

研究結果説明書（中間状況）

平成26年度（No.26-1）

| 研究課題名 | 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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------------------------------------|-------|------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---|------|--|-----|---|------|---|-----|------|------|----|----|---|------|--|-----|---|------|----|----|---|------|-------|-----|---|------|--|----|---|-----|------|-----|---|-----|------|-----|------|-----|------|----------|-----|-----|--|---------|-----|-----|--|----|-----|-----|--|-----|----|-----|----|------|---|-----|--|-------|---|-----|--|-----|---|-----|--|-------|---|-----|--|--------|----|-----|--|-------|---|-----|--|-----------|---|-----|--|--------|-----|----|--|------|-----|----|--|
| 研究期間 | 平成26年度 ～ 28年度 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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、尾形美貴 富士山科学研究所：長谷川達也 昭和薬科大学）：北島潤一、高野明人 シミックバイオリサーチセンター：小松弘幸 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 研究の目的 | <p>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。</p> <p>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。</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 研究の進捗状況 | <p>1. 植物の抗酸化活性値の測定</p> <p style="text-align: center;">表-1 植物等のH-ORAC値</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;"></th> <th style="width: 15%;">種名</th> <th style="width: 15%;">部位</th> <th style="width: 20%;">H-ORAC値 ($\mu\text{mol of TE/g}$粉末)</th> <th style="width: 30%;">備考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="15" style="vertical-align: top; padding: 5px;"> L-FABPを排出の原因となる要素は、活性酸素の尿管細胞への攻撃である事から、抗酸化活性値の高い植物エキスを接種する事によりL-FABPの排出を押さえることできるのではないかと考え、抗酸化活性値を測定した。測定方法は、凍結乾燥した植物を粉末にし、高速溶媒抽出装置により抽出し、植物の標準的な抗酸化活性値を測定した。測定結果は、表-1の通り。ブルーベリー、ウコギの抗酸化活性値が高い事が判明した。 </td> <td>ブルーベリー</td> <td>葉</td> <td>2871</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ウコギ</td> <td>葉</td> <td>1568</td> <td>葉</td> </tr> <tr> <td>ブドウ</td> <td>葉+葉柄</td> <td>1186</td> <td>甲州</td> </tr> <tr> <td>モモ</td> <td>花</td> <td>1109</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ブドウ</td> <td>葉</td> <td>1081</td> <td>甲州</td> </tr> <tr> <td>モモ</td> <td>蕾</td> <td>1041</td> <td>花粉取機後</td> </tr> <tr> <td>アケビ</td> <td>葉</td> <td>1009</td> <td></td> </tr> <tr> <td>モモ</td> <td>花</td> <td>869</td> <td>温風乾燥</td> </tr> <tr> <td>ブドウ</td> <td>葉</td> <td>837</td> <td>ピオーネ</td> </tr> <tr> <td>ブドウ</td> <td>葉+葉柄</td> <td>797</td> <td>ピオーネ</td> </tr> <tr> <td>スペインカンゾウ</td> <td>地上部</td> <td>679</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ウラルカンゾウ</td> <td>地上部</td> <td>663</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ウド</td> <td>地上部</td> <td>632</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ブドウ</td> <td>葉柄</td> <td>624</td> <td>甲州</td> </tr> <tr> <td>朝鮮人参</td> <td>葉</td> <td>548</td> <td></td> </tr> <tr> <td>エビスグサ</td> <td>葉</td> <td>543</td> <td></td> </tr> <tr> <td>アケビ</td> <td>蔓</td> <td>337</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ラベンダー</td> <td>蕾</td> <td>305</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ブルーベリー</td> <td>果実</td> <td>267</td> <td></td> </tr> <tr> <td>コシアブラ</td> <td>葉</td> <td>240</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ギョウジャニンニク</td> <td>葉</td> <td>158</td> <td></td> </tr> <tr> <td>ブナハリタケ</td> <td>子実体</td> <td>64</td> <td></td> </tr> <tr> <td>マスタケ</td> <td>子実体</td> <td>41</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>、ブルーベリー葉、ブドウ（甲州）葉、エビスグサ葉</p> <p>2. 植物等の選定</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 抗酸化活性値および利尿作用などを考慮し、以下のものを選抜した ○ ● 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 | | 種名 | 部位 | H-ORAC値 ($\mu\text{mol of TE/g}$ 粉末) | 備考 | L-FABPを排出の原因となる要素は、活性酸素の尿管細胞への攻撃である事から、抗酸化活性値の高い植物エキスを接種する事によりL-FABPの排出を押さえることできるのではないかと考え、抗酸化活性値を測定した。測定方法は、凍結乾燥した植物を粉末にし、高速溶媒抽出装置により抽出し、植物の標準的な抗酸化活性値を測定した。測定結果は、表-1の通り。ブルーベリー、ウコギの抗酸化活性値が高い事が判明した。 | ブルーベリー | 葉 | 2871 | | ウコギ | 葉 | 1568 | 葉 | ブドウ | 葉+葉柄 | 1186 | 甲州 | モモ | 花 | 1109 | | ブドウ | 葉 | 1081 | 甲州 | モモ | 蕾 | 1041 | 花粉取機後 | アケビ | 葉 | 1009 | | 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 | | 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 | | ブナハリタケ | 子実体 | 64 | | マスタケ | 子実体 | 41 | |
| | 種名 | 部位 | H-ORAC値 ($\mu\text{mol of TE/g}$ 粉末) | 備考 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-FABPを排出の原因となる要素は、活性酸素の尿管細胞への攻撃である事から、抗酸化活性値の高い植物エキスを接種する事によりL-FABPの排出を押さえることできるのではないかと考え、抗酸化活性値を測定した。測定方法は、凍結乾燥した植物を粉末にし、高速溶媒抽出装置により抽出し、植物の標準的な抗酸化活性値を測定した。測定結果は、表-1の通り。ブルーベリー、ウコギの抗酸化活性値が高い事が判明した。 | ブルーベリー | 葉 | 2871 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ウコギ | 葉 | 1568 | 葉 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ブドウ | 葉+葉柄 | 1186 | 甲州 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | モモ | 花 | 1109 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ブドウ | 葉 | 1081 | 甲州 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | モモ | 蕾 | 1041 | 花粉取機後 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | アケビ | 葉 | 1009 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ブナハリタケ | 子実体 | 64 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| マスタケ | 子実体 | 41 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

3. 水抽出エキス末の作成

- 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。

4. 腎機能障害モデルマウスの作成

- 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。

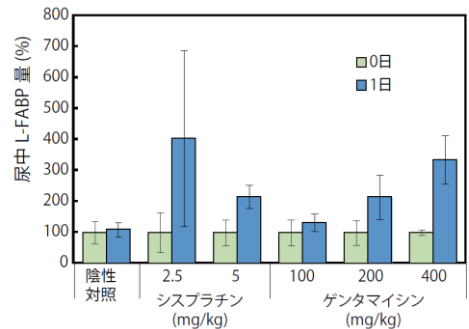


図1 惹起物質および投与量の検討

- 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。

5. 水抽出エキスの安全性確認試験

- 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。その結果、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。

6. 腎機能障害抑制効果確認試験

植物エキスが腎機能障害を抑制することを確認するため、Tgマウスに植物エキスを与えたのち、シスプラチンを投与し、L-FABPの上昇について検討した。

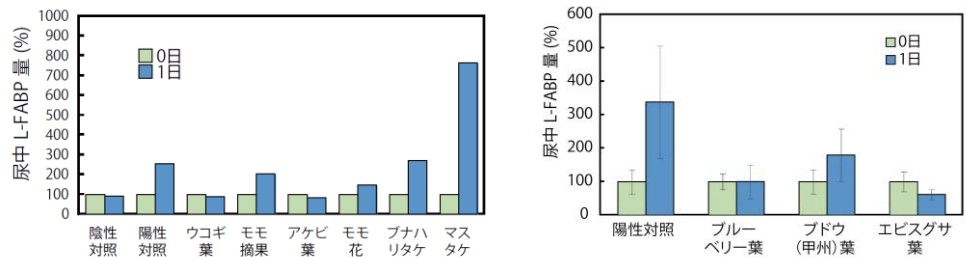


図2 植物エキスの腎機能障害抑制試験1

この結果、ウコギ、アケビ、ブルーベリー、エビスグサ等でL-FABP排出抑制効果が確認された。しかし、陽性対象のマウスでも、必ずしもL-FABP排出量が上昇するマウスのみではないため、シスプラチンに対する応答が悪い個体もあるように思われた。そこで、陽性試験でシスプラチン投与で、L-FABP排出量が上がる個体を選抜し、植物エキスの効果について検討した。

陽性対照試験の上昇割合の平均値が429.16であったので、ブルーベリーの5000mg/kg以外は効果が確認された。

ブルーベリー5000mg/kgは、安全性確認試験では問題がなかったものの、Tgマウスでは、5検体とも下痢の症状が確認されたため、残りの5検体については、エキス量を2500mg/kgで試験を行った。その結果、ブルーベリーについても効果が確認された。

研究継続の必要性

Tgマウスを用いた試験では、まだデータにばらつきがあるものの効果が確認されつつあると思われる。

今後も、データの集積を行い、データの解析手法を考慮しながら、より確実な効果を確認できると考えられるため、継続して研究することが必要である。