

博士學位論文

Salacia chinensis の抗糖尿病作用と
品質評価に関する研究

赤木 淳二

博士學位論文

Salacia chinensis の抗糖尿病作用と
品質評価に関する研究

平成27年11月26日

赤木 淳二

目次

| | |
|---|----|
| 序論 | 1 |
| 本論 | 6 |
| 第一章 <i>Salacia chinensis</i> 幹部抽出エキスの抗糖尿病作用 | 6 |
| 第一節 正常ラットに対する血糖上昇抑制効果の検討 | 6 |
| 第二節 2型糖尿病マウスに対する抗糖尿病作用の検討 | 9 |
| 第二章 スルホニウム化合物を指標とした <i>Salacia</i> 属植物の品質評価 | 12 |
| 第一節 Salacinol (1) および kotalanol (3) の LCMS 分析法の検討 | 12 |
| 第二節 Neosalacinol (2) および neokotalanol (4) の LCMS 分析法の検討 | 15 |
| 第三節 <i>Salacia</i> 属植物中スルホニウム化合物 (1—8) 含量の測定 | 18 |
| 第三章 塩基配列情報に基づく <i>Salacia chinensis</i> の鑑別 | 26 |
| 第一節 <i>Salacia</i> 属植物の rDNA ITS 領域の塩基配列の比較 | 26 |
| 第二節 市場に流通する <i>Salacia</i> 属植物の鑑別 | 30 |
| 結論 | 32 |
| 実験の部 | 34 |
| 参考文献 | 60 |
| 謝辞 | |

序 論

厚生労働省「平成 24 年国民健康・栄養調査」によると、糖尿病が強く疑われる人は全国に約 950 万人、糖尿病の可能性が否定できない人は約 1,100 万人と推定され、¹⁾ 実に 5 人に 1 人が糖尿病かその予備軍であるとされている。糖尿病は、インスリン作用の不足などによって引き起こされる慢性の高血糖状態を特徴とする代謝性疾患であり、合併症として網膜症、腎症、神経障害など多くの重篤な障害を発症することで知られている。これらの合併症を一旦発症すると、生活の質 (QOL) は著しく低下し、また心臓病や脳卒中など直接死亡リスクに繋がる動脈硬化を併発する可能性も高まるため、糖尿病の進展予防や治療の向上は重要な課題であるといえる。²⁻⁴⁾ 糖尿病を引き起こさないためには、食事や運動などの生活習慣を見直し、体重をコントロールすることが重要とされている。実際、生活習慣の改善を促す介入試験において、2 型糖尿病の改善効果が多数報告されている。⁵⁻⁸⁾ 一方、近年、糖尿病治療薬のひとつである α -グルコシダーゼ阻害 (α -GI) 薬を服用することでも、2 型糖尿病の発症を抑制できることが大規模臨床試験によって明らかにされており、^{9,10)} 生活習慣の改善と併せて、食後高血糖の是正が糖尿病の発症や進展を防ぐひとつのアプローチとなっている。

Salacia 属植物 (*Salacia chinensis*, *S. reticulata* および *S. oblonga*) は、インド、スリランカをはじめ、タイやインドネシアなどの東南アジア一帯に広く分布するつる性の多年生木本であり (Figure 1), 現地においてその根や幹の煎じ液が糖尿病の予防や改善を目的に古くから利用されている。¹¹⁾



Fig. 1. *Salacia chinensis*

1997年、吉川らは、スリランカ産 *S. reticulata* 根部の抽出エキスに顕著な α -GI 活性を見いだすとともに、その活性成分としてチオ糖スルホニウム分子内硫酸塩構造を有する salacinol (1) を単離・構造決定した。^{12,13)} その後、インド産 *S. oblonga* や タイ産 *S. chinensis* からも salacinol (1) が単離同定されるとともに、^{14,15)} 1 の類縁体である neosalacinol (2),^{16,17)} kotalanol (3),¹⁸⁾ neokotalanol (4),^{19,20)} ponkoranol (5),²¹⁾ neoponkoranol (6),²²⁾ salaprinol (7)²¹⁾ および neosalaprinol (8)²²⁾ が相次いで単離・構造決定されている (Figure 2)。これらのスルホニウム化合物 (1—8) のうち、1—6 に関しては、acarbose や voglibose などの市販の α -GI 薬と同程度の活性を有することがラット小腸由来 α -グルコシダーゼを用いた実験より明らかにされており (Table 1),²³⁾ これらの化合物をモデルとした新規糖尿病治療薬の創製を目指した合成研究が盛んに行われている。²⁴⁾ また、*Salacia* 属植物の根や幹の抽出エキスは、ラットやマウスを用いた糖負荷試験によって血糖値に対する作用が検証されており、*S. reticulata* や *S. oblonga* の抽出エキスを中心に、食後高血糖の改善効果が報告されている。^{11,12,15)}

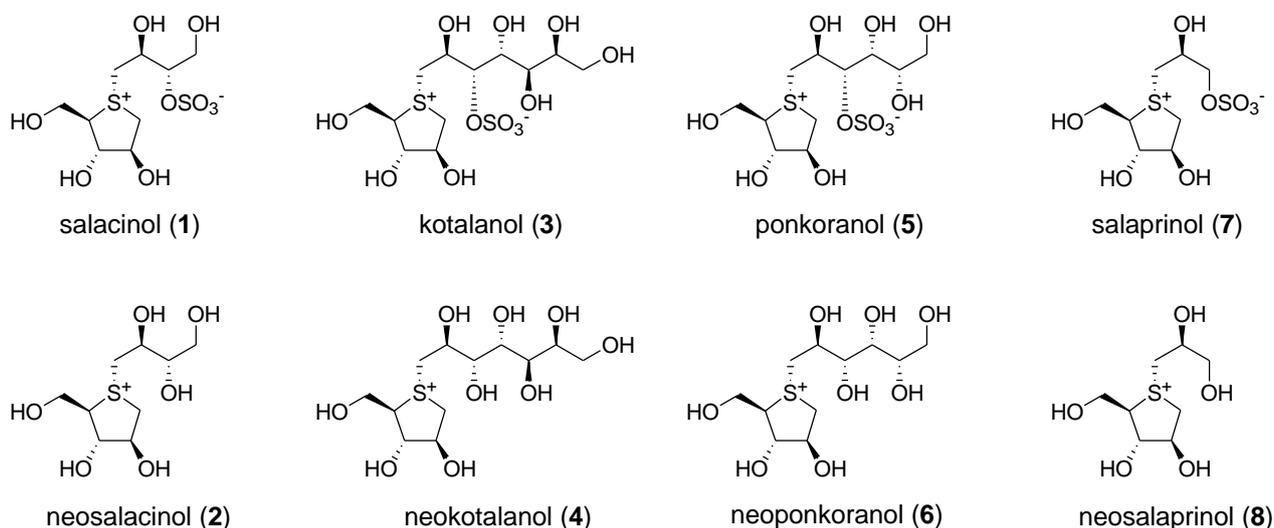


Fig. 2. Structure of sulfonium constituents isolated from *Salacia* species

Table 1. IC₅₀ Values of 1—8 for rat small intestinal α -glucosidases

| Compound | IC ₅₀ (μ M) [(μ g/mL)] | | |
|-------------------|---|--------------|-------------|
| | Maltase | Sucrase | Isomaltase |
| Salacinol (1) | 6.0 [2.0] | 1.3 [0.42] | 1.3 [0.44] |
| Kotalanol (3) | 2.0 [0.86] | 0.43 [0.18] | 1.8 [0.78] |
| Ponkoranol (5) | 5.6 [2.2] | 0.41 [0.16] | 4.6 [1.8] |
| Salaprinol (7) | >329 [>100] | >329 [>100] | 14 [4.4] |
| Neosalacinol (2) | 22.2 [5.65] | 2.5 [0.65] | 0.68 [0.17] |
| Neokotalanol (4) | 1.6 [0.54] | 1.5 [0.53] | 0.46 [0.16] |
| Neoponkoranol (6) | 5.1 [1.6] | 1.0 [0.32] | 1.4 [0.43] |
| Neosalaprinol (8) | >444 [>100] | 90 [20] | 6.5 [1.5] |
| Acarbose | 1.7 [1.1] | 1.5 [1.0] | 645 [417] |
| Voglibose | 1.3 [0.34] | 0.22 [0.060] | 2.2 [0.58] |
| Miglitol | 8.2 [1.7] | 0.43 [0.090] | 4.6 [0.96] |

Salacia 属植物の生理活性や含有成分が解明されるにつれて、*Salacia* 属植物は血糖値が気になる人のための健康食品素材「サラシア」として国内でも認知されるようになり、最近では顆粒剤や錠剤などのさまざまな健康食品として広く流通するようになっている。サラシアの需要が高まる一方で、これまでサラシアの原材料には野生品が用いられているため、その資源性や供給安定性の確保が大きな課題となっている。現在国内では、先行して研究が行われた背景から、*S. reticulata* や *S. oblonga* がサラシアの原材料として主に使用されており、これらについては有用植物の資源保護の観点からも既に栽培化の検討が着手されている。しかし、これらの栽培品が十分に生育するまでには時間を要するため、これまでのところ商業利用には至っていない。そこで著者は、*S. reticulata* や *S. oblonga* と同じく α -GI 活性を有し、地域分布が広く資源量が比較的豊富な *S. chinensis* に着目し、その利用拡大を目指した評価研究の一環として、タイ産 *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス (SCE) の血糖値や糖尿病に対する作用を *in vivo* 試験にて評価することとした。

はじめに SCE について、正常ラットに投与したときの血糖上昇抑制作用について検討した。これまで *S. chinensis* については、糖質としてスクロースやマルトースを用いた糖負荷試験において血糖上昇抑制作用が報告^{12,15)} されているが、通常食事由来の糖質は主に米飯や小麦などに由来するデンプンであるため、今回糖質にデンプンを用いて試験を実施した。その結果、SCE はデンプン負荷後の血糖値の上昇を用量依存的に抑制し (ED₅₀=94.0

mg/kg), その効果は糖質との同時投与において強く発揮されることを確認した. また, 代表的なスルホニウム化合物についても評価を行った結果, ED₅₀ は, **1** : >1.0 mg/kg, **3** : 0.62 mg/kg および **4** : 0.54 mg/kg であり, neokotalanol (**4**) がデンプン負荷に対して強い血糖上昇抑制作用を示すことを明らかにした. また, これらのスルホニウム化合物はその極性の高い構造から小腸から吸収され難いと予想されるため, 消化管内における安定性や吸収性についても評価を行った. その結果, **1—4** は胃液に安定であり, 小腸からほとんど吸収されないことを確認した.²⁵⁾

さらに, 2 型糖尿病モデル動物に SCE を混餌投与したときの抗糖尿病作用についても検討した結果, SCE は長期的な血糖コントロールの指標である HbA1c の上昇を抑えるとともに, 耐糖能の改善効果を有することを明らかにした. さらにこの効果の作用機序を検討した結果, α -GI 活性を介した作用であることを確認した.²⁵⁾ (第一章)

また, 昨今の消費者の食の安全への関心の高まりを背景に, 食品の品質を一定に保つことが安全性のみならず有効性の観点からも重要視されている. 特に野生品を原材料とする場合, 採取時期や採取場所などによって, 生理活性強度や含有成分が大きく変動することがあるため, 使用する原材料の規格に基原や成分含量などの一定の基準を定めておくことが重要といえる. *Salacia* 属植物においては, 以前から野生品が原材料に用いられているが, その規格管理は主に α -GI 活性を指標とした生物学的手法により行われている.¹⁵⁾ 一方, スルホニウム化合物 (**1—8**) は, これまでのところ *Salacia* 属植物からのみ単離されている特徴成分であり, また *Salacia* 属植物の α -GI 活性の活性寄与成分であることから, **1—8** の定量分析に基づく化学的品質評価法の確立が強く望まれている.

これらの背景をもとに, 著者は高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LCMS) を用いたスルホニウム化合物 (**1—8**) の定量分析法を確立し^{26,27)}, 種々の *Salacia* 属植物サンプルについてその含有量を調査した. その結果, 根および幹部サンプルについては, salacinol (**1**) あるいは neokotalanol (**4**) が主要なスルホニウム化合物であることを明らかにするとともに²³⁾, エキス中のスルホニウム化合物含量と α -GI 活性とが良好な相関関係にあることを見だし, スルホニウム化合物の定量分析が *Salacia* 属植物の生理活性の規格管理に利用

可能であることを明らかにした.²⁷⁾ (第二章)

また、基原種や使用部位といった基原情報の正しい原材料を使用することも品質保証において重要な要素である。一般的に *Salacia* 属植物は外部や内部組織などの形態学的特徴による基原種の鑑別が行われているが、薬用部位である根や幹は断片化された木片や粉末の状態で市場に流通していることも多く、形態学的特徴を失っている時の基原種の同定は困難である。

そこで形態学的特徴による基原種の同定法を支援する目的で遺伝子情報を利用した鑑別法を検討した結果、*S. chinensis* について *S. reticulata* および *S. oblonga* と識別可能な塩基配列を見いだすとともに、実際にインドやスリランカ、タイの市場に流通する *Salacia* 属植物サンプルを用いて、これらの配列が基原鑑別に利用可能であることを明らかにした。²⁸⁾ (第三章)

本 論

第一章 *Salacia chinensis* 幹部抽出エキスの抗糖尿病作用

第一節 正常ラットに対する血糖上昇抑制効果の検討

タイ産 *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス末 (SCE) および主要なスルホニウム化合物である salacinol (**1**), kotalanol (**3**), neokotalanol (**4**) について, ラットを用いたデンプン負荷試験を実施した. 血糖値の推移を Table 2 に示した.

Table 2. Effects of SCE and principal sulfoniums (**1**, **3**, and **4**) on blood glucose levels in starch-loaded rats

| Group | Dose (mg/kg) | Blood glucose (mg/dL) | | | | | iAUC _{0-2h} (mg·h/dL) | ED ₅₀ (mg/kg) |
|----------|-----------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|------------|------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | | 0 h | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h | | |
| Normal | — | 64.6 ± 2.1 | 69.9 ± 2.0 ^b | 68.5 ± 3.6 ^b | 61.5 ± 5.1 | 62.0 ± 4.2 | 0.0 ± 6.0 ^b | |
| Control | — | 63.9 ± 3.8 | 126.1 ± 6.3 | 107.6 ± 11.4 | 65.9 ± 7.9 | 54.3 ± 5.1 | 59.5 ± 14.5 | |
| SCE | 10 | 67.8 ± 3.8 | 124.1 ± 6.3 | 106.0 ± 6.3 | 69.8 ± 4.9 | 65.6 ± 3.2 | 60.2 ± 9.0 | 94.0 |
| | 30 | 72.9 ± 2.8 | 101.9 ± 3.9 ^a | 96.8 ± 4.7 | 66.8 ± 2.6 | 61.3 ± 4.1 | 41.9 ± 5.7 | |
| | 100 | 68.0 ± 2.5 | 86.5 ± 7.5 ^b | 90.5 ± 4.7 | 68.8 ± 7.1 | 66.9 ± 6.0 | 29.3 ± 9.8 | |
| | 300 | 67.1 ± 2.1 | 81.1 ± 2.1 ^b | 79.6 ± 3.3 ^b | 63.1 ± 3.5 | 56.5 ± 2.9 | 15.4 ± 4.7 ^b | |
| 1 | 0.21 | 65.9 ± 3.7 | 107.3 ± 8.1 | 99.6 ± 6.3 | 69.4 ± 3.4 | 59.6 ± 3.4 | 46.3 ± 7.8 | > 2.06 |
| | 0.69 | 68.3 ± 2.1 | 101.5 ± 5.1 ^a | 107.4 ± 3.3 | 73.3 ± 4.9 | 56.0 ± 3.5 | 51.8 ± 4.3 | |
| | 2.06 | 69.6 ± 3.9 | 88.3 ± 4.7 ^b | 93.1 ± 3.0 | 71.4 ± 3.0 | 54.5 ± 4.2 | 33.8 ± 4.4 | |
| 3 | 0.15 | 67.3 ± 2.5 | 110.1 ± 6.1 | 100.0 ± 6.8 | 68.0 ± 4.4 | 61.6 ± 2.5 | 47.7 ± 10.2 | 0.62 |
| | 0.49 | 69.9 ± 1.9 | 94.9 ± 3.1 ^b | 86.5 ± 4.1 | 65.1 ± 4.6 | 62.1 ± 3.2 | 29.1 ± 6.1 | |
| | 1.48 | 69.9 ± 2.3 | 84.1 ± 3.6 ^b | 81.0 ± 3.0 ^b | 68.8 ± 3.9 | 66.3 ± 1.8 | 21.4 ± 5.7 ^b | |
| 4 | 0.07 | 66.8 ± 2.9 | 104.5 ± 6.1 | 108.4 ± 4.7 | 67.0 ± 4.9 | 56.0 ± 5.4 | 50.5 ± 7.9 | 0.54 |
| | 0.20 | 64.1 ± 2.7 | 99.6 ± 6.0 ^b | 102.3 ± 3.5 | 65.0 ± 2.6 | 54.6 ± 4.4 | 41.8 ± 4.2 | |
| | 0.68 | 64.8 ± 3.9 | 89.9 ± 5.1 ^b | 88.9 ± 6.0 | 63.4 ± 4.8 | 55.6 ± 2.4 | 26.3 ± 8.6 ^a | |

Values are means ± SEM (n = 8). Significantly different from control, ^ap < 0.05, ^bp < 0.01 (Dunnett's test). iAUC: incremental area under the curve. ED₅₀: median effective dose.

コントロール群の血糖値は, デンプン負荷 30 分後に最大値 (126.1 mg/dL) となり, 投与 2 時間後には初期値に近い値 (65.9 mg/dL) を示した. これに対して, 被験物質投与群では, デンプン負荷 30 分後や 60 分後において低値を示し, いずれも用量依存的な血糖上昇抑制効果が観察された. そこで血糖上昇曲線下面積 (iAUC₀₋₂) に基づき被験物質の 50% 有効量 (ED₅₀) を算出したところ, それぞれ SCE : 94.0 mg/kg, **1** : >1.0 mg/kg, **3** : 0.62 mg/kg および **4** : 0.54 mg/kg であり, **4** がデンプン負荷に対して強い血糖上昇抑制作用を示すことが

明らかとなった。

次に、SCE の作用時間を検討するため、ラットに対して SCE を投与後、様々な経過時間をおいてからデンプン負荷を行い、経過時間の違いが食後血糖上昇抑制作用に及ぼす影響を検討した。血糖値の推移を Table 3 に示した。

Table 3. Effects of SCE on blood glucose levels in SCE-pretreated starch-loaded rats

| Group | Time of Administration | | Blood glucose (mg/dL) | | | | |
|----------------|------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|
| | Before starch loading | Before SCE loading | After starch loading | | | | |
| | | | 0 h | 0.5 h | 1.0 h | 2.0 h | 3.0 h |
| Normal | — | — | 64.4 ± 2.4 | 62.4 ± 3.9 ^a | 60.5 ± 3.8 ^a | 56.5 ± 2.9 | 57.3 ± 3.7 |
| Control | — | — | 63.8 ± 2.0 | 126.8 ± 4.5 | 93.1 ± 2.2 | 63.9 ± 2.8 | 64.0 ± 2.6 |
| SCE (75 mg/kg) | 0 h | — | 63.8 ± 1.4 | 88.5 ± 2.4 ^a | 87.0 ± 4.6 | 62.6 ± 4.7 | 62.0 ± 3.1 |
| | 0.5 h | 65.4 ± 3.7 | 71.1 ± 3.2 | 109.4 ± 8.0 | 92.5 ± 3.9 | 63.5 ± 1.9 | 58.3 ± 3.2 |
| | 1.0 h | 65.8 ± 3.0 | 68.3 ± 2.1 | 124.3 ± 6.8 | 94.9 ± 6.0 | 65.9 ± 2.3 | 55.3 ± 3.5 |
| | 2.0 h | 63.3 ± 2.0 | 63.4 ± 3.1 | 124.1 ± 10.6 | 100.3 ± 6.6 | 64.5 ± 3.3 | 63.6 ± 5.3 |

Values are means ± SEM (n = 8). Significantly different from control, ^ap < 0.01 (Dunnett's test).

コントロール群の血糖値は、デンプン負荷 30 分後に最大値 (126.8 mg/dL) に達し、これに対して SCE とデンプンの同時負荷群では、88.5 mg/dL であり血糖値の上昇が有意に抑制された。一方、30 分後負荷群では 109.4 mg/dL であり血糖上昇抑制効果はやや減弱し、60 分後負荷群ならびに 120 分後負荷群においては、コントロール群との差は認められず、SCE の効果は消失した。以上の結果から、SCE による食後血糖上昇抑制作用は投与後に一過的に発揮され、その後は経過時間とともに減弱していくことを確認した。

次に、SCE を投与した時の血糖上昇抑制効果の特性を明らかにするため、活性成分であるスルホニウム化合物の投与後の動態について検討した。まず、SCE を人工胃液に溶解して 37°C に保持し、経時的に 1—4 含量を測定したところ、いずれの化合物もほとんど減少は認められなかった (Table 4)。このことから 1—4 は胃酸や消化酵素に対して安定で、胃内で分解を受けにくいものと考えられた。

Table 4. Stability of sulfoniums (1—4) in artificial gastric juice

| | Relative content (% of 0 h) | | |
|------------------|-----------------------------|-------------|------------|
| | 0 h | 1.0 h | 3.0 h |
| Salacinol (1) | 100.0 ± 4.6 | 100.0 ± 6.9 | 92.5 ± 6.1 |
| Neosalacinol (2) | 100.0 ± 6.0 | 96.5 ± 5.1 | 93.2 ± 6.2 |
| Kotalanol (3) | 100.0 ± 4.1 | 97.3 ± 6.6 | 91.4 ± 4.6 |
| Neokotalanol (4) | 100.0 ± 3.3 | 97.4 ± 3.0 | 96.5 ± 4.7 |

Values are means ± SEM (n = 3).

続いて、ラット小腸結紮ループへ SCE を注入し、1—4 の残存率からその吸収性を評価したところ、比較対照として実施した miglitol や D-glucose においては小腸からの吸収に伴うループ内残存率の経時的な減少が認められるのに対し、1—4 は 180 分後においても大部分が残存しており (≥94.5%, Table 5), 1—4 は小腸において安定かつ吸収されにくいことを確認した。

これらの結果から、経口摂取された SCE 中のスルホニウム化合物は胃内で分解を受けずに小腸に到達し、小腸においてほとんど吸収されずに血糖上昇抑制作用を発揮し、そのまま排泄されるものと考えられた。

Table 5. Residual rate of sulfoniums (1—4) in ligated intestinal loop

| | Relative content (% of 0 h) | | |
|------------------|-----------------------------|-------------|------------|
| | 0 h | 0.5 h | 2.0 h |
| Salacinol (1) | 100.0 ± 2.4 | 98.7 ± 2.5 | 97.6 ± 1.8 |
| Neosalacinol (2) | 100.0 ± 3.9 | 101.3 ± 3.0 | 94.5 ± 1.8 |
| Kotalanol (3) | 100.0 ± 3.0 | 98.1 ± 2.6 | 99.7 ± 2.7 |
| Neokotalanol (4) | 100.0 ± 2.1 | 100.0 ± 2.6 | 96.6 ± 1.7 |
| Miglitol | 100.0 ± 1.4 | 87.6 ± 1.4 | 52.2 ± 4.7 |
| D-Glucose | 100.0 ± 3.1 | 32.5 ± 0.5 | 9.1 ± 0.4 |

Values are means ± SEM (n = 5).

第二節 2 型糖尿病マウスに対する抗糖尿病作用の検討

近年, α -GI 薬の服用による糖尿病の発症予防効果が報告されている.^{9,10)} *Salacia* 属植物エキスにおいても同様の効果が期待できることから, 2 型糖尿病モデル動物である KK-A^y マウスを用いて SCE の抗糖尿病作用について検討を行った. まず, 0.1—0.5% の SCE を標準飼料 CE-2 に配合し, 糖尿病発症前の KK-A^y マウスに対して 3 週間混餌投与を行った. その結果, 0.25 および 0.50% 配合において, 血糖値および HbA1c の上昇抑制効果が観察された (Table 6).

Table 6. Effects of chronic administration of SCE on blood glucose and HbA1c levels in CE-2 diet-fed KK-A^y mice

| Group | Dose (%) | Average food intake (g/day) | | | Body weight (g) | | |
|---------|----------|-----------------------------|------------|------------|-----------------|--|--|
| | | 0–21 days | 0 day | 15 days | 21 days | | |
| Control | — | 7.5 ± 0.2 | 29.9 ± 0.6 | 36.6 ± 0.9 | 39.7 ± 1.1 | | |
| SCE | 0.10 | 6.9 ± 0.4 | 29.8 ± 0.5 | 35.9 ± 1.3 | 38.4 ± 1.5 | | |
| | 0.25 | 6.7 ± 0.2 | 30.0 ± 0.6 | 37.4 ± 1.0 | 40.5 ± 1.3 | | |
| | 0.50 | 6.8 ± 0.1 | 30.1 ± 0.5 | 35.5 ± 0.6 | 39.2 ± 0.8 | | |

| Group | Dose (%) | Blood glucose (mg/dL) | | | HbA1c (%) | | |
|---------|----------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|------------------------|------------------------|
| | | 0 day | 15 days | 21 days | 0 day | 15 days | 21 days |
| Control | — | 206.2 ± 15.7 | 502.0 ± 33.7 | 576.3 ± 15.1 | 3.2 ± 0.1 | 5.9 ± 0.2 | 6.9 ± 0.2 |
| SCE | 0.10 | 197.8 ± 17.9 | 402.3 ± 66.4 | 436.7 ± 67.6 | 3.2 ± 0.1 | 5.0 ± 0.5 | 5.5 ± 0.6 |
| | 0.25 | 217.7 ± 38.3 | 335.7 ± 59.5 | 382.5 ± 64.2 | 3.2 ± 0.1 | 4.5 ± 0.2 ^a | 4.8 ± 0.4 ^a |
| | 0.50 | 209.3 ± 22.8 | 217.8 ± 41.4 ^a | 281.7 ± 54.2 ^a | 3.2 ± 0.1 | 4.1 ± 0.1 ^a | 4.3 ± 0.3 ^a |

Values are means ± SEM (n = 6). Significantly different from control, ^ap < 0.01 (Dunnett's test).

続いて, 栄養素が明確な精製飼料 AIN93M に 0.03—0.12% の SCE を配合し, ペアフィーディング法による混餌投与を行った. その結果, CE-2 を用いた試験よりも低用量 (0.06 および 0.12%) において, 血糖値や HbA1c の上昇抑制効果が観察された (Table 7). また, 0.12% 投与群については, 飼育最終日にグルコース負荷試験を実施したところ, 血糖値の上昇が有意に抑えられ, 耐糖能の改善効果が認められた (Figure 3).

以上の結果から, SCE は糖尿病状態である血糖値や HbA1c の上昇を抑え, 耐糖能の悪化を防ぐことを明らかにした.

Table 7. Effects of chronic administration of SCE on HbA1c levels in AIN93M purified diet-fed KK-A^y mice

| A | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|------------|------------|-----------------------|--------------|--------------|-----------|-----------|-----------|--|
| Group (%) | Body weight (g) | | | Blood glucose (mg/dL) | | | HbA1c (%) | | | |
| | 0 day | 11 days | 18 days | 0 day | 11 days | 18 days | 0 day | 11 days | 18 days | |
| Control — | 27.5 ± 0.3 | 33.2 ± 0.7 | 35.4 ± 1.0 | 243.8 ± 26.8 | 447.0 ± 44.2 | 389.8 ± 47.5 | 3.8 ± 0.1 | 6.1 ± 0.4 | 7.2 ± 0.5 | |
| SCE 0.03 | 26.8 ± 0.5 | 33.2 ± 0.6 | 35.8 ± 0.9 | 279.0 ± 46.8 | 459.0 ± 59.1 | 415.7 ± 49.7 | 3.9 ± 0.1 | 5.6 ± 0.4 | 6.8 ± 0.5 | |

| B | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|------------|------------|-----------------------|---------------------------|--------------------------|-----------|------------------------|------------------------|--|
| Group (%) | Body weight (g) | | | Blood glucose (mg/dL) | | | HbA1c (%) | | | |
| | 0 day | 11 days | 18 days | 0 day | 11 days | 18 days | 0 day | 11 days | 18 days | |
| Control — | 27.3 ± 0.4 | 32.6 ± 0.5 | 34.1 ± 0.5 | 231.7 ± 50.3 | 451.7 ± 33.3 | 432.5 ± 40.2 | 3.9 ± 0.1 | 5.7 ± 0.3 | 6.7 ± 0.4 | |
| SCE 0.06 | 27.1 ± 0.3 | 32.3 ± 0.7 | 34.6 ± 0.6 | 210.7 ± 29.4 | 220.5 ± 32.7 ^b | 171.7 ± 6.6 ^b | 4.0 ± 0.1 | 4.7 ± 0.1 ^a | 5.1 ± 0.2 ^b | |

| C | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|------------------------|------------------------|--|
| Group (%) | Body weight (g) | | | Blood glucose (mg/dL) | | | HbA1c (%) | | | |
| | 0 day | 13 days | 27 days | 0 day | 13 days | 27 days | 0 day | 13 days | 27 days | |
| Control — | 26.2 ± 0.4 | 33.1 ± 0.4 | 38.0 ± 0.5 | 247.3 ± 22.6 | 300.1 ± 38.6 | 305.9 ± 39.8 | 4.0 ± 0.0 | 5.1 ± 0.1 | 5.9 ± 0.2 | |
| SCE 0.12 | 26.9 ± 0.3 | 32.3 ± 0.3 | 34.7 ± 0.6 ^b | 299.4 ± 51.3 | 156.6 ± 9.4 ^b | 184.4 ± 9.5 ^a | 4.0 ± 0.0 | 4.6 ± 0.1 ^b | 4.7 ± 0.2 ^b | |

Values are means ± SEM (n = 6–7). Significantly different from control, ^a*p* < 0.05, ^b*p* < 0.01 (Student's *t*-test). Control group was pair-fed the amount of food consumed by SCE-treated group: (A) 5.4, (B) 4.6, and (C) 4.6 g/day, respectively.

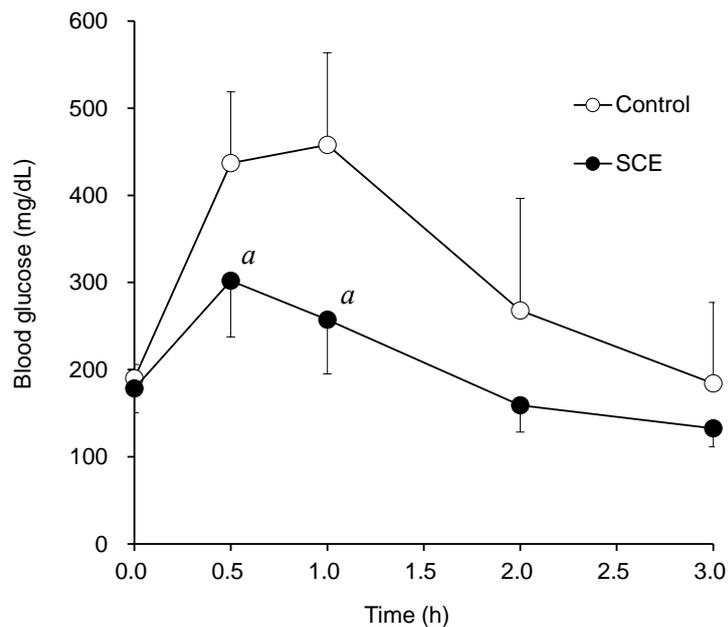


Fig. 3. Improvement effect of glucose tolerance after chronic administration of 0.12% SCE in AIN93M purified diet-fed KK-A^y mice.

Values are means ± SEM (n = 7). Significantly different from control, ^a*p* < 0.01 (Student's *t*-test).

次に、SCE による HbA1c の上昇抑制効果の作用機序を検討するため、AIN93M の消化性糖質をすべてグルコースに置換し、2 週間飼育したときの SCE の効果について検討した。その結果、通常の AIN93M 飼料では 0.06% の SCE の配合で HbA1c の上昇抑制効果が観察されるのに対し (Figure 4A), グルコースに置換した AIN93M/Glc 飼料では、その 5 倍量を配合しても効果は観察されなかった (Figure 4B)。つまり、SCE による HbA1c の上昇抑制効果は消化性糖質を飼料に用いた時のみで認められることから、その作用機序は α -GI 活性を介した作用であることが確認された。

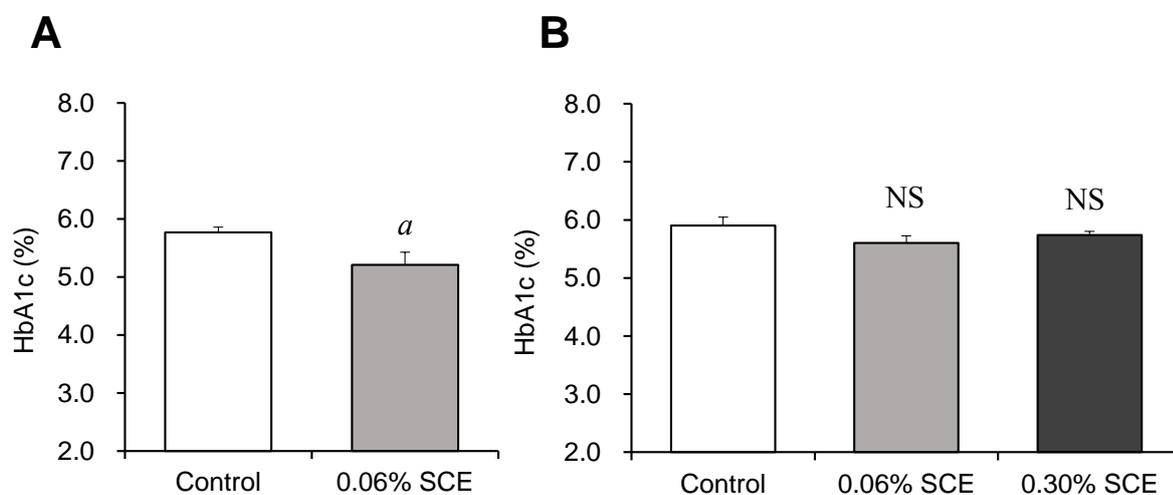


Fig. 4. Effects of chronic administration of SCE on HbA1c levels in (A) AIN93M purified (B) AIN93M/Glc diet-fed KK- A^y mice.

Values are means \pm SEM (n = 10). Significantly different from control, $^a p < 0.05$ (Student's *t*-test). NS: Not significantly different from control (Dunnett's test). Control group was pair-fed the amount of food consumed by SCE-treated group: (A) 5.6 and (B) 5.9 g/day, respectively.

第二章 スルホニウム化合物を指標とした *Salacia* 属植物の品質評価

第一節 Salacinol (1) および kotalanol (3) の LCMS 分析法の検討

スルホニウム化合物 (1—8) は, *Salacia* 属植物中に大量に共存する糖質に比べて含有量は少なく, また UV 領域に吸収を持たないため, 通常定量分析に用いられる HPLC-UV での分析は困難であった. そこで特異性が高く高感度な方法として LCMS を用いた分析法について検討を行った. まずエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) にて 1 および 3 を分析したところ, ネガティブイオンモードにおいてそれぞれ Figure 5 に示す MS スペクトルが観測された. すなわち, 1 においては, 擬似分子イオンに該当する m/z 333 が検出されるとともに, チオ糖部が切断されたと考えられるフラグメントイオン m/z 183 が観察され, 同様に 3 においては擬似分子イオン m/z 423 およびフラグメントイオン m/z 273 が観測された. 一方, ポジティブイオンモードにおいては, 3 で擬似分子イオンピークが検出されず, 完全にフラグメントイオンに分解されたものと考えられた. そこで, 共通したイオン化パターンを示したネガティブイオンモードを 1 および 3 の分析に選択することとした.

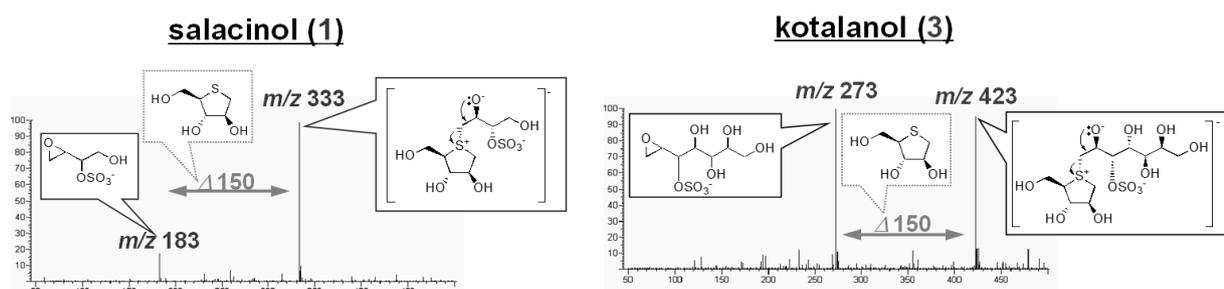


Fig. 5. Negative-ion ESI-MS fragmentation patterns of salacinol (1) and kotalanol (3)

次に、LC 分離条件は糖などの親水性化合物の分析に利用されるアミノ系カラムを用いて、*Salacia* 属植物中の主要な糖アルコール成分である dulcitol¹⁵⁾ との分離を目標に検討を行った。3 種類のアミノ系カラムについて検討した結果、分離能や保持時間、ピーク形状において硬質合成ポリマーにポリアミンを結合させた Asahipak NH2P-50 カラムが最も分析に適していると判断した (Figure 6)。

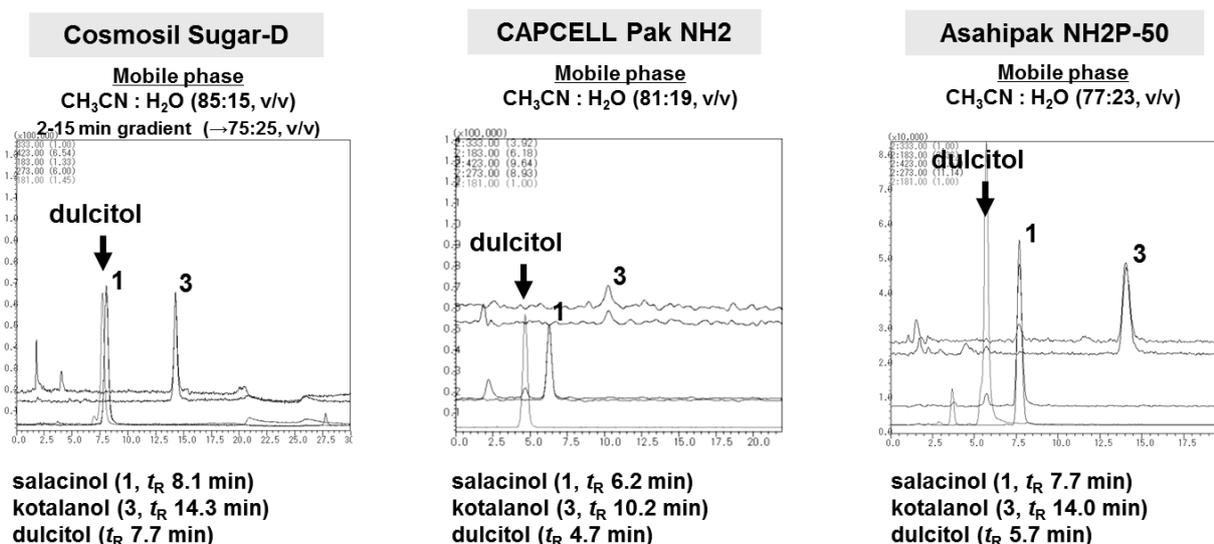


Fig. 6. SIM chromatograms (negative-ion ESI-MS) of a MeOH extract from roots/stems of *S. reticulata* under various LC conditions

次に、設定した分析条件 (Table 8) について、分析法バリデーションを実施した (Tables 9, 10)。0.5—5.0 $\mu\text{g/mL}$ における検量線の相関係数は **1** ($R^2=0.9979$) および **3** ($R^2=0.9992$) であり、検出限界および定量限界はそれぞれ **1** (0.015, 0.050 ng) および **3** (0.030, 0.10 ng) であった。*S. chinensis* 幹部抽出エキスをを用いて評価した繰り返し測定精度は、日内および日間の変動係数 (RSD) において、それぞれ **1** (4.6, 6.7%) および **3** (6.8, 8.5%) であった。また、**1** および **3** を *S. chinensis* 幹部抽出エキスに加えたときの、添加回収率を算出したところ、**1** (88.0—110.1%) および **3** (100.5—104.6%) であった。

以上の結果より、本法は **1** および **3** の定量分析に適用可能であると判断した。設定した分析条件における代表的な選択イオンモニタリング (SIM) クロマトグラムを Figure 7 に示した。

Table 8. Analytical conditions of **1** and **3**

| | |
|----------------|---|
| Instrument | Shimadzu LC-MS-2010EV + Prominence |
| Column | Asahipak NH2P-50 (5 μ m, 2.0 mm i.d. \times 150 mm) |
| Mobile phase | CH ₃ CN—H ₂ O (78:22, v/v) |
| Flow rate | 0.2 mL/min |
| Column temp. | 40°C |
| Injection vol. | 1 μ L |
| Ionization | ESI-Negative |
| SIM | 1: <i>m/z</i> 333, 3: <i>m/z</i> 423 |

Table 9. Linearities, detection and quantitation limits, and precisions of **1** and **3**

| Analyte | Regression Equation ^a | Correlation Coefficient (<i>R</i> ²) | Detection Limit ^b (ng) | Quantitation Limit ^b (ng) | Precision ^c (RSD, %) | |
|------------------------|----------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------|
| | | | | | Intra-day | Inter-day |
| Salacinol (1) | $y = 525115x + 34981$ | 0.9979 | 0.015 | 0.050 | 4.6 | 6.7 |
| Kotalanol (3) | $y = 164713x - 10070$ | 0.9992 | 0.030 | 0.10 | 6.8 | 8.5 |

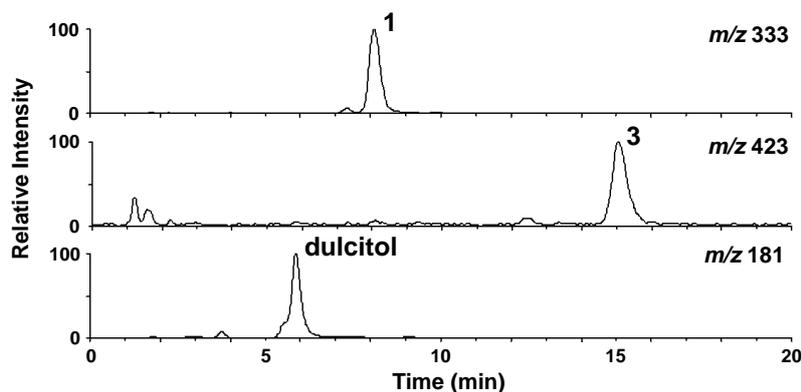
^aIn the regression equation, the *x* is the concentration of analyte solution (μ g/mL), and *y* is the peak area of analyte. ^bValues are the amount of analyte injected on-column. ^cPrecision and accuracy of the analytical method were tested using the water extract from the stems of *S. chinensis* (*n* = 5).

Table 10. Recoveries of **1** and **3**^a

| Analyte | Extract conc. (μ g/mL) | Added amount (μ g/mL) | Recovery ^b (%) |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Salacinol (1) | 500 | 1.0 | 88.0 \pm 2.0 |
| | | 2.0 | 108.2 \pm 1.0 |
| | | 3.0 | 110.1 \pm 2.2 |
| Kotalanol (3) | 500 | 1.0 | 103.8 \pm 1.4 |
| | | 2.0 | 100.5 \pm 0.7 |
| | | 3.0 | 104.6 \pm 1.7 |

^aRecoveries of **1** and **3** spiked with a water extract from stems of *S. chinensis*.

^bValues are means \pm SD (*n* = 3).

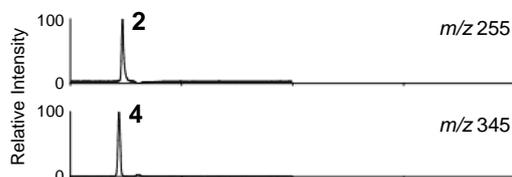
**Fig. 7.** Typical SIM chromatogram of a water extract from roots of *S. reticulata*

第二節 Neosalacinol (2) および neokotalanol (4) の LCMS 分析法の検討

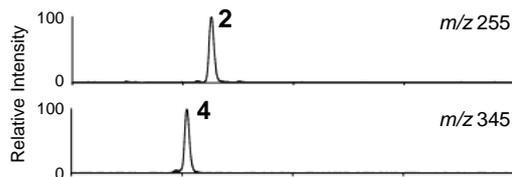
Neosalacinol (2) および neokotalanol (4) はスルホニウムカチオン構造に由来する陽イオン性化合物であり、ポジティブイオンモード ESI-MS にて分子イオンを検出することとした。一方、1 および 3 と同様の LC 分離条件 (Table 8) では、これらはカラムに保持されなかったため、新たに LC 条件の設定が必要であった。一般的にイオン性の化合物を測定対象とする場合、移動相にイオンペア試薬を添加した逆相クロマトグラフィーによって分離を改善する手法が知られている。すなわち、移動相中のイオンペア試薬とイオン性化合物とがイオン対を形成して中性な物質となり、疎水性が増大することによって逆相系担体に保持されやすくなることを利用した方法である。そこで、イオンペア試薬として trifluoroacetic acid (TFA), heptafluorobutyric acid (HFBA), nonafluorovaleric acid (NFVA) および undecafluorohexanoic acid (UFHA) を用いて検討したところ、NFVA および UFHA を用いた移動相条件において十分な保持が認められた (Figure 8)。一方、この LC 条件では 1 および 3 はカラムに保持されず、1—4 の一斉同時分析は困難であった。

A Inertsil ODS-3 (5 μm , 2.1 mm \times 150 mm)

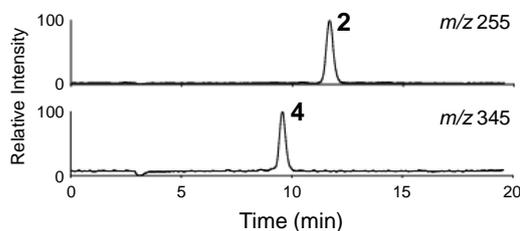
1.3 mM trifluoroacetic acid-MeOH (99:1, v/v)



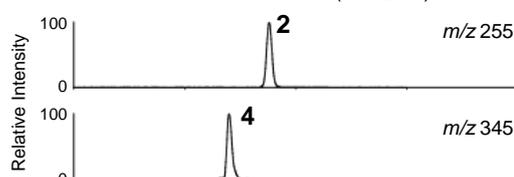
5 mM heptafluorobutyric acid-MeOH (99:1, v/v)



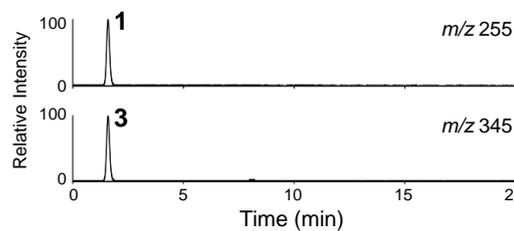
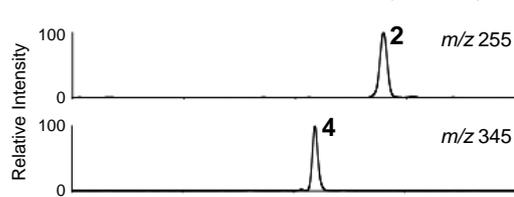
5 mM nonafluorovaleric acid-MeOH (99:1, v/v)

**B Inertsil ODS-3 (3 μm , 2.1 mm \times 100 mm)**

5 mM nonafluorovaleric acid-MeOH (99:1, v/v)



5 mM undecafluorohexanoic acid-MeOH (99:1, v/v)

**Fig. 8.** SIM chromatograms (positive-ion ESI-MS) of standard solutions under various LC conditions

次に、設定した分析条件 (Table 11) について、分析法バリデーションを実施した (Tables 12, 13). 0.5—5.0 $\mu\text{g/mL}$ における検量線の相関係数は **2** ($R^2=0.9986$) および **4** ($R^2=0.9988$) であり、検出限界および定量限界はそれぞれ **2** (0.025, 0.075 ng) および **4** (0.025, 0.075 ng) であった. *S. chinensis* 幹部抽出エキスをを用いて評価した繰り返し測定精度は、日内および日間の RSD において、それぞれ **2** (5.2, 3.1%) および **4** (3.3, 1.8%) であった. また、**2** および **4** を *S. chinensis* 幹部抽出エキスに加えたときの、添加回収率を算出したところ、**2** (105.2—107.9%) および **4** (97.5—100.4%) であった.

以上の結果より、本法は **2** および **4** の定量分析に適用可能であると判断した. 設定した条件における代表的な SIM クロマトグラムを Figure 9 に示した.

Table 11. Analytical conditions of **2** and **4**

| | |
|----------------|--|
| Instrument | Shimadzu LC-MS-2010EV + Prominence |
| Column | Inertsil ODS-3 (3 μm , 2.1 mm i.d. \times 100 mm) |
| Mobile phase | 5 mM UFHA—MeOH (99:1, v/v) |
| Flow rate | 0.2 mL/min |
| Column temp. | 40°C |
| Injection vol. | 1 μL |
| Ionization | ESI-Positive |
| SIM | 2 : m/z 255, 4 : m/z 345 |

Table 12. Linearities, detection and quantitation limits, and precisions of **2** and **4**

| Analyte | Regression Equation ^a | Correlation Coefficient (R^2) | Detection Limit ^b (ng) | Quantitation Limit ^b (ng) | Precision ^c (RSD, %) | |
|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------|
| | | | | | Intra-day | Inter-day |
| Neosalacinol (2) | $y = 882204x + 111453$ | 0.9986 | 0.025 | 0.075 | 5.2 | 3.1 |
| Neokotalanol (4) | $y = 662587x + 91332$ | 0.9988 | 0.025 | 0.075 | 3.3 | 1.8 |

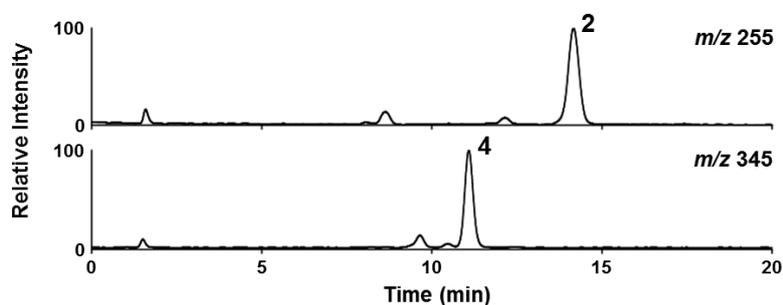
^aIn the regression equation, the x is the concentration of analyte solution ($\mu\text{g/mL}$), and y is the peak area of analyte. ^bValues are the amount of analyte injected on-column. ^cPrecision and accuracy of the analytical method were tested using the water extract from the stems of *S. chinensis* ($n = 5$).

Table 13. Recoveries of **2** and **4**^a

| Analyte | Extract conc. ($\mu\text{g/mL}$) | Added amount ($\mu\text{g/mL}$) | Recovery ^b (%) |
|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Neosalacinol (2) | 500 | 0.336 | 107.9 \pm 2.3 |
| | | 0.672 | 105.6 \pm 1.6 |
| | | 1.344 | 105.2 \pm 2.8 |
| Neokotalanol (4) | 500 | 0.587 | 97.5 \pm 2.9 |
| | | 0.798 | 100.4 \pm 2.6 |
| | | 1.174 | 99.9 \pm 2.6 |

^aRecoveries of **2** and **4** spiked with a water extract from stems of *S. chinensis*.

^bValues are means \pm SD ($n = 3$).

**Fig. 9.** Typical SIM chromatogram of a water extract from stems of *S. chinensis*.

第三節 *Salacia* 属植物中スルホニウム化合物 (1—8) 含量の測定

第一節および第二節において設定した 2 つの分析法を用いて, 5—8 についても分析を行ったところ, 良好な分離とピーク形状が確認できたため (Figure 10), 5—8 についても分析法バリデーションを実施した. (Tables 14, 15).

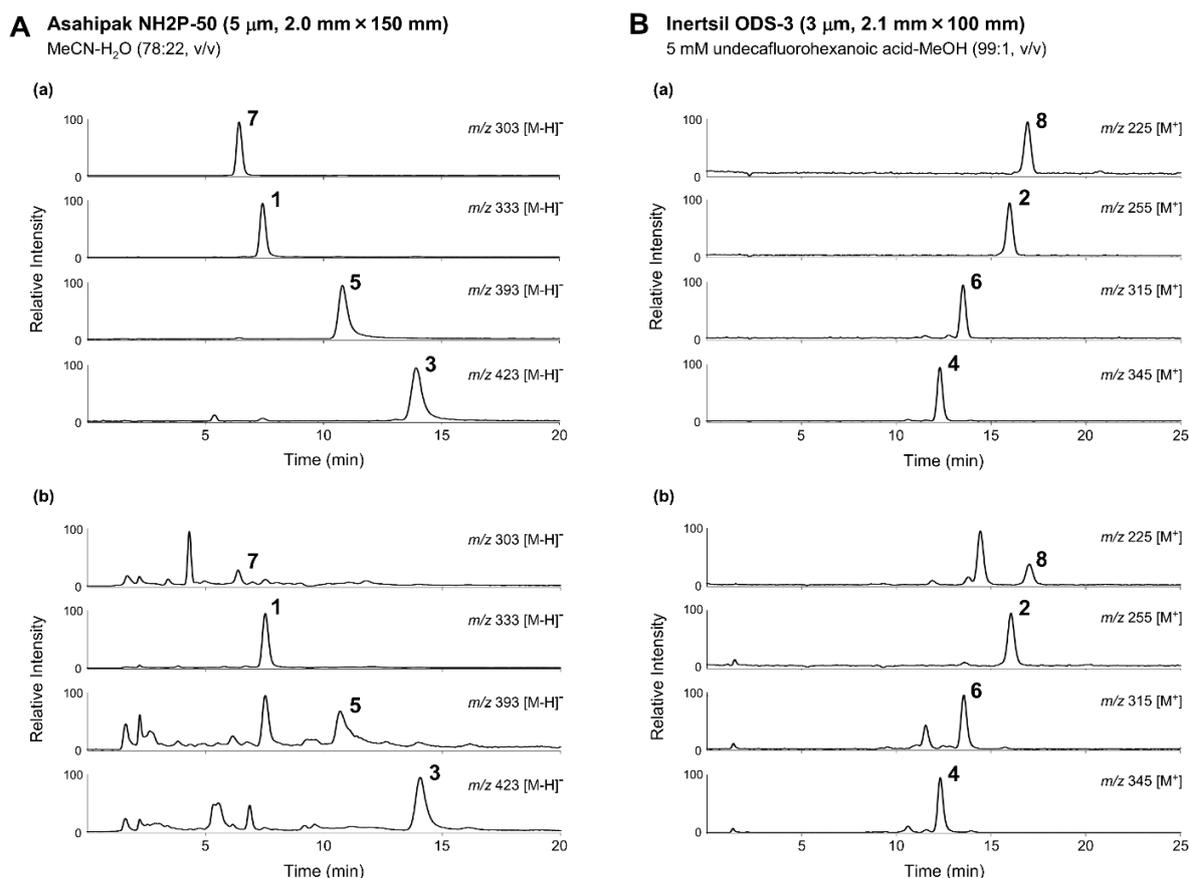


Fig. 10. Typical SIM chromatograms of (a) standard sulfoniums (1—8) and (b) a water extract from stems of *S. chinensis*

Table 14. Linearities, detection and quantitation limits, and precisions of sulfoniums (5—8)

| Analyte | Regression Equation ^a | Correlation Coefficient (R^2) | Detection Limit ^b (ng) | Quantitation Limit ^b (ng) | Precision ^c (RSD, %) | |
|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------|
| | | | | | Intra-day | Inter-day |
| Ponkoranol (5) | $y = 45431x - 5363$ | 0.9989 | 0.050 | 0.14 | 4.3 | 2.2 |
| Neoponkoranol (6) | $y = 1847579x + 376724$ | 0.9974 | 0.010 | 0.040 | 3.1 | 1.4 |
| Salaprinol (7) | $y = 134493x + 26521$ | 0.9958 | 0.010 | 0.020 | 3.9 | 3.3 |
| Neosalaprinol (8) | $y = 4637054x + 1770490$ | 0.9954 | 0.010 | 0.020 | 3.3 | 2.3 |

^aIn the regression equation, the x is the concentration of analyte solution ($\mu\text{g/mL}$), and y is the peak area of analyte. ^bValues are the amount of analyte injected on-column. ^cPrecision and accuracy of the analytical method were tested using the water extract from the stems of *S. chinensis* (Intra-day: $n = 6$, Inter-day: $n = 3$).

Table 15. Recoveries of sulfonium (**5—8**)^a

| Analyte | Extract conc. ($\mu\text{g/mL}$) | Added amount ($\mu\text{g/mL}$) | Recovery ^b (%) |
|----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Ponkoranol (5) | 500 | 0.125 | 112.0 \pm 7.7 |
| | | 0.500 | 108.9 \pm 3.3 |
| Neoponkoranol (6) | 1000 | 0.125 | 107.9 \pm 5.4 |
| | | 0.500 | 96.4 \pm 0.1 |
| Salaprinol (7) | 500 | 0.125 | 102.0 \pm 6.1 |
| | | 0.500 | 100.1 \pm 4.6 |
| Neosalaprinol (8) | 1000 | 0.125 | 107.8 \pm 3.4 |
| | | 0.500 | 105.2 \pm 0.4 |

^aRecoveries of sulfoniums (**5—8**) spiked with a water extract from stems of *S. chinensis*. ^bValues are means \pm SD ($n = 3$).

0.5—5.0 $\mu\text{g/mL}$ における検量線の相関係数 (R^2) は ≥ 0.9954 であり、検出限界および定量限界はそれぞれ ≤ 0.050 ng および ≤ 0.14 ng であった。 *S. chinensis* 幹部抽出エキスをを用いて評価した繰り返し測定精度は、日内および日間の RSD において、それぞれ $\leq 4.3\%$ および $\leq 3.3\%$ であった。 また、**5—8** を *S. chinensis* 幹部抽出エキスに加えたときの、添加回収率は、96.4—112.0% であった。 以上の結果より、本法は **5—8** の定量分析にも適用可能であり、Table 16 の条件でスルホニウム化合物 (**1—8**) の分析法を確立した。

Table 16. Analytical conditions of sulfoniums (**1—8**)

| Instrument | Shimadzu LC-MS-2010EV + Prominence | |
|----------------|---|---|
| | Sulfonate (1, 3, 5 and 7) | Desulfonate (2, 4, 6 and 8) |
| Column | Asahipak NH2P-50 (5 μm , 2.0 mm i.d. \times 150 mm) | Inertsil ODS-3 (3 μm , 2.1 mm i.d. \times 100 mm) |
| Mobile phase | $\text{CH}_3\text{CN—H}_2\text{O}$ (78:22, v/v) | 5 mM UFHA—MeOH (99:1, v/v) |
| Flow rate | 0.2 mL/min | 0.2 mL/min |
| Column temp. | 40°C | 40°C |
| Injection vol. | 1 μL | 1 μL |
| Ionization | ESI-Negative | ESI-Positive |
| SIM | 1 : m/z 333, 3 : m/z 423, 5 : m/z 393 and 7 : m/z : 303 | 2 : m/z 255, 4 : m/z 345, 6 : m/z 315 and 8 : m/z 225 |

次に確立した分析法を用いて、*Salacia* 属植物サンプルの定量分析を実施した。 まず、分析用サンプルの調製法の最適化を目的に、異なる溶媒・抽出条件でエキスを調製し、**1—4** を指標に抽出効率を検討した (Table 17)。 その結果、溶媒に水を用いた時の加熱/超音波抽出 (96—102%)、および 50% MeOH を用いたときの加熱抽出 (96—105%) において高い抽出効率を示した。 一方、溶媒に MeOH を用いた時では抽出効率は大きく低下し、特に

neokotalanol (4) において顕著であった。一般的に、健康食品原料として流通する「サラシア」には熱水抽出エキスが用いられていることが多いため、以降では、熱水抽出エキスを調製し、定量分析を実施することとした。

Table 17. Influences of extraction method and solvent on extraction efficiency of sulfoniums (1—4)

| Extraction Method ^a | Solvent | Relative rate (%) | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Reflux, 120 min | H ₂ O | 100 ^b | 100 ^b | 100 ^b | 100 ^b |
| | 50%MeOH | 103 | 105 | 96 | 101 |
| | MeOH | 86 | 68 | 60 | 20 |
| Sonication, 30 min | H ₂ O | 99 | 102 | 96 | 100 |
| | 50%MeOH | 97 | 87 | 95 | 78 |
| | MeOH | 57 | 21 | 33 | 9 |

^aEach extraction procedure was carried out twice, using roots of *S. reticulata* and stems of *S. chinensis*.

^bRelative rate (%) was obtained under the standard condition (reflux in H₂O).

次に、インド、スリランカおよびタイより入手した *Salacia* 属植物サンプル 32 検体 (Figure 11) について、熱水抽出エキスを調製した。このエキスを用いて、1—8 の定量分析を実施した (Table 18)。

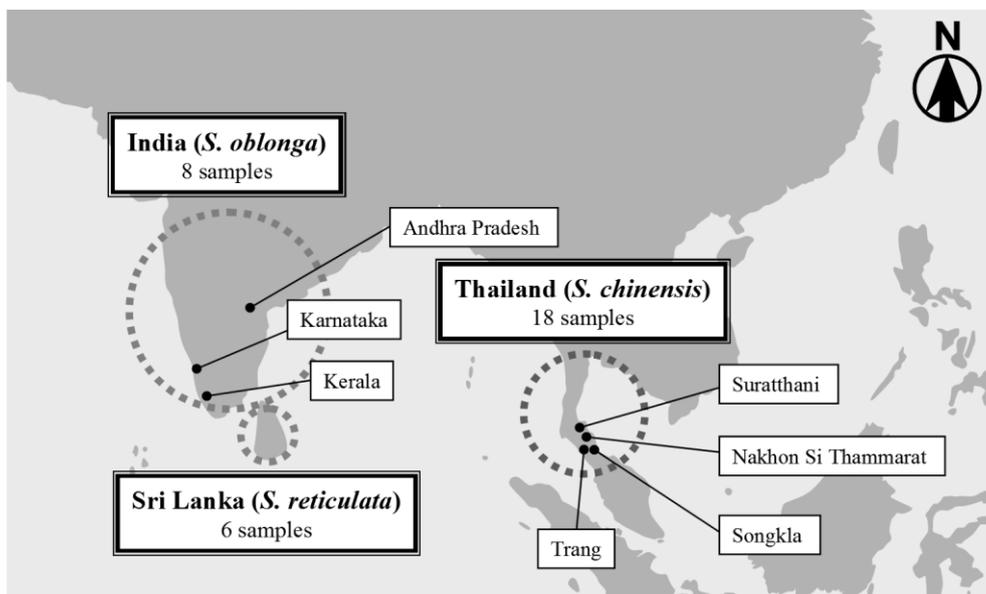


Fig. 11. Sampling sites of *Salacia* species

Table 18. Contents of sulfoniums (**1—8**) in *Salacia* species

| Sample No. | Area | Collection year | Loss on drying (%) ^a | Extraction Yield (%) | Sulfonium content (mg/g from dry material) ^b | | | | | | | | Total |
|--|---------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|---|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| Thailand (<i>Salacia chinensis</i>) | | | | | | | | | | | | | |
| Stem | | | | | | | | | | | | | |
| SCST-1 | Suratthani | 2007 | 10.0 | 9.8 | 0.187 | 0.021 | 0.102 | 0.288 | — ^c | 0.048 | 0.002 | 0.013 | 0.661 |
| SCST-2 | Suratthani | 2008 | 10.0 | 9.3 | 0.066 | — ^c | 0.128 | 0.677 | 0.042 | 0.155 | 0.004 | 0.022 | 1.094 |
| SCST-3 | Suratthani | 2008 | 10.3 | 22.4 | 0.483 | 0.067 | 0.165 | 0.571 | 0.040 | 0.134 | 0.012 | 0.034 | 1.506 |
| SCST-4 | Nakhon Si Thammarat | 2007 | 8.9 | 9.6 | 0.016 | 0.008 | 0.147 | 1.345 | 0.021 | 0.200 | 0.005 | 0.132 | 1.874 |
| SCST-5 | Nakhon Si Thammarat | 2008 | 9.9 | 9.2 | 0.276 | 0.063 | 0.057 | 0.236 | 0.026 | 0.063 | 0.003 | 0.017 | 0.741 |
| SCST-6 | Nakhon Si Thammarat | 2009 | 8.8 | 17.8 | 0.066 | — ^c | 0.293 | 0.640 | — ^c | 0.267 | 0.020 | 0.080 | 1.366 |
| SCST-7 | Nakhon Si Thammarat | 2011 | 9.4 | 13.3 | 0.413 | 0.066 | 0.084 | 0.317 | 0.035 | 0.094 | 0.004 | 0.025 | 1.038 |
| SCST-8 | Songkla | 2008 | 11.3 | 5.0 | 0.306 | 0.092 | 0.033 | 0.403 | — ^c | 0.103 | — ^c | 0.011 | 0.948 |
| SCST-9 | Songkla | 2008 | 9.9 | 17.7 | 0.422 | 0.061 | 0.096 | 0.367 | 0.033 | 0.110 | 0.005 | 0.019 | 1.113 |
| SCST-10 | Southern region | 2004 | 10.3 | 11.3 | 0.260 | 0.011 | 0.058 | 0.227 | 0.022 | 0.057 | 0.014 | 0.059 | 0.708 |
| SCST-11 | Southern region | 2005 | 10.4 | 12.8 | 0.507 | 0.037 | 0.227 | 0.661 | 0.062 | 0.178 | 0.010 | 0.068 | 1.750 |
| SCST-12 | Southern region | 2007 | 9.0 | 11.3 | 0.124 | 0.018 | 0.056 | 0.136 | — ^c | 0.032 | — ^c | — ^c | 0.366 |
| SCST-13 | Southern region | 2010 | 9.5 | 14.9 | 0.449 | 0.049 | 0.605 | 0.717 | 0.138 | 0.211 | 0.022 | 0.083 | 2.274 |
| SCST-14 | Southern region | 2010 | 9.9 | 9.0 | 0.468 | 0.033 | 0.103 | 0.324 | 0.023 | 0.073 | 0.007 | 0.030 | 1.061 |
| Root | | | | | | | | | | | | | |
| SCRT-1 | Nakhon Si Thammarat | 2009 | 10.2 | 17.7 | 0.366 | 0.309 | 0.034 | 1.555 | — ^c | 0.291 | — ^c | 0.084 | 2.639 |
| SCRT-2 | Nakhon Si Thammarat | 2009 | 9.9 | 18.4 | 0.624 | 0.095 | 0.184 | 0.378 | 0.037 | 0.131 | 0.005 | 0.061 | 1.515 |
| | | | | Mean ^d | 0.315 ^B | 0.058 ^C | 0.148 ^{B,C} | 0.553 ^A | 0.030 ^C | 0.134 ^{B,C} | 0.007 ^C | 0.046 ^C | 1.291 |
| | | | | SD | 0.176 | 0.071 | 0.137 | 0.382 | 0.033 | 0.075 | 0.007 | 0.035 | 0.594 |
| Leaf | | | | | | | | | | | | | |
| SCLT-1 | Trang | 2008 | 11.0 | 15.6 | 0.020 | — ^c | 0.026 | 0.073 | — ^c | 0.012 | — ^c | — ^c | 0.131 |
| Fruit | | | | | | | | | | | | | |
| SCFT-1 | Nakhon Si Thammarat | 2008 | 10.4 | 48.9 | 0.039 | 0.011 | 0.038 | 0.021 | — ^c | 0.009 | — ^c | 0.003 | 0.121 |

^aEach powdered sample was dried at 105°C for 8 h. ^bValues are means of three independent analyses. ^cBelow quantitation limit. ^dDifferent capital letters (A, B, and C) in the same row indicate significant difference among means of sulfoniums (**1—8**) content (Tukey's test, $p < 0.05$).

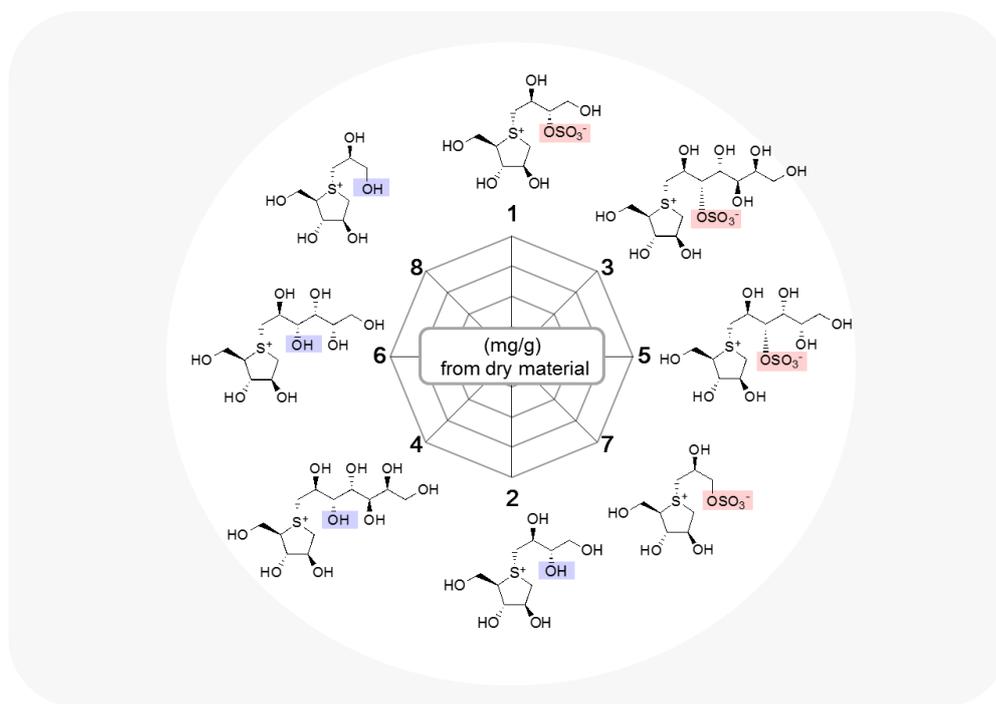
Table 18. *Continued*

| Sample No. | Area | Collection year | Loss on drying (%) ^a | Extraction Yield (%) | Sulfonium content (mg/g from dry material) ^b | | | | | | | | Total |
|--|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|---|--------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| Sri Lanka (<i>Salacia reticulata</i>) | | | | | | | | | | | | | |
| Stem | | | | | | | | | | | | | |
| SRSS-1 | | 2004 | 9.9 | 9.8 | 0.557 | 0.058 | 0.172 | 0.137 | 0.030 | 0.052 | — ^c | 0.016 | 1.022 |
| Root | | | | | | | | | | | | | |
| SRRS-1 | | 2004 | 10.9 | 17.4 | 1.420 | 0.074 | 0.749 | 0.108 | 0.270 | 0.107 | 0.051 | 0.133 | 2.912 |
| SRRS-2 | | 2007 | 9.7 | 10.6 | 0.474 | 0.010 | 0.082 | 0.053 | 0.076 | 0.028 | 0.008 | — ^c | 0.731 |
| SRRS-3 | | 2007 | 10.4 | 19.0 | 0.427 | 0.042 | 0.073 | 0.227 | 0.028 | 0.090 | 0.008 | 0.073 | 0.968 |
| | | | | Mean ^d | 0.720 ^A | 0.046 ^B | 0.269 ^{A,B} | 0.131 ^B | 0.101 ^B | 0.069 ^B | 0.017 ^B | 0.056 ^B | 1.408 |
| | | | | SD | 0.470 | 0.027 | 0.323 | 0.073 | 0.115 | 0.036 | 0.023 | 0.060 | 1.010 |
| SRRS-4 | | 2008 | 10.5 | 11.4 | — ^c | — ^c | — ^c | 1.282 | — ^c | 0.157 | — ^c | 0.070 | 1.509 |
| Leaf | | | | | | | | | | | | | |
| SRLS-1 | | 2008 | 8.3 | 25.8 | 0.010 | 0.081 | 0.014 | 0.054 | — ^c | 0.024 | — ^c | 0.007 | 0.190 |
| India (<i>Salacia oblonga</i>) | | | | | | | | | | | | | |
| Root | | | | | | | | | | | | | |
| SORI-1 | Andhra Pradesh | 2003 | 10.7 | 8.2 | 0.465 | — ^c | 0.078 | 0.050 | 0.048 | 0.020 | 0.080 | 0.110 | 0.851 |
| SORI-2 | Andhra Pradesh | 2004 | 10.9 | 21.9 | 0.322 | 0.013 | 0.125 | 0.109 | 0.031 | 0.042 | 0.009 | 0.038 | 0.689 |
| SORI-3 | Andhra Pradesh | 2007 | 10.3 | 17.9 | 0.854 | 0.030 | 0.079 | 0.124 | 0.061 | 0.068 | 0.018 | 0.050 | 1.284 |
| SORI-4 | Andhra Pradesh | 2010 | 11.2 | 16.6 | 0.540 | 0.015 | 0.080 | 0.104 | 0.034 | 0.038 | 0.014 | 0.062 | 0.887 |
| SORI-5 | Andhra Pradesh | 2010 | 10.2 | 26.8 | 0.990 | 0.021 | 0.493 | 0.205 | 0.140 | 0.087 | 0.043 | 0.081 | 2.060 |
| SORI-6 | Kerala | 2010 | 15.8 | 10.4 | 1.020 | 0.043 | 0.107 | 0.271 | 0.039 | 0.101 | 0.011 | 0.051 | 1.643 |
| SORI-7 | Karnataka | 2010 | 12.4 | 5.6 | 0.890 | 0.008 | 0.146 | 0.107 | 0.042 | 0.031 | 0.010 | 0.005 | 1.239 |
| | | | | Mean ^d | 0.726 ^A | 0.019 ^B | 0.158 ^B | 0.139 ^B | 0.056 ^B | 0.055 ^B | 0.026 ^B | 0.057 ^B | 1.236 |
| | | | | SD | 0.278 | 0.014 | 0.150 | 0.074 | 0.038 | 0.030 | 0.026 | 0.033 | 0.486 |
| SORI-8 | Kerala | 2007 | 10.0 | 12.6 | — ^c | — ^c | — ^c | 0.651 | — ^c | 0.074 | — ^c | 0.035 | 0.760 |

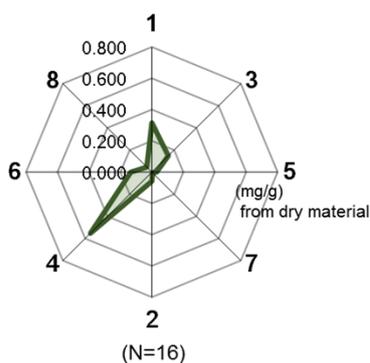
^aEach powdered sample was dried at 105°C for 8 h. ^bValues are means of three independent analyses. ^cBelow quantitation limit. ^dDifferent capital letters (A, B, and C) in the same row indicate significant difference among means of sulfoniums (1–8) content (Tukey's test, $p < 0.05$).

乾燥原料中の含量を算出したところ、スルホニウム化合物 (**1—8**) の合計含量は 0.131—2.912 mg/g であり、同一種内にもバラつきがあった。最も合計含量が高い検体は、スリランカ産 *S. reticulata* 根部 (SRRS-1) であり、**1** (1.420 mg/g) および **3** (0.749mg/g) の含量が特に高かった。部位別には、幹部 15 検体および根部 14 検体の平均値はそれぞれ 1.168 ± 0.508 および 1.406 ± 0.707 mg/g であるのに対し、葉部および果実部は ≤ 0.190 mg/g であり、スルホニウム化合物は主に根や幹に局在しているものと考えられた。また、根や幹では、salacinol (**1**) あるいは neokotalanol (**4**) の含量が高く、特にスリランカ産およびインド産の検体では、一部の検体 (SRRS-4, SORI-8) を除いて **1** が多く、タイ産では **4** が多い特徴が認められた (Figure 12)。つまり、これらの産地においては **1** もしくは **4** が、主要な α -GI 活性寄与成分であると考えられた。一方、**2**, **5**, **7** および **8** については、いずれの産地においても含量は低く (< 0.100 mg/g)、これらについては *Salacia* 属植物の α -GI 活性にあまり寄与しないものと考えられた。特に **7** および **8** については、マルターゼおよびスクラーゼ阻害活性についても **1—6** よりも劣るため (Table 1)、これらは *Salacia* 属植物の品質評価においてあまり重要でないと考えられた。

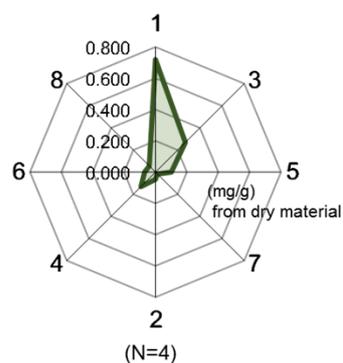
以上の結果から、*Salacia* 属植物のスルホニウム化合物 (**1—8**) 含量は部位や産地によって分布が異なり、薬用部位である根や幹の品質評価においては **1** や **4** の含量が特に重要であると考えられた。



Thailand
S. chinensis (stem & root)



Sri Lanka
S. reticulata (stem & root)



India
S. oblonga (root)

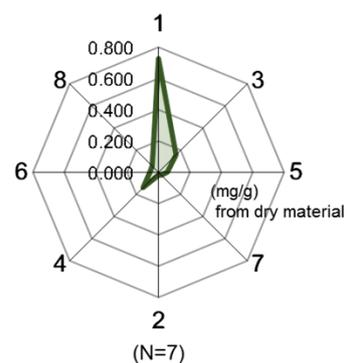


Fig. 12. Average contents of 1—8 in stems and roots of *Salacia* species

次に、タイ産 *S. chinensis* 幹部サンプル 13 検体から新たに熱水抽出エキスを調製し、スルホニウム化合物 (1—6) 含量と α -GI 活性を測定した (Table 19). 得られた結果をもとに、マルターゼおよびスクラーゼ阻害活性強度 (Table 1) に基づき補正²⁷⁾した 1—6 の合計含有量を横軸に、抽出エキスの活性強度 ($1/IC_{50}$) を縦軸にプロットしたところ、Figure 13 に示すような良好な正の相関が認められた. このことから、スルホニウム化合物 (1—6) の定量分析が、*Salacia* 属植物の品質評価法として有用であることが示された.

Table 19. Contents of 1–4 in extracts from stems of *S. chinensis* and their α -glucosidase inhibitory activities

| | Source | Collecting date | Extraction Yield (%) | Content (% from extract) | | | | | | IC ₅₀ (μ g/m) | |
|--------|---------------------|-----------------|----------------------|--------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|---------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Maltase | Sucrase |
| SCS-1 | Nakhon Si Thammarat | 2008.1 | 10.0 | 0.238 | 0.022 | 0.069 | 0.257 | 0.025 | 0.069 | 81.1 | 36.5 |
| SCS-2 | Nakhon Si Thammarat | 2007.1 | 7.8 | 0.117 | 0.065 | 0.018 | 0.218 | 0.013 | 0.065 | 97.9 | 60.6 |
| SCS-3 | Nakhon Si Thammarat | 2007.11 | 9.0 | 0.022 | — ^a | 0.108 | 0.727 | 0.022 | 0.209 | 31.6 | 26.7 |
| SCS-4 | Nakhon Si Thammarat | 2007.1 | 9.4 | 0.239 | 0.024 | 0.088 | 0.273 | 0.026 | 0.071 | 79.1 | 42.2 |
| SCS-5 | Nakhon Si Thammarat | 2007.9 | 9.9 | 0.194 | 0.024 | 0.072 | 0.244 | 0.021 | 0.063 | 82.4 | 46.0 |
| SCS-6 | Nakhon Si Thammarat | 2008.5 | 9.3 | 0.261 | 0.036 | 0.062 | 0.233 | 0.026 | 0.081 | 58.8 | 38.3 |
| SCS-7 | Nakhon Si Thammarat | 2008.5 | 13.0 | 0.174 | 0.020 | 0.043 | 0.185 | 0.020 | 0.055 | 78.5 | 51.7 |
| SCS-8 | Surat Thani | 2007.10 | 9.8 | 0.190 | 0.027 | 0.075 | 0.272 | 0.022 | 0.069 | 79.5 | 46.3 |
| SCS-9 | Surat Thani | 2008.3 | 10.1 | 0.050 | — ^a | 0.085 | 0.370 | 0.045 | 0.167 | 52.4 | 31.7 |
| SCS-10 | Surat Thani | 2008.6 | 9.7 | 0.253 | 0.028 | 0.069 | 0.202 | 0.028 | 0.068 | 66.5 | 39.4 |
| SCS-11 | Songkla | 2008.7 | 9.5 | 0.238 | 0.028 | 0.059 | 0.189 | 0.026 | 0.060 | 76.8 | 42.6 |
| SCS-12 | Krabi | 2008.11 | 9.7 | 0.222 | 0.025 | 0.078 | 0.261 | 0.024 | 0.069 | 76.9 | 44.8 |
| SCS-13 | Trang | 2008.5 | 4.4 | 0.018 | — ^a | 0.057 | 0.652 | 0.012 | 0.131 | 36.4 | 34.1 |
| | | Mean | 9.3 | 0.170 | 0.030 | 0.068 | 0.314 | 0.024 | 0.090 | 69.1 | 41.6 |
| | | SD | 1.9 | 0.089 | 0.013 | 0.022 | 0.174 | 0.008 | 0.048 | 19.2 | 8.8 |

^aBelow quantitation limit.

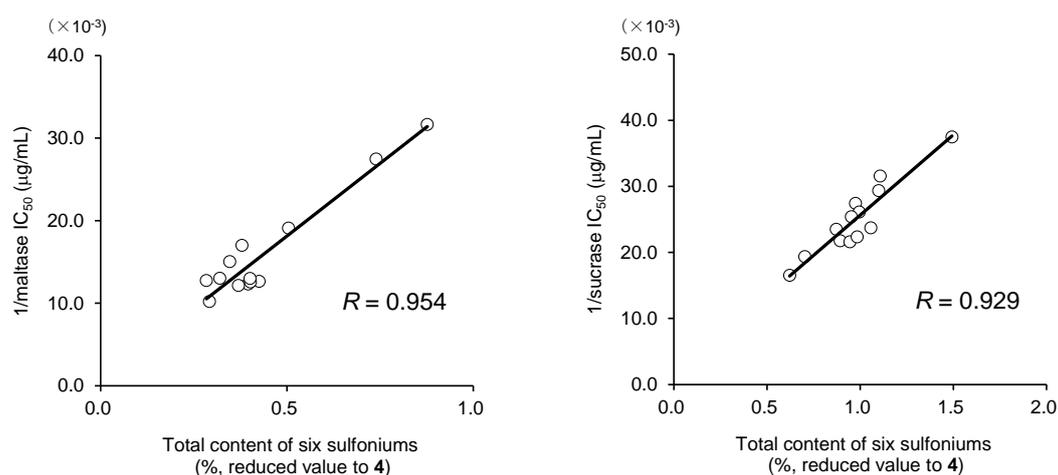


Fig. 13. Correlations between α -glucosidase inhibitory activities and total content of sulfoniums (1–6) Total contents (%) of the six sulfoniums are presented in values to the content of neokotalanol (4), calculated based on the ratio of IC₅₀ values (μ g/mL) of 1–6 against maltase or sucrase (Table 1).

第三章 塩基配列情報に基づく *Salacia chinensis* の鑑別

第一節 *Salacia* 属植物の rDNA ITS 領域の塩基配列の比較

植物などの真核生物の核リボソーム DNA (nrDNA) には3つのリボソーム RNA (rRNA) をコードする遺伝子領域 (18S rDNA, 5.8S rDNA, 26S rDNA) があり, 18S と 5.8S および 5.8S と 26S の各 rDNA の間には, RNA を転写しない internal transcribed spacer 1 (ITS1) および ITS2 領域が存在し, 系統解析マーカーとして有用とされている (Figure 14).

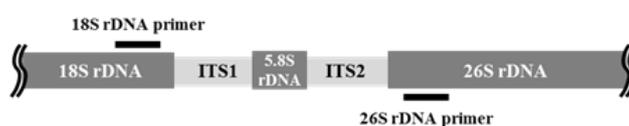


Fig. 14. Schematic representation of rDNA, ITS and primer locations

そこで *Salacia* 属植物の ITS 領域の塩基配列を明らかにする目的で, 植物間で塩基配列が高度に保存されている 18S rDNA および 26S rDNA にプライマーを設計し, 設計したプライマーセットを用いて, 両 rDNA に挟まれた ITS 領域を PCR 増幅させることとした. GenBank の登録情報 (Accession number, Acc. No.) より Table 20 に示した植物の 18S および 26S rDNA の塩基配列を選択し, これらに共通する塩基配列のうちできるだけ ITS 領域に近い部分にプライマー (18S rDNA primer: 5'-GATTGAATGGTCCGGTGAAGT-3', 26S rDNA primer : 5'-CGCTTCTCCAGACTACAATTTCG-3') を設計した.

Table 20. List of accession numbers applied in primer design

| rDNA | Species | Acc. No. | rDNA | Species | Acc. No. |
|----------|---|----------|----------|---------------------------------|----------|
| 18S rDNA | <i>Panax japonicus</i> | D84100 | 26S rDNA | <i>Citrus limon</i> | X05910 |
| | <i>P. pseudoginseng</i> var. <i>angustifolius</i> | AB088019 | | <i>Disanthus cercidifolius</i> | AF479218 |
| | <i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i> | AB044901 | | <i>Geranium sanguineum</i> | AF479129 |
| | <i>Tapiscia sinensis</i> | AF207034 | | <i>Pleurostyliia leucocarpa</i> | AF222405 |
| | <i>Anisophyllea fallax</i> | AF534775 | | <i>Siphonodon australis</i> | AF222346 |
| | <i>Conopholis alpina</i> | AF039068 | | <i>Mortonia greggii</i> | AF222380 |
| | <i>Corallocarpus bainesii</i> | AF008955 | | <i>Salacia impressifolia</i> | AF222431 |
| | <i>Flacourtia jangomas</i> | AF206912 | | <i>Salacia nitida</i> | AF222428 |
| | <i>Luffa quinquefida</i> | AF008957 | | <i>Kokoona</i> sp. | AF222409 |
| | <i>Marah macrocarpus</i> | AF008956 | | <i>Licania heteromorpha</i> | AF222370 |
| | <i>Plagiopteron suaveolens</i> | AF206993 | | <i>Putterlickia verrucosa</i> | DQ217434 |
| | <i>Quiina pteridophylla</i> | AF207003 | | | |

設計したプライマーの *Salacia* 属植物への適用性を評価するため、*Salacia* 属植物サンプル 11 検体 (Table 21) から鋳型となる DNA を抽出し、PCR 増幅を検討したところ、すべての検体から予測サイズと一致する 970 bp 付近の DNA 断片が増幅し、本プライマーが *Salacia* 属植物の ITS 領域を含む DNA 断片の増幅に適用可能であることが確認できた。

Table 21. Data of authentic *Salacia* sp. samples

| <i>Salacia</i> species | Sample No. | Acc. No. | Date | Collection | |
|------------------------|------------|----------|--------|-------------------------------|------|
| | | | | Area | Part |
| <i>S. reticulata</i> | SR-1 | LC010118 | 2011 | Sri Lanka | Leaf |
| | SR-2 | LC010119 | 2007 | Sri Lanka | Leaf |
| | SR-3 | LC010120 | 2007 | Sri Lanka | Leaf |
| <i>S. oblonga</i> | SO-1 | LC010117 | 2007 | India | Leaf |
| <i>S. chinensis</i> | SC-1 | LC010227 | 2011.3 | Trang, Thailand | Stem |
| | SC-2 | LC010228 | 2011.3 | Nakhon Si Thammarat, Thailand | Stem |
| | SC-3 | LC010229 | 2011.3 | Nakhon Si Thammarat, Thailand | Stem |
| | SC-4 | LC010230 | 2011.3 | Trang, Thailand | Stem |
| | SC-5 | LC010231 | 2011.3 | Krabi, Thailand | Stem |
| | SC-6 | LC010232 | 2011.3 | Krabi, Thailand | Stem |
| | SC-7 | LC010233 | 2011.3 | Nakhon Si Thammarat, Thailand | Stem |

続いて、得られた DNA 断片について塩基配列を決定し、日本 DNA データバンク (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) の Acc. No. を得た (Table 21). 得られた配列から他の *Salacia* 属植物との遺伝的な距離を調べる目的で、GenBank に登録されている *Salacia* 属植物の ITS 配列情報 (*S. alwynii* : FJ705520, *S. cordata* : FJ705521, *S. crassifolia* : FJ705522, *S. disepala* : FJ705523, *S. elliptica* : FJ705524, *S. erythrocarpa* : FJ705525, *S. gerrardii* : FJ705526, *S. madagascariensis* : FJ705527, *S. nitida* : FJ705528, *S. owabiensis* : FJ705529, *Salacia* sp. : FJ705530, *S. arborea* : FJ705531, *S. chinensis* : HM230110, *S. grandifolia* : HM230111, *S. krigsneri* : HM230112) をもとに系統樹の作成を行ったところ、*S. chinensis*, *S. reticulata* および *S. oblonga* は *S. erythrocarpa* から分岐したグループであり、これらの 3 種は、進化距離の非常に短い遺伝的な近縁種であると考えられた (Figure 15).

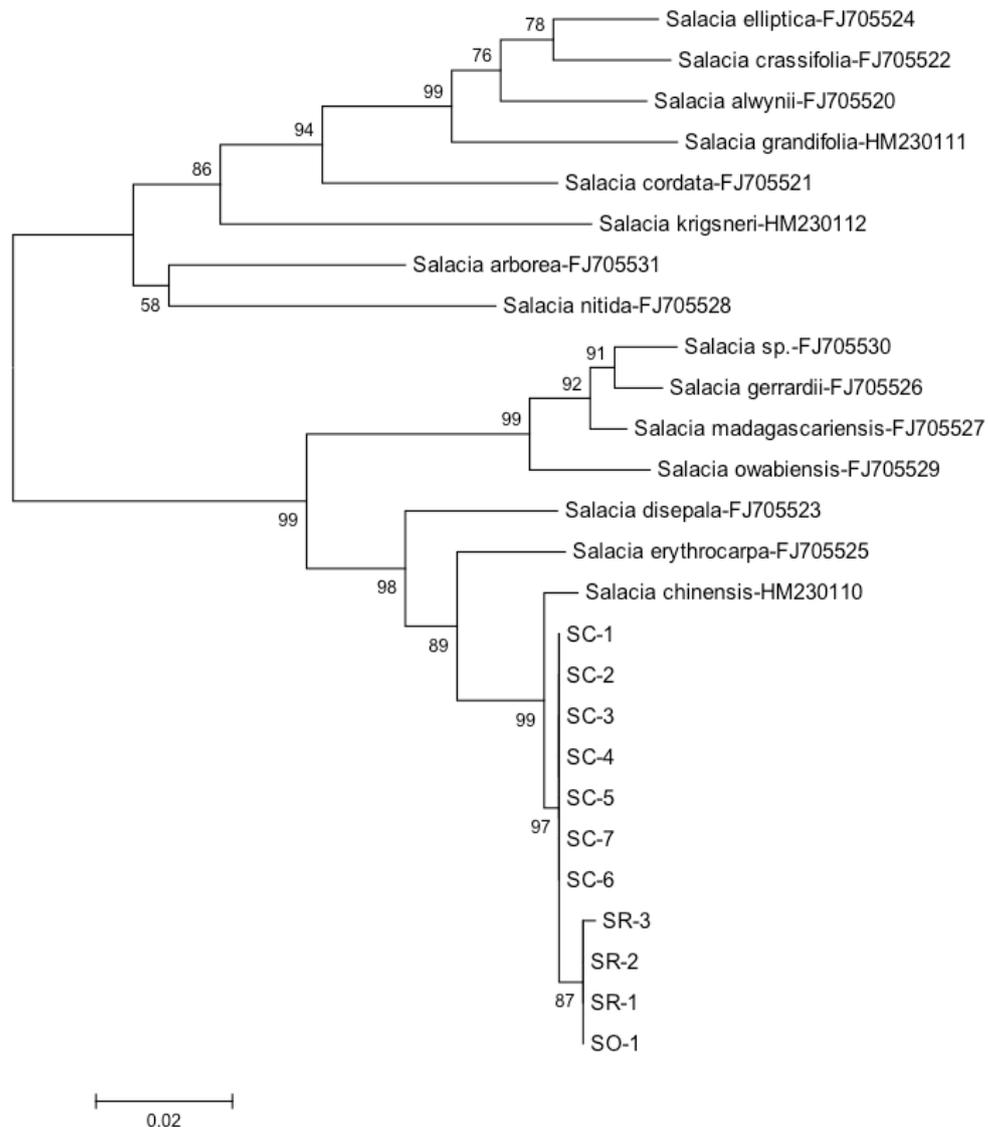


Fig. 15. Phylogenetic tree of DNA sequences of the ITS region^a
^aNumbers and branch length represent sequence divergence.

次にこれらの 3 種の識別に利用可能な配列を検討するため、それぞれの配列について alignment 解析を行った (Table 22). その結果, *S. reticulata* (SR-1—3) については, SR-1 と SR-2 で同一配列を示すのに対し, SR-3 では ITS1 領域 168 位に「G→A」の塩基置換が認められ, *S. reticulata* には 2 つの遺伝子タイプ (Type 1, Type 2) が認められた. また *S. reticulata* (SR-1—3) と *S. oblonga* (SO-1) について比較したところ, SO-1 の ITS1 領域

183 位は A もしくは C のヘテロ (Type 3) が認められた。しかし、それ以外では両種を区別できるような配列は見いだせず、*S. reticulata* および *S. oblonga* の間では ITS 領域の塩基配列が高度に保存されているものと考えられた。これに対し、*S. chinensis* (SC-1—7) では、ITS1 領域 183 位において「A→C」の塩基置換、ITS1 領域 260—262 位において「TCG→CGA」の塩基置換が共通して認められ、さらに ITS2 領域については一部の検体で 609 位に「G」、760—763 位に「CAGG もしくは TAGG」の挿入が確認された。これらの特徴はオーストラリア産 *S. chinensis* : HM230110 においても認められ、*S. chinensis* には 5 種類の遺伝子タイプ (Type 4—8) が確認された。以上のことから、*S. reticulata* と *S. oblonga* では ITS 領域の配列が類似しているため、鑑別困難であるのに対し、*S. chinensis* については *S. reticulata* および *S. oblonga* と区別可能な特徴的な遺伝子タイプを示すことから、これらの特徴が *S. chinensis* の識別に利用可能であると考えられた。

Table 22. Sequence alignment of ITS region of authentic *Salacia* species

| <i>Salacia</i> Species | Sample No. | Acc. No. | ITS1 | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | 168 | 183 | 200 | 201 | 226 | 229 | 260 | 261 | 262 | 271 | 376 |
| <i>S. reticulata</i> | SR-1 | LC010118 | G | A | T | C | A | C | T | C | G | T | C |
| | SR-2 | LC010119 | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| | SR-3 | LC010120 | A | · | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| <i>S. oblonga</i> | SO-1 | LC010117 | · | A/C | · | · | · | · | · | · | · | · | · |
| <i>S. chinensis</i> | SC-1 | LC010227 | · | C | · | · | · | · | C | G | A | · | · |
| | SC-2 | LC010228 | · | C | · | · | · | · | C | G | A | · | · |
| | SC-3 | LC010229 | · | C | · | · | · | · | C | G | A | · | · |
| | SC-4 | LC010230 | · | C | · | · | · | · | C | G | A | · | · |
| | SC-5 | LC010231 | · | C | · | · | · | · | C | G | A | · | · |
| | SC-6 | LC010232 | · | C | · | · | · | · | C | G | A | · | · |
| | SC-7 | LC010233 | · | C | · | · | · | · | C | G | A | · | · |
| Ref. | HM230110 | · | C | C | G | G | — | C | G | A | A | A | |

| <i>Salacia</i> Species | Sample No. | ITS2 | | | | Genotype | |
|------------------------|------------|------|-----|-----|-----|----------|--------|
| | | 609 | 760 | 761 | 762 | | 763 |
| <i>S. reticulata</i> | SR-1 | — | — | — | — | — | Type 1 |
| | SR-2 | — | — | — | — | — | Type 1 |
| | SR-3 | — | — | — | — | — | Type 2 |
| <i>S. oblonga</i> | SO-1 | — | — | — | — | — | Type 3 |
| <i>S. chinensis</i> | SC-1 | G | — | — | — | — | Type 4 |
| | SC-2 | G | — | — | — | — | Type 4 |
| | SC-3 | G | C | A | G | G | Type 5 |
| | SC-4 | — | C | A | G | G | Type 6 |
| | SC-5 | G | C | A | G | G | Type 5 |
| | SC-6 | G | C | A | G | G | Type 5 |
| | SC-7 | — | T | A | G | G | Type 7 |
| Ref. | G | — | — | — | — | Type 8 | |

第二節 市場に流通する *Salacia* 属植物の鑑別

S. chinensis, *S. reticulata* および *S. oblonga* として流通する市場品 (根もしくは幹) をそれぞれ 5 種類ずつ, 合計 15 種を入手した (Table 23). いずれも木片もしくは粉末の状態で流通していたため, 形態的特徴から基原種を鑑別するのは困難であった. これらの市場品について DNA を抽出した後, 設計したプライマーにて PCR 増幅させ, ITS 領域の塩基配列を決定した. その結果, Table 23 に示すようにスリランカで入手した 3 検体 (M-01—03) およびインドで入手した 2 検体 (M-09, M-10) については, いずれも Type 1 と共通する遺伝子タイプが認められ, ITS 領域の塩基配列からは製品の表示名称のとおり *S. reticulata* もしくは *S. oblonga* であると推定された. また, タイから入手した 5 検体 (M-11—15) については, Type 4—7 のいずれかの遺伝子タイプが認められ, これらについても製品の表示名称のとおり, *S. chinensis* であると推定された. 一方, インドから *S. reticulata* として入手した M-04 および M-05, また *S. oblonga* として入手した M-06—08 については, いずれも Type 6 の遺伝子タイプが認められ, ITS 領域の塩基配列からは *S. chinensis* と推定された. インドでは, *S. reticulata* や *S. oblonga* と同様に *S. chinensis* が多く自生していることから, これらの種間で交雑が起こっている可能性や, 流通時に種が混在している可能性が考えられたが, 現時点ではその原因は不明である.

以上の結果より, 本法は *S. chinensis* の鑑別に適用可能であり, 品質管理における基原種の同定に有用であると考えられた.

Table 23. Discrimination of *Salacia* samples obtained in markets by DNA sequencing data of PCR products

| Sample No. | Representation in Market | | Collection | | ITS1 | | | | | | | | | | |
|------------|--------------------------|------|------------|-----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Origin | Part | Date | Area | 168 | 183 | 200 | 201 | 226 | 229 | 260 | 261 | 262 | 271 | 376 |
| M-01 | <i>S. reticulata</i> | root | 2011 | Sri Lanka | G | A | T | C | A | C | T | C | G | T | C |
| M-02 | <i>S. reticulata</i> | stem | 2010 | Sri Lanka | . | A | . | . | . | . | T | C | G | . | . |
| M-03 | <i>S. reticulata</i> | root | 2011 | Sri Lanka | . | A | . | . | . | . | T | C | G | . | . |
| M-04 | <i>S. reticulata</i> | stem | 2010 | India | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-05 | <i>S. reticulata</i> | root | 2010 | India | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-06 | <i>S. oblonga</i> | root | 2006 | India | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-07 | <i>S. oblonga</i> | root | 2010 | India | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-08 | <i>S. oblonga</i> | root | 2010 | India | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-09 | <i>S. oblonga</i> | root | 2010 | India | . | A | . | . | . | . | T | C | G | . | . |
| M-10 | <i>S. oblonga</i> | root | 2010 | India | . | A | . | . | . | . | T | C | G | . | . |
| M-11 | <i>S. chinensis</i> | stem | 2008 | Thailand | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-12 | <i>S. chinensis</i> | stem | 2008 | Thailand | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-13 | <i>S. chinensis</i> | stem | 2007 | Thailand | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-14 | <i>S. chinensis</i> | stem | 2008 | Thailand | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |
| M-15 | <i>S. chinensis</i> | stem | 2009 | Thailand | . | C | . | . | . | . | C | G | A | . | . |

| Sample No. | ITS2 | | | | | Distinguished <i>Salacia</i> Species | |
|------------|------|-----|-----|-----|-----|--------------------------------------|---|
| | 609 | 760 | 761 | 762 | 763 | Genotype | |
| M-01 | — | — | — | — | — | Type 1 | <i>S. reticulata</i> or <i>S. oblonga</i> |
| M-02 | — | — | — | — | — | Type 1 | <i>S. reticulata</i> or <i>S. oblonga</i> |
| M-03 | — | — | — | — | — | Type 1 | <i>S. reticulata</i> or <i>S. oblonga</i> |
| M-04 | — | C | A | G | G | Type 6 | <i>S. chinensis</i> |
| M-05 | — | C | A | G | G | Type 6 | <i>S. chinensis</i> |
| M-06 | — | C | A | G | G | Type 6 | <i>S. chinensis</i> |
| M-07 | — | C | A | G | G | Type 6 | <i>S. chinensis</i> |
| M-08 | — | C | A | G | G | Type 6 | <i>S. chinensis</i> |
| M-09 | — | — | — | — | — | Type 1 | <i>S. reticulata</i> or <i>S. oblonga</i> |
| M-10 | — | — | — | — | — | Type 1 | <i>S. reticulata</i> or <i>S. oblonga</i> |
| M-11 | — | C | A | G | G | Type 6 | <i>S. chinensis</i> |
| M-12 | G | C | A | G | G | Type 5 | <i>S. chinensis</i> |
| M-13 | G | — | — | — | — | Type 4 | <i>S. chinensis</i> |
| M-14 | G | C | A | G | G | Type 5 | <i>S. chinensis</i> |
| M-15 | — | T | A | G | G | Type 7 | <i>S. chinensis</i> |

結 論

タイ産 *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス (SCE) を用いて、正常ラットや 2 型糖尿病マウスに投与したときの抗糖尿病作用について検討し、以下の知見を得た。

- 1) ラットデンプン負荷試験において SCE の用量依存的な血糖上昇抑制作用を確認するとともに、ED₅₀ は、SCE : 94.0 mg/kg, **1** : >1.0 mg/kg, **3** : 0.62 mg/kg および **4** : 0.54 mg/kg であり、neokotalanol (**4**) がデンプン負荷に対して強い血糖上昇抑制作用を示すことを明らかにした。
- 2) SCE の食後血糖上昇抑制効果は投与から 60 分以内に消失し、その効果は一過的であることを確認した。
- 3) SCE 中のスルホニウム化合物 (**1—4**) の消化管内安定性と吸収性を評価し、**1—4** は胃液に安定で小腸から吸収され難いことを確認した。
- 4) 2 型糖尿病 KK-A^y マウスに対する混餌投与試験において、SCE は血糖値および HbA1c の上昇抑制効果を発揮し、その作用機序は α -GI 活性を介した作用であることを確認した。

また *Salacia* 属植物の品質評価法の確立を目的に、化学的品質評価法としてスルホニウム化合物 (**1—8**) の LCMS 定量分析法を検討した。また基原鑑別法として ITS 領域の塩基配列を解析し、植物種固有のマーカ配列を検討した。確立した方法を利用し、インドやスリランカ、タイより入手した種々の *Salacia* 属植物サンプルについて分析を行い、以下の知見を得た。

- 1) スルホニウム化合物は薬用部位である根や幹に多く局在し、スリランカ産およびインド産の *Salacia* 属植物サンプルでは salacinol (1) が、タイ産では neokotalanol (4) が多い特徴を見いだした。
- 2) Neosalacinol (2), ponkoranol (5), salaprinol (7) および neosalaprinol (8) については、いずれの産地においても含量は低く、マイナー成分であった。
- 3) タイ産 *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキスについて、スルホニウム化合物 (1—6) 含量と α -GI 活性を測定した結果、良好な正の相関が認められ、スルホニウム化合物 (1—6) の定量分析が、*Salacia* 属植物の品質評価法として有用であることを明らかにした。
- 4) ITS 領域に基づく系統樹解析の結果、*S. chinensis*, *S. reticulata* および *S. oblonga* は *S. erythrocarpa* から分岐したグループであり、これらの 3 種は遺伝的な近縁種であることを明らかにした。
- 5) *S. chinensis* について *S. reticulata* および *S. oblonga* と区別可能な特徴的な遺伝子配列を見いだし、市場品を用いて鑑別に利用可能であることを見いだした。

実験の部

第一章の実験

S. chinensis 幹部エキスの調製

タイ南部で採取した *S. chinensis* 幹部から熱水抽出エキスを調製した。基原植物は、Rajamangala 工科大学 Yutana 博士によって形態学的特徴より同定された。自然乾燥させた幹部を粉砕後、10 倍量の熱水にて抽出 (2 時間, 2 回) し、得られた抽出エキスを減圧濃縮後、凍結乾燥した。得られた *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス (SCE) を実験に使用した。

第一節の実験

実験動物

Sprague-Dawley (SD) 雄性ラット (5 週齢, 日本エスエルシー社) を購入し、1 週間予備飼育後、実験に使用した。動物実験は、近畿大学動物実験委員会にて承認された内容にて実施した。

デンプン負荷に対する SCE の血糖上昇抑制効果

20 時間絶食した 6 週齢の SD 雄性ラットに、検体を含む 5% (w/v) α 化デンプン溶液 (1 g/kg) を経口投与した (20 mL/kg)。その後、尾静脈をメスで 2~3 mm ほど切開した際に漏出する血液を用いて、経時的 (0, 0.5, 1, 2 および 3 時間後) に血糖値を測定した。血糖値の測定には、グルコースオキシダーゼ法を利用した小型自動血糖測定器 (メディセーフミニ, テルモ社製) を使用した。また α 化デンプン溶液のみを投与した動物をコントロール群とし、蒸留水のみを投与した動物をノーマル群とした。各群は 8 匹で実験を行った。50%有効用量 (ED₅₀) は、検体の投与量と iAUC_{0-2h} のコントロール群に対する阻害率 (%) から算出した。なお, salacinol (1), kotalanol (3) および neokotalanol (4) 標準品は第二章にて調製したものを使用した。

SCE の血糖上昇抑制効果の作用時間

試験群は, SCE と α 化デンプンの混合液を同時投与する群と, SCE を投与後, 30, 60, 120 分後にそれぞれ α 化デンプンを投与する群の合計 4 群とした. また, α 化デンプン溶液のみを投与した動物をコントロール群とし, 蒸留水のみを投与した動物をノーマル群とした. 各群は 8 匹で実験を行った. 20 時間絶食した 6 週齢の SD 雄性ラットに, SCE (75 mg/kg) を経口投与し, これと同時に, もしくは 30, 60, 120 分後に 5% (w/v) α 化デンプン (1g/kg) を投与した (20 mL/kg). その後, 尾静脈をメスで 2~3 mm ほど切開した際に漏出する血液を用いて, 経時的 (0, 0.5, 1 および 2 時間後) に血糖値を測定した.

人工胃液を用いた安定性試験

人工胃液は, NaCl 2.0 g に HCl 7.0 mL および蒸留水を加えて 1 L とし (日本薬局方崩壊試験第 1 液, pH1.2 に相当), これに pepsin (1:10000, ブタ胃粘膜由来, 和光純薬社製) 3.2 g を溶解して調製した. この人工胃液に対して SCE を溶解し (1.0 mg/mL), 37°C で 3 時間インキュベートした. 経時的 (0, 1 および 3 時間後) に一部を抜き取り, 1N NaOH 水溶液で中和した. これを限外ろ過 (アミコンウルトラ MWCO 3000 Da, 日本ミリポア社製) による除タンパク後, 第二章の LCMS 分析条件にてスルホニウム化合物 (1—4) 含量を測定した.

小腸結紮ループを用いた吸収性試験

18 時間絶食した 10 週齢の SD 雄性ラットを, thiobutabarbital-Na (80 mg/kg) 麻酔下で開腹し, 空腸領域の約 20 cm を結紮しながらカニューレを挿入し, 小腸結紮ループを作製した. このループ内に蒸留水に溶解した SCE を注入した (300 mg/2 mL/匹). 全採血にて安楽死させ, 経時的 (0, 0.5, 2 時間後) にループ内残液を回収した. 生理食塩水 10 mL でループ内を洗浄した後, ループ内残液と合わせ, 全量を 25 mL とした. これをさらに生理

食塩水で適宜希釈し，第二章の LCMS 分析条件にてスルホニウム化合物 (1—4) 含量を測定した．なお，比較対象として，小腸から吸収されることが報告されている α -GI 薬 miglitol (1 mg/匹，三和化学社製) ならびに D-glucose (10 mg/匹，ナカライテスク社製) についても同様に評価した．各群は 5 匹で実験を行った．

なお，miglitol 含量の測定は以下の装置ならびに分析条件にて行った．装置：LCMS-2010EV/LC-20A Prominence (Shimadzu 社製)，カラム：Inertsil ODS-3 (5 μ m, 2.1 mm i.d.×150 mm, GL サイエンス社製)，カラム温度：40°C，移動相：5 mM NFVA-MeOH (95:5, v/v)，流速：0.2 mL/min，イオン化：ESI-Positive，SIM: $m/z=208$ ，注入量：1 μ L．

D-Glucose 含量の測定は，グルコースオキシダーゼ法 (グルコース CII テストワコー，和光純薬社製) にて行った．

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表した．それぞれのコントロール群との比較は，Dunnett の多重比較検定により行った．有意水準は 5% とした．

第二節の実験

実験動物

KK-A^y 雄性マウス (5 週齢, 日本クレア社) を購入し, 個別ゲージで 1 週間予備飼育した後, 実験に使用した. 動物実験は, 近畿大学動物実験委員会にて承認された内容にて実施した.

CE-2 混餌投与試験

標準飼料である CE-2 固形飼料 (日本クレア社製) を実験に使用した. KK-A^y マウスを個別ゲージにて 1 週間の予備飼育後, 体重, 血糖値, HbA1c に基づいて 4 群に分け, それぞれコントロール群および SCE (0.10, 0.25, 0.50% 配合) を投与する群とした. 飼料を自由摂餌にて飼育し, 15 日目および 21 日目に, 尾静脈をメスで 2~3 mm ほど切開した際に漏出する血液を用いて, 非絶食下の血糖値および HbA1c を測定した. すなわち, 血糖値はグルコースオキシダーゼ法を利用したメディセーフミニを用いて測定し, HbA1c はラテックス免疫凝集阻害法を利用した DCA Vantage AnalyzerTM (シーメンス社製) を用いて測定した.

AIN93M 混餌投与試験

精製飼料である AIN93M 粉末飼料 (日本クレア) を実験に使用した. KK-A^y マウスを個別ゲージにて 1 週間の予備飼育後, 体重, 血糖値, HbA1c に基づいて 2 群に分け, それぞれコントロール群および SCE (0.03% 配合) を投与する群とした. 予備検討の結果, SCE 投与群で摂餌量の減少傾向が認められたため, 群間で摂餌量が同じになるようにペアフィーディング法にて給餌し飼育した. 11 日目および 18 日目に, 尾静脈の漏出血液を用いて, 血糖値および HbA1c を測定した. なお, SCE の配合量 0.06% および 0.12% についても同様に試験を実施した. また, SCE 0.12% 投与群に関しては, 27 日目に 20 時間の絶食後,

D-glucose 負荷 (2.0 g/kg) を行った。その後、尾静脈より経時的 (0, 0.5, 1 および 2 時間後) に血糖値を測定し、対応するコントロール群と比較した。

作用機序の検証

AIN93M の消化性糖質をすべてグルコースに置換した特殊飼料 AIN93M/Glc (日本クレア社製, Table 24) を作製し、実験に使用した。KK-A^y マウスを 1 週間の予備飼育後、体重に基づいて 5 群に分け、それぞれ AIN93M を投与する 2 群および AIN93M/Glc を投与する 3 群とした。AIN93M を投与する 2 群はコントロール群および SCE (0.06% 配合) 投与群とし、AIN93M/Glc を投与する 3 群はコントロール群および SCE (0.06%, 0.30% 配合) 投与群とした。なお AIN93M および AIN93M/Glc を投与するそれぞれの群間で摂餌量が同じになるようにペアフィーディングを行い飼育した。14 日目に、尾静脈の漏出血液を用いて、HbA1c を測定した。

Table 24. Composition of diets

| | AIN93M | AIN93M/Glc |
|--------------------------------|----------|------------|
| D-Glucose | – | 72.0692% |
| Corn starch | 46.5692% | – |
| Dextrin | 15.50% | – |
| Sucrose | 10.00% | – |
| Casein | 14.00% | 14.00% |
| Powdered cellulose | 5.00% | 5.00% |
| Soybean oil | 4.00% | 4.00% |
| AIN-93 mineral mixture | 3.50% | 3.50% |
| AIN-93 vitamin mixture | 1.00% | 1.00% |
| L-Cystine | 0.18% | 0.18% |
| Choline bitartrate | 0.25% | 0.25% |
| <i>tert</i> -Butylhydroquinone | 0.0008% | 0.0008% |
| Total | 100% | 100% |

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表した。それぞれのコントロール群との比較は、Student's *t*-test もしくは Dunnett の多重比較検定により行った。有意水準は 5% とした。

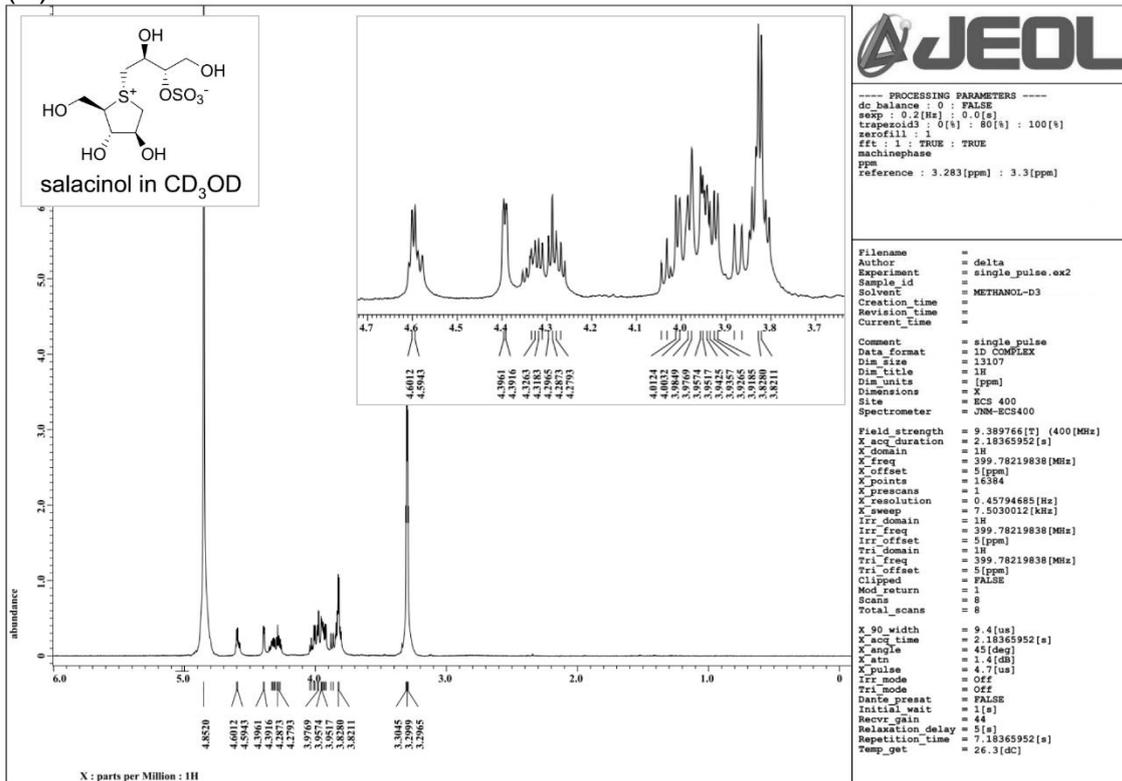
第二章の実験

第一節の実験

Salacinol (1) および kotalanol (3) の調製

タイ産 *S. chinensis* 幹部 (12.0 kg) から熱水抽出エキス末 (収量: 1.12 kg, 収率: 9.37%) を調製し, そのうち 1 kg をさらに加熱還流下 MeOH 抽出 (3 時間, 3 回) し, MeOH 抽出エキス末 (347.54 g, 3.26%) を得た. 続いて MeOH 抽出エキス末 (303.80 g) を Diaion HP20 カラムクロマトグラフィー (4.0 kg×2, H₂O→MeOH) に供し, 水溶出画分 (167.64 g, 1.80%) および MeOH 溶出画分 (123.75 g, 1.33%) を得た. 水溶出画分 (150.00 g) をイオン交換クロマトグラフィー (Duolite A368S OH⁻ form, H₂O→1.0 M AcOH, 住化ケムテックス社製) に供し, Fr. 1 (115.65 g) および Fr. 2 (19.91 g) の 2 つのフラクションに分け, さらに Fr. 2 (7.00 g) を Chromatorex NH [500 g, CH₃CN-H₂O (75:25→50:50, v/v), 富士シリシア化学社製] に供して, Fr. 2-1 (2.78 g), Fr. 2-2 (1.80 g) および Fr. 2-3 (2.26 g) の 3 つのフラクションを得た. Fr. 2-1 (1750 mg) を HPLC [検出: RI, カラム: Cosmosil Sugar-D, 20 mm i.d.×250 mm, 移動相: CH₃CN-H₂O (85:15, v/v)] に供し, salacinol (**1**, 310.0 mg, 0.017%) を得た. また, Fr. 2-2 (725 mg) を HPLC [検出: RI, カラム: Cosmosil Sugar-D, 20 mm i.d.×250 mm, 移動相: CH₃CN-H₂O (75:25, v/v)] に供し, kotalanol (**3**, 73.9 mg, 0.0062%) を得た. なお, NMR 解析の結果, **1** および **3** に不純物に由来するシグナルは認められず, 標準品として問題ないものと判断した. (Figures 16, 17).

(A) ¹H-NMR



(B) ¹³C-NMR

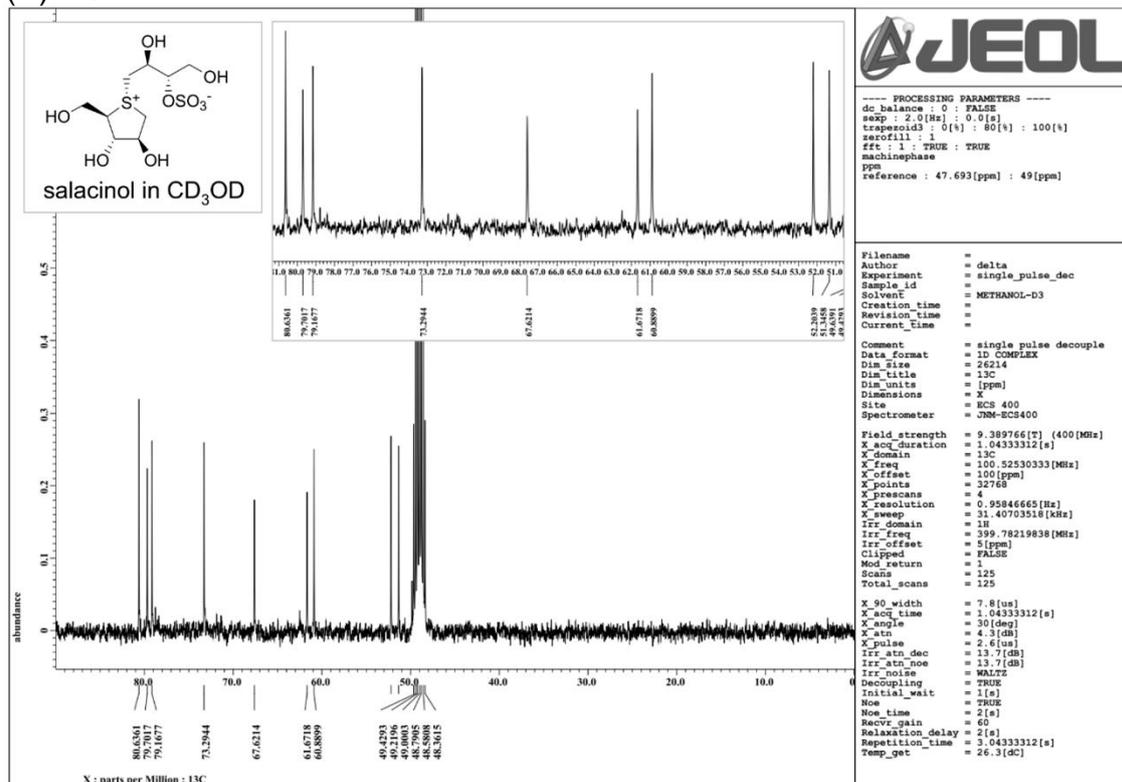


Fig. 16. NMR spectrum of salacinol (1) in CD₃OD

標準溶液の調製

20 mL 容メスフラスコに **1** もしくは **3** を 2.0 mg 秤取し、蒸留水を加えてストック溶液 (100 µg/mL) を調製した。これを分析に使用するまで -30°C に保管した。分析時にはこのストック溶液を 50% MeOH で希釈し、5 濃度 (0.5, 1.0, 1.5, 2.5 および 5.0 µg/mL) の標準溶液を調製した。

Salacinol (**1**) および kotalanol (**3**) の LCMS 分析条件の検討

MS 条件は、**1** および **3** の標準溶液 (5.0 µg/mL) を ESI-MS にて分析し、得られる MS スペクトルから検討した。LC 条件は、アミノ系カラムである Cosmosil Sugar-D (5 µm, 2.0 mm i.d.×150 mm, ナカライテスク社製), CAPCELL PAK NH2 UG (5 µm, 2.0 mm i.d.×150 mm, 資生堂社製) および Asahipak H2P-50 (5 µm, 2.0 mm i.d.×150 mm, 昭和電工社製) の 3 つのカラムを用いて、移動相: CH₃CN/水系, カラム温度: 40 °C, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 1 µL にて SIM 測定 [**1** : *m/z* 333, 183, **3** : *m/z* 423, 273, dulcitol : *m/z* 181] を行い、得られるピークの分離度やピーク形状から検討した。分析試料は、スリランカ産 *S. reticulata* 根/幹部を MeOH で加熱還流抽出 (3 時間, 3 回) したエキス末を 50% MeOH で 1 mg/mL に調製し、0.45 µm フィルターろ過したものを用いた。なお、分析装置は下記の設定にて分析を行った。装置: LCMS-2010EV/LC-20A Prominence, Neburizing gas 流量: 1.5 L/min, Drying gas 圧: 0.15 MPa, CDL 温度: 250°C, Block heater 温度: 200°C, CDL voltage: Constant-mode (-25 V), Q-array DS & RF voltage: Scan-mode.

分析法バリデーション

直線性は 5 濃度 (0.5, 1.0, 1.5, 2.5 および 5.0 µg/mL) の標準溶液を用いて検討した。検出限界および定量限界は、標準溶液を段階的に希釈して分析した時のシグナル/ノイズ (S/N) 比 3 および 10 より算出した。日内および日間精度は、*S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス末を用いて、測定試料を繰り返し調製・分析した時の RSD から評価した。添加回収率

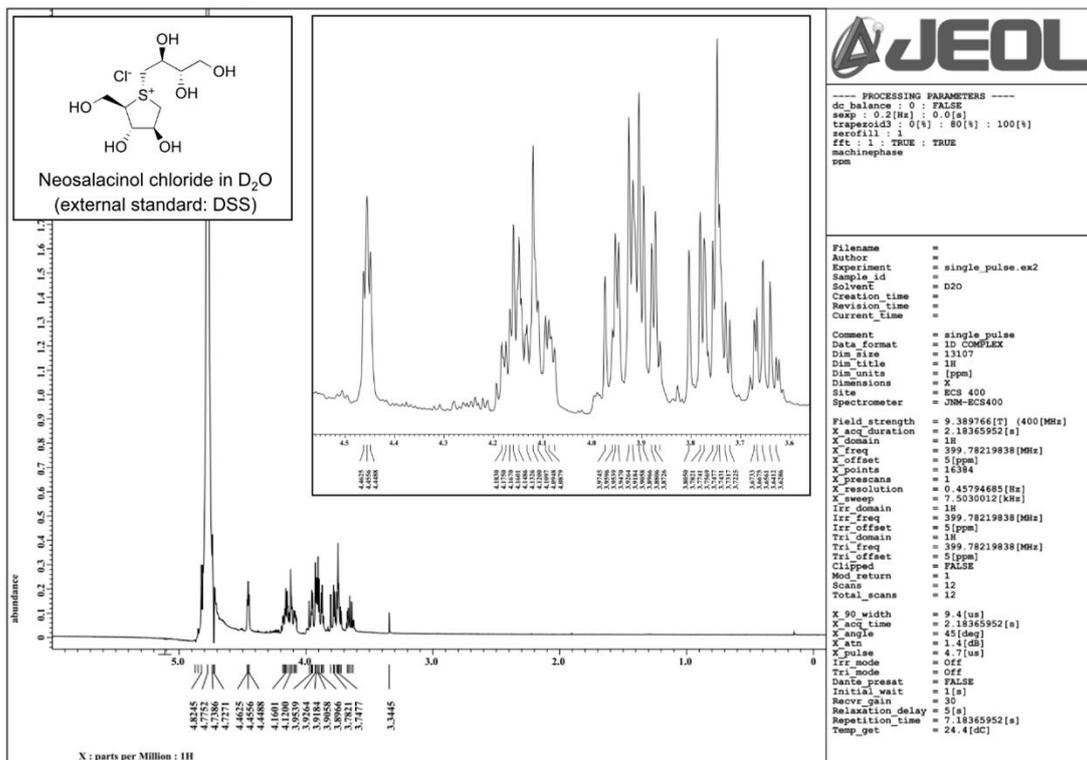
は, 各濃度 (1.0, 2.0, 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の標準品を添加した *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス試料 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50% MeOH) の測定値から算出した.

第二節の実験

Neosalacinol (2) および neokotalanol (4) の調製

タイ産 *S. chinensis* 幹部 (15.0 kg) から熱水抽出エキス末 (1.48 kg, 9.87%) を調製し、そのうち 1 kg を蒸留水 (10 L) に溶解し遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) を行った。上清を Diaion HP20 カラムクロマトグラフィー (4.0 kg×2, H₂O→MeOH) に供し、水溶出画分 (405.6 g, 4.00%) および MeOH 溶出画分 (197.8 g, 1.95%) を得た。水溶出画分 (25.0 g) を CH₃CN–H₂O (50:50, v/v, 500 mL) に溶解し、遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) 後、Chromatorex NH [2 kg, CH₃CN–H₂O (50:50→20:80→H₂O, v/v)] に供して、8 つのフラクションを得た [Fr. 1 (5.91 g, 0.946%), Fr. 2 (2.84 g, 0.454%), Fr. 3 (0.88 g, 0.140%), Fr. 4 (0.90 g, 0.145%), Fr. 5 (0.29 g, 0.0464%), Fr. 6 (1.22 g, 0.195%), Fr. 7 (0.68 g, 0.109%), and Fr. 8 (6.28 g, 1.00%)]. Fr. 4 (0.80 g) を HPLC [検出: RI, カラム: Daisopak-SP-120-5-ODS-BP (20 mm i.d.×250 mm), 移動相: H₂O および 0.1% (v/v) 酢酸水溶液, ダイソー社製] に供し、neosalacinol (**2**, 8.0 mg, 0.0014%) を得た。また, Fr. 6 (1.12 g) を HPLC [検出: RI, カラム: Daisopak-SP-120-5-ODS-BP (20 mm i.d.×250 mm), 移動相: H₂O および 0.1% (v/v) 酢酸水溶液] に供し、neokotalanol (**4**, 99.6 mg, 0.017%) を得た。得られた **2** および **4** は、イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400J (Cl⁻ form, オルガノ社製) を用いて、カウンターイオンを塩化物イオンに置換した。¹⁶⁾ なお, NMR 解析の結果, **2** および **4** に不純物に由来するシグナルは認められず, 標準品として問題ないものと判断した。(Figures 18, 19).

(A) ¹H-NMR



(B) ¹³C-NMR

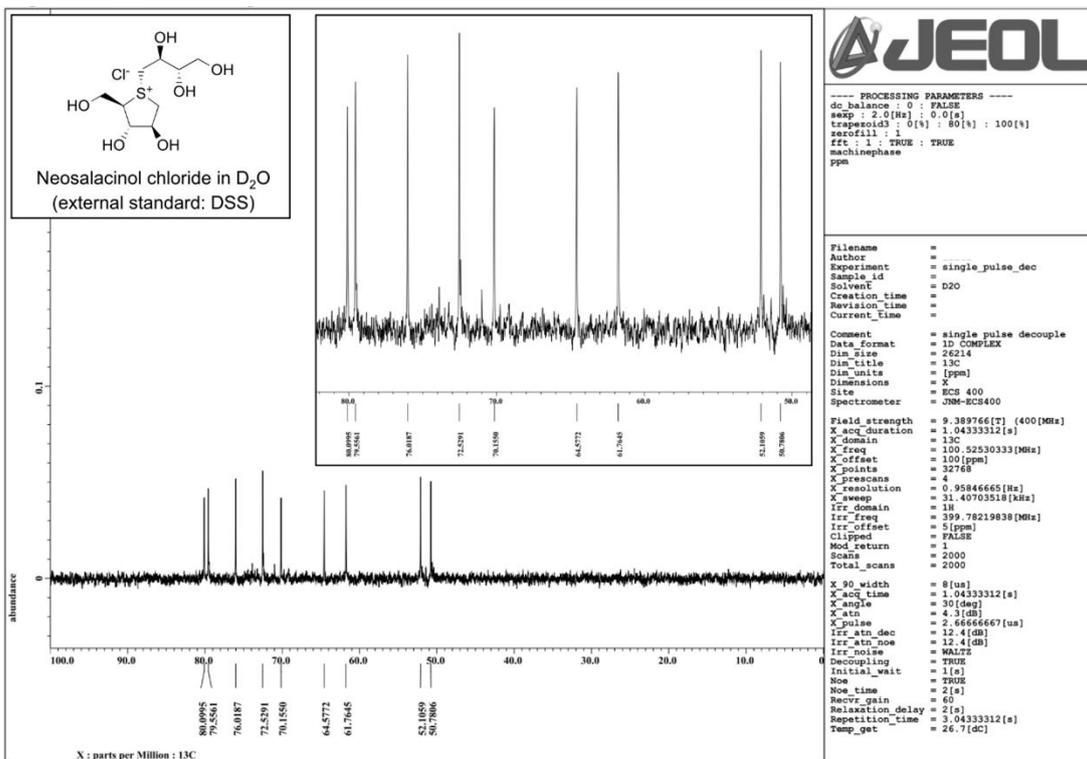
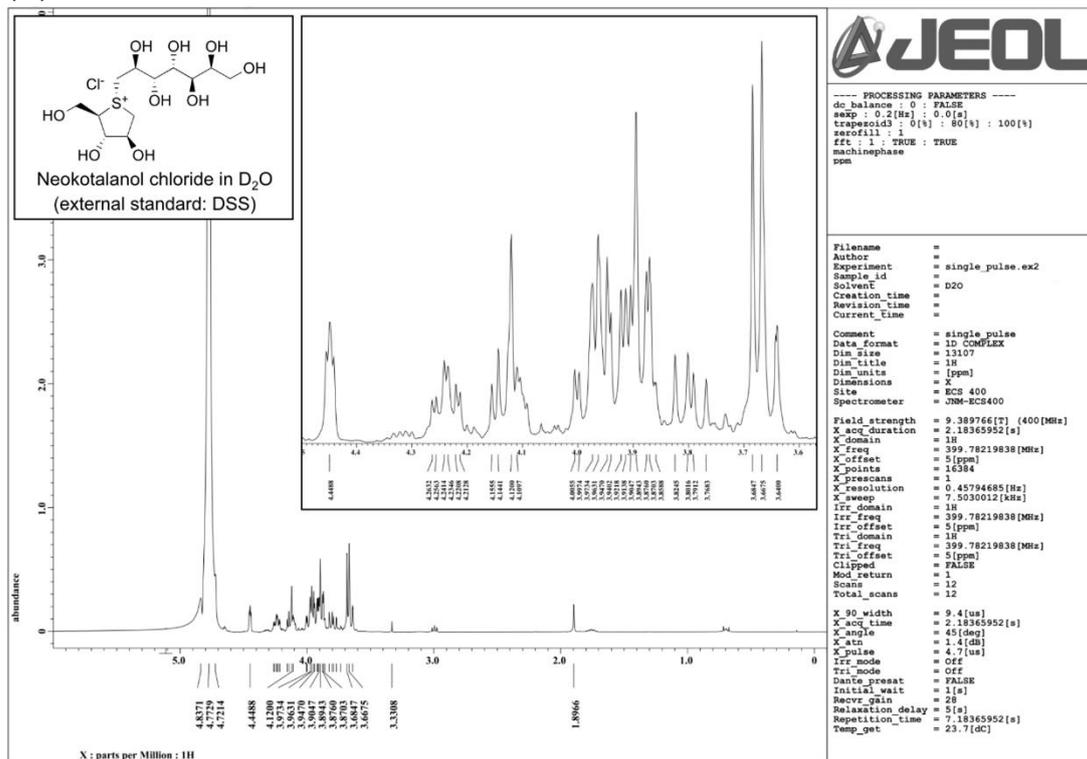


Fig. 18. NMR spectrum of neosalacinol (2) chloride in D₂O

(A) ¹H-NMR



(B) ¹³C-NMR

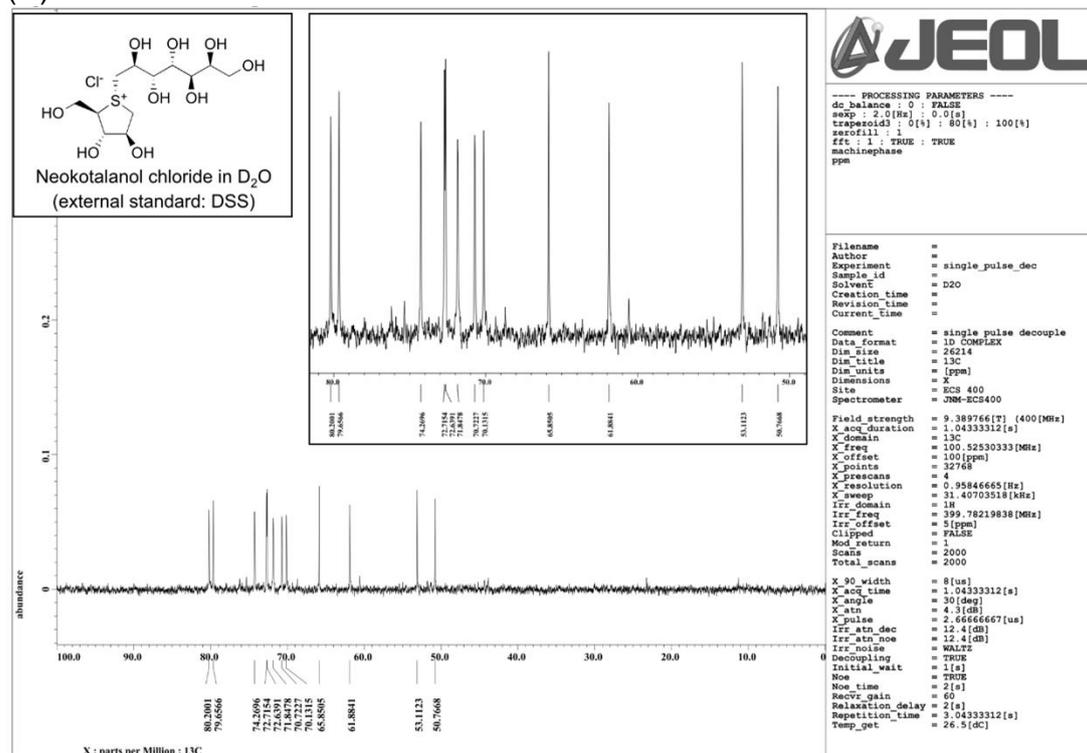


Fig. 19. NMR spectrum of neokotalanol (4) chloride in D₂O

標準溶液の調製

20 mL 容メスフラスコに **2** もしくは **4** を 2.0 mg 秤取し、蒸留水に溶かしてストック溶液 (100 µg/mL, 塩化物塩として) を調製した. これを分析に使用するまで -30°C に保管した. 分析時にはこのストック溶液を 10% MeOH で希釈し, 5 濃度 (0.5, 1.0, 1.5, 2.5 および 5.0 µg/mL) の標準溶液を調製した.

Neosalacinol (**2**) および neokotalanol (**4**) の LCMS 分析条件の検討

LC 条件は, ODS 系カラムである Inertsil ODS-3 (3 µm, 2.1 mm i.d.×100 mm, GL サイエンス社製) を用いて, イオンペア試薬 [trifluoroacetic acid (TFA), heptafluorobutyric acid (HFBA), nonafluorovaleric acid (NFVA) もしくは undecafluorohexanoic acid (UFHA)] を添加した移動相条件について, カラム温度: 40 °C, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 1 µL にて SIM 測定 [**2**: m/z 255, **4**: m/z 345] を行い, 得られるピークの分離度やピーク形状から検討した. なお, ピークの検出は, ポジティブイオンモード ESI にて分子イオンを検出した. 分析試料は, タイ産 *S. chinensis* 幹部を熱水抽出 (2 時間, 2 回) したエキス末を 10% MeOH で 0.5 mg/mL に調製し, 0.45 µm フィルターろ過したものを用いた. なお, 分析装置は下記の設定にて分析を行った. 装置: LCMS-2010EV/LC-20A Prominence, Neburizing gas 流量: 1.5 L/min, Drying gas 圧: 0.15 MPa, CDL 温度: 250°C, Block heater 温度: 250°C, CDL voltage: Constant-mode (-25 V), Q-array DS & RF voltage: Scan-mode.

分析法バリデーション

直線性は 5 濃度 (0.5, 1.0, 1.5, 2.5 および 5.0 µg/mL) の標準溶液を用いて検討した. 検出限界および定量限界は, 標準溶液を段階的に希釈して分析した時の S/N 比 3 および 10 より算出した. 日内および日間精度は, *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス末を用いて, 測定試料を繰り返し調製・分析した時の RSD から評価した. 添加回収率は, 各濃度 (0.336

—1.344 $\mu\text{g/mL}$) の標準品を添加した *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス試料 (500 $\mu\text{g/mL}$, 10% MeOH) の測定値から算出した.

第三節の実験

スルホニウム化合物 (1—8) の調製

Salacinol (1), kotalanol (3), neokotalanol (4) については、第一節および第二節で調製したものを使用した。Ponkoranol (5) は Xie らによって *S. chinensis* 幹部より調製されたものを用いた。²²⁾ その他のスルホニウム化合物 (2, 6, 7 および 8) については、既報の方法^{16,22,29)} によって合成されたものを用いた。なお、脱硫酸エステル体 (2, 4, 6 および 8) は、いずれも Amberlite IRA-400J (Cl⁻ form) を用いて、カウンターイオンを塩化物イオンに置換した。なお、NMR 解析の結果、新たに調製した 5—8 に不純物に由来するシグナルは認められず、標準品として問題ないものと判断した。(Figures 20—23)。

標準溶液の調製

スルホニウム化合物 (1—8) を蒸留水に溶解してストック溶液 (100 µg/mL) を調製し、-30°C に保管した。分析の際は、硫酸エステル体 (1, 3, 5 および 7) は、ストック溶液を 50% MeOH で希釈し、脱硫酸エステル体 (2, 4, 6 および 8) はストック溶液を 10% MeOH で希釈して、5 濃度 (0.5, 1.0, 1.5, 2.5 および 5.0 µg/mL) の標準溶液を調製した。

植物サンプルの入手

S. chinensis については、幹部 27 検体 (SCST-1—14, SCS-1—13), 根部 2 検体 (SCRT-1, 2), 葉部 1 検体 (SCLT-1), 果実部 1 検体 (SCSFT-1) を、タイから入手した。また、*S. reticulata* については、幹部 1 検体 (SRSS-1), 根部 4 検体 (SRRS-1—4), 葉部 1 検体 (SRLS-1) をスリランカから、*S. oblonga* については、根部 8 検体 (SORI-1—8) をインドから入手した。これらのサンプルは Rajamangala 工科大学 Yutana 博士によって、形態学的特徴に基づき基源種が同定されたものを用いた。

サンプルの乾燥

入手した *Salacia* 属植物サンプルは、室内で自然乾燥させた後、ミルミキサーで破碎し、デシケーター内に保存した。乾燥減量の測定は、105°C で予備加熱したはかり瓶を、デシケーター内で室温になるまで約 30 分間放冷し、はかり瓶自体の重さを測定したうえで、各粉末サンプル 1.00 g をはかり瓶内に正確に秤量し、105°C で 8 時間加熱した。再びデシケーター内で約 30 分間放冷後、はかり瓶の重さを測定し、サンプルの重量の減少率から乾燥減量 (%) を算出した。

試料溶液の調製

粉末サンプル 2 g (乾燥減量分を換算) を秤取し、10 倍量 (w/v) の溶媒にて抽出を行った。溶媒には、蒸留水、50% MeOH もしくは MeOH を用いた。抽出方法は、加熱抽出 (2 時間、

2 回) もしくは 超音波抽出 (30 分間, 2 回) を行った. 遠心分離 (3000 rpm, 5 分間) した後, 上清を 100 mL に定容し, その 10 mL を 0.45 μm フィルターろ過したものを分析用の試料溶液とした. 残りの 90 mL をエバポレーターを用いて減圧濃縮後, 凍結乾燥し, 得られるエキス末の重量からエキス収率 (%) を算出した.

分析方法

硫酸エステル体 (**1, 3, 5, 7**) は以下の条件にて分析した. 装置: LCMS-2010EV/LC-20A Prominence, カラム: Asahipak H2P-50 (5 μm , 2.0 mm i.d. \times 150 mm), 移動相: CH_3CN /蒸留水 (78 : 22, v/v), カラム温度: 40 $^\circ\text{C}$, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 1 μL , Neburizing gas 流量: 1.5 L/min, Drying gas 圧: 0.15 MPa, CDL 温度: 250 $^\circ\text{C}$, Block heater 温度: 200 $^\circ\text{C}$, CDL voltage: Constant-mode (-25 V), Q-array DS & RF voltage: Scan-mode, イオン化: ESI-Negative, SIM: **1**, m/z 333, **3**, m/z 423, **5**, m/z 393, **7**, m/z 303.

脱硫酸エステル体 (**2, 4, 6, 8**) は以下の条件にて分析した. 装置: LCMS-2010EV/LC-20A Prominence, カラム: Inertsil ODS-3 (3 μm , 2.1 mm i.d. \times 100 mm), 移動相: 5 mM UFHA/MeOH (99 : 1, v/v), カラム温度: 40 $^\circ\text{C}$, 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 1 μL , Neburizing gas 流量: 1.5 L/min, Drying gas 圧: 0.15 MPa, CDL 温度: 250 $^\circ\text{C}$, Block heater 温度: 250 $^\circ\text{C}$, CDL voltage: Constant-mode (-25 V), Q-array DS & RF voltage: Scan-mode, イオン化: ESI-Positive, SIM: **2**, m/z 255, **4**, m/z 345, **6**, m/z 315, **8**, m/z 225.

分析法バリデーション

直線性は 5 濃度 (0.5, 1.0, 1.5, 2.5 および 5.0 $\mu\text{g/mL}$) の標準溶液を用いて検討した. 検出限界および定量限界は, 標準溶液を段階的に希釈して分析した時の S/N 比 3 および 10 より算出した. 日内および日間精度は, *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス末を用いて, 測定試料を繰り返し調製・分析した時の RSD から評価した. 添加回収率は, 各濃度 (0.125,

0.50 µg/mL) の標準品を添加した *S. chinensis* 幹部熱水抽出エキス試料 (500, 1000 µg/mL, 10% MeOH) の測定値から算出した.

α-グルコシダーゼ阻害活性の測定

α-グルコシダーゼ阻害活性の測定は、既報の方法¹²⁾ を一部改変し、マルターゼおよびスクラーゼ阻害活性について測定した. すなわち、ラット小腸より得られた刷子縁膜を粗酵素として用い、これを、0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、下記の酵素反応で、およそ 25—50 µg の D-glucose が生成する濃度に希釈して実験に用いた. 96 穴マイクロプレートに、基質として 74 mM maltose 溶液もしくは 74 mM sucrose 溶液 50 µL を加え、そこに各濃度に調製した検体溶液 25 µL を加えた. よく混合した後、酵素液 25 µL を加えて、37°C で 30 分間酵素反応させた. 反応終了後、沸騰水浴で 2 分間加熱し、酵素を失活させた. 生成した D-glucose 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、得られた D-glucose 量をもとに 50% 阻害濃度 (IC₅₀ 値) を算出した. 基質は 0.1 M マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、検体は DMSO に溶解したものをマレイン酸緩衝液に添加 (DMSO の反応系終濃度 2.5 %) して用いた. また、酵素の代わりに緩衝液を加え、同様の操作を行ったものをブランクとした.

統計処理

結果はすべて平均値±標準誤差で表した. スルホニウム化合物 (1—8) 含量の比較は、Tukey の多重比較検定により行った. 有意水準は 5% とした.

第三章の実験

第一節の実験

植物サンプルの入手

S. chinensis については、幹部 7 検体 (SC-1—7) をタイから入手した。また、*S. reticulata* については、葉部 3 検体 (SR-1—3) をスリランカから、*S. oblonga* については、葉部 1 検体 (SO-1) をインドから入手した。これらのサンプルは Rajamangala 工科大学 Yutana 博士によって、形態学的特徴に基づき基源種が同定されたものを用いた。

DNA 抽出と PCR

全 DNA は改変 CTAB 法³⁰⁾ により、破碎した葉組織、根または幹組織から抽出した。ITS 領域を含む DNA 断片を増幅するため、抽出した DNA を鋳型として PCR を行った。プライマーには、18S および 26S rDNA の ITS 領域に近い部分に設計した (18S rDNA primer: 5'-GATTGAATGGTCCGGTGAAGT-3', 26S rDNA primer: 5'-CGCTTCTCCAGACTACAATTCG-3') を用いた。PCR 反応液の組成は、設計したプライマーを各 0.5 μ L, 鋳型 DNA 100 ng, AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社製) を 12.5 μ L, 滅菌水を加えて全量を 25 μ L とした。PCR 条件は、初期ステップ 95°C 5 分後、変性を 95°C で 30 秒、アニーリングを 58°C で 30 秒、伸長を 72°C で 1 分間行い、これを 40 回反復し、最終伸長を 72°C で 5 分間行った。

塩基配列の解析

PCR により得られた DNA 断片の塩基配列をクローニングベクター pGEM-T Easy Vector (Promega 社製) に挿入し、得られたプラスミド DNA を BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いてシーケンス反応を行った。プライマーは、M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') および M13

reverse (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') を使用した。シーケンス反応後、3130 Genetic Analyzer (Life Technologies 社製) で解析し、塩基配列を決定した。さらに遺伝情報処理ソフトウェア ClustalX v. 2.1 を用いて alignment 解析を行い、また、系統解析ソフトウェア MEGA v. 6.0 を用いて、系統樹 (Neighbor-Joining 法, ブートストラップ 1000 回) を作成した。

第二節の実験

市場品サンプルの入手

インド, スリランカおよびタイで *Salacia* 属植物として流通する 15 種 (M-01—15) を入手した. なお, サンプル (M-01—05) は *S. reticulata* の表示名称で流通しており, サンプル (M-06—10) および サンプル (M-11—15) はそれぞれ *S. oblonga* および *S. chinensis* の表示名称で流通していたが, いずれも木片もしくは粉末の状態に流通しており, 形態学的特徴から基原種を鑑別するのは困難であった.

DNA 抽出と PCR

第一節と同様の方法で実施した.

塩基配列の解析

第一節と同様の方法で実施した.

参 考 文 献

1. 厚生労働省 平成 24 年度国民健康・栄養調査 (2014.3).
2. Kannel W.B., McGee D.L., Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease: the Framingham study. *Diabetes Care*, **2**, 120–126 (1979).
3. Fujishima M., Kiyohara Y., Kato I., Ohmura T., Iwamoto H., Nakayama K., Ohmori S., Yoshitake T., Diabetes and cardiovascular disease in a prospective population survey in Japan: The Hisayama Study. *Diabetes*, **45**, S14–16 (1996).
4. Fox C.S., Coady S., Sorlie P.D., Levy D., Meigs J.B., D'Agostino R.B. Sr., Wilson P.W., Savage P.J., Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA*, **24**, 2495–2499 (2004).
5. Eriksson K.F., Lindgarde F., Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmo feasibility study. *Diabetologia*, **34**, 891–898 (1991).
6. Torjesen P.A., Birkeland K.I., Anderssen S.A., Hjermann I., Holme I., Urdal P., Lifestyle changes may reverse development of the insulin resistance syndrome. The Oslo Diet and Exercise Study: a randomized trial. *Diabetes Care*, **20**, 26–31 (1997).
7. Pan X.R., Li G.W., Hu Y.H., Wang J.X., Yang W.Y., An Z.X., Hu Z.X., Lin J., Xiao J.Z., Cao H.B., Liu P.A., Jiang X.G., Jiang Y.Y., Wang J.P., Zheng H., Zhang H., Bennett P.H., Howard B.V., Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care*, **20**, 537–544 (1997).
8. Jeon C.Y., Lokken R.P., Hu F.B., van Dam R.M., Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*, **30**, 744–752 (2007).
9. Chiasson J.L., Josse R.G., Gomis R., Hanefeld M., Karasik A., Laakso M., STOP-NIDDM Trail Research Group., Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, **359**, 2072–2077 (2002).

10. Kawamori R., Tajima N., Iwamoto Y., Kashiwagi A., Shimamoto K., Kaku K., Voglibose PH-3 Study Group., Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance. *Lancet*, **373**, 1607–1614 (2009).
11. Matsuda H., Yoshikawa M., Morikawa T., Tanabe G., Muraoka O., Antidiabetogenic constituents from *Salacia* species. *J. Trad. Med.*, **22**, 145–153 (2005).
12. Yoshikawa M., Murakami T., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Tanabe G., Muraoka O., 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**, 8367–8370 (1997).
13. Yoshikawa M., Morikawa T., Matsuda H., Tanabe G., Muraoka O., Absolute stereostructure of potent α -glucosidase inhibitor, salacinol, with unique thiosugar sulfonium sulfate inner salt structure from *Salacia reticulata*. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 1547–1554 (2002).
14. Matsuda H., Murakami T., Yashiro K., Yamahara J., Yoshikawa M., Antidiabetic principles of natural medicines. IV. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from the roots of *Salacia oblonga* WALL. (Celastraceae): Structure of a new friedelane-type triterpene, kotalagenin 16-acetate. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1725–1729 (1999).
15. Yoshikawa M., Pongpiriyadacha, Y., Kishi A., Kageura T., Wang T., Morikawa T., Matsuda H., Biological activities of *Salacia chinensis* originating in Thailand: The quality evaluation guided by α -glucosidase inhibitory activity. *Yakugaku Zasshi*, **123**, 871–880 (2003).
16. Tanabe G., Yoshikai K., Hatanaka T., Yamamoto M., Shao Y., Minematsu T., Muraoka O., Wang T., Matsuda H., Yoshikawa M., Biological evaluation of de-*O*-sulfonated analogs of salacinol, the role of sulfate anion in the side chain on the α -glucosidase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 3926–3937 (2007).

17. Tanabe G., Xie W., Ogawa A., Cao C., Minematsu T., Yoshikawa M., Muraoka O., Facile synthesis of de-*O*-sulfated salacinols: Revision of the structure of neosalacinol, a potent α -glucosidase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2195–2198 (2009).
18. Yoshikawa M., Murakami T., Yashiro K., Matsuda H., Kotalanol, a potent α -glucosidase inhibitor with thiosugar sulfonium sulfate structure, from antidiabetic Ayurvedic medicine *Salacia reticulata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1339–1340 (1998).
19. Muraoka O., Xie W., Osaki S., Kagawa A., Tanabe G., Amer M.F.A., Minematsu T., Morikawa T., Yoshikawa M., Characteristic alkaline catalyzed degradation of kotalanol, a potent α -glucosidase inhibitor isolated from Ayurvedic traditional medicine *Salacia reticulata*, leading to anhydroheptitols: Another structural proof. *Tetrahedron*, **66**, 3717–3722 (2010).
20. Muraoka O., Xie W., Tanabe G., Amer M.F.A., Minematsu T., Yoshikawa M., On the structure of the bioactive constituent from Ayurvedic medicine *Salacia reticulata*: Revision of the literature. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 7315–7317 (2008).
21. Yoshikawa M., Xu F., Nakamura S., Wang T., Matsuda H., Tanabe G., Muraoka O., Salaprinol and ponkoranol with thiosugar sulfonium sulfate structure from *Salacia prinoides* and α -glucosidase inhibitory activity of ponkoranol and kotalanol desulfate. *Heterocycles*, **75**, 1397–1405 (2008).
22. Xie W., Tanabe G., Akaki J., Morikawa T., Ninomiya K., Minematsu T., Yoshikawa M., Wu X., Muraoka M., Isolation, structure identification and SAR studies on thiosugar sulfonium salts, neosalaprinol and neoponkoranol, as potent α -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2015–2022 (2011).
23. Akaki J., Morikawa T., Miyake S., Ninomiya K., Okada M., Tanabe G., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., Muraoka O.. Evaluation of *Salacia* species as anti-diabetic natural resources based on quantitative analysis of eight sulphonium constituents: A new class of α -glucosidase inhibitors. *Phytochem. Anal.*, **25**, 544–550 (2014).

24. Mohan S., Eskandari R., Pinto B.M., Naturally occurring sulfonium-ion glucosidase inhibitors and their derivatives: a promising class of potential antidiabetic agents. *Acc. Chem. Res.*, **47**, 211–225 (2014). (Recent review relevant to the present work)
25. Morikawa T., Akaki J., Ninomiya K., Kinouchi E., Tanabe G., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., Muraoka O., Salacinol and related analogs: New leads for type 2 diabetes therapeutic candidates from the Thai traditional natural medicine *Salacia chinensis*. *Nutrients*, **7**, 1480–1493 (2015).
26. Muraoka O., Morikawa T., Miyake S., Akaki J., Ninomiya K., Yoshikawa M., Quantitative determination of potent α -glucosidase inhibitors, salacinol and kotalanol, in *Salacia* species using liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **52**, 770–773 (2010).
27. Muraoka O., Morikawa T., Miyake S., Akaki J., Ninomiya K., Pongpiriyadacha Y., Yoshikawa M., Quantitative analysis of neosalacinol and neokotalanol, another two potent α -glucosidase inhibitors from *Salacia* species, by LC-MS with ion pair chromatography. *J. Nat. Med.*, **65**, 142–148 (2011).
28. Nakamura K., Akaki J., Ishibushi F., Tani K., Morikawa T., Pongpiriyadacha Y., Muraoka O., Hayakawa T., Kakutani K., Discrimination of genus *Salacia chinensis* based on the DNA sequence of the rDNA region. *Shoyakugaku Zasshi*, **69**, 53–58 (2015).
29. Tanabe G., Sakano M., Minematsu T., Matsuda H., Yoshikawa M., Muraoka O., Synthesis and elucidation of absolute stereochemistry of salaprinol, another thiosugar sulfonium sulfate from the Ayurvedic traditional medicine *Salacia prinooides*. *Tetrahedron*, **64**, 10080–10086 (2008).
30. Cheng F.S., Brown S.K., Weeden N.F., A DNA Extraction Protocol from Various Tissues in Woody Species. *HortScience*, **32**, 921–922 (1997).

謝 辞

本研究に際し、御指導、御鞭撻を賜りました 村岡 修 教授 に衷心より感謝いたします。

実験を進めるにあたり、御懇篤なるご指導を賜りました 食品薬学研究室 森川 敏生 教授 および 二宮 清文 講師 ならびに 機能性植物工学研究室 角谷 晃司 教授 および 中村 恭子 講師 に深謝いたします。

また、共に本テーマ研究を行い、ご尽力頂いた 三宅 荘八郎 氏 小林 正和 氏 に深く感謝いたします。

そして、日々の研究室生活でお世話になった 有機薬化学研究室 および 食品薬学研究室の諸氏に心より感謝の意を示し御礼申し上げます。

最後に、長きにわたり物心両面より支えてくれた家族に心より感謝致します。