

研究計画説明書

平成26年度（No.26-1）

（事務局にて記載）

研究課題名	新しいバイオマーカーを利用した山梨県の植物資源の探索および活用			
研究期間	平成26年度～28年度	形態	・新規	・継続（年目）
研究開発予算	H26年度：5,982 旅費： 消耗品費：1,862 委託費：2,166 使賃：342 原材料費： 備品：1,612 負担金：	H27年度：7,342 旅費：200 消耗品費：1,800 委託費：3,000 使賃：342 原材料費： 備品：2,000 負担金：20	H28年度：5,342 旅費：200 消耗品費：1,800 委託費：3,000 使賃：342 原材料費： 備品： 負担金：20	予算総額：18,666 旅費：400 消耗品費：5,462 委託費：8,166 使賃：1,026 原材料費： 備品：3,612 負担金： (単位：千円)
研究担当者	(森林総合研究所)：(戸沢 一宏、柴田 尚) (衛生環境研究所)：(小林 浩、小泉 美樹) (工業技術センター)：(木村 英夫、樋口 かよ) (環境科学研究所)：(長谷川 達也)			
外部共同研究者	(昭和薬科大学)：(北島 潤一、高野 昭人) (シミックバイオリサーチセンター)：(小松 弘幸)			
研究の目的	最近の人工透析患者は、増加の一途をたどっている。これは、食生活の変化や人工透析技術の向上などが考えられる。また、腎機能障害の指標である尿蛋白はすでに腎機能障害が起こってから検出されるもので、最近ではこれに加えて、初期腎機能障害指標であるL-FABPが検出できるようになり、厚生労働省でもこの検査に対する保険適用がされている。このL-FABPに加えて、アルブミン濃度を用い、これらの濃度が高く維持されると、高い確率で人工透析が必要になってくるかことがわかってきている。そこで、本研究ではL-FABPを排出するTgマウスを用いて、L-FABPを減少させる機能を持った植物・菌類の探索を行い、効果について検証を行うことを目的とする。 (本研究課題を計画するに至った背景、研究の目的、到達目標などを簡潔、明瞭に記載)			
研究の内容	腎臓の尿管細胞にはL-FABP（脂肪結合性蛋白）があり、腎臓が酸化ストレスを受けると、腎機能維持のため、有害な過酸化脂質と結びついて、細胞外へ排出させる機能をもっている。そこで、このL-FABPが尿中に排出されると、腎臓が酸化ストレスを受け、機能障害の前兆であると判断される。また、L-FABPとアルブミンと併用することにより機能性障害を予測することができる。このL-FABPを減少させること、つまり、酸化ストレスを軽減させることができれば、機能性障害を抑えることができ、人工透析への移行を阻止、または遅延させることができると考えられる。 また、通常、マウスにはL-FABPを排出する遺伝子を持ち合わせていないが（極微量排出される）、L-FABPの研究を行う際、遺伝子操作を行い、L-FABPを多く排出する機能を持ったマウス（Transgenic Mouse 以下Tgマウス）がシミックバイオリサーチで開発された。このマウスを用い、シスプラチンなど腎機能障害を引き起こす物質を投与すると、機能障害が発生し、尿中にL-FABPが排出されるようになる。また、機能障害が改善されると、L-FABP量が少なくなる。 本研究では、植物・菌類が持つ様々な機能に関して、L-FABPを減少させる作用について着目し、Tgマウスを用いた試験により、スクリーニング検査を行う。特にL-FABPは酸化ストレスにより起こるため、1次スクリーニングの指標として抗酸化活性値（ORAC値）に注目し、一次選抜を行い、動物実験を実施する。 研究内容は以下の手順で行う。 (1) 植物・菌類の選抜：腎機能障害に対して、効果があると思われる植物菌類のリストアップ。 (2) 一次スクリーニング：リストアップされた植物・菌類の抗酸化活性値を測定し、活性値の高いものを中心に選抜を行う。（ORAC値：Oxygen Radical Absorbance Capacity：活性酸素吸収能力） (3) 1次スクリーニングされたものから抽出物を作成（溶媒：水、エタノール）			

	<p>(4) n-マウス (Tgマウスと同系統の遺伝子操作していないマウス) に抽出物の水溶液・懸濁液を与え、抽出物がマウスに与える毒性について調査する。</p> <p>(5) 腎機能障害モデルのTgマウスに抽出液を与え、抽出液がL-FABP分泌量に与える影響について調査し、L-FABP分泌量を減少させるような植物等を選抜する (二次選抜)。</p> <p>(以上1-2年次)</p> <p>(6) 有効性が確認されたものは、機能成分の単離を試みる。(2-3年次)</p> <p>(目的達成のために行う研究の具体的内容を、必要に応じて年次別に簡潔に記載)</p>																												
<p>研究の基礎となるこれまでの研究蓄積</p>	<p>予備試験では以下のことについて検討した。</p> <p>(1) 試験材料として、菌類からブナハリタケ、マスタケ、植物からナンバンゲ (トウモロコシの髭)、桃摘花、桃摘果を設定した。</p> <p>(2) ORAC値の測定および抽出液の作成方法の検討を行った。以下にORAC値の測定結果を示す。</p> <table border="1" data-bbox="411 539 1018 770"> <thead> <tr> <th>部位</th> <th>L-ORAC</th> <th>H-ORAC</th> <th>合計ORAC値 (μ mol of TE/g-Dry)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>ブナハリタケ</td> <td>340</td> <td>640</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>マスタケ</td> <td>130</td> <td>390</td> <td>52</td> </tr> <tr> <td>摘果桃</td> <td>4.6</td> <td>186.9</td> <td>191</td> </tr> <tr> <td>桃摘蕾</td> <td>27.2</td> <td>1,015.5</td> <td>1,043</td> </tr> <tr> <td>桃摘花</td> <td>9.8</td> <td>535.0</td> <td>545</td> </tr> <tr> <td>ナンバンゲ</td> <td>3.0</td> <td>375.0</td> <td>378</td> </tr> </tbody> </table> <p>きのこ類のORAC値は低かったが、桃の摘蕾、摘花の値は高いことが判明した。</p> <p>(3) これらの植物・菌類のエタノール (Et-Ex) 及び水 (Wa-Ex) 抽出物の作成を行った。動物実験では、エキスの量を正確に測る必要があるため、エタノールエキスはエバポレータで濃縮後、温風乾燥機で乾燥、水抽出液はイオン交換樹脂XAD-IIにて分離後、XAD-IIに吸着されない水相と吸着後エタノールで溶出したEt相に分け、それぞれ凍結乾燥機とエバポレータ等で乾燥し抽出物を得た。</p> <p>(4) 水抽出物は、水に溶解させ、エタノール抽出物については、水またはカルボキシセルロースに分散可能なものはマウスに投与し、体重を測定することにより、抽出物の毒性や投与量の検討を行った。得られた抽出物を投与したところ、2000mg/kg、5000mg/kgの投与量でも体重には変化がないことが判明した。この結果をもとにTgマウスに投与量を今後検討していく。</p> <p>(5) Tgマウスを用いた腎機能障害マウスの作成について検討を行っている。通常腎毒性を引き起こす方法としてシスプラチンの投与があげられるが、シスプラチンは毒性が高いため、シスプラチンに加えて、比較的毒性の低いゲンタマイシンを使った腎機能障害マウス作成方法の検討を並行して行っている。これらの薬品に関しても、活性酸素の影響で、腎機能障害が起こることが報告されている。</p> <p>(関連する過去の研究成果、予備研究の進捗状況等を簡条書きで記載)</p>	部位	L-ORAC	H-ORAC	合計ORAC値 (μ mol of TE/g-Dry)	ブナハリタケ	340	640	98	マスタケ	130	390	52	摘果桃	4.6	186.9	191	桃摘蕾	27.2	1,015.5	1,043	桃摘花	9.8	535.0	545	ナンバンゲ	3.0	375.0	378
部位	L-ORAC	H-ORAC	合計ORAC値 (μ mol of TE/g-Dry)																										
ブナハリタケ	340	640	98																										
マスタケ	130	390	52																										
摘果桃	4.6	186.9	191																										
桃摘蕾	27.2	1,015.5	1,043																										
桃摘花	9.8	535.0	545																										
ナンバンゲ	3.0	375.0	378																										
<p>期待される成果</p>	<p>山梨県の植物・菌類資源から、腎機能障害予防・抑制機能を持ったものが発見できれば、人工透析への移行を抑えることができる可能性があり、桃の摘花・摘果などで効果確認できれば、山梨県の農林業の新たな収入源として、期待できる。</p> <p>(研究実施することによって得られる成果を簡条書きで記載)</p>																												
<p>共同研究とする理由</p>	<p>森林総合研究所には、八ヶ岳薬用植物園を有しており、薬草類の栽培法や植物資源の管理を行っている。また、機能性成分などの研究を過去に行っているが、分析機器類の整備不足などがあり、この部分を他研究機関と共同で行う必要があった。</p> <p>衛生環境研究所・工業技術センターには、HPLC質量分析計やORAC測定装置を有しており、またそれぞれ薬・食品部門がありこれらの知識やノウハウを用いて、総合的な研究を行うことができる。環境科学研究所にはマウスの実験施設を完備しており、高額なTgマウスを使用する前の毒性試験などを担当可能であり、柔軟な試験を行うことができる。</p> <p>また、昭和薬科大学 北島教授、高野教授は漢方治療学教室に属しており、生薬成分の分析手法や資源管理方法について、研究しており、高度な知識を有している。また、化学物質の構造解析にも長けている。</p> <p>シミックバイオリサーチセンターでは、本研究の中心でもあるTgマウスの実験施設を有しており、豊富な臨床検査の実績から、本研究に重要な位置を占める。</p> <p>これらの機関が連携することにより、高度な研究が行えるとともに、山梨県の試験研究機関にも、有用な技術・知識を取得することが可能となる。</p> <p>分担</p> <p>植物・菌類の選定：全機関</p> <p>抽出物の作成・成分分析・構造解析：森林総研、衛環研、工技セ、昭和薬大</p> <p>抽出物の毒性試験：環境研</p> <p>Tgマウスを用いたスクリーニング試験：シミックバイオリサーチセンター</p> <p>(共同研究とする理由、役割分担などを簡潔に記載)</p>																												