

2003年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 調査・共同研究に対する助成 —

2004年3月11日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 岡田 嘉仁 
所属機関名 明治薬科大学
部署・役職 天然薬物学教室 助教授
所在地 〒204-8588 東京都清瀬市野崎2-522-1
電話 0424-95-8906 内線 _____

1. 研究テーマ

糖尿病合併症に有効な中国産薬用資源の新薬への応用開発

2. 研究期間 自 2003年4月1日 ~ 至 2004年3月15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 奥山 徹 他
所属機関 明治薬科大学 職名 教授

中国側研究者氏名 匡海学 他
所属機関 黑龙江中医药大学 職名 学長、理事長

4. 研究報告書

別紙「研究報告書の作成について」の体裁に倣い、指定の用紙で作成し添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

糖尿病合併症に有効な中国産薬用資源の新薬への応用開発

研究者氏名 岡田嘉仁
所属機関 明治薬科大学 天然薬物学教室 助教授
共同研究者名 奥山 徹、馬場正樹、鈴木龍一郎、石丸亜貴子
匡海学、程 偉、王 威、李 帥、常海濤

要 旨

当研究室において、すでにタンパク糖化反応（メイラード反応）抑制作用が認められていた生薬の南蛮毛（ナンバンモウ）について、さらなる分画および成分検索を行い、活性成分を含め 11 種の化合物を単離した。NMR をはじめとする各種スペクトルデータなどの解析により、1 を新規フラボノイド配糖体 chrysoeriol-6-C- β -fucopyranoside と決定した。2 は類似の chrysoeriol-2''-O- α -rhamnopyranonyl-6-C- β -fucopyranoside と、また、3~11 については後述のように同定した。今回、中国で新たに採集した各種の海藻について、活性評価のためのアルドース還元酵素（Aldose Reductase : AR）阻害活性試験等を行い、いくつかに活性を認めた。特に *Symphycardia latiuscula* (Harvey) Yamada (日本名:イソムラサキ) は高い活性を示した。また、アラメからは新規化合物 1-(3',5'-dihydroxyphenoxy)-7-(2'',4'',6''-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxin (12)を含む3種のフロログルシノール誘導体を単離した。これらはいずれも Table 4 に示したように強い活性を示した。STZ 糖尿病モデル動物による南蛮毛の有効性の評価については現在進行中である。

Key Words 糖尿病合併症、南蛮毛、海藻、アラメ、グリケーション阻害、アルドース還元酵素阻害

結 言：

日中両国において、現代の多様化する食習慣をはじめとする生活習慣の中、増加傾向にある糖尿病合併症の予防を指標に、近代的な手法によるあらたな観点からの評価を行い有用な素材を発掘することは急務である。糖尿病合併症の発症要因としていくつかがことが考えられているが、その中で当研究室では主として、機能タンパクのグリケーション（非酵素的糖化反応）阻害とポリオール代謝経路の律速酵素であるアルドース還元酵素阻害効果に着目して研究を行っている。生体内ではあらゆるタンパクがグルコース存在下でグリケーションを受けて、後期糖化反応生成物（Advanced glycation end products: AGE）になりうる。この生成した AGE あるいは AGE 化の過程が糖尿病合併症に関与していると考えられている。事実、AGE は糖尿病性腎症などでも多く認められている。一方、糖尿病状態ではポリオール代謝経路とくにアルドース還元酵素が亢進し、特に糖の取り込みがインスリン非依存的におこる、神経、腎糸球体、水晶体、網膜などの組織はソルビトールが過剰蓄積し、結果として合併症を招来することが知られている。しかしながら、合併症に有効な薬剤はほとんどなく、AR 阻害剤としてキネダックなどがあるのみである。このような背景のもと、我々は近年急増している糖尿病、またその合併症の予防に有効な天然素材の探索を目的として研究に着手した。

方法と結果：

Glycation 阻害活性を有する南蛮毛（ナンバンモウ）の成分検索

南蛮毛は、トウモロコシ *Zea mays* L. (イネ科) の新鮮花の花柱と花頭を乾燥したものであり、一般的にはトウモロコシの毛のことである。当研究室で行っている糖尿病合併症の予防に関する研究の一環として行ったグリケーション阻害活性試験において活性が認められ、活性成分の一部として2種のフラボノイド C-配糖体を単離した。¹⁾ さらなる活性成分の単離と構造決定、ならびに糖尿病ラットにおけ

る有用性を評価するため以下の研究に着手した。

紀伊国屋漢薬局から購入した中国吉林省産南蛮毛 1kg をメタノールで抽出し、得られたエキスを引き続き分画し、既に単離したフラボノイド2種の他、さらに2種のフラボノイド C-配糖体 (1、2) を、また、水抽出エキスより6種の化合物 (3~8) を得た。別途抽出した水エキスの酢酸エチルで分配して得られた酢酸エチル層 20g を分画し、化合物 9~11 を得た。

南蛮毛から単離した成分の構造研究

南蛮毛を熱メタノールで抽出して得られた抽出液を減圧下濃縮後、Diaion HP-20、TOYOPEARL-HW-40F および逆相 HPLC を組み合わせて新規化合物 (1) と既知化合物 (2) を単離した。1 は FAB-MS より分子量 446 であり ^1H -、 ^{13}C -NMR さらに COSY、HMQC、HMBC などの 2D-NMR の解析からフラボンの C-配糖体であることが推測された。次にデカップリング、差 NOE 実験の結果から糖は β -フコースであることが明かとなった。また、フラボン5位の水酸基からのプロトンおよび糖のアノマープロトンからの HMBC によりフコースはフラボンの6位に結合していることが明らかとなった。以上のことから 1 を新規化合物 chrysoeriol-6-C- β -fucopyranoside と決定した。2 の ^1H -NMR は 1 とよく似ており、1 にさらに糖が結合した化合物であることが推測された。2D-NMR を詳細に検討した結果、2 は chrysoeriol-2''-O- α -rhamnopyranonyl-6-C- β -fucopyranoside と同定した。また、この化合物は1995年に Maurice E. Snook らによって南蛮毛からの単離が報告されているが、 ^{13}C の帰属が不完全であったので完全に帰属した。²⁾ これらの化学構造は各種スペクトルデータの解析を中心に行い、1 および 2 は図 (Fig. 1) に示したように決定した。また、3~11 は以下のように同定した。

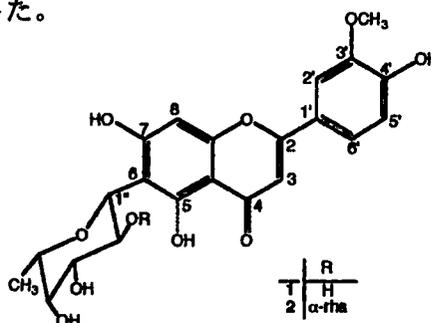
3: adenosine, 4: guanosine, 5: urasil, 6: vanillin,

7: acetovanillone, 8: vanillic acid,

9: stigmast-4-en-3-one, 10: stigmastanone,

11: 7 α -hydroxysitosterol

Fig. 1



CML 形成阻害活性

Bovine serum albumin (BSA) 4mg/mL と glucose 100mM を phosphate buffer pH 7.4 に溶解し、検体の存在下および非存在下において 37°C で 7 日間インキュベーションを行った。検体は phosphate buffer あるいは MeOH に溶解し、反応液に添加した。陽性検体として、aminoguanidine を用いた。インキュベーション終了後、反応液をコーティングバッファー (50ml カルボネートバッファー) で希釈し、その希釈液を 96 穴プレートに添加して室温で 1 時間インキュベーションした。1 時間後、各 well を洗浄バッファー (PBS/0.05% Tween, pH7.4) で洗浄した。以降、各段階で 1 時間インキュベーション後に、各 well を洗浄バッファーで洗浄した。次にブロッキングバッファー (コーティングバッファーの 0.5% w/v でゼラチンを溶解したもの) を添加して再び、室温で 1 時間インキュベーションした。その後、抗 AGE (CML) 抗体を加え、同様にインキュベーションした後、horse radish peroxidase 標識二次抗体を添加して 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、1,2-phenylenediamine dihydrochloride を含む基質バッファーを添加した。20 分後、1M H_2SO_4 溶液で反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで 492nm の吸光度を測定した。

阻害率は次のように計算した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (\text{Sample} - \text{blank}) / (\text{control} - \text{blank})\} \times 100$$

2 種のフラボノイド、3 種の核酸、3 種のバニリン誘導体と 3 種のステロール類を単離した。

これらのうち、2 種のフラボノイドと 4 つの化合物についてグリケーション阻害活性試験を行ったところ、フラボノイド 1 に活性が見られた。(Table. 2) また、グアノシンにも阻害活性が認められたことから、グアニジン基が阻害活性に重要な役割をしていることが示唆された。

Table 1 Inhibition (%) of Extract of Style of *Zea mays* L. on CML Formation

	1 mg / mL	0.5 mg / mL	0.1 mg / mL
Methanol extract	98.6	91.8	89.4
Water extract	100	94.1	95.3
Aminoguanidine	98.2	91.8	89.4

Table 2 Inhibition (%) of Compounds Isolated from *Zea mays* L. on CML Formation

1 (1mM)	2 (1mM)	Aminoguanidine (1mM)
80.7	1.7	61.3

中国産海藻のアルドース還元酵素阻害活性

緩衝液 0.2 M Na Phosphate buffer (pH 6.2)

基質溶液 100 mM DL-glyceraldehyde

補酵素溶液 1.5 mM NADPH

AR 溶液 3.0×10^{-2} units*/mL (final conc. 3.0×10^{-3} units/mL)

試料溶液 quercetin 1.0 mg/mL (final conc. $3 \mu\text{g/mL}$) extract 3.3 mg/mL (final conc. $9.9 \mu\text{g/mL}$)

* one unit of the enzyme activity was defined as the amount of enzyme reducing 1 μmol on NADPH per min. under the above assay conditions.

● 阻害率 (%) = $\{1 - (\Delta\text{As} - \Delta\text{Ab}) / \Delta\text{Ac} - \Delta\text{Ab}\} \times 100$

ΔAs Sample $\Delta\text{ABS}/\text{min}$; ΔAb Blank $\Delta\text{ABS}/\text{min}$; ΔAc Control $\Delta\text{ABS}/\text{min}$;

試料溶液 $3 \mu\text{L}$, 緩衝液 $700 \mu\text{L}$, 補酵素溶液 $100 \mu\text{L}$, 酵素溶液 $100 \mu\text{L}$ に基質溶液 $100 \mu\text{L}$ を加えて 25°C で反応を開始する。反応開始時 30 秒後から 3 分後までの波長 340 nm における NADPH の吸光度変化を測定し、吸光度変化率を求め、上式によって阻害率を求める。測定はすべて duplicate で行った。

Table 3 Aldose Reductase Inhibitory Effects (%) of Sea weeds

Samples	MeOH extr.	H ₂ O extr.
<i>Codium fragile</i> (Suringar) Hariot	-1	6
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i> Harver	28	3
<i>Sargassum thunbergii</i> (Mertens) O.Kuntze	21	8
<i>Symphyclocladia latiuscula</i> (Harvey) Yamada	93	75
<i>Ulva pertusa</i> Kjellman	14	7
Quercetin	66	

アラメの活性成分の検索およびグリケーション阻害活性

本研究課題の一つである各種海藻類の糖尿病合併症予防効果に関する研究の一環として行った褐藻類海藻のアラメ (今回は日本産を用いた) より 3 種のフロログルシノール誘導体を単離した。³⁾ それらの構造は各種スペクトルデータの解析などにより図 (Fig. 2) のように決定した。これらの化合物について CML 形成阻害活性試験を行った。

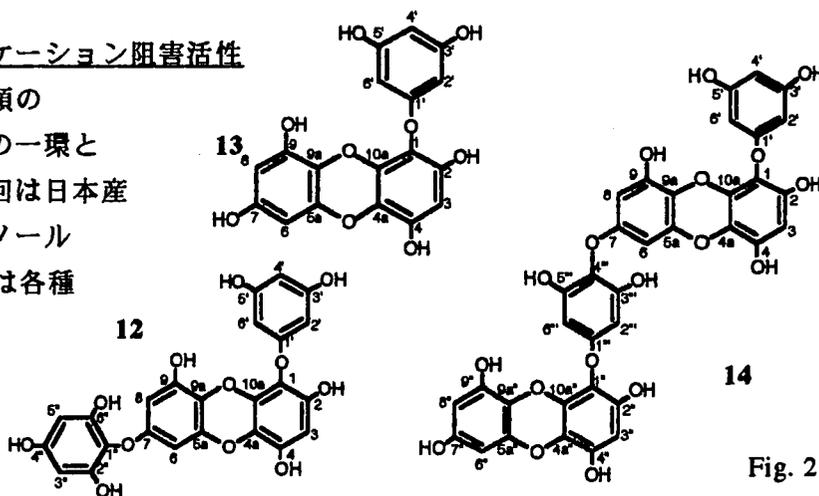


Fig. 2

Table 4 Inhibition (%) of Compounds on CML Formation

Compounds(0.1mM)	Inhibition (%)
12	91.1
13	96.2
14	86.7
Aminoguanidine	76.0

STZ 糖尿病モデル動物による南蛮毛の有効性の評価

南蛮毛の水エキスに *in vitro* においてグリケーション阻害活性が見られたことから、本生薬が動物に投与した場合でもその効果が認められるかどうかを検討するため以下の実験を行った。

8 週齢の Wister 系雄性ラットを無作為に糖尿病生薬投与群 (n=6)、糖尿病生薬非投与群 (n=6) および健常対照群 (n=6) の 3 群に分け、糖尿病ラットは STZ 40 mg / kg を尾静脈より静注し、随時血糖 400 mg / dL 以上をもって糖尿病とする。生薬投与群は糖尿病発症直後から、0.05 % の濃度に調製した生薬エキスをを自由摂取させる。生薬非投与群には水道水を自由摂取させる。3 週間ごとに体重測定し、眼静脈叢からの採血と 24 時間蓄尿法により血糖、フルクトサミン、尿中アルブミン排泄量、内因性クレアチニンクリアランスを測定する。投与 3 ヶ月目の実験終了時にラットを屠殺後、腎臓を摘出して重量を測定し、10 % 緩衝ホルマリンで固定後 PAM 染色を施した腎光顕標本を作成する。この標本上で 1 個体につき 50 糸球体の平均糸球体面積と平均メサンギウム領域面積を自動解析装置を用いて計測する。また、ELISA 法により、腎組織中の AGE 量を測定する。

これらの生化学的および組織学所見から生薬エキスの糖尿病合併症進展抑制効果について検討する。現在、動物実験は進行中である。

考 察 :

予防は薬により疾病の発症、増悪を予防しようという考え方であるが、予防は一生続く。そのような長期投与あるいは連用を考えたとき、問題となる副作用の有無を考えると、日常食する素材で無理なく予防することがもっとも重要であると考えられる。糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第 1 位である。また、近年著しく増加傾向にある。この疾患は一旦発症すると抵抗性であり、予後もよくないことから予防および新たな治療法の開発が必要とされている。南蛮毛、アラメにグリケーション阻害活性が、また、Table 3 に示したように、イソムラサキにアルドース還元酵素阻害活性が認められたことから、日常食する素材あるいは食されてなくとも多量に存在する天然資源による予防効果が期待できる。現在これら 3 種についてさらに活性成分の探索を行っている。進行中の動物実験の結果を踏まえさらなる有用性を検討したい。その他の素材についても活性試験を行う予定である。

参考文献 :

- 1) Ryuichiro Suzuki, Yoshihito Okada, Toru Okuyama, *J. Nat. Prod.*, **66**(4), 564-565 (2003)
- 2) Ryuichiro Suzuki, Yoshihito Okada, Toru Okuyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**(10) 1186-1188 (2003)
- 3) Yoshihito Okada, Akiko Ishimaru, Ryuichiro Suzuki, Toru Okuyama, *J. Nat. Prod.*, **67** (1) 103-105 (2004)

作成日 : 2004 年 3 月 10 日