

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：18580167

研究課題名 (和文) マングローブ樹種の機能性成分について

研究課題名 (英文) Bioactive substance from Mangrove trees

研究代表者

金城 一彦 (kinjo kazuhiko)

国立大学法人 琉球大学・農学部・教授

研究者番号：10167380

研究成果の概要：マングローブ樹種の抗酸化活性、抗腫瘍活性、抗菌活性について検討した。各樹種の中で抗酸化活性の高いヤエヤマヒルギ樹皮メタノール抽出物から抗酸化物質として 9 種類のフラボノイド化合物を単離、同定しそのなかで glabrosideA が EGC g と同程度の活性を示した。抗腫瘍活性はヤエヤマヒルギ樹皮メタノール抽出物中の酢酸エチル画分に見られ、マウスの延命効果はないが、腫瘍のサイズや臓器への転移を抑制した。木材腐朽菌に対する抗菌活性はオヒルギ幹メタノール抽出物で最も高かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	450,000	3,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林産科学・木質工学

キーワード：マングローブ、抗酸化活性、抗腫瘍活性、抗菌活性、フラボノール、カテキン

1. 研究開始当初の背景

マングローブは熱帯および亜熱帯の海岸や河口の一部の海水あるいは淡海水の潮間帯泥土地に生える常緑低木または高木植物種の総称である。Watoson によると世界で約 80 種が分布する。これまでの東南アジアの調査をとおして、マングローブ林帯を生活の場とする人々が様々な形でマングローブを利用していることを知った。そのような中でマングローブを下痢止め、解熱剤、アストリンゼン等の民間薬として利用されていることに興味を持ち、日本に分布しているマングローブの機能性成分について検討することにした。

2. 研究の目的

沖縄県にはヒルギ科のメヒルギ、オヒルギ、ヤエヤマヒルギ、クマツヅラ科のヒルギダマシ、シクンシ科のヒルギモドキ、マヤブシ科のマヤブシの 4 科 6 属 6 種とトウダイグサ科のシマシラキ、アオギリ科のサキシマスオウ、ミミモチシダ、ヤシ科のニッパヤシ等でマングローブ林が構成され、総面積は 500ha である。マングローブは燃料 (薪材、木炭材)、染料 (衣類、魚網)、飼料 (ヤギやラクダの飼料)、用材 (建築材、家具材、支柱、パルプ、足場材)、薬剤等として利用さ

れている。

これまでにヒルギ科の *Bruguiera sexagula*, *B. exaristata* からブルギン、*B. conjugata* からブルギエロールが単離され、Sarcoma 180、への抗腫瘍活性および殺虫作用、シマシラキから単離されたジテルペンが炎症作用、抗 HIV 作用、オヒルギから単離されたブルギエロールがシロアリを殺す作用を有する生理活性物質がマングローブから報告されている。

本研究では日本に分布するマングローブ林の主要構成樹種であるヒルギ科の樹種（オヒルギ、メヒルギ、ヤエヤマヒルギ）を中心としてマヤブシキ、シマシラキ、サキシマスオウの葉、樹皮、幹、根のメタノール抽出物の抗酸化活性、抗腫瘍活性、抗菌活性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 供試材料

オヒルギ、ヤエヤマヒルギ、メヒルギ、マヤブシキ、シマシラキ、サキシマスオウの樹皮、幹、葉、根を使用した。

(2) マングローブの抗酸化活性

DPPH ラジカル消去活性測定及び分画

① DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) の消去活性は試料溶液 (50 μ l 50%EtOH) に 200mM MES 緩衝液 (50 μ l)、50%EtOH (50 μ l)、400 μ MDPH (EtOH) を加え、20 分後に 520nm の吸光度を測定した。

消去活性 = $(1 - A/B) \times 100$ で計算する

A: サンプルの吸光度

B: サンプルの代わりに 50%EtOH の吸光度

② マングローブ樹種の中で DPPH ラジカル消去活性の大きいヤエヤマヒルギ樹皮メタノール抽出物の抗酸化物質について検討した。分画はメタノール抽出物を水に溶解し液・液分配により酢酸エチル、ブタノールフラクションに分けた。酢酸エチル画分はシリカゲルカラムに溶離溶媒としてヘキサン/酢酸エチル (5:5, 3:7, 0:10)、酢酸エチル/メタノールの混合溶媒 (9:1, 8:2, 0:10) で 6 フラクションに分画した。酢酸エチル/メタノール (9:1) フラクションを Extra-Clean high-capacity C18 cartridge を用い 80%メタノールで固層抽出を行った。抽出液を LiChroprep RP-18 のカラムを用い、0.1%蟻酸を含む 40%、50%、60%メタノールで溶出し、4 フラクション (F1-F4) に分画した。

F1 を LiChroprep Si60 シリカゲルカラムを用い、ジクロロメタン/メタノール/蟻酸 (90:10:0.1, 80:20:0.1, 50:50:0.1) で 7 フラクション (F1-1~F1-7) に分画した。F1-1 を Toyopearl HW-40 カラムを用い 70%、80% 100%メタノールで溶出し化合物 1, 2 の混合物を得た。F1-2 を同様の充填剤を用い、70

~100%メタノールで溶出し化合物 3, 4 を得た。F2 から同様な方法で化合物 5, 6 の混合物を得た。F3 を同様な条件でクロマトグラフィーを行い 6 フラクション (F3-1~F3-6) を得た。F3-3 を LiChroprep RP-18 カラムを用い 0.1%の蟻酸を含む 30%~70%メタノール溶出し、化合物 7, 8 を得た。F4 を Toyopearl HW-40 カラムを用い、70%~100%メタノールで溶出し化合物 9 を得た。単離した化合物は HRFAB-MS、ESI-MS、UV、C-NMR、H-NMR で分析し構造を決定した。

(3) マングローブの抗腫瘍活性

① 供試材料および試料の抽出と分画

採集したヤエヤマヒルギ樹皮を風乾後、粉碎し、メタノールを加え約 1 週間浸漬・抽出した。抽出液を濾過後、減圧濃縮しメタノール抽出物を得た。これを水に溶解し、液・液分配を行い酢酸エチルと水層に分画した。水層を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (CC) に付し、メタノール:水 (1:1)、アセトン:水 (1:1) の画分を得た。また、酢酸エチル画分を Sephadex LH-20 CC に付し、10 フラクションに分画し、各フラクションがマウス腹腔マクロファージの NO 酸性に及ぼす影響を検討した。

② マウス毒性試験及び細胞毒性試験

ICR 雄マウス (7 週齢、日本チャールズリバー株式会社) を予備飼育後供試した。分画した試料を溶媒に溶解し、濃度 10、30mg/ml に調整した。この 0.1ml/マウス/日で約 2 週腹腔内に隔日投与した。投与期間中一般状態を毎日観察し、試験終了後解剖し、剖検、血液検査および臓器重量を測定した。また MTS 法による RAW264.7 株細胞に対する細胞毒性試験を行った。

③ NO 産生量の測定

分画した試料について 40、200、400 μ g/ml、アセトン:水画分は 20、100、200 μ g/ml 濃度に調整後、投与し、RAW264.7 株細胞が産生する NO 量を調べた。酢酸エチルから分画したフラクションについても同様に調べた。NO 産生量の測定には市販の測定キット (NO₂/NO₃ Assay Kit-C II、同仁化学) を用い LPS 刺激下での産生量を測定した。マイクロプレートに培養上清に Griess 試薬を加え、550nm における吸光度を測定した。腹腔マクロファージは 5%プロテオースペプトンで ICR 正常マウスより誘導して用いた。

④ 酢酸エチル画分の抗腫瘍試験

ICR 雄マウス (8 週齢、日本エスエルシー株式会社) を 1 週間の馴化後使用した。Sarcoma-180 腫瘍細胞 (東北大学加齢医学研

究所より入手) をマウスの右背側皮下に細胞浮遊液 (1×10^5) 0.1ml を接種し、担癌マウスを作成した。腫瘍細胞の生着が肉眼的に確認されたマウスを1群20匹の2群に分け、酢酸エチル画分 (I) を隔日に腹腔内投与し、体重と腫瘍径を5日ごとに測定し、腫瘍容積を算出した。癌細胞接種から10週間後、剖検および腫瘍を摘出して重量を測定した。

(4) マングローブの抗菌活性

① 供試菌

木材腐朽菌のカワラタケ (*Coriolus versicolor* FFPRI 1030)、オオウズラタケ (*Tyromyces palustris* FFPRI 0507) を供試した。

② メタノール抽出および分画

オヒルギ、メヒルギ、ヤエヤマヒルギ、シマシラキ、マヤブシキ、サキシマスオウの葉、幹、樹皮、根を風乾後、粉碎しメタノールに浸漬、濾過し、ろ液を濃縮しメタノール抽出物を得た。メタノール抽出物を水に溶解し、酢酸エチルで液・液分配し、酢酸エチル相と水相に分画した。活性の見られた酢酸エチル相をシリカゲルカラムを用い、種々の溶媒で分画を繰り返した。

抗菌活性の測定は寒天希釈法を用いた。

4. 研究成果

(1) マングローブの抗酸化活性

DPPH ラジカル消去活性物質

各樹種と部位のメタノール抽出物における DPPH ラジカル消去活性はオヒルギ、ヤエヤマヒルギ、マヤブシキとも根より樹皮に強く認められ、特にヤエヤマヒルギ樹皮は EGCg に匹敵するほど強い活性が確認された。オヒルギ根は DPPH ラジカル消去活性は $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度で 24.4% と弱かった (Fig. 1.)。

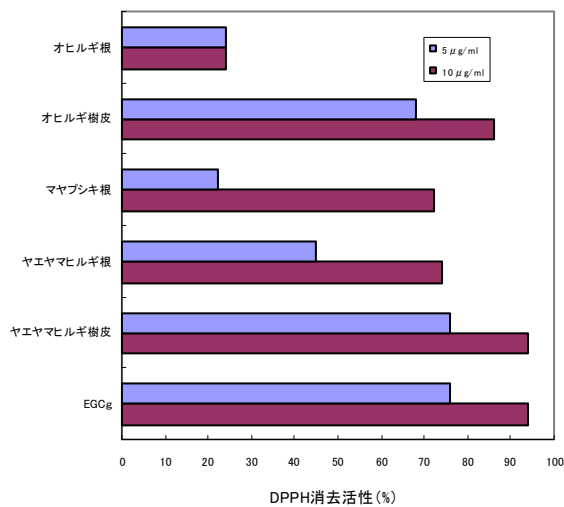


Fig. 1. 各部位メタノール抽出物におけるDPPHラジカル消去活性

最も DPPH ラジカル消去活性の高いヤエヤマヒルギ樹皮メタノール抽出物から各種クロマトグラフィーを組み合わせ9種類の化合物を単離し、機器分析により Fig1 のように同定し、それらの化合物のラジカル消去活性を Table1 に示した。

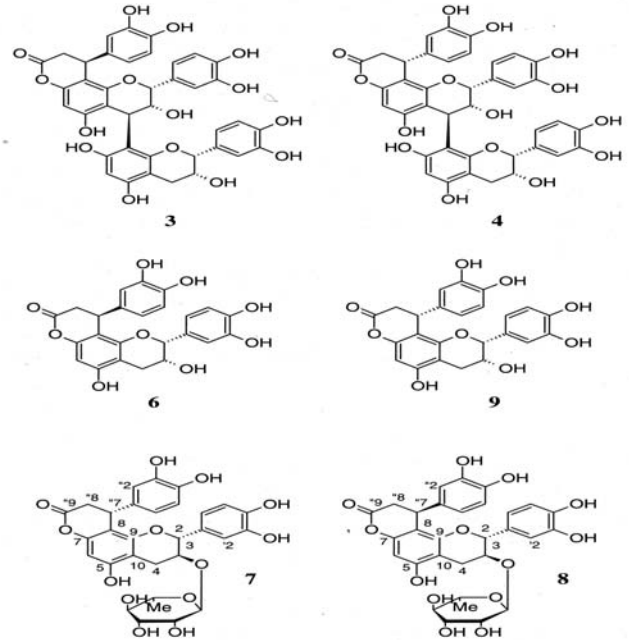


Fig. 2. ヤエヤマヒルギ幹から単離した化合物 3, 4, 6, 7, 8, 9 の構造

単離した化合物はいずれもアスコルビン酸よりラジカル消去能が高い。活性の強さは $\text{glabraoside} > \text{EGCg} > \text{cinchonain II b} > \text{cinchonain II a} > \text{glabraoside B} > \text{cinchonain I a} > \text{cinchonain I b} > (+)\text{-catechin} > (-)\text{-epicatechin} > (+)\text{-catechin 3-O-}\alpha\text{-L-rha} > \text{L-アスコルビン酸}$ であり、カテコールの単位を含んだ化合物の活性が大きい、化合物 glabraoside A は別であった。

Table 1 単離した化合物の DPPH ラジカル消去活性

Compound	EC50 (μM)
(+)-catechin (1)	18.4
(-)-epicatechin (2)	19.3
cinchonain II a (3)	7.3
cinchonain II b (4)	6.5
(+)-catechin 3-O- α -L-rha (5)	22.9
cinchonain I a (6)	9.3
glabraoside A (7)	4.6
glabraoside B (8)	8.6
cinchonain I b (9)	10.3
EGCg	4.8
L-sacorbic acid	36.7

(2) マングローブの抗腫瘍活性

①マウスの毒性および細胞毒性

ICR正常マウスおよびRAW264.7株細胞を用いて毒性4試料の毒性評価を行った。約2週間にわたって各試料を腹腔内に隔日投与した結果、アセトン：水画分で強い増加抑制作用が見られ、高用量群(30mg/ml)においてその影響はより顕著であった。剖検時の脾臓重量および血液検査において試験群間に差は認められず、対照群との比較でも差はなかった。胸腺の質重量にも試験群間で差はなかった。しかし、剖検所見において腹腔内の消化系臓器に癒着や腹水貯留などが散見された。特にアセトン/水画分で顕著であった。また、癒着は溶解液を投与した群では認められなかったため、試料中の成分による影響であると考えられた。一方のMTS法によるRAW264.7株細胞に対する毒性試験ではいずれの試料でも生存率曲線は用量相関的に推移し、培地中の試料濃度が低くなるほど細胞生存率は上昇し、0.39mg/ml暴露下で水可溶部と酢酸エチル画分が90%以上の高い生存率を示した。

②担癌マウスにおける酢酸エチル画分の抗腫瘍活性

Sarcoma-180担癌マウス作成後酢酸エチル画分(3mg/0.1ml/mouse/day)を隔日に約10週にわたって腹腔内投与した。腫瘍径を5日ごとに測定し、計算式から求め

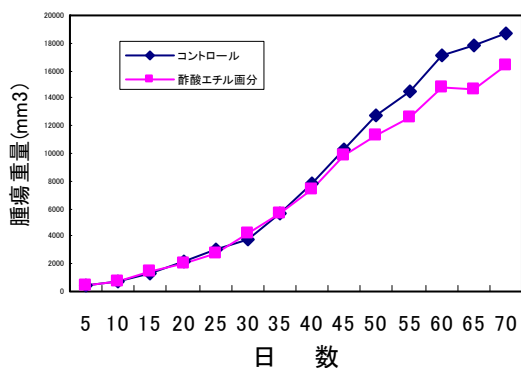


Fig. 3. 酢酸エチル画分の抗腫瘍活性
* : P<0.05

た推定腫瘍容積の推移をFig.3に示した。酢酸エチル画分投与群において投与開始50日目頃から推定腫瘍容積が対照群と比べて低値傾向にあった。腫瘍転移に関し、対照群においては四肢間接部や肺への転移が多く見られたが、酢酸エチル画分ではまったく見られず、この点は興味ある所見が得られた。また、マウスの生存率では有意な延命効果は認められなかったが、腫瘍の肺への転移および推定腫瘍容積において抑制傾向がみられた。

③Raw264.7細胞および腹腔内マクロファージのNO産生に及ぼす各分画物の影響

メタノール抽出物、酢酸エチル画分、メタノール：水画分およびアセトン：水画分がRaw264.7細胞のNO産生に及ぼす影響を検討した結果、4試料とも、暴露濃度が高いところではNOの産生量が低く、逆に暴露濃度が高いところではNOの産生量が多くなる傾向が見られた。

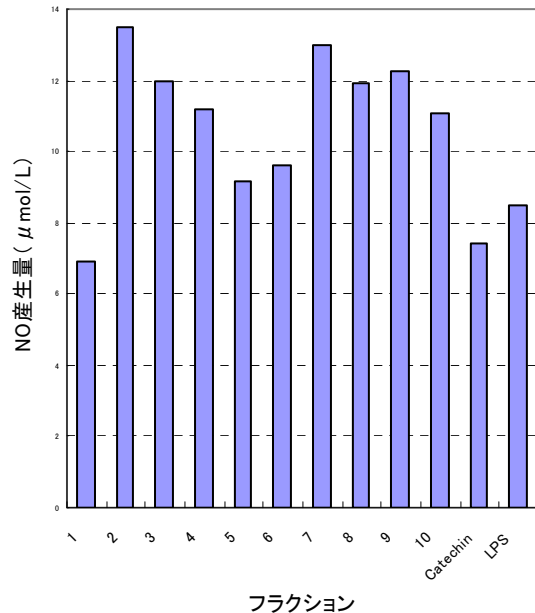


Fig. 4. 各フラクションのNO産生量

酢酸エチル画分をカラムクロマトで分画した各フラクションが腹腔内マクロファージに及ぼす影響をFig.4に示した。

10画分中9画分(Fr2~Fr10)ではNO産生量はカテキンの値(7.4μmol/L)を上回った。中でもFr2,7および9では13.5、13.1および12.8μmol/Lを示し、カテキンの約2倍であり、特にFr3が高い活性を示し、これらのフラクションが抗腫瘍活性成分の主体であると推定される。

(3) マングローブの抗菌活性

①各樹種および各部位におけるオオウズラタケ、カワラタケの菌糸成長

各樹種および各部位におけるオオウズラタケ、カワラタケの菌糸成長の結果をFig.5、6に示した。オオウズラタケについて見ると最も菌糸成長が阻害されたのはシマシラキの幹抽出物で他の樹種では阻害は20~40%で阻害は大きくない。また樹種によっては逆に菌糸成長が促進されたのも見られた。また、シマシラキは幹で阻害が見られるが葉では促進され同じ樹種でも部位によって菌糸成長に相違が見られた。

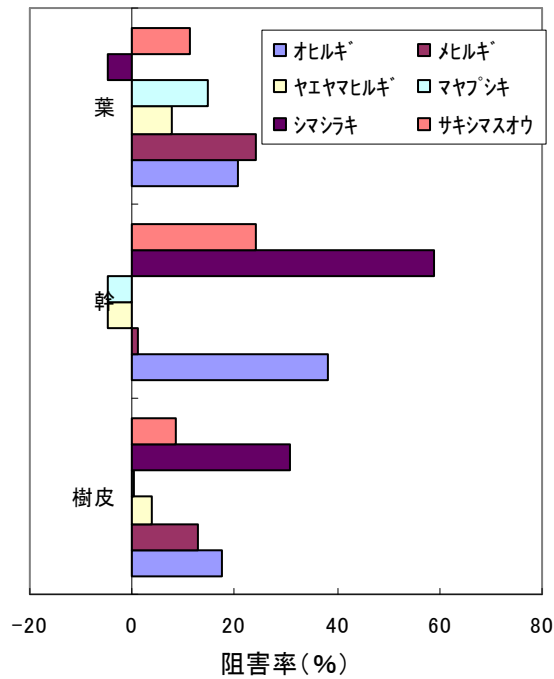


Fig. 4. 各樹種のカワラタケでの生長

各樹種でのカワラタケの生長を Fig. 5 に示した。最も菌糸成長が阻害されたのがサキシマスオウ葉、シマシラキ幹、オヒルギ幹の抽出物であった。以上のことからここでは試料の入手が比較容易であるオヒルギ幹のメタノール抽出物について抗菌活性を検討した。

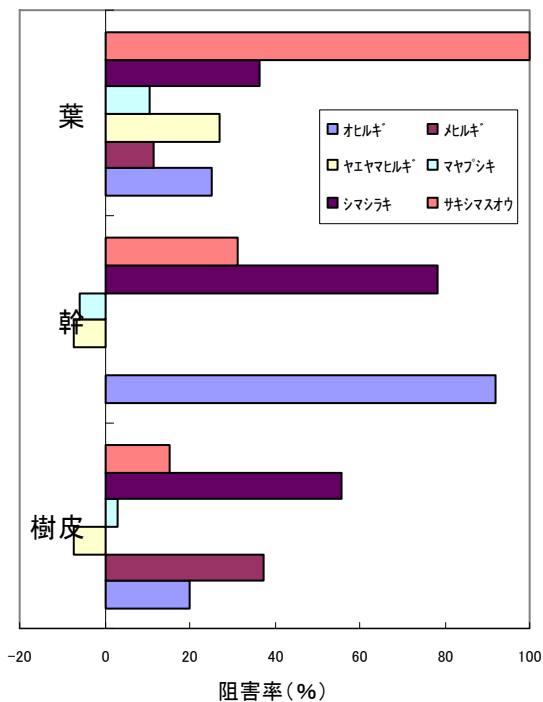


Fig. 5. 各樹種におけるカワラタケの生長

②オヒルギの抗菌活性

オヒルギを水に溶解し酢酸エチルの液・液分配で酢酸エチル相と水相に分画した。2分画で活性の見られたのが酢酸エチル相であった。酢酸エチル相をシリカゲルカラムを用いて溶離溶媒にヘキサン/酢酸エチル/クロロホルムを用い12フラクションに分画した。さらに活性の見られたフラクションを同様にカラムクロマトグラフィーを行い9フラクションに分画した。活性の見られた Fr2.1~Fr2.2 をカラムクロマトグラフィーを行い16フラクション (Fr3.1-Fr.3-16) に分画した。活性の見られたフラクション (Fr3.3-Fr3.12) をカラムで分画10フラクション (Fr4.1-Fr4.10) に分けた活性はフラクション4-9, 4-10に見られた。

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)

① 上地俊徳、黛和宏、高橋梢、野原敏次、金城一彦 ヤエヤマヒルギ樹皮メタノール抽出画分の生理活性—細胞毒性、抗腫瘍活性を中心として— 琉球大学農学部学術報告第55号 11-15頁 2008年 査読無

② Kensaku Takara, Ayako Kuniyoshi, Koji Wada, Kazuhiko Kinjyo and Hironori Iwasaki Antioxidative Flavan 3-ol Glycosides from Stem of *Rhizophora stylosa* *Biosci. Biotechnol. Biochem* 78 P2191- P2194 2008 査読有

[学会発表] (計4件)

① 金城一彦、高良健作、国吉綾子、和田浩二 マングローブ茎 Flavan-3ol 誘導体の抗酸化活性 第59回日本木材学会大会 2009年3月16日 松本市

② 金城一彦、横正紫、池田実沙季、上地俊徳 マングローブの抗菌活性 (II) 第64回日本森林学会九州支部大会 2008年11月22日 別府市

③ 横正紫、池田実沙季、上地俊徳、金城一彦 マングローブメタノール抽出物の抗菌活性 亜熱帯森林・林業研究会 2008年9月5日 那覇市

④ 高橋梢、上地俊徳、野原敏次、黛和宏、金城一彦 ヤエヤマヒルギ樹皮メタノール抽出物における抗腫瘍活性 亜熱帯森林・

林業研究会 2008年9月5日
那覇市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金城 一彦 (Kinjo Kazuhiko)
琉球大学・農学部・教授
研究者番号：10167380

(2) 研究分担者

上地 俊徳 (Uechi Shuntoku)
琉球大学・農学部・准教授
研究者番号：80305185

高良 健作 (Takara Kensaku)
琉球大学・農学部・准教授
研究者番号：00305187

(3) 連携研究者