焼酎蒸留廃液有効利用のための抗腫瘍活性成分の解明

課題番号：１７５１００７１

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金
（基盤研究(C)）研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者　　森村　茂
熊本大学大学院自然科学研究科助教授

目　次

はしがき

焼酎は日本の代表的な蒸留酒であり、焼酎製造の大部分が九州地方で行われている。焼酎製造の蒸留工程で副生する蒸留廃液 (以後、焼酎粕とする) の排出量は、焼酎ブームで焼酎製造量が増加するにしたがい、南九州 4 県だけでも平成 14 年酒造年度で約 47 万 kL、平成 15 年酒造年度で約 60 万 kL、平成 16 年酒造年度には約 85 万 kL と、年々大幅に増加している。焼酎は蒸留酒であるため、他の酒類に比べてこのように副生物である焼酎粕が多く発生するのが問題である。焼酎粕は BOD が 35,000 - 80,000 ppm もある高濃度有機性廃水であるため、処理が困難である。したがって、これまでの焼酎粕の処理法としては海洋投棄や焼却が主流であり、一部は飼料化や特殊肥料化などによる利活用が行なわれている程度であった。しかし、環境側面への配慮などから焼却処理は難しく、ロンドン条約によって海洋投棄が禁止されることになり、畑地還元も禁止する方針である。一方で、食品リサイクル法の施行に伴い、焼酎粕のリサイクルが義務付けられている状況にある。焼酎粕の飼料化は収入を考慮しても焼酎粕 1 トンあたり約 5000 円を要している。焼却に至っては 6000 円以上を要し、さらに地球温暖化に関与する CO_2 の発生など二次公害の問題がある。最近は、焼酎粕のメタン発酵が協業組合形式等で採用されているところもある。しかし、初期投資の多くを補助金で賄い、発生する燃料（バイオガス）を収入として試算しても処理費に約 3500 円／トンを費やしている。このような状況から、経済性の高い方法で焼酎粕を利活用できる技術の開発に大きな期待が寄せられている。

上述したように、焼酎粕は高濃度の有機物を含み処理が困難な廃液であるが、同時に、原料や麹あるいは酵母由来のタンパク質、糖質、脂質、ペプチド、各種アミノ酸、ビタミンおよびその他の有効成分を豊富に含む有用素材でもある。われわれは、これまでの研究結果において、麦、甘藷および米焼酎粕にポリフェノールや遊離アミノ酸およびタンパク質が多く含まれ、焼酎の原料によって各成分の組成や含有量に違いがあることを示している [1)]。そこで、焼酎粕を新規な未利用資源として捉え、環境負荷軽減に繋がる排出量削減と有効利用を同時に達成することを目指して、焼酎粕からの機能性醸造酢製造を組み込んだゼロエミッション型の新規焼酎製造プロセスを開発し、実証試験を行ってきた [2-6)]。開発したプロセスに関しては実用化の段階に達したので、次は、製造した醸造酢が確かにヒトの健康維持に寄与できる機能性を有することを実証するために、生理活性成分の解明が必要である。

厚生労働省の統計で報告されているように、生活習慣病であるがん、脳卒中および心疾患は、日本人の死亡原因の上位を占めている。近年、メタボリックシンドロームなどの問題がクローズアップされており、生活習慣病に対する警告が日々なされている。

脳卒中および心疾患の発生機序には、動脈硬化が大きく関与している。動脈硬化は、以下のメカニズムで起こると考えられている。すなわち、低比重リポタンパク (LDL) が酸化変性されて酸化 LDL になり、マクロファージがスカベンジャー受容体を介して酸化 LDL を取り込むことで細胞内にコレステロールエステルの脂肪滴を有する泡沫細胞となり、泡沫細胞が集合体を形成することで脂肪腺状の初期病変を形成し、動脈硬化になる。このように、動脈硬化は LDL の酸化が非常に重要なトリガーとなり進行することがわかる。LDL 酸化などの生体内酸化は、内因性および

外因性に産出される活性酸素や一酸化窒素 (NO) などのフリーラジカルによる酸化ストレスによって引き起こされており、この酸化ストレスは、アルツハイマーおよび糖尿病などの様々な疾患に関与すると考えられている。さらに、がん化のプロモーションにも活性酸素種などのラジカルが深く関係しており、抗酸化活性はがん化のプロモーション抑制に効果があると考えられている。このような観点から、世界中で、がん予防の候補物質が多くの植物性食品素材から単離された。植物由来のがん予防候補物質には、クルクミン、EGCG、オーラプテンなどがあり、中心的な作用機序は、活性酸素や活性窒素などの内因性ラジカルの消去である。また、単離された物質の作用機序については、mitogen-activated protein kinases (MAPKs)に代表される細胞内シグナル伝達の制御、nuclear factor κB (NF-κB)の DNA との結合阻害、NF-κB の活性化の抑制および核内移行の阻害など、分子レベルで解析した研究が盛んに行われている [7, 8]。

1981 年以来日本人の死因第 1 位であるがんは、人類が超えなければならない最大の課題の一つである。長いがん研究の成果により、上述したがん化のプロモーションなど、がん発生のメカニズムは次第に解明されつつある。また、がんに対する治療も徐々に成果が現れている。しかし、21 世紀を迎えて日本や欧米などの先進諸国は高齢化社会に到達しており、がんの罹患率や死亡率はさらに増加すると考えられる。がん治療の代表的手法の一つに、細胞傷害型薬剤を用いる化学療法がある。治療のタ− ゲットである固型がんが臨床的に検出あるいは画像診断がなされたとき、その細胞の数は 10^{10} - 10^{12} 個である。この腫瘍を、通常使用されている細胞殺傷型の化学療法剤 (制がん剤) で治療すれば、1 コースの投与で、せいぜいがん細胞は 20% - 10%にしか減らせず 10^{10} 個程度は容易に残存することになる。また、制がん剤の副作用により、宿主の免疫などの生体機能は大幅に低下する。通常のマウス実験モデルでは、わずか 10^{6} 個のがん細胞を移植しても固型がんは形成する。このため、その約 10,000 倍のがん細胞が残存し、しかも化学療法によって免疫抑制状態にある宿主では、残存するがん細胞は容易に増殖してがんを形成する。さらに、このような化学療法では、免疫抑制に加えて心臓、腎臓、あるいは骨髄などの機能も大幅に低下するという副作用が知られている [9]。つまり、細胞傷害型薬剤は、優れた制がん効果を発揮するが、同時に、腎障害や嘔吐、心筋障害さらには免疫機能の大幅な低下といった重篤な副作用をもたらす。

このため、副作用のない免疫賦活などの生体機能を改善することで、がんを治療もしくは治療をサポートするものとして、きのこに含まれる多糖類などの成分が研究されてきた。各種きのこ類の多糖 (マンナンおよびグルカンなど) は古くから抗腫瘍活性を有すると考えられ、今日でも、生体応答調節剤 (Biological response modifier, レンチナンなどが使用されている) や健康補助食品として用いられている。また、1960 年代から連鎖球菌の菌体 (OK-432; ピシバニール) が、胃がん、肺がん、がん性胸腹水、他剤無効の頭頸部がんおよび甲状腺がんの治療に供されている。また、Doll らは、がんの要因の約 80%が、アルコール、タバコ、感染および食生活であると報告しており、その中でもがんの要因の 30 - 40%が日常的な食習慣によるものと報告している [10]。このように、がんはそのヒトの食生活と非常に密接な関係がある。ヒトを対象とした介入試験やコホート研究のような多くの疫学検討により、一日に約 5 種類以上の野菜や果物を摂取するヒトは、摂取しないヒトと比較して約 50%もがんのリスクを下げると報告されている [11, 12]。この結果を受け、‘Five-A-Day for Better Health’ report などに代表されるように、アメリカや EU では日常生活で

野菜や果物を多く摂取して人類の大きな問題の一つであるがんの発生リスクを下げるように促す政策がとられている。しかし、実際には臨床的にがんと診断された場合、多くは進行した状態であり食による手法のみで治療することは困難であると考えられる。そのため、がんになってから治すのではなく、がんにならないように予防することが重要であると考えられる。

これまでにも、焼酎粕の生理活性（機能性）に関する報告は多い。古くは中国において、蒸留酒の残渣は胃腸虚弱や吐き気、打撲による青痣、手足の浮腫に有効であると何千年も前に中国医学書《本草綱目》に記載されており、今でも中国の民間で機能性食品として糖尿病治療に利用されている。日本においては、望月らは、麦焼酎粕がオロチン酸投与によるラット脂肪肝生成を抑制すると報告している [13)]。すなわち、1.0%オロチン酸含有飼料に 2.5-10%の麦焼酎粕を添加し、ラットに 16 日間自由摂取させ、脂肪肝の生成を血清および肝臓中の脂質量で比較検討している。その結果、麦焼酎粕の添加濃度に依存して肝臓脂質の増加を抑制し、オロチン酸による脂肪肝の生成を抑制したと報告している。また、麦焼酎粕を投与すると、D-ガラクトサミン誘発肝障害による血清中 ALT および AST 量を有意に抑制し、病理学的検査による肝臓組織像でも肝障害を抑制したとの報告もある [14)]。さらに、Mahfdz らは、焼酎粕はコレステロール降下作用を有すると報告している [15)]。泡盛を製造する際に排出される泡盛蒸留粕についても DPPH 法、ESR 法などにより、抗酸化活性を有することが示されている [16)]。われわれも、麦、甘藷および米焼酎粕および各種焼酎粕から製造した醸造酢が、過酸化脂質ラジカル生成抑制活性を有していること、過酸化脂質ラジカル生成抑制活性の違いは各焼酎粕に含まれる総フェノール化合物濃度に関連があること、また、各種焼酎粕および醸造酢が、*in vitro* でアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性を有することを報告している [1)]。その中で麦、甘藷および米の焼酎粕と醸造酢を比較すると醸造酢の方が ACE 阻害活性は高く、酢酸発酵過程においてタンパク質の低分子化に伴うペプチドの生成が起こり、醸造酢が高い ACE 阻害活性を示したとことを明らかにした。また、*in vivo* で高血圧自然発症ラット (SHR) を用い、0.3%米焼酎粕の投与により血圧上昇を抑制することも示している。大森らも、同じく SHR ラットを用いて麦焼酎粕の血圧上昇抑制作用を報告している [17)]。また、各焼酎粕には血圧上昇抑制作用を有するγ-アミノ酪酸（GABA）が多く含まれており、麹歩合に依存して濃度が高くなることも報告されている [18, 19)]。抗腫瘍活性に関しては、廣瀬らは、ヒト胃がん細胞 GT3TKB などで焼酎粕が細胞増殖抑制効果を示した [20)] と報告している。その他の生理活性に関しても、われわれは、各種焼酎粕および醸造酢が老化や糖尿病の進行に関連があると考えられている advanced glycation endproducts (AGE) 生成抑制作用を示すことを *in vitro* 評価系で明らかにした [1)]。

このように、焼酎粕の生理活性評価に関する報告は多いが、抗酸化活性や抗腫瘍活性に関して *in vivo* で評価した報告はない。また、焼酎粕中のどの成分が何の生理活性に寄与しているか、作用機序はどのようになっているかに関する報告もない。

本報告では、がん予防あるいは初期がんの改善効果に関して、焼酎粕から製造した醸造酢およびその原料である焼酎粕の抗酸化活性や抗腫瘍活性について *in vivo* 評価を中心に生理活性評価を行い、抗酸化活性およびアポトーシス誘導活性を有する物質の精製・同定を行った。得られた研究成果に基づいて、焼酎粕および焼酎粕から製造した醸造酢が抗腫瘍活性や抗酸化活性を含めて

優れた生理活性を有することを証明できれば、開発したゼロエミッションプロセスの実用化が促進され、地球環境悪化防止はもとより、国民の健康的な生活を支援することができる。

第 1 章では、*in vivo* を中心とした抗ラジカル活性評価および抗ラジカル活性物質の精製・同定について検討を行った。第 2 章では、醸造酢に含まれるアポトーシス誘導物質の探索、精製・同定・、アポトーシス誘導物質の生成機構、およびアポトーシス誘導のメカニズムに関する検討を行った。

本研究は、下記の体制で実施した。

研究組織

研究代表者：森村　茂　（熊本大学大学院自然科学研究科助教授）
研究分担者：木田　建次（熊本大学大学院自然科学研究科教授）
研究分担者：重松　亨　（熊本大学大学院自然科学研究科助手）
（現　新潟薬科大学応用生命科学部助教授）
研究協力者：稲垣　秀一郎
研究協力者：関　孝弘

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	1,700,000	0	1,700,000
平成 18 年度	1,600,000	0	1,600,000
平成　年度			
平成　年度			
平成　年度			
総　計	3,300,000	0	3,300,000

研究発表

（1）　学会誌等

- Inagaki, S., Morimura, S., Gondo, K., Tang, Y.Q., Akutagawam H., Kida, K.: Isolation of tryptophol as an apoptosis-inducing component of vinegar produced from boiled extract of black soybean in human monoblastic leukemia U937 cells. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 71 (2), 371-379 (2007).
- 稲垣秀一郎、森村　茂、権藤和修、湯　岳琴、芥川浩志、木田建次：エタノール発酵過程で生成するアポトーシス誘導物質・トリプトフォール．日本醸造協会誌，102 (3), 222-224 (2007)．
- Inagaki, S., Morimura, S., Shigematsu, T., Kida, K, Akutagawa, H.: Apoptosis induction by vinegar produced from black soybean boiled extract in human monoblastic leukemia U937 cells: difference in cell toxic sensitivity compared to normal lymphocytes. Food Science and Technology Research, **11**, 311-317 (2005).

（２） 口頭発表

・稲垣秀一郎、 森村　茂、湯　岳琴、木田建次：黒豆大豆煮汁から製造した醸造酢からアポト−シス誘導物質・トリプトフォールの単離とヒト単核球白血病細胞(U937)に対する誘導メカニズム解析. 第13回日本生物工学会九州支部大会講演要旨集 p.66, 鹿児島大学工学部 (2006年12月9日).

・鈴木一厳、森村　茂、湯　岳琴、木田建次：コーヒー酸のエチルエステル化による抗ラジカル活性の向上. 第 11 回日本フードファクター学会 (JSoFF), 犬山国際観光センター (2006年11月21日).

・Takahiro, Seki; Sachiko, Tabata; Shigeru, Morimura; Toru, Shigematu; Kenji, Kida : Evaluation of antioxidant activity of vinegar produced from rice-*shochu* post-distillation slurry *in vivo* and identification of antioxidant compound in the vinegar. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, p.32, Honolulu, Hawaii (2005年12月17日).

・稲垣秀一郎、 森村　茂、 重松　享、 木田建次、 芥川浩志：黒豆納豆製造工程で副生する大豆煮汁を用いた醸造酢の製造とそのアポト− シス誘導効果」第 10 回日本フードファクター学会 (JSoFF) 講演要旨集 p.91, 岡山大学農学部 (2005年11月24日).

・権藤和修、稲垣秀一郎、森村　茂、重松　享、木田建次、芥川浩志：黒豆納豆大豆煮汁から製造した醸造酢のアポトーシス誘導. 平成17年度日本生物工学会大会講演要旨集 p. 171, つくば国際会議場 (2005年11月15日).

・森村　茂、関　孝弘、重松　亨、木田建次：米焼酎粕から製造した醸造酢の免疫増強作用. 平成17年度日本醸造学会大会講演要旨集 p. 12, 北トピア(2005年10月6日).

（３） 出版物

なし

研究成果による工業所有権の出願･取得状況

なし

第 1 章　焼酎粕および焼酎粕から製造した醸造酢の抗酸化活性評価および抗酸化物質の同定

1.1 緒言

ヒトにおいて、正常な細胞代謝により生み出される有害な副生成物であるスーパーオキシド、ヒドロペルオキシド、過酸化水素などの活性酸素種（ROS）は、高い反応性のために DNA、細胞、組織の酸化や損傷を引き起こすことが知られている。ROS は、発がん、老化、動脈硬化などの発症に深く関わっているのみならず、発がんとは全く正反対の制がん剤の作用 (制がん作用) や殺菌 (感染防御) の本体としても重要な分子種であることがわかってきている [21-23]。

ROS を消去する抗酸化活性物質として有名なものに、芳香族炭化水素の 2 個以上の水素がヒドロキシル基で置換されたポリフェノール類や 2 個のフェニル基がピラン環あるいはそれに近い構造の 3 個の炭素原子を介して結合している物質群のフラボノイド類、緑色植物やカビ、キノコ、酵母、細菌などが作る黄色や赤色、紫色のリコペンを基本骨格とするカロテノイド類がある [24-27]。これらの物質は、自然界のいたるところに分布している物質であり、植物の代謝や動物の食生活に必要不可欠の物質である [28]。

発酵食品に含まれる抗酸化活性物質に関する報告も多数ある。例えば、日本の伝統食品のひとつである味噌が強い抗酸化活性を有することは早くから知られている [29]。また、紫芋を原料とした赤酢が強い抗酸化活性を有することも報告されている [30]。同様に紫芋を原料として作られたワインが強い抗酸化活性を有し、抗酸化活性とポリフェノール含量が相関することが明らかにされている [31]。他にもフェノール含量と抗酸化活性の相関性について研究がなされており、フェノール含量が多いほど抗酸化活性が強くなることが明らかになっている [32]。さらに、玄米を原料とし、時間をかけて酢酸発酵して製造される黒酢の健康への有益性が現在広く知られているが、その黒酢から、抗酸化活性物質として dihydrosinapic acid および dihydroferulic acid が単離されている [33]。このような活性を有する野菜や果物などの植物由来の化合物である phytochemicals は大きく注目され、抗酸化活性からがん予防にいたるまで、現在幅広く研究が進んでいる [34]。

本章では、米焼酎粕および醸造酢に含まれる抗酸化物質を精製・同定し、*in vitro* での抗酸化活性は、米焼酎粕、醸造酢、およびそれらから同定した化合物を用いて H_2O_2 によるヒト肝細胞がん細胞株 HepG2 への酸化ストレスによる細胞障害に対する細胞保護活性を検討した。さらに、*in vivo* での抗酸化活性は CCl_4 によるマウス急性肝障害モデルを用いて、各サンプルの経口投与による肝障害の軽減効果を検討した。

1.2 材料および実験方法

1.2.1 試薬

液体クロマトグラフィーにおける移動相溶液用のアセトニトリルおよびメタノールは液体クロマトグラフィーグレードのものを使用した。また、抗酸化活性測定におけるルミノール、ジエチレントリアミン 5 酢酸は、ナカライテスクより購入した。標準試薬として使用した caffeic acid, *p*-hydroxyphenethyl alcohol (tyrosol) および 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid) は SIGMA から購入した。その他の試薬は特級試薬を使用した。L-シスチンは Sigma より購入し、その他の飼料素材はオリエンタル酵母工業(株)より購入した。

1.2.2 米焼酎粕および酢酸菌

米焼酎粕は、熊本県球磨地方の米焼酎製造メーカーから提供された新鮮なものを用いた。醸造酢を製造するための酢酸発酵には、（財）発酵研究所から購入したクエン酸耐性を有する酢酸菌 *Acetobactor aceti* NBRC 3283 を用いた。酢酸菌を培養する際に使用した培地を表 1-1, 1-2 に示した。培地はすべて 121°C 20 分間の条件で滅菌したものを用いた。

表 1-1　*A. aceti* NBRC 3283 に対する斜面培地組成

組成	濃度 (g/L)
グルコース	5.0
ポリペプトン	5.0
酵母エキス	5.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
寒天	15.0

表 1-2　米焼酎粕から醸造酢を製造するための前々培地組成

組成	濃度 (g/L)
グルコース	10.0
ポリペプトン	10.0
酵母エキス	10.0
エタノール＊(mL/L)	50.0

＊: オートクレーブ後に添加した。

1.2.3 細胞株および培地

ヒト肝細胞培養株 HepG2 はヒューマンサイエンスより購入し、Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) に 10%FBS を加え、100 μg/mL ストレプトマイシンおよび 100 units/mL ペニシリンを添加した培地を用いて、37°C 5% CO_2 雰囲気下で培養した。

1.2.4 実験動物および飼養

日本 SLC 株式会社（浜松市）より購入した 5 週令の雄性 ddY マウスを使用した。マウスは 22±1°C 湿度 55±5%に制御された動物飼育室で飼育し、1 ケージ 5 匹で飼育した。飼料および飲料水は自由摂取とし、午前 7 時から午後 7 時まで点灯する 12 時間の明暗周期とした。動物実験はすべて熊本大学動物実験指針にしたがって行った。

1.2.5 米焼酎粕からの醸造酢の製造および各試験で用いるサンプルの調製

A. aceti NBRC3283 株を表 1-1 の斜面培地で植え継ぎ、30°C で 48 時間培養した。滅菌した表 1-2 の前々培養培地 75 mL の入った 300 mL 三角フラスコ 2 本に *A. aceti* NBRC3283 株を一白金耳植菌し、30°C で 24 時間振とう培養した。総容積 3 L の発酵槽（多目的型培養装置 BMS03PI、エイブル（株））をあらかじめ滅菌しておき、滅菌していない米焼酎粕 1.35 L および前々培養液 150 mL を無菌的に添加し、初発エタノール濃度 5% (v/v)、撹拌速度 600 rpm、温度 30°C 通気量 1 vvm の条件で前培養を行った。pH は 2 N NaOH により 4.0 に制御して培養を行った。蒸気滅菌しておいた総容積 70 L の発酵槽（MSJ-U2W 型 、丸菱バイオエンジ）に 27 L の滅菌していない米焼酎粕、1.5 L のエタノールおよび酢酸菌前培養液 1.5 L を入れ、撹拌速度 250 rpm、温度 30°C 通気量 0.5 vvm の条件で本培養を行った。pH は 6 N NaOH により 4.0 に制御した。次に、前培養および本培養では溶存酸素 (DO) 濃度の制御は行なわずに経時的にモニターした。DO 濃度が減少し、その後、培養開始時の DO 濃度に戻った時点で培養終了と判断した。得られた発酵醪を 4°C で 1 週間静置することで固液分離を行い、上澄液を回収した。さらに、連続遠心分離 (H-600N、(株)コクサン) による固液分離を行って得た上清と合わせて醸造酢とした。得られた醸造酢、および米焼酎粕を連続遠心分離して得られた上清は凍結乾燥 (DF-010H、日本真空(株))した。得られた凍結乾燥物は、10 mM リン酸緩衝溶液 (PBS) で再溶解したものを細胞試験に使用し、動物試験で使用する際は、滅菌した生理食塩水で再懸濁した溶液もしくは凍結乾燥物を合成飼料に混ぜて使用した。

1.2.6 過酸化脂質ラジカル生成抑制活性

In vitro での米焼酎粕および醸造酢の過酸化脂質ラジカル生成抑制活性の測定は、Kanazawa らの方法 [35]であるルミノール依存性化学発光法に従って行った。96 穴マイクロプレートを用い、各ウェルにリン酸緩衝溶液 125 μL、10 mM ジエチレントリアミン 5 酢酸 25 μL、300 mM t-BuOOH 25 μL、100 mM ルミノール 25 μL、エタノール/PBS（2/1）溶液に様々な濃度で溶解させた抗酸化活性物質 25 μL を入れ、ケミカルルミネッセンス装置（大日本製薬（株））で測定した。反応は、210 秒間、37°C で撹拌を行った後、100 mg/L ヘモグロビンを 25 μL 添加し測定を開始した。ルミノールの蛍光強度を 50%に抑制する反応液中のサンプル濃度を $IPOX_{50}$ 値として表した。

1.2.7 米焼酎粕から製造した醸造酢に含まれる抗酸化物質の精製および同定

はじめに、醸造酢に対して酢酸エチル抽出を行った。醸造酢 100 mL を酢酸エチル 40 mL と混合し、シェーカー（池本理化工業（株））で 20 分間振とうした後、5000 rpm で 10 分間の条件で遠心分離（KUBOTA6700）し、酢酸エチル層を回収した。水層に酢酸エチル 40 mL を添加し、同様の操作で抽出を行った。この抽出操作を全部で 3 回繰り返した後、回収した酢酸エチル層をエバポレーターで乾燥させ抽出物を得た。次に、酢酸エチル抽出物を蒸留水に溶解させ、Rechner らの方法 [36]を参考にして、Gilson HPLC System を用いた逆相液体クロマトグラフィーにより分離・精製した。カラムは L- column ODS（（財）化学品検査協会）を使用し、A、B の２液によるグラジエント溶離法で行った。A 液としてメタノール/水/5 N HCl ＝ 10 / 89.9 / 0.1 、B 液として

アセトニトリル/水/5 N HCl ＝ 50 / 49.9 / 0.1 を用い、合計流速は 1 mL/min で、5 分まで 100%A 液、5 分から 40 分で A 液 100%→50%、40 分から 60 分で A 液 50%→0%、65 分まで A 液 0%、65.1 分に A 液 100%とし 70 分間分析した。そして、次のサンプル測定まで 10 分間 A 液でカラムを洗浄した。カラム温度は 30° Cとし、220 nm および 280 nm の吸収ピークを検出した。各画分を分画して乾燥させ、精製サンプルとした。分画した画分に対し、過酸化脂質ラジカルの生成抑制活性を調べ、その中で最も活性の強かった 2 つの分画物 (画分④および⑦) の同定を行った。

精製サンプルの分子量分析は、移動相としてメタノールを用いた LC/MS（JMS-LC mate（JEOL））で測定した。また、核磁気共鳴スペクトル（磁石：OXFORD（イギリス）、解析装置：VARIAN（アメリカ））は、サンプルをメタノール-d_4 に溶解させ、400 MHz において ^{1}H-NMR および ^{13}C-NMR を測定した。さらに、赤外吸収スペクトル（Spectrum One FT-IR Spectrometer（Perkin Elmer Instruments, イングランド））を測定し、同定を行った。

1.2.8 ヒト肝細胞がん細胞株 HepG2 への H_2O_2 による酸化ストレスに対する抗酸化活性

米焼酎粕および醸造酢の生体肝細胞への抗酸化活性を検討するため、HepG2 を用いた Puiggròs らの報告を参考にして試験を行った[37]。はじめに、酸化ストレス H_2O_2 を用いた試験を行う前に、米焼酎粕、醸造酢および同定した tyrosol と ferulic acid に対する細胞毒性試験を行った。対数増殖期にある HepG2 を 96 穴平底マイクロプレートに播き、37° C 5%CO_2 雰囲気下で一晩インキュベートした。HepG2 (10^4 cells/well) に、濃度を変化させた各サンプルを添加し、37° C 5%CO_2 雰囲気下で 24 時間インキュベートした。24 時間後、HepG2 の生存率を MTT 法の改変である WST-8 法により測定した。その後、細胞毒性を示さなかった濃度範囲で、酸化ストレス H_2O_2 を用いた米焼酎粕および醸造酢の抗酸化活性試験を行った。

抗酸化活性試験は、control 群（1.0 mM H_2O_2 を 1 時間作用させた群）、米焼酎粕群（各濃度の米焼酎粕を 23 時間作用させ、23 時間後に洗浄し、1.0 mM H_2O_2 を 1 時間作用させた群）および醸造酢群（各濃度の米焼酎粕を 23 時間作用させ、23 時間後に洗浄し、1.0 mM H_2O_2 を 1 時間作用させた群）を設け行った。その際に細胞の酸化の指標として過酸化脂質および GSH を測定し、control 群とサンプル群との比較を行い検討した。過酸化脂質は thiobarbituric acid (TBA) 法により測定し、GSH は 5, 5€-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 法を用いて測定した。

1.2.9 CCl_4 によるマウス急性肝障害モデルを用いた抗酸化活性

米焼酎粕および醸造酢の抗酸化活性が生体内でも発揮されることを示すため、CCl_4 によるマウス急性肝障害モデルを用いて検討した。*In vivo* での抗酸化試験には、AIN-93G を基準に抗酸化物である 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT) を除いた合成飼料を作製した。合成飼料は、1 kg あたりコーンスターチ 397.5 g、カゼイン 200 g、α 化コーンスターチ 132 g、スクロース 100 g、大豆油 70 g、セルロース 50 g、ミネラル混合 （AIN-93G） 35 g、ビタミン混合 (AIN-93G) 10 g、L-シスチン 3 g、重酒石酸コリン 2.5 g、を加え調製した。

米焼酎粕および醸造酢を用いて CCl_4 による急性肝障害に対する抑制試験を行った。CCl_4 は、肝代謝により $CCl_3\cdot$ を生じ、それに続くラジカル反応により肝細胞を傷害し肝障害を引き起こす。試

験は Song らの報告を改変し行った[38]。購入した 5 週令の雄性 ddY マウスは、飼料および飲料水を自由摂取で与え、1 週間の予備飼育を行い、試験を開始した。飼料は、上述した合成飼料をすべての群のマウスに試験期間中に自由摂取させた。CCl_4 に対する肝障害抑制試験は、実験群を 200, 400, 800 mg/kg の米焼酎粕および醸造酢、100 μmol/kg の tyrosol、基本食を与えた CCl_4 処理のみの群 (control 群)および CCl_4 処理なしの群 (normal 群)の計 9 群を設けて行った。各サンプルはゾンデを用いて 10 mL/kg で 5 日間連続経口投与し、6 日目に 10% (v/v)CCl_4/大豆油を腹腔内に投与した。Control および normal 群は生理食塩水のみを経口投与した。CCl_4 を腹腔内に投与して 20 時間後、マウスを麻酔により屠殺し、血液および肝臓を採取した。血液から血清を採取し、肝障害の指標である肝臓酵素の AST (GOT) および ALT (GPT) の活性を測定した。また、酸化ストレスによる肝臓の過酸化脂質および GSH レベルを測定し、さらに GSH 関連酵素である GSH Px および GSH Rd の活性を測定した。屠殺した後、肝臓および血清は、各項目を測定するまで－ 80°C に保存した。ただし、各項目は保存してから 1 週間以内に測定した。肝臓を氷中にて、電子天秤で約 0.5 g の重量に切り取った。その際に、肝臓重量は記録しておいた。肝臓重量の 10 倍量の 0.15 M KCl 水溶液で希釈し、最終濃度が 1.0 mM になるように 0.05 M BHT エタノール溶液を加えた (0.5 g の肝臓に対し、0.5 mL 加えた)。その後、氷上でホモジネートを行った。これをサンプル溶液とした。0.5 mL サンプル溶液（または 5×10^{-5} M 1,1,3,3-tetraethoxypropane 標準試料）に、3.0 mL の 0.1 M リン酸水溶液と 0.5 mL の 0.01 M $FeCl_2$ 水溶液を加え、その後 1.0 mL の 0.04 M TBA 水溶液を混合した (15 mL 容遠沈管)。95°C の沸騰水浴中で 60 分間加熱した。60 分経過後、氷にて急冷した。冷却後、4 mL の n-Buthanol：Pyridin（15：1）を加えて激しく攪拌した。3,000 rpm, 10 分間, 25°C の条件で遠心分離した。遠心終了後、有機層 (赤に呈色した上層) を回収して 535 nm の吸光度を測定した測定した吸光度からの thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) の計算は次の式を用いた。

$A=\varepsilon\cdot c\cdot l$ より

$$(\text{有機層のRed pigment濃度})_{mol/l} = A_{535nm}/\varepsilon_{\text{Red pigment}}$$

$$(1\,\text{gの湿肝臓あたりのRed pigment生成量})_{\text{nmol/g-wet liver}}$$

$$=(A/\varepsilon_{\text{Red pigment 535nm}})_{mol/l}\times\frac{4_{ml}}{1000_{ml}}\times\frac{(X_g\times10)_{ml}+\left(\dfrac{X_g}{\rho_{\text{Liver}}}\right)_{ml}+X_{ml}}{0.5_{ml}}\times\frac{1_g}{X_g}\times10^9$$

なお、Red pigment の 535 nm のモル吸光係数 $\varepsilon=1.56\times10^5\ M^{-1}cm^{-1}$、肝臓密度は $\rho_{Liver}=1$ g/mL とした。

1.2.10 分析方法

米焼酎粕および醸造酢中の総フェノール化合物量を、Folin-Ciocalteu 法[39] に従って次の操作により測定した。すなわち、3.2 mL の蒸留水に 200 μL のサンプルを添加した。これに Folin 試薬 200 μL を加え直ちに攪拌し 3 分間放置した後、10%炭酸ナトリウム水溶液 400 μL を加え攪拌した。

この反応液を 1 時間室温で放置後 750 nm の吸光度を測定した（Shimadzu UV-160A）。サンプル中の総フェノール化合物量は、caffeic acid を標準試薬として作成した標準曲線を元に定量した。エタノールは FID ガスクロマトグラフィー（GC-353; FS-WCOT.OV101 カラム、GL サイエンス(株)）により定量した。酢酸濃度は F-キット酢酸（ベーリンガー・マンハイム社）により定量した。

1.2.9 で行った CCl_4 によるマウス急性肝障害モデルを用いた抗酸化活性試験において、肝臓中の GSH は、DTNB 法を用いて測定した。肝臓をホモジナイズし、タンパク質沈殿のためにホモジネートした肝臓を 0.4 mL に 0.4 mL の metaphosphoric acid solution (1.67 g metaphosphoric acid, 0.20 g EDTA, 30.0 g NaCl を 100 mL H_2O に懸濁) を加えた。40 分後に 5000 rpm、4°C で 5 分間の条件で遠心分離した。0.4 mL の上清に 0.4 mL の 300 mM Na_2HPO_4、または 0.4 mL の上清に 0.4 mL の H_2O を加えたものをブランクとして設けた。その溶液に 0.1 mL DTNB (0.02%, w/v; 20 mg DTNB を 100 mL の 1.0% sodium citrate に溶解) を加え 412 nm の吸光度を測定した。GSH 含量は、特級試薬の GSH を用いて作成した標準曲線から求めた。GSH 濃度はμmoL/mg protein として表した。

さらに、酸化ストレスにより酸化された酸化物の分解に関わる GSH 関連酵素である glutathione peroxidase (GSH Px)および glutathione reductase (GSH Rd)の米焼酎粕および醸造酢の投与による活性を測定した。GSH Rd は 0.99 μL の 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.1 mM $MgCl_2$, 5 mM 酸化型グルタチオン(GSSG)および 0.1 mM NADPH を加えたものを反応溶液として活性を測定した。その反応液に 10 mL の肝ホモジネートを添加し、NADPH の酸化還元反応を起こさせ、その活性を測定した。340 nm の吸光度の変化を 5 分間、25 °C の条件で分光光度計 (Shimadzu UV160UV-160A, Kyoto, Japan) で測定した。GSH Rd の活性は nmol NADPH/min/mg-protein として表した。GSH Px は 1 mL crystal cuvette , 0.8 mL の 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.0 mM EDTA, 1.0 mM NaN_3, 0.2 mM NADPH, 1.0 U/mL GSH reductase および 1.0 mM GSH を含む反応液を調製し、その反応液に 5 μL 肝ホモジネートを加え、そして NADP から NADPH への還元反応を 340 nm で 3 分間記録し、測定した。GSH Px の活性は nmol NADPH/min/mg-protein として表した。

1.2.11 統計学的解析

各試験の結果は、平均値 ± 標準偏差で示した。有意差検定には t-検定を用いた。危険値 *P* が 0.05 以下であるときに有意差があると定義した。

1.3 実験結果および考察

1.3.1 米焼酎粕からの醸造酢の製造

総容積 70 L の発酵槽を用いて酢酸発酵を行った結果、29 時間で酢酸発酵が終了し、生成酢酸濃度は 38 g/L、酢酸生成収率は 73%であった。代表的な抗酸化物質と考えられるフェノール化合物の含有量を Folin-Ciocalteu 法で測定した結果、米焼酎粕および醸造酢でそれぞれ 1.07、1.33 mg/mL であった。

1.3.2 **過酸化脂質ラジカル生成抑制活性**

米焼酎粕および醸造酢の抗酸化活性を明らかにするため、*in vitro* **での過酸化脂質ラジカルに対する抑制活性を測定した。米焼酎粕は** $IPOX_{50}$ **の値は** 0.005 mL/mL **であり、同様に醸造酢も** $IPOX_{50}$ **の値は** 0.005 mL/mL **であった。**

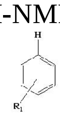
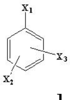
1.3.3 **醸造酢に含まれる抗酸化物質の精製および同定**

植物などに含まれるフェノール化合物は、抗酸化活性を示す物質である。このため、米焼酎粕および醸造酢に含まれる抗酸化活性物質としてフェノール化合物に着目し、酢酸エチル抽出により醸造酢から抽出を行った。表 1-3 **に示したように、醸造酢、酢酸エチル抽出物および水相抽出物の中では酢酸エチル抽出物が、もっとも強い過酸化脂質ラジカル抑制活性を示した。酢酸エチル抽出物は、醸造酢に含まれる総フェノール化合物の約** 10%**であったが、高い過酸化脂質ラジカル生成抑制活性を示したので、酢酸エチル抽出物を用い、逆相** HPLC **による分画を行った。**

1.2.7 **に記述した分離条件では、**gallic acid **は** 5.6 **分、**caffeic acid **は** 22.5 **分および** ferulic acid **は** 30.5 **分に検出され、フェノール様の化合物を検出するのに適している分離法であると考えた。図** 1-1 **に示したように、逆相** HPLC **による分画で** 7 **つの主要な画分が得られた。その各分画の過酸化脂質ラジカル生成抑制活性およびフェノール化合物含有量を測定し、表** 1-4 **に示した。画分④および⑦の過酸化脂質ラジカル生成抑制活性は、それぞれ** $IPOX_{50}$ **の値が** 0.0001 mg/mL、0.0002 mg/mL **と非常に強く、さらに画分④に関しては、フェノール含量も全画分の中で最も多い成分であった。酢酸エチル抽出物の逆相** HPLC **分画で回収した画分④および⑦を、再び逆相** HPLC **で確認した結果、シングルピークが得られ精製できていると判断できたので、画分④および⑦の同定を行った。**

表 1-3 **酢酸エチル抽出による過酸化脂質ラジカル生成抑制活性** ($IPOX_{50}$) **と総フェノール化合物含量の分配**

サンプル	$IPOX_{50}$ (mg/mL)	**フェノール化合物含量** (mg)
醸造酢	0.03	209
酢酸エチル抽出物	0.001	17
水層	0.03	178

NMR **解析、**LC/MS **による分子量解析および** FT-IR **による構造解析を行った。画分④の** MS **は、主要な** MS **スペクトルとして** m/z; 121 **が検出され、続いて** m/z; 107、108、122 **のイオン化が検出された。このため画分④は、分子量** 120 **前後のフェノール化合物であると考えられた。**^{1}H-NMR ($CDOD_3$, 400 MHz) **の結果、**δ 2.79, 3.76, 6.78, 7.10 **の化学シフトを検出した。また、**^{13}C-NMR ($CDOD_3$, 100 MHz) **の結果、**δ 38.57, 63.75, 115.45, 130.04, 130.43 **の化学シフトを検出した。**^{1}H-NMR **スペクトルについて、**MS **スペクトルデータを参考として種々の置換基の可能性を考察し、**  **由来の化学シフト**: ⊿=7.26+^ I_i **に則って解析を行い、**^{13}C-NMR **のスペクトルについて、**  **由来の化学シフト**: ⊿=128.5+ I_{1j}+ I_{2j}+ I_{3j} **に則って解析した。以上の解析から、画分④は** tyrosol **で**

あると推測した。

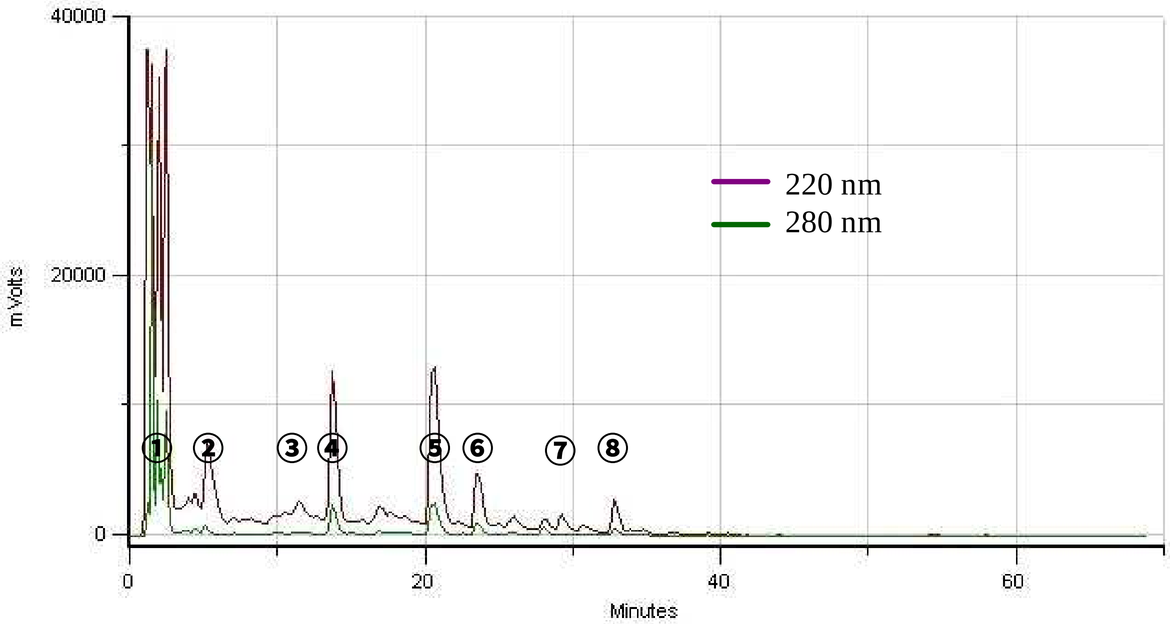


図 1-1　醸造酢の逆相 HPLC クロマトグラム。220 および 280 nm の吸収スペクトルを検出し、① - ⑧までの 8 画分を回収し、総フェノール化合物量および過酸化脂質ラジカル生成抑制活性を測定した。

表 1-4　醸造酢の逆相 HPLC 分画で得られた 8 画分の過酸化脂質ラジカル生成抑制活性($IPOX_{50}$)と総フェノール化合物含量

画分 No. R.T.	① R.T.~5	② R.T.7	③ R.T.11	④ **R.T.14**	⑤ R.T.21	⑥ R.T.23	⑦ **R.T.29**	⑧ R.T.34
フェノール含量 (mg)	15.9	1.4	2.1	**14.1**	3.5	1.9	**1.6**	1.6
$IPOX_{50}$ (mg/mL)	0.02	0.002	0.003	**0.0001**	0.04	0.02	**0.0002**	0.007

また、表 1-5 に示したように Spectral Data Base System (SDBS, 産業技術総合研究所有機化合物のスペクトルデータベース) のスペクトルデータベースともほぼ一致した。そこで市販の tyrosol 試薬の FT-IR による構造解析を行い、画分④の結果と比較した結果、画分④のスペクトルと tyrosol 試薬の FT-IR スペクトルが完全に一致した。さらに、図 1-2 に示したように画分④と tyrosol 試薬の逆相 HPLC 分析によるリテンションタイムが完全に一致した。また、LC/MS 分子量解析も一致した。以上の結果から、画分④を tyrosol と断定した。市販の tyrosol 試薬の過酸化脂質ラジカル生成抑制活性を測定したところ $IPOX_{50}$ の値は 0.0002 mg/mL となり、画分④の $IPOX_{50}$ の値は 0.0001 mg/mL とほぼ同じ値が得られ、米焼酎粕および醸造酢中で主要な高い抗酸化活性物質であると考えられた。

表 1-5　SDBS データベースと画分④の実測値との化学スピンの比較

No.	^{1}H（δ, ppm）実測値	SDBS	^{13}C（δ, ppm）実測値	SDBS
1	—		130.430	
2, 6	7.104	6.933	130.039	
3, 5	6.777	6.668	115.445	
	$J_{2,6、3,5}$ = 8 Hz			No data.
4	—		155.880	
7	2.788	2.607	38.565	
8	3.755	3.531	63.749	

－ は、検出されていない。

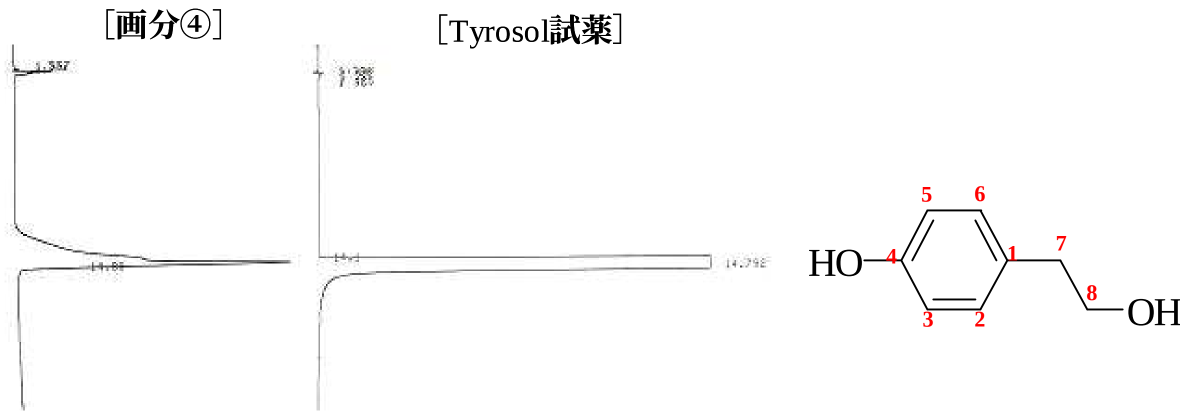


図 1-2　醸造酢から精製した画分④と市販の tyrosol 試薬の逆相 HPLC のリテンションタイム比較 (左図) および tyrosol の化学構造 (右図)。化学構造中の数字は表 1-5 の No.と対応。

同様に、画分⑦の NMR 解析および LC/MS による分子量解析による構造解析を行った。画分⑦の MS は、主要な MS スペクトルとして、m/z; 209 が検出され、続いて m/z; 209、195、151 のイオン化が検出された。このため画分⑦は、分子量 200 前後のフェノール化合物であると考えられた。^{1}H-NMR ($CDOD_3$, 400 MHz) の結果、δ 3.95, 6.38, 6.86, 7.11, 7.23, 7.66 の化学シフトを検出した。^{13}C-NMR ($CDOD_3$, 100 MHz) の結果、δ 55.63, 110.81, 115.31, 115.31, 115.64, 123.20, 126.96, 146.14, 148.53, 149.66, 170.22 の化学シフトを検出した。

以上の解析結果から画分⑦は、桂皮酸の 1 つである ferulic acid と推測した。

表 1-6 に示したように SDBS のスペクトルデータベースともほぼ一致した。さらに、画分⑦と試薬の ferulic acid の逆相 HPLC 分析によるリテンションタイムおよび FT-IR 構造解析を比較した結果、画分⑦のスペクトルと ferulic acid の FT-IR スペクトルが完全に一致した。また、逆相 HPLC のリテンションタイムも完全に一致したため画分⑦は ferulic acid と同定した。

表 1-6　SDBS データベースと画分⑦の実測値との化学スピンの比較

No.	^{1}H（δ, ppm） 実測値	SDBS	^{13}C（δ, ppm） 実測値	SDBS
1			126.964	125.68
2	7.232	7.302	123.196	122.70
3			115.305	115.44
4	—	—	149.659	148.98
5	6.861	6.819	148.531	147.81
6	7.109	7.106 7.524	110.811	111.09
7	7.658 $J_{7, 8a}$ = 15.4 Hz		146.144	144.38
8	6.376	6.396	115.635	115.54
9	—	—	170.216	167.86
OMe	3.949	3.838	55.627	55.59

－ は、検出されていない。

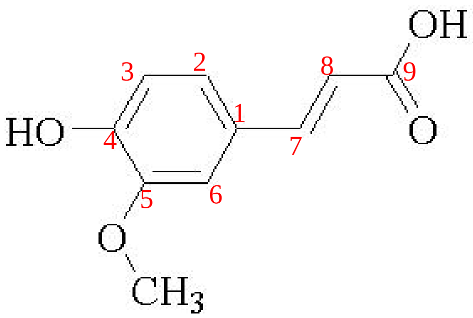


図 1-3　Ferulic acid の化学構造。造化学構造中の数字は表 1-6 の No.と対応。

表 1-7 に示したように、tyrosol は醸造酢に比べて米焼酎粕が多く含有しており、また ferulic acid は醸造酢中の方が多く含有していることがわかった。

表 1-7　米焼酎粕および醸造酢に含まれる tyrosol および ferulic acid の含有量

サンプル	Tyrosol (μg/mg-freeze-dried sample)	Ferulic acid (μg/mg-freeze-dried sample)
米焼酎粕	5.98	0.14
醸造酢	1.87	0.29

1.3.4 ヒト肝細胞がん細胞株 HepG2 への H_2O_2 による酸化ストレスに対する抗酸化活性

米焼酎粕および醸造酢が有する抗酸化活性が生体でも発揮されるかを明らかにするため、はじめに肝細胞 HepG2 を用いて検討した。その際、1.3.3 で精製・同定した米焼酎粕および醸造酢の主要な抗酸化物質と考えられる tyrosol および ferulic acid も合わせて検討した。最初に細胞毒性試験を行った結果、図 1-4 に示したように、米焼酎粕および醸造酢ともに約 2.5 mg/mL まで細胞毒性を示さなかった。また、図 1-5 に示したように tyrosol および ferulic acid も約 200 μM までは細胞毒性を示さなかった。したがって、HepG2 を用いた抗酸化活性試験には、米焼酎粕および醸造酢は 0 - 2.5 mg/mL の範囲で、tyrosol および ferulic acid は 0 – 200 μM の濃度範囲で行うこととした。

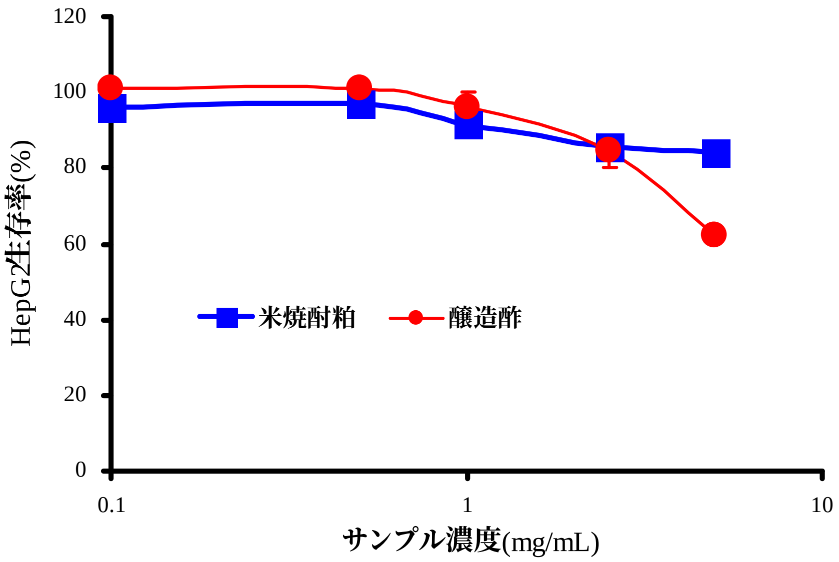


図 1-4　米焼酎粕および醸造酢の HepG2 に対する細胞毒性。平均値 ± SD で表した。

表 1-8 に示したように、1.0 mM H_2O_2 のみを処理した群（control 群）は、脂質過酸化の指標である TBARS 濃度が未処理（normal）よりも有意に増加した。しかし、tyrosol および ferulic acid の処理により、濃度依存的に TBARS 濃度の増加を抑制し、細胞内の GSH 濃度の減少を抑制した。また図 1-5 に示したように米焼酎粕および醸造酢で処理した群は、濃度依存的に TBARS 濃度が control 群よりも有意に減少した。また、表 1-9 に示したように米焼酎粕および醸造酢で処理した群は、有意に GSH 濃度の減少を抑制した。図 1-4 に示したように 2.5 mg/mL 以上の醸造酢処理で

は細胞毒性を示していた。したがって表 1-9 の 2.5 mg/mL の醸造酢では、醸造酢中のフェノール化合物によるラジカル生成により酸化ストレスが生じ GSH が減少し始めたと考えられた。

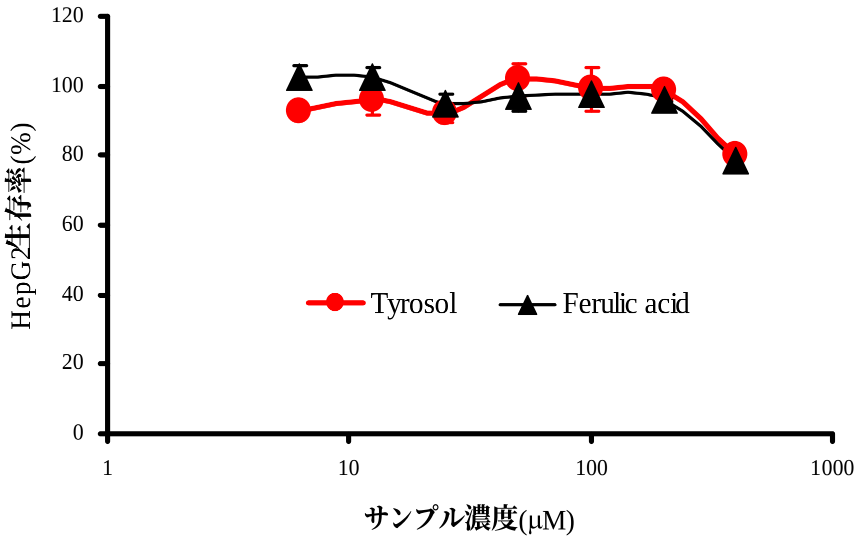


図 1-5 Tyrosol および ferulic acid の HepG2 に対する細胞毒性。平均値 ± SD で表した。

表 1-8 HepG2 への H_2O_2 による酸化ストレスに対する脂質過酸化および細胞内 GSH レベルの減少に対する tyrosol および ferulic acid 処理による抑制効果。表は平均値 ± SD で表した。$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs.* control 群。

試験群	TBARS (nmol/mg-protein)	GSH (nmol/mg-protein)
未処理 (normal)	0.389 ± 0.08	51.1 ± 7.26
1.0 mM H_2O_2 (Control 群)	0.576 ± 0.07	36.8 ± 5.48
25 μM tyrosol+ H_2O_2	0.457 ± 0.04	40.2 ± 1.23
50 μM tyrosol + H_2O_2	0.393 ± 0.05**	41.7 ± 5.93*
100 μM tyrosol + H_2O_2	0.349 ± 0.05**	38.0 ± 6.15
200 μM tyrosol + H_2O_2	0.364 ± 0.05**	44.5 ± 1.97**
25 μM ferulic acid + H_2O_2	0.457 ± 0.05	31.0 ± 7.26
50 μM ferulic acid + H_2O_2	0.384± 0.04**	47.0 ± 8.28*
100 μM ferulic acid + H_2O_2	0.396 ± 0.05**	51.7 ± 7.28*
200 μM ferulic acid + H_2O_2	0.339 ± 0.05**	41.0 ± 4.81

表 1-9　HepG2 への H_2O_2 による酸化ストレスに対する脂質過酸化および細胞内 GSH レベルの減少に対する米焼酎粕および醸造酢の処理による抑制効果。表は平均値 ± SD で表した。$^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs.* control 群。

試験群	TBARS (nmol/mg-protein)	GSH (nmol/mg-protein)
未処理 (normal)	0.28 ± 0.08	63.20 ± 7.26
1.0 mM H_2O_2 (Control 群)	0.66 ± 0.07	39.02 ± 5.48
0.25 mg/mL 米焼酎粕+ H_2O_2	0.38 ± 0.04*	56.48 ± 1.23*
0.5 mg/mL 米焼酎粕+ H_2O_2	0.30 ± 0.05**	58.16 ± 5.93*
1.25 mg/mL 米焼酎粕+ H_2O_2	0.31 ± 0.05**	58.03 ± 6.15*
2.5 mg/mL 米焼酎粕+ H_2O_2	0.22 ± 0.05**	58.84 ± 1.97**
0.25 mg/mL 醸造酢+ H_2O_2	0.38 ± 0.05**	54.66 ± 7.26*
0.5 mg/mL 醸造酢 + H_2O_2	0.27 ± 0.04**	59.78 ± 8.28*
1.25 mg/mL 醸造酢 + H_2O_2	0.25 ± 0.05**	57.20 ± 7.28*
2.5 mg/mL 醸造酢 + H_2O_2	0.29 ± 0.05**	47.26 ± 4.81*

1.3.5 CCl_4 によるマウス急性肝障害モデルを用いた抗酸化活性

米焼酎粕および醸造酢は、ヒト肝細胞がん細胞株 HepG2 に対する抗酸化活性を有していたため、次に、マウスを CCl_4 処理による急性肝障害モデルを用いて検討した。本試験では、米焼酎粕、醸造酢、および精製・同定した中で両者に最も多く含まれている抗酸化物質である tyrosol を用いて行った。

図 1-6 に示したように、CCl_4 を腹腔内に投与する前に米焼酎粕、醸造酢および tyrosol をゾンデにて 5 日間連続経口投与したときの体重変化は、normal 群と比較して有意な差はなかった。そこで、6 日目に CCl_4 の腹腔内投与を行い、抗酸化活性に関する指標を分析した。

図 1-7 に示したように、肝障害の指標となる血清 ALT および AST は、control 群は normal 群と比較して有意に増加した。しかし、米焼酎粕の前投与群では、400 mg/kg 以上の投与で control 群と比較して血清 ALT、AST が有意に減少した。また、醸造酢を前投与した群は、200 – 800 mg/kg の投与で control 群と比較して血清 ALT、AST が有意に減少した。100 μmol/kg の tyrosol 投与においても、control 群と比較して血清 ALT、AST が有意に減少した。さらに、図 1-8 に示したように CCl_4 のみ処置した control 群の肝臓中の過酸化脂質である TBARS 濃度は normal 群と比較して有意

に増加した。しかし、米焼酎粕および醸造酢を 200 – 800 mg/kg で前投与することにより、肝臓中の TBARS 濃度が減少した。100 µmol/kg の tyrosol の投与においても、control 群と比較して TBARS 濃度が有意に減少した。以上の結果から、米焼酎粕、醸造酢および tyrosol の前投与により、有意に急性肝障害の反応を抑制できることがわかった。

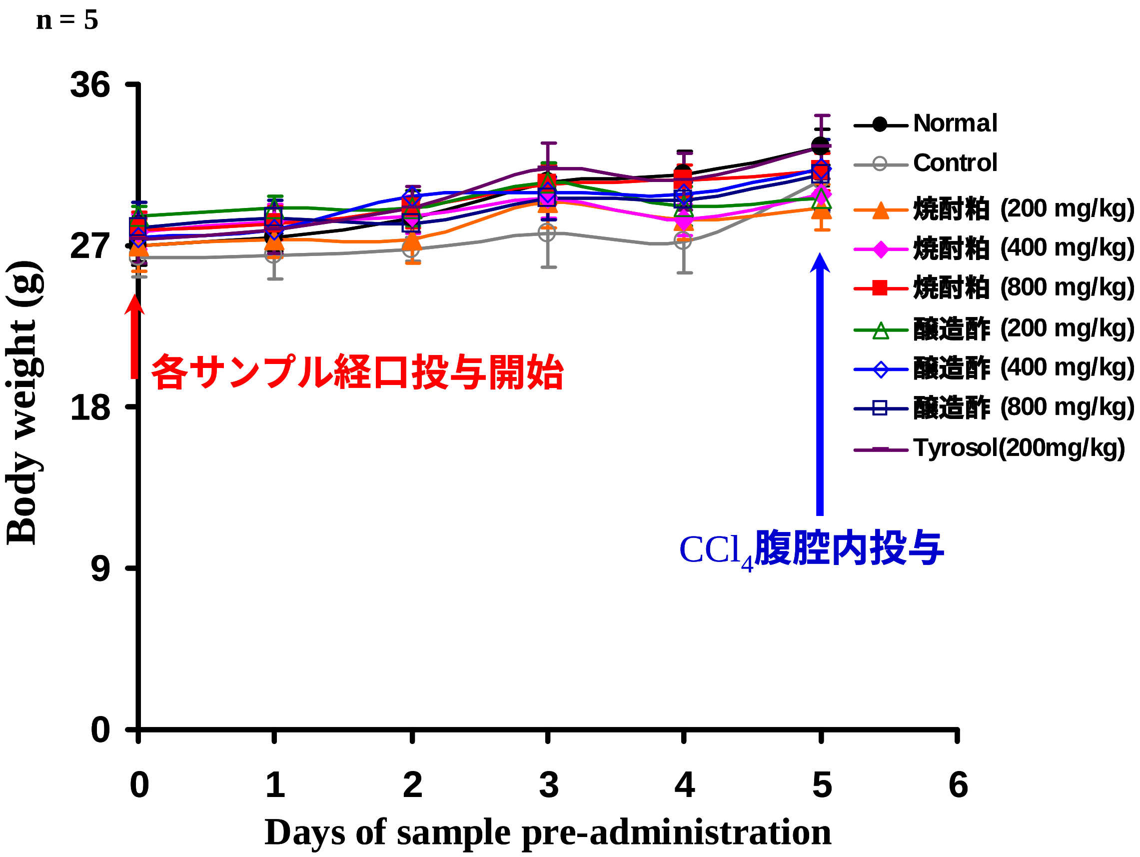


図 1-6　各サンプルの 5 日間連続経口投与によるマウス体重変化。5 週令の雄性 ddY マウスを米焼酎粕、醸造酢および tyrosol をゾンデにより 5 日間の連続経口投与を行った。Normal および control 群は生理食塩水のみを経口投与した。

GSH は、酸化ストレスに対して細胞を保護する役割を持った主要な細胞内抗酸化物質である。図 1-9 に示したように、CCl_4 のみ処置した control 群は、normal 群と比較して顕著に GSH 濃度が減少していた。しかし、400, 800 mg/kg の米焼酎粕の前投与によって、GSH 濃度が有意に増加した。また、醸造酢は 200 – 800 mg/kg の前投与によっても有意に増加した。100 µmol/kg の tyrosol の投与においても、control 群と比較して有意に増加した。GSH 関連酵素として GSH Px および GSH Rd の活性を測定した結果、図 1-10 に示したように、CCl_4 のみ処置した control 群ではそれぞれ約 70%, 約 50%に低下した。しかし、GSH Px 活性は、400, 800 mg/kg の米焼酎粕の前投与によって有意に上昇し、800 mg/kg の醸造酢の前投与によっても有意に上昇した。さらに、GSH Rd 活性は、400, 800 mg/kg の米焼酎粕の前投与によって有意に上昇し、醸造酢の前投与によっても傾向的に活性が上昇した。100 µmol/kg の tyrosol の投与では、control 群と比較して増加する傾向を示した。

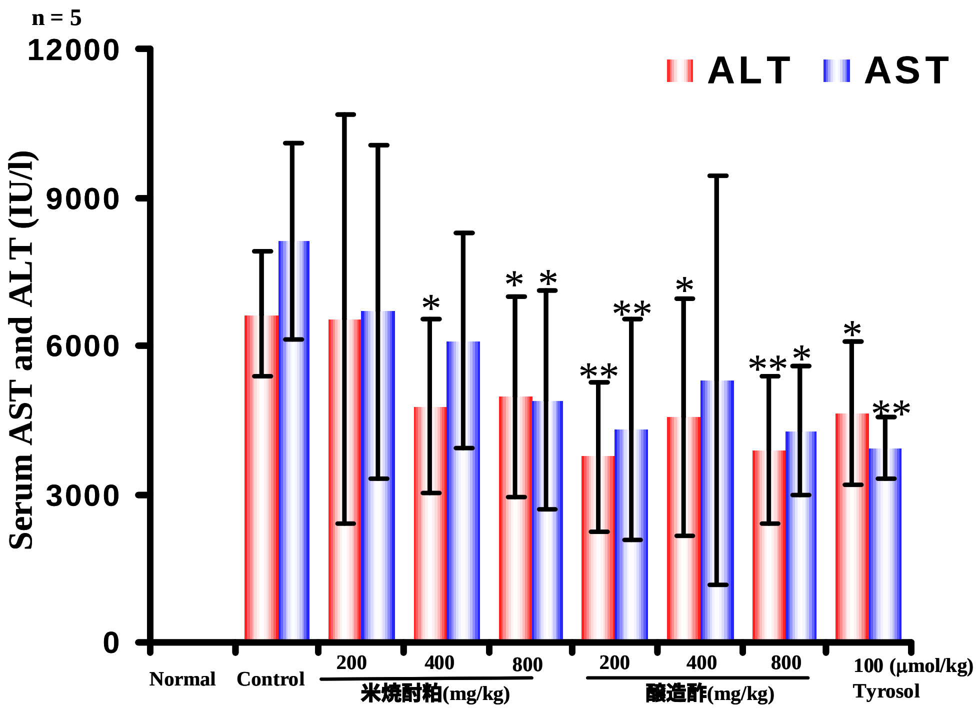


図 1-7　CCl_4 を腹腔内に投与した 20 時間後の各群の血清中の ALT および AST。各サンプルを 5 日間連続経口投与し、6 日目に 10% (v/v)CCl_4/大豆油を腹腔内に投与した。血清中の AST および ALT の活性を測定した。平均値 ± SD で表した。*P < 0.05, ** P < 0.01 *vs.* control 群。

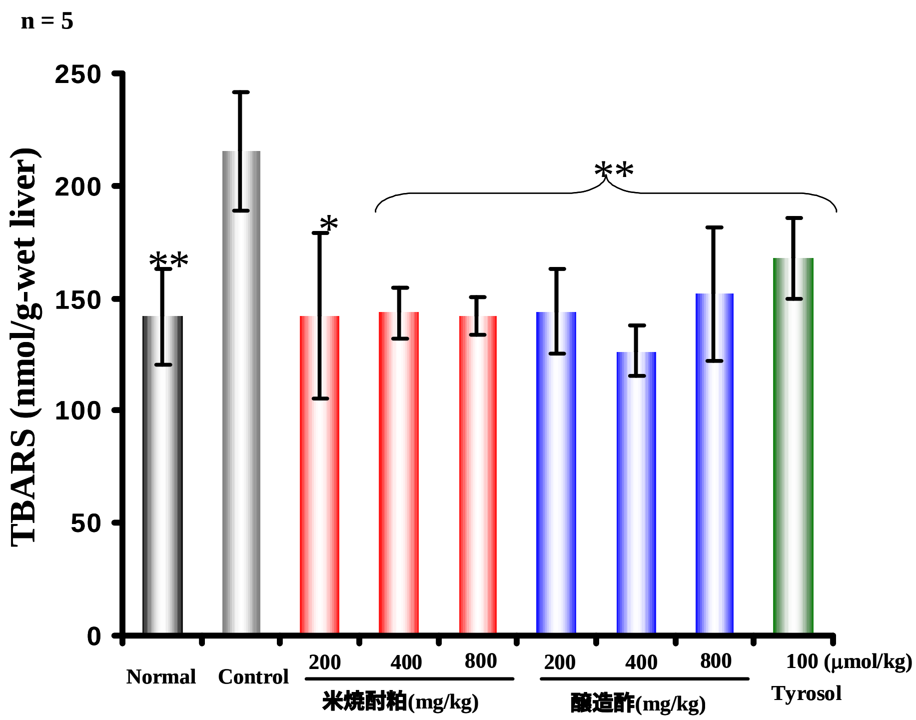


図 1-8　CCl_4 を腹腔内に投与した 20 時間後の各群における肝臓中の過酸化脂質濃度。各サンプルを 5 日間連続経口投与し、6 日目に 10% (v/v)CCl_4/大豆油を腹腔内に投与した。肝臓の過酸化脂質を測定した。平均値 ± SD で表した。*P < 0.05, ** P < 0.01 *vs.* control 群。

n = 5

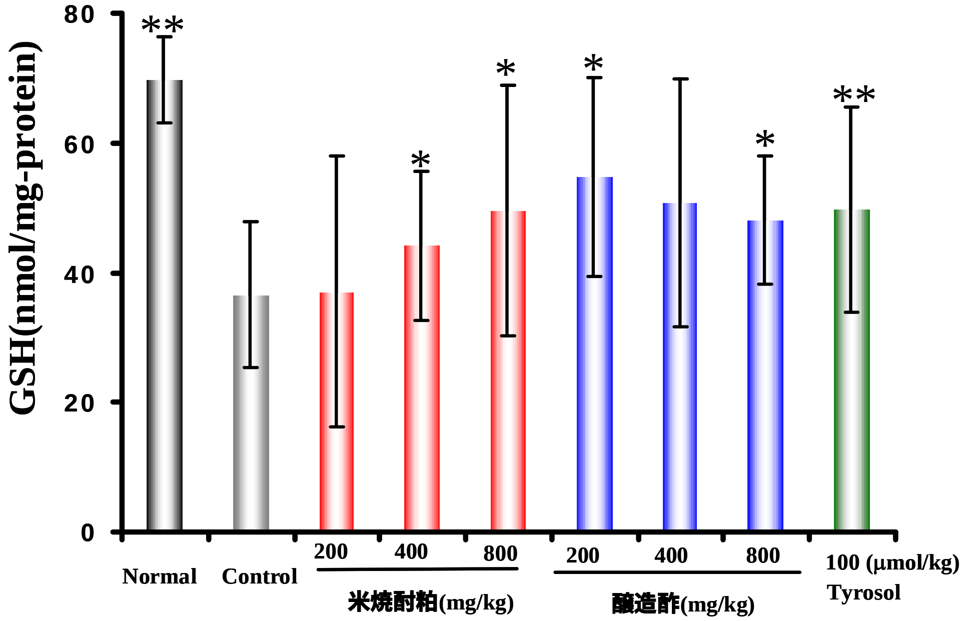


図 1-9　CCl_4 を腹腔内に投与した 20 時間後の各群における肝臓中の GSH 濃度。各サンプルを 5 日間連続経口投与し、6 日目に 10% (v/v)CCl_4/大豆油を腹腔内に投与した。20 時間後、肝臓中の GSH 濃度を測定した。平均値 ± SD で表した。*$P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs.* control 群。

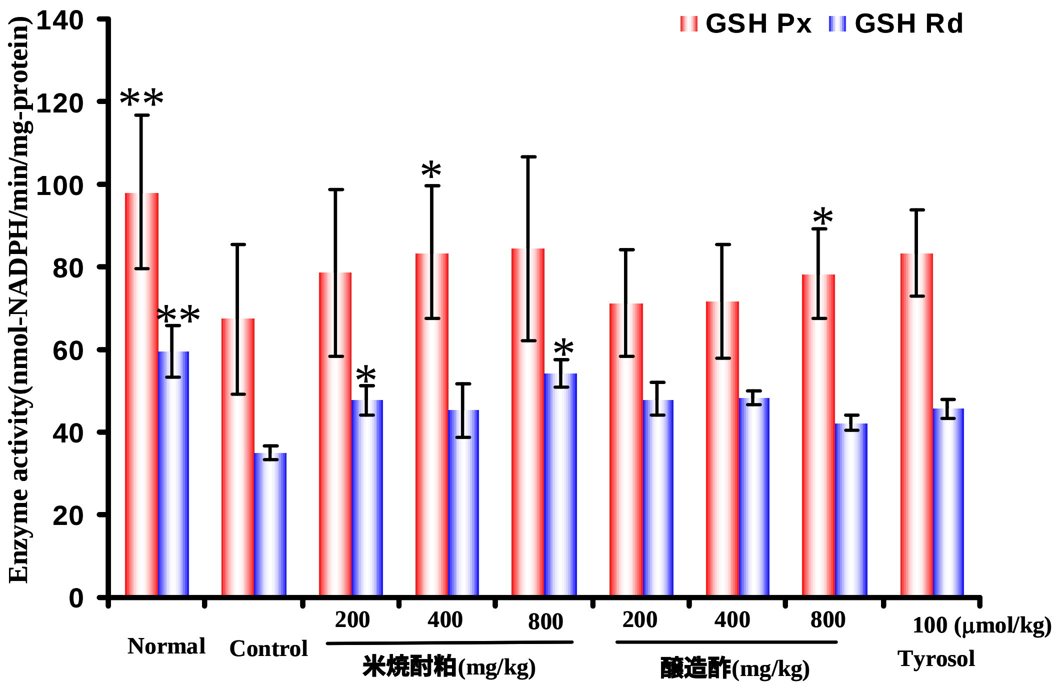


図 1-10　CCl_4 を腹腔内に投与した 20 時間後の各群における肝臓中の GSH Px および GSH Rd 活性。各サンプルを 5 日間連続経口投与し、10% (v/v)CCl_4/大豆油を腹腔内に投与した後の GSH Px および GSH Rd 活性。平均値 ± SD で表した。*$P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *vs.* control 群。

表 1-7 に示したように、100 μmol/kg の tyrosol の投与は、米焼酎粕および醸造酢を 800 mg/kg 投与した中に含まれている tyrosol よりも約 3 倍多いことになる。100 μmol/kg の tyrosol の投与群は、急性肝障害による ALT および AST、過酸化脂質の度合いである TBARS の増加を抑制した。さらに、肝中の GSH 濃度は、米焼酎粕および醸造酢と同様に高い濃度を維持できた。以上の結果から、米焼酎粕および醸造酢の投与量の違いによる効果の差は、tyrosol の投与量に関係していると考えられた。しかし、tyrosol の単独投与では、GSH 関連酵素の酵素活性が増加しておらず、GSH Px では 400, 800 mg/kg の米焼酎粕の前投与によって有意に上昇し、800 mg/kg の醸造酢の前投与により有意に上昇した。さらに、GSH Rd では 400, 800 mg/kg の米焼酎粕の前投与によって有意に上昇したことから、ferulic acid などの tyrosol 以外の抗酸化物質による相乗的な作用が働いていると考えられた。

Tyrosol は LDL の酸化を抑制し[40, 41]、ferulic acid は AOM により引き起こされる大腸がんの発がんを抑制すると報告されている[42]。また、phytochemicals を摂取することにより、ラジカルが原因と考えられるがん、動脈硬化や心疾患などのリスクを下げることが報告されている[43, 44]。Liu らは、抗酸化物質の相乗的な効果が、強い抗酸化活性や抗がん活性を示し、いろいろな抗酸化物質を含む果物や野菜自体を接種することがもっとも効果的と報告している[45-47]。

焼酎粕から製造した醸造酢は、抗酸化活性を有する食品である。Sasaki らは、芋焼酎粕が DMBA による乳がん発がんを抑制したことを報告している[48]。本章で、優れた抗酸化物質を焼酎粕から初めて同定し、生体内でも抗酸化活性を有することを明らかにした。Tyrosol および ferulic acid を含む焼酎粕から製造した醸造酢を摂取することで、ラジカルが原因と考えられるがんや心疾患などのリスクを軽減できる可能性があると考えられた。

1.4 要約

本章では、焼酎粕中の抗酸化活性物質の精製・同定を行った。その結果、焼酎粕および醸造酢中には抗酸化物質である tyrosol および ferulic acid が含まれていることを明らかにした。Tyrosolo は酵母のエタノール発酵過程で tyrosol が生成することとの報告があり[49]、また ferulic acid は米に含まれることが知られている。米焼酎粕および米焼酎粕から製造した醸造酢に含まれる抗酸化活性物質として、発酵過程で生成する tyrosol や原料由来の ferulic acid が主要な抗酸化活性成分であることがわかった。

また、焼酎粕および焼酎粕から製造した醸造酢が細胞およびマウスレベルで抗酸化活性を有することを明らかにした。HepG2 に対して、酸化ストレスである H_2O_2 による細胞障害を与える試験で抗酸化活性を評価した結果、脂質過酸化を抑制し、生体内の抗酸化に重要な役割を示す GSH の酸化ストレスによる減少を抑制した。さらに、CCl_4 の肝代謝によるラジカル生成を介した肝障害動物実験モデルでの検討を行った結果、米焼酎粕および醸造酢は、肝代謝により生じるラジカルを消去することや、生体内の抗酸化システムを強めることにより肝臓の脂質過酸化を抑制することで CCl_4 による肝障害を保護することを明らかにした。

第 2 章　醸造酢のアポトーシス誘導活性評価およびアポトーシス誘導活性物質の同定

2.1　緒言

がんの発症には複数の原因が複雑に関与していると言われており、がん治療には主に抗ラジカル、免疫およびアポトーシスの観点からのアプローチが現代医学では注目されている。アポトーシスは、発生、免疫またはがん細胞の除去など生体の恒常性維持に欠かせない生理機能である [50-55]。たとえば、オタマジャクシがカエルになる際の尻尾の切断はアポトーシスよるものである。また、免疫担当細胞である T 細胞の脾臓中での発育の際、未熟 T 細胞の排除はアポトーシスによる機能である。さらに生体は、不要になった細胞や変異を受けた細胞にアポトーシスを誘導して除去させる機能を持っている（図 2-1）。臨床の場で一般に用いられている抗がん剤のほとんどは、がん細胞にアポトーシスを誘導して効果を発揮するものである。最近、食品中にもがん細胞にアポトーシスを誘導する物質が多数みつかっている [56-61]。たとえば、緑茶中のカテキン種は U937 細胞に対してさまざまな濃度でアポトーシスを誘導する [62]。また，キャベツやブロッコリに含まれるインドール-3-カルビノールやイソチオシアネートはヒト直腸がん細胞に対してアポトーシスを誘導する [63-65]。このような生理活性成分を含む食品を摂取している地域では、がんの発症が少ないという疫学データがある [66, 67]。

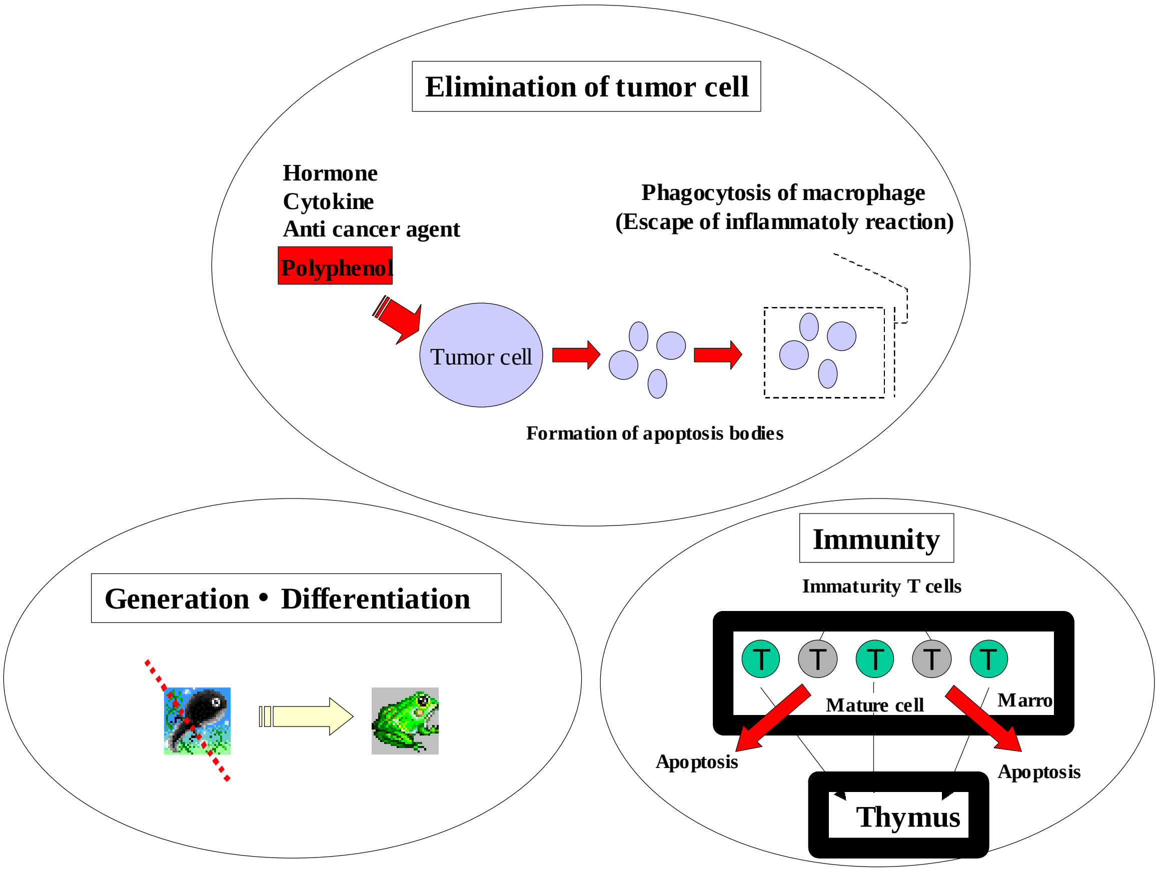


図 2-1　アポトーシスの機能

醸造酢のアポトーシス誘導物質については多くの報告がある。すなわち、黒酢の酢酸エチル抽出画分が Caco-2 細胞に対して G_0/G_1 arrest を起こすことによって誘導すること[68]や、奄美大島で採取されたキビ酢の 40%メタノール抽出画分が HL-60 細胞などに対して効果をもつこと[69]などが報告されている。しかしながら、これらの報告は全て、さまざまな成分が含まれている混合物としての効果であり、単一成分を精製してアポトーシス誘導活性が評価した例はない。

第２章ではアポトーシスに着目し、醸造酢のアポトーシス誘導活性、アポトーシス誘導物質の精製・同定、生成機構、およびアポトーシス誘導のメカニズムについて検討した。

2.2　材料および方法

2.2.1　酢酸エチル抽出

各試料 100 ml に酢酸エチル 100 ml を添加し、シェーカー（ELEYA）で 20 分間攪拌した。水層と酢酸エチル層を分取した後、水層画分を用いて同様の操作を 2 回繰り返した。酢酸エチル層をエバポレータで乾燥処理した後、フリーズドライヤーで凍結乾燥処理した。乾燥物を水：エタノール=50：50 の溶液１ml で溶解後、不溶物を遠心分離（15,000 rpm, 5 min, 4℃）により除き、メンブレンフィルター（0.45μm　アドバンテック）で濾過した。

2.2.2　培養細胞

単核球性白血病細胞（U937）は財団法人 ヒューマンサイエンス研究資源バンク（大阪）より購入した。U937 細胞は 10%ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地（和光）で 5% CO_2、37℃条件下で培養した。

2.2.3　細胞毒性試験

サンプルの U937 細胞に対する細胞毒性は WST-8 試験により評価した。96 穴マイクロプレートに 1×10^6 cells/ml になるように細胞を撒き、サンプルを添加して 5% CO_2、37℃条件下で 12 h 保温した。WST-8 試薬（キシダ化学）を添加した後、37℃で２ h 保温し、マイクロプレートリーダー（ナルジェヌンクインターナショナル）で 490 nm の吸光度を測定した。

2.2.4　DNA 断片化能の確認

24 穴マイクロプレートに 1×10^6 cells/ml になるように細胞を撒き、試料を添加して 12 時間インキュベートした。DNA の抽出は Ishizawa らの方法[70]に従った。細胞を遠心分離（10,000 rpm, 5 min, 4℃）により集めた後、上清を除き、DNA 抽出バッファー（0.05% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 6M NaI）およびプロテアーゼ K（1 mg/ml）を添加して 37℃で 1 h 保温した。イソプロパノールにより染色体 DNA を沈殿させ、50%イソプロパノールで洗浄後に 50 μl の TE 緩衝液（10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA）に溶解した。DNA は 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動され、エチジウムブロマイド染色後、トランスイルミネータ（FASⅢ, 東洋紡）により可視化された。

2.2.5　フローサイトメトリー解析

アポトーシス誘導細胞を検出するためのフローサイトメトリー解析は Annexin-V-FLUOS Staining Kit を用いた[71)]。サンプルで処理された U937 細胞（１$\times 10^6$ cells）は、200 x*g* で 5 min 遠心分離して沈殿させた。PBS で沈殿を洗浄した後、100 µ l の Annexin-V-FLUOS ラベリング液（FITC でラベルされた Annexin-V と PI を含んでいる）に溶解した。室温に 15 min 放置した後、細胞は Cyto ACE（Jasco, 東京）に供じた。蛍光は FL1: 基底 488 nm, 励起 530 nm（FITC ラベル Annexin-V）および FL3: 基底 488 nm, 励起 600 nm（PI）で検出した。データは Cytoflow-300 分析プログラムで処理された。アポトーシス誘導細胞の全体における割合は、初期のアポトーシス細胞（Annexin-V 陽性および PI 陰性）の全体における分布量で計算した。

2.2.6　正常白血球細胞の単離

PBS（-）　で 2 倍希釈した採血後の血液 10 ml を、リンフォセパール溶液 10 ml 上に重層した。室温で 400 x*g*、30 min 遠心分離した後、中間層の白血球を別のチューブに移した。白血球液を PBS（-）　で２倍に希釈し、室温で 400 x*g*、30 min 遠心分離して白血球を沈殿させた。単離した正常白血球細胞は 10%FBS、抗生物質および 2%フィトヘマトグルチニン（PHA）-M を含有した RPMI 1640 培地で培養した。

2.2.7　HPLC の条件

黒大豆煮汁醸造酢・酢酸エチル抽出層の HPLC 分画はギルソン高速液体クロマトグラフィーシステム（Gilson, 東京）を用いて以下の条件で行った。

カラム：L-Column™（(財）化学物質評価研究機構：20 mm i.d × 250 mm）

移動相 A；　超純水：メタノール：5N 塩酸（89.9 : 10 : 0.1, v/v）

移動相 B；　超純水：アセトニトリル：5N 塩酸（49 : 50 : 0.1, v/v）

	A	B
0- 10 分：	100%	0%
10- 80 分：	60%	40%
80-100 分：	0%	100%
100-120 分：	0%	100%
120-135 分：	100%	0%

カラム温度：　30℃

流速： 10 ml/min

検出波長：　220, 280 nm

時間：　135 min

2.2.8　構造解析

Compound-6 の構造は，吸光度計（UV/VIS)、質量分析装置（ＭＳおよびＦＡＢ-ＭＳ）および磁気共鳴装置（NMR）を用いて解析された。機器名は以下に示す。

吸光度計：UV-1700 UV（島津製作所，京都）
質量分析装置：Lcmate (JEOL，東京；positive, APCI)
磁気共鳴装置：^{1}H- and ^{13}C-NMR UNITY INOVA (VARIAN，東京；Oxford AS 400)

データはスペクトルデーターベースシステム (SDBS, AIST)と比較されて実証された。

2.2.9　試料中の Compound-6 含量の測定

各試料中の Compound-6 含量は、2.2.1 に従って酢酸エチル抽出した後、HPLC を用いて 74 min の溶出ピークを既知濃度のトリプトフォールのピーク面積と比較し、下記の計算式からトリプトフォール換算値を求めた。

ピーク面積　／既知濃度トリプトフォール（0.1 mg/ml）のピーク面積　×　0.1 ×100 (g)
　＝　試料 100 g 中の Compound-6 含量（mg）

また、Compound-6 の確認は、本ピーク画分を分取し、凍結乾燥後に MS 解析まで行った。なお、Compound-6 の MS スペクトルは m/z : 130, 144, 161 である。

2.2.10　発酵試験

蒸留水 100 ml、米麹 15 g および酒母（5×10^{8} cells/ml)、または最少培地（MM 培地：yeast nitrogen base w/o aminoAcids 1.7 g，硫酸アンモニウム 5 g/*l*，D-グルコース 20 g/*l*）を 100 ml、トリプトファンを 0.04 mg、および酒母（5×10^{8} cells/ml）を混合し、30℃で 2 日間静置培養した。遠心分離（3,000 rpm，5 min，4℃）した上清を酢酸エチル抽出し、HPLC で分析した。

2.2.11　カスパーゼ活性測定

カスパーゼ 3, 8,および 9 の酵素活性測定は Caspase Colormetric Protease Assay Kit (医学生物学研究所)を用いた。U937 細胞を 100 μ Mの Compound-6 で 24 h 処理した後、遠心分離により細胞を集め，PBS で洗浄した。キットに付属の溶解バッファーで細胞を破壊した後、遠心分離（15,000 ×g, 10 min, 4 度）により不溶性物質を除去し、その上清を細細胞質抽出液とした。基質ペプチド（IETD-, LEHD-，および DEVE-*p*-ニトロアニリド（*p*NA)）を含む反応混合液、細胞質抽出液（50 μ gタンパク質分）および反応緩衝液を 96 穴マイクロプレート内で混合し、37℃に保温した。それぞれのカスパーゼ活性はマイクロプレートリーダーを用いて 600 nm の吸光度を測定することによって評価した。

2.2.12　ウエスタンブロット解析（Western blotting; WB）

100 μ Mの Compound-6 で 24 h 処理した U937 細胞および無処理の U937 細胞を遠心分離（3,000 rpm, 10 min, 室温）により集め、PBS で 2 回洗浄した後、溶解バッファー（WB 用；50 mM Tris HCl（PH 7.5）,150 mM NaCl, 0.1% (w/v) SDS, 1% (w/v) トリトン X-100, 1% (w/v) deoxycholic acid, 1 μg/ml アプロチニン, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride）で細胞を破壊し、遠心分離により不破壊物を除いた。細胞溶解液を SDS 変性バッファー（125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 4% (W/V) SDS, 0.1 g/ml スクロース, 0.1 mg/ml ブロモフェノールブルー）に混合し、100℃で 5 分保温した。タンパク質濃度は BCA タンパク質アッセイキット（ピアース）用いた。50 μ gのタンパク質を SDS 緩衝液（25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 192 mM グリシン, 1% (w/v) SDS）を用いて 10% SDS-PAGE ゲル電気泳動により分離した。泳動後、トランスファーバッファー（25 mM Tris-HCl (pH 8.9), 192 mM グリシン, 10% (v/v)メタノール）を用いて PVDF メンブレンへタンパク質を転写させた。0.3% スキムミルクで室温 1 h ブロッキングしたメンブレンを、1/1000 希釈した 1 次抗体（Table 6-1）添加で 4℃で 1 h 保温した. メンブレンを TBST（Tris buffered saline Tween-20; 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.1% (w/v) Tween-20）で 3 回洗浄し，HRP でラベルされた 2 次抗体（1/10,000 希釈）を用いて 1 h 室温で保温した。メンブレンを TBST で 3 回洗浄した後、化学蛍光試薬（ECL）で検出した.

2.2.13　免疫沈降（Immuno precipipation; IP）

100 μ Mの Compound-6 で 12 h 処理した U937 細胞および無処理の U937 細胞を遠心分離により集め、PBS で 2 回洗浄した後、溶解バッファー（IP 用；20mM Tris HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1%（w/v）トリトン X-100, 1% (w/v) deoxycholic acid, 1 μg/ml アプロチニン, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride）で細胞を破壊し、遠心分離により不破壊物を除き、細胞抽出液とした。5 μ の ProteinG-Sepharose（アマシャム）ビーズと 2 μ の抗体を混合した後、室温で 2 h 保温してビーズ-抗体複合体を作製した。ビーズ-抗体複合体と細胞抽出液を混合した後、4℃で 24 h 保温してビーズ-抗体-タンパク質複合体を形成させた。ビーズ-抗体-タンパク質複合体溶液に SDS 変性バッファーを混合し、100℃、5 min で変性させた後、SDS-PAGE および WB 解析に供じた。

2.2.14　Total RNA の抽出と mRNA (poly $(A)^+$ RNA)精製

U937 細胞からの total RNA 抽出には Catrimox-14 RNA Isolation Kit ver 2.11（タカラバイオ）を用いた。$1×10^5$ cells の細胞を PBS（−） で 2 回洗浄した後、細胞を 500 μ の Catrimox-14 で溶解した。20 min、室温で放置した後、遠心分離（3,000 rpm, 5 min）した。沈殿を DEPC 水で 1 回洗浄した後、遠心分離（10,000 rpm, 2 min, 4℃）し、沈殿を 2 M 塩化リチウム溶液を 1 ml で溶解した。氷上で 2 時間以上放置した後、遠心分離（15,000 rpm, 20 min, 4℃）した。沈殿させた RNA を適当な量の DEPC 水で溶解して total RNA 溶液とした。total RNA からの mRNA の精製には Oligotex−dT30™ (super)（タカラバイオ）を用いた。50 μ gの toal RNA 中の mRNA をオリゴテックスにアニ− リングさせ、洗浄液で洗浄後、溶出液により mRNA をオリゴテックスから溶離させた。

2.2.15 RT-PCR

100 μ Mの Compound-6 で処理された U937 細胞、無処理の U937 細胞および正常白血球細胞から抽出した 1 μ gの total RNA を RT-PCR へ供じた。RT-PCR は SuperScript™ One Step RT-PCR for Long Template（インビトロジェン）を用いて RT 反応（50℃, 50 min）を行った後、変性（94℃, 30 sec）、アニ－リング（57℃, 30 sec）、伸長（72℃, 30 sec）を 35 サイクル行った。増幅された DNA は 3% アガロースゲルを用いて電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色し、トランスイルミネータで検出した。

2.2.16 ノーザンブロット解析

上記の方法で抽出した total RNA（20 μ g）を、0.8%アガロース/5%ホルムアルデヒドゲルを用いて電気泳動した後、ナイロンメンブレン（アマシャム）へ転写した。プローブは、pT7Blue にサブクローニングされた全長 DcR1 を鋳型にして、PCR 反応（変性（94℃, 30 sec）、アニ－リング（55℃, 30 sec）、伸長（72℃, 30 sec））により DcR1 cDNA 断片を増幅して用いた。DcR1 増幅断片は、DIG ハイプライムキット（ロシュ）により標識した。RNA をナイロンメンブレンに転写し、DIG ラベルしたプローブを用いてハイブリダイゼーションした。DIG をアルカリホスファターゼ標識した DIG 抗体により反応させ、アルカリホスファターゼの検出は CDP Star, ready to use（ロシュ）を用いて行った。

2.2.17 DcR1 および DcR2 のサブクローニング

(1) DcR1 および DcR2 全長 cDNA の PCR 増幅と平滑末端処理

アンビオン社の Human lung total RNA を鋳型にして、DcR1 および DcR2 の全長増幅用プライマーを用いて上記した条件で RT-PCR を行った。DcR1 は全長増幅用プライマーで全長 cDNA を増幅することができたが、DcR2 は増幅することができなかったため、fusion PCR を行った。プライマーを用いて全長を二つに分けて増幅後、カラム精製によりプライマーを除去した。二つの断片を等量ずつ混合して鋳型 DNA とし、全長増幅用プライマーを用いて fusion PCR を行うことにより DcR2 全長 cDNA を得た。増幅した DcR1 および DcR2 の全長 cDNA 断片は、BLK キット（タカラバイオ）により末端の平滑化を行った。

(2) pTriEX™-4 Neo の制限酵素処理と脱リン酸化

タンパク質発現用ベクターpTriEX™-4 Neo（Novagen）10 μ gを制限酵素 *Psh*A1 で 37℃、1 h 処理した。酵素処理した DNA 断片をエタノール沈殿により濃縮し、脱リン酸化酵素（BAP; Bacterial Alkaline Phosphatase）により pTriEX-Neo の 5€リン酸を除去した。

(3) 平滑末端クローニング

RT-PCR により増幅した DNA 断片は、あらかじめ pT7Blue（ノバジェン）に TA クローニングによりサブクローニングした。なお、大腸菌コロニーのブルーホワイトセレクションには基質として Blugal（5-Bromo-3-indolyl-β-D-galactoside；和光純薬工業）を用いた。pT7Blue に挿入された

目的遺伝子を各種プライマーを用いて PCR 増幅し、その DNA 断片を Takara Blunt end Kit（タカラバイオ）により平滑末端処理した。平滑末端処理した DNA 断片を 16℃1 h のライゲーション反応によりベクター（制限酵素（*Psh*A1）処理した pTriEX^{TM}-4 Neo）へ連結し、大腸菌（DH-5v）に形質転換した。形質転換された大腸菌をアンピシリンナトリウム（100 mg/*l*；和光純薬工業）を含む LB 寒天培地（トリプトン 10 g/*l*，酵母エキス 5 g/*l*，塩化ナトリウム 10 g/*l*，寒天 17.5 g/*l*）に塗末し、37℃で一晩培養した。挿入断片の確認はコロニー・ダイレクト PCR 法により行った。塩基配列は Beckman SEQ システムを用いて決定した。決定した塩基配列の相同性検索は NCBI Blast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast）を利用した。全長の DcR1 cDNA を挿入した pTriEX^{TM}-4 Neo プラスミドを DcR1/pTriEX4 Neo とした。

2.2.18　DcR１の大腸菌（Origami BL2 (DE3) placI）での発現とカラム精製

DNA 断片をクローニングした各ベクターを発現用大腸菌（Origami BL2 (DE3) placI，ノバジェン）へ形質転換した。形質転換された大腸菌をアンピシリンナトリウム（100 mg/*l*）を含む LB 寒天培地（トリプトン 10 g/*l*，酵母エキス 5 g/*l*，塩化ナトリウム 10 g/*l*，寒天 17.5 g/*l*）に塗末し、37℃で一晩培養した。生育した単一コロニーを LB 液体培地 100 ml へ植菌した。37℃で OD_{600} が 0.5〜1.0 になるまで培養した後、50 ml づつ 2 本の三角フラスコに分け、片方に最終濃度が 1 mM になるように 100 mM IPTG （Isopropil-β-D(-)-thiogalactopyranoside；和光純薬工業）を添加した。37℃で 3 h 培養した後、両菌液を遠心分離（3,000 x*g*, 10 min, 室温）により集菌し、沈殿を 20 mM Tris-HCl（pH 8.0）で洗浄後、菌体を超音波破砕した。不破壊物を遠心分離（15,000 x*g*, 10 min，4℃）により除き、その上清を細胞抽出液とした。また、発現タンパク質は，細胞抽出液を His MicroSpin Purification Modul（アマシャム）により精製した。10 μｇの細胞抽出液および 0.1 μｇの目的のタンパク質を SDS-PAGE で分離し、His-tag 抗体（アマシャム）を用いてウエスタンブロット解析により確認した。

2.2.19　U937 細胞へのトランスフェクションと β-gal アッセイ

(1)　トランスフェクション

インビトロジェン社の Lipofectamin^{TM} 2000 を用いてリポフェクション法により一過的なトランスフェクションを行った。トランスフェクションにはゲノムに組み込まれ安定に発現させる方法（Stable expression）と細胞質内で一過的に発現させる方法（Transient expression）があるが、今回は一過的な発現方法を用いた。Lipofectamin 溶液 2 μl および 1 μg の DNA をそれぞれ RPMI 1640 溶液（血清および抗生物質不含）50 μl に溶解し、10 min 室温に放置した後、これらを混合した。20 min 室温に放置した後、U937 細胞（1×10^5 cells/ml）を RPMI 1640 溶液（血清および抗生物質不含）で培養した 24 穴プレートに添加し、12 h，37℃，5%CO_2 条件下で培養した。RPMI 1640 溶液（血清含）に培地交換し、24 h 培養した後に各試験に用いた。

(2)　β-gal アッセイ

インビトロジェン社の β-gal assy kit を用いて、U937 における目的遺伝子の発現を確かめるため

に β-gal assy を行った。β-gal コントロールプラスミドをトランスフェクションした細胞を Lysis バッファーに溶解し、凍結融解により細胞を破壊した。遠心分離（15,000 rpm, 10 min）し、細胞非破壊物を除いた上清を細胞抽出液として用いた。β-gal 活性は、基質である ONPG（*O*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside）が加水分解されて生成された ONP（*O*-nitrophenol）の吸光度（420 nm）を測定することにより求めた。

2.3　結果

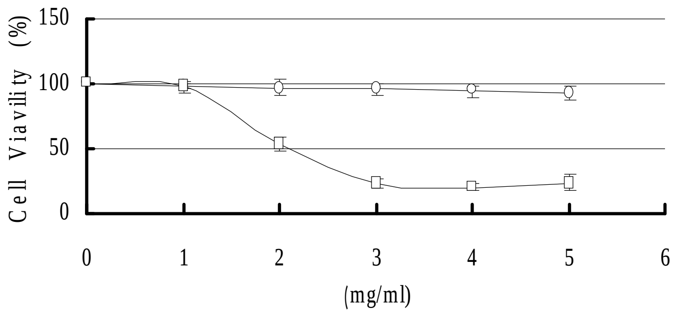
2.3.1　醸造酢の各抽出画分の U937 細胞に対する細胞毒性およびＤＮＡ断片化能

醸造酢の酢酸エチル抽出画分（EBV 画分）と水層画分の U937 細胞に対する細胞毒性を調べた。図 2-2 に示したように、U937 細胞の生存率は酢酸エチル画分の培養液への添加によって濃度依存的に減少した。一方、水層画分では影響は見られなかった。したがって、醸造酢の U937 細胞に対する細胞毒性は酢酸エチル層に依存していることがわかった。

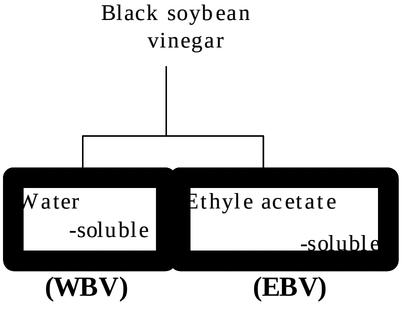
2.3.2　アポトーシスの検出

図 2-3 に示されるように、EBV 画分は、濃度依存的および時間依存的に U937 細胞に対して DNA の断片化を誘導した。また、EBV 画分は顕微鏡観察において 10 mg/ml の濃度でアポトーシス小体が観察された（図 2-4）。さらに、フローサイトメトリー解析において、10 mg/ml の EBV 画分で 12 h 処理した U937 では、Annexin-V 蛍光が増加した(図 2-5)。これらの結果は、EBV 画分が U937 細胞に対してアポトーシスを誘導していることを示している。

A



B



Abbreviations

図 2-2　醸造酢を分画して得た各画分の U937 細胞に対する増殖毒性試験結果

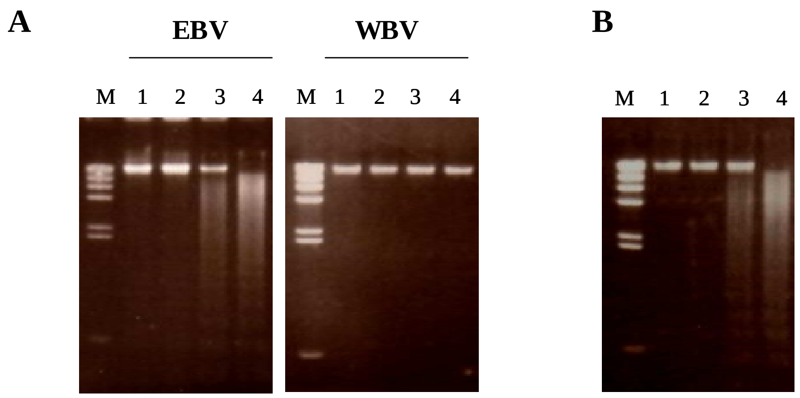


図 2-3　醸造酢各画分の DNA 断片可能

A, 0 mg/ml (lane 1); 1 mg/ml (lane 2); 5 mg/ml (lane 3); 10 mg/ml (lane 4).

B, 10 mg/ml EBV 処理における 0 h (lane 1); 4 h (lane 2); 12 h (lane 3); 24 h (lane 4); M, λDNA digested *Hind*III.

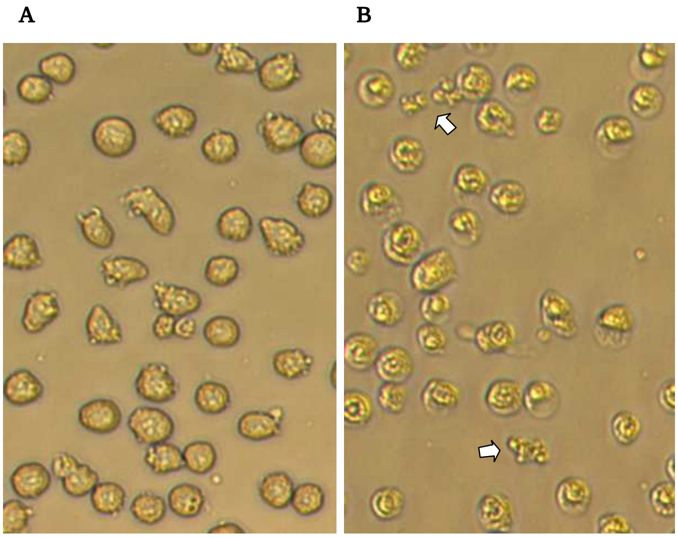


図 2-4　醸造酢 EBV 画分によるアポトーシス小体の形成

(A) EBV 処理なし、(B) 10 mg/ml EBV 処理 (24 h). →, アポトーシス小体.

2.3.3　正常白血球細胞に対する EBV 画分の影響

正常な細胞に対する EBV 画分の影響を調べるため、ヒト血液から単離した白血球細胞を用いて, WST-8 試験および DNA 断片化試験を行った。正常白血球細胞と U937 細胞に対する EBV 画分の毒性を比較したところ、EBV 画分は正常白血球細胞に対してよりも U937 細胞に対する方が有意に強い毒性を示した（図 2-6A)。また、EBV 画分は正常白血球細胞に対しては DNA 断片化を誘導しなかった（図 2-6B)。

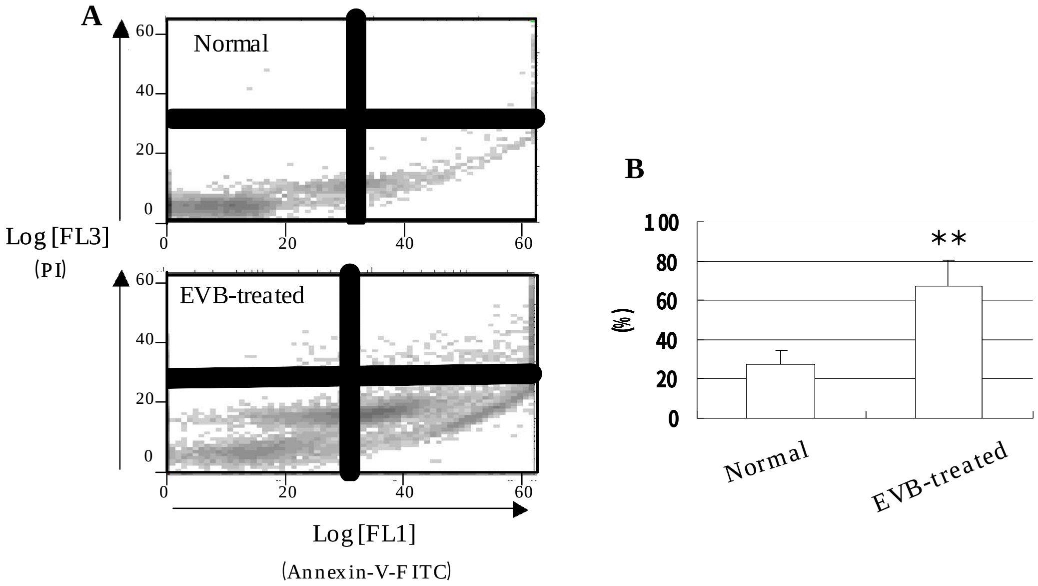


図 2-5　フローサイトメトリーによるアポトーシスの検出

A, Annexin-V/PI dot plots. B, The proportions of apoptotic cells are shown by the bar diagram as the distribution of the Annexin-V+ /PI – area. The values shown are means (±S.E.M) of triplicate experiments. ***$p < 0.001$; **$p < 0.01$; *$p < 0.05$.

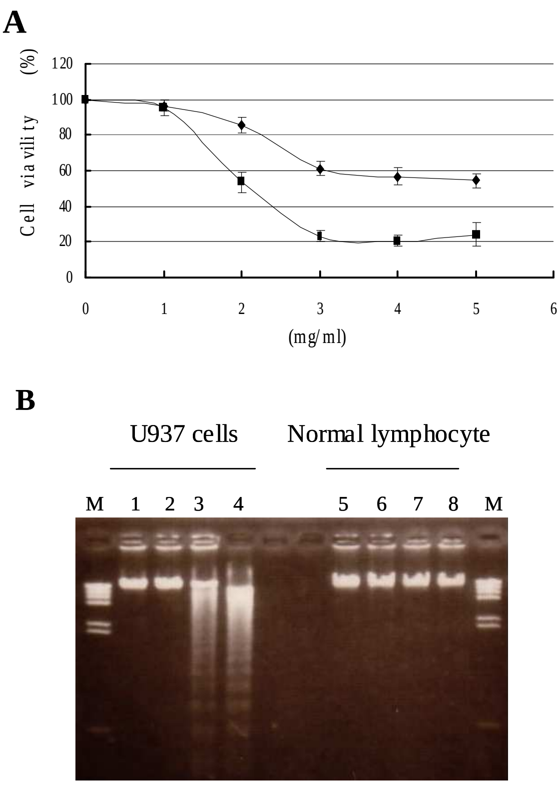


図 2-6　EBV **画分の** U937 **細胞および正常白血球細胞に対する影響の比較**.

A, **細胞毒性試験**; ■, U937 **細胞**; ●, **正常白血球細胞**. B, DNA **断片化能**. **処理なし** (lane 1, 5)；1 mg/ml (lane 2, 6)； 5 mg/ml (lane 3, 7)； 10 mg/ml EBV fraction (lane 4, 8). M, λDNA digested *Hind*III.

2.3.4　醸造酢・酢酸エチル抽出画分の HPLC 分画とアポトーシス誘導試験

黒大豆煮汁醸造酢・酢酸エチル抽出層の HPLC クロマトグラムを図 2-7 に示した。全 10 画分のうち画分 No. 6 のみがアポトーシスの特徴である DNA 断片化を誘導し、ELISA 法によるアポトーシス誘導細胞の検出法においても電気泳動法による DNA の断片化結果と相関が見られた。また、顕微鏡観察においてもアポトーシス小体の形成が見られた（図 2-8)。本画分を Compound-6 として構造解析を行った。

2.3.5　Compound-6 の構造解析

HPLC を用いて Compound-6 を繰り返し分取した。1 *l* の黒煮汁醸造酢から 6 mg の Compound-6 が集められた。分取した Compound-6 の構造解析の結果を以下に示した。

UV λMax (MeOH) ：223, 280 nm;

Reteintion time of HPLC：74min,

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) ：δ 2.04 (1H, s), 3.08 (2H, t, J=7.5 Hz), 3.90 (2H, t, J＝7.5 Hz), 6.70 (1H, m), 7.15 (1H, m), 7.22 (1H, m), 7.41 (1H, m), 7.64 (1H, m), 8.08 (1H, s)

^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz) ：δ 29, 65, 112, 118, 121, 123, 124, 128, 137 (Fig. 5-3 A)

MS m/z ：130, 144, 161 $[M+H]^+$

FAB-MS m/Z： 403 $[M+H]^+$

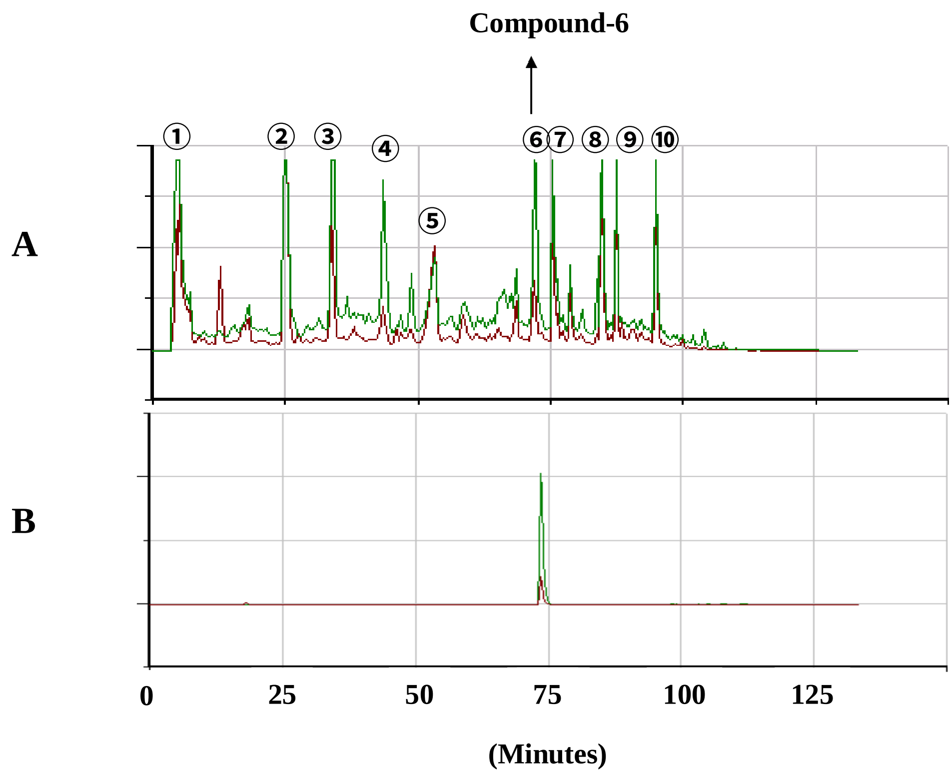


図 2-7　HPLC クロマトグラム

A, 醸造酢の酢酸エチル抽出画分. B, 精製した compound-6. Absorbances at 220 nm (green line) and 280 nm (brown line).

HPLC（図 2-7)、NMR 解析（図 2-9A）および MS 解析（図 2-9B）の解析結果から、Compound-6 はトリプトフォールと推察された。

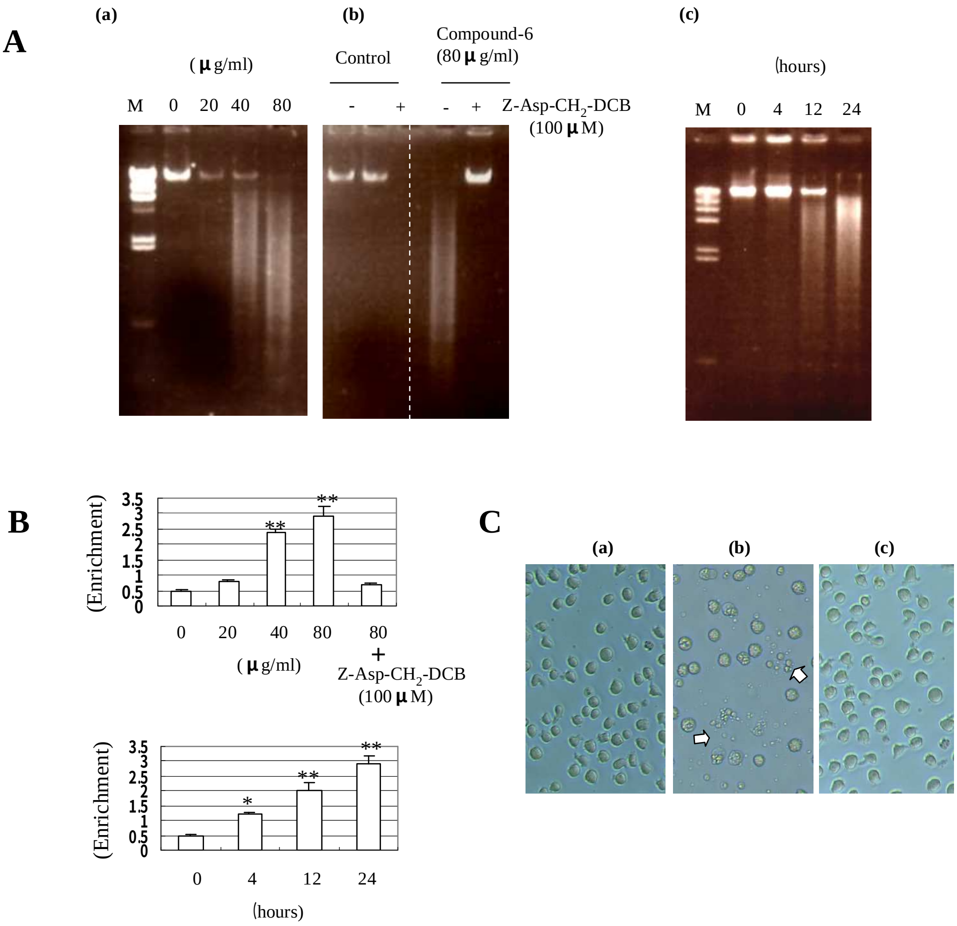


図 2-8　Compound-6 のアポトーシス誘導能. (A) DNA 断片化. 濃度の影響(a), カスパーゼ阻害剤（Z-Asp-CH_2-DCB (100 μM)）によるアポトーシス誘導の確認(b), 処理時間の影響(c). (B) カスパーゼ 3 活性の測定結果. (C) アポトーシス小体の形成. 処理なし(a), compound-6 at 80 μg/ml for 24 h (b). カスパーゼ阻害剤（Z-Asp-CH_2-DCB (100 μM)）.

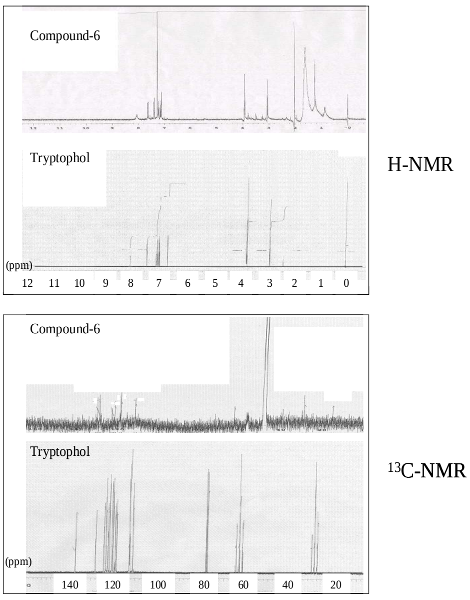


図 2-9　Compound 6 および tryptophol の構造解析

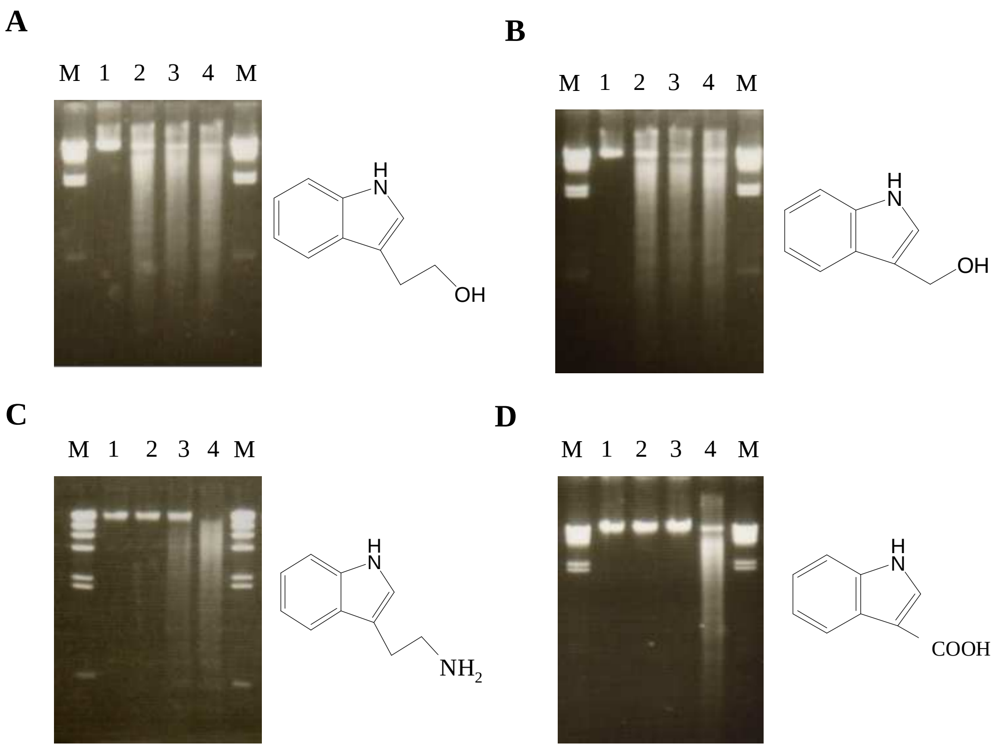


図 2-10　　**トリプトフォール類縁物質のアポトーシス誘導能**

Tryptophol (A), indole-3-carbinol (B), tryptoamine (C), indole-3-carboxylic acid (D). 0 mM (lane 1), 0.5 mM (lane 2), 3 mM (lane 3), 5 mM (lane 4) for 24 h.

2.3.6　Compound-6 **の類縁物質の** DNA **断片化能**

Compound-6 **はトリプトフォールの類縁物質である可能性が示されたため、トリプトフォールおよびその類縁物質（インドール-３-カルビノール** (I3C)**、トリプトアミン、インドール**-3-**カルボキシル酸）の** DNA **断片化能を調べた。その結果、誘導濃度に違いはみられるが、これらの物質全てが** U937 **細胞に対して** DNA **の断片化を誘導した** (**図** 2-10)。

2.3.7　**各醸造酢中の** Compound-6 **含量および発酵試験**

表 2-1 **に示したように、**Compound-6 **は当研究室でこれまでに製造したすべての醸造酢に含まれていることがわかった。われわれは、醸造酢の製造に用いた米麹および酵母が** Compound-6 **の産生に関与していることを証明するため、米麹液に酵母を添加して培養し、**Compound-6 **産生の有無を調べた。その結果、米麹液の酢酸エチル抽出物中に本物質は検出されなかったが（図** 2-11A)、**酵母を添加して２日間培養した培養液の酢酸エチル抽出物中には** Compound-6 **が検出された（図** 2-11B)。**したがって、**Compound-6 **は米麹および酵母を用いて製造した焼酎の副産物である焼酎粕中にも含まれることが推測されたため、米焼酎粕中の** Compound-6 **の有無を酢酸エチル抽出、**HPLC **分析および** MS **解析により調べた。その結果、米焼酎粕中にも** Compound-6 **が含まれていることが確認できた（図** 2-11C)。

表 2-1　焼酎粕および大豆煮汁から製造した醸造酢中の Compound-6 濃度

醸造酢	大豆煮汁		焼酎粕		
	黄大豆	黒大豆	米	芋	麦
含量[a] (mg/kg)	4.86	5.58	11.1	5.8	6.3

[a] 含量, mg-tryptophol/kg- each vinegar.

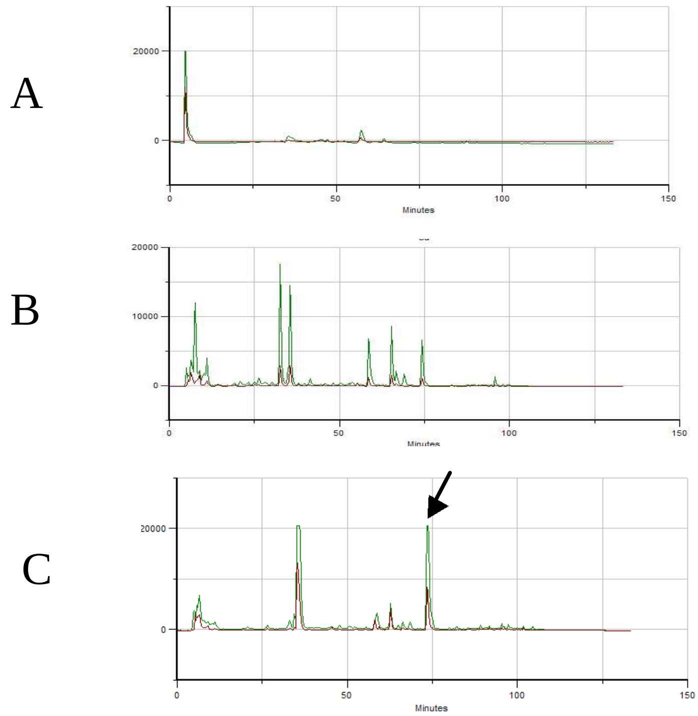


図 2-11　麹と酵母による Compound-6 生成の確認

(A) 米麹抽出液, (B) 米麹と酵母を用いた発酵液, (C) 米焼酎粕. 矢印は Compound-6 を示す.

2.3.8　醸造酢の原料中の Compound-6 含量と発酵試験

製造した醸造酢の原料である大豆煮汁および焼酎粕中の Compound-6 含量を調べた（表 2-2）。その結果、Compound-6 は大豆煮汁以外の原料（焼酎粕類）すべてに含まれることがわかった。トリプトフォールは、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）においてトリプトファンの代謝産物であることが知られている。本研究で検出された Compound-6 がトリプトファンに由来していることを確かめるために発酵試験を行った。その結果、トリプトファンおよび最少培地のみを混合した水溶液中に Compound-6 は検出されなかったが（図 2-12A, B）、それらに酵母を添加して得た発酵液からは Compound-6 が検出された（図 2-12C）。この結果から、Compound-6 は酵母によってトリプトファンから合成された二次代謝産物であることが確認された。

表 2-2　醸造酢製造原料である焼酎粕および大豆煮汁中の Compound-6 濃度

原料	大豆煮汁		焼酎粕		
	黄大豆	黒大豆	米	芋	麦
含量[a] (mg/kg)	N.D.[b]	N.D.	6.9	6.8	5.7

[a] 含量, mg-tryptophol/kg- each raw material.

[b] N.D., not detected.

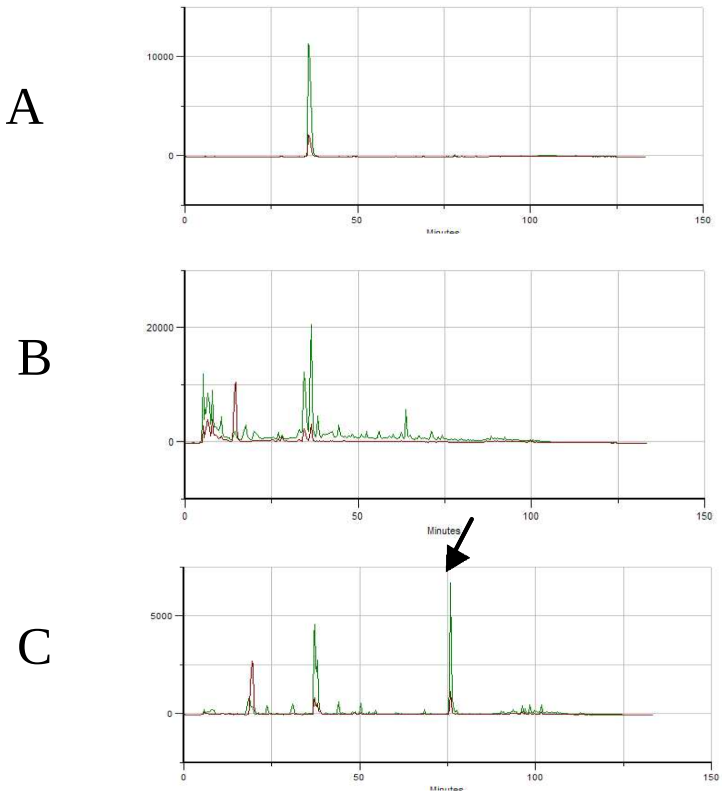


図 2-12　トリプトファンからの Compound-6 の生成の確認

(A) トリプトファン溶液, (B) 最小培地＋トリプトファン 0.04 mg/ml（発酵前）, (C) 最小培地＋トリプトファン 0.04 mg/ml（発酵後）. 矢印は Compound-6 を示す.

2.3.9　酒類および酒粕類中の Compound-6 含量

　これまでの結果から、トリプトファンを含む原料を用いた酒類およびその副産物である酒粕類であれば Compound-6 が含まれることが予想されたため、無作為に購入した市販の酒類および清酒粕およびメーカーから提供されたビール粕およびワイン粕中の Compound-6 含有の有無を調査した。その結果、A 社清酒および B 社酒粕ともに Compound-6 が含まれていたが、酒粕中には 9.2 mg/kg 含まれていたのに対し、清酒中の含量は 0.7 mg/kg と微量であった。また、A 社米焼酎、B 社芋焼酎、C 社麦焼酎や D 社ビールおよび E 社ワインには検出されなかった（表 2-3）。

表 2-3　市販のアルコール飲料や酒粕に含まれる Compound-6 濃度の比較

	清酒		焼酎			ビール	ワイン
	清酒	酒粕	米	芋	麦		
含量[a] (mg/kg)	0.7	9.2	N.D.[b]	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

[a] 含量, mg-tryptophol/kg-each product.

[b] N.D., not detected.

2.3.10　Compound-6 のカスパーゼ活性経路

Compound 6 のカスパーゼ活性経路を調べるために、カスパーゼ 3, 8 および 9 の酵素活性を測定した。その結果、図 2-13A に示したようにカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 8 の活性化は見られたが、カスパーゼ 9 の活性化は見られなかった。また、ウエスタンブロット解析を用いて各カスパーゼタンパク質の断片化を調べたところ、カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 8 の断片化は見られたが、カスパーゼ 9 の断片化は見られなかった。また、カスパーゼ 3 により切断されるポリ（ADP リボース）ポリメラーゼ（PARP）の断片化も見られた（図 2-13B）。さらに、Compound-6 による U937 細胞のアポトーシスに対する各種特異的阻害剤の効果を ELISA 法によるアポトーシスの検定法を用いて調べた結果，カスパーゼ 3 阻害剤（Z-DEVD-FMK）およびカスパーゼ 8 阻害剤（Z-IETD-FMK）によって抑制されたが、カスパーゼ 9 阻害剤（Z-LEHD-FMK）によっては抑制されなかった（図 2-13C,a）。また、Compound-6 による U937 細胞のカスパーゼ 3 活性はカスパーゼ 8 阻害剤（Z-IETD-FMK）によって抑制されたが、カスパーゼ 9 阻害剤（Z-LEHD-FMK）によっては抑制されなかった（図 2-13C,b）。これらの結果から、Compound-6 はカスパーゼ 8 を経由してカスパーゼ 3 を活性化し、アポトーシスを誘導していると推察された。

2.3.11　デスレセプターの DISC 形成解析と DR5，TRAIL および FADD の発現解析

100 μ M の Compound-6 で 1，2 および 3 h 処理した U937 細胞の細胞抽出液を用いて IP-WB を行った。デスレセプター（Fas, DR4, DR5 および TNF-R1）のうち、DR5 抗体を IP 用抗体に用い、カスパーゼ 8 抗体を WB 用抗体に用いたところ、時間依存的に活性型カスパーゼ 8 のバンド（42 kDa）が強く検出され（図 2-14A）、Compound-6 が DR5 を含む DISC 形成を誘導することによってカスパーゼ 8 を活性化していることが示唆された。また、DR5 およびそのリガンドである TRAIL や、それらのアクセプターである FADD の RT-PCR を行ったところ、100 μ M の Compound-6 で 1 h 処理した U937 細胞において無処理の細胞の発現量との差は見られなかった（図 2-14B）。

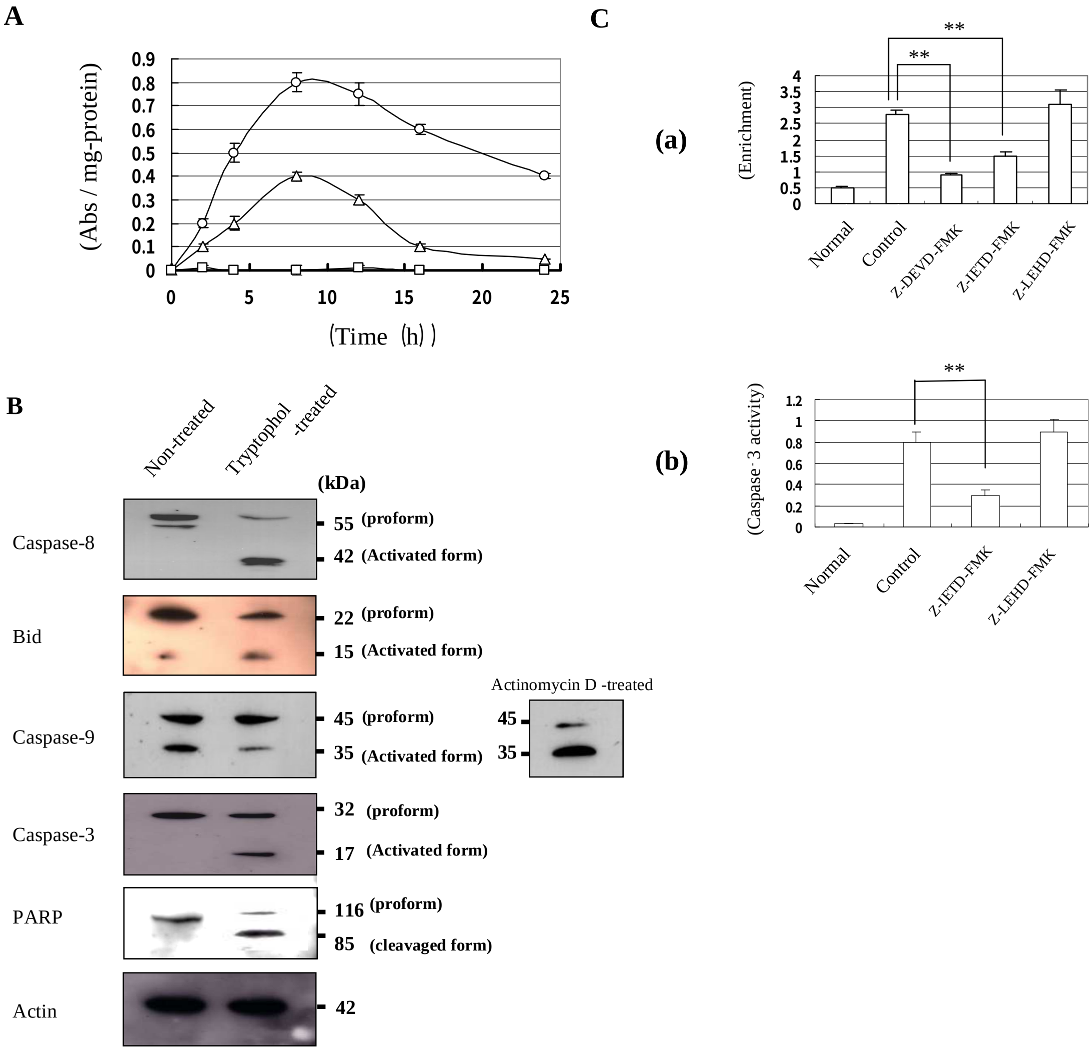
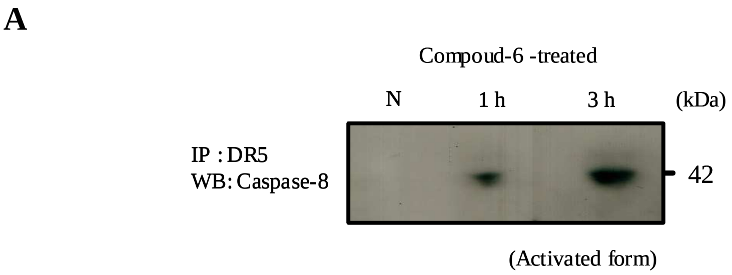


図 2-13　Compound 6 **のカスパーゼ活性経路の推定**

A, **カスパーゼ**-8, -9, -3 **活性の経時変化**. $***p < 0.001$; $**p < 0.01$; $*p < 0.05$. B, **カスパーゼ**-8, -9, -3 **および** PARP **抗体に対するウエスタンブロッティング**. C, **カスパーゼ**-8, -9, -3 **の阻害剤添加に対するカスパーゼ活性の変化**.



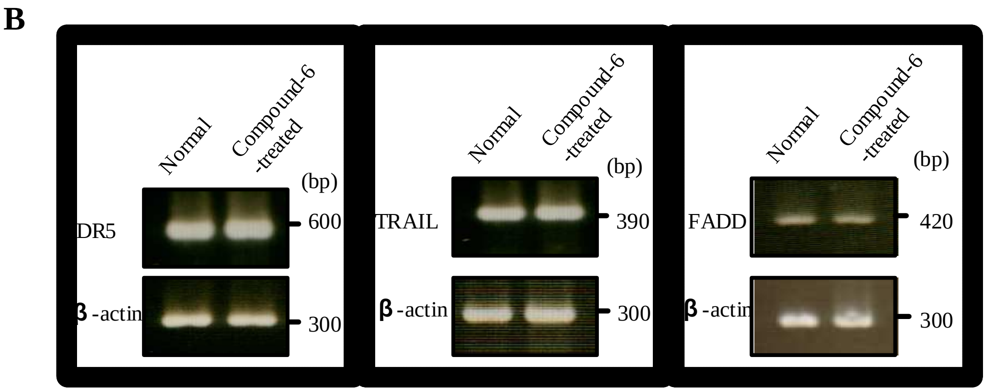


図 2-14　デスレセプターに対する DISC 形成の確認

(A) DR5 で免疫沈降し、カスパーゼ８を抗体とするウエスタンブロッティングの結果.

(B) Compound-6 で 1 h 処理した U937 細胞を用いて、DR5, TRAIL, FADD のプライマーセットに対する RT-PCR の結果.

2.3.12　DcR1 を強制発現させた U937 細胞に対する Compound-6 の作用

U937 細胞および正常白血球細胞における DcR1 と DcR2 の発現解析を RT-PCR を用いて行ったところ、図 2-15A に示したように、DcR2 の発現量は両細胞で変わらなかったが、DcR1 は U937 細胞に比べて正常白血球細胞の方が有意に発現量が高かった。次に、DcR1/pTriEX^{TM}-4 Neo をトランスフェクションした U937 細胞の DcR1 の発現量をノーマル U937 細胞と比較したところ、有意に DcR1 の発現は増強されていることを確認した（図 2-15B)。U937 トランスフェクタントに対する Compound-6 の細胞毒性およびアポトーシス誘導活性を調べたところ、WST-8 を用いた細胞毒性試験では、Compond-6 が U937 細胞に対してアポトーシスを誘導する濃度範囲（100-200 μM）において､ノーマルに比べてトランスフェクタントに対して細胞毒性の緩和が見られた(図 2-15C).また、ELISA 法によるアポトーシス誘導活性試験では、ノーマルと比べてトランスフェクタントに対しては Compound-6 により誘導されるアポトーシスが有意に抑制された（図 2-15D)。

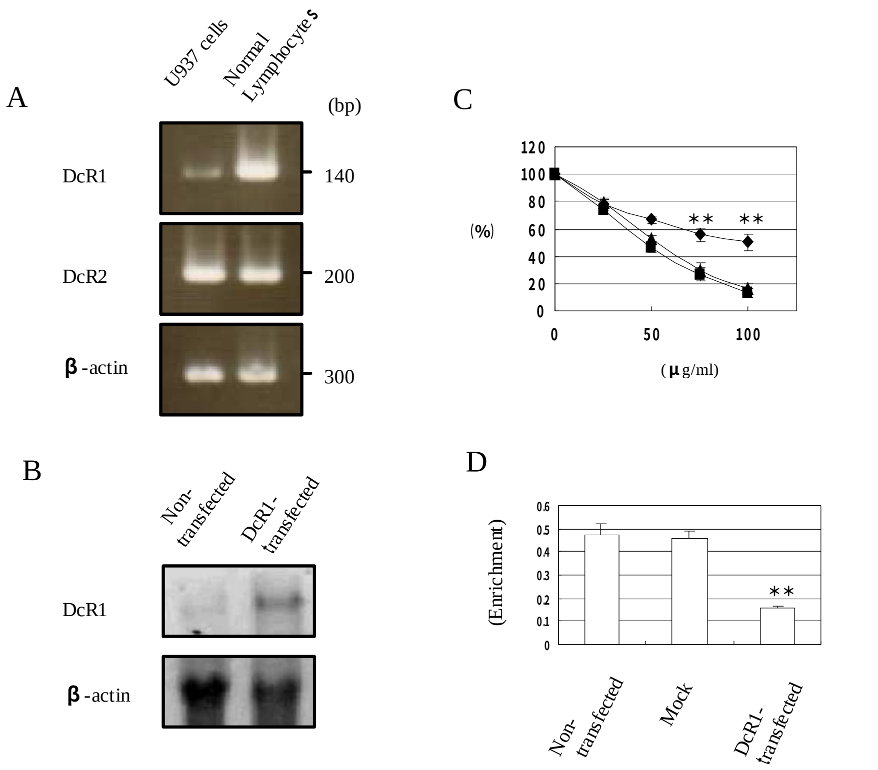


図 2-15　DcR1 **トランスフェクタントにおける** Compound 6 **の作用の軽減**.

(A) RT-PCR **による** U937 **細胞と正常白血球細胞での** DcR1, DcR2 **および**β-actin **の転写レベル確認**.

(B) **ノーザン・ブロットによる** DcR1 **トランスフェクタントの** DcR1 **転写の確認**.

(C) DcR1 **トランスフェクタント**(●)、U937 **細胞**(▲)、**ベクターのみ導入した** U937 **細胞**(■)**に対する**、Compound 6 **の生存率に対する影響**.

(D) DcR1 **トランスフェクタント**、U937 **細胞**、**ベクターのみ導入した** U937 **細胞に対して** Compound 6 **処理した場合のカスパーゼ活性の比較**. $^{**}p < 0.01$ (Non-transfected *versus* DcR1-transfected U937 cells).

2.4　考察

本章では、醸造酢の EBV 画分が U937 細胞に対してアポトーシスを誘導することによって細胞毒性を発揮することを示した。EBV 画分は、U937 細胞に対しては濃度および時間依存的にアポトーシスを誘導したが、正常白血球細胞に対しては誘導しなかった。細胞種によってアポトーシスの感受性が異なることは多数報告されているが [72]、U937 細胞と正常白血球細胞で感受性に差が見られた。

醸造酢の酢酸エチル抽出層から HPLC で分画された Compound-6 は、構造解析の結果からトリプトフォールの誘導体である可能性が示された。Compound-6 の類縁物質と考えられるインドール化合物であるトリプトフォール、I3C、トリプトアミン、インドール３カルボキシル酸は誘導濃度に違いはあったが、すべてアポトーシスを誘導したため、Compound-6 のアポトーシス誘導能はそのインドール環に依存していると考えられた。I3C はトリプトフォールの類縁物質であり、ブロッコリ、キャベツおよびカリフラワーのようなアブラナ科の野菜に含まれるアポトーシス誘導物質として知られている [73-75]。3,3'-インドリルメタン（DIM）は I3C の 2 量体であり，アポトーシス誘導能が I3C の約５倍であることが報告されている [73]。

トリプトフォールは、酵母においてトリプトファンの２次代謝物として合成れることが報告されているが [76-81]、天然成分または発酵代謝産物中のトリプトフォールがアポトーシスを誘導することは知られていなかった。酵母では、パン酵母の細胞抽出液で処理した子牛スキムミルクのエタノール抽出画分が HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導し、その活性成分は酵母のタンパク質分解酵素によって分解された低分子タンパク質であることが報告されている [82]が、トリプトファンの二次代謝産物がヒト細胞に対してアポトーシスを誘導することは報告されていなかった。

Compound-6 は無作為に選んだビールおよびワインには含まれなかったことから、Compound-6 の合成には清酒製造に用いた麹菌によるタンパク質の分解（トリプトファンの遊離）が必須であると推察している。また、Compound-6 の清酒および酒粕の含有量を比較したところ、清酒に含まれる Compound-6 は少量であり、清酒の製造過程において、その残査である粕に移行していると考えられた。

最後に、Compound-6 の正常白血球細胞に対する細胞毒性およびアポトーシス誘導活性が U937 細胞に対するよりも弱い理由を明らかにするため、Compound-6 のアポトーシス誘導のメカニズムについて検討した。カスパーゼ酵素活性測定およびウエスタンブロット解析を用いて Compound-6 のカスパーゼ活性経路を調べたところ、Compound-6 はカスパーゼを活性化せずにカスパーゼ 9 を活性化し、カスパーゼ 3 の活性化を経てアポトーシスを誘導していることがわかった。次に、カスパーゼ 8 とデスレセプターの DISC 形成を IP-WB 法により調べたところ、Compound-6 は DR5 を含む DISC の形成を促進することがわかった。また、DR5 の発現量を RT-PCR により調べたところ、Compound-6 で処理した U937 細胞の DR5 発現量には変化がなかったため、Compound-6 は DR5 の発現には影響を与えずに DISC の形成を制御していると推察された。そこで、U937 細胞には発現されておらず正常白血球細胞に発現されている DcR1 の存在が両細胞間におけるアポトーシス感受性の違いの 1 つの要因ではないかと考え、DcR1 を強制発現させた U937 細胞に対する

Compound-6 のアポトーシス誘導感受性を調べた。その結果、DcR1 トランスフェクタントでは Compound-6 による細胞毒性およびアポト－シス誘導が、ノーマル U937 細胞と比較して有意に抑制されることが示された。

疫学的な観点から、発酵食品はさまざまな健康機能性を有し、長い歴史を通じて人々の健康に大きく貢献してきたと考えられており、近年の分子生物学的技術の進歩により、その健康機能性が科学的に証明されてきている。本章の結果は、百薬の長といわれる酒類やその副産物である酒粕中にアポトーシス誘導能をもつトリプトフォールが含まれることを明らかにし、Compound-6 はアルコール発酵中にトリプトファンから合成されることを確かめた。酒類や酒粕類の抗がん作用については、清酒および酒粕ががん細胞増殖抑制効果をもつこと[83]や酒粕の 50%エタノール抽出物が Molt 4B 細胞に対してアポトーシスを誘導すること[84]など多くの報告があるが、Compound-6 がそれらの効果に対して寄与しているのかどうかに興味がもたれる。

2.5　要約

醸造酢の *in vivo* における抗腫瘍効果の作用メカニズムを解明することを目的として、アポトーシス誘導活性に着目した。まず、醸造酢を酢酸エチル抽出し、水層と酢酸エチル層に分画した。得られた画分の U937 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、水層に比べて酢酸エチル層は有意に強い細胞毒性を示した。また、これらの画分のアポトーシス誘導能を調べるために、DNA 断片化試験、顕微鏡観察およびフローサイトメトリー解析を行った結果、水層はアポトーシスを誘導しなかったが酢酸エチル層は U937 細胞に対してアポトーシスを誘導することがわかった。また、酢酸エチル層の正常白血球細胞に対する細胞毒性は U937 細胞に対するよりも弱く、また、正常白血球細胞に対してはアポトーシスを誘導しなかった。

醸造酢の酢酸エチル抽出物を HPLC で分画し、各画分のアポトーシス誘導能を調べた。その結果、リテンションタイムが早い順から 6 番目の画分（Compound-6 とした）が U937 細胞に対してアポトーシスを誘導した。Compound-6 の構造解析を行った結果、HPLC 分析，LC-MS 解析，NMR 解析により、Compound-6 はトリプトフォールに類似する物質であると推察された。

Compound-6 の生成機構を調べたところ、Compound-6 は大豆煮汁から製造した醸造酢にも焼酎粕醸造酢にも含まれていたこと、また、原料である大豆煮汁には含まれずにアルコール発酵過程で生成されることがわかっていたため、それらの原料として共通に用いた米麹の成分からの酵母の二次代謝産物ではないかと推察した。発酵試験において、Compound-6 は米麹を酵母が発酵する過程で生成することを確かめた。また、Compound-6 は米麹中の成分であるトリプトファンから生成することも確認し、Compound-6 は米麹中のトリプトファンからの酵母の二次代謝産物であることを実証した。また、Compound-6 は製造した醸造酢のみでなく、アルコール発酵を経ている焼酎粕中や酒粕および清酒にも含まれることを明らかにした。

参考文献

1) Ye XJ, Morimura S, Han LS, Shigematsu T, Kida K. In vitro evaluation of physiological activity of vinegar produced from barley-, sweet potato-, and rice-shochu post-distillation slurry. Biosci Biotechnol Biochem 2004; 68: 551-556.

2) 中川 優, 森村 茂, 木田建次. 返し仕込による焼酎製造に使用する生存能の高い焼酎用酵母の育種. 醸協 1997; 92: 651-659.

3) 木田建次, 中川 優, 西迫 博行, 森村 茂. 生存能の高い焼酎用酵母を用いた実験室規模での返し仕込みによる蒸溜残液からの焼酎製造. 醸協 1997; 92: 759-768.

4) 木田 建次, 中川 優, 張 文学, 森村 茂. 8,300 L の規模での返し仕込法による米焼酎の製造と製品の評価. 醸協 1998; 93: 976-981.

5) 張 文学, 森村 茂, 木田 建次. 一日放置した蒸留残液を用いた酵素およびクエン酸添加返し仕込みによる米焼酎製造のための実用化試験. 醸協 1999; 94: 989-997.

6) 森村 茂, 叶 秀娟, 重松 亨, 木田 建次. 米焼酎粕蒸留残渣からの機能性を有する醸造酢の製造. 生物工学会誌 2002; 80: 417-423.

7) Surh Y-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nat Rev Cancer 2003; 3: 768− 780.

8) Kundu JK, Surh Y-J. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with anti-inflammatory phytochemicals. Mut Res 2005; 591: 123− 146.

9) Hassett JM, O’Malley JA, Pakes RJ, Newhouse PJ, Earle CC. Frequency and cost of chemotherapy-related serious adverse effects in a populations sample of women with breast cancer. J Nat Cancer Inst 2006; 98: 1108− 1117.

10) Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Int 1981; 66: 1191-1308.

11) http://www.aicr.org/exreport.html

12) Five A Day for Better Health’ report: http://www.5aday.gov/

13) 望月 聡, 宮本 安紀子, 萩原 美和子, 竹嶋 直樹, 大森 俊郎. オロチン酸投与によるラット脂肪肝に対する大麦焼酎粕の抑制効果. 醸協 2001; 96: 559-563.

14) 望月 聡, 宮本 安紀子, 大神 彩子, 甲斐 千晴, 大島 孝平, 田中 寿一, 外薗 英樹, 竹嶋 直樹, 大森 俊郎. ラットの D− ガラクトサミン誘発肝障害に及ぼす大麦焼酎粕の影響. 醸協 2005; 100: 135-140.

15) Mahfudz LD, Hayashi K, Otsuji Y, Ohtsuka A, Tomita Y. Separation of growth promoting factor of broiler chicken from shochu distillery by-product. Jpn Poult Sci 1996; 33: 96 - 103.

16) 寺澤 圭一, 大野 英作. 泡盛蒸留粕 (もろみ酢) の各種評価系における抗酸化活性. 日本農芸化学大会公演要旨集 2005; p271.

17) 大森 俊郎, 望月 聡. 特許公開 130736;「大麦焼酎蒸留残液から得られる血圧降下作用を有し且つ優れた呈味性を有する組成物」2005

18) 外薗 英樹, 望月 聡. 特許公開 281159; 「大麦焼酎蒸留残液から得られる血圧降下作用を有する組成物」2005.

19) 土谷 紀美, 松田 豊和, 西村 賢了, 岩原 正宜. 麹菌リアクター処理による米及び麦焼酎蒸留粕のγ− アミノ酪酸富化. 醸協 2003; 2: 98 132-138.

20) **廣瀬 茂, 田上 修, 家藤 治幸, 松本 陽子, 上岡龍一. 焼酎蒸留粕（廃液）を利用した新素材転換システムに関する基礎研究 -がん細胞増殖抑制効果-. 化学工学論文集** 2002; 28: 621-625.

21) Sunderesan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. Science 1995; 270: 296-299.

22) Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. J Biol Chem 1997; 272: 19633-19636.

23) Ranalli A, Lucera L, Contento S. Antioxidizing Potency of Phenol Compounds in Olive Oil Mill Wastewater. J Agric Food Chem 2003; 51: 7636-7641.

24) Desmarchelier G, Ciccia G, Coussio J. Recent advances in the search for antioxidant activity in South American plants. Stud Nat prod Chem 2000; 22: 343-367.

25) Cos P, Calomme M, Pieters L, Vlietinck J, Vanden BD. Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. Stud Nat prod Chem 2000; 22: 307-341.

26) Ichikawa H, Ichiyanagi T, Xu B, Yoshii Y, Nalajima M, Konishi T. Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract from purple Black Rice. J Med Food 2001; 4: 211-218.

27) Abdel-Lateff A, Fisch KM, Wright AD, Konig GM, A New antioxidant isobenzofuranone Derivative from the Algicolous Marine Fungus *Epicoccum SP*. Planta Med 2003; 69: 831-834.

28) Hung CY, Yen G C. Antioxidant Activity of phenolic Compounds Isolated from Mesona procumbens Hensl. J Chromatogr A 2002; 50: 2993-2997.

29) Santiaga LA, Hiramathu M, Mori A. Japanase Soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidtion. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 38: 297-304

30) Terahara N, Mathui T, Fukui K, Matsugano K, Sugita K, Matsumoto K. Caffeoylsophorose in a red vinegar produced through fermentation with purple sweetpotato. J Agric Food Chem 2003; 51: 2539-2543.

31) Alonso BAM, Zorro L, Gullen DA, Barroso CG. Study of the polyphenol content of red ond white grape varieties by lipid chromatography-mass spectrometry and its relationship to antioxidant power. J Chromatogr A 2003; 1012: 31-38.

33) Julkunen-Tiitto R. Phenolic constituents in theleaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. J Agric Food Chem 1985; 33: 213-217.

34) Liu RH. Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. Am J Clin Nutr 2003; 78: 517s-520s.

35) Kanazawa A, Sawa T, Akaike T, Morimura S, Kida K, Maeda H. Generation of lipid peroxyl radicals from edible oils and their biological activities : A need for consideration for anti-radical components and purification processing. BioFactors 2000; 13: 187-193.

36) Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Harn U, Rice-Evans CA. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. Free Rad Biol Med 2001; 30: 1213-1222.

37) Puiggros F, ArdeÄvol NLA, BladeÄ C, Arola L, and Salvadoa MJ. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. J Agric Food Chem 2005; 53: 6080-6086.

38) Song T-Y, Yen G-C. Protective effects of fermented filtrate from Antrodia camphorata in submerged culture against CCl_4-induced hepatic toxicity in rats. J Agric Food Chem 2003; 51: 1571-1577.

39) Julkunen-Tiitto, R. Phenolic constituents in theleaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. J Agric Food Chem 1985; 33: 213-217.

40) Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. Euro J Clin Nutri 2004; 58: 955–965.
41) Benedetto RD, Varı` R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, Matarreso P, Archivio MD', Masella R. Tyrosol, The major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. Nut Metabo Cardi Diseases 2006;
42) Kawabata K, Yamamoto, T, Hara A, Shimizu M, Yamada Y, Matsunaga K, Tanaka T, Mori H. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. Can Lett 2000; 157: 15-21.
43) Willett WC. Diet and Health: what should we eat. Science 1994; 254: 532-537.
44) Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. Science 2002; 296: 695-698.
45) Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. Antioxidant activity of fresh apples. Nature 2000; 405: 903-904.
46) Sun J, Chu Y-F, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of fruits. J Agric Food Chem 2002; 50: 7449-7454.
47) Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J Nutri 2004; 134: 3479S-3485S.
48) Sasaki T, Abe M, Nakayama S, Moriyama K, Tahara H, Takita T. Novel application of shochu distillery by-products to prophylaxis against mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rats. Biosci Biotechnol Biochem 2005; 69: 1898-1904.
49) **岡本成通**, **渡邉正澄**. β-**フェネチルアルコール**, **チロソール**, **トリプトフォールの生成**. J Brew Soc Japan 1981; 76: 629-634.
50) Cohen, G. M., Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*., **326**, 1-16 (1997).
51) Steller, H., Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, **267**, 1445-1449 (1995).
52) Cohen, J. J., Apoptosis. *Immunol. Today*, **14**, 126-130 (1993).
53) Savill, J., Fadok, V., Henson, P. and Haslett, C., Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol. Today*, **14**, 131-136 (1993).
54) Arends, MJ., Morris, RG., Wyllie AH., Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol*., **136,** 593-608 (1990).
55) Kerr, JFR., Wyllie, AH. and Currie, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).
56) Watanabe, M., Ohata, M., Hayakawa, S., Isemura, M., Kumazawa, S., Nakayama, T., Furugori, M., Kinae, N., Identification of 6-methyl sulfinylhexyl isothiocyanate as an apoptosis-inducing component in wasabi. *Phytochemistry*, **62**, 733-739 (2003).
57) Watanabe, M., Hayakawa, S., Isemura, M., Kumazawa, S., Nakayama, T., Mori, C. and Kawakami, T., Identification of licocoumarone as an apoptosis-inducing component in licorice. *Biol. Pharm. Bull*., **25**, 1388-1390 (2002)
58) Koyama, Y., Katsuno, Y., Miyoshi, N., Hayakawa, S., Mita, T., Muto, H., Isemura, S., Aoyagi, Y. and Isemura, M., Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas* in U937 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **66**, 784-789 (2002).
59) Hayakawa, S., Kimura, T., Saeki, K., Koyama, Y., Aoyagi, Y., Noro, T., Nakamura, Y. and Isemura, M.,

Apoptosis-inducing activity of high molecular. weight fraction of tea extracts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **65**, 459-462 (2002).
60) Hayakawa, S., Saeki, K., Sazuka, M., Suzuki, Y., Shoji, Y., Ohta, T., Kaji, K. Yuo, A., and Isemura, M., Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **285**, 1102-1106 (2001).
61) Katsuno, Y., Koyama, Y., Saeki, K., Sazuka, M., Ookawa, K. and Isemura M., Apoptosis-inducing activity of a driselase digest fraction of green tea residue. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **65**, 198-201 (2001).
62) Saeki, K., Kobayashi, N., Inazawa, Y., Zhang, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Saeki, K., Isemura, M. and You, A., Oxidation-triggered c-jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem. J.,* **368**, 705-720 (2002).
63) Miyoshi, N., Uchida, K., Osawa, T., Nakamura**,** Y., A link between benzyl isothiocyanate-induced cell cycle arrect and apoptosis: involvement of mitogen-activated protein kinases in the Bcl-2 phosphorylation. *CancerRes*., **64**, 2134-2142 (2004).
64) Nakamura, Y., Kawakami, M., Yoshihiro, A., Miyoshi, N., Ohigashi, H., Kawai, K., Osawa, T., Uchida, K., Involvement of the mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*., **277**, 8492-8499 (2002).
65) Chinnni, S. R., Sarkar, F. H., Akt inactivation is a key event in indole-3-carbinol-induced apoptosis in PC-3 cells. *Clinical Cancer Res*., **8**, 1228-1236 (2002).
66) Imai, K., Suga, K., Nakachi, K., Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population. *Prev. Med*., **26**, 269-775 (2004).
67) Park, O. J., Surh, Y. J., Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate an genistein: evidnce from epidemiological and laboratory studied. *Toxicology Letters*, **150**, 43-56 (2004).
68) Nanda, K., Miyoshi, N., Nakamura, Y., Shimoji, Y., Tamura, Y., Nishikawa, Y., Uenakai, K., Kohno, H. and Tanaka, T. (2004). Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the proliferation of human cancer cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **23** (1) 69-75.
69) Mimura, A., Suzuki, Y., Toshima, Y., Yazaki, S., Ohtsuki, T., Ui, S., Hyodoh, F., Induction of apoptosis in human leukemia cells by naturally fermented sugar cane vinegar (kibizu) of Amami Ohshima Island. *Biofactors*, **22**, 93-97 (2004).
70) Ishizawa, M., Kobayashi, Y., Miyamura, T. and Matsuura, S., Simple procedure of DNA isolation from human serum. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5792 (1991).
71) Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein-labeled Annexin-V. *J. Immunol. Methods*, **184**, 39-51 (1995).
72) Hasegawa, H., Yamada, Y., Harasawa, H., Tsuji, T., Murata, K., Sugahara, K., Tsuruda, K., Ikeda, S., Imaizumi, Y., Tomonaga, M., Masuda, M., Takasu, N. and Kamihira, S., Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Br. J. Haematol*., **128**, 253-265 (2005).

73) Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., Fares, F. A. Induction of apoptosis in human prostate cancer cell line, PC3, by 3,3'-diindolylmethan through the mitochondrial pathway. *Br. J. Cancer*, **91**, 1358-1363 (2004).
74) Ge, X., Yannai, S., Rennert, G., Gruener, N., Fares, F. A., 3,3'-Diindolylmethan induce apoptosis in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 153-158 (1996).
75) Birt, D. F., Walker, B., Tibbels, M. G., Bresnick, E. Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin amd indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*, **7**, 959-63 (1986).
76) Pozo-Bayon, M. A., Hernandez, M. T., Martin-Alvarez, P. J., Polo, M. C., Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties. *J. Agric. Food Chem*., **51**, 2089-2095 (2003).
77) Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., Hewlins, M. J. E., The catabolism of amino acids long chain and complex alcohols in saccaromices cerevisiae. *J. Biol. Chem*., **278**, 8028-8034 (2003).
78) Erdogan, I., Sener, B., Higa, T., Tryptophol, a plant auxin isolated from the marine sponge *Ircinia spinulosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **28**, 793-794 (2000).
79) Mattivi, F., Vrhovsek**,** U., Versini, G., Determination of indole-3-acetic acid, tryptophan and other indoles in must and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatogrphy A*, **855**, 227-235 (1999).
80) **秋田 修**,**井田哲朗**, **小幡孝之**, **原 昌道**, β-**フェネチルアルコール**, **酢酸** β-**フェネチル高生産性酵母の遺伝子背景と清酒醸造への利用**, **醸協**, **85**, 501-505 (1990).
81) **岡村成通**, **渡辺正澄**, *Saccharomyces cerevisiae* **による糖からの** β-**フェネチルアルコール**, **チロゾール**, **トリプトフォールの生成**, **醸協**, **76**, 629-634 (1981).
82) Roy, M. K., Watanabe, Y., Tamai, Y., Induction of apoptosis in HL-60 cells by skimmed milk digested with a proteolytic enzyme from the yeast *Saccharomyces cerevisiae, J. Biosci. Bioeng*. **88**, 426-432 (1999).
83) Saito, Y., Ohura, S., Kawato, A., Suginami, K., Prolyl endopeptidase inhibitors in sake and its byproducts. *J. Agric. Food Chem*., **45**, 720-724 (1997).
84) **金宗鉉**, **村松浩一郎**, **酒粕および米糠発酵エキス粕よりなるアポトーシス誘導物質およびその製法**, **特開** 2001-58953 (2001).