

研究テーマ	新バイオマーカーを利用した山梨県の有用植物等資源の探索と活用		
担当者(所属)	戸沢 一宏、柴田 尚 (森林総総合研究所)、小林 浩、小泉 美樹 (衛生環境研究所) 木村英生、樋口かよ (工業技術センター)、長谷川達也 (環境科学研究所) 北島潤一、高野昭人 (昭和薬科大学)、小松弘幸 (シミックバイオリサーチセンター)		
研究区分	・単独研究      ○共同研究	研究期間	平成 26 年度 (平成 26 年～28 年)

**【背景・目的】**

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つた。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hL-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。このため、尿中のhL-FABP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、腎機能障害モデルマウスの尿中の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、ヒトと違ってマウスの腎臓ではL-FABPの発現が少ないことが知られている。そこで、ヒトのL-FABP発現遺伝子を導入したマウス (hL-FABP Tgマウス、シミックバイオリサーチセンター所有) を用いて実験を行う。

**【得られた成果】**

1. ORAC値の測定

L-FABPは、腎臓の酸化ストレスにより排出されることから、一次スクリーニングの手法として抗酸化活性値の指標であるORAC値の測定した。

高速溶媒抽出装置 (抽出液: MWA溶液 メタノール: 水: 酢酸=90:9.5:0.5) で抽出したのち、測定を行った。今年度の試験では、水およびエタノールで抽出物を作成するため、H-ORAC (親水性ORAC) のみを測定した。ブルーベリーやウコギサクランボなどで高い値を示した。

2. 抽出物の安全性試験

動物試験を行う前に、被験物質の安全性を確認した。本試験で使用した被験物質を投与したマウスの体重は変化せず、安全に試験を行えることを確認した。

3. 桃の花に含まれる成分

モモの花に含まれる成分は、ケンフェロールおよびその配糖体、プルナシン、マルチフローリンA、などが含まれていることが判明した。

マルチフローリンは、エイジツ (ノイバラ) にも含まれている瀉下効果のあるものでももので、モモの花の瀉下効果もこの物質によるものと考えられる。

4. フラボノイド類の抗酸化活性値の測定

モモの花やウコギにはケンフェロール及びその配糖体

表 1 ORAC 値測定結果

種名	部位	平均H-ORAC値 ( $\mu\text{mol of TE/g粉末}$ )	備考
ブルーベリー	葉	2871	ラビットアイ系
ブルーベリー	葉	2426	ハイブッシュ系
ウコギ	葉	1568	葉
サクランボ	花梗	1418	花梗
ブルーベリー	枝	1187	ハイブッシュ系
ブドウ (甲州)	葉+葉柄	1186	
モモ	花	1109	
ブドウ (甲州)	葉	1081	
モモ	花・蕾	1041	花粉取機後
ブルーベリー	枝	1011	ラビットアイ系
アケビ	葉	1009	
モモ	花	869	温風乾燥
ブドウ (ピオーネ)	葉	837	
ブドウ (ピオーネ)	葉+葉柄	797	
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 (甲州)	葉柄	624	
朝鮮人参	葉	548	
エビスグサ	葉	543	
タラノキ	葉	400	
ブドウ (ピオーネ)	葉柄	379	
アケビ	蔓	337	
ラベンダー	蕾	305	
茹でこぼした花モモ	花卉	300	
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	
ブナハリタケ	子実体	64	
マスタケ	子実体	41	

その結果を表-1に示す。

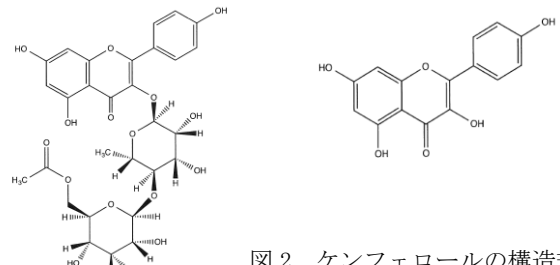


図 1 マルチフローリンの構造式

図 2 ケンフェロールの構造式

表 2 フラボノイド標準品の ORAC 値

kaempferol	2615
kaempferol-3-O-Glucoside	17372
kaempferitrin	20938
Glutathione	3149

が含まれており、それら単品のORACを測定した。  
 また、シスプラチン毒性に効果があるグルタチオンについてもORAC測定を行い、その結果を表2に示す。ケンフェロール配糖体のORAC値が高いことが判明した。

5. ウコギおよび桃花に含まれるケンフェロールおよび配糖体の含有量の測定

HPLCにより、ケンフェロール類の含有量を測定したところ、桃花にはケンフェロール及びその配糖体が含まれており、ウコギにはケンフェロール配糖体のみが含まれていることが判明した。(図3,4)

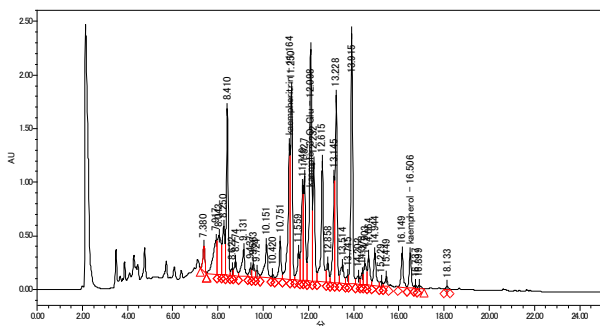


図-3 モモ花のケンフェロール類の分析

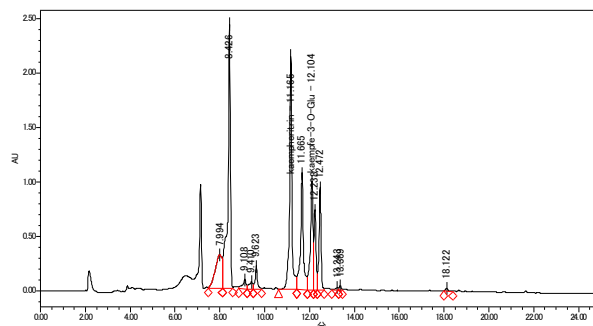


図-4 ウコギのケンフェロール類の分析

ウコギにはモモの花と比較してケンフェロール配糖体が多く含まれていることから(表3)、このケンフェロール配糖体がウコギのORAC値を高めているのではないかと推測される。

表3 ケンフェロール含有量

桃花		
成分名	μg/g	含有率(%)
kaempferitrin	2201.3	0.0022
kaempferol-3-O-Glucoside	4093.7	0.0041
kaempferol	506.9	0.0005

ウコギ		
成分名	μg/g	含有率(%)
kaempferitrin	3809.9	0.019
kaempferol-3-O-Glucoside	4197.9	0.021
kaempferol	-	-

6.動物試験安定性のための試験

これまでの試験では、hL-FABPの分泌量を上昇させる薬物としてシスプラチンを用い、2次スクリーニングを行っている。しかし、薬物投与および被験物質の投与に対して、安定的な結果が得られていない。特に、投与前にhL-FABP分泌量が少ないものについては、投与後のデータのばらつきが高くなっていることが確認された。そこで、安定的に試験ができるように、薬物(ゲンタマイシン)と投与方式(7日間連続投与)を変更した。

その結果、

また、1検体あたりのマウスを増やして、植物エキスの試験を行った。

用いた試料はブルーベリー葉(n=6 :nはマウス数)、エビスグサ葉(n=6)、ブドウ(甲州)葉(n=3)、陽性対照として生理

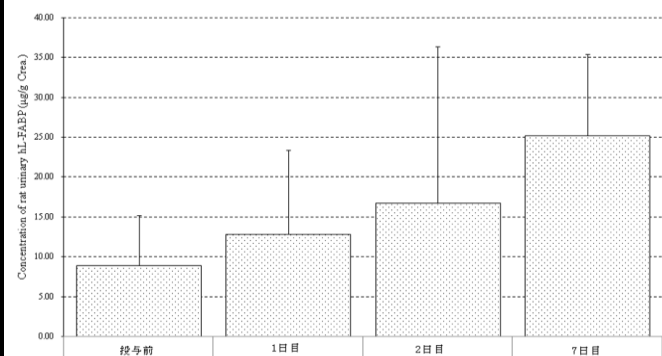


図-5 連続投与に伴うhL-FABP分泌量の変化

食塩水(n=5)を用いた。

この結果、クレアチニン補正しない場合、ブルーベリー葉は6検体中4検体、エビスグサ葉は6検体中5検体、ブドウ葉については、3検体中2検体で投与前と同等または下回っており、効果があると考えられる。

今後、7日間投与か供試マウス数の増加するか検討し、スクリーニング基準について検討する必要がある。

【成果の応用範囲・留意点】

本試験では、有効成分の同定等はまだ行われていないことや、その他の毒性等が調査されていないものがある。そのため、本研究の成果が直ちに使用できるとは限らない。

表-4 hL-FABP分泌量

被験物質	投与量 (mg/kg)	動物番号	hL-FABP (ng/mL)		投与後/投与前 (比)	補正hL-FABP (μg/g Crea.)		投与後/投与前 (比)
			投与前	投与後		投与前	投与後	
媒体 (陽性対照)	0	1101	19.360	54.621	2.82	19.348	83.672	4.32
		1102	19.945	8.293	0.42	18.342	12.523	0.68
		1103	8.776	19.146	2.18	4.666	25.514	5.47
		1104	21.336	12.623	0.59	24.027	29.757	1.24
		1105	3.633	8.185	2.25	3.305	12.191	3.69
		Mean	14.610	20.574	1.50	13.938	32.731	2.93
S.E.	3.541	8.743	0.48	4.180	13.203	0.90		
ブルーベリー葉 (水抽出物)	5000	1201	4.570	5.749	1.26	4.450	8.383	1.88
		1202	2.529	9.680	3.83	3.488	13.557	3.89
		1203	25.865	9.283	0.36	26.870	9.246	0.34
		1204	7.198	5.964	0.83	12.767	9.806	0.77
		1205	15.190	6.556	0.43	11.947	6.205	0.52
		1206	24.297	6.991	0.29	19.617	10.111	0.52
		Mean	13.275	7.371	0.63	13.190	9.551	0.81
S.E.	4.131	0.693	0.55	3.655	0.985	0.60		
エビス草 (水抽出物)	5000	1301	5.622	2.925	0.52	5.392	4.028	0.75
		1302	20.764	4.345	0.21	28.289	6.793	0.24
		1303	10.335	5.945	0.58	11.476	8.340	0.73
		1304	15.567	12.927	0.83	18.409	13.346	0.72
		1305	3.064	5.256	1.72	3.564	7.732	2.17
		1306	12.970	12.098	0.93	14.313	22.020	1.54
		Mean	11.387	7.249	0.61	13.574	10.377	0.80
S.E.	2.655	1.718	0.21	3.706	2.637	0.30		
ブドウ葉 甲州 (水抽出物)	5000	1401	13.176	7.659	0.58	16.474	15.300	0.93
		1402	6.042	14.231	2.36	4.351	23.774	5.46
		1403	18.176	17.178	0.95	20.556	37.279	1.81
		Mean	12.465	13.023	1.29	13.794	25.451	2.70
S.E.	3.521	2.814	0.54	4.866	6.400	1.40		