

総 説

アカメガシワ葉の抗酸化活性及び活性成分の解析とヒト効果試験

Evaluation of antioxidative properties of *Mallotus japonicus* leaves and their components, and efficacy test in human

田畑 光正*

日本人の死因上位を占める悪性新生物，心疾患，脳血管疾患の発症や生体の老化には，生体酸化ストレスによる生体分子，生体組織の酸化的障害，酸化的修飾が深く関与していることが近年の研究により明らかになってきた．さらに，健康志向食品市場及びスキンケア，ボディケア等の機能性化粧品市場が消費者意識を刺激し台頭したため，生体酸化ストレスを中和，無毒化する抗酸化活性を有する食品・成分に関する研究が盛んに行われている．抗酸化活性を有する素材に関する報告は多数存在するが，詳細な研究が進められている緑茶，赤ワインと比較して遜色ない，あるいはそれ以上の抗酸化活性を有する食品素材に関する報告はほとんどない．そこで，優れた抗酸化素材を探索した結果，アカメガシワ葉に高い抗酸化活性を見出した．

アカメガシワ (*Mallotus japonicus*) は，トウダイグサ科 (Euphorbiaceae) の落葉高木であり，日本の本州，四国，九州に広く自生している．樹皮は健胃薬として胃酸過多，胃潰瘍に用いられる他，整腸作用にも利用されている．日本薬局方 (第14改正) は樹皮エキスを収載し，単離成分のベルゲニンを指標成分としている．また，種子については抗腫瘍活性，抗ウイルス活性が報告されている．一方，葉は吹き出物に対する民間療法として用いられている程度で未利用資源となっているのが現状であり，生理活性に関する学術的な報告は少ない．葉の抗酸化活性に関しても詳細に検証した報告はないため，抗酸化活性成分の解析等，未解明の点が多数存在する．

本総説では，アカメガシワ葉抗酸化活性の評価，活性本体の単離，同定及び抗酸化プロファイルについて詳述するとともに，ヒト摂取による効果試験について解説する．

1. はじめに

国連開発計画 (United Nations Development Programme, UNDP) の人間開発報告書2007/2008によると¹⁾，2005年時の出生平均余命，いわゆる平均寿命は2002年時と比較すると，177カ国の調査でサハラ以南の南アフリカで30歳代がなくなり (177位ザンビア40.5歳)，欧米では80歳代が増加している．また，人口一人当たりGDPと平均寿命データより，所得水準と平均寿命に高い相関があることが分かる．経済活動の格差は，平均寿命に40年もの差を生じさせているが，同時に人類の平均寿命は延びていると考えられる．この中で日本は，人口一人当たりGDPが世界17位でありながら，平均寿命は男女計が82.3歳で1位，男性が78.7歳で3位 (1位は，アイスランドの79.9歳)，女性が85.7歳で1位である．人口1億人を超える国でありながら，平均寿命が長いということは，社会格差が少なく，食生活，医療体制の水準が高く，平均的に維持されていることが要因の一つと考えられる．厚生労働省の報告によると，日本人の平均寿命は1950年が男性58.0歳，女性61.5歳，1970年が男性69.3歳，女性74.7歳，2000年が男性77.7歳，女性84.6歳であるから，日本は戦後の経済発展により所得水準向上とともに，平均寿命を延長させてきたといえる．

*機能性食品産業化プロジェクトチーム

一方，死因については明治，大正，昭和初期にかけては結核，肺炎，胃腸炎あるいはインフルエンザの大流行等の感染症が主であったが，昭和20年代後半以降は，悪性新生物，心疾患，脳血管疾患が主な死因に変化してきている．感染症に関しては，インフラの整備，医療技術の進歩により多くの感染症が致死に直結するものではなくなったこと，あるいは感染自体が抑制されたことによる．逆に，悪性新生物，心疾患，脳血管疾患に関しては，高齢化に伴い発症確率が高まるが，現在の医学は早期治療による治癒あるいは症状改善，身体機能回復技術向上等，一定の進歩はあるものの完全に制圧するまでには至っていない．今後，完全治癒に向けて医学の進歩が期待されるが，それと同時に疾病しない，あるいは遺伝情報等により個々の食生活を含む生活習慣を改善する，いわゆる未病時の対応が重要であると考えられる²⁾．世界を代表する長寿社会にあって，単に寿命が長いだけでなく，健康長寿であることが求められる．健康長寿は，国民の年齢構成が急速に上昇し，いわゆる高齢化社会が現実のものとなり，医療費の高騰が国家予算に大きな負担となっていることから早急な実現が必要な課題である．

このような状況の下，日本では1980年代に世界に先駆けて食品の「栄養」，「味覚」に続く第3次機能，いわゆる機能性食品の研究が展開されてきた．現在ではアメリカ，ヨー

ロッパをはじめ、世界各国で食品成分の生理生体調節機能が研究され、実用化、産業化されている。日本では平成3年より特定保健用食品制度が誕生し、認可された食品は医薬品でなくても生理生体に対する効果効能が表記できることとなった。本制度はこれまでに改正、条件緩和がなされているが、食品であるために誰でも容易に入手できることから、消費者を誤解や虚偽による事故等の不利益から保護するため、安全性、機能メカニズム解析等の高いハードルが課せられている。しかし、特定保健用食品制度により認可された食品だけでなく、生理生体調節機能が科学的に裏付けられた安心安全な素材・商品であれば、十分に商品価値を見出すことができる。具体的には、機能性成分の特定、動物およびヒトでの効果試験データ、あるいは有機栽培による差別化等が挙げられる。実際、健康志向食品市場は1990年代後半から急成長を遂げている。また、単に健康志向というだけでなく、体型、美肌等、外面的な生体調節機能にも需要は高まっているのが実情である。インターネット販売の普及、地産地消の考え方、地方発の物語性、ニッチ的な需要等を考慮すれば、より魅力的な商品、素材の提供により地方の中小零細企業であっても、販路のある大手企業と対等に競争が可能になると考えられる。よって、地方で機能性食品産業群を立ち上げるには生理生体調節機能の正確な科学的根拠に基づく（Evidence-Based）評価が必須であり、スタートであると考えられる。

島根県は産業振興のため、平成15年度より新産業創出プロジェクトを立ち上げた。この中の一つの柱である健康食品産業化プロジェクトは、「安心安全」、そして「科学的根拠」を担保した健康食品産業群の集積を目的に組織された。本プロジェクトは、島根県の独自性を担保できる素材について、企業主導型、県主導型により研究開発³⁻⁷⁾、商品開発及び販路開拓を行っている。平成20年度より機能性食品産業化プロジェクトに名称変更し、既存素材の商品化、ブラッシュアップ、そして継続的な商品開発システム構築（素材評価、加工工程等技術支援、販路、および流通構築支援）を行っている。この中で、「山野草を用いた健康食品の開発」は県主導型課題の一つである。これは島根県が平成12年度から平成14年度まで県立試験研究機関連携推進事業として共同研究を行った、「薬草等栽培技術の確立と利用技術の開発」で得られた成果⁸⁾をもとにスタートさせ

たものであり、同共同研究で行った抗酸化活性、抗アレルギー活性、抗高血圧活性、抗腫瘍活性等の素材の機能性評価結果から有望なものを選択して、生理生体調節機能の正確な科学的根拠を付加させるため基礎検証を行っている。本研究は、課題素材のひとつであるアカメガシワ葉の抗酸化機能に着目し、詳細な検証を行ったものである⁹⁻¹¹⁾。

2. アカメガシワ葉の抗酸化活性

抗酸化活性を有する素材をスクリーニングすることを目的とした評価試験により、アカメガシワ葉に最も強い抗酸化活性を見出した³⁾。さらに、既存抗酸化素材（商材）であり、抗酸化活性に関する報告が多数存在する緑茶、ルイボスティー、赤ワインとの比較を行った¹⁰⁾。総ポリフェノール濃度、抗酸化活性、総抽出成分量を表1にまとめた。総ポリフェノール濃度はフォーリンチオカルト法により測定し、没食子酸相当量で示した。抗酸化活性はDPPHラジカル消去活性を評価し、トロロックス相当量で示した。総ポリフェノール濃度は、アカメガシワ葉が最も高い値を示した。総抽出成分量はアカメガシワ葉 $7.5 \pm 0.3 \text{ mg/mL}$ 、緑茶 $7.6 \pm 0.3 \text{ mg/mL}$ 、ルイボスティー $3.8 \pm 0.3 \text{ mg/mL}$ であったのに対し、赤ワインは $32.5 \pm 4.7 \text{ mg/mL}$ であった。赤ワインの総ポリフェノール濃度は他の試料と近い値であったが、総抽出成分量が他の4.3～8.6倍であることから、単位抽出成分量あたりの総ポリフェノール濃度は他の試料を大きく下回る結果となった。抗酸化活性は、総ポリフェノール濃度と高い相関を示し、アカメガシワ葉の抗酸化活性は緑茶より高く、ルイボスティーと比較すると3.9倍、赤ワインと比較すると2.2倍高かった。各試料の総ポリフェノール含量と抗酸化活性の相関関係から、植物が原料である各素材の抗酸化活性はいずれもポリフェノールに起因することが示唆された。抗酸化活性を有する素材に関しては多くの報告が存在するが、緑茶を上回る抗酸化活性が報告された例はほとんどないことから、アカメガシワ葉は天然抗酸化素材としての利用価値が極めて高いと考えられた。

3. アカメガシワ葉抗酸化活性成分の単離及び同定

緑茶を上回るアカメガシワ葉抗酸化活性の由来物質を探索するため、活性成分の単離精製及び同定を行った。主要成分としてポリフェノールが強く示唆されたことから、ア

表1 各種素材の総ポリフェノール含量、抗酸化活性、総抽出成分量の比較

試料	N*	F-C**	DPPH***	総抽出成分量 (mg/mL)
		(mM gallic acid eq.)	(mM Trolox eq.)	
アカメガシワ葉	10	17.4 ± 2.2	26.6 ± 2.2	7.5 ± 0.3
緑茶	5	12.9 ± 0.7	23.6 ± 0.7	7.6 ± 0.3
ルイボスティー	5	6.5 ± 0.6	6.8 ± 0.8	3.8 ± 0.3
赤ワイン	6	10.3 ± 2.3	12.1 ± 3.0	32.5 ± 4.7

*試料数、**フォーリンチオカルト法による総ポリフェノール含量（没食子酸相当量）、***DPPHラジカル消去活性測定による抗酸化活性（トロロックス相当量）、値は平均値（3回測定）±標準偏差

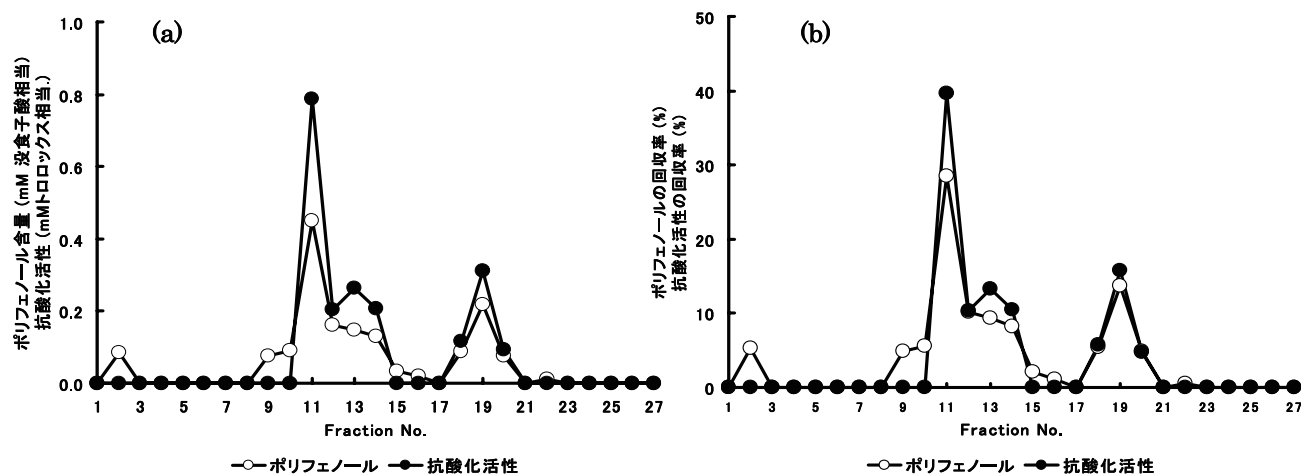


図1 アカメガシワ葉エキスをHPLCにより分画したフラクションのポリフェノール含量と抗酸化活性

(a) 各フラクションのポリフェノール含量と抗酸化活性, (b) 供与した試料に対する各フラクションのポリフェノール含量と抗酸化活性の回収率

アカメガシワ葉 1 mg 相当の熱水抽出液を、ODSカラムを用いた分取クロマトグラフィーに供与し、0～50%アセトニトリルグラジエントにより溶出させ、ポリフェノール画分と抗酸化活性画分が一致するかどうかを検討した。フラボノイドは植物由来ポリフェノールの代表でありフラボン及びフラボノールは340～370nmに、フラバン、フラバノンは270～295nmに極大吸収波長を持つこと、また奥田らのアカメガシワ葉ポリフェノールに関する報告文献^{12,13)}を参考にし、254nm、276nm、370nmにおける吸光度を測定した。その結果、254nmと276nmのクロマトグラムはほぼ一致したが、370nmのクロマトグラムは吸光度が低く、ほとんどのピークが検出できなかったことから、クロマトグラフィーによる分離は254nmで検出することとした。

回収した27フラクションのポリフェノール濃度と抗酸化活性を測定したところ、各フラクション別の両者の挙動は良く一致するとともに、254nmにおける吸光度のピークフラクション（フラクションNo.11）が最大のポリフェノール含量と抗酸化活性を示した（図1）。また、供与した抗酸化活性に対して回収された27フラクションの抗酸化活性の総和が100%に近いことから、アカメガシワ葉抗酸化成分は抗酸化活性画分に含まれるポリフェノールであると判断し、次の段階としてこれらの成分を単離精製し、同定することとした¹⁰⁾。

奥田らは、アカメガシワ葉ポリフェノールとしてベルゲニン、マロチン酸、マロツシン酸、コリラジン、ゲラニン、ルチン、エラグ酸を報告している^{12,13)}。このうち、標品が入手可能なベルゲニン、ルチン、エラグ酸とアカメガシワ葉熱水抽出エキスのクロマトグラムを比較した結果、ベルゲニンと溶出時間が同一のピークは検出できなかったが、抗酸化活性画分にルチンとエラグ酸と一致するピークが検出された。各標品とアカメガシワ葉熱水エキスを重ね打ちして溶出させるとピークは完全に一致し、さらにLC-MS解析を行い得られたmassスペクトルの結果より、m/z値がルチン及びエラグ酸の質量数と一致することが明

らかになった（図2、図3）。これらのことから、アカメガシワ葉抗酸化成分としてルチンとエラグ酸を同定した。また、エラグ酸が没食子酸の2量体であることから、没食子酸の標品を用いて同様に溶出パターンを比較したところ、溶出時間が一致するピークを見出し、これらは重ね打ちでも単一ピークとなった（図4）。アカメガシワ葉が没食子酸を含有するという報告はないが、ガロイル基をもつマロチン酸、マロツシン酸を含有することが報告されていることから、これらの結果はアカメガシワ葉が没食子酸を含有することを支持する実験結果と考えられた。

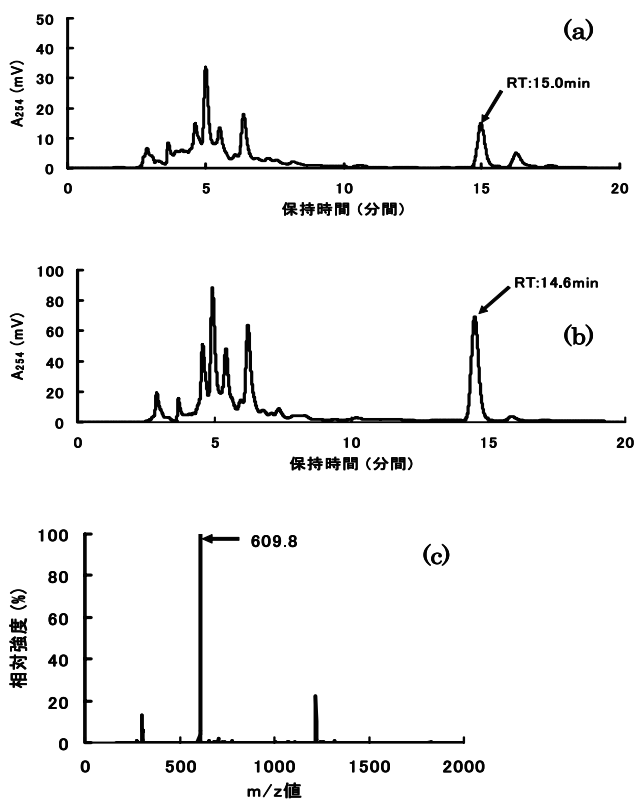


図2 ルチンの同定

(a) 熱水抽出液のHPLCクロマトグラム, (b) 熱水抽出液と標品の重ね打ちクロマトグラム, (c) ピーク成分のLC-MS解析結果

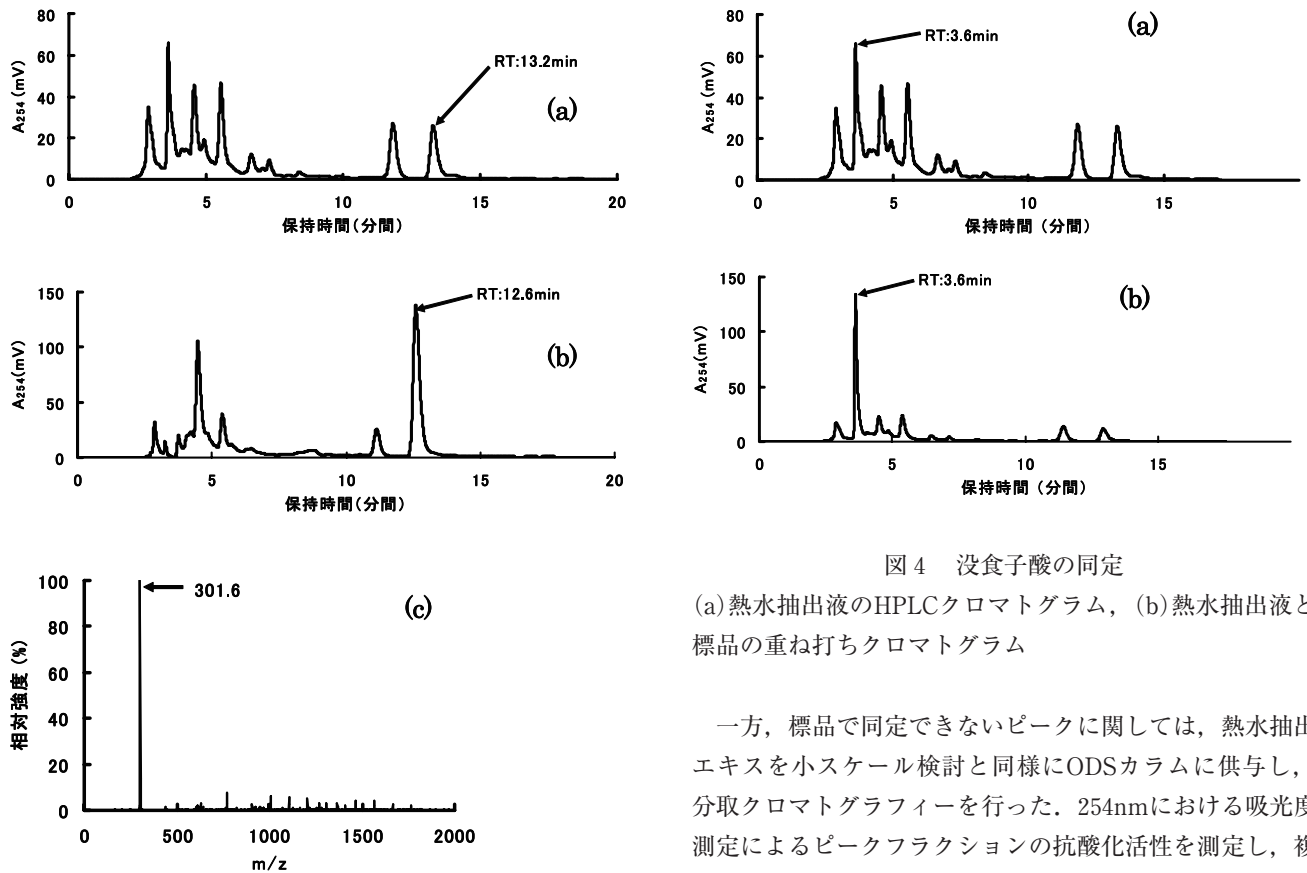


図3 エラグ酸の同定

(a)熱水抽出液のHPLCクロマトグラム, (b)熱水抽出液と標品の重ね打ちクロマトグラム, (c)ピーク成分のLC-MS解析結果

図4 没食子酸の同定

(a)熱水抽出液のHPLCクロマトグラム, (b)熱水抽出液と標品の重ね打ちクロマトグラム

一方、標品で同定できないピークに関しては、熱水抽出エキスを小スケール検討と同様にODSカラムに供与し、分取クロマトグラフィーを行った。254nmにおける吸光度測定によるピークフラクションの抗酸化活性を測定し、複数の活性画分を得た。各フラクションをODSカラムに供与し分取クロマトグラフィーを行い、単一ピークになるまでリクロマトし、4つの成分C1～C4を精製した(図5)。C1～C4をLC-MS解析した結果、これらのm/z値がマルチン酸、マルツシン酸、コリラジン、ゲラニインの質量数

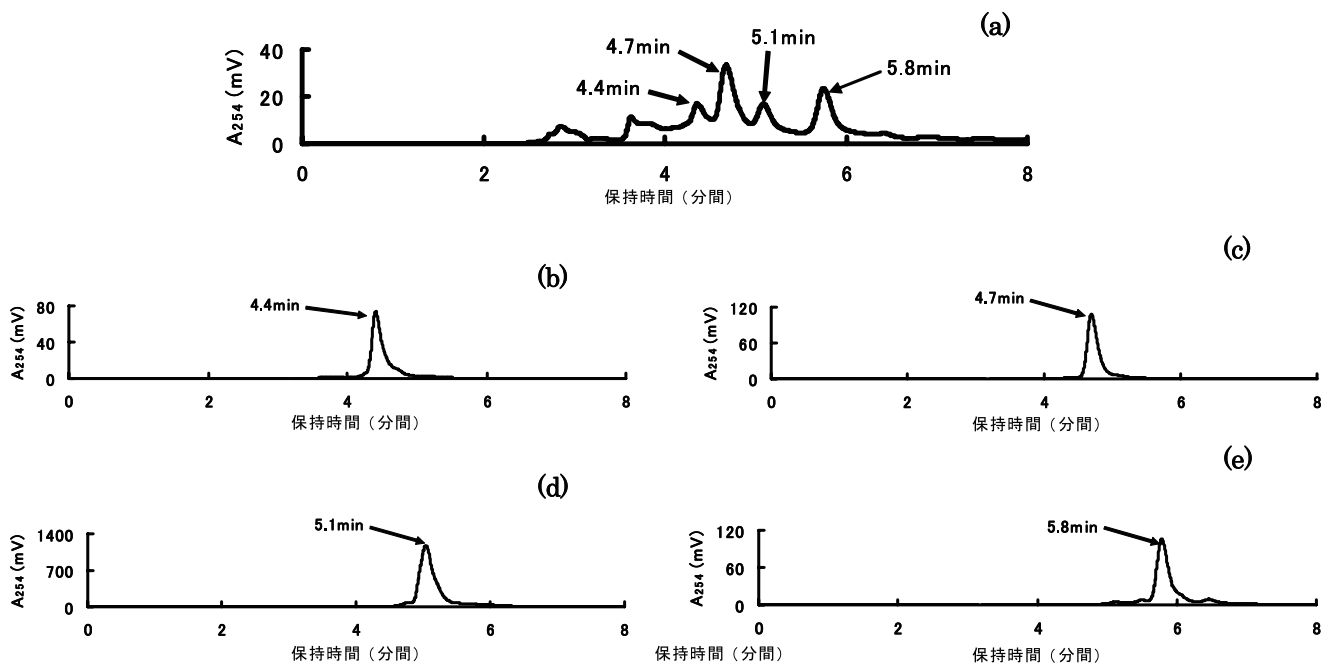


図5 アカメガシワ葉抗酸化成分の精製結果 (HPLC クロマトグラム)

(a)熱水抽出液, (b)C1, (c)C2, (d)C3, (e)C4

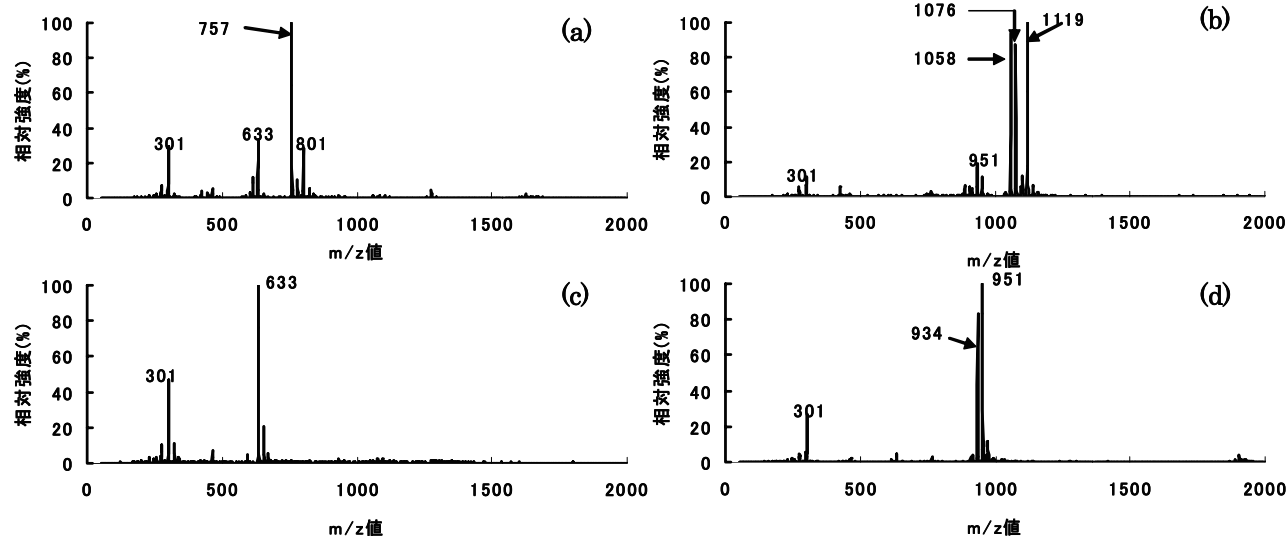


図6 精製成分のLC-MS解析結果

(a)C 1, (b)C 2, (c)C 3, (d)C 4

と一致した。またプレカーサーイオンから生じたプロダクトイオンの m/z 値は脱炭酸, 脱水, 脱ガロイル基等, 想定される脱離で生じる m/z 値と一致した(図6)。さらに, マロツシン酸とゲラニンを主要ポリフェノールとする構成(表2)が既報¹³⁾と一致したことから, C1~C4を各々, マロチン酸, マロツシン酸, コリラジン, ゲラニンと同定した(図7)。アカメガシワ葉抗酸化成分として7つのポリフェノールが同定されたことから, 各成分の構成, および主要に寄与する成分の特定を行った。採取した時期, 場所の異なるアカメガシワ葉試料について検討した結果, 抗酸化活性はアカメガシワ葉抗酸化成分の中でマロツシン酸, ゲラニンと高い相関を示した。また, 抗酸化活性が高い時期のアカメガシワ葉では, マロツシン酸とゲラニンがポリフェノールの主要構成成分(表2)であることから, アカメガシワ葉抗酸化活性に主要に寄与している成分はマロツシン酸とゲラニンであると考えられた。マロツシン酸は, 他のトウダイグサ科植物にも含有されていることが確認されているが含有量は少なく¹⁴⁾, アカメガシワ

葉に特徴的な抗酸化成分であると考えられた。また, アカメガシワ葉は抗酸化活性の他に血管強化作用のあるルチンを354mg/100g 生鮮重量(表2)含有することが示された。

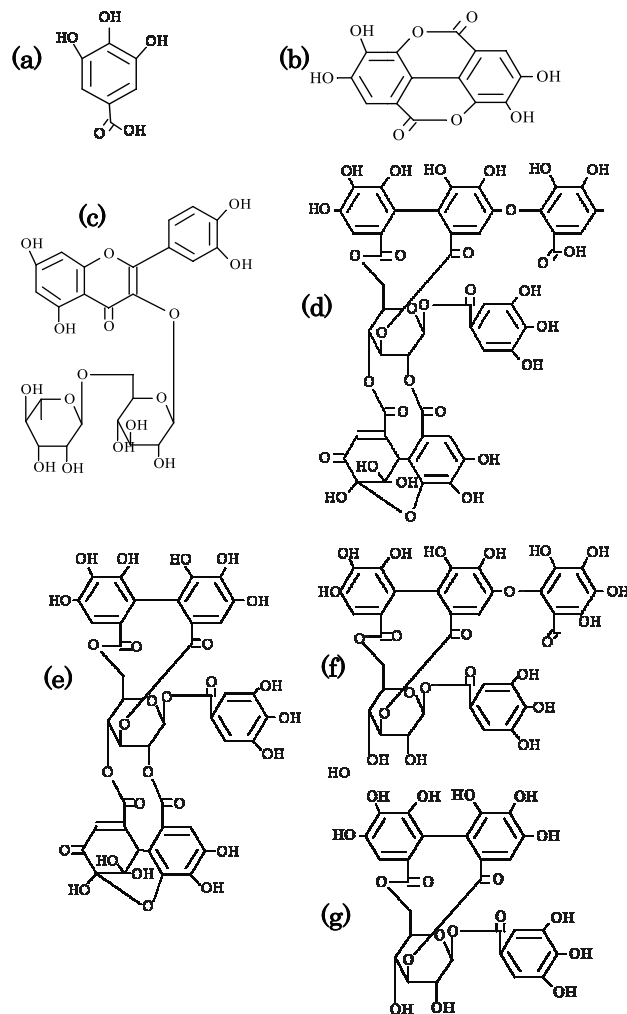


図7 アカメガシワ葉抗酸化成分の構造

(a)没食子酸, (b)エラグ酸, (c)ルチン, (d)マロツシン酸, (e)ゲラニン, (f)マロチン酸, (g)コリラジン

表2 アカメガシワ葉のポリフェノール構成

成分	含 量	
	実測値* (mg/f.w.100g)	相対値 (% of total)
マロチン酸	513±124	11.3
マロツシン酸	2250±276	49.5
コリラジン	34±30	0.8
ゲラニン	1247±204	27.5
没食子酸	126±4	2.8
ルチン	354±92	7.8
エラグ酸	17±11	0.4
合計	4542	100.0

*平均±標準偏差(新鮮重量 100g 当たり)

これはルチンの含有量が多いとされる韃靼ソバ（日本ソバの100倍程度）に近い含有量である。ソバでは、茹でると茹汁にルチンが移行してしまうことや、実よりも殻に多くルチンが含まれることを考慮に入れると、アカメガシワ葉はルチンの摂取源としても期待できることが明らかになった。

4. アカメガシワ葉抗酸化成分の解析

前述のとおり、アカメガシワ葉抗酸化活性の主要成分としてポリフェノールであるマロチン酸、マロツシン酸、コリラジン、ゲラニイン、没食子酸、ルチン、エラグ酸を同定した。アカメガシワ葉の抗酸化活性を解析するためには、主要成分個々の抗酸化能力を既存の抗酸化物質と比較することが重要であると考えられる。事実、抗酸化素材として報告が多い緑茶に関しては、主要成分であるカテキン類の同定とともに、各成分の詳細な抗酸化プロファイルについても多くの報告がある¹⁵⁻¹⁸⁾。そこで、アカメガシワ葉抗酸化成分のラジカル消去活性及び酸化ストレスに対する生体成分保護活性を、既存の抗酸化物質と比較し検討した^{10,11)}。比較するポリフェノール物質としては、緑茶の主要カテキンである(−)-エピガロカテキンガレート（以下、EGCG）、コーヒー等に含まれるクロロゲン酸、タマネギ、桑等に含まれるクエルセチンとした。ラジカル消去活性を測定するラジカル種としては、抗酸化活性のスクリーニングに広く使用されている合成ラジカルであるDPPHラジカルと生体内で生成する代表的な活性酸素種であるスーパーオキシドラジカル及びヒドロキシルラジカルを選択した。

DPPHラジカルに対する消去活性は、マロツシン酸が最大となりEGCGより有意に高い活性を示した。マロチン酸、コリラジン、ゲラニインはEGCGと同等の活性を示した（表3）。EGCGとアカメガシワ葉ポリフェノールのうち、タンニンであるマロチン酸、マロツシン酸、コリラジン、ゲラニインの4成分の持つ高いDPPHラジカル消去活性は、各々が含有する多数の水酸基に起因するものと考えられた。

スーパーオキシドラジカルとヒドロキシルラジカルは生体内で生成するが、前者は生体内での酸化反応の最初に生成し、細胞傷害を引き起こす種々のラジカルを産生する。一方後者は、生体傷害性の最も高いラジカルであり、鉄、銅等の金属イオンの存在下でスーパーオキシドラジカルより生成する¹⁹⁾。スーパーオキシドラジカルに対する消去活性を評価した結果、アカメガシワ葉タンニンがEGCGと同等の活性を示し、その他の物質と比較して強い活性を有することが明らかになった（表3）。DPPHラジカル消去活性評価ではマロツシン酸が最大であり、クエルセチンに対して3.4倍の活性を示したのに対し、スーパーオキシドラジカル消去活性評価ではマロツシン酸の活性はクエルセチンの16.6倍であった（表3）。DPPHに対する活性とスーパーオキシドラジカルに対する活性で差が生じた原因としてはラジカルの大きさ、ラジカル中心に対する抗酸化物質の接触頻度等による影響が考えられた²⁰⁾。ルチン、クロロゲン酸のラジカル消去活性が著しく低い理由としてはグルコシル化、エステル化等による影響が考えられた¹⁸⁾。ヒドロキシルラジカルに対する消去活性については、アカメガシワ葉タンニンとEGCGを比較した結果、明確な有意差はみられなかったもののアカメガシワ葉タンニンの方が高い傾向を示した（表3）。DPPHラジカル、スーパーオキシドラジカル、ヒドロキシルラジカルに対する消去活性の検討結果より、アカメガシワ葉はEGCGを含有する緑茶同様に、高い抗酸化ポリフェノールを有する優れた天然の抗酸化素材であると考えられた。

アカメガシワ葉抗酸化成分のうち、4つのタンニンであるマロチン酸、マロツシン酸、コリラジン、ゲラニインが高いラジカル消去活性を有することが確認されたことから、次に酸化ストレスに対する生体成分保護活性を検討した。生体成分としてタンパク質、脂質、ヒト血清由来LDLを用い、4つのタンニンを含有するアカメガシワ葉抽出物及び各精製タンニンの保護活性を評価した。

活性酸素である次亜塩素酸によるタンパク質分解に対す

表3 アカメガシワ葉成分のラジカル消去活性評価結果

試 料	DPPH*	O ^{2-*}	OH ^{***}
	(mMトロロックス相当量)	(U SOD 相当/μmol)	(mg DMSO 相当/μmol)
マロチン酸	6.2a	267a	179
マロツシン酸	9.1b	299a	292
コリラジン	4.5c	307a	274
ゲラニイン	6.2ad	281a	272
没食子酸	2.9e	63b	NA
ルチン	1.7f	7b	NA
エラグ酸	3.6c	44b	NA
EGCG	5.0acd	339a	154
クエルセチン	2.7e	18b	NA
クロロゲン酸	1.1g	23b	NA

*DPPH ラジカル消去活性, **スーパーオキシドラジカル消去活性, ***ヒドロキシルラジカル消去活性

各測定において異なる文字は有意差あり (p<0.01), NA=未測定

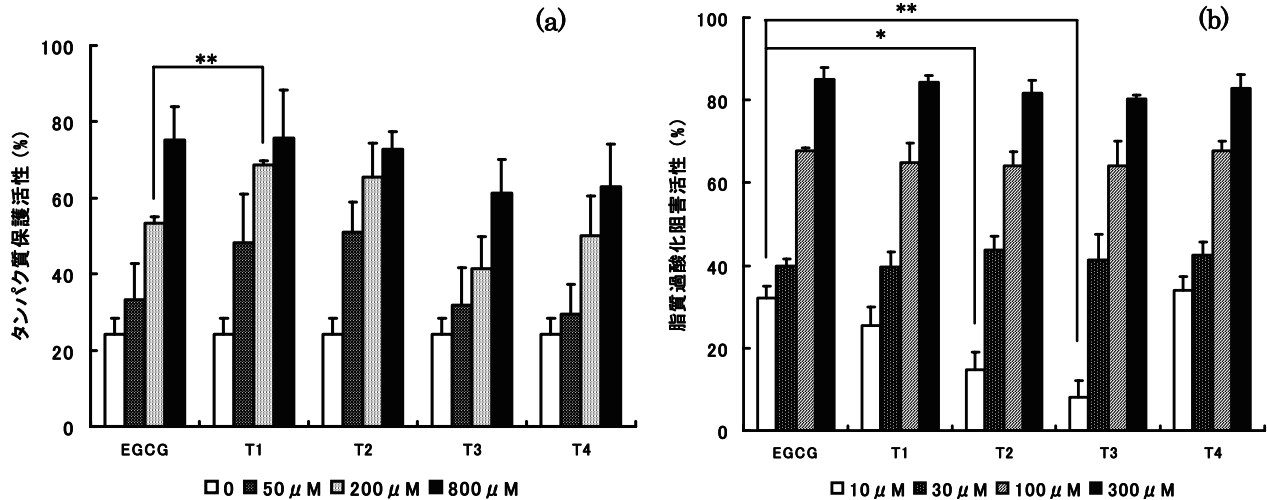


図8 アカメガシワ葉抗酸化成分の酸化ストレスに対する生体成分保護活性評価結果

 (a)次亜塩素酸ラジカルによるタンパク質分解に対する保護活性 (各試料の終濃度 0, 50, 200, 800 μ M)

 (b)脂質過酸化に対する保護活性 (各試料の終濃度10, 30, 100, 300 μ M)

 T1 ; マロチン酸, T2 ; マロツシン酸, T3 ; コリラジン, T4 ; ゲラニン, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

る保護活性を、牛血清アルブミン (BSA) をモデルタンパク質として評価した。次亜塩素酸は、活性化好中球により産生されるミエロペルオキシダーゼ (MPO) によって過酸化水素より生成する。好中球等の活性化食細胞のMPO系は宿主の主要防御システムであり、MPO系に不具合が生じると感染症等の疾病の原因となるため²¹⁾、生体中での次亜塩素酸生成は避けることはできない。しかし、タンパク質の酸化ストレスによる修飾は疾病、老化を促進することから、この酸化ストレスによるタンパク質分解に

する保護活性は生体防御効果とみなすことができる²²⁾。アカメガシワ葉の4つのタンニンが、次亜塩素酸によるBSA酸化修飾 (分解) に対し保護効果を示したことから (図8 (a))、これらアカメガシワ葉タンニンが、活性酸素種によるタンパク質分解に対して保護活性を示すことを確認できた。

脂質過酸化は、フリーラジカルを介して生じ細胞に傷害を与える²³⁾。抗酸化物質であるEGCGについては、脂質過酸化を抑制するという報告²⁴⁾があることから、アカメガシワ葉タンニンについて、脂質過酸化に対する阻害活性をEGCGと比較し評価した。その結果、各タンニンはEGCGに匹敵する阻害活性を示した (図8 (b))。このことから、アカメガシワ葉タンニンは、生体の脂質成分を保護する活性を有することが示された。

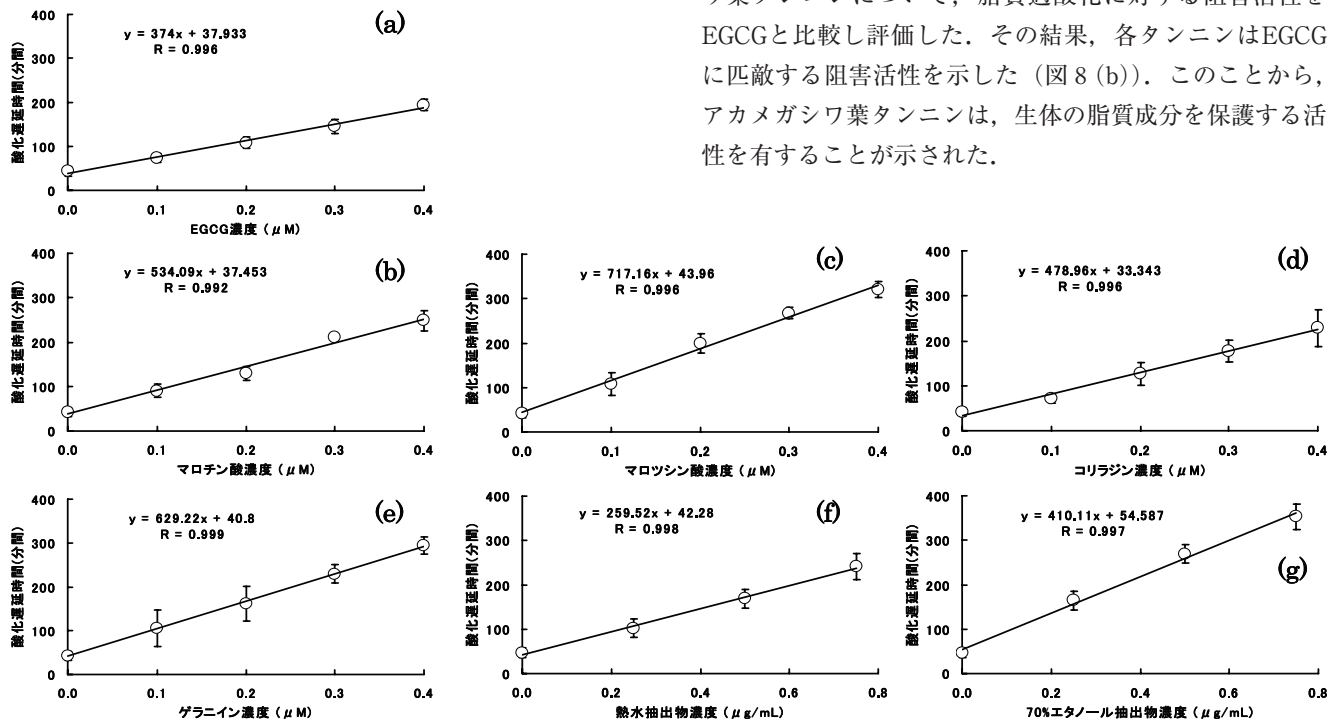


図9 アカメガシワ葉抽出物及びタンニンのLDL酸化に対する保護活性

(a)EGCG, (b)マロチン酸, (c)マロツシン酸, (d)コリラジン, (e)ゲラニン, (f)熱水抽出物, (g)70%エタノール抽出物

表4 アカメガシワ葉抽出物及びタンニンのLDL酸化に対する保護活性

	傾き	相対活性	
		(vs. EGCG, %)	(mg EGCG eq./mg)
EGCG	374	100	
マロチン酸	534	143	
マロツシン酸	717	192	
コリラジン	479	128	
ゲラニイン	629	168	
熱水抽出物	260		0.32
70%エタノール抽出物	410		0.50

LDL酸化修飾は動脈硬化進行過程において観察される^{25,26)}。アカメガシワ葉抗酸化成分について、酸化ストレスに対してタンパク質及び脂質を保護する活性を有することが確認できたので、次にLDL酸化修飾に対する阻害活性を評価した。酸化ストレスによりLDL酸化が始まるまでの遅延時間と濃度をプロットすると抽出物、タンニン、EGCGは全て濃度依存的な阻害活性を示した(図9)。図9で得られた回帰式の傾きの比によりLDL保護活性を算出すると表4のとおり、4つのタンニンはEGCGを上回る活性を示し、特にマロツシン酸はEGCGに対して1.92倍の高い活性を示した。構造式(図7)から分かるように、各タンニンはEGCGより多数の水酸基を有している。ラジカル消去活性の場合と同様に、この水酸基の存在が酸化修飾に対する阻害活性を示す原因と考えられる。ポリフェノールを摂取した際、生体内に到達するポリフェノール濃度は数 μ M以下であると推定されるが²⁷⁾、本評価結果によれば、1 μ M以下の低濃度域であってもLDL酸化の遅延が認められ、アカメガシワ葉タンニンが生理条件下において酸化ストレスから生体成分を保護し得ることを示した。

本章で得られた結果より、4つのアカメガシワ葉タンニンは生体を酸化ストレス関連の疾患から保護する天然機能性食品素材として期待できると考えられた。特に、主要ポリフェノールであるマロツシン酸(2.3%生鮮重量)とゲラニイン(1.2%生鮮重量)はこの活性に大きく寄与すると考えられた。

5. アカメガシワ葉摂取によるヒト効果試験

植物由来ポリフェノールに関する研究は近年精力的に進められており、その生理活性、いわゆる機能性に対する注目度は高い。ポリフェノールが有する抗酸化活性を癌、心疾患等の酸化ストレスが関与する疾患等に対する予防に応用した報告も存在する^{28,29)}。また、生体酸化が老化を促進することから、抗酸化素材は疾患に対してのみでなく、老化防止や美容に対する機能性素材としても注目を集めている³⁰⁾。紫外線は直接的に生体にストレスを与えるとともに、活性酸素を発生し皮膚に大きな影響を与える。紫外線により発生した活性酸素は、脂質過酸化、遺伝子損傷、タンパク質変性、酵素阻害等の酸化傷害を誘導し、結果として皮

膚の急性炎症、真皮成分の変性等の組織障害や老化を引き起こすと考えられている³¹⁻³³⁾。実際、化粧品などの外用による体の外側からの改善に加え食品成分、医薬品等の摂取による体の内側からの肌改善効果が注目され、ポリフェノールの経口摂取による効果も報告されている³⁴⁾。また、日本人の食生活は過去数十年の間に欧米化し、脂肪摂取量が増大しメタボリックシンドロームの危険因子のひとつである肥満人口が急速に増加している。脂肪過多は生体酸化ストレスマーカーを増大させることも報告されている³⁵⁾。ポリフェノールに抗肥満効果があることが報告されていること³⁶⁻³⁸⁾、アカメガシワ葉は α -グルコシダーゼ阻害活性を有するとの報告があること³⁹⁾から、アカメガシワ葉は抗肥満効果も期待できると考えられる。一方、アカメガシワ葉のような消費者の認知度が低い素材を産業化するためには、安全性とヒトに対する効果を実験的に実証することが重要となる。そこで本章では、安全性試験及び摂取による肌改善効果と体型改善効果を検討した⁹⁾。

急性経口毒性試験は、2,000mg/kg用量のアカメガシワ葉凍結乾燥粉末を雌ラットに単回投与した結果、観察期間中の異常及び死亡は認められず、LD50は2,000mg/kg以上と考えられた。単純に体重50kgのヒトであれば100gに相当し、急性毒性の危険はないと考えられた。また、5菌株を用いた細菌における復帰突然変異試験では、全ての株でコロニー数が陰性対照の2倍未満であったことから、変異原性は陰性と確認できた。試験を行った安全性試験で毒性が確認できなかったことに加え、過去にある程度の食経験があることから、ヒト効果試験に対する安全性は問題ないと判断した。

安全性が確認されたアカメガシワ葉について、肌改善効果、体型改善効果の検討と、血液成分分析及びアンケートによるヒト継続摂取での安全性を評価するため、BMI25以上、体脂肪率25%以上で肌の弾力が低めの成人女性を対象に、1回3カプセル(1g)を1日2回、朝食および夕食前に連続8週間摂取させるオープンラベル試験を行なった。その結果、図10のとおり体重とBMIは低下しなかったものの、筋肉量、骨量、除脂肪量、基礎代謝量は、試験品摂取前に比べて、摂取8週後で有意に高値を示し、体脂肪率、腹部脂肪率は試験品摂取前と比較して、摂取8週後で有意

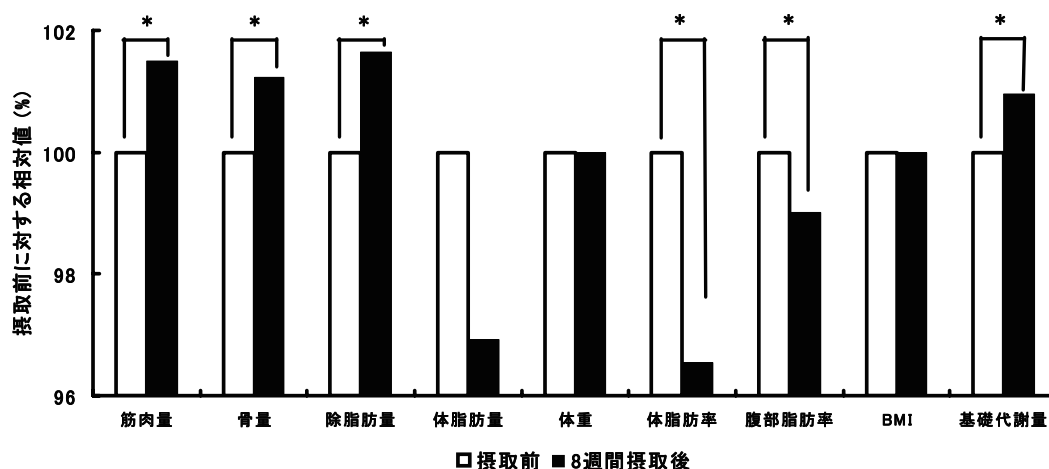


図10 身体計測値の推移（摂取前と8週間摂取後についてDunnettの検定，N=11，*：p<0.05）

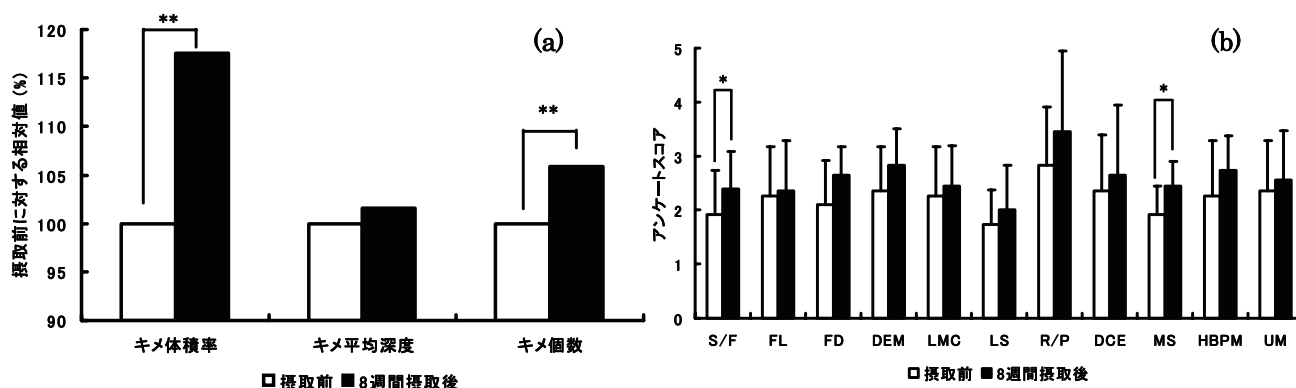


図11 肌に対するアカメガシワ葉の効果

(a)キメの推移（摂取前と8週間摂取後についての対応あるt検定，N=11，**：p<0.01），(b)肌アンケートの推移（摂取前と8週間摂取後についてのWilcoxonの符号付順位検定，N=11，*：p<0.05），アンケートスコアは1：非常に気になる，2：少し気になる，3：どちらとも言えない，4：あまり気にならない，5：まったく気にならない

項目はS/F：シミ・ソバカス，FL：小ジワ，FD：顔全体のかさつき，DEM：目元・口元のかさつき，LMC：洗顔後のつっぱり感，LS：たるみ，R/P：吹き出物・にきび，DCE：目元のくま，MS：顔全体のくすみ，HBPM：化粧ノリの悪さ，UM：化粧崩れ

に低値を示した。大野⁴⁰⁾は，ダイエットのみで減量すると体脂肪だけでなく除脂肪量も若干減少すると述べており，今回の場合，測定値の変動は小さいもののカロリー制限等の環境制限を加えていない条件でありながら，体脂肪の低下と同時に除脂肪量，筋肉量が増加し，基礎代謝量も増加するというダイエットとして理想的な成績であった。エネルギー及び栄養成分摂取量は試験品摂取前，摂取4週後，摂取8週後でほとんど差がなく，今回の結果は食事の影響によるものでないことは明らかであった。また，図11のとおり，肌に関しては機器測定でキメ体積率，キメ個数について有意な改善が，アンケートで「シミ・ソバカス」と「顔全体のくすみ」について有意な改善が示され，アカメガシワ葉にはキメの改善と美白効果があることが示唆された。アカメガシワ葉が含有するエラグ酸については，美白効果の報告³²⁾があり，本結果を裏付けるものと考えられた。一方，血液検査についてはアカメガシワ葉摂取前と比べて

摂取後に有意な変化をした項目もあったが，全ての検査項目はいずれも標準値の範囲内で問題はなかった。自覚症状アンケート結果についても試験品の摂取前後でほとんど差がなく，アカメガシワ葉の安全性についても確認できたと考えられた。

以上のことから，アカメガシワ葉は，肌改善効果と体質改善効果を有する安全性の高い機能性食品素材であると考えられた。

6. おわりに

食品及び食品素材の生理生体調節機能に関する研究は多岐にわたっているが，種々の疾病，老化に関与すると考えられている生体酸化を抑制する抗酸化機能に関する研究もそのひとつである。本研究により，アカメガシワ葉が豊富なポリフェノールを含有し，既存素材を上回る高い抗酸化機能性を有する食品素材であることが確認でき，有効な生

理調節機能を示唆するデータが得られた。効果試験において示唆された有効性を裏付けるために、動物試験による皮膚組織成分の増減、あるいは遺伝子発現の解析が今後の課題である。遺伝子解析は遺伝子発現の変動を網羅的に評価することにより詳細なメカニズム情報が得られる他に、想定していない発現変動の情報から新しい機能が見出される可能性もある。

また、アカメガシワ葉を機能性食品素材として産業化するためには、一定品質の原料を安定供給する必要があるため、栽培技術についても検討を進めている。現段階では自生種を原料とせざるを得ない状況であるが、アカメガシワ葉を主原料とした健康茶が商品化されたことにより、民間での栽培がスタートした。アカメガシワ葉の栽培は、休耕田の有効利用や中山間地域での収入源として期待できることから、安定した需要が見込めるよう、より多くの商品化、企業参入が望まれる。今後は、アカメガシワ葉の産業化に伴って研究が進み、より多くの知見が得られことを期待している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導とご鞭撻を賜りました山口大学医学系研究科教授 内海 俊彦 博士をはじめ関係各位に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 国連開発計画 (UNDP) 東京事務所, 人間開発報告書2007/2008, <http://www.undp.or.jp/hdr/global/2007/index.shtml>.
- 2) 厚生白書 (平成9年版). 厚生労働省.
- 3) Katsube, T.; Tabata, H.; Ohta, Y.; Yamasaki, Y.; Anuurad, E.; Shiwaku, K.; Yamane, Y. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, Vol.52, p.2391-2396.
- 4) Katsube, T.; Imawaka, N.; Kawano, Y.; Yamazaki, Y.; Shiwaku, K.; Yamane, Y. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2006, Vol.97, p.25-31.
- 5) Katsube, T.; Watanabe, M.; Yamasaki, M.; Kitajima, K.; Yamane, Y.; Shiwaku, K. Dietary Antioxidants for Prevention of Cardiovascular Disease. *Journal of Rural Medicine*. 2005, Vol.1, No.1, p.4-14.
- 6) 渡部忍, 今若直人, 勝部拓矢, 山崎幸一. 島根県産紫黒米のアントシアニン系色素の同定およびラジカル消去活性. *日本食品科学工学会誌*. 2009, Vol.56, No.7, p.419-423.
- 7) Ogawa, T.; Tabata, H.; Katsube, T.; Ohta, Y.; Yamasaki, Y.; Yamasaki, M.; Shiwaku, K. Suppressive effect of hot water extract of wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.) leaves on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Food Chemistry*. 2010, Vol.118, p.239-244.
- 8) 宮崎稔, 北川優, 志田原崇, 富川康之, 鶴永陽子, 田畑光正. 薬

- 草等の栽培技術の確立と利用技術の開発. 平成12~14年度重点的科学技术開発事業研究成果報告書. 島根県, 2003.
- 9) 小池田崇史, 田畑光正, 杉中克昭, 富川康之, 斎藤安弘. アカメガシワ葉乾燥粉末のダイエットおよび肌改善効果と安全性. *診療と新薬*. 2007, Vol.44, No.10, p.1207-1213.
 - 10) Tabata H; Katsube T; Tsuma T; Ohta Y; Imawaka N; Utsumi T. Isolation and evaluation of the radical scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. *Food Chemistry*. 2008, Vol.109, No.1, p.64-71.
 - 11) Tabata H; Katsube T; Moriya K; Utsumi T; Yamasaki Y. Protective activity of components of an edible plant, *Mallotus japonicus*, against oxidation modification of proteins and lipids. *Food Chemistry*. 2010, Vol.118, p.548-553.
 - 12) Okuda, T.; Mori, K.; Seno, K.; Hatano, T. Constituents of *Geranium Thunbergii* Sieb. et Zucc. : VII. High-performance reversed-phase liquid chromatography of hydrolysable tannins and related polyphenols. *Journal of Chromatography*. 1979, Vol.171, p.313-320.
 - 13) Okuda, T.; Seno, K. Tannins of leaf of *Mallotus japonicus*. *Nihon Kagakukaishi*. 1981, vol.1981, no.5, p.671-677.
 - 14) Okuda, T.; Mori, K.; Hatano, T. The distribution of geraniin and mallotusinic acid in the order eraniales. *Phytochemistry*. 1980, Vol.19, no.4, p.547-551.
 - 15) Cabrera C; Gimenez R; Lopes C M. Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, Vol.51, p.4427-4435.
 - 16) Aliaga, C.; Lissi, A. E. L. Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin -An experimental and theoretical study. *Canadian Journal of Chemistry*. 2004, Vol.82, p.1668-1673.
 - 17) Zang, L-Y.; Cosma, G.; Gardner, H.; Castranova, V.; Vallyathan, V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003, Vol.247, p.205-210.
 - 18) Kim, D-O.; Lee, Y. C. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, Vol.44, p.253-273.
 - 19) Chang, S-T.; Wu, J-H.; Wang, S-Y.; Kang, P-L.; Yang, N-S.; Shyur, L-F. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, Vol.49, p.3420-3424.
 - 20) Joubert, E.; Winterton, P.; Britz, J.; T, Ferreira D. Superoxide anion a, a -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids. *Food Research International*. 2004, Vol.37, p.133-138.
 - 21) 荒谷康昭. 真菌感染と好中球ミエロペルオキシダーゼ. *Japanese Journal of Medical Mycology*. 2006, Vol.47, No.3, p.195-199.
 - 22) Hipkiss, R. A.; Worthington, C. V.; Himsworth, J. T. D.; Herwig, W. Protective effects of carnosine against protein

- modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998, Vol.1380, p.46-54.
- 23) Upasani, C. D.; Khera, A.; Balaraman, R. Effect of lead and vitamin E, C or spiruline on malondialdehyde, conjugated dienes and hydroperoxides in rat. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2001, Vol.39, p.70-74.
- 24) Chen, C-W.; Ho, C-T. Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*. 1995, Vol.2, p.35-46.
- 25) Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C.; Witztum, J. L. Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoproteins that increase its atherogenicity. *New England Journal of Medicine*. 1989, Vol.320, p.915-924.
- 26) Aviram, M. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1993, Vol.98, p.1-9.
- 27) Nakagawa, K.; Okuda, S.; Miyazawa, T. Dose-dependent Incorporation of Tea Catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate and (-)-Epigallocatechin into Human Plasma. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 1997, Vol.61, No.12, p.1981-1985.
- 28) Tinahones, F. J.; Rubio, M. A.; Garrido-Sanchez, L.; Ruiz, C.; Gordillo, E.; Cabrerizo, L.; Cardona, F. Green Tea Reduces LDL Oxidability and Improves Vascular Function. *Journal of the American College Nutrition*. 2008, Vol.27, No.2, p.209-213.
- 29) 大浦彦吉, 横澤隆子. タンニンの薬理 (II). *現代東洋医学*. 1990, Vol.11, No.4, p.62-69. 30) 常長誠, 高田恵子. 生体成分・カルノシンの抗老化・抗酸化作用. *Fragrance Journal*. 2008, Vol.36, No.2, p.55-62.
- 31) 田中浩. 活性酸素の培養ヒト皮膚繊維芽細胞におけるコラーゲン代謝に及ぼす影響. *日本化粧品技術者会誌*. 1994, Vol.28, No.2, p.172-177.
- 32) 田中忠昭. 最近の健康・美容食品の開発動向 肌改善対策ビタミン剤の開発動向. *Fragrance Journal*. 2003, Vol.31, No.12, p.69-75.
- 33) Abella, M. L.; Rigal, J.; Neveux, S. A simple experimental method to study de pigmenting agents. *International Journal of Cosmetic Science*. 2007, Vol.29, No.4, p.311-317.
- 34) 古賀拓郎, 葛西浩一. ザクロエラグ酸の機能性～新しい美容食品素材としての魅力～. *New Food Industry*. 2004, Vol.46, No.11, p.1-5.
- 35) Chen, C-C.; Liu, L-K.; Hsu, J-D.; Huang, H-P.; Yang, M-Y.; Wang, C-J. *Mulberry* extract inhibit the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chemistry*. 2005, Vol.91, No.4, p.601-607.
- 36) 太田豊, 船山誠, 清野博威, 佐見学, 神田智正, 庄司俊彦, 大竹康之, 長田恭一. リンゴポリフェノールによる易肥満性ラットの脂質代謝およびインスリン非依存性の改善. *日本食品科学工学会誌*, 2007, Vol.54, No.6, p.287-294.
- 37) 西繁典, 齋藤優介, 小嶋浩, 弘中和憲, 小嶋道之. シーベリー葉ポリフェノールによる高脂肪食投与雄マウスの抗肥満効果. *日本食品科学工学会誌*, 2007, Vol.54, No.11, p.477-481.
- 38) Bose, M.; Lambert, J. D.; Ju, J.; Reuhl, K. R.; Shapses, S. A.; Yang, C. S. The Major Green Tea Polyphenol, (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Obesity, Metabolic Syndrome, and Fatty Liver Disease in High-Fat-Fed Mice. *The Journal of Nutrition*. 2008, Vol.138, No.9, p.1677-1683.
- 39) 鎌田靖弘, 豊川哲也, 照屋正英, 吉田安彦, 花城薫, 新垣美香, 上地美香. 県産資源を利用した機能性素材の開発-in vitro試験での機能性評価-. *沖縄県工業技術センター研究報告*, 2002, Vol.4, p.77-84.
- 40) 大野誠. 肥満治療の基本と減量指導の進め方. *成人病と生活習慣病*. 2002, Vol.32, p.1306-1312.