

<平成 20 年度助成>

血糖値調節機構における神経伝達物質の関与に着目した 生薬由来の血糖上昇抑制成分の研究

堀 由美子・鳥居塚 和生

(昭和大学 薬学部)

1. はじめに

ショウキョウ(生姜, *Zingiberis rhizoma*) およびカンキョウ(乾姜, *Zingiberis processum rhizoma*) は共にショウガ(*Zingiber officinale* ROSCOE)の根茎を基原とする現行日本薬局方記載生薬である。ショウキョウはショウガ根茎の周皮を除去して乾燥させたものであり、漢方では鎮嘔や去痰などを目標に使用される¹⁻³⁾。カンキョウはショウガ根茎を茹でる、あるいは蒸すなどの加熱処理をした後に乾燥させたものであり、ショウキョウに比べて体を温める作用が強いとされ、冷えによる嘔吐や下痢、水分の停滞改善などを目標に用いられる¹⁻³⁾。両生薬は漢方処方において配剤される頻度が共に高く、胃腸薬や感冒薬、婦人薬などの OTC 医薬品中への利用率も高い。基原であるショウガの根茎についても、食用として

非常に身近な存在であり、健康食品やサプリメント、香辛料の原料として広く利用されている。このように、ショウガならびにこれを基原とする生薬ショウキョウおよびカンキョウは食品や医薬品として幅広い規模の市場を誇る。

我々はこれまでに、生薬ショウキョウ、カンキョウならびにショウガ新鮮根茎について詳細な成分研究を行ってきた。その過程で、ショウキョウとカンキョウから主要成分である gingerol 類、shogaol 類や diarylheptanoid 類などの他に、これらのスルホン化誘導体である gingesulfonic acid 類や shogasulfonic acid 類(Chart 1)が検出された⁴⁾。次いでこれらは生薬の調製(修治)過程で防虫・防カビ・漂白などを目的として行われる硫黄燻蒸に起因するものであることを見出した⁵⁾(Chart 2)。更に、本邦市場のショウキョウやカンキョウ、ショウガ製品について調査したところ、食用

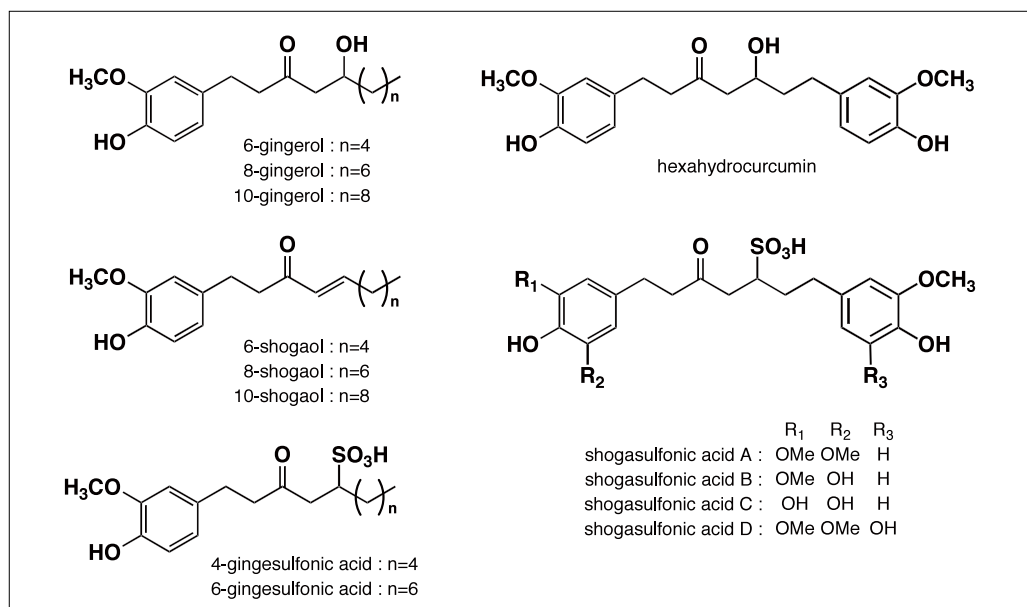


Chart 1

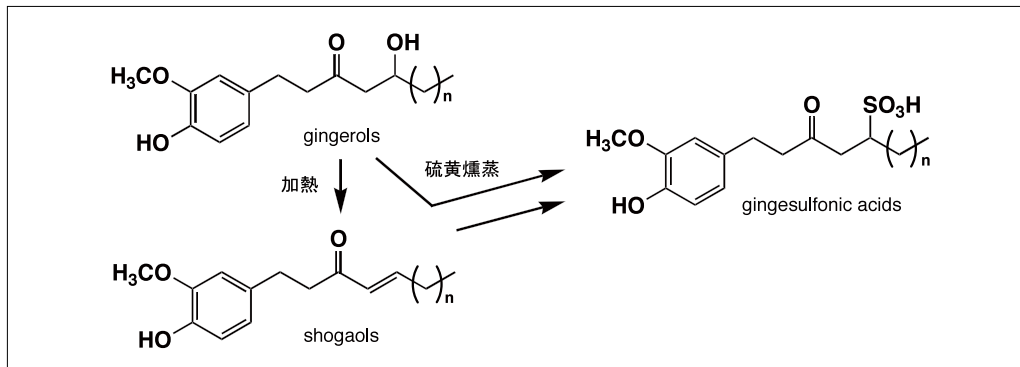


Chart 2

ショウガ製品については極一部の乾燥製品に含有されるのみであったが、ショウキョウではほぼ全てに、カンキョウでは約半数のものにスルホン化誘導体が含有されることが分かった⁵⁾。また、ショウガの主要成分である gingerol 類、shogaol 類や diarylheptanoid 類などは、硫黄燻蒸処理によって、スルホ基(-SO₃H)のような特徴的な置換基が導入されることにより、その性状が脂溶性から水溶性へと極端に変化し、生体内機能においても多様性を生み出すことが期待される。

そこで、このようなスルホン化誘導体の特性に着目し、生理活性を検討した結果、高血糖や肥満の抑制効果を示唆する知見が得られた。また、近年、糖尿病と脳内の神経伝達物質とが密接に関係することや、摂食内容により脳内代謝が容易に変動することが明らかになってきた⁶⁻⁹⁾。スルホン化誘導体摂取により血糖値が変動するのであれば、相関して脳内神経伝達物質の合成量も影響を受けると考えられ、この関与を明らかにすることで血糖調節機構における新たな評価系を構築できるものと期待される。

そこで本課題では、ショウキョウ由来スルホン化誘導体の糖尿病に対する有用性を検討するために、スルホン化誘導体のマウスにおける糖負荷後の血糖上昇抑制作用と *in vitro* の糖質分解酵素阻害作用を実施した。さらに高血糖や尿糖陽性、高インスリン血症などの2型糖尿病症状を呈する KK-A^y 系マウスを用いて、スルホン化誘導体の

長期経口投与による影響を調べ、その際の血糖値変動と脳内神経伝達物質との相関性について検討した。

2. 実験方法

2-1. 試料の調製

1) ショウキョウ 80% MeOH 抽出エキス

スルホン化誘導体含有ショウキョウ(ウチダ和漢薬 Lot. US242210)20 g を、ミルで粉碎し、80% MeOH 200 ml にて室温下で一昼夜抽出し、ろ過した。残渣に再び 80% MeOH 200 ml を加えた後ろ過した。この操作をもう一度繰り返し、ろ過した。ろ液を全て合わせて減圧下で濃縮乾固したものを 80% MeOH 抽出エキス(3.2 g)とした。

2) 6-Gingerol (6-G)・6-Shogaol (6-S)

ショウキョウ末(1.0 kg、中国産：ウチダ和漢薬株式会社、Lot. SU262730)を 80% MeOH(7 L)で抽出した。ろ過した抽出エキスを濃縮乾固し、80% MeOH 抽出エキス(64.1 g)を得た。H₂O で懸濁し Et₂O で抽出して、Et₂O 移行部(39.4 g)と H₂O 移行部(25.0 g)に分けた。Et₂O 移行部(12.4 g)は Silica gel カラムクロマトグラフィー(CC)と ODS CC を用いて分離・精製を繰り返し、6-G¹¹⁻¹²⁾と 6-S¹³⁻¹⁴⁾(それぞれ 967mg, 156 mg)、hexahydrocurcumin^{11,14)}(49 mg)を単離した。各成分については、性状、MS ならびに¹H と¹³C NMR の値が文献値と

一致したことから同定した。

3) 6-Gingesulfonic acid (6-GS)・Shogasulfonic acid A (SSA)

本実験で用いた6-GSは6-Gから誘導した¹⁵⁾。すなわち、6-G (198 mg)とベンゼン(20 ml)、触媒として*p*-トルエンスルホン酸水和物(9 mg)を加え、70℃の油浴上で反応させた。炭酸水素ナトリウム水溶液(3 ml)を加えて中和した後、酢酸エチルを用いて水移行部と酢酸エチル移行部に分配した。酢酸エチル移行部をSilica gel 60 CC [Hexane-AcOEt (3:1)、MeOH]で精製し、6-S(171 mg)を得た。6-S (170 mg)は96%エタノール水溶液(1.03 ml)に溶かした。ここに、亜硫酸水素ナトリウム(64.5 mg)を水(0.69 ml)に溶解した水溶液を加え、130℃の油浴で加熱還流を行った。反応液は水とクロロホルムを加えて分配した。水移行部から6-GS(203 mg)を得た(性状、MSならびに¹Hと¹³C NMRの値が文献値⁴⁾と一致した)。

6-GSの合成法に準じて、hexahydrocurcumin (49 mg)からgingernone A(38 mg)を経て、SSA(41 mg)を合成した⁴⁾。

2.2. 実験動物

すべての動物実験は、内閣府の「実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」および「昭和大学動物実験施設管理規定」に従って実施した。

ddY系雄性マウス5週齢(日本エルエスシー株式会社)、あるいはKK-A^y雄性マウス5週齢(日本クレア株式会社)は、市販の飼育用固形飼料(ラボMRストック;日本農産)および水を1週間自由摂取させて予備飼育した後実験に供した。実験期間を通じて室温24±2℃、湿度53±7%、12時間の明暗サイクルのある部屋で飼育した。

2.3. 被験薬の調製

6-GSは蒸留水に溶解して濃度調整し、6-GS水

溶液を調製した。ヒトが漢方処方として摂取するショウキョウは一日当たり約2gであり、ショウキョウ中の6-GS含量は平均1.0 mg/gである。マウスの感受性をヒトの1/10倍程度という点を加味し、マウス一匹が一日に摂取する6-GSの量を算出すると0.4 mg/kgとなる。これを基準に長期継続経口投与試験では0.4 mgと0.8 mg/kg/dayを設定した。単回経口投与試験では40.0 mg/kgおよび80.0 mg/kgの濃度を設定した。

2.4. 投与方法

単回経口投与試験では、投与量を0.5 ml/50 g b.w./匹とし、胃内ゾンデにて非麻酔下で投与した。継続経口投与試験では、最大給飲量を一匹あたり10 ml/dayとし、給水瓶を用いて自由摂取させた。

2.5. 測定・観察項目

1) 一般所見

一般状態は、被験薬投与後実験期間中にわたって外観や活動性などを観察した。体重は、試験開始時と試験開始2週間は3日間隔、それ以降は1週間に1回、実験終了時に測定した。摂飲量は、被験薬である試料溶液の摂取量を実験期間中にわたって測定した。活動性は自発運動量で評価した。すなわち、被験薬投与試験終了前日にOpen field法に従い、crossingとrearingの回数を測定した。

2) 血糖値の測定

血糖値は、マウス尾静脈より採血し、簡易血糖測定システム(ニプロフリースタイルメーター)にて測定した。

3) 解剖学的検査

マウス安楽死後、血液を採取し、開腹解剖した。各種臓器の肉眼観察を行った。脳を摘出し、液体窒素中で直ちに凍結させた。

4) 脳内神経伝達物質の測定

マウス脳の視床下部、海馬、大脳皮質の各脳分画に生理食塩水を加え、ホモジナイズ

した。次に 100 μ M EDTA2Na を含む 0.2 M PCA を加え再びホモジナイズし、4°C、30 分間静置した後、遠心した(4°C, 12,000 rpm \times 20 min)。上清を分取し、1 M 酢酸ナトリウムで pH 3 に調整後、0.45 μ m フィルターでろ過し、ECD-HPLC [(RP-18 (4.6 \times 250 mm, KANTO Chemical); ECD-300 (EICOM)] を用いて測定した。脳内神経伝達物質はモノアミンならびにその代謝産物として以下の 7 種: Norepinephrine (NE), Normethanephrine (NM), Dopamine (DA), Dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), Homovanillic acid (HVA), Serotonin (5-HT), 5-Hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) を測定した。

2-6. アディポサイトカイン類の測定

血清中のアディポネクチン濃度は、マウス・ラットアディポネクチン ELISA キット(大塚製薬(株))、レプチン濃度はマウスレプチン ELISA キット(株)森永生科学研究所)を用いて測定した。

2-7. 各種糖負荷後マウスの血糖上昇抑制作用

ddY 系雄性 6 週齢マウスは、実験日前夜より 16 時間絶食させ、対照群と 6-GS 群に分け、対照群には蒸留水(Water)を投与し、6-GS 投与群には 6-GS [40mg/kg b.w. (GS-low); 80 mg/kg b.w. (GS-high)] を胃内ゾンデにて経口投与した。30 分後にグルコース、マルトース、ピルビン酸(各 2 g/kg b.w.) を負荷し、その 0, 15, 30, 60 および 120 分後に尾静脈から採血し、それぞれにおける血糖値を簡易血糖測定システム(ニプロフリースタイルメーター)にて測定した。

また、ddY 系雄性 6 週齢マウスに 6-GS(0.4 mg/kg b.w./day)を 1 ヶ月間自由摂取させ、16 時間絶食後、グルコース、マルトース(各 2 g/kg 体重)を負荷し、同様に血糖値を測定した。

2-8. 糖質分解阻害活性試験

ショウキョウ 80% MeOH 抽出エキス(SK ext)、6-G, 6-S, 6-GS および SSA の各溶液(0.1-100.0

mg/ml) は、2%マルトースまたは 4%スクロースと混和し、37°C でプレインキュベートした。ラット腸管アセトン粉末から調製した酵素を加え 37°C で 30 分間インキュベート後、酵素を失活させ反応を終了した。反応液中のグルコース量をグルコース C-II テストワコー(和光純薬)を用いて測定した。

2-9. 糖尿病モデルマウスを用いた 6-GS の長期経口投与による血糖上昇抑制作用

6 週齢雄性 KK-A^y マウスに対し、6-GS [0.4 mg/kg b.w./day (GS-low); 0.8 mg/kg b.w./day (GS-high)] を 1 ヶ月間給水瓶より自由摂取させ、その影響を調べた。対照群には蒸留水(Water)を投与した。上記 2-5. と 2-6. の項目について観察・測定した。

2-10. 統計学的処理

データの数値はすべて平均値 \pm 標準誤差で表した。図中に記載が無い限り、対照群と処置群との間で t 検定法により検定した。危険率が 5%未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありと判定した。

3. 結 果

3-1. 各種糖負荷後マウスの血糖上昇抑制作用

6-GS 単回経口投与、長期経口投与のいずれにおいても、被験薬投与期間中にマウスの死亡は認められず、一般状態や体重への影響や異常行動も見られなかった。解剖時の組織においては、肉眼観察上の異常は見られず、肝機能障害の指標である ALT と AST についても正常値の範囲内であった。

6-GS の単回投与によるグルコース、マルトースまたはピルビン酸負荷による血糖上昇抑制作用について検討した。糖を負荷した時点(0 分)の血糖値を 0 mg/dl とし、その 15, 30, 60, 120 分後の血糖値推移を相対値(mg/dl)で示した(Fig. 1a ~ 1c)。グルコースを負荷した場合には、対照群(Water)と 6-GS 投与群で血糖値の推移に差

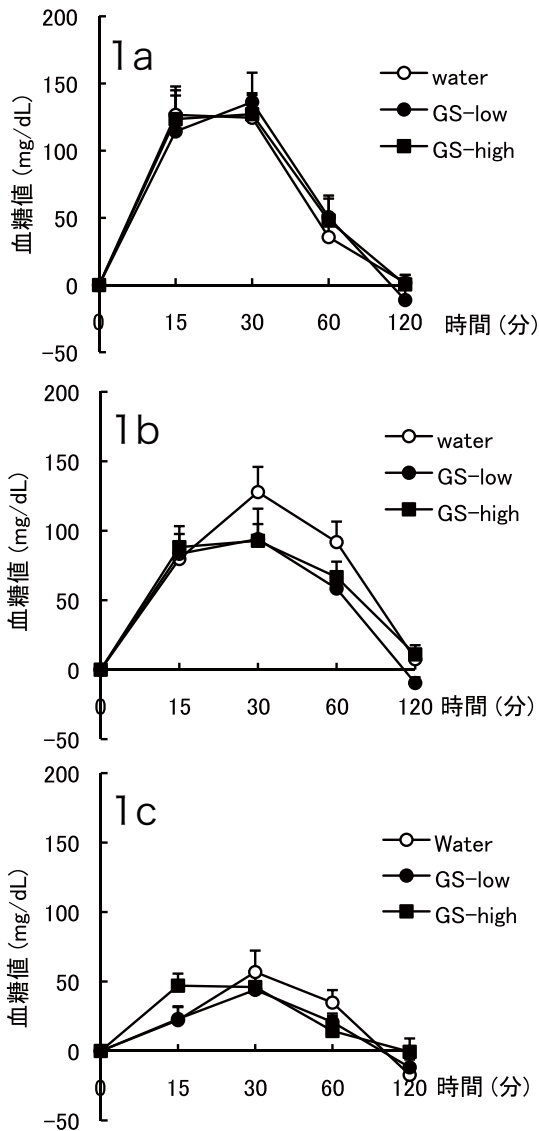


Fig. 1 グルコース負荷(1a)、マルトース負荷(1b)、ピルビン酸負荷(1c)による血糖上昇に対する6-GS単回投与の作用

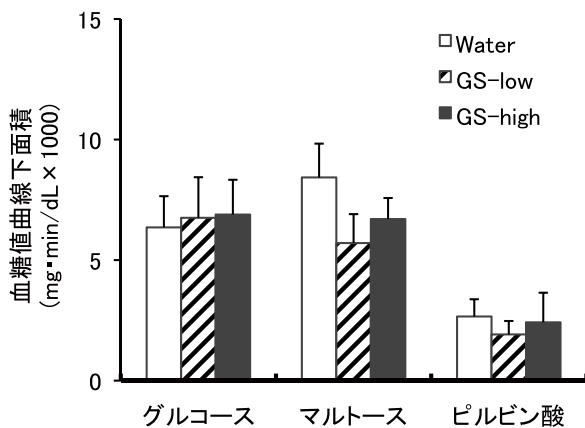


Fig. 2 糖負荷による血糖上昇に対する6-GS単回投与の作用、血糖値曲線下面積(AUC)

は認められなかった(Fig. 1a)。マルトース負荷によって Water 群の血糖値は30分後に 127.8 ± 18.1 mg/dl、60分後には 91.8 ± 14.8 mg/dlを示した。これに対し、6-GS低濃度群(GS-low)ではマルトース負荷後の30分、60分の血糖値はそれぞれ 94.0 ± 21.9 mg/dl、 58.4 ± 6.3 mg/dlを示し、6-GS高濃度群(GS-high)では 92.8 ± 12.0 mg/dl、 66.6 ± 11.2 mg/dlを示し、Water群と比較して血糖値上昇が抑制された(Fig. 1b)。ピルビン酸負荷では、6-GS投与による有意な抑制効果を示さなかった(Fig. 1c)。各投与群の血糖値曲線下面積(AUC)を Fig. 2 に示した。マルトース負荷において、GS-low 群での AUC は Water 群と比較して32%の減少量を示した($p < 0.098$)が、その他については大きな差は認められなかった。

次に、6-GSを1ヶ月間継続投与した後に糖負荷試験を行った。グルコースを負荷した場合には、Water 群の血糖値は30分後に 72.0 ± 5.6 mg/dl、60分後には 55.8 ± 6.3 mg/dlを示した。一方、6-GS群では30分、60分の血糖値はそれぞれ 75.7 ± 12.5 mg/dl、 40.5 ± 9.9 mg/dlを示し、60分後の血糖値は Water 群と比較して6-GS投与群で低い傾向を示した(Fig. 3a)。マルトースを負荷した場合には、Water 群の血糖値は30分後に 65.2 ± 16.4 mg/dl、60分後には 33.8 ± 19.5 mg/dlを示したのに対し、6-GS群では、それぞれ 42.0 ± 5.1 mg/dl、 24.6 ± 4.9 mg/dlを示し、Water群と比較して血糖値上昇が抑制された(Fig. 3b)。血糖値曲線下面積(AUC)を Fig. 4 に示した。グルコース負荷において、6-GS群での AUC は Water 群と比較して16%の減少量を示したのに対し、マルトース負荷では36%減少した。

3.2. 糖質分解阻害活性試験

In vitro 実験系において、SK ext, 6-G, 6-S, 6-GS および SSA のマルターゼとスクラーゼに対する阻害活性について検討した。Fig. 5a には、0 mg/ml 添加時のマルターゼ阻害率を100%とし

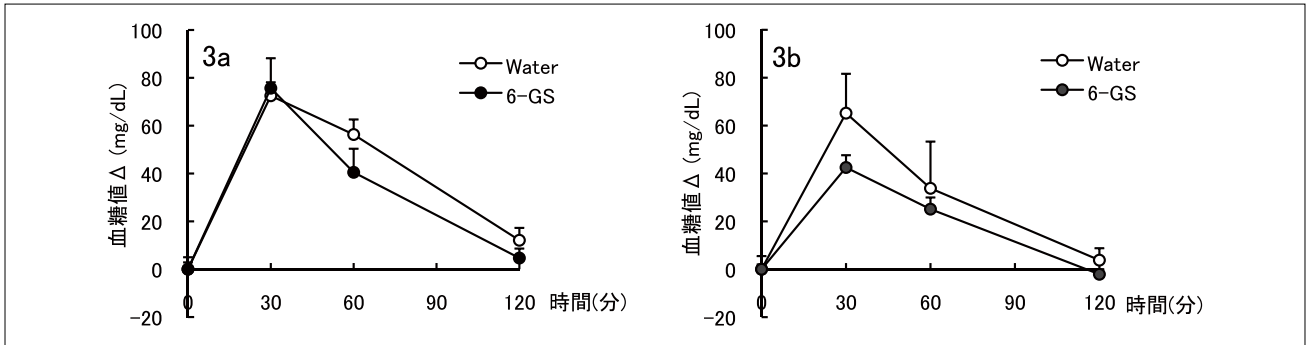


Fig. 3 グルコース負荷 (3a)、マルトース負荷 (3b) による血糖上昇に対する 6-GS 継続投与の作用

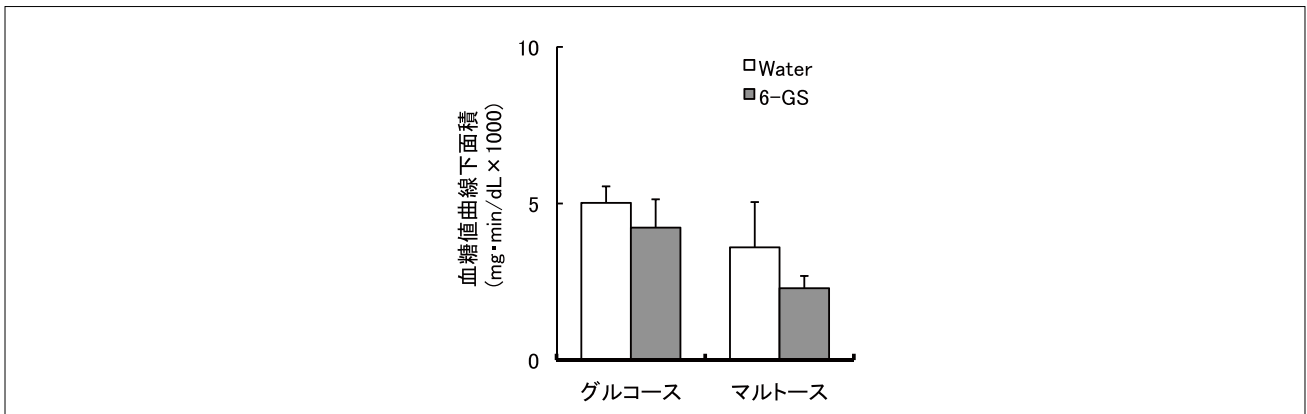


Fig. 4 糖負荷による血糖上昇に対する 6-GS 継続投与の作用、血糖値曲線下面積 (AUC)

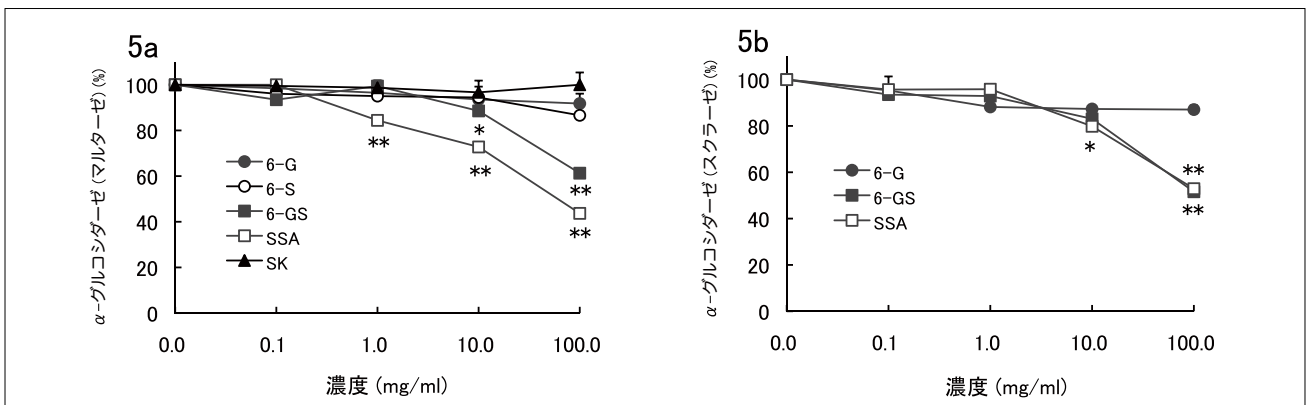


Fig. 5 糖質分解酵素活性におけるスルホン化誘導体の作用

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, significantly different from the 6-GS (t-test).

て各試料の阻害率を示した。6-GS は 10.0 mg/ml の濃度で 88.5%、100.0 mg/ml では 61.3%まで濃度依存的にマルターゼの活性を阻害した。Fig. 5b にはスクラーゼに対する阻害率を示した。6-GS は 10.0 mg/ml の濃度で 83.1%、100.0 mg/ml では 51.6%の阻害率を示し、濃度依存的にスクラーゼの活性を阻害した。また、diarylheptanoid のスルホン化誘導体である SSA はマルターゼに対する阻害率は、10.0 mg/ml 濃度で 72.8%、100.0 mg/ml 濃度で 43.7%、スクラーゼに対する阻害

率は、それぞれ 79.8%と 52.9%を示し、6-GS よりさらに強い効果が認められた。

一方、SK ext, 6-G ならびに 6-S については、阻害活性は認められなかった。

3.3. 糖尿病モデルマウスを用いた 6-GS の長期経口投与による血糖上昇抑制作用

2型糖尿病モデル KK- A^y マウスに対する 6-GS 投与の効果を検討した。体重、摂飲量、摂餌量、自発運動量については群間に差は認められず、異常行動なども見られなかった。

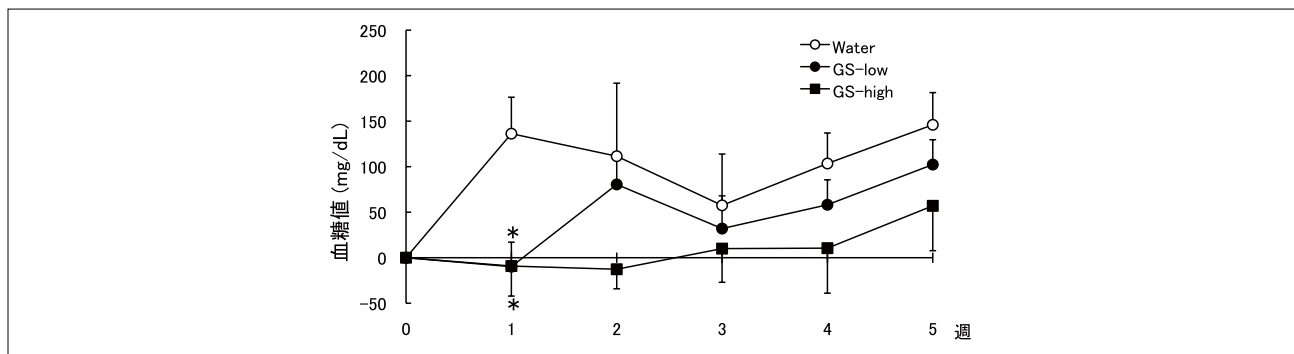


Fig. 6 KK-A^y マウスの血糖上昇に対する 6-GS 継続経口投与による作用 (*p<0.05)

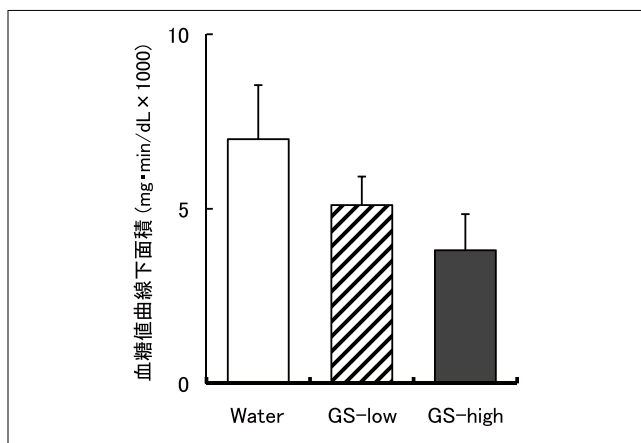


Fig. 7 KK-A^y マウスの血糖上昇に対する 6-GS 継続経口投与による作用

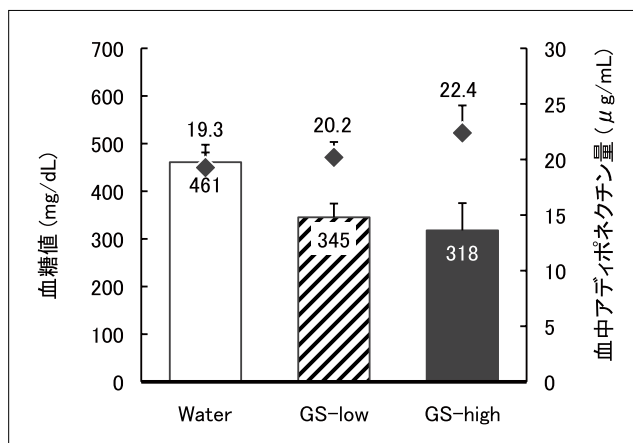


Fig. 8 KK-A^y マウスの血糖上昇に対する 6-GS 継続経口投与の作用、試験最終日の血糖値と血中アディポネクチン量

被験薬投与開始時の血糖値を 0 mg/dL として、実験期間中の血糖値推移を相対値(mg/dL)で示した(Fig. 6)。いずれの群も血糖値は経時的に上昇し、実験期間の 5 週間後には、対照群(Water)では 146.0 ± 35.4 mg/dL の上昇量を示したのに対し、6-GS 低濃度(GS-low)では 102.3 ± 30.0 mg/dL、高濃度群(GS-high)では 57.0 ± 54.0 mg/dL に留まり、血糖上昇を抑制する作用が認められた。特に、GS-high 群では他群と比較して、常時低い値で推移しており、特に投与後初期段階では Water 群と比較して、顕著な血糖上昇抑制作用を示した。各投与群の血糖値曲線下面積(AUC)を Fig. 7 に示した。GS-low 群での AUC は Water 群と比較して 27%減少し、GS-high 群では 46%減少(p<0.071)した。

また、試験最終日の血糖値と血中アディポネクチン量を Fig. 8 に示した。両者には負の相関が認められ、特に個体ごとに解析すると、血糖上昇抑

制作用の効果が強く認められたマウスでは、アディポネクチン量が高く示された(データ示さず)。

試験最終日の脳内モノアミン量を Table 1 に示した。大脳皮質において、5-HT から 5-HIAA への代謝回転率が Water 群： 0.72 ± 0.074 に対して、それぞれ GS-low 群： 0.49 ± 0.042 、GS-high 群： 0.50 ± 0.039 を示し、6-GS 投与により有意に減少した。視床下部においても Water 群： 1.16 ± 0.048 に対し、GS-low 群： 0.82 ± 0.043 、GS-high 群： 0.80 ± 0.068 と、6-GS 投与により有意に減少した。また海馬においても同様に 6-GS 群で減少する傾向が認められた (Water 群： 1.01 ± 0.048 、GS-low 群： 0.97 ± 0.098 、GS-high 群： 0.95 ± 0.057)。視床下部においては、6-GS 投与により DOPAC から DA への代謝回転率が有意に減少し、海馬では DA が減少していた。

4. 考 察

本課題では、ショウキョウ・カンキョウから見

Table 1 KK-A γ マウスにおける 6-GS 継続経口投与後の大脳皮質、視床下部、海馬領域におけるモノアミン濃度：dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), norepinephrine (NE), normethanephrine (NM), serotonin (5-HT), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA)

大脳皮質	Water	GS low	GS high
DA (pmol/mg)	13.22 \pm 11.74	2.29 \pm 0.70	13.22 \pm 9.48
DOPAC (pmol/mg)	3.20 \pm 2.64	0.59 \pm 0.09	2.32 \pm 1.50
HVA (pmol/mg)	1.65 \pm 1.08	0.64 \pm 0.11	1.55 \pm 0.85
DOPAC/DA ratio	0.40 \pm 0.08	0.39 \pm 0.10	0.26 \pm 0.04
NE (pmol/mg)	8.85 \pm 0.41	8.19 \pm 0.33	12.45 \pm 2.36
NM (pmol/mg)	0.20 \pm 0.04	0.23 \pm 0.03	0.32 \pm 0.08
5-HT (pmol/mg)	4.58 \pm 0.92	4.08 \pm 0.27	7.58 \pm 2.22
5-HIAA (pmol/mg)	3.23 \pm 0.65	1.97 \pm 0.19	3.59 \pm 0.89
5-HIAA/5-HT ratio	0.72 \pm 0.07	0.49 \pm 0.04 *	0.50 \pm 0.04 *
視床下部	Water	GS low	GS high
DA (pmol/mg)	5.38 \pm 1.16	8.37 \pm 1.12	5.61 \pm 0.60
DOPAC (pmol/mg)	2.35 \pm 0.43	2.70 \pm 0.33	1.83 \pm 0.09
HVA (pmol/mg)	1.76 \pm 0.31	1.94 \pm 0.25	1.42 \pm 0.10
DOPAC/DA ratio	0.45 \pm 0.03	0.33 \pm 0.02 **	0.34 \pm 0.03 *
NE (pmol/mg)	44.43 \pm 7.55	58.24 \pm 6.78	43.68 \pm 3.31
NM (pmol/mg)	0.17 \pm 0.04	0.26 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02
5-HT (pmol/mg)	7.83 \pm 0.91	11.12 \pm 1.44	9.66 \pm 1.56
5-HIAA (pmol/mg)	9.14 \pm 1.16	8.87 \pm 0.80	7.29 \pm 0.45
5-HIAA/5-HT ratio	1.16 \pm 0.05	0.82 \pm 0.04 **	0.80 \pm 0.07 **
海馬	Water	GS low	GS high
DA (pmol/mg)	0.79 \pm 0.06	0.48 \pm 0.03 **	0.57 \pm 0.03 **
DOPAC (pmol/mg)	0.60 \pm 0.08	0.48 \pm 0.06	0.48 \pm 0.01
HVA (pmol/mg)	0.55 \pm 0.10	0.50 \pm 0.13	0.48 \pm 0.08
DOPAC/DA ratio	0.76 \pm 0.03	1.02 \pm 0.13	0.84 \pm 0.02
NE (pmol/mg)	9.61 \pm 0.64	9.40 \pm 0.93	8.44 \pm 0.51
NM (pmol/mg)	0.20 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.21 \pm 0.03
5-HT (pmol/mg)	6.00 \pm 0.62	5.24 \pm 0.33	5.18 \pm 0.32
5-HIAA (pmol/mg)	5.93 \pm 0.29	4.97 \pm 0.35	4.89 \pm 0.23 *
5-HIAA/5-HT ratio	1.01 \pm 0.08	0.97 \pm 0.10	0.95 \pm 0.06

Values are mean \pm SEM n=4-6, when compared with control, *:p<0.05, **:p<0.01

出された新規スルホン化誘導体の糖尿病に対する有用性を評価するために、健常マウスの食後過血糖や糖尿病モデルマウスの高血糖に対する抑制作用を検討した。また、その効果を評価するパラメーターとして血糖値や血中アディポサイトカイン量に加えて、脳内神経伝達物質(モノアミン類)濃度に着目し、それらの関連性について検討した。

これまでに、スルホン化誘導体の 6-GS や SSA は抗潰瘍活性や胃内容物排出遅延改善作用など消

化管に対する作用を有し、その作用は主要成分である 6-G や 6-S より強いことが報告されている¹⁵⁻¹⁶⁾。また、近年ショウガエキスの抗糖尿病作用が報告されており¹⁷⁻²⁰⁾、その主要活性成分は 6-G とされている^{18, 21)}。6-G はスルホン化されることにより 6-GS となるが、このときスルホ基(-SO₃H)の導入により水溶性が著しく増す。極性の変化は、吸収、分布、代謝、排泄など体内動態に大きな影響を発現する可能性がある。このよ

うな背景から、本実験ではショウキョウ・カンキョウ中のスルホン化誘導体のうち最も高含量で含まれる6-Gのスルホン化体である6-GSを中心に検討した。

6-GSを経口投与したマウスに対して、グルコース、マルトースまたはピルビン酸の負荷後、血糖値の推移を観察することにより、6-GSが吸収代謝過程の中のどこに作用するのかを見出すことができる。すなわちグルコースの負荷により効果が得られた場合、インスリン感受性およびグルコース吸収過程へ影響を与えること、マルトース負荷ではマルターゼ活性へ影響を与えること、ピルビン酸負荷では糖新生へ影響を与えることがわかる。本実験の結果、6-GSの単回投与はマルトース負荷による血糖値の上昇を抑制することが分かった。また、6-GSの1ヶ月間継続投与も同様にマルトース負荷による血糖値の上昇を抑制した。このことから、6-GSはマルターゼ活性を阻害するということが示唆された。

一方、グルコース負荷時に6-GS単回投与の効果は認められなかったが、継続投与により軽度の血糖上昇抑制効果が見られるため、今後は投与量を含めて詳細な検討を行いたい。ピルビン酸を負荷した場合には6-GSの効果は認められなかった。

6-GSのマルターゼ活性阻害を確認するために、*in vitro*における小腸粘膜酵素阻害活性試験を行った。その結果、6-GSは濃度依存的にマルターゼおよびスクラーゼ阻害活性を示し、特にその効果はSSAで強かった。6-GSとSSAは α -グルコシダーゼ活性を阻害することにより、マルトースやスクロースからブドウ糖への分解を抑制し、腸管からのグルコース吸収を遅延あるいは抑制することが考えられた。これに対して、ショウキョウ本来の成分である6-Gはこの作用を示さなかった。また、6-Gはインスリン感受性を上昇させ、抗糖尿病作用を示すことが報告されている^{18,21)}。このことを考慮すると、スルホン化誘導体を含む

ショウキョウは、小腸粘膜酵素活性阻害とインスリン感受性上昇の2種の機構によって抗糖尿病作用を示すことが期待される。

2型糖尿病モデルKK-A^yマウスに対する6-GSを1ヶ月間経口自由摂取させ、マウスの血糖値の変動量や血中アディポサイトカイン量、脳内神経伝達物質の合成量について検討した。その結果、6-GS投与群は対照群と比較して、血糖値の上昇を抑制する作用が認められた。特にその効果が顕著であったマウスにおいては、血中アディポネクチン量が高く認められた。一方で、健常マウスに対するスルホン化誘導体含有ショウキョウエキスの12ヶ月継続投与試験においても、試験期間中の血中アディポネクチンレベルが対照群と比較して高いことを確認している。これらのことから、スルホン化誘導体の長期経口投与は、インスリン感受性ホルモンであるアディポネクチン分泌を促進して血糖値の上昇を抑制することが示唆された。

また、これらと関連して、6-GSの投与により脳内のモノアミン類のうち、セロトニン(5-HT)やドーパミン(DA)に関与する合成量・代謝回転率の変動する傾向が認められた。糖尿病患者では情緒障害やうつ病などの神経精神障害などを合併することや²²⁾、摂食障害の報告もみられ²³⁾、これらの障害は脳内神経伝達物質の合成量と密接に関わっていることが考えられる。糖尿病モデル動物の脳内モノアミンレベルについては海馬での5-HTおよびDAが健常ラットに比較して有意に低下していることや⁹⁾、脳内セロトニン作動神経の活動度と血糖値は逆相関することが報告されている⁸⁾。脳内5-HTの不足は鬱状態を引き起こすことから、血糖上昇による5-HTの低下が神経精神症状をもたらすことが想定され、5-HTは血糖調節において重要な役割を果たしていると考えられる。

本実験では、6-GSの投与により血糖上昇が抑

制され、このとき脳内の 5-HT から 5-HIAA への代謝回転率が低く検出された。このことは代謝物の 5-HIAA 濃度が低いことに因るものではなく、6-GS 投与群で 5-HT 濃度が対照群と比較して高いレベルを示していることから、血糖上昇抑制効果は 5-HT 濃度の上昇に起因すると考えられる。この結果は、血糖値と脳内モノアミン類との相補的な関係を支持するものであり、スルホン化誘導体の長期経口投与が脳内 5-HT 濃度を上昇させることにより血糖値の上昇を抑制している可能性を示唆するものであった。5-HT 量の増加因子としては、5-HT の前駆体となるトリプトファン量の増加や 5-HT 産生細胞数の増加、あるいは 5-HT の分解酵素である MAO の阻害が考えられる。6-GS の経口投与はこれらの部分に対して直接、あるいは間接的に関与し、血糖値の上昇を抑制するレベルで脳内の 5-HT 量を維持しているものと推測される。

また一方で、我々は健常マウスにおける 5-HT の腹腔内投与による血糖レベルの変化について検討したところ、5-HT の 10.0 あるいは 100.0 mg/kg 投与は血糖値を顕著に低下させるものの、低濃度 (1.0 mg/kg) 投与では血糖値を上昇させる方向に作用することを確認している。5-HT 濃度と血糖値の相補的な関係には複雑な制御機構があることが考えられ、5-HT 濃度に影響を及ぼす 6-GS の投与量についても、その効果を最大限に生かすための検討が必要と思われる。

以上、ショウキョウ・カンキョウ由来成分のスルホン化誘導体の特性に着目し、生理活性を検討した結果、スルホン化誘導体は α -グルコシダーゼ阻害活性を有し、健常マウスに対する食後過血糖抑制作用を示すこと、糖尿病モデルマウスの高血糖に対する抑制効果を示すことが明らかになった。また、血糖値の変動には脳内モノアミンレベルの関与が示され、特に 6-GS 投与による血糖上昇抑制には脳内 5-HT 濃度の上昇を促すような神経

伝達物質を介した作用であることが示唆された。

謝 辞

本研究に対し、多大な研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団および関係各位に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行にご指導を賜りました横浜薬科大学 伊田喜光 教授、昭和大学 吉田武美 教授、実験に協力して頂きました古屋奈々子、石田雅人、福村基徳、渥美聡孝の各氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Egawa M.: The prescription of Zingiberis Rhizoma in Kampo medicine. *Gendai Toyo Igaku* (in Japanese) **8**, 40-44 (1987).
- 2) Nishimoto. K.: Quality of Ginger. *Gendai Toyo Igaku* (in Japanese) **8**, 62-67 (1987).
- 3) Satake M., Ida Y., Nemoto Y.: Kanpo 210 Shoho Syoyaku Kaisetsu, *Jiho*, 10-13 and 70-72 (2001).
- 4) Hori Y., Miura T., Hirai Y., Fukumura M., Nemoto Y., Toriizuka K., Ida Y.: Pharmacognostic studies on ginger and related drugs (1). Five sulfonated compounds from Zingiberis Rhizome (Shokyo). *Phytochemistry*, **64**, 613-617. (2003).
- 5) Hori Y., Wakabayashi Y., Oheda M., Mizui K., Fukumura M., Hirai Y., Nemoto Y., Toriizuka K., Ida Y. ; Sulfonated Compounds in Shokyo and Kankyo. *Natural Medicines*, **59** (5) 229-236 (2005).
- 6) Tanaka S., Furukawa T., Ishimoto M.: Role of Central Noradrenaline and Serotonin in Blood Glucose Regulation. *IRYO* **43**, 1045-1048 (1989).
- 7) Gotoh M., Li C., Yatoh M., Okabayashi N., Habu S., Hirooka Y.: Hypothalamic monoamine metabolism is different between the diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats and streptozotocin-induced diabetic rats, *Brain Reseach* **1073-1074**, 497-501 (2006).
- 8) 青峰正裕, 大和孝子: 糖尿病におけるモノアミン濃度, 糖尿病, **46**, 511-516 (2003).
- 9) Barber M., Kasuri B.S., Austin M.E., Patel K.P., MohanKumar S.M.J., MohanKumar P.S.: Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: role of brain monoamines, insulin and leptin, *Brain Reseach* **964**, 128-135 (2003).
- 10) Yamagishi T., Hayashi K., Mitsuhashi H.: Isolation of hexahydrocurcumin, dihydrogingerol and two additional pungent principles from ginger. *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 2291-2292 (1972).

- 11) Kikuzaki H., Saiu-Mei T., Nakatani N.: Gingerdiol related compounds from the rhizomes of *Zingiber officinale*. *Phytochemistry* **31**, 1783-1786 (1992).
- 12) Connell D. W., Melachilan R.: Examination of the gingerols, shogaols, paradols and related compounds by thin-layer and gas chromatography. *J. Chromatogr* **67**, 29-35 (1972).
- 13) Chen C. C., Rosen R. T., Ho C.T.: Chromatographic analyses of isomeric shogaol compounds derived from isolated gingerol compounds of ginger (*Zingiber officinale* ROSCOE). *J. Chromatography*, **360**, 175-184 (1986).
- 14) Kikuzaki H., Usuguchi J., N. Nakatani N.: Constituents of Zingiberaceae. I. Diarylheptanoids from the Rhizomes of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 120-122 (1991).
- 15) Yoshikawa M., Yamaguchi S., Kunimi K., Matsuda H., Okuno Y., Yamahara J., Murakami N.: Stomachic principles in ginger. III. An anti-ulcer principle, 6-gingsulfonic acid, and three monoacyldiglycerols, gingersglycolipids A, B and C, from *Zingiberis Rhizoma* originating in Taiwan. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1226-1230 (1994).
- 16) Hashimoto K., Kase Y., Murata P., Kido T., Nakai Y., Sakakibara I., Higuchi M., Sasaki H., Okada M.: Pharmacological evaluation of Shokyo and Kankyo (1). *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1183-1187 (2002).
- 17) Akhiani SP., Vishwakarma SL., Goyal RK.: Anti-diabetic activity of *Zingiber officinale* in streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* **56**, 101-5 (2004).
- 18) Sekiya K., Ohtani A., Kusano S. : Enhancement of insulin sensitivity in adipocytes by ginger., *Biofactors.*, **22**, 153-6 (2004).
- 19) Bhandari U., Kanojia R., Pillai KK. : Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on dyslipidaemia in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.*, **97**, 227-30 (2005).
- 20) Al-Amin ZM., Thomson M., Al-Qattan KK, Peltonen-Shalaby R., Ali M. : Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr.*, **96**, 660-6 (2006).
- 21) Ueno Y., Tsuda T., Takajo H., Ohsawa T., Yoshikawa T. : shokuhinkogyo, **49** (2006).
- 22) Anderson RJ., Clouse RE., Freedland KE., Lustman PJ. : The Prevalence of Comorbid Depression in Adults With Diabetes. *Diabetes Care*, **24**, 1069-78 (2001).
- 23) Engstrom I, Kroon M, Arvidsson C-G, Segnestam K, Snellman K, Aman J. : Eating disorders in adolescent girls with insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based case-control study. *Acta Paediatr.* **88**, 175-180 (1999).

Hypoglycemic Effects of Compounds from Crude Drugs : Focused on the Contribution of Brain Monoamines in Blood Glucose Regulation

Yumiko Hori · Kazuo Toriizuka
School of Pharmacy, Showa University

Shokyo and Kankyo (Japanese names for *Zingiberis* rhizome and *Zingiberis* processum rhizome, respectively) are important traditional Kampo medicines prepared from ginger, the rhizomes of *Zingiber officinale* ROSCOE (Zingiberaceae), by different process. And they have been used for different clinical purposes in Kampo medicine. The sulfonated derivatives: 4-, 6-gingesulfonic acids (6-GS), shogasulfonic acids A (SSA), B, C and D, isolated from Shokyo and Kankyo, were found to be artifacts formed by bleaching with sulfur in their preparation processes. These sulfonated derivatives were yielded by replacement of the hydroxyl group of gingerols and diarylheptanoids with the sulfo group. Consequently, these sulfonated derivatives may produce various bioactivities, because of their water-soluble properties.

The present studies examined suppressive effects of 6-GS on the elevation of blood glucose levels after its oral administration to healthy mice, *in vitro* effects of these compounds on α -amylase activity and the antidiabetic effect of 6-GS in spontaneously diabetic KK- A^y mice, which are a model of type 2 diabetes. Beside, we aimed to examine the relationship between blood glucose and brain monoamine levels. 6-GS had suppressive effects on postprandial blood glucose elevation using sugar tolerance tests in mice. Oral administration of 6-GS, which did not alter the fasting blood glucose, suppressed the increase of blood glucose level after loading of maltose compared with the control mice. *In vitro* study showed that sulfonated compounds: 6-GS and SSA inhibited maltase and sucrase activities in concentration-dependent manner, whereas major compounds of ginger: 6-gingerol and 6-shogaol did not show any effect on these enzyme activities. These results suggest that sulfonated derivatives have a glucose-lowering effect on loading sugar, which may be based on inhibition of the activity of saccharide hydrolyzing enzyme. Also, the repeated administration of 6-GS (0.8 mg/kg body weight/day) for five weeks showed continuous hypoglycemic effects throughout the experimental periods in KK- A^y mice. Concomitantly, the hypoglycemic effects of 6-GS were correlated with the increased serum adiponectin and brain serotonin (5-HT, 5-hydroxytryptamine) levels. These findings suggest that serum glucose concentrations influence on the brain monoamine neurotransmitters metabolism in KK- A^y mice, yet unknown manner.