

新しいバイオマーカーによる山梨県内有用植物等探索と活用

戸沢 一宏 小林 浩¹⁾ 小泉 美樹¹⁾ 木村英生²⁾ 樋口かよ²⁾ 尾形美貴²⁾ 長谷川達也³⁾
北島潤一⁴⁾ 高野昭人⁴⁾ 小松弘幸⁵⁾

Search and utilization of useful plants such as resources of Yamanashi Prefecture using a new biomarker

Kazuhiro TOZAWA, Hiroshi KOBAYASHI, Miki KOIZUMI¹⁾, Hideo KIMURA, Kayo HIGUCHI,
Miki OGATA²⁾, Tatsuya HASEGAWA³⁾, Jun-ichi KITAJIMA, Akihito TAKANO⁴⁾, Hiroyuki KOMATSU⁵⁾

Summary : Although as an indicator of renal dysfunction such as urinary protein is used, recently as a biomarker for the early renal impairment, L-FABP is used in the clinic. Thought to be capable of suppressing plant such as the L-FABP is to inhibit the progression of renal dysfunction, and to explore the useful plants.

The confirmation of the effect, using a mouse was introduced L-FABP expression gene for human (hL-FABP Tg mouse, CMIC Pharma Science own), and compares an increase in L-FABP after cisplatin administration, it was confirmed effect . As a result, , the inhibitory effect in the peach flowers, *Acanthopanax sessiliflorus*, etc. has been confirmed.

要旨 : 腎機能障害の指標として尿たんぱく等が用いられているが、最近では初期の腎機能障害に対するバイオマーカーとして、L-FABP が臨床で用いられている。この L-FABP の抑制する植物等が腎機能障害への進行を抑制することができると考え、有用な植物を探索した。

効果の確認には、ヒトの L-FABP 発現遺伝子を導入したマウス (hL-FABP Tg マウス、シミックファーマサイエンス所有) を用い、シスプラチン投与後の L-FABP の上昇を比較し、効果を確認した。この結果、モモの花、ウコギ等で抑制効果が確認された。

1 はじめに

病気の診断には血液や尿中の指標 (バイオマーカー) が広く用いられている。特に病気の初期症状を高感度に検知するバイオマーカーが重要である。古くから腎機能障害のバイオマーカーとして用いられている尿素窒素、クレアチニン、尿タンパク質などは機能障害が亢進した場合に上昇するため、初期症状を診断することができなかった。しかし最近、腎機能障害の原因の一つである酸化ストレスに着目し、腎機能障害の初期症状を診断するための新しいバイオマーカーが開発されて臨床で用いられ始めた。腎臓が酸化ストレスを受けると、脂質は有害な過酸

化脂質に変化する。近位尿細管上皮細胞に存在する L-FABP はこの過酸化脂質と結びついて体外に排出させる解毒的な機能を持っている。また、L-FABP のタンパクがヒト型である場合、一般的な L-FABP と区別して hL-FABP とよび、尿中の hL-FABP のタンパクを検出することにより、酸化ストレスに起因する初期の腎機能障害の診断が可能となる。

そこで本研究では、マウスの尿中の hL-FABP 量を指標にして、腎機能障害抑制効果を示す成分を含有する植物等の探索を行い、その機能性成分を解明することを目的として行う。しかし、通常のマウスの腎臓では hL-FABP の発現が少ないことが知られている。そこで、マウスの L-FABP のタンパク部分をヒト型に変更させた hL-FABP

1) 衛生環境研究所 2) 工業技術センター 3) 富士山科学研究所 4) 昭和薬科大学 5) シミックファーマサイエンス
本研究は、山梨県総合理工学研究機構課題「新しいバイオマーカーによる山梨県内有用植物等探索と活用」(平成 26 ~ 28 年度)の一部として実施した。

発現遺伝子を導入したマウス (Tg マウス、シミツクバイオリサーチセンター所有) を用いて、排出量を測定し、機能性の有無に関する実験を行う。

2 実験方法

2.1 試験材料の選定

試験材料は、山梨県に自生しているもの、過去の研究で山梨県で栽培可能な植物等から、利尿作用等腎臓に有効と思われるものについて選定した。

選定した植物は以下の通り (表1)。

表1 使用した植物

種名	部位	備考
ブルーベリー	葉	
ウコギ	葉	葉
ブドウ	葉+葉柄	甲州
モモ	花	
ブドウ	葉	甲州
モモ	蕾	花粉取機後
アケビ	葉	
モモ	花	温風乾燥
ブドウ	葉	ピオーネ
ブドウ	葉+葉柄	ピオーネ
スペインカンゾウ	地上部	
ウラルカンゾウ	地上部	
ウド	地上部	
ブドウ	葉柄	甲州
朝鮮人参	葉	
エビスグサ	葉	
タラノキ	葉	
ブドウ	葉柄	ピオーネ
アケビ	蔓	
ラベンダー	蕾	
ブルーベリー	果実	
コシアブラ	葉	
ギョウジャニンニク	葉	
タケ	稈	
ブナハリタケ	子実体	
マスタケ	子実体	

2.2 試験材料の調整

試験材料として用いた試料は、採取後ただちに凍結乾燥を行った。乾燥後、ミルで粉碎し、

冷凍庫にて保管した。モモの花の一部は温風乾燥 (60℃) にて乾燥した。

2.3 抗酸化活性値の測定

hL-FABP は腎臓が酸化ストレスを受けると尿中に排出されることから、抗酸化活性物質の存在が hL-FABP の増減に影響を与えると考え、乾燥試料の抗酸化活性値を測定した。抗酸化活性値の指標には SOD 法などがあるが、近年、食品業界で標準となっている ORAC (酸素ラジカル吸収能 Oxygen Radical Absorption Capacity, Oxygen Radical Absorbance Capacity) を用いた。ORAC には親水性画分の ORAC (H-ORAC) と親油性画分の L-ORAC があり、本試験では主に水およびアルコール抽出物での試験を行うため、H-ORAC を基準とした。

抽出は以下の方法を用いた。

- ①測定試料を凍結乾燥し、粉末にする。
- ②0.5 ~ 1.0g 精秤し乳鉢に入れ、2g の ASE 専用 Diatomaceous Earth (珪藻土) を加える。
- ③乳棒でよく混ぜ、あらかじめ 1g の ASE 専用 Diatomaceous Earth を入れておいたセルに加える。
- ④セルを ASE-350 にセットし、抽出する。用いた抽出溶媒は MWA 溶液 (メタノール:水:酢酸 = 90:9.5:0.5)
- ⑤抽出液は MWA 溶液を用いて 50ml に定容し、H-ORAC 用試料溶液とした。



図1 高速溶媒抽出装置

抽出条件は以下の通り。

- ・ static time : 5 分間
- ・ flush : 60%
- ・ purge : 60 秒間
- ・ cycle : 3
- ・ temperature : 80°C
- ・ pressure : 1500psi

ORAC 法では、標準試料として Trolox ((±)6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) を用いた。H-ORAC 用試料には 37°C に保温した Assay buffer (75mM K₂HPO₄ 500ml に 75mM KH₂PO₄ 155ml を添加) を用いて適宜希釈し、96 穴マイクロプレートに 35μL ずつ分注した。



図2 マイクロプレートリーダー

Fluorescein 溶液 (Assay buffer 25mL に 6.0μM FL stock solution 470μL を添加し 37°C に保温) を各ウェルに 115μL ずつ分注し、10 分後 37°C に保温したプレートリーダー (コロナ電気, SH-9000Lab) にて蛍光強度を測定した (Em.485nm, Ex.520nm)。

測定後、96 穴マイクロプレートを取り出し、Assay buffer で調製した AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) 溶液 (31.7mM) を 50μL 添加後、プレートリーダーに戻し 2 分後に測定を再開した。2 分間隔で合計 90 分間蛍光強度の経時変化を測定し、その値から ORAC 値を算出した。

2.4 マウス投与と抽出物の作成

マウスに投与する抽出物は、安全性を考慮し

水およびエタノールで抽出を行った。

水抽出物の作成方法は、以下の通り。

- ①乾燥試料 10g を精秤し、蒸留水 1 リットルを加える
- ②ホットスターラー (120°C 600rpm) で 2 時間抽出
- ③ろ紙 (5A) にて濾過
- ④濾液をロータリーエバポレータで 30ml 前後まで濃縮
- ⑤凍結乾燥機で乾燥

エタノール抽出物作成方法は以下の通り。

- ①乾燥試料 10g を精秤し、エタノール 1 リットルを加える
- ②室温 (20°C) で振盪機にて 2 時間抽出
- ③ろ紙 (5A) にて濾過
- ④濾液をロータリーエバポレータで 100ml 前後まで濃縮
- ⑤濃縮液に蒸留水 100ml を加える。
- ⑥濾液をロータリーエバポレータで 30ml 前後まで濃縮
- ⑦凍結乾燥機で乾燥

2.5 抽出物のマウスに対する安全性試験

抽出物投与の安全性の確認のため、Tg マウスと同系統のマウス (C57BL/6J、オス、7 週齢 エサ: CE-2 飼育: 一群 4 匹) を用い、抽出物投与の安全性について確認した。

与える抽出物の量はマウス体重 1kg 当たり 2,000 および 5,000mg を与えた。投与後の体重変化及び行動を観察し、問題がないか確認した。



図3 マウス飼育環境



図4 ゾンデによる強制経口投与

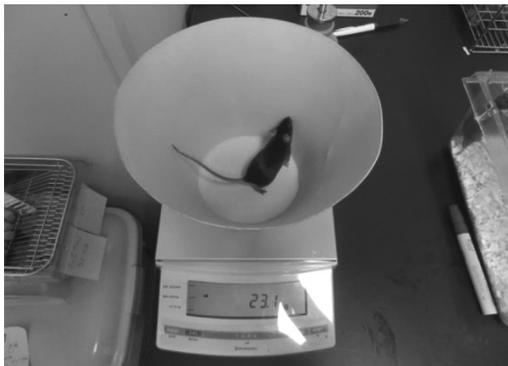


図5 マウスの体重測定の様子

2.6 hL-FABP を分泌させる初期腎機能障害惹起物質の検討

hL-FABP の分泌を惹起させる物質として、シスプラチンとゲンタマイシンを用い、分泌量に及ぼす影響について検討した。

シスプラチン、ゲンタマイシンの濃度を変化させ、hL-FABP の分泌量の変化について検討した。

2.7 抽出物の hL-FABP 分泌量に及ぼす影響試験

マウスの安全性に問題がなかった抽出物に関しては、hL-FABP の分泌量に及ぼす影響試験を行った。hL-FABP の分泌を促すための薬物としてシスプラチン (Yoshiko KAWAI 2007; Conklin KA 2000) を用いた。

まず陰性対象として生理用食塩水を皮下注射を行い、陽性対照対象試験として、シスプラチンを皮下注射後 24 時間の尿中に含まれる hL-FABP の量を測定した。

次に、抽出物を経口投与し、1 時間後にシスプラチンを皮下注射を行い (0 時間)、24 時間尿を採取し、分泌された hL-FABP 量を測定し、

陽性対照と比較した。

3 結果及び考察

3.1 抗酸化活性値の測定結果

表 1 で選定した被験物質の抗酸化活性の指標である ORAC 法を用いて測定した。結果を表 2 に示す。この結果から、ブルーベリー葉、ウコギ葉などが ORAC 値が高いことが判明した。

種名	部位	H-ORAC値 ($\mu\text{mol of TE/g}$ 粉末)	備考
ブルーベリー	葉	2,871	
ウコギ	葉	1,568	葉
ブドウ	葉+葉柄	1,186	甲州
モモ	花	1,109	
ブドウ	葉	1,081	甲州
モモ	蕾	1,041	花粉取機後
アケビ	葉	1,009	
モモ	花	869	温風乾燥
ブドウ	葉	837	ピオーネ
ブドウ	葉+葉柄	797	ピオーネ
スペインカンゾウ	地上部	679	
ウラルカンゾウ	地上部	663	
ウド	地上部	632	
ブドウ	葉柄	624	甲州
朝鮮人参	葉	548	
エビスグサ	葉	543	
タラノキ	葉	400	
ブドウ	葉柄	379	ピオーネ
アケビ	蔓	337	
ラベンダー	蕾	305	
ブルーベリー	果実	267	
コシアブラ	葉	240	
ギョウジャニンニク	葉	158	
タケ	稈	127	
バナハリタケ	子実体	64	
マスタケ	子実体	41	

3.2 抽出物のマウスに対する安全性試験

対象植物の水抽出物を与えた時の体重変化及び陽動について観察した。

1) 桃花 水抽出物

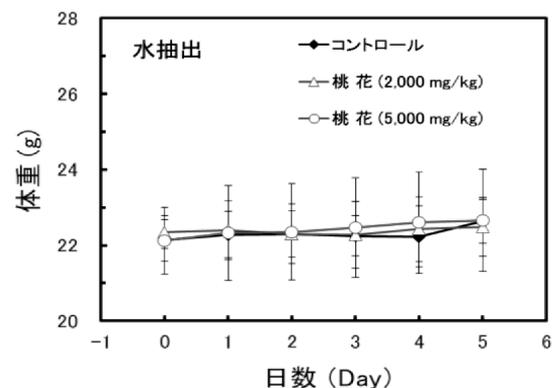


図6 経口投与による体重変化

2) 桃果 (摘果した果実) 水抽出物

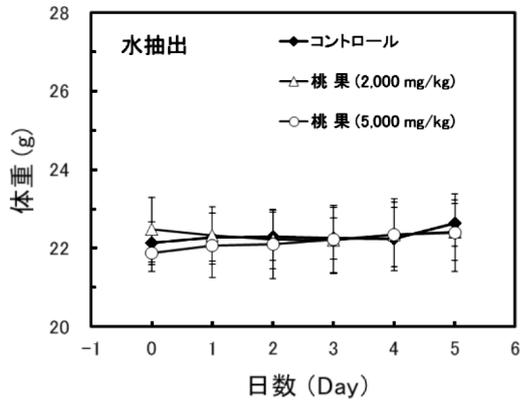


図7 経口投与による体重変化

5) ウコギ葉水抽出物

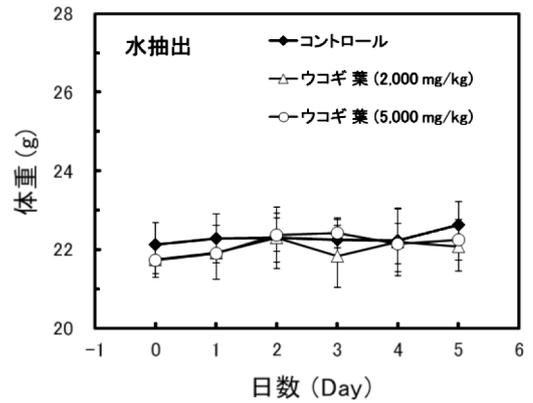


図10 経口投与による体重変化

3) ブナハリタケ子実体水抽出物

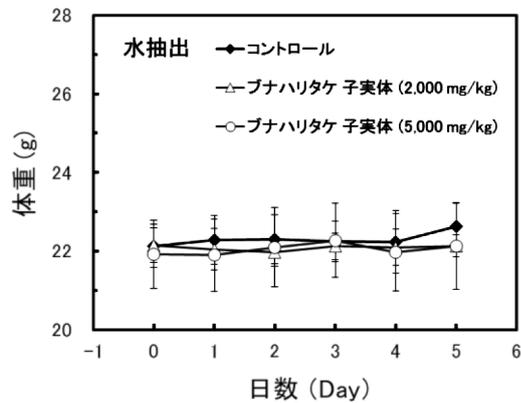


図8 経口投与による体重変化

6) アケビ葉水抽出物

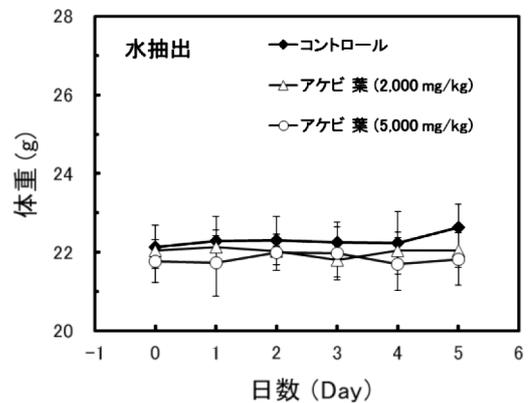


図11 経口投与による体重変化

4) マスタケ子実体水抽出物

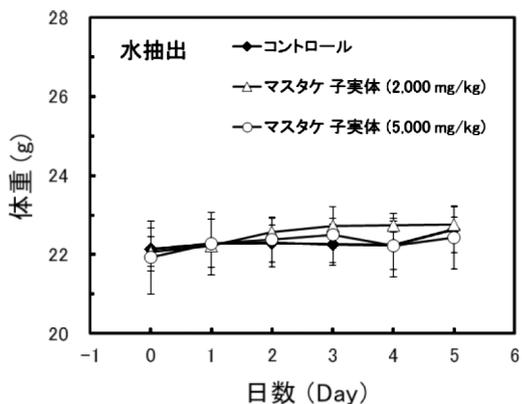


図9 経口投与による体重変化

7) トウモロコシ 雌花穂水抽出物

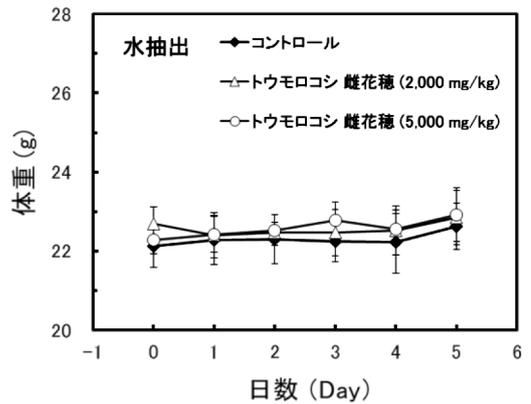


図12 経口投与による体重変化

8) ブルーベリー葉 水抽出物

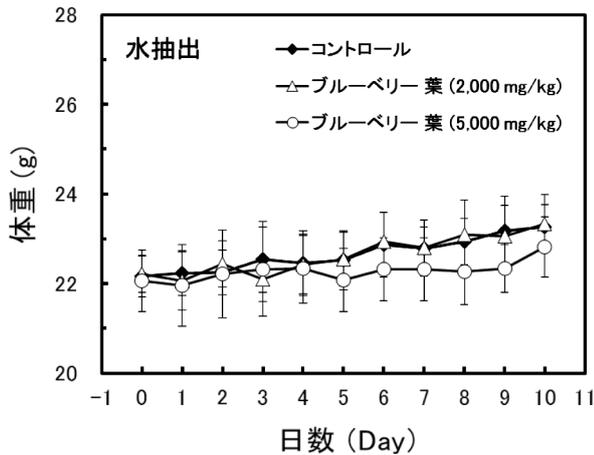


図 13 経口投与による体重変化

9) エビスグサ葉 水抽出物

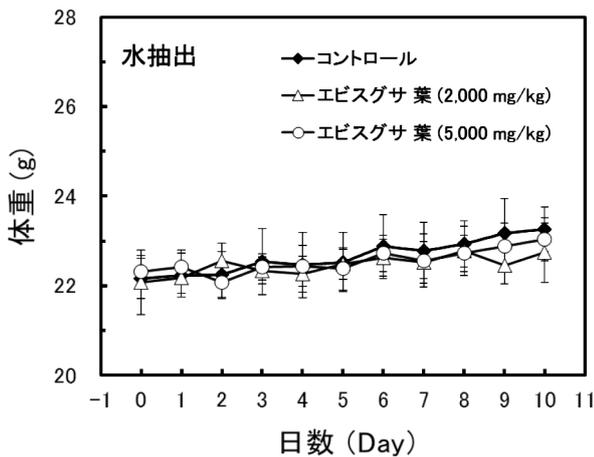


図 14 経口投与による体重変化

3.3 抽出物の hL-FABP 分泌量に及ぼす影響試験

動物安全性の試験から、水抽出物を 5000mg/kg 与えても問題ないことが明らかとなったため、Tg マウスに被験物質を与えた時 hL-FABP の上昇の変化について検討した。

図 15 にシスプラチンを与えた時の hL-FABP の変化の様子を示す。

図 15 より、ブルーベリー葉、桃花、ウコギ、アケビ、ナンバンゲなどに効果があることが推測される。

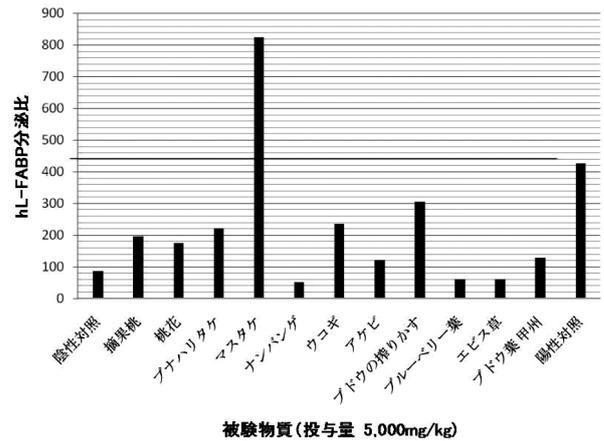


図 15 験物質投与による hL-FABP 分泌量の変化

4. 考察

L-FABP に対する分泌抑制効果に関しては、モモの花やウコギ等に改善効果が確認できた。しかし、試験前の hL-FABP の低いマウスに関しては、少しの差が試験結果に大きな影響を与えることが予測され、この点について、改善の余地が残っている。また、モモの花の含有成分が明らかとなり、ウコギについても抗酸化活性値の高い物質を豊富に含んでいることが明らかとなった。今後、この部分を深く考察していく必要があると思われる。

また、動物実験の評価方法は、平均上昇率ではなくて、影響を受けた個体割合で議論する必要があるのではないかと考えられる。

この方法で評価した場合、モモの花、ナンバンゲ、ウコギ葉、アケビ葉、ブルーベリー葉、エビスグサ葉、ブドウ（甲州）葉で効果が期待できる。

また、対照区について検討した結果、対照区でも hL-FABP が上がらない個体が存在することが判明し、これが動物実験の不安定性に関与しているのではないかと考えられる。

今後の試験においては、シスプラチンに対して hL-FABP 分泌量が高くなる個体を選抜し、この個体を用いて効能試験を行うことにより、より安定した試験ができるのではないかと考えている。

5. 結 言

山梨県に由来のある植物等の抗酸化活性の指標である ORAC を計測したところ、ブルーベリー葉、ウコギ葉、ブドウ葉、モモの花等で高い値が得られた。これらを Tg マウスで hL-FABP の分泌量に与える影響を調べたところ、モモの花、ナンバンゲ、ウコギ葉、アケビ葉、ブルーベリー葉、エビスグサ葉、ブドウ（甲州）葉で分泌量を上げないことが判明した。

また、モモの花に含まれている成分については、いくつかの抗酸化活性の高いケンフェロール類や問題となるであろう瀉下効果のあるマルチフロリンの存在が明らかとなった。ウコギにもケンフェロール配糖体が多く含まれていることが判明した。

これらケンフェロール類は ORAC も高いことから、これらの影響が大きいと考えられる。

引用文献

- 1) Yoshiko KAWAI (2007) Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences 1, P129-134
- 2) Conklin KA (2000) Nutrition and Cancer;37(1): P.1-18