短　報

機能性食品としての食用菊の利用法開発（第２報）

沼澤聡明，伊藤健，笠原義正

Studies of Flower Petals of *Chrysanthemum spp.* on Antibiotic Activity against *Helicobacter pylori*（Ⅱ）

by Toshiaki NUMAZAWA, Takeshi ITO and Yoshimasa KASAHARA

我々はすでに，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にして分画し，種々の活性画分を得ている．これらの画分をさらに精製したフラクションについて GC/MS で分析した結果，新たにルペオール，タラキサステロール，α－アミリン等の植物性ステロールの存在が考えられた．また，モッテノホカのポリフェノール画分を作製し，抗ピロリ菌活性を指標にして分画し，活性画分を得た．

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

我々は，すでに多くの種類の県産農産物について種々の機能性研究を行い，興味ある結果を得ている．今回は，前報[1]に引き続き，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にして分画し，物質の分離，精製，特定を試みた．さらに，モッテノホカのポリフェノール画分についても活性が認められたので，こちらについても活性物質の分取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）α－アミリン，β－アミリン，ルペオールは日本大学理工学部秋久俊博教授より供与いただいたものを用いた．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㈱社製，緑茶由来ポリフェノールはMP Biomedicals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 4.9 kg（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（収率 6.6 %）．

2）モッテノホカエタノールエキス：モッテノホカの花弁 2.1 kg（湿重量）を２倍量の 80 %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（収率 6.7 %）．

３　装　置

ガスクロマトグラフ/質量分析装置（GC/MS）　㈱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：52 kPa，キャリアーガス流量：21.4 mL/min.，注入口温度：320 ℃，カラム温度：60 ℃ → 10 ℃/min. → 300 ℃（15 min.），イオン源温度：320 ℃，イオン化電圧：1.3 keV，注入量：1.0 μL，試料注入方式：スプリットレス，測定モード：EI スキャン法（*m/z* 80～600）

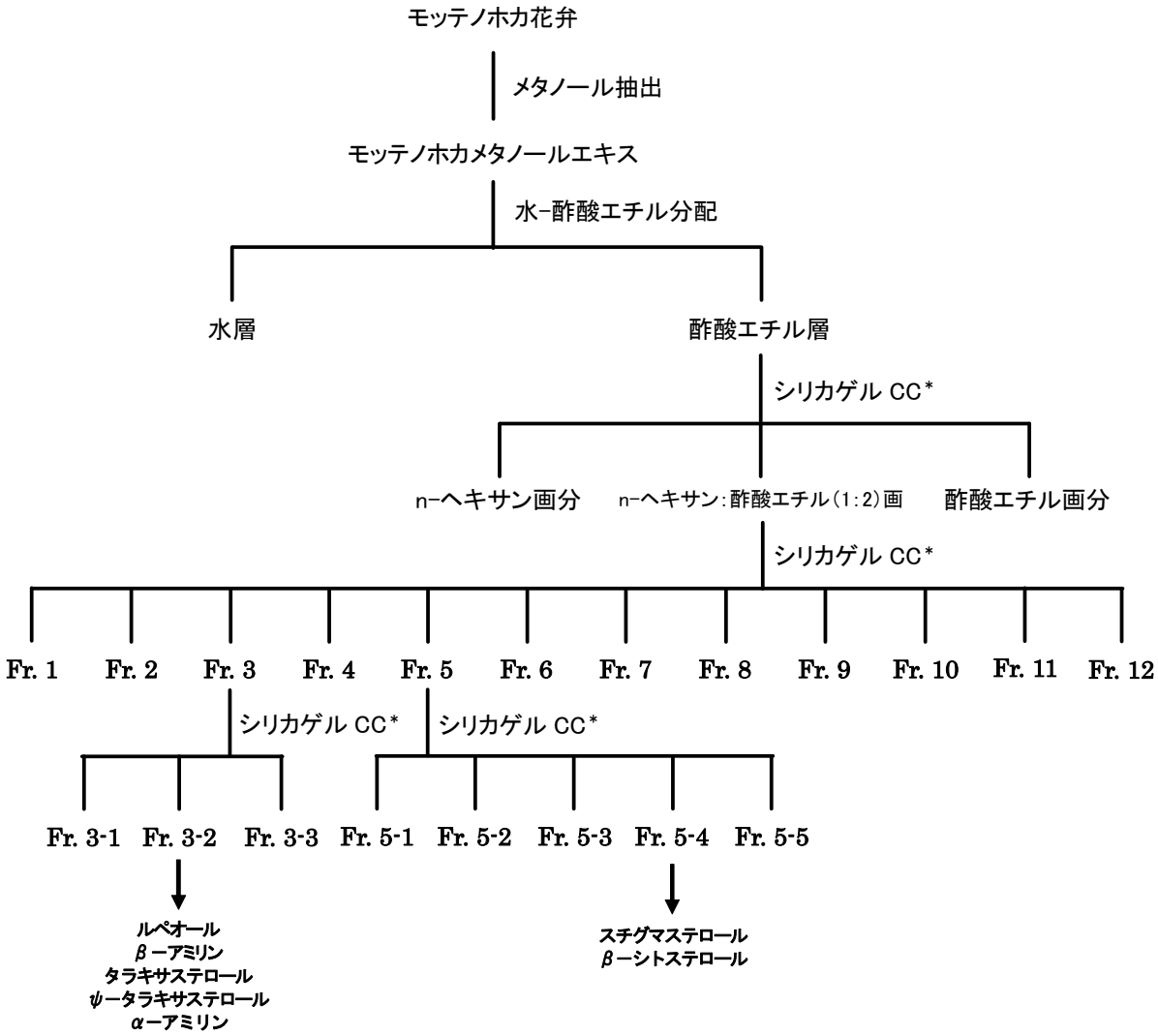
高速液体クロマトグラフ（HPLC）　日本分光㈱社製 Gulliver 900 シリーズ

HPLC 条件　分析カラム：Mightysil RP-18 GP aqua（4.6 mm i.d.×150 mm），5 μm，測定波長：235 nm，カラム温度：40 ℃，移動相：A：5 %アセトニトリル 0.05 %リン酸溶液，B：50 %アセトニトリル 0.05 %

リン酸溶液，グラジェント：80 %A（0 min.）→const.（5 min.）→20 %A（60 min.）→10 %A（10 min.）→const.（5 min.），流速：0.8 mL/min.，注入量：10 μL

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，酢酸エチル層と水層に分配した．酢酸エチル層をシリカゲル（Silica gel 60，Merck㈱社製）カラムクロマトグラフィーに付し，まず，n－ヘキサンで溶出する画分，n－ヘキサン－酢酸エチル（1:2）で溶出する画分及び酢酸エチルで溶出する画分の 3 つに分画した（Scheme 1）．次に，同様なシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し，n－ヘキサン－酢酸エチル（1:2）画分について，n－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 30 mL 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 F_{254}，Merck㈱社製，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）（Scheme 1）．ここで得られた Fr. 3 及び Fr. 5 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. 3-1～3-3 及び Fr. 5-1～5-5 を得た（Scheme 1）．



Scheme 1．モッテノホカメタノールエキス分画

＊ シリカゲル CC ： ヘキサン－酢酸エチル（10:1）～（1:2）

５　モッテノホカエタノールエキスの分画

モッテノホカエタノールエキスを水で溶解し，DIAION HP-20（合成吸着剤，三菱化学㈱社製）を充填したオープンカラムクロマトグラフィー（以下，DIAION カラムクロマトグラフィー）に付し，水ーエタノールーアセトニトリルで溶出させ，水画分，20 %エタノール画分，80 %エタノール画分（ポリフェノール画分）及びアセトニトリル画分の 4 つに分画した（Scheme 2）．ここで得られた 80 %エタノール画分についてさらに精製するため，DIAION カラムクロマトグラフィーによる分画を繰り返した．水から 100 %エタノールまでのグラジェントにより溶出・分取し，それぞれのフラクションを HPLC で分析し，このチャートパターンを指標に 5 つのフラクション（Fr. p-1～p-5）にまとめた（Scheme 2）

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

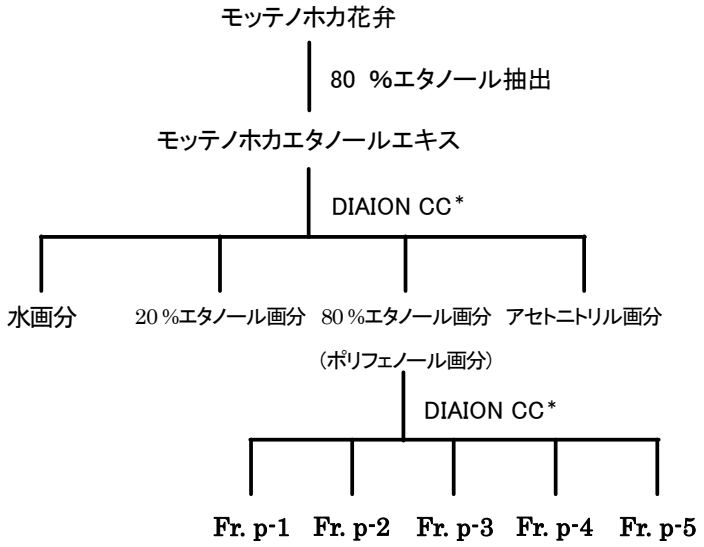
H. pylori は東京大学医科学研究所から分与を受けた IID3023 株を使用した．*H. pylori* の培養は 15%馬脱繊維血液加ミューラヒントン寒天培地に本菌を接種し，角型ジャー内で微好気下 37 ℃で 3～5 日間培養した．ペーパーディスク（ADVANTEC㈱社製，φ10mm）にモッテノホカの各フラクション，各種材料及びステロール標準品等を染みこませ 37℃で一晩乾燥した．濃度を一定に調製した *H. pylori* の菌液をミューラヒントン寒天培地上に塗布し，その上にディスクを置き，前述の条件で 3～5 日間培養し，阻止円の直径を測定した．

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

１）モッテノホカメタノールエキスの分画

前報[1)] で抗ピロリ菌活性を確認した酢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，Scheme 1 に示したように n－ヘキサン画分，n－ヘキサン－酢酸エチル（1:2）画分及び酢酸エチル画分の 3 つに分画した．ここで得られた n－ヘキサン－酢酸エチル（1:2）画分をさらに分画し，TLC パターンを指標に 12 フラクションにまとめた（Scheme 1）．これらのうち，前報[1)] で数種の植物性ステロールが含まれていることを確認したフラクションに対応すると考えられる Fr. 3 及び Fr. 5 について検討した．Fr. 3 には白色結晶が見られたので精製が進んでいると考え，さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し，ヘキサン－酢酸エチル系の溶媒で溶出し，Fr. 3-1～3-3 の 3 フラクションに分けた（Scheme 1）．これらのフラクションのうち，TLC でほぼ 1 スポットであった Fr. 3-2 を GC/MS で分析した．その結果，Fr. 3-2 にルペオール，タラキサステロール，φ－タラキサステロール，α－アミリンが含まれていることを確認した．Fr. 5 に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. 5-1～5-5



Scheme 2.　モッテノホカエタノールエキス分画

＊ DIAION CC ： 水－エタノール－アセトニトリル

の5フラクションにまとめた（Scheme 1）．得られたフラクションのうち，TLC でほぼ1スポットであった Fr. 5-4 を GC/MS で分析したが，物質の特定には至らなかった．

2）モッテノホカエタノールエキスの分画

緑茶[2)]，オリーブ[3)]，クランベリー[4)]，赤ワイン[5)]などのポリフェノール画分に抗ピロリ菌活性があることが報告されている．そこでモッテノホカのポリフェノール画分についてもこの可能性があると考え，水画分，20 %エタノール画分，80 %エタノール画分（ポリフェノール画分）及びアセトニトリル画分の4つの画分について抗ピロリ菌作用を検討した(Scheme 2)．その結果，ポリフェノール画分が最も強い活性を示した(Table 1)．そこで，これをさらに精製するため，DIAION カラムクロマトグラフィーに付し，HPLC のチャートパターンを指標に Fr. p-1～p-5 の 5 つのフラクションにまとめた（Scheme 2）．これら5フラクションの抗ピロリ菌活性を測定したところ，全てのフラクションにおいて活性が認められた（Table 1）．特に Fr. p-2～p-4 は，市販品の緑茶由来ポリフェノールと同程度の活性が認められた（Table 1）．そこで活性画分を大量に分取するため，HPLC による方法を検討する予定である．

Table 1. モッテノホカ *H. pylori* 発育阻止作用 アッセイ結果

サンプル		濃度 (mg/disk.)[a)]	ピロリ菌（阻止円：mm）
モッテノホカ	メタノールエキス	5.0	13.0
	水層	5.0	0.0
	酢酸エチル層	5.0	22.4
		2.5	18.3
	水画分	5.0	16.9
	20 %エタノール画分	5.0	23.6
		2.5	16.6
	80 %エタノール画分	5.0	32.6
	（ポリフェノール画分）	2.5	27.3
	アセトニトリル画分	5.0	24.1
		2.5	20.3
	Fr. p-1	5.0	25.6
		2.5	19.4
	Fr. p-2	5.0	32.2
		2.5	25.5
	Fr. p-3	5.0	31.1
		2.5	23.5
	Fr. p-4	5.0	33.1
		2.5	25.9
	Fr. p-5	5.0	27.1
		2.5	22.8
緑茶由来ポリフェノール		5.0	35.9
		2.5	27.1
		1.25	22.3
アモキシシリン（抗生物質）		0.1	51.0
		0.05	35.8
		0.025	20.0

a）アモキシシリン（抗生物質）のみ単位は（μg/disk.）

謝　辞

この研究にあたり，ステロール類の分析及び同定に御協力いただいた日本大学理工学部秋久俊博教授に深謝します．

文　献

1）沼澤聡明 他，機能性食品としての食用菊の利用法開発．山形県衛生研究所報. 40, 18-21, 2007
2）Takabayashi, F., Harada, N., Effect of green tea catechins on *Helicobacter pyroli* infection. Foods Food Ingredients Journal. 209(5), 391-396, 2004
3）柴崎博行，オリーブ抽出白の *Helicobacter pylori*（ピロリ菌）活性．香川県産業技術センター研究報告. 4, 81-82, 2004
4）D.A. Vattem., Y.-T. Lin., et al, Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. Process Biochemistry. 40(5), 1583-1592, 2005
5）佐藤充克，赤ワイン・ポリフェノールの健康効果．New Food Industry. 41(11), 55-64, 1999