

新品種の食用菊『上大野』の機能性に関する研究

昭和薬科大学 天然物化学研究室
栗本 慎一郎

【研究の目的と背景】

菊の花は生薬「菊花」として古来より不老長寿の霊薬とされ、中国最古の本草書である神農本草経に上品として記載されている。また、苦味の少ない『もってのほか』や『阿房宮』などの品種の菊の花は食用とされており、山形、新潟、青森などで栽培されている。食用菊の機能性に関しては、これまでに抗ピロリ菌作用、抗酸化作用、精神安定作用、解毒作用などが報告されているが、十分な研究が行われているとはいえず、さらなる機能性の発見が期待できる素材である。

我々の研究グループでは、食用菊としては稀な白色花の個体を発見し、『上大野』と命名して2012年に品種登録している。今回は、本品種の機能性を明らかにする目的で、花部抽出エキスのDNA損傷抑制作用と抗糖化作用を評価した。

【研究の方法と内容】

<研究材料および食用菊抽出エキスの調製>

2015年10月姫路獨協大学薬用植物園にて採取した『上大野』、『もってのほか』、『阿房宮』の花部をMeOHで冷浸抽出した。得られたMeOH抽出エキスを水とEtOAcおよび η -BuOHで順次分配後、減圧濃縮し、各可溶画分を得た。

<抗糖化活性>

糖化経路全体に対する抑制作用に加え、糖化経路のうち、酸化反応経路、付加反応経路に対する抑制作用の評価を行った。

• 糖化抑制作用（経路全体に対する抑制作用）

2 mg/mL ヒト血清アルブミン（HSA）および37 mM Glucose となるように食用菊エキスと混合し、37°Cで4週間インキュベートした。インキュベート後は8 mm セルロースチューブに入れ、PBS中で4°Cで48時間透析を行った。DC プロテインアッセイキットを用いてタンパク質濃度を測定し、1 μ g protein 当たりのAdvanced Glycation End-products (AGE) の生成量をELISA法により定量した。AGEの指標としてN^ε-(carboxymethyl) lysine (CML)を用いた。

• 酸化反応経路阻害作用

2 mg/mL アマドリ化合物（Glycated-HSA）となるように食用菊エキスと混合し、37°Cで2週間インキュベートし

た。インキュベート後は、糖化抑制作用の実験と同様の操作を行った。

• HSA 付加反応経路阻害作用

2 mg/mL HSA および10 mM Glyoxal となるように食用菊エキスと混合し、37°Cで2日間インキュベートした。インキュベート後は、糖化抑制作用の実験と同様の操作を行った。

< UV に対する DNA 損傷抑制活性 >

• 細胞培養

コメットアッセイおよび *in vitro* 小核試験には、ヒトリンパ芽球様 TK6 細胞を用いた。細胞は10% 馬血清、200 μ g/mL のピルビン酸ナトリウム、200 μ g/mL のストレプトマイシンを添加したRPMI1640 培養液を用いて37°C、CO₂分圧5%で培養した。

• コメットアッセイ

5 \times 10⁵ cells/mL の濃度の細胞をUVに暴露し、UVの暴露後菊エキス存在下で30分培養した後に標本を作成し、comet tailの長さ（migration）を測定した。

• *in vitro* 小核試験

5 \times 10⁵ cells/mL の濃度の細胞をUVに暴露し、Cytochalasin Bの存在下で菊エキスに24時間暴露し、直ちに標本を作成し、二核細胞（BNC）2000個中の小核を有する二核細胞（MNBNC）数を計測した。

< Mitomycin C に対する DNA 損傷抑制作用 (*in vivo* 小核試験) >

CD1 マウス（雄、7週齢、各群12匹）を1週間順化させた後、Mitomycin C (MMC) 1.0 mg/kg を腹腔内投与し、直後に描く濃度に調製した上大野エキス（500 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg）を経口投与した。また対照群として、①MMCを投与せずに上大野エキスを投与する群、②MMC1.0 mg/kgを投与した直後にvehicleを投与する群についても同様に実験を行なった。MMC投与直後、24時間後、48時間後、72時間後に尾静脈から血液を採取し、アクリジンオレンジで染色してスライドを作成した。作成したスライドを蛍光顕微鏡で観察し、1000個の網状赤血球のうち小核を有するものをカウントした。

【研究の実施経過】

<抗糖化活性>

食用菊エキスによる糖化反応抑制を Fig. 1 ~ 3 に示し

た。HSA 及び Glucose の酸化反応経路において、3種の食用菊エキス 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ により CML 生成が 40%以下に抑制された (Fig. 1) ことから、いずれの品種も CML 生成抑制作用を有することが示された。酸化反応のみが関与する経路においては、いずれの品種も CML の生成抑制を示しており、『もってのほか』および『阿房宮』が強い抑制作用を示した (Fig. 2)。また、酸化反応の関与しない Glyoxal のタンパク付加経路において、いずれの品種も CML 生成抑制を示したが、その作用は CML 生成を約 80%に抑える程度のものであった (Fig. 3)。

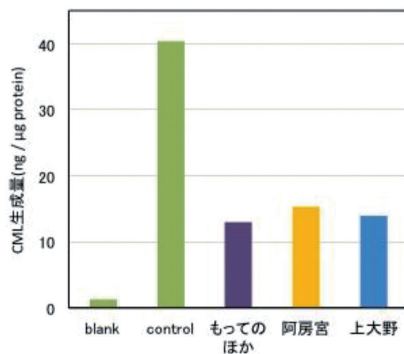


Fig.1 HSA および glucose の酸化反応経路における CML 生成の抑制

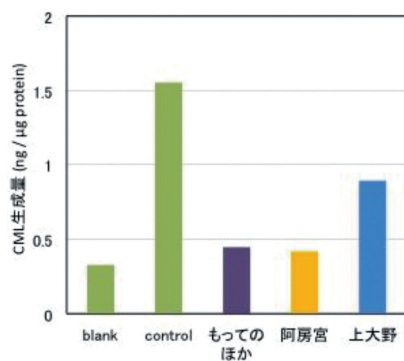


Fig.2 Glycated HSA の酸化反応経路における CML 生成の抑制

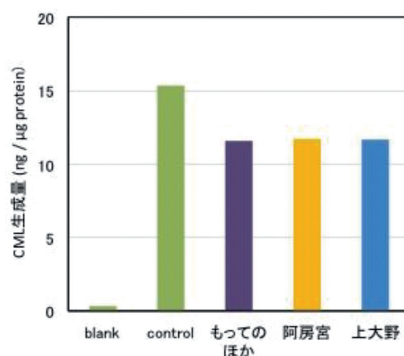


Fig.3 Glyoxal の HSA 付加反応経路における CML 生成の抑制

食用菊エキスおよび各可溶部による糖化反応抑制を Fig.

4-6 に示した。EtOAc 可溶部、 η -BuOH 可溶部、水可溶部のいずれの画分も 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で抗糖化作用を示した。『もってのほか』では酢酸エチル可溶部 (Fig. 4), 『阿房宮』では EtOAc 可溶部および η -BuOH 可溶部 (Fig. 5) が特に強い CML 生成抑制を示したが、『上大野』では各可溶部間での CML 生成抑制に差は見られなかった (Fig. 6)。

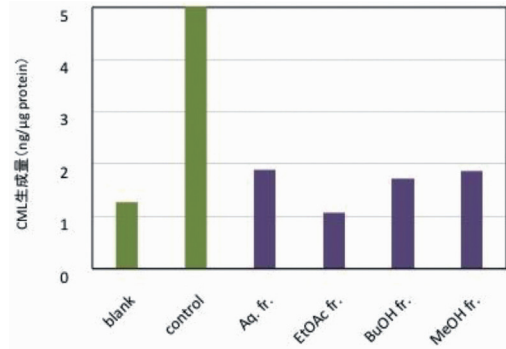


Fig.4 『もってのほか』 MeOH エキスおよび各可溶部の HSA の酸化反応経路における CML 生成の抑制

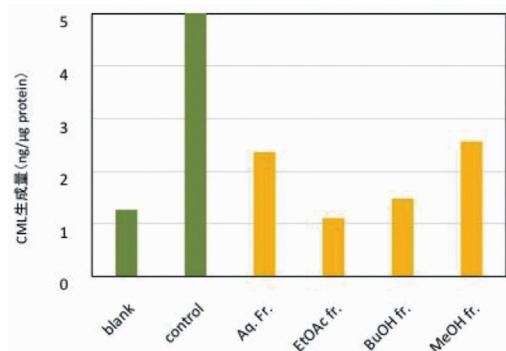


Fig.5 『阿房宮』 MeOH エキスおよび各可溶部の HSA の酸化反応経路における CML 生成の抑制

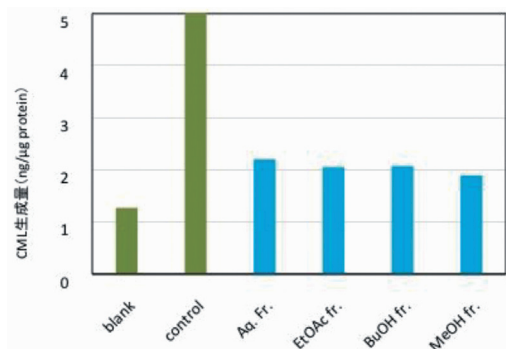


Fig.6 『上大野』 MeOH エキスおよび各可溶部の HSA の酸化反応経路における CML 生成の抑制

< UV に対する DNA 損傷抑制作用 >

食用菊 MeOH エキスの結果を Fig. 7, 8 に示した。食用菊 MeOH 抽出物の用量 ≤ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において BNC 頻度が対照の 50%以下に減少しなかったことから、食用菊エキスは ≤ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において細胞毒性を示さないと考

えられた。細胞毒性を示さない用量範囲 ($\leq 1000 \mu\text{g/mL}$) で、いずれの品種のエキスで処置した場合も UV によって誘発される小核頻度の同等の減少がみられた。コメットアッセイの結果においても著しい細胞毒性を示さない用量範囲 ($\leq 1000 \mu\text{g/mL}$) で、UV によって誘発される tail length の減少が、3 品種で同等にみられた。

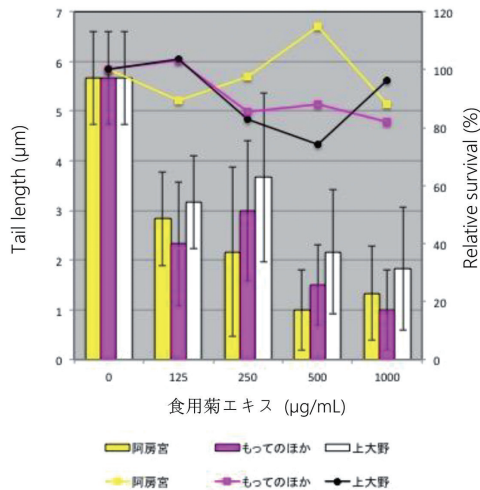


Fig.7 食用菊 MeOH エキスの UV に対する DNA 損傷抑制作用 (小核試験)

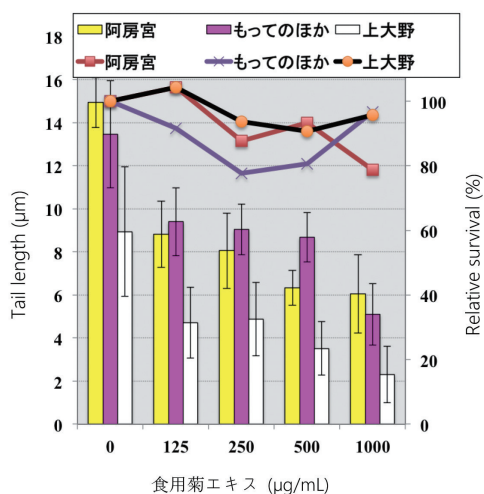


Fig.8 食用菊 MeOH エキスの UV に対する DNA 損傷抑制作用 (コメットアッセイ)

食用菊 MeOH エキスの各可溶部の結果を Fig. 9 ~ 11 に示した。EtOAc 可溶部では UV によって誘発される tail length の減少が、3 品種で同等にみられた (Fig. 9)。 η -BuOH 可溶部では UV によって誘発される tail length の減少が、『阿房宮』、『もってのほか』で同等にみられたが、『上大野』ではみられなかった (Fig. 10)。水可溶部では UV によって誘発される tail length の減少が 3 品種ともみられなかった (Fig. 11)。

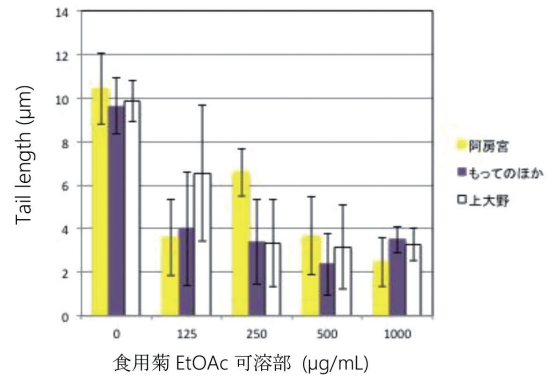


Fig.9 食用菊 EtOAc 可溶部の UV に対する DNA 損傷抑制作用 (コメットアッセイ)

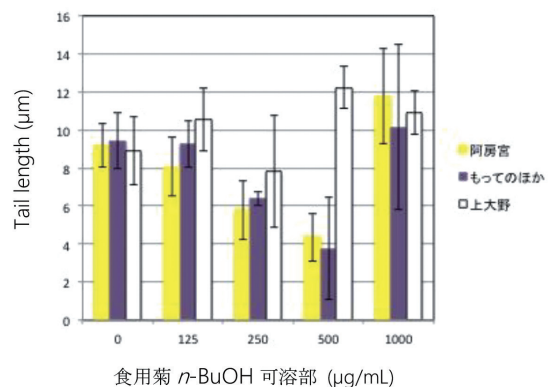


Fig.10 食用菊 η -BuOH 可溶部の UV に対する DNA 損傷抑制作用 (コメットアッセイ)

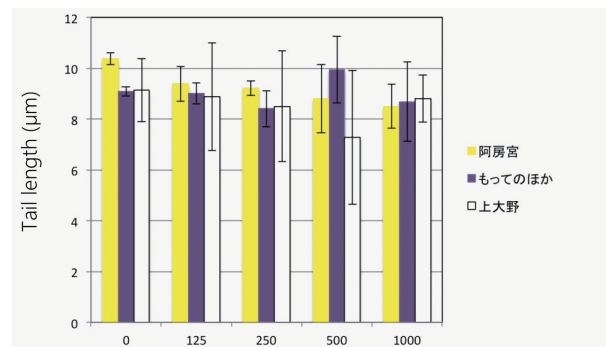


Fig.11 食用菊水可溶部の UV に対する DNA 損傷抑制作用 (コメットアッセイ)

< *in vivo* 小核試験による Mitomycin C に対する DNA 損傷抑制作用 >

上大野 MeOH エキスについて、*in vivo* における DNA 損傷抑制作用を小核試験により検討した。上大野 MeOH 抽出物を投与した群では、エキスを投与しなかった群と比較して、24 時間後、48 時間後において観察される小核の数が減少した (Fig. 12)。また投与量が多い群ほど小核の数が現象する傾向がみられた。

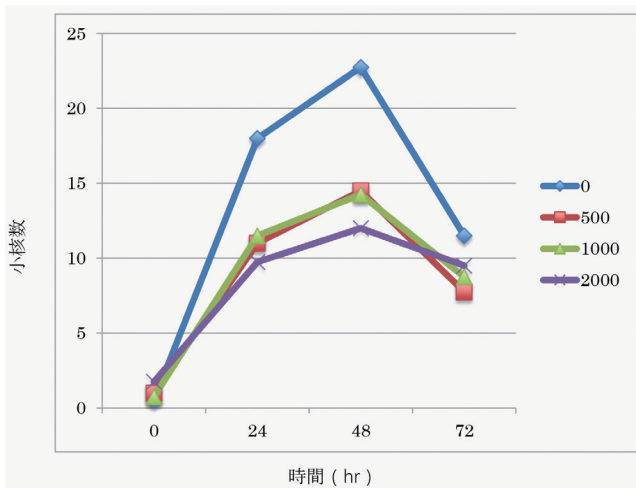


Fig.12 上大野 MeOH エキスの MMC に対する DNA 損傷抑制作用

【研究から得た結論・考察】

抗糖化活性試験の結果より、食用菊エキスには抗糖化作用があること、その作用は主に抗酸化作用によるものであること、CML 生成抑制を示す活性成分は EtOAc 可溶部に含まれる可能性が示唆された。『もってのほか』、『阿房宮』が上大野に比べてアマドリ化合物の酸化による糖化経路を強く阻害したことから、色素成分であるカロテノイドやアントシアニンなどの抗酸化活性をもつ化合物が活性に寄与していると推測される。一方で、『上大野』は抗糖化経路全体の抑制作用は他の品種とほぼ同様の活性を示したことから、多品種とは異なる作用点をもつ成分を含有することが示唆された。

食用菊エキスの UV に対する DNA 損傷抑制作用はコメットアッセイと小核試験の2つの方法で検討した。前者は初期損傷としての DNA 単鎖切断および DNA 修復の指標としての DNA 単鎖切断を検出する方法であり、後者は未修復の DNA 損傷をもった DNA が S 期で複製の鋳型となった場合にその DNA 損傷が DNA 二重鎖切断に派生し、続く G2 期の複製後修復をバイパスしてしまった場合に、続く M 期で生じる染色体断片を検出する方法である。食用菊エキスによって小核頻度の有意な減少がみられたことから、食用菊エキスは染色体異常誘発抑制作用があることが示唆された。さらにコメットアッセイでは UV 照射 30 分後に残存している損傷を tail length として検出していると考えられ、食用菊エキスには UV による DNA 損傷修復（ヌクレオチド除去修復）を促進する bio-antimutagen が含まれることが示唆された。

『上大野』 MeOH エキスは *in vivo* 小核試験においても MMC による小核の発生を抑制する作用を示した。このことから『上大野』に含有される活性成分は経口投与によっても体内に吸収され、活性を示すことが示唆された。

【残された問題、今後の課題】

本研究により、食用菊の新たな機能性として抗糖化作用、DNA 損傷抑制作用を見いだすことができた。今後の課題として、それぞれの機能性に関わる含有成分を同定し、作用メカニズムの解明を行う必要がある。現在、『上大野』の EtOAc 可溶部、 η -BuOH 可溶部については成分探索を進めており、今後、単離した化合物の活性試験を行う予定である。また、機能性食品やサプリメントとしての応用を目指し、同定した主要な活性成分について、一斉定量が可能な分析条件の検討を行い、品質評価法を確立するとともに、品種間の成分比較によりそれぞれの品種の特性を明らかにしていきたいと考えている。