

## 有明海干潟に自生する塩生植物の高機能性成分に関する研究

食品工業部  
 柘植 圭介  
 香川大学 農学部  
 東江 栄  
 佐賀大学 農学部  
 早川 啓亮

有明海沿岸に自生する耐塩性植物（塩生植物）における健康維持機能の探索を目的として、アカザ科並びにキク科塩生植物の抗酸化能及び抗炎症作用を検証した。高塩濃度（400 mM）環境下で水耕栽培した塩生植物より含水エタノール抽出物を調製し、抗酸化能の指標である DPPH ラジカル消去活性を測定した。また、マウスマクロファージ由来細胞株 J774A.1 の LPS 刺激により誘導される炎症性因子の産生に及ぼす影響について検討した。DPPH ラジカル消去活性はキク科塩生植物であるフクド及びウラギクにおいて高い活性が認められた。他方、炎症性因子の一種である一酸化窒素（NO）の産生は、アカザ科のハマツナにおいて対照植物（ホウレンソウ）に比して有意に抑制された。酸化ストレスや炎症反応はメタボリックシンドロームの病態形成に重要な役割を果たしており、これらの結果は、メタボリックシンドロームの改善を志向した健康維持食品としての塩生植物の利用可能性を拓くものと考えられた。

### 1. はじめに

有明海干潟のような土壌塩分含量の高い地域には塩生植物とよばれる耐塩性の高い植物が生息している。塩生植物は厳しい環境に適応して有用成分を含む様々な物質を体内に蓄積する。北海道の代表的な塩生植物であるアッケシソウの抽出液は、繊維質、多糖類、コリン、ベタイン及びアルカロイド等の成分を含み、疲労回復や胃腸機能の改善に役立つ可能性が報告されている<sup>1-3)</sup>。さらに最近では、血中脂質の低下作用<sup>4)</sup>や骨髄性白血病の治療における免疫増強作用<sup>5)</sup>、単球の活性化作用<sup>6)</sup>等があることが示されている。有明海干潟には日本の塩生植物 15 種のうち 12 種の生息が確認されている。有明海の代表的な塩生植物であるシチメンソウ、ヒロハマツナ及びホソバノハマアカザ等はアッケシソウと同じアカザ科に属しており同様な効用を有することが期待されるが、抽出液の機能性や有用成分についてはほとんど調べられていない。また実用化を念頭においた栽培法についてもこれまでほとんど検討されていなかった。

他方、生活習慣病をはじめとする種々の疾病の発症が生体内での活性酸素・フリーラジカルの過剰発生と関連し、これらの疾病の発症予防に食品由来の抗酸化物質の摂取が有効であるとの考え方が提示されている<sup>7)</sup>。また、近年、メタボリックシンドロームにおける病態

形成・増悪にマクロファージ・好中球等が引き起こす炎症反応が深く関与していることが明らかとなり<sup>8)</sup>、食品成分の摂取による過剰な炎症反応の抑制が期待されている。

これらをうけ、本研究では、塩生植物の健康維持機能を探索することを目的とし、有明海干潟に生息する塩生植物の抗酸化能及び抗炎症作用について検証した。抗酸化能の指標として、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl（DPPH）ラジカル消去活性<sup>9)</sup>を用いた。また、抗炎症作用の指標として、マウスマクロファージ由来細胞株 J774A.1 によるリポ多糖（LPS）誘導性・炎症性因子の産生抑制を指標とした *in vitro* 系の抗炎症作用を用いて検証した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 塩生植物

選抜した塩生植物 6 種（アカザ科 4 種、キク科 2 種；表 1 及び図 1 参照）は総て有明海干潟に自生する植物であり、NaCl 濃度 400 mM 環境下 28 日間水耕栽培したものを使用した。アカザ科及びキク科の対照植物として栽培植物であるアカザ科ホウレンソウ、ならびにキク科レタスをそれぞれ用いた。

#### 2.2 抽出液の調製

-80°C で保存していた凍結組織 0.5 g に 80% (v/v) エ

表1 供 試 試 料

	学 名	属 名	分 布	食履歴
アカザ科				
シチメンソウ	<i>Suaeda japonica</i>	マツナ属	佐賀県・長崎県・北九州市～大分県北部	有
ハママツナ	<i>Suaeda maritima</i>	マツナ属	本州(宮城県以南), 四国, 九州, 南西諸島	有
ヒロハマツナ	<i>Suaeda malacosperma</i>	ハマアカザ属	本州(兵庫県・岡山県), 九州	
ホソバノハマアカザ	<i>Atriplex gmelinii</i>	マツナ属	北海道～九州	有
キク科				
フクド	<i>Artemisia fukudo</i>	ヨモギ属	本州(宮城県の一部と太平洋の中部地方以西), 四国, 九州	有
ウラギク	<i>Aster tripolium</i>	シオン属	北海道～九州	有

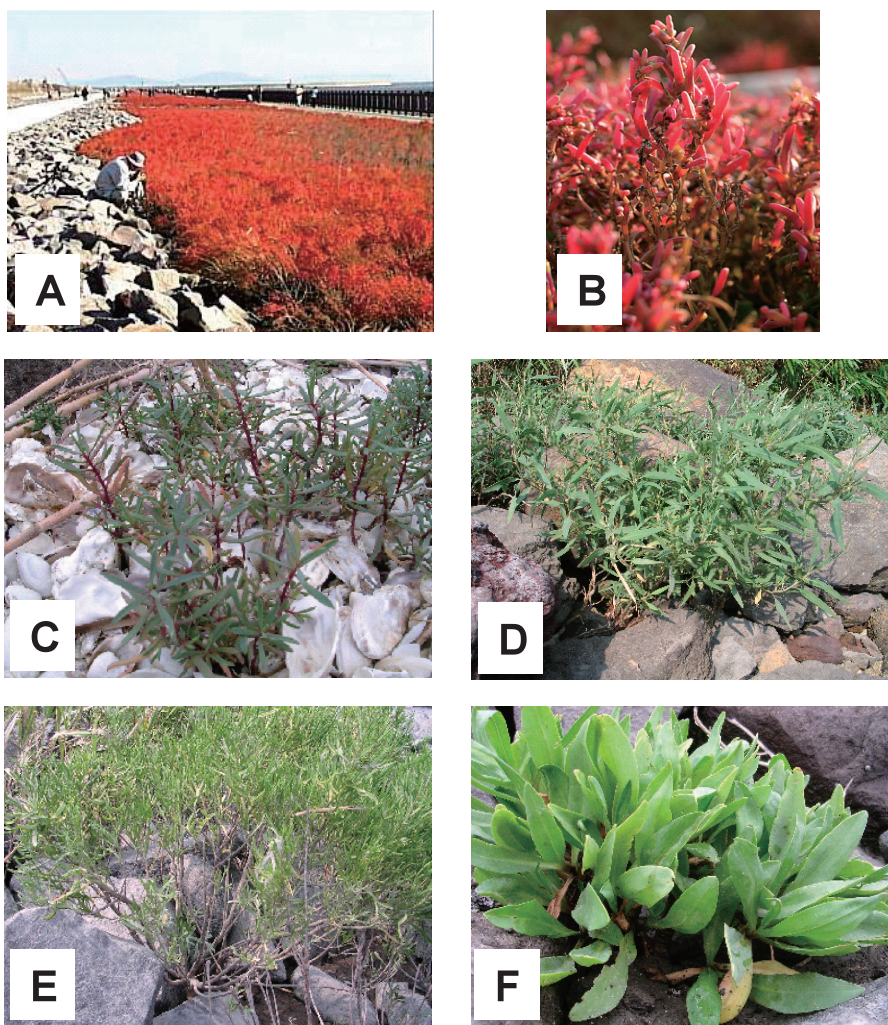


図1 塩生植物写真

- A: シチメンソウ *Suaeda japonica*
- B: ハママツナ *Suaeda maritima*
- C: ヒロハマツナ *Suaeda malacosperma*
- D: ホソバノハマアカザ *Atriplex gmelinii*
- E: フクド *Artemisia fukudo*
- F: ウラギク *Aster tripolium*

タノールを加え磨砕し、3000×g、4°C で 10 分間遠心分離した。得られた上清はミラクロスでろ過し、ろ過液を得た。その後、沈殿に 80%エタノールを加え、ヒスコトンホモジナイザー(日音理科機械製作所、NS-50)で破砕し、3000×g、4°C で 10 分間遠心分離した。沈殿に対して同様の作業を 2 回繰り返した。ろ過液に 80%エタノールを加え、全容が生重の 20 倍量になるように調整して抗酸化活性の測定に供した。また、抽出液の一部を遠心濃縮装置 (Genevac 社製 Myvac ; 平成 21 年度電源立地地域対策交付金補助) により乾固し、乾物重量を測定した後に、5 mg/mL になるよう純水に分散させて-80°C以下で凍結保存し、抗炎症作用の測定に供した。

### 2.3 抗酸化活性

抽出液に DPPH (100 μM, 50% (v/v) エタノール, 50 mM MES バッファー)を加え、室温、暗所で反応させた。試料添加 5 分後に波長 517 nm の吸光度を分光光度計(JASCO, V-630)で測定した。測定は 2 から 3 反復とした。DPPH に試料を含まない溶液 (50%エタノール, 50 mM MES バッファー混合溶液)を加えたものをコントロールとし、DPPH の代わりに 50%エタノール, 50 mM MES バッファーの混合液を試料に加えたものをブランクとした。測定試料、コントロール及びブランクの吸光度の値を、以下の式で用いて、DPPH 消去率を算出した。

$$\text{DPPH 消去率 (\%)} = \{1 - (Aa - Ab) / Ac\} \times 100$$

ここで、Aa : 測定試料の吸光度、Ab : ブランクの吸光度、Ac : コントロールの吸光度

抗酸化活性は DPPH を 50%消去するのに必要な測定試料の生重(IC50, mg FW/ml)で表した。

### 2.4 LPS 誘導性炎症誘発因子の産生抑制活性

マウスマクロファージ由来細胞株 J774A.1 にリポ多糖(LPS)を添加することで誘導される一酸化窒素(NO)及び TNF-α の産生抑制活性を評価した。1% Penicillin/streptomycin, 10% FBS 含有 DMEM 培地で継代培養した J774A.1 (理研バイオリソースより提供、再培養後 3~20 回継代)を  $2 \times 10^5$  cells/mL の細胞密度になるよう培地で希釈し、96 well プレート (Falcon 製 353072)に 200 μL ずつ分注して 16~24 時間培養した。培地を除去し細胞を PBS (-) で洗浄後、培地に 2.5 mg/mL に希釈した試料を 20 μL、培地を 160 μL 添加し、さらに培地に溶解させた LPS (大腸菌 0111:B4 由来、和光純薬製、0.5 μg/mL)を 20 μL 添加して総量 200 μL で培養した (n = 3, 試料の終濃度 250 μg/mL)。培養 6 時間並びに 19 時間後の培養上清を採取し、TNF-α産生量 (培養 6 時間後) 及び NO 産生量 (培養 19 時間後) を

測定した。TNF-α産生量は ELISA 法 (ベイバイオサイエンス社製 Mouse TNF-α定量キット) により求めた。試料含有培地の代わりに培地を添加したものをコントロール、LPS 含有培地の代わりに培地を添加したものをブランクとし、TNF-α産生抑制活性 (%) を以下の式で算出した。

$$\text{TNF-}\alpha\text{産生抑制活性 (\%)} = \{1 - (Sa - Sb) / (Sc - Sb)\} \times 100$$

ここで、Sa : 試料添加培地における TNF-α濃度、Sb : ブランクの TNF-α濃度、Sc : コントロールの TNF-α濃度

他方、NO 産生量は、Griess 法により測定した培養上清中の亜硝酸イオン (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 濃度より算出した。即ち、培養上清 125 μL を 96 well マイクロプレートに採取し、Griess 試薬を 125 μL 添加して速やかに攪拌し、10 分室温放置後マイクロプレートリーダー (Molecular devices 製 M5 ; 平成 18 年度電源立地地域対策交付金補助) にて波長 500 nm と 650 nm における吸光度差 (ΔA) を測定した。培地に NO<sub>2</sub><sup>-</sup>を溶解させたものを標準液として検量曲線を作成し、培地中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度を求めた。試料含有培地の代わりに培地を添加したものをコントロール、LPS 含有培地の代わりに培地を添加したものをブランクとし、NO 産生抑制活性 (%) を以下の式で算出した。

$$\text{NO 産生抑制活性 (\%)} = \{1 - (\Delta Aa - \Delta Ab) / (\Delta Ac - \Delta Ab)\} \times 100$$

ここで、ΔAa : 試料添加培地の吸光度差、ΔAb : ブランクの吸光度差、ΔAc : コントロールの吸光度差

それぞれの科の対照植物との活性の差を Dunnett の多重比較により検定した。

## 3. 結果

### 3.1 アカザ科塩生植物

表 2 にアカザ科塩生植物における抽出物の収率、抗酸化活性 (DPPH ラジカル消去活性) 及び *in vitro* 抗炎症作用を示す。抽出物重量基準で比較した場合、抗酸化活性が最も高い植物はヒロハマツナであった。他方、NO 産生抑制活性が最も高い植物はハマツナであり、対照植物 (ホウレンソウ) に比して有意に高値であった。もう一つの抗炎症作用の指標である TNF-α産生抑制活性は、対照植物を含めた総ての植物で認められなかった。

### 3.2 キク科塩生植物

表 3 にキク科塩生植物における抽出物の収率、抗酸化活性 (DPPH ラジカル消去活性) 及び *in vitro* 抗炎症作用を示す。対照植物のレタスに比してウラギク並びにフクドの抗酸化活性は格段に高く、特にフクドがより高い値であった。抗酸化活性は、アカザ科塩生植物



に比べて高くなる傾向が認められた。他方、NO 産生抑制作用はウラギクの方が高く、対照植物に比して有意に高い値であった。TNF- $\alpha$ 産生抑制活性は、対照植物を含めた総ての植物で認められなかった。

#### 4. おわりに

生体内における酸化ストレスの概念は、これまで酸化ストレスの要因である活性酸素種 (ROS) や関連因子による生体分子の酸化的損傷を介する細胞機能の障害と毒性発現という論点から議論されてきた。例えば、ROS により脂質過酸化反応が誘発され、細胞の生体膜機能が損なわれたり、動脈硬化の病巣形成を促したりすること、高血糖による酸化ストレス亢進が合併症のみならず、脂肪組織のインスリン抵抗性やアディポサイトカインの産生異常を惹起する<sup>10)</sup>ことが明らかとなっており、酸化ストレスがメタボリックシンドロームを中心とした生活習慣病の病態形成に普遍的に関与することが認められている。このような観点から、抗酸化物質により ROS の酸化的毒性を抑える効果が期待され、食事由来抗酸化物質の摂取と酸化ストレスの緩和作用との関係が盛んに研究されてきた。他方、近年 ROS が、生体内の他のシグナル伝達物質と同様に、特異的なシグナル経路を活性化して、細胞保護、細胞の分化・増殖、細胞死の制御などを司る<sup>11)</sup>ことが明らかとなっている。酸化ストレスを、ROS による生理的

シグナル伝達経路の過剰発現や制御異常を介した病態から捉える考え方も提示されている。

本研究の結果、抗酸化レベルにおいては、アカザ科よりもキク科の塩生植物であるフクドやウラギクに格段に強い活性が認められることが明らかとなった。他方、LPS 刺激による J774A.1 細胞の NO 産生に対しては、強い抗酸化活性が認められなかったハマツナにおいて最も強い産生抑制が認められ、抗酸化レベルと NO 産生抑制との間に明確な相関関係は見られなかった。マクロファージは LPS や IFN $\gamma$ などの因子により活性化され、NO や過酸化水素、炎症性サイトカインを産生し、生体防衛的にはたらく。NO の産生は一酸化窒素合成酵素 (NOS) に触媒され、マクロファージに発現しているのはアイソザイムである iNOS である。これらの因子が過剰に亢進した状況は炎症反応に相当し、マクロファージからの産生因子がメディエーターとなって炎症反応をさらに増幅させ、病態形成を促す。今回の結果は、ハマツナをはじめとする一部の塩生植物に、マクロファージが主体となる炎症性メディエーターの産生を抑え、炎症反応の進展を防止する作用があることが示唆するものである。上述のように炎症反応はメタボリックシンドロームの病態形成に重要な役割を果たしており、メタボリックシンドロームの改善を志向した健康維持食品としての塩生植物の利用可能性を拓くものと考えられる。ただし、その有効性に

表 2 アカザ科塩生植物の抗酸化活性及び *in vitro* 抗炎症作用

	抽出物の収率 %/FW	DPPHラジカル消去活性 (IC50, ug/mL)		<i>in vitro</i> 抗炎症作用 <sup>a</sup>	
		生重量基準	抽出物重量基準	NO産生抑制 (%)	TNF- $\alpha$ 産生抑制 (%)
シチメンソウ	5.04 $\pm$ 0.57	6430 $\pm$ 108	324 $\pm$ 5	35.6 $\pm$ 8.8	-17.4 $\pm$ 2.9
ハマツナ	4.51 $\pm$ 0.37	5723 $\pm$ 393	258 $\pm$ 18	65.0 $\pm$ 2.1 **	-8.3 $\pm$ 7.4
ヒロハマツナ	7.91 <sup>b</sup>	2266 $\pm$ 247	179 $\pm$ 20	34.3 $\pm$ 3.1	-21.4 $\pm$ 7.9
ホソバナハマアカザ	5.49 $\pm$ 1.48	3721 $\pm$ 129	204 $\pm$ 7	47.8 $\pm$ 9.9	-1.8 $\pm$ 7.0
対照植物：ホウレンソウ	2.93 $\pm$ 0.31	8609 $\pm$ 502	252 $\pm$ 15	37.8 $\pm$ 5.0	-3.9 $\pm$ 11.6

<sup>a</sup>各種抽出液を終濃度250 $\mu$ g/mLになるよう添加し、10分間前培養した。その後LPSを終濃度50ng/mLになるよう添加し、培養した。培養6時間後のTNF- $\alpha$ 濃度並びに培養19時間後のNO濃度をそれぞれ定量した。値は平均値 $\pm$ SD。

<sup>b</sup>一点のみで測定。

\*\*対照植物(ホウレンソウ)に比して有意差有り(Dunnet,  $p < 0.01$ )。

表 3 キク科塩性植物の抗酸化活性及び *in vitro* 抗炎症作用

	抽出物の収率 %/FW	DPPHラジカル消去活性 (IC50, ug/mL)		<i>in vitro</i> 抗炎症作用 <sup>a</sup>	
		生重量基準	抽出物固形重量基準	NO産生抑制 (%)	TNF- $\alpha$ 産生抑制 (%)
フクド	5.15 $\pm$ 0.12	510 $\pm$ 48	26 $\pm$ 2	38.1 $\pm$ 4.9 *	-9.8 $\pm$ 10.4
ウラギク	5.69 $\pm$ 0.28	1205 $\pm$ 33	69 $\pm$ 2	48.3 $\pm$ 6.4 **	1.5 $\pm$ 4.2
対照植物：レタス	2.82 $\pm$ 0.83	30144 $\pm$ 14090	852 $\pm$ 398	25.3 $\pm$ 2.6	-16.8 $\pm$ 12.7

<sup>a</sup>各種抽出液を終濃度250 $\mu$ g/mLになるよう添加し、10分間前培養した。その後LPSを終濃度50ng/mLになるよう添加し、培養した。培養6時間後のTNF- $\alpha$ 濃度並びに培養19時間後のNO濃度をそれぞれ定量した。値は平均値 $\pm$ SD。

<sup>b</sup>一点のみで測定。

\*\*対照植物(レタス)に比して有意差有り(Dunnet,  $p < 0.01$ )。

については、関与成分の体内利用性や作用量等の検証も含めた上で議論しなければならない。今後、成分の特定や作用機序の明確化も含めた検討が必要である。

塩生植物における 80%エタノール抽出物の収率が、アカザ科、キク科ともに対照植物に比して 1.5~2 倍程度高いのは興味深い。この「栽培型」に対する「野生型」の優性が、塩生植物というカテゴリーの生来の資質によるものか、それとも高塩環境下で栽培されたことによる植物代謝上の何らかの変化が引き起こした結果なのか、それともたまたま今回選抜した植物が、栽培植物に比して関与成分の量が多かったのか、その原因を本結果のみで特定することはできない。この差の要因を明確にすることが、機能性成分や薬理成分の量を高めた植物の育種や栽培技術を開発する上で役立つものと期待される。

本研究に用いた遠心濃縮装置及びマイクロプレートリーダーは電源立地地域対策交付金の補助によるものである。また、培養細胞を用いた *in vitro* 抗炎症作用の評価法については、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所 石川祐子先生に実験手法の指導を賜った。記して深謝の意を表します。

#### 参考文献

- 1) Park, D.I.: Methods utilizing pharmacological activities of *Salicornia herbacea*. Korea Patent 2000-0074066 (2000).
- 2) Shin, K.S., Boo, H.O., Jeon, M.W., and Ko, J.Y.: Chemical constituents of native plant, *Salicornia herbacea*. *Korean Journal of Plant Research*, **15**, 216–220 (2002).
- 3) Park, S.-H. and Kim, K.-S.: Isolation and identification of antioxidant flavonoids from *Salicornia herbacea* L. *Journal of Korean Society of Applied Biological Chemistry*, **47**, 120–123 (2004).
- 4) Jo, C.J., Ahn, J.H., Chon, S.M., Lee, K.S., Bae, T.J., and Kang, D.S.: Studies on pharmacological effects of glasswort (*Salicornia herbacea* L.). *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*, **10**, 93–99 (2002).
- 5) Im, S.A., Kim, K., and Lee, C.K.: Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea*. *International Immunopharmacology*, **6**, 1451–1458 (2006).
- 6) Im S., Lee Y., Lee Y., Oh S., Gerelchuluun T., Kim B., Kim Y., Yun Y., Song S., and Lee C.: Synergistic activation of monocytes by polysaccharides isolated from *Salicornia herbacea* and interferon- $\gamma$ . *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, 365–370 (2007).
- 7) 沖智之：食品機能性評価マニュアル集 第II集。食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編，日本食品科学工学会，71-78 (2008)。
- 8) Trayhurm, P. and Wood I. S.: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.*, **92**(3), 347-355 (2004).
- 9) 須田郁夫：食品機能研究法。篠原和毅，鈴木健夫，上野川修一編，光琳，218-223 (2000)。
- 10) 西川武志，荒木栄一：糖尿病合併症および糖尿病発症における酸化ストレスの意義。実験医学，**27**(15)，2459-2461 (2009)。
- 11) 赤池孝章：活性酸素のシグナル伝達機能。実験医学，**27**(15)，2320-2327 (2009)。