

# 高脂肪高果糖飼料飼育マウスにおける雲南百薬 (*Anredera cordifolia*)

## エキスの肝障害改善効果

芳野恭士 \*1・嘉島康二 \*2・丸山浩司 \*3

### *Anredera cordifolia* Extracts Effectively Ameliorate Hepatic Disorders in High Fat and High Fructose Diet-Fed Mouse Model

Kyoji YOSHINO \*1, Koji KAJIMA \*2, Koji MARUYAMA \*3

Abstract: We investigated the preventive effects of the extracts of the leaves of Madeira vine (*Anredera cordifolia*) on hepatic disorders in mice fed high fat and high fructose diet. Aqueous solutions of water extract, ethanol extract, and methanol extract prepared from the leaves of *A. cordifolia* were administered to nine-week-old male C57BL/6J mice as a drinking water for 42 days. Plasma PAI-1 and TNF- $\alpha$  levels in high fat and high fructose diet-fed mice were higher than those of normal diet-fed mice, then high fat and high fructose diet-fed mice would be obese. Liver total cholesterol and triglyceride levels in high fat and high fructose diet-fed mice were higher than those of normal diet-fed mice. Fatty liver was observed in high fat and high fructose diet-fed mice. Plasma TBARS, 8-OHdG, uric acid, and IFN- $\gamma$  levels, markers for oxidative stress and inflammation, were also elevated in high fat and high fructose diet-fed mice. These changes were suppressed by simultaneous administration of the extracts of *A. cordifolia*. The active components for the preventive effects of *A. cordifolia* on metabolic syndrome and liver disorders in mice would be some polyphenols and triterpenoid saponins.

Key Words: Madeira vine, *Anredera cordifolia*, Hepatic disorder, Mouse

#### 1. はじめに

アカザカズラ (*Anredera cordifolia*) は、南米原産のツルムラサキ科のつる性多年草であり、日本では「雲南百薬」あるいは「オカワカメ」とも呼ばれている。その葉や球茎が食用とされており、民間薬としても中国で糖尿病、炎症あるいは肝臓病等に使用されてきた[1]。雲南百薬には、これまでに根のエキスの抗菌作用[2]や全草エキスの抗ウイルス作用[3]、食用部位エキスの抗変異原作用[4]、葉エキスの皮膚繊維芽細胞によるコラーゲン合成促進作用[5]、葉や茎エキスの出産後の体調調節作用[6]、葉エキスのラット胃底部筋肉に対する弛緩作用[7]といった多様な効果が知られている。また、葉エキスの肥満ラットに対する肥満

抑制作用と脂質低下作用[1]、葉エキスのラットにおける血糖低下作用[8]、葉、茎、球茎エキスの薬物誘発でのラット肝炎に対する抑制作用[9]が報告されてきた。同属の *Anredera diffusa* エキスには、傷治癒作用が認められている[10]。我々も、これまでに高脂肪高果糖飼料飼育マウスを用いて、雲南百薬の葉エキスの代謝症候群改善作用や酸化ストレス抑制作用について報告してきた[11-13]。

厚生労働省の「平成 25 年度国民健康・栄養調査」によると、日本人の男性の 28.6%、女性の 20.3%が肥満であると報告されている。その原因としては、食生活における過剰な脂質と糖の摂取が挙げられる[14]。肥満は、糖尿病や高脂血症、高血圧といった生活習慣病の発症と関係があると考えられており、これらはさらに重篤な動脈硬化等の循環器障害を引き起こす可能性が高い[15]。そのため、内臓脂肪型肥満に高血糖、高脂血症あるいは高血圧のうちの 2 つを併発した状態を代謝症候群と呼ぶようになった[16]。また、肥満そのものも、変形性関節症[17]や非アルコール性肝炎 (NASH) [18]などの疾病と関連があるとされている。多量の脂質が肝臓に蓄積されると脂肪肝となり、M1M $\phi$ 等の炎症性免疫細胞が産生する活性酸素による酸

\*1 物質工学科

Department of Chemistry and Biochemistry

\*2 応用薬理研究会

The Japanese Society of Pharmacometrics

\*3 ㈱三協ホールディングス

Sankyo Holdings Co., Ltd.

化ストレスを受けて、肝炎や肝硬変を発症して肝機能が低下する恐れがある。

本研究では、高脂肪高果糖飼料飼育マウスにおける肝障害に対する、雲南百葉の葉エキスの改善作用について検討した。

## 2. 材料および方法

### 2. 1 雲南百葉の葉エキスの調製

静岡県富士市で栽培された雲南百葉の乾燥葉を用いて、既報の方法[13]で水エキス、エタノール (EtOH) エキスおよびメタノール (MeOH) エキスを調製した。

### 2. 2 実験動物

本実験では、マウスは 12 時間間隔で照明が点灯、消灯する 25°C の部屋で飼育し、実験中は飲料水と飼料を自由に摂取させた。

### 2. 3 高脂肪高果糖飼料によるマウスの飼育

日本 SLC 社より購入した 9 週齢の雄性 C57BL/6J 系マウスを用い、Sato ら[19]の方法に従って代謝症候群のモデルを作成した[11]。マウスを 1 群 5 匹として、健常群、高脂食群、水群、EtOH 群、MeOH 群の 5 群に分けた。飼料は、健常群には通常食として PMI 社製の 5L37 を、その他の群には高脂肪高果糖食として同社製の 58TQ を与えた。飲料水は、水群、EtOH 群、MeOH 群にはそれぞれ雲南百葉の葉の水エキス、EtOH エキス、MeOH エキスの水溶液を与え、その他の群には水道水を与えた。マウスは 42 日間飼育し、その後エーテル麻酔下で血液および肝臓を採取した。動物の取扱いは、文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠した「沼津工業高等専門学校における動物実験に関する指針」に従った。

### 2. 4 マウス試料の分析

マウスから採取した血液は、4 °C、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、その上清を血漿として用いた。肝臓については、0.04 M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて 5% ホモジネートを調製して用いた。

血中プラスミノーゲン活性化抑制因子-1 (PAI-1) レベルは Innovative Research 社製 Mouse PAI-1 Total Antigen ELISA Kit、血中腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) レベルは eBioscience 社製 Mouse TNF alpha ELISA を用いて測定した。

肝臓の総コレステロール (TC) およびトリグリセリド

(TG) のレベルについては、Folch 法[20]で脂質を抽出した後、和光純薬工業社製コレステロール E-テストワコーおよびトリグリセライド E-テストワコーを用いて測定した。

血中過酸化脂質レベルとしてチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) レベルを Yagi の方法[21]で測定し、マロンジアルデヒド相当量として算出した。血中 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) のレベルは、日研ザイル社製 New 8-OHdG Check ELISA を用いて測定した。血中尿酸レベルは、和光純薬工業社製尿酸 C-テストワコーを用いて測定した。血中インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) のレベルは R&D systems 社製 Quantikine ELISA mouse IFN- $\gamma$  Immunoassay を用いて測定した。

### 2. 5 統計処理

動物実験で得られたデータは、平均値±標準誤差で表した。各群間の平均値の差の検定には、一元配置分散分析法と Tukey の多重比較法を用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとした。

### 2. 6 糖類およびポリフェノール類の総量の測定

雲南百葉の葉の水エキス、EtOH エキスおよび MeOH エキスについて、糖類の総量をアントロン硫酸法[22]を用いて測定した。糖量は、グルコース相当量として算出した。また、各エキスのポリフェノール類の総量を、フォーリン-チオカルトール法[23]を用いて測定した。ポリフェノール量は、没食子酸エチル相当量として算出した。同様の実験を 3 回行い、データは平均値±標準偏差で表した。

### 2. 7 DART-TOF-MS によるサポニン類の定性分析

雲南百葉の葉の水エキス、EtOH エキスおよび MeOH エキスについて、リアルタイム直接分析 (DART) -飛行時間型質量分析 (TOF-MS) 法を用いて、含有されるサポニン類の存在を検討した。質量分析の条件は、装置は JEOL 社製 DART イオン源装着 JMS-T100LC AccuTOF™ LC-TOFMS、イオン化ガスはヘリウム、ガス温度は 350°C、正イオンモードで測定した。

## 3. 結果および考察

マウスの体重、脂肪重量および肝臓重量は、健常群に比較して高脂食群で上昇し、高脂食群のマウスで肥満を発症したことが確認されている[13]。これらの値の上昇は、EtOH 群と MeOH 群で抑制される傾向が見られた[13]。本研究では、肥満のマーカーとしてさらに血中 PAI-1 および TNF- $\alpha$  のレベルを測定したが、各レベルともに健常群

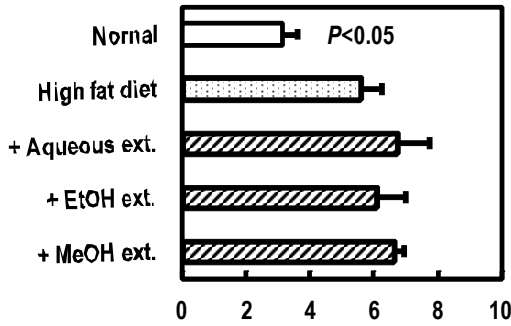


Fig.1 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse plasma PAI-1 (pg/mL).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

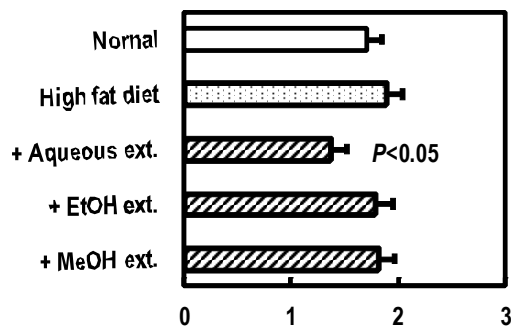


Fig.2 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse plasma TNF-α (pg/mL).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

に比較して高脂食群で上昇した (Fig.1, Fig.2)。このうち、TNF-αのレベルは水群でその上昇が抑制された。

肝臓中の TC と TG のレベルは、健常群に比較して高脂食群で上昇する傾向が見られた (Fig.3, Fig.4)。高脂食群では高脂血症も見られ[13]、脂質代謝異常症を発症していることが確認された。血中 PAI-1 レベルの上昇と合わせると血圧の上昇が予想され、本動物モデルは代謝症候群を発症しているものと予想される。実際、本動物モデルで血圧の上昇が確認されている[24]。EtOH 群と MeOH 群では、肝臓中の脂質レベルの上昇を抑制する傾向が見られた。目視においても、高脂食群の肝臓は白色で肥大しており脂肪肝の形成が認められたが、これは雲南百薬の葉の各エキスの投与で抑制された。

血中グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼおよびグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼの各レベルは、健常群に比較して高脂食群で上昇する傾向が見られ、高脂食群における肝機能障害の発症が確認されている[12]。これらの障害は、雲南百薬の葉エキスの投与で抑制される傾向が見られ、特に EtOH エキスと MeOH エキスで効果が強いことがわかっている。

肝臓の機能障害と関連があると考えられる因子に酸化

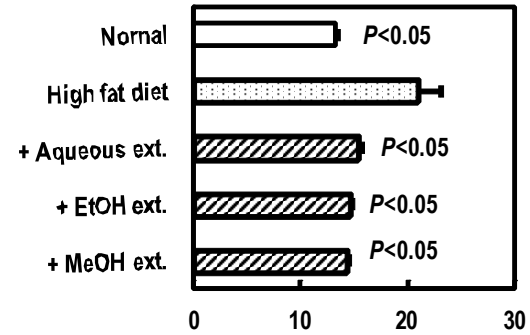


Fig.3 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse liver TC (mg/g).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

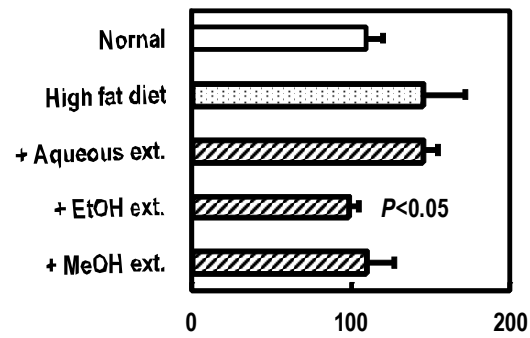


Fig.4 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse liver TG (mg/g).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

ストレスと炎症がある。肝臓中の TBARS のレベルは、健常群に比較して高脂食群で上昇し、雲南百薬の葉エキスの投与でその上昇が抑制される傾向が見られている[13]。全身の酸化ストレスマーカーについても、尿中 8-OHdG のレベルは、健常群に比較して高脂食群で上昇し、雲南百薬の葉エキス投与群でその上昇が抑制されることがわかっている[13]。本実験では同マーカーとしてさらに、血中 TBARS、8-OHdG さらには尿酸の各レベルを測定したが、尿中 8-OHdG レベルと同様の変動が見られた (Fig.5～Fig.7)。また、全身の炎症マーカーとして血中 IFN-γのレベルを測定し、これについても同様の変動が見られた (Fig.8)。尿酸は、核酸や核酸代謝のマーカーであるが、近年、酸化ストレスや代謝症候群のマーカーとしても認識されつつある[25]。

以上の結果から、雲南百薬の葉の水エキス、EtOH エキスおよび MeOH エキスには、高脂肪高果糖飼料摂取によるマウスの肥満、脂質代謝異常症、酸化ストレス、炎症、さらには肝機能障害等を予防する効果があるものと考えられる。雲南百薬の葉エキス[2]や *Anredera diffusa* エキス[10]には細胞毒性は認められず、安全な食材と考えられることから、その有用性が期待される。

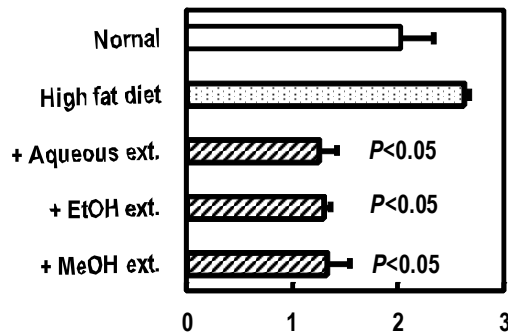


Fig.5 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse plasma TBARS (nmol/mL).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

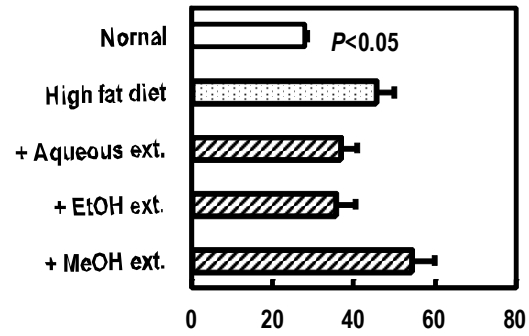


Fig.8 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse plasma IFN- $\gamma$  (pg/mL).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

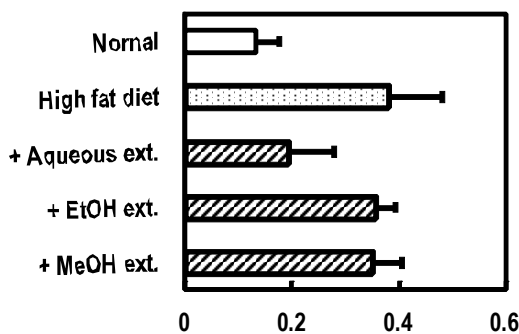


Fig.6 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse plasma 8-OHdG (pg/mL).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

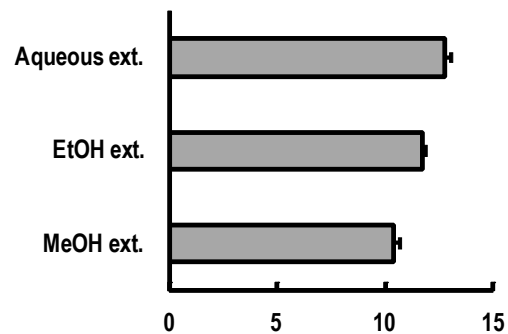


Fig.9 Total saccharide contents of *Anredera cordifolia* extracts (% w/w as glucose).

Values are means  $\pm$  SD, n=3.

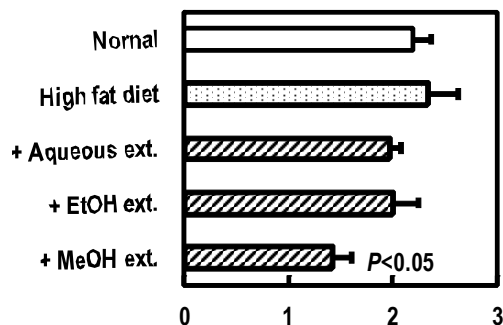


Fig.7 Effects of *Anredera cordifolia* on mouse plasma uric acid (mg/dL).

Values are means  $\pm$  SE, n=5.

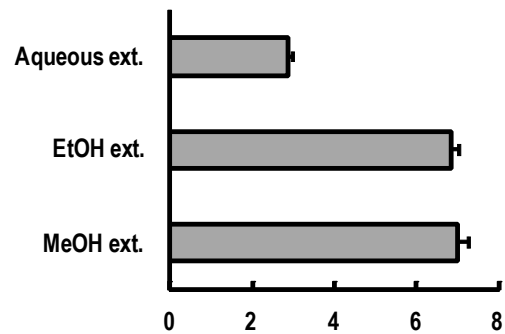


Fig.10 Total polyphenol contents of *Anredera cordifolia* extracts (% w/w as ethyl gallate).

Values are means  $\pm$  SD, n=3.

雲南百葉の葉は、肉厚でデンプンを多く含むとともに[26]、モロヘイヤ (*Corchorus olitorius*) の葉などと同様に粘性多糖に富んでいる。そこで、3種類のエキスについて糖類の総量を測定したところ、水エキスの糖含量が最も高く、次に EtOH エキスで高かった (Fig.9)。

一方、ポリフェノール類は植物に普遍的に含まれる成分の一つであり、茶のカテキン類のように、糖や脂質の吸収抑制作用[27]、酸化ストレスや炎症の抑制作用[28,29]といった保健作用が報告されているものが多い。そこで、3種

類のエキスについてポリフェノール類の総量を測定した。EtOH エキスと MeOH エキスのポリフェノール含量に差は見られず、いずれも水エキスに比較して高かった (Fig.10)。水エキスに比較して EtOH エキスと MeOH エキスで高い代謝症候群抑制効果が見られる傾向にあることから、雲南百葉の葉に含まれるポリフェノール類は、その作用に関与している可能性があるものと考えられる。

多糖以外の成分として、雲南百葉の葉[8,30]や球莖[31]中のトリテルペノイドサポニンが知られている。葉エキス

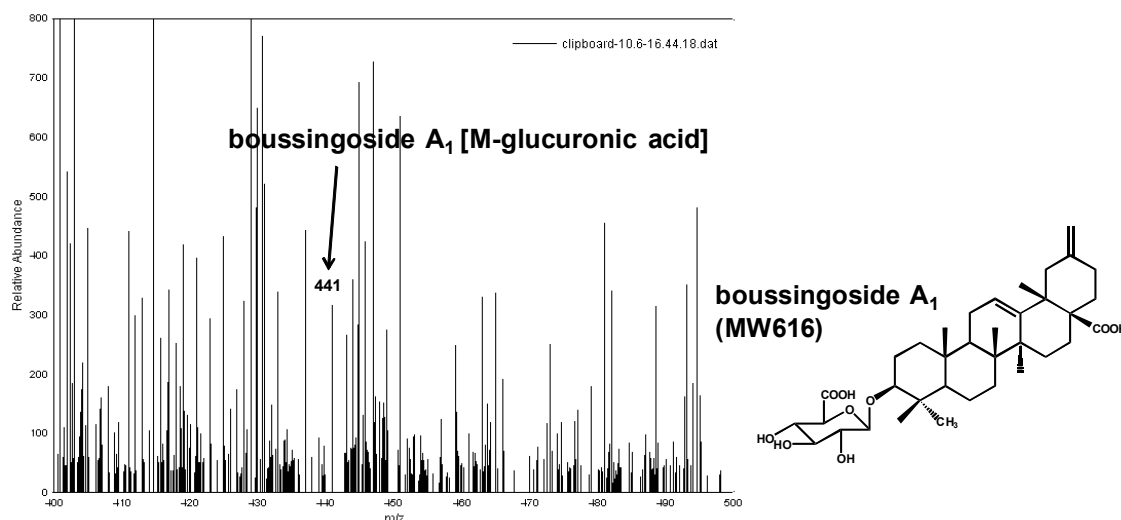


Fig.11 DART - TOF spectrum of MeOH extract of *Anredera cordifolia*.

の糖吸収抑制作用には、特にトリテルペノイドサポニンの boussingoside A<sub>1</sub> が関与していることが報告されている [8]。そこで、雲南百薬の各エキス中の boussingoside A<sub>1</sub> について、DART-TOF-MS による定性分析を行った。boussingoside A<sub>1</sub> の分子量は 616 であり、アグリコンの部分の分子量は、グルクロン酸 1 つ分少ない 441 である。各エキスとも、m/z 616 には分子イオンピークは見られなかったが、m/z 441 に明確なピークが見られたことから、boussingoside A<sub>1</sub> の存在が推測された。m/z 441 のピーク強度を比較すると、EtOH エキスと MeOH エキスはほぼ同じで、水エキスではそれらより低かった。例として MeOH エキスのスペクトルを Fig.11 に示す。雲南百薬の葉エキスが示す代謝症候群抑制効果に、サポニンが関与している可能性が示唆された。

アカザカズラの代謝症候群抑制効果に関する作用機序に関する報告は少なく、葉エキスの肥満抑制作用に脂肪前駆細胞での AMP 誘発プロテインキナーゼの活性化が関与することが知られている程度である [32]。今後、雲南百薬の保健作用に関与する有効成分とその作用機序についての検討を行う必要がある。

#### 4. 参考文献

- [1] L. Wang, C. Y. Bang, *et al.* (2011): *J. Med. Food*, **14**, 17-25.
- [2] T. E. Tshikalange, J. J. Meyer, *et al.* (2005): *J. Ethnopharmacol.*, **96**, 515-519.
- [3] L.-C. Chiang, H.-Y. Cheng, *et al.* (2003): *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1600-1604.
- [4] G. C. Yen, H. H. Peng, *et al.* (2001): *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 1045-1053.
- [5] M. Takahashi, K. Takara, *et al.* (2012): *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 2317-2320.
- [6] K. Panyaphu, T. V. On, *et al.* (2011): *J. Ethnopharmacol.*, **135**, 226-237.
- [7] W.-C. Lin, S.-C. Wu, *et al.* (1996): *Phytother. Res.*, **10**, 625-627.
- [8] A. Espada, J. Rodriguez, *et al.* (1990): *Can. J. Chem.*, **68**, 2039-2044.
- [9] C.-C. Lin, T.-C. Sung, *et al.* (1994): *Phytother. Res.*, **8**, 201-207.
- [10] L. F. Villegas, I. D. Fernandez, *et al.* (1997): *J. Ethnopharmacol.*, **55**, 193-200.
- [11] 丸山浩司, 新井康介, 他 (2014): *応用薬理*, **87**, 21-24.
- [12] 丸山浩司, 山田瑞恵, 他 (2015): *応用薬理*, **88**, 47-51.
- [13] 丸山浩司, 芳野恭士, 他 (2016): *応用薬理*, **90**, 25-30.
- [14] K. Sato, H. Arai, *et al.* (2008): *J. Med. Invest.*, **55**, 183-195.
- [15] 小森昭二 (2006): *日本栄養・食糧学会誌*, **59**, 97-105.
- [16] 河合俊英, 伊藤 裕 (2007): *Functional Food*, **1**, 18-22.
- [17] 高澤俊治 (2005): *順天堂医学*, **51**, 202-209.
- [18] 米谷政志 (2014): *日本消化器病学会雑誌*, **111**, 35-41.
- [19] A. Sato, H. Kawano, *et al.* (2010): *Diabetes*, **59**, 2495-2504.
- [20] J. Folch, I. Ascoli, *et al.* (1951): *J. Biol. Chem.*, **191**, 833-841.
- [21] K. Yagi (1976): *Biochem. Med.*, **15**, 212-216.

- [22] T. A. Scott, Jr., E. H. Melvin (1953): *Anal. Chem.*, **25**, 1656-1661.
- [23] V. L. Dressler, E. L. Machado, *et al.* (1995): *Analyst*, **120**, 1185-1188.
- [24] 丸山浩司, 嘉島康二 (2015): *応用薬理*, **89**, 59.
- [25] 益崎裕章, 中山良朗, 他 (2013): *成人病と生活習慣病*, **43**, 994-1000.
- [26] 藤本滋生, 山中 修, 他 (1990): *鹿児島大学農学部学術報告*, **40**, 49-54.
- [27] 松本なつき, 原 征彦 (1992): *食品工業*, **35**, 26-30.
- [28] 芳野恭士, 渭原 寛, 他 (2006): *J. Technol. Educ.*, **13**, 1-7.
- [29] 芳野恭士, 近藤郁美子, 他 (2014): *J. Technol. Educ.*, **21**, 45-51.
- [30] A. Espada, J. Rodriguez, *et al.* (1991): *Liebigs Ann. Chem.*, **1991**, 291-293.
- [31] A. Espada, R. Riguera, *et al.* (1997): *J. Nat. Prod.*, **60**, 17.
- [32] H. Kim, S.-Y. Choung (2012): *J. Med. Food*, **15**, 811-817.