

美容・健康機能性に優れた青森県ブランド素材に関する試験・研究開発

－青森県産素材の抗アレルギー作用評価－

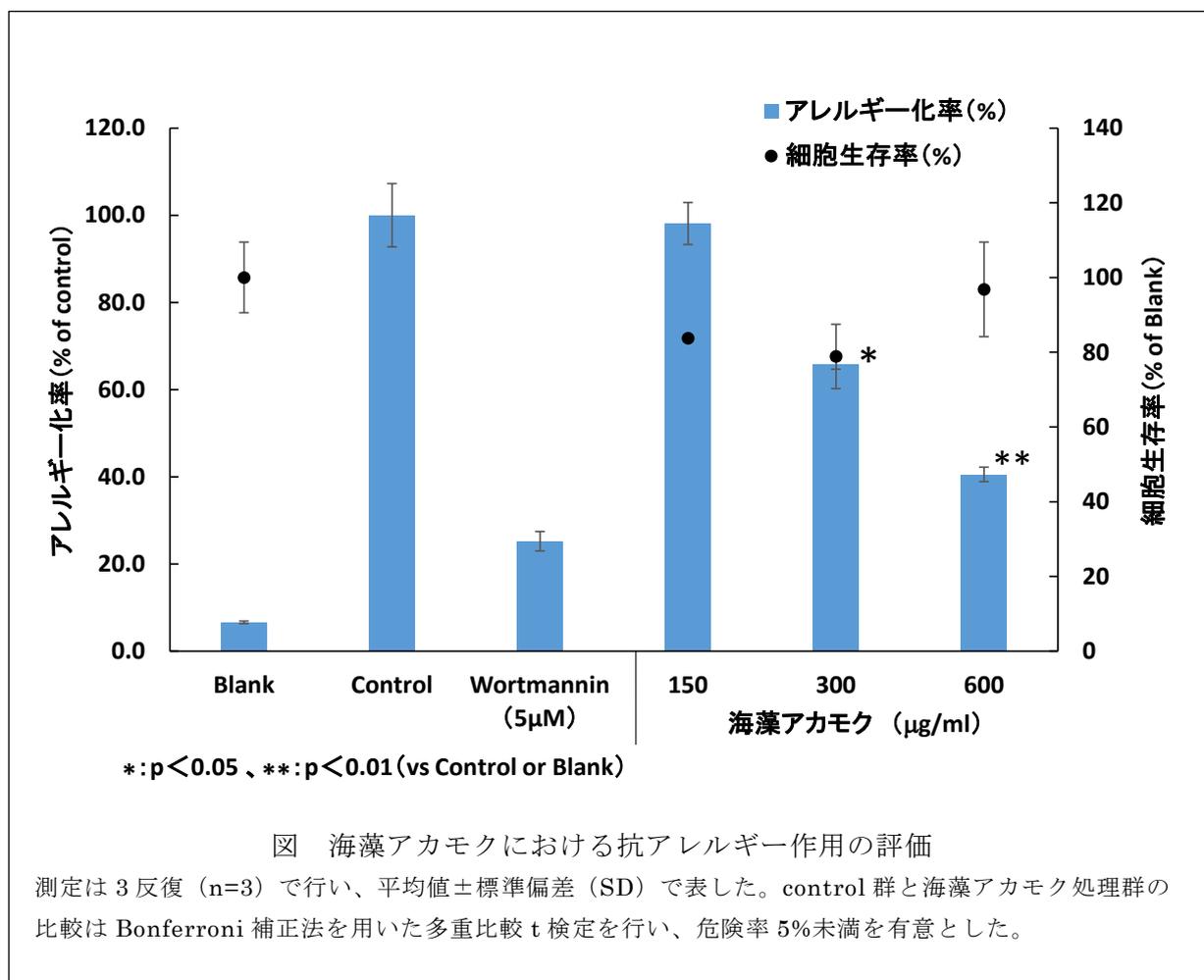
Research and development of Aomori brand materials with beauty and healthy functions

- Evaluation of antiallergic effect of the natural resources of Aomori prefecture -

岩間 直子

近年、全国的に美容・健康機能性に関わる機能性素材関連研究が盛んになっており、国内各地で競争が激化していることから独自性を持つ素材開発が求められてきている。そのため、本研究において弘前工業研究所では美容・健康製品への利用に適した青森県独自の新たな機能性素材の探索と開発を目的として、美容と健康に関わる重要な機能性である抗アレルギー作用に着目し、各種青森県産素材についてマウス好塩基球由来細胞を用いた脱顆粒（アレルギー誘発物質の放出現象）抑制試験による評価を行った。

今回検討した青森県産素材 24 種類の中で、海藻アカモクにおいて 600 μ g/ml 濃度で約 40%にまで脱顆粒が抑制され、高い抗アレルギー作用が認められた。このことから、海藻アカモクは抗アレルギー素材として有望であり、化粧品や健康食品への利用が期待できるものと考えられた。



1. はじめに

近年消費者の健康・美容への意識の高まり及び自然志向により、農林水産物を原料とした機能性素材の需要は増加傾向にある。その中で、全国的に美容・健康機能性に関わる機能性素材関連研究が盛んになっており、国内各地で競争が激化していることから独自性を持つ素材開発が求められてきている。

そのため、弘前工業研究所では美容・健康製品への利用に適した新たな青森県独自の機能性素材の探索と開発を目的とし、青森県産農林水産物の機能性評価及び素材化に関する検討を行っている。今回、美容と健康に関わる重要な機能性として抗アレルギー作用に着目し、各種青森県産素材についてマウス好塩基球由来細胞を用いた脱顆粒（アレルギー誘発物質の放出現象）抑制試験による評価を行い、アレルギー抑制効果の高い有用な素材を見出すことが出来たので報告する。

2. 実験方法

2. 1 凍結乾燥試料の調製

青森県内で収集した 24 種類の県産素材を液体窒素又は -80°C で冷凍した後、真空凍結乾燥機 DFM-10N-04（ULVAC）を用いて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）で粉碎処理し、凍結乾燥粉末を調製した。

2. 2 脱顆粒抑制作用評価試験に用いる抽出試料液の調製

各素材の凍結乾燥粉末 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。エキス抽出終了後、12,000×g で 10 分間遠心して得られた上清を 0.45 μm 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。

2. 3 脱顆粒抑制作用評価試験

2. 3. 1 脱顆粒刺激処理

RBL-2H3 ラット好塩基球由来株細胞を 2.5×10^5 cells/ml の濃度で 24 ウェルマイクロプレートに 1ml ずつ播種して、10%ウシ胎児血清（FBS）を含む DMEM 培地（Gibco）で、 37°C 、5% CO_2 存在下で 24 時間前培養した。これに 500ng/ml の抗体 Anti DNP-IgE を 500 μl 添加して 2 時間培養して細胞を感作させ、MT Buffer で適宜希釈した各抽出試料液（最終濃度 150~600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）またはポジティブコントロールとして 5 μM Wortmannin を 490 μl 添加して 10 分間培養した。その後、抗原 DNP-HAS 溶液を 10 μl 加えよく混合し、30 分間培養することで細胞を脱顆粒刺激した。この培養上清を移しとり、残った細胞に 0.5% Triton X-100 を 500 μl 加えて超音波破碎し細胞溶解液を調製した。

2. 3. 2 β -hexosaminidase 活性の測定及び放出率の算出

脱顆粒状態の指標として、顆粒内に存在する β -hexosaminidase 酵素活性の測定を以下の手順で行った。培養上清及び細胞溶解液を 96 ウェルマイクロプレートにそれぞれ 50 μl ずつ分注し、100mM Citrate Buffer に溶解した基質溶液 3.3mM p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside（Wako、144-05631）を 100 μl 加えて、 37°C で 25 分間反応させた後、反応停止液 2M Glycine Buffer を 100 μl 加え、マイクロプレートリーダーで 405nm の吸光度を測定した。以下の式を用いて、 β -hexosaminidase の放出率を算出し、MT Buffer のみを添加したコントロールの β -hexosaminidase 放出率を 100%として、各抽出試料液の β -hexosaminidase 放出抑制活性

を求めた。

$$\beta\text{-hexosaminidase 放出率 (\%)} = 100 \times [(S-Sc) / \{(S-Sc) + (CL-CLc)\}]$$

CL : 細胞溶解液の吸光度

CLc : 反応停止溶液→基質溶液の順で加えた際の細胞溶解液の吸光度

S : 培養上清の吸光度

Sc : 反応停止溶液→基質溶液の順で加えた際の培養上清の吸光度

2. 3. 3 細胞生存率の測定

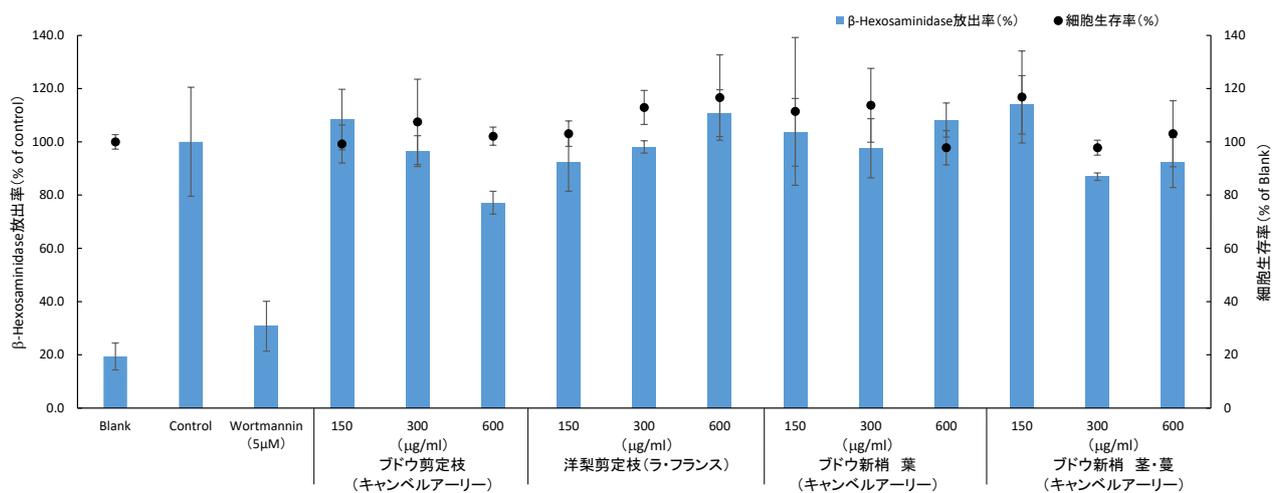
各抽出試料液を添加して 24 時間培養した細胞の生存率について、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて、WST-8 法により測定した。

3. 結果

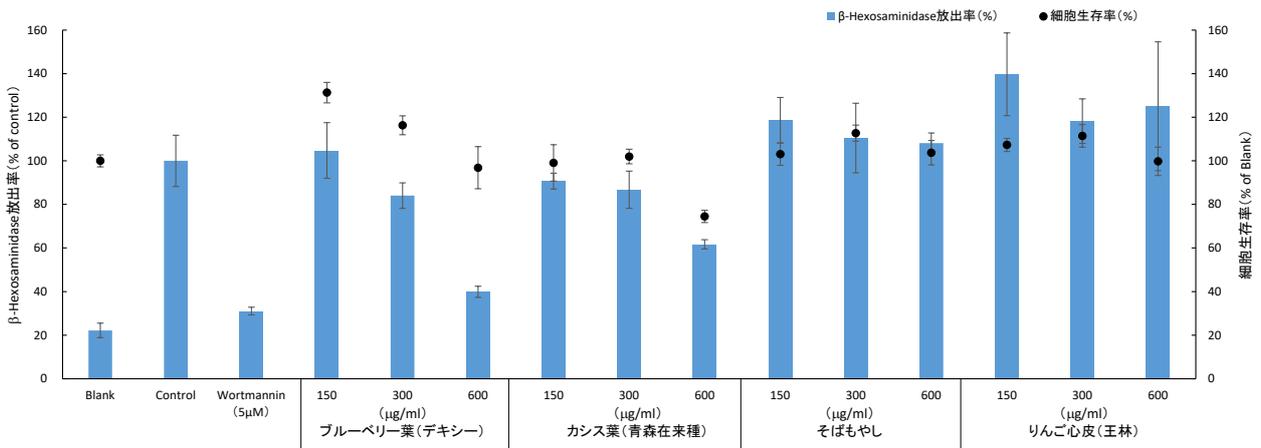
青森県産素材 24 種類について、RBL-2H3 ラット好塩基球由来株細胞を用いて 150、300、600 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加した場合の脱顆粒制作用を検討した結果、いくつかの青森県産素材において明らかな脱顆粒抑制効果が認められた。その中で、ブルーベリー葉 (品種: デキシー) においては、600 $\mu\text{g/ml}$ 濃度添加で脱顆粒が約 40% まで濃度依存的に抑制されていたが、抽出試料液添加 24 時間培養後の細胞生存率は若干の低下が認められ、この添加濃度では細胞毒性があらわれる可能性が考えられた (図 1 (B))。

一方、海藻アカモクにおいては同じように 600 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で約 40% にまで濃度依存的に脱顆粒が抑制されていたが、細胞生存率はほとんど低下しておらず細胞毒性が認められなかったことから、かなり有望な抗アレルギー素材であることがわかった (図 1 (F))。

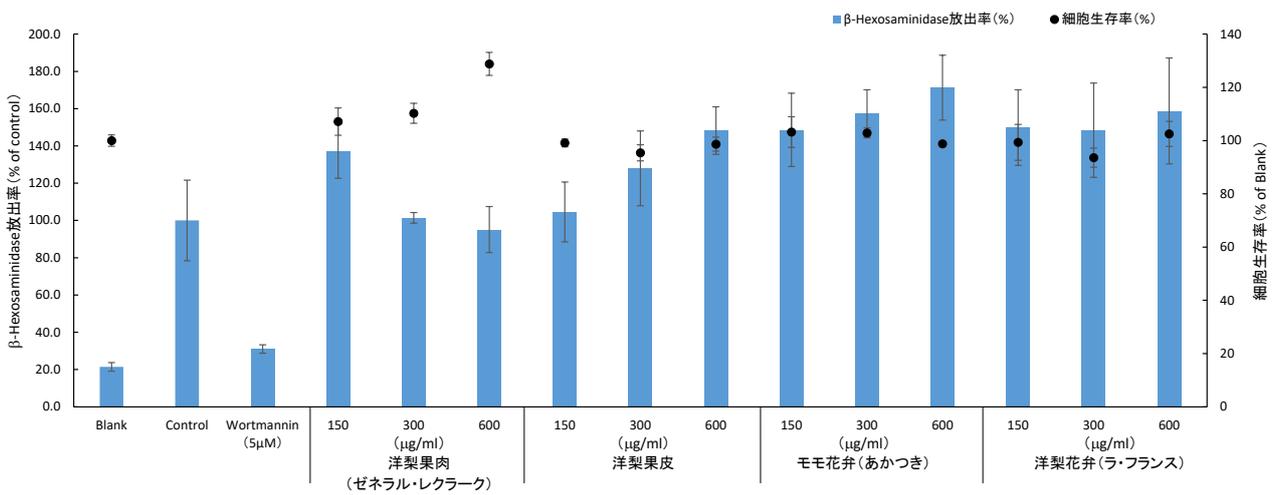
(A)



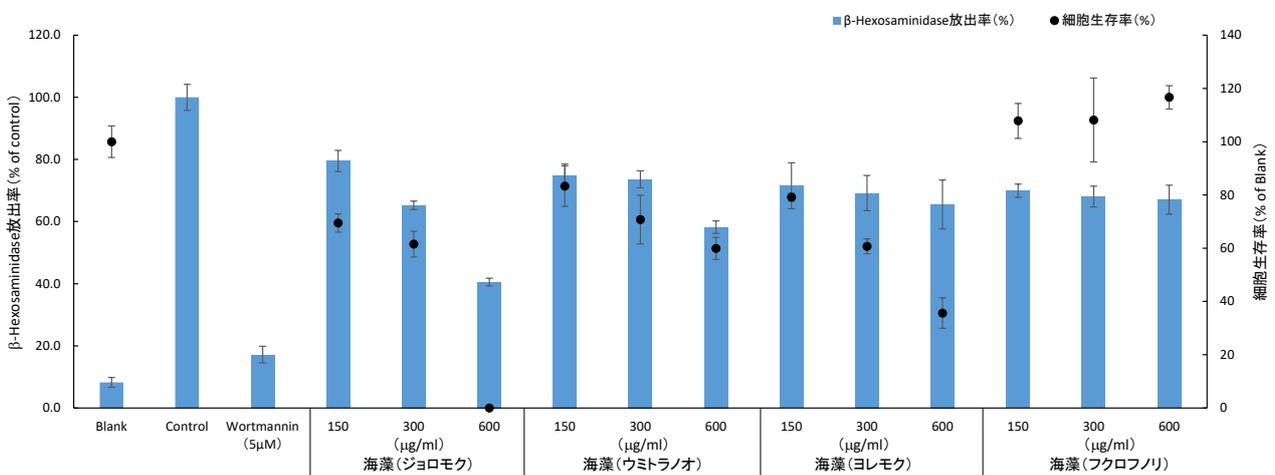
(B)



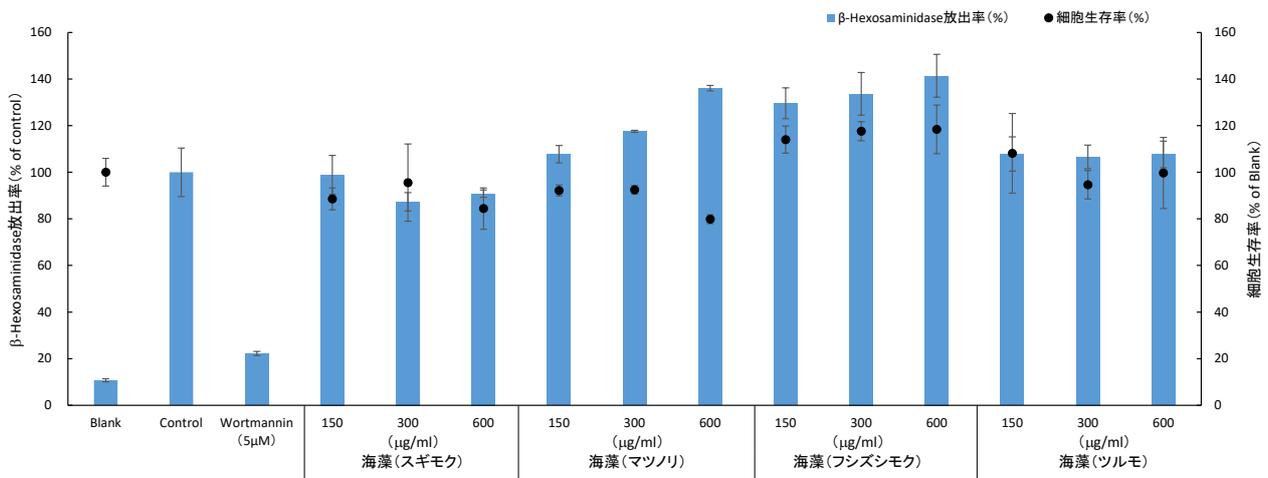
(C)



(D)



(E)



(F)

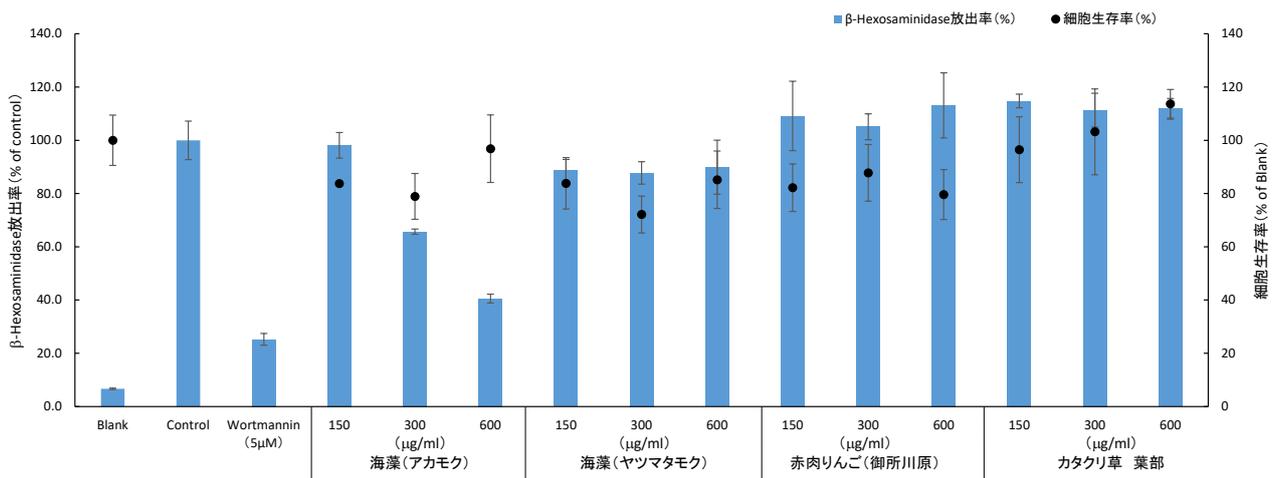


図 1 (A) ~ (F) 各種青森県産素材における脱顆粒抑制作用 (抗アレルギー作用) の評価測定は 3 反復 (n=3) で行い、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。

4. まとめ

青森県産素材 24 種類について、RBL-2H3 ラット好塩基球由来株細胞を用いた脱顆粒抑制試験による抗アレルギー作用を評価した結果、海藻アカモクにおいて高い抗アレルギー作用が認められた。このことから、海藻アカモクは、抗アレルギー作用を持つ機能性素材として有望であり、化粧品や健康食品への利用が期待できるものと考えられた。