

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

笠木 健 吉岡伸一* 井元敏明*

Takeshi KASAGI, Shin-ichi YOSHIOKA and Toshiaki IMOTO

Inhibition of the intestinal glucose absorption by the phlorizin-like substance extracted from the jujuba leaf (*Zizyphus jujuba*)

甘味受容抑制物質として、古くからギムネマ酸という物質が知られている¹⁾²⁾³⁾。これは、熱帯アジア、アフリカに分布するガガイモ科 (*Asclepiadaceae*) の *Gymnema sylvestre* という植物の葉に含まれる配糖体で、トリテルペン系のサポニンである⁴⁾。糖やサッカリンを始めとする多くの甘味物質がつくる甘さの感覚を抑制するが、動物の種によっても抑制をしたり、しなかったりする興味深い物質である。近年、ギムネマ酸の他に、なつめ (*Zizyphus jujuba* : *Rhamnaceae* クロウメモドキ科) の葉にも、同様の甘味受容抑制効果をもつ物質が存在することが報告された⁵⁾⁶⁾。しかし、これらの物質の作用機序や分子構造の詳細は、未だ明らかにされていない。我々は、これらの甘味受容抑制物質の作用と、小腸での糖吸収抑制物質の作用とを比較することで、舌味細胞の甘味受容体や、小腸上皮細胞の糖輸送担体の本質を少しでも理解したいものと考えている。

現在、我々はなつめの葉から抽出した物質について、その舌、小腸における生理活性を、ラットを使用して検索しているところである。その中で、なつめからのある抽出分画に、バラ科の植物に固有と考えられているフロリジンという配糖体と見なされる物質が含まれていることを見出した。バラ科以外の植物からのフロリジンの抽出の報告は未だないと思われるのでここに報告する。

材料と方法

なつめの生理活性物質の単離精製

単離精製の手法は、ギムネマ葉⁷⁾や以前になつめの葉⁸⁾で行われたものを参考にして、改良を加えたものである。

なつめの葉は、米子、松江市内において5月、6月に採取し、直後に温風乾燥させて保存したものである。30gの乾燥葉を100mlの蒸留水中に入れて、60°Cで12時間浸した後、10,000rpm、10分間遠沈して上清を回収した。これを2回繰り返して、両上清を集めて濃縮し、凍結乾燥を行って水抽出物を得た。これにメタノールを100mlを加えて攪拌し、上清を回収した。3回繰り返して集めたメタノール抽出物を、濃縮、乾燥した後、Sephadex G-10のカラムに通した。約1,000mlの蒸留水で溶出、続いて0.1Nのアンモニア水で溶出した分画を濃縮し、凍結乾燥して回収した。この分画にフロリジン様物質が存在すると見られ、これをZj-Eと名づけた。

薄層クロマトグラフ (TLC) による展開

Zj-Eを250 μ g、フロリジン (Sigma製) 50 μ gをシリカゲル薄層プレート (Merck, 5720) で展開して比較をした。展開溶媒は、ギ酸ブチル : メチルエチルケトン : ギ酸 : 水を5 : 3 : 1 : 1に混合したものである。酢酸-クロロホルム、硫酸の噴霧の後、加温して呈色させた。同じRf値のスポットの部分の

看護学科

* 鳥取大学医学部生理学第一教室

シリカゲルを削りとり、紫外可視光の吸収スペクトルを観察して、フロリジン様物質のおおよその含有率を求めてみることにした。

循環灌流法によるブドウ糖吸収実験

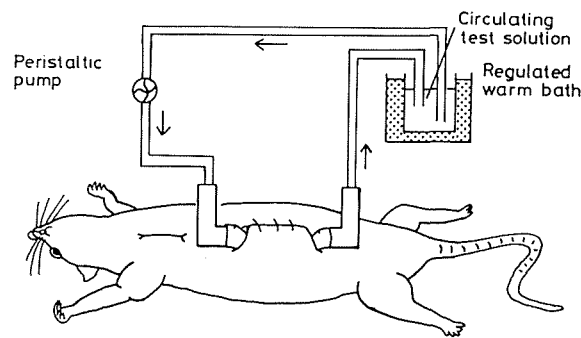
ウィスター系ラット（体重約200g）にペントバルビタール（50mg/kg体重）の腹腔内投与をして麻酔をした。開腹後、Jervis⁸⁾やBarry⁹⁾らが行ったものと同様に、トライツの靭帯から約3cm離れた部分と、それから約20cm離れた部分に、L字型のガラス管をそれぞれ挿管し、ペリスタポンプと接続した（図-1, A）。実験は腸管内容物洗浄のためにリンガー液（灌流液温はすべて38°C）で約15分灌流した後に、下記の試験液をそれぞれ20mlとって、4.5ml/minの流速で循環灌流した。

試験液 5mM ブドウ糖溶液（リンガー液に溶解したもの）を標準液としてまず循環灌流し、続いて Zj-E

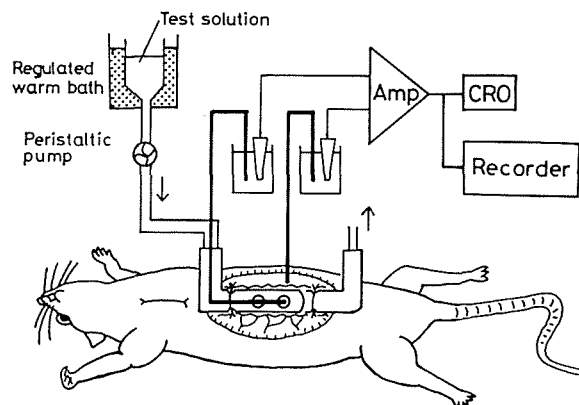
を 2mg/ml の濃度で添加した 5mM ブドウ糖溶液を灌流した。約1時間の洗浄の後、再び 5mM ブドウ糖溶液を循環灌流させて、小腸の吸収状態の経時変化や、安定性を見ることにした。試験液中のブドウ糖濃度は、循環中の試験液から10分毎に 100 μ l を採取し、GOD法（Blood-sugar-GOD-perid-test, ベーリンガーマンハイム社）で測定した。

糖吸収電位によるブドウ糖吸収実験

小腸上皮細胞刷子縁膜でブドウ糖が能動輸送される時、Na⁺が共輸送される。したがって、ブドウ糖の吸収フラックスと平行するNa⁺のフラックスが生じる。このフラックスに由来する電位差が、小腸の管腔側（粘膜側）と漿膜側との間に発生することになる。これを糖吸収電位（PD）と呼び、ブドウ糖の能動輸送を測定するのによく応用される。図-1, BにPDを測定する装置の概略を示す。循環灌流法で使用



A. Measurement of intestinal sugar absorption in vivo



B. Measurement of transmural potential difference in vivo

図-1 実験方法の概略図

A : 循環灌流法

B : 糖吸収電位法

した空腸と同じ部位約3cmの長さのところにL字管を挿管して、試験液が灌流できるようにした。口側の管内に一本、小腸外壁に接触できるようにもう一本の寒天ブリッジ（外径2mmのポリエチレン管に1MKCl寒天充填）電極を設置した。これらをZn-ZnSO₄不分解電極を通して、直流増幅器に導びき、その出力をペンレコーダに入力してPD波形を記録した。ブドウ糖およびZj-EはKrebs-Henseleit (K-H)液に溶解して、灌流直前までO₂95%-CO₂5%混合ガスを通気しておいた。ブドウ糖、Zj-Eの濃度はそれぞれ5mM、2.0mg/mlであった。

結果と考察

30gのなつめの乾燥葉から、0.18gのZj-Eが採取できた。Zj-Eは黄褐色粉末で、それ自身は無味・無臭の物質である。

Zj-Eを口に含んだ後、ショ糖をなめて見たが、甘味に変化がなかったことから、甘味受容抑制効果はこのものには無いといえる。

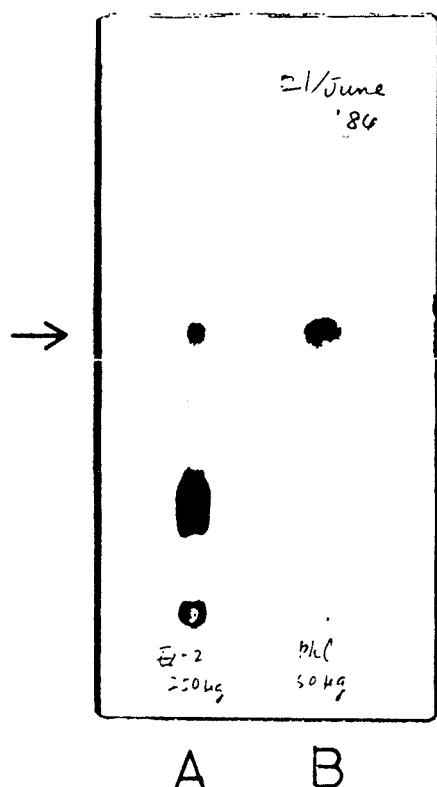


図-2 TLCによる分離
A列はZj-E (250 μ g)、B列はフロリジン (50 μ g)を示す。矢印のところにフロリジン様物質が見られる。

TLCによるZj-Eとフロリジンとの比較を行ったプレートのコピーを図-2に示す。Zj-Eにはフロリジンと同Rf値のところに、かなりのスポットがあることから、フロリジンあるいはフロリジン様物質が多く含まれている様に見えるが、この部分をけずり取って吸収スペクトルを観察すると、少なくとも二種類の物質が混在していることが判った。その中の一つのスペクトルはフロリジンに酷似しており、展開溶媒を少しずつ変えて、できるだけフロリジンに近いスペクトルになるようにすると、極大吸収のピーク値(325 μ m)からフロリジン様物質のZj-E内の含有率が5 μ g/ml (0.5%)と推定された。

次にZj-Eがブドウ糖吸収にどのような影響を及ぼすかを、ラット小腸で観察した。ブドウ糖試験液をin vivoで小腸内に循環灌流させた実験の結果が図-3である。5mMブドウ糖試験液は、1時間循環灌流させると、元の濃度すなわち5mMの約80%は吸収され、約20%が循環液の中に残る。5mMのブドウ糖試験液に2.0mg/mlの濃度でZj-Eを添加して、同様の循環をさせると、1時間で吸収高は約36%で、Zj-Eを添加しない場合に較べると約56%の吸収抑制をしていることがわかる。リンガー液で約1時間腸内洗浄した後に、もう一度5mMブドウ糖のみを含んだ試験液を循環させると、ほとんど最初の5mMブドウ糖試験液と同じ吸収であった。このことから、小腸の吸収状態が、全実験時間中安定していて、Zj-Eの添加によって小腸に不可逆的な変性が残ったりはしていないものと考えられる。

Na⁺依存性の糖吸収電位(PD)の測定結果を図-4に示す。5mMのブドウ糖試験液を、電極が設置してある小腸に灌流すると、小腸管腔側が負であるような、約2mVのPDが発生した(図-4, A)。灌流を中止してK-H液で灌流洗浄すると、PDはほぼ元のレベルまで返る。2mg/mlの濃度のZj-Eを添加した5mMブドウ糖試験液では、ほとんどPDが発生していない(図-4, B)。このことはNa⁺依存性のブドウ糖の能動輸送が、ほとんど抑制されていることを示す。約1時間後に、再び5mMブドウ糖試験液を灌流すると、はじめのブドウ糖試験液の場合とほぼ同じ程度のPDが見られ、ブドウ糖吸収が元に戻っていることがわかる(図-4, C)。

Zj-Eによって、ブドウ糖吸収によるPDがほとんど発生しない程に抑制されていることから、Zj-Eはかなり強力なNa⁺依存性ブドウ糖吸収抑制物質を含

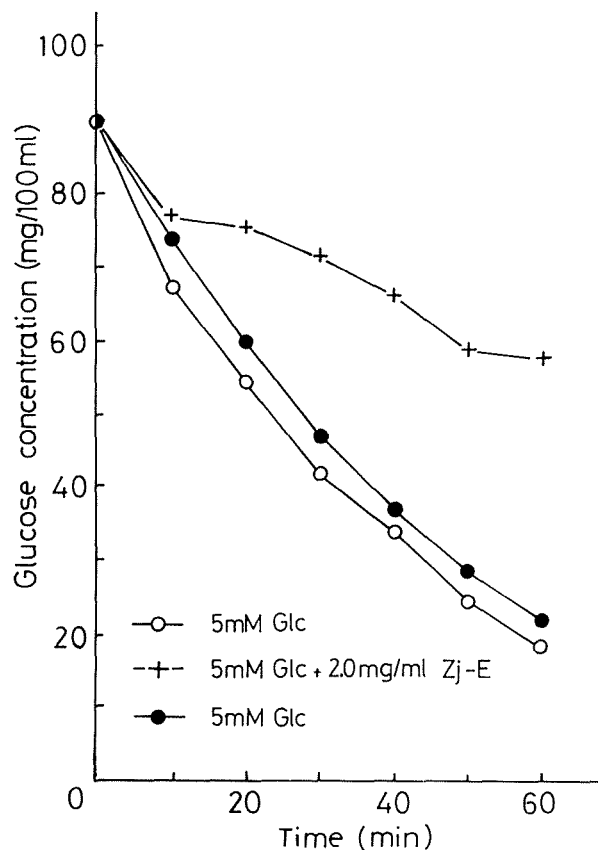


図-3 循環灌流法によるブドウ糖吸収実験の結果
○ ははじめのブドウ糖試験液, + は Zj-E を
添加したもの, ● は+の後に循環灌流したブ
ドウ糖試験液を表す。

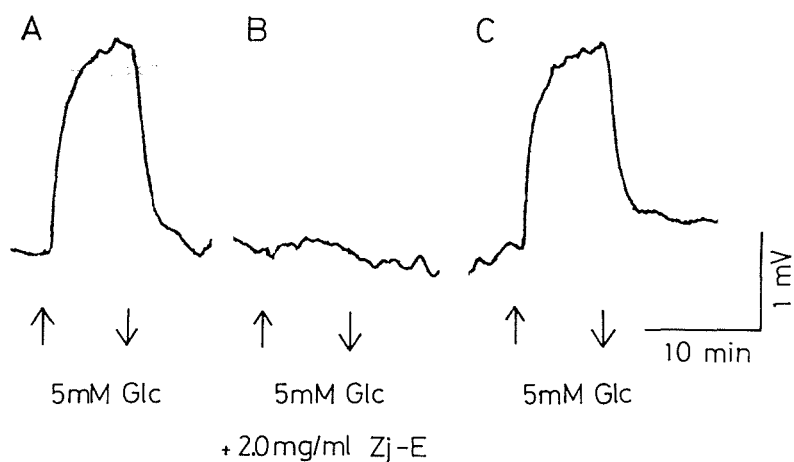


図-4 糖吸収電位法によるブドウ糖吸収実験の結果
矢印(↑↓)の間に試験液を流している。

むことが判る。循環灌流実験においては、5 mM ブドウ糖試験液が、Zj-E を加えた場合でも一部吸収が見られるが、これはブドウ糖の Na⁺ 共輸送によらない受動的な輸送が働いたものと考えられるが、それでもかなりのブドウ糖吸収抑制が見られる。このようなブドウ糖の吸収を小腸管腔側で抑える物質には、配糖体の中にいくつか知られているが、中でも顕著な作用をもつものは、フロリジンである。この物質はバラ科 (Rosaceae) のナシ、リンゴ、サクラ等の樹皮や根皮¹⁰⁾、あるいはこれらの果実の種子¹¹⁾に多く含まれる配糖体である。この物質のブドウ糖吸収抑制作用は、ブドウ糖の輸送担体における競合阻害によるもので⁶⁾¹²⁾¹³⁾ブドウ糖よりも担体に対する親和性が1,000~10,000倍強いためであると言われる。

吸収実験に使用した Zj-E の 2 mg/ml の濃度の中で、もしフロリジンが先述のように0.5%含まれているとすれば10 μ g/ml のフロリジン濃度となり、これは0.023mM という濃度となる。ブドウ糖濃度の1/200以下の希薄な濃度でも、大きな吸収抑制を示す物質はフロリジンをおいては他に考えにくい。

Zj-E 中のブドウ糖吸収抑制物質が、フロリジンそのものであると断定するには、実験が不十分であるが、フロリジンである可能性は高い。少なくともフロリジンによく似た配糖体であると考えられる。完全にフロリジンであると断定するには、分子構造や、その他の物理化学的特性を解明しなければなるまい。しかし、バラ科植物以外からのフロリジン抽出の報告が見られないし、なつめが属するクロウメモドキ科が、分類学的にバラ科とは近縁ではないのにもかかわらず、類似の物質が得られることは興味深いことなので、ここに報告をした次第である。なつめの葉からの他の抽出物に関する結果は稿を改めて報告することにする。

要 約

なつめ (*Z. jujuba*) の葉の中には、舌における甘味受容抑制を示さず、小腸で強力にブドウ糖吸収抑制を行う物質の存在することが明らかとなった。薄層クロマトグラフや、紫外一視光の吸収スペクトル分析を行ったところ、フロリジンに酷似する物質であった。バラ科植物以外にもフロリジンを含むことは興味深いことである。

文 献

- 1) Hooper, D., Nature, **35**, 565-567, 1887.
- 2) Power, F. B. and Tutin, F., Pharm. J., **73**, 234-239, 1904.
- 3) Khastgir, H. N. et al., J. Indian Chem. Soc., **35**, 650-652, 1958.
- 4) Stöcklin, W. et al., Helv. Chim. Acta, **50**, 474-490, 1967.
- 5) Mieselman, H. L. et al., Physiol. Behav. **17**, 313-317, 1967.
- 6) Kennedy, L. M. and Halpern, B. P., Physiol. Behav., **24**, 135-143, 1979.
- 7) Kurihara, Y., Life Science, **8**, 537-543, 1969.
- 8) Jervis, E. L. et al., J. Physiol., **134**, 675-688, 1956.
- 9) Barry, R. J. C. et al., J. Physiol., **171**, 316-338, 1964.
- 10) Petersen, C., Ann., **15**, 75-77, 1839.
- 11) Woodstock, D., Nature, **159**, 100, 1947.
- 12) Alvarado, F. and Crane R. K., Biochim. Biophys. Acta, **56**, 170-172, 1956.
- 13) Alvarado, F., FEBS symposium, **20**, 131-139, 1970.

SUMMARY

Gustatory and intestinal effects of extracts from *Z. jujuba* (Rhamnaceae) have been investigated. One of them inhibited the intestinal glucose absorption. It was cleared that these extracts included phlorizin-like substance by means of TLC and spectrometry. Phlorizin is a specific glycoside in plants of Rosaceae, so it is interested that phlorizin-like substance is found in that of other than Rosaceae.

(受付 1984. 12. 14)