機能性食品・コスメ原料に関する
評価技術の確立及びその応用に関する研究（第３報）

食品コスメ部
柘植圭介
宮崎大学農学部
山崎正夫
宮崎大学工学教育研究部
菅本和寛

九州北西部に多く自生する芳香性樹木アオモジの機能性食品化を目指し，アオモジ葉 80%エタノール抽出物の分画及び in vitro の系での機能性を検証した．疎水性吸着樹脂を用いてアオモジ葉抽出物を分画し，各画分の抗炎症作用及びα-グルコシダーゼ阻害活性を評価した．抗炎症作用は，マクロファージの LPS 誘導型 NO 産生抑制作用を指標とした．その結果，アオモジ抽出物より，NO 産生阻害作用を有し，比較的疎水性が高い画分と，α-グルコシダーゼ阻害活性を有し，kaempferol の rhamnose 配糖体を多く含む画分を得た．これらの結果は，アオモジ抽出物における新たな生理機能性の明示と活性物質の同定につながる有用な知見であると考えられた．

1. はじめに

アオモジ（*Litsea cubeba*；図 1）は，クスノキ科ハマビワ属の落葉小高木で，九州以南から中国，マレーシア，インドに分布する[1]．別名「ショウガノキ」「コショウノキ」とも呼ばれ，花，果実，葉，幹，根のそれぞれにレモンのような芳香がある．中国や東南アジア諸国では，果実から精油を抽出して香料にしたり，果実そのものを「馬告（マーガオ：台湾）」「木姜子（ムージャンズ：中国貴州省）」と称し，香辛料や食油に加工したりして幅広く食されている．佐賀県や長崎県はアオモジの生育密度が高く，山間道路の法面や雑木林の明るい場所に多くみられる雑木である．しかし，アオモジは 3～4 月の花期に芳香を発する樹木として身近に知られてはいるものの，国内ではほとんど利用されてこなかった．

近年，アオモジ葉の生理機能性に関する研究が進展している．アオモジ葉には水溶性多糖類やポリフェノール類が多く含まれ，強い抗酸化性を有する[2]．また，葉の乾燥粉末の摂取がラットの血清ペントシジン濃度を低下させ，生体内の抗糖化にはたらく[2]ことや，血清脂質濃度を低下させ，脂質代謝を改善[3]すること，エタノール抽出物がマクロファージにおける caspase−1 や IL−1β 分泌の抑制を介して NLRP3 インフラマソームの活性化を抑える[4]こと等が報告されている．これらの知見は，アオモジ葉が，メタボリックシンドロームの基礎疾患である糖・脂質代謝異常の予防に役立つ機能性食品の有望な素材である可能性を示唆している．



図 1　アオモジ

一方，糖尿病等の慢性疾患の病態形成に，「慢性炎症」が深く関わっていることが注目されている[5]．慢性炎症では，酸化ストレスなどの刺激を受けた臓器の細胞から放出される自己由来の成分（内因性リガンド）が，マクロファージ等の細胞に発現する Toll 様受容体（TLR）により認識されて，恒常的な炎症反応を誘導すると考えられている．

また，消化管の糖質分解酵素のはたらきを阻害して糖類の分解を抑え，体内への吸収を穏やかにすることで食後血糖値の上昇を抑え得ることが知られている．これらのことから，マクロファージが引き起こす炎症抑制や，糖質分解酵素の一種である小腸由来 α-グルコシダーゼの阻害をターゲットにした食品由来の抗メタ



図２　アオモジ葉（蒸煮前）

ボリックシンドローム因子の探索が盛んに行われている．

以上の背景から，アオモジの機能性食品化を目指し，佐賀県産アオモジ葉のマクロファージ誘導による炎症抑制作用及びα-グルコシダーゼ阻害活性について評価した結果を報告する．

2. 実験方法

2.1 試料の調製

佐賀県太良町に自生するアオモジより葉（図 2）を採取し，スチームコンベクションオーブン（(株）エフエムアイ UNOX XV-706ONE）にて 95℃-4 分間蒸煮した後に熱風乾燥機（木原製作所製 SM10S-EH-DPC）にて乾燥温度 45℃で乾燥した．乾燥葉を粉砕機にて粉砕したものをアオモジ葉乾燥粉末とした．

2.2 抽出物の調製

アオモジ葉 80%エタノール抽出物は以下のように調製した．アオモジ葉乾燥粉末を 40 g 秤量し，80%エタノール水溶液を 4 L 添加して約 3 時間攪拌した．撹拌液を 4℃, 10,000×g で 30 分間遠心分離し，上清を 0.45 μm フィルターを使って吸引濾過した後，残渣に 80%エタノール水溶液を 4 L 添加した．その後約 3 時間攪拌し，4℃, 10,000×g で 30 分間遠心分離した後，上清を 0.45 μm フィルターを使って吸引濾過した．その後濾液をエバポレーターで濃縮して凍結乾燥させ，乾燥物重量，すなわち抽出物重量を秤量した．この操作を繰り返して必要量の抽出物を調製し，-30℃で冷凍保存した．

2.3 分画

疎水性吸着剤によるアオモジ葉 80%エタノール抽出物の分画を行った．抽出物を 50 g 秤量し，20%エタノール溶液 10 L に溶解させた後，スチレン-ジビニルベンゼン系合成吸着剤である HP-20（500 cm^3）を充填したカラム（内径 5 cm, 高さ 100 cm）に通液して素通り画分を得た．その後，カラムに吸着した物質を，エタノールの濃度を 20%から 100%まで 20%刻みで段階的に上げてそれぞれ 2 L ずつ通液し，順次溶出させた．さらにアセトンを 2 L 通液し，アセトン溶出画分を得た．

これらの画分はエバポレーターを用いて濃縮して乾固し，表 1 のように番号を振り分け，収率も併せて記載した．

表1　分画物の収率及び細胞への添加濃度

Fr.No.	説明	収率 (%)	細胞への添加濃度（終濃度, μg/mL）			
			濃度1	濃度2	濃度3	濃度4
0	カラムを素通りした分画物	43.6	87.2	43.6	21.8	10.9
1	20% エタノール溶出画分	3.7	7.4	3.7	1.9	0.9
2	40% エタノール溶出画分	10.2	20.5	10.2	5.1	2.6
3	60% エタノール溶出画分	2.6	5.3	2.6	1.3	0.7
4	80% エタノール溶出画分	2.3	4.6	2.3	1.2	0.6
5	100% エタノール溶出画分	6.7	13.3	6.7	3.3	1.7
6	アセトン溶出画分	2.8	5.6	2.8	1.4	0.7

細胞への添加濃度は、分画前の抽出物相当で200 (濃度1), 100 (濃度2) , 50 (濃度3), 25 (濃度4) μg/mLになるよう調整した。

2.4 抗炎症作用

抗炎症作用は既報[6]に準じて 96 well マイクロプレートを用いた細胞試験で評価し，エンドトキシンであるリポ多糖（LPS）の誘導によりマウスマクロファージ様細胞 RAW 264.7 が産生する炎症性物質（一酸化窒素：NO）の産生阻害の程度を抗炎症の指標とした．培地として，Glutamine, Phenol Red, Sodium Pyruvate 含有 D-MEM (High Glucose) 500 mL に Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B を添加し，使用直前に 10%になるように fetal bovine serum（FBS）を加えたものを用いた．培養環境は 37℃，5% CO_2 とした．

NO 産生試験では以下に従って実施した．96 well マイクロプレートに，細胞懸濁液を細胞密度 1.0×10^5 cells/cm^2 になるように 1 well あたり 50 μL ずつ添加し，24 時間培養した．次に，分画物を培地に添加し，24 時間処理後に終濃度 100 ng/mL となるように LPS を添加し，さらに 24 時間処理した．培養終了後，$NaNO_2$ 溶液を標準物質として，Griess 法によって NO 産生量を定量した．分画物の培地への添加濃度は，各画分の収率を抽出物中の存在量とみなし，抽出物の添加濃度として 200, 100, 50 及び 25 μg/mL 相当になるよう調整した（表 1）．Dunnett 法により，各群における LPS 群との有意差を統計解析した．

2.5 α-グルコシダーゼ阻害活性

各画分の α-グルコシターゼ阻害活性は，以下により測定した．アオモジ葉の分画物を秤量し，1 ml のジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させた分画物サンプル溶液を調製した．96 well マイクロプレートに滅菌超純水，リン酸カリウム緩衝液，DMSO，サンプル溶液（10 mg/mL）及び α-グルコシターゼ溶液を加え，well

内をよく混合した．インキュベーターにマイクロプレートを入れて 37℃で 5 min 加熱した．さらに，1.0 mM pNPG 及び 1.0 mM pNPG を 60 µl 加えて well 内をよく混合し，401 nm の吸光度を測定した．サンプル量が足りず，評価できなかった Fr. 6 を除くすべての画分を評価した．ポジティブコントロールとして，食後血糖値の上昇を抑える医療用の α-グルコシダーゼ阻害剤である acarbose を用いた．

2. 6 LC-MS

精密質量に関する情報が得られる Orbitrap 型質量分析装置（Thermo Fisher 製 Q Exactive）を用いた高速液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）により，アオモジ葉抽出物及び分画物の分析を行った．分析条件は表 2 に従った．

3. 結果及び考察

3. 1 抗炎症作用

RAW264.7 の LPS 誘導 NO 産生試験のうち，Fr. 0 から Fr. 3 までの結果を図 3 に，Fr. 4 から Fr. 6 までの結果を図 4 に示す．NO 産生試験では，Fr. 0 及び Fr. 4 の 2 画分が，全ての濃度において LPS 群と比較して有意に NO 産生量を減少させ，Fr.1, 2 及び Fr. 6 は高濃度側で LPS 群と比較して有意に NO 産生量を減少させた．Fr. 3 及び Fr. 5 は NO 産生に影響を認めなかった．

予備的な試験において，熱水抽出物より 80%エタノール抽出物の方が強い NO 産生阻害を示すことを明らかとしており（データ示さず），アオモジ葉抽出物中の活性成分は，やや極性の低い物質と想定していた．本試験において，Fr. 6 に濃度依存的な活性を見出したことから，この画分に比較的低極性の活性成分が存在すると推察される．また，Fr. 0, 1 及び 2 でも活性が確認されており，複数の活性成分が存在していることが示唆された．Fr. 0, 1 及び 2 は Fr. 6 に比べると比活性は低く，Fr. 6 に高い抗炎症特性を持つ化合物が存在することが示唆された．

Fr. 5 の高濃度添加を除き，すべての画分において，相対生細胞数は LPS 群との差異が観察されず，分画物の細胞毒性は概ね低いものと判断された（データ示さず）．

表2　LC-MS条件

HPLC	Vanquish (Thermo Fisher Scientific)
MS	Q Exactive plus (Thermo Fisher Scientific)
Column	Cadenza CDC18, i.d.2 x 250 mm (Imtakt Co.) at 40dC
Mobile phase	A: water/formic acid = 100/0.1 (v/v) B: acetonitrile/formic acid =100/0/1 (v/v) B10% (0 to 2.5 min), B10-100% with linear gradient to 25 min, B100% to 30 min
Flow rate	0.2 mL/min
PDA detection	200-400 nm
MS detection	ion source: ESI, polarity: positive/negative

3. 2 α-グルコシダーゼ阻害活性

分画物の α-グルコシダーゼ阻害活性を表 3 に示した．Fr. 3 に，医薬品である acarbose と同等の α–グルコシターゼ阻害活性があることが認められた．このことから，Fr. 3 に強力な α-グルコシターゼ阻害活性を示す化合物が含まれている可能性が考えられた．

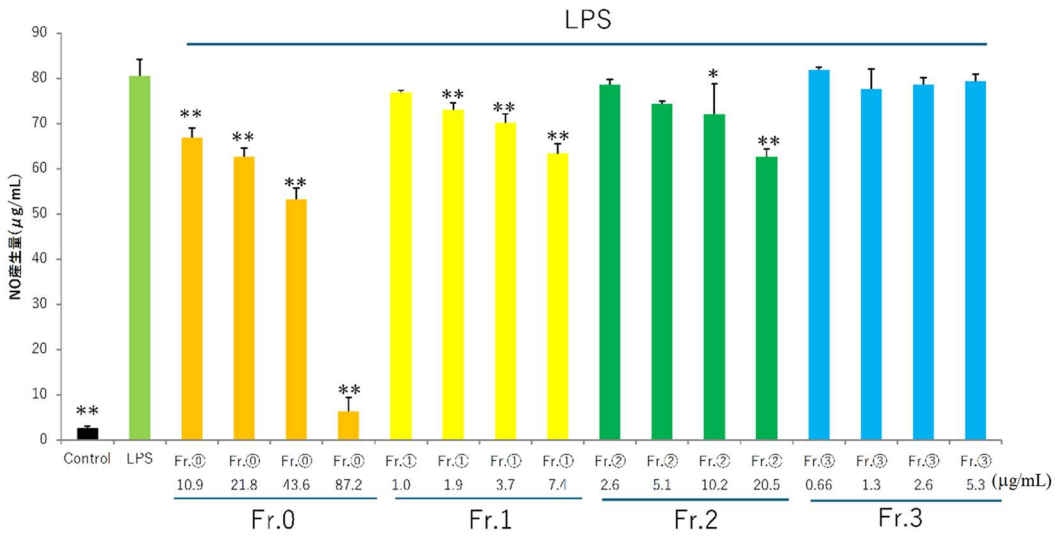


図3　RAW264.7細胞のLPS誘導型NO産生に及ぼす
アオモジ葉抽出物由来画分の影響 (Fr.0～Fr.3)
Data are statistically significant at $P < 0.05$*, 0.01**

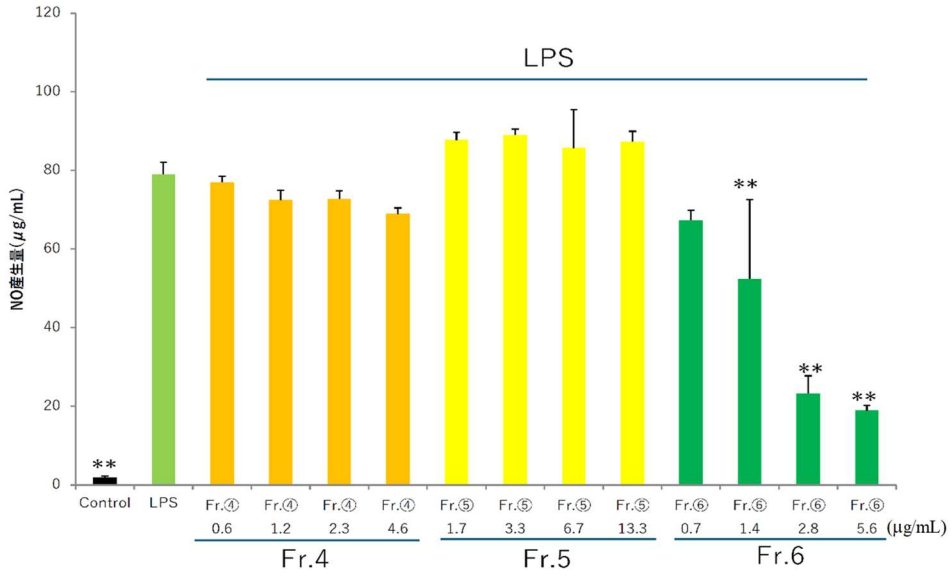


図4　RAW264.7細胞のLPS誘導型NO産生に及ぼす
アオモジ葉抽出物由来画分の影響 (Fr.4～Fr.6)
Data are statistically significant at $P < 0.05$*, 0.01**

表3　アオモジ葉分画物の
α-グルコシダーゼ阻害活性

Fr.No.	酵素阻害活性 (%)
0	10.3
1	No inhibition
2	12.2
3	48.7
4	29.5
5	2.5
acarbose	46.4

3. 3 LC-MS

分画物を用いた in vitro 試験では，Fr.3 と Fr.6 にそれぞれ強い α–グルコシダーゼ阻害活性および抗炎症作用が観察された．そこで，高速液体クロマトグラフィー-質量分析法（LC-MS）を用いて，各画分の成分分析を実施した．

強い α–グルコシダーゼ阻害活性を有する Fr. 3 の LC-MS によるクロマトグラムを図 5 に示した．Fr. 3 の主要なピークは，PDA 検出及び MS のネガティブモードで保持時間 10～20 分の間にまとまって観察された．また，各ピークの MS スペクトルにおける主要な m/z 観察結果から，ピーク成分のモノアイソトピック質量を得た．

この情報から組成式推定を行った結果，Fr.3 には kaempferol 配糖体と推定される多数のピークが検出された．そのうち，afzelin (kaempferol 3-O-rhamnoside) と kaempferitrin (kaempferol 3,7-O-dirhamnoside)は，標準物質とピーク保持時間及び MS/MS スペクトルが一致し，それらの物質の含有が強く支持された．他の未同定ピークについても，rhamnose の質量と一致する neutral loss が観察されたため，Fr. 3 は，kaempferol の rhamnose 配糖体を多く含む画分であることが示唆された．

次に，強い NO 産生阻害作用を有する Fr. 6 の LC-MS によるクロマトグラムを図 6 に示した．Fr. 6 の主要なピークは，MS のポジティブモードで保持時間 24～34 分の間にまとまって観察された．これらのピークのうち，ブランク試料（溶媒のみ）にも同レベルで検出されたものは Fr. 6 由来ではないと判断された．保持時間 24.1 分のピークは，試料においてのみ際立って観察されたため，このピークは試料由来の成分であると判断された．

このピーク（P1 と称する）の MS/MS スペクトルのプロファイルは，図 7 に示すように同一の m/z である alpinetin（7-Hydroxy-5-methoxyflavanone）に酷使していたが，保持時間に隔たりがあった．このことから，P1 は alpinetin ではないが，hydroxyl methoxyl flavanone のような，alpinetin と類似した構造を有する化合物であると推察された．

しかしながら，Fr. 6 においては，MS のネガティブモードでも試料由来と思われる複数のピークが検出されたため（データ示さず），Fr. 6 は多成分の混合物であり，今後さらなる構造解析が必要と思われた．

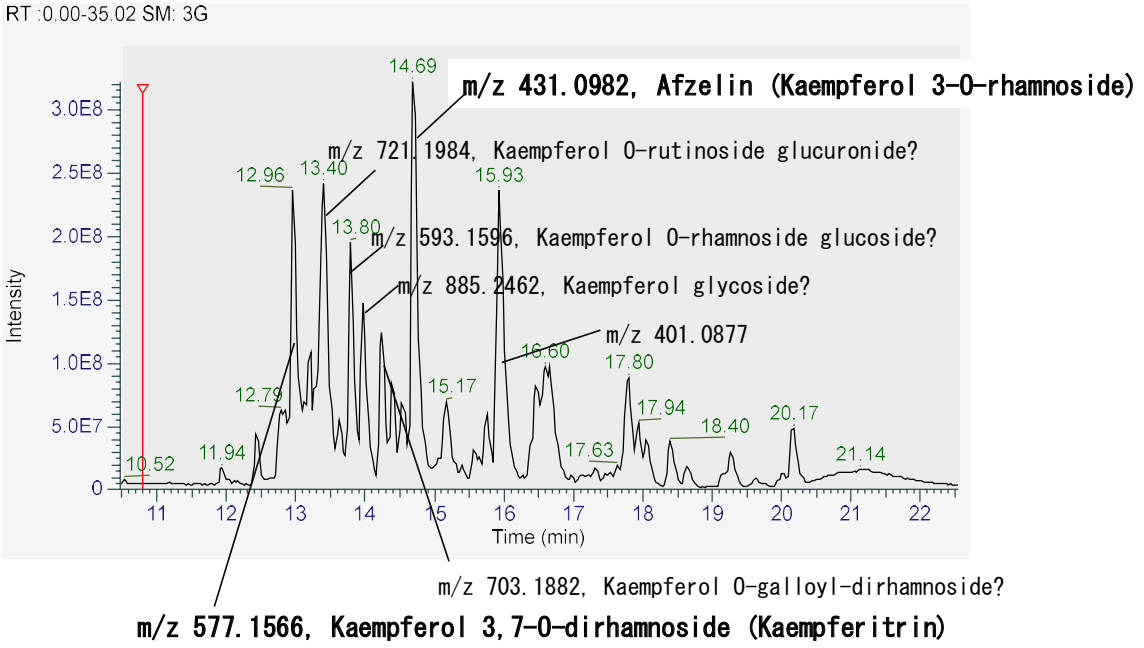


図5　アオモジ葉抽出物由来Fr.3のLC-MSクロマトグラム
（ネガティブイオンモード検出）

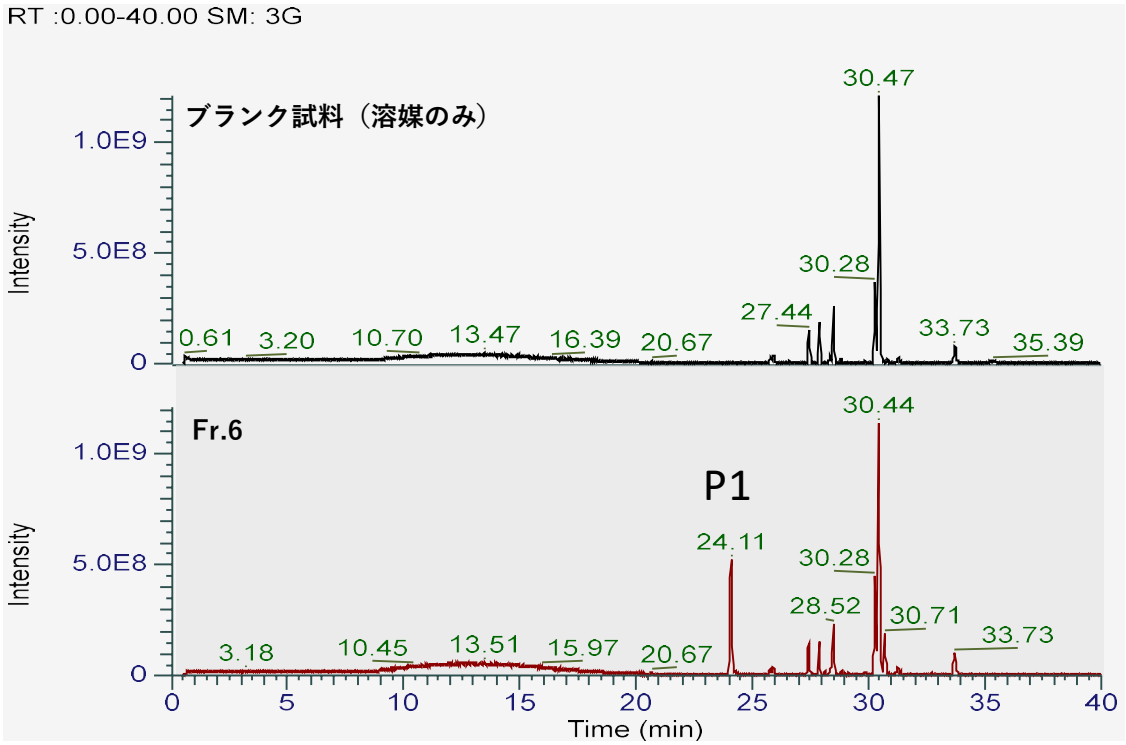


図6　アオモジ葉抽出物由来Fr.6のLC-MSクロマトグラム
（ポジティブイオンモード検出）

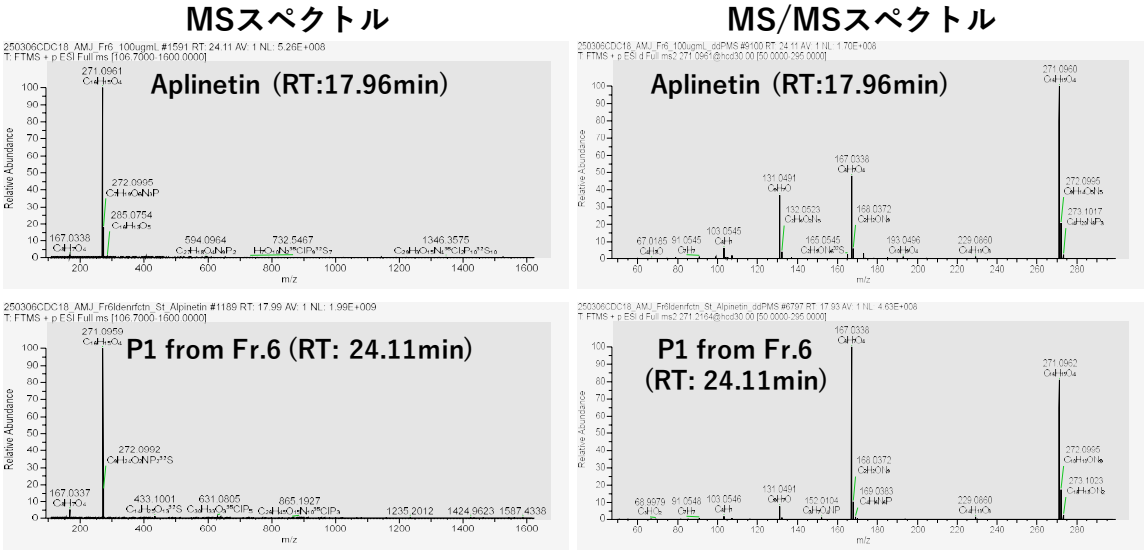


図7　Alpinetin及びFr. 6において検出されたP1のマススペクトル
P1とAlpinetinのMS/MSスペクトルの両方において
m/z 91.05, 103.05, 131.05, 167.03, 229.09が観察される

4. おわりに

アオモジはレモンのような芳香が特徴の植物で，これまで東南アジアを中心に，香辛料や精油など，香りを特徴とする製品に広く用いられている．一方，日本国内において，アオモジ葉については，ハーブティーとして上市されているものの，食品としての活用は限定的であった．近年の研究の進展によりアオモジ葉の生理機能性が明らかとなり，機能性食品の原料としての利用可能性が期待されている．

既報において，アオモジ葉には抗酸化物質であるポリフェノール類が多く含まれ，含水エタノールを用いることによりこれらの成分が多く抽出されることを明らかにしたが，その詳細は不明であった．

本試験によってアオモジ葉抽出物を分画し，その生理活性を in vitro で評価することにより，特定の画分に生理活性が観察され，含有成分に関する情報を得ることができた．これらを以下にまとめる．

1) アオモジ葉抽出物から，α-グルコシダーゼ阻害活性を有する画分を得た．この画分は afzelin や kaempferitrin 等の，kaempferol の rhamnose 配糖体を多く含むことが示唆された．
2) アオモジ葉抽出物から，マクロファージの LPS 誘導型 NO 産生阻害を有する比較的低極性の画分を得た．この画分において，hydroxyl methoxyl flavanone の存在が示唆された．

これらの知見は，アオモジ葉を原料とした機能性食品を開発するうえで有用な情報と考えられる．今後は，本知見を踏まえ，他の研究機関とも連携しながらアオモジの種々の生理機能性や加工条件について検討を進める．また，有効成分の特定化に向けて研究開発を進展させる予定である．

なお，本研究に使用したイオントラップ型高速液体クロマトグラフ質量分析装置は電源立地地域対策交付金により導入した．

参考文献

1) 北村ら，原色日本植物図鑑，保育社, 545 (1979).
2) 古場ら，アオモジ葉の機能性に関する研究，長崎県立大学 令和 3 年度学長裁量研究成果報告書（様式３号）3−3.
3) Asija et al, Study on Hypolipidaemic activity of *Litsea cubeba* leaves in rats, *Chemistry Research Journal*, 7(2):100-115 (2022).
4) Wong et al, The leaves of the seasoning plant *Litsea cubeba* inhibit the NLRP3 inflammasome and ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, *Front. Nutr. Sec. Nutr. Immunology*, 9 (2022).
5) 小川佳宏，眞鍋一郎，大島正伸，竹田潔編，慢性炎症-多様な疾患の基礎病態，実験医学増刊．羊土社 (2011).
6) 柘植圭介，鶴田裕美，佐藤真佐恵，吉村臣史，海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用 (2) -スサビノリにおける抗炎症性脂質の特定-．平成 25 年度佐賀県工業技術センター報告, 19-28 (2014).