

Effect of Kumaizasa (*Sasa senanensis* Rehder) on the Inhibition of Advanced Glycation End Product (AGEs) Formation

Mio HORI, Masayuki YAGI, Keitaro NOMOTO, Takahiro KITANO, Ryo MIYAZAKI, Yoshikazu YONEI

(Received July 14, 2011)

Non-enzymatic reaction between glucose and protein leads to the formation of advanced glycation end products (AGEs), and its accumulation has been linked to the development of diabetic complications, as well as to the progression of age-related diseases. In recent years, attention has been paid to the effect of inhibiting AGE formation in the body for the purposes of anti-aging, health promotion, and lifestyle-disease prevention. In the present study, we evaluated the anti-glycation effects of Kumaizasa (*Sasa senanensis* Rehder) and the potential of its use as an anti-glycation product. Using an *in vitro* method with glucose and human serum albumin (HSA), we analyzed the inhibition of the formation of AGEs; specifically fluorescent AGEs, 3-deoxyglucosone (3DG), Pentosidine (Pent), and *N*^ε-(carboxymethyl)lysine(CML) by Kumaizasa utilizing fluorescence spectroscopy, HPLC, and enzyme linked immunoassay (ELISA). We analyzed its anti-glycation effects by comparing the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) against these glycated products with aminoguanidine, a known inhibitor of glycation. IC₅₀ of fluorescent AGEs by Kumaizasa (powder form) and aminoguanidine were almost equal concentrations, while IC₅₀ against 3DG, Pent, and CML were significantly lower for Kumaizasa (powder form) than that of aminoguanidine. IC₅₀ of 3DG by Kumaizasa (hot water extraction) and aminoguanidine were almost equal concentrations, while IC₅₀ against fluorescent AGEs, Pent, and CML were significantly lower for Kumaizasa (hot water extraction) than that of aminoguanidine. These results suggest that Kumaizasa strongly inhibits glycation and may be useful for anti-glycation products, including health foods and cosmetics.

Key words: glycation, advanced glycation end products (AGEs), Kumaizasa (*Sasa senanensis* Rehder)

キーワード: 糖化, 蛋白質糖化最終生成物(AGEs), クマイザサ(*Sasa senanensis* Rehder)

クマイザサ (*Sasa senanensis* Rehder) の蛋白質糖化最終生成物 (AGEs) 生成抑制作用の研究

堀未央, 八木雅之, 埜本慶太郎, 北野貴大, 宮崎亮, 米井嘉一

1. はじめに

グルコースは生体において重要なエネルギー源であり, 生命を維持する上で不可欠な物質である. 一方でグルコースは糖尿病の有無にかかわらず全ての人に老化の危険因子として関与する可能性がある. 近年, グルコースおよび糖代謝異常の老化への影響

についての研究が進んでいる¹⁾.

グルコースは蛋白質と共存すると非酵素的に反応し, 不可逆的な変性を起こす. この反応は糖化反応と呼ばれ, 蛋白質とグルコースが結合し, アマドリ化合物を経て蛋白質糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs) を生成する. AGEs に

はその生成中間体である 3-デオキシグルコソン (3DG), グリオキサール, メチルグリオキサールをはじめ, ピラリン, ペントシジン (Pent), カルボキシメチルリジン (CML) など, 数 100 種類の物質が同定されている。これら AGEs の生体内蓄積は, 糖尿病合併症の網膜症・腎症・神経症, 動脈硬化症, 骨粗鬆症, アルツハイマー病, 皮膚硬化, 加齢黄斑変成症に関与する^{1,2)}。

以上のように, 糖化反応および AGEs の生成・蓄積が健康長寿, 生活の質 (Quality of Life:QOL) の維持・向上に対し大きな危険因子となっている。健康長寿, QOL の維持・向上を達成するためには生活指導として提案できる抑制因子の探究が予防医学・健康増進に携わる機関の急務といえる。

今回の研究で注目した「クマイザサ (クマザサ) (*Sasa senanensis* Rehder)」は便秘の改善^{3,4)}, 抗ウイルス作用⁵⁾を期待して用いられてきた食経験豊かな素材である。葉には, 鉄, カリウム, マグネシウム, カルシウムなどのミネラルや, ビタミン C, K, B1, B2などが多く含まれている。しかしながらその生体作用については, これまでに多くの研究がなされてきたわけではない。そこで, 本研究では「クマイザサ」について *in vitro* 実験系における AGEs 生成抑制作用の有無を検証し「抗糖化」をキーワードとした健康食品・化粧品素材としての可能性を模索することを目的とした。実験モデルとしてヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) とグルコースとの糖化反応系を用いた。

2. 方法

2.1 サンプル

サンプルは株式会社ユニアル (東京都板橋区) より提供されたクマイザサを用いた。粉末はクマイザサ原料を乾燥後, 殺菌・粉砕し, 得られたもの (約 120 メッシュ) とした。熱水抽出物は原料から 80°C, 2 時間で抽出し作製した。陽性対照として塩酸アミノグアニジン (以下 AG) (和光純薬工業, 大阪府中央区) を用いた。

2.2 サンプル調製

クマイザサ粉末および AG を蒸留水で溶かし 1% に調製した。クマイザサ粉末は完全に溶解しなかったため懸濁液として使用し, 熱水抽出物は液体重量で 1% に調製した後, 調製液 5mL を 120±10°C, 3 時間加熱した時の前後の重量差からエキス固形分濃度を算出した。

2.3 AGEs 生成

AGEs 由来蛍光を既報の如く以下のように測定した⁶⁾。0.1mo1/L リン酸緩衝液 (PBS) (pH7.4) 500μL, 蒸留水 100μL, 40mg/mL ヒト血清アルブミン (HSA, Sigma Chemical Co.Ltd, MO, USA) 200μL, 2mo1/L グルコース水溶液 100μL に, 各濃度のクマイザサ粉末, クマイザサ熱水抽出物, または AG 水溶液を 100μL 添加し, 蒸留水を添加して総量を 1mL とした後, 60°C, 40 時間インキュベーションした (A)。同時に各反応ブランクとして, グルコース水溶液の代わりに蒸留水を添加したものをインキュベーションした (B)。陽性コントロールとして, クマイザサ粉末, クマイザサ熱水抽出物または AG を添加しない試料を調製してインキュベーションした (C)。同時に陽性コントロールに対するブランクとしてグルコース水溶液の代わりに蒸留水を添加したものをインキュベーションした (D)。メイラード反応阻害活性の評価は, 各試料反応液 (A, B, C, D) 中のメイラード反応生成物量を測定した。マイクロプレートリーダー ARVO MX 1420 ARVO series Multilabel Counter (Perkin-Elmer Japan Corp.) を用い, 励起波長 370nm, 蛍光波長: 440nm で AGEs 由来蛍光を測定した。下式を用いて陽性コントロールに対する AGEs の生成抑制率を算出し, 抗糖化活性として IC₅₀ (50% 生成阻害濃度) を算出した。

$$\text{蛍光性 AGEs 生成抑制率 (\%)} = \{1 - (A - B) / (C - D)\} \times 100$$

蛍光性 AGEs 生成抑制率は Fig. 1 に示すように, 各サンプルを 3 濃度 (0.1%, 0.01%, 0.001%) で反応液に添加し, 反応後の AGEs 生成抑制率から検量線を作成した。IC₅₀ は生成抑制率 50% に相当するサンプル濃度とした。

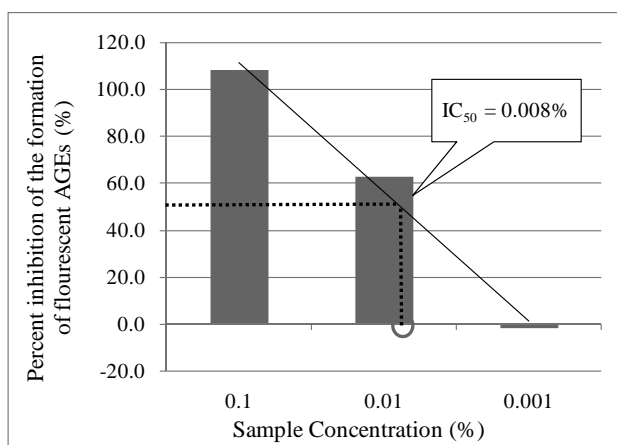


Fig. 1. The method of calculation of inhibitory concentration IC_{50} (50% inhibitory concentration) (Sample: Aminoguanidine)

2.4 HPLC

3DG は既報の如く HPLC 法にて測定した⁷⁾。3DG 測定用サンプルは、各サンプル 200 μ L に蒸留水 300 μ L、内部標準物質として 20mg/mL 2,3-pentanedione (和光純薬工業) 25 μ L を添加し攪拌混合した。次いで 6.0% 過塩素酸 (和光純薬工業) 500 μ L を加え攪拌後、12,000rpm、10 分間遠心分離した。遠心分離後は、上清 800 μ L を分注し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (和光純薬工業) 1,000 μ L を加え攪拌した。ラベル化剤として 1.0 mg/mL 2,3-diaminonaphthalene (同仁化学研究所) 100 μ L を加え、攪拌し室温で 1 日静置し、以下の条件で HPLC へ導入し、3DG を測定した。

カラムは YMC-Pack CN, 150 x 4.6 mm I.D. (ワイエムシイ, 京都) を使用した。溶離液は 50mM リン酸 : アセトニトリル : メタノール = 70 : 17 : 13 を調製した。流速は 1.0mL/min, 検出波長 UV 268 nm とした。抗 3DG 活性として IC_{50} を算出し、小数点以下 3 桁まで表示した。

2.5 ELISA

ペントシジンは市販のキット (FSK ペントシジン : 伏見製薬所, 香川) を用いて ELISA 法にて測定した⁷⁾。各 50 μ L のサンプルまたはペントシジン標準

液に、プロナーゼ溶液 20 μ L とトリス塩酸緩衝液 80 μ L を加え、それらの混合液 55 μ L を 90 分インキュベーションした後、沸騰水中で 15 分加熱しプロナーゼを不活化した。各サンプルは、マイクロプレートリーダー上のウェルに注入し、37 $^{\circ}$ C、60 分インキュベーションした。キットに添付の抗ペントシジンモノクローナル抗体溶液 50 μ L とサンプルまたはペントシジン標準液を加え、37 $^{\circ}$ C、60 分インキュベーションした。その後 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 0.5mg/mL を含む発色剤を各ウェルに添加後、10 分間反応させた後、TMB 反応停止緩衝液 100 μ L を加え反応停止させた。得られた反応液は反応液添加後停止後 10 分以内に 450nm (主波長) / 630nm (参照波長) における吸光度を測定した。サンプル中のペントシジン濃度はペントシジン標準液で作成した検量線から算出した。抗 Pent 活性は IC_{50} を算出し、小数点以下 3 桁まで表示した。

CML (*N*^ε-(carboxymethyl)lysine) は、市販のキット (CycLex CML / *N*^ε-(carboxymethyl) Lysine ELISA Kit : CycLex Co., Ltd.) を用いて ELISA 法にて測定した⁷⁾。まず測定キットに添付の濃縮洗浄液 50mL に精製水 450mL を加え (10 倍希釈), 500mL の洗浄液を調製した。さらに添付の抗 CML モノクローナル抗体 (一次抗体) に精製水 3mL を加え、よく攪拌し、10 分間静置した。このうち 600 μ L を取り出し、精製水 5.4mL を加え (10 倍希釈), 計 6mL の一次抗体反応液を作成した。CML-HSA 標準液 (standard) に精製水 500 μ L を加え、CML-HSA Master standard (20 ng/mL) を調製した。これらを用いて検量線を作成し、濃度を算出した。各サンプルの遠心上清 30 μ L にサンプル希釈用緩衝液 90 μ L を加え、さらに一次抗体反応液 120 μ L を加え軽く攪拌した。次に、サンプルを 100 μ L ずつマイクロプレート上のウェルに注入し、室温で攪拌しながら反応させた。その後、各ウェルの反応液を捨て 200 μ L ずつの洗浄液で 4 回洗浄した。さらに HRP 標識二次抗体を 100 μ L ずつ各ウェルに注入し、室温で 60 分攪拌しながら反応させた。反応終了後、上記と同様の洗浄操作を行った。各ウェルに反応基質液 (substrate reagent) 100 μ L を注入して 1 分攪拌した後、アルミホイルでプレート

を包み遮光し、10分間静置した。その後各ウェルに反応停止液 100 μ L を分注し、1分攪拌し、直ちにマイクロプレートリーダーで 450nm (主波長) / 540nm (参照波長) で測定した。サンプル中の CML 濃度は CML-HSA Standard で検量線を作成して算出した。抗 CML 活性は IC₅₀ を算出し、小数点以下 3 桁まで表示した。

3. 結果

各サンプル溶液の糖化物生成抑制作用を IC₅₀ として Table 1 に示した。クマイザサ (粉末) の抗糖化活性の IC₅₀ は抑制率 (%) として Fig. 2~4 に AG と同等であった。クマイザサ (熱水抽出物) の抗糖化活性の IC₅₀ は AG と比べ極めて小さかった。

3DG 生成阻害活性に関して、クマイザサ (熱水抽出物) の IC₅₀ はアミノグアニジンと同等であった。クマイザサ (粉末) の IC₅₀ は AG よりも極めて小さかった。

Pent 生成阻害活性に関して、AG と比較してクマイザサ (粉末) および (熱水抽出物) の IC₅₀ は極めて小さかった。

CML 生成阻害率に関して、AG と比較してクマイザサ (粉末) および (熱水抽出物) の IC₅₀ は極めて小さかった。

4. 考察

本研究では、HSA とグルコースを反応させた *in vitro* 実験系において、クマイザサ抽出物の抗糖化作用を検討した結果、AG と同等以上の AGEs 生成抑制作用が確認された。

AG は AGEs 生成経路中の 3DG 分子内のカルボニル基を封鎖し以降の反応を止めるようにデザインされた物質であり、先行研究においても陽性対照として用いている^{6,7)}。AGEs として評価した項目は蛍光性 AGEs, CML, Pent, 3DG で先行研究^{6,7)}と同様である。CML, Pent の ELISA 法測定値は HPLC による測定値と相関性があることが確認されている⁸⁾。CML の ELISA 法による測定の際には加熱処理により非特異的 CML が生成されることが指摘されており⁹⁾、今回は熱処理を加えない方法で測定した。

これまでハーブや食用植物の抗糖化活性について

研究報告があり、オウギに含まれる astragaloside が CML および Pent 生成を有意に抑制することが示されている⁸⁾。今回と同様に HSA グルコース反応モデルを用いた著者らの検討では、カモミール (Chamomile: *Anthemis nobilis*), セイヨウサンザシ (Hawthorn: *Crataegus laevigata* (*C. oxyacantha*)), ドクダミ (Doku-dami: *Houttuyniacordata*), ブドウ葉 (Grape: *Vitis vinifera*) の混合ハーブエキス⁶⁾、および食用紫菊花抽出物⁷⁾に強い抗糖化活性が確認しており、クマイザサ抽出物もそれらと同等の活性を有することが示された。

クマイザサ (クマザサ) はイネ科の植物で、そのほとんどが日本に分布し、中国東北部~朝鮮半島、樺太、千島列島などにも分布が確認されている。クマイザサは、殺菌作用が強く様々な保存食に利用され、民間伝承ならびに古典薬物書の 1 つである「本草綱目」にも収められている食経験豊富な素材である。ササ多糖体、アミノ酸、ビタミン、ミネラルを豊富に含有する。

実験的にも抗炎症作用^{10,11)}、抗酸化作用¹²⁾、免疫刺激作用¹³⁾、抗ウイルス・抗菌作用^{5,14)}、胃粘膜保護作用¹⁵⁾が報告されている。ササに含まれる物質の中で抗酸化活性が強い成分として Absolutely Hemicellulose Senanensis (AHSS) が得られ、AHSS にはスーパーオキシド除去作用ならびにラット小腸の虚血再還流障害に対し抑制作用が確認されている¹²⁾。AGEs 生成経路においては、CML 産生過程には酸化反応が深く関与している¹⁶⁾。今回の試験結果においても CML 生成抑制作用が強く見られており、ササ抽出物の抗糖化作用に加え、AHSS の抗酸化作用が関与している可能性がある。

クマザサのヒトにおける作用としては、被検者 20 例を対象に 6 週間クマザサ抽出物を経口投与した報告があり、便秘の改善ならびに安全性が確認されている⁴⁾。

今回、HSA とグルコースを反応させた *in vitro* 実験系において、クマイザサ抽出物の抗糖化作用を検討した。クマイザサについては初めて糖化物生成抑制作用が確認され、その活性はアミノグアニジンと同等以上であった。クマイザサは古来より民間薬な

Table 1. Inhibitory activity of the formation of each glycated product

Sample	Anti-glycation activity	Anti-3DG activity	Anti-Pent activity	Anti-CML activity
AG	0.008	0.003	>0.1	0.071
Kumaizasa (powder)	0.008	<0.001	<0.001	<0.001
Kumaizasa (Hot water extraction)	<0.001	0.002	<0.001	<0.001

unit: %

Anti-glycation activity : 50% inhibitory concentration against fluorescent AGEs

Anti-3DG activity : 50% inhibitory concentration against 3DG

Anti-Pent activity : 50% inhibitory concentration against Pent

Anti-CML activity : 50% inhibitory concentration against CML

AG: aminoguanidine

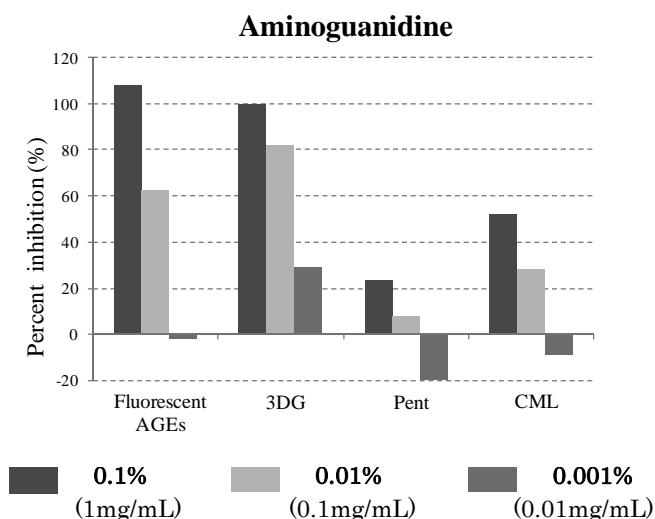


Fig. 2. Glycation inhibitory activity of aminoguanidine

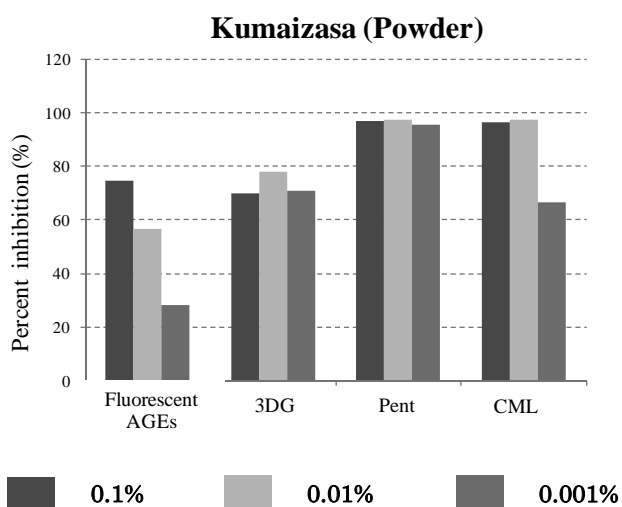


Fig. 3. Glycation inhibitory activity of Kumaizasa (powder)

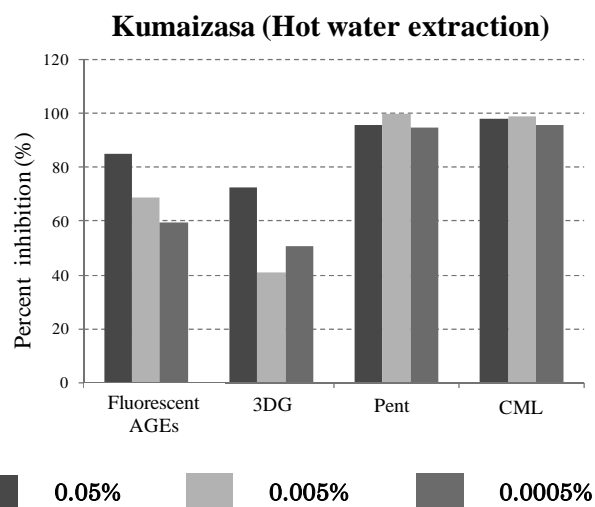


Fig. 4. Glycation inhibitory activity of Kumaizasa (hot water extraction)

どに利用されてきた食経験豊富な素材であり高い安全性が期待される。これまでも *in vitro* 実験系で抗糖化活性を示した成分が、実際にヒトにおいて抗糖化活性を発揮する例があることから¹⁷⁾、クマイザサ抽出物においても、ヒト臨床試験を行うことで生体での効果が確認できるのではないかと期待される。

謝辞，本研究の遂行にあたり理工学研究所研究助成を受けたことを感謝する。

参考文献

- 1) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, Kaji Y, Yonei Y. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Medicine* 7: 112-119, 2010.
- 2) Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Fujii N. Pathological role of D-amino acid-containing proteins and advanced glycation end products in the development of age-related macular degeneration. *Anti-Aging Medicine* 7: 107-111, 2010.
- 3) 小池田崇史、斎藤安弘、八木勇三、原高明。便秘傾向者の排便状況、腸内菌叢およびNK細胞活性に対する「SanSTAGE ソフトカプセル」摂取の効果。新薬と臨床 56: 163-170, 2007.
- 4) 柿野賢一、高良毅、鈴木直子、山本和雄、来海芳久。肥満、便秘および老化現象に対する「出雲クマザサ(よささ)エキス」摂取の効果と安全性。新薬と臨床 59: 477-487, 2010.
- 5) 阿久澤和彦、山田理恵、畢長暁、定成秀貴、松原京子、土田裕三、渡邊邦友、二ノ宮真之、額纈守、村山次哉。クマザサ含有成分によるヒトサイトメガロウイルスの増殖抑制効果。日本補完代替医療学会誌 7: 25-33, 2010.
- 6) Yonei Y, Yagi M, Hibino S, Matsuura. Herbal extracts inhibit Maillard reaction, and reduce chronic diabetic complications risk in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anti-Aging Medicine* 5: 93-98, 2008.
- 7) 北野貴大、八木雅之、榎本慶太郎、堀未央、庄野繁一、米井嘉一、原英郎、山路明俊。食用紫菊花の蛋白糖化最終生成物 (AGEs) 生成抑制作用の研究。New Food Industry 53: 1-10, 2011.
- 8) Motomura K, Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Takeya M, Nohara T, Nagai R, Ikeda T. Astragalosides isolated from the root of *Astragalus radix* inhibits the formation of advanced glycation end-products. *J Agric Food Chem* 57: 7666-7672, 2009.
- 9) Hayashi CM, Nagai R, Miyazaki K, Hayase F, Araki T, Ono T, Horiuchi S. Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N^ε-(carboxymethyl)lysine by short-term heating: possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Lab Invest* 82: 795-807, 2002.
- 10) Okazaki M, Tsuji M, Yamazaki Y, Kanda Y, Iwai S, Oguchi K. Inhibitory effects of *SasasenansensisRehder* extract (SE) on calcium-ionophore A23187-induced histamine release from rat peritoneal exudate cells. *Jpn J Pharmacol* 79: 489-492, 1999.
- 11) Zhou L, Hashimoto K, Satoh K, Yokote Y, Kitajima M, Oizumi T, Oizumi H, Sakagami H. Effect of *SasasenansensisRehder* extract on NO and PGE2 production by activated mouse macrophage-like RAW264.7 cells. *In Vivo* 23: 773-777, 2009.
- 12) Kurokawa T, Itagaki S, Yamaji T, Nakata C, Noda T, Hirano T, Iseki K. Antioxidant activity of a novel extract from bamboo grass (AHSS) against ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *BiolPharm Bull* 29: 2301-2303, 2006.
- 13) Seki T, Kida K, Maeda H. Immunostimulation-mediated anti-tumor activity of bamboo (*Sasasenansensis*) leaf extracts obtained under 'vigorous' condition. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008 May 7. [Epub ahead of print]
- 14) Sakagami H, Amano S, Kikuchi H, Nakamura Y, Kuroshita R, Watanabe S, Satoh K, Hasegawa H, Nomura A, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Taniguchi S, Oizumi T. Antiviral, antibacterial and vitamin C-synergized radical-scavenging activity of *SasasenansensisRehder* extract. *In Vivo* 22: 471-476, 2008.
- 15) Ohizumi T, Nakayama S, Oguchi K. Effects of *SasaSenansensisRehder* (SE) on stress or ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. *The Showa University Journal of Medical Sciences* 3: 133-141, 1991.
- 16) Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, N^ε-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycooxidation reactions. *J BiolChem* 271: 9982-9986, 1996.
- 17) Yonei Y, Miyazaki R, Takahashi Y, Takahashi H,

Nomoto K, Yagi M, Kawai H, Kubo M, Matsuura N.
Anti-glycation effect of mixed herbal extract in
individuals with pre-diabetes mellitus: a
double-blind, placebo-controlled, parallel group
study. *Anti-Aging Medicine* 7: 26-35, 2010.