

称号及び氏名 博士（応用生命科学） 西川 泰

学位授与の日付 平成19年2月20日

論文名 「伝統食材を利用した食品の機能性評価」

論文審査委員
主査 中野 長久
副査 森田 尚文
副査 乾 博

論文要旨

昔から体調を整えるために、人は種々の食材を摂取する習慣を持っている。その地域毎の伝統的な食文化が、人々の健康を支えてきた。伝統的な食素材に関しては未解明の部分も多く、薬効や機能性など科学的検証が求められている。

本研究では、日本の伝統食材でもあり健康食品である米（特に玄米）の機能性について、玄米の外側部分である米糠の水抽出液から(10E, 12Z)-9-ヒドロキシ-10, 12-オクタデカジエン酸（ヒドロキシ酸1）と(9Z, 11E)-13-ヒドロキシ-9, 11-オクタデカジエン酸（ヒドロキシ酸2）を単離し、その *in vitro* と *in vivo* の抗腫瘍活性について、および玄米から静置酢酸発酵を経て製造された黒酢の濃縮物の血圧上昇抑制作用について検討した。また日本で健康食品の原料となり、ブラジルで昔から薬草として使われ、現在は栽培もされているインスリーナの機能性について、抗糖尿病予防作用について検討した。

醸造メーカーでは、発酵原料の品質が製品の質を左右する場合が多いので、一般的に日本酒メーカーでは清酒の風味を上げるために、精米度の高い白米を発酵原料とし、必ず洗米工程が含まれている。そこで、穀物の洗米廃水から得られた抗腫瘍化合物を分析して、これらの廃棄物から有効成分を見出し、新しいサプリメント開発への試みとして、玄米の外側部分である米糠の水抽出液から(10E, 12Z)-9-ヒドロキシ-10, 12-オクタデカジエン酸と(9Z, 11E)-13-ヒドロキシ-9, 11-オクタデカジエン酸を単離し、*in vitro* と *in vivo* の抗腫瘍活性について調べた。

ヒドロキシ酸1は、マウス白血病細胞P388 に対し *in vitro* において強い殺細胞活性を示し、そのIC₅₀値は1.7 μg/mlであった。対照的に、2の殺細胞活性は非常に弱く、そのIC₅₀値は11.3 μg/mlであった。正常細胞BALB/c 3T3 とガン細胞SV-T2 で比較することによって1と2の殺細胞活性に選択性があるかを検討したところ、リノール酸と2において選択性は観察されなかったが、1は、腫瘍細胞に選択的に殺細胞活性を示し、1のSV-T2でのIC₅₀値は1.4 μg/ml、BALB/c 3T3でのそれは11.4 μg/mlであった。

次に、P388、S180、およびMM46腫瘍細胞を投与したマウスに1を5日間連続腹腔内

投与することによって抗腫瘍活性を試験したところ、S180 肉腫を接種した ICR マウスと MM46 を接種した C3H/HeJ マウスの両方において、**1** を投与した時の生存期間は顕著（およそ 2.3 倍）に延長した。さらに、MM46 を接種した C3H/HeJ マウスでは、腫瘍の消失が観察された。

次に、MM46 を接種した C3H/HeJ マウスにおいて、**1** の投与スケジュールの効果を試験した。MM46 (1×10^6 個細胞) を C3H/HeJ マウスに腹腔内接種した後、**1** を 1 日後に 1 回投与と 1, 2, 3 日後に 1 回ずつ 3 回投与を行ったところ、すべての試験において生存期間が延長した。これらの結果の比較から、抗腫瘍活性は全体投与量というよりも単回投与量に依存していた。一方、**2** またはリノール酸では抗腫瘍活性は観察されなかった。

食酢は酢酸を主体とする酸性調味料である。しかし、単なる調味料としてではなく、疲労回復、食欲増進のような健康維持・増進や病気の予防・治療効果も報告されている。最近では、健康志向を反映して調味料としてだけでなく健康飲料としても数多く市販されている。その中で、米、玄米を原料とした黒酢はその代表である。本研究では、玄米から静置酢酸発酵によって製造された黒酢の濃縮物の血圧上昇抑制作用について、高血圧自然発症ラット（SHR/Hos）を用いて単回投与および長期間の投与が及ぼす影響について検討した。

黒酢エキスを SHR に経口投与して経時的に血圧を測定し、その降圧作用の有無と用量依存性を調べた。黒酢エキス 30mg/kg 投与群では、投与後すぐには有意な血圧上昇が見られたが、24 時間経過後には投与前血圧に比べ有意に降下した。100、300mg/kg 投与群では、投与量依存の傾向を示し、投与前に比べ投与 2 時間後に有意な血圧降下がみられ、24 時間経過後も投与前に比べ有意な血圧抑制が続いた。

次に、黒酢エキスの長期投与を試みた。投与期間中、SHR ラットの体重および 1 日当たりの飲水量は各群間において差はなく、1 日当たりの飲水量は開始時 12.5ml で経時的に増加し、実験終了時では 42.5 ± 2.4 ml であった。また、WKY ラットの実験においても体重および 1 日当たりの飲水量は各群間において差はなかった。平均血圧は、黒酢エキス 1000mg/kg 摂取群では摂取 2 週後に、対照群に対して有意に血圧上昇を抑制し始め、黒酢エキス 200mg/kg 摂取群においても摂取 7 週後には有意に血圧上昇を抑制した。心拍数においても、黒酢エキス 200、1000mg/kg 摂取群において対照群に対し有意に上昇を抑制した。一方、WKY ラットにおいては対照群と黒酢エキス群との間に差は見られなかった。

インスリーナ(学名: *Cissus sicyoides* L.) は熱帯アメリカ・ブラジルが原産で、二次林や原野に広く自生するブドウ科の植物である。葉は外用薬として、リウマチ、腫れ物および筋肉の腫れに用い、葉と茎は乾燥粉末を内服したり、茶剤や煎剤として高血圧、ひきつけおよび糖尿病の治療に有効であるとされ、ブラジルでは民間療法として用いられている。本研究では、インスリーナに抗糖尿病予防作用を検討し、まず、インスリーナの熱水抽出物の糖類分解酵素阻害活性を *in vitro* で調べた。次いで自然発症糖尿病マウスにインスリーナ粉末の連続摂取後の作用と正常ラット、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットにインスリーナ熱水抽出物を単回投与後の血糖値上昇への影響を調べた。さらに、血糖上昇抑制成分が効果的に抽出されているのかどうかを明らかに

するために、インスリーナの血糖上昇抑制作用を増強させる調製法を、 α -グルコシダーゼ阻害活性を指標として検討し、スクロースに対する消化吸収阻害効果の持続時間を測定し、その効力を比較した。

インスリーナ抽出エキスはヒトだ液およびブタすい臓由来 α -アミラーゼに対して阻害反応を示さず、 α -グルコシダーゼおよびマルターゼに対して阻害反応を示した。 α -グルコシダーゼおよびマルターゼに対する IC_{50} は、それぞれ 24.9 mg/ml、28.4 mg/mlであった。インスリーナ葉を 140°C、10 分間焙煎し、120°C、20 分加圧加熱抽出した抽出液の IC_{50} は 2.75 mg/mlとなったので、インスリーナ葉を焙煎し、抽出温度を高くすることで阻害活性が上昇することがわかった。さらに、この加熱加圧抽出した抽出液を酢酸エチルで分配したところ、酢酸エチル層に強い α -グルコシダーゼ阻害成分が移行した。

次に、YKK-A⁷マウスにインスリーナ粉末を 500mg/kg体重/day連続摂取させ、4 週間後に採血し血糖値を測定したところ、インスリーナ摂取群の血糖値は対照群と比較して有意に低値であった($p<0.001$)。

ショ糖およびブドウ糖をそれぞれ負荷した時のインスリーナ抽出エキスの血糖上昇抑制作用について調べた。ショ糖負荷前の対照群、インスリーナ投与群の血糖値は、それぞれ 127.3 \pm 2.6、132.4 \pm 4.0mg/dl で、ショ糖を 1g/kg 体重負荷した場合のインスリーナ投与群の血糖上昇値は、負荷後 30 分値で 48.8 \pm 4.2mg/dl と対照群の 69.5 \pm 4.4mg/dl と比較して有意($p<0.01$)な上昇抑制を示した。一方、ブドウ糖 0.5g/kg 体重負荷では、インスリーナ投与群と対照群の間に差異はなく血糖値上昇は同様の傾向を示した。

ショ糖およびブドウ糖をストレプトゾトシン処理で作成した糖尿病ラットにそれぞれ負荷した時のインスリーナ抽出エキスの血糖上昇抑制作用について調べた。ショ糖負荷前の対照群、インスリーナ投与群の血糖値は、それぞれ 426.2 \pm 11.0、441.8 \pm 16.3mg/dl で、ショ糖を 1g/kg 体重負荷した場合のインスリーナ投与群の血糖上昇値は、負荷後 60 分値で 107.9 \pm 10.7 mg/dl と対照群の 153.9 \pm 15.5 mg/dl と比較して有意($p<0.05$)に抑制した。一方、ブドウ糖 0.5 g/kg 体重負荷の場合は、インスリーナ投与群と対照群の間に差異はなく血糖値上昇は同様の傾向を示した。

15%スクロース溶液を 11.25 ml/kg/h の速度で胃に持続投与すると、投与開始約 60 分後に門脈血中グルコース濃度は一定になったので、投与開始 120 分後のラットにインスリーナ抽出エキスを投与し、それぞれの門脈血漿中グルコース濃度変化を比較した。各抽出液を 20 倍に減圧濃縮したものを 3 ml/kg 投与したところ、焙煎して 120°Cで 20 分間加圧加熱抽出した抽出液は、血糖上昇抑制効果を示した未焙煎葉を 80°Cで 30 分間抽出した抽出液に比べ強い血糖上昇抑制効果を示した。 α -グルコシダーゼ阻害活性成分が移行した酢酸エチル層においては、さらに血糖上昇抑制効果が増した。

審査結果の要旨

昔から体調を整えるために、人は種々の食材を摂取する習慣を持っている。その地域の伝統的な食文化が、人々の健康を支えてきた。伝統的な食素材に関しては未解明の

部分も多く、薬効や機能性など科学的検証が求められている。本研究では、日本の伝統食材でもあり健康食品である米（特に玄米）の機能性について、玄米の外側部分である米糠の水抽出液から(10E, 12Z)-9-ヒドロキシ-10, 12-オクタデカジエン酸（ヒドロキシ酸1）と(9Z, 11E)-13-ヒドロキシ-9, 11-オクタデカジエン酸（ヒドロキシ酸2）を単離し、その *in vitro* と *in vivo* の抗腫瘍活性について、および玄米から静置酢酸発酵を経て製造された黒酢の濃縮物の血圧上昇抑制作用について検討した。また日本で健康食品の原料となり、ブラジルで昔から薬草として使われ、現在は栽培もされているインスリーナの機能性について、抗糖尿病予防作用について検討し、以下の成果を得た。

ヒドロキシ酸1は、マウス白血病細胞P388 に対し *in vitro* において強い殺細胞活性を示し、そのIC₅₀値は 1.7 μg/ml で、2 の殺細胞活性は弱く、そのIC₅₀値は 11.3 μg/ml であった。正常細胞BALB/c 3T3 とガン細胞SV-T2 で比較することによって1と2の殺細胞活性に選択性があるかを検討したところ、リノール酸と2は選択性が観察されなかったが、1は、腫瘍細胞に選択的に殺細胞活性を示し、1のSV-T2でのIC₅₀値は1.4 μg/ml、BALB/c3T3でのそれは11.4 μg/mlであった。

次に、P388、S180、およびMM46 腫瘍細胞を投与したマウスに1を5日間連続腹腔内投与することによって抗腫瘍活性を試験した。S180肉腫を接種したICRマウスとMM46を接種したC3H/HeJマウスの両方で、1を投与した時の生存期間は顕著に延長した。さらに、MM46を接種したC3H/HeJマウスでは、腫瘍の消失が観察された。

次に、MM46を接種したC3H/HeJマウスにおいて、1の投与スケジュールの効果を試験した。MM46(1×10⁶個細胞)をC3H/HeJマウスに腹腔内接種した後、1を1日後に1回投与と1, 2, 3日後に1回ずつ3回投与を行ったところ、すべての試験において生存期間が延長した。この結果から、抗腫瘍活性は全体投与量というよりも単回投与量に依存していた。一方、2またはリノール酸では抗腫瘍活性は観察されなかった。

食酢は酢酸を主体とする酸性調味料である。そして、疲労回復、食欲増進のような健康維持・増進や病気の予防・治療効果も報告されている。最近では、健康志向を反映して調味料としてだけでなく健康飲料としても数多く市販されている。その中で、米、玄米を原料とした黒酢はその代表である。本研究では、玄米から静置酢酸発酵によって製造された黒酢の濃縮物の血圧上昇抑制作用について、高血圧自然発症ラット（SHR/Hos）を用いて単回投与および長期間の投与が及ぼす影響について検討した。

黒酢エキスをSHRに経口投与して経時的に血圧を測定し、その降圧作用の有無と用量依存性を調べた。黒酢エキス30mg/kg投与群では、24時間経過後には投与前血圧に比べ有意に降下した。100、300mg/kg投与群では、投与量依存の傾向を示し、投与前に比べ投与2時間後に有意な血圧降下がみられ、24時間経過後も投与前に比べ有意な血圧抑制が続いた。

次に、黒酢エキスの長期投与を試みた。投与期間中、SHRラットの平均血圧は、黒酢エキス1000mg/kg摂取群では摂取2週後に、対照群に対して有意に血圧上昇を抑制し始め、黒酢エキス200mg/kg摂取群においても摂取7週後には有意に血圧上昇を抑制した。心拍数においても、黒酢エキス200、1000mg/kg摂取群において対照群に対し有意に上昇を抑制した。一方、WKYラットにおいては対照群と黒酢エキス群との間に差は見られなかった。

インスリーナ(学名:*Cissus sicyoides* L.)は熱帯アメリカ・ブラジルが原産で、ブドウ科の植物である。葉は外用薬として、リウマチ、腫れ物および筋肉の腫れに用い、葉と茎は乾燥粉末を内服したり、茶剤や煎剤として高血圧、ひきつけおよび糖尿病の治療に有効であるとされ、ブラジルでは民間療法に用いられている。まず、インスリーナの熱水抽出物の糖類分解酵素阻害活性を *in vitro* で調べた。次いで自然発症糖尿病マウスにインスリーナ粉末の連続摂取後の作用と正常ラット、ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットにインスリーナ熱水抽出物を単回投与後の血糖値上昇への影響を調べた。また血糖上昇抑制成分が効果的に抽出されているかを明らかにするために、インスリーナの血糖上昇抑制作用を増強させる調製法を、 α -グルコシダーゼ阻害活性を指標として検討し、スクロースに対する消化吸収阻害効果の持続時間を測定し、その効力を比較した。

インスリーナ抽出エキスはヒトだ液およびブタすい臓由来 α -アミラーゼに対して阻害反応を示さず、 α -グルコシダーゼおよびマルターゼに対して阻害反応を示した。 α -グルコシダーゼおよびマルターゼに対する IC_{50} は、それぞれ24.9mg/ml、28.4mg/mlであった。インスリーナ葉を140°C、10分間焙煎し、120°C、20分加圧加熱抽出した抽出液の IC_{50} は2.75mg/mlとなったので、抽出温度を高くすることで阻害活性が上昇することがわかった。さらに、この加熱加圧抽出した抽出液を酢酸エチルで分配したところ、酢酸エチル層に強い α -グルコシダーゼ阻害成分が移行した。

次に、YKK-A^vマウスにインスリーナ粉末を500mg/kg体重/day連続摂取させ、4週間後に採血し血糖値を測定したところ、インスリーナ摂取群の血糖値は対照群と比較して有意に低値であった($p<0.001$)。シヨ糖負荷前の対照群、インスリーナ投与群の血糖上昇値は、有意($p<0.01$)な上昇抑制を示した。一方、ブドウ糖0.5g/kg体重負荷では、インスリーナ投与群と対照群の間に差異はなく血糖値上昇は同様の傾向を示した。

シヨ糖およびブドウ糖をSTZ処理糖尿病ラットに負荷した時のインスリーナ抽出エキスの血糖上昇抑制作用について調べた。シヨ糖を1g/kg体重負荷した場合のインスリーナ投与群の血糖上昇値は、負荷後60分値と比較して有意($p<0.05$)に抑制した。一方、ブドウ糖0.5g/kg体重負荷の場合は、インスリーナ投与群と対照群の間に差異はなく血糖値上昇は同様の傾向を示した。

15%スクロース溶液を11.25 ml/kg/hの速度で胃に持続投与すると、投与開始約60分後に門脈血中グルコース濃度は一定になったので、投与開始120分後のラットにインスリーナ抽出エキスを投与し、それぞれの門脈血漿中グルコース濃度変化を比較した。焙煎して120°Cで20分間加圧加熱抽出した抽出液は最も高い血糖上昇抑制効果を示した。 α -グルコシダーゼ阻害活性成分が移行した酢酸エチル層においては、さらに血糖上昇抑制効果が増した。

以上の成果は、生化学、医学、酵素化学および栄養分子生物学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査並びに、学力確認の結果と併せて、博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。