

ラット小腸におけるギムネマ酸およびナツメ
葉抽出物のブドウ糖吸収抑制効果

鳥取大学医学部生理学第一教室 (主任 日地康武教授)

鳥取大学医学部神経精神医学教室 (主任 挾間秀文教授)

吉 岡 伸 一

Inhibitory effects of gymnemic acid and an
extract from the leaves of *Zizyphus jujuba* on
glucose absorption in the rat small intestine

Shin-ichi YOSHIOKA

Department of Physiology and Department of Neuropsychiatry,
Tottori University School of Medicine, Yonago 683, Japan

ABSTRACT

Gymnemic acid (GA), a triterpene glycoside extracted from the leaves of *Gymnema sylvestre*, has been known to suppress selectively the sweet taste sensation in man. An extract from the leaves of *Zizyphus jujuba* (Zj-E) like GA has been also reported to possess the inhibitory activity for sweetness. In this study, effects of these taste inhibitors on glucose absorption in the small intestine of the rats were investigated using a measurement of glucose-evoked transmural potential difference (Δ PD), a circulating method and the oral sucrose tolerance test.

Addition of GA caused a decrease of Δ PD for glucose application, while an increased transmural potential difference (PD) was observed when more than 0.25 mg/ml of GA alone was perfused. During the whole period of the PD changes by GA, suppression of Δ PD for glucose was markedly observed, even after washing out GA from the lumen. The results of the circulating method showed that the inhibitory potency of GA was dose-dependent and reversible. Under the conditions that active glucose absorption was almost completely inhibited by 1 mM of phlorizin, the effect of GA was hardly observed. This suggests that GA may have little influence on passive glucose transport. In addition, suppression of post-prandial hyperglycemia was examined by the oral sucrose tolerance test to know how inhibitory effect of GA on intestinal glucose absorption could reflect to blood glucose levels. It was found that rising blood glucose levels after oral administration of sucrose (2 g/kg body weight) were significantly suppressed with GA orally administered. Similarly, it was demonstrated that Zj-E caused a decrease of Δ PD for glucose and inhibited intestinal glucose absorption.

The present results indicate that both GA and Zj-E inhibit intestinal glucose absorption as well as the sweet taste sensation. This fact would be interesting in view of the discrimina-

...tive mechanism of sugars.

糖吸収抑制物質は、腸管における糖輸送機構の解明に大きな役割を果たしてきた。例えば、フェノール配糖体のフロリジンは糖の能動輸送に対する拮抗的阻害剤として、広く利用されている¹⁾³⁾¹¹⁾¹²⁾²⁰⁾³²⁾。一方、腸管からの糖吸収を糖吸収抑制物質によって抑制あるいは遅延させることは、急激な血糖値上昇を抑えて膵臓からのインスリン分泌を軽減させることになる。このようなことはまた持続的な高血糖状態に伴って生じる各種の代謝障害を回避することにもつながり、糖尿病や肥満などの疾患に対する治療的、あるいは予防的な面から重要な意義があるものと考えられる。

小腸において単糖は、濃度勾配に従った受動拡散の他に、上皮細胞の刷子縁膜に存在する糖輸送担体（以下、糖担体と略す）という特殊な蛋白質を介して吸収されることが知られている⁶⁾。糖担体には能動輸送されるブドウ糖などと結合するものと促進拡散される果糖などと結合するものの二種類が存在し¹⁶⁾、また、ブドウ糖の能動輸送は Na^+ との共輸送により作動していることが確かめられている⁶⁾¹⁶⁾³⁴⁾。ところで小腸からの糖吸収にあずかる糖担体は生体膜上での糖分子を受容識別するために生体に備わった機構の一つと考えられるが、加えて味覚においても糖を受容識別するための特殊な機構が備わっている。すなわち、舌味細胞膜上には我々が感じる四基本味のうち、糖の味においては、甘味発現に必要な甘味受容体蛋白質の存在が知られている⁷⁾。この蛋白質においては単糖以外に二糖類も認識し、さらにサッカリンなどの人工甘味料やある種のアミノ酸など多くの甘味物質を受容することで知られている。したがって味覚における糖の識別は小腸における糖担体に比べて厳密ではないと考えられているが、少なくとも生体にとってエネルギー源として重要な役割を持つブドウ糖の受容識別に関して両者はそれぞれ共通した受容機構を備えているものと推察される。

ギムネマ酸はインド産のガガイモ科植物 (*Gymnema sylvestre*) の葉から抽出されるトリテルペン配糖体の一種であるが³⁶⁾、この配糖体はヒトの味覚において甘味受容のみを選択的に抑制することで古くから知られている¹⁸⁾。この甘味受容抑制効果は、ギムネマ酸を口に含み、舌に作用させた後数十分間にわたり持続し、またサッカリンやアミノ酸の甘みをも抑制す

るとい²⁶⁾。また、クロウメモドキ科植物、ナツメ (*Zizyphus jujuba*) の葉にもギムネマ酸と同様に甘味受容抑制効果が報告されている²²⁾²⁸⁾³⁹⁾。本研究では、甘味受容抑制効果を有するギムネマ酸とナツメ葉の抽出物が、小腸における糖吸収にどのような影響を及ぼすかを調べるために、ラット小腸を用いた糖輸送電位 (ΔPD) の測定、腸管灌流法によるブドウ糖吸収実験および経口的ショ糖負荷試験を行った。

材料と実験方法

1. ギムネマ酸およびナツメ葉の活性成分の抽出

Gymnema sylvestre 葉からのギムネマ酸の抽出は、Kurihara²⁶⁾の方法に準じて行った(図1)。インドから輸入した *Gymnema sylvestre* の乾燥葉 200 g を 60°C の温水中に約 5 時間浸し、これを 4-5 回繰り返した。得られた温水抽出液を 2 N 硫酸で pH 3 に調整し、生じた沈殿物を 15,000 rpm, 15 分間遠沈して集め、水で洗浄後エタノールで 4-5 回抽出を行った。エタノール抽出液を減圧下で濃縮し、その 2 倍量のアセトンを加えた後遠沈した。上清部を減圧下で濃縮乾固し、炭酸ジエチルを加えて沸点下で数回抽出を繰り返した。その後溶媒から析出するギムネマ酸

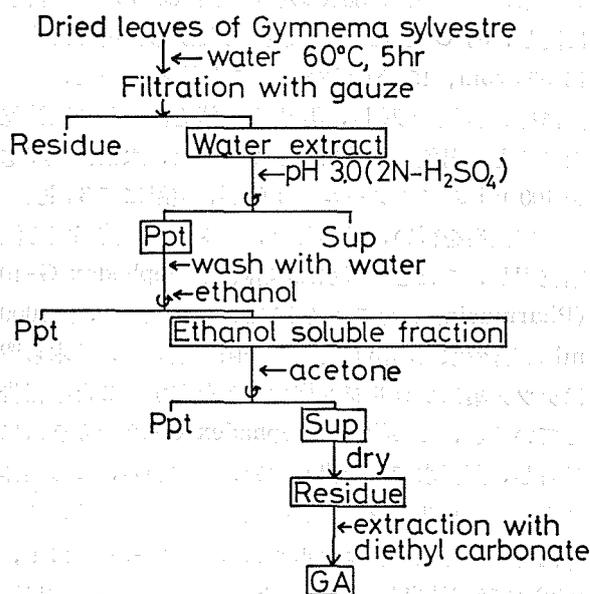


図 1. *Gymnema sylvestre* の葉からギムネマ酸 (GA) の抽出方法

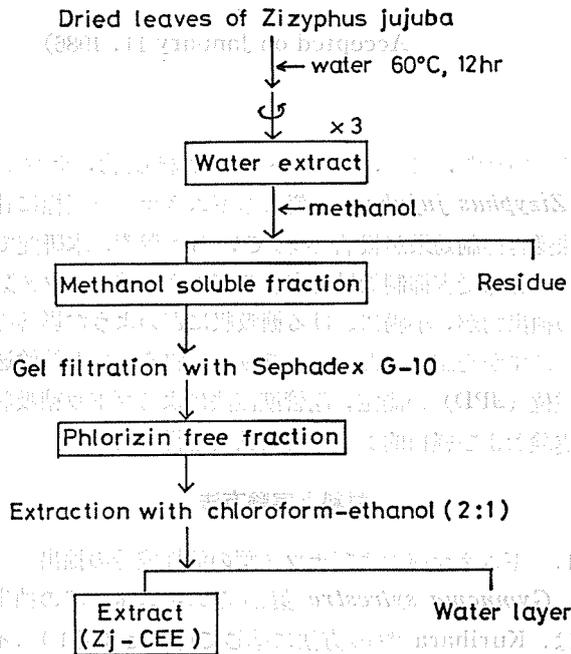


図 2. ナツメ (*Zizyphus jujuba*) の葉から甘味受容抑制成分 (Zj-CEE) の抽出方法

(GA) を集め、蒸発乾固して実験に用いた。GA の収量は乾燥葉 200 g あたり約 1.2 g であった。

ナツメ葉に存在する甘味受容抑制物質の粗抽出は、すでに Kennedy²²⁾らにより試みられている。今回の実験では彼らと異なる方法でナツメ葉からの活性成分の抽出を行った (図 2)。ナツメ葉は 5 月から 6 月にかけて、米子、松江市内で採取して温風乾燥し、保存したものを用いた。30 g の乾燥葉を 300 ml の蒸留水に浸し、60°C で 12 時間攪拌しながら抽出した後、15,000 rpm、15 分間遠沈して上清を集めた。この操作を 3 回繰り返して、集めた上清を濃縮して凍結乾燥すると黄褐色の水抽出物が得られた。水抽出物 5 g を 100 ml のメタノールで 1 時間、室温にて 3 回繰り返して抽出を行い、濾過した。メタノール抽出液を濃縮乾固し、これを蒸留水に溶解して Sephadex G-10 (Pharmacia) のカラム (5×10 cm) に通し、約 1000 ml の蒸留水で溶出してくる分画を集めた。笠木ら¹⁹⁾はナツメ葉にフロリジン様物質が存在することを報告しているが、この物質は Sephadex G-10 のカラムに吸着し、蒸留水では溶出しない。すなわち、この操作によってフロリジン様物質を除くことができる。この分画を濃縮した後クロロホルム-エタノール (2:1, v/v) で数回抽出し、クロロホルム-エタノール抽出層を濃縮乾固した。得られた黄色のクロロホルム-エタノール抽出物 (Zj-CEE) を実験に用いた。この成分

は薄層クロマトグラフィー (展開剤; クロロホルム: メタノール: 水 65:25:4, v/v) から数個の成分よりなる混合物であったが、ヒトならびにラットの味覚に対する甘味受容抑制効果の存在が報告されている³⁹⁾。

2. 糖吸収実験

実験には Wistar 系雄性ラット (体重 200-300 g) を用いた。

(1) 糖輸送電位 (ΔPD) 測定によるブドウ糖吸収実験 (図 3-A)

小腸においてブドウ糖が Na^+ 依存性に能動輸送されることにより発生する糖輸送電位 (ΔPD) の測定は、Barry⁴⁾ や Debnam⁸⁾ の方法を改良して行った。

ラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg 体重) を腹腔内投与して麻酔し、腹部を正中切開した。Treitz 靭帯から 10-20 cm 離れた小腸を選び、近位側に L 字型カニューレを挿入してペリスタポンプ (SJ-1211H, アトー) に接続し、また、そこから約 3 cm 離れた遠位側にも L 字型カニューレを挿入し、その間の小腸の血管や神経は出来るかぎりそのままに保った。そして 1 M KCl, 2% 寒天を充填したポリエチレンチューブ (外径 2 mm) からなる寒天ブリッジ電極の 1 本を近位側の L 字型カニューレに挿入し、もう 1 本を腸管の漿膜側に灌流液で湿らせた脱脂綿を介して設置した。この寒天電極を Zn-ZnSO₄ 不分極電極を通して直流増幅器 (RDH-5, 日本光電工業) に導き、ペンレコーダー (VP-6722A, 松下通信工業) に接続して腸管壁内外の電位差 (PD) を記録した。灌流液には、O₂:CO₂ 混合ガス (95%:5%, v/v) を十分に通気して pH を 7.6 付近に調整した修正 Krebs-Henseleit 液 (50 mM NaCl, 25 mM Na₂SO₄, 4.7 mM KCl, 25 mM NaHSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 0.9 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 50 mM mannitol, 以下 K.-H. 液と略す) を腸管流入部位での液温が 37°C になるように加温して用いた。

実験は、始めに K.-H. 液で腸管内を PD が安定するまで十分に洗浄した後にいった。ブドウ糖、ギムネマ酸、ナツメ葉の抽出物は、それぞれ K.-H. 液 30 ml に溶解し、小腸内を流速 4.5 ml/min で灌流して PD の変化を記録した。ブドウ糖を灌流する場合には等量の mannitol を除くことによって試験液の浸透圧が K.-H. 液と異ならないように補正した。

(2) 腸管灌流法によるブドウ糖吸収実験 (図 3-B)

ラットにペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg

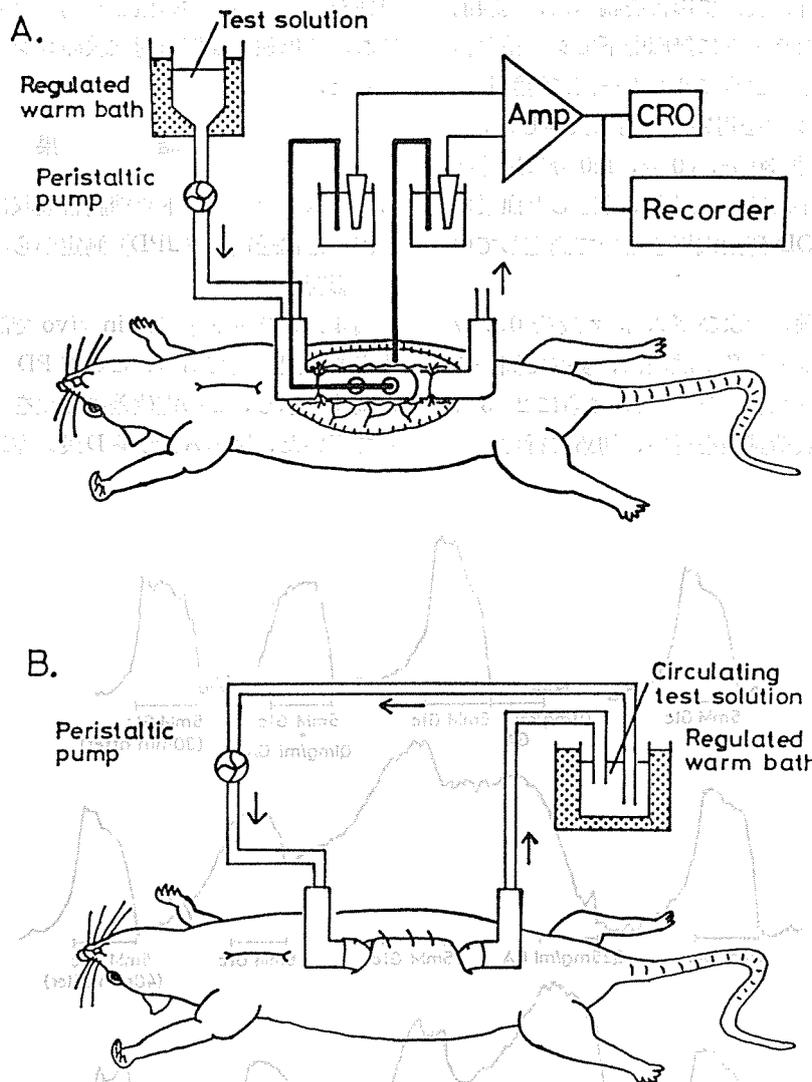


図 3. ラット小腸, in vivo, でのブドウ糖吸収実験の概略図
 A: 糖輸送電位の測定 — B: 腸管灌流法

体重)を腹腔内投与して麻酔し、腹部を正中切開した。そして Barry ら⁴⁾や川口²⁰⁾の方法に従い、Treitz 靱帯から約 2 cm 離れた部分とそこから約 25 cm の遠位側の部分にそれぞれ L 字型カニューレを挿入してペリスタポンプに接続した。灌流に用いた部分の小腸の血管や神経は出来るかぎりそのままに保った。灌流液は pH を 7.6 付近に調整した哺乳動物用リンガー液 (145.4 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2.4 mM NaHCO₃, 以下、リンガー液と略す) を用い、恒温槽で 37 °C に調整した。試験液は、ブドウ糖、ギムネマ酸、ナツメ葉の抽出物を実験直前にそれぞれリンガー液に溶解したものを用いた。

実験は、始めに腸管内容物を洗浄するためリンガー液を約 30 分間、腸管内に灌流し、その後試験液 20 ml

を 2 ml/min の流速で 60 分間、小腸内に循環灌流した。始めにブドウ糖のみを含む試験液を灌流し、コントロールとした。一匹のラットで 2-4 回、試験液を灌流する場合、1 回の灌流を終えたのち 30 分間、リンガー液で腸管内を洗浄した。試験液を灌流し始めてから 10 分毎に灌流液を 50 μl ずつ採取し、H₂O₂ 電極 (石川製作所) を用いたグルコースオキシダーゼ (GOD) 酵素電極²¹⁾により灌流液中に残存するブドウ糖濃度を測定した。

実験終了後に灌流に用いた部分の小腸を切り出してその長さを測定し、腸管からのブドウ糖吸収量をそれぞれ小腸 25 cm 当りに換算して表した。

(3) 経口的ショ糖負荷試験

ギムネマ酸については、さらに経口的ショ糖負荷試

験を行い、血糖値上昇に及ぼす影響を調べた。実験前日より一晩絶食させたラットに無麻酔下でシヨ糖負荷量が 2 g/kg 体重となるようにリンガー液に溶解した 25%シヨ糖液を胃ゾンデを用いて胃内に投与した。投与前（空腹時）、投与後 30 分、60 分、120 分に尾静脈から血液 100 μ l ずつ採取し、遠沈後、分離した血漿中のブドウ糖濃度を GOD 酵素電極を用いて測定して血糖値とした。

単独シヨ糖負荷試験、およびギムネマ酸を 0.2 g/kg 体重、添加したシヨ糖負荷試験は、すべて同一ラットを用いて 2-3 日の間隔で行った。さらに 2-3 日後に再び単独シヨ糖負荷試験を行い、初めに行なった

単独シヨ糖負荷試験の値と平均したものをそのラットにおける単独シヨ糖負荷試験のコントロールの血糖値とした。

結果

1. ギムネマ酸のブドウ糖腸管吸収に及ぼす効果

(1) 糖輸送電位 (Δ PD) 測定からみたギムネマ酸の影響

図 4 は、ラット小腸の *in vivo* で測定された PD の代表的な記録例である。ここで PD とは腸管壁内外の電位差を示し、この電位差の変化を Δ PD として区別して用いた。図の A 段から D 段の左端はコントロール

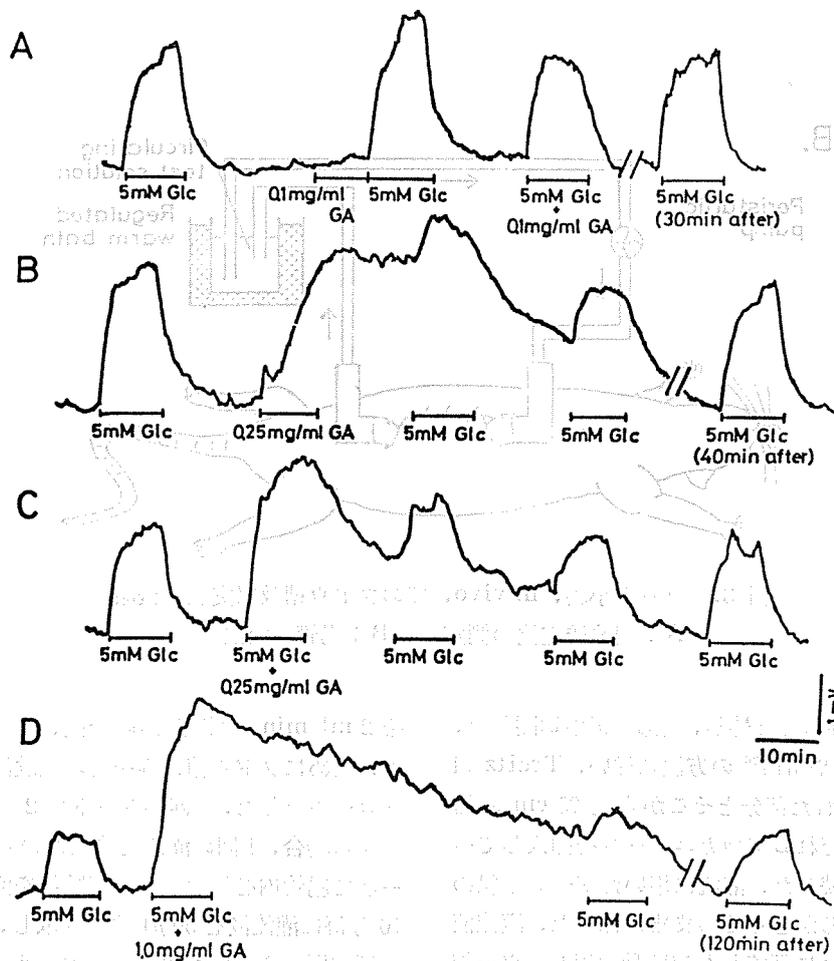


図 4. ギムネマ酸の糖輸送電位に及ぼす影響をみた記録例

ブドウ糖 (Glc) とギムネマ酸 (GA) をそれぞれ単独、あるいは混合した試験液を下線 (|—|) で示す間、腸管内に流している。腸管内外の電位差 (PD) は漿膜側が粘膜側に対してプラスの時、上向きとなるように記録している。0.1 mg/ml の濃度の GA では PD に変化がみられないが、Glc に添加すると糖輸送電位 (Δ PD) を抑制し、0.25 mg/ml 以上の GA では単独で PD の増加が生じ、GA による PD の変化が持続している間、Glc を灌流しても糖輸送電位の抑制がみられる。

として5 mM のブドウ糖による輸送電位を示してある。5 mM のブドウ糖により粘膜側を負とする1~2 mV の ΔPD が生じ、K.-H. 液で腸内を洗浄すると PD の変化はほぼ元のレベルに戻るのがわかる。そこで0.1, 0.25, 1.0 mg/ml の濃度のギムネマ酸単独、あるいはそれぞれ5 mM のブドウ糖に混じて ΔPD の変化を調べた。0.1 mg/ml のギムネマ酸の場合、それ単独では PD に変化をきたさないが、ブドウ糖に添加すると ΔPD が抑制される傾向がみられた(図4-A)。しかし0.25 mg/ml のギムネマ酸の場合、それ単独により PD が増加し(図4-B)、また、ブドウ糖に添加しても同様に PD の増加がみられた(図4-C)。そこでギムネマ酸単独による PD の変化を差し引いて考えるとすれば、ギムネマ酸をブドウ糖に添加することにより糖輸送電位が抑制されていることがわかる。さらに、0.25 mg/ml のギムネマ酸により生じた PD の変化は、K.-H. 液を灌流し洗浄してもすぐには元のレベルに戻らず、その間、ブドウ糖を灌流すると漸次減少する PD に重畳して、コントロールに比べると小さな ΔPD が発生するのがわかる。1.0 mg/ml のギムネマ酸をブドウ糖に添加した場合、PD の変化はさらに大きくなり、元のレベルに戻るのに2時間近く要した(図4-D)。図の右端に示されるように、ギムネマ酸による PD の変化がみられなくなると、ブドウ

糖による ΔPD はコントロールと同程度に回復するのがわかる。

(2) 腸管灌流法からみたギムネマ酸の影響

ギムネマ酸による糖輸送電位抑制効果が腸管からのブドウ糖吸収に実際に影響を及ぼすかどうか調べた。0.1, 0.25, 1.0 mg/ml の濃度のギムネマ酸を5 mM のブドウ糖液にそれぞれ添加し、1番目に5 mM のブドウ糖液、2番目に5 mM のブドウ糖液+ギムネマ酸、3番目と4番目に再び5 mM のブドウ糖液を小腸内に60分間ずつ灌流した。図5はそれぞれ灌流液中に残存するブドウ糖濃度の経時変化を示したものである(n=4)。1番目に5 mM のブドウ糖液を灌流した場合、始めに90 mg/100 ml のブドウ糖濃度が灌流開始60分後には35~40 mg/100 ml に減少した。ギムネマ酸を5 mM のブドウ糖液に添加すると、灌流開始60分後にはギムネマ酸の濃度に依存してブドウ糖の吸収が有意に抑制され、さらにその後灌流したギムネマ酸を含まないブドウ糖の吸収についても抑制が持続しているのがわかる。これらの結果を灌流開始60分後のブドウ糖吸収についての相対的抑制率で表したのが図6である。ギムネマ酸の濃度が高いほど抑制率は大きく、しかも、回復に時間を要することがわかる。

次に、ギムネマ酸が小腸におけるブドウ糖の拡散輸

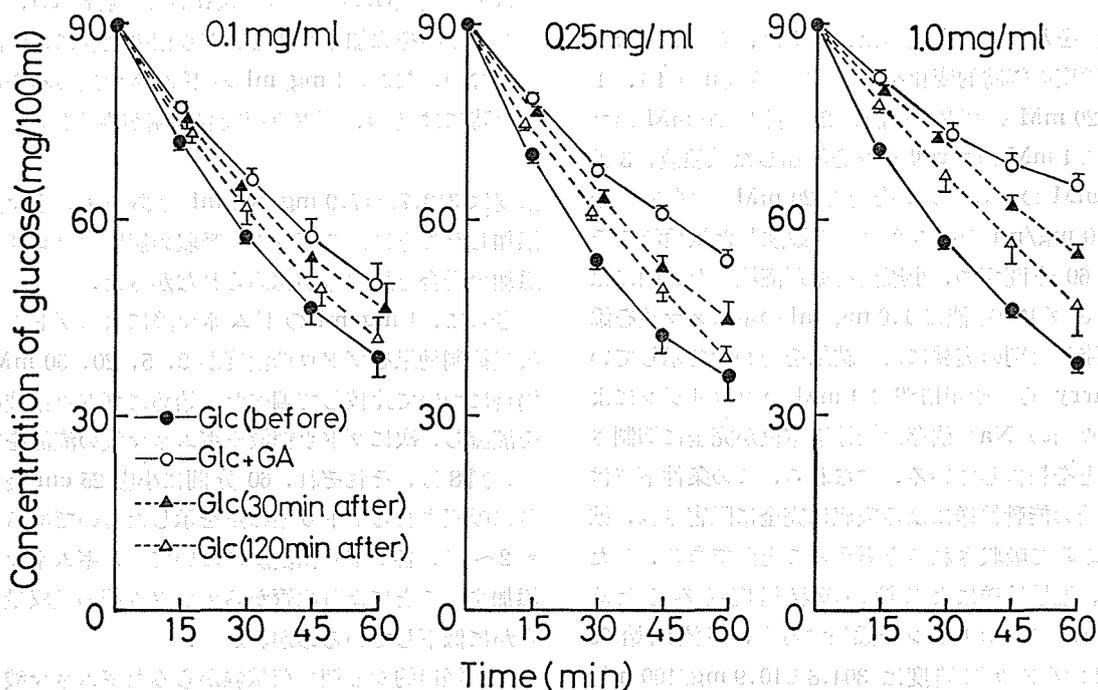


図5. 各種濃度のギムネマ酸のブドウ糖吸収に及ぼす影響

縦軸は灌流液中のブドウ糖濃度 (mean±SE, mg/100 ml), 横軸は時間経過 (分).

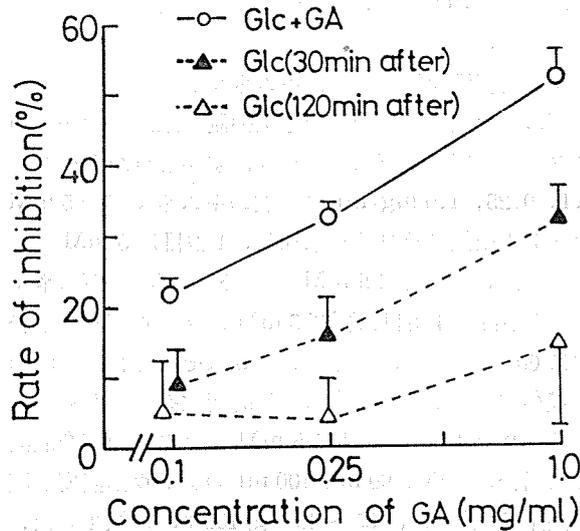


図 6. 各種濃度のギムネマ酸の 5 mM ブドウ糖吸収に及ぼす影響

図 5 に示したギムネマ酸 (GA) によるブドウ糖 (Glc) 吸収抑制効果をそれぞれ灌流開始 60 分後のブドウ糖吸収量から比較したものである。縦軸は 1 回目に灌流した 5 mM ブドウ糖 (Glc) の吸収量に対する、ギムネマ酸添加時とその後のブドウ糖吸収の相対的抑制率 (mean±SE, %), 横軸はギムネマ酸の対数濃度 (mg/ml)。ブドウ糖の吸収抑制率はギムネマ酸の濃度に依存しているが、時間経過と共に抑制率が低下することがわかる。

送に影響を及ぼすかを調べた。図 7 は、灌流液中のブドウ糖濃度の経時変化を示している (n=4)。1 番目に 20 mM のブドウ糖液, 2 番目に 20 mM のブドウ糖に 1 mM のフロリジンを添加した試験液, 3 番目に 1 mM のフロリジンを含む 20 mM のブドウ糖液に 1.0 mg/ml のギムネマ酸を添加した試験液をそれぞれ 60 分間ずつ、小腸内を循環灌流した。図には 20 mM のブドウ糖液に 1.0 mg/ml のギムネマ酸を添加し灌流した別の実験による結果を合わせて示している。Barry ら⁴⁾や川口²⁰⁾は 1 mM のフロリジンによりブドウ糖の Na⁺ 依存性糖輸送電位が完全に抑制されることを報告している。すなわち、この条件下ではブドウ糖の能動輸送による吸収は完全に阻害され、拡散輸送のみで吸収されると考えることができる。したがって、拡散輸送による糖の吸収程度をみるために、1 mM のフロリジンを添加すると、灌流開始 60 分後にはブドウ糖濃度は 304.8±10.9 mg/100 ml (mean±SD, 以下同様) となったが、これに 1 mg/ml のギムネマ酸をさらに添加した場合にもブドウ糖

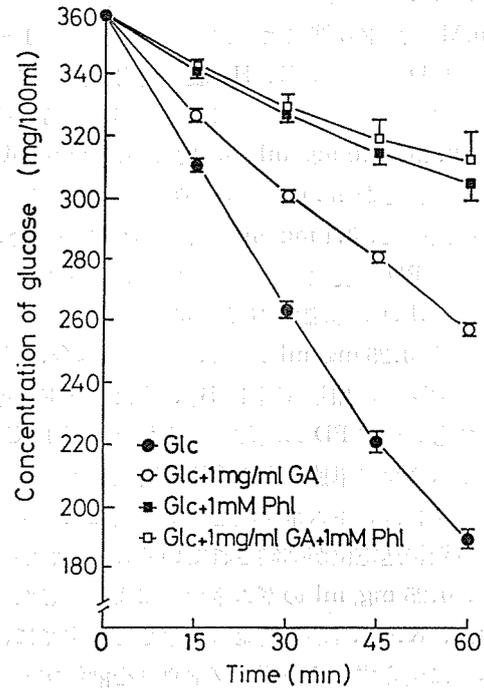


図 7. ギムネマ酸を 1 mM フロリジンに添加した時のブドウ糖吸収に及ぼす影響

縦軸は灌流液のブドウ糖濃度 (mean±SE, mg/100 ml), 横軸は時間経過 (分) を示す。20 mM ブドウ糖 (Glc) を灌流した場合のブドウ糖吸収は、1 mM フロリジン (Phl) を添加した時 (■), 顕著に抑制されるが、1 mM フロリジンを含むブドウ糖に 1 mg/ml のギムネマ酸 (GA) をさらに添加した場合 (□), フロリジンのみを添加した時とブドウ糖の吸収に差が認められない。なお、1 mg/ml のギムネマ酸のみを添加した時には (○), ブドウ糖吸収抑制がみられる。

濃度は 313.7±17.9 mg/100 ml でありギムネマ酸を添加したことによるブドウ糖吸収の影響はフロリジン添加の場合と比べ差が認められなかった。

さらに、1 mg/ml のギムネマ酸によるブドウ糖の吸収抑制効果をブドウ糖濃度が 2, 5, 20, 50 mM の場合について比較して調べた。始めにブドウ糖液のみを灌流し、次にブドウ糖液+ギムネマ酸の灌流を行った。図 8 は、それぞれ、60 分間に小腸 25 cm 長当たり吸収されるブドウ糖の量を示したものである (n=2~4)。各ブドウ糖濃度においても、ギムネマ酸を添加することにより腸管からのブドウ糖の吸収量が明らかに低下しているのがわかる。

(3) 経口的ショ糖負荷試験からみたギムネマ酸の影響

ギムネマ酸によるブドウ糖腸管吸収抑制効果が経口

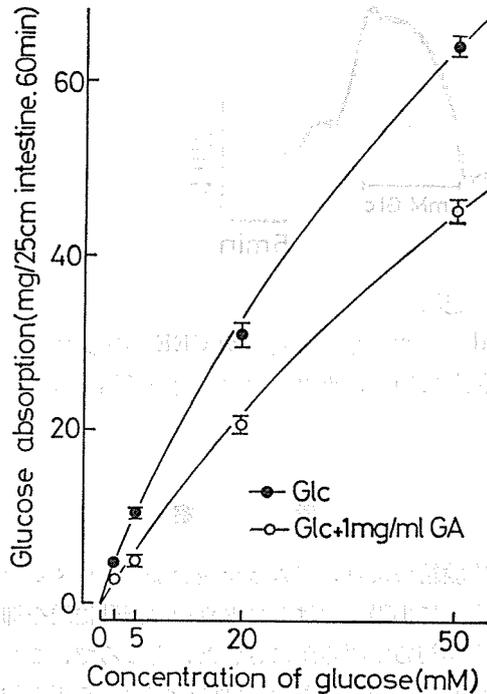


図 8. 各種濃度のブドウ糖にギムネマ酸を添加した時のブドウ糖吸収量に及ぼす影響

縦軸は 60 分間の灌流により小腸 25 cm 当たりで吸収されるブドウ糖吸収量 (mean±SE, mg/25 cm 小腸, 60 分), 横軸はブドウ糖濃度 (mM). 1.0 mg/ml のギムネマ酸 (GA) をブドウ糖 (Glc) に添加することにより, 各濃度におけるブドウ糖の吸収が抑制される。

的にショ糖を投与した場合の血糖値上昇に反映するかを調べた。図 9 は, 経口的ショ糖負荷後に空腹時より上昇した血糖値の増加分を示している (n = 4)。一晩絶食させた後のラットの空腹時血糖値は 113.2±7.7 mg/100 ml であった。単独ショ糖負荷の場合, 30 分後に空腹時血糖値より 63.7±9.2 mg/100 ml と上昇したが, 60 分後, 120 分後にはそれぞれ 51.3±5.6, 20.0±4.6 mg/100 ml と低下した。これに対してギムネマ酸をショ糖の 10 分の 1 量添加した場合, 30 分後 26.2±7.4, 60 分後 27.8±5.6 mg/100 ml と血糖値上昇は有意に抑制されたが (ともに p<0.05), 120 分後には 28.3±8.0 mg/100 ml となったがコントロールとの差を認めなかった。なお, 予備実験として, ギムネマ酸がスクラーゼ (Invertase, 生化学工業) 活性を抑制するかを調べたが, 抑制効果はみられなかった。また, 負荷試験に用いた同量 (2g/kg 体重) のギムネマ酸を単独で経口投与しても血糖値に変化を与えなかった。

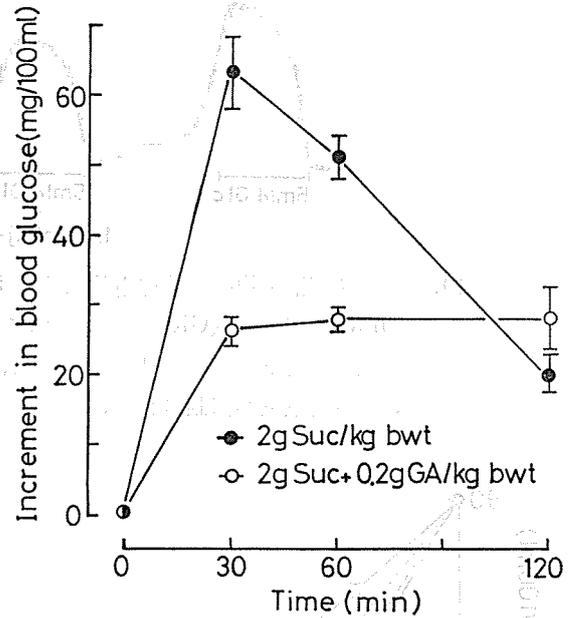


図 9. 経口的ショ糖負荷後の血糖値上昇に及ぼすギムネマ酸混合投与の影響

縦軸はショ糖負荷後における空腹時よりの血糖値上昇分 (mean±SE, mg/100 ml), 横軸は投与後の時間経過 (分). 単独ショ糖負荷試験にみられた血糖値上昇が, ギムネマ酸 (GA) を同時に投与した場合, 投与後 30 分, 60 分では抑制されている。

2. ナツメ葉の抽出物のブドウ糖腸管吸収に及ぼす効果

(1) 糖輸送電位 (ΔPD) 測定からみたナツメ葉の抽出物の影響

図 10 は, ナツメ葉の抽出物 (Zj-CEE) を 5 mM のブドウ糖に添加し, 測定した PD の記録例である。5 mM のブドウ糖を小腸内に灌流すると PD が 1.5 mV 増加した。続いて 5 mM のブドウ糖に 1.0 mg/ml のナツメ葉の抽出物を添加した場合, ΔPD は 1.1 mV とコントロールに比べ抑制された。その後再び 5 mM のブドウ糖を灌流すると 1.5 mV の ΔPD がみられ, ブドウ糖の吸収が回復していると考えられた。なお, 1.0 mg/ml のナツメ葉の抽出物単独では, ギムネマ酸の場合と異なり PD の変化は観察されなかった。

(2) 腸管灌流法からみたナツメ葉の抽出物の影響

ナツメ葉の抽出物によるブドウ糖の吸収抑制効果を腸管灌流法により調べたのが図 11 である (n = 4)。1 番目と 3 番目, 4 番目に 5 mM のブドウ糖液を, 2 番目に 1.0 mg/ml のナツメ葉の抽出物を添加した 5 mM のブドウ糖液をそれぞれ 60 分間ずつ, 小腸内に

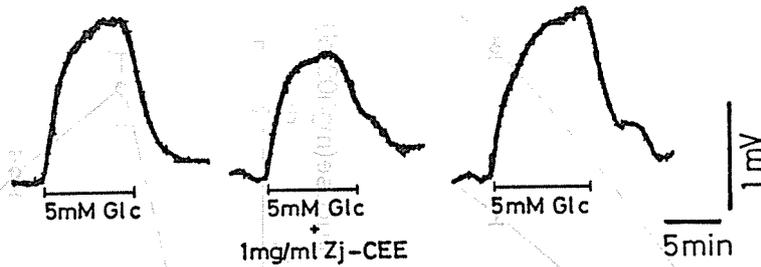


図 10. ナツメ葉抽出物の糖輸送電位に及ぼす影響をみた記録例
5mMブドウ糖 (Glc) 単独, および, 1 mg/ml のナツメ葉抽出物 (Zj-CEE) を添加した試験液を下線 (|—|) で示す間, 腸管内に流している. ナツメ葉抽出物を添加すると, 糖輸送電位が抑制される.

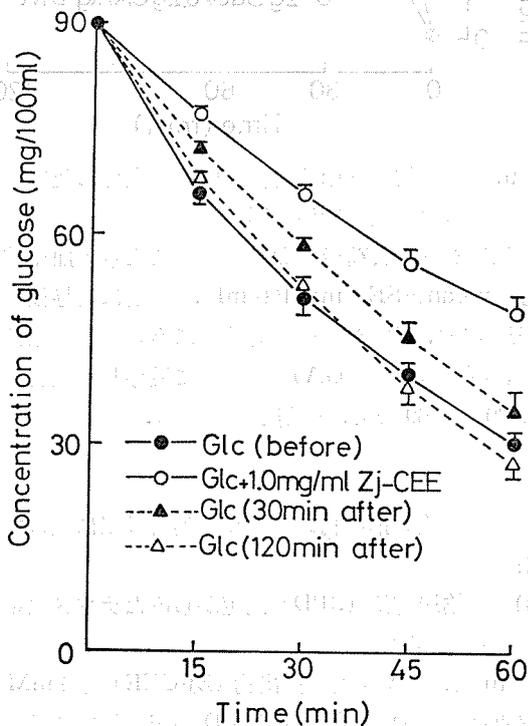


図 11. ナツメ葉抽出物の 5 mM ブドウ糖の吸収に及ぼす影響

縦軸は灌流液中のブドウ糖濃度 (mean±SE, mg/100 ml), 横軸は時間経過 (分). 始めに 5 mM ブドウ糖 (Glc) の灌流を行い, 次に 1 mg/ml のナツメ葉抽出物 (Zj-CEE) を添加したブドウ糖を, その後 30 分, 120 分後に再びブドウ糖のみを灌流している. ブドウ糖吸収がナツメ葉抽出物の添加により抑制される.

循環灌流した. ナツメ葉の抽出物を添加した場合, ブドウ糖の吸収は有意に抑制されたが ($p < 0.05$), その後, 3 番目, 4 番目に試験液を灌流したところ, 1 番目の場合とほぼ同程度のブドウ糖の吸収がみられた.

考 察

本実験結果より, ギムネマ酸およびナツメ葉の抽出物がともに小腸におけるブドウ糖の能動輸送を抑制することが初めて明らかにされた. ところで, これらの物質はヒトの味覚において甘味受容のみを選択的に抑制することが知られている¹⁸⁾²²⁾²⁶⁾²⁸⁾³⁹⁾. 小腸および味覚にはそれぞれ糖担体⁶⁾と甘味受容体⁷⁾という糖識別機構を備えており, ギムネマ酸とナツメ葉の抽出物が両者共に抑制効果を示したことは糖識別という共通した機構を考える上で興味深い.

今回の実験では, 小腸からのブドウ糖吸収阻害作用を検討するために糖輸送電位 (ΔPD) を測定し, さらに腸管灌流法によりその阻害効果を確認めた. ΔPD はブドウ糖が小腸から糖担体により Na^+ 依存性の能動輸送により吸収される時に共輸送される Na^+ のフラックスに比例して生じてくる経皮電位差の変化を示し³⁴⁾, そこで ΔPD を測定することにより能動輸送に及ぼす影響を知ることが出来ると考えられた.

ギムネマ酸を腸管内に灌流し, 同時にブドウ糖の輸送電位を測定すると ΔPD が抑制された. また, ギムネマ酸単独により PD の増加がみられたが, このような PD の変化が続いている時の糖輸送電位も抑制された. すなわち, ギムネマ酸はブドウ糖の能動輸送を持続的に, そして濃度依存性に抑制することがわかる. この糖輸送電位に及ぼすギムネマ酸の効果は腸管灌流実験により添加したギムネマ酸濃度に依存してブドウ糖の吸収が抑制されたこととよく一致していた. また, ギムネマ酸により腸上皮細胞が不可逆的な変化をきたした結果, 糖吸収が抑制されているのではないことは, ギムネマ酸による糖吸収抑制が時間経過とともにやがて回復し, ギムネマ酸を灌流する前のコントロール値に戻ることでより推察される. 小腸におけるブド

ウ糖の能動輸送は緒言で述べたように刷子縁膜上に存在する糖担体による Na^+ との共輸送であり、細胞内への取り込みは細胞内外の Na^+ の電気化学的ポテンシャル差に依存し、そしてそのポテンシャル差は側底膜上の Na^+ , K^+ -ポンプにより維持されていることが知られている³⁴⁾。そこでギムネマ酸がブドウ糖の能動輸送を抑制する作用機序として、刷子縁膜上の糖担体に対する直接的な作用だけでなく、側底膜上の Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害あるいはその他の機序による Na^+ の電気化学的ポテンシャル差の消失についても検討する必要がある。

ギムネマ酸の化学構造はグルクロン酸を糖成分とするトリテルペン配糖体であることが知られているが³⁶⁾、配糖体の中にはギムネマ酸のように糖吸収を阻害するものが存在している。フェノール配糖体のフロリジンはその糖成分が糖担体の糖輸送にあずかるグルコース部位に結合し、同時に糖担体のフェノール部位にも結合して拮抗的に糖の能動輸送を阻害すると考えられている¹⁾³⁾¹¹⁾¹²⁾³²⁾。フロリジン以外に、ブドウ糖吸収を阻害し、また小腸から能動的に吸収される配糖体も知られている²⁾¹⁰⁾²⁷⁾。そこでギムネマ酸についても配糖体というその構造からグルクロン酸の部分が糖担体のグルコース部位に結合してブドウ糖吸収阻害作用を示すと考えることが出来る。

ところで、フロリジンの同族体³⁾¹¹⁾¹²⁾³²⁾や種々の配糖体²⁾¹⁰⁾によるブドウ糖吸収阻害効果を検討した報告によれば、単糖で、糖担体との親和性が高く、能動輸送される糖成分をもつ配糖体ほど阻害効果が大きいとされる。一方、ギムネマ酸の糖成分であるグルクロン酸については海産バクテリアでは Na^+ 依存性に取り込まれるが³³⁾、イヌ小腸からの吸収は低いという報告があり⁹⁾、小腸から能動輸送されるか不明である。したがって、ギムネマ酸によるブドウ糖能動輸送阻害効果を配糖体の糖成分と糖担体との相互作用のみで生じると考えることは難しいであろう。

一方、糖担体には糖輸送にあずかるグルコース部位だけでなくブドウ糖と共輸送される Na^+ が結合する部位が考えられているが、この Na^+ 部位に結合して能動輸送を抑制する物質が知られている。 Na^+ , K^+ -ATPase 阻害剤である harmaline は糖やアミノ酸の Na^+ 依存性能動輸送を阻害すると同時に Na^+ の取り込みを阻害することが知られているが、Sepulveda ら³⁵⁾によれば harmaline のこのような阻害作用は Na^+ , K^+ -ATPase に作用するように糖担体の Na^+ 部位にも結合しているためという。harmaline の他

に糖担体の Na^+ 部位に結合し糖の能動輸送を阻害すると考えられているものとして biguanide も知られている²⁴⁾。ギムネマ酸にも Na^+ , K^+ -ATPase 阻害作用を示すという報告があり²⁵⁾、ギムネマ酸が糖担体の Na^+ 部位に結合し、harmaline のように糖吸収を阻害することも推察されるが、そのためにはブドウ糖以外に能動輸送される、例えばアミノ酸や Na^+ の吸収もギムネマ酸により阻害されるか検討しなければならない。

糖輸送電位 (PD) を測定した時、ギムネマ酸単独で腸管の PD の増加がみられたが、この PD の変化については例えば、ギムネマ酸がブドウ糖のように輸送されて生じると考えることも出来る。あるいはギムネマ酸には溶血作用³⁸⁾や表面活性作用⁹⁾が知られていることから、ギムネマ酸が腸上皮細胞膜内に入り込み、 Na^+ などの陽イオンの膜透過性を変化させ、PD が持続的に増加している可能性もある。細胞内への Na^+ の取り込みが亢進することにより細胞内外の Na^+ の電気化学的ポテンシャル差が消失し、その結果、ブドウ糖の能動輸送が抑制されると考えることも出来る。ギムネマ酸のように PD の増加を来すものとして表面活性剤¹⁴⁾や胆汁酸¹³⁾が知られ、PD の増加の成因として Na^+ の透過性の亢進が示唆されている。また、これらの物質は小腸からの糖の能動輸送を阻害するが、同時に糖の透過性も亢進させ、すなわち拡散輸送にも影響を及ぼすといわれる¹⁵⁾³⁰⁾³⁷⁾。

腸管内のブドウ糖の濃度が 20 mM の場合、全体のブドウ糖吸収に対する拡散輸送の割合が 30-40% という報告があり⁸⁾²⁰⁾、この濃度では能動輸送だけでなく拡散輸送も反映できる。そこでギムネマ酸が拡散輸送にも影響を及ぼすかについて 1 mM のフロリジンを含む 20 mM のブドウ糖液に 1 mg/ml のギムネマ酸を加えて実験を行なったが、ギムネマ酸の影響がみられなかった。すなわち、ギムネマ酸は能動輸送のみを抑制し、拡散輸送に変化を与えることはない。このことはギムネマ酸の表面活性作用により、膜の透過性が亢進して腸管からのブドウ糖吸収が抑制されたものではないことを示唆している。ところで胆汁酸によるブドウ糖の能動輸送阻害の作用機序としては刷子縁膜レベルだけではなく、さらに粘膜の Na^+ , K^+ -ATPase 活性の低下を伴うことから、側底膜の Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害によることが重要であるということ Guiraldes ら¹⁷⁾は指摘している。前述したようにギムネマ酸は Na^+ , K^+ -ATPase 活性を抑制することが知られているが、ギムネマ酸が細胞内に取り込

まれ、胆汁酸のように側底膜上の Na^+, K^+ -ATPase 活性を抑制することによりブドウ糖吸収抑制効果を示す可能性も否定できない。

今回の実験からはギムネマ酸が糖担体に特異的に作用してブドウ糖の能動輸送を抑制しているのかどうか、断定できない。しかし、当教室ではこれまでギムネマ酸を含め 35 種類の配糖体についてブドウ糖吸収阻害効果の検討を行い、その中にはギムネマ酸のように表面活性作用を示すものも存在したがギムネマ酸のような顕著なブドウ糖吸収阻害効果は認められなかった。このことは、ギムネマ酸による糖吸収阻害効果はギムネマ酸の分子構造やあるいは生理活性に基づく特異的な作用と推察することが出来る。ギムネマ酸がどのように腸管に作用してブドウ糖能動輸送を阻害するかについては今後、解明されなければならない。

ギムネマ酸をショ糖と同時に経口投与した場合、投与後 30 分、60 分値において著名な血糖値上昇抑制が認められた。ギムネマ酸の抽出母体である *Gymnema sylvestre* 葉はインドにおいて古来より糖尿病の民間治療薬として使用され³¹⁾、その薬理作用の一つにインスリン分泌促進作用の報告が挙げられている²⁹⁾。しかし、今回行った予備実験からは、ギムネマ酸単独投与 (0.2 g/kg 体重) では血糖値の低下は認められなかった。すなわち経口投与されたギムネマ酸がインスリン分泌を刺激することにより、血糖値上昇を抑制したのではないと推察される。また、スクラーゼ活性に対する抑制作用も認められないことより、ギムネマ酸がショ糖の分解を阻害して血糖値に影響を及ぼしているのではないと思われる。血糖値の低下を来す原因としては他に胃内滞留時間を遅延させることなども考えられる。しかし、今回の実験からギムネマ酸に糖吸収抑制効果の存在することが確かめられていることより、ショ糖負荷後の血糖値上昇の抑制は、主としてブドウ糖腸管吸収阻害作用を反映した結果と考えられる。

ナツメ葉の抽出物の腸管からのブドウ糖吸収に及ぼす効果についても触れておきたい。ナツメ葉の抽出物を 5 mM のブドウ糖に添加し、糖輸送電位を測定すると輸送電位の低下がみられ、また腸管灌流実験からブドウ糖吸収阻害効果が明らかとなった。すなわち、ナツメ葉の抽出物にも小腸におけるブドウ糖能動輸送抑制効果の存在することが示された。ナツメ葉にはフロリジン様のブドウ糖腸管吸収阻害物質が存在するという報告があるが¹⁹⁾、今回の実験では Sephadex G-10 のカラムを通すことによりフロリジン様物質を

完全に除いたナツメ葉の抽出物を用いた。ナツメ葉に含まれる甘味受容抑制成分はトリテルペン配糖体と推察されている²²⁾。そこで、今回用いたナツメ葉の抽出物の腸管での糖吸収に及ぼす作用についてもギムネマ酸と類似した作用部位や機序が考えられる。しかし、味覚に及ぼす効果については、ナツメ葉の抽出物のほうがギムネマ酸に比較して甘味受容抑制時間が短く²²⁾、²³⁾³⁹⁾、また甘味受容抑制効果がみられる動物の種属も広範囲にわたること³⁹⁾など、ギムネマ酸との相違が指摘されている。

糖吸収抑制物質の開発は現在も盛んに続けられている。その理由の一つとして糖尿病などの治療に対する応用が挙げられる。すなわち、インスリン作用不足などにより元々耐糖能異常が存在しているそのような疾患にとって、腸管から急激で大量な糖の吸収は血糖値を低下させるためにインスリン分泌細胞に対し、さらに負荷を強いることになり、悪循環となる。そこで糖吸収抑制物質による糖吸収遅延や抑制はこの悪循環を断ち切ることにつながると考えられる。今回の実験により糖吸収抑制効果の認められたギムネマ酸とナツメ葉の抽出物についても、血糖値抑制効果を期待した臨床への応用が考えられるかもしれない。

総 括

ヒトの味覚において甘味受容のみを選択的に抑制することが知られているギムネマ酸およびナツメ葉の抽出物のラット小腸におけるブドウ糖吸収に及ぼす効果について、糖輸送電位の測定と腸管灌流法を用いたブドウ糖吸収実験により検討し、さらに経口的ショ糖負荷試験より血糖値上昇に及ぼす影響をみた。得られた結果は以下の通りである。

- (1) ギムネマ酸はブドウ糖の Na^+ 依存性能動輸送により発生する糖輸送電位を抑制したが、経皮電位の増加がギムネマ酸単独により生じた。
- (2) ギムネマ酸はブドウ糖の腸管からの吸収を濃度依存性に、しかも持続的に抑制したが、この抑制効果は可逆的であることを示した。
- (3) ギムネマ酸はブドウ糖の拡散輸送には影響を及ぼさないことが示唆された。
- (4) ギムネマ酸はショ糖負荷後の血糖値上昇を顕著に抑制した。
- (5) ナツメ葉の抽出物にもブドウ糖の輸送電位を抑制し、また腸管からのブドウ糖吸収を阻害する作用が認められた。

稿を終えるに臨み、終始懇切な御指導と御校閲を賜った恩師日地康武教授、御助言、御校閲を賜った扶間秀文教授に心からの謝意を捧げます。また終始暖かい御指導、ならびに御協力を頂いた鳥取大学医学部生理学第一教室井元敏明講師、鳥取大学医療技術短期大学部笠木 健教授、生理学第一教室市川 修助手、三好美智夫助手、山田博子助手をはじめ教職員各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の一部は第36回日本生理学会中国四国地方会(1984年10月、高松)において発表した。

文 献

- 1) Alvarado, F. and Crane, R. K. (1962). Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine, *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* **56**, 170-172.
- 2) Alvarado, F. and Crane, R. K. (1964). Studies on the mechanism of intestinal absorption of sugars. VII. Phenylglycoside transport and its possible relationship to phlorizin inhibition of the active transport of sugars by the small intestine. *Biochim Biophys Acta* **93**, 116-135.
- 3) Alvarado, F. (1967). Hypothesis for the interaction of phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars. *Biochim Biophys Acta* **135**, 483-495.
- 4) Barry, R. J. C., Dikstein, S., Matthews, J., Smyth, D. H. and Wright, E. M. (1964). Electrical potentials associated with intestinal sugar transfer. *J Physiol (Lond)* **171**, 316-338.
- 5) Buckeridge, F. A. and Freeman, S. (1957). Comparison of the absorption and destruction of the lactone and salt form of gluconic acid by dogs. *Am J Physiol* **188**, 54-60.
- 6) Crane, R. K. (1960). Intestinal absorption of sugars. *Physiol Rev* **40**, 789-825.
- 7) Dastoli, F. R. and Price, S. (1966). Sweet-sensitive protein from bovine taste buds: Isolation and assay. *Science* **154**, 905-907.
- 8) Debnam, E. S. and Levin, R. J. (1975). An experimental method of identifying and quantifying the active transfer electrogenic component from the diffusive component during sugar absorption measured *in vivo*. *J Physiol (Lond)* **246**, 181-196.
- 9) DeSimone, J. A. and Heck, G. L. (1980). Surface active taste modifiers: a comparison of the physical and psychophysical properties of gymnemic acid and sodium lauryl sulfate. *Chem Senses* **5**, 317-330.
- 10) Despopoulos, A. (1966). Glucose transport in hamster intestine: inhibition by glucosides. *Am J Physiol* **211**, 1329-1333.
- 11) Diedrich, D. F. (1963). The comparative effects of some phlorizin analogs on the renal reabsorption of glucose. *Biochim Biophys Acta* **71**, 688-700.
- 12) Diedrich, D. F. (1966). Competitive inhibition of intestinal glucose transport by phlorizin analogs. *Arch Biochim Biophys* **117**, 248-256.
- 13) Feldman, E. B., Marx, J. W., Heyman, H., Grundmeyer, H. and Feldman, D. S. (1970). Hyperpolarization of jejunal mucosa by conjugated bile salts and detergents. *Am J Clin Nutr* **23**, 662.
- 14) Feldman, D. S., Rabinovitch, S. and Feldman, E. B. (1975). Surfactants and bioelectric properties of rat jejunum. *Dig Dis* **20**, 866-870.
- 15) Frizzell, R. A. and Schultz, S. G. (1970). Effect of bile salts on transport across brush border of rabbit ileum. *Biochim Biophys Acta* **211**, 589-592.
- 16) Gray, G. M. (1970). Carbohydrate digestion and absorption. *Gastroenterology* **58**, 96-107.
- 17) Guiraldes, E., Lamabadusuriya, S. P., Oyesiku, J. E. J., Whitfield, A. E. and Harries, J. T. (1975). A comparative study on the effects of different bile salts on mucosal ATPase and transport in the rat jejunum *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* **389**, 495-505.
- 18) Hooper, D. (1887). An examination of the leaves of *Gymnema sylvestre*. *Pharm J*

- Trans 17, 867-868.
- 19) 笠木健, 吉岡伸一, 井元敏明 (1985). なつめの葉から抽出したフロリジン様物質の小腸ブドウ糖吸収抑制効果. 鳥取大学医療技術短期大学部研究報告 9, 13-17.
- 20) 川口徳久 (1985). ラット小腸におけるフロリジンのブドウ糖並びに蔗糖に対する吸収阻害作用. 米子医学雑誌 36, 131-145.
- 21) 河島拓治 (1985). 酵素電極の原理. 蛋白質 核酸 酵素 30, 247-263.
- 22) Kennedy, L. M. and Halpern, B. P. (1980). Extraction, purification and characterization of a sweetness-modifying component from *Ziziphus jujuba*. Chem Senses 5, 123-147.
- 23) Kennedy, L. M. and Halpern, B. P. (1980). A biphasic model for action of the gymnemic acids and ziziphins on taste receptor cell membranes. Chem Senses 5, 149-158.
- 24) Kessler, M., Meier, W., Storelli, C. and Semenza, G. (1975). The biguanide inhibition of D-glucose transport in membrane vesicles from small intestinal brush borders. Biochim Biophys Acta 413, 444-452.
- 25) Koch, R. B., Desai, D. and Cutkomp, L. K. (1973). Inhibition of ATPases by gymnemic acid. Chem Biol Interact 7, 121-125.
- 26) Kurihara, Y. (1969). Antisweet activity of gymnemic acid A₁ and its derivatives. Life Sci 8, 537-543.
- 27) Landau, B. R., Bernstein, L. and Wilson, T. H. (1962). Hexose transport by hamster intestine in vitro. Am J Physiol 203, 237-240.
- 28) Meiselman, H. L., Halpern, B. P. and Dateo, G. P. (1976). Reduction of sweetness judgements by extracts from the leaves of *Ziziphus jujuba*. Physiol Behav 17, 313-317.
- 29) Mhaskar, K. S. and Caius, J. F. (1930). A study of indian medicinal plants. II. *Gymnema sylvestre*, Br. Ind J Med Res Suppl 16, 1-49.
- 30) Moore, J. D., Zatzman, M. L. and Overack, D. E. (1971). The effects of synthetic surfactants on intestinal permeability to glucose *in vitro*. Proc Soc Exp Biol Med 137, 1135-1139.
- 31) Nadkarni, A. K. (1982). Indian Materia Medica, vol. I, III ed., pp. 596-599, Popular Prakashan Pvt, Ltd., Bombay.
- 32) Newey, H., Sanford, P. A., Smyth, D. H. and Williams, A. H. (1963). The effect of some analogues of phlorrhizin on intestinal hexose and fluid transfer. J Physiol (Lond) 169, 229-236.
- 33) Payne, W. J. (1960). Effects of sodium and potassium ions on growth and substrate penetration of a marine pseudomonad. J Bacteriol 80, 696-700.
- 34) Schultz, S. G. (1977). Sodium-coupled solute transport by small intestine: a status report. Am J Physiol 233, E249-E254.
- 35) Sepulveda, F. V. and Robinson, J. W. L. (1974). Harmaline, a potent inhibitor of sodium-dependent transport. Biochim Biophys Acta 373, 527-531.
- 36) Stöcklin, W., Weiss, E. und Reichstein, T. (1967). Gymnemasäure, das antisaccharine Prinzip von *Gymnema sylvestre* R. Br. Isolierungen und Identifizierungen. Helv Chim Acta 50, 474-490.
- 37) Taylor, C. B. (1963). The effect of cetyltrimethylammonium bromide and some related compounds on transport and metabolism in the intestine of the rat *in vitro*. J Physiol (Lond) 165, 199-218.
- 38) Yackzan, K. S. (1969). Biological effects of *Gymnema sylvestre* fractions. II. Electrophysiology—Effect of gymnemic acid on taste receptor response. Ala J Med Sci 6, 455-463.
- 39) 山田博子, 井元敏明, 吉岡伸一 (1984). ラット味覚におけるナツメの葉抽出物の糖応答抑制効果. 味と匂のシンポジウム論文集 18, 69-72.