

地域特産野菜「行者菜」の 皮膚保護作用の探索（第1報）

Effect of Gyojya-na extracts on UVB-induced apoptosis in HaCaT cells

仁科 淳良・倉兼 静江

Atsuyoshi Nishina and Shizue Kurakane

1. はじめに

行者菜とは、行者にんにくとニラを交配した植物で、行者にんにくは、昔、修験者が荒修行の際に精力をつけるために食べたといわれる希少な山菜である。行者にんにくは、栽培も行われているが、収穫まで5年を要する。収穫期間も1年のうちの2週間ほどであり、消費者が手軽に購入することができなかった。そこで開発されたのが行者菜で、ニラと同様に1年で収穫可能である。図1にニラ、行者菜、行者にんにくの形状を示した。

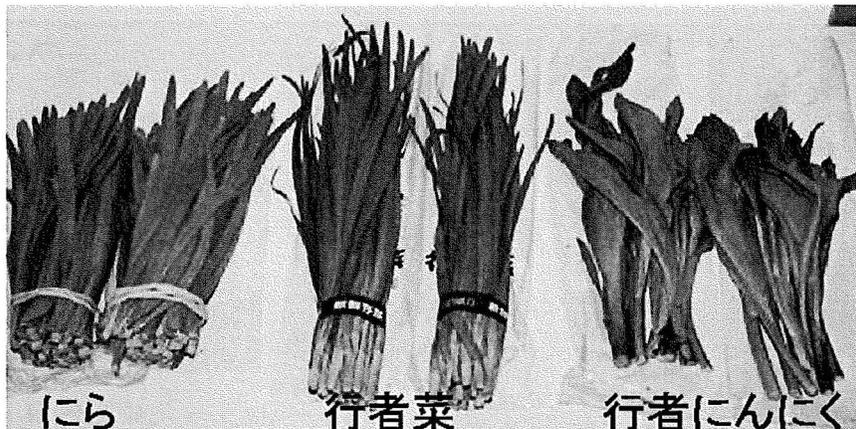


図1 ニラ、行者菜、行者にんにくの形状比較

行者菜の見た目はニラと似ているが、行者にんにくから受け継いだ形質として、茎が太いのが特徴である。宇都宮大学農学部の成分分析の結果、滋養強壯の基となる硫化アリルの含有率が行者にんにくよりも高く、生活習慣病を予防すると言われている。また、ニラと比べてビタミンA、Bは15%、葉酸は20%多く含まれている。

行者菜の2007年度の生産量は1.5t、2008年度は2.5t程度で置賜地方や首都圏、関西圏の一般消費者や料理店に出荷している。出荷は5月から9月末まで行われている。

本研究室では全国行者菜研究会から行者菜の機能についての研究を依頼された。行者菜に機能性に関する検討は、これまでほとんど行われていないが、ニラの成分や機能性に関しては、いくつかの報告がある。ニラの長鎖脂肪酸に関しては Cassagne ら [1]、Bessoule ら [2]、Schneider ら [3]、そして Evenson ら [4] が、フラボノイドに関しては Fattorusso ら [5] が、ニラ中のオイルの抗菌性に関しては Tsao ら [6] が、ニラの精油成分とリポキシゲナーゼに関しては Nielsen ら [7] が、揮発成分に関しては Nielsen ら [8] が検討を行った。我々が予

備実験を行ったところ、行者菜成分に皮膚保護作用が認められたため、皮膚保護作用の探索を本研究の目的とした。具体的検討項目として行者菜からエキス成分を抽出し、エキス成分の活性測定を行った。その後、活性のあるエキスの分画、活性成分の単離・同定を行うとともに、皮膚保護メカニズムの推定を行った。

2. 実験方法

2. 1 実験材料

行者菜は山形県長井市の全国行者菜研究会から収穫日の揃ったものを購入した。

2. 2 試薬

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) はシグマ社の製品をそのまま用いた。ヘキサン、クロロホルム、そしてメタノールは半井化学の製品（特級）をそのまま使用した。

2. 3 HaCaT 細胞

HaCaT 細胞は、国立感染症研究所の木村博一博士のご好意により寄与されたものを用いた。ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) に牛胎児血清 (FBS) を10%添加し、37℃、CO₂ 5%の環境で培養した。

2. 4 細胞の採取法

HaCaT がコンフルエントになるまで培養したカルチャーフラスコの培地を捨て、PBS 5 ml で洗浄後、PBS 5 ml、トリプシン 1 ml を加えチルティングにより混合した。10分間37℃でインキュベートし、FBS を 1 ml 入れ、ピペッティングし、遠心管に移し、4℃ 1000 rpm で5分間遠心分離した。上清を捨て、沈澱した細胞をほぐし、DMEM 5 ml を加えよく混ぜ、培地 (DMEM 30ml、牛胎児血清 (FCS) 3 ml 入れ攪拌) に入れピペッティングした。96穴プレートに100 μ l ずつ分注し、CO₂ インキュベーターでインキュベートした。

2. 5 HaCaT の生存率測定法

生存率測定法には MTT 法

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide を用いた、細胞の生死判定法] を用いた。すなわち、96穴プレートにあらかじめ HaCaT 細胞を十分発育させ、MTT 溶液 (5 mg/ml) を添加し、2時間後に分光光度計 (650 nm) で生存率を測定した。

2. 6 細胞毒性測定

96穴ウェルにコンフルエントになるまで HaCaT を生育させた。培地に100 μ g/ml または 500 μ g/ml の被験物を添加し、一晚37℃でインキュベートした。その後 MTT 法で細胞の生存率を測定した。

2. 7 皮膚保護作用測定

96穴ウェルにコンフルエントになるまで HaCaT を生育させた。培地に100 μ g/ml または 500 μ g/ml の被験物を添加し、一晚37℃でインキュベートした。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 100ml で2回洗浄し、FBS を1%添加した DMEM (アッセイ用培地) に交換した。UVB を400mJ/cm² 照射し、0、12、24、36時間後に MTT 法で生存率を測定した。

2. 8 エキスの調製

行者菜を真空乾燥して乾燥行者菜とした。ミキサーで乾燥行者菜を粉碎し、抽出原料とした。抽出原料に5倍量のヘキサンを入れ、一晚静置した後濾過し、ロータリーエバポレーターで乾燥して、ヘキサン抽出物を得た。次に抽出残渣にヘキサンと同量のクロロホルムを入れ、ヘキサン抽出と同じ操作によりクロロホルム抽出物を得た。同様の方法でメタノール抽出物を得た。189 gの乾燥行者菜からヘキサン抽出物0.27 g、クロロホルム抽出物1.54 g、メタノール抽出物4.12 gが得られた（図2参照）。

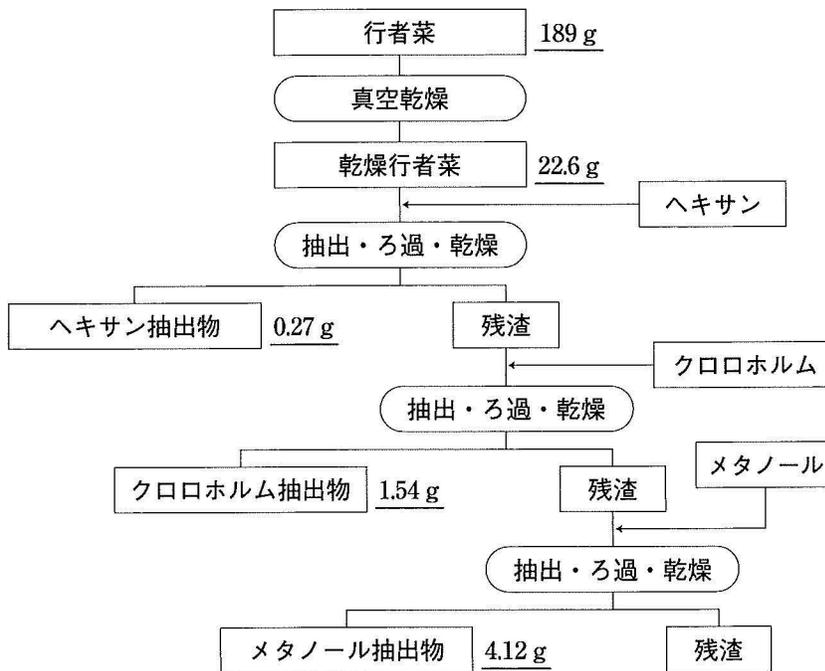


図2 行者菜抽出物の溶媒による分画

2. 9 粗分画

充填剤としてシリカゲル（ワコーゲル C-200）を用いたオープンカラムクロマトグラフィーで、皮膚保護作用を示したヘキサン抽出物を5つのフラクションに粗分画した。移動相はヘキサン：酢酸エチル＝100：0、75：25、50：50、25：75、0：100（いずれも容積比）を用いた。

2. 10 活性フラクションの薄層クロマトグラフィー（TLC）による分析

活性が認められたヘキサン100%画分を薄層プレート RP-18を使って分析した。移動相はメタノール：クロロホルム＝100：0、90：10、80：20、70：30、60：40、50：50（いずれも容積比）を用いた。展開後風乾し、リン酸硫酸銅液（硫酸銅 3 gを15%リン酸水溶液100ml溶かした）を用いて発色させた。

2. 11 皮膚保護物質（純品）の精製

カラムは DevosilODS (20mm ϕ \times 250mm、野村化学製)、ポンプは L-200 (日立製作所)、検出器は870-UV (日本分光) を用いた。移動相はメタノール：クロロホルム=70：30、60：40、50：50、40：60、30：70 (いずれも容積比) を用いた。最も高い理論段数が得られた組成 (メタノール：クロロホルム=60：40) を用いて行者菜中の皮膚保護物質 (純品) を調製した。

2. 12 活性成分の同定

直接導入装置付きの質量分析計 (QP-5000; 島津製作所) を用いて、活性成分のマスキロマトグラムを得た。なお、サンプルのイオン化はエレクトロン・インパクト法を用いた。得られたマススペクトルを分析計付属のライブラリーと照合して活性成分の同定を試みた。

3. 結果

3. 1 各抽出物の細胞毒性

各抽出物の細胞毒性を図3に示した。無添加と比較してクロロホルム抽出物を100または500 μ g/ml 添加した際に細胞生存率が有意に低かった。よって、クロロホルム抽出物には有意な細胞毒性が認められた。以後、皮膚保護作用の測定にはヘキサンおよびメタノール抽出物を用いた。

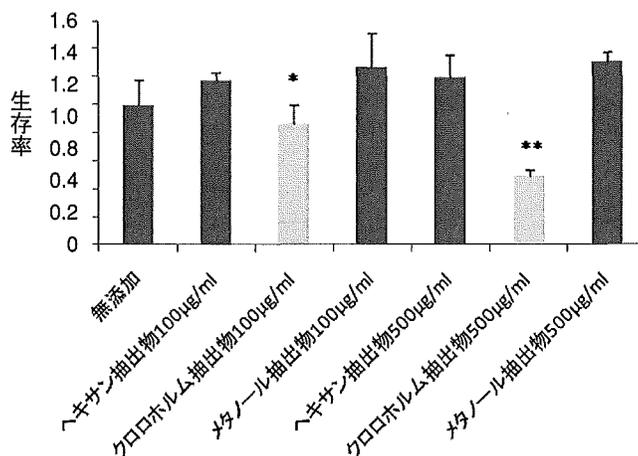


図3 行者菜粗抽出物の細胞毒性

3. 2 各抽出物の皮膚保護作用

ヘキサンおよびメタノール抽出物の皮膚保護作用を図4に示した。ヘキサン抽出物100または500 μ g/ml、メタノール抽出物100 μ g/ml 添加することにより、生存率が無添加より有意に高くなった。図4の結果から、ヘキサン100 μ g/ml または 500 μ g/ml 抽出物と、メタノール100 μ g/ml 抽出物に皮膚保護作用があると判断した。メタノール抽出物は極性が高く、経験的に分画が困難であることがわかっているので、本研究ではヘキサン抽出物から皮膚保護物質を精製することとした。

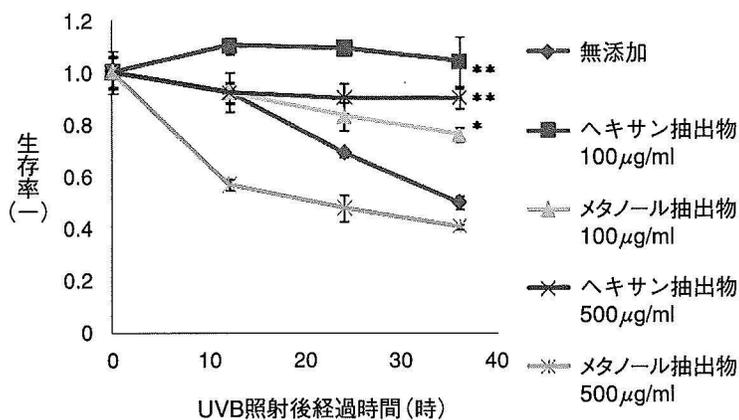


図4 行者菜抽出物の皮膚保護作用

3.3 オープンカラムによる行者菜ヘキサン抽出物の粗分画

オープンカラムで行者菜ヘキサン抽出物1gを分画したときの収量を表1に示した。また、それぞれの画分の皮膚保護作用を図5に示した。ヘキサン0%<25%<50%<100%の順に細胞生存率が無添加よりも高くなった。ヘキサン100%画分を添加することにより、UVBによる生存率の減少が最も顕著に抑えられることがわかった。

溶媒組成		収量 (mg)
ヘキサン	酢酸エチル	
100	0	132
75	25	619
50	50	42
25	75	26
0	100	5

表1 行者菜ヘキサン抽出物のオープンカラム分画

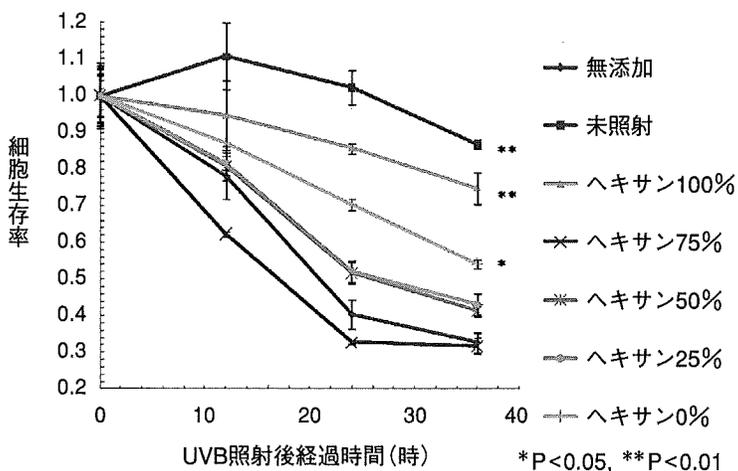


図5 行者菜ヘキサン抽出物のオープンカラム分画物の皮膚保護作用

3. 4 薄層クロマトグラフィーによるヘキサン100%画分の分析

薄層クロマトグラフィーによるヘキサン100%画分の分析結果を図6に示した。主成分のスポットを矢印で示した。展開液中のメタノールの量を増すことにより、移動量が大きくなることがわかった。展開後のプレートに254 nmの紫外線を照射して観察した結果、矢印の主成分は紫外吸収作用を示すことがわかった。

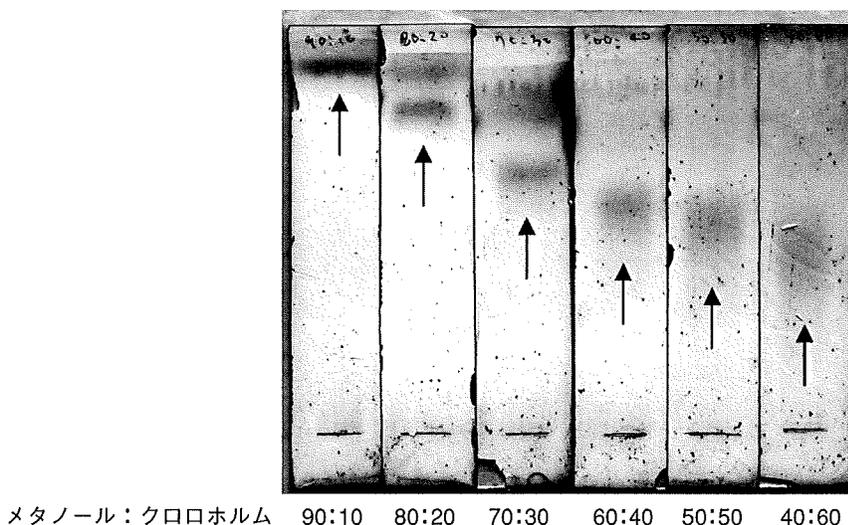


図6 TLCによるヘキサン100%画分の分析 (最適溶媒組成検討)

3. 5 高速液体クロマトグラフィーによる精製

高速液体クロマトグラフィーによる分析の結果を図7に示した。まず移動相の組成を図7に示した割合で変化させ、主成分の理論段数を比較した。結果、メタノール60%、クロロホルム40%を用いることにより、理論段数が最も大きくなると推定した。カラムとしてODS、移動相はメタノール：クロロホルム=60：40（容積比）を用いてヘキサン100%画分を精製し、皮膚保護物質の純品を得ることができた。

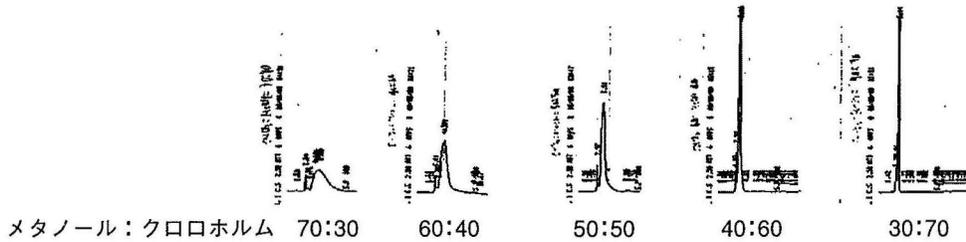


図7 HPLCによるヘキサン100%画分の分析
（最適溶媒組成検討）

3. 6 質量分析計による活性成分の分析

行者菜皮膚保護成分のマスキロマトグラムを図8（A）、ライブラリー検索結果を図8（B）に示した。図8（B）のライブラリー検索結果から、行者菜の皮膚保護物質は図9の物質N-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamideと推定した。

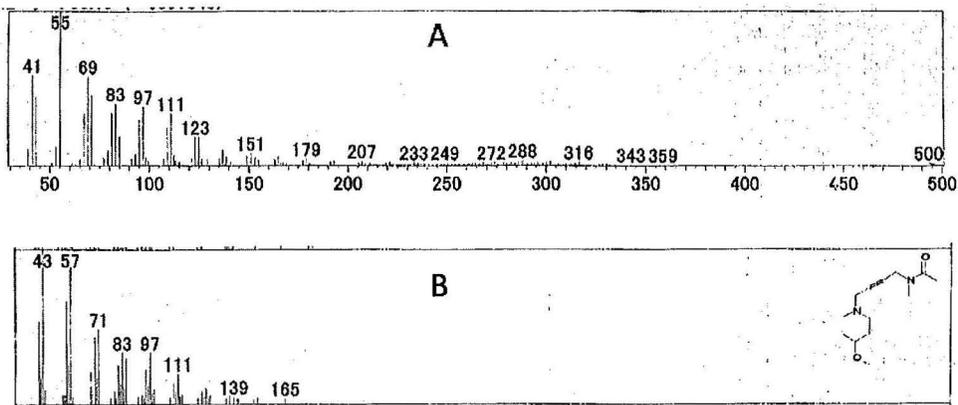


図8 行者菜の皮膚保護成分のマスキロマトグラム（A）と
ライブラリー検索結果（B）

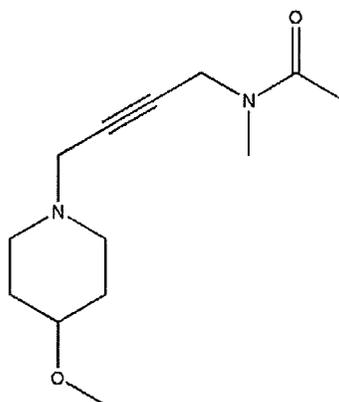


図9 行者菜皮膚保護成分(推定)
(N-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamide)

4. 考察

行者菜の粗分画物の毒性を評価した結果、クロロホルム抽出物に有意な細胞毒性が認められた。今後、毒性を示した原因を明らかにすることにより、行者菜の調理法などに関する有益な情報が得られる可能性がある。

粗分画物の皮膚保護作用を図4に示した。ヘキサン抽出物の皮膚保護作用は、添加量に関わらず同等であったことから、100 $\mu\text{g/ml}$ の添加量が適正な濃度であると判断した。一方、メタノール抽出物は500 $\mu\text{g/ml}$ 添加することにより、皮膚細胞の死滅が亢進することがわかった。よって、メタノール抽出物は添加量が100 $\mu\text{g/ml}$ が適正と判断した。

オープンカラム分画物の皮膚保護作用(図5)から、ヘキサン100%画分の活性が最も高いことがわかった。炭化水素など極性の低い物質がヘキサン100%で溶出する。一方、TLCにより分析結果から活性成分が紫外吸収を示すことがわかった。質量分析およびライブラリサーチにより、活性成分はN-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamideと推定されたが、N-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamideはヒドロキシ基を持たず、極性は低く、また、三重結合を持つので紫外吸収作用を持つと推定できる。活性成分がN-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamideであることに関して、極性、紫外吸収の面で矛盾はないと考えた。また、N-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamideの生理活性に関する報告は、見あたらなかった。

以上の結果から、行者菜中の皮膚保護成分はN-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamideまたはその類縁体と推定した。今度、NMR分析、IR分析を行い活性成分を同定したい。

行者菜は新しい野菜だが、山形県産野菜はもつてのほかやうこぎなど、他県に比べて多くの在来作物が栽培されている。

もつてのほかは山形県特産の食用菊で、健康食材である。苦味が少なく、繊維質が豊富で、カロチン、カリウム、カルシウム、リンを多く含んでいる。日本大学薬学部、理学部並びに山形県衛生研究所との共同研究の結果、発ガン抑制効果及びコレステロールと中性脂肪を低下させる効果があるとなわっている。

うこぎについては山形県テクノポリス財団(現山形県企業振興公社)が行った研究で、う

こぎの葉は抗酸化性が一般の緑黄色野菜より非常に高いことが分かっている。また、山形大学工学部や本学を中心に、各研究機関で成分分析が行われており、ビタミンとミネラルが豊富で、特にカルシウムはほうれん草の5倍、ビタミンCは3倍近く含まれているなど、極めて優れた栄養価値が認められている。

我々は行者菜の栄養面ではなく機能面に注目し、皮膚保護成分の単離・同定を試みた。今後、行者菜の機能を科学的に明らかにして販売量の増加に貢献したいと考える。

5. まとめ

近年、フロンガスの排出量が増加するとともに大気上層のオゾンが減少し、地上に達する紫外線が増加しつつある。紫外線の増加と皮膚ガンの発症は相関があることがわかっており、できれば天然物で紫外線による皮膚細胞障害に対応する素材が求められている。一方、行者菜は山形県長井市近郊で作られるようになった野菜で、予備実験により抽出物に皮膚保護作用が認められた。本研究では、行者菜の付加価値の向上を目的として、ヒトケラチノサイト（HaCaT細胞）を用いて、行者菜中のUVBによる皮膚細胞死を抑制する物質（皮膚保護物質）の探索を行った。結果、①種々の有機溶剤で行者菜の抽出物を調整し、皮膚保護作用を比較した結果、低極性の抽出物に活性が認められた。②皮膚保護物質を単離し、質量分析計をライブラリーにより構造解析を行った結果、活性成分はN-[4-(4-Methoxy-piperidin-1-yl)-but-2-ynyl]-N-methyl-acetamideと推定された。

参考文献

1. Cassagne, C. and R. Lessire, Biosynthesis of saturated very long chain fatty acids by purified membrane fractions from leek epidermal cells. *Arch Biochem Biophys*, 1978. 191(1): p. 146-52.
2. Bessoule, J.J., et al., Evaluation of the amount of acyl-CoA elongases in leek (*Allium porrum* L) leaves. *Biochim Biophys Acta*, 1992. 1117(1): p. 78-82.
3. Schneider, F., et al., Effect of cerulenin on the synthesis of very-long-chain fatty acids in microsomes from leek seedlings. *Biochim Biophys Acta*, 1993. 1152(2): p. 243-52.
4. Evenson, K.J. and D. Post-Beittenmiller, Fatty Acid-Elongating Activity in Rapidly Expanding Leek Epidermis. *Plant Physiol*, 1995. 109(2): p. 707-716.
5. Fattorusso, E., et al., The flavonoids of leek, *Allium porrum*. *Phytochemistry*, 2001. 57(4): p. 565-9.
6. Tsao, S.M. and M.C. Yin, In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol*, 2001. 50(7): p. 646-9.
7. Nielsen, G.S., L.M. Larsen, and L. Poll, Formation of aroma compounds and lipoxygenase (EC 1.13.11.12) activity in unblanched leek (*Allium ampeloprasum* Var. *Bulga*) slices during long-term frozen storage. *J Agric Food Chem*, 2003. 51(7): p. 1970-6.
8. Nielsen, G.S., L.M. Larsen, and L. Poll, Impact of blanching and packaging atmosphere on the formation of aroma compounds during long-term frozen storage of leek (*Allium ampeloprasum* Var. *Bulga*) slices. *J Agric Food Chem*, 2004. 52(15): p. 4844-52.

要旨

行者菜は、行者にんにくとニラを交配した植物で、長井市近郊で栽培されているが、未だ出荷量は年間3 t程度であり、開発途上の特産物といえる。我々は、地位貢献の一環として、行者菜の機能成分を探索し、販売量の増加に貢献したいと考え、HaCaT細胞を用いて、行者菜エキスの皮膚保護作用について検討した。

行者菜の粗抽出物のうち、ヘキサン抽出物に皮膚保護作用が認められた。ヘキサン抽出物をオープンカラムクロマトグラフィーで分画し、それぞれの活性判定を行った結果、ヘキサン100%で溶出する成分に皮膚保護作用が認められた。ヘキサン100%フラクションを分取用HPLCで精製し、活性成分の精製物を得るとともに、質量分析計を用いて活性成分の構造を推定した。

SUMMARY

The ascetic green (Gyojya-na) is the plant that hybridizes the ascetic garlic and the leek, and cultivated around Nagai City, Yamagata. Production of Gyojya-na is still about 3t a year, and it is a special regional product on the way for development. We aimed to study biological activity of Gyojya-na as part of the regional contribution, and to contribute to an increase in the volume of sales. At current year, effect of Gyojya-na extracts on UVB-induced apoptosis in HaCaT cells was examined.

Cell death by UVB irradiation was suppressed by hexane soluble among whole extract of Gyojya-na. Hexane soluble was fractionated by open column chromatography and activities of all fractions were evaluated. Activity of the fraction that eluted by hexane was strongest. Hexane eluate was purified by preparative HPLC and the structure of the active component was estimated using a mass spectrometer.