

研究成果報告書の要旨

研究代表者

所属・職・氏名

和歌山県立医科大学医学部・

准教授・宇都宮洋才

共同研究者

所属・職・氏名

和歌山農協連合会総合企画部・

部長・澤井荘平

和歌山信愛女子短期大学・

教授・大山輝光

和歌山工業高等専門学校・

助教・奥野祥治

和歌山県立医科大学医学部・

特別研究員・河野良平

和歌山県伝統産業の振興と農林水産物を用いた特産品の開発

要旨

本研究では、和歌山県の特産農産物を原料とした新規成分の探索とその機能性を解明することにより、特産農産物に付加価値をつけ、これを利用した新たな産業を開拓し、和歌山県伝統産業の振興と農林水産物を用いた特産品の開発を目的として研究を推進した。H1N1インフルエンザウイルスの感染症が国民の生活に大きく影響を与えたが、我々は梅からインフルエンザウイルス増殖抑制効果のある新規成分を発見した。その新規成分の食品からの迅速な定量法を開発した。また、他の農産物にもその新規成分が含有されないか調査した。今回は、梅と同じバラ科の植物である桃の果肉および種子のみを測定したが、新規成分は含有されなかった。

また、さらに新たな新規成分探索と機能性解明を、和歌山県産特産農産物を用いて研究した結果、山椒に胃癌細胞に対する抗癌作用があることがわかってきた。今後、成分の特定とメカニズムの解明を急ぎたい。

研究代表者

所属・職・氏名

和歌山県立医科大学医学部・
准教授・宇都宮洋才

共同研究者

所属・職・氏名

和歌山農協連合会総合企画部・
部長・澤井荘平
和歌山信愛女子短期大学・
教授・大山輝光
和歌山工業高等専門学校・
助教・奥野祥治
和歌山県立医科大学医学部・
特別研究員・河野良平

和歌山県伝統産業の振興と農林水産物を用いた特産品の開発

1 目的

我々は県内の高等教育機関を基幹としたコンソーシアムを組み和歌山県の特産農産物の機能性を明らかにし、和歌山県から県外へとその情報を発信し、和歌山県の農産物の高付加価値化を図っている。これまでの研究で機能性食品を使った研究を行い、和歌山県の特産農産物の機能性を科学的に解明してきた。またこれらの事実は、和歌山県知事から大学等地域貢献促進事業の成果として和歌山県産の梅に含まれるH1N1インフルエンザウイルス抑制成分として新規化合物の発見を、マスコミを通じて広く県外に情報発信を行い、新聞やテレビで広く広報された。これまでの研究の成果は高等教育機関コンソーシアムを組む大学で特許出願を行った。本年度は我々コンソーシアムの知的財産を県民の財産へと転換するための研究を企画した。具体的には、梅より発見した新規物質の効率的測定方法を開発し、その技術を活用してより機能性の高い梅干作りを行い、県産農産物のさらなる高付加価値化を目指し、伝統産業の振興と特

製品の開発を行う。また、和歌山県には様々な農産物があるが、それらに今回発見された新規物質の含有の可能性も検討する。

和歌山県は自然環境に恵まれ、梅を加工した伝統産品である梅干は全国一の生産高で県産品として重要な地位を占めている。食生活の欧米化や若年者の米離れとともに梅干の販売高は下降しており、抜本的な対策を求められている。また、昨年よりH1N1インフルエンザウイルスの感染症が国民の生活に大きく影響を与えた。梅とその加工品のインフルエンザウイルスに対する効果を明らかにし、先に述べた二つの課題を合わせて解決できれば、和歌山県民のみならず国民にとっても大きな貢献ができると確信し、今回の研究を企画した。具体的には、我々が、梅より発見した新規活性物質の機能性を解明し、その機能性を大きくアピールし、梅加工品の販売促進を目指す。また、これらの研究から生まれる情報は和歌山伝統産業の振興に大きく貢献を期待している。本研究では、和歌山県の特産農産物を原料とした新規成分の探索とその機能性を解明することにより、特産農産物に付加価値をつけ、これを利用した新たな産業を開拓し、和歌山県伝統産業の振興と農林水産物を用いた特産品の開発を目的とする。

2 実施方法

梅新規成分の効率的付加梅干作製方法を見据えた新規成分の効率的測定方法の検討

(高速液体クロマトグラフィー等の装置を使用し、迅速かつ簡便に新規成分の測定を樹立する。)

他の農産物における新規成分の含有量の測定ならびに類似成分探索 (高含有農産物が発見されれば、新たな農林水産物を用いた特産品の開発の可能性が発掘できる)

対象とする農産物は、山椒、しょうが、桃を中心とする。

さらなる新規成分の探索 (ウイルス増殖抑制作用のみならず、さまざまな機能性についても成分の調査を行う。)

①和歌山県産の農産物 (澤井)

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。

② 梅から得た新規機能性成分の効率的定量法の開発（奥野）

梅中に存在する新規機能成分の量を効率的に測定する方法を開発した。

③ 農産物からの抽出物の機能性を調べる（宇都宮・河野）

サンプルの持つ機能性として、各種培養細胞を用いた実験を行った。

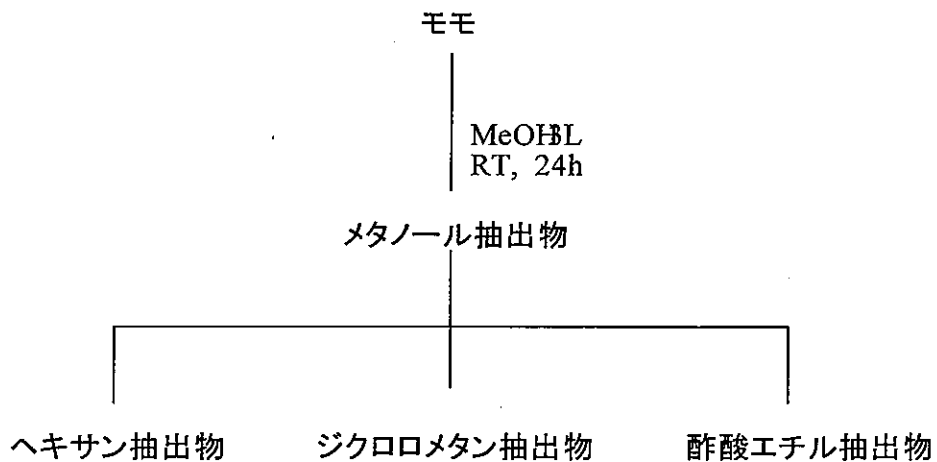
④ 統計学的解析により機能性を比較する（大山）

消費者にわかりやすく研究結果を伝えるために、農産物の機能性効果を従来の物と比較を行った。

3. エキスの調整

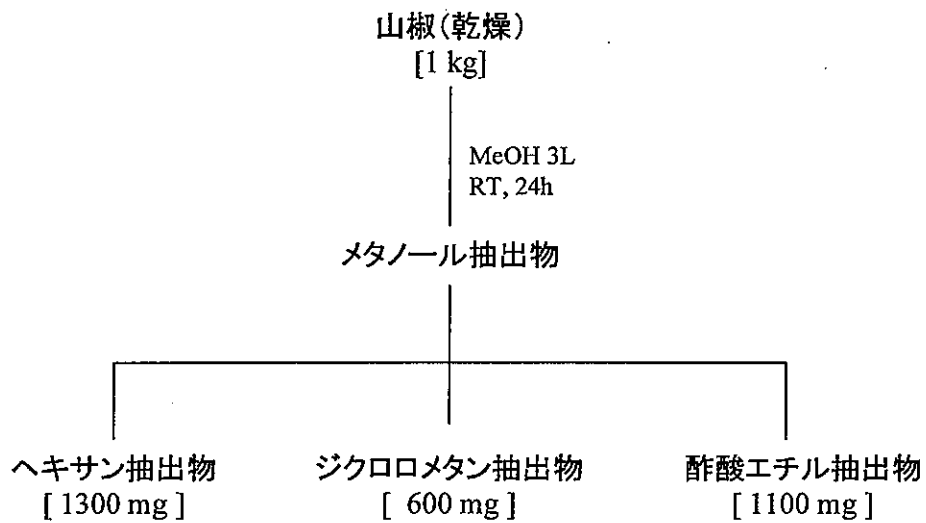
モモエキスの調整

モモをメタノールに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。



山椒エキスの調整

山椒は乾燥させた物のエキスを調整した。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。



4. 新規成分の効率的測定方法の開発

これまでの研究において、梅機能性成分であるシリングレシノールの定量方法を開発しているが、インフルエンザウイルス増殖抑制物質として発見された新規成分の定量に既存方法を用いると、他の成分との分離が不十分であった（図1）。そこで、今回は新規成分および他のリグナン類（3種）を同時に測定できる測定方法について検討した。

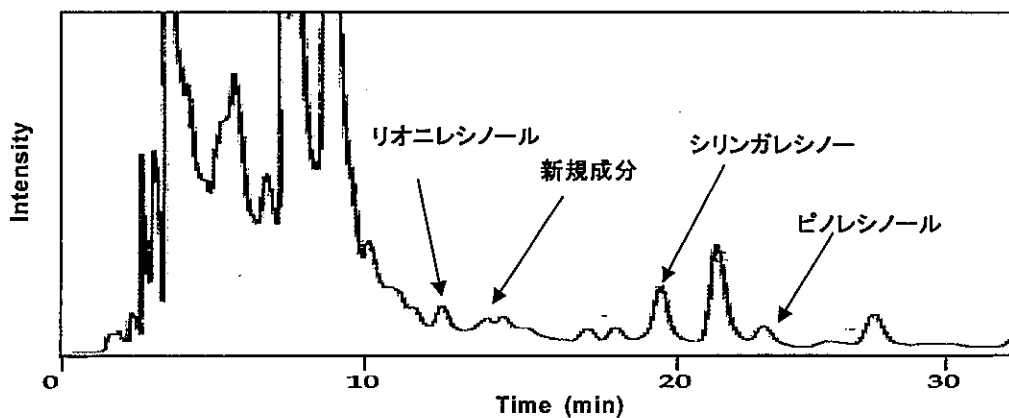
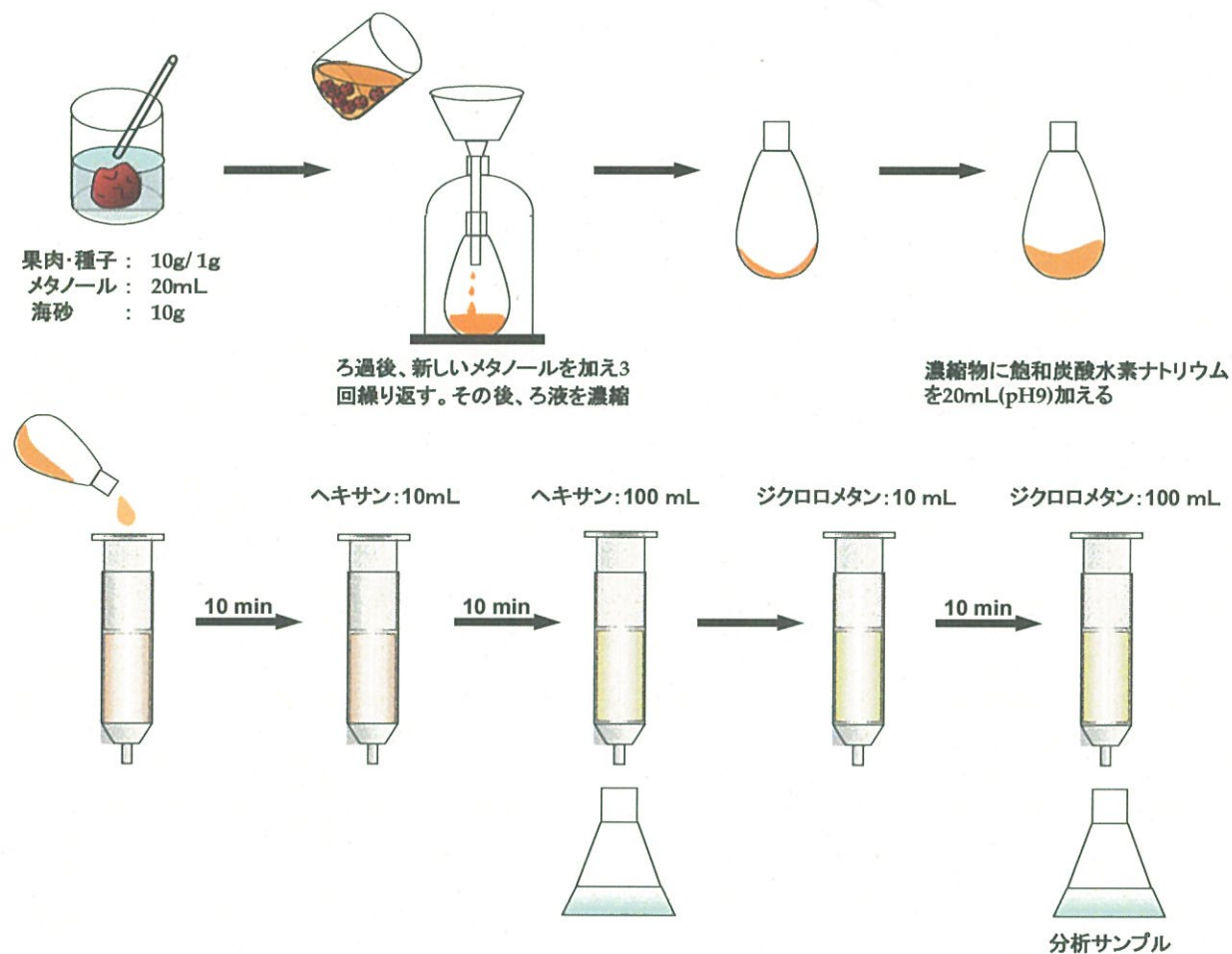


図1. 梅果肉中のリグナン類のHPLCクロマトグラム

分析カラム：コスモシール 5C18 AR-II、4.6×250 mm、移動相：40%メタノール（0.1%（v/v）酢酸含有）、流速：1-35 min 0.4 mL/min、35-55 min 1.2 mL/min、サンプル注入量：10 μ L、検出器：紫外分光検出器（検出波長：240nm）

分析サンプルの調製

分析用サンプルを迅速に調製するために、メルク社製固相カラムエクストレート NT20 を用いた。調整法は以下の通りに行った。



HPLC 分析条件

カラム : コスモシール 5C₁₈ AR-II、4.6×250 mm (ナカライテスク株式会社)

移動相 : A 液 = 水 (0.1%ギ酸含有)、B 液 = アセトニトリル (0.1%ギ酸含有)

0-15 分 A:B=80:20、15-40 分 A:B=80:20→50:50、40-50 分 A:B=80:20

流 速 : 1.0mL/min

注入量 : 10 μL

検出器 : 紫外分光検出器 (検出波長 : 240nm)

分析条件

4. と同様

結果

HPLC による分析結果を図3に示す。桃果肉、種子ともに新規成分およびその他3種の化合物は含有されていなかった。しかし、和歌山県にはまだまだ多くの農産物があるので、今後さらに検討していく予定である。

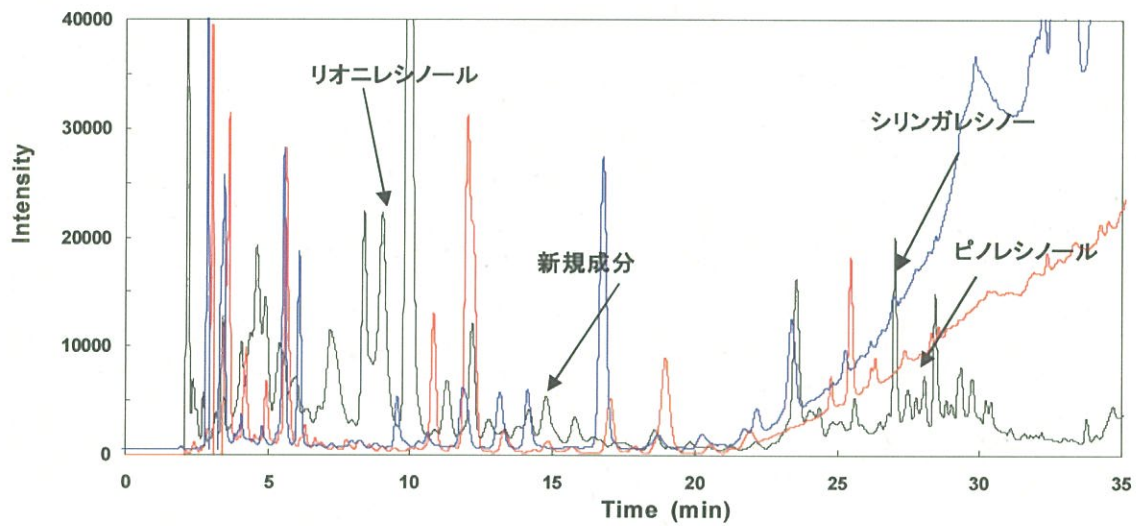


図3. 梅果肉、桃果肉、桃種子中の成分比較

— : 梅果肉、— : 桃果肉、— : 桃種子

分析条件

4. と同様

結果

HPLCによる分析結果を図3に示す。桃果肉、種子ともに新規成分およびその他3種の化合物は含有されていなかった。しかし、和歌山県にはまだまだ多くの農産物があるので、今後さらに検討していく予定である。

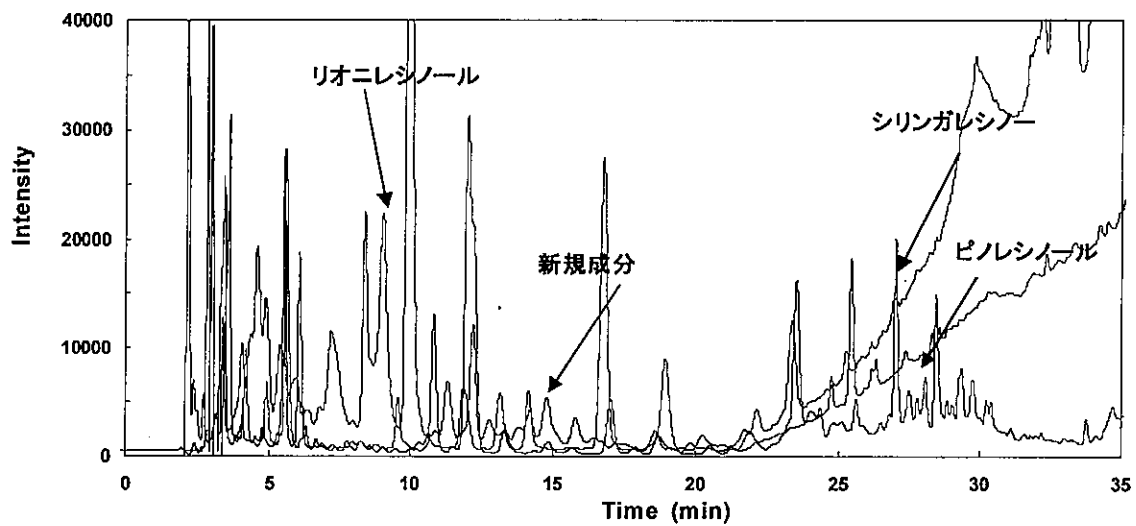


図3. 梅果肉、桃果肉、桃種子中の成分比較

—: 梅果肉、—: 桃果肉、—: 桃種子

6. 新たな成分の探索1 (骨粗鬆症予防効果)

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。

骨粗鬆症予防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。

骨粗鬆症予防効果実験方法

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 インキュベーター内で 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 4×10^4 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 1 50 μ L 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 50ul 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 50ul ずつ加え、呈色 405nm 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 50uL 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、750nm 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 3mL 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、750nm 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。

7. 新たな成分の探索 2 (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な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 MKN-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した。

サンプル

試験には、山椒のヘキササン抽出物 (JPDH)、ジクロロメタン抽出物 (JPDC) を用いた。

MTTアッセイ

1. MKN-45 細胞を 96well プレートに 5×10^4 cell/well となるように播種し 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地中で 6 時間プレートに接着させる。
2. サンプルを溶解した培養液を加え、48 時間処理する。
3. MTS 溶液を $20 \mu\text{L}$ ずつ well に添加し 2 時間 37°C 、5% CO_2 条件下で反応させる。
4. マイクロプレートリーダーを用いて、各 well の 490nm における吸光度を測定し、正細胞数をコントロールとの比較で算出する。

アポトーシス誘導試験

1. MKN-45 細胞を 12well 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 6 時間プレートに接着させる。
2. 培養液を取り除き、サンプルを添加した培養液をプレートに加える。
3. 数時間から数日処理した後、セルスクレーパーで細胞をプレートから剥がし、回収する。
4. 細胞懸濁液を 1500rpm で 5 分間遠心し、上澄みを除去する。
5. 冷 PBS 1 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。試料をロードし以下の操作に移る。

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 μM camptothecin を加えて 2 日間培養した細胞を用いた。

- 細胞懸濁液 200 μL に AnnexinV、PI を添加し、室温・暗所で 15 min 反応後、800 μL 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~	+	+

- 機器設定終了後、サンプル 6 以降を調整し、測定する。

結果

骨粗鬆症予防効果

モモの酢酸エチル（EA）抽出物とヘキササン抽出物を培養液に添加し、7日間分化誘導した。モモエキス濃度の増加に伴い、ALP活性の減少が確認された。

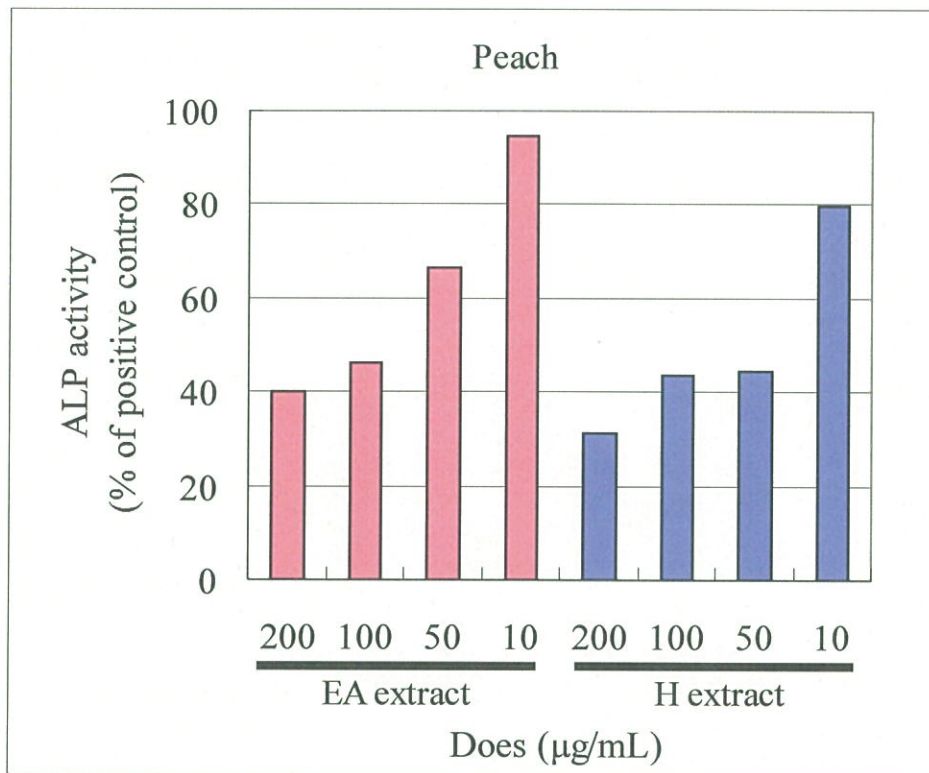


図4. ALP活性のモモ抽出エキス濃度依存性

抗癌作用

エキス添加後の正細胞数

MTT アッセイの結果を以下に示す。縦軸が生細胞数、横軸が添加エキス濃度を表す。山椒のヘキサン抽出物 (JPDH)、ジクロロメタン抽出物 (PDC)、すべてのエキスにエキス濃度依存的な生細胞数の減少がみられた。

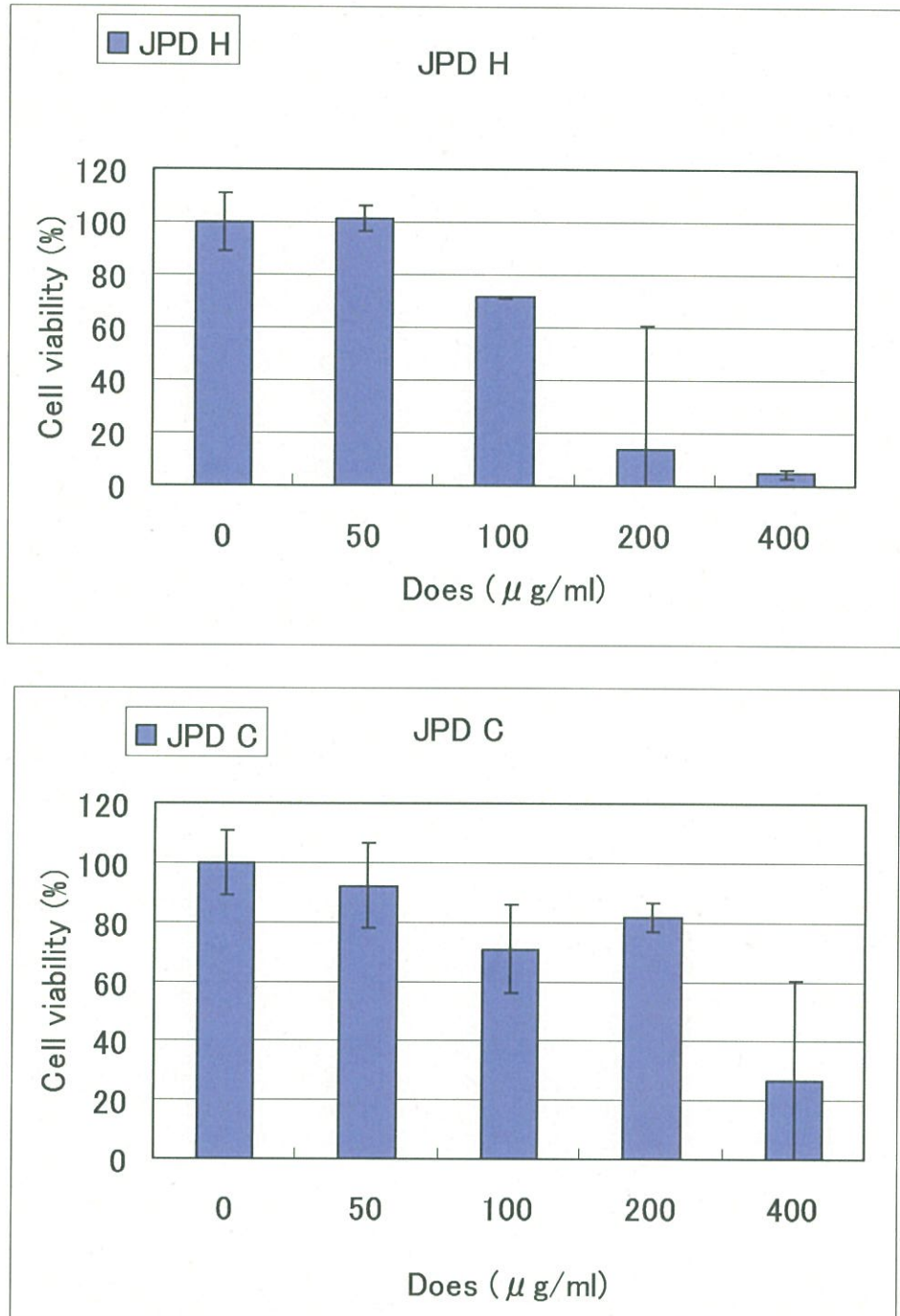


図5. 生細胞数の山椒エキス濃度依存性

アポトーシス誘導効果

アポトーシス、ネクローシスを起こした細胞をフローサイトメトリーで解析した結果を以下に示す。縦軸は細胞数を表す。山椒のヘキササン、ジクロロメタン抽出物共に細胞への高いアポトーシス誘導がみられた。

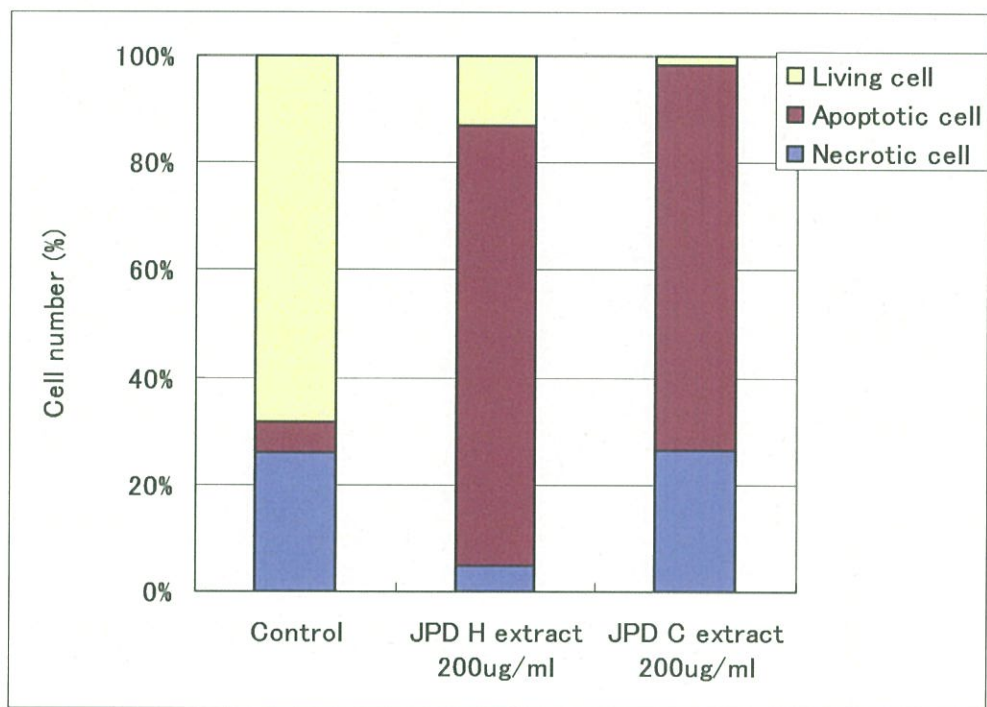


図 6. 山椒抽出物を添加して培養した細胞

表 2. 山椒抽出物を添加して培養した細胞のアポトーシス細胞数

	Control	JPD H extract 200ug/ml	JPD C extract 200ug/ml
other	0.1	0	0
Necrotic cell	26	4.9	26.4
Living cell	68.3	13.2	1.6
Apoptotic cell	5.6	81.9	72.1

8. 総括

本研究では、和歌山県の特産農産物を原料とした新規成分の探索とその機能性を解明することにより、特産農産物に付加価値をつけ、これを利用した新たな産業を開拓し、和歌山県伝統産業の振興と農林水産物を用いた特産品の開発を目的として研究を推進した。H1N1インフルエンザウイルスの感染症が国民の生活に大きく影響を与えたが、我々は梅からインフルエンザウイルス増殖抑制効果のある新規成分を発見した。その新規成分の食品からの迅速な定量法を開発した。また、他の農産物にもその新規成分が含有されないか調査した。

さらに新たな新規成分探索と機能性解明を、和歌山県産特産農産物を用いて研究した。骨粗鬆症予防効果を検討した結果、モモの酢酸エチルとヘキササン抽出エキスを培養液に添加し、7日間分化誘導した細胞ではALP活性の減少が確認された。したがって、モモの酢酸エチルとヘキササン抽出相には骨芽細胞分化を促進する効果のある成分は含有されないと示唆される。

また、山椒のヘキササン抽出物（JPDH）、ジクロロメタン抽出物（JPDC）にエキス濃度依存的な胃癌細胞の生細胞数の減少がみられた。アポトーシス、ネクローシスを起こした細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、山椒のヘキササン、ジクロロメタン抽出物共に胃癌細胞への高いアポトーシス誘導効果がみられた。以上のように、山椒のヘキササン抽出物に胃癌細胞に対する抗癌作用があることがわかってきた。

今後、成分の特定とメカニズムの解明を急ぎたい。