福井県産ウメ抽出物ならびにエゴマ油成分の肝細胞脂肪蓄積抑制作用の検討

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2015-10-06
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 高橋, 正和, 村上, 茂, 久保, 義人, 小林, 恭一
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/67

［研究論文］

福井県産ウメ抽出物ならびに エゴマ油成分の肝細胞脂肪蓄積抑制作用の検討

高橋　正和[1)]・村上　　茂[1)]・久保　義人[2)]・小林　恭一[2)]

1．序

近年、生活習慣病の患者数増加とともに明瞭な飲酒歴を持たない非アルコール性脂肪肝障害（non–alcoholic fatty liver disease；NAFLD）の報告例が年々増加しており、その患者数は1000万人～2000万人に及ぶといわれている[1,2)]。NAFLD は肥満による肝臓への脂肪蓄積を第一原因（ファーストヒット）として発症する。その約９割は単純脂肪肝であるが、約10％は酸化ストレス・炎症反応など次の刺激（セカンドヒット）によって非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に進行し、さらには肝硬変・肝臓がんへと進行する[3,4)]。このため運動や食事制限だけでなく、普段の食生活で予防につながる食成分についても、現在注目が集まっている。そこで本研究では、この NAFLD 発症のファーストヒットとなる肝臓細胞への脂肪蓄積や炎症反応に対する福井県産作物、特にウメ抽出物やエゴマ油およびその主成分の抑制効果を検討した。

ウメ（*Prunus mume*）は全国各地で栽培されており、和歌山県の南高梅が最大の生産量を誇っている[5)]。福井県で現在栽培されている「紅映（紅サシ）」や「剣先」は、明治初期に開発された品種であり、前者は「福井梅」のブランドで知られる梅干し製造用として、後者は梅酒の原料用としてよく知られている[6)]。この他に新しく開発された品種も含め、福井県では三方五湖周辺を中心に栽培が盛んであり、その栽培面積（結果樹面積）(497 ha（平成26年実績)）は和歌山、群馬、茨城、長野についで全国５位、日本海側では最大の産地となっている（表１）[5)]。ウメはクエン酸をはじめとする有機酸類が豊富に含まれ、古くから疲労回復効果がうたわれているほか、近年では (+)–syringaresinol による *Helicobacter pyroli* の運動抑制作用[7)]、抗酸化成

表１　都道府県別ウメ結果樹面積・収穫量（H26年産）

都道府県名	結果樹面積(ha)	収穫量(t)
和歌山県	5,140	71,400
群馬県	1,040	5,400
茨城県	511	1,380
長野県	503	2,190
福井県	497	1,860
宮城県	465	1,510
山梨県	436	1,860

※結果樹面積順で１～７位を示す

受付日　2015. 5. 1
受理日　2015. 7. 7
所　属　１）生物資源学部、２）福井県食品加工研究所

分 lyoniresinol の単離[8]など、機能性食資源としての新たな科学的根拠を提示する報告がなされている[9]。

一方、シソ科植物のエゴマ（*Perilla frutescens* var. *frutescens*）（荏胡麻）は、その種子から *n*−3系脂肪酸である α−リノレン酸（C18 : 3, *n*−3）を豊富に含むエゴマ油が得られることが最大の特徴である。食用油（油脂）は通常３分子の脂肪酸がグリセリンと縮合したトリアシルグリセロールであるが、油脂の種類によって脂肪酸ごとの含有率は異なる。一般に動物性脂肪では飽和脂肪酸の含有率が高いが、植物油には不飽和脂肪酸の含有率が高いものが多い。例えば、キャノーラオイルやオリーブオイルでは *n*−9系のオレイン酸（C18 : 1, *n*−9）が、大豆油やゴマ油では *n*−6系のリノール酸（C18 : 2,　*n*−6）が多く、そしてエゴマ油やシソ油では *n*−3系の α−リノレン酸（C18 : 3, *n*−3）が多い。ヒトをはじめ動物は、リノール酸（*n*−6系）や α−リノレン酸（*n*−3系）から、同系列の脂肪酸を合成することは可能であるが、オレイン酸（*n*−9系）からリノール酸（*n*−6系）を合成することも、リノール酸（*n*−6系）から α−リノレン酸（*n*−3系）を合成することもできない。したがって *n*−3系ならびに *n*−6系脂肪酸は、我々にとって食事から摂取しなければならない必須脂肪酸となっている。リノール酸（*n*−6系）から体内合成されるアラキドン酸（C20 : 4, *n*−6）からはプロスタグランジンなどのエイコサノイドが生じ、体内機能を調節する極めて重要な働きを担っている。一方、*n*−3系脂肪酸については虚血性心疾患など心血管疾患に対するリスク低減作用が示されており、生活習慣病リスク低減の意味でも重要である[10]。魚油に多い EPA（C20 : 5, *n*−3）や DHA（C22 : 6, *n*−3）は *n*−3系脂肪酸の中でも強力な効果を示し、近年ではレゾルビンやプロテクチンといった抗炎症性代謝物による炎症制御機構も明らかになっている[10,11]。このような *n*−6系脂肪酸と *n*−3系脂肪酸については、従来からその摂取バランスが強調されてきたが、さらに厚生労働省から発表された食事摂取基準（2015年度版）においては、年齢層ごとに一日当たりの摂取目安量（絶対量）が *n*−6系・*n*−3系双方について示されている。α−リノレン酸は一日に摂取する総 *n*−3系脂肪酸の約６割を占め、体内に取込まれた α−リノレン酸の一部は EPA や DHA に変換されることが示されている[10,12]。エゴマ油に含まれる脂肪酸は約60％が α−リノレン酸であり[13]、その機能性に注目が集まりブームが起きている。福井県内では勝山市内の農家がエゴマ栽培を精力的に行っており、六次産業化によってその種子から搾ったエゴマ油や関連商品の生産・販売にも力を入れている。

２．方法

１）材料

ウメ果実は福井県農業試験場園芸研究センター（福井県三方郡美浜町）より、エゴマ油は株式会社のむきのえごま（福井県勝山市野向町）より入手した。ヒト肝がん由来肝細胞株 HepG2

（RCB1886）とマウスマクロファージ細胞株 RAW264（RCB0535）は、理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。一般的な試薬類は、ナカライテスクもしくは和光純薬工業より購入した。また CE–2固形飼料、CE–2粉末飼料、牛脂、コーン油は日本クレアより購入した。

2）細胞株の基本培養

HepG2と RAW264の基本培地には、それぞれ DMEM 培地（和光純薬，044－29765）と MEM 培地（和光純薬，056-08385）（4 mM L–Gln 添加）を使用し、双方ともに終濃度にてウシ胎仔血清10%，ペニシリン100 U/mL，ストレプトマイシン100 μg/mL を添加して37℃，5% CO_2下にて培養した。細胞継代の際には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）にて培地を適宜洗い流したのち、細胞剥離液として HepG2には0.25%トリプシン含有 PBS（0.02% EDTA 添加）を、RAW264には0.05%トリプシン含有 PBS（0.02% EDTA 添加）を使用し、単細胞懸濁液を調製して新たな培養容器に播種した。

3）HepG2細胞による肝細胞脂肪蓄積抑制活性の測定

HepG2細胞をシャーレまたはマルチウェルプレートに播種し、継代培地にてコンフルエントになるまで37℃，5 % CO_2にて培養した。次に、終濃度0.5 mM となるように脂肪酸混合溶液（P/O 混合溶液）（パルミチン酸：オレイン酸＝１：２）を添加して24時間培養を継続し、細胞内への脂肪蓄積を誘導した後、脂肪蓄積度をオイルレッドＯによる細胞内脂肪染色法により検討した。また0.5 mM 脂肪酸存在下における24時間培養の際、さまざまな濃度の検体試料を添加し、脂肪酸による脂肪蓄積誘導に対する抑制効果を検討した。24時間培養後、培養上清を捨てて PBS で洗浄し、４%パラホルムアルデヒド入り PBS を用いて細胞を固定したのち、オイルレッドＯ染色試薬にて細胞内に蓄積した脂肪を染色した。60%イソプロパノールを用いて数回洗浄し、培養シャーレや細胞の非特異的染色を除去したのち、光学顕微鏡撮影あるいはオイルレッドＯ抽出に供した。検体試料による脂肪蓄積抑制効果は細胞のオイルレッドＯ染色強度で判定できるため、100%イソプロパノールで抽出されたオイルレッドＯを吸光度（A_{510nm}）測定で調べ、定量的に評価した。なお、HepG2細胞への脂肪蓄積量は、細胞播種時の細胞コンディションの違いでばらつきやすいため、必ず同一実験日に播種した培養プレート内にコントロールを設定した。

4）NO 産生抑制活性の測定

RAW264細胞を 2×10^5 cells/mL に調製し、96 well plate に200 μL/well となるように加え、37℃，5 % CO_2にて24時間培養した。上清を180 μL ずつ捨てた後、各 well を PBS 100 μL/well で１回洗浄後、継代培地を196 μL/well 添加した。次に１μg/mL のリポ多糖（LPS，大腸菌 O111：

B4由来；和光純薬）と供試サンプル（×100）をそれぞれ2 μL/well ずつ添加し、37℃, 5 % CO_2 にて24時間培養した（LPS 終濃度は100 ng/mL）。翌日、培養上清（NO から生じた亜硝酸イオンを含む）100 μL と Griess 試薬（0.5% sulfanilamide, 2.5% H_3PO_4, 0.05% *N*–(1–naphtyl)ethylenediamine dihydrochloride）100 μL を混合し、赤色に発色した溶液の吸光度（A_{543nm}）を測定して発色増加の阻害率から NO 産生抑制活性を評価した[14,15]。なお、細胞生存率を MTT アッセイで検討した。

5）マウス経口投与によるエゴマ油の機能性評価

福井県立大学動物実験取扱規程にしたがって実施した。ICR マウス（メス, 4 週令）を日本クレアより購入し、CE–2固形飼料で 1 週間予備飼育した（3 匹／ケージ）。次に牛脂・コール酸ナトリウム・植物油（コーン油もしくはエゴマ油）を表 2 に示す組成にしたがって CE–2粉末飼料と混合して試験食を調製し、2 週間自由摂食させた[16]。この間、体重および摂餌量を毎日測定するとともに、試験食中の油脂の変敗を防ぐため飼料容器内の試験食を毎日交換した。投与期間終了後、肝臓を採取して臓器重量を測定した。

表 2　試験食の組成

	含有量（g/100g－試験食）			
	通常食	高脂肪食	コーン油混合食	エゴマ油混合食
CE–2粉末飼料	100	79.6	77.6	77.6
牛脂粉末	0	20.0	20.0	20.0
コール酸ナトリウム	0	0.4	0.4	0.4
コーン油	0	0	2.0	0
エゴマ油	0	0	0	2.0

3．結果

1）HepG2脂肪蓄積誘導系の構築

培養条件・洗浄条件を種々検討した結果､図 1 に示すように脂肪酸溶液を加えることによってヒト肝臓細胞株 HepG2において脂肪蓄積誘導系を構築することに成功した。以後、この系をモデル細胞系として、NAFLD のファーストヒット段階に対する抑制効果を検討した。

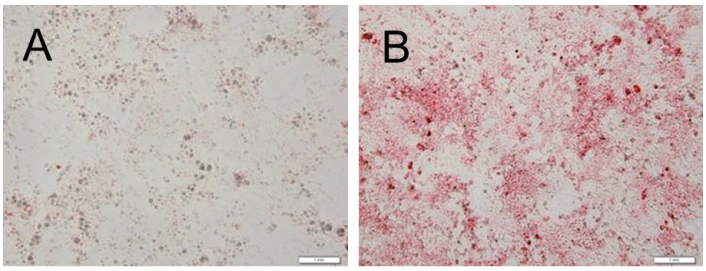


図 1　HepG2肝細胞株における脂肪蓄積誘導系の構築

通常の継代培地で培養した HepG2細胞（A）はオイルレッド O で染色されないが、脂肪酸（パルミチン酸、オレイン酸）混合溶液を終濃度0.5 mM 添加して脂肪蓄積を誘導すると、オイルレッド O によって細胞内の脂肪が染色されるようになる（B）.

2）ウメ抽出物の脂肪蓄積抑制効果

まず、紅サシおよび剣先の青ウメを100％エタノールにて浸漬抽出し、濃縮後に水―酢酸エチル分配によって水画分と酢酸エチル画分に分画した。得られた酢酸エチル画分をエタノールに再溶解し、HepG2細胞に対する脂肪蓄積抑制活性を検討した結果(図２)、紅サシ・剣先共に濃度依存的な脂肪蓄積抑制活性が認められ、特にその活性は剣先抽出物で強く認められた。なお、水画分にはこのような活性は認められなかった。

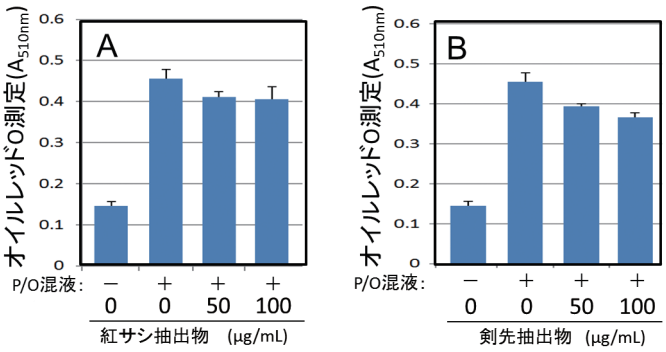


図２　青ウメ抽出物による HepG2脂肪蓄積抑制効果

細胞内に蓄積した脂肪をオイルレッド O で染色し、イソプロパノールで抽出して A510nm を測定した．P/O 混液（＋/－）は脂肪酸（P/O）混合溶液の添加有無を指す．A：紅サシ，B：剣先．

3）ウメ抽出物の NO 産生抑制活性の検討

次にウメ抽出物について、NAFLD のセカンドヒット段階への抑制効果を検討するため、マウスマクロファージ細胞株 RAW264に対する NO 産生抑制活性を検討した。図２で使用したサンプルと同一サンプルを用いて検討した結果、図３に示すように、紅サシ・剣先どちらのエタノール抽出物についても、NO 産生抑制効果が認められたが、図２と同様、やはり剣先抽出物で強い活性が認められた（図３）。

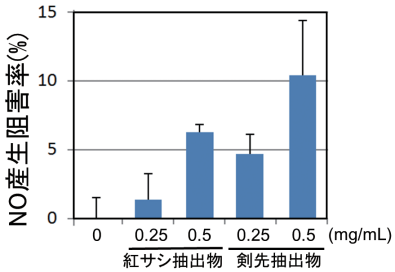


図３　青ウメ抽出物の NO 産生抑制効果

4）HepG2細胞に対するα-リノレン酸による脂肪蓄積抑制効果の検討

エゴマ油そのものを培地に添加しても細胞には取込まれないこと、生体内では末梢組織内へは脂肪酸となって取込まれることから、ここではエゴマ油に豊富なα−リノレン酸を試料として、脂肪蓄積抑制活性を検討した。その結果、図４に示すように、HepG2に対して用量依存的な脂肪蓄積抑制活性が認められた。

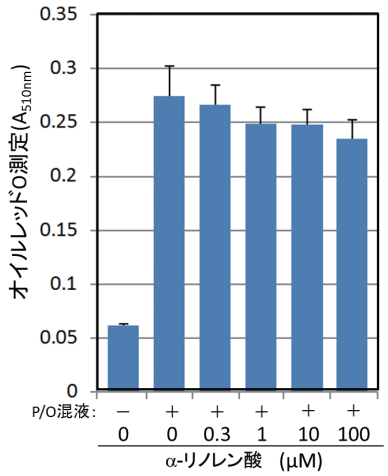
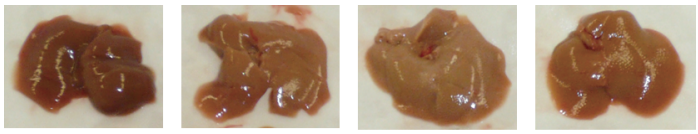


図４　α−リノレン酸による HepG2 細胞脂肪蓄積抑制効果

5）エゴマ油経口投与によるマウス肝臓への脂肪蓄積抑制効果の検討

図４で HepG2細胞に対する脂肪蓄積抑制効果が認められたことから、マウスへの経口投与試験にて検討を試みた。投与食組成や投与期間については、最適条件が不明であったが、まずは方法で記載したように５週令の ICR マウス（メス）に２週間高脂肪食を自由摂食させる系を用いた。この系では、牛脂とコール酸ナトリウムを加えた混餌食（高脂肪食）で脂肪肝が誘発される。さらにこの投与系にて、コーン油２％またはエゴマ油２％を餌に混ぜることでエゴマ油の効果を検討した（表２）。投与期間終了後に肝臓を回収したところ、通常食群に比べてあきらかに高脂肪食群では脂肪蓄積による肝臓の白色化が認められた（図５）。さらにコーン油２％投与群ではさらにその症状が悪化する傾向が認められたが、エゴマ油２％添加食群は、コーン油２％添加食群よりも肝臓組織の白色化が軽減されている様子が観察された（図５）。さらに肝臓重量を比較したところ、有意差はなかったものの、コーン油の添加によって肥大化した肝臓が、若干エゴマ油の添加によって軽減される傾向が認められた（図６）。なお、この間の各投与群の平均体重の変化を比較したが、大きな差は認められないため体重差が肝重量に影響しているとは考えられなかった（図７）。



通常食　高脂肪食　高脂肪食＋コーン油2%　高脂肪食＋エゴマ油2%

図５　高脂肪食投与マウスの肝臓の比較

試験食２週間投与後に比較した.

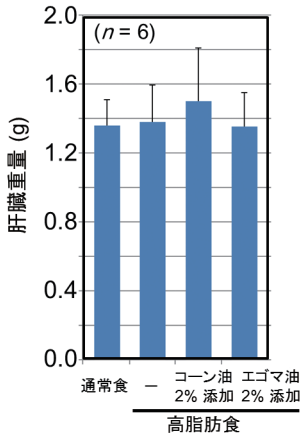


図６　高脂肪食投与マウスの肝重量

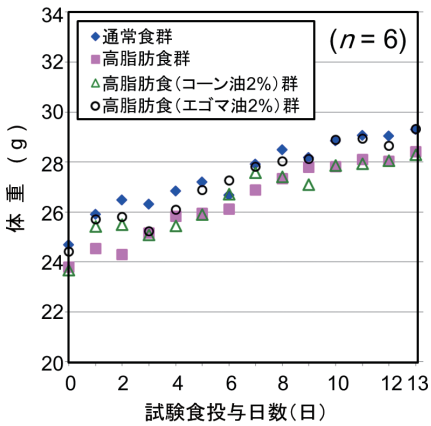


図７　試験食投与期間中のマウス体重変化

各群の平均値を示した.

6）α-リノレン酸の NO 産生抑制活性の検討

最後にα–リノレン酸について、NAFLD のセカンドヒット段階への抑制効果を検討するため、RAW264に対する NO 産生抑制活性を検討した。高濃度では細胞障害性が認められたが、終濃度10 μg/mL（＝約36 μM）において、α–リノレン酸による NO 産生抑制活性が確認された（図８）。

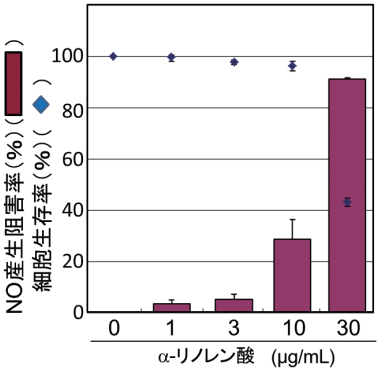


図８ α–リノレン酸の NO 産生抑制効果

４．考察

図２，３より、紅サシ・剣先の青ウメ抽出物において、肝細胞への脂肪蓄積抑制効果と NO 産生抑制活性の両方が確認された。これらは培養細胞を用いたモデル評価系ではあるが、HepG2を用いた肝脂肪蓄積抑制活性から、in vivo でも同様の効果が得られるものと期待される。またセカンドヒットについては、RAW264細胞による NO 産生抑制活性だけで十分なモデル系になっているか課題は残るが、NASH へと悪性化する際には肝臓のマクロファージ系細胞であるクッパ―細胞の活性化が関与するとの報告もあるため[3,17,18]、マクロファージの過剰活性化抑制活性をモデル評価系の指標に採用すること自体は妥当であると思われる。以上のように、図２にて肝細胞への脂肪蓄積抑制効果を示し、また図３にてマクロファージ過剰活性化抑制効果を示したことから、NAFLD 抑制効果を示す機能食素材として、これら青ウメが期待されると考えられる。ただし、今回検出した効果は比較的弱い印象があり、例えば剣先抽出物に比べ、紅サシでは明らかに活性は弱い。またデータ不足のため本稿への記載は見合わせたが、より熟した果実ではさらに活性が弱くなる傾向が認められた（data not shown）。一般にウメ果実に含まれる生理活性成分の種類や量は、果実の生育度合によって変動することが報告されている。例えば抗酸化性を示す lyoniresinol[8]や(+)–syringaresinol[7]などのポリフェノール化合物は青ウメのみより単離されており、果実が熟してクエン酸などの有機酸含量が高まるにつれて果肉に含まれるポリフェノール化合物の分解や抗酸化活性の低下が報告されている[19]。そこで今後はより未熟な段階から完熟段階までウメ果実の生育ステージを追いながら脂肪蓄積抑制活性の強度を詳しく調べることで、より機能性の強い時期の果実ステージを突き止め、その利用価値を高めることが可能になると考えられる。また今後は活性成分の同定が期待されるとともに、in vivo 投与系にてウメ抽出物の有効性を検討する必要性があると考えられる。

一方、本研究では図４，８よりエゴマ油を構成する主要脂肪酸であるα–リノレン酸に肝細胞への脂肪蓄積抑制効果と NO 産生抑制活性の両方が確認された。さらにマウス投与系においても肝臓への脂肪蓄積抑制が期待できる変化が認められた。本研究においては投与期間を２週

間に設定したが、若干短かった可能性があるため、投与期間を延ばすことでより明確な効果が確認できるものと期待される。今後はさらにNAFLDやNASH予防効果を確認するとともにその作用の分子機構に関心がもたれる。なお図７では投与群間で平均体重の差が認められるが、投与開始前の体重差が拡大されたものと考えられ、統計的な優位さは認められなかった。長期投与実験においては体重差についてより明確な差が生じるかもしれない。

なお、α−リノレン酸やα−リノレン酸が豊富な油（シソ油など）には、血中コレステロール低下作用が報告されており[20]、このため「食品の機能性評価モデル事業」の結果報告（平成24年消費者庁）では、α−リノレン酸の心血管疾患リスク低減効果の総合評価はＢ（EPA, DHAの総合評価はＡ）とされている[21]。このため福井県産エゴマ油についても同様の効果が得られるか、今後は投与期間を延ばした系で検討予定である。

謝辞

本研究は、福井県大学連携リーグ連携研究推進事業補助金の援助を受けて行われたものです。心より御礼申し上げます。

引用文献

１）工藤陽香，青江誠一郎：「非アルコール性脂肪肝炎（NASH）モデルマウスの開発と評価」，*人間生活文化研究*，No.24, 200-203（2014）.

２）Kessoku T, Ogawa Y, et al. : Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol*., **20**, 10108-10114 (2014).

３）Malaguarnera M, Rosa MD, Nicoletti F, Malaguarnera L. : Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J. Mol. Med*., **87**, 679-695 (2009).

４）橋本悦子：「肥満と肝臓」.「肥満と消化器疾患ガイド」(日本消化器病学会編).
http : //www.jsge.or.jp/theme/jsge2015/files/citizens/guide_201406.pdf

５）農林水産省：「平成26年産びわ、おうとう、うめの結果樹面積、収穫量及び出荷量」(平成26年).
http : //www.e−stat.go.jp/SG1/estat/Xlsdl.do?sinfid=000027248958

６）福井県農林水産部農畜産課：「福井うめ「健康」クラブ」(2007).
https : //info.pref.fukui.lg.jp/noutikusan/ume/ume−intro/intro−frame.html

７）Miyazawa M, Utsunomiya H, Inada K, Yamada T, Okuno Y, Tanaka H, Tatematsu M : Inhibition of *Helicobacter pylori* motility by (+)−syringaresinol from unripe Japanese apricot. *Biol. Pharm. Bull*., **29**, 172-173 (2006).

８）白坂憲章，高崎竜史，吉栖　肇：「梅果実由来抗酸化成分リオニレシノールの梅加工品中の含量および調味梅干し製造工程における含量変化」，*日本食品科学工学会誌*, **52**, 495-498（2005）.

９）大江孝明：「機能性成分と香りに優れた梅酒製造のためのウメ果実の栽培・追熟方法に関する研究」，*和歌山県農林水産試験研究機関特別研究報告*，第２号（2013）.

10）江崎　治，佐藤眞一，窄野昌信，三宅吉博，三戸夏子，梅澤光政：「*n*−3系多価不飽和脂肪酸の摂取

基準の考え方」，*日本栄養・食糧学会誌*，**59**, 123-158（2006）.

11）有田　誠：「炎症反応を制御する抗炎症性脂質メディエーター」，「分子から個体へと深化する脂質生物学」（佐々木雄彦ら編集），*実験医学*　増刊 28, 201-208（2010）.

12）Ezaki O, Takahashi M, Shigematsu T, Shimamura K, Kimura J, Ezaki H, Gotoh T ： Long–term effects of dietary α–linolenic acid from perilla oil on serum fatty acids composition and on the risk factors of coronary heart disease in Japanese elderly subjects. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **45**, 759-772 (1999).

13）高橋正和，上前知之，天谷美都希，小林恭一，村上亜由美：「福井県産エゴマ油の機能分析ならびに加工開発」，*福井県立大学論集*，第43号，47-54（2014）.

14）Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H ： Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Lett*., **125**, 199-207 (1998).

15）Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR ： Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem*., **126**, 131-138 (1982).

16）Watanabe S, Tsuneyama K ： Eicosapentaenoic acid attenuates hepatic accumulation of cholesterol esters but aggravates liver injury and inflammation in mice fed a cholate–supplemented high–fat diet. *J. Toxcol. Sci*., **38**, 379-390 (2013).

17）Wan J, Benkdane M, et al. ： M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis ： A protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol*., **59**, 130-142 (2014).

18）Smith K ： Kupffer cells regulate the progression of ALD and NAFLD. *Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **10**, 503 (2013).

19）三谷隆彦：「ウメ（*Prunus mume* Sieb. et Zucc.）中のフェノール性化合物」.
http : //www.kasuikyo.jp/text/16-3.html

20）Takahashi Y, Ide T ： Dietary *n*–3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *Br. J. Nutr*., **84**, 175-184 (2000).

21）消費者庁：「食品の機能性評価モデル事業」の結果報告.（平成24年）.
http : //www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin915.pdf