

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19560823
 研究課題名(和文) 焼酎蒸留粕を用いる医薬品・機能性食品および化粧品の開発に向けた基礎研究
 研究課題名(英文) The basic research for the development of medicines, functional foods and cosmetics using the residual powder from Shochu distillation remnants
 研究代表者
 田上 修 (TANOUE OSAMU)
 崇城大学・生物生命学部・助教
 研究者番号：10343716

研究成果の概要：

従来バイオマスとして扱われている焼酎蒸留粕を分離・精製し、有効成分(焼酎粕パウダー)を得た。この焼酎粕パウダーは、様々ながん細胞に対する抗腫瘍効果を示し、その抑制メカニズムはアポトーシスであることが示唆された。また、正常マウスへの尾静脈投与により、血中のIFN- γ 産生量が増大し、免疫賦活効果を示した。さらに、悪性黒色腫細胞を用いた実験から、チロシナーゼ活性の抑制によりメラニン産生を抑え、美白化粧品への可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・リサイクル工学

キーワード：焼酎蒸留粕、バイオマス、再生利用、抗腫瘍効果、免疫賦活効果、美白効果、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

焼酎蒸留粕(焼酎粕)の排出量は、近年の焼酎の生産量の増加に比例して、ますます増大している。従来その処理の大半を安価な海洋投棄に頼ってきたが、2007年のロンドン条約により完全に禁止されるため、今後は有効活用を視野に入れた新たな処理方法の開発が望まれている。これまで多数の焼酎蒸留粕処理に関する技術開発が本研究以前より行われているが、研究代表者らのように焼酎蒸留粕そのものを用いたがん治療に関わる研

究報告は極めて少ない。

一方、これまでに研究代表者の研究グループでは、リン脂質と界面活性剤より構成される複合脂質膜(ハイブリッドリポソーム)のみを用いる制がん剤の開発にむけた研究をおこなっている。研究代表者らの研究グループでは制がん剤の開発に向けた基礎研究を臨床レベルまで到達させた実績があり、焼酎蒸留粕を原料とした医薬品の開発等の医用工学的応用に向けた研究を行う素地および技術力は十分である。

焼酎粕には原料である芋、麦、米等に由来する繊維質、脂質、糖質、ビタミン、ミネラル等が多量に含まれており、成分的には非常に優れているが、形状がスラリー状で腐敗し易い性質も有することから、研究代表者らは、有効成分のみの抽出等の適切な処理を行うことにより、新たな有効利用が可能になると考えた。

2. 研究の目的

従来焼酎業界において廃棄物として扱われている焼酎蒸留粕から有効成分を抽出し、様々な腫瘍に対して予防および治療効果を示す医薬組成物および化粧品として有効利用することを目的としている。焼酎蒸留粕より分離・精製した有効成分の種々のがん細胞に対する細胞増殖抑制試験を実施し、その後、安全性試験を行う。さらに、細胞死に関する解析をもとにがん増殖抑制のメカニズムを解明すると共に、実験動物を用いて免疫賦活効果についての検討もを行い、最終的には臨床への応用を目指す予定である。また、同様に焼酎蒸留粕から得られた有効成分と悪性黒色腫細胞等を用いて、メラニン色素生成の抑制試験等による美白効果の検討を行い、美白効果を有する化粧品としての有効性の検討も行う。本研究は廃棄物リサイクルによる循環型社会の構築をも見据えている点に特色があり、得られた研究成果は、焼酎蒸留粕を原料とする医薬品および化粧品の開発において有効な指針を与えると考える。

3. 研究の方法

(1) 焼酎蒸留粕の分離・精製技術の確立および有効成分の特定

スラリー状の焼酎蒸留粕を超遠心分離器およびメンブランフィルターを用いて固液分離を行い、固形分および焼酎酵母を含む混入菌体の除去を行う。得られた上澄液を凍結乾燥機を用いて凍結乾燥して試料を作成した。さらに、この試料を有機溶媒（エタノール）を用いて処理し、溶媒に対し可溶あるいは不溶（水溶性の白色粉末；焼酎粕パウダー）で分離して試料とした。

(2) がん細胞に対する増殖抑制試験

培養がん細胞として肺がん細胞（RERF-LC-AI）、肝臓がん細胞（HuH-7）、胃がん細胞（MKN-45）、マウス由来悪性黒色腫細胞（B16）などを用い、(1) で得られた上澄凍結乾燥物、エタノール処理した白色粉末（焼酎粕パウダー）についての、細胞レベルでの増殖抑制試験を行った。付着細胞（脳腫瘍、肺腺がん、肝臓がん、胃がん）に関しては酵素活性測定法によりプレートリーダー

を用いて、比色法によりがん細胞増殖抑制効果を検討した。

(3) 制がんメカニズムの解明

麦焼酎粕パウダーを種々のがん細胞に添加した後、①フローサイトメーターを用い、がん細胞の形態変化の観測およびヨウ化プロピジウム染色法によりアポトーシス誘導率を求めた。②共焦点レーザー顕微鏡（現有）を用いて、TUNEL 法による画像解析を行い、断片化 DNA 細胞の有無を確認した。

(4) 美白化粧品の開発に向けた細胞毒性試験

マウス由来悪性黒色腫（B16 メラノーマ）細胞を用いて、細胞毒性試験を行い、細胞に毒性を示さない各種焼酎粕パウダーの濃度を決定した。焼酎粕パウダーの 10%および 50%細胞増殖抑制濃度（ IC_{10} ・ IC_{50} ）は、WST-1 assay 法により得られた濃度依存性曲線により算出した。

(5) 動物レベルでの安全性試験

正常ラットを用いる安全性試験として、試験溶液を単回投与する急性毒性試験を行い、一般状態観察、血液検査、生化学検査および体重比器官重量測定により安全性を確認した。

(6) マウス由来悪性黒色腫細胞に対するチロシナーゼ抑制効果

B16 メラノーマ細胞に各種焼酎粕パウダーを添加して培養した細胞を、Triton-X 含有リン酸緩衝液を用いて溶解させた。L-3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン（L-ドーパ）含有リン酸緩衝液を加え、試料溶液の細胞当たりのチロシナーゼ酵素活性をマイクロプレートリーダー（Molecular Devices、現有）を用いて測定し、チロシナーゼの抑制効果を検討した。

(7) マウス由来悪性黒色腫細胞に対するメラニン形成抑制効果

B16 メラノーマ細胞に各種焼酎粕パウダーを添加して培養した細胞を、水酸化ナトリウム水溶液にて溶解させた。その試料溶液の吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定し、細胞当たりのメラニン形成量を算出した。

(8) 免疫賦活効果の基礎研究

がん治療に関連して、焼酎蒸留粕の有効成分の免疫賦活効果を検討するために、正常ラットを用いてインターフェロン γ （IFN- γ ）産生能の評価を行った。上澄凍結乾燥物および焼酎粕パウダー溶液の尾静脈単回投与を行い、12 時間後の血清中の IFN- γ を ELISA 法より算出した。また、上記と同様の操作を

行ったラットを用い、3 時間後のラット脾臓組織から脾臓エフェクター細胞を単離した。同時にマウス由来悪性黒色腫細胞を NK (ナチュラルキラー) 感受性細胞として用いて共培養を行い、細胞傷害活性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 焼酎粕固形物は、エタノール抽出操作により抽出物と焼酎粕パウダーに分離された (図 1)。焼酎粕パウダーは、粉末状で水に溶けやすく、焼酎粕特有の発酵臭がなかった。また、固形物に比べ吸湿性が低いため長期保存が容易であると考えられる。

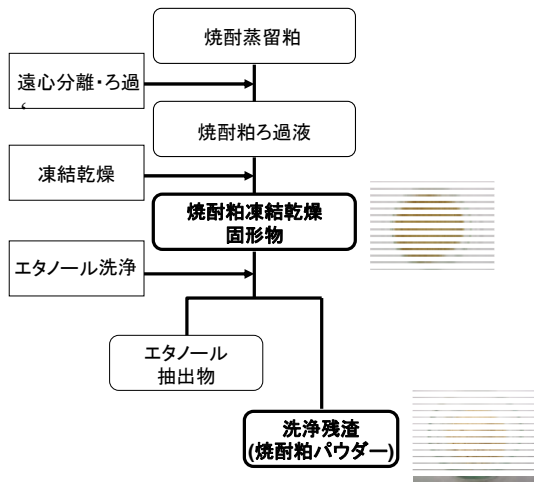


図 1 焼酎粕の精製プロセス
写真：麦焼酎粕

(2) 黒米・麦・芋・米の各焼酎粕固形物、抽出物およびパウダーのヒト肝臓がん (Huh-7) 細胞に対する 50%細胞増殖抑制濃度 (IC_{50}) の測定から、凍結乾燥固形物中の抗腫瘍成分の多くがパウダーに含まれていることが示唆された (表 1)。また、各焼酎粕パウダーの Huh-7 細胞に対する細胞増殖抑制効果は、黒米 > 麦 > 芋 > 米の順となった。

表 1 各焼酎粕の Huh-7 細胞に対する IC_{50} 値

焼酎粕	IC_{50} 値 (mg/ml)		
	固形物	エタノール抽出物	パウダー
黒米焼酎粕	0.91	6.86	0.71
芋焼酎粕	4.26	4.42	1.33
麦焼酎粕	1.28	>20	1.06
米焼酎粕	—	—	2.92

また、ヒト胃がん (MKN-45) 細胞およびヒト肺扁平上皮がん (RERF-LC-AI) 細胞に関して、麦焼酎粕パウダーが芋焼酎粕パウダーより高い増殖抑制効果を示した (表 2)。

表 2 芋および麦焼酎粕の各がん細胞に対する IC_{50} 値

	IC_{50} 値 (mg/ml)					
	MKN-45細胞			RERF-LC-AI細胞		
焼酎粕	固形物	パウダー	エタノール抽出物	固形物	パウダー	エタノール抽出物
芋焼酎粕	4.27	5.16	6.43	3.40	3.9	7.5
麦焼酎粕	2.79	2.01	6.67	1.31	1.65	—

次に、麦焼酎粕パウダーの各がん細胞に対する抗腫瘍効果の濃度応答性を確認した結果、RERF-LC-AI 細胞、Huh-7 細胞および B16 メラノーマ細胞のいずれにおいても、濃度依存的に抑制効果が増大することが明らかとなった。

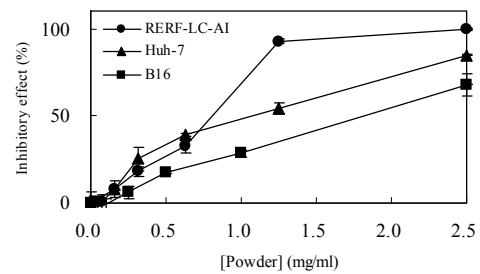


図 2 麦焼酎粕パウダーの各がん細胞に対する抗腫瘍効果の濃度応答性

(3) ラットへの米、麦、黒米焼酎粕パウダーの尾静脈投与による急性毒性試験等において、体重変化および体重比器官重量ともに共にコントロールと同等の値となった (表: 図 3)。また、血液検査及び血液生化学検査においても正常値の範囲内であり、米及び黒米焼酎粕パウダーの高い安全性が確認された。

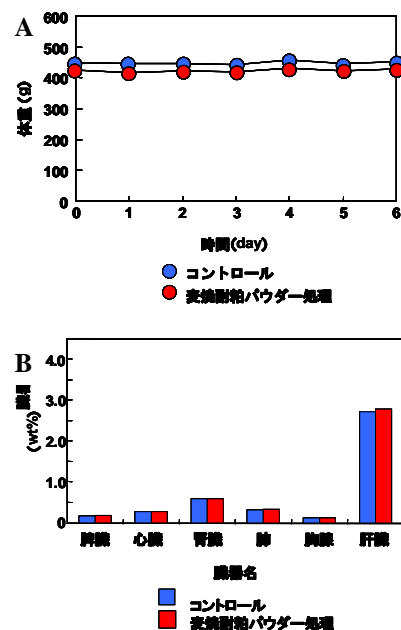


図 3 麦焼酎粕パウダーの急性毒性試験。
A: 全体重, B: 各臓器重量。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察およびフローサイトメーターによるDNA断片化率の測定から、麦焼酎粕パウダーの添加によりヒト肺扁平上皮がん(RERF-LC-AI)細胞およびヒト肝臓がん(Huh-7)細胞にアポトーシスを誘導していることが明らかとなった。

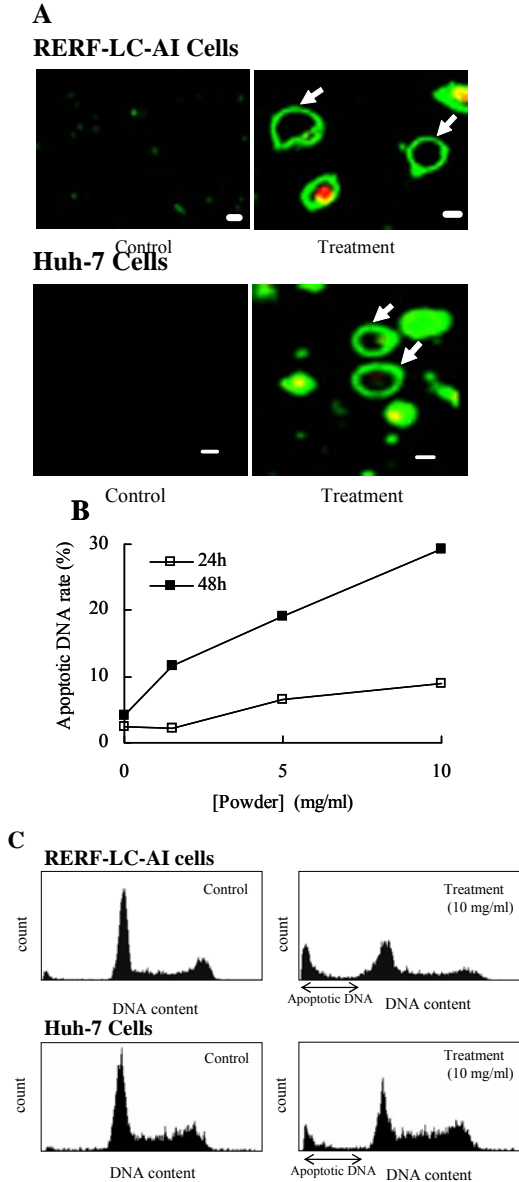


図4 麦焼酎粕パウダー添加によるRERF-LC-AI細胞およびHuh-7細胞に対するアポトーシス誘導。A: 共焦点レーザー顕微鏡による観察, B, C: フローサイトメトリによるDNA断片化率の測定結果。

(5) 麦焼酎粕パウダーのB16メラノーマ細胞に対する10%および50%細胞増殖抑制濃度(IC₁₀・IC₅₀)の測定を行った結果、麦焼酎粕凍結乾燥物やコウジ酸よりも高い抑制効果を示した。このIC₁₀の結果を基に、細胞に毒

性を示さない焼酎粕パウダーの濃度を決定した。

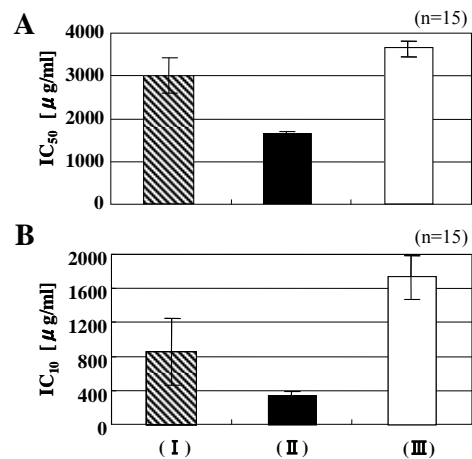


図5 各種試料のB16メラノーマ細胞に対するIC₅₀値(A)およびIC₁₀値(B)。(I) 焼酎粕凍結乾燥固形物, (II) 麦焼酎粕パウダー, (III) コウジ酸。

(6) 麦焼酎粕パウダーのゲル濾過クロマトグラフィーを用いた分取による分離、精製を試みた結果、分子量22000以下のタンパク質、オリゴペプチド、多糖類が含まれている可能性が示唆された。また、その分取成分のヒトHuh-7細胞に対する増殖抑制効果について検討した結果、麦焼酎粕パウダー使用時とほぼ同等もしくはやや高い抑制効果が確認され、抗腫瘍成分を多く含んでいることが示唆された。

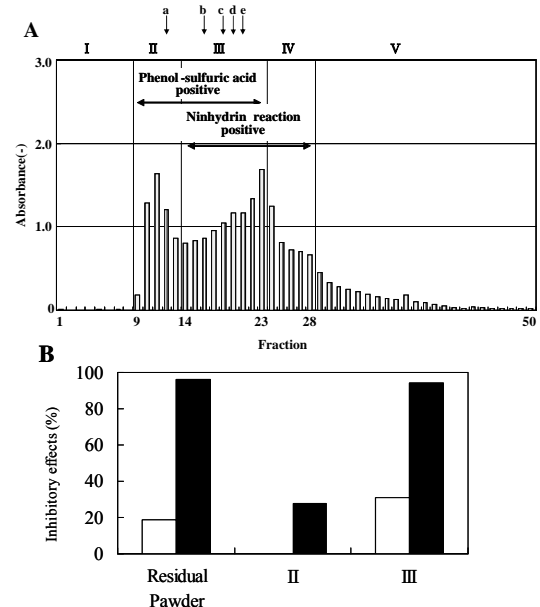


図6 麦焼酎粕パウダーのゲルろ過クロマトグラフィー。A: フラクシオン分取による定性分析{(II)糖類、(III)糖ペプチド、(IV)ペプチド}。B: 麦焼酎粕パウダー{(II)糖

類および(Ⅲ)糖ペプチド}の Huh-7 細胞に対する抗腫瘍効果；{1.5 mg/ml (白)、3 mg/ml (黒)}.

(7) 麦焼酎粕パウダーの B16 メラノーマ細胞への添加により、細胞の白色化が目視にて確認された。また、顕著なメラニン産生抑制効果および濃度依存的なチロシナーゼ活性抑制効果が確認され、麦焼酎粕パウダーの美白効果が示唆された。

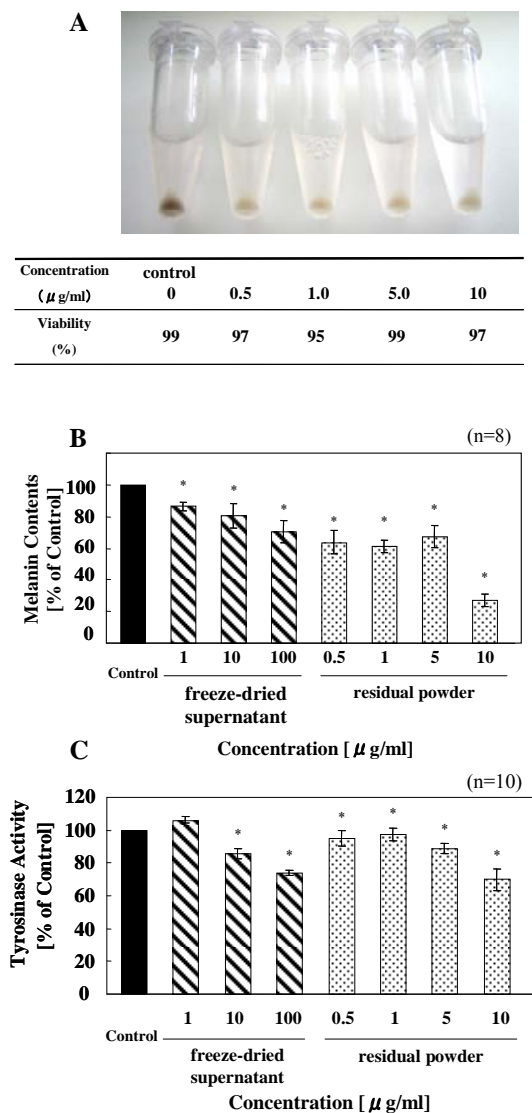


図7 麦焼酎粕パウダーの B16 メラノーマ細胞に対する美白効果. A: 用いた細胞の目視写真と生存率, B: メラニン産生量, C: チロシナーゼ活性.

(8) 正常マウスに対する各焼酎粕パウダーの投与時の免疫賦活効果について検討した結果、麦焼酎粕パウダーを投与した場合のマウスの脾臓細胞の細胞傷害活性を向上さ

せる傾向が認められた。また、マウス血清中の IFN- γ 濃度について、芋焼酎粕パウダーの投与時に、他の焼酎粕パウダー投与時よりも高い IFN- γ 産生能を示すことが明らかとなり、焼酎粕パウダーの医用素材への転換が期待される。

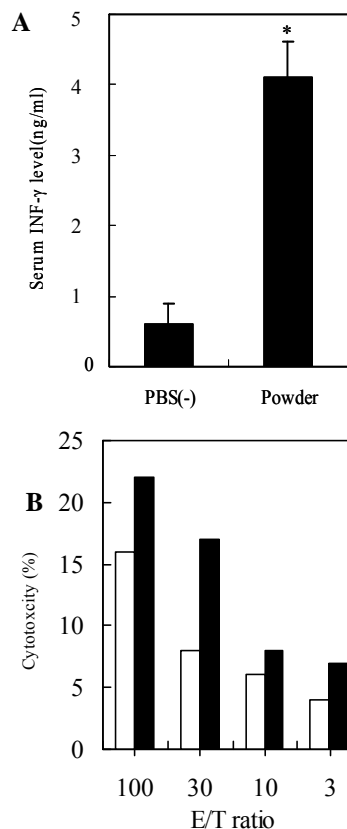


図8 麦焼酎粕パウダーの正常ラットに対する免疫賦活効果. A: 血清中の IFN- γ 産生量, B: マウス脾臓細胞の B16 メラノーマ細胞に対する細胞傷害活性率.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Yuji KOMIZU, Kouta FUNAMOTO, Hideaki ICHIHARA, Osamu TANOUÉ, Koichi GOTO, and Ryuichi UEOKA, Antitumor and immunostimulatory effects of residual powder from barley-Shochu distillation remnant, Journal of Health Science, 査読有, **54**, 287-293(2008).

[学会発表] (計1件)

①竹中彩、田上修、後藤浩一、上岡龍一、焼酎粕パウダーのアポトーシス誘導制がんメカニズム、2008 化学工学会沖縄大会、平成

20年8月8日、沖縄産業支援センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 修(TANOUE OSAMU)
崇城大学・生物生命学部・助教
研究者番号：10343716

(2) 研究分担者

上岡 龍一(UEOKA RYUICHI)
崇城大学・生物生命学部・教授
研究者番号：70099076

(3) 連携研究者

なし