家蚕関連天然資源の XOD 阻害活性とマウス血漿尿酸値低下作用

田中龍一郎,^{*,a} 宮田侑磨,^a 水口直紀,^a 村上綾子,^a 坂崎文俊^b

The Xanthine Oxidase Inhibitory Activity and Hypouricemic Effects of Crude Drugs Obtained from the Silkworm in Mice

Ryuichirou Tanaka,^{*,a} Yuuma Miyata,^a Naoki Minakuchi,^a Ayako Murakami,^a and Fumitoshi Sakazaki^b^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University; 45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan: and^bFaculty of Pharmacy, Osaka Ohtani University; 3-11-1 Nishikiori-kita, Tondabayashi, Osaka 584-8540, Japan.

(Received July 31, 2014; Accepted June 13, 2015)

This study evaluated the effects of crude drugs obtained from the silkworm in mice with oxonic acid-induced hyperuricemia using xanthine oxidase inhibitory activity and plasma uric acid levels. The plasma uric acid level was analyzed using an improved HPLC with UV detection (HPLC-UV) method, which enabled high-sensitivity analysis of a microliter of plasma. Using this method, we evaluated natural products administered orally to the hypouricemic mice. The plasma uric acid level of mice administered a water-soluble extract from silkworm larvae with botrytis (used in traditional Chinese medicine to reduce wind, lower blood pressure, and change platelet coagulation) was significantly lower than in the control group 1, 2, and 3 h after treatment. In addition, water soluble extracts from a fungus (NBRC 31161) metabolite and silkworm pupae and larvae reduced the plasma uric acid levels in mice compared with the control group.

Key words—hypouricemia effect; plasma uric acid level; xanthine oxidase inhibition; silkworm with botrytis

緒 言

血中尿酸値の高値は高血圧発症の予測因子や脳卒中の危険因子であり、痛風を始めとする腎疾患や心筋梗塞など多くの疾病を誘発する。そのため 100 万人を超える高尿酸血症の患者とその予備群における血中尿酸値コントロールが予防医学的立場からも重要となってきた。これに対しバランスのよい食事と適度な有酸素運動が奨励される一方、¹⁾ 安価で安全性の高い天然物や生薬基原の体質改善効果への期待が高まっている。しかしながら、天然薬用資源や機能性食品の効能評価系において、その高尿酸血症改善効果を数値化したものや、モデル動物を用いた科学的な検証を行った論文はいまだ数報^{2,3)}を散見するに留まる。

ヒトの血中尿酸値測定は自動分析装置での酵素-VIS (UV) 法により行われ、その精密測定には日本臨床化学会が勧告する HPLC-UV 法 (以下、勧

告法) が推奨される。^{4,5)} また天然薬用資源や食品の機能性評価で用いられるモデル小動物の血中尿酸値測定には、麻酔と開腹手術による採血と勧告法に従ったサンプル血清の前処理と定量操作が準用されている。⁵⁾ 以来、このシステム運用の煩雑さや精度が問題とされてきたが、⁶⁾ 最近になってモデルマウスやラットの血清尿酸値が報告毎に大きくバラついていることが指摘され、にわかに既報データへの信頼が揺らぎ始めた。^{7,8)} これを受け渡部らは、モデル小動物の血清中尿酸値がその取り扱いにより変動してしまういくつかの原因を明示し、マウス血中尿酸値の測定における適切な採血と前処理法の一例を示した。⁹⁾ 一方、われわれは、無麻酔でモデルマウスの尾静脈から採血した 1 滴の血液中の尿酸値を簡便に定量する「改良 HPLC-UV 法」を開発し、経口投与した治験試料の血中尿酸低下作用を評価するシステムを構築した。¹⁰⁾

今回、家蚕 (*Bombyx mori* L.) 関連天然薬用資源である虫草; 「ハナサナギタケ (*Isaria japonica*; *IJ*) の乾燥体」と白僵蚕; 「白僵菌 (*Botrytis bassiana* Bals.) による病蚕の乾燥体」に注目し、それ

^a摂南大学薬学部, ^b大阪大谷大学薬学部

*e-mail: tanaka-r@pharm.setsunan.ac.jp

Fig. 1. The Photographs of the Materials That Relate to Silkworm

Bombyx mori L. (Kinsyu×Showa strain) was provided by a sericulturist from the Kiryu-Omama district of Gunma Prefecture, Japan. The silkworms were raised in the late spring, and fed solely on mulberry leaves (*Morus bombycis*; Ichinose) cultivated in Gunma Prefecture. A, Thirty-six d after hatching (36-d-old), the cocoons were separated into pupae and cocoon shells; B, Silkworm larva (22-d-old, 5th instar larvae); and C, Byakkyousan (silkworm larva with botrytis) from Sichuan (SI).

らの xanthine oxidase (XOD) 阻害活性と「改良 HPLC-UV 法」による高尿酸モデルマウスの血中尿酸値低下作用を検討した。Fu らの報告¹¹⁾には、虫草の主成分は虫草酸 (D-マンニトール) であり、同エキスはラットの血中尿酸値を低下させるとの記載があることから、特に虫草エキスの活性本体に興味を持たれた。一方、白僵蚕は一般に母乳の出の改善や乳幼児の鎮静作用を目的に処方されるものであり、既に長期投与での安全性が確認されている。今回さらに、その血中尿酸値低下作用が認められれば比較的安価な生薬原料である白僵蚕の有用性が高まる。本研究では虫草、白僵蚕の基原である蚕蛹と蚕幼虫をそれぞれ対比し、各エキスの活性を比較した。また特に有意な活性を示した白僵蚕については産地別での活性評価を行い、白僵蚕エキスが示した効果の再現性を検証するとともに、生薬原料としての理化学的評価指標を得るべくその基礎データを得た。さらに同エキスを分画したものの活性検証から有効成分を含有する画分の特定を行った。

実験材料及び実験方法

1. 試薬及び機器 ハナサナギタケ成分としても知られる虫草酸 (cordicepic acid=D-マンニトール; Man) 及び尿酸関連物質であるオキシプリン類、すなわちアラントイン (allantoin; All), アロプリノール (allopurinol; AP), ヒポキサンチン (hypoxanthine; Hyp), オキシプリンノール (oxipurinol; OP), オキソニン酸カリウム, キサンチン (xanthine; Xan), 尿酸 (uric acid; UA), 尿酸標準液 (10 mg/dL, Uric Acid-TEST WAKO, the calibration using National Institute of Standards and Tech-

nology; SRM913a), トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid; TFA), リン酸及び塩酸はいずれも和光純薬工業 (大阪) 製の特級試薬を用いた。またキサンチンオキシダーゼ (バターミルク由来, 0.084 U, 10 L) はカルビオケム (Darmstadt) 製, ウリカーゼ (酵母由来, 0.075 U, 5 L) はオリエンタル酵母工業 (株) (東京) 製を用いた。

酵素反応はすべてパソリナインキュベータ PI-301 (東京) を用いて行った。また尿酸関連物質群のスペクトル並びに吸光度は Jasco V-630 (東京) を用い、200–300 nm の範囲で室温測定した。¹H-NMR スペクトルは JEOL GSX-400 (東京) を用い 25°C で測定した。除タンパク処理したマウス血漿サンプルの減圧乾燥には、遠心式加熱デシケーター; TOMY SEIKO Micro vac MV-100 (東京) を用いた。マウス血漿中尿酸値の定量はカラム; Nacalai Tesque Cosmosil C18 AR-5 4.6×250 mm (京都) を用い、ポンプ; JASCO PU-980 (東京), カラムオープン; Sugai U-620 (東京), UV 検出器; JASCO UV-980 (東京) 及び記録計; Shimadzu C-R-8A (京都) で構成される HPLC システム¹⁰⁾で、移動相にはリン酸水溶液 (30 mmol/L, pH 1.8) を使用した。マンニトールの同定はカラム; Kanto Kagaku Mightysil RP-18 GP Aqua 10×250 mm (東京), 移動相に 0.1% TFA/H₂O, RI 検出器; GL Science 504R (東京) を用い標準品と直接比較した。

2. 試験サンプルの抽出, 前処理

2-1. 試料の調製 蚕蛹 [群馬県産錦秋×鐘和, 36 d, 天日乾燥品, Fig. 1(A)] は、その 500 g に対し 2 L の 80% メタノールで、蚕 [群馬県産錦秋×

鐘和, 22 d, 5 齢幼虫, Fig. 1(B)]は同じくメタノールで室温抽出し(4 週間), それぞれの抽出液に対して, クロロホルム:メタノール:水=1:2:1 (v/v) となるよう各溶媒を最小限添加, 分配して得られる各上層を減圧乾燥した. このものをさらにグラム当たり 10 mL のブタノール:水=1:1 (v/v) 混液で分配し, その下層(水層)を減圧下乾燥し得られる残渣を「水溶性画分」とした.

次に四川省産 [SI, Fig. 1(C)], 安徽省産 (AN) 「白僵蚕」は栃本天海堂(株)(大阪)より, 浙江省産 (SE) はウチダ和漢薬(株)(東京)から購入した. それぞれ 500 g に対し 2 L の 80%メタノールにより, 室温で抽出(4 週間)後, ろ過し得られる抽出液を減圧下溶媒留去してエキスとした. また産地別の「水溶性画分」は同上の操作により調製した. なお, 特に断らない限り本稿での「白僵蚕」とは栃本天海堂(株)より購入した四川省産を用いたものである. 非水溶性画分(メタノール可溶性並びにヘキサン可溶性)についても, 同省産のそれを別途, 藤田らが行ったシソ科植物エキスの活性評価¹²⁾と同様のサンプル調製方法に従って再調製した. すなわち抽出エキスを水と酢酸エチルで分配, この酢酸エチル可溶部をさらにメタノールとヘキサンで再分配して「SI-水画分」, 「SI-MeOH 画分」及び「SI-Hexane 画分」とした. なお, これらは, ¹H-NMR スペクトルデータ (D₂O あるいは CD₃OD で 20 mg/600 μ L の溶液とし, 同一条件下で測定) 並びに収量において, 冒頭の操作で得られた白僵蚕の「水溶性画分」, 「ブタノール画分」及び「クロロホルム画分」とそれぞれよく一致した(データ非記載).

最後にハナサナギタケ (IJ) 菌の培養は, 上述の蚕蛹「水溶性画分」50 g を 2500 mL の糖アミノ酸混合液に添加して調製した液体培地を用いて行った. また, その栄養条件は中島らが最適化した組成に従い,¹³⁾ 滅菌処理した培地に IJ 菌種(独立行政法人製品評価技術基盤機構:NBRC より分渡された NBRC 31161)を無菌操作で添加し, 三ツワフロンテック(株)製 KMJ-3C (大阪)で 8 週間の培養を行った. こうして得られた培養液を MILLIPOA Express™ PLUS 0.22 μ m (東京)でろ過して得られる清明な液を EYELA FD-5 (東京)で凍結乾燥し, ハナサナギタケ (IJ) 培養代謝物とした. なお, 被検対象とした「IJ-水溶性画分」並びに「IJ-ブタノール

画分」は, 同培養代謝物グラム当たり 10 mL のブタノール:水=1:1 (v/v) 混液で分配し, 得られる画分を減圧乾燥した残渣(減圧乾燥物)である.

2-2. マウスに投与する試料調製 試料それぞれの「水溶性画分」の減圧乾燥物及びマンニトールの約 60 mg を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液 300 μ L に溶解させた. 陽性対照群(以下, 治療モデル群)には, 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に AP を 5 mg/mL となるように懸濁させた試液 300 μ L を用いた. 陰性対照群(以下, 対照群)には 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液 300 μ L を用いた ($n=10$).

また白僵蚕由来の非水溶性画分 (SI-MeOH 及び SI-Hexane) はそれぞれの 60 mg を 3%エタノール添加オリーブ油 (300 μ L) に溶解し, IJ-水溶性画分は同量を生理食塩水 (300 μ L, ブタノール画分は 3%エタノール添加) に溶解し, 経口投与試料とした ($n=10$).

3. 高尿酸モデルマウスの作製と試料の投与及び採血 本実験で行った動物実験は, 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」及び日本薬理学会の動物実験ガイドラインに基づいて作成された摂南大学動物実験指針に従い, 摂南大学動物実験委員会の承認を得て行った. また, 大阪大谷大学動物実験委員会規定及び大阪大谷大学における動物実験に関する指針に従い, 大阪大谷大学動物実験委員会の承認を得て行った.

マウスの飼育条件等を簡単に記述すると, 体重約 30 g の 8 週齢雄性 ICR マウスを 1 群 10 匹とし, 正常群, 対照群(オキシロン酸前投与), 治療モデル群 (AP 投与), 基準投与量モデル群(マンニトール投与), 蚕蛹「水溶性画分」投与群, ハナサナギタケ「水溶性画分」投与群, 蚕幼虫「水溶性画分」投与群, 白僵蚕「水溶性画分」投与群の 8 群に分けた. 高尿酸血症モデル作製のため, 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液に懸濁させたオキシロン酸カリウムを 250 mg/kg 体重となるように腹腔内投与した. 1 時間後に, 被検試料を 2 g/kg 体重(約 60 mg/匹)となるように胃ゾンデを用いて経口投与した. 1, 2 及び 3 時間後に, 尾静脈から約 30 μ L の血液を採取した. 凝血防止のために少量の 0.5 mol/L EDTA ナトリウム溶液 (pH 8.0) を用いた. 血液試料を遠心分離して血漿 10–15 μ L を採取し, -30°C で保存

した。

4. 血漿の前処理と尿酸値の定量¹⁰⁾ サンプル血漿 15 μL について除タンパク処理し、そのろ液を遠心式加熱デシケーターで 90 分間減圧乾燥した。乾燥残渣に H_2O を加え混和し、均一化したサンプル水溶液について「改良 HPLC-UV 法」¹⁰⁾ で尿酸値測定を行った。血漿尿酸値は勧告法の評価基準に従い、同一試料について 3 回の連続測定による結果の平均値から算出した。

5. マウス血漿における定量性の確認 プール血漿は、正常群からそれぞれ 10–15 μL ずつの血漿を集め混和し、用時調製した。マウス血漿における定量性の確認はヒトに対する従来法^{14,15)} のそれに従った。すなわちプール血漿に尿酸標準液を添加し、その回収率を検討した。また、キサンチンオキシダーゼとウリカーゼによるプール血漿の酵素処理を行い、それぞれが与えた HPLC クロマトグラム上のキサンチン、尿酸に由来するピークの増大と消失を確認することにより、キサンチン及び尿酸のピーク面積の定量性を検証した。¹⁰⁾

6. キサンチンオキシダーゼ活性阻害作用
XOD 阻害実験は各々 14 mg/検体を秤量し、これに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) 2.5 mL を加え溶解し、試料液とした (用時調製, $n=3$)。このもの 10 μL にリン酸緩衝液 1.69 mL, 蒸留水 0.8 mL, 0.1 mM キサンチン溶液 3.0 mL を加え、37°C で 15 分間保温した。続いてキサンチンオキシダーゼ溶液 0.5 mL (30 $\mu\text{L} \rightarrow 3.0 \text{ mL}/0.1 \text{ M}$ リン酸緩衝液としたもの) を加え 40 分間インキュベーションして、メンブランフィルター (0.22 μm) で濾過して得られるサンプル液の吸光度 (X_{Abs}) を測定した。なお、試料液と XOD 液を含まないブランク (A_{Abs})、試料液を含まないブランク (B_{Abs})、XOD 液を含まないブランクの吸光度 (N_{Abs}) も同時に測定し、阻害率を求めた。また同実験は海野らの方法¹⁶⁾ に従い、阻害率はアロプリノール 8.57 μM のそれを 100% として相対評価した。

$$\text{阻害率 (\%)} : 100 - [(X_{\text{Abs}} - N_{\text{Abs}}) / (B_{\text{Abs}} - A_{\text{Abs}}) \times 100]$$

7. キサンチンオキシダーゼ阻害活性 (IC_{50} 測定)

IC_{50} 測定のための XOD 阻害活性試験は、奥田らがポリフェノール類の評価で用いた方法¹⁷⁾ に従って実施した。すなわち、ねじ口式試験管 (1.2 mL)

に 360 μL の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) を取り、これに 24 μL の試料溶液 (被験物質あるいはアロプリノールを 0.1 M リン酸緩衝液に溶解したもの) を混合後、40 μL の XOD 溶液 (前項の活性強度測定で用いた同じロットの XOD 180 μL を 2.5 mL の 0.1 M リン酸緩衝液で用時希釈したもの) を加え、37°C で 10 分ブレインキュベーションした。次に 600 μL のキサンチン溶液 (5 mg のキサンチンを 100 mL の 0.1 M リン酸緩衝液に溶解したもの) を基質として加えて 37°C で 40 分間反応させた。これに 100 μL の 1 N 塩酸を加え反応を停止させ、ただちに同反応液を Nacalai Tesque スピンフィルター G (京都) で 10 分間遠心濾過し、そのろ液 3 μL を既述の「改良 HPLC-UV 法」で連続 3 回分析し、生成した尿酸と基質のキサンチン残量を定量した。

XOD 阻害活性は試料溶液の代わりに 0.1 M リン酸緩衝液を添加したコントロールの基質減少量を基準とし、評価対象の試料溶液の添加により反応阻害したサンプルにおける基質減少量と比較し阻害率 (%) として評価した。

なお、ポジティブコントロールとして用いたアロプリノールの 0.782, 7.82, 39.1, 78.2, 391 及び 782 μM の標準液による本試験での IC_{50} 値は 4.94 μM であり ($y=0.7988x-0.5541$, $R^2=0.89085$)、既報の値と同程度であったことから、この実験系の信頼性が確認された。

被験物質の調製に関しては、白僵蚕「水溶性画分」14 mg を 250 μL の 0.1 M リン酸緩衝液に溶解したもの (被験物質原液) の 25 μL を同緩衝液で希釈し、全量を 250 μL とした (10 倍希釈液)。また 100 倍及び 1000 倍希釈液は、同様の操作でそれぞれ用時調製し試料溶液とした。なお、2 倍液は試料溶液添加量を 48 μL とし、あらかじめ加える 0.1 M リン酸緩衝液で調製した。

8. データ解析 それぞれの試料について HPLC 分析を 3 回ずつ行い、平均値を求めた。十分な量の血漿が得られなかった試料を解析から除外し、それぞれの投与群毎に得られた $n=7-10$ の測定結果から平均と標準偏差を求めた。有意差検定には一元配置の分散分析及び Bonferroni による修正 t 検定を行った。有意差検定の計算は OriginPro9.1J (Originlab Co., Northampton, Massachusetts) 及び IBM SPSS Statistics 20 (International Business

Machines Co., Armonk, New York) を用いて行った。

実験結果及び考察

1. 高尿酸モデルマウスを用いた家蚕関連薬用資源群の血中尿酸低下作用 オキソソンのみを投与した対照群（高尿酸モデルマウス群）の血漿中尿酸濃度が溶媒のみを投与した正常群に比べて有意に高く（修正後の $p=0.010$ ），治療モデル群（AP 投与マウス群）の血漿中尿酸濃度が対照群に比べて有意に低い結果が得られたことから（修正後の $p=0.014$ ），本実験系において高尿酸血漿モデルの作製及び血漿中尿酸濃度の測定が正しく行われていることが確認された。

今回，白僵蚕水溶性画分投与群の血漿中尿酸濃度が投与 1, 2, 3 時間後のいずれの時間においてもオキソソンのみを投与した対照群に比べて有意に低く（修正後の p 値は 1 時間後 0.018, 2 時間後 0.002, 3 時間後 0.018），溶媒のみを投与した正常群と同程度であった結果から（修正後の p 値は 1 時間後 1.000, 2 時間後 1.000, 3 時間後 1.000），白僵蚕が血漿中尿酸濃度の低下に有効であることが明らかになった。

試料投与 1, 2, 3 時間後に採血した結果を比較すると，2 時間後に採血した結果において溶媒のみを投与した正常群とオキソソンのみを投与した対照群の差が最も大きかったことから，尿酸濃度の低下作用を評価するために 2 時間後の採血が最も適正と判断し，以後の検討では試料投与 2 時間後に採血を行った [Fig. 2(b)]。

冬虫夏草菌類は特定の昆虫に寄生し棒状の子実体を生じる。一般的にこの子実体そのものを「冬虫夏草」あるいは「虫草」と呼び，古くから生薬原料として解熱，鎮静，痛風治療等に用いている。今回引用した虫草に関しまとめた中医学の総説¹¹⁾には，虫草エキスにはその主成分としてマンニトールを始めとする糖アルコール，アミノ酸類が存在することと，その痛風改善効果が明記されている。しかしながら同文献，その引用文献には同作用や効果を裏付ける化学的実験やその根拠となる数値等は見当たらなかった。そこで今回，このことに関する検証を行うべく，ハナサナギタケ (*IJ*) 培養代謝物を調製し，マンニトール標準品と得られた *IJ*-水溶性画分の

Fig. 2. Plasma Uric Acid Levels in Mice Administered Oxonic Acid and Test Samples

Byakkyousan (silkworm larva with botrytis), but not mannitol, suppresses the uric acid level in mouse plasma. Mice were administered oxonate 1 h before the test sample. Blood was collected a) 1, b) 2, and c) 3 h after administering the sample. A, no oxonate was administered. B to H, oxonate was administered: B, vehicle; C, allopurinol; D, mannitol; E, byakkyousan; F, *Isaria japonica*; G, silkworm pupae; and H, silkworm larvae. Seven to 10 mice were used per group, and the means $\pm$ S.D. are shown. * $p<0.05$ compared with A. ** $p<0.01$ compared with A. † $p<0.05$ compared with B. ‡ $p<0.01$ compared with B.

¹H-NMR と HPLC による保持時間の比較により，マンニトールの存在を確認した（データ未掲載）。D-マンニトールは臨床においてその利尿作用を期待して静注されることがあることから，当初 *IJ* の二次的な活性本体と予想した。しかしながら今回の結果では，D-マンニトール投与群の血漿中尿酸濃度はオキソソン投与群の血漿中尿酸濃度に比べて低くなかったことから（修正後の p 値は 1 時間後 1.000，

2 時間後 1.000, 3 時間後 1.000), その経口投与では不活性であることが示された。これに対し, 白僵蚕以外の *IJ*, 蚕蛹及び蚕幼虫の各水溶性成分投与群の血漿中尿酸濃度もまた, オキソソンのみを投与した対照群に比べて低い傾向を示し, これらすべてにマウス血漿中尿酸濃度低下作用の可能性が示唆された (オキソソンの間, 修正後の p 値は 1 時間後 1.000, 2 時間後 0.185, 3 時間後 1.000, オキソソンの間, 修正後の p 値は 1 時間後 1.000, 2 時間後 0.012, 3 時間後 1.000, オキソソンの間, 修正後の p 値は 1 時間後 0.158, 2 時間後 1.000, 3 時間後 0.078)。

以上のことから *IJ* 培養代謝物を始め蚕関連天然資源群の活性本体は D-マンニトールとは異なる水溶性成分であると推察され, プロポリスに含有されるアルテピリン C や p -クマール酸などの化合物群²⁾とは異なる新規有効成分の存在を期待させた。なお, 今回最も強い血中尿酸低下作用が認められた白僵蚕水溶性画分の IC_{50} は 1.25 mg/mL であり ($y = 0.7747x + 0.472$, $R^2 = 0.70345$), プロポリスのその 1/5 倍程度の活性であった。²⁾

2. 産地別白僵蚕の水溶性画分の評価 また上述のように, 白僵蚕エキスの 86% (w/w) を占める水溶性画分が有意な活性を示したことから, わが国市場に流通する安徽, 浙江省産の「白僵蚕」水溶性画分についても, その活性の有無を検証することとした。今回「白僵蚕」から得られた水溶性画分は四川省産: 31.2 g/500 g に対し, 安徽省産: 47.7 g/500 g, 浙江省産: 45.5 g/500 g であった。これら産地別「白僵蚕」の水溶性画分について, 同量投与による活性評価を実施したところ, いずれも有意な尿酸低下作用を示し (修正後の p 値は四川省産 0.000, 安徽省産 0.000, 浙江省産 0.000), その XOD 阻害活性と正相関を示した。また産地別相互間での有意差は認められず (修正後の p 値は四川省産と安徽省産の間 1.000, 四川省産と浙江省産との間 1.000, 安徽省産と浙江省産との間 1.000), 白僵蚕成分が示したモデルマウスに対する尿酸低下作用の再現性が確認された。また, このことは生薬原料「白僵蚕」の製造で用いる菌株レベルの違いや乾燥方法などが, その有効性には影響していないことを示唆した。一方, 四川省産「白僵蚕」の活性成分含有率が比較的高いことが示唆されたことから, 有

Fig. 3. Inhibition Rate of Xanthine Oxidase (XOD) with Byakkyousan (Silkworm Larva with botrytis) Samples from Different Production Areas

The inhibition rate of XOD with each byakkyousan sample: control, inhibition rate with vehicle; byakkyousan from Zhejiang (SE), Anhui (AN), and Sichuan (SI). ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 4. Effects of Byakkyousan Samples on the Mouse Plasma Uric Acid Level

The mouse plasma uric acid level: normal, no oxonate administered; OXO, oxonate and vehicle administered; oxonate and byakkyousan from Zhejiang (SE), Anhui (AN), and Sichuan (SI). Seven to 10 mice were used per group, and the means $\pm$ S.D. are given. ** $p < 0.01$ compared with the group administered oxonate and vehicle.

効成分の特定には四川省産のもの (SI) を用いることとした (Figs. 3 and 4)。

3. 白僵蚕エキスの低極性成分の評価 「白僵蚕」エキスのマイナー成分となる低極性成分の評価については四川省産のヘキサン可溶画分とメタノール可溶画分 (SI-Hexane, SI-MeOH) を用いた。この結果, ヘキサン画分は尿酸値を低下させず (オキソソンの間, 修正後の $p = 1.000$, 1.000, 1.000), 同メタノール画分は平均値が低下傾向にあったが (オキソソンの間, 修正後の p 値は 1 時間後 1.000, 2 時間後 0.999, 3 時間後 1.000), 水溶性画分に匹敵する作用はなかった。同様に検討した *IJ* 由来の水画分も平均値が低下傾向を示したが有意ではなく, (オキソソンの間, 修正後の p 値は 1 時間後 1.000, 2 時間後 0.185, 3 時間後 1.000)。

Fig. 5. Effects of the Byakkyousan (Silkworm Larva with botrytis) Fractions on the Uric Acid Level

The a) aqueous, b) butanol, and c) methanol and hexane fractions. Hatched bars, no oxonate administered. Open bar, oxonate and vehicle administered. Closed bar, oxonate and a sample of the aqueous, butanol, or methanol fraction administered. Shaded bar with horizontal lines, oxonate and hexane fraction administered. Seven to 10 mice were used for each group, and the means $\pm$ S.D. are indicated. * $p < 0.05$ between the indicated pairs.

水画分の間、修正後の p 値は 1 時間後 1.000, 2 時間後 1.000, 3 時間後 1.000), *IJ* 由来のブタノール画分ではその尿酸値を上昇させた (オキソン酸と *IJ* ブタノール画分の間、修正後の p 値は 1 時間後 0.025, 2 時間後 0.295, 3 時間後 0.043). 今回、低極性成分を動物に投与するための溶媒として少量の

エタノールとオリーブ油を用いた. この溶媒とオキソン酸を投与した群が正常マウスにくらべて有意な高尿酸状態が得られなかったことから (正常マウスとオキソン酸の間、修正後の p 値は 1 時間後 1.000, 2 時間後 1.000, 3 時間後 1.000), 非水溶性画分の評価では投与サンプル調製に最適な溶媒選択が必要と考えられた [Figs. 5(a)–(c)].

藤田らはシソ科植物タイムのアルコールエキスの血中尿酸低下作用を示し,¹²⁾ 吉積らはプロポリスから、増田らはショウガ科植物エキスからそれぞれ血中尿酸低下作用と XOD 阻害活性の本体成分であるチリシンやガラングニン等のフラボノイド、カフェ酸フェネチルエステルなどを同定している.^{2,3)} 今回の検討から生薬「白僵蚕」の含有成分のうちマウスの血中尿酸値を低下させる活性本体は、水溶性画分そのものあるいは D-マンニトール以外の構成成分であることが明らかとなった. またその水溶性画分の NMR スペクトルにはカフェ酸誘導体やフェノール性化合物の存在を示す 6.5 から 7.5 ppm 付近のダブルレットシグナル群が検出されず、代わりに 2.7 から 4.3 ppm 付近にクエン酸塩類やグルタミン酸誘導体の存在を示唆する特徴的なシグナルパターンが明瞭に観測された. このことは水溶性画分中の、経口投与でその血中尿酸低下作用を示す新規成分の存在をも示唆している. 含有成分の同定と活性本体構造の詳細については次報で明らかとしたい.

謝辞 ハナサナギタケ (*Isaria Japonica*) 培養に関し、有益なご指導、ご助言を賜りました中島豊氏並びに本研究実施に有益な御助言とご高配を賜りました本学薬学部共同利用機器室、西 正敏博士、山口昌之博士並びに臨床薬剤学教授 中西邦夫博士に深謝致します.

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- 1) Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism, "Guideline for the Management of Hyperuricemia and Gout," 2nd ed., Medical Review Co., Ltd., Osaka, 2010.
- 2) Yoshizumi K., Nishioka N., Tsuji T., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 315–321 (2005).

- 3) Masuda K., Kubo C., Naruse M., *Bulletin of Jin-ai College*, **41**, 29–36 (2009).
- 4) Committee on Biochemical Constituents and Their Analytical Reagents, Japan Society of Clinical Chemistry, *Jpn. J. Clin. Chem.*, **22**, 300–307 (1993).
- 5) Japan Society of Clinical Chemistry, “The Compilation of Recommended Method 2012 Edition,” Japan Society of Clinical Chemistry, Tokyo, 2012, pp. 374–382.
- 6) Chikaura Y., Koga K., Nakano N., *Bulletin of Ginkyo College of Medical Technology*, **17**, 21–28 (1993).
- 7) Horiuchi S., Koshimizu K., “Biological Reference Data Book on Experimental Animals,” Soft Science, Tokyo, 1989, p. 158.
- 8) Watanabe T., Tomioka N., Nakamura M., Doshi M., Kaneko K., Uchida T., Fujimori S., Ichida K., Tsuchiya M., Hosoyamada M., *Gout and Nucleic Acid Metabolism*, **37**, 61 (2013).
- 9) Watanabe T., Tomioka H. N., Watanabe S., Tsuchiya M., Hosoyamada M., *Nucleos., Nucleot. Nucleic Acids*, **33**, 192–198 (2014).
- 10) Tanaka R., Miyata Y., Sakazaki F., *Gout and Nucleic Acid Metabolism*, **37**, 117–125 (2013).
- 11) Fu L., Chen Z. H., *Life Science Research*, **8**, 1–7 (2004).
- 12) Ando S., Kondo M., Onodera N., Shigematsu M., Fujita T., Abstracts of papers, the 2010 Annual Meetings of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, Tokyo, March 2010.
- 13) Nakashima Y., Chisiki K., *Kyushu Journal of Forest Research*, **55**, 209–210 (2002).
- 14) Hiroshige K., Kunifuji Y., Takasugi M., Kuroiwa A., *Journal of UOEH.*, **14**, 211–218 (1992).
- 15) Hiroshige K., Takasugi M., Yuu K., Kuroiwa A., *Journal of UOEH.*, **16**, 167–178 (1994).
- 16) Unno T., Sakane I., Kakuda T., *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, **47**, 740–743 (2000).
- 17) Hatano T., Yasuhara T., Yoshihara R., Agata I., Noro T., Okuda T., *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **38**, 1224–1229 (1990).