

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

近畿大学先端技術総合研究所・高圧力蛋白質研究センター・教授・赤坂一之

近畿大学生物理工学部・教授・橘秀樹

和歌山県農業協同組合連合会営農対策部・部長・澤井 莊平

和歌山信愛女子短期大学・准教授・大山輝光

和歌山工業高等専門学校・助教・奥野祥治

**新たな食品処理法による県産特産農産物を原材料とした
有用成分抽出と加工に関する研究**

要旨

和歌山県は自然環境に恵まれ、梅やみかん、柿といった農産物の全国一の生産高を有するが、輸入農産物の増加や国内消費の減少により、経済の不安定化が起きている。また、食生活の欧米化にともない、さまざまな生活習慣病が増加している。さらに高齢化の進むわが国では、加齢性の疾患である癌や骨粗鬆症などへの対策が急がれている。本研究では、果樹王国である和歌山県のより一層の発展と現代人の健康のために、和歌山県の特産農産物を原料とした新たな食品処理法による新規成分の抽出と特色ある加工食品を生み出し新たな産業を開拓することを目的とした。本研究では、ミカン、山椒、生姜、ウメ、シソ、ウスイエンドウから新たな食品処理法により成分抽出を行い、そこで得られた抽出エキスの機能性を検討した。検討した機能性は、抗骨粗鬆症効果、抗肥満効果、抗酸化活性、抗癌作用、痴呆症予防効果である。抗骨粗鬆症効果はマウス頭蓋骨由来細胞株 3T3-E1 の骨芽細胞への分化促進効果を指標として検討を行った。その結果、全農作物中、モモ、ウメ種子の新規食品処理法抽出物に分化促進効果が見られた。抗肥満効果はマウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 の脂肪細胞への分化阻害効果を指標として検討を行った。すべての抽出エキスを脂肪滴蓄積阻害効果がみられ特に新規食品処理法抽出物で効果が高かった。以上の様に新規食品処理法の有効性を確認したが、その処理によって必ずしも有効成分抽出に効果があるわけではないことも判明した。

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

近畿大学先端技術総合研究所・高圧力蛋白質研究センター・教授・赤坂一之

近畿大学生物理工学部・教授・橘秀樹

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

和歌山工業高等専門学校・助教・奥野祥治

新たな食品処理法による県産特産農産物を原材料とした
有用成分抽出と加工に関する研究

1. 目的

和歌山県は自然環境に恵まれ、みかん、山椒や梅といった農産物の全国一の生産高を有するが、輸入農産物の増加や国内消費の減少により、経済の不安定化が起きている。また、食生活の欧米化にともない、さまざまな生活習慣病が増加している。さらに高齢化の進むわが国では、糖尿病、高血圧、癌や骨粗鬆症など生活習慣病への対策が急がれている。現在の消費者は健康に対する意識が高まり、多少高価であっても、おいしく、自然で、健全な食品を好む傾向が強まっているが、それでもなお、現代人には健康保持に必要な有用成分は不足しがちである。一般に、野菜や果物といった農産物はビタミン・ミネラル・食物繊維など健康に対して有用な成分を豊富に含んでおり、健康志向の高まる現代社会において注目されている。本研究では、果樹王国である和歌山県のより一層の発展と産業の活性化、現代人の健康のために、和歌山県の特産農産物を原料とした新たな食品処理法による新規成分の抽出と特色ある加工食品を生み出し新たな産業を開拓することを目的とした。本研究でターゲットとした農作物はミカン、山椒、生姜、ウメ、シソ、ウスイエンドウである。これらの農作物の抽出物を用いて、以下の項目で新たな食品処理法の有用性と農作物の機能性を評価した。

① 抗骨粗鬆症効果

抗骨粗鬆症効果はマウス頭蓋冠由来細胞株MC3T3-E1細胞の骨芽細胞への分化促進効果を指標として検討した。

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。

③ 抗酸化活性

DPPHラジカル補足能を指標として抽出エキスの抗酸化活性を検討した。

④ 抗癌作用

抗癌作用は食品由来成分のヒト胃癌細胞株MKN-45に対するアポトーシス誘導効果から検討した。

⑤ 痴呆症予防効果

痴呆症予防効果は、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株SH-SY5Yの神経細胞保護効果、軸索診療促進効果等から検討した。

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。今回はミカン、山椒、生姜、ウメ、シソ、ウスイエンドウを用いた。ミカンは搾りかすと果皮、シソは葉と茎、ウメは果肉と種子、エンドウは実と鞘を抽出対象とした。

新たな食品処理法を用いた農作物からの抽出

ミカン、山椒、ウメ、シソ、ウスイエンドウの重量に対して二倍量の抽出溶媒を用い、常圧下室温で一時間静置し抽出した溶液と、高圧 2~4000 気圧下室温で一時間抽出した溶液を減圧濃縮して各種試験に用いた。

その他の県産農作物エキスの調整

モモ、山椒、生姜は下記の方法で得られたエキスを用いた。（平成 20 年度調製品）

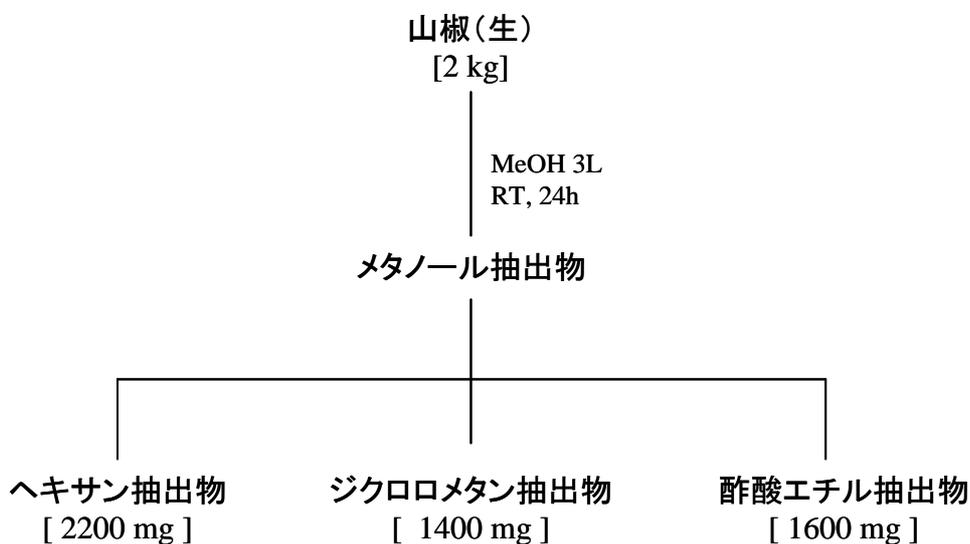
① 桃エキスの調整

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



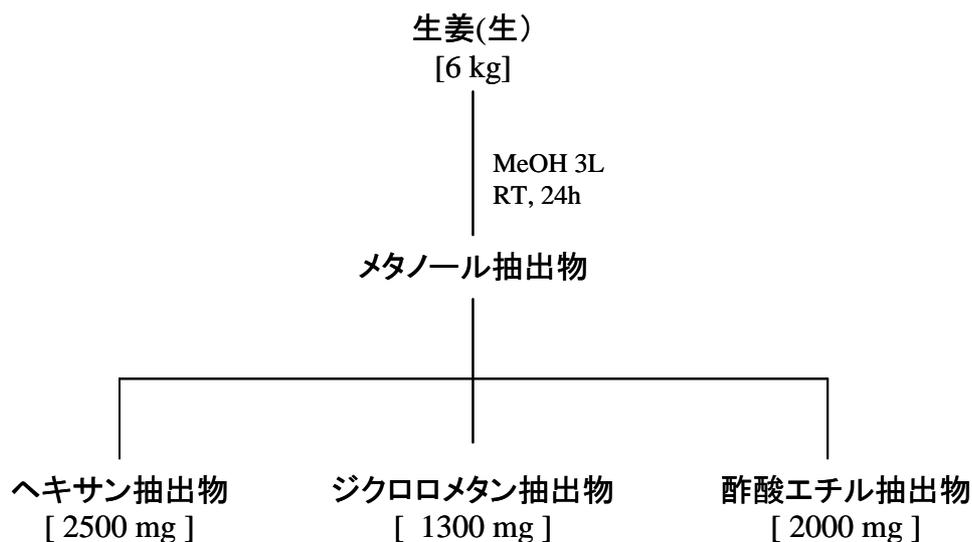
②山椒エキスの調整

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



3. 抗骨粗鬆症効果

骨粗鬆症のような老人性疾患は、骨組織の代謝異常により起こる疾患で、骨折を起こしやすくなるなど、生活に支障を来す疾患である。このため、骨形成を促進するような効果のある食品は骨粗鬆症の予防に効果があることが期待される。骨の形成を担う骨芽細胞は、有機成分からなる骨の土台（類骨）を形成し、次にリン酸カルシウム（ヒドロキシアパタイト）を沈着させる。このリン酸カルシウムの沈着には、骨芽細胞膜上に存在する骨型のアルカリ性ホスファターゼ (ALP) が重要な役割を果たす。したがって、ALP は正常な骨組織の形成に必須であり、ALP 活性を上昇させる効果を調べることで骨粗鬆症の予防効果を検討した。

3-1. 実験方法

骨芽細胞前駆細胞である 3T3-E1 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% 牛胎児血清 (FBS) を加えた α -MEM 培地中、5% CO₂ 条件下で継代した。骨芽細胞分化試薬 (タカラバイオ、MK430) である、Ascorbic acid (最終濃度 1%)、Hydrocortisone (最終濃度 0.2%)、 β -Glycerophosphate (最終濃度 2%) を培地に添加し分化培地として用いた。

骨芽細胞分化誘導促進試験

操作手順

1. 1日目、3T3-E1細胞（100%まで増殖）を培養した75cm²フラスコから古い培地を吸引し、PBS（-）5 mLを加え細胞を洗浄する
2. 0.25%トリプシン-EDTAを3mL加え、37°Cに設定したCO₂インキュベータ内で2min程度静置する。その後、10%FBS含有α-MEM培地7mLを加え反応をとめる。
3. ピペッティングの後、50mLの遠心チューブに移し、1500rpm、5minで遠心する。
4. 上澄みを取り除き、10%FBS含有α-MEMを2ml加え、血球計算版で細胞数をカウントする。
5. 細胞数を4 x 10⁴cell/mLに調整し、96wellマイクロプレートにあらかじめ100ul培地を添加しておき、その後、細胞懸濁液を静かに100 μLずつ分注する。（最終細胞数4 x 10³cell/well）
6. 3日目（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。
7. 9日目、アルカリ性フォスファターゼの活性測定と染色を行う。

アルカリ性フォスファターゼの活性測定と染色

アルカリ性フォスファターゼの活性測定と染色にはそれぞれ、TAKARA TRACP &ALP Assay Kit (MK301)、TRACP&ALP double-stain kit (MK300)を使用した。

操作手順

ALP 活性測定 1

1. 試薬を室温に戻しておく。pNPP（p-nitro-phenyl phosphate）substrate（pNPP substrate）（ALP 基質）1本をアルカリ性フォスファターゼ用緩衝液5mlで十分に溶かし、反応基質液（12.5mM）とする。
2. 細胞を培養していたwellから培養上清を取り除く。
3. 各well（上段）に生理食塩水を200ulずつ加え、一回洗浄する。

ALP 染色 1

4. 下段のwellをPBS(-)200ulで洗浄する。
5. Fixative solutionを50ul加え5min細胞を固定する。
6. 蒸留水を250ul加え洗浄する。

ALP 活性測定 2

7. 細胞抽出液を各well（上段）に50ulずつ加え、軽くピペッティングす

る。(内 5 μ L を DC protein assay に用いる)

8. 顕微鏡で可溶化の確認をする
9. 反応基質液を各 well に 50 μ L ずつ加え、37°C で 15 分反応させる。
10. 反応停止液を各 well に反応基質液と等量の 50 μ L ずつ加え、呈色 405 nm の吸光度を測定する。

ALP 染色 2

11. 反応基質 substrate for ALP を各 well (上段) に 50 μ L 加え 37°C で 15 ~ 45 分間反応させる。
12. 反応液を取り除き蒸留水で 3 回洗浄の後、検鏡する。

DC protein assay

Well ごとに細胞数が異なるため、DC protein assay kit を使用し Lowry 法に基づき、well ごとの総タンパク質量を算出し、細胞数を統一化させて脂肪滴量の比較を行う。タンパク質溶液にアルカリ性条件で硫酸銅、次いでフォーリン試薬を加えて反応させ、750 nm の吸光度を測定する。

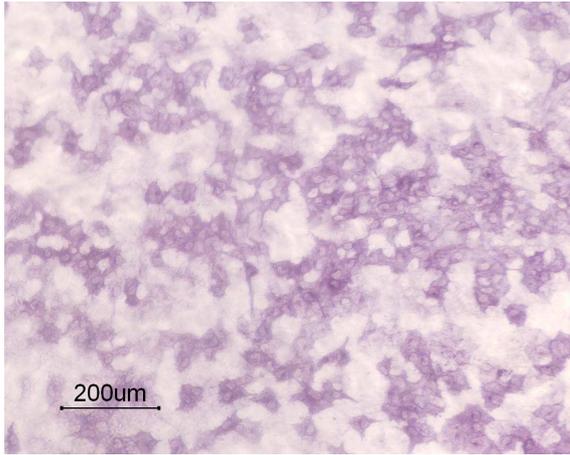
DC protein assay kit (Reagent S (硫酸銅), Reagent A (緩衝液), Reagent B (フォーリン試薬))

Reagent S 60 μ L を Reagent A 3 mL と混合し、Reagent A' とする。

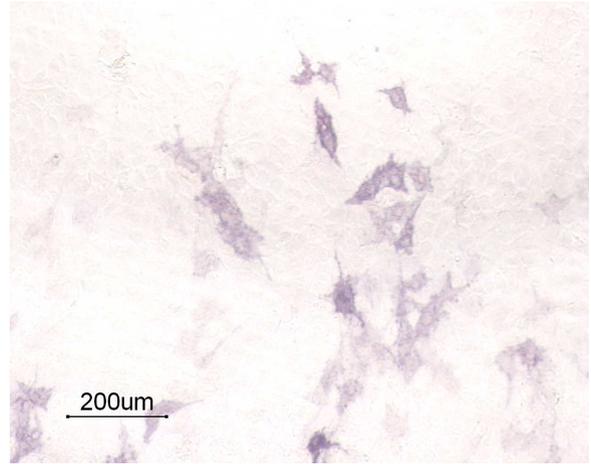
13. 各 well を蒸留水で洗浄後、細胞抽出液として 1% Triton X-100 を 50 μ L 添加し、内 5 μ L を新しいマイクロプレートに添加する。
14. スタンダードとして牛血清アルブミン (BSA) を濃度 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml に調整し well に添加する。(デュープリケートで行う)
15. サンプルを添加した well に Reagent A' を 25 μ L 加え、さらに Reagent B を 200 μ L 加えて 20 分反応させ、750 nm の吸光度を測定する。
16. 得られた結果から、細胞数を統一化 (補正) する。

結果

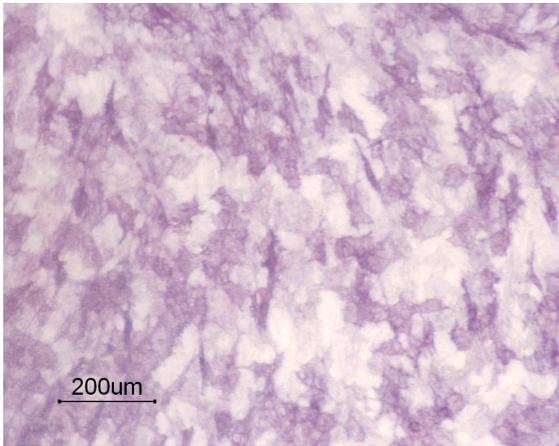
ALP 染色像と ALP 活性測定結果を示す。



分化誘導試薬有り
陽性コントロール



試薬無し
陰性コントロール



サンプルエキス（ウメ MeOH 抽出物）を添加して分化誘導した細胞

図. ALP 染色像

染色結果から分化誘導促進効果を判断するのは難しく、ALP 活性測定の結果から考察した。

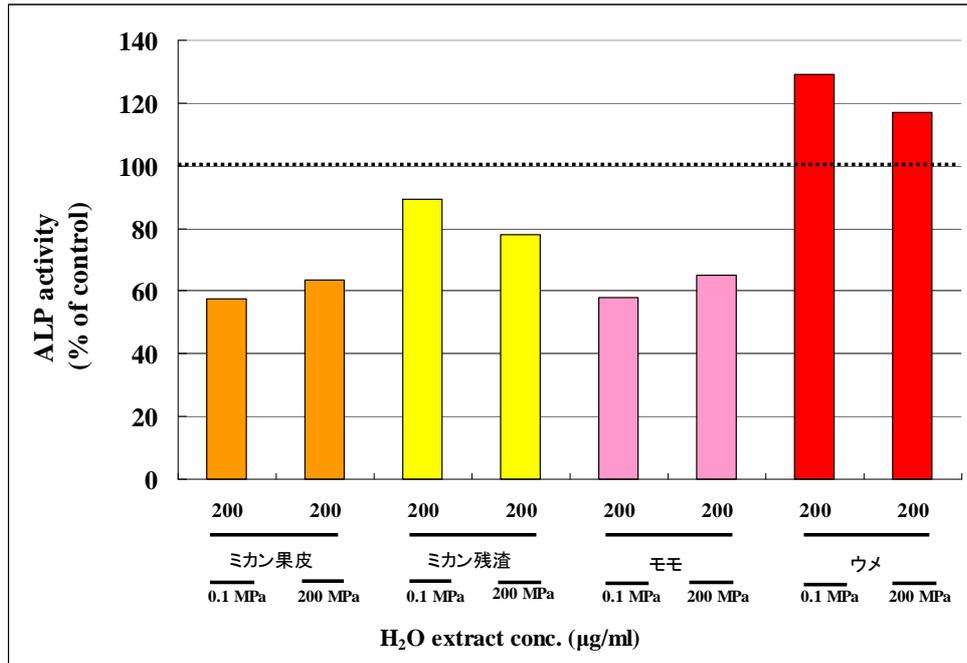


図. ミカン、モモ、ウメの水抽出物を添加し分化誘導した細胞の ALP 活性

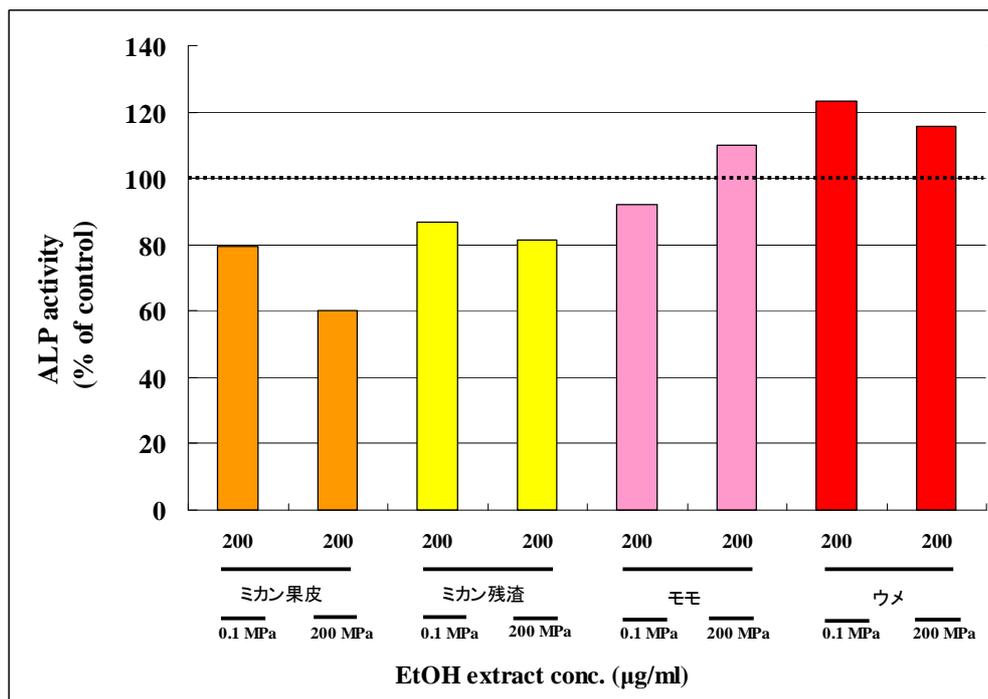


図. ミカン、モモ、ウメの EtOH 抽出物を添加し
分化誘導した細胞の ALP 活性

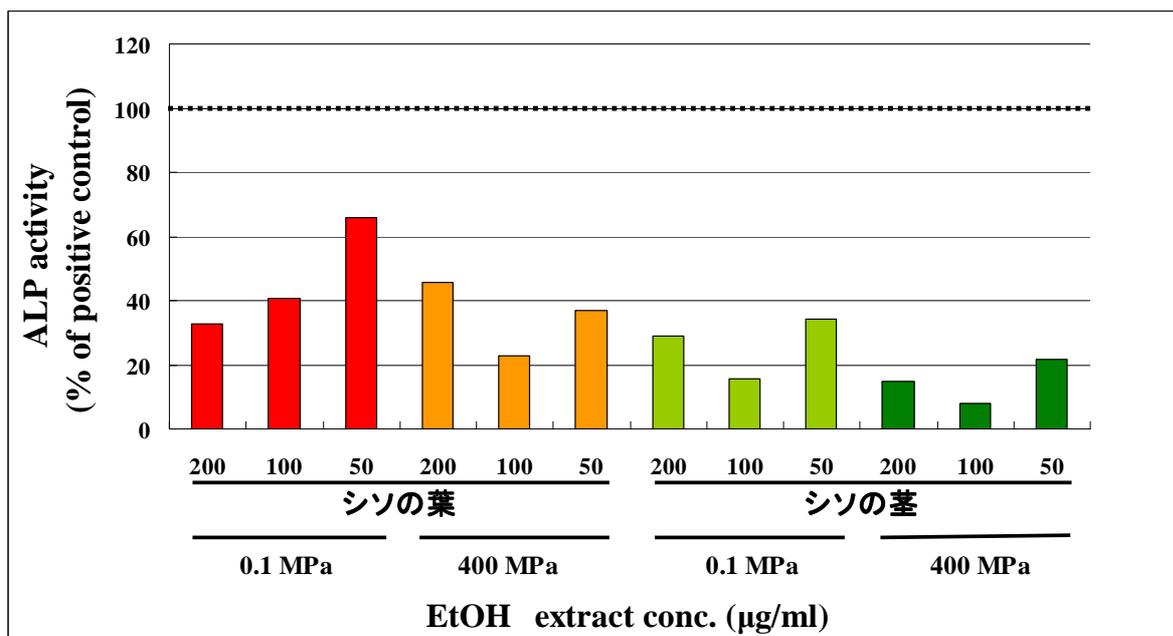


図. シソの EtOH 抽出物を添加し
分化誘導した細胞の ALP 活性

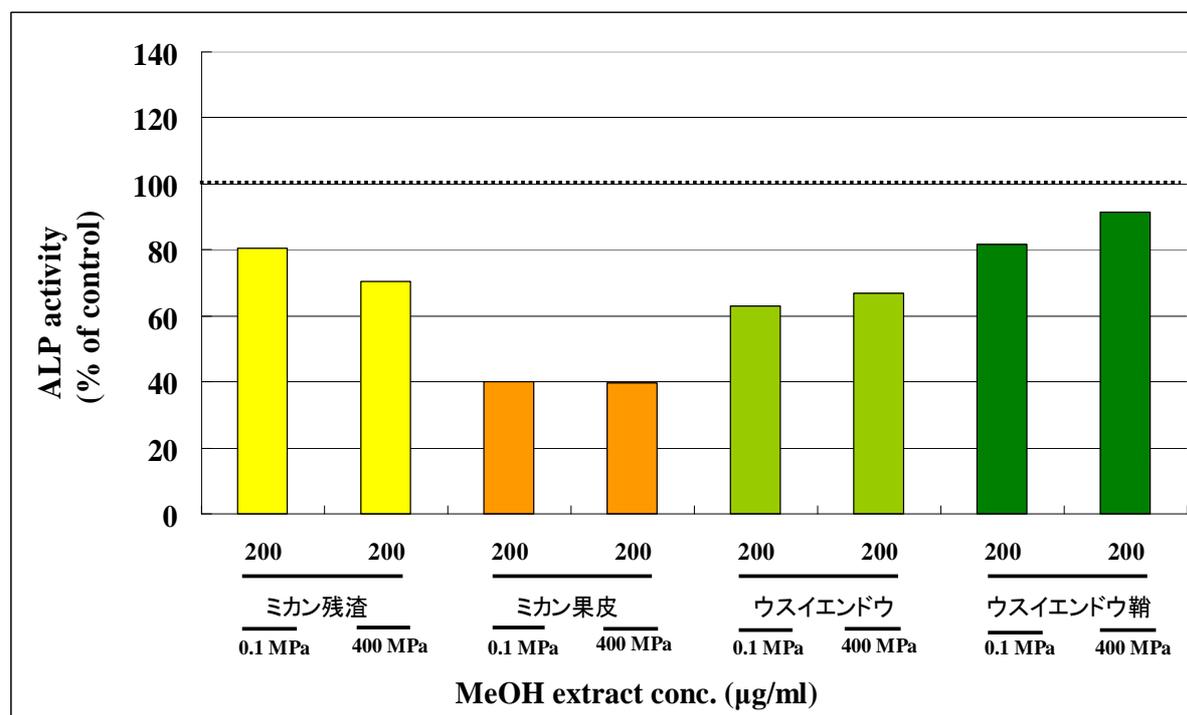


図. ミカン、ウスイエンドウの MeOH 抽出物を添加し
分化誘導した細胞の ALP 活性

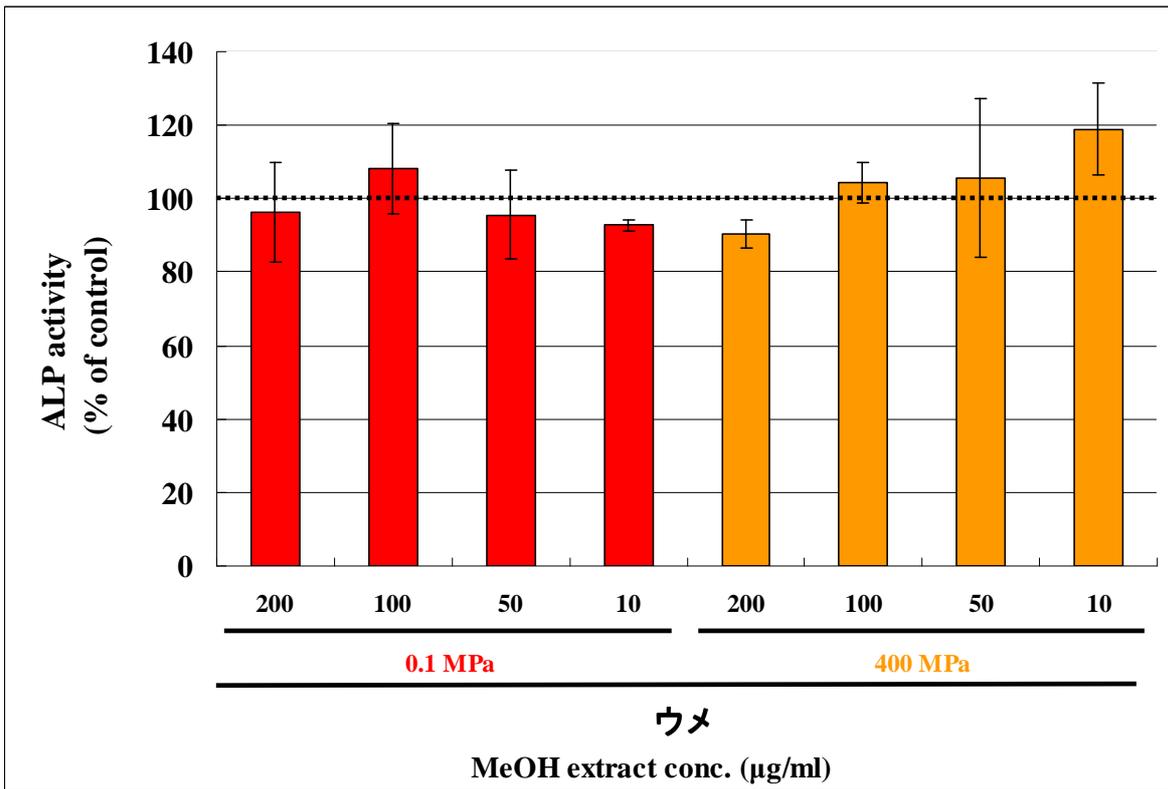


図. ウメの MeOH 抽出物を添加し
分化誘導した細胞の ALP 活性

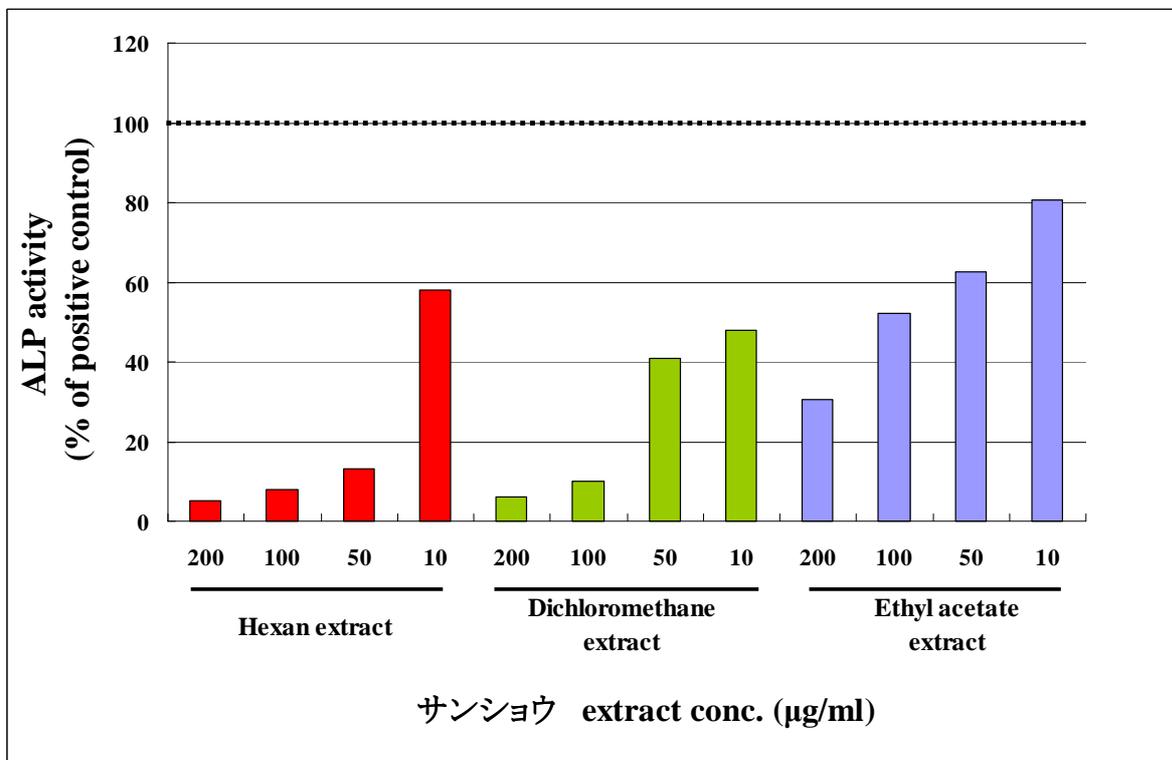


図. サンショウの抽出物を添加し分化誘導した細胞の ALP 活性

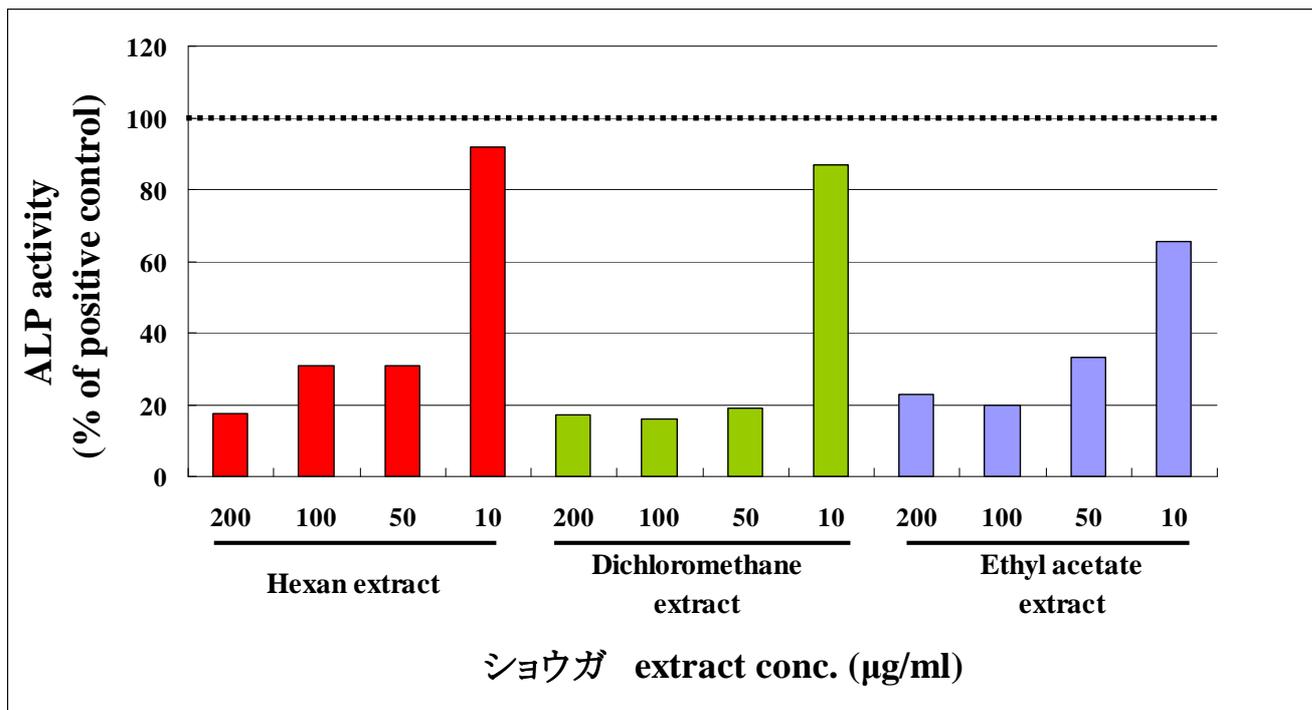


図. ショウガの抽出物を添加し分化誘導した細胞の ALP 活性

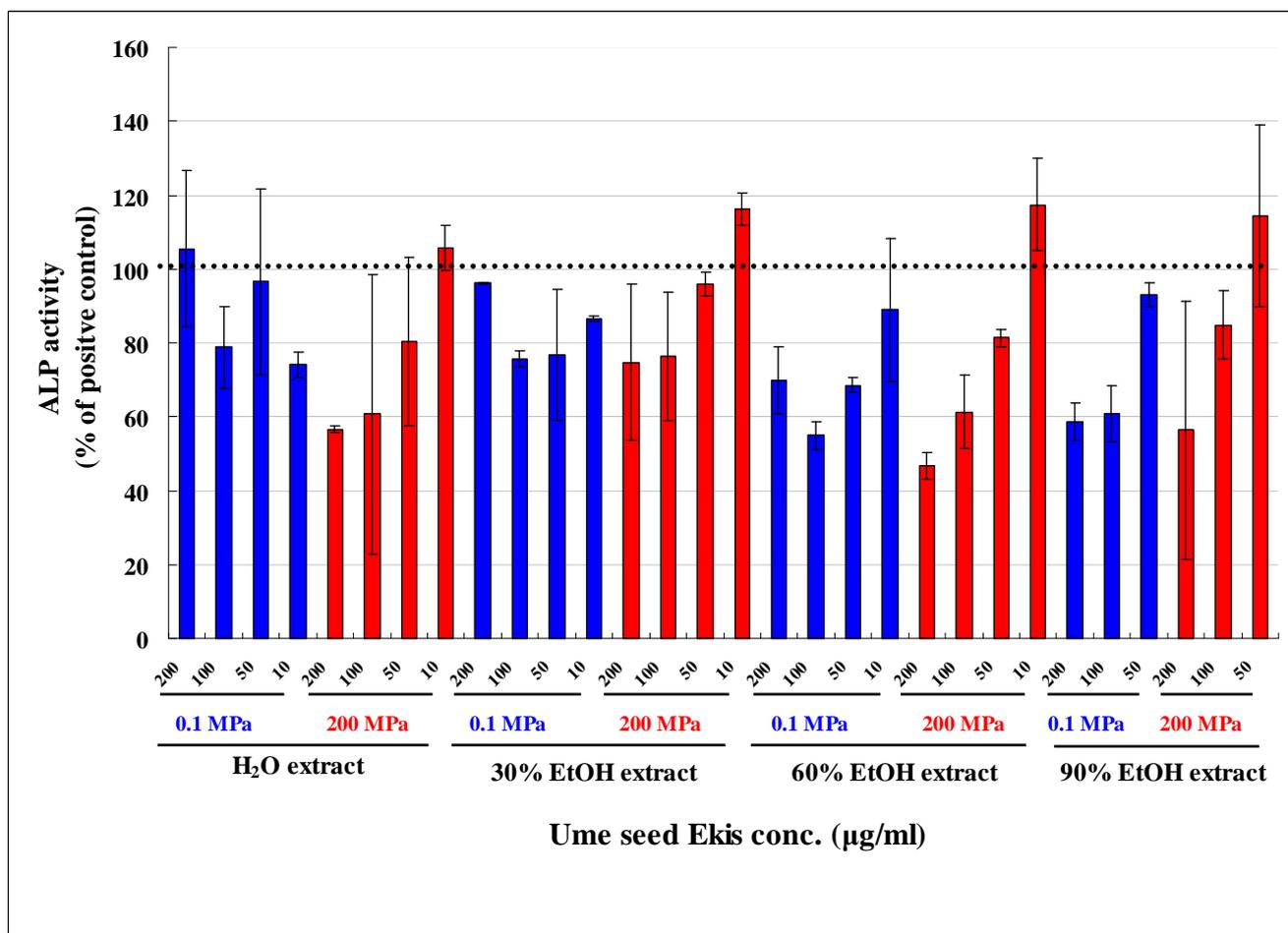


図. ウメ種子の EtOH 抽出物を添加し分化誘導した細胞の ALP 活性

エキス無添加で分化誘導した細胞の ALP 活性を陽性コントロールとして、梅種子エキスを添加して分化誘導した細胞の ALP 活性を算出した。青は常圧抽出エキス、赤は高圧抽出（200 MPa 2000 気圧）エキスを表す。

考察

全農作物中、モモの EtOH-高圧抽出物、ウメの抽出物にのみ ALP 活性の増加が見られた。これらの農作物はバラ科サクラ属であり、今後は同属の農作物でも調査したい。ミカン、ウスイエンドウ、シソでは濃度依存性を調査できなかったため、今後の課題である。またウメ種子の水または 30、60、90%EtOH 抽出物は、200 MPa で処理したエキスを少量（10 μ g/ml）添加したときに ALP 活性の増加が確認された。したがって、常圧下では抽出されない、または、抽出されにくい成分が高圧下では抽出されている可能性が考えられる。

4. 抗肥満効果

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、糖尿病や高脂血症、高血圧などと特に密接に関与している。本試験では、脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞に脂肪細胞分化誘導試薬とサンプルエキスを添加し、脂肪細胞への分化誘導抑制効果を抗肥満効果の指標として検討した。ここではミカン残渣、ミカン果皮、ウスイエンドウ実、ウスイエンドウ鞘の MeOH 抽出エキスのみを試験に用いた。

実験方法

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。分化誘導試薬として Insulin（最終濃度 10 μ g/ml）、Dexamethasone solution（最終濃度 2.5 μ M）、3- isobutyl - 1- methylxanthine solution（最終濃度 0.5 mM）を添加した培地を分化培地、Insulin のみを添加した培地を維持培地として用いた。

脂肪細胞分化誘導阻害試験

操作手順

1. 1 日目、3T3-L1 細胞（70~80%）を培養した 75cm² フラスコから古い培地を吸引し、PBS（-）5 mL を加え細胞を洗浄する
2. 0.25%トリプシン-EDTA を 3mL 加え、37°C に設定した CO₂ インキュベータ内で

- 2min 程度静置する。その後、10%CS 含有 DMEM 培地 7mL を加え反応をとめる。
3. ピペティングの後、50mL の遠心チューブに移し、1500rpm、5min で遠心する。
 4. 上澄みを取り除き、10%CS 含有 DMEM を 2ml 加え、血球計算版で細胞数をカウントする。
 5. 細胞数を 4×10^4 cell/mL に調整し、96well マイクロプレートにあらかじめ 100ul 培地を添加しておき、その後、細胞懸濁液を静かに 100 μ L ずつ分注する。（最終細胞数 4×10^3 cell/well）
 6. 3 日目（confluent）、培地を抜き取り、サンプルを添加した分化培地を 150 μ L 添加する。
 7. 6 日目、培地を抜き取り、サンプルを添加した維持培地を 150 μ L 添加する
 8. 8 日目、培地を抜き取り、サンプルを添加した維持培地を 150 μ L 添加する
 9. 10 日目、Oil red O による脂肪滴の染色を行う。

Oil red O による脂肪滴の染色

Adipogenesis Assay Kit (cayman chemical Co. Ltd.) に付属している染色キットを使用して以下の手順により Oil red O による脂肪滴の染色を行った。

操作手順

10. ピペットで培地を抜き取る
11. Fixative (10%ホルマリン) を各 well に 75 μ L ずつ添加し、15 分間放置
12. Oil red O と蒸留水を 6 : 4 の割合で混合し、10 分間静置、0.45 μ m にフィルターでろ過し染色液とする
13. Wash solution 100uL を well に添加し、5 分間放置。（2 回繰り返す）
14. Wash solution 除去後、風乾
15. Oil red O を 75ul 添加、20 分間放置。（細胞を未添加の well 二箇所も同様の処理をする）
16. 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（150ul で 2-3 回）繰り返す。
17. Wash solution を添加、5 分間放置。2 回繰り返し風乾。

脂肪滴を染色した Oil red O の吸光度測定（脂肪滴の相対量）

18. Extraction solution（染色液抽出液）を well に 100ul 入れ 20 分間放置
19. 490nm の吸光度を測定し、脂肪滴量を計算する。

DC protein assay

Well ごとに細胞数が異なるため、DC protein assay kit を使用し Lowry 法に基づき、well ごとの総タンパク質量を算出し、細胞数を統一化させて脂肪滴量の比較を行う。

20. 各 well を蒸留水で洗浄後、細胞抽出液として 1% Triton X-100 を $50 \mu\text{L}$ 添加し、内 $5 \mu\text{L}$ を新しいマイクロプレートに添加する。
21. スタンダードとして牛血清アルブミン (BSA) を濃度 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml に調整し well に添加する。(デュープリケートで行う)
22. サンプルを添加した well に Reagent A' を $25 \mu\text{L}$ 加え、さらに Reagent B を $200 \mu\text{L}$ 加えて 20 分反応させ、750nm の吸光度を測定する。
23. 得られた結果から、細胞数を統一化 (補正) する。

結果

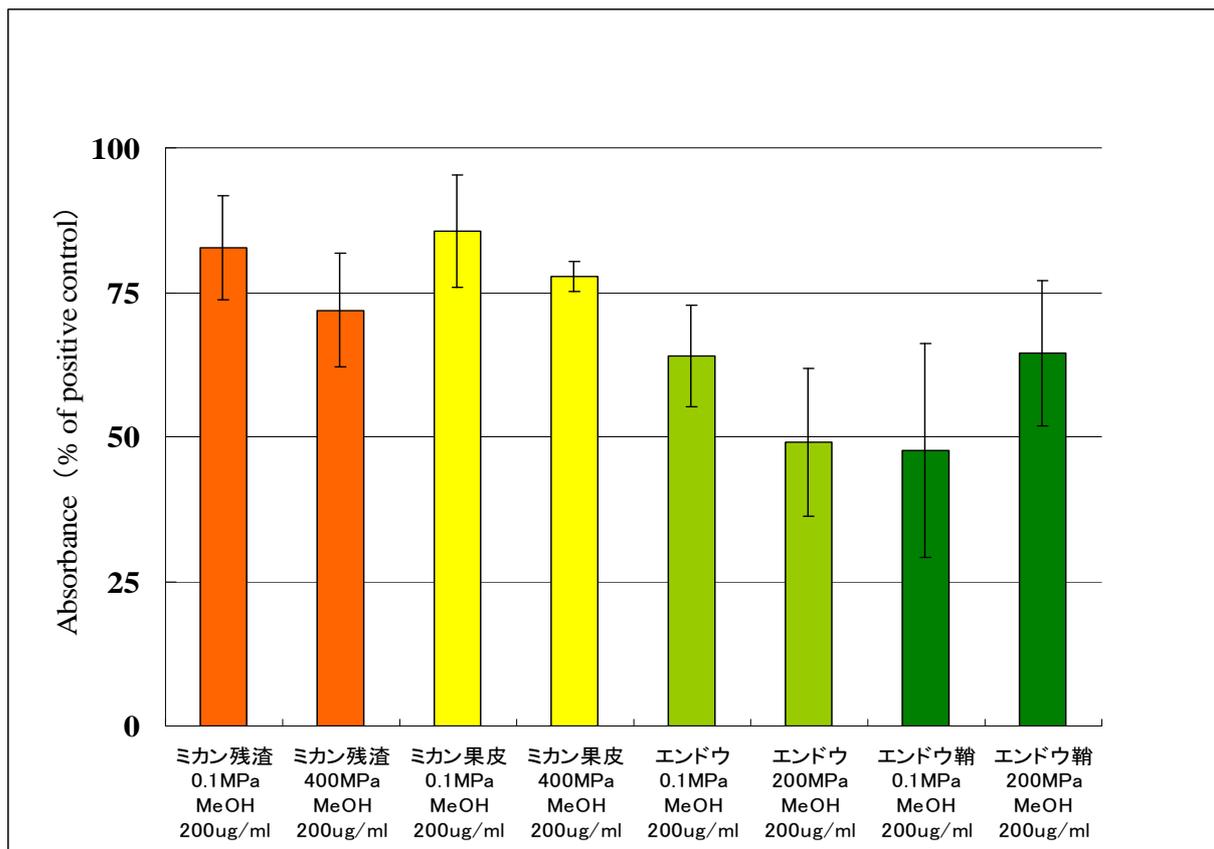


図. 各種エキス添加後分化誘導した細胞の脂肪滴量

エキス無添加の分化誘導後の細胞を陽性コントロールとした。

考察

すべての抽出エキスに脂肪滴蓄積阻害効果がみられた。特に、ミカン果皮、ミカン残渣、ウスイエンドウの実の抽出物については高压抽出エキスの方が常圧抽出エキスよりも5~15%前後阻害効果が高いことが判明した。

5. 抗酸化作用

活性酸素の高い反応性は外部から入り込んできた異物（微生物）を排除することが出来るが、余分な活性酸素は様々な物質に対して非特異的な化学反応をもたらすために、その有害性が指摘されている。その余分な活性酸素が生活習慣病といわれる糖尿病、高脂血症、肝機能の低下などや癌の原因とされている。つまり、活性酸素を取り除くことは、生活習慣病を予防につながると期待される。本試験では抽出エキスの活性酸素を除去する能力、すなわち、抗酸化活性を測定することで、生活習慣病予防を検討した。ここではミカン、ウスイエンドウの MeOH 抽出物について検討した。

実験方法

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を 10 mg 精秤し、50 mL の MeOH に溶解し DPPH 溶液とした。この DPPH 溶液 500 μ L に対し、sample (10 mg/mL に調整したもの) を 500 μ L 添加し、サンプルの最終濃度を 2 mg/ml として 30 分間 25°C、遮光状態で 30 分間反応させた。DPPH ラジカルの不対電子が抗酸化物質によりトラップされると、DPPH ラジカル特有の色（紫が、退色するので、その退色の程度を、可視部の波長 520 で測定することにより、DPPH ラジカル消去能を測定した。）DPPH ラジカル消去能は以下の式より求めた。ラジカル消去率 (%) = ((control O.D - (Sample O.D - blank O.D.)) / control O.D) X 100

結果

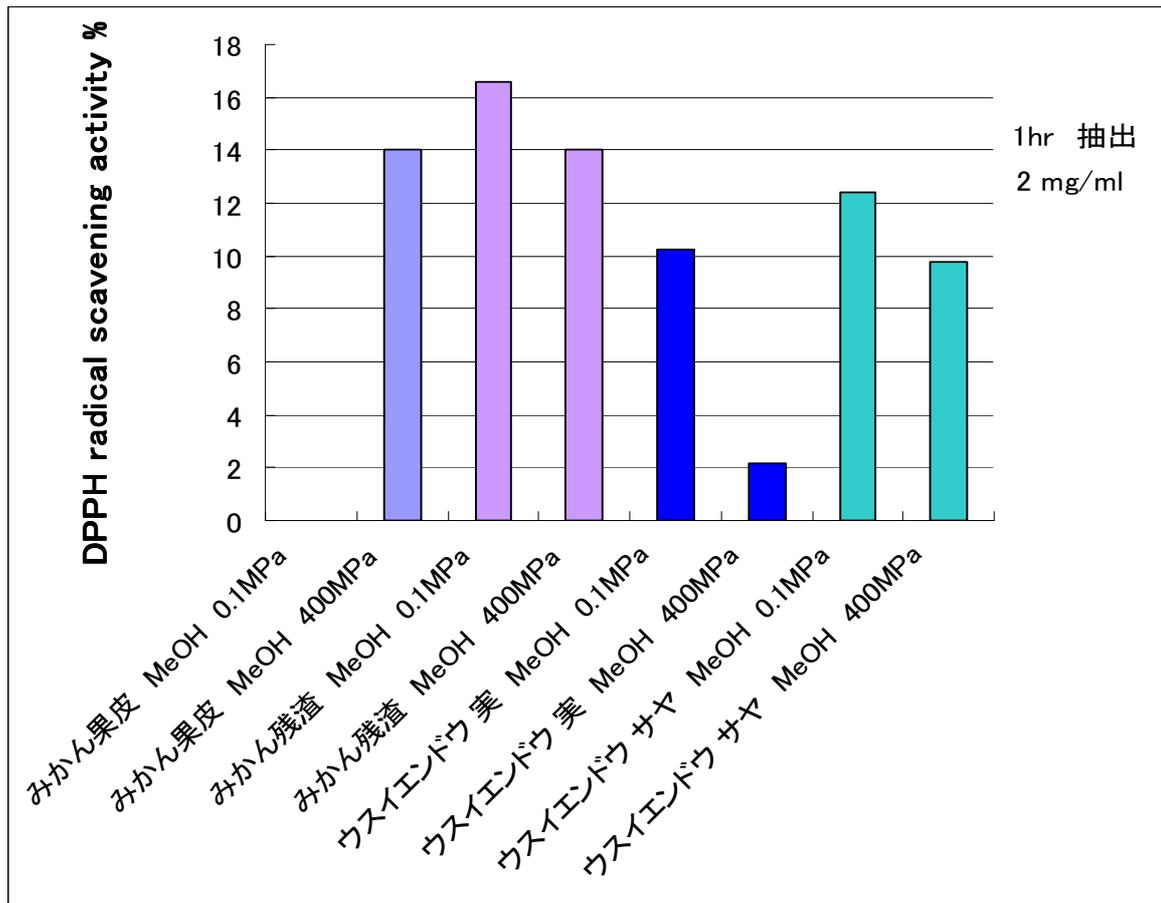


図. 各抽出物のラジカル消去率

考察

ミカン果皮の高圧抽出品は常圧品と比較して抗酸化作用の増加がみられたが、それ以外の抽出物では高圧処理によって抗酸化能の低下がみられた。より詳細に検討するには濃度依存性を調べる必要がある。

6. 抗癌作用

ヒトの身体を構成する数十兆個の細胞は、正常な状態では細胞数をほぼ一定に保つため、分裂・増殖しすぎないように制御機構が働いている。それに対して悪性腫瘍(がん)は、細胞が無制限に増殖し、他の組織に浸潤するようになったものである。アポトーシス (apoptosis) とは、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる細胞死の一種である。これに対し、ネクローシス (necrosis) または壊死 (えし) は、血行不良、外傷などによる細胞内外の環境の悪化によって起こる細胞死のことである。ここでは、食品由来成分のヒト胃癌細胞株 M

KN-45 に対するアポトーシス誘導効果を調べ、抗癌作用成分を探索することを目的とした。

試験方法

ヒト胃癌細胞由来細胞株 MKN-45 を 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地中で培養・継代を行った。

アポトーシス誘導試験

1. MKN-45 細胞を 6 well プレートに 5×10^5 cell/well となるように播種し 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地中で 2 日間培養
2. 培養液を取り除き、PBS で洗浄する
3. 0.25%トリプシン-EDTA (or Accutase) を 1ml 加え 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 2min 程度静置する。その後、冷 PBS 1 mL を加え反応をとめる。
4. 細胞懸濁液を 1500rpm で 5 分間遠心し、上澄みを除去する。以降氷上で操作を行う。
5. 冷 PBS 2 mL で静かに洗浄し、遠心後上澄みを除去する。
6. Annexin V binding buffer 1 mL で細胞を浮遊させる。
7. FACS Aria を起動し、測定準備。試料をロードで以下の操作に移る。

アポトーシス細胞の標識

アポトーシスを起こした細胞では細胞膜内側にあるリン脂質のホスファチジルセリン (phosphatidylserin : PS) が細胞膜外側に露出する。蛍光色素標識した Annexin V はリン脂質結合蛋白質で PS に対して高い親和性を持つ蛋白質であり、PS を曝露した細胞に結合することができる。アポトーシス後期ならびにネクローシスを起こした細胞では、細胞膜の状態が失われ、PI (propidium iodide) によって核が染色される。これらの試薬を用いることで、生細胞、アポトーシスを起こした細胞、ネクローシスを起こした細胞を分離することができる。解析にはフローサイトメーター (FACS Aria) を用いた。陽性コントロールとしてアポトーシス誘導試薬 6 μ M camptothecin を加えて 2 日間培養した細胞を用いた。

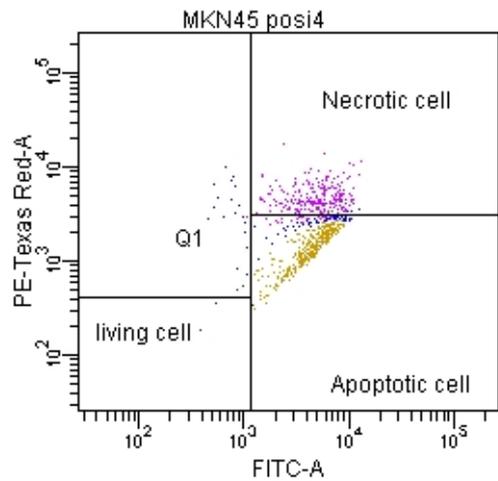
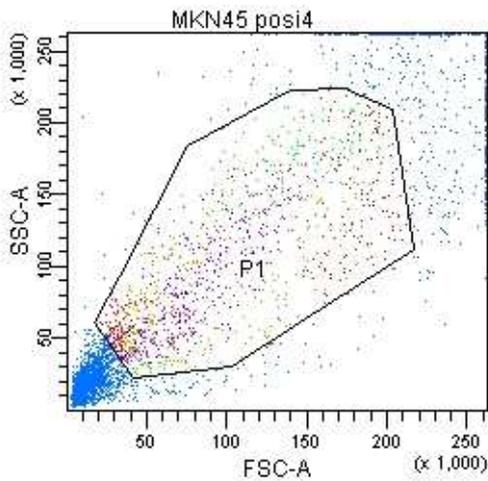
8. 細胞懸濁液 200 μ L に AnnexinV なら 10 μ L、PI なら 4 μ L 添加し、室温・暗所で 15 min 反応後、800 μ L の Annexin V binding buffer x1 を加えて反応を停止させ、1 時間以内に測定する。($\sim 1 \times 10^5$ cell/ mL) 陽性コントロール、陰性コントロールを以下の表の通り用意し、機器設定に用いる。

	No.	Annexin V	PI
Positive 1	1	-	-
Positive 2	2	+	-
Positive 3	3	-	+
Positive 4	4	+	+
Negative 5	5	+	+
Sample 6~	6~	+	+

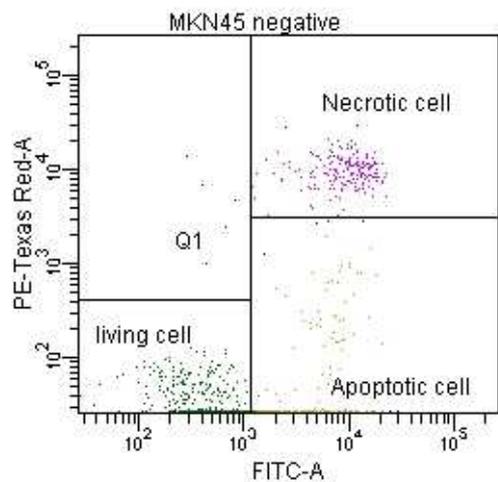
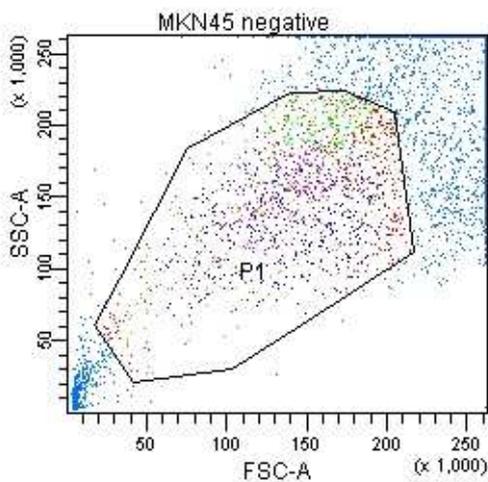
9. 機器設定終了後、サンプル 6 以降を調整し、測定する。

結果

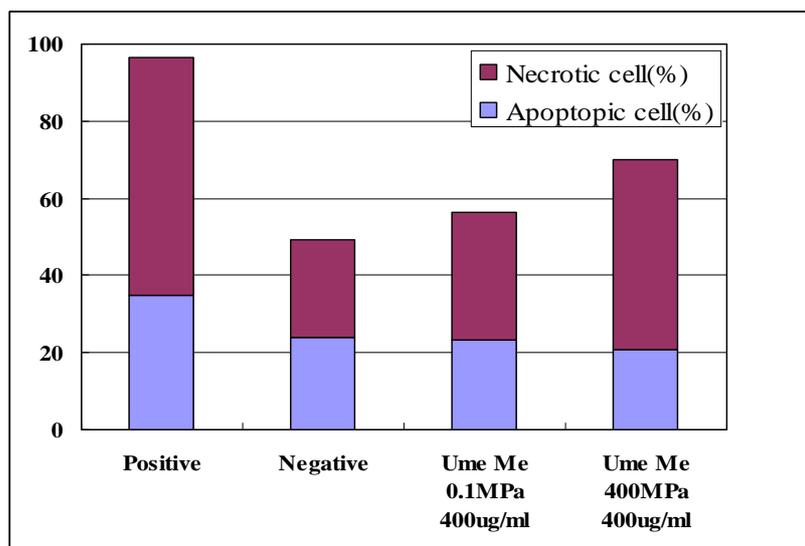
A. 陽性コントロール



B. 陰性コントロール



- A. アポトーシス誘導試薬を添加してアポトーシスを誘導させた MKN-45 細胞
 B. アポトーシス非誘導細胞



総細胞数を 100%としたときのアポトーシスとネクローシスの細胞数 (%)

	Positive	Negative	Ume Me 0.1MPa 400ug/ml	Ume Me 400MPa 400ug/ml
Living cell	0.3	50.2	42.9	29.6
Apoptotic cell	61.7	25.3	33.4	49.1
Necrotic cell	34.8	23.9	23.1	20.8
Q1	3.2	0.6	0.6	0.4

総細胞数を 100%としたときの細胞数

考察

陽性コントロールとして用意した細胞は 95%程度死細胞であったのに対して陰性コントロールとして用意した細胞では 50%程度（アポトーシス 25.3%）であった。例としてウメ抽出物を添加した細胞は陰性コントロールと比較してアポトーシス（33.4%）を誘導していた。特に高圧抽出エキスを添加した場合は、よりアポトーシスを誘導（49.1%）した。一方、ネクローシスは陰性コントロールと比較してエキス添加品では変化は無かった。しかし、陰性コントロールの死細胞数はトリパンブルー染色の結果からでは 20%程度であった。今後は、この差の原因を突き止めなければならない。

7. 痴呆症予防効果

痴呆症予防効果（アミロイド病予防効果）を検証するために新たに導入したヒト神経芽細胞腫由来細胞株SH-SY5Y（DSファーマバイオメディカル）の培養・継代を安定に行うことが可能になった。

今後は、神経細胞保護効果や、軸索の伸長促進効果、アミロイド線維形成阻害効果等を検証する予定である。

8. 総括

本研究の結果から新規食品処理法の有効性を確認できたが、一方で、その処理によって必ずしも有効成分抽出に効果があるわけではないことも判明した。他方、新規食品処理法による新規産業開拓の可能性を見出した。