

## 県産農産物のがん細胞増殖抑制活性\*

酒井 美穂\*<sup>1</sup>・柚木崎 千鶴子\*<sup>1</sup>・岡部 玲二\*<sup>2</sup>

Antitumor Activity of Agricultural Products in Miyazaki Prefecture

Miho SAKAI, Chizuko YUKIZAKI and Reiji OKABE

本県産農産物39作物64品種136部位について、肝がん細胞の増殖抑制活性を評価した。その結果、茶、バジル、ローズマリー、レモンバーム、ペパーミント、スペアミント、ステビア、カモミール、香酸柑橘果皮、ニガウリ種子、茎葉利用カンショ葉・茎は肝がん細胞の増殖を抑制した。また、これまでの機能性評価によりスクリーニングされた、抗酸化活性及びがん細胞（HL60、肝がん細胞3種）増殖抑制活性の両機能を有する作物について、抗酸化成分とがん細胞増殖抑制成分の関係について検討した。その結果、シソ科ハーブ類の抗酸化成分3成分のうち2成分はがん細胞増殖抑制活性を有することがわかった。しかし、各細胞種で細胞増殖抑制要因が異なる結果となった。

キーワード：農産物、ハーブ、HL60細胞、肝がん細胞、過酸化水素

### 1 はじめに

これまで、本県を産地とした農産物の機能性を、抗酸化活性およびHL60細胞増殖抑制活性を指標として網羅的に評価してきた。<sup>1), 2)</sup>すでに、高抗酸化作物として茶、シソ科ハーブ類、マンゴー果皮、茎葉利用カンショ葉、ゴボウ、ニンジン葉をスクリーニングし、その活性成分のひとつが、caffeic acid, chlorogenic acid, dicaffeoyl tartaric acid, rosmarinic acidであること、また、茶、シソ科ハーブ類、有色米、香酸柑橘果皮がHL60細胞の増殖を強く抑制することを報告してきた。

本研究では、肝がん細胞3種を用いた県産農産物の増殖抑制活性を評価するとともに、これまでの機能性評価によりスクリーニングされた作物のうち、抗酸化活性及びがん細胞増殖抑制活性を有する作物について、抗酸化成分とがん細胞増殖抑制成分の関係について検討したので報告する。

### 2 実験方法

#### 2-1 抽出物の調製

宮崎県総合農業試験場で栽培された農産物（39作物64品種136部位）を収穫期にあわせて提供を受け、即日、可食部および非可食部の部位ごとに分けて真空凍結乾燥機（FTS SYSTEM, Dura-Top MP & Dura-DRY MP）で乾燥した。乾燥試料は、超遠心粉砕器（MRK & RETSCH, EM-1型）で0.5mmのスクリーンを通して（一部糖分の多い試料は5mmスクリーン使用）粉砕した。

凍結乾燥試料1gに30mlの80%エタノールを加えてボルテックスで30秒かくはんし、NO.5Aのろ紙で吸引ろ過した。そのろ液をエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥後、抽出物を得た。抽出物はdimethyl sulfoxide（DMSO）に再溶解し、供試した。

#### 2-2 細胞および培養条件

HL60ヒト白血病細胞（RCB0041）は（独）理化学研究所バイオリソースセンターより、肝がん細胞（HLE, HLF, HuH-7）は宮崎大学医学部より分譲を受けた。それぞれ10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地あるいはDMEM培地で、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下、相対湿度100%の条件で

\* バイオマーカーによる県産農産物の機能性評価に関する研究（第3報）

\*1 食品開発部

\*2 宮崎県総合農業試験場（現 宮崎県農政水産部東白杵農林振興局）

培養した。

### 2-3 HL60細胞増殖抑制試験

測定培地中で試料終濃度が62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g}$  (extract) /mlになるようにDMSOで希釈し, 1  $\mu\text{l}$ ずつ96穴プレートに分注した。ここに細胞懸濁液 ( $1 \times 10^5$  cells/ml) を99  $\mu\text{l}$ ずつ加えて混合し, 48時間培養した。その後, テトラカラーワン試薬 (生化学工業) 10  $\mu\text{l}$ を加えてさらに4時間培養し, 650nmの吸光度を参考波長として450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (ナルジェヌンクインターナショナル, Immuno Mini NJ-2300) で測定した。測定は3連で行い, 細胞にDMSO 1  $\mu\text{l}$ を添加したものをcontrolとし, 細胞増殖はcontrolの平均吸光度に対する百分率で算出した。また, 対control%が50%の時の試料濃度をIC<sub>50</sub>として増殖抑制活性を示した。

### 2-4 肝がん細胞3種増殖抑制試験

細胞懸濁液 ( $1 \times 10^4$  cells/ml) を96穴プレートに50  $\mu\text{l}$ 添加し, 24時間接着させた。その後終濃度が125, 250, 500, 1,000  $\mu\text{g}$  (extract) /mlになるようDMSOで希釈した試料を培地に懸濁させ, あらかじめ細胞を接着させてある96穴プレートに50  $\mu\text{l}$ ずつ分注した。48時間培養後, テトラカラーワン試薬10  $\mu\text{l}$ を加えてさらに3時間培養し, 650nmの吸光度を参考波長として450nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。測定は3連で行い, 細胞にDMSO 1  $\mu\text{l}$ を添加したものをcontrolとし, 細胞増殖はcontrolの平均吸光度に対する百分率で算出した。また, 対control%が50%の時の試料濃度をIC<sub>50</sub>として増殖抑制活性を示した。

### 2-5 カタラーゼ添加による細胞増殖抑制試験

最終濃度が50U/mlになるようにカタラーゼを添加した培地を用いて, 2-3, 2-4と同様に試験を実施した。

### 2-6 DPPHラジカル消去活性の測定

凍結乾燥試料に適量の80%エタノール溶液を加えてスターラーでかくはんしながら10分間抽出し, 0.45  $\mu\text{m}$ フィルターでろ過し試料抽出液とした。96穴マイクロプレートに調製した試料抽出液, pH6.0の200mM MES (2-morpholinoethanesulphonic acid, 同仁化学) 緩衝液を順次加

えた。続いて, 1200  $\mu\text{M}$  DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 和光純薬) エタノール溶液を8連ピペットを用いて加え反応を開始させた。室温で20分間放置後, 520nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。なお, 反応液の最終エタノール濃度は50%になるように調製し, 活性は, 凍結乾燥粉末試料絶乾物1g当たりのTrolox (Aldrich) 相当量として3連の平均値を表示した。

### 2-7 抗酸化成分の特定

#### 1) DPPH-HPLCオンライン法<sup>3)</sup>

DPPH-HPLCオンライン法を用いてDPPHラジカル消去活性成分を検出した。HPLCで分離した抗酸化成分は, ポストカラムで $10^{-5}$ M DPPHメタノール溶液と約50秒間反応させると, 517nmで負のピークとして検出される。供試試料は, 80%エタノールで抽出後0.45  $\mu\text{m}$ フィルターでろ過し, 直接HPLC分析に供した。HPLCの測定条件は以下のとおりであった。

装置: JASCO PU-980, DG-980

検出器: PDA

カラム: Finepak SIL-5 (4.6mm  $\times$  250mm)

カラム温度: 40°C

移動相: A液; 0.2%ギ酸,

B液; 0.2%ギ酸含有CH<sub>3</sub>CN

流量: 1ml/min

グラジエント: B液10  $\rightarrow$  45%(20分)  $\rightarrow$  55% (10分)  $\rightarrow$  55%(10分)  $\rightarrow$  100% (10分)

#### 2) HPLCによる抗酸化成分の特定

DPPH-HPLCオンライン法で抗酸化活性を示すピークを特定した後, 標品を用いて, 溶出時間および吸収スペクトルの比較により成分の特定を行った。

## 3 結果および考察

### 3-1 肝がん細胞増殖抑制効果結果

県産農産物80%エタノール抽出物の肝がん細胞3種増殖抑制試験の結果を表1に示した。IC<sub>50</sub>の値が, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下を示すものを強い作用, 200

μg/ml以上500 μg/ml未満を中程度の作用, 500 μg/ml以上1,000 μg/ml未満を弱い作用, 1,000 μg/ml以上を今回の試験では効果なしとした。

その結果, いずれの肝がん細胞でも茶, バジル, ローズマリー, レモンバーム, ペパーミント, スペアミント, ステビア, カモミール, 香酸柑橘果皮, ニガウリ種子, 茎葉利用カンショ葉・茎に活性が認められた。よって活性成分による細胞の選択性はないものと思われた。

### 3-2 抗酸化成分の特定

これまで, 抗酸化活性およびがん細胞増殖抑制活性を指標とし, 県産農産物の機能性を評価してきた。その結果をまとめると, 茶, シソ科ハーブ類5種 (バジル, ローズマリー, レモンバーム, ペパーミント, スペアミント,) ステビア, ムラサ

キカンショ, ブルーベリー可食部の80%エタノール抽出物は, 抗酸化活性およびがん細胞増殖抑制活性を併せ持つことが分かった (図1)。これより, 抗酸化成分ががん細胞増殖抑制活性を有する可能性が考えられたため, 抗酸化成分を特定し, そのがん細胞増殖抑制活性について検討を行った。本試験では, 抗酸化活性およびがん細胞増殖抑制活性の両機能を強く併せ持つシソ科ハーブ類5種について検討した。

DPPH-HPLCオンライン法およびHPLCを用いて, シソ科ハーブ類5種の抗酸化成分 (DPPHラジカル消去活性) を分離した結果, バジルでは eugenol, シソ科ハーブ類5種で rosmarinic acid, ローズマリーでは carnolic acid と3種の化合物を検出した。(図2-1, 2-2)

表1 県産農産物の肝がん細胞増殖抑制活性 (IC<sub>50</sub>)

H L E	強い作用 200 μg/ml以下 茶, ローズマリー, 香酸柑橘果皮
	中程度の作用 200 μg/ml以上500 μg/ml未満 ニガウリ種子, バジル, レモンバーム, スペアミント, ペパーミント, ステビア
	弱い作用 500 μg/ml以上1000 μg/ml未満 ムラサキカンショ, 茎葉利用カンショ葉・茎, 金柑未熟種子, カモミール, 香酸柑橘果皮
H L F	強い作用 200 μg/ml以下 ローズマリー, 香酸柑橘果皮
	中程度の作用 200 μg/ml以上500 μg/ml未満 茶, ニガウリ種子, バジル, レモンバーム, スペアミント, ペパーミント, ステビア 香酸柑橘果皮
	弱い作用 500 μg/ml以上1000 μg/ml未満 ムラサキイモカンショ, 茎葉利用カンショ茎・葉, カモミール
HuH-7	強い作用 200 μg/ml以下 茶, 香酸柑橘果皮
	中程度の作用 200 μg/ml以上500 μg/ml未満 ニガウリ種子, バジル, ローズマリー, レモンバーム, スペアミント, ペパーミント, ステビア 香酸柑橘果皮
	弱い作用 500 μg/ml以上1000 μg/ml未満 茎葉利用カンショ葉・茎, カモミール

### 3-3 抗酸化成分の寄与率

シソ科ハーブ類5種から検出した抗酸化成分のDPPHラジカル消去活性の寄与率を表2に示す。寄与率は、各ハーブの持つDPPHラジカル消去活性を100%とし、特定した成分がその活性に何%寄与するかを示す値であり、各成分の含有量から算出した。その結果、rosmarinic acidは5種全てのハーブから検出され、その寄与率は10~35%程度であった。バジルでは、rosmarinic acidとeugenolの寄与率が全体の抗酸化活性の50%を占めた。また、ローズマリーでは、rosmarinic acidとcarnosic acidが全体の抗酸化活性とほぼ等しい値となったことから、rosmarinic acidおよびcarnosic acidが、ローズマリーのDPPHラジカル消去活性本体であることが推測された。

### 3-4 抗酸化成分のがん細胞増殖抑制活性

特定した成分のがん細胞増殖抑制活性を、HL60細胞、肝がん細胞3種(HLE, HLF, HuH-7)を用いて検討した。また、成分のがん細胞増殖抑制活性に対する寄与を確認するため、eugenolはバジルに、rosmarinic acidはレモンバームに、carnosic acidはローズマリーに含まれる濃度で試験を実施した。その結果、eugenolはいずれの細胞の増殖も抑制しなかったが、rosmarinic acidはHL60細胞の増殖を抑制し、carnosic acidは強弱はあるが全ての細胞の増殖を抑制した。(図3-1, 2, 3, 4, 5)

がん細胞増殖抑制活性の認められたrosmarinic acidおよびcarnosic acidは、いずれもポリフェノールに分類される。最近の研究で、ポリフェノールを細胞培養用培地に添加すると、過酸化水素が発生し、それが原因となってがん細胞の増殖が抑制されるという報告がある。<sup>4),5),6),7)</sup>そこで、発生していると推測される過酸化水素をカタラーゼ添加により分解し、rosmarinic acidおよびcarnosic acidのがん細胞増殖抑制活性をIC<sub>50</sub>を挟む濃度2点で検討した。その結果、カタラーゼ添加により、rosmarinic acidおよびcarnosic acidのHL60細胞増殖抑制作用は阻害されたが、carnosic acidの肝がん細胞増殖抑制作用は阻害されなかった。(図4-1, 2, 3, 4, 5)

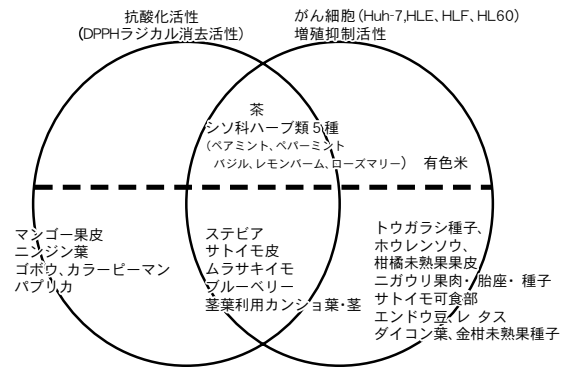


図1 県産農産物機能性評価結果のまとめ

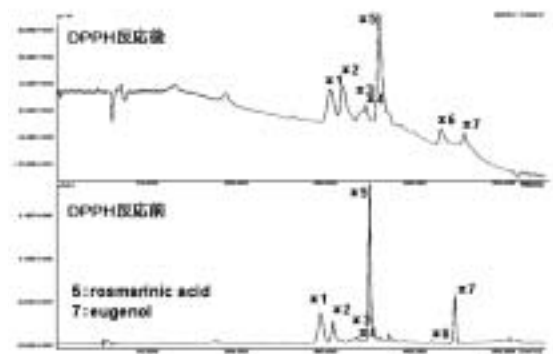


図2-1 DPPH-HPLCオンライン法によるバジル抗酸化成分の特定 (\*は抗酸化活性を示すピークであり, 1, 2, 3, 4, 6は未同定)

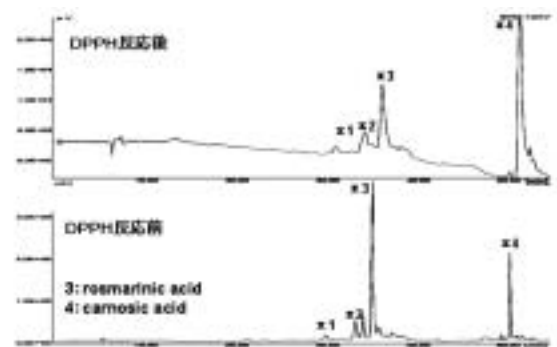


図2-2 DPPH-HPLCオンライン法によるローズマリー抗酸化成分の特定 (\*は抗酸化活性を示すピークであり, 1, 2は未同定)

表2 シソ科ハーブ類抗酸化成分の寄与率 (%)

サンプル名	rosmarinic acid	eugenol	carnosic acid
レモンバーム	34	-	72
ローズマリー	34	-	-
バジル	31	22	-
スペアミント	12	-	-
ペパーミント	27	-	-

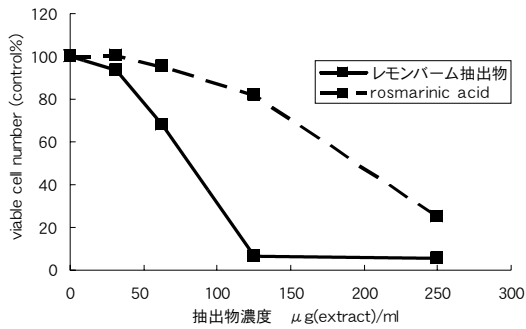


図3-1 rosmarinic acidのHL60増殖抑制活性  
(rosmarinic acid 濃度左から (10, 20, 40, 80 μ M))

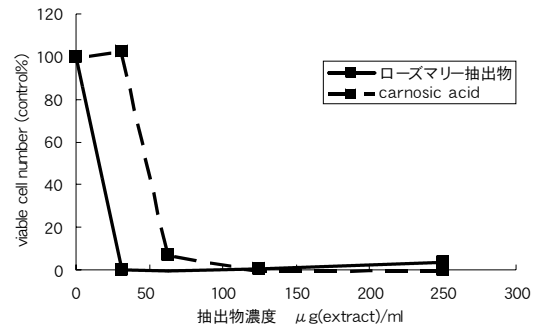


図3-2 carnosic acidのHL60増殖抑制活性  
(carnosic acid 濃度左から (11.25, 22.5, 45, 90 μ M))

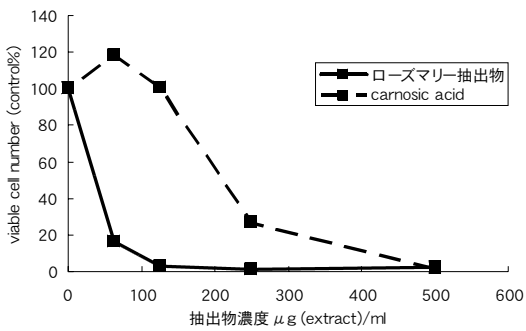


図3-3 carnosic acidのHLE増殖抑制活性  
(carnosic acid 濃度左から (22.5, 45, 90, 180 μ M))

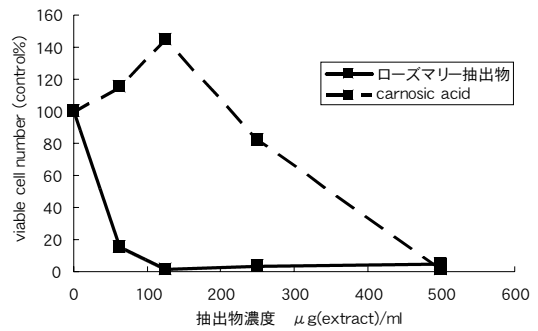


図3-4 carnosic acidのHLF増殖抑制活性  
(carnosic acid 濃度左から (22.5, 45, 90, 180 μ M))

これより、HL60細胞は、rosmarinic acidおよびcarnosic acidを培地に添加することにより発生した過酸化水素の影響で増殖を抑制されていることが推測された。加えて、肝がん細胞では、carnosic acidが直接肝がん細胞の増殖抑制作用に寄与している可能性が考えられた。

#### 4 まとめ

県産農産物のがん細胞増殖抑制活性について検討した結果は以下のとおりであった。

- 1) 茶, バジル, ローズマリー, ペパーミント, スペアミント, レモンバーム, ステビア, カモ

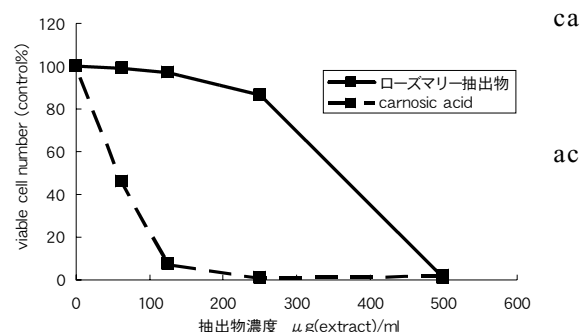


図3-5 carnosic acidのHuH-7増殖抑制活性  
(carnosic acid 濃度左から (22.5, 45, 90, 180 μ M))

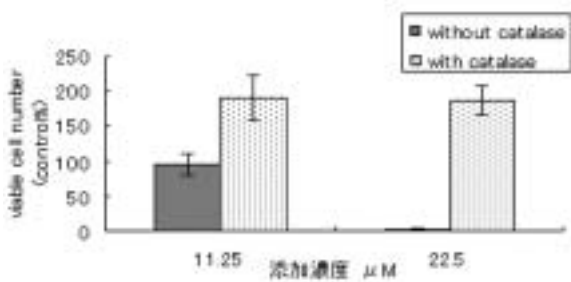


図4-1 rosmarinic acidのHL60増殖抑制活性

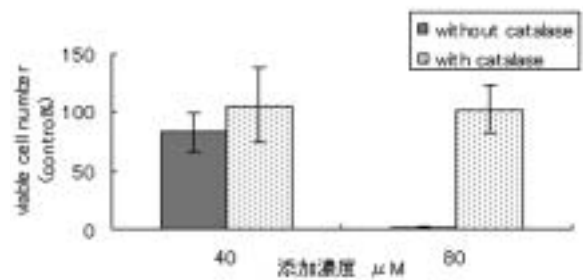


図4-2 carnosic acidのHL60増殖抑制活性

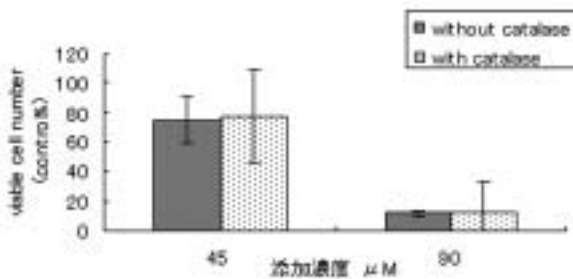


図4-3 carnosic acidのHLE増殖抑制活性

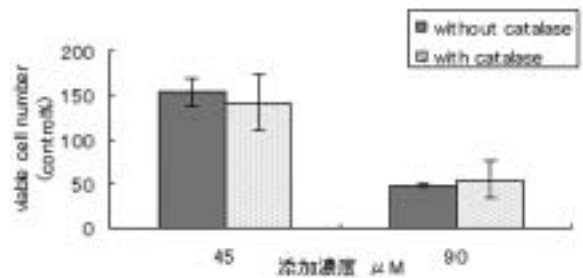


図4-4 carnosic acidのHLF増殖抑制活性

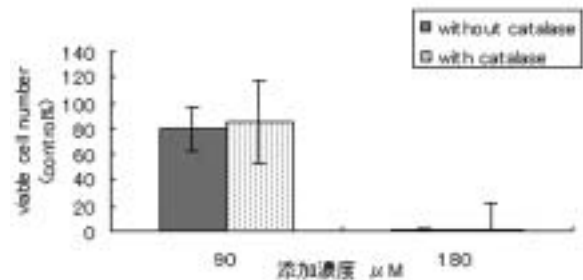


図4-5 carnosic acidのHuH-7増殖抑制活性

ミール、香酸柑橘果皮、ニガウリ種子、莖葉利用カンショ葉・茎は肝がん細胞3種（HLE、HLF、HuH-7）の増殖を抑制した。

- 2) 抗酸化活性およびがん細胞増殖抑制活性を併せ持つ作物は茶、シソ科ハーブ類5種（バジル、レモンバーム、ローズマリー、ペパーミント、スペアミント、）、ステビア、ムラサキカンショ、ブルーベリー可食部であった。
- 3) シソ科ハーブ類の抗酸化成分として、バジルではeugenol、シソ科ハーブ類5種ではrosmarinic acid、ローズマリーではcarnosic acidの3種の化合物を検出した。
- 4) シソ科ハーブ類5種のDPPHラジカル消去活性に対するrosmarinic acidの寄与率は、20～30%程度であり、バジルではrosmarinic acidとeugenolが全体の50%を占めた。また、ローズマリーでは、rosmarinic acidとcarnosic acidがDPPHラジカル消去活性本体であることが推測された。
- 5) 特定した抗酸化成分のうちeugenolはいずれの細胞の増殖も抑制しなかったが、rosmarinic acidはHL60細胞の増殖を抑制し、carnosic acidは強弱はあるが実験に用いた全ての細胞の増殖を抑制した。

- 6) カタラーゼ添加試験の結果、rosmarinic acid及びcarnosic acidのHL60細胞増殖抑制作用は培地での過酸化水素発生によるものと推測された。加えて、肝がん細胞では、carnosic acidが直接肝がん細胞の増殖抑制作用に寄与している可能性が推測された。

- 7) carnosic acidは、抗酸化活性および肝がん細胞増殖抑制活性の両方の機能を有する成分であると推測された。

## 5 参考文献

- 1) 柚木崎千鶴子，小村美穂，アショク・クマル・サーカー，岡部玲二，宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告，第48号，P91-98(2003)。

- 2) 小村美穂, 柚木崎千鶴子, アショク・クマル・サーカー, 杉下弘之, 岡部玲二, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, 第49号, P81-84(2004).
- 3) アショク・クマル・サーカー, 柚木崎千鶴子, 小村美穂, 小窪正人, 岡部玲二, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, 第49号, P95-101(2004).
- 4) Lee Hua Long, Marie Veronique Clement, Barry Halliwell, BBRC, 273, 1, p50-53 (2000)
- 5) Phing Chian Chai, Lee Hua Long, Barry Halliwell  
BBRC, 304, 4, p650-654(2003)
- 6) 久保田芳美, 湯浅(小島)明子, 湯浅勲, 生活科学研究誌, Vol.2 (2003)
- 7) Hiroshi Nakagawa, Keiji Hasumi, Je-Tae Woo, Kazuo Nagai, Masaaki Wachi, Vol25, 9, p1567-1574 (2004)
- 8) 新本洋士, 食品機能研究法, 光琳, 2000, p.275-278
- 9) 豊川哲也, 鎌田靖弘, 山城利枝子, 比嘉賢一, 吉田安彦, 花城薫. 沖縄県工業技術センター研究報告, 第3号, 2001, p91-95
- 10) 新本洋士, 鈴木雅博, 木村俊之, 山岸賢治. 日本食品科学工学会誌, 48, 10, p787-790, 2001.
- 11) 江藤公美, 岩下恵子, 武井利之, 八巻幸二, 篠原和毅, 小堀真珠子. 日本食品科学工学会誌, 49, 4, p250-256, 2002.