

氏名	ジョー ハイ 徐 萍
本籍（国籍）	中国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連論第 160 号
学位授与年月日	平成 26 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当論文博士
研究科及び専攻	連合農学研究科
学位論文題目	桑枝条抽出物によるアンチエイジングの機能解析 (Functional analysis of mulberry twig extract on anti-aging)
学位審査委員	主査 准教授 小藤田 久義 副査 准教授 小田 伸一 副査 教授 高橋 孝悦 副査 准教授 木下 幹朗

## 論文の内容の要旨

落葉樹クワ科クワ属の桑はカイコの食餌植物として利用されることだけではなく、漢方薬と健康茶として愛用され、現代薬理学の分野において各種の生理活性について研究されている。桑葉には抗糖尿病、抗炎症、美白などの作用、桑根には抗ガン、抗肥満、肝臓保護などの作用、桑実には抗酸化、神経保護などの作用、桑の樹皮には免疫賦活、抗酸化、抗炎症などの作用があるという報告がされている。しかしながら、桑枝条の大部分が廃棄され、その上これまで桑枝条についての知見は極めて少ない。そこで、本研究では桑枝条のアンチエイジング機能を解析することを目的し、QOL 向上の桑の新しい機能開発を目指した。

第一章では、桑枝条のアンチエイジングの機能を解析するためには、まず第一に、脳老化モデルを確立する必要があると考えられる。D-galactose の長期投与は酸化ストレス、認知機能障害、神経損傷、遺伝子転写の変化、免疫機能障害などの自然老化に似た変化を誘導することが報告され、老化モデルとして使用されている。しかしながら、報告されているマウスへの D-galactose の投与量は広範囲となっているが、その科学的な妥当性が求められる。そこで、老化モデルを確立するため、C57BL/6J マウスにおける D-galactose による老化モデルの惹起の検討をおこなった。12 週齢の C57BL/6J 系統マウスに D-galactose 200mg/kg、400mg/kg、800mg/kg を皮下注射し、脳神経系の老化の評価を目的とし、文脈学習・記憶能を分析するためのステップスルー型受動的回避実験と空間学習・記憶能を分析するためのモリス水迷路実験の 2 種類の行動実験による解析をおこなった。ステップスルー型受動回避実験は明室に入ったマウスが暗室に進入すると電気ショックを受けるという記憶を学習させ、その 24 時間後にその記憶の定着状況を計測するものである。コントロール群（NC 群）に比べて、D-galactose 投与群（200mg/kg、400mg/kg、800mg/kg）ではいずれも暗室に入るまでの潜伏時間では有意な差が認められなかった。一方、モリス水迷路実験においては実験用プール内の水面下に設置したプラットフォームの位置をマウスに 7 日間にわたり学習させる訓練をおこない、

プールへの投入からそのプラットフォームにたどり着くまでの反応潜時から学習・記憶の推移を比較した。結果は各訓練群 1 日目を基準に、D-galactose 400mg/kg 投与群では 5 と 6 日目で、D-galactose 800mg/kg 投与群では 5 と 7 日目で、平均反応潜時の有意な短縮が認められた。また、8 日目には水面下に設置していたプラットフォームを撤去し、プールに投入したマウスがプラットフォームの元位置を記憶しているかを評価するプローブテストを実施した。結果はプラットフォームの元地点でのクロッシング回数が 4 群の間に有意な差が認められなかった。さらに、プラットフォームがあった領域での滞在率が NC 群ならびに D-galactose 800mg/kg 投与群とも、他の領域での滞在率よりも有意に高かった。これらの行動実験結果から、8 週間にわたり D-galactose 200mg/kg、400mg/kg、800mg/kg の皮下注射によりマウスの文脈学習・記憶能及び空間学習・記憶能が低下することは認められなかった。

一方、D-galactose による組織への影響の評価を目的とし、脳、心臓、肝臓、脾臓、肺および腎臓の組織学的観察をヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) で行った。その結果、D-galactose 投与群と NC 群には差が認められなかった。

以上の行動実験と組織学的解析から、D-galactose による C57BL/6J マウスの老化促進は惹起することなく、これまでの多くの報告に対して、改めて普遍性を再検討する必要がある。

第二章では選抜淘汰され遺伝的に固定した老化促進を特性とする SAM 系統マウスを使用した。学習・記憶に欠陥を有する SAM-P8 マウスを老化群とし、老化抵抗の特徴を持っている SAM-R1 マウスを対照群とした。さて、桑枝条には鎮痛、抗炎症、抗酸化、神経保護などの作用が報告されている。また、50%エタノール抽出法では多糖類、ポリフェノール、アルカロイド、アミノ酸、ビタミン類などの多様な生理活性物質の抽出が可能であると考えられる。

そこで、桑枝条の 50%エタノール抽出物 (MTE) を SAM-P8 マウスに経口投与し、*In vivo* での脳神経系への影響の評価を目的とし、第一章と同様なステップスルー型受動回避実験とモリス水迷路実験の 2 種類の行動実験の解析をおこなった。なお、*N*-アセチル-L-システイン (NAC) は既知の酸化防止剤として加齢に伴う機能障害を改善し、ポジティブコントロール群の試薬として投与した。結果では、ステップスルー型受動回避実験において、電気ショックを受ける 24 時間後に暗室に入るまでの潜伏時間では、SAM-R1 群 (NC 群) に比べると、ポジティブコントロール群と 5mg/kg MTE 群では有意に低かった。モリス水迷路実験において、7 日間にわたり学習させる成績では、NC 群が 3, 4, 5, 6 と 7 日目で 1 日目より有意な短縮が認められた。プローブテストにおいて、各群のクロッシング回数が NC 群に比較して顕著に低かった。さらに、プラットフォームがあった領域での滞在率が NC 群において、他の領域での滞在率よりも有意に高かった。すなわち、SAM-P8 老化マウスの文脈学習・記憶能と空間学習・記憶能において、MTE による顕著な改善は認められなかった。しかしながら、老化は脳神経だけではなく、全身的に進行すると考えられ、老化の 1 つの重要な指標としてマウス体毛に着目し、体毛のキューティクルの状態の評価を目的とし、摩擦係数の測定と走査型プローブ顕微鏡の観察をおこなった。摩擦係数の結果として、老化群 (AC) の平均摩擦係数はほかの群と比較して有意に高く、NC 群よりも 31% 高かった。ポジティブコントロール群、5 mg/kg MTE 群および 25 mg/kg MTE 群の平均摩擦係数が NC 群の近いレベルに回復した。また、走査型プローブ顕微鏡の観察結果では AC 群においては体毛のキューティクルが不鮮明であった。NAC 群、5 mg/kg MTE 群および 25 mg/kg MTE 群では、体毛キューティクルの損傷が修復され、規則的な形であった。特に、25 mg/kg MTE 群においては、キューティクルが鮮明で、典型的な階段状の特徴がはっきり示された。

以上の実験結果から、MTEの経口投与により、SAM-P8マウスの文脈学習・記憶能と空間学習・記憶能を向上させなかったが、新しいアンチエイジングの指標として、体毛の質を改善する機能を明らかにすることができた。今後、有効成分の同定することで新たな研究展開が期待される。すなわち、落葉樹クワ科クワ属の桑枝条抽出物がQOL向上のための新素材になると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

わが国における森林資源の多面的な活用法のひとつに、薬木・薬草の試験研究成果に基づく事業化があげられる。本研究では、桑における薬理機能に着目した。養蚕におけるカイコの食餌植物としての桑葉の利用以外では、これまで桑根が漢方薬の素材として利用されている。本研究では未利用資源である桑の枝条の有効活用法を開発するために、マウス実験系を用いて桑枝条の抽出物における薬理機能を解析した。その結果、薬木としての利活用の可能性を開く、新しい知見を得ることができた。

1. はじめに、桑枝条抽出物には種々の抗酸化物質が含まれていることを踏まえ、アンチエイジングならびに脳機能改善の薬理機能を解析するために、マウス老化促進モデルの確立を検討した。D-ガラクトース投与による老化促進マウスの作製は、1991年に提唱されて以来、多くの研究報告がある。これらはD-ガラクトースをマウスに6~8週間継続して投与することにより誘導され、生理学的・病理学的に老化が促進されたモデルであることが知られている。本研究では、C57BL/6JマウスにおけるD-ガラクトース投与による老化モデル作製について検討した。12週齢のC57BL/6JマウスにD-ガラクトース200~800mg/kgを投与し、文脈学習・記憶能を解析するためにステップスルー型受動的回避実験を、空間学習・記憶能を解析するためにモリス水迷路実験を、それぞれ行った。その結果、ステップスルー型受動回避実験とモリス水迷路実験ともに、コントロール群に比較してD-ガラクトース群のいずれの濃度でも、学習・記憶能において有意差は認められなかった。さらに、マウスの脳や各内臓器官の細胞と組織の構造変化を組織化学的方法で解析した結果、D-ガラクトース群のいずれの濃度でも細胞と組織の構造変化は観察されなかった。これらの結果から、D-ガラクトース投与によるマウス老化促進モデルでは、マウスの系統や週齢などの影響を強く受けることが推定され、普遍性のあるモデルとは認められないと考えられた。

2. そこで、選抜淘汰され遺伝的に固定されている老化促進モデルマウスのSAM-P8とその対照群としてSAM-R1の正常老化マウス、ならびにポジティブコントロール群として、SAM-P8にN-アセチル-L-システインを経口投与したマウス(NAC群)を使用した。これらの3群に桑枝条の50%エタノール抽出物を経口投与して、脳機能改善作用を評価した。しかしながら、ステップスルー型受動的回避実験と空間学習・モリス水迷路実験を行った結果、文脈学習と空間学習の記憶能の向上は認められなかった。続いて、脳機能とは異なるアンチエイジング機能の評価を目的として、体毛のキューティクルの特性について摩擦係数測定と走査型プローブ顕微鏡による観察を行った。体毛キューティクルは老化にともなって損傷を受け、摩擦係数が増加する。老化促進マウスであるSAM-P8の体毛摩擦係数は、SAM-R1やNACに比較して31%の上昇が認められたが、SAM-P8に25mg/kgの桑枝条抽出物を投与したところ、SAM-R1やNACマウスレベルまで数値が回復した。さらに、走査型プローブ顕微鏡の観察でも、桑枝条

抽出物投与群においては、体毛キューティクルの著しい修復が認められた。すなわち、桑枝条抽出物の経口投与によってマウス体毛の老化を防止することができることが示された。

以上のことから、本研究において老化促進マウスを用いた動物実験により、桑枝条抽出物は体毛キューティクルにおけるアンチエイジング効果を有することが明らかにされた。本研究成果は、森林資源の有効活用法としてヒトのQOL向上を目指した薬理的なモデルを提案するものである。本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値があるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

##### 主論文

1. Ping Xu, Michimasa Utidate, Akira Iwabuchi, Hikari Kondo, Yoshiki Matsui, Makoto Mangetsu, Jun Sasaki, Masanobu Goryo, Hisayoshi Kofujita, and Koichi Suzuki

Mulberry twig extract counters hair aging in senescence-accelerated mice.

Journal of Traditional Medicines, 30, 229-235, 2013

##### 参考論文

1. 徐萍、鈴木忠彦、永井三紀子、沈明浩、李大軍、小林春男  
糖尿病誘発マウスにおける抗コリンエステラーゼ薬の作用  
医学と生物学、151、420-425、2007