

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月11日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500784

研究課題名（和文） 動脈硬化予防食材としてのヨモギの可能性を探る食品栄養学的研究

研究課題名（英文） A study in the field of Food Science and Nutrition seeking for capability of edible yomogi to prevent atherosclerosis

研究代表者

平松 直子（HIRAMATSU NAOKO）

兵庫県立大学・環境人間学部・准教授

研究者番号：30099585

研究成果の概要（和文）：

ヨモギ熱水抽出液は、ヒト LDL 酸化系において、共役ジエン形成 Lag Time の延長、TBARS 生成抑制、ヘキサノイルリジン生成抑制、ApoB100 断片化抑制など、様々な酸化マーカーに対し、投与量依存的に強い抗酸化性を示した。また、ヨモギ熱水抽出成分は、CaCo-2 および HepG2 細胞培養系において、それぞれ、ApoB48 の分泌および ApoB100 の合成を、ポジティブコントロール Atorvastatin と同様に抑制した。以上のことから、in vitro ではあるが、ヨモギは、動脈硬化の主因とされるヒト LDL 酸化を強く抑制すること、コレステロール吸収抑制・コレステロール合成抑制にも関与することが明らかとなり、動脈硬化予防食材としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Yomogi water extracts extended the lag phase of conjugated diene formation in human LDL oxidation. Yomogi water extracts dose-dependently inhibited hexanoyl lysine and TBARS formations, and degradation of ApoB100 in human LDL oxidation. These results indicate yomogi has a strong anti-oxidative activity in each phase from the beginning to the end of LDL oxidation. Yomogi water extracts inhibited secretion of ApoB48 (chylomicron) from human intestinal CaCo-2 cells, and inhibited synthesis of ApoB100 (LDL-cholesterol) in human HepG2 cells. Collectively, the results imply that daily consumption of yomogi may have an effect to slow down the development of human atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

1. 研究開始当初の背景

現在、わが国では、死因の約3割を動脈硬化由来の心疾患や脳血管疾患が占めている。ガンを含めると全死因の3分の2以上を占めており、食生活の面から生活習慣病を予防することは、欧米諸国のみならず、わが国においても最重要課題の一つである。

動脈硬化の主因は血中コレステロールの増加と酸化変性LDLの動脈壁への蓄積によることが明らかになり、現在、それらの値を下げるための研究が数多くなされている。コレステロール代謝の研究方法には、ヒトの臨床データ、動物実験、あるいは、ヒト細胞培養系を用いた方法などさまざまな取り組みがあるが、本研究課題では、細胞培養系を用いた *in vitro* の方法を採用する。具体的には、ヒトの肝細胞 (HepG2) 及び腸上皮細胞 (CaCo-2) の細胞培養系を用いて、LDL 合成・分泌系ならびにカイロミクロンの合成・分泌系を抑制しコレステロール値を下げる機能性物質を食品中に見出す。この方法は、実験動物を用いた方法に比べ種の違いを懸念する必要がなく、簡便で経済性にも優れており、実験方法の信頼性や先端性、実用性の点でも非常に優れている。

更に、動脈硬化の成立においてLDLの酸化変性は重要なステップのひとつであり、ヒトLDLの酸化を防ぐ成分を食品中に見出すことも重要である。ハーブの抗酸化性についてはすでに様々な研究がなされているが、ヒトのLDL酸化系に対する詳細な検討は、Gugliucci, Menini らが南米産の薬草 *Achyrocline satureoides* の水溶性画分を用いて行った研究 (Life Sciences, 71, pp 693-705, 2002) 以外は、未だ多くの研究がなされていない。

申請者は、既に、日本古来の野草成分、ヨモギ、ゲンノショウコ、センブリ、イワタバコなどが数種の発ガン物質に対して強い抗変異原性 (Biofactors, vol. 22, pp. 123-125, 2004.) や、抗遺伝毒性 (J. Clin. Biochem. Nutr., 43 Suppl. 1, pp 149-151, 2008) を有すること、ならびに、DPPH ラジカル消去能において強い抗酸化性 (Biofactors, vol. 21, pp. 281-4, 2004) を示すことを報告している。

古くから薬草としてまた食材として人々に親しまれてきたヨモギは特に抗酸化性が強く、ヒトLDLの酸化抑制による動脈硬化抑制能の可能性も大いに期待される。ヨモギの抗酸化性に関しては、申請者らの研究の他に、Toda S. らがヨモギ (*Artemisia princeps*) の葉に含まれるポリフェノールがCu²⁺酸化による牛血清アルブミンの断片化抑制に効果があると報告している (J Med Food, 7, pp. 52-54, 2004) 他、Kim K. S. らが、ヨモギ (*Artemisia apiancea*) の n-ヘキサノール抽出液が、ラットのTBARSの生成抑制に効果があったと報告している (J Ethnopharmacol., 85, pp. 69-72, 2003)。

しかしながら、ヒトLDL酸化に対するヨモギの抗酸化性、ならびに、ヒト細胞培養系を用いたコレステロール合成・分泌に関するヨモギの抑制作

用については、申請者の知る限り報告がない。

2. 研究の目的

本研究は、ヨモギ成分の動脈硬化抑制能の可能性の有無を、*in vitro* で、ヒトの試料を用いて明らかにするため、次の(1)～(3)の課題について検討することを目的としている。

(1) 動脈硬化形成の原因とされるヒトLDL酸化に対するヨモギ熱水抽出液の抗酸化能について

(2) 肝臓のコレステロールの合成・分泌モデルとしてHepG2細胞培養系を用い、LDL合成・分泌に対するヨモギ熱水抽出液の影響について

(3) 小腸のコレステロールの吸収モデルとしてCaCo-2細胞培養系を用い、カイロミクロンの合成・分泌に対するヨモギ熱水抽出液の影響について

3. 研究の方法

(1) ヒトLDLの酸化変性に対するヨモギ熱水抽出液の影響

動脈硬化の成立においてLDLの酸化変性は重要なステップのひとつである。実験に先立ち、超遠心法により密度の違いを利用して、ヒト血清からLDL画分を分離・調製した。

ここでは、Gugliucci らの方法 (Life Sciences, 71, pp 693-705, 2002) に従い、銅 (CuSO₄) 酸化によるヒトLDL酸化系において、各酸化ステージにおける様々な酸化マーカーへのヨモギ熱水抽出液の影響を、次にあげる方法でモニターした。

○共役ジエン生成ラグタイムの測定

共役ジエンは、脂質過酸化の初期段階で生じるヒドロパーオキシドの生成に伴い検出される。共役ジエン生成までのラグタイム延長 (抗酸化) にヨモギ熱水抽出液が効果を示すか観察した。

○ELISA法による「ヘキサノイルリジン」(Nε-(Hexanoyl) Lysine: HEL) 生成量の測定

HELはリノール酸ヒドロペルオキシドとリジン残基との反応によって脂質過酸化の初期段階を捉えることが可能な酸化ストレスバイオマーカーである。ここでは、ELISAキットを用いて、ヒトLDL酸化系におけるHEL生成抑制 (抗酸化) へのヨモギ熱水抽出液の影響を観察した。

○TBARS生成量の測定

チオバルビツール酸反応性物質 (脂質の二次分解産物) の生成抑制にヨモギ抽出液が効果を示すかどうかを観察した。

○LDL構成タンパクApoB100の測定

電気泳動法 (SDS-PAGE ウェスタンブロッティング法) でApoB100を検出し、ヒトLDL酸化系におけるLDL構成タンパク (ApoB100) の断片化抑制 (抗酸化) へのヨモギ抽出液の影響を観察した。

(2) ヒト肝細胞由来HepG2細胞におけるLDL合成・分泌へのヨモギ熱水抽出液の影響

コレステロールの生合成は肝細胞で行われる。ヒト肝細胞のモデル実験系として、ヒト肝細胞由来 HepG2 細胞培養系を用い、ヨモギ熱水抽出液が

LDL コレステロールの生合成にどのように影響するかを、構成タンパク ApoB100 の変化量を指標に観察した。SDS-PAGE ウェスタンブロッティングによる電気泳動法を用いて ApoB100 量を測定し、細胞内・外のコレステロール量、即ち LDL コレステロール合成・分泌の指標とした。

(3) ヒト腸由来CaCo-2細胞におけるカイロミクロン合成・分泌へのヨモギ熱水抽出液の影響

小腸のコレステロール吸収モデル実験系として、CaCo-2 細胞培養系を用い、カイロミクロンの合成・分泌に対するヨモギ熱水抽出液の影響を観察した。CaCo-2 細胞内・外の ApoB48 量は、SDS-PAGE ウェスタンブロッティングによる電気泳動法を用いて測定し、カイロミクロン合成・分泌（コレステロール吸収）の指標とした。

4. 研究成果

(1) ヒト LDL 酸化変性に対するヨモギ熱水抽出液の酸化抑制効果

ヨモギ熱水抽出液は、ヒト LDL 酸化系において、共役ジエン形成 Lag Time の延長 (Fig. 1)、TBARS 生成の抑制 (Fig. 2)、ヘキサノイルリジン生成抑制 (Fig. 3)、ApoB100 の分解抑制 (Fig. 4) など、様々な酸化マーカーに対し、投与量依存的に強い抗酸化性を示した。in vitro ではあるが、ヨモギ熱水抽出成分は、動脈硬化の主因とされるヒト LDL 酸化を強く抑制することが明らかとなった。これらのことから、動脈硬化予防食材としてのヨモギの可能性が示唆された。

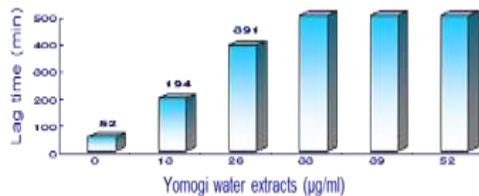


Fig. 1 ヒト LDL 酸化系における共役ジエン生成ラグタイムへのヨモギ熱水抽出液量の影響

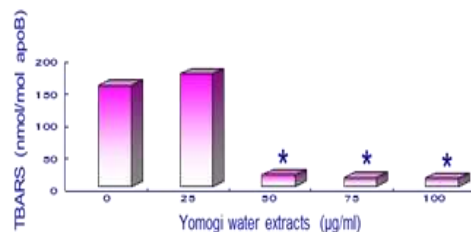


Fig. 2 ヒト LDL 酸化系における TBARS へのヨモギ熱水抽出液量の影響。
*ヨモギ 0µg/ml との有意差 (p<0.05, n=3)

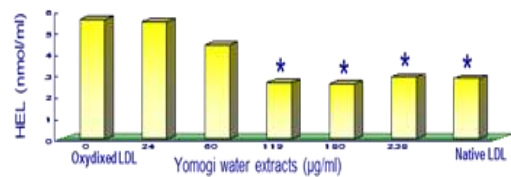


Fig. 3 ヒト LDL 酸化系における HEL 生成へのヨモギ熱水抽出液量の影響。(*ヨモギ 0µg/ml に対する有意差. P<0.05, n=3)

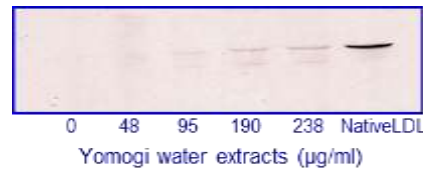


Fig. 4 ヒト LDL 酸化系における ApoB100 の断片化抑制に与えるヨモギ熱水抽出液の影響

(2) HepG2 細胞培養系における ApoB100 合成・分泌能へのヨモギ熱水抽出液の影響

ヨモギ乾物終濃度 0.45mg/ml 並びにポジティブコントロール Atorvastatin 終濃度 10µM は、コントロールと比べて ApoB100 合成を有意に抑制した (Fig. 5)。分泌に関しては、Atorvastatin、ヨモギ共に、コントロールと比べて有意差は認められなかった。

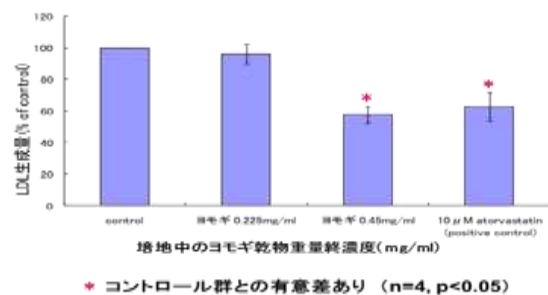
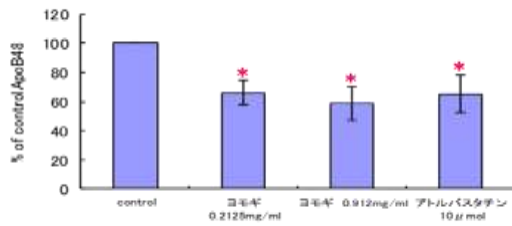


Fig. 5 HepG2 細胞内 ApoB100 (LDL) 合成に対するヨモギ成分添加の影響

(3) CaCo-2 細胞培養系における ApoB48 合成・分泌能へのヨモギ熱水抽出液の影響

ヨモギ乾物終濃度 0.21, 0.91mg/ml および Atorvastatin 終濃度 10µM の ApoB48 (カイロミクロン) 合成への影響は認められなかった。培地中への分泌に与える影響に関しては、コントロールと比べてヨモギ乾物終濃度 0.21, 0.91mg/ml および Atorvastatin 終濃度 10µM で有意に抑制した (Fig. 6)。



* コントロール群との有意差あり(n=3, p<0.05)

Fig.6 CaCo-2 培地中 ApoB48 (カイロミクロン) 分泌に対するヨモギ成分添加の影響

ヨモギ抽出成分が、コレステロール吸収ならびに合成モデル実験系 (CaCo-2 ならびに HepG2 細胞培養系) において、Atorvastatin 同様の効果を示したことから、ヨモギの動脈硬化予防食材としての可能性が示唆された。

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 2 件)

①Naoko Hiramatsu, A Study on Capability of Edible Yomogi to Prevent Atherosclerosis: The in vitro Inhibitory Effect of Yomogi Caffeic Acid on Human LDL Oxidation, Proceedings of the 19th International Joint Seminar Between the Dong-A University & the University of Hyogo, 査読無, 19, 2011, 25.

② Naoko Hiramatsu, Studies on Functional Components of Japanese Traditional Herb Yomogi for Prevention of Lifestyle-related Diseases - Inhibitory Effect of Yomogi on Human LDL Oxidation in vitro, Proceedings of the 17th international joint seminar between university of Hyogo and Dong-A university, 査読無, 17, 2009, 45-49.

〔学会発表〕(計 6 件)

①Naoko Hiramatsu, A Study on Capability of Edible Yomogi to Prevent Atherosclerosis: The in vitro Inhibitory Effect of Yomogi Caffeic Acid on Human LDL Oxidation. The 19th international joint seminar between university of Hyogo and Dong-A university, 2011, Dong-A university, Pusan, Korea

②平松直子・須原麻由・森下愛, 動脈硬化予防食材としてのヨモギの可能性を探る研究: CaCo-2 および HepG2 細胞培養系の各 ApoB48 および ApoB100 の合成・分泌を抑制するか?, 平成 23 年 5 月, 日本栄養食糧学会全国大会 (東京, お茶の水女子大学)

③ Naoko Hiramatsu, Studies on Functional Components of Japanese Traditional Herb Yomogi for Prevention of Lifestyle-related Diseases - Inhibitory Effect of Yomogi on Human LDL Oxidation in vitro, The 17th international joint seminar between university of Hyogo and Dong-A university, November, 2009, Dong-A university, Pusan, Korea

④河上智紀, 加藤陽二, 平松直子, 伝統的な食用野草のアク抜き処理が抗酸化活性に与える影響と成分の推定, 平成 22 年 10 月 日本家政学会近畿支部大会 (姫路, 兵庫県立大学)

⑤平松直子, 伊藤美紀子, 加藤陽二, 阿尾達紀, 山中誠也, ヨモギの動脈硬化予防食材としての可能性を探る研究, 平成 22 年 10 月, 日本家政学会近畿支部総会 (姫路, 兵庫県立大学)

⑥平松直子, 山本大志, 永井成美, 加藤陽二, 日本産ヨモギ茶飲用が血管内皮機能 (動脈硬化抑制指標) に及ぼす影響, 平成 22 年 5 月, 第 64 回日本栄養・食糧学会大会 (徳島, アステイとくしま)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-hyogo.ac.jp/shse/hiramats/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 直子 (HIRAMATSU NAKO)

兵庫県立大学・環境人間学部・准教授

研究者番号: 30099585