

【研究報告】

有用野生資源の探索
(県単課題 平成13～17年)

武井 利之
古川 成治

目 次

要 旨	51
はじめに	52
実験方法	52
1 がん細胞アポトーシス誘導効果	52
2 がん細胞分化誘導作用	53
3 DPPHラジカル消去能	54
結果と考察	54
1 がん細胞を用いたがん予防機能の評価	54
2 抗酸化機能の評価	58
引用文献	59

要 旨

福島県で採取される山菜ときのこの食品機能性を明らかにする目的で、がん予防機能が期待されるがん細胞アポトーシス誘導効果とがん細胞分化誘導作用について検討した。山菜ときのこの有機溶媒抽出物をHL60細胞に加えて培養した結果、コウタケ抽出物に強いアポトーシス誘導効果があることが明らかとなった。コウタケ抽出物を各種クロマトグラフィーにより精製し、質量スペクトル分析及び核磁気共鳴スペクトル分析した結果、活性の中心物質はエルゴステロールパーオキサイドであることがわかった。エルゴステロールパーオキサイドは、25 μMの濃度で24時間以内に、50 μMの濃度で12時間以内にがん細胞をほぼ完全に抑制した。また、がん細胞分化誘導作用について検討した結果、マゴジャクシ抽出物が強いニトロブルーテトラゾリウム還元能を有することが明らかとなり、がん細胞分化誘導作用があることが示唆された。続いて、活性酸素種に由来する各種疾病の予防に効果が期待される抗酸化機能をDPPHラジカル消去能により評価した。その結果、コゴミ、ワラビ等に強いDPPHラジカル消去能が確認された。

本研究により、福島県産の山菜ときのこの高い食品機能性を有することが明らかになった。

受理日 平成18年2月28日

はじめに

近年、野菜、果樹、茶などの農産物、及び海草や魚介類などの水産物に数多くの体調節機能（三次機能、食品機能性）が見いだされ、高い関心が持たれている¹⁾。また、山菜ときのこも、人への健康維持・増進に効果が期待されており、特にシイタケやマイタケ等の一般的なきのこについては、がん抑制効果を始め多くの生理活性について、活性中心の分離精製及び構造決定とともに解明が進み、成果が取りまとめられてきた²⁻⁴⁾。さらに、近年盛んに適用されるようになった抗酸化機能の評価や培養細胞を用いたバイオアッセイ法等、食品機能性を証明する新しい実験手法⁵⁾で得られた成果も加わり、他の農水産物とともに山菜・きのこの食品機能性が解明されつつある。

福島県では特用林産物の年間粗生産額⁶⁾の合計が約57億9千600万円で、このうち栽培きのこのが86.0%、野生きのこのが0.9%、山菜が8.4%を占めている。また、福島県では多種の山菜やきのこを食べる習慣がある⁷⁾。これらの山菜やきのこは、多くの食品機能性を有している可能性が考えられるが、本県産の特用林産物について食品機能性を具体的に示した報告例は少なく、それらはほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では、山林から採取し直売所で販売される、あるいは自家消費される、または地域の気象に適合する特色ある栽培品であるなど、採取量や生産量は少ないが福島県で伝統的に食用とされてきた山菜ときのこを主に試料として、第一にがん予防機能が期待できるがん細胞のアポトーシス誘導効果について、第二に同様の機能が期待できるがん細胞分化誘導作用について、そして第三に多くの疾病の原因である活性酸素種の消去が期待できる抗酸化機能について検討した。

なお、本研究は平成13、14年度、独立行政法人食品総合研究所と共同研究契約を締結し、同所小堀真珠子主任研究官、亀山眞由美品質向上研究チーム長、吉田充状態分析室長の指導により実施した。

実験方法

1 アポトーシス誘導効果

(1) 試料

試料とした山菜類は、ウワバミソウ（ミズナ）、オオバギボウシ（ウルイ）、コシアブラ、ヨブスマソウ（ドウナ）、ハチクの可食部及びホップの穂花とした。きのこ類は、アカヤマドリ、オオイチョウタケ、コウタケ、コフキサルノコシカケ、サケツバタケ、スギヒラタケ、タモギタケ、ハタケシメジ、ブナハリタケ、マゴジャクシ、マツオウジ及びヤマブシタケの可食部（子実体）を用いた。

(2) 培地及び細胞

細胞は、ヒト前骨髄性血病細胞株HL60（HL60細胞）を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地で37℃、炭酸ガス濃度5%、相対湿度100%で培養器内で培養して用いた。

(3) 抽出物の調製及びHL60細胞への影響

試料抽出物は、試料を有機溶媒で抽出して調製した。試料に生重の10～20倍量のエタノール又はアセトンを加えてブレンダーでホモジナイズし、ガーゼでろ液と残さに分け、ろ液をろ紙で再度ろ過し有機溶媒可溶部を得た。これをロータリーエバポレーター（40℃）で濃縮乾固して抽出物を調製した。なお、コフキサルノコシカケとマゴジャクシは振動式粉

砕器で粉碎してからエタノール中で攪拌抽出し、遠心分離して有機溶媒可溶部を得た。HL60細胞をシャーレに 1×10^5 個cells/mlで播種し、エタノールに溶解した試料抽出物を0.1mg/mlとなるように加え、24時間培養後、顕微鏡によりアポトーシス様細胞死の有無を観察した。また、生細胞数は、トリパンブルー色素排除能を示す細胞を血球計算版を用いて測定し、算出した。

核の凝縮・断片化は、試料を添加して培養した細胞を回収後、10%グルタルアルデヒド/PBSで固定し、ヘキスト33258で核DNAを蛍光染色して蛍光顕微鏡で観察した⁸⁾。

DNAのヌクレオソーム単位での断片化は、試料を添加して培養した細胞を回収し、Lysis緩衝液を加えて細胞を溶解した後、RNase、ProteinaseKで処理し、エチレンブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動してUVトランスイルミネーター上で観察した⁹⁾。

(4) コウタケ抽出物の精製

コウタケ103.3g(含水率3.7%)をアセトンで抽出して得た有機溶媒可溶部をロータリーエバポレーター(40)にて濃縮して抽出物5.27gを得た。このコウタケ抽出物5.20gをWaters社製OASIS HLBカラムに添加し、蒸留水:エタノール(10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10)で順次溶出し、溶出液をロータリーエバポレーター(40)にて濃縮乾固した。蒸留水:エタノール2:8溶出部から、アポトーシス誘導活性を有する画分2.34gを得た。これをヘキサン溶解し、可溶部(2.05g)と不溶部(0.29g)に分けた。このヘキサン可溶部をシリカゲルカラムに添加し、ヘキサン:酢酸エチル(10:1)、ヘキサン:酢酸エチル(3:1)、メタノールで溶出し、4画分(1:968mg、2:546mg、3:63.3mg、4:351mg)を得た。アポトーシス誘導活性を有する画分3を、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィーにより2.5%メタノール/ジクロロメタンを展開溶媒に用いて分離し、アポトーシス誘導化合物として物質A 13.7mgを得た。

コウタケ抽出物から精製した物質AのHL60細胞の増殖に及ぼす影響は、 5×10^4 個cells/mlで播種したHL60細胞に物質Aを0~50 μ Mとなるように加え、0~48時間培養後、トリパンブルー色素排除能を示す生細胞数を血球計算盤を用いて測定し、検討した。

核の凝縮・断片化は、試料を添加して培養した細胞を回収後、10%グルタルアルデヒド/PBSで固定し、ヘキスト33258で核DNAを蛍光染色して蛍光顕微鏡で観察した⁸⁾。

DNAのヌクレオソーム単位での断片化は、試料を添加して培養した細胞を回収し、Lysis緩衝液を加えて細胞を溶解した後、RNase、ProteinaseKで処理し、エチレンブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動してUVトランスイルミネーター上で観察した⁹⁾。

(5) 機器分析

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、Bruker Biospin社製 Avance 800 スペクトロメーター(800.30MHz)を用いて¹H、DQF-COSY、HSQC、及びHMBCを、DRX 600 スペクトロメーター(150.92MHz)を用いて¹³C及びDEPTをCDCl₃中、298Kで測定した。また、エレクトロスプレーイオン-マス(ESI-MS)スペクトルは、Bruker Daltonics社製Apex 70e FT-ICR マススペクトロメーターを用いて測定した。なお、ESI-MSスペクトル分析において、試料がナトリウム塩と推定されたため、カリウム塩に変換後再度測定した。

2 分化誘導作用

(1) 試料

試料としてオオイチョウタケ、コフキササルノコシカケ、スギヒラタケ、タモギタケ、マ

ゴジャクシ及びヤマブシタケを用いた。

(2) 培地及び細胞

細胞は、HL60細胞を10%牛胎児血清を含むRPMI1640培地で37℃、炭酸ガス濃度5%、相対湿度100%で培養器内で培養して用いた。

(3) 抽出物の調製及びニトロブルーテトラゾリウム(NBT)還元能の測定

オオイチョウタケ、スギヒラタケ、タモギタケ及びヤマブシタケは、生重の10~20倍量のエタノールを加えてブレンダーでホモジナイズし、ガーゼでろ液と残さに分け、ろ液をろ紙で再度ろ過しエタノール可溶部を得た。コフキサルノコシカケとマゴジャクシは振動式粉碎器で粉碎した後エタノールに浸漬し、エタノール可溶部を得た。これらのエタノール可溶部をロータリーエバポレーター(40℃)で濃縮乾固して試料抽出物を調製した。

シャーレに 5×10^4 個cells/mlで播種したHL60細胞に試料抽出物を加え、3~4日間培養後、NBT試薬、12-テトラデカノエル-フォルボル-13-アセテート試薬を加えた。30分放置後氷冷して反応を停止し、血球計算盤を用いてNBT還元能を示した細胞を測定し、生細胞数に占めるNBT色素陽性細胞の割合を求めた¹⁰⁾。

3 DPPHラジカル消去能

(1) 試料

山菜試料として、ウド、コゴミ、ゼンマイ、ネマガリタケ、ハチク及びワラビを用いた。きのこ試料として、サケツバタケ、シイタケ、ツチグリ、ナメコ、ブナハリタケ及びムキタケを用いた。

(2) 抽出物の調製及びDPPHラジカル消去能の測定方法

試料を凍結乾燥した後、振動式粉碎器で粉碎した。これを80%エタノール中でホモジナイズし、遠心分離後、可溶部をろ紙でろ過して80%エタノール抽出液を調製した。この抽出液に蒸留水を加えてエタノール濃度50%とし、25mg生重量相当/mlとなる分析試料を調製した。100 μ M DPPH 600 μ lに50%エタノール(600-a) μ l、分析試料a μ lを加えて混合し、一定時間後520nmの吸光度を測定した。加える分析試料a μ lを0~300 μ lと変えて吸光度を測定して検量線を作成し、分析試料0 μ lの吸光度が50%になる分析試料添加量を求めた。測定は2回行い、その平均値に含水率を換算して、DPPHラジカルを50%消失させる試料量(生重)を求めた¹¹⁾。

結果と考察

1 がん細胞を用いたがん予防機能の評価

(1) がん細胞アポトーシス誘導効果

福島県内で栽培または採取される山菜ときのこの食品の三次機能を明らかにする目的で、がん予防効果が期待できる、がん細胞のアポトーシス誘導効果について検討した。山菜等6種類、きのこ12種類の有機溶媒抽出物をHL60細胞に加えてアポトーシス様細胞死の有無を観察した結果を表-1に示した。その結果、コウタケ抽出物にだけHL60細胞のアポトーシス様細胞死が観察され、他の山菜ときのこには観察されなかった。また、生きている細胞数を測定した結果、コウタケ抽出物を添加した場合、細胞数は無添加に比べて著しく減少した(図-1)。続いてコウタケ抽出物を添加した細胞の核を蛍光染色して観察した結果、アポトーシス特有のクロマチン凝集と核の断片化が観察された(図-2)。また、

細胞のDNAを観察した結果、DNAにアポトーシス特有のヌクレオソーム単位の断片化が生じていた(図-3)。これらのことから、コウタケ抽出物がHL60細胞にアポトーシスを誘導したことが明らかとなった¹²⁾。

表 - 1 山菜ときのこの抽出物によるHL60細胞のアポトーシス誘導効果

	試料名	部位	アポトーシス様細胞死
山菜	ウワバミソウ(ミズナ)	茎	×
	オオバギボウシ(ウルイ)	新葉・葉柄	×
	コシアブラ	新葉・葉柄	×
	ヨブスマソウ(ドウナ)	新葉・成葉	×
	ハチク	タケノコ	×
	ホップ	球花	×
きのこ	アカヤマドリ	子実体	×
	オオイチョウタケ	子実体	×
	コウタケ	子実体	
	コフキサルノコシカケ	子実体	×
	サケツバタケ	子実体	×
	スギヒラタケ	子実体	×
	タモギタケ	子実体	×
	ハタケシメジ	子実体	×
	ブナハリタケ	子実体	×
	マゴジャクシ	子実体	×
	マツオウジ	子実体	×
	ヤマブシタケ	子実体	×

: 有り、× : 無しまたは微弱

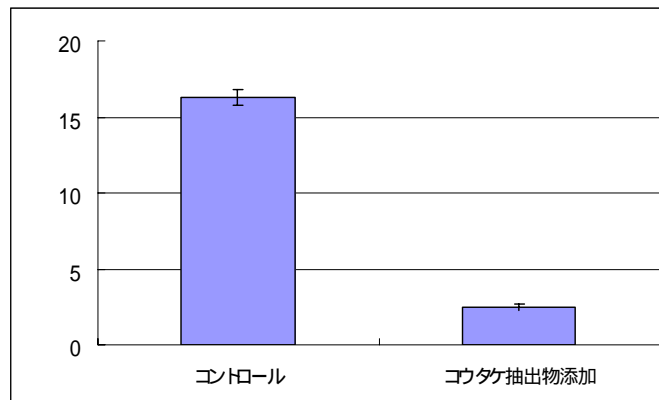


図 - 1 HL60細胞にコウタケ抽出物を加えて24時間培養した後の細胞数

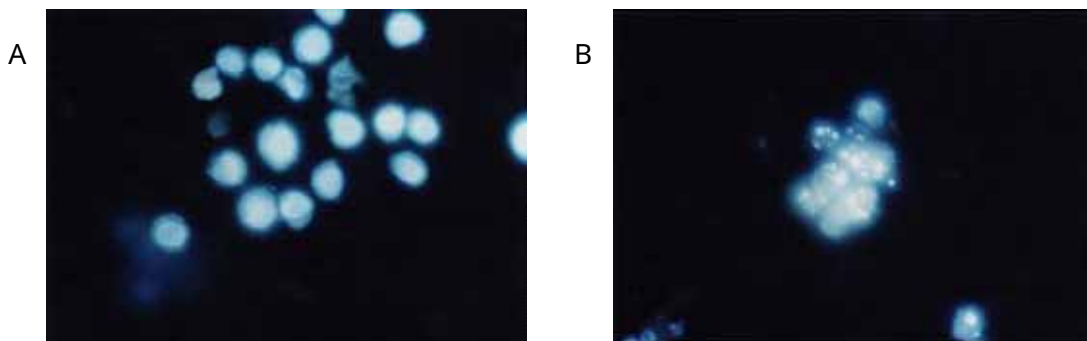


図 - 2 HL60細胞にコウタケ抽出物を加えて24時間培養した後の蛍光画像
A : 抽出物なし B : 抽出物を0.1mg/mlの濃度で添加

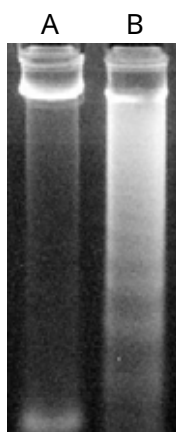


図 - 3 HL60細胞にコウタケ抽出物を加えて24時間培養した後のDNA
A：抽出物なし B：抽出物を0.1mg/mlの濃度で添加

続いて、アポトーシス誘導活性を指標に各種クロマトグラフィーで精製した結果、活性の中心物質として物質Aを得た。これをMS及びNMRにて分析した結果、活性物質Aは 5,8,11-epidioxy-22E-ergosta-6,22-diene-3-ol (エルゴステロールパーオキシド、図 - 4) であることが明らかとなった。エルゴステロールパーオキシドは細胞毒として報告されていたが¹³⁾、その機序については解明されておらず、がん細胞アポトーシス誘導効果が本研究により初めて明らかとなった。エルゴステロールパーオキシドは濃度依存的にHL60細胞の増殖を抑制し、培地中の濃度25 μ Mで48時間後に、また50 μ Mで24時間後にHL60細胞をほぼ完全に死滅させた (図 - 5)。さらに、HL60細胞にはアポトーシス特有のクロマチン凝集と核の断片化 (図 - 6) とDNAのヌクレオソーム単位での断片化 (図 - 7) が観察された。がん細胞のアポトーシス誘導はがん抑制の重要な機序と考えられており、多くの抗がん剤ががん細胞にアポトーシスを誘導することが知られている¹⁴⁾。コウタケ及びコウタケから得られたエルゴステロールパーオキシドにがん予防に効果があること期待される。

一方、コウタケからはエルゴステロールパーオキシドとともに多くのエルゴステロールが得られた。エルゴステロールはプロビタミンDとしてキノコの重要な栄養成分であり、ヒメマツタケ (アガリクス) から得られたエルゴステロールは、Sarcoma 180腫瘍細胞を接種したマウスへの経口投与で腫瘍増殖を抑制する¹⁵⁾などの報告がなされているが、本実験ではHL60細胞のアポトーシス誘導効果は認められなかった。

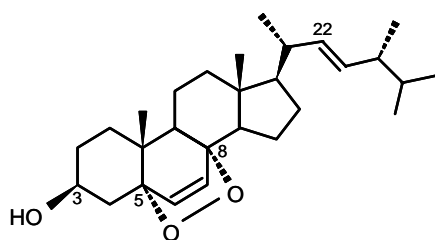


図 - 4 エルゴステロールパーオキシド

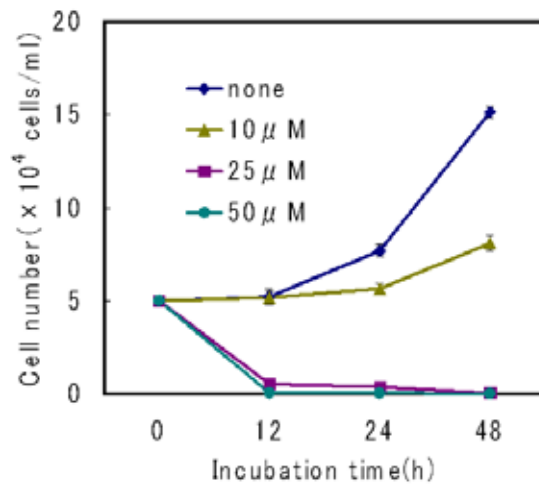


図 - 5 エルゴステロールパーオキシドによるHL60細胞の増殖への影響

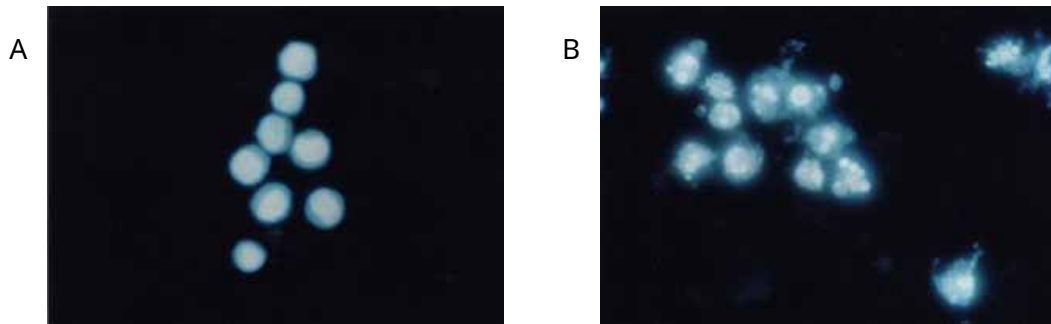


図 - 6 HL60細胞にエルゴステロールパーオキシドを加えて24時間培養した後の蛍光画像

A : エルゴステロールパーオキシドなし B : エルゴステロールパーオキシドを25 μMの濃度で添加

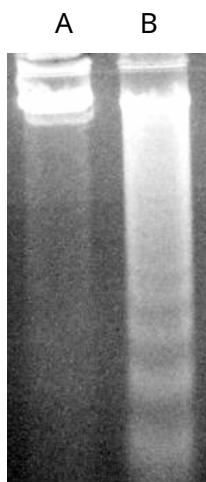


図 - 7 HL60細胞にエルゴステロールパーオキシドを加えて24時間培養した後のDNA
A : エルゴステロールパーオキシドなし B : エルゴステロールパーオキシドを25 μMの濃度で添加

(2) がん細胞分化誘導作用

アポトーシスとともに、がん細胞抑制の重要な経路の一つに、脱がん作用とも呼ばれる分化誘導作用がある。がん細胞にさまざまな分化誘導因子が作用して単球及び顆粒球などへ分化が誘導された場合、これをNBT色素還元能で評価することが出来る。

福島県産きのこのエタノール抽出物をHL60細胞に添加して培養し、NBT陽性細胞の割合を評価した結果(図-8) マゴジャクシが他のきのこに比べて強いNBT還元能を示した。

きのこ抽出物の分化誘導作用については、キシメジ科のハタケシメジ、ホンシメジ、キシメジ、マツタケ、シモフリシメジ、多孔菌科のマイタケ、トンビマイタケなどがB16 2F2細胞の分化を誘導することが明らかとなっている¹⁶⁾が、マゴジャクシについては検討されておらず、本研究によって初めて明らかとなった。また、マゴジャクシは当林業研究センターで栽培技術を開発してきた¹⁷⁾薬用きのこであり、本研究によりその効果について、具体的食品機能性を明らかにすることができた。

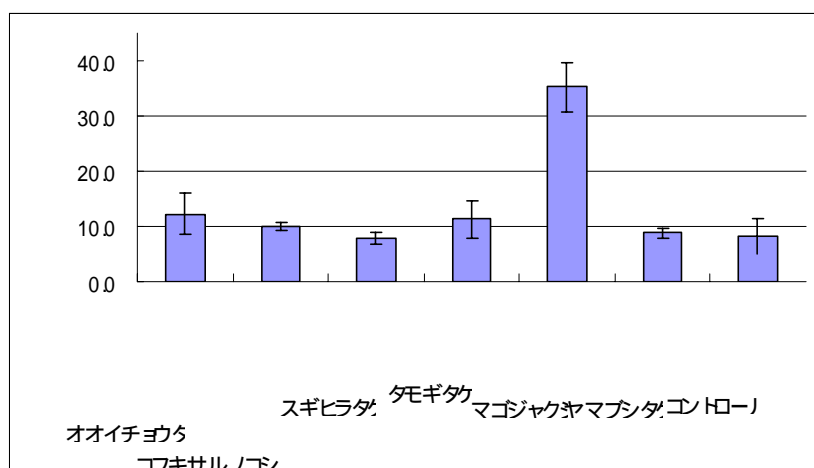


図 - 8 HL60細胞にきのこ抽出物を加えて培養した後のNBT還元能

2 抗酸化機能の評価

抗酸化機能を示す手法の一つであるDPPHラジカル消去能について検討した。山菜6種類、きのこ6種類から調製した80%エタノール抽出物をDPPH溶液に加えて520nm吸光度を測定し、DPPHラジカルを50%消去する試料量(生重)を求めた結果を図-9に示した。

最も強い活性を示したのはコゴミ、ワラビ等のシダの仲間であった。コゴミのDPPHラジカル消去能の中心物質はクロロゲン酸等である¹⁸⁾ことが報告されており、本試験の結果もこれに由来すると考えられる。また、ツチグリ、ブナハリタケ、ムキタケ等のきのこ類はコゴミ、ワラビ等に次ぐ活性を示した。これに対し、ハチクとネマガリタケのDPPHラジカル消去能は弱く、タケノコの抗酸化機能は弱いと考えられた。本試験の結果は、木村らの報告¹⁹⁾とほぼ一致する結果であったが、ブナハリタケ、ムキタケ、ツチグリ、サケツバタケについては、初めてDPPHラジカル消去能が明らかとなった。

本試験により、福島県内から採取した山菜ときのに、がん細胞アポトーシス誘導効果、がん細胞分化誘導作用及び抗酸化機能が確認されたことにより、生産者に対して、また、地域の特色ある素材を用いた加工食品等の開発等を目指す加工業者にとっても有益な情報

を提供できたと考える。

特に、ブナハリタケ、ムキタケは、当林業研究センターにて栽培方法及び優良株の選抜を実施していることであることから、これらに食品機能性が認められたことは、今後の生産振興や消費の促進に大きく寄与するものと考えられる。

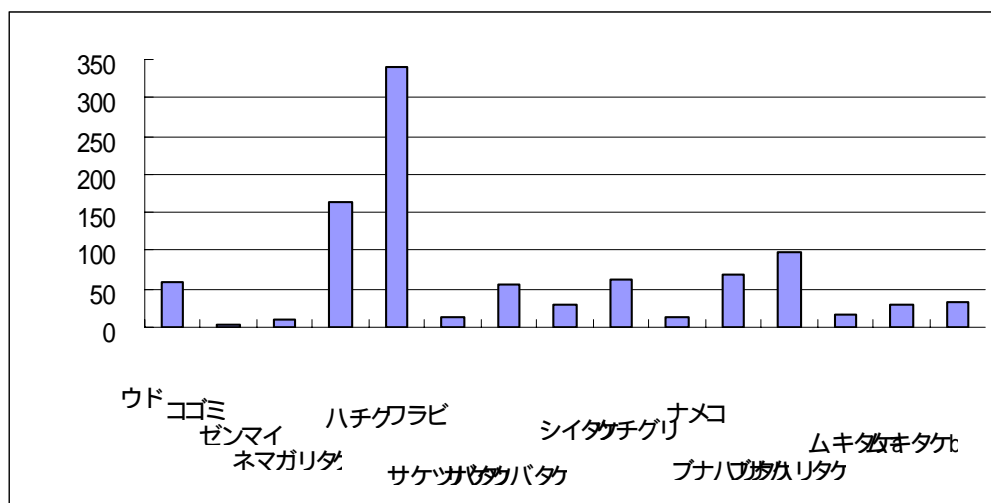


図 - 9 山菜ときのご抽出物のDPPH50%消去能

引用文献

- 1) 農林水産省食品総合研究所平成11年度公開講演会“食と健康の科学的解析”，1999,p.1-30.
- 2) 水野卓 他 キノコ類からの生物活性物質の開発と利用 Nippon Nogeikagaku Kaishi ,63, 861-889(1989).
- 3) 宮崎利夫編，“多糖の構造と生理活性”，朝倉書店,1990,p.1-36.
- 4) 菅原龍幸編，“キノコの科学”，朝倉書店,1997,p.143-180.
- 5) 農林水産省農林水産技術会議事務局 農林水産省食品総合研究所，“食品の機能性評価マニュアル”，平成11年1月,p.1-144.
- 6) 福島県農林水産部森林林業領域“平成16年度特用林産関係統計書(平成15年)”，2004,p.5.
- 7) 大沢章，“ふくしまの山菜とキノコ”，歴史春秋社,2001,p.10-19, 114-118.
- 8) 田沼靖一監修，“改訂アポトーシス実験プロトコール基礎編”，秀潤社,1998,p.56-57.
- 9) 田沼靖一監修，“改訂アポトーシス実験プロトコール基礎編”，秀潤社,1998,p.73.
- 10) 農林水産省農林水産技術会議事務局 農林水産省食品総合研究所，“食品の機能性評価マニュアル”，平成11年1月,p.59-61.
- 11) 農林水産省農林水産技術会議事務局 農林水産省食品総合研究所，“食品の機能性評価マニュアル”，平成11年1月,p.16-18.
- 12) T. Takei, M. Yoshida, M. Ohnisi-Kameyama, M. Kobori, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 212-215(2005)
- 13) J. W. Bok *et al.*, *Phytochem.*, 51, 891-898(1999)

- 14) 西條長広編, “アポトーシスと疾病”, 医薬ジャーナル社, 1999, p.21-23.
- 15) T. Takaku *et al.*, *J. Nutr.*, 131, 1409-1413(2001)
- 16) K. Hata *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 23, 962-967(2000)
- 17) 熊田淳 青野茂, 福島県林業研究センター研究報告 第35号 平成14年4月, p.56-73
- 18) T. Kimura *et al.*, *Phytochem.*, 65, 423-426(2004)
- 19) 木村俊之 他, 日本食品工業学会誌49, 257-266 (2002)