

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 シソ及び2品種のエゴマの
薬理的機能性と関連成分に関する研究

指導教員

松田佳和

印



学位申請者

齋藤 貴弘



シソ科植物は、アジアを中心に古くから食用や薬用として利用されてきた植物群であり、その多様性、有用性から、現在では健康食品や医薬品の原材料としても注目されている^{引用)}。特にシソ (*Perilla frutescens* var. *crispa*) とその変種であるエゴマ (*Perilla frutescens* var. *frutescens*) は、シソ科植物の中でも代表的な存在であり、両者は多くの研究で薬効成分を有することが報告されている^{引用)}。これらは同じシソ属に属し、さらに同じ種 (*P. frutescens*) に分類される植物であるが、それぞれが持つ成分や薬効には特徴的な違いがある。シソは、抗炎症、抗酸化、抗アレルギー作用を持ち、伝統医学においても解熱や消化促進作用があるとされ、料理や健康食品として広く利用されている。一方、エゴマは、主に種子を搾油して得られるエゴマ油が特徴であり、 α -リノレン酸やポリフェノールなどの機能性成分を豊富に含む。そのため、心疾患予防や抗炎症作用を期待した食品や栄養補助食品として利用されることが多い。

シソ及びエゴマは、同じシソ科シソ属に属し、形態的及び成分的に共通点がある一方で、それぞれが有する成分や薬効には違いが存在する。例えば、シソ

の葉には精油成分であるペリラルデヒドやリモネンが豊富に含まれ、これらがシソ独自の香りと薬効を生み出していると考えられている。一方、エゴマの種子には、植物性油脂として貴重な ω -3脂肪酸である α -リノレン酸が高濃度で含まれ、その健康効果が注目されている。さらに、シソには抗アレルギーや抗菌作用が報告されており、エゴマには炎症性サイトカインを抑制する作用があるとされるが、これらの作用の比較研究は十分に進んでいない。特に、シソの葉や種子とエゴマの葉や種子を直接的に比較した研究は非常に限られている。

近年、炎症反応は慢性疾患の進行や悪化に関与することが知られており、抗炎症作用を有する植物性成分の探索が進められている。炎症は外部刺激に対する自然免疫の一環として発生するが、慢性的な炎症は動脈硬化や糖尿病、さらには神経疾患などの原因となり得る。LPS（リポ多糖）刺激によりマクロファージから産生される NO や IL-1 β などの炎症性因子は、炎症反応の主要な指標とされている。シソ及びエゴマに含まれる成分がこれらの炎症性因子の産生をどの程度抑制するかを評価することは、植物由来の抗炎症剤の開発において重要である。

本研究では、エゴマ（黒エゴマ及び白エゴマ）の葉及び種子に含まれる成分を分析し、その抗炎症作用を中心に評価を行った。同じシソ科シソ属で種も同じであるシソを比較対象として用いることで、エゴマの持つ独自の特性をより明確にするとともに、両者の成分構成や薬効の違いを科学的に検討した。

シソ及び 2 品種のエゴマの種子に含まれる成分の比較

シソおよび 2 品種のエゴマ種子に含まれる成分を分析した結果、脂溶性成分とフィトケミカル成分に特徴的な違いが見られた。GC/MS による分析では、黒エゴマ種子 (BSP)、白エゴマ種子 (WSP)、シソ種子 (PS) のアセトン抽出物から、 α -リノレン酸やスクワレン、オクタコサノール、高級脂肪族アルコール、ビタミン E (トコフェロール)、および植物ステロール類 (カンペステロール、スティグマステロール、 β -シトステロール) が共通して検出された。これらの中で、PS では α -リノレン酸の含量が最も高く、BSP がこれに続き、WSP ではやや低い値を示した。また、植物ステロールのうち β -シトステロールの含量が最も多く検出された (Fig.1)。

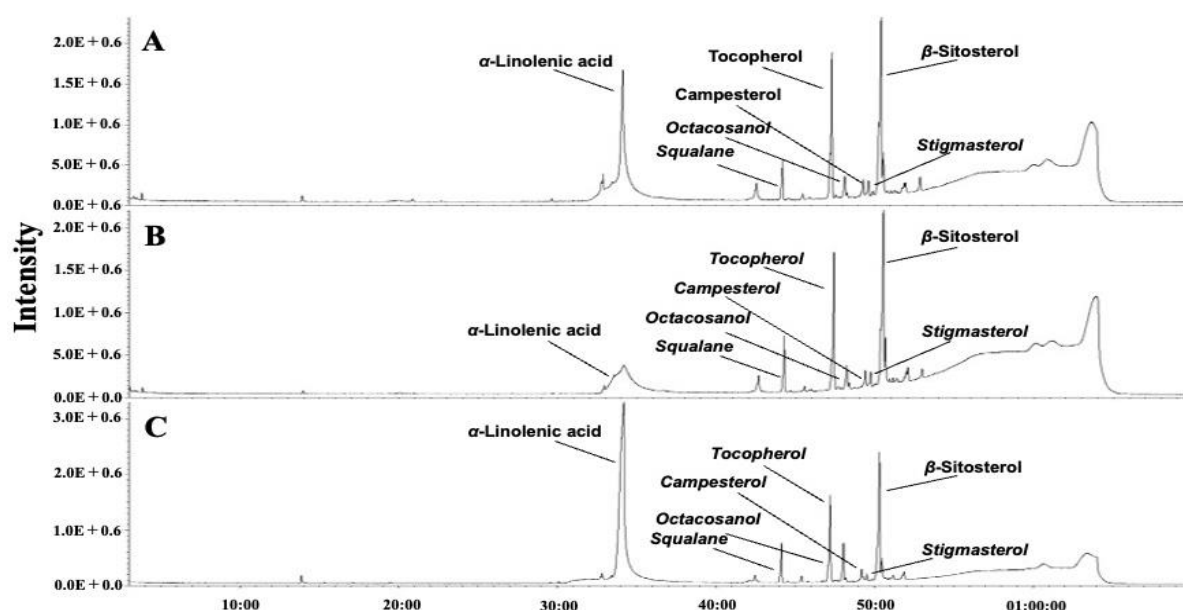


Fig. 1 GC/MS-TIC chromatograph of the three different acetone extracts of *Perilla* seeds.

A: Acetone extract from the BSP, **B:** Acetone extract from the WSP, and **C:** Acetone extract from the seed of PS.

一方、LC/MS によるメタノール抽出物の分析では、カフェ酸、ロスマリン酸、アピゲニン、ルテオリンが主要なフィトケミカルとして検出された。ポリフェ

ノール含量を比較すると、カフェ酸は PS で最も高く、次いで BSP、WSP の順であった。ロスマリン酸の含量は BSP で最も多く、WSP と PS ではほぼ同程度であった。さらに、WSP ではアピゲニンおよびルテオリンの含量が黒エゴマ BSP や PS と比較して高い値を示した (Fig.2)。

これらの結果から、シソとエゴマ種子の成分には共通点が見られる一方で、 α -リノレン酸やポリフェノール含量においてそれぞれ特徴的な違いが確認された。特に、黒エゴマはロスマリン酸を多く含み、白エゴマではフラボノイド成分であるアピゲニンやルテオリンが豊富に含まれていることが明らかとなった。

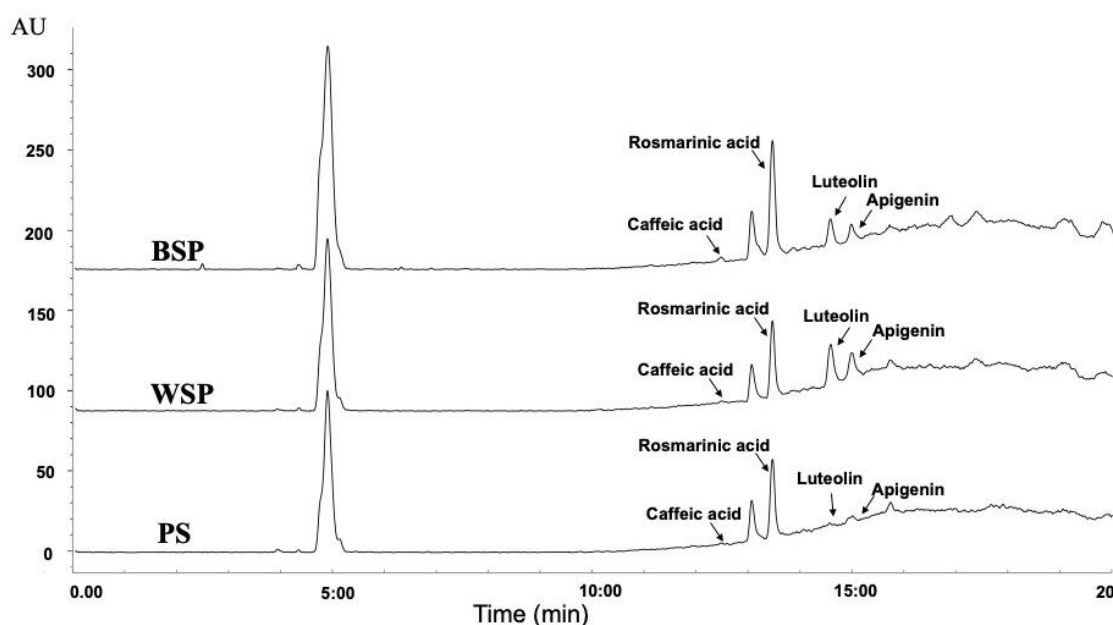


Fig. 2 LC/MS chromatograms of the three different methanol extracts of *Perilla* seeds.

LPS により誘導される NO、IL-1 β とシソ及び 2 品種のエゴマの種子の抑制効果

BSP、WSP、及び PS のメタノール抽出物の抗炎症作用を評価するため、LPS 刺激による RAW264.7 細胞における NO および IL-1 β の産生抑制効果を比較した (Fig.3)。

NO の産生抑制効果については、LPS 投与後 24 時間における NO 濃度を測定した結果、BSP、WSP、およびシソのメタノール抽出物は 1~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で、いずれの濃度においてもコントロール群と比較して有意に NO 産生を抑制した。特に BSP および WSP は、薬用として知られる PS のメタノール抽出物と同等の抑制効果を示した。

IL-1 β の産生抑制効果については、LPS 投与後 3 時間における IL-1 β の値を測定した。10~100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において、BSP、WSP、PS のメタノール抽出物はコントロール群と比較して有意に IL-1 β 産生を抑制し、BSP および WSP は PS と同様の抑制効果を示した。

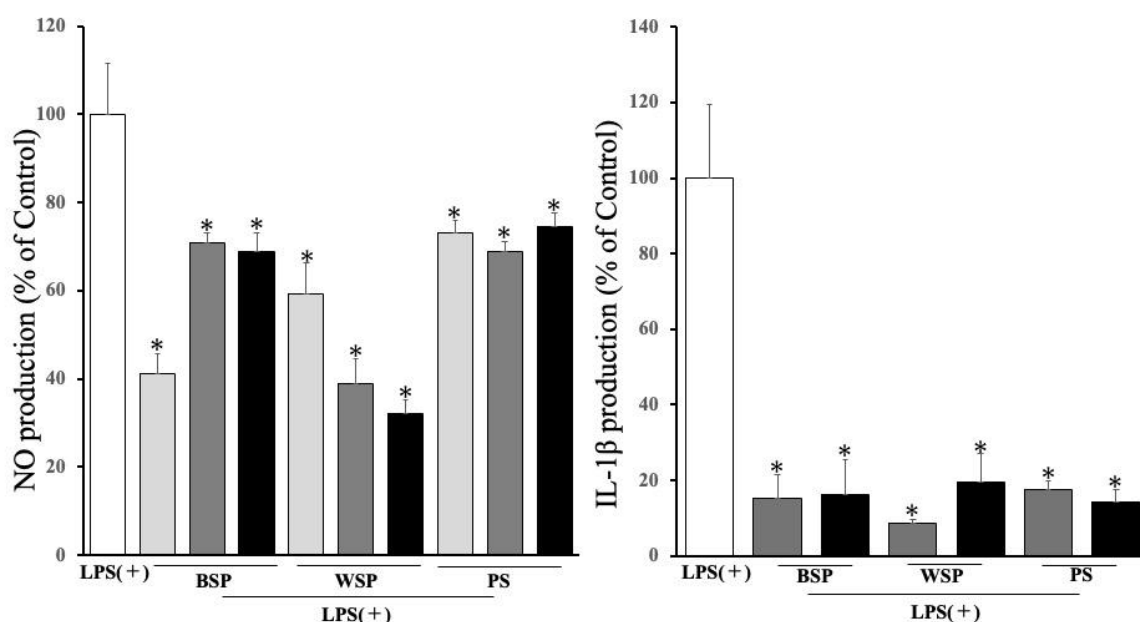


Fig. 3 Effects of Effects ofBSP, WSP and PS extracts on production of NO and IL-1 β in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS

The cells were incubated with LPS, 1-100 $\mu\text{g/mL}$ of WS and BS, and PS extract. IL-1 β was measured after 3 h of incubation, and NO was measured after 24 h. Each value is presented as the mean $\pm$ SEM ($n=6$). * $P < 0.05$ as compared with LPS alone-treated group. :extract 1 $\mu\text{g/mL}$, :extract 10 $\mu\text{g/mL}$, :extract 100 $\mu\text{g/mL}$.

これらの結果から、食用とされる黒エゴマおよび白エゴマの種子のメタノール抽出物は、薬用のシソの種子と同等の抗炎症作用を有することが示唆され

た。特に NO および IL-1 β 産生の抑制効果は、エゴマ種子の機能性成分が炎症反応の制御に寄与する可能性を示している。

シソ及びエゴマの種子に含まれるフィトケミカルの抗炎症作用

次に、LC/MS により検出されたシソ科植物やキク科植物に含まれるフィトケミカルであるカフェ酸、ロスマリン酸、アピゲニン、及びルテオリンの抗炎症作用を検討するために LPS 添加後の NO 及び IL-1 β を測定した。その結果を Fig.4 に示した。これら 3 $\mu\text{g/mL}$ の濃度のフィトケミカルはいずれも NO 及び IL-1 β の産生をコントロール群と比較し有意に抑制した。

シソ及び 2 品種のエゴマの葉の成分及び抗炎症作用の比較

シソ及び 2 品種のエゴマ葉の脂溶性成分とフィトケミカル成分を比較するため、黒エゴマの葉 (BLP)、白エゴマの葉 (WLP)、及びシソの葉 (PL) を用い GC/MS 及び TLC 分析を実施した。GC/MS 分析では、PL にのみペリラルデヒド、リモネン、シソオールが検出され、これらはシソ特有の機能性香気成分であることが確認された (Fig. 5, Table1)。一方、BLP および WLP ではこれらの成分は検出されなかった。

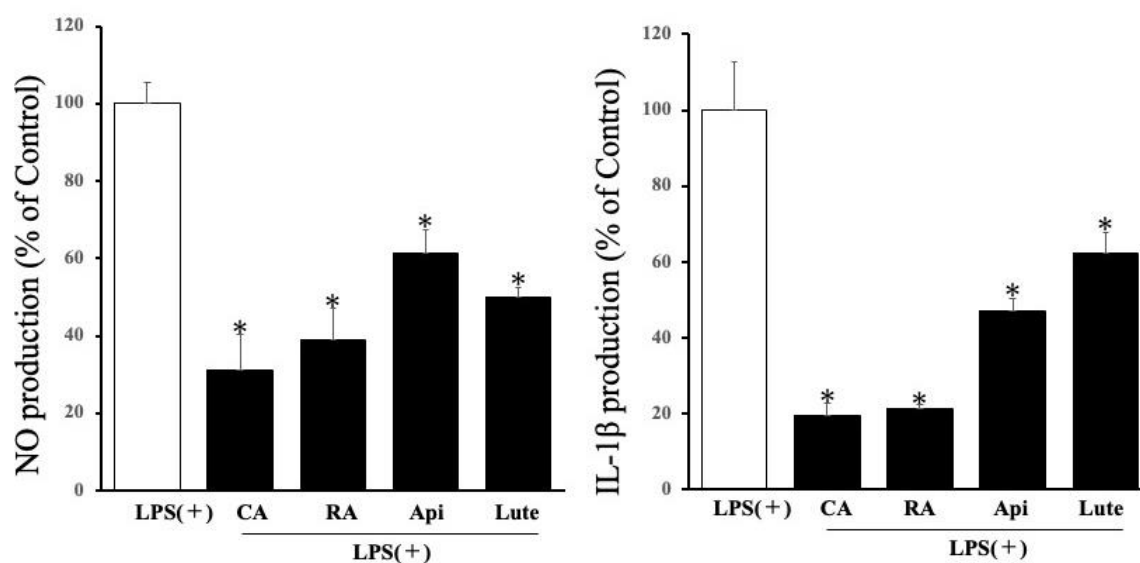


Fig. 4 Effects of caffeic acid, rosmarinic acid, apigenin, and luteolin on the production of NO and IL-1 β in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS.

The cells were incubated with LPS, 3 μ g/mL of caffeic acid, rosmarinic acid, Apigenin, and Luteolin. IL-1 β was measured after 3 h of incubation, and NO was measured after 24 h. Each value is presented as the mean + SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ as compared to LPS alone-treated group.

TLC 分析においては、カフェ酸、ロスマリン酸、アピゲニン、ルテオリンの 4 種類のフィトケミカル成分含量を比較した結果、WLP のスポットが最も濃く、WLP にこれらの成分が最も多く含まれることが示された (Fig. 6)。

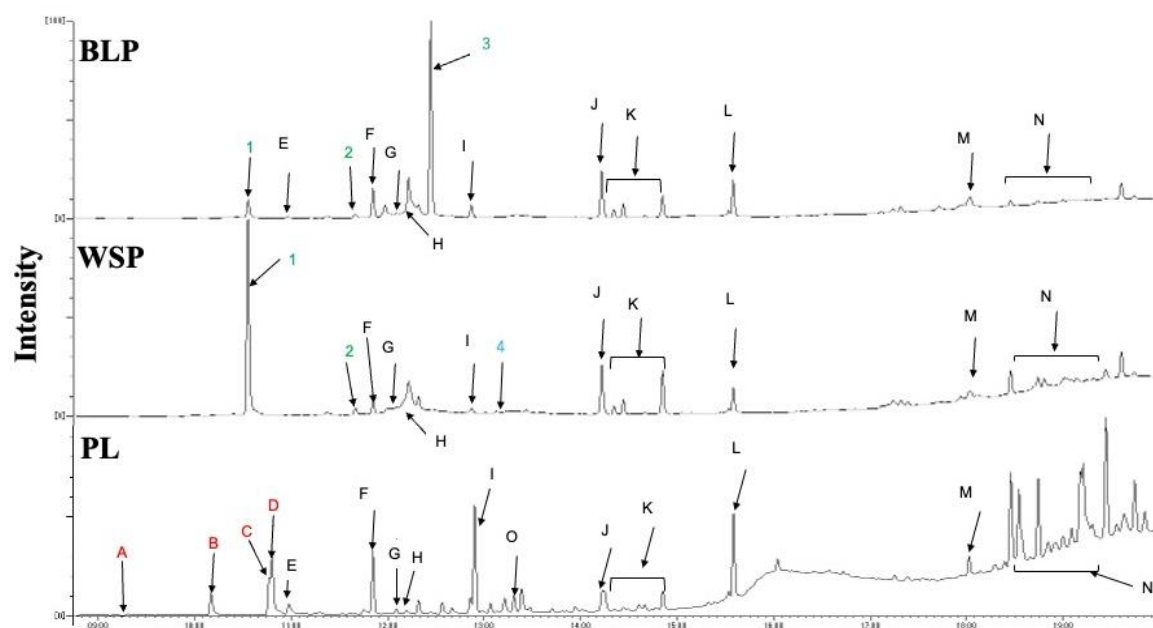


Fig. 5 GC/MS-TIC chromatograph of the three different diethyl ether extracts of *Perilla* leaves.

Table 2. Chemical profile of the prepared lipophilic extract from BLP, WLP, and PL

Peak	Compound	BLP	WLP	PL
1	2-Hexanoylfuran	+	+	-
2	1-Ethylideneoctahydro-7a-methyl-(1Z,3a.α,7a.β)-1H-indene	+	+	-
3	Copaene	+	+	-
4	4-Hydroxy-ionone	-	+	-
A	Limonene	-	-	+
B	Elsholtziaketone	-	-	+
C	Shisool	-	-	+
D	Perillaldehyde	-	-	+
E	Perilla alcohol	+	-	+

F	Caryophyllene	+	+	+
G	Humulene	+	-	+
H	Farnesene	+	+	+
I	Caryophylleneoxide	+	+	+
J	Neophytadine	+	+	+
K	Phytol/phytolacetate	+	+	+
L	Menthol	+	+	+
M	Eugenol	+	+	+
N	Squalene	+	+	+
O	Spathulenol	+	+	+

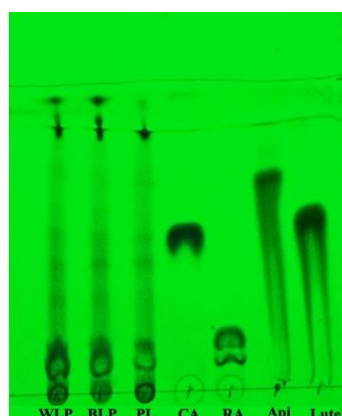


Fig. 6 Thin-layer chromatograms (TLC) of Tested substances.

BLP, WSP, PL, caffeic acid, rosmarinic acid, apigenin, and luteolin were dissolved in methanol at a concentration of 1 mg/mL, and 20 spots were applied to the TLC plate using a fine glass capillary, with approximately 1 μ L per spot. The developing solvent system used was chloroform/methanol/acetic acid (9:1.5:1) to separate the components. After development, the TLC plate was dried, sprayed with p-anisaldehyde, and heated at 220°C for about 40 seconds to visualize the spots.

LPS により誘導される NO、IL-1 β とシソ及び 2 品種のエゴマの葉の抑制効果

シソおよび 2 品種のエゴマの葉のメタノール抽出物について、RAW264.7 細胞を用いた LPS 刺激後の NO および IL-1 β 産生抑制効果を比較した。いずれの抽出物もコントロール群と比較して有意に NO および IL-1 β の産生を抑制したが、薬用の PL は NO 産生抑制率が最も高く、一方で WLP は IL-1 β の抑制率が最も高い結果となった。

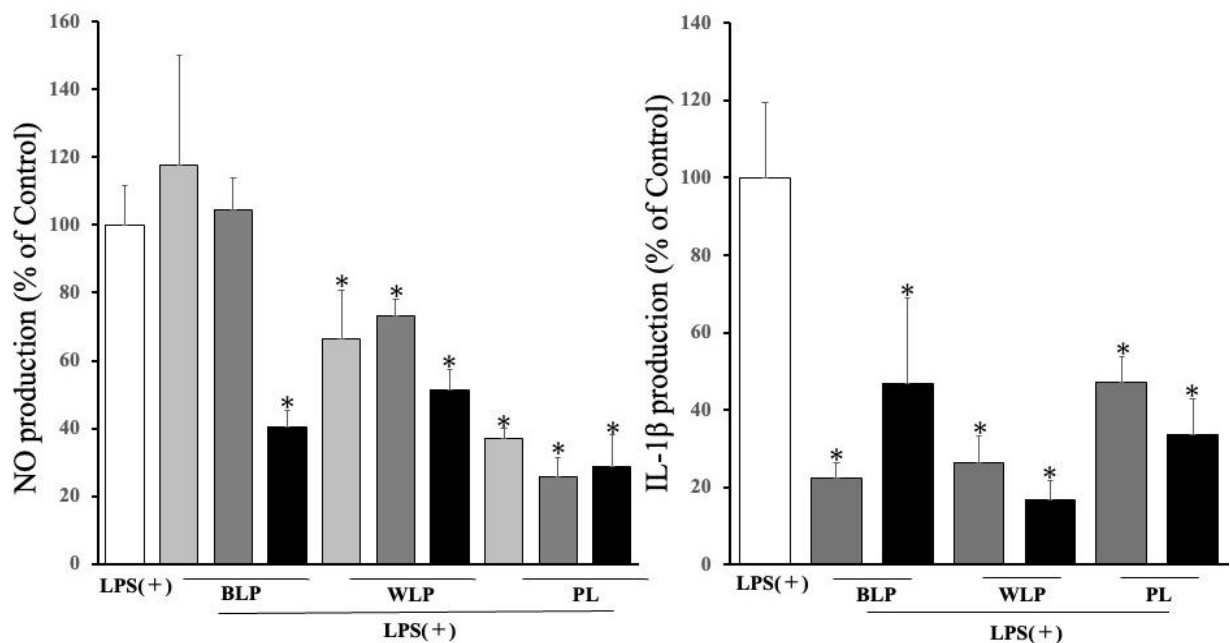


Fig. 7 Effects of Effects of BLP,WLP and PL extracts on production of NO and IL-1 β in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS

The cells were incubated with LPS, 1-100 μ g/mL of WS and BS, and PS extract. IL-1 β was measured after 3 h of incubation, and NO was measured after 24 h. Each value is presented as the mean $\pm$ SEM ($n=6$). * $P < 0.05$ as compared with LPS alone-treated group. :extract 1 μ g/mL, :extract 10 μ g/mL, :extract 100 μ g/mL.

結論

本研究では、変種の関係にある薬用のシソと2品種の食用のエゴマの種子及び葉について含まれる成分の特徴を検討した。さらに、メタノール抽出物による抗炎症作用の比較検討をした。エゴマの種子及び薬用のシソの種子成分は脂質成分、機能性成分共に類似していることを明らかとした。また、エゴマ種子のメタノール抽出物は薬用のシソのメタノール抽出物と同様にLPSに刺激による炎症を有意に抑制した。その活性成分としてカフェ酸及びロスマリン酸等のフィトケミカルが関与していることも示唆された。

エゴマは α -リノレン酸を豊富に含むために近年その健康機能性が着目され、種子が压榨されエゴマ油として市場に出回っている。しかし、不飽和脂肪酸を多く含み、酸化されやすいため加熱調理に不向きであるなど、その用途が限られる。また、データには示していないがエゴマ油には、 α -リノレン酸といった機能性に優れる脂肪酸を含むが、種子に含まれるロスマリン酸やカフェ酸といったシソ科特有のフィトケミカルを含まないことが分かった。したがって、压榨後に廃棄される残滓の部分やエゴマを種子の形で食生活に利用することで搾油によって廃棄される機能性成分の摂取が可能になる。また、種子は種皮に覆われており、脂質が酸化しにくい点も優れている。

本研究において食用のエゴマが薬用のシソと同様に抗炎症作用を有することを明らかにしたことで、エゴマを日常の食生活に取り入れることの重要性及びエゴマをシーズとした医薬品開発に関わる有用な知見が得られたと考えられる。

エゴマの葉及び薬用のシソの葉の成分の比較では含まれる精油成分についてリモネン及びペリラルデヒドといった重要な香気性機能成分は薬用のシソにのみ含有されることがわかった。また、フィトケミカル成分については食用の白エゴマの葉に最も多く含まれることを明らかとした。抗炎症作用の比較検討では薬用のシソの葉の抽出物がNOを、白エゴマの葉の抽出物がIL-1 β を最も抑制した。これら結果が成分の差によるものか、相加相乗作用によるものかを調査するために生理活性の試験を検討している。

また、今回は食用のエゴマが薬用のシソと同様の抗炎症作用を有するかの初期段階での検討としてメタノール抽出物による生理活性を検討したが、メタノール抽出物には親水性の成分と親油性の成分が含まれ、どちらが抗炎症作用により強く寄与するかはわかっていない。今後は活性本体を検討するためにメタノール抽出物を親水性、新油性のものにフラクション分けを行い、それらでの生理活性試験を行うことで、エゴマの活性本体を詳細に調査していく必要がある。