

植物抽出物の抗酸化能およびエストロゲン様作用に関する研究

井口 朋子⁽¹⁾, 笠原 義正⁽²⁾, 益子 詔次⁽³⁾, 中津川 研一⁽¹⁾, 木村 修一⁽¹⁾

⁽¹⁾昭和女子大学大学院, ⁽²⁾山形県衛生研究所, ⁽³⁾宇都宮大学

Study of antioxydative activity and estrogenic function of some plants extracts

Tomoko Iguchi⁽¹⁾, Masayosi Kasahara⁽²⁾, Shoji Masiko⁽³⁾,
kenichi Nakatsugawa⁽¹⁾, Shuichi Kimura⁽¹⁾

⁽¹⁾ Showa Women's University, ⁽²⁾ The Yamagata Prefectural Institute of Public Health,

⁽³⁾ Utsunomiya University

Firstly, the antioxydative activities of the ten kinds of plants extracts were evaluated by three methods.

The conker (*Aesculus turbinata* BLUME.), the barilla plant (*Salsola Komarovi* IJIN.) and the purslane (*Potulaca oleracea* L.) extract was found to be a strong antioxidant when tested by the TBA method using deoxyribose as the substrate, whereasthe Colorimetric assay using Methyl indole as a reagent and linolenic asid as the substrate indicated that the activity of athers. The seedvessel of a conker, the barilla plant (*Salsola Komarovi* IJIN.) and the purslane (*Potulaca oleracea* L.) extracts were showed extremaly strong $\cdot\text{OH}$ radical scavenging activity when tested by the ESR method.

Secondly, the effect of *Salsola Komarovi* IJIN. and *Potulaca oleracea* L. extracts studied in the overiect-mized rat model of osteoporosis.

Twelve week old femal SD rats were randomly assingned to following four groups, i.e., sham operated (Sham); overectmized (OVX); OVX and fed a diet containing 1.5% *Salsola Komarovi* IJIN. extracts (OVX + SK); OVX and fed a diet containing 1.5% *Potulaca oleracea* L. extracts (OVX + PO).

In conclusion, the OVX and OVX + SK group were to be sthenia both deossification or osteogenesis.

植物中に含まれる抗酸化物質にはビタミンC・Eやカロテノイドなどがあげられるが、近年ポリフェノール類が注目されてきている¹⁾。これは植物成分中には栄養成分以外ではポリフェノール類が他種類にわたって存在することや動物細胞に親和性が高いため動物の生体機能に対して影響を及ぼしやすいことによる。また、ビタミンCが水相、ビタミンEおよびカロテノイドが脂質相での抗酸化物質であるのに対し、ポリフェノールは配糖体では水相に、アグリコンでは脂質相との界面に存在することがその

構造から推察され、特異な機能を発揮する可能性が考えられる。

また、ポリフェノールは抗酸化作用の他にも様々な生理作用をもつことが知られており、最近の研究でエストロゲン様作用を示すことが指摘されている⁷⁾。

そこで今回、*in vitro*において強い抗酸化作用を示した植物抽出物を卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに給与し、閉経後骨粗鬆症に対する効果についても基礎的な検討を行ったので、その結果もあわせて報告する。

実 験 方 法

1) 植物抽出物の抗酸化能

[試料の調製]

10種類の植物抽出物は、山形県衛生研究所にて50%および100%メタノールを溶媒として3日間抽出し、ロータリーエバポレータで減圧濃縮して調製されたものを用いた。使用に際しては各々の抽出溶媒と同濃度のメタノールで1%溶液に調製して用いた。

Table 1 Experimental plants and their solvents and yields.

Plant	Solvents	Yields (%)
(A) Carthamus tinctorius L. (flower)	100%-MeOH	21.1
(B) Tagetes Patula L.	100%-MeOH	4.0
(C) Chrysanthemum morifolium Ramat.	100%-MeOH	4.3
(D) Carthamus tinctorius L. (leaf)	100%-MeOH	2.2
(E) Salvia Komarovii Iijin.	50%-MeOH	3.2
(F) Portulaca oleracea L.	50%-MeOH	2.8
(G) Prunella vulgaris L.	50%-MeOH	32.2
(H) Trichosanthes kirilowii Maxim.	100%-MeOH	2.5
(I) Aesculus turbinata Blume. (seed)	50%-MeOH	1.7
(J) Aesculus turbinata Blume. (seed vessel)	100%-MeOH	7.5

[チオバルビツール酸 (TBA) 法による抗酸化能測定²⁾³⁾]

水相での抗酸化活性は TBA 法を用い、多価不飽和脂肪酸を基質とした Ohkawa らの方法を変法し、デオキシリボースの酸化分解に対する効果を測定した。デオキシリボースの酸化は 0.4ml の Fe (II) 溶液 (1mM-FeSO₄・7H₂O, 1mM-EDTA) に同量の 2mM-過酸化水素水, 2mM-デオキシリボースを加え、37℃で30分インキュベートすることによって誘発した。TBA 値は、インキュベートした後、2.8%-トリクロロ酢酸 1ml と 0.35% TBA 試薬 1ml を加えて加熱反応後、発色した赤色色素の吸光度を 532nm で測定して求めた。反応系には10種類の 1%-植物抽出物溶液、対照は蒸留水、ポジティブコントロールは 1%-アスコルビン酸溶液をそれぞれ 0.4ml ずつ加えた。

[薄層クロマトグラフィー (HPTLC) プレートを用いた抗酸化活性の測定²⁾⁴⁾]

各々の 1%-植物抽出物溶液 0.1ml にそれぞれ同量の 2%-リノレン酸メタノール溶液を加え、氷上

に5分間放置した。各々のサンプルを10 μ l マイクロシリンジにて HPTLC プレートに10mm 間隔で2 μ l ずつスポットした。80℃の DRY BLOCK BATH 上で20分間加温して室温まで冷却した後、2%-ブチルヒドロキシトルエン-メタノール溶液をプレート全体に噴霧して酸化反応を停止させ、50%蟻酸、0.5%-メチルインドール-メタノール溶液を次々に噴霧した。80℃の DRY BLOCK BATH 上で90秒加温して赤色に発色したスポットを、二波長クロマトスキャナー (Shimadzu CS-9000) を用い、557nm で測定した。

[電子スピン共鳴 (ESR) によるフリーラジカル消去能の測定²⁾⁵⁾]

各々の1%-植物抽出液100 μ l に1mM-第一硫酸鉄溶液と1mM-過酸化水素水を50 μ l ずつ加えて混和し、1mM-PBB 溶液100 μ l を加えてから30分後に ESR 測定を行った。

2) 卵巣摘出ラットに対する植物抽出物給与試験

12週齢の Sprague-Dawley 系雌性ラット24匹をベントバルビタールナトリウム麻酔下、疑似手術を施した群 (Sham 群)、卵巣摘出手術群 (OVX 群)、卵巣摘出手術を施し *Salsola Komarovi* IJIN. 抽出物を1.5%食餌に添加した群 (OVX + SK 群)、卵巣摘出手術を施し *Potulaca oleracea* L. 抽出物を1.5%食餌に添加した群 (OVX + PO 群) の群に6匹ずつ配した。なお、植物抽出物の添加量は食餌量の1.5%とした。

飼料はミルクカゼインをタンパク質源、コーンスターチを主な糖質源、大豆油を脂質源とし、ミネラルおよびビタミン混合は AIN-93 の組成に従った。

実験期間は手術後40日とし、体重および摂食量の測定は連日実施した。なお、給餌量は一律20gとし、残食があった場合には残食量を測定した。

動物は剖検日前日より一晩絶食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、屠殺・剖検し生化学的および病理組織学的検査に供した。

[ICP 法による骨中微量元素の定量]

大腿骨の元素分析は、左大腿骨骨頭部近位の皮質骨部分とし、測定元素はカルシウム、ナトリウム、リン、ケイ素、およびマグネシウムの5元素とした。

大腿骨は湿重量で約5mgを精秤してテフロン製小容器にとり、濃硝酸3mlと過塩素酸1mlを加えて電子レンジ用試料分解容器にセットし、電子レンジで湿式分解した。放冷後開栓し、分解液をホットプレート上で殆ど蒸発乾固するまで加熱した。放冷後、0.1Mの硝酸で一定重量として測定用検体とし、誘導結合プラズマ (ICP) 発光分析装置を用いて元素定量を行った。

なお、カルシウム、マグネシウム、ケイ素およびナトリウムの標準溶液は、原子吸光分析用1000PPM標準溶液を希釈混合して使用し、リンの標準溶液は光電用標準溶液1mg/kgを希釈して使用した。

[血清アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性]

血清 ALP 活性は、Bessey Lowrey の比色法により測定した。

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを2mM-塩化マグネシウムを含む0.1M-炭酸塩緩衝液 (pH 10) に6.15mg/mlの濃度で溶解し、基質緩衝液とした。基質緩衝液を37℃で3分間加温し、血清50 μ lを加えてさらに37℃で正確に15分間保温した。0.02N-水酸化ナトリウム5mlを加えて混和後、405nmにお

ける吸光度を測定した。なお、スタンダードとしては、0.5mM-*p*-ニトロフェノールを用いた。ブランクとしては、0.02N-水酸化ナトリウム 5ml を加えた後で血清 50 μ l を添加したものとし、スタンダードのブランクは、標準液無添加の水酸化ナトリウム液とした。

[骨破断特性試験]

右大腿骨の骨破断強度は、骨破断特性測定装置（飯尾電気製 DYN-1255）を用い、破断応力および破断エネルギーの測定を行った。

測定条件は、室温：23℃、支点間距離：20mm、負荷重量：20.0kg、破断速度：20mm/min とした。

[二重エネルギー X 線吸収 (DXA) 法による骨密度測定]

破断強度測定後の骨を、The Stratec XCT 960 pQCT (Stratec Medizin-technik GmbH, Erasmusstr. 6.75172 Pforzheim, Germany) を用い、38keV の X 線エネルギーで測定した。測定部位は、骨端から 4mm の骨幹端部および骨端から 11mm の骨幹部の 2 ヶ所とした。

結 果 と 考 察

1) 植物抽出物の抗酸化能およびフリーラジカル消去能

チオバルビツール酸法による植物抽出物の抗酸化活性を Table 2 に示した。

TBA 法は食品中の油脂の劣化をはかる尺度として用いられることが多いが、水と油の二層反応であることなどのため、測定値の再現性や検量線の直線性に乏しい。今回デオキシリボースを基質として水溶性のみの系を作りだし、この点の改善を図った。

水相での抗酸化活性をみるこの系において比較で用いた同濃度のアスコルビン酸よりも強い活性を示

Table 2 Antioxidative activity of some plant extracts determined by Thiobarbituric acid method.

Samples	TBARS (%)
Blank (Distilled Water)	100.0 $\pm$ 0.0
Positive Control (1%-ascorbic acid)	48.3 $\pm$ 0.0
(A) <i>Carthamus tinctorius</i> L. (flower)	218.6 $\pm$ 17.5
(B) <i>Tagetes Patula</i> L.	74.0 $\pm$ 3.7
(C) <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat.	109.8 $\pm$ 14.6
(D) <i>Carthamus tinctorius</i> L. (leaf)	172.3 $\pm$ 2.3
(E) <i>Salvia Komarovii</i> Iijin.	39.3 $\pm$ 2.4
(F) <i>Portulaca oleracea</i> L.	36.1 $\pm$ 0.0
(G) <i>Prunella vulgaris</i> L.	36.6 $\pm$ 1.1
(H) <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	67.9 $\pm$ 12.2
(I) <i>Aesculus turbinata</i> Blume. (seed)	28.6 $\pm$ 0.7
(J) <i>Aesculus turbinata</i> Blume. (seed vessel)	96.8 $\pm$ 2.1

Result of the TBA method indicate the relative TBA reactive substance (%) induced by hydroxyl radicals.

The value of the control (no additive) was 100%.

したのは, *Salsola Komarovi* IJIN, *Potulaca oleracea* L., *Prunella vulgaris* L., *Aesculus turbinata* BLUME. であった。これらは抽出溶媒がいずれも50%-メタノールである。100%-メタノールと比較して水溶性成分が多く抽出されていることが推察され、活性物質は水溶性であることが示唆された。

デンシトメータを用いた HPTLC の分光光度法における抗酸化活性を Figure. 1 に示した。この系では、アスコルビン酸は固有の赤色を示すデヒドロアスコルビン酸を形成するため比較のための抗酸化剤として同濃度の α -トコフェロールを用い、トコフェロールの抗酸化活性を100%としたときの相対値で示した。

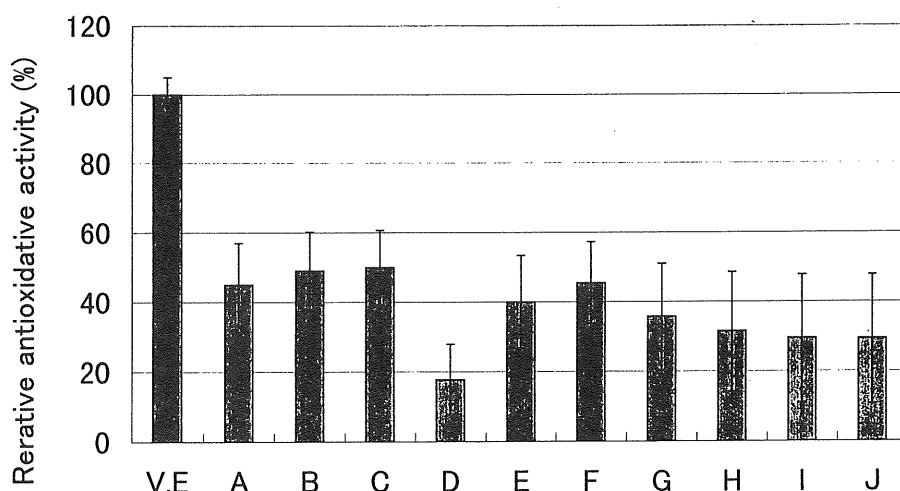


Fig. 1 Antioxidative activity of some plant extracts determined by Colorimetric assay.

この系では、 α -トコフェロールと比較するといずれのサンプルも活性が低く、比較的強い活性を示した *Tagetes patula* L., *Chrysanthemum morifolium* RAMAT., *Carthamus tinctorius* L., *Prunella vulgaris* L. でさえも α -トコフェロールの活性の50%以下であった。フラボノイドの抗酸化機構としてフェノール性水酸基によるラジカル捕捉作用が明らかであるが、溶液中でのその活性は α -トコフェロールより低いという報告もある⁶⁾。

植物抽出物のヒドロキシラジカル消去能は、安定な PBN-OH spin adduct のシグナルの強さを ESR によって測定した (Figure. 2)。この方法では *Carthamus tinctorius* L., *Salsola Komarovi* IJIN., *Potulaca oleracea* L., *Aesculus turbinata* BLUME. が非常に強い活性を示し、とりわけ *Aesculus turbinata* BLUME. についてはアスコルビン酸と同様かそれ以上の活性がみられ、そのラジカル消去能はほぼ100%であった。

しかし、今回は抗酸化剤無添加の対照系では蒸留水を用いたが、溶媒の性質が問題となる ESR では異なる濃度の抽出溶媒が測定値に影響を及ぼしていることが考えられる。実際、スピントラップ剤として PBN ではなく DMPO を用いる場合には、アルコールの存在下ではノイズが激しく測定にならないほど多大な影響を及ぼす。従って蒸留水ではなく50%および100%メタノールの対照系をもうけるべきで

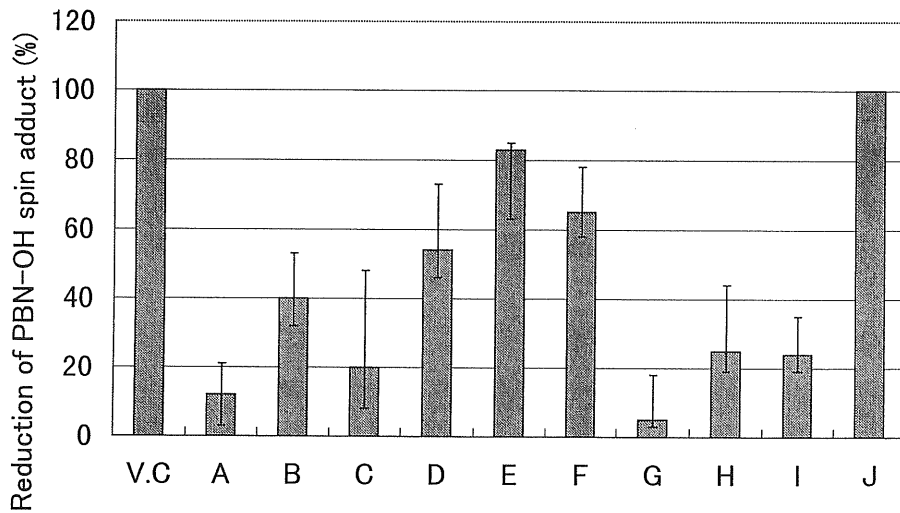


Fig. 2 The hydroxyl radical scavenging effects of some plant extracts determined by ESR method.

あろう。

抗酸化物質を抗酸化機構の面から大きく分類すると、①抗酸化剤、②フリーラジカル捕捉剤、③金属キレート剤、となるが、10種類の植物抽出物において、その多くがこの3つのいずれか、もしくは重複して機能性をもつことが示唆された。特に *Salsola Komarovi* IJIN., *Potulaca oleracea* L. に安定した効果がみられた。

2) 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに対する影響

[体重および飼料摂取量]

卵巣摘出モデルにおいて、摂食量が亢進し体重増加が起こることが多くの研究者から報告されている⁸⁾。本研究でも OVX 群は Sham 群と比較して摂食量が多い傾向を示し、体重増加が顕著であった (Figure. 3)。また、OVX + SK 群においても OVX 群と同様の摂食傾向ならびに体重増加傾向がみられ、抽出物投与の効果はみられなかった。OVX + PO 群においては、体重曲線が OVX 群および OVX + SK 群と Sham 群とのちょうど中間程に位置していることから投与の効果がみられたといえる。

[ICP による大腿骨の元素分析]

骨中微量元素は、リン、マグネシウム、ナトリウム、およびケイ素に対するカルシウムの比で表した (Table 3)。

元素の動向において、Sham 群と OVX + PO 群、OVX 群と OVX + SK 群に共通する傾向がみられた。

測定した元素のうち Ca/Si に最も大きな差がみられ、OVX 群および OVX + SK 群においては Sham 群および OVX + PO 群と比較して一桁の高値を示した。また、Ca/P では明らかな高値、Ca/Mg では明らかな低値を示した。

ケイ素は骨の石灰化の初期において活発な石灰沈着部位に顕著に局在することが報告されている。ケ

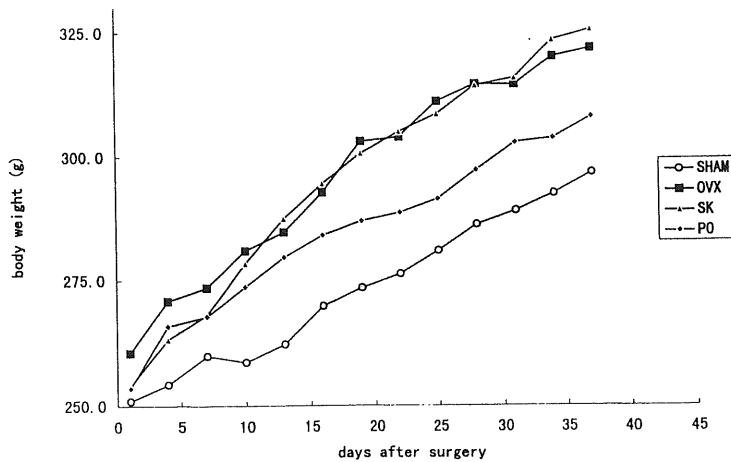


Fig. 3 Change in body weight in rats.

Table 3 Weight of ratios to calcium of the rat femur.

	Ca/P	Ca/Mg	Ca/Na	Ca/Si
Sham	1.47±0.001	33.6±0.021	23.3±0.017	3384.4±7.167
OVX	1.58±0.002*	21.9±0.012*	10.4±0.006*	331.5±0.022*
OVX + SK	1.51±0.002*	26.8±0.018*	11.6±0.015*	251.2±0.174*
OVX + PO	1.32±0.001	32.3±0.037	20.8±0.023	3505.5±8.754

Values are mean ± SD.

*Significant difference ($p < 0.05$), when compared to the Sham.

イ素はカルシウムの含量が低いか中程度でかつその変動が活発な石灰化を示すような部位に現れてカルシウムと直接関連して増加し、ハイドロキシアパタイトの組成に近づく定量限界以下となる。

カルシウムおよびリンは、含有量でみるといずれも Sham 群が高値であるが、Ca/P の比をとると、Sham 群と比較して OVX 群および OVX + SK 群が有意に高値を示した。造骨が活発な部位では Ca/P が高値を示すことが知られている¹¹⁾。

マグネシウムの骨代謝への関与としては、アパタイト形成を抑制し、その含量が増加すると骨の溶解度が増すことが知られている。

以上より、OVX 群および OVX + SK 群においては骨形成と骨吸収の同時亢進がおこっているといえる。

[血清アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性]

卵巣摘出モデルにおいて血清 ALP 活性が亢進することが知られている⁹⁾。ALP は体内諸器官に広く分布し、その起源は造骨組織に由来するものが多いといわれており、Paget 病、くる病、骨軟化症、骨肉腫、線維性骨炎、上皮小体機能亢進症、転移性骨癌などの造骨器官の疾患に際し、病勢に並行して血

清 ALP 活性の上昇がみられる。

本研究において、Sham 群と比較して OVX 群、OVX + SK 群、OVX + PO 群ともに有意な高値を示したが、OVX + PO 群については OVX 群と比較して有意な低値を示し、ALP 活性上昇の抑制がみられた。

[骨破断特性試験および骨密度]

骨破断特性試験において最も好成績を示したのは OVX + PO 群であった。骨幹部の皮質骨に対する密度および面積、骨幹端部の皮質骨・海綿骨における密度および面積のすべての測定項目について高値を示したことから、OVX + PO 群では骨が太くかつ骨密度が高かったといえる。破断力についても最も強度があり破断エネルギー・変形量ともに大きかった。

Sham 群では骨密度は高値を示したが骨自体が全体的に細い傾向がみられ、機械的強度の弱さにつながったと思われる。しかし、破断エネルギー・変形量は比較的高く、骨に柔軟性のあることが示唆された。

OVX 群については、海綿骨に対して皮質骨の割合が大きく、全体的な密度もやや低めであった。皮質骨には強度があるため破断試験において機械的強度をはかる破断力はやや高値を示したものの、柔軟性をみる破断エネルギー・変形量とともに4群中最低値を示し、柔軟性に乏しいことが顕著であった。

4群中もっとも骨量減少が甚だしかったのは OVX + SK 群であった。全体として海綿骨に対する皮質骨の割合が少なく、皮質骨の内部の浸食が亢進していることが示された。また、皮質骨・海綿骨ともに骨密度がもっとも低値であった。全体的にみて4群中もっとも太さがあったにもかかわらず、機械的強度は低値を示した。しかし海綿骨の割合が大きく、数値的にももっとも高かったためか、破断エネルギー・変形量ともに最高値を示した。

以上の結果から、植物抽出物の多くが評価法によって異なる抗酸化能を示し、それぞれ異なる成分が活性に関与していることが示唆されたが、その中でも安定した活性を示したのは *Salsola Komarovi* IJIN. と *Potulaca oleracea* L. であった。この2つを卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットに投与した結果、*Salsola Komarovi* IJIN. には効果がみられず各々の検査において OVX 群と同様の傾向を示したが、*Potulaca oleracea* L. の投与では Sham 群と類似の傾向がみられ、植物エストロジェンの存在が示唆された。

文 献

- 1) Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. : *Amer. Chem. Soc.* 87-97, 1992.
- 2) 越智宏倫, ナラシマン・ラマツナム, 竹内征夫, 杉山裕之 : *J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci.*, 48, 3, 236-238, 1995
- 3) Okuda, T., Ohishi, N. and Iwatani, Y. : *Anal. Biochem.*, 95 : 351, 1979.
- 4) Sano, M., Abe, M., Yoshino, K., Matsuura, T., Sekino, T., Saitoh, S. I. and Tomita, I. : *Chem. Pharm. Bull.*, 34 : 174, 1986.
- 5) Ogawa, N., Edamatsu, R., Mizukawa, K., Asanuma, M., Kohno, M. and Mori, A. : *Adv. Neur.*, 60 : 242, 1993.

- 6) 寺尾純二：食品と開発 28：10-13, 1993.
- 7) B. H. Arjmandi, L. Alekel, B. W. Hollis, D. Amin, M. Stacewicz-Sapuntzakis, P. Guo and S. C. Kukreja : *J. Nutr.* 126 : 161-167, 1996.
- 8) 佐藤毅, et al. : *Clinical Calcium* 4 : 9-13, 1994.
- 9) Bessey, O. A., Lowry, O. H. and Brock, M. J. : *J. Biol. Chem.* 164 : 321, 1946.
- 10) E. M. Carlisle : *Science* 167 : 279, 1970 : *Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 28 : 374, 1969.
- 11) 岡本正生, 荒井綜一：学術学報 43 : 104-108, 1990.