福井県産農作物のラジカル産生抑制活性の比較検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2010-11-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 正和, 大東, 肇 メールアドレス: 所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/121

［研究論文］

福井県産農作物のラジカル産生抑制活性の比較検討

高橋　正和　・　大東　肇

1．序

食細胞である好中球やマクロファージは、感染微生物が我々の体内に侵入した時、これを取込んで殺菌・分解する重要な細胞であり、生体防御機構の一翼を担っている。この殺菌作用には、食細胞内で産生される活性酸素分子種（ROS）やフリーラジカルが活用されている。ROSにはNADPHオキシダーゼ（NOX）によって産生されるスーパーオキシドアニオンラジカル（O_2^-・）に由来するヒドロキシラジカル（・OH）や過酸化水素（H_2O_2）など多様な化学種が含まれる（図１）[1]。同様に、食細胞においては誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）によって生産される一酸化窒素（NO）も殺菌・炎症応答において重要なラジカル分子であり、多様な役割を果たしている（図１）[2]。しかしながら、炎症局所におけるROSやNOの慢性的な過剰産生は細胞や組織を障害し、生活習慣病に見られる多くの酸化ストレス障害や炎症性疾患の原因となることが報告されており、O_2^-・を含むROSやNOの過剰産生抑制は慢性炎症性疾患の予防にとって重要な課題である[3-5]。

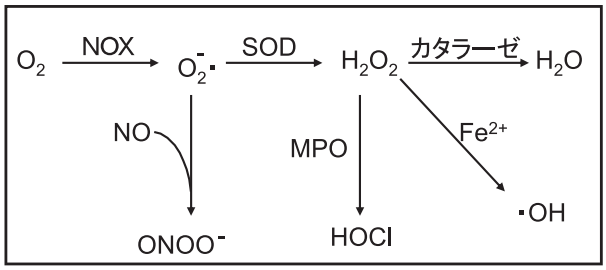

図１．食細胞における主要なROS生成機構とNOの関わり
SOD, スーパーオキシドジスムターゼ
MPO, ミエロペルオキシダーゼ

生活習慣病に関しては、医薬品による治療に至る以前に生活習慣の改善による予防が重要である。この観点から食による炎症性疾患予防の重要性が増しており、これまでに多様な食素材から抗酸化性・抗炎症性化合物など多数の生理活性化合物が報告され、国内外で精力的な研究が展開されている[6]。

このような背景のもとで我々は福井県特産農作物について抗酸化・抗炎症活性を評価し、その活性化合物を突き止め、分子レベルで明確な科学的証拠を提示することによって福井県特産

受付日　2010．4．15
受理日　2010．6．7
所　属　福井県立大学生物資源学部生物資源学科

農作物の付加価値を高めることを目指している。特に、食細胞が産生する２種類のラジカル、O_2^-・と NO の産生抑制活性を示す化合物に注目して研究を進めており、本研究報告ではその第一報として、複数の福井県特産農作物に関する O_2^-・および NO ラジカル産生抑制活性の検討結果を報告する。まず福井県特産品の中でも有名な大野市特産のサトイモ、三里浜特産のラッキョウ、福井県北部丘陵地域で盛んに栽培されているメロンなどに注目し、これら作物およびその類縁作物を中心に検討した。

２．研究方法

１）農作物抽出物の調製

サトイモ類と赤ズイキは JA テラル越前（大野市）から、シソ（木田チリメンシソ）は木田シソ普及組合（福井市）から入手した。ラッキョウは三里浜特産農業協同組合（坂井市三国町）より分譲していただいた。ウリ科作物であるメロン（アールスメロン）とマクワウリ（キンカンウリ、瓜）は、あわら市内にて市販品を入手した。これらの作物をアセトンまたはメタノールで２週間以上浸漬し、得られた抽出物を濃縮後、水－酢酸エチルで分配し、酢酸エチル可溶画分を濃縮後に活性測定に供した。

２）アッセイ用細胞株の継代培養

ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60とマウスマクロファージ様細胞株 RAW264は、ともに理化学研究所セルバンクより購入した。HL-60および RAW264の基本培地には RPMI-1640培地（R 8758；Sigma）と MEM（M5650；Sigma）(4 mM L-Gln 添加）をそれぞれ使用し、共に終濃度10％ウシ胎仔血清（FBS)、100 U/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシンを添加して37℃、５％CO_2にて培養した。

３）O_2^-・産生測定

HL-60を1.25％ジメチルスルホキシド（DMSO）存在下で１週間培養して好中球様に分化誘導させた後、Hanks 液（137 mM NaCl, 5 mM KCl, 16 mM $MgSO_4$, 0.2 mM Na_2HPO_4, 0.4 mM KH_2PO_4, 1 mM $CaCl_2$, 4 mM $NaHCO_3$, 6 mM D-グルコース）にて洗浄・懸濁した[7,8]。この分化細胞を phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA；和光純薬工業）で刺激し、産生された O_2^-・によって WST-１（同仁化学）から生じるホルマザンを $Abs._{450\,nm}$ によって測定した[9-11]。以上の系において、分化 HL-60を各種食素材抽出物の存在下で PMA 刺激したときに認められる $Abs._{450\,nm}$ の増加抑制度を調べ、O_2^-・産生阻害活性を評価した。なお反応は２連で行い、細胞生存率に影響がないか確認するためサンプル終濃度を変えながら数回行った。分化 HL-60、WST-１、PMA はそれぞれ終濃度 5 x 10^5 cells/ml、25 μg/ml、２ng/ml とし、37℃で１時間反応させた。

４）ＮＯ産生測定

RAW264を 2 x 10^5 cells/ml に調製し、100 ng/ml リポ多糖（LPS，大腸菌0111 : B4由来；和光

純薬）と100 U/ml 組換え型マウスインターフェロン-γ（IFN-γ；R&D systems）と共に24穴プレートに播種して37℃、５%CO_2にて培養し、NO を産生させた。RAW264が産生する NO は水に溶解して亜硝酸イオンを生じる。そこで24時間後に細胞培養上清を回収して等量の Griess 反応試薬（0.5% sulfanilamide, 2.5% H_3PO_4, 0.05% *N*-（1-naphtyl) ethylendiamine dihydrochloride）と混合し、亜硝酸イオンと Griess 試薬が反応して生じるジアゾ化合物を $Abs._{543\,nm}$ によって測定した[12,13]。以上の系において、RAW264を各種食素材抽出物の存在下で LPS および IFN-γで刺激し、$Abs._{543\,nm}$ の増加抑制度を調べて NO 産生阻害活性を評価した。反応は２連で行い、細胞生存率に影響がないか確認するためサンプル終濃度を変えながら数回実施した。

３．結果

大野市の特産品である赤ズイキは、サトイモの一品種（八頭）の茎のことであり、甘酢漬けに加工されて市販されている。この赤ズイキについては皮つき・皮なしの２種類を入手し、抽出物を調製した。また茎だけでなくイモについても抽出物を調製し、茎とイモの違いを検討した。さらに、大野市の主要ブランドである上庄イモ（大野在来品種）や、一般にはほとんど流通していない早生品種のサトイモも入手し、品種間の違いを比較検討した。また、福井市木田地区で栽培されている木田チリメンシソについては、葉と茎に分けて抽出物を調製し、両者を比較した。さらに坂井市三国町で栽培されているラッキョウに関しては１年堀と３年堀の２種類に関して比較を行った。また、あわら市内で栽培されているメロンをはじめとするウリ科作物について比較するため、抽出物を調製して検討した。

各抽出物について酢酸エチル可溶画分を調製し、O_2^-・産生阻害活性ならびに NO 産生阻害活性を検討した。細胞毒性がないことを確認するため濃度を変えながら数回実験を行い、代表的な結果を図２、３に示した(サンプル終濃度は、それぞれ70および 50 μg/ml)。その結果、50%以上の O_2^-・産生阻害活性を示した作物は、木田チリメンシソ、八頭のイモ部分、早生イモ、瓜、であった。一方、NO 産生阻害活性については、ウリ科の中ではアールスメロン、ラッキョウでは１年堀、サトイモ類については赤ズイキが特に強い活性を示した。

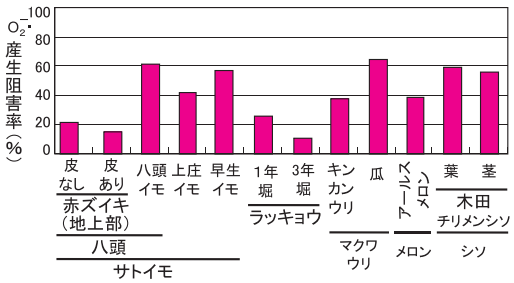

図２．福井県産農作物抽出物の O_2^-・産生抑制活性
供試濃度はすべて70 μg/ml。

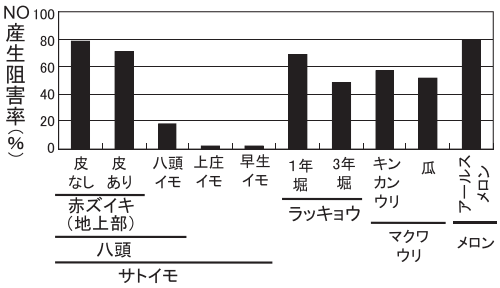

図３．福井県産農作物抽出物の NO 産生抑制活性
供試濃度はすべて50 μg/ml。

4．考察

興味深いことに、同じ作物がO_2^-・とNOの両方について強い産生阻害活性を示すとは限らず、むしろ赤ズイキやラッキョウ（1年堀、3年堀）のようにNO産生阻害活性が顕著な作物や、逆にサトイモ類のイモ部分のようにO_2^-・産生阻害活性が顕著な作物が見出された。さらに、同じ品種のサトイモでも、八頭では茎（赤ズイキ）が強いNO産生阻害活性を示すのに対し、イモ部分はO_2^-・産生阻害活性が顕著であり、同一作物でも部位によって含まれる活性成分の特異性がまったく異なる例が認められた。またイモ部分はどのサトイモ品種でもNO産生抑制活性は低く、O_2^-・産生阻害活性は比較的高い傾向があった。

以上のように同一作物でも部位によってあるいは品種によって活性に強弱が認められた。これは植物体内における活性化合物の種類や含有量が部位によって異なることによると予想された。

なお、赤ズイキについては皮の有無は大きく影響しないことが示された。商品加工する場合には皮部分は除去されているが、NO産生阻害活性に関しては特に影響しないことが判明した。ラッキョウに関しては、予想に反して福井県特産として有名な3年堀ラッキョウよりも1年堀方が若干高いNO産生抑制活性を示した。しかしその差は極端に大きなものではないため、3年堀にも十分な活性化合物が含有されていると考えられる。

また木田チリメンシソについては明瞭なO_2^-・産生阻害活性が認められた。木田チリメンシソは福井市木田地区特産の赤シソであり、梅干の色づけに利用される固有品種である。高いDPPHラジカル産生阻害活性も報告されており、多くの加工食品への利用に期待が持たれる素材である[14]。

今回調べた福井県特産農作物には、総じてラジカル産生抑制活性が認められたことから、これらの農作物は炎症との関わりが深い生活習慣病の予防に役立つものと期待される。これまでに報告されている各種食用作物抽出物の研究結果と比較しても、供試濃度（50－70 μg/ml）にて50％を超える阻害活性を示す有望なものが認められており、今後その活性成分の特定に興味がもたれる[12,15-16]。

5．おわりに

本研究で検討した福井県特産農作物およびその類縁作物の中から、興味深い食素材を見出すに至った。これらは健康増進に役立つ食素材として非常に興味深い。特に顕著な活性を示した作物については、現在抽出物に含まれる活性成分の精製を進めており、既にいくつかの化合物の単離・構造決定に成功している（未発表データ）。活性化合物の同定・定量分析を通じて、品種間差や部位ごとの違いが説明できるものと考え、さらに研究を進めている。

なお本研究報告で用いたアッセイ結果では、O_2^-・とNOの産生段階が阻害されているのか、

あるいは産生後にラジカル捕捉活性によって消去されているのか、明確な区別はなされていない。作物中には多様な化合物が含まれており、活性化合物にはどちらの作用メカニズムで作用するものも含まれていると思われる。近年、特に前者の産生段階の阻害が注目されており、我々も活性化合物の作用機構に関して現在検討を進めている[4)]。

また本研究報告では細胞株を用いて得られた実験データを示した。当然ながら、食としての作用を考える場合には、作物抽出物あるいは作物自身を個体レベルで経口摂取した場合の有効性についても検討しなければならない。また加工による影響も重要であり、より高い機能を引出すための加工法にも興味がもたれる。これらの点に関しても検討を始めている。

文献

1）住本英樹．*実験医学　増刊*，vol. 27，No.25, 30-37（2009）.

2）NO－化学と生物．化学総説，No. 30（1996）.

3）Murakami A, Ohigashi H. *Int. J. Cancer,* **121**, 2357–2363（2007）.

4）大東　肇.「栄養とがん」（ネスレ栄養科学会議監修），31-54（2009）.

5）長瀬美樹，藤田敏郎．*実験医学　増刊*，vol.25, No.15, 223-227（2007）.

6）機能性食品の事典.（荒井綜一ら編），朝倉書店（2007）.

7）Kim HW, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. *Cancer Lett.,* **176**,7–16 （2002）.

8）Carrigan SO, Weppler AL, Issekutz AC. *Immunol.,* **115**, 108–117 （2005）.

9）Tan AS, Berridge MV. *J. Immunol. Methods,* **238**, 59–68 （2000）.

10）Ukeda H, Kawana D, Maeda S, Sawamura M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **63**, 485–488 （1999）.

11）受田浩之　*Dojin News*, 112, 1–8 （2004）.

12）Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. *Cancer Lett.,* **125**, 199–207 （1998）.

13）Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. *Anal. Biochem.,* **126**, 131–138 （1982）.

14）倉内美奈．*平成18年度食品加工に関する試験成績（福井県農業試験場食品加工研究所）*，18-20（2007）.

15）大東　肇，小清水弘一．*日本農芸化学会誌*，vol. 67，No. 1, 31-34（1993）.

16）Jiwajinda S, Santisopasri V, Murakami A, Kim OK, Kim HW, Ohigashi H. *Asian Pacific J. Cancer Prev.,* **3**, 215–223 （2002）.