

# 数種の野菜抽出物がマクロファージの サイトカイン産生に及ぼす影響

Effects of Several Vegetable Extracts  
on Cytokine Production in Macrophage Cell line

伊藤友美, 土田廣信, 水野雅史\*

愛知みずほ大学人間科学部, \*神戸大学大学院農学研究科

Tomomi ITO, Hironobu TSUCHIDA and Masashi MIZUNO\*

Department of Human Sciences, Aichi Mizuho College, \*The Graduate School of Agriculture, Kobe University

## Abstract

We investigated effects of an ethanol-extract and a hot water-extract from several vegetables on the cytokine production of RAW 264 cells, a murine macrophage cell line. Production of NO (a cytokine) was most highly promoted by addition of the hot-water extract from Turumurasaki (Malabar spinach, *Basella rubra* L.) and production of TNF- $\alpha$  (a cytokine) was markedly facilitated by the hot water extracts from Turumurasaki and Kinjisou (*Gynura bicolor* DC. ). On the other hand, the production of these cytokines was inhibited by addition of the ethanol extracts from Turumurasaki and Cabbage (*Brassica oleracea*). The present results indicate that some components of vegetables may take part in modulation of immunological functions murine macrophages, by affecting their cytokine production.

## 1. 緒言

これまで緑黄色野菜は、栄養学的観点から水溶性ビタミン類、カロテノイド（プロビタミンA）、ミネラル、食物繊維など主要な供給源として位置づけられてきた。近年、野菜類には非栄養的ではあるが、抗酸化活性成分、抗変異原成分、抗プロモーター成分などの生理活性成分を含有していることが数多く報告されている<sup>1-3)</sup>。これらの生理活性成分はいずれも傷害細胞に直接的に作用するものと考えられているが、山崎ら<sup>4)</sup>は野菜・果実の水溶性成分中には白血球を主とする免疫系を刺激する成分が存在し、免疫系を活性化することによって間接的に傷害細胞を除去する機構があることを報告しており、特に注目されつつある。すなわち、山崎ら<sup>5)</sup>は野菜成分には白血球の活性化を促すものと抑制するものがあり、それらを上手に利用することによって感染症、ガン、動脈硬化、糖尿病、高血圧などの予防に役立てるこ

とが可能であろうと考えている。(Fig.1)

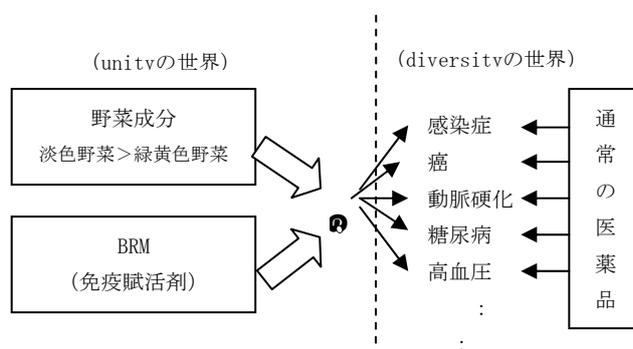


Fig. 1 White cell activity and disease improvement by vegetable

また、水野ら<sup>6)</sup>は10数種の食用キノコの熱水抽出物をマウスに投与したところ、免疫賦活作用すなわち、リンパ球T細胞がバランスよく増殖をすること、さらに、キノコの中でもヒメマツタケは増殖バランスがよく、これらの増殖活性物質は水溶性多糖 $\beta$ -1,3および $\beta$ -1,6グルカンであること、さらに、彼ら<sup>7)</sup>は十種の食用キノコ抽出物をマウスに投与した実験でコウタケの熱水抽出物(フコガラクトン)が最もマクロファージを活性化することを明らかにしている。Shinら<sup>8)</sup>は薬用ニンジン<sup>9)</sup>のラムノウロナンIIにはマクロファージ活性化作用、また、山田ら<sup>9)</sup>は植物の粘質多糖は血糖値降下作用あるいは抗補体活性があることを報告している。野菜中にもこれらの多糖体と類似のものが含まれていることが予想されるので、本研究では健康野菜とも言われているモロヘイヤとケール、伝統野菜として知られるツルムラサキとキンジソウ、一般的に利用されている野菜としてキャベツとホウレンソウの熱水抽出物およびエタノール抽出物を用い、免疫制御の重要な役割を演じているマクロファージ活性、すなわち、これらの抽出物のマクロファージ由来サイトカイン(NOおよびTNF- $\alpha$ )産生能の増強あるいは抑制効果について検討を行った。

## 2. 試料および実験方法

### (1) 実験材料

日常的に利用している野菜としてキャベツ(群馬県産)とホウレンソウ(岐阜県産)、健康野菜としてモロヘイヤ(岐阜県産)とケール(兵庫県産)、伝統野菜としてツルムラサキ(徳島県産)とキンジソウ(愛知県産)を購入し、1日風乾した後、70°Cで乾燥した。それらの乾燥品をブレンダーを用いて粉砕し、これらを試料として用いた。

### (2) 抽出物の調製

上記の6種の野菜乾燥粉末50gを500mlのアセトンで還流下3回抽出し、その残渣を500mlエタノールで還流下3回抽出し、さらにその残渣を熱水で3回抽出した。得られたそれらの抽出液を減圧濃縮したのち、凍結乾燥し、それぞれの抽出画分の重量を測定した。

### (3) マクロファージ活性化にもとづくサイトカイン(NOとTNF- $\alpha$ )産生量の測定

上記の6種類の試料から得られた熱水抽出画分(HW)とエタノール抽出画分(EtOH)をそれぞれMQ水に200 $\mu$ g/mlの濃度になるように溶解し、一昼夜放置した。次の処理を行う当日に121°C、15分間オ

ートクレープし、これをサンプルに供した。

セルラインマクロファージRAW264.7を5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/wellに調製し、24穴マイクロプレートに分注し、24時間接着させた。サンプルを1000 $\mu$ g/mlになるようにRPMI-1640で希釈し、RAW264.7に処理した。また、コントロールとしてRPMIのみ、ポジティブコントロールとしてLPS(lipopolysaccharide)100ng/mlを処理し、24時間培養した後、培養上清を回収し、次のNO量およびTNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor)活性の測定に供した。

### (4) NO産生量の測定

NO産生量の測定は、StuehrおよびNathanの方法<sup>10)</sup>に準じて行った。すなわち、96wellマイクロプレートに分注された上述の培養上清50 $\mu$ lにグリース試薬50 $\mu$ lを加えた後、570nmにおける吸光度を測定した。

### (5) TNF- $\alpha$ 活性の測定

TNF- $\alpha$ 活性は、Kerekyartoの方法<sup>11)</sup>に準じて行った。すなわち、cell L-929が2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mlになるように調製し、これを96well flat-bottomマイクロプレートに分注し、2-3時間培養して接着させた。アクチノマイシンD(4 $\mu$ g/ml)75 $\mu$ lと上述の培養上清を25 $\mu$ l加え、37°Cで20時間インキュベーションした後、上清を除き、0.1%クリスタルバイオレットで染色し、エタノール・PBS混液(1:1)に溶解し、570nmにおける吸光度を測定した。

## 3. 結果および考察

数種の野菜から得られたアセトン抽出物、エタノール抽出物、熱水抽出物および抽出残渣の量的割合をTable 1に示した。それぞれの抽出画分の量的割合は野菜の種類によってかなりの差異があるが、キャベツを除けば、熱水抽出画分が最も多かった。アブラナ科のケールおよびキャベツはエタノール抽出画分が約24%とその他の野菜に比べ、2-4倍程度多かった。アセトン抽出物は水に不溶であるため、本実験には使用できなかった。アセトン抽出画分には主に脂質等の脂溶性成分、エタノール抽出画分には単糖類、二糖類、ポリフェノール類およびそれらの配糖体、アミノ酸、ペプチドなど、熱水抽出画分には水溶性多糖類、各種配糖体、水溶性タンパク質などを含んでいるものと予測される。

Table 1 Content ratio of each extract from 6 kinds of

vegetable

	アセトン抽出物	エタノール	熱水抽出物	抽出残渣
	(%)	抽出物 (%)	(%)	(%)
モロヘイヤ	4.69	5.89	25.65	63.77
ケール	5.20	24.40	37.36	33.04
ツルムラサキ	5.56	7.46	31.53	55.45
キンジソウ	5.63	6.36	44.22	43.79
キャベツ	7.30	23.99	22.95	45.76
ホウレンソウ	3.22	10.41	40.61	45.76

Fig. 2-1 は 6 種の野菜エタノール抽出物のマクロファージ NO 産生能に及ぼす効果を調べた結果を示している. この図に見られるように, いずれの野菜エタノール抽出物についてもマクロファージ NO 産生増強効果は認められず, 逆にケール, ツルムラサキおよびキャベツのエタノール抽出物は NO 産生抑制効果が認められた.

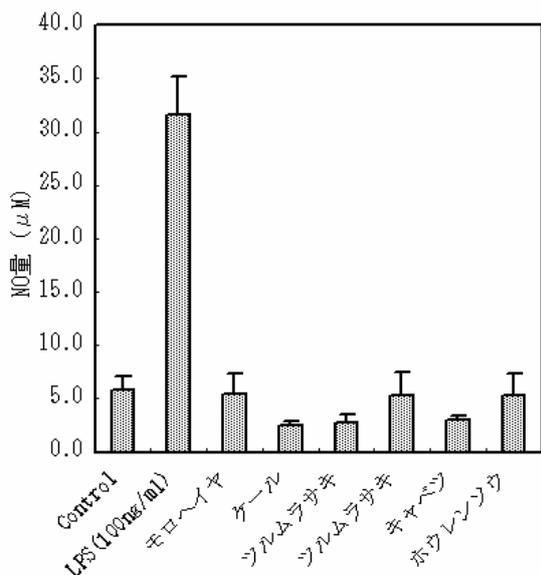


Fig. 2-1 NO contents produced from macrophage after adding ethanol-extract from 6 vegetables

次いで, 野菜熱水抽出物のマクロファージ NO 産生能に及ぼす効果を調べたところ, Fig. 2-2 に示したように, ツルムラサキ, キンジソウ, モロヘイヤおよびホウレンソウの場合, かなりの NO 産生増強効果が認められた. アブラナ科のケールとキャベツでは, NO 産生増強効果が認められなかった.

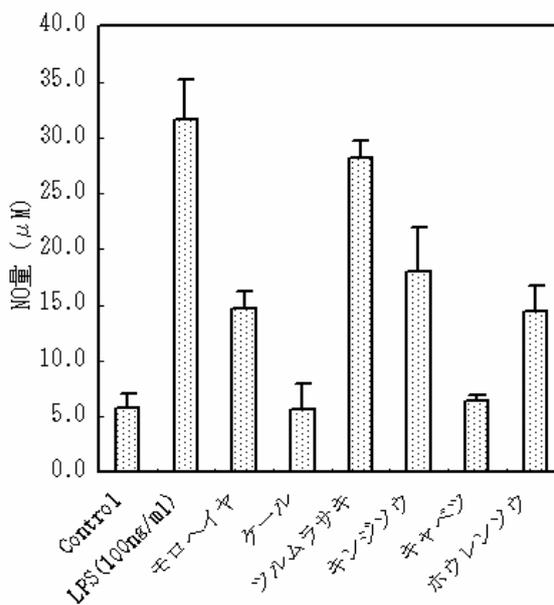


Fig. 2-2 NO contents produced from macrophage after adding hot water-extract from 6 vegetables

さらに, マクロファージ活性化の指標としてサイトカイン TNF- $\alpha$  産生能に及ぼす影響について検討を行った. Fig. 3-1 は各野菜抽出物から得たエタノール抽出物のマクロファージ TNF- $\alpha$  産生能に及ぼす効果を調べた結果である. この図で見られるように, ケールおよびホウレンソウではコントロールとほとんど変化は認められなかったが, モロヘイヤ, ツルムラサキ, キンジソウおよびキャベツでは TNF- $\alpha$  産生抑制効果が認められた. なかでもツルムラサキは, かなり強い抑制効果を示した.

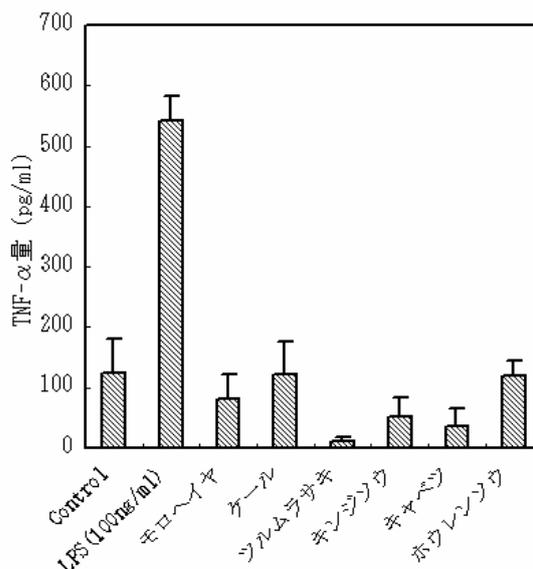


Fig. 3-1 TNF- $\alpha$  contents produced from macrophage after adding ethanol-extract from 6 vegetables

Fig. 3-2 は各種野菜熱水抽出物のマクロファージ TNF- $\alpha$  産生能に及ぼす効果を検討した結果を示している。6 種類の野菜いずれもかなり増強効果を示した。特にツルムラサキとキンジソウではポジティブコントロールである LPS (lipopolysaccharide) よりも高い値を示した。キャベツは他の 5 種類の野菜に比べてかなり低い効果しか認められなかった。

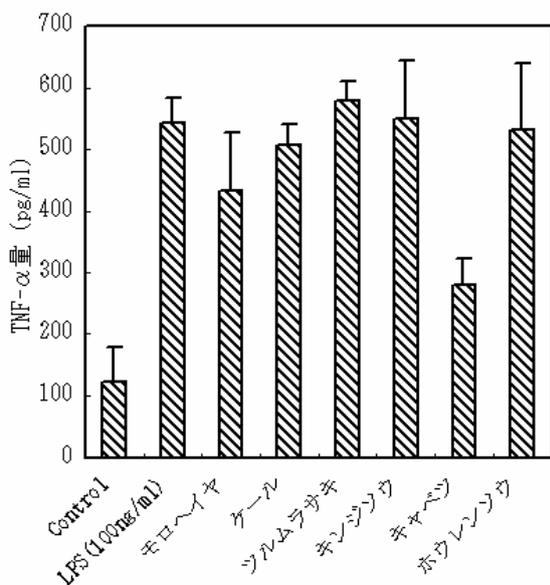


Fig. 3-2 TNF- $\alpha$  contents produced from macrophage after adding hot water-extract from 6 vegetables

山崎ら<sup>12)</sup>は、数種の野菜（キャベツ、ナス、ダイコン、ホウレンソウ、キュウリ、ニンジン、シソ）抽出物のマウス腎臓マクロファージ TNF- $\alpha$  産生能に及ぼす効果を検討した結果、キャベツ抽出物が最も増強効果があったと報告しているが、上述のように本実験で用いたツルムラサキ、キンジソウ、ホウレンソウ、ケール、モロヘイヤいずれもキャベツと比べ非常に高い値を示した。(Fig. 3-2)

Fig. 2-1, Fig. 2-2, Fig. 3-1 および Fig. 3-2 で示されている NO 産生能および TNF- $\alpha$  産生能からそれぞれの増強率（ポジティブコントロール LPS を 100 としての割合）および抑制率（コントロールを 100 としての割合）を算出して得られた結果を Table 2 に示した。この表から明らかなように、いずれの野菜も熱水抽出はマクロファージの活性化を寄与しており、エタノール抽出はマクロファージからの NO 産生および TNF- $\alpha$  産生の抑制作用を示した。特に、ツルムラサキおよびキンジソウの熱水抽出物はそれらサイトカイン産生促進効果が高く、これらの熱水抽出物中のこれらのサイトカイン産生促進物質を明らかにする必要があるものと考えている。

Table 2 Effects of hot water-extracts and ethanol-extracts from several vegetables on production of NO and TNF- $\alpha$  from macrophage

		TNF- $\alpha$ 産生		NO 産生能	
		増強率	抑制率	増強率	抑制率
熱	モロヘイヤ	79.8	-	46.4	-
水	ケール	93.4	-	-	-
抽	ツルムラサキ	107.1	-	88.9	-
出	キンジソウ	101.2	-	56.4	-
画	キャベツ	26.8	-	20.4	-
分	ホウレンソウ	98.3	-	46.4	-
エ	モロヘイヤ	-	35.7	-	5.1
タ	ケール	-	2.1	-	57.6
抽ノ	ツルムラサキ	-	91.4	-	57.6
出	キンジソウ	-	57.1	-	9.3
画ル	キャベツ	-	71.4	-	51.7
分	ホウレンソウ	-	5.7	-	8.5

\*: TNF の産生能および NO 産生の能の増強率は LPS(ポジティブコントロール)を 100%とした時の比率(%)

\*: TNF の産生能および NO 産生の能の抑制率は 100-(各野菜抽出物産生量/コントロール産生量×100)として算出した

#### 4. 要約

セルラインマクロファージ RAW264 細胞の免疫機能に及ぼす数種の野菜エタノール抽出物および熱水抽出物の影響について調べた。

セルラインマクロファージ RAW264 細胞の NO 産生能はツルムラサキ熱水抽出物を処理したものが最も高い値を示し、また TNF- $\alpha$  産生能はキンジソウおよびツルムラサキ熱水抽出物により著しく促進された。一方、これらサイトカイン産生能はツルムラサキおよびキャベツエタノール抽出物添加により抑制された。この結果から、野菜中の成分はセルラインマクロファージ RAW264 細胞の免疫機能を調節に寄与するものと考えられる。

#### 5. 参考文献

- 1) 菅原勉, 食と生活習慣病-予防医学に向けた最新の展開-, (昭和堂, 京都) pp. 2-208 (2004).
- 2) 大澤俊彦, 酸化ストレス制御因子含有植物素材の探索と評価システム, 日食工誌, 52, 7-18 (2005).
- 3) 西堀すき江, 並木和子, 野菜類・いも類・きのこ類・果実類ジュースのスーパーオキシドアニオンラジカル消去能について, 栄養学雑誌, 56, 81-87 (1996).

- 4) Yamazaki M. Ueda H. Fukuda K. Okamoto M. and Yui S, Priming effects of vegetable juice on endogenous production of tumor necrosis factor, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 149 (1992).
- 5) 山崎正利, 上田浩史, 淡色野菜類の効能-白血球活性化物質が緑黄色野菜より豊富-, 化学と生物, **33**, 145-146 (1995).
- 6) 水野雅史, 森本幹雄, 土田廣信, 横野浩一, 滝俊哉, キノコ中の免疫応答系細胞賦活物質の検索及びそれらの物質の分離と化学構造特性, 神戸大学共同研究開発センター年報, **4**, 13-28 (1992).
- 7) Mizuno M. et al., Fucogalactan isolated from *sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide from murine macrophage, *Immunopharmacol.*, **46**, 113-121 (2000).
- 8) Shin K. S., Kiyohara H., Matsumoto T. and Yamada H., Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide, *Carbohydr. Res.*, **300**, 239-249 (1997).
- 9) Yamada M. et al., Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products, *Plant Medica.*, **53**, 8-15 (1987).
- 10) Stuehr D. J. and C. F. Nathan, Nitric oxide a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J. Exp. Med.*, **169**, 1543-1555 (1989).
- 11) Kerekgartyo C. et al., Stain differences in the cytotoxic activity and TNF production of marine macrophage stimulated by Lentinan, *Int. J. Immunopharmacol.*, **18**, 347-353 (1996).
- 12) 山崎正利, 上田浩史, 植物性食品成分による白血球数の増強とサイトカイン産生調節機能, 機能性食品の研究, 初版, 荒井綜一 (学会出版センター, 東京) pp.180-186 (1995).

原著