

機能的食品としての食用菊の利用法開発

沼澤 聡 明, 伊 藤 健, 笠 原 義 正

Studies of Flower Petals of Chrysanthemum on Antibiotic Activity against *Helicobacter pylori*

by Toshiaki NUMAZAWA, Takeshi ITO and Yoshimasa KASAHARA

食用菊（モッテノホカ）のメタノールエキスを抗ピロリ菌活性を指標として分画し、種々の活性画分を得た。これらの画分についてGC/MSによる分析を行った結果、スチグマステロール、 β -シトステロール等の植物性ステロールが含まれていることが分かった。これらの標準品を用いて抗ピロリ菌活性を測定した結果、活性が確認された。さらに他の画分にも活性の強い物質の存在が示唆された。また、モッテノホカ、寿、岩風のポリフェノール画分にも抗ピロリ菌活性があることを明らかにした。

Key Words : 食用菊, モッテノホカ, 抗ピロリ菌活性, 食品機能性

I はじめに

山形県の食用菊の生産量は日本一であり、県内のほとんどの地域で栽培されている。しかし、他の作物と比較すると決して生産量が多いとはいえず、県の主力農産物とは言い難いのが現状である。

一方、高齢社会の急速な進展、生活習慣病の増加により食品の機能性に対する関心が大きくなっている。我々は、食品の新規な機能性や食用菊ではまだ知られていない機能性を本県独自の資源である県産食材で明らかにするために種々の検討を行い、食用菊の有効性を見出した。これまでに発癌プロモーター抑制作用^{1),2)}、二段階発癌実験による癌予防作用³⁾、それらの活性物質の分離構造決定（ファラジオール、ヘリアントリオール）^{4),5)}、各種ヒト癌細胞に対する抑制作用（アルニジオール）⁶⁾、活性酵素消去作用⁷⁾などを検討し、食用菊の生物活性について明らかにしてきた。このように科学的根拠をもとに食用菊の機能性を解明し健康増進に寄与すること、さらに付加価値をつけることで生産や消費の拡大につなげることは食用菊の生産県として意義のあることと考える。

今回は、抗ピロリ菌作用の可能性を見出したのでこれについて検討した。食用菊のエキスを抗ピロリ菌活性を指標に分画し、物質の分離、精製、特定を試みたので報告する。

II 実験方法

1 材料及び試薬

- 1) 食用菊のモッテノホカは2006年の山形市場品を用いた。
- 2) 食用菊の寿及び岩風（黄菊）のポリフェノール画分は山形県工業技術センターで調製したものをを用いた。
- 3) γ -オリザノール、 α -アミリン、 β -アミリン、ルベオール、シクロアルテノール、フリーデリンは日本大学理工学部教授秋久俊博先生より供与いただいたものをを用いた。スチグマステロール標準品はACROSS ORGANICS社製、 β -シトステロール標準品はタマ生化学工業株式会社製、アモキシシリンはFluka社製を用いた。メタノール、エタノール、n-ヘキサン、酢酸エチル、アセトンは全て市販の特級品を用いた。

2 エキスの調製

- 1) モッテノホカメタノールエキス：モッテノホカの花弁4.9kg（湿重量）を2倍量のメタノールに2週間浸漬し、ろ液を減圧濃縮してメタノールエキスを得た（収量6.6%）。
- 2) モッテノホカポリフェノール画分：モッテノホカの花弁2.1kg（湿重量）を2倍量のエタノールに2週間浸漬し、ろ液を減圧濃縮してエタノールエキスを得た（収量6.7%）。得られたエキスを水で溶解し、DIAION HP-20（三菱化学株式会社製）カラムクロマトグラフィーに付し、水-エタノール-

アセトニトリルで流下させ、80%エタノールにより溶出した画分をポリフェノール画分とした。

3 装置

ガスクロマトグラフ/質量分析装置(GC/MS) (株島津製作所社製GC-17A (GC), QP-5000 (MS), AOC-17 (オートサンプラー)

GC/MS条件 使用カラム：DB-1 (0.32 mm i.d.×30 m, J&W Scientific), カラム入口圧：52kPa, キャリヤーガス流量：21.4ml/min, 注入口温度：320℃, カラム温度：60℃→10℃/min→300℃ (15min), イオン源温度：320℃, イオン化電圧：1.3kV, 注入量：1.0μl, 試料注入方式：スプリットレス, 測定モード：EISキャン法 (m/z 80~600)

4 モッテノホカメタノールエキスの分画

モッテノホカメタノールエキスを水で溶解し、酢酸エチルを加え、酢酸エチル層、水層に分配した。酢酸エチル層をシリカゲル (Silica gel 60, Merck(株)製) カラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (10:1) から (1:2) までのグラジェントにより溶出した。1フラクションは30mLとし、約90フラクションを分取した。これらのフラクションについて各々薄層クロマトグラフィー (TLC) (薄層：Silica gel 60 F254, Merck(株)製, 展開溶媒：ヘキサン-酢酸エチル (3:1), 展開後50%硫酸を噴霧し、加熱して発色) を行い、そのパターンを指標に類似のスポットが含まれるフラクションをまとめた (Fr.1~12) (Fig.1)。ここで得られたFr.3, Fr.5及びFr.9についてさらに精製するため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を繰り返し、それぞれFr.3-3-1~3-3-7, Fr.5-2-1~5-2-4及びFr.9-1~9-5を得た (Fig.1)。

5 *Helicobacter pylori* に対する抗菌活性(ピロリ菌発育阻止作用)

H. pylori は東京大学医科学研究所から分与を受けた

IID3023株を使用した。*H. pylori*の培養は15%馬脱繊維血液加ミューラヒントン寒天培地に本菌を接種し、角型ジャー内で微好気下37℃で3~5日間培養した。ペーパーディスク (ADVANTEC(株)製, φ10mm) にモッテノホカの各フラクション, 各種材料及びステロール標準品等を染みこませ37℃で一晩乾燥した。*H. pylori*調製液を綿棒で一様に塗布したミューラヒントン寒天培地上にこれらのディスクを置き、前述の条件で3~5日間培養し、阻止円の直径を測定した。

III 実験結果及び考察

1 抗ピロリ菌活性を指標にした分画

モッテノホカメタノールエキスに抗ピロリ菌活性のあることを確認し、さらにこのエキスを酢酸エチルと水で分配したのについて活性を検討した。その結果、酢酸エチル層はメタノールエキスと比較して強い活性が見られたが、水層には見られなかった (Table 1)。活性はほとんど酢酸エチル層に移行することが確認されたので、酢

Table 1. *H. pylori* 発育阻止作用 アッセイ結果 (I)

サンプル	濃度 (mg/disk.)	ピロリ菌 (阻止円: mm)
モッテノホカ	メタノールエキス	5.0 13.9
	酢酸エチル層	5.0 21.4
		2.5 15.2
	水層	5.0 0.0
	酢酸エチル層 Fr. 1	2.5 19.0
	酢酸エチル層 Fr. 2	2.5 15.7
	酢酸エチル層 Fr. 3	2.5 20.1
	酢酸エチル層 Fr. 4	2.5 21.8
	酢酸エチル層 Fr. 5	2.5 23.3
	酢酸エチル層 Fr. 6	2.5 25.0
	酢酸エチル層 Fr. 7	2.5 22.4
	酢酸エチル層 Fr. 8	2.5 25.8
	酢酸エチル層 Fr. 9	2.5 27.9
	酢酸エチル層 Fr.10	2.5 29.0
	酢酸エチル層 Fr.11	2.5 33.3
	酢酸エチル層 Fr.12	2.5 30.3

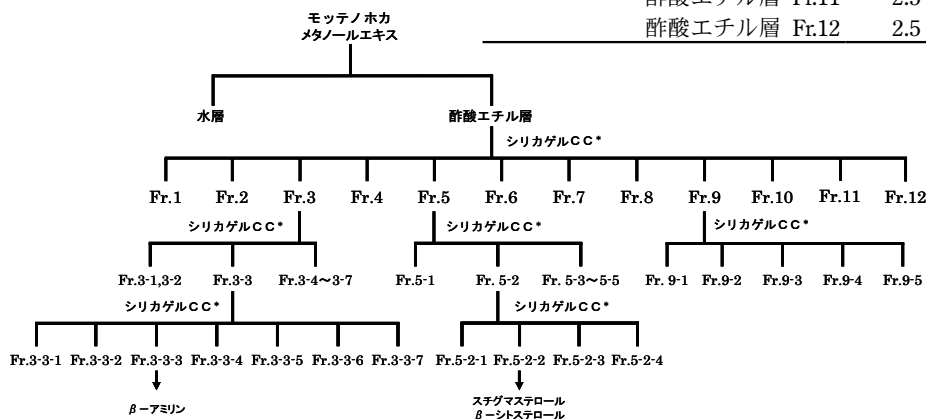


Fig.1. モッテノホカメタノールエキス分画図

*シリカゲルCC (カラムクロマトグラフィー)：ヘキサン-酢酸エチル (50:1~1:2)

Table 2. *H. pylori* 発育阻止作用 アッセイ結果 (II)

サンプル	濃度 (mg/disk.) ^{a)}	ピロリ菌 (阻止円: mm)	
スチグマステロール	2.5	12.3	
β-シトステロール	2.5	16.8	
モッテノホカ	メタノールエキス	5.0	21.4
	水層	5.0	0.0
	酢酸エチル層	5.0	28.8
		2.5	21.2
	ポリフェノール画分	5.0	41.8
		2.5	28.9
寿	ポリフェノール画分	5.0	30.4
		2.5	20.2
岩風	ポリフェノール画分	5.0	31.3
		2.5	24.4
アモキシシリン (抗生物質)	0.025	60.7	

a) アモキシシリン(抗生物質)の濃度のみ単位は
(μ g/disk.)

酸エチル層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、活性物質が含まれるフラクションの探索を行った。すなわち、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分取した各フラクションをTLCパターンを指標に12フラクションにまとめ、各々について活性を検討した。その結果、Table 1に示したように抗ピロリ菌活性は全てのフラクションにあるものの、Fr.8~12の比較的極性の高いフラクションの方に、より移行していると考えられた。食用菊の既知成分を考えると精油成分やテルペン類、ステロール類、直鎖状の炭化水素などが示唆される。Fr.8~12のうち比較的収量の多かったFr.9についてさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、TLCを指標にFr.9-1~9-5に分画したが、良い分離が得られず、活性物質を単離、特定するには至らなかった。

次に、Fr.1~7についても抗ピロリ菌活性が認められるので、収量の多いフラクションについて検討することにした。Fr.3については収量が多く白色結晶も見られたので精製が進んでいると考え、さらに分画を進めた。すなわち、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付して、ヘキサン-酢酸エチル系の溶媒で溶出し、これを繰り返してFr.3-3-1~3-3-7の7フラクションに分けた。これらのフラクションについてTLCを用いて精製を確認し、ほぼ1スポットであったFr.3-3-3をGC/MSで分析した。その結果、保持時間(Rt) 37.8分と38.3分に2つのピークが認められ、ピーク面積からRt38.3分の物質が主成分と考えられた。そこでこのピークの質量分析を行ったところ、分子量が m/z 426であることが分かった。さらに m/z 218, 203, 189, 175, 161のフラグメントイオンが認められた。分子量426はステロールである可能性が高いため、いくつかのステロールの標準品と比較した。その中

で、β-アミリンはRt38.3分で、分子量は426であった。またフラグメントイオンパターンもRt38.3分の主成分とよい一致を示した。したがって、このRt38.3分のピークはβ-アミリンであると同定した。Rt37.8分のマイナーなピークについては、GC/MSで分子量281と推定されるが、この成分の同定には至らなかった。Fr.5についても同様に白色結晶が見られたので、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、Fr.5-2-1~5-2-4の4フラクションにまとめた。TLCでほぼ1スポットであることを確認したFr.5-2-2をGC/MSで分析した。その結果、Rt 36.6分, 37.0分, 37.7分, 37.8分に4つのピークが認められ、ピーク面積からRt37.0分と37.7分の2物質が主成分と考えられた。そこでこれらのピークの質量分析を行ったところ、分子量がそれぞれ m/z 412と414であることが分かった。さらにRt37.0分で分子量412の物質のフラグメントイオンは m/z 351, 300, 271, 255, 213であった。分子量412はスチグマステロールである可能性が高いため標準品と比較したところ、Rt36.9分, 分子量は412であり、フラグメントイオンパターンもよい一致を示した。したがって、このRt37.0分のピークはスチグマステロールであると同定した。一方、Rt37.7分で分子量414の物質のフラグメントイオンは m/z 396, 381, 329, 303, 273であった。分子量414はβ-シトステロールである可能性が高いため標準品と比較したところ、Rt37.7分, 分子量は414であり、フラグメントイオンパターンもよい一致を示した。したがって、Rt37.7分のピークはβ-シトステロールと同定した。Rt36.6分のピークについては、GC/MSで分子量400, Rt37.7分のピークは分子量412と推定されるが、これらの物質の同定には至らなかった。

2 各種材料の抗ピロリ菌活性

GC/MSでスチグマステロール、β-シトステロールの存在が確認されたので、これらの標準品を用いて抗ピロリ菌活性を検討したが、活性はあるもののその作用は酢酸エチル層と比べ弱く、他に活性成分の存在が考えられる (Table 2)。

緑茶などのポリフェノールに抗ピロリ菌作用があることが報告されているので⁸⁾、今回実験に供した画分とは別に、モッテノホカのポリフェノール画分を作製し活性を見たところ、強い活性が認められた。また、工業技術センターから入手した寿、岩風のポリフェノール画分についても比較的強い活性が見られた (Table 2)。

以上これまでの検討の範囲では、食用菊の抗ピロリ菌活性をすべて説明できるような主要な物質は得られていないと考える。さらにこれらの検討を深め、機能性の解明を続けなければならない。

文 献

- 1) Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K., Tamura, T., Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, 43, 1255-1260(1996).
- 2) Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kasahara, Y., Kimura, Y., Yamanouchi, S., Kumaki, K., Tamura, T., Takido, Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of Compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *M., Biol. Pharm.Bull.*, 19, 1329-1331(1996).
- 3) Yasukawa, K., Akihisa, T., Oinuma, H., Kaminaga, T., Kanno, H., Kasahara, Y., Tamura, T., Kumaki, K., Yamanouchi, S., Takido, M., Inhibitory effect of taraxastane-type triterpenes on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology*, 53, 341-344(1996).
- 4) Yasukawa, K., Akihisa, T., Kasahara, Y., Ukiya, M., Kumaki, K., Tamura, T., Yamanouchi, S., Takido, M., Inhibitory effect of heliantriol C; a component of edible *Chrysanthemum*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Phytomedicine*, 5, 215-218 (1998).
- 5) Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., Takido, M., Constituents of compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible *Chrysanthemum* flower extract and their anti-inflammatory effects. *J.Agric.Food Chem.*, 49, 3187-3197(2001).
- 6) Ukiya, M., Akihisa, T., Tokuda, H., Suzuki, H., Mukainaka, T., Ichiishi, E., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Nishino, H., Constituents of compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible *Chrysanthemum* flowers. *Cancer Letters*, 177, 7-12(2002).
- 7) Hiramatsu, M., Xu, Y., Kasahara, Y., Komatsu, M., Wang, H., Scavenging of free radicals and inhibition of lipid peroxidation by extracts of *Chrysanthemum* petals. *Research Communications in Pharmacology and Toxicology*, 3, 147-154(1998).
- 8) Takabayashi, F., Harada, N., Effect of green tea catechins on *Helicobacter pylori* infection. *Foods & Food Ingred J Jpn*, vol.209, No.5, 391-396(2004).