

原 著

羅漢果抽出エキスを用いた甘味代替薬の抗酸化作用

武生英一郎 吉田 博 新宮 哲司 片野 高広
桑島利江子 豊田 康嗣 勝本 征行 大田 和子
松浦 秀夫 神田 博史 村田 雄司 吉川 慎一
大鈴 文孝

羅漢果抽出エキスを用いた甘味代替薬の抗酸化作用

Takeo Eiichiro
武生英一郎¹⁾
Kuwashima Rieko
桑島利江子¹⁾
Matsuura Hideo
松浦 秀夫¹⁾
Ohsuzu Fumitaka
大鈴 文孝⁵⁾

Yoshida Hiroshi
吉田 博²⁾
Toyota Yasushi
豊田 康嗣¹⁾
Kohda Hiroshi
神田 博史³⁾

Shingu Tetsuji
新宮 哲司¹⁾
Katsumoto Masayuki
勝本 征行¹⁾
Murata Yuji
村田 雄司⁴⁾

Katano Takahiro
片野 高広¹⁾
Ohta Kazuko
大田 和子¹⁾
Yoshikawa Shinichi
吉川 慎一⁴⁾

要 約

糖尿病患者に対する代替栄養成分として開発されたラカント S[®]を用いて、糖尿病で亢進していると考えられている低比重リポ蛋白 (LDL) 被酸化性に対して、このラカント S[®]に抑制効果があるか否か検討してみた。LDL の銅酸化において、ラカント S[®] は 7.5, 15, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の順に酸化の lag time が増加しており、濃度依存的にラカント S[®] による抗酸化作用が認められた。ラカント S[®] にはエリスリトールが約 99% 含まれていることから、エリスリトールさらにはグルコースによる LDL 銅酸化に対する影響を検討したが、ラカント S[®] とは異なり抗酸化効果は認められなかった。したがって、ラカント S[®] に約 1% 含まれている羅漢果エキスが抗酸化作用を発揮していると考えられた。この羅漢果エキスには実験系に影響を及ぼす程度の抗酸化ビタミンは検出されなかった。さらに、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) による LDL 酸化におけるラカント S[®] の効果を検討したところ、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で有意な酸化抑制が認められた。

以上の結果から、糖尿病患者に対する食事療法の中で甘味を有する代替栄養として使用されるラカント S[®] は、糖尿病における LDL 酸化変性の亢進に対する抑制効果があり、抗酸化作用を介した糖尿病合併症の予防が期待される。

はじめに

酸化変性した低比重リポ蛋白 (LDL)、すなわち酸化 LDL が動脈硬化の発症および進展に重要な役割を果たしていることは、多くの実験により明らかにされている¹⁻³⁾。最近、LDL に対するお茶やワインの抗酸化作用が明らかになり、動脈硬化の進展予防のために各種食品成分の生物学的効果が研究されている⁴⁻⁷⁾。また糖尿病患者の LDL は酸化されやすく、血中の抗酸化 LDL 抗体の増加や抗酸化ビタミンの低下が最近報告されている^{8,9)}。

現在、糖尿病患者の食事療法という観点から、低カロリー甘味成分はブドウ糖やショ糖の代替物として用いられているが、その 1 つに羅漢果がある。羅漢果、

Siraitia grosvenori (SG) は中国南部の高冷地で栽培されているウリ科の多年性草本であり、古くから去痰や鎮咳作用があることが知られている。また、その成分の中に極めて強い甘味成分が含まれ、ショ糖の数倍の甘味があると報告されており、現在低カロリー甘味食品として応用されている。糖尿病患者の動脈硬化進展の予防という観点から、この天然甘味成分について LDL の酸化を阻害する作用があるか否かは興味深い。

われわれは今回羅漢果から抽出された甘味成分 (羅漢果エキス) について LDL に対する抗酸化作用を確認し、さらにその成分についても一部検討を行ったので報告する。

1) 広島大学医学部第一内科 2) 防衛庁陸上幕僚監部衛生部企画室, 防衛医科大学校第一内科 3) 広島大学医学部附属薬用植物園
4) サラヤ株式会社バイオケミカル研究所 5) 防衛医科大学校第一内科
当論文に対し、第一著者 (武生英一郎) と第二著者 (吉田 博) は同等に寄与する。

材料と方法

1. ラカント S[®]について

羅漢果エキスを含む食品として、現在低カロリー甘味食品として市販されているラカント S[®](サラヤ株式会社製品)を用いた。ラカント S[®]の成分はエリスリトール 99.2 % および羅漢果エキス 0.8 % からできている。その成分中の羅漢果エキスは羅漢果果実に含まれる。なお、羅漢果エキスについては成分分析にて 1 g 当たりビタミン E は 10 nmol 以下しか含まれておらず、またビタミン C や β -カロチンは含まれていない。

2. LDLの単離・調整

LDLは健常人の空腹時血漿から密度勾配超遠心法により分離し¹¹⁾、EDTAを除くためにLDLをPBSで4℃、24時間透析した。LDLの蛋白濃度はLowry法により測定した¹²⁾。

3. 銅によるLDL酸化の評価

LDLの酸化に対する感受性はEsterbauerらの方法により測定し¹³⁾、銅酸化開始までの酸化抵抗時間をlag time(分)とし、酸化のpropagation phaseの傾きをpropagation rateとした。LDL(50 μ g protein/mL)に2 μ MのCuSO₄を添加した後、共役ジエン形成を37℃、吸光度234 nmにて5分間隔で4時間連続測定したものをコントロールとした。一方でLDL(50 μ g protein/mL)にそれぞれ15 mMのグルコース、エリスリトール、およびエリスリトールの分子量に換算して15 mM相当のラカント S[®](羅漢果エキスに換算して約15 μ g/mL)を加えたものを作り、2 μ MのCuSO₄を添加後の共役ジエン形成を同時に測定し、コントロールとの比較を行った。

また、ラカント S[®]について用量依存的な抗酸化作用の変化を検討するために、羅漢果エキス換算で7.5 μ g/mL、15 μ g/mL、30 μ g/mLの溶液を作り、同様の測定を行った。

4. HUVECを用いたLDL酸化の評価

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いて、Ham's F-10 培養液(Life Technologies, GIBCO-BRL)下にLDL(100 μ g protein/mL)およびラカント S[®]を同時に添加し、37℃で15時間incubationを行った。その後、上清を回収しLDL酸化の程度をlipid peroxide assay kit(Determiner LPO, Kyowa, Tokyo)を用いて測定した^{7,9)}。

5. 統計学的分析

本文中のデータはmean \pm SDを表す。3群以上の相違はANOVAのFisher法に基づき、また2群間の相違はunpaired Student t-testにより分析し、 $p < 0.05$ をもって統計学的有意差ありとした。

結 果

1. ラカント S[®]のLDLに対する抗酸化作用について

1) 他の糖類との比較

本製品において、羅漢果エキスの占める割合は0.8 % であり、残りはエリスリトールである。そのためグルコースおよびエリスリトールの単独投与群との比較を行い、LDLの銅酸化に対する抗酸化作用を検討した。図1に示すようにコントロールおよびグルコース15 mM、エリスリトール15 mMでは同様の傾向を示すのに対し、ラカント S[®] 15 mM相当の添加群ではlag timeの延長を認めた。lag timeはコントロール57.2 \pm 1.7 min、ラカント S[®] 117.8 \pm 16.7 minでlag timeの有意な延長を認めた($p < 0.005$, $n = 3$)。また、propagation rateは、コントロールとラカント S[®]とで有意差を認めなかった。

2) 用量依存性効果の検討

ラカント S[®]の用量依存的な抗酸化作用を検討した結果を図2に示す。添加量の増加に従い、lag timeの延長傾向を認め、propagation rateは低下傾向を認めた。

2. HUVECを介したLDLの酸化に対する影響

HUVECにLDLとラカント S[®]をそれぞれ羅漢果エキス換算で7.5 μ g/mL、15 μ g/mL、30 μ g/mL同時に添加し、15時間incubationした後、生成された過酸化脂質を定量した結果を図3に示す。各群の過酸化脂質生成量はコントロール、7.5 μ g/mL、15 μ g/mL、30 μ g/mLの順にそれぞれ1,002.3 \pm 96.0, 1,021.7 \pm 103.5, 1,009.0 \pm 146.6, 763.0 \pm 29.1 nmol/mg LDL proteinであり、30 μ g/mL添加群において、有意な低下を認めた($p < 0.01$, $n = 3$)。

考 察

LDLの酸化変性が動脈硬化の発症、進展に影響を与えることがSteinbergらの仮説により示されて以来、LDLの酸化を抑制する抗酸化物質が動脈硬化を予防する上で注目を浴びている。現在までに知られている抗酸化物質としては、アスコルビン酸、 α -トコフェロー

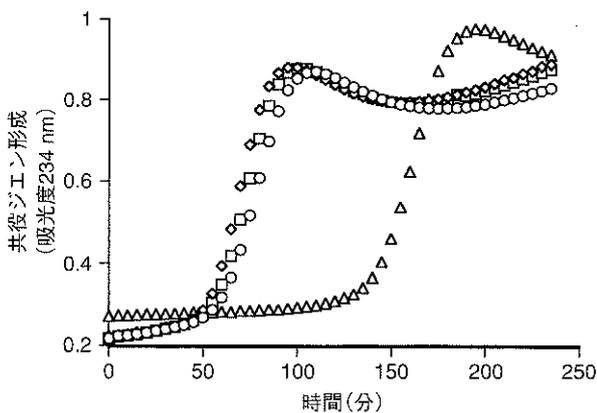


図1 ラカントS®の抗酸化作用(他の糖類との比較)
 図中の○はコントロール, ◇はグルコース15 μM, □はエリトリール15 μM, △はラカントS(羅漢果エキス換算で15 μg/mL)を表す。ラカントS®添加によりlag timeの延長を認める。

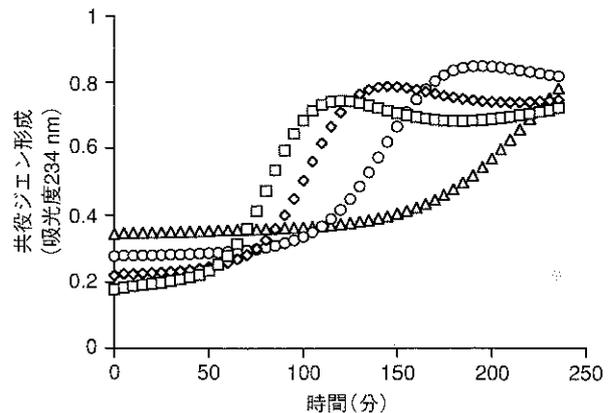


図2 ラカントS®の抗酸化作用(用量依存性の検討)
 図中の□はコントロール, ◇, ○, △はそれぞれラカントS®(羅漢果エキス換算でそれぞれ7.5 μg/mL, 15 μg/mL, 30 μg/mL)を表す。ラカントS®添加量を増やすに従い, lag timeの延長を認める。

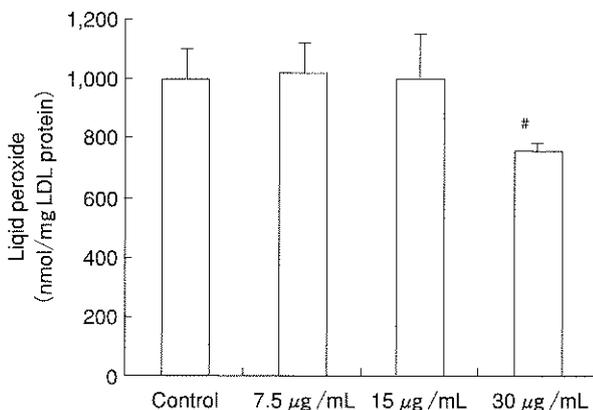


図3 HUVECを介したLDLの酸化に対する影響
 HUVECにLDLとラカントS®をそれぞれ羅漢果エキス換算で7.5 μg/mL, 15 μg/mL, 30 μg/mL同時に添加し, 37℃, 15時間incubationした後, 生成された過酸化脂質を定量し, コントロールとの比較を行った。
 #: p<0.01 (vs.コントロール, n=3)。

ルに代表されるビタミン類やワインやお茶のポリフェノールといった天然の抗酸化物質に加えて, プロブコールをはじめとする医薬品にも抗酸化作用が知られている。今回われわれが使用した羅漢果エキスは, 羅漢果中の甘味成分だけを選択的に分画, 抽出し高純度に精製した抽出物である。その代表的な甘味成分はククルビタン型トリテルペン配糖体であり, ショ糖の数百倍の甘味をもつことが報告されている^{14,15)}。なお, 本エキスの分析にてβ-カロチン, アスコルビン酸は検出されず, α-トコフェロールは0.5 mg/100 gという極めて低濃度であり, 今回の実験結果についてはビタミンの影響はないと考えられた。

生体内における酸化ストレスに対する抗酸化物とし

ては, アスコルビン酸やα-トコフェロールをはじめとするラジカル捕捉型抗酸化物や, 過酸化物の還元酵素としてペルオキシダーゼや, スーパーオキシドジスムターゼ, さらにアルブミンやトランスフェリンなどの金属イオンのキレーターなどが存在する。今回の実験では図2に示すようにラカントSの濃度が増加するに従い, lag timeの延長だけでなく, propagation rateも低下しており, 高濃度ではラジカル捕捉だけでなくキレート作用も関与している可能性がある。

羅漢果エキスの成分については, 未だ完全には解明されていないが, その4成分(Mogroside IV, Mogroside V, Siamenoside I, 11-oxo-mogroside V)を用いて銅酸化によるLDL酸化の評価についても実施中であるが, その結果, 11-oxo-mogroside Vに抗酸化作用を認めた。しかし, 羅漢果エキスそのものの抗酸化作用を説明できるほどの作用はなく, さらに詳細な検討を要する。ラカントS®を負荷して, 3時間後までmogroside Vの血中濃度とLDL被酸化性を検討したが, ラカントS®には0.8%の羅漢果エキスが含有されているのみであり, 血中でのmogroside Vの検出は限界以下であり, LDL被酸化性の変化も認められなかった。今後は, 羅漢果エキスの中の有効な抗酸化物質のみを負荷して確認する必要があると考えられた。

羅漢果エキスは天然の甘味料であり, ショ糖の数百倍の甘味をもつことから, 現在, 糖尿病患者に対する低カロリー甘味料として応用されているが, その抗酸化作用を通じて動脈硬化や糖尿病患者の合併症の予防という点からも今後非常に興味もたれる。

謝 辞

当論文に関します、三越厚生事業団診療所長、防衛医科大学校名誉教授中村治雄先生およびソニー株式会社健康開発センター長石川俊次先生の御指導に対して感謝申し上げます。

文 献

- 1) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E. et al. : Beyond cholesterol : modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* **320** : 915-924, 1989
- 2) Witztum, J. L. and Steinberg, D. : Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **88** : 1785-1792, 1991
- 3) Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M. et al. : Atherosclerosis : basic mechanisms : oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* **91** : 2488-2496, 1995
- 4) Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B. et al. : Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341** : 454-457, 1993
- 5) Hayek, T., Furman, B., Vaya, J. et al. : Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenolic quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17** : 2744-2752, 1997
- 6) Ishikawa, T., Suzukawa, M., Ito, T. et al. : Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am. J. Clin. Nutr.* **66** : 261-266, 1997
- 7) Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoi, H. et al. : Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochem. Pharmacol.* **58** : 1695-1703, 1999
- 8) Reaven, P. D., Barnett, J., Herold, D. A. et al. : Effects of vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and low-density lipoprotein subfractions to oxidation and on protein glycation in NIDDM. *Diabetes Care* **18** : 807-816, 1995
- 9) Yoshida, H., Ishikawa, T. and Nakamura, H. : Vitamin E/lipid peroxide ratio and susceptibility of LDL to oxidative modification in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17** : 1438-1446, 1997
- 10) Bellomo, G., Maggi, E., Poli, M. et al. : Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* **44** : 60-66, 1995
- 11) Chung, B. H., Segrest, J. P., Ray, M. J. et al. : Single vertical spin gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* **128** : 181-209, 1986
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. J. et al. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951
- 13) Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. et al. : Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **6** : 67-75, 1989
- 14) Kasai, R., Nie, R., Nashi, K. et al. : Sweet cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia siamensis* (chi-zi luohan-guo), a Chinese folk medicine. *Agric. Biol. Chem.* **53** : 3347-3349, 1989
- 15) Matsumoto, K., Kasai, R., Ohtani, K. et al. : Minor cucurbitane-glycosides from fruits of *Siraitia grosvenori* (Cucurbitaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **38** : 2030-2032, 1990

*Anti-oxidative Effect of Alternative Medical Product of Sweet Elements
Made with Extracts from Siraitia grosvenori*

Eiichiro Takeo¹⁾, Hiroshi Yoshida²⁾, Tetsuji Shingu¹⁾, Takahiro Katano¹⁾,
Rieko Kuwashima¹⁾, Yasushi Toyota¹⁾, Masayuki Katsumoto¹⁾, Kazuko Ohta¹⁾,
Hideo Matsuura¹⁾, Hiroshi Kohda³⁾, Yuji Murata⁴⁾, Shinichi Yoshikawa⁴⁾ and
Fumitaka Ohsuzu⁵⁾

- 1) First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine
- 2) Medical Department, Ground Staff Office, Japan Defense Agency. First Department of Internal Medicine, National Defense Medical College
- 3) Experimental Station of Medicinal Plants, Hiroshima University School of Medicine
- 4) Biochemical Laboratory, Saraya Co., LTD
- 5) First Department of Internal Medicine, National Defense Medical College

It was undertaken to examine whether Lakanto S, developed for alternative nutrient to patients with diabetes mellitus (DM), could inhibit oxidative susceptibility of low-density lipoprotein (LDL), which has reported to be increased in DM patients. Lakanto S prolonged lag time of copper-mediated LDL oxidation in a dose-dependent manner following the concentration order of 7.5, 15, and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Lakanto S contains erythritol by 99%. That was why the effect of erythritol and glucose on copper-mediated LDL oxidation was tested. However, neither erythritol or glucose did not influence on LDL oxidizability. Therefore, extract from *Siraitia grosvenori*, which is included 1% in Lakanto S, is likely to give rise to anti-oxidative function of Lakanto S. In addition, the effective mass of anti-oxidative vitamins was not detected. Moreover, Lakanto S significantly inhibited human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)-mediated LDL oxidation at the concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results suggest that Lakanto S, provided as an alternative sweet nutrient in the diet therapy to DM patients can inhibit LDL oxidation, implying the prevention of DM complication through this anti-oxidative function.

Key words : LDL, oxidation, *Siraitia grosvenori*, alternative medical product