

タイ産 *Salacia chinensis* の生物活性： α -グルコシダーゼ阻害活性を指標とした品質評価

吉川雅之,* Yutana PONGPIRIYADACHA, 來住明宣, 蔭浦禎士,
王 涛, 森川敏生, 松田久司

Biological Activities of *Salacia chinensis* Originating in Thailand: The Quality Evaluation Guided by α -Glucosidase Inhibitory Activity

Masayuki YOSHIKAWA,* Yutana PONGPIRIYADACHA, Akinobu KISHI, Tadashi KAGEURA,
Tao WANG, Toshio MORIKAWA, and Hisashi MATSUDA
Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan

(Received May 19, 2003; Accepted July 10, 2003)

In the course of our characterization studies on anti-obese and antidiabetogenic principles in medicinal foodstuffs, we found that the methanolic extract from the stems of *Salacia chinensis* (Hippocerateaceae) showed potent anti-hyperglycemic effects in oral sucrose or maltose-loaded rats, inhibitory effects on intestinal α -glucosidase, rat lens aldose reductase, formation of Amadori compounds and advanced glycation end-products, nitric oxide production from lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophage, and radical scavenging activities. Those *in vivo* and *in vitro* biological activities were compared with those of *S. oblonga* and *S. reticulata*. In addition, we isolated the principal α -glucosidase inhibitor, salacinol, from the stems of *S. chinensis* and examined α -glucosidase inhibitory activities of eleven samples of *S. chinensis* collected in Thailand.

Key words—*Salacia chinensis*; antidiabetic activity; α -glucosidase inhibitory activity; aldose reductase inhibitory activity; radical scavenging activity; nitric oxide production inhibitor

緒 言

ゲチンムル科 (Hippocerateaceae)¹⁾ *Salacia* 属植物は、インド、スリランカを始め、タイやインドネシアなどの東南アジア、ブラジルなどの熱帯地域に広く分布し、約 120 種が知られている。スリランカ、インド、タイなどに多く自生する *Salacia* (*S. reticulata*, *S. oblonga* 及び *S. chinensis* (syn. *S. prinoidea*)) は、つる性の多年性木本で、その根部や幹は、インドやスリランカの伝統医学であるアーユルヴェーダを始め、中国やタイの伝承医学などにおいて天然薬物として利用されてきた。スリランカでは、*S. reticulata* の根皮は、リウマチ、淋病及び皮膚病の治療に用いられるほか、特に糖尿病の初期の治療に有効であると伝承されている。インドでは、*S. reticulata* や *S. oblonga* の根部が、リウマチ、淋病、皮膚病及び糖尿病の治療に用いられている。*S.*

chinensis は、*S. prinoidea* と同一植物であると言われており、インドや中国及びタイ、インドネシアなどの東南アジアに広く分布している。インドにおいては、*S. prinoidea* は糖尿病の治療のほかに、墮胎、通経、性病の治療に用いられている。^{2,3)} 一方、中国伝統医学では、*S. prinoidea* はサラツボクと称され、リウマチ性関節炎、腰筋の疲労、体力の虚脱や無力感の改善に用いられている。タイにおいては *S. chinensis* の幹の煎じ液が緩下や筋肉痛の緩和によいとされているが、糖尿病や肥満の治療に用いられることはない。⁴⁾

我々は、代表的な生活習慣病の 1 つで、現在日本人の約 1 割が発病又はその予備軍と言われている糖尿病あるいはその主たる因子の 1 つとされている肥満の予防に役立つ機能性素材を世界各地の薬用食物に求めて解明研究を進めている。⁵⁻⁹⁾ その探索研究の一環として、スリランカ産 *S. reticulata* 及びインド産 *S. oblonga* の幹及び根部エキスにショ糖負荷ラットにおける強い血糖値上昇抑制活性を見出し、

その作用メカニズムが糖質加水分解酵素阻害作用であることを明らかにした。また、活性成分として、新奇なチオ糖スルホニウム硫酸分子内塩構造を有する salacinol (1) 及び kotalanol (2) を単離するとともに、1 や 2 が、市販の α -glucosidase 阻害薬と同等の強い α -glucosidase 阻害や糖の吸収抑制作用を示すことを見出した。¹⁰⁻¹⁴ また、糖尿病性合併症である白内障や神経障害に関与するポリオール代謝系の律速酵素である aldose 還元酵素に対する阻害作用成分を探索したところ、*Salacia* 属植物から活性成分として mangiferin (3) 及び数種のトリテルペン類を見出した。^{14,15} さらに、肥満及び肝障害など種々の生活習慣病に関連した活性評価を行い、3 やポリフェノール成分などに活性を見出している (Chart 1)。^{16,17}

これまでに、タイ産 *S. chinensis* の成分として、茎から dulcitol, proanthocyanidin 及び leucopelargonin の 2 量体が単離され、葉からは proanthocyanidin が単離されている。¹⁸ また、インド産 *S. prinooides* から多数のトリテルペン成分が報告されている。¹⁹ 最近、*Salacia* 属植物の幹部や根部がダイエット素材としていわゆる健康食品に利用されるようになっている。しかし、これらの *Salacia* 属植物は、現在のところいずれも栽培化に成功しておらず、もっぱら野生品が供給されているのが現状で、基源植物の同定を始め採取地や採取時期などが明確でないことも多い。また、抗糖尿病関連の活性が伝承されていないタイ産 *S. chinensis* が、ダイエット素材として利用されている。

今回、タイ産 *S. chinensis* の 80% 含水メタノール抽出エキスについて、スリランカ産 *S. reticulata* とインド産 *S. oblonga* との比較のもとに、抗糖尿病作用や炎症に関連した活性評価試験として、i) 糖負荷ラットにおける血糖値上昇抑制作用 (*in vivo*),

ii) ラット小腸刷子縁膜由来及びパン酵母由来 α -glucosidase 阻害活性, iii) ラットレンズ由来 aldose 還元酵素阻害活性 (*in vitro*), iv) アマドリ化合物及び終末糖化産物 [advanced glycation end-products (AGEs)] 生成抑制活性, v) DPPH 及び $\cdot O_2^-$ ラジカル消去活性, vi) マウス腹腔マクロファージからのリポ多糖 (LPS) 誘発一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性について検討した。また、*S. chinensis* の 80% 含水メタノール抽出エキスから salacinol (1) を単離、同定するとともに、タイ各地で入手した *S. chinensis* についてラット小腸由来 α -glucosidase 阻害活性を比較した結果について報告する。

実 験

1. 実験材料 2000年7月、8月及び12月に採取した計11Lotの*S. chinensis*の採取地(入手地)などをTable1に示す。なお、基源植物の同定は、採集に同行した著者の1人、Yutana Pongpiriyadacha 博士により同定された。

また、比較検討に用いた *S. reticulata*¹⁰⁻¹² (スリランカ産) 及び *S. oblonga*¹³ (インド産) は、前報と同様のものを用いた。

2. *S. chinensis*, *S. oblonga* 及び *S. reticulata* 80% 含水 MeOH 抽出エキスの調製 タイにて入手した *S. chinensis* 乾燥幹部 500 g を各 Lot ごとに粉碎後、10 倍量の MeOH-H₂O (80:20, v/v) で熱時抽出し (80°C, 3 時間, 3 回), ろ過後 (アドバンテック, No. 2 ろ紙), 減圧下濃縮乾固して *S. chinensis* 80% 含水 MeOH 抽出エキスを得た。各 Lot のエキス収率は、Table 1 に示す。また、salacinol (1) の分離、精製や *in vivo* 活性評価試験にも用いた Lot I (Nakhon si thammarat 地区の沼地で 2000 年 7 月に採取) については、5.0 kg から調製した。

S. oblonga 含水 MeOH 抽出エキスは前報のものを用いた (収率 11.4%)。¹³ *S. reticulata* については、上記と同様に調製し、50 g の乾燥幹部から *S. reticulata* 含水 MeOH 抽出エキス 5.4 g (10.8%) を得た。

3. 糖負荷ラットにおける血糖値上昇抑制作用試験¹⁰⁻¹⁴ 20-24 時間絶食させた Wistar 系雄性ラット (体重 130-170 g, 紀和実験動物) に 5% アラビアゴム末 (和光純薬) 水溶液に懸濁させた被験サンプルを経口投与し、その 30 分後に各種糖質 (su-

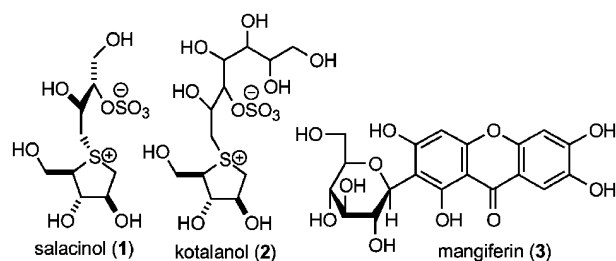


Chart 1

Table 1. Inhibitory Effects of the 80% Aqueous MeOH Extracts from *S. chinensis* in Different Sources in Thailand on Rat Intestinal α -Glucosidase

Lot	Source	Date	Yield (%)	IC ₅₀ (μ g/ml)		
				Sucrase	Maltase	
A	Chiangmai	purchased	2000/08/15	9.5	207	331
B	Bangkok	purchased	2000/07/06	13.0	117	148
C	Bangkok	purchased	2000/07/06	7.7	49	99
D	Bangkok	purchased	2000/07/06	8.8	46	172
E	Kanchanaburi	purchased	2000/08/03	9.6	145	236
F	Chantaburi	purchased	2000/12/11	9.8	51	180
G	Surtat thani	collected	2000/07/05	10.3	76	156
H	Surtat thani	collected	2000/08/06	9.8	38	162
I	Nakhon si thammarat (plane area)	collected	2000/07/03	11.0	48	118
J	Nakhon si thammarat (mountain area)	collected	2000/07/04	8.7	>400	>400
K	Krabi	collected	2000/07/05	9.4	32	115

Table 2. Effects of the 80% Aqueous MeOH Extract from *Salacia* Species on Aldose Reductase, Amadori Compounds and AGEs Formation, Redical Scavenging, and LPS-Activated NO Production

80% aq. MeOH ext.	<i>S. chinensis</i> (Lot 1)	<i>S. oblonga</i>	<i>S. reticulata</i>
Aldose reductase (IC ₅₀ μ g/ml)	3.6	3.4	36
Amadori compounds (IC ₅₀ μ g/ml)	>400	>400	>400
AGEs (IC ₅₀ μ g/ml)	139	236	234
DPPH radical (SC ₅₀ μ g/ml) ^{a)}	3.8	4.0	4.0
\cdot O ₂ ⁻ (IC ₅₀ μ g/ml) ^{b)}	3.1	4.9	2.9
NO production (IC ₅₀ μ g/ml)	52	29	27

a) Concentration required for 50% reduction of 40 μ M DPPH radical. b) Formazane formation IC₅₀.

crose, maltose あるいは glucose) の 20% (w/v) 水溶液を 5 ml/kg の用量で経口投与した。その 30 分後、1 時間後及び 2 時間後にエーテル軽麻酔下、眼窩静脈より約 0.4 ml ずつ採血した。採血した血液を遠心分離 (3000 rpm, 10 min) により血清を分離後、グルコースオキシダーゼ法 [グルコース C II テストワコー (和光純薬)] を用いて血糖値を測定した。対照群には、アラビアゴム末水溶液及び水のみを投与した。

4. α -Glucosidase 阻害活性試験

4-1. ラット小腸由来 α -Glucosidase 阻害活性試験¹⁰⁻¹⁴⁾

4-1-1. 酵素活性の測定 基質として sucrose (74 mM) 及び maltose (74 mM) 溶液 100 μ l に被験サンプル溶液 50 μ l を加え、37°C で 2-3 分間予備加温した。酵素液 50 μ l を加えて 30 分間反応させ、水 800 μ l を加え、沸騰水浴中で 2 分間加熱し、酵素を失活させた。別に、各サンプルにつき酵

素液を加えた後、直ちに水を加えて沸騰水浴中で 2 分間加熱し、酵素を失活させたものをブランクとした。生成した D-glucose の量をグルコースオキシダーゼ法 (グルコース C II テストワコー) により測定した。基質は 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、被験物質は DMSO に溶解した液をマレイン酸緩衝液に添加 (DMSO の終濃度 2.5%) して用いた。得られた値より 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。比較対照薬として acarbose 及び voglibose を用いた。

4-1-2. 酵素液の調製 Wistar 系雄性ラット (体重約 150-350 g) の空腸から、Kessler らの方法²⁰⁾により得られた刷子縁膜を粗酵素として用いた。刷子縁膜は、0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、上記の反応条件で、sucrase 阻害試験においては約 0.05 mg, maltase 阻害試験においては約 0.1 mg の D-glucose が生成する濃度に希釈して用いた。

4-2. パン酵母由来 α -Glucosidase 阻害活性試験
基質として *p*-nitrophenol- α -D-glucopyranoside (10 mM) 溶液 250 μ l に被験サンプル溶液 500 μ l を加え、37°C で 5 分間予備加温した。酵素液 [パン酵母由来, 0.038 unit/ml を 0.2% 牛血清アルブミン含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解] 250 μ l を加えて 15 分間インキュベートした。0.2 M 炭酸ナトリウム溶液を 1 ml 加えて反応を終了させ、生成した *p*-nitrophenol の量を 400 nm の吸光度から算出した。基質は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、被験物質は DMSO に溶解した液をリン酸緩衝液に添加 (DMSO の終濃度 5.0%) して用いた。得られた値より 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

5. Aldose 還元酵素阻害活性試験^{13,14,21)}

Dufrane らの方法²²⁾を一部改変して行った。すなわち、Wistar 系雄性ラットのレンズを 10 mM 2-mercaptoethanol 含有 135 mM Na, K-リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でホモジナイズし、遠心分離 (100000 g, 30 min, 4°C) した。その上清を粗酵素として用いた。粗酵素はリン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、以下の反応条件で約 10 nmol の NADP が生成する濃度に希釈して用いた。反応混合液は、500 μ l 中に 180 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0), 100 mM Li₂SO₄, 0.03 mM NADPH, 基質として 1 mM DL-glyceraldehyde, 酵素分画 100 μ l 及び被験サンプルの DMSO 溶液 25 μ l を含むように調製した。反応は、30°C 下 NADPH の添加により開始した。30 分間インキュベートした後、0.5 M HCl 150 μ l を加え反応を停止した。反応停止後、溶液に 10 mM imidazole 含有 6 M NaOH 0.5 ml を加え、20 分間 60°C で加熱し、NADP を蛍光物質に変換させた。生成した蛍光物質を、室温で蛍光分光光度計 (LS50B, Perkin Elmer) を用い測定した (励起波長 360 nm, 測定波長 460 nm)。得られた値より 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。比較対照薬として epalrestat を用いた (IC₅₀=0.023 μ g/ml)。

6. アマドリ化合物及び AGEs 生成抑制試験

Morimitsu らの方法²³⁾に準じて試験を行った。すなわち、D-glucose 200 mg, 牛血清アルブミン (BSA, 20 mg) 及び被験物質を含む 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 2.0 ml を 60°C で 48 時間インキュベーションした。アマドリ化合物の測定には、反応液 400 μ l に 0.25 mM nitroblue tetrazolium (NBT)/トリス

緩衝液 (50 mM, pH 9.0) 3.0 ml を加え、37°C で 15 min 反応させ、530 nm における吸光度の変化を求めた。一方、AGEs の生成量は、反応液 200 μ l に水 2.0 ml を加え、蛍光分光光度計を用いて蛍光強度 (励起波長 370 nm, 測定波長 440 nm) を測定することにより求めた。なお、被験物質は DMSO に溶解した後、リン酸緩衝液で希釈して用いた (DMSO 終濃度 2.5%)。AGEs 生成抑制試験における比較対照薬として aminoguanidine を用いた (IC₅₀=172 μ g/ml)。

7. ラジカル消去活性試験²⁴⁾

7-1. DPPH ラジカル消去活性試験 0.1 M 酢酸一酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 1.0 ml, 200 μ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルのエタノール溶液 0.5 ml, 各濃度の被験物質のエタノール溶液 1.0 ml を混合した。室温にて 30 分間放置した後、517 nm における吸光度を測定し、吸光度の変化から DPPH ラジカル (終濃度 40 μ M) を 50% を消去するのに要した被験物質の濃度 (SC₅₀) を算出した。なお、被験物質は DMSO に溶解した後、エタノールで希釈して用いた (DMSO 終濃度 1.0%)。比較対照として α -tocopherol (SC₅₀=4.2 μ g/ml), (+)-catechin (SC₅₀=1.7 μ g/ml) 及び gallic acid (SC₅₀=0.66 μ g/ml) を用いた。

7-2. \cdot O₂ 消去活性試験 Imanari らの方法²⁵⁾に準じて試験を行った。すなわち、100 μ M xanthine, 100 μ M EDTA, 25 μ M NBT, 空試験での吸光度が 0.2—0.23 になるように調製した xanthine oxidase, 0.005% ウシ血清アルブミン, 40 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.2) 及び被験サンプルを含む反応液 3.0 ml を 25°C で 20 分間インキュベーションした。インキュベーション後、 \cdot O₂ により還元されて生成した NBT formazan の吸光度を 560 nm を測定波長として測定した。得られた値より 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。比較対照として (+)-catechin (IC₅₀=1.5 μ g/ml) 及び gallic acid (IC₅₀=0.34 μ g/ml) を用いた。

8. NO 産生抑制活性試験²⁶⁾ ddY 系雄性マウス (体重約 30 g, 紀和実験動物) を頸椎脱臼により致死させた後に、腹部の体皮を剥離し、氷冷した Ca²⁺, Mg²⁺ 不含リン酸緩衝化生理食塩水 [PBS (-)] 7 ml で腹腔内を洗浄し、洗浄液を回収した。回収した洗浄液を遠心分離 (1000 rpm, 10 min, 4°C)

し、PBS(-)で2回洗浄した後に、5%ウシ胎仔血清(FCS)、100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 培地(GIBCO)に懸濁した。次に、96 ウェル平底マイクロプレートに 5.0×10^5 cells (100 μ l medium/well) ずつ播種し、1時間前培養(95% O₂-5% CO₂, 37°C)し、PBS(-)で洗浄した後に、被験物質及び10 μ g/ml LPS (*Salmonella enteritidis* 由来, Sigma)を含む培地で20時間培養した。培養上清中に蓄積したNO酸化物NO₂⁻を Griess 法により定量した。すなわち、培養上清に同量の Griess 試薬(1%スルファニルアミド/0.1% N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩/2.5%リン酸)を加えて混和し、10分間室温で放置した後に、マイクロプレートリーダー(model 550, BIO-RAD)にて吸光度(測定波長 570 nm, 参照波長 655 nm)を測定し、培地で希釈したNaNO₂をスタンダードとして培養上清に蓄積したNO₂⁻を定量した。また、被験サンプルによる細胞毒性については MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] アッセイ法を用い、生成した MTT formazan を 0.04 M HCl 含有 2-propanol で溶解した後に、マイクロプレートリーダーにて吸光度(測定波長 570 nm, 参照波長 655 nm)を測定した。なお、被験物質は DMSO に溶解し、培地に添加した(DMSOの終濃度 0.5%)。

阻害率[inhibition(%)]は、下式により計算し、50%阻害濃度(IC₅₀)は、濃度-阻害曲線から算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

A-C: NO₂⁻ 濃度 (μ M)

A: LPS (+), sample (-)

B: LPS (+), sample (+)

C: LPS (-), sample (-)

比較対照物質として N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, IC₅₀=7.0 μ g/ml), caffeic acid phenylester (CAPE, IC₅₀=1.1 μ g/ml) 及び guanidinoethylsulfide (GED, IC₅₀=0.43 μ g/ml) を用いた。

8-1. 統計処理 また、数値は平均値±標準誤差(S.E.)で表し、対照群と被験薬物群の平均値の差の検定には、一元配置の分散分析後、Dunnettの方法を用いた。

9. *S. chinensis* から Salacinol (1) の単離 S.

chinensis 乾燥幹部 (Lot I, 5.0 kg) から得た 80% 含水 MeOH 抽出エキス (551 g, 11.0%) のうち、538 g を EtOAc/H₂O (1:1, v/v) にて溶媒分配し、EtOAc 移行部 (66.6 g, 1.4%) 及び H₂O 移行部 (471.4 g, 9.6%) を得た。得られた H₂O 移行部のうち、42.0 g について、カラムクロマトグラフィー [1.0 kg, NH Chromatorex, 200-350 mesh, (Fuji Silysia Chemical Ltd.), H₂O→MeOH] に付し、H₂O 溶出部 (6.2 g) 及び MeOH 溶出部 (35.8 g) を得た。得られた H₂O 溶出部 (2.0 g) を HPLC [detection: RI, column: YMC-Pack Polyamine II, 250×20 mm, i.d. (YMC Co., Ltd.), mobile phase: CH₃CN-H₂O (60:40 or 70:30, v/v)] にて分離精製し、salacinol (1, 14 mg, 0.0099%), dulcitol (347 mg, 0.25%) 及び sucrose (68 mg, 0.048%) を得た。単離した化合物は、それらの旋光度、MS 及び NMR などの物理化学データを標品のデータと直接比較することにより同定した。^{10,12)}

結果及び考察

1. *Salacia* 属植物 MeOH 抽出エキスの糖負荷ラットにおける血糖値上昇抑制作用 3種の *Salacia* 属植物、*S. chinensis*, *S. oblonga* 及び *S. reticulata* の MeOH 抽出エキスの糖負荷ラットにおける血糖値上昇抑制作用を Tables 3-5 に示す。Sucrose 負荷ラットにおいて、*S. chinensis* の MeOH エキスは有意な抑制作用を示すものの、その活性強度は *S. oblonga* 及び *S. reticulata* の MeOH エキスと比べて、若干弱い傾向が認められた (Table 3)。また、maltose 負荷モデルにおいて *S. chinensis* エキスは、*S. oblonga* エキスと同程度の有意な抑制作用を示したが、*S. reticulata* エキスと比べると弱い傾向が認められた (Table 4)。一方、glucose 負荷ラットにおいては、3種のエキスいずれも血糖値の上昇抑制作用が認められなかったことから (Table 5)、*S. oblonga* 及び *S. reticulata* と同様に *S. chinensis* についてもその作用メカニズムとして、消化管内における糖質加水分解酵素阻害活性が示唆された。そして、*S. chinensis* から salacinol (1) が単離されたことから、活性本体は、*S. oblonga* や *S. reticulata* と共通することが確認された。

2. *Salacia* 属植物含水 MeOH 抽出エキスの α -Glucosidase 阻害活性、Aldose 還元酵素阻害活性及

Table 3. Inhibitory Effects of the 80% Aqueous MeOH Extract from *Salacia* Species on Serum Glucose Levels in Sucrose-loaded Rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	N	Serum glucose (mg/dl)		
			0.5 h	1.0 h	2.0 h
Normal	—	10	76.9±2.4**	95.9±5.9**	93.7±5.7**
Control	—	10	184.1±4.7	154.6±4.3	129.0±3.3
<i>S. chinensis</i>	50	6	147.5±5.7**	147.5±5.4	126.4±7.8
	100	6	148.7±10.4**	142.7±7.1	122.3±2.7
	200	6	113.7±4.3**	126.6±6.7**	129.7±7.7
<i>S. oblonga</i>	50	6	141.2±4.1**	130.4±5.7*	117.6±5.8
	100	6	137.8±7.1**	138.9±6.1	124.9±3.8
	200	6	102.5±4.5**	108.3±4.2**	116.1±3.0
<i>S. reticulata</i>	50	5	145.6±7.6**	129.4±3.1*	123.2±2.3
	100	5	115.1±6.4**	117.1±8.1**	126.2±4.4
	200	5	94.6±3.7**	104.8±5.4**	104.6±3.9**

Each value represents the mean±S.E.M.
Significantly different from the control: * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Table 4. Inhibitory Effects of the 80% Aqueous MeOH Extract from *Salacia* Species on Serum Glucose Levels in Maltose-loaded Rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	N	Serum glucose (mg/dl)		
			0.5 h	1.0 h	2.0 h
Normal	—	10	82.4±4.9**	96.3±5.1**	90.8±3.9**
Control	—	10	213.9±7.1	183.6±10.4	129.6±3.1
<i>S. chinensis</i>	50	6	198.2±8.6	183.6±4.3	130.1±4.0
	100	6	188.1±8.0	184.2±8.4	131.9±2.5
	200	6	150.6±7.7**	159.0±7.5	144.1±3.2
<i>S. oblonga</i>	50	6	188.1±8.8	187.2±13.0	146.9±10.3
	100	6	159.7±12.3**	165.9±6.0	136.5±3.9
	200	6	146.8±15.8**	157.6±10.7	139.3±5.8
<i>S. reticulata</i>	50	5	162.4±14.3**	167.6±4.9	141.6±5.3
	100	5	167.1±11.0**	159.1±8.3	141.1±4.1
	200	5	118.6±8.1**	135.5±5.9**	129.4±3.7

Each value represents the mean±S.E.M.
Significantly different from the control: ** $p<0.01$.

び AGEs 生成抑制活性 ラット小腸刷子縁膜を粗酵素として用い, *in vivo* 糖負荷試験で有意な血糖値上昇抑制作用の認められた sucrose 及び maltose を基質 (基質濃度 37 mM) としてラット小腸由来 α -glucosidase (sucrase 及び maltase) 及び *p*-nitrophenol- α -D-glucopyranoside を基質 (基質濃度 2.5 mM) としてパン酵母由来 α -glucosidase に対する酵素阻害活性試験を実施した。Table 6 に結果を示すが, 小腸由来の主な α -glucosidase として maltase 及び sucrase を測定したところ, *S. chinensis*

(ロット I) エキスは *S. reticulata* や *S. oblonga* エキスに比べやや弱い活性を示す傾向にあった。一方, パン酵母由来の酵素活性に対しては, いずれのエキスも阻害活性が減弱する傾向にあった。小腸由来の maltase や sucrase に対して強い活性を示した acarbose や salacinol 及び kotalanol においては, パン酵母由来の酵素活性に対してほとんど阻害活性を示さず, 酵素に対する特異性が認められた。これらの結果から, α -glucosidase 阻害活性試験に繁用されているパン酵母由来の α -glucosidase は小腸内で

Table 5. Inhibitory Effects of the 80% Aqueous MeOH Extract from *Salacia* Species on Serum Glucose Levels in Glucose-loaded Rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	N	Serum glucose (mg/dl)		
			0.5 h	1.0 h	2.0 h
Normal	—	10	84.9±4.8**	87.9±3.4**	92.6±3.8
Control	—	10	191.4±6.0	157.9±5.3	119.7±2.6
<i>S. chinensis</i>	50	6	196.5±5.0	181.1±12.4	141.0±16.0
	100	6	198.5±8.0	172.8±4.6	124.8±3.0
	200	6	174.9±12.9	180.1±15.8	151.1±25.4
<i>S. oblonga</i>	50	6	186.1±10.4	174.5±9.8	133.6±6.3
	100	6	191.2±5.6	189.8±7.0	149.2±9.9
	200	6	201.4±7.1	171.5±3.5	130.5±4.3
<i>S. reticulata</i>	50	5	173.2±11.3	163.6±14.9	148.2±23.3
	100	5	194.7±10.8	184.0±13.5	154.0±22.0
	200	5	198.3±16.8	199.9±26.4	176.0±40.1

Each value represents the mean±S.E.M.
Significantly different from the control: ** $p<0.01$.

Table 6. Effects of the 80% Aqueous MeOH Extract from *Salacia* Species on Intestinal α -Glucosidase and Yeast α -Glucosidase (IC_{50} μ g/ml)

	Intestinal α -glucosidase		Yeast α -glucosidase
	Sucrose (37 mM)	Maltose (37 mM)	<i>p</i> -nitrophenol- α -D-glucopyranose (2.5 mM)
<i>S. chinensis</i> (Lot I)	48	118	133
<i>S. oblonga</i>	24	66	64
<i>S. reticulata</i>	18	60	87
Salacinol (1)	0.84	3.2	>400
Kotalanol (2)	0.58	2.8	>400
Acarbose	1.1	1.3	>400
Voglibose	0.059	0.32	>400

の糖質加水分解酵素への影響を調べるには適していないことが明らかとなった。Table 6 に示す *S. oblonga* 及び *S. reticulata* 含水 MeOH 抽出エキスにおける IC_{50} 値と比較して、Table 1 及び Fig. 1 に示した合計 11 ロットの *S. chinensis* 含水 MeOH 抽出エキスの活性強度は、同程度のものからほとんど活性の認められない Lot (Lot J の sucrase 及び maltase 阻害活性はいずれも >400 μ g/ml) も存在し、活性強度には大きな差異が認められた。

一方、aldose 還元酵素は、ポリオール代謝系における律速酵素であり、その阻害物質は糖尿病性合併症の白内障や末梢神経障害の治療薬として開発されている。*Salacia* 属植物の含水 MeOH 抽出エキスについて、aldose 還元酵素阻害活性を検討した結果を

Table 2 に示すが、*S. chinensis* 及び *S. oblonga* に顕著な活性が認められた。*S. oblonga* の aldose 還元酵素阻害活性成分については、mangiferin (3) や複数のトリテルペン成分であることを見い出していることから、¹³⁻¹⁵⁾ *S. chinensis* の活性成分についても、3 や含有トリテルペン成分であることが推察された。

蛋白質の非酵素的糖化によって生成される AGEs は糖尿病性腎症を含めた糖尿病の合併症の成因に深く関わっている。²⁷⁾ 今回、我々は *in vitro* 試験における AGEs 生成抑制活性を比較検討した。AGEs は蛍光法により測定し、また、アマドリ転移によって生成するアマドリ化合物は NBT と反応させて測定した。*Salacia* 属植物の 80% 含水 MeOH 抽出エキ

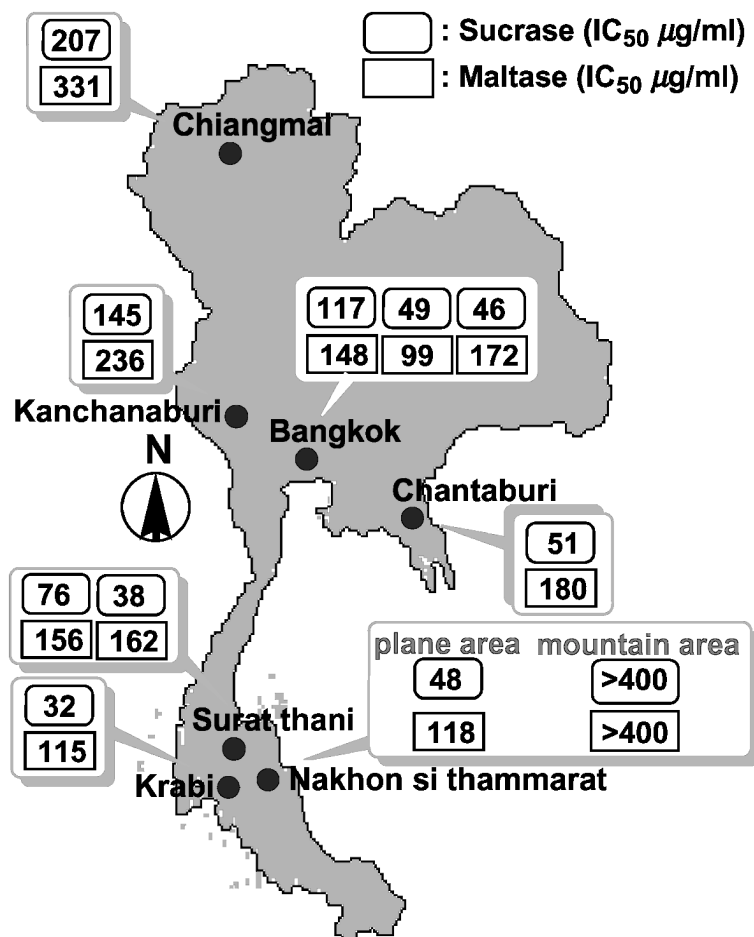


Fig. 1. Map of Thailand

スについて検討した結果を Table 2 に示すが、いずれにも AGEs 産生抑制活性が認められ、特に、*S. chinensis* エキスに強い活性が認められた。なお、アマドリ化合物の生成にはいずれのエキスもほとんど抑制活性は認められなかった ($IC_{50} = >400 \mu\text{g/ml}$)。

3. *Salacia* 属植物含水 MeOH 抽出エキスのラジカル消去活性及びマウス腹腔マクロファージからの LPS 誘発 NO 産生抑制活性 前報において *S. reticulata* から調製した MeOH エキス及び mangiferin (3) などの主要成分に DPPH ラジカル消去活性があることを報告した。¹³⁻¹⁵⁾ また、炎症部位においては好中球やマクロファージから産生される $\cdot\text{O}_2^-$ や NO などの過剰に産生されるラジカル種は防御物質としての役割を有している反面、各種臓器障害や炎症を悪化させる原因や酸化ストレスによる生活習慣病とも関連している。*Salacia* 属植物はリウマチなどの炎症性疾患にも有効であると伝承され

ていることから、今回、*in vitro* 試験において、DPPH ラジカル及び xanthine-xanthine oxidase 法で生成した $\cdot\text{O}_2^-$ に対する消去活性及び活性化マクロファージからの NO 産生に対する抑制活性について検討した。

Table 2 に示したように、DPPH ラジカル及び $\cdot\text{O}_2^-$ の消去活性を検討したところ、3 種のエキスでの活性強度はほぼ同等で、比較対照に用いた (+)-catechin の半分程度の消去活性が認められ、抗酸化作用を示す素材としても有望であることが認められた。また、NO 産生抑制活性については、*S. oblonga* 及び *S. reticulata* に比較対照の L-NMMA と同程度の活性を見出し、*S. chinensis* は若干弱い作用であった。

4. α -Glucosidase 阻害活性を指標としたタイ産 *S. chinensis* の品質評価 タイ各地で入手した *S. chinensis* 幹部について、sucrase 及び maltase に対する阻害活性を比較した。*S. chinensis* はタイ南部

に主として生育していることから, Surtat thani や Nakhon si thammarat 及び Krabi 近郊では野生品を採集したものを検体 (Lot G—K) とした. Bangkok, Chantaburi, Kanchanaburi 及び Chiangmai では市内薬局で購入した生薬 (Lot A—F) を用いた.

Nakhon si thammarat, Surat thani 及び Krabi 近郊の沼地や湿地帯で採取した *S. chinensis* (Lot G—I, K) は, ほぼ同様の α -glucosidase 阻害活性が認められたが, それら地域の間地点とも言える Nakhon si thammarat 西北部の山地で採取した *S. chinensis* (Lot J) には活性が認められなかった. 各種クロマトグラフィーの比較検討から, テルペノイド成分や **3** などの成分はほぼ共通しており, 植物学的にも同一であることが確認されたが,^{28,29)} 沼地と山地における *S. chinensis* の α -glucosidase 阻害活性の差異は, salacinol (**1**) などの生合成と関連して興味深い知見と考えられる.

一方, Bangkok などの北部都市の薬局で購入した *S. chinensis* については, いずれも採取地や採取年度が不明であったが, 切断面が褐色を帯びるなど明らかに古い検体 (Lot A, B, E) の阻害活性は弱い傾向が認められた.

これまでに我々は *Salacia* 属植物の *S. oblonga* 及び *S. reticulata* に強い α -glucosidase 阻害活性を有する salacinol (**1**) 及び kotalanol (**2**) を始め, aldose 還元酵素阻害活性や抗酸化作用を示す mangiferin (**3**) などのポリフェノール成分やトリテルペン成分などの多種の成分を含有していることを明らかにしている. 今回, 同属の *S. chinensis* についても同様に抗糖尿病作用や抗炎症作用が期待できることを明らかにし, 活性本体は salacinol (**1**) であることを確認した. また, タイにおける *S. chinensis* の産地別の品質調査を実施し, 各地域にて入手したサンプルについて α -glucosidase 阻害活性を検討したところ, Lot 間で活性強度に大きな差異のあることが判明した.

REFERENCES

- 1) The family of *Salacia* spices are recently classified as Hippocrateaceae rather than Celastraceae.
- 2) Yoshikawa M., *FOOD Style* 21, **6**, 72–78 (2002).

- 3) Yoshikawa M., *Food Science*, **44**, 26–30 (2002).
- 4) Chuakul W., Saralamp P., Paonil W., Temsiririkkul R., Clayton T., “Medicinal Plants in Thailand,” Vol. II, Department of Pharmaceutical Botany Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, 1997, pp. 192–193.
- 5) Yoshikawa M., *Farumashia*, **34**, 555–557 (1998).
- 6) Yoshikawa M., *up-to-date Food Processing*, **34**, 4–8 (1999).
- 7) Yoshikawa M., *Fragrance Journal*, **29**, 13–23 (2001).
- 8) Yoshikawa M., “Remarkable Advance of Medicinal Plant,” ed. by Satake M., CMC Co., Ltd., Tokyo, 2001, pp. 184–195.
- 9) Yoshikawa M., *Kagaku To Seibutsu*, **40**, 172–178 (2002).
- 10) Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G., Muraoka O., *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8367–8370 (1997).
- 11) Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1339–1340 (1998).
- 12) Yoshikawa M., Morikawa T., Matsuda H., Tanabe G., Muraoka O., *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 1547–1554 (2002).
- 13) Matsuda H., Murakami T., Yashiro K., Yamahara J., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1725–1729 (1999).
- 14) Matsuda H., Morikawa T., Yoshikawa M., *Pure Appl. Chem.*, **74**, 1301–1308 (2002).
- 15) Yoshikawa M., Nishida N., Shimoda H., Takada M., Kawahara Y., Matsuda H., *Yakugaku Zasshi*, **121**, 371–381 (2001).
- 16) Yoshikawa M., Ninomiya K., Shimoda H., Nishida N., Matsuda H., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 72–76 (2002).
- 17) Yoshikawa M., Shimoda H., Nishida N., Takada M., Matsuda H., *J. Nutr.*, **132**, 1819–1824 (2002).
- 18) Krishnan V., Rangaswami S., *Tetrahedron Lett.*, **26**, 2441–2446 (1967).
- 19) Rogers D., Phillips F. L., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1048–1049 (1980).
- 20) Kessler M., Acuto O., Storelli C., Murer H., Müller M., Semenza G., *Biochim. Biophys. Acta*, **506**, 136–154 (1978).

- 21) Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 788–795 (2002).
- 22) Dufrane S. P., Malaisse W. J., Sener A., *Biochem. Med.*, **32**, 99–105 (1984).
- 23) Morimitsu Y., Yoshida K., Esaki S., Hirota A., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2018–2021 (1995).
- 24) Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Park J.-Y., Harima S., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 41–50 (2001).
- 25) Imanari T., Hirota M., Miyazaki M., Hayakawa K., Tamura Z., *Igaku No Ayumi*, **101**, 496–497 (1977).
- 26) Matsuda H., Morikawa T., Ando S., Toguchida I., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 1995–2000 (2003).
- 27) Ulrich P., Cerami A., *Recent Prog. Horm. Res.*, **56**, 1–21 (2001).
- 28) Morikawa T., Kishi A., Pongpiriyadacha Y., Matsuda H., Yoshikawa M., *J. Nat. Prod.* **66** (2003) (in press).
- 29) Kishi A., Morikawa T., Matsuda H., Yoshikawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **51** 1051–1055 (2003).