

日本薬科大学
学位論文

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

2025

齊藤 貴弘

本論文で使した略語一覧表

BCA:	bicinchoninic acid assay
COX-2:	cyclooxygenase-2
DMEM:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO:	dimethyl sulfoxide
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
GC/MS:	Gas Chromatography / Mass Spectrometry
GLP-1:	glucagon-like peptide-1
IκB:	inhibitor of NF-κB
IL:	interleukin
iNOS:	inducible NOS
LC/MS:	liquid chromatography mass spectrometry
LPS:	lipopolysaccharide
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MyD88:	myeloid differentiation protein-88
NF-κB:	nuclear factor-kappa B
NO:	nitric oxide
PBS:	phosphate-buffered saline
TAK1:	transforming growth factor beta-activated kinase 1
TNF-α:	tumor necrosis factor alpha
TXA ₃ :	thromboxane A ₃
TLR4:	toll-like receptor 4
TRL6:	TNF receptor-associated factor 6

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

(1) Comparative Analysis of Constituents and Anti-Inflammatory Effects of Seeds from *Perilla frutescens* var. *crispa* f. *purpurea* and *Perilla frutescens* var. *frutescens*, *Pharmacometrics* **107** (3/4); 81-87, (2024).

Takahiro Saito¹⁾, Tomoji Maeda¹⁾, Yuma Higuchi¹⁾, Toshiyasu Mikuma¹⁾, Umon Agata¹⁾,

Yu Fujita²⁾, Kenichi Sako¹⁾, Yoshikazu Matsuda¹⁾ and Fumihide Takano^{1)*}

¹⁾*Division of Clinical Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nihon Pharmaceutical University.*

²⁾*Division of Pharmacology, Yokohama University of Pharmacy.*

参考論文

(1) Pork Liver Decomposition Product May Improve Frontal Lobe Function in Humans—Open Trial *Brain Science*, 14, 586 (2024).

Miiru Suzuki, Ikuya Sato, Masatsugu Sato, Hideki Iwasaki, Takahiro Saito, Masahiko Kimura, Kenichi Sako, Tomoji Maeda, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, and Yoshikazu Matsuda

(2) AH2C の薄毛男性に対する有効性評価：ランダム化二重盲検比較試験

日本臨床皮膚外科学会雑誌, Vol32, No2, 45-52 頁

柳澤正之、杉本孝之、馬場香子、増田健二、高橋秀樹、中西美咲、鈴木美威瑠、佐藤郁也、佐藤将嗣、岩崎英毅、齊藤貴弘、松田佳和、勝田啓、佐藤明男

目 次

序論	1
本論	3
第 1 章 炎症について	3
第 2 章 シソについて	6
第 1 節 シソの用途及び特性	6
第 2 節 シソの薬効	7
第 3 節 シソの薬理学的機能性及び生理活性成分について	8
第 4 節 シソの医薬品以外の応用について	8
第 3 章 エゴマについて	10
第 1 節 エゴマの用途及び特性	10
第 2 節 エゴマの成分及び効能	11
第 3 節 シソ及びエゴマの相同性	12
第 4 節 エゴマの応用	13
第 4 章 シソ及び 2 品種のエゴマ種子の成分及び抗炎症作用の比較	15
第 1 節 シソ及び 2 品種のエゴマ種子に含まれる成分の比較	15
1.1 GC/MS による種子の成分測定	15
1.2 LC/MS によるフィトケミカルの測定	17
第 2 節 LPS により誘導される NO とシソ及び 2 品種のエゴマ種子の抑制効果	21
第 3 節 LPS により誘導される IL-1 β とシソ及び 2 品種のエゴマ種子の抑制効果	22
第 4 節 シソ科植物に含まれるフィトケミカルの抗炎症作用	23
第 5 節 考察	24
第 5 章 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	26
第 1 節 シソ及び 2 品種のエゴマ葉に含まれる成分の比較	26
1.1 GC/MS による葉の成分測定	26
1.2 TLC によるフィトケミカルの測定	30

第2節	LPSにより誘導される NO とシソ及び2品種のエゴマ葉の抑制効果	30
第3節	LPSにより誘導される IL-1 β とシソ及び2品種のエゴマ葉の抑制効果	31
第4節	考察	32
結論		34
謝辞		36
実験の部		37
第1章付属実験		37
第1節	シソ及び2品種のエゴマ種子の抽出エキスの作製及び成分測定方法	37
1.1	GC/MSによる種子の成分測定	37
1.2	LC/MSによるフィトケミカルの測定	37
第2節	LPSにより誘導される NO 産生量の測定方法	38
第3節	LPSにより誘導される IL-1 β 産生量の測定方法	39
第4節	シソ科植物の種子に含まれるフィトケミカルの抗炎症作用の測定方法	39
第5節	有意差検定	39
第2章付属実験		40
第1節	シソ及び2品種のエゴマ葉の抽出エキスの作製及び成分測定方法	40
1.1	GC/MSによる葉の成分測定	40
1.2	TLCによるフィトケミカルの測定	40
第2節	LPSにより誘導される NO 産生量の測定方法	41
第3節	LPSにより誘導される IL-1 β 産生量の測定方法	41
第4節	有意差検定	41
引用文献		42

序論

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¹⁾。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²⁾。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³⁾。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。

実験では、エゴマ及びシソの葉と種子の抽出物を用い、それらに含まれる脂肪酸、ポリフェノール類、フラボノイド成分を詳細に分析した。さらに、LPS 刺激 RAW264.7 細胞を用いた炎症モデルを適用し、NO 及び IL-1 β の産生抑制効果を指標として抗炎症作用を評価した。本研究を通じて、エゴマの成分が示す抗炎症効果の特徴を明らかにするとともに、シソとの比較によりエゴマの特性をさらに深く理解することを目指した。

本研究の成果はエゴマの健康食品や医薬品としての応用可能性を評価するための科学的根拠を提供するものである。特に、エゴマ油に含まれる α -リノレン酸やポリフェノール類が炎症抑制にどの程度寄与するかを明確にすることでエゴマの有用性をさらに深く探る基盤となることが期待される。

本研究において見出された研究成果について、以下、章節に分けて詳述する。

第1章 炎症について

炎症は、生体が外部からの刺激（外傷、感染、毒素、異常な物質など）に対して示す自然免疫の防御反応であり、生体を守る重要なプロセスである。炎症の主な目的は、損傷を修復し、病原体や異常分子を除去することであるが、炎症が制御不能な状態に陥ると、慢性的な組織損傷や病態を引き起こす。炎症は、その期間と進行の程度に応じて急性炎症と慢性炎症に分類される。急性炎症は外的刺激に応じて発生し、短期間で終了する生理的反応である一方、慢性炎症は持続的な刺激により長期化する状態を指し、組織の損傷と修復が繰り返される。この慢性炎症は、動脈硬化、自己免疫疾患、神経変性疾患など、数多くの病態の発症や進展に寄与する。炎症の発症は、外部刺激が免疫細胞によって認識されることから始まる。この認識には、Toll 様受容体（Toll-like receptor, TLR）が中心的な役割を果たす⁴⁾。リポ多糖（LPS）などの病原体関連分子パターン（PAMPs）が免疫細胞の表面に存在する TLR4 に結合すると、NF- κ B シグナル伝達経路、mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケード等のシグナル伝達経路が活性化される⁵⁾。TLR4 が活性化されることで、細胞内で Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) 経路が誘導され、炎症性サイトカイン（IL-1 β 、IL-6、TNF- α など）の産生が引き起こされる⁶⁾。NF- κ B は通常、細胞質で阻害因子（I κ B）と結合して不活性化された状態で存在するが、TLR4 を介した刺激により I κ B が分解されると、NF- κ B は核内に移行し、炎症性遺伝子の転写を活性化する⁷⁾。この一連のプロセスにより、局所的な炎症反応が開始され、他の免疫細胞を炎症部位へと動員することで炎症が拡大する⁸⁾。また、LPS が TLR4 に結合すると、Myeloid Differentiation Protein-88 (MyD88) が TIR ドメインを介して TLR4 に結合し、シグナル伝達が開始される。MyD88 依存性経路では、interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) が活性化され、TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) をリン酸化することで、MAPK カスケードが誘導される。

MAPK カスケードでは、transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) が活性化され、これにより extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、および p38 MAPK がリン酸化される¹⁰⁾。これらのシグナルは、転写因子 Activator Protein-1 (AP-1) を構成する c-Fos や

c-Jun を活性化し、核内に移行して転写活性を示す。AP-1 は炎症関連遺伝子の発現を促進し、iNOS や cyclooxygenase-2 (COX-2)、および TNF- α といった炎症性サイトカインの産生に関与する¹¹⁾。

iNOS (NOS2) は、NO (一酸化窒素) の産生を引き起こし、炎症部位での血管拡張や免疫細胞の活性化を制御する¹²⁾。しかし、NO が過剰に産生されると、酸化ストレスの増加を引き起こし、細胞や組織の損傷を促進する¹³⁾。これに加えて、COX-2 はアラキドン酸からプロスタグランジンを生成する¹⁴⁾。プロスタグランジンは、炎症の進行において発熱や疼痛、血管透過性の亢進を引き起こし、免疫細胞のさらなる動員を促す。また、これらのプロセスが慢性化すると、組織のリモデリングや線維化が進行し、疾患の発症リスクを高める。炎症反応に関与する主要な因子として、以下の分子が挙げられる。まず、IL-1 β は、マクロファージや樹状細胞によって分泌される炎症性サイトカインであり、炎症反応の初期段階において発熱や細胞活性化を誘導する¹⁵⁾。TNF- α (腫瘍壊死因子- α) は、強力な炎症促進因子であり、急性炎症だけでなく慢性炎症の進展にも重要である¹⁶⁾。また、IL-6 は急性期タンパク質の産生を誘導するほか、全身性炎症を反映する重要なバイオマーカーとして知られている¹⁷⁾。これらの因子は炎症反応を制御する一方で、その過剰な産生は病的な炎症状態を引き起こす¹⁸⁾。近年、炎症の調節を目的とした治療法の開発が進められており、植物由来成分の役割が注目されている。シソに含まれるポリフェノールの一種であるロスマリン酸は、NF- κ B シグナル経路を抑制し、炎症性サイトカインの分泌を低下させる作用がある¹⁹⁾。また、エゴマに豊富に含まれる ω -3 脂肪酸である α -リノレン酸は、COX-2 を介したプロスタグランジンの産生を抑制し、炎症反応を軽減することが報告されている²⁰⁾。これらの植物成分の抗炎症効果を利用した研究は、慢性炎症に起因する疾患の予防や治療において、新たな可能性を提供している。現在知られているマクロファージ系細胞における LPS 誘発性の炎症のメカニズムモデルを Fig. 1 に示す。

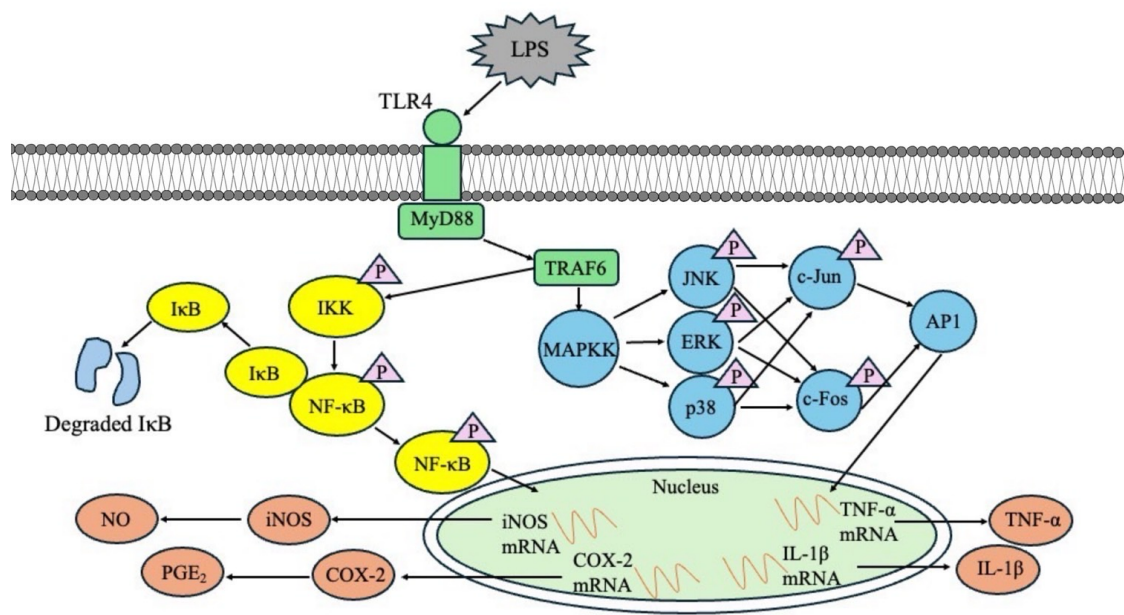


Fig. 1 Inflammatory Signaling Pathway in Macrophages Triggered by LPS Stimulation

第2章 シソについて

第1節 シソの用途及び特性

シソ *Perilla frutescens* var. *crispa* (synonym: *P. crispa* (Thunb.) H. Deane) は、シソ科 Lamiaceae、*Perilla* 属に属する一年生植物で、東アジアを中心に食用、薬用、観賞用として幅広く利用されている²¹⁾。日本、中国、韓国をはじめとするアジア諸国では古くから親しまれており、その用途は非常に多岐にわたる²²⁾。シソには青ジソ（緑ジソ、*P. frutescens* var. *crispa* f. *viridis*）と赤ジソ（*P. frutescens* var. *crispa* f. *purpurea*）の2種類があり(Fig. 2)、それぞれの用途や特性が異なる²³⁾。青ジソは香りや風味が特長であり、赤ジソは抗菌作用や色素成分が特徴である²⁴⁾。これらの特性を活かして、食用や薬用として古くから重要視されてきた²⁵⁾。



青ジソ



赤ジソ

Fig. 2 青ジソ (*P. frutescens* var. *crispa* f. *viridis*) と赤ジソ (*P. frutescens* var. *crispa* f. *purpurea*) の葉の比較。

引用元: Photo AC <https://www.photo-ac.com/>

青ジソ及び赤ジソは、同じシソの異なる品種であり、それぞれの用途や薬効には違いがある²⁶⁾。青ジソは、主に薬味や調味料として用いられ、日本料理に欠かせない存在である。刺身の添え物や天ぷらの材料として広く活用されるほか、サラダや炒め物にも利用される²⁷⁾。

一方赤ジソは、その葉にアントシアニン系色素（シソニンやペリラニン）が含まれ、シソ特有色調を形成し、梅干しの色付けやシソジュースの原料として利用されるほか、食品の保存にも活用される²⁸⁾。シソの葉には抗菌作用や抗酸化作用があり薬用としての利用価値があるが、主として食用や加工食品への利用が多い。

第2節 シソの薬効

シソは薬用として古くから利用されており、漢方方剤の「半夏厚朴湯」や「香蘇散」などに配合され、解毒や整腸作用、あるいは風邪の早期治療を目的として配合される生薬として重要視されている²⁹⁾。シソを薬用利用する場合、その薬用部位は、葉（シソ葉）及び種子（Fig. 3）の2ヶ所である³⁰⁾。葉を薬用とした場合の紫蘇葉は、漢方薬「半夏厚朴湯」に配合され、解毒や胃腸の調整を目的に用いられる³¹⁾。一方、種子を薬用とした場合の紫蘇子は、「蘇子降気湯」に配合され、咳や喘息などの呼吸器の不調を改善するために利用されてきた³²⁾。これらの漢方薬における紫蘇の使用例は、薬効を活かした特性を示すものであり、重要な生薬としての役割を果たしている。



Fig. 3 シソの種子（シソ子）。漢方薬『蘇子降気湯』や食品保存料としての利用が知られる。

このように、シソは薬用部位に応じて薬効が異なり、漢方用途も異なる。したがって、これらの漢方薬は、古代からシソが重要な生薬として利用されてきたことを示す例といえる。

第3節 シソの薬理学的機能性及び生理活性成分について

シソの種子や葉に含まれる薬効薬理学的機能性やフィトケミカルについては、多くの研究が行われている。すなわち、シソの葉には、抗炎症作用、抗酸化作用、抗菌作用、抗真菌作用、抗アレルギー作用、さらには抗うつ作用があることが知られている³³⁻⁴²⁾。これらの薬効は、シソに含まれる多様な成分によるもので、特にモノテルペンからジテルペン系の精油成分やポリフェノール類が主な生理活性物質とされ、ペリラアルデヒド、リモネン、カリオフィレンなどが抗炎症、抗アレルギー、抗菌、及び抗真菌作用を発揮するとされる⁴³⁾。

また、シソ科植物を中心に含まれる多く含まれるポリフェノール類のロスマリン酸は、抗酸化作用と抗炎症作用の両面で重要な役割を果たしていると考えられる⁴⁴⁾。これ以外にも、ルテオリンやアピゲニンといったフラボノイド類も、免疫調節や細胞保護に寄与していると考えられている⁴⁵⁾。また、種子には、油脂成分としてリノール酸や α -リノレン酸が含まれ、心血管の健康維持や炎症の軽減が期待される⁴⁶⁾。

第4節 シソの医薬品以外の応用について

シソの価値は、食品分野はもちろん、健康食品、医薬品、及びスキンケア製品などのさまざまな分野に応用されている。

食品分野では、香りや色付けの特性を活かした食材として重宝され、刺身や梅干しなど日本料理の要素として欠かせない存在である。健康食品では、抗酸化作用や免疫調節作用を謳うサプリメントや機能性表示食品に使用され、美容や生活習慣病予防の観点から広く利用されている。医薬品分野では、伝統的な漢方薬や、呼吸器や消化器に関連する製品に配合されている。さらに、スキンケア製品では、抗炎症作用や保湿作用を持つ成分として使用され、シソの薬効が美容目的で応用されて

いる。このように、シソは古代からの伝統的な利用法及び現代科学の進展によって明らかになった新たな有用性が融合した、極めて重要な植物資源である。葉や種子などの部位ごとの特性を活かし、多様な分野でその価値が広がりつつある。現在も成分や特性に関する研究が進行しており、さらなる応用可能性が期待されている。

現代において、シソは食品分野だけでなく、健康食品や医薬品、スキンケア製品などさまざまな分野で活用されている。シソから抽出された成分は、抗酸化作用や免疫調節作用を謳うサプリメントや機能性表示食品として製品化され、生活習慣病予防や美容、健康維持のための重要な素材として広く認識されている。また、伝統的な漢方薬においても引き続き薬効の再評価がなされており、薬用以外にも幅広い用途に応用されている。

第3章 エゴマについて

第1節 エゴマの用途及び特性

エゴマ *P. frutescens* (synonym: *P. frutescens* (L.) Britton) は、シソ科に属する一年生植物であり、主に種子から搾油して得られるエゴマ油が食品として利用される。エゴマはシソの変種とされ、その成分や利用法にはシソと異なる点がある。変種とは、同じ種に属しながらも形態や性質に一定の違いが認められる個体群を指し、遺伝的な特徴や生態的な適応に基づいて区別されることが多い⁴⁷⁾。ここでいう「性質」とは、形態的特徴、生態的特徴、及び利用方法等の違いを指す。例えば、エゴマは種子の形状や色がシソと異なり、また、エゴマはシソに比べて生育環境への適応性や成長特性に違いがあり、耐寒性や病害虫への耐性といった生態的な特徴が認められる⁴⁸⁾。さらに、エゴマの種子が主に油の原料として利用される一方で、シソは葉や茎が食用や薬用として利用されるなど、利用方法にも差がある⁴⁹⁾。これらの性質の違いが、エゴマをシソの変種として区別する根拠の一つとなっている。エゴマは主に種子や葉が利用され、特に種子から得られるエゴマ油は健康食品としての重要性が高い⁵⁰⁾。エゴマは、一般にはシソの種子に類似した黒色の種子を結実するが、このほかにも白色の種子を結実する品種があることが知られている(Fig. 4)⁵¹⁾。



Fig.4 エゴマの種子。黒エゴマ（左）は黒色の種子を結実し、白エゴマ（右）は白色の種子を結実する品種。両者は成分や利用法に違いが見られる。

エゴマの最も重要な特徴は、その主成分である α -リノレン酸 (ω -3 系脂肪酸) 含量であり、搾油した油には高濃度の α -リノレン酸が含まれる。

α -リノレン酸は、体内でエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) に変換され、抗炎症作用や血液循環の改善、神経保護作用に寄与することが知られている⁵²⁾。特に、 α -リノレン酸は血小板凝集を抑制するトロンボキサン A3 (TXA3) の産生を誘導し、血栓形成を防ぐことで心血管疾患や脳卒中の予防に役立つ⁵³⁾。また、 α -リノレン酸は抗炎症作用に加え、食後の血糖値調節にも効果を示し、リノール酸や α -リノレン酸が胃の動きを緩やかにするホルモン (グルカゴン様ペプチド-1) の分泌を促進することが示唆されている⁵⁴⁾。

第2節 エゴマの成分及び効能

エゴマの種子には油脂成分に加え、非親油性のポリフェノール化合物が豊富に含まれている。これらにはカフェ酸、ロスマリン酸、ロスマリン酸-3-O-グルコシド、スクテラリンなどが含まれており⁵⁵⁾、抗酸化作用や抗炎症作用を通じて慢性疾患の予防に寄与する。また、種子にはルテオリン、アピゲニン、アピゲニン-7-O-グルコシドといったフラボノイドも含まれ、免疫調節作用や抗腫瘍作用を持つことが考えられている⁵⁶⁾。したがって、これらの成分が含まれるエゴマは心血管保護作用、血糖値調節効果、抗炎症作用、抗酸化作用といった多様な薬理効果を発揮すると考えられている。

第3節 シソ及びエゴマの相同性

エゴマ及びシソは、どちらもシソ科シソ属に属する同科同属植物であり変種の関係にあるが、それぞれの利用方法や特徴には明確な違いがある(Fig. 5)。



Fig. 5 黒エゴマ (左)、白エゴマ (中央)、シソ (右) の葉の比較。

外見は似ているが、エゴマは主に食品に利用され、シソは薬味や薬用として利用される。

エゴマ及びシソの葉は形状が極めて類似しており、視覚による見分けが困難であるが、芳香成分に相違点があり、食薬における適応に相違点がある。シソは、葉(シソ葉)と種子(シソ子)の両方が薬用や食用として利用されており、葉には特有の芳香性を示す精油成分(ペリラルデヒドやリモネン)が含まれる。一方、種子にはポリフェノールや油脂成分が含まれ、それぞれが漢方薬や健康食品に用いられているが、エゴマには薬用としての用途はない。

エゴマは、主に種子が利用される点で特徴的であり、特に種子から得られるエゴマ油に豊富に含まれる α -リノレン酸(ω -3系脂肪酸)を活かした健康食品や美容製品としての利用が中心である。また、エゴマの葉も食品として利用されることがあるが、シソほどの使用頻度はない。エゴマは、シソと異なり、シソとエゴマは、どちらも抗炎症作用や抗酸化作用を持つが、シソはその香り成分や多様な薬効で幅広い用途に対応しており、エゴマは種子を基盤とした油脂の健康効果に特化している点で異なる。

エゴマの成分が示す薬理効果は、心血管保護作用や血糖値調節効果に加え、抗炎症作用や抗酸化作用が中心である。特にエゴマ油は、家庭用調理油としてだけでなく、サプリメントや機能性表示食品としても広く利用されており、健康維持や病気予防を目的とした製品が増えている。また、エゴマの葉も栄養価が高く、食品として利用されるほか、乾燥加工されて食品添加物やハーブティーとしても活用されている。エゴマ種子から抽出されたポリフェノールは、スキンケア製品や医薬部外品に応用されるなど、その利用可能性は多岐にわたる。

第4節 エゴマの応用

エゴマは、食品、健康食品、美容、さらには環境分野にまで広がりつつある。その利用可能性は、主に種子から得られるエゴマ油に基づくものだが、種子や葉に含まれるその他の成分も多様な用途を生み出している。

エゴマ油は、その豊富な α -リノレン酸含有量から、家庭用調理油としての利用が広く普及している。高温に弱い性質を活かし、加熱を控えたドレッシングや和え物、スムージーの材料として健康志向の消費者に人気がある。また、特有の風味が料理に深みを与えることから、食品業界では高付加価値の調味料やヘルシーオイルとして注目されている。さらに、動物用飼料としてエゴマ油を利用する試みもあり、家畜やペットの健康維持に役立つ可能性が示されている。

健康食品分野では、エゴマ油の摂取が心血管疾患予防や血糖値コントロールに役立つとされ、機能性食品としての開発が進められている。エゴマ油を主成分とするサプリメントは、オメガ-3 脂肪酸の供給源として、魚油を摂取しないベジタリアンやビーガン層に特に支持されている。また、エゴマの種子から抽出したポリフェノール成分を用いた健康飲料やスナック製品も市場に登場しており、エゴマは多様な加工食品の材料としての可能性を広げている。

美容分野では、エゴマ油や種子から得られる成分がスキンケア製品やヘアケア製品に活用されている。特に、エゴマ油の保湿作用や抗炎症作用が注目され、乾燥肌のケアやアトピー性皮膚炎の予防を目的とした製品が開発されている。また、抗酸化成分として知られるポリフェノール類やフラ

ボノイドは、肌の老化を防ぎ、透明感を引き出す成分として美容業界で需要が高まっている。エゴマ由来の天然成分を活かした化粧品やオーガニック製品の市場は拡大しており、今後の応用範囲も期待されている。

農業や環境分野でも、エゴマの利用が注目されている。エゴマを栽培することで、低肥沃地や耕作放棄地の活用が可能となり、地域の農業振興に寄与している。また、エゴマを含む植物油がバイオディーゼル燃料の原料として検討されており、持続可能なエネルギー資源としての可能性が示されている。さらに、エゴマ栽培の副産物として得られる搾りかすは、有機肥料や飼料として再利用されることがあり、環境に優しい資源循環型の農業モデルを実現する素材として評価されている。葉の利用についても、新たな可能性が模索されている。エゴマの葉は、特有の香りと栄養価の高さから、サラダや漬物、ハーブティーとして利用されている。近年では、エゴマ葉を乾燥させたパウダーが調味料や健康食品の材料として活用される例も増えている。また、葉に含まれるフィトケミカルが抗菌作用や抗酸化作用を示すことから、食品添加物や保存料としての応用が期待されている。このように、エゴマはその成分や特性を活かし、食品、美容、農業、環境など多岐にわたる分野で応用されている。今後もその利用可能性が拡大することが予想されており、持続可能な社会の実現に向けた素材としての地位が一層高まると考えられる。

第4章 シソ及び2品種のエゴマ種子の成分及び抗炎症作用の比較

第1節 シソ及び2品種のエゴマ種子に含まれる成分の比較

1.1 GC/MS による種子の成分測定

シソ及び2品種のエゴマの種子に含まれる脂溶性成分を分析するために黒エゴマの種子(BSP)、白エゴマの種子(WSP)、及びシソの種子(PS)の一定量を秤量し、アセトンによる抽出をおこなって、それぞれの抽出エキスを得た。これについて GC/MS による分析を実施した。

そのスペクトルデータと成分の構造式を **Fig. 6-a, b** に示す。GC/MS の結果、3 種類の種子からは不飽和脂肪酸の α -リノレン酸 (18 : 3) とスクワレン、サトウキビなどに多く含まれる高級脂肪族アルコールのオクタコサノール⁵⁷⁾、ビタミン E のトコフェロール、これに一般的な植物ステロール類のカンペステロール、スティグマステロール、及び β シトステロールが検出された。脂溶性を示すこれらの成分プロファイルは、BSP (A) と PS (C) のそれとよく類似していた。リノレン酸のピークは、PS (C)において BSP (A)、WSP (C) よりも高くなることから含量が高いことが示された。異品種の BSP 及び WSP において比較した場合、 α -リノレン酸の検出ピークは、BSP (A)で高く、WSP (C)では小さいことから、含量が少ないことが示された。エゴマ類及びシソ子に含まれる植物ステロールについてスティグマステロール、カンペステロール、及び β シトステロールについて、最も含量が高かったのは、 β シトステロールであった。

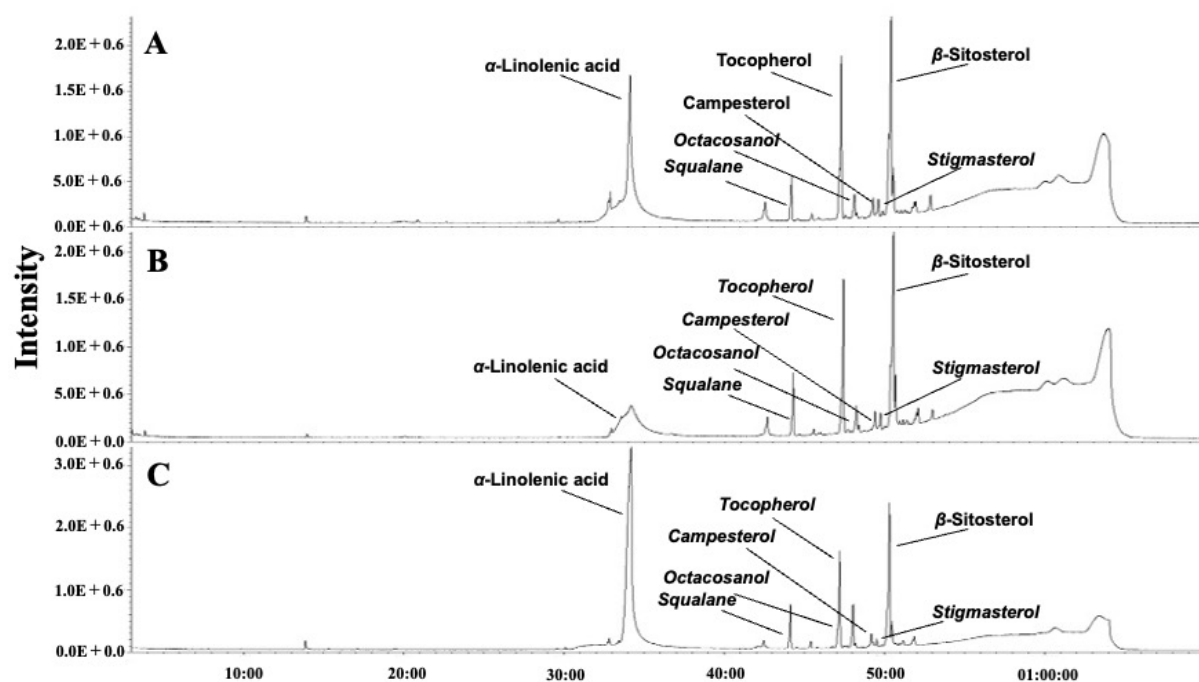


Fig. 6-a GC/MS-TIC chromatograph of the three different acetone extracts of *Perilla* seeds.

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

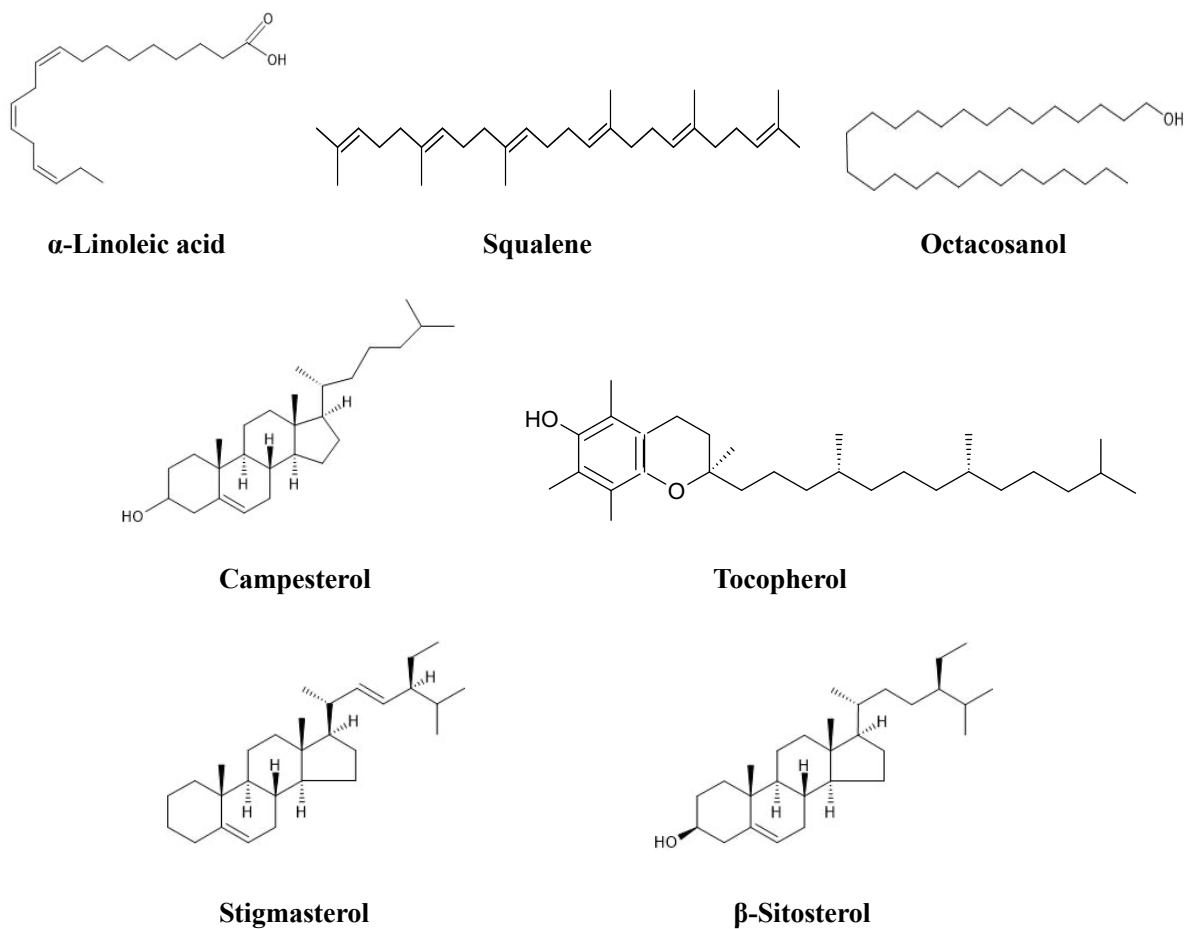


Fig. 6-b Structures of the major constituents in the three different acetone extracts of Perilla seeds.

1.2 LC/MS によるフィトケミカルの測定

次に、シソ及び2品種のエゴマの種子に含まれる代表的なフィトケミカルについて、メタノール抽出物をLC/MSで分析した。

そのスペクトルデータと成分の構造式を **Fig. 7-a, b** に示す。保持時間が10分以降にピークとして検出されるのが、エゴマ及びシソ子の機能性に関わると考えられる成分であり、それぞれのピークに示されるマススペクトルデータからのデータベース解析を行なった結果、カフェ酸、ロスマリン酸、ルテオリン、及びアピゲニンであることが判明した。

ロスマリン酸はフェニルプロパノイド誘導体であり、シソ科植物の特にハッカ類に多く含まれる

ことが知られている⁽⁵⁸⁾。さらに、エゴマ及びシソの種子にはロスマリン酸と構造類似したカフェ酸も含まれていた。さらに、フラボノイド類として知られるアピゲニン及びルテオリンなども検出された。アピゲニンは植物界に広く分布するフラボノイドであり、抗酸化活性を示しこれと構造が極めて類似したルテオリンは、セリ科、シソ科、キク科に分類される食用植物に多く存在する^{59,60)}。

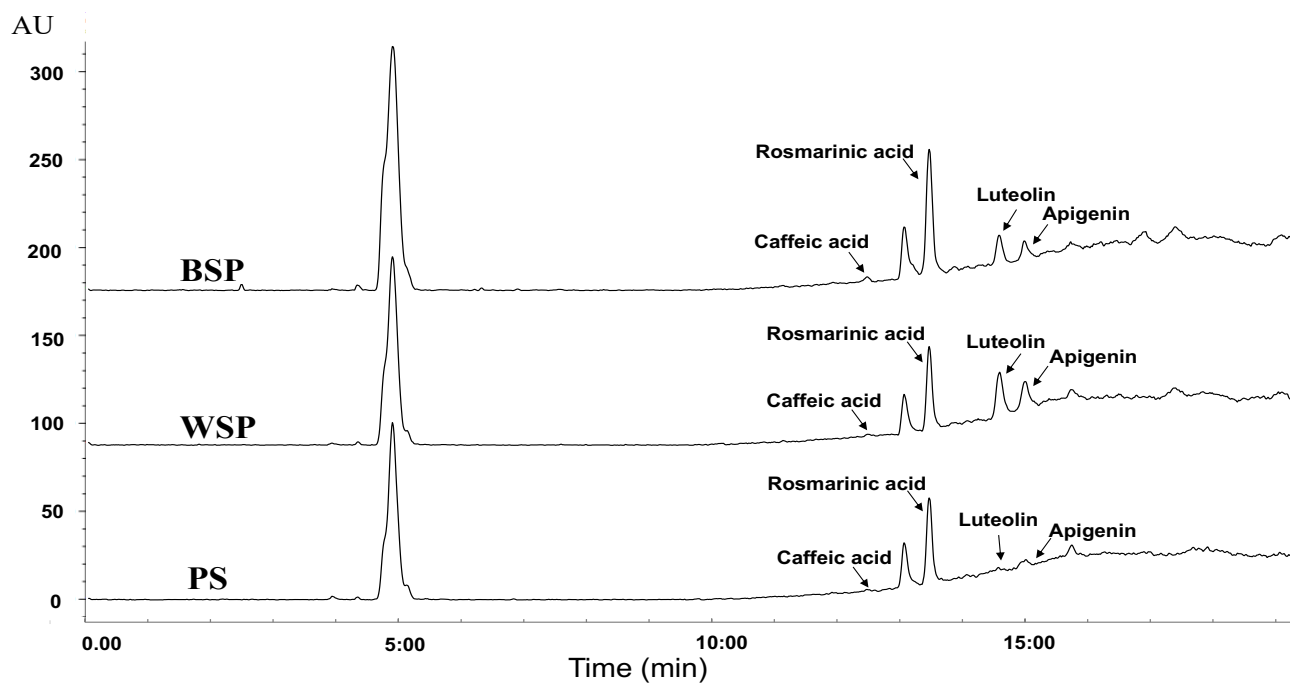
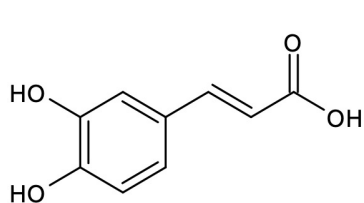
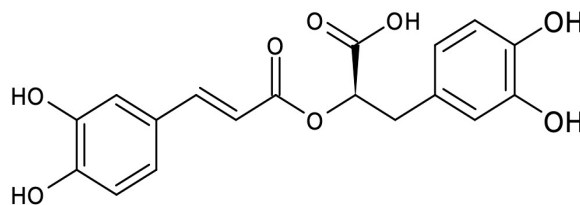


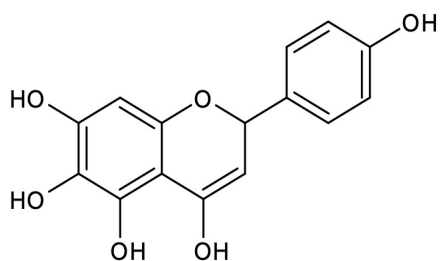
Fig. 7-a LC/MS chromatograms of the three different methanol extracts of *Perilla* seeds.



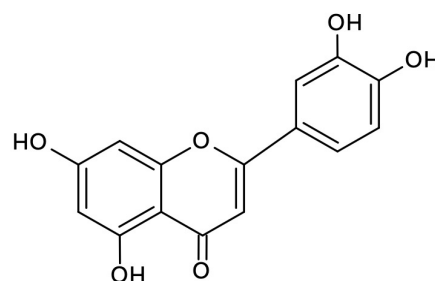
Caffeic acid



Rosmarinic acid



Apigenin



Luteolin

Fig. 7-b. Structures of the major constituents in the three different methanol extracts of *Perilla* seeds.

次に、これらの4種のポリフェノール類の含量をBSP、WSP、及びPSのメタノール抽出エキスを分析し、比較した結果をTable 1に示した。ポリフェノール含量は、メタノールエキスの1gあたりに含まれる量として表示した。カフェ酸については、PSで高く(129 mg/g)、ついでBSP (91 mg/g)とWSP (11 mg/g)の順であった。健康機能性成分として最も注目されるロスマリン酸の含量は、BSPのメタノール抽出物に最も多い(約13 mg/g)ことがわかった。ロスマリン酸量は、WSP及びPSのエキスではほぼ同程度であることもわかった。表に示したように、アピゲニン及びルテオリンについて、WSPは、アピゲニン約2 mg/g及びルテオリンで約8 mg/gであり、これらの含量がBSP及びPSのメタノールエキスよりも高いことがわかった。アピゲニン及びルテオリンの含量は、WSP及びBSPとの間にも差があり、異品種の関係にある種子でも成分差があることが判明した。

Table 1. Polyphenol Contents in methanolic extracts of three different types of perilla seeds

Substances	CA	RA	Api	Lute	N
	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	
BSP	0.091	12.59	0.55	2.39	3
WSP	0.011	7.45	2.44	8.07	3
PS	0.129	8.41	0.70	0.96	3

Data are expressed as mean of three independent experiments.

n: number of experiments. CA: caffeic acid, RA: Rosmarinic acid, Api: Apigenin, and Lute: Luteolin.

第2節 LPS により誘導される NO とシソ及び2品種のエゴマ種子の抑制効果

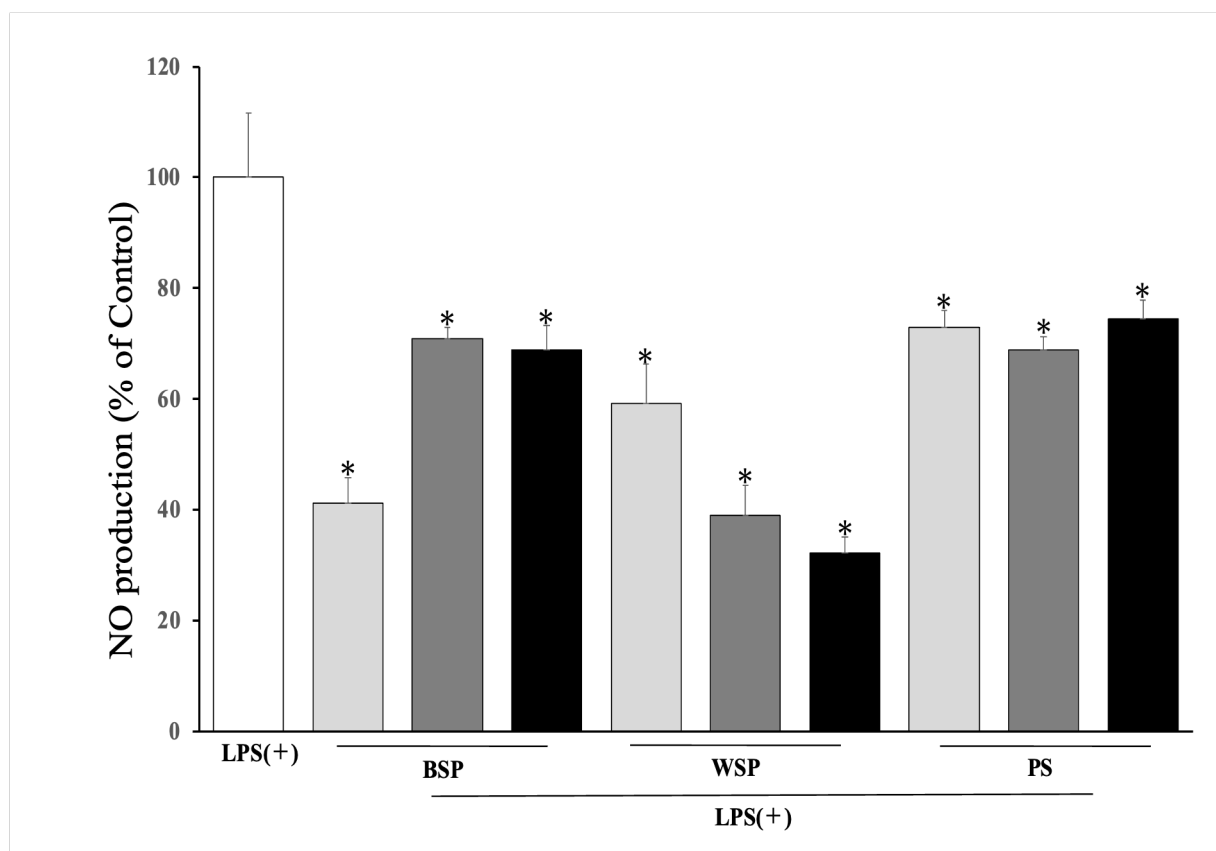


Fig. 8 Effects of BSP, WSP, and PS on NO production of in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS.

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

シソ及び2品種のエゴマの種子のメタノール抽出物による RAW264.7 細胞における LPS 添加後の NO 抑制効果を比較するために LPS 投与後 24 時間の NO の値を測定した。その結果を **Fig. 8** に示した。1~100 µg/mL の濃度の BSP、WSP、及び PS のメタノール抽出物は、いずれの濃度においてもコントロール群と比較して NO を有意に抑制した。図に示す通り BSP、及び WSP のメタノール抽出物は薬用の PS のメタノール抽出物と同様に NO の産生を抑制した。

第3節 LPSにより誘導される IL-1 β とシソ及び2品種のエゴマ種子の抑制効果

シソ及び2品種のエゴマのメタノール抽出物による RAW264.7 細胞における LPS 添加後の IL-1 β 抑制効果を比較するために LPS 投与後3時間の IL-1 β の値を測定した。その結果を Fig. 9 に示した。10~100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度の黒エゴマ、白エゴマ、シソの種子のメタノール抽出物はいずれの濃度においてもコントロール群と比較して IL-1 β を有意に抑制した。図に示すとおり、エゴマの種子のメタノール抽出物はコントロール群と比較し、薬用のシソの種子のメタノール抽出物と同様に IL-1 β の産生を抑制した。

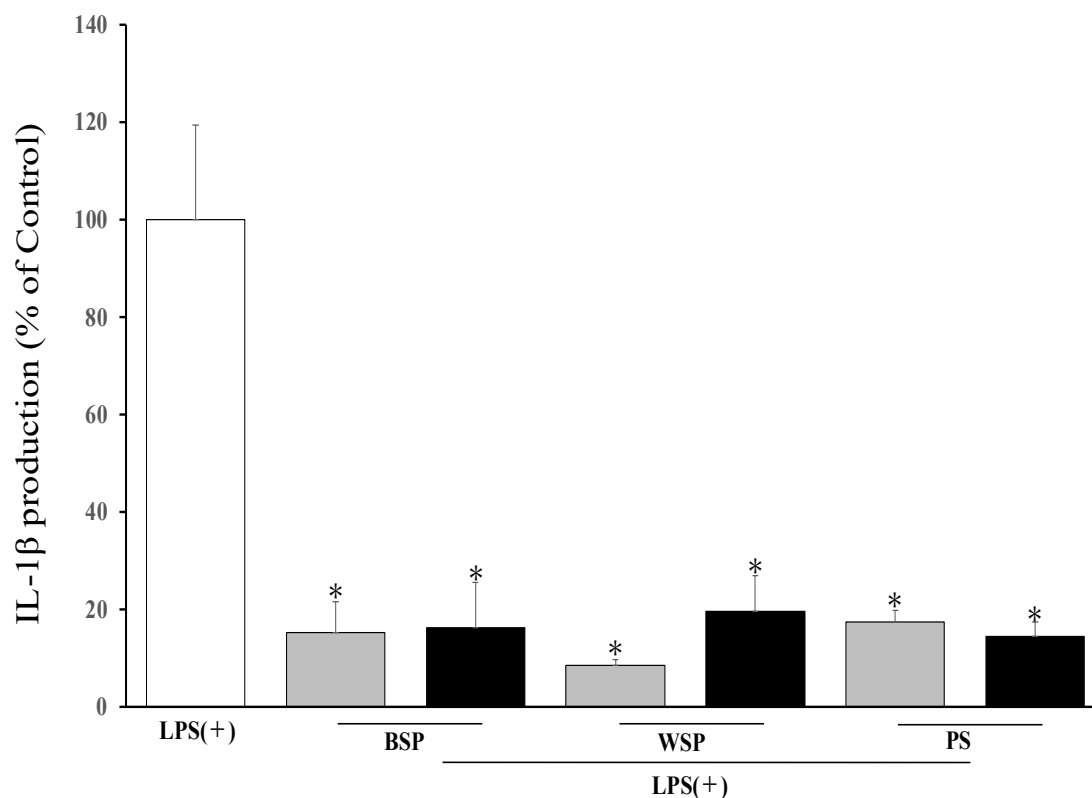


Fig. 9 Effects of Effects of BSP, WSP, and PS on production of IL-1 β in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS.

The cells were incubated with LPS, 10-100 $\mu\text{g/mL}$ of WS and BS, and PS extract. IL-1 β was measured after 3 h of incubation. Each value is presented as the mean + SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ as compared with LPS alone-treated group. :extract 10 $\mu\text{g/mL}$, :extract 100 $\mu\text{g/mL}$.

第4節 シソ科植物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エ酸、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第2節及び第3節の方法と同様に LPS 添加後の NO 及び IL-1 β を測定した。その結果を Fig. 10 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。

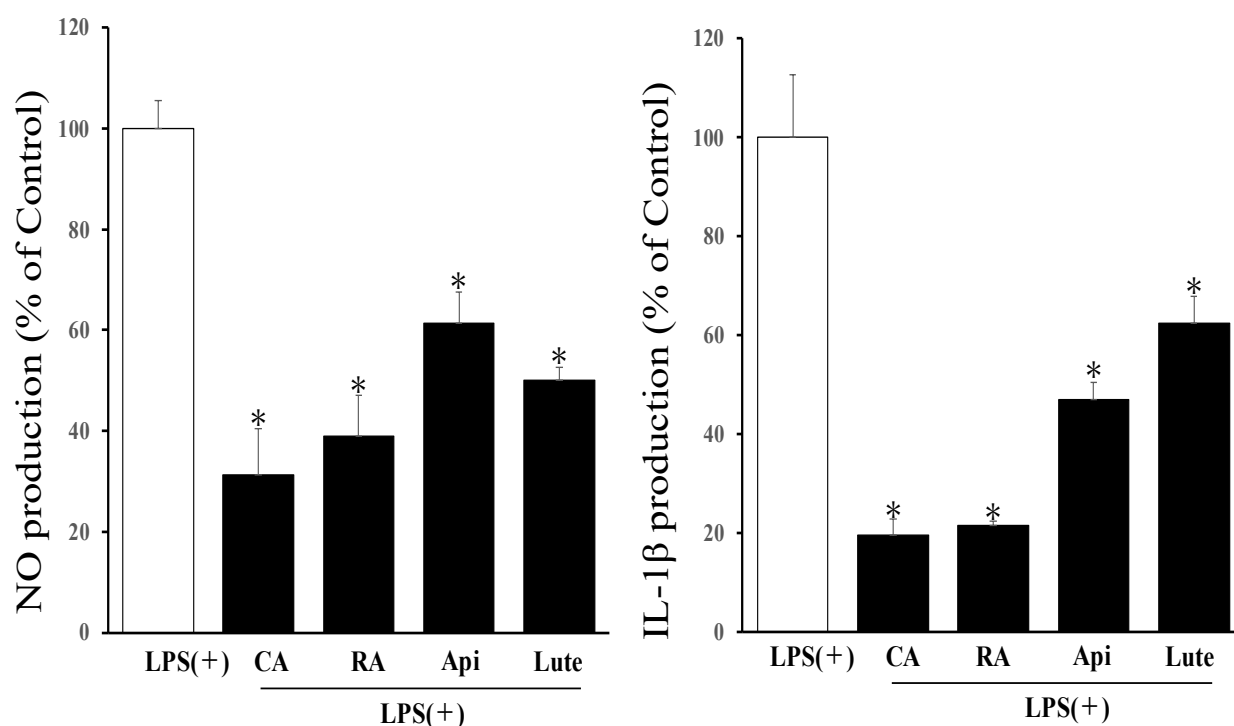


Fig. 10 Effects of caffeic acid, rosmarinic acid, apigenin, and luteolin on the production of NO and IL-1 β in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS.

The cells were incubated with LPS, 3 $\mu\text{g/mL}$ 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 \pm SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ as compared to the control (LPS alone).

第5節 考察

本実験に用いたシソ及び2品種のエゴマの種子の親油性成分の比較をするためにアセトン抽出物をGC/MSで分析したところ、親油性分のプロファイルはプロファイルのパターンに変化はなく、ほぼ同一の成分で構成されていることが判明し、シソ科植物に豊富に含まれる α -リノレン酸は3種共通で豊富に含むことも確認された。

次にシソ科植物に特有のフィトケミカル成分を比較するためにLC/MSで分析を行ったところ、WSPのメタノール抽出物は、BSPやPSのメタノール抽出物と比較して、カフェ酸及びロスマリン酸の含量は少ないが、アピゲニン及びルテオリンについては多く含まれる結果となった。この結果には、種の栽培時期による成長及び種子の成熟度合いが関与している可能性が考えられ、今後はフィトケミカル類の成分量を経時的に調べる必要がある。

成分分析後に、これら3種の抗炎症作用の違いが見られるか解析するためにシソ及び2品種のエゴマの種子の抽出物のLPS刺激によるマクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞においてNO産生抑制作用、IL-1 β 産生抑制作用を検討した。その結果、薬用のシソだけでなく、2品種のエゴマの種子はNO産生、IL-1 β 産生を抑制させたことから、食用のエゴマの種子も抗炎症作用を有することが示唆された。

次に、これら3種の抗炎症作用の活性成分を解析するためにシソ及びエゴマで検出されたフィトケミカル成分の抗炎症作用を検討した。その結果、ポリフェノール成分であるロスマリン酸及びカフェ酸でも抗炎症作用が確認された。また、フラボノイド化合物であるアピゲニン及びルテオリンの両成分でもRAW264.7細胞においてNO産生抑制、IL-1 β 発現抑制作用が確認された。したがって種子の抗炎症作用には、ロスマリン酸、カフェ酸、アピゲニン、及びルテオリンによる相乗作用や相加作用や、まだ作用が未同定の成分による関与も十分に考えられる。さらに、本研究ではRAW264.7細胞においてIL-1 β 産生をBSP及びWSPはPSのメタノール抽出物と同程度抑制し、さらにWSPのメタノール抽出物はNO産生をPSのメタノール抽出物よりも抑制した。このことからWSPは抗炎症作用以外にも薬用のPSのメタノール抽出物と同等かそれ以上の抗酸化作用、抗アレルギー作用を示す可能性がある。本研究ではn=3とした試行数で実験を実施したが、試行数が少ないため、結果

の再現性や信頼性をさらに向上させるためには、試行数を増やす必要があると考えられる。今後の課題として、より多くの試行を行い、統計的な精度を高めることで、結果の妥当性を確保する予定である。そのうえで今後は薬用のシソとの抗酸化作用及び抗アレルギー作用等の比較や動物実験での効果の検討もしている。また、WSP 及び BSP についても NO 産生抑制作用に差が見られており、本研究結果が有効成分の差によるものであるかを解明する必要がある。

第5章 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

第1節 シソ及び2品種のエゴマ葉に含まれる成分の比較

1.1 GC/MS による葉の成分測定

シソ及び2品種のエゴマ葉に含まれる脂溶性成分を分析するために黒エゴマの葉 (BLP)、白エゴマの葉 (WLP)、シソの葉 (PL)のジエチルエーテルで抽出し、それぞれ GC/MS 分析を行った。

スペクトルデータと成分の構造式、及び成分のプロファイルを Fig. 11-a, b、Table 2.に示す。物質 1~3 は BLP と WLP に共通、4 は WLP のみ、A~D は PL にのみ含有する化合物であり、PL にはシソ葉の代表的な機能性成分であるペリラルデヒド、リモネン、及びシソオールが含まれていたのに対し BLP と WLP には、これらの成分は検出されなかった。

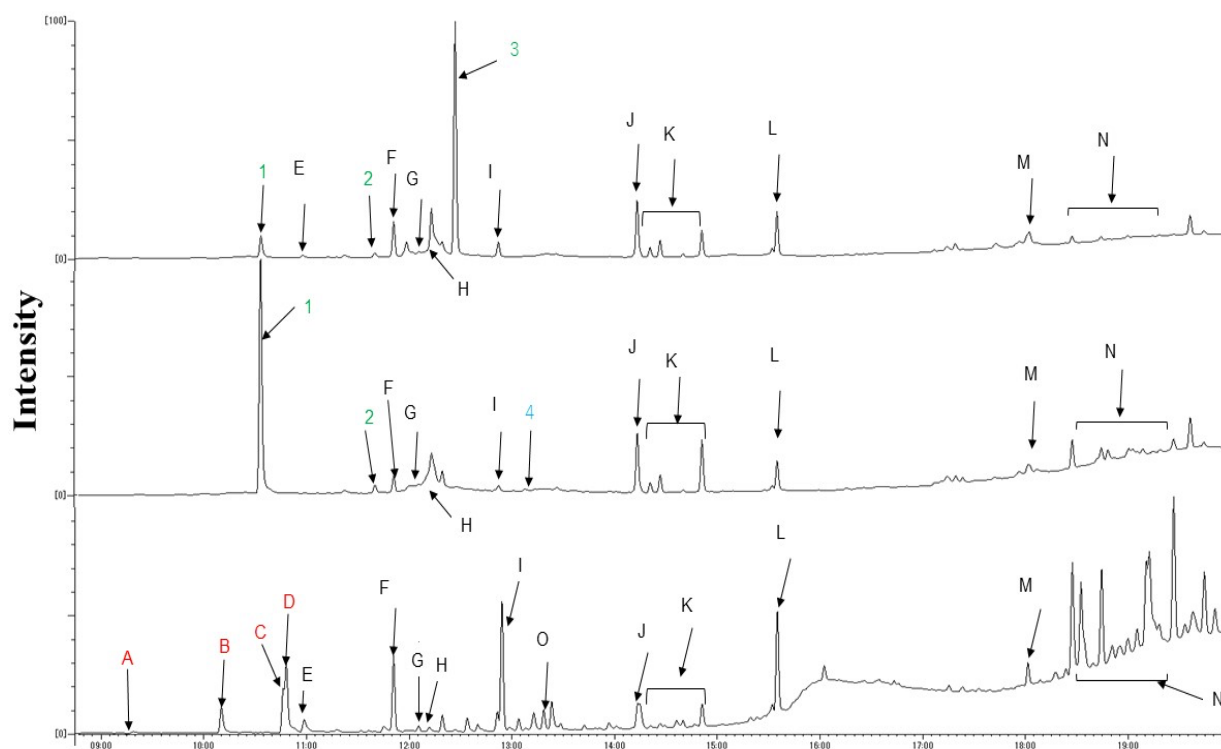
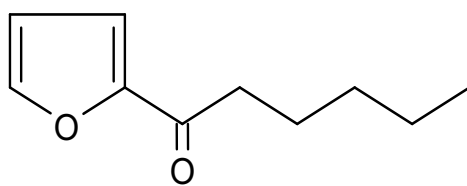
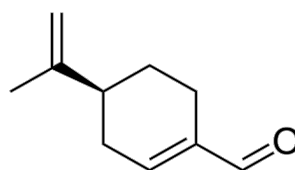


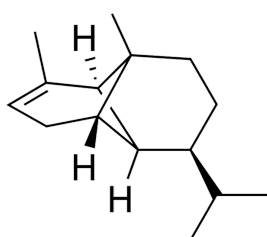
Fig. 11-a. GC/MS-TIC chromatograph of the three different diethyl ether extracts of Perilla leaves.



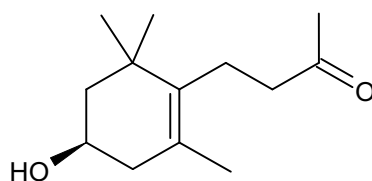
1



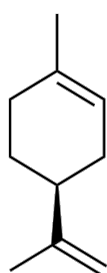
2



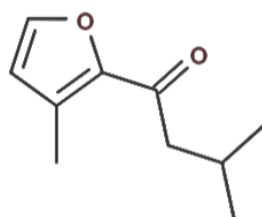
3



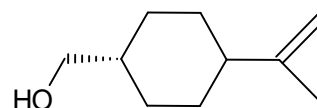
4



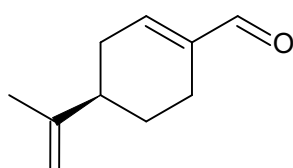
A



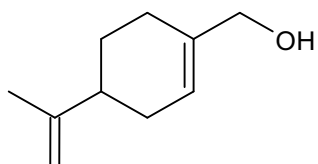
B



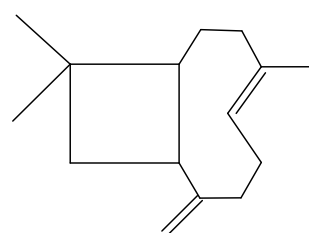
C



D



E



F

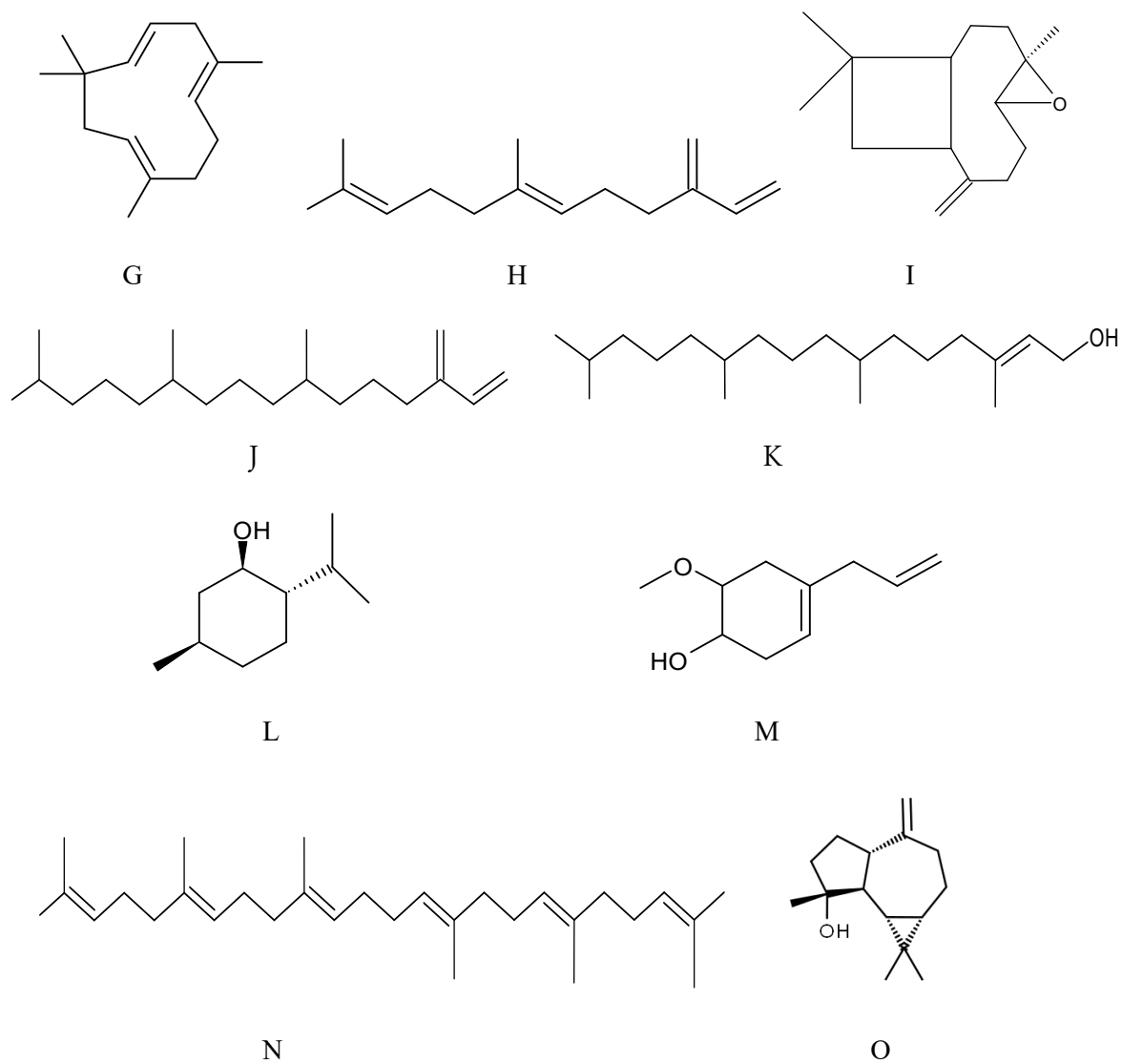


Fig. 11-b Structures of the major constituents in the three different acetone extracts of Perilla leaves.

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	+	+	+

1.2 TLC によるフィトケミカルの測定

WLP、BLP 及び PL のメタノール抽出物について、シソ科植物の代表的な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、及びルテオリンについて薄層クロマトグラフィー (TLC) 法で比較検討した結果を Fig.12 に示す。

いずれの 4 成分においても WLP のスポットが最も濃い結果となり、WLP に含まれるフィトケミカル成分量が最も多く含まれていた。

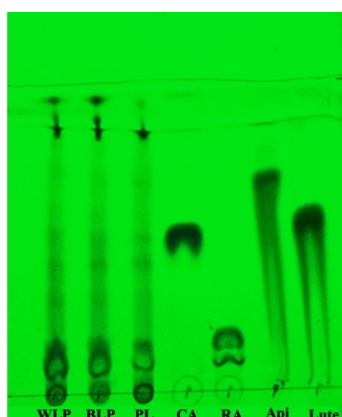


Fig. 12 Thin-layer chromatograms (TLC) of Tested substances.

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.

第2節 LPS により誘導される NO とシソ及び2品種のエゴマ葉の抑制効果

シソ及び2品種のエゴマの葉のメタノール抽出物による RAW264.7 細胞における LPS 添加後の NO 抑制効果を比較するために LPS 添加後 24 時間の NO の値を測定した。その結果を Fig. 13 に示した。1~10 μ g/mL の濃度の BLP を除いて、BLP、WLP、及び PL のメタノール抽出物はいずれの濃度においてもコントロール群と比較して NO を有意に抑制した。また、薬用の PL はいずれの濃度においても BLP、WLP よりも NO 産生の抑制率は高かった。

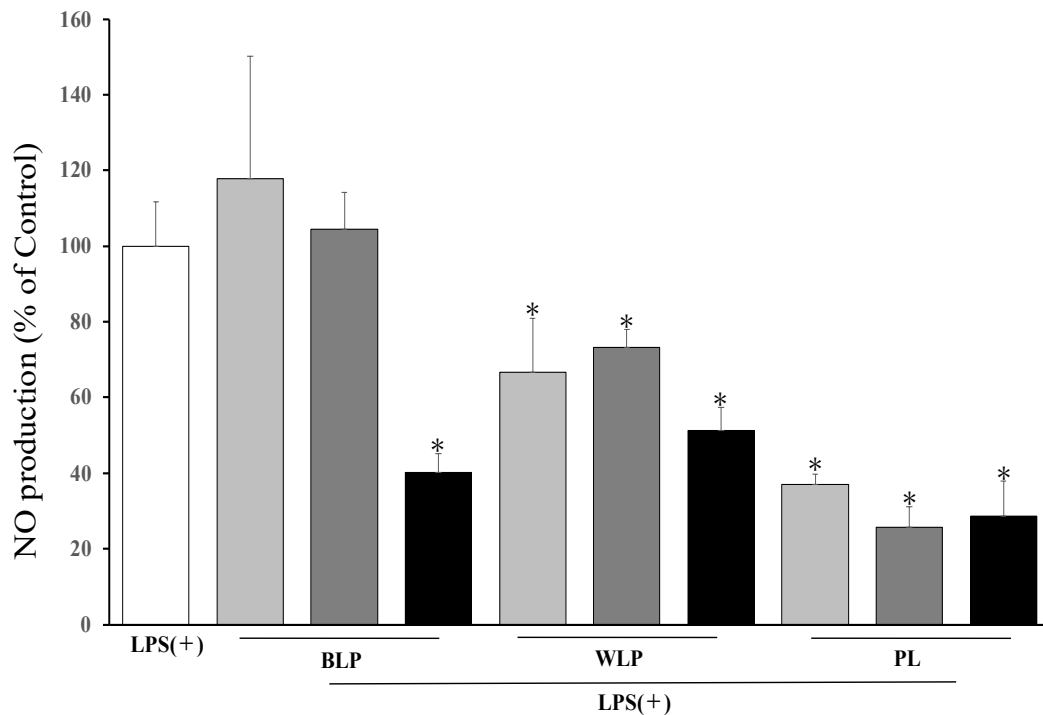


Fig. 13 Effects of BLP, WLP, and PL on NO production of in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS.

The cells were incubated with LPS, 1-100 µg/mL of WL and BL, and PL extract. NO was measured after 24 hours. Each value is presented as the mean + SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ as compared with LPS alone-treated group (C). :extract 1 µg/mL, :extract 10 µg/mL, :extract 100 µg/mL.

第3節 LPSにより誘導される IL-1 β とシソ及び2品種のエゴマ葉の抑制効果

シソ及び2品種のエゴマの葉のメタノール抽出物による RAW264.7 細胞における LPS 添加後の IL-1 β 抑制効果を比較するために、LPS 添加後 3 時間の IL-1 β の値を測定した。その結果を Fig. 14 に示した。

10~100 µg/mL の濃度の BLP、WLP 及び PL のメタノール抽出物はいずれの濃度においてもコントロール群と比較して IL-1 β を有意に抑制した。エゴマの葉のメタノール抽出物は、コントロール群と比較し、薬用のシソの葉のメタノール抽出物と同様に IL-1 β の産生を抑制した。

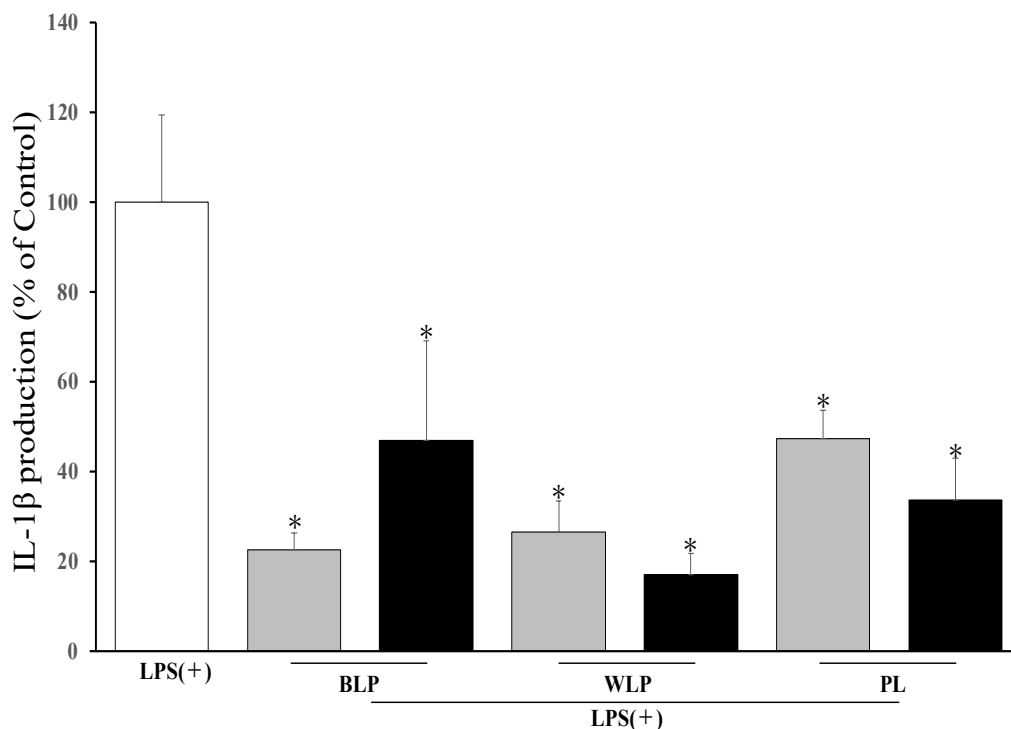


Fig. 14 Effects of Effects of BLP, WLP, and PL on production of IL-1 β in cultured RAW264.7 cells co-stimulated with LPS. The cells were incubated with LPS, 1-10 μ g/mL of WS and BS, and PS extract. IL-1 β was measured after 3 h of incubation. Each value is presented as the mean + SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ as compared with LPS alone-treated group (C). :extract 10 μ g/mL, :extract 100 μ g/mL.

第4節 考察

本実験に用いた薬用のWLPのメタノール抽出物は、BLP及びPLのメタノール抽出物と比較して、カフェ酸、ロスマリン酸、アピゲニン、及びルテオリンについていずれにおいても最も多く含まれることがTLCの分析において判明した。この結果には、それぞれの種子と同様に栽培時期による成長及び種子の成熟度合いとの関係性が成分の含量に影響している可能性があるため、経時的な成分含量の変化を調べる必要がある。また、より正確な成分含量を測定するためにLC/MSでの定量分析も今後必要である。

1~10 µg/mL の濃度の BLP の抽出物を除き、BLP 及び WLP のメタノール抽出物は薬用の PL 同様に LPS 添加後のマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞において NO と IL-1 β の産生量を減少させ、抗炎症作用が示された。一方で、葉では興味深いことに IL-1 β 産生を WLP のメタノール抽出物の抑制率が最も高く、PL の抽出物が NO 産生の抑制率は高かった。RAW264.7 細胞は LPS 刺激により NF- κ B が活性化され、Pro-IL-1 β から IL-1 β を生成すること、及び Caspase-1,8 を活性化し、IL-1 β の生成を促進することがこれまでに知られている^{61,62}。このことから、IL-1 β の産生を最も抑制した WLP のメタノール抽出物は NF- κ B 経路、及び Caspase の経路に最も強い影響を与えた可能性がある。一方で、RAW264.7 細胞は LPS 刺激により NF- κ B を活性化し、iNOS の誘導を促進し、NO の産生を促進することがこれまでに知られている。このことから PL のメタノール抽出物は NO 産生に関わる iNOS の発現を調節し、NO 産生を最も効果的に抑制している可能性がある。

今後は、これらの物質が各シグナル経路に及ぼす影響を遺伝子レベルで詳細に解析し、その分子メカニズムを解明する必要がある。また、TLC により WLP には代表的なフィトケミカル成分が BLP、及び PL の葉よりも多く含まれることが分かった。今後は種子と同様に LC/MS により正確な含有量を測定する必要がある。また、GC/MS の結果、シソの葉にはエゴマの葉と異なりペリラルデヒド及びリモネンといった機能性の香気成分が含まれていた。ペリラルデヒドはマクロファージ系細胞における抗炎症作用だけでなく、マウスにおける炎症性腸疾患に対しても抑制作用を示すなど強力な抗炎症作用を持つことが知られている^{63,64}。これら強力な抗炎症作用を有する機能性香気成分はシソにのみ含まれていることから、シソが NO、IL-1 β の抑制率が最も高いことが予想されたが実際は上述の通り異なる結果が得られた。このことから、カフェ酸などのフィトケミカル成分と機能性香気成分は異なる炎症メディエーターに対して作用する可能性も示唆された。今後は機能性香気成分とフィトケミカル成分の抗炎症作用の比較などを行い、成分の抗炎症作用への寄与度の検証も検討している。

結論

本研究では、シソとシソの変種の関係にあるエゴマについて、特にエゴマについては白色と黒色の2品種について、種子及び葉に含まれる成分の特徴と活性について詳細な検討を行った。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、種子が圧搾されエゴマ油として市場に出回っている。しかし、種子には不飽和脂肪酸も多く含むことから、酸化されやすいため加熱を繰り返す調理には不向きであるなど、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や一般的な植物ステロール類を含むが、極性が高い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は含まれないことが分かった。したがって、圧搾後に廃棄される残渣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にした。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。シソは葉及び種子が漢方薬に配合されるほか、食用になるなど、食・薬の両区分において用いられるが、本研究においてエゴマの葉及び種子にもシソと同レベルがそれを超える活性が認められたことから、その健康機能性維持に関する活用にも期待がもたれる。

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。

謝 辞

本研究を終えるに際しまして、始終ご懇意なるご指導とご高配を賜りました日本薬科大学 臨床薬理学分野 松田佳和教授、前田智司教授、ならびに漢方薬学分野 高野文英教授に衷心より謝意を表します。

ELISA 法におけるタンパク質の定量におきまして、大変お世話になりました日本薬科大学 医療ビジネス薬科学科 縣右門准教授、成分分析におきましてご指導くださりました日本薬科大学 分子機能科学分野 三熊敏靖准教授、統計解析におきまして大変お世話になりました日本薬科大学 データサイエンスセンター 佐古兼一准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において使用した 2 種類のエゴマ種子の栽培及び搾油提供にご協力いただいた埼玉県児玉郡美里町のエゴマ農園の皆様に深く感謝申し上げます。また、栽培条件の確認及び研究用材料の収集にお力添えいただいた本学地域連携室の西村恵美子氏にも心より御礼申し上げます。

実験の部

第 1 章 付属実験

第 1 節 シソ及び 2 品種のエゴマ種子の抽出エキスの作製及び成分測定方法

埼玉県北部の美里町で栽培された黒色に結実する品種から採取した種子及び白色に結実する品種から得られた種子をそれぞれ購入した（2022 年 10 月に種子を採取）。薬用のシソの種子は、ウチダ和漢薬（NYM0216、東京）より購入した。

1.1 GC/MS による種子の成分測定

GC-MS 分析は JEOL UltraQuad GC/MS (JMS-K9)-Agilent Tech 6890N system を用いて行った。カラムは DB-WAX (Agilent Tech) を用い、カラム温度は 70°C から 300°C で 20 min 保持した。サンプルの注入口の温度は 100°C であり、キャリアガスは He を用いた。サンプルの注入量は 1 μ L としイオン化電圧は 70 eV であった。なお、分析時間は 60 分で実施した。なお、成分の同定は Agilent database で保持時間と m/z 分子イオンピーク（陰イオン）及びフラグメントマスパターンの類似度から決定した。

分析にあたっては、白と黒の品種のそれぞれのエゴマ、及びシソの種子 10 g をグラインダーで粉碎し、アセトン 200 mL で 24 時間抽出した後、減圧下にアセトンを溜去し、得られたアセトン抽出物を得た。このアセトン抽出物を 10 mg/mL の濃度になるようにメタノールに溶解し、GC/MS 分析に供した。

1.2 LC/MS によるフィトケミカルの測定

BSP、WSP 及び PS を秤量し、中型乳鉢で粉碎した。擦り潰された 3 種類の種子を三角フラスコに移し、これに 1 L のメタノールを加えて抽出した。抽出開始から 24 時間後、メタノール液を濾過し、減圧下にエバポレーターで溶媒を溜去し、それぞれのエキスを作製した。なお、メタノールによ

る抽出操作は3回繰り返してエキスを作製した。

この操作により、黒エゴマ抽出エキスとして 8.51 g、白エゴマ抽出エキスとして 8.24 g 及びシソ種子抽出エキスとして 7.70 g をそれぞれ得た。

LC/MSによる分析は、スノーデン株式会社への委託試験で実施した。すなわち、LC分析機器 1260 InfinityII (Agilent) にMS分析装置 InfinityLab LC/MSD (Agilent) を搭載したシステムで分析した。分析カラムは InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm I.D.×100 mm、particle size 2.7 µm、Agilent) を用い、カラム温度 40 °C で測定した。

移動相はA液：0.01 % (v/v)ギ酸溶液及びB液：メタノール (0.01 % (v/v)ギ酸含有)とし、グラジエント条件として 20 %のB液を (0min)、ついで A 液から B 液 20 %→55 %を(0→3min)、次に A 液から B 液を 55 %→100 %で 3→7 min、次にB液の 100 %を7→12 min で通過させた (流速：0.2 mL/min)。

MS インターフェイスは、ESI 及び APCI の同時イオン化法により、陰イオンの MS m/z において、カフェ酸179、クロロゲン酸353、ルテオリン:285、ロスマリン酸360、アピゲニン:270 で検出した。

検量線の作成

カフェ酸 (Sigma-Aldrich) : 0.1~4 µg/mL、クロロゲン酸 (Sigma-Aldrich) : 0.1~2 µg/mL、ルテオリン (Sigma-Aldrich) : 0.1~1 µg/mL (Sigma-Aldrich)、ロスマリン酸 (富士フイルム-Wako) : 0.5~3 µg/mL、アピゲニン (富士フイルム-Wako) : 0.02~0.2 µg/mL を用いて作成し、保持時間におけるピーク面積法より成分量を決定した。

分析にあたっては、白及び黒のエゴマのメタノール抽出物、あるいはシソの種子をメタノールで抽出したエキスをメタノール/DMSO(9:1)で希釈し、その 1 µL を注入して 60 分間分析した。成分の同定は Agilent database で保持時間と m/z 分子イオンピーク (陰イオン) 及びフラグメントマスパターンの類似度から決定した。

第2節 LPS により誘導される NO 産生量の測定方法

24-well plate に RAW 264.7 細胞を 1×10^5 cells/well に調整後播種し、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。その後ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解したシソ及び2品種のエゴマのメタノール抽出物、及び LPS 濃度が 100 ng/mL になるように調整後添加し、24 時間培養した。遊離した NO 量は上清 100 µL に Griess 試薬を 100 µL 添加し、550

nm における吸光度を測定した。なお、標準物質として亜硝酸ナトリウム (NaNO_2) を用いた検量線から亜硝酸イオン (NO_2^-) の濃度を算出した。細胞は PBS (-) で洗浄した後、1 %Triton-X で可溶化し BCA 法を用いてタンパク量を測定した。 NO_2^- 量をタンパク量で除し、NO 産生量とした。

第3節 LPS により誘導される IL-1 β 産生量の測定方法

24-well plate に RAW 264.7 細胞を 1×10^5 cells/well に調整後播種し、DMEM で培養した。その後第2節と同様にシソ及び2品種のエゴマのメタノール抽出物、及び LPS を調整後添加し、3 時間培養した。IL-1 β 産生量の測定は IL-1 β ELISA kit (abcam) を使用しマニュアルに従った。なお、第2節と同様に、細胞は PBS (-) で洗浄した後、1 %Triton-X で可溶化し BCA 法を用いてタンパク量を測定した。IL-1 β の量をタンパク量で除し、IL-1 β 産生量とした。

第4節 シソ科植物の種子に含まれるフィトケミカルの抗炎症作用の測定方法

24-well plate に RAW 264.7 細胞を 1×10^5 cells/well に調製後に播種し、DMEM で培養した。シソ科植物に含まれるフィトケミカル成分を DMSO で溶解後、第2節・第3節と同様に NO 及び IL-1 β を測定した。すなわち LPS 添加後 24 時間後に NO、3 時間後に IL-1 β を測定し、タンパク量で除することで補正し各項目の産生量とした。

第5節 有意差検定

得られた結果はすべて平均値 + 標準誤差 (mean + SEM) で表示した。また、有意差検定は平均値の差を一元配置分散分析、それに続く Dunnett の多重比較検定を行なった。平均値の差は $p < 0.05$ で統計的に有意であるとした。

第2章 付属実験

第1節 シソ及び2品種のエゴマ葉の抽出エキスの作製及び成分測定方法

埼玉県北部の美里町で栽培された黒色に結実する品種から採取した葉及び白色に結実する品種から得られた葉をそれぞれ購入した（2022年10月に種子を採取）。薬用のシソの葉は、ウチダ和漢薬（NYM0216、東京）より購入した。

1.1 GC/MS による葉の成分測定

GC-MS 分析は JEOL UltraQuad GC/MS (JMS-K9)-Agilent Tech 6890N system を用いて行った。カラムは DB-WAX (Agilent Tech) を使い、カラム温度は 70 °C から 200 °C で 20 min 保持した。サンプルの注入口の温度は 100 °C であり、キャリアガスは He を用いた。サンプルの注入量は 1 µL としイオン化電圧は 70 eV であった。なお、分析時間は 60 分で実施した。なお、成分の同定は Agilent database で保持時間、 m/z 分子イオンピーク（陰イオン）、及びフラグメントマスパターンの類似度から決定した。

分析にあたっては、白、黒の品種のそれぞれのエゴマ、及びシソの葉 2 g をジエチルエーテル 200 mL で 24 時間抽出した後、得られた濾液を 10 mg/mL の濃度になるようにメタノールに溶解し、GC/MS 分析に供した。

1.2 TLC によるフィトケミカルの測定

乾燥したシソ及び2品種のエゴマの葉を秤量し、これらを三角フラスコに移し、1 L のメタノールを加えて抽出した。抽出開始から 24 時間後、メタノール液を濾過し、減圧下にエバポレーターで溶媒を溜去し、それぞれのエキスを作製した。なお、メタノールによる抽出操作は3回繰り返してエキスを作製した。それらエキスをメタノールで 1 mg/mL の濃度になるように調製し、試料溶液とする。別にカフェ酸、ロスマリン酸、アピゲニン、ルテオリンを 1 mg/mL の濃度になるようにメタノールに溶解し、これらを標準溶液とする。これらの液につき TLC により試験を行う。試料溶液

及び標準溶液 1 μL ずつ各 20 回をクロマトグラフィー用シリカゲル (蛍光剤入り) を用いて調製した薄層板にアプライした。次に、クロロホルム／メタノール／酢酸混液 (9:1.5:1) を展開溶媒として約 7 cm 展開した後薄層版を風乾する。これに紫外線 (254 nm) を照射するとき試料溶液から得た数個のスポットのうち 4 個のスポットは標準溶液から得たスポットと Rf 値と色調が等しい。これら 4 個のスポットの濃さを用いて 3 種の葉の成分含量の比較を行った。

第 2 節 LPS により誘導される NO 産生量の測定方法

24-well plate に RAW 264.7 細胞を 1×10^5 cells/well に調整後播種し、DMEM で培養した。その後ジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解したシソ及び 2 品種のエゴマの葉のメタノール抽出物、及び LPS 濃度が 100 ng/mL になるように調整後添加し、24 時間培養した。第 2 章-第 2 節と同様に遊離した NO 量は上清 100 μL に Griess 試薬を 100 μL 添加し、550 nm における吸光度を測定し、BCA 法を用いて測定したタンパク量で NO^{2-} 量を除し、NO 産生量とした。

第 3 節 LPS により誘導される IL-1 β 産生量の測定方法

24-well plate に RAW 264.7 細胞を 1×10^5 cells/well に調整後播種し、DMEM で培養した。その後シソ及び 2 品種のエゴマの葉のメタノール抽出物、及び LPS を調整後添加し、3 時間培養した。IL-1 β ELISA kit を使用し IL-1 β 産生量の測定を行い、BCA 法を用いて測定したタンパク量で IL-1 β を除し、IL-1 β 産生量とした。

第 4 節 有意差検定

得られた結果はすべて平均値 + 標準誤差 (mean + SEM) で表示した。また、有意差検定は平均値の差を一元配置分散分析、それに続く Dunnett の多重比較検定を行なった。平均値の差は $p < 0.05$ で統計的に有意であるとした。

引用文献

- 1) 広井 勝. エゴマの成分と利用、特産種苗. 2009; **5**: 13-16.
- 2) 伊藤美千穂. 日本産シソ属植物の類縁および化学分類に関する研究. 京都大学博士論文; 1999.
- 3) Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell*. 2002; **10**(2): 417–426.
- 4) Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006; **13**(5): 816–825.
- 5) Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000; **173**(1): 89–97.
- 6) Hayden M.S, Ghosh S. NF- κ B in immunology. *Cell Res*. 2011; **21**(2): 223–244.
- 7) Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009; **27**(1): 693–733.
- 8) Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005; **17**(1): 1–14.
- 9) Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002; **20**(1): 55–72.
- 10) Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012; **33**(7): 829–837.
- 11) Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994; **78**(6): 915–918.
- 12) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite. *Physiol Rev*. 2007; **87**(1): 315–424.
- 13) Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000; **69**(1): 145–182.
- 14) Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Nat Immunol*. 2010; **11**(10): 895–897.
- 15) Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008; **214**(2): 149–160.
- 16) Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015; **16**(5): 448–457.
- 17) Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; **454**(7203): 428–435.

- 18) Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, et al. Rosmarinic acid reduces inflammatory reactions. *J Ethnopharmacol.* 2004; **93**(1): 175–181.
- 19) Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation. *J Am Coll Nutr.* 2002; **21**(6): 495–505.
- 20) Nitta M, Lee J, Kang S. Genetic diversity of Perilla and its related taxa. *Genet Resour Crop Evol.* 2005; **52**(5): 663–670.
- 21) Asif M. Pharmacological activities and phytochemistry of Perilla frutescens. *Int J Green Pharm.* 2011; **5**(4): 333–339.
- 22) Omori T, et al. Differences in aroma compounds. *J Agric Food Chem.* 1995; **43**(3): 664–668.
- 23) Satoh J, et al. Antioxidant properties of anthocyanins in red shiso. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1996; **42**(5): 473–482.
- 24) Wang Q, Cui J, Li M. Traditional Chinese medicine and immune regulation. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019; **57**(3): 371–381.
- 25) Kim MJ, Moon Y. Antioxidative and antimicrobial activities of shiso leaves. *J Food Sci.* 2008; **73**(6): C411–C418.
- 26) Lee JH, et al. Isolation of Perillanin, a new anthocyanin. *Phytochem Lett.* 2012; **5**(1): 27–32.
- 27) Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; **75**(3): 645–662.
- 28) Yamamoto J, Tsujioka T, Imanishi N, et al. Traditional Chinese medicines. *J Ethnopharmacol.* 2006; **104**(3): 329–338.
- 29) Li R, et al. Pharmacological properties of Perilla seed. *Phytomedicine.* 2014; **21**(9): 1101–1109.
- 30) Kim H, Lee J, Park C, et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects. *J Ethnopharmacol.* 2017; **198**: 295–303.
- 31) Hwang JT, Ha J, Park IJ, et al. Apigenin and lipid accumulation. *J Food Sci.* 2011; **76**(9): H221–H228.
- 32) Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions. *Annu Rev Immunol.* 2009; **27**: 519–550.
- 33) Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity. *J Antimicrob Chemother.* 2001; **47**(5): 565–573.

- 34) Makino T, Furuta A, Shimizu R, et al. Perilla aldehyde suppresses colitis. *Inflamm Res*. 2013; **62(8)**: 773–780.
- 35) Choe E, Min DB. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2009; **8(4)**: 345–358.
- 36) Guo LH, Zhou Z, Zhang W. The bioactive compounds in *Perilla frutescens* and their pharmacological properties. *Pharmacognosy Journal*. 2012; **4(32)**: 45-50.
- 37) Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003; **62(2)**: 121–125.
- 38) Hossain MA, et al. Identification and quantification of rosmarinic acid. *J Med Plants Res*. 2010; **4(8)**: 569–573.
- 39) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite. *Physiol Rev*. 2007; **87(1)**: 315–424.
- 40) Nagaya T. The functional components of *Perilla frutescens*. *J Herbal Med Res*. 2024; **18(2)**: 123–135.
- 41) Lee JH, Kang HS. Roles of α -linolenic acid. *J Lipid Res*. 2010; **51(3)**: 1234–1243.
- 42) Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. Anti-inflammatory effects of essential oils. *J Antimicrob Chemother*. 2001; **47(5)**: 565–573.
- 43) Makino T, Furuta A, Shimizu R. Perilla aldehyde suppresses colitis. *Inflamm Res*. 2013; **62(8)**: 773–780.
- 44) Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003; **62(2)**: 121–125.
- 45) Kim DH, Park SE, Park HS. Flavonoid components and biological effects. *Molecules*. 2018; **23(5)**: 1100.
- 46) Lee JH, Kang HS. Roles of α -linolenic acid. *J Lipid Res*. 2010; **51(3)**: 1234–1243.
- 47) Solbrig OT. The origin and structure of adaptive radiation. *Annu Rev Ecol Syst*. 1970; **1(1)**: 213–242.
- 48) Futuyma DJ. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates; 1998.
- 49) Liu Q, et al. Perilla: A rich source of biologically active compounds. *Phytochem Rev*. 2019; **18(5)**: 1249–1270.
- 50) Choe E, Min DB. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in*

Food Science and Food Safety. 2009; **8**(4): 345–358.

51) Lee YN, et al. Morphological and genetic variation in Perilla crop species. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2017; **20**(3): 175–183.

52) Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Effects on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events. *Circulation Research*. 2016; **118**(4): 596–615.

53) Dietary α -Linolenic Acid and Risk of Fatal Ischemic Heart Disease Among Women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; **77**(4): 824–829.

54) α -Linolenic Acid and Cardiovascular Disease. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2009; **82**(4-6): 267–273.

55) 及川和志、遠山良. エゴマ種子に含まれる栄養成分および機能性成分. 岩手県工業技術センター研究報告. 2008; **15**: 107–113.

56) 小川哲郎、近重克幸、荒木英稀、北川優、勝部拓矢、太田ゆかり、山崎幸一、橋本道男、東敬子. 乾燥方法や前処理条件がエゴマ葉の機能性成分含量および抗酸化活性に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌. 2016; **63**(5): 217–224.

57) Pérez-Rodríguez ML, et al. Major components of sugarcane wax: Octacosanol and its effects on lipid metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. 2018; 114: 95–102.

58) Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003; **62**(2): 121–125.

59) Weng JK, Noel JP. The remarkable pliability and promiscuity of specialized metabolism in plants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2012; **77**: 309–320.

60) Hwang JT, Ha J, Park IJ, et al. Apigenin attenuates the lipid accumulation in human adipocytes. *Journal of Food Science*. 2011; **76**(9): H221–H228.

61) Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*. 2009; **27**: 519–550.

62) Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases. *Molecular Cell*. 2002; **10**(2): 417–426.

63) Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. In-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity of essential oils

derived from plants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; **47**(5): 565–573.

64) Makino T, Furuta A, Shimizu R, Wakushima H. Perilla aldehyde suppresses colitis via inhibition of inflammatory cytokine production. *Inflammation Research*. 2013; **62**(8): 773–780.