなかった。さらに、SREは唾液由来の α -アミラーゼに対して抑制作用を示し (IC₅₀: 35 μ g/mL)、その効果はボグリボース (IC₅₀: 600 μ g/mL) と比較して強いものであった。

4. SREのラット空腸由来各種 α -グルコシダーゼに対する阻害作用

Table 8に、各種二糖類を基質として測定したSREとボグリボースの、ラット空腸由来部分精製 α -グルコシダーゼに対する阻害作用を示した。SREは、スクラーゼ、イソマルターゼに対してとくに強い阻害作用を示し (IC₅₀: 15 μ g/mL)、マルターゼに対しても、やや効力は劣るが阻害活性を示した (IC₅₀: 70 μ g/mL)。一方、ボグリボースも各 α -グルコシダーゼに対して低濃度で抑制作用を示し、とくにスクラーゼに対して強い抑制作用 (IC₅₀: 0.03 μ g/mL) を示した。

Fig. 1には、各基質濃度を変化させて作製したSREのLineweaver-Burk (L-B) プロットを示した。L-Bプロットの形状より、SREはスクラーゼに対して、明らか

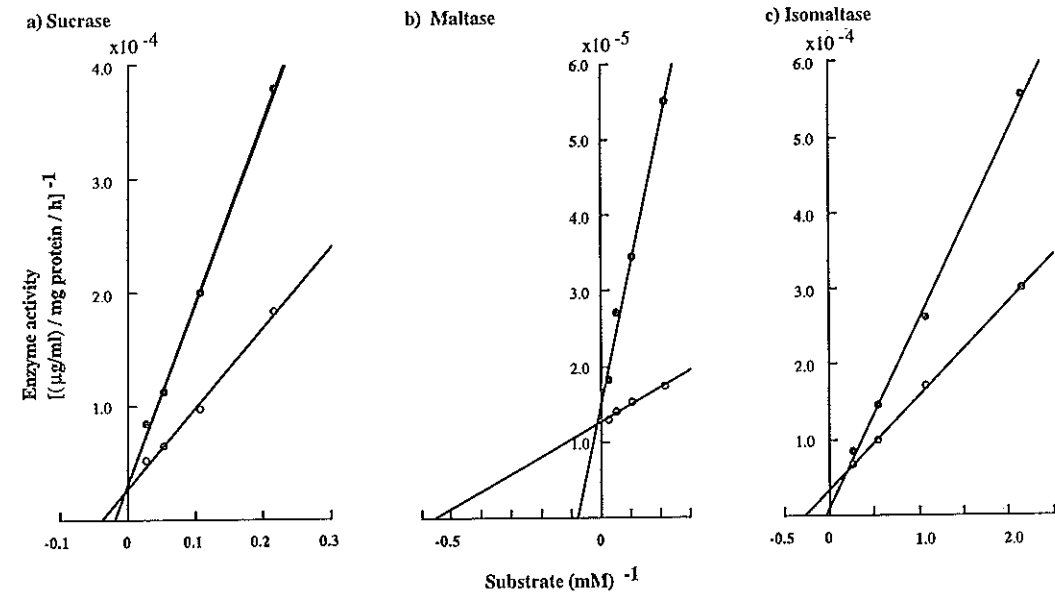


Fig. 1. Lineweaver-Burk plot of partially purified α -glucosidases prepared from rat jejunum with or without aqueous extract from *Salacia reticulata* (SRE, 5 μ g/ml for sucrase, 30 μ g/ml for maltase, 7 μ g/ml for isomaltase).

The substrate concentration were sucrose and maltose : 4.6-37.0 mM, isomaltose : 0.46-3.70 mM, respectively. Symbols represent \circ : control, and \bullet : SRE, respectively.

Table 9. Kinetic constants (V_{max} , K_m) of partially purified α -glucosidases prepared from rat jejunum, and inhibitor constants (K_i) of aqueous extract of *Salacia reticulata* (SRE).

Substrate	V_{max} (mM/mg protein/h)	K_m (mM)	K_i of SRE (mg/ml)
Sucrose	200	25.4	5.7
Maltose	441	1.8	5.0
Isomaltose	165	3.7	1.0

な拮抗阻害を示すことが明らかとなった。また、マルターゼやイソマルターゼに対しては、controlとの交点が、Y軸よりわずかにずれることから拮抗阻害にその他の阻害様式が複合した混合型であることが判明した。Table 9には、L-Bプロットより算出した、ラット空腸由来部分精製 α -グルコシダーゼの酵素反応速度定数 (V_{max} および K_m) とSREの阻害定数 (K_i) を示した。スクラーゼの K_m 値は、マルターゼやイソマルターゼのそれと比べて高く、スクロースに対する親和性は、他の酵素と比較すると低いものであった。一方、 K_i 値よりSREのイソマルターゼに対する親和性は最も高く、スクラーゼやマルターゼに対する親和性はイソマルターゼの

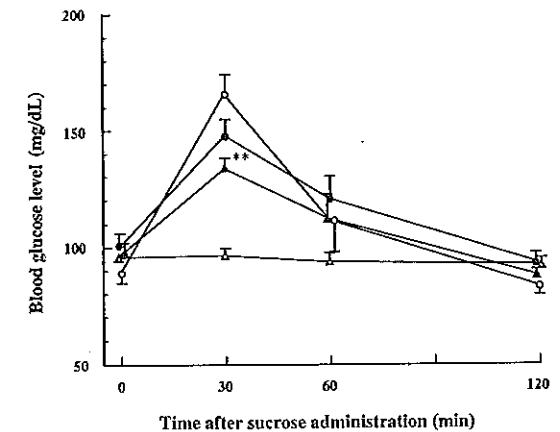


Fig. 2. Effects of an aqueous extract from *Salacia reticulata* (SRE) on the human sucrose tolerance test.

Male human volunteers were fasted for 10-12 h, and SRE was administered orally. Five minutes thereafter, sucrose solution (50 g/person) were loaded. Blood samples were collected intermittently by needle-prick the finger. Symbols represent \circ : control, Δ : normal, \bullet : SRE 100 mg/person, \blacktriangle : SRE 200 mg/person, respectively. Each point represents the mean with the SE from 7 human volunteers. An asterisk denotes significant difference from the control, ***p*<0.01.

1/5~1/6であった。

5. ヒトにおける血糖上昇抑制作用

Fig. 2に示したように、SREはショ糖源摂取5分前の服用により、30分後の血糖値の上昇を、100 mgで抑制傾向を示すとともに、200 mgでは有意な抑制作用を示した。なお試験実施中あるいは試験終了後において、下痢、腹部膨満感、放屁回数の増加などの一般症状は認められなかった。

考 察

ヒトが摂取する糖質の中で、最も多いものはデンプンで55%、次いでショ糖が35%といわれており、麦芽糖や果糖は5%以下とされている¹¹⁾。今回著者らは、SREの血糖上昇抑制作用の特性を明らかにするため、まず最初にラットに種々の糖質を経口投与した際の血糖上昇に及ぼす作用を検討した。SREは α -1,4結合を有する二糖類の、ショ糖や麦芽糖による血糖上昇に対して、用量依存的な抑制効果を示した。また、 α 化デンプンによる血糖上昇に対しても、麦芽糖負荷時と近似した抑制パターンを示し、50 mg/kg以上の投与量で血糖上昇を用量依存的に抑制した。これらに加えSRE (100 mg/kg) 投与群において、ショ糖4 g/kg 負荷の3~4時間後にみられた血糖値の上昇の結果から、SREはヒトが栄養源とするおもな糖質の吸収を、抑制または遅延させる作用を有することが明らかとなった。続いてSREの、二糖類に対する血糖上昇抑制作用の効力を比較する目的で、ショ糖と麦芽糖の負荷量を変えて、過血糖抑制作用を比較したところ、ブドウ糖換算で0.5 g (ショ糖1 g, 麦芽糖0.5 g) の負荷では、ショ糖による過血糖抑制作用は、麦芽糖に対する作用の約2倍であることが明らかとなった。しかし、ブドウ糖換算で2 g (ショ糖4 g, 麦芽糖2 g) に相当する高用量を負荷した場合、両者の差はほとんどみられなくなった。さらに、ショ糖 (1 g) を用いて、過血糖抑制作用の持続性や有効な投与時期について検討したところ、SREの投与量 (100~400 mg/kg) に応じて作用の持続時間は1~6時間と延長し、また、ショ糖摂取の30分前から直前に投与することで、十分な効果が得られることが明らかとなった。しかし一方で、単糖のブドウ糖や、 β -1,4結合を有する乳糖に対しては、全く抑制作用を示さなかったことから、SREは臨床で使用されている糖尿病治療薬であるアカルボース¹²⁾¹³⁾ やボグリボース¹⁴⁾¹⁵⁾ と同様の α -グルコシダーゼ阻害作用に基づく血糖上昇抑制作用を有する可能性が示唆された。

ショ糖や麦芽糖は、それぞれスクラーゼやマルターゼにより加水分解された後、ブドウ糖の形で吸収される。またデンプンも、唾液や唾液に含まれる α -アミラーゼによりランダムに α 結合を切断され、麦芽糖と限外デ

キストリンにまで低分子化された後、マルターゼの作用を受けてブドウ糖にまで変換され、小腸粘膜より吸収される。そこでSREの、糖質の加水分解に関与する酵素に対する阻害作用を、比較対照にボグリボースを用いて検討した。その結果、ボグリボースがとくにラット空腸由来の α -グルコシダーゼに対して、特異的な阻害作用を示したのに対し、SREは酵母、ラット空腸由来の双方の α -グルコシダーゼに対して、阻害作用を示した。この結果より、SREの α -グルコシダーゼ阻害作用の酵素特異性は、ボグリボースより低かったものの、SREは天然物の粗抽出物でありながら、非常に強い酵素阻害作用 (IC₅₀ 値10 μ g/mL以下) を有することが明らかとなった。さらにボグリボースが非常に弱い阻害作用しか示さなかった α -アミラーゼにしても、SREは強い抑制作用を有することが判明した。次に、SREの α -グルコシダーゼ阻害作用の基質特異性を明らかにするため、ラット空腸腸子縁膜由来の部分精製 α -グルコシダーゼについて、各種基質を用いた酵素阻害試験を行った。その結果、実験間で基質濃度および酵素濃度が異なることから、厳密な比較はできないものの、SREはスクラーゼをはじめとするおもな α -グルコシダーゼに対して阻害作用を示し、中でもスクラーゼとイソマルターゼに対して、とくに強い阻害活性を示すことが明らかとなった。また、各酵素に対する阻害形式は、L-Bプロットより、拮抗阻害または拮抗阻害と他の阻害形式との混合型を示し、イソマルターゼに対する親和性が最も高いことが明らかとなった。以上の結果より、SREは糖質の消化吸収に関与するアミラーゼや種々の α -グルコシダーゼを強力に阻害することで、血糖上昇を抑制することが判明した。これら *in vivo* および *in vitro* の成績に加えて、健康人ボランティアに対して行った耐糖能試験の結果より、SREは天然物の抽出物でありながら、ごく少量で糖質の消化に関与する酵素を阻害することで、食後の過血糖を抑制することが明らかとなった。以上の知見より、サラシアを新規な食品素材として、糖尿病食などに添加応用することで、過血糖のコントロールに有用な素材になりうるものと考えられる。

要 約

スリランカに自生するニシキギ科の植物サラシア・レティキュラータ (*Salacia reticulata*) より得た水抽出物 (SRE) の、食後の過血糖に及ぼす作用を、ラットおよびヒトボランティアで検討した。SREはショ糖、麦芽糖および α 化デンプン負荷によるラットの血糖値の上昇を用量依存的に抑制した。しかしながら、ブドウ糖や乳糖による血糖上昇に対しては、抑制作用を示さなかった。ショ糖に対する血糖上昇抑制作用は、他の麦芽糖や α 化

デンプンより強く、ショ糖負荷直前の投与で奏効し、投与量の増加に伴い作用の持続時間も延長した。

次に、各種グルコシダーゼおよび α -アミラーゼに対する阻害活性について検討を行ったところ、SREは酵母およびラット空腸由来の α -グルコシダーゼに対して強い阻害作用を示すと同時に、 α -アミラーゼに対しても阻害作用を示した。一方、 β -グルコシダーゼの活性には影響を及ぼさなかった。SREのラット空腸由来各種 α -グルコシダーゼに対する阻害活性の強度は、スクラーゼ=イソマルターゼ>マルターゼの順であった。さらに、健康人ボランティアにショ糖 (50 g) を負荷した耐糖能試験において、SREはショ糖負荷5分前200 mgの服用で、30分後の血糖値を有意に抑制した。

以上の結果より、SREは α -グルコシダーゼおよび α -アミラーゼ阻害作用に基づく過血糖抑制作用を有し、ヒトにおいても少量で食後の過血糖を抑制することが明らかとなり、糖尿病患者の食事療法に活用できる有望な食品素材であると考えられる。

文 献

- 1) Kumar V, Wazeer MIM, Wijeratne DBT (1985) 21 α , 26-Dihydroxy-D : A-friedooleanan-3-one from *Salacia reticulata* var. *diandra* (Celastraceae). *Phytochemistry* 24 : 2067-9.
- 2) Gunatilaka AAL, Dhanabalasingham B, Karunaratne V (1993) Studies on terpenoids and steroids. Part 27. Structure of a D : A-Friedo-oleanane triterpenoid from *Salacia reticulata* and revision of the structures of kokoonol and kokzeylanol series of triterpenoids. *Tetrahedron* 49 : 10397-404.
- 3) Tezuka Y, Kikuchi T (1994) Studies on terpenoids and steroids, 25. Complete ¹H- and ¹³C-NMR spectral assignments of salaciquinone, a new 7-oxo-quinonemethide dinortriterpenoid. *J Nat Prod* 57 : 270-6.
- 4) Dhanabalasingham B, Karunaratne V, Tezuka Y, Kikuchi T, Gunatilaka AAL (1996) Biogenetically important quinonemethides and other triterpenoid constituents of *Salacia reticulata*. *Phytochemistry* 42 : 1377-85.
- 5) Karunanayake EH, Welihinda J, Sirimanne SR, Sinnadorai G (1984) Oral hypoglycaemic activity of some medicinal plants of Sri Lanka. *J Ethnopharmacol* 11 : 223-31.
- 6) Serasinghe S, Serasinghe P, Yamazaki H, Nishiguchi K, Hombhanje F, Nakanishi S, Sawa K, Hattori M, Namba T (1990) Oral hypoglycaemic effects of *Salacia reticulata* in the streptozotocin induced diabetic rat. *Phytotherapy Res* 4 : 205-6.
- 7) Yoshikawa M, Murakami T, Shimada H, Matsuda H, Yamahara J, Tanabe G, Muraoka O (1997) Salacinol, potent antidiabetic principle with unique thiosugar sulfonium sulfate structure from the Ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata* in Sri Lanka and India. *Tetrahedron Lett.* 38 : 8367-70.
- 8) Kessler M, Acuto O, Storelli C, Murer H, Müller M, Semenza G (1978) A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. *Biochim Biophys Acta* 506 : 136-54.
- 9) Dunnett CW (1955) A multiple comparison procedure for comparing several means with a control. *J Am Stat Assoc* 50 : 1096-121.
- 10) Dunnett CW (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20 : 482-91.
- 11) 藤原豊博 (1993) 新たな治療概念を導入した糖尿病薬アカルボース (グルコバイ®) の基礎と臨床。基礎と臨床 27, 6337-51.
- 12) Krause HP, Keup U, Puls W (1982) Inhibition of disaccharide digestion in rats intestine by the α -glucosidase inhibitor acarbose (BAY g 5421). *Digestion* 23 : 232-8.
- 13) Radziuk J, Kemmer F, Morishima T, Berchtold P, Vranic M (1984) The effects of an alpha-glucosidase hydrolase inhibitor on glycemia and the absorption of sucrose in man determined using a tracer method. *Diabetes* 33 : 207-13.
- 14) Horii S (1993) Valiolamine and its N-substituted derivatives, α -D-glucosidase inhibitors : from validamycins to voglibose (AO-128), an antidiabetic agents. *J Takeda Res Lab* 52 : 1-26.
- 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高血糖抑制作用。日本栄養・食糧学会誌 45, 27-31.

(1998年5月19日受理)