

2016. 12

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人  
高知大学学報

高知大学学位授与記録第八十四号

総務課広報係発行

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づきその論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総黒博第18号	Niger Mst Tamanna	Inhibitory effect of plant leaf extracts on carbohydrate digestive enzyme:a case study on some woody plants species collected in Bangladesh and Japan (植物葉抽出液の炭水化物分解酵素の阻害効果： バングラデシュおよび日本で採取した木本に関する事例研究)	1

<p>ふりがな 氏名（本籍） 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目</p> <p>発 表 誌 名</p>	<p>ニガ'ロ エア'ス'テイ タマンナ'</p> <p>Niger Mst Tamanna (バングラデシュ人民共和国)</p> <p>博士 (学術)</p> <p>甲総黒博第 18 号</p> <p>学位規則第 4 条第 1 項該当</p> <p>平成 28 年 9 月 20 日</p> <p>Inhibitory effect of plant leaf extracts on carbohydrate digestive enzyme: a case study on some woody plants species collected in Bangladesh and Japan</p> <p>植物葉抽出液の炭水化物分解酵素の阻害効果:バングラデシュおよび日本で採取した木本に関する事例研究</p> <p>Mst Tamanna Niger, Kazuhiro Ohtani, Bhuiyan Feroze Ahamed, Inhibitory Effects of Bangladeshi Medicinal Plant Leaf Extracts on <math>\alpha</math>-glucosidase Activity, Kuroshio Science Vol.10 No.1, 2016, pp.49-58.</p> <p style="text-align: right;">審査委員 主査 教 授 飯國 芳明 副査 教 授 久保田 賢 副査 教 授 大島 俊一郎</p>
--	--

論文の内容の要旨

Plants are a rich source of bioactive compounds that may be used as functional ingredients for human health. Plants have long fulfilled our nutritional requirements and have been used for various medical purposes. Different types of active components in various plant species have been investigated for antidiabetic activity. For the treatment of diabetes, plants have been used in various systems of medicine since ancient times, especially in developing countries where large numbers of people have limited access to natural resources and access to allopathic treatment for diabetes.

Diabetes is a common chronic disease, characterized by high blood sugar levels that result in various health complications, including heart disease, kidney disease, retinopathy, and neuropathy. The prevalence of diabetes is increasing worldwide. One of the best strategies for the treatment of diabetes mellitus management involves control of postprandial hyperglycemia through enzymatic inhibition of starch degradation. The inhibition of  $\alpha$ -glucosidase activity is essential to delay carbohydrate digestion and absorption, reduce blood glucose levels, and finally control postprandial hyperglycemia. Many antidiabetic agents have been reported. However, these drugs have some undesirable side effects. Therefore, new natural antidiabetic drugs that are both safe and effective are required.

This study was performed to identify new medicinal plants from Bangladesh for diabetes, and to identify new compounds from Japanese plant leaves for diabetes. Many people use traditional medicine in Bangladesh to treat various diseases.

Therefore, three Bangladeshi medicinal plants were screened for antidiabetic effects. Japanese people occasionally use traditional medicine. Therefore, we used 19 types of Japanese woody plant leaves to investigate the inhibitory effects on diabetes and identify the structures of active compounds to make modern medicines.

**Materials and Methods:** The leaves of three plant species were collected from Bangladesh Agricultural University in Bangladesh and the leaves of 19 plant species were collected from Kochi University (Monobe campus) in Japan. The leaves were extracted with methanol and then dried using a rotary evaporator. The dry extract was partitioned in 30% hexane/70% methanol solution, followed by fractionation with ethyl acetate, butanol, and water. Each fraction was evaporated under reduced pressure to provide hexane, ethyl acetate, butanol, and water fractions. The methanol extracts and their partitioned fractions were examined for inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase activity.

The results were obtained from yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory assay and rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase (sucrase) inhibitory assay. For yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory assay, 10  $\mu$ l of phosphate buffer (pH 6.8), 20  $\mu$ l of test sample, and 150  $\mu$ l of p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (5 mmol/ml) were added to each well of 96-well plates. The reaction was started by adding 20  $\mu$ l (5  $\mu$ g/ml) of the enzyme to the reaction mixture in the plates. The changes in absorbance at 405 nm ( $A_{405}$ ) were recorded at 1-minute intervals for 10 minutes, and the percentage inhibition was estimated from the slope using the following equation:

$$\text{Inhibition \%} = (1 - \text{slope of test sample/slope of control}) \times 100.$$

For rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase (sucrase) inhibitory assay, 20  $\mu$ l of test sample and 150  $\mu$ l of saccharose (5 mg/ml) were added to each well of 96-well plates. The reaction was initiated by adding 30  $\mu$ l of the enzyme to the reaction mixture in the plates. The changes in absorbance at 492 nm ( $A_{492}$ ) were recorded at 1-minute intervals. The percentage inhibition was estimated using the following equation:

$$\text{Inhibition \%} = (1 - (\text{absorbance of test sample} - \text{absorbance of blank}) / (\text{absorbance of control} - \text{absorbance of blank})) \times 100.$$

A fractionation technique was used for isolation and purification of yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plant extracts. Silica gel column chromatography (Si-gel CC), medium-pressure liquid chromatography (MPLC), and high-performance liquid chromatography (HPLC) were used to separate and purify different components from mixtures of plant extracts. The collected fractions were examined by thin layer chromatography (TLC) for desired components.

**Inhibitory effects of Bangladeshi medicinal plant leaf extracts:** The methanol extracts of the leaves of *Emblica officinalis*, *Terminalia bellirica*, and *Terminalia chebula* screened for their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory potential activities in vitro. Methanol extract of *T. chebula* showed maximum inhibitory activity against yeast  $\alpha$ -glucosidase with a half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of 15  $\mu$ g/ml, followed by *T. bellirica* with an  $IC_{50}$  value of 34  $\mu$ g/ml and *E. officinalis* with an  $IC_{50}$  value of 50  $\mu$ g/ml, compared with the standard drug, acarbose ( $IC_{50}$  value: 13 mg/ml). Rat intestinal sucrase inhibitory activity was also investigated. The methanol

extracts of these three plants at 1 mg/ml showed considerable rat intestinal sucrase inhibitory activity. The hexane extract, ethyl acetate extract, butanol extract, and water extract from the three plants screened for yeast  $\alpha$ -glucosidase and rat intestinal sucrase inhibitory activity. The *T. chebula* butanol fraction showed a strong inhibitory effect with an  $IC_{50}$  value of 10  $\mu$ g/ml. The butanol and ethyl acetate fractions of *E. officinalis* showed almost the same inhibitory activities, with  $IC_{50}$  values of 18  $\mu$ g/ml and 19  $\mu$ g/ml, respectively. The hexane fraction of *T. bellirica* leaves was also less active than the ethyl acetate, butanol, and water fractions, with  $IC_{50}$  values for the butanol and ethyl acetate fractions of 12  $\mu$ g/ml and 18  $\mu$ g/ml, respectively. Among the three plants, butanol extract exhibited potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. Methanol and butanol extracts of the three plants also showed excellent inhibitory activity against rat intestinal sucrase. *E. officinalis*, *T. bellirica*, and *T. chebula* are potential plant sources of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors that can be used to treat diabetes.

**Inhibitory effects of Japanese plant leaf extracts:** The methanol extracts of nineteen Japanese plants that were not reported previously to show any in vitro inhibitory activity were tested. Five of these plants, *Quercus phillyraeoides*, *Mallotus japonicas*, *Sapium sebiferum*, *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*, and *Myrica rubra*, showed high inhibitory activity against  $\alpha$ -glucosidase with  $IC_{50}$  values in the range of 22 – 92  $\mu$ g/ml. The methanol extracts of these five plants at 1 mg/ml showed significant rat intestinal sucrase inhibitory activity. The hexane, ethyl acetate, butanol, and water extracts from the five plants were also screened for yeast  $\alpha$ -glucosidase and rat intestinal sucrase inhibitory activity. The extracts of *Q. phillyraeoides* leaves (ethyl acetate and butanol extracts), *M. japonicas* leaves (ethyl acetate and butanol extracts), and *E. sylvestris* var. *ellipticus* leaves (ethyl acetate and butanol extracts) showed excellent inhibitory effects against yeast  $\alpha$ -glucosidase. Methanol, ethyl acetate, and butanol extracts of the five plants also exhibited potent inhibitory effects against rat intestinal sucrase. Due to their inhibitory effect, the leaves of these five plant species were selected for further investigation to isolate and identify the active constituent(s) responsible for the potential antidiabetic activity.

**Isolation and purification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents:** Finally, the butanol extract of *T. chebula* showed high  $\alpha$ -glucosidase activity in the screening experiments. The butanol extract was divided into seven fractions (B1 – B7) by silica gel column chromatography. Among them, the B1 fraction showed the strongest inhibitory activity. On HPLC, the B1 fraction showed two active peaks, designated as B1-1 (TCB-1) and B1-2 (TCB-2) that showed significant inhibitory effects against  $\alpha$ -glucosidase with  $IC_{50}$  values of 2  $\mu$ g/ml and 3  $\mu$ g/ml, respectively.

The butanol extract of *M. japonicas* showed high yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in the screening experiments. The butanol extract was divided into seven fractions (B1 – B7) by silica gel column chromatography, among which the B2 fraction showed the highest inhibitory activity. On MPLC, the B2 fraction was divided into five fractions (B2-1 – B2-5), and HPLC of the B2-4 fraction showed an active peak with an  $IC_{50}$  value of 10  $\mu$ g/ml (B2-4-2; MJB 1).

The ethyl acetate extract of *Q. phillyraeoides* showed the highest  $\alpha$ -glucosidase inhibitory

activity in the screening experiments. The ethyl acetate fraction of *Q. phillyraeoides* was divided into six fractions by MPLC, among which the fractions E1 – E4 showed excellent inhibitory effects. Repeated column chromatography of the ethyl acetate extract of *Q. phillyraeoides* (E1) fraction yielded E1-1-1-1, which exhibited strong inhibitory activity ( $IC_{50}$ : 1.6  $\mu\text{g/ml}$ ). The E2-1 (QPE-2) fraction isolated from E2 fraction, which showed significant inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of 26  $\mu\text{g/ml}$ . The E4 fraction was fragmented by HPLC and showed four peaks (E4-1 – E4-4). Among them, E4-2 fraction showed a clear spot and high inhibitory activity. The E4-2 fraction was purified by HPLC and divided into three fractions. Among them, E4-2-1 (QPE-3) fraction showed high inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of 27  $\mu\text{g/ml}$ .

Two fractions (TCB-1 and TCB-2) were isolated from the leaves of *T. chebula*, one fraction (MJB-1) was isolated from the leaves of *M. japonicus*, and three fractions (QPE 1, QPE-2, and QPE-3) were isolated from the leaves of *Q. phillyraeoides*. The half maximal concentrations ( $IC_{50}$ ) of TCB-1, TCB-2, and MJB-1 fractions were 2  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , and 10  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, and those of QPE 1, QPE-2, and QPE-3 fractions were 1.6  $\mu\text{g/ml}$ , 26  $\mu\text{g/ml}$ , and 27  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. All six fractions showed significant *in vitro*  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity compared with acarbose ( $IC_{50}$ : 13  $\text{mg/ml}$ ). These results suggest that the three plants may be useful as sources of natural  $\alpha$ -glucosidase inhibitors for use in the treatment of diabetes.

## 論文審査の結果の要旨

### 【論文の目的】

本論文の目的は、バングラデシュ及び日本の植物から、炭水化物分解酵素のひとつである  $\alpha$ -glucosidase の機能阻害を指標に血糖上昇抑制作用が期待される植物葉抽出液を特定し、薬用として直接的に利用する植物あるいは新規の活性阻害物を見出すことにある。

### 【背景】

糖尿病は現在、世界的に問題になっている疾病であり、今後広がりを見せる恐れがある。先進国ではすでに糖尿病患者が高い比率に達している。また、途上国においては、経済発展とともに所得が増大して食生活や行動様式が激変する中で、その比率が急速に増加しつつある。その対処は経済発展の程度に関わらず喫緊の課題となっている。

糖尿病は血糖の制御機能が不全となり、高濃度のままに推移することにより発生する疾患である。この疾患の対処には糖質の摂取制限や運動などさまざまな方法がある。このうち、本論文では、血糖値を左右する炭水化物が体内に取り込まれる過程を阻害する方法に着目した。すなわち、デンプンや砂糖が体内に取り込まれた後に、これを腸壁から吸収するために、糖質を分解する機能を有している酵素の機能を阻害する方法である。具体的には同酵素のひとつである  $\alpha$ -glucosidase (デンプン由来の麦芽糖の分解酵素である maltase : yeast  $\alpha$ -glucosidase と砂糖の分解酵素である sucrase : rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase) の機能を阻害する働きをもつ物質をバングラデシュ及び日本の植物のから抽出した溶液から発見することを課題としている。

論文では、また、分析に際して発展途上国と日本における薬の利用方法にも留意している。日本では疾病への治療に薬を使う場合には、製薬会社が提供する薬品が一般化している。これに対して、バングラデシュでは植物をすり潰したり、煮沸したりしたものを摂取・塗布する治療が根強く存在している。しかし、糖尿病患者の増加が近年になって加速したため、こうした民間薬が他の疾病の民間薬に比べて十分に開発されていない。

このことから、本論文ではバングラデシュで採取された植物からは、 $\alpha$ -glucosidaseの活性阻害の高い植物の特定を目的とし、民間薬の候補を発見することを目的とした。また、先進国を意識した対処とし、製薬を目的として、両国で採取された植物で $\alpha$ -glucosidaseの活性阻害の高い植物の葉溶液を分離・精製して活性阻害物質特定作業を課題としている。

### 【論文の構成と各章の概要】

論文は、3つの章からなっている。

第1章では、バングラデシュで収集した3つの薬用植物 (*Emblica officinalis*, *Terminalia bellirica*, and *Terminalia chebula*) の葉から得た抽出物をメタノール、ヘキサン、エチルアセテート、ブタノール及び水によって分画し、それぞれの層で抽出された物質の阻害効果を測定した。アーユルヴェーダと呼ばれる伝統的な治療法では、多用されるが、従来は、もっぱら、果実が利用されており、葉についての検討はこれまでほとんどなされていなかった。

実験の結果、メタノールで抽出された *Terminalia chebula* が maltase に対して最も高い阻害効果を示した (IC<sub>50</sub> 値が 15  $\mu$ g/ml)。また、ほかの2つの植物についても、*Terminalia bellirica* の IC<sub>50</sub> 値が 34  $\mu$ g/ml、*Emblica officinalis* では同 50  $\mu$ g/ml となった。また、sucrase に対しても同様に高い阻害効果が認められた。これ以外の溶液の抽出物では、3つの植物からブタノールによって得た抽出物質がいずれの酵素に対しても阻害効果を持つ可能性が示された。

第2章では、高知県で収集した19の植物の葉から得た抽出液の阻害効果を第1章と同様の手順で検

証した。これらの植物については、これまで  $\alpha$ -glucosidase に対する阻害効果の *in vitro* 実験はなされていない。

実験の結果は次の通りである。まず、エチルアセテートとブタノールによる抽出からは *Quercus phillyraeoides*、*Mallotus japonicas* 及び *Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus* の3つの植物で maltase に対する阻害効果が確認された。また、メタノール、エチルアセテート及びブタノール抽出物では、*Quercus phillyraeoides*、*Mallotus japonicas*、*Sapium sebiferum*、*Elaeocarpus sylvestris* var. *ellipticus*、*Myrica rubra* の5種の植物で sucrase に対する阻害効果が確認された。

第3章では、第2章までの実験で高い阻害効果が確認できた *Quercus phillyraeoides* のエチルアセテート抽出物、*Mallotus japonicas* 及び *Terminalia chebula* のブタノール抽出物を対象に以下の手順で分離・精製を行った。すなわち、シリカゲル・カラム・クロマトグラフィー (Si-gel CC)、中圧カラム・クロマトグラフィー (MPLC)、高圧カラム・(HPLC) などの手法で分離・精製した後に、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて阻害効果の高い画分の純度を確認するという手順である。

実験の結果、*Quercus phillyraeoides* からは QPE-1, QPE-2, and QPE-3 と名付けた3つの抽出液から、maltase に対する高い活性阻害効果が認められた。それぞれの IC<sub>50</sub> 値は 1.6  $\mu$ g/ml、26  $\mu$ g/ml として 27  $\mu$ g/ml となった。また、*Terminalia chebula* から得られた2つの抽出液 (TCB-1 と TCB-2 と命名) の IC<sub>50</sub> の値はそれぞれ 3  $\mu$ g/ml、2  $\mu$ g/ml となり、*Mallotus japonicas* から得られた抽出液 (MJB-1 と命名) の IC<sub>50</sub> 値は 10  $\mu$ g/ml となった。いずれも高い活性阻害効果を示していることが判明した。

#### 【論文の評価】

本論文で評価すべき点のひとつは、糖尿病に対する民間薬を視野に入れた薬用植物の利用を社会の発展段階を考慮しながら展開した点にある。途上国と先進国のそれぞれに焦点を絞った糖尿病対策薬の分離・精製の過程とその成果が明確に示されている。こうした社会の実態に応じた技術開発の思考は、本専攻が目指す持続的な社会の確立を促す上で欠かせない要素であり、また、今後の研究を発展させるものといえる。さらに、実験を通じて maltase 及び sucrase の活性阻害効果をもつ植物葉抽出液が新しく特定された点も高く評価できることは言うまでもない。

なお、本論文の第1章は、Mst Tamanna Niger, Kazuhiro Ohtani, Bhuiyan Feroze Ahamed, Inhibitory effects of Bangladeshi medicinal plant leaf extracts on  $\alpha$ -glucosidase activity, *Kuroshio Science* (Kuroshio Science Vol. 10 No. 1, 2016, pp.49-58) として公表されていることを付記する。