

東北公益文科大学

総合研究論集

第 25 号

最上紅花の花弁による老化促進モデルマウスの
記憶保持に関する研究

平松 緑・高橋 琴恵・相蘇 剛宏・及川 彰

2014 年 2 月 20 日発行

最上紅花の花弁による老化促進モデルマウスの 記憶保持に関する研究

平松 緑・高橋 琴恵・相蘇 剛宏・及川 彰*

1. はじめに

現在の日本は高齢社会に突入している。2013年の敬老の日に、日本では4人に一人が65歳以上の高齢者となったことが報道された¹⁾。これからは高齢者の医療費と介護費の増加を削減し、“ぴんぴんころりん”をめざすには、食事、運動、社会貢献、前向きな姿勢などがあげられる。

地域の資源を活用して“ぴんぴんころりん”をめざすために、山形県花の最上紅花に焦点をあてた。最上紅花の原産地は紀元前2,500年頃のエジプト、エチオピア及びアフガニスタンと考えられている。その頃には染料植物として農耕文化に携わったと思われる。その後、これらの地域から中近東を通じて世界中に生薬として広まっていった。その効能としては、花弁に緩下作用、促乳作用、皮膚病、血流改善作用、免疫賦活作用、血圧降下作用などのあることが知られている²⁾。さらに、最上紅花の花びら、葉、茎および種には抗酸化作用のあること、並びに花びらには脳保護作用のあることを見出した³⁾。また最近においては種の骨形成促進・骨そしょう症予防作用⁴⁾、種皮の血管壁硬化抑制作用⁵⁾及び葉の免疫促進作用⁶⁾のあることが報告されている。

今回は最上紅花のはなびら（花弁）に注目し、認知症の予防効果を記憶障害及び学習障害を有する老化促進モデルマウス⁷⁾を用い、学習修得試験及び記憶保持試験について検討をおこなった。また花弁中の成分についてメタボローム解析を行い、検索した。

2. 実験方法

(1) 実験動物

3ヶ月齢の雄性、老化促進モデルマウスSAMP8とSAMP10を用いた。対照には3ヶ月齢の雄性、SAMR1とddYマウスを用いた。これらのマウスは日本SLC（株、静岡）より購入した。

(2) 試料の調整及び投与方法

最上紅花の花弁抽出液は、乱花（花びらを乾燥したもの）を水とエタノールの混合液（1:1）で抽出後、エバポレーターにより濃縮した。次いで水で3.3 mg/kg/日となるように調整し、用事まで冷蔵庫で保存した。

SAMP8に最上紅花抽出液を吸水瓶に入れ自由に3ヶ月間投与した。対照には同じマウスに水道水を同様に投与した。また、ddYマウスに最上紅花抽出液を約3ヶ月間同様に投与した。

SAMP10には、最上紅花抽出液を吸水瓶に入れ自由に6ヶ月間投与した（3.3 mg/kg/日）。対照には水道水を投与した。またSAMP10のコントロールとしてSAMR1を用い、最上紅花抽出液と水道水を同様に投与した。

(3) 学習習得試験及び記憶保持試験

学習習得試験及び記憶保持試験にはステップスルー受動回避試験装置〔室町機械(株)〕を使用した。

この装置はマウスが明室から暗室に入ったとき、足に電気ショックが1秒間、0.5 mA流れる。その後にマウスを外に出し、1分間放置後再度明室にマウスを入れる。暗室にマウスが移動すると再度電気刺激が加わる。再度マウスを外に出し、1分間放置後明室に入れる。

明室にマウスが300秒間留まった時、回避行動をしたと判断した（図1、2）。

(4) メタボローム解析

最上紅花の花弁を凍結乾燥し、粉碎した。次いで80%メタノール溶液で抽出後、高速液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-TOF MS）を用いてフラボノ

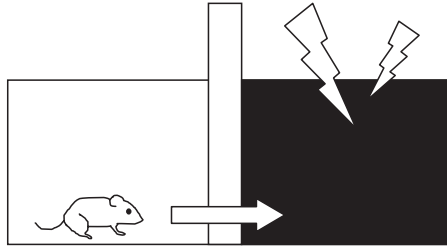


図1 ステップスルー受動回避試験装置の模型図
暗室に入ると足に電気ショックが1秒間、0.5 mA 流れる。

A



B



図2 ステップスルー受動回避試験装置
A. 横から見た装置
B. 上からみた明室にいるマウス

イドの分析をした。また糖の分析には、高速液体クロマトグラフィー三連四重極質量分析計 (LC-TripleQ MS) によりおこなった。さらにアミノ酸及び有機酸の分析には、花卉を凍結乾燥後に、クロロホルム・メタノールで抽出し、ミリQでろ過後、キャピラリー高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (CE-TOF-MS) を用いてを行なった。

3. 結果

(1) 最上紅花の花弁抽出液投与による体重及び吸水料の変化

花弁抽出液を投与した3ヶ月間においては、ddYマウスの吸水量及びSAMP8の体重への変化には大きな相違は認められなかった（図3、4）。またSAMP8の吸水量に対しての影響は認められなかった（図5）。

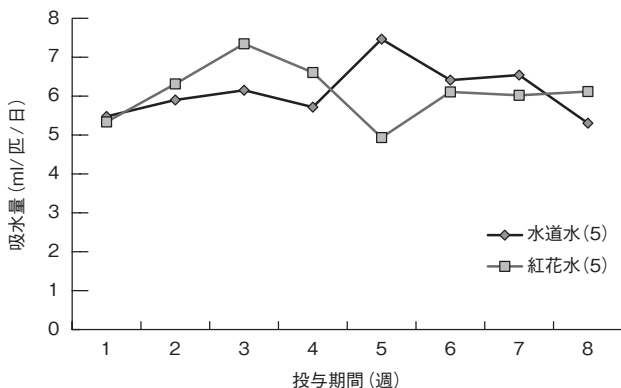


図3 ddYマウスの吸水量の推移

現在、マウスは5ヶ月齢（投与開始時は3ヶ月齢）。投与期間は約3ヶ月間。
各値は水道水5匹の平均値、紅花水5匹の平均値。

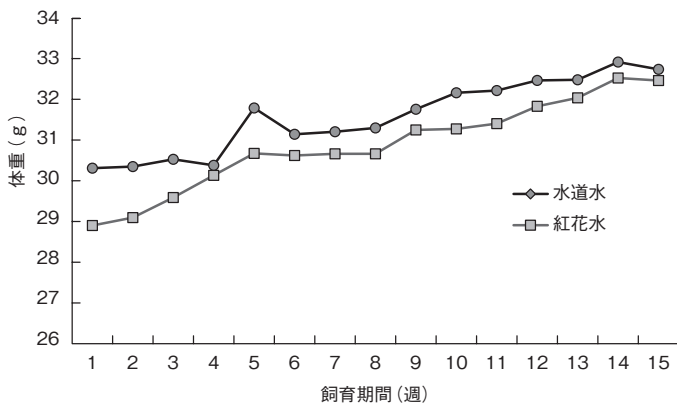


図4 老化促進モデルマウス (SAMP8) の体重の推移

現在、マウスは6.2ヶ月齢（投与開始時は3ヶ月齢）。投与期間は約3ヶ月間。
各値は水道水7匹の平均値、紅花水8匹の平均値。

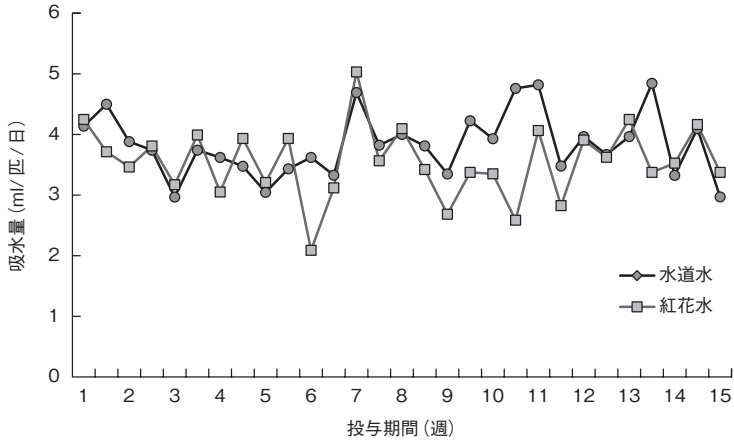


図5 老化促進モデルマウス（SAMP8）の吸水量の推移

現在、マウスは6.2ヶ月齢（投与開始時は3ヶ月齢）。投与期間は約3ヶ月間。
各値は水道水7匹の平均値、紅花水8匹の平均値。

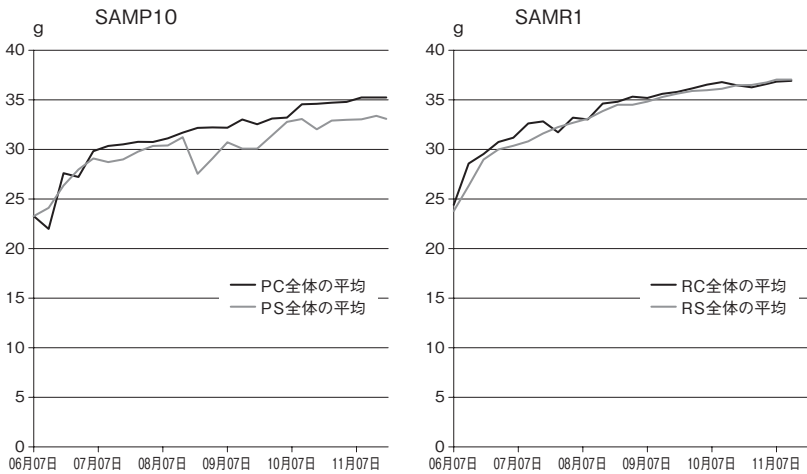


図6 老化促進モデルマウス（SAMP10及びR1）の体重の推移

現在、マウスは8ヶ月齢。投与期間は約6ヶ月間。

SAMP10の値は水道水13匹の平均値、紅花水15匹の平均値。

SAMR1の値は水道水16匹の平均値、紅花水16匹の平均値。

PC：SAMP10-水道水投与群

PS：SAMP10-紅花水抽出液投与群

RC：SAMR1-水道水投与群

RS：SAMR1-紅花水抽出液投与群

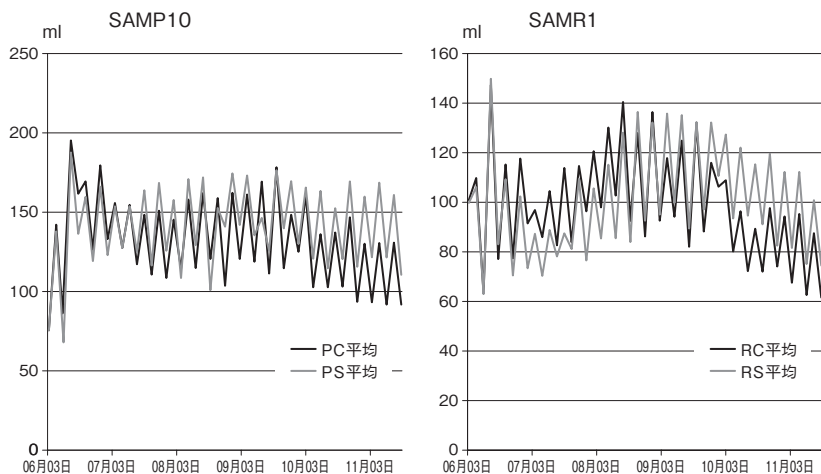


図7 老化促進モデルマウス（SAMP10及びR1）の吸水量の推移

現在、マウスは8ヶ月齢。投与期間は約6ヶ月間。

SAMP10の値は水道水13匹の平均値、紅花水15匹の平均値。

SAMR1の値は水道水16匹の平均値、紅花水16匹の平均値。

PC : SAMP10-水道水投与群 PS : SAMP10-紅花花卉抽出液投与群
 RC : SAMR1-水道水投与群 RS : SAMR1-紅花花卉抽出液投与群

SAMP10の紅花抽出液の6ヶ月の投与期間において、体重及び吸水量はSAMP10の水投与群に比べて、相違は認められなかった（図6、7）。

(2) 学習習得試験及び記憶保持試験

① ddYマウス

第1日目の学習修得試験においては、3回行なったところ水道水投与群（N=5）と紅花花卉抽出液投与群（N=5）の間では明室に留まっていた時間には相違は認められなかった。1回目はマウス5匹とも暗室に行き、2回目は5匹中2匹はいずれの群においても暗室に行った。3回目では5匹中5匹とも明室に留まっていた。これらから1日目の学習試験には紅花花卉抽出液の効果は認められなかった。

2日目の記憶保持試験においては、紅花花卉抽出液投与群において2回目の試験では、明室に留まっている時間は水道水投与群に比べて2倍に延長してい

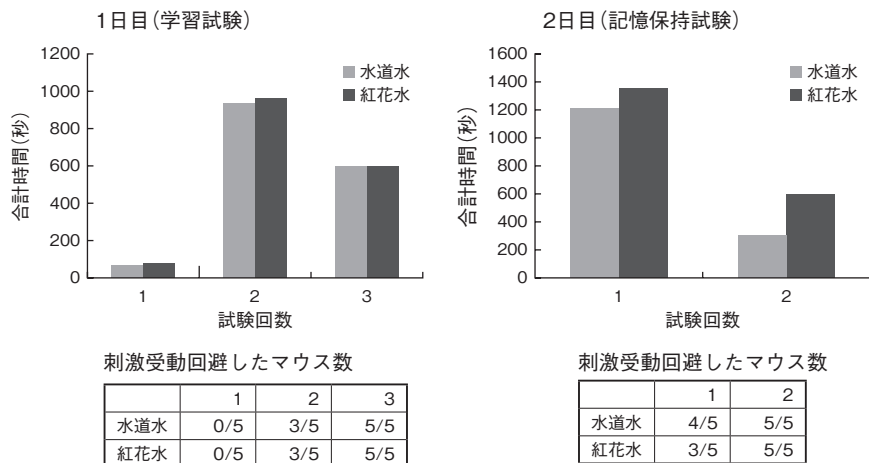


図8 ddYマウスの学習試験と記憶保持試験

上の棒グラフは1日目と2日目の明室に留まった時間の合計を示す。
下の表は明室に留まった(刺激受動回避した)マウス数を示す。

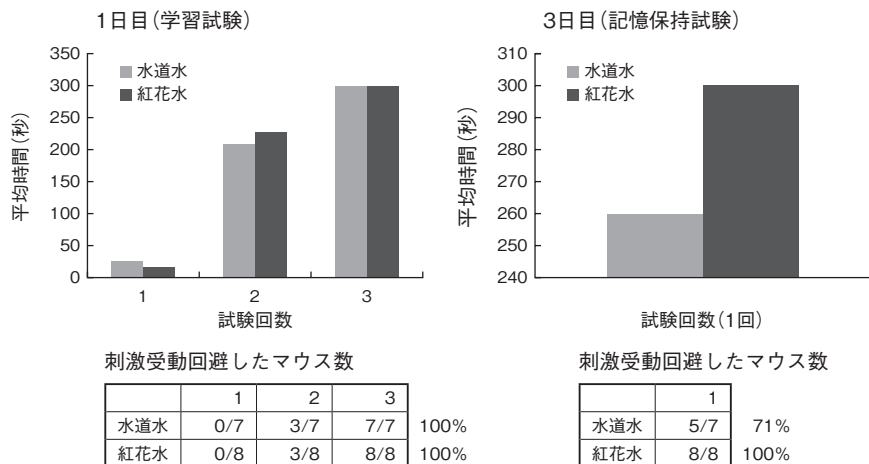


図9 老化促進モデルマウス(SAMP8)の学習試験と記憶保持試験

上の棒グラフは1日目と3日目の明室に留まった時間の合計を示す。
下の表は明室に留まった(刺激受動回避した)マウス数を示す。

た。しかし、暗室に移行することを回避したマウスは1回目の水道水投与群では5匹中4匹、紅花花弁抽出液投与群では5匹中3匹であった。2回目はいずれも受動回避をしたマウスは5匹中5匹であった (図8)。

以上の結果から ddY マウスにおいては紅花花弁抽出液投与により、記憶保持を増加させる傾向が認められた。

② SAMP8

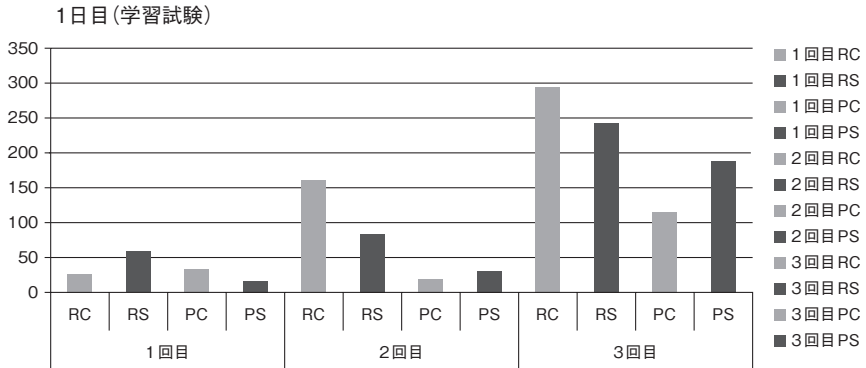
第1日目の学習習得試験において、3回試験を行なった結果、3回とも明室に留まっている時間は水道水投与群 (N=7) と紅花花弁抽出液投与群 (N=8) の間において相違は認められなかった。しかし記憶保持試験では第3日目に紅花花弁抽出液投与群の明室に留まっている時間は水道水投与群に比べて3倍増加していた。また、刺激受動回避をしたマウスは学習習得試験では両群間においては差は認められなかった。記憶保持試験においては第1回目において水道水投与群では受動回避率は71%であったが、紅花花弁抽出液投与群においては100%であった (図9)。

以上の結果から、SAMP8には紅花花弁抽出液投与による記憶保持効果のあることが明らかとなった。

③ SAMP10

SAMP10とSAMR1の学習習得試験を比較すると第2回目の明室に留まっている時間はSAMP10はSAMR1に比べて顕著に短く、第3回目においてもいずれも時間は増加しているがやはり留まっている時間は短かった。次に刺激受動回避については第2回目ではSAMR1は13匹中4匹、3回目は13匹中12匹が回避していた。しかしSAMP10では2回目及び3回目は11匹中0匹であり、SAMP10には学習習得の障害のあることが認められた。

SAMP10において、第2回目の学習習得試験により明室に留まっている時間は紅花花弁抽出液投与群 (N=9) では水道水投与群に比べて約2倍増加し、その時間は第3回目においては大きく増加していた。しかし対照の紅花花弁抽出液投与群 (N=15) のSAMR1においては、第2回目及び3回目では水道水投与群 (N=15) に比べて逆に減少していた (図10)。また、刺激受動回避をしたマウスはSAMP10において3回目で水道水投与群では受動回避率は0%であったが、紅花花弁抽出液投与群においては22%であった。



刺激受動回避したマウス数

1日目	1	2	3	
RC	0/13	4/13	12/13	92%
RS	0/15	2/15	11/15	73%
PC	0/11	0/11	0/11	0%
PS	0/9	0/9	2/9	22%

図10 老化促進モデルマウス (SAMP10とSAMR1) の学習試験

上の棒グラフは1日目の明室に留まった時間の合計(秒)を示す。

下の表は明室に留まった(刺激受動回避した)マウス数を示す。

RC : SAMR1の水道水投与群

RS : SAMR1の紅花花卉抽出液投与群

PC : SAMP10の水道水投与群

PS : SAMP10の紅花花卉抽出液投与群

以上より、SAMP10においては紅花花卉抽出液による学習効果が認められた。

(3) 寿命に対する紅花花卉抽出液の効果

SAMP10及びSAMR1に紅花花卉抽出液と水道水をそれぞれ4群(各16匹)に6ヶ月間投与し、生存数への影響を調べた。その結果、SAMR1では紅花花卉抽出液投与群及び水道水投与群のいずれにおいても16匹中16匹は生存していた。

SAMP10においては水道水を6ヶ月間投与すると5匹死んだが、紅花花卉抽出液投与群においては3匹が死んだのみであった(図11)。

以上より、SAMP10に対して紅花花卉抽出液を投与すると、延命効果の傾向のあることが明らかとなった。

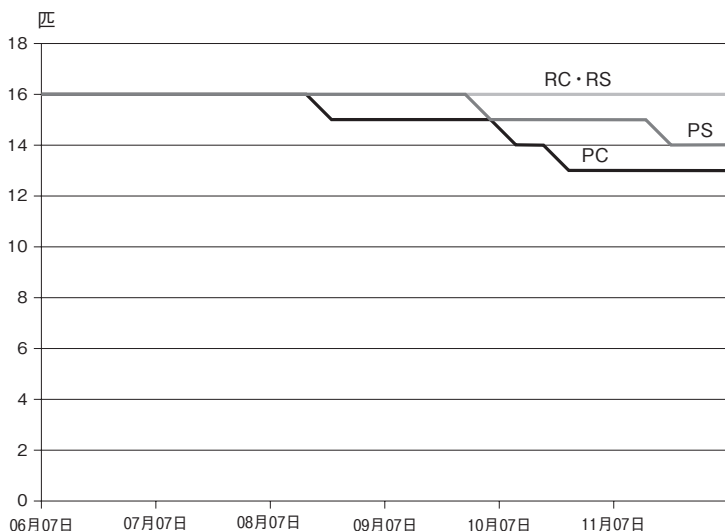


図11 紅花花弁抽出液の投与による生存数への影響

RC : SAMR1 の水道水投与群 RS : SAMR1 の紅花花弁抽出液投与群
 PC : SAMP10 の水道水投与群 PS : SAMP10 の紅花花弁抽出液投与群

(4) 紅花花弁のメタボローム解析

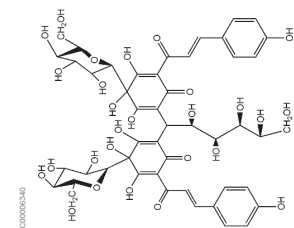
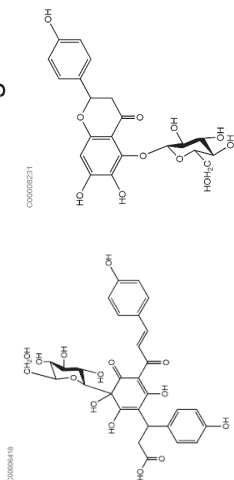
最上紅花の花弁にはカルサミン (carthamin)、safflor yellow B、Safflomin C、carthamidin 5-glucoside、precarthamin、hydroxysafflor yellow A、safflomin A、anhydroxysafflor yellow B が検出された (図12)。

また多くのポリフェノール及び未知のポリフェノールが検出された (図13)。

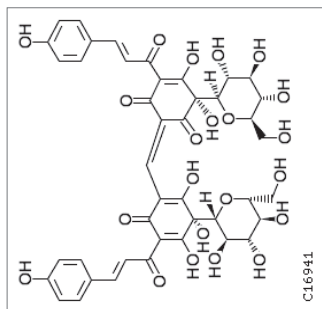
4. 考察

老化促進モデルマウス (SAM) は武田俊男京都大学名誉教授らにより開発され、病態より SAMP1 から SAMP11 に類別されている¹⁾。今回の研究においては SAMP8 と SAMP10 を用いた。SAMP8 は記憶障害及び学習障害を有し、認知症のモデルとみなされている。SAMP10 は記憶障害及び学習障害があり、脳の萎縮があるほか、精神不安症のモデルでもある。寿命はラット及びマウスは2年であるが、老化促進モデルマウスの寿命は約1年であり、延命効果を検

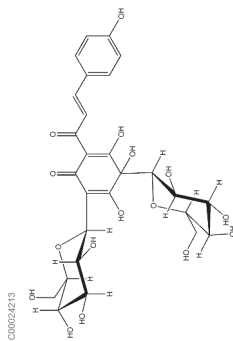
Safflomin C Carthamidin 5-glucoside



Safflor yellow B

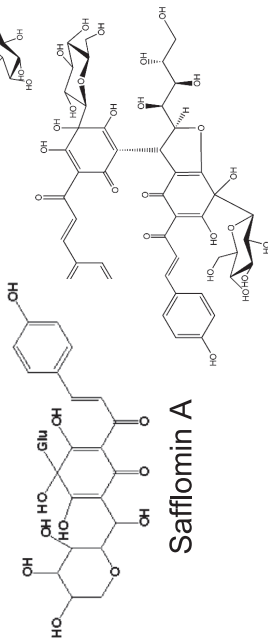
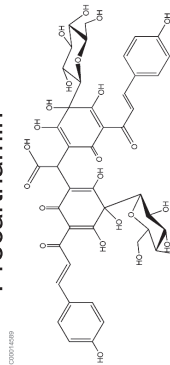


Carthamin



Hydroxysafflor yellow A

Precarthamin



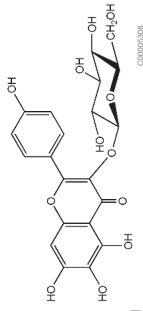
Safflomin A

Anhydroxysafflor yellow B

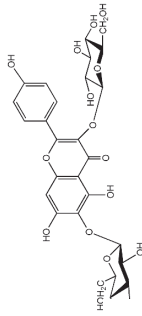
図 12 最上紅花の花弁に含まれるカルサミンとその誘導体

Kaempferol-3-O-Rutinoside*;Kaempferol-7-Neochesperifoside
 Quercetin-3,4'-di-O-glucoside
 Hyperoside-2;Quercetin-3-O-glucoside[Isouqueritrin]-2
 Kaempferol-3-O-glucoside[Astragalin]
 Rutin
 r-Hydroxyquinoline
 Rutin-1
 Apigenin;Aloe-emodin;Baicalin;Genistein;8-Hydroxydaizein
 Saponarin
 Hyperoside*;Quercetin-3-O-glucoside[Isouqueritrin]*;Quercetin-4'-O-glucoside[Spiraeoside]-1
 Keracyrin;Saponarin-1
 Quercetin-3,7-O-diglucoside*;Quercetin-3,5-O-diglucoside*
 Kaempferol-3-O-glucoside[Astragalin]-1
 Saponarin-2;Kaempferol-3-O-Rutinoside-1
 Kaempferol
 Quercetin-3-O-glucuronide
 Quercetin-3,7-O-diglucoside-1;Quercetin-3,5-O-diglucoside-1
 trans-3,5-Dimethoxy-a-hydroxycinnamaldehyde
 Datiscein;6-Hydroxyapigenin-1
 Quercetin*
 Fisetin;6-Hydroxyapigenin*
 Eriocitrin;Neocrocin;Eriocitrin
 7,8-Dihydroxycoumarin
 Quercetin-4'-O-glucoside[Spiraeoside]*
 Quercetin-1
 Hyperoside-1;Quercetin-3-O-glucoside[Isouqueritrin]-1
 Vitexin
 Apigenin-7-O-glucoside
 Kaempferol-3-O- α -L-mannopyranosyl(1 \rightarrow 2) β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6) β -D-glucopyranoside
 trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate
 Kaempferol-3-(2,6-di-O- α -mannopyranosyl)- β -galactopyranoside
 Sinapate
 Naringenin-7-glucoside
 Catechol
 Quercetin-3,7-O-diglucoside*;Quercetin-3,5-O-diglucoside*
 Chlorogenate
 Chirogenate
 (Kaempferol)
 p-Coumarate*
 Quercetin-3,7-O-diglucoside-1;Quercetin-3,5-O-diglucoside-1
 Homooientin*;Orientin*
 Caffeate*
 Irens-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate
 Eriocitrin;Neocrocin;Eriocitrin
 Gallate
 Datiscein;6-Hydroxyapigenin-1
 Saponarin*
 Quercetin-4'-O-glucoside[Spiraeoside]*
 Caffeate-1
 Fisetin*
 Ononin
 p-Coumarate-1
 Quercetin-3-O-beta-D-Glucopyranosyl-6'-Acetate
 Homooientin-1;Orientin-1

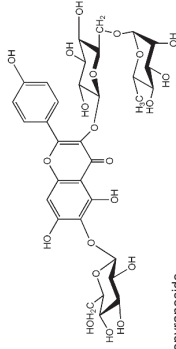
CO0005206



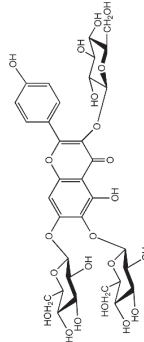
CO0005308



CO0005310



CO0005311



討するには適したモデル動物である⁷⁾。

老化促進モデルマウスの病態及び病態制御に関する研究論文の発表は世界に及び、最近武田らにより総説集が発刊されている⁸⁾。このように老化の研究には老化促進モデルマウスが最適な実験モデル動物である。

ddY マウスは老化促進モデルマウスの対照マウスとして使用した。成熟マウスでありながら最上紅花の花弁抽出液投与により、記憶保持効果の傾向が明室に留まる時間の延長により認められた。SAMP8は明らかに記憶及び学習に障害のあるマウスで、認知症のモデルマウスとして使用した。今回の実験成績では、最上紅花の花弁抽出液は記憶保持試験により明室に留まる時間及び刺激受動回避率を増加させたことから、明らかに最上紅花の花弁には記憶保持効果のあることが示された。また、SAMP10の場合、対照のSAMR1に比較して、明室に留まる時間は短く、電気刺激受動回避率はR1が92%に対してSAMP10は0%と明らかに顕著で学習障害があった。しかし、最上紅花の花弁抽出液の6ヶ月投与は電気刺激受動回避率の0%から22%に増加させたことから、記憶保持効果のあることが示された。

認知症に使用されている主な薬の薬理作用はコリンエステラーゼ阻害作用である。そのほかに血流改善作用剤と脳代謝機能賦活剤が一般に使用されている。紅花の花弁には血液循環促進作用がある。また花弁の色素には抗酸化作用がある。脳神経細胞死には、グルタミン酸神経伝達物質が受容体に結合すると、細胞外から入ったカルシウムイオンが一酸化窒素 (NO) 合成酵素に作用してNOができ、このNOが活性酸素のスーパーオキシドと反応して生成するスーパーオキシドアニオンが原因とされている。紅花の花弁にはスーパーオキシドを消去する抗酸化成分があること³⁾、グリア細胞の培養実験から、紅花の花弁抽出液は培養細胞死を押えること及びラット頭部の外傷による脳組織中の過酸化脂質及びDNA酸化物質 (6-ヒドロキシ-2-デオキシグアノシン) の生成は増加するが、予め花弁抽出液を投与させたラットではその生成は抑えられることから最上紅花の花弁には脳保護作用のあること³⁾を明らかにした。これらの作用が神経細胞死を防ぎ、血流の改善による神経機能を維持した結果、記憶保持効果が現れたものと推定される。

また紅花花弁抽出液によりSAMP10の延命効果が認められた。これは血圧

降下、血流改善、抗腫瘍、抗炎症、免疫賦活並びに抗酸化作用によることが示唆される。

また、さきに生活習慣病の予防の可能性として、ヒトにおいて最上紅花の乱花を摂取すると血圧低下の効果が見られた⁹⁾が、これは血流改善作用によることが大きい。最近リングポリフェノールまたは緑茶のカテキンは中性脂肪を減少させることが知られている。今回のわれわれの実験成績からヒトの血液中の中性脂肪は減少すること⁹⁾が示されたが、これは紅花の花弁に多く含まれるポリフェノールによることが示唆される。これらの実験成績から、最上紅花の花弁には生活習慣病予防並びに高齢者の疾病予防に大きな貢献が期待される。

またメタボローム解析により、最上紅花の花弁には多くのフラボノイド及びポリフェノールが存在することが明らかとなった。さきに最上紅花の花弁には赤色の色素のカルサミン及び、黄色の色素にはサフラワーイエロー及び多くの黄色の未知の誘導体があることが見出されている。これらはフラボノイドであり、ポリフェノールである。これらフラボノイド及びポリフェノールには抗酸化作用のあることが知られている。これらの相乗作用により素晴らしい抗酸化作用が、老化促進モデルマウスの記憶保持効果並びに延命作用の効果として大いに発揮しているものと想定される。

これらの考察をふまえると、最上紅花の花弁にはアンチエイジング作用のあることが示唆された。最近、最上紅花の栽培は庄内地域の砂地に適し、栽培可能であることを明らかにした^{9,10)}。これから高齢者はさらに増加するが、脳神経の機能維持のために呆けないために、紅花の乱花を用いた加工食品の開発が推奨される。

まとめ

1. ddYマウスに最上紅花の花弁抽出液を3ヶ月間吸水瓶にて投与すると、記憶保持時間を増加させる傾向が認められた。
2. 老化促進モデルマウス（SAMP8）に最上紅花の花弁抽出液を3ヶ月間投与した結果、記憶保持時間を延長させる効果が認められた。
3. 老化促進モデルマウス（SAMP10）に最上紅花の花弁抽出液を6ヶ月間投

与した結果、学習習得効果が認められ、生存率を増加させることが明らかとなった。

4. これらの成果は最上紅花の花びらにある抗酸化作用と血流促進作用によることが示唆された。
5. 最上紅花の花弁にはフラボノイドのほかに多くのポリフェノールと未知のポリフェノール検出された。

引用文献

- 1) <http://www.garbagenews.net/archives/2092270/html>
- 2) 平松緑, 紅花の奥深い魅力—種々の効用—, 現代と公益3, 44-54, 2002
- 3) Hiramatsu M, Takahashi T, Komatsu M et al., Antioxidant and neuroprotective activities of Mogami-benibana (Safflower, *Carthamus tinctorius* Linne), *Neurochem Res*, 34, 795-805, 2009
- 4) Lee YS, Choi CW, Kim JJ et al., Determination of mineral content in methanolic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract and its effect on osteoblast markers, *Int J Mol Sci*, 10, 292-305, 2009
- 5) Koyama N, Suzuki S, Furukawa Y et al., Effects of safflower seed extract supplementation on oxidation and cardiovascular risk markers in healthy human volunteers, *British J Nutrition*, 101, 568-575, 2009
- 6) Lee S-H, Lillehoj HS, Heckert RA et al., Immune enhancing properties of safflower leaf (*Carthamus tinctorius*) on chicken lymphocytes and macrophages, *J Poultry Sciences*, 45, 147-151, 2008
- 7) Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S et al., A new murine model of accelerated senescence. *Mech Aging Dev* 17, 183-194, 1981
- 8) The senescence-accelerated mouse (SAM) achievements and future directions, Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K et al. eds, Elsevier, 2013
- 9) 平松緑, 最上紅花の若菜栽培の1年間の取組, 東北公益文科大学総合研究論集 18, 103-132, 2010
- 10) 平松緑, 最上紅花の庄内砂丘の栽培開発と花びらを用いた加工食品の開発, 東北公益文科大学総合研究論集 22, 51-86, 2012