

研究代表者

和歌山県立医科大学医学部・講師・宇都宮洋才

共同研究者

和歌山県農業協同組合連合会営農対策部・部長・
澤井荘平

和歌山信愛女子短期大学・准教授・大山輝光

和歌山県立医科大学医学部・助教・奥野祥治

科学的効能解明による県産農作物の高付加価値化に関する研究

要旨

和歌山県は果樹王国といわれている。みかん、梅や柿といった全国一の生産高を有しており、和歌山の豊かな自然環境を活かした基幹産業である。この和歌山県の農産物の価値をさらに高めることを本研究の目的とした。このために、農産物を科学的に解析し、科学的・医学的データにより有用性を明らかにすることにより、消費者の購買意欲を高め、和歌山県産品としての価値を高めうる科学的・医学的研究を行った。

本研究で注目した有用性は、抗酸化活性および、抗肥満効果の2点である。抗酸化活性は発がん、細胞傷害の予防に関与している重要な活性であり、今回は1992年に米国農務省と国立老化研究所で開発された抗酸化力の新しい指標であるORAC（Oxygen Radical Absorbance Capacity：活性酸素吸収能力）を用いて行い、農作物エキスの抗酸化活性について検討した。一方、抗肥満効果は脂肪前駆細胞株3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化抑制効果および分化促進効果を指標として検討した。肥満はメタボリックシンドロームの発症に深く関わっていると考えられており、当効果は、肥満抑制だけでなくメタボリックシンドロームの制御に対しても期待できる。

以上、2点について検討した結果、桃抽出エキスの強い脂肪前駆細胞分化促進効果があることを見出した。

研究代表者

和歌山県立医科大学医学部・講師・宇都宮洋才

共同研究者

和歌山県農業協同組合連合会営農対策部・部長・澤井
荘平

和歌山信愛女子短期大学・准教授・大山輝光

和歌山県立医科大学医学部・助教・奥野祥治

科学的効能解明による県産農作物の高付加価値化に関する研究

1 目的

わが国ではファーストフードを代表とする食生活の欧米化に伴い、高脂肪、高タンパクの食事形態をとるようになってきた。これに伴い糖尿病、高脂血症などの生活習慣病が急速に増加し、その対策が急がれている。そのため、日本食が見直されている。米、味噌汁、漬物や小皿といった野菜や果物を中心とする日本食は健康食としての評価から広く海外においても注目されている。一般に野菜や果物といった農産物には抗酸化能や抗癌作用効果を有しているといわれている。特に農産物は加齢性の疾患(生活習慣病や癌などは高齢化の進む我が国において増加の一途を示しており、それらに対する予防効果を解明することは医療費の抑制といった点からも結果が求められる研究である)に対して、有益な結果を有するといわれている。本研究の目的は、本県産の農産物の機能性を科学的に証明することである。本研究のターゲットとした農産物は試験管内試験による機能性の科学的解析データを有し、さらに人間が食べることによる有用性を統計学的に明らかにすることにより、和歌山県産農産物の有用性を述べる事が可能となる。これにより、和歌山県産の農産物の市場価値を更に高めることができると確信し、疑う余地の無い研究であり、和歌山県の活性化と県外での和歌山県の認知度の上昇ができると期待できる。本研究では、農作物の機能性として次の2点について検討した。

① 抗酸化活性

発がん、細胞傷害を予防する作用がある抗酸化能を新規抗酸化活性試験法である、ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity : 活性酸素吸収能力) を用いて行った。

② 抗肥満効果

抗肥満効果はマウス脂肪前駆細胞株3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化抑制効果および分化促進効果を指標として検討した。

2 実施方法

県産農作物の入手

県産農作物は和歌山県下の農業協同組合より提供していただいた。今回は桃、山椒、生姜、玉葱を用いた。

各種試料の採取および入手時期は表1に示す。

表1. 県産農作物の入手時期

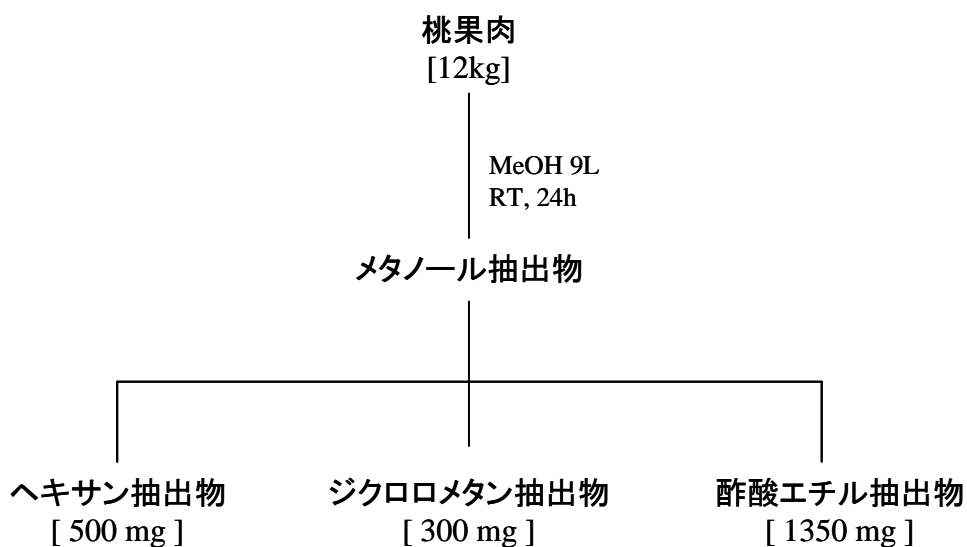
農作物	時期
桃（白桃）	7月
山椒（生）	7月
山椒（乾燥）	12月
生姜	1月

県産農作物エキスの調整

各種農作物のエキスは以下のように調整した。

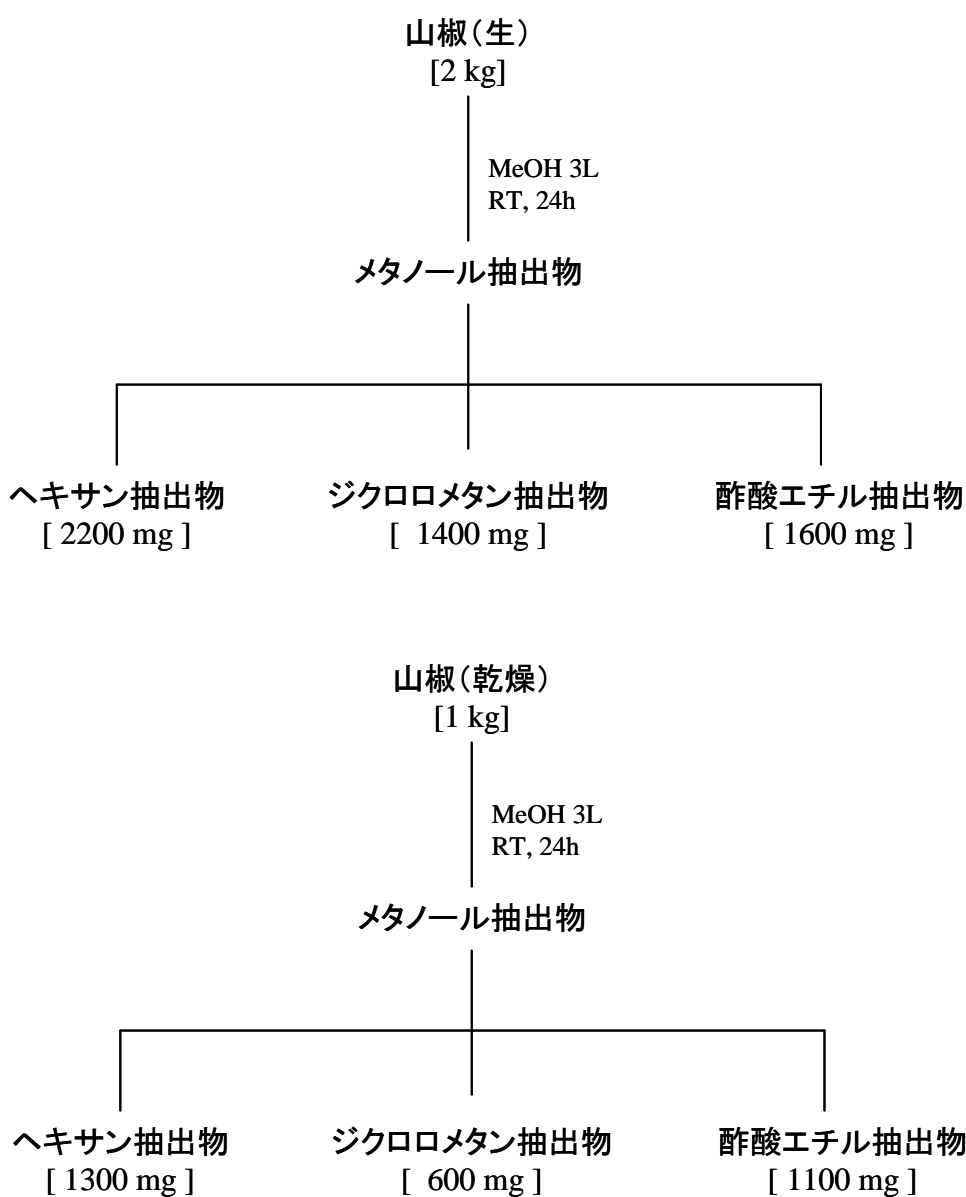
① 桃エキスの調整

新鮮な桃果実の皮をむき、果肉をメタノールに24時間、室温に浸漬することにより、メタノール抽出液を得、これを減圧か濃縮することによりメタノール抽出物を調整した。メタノール抽出物を水に懸濁後、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルの各種有機溶媒により順次抽出し、それぞれの抽出物を調整した。収量は下図に示す



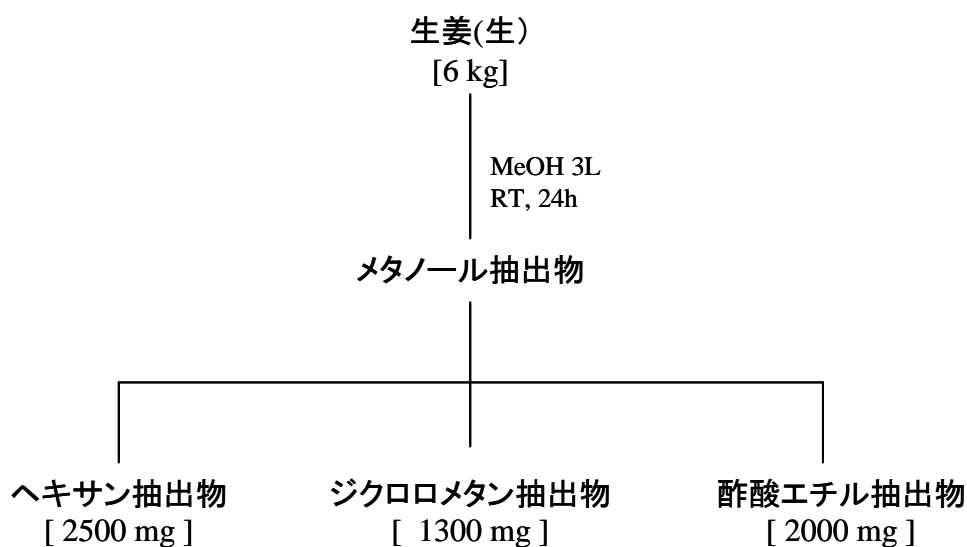
②山椒エキスの調整

山椒は収穫直後の新鮮な物（生）と乾燥後の物（乾燥）それぞれのエキスを調整した。生および乾燥品をメタノールに24時間、室温に浸漬することにより、メタノール抽出液を得、これを減圧か濃縮することによりメタノール抽出物を調整した。メタノール抽出物を水に懸濁後、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルの各種有機溶媒により順次抽出し、それぞれの抽出物を調整した。収量は下図に示す



③生姜エキスの調整

新鮮な生姜を水洗いし、キムタオルで水気をとった後、3 cm角にカットしたものをメタノールに室温で24時間浸漬することにより、メタノール抽出物を得た。メタノール抽出物を水に懸濁後、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチルの各種有機溶媒により順次抽出し、それぞれの抽出物を調整した。収量は下図に示す



抗酸化活性測定法

抗酸化活性はORAC試験を用いて評価した。本試験に使用した蛍光物質フルオレセインは、ラジカル促進剤2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ジハイドロクロライド(AAPH)により生ずるペルオキシラジカルにより蛍光を失う。蛍光強度を測定することにより、試料中の抗酸化物質の蛍光減少阻害能力をラジカル捕捉能の指標とした。

マイクロプレートの各wellに試料液 25mL、81.6nM フルオレセイン/75mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 150mL、320mM AAPH 水溶液 50mL を入れて、10 秒間浸透させた後、37°Cでインキュベートしながら1分間隔で60分間経時的に蛍光強度 (Em. 535nm、Ex. 505nm) を測定し、試料 100gあたりのORAC値を算出し、トロロックス当量(mg)で表した。

抗肥満効果

脂肪細胞は糖・脂質代謝を活発に行い生体内のエネルギーの恒常性の維持に重要な役割を果たしており、皮下や腹部に多く分布している。この細胞は小さいものは直径約 20 μm 、大きなものは直径約 100 μm になるので、体積や重さは 100 倍程にも変化することになる。このように大きさの変化の激しい脂肪細胞では、小さいものと大きいものとで性質が全く異なることが最近わかってきた。大きく肥大した脂肪細胞からは TNF（腫瘍壊死因子） α 、PAI-1（プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1）、脂肪酸などが多く分泌され、メタボリックシンドロームや生活習慣病の原因になることが指摘されている。一方、小さい脂肪細胞はインシュリン感受性が高く、アディポネクチンを多く分泌することからメタボリックシンドロームを予防改善することが知られている。本研究では、脂肪前駆細胞（3T3-L1 細胞）を用いて、脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化を抑制する物質および、分化を促進し、小型の脂肪細胞を作り出す物質を農作物の中から検索することにした。

①3T3-L1 細胞

脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞は DS ファーマバイオメディカル株式会社より入手した。細胞株は 10% 仔牛血清（CS）を加えた DEME 培地中、5% CO₂ 条件下で継代した。

②分化誘導抑制試験

1. 3T3-L1 細胞（70~80%）を培養した 75 cm² 培養フラスコから古い培地を抜き、HBSS または PBS(-) 5 mL を加え細胞を洗う。
2. 0.25% トリプシン-EDTA を 5mL 加え、37 °C で 2 分間程度静置する。その後、10%CF 含有 DMEM 培地 5 mL を加え反応を止める。
3. ピペッティング後、50mL の遠心チューブに移し、1500rpm、5min で遠沈する。
4. 上澄みを取り除き、10%CF 含有 DMEM を 2 mL 加え細胞数をカウントする
5. 細胞数を 8x10⁴ cell/mL に調整し、96 well マイクロプレートに 200 μL ずつ分注する(1~2x10⁴ cell/well) < -2day >
6. 2 日後 (confluent)、培地を抜き取り、サンプルを添加した分化培地を 150 μL 添加する < 0 day >
7. 3 日後、培地を抜き取り、サンプルを添加した維持培地を 150 μL 添加する < 3 day >
8. 2 日後、培地を抜き取り、サンプルを添加した維持培地を 150 μL 添加する

< 5 day >

9. 2日後、Oil red Oによる脂肪滴の染色を行う < 7 day >

③分化促進試験

1. 3T3-L1 細胞 (70~80%) を培養した 75 cm²培養フラスコから古い培地を抜き、HBSSまたはPBS(-) 5mLを加え細胞を洗う。
2. 0.25%トリプシン-EDTAを5 mL加え、37°Cで2分間程度静置する。その後、10%CF含有DMEM培地5 mLを加え反応を止める。
3. ピペッティング後、50 mLの遠心チューブに移し、1500rpm、5minで遠沈する。
4. 上澄みを取り除き、10%CF含有DMEMを2 mL加え細胞数をカウントする
5. 細胞数を8x10⁴ cell/mLに調整し、96 wellマイクロプレートに200 μLずつ分注する (1~2x10⁴) < -2day >
6. 2日後 (confluent)、培地を抜き取り、サンプルを添加した維持培地を150μL添加する < 0 day >
7. 3日後、培地を抜き取り、サンプルを添加した維持培地を150μL添加する
< 3 day >
8. 2日後、培地を抜き取り、サンプルを添加した維持培地を150μL添加する
< 5 day >
9. 2日後、Oil red Oによる脂肪滴の染色を行う < 7 day >

Oil red Oによる脂肪滴の染色および有効性評価方法

Adipogenesis Assay Kit (cayman chemical Co. Ltd.) に付属している染色キットを使用。Oil red O溶液はOil red O stockと蒸留水を6:4の割合で混合し、10分間静置、0.45 μmのフィルターでろ過し調整した。

1. 培地を抜き取る
2. Fixative (10%ホルマリン)を各wellに75 μLずつ添加し、15分間放置
3. Wash solution 100 μLを添加し、5分間放置。これを2回繰り返す
4. Wash solution 除去後、風乾
5. Oil red O solutionを75 μL添加、20分間放置 (細胞を未添加wellの2箇所も同様の処理をする)
6. Oil red O除去後、蒸留水で洗浄。蒸留水の色が透明になるまで (150 μ

L 添加で 2~3 回繰り返す)

7. Wash solution 100 μ L を添加、5 分間放置。2 回繰り返す。
8. PBS を 100 μ L 添加し、顕微鏡で観察する
9. PBS を除去後、風乾
10. Extraction solution を 100 μ L 入れ 20 分間放置
11. 490nm の吸光度を測定

3 結果

抗酸化活性

新規抗酸化試験法である ORAC 法をもちいて検討を行ったが、試料のアッセイ系の溶解性が悪く適したデータが得られなかった。

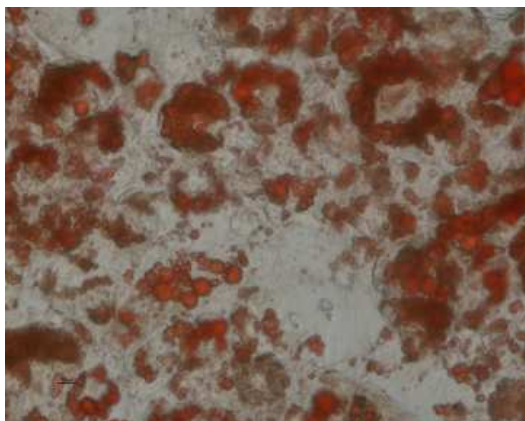
抗肥満効果

分化誘導抑制効果

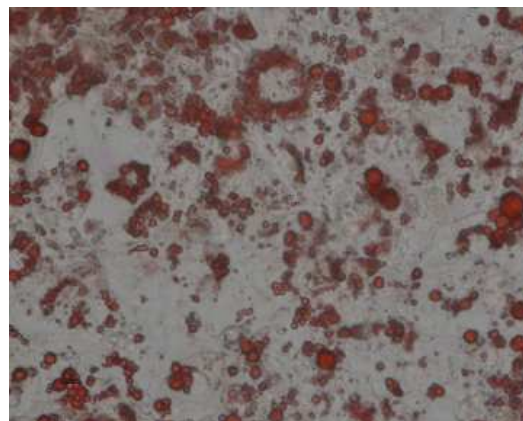
①桃エキス

桃エキス分画部における分化誘導抑制試験の結果を以下に示す。添加濃度は 200 μ g/mL。すべての分画部において抑制効果は見られなかった。

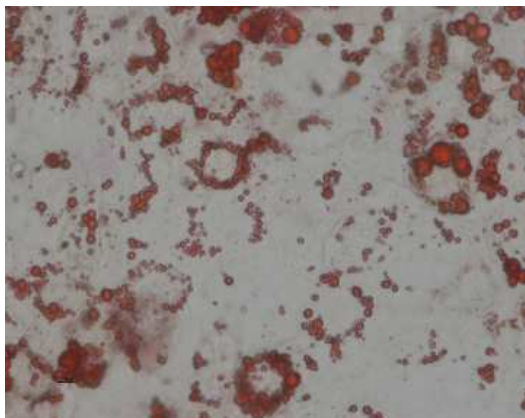
DMSO



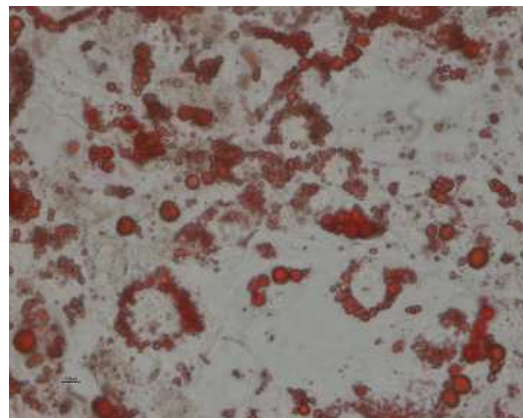
ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物



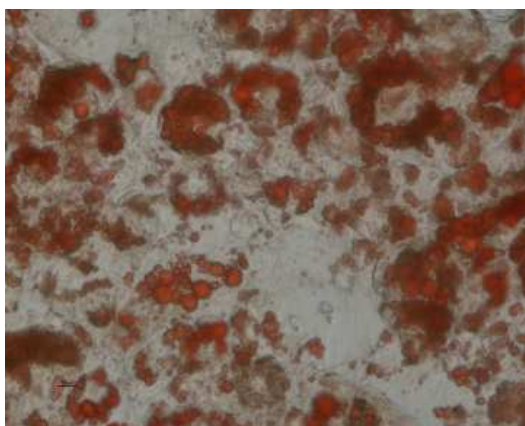
酢酸エチル抽出物



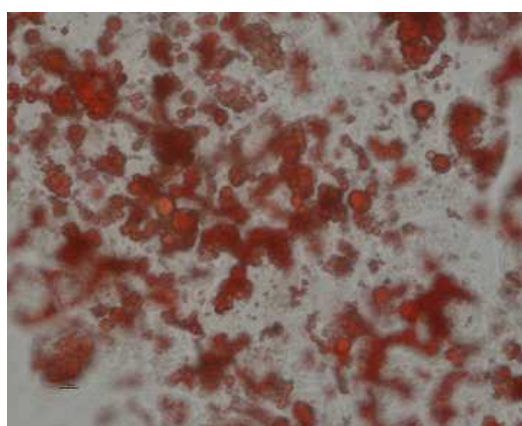
②山椒エキス (生)

山椒エキス(生)分画部における分化誘導抑制試験の結果を以下に示す。添加濃度は200 μ g/mL。すべての分画部において抑制効果は見られなかった。

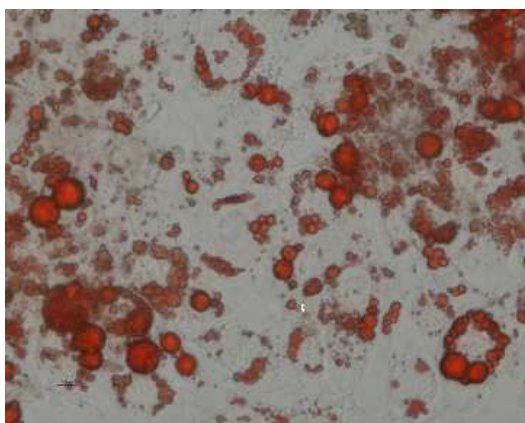
DMSO



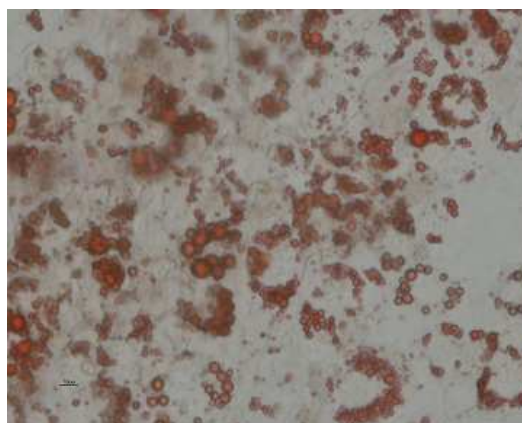
ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物



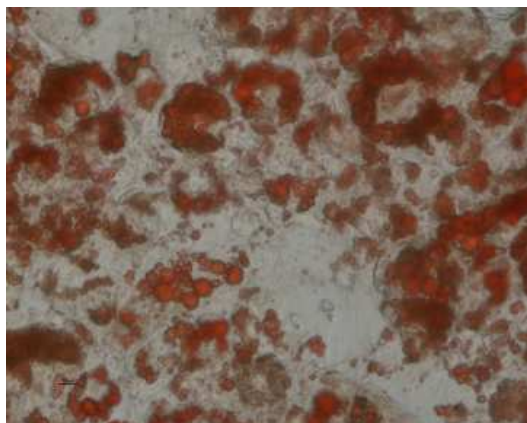
酢酸エチル抽出物



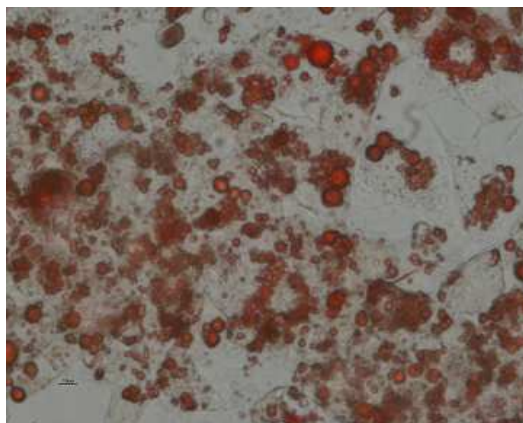
③山椒エキス（乾燥）

山椒エキス(乾燥)分画部における分化誘導抑制試験の結果を以下に示す。添加濃度は200 μ g/mL。ジクロロメタン抽出物に若干の分化誘導抑制効果が見られた。

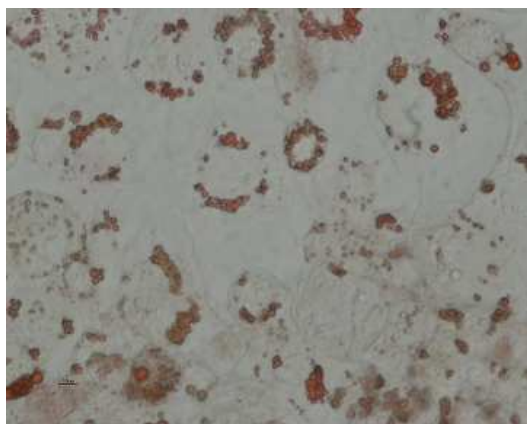
DMSO



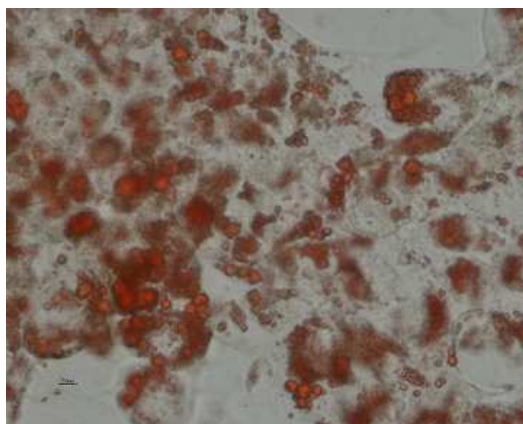
ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物



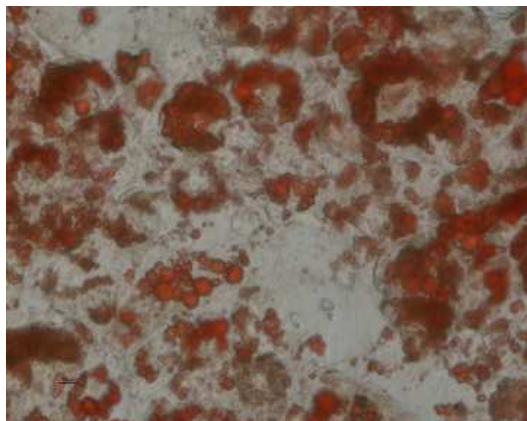
酢酸エチル抽出物



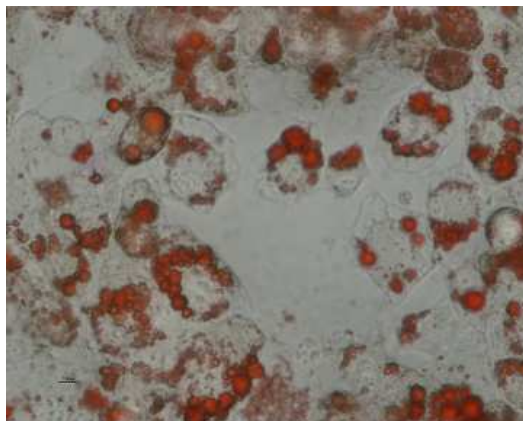
④生姜エキス

生姜エキス分画部における分化誘導抑制試験の結果を以下に示す。添加濃度は200 μ g/mL。ジクロロメタン抽出物に若干の分化誘導抑制効果が見られた。

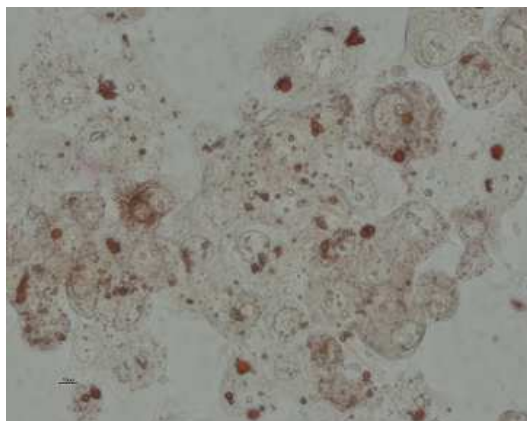
DMSO



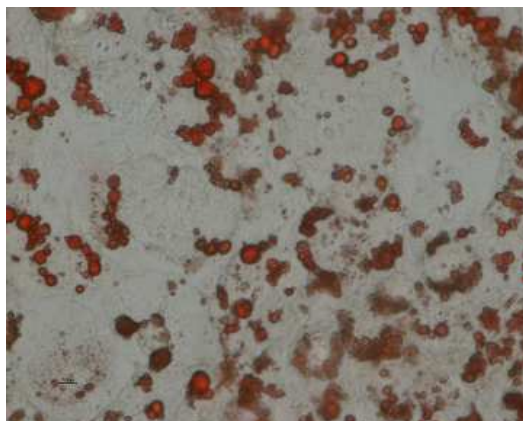
ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物



酢酸エチル抽出物

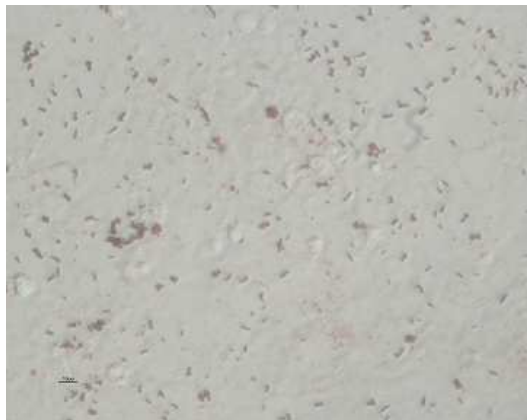


分化促進効果

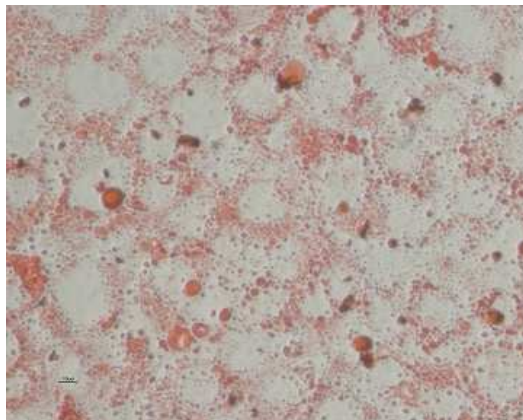
①桃エキス

桃エキス分画部における分化誘導抑制試験の結果を以下に示す。添加濃度は 200 μ g/mL。ヘキサン抽出物に分化促進効果が見られた。

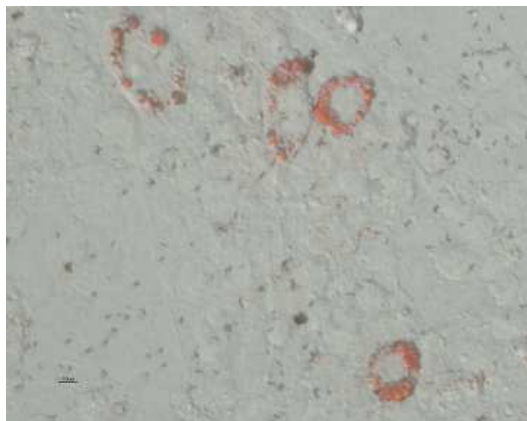
DMSO



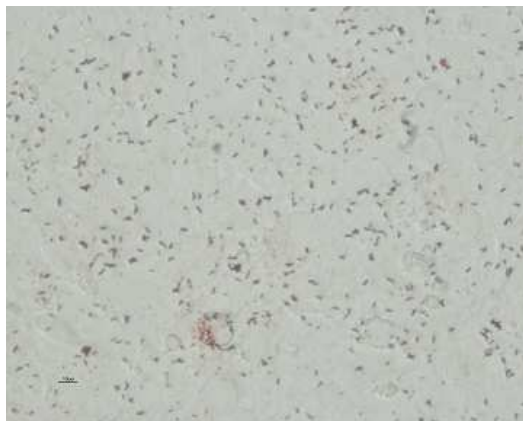
ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物



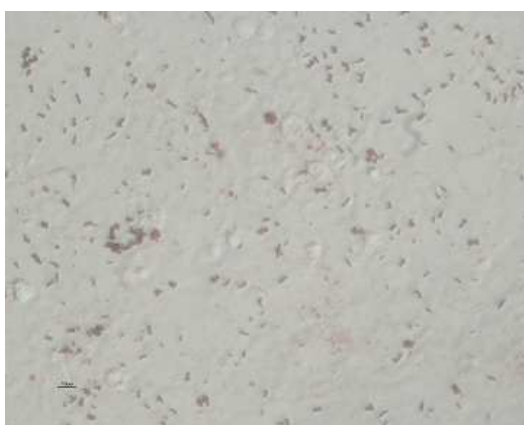
酢酸エチル抽出物



②山椒エキス (生)

山椒エキス(生)分画部における分化促進試験の結果を以下に示す。添加濃度は200 μ g/mL。すべての分画部において促進効果は見られなかった。

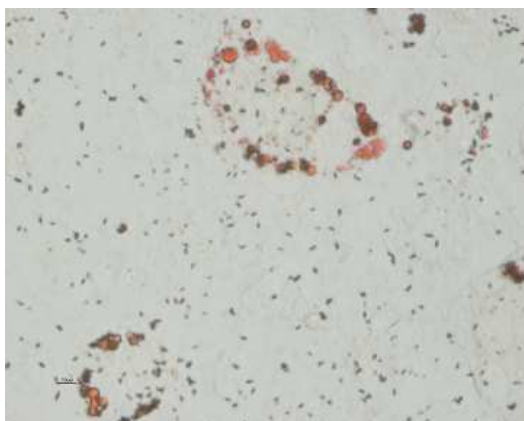
DMSO



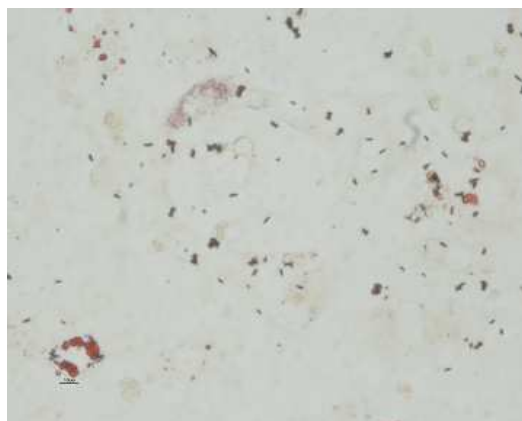
ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物



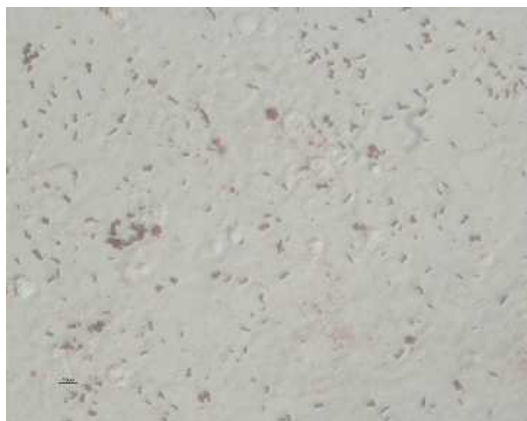
酢酸エチル抽出物



③山椒エキス（乾燥）

山椒エキス(乾燥)分画部における分化促進試験の結果を以下に示す。添加濃度は200 μ g/mL。すべての分画部において促進効果は見られなかった。

DMSO



ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物



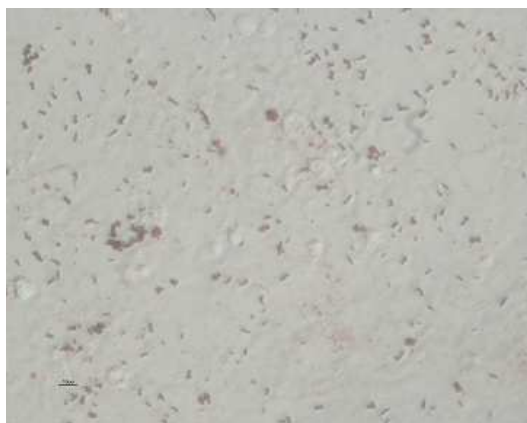
酢酸エチル抽出物



④生姜エキス

生姜エキス分画部における分化促進試験の結果を以下に示す。添加濃度は200 μ g/mL。すべての分画部において促進効果は見られなかった。

DMSO



ヘキサン抽出物



ジクロロメタン抽出物

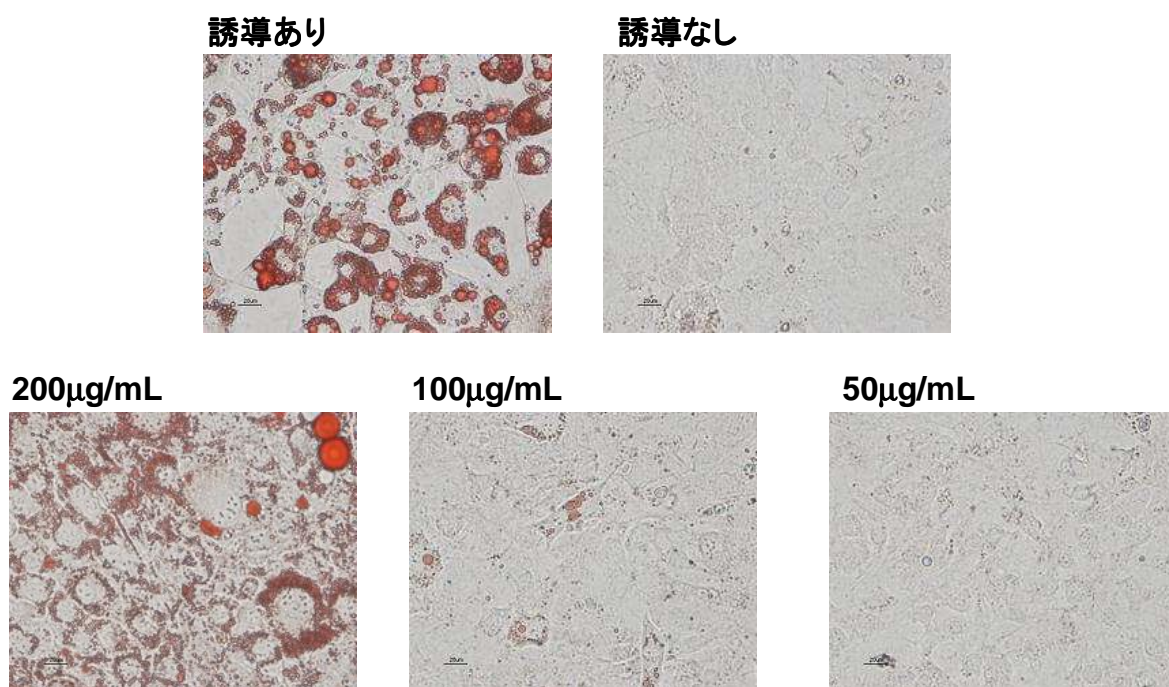


酢酸エチル抽出物

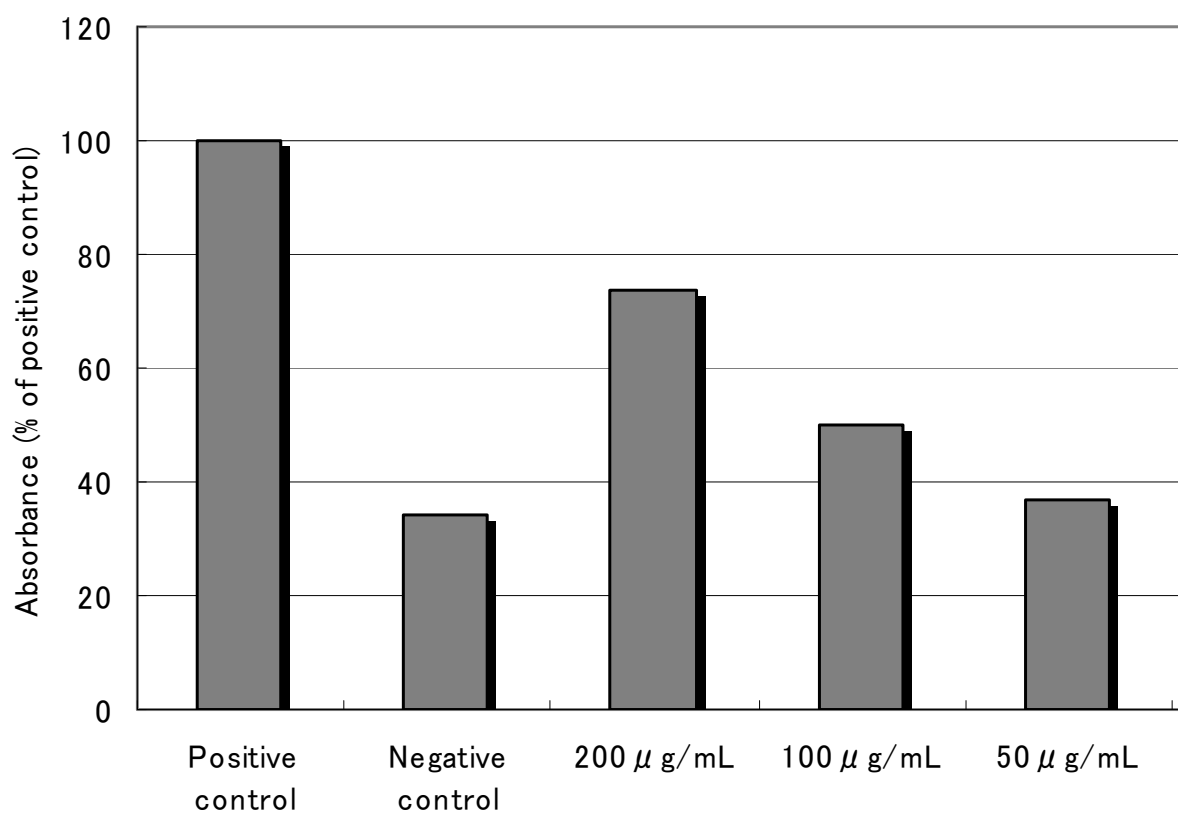


桃ジクロロメタン抽出物の分化促進効果

各種エキスの分化誘導抑制効果および分化促進効果のスクリーニング結果より、もっとも活性が見られた桃ジクロロメタン抽出物の分化促進効果について、濃度依存的分化促進効果について検討した。



濃度依存的分化促進試験を行った結果、200µg/mLのみ分化促進効果が顕著に見られた。この結果を吸光度測定により数値化したものを次に示す。



吸光度測定による桃ジクロロメタン抽出物の分化測定効果

上図に、分化誘導剤により分化を誘導した細胞の吸光度を 100%とした時の各濃度における吸光度を%で示した。桃ジクロロメタン抽出物は 200µg/mL、100µg/mL において分化誘導をかけていない細胞に比べそれぞれ、約 2 倍、1.5 倍の分化誘導促進活性があった。