

みやこカボチャの糖化液に含まれる細胞増殖活性

青木 央, 清水 健志

Accelerative Vascular Wall Repair Factor in the Miyako Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Enzyme Hydrolysis Solution

Hiroshi Aoki and Takeshi Shimizu

要 旨

みやこカボチャをセルラーゼ系複合酵素で分解すると、その溶液中に、血管内皮細胞の秩序ある増殖を助ける成分が遊離することが判った。この成分は分子量1300程度、260nmに吸収極大のある物質であった。みやこカボチャに、この非栄養性機能物質が含まれることから、動脈硬化の予防という機能性食材としての期待が高まった。

1. 緒 言

農水産資源の機能性物質に着目し、付加価値の高い有効利用法を開発するという立場から、森町駒ヶ岳周辺（北海道茅部郡）で栽培されているカボチャ「みやこ」の研究を行った。カボチャは、基本的に栄養学的なバランスの良い優れた作物であり、「みやこ」は特に果肉の朱色が濃く、栄養素を多く含む新たな機能性食品が開発されることが期待できる。

著者らは、すでに米麴を用いた糖化を利用したカボチャジュースの開発を行っていた。¹⁾ここではオリゴ糖が含まれ、NaとKの摂取比が改善された飲料の開発が出来たことを示したが、製造上のコストの関係で実用化に至っていない。このようなことから、市販の酵素を用い、より工業生産に乗るような製造方法の検討を行う必要があった。そして、この酵素を工程に採用する利点を研究するため、遊離する成分について、ヒト正常細胞に対する機能性を調べた。

特に、冬至にカボチャを食する習慣があるが、この点についても何かの生理作用が関係しているのではないかと考え機能性の検討対象とした。日本人の3大成人病である、ガン、脳卒中、心臓病の予防に貢献できる成分の検討に注力した。この

点では、クリカボチャ種子の摂取の影響について脳卒中易発性ラットを用いた報告がある。²⁾

培養細胞をモデル系として用い、その生理メカニズムや機能性因子を研究する手法は数多く工夫されている。血管研究の手法にも数多く取り入れられており、今ではこのような基礎研究から、有効な細胞増殖因子は臨床応用されている。国内の最近の例では大阪大の森下らのグループ^{3) 4)}が閉塞性動脈硬化症などへ臨床応用例を重ね、成長因子が血管の修復に効果のあることを示している。血管内皮細胞の増殖は、ECGFのような増殖因子の存在が必要なほか、ヘパリンのような物質が介在し、その増殖効果を高めることもある。

本報では、酵素分解を行うと、カロテノイドなどの抗酸化活性成分とは別に、正常ヒト血管内皮細胞の増殖効果を有する成分の遊離が、体に吸収されうる低分子量（1300程度）の画分に認められたので報告する。

カボチャを常食とする場合は、このような細胞増殖を補助し、素早い血管の修復作用を健康維持の点から期待するものである。カボチャを可溶化して用いることが、野菜飲料や加工食材としてのカボチャの利点となり、さら、優れた機能性物質の摂取の改善につながることを判った。

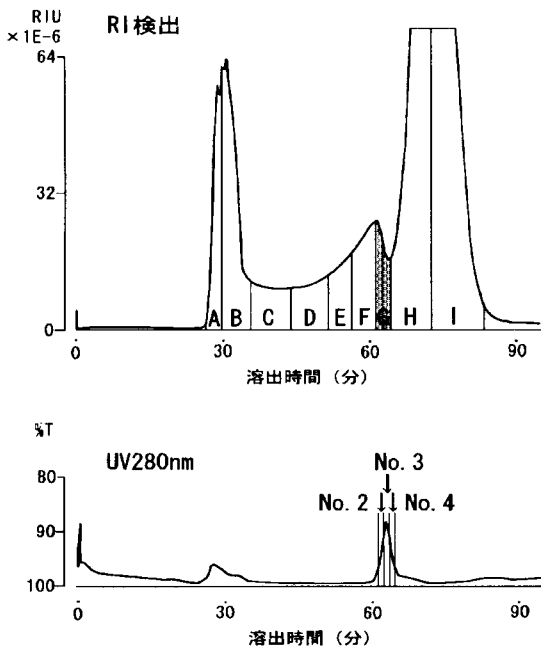


図1 カボチャ酵素分解液上清のゲルクロマトグラフィによる分画

カラム: Bio-Gel P-6 (2.5cmID, 100cm), 流速6.0ml/min。上段は、示差屈折による検出, 下段は UV280nm の検出。G 区分に血管内皮細胞の増殖活性がある。

2. 実験方法

2.1 細胞試験用有効成分の抽出法および分析

カボチャは、2000年9月に入手した森町(北海道)産「みやこ」を使用した。皮と種子を除き、加圧加熱(110°C, 15分間)して凍結した。この加圧加熱カボチャを凍結乾燥し、粉碎して用いた。凍結乾燥粉末 5 g に40ml のクエン酸 1 水和物 2.5 g/l とリンゴ酸 1.2g/l を含む溶液を加えオートクレーブ滅菌(110°C, 15分間)した後、セラゼオノズカRS(ヤクルト薬品工業(株)) 0.25 g を同溶液 5 ml に溶解し、メンブレンフィルターを用いて無菌的に添加、50°C で20時間振とうさせた。酵素反応を止めるため、再度、加熱煮沸させた(火入れ)。

カボチャ酵素分解液の固液分離した上清はゲルクロマトグラフィで分画した。Bio-Gel P 6 medium (Bio-Rad社) をガラスカラム (2.5cmI. D., 100cm) に充填し用いた。示差屈折計(株島津製作所RID-6A) と紫外可視検出計(株アトー, UVモニターI) を用いて、分画した。

カボチャ分画成分の紫外可視吸収スペクトルスキャンはUVIKON860(コントロール社(スイス)) により測定した。

さらに、HPLCでの分析は順相系カラム LiChrosorbNH2 (4mmID, 250mm (5 μm) 関東化学(株)) を用いて分析した。移動相は、75%アセトニトリル, 25%蒸留水, 流量は1ml/min, 260nmの紫外線吸収で検出した。分取は、1分ごとマイクロチューブに取り、遠心濃縮して、再び、培地に溶解、ろ過滅菌して用いた。

2.2 正常ヒト血管内皮細胞の増殖の測定

培養細胞は、正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞(東洋人由来, 日水製薬(株)) を5%牛胎児血清含有MCDB104液体培地(日水製薬(株)) 中で培養して用いた。成長因子はこの液体培地に添付のECGSとヘパリン(1:2)含有PBS溶液を定量用いた。細胞増殖に与える効果の測定は96穴マイクロプレート(バイオコートコラーゲンIコート品, 日本ベクトン・デッキンソン) を使用し, XTT法によった。この方法は、テトラゾリウム塩の一種であるXTTが、ミトコンドリアの脱水素酵素の代謝により、フォルマザン色素が形成される特性を利用し、細胞増殖を比色測定できる定量試験法である。試薬は、Cell Proliferation Kit II (ロッシュ・ダイアグノステックス(株)) を用いた。XTTの測定後、培地を除き倒立顕微鏡で細胞形態の観察を行った。

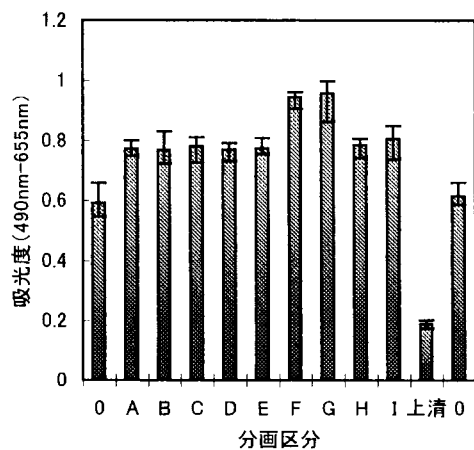


図2 カボチャ酵素分解液上清の血管内皮細胞の増殖へ与える効果

2000cells/100 μl/well (5 μl/ml ECGS, 10 μl/ml ヘパリン添加MCDB104) を分注、分画したカボチャ上清を凍結乾燥後、培地に溶解、各10 μl添加してある。0は培地のみ。上清は分画前の試料、培地は不含有。

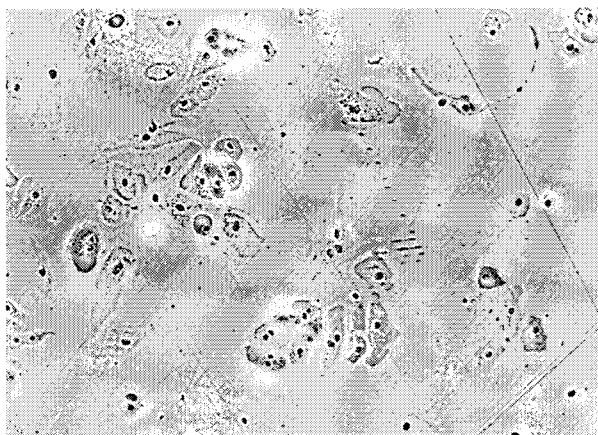


写真1 カボチャ酵素分解液の増殖有効画分を加えて培養した血管内皮細胞の様子

XTT 測定後、培地を吸引除去したマイクロプレートの底部を観察した。血管内皮細胞が連結し、きれいに扁平した単層構造を形成して増殖している様子がわかる。

3. 結果

細胞増殖に有効な成分の抽出、分離精製については、最初にカボチャ分解液の上清 1 ml をゲルクロマトグラフィーにかけ、分画した。示差屈折計 (RI) と紫外可視検出器 (280nm) のクロマトは、酵素消化による生成物の典型的なパターン (図1) を示した。最初に大きくあるピークは未分解の試料を中心とする水溶性の高分子化合物で、引き続き低分子化された分解生成物が徐々に増加、クロマトの最後に大きく出るピークは含有している糖分や有機酸などであった。紫外可視検出器で見ると、30分前後と60分後に二つのピークが認められたが、この最初のピークは、未分解物や酵素を含む蛋白質、2番目のピークは、示差屈折計の低分子化された分解生成物のピーク位置とほぼ一致していた。この位置は分子量でいうと1300から1400で、マーカーとして用いた標準物質ビタミンB12 (MW1355) の溶出位置に近かった。カボチャの上清は、再加熱 (火入れ) を行わないと、クロマトの高分子側 (A, B 区分) の形状が経時変化する。

このカボチャ酵素分解液の上清 1 ml を図1のようにAからI, 9つの分画成分に分離し、凍結乾燥後、再び培養培地 1 ml に溶解し、ろ過滅菌して、細胞培養系に供した。マイクロプレートのウェル毎に培地100 μ l, 細胞数2000cells を分注した。これに10 μ l を添加、増殖を XTT 法で分析した。培養日数は 2 日間、発色時間は 6 時間の結果を図2

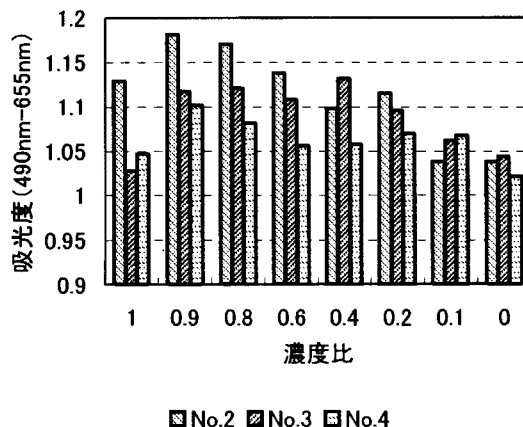


図3 カボチャの増殖有効成分の濃度依存性

UV ピークを 3 分割して増殖活性を同様に調べた。濃度比0.1は 1 well 毎10 μ l の添加の際、9 μ l の培地を加え希釈してある。ピークの前半であるNo.2に活性の強いことがわかる。

に示した。この時、全体的に増殖が良くなることが示されたが、その中でも分画番号でG区分に著しく増殖活性が高い成分のあることが判った。このG区分は紫外線吸収のある部分とほぼ一致しているため、この部分をNo.2, No.3, No.4の3つに分画し、細胞増殖効果に濃度依存性があるかどうか同様の方法で実験した。この結果を図3に示した。この結果により、分画ピークの前方のNo.2に活性のより高い成分がある事が判った。また、96穴マイクロプレート上の血管内皮細胞の様子を観察した。添加しない場合の増殖は、散発的で細胞の重なりに秩序だった規則正しさが低く見受けられるのに対して、写真1に示すように、カボチャの増殖活性成分を添加した場合、増殖した細胞に秩序ある連結をした単層細胞集合が認められる領域が多かった。

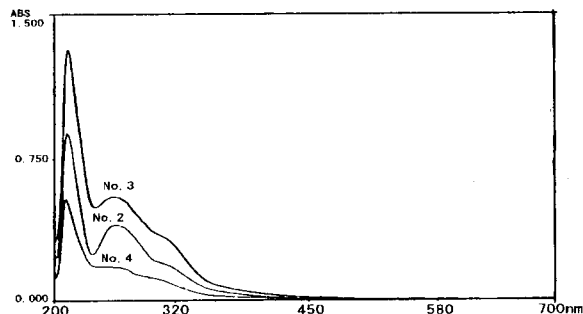


図4 カボチャ酵素分解液上清に含有する細胞増殖有効成分を含むUV画分の紫外可視吸収スペクトル

260nm 吸収極大がある。No.3の画分は、吸収が高いが、No.2の画分に細胞増殖活性は高い。

カボチャの増殖活性成分の紫外可視吸収スペクトルを図4に示した。260nmに吸収極大があった。順相HPLCの分析で、分析された成分の全面積は、紫外可視吸収スペクトルの吸光度と一致し、分画No.3がもっとも高く、ついで、No.2, No.4の順であった。

HPLCのクロマトグラフを図5に示したが、これを各ピーク面積で比較すると図6になる。細胞増殖活性(図3)と面積が比例関係に含有すると見られる成分は、溶出時間4.0分と5.2分の二成分であった。

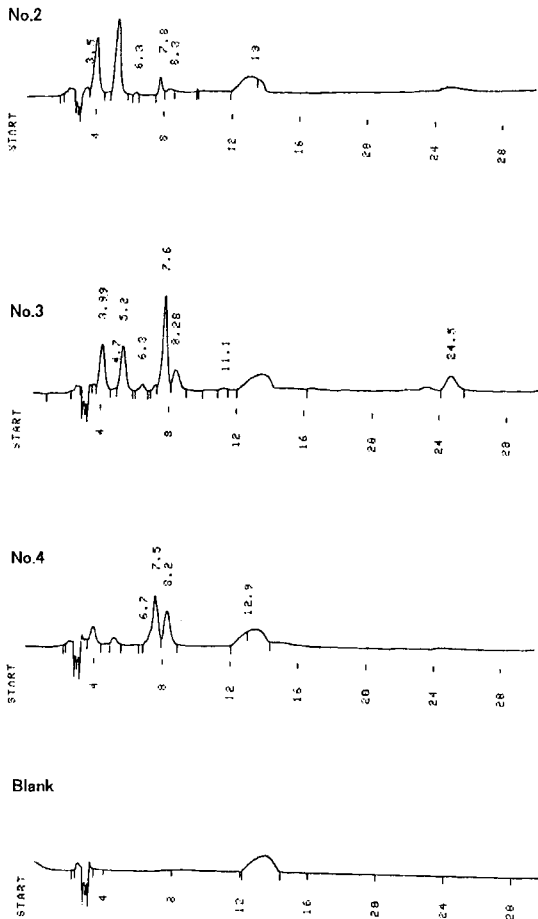


図5 順相HPLCによるUVピークの各分画の分析

溶離液は75%アセトニトリル(1ml/min) カラムはLichrosorbNH2(250-4.5μm), 検出UV260nm。Blankは、1mM NaNO₃である。

図2と同様の条件で細胞増殖効果を測定したところ、図7より最も効果の認められるのは5.2分の成分であることが判った。細胞応答が少し鈍い感じを受けるが、これは、移動相などに混在する微量物質の濃縮の影響が避けられないことがある。この有効成分の含有量を核酸1mg/mlのE1cm=20を適用⁵⁾し、分析されるピークの面積百分率が

ら、このカボチャ酵素分解液には10μg/mlあると計算された。これは、生カボチャの可食部100g中に約1~2mgの含有量となる。

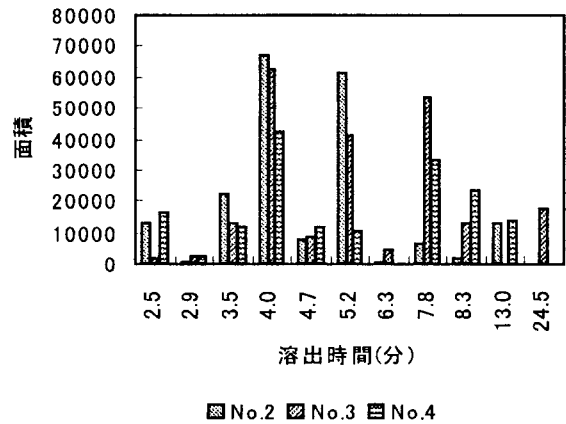


図6 順相HPLCでの有効成分のピーク面積の比較

分析される成分で増殖活性と比例関係にあるピークは4.0と5.2の2つある。

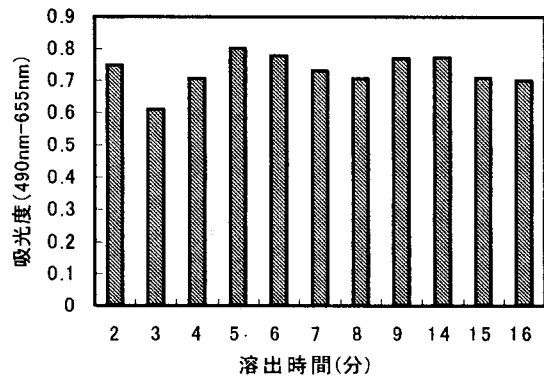


図7 HPLC分画したカボチャの有効成分の細胞増殖活性

順相HPLCより時間分収後、遠心濃縮試料を図8の濃度比0.5と等量添加。培養は2日間、XTTは20時間発色。5分台の値が高い。

4. 考 察

血管内皮細胞は、血管の最も内側にあり、直接、血液に接している。しかも、栄養摂取に重要な毛細血管を構成している。動脈硬化については、わが国を含め、LDLコレステロールやマクロファージの関与などの総合的な研究があるが^{6), 7)}、疾病初期、この血管内皮細胞に生化学的な傷が発生したところから始まる炎症性の変化(an inflammatory disease)であると説明される。この傷に対して、血管内皮細胞への増殖を高め、動脈硬化の初期に、すなわち、血管中膜にある平滑筋の肥大増殖へ影響が現れる前に、傷の早期修

復ができると動脈硬化予防につながると予想される。強力な血管細胞増殖因子は、治療という意味では有効な症例がある一方で、血管新生が悪化を招きうる疾患を併発している場合は適用ができない。しかし、ここでは、疾病治療ではなく、健康維持という視点での、食材の機能性という意味からカボチャに注目できると考えたい。

カボチャ酵素分解液には、この血管内皮細胞の秩序だった柔らかな増殖を助ける働きのある成分が含有している事が判った。このことにより、血管内皮細胞の損傷を早期に修復する効果が期待できるので、動脈硬化の中でも、特にアテローム性動脈硬化症とか粥状動脈硬化症といわれる症例の初期症状の発生予防に貢献すると考えられる。カボチャの持つ非栄養成分の機能として注目できると考えられる。カロテノイド系色素と同様に通常の加熱調理のあと、食しても十分摂取される成分と考えるが、前もって、酵素分解を行い、ジュースに加工しておくことで摂取効率が改善できることを意味している。この有効成分の化学構造が特定されることが大事で、LC-MSの分析などが望まれるが、現在のところ、核酸系のオリゴマーではないかと推定される。

冬至にカボチャを食べるのは、脳卒中の起こりやすくなる季節に、カボチャを食べると血管の調

子が良くなるというのが、習慣になったとも考えられる。これからもカボチャが動脈硬化を予防する食材として、消費者の健康増進に寄与できることを期待したい。

参考文献

- 1) 青木央, 大坪雅史, 宮崎俊一: 北海道立工業技術センター研究報告, 第2号 (1992), P15-21
- 2) 南勝, 富樫広子, 佐野真知子, 吉岡充弘, 斉藤巖, 斉藤秀哉他: 基礎と臨床, Vol.19, No.8 (1985), P670-680
- 3) 富田奈留也, 森下竜一, 萩原俊男: 臨床と研究 Vol.78, No.9 (2001), P1638-1641
- 4) 青木元邦, 萩原俊男, 森下竜一: 実験医学, Vol.19, No.7 (2001), P860-866
- 5) D. A. Harris and C.L.Bashford: Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach, IRL Press Limited Oxford · Washington DC, (1987), P49-66
- 6) 北徹編: 第16回「大学と科学」公開シンポジウム-動脈硬化のしくみをさぐる-, アドスリー (東京) (2001)
- 7) R. Ross: N. Engl. J. Med., Vol.340 (1999), P115-126