

# 新しい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

戸沢 一宏<sup>1</sup>, 柴田 尚<sup>1</sup>, 小林 浩<sup>2</sup>, 小泉 美樹<sup>2</sup>, 木村 英生<sup>3</sup>, 樋口 かよ<sup>3</sup>, 長谷川達也<sup>4</sup>, 北島 潤一<sup>5</sup>,  
高野 昭人<sup>5</sup>, 小松 弘幸<sup>6</sup>

(<sup>1</sup>森林総合研究所, <sup>2</sup>衛生環境研究所, <sup>3</sup>工業技術センター, <sup>4</sup>富士山科学研究所, <sup>5</sup>昭和薬科大学,  
<sup>6</sup>シミックバイオリサーチセンター)

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

Kazuhiro Tozawa<sup>1</sup>, Hisashi Shibata<sup>1</sup>, Hiroshi Kobayashi<sup>2</sup>, Miki Koizumi<sup>2</sup>, Hideo Kimura<sup>3</sup>, Kayo Higuchi<sup>3</sup>, Tatsuya Hasegawa<sup>4</sup>,  
Junichi Kitajima<sup>5</sup>, Akihito Takano<sup>5</sup>, Hiroyuki Komatsu<sup>6</sup>

(<sup>1</sup>Yamanashi Forest and Forestry Product Research Institute, <sup>2</sup>Yamanashi Institute for Public Health and Environment,  
<sup>3</sup>Yamanashi Industrial Technology Center, <sup>4</sup>Mount Fuji Research Institute, <sup>5</sup>Showa Pharmaceutical University,  
<sup>6</sup>CMIC Bio Research Center)

### 要 約

腎障害のバイオマーカーとして尿中や血中尿素窒素などが用いられているが、最近では新しいバイオマーカーとして尿中L-FABP (L型脂肪酸結合タンパク質) が臨床で使い始められている。本研究では、腎機能障害を抑制する効果を示す植物等の天然素材を、L-FABPを指標として探索し、それらを活用するための基礎実験を行う。そのために、ヒトのL-FABP発現遺伝子を導入したマウス (L-FABP Tgマウス) を用い、シスプラチン投与腎機能障害モデルマウスを作成した。このモデルマウスを使ってモモ花、モモ摘果、アケビ葉、ウコギ葉、ブナハリタケ、マスタケ、ブルーベリー葉、ブドウ (甲州) 葉およびエビスグサ葉の各水抽出エキス末について腎機能障害抑制効果 (作用) を検討した。その結果、ウコギ葉、アケビ葉、エビスグサ葉およびブルーベリー葉で腎機能障害抑制効果が確認された。

### Abstract

Although such urine and blood urea nitrogen is used as a biomarker for renal disorders, urinary L-FABP (L-type fatty acid binding protein) has been used clinically as a new biomarker recently. Now studies, the natural materials of vegetable or the like indicating an effect of inhibiting renal dysfunction, and searches to have an index of L-FABP, is carried out basic experiments in order to take advantage of them. For this purpose, using a mouse obtained by introducing the L-FABP expressed genes in human (L-FABP Tg mice) to prepare a cisplatin renal dysfunction model mice. Peach flowers using this mouse model, peach fruit thinning, Study akebi leaf, Acanthopanax leaf, Bunaharitake, chicken mushroom, blueberry leaf, grapes (Koshu) renal dysfunction inhibitory effect for each water extract powder of leaves and sickle senna leaves (action) It was. As a result, renal dysfunction inhibitory effect was confirmed in Acanthopanax leaf, chocolate vine leaves, sicklepod leaves and blueberry leaf.

## 1. 緒 言

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血中尿素窒素、血中クレアチニン、尿中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ている。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タンパク質である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。従って、尿中のL-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、マウスに腎機能障害を誘導する化合物を投与して腎機能障害モデルを作成し、尿中のL-FABPを指標にして、腎機能障害を軽減する成分を含む植物等の探索を行うこととした。しかし、通常のマウスの腎臓ではL-FABPの発現が少ないことが知られている。そこで、ヒト型のL-FABP (hL-FABP) 発現遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (hL-FABP Tgマウス, シミックバイオリサーチセンターで開発) を用いて検討を行った。

## 2. 実験方法

### 2-1 原材料の選定

実験に用いる原材料は、山梨県に自生しているもの、ならびに過去の研究において山梨県で栽培可能な植物等から選定した。表1に初年度に原材料として選定した植物15種およびキノコ2種、合計17種を示す。

表1 選定した原材料

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



図1 ウコギ



図2 アケビ



図3 モモ

### 2-2 被検物質の調製

選定した原材料を基に被検物質を調製した。すなわち、原材料を採取後ただちに凍結乾燥してミルで粉碎した粉末を被検物質とした。凍結乾燥には東京理科 FDU-1200およびヤマト科学 DC-401を用いた。原材料が大量にある場合には、いすゞ製真空チャンバーを用いた。得られた被検物質はマイナス5℃の冷凍庫にて保管した。モモ花については、採取後温風乾燥(60℃)にて乾燥し、ミルで粉碎して被検物質とし、同様に冷凍庫で保管した。



図4 凍結乾燥機



図5 真空チャンバー

### 2-3 被検物質の抗酸化活性値の測定

抗酸化活性値の測定は、ORAC (酸素ラジカル吸収能 Oxygen Radical Absorption Capacity, Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法を用いて行った。ORAC法では検体の親水性画分の抗酸化活性値 (H-ORAC) と親油性画分の抗酸化活性値 (L-ORAC) をそれぞれ求めることができる。本研究では、水溶液として動物への投与を想定しているため、親水性画分の抗酸化活性 (H-ORAC) を測定した。すなわち、被検物質0.5～1.0gと珪藻土3gを乳鉢で混ぜ、高速溶媒抽出装置 (ASE-350) で抽出した。抽出溶媒にはMWA溶液 (メタノール：水：酢酸=90：9.5：0.5) を用いた。得られた抽出液は、MWA溶液を用いて50mLにメスアップし、H-ORAC用試料溶液とした。なお高速溶媒抽出装置での抽出条件はstatic time：5分間、flush：60%、purge：60秒間、cycle：3回、temperature：80℃、pressure：1500psiとした。



図6 高速溶媒抽出装置

H-ORAC用試料溶液は37℃に保温したAssay buffer (75mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>500mLに75mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>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。蛍光試薬 (Assay buffer 25mLに6.0μM Fluorescein stock solution 470μLを添加し37℃に保温)を各ウェルに115μLずつ分注し、10分後37℃に保温したマイクロプレートリーダー (コロナ電気,SH-9000Lab)にて蛍光強度を測定した (Ex.485nm, Em.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、マイクロ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H-ORAC値を算出した。なお、標準試料としてTrolox ((±)6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)を用いた。



図7 マイクロプレートリーダー

### 2-4 マウスへの投与液の作成

#### 2-4- (1) 水抽出エキス末の調製

被検物質10gを精秤し、蒸留水1リットルを加えてホットスターラー (120℃,600rpm)で2時間攪拌抽出を行った。残渣を取り除くためろ紙 (5A)を用いてろ過を行った。ろ液をロータリーエバポレーターで30mL程度まで濃縮した後、凍結乾燥機で乾燥して水抽出エキス末を作成した。

#### 2-4- (2) エタノール抽出エキス末の調製

被検物質10gを精秤し、エタノール1リットルを加えて振盪機を用いて2時間室温 (20℃)で振盪抽出を行った。残渣を取り除くためろ紙 (5A)を用いてろ過した。ろ液をロータリーエバポレーターで100mL程度まで濃縮し、これに蒸留水100mLを加え、再度ロータリーエバポレーターで30mL程度まで濃縮した後、凍結乾燥機で乾燥してエタノール抽出エキス末を作成した。

#### 2-4- (3) 投与液の調製

健常マウスを用いた抽出エキス末の安全性試験における動物への投与量は2,000mg/kgならびに5,000mg/kgとし、腎機能障害モデルマウスにおける腎機能障害抑制物質のスクリーニング試験では5,000mg/kgとした。どちらも、マウス体重10gあたり0.2mLの割合でゾンデを用いて経口投与した。すなわち、エキス末0.3gあるいは0.75gに蒸留水を加え超音波洗浄機で微細に懸濁した後、3mLにメスアップして、投与液とした。コントロール群には蒸留水を経口投与した。

### 2-5 健常マウスを用いた抽出物の安全性試験

#### 2-5- (1) 安全性試験-1

抽出物投与の安全性を確認するため、Tgマウスと同系統のマウス (C57BL/6J,オス,7週齢)を用い、一群4匹として実験を行った。すなわち、C57BL/6Jマウスにウコギ葉、モモ花、モモ摘果、アケビ葉、ブナハリタケ、マスタケの水抽出エキス末を2,000mg/kgあるいは5,000mg/kgの投与量で1回強制経口投与し、投与日を0日として4日後まで毎日マウスの観察および体重測定を行った。



## 2-5- (2) 安全性試験-2

C57BL/6Jマウス(オス,7週齢)を一群5匹として実験を行った。すなわち, C57BL/6Jマウスにブルーベリー葉, エビスグサ葉およびブドウ(甲州)葉の水抽出エキス末2,000mg/kgあるいは5,000mg/kgの投与量で1回強制経口投与し, 投与日を0日として10日後まで毎日マウスの観察および体重測定を行った。エタノール抽出エキス末についても同様の投与量で実験を行う予定であったが, エビスグサ葉のエキス末の量が少なかったため投与量は1,000mg/kgとなってしまった。また, ブドウ葉についても同様の理由で2,000mg/kgのみの投与量となった。コントロール群には蒸留水を同様に投与した。



図8 健常マウス



図9 マウス飼育ケージ

(C57BL/6J, オス, 7週齢)



図10 マウス飼育環境



図11 ゾンデによる強制経口投与



図12 マウスの体重測定の様子

## 2-6 腎機能障害モデルマウスの作成

### 2-6- (1) 単回投与

ヒト型L-FABP Tgマウスに腎機能障害を惹起させる条件の検討を行った。すなわち, 惹起物質としてシスプラチンとゲンタマイシンを選び, それぞれの化学物質1回投与による尿中L-FABP量を検討した。

ヒト型L-FABP Tgマウスをそれぞれ代謝ケージに入れ尿を24時間(0日)採取した後, シスプラチンを2.5mg/kgあるいは5.0mg/kgの割合で腹腔内投与した。ゲンタ

マイシンは100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kgの割合で皮下投与した。全てのTgマウスは化学物質投与後代謝ケージに入れさらに尿を24時間(1日)採取した。陰性対照群には, シスプラチンの代わりに生理食塩水を投与した。0日および1日の尿中L-FABP量をエライサを用いて測定した。0日の尿中L-FABP量を100とし, 1日の尿中L-FABP量の割合を算出した。

### 2-6- (2) 反復投与

Tgマウスをそれぞれ代謝ケージに入れ尿を24時間(0日)採取した後, ゲンタマイシン200mg/kgの割合で1日1回ずつ7日間皮下投与した。Tgマウスは1回目, 2回目, 7回目のゲンタマイシン投与後代謝ケージに入れさらに尿を24時間(1日,2日,7日)採取した。0日の尿中L-FABP量を100とし, 1日, 2日及び7日の尿中L-FABP量の割合を算出した。

## 2-7 腎機能障害モデルマウスを用いた腎機能障害抑制物質のスクリーニング

### 2-7- (1) スクリーニング-1

ヒト型L-FABP Tgマウスをそれぞれ代謝ケージに入れ24時間(0日)尿の採取を行った後, シスプラチンを2.5mg/kgの割合で腹腔内投与してさらに24時間(1日)尿の採取を行った。水抽出エキス末から調製した投与液はシスプラチン投与1時間前に5,000mg/kgの割合で経口投与した。一群2匹として, シスプラチン投与前後の尿中L-FABP量をエライサ法で測定して腎機能障害惹起への水抽出エキス末(ウコギ葉, モモ花, モモ摘果, アケビ葉, プナハリタケ, マスタケ)の影響を検討した。また, シスプラチンの代わりに生理食塩水を投与した陰性対照群と, 水抽出エキス末投与の代わりに蒸留水を投与した陽性対照群を設定した。

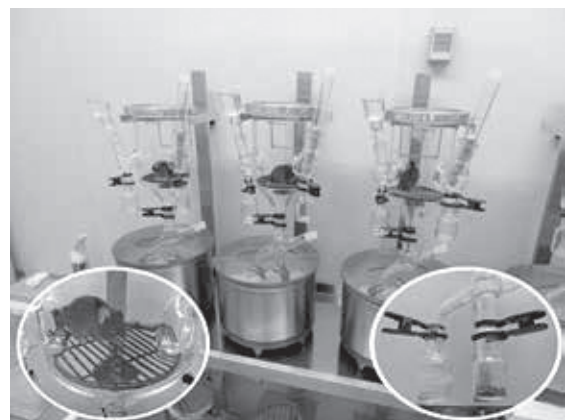


図13 代謝ケージでの尿サンプルの採取

### 2-7- (2) スクリーニング-2

スクリーニング-1と同様に, シスプラチン投与による腎機能障害惹起への影響をブルーベリー葉, エビスグ

サ葉およびブドウ(甲州)葉の水抽出エキス末について行った。なお、ブルーベリー葉およびエビスグサ葉の水抽出エキス末群は一群6匹、ブドウ(甲州)葉の水抽出エキス末群は一群3匹で行った。

## 2-8 ウコギ中ケンフェロール類の分析

ケンフェロール類の分析は標準物質が入手可能な3種類について行った。すなわち、ケンフェロールならびにケンフェロールの配糖体であるアストラガリンとケンフェトリンをUHPLC(WatersUPLC-PDA)で分離して分析を行った。試料約0.1gを遠心用プラスチックチューブ(15mL容量)に精秤し、メタノール(残農分析用MeOH 5000(和光))3mLを加え、攪拌し超音波を5分かけた。遠心分離(3,000rpm, 5分)により得られた上清を、メンブランフィルター(0.45 $\mu$ m)でろ過したものをUPLC分析試料とした。カラムはAtlantis C3(C18)カラム(2.1mm, id $\times$ 150mm, 粒径3 $\mu$ m)を用い、分離は水とアセトニトリルのグラジエント条件で行い、検出にはPDAを用いた。分光光度計により、ケンフェロール類の吸収波長が340nmであることから、測定に使用した波長は340nmで行った。さらに256, 350, 370nmの波長についても測定し、ピーク面積より定量を行った。

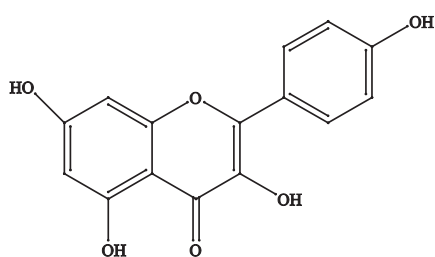


図14 ケンフェロールの構造式

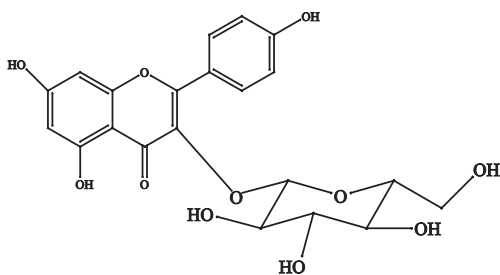


図15 アストラガリンの構造式

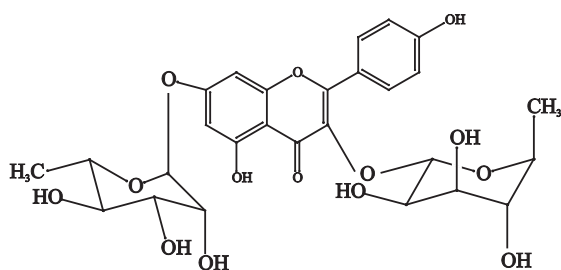


図16 ケンフェトリンの構造式

## 2-9 マウスへのケンフェロール類の投与実験

C57BL/6Jマウスを一群3~4匹として実験を行った。すなわち、C57BL/6Jマウスにケンフェトリン、アストラガリンおよびケンフェロールを32mg/kgの投与量でそれぞれ1回強制経口投与し、投与日を0日として10日後まで毎日マウスの観察および体重測定を行った。

ヒト型L-FABP Tgマウスをそれぞれ代謝ケージに入れ24時間(0日)尿の採取を行った後、シスプラチンを2.5mg/kgの割合で腹腔内投与してさらに24時間(1日)尿の採取を行った。シスプラチン投与1時間前にケンフェトリン、アストラガリンおよびケンフェロールを32mg/kgの割合で、それぞれ経口投与した。一群3匹として、シスプラチン投与前後の尿中L-FABP量をエライサ法で測定して腎機能障害惹起へのケンフェトリン、アストラガリンおよびケンフェロールの影響を検討した。また、陽性対照としてシスプラチン単独投与群、陰性対照として蒸留水投与群を設定した。

## 3. 結果と考察

### 3-1 被検物質の抗酸化活性値-1

L-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L-FABPの増減に影響を与えられられる。そこで、被検物質の抗酸化活性値を測定した(表2)。

表2 被検物質のH-ORAC値1

| 種名        | 部位  | H-ORAC値<br>( $\mu$ mol of TE/g粉末) | 備考    |
|-----------|-----|-----------------------------------|-------|
| ウコギ       | 葉   | 1568                              | 葉     |
| モモ        | 花   | 1109                              |       |
| モモ        | 蕾   | 1041                              | 花粉採取後 |
| アケビ       | 葉   | 1009                              |       |
| 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                               |       |
| 朝鮮人参      | 葉   | 548                               |       |
| タラノキ      | 葉   | 400                               |       |
| アケビ       | 蔓   | 337                               |       |
| ラベンダー     | 蕾   | 305                               |       |
| コシアブラ     | 葉   | 240                               |       |
| モモ        | 摘果  | 187                               |       |
| 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                                |       |

ウコギ(葉)、モモ(花,蕾,花弁,摘果)、アケビ(葉)、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)、朝鮮人参(葉)、タラノキ(葉)、アケビ(蔓)、

ブナハリタケ、マスタケについて、ORAC試験を行い、抗酸化活性値を算出した。その結果を表2に示す。ウコギ葉の抗酸化活性値は1568  $\mu$  mol TE/gと高い値を示した。続いて、モモ花、モモ蕾、アケビ葉であった。酸化ストレスはいくつものラジカルや活性酸素種によって引き起こされる。ORAC試験はDPPHラジカル消去能を検査する方法であるため、ORAC値は抗酸化活性のひとつの指標であるが、全ての酸化ストレスを抑制する指

標ではない。そこで、表2の結果とこれまでの経験からウコギ葉、モモ花、モモ摘果、アケビ葉、ブナハリタケ、マスタケを選び、動物実験を行うことにした。

### 3-2 健常マウスを用い抽出物の安全性試験-1

健常マウスにウコギ葉、モモ花、モモ摘果、アケビ葉、ブナハリタケ、マスタケの水抽出エキス末を2,000mg/kgおよび5,000mg/kgの割合で経口投与し、4日間毎日

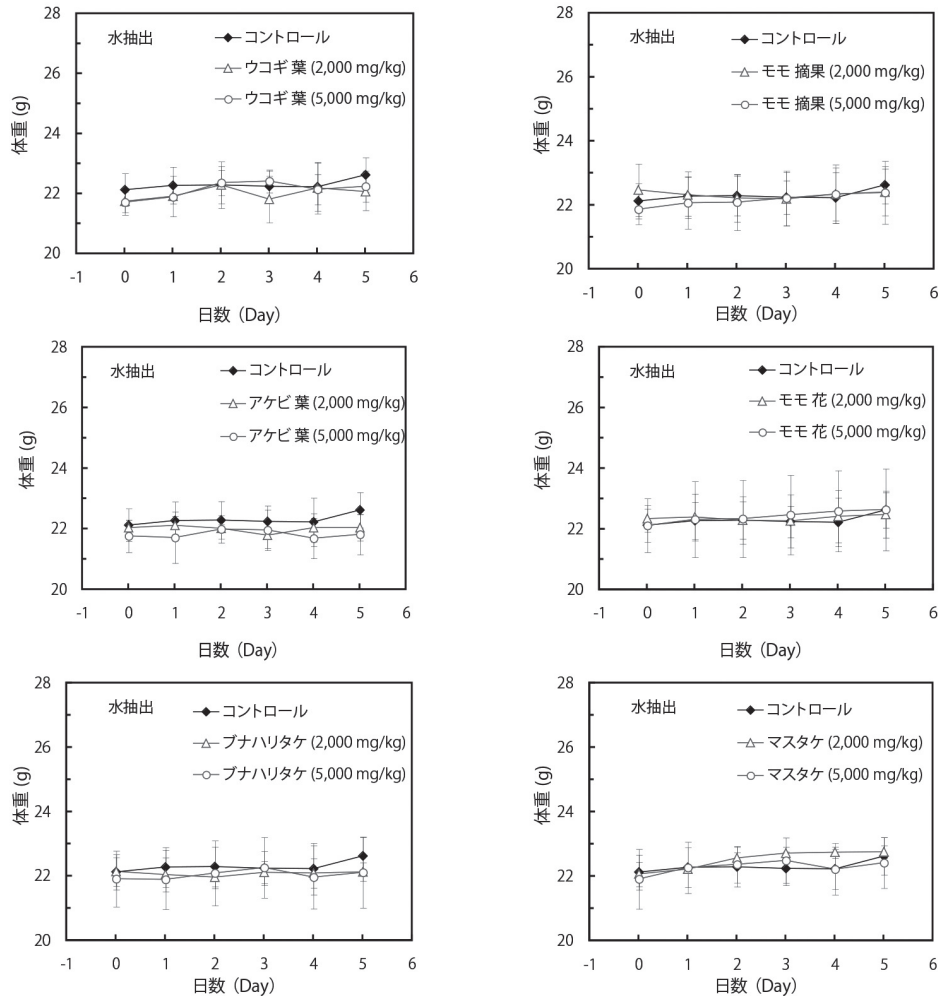


図17 水抽出エキス末の安全性確認試験（動物の体重変化）1

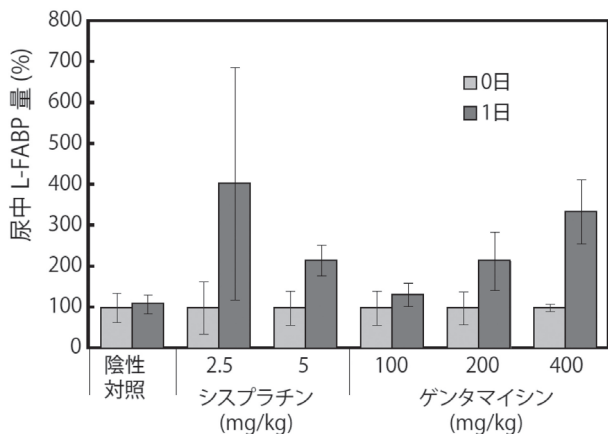


図18 惹起物質および投与量の検討

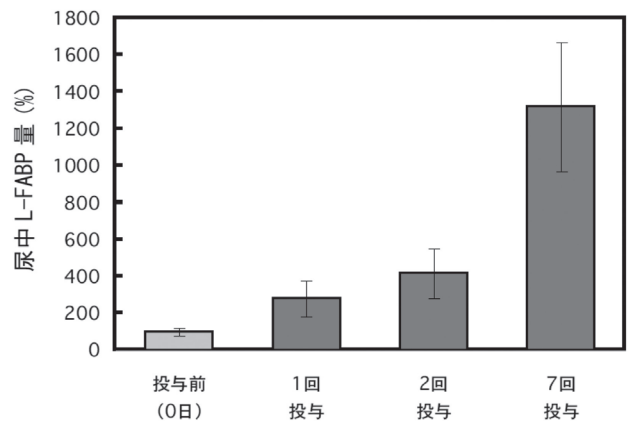


図19 ゲンタマイシン反復投与による尿中L-FABP量

動物の行動および体重の測定を行った。体重を測定した結果を図17に示す。全ての水抽出エキス末において2,000mg/kgおよび5,000mg/kgを投与しても動物の体重は蒸留水を投与したコントロール群と有意な差は認められなかった。また、全ての動物において、異常な行動や脱毛、下痢などの症状は認められなかった。これらの結果から、ウコギ葉、モモ花、モモ摘果、アケビ葉、ブナハリタケ、マスタケの水抽出エキス末を5,000mg/kgの投与量でマウスに経口投与しても毒性が示されないことが明らかとなった。

### 3-3 腎機能障害モデルマウスの作成

ヒト型L-FABP Tgマウスに腎機能障害を惹起させる条件の検討を行った。すなわち、惹起物質としてシスプラチンとゲンタマイシンを選び、それぞれの化学物質1回投与によるL-FABPの影響を検討した。

化学物質投与前24時間の尿中L-FABP量に対する、化学物質投与後24時間の尿中L-FABP量の割合を図18に示す。シスプラチン2.5mg/kg投与により尿中L-FABP量が4倍(400%)にまで上昇することが認められた。シスプラチン5.0mg/kg投与群ではマウスが1匹死亡した。生き残った動物の尿中L-FABP量は2.5mg/kg投与群に比べ低かった。尿中L-FABPは腎臓への比較的軽度な酸化ストレスに起因する障害の指標である。従って、シスプラチン5.0mg/kg投与により腎臓に、酸化ストレス以外のメカニズムにより障害が起きたことが考えられた。ゲンタマイシン投与では100mg/kg、200mg/kg投与群とも有意に尿中L-FABP量を上昇させることはできなかった。400mg/kg投与群はマウスが1匹死亡し、生存した動物の尿中L-FABP量は3倍(300%)にまで上昇した。ゲンタマイシン1回投与では動物を死亡させることなく尿中の尿中L-FABP量を上昇させることができなかった。反復投与の検討を行った。ゲンタマイシンの投与量を200mg/kgとし、1日一回ずつ7日間反復投与を行った。その時の尿中L-FABP量を図19に示す。ゲンタマイシン200mg/kgを7回反復投与すると、尿中L-FABP量が有意に上昇することが明らかとなった。しかし、反復投与のモデルを用いた場合、被検物質(エキス末)の投与タイミングを選定することが非常に難しくなる。そこで、バラツキは大きい1回投与で尿中L-FABP量が上昇するシスプラチン2.5mg/kgを用いて腎機能障害モデルマウスを作成することにした。

### 3-4 腎機能障害モデルマウスを用いた腎機能障害抑制物質のスクリーニング-1

健康マウスを用いて安全性試験で安全が確認されたウコギ葉、モモ花、モモ摘果、アケビ葉、ブナハリタケ、マスタケの水抽出エキス末を5,000mg/kgの投与量で、シスプラチンで誘導した腎機能障害モデルマウスに投与

して、これらエキス末の腎機能障害抑制効果を検討した。シスプラチン投与前の尿中L-FABP量を100として、シスプラチン投与後の尿中L-FABP量に対する各種水抽出エキス末の影響を検討した結果を図20に示す。ウコギ葉、アケビ葉の水抽出エキス末を投与した動物において、尿中L-FABP量が陰性対照レベルにまで減少した。ウコギ葉とアケビ葉のORAC値は1568  $\mu\text{mol TE/g}$ 、1009  $\mu\text{mol TE/g}$ と高い値を示していたので、これらエキス末の抗酸化活性が関与している可能性が考えられた。モモ花はORAC値が1109  $\mu\text{mol TE/g}$ と1000を超えていたが、動物実験では腎機能障害抑制作用は示されなかった。

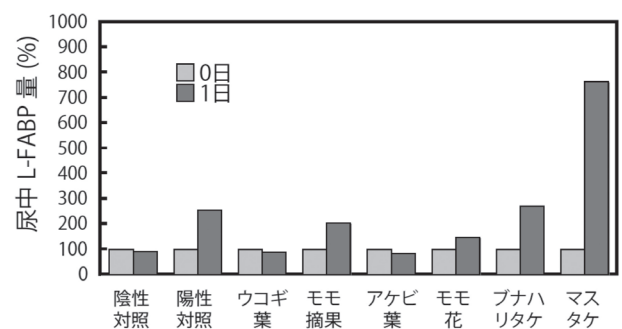


図20 各種水抽出エキス末の腎機能障害抑制効果の検討

### 3-5 被検物質の抗酸化活性値-2

これまでの検討結果からウコギ葉およびアケビ葉において、腎機能障害抑制効果のある可能性が示された。そこで、さらに可能性のある原材料の候補を増やすため、ブルーベリー(葉、枝、果実)、ブドウ(甲種、ピオーネ;葉、枝、葉柄)、エビスグサ(葉)について抗酸化活性を測定した。その結果を表3に示す。ブルーベリー葉のORAC値は2426  $\mu\text{mol TE/g}$ とウコギ葉より高い値であった。そこで、ブルーベリー葉、エビスグサ葉、そしてブドウを代表してブドウ(甲州)葉を選び、動物実験を行うことにした。

表3 被検物質(ブルーベリー、ブドウ、エビスグサ)のH-ORAC値

| 種名     | 部位   | H-ORAC値<br>( $\mu\text{mol of TE/g}$ 粉末) | 備考   |
|--------|------|--|------|
| ブルーベリー | 葉    | 2871                                     |      |
| ブドウ    | 葉+葉柄 | 1186                                     | 甲州   |
| ブドウ    | 葉    | 1081                                     | 甲州   |
| ブドウ    | 葉柄   | 624                                      | 甲州   |
| ブドウ    | 葉    | 837                                      | ピオーネ |
| ブドウ    | 葉+葉柄 | 797                                      | ピオーネ |
| エビスグサ  | 葉    | 543                                      |      |
| ブドウ    | 葉柄   | 379                                      | ピオーネ |
| ブルーベリー | 果実   | 267                                      |      |



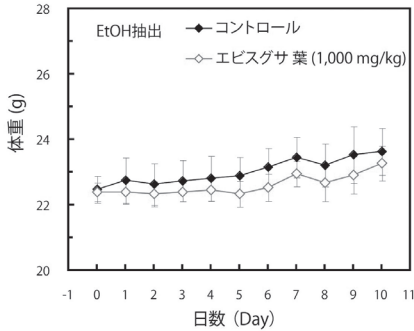
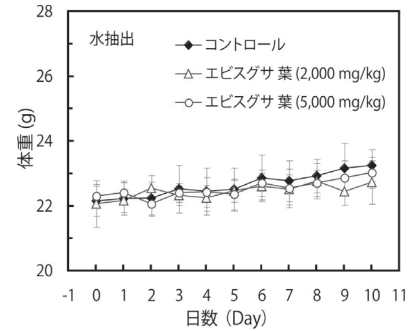
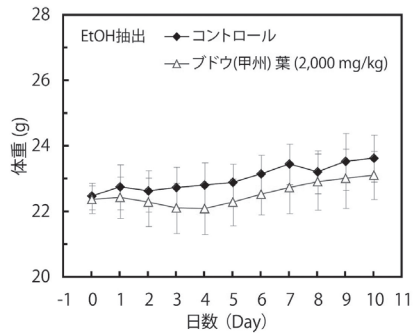
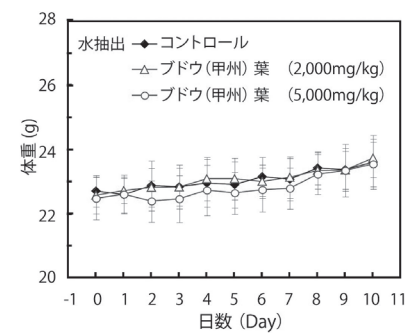
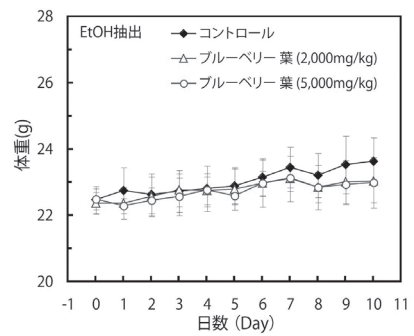
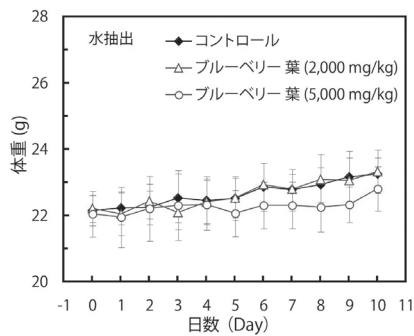


図21 水抽出エキス末の安全性確認試験（動物の体重変化）

図22 エタノール抽出エキス末の安全性確認試験（動物の体重変化）

### 3-6 健常マウスを用いた抽出物の安全性試験-2

健常マウスにブルーベリー葉、ブドウ（甲州）葉、エビスグサ葉の水抽出エキス末を2,000mg/kgおよび5,000mg/kgの割合で経口投与し、10日間毎日動物の行動および体重の測定を行った。さらにエタノール抽出エキス末も調製してマウスに投与した。ただし、ブドウ（甲州）葉とエビスグサ葉のエタノール抽出エキス末は、比較的量が確保できなかったため、投与量がそれぞれ2,000mg/kgと1,000mg/kgになってしまった。水抽出エキス末を投与した動物の体重変化を図21に、エタノール抽出エキス末を投与した動物の体重変化を図22に示す。いずれも蒸留水を投与したコントロール群と比べて有意な差は認められなかった。これらの結果から、ブルーベリー葉、ブドウ（甲州）葉、エビスグサ葉の水抽出エキス末、およびエタノール抽出エキス末の毒性は低いと考えられた。

### 3-7 腎機能障害モデルマウスを用いた腎機能障害抑制物質のスクリーニング-2

ブルーベリー葉、ブドウ（甲州）葉、エビスグサ葉の水抽出エキス末を5,000mg/kgの投与量で、シスプラチンで

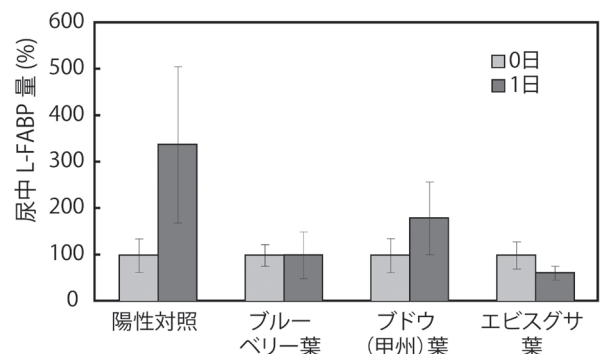


図23 3種類の水抽出エキス末（ブルーベリー、ブドウ、エビスグサ）の腎機能障害抑制効果の検討



誘導した腎機能障害モデルマウスに投与して、これらエキス末の腎機能障害抑制効果を検討した。その結果を図23に示す。尿中L-FABP量はシスプラチンを投与した陽性対照に比べドウ(甲州)葉、ブルーベリー葉、エビスグサ葉の順に減少することが示された。特にエビスグサ葉では78%までに減少した。エビスグサ葉のORAC値は543  $\mu\text{mol TE/g}$ と1000に満たないが、動物実験では腎機能障害抑制作用がある可能性が示された。ブルーベリー葉のORAC値は2871  $\mu\text{mol TE/g}$ と最も高かったが、動物実験の結果ではエビスグサ葉に劣る結果となった。

### 3-8 ウコギ中ケンフェロール類の分析ならびに抗酸化活性

ウコギ<sup>3)</sup>モモ花<sup>4)</sup>には、ケンフェロールおよびその配糖体が含まれていることが知られている。また、ケンフェロール類には、抗酸化活性があることが判明している<sup>5)</sup>。そこで、これらの成分のORAC値を測定した。表4にそれぞれのORAC値を示す。ケンフェリトリンのORAC値は20938  $\mu\text{mol TE/g}$ と非常に高い値であった。さらに、アストラガリンは17372  $\mu\text{mol TE/g}$ 、ケンフェロールで2615  $\mu\text{mol TE/g}$ であった。

表4 ケンフェロール類およびグルタチオンのH-ORAC値

| 物質名        | H-ORAC値<br>( $\mu\text{mol of TE/g}$ 粉末) |
|------------|--|
| ケンフェリトリン   | 20938                                    |
| アストラガリン    | 17372                                    |
| ケンフェロール    | 2615                                     |
| グルタチオン 還元型 | 3149                                     |

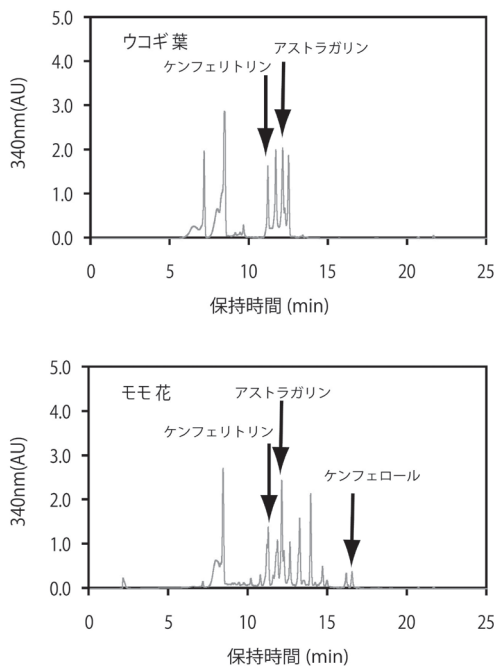


図24 ウコギ葉およびモモ花中のケンフェロール類のクロマトグラム

そこで、今回実験に用いたウコギ葉を用いて、ケンフェロール類の分析を行った(図24, 表5)。また、モモ花についても同様に分析してウコギ葉と比較検討した。ウコギ葉中にはアストラガリンが0.21mg/g、ケンフェリトリンが0.19mg/g含まれており、ケンフェロールは検出できなかった。これに対して、モモ花ではアストラガリンが0.04mg/g、ケンフェリトリンが0.02mg/g、ケンフェロールが0.01mg/g検出された。従って、ウコギ葉の方がモモ葉よりアストラガリンが5倍、ケンフェリトリンが10倍多く含まれていることがわかった。

表5 ウコギおよびモモ花中のケンフェロール類の含量

| 物質名      | 含有量(mg/g) |      |
|----------|-----------|------|
|          | ウコギ葉      | モモ花  |
| ケンフェリトリン | 0.19      | 0.02 |
| アストラガリン  | 0.21      | 0.04 |
| ケンフェロール  | N.D.      | 0.01 |

### 3-9 マウスへのケンフェロール類の投与実験

ウコギ葉に含まれるケンフェリトリンおよびアストラガリン、ならびにケンフェロールを腎機能障害モデルマウスに投与した場合の腎機能障害抑制作用について検討した。まず、腎機能障害モデルマウスを用いる前にケンフェリトリン、アストラガリン、ケンフェロールを健常マウスに投与して安全性の検討を行った。32mg/kgの投与量で3つの化合物をマウスに一回経口投与して10日間体重の変化を測定した。全ての化合物で、体重はコントロール群と有意な違いは認められなかった(図25)。

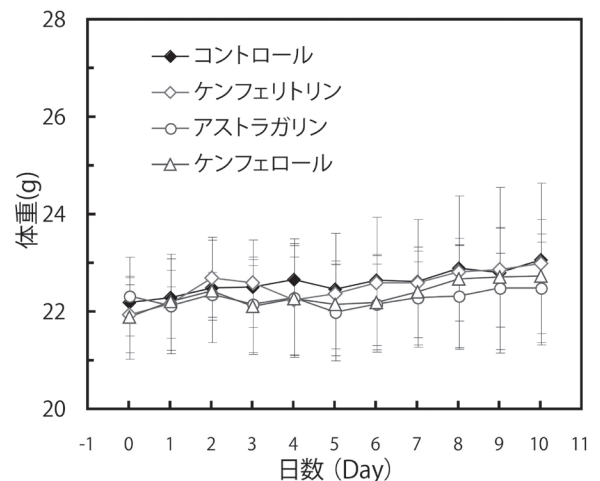


図25 ケンフェロール類の安全確認性試験

そこで、腎機能障害モデルマウスを用いて、尿中L-FABP量を指標にして、3つの化合物の腎機能障害抑制効果を検討した。その結果を図26に示す。アストラガリン投与群ではシスプラチンのみを投与した陽性対照と同程度の尿中L-FABP量であった。ケンフェリトリン

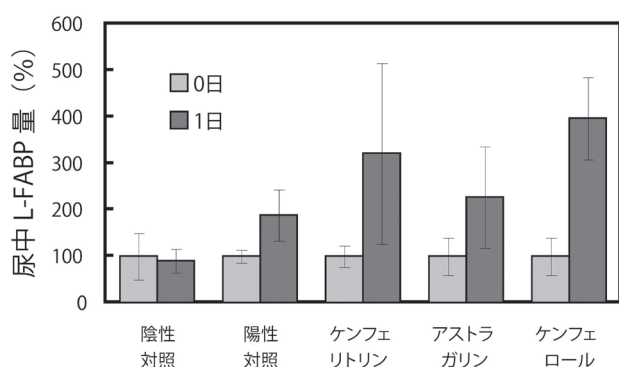


図26 ケンフェロール類の腎機能障害抑制効果の検討

とケンフェロールを投与した場合、尿中L-FABP量は陽性対照群より高くなることが示された。これらの結果から、32mg/kgのアストラガリン、ケンフェリトリンならびにケンフェロールには腎機能障害抑制効果は示されないことが明らかとなった。

#### 4. 結 言

- 山梨県に由来のある植物等について抗酸化活性の指標であるORAC値を計測したところ、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。
- 腎機能障害モデルマウスを用いて尿中L-FABPを指標にして腎機能障害抑制作用を調べた。その結果、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）葉の水抽出エキスで腎機能障害抑制効果が確認された。
- 植物などに含まれていることが知られており、ORAC値が高いケンフェロール類について、ウコギ葉とモモ花で分析を行った。その結果、ウコギ葉にはケンフェロールの配糖体であるアストラガリンとケンフェリトリンが、モモ花にはケンフェロール、アストラガリン、ケンフェリトリンの3種類が含まれていることが確認された。
- ケンフェロール類を腎機能障害モデルマウスに投与したところ、腎機能障害抑制効果は確認されなかった。
- 腎機能障害モデルマウス作成における腎機能障害の強さにバラツキが多いこと等データに不安定要素がある。このことから、今後評価方法について再考し、安定した結腎機能障害モデルマウスの作成方法および腎機能抑制評価方法を考える必要がある。

#### 参考文献

- 1) Kawai Y. : Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences. 1, 129-134 (2007)
- 2) Conklin K.A. : Nutrition and Cancer. 37, 1-18 (2000)

- 3) 戸沢 一宏:山梨県森林総合研究所 事業報告, 28-29, (2011)
- 4) 田中 咲穂, 北島 潤一, 昭和薬科大学漢方治療学教室卒業論文集,62-96 (2014)
- 5) Calderón-Montaño J.M., Burgos-Morón E., Pérez-Guerrero C., López-Lázaro M.:Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11, 298-344 (2011)