

[研究論文]

福井県伝統野菜木田チリメンシソの抗アレルギー作用の検討

高橋 正和¹⁾・橋本 直哉²⁾・小林 恭一²⁾・大東 肇¹⁾

1. 序

Perilla frutescens (Lamiaceae) は、東アジアで食用あるいは生薬に利用されているシソ科植物であり、多くの亜種が存在する^{1,2)}。特に有名なものは、いわゆる「シソ」としてよく知られる *P. frutescens* var. *crispa* と、種子を食用油の製造に用いるエゴマ (*P. frutescens* var. *frutescens*) である。またさらに、前者には「シソ」(紫蘇) の名前が示すとおり、アントシアニンの蓄積によって葉が赤～赤紫色を呈する「赤ジソ」類のほか、アントシアニン生合成酵素系に欠損をもつため青色の葉を持つ「青ジソ」(*P. frutescens* var. *acuta* f. *viridis*) とがある¹⁻³⁾。これら多様な「シソ」の中でも、チリメンシソ (*P. frutescens* var. *crispa* f. *crispa*) とは、葉の周囲が縮緬(ちりめん)のように縮れた形態を持つ典型的な赤ジソの仲間であり、「シソ」(紫蘇) の最も基本的な品種である。木田チリメンシソ (通称 「木田ちそ」) は、福井市木田地区で明治中期頃から栽培されてきた品種であり、比較的葉が厚めで縮れが強く、濃い赤紫色と強い芳香などの特徴を有し、「福井県の伝統野菜」の1つに数えられている⁴⁾。「木田ちそ」は6～7月頃に収穫期を迎え、おもに梅干を漬ける際に色付け用として利用されている。

このようなシソ (*P. frutescens* var. *crispa*) からは、さまざまな機能成分が単離・報告されている。例えば、主要香気成分としてペリルアルデヒドが単離され、その鎮静作用がマウスにおいて報告されている⁵⁾。また、赤紫色の色素としてアントシアニン色素のシソニンなどが⁶⁾、抗酸化・抗炎症成分としてロスマリン酸やルテオリン(図1)などが含まれるため⁷⁻¹⁰⁾、シソの生理機能として抗酸化作用⁷⁾や抗炎症・抗アレルギー作用が報告されている⁸⁻¹²⁾。

食細胞である好中球やマクロファージは、炎症反応と深いかわりを持つ細胞である。これらは

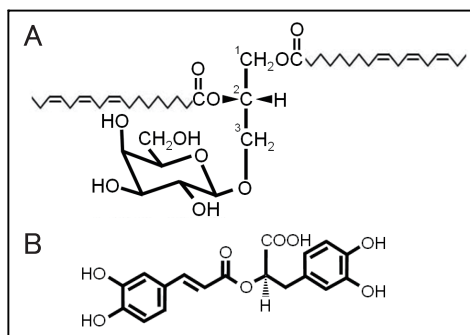


図1 木田ちそに含まれる抗炎症化合物の例 A, DLGG. B, ロスマリン酸。

受付日 2012.11.1

受理日 2012.12.25

所属 ¹⁾ 生物資源学部 ²⁾ 福井県食品加工研究所

感染微生物が体内に侵入した時、食作用によって取込んで殺菌・分解する細胞であり、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利用されている。ROSにはNADPHオキシダーゼ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($O_2^{\cdot-}$)に由来するヒドロキシラジカル($\cdot OH$)や過酸化水素(H_2O_2)など多様な分子種が含まれる¹³⁾。同様に、食細胞においては誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)によって産生される一酸化窒素(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¹⁴⁾。しかし、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、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¹⁵⁻¹⁷⁾。

生活習慣病は、早期発見・治療だけでなく、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、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¹⁸⁾。

以上の背景のもと、我々は福井県特産農作物について食細胞の $O_2^{\cdot-}$ ならびにNO産生に対する抑制活性を検討し、活性化合物の精製・同定に取り組んできた。そして木田ちそメタノール抽出物より、1,2-di-*O*- α -linolenoyl-3-*O*- β -galactosyl-*sn*-glycerol (DLGG)(図1)をDMSO分化HL-60細胞系において $O_2^{\cdot-}$ の過剰産生阻害化合物として単離・同定し、さらにDLGGがNO産生抑制活性を有することを確認した¹⁹⁾。そこで本研究では、このようなDLGGやロスマリン酸のように抗炎症・抗アレルギー作用を持つ化合物を含んでいる木田ちそ抽出物について、マウス経口投与系において抗アレルギー作用を示すか検討した。

2. 研究方法

1) 木田ちそ抽出物の調製

木田ちそ(木田チリメンシソ)は木田ちそ出荷組合(福井市)から入手した。木田ちそ新鮮葉1.5 kgをメタノール3 Lあるいはエタノール3 Lに2週間以上浸漬し、得られた抽出物を綿ろ過して木田ちそ抽出物とした。固形物含量はその一部を分取し、エバポレーターで濃縮乾固して算出した。

2) DLGGの定量

抽出試料をSep-Pak PLUS C₁₈(Waters)にて前処理した後、適宜メタノールにて希釈し、SULCO Discovery HS C₁₈カラム(4.6 × 150 mm, 5 μm)(Sigma Aldrich)を用いて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(島津LC-20ADシステム)で定量分析した。流速は1 mL/minとし、溶出には水-メタノールによるグラジエント溶出法(80%(0 min) → 95%(5 min) → 100%(15

min) → 100%メタノール (15–25 min)) を用い、カラム温度は30℃とした。波長210 nmでの吸収を指標にDLGGの溶出をモニターし、既知量のDLGGで作成した検量線から未知試料のDLGG含量を決定した。なお、DLGGの溶出時間は18.3 minであった。

3) ロスマリン酸の定量

抽出試料を適宜50%メタノール水溶液にて希釈後、0.45 μm フィルターを用いて不溶成分を除去した後、HPLC分析に供した。Shiseido Capcell Pak C₁₈ ACR カラム (4.6 × 150 mm, 5 μm) を用いてHPLC (Waters Alliance 2695システム) で定量分析した。流速は0.8 mL/minとし、溶出には25%アセトニトリル, 0.3%ギ酸によるイソクラティック溶出条件を用い、カラム温度は40℃とした。波長280 nmでの吸収を指標にロスマリン酸の溶出をモニターし、既知量のロスマリン酸 (Carbosynth Ltd.)で作成した検量線から未知試料のロスマリン酸含量を決定した。なお、ロスマリン酸の溶出時間は5.3 minであった。

4) 耳介浮腫抑制試験

マウス耳介浮腫抑制試験は、ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) の塗布による接触過敏反応 (IV型アレルギー) の抑制試験法を用いて検討した²⁰⁾。ICRマウス (メス, 6週齢) を日本クレアより購入し、CE-2通常固型食で1週間予備飼育した (4匹/ケージ)。次にCE-2粉末食で1週間予備飼育し、最終日の2日前に背部体毛を専用バリカンで刈ると共に、飼育サイズを1匹/ケージとした。これらの予備飼育の間、毎日体重を測定し、飼育環境と体重測定に馴化させた (図2)。次にDNFB (Sigma) をアセトン-大豆油 (4 : 1) 混合溶液で希釈して0.5%溶液を調製し、背部に100 μLずつ塗布して感作した (コントロール群は溶媒のみを塗布)。同時に木田ちそエタノール抽出物を終濃度0~0.2% (w/w) となるようにCE-2粉末食に混餌した試験食に切替え、さらに一週間毎日体重と摂食量を測定した。最終日の前日に前述の0.5% DNFB希釈液をマウスのどちらか一方の耳に20 μLずつ塗布した (コントロール群は溶媒のみを塗布)。約20時間後、耳介浮腫が十分起きている段階で安楽死させた後、生検トレパン (φ 5 mm) (カイ インダストリーズ株式会社) で耳介生検を採取し、その重量を測定した。

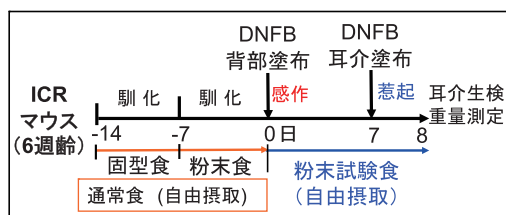


図2 DNFB塗布による耳介浮腫抑制試験の概略

3. 結果

DLGGは木田ちそメタノール抽出物より単離されたが、メタノールは動物に有毒であるため、投与試験には使えない。そこでエタノール抽出物を調製してマウス経口投与を検討することにした。まずメタノール抽出物とエタノール抽出物の間で、DLGG含量に違いが認められ

るか検討したところ、粗抽出液中の含量は、前者は $150 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$ ($n = 3$)、後者は $160 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$ ($n = 3$)となり、大きな差は認められなかった。次にエタノール抽出物(粗抽出液)について、ロスマリン酸含量を調べたところ、 $220 \pm 40 \mu\text{g/mL}$ ($n = 3$)と十分抽出されていることが確認された。

そこでこのエタノール抽出物を用いて0, 0.1, 0.2% (w/w)混合食を調合し、マウスに自由摂食させ、DNFB誘発性の耳介浮腫に対する抑制効果を検討した。その結果、図3に示すように、0.1および0.2%摂取群では、0%摂取群と比較して、有意に接触過敏反応が抑制されることが示された。なお、試験は再現性を見るため2回繰り返し、代表的な結果を図3に示した。

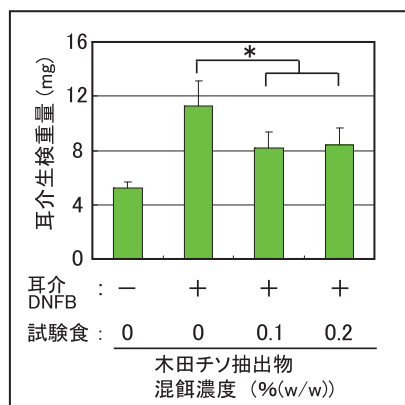


図3 木田ちそ抽出物のマウス耳介浮腫抑制活性 (*, $p < 0.01$ ($n = 5$))

4. 考察

本研究より、木田ちそ抽出物は、これまでのシソ抽出物の報告¹⁰⁻¹²⁾と同様、*in vivo* 経口投与系にて抗アレルギー作用を示すことが明らかとなった。木田ちそは食細胞による O_2^- ならびにNOの過剰産生を抑制することが確認されているほか、高いDPPHラジカル産生阻害活性も報告されており、抗酸化・抗炎症効果が*in vitro*と*in vivo*の両面で示されたことになる^{19,21)}。ただし、本研究で用いたのは粗抽出物であるため、抽出物に含まれるいずれか単独の成分が効果を示したのか、あるいは複数の成分が相加的/相乗的に作用した結果であるのかは判別はつかない。

5. おわりに

木田ちそは福井市木田地区特産の赤シソであり、福井県伝統野菜のひとつに数えられている。したがって今後、さまざまな加工食品への利用に期待が持たれる素材のひとつである²²⁾。ただし、本研究は他のシソとの比較検討はおこなっておらず、例えば他県産あるいは他地域産のチリメンシソや青ジソと比較した場合の優劣はどの程度あるのか、に関しては、今後の課題である。また本研究は、木田ちその有用性を暗示する重要な知見ではあるが、本研究で示したデータは動物を用いたものであり、この結果からヒトへの有用性を直接語ることは出来ない点には注意が必要である。

文献

- 1) Yamazaki M., Shibata M., Nishiyama Y., Springob K., Kitayama M., Shimada N., Aoki T., Ayabe S., and Saito K., *FEBS J.*, **275**, 3494–3502 (2008).
- 2) Ito M. and Honda G., *J. Phytogeogr. Taxon.*, **44**, 43–52 (1996).
- 3) 山崎真巳., *薬学雑誌*, vol. 122, No.1, 47–56 (2002).
- 4) 「伝統の福井野菜」(伝統の福井野菜振興協議会・福井県農林水産部販売開拓課編)(2011).
- 5) Honda G., Koezuka Y., Kamisako W., and Tabata M., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1672–1677 (1986).
- 6) Yoshida K., Kondo T., Kameda K., and Goto T., *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1745–1751 (1990).
- 7) Meng L., Lozano Y.F., Gaydou E.M., and Li B., *Molecules*, **14**, 133–140 (2009).
- 8) Makino T., Furuta Y., Fujii H., Nakagawa T., Wakushima H., Saito K., and Kano Y., *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1206–1209 (2001).
- 9) Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., and Yoshikawa T., *Carcinogenesis*, **25**, 549–557 (2004).
- 10) Ueda H., Yamazaki C., and Yamazaki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1197–1202 (2002).
- 11) Takano H., Osakabe N., Sanbongi C., Yanagisawa R., Inoue K., Yasuda A., Natsume M., Baba S., Ichiishi E., and Yoshikawa T., *Exp. Biol. Med.*, **229**, 247–254 (2004).
- 12) Oh H.A., Park C.S., Ahn H.J., Park Y.S., and Kim H.M., *Exp. Biol. Med.*, **236**, 99–106 (2011).
- 13) 住本英樹., *実験医学 増刊*, vol.27, No. 25, 30–37 (2009).
- 14) NO－化学と生物. *化学総説*, No.30 (1996).
- 15) Murakami A. and Ohigashi H., *Int. J. Cancer*, **121**, 2357–2363 (2007).
- 16) 大東 肇., 「栄養とがん」(ネスレ栄養科学会議監修), 建帛社, 31–54(2009).
- 17) 長瀬美樹, 藤田敏郎., *実験医学 増刊*, vol.25, No.15, 223–227 (2007).
- 18) 機能性食品の事典. (荒井綜一ら編), 朝倉書店 (2007).
- 19) Takahashi M., Sugiyama Y., Kawabata K., Takahashi Y., Irie K., Murakami A., Kubo Y., Kobayashi K., and Ohigashi H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 2240–2242 (2011).
- 20) Sakai S., Sugawara T., Kishi T., Yanagimoto K., and Hirata T., *Life Sci.*, **86**, 337–343 (2010).
- 21) 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).
- 22) 橋本直哉, 高橋正和., 平成23年度食品加工に関する試験成績 (福井県食品加工研究所), 31–33 (2012).