

## 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15日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300272

研究課題名（和文）

香辛野菜の調理加工による機能性含硫成分生成と体内プロドラッグ効果の検証

研究課題名（英文） Chemical evaluation for functionality and toxicity of pungent compounds in vegetables and spices.

研究代表者

森光 康次郎 (MORIMITSU YASUJIRO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：00244533

研究成果の概要（和文）：

代表的な香辛性の食品機能成分として、スルフィド類（ニンニク）とジンゲロール類（ショウガ）に着目し、加熱調理加工による変化と生理機能、代謝物ベースによる作用機構の解明を行った。マイルドな加熱調理加工において、ニンニク中のジアリルジスルフィド（DADS）の生成が有意に増加した。DADSの動物投与実験において、主要臓器で有意な第二相解毒酵素誘導能を示した。質量分析によるDADSの代謝物解析から、代謝物（推定）による生理機能性である可能性を示した。また、胃癌細胞を用いた生理機能（アポトーシス）と毒性（ネクローシス）の濃度範囲を、ジンゲロールとショウガオールを比較しながら精査した結果、通常の摂取量で双方の毒性は観測されなかった。また、ジンゲロールの生理機能性には、食品としての摂取量よりも多くの濃度が必要であったのに対し、ショウガオールは低濃度で高い胃癌アポトーシス誘導能を示した。

研究成果の概要（英文）：

Sulfides in the *Allium* vegetables and gingerols in ginger, the representative spicy or pungent compounds in foods, were examined for their functionality, bioavailability, and metabolites. First, the contents of diallyldisulfide (DADS) were increased in garlic during a mild heat cooking. The administration of DADS has been shown in the inducing activity of phase II detoxification enzymes in vivo. The putative metabolite of DADS thought to be affected with this induction activity. On the other hand, 6-Gingerol and 6-shogaol reduced gastric cells viabilities depend on their concentrations, but no toxic effects was observed for normal gastric cells isolated from ICR mice even in high concentration. The results of staining with 7-AAD and Annexin V on gastric cancer HGC-27 cells showed that 6-shogaol remarkably induced apoptosis at 2  $\mu$ M and induced necrosis at 100  $\mu$ M.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

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：香辛成分、含硫成分、加熱調理、第二相解毒酵素誘導、細胞毒性、ジアリルジスルフィド、ショウガオール、グルタチオン付加体

## 1. 研究開始当初の背景

ネギ属野菜（ニンニク、タマネギなど）やショウガ科野菜（ショウガ、ミョウガなど）の重要な機能性として、第一に香りや辛味などの香辛機能が挙げられる。また、食の三次機能（生理機能）としても、抗菌活性や血流改善効果（含む血小板凝集阻害活性）、発がん抑制効果などがすでに知られており、その機能性成分としてスルフィド類やジンゲロール類をはじめとする香辛性の機能性成分が本体であると結論付けられてきた。

(1) スルフィド類は加熱調理などにより、ネギ属野菜から二次的に生成する食品含硫成分である。一方、ある種の動物（イヌなど）にネギ属野菜を摂取させると、溶血性貧血や消化器官の組織変性などが短時間に起こることも知られている。近年の研究から、これらの毒性にもスルフィド類の関与が明らかとなってきた。

(2) また、ショウガは生姜（しょうきょう）と乾姜（かんきょう）という生薬素材としての利用歴も長く、その主な辛味成分がジンゲロールとショウガオールであることも周知されている香辛野菜である。食品からの正常な摂取量では毒性を考慮する必要はないが、サプリメントなどによる高濃度摂取といったケースに対して、その生理機能性と毒性に関する情報は乏しい。

これら研究開始当初の背景から、本研究では調理加工に伴い生成または変化していく重要な香辛成分に着目し、その生理機能と作用メカニズム、さらには大量摂取による毒性を考慮し、生体内代謝物を化学ベースで明らかにしたいという動機があった。

## 2. 研究の目的

世界の大部分の国々において利用歴が長く、また成分や生理機能性が広く認知されている香辛野菜の代表として、ネギ属野菜とショウガ科野菜に注目した。それらの生理機能性を示す成分としては、ネギ属野菜ではスルフィド類が、ショウガではジンゲロールとショウガオールが知られている。

(1) 本研究では、ニンニクの加熱調理加工において変動する含硫成分を分析し、ヒトがニンニクを摂取する場合に重要な含硫成分の機能性と毒性を、代謝物にターゲットを絞って解析することを目的とした。

(2) また、ジンゲロールとショウガオールについては、胃がん細胞を用いた生理機能（アポトーシス）と毒性（ネクローシス）の濃度範囲を検討し、同じく機能性と毒性に関して精査した。

## 3. 研究の方法

(1) ニンニク加熱調理加工によるスルフィ

ド化合物の生成は、ニンニクをブロックヒーターまたは煮熟（沸騰水）にて加熱後（様々な温度条件）、脂溶性成分を有機溶媒（ヘキサン/酢エチ系）で抽出し、GC（カラム:DB-1、0.25mm×30m）にて定法に従い分析した。ニンニクオイル（食品添加物、米国製）についてもブロックヒーター加熱にて処理し、GC分析を実施した。

(2) ニンニク加熱物や DADS、ジアリルトリスルフィド (DATS)、その他の含硫化合物についてラット肝上皮由来正常 RL34 細胞を用いて、細胞生存率を MTT アッセイにて、第二相解毒酵素誘導能 (GST, NQO1) を CDNB アッセイにて測定した。さらに、ウエスタンブロットにより発現しているタンパク質量を特異抗体により検出し、定量した。同様に、ICR マウス（雌、4 週齢）に胃内強制投与にて 2 日間～4 日間、DADS、DATS、その他の含硫化合物を投与し、各種臓器に関して第二相解毒酵素誘導能 (GST, NQO1) と、ウエスタンブロットにより発現しているタンパク質サブタイプ量を定量した。

(3) DADS を投与した臓器の LC-MS 分析

(Q-trap; ABSciex 社) にて代謝物の分析を行った。推定した含硫化合物に関しては、有機合成を行い調製し、各種機器分析で同定した。さらに、RL34 細胞を用いて第二相解毒酵素誘導能を測定した。

(4) ショウガ抽出物、ジンゲロールとショウガオール（ともに本研究室合成品）に関して、ヒト胃がん由来 HGC-27 細胞またはヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて、細胞生存率を MTT アッセイにて測定し、7-ADD と Annexin V（ともに蛍光色素）を用いて、マイクロビデオ撮影もしくは蛍光位相差顕微鏡 (FX-100、オリンパス) を用いて、アポトーシスとネクローシスの判断を実施し、定量化した。また、カスパーゼ 3/7 活性についても、GloMax 96 マイクロプレートリーダー（プロメガ）にて測定した。

## 4. 研究成果

(1) ニンニクの高濃加熱（ブロックヒーター、150°C、200°C、250°C）において、ニンニク（スライス）、ニンニクオイルとも DATS よりも硫黄数の多い含硫成分が加熱時間とともに増加した。つまり、硫黄数が 4、5、6 と加熱香気としては好ましくない状態へと変化するにつれ、RL34 細胞に対する細胞毒性が一気に上昇した（1 µg でも 90% 死滅、250°C、30 分加熱-ニンニクオイル）。加熱香気としても好ましい（150°C、5 分）においては、DATS 含量が最大となり 100 µg 添加においても細胞毒性が認められなかった。また、第二相解毒酵素誘導能 (GST) も生ニンニクの 2 倍まで上昇した（10 µg 添加時）。一方、煮熟ニンニクにおいては硫黄数が 3 つまでの DATS の

生成に留まり、DADS が常に生成する含硫化合物の主生成物であった。日常の加熱調理加工の温度や時間を鑑みるに、摂取している加熱ニンニク由来の含硫成分としては、DADS がメジャーであり、DATS がマイナーだが 2 番に多い含硫成分であると推定された。

(2) そこで、最も多く加熱調理加工由来で摂取しているであろう DADS に着目し、その細胞毒性と第二相解毒酵素誘導能 (GST、NQO1) を酵素活性とウエスタンブロットにてタンパク質発現量を調べた。その結果、RL34 細胞においては、DATS は 2  $\mu$ M でも GST、NQO1 とともに 2 倍に活性、タンパク質とも誘導した。ただし、50  $\mu$ M 添加時に細胞生存率が 50% を切って細胞毒性を示した。一方、DADS の細胞生存率は、100  $\mu$ M 添加時でも 90% 以上と毒性が低かった。ただし、第二相解毒酵素誘導能に関しては、25 $\mu$ M 添加時で 1.5 倍の誘導と DATS に生理機能性では劣ると考えられた。

さらに、DATS と DADS を高濃度 (200 mg/kg/day) と低濃度 (2 mg/kg/day) の 2 段階の濃度で ICR マウスに胃内強制投与した。期間は 2 日間~4 日間で連続投与し、解剖後、各種臓器 (肺、胃、腎臓、肝臓、十二指腸、小腸、大腸) について第二相解毒酵素誘導能を同様に調べた。その結果、高濃度、低濃度ともマウスの肝重量などの解剖的異常所見は認められなかった。過去の研究にて、低濃度投与で 4 週間のゾンデ投与実験を実施したが、同じく毒性等は認められなかった。培養細胞実験では、DATS に強い細胞毒性が認められたが、動物実験における高濃度投与実験では、DADS とともに毒性がなかったことから、単回~数回における DATS の毒性は弱いものと考えられた。

一方、第二相解毒酵素誘導能については、肝臓において DATS 投与群、DADS 投与群ともに 1.9 倍を超える高い誘導活性を示した (図 1)。また、図 2 に示したように、十二指腸における誘導活性は DATS 投与群、DADS 投与群ともに非常に高く、3 倍を超えた。肝臓、胃では、わずかながら DATS 投与群の方が DADS 投与群よりも誘導能が強い傾向が認められたが、十二指腸では、約 3.3 倍の DATS 投与群に対し、DADS 投与群は約 4.0 倍と、DADS の方が高い誘導活性を示した。DATS 投与群では、肝臓、胃において活性は高いが、有意差はないという結果が得られた。また、各臓器における NQO1 誘導活性も肝臓において高い誘導活性は認められなかったが、胃においては、DATS 投与群で約 1.8 倍、DADS 投与群で約 1.4 倍と、両者ともにコントロール群と比較して有意に高い誘導活性が認められた。十二指腸における誘導活性は DATS 投与群、DADS 投与群ともに約 1.7 倍の高い誘導活性を示した。また、GST アイソザイム 3 種の発現量、NQO1 誘導活性および NQO1 発現量の測定を行

ったところ、 $\alpha$  クラス、 $\mu$  クラスの誘導が活性測定同様に観測された (図 3)。

DATS および DADS を投与したマウスでの実験結果から、臓器特異性が大きく GST/NQO1 誘導活性について、肝臓および胃では DATS > DADS となり、十二指腸では DADS > DATS となった。

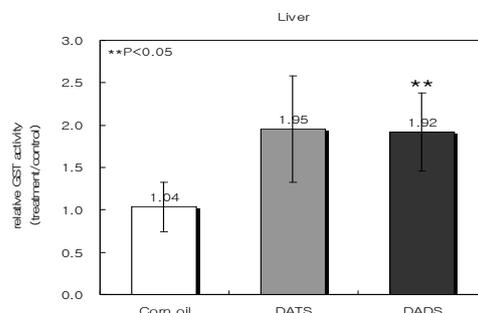


図 1. GST 誘導活性 (3 日間ゾンデ、高濃度)

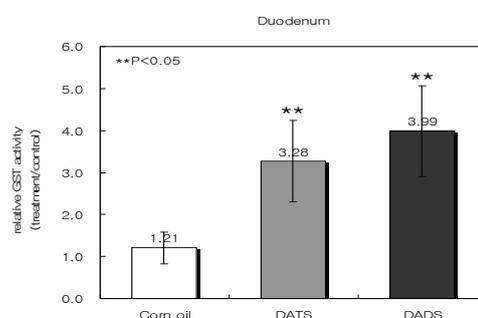


図 2. GST 誘導活性 (3 日間ゾンデ、高濃度)

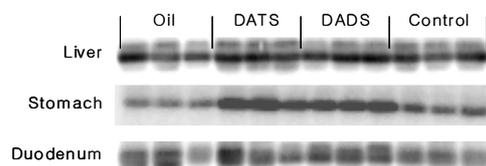


図 3. GST- $\alpha$  : ウエスタンブロット解析

(3) DADS を投与したマウス血清、臓器について、LC-MS 分析により代謝物解析を行った。肺や腎臓など臓器では特に代謝物は観測されなかった。血清と胃、十二指腸においては、原料である DADS が微量観測された。際立ったのは、肝臓において DADS のピークは検出できなかったが、2つのメジャーな含硫成分のピークを検出した。それぞれをアリルメチルスルホキシド (AMSO) とアリルメチルスルホン (AMSO<sub>2</sub>) と推定した。この化合物をアリルスルフィドから有機合成し、各種機器分析で確認後、同定した。本研究において、DADS がこの 2つの含硫成分の一部 (メジャーに?) 変化することを初めて明らかにできた。ただし、この 2つ含硫成分は、RL34 細胞においては全く第二相解毒酵素誘導能を示さなかった。これらは、先の科研費採択

研究（課題番号：17500532）の成果から、高い第二相解毒酵素誘導能を有していたアリシンが DADS により生成し、その安定代謝産物である可能性が推測された。しかし、アリシンは反応性が高いためか、今回の代謝産物分析では検出できなかった。

それでも、2つの含硫成分が細胞毒性を示す濃度は高いと推定され（ $> 500 \mu\text{M}$ ）、通常のニンニクまたはニンニクサプリメント摂取からは、DADS による健康的問題が生じにくいと推察された。むしろ、2つの含硫成分は異臭（体臭）に関与する成分として知られているため、そちらでの欠点が顕在化した。これにより、ニンニクのマイルドな加熱調理加工からの DADS 主生成、さらには体内代謝の経路を推定でき、途中で生理機能的にも有効なアリシンへの体内変換も予想され、温度条件がマイルドなニンニクの調理加工は、ニンニクの生理機能性を有効利用できるひとつの手段であることを明らかにした。一方で、過加熱（ディープフライなど）による調理加工では、DADS よりも硫黄数の多い不安定なスルフィド類の含量が大幅に上昇し、生理機能性が高くなる反面、細胞毒性濃度が極端に低くなることから、サプリ利用での濃度表示など注意喚起を促すべきケースが起りうるという結果が示された。

(4)次に、HGC-27細胞とCaco-2細胞を用い、MTT assayにて細胞毒性を調べた結果、各種野菜抽出物の中でもショウガ抽出物に強い細胞毒性が認められた。そこで、ショウガの辛味成分であるジンゲロール（6-、8-、10-）とショウガオール（6-、8-、10-）でさらにMTT assayを行ったところ、ショウガオールに特にHGC-27細胞に対する強い細胞毒性が認められた。この細胞毒性が、アポトーシスとネクローシスどちらによるものかを確認するため、Annexin Vと7-AADによる蛍光色素染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、低濃度（ $2 \mu\text{M}$ ）のショウガオール投与では、細胞表面がAnnexin Vによく染まり、アポトーシスが誘導されていると確認できた（図4-A）。高濃度（ $100 \mu\text{M}$ ）では、ネクローシスが発生していた（図4-B）。

一方、ジンゲロールでは、細胞毒性が強くなく、逆にアポトーシス誘導能弱かったものの、6-、8-、10-と側鎖が長くなるに従い高濃度（ $500 \mu\text{M}$ ）ではネクローシスが強くなるという傾向を示した。低濃度（ $10 \mu\text{M}$ ）では、細胞全体としての生存率をあまり減らさずにアポトーシス誘導を少し起こした形跡が、マイクロビデオ撮影の解析から示唆された。

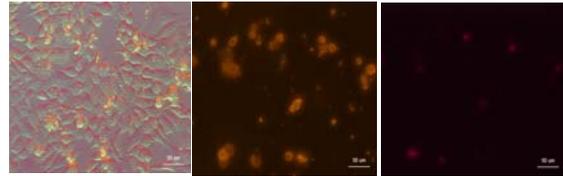


図4-A. 6-ショウガオール（ $2 \mu\text{M}$ ）

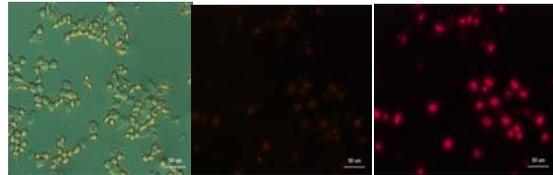


図4-B. 6-ショウガオール（ $100 \mu\text{M}$ ）

[蛍光顕微鏡観察映像：左から明視野、真ん中がAnnexin Vの蛍光、右が7-AADによる蛍光。]

カスパーゼ3/7活性について、6-ジンゲロールと6-ショウガオールの誘導を調べた結果、ジンゲロールでは高濃度（ $100 \mu\text{M}$ ）でも活性化せず、6-ショウガオールでは低濃度（ $2 \mu\text{M}$ ）で活性化していた。

また、6-ジンゲロールがTRAILと共存することでアポトーシスを誘導するという報告に着目し、6-ジンゲロール（ $150 \mu\text{M}$ ）とTRAIL（ $40 \text{ng/ml}$ ）によるカスパーゼ-3/7活性調べた。6-ジンゲロール、TRAILそれぞれ単独で添加した場合にはTRAILの方がカスパーゼ-3/7を活性化したが、どちらもポジコンよりは活性が低く、6-ジンゲロールとTRAILを共に添加した場合には単独で添加した場合に比べて著しく活性が高くなり、6-ショウガオール（ $2 \mu\text{M}$ ）とほぼ同じくらいの活性がみられた。サイトカインの中でアポトーシスを誘導するデスリガンド（FasL、TNFなど）は全てTNFファミリーに属し、その中の1つにTRAIL（Apo2L）がある。これが標的細胞の細胞膜にあるレセプターに結合することでアポトーシスを誘導するとされている。また、正常細胞に対する影響は少ないとされている。このTRAILと6-ジンゲロールが共存することで強いアポトーシス誘導能を示したことから、6-ジンゲロールがTRAILに何らかの影響を与えていることが考えられた。

ジンゲロールとショウガオールは、類似した化学構造を有するがアポトーシス誘導機序に違いがあると考えられた。ただし、その行為かを発揮できる濃度には大きな差があり、言い換えれば、ジンゲロールは一般の食生活での摂取量においては、何ら毒性を危惧することはないと推定された。一方、ショウガオールに関しては、通常も生ショウガにおいての含量が低いことから、例え調理したと

しても、特段危惧する量に増えることはなく、むしろ、サプリメントなどにおいて、高濃度に濃縮されたショウガオールを摂取する場合は、注意喚起が必要であるかもしれない。

ラット肝由来 RL34 細胞を用いた GST 誘導能を、HGC-27 細胞を用いた MTT の結果と比較してみると、細胞生存率の低下が顕著な食品成分ほど、GST 活性が高いという傾向が示された。食品成分の求電子部分において Keap1 の SH 基に対する反応と、チューブリン中の SH 基に対する反応は類似傾向がある可能性が高かった。一般的に、抗がん剤は活発に増殖している細胞(休止期 G0 以外)により多く取り込まれ作用すると考えられている。正常細胞では G0 期が長いのであまり影響を受けず、分裂を繰り返すがん細胞は単位時間当たり M 期を頻繁に繰り返すため、M 期が標的である微小管機能阻害剤によって影響を受けやすい。ただ、抗がん剤は細胞の増殖阻害をターゲットとしているが、正常細胞とがん細胞の区別はつかない。これと同様に、今回の研究において、ショウガオールは胃がん細胞の生存能力に影響を及ぼしたが、がん細胞に特異的に働いたというわけではない。正常細胞が傷つけば、当然副作用が起こる可能性もある。

それでも、ショウガオールの分子内には、 $\alpha, \beta$ -不飽和カルボニル骨格を有しているため、ジンゲロールとは異なり、生体内に多く存在する還元型グルタチオンとの付加体についても検討した。化学合成によりグルタチオン付加体を調製したところ、付加体は辛味刺激を減弱するだけでなく、高濃度投与においても細胞毒性が低いことが明らかとなった。モデル調理実験において、ショウガオール付加体の生成を分析したが、その生成量は低いものの、一部、ショウガオールの安定化・無毒化に寄与し、生体内での可逆反応による付加体から再遊離に伴いショウガオールの重要な供与体となっている可能性を示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

- ① 高沢香織、他 4 名、The apoptosis induction activities of major pungent components of ginger against gastric cancer cells、International Conference on Food Factors (ICoFF) 2011、2011 年 11 月 22 日、台北 (台湾)、台北国際コンベンションセンター
- ② 西村安澄、他 5 名、The effect of diallyl disulfide from garlic on the induction of phase II detoxification enzymes in

vitro and in vivo、International Conference on Food Factors (ICoFF) 2011、2011 年 11 月 22 日、台北 (台湾)、台北国際コンベンションセンター

- ③ 高沢香織、他 5 名、ショウガ辛味成分の抗がん作用に関する研究、第 26 回日本香辛料研究会、2011 年 11 月 19 日、福井県国際交流会館
- ④ 高沢香織、他 4 名、ショウガ辛味成分の抗がん作用に関する研究、日本農芸化学会大会、平成 23 年 3 月 27 日、京都女子大学 (京都：震災により直前の中止、ただし学会は成立)
- ⑤ 武藤知衣、他 6 名、セロリベビーリーフ中 phthalide 類の第二相解毒酵素誘導に関する研究、第 24 回日本香辛料研究会、2010 年 11 月 21 日、大阪市立大学 (大阪市)
- ⑥ 森光康次郎、食品中の香気成分と生理機能—親電子生物質の功罪、第 2 回抗血栓食品研究会 (招待講演)、2010 年 3 月 14 日、神戸学院大学 (神戸市)

[図書] (計 1 件)

- ① 黒林淑子、武藤知衣、森光康次郎、シーエムシー出版、スパイス・ハーブの機能と最新応用技術「第 12 章セリ科植物と機能」(分担共著)、2011、198-205

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森光 康次郎 (MORIMITSU YASUJIRO)  
お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授  
研究者番号：00244533

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし