

# 美容機能性素材の探索と生産及びその利用に関する研究（第4報）

－そばもやしの美容健康機能性に関する評価－

## Exploratory research of functional materials having beauty and health effect (Part 4)

－Beauty and health functionality assessment of Buckwheat Sprout－

岩間 直子

青森県の津軽地域では、そばの実から発芽させた「そばもやし」が伝統的に栽培されていて、全国的に栽培されているそばスプラウトとは異なり、光を遮って栽培するのが特徴である。このそばもやしにはルチンが豊富に含まれ、腸内環境改善に有用なパントエア菌も存在していることが明らかとなっている。しかし、これまでに生理機能性については明らかにされてきていない。本研究では、そばもやしが生体の健康及び美容面に及ぼす影響を評価することにより生理機能性を明らかにし、新たな青森県産機能性素材としての健康食品及び化粧品への利用の可能性を検討した。

青森県内で製造されたそばもやしのメタノール抽出試料液（BWSE）をマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に添加して、リポ多糖刺激後の活性酸素種 NO（一酸化窒素）の産生量を測定し、炎症関連物質産生抑制作用を評価した。その結果、RAW264.7 細胞へのそばもやし抽出試料液の添加によって、NO 産生量が濃度依存的に減少し、600 $\mu\text{g/ml}$  濃度添加で約 1/4 に抑制された。また、効果が認められた 150～600 $\mu\text{g/ml}$  濃度範囲の添加では特に細胞毒性はみられず、安全であることも確認された。よって、そばもやしは非常に強い抗炎症作用を有するものと推測された。

さらに、そばもやし抽出試料液をマウス B16 メラノーマ細胞に添加してメラニン生成量の変化を分析し、メラニン生成抑制作用を評価した。その結果、600 $\mu\text{g/ml}$  濃度添加でメラニン生成量が半分にまで減少し、顕著なメラニン生成抑制作用が認められた。以上のことから、そばもやしは、抗炎症及び美白作用を持つ機能性素材として利用できる可能性が示唆された。

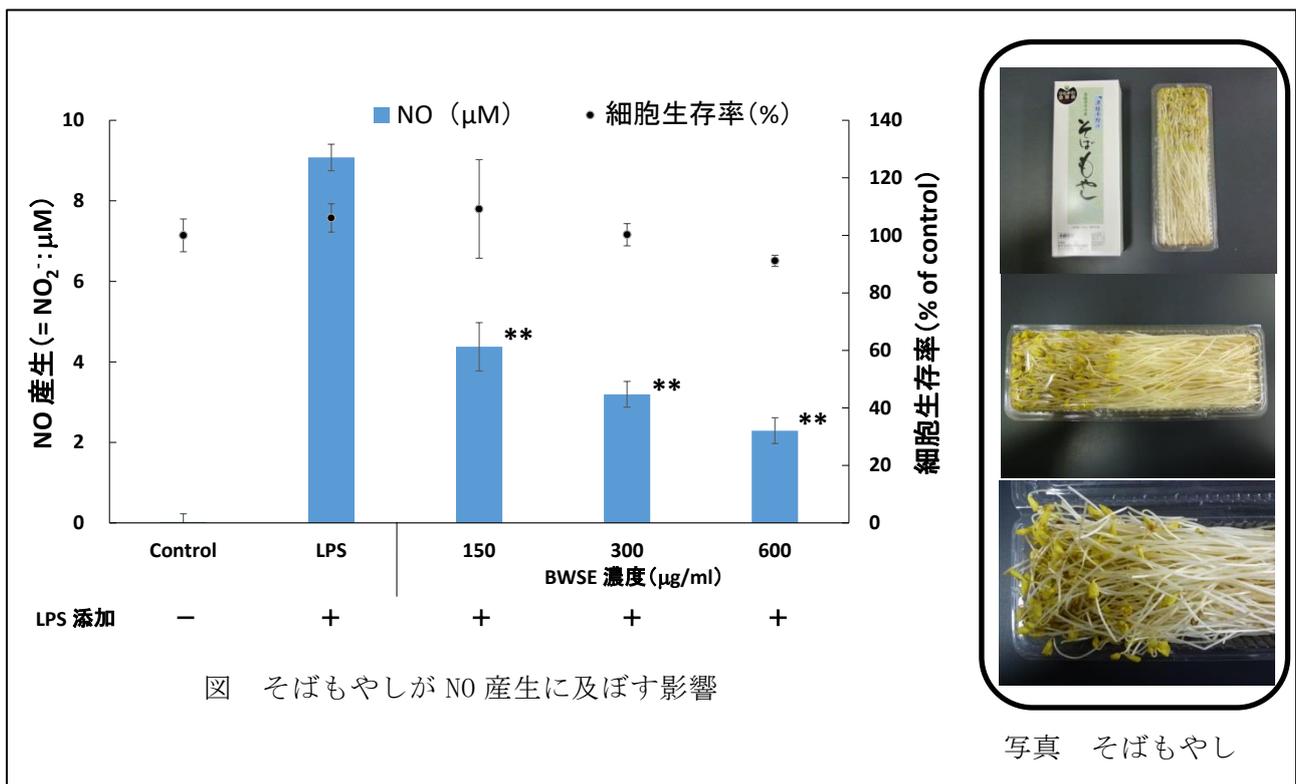


図 そばもやしは NO 産生に及ぼす影響

## 1. 背景及び目的

そばもやしは、青森県の津軽地域で江戸時代から温泉熱を使用し、野菜の少ない冬季に栽培されてきた伝統野菜であり、350年以上の歴史がある。一般的に出回っている通常のそばスプラウトが光をあてて栽培するのとは異なり、そばもやしは遮光して暗所で育てるのが特徴であり、光に当たらないため非常にやわらかい食感となる。実際の栽培工程としては、殻を剥いたそばの実を播種して遮光した状態で水耕栽培を行い、発芽した芽生えを一週間程育成したものをそばもやしとして収穫している。このそばもやしには、ルチンを始めとするフラボノイド類やアルカロイド類が豊富に含まれていることがこれまでに明らかにされており、そばスプラウトやそば粉に比べてルチン含量が多いことが分かっている。ルチン等のフラボノイド類は非常に強い抗酸化能を有しており、それに基づく様々な機能が期待できると考えられる。

そのため本研究では、特産品であるそばもやしが生体の健康及び美容面に及ぼす影響を評価して生理機能性を明らかにすることにより、美容健康機能性素材として新たな価値を見出すことを目的とし、青森県産機能性素材としての健康食品及び化粧品分野への利用可能性を検討した。

## 2. 実験方法

### 2. 1 凍結乾燥試料の調製

(株) あすなる理研で製造したそばもやしを $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍した後、真空凍結乾燥機 DFM-10N-04 (EYELA) を用いて 94 時間凍結乾燥処理を行った。得られた凍結乾燥物をミルサー IFM800DG (イワタニ) で粉砕処理し、凍結乾燥粉末を調製した。

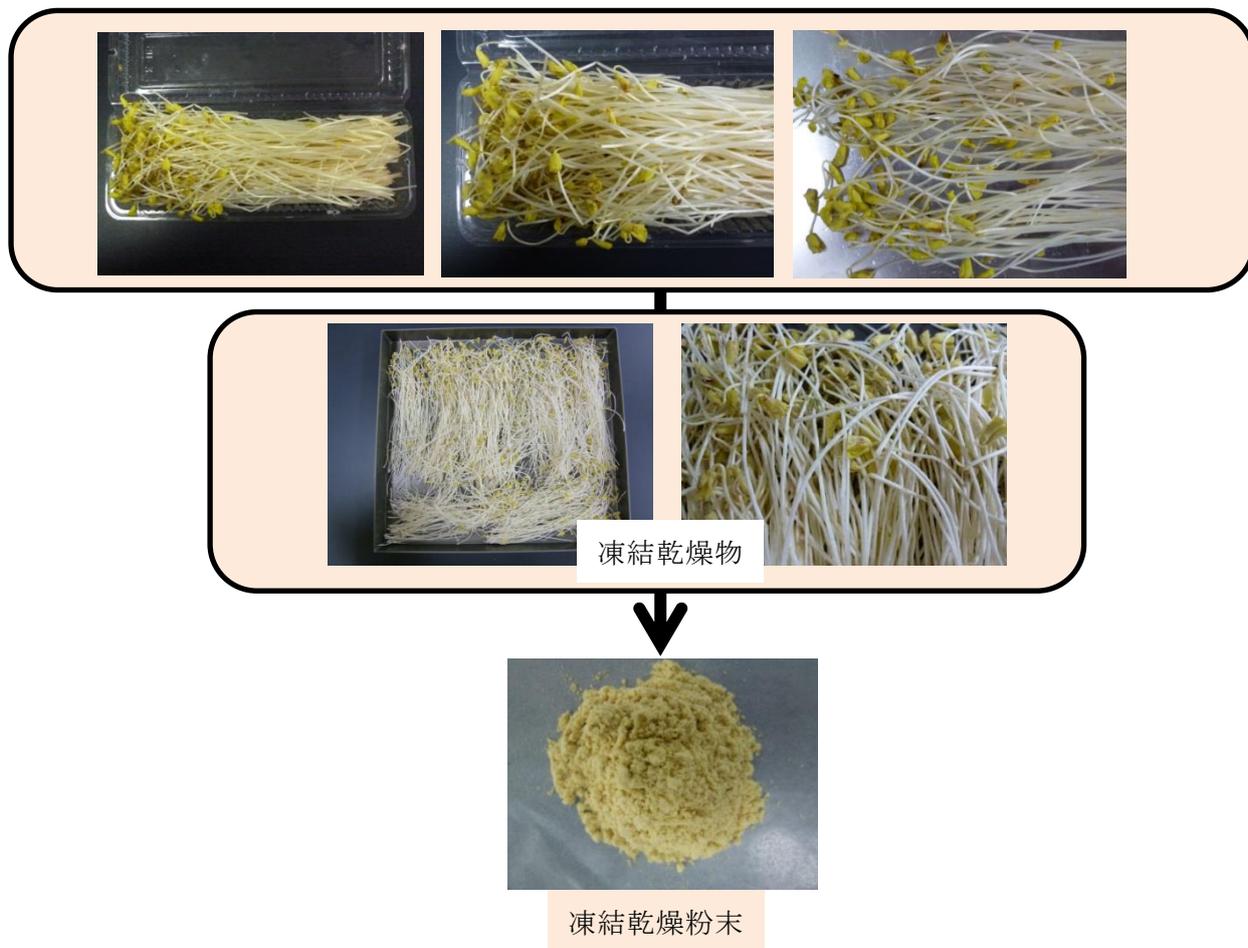


図1 そばもやし試料

## 2. 2 抽出試料液の調製

そばもやしの凍結乾燥粉末 150mg (0.1mg まで精秤) に 80%メタノール 1.5ml を加えて、ビーズ式破碎装置 Precellys 24 (Bertin Technologies、M&S) を用いて 5000rpm、90 秒×6 回の破碎抽出処理を行った。抽出終了後、12,000×g で 10 分間遠心して得られた上清を 0.45μm フィルターでろ過し、減圧遠心濃縮を行った。得られた濃縮乾燥物を Dimethyl sulfoxide に溶解し、300mg/ml 濃度 (凍結乾燥粉末重量として換算) の抽出液を調製した。以後、そばもやし抽出液を BWSE と表記する。

## 2. 3 一酸化窒素 (NO) 産生抑制作用評価試験

RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞を  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度で 96 ウェルマイクロプレートに 100μl ずつ播種して、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI 培地 (Invitrogen) で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 2 時間前培養した。これに同量の新鮮培地とともにリポ多糖 (LPS、from *Escherichia coli* Serotype 0111:B4、Sigma-Aldrich、終濃度 100ng/ml) 及び BWSE (終濃度 150~600μg/ml) を添加して 24 時間培養した。

培養後に培地中に産生された NO の量を NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (Colorimetric) - Griess Reagent Kit- (同仁化学研究所) を用いて、亜硝酸 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) として測定した。また、細胞の生存率は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて、WST-8 法により測定した。

## 2. 4 メラニン生成抑制作用評価試験

### 2. 4. 1 細胞培養

B16 マウスメラノーマ 4A5 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/ml の濃度で 6 ウェルマイクロプレートに 3ml ずつ播種して、10%FBS を含む DMEM 培地 (Gibco) で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養した。その後培地を除去して、新鮮培地とともに BWSE (終濃度 300 及び 600μg/ml) を添加して 48 時間培養した。再び、培地を除去して新鮮培地とともに BWSE (終濃度 300 及び 600μg/ml) を添加してさらに 24 時間培養した。その後培地を除去してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) で洗浄後、0.25%トリプシン-EDTA 溶液 0.5ml を加えて細胞を剥離し、さらに FBS 0.5ml と PBS (-) 2ml を加えて細胞を懸濁させて回収した。

### 2. 4. 2 メラニン含量の測定

回収した細胞懸濁液の一部 (2.8ml) を 1,000rpm で 5 分間遠心し、上清を除去して 1N 水酸化ナトリウム溶液を 1ml 加えた。超音波破碎機でクリアな溶液になるまで細胞を破碎し、475nm の吸光度を測定した。あらかじめ市販メラニン標準試薬の水酸化ナトリウム溶液で作成した検量線からメラニン生成量を求めた。

### 2. 4. 3 タンパク質含量の測定

回収した細胞懸濁液の一部 (0.2ml) を 1,000rpm で 5 分間遠心し、上清を除去して PBS を 100μl 加えて懸濁させた。この細胞懸濁液について、DC プロテインアッセイキット II (BIO-RAD) を使用し、Lowry 法により細胞中のタンパク質含量を測定した。ウシ血清アルブミン (BSA) を標準液として作成した検量線からタンパク質量を求めた。

### 3. 結果

#### 3. 1 NO 産生抑制作用の評価

そばもやし抽出液 (BWSE) について、150、300、600 $\mu\text{g/ml}$  濃度で添加した場合の RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞における活性酸素種 NO の産生抑制作用を検討した。その結果、LPS 刺激によって誘導される NO 産生が濃度依存的に抑制されることが認められ、600 $\mu\text{g/ml}$  の添加濃度で 25%以下にまで NO 産生量が顕著に減少することがわかった (図 2)。また、BWSE を 600 $\mu\text{g/ml}$  の濃度まで添加しても細胞生存率の低下は認められず、細胞毒性は見られなかった。よって、そばもやしは細胞毒性が低く安全で、高い NO 産生抑制作用 (抗炎症作用) を持つ有望な機能性素材であると考えられた。

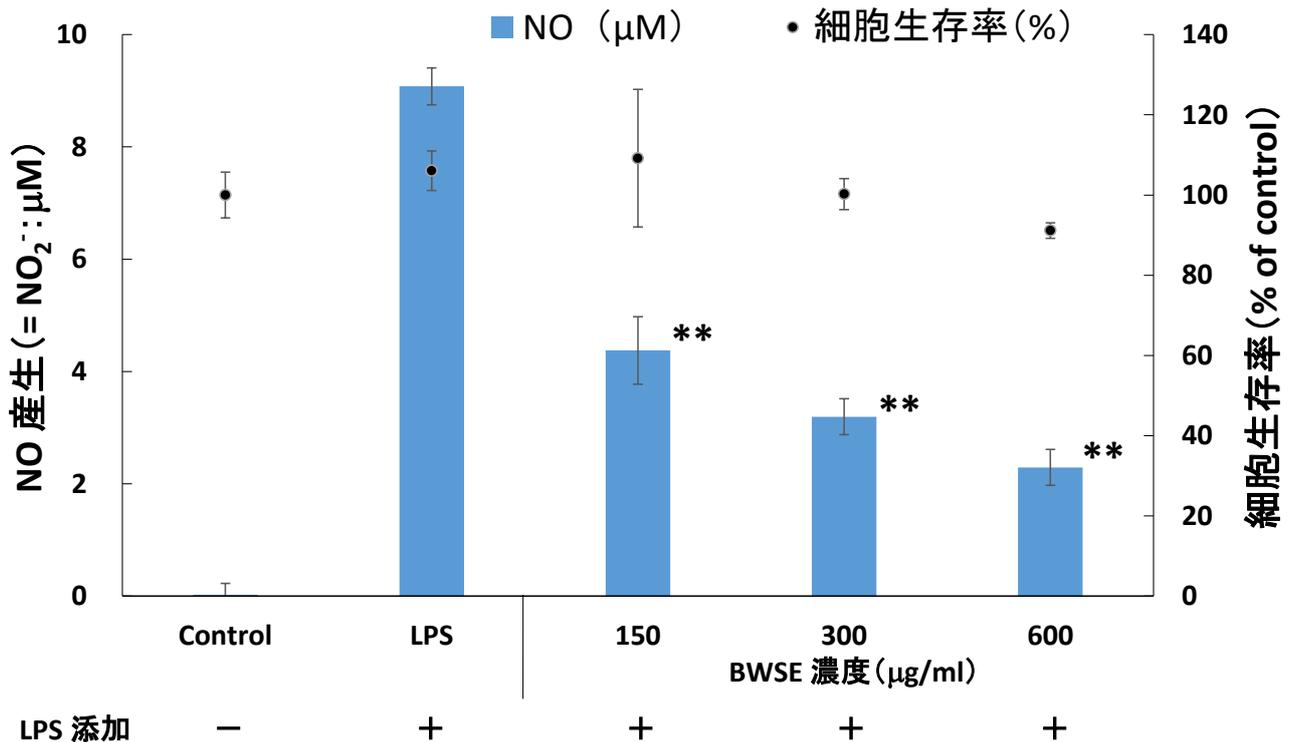


図 2 そばもやし NO 産生に及ぼす影響

測定は 3 反復 (n=3) で行い、平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表した。LPS 処理のみの群と BWSE 各濃度で処理した群の比較は Bonferroni 補正法を用いた多重比較 t 検定を行い、危険率 5%未満を有意とした。

(\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ )

#### 3. 2 メラニン生成抑制作用の評価

BWSE について、300、600 $\mu\text{g/ml}$  濃度で添加した場合のマウス B16 メラノーマ細胞におけるメラニンの産生抑制作用を検討した結果、明らかなメラニン産生抑制効果が認められた。その中で、600 $\mu\text{g/ml}$  濃度の添加では 50%以下に、300 $\mu\text{g/ml}$  の低濃度での添加でも 70%以下にまで顕著にメラニン産生が抑制されることが分かった (図 3)。これは、ポジティブコントロールであるリノール酸には及ばないものの、そばもやしは明らかにメラニン産生抑制作用を持つ有望な美白機能性素材であると考えられた。また、600 $\mu\text{g/ml}$  の高濃度で BWSE を添加した場合でも、顕微鏡観察において細胞死が起こっていることは確認されず、細胞毒性は認められなかった。

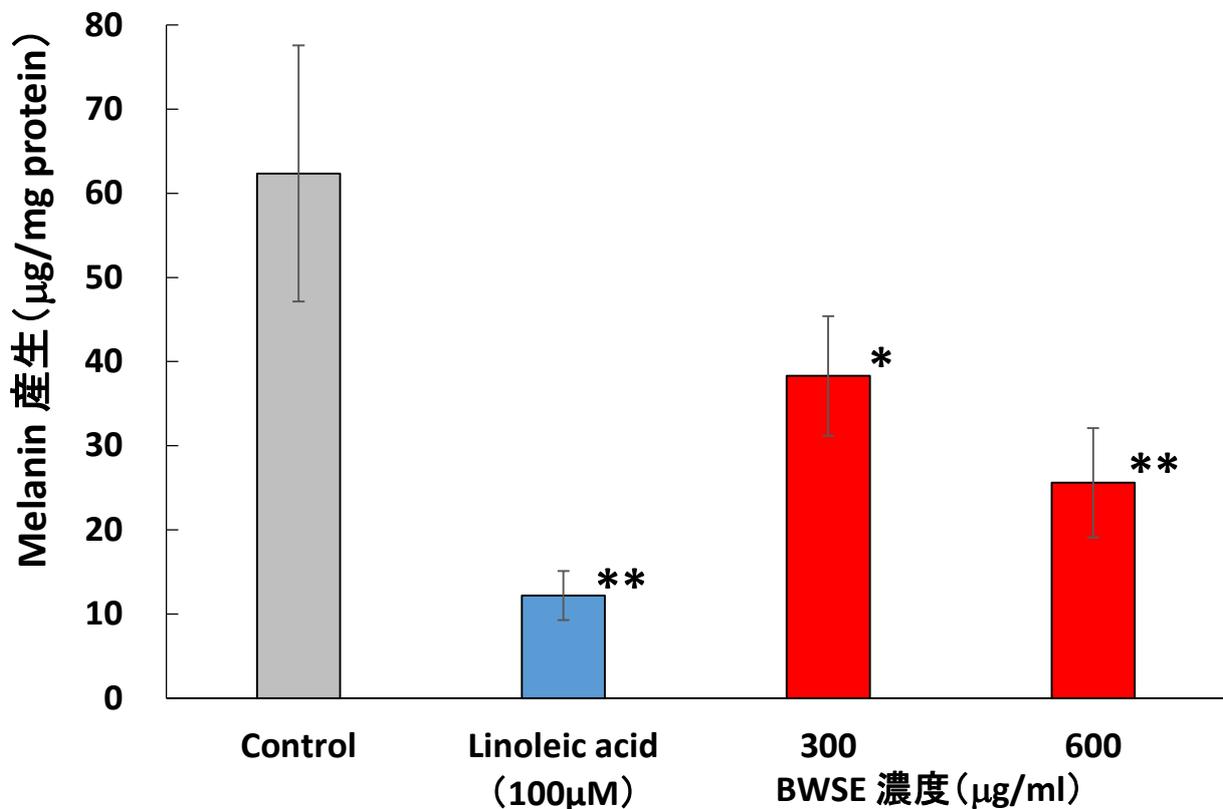


図3 そばもやしがメラニン生成に及ぼす影響

測定は3反復 (n=3) で行い、平均値±標準偏差 (SD) で表した。無処理の Control 群と BWSE 各濃度で処理した群の比較は Bonferroni 補正法を用いた多重比較 t 検定を行い、危険率 5%未満を有意とした。

(\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ )

#### 4. 結論

青森県内で製造されたそばもやしのメタノール抽出液 (BWSE) をマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に添加して、LPS 刺激によって誘導される活性酸素種 NO の産生量に及ぼす影響を検討し、炎症関連物質産生抑制作用を評価した。その結果、RAW264.7 細胞への BWSE の添加によって NO 産生量が濃度依存的に減少し、600µg/ml 濃度添加で約 25%以下にまで抑制された。よって、そばもやしは強い抗炎症作用を有するものと推測された。

さらに、BWSE をマウス B16 メラノーマ細胞に添加してメラニン生成量の変化を分析し、メラニン生成抑制作用を評価した。その結果、600µg/ml 濃度添加でメラニン生成量が約 50%以下にまで減少し、顕著なメラニン生成抑制作用が認められた。以上のことから、そばもやしは、抗炎症及び美白作用を持つ有望な機能性素材として期待できるものと考えられた。

#### 5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、機能性評価に関わる技術のご指導とご教示を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術研究支援機構食品研究部門 食品健康機能領域 食品機能評価ユニット

小堀真珠子ユニット長に謹んでお礼申し上げます。