

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月26日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05127

研究課題名(和文) ベトナム少数民族の伝統野菜と伝統果実の遺伝的特性と食品機能性の探索研究

研究課題名(英文) Field research of health benefit and genetic feature in heirloom vegetables and fruits preserved by Vietnamese ethnic minorities

研究代表者

中村 考志 (Nakamura, Yasushi)

京都府立大学・和食文化研究センター・教授

研究者番号：90285247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナム少数民族が保持するミントの伝統品種のうち、がん細胞分化誘導作用をもつP0型ミントの占有率はKho Mu族で高く、Dao族で低い傾向がみられた。P0の鏡像異性体の分化誘導作用は、(+)体がわずかに高い傾向がみられた。P0型ミントと分化誘導活性をもたないC型ミントの形態は同一で、遺伝子マーカーでも極めて近縁であった。また、系統によって葉面のトライコームの形態が異なっていた。P0型ミントは日本の植物病原菌に対する抵抗力が高く、葉茎部の収穫であれば日長感応性には影響を受けず、冬期の低温下を除いて年間7か月間収穫可能であったことから、日本における生産性は高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベトナムで栽培される野菜(ミント)について、普及種と少数民族が保持する伝統品種の中から、がん患者と糖尿病患者の生活の質を高める効果をもつ系統を探索して、その食品機能性と遺伝学的な特性を明らかにした。「和食の中に日本人のみがもつ食材や食習慣があれば、そこに日本人の長寿要因があるはずである」ことを念頭において、和食材の食品機能性を研究することに学術的意義はあるが、地球温暖化の進行により、日本の植物性食材が、亜熱帯性や熱帯性の食材へと変遷したときのこと想定して、将来、日本で栽培可能な食品機能性の高い世界の食材を見いだしておくこのような研究の社会的意義は高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：In mint race preserved by Vietnamese ethnic minorities, P0 (piperitenone oxide)-type mint (having differentiation-inducing effect for human colon cancer cells) was distributed highly in Kho Mu people, and hardly in Dao people. Biological evaluation of both enantiomers of P0 indicates that (+)-P0 showed the differentiation inducing effect at slightly lower concentrations than (-)-P0. P0-type mint and C-type mint (not having the differentiation-inducing effect) were the same in morphological shape and closely related in genetic marker; but different in leaf trichome type depend on some lines. P0-type mint possessed resistance against common plant pathogenic microbes seen in Japan. Crop yield of the leaves seemed unaffected by sensitivity to daylength, and was stable in 7 months between April to October. It was thus considered to be a high productivity in Japanese crop field.

研究分野：和食文化学

キーワード：少数民族 ベトナム 伝統野菜 伝統果実 ミント ズーボア がん予防 ピペリテノンオキシド

1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の進行により日本の植物性食材が、将来、亜熱帯性や熱帯性の食材へと変遷する可能性を念頭におくと、日本で栽培可能な機能性の高い亜熱帯・熱帯性の食材を見いだすことは重要と考えられる。この観点から本研究は、2010年から亜熱帯・熱帯気候に属するタイの Mahidol 大学薬学部とキングモンクット工科大学、ベトナムのハノイ医科大学の3大学と、本研究グループとの国際共同研究を開始し、亜熱帯・熱帯性の50種類の香草・野菜・果実から、がん治療につながる発がん抑制効果を示す食材を探索した結果、2012年に、9種類の食材の香気成分画分が、高分化型ヒト大腸がん細胞(RCM-1細胞)を用いた *in vitro* の分化誘導試験で活性を示すことを明らかとし、2013年には、スペアミントから piperitenone oxide (PO) を分化誘導物質として同定した。

ミントは易交雑性で雑種が多く、スペアミントとして市販されている品種でさえも、分化誘導活性をもつ PO を高含有する PO 型系統から全く含有しない系統、分化誘導活性をもたない carvone (C) を含有する C 型の系統まで幅広く存在していることが明らかになってきた。このため、本研究では、ミントの型の分布形態の傾向を見いだすため、生物地理学的検討と人文地理学的検討をおこなってきた。PO 型ミントの分布形態の生物地理学的検討については、2015年に検討し、タイ国内で採取したミント3系統の PO 含有量に差があったことから、栽培される系統、栽培地の気温・日照量・降水量の地域差、居住者の嗜好がこれに関係する可能性があると予想されていた。PO 型ミントの分布形態の人文地理学的検討については、2016年に検討されており、ベトナムに居住する11民族を調査し、5民族はC型ミントとPO型ミントを保持していたが、6民族はC型ミントのみしか保持していなかったことから、民族によるミントの型の選択が存在する可能性が示唆されていた。

以上をふまえ、本研究では、*in vitro* の分化誘導効果試験法で活性を示すがん細胞分化誘導物質である PO を、ヒトが食生活で可能な量の摂取で、腫瘍増殖抑制効果を得られることに期待し、PO の経口摂取での腫瘍増殖抑制効果における最小有効濃度の決定を目的とした検討をおこなった。その結果、マウスにおける最小有効濃度を 200 ppm と決定し、この値のマウスからヒトへの体重と摂食量を換算した外挿値から、ヒトが食生活で無理なく摂取できるミントの量で腫瘍増殖抑制効果を得るためには、ミント 100 g 中に PO を 3.5 g 含有する系統の同定が望まれたため、この値をミントの探索目標値として設定した。

C 型ミントと PO 型ミントの分布形態の生物地理学的検討と人文地理学的検討をおこない、設定した探索目標値の PO (3.5 g/100 g) を含有するミントの探索をおこなった。PO 型ミントの分布形態に傾向を見いだすことができれば、探索目標値の PO を含有するミントの効率的な採取作業を容易にするとともに、食文化と嗜好と健康の密接な関係が協働するフィールドの存在が示され、文化人類学的観点からの研究分野においても興味のある結果を提供できるかもしれない。もし、探索目標値の PO (3.5 g/100 g) を含有するミントが同定されれば、これまでにない「日常摂取可能な量の香草食を通しての健康増進」の一方法を提供することができると考えられる。

2. 研究の目的

ミントの香気成分のひとつであるピペリテノンオキシド(PO)は、がん細胞の分化誘導物質として同定され、混餌投与でマウスの腫瘍増殖抑制効果を示す発がん抑制成分でもある。ヒトがミントを日常摂取可能な量で発がん抑制効果を得られる環境を提供することを最終目標として、演者は、その初期段階の研究として、PO を高含有するミントの探索と、動物実験で腫瘍増殖抑制効果を得るための PO の最小有効摂取量(暫定値 200 ppm)を決定することを試みた。ミントは東南アジア大陸部に多く分布するが、PO を含有する系統(PO型)と分化誘導活性をもたないカルボン(C)を含有する系統(C型)が混在するだけでなく、両者は同一形態を示すことから、これが PO を高含有するミントを探索する上での大きな支障となっている。演者は PO を高含有するミント(暫定最高値 687 mg/100 g)の探索をおこなったが、PO 型ミントの高効率な探索のためには、PO 型と C 型の分布形態の傾向を見いだすことも重要と考え、これに生物地理学的・人文地理学的検討を加えながら、目的とするミントを同定することとした。

3. 研究の方法

発がん抑制試験：9週齢雌性ヌードマウスに PO 混餌食(10-150 ppm)を与えた2週間後に、ヒト大腸がん細胞(RCM-1細胞)を後頸部に移植し、腫瘍増殖抑制効果の有無を判定した。

PO 定量試験：ミントは東南アジアで採取した 203 系統と、日本の 6 系統を対象とし、同一環境で挿し芽生育させた後に、1 系統 5 葉部を試料とした。ミント葉部(ミント茎部の頂芽を0節目として、0-3 節目につく葉)を乳鉢にとり、2 ml のヘキサンを加えて乳棒で搗潰し抽出した。2 ml のヘキサンを加えて搗潰する抽出工程を 5 回繰り返した(5 回目の抽出で PO が含有していないことを確認)。抽出液を集め 10 ml にヘキサんで定容し、分析試料とした。紫外線(220 nm)吸収を指標とした吸光検出器を用いた逆相 HPLC により定量をおこなった。分析条件は以下に示したとおりである。カラム：YMC-Pack Pro C18、溶出液：0.1% FA/36% CH₃CN (40%)、

検出波長：220 nm，流速：1.0 ml/min，注入量：10 μ l (0.1 mg/ml). HPLC で PO が検出されたときは，PO の含有を保証するため，ガスクロマトグラフ マススペクトロメーター (GC-MS，島津製作所，GC-2010 Plus) を用いて定性もおこなった．分析条件は以下に示したとおりである．Column：HR20M，0.32 mm \times 0.5 μ m \times 30 m，Injection temperature：60 $^{\circ}$ C，Carrier gas：He (99.99995%)，Interface temperature：240 $^{\circ}$ C，Flow rate：2.31 ml/min，Source temperature：200 $^{\circ}$ C，Voltage：70 eV，Column temperature：60-240 $^{\circ}$ C，Current：400 μ A，Sample injection：3 μ l，GC のカラム温度条件は初温 60 $^{\circ}$ C (5 分間保持)，昇温速度 10 $^{\circ}$ C/min，終温 240 $^{\circ}$ C に設定し，質量分析の条件は 35-400 m/z 間を 0.5 秒ごとにデータを取り込むように設定した．HPLC におけるピークの保持時間が 17 分 46 秒かつ GC-MS において MW166 を示した時に PO を含有する PO 型ミントと同定して PO 含有量を求めた．

4．研究成果

PO 10-150 ppm の混餌投与でマウス腫瘍増殖抑制効果はなく，これまでの暫定値であった PO 200 ppm を最小有効摂取量と決定した．ミントの型の解析では，209 系統のうち，PO 型は 83 系統 (40%) 存在し，他は，C 型 125 系統と PO と C を含有する PO+C 型 1 系統であった．

PO 型ミントの局在を生物地理学的視点から検討すると，PO 型占有率 (全系統中の PO 型系統の割合) は，北ベトナム群 (北緯 18.9-23.1，東経 103.0-106.9) では 21% (155 系統中 33 系統) と低値であったが，タイ群 (北緯 7.0-20.5，東経 99.9-102.8) では 97% (39 系統中 38 系統)，南ベトナム群 (北緯 10.0-12.0，東経 105.1-107.3) では 78% (9 系統中 7 系統) と高値であった．しかし，北ベトナム群中の亜群を見ると，Nghê An 省亜群では 73% (15 系統中 11 系統) と高値であった．また，標高 700 m 以上では PO 型が 16% (44 系統中 7 系統) しか採取されなかったが，C 型は 84% (44 系統中 37 系統) 採取されていた．これらのことから，PO 型ミントの高効率の採取には，PO 型ミントの局在傾向がみられる，タイ，南ベトナム，北ベトナム Nghê An 省のうち，標高 700 m 未満のフィールドが今後の調査対象となるかもしれない．

一方，人文地理学的視点からはベトナムが 54 民族からなる多民族国家であることに注目し，このうち 22 民族が保持するミントについて民族的分布傾向の解析を試みた [A: Chăm 族，B: Dao 族，C: Giáy 族，D: Hà Nhi 族，E: H'Mông 族，F: Khơ Mú 族，G: Kinh 族，H: Lào 族，I: Lô Lô 族，J: Lự 族，K: Mạ 族，L: Mảng 族，M: Mường 族，N: Nùng 族，O: Ô Đu 族，P: Phù Lá (Xá Phó) 族，Q: Pu Péo 族，R: Sán Chay 族，S: Sán Diu 族，T: Tày 族，U: Thái 族，V: Xinh Mun 族]．その結果，人口構成第 1 位の Kinh 族には強い系統選択は見られなかったが，Khơ Mú 族は PO 型系統を，Dao 族は C 型系統を選択している傾向にあった．Khơ Mú 族と Dao 族には民族特有の嗜好の違いや伝統料理等の違いから，それぞれ PO 型ミントと C 型ミントを多く保持している可能性もあり，文化人類学的見地からも今後の研究を進めると，興味深い結果が得られる可能性があると考えている．

上記検討で，腫瘍増殖抑制作用を日常の食生活で無理なく得られるミントの探索目標値 (PO 含有量 3.5 g/100 g) を念頭において PO を高含有するミントを探索してきた．しかしながら，これまでに採取したいずれのミントもこの目標値に到達することはなかった．PO 含有量に及ぼす季節変動の検討では，春期よりも夏期の方が PO を高含有する傾向が見いだされた．日照時間，気温，湿度は日本の気候下では夏期の方が植物に優位であり，これにより PO の生合成が促進され，夏期の PO 含有量が春期よりも高い傾向を示したと考えられる．一方，23 系統中 2 系統では，夏期よりも春期で PO 含有量が高いことから，日本の夏期の気候に適さないミントも存在することも見いだすことができた．

ミントの PO 含有量の最高値は 1,121 mg/100 g であった．厚生労働省が推進する「健康日本 21」で目標設定している 1 日 350 g の野菜摂取量の 100%，50%，25% をミントに置換すると，ミント 100 g 中にそれぞれ 857 mg，1,714 mg，3,428 mg の PO を含有する系統を摂取することで腫瘍増殖抑制効果 (動物実験外挿) を得られると考えている．1,121 mg/100 g の系統のミントは上記範囲内にあり，動物実験外挿値からの推測ではあるが，ヒトは 1 日 276 g 以上摂取することで腫瘍増殖抑制効果が期待できると考えられる．著者は，ミントを生で 276 g 摂取することは困難であるかもしれないが，他の食材と和えたり，ミントティーとして飲用したり，ペースト状に加工して他の食材と和えたりすることで，1 日 276 g 以上を継続的に摂取することは可能と考えている．今後の展望として，PO を高含有するミントの探索において，本研究で見いだした PO 型ミント分布予測も考慮に入れて PO 含有量が 3.5 g/100 g に達するミントをさらに広範囲から探索すること，現有のミントを 1 日 276 g 摂取できる食事メニューを考案すること，PO のヒト臨床試験を実施して，ヒトが発がん抑制効果を得られるミントのより精確な摂取量を決定することに研究を発展させる予定である．

5．主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Nakamura Y, Sasaki A, Park EY, Kubo N, Nakamura T, Kubo Y, and Okamoto S, Expectations of health benefits in plant materials in Southeast Asia based on *Washoku* (Japanese cuisine) study focusing on *Kyo-yasai* (heirloom vegetables in Kyoto), *Mahidol Univ. J. Pharm. Sci.*, 42, 47-54

(2015) 査読あり

Rattananeerusee A, Thirapanmethee K, Nakamura Y, and Chomnawang TM, Differentiation-inducing effect in human colon cancer cells of essential oils, *Pharm. Sci. Asia*, 45, 154-160 (2018) 査読あり

Rattananeerusee A, Thirapanmethee K, Nakamura Y, and Chomnawang TM, Chemopreventive and biological activities of *Helicteres isora* L. fruit extracts, *Res. Pharm. Sci.*, 13, 482-492 (2018) 査読あり

[学会発表](計6件)

Nakamura Y, Expectation of health benefits in plant materials in Southeast Asia based on *Washoku* (Japanese cuisine) study, Joint Symposium with four Universities (KMUTT, KPU, KU, MUPY), on Basic and Applied Studies of Natural Products, 2015.9.14 (Bangkok, Thailand)

Okamoto S, Do unfavourable growth conditions impact on production of secondary metabolites in herbaceous plants?, Joint Symposium with four Universities (KMUTT, KPU, KU, MUPY), on Basic and Applied Studies of Natural Products, 2015.9.14 (Bangkok, Thailand)

Nakamura Y, Ethnic food materials for human health in Japan and Southeast Asia based on *Washoku* (Japanese cuisine) study, The 2nd Joint Symposium with five Universities (KMUTT, KPU, KU, MUPY, TSU), on Basic and Applied Studies of Ethnic Food Materials for Human Health, 2016.7.6 (Kyoto, Japan)

Sato S, Exploration of spearmint species highly containing piperitenone oxide in Southeast Asia, The 3rd Joint Symposium on Basic and Applied Studies of Ethnic Food Materials for Human Health, 2017.6.29 (Bangkok, Thailand)

Takeda S, Morphological classification of leaf hairs in *Mentha* that can be a good marker for suppressing cancer development, The 3rd Joint Symposium on Basic and Applied Studies of Ethnic Food Materials for Human Health, 2017.6.29 (Bangkok, Thailand)

Sato S, Nakamura Y, Sasaki A, and Tashiro Y, Identification of vegetation of spearmint strains with highly containing piperitenone oxide in Southeast Asia, The 4th Joint Symposium on Basic and Applied Studies of Plant Natural Products for Agriculture and Human Health, 2018.11.8 (Kagoshima, Japan)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡本繁久
ローマ字氏名：OKAMOTO Shigehisa
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：農水産獣医学域農学系
職名：准教授
研究者番号(8桁)：30211808

研究分担者氏名：久保中央
ローマ字氏名：KUBO Nakao
所属研究機関名：京都府立大学
部局名：生命環境科学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：60347440

研究分担者氏名：中村貴子
ローマ字氏名：NAKAMURA Takako
所属研究機関名：京都府立大学
部局名：生命環境科学研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：70305564

研究分担者氏名：武田征士

ローマ字氏名：TAKEDA Seiji
所属研究機関名：京都府立大学
部局名：生命環境科学研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：90508053

研究分担者氏名：伊達修一
ローマ字氏名：DATE Syuichi
所属研究機関名：京都府立大学
部局名：生命環境科学研究科
職名：講師
研究者番号(8桁)：80236786

研究分担者氏名：久保康之
ローマ字氏名：KUBO Yasuyuki
所属研究機関名：京都府立大学
部局名：生命環境科学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：80183797

研究分担者氏名：倉持幸司
ローマ字氏名：KURAMOCHI Koji
所属研究機関名：東京理科大学
部局名：理工学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：90408708

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。