

研究ノート**乾燥ハーブの抗アレルギー活性および抗酸化能の評価**富岡 悟¹, 後藤真生², 渡辺 純², 新井 亮³, 田口裕基³, 石川(高野) 祐子^{2*}国立大学法人茨城大学大学院農学研究科資源生物科学専攻¹,
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門²,
エスビー食品株式会社³**Anti-allergic and anti-oxidant activities of dried herbs**Satoru Tomioka¹, Masao Goto², Jun Watanabe², Ryo Arai³, Yuuki Taguchi³
and Yuko Takano-Ishikawa^{2*}Graduate School of Agriculture, Ibaraki University¹,
Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization²,
S&B Foods Inc.³**Abstract**

Anti-allergic and anti-oxidant activities of six varieties of herbs for herbal tea, hibiscus, rosemary, thyme, spearmint, lemon balm, lemon grass were estimated. Antigen-induced degranulation of RBL-2H3 cells was measured for estimating anti-allergic activity. Hibiscus, rosemary, thyme and spearmint showed the inhibitory effects. Anti-oxidant activities were measured by hydrophilic-oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method. Spearmint showed the highest H-ORAC value (4268.4 $\mu\text{mol TE/g}$) among six herbs. H-ORAC values of other herbs were lemon balm (4098.2), thyme (3723.3), rosemary (2301.7), lemon grass (856.1) and hibiscus (686.7), respectively.

Key words: anti-allergic activity, anti-oxidant activity, hydrophilic-oxygen radical absorbance capacity, dried herb
抗アレルギー活性、抗酸化能、親水性酸素ラジカル吸収能、乾燥ハーブ

ハーブ類は、食品の嗜好性や保存性の向上を目的として古くから用いられてきたが、それに加え、抗酸化、抗菌、抗炎症など様々な生体調節機能等を有することが知られるようになってきている¹⁾。近年、我が国においても食生活の多様化に伴い、様々なハーブが消費されるようになり²⁾、食と健康に対する関心の高まりを受

け、ハーブ類の機能の科学的なエビデンスや安全性確保のための研究の進展と、情報の普及が望まれている³⁾。

平成23年の厚生労働省の調査によれば、我が国でも国民の約2人に1人は何らかのアレルギー疾患に罹患している⁴⁾が、ハーブ類は、抗アレルギー活性を有するポリフェノール、特にフラボノイドアグリコン等

* 連絡先 (Corresponding author), yuko@affrc.go.jp

を多く含有している⁵⁾。また、生体内酸化ストレスとメタボリックシンドロームをはじめとする生活習慣病や老化、加齢性の疾患等との関係が解明されつつある⁶⁾なかで、ハーブ類は、主にポリフェノール化合物に由来するラジカル消去能を有する事が示唆されている⁷⁾。そこで、ハーブの抗アレルギー活性、抗酸化能の評価を目的として試験を行った。

試料および方法

1. 供試試料

エスピー食品株式会社より提供されたハーブティー用乾燥ハーブ（商品名：「フレッシュドライハーブティー」）のハイビスカス *Hibiscus sabdariffa*（アオイ科）、ローズマリー *Rosmarinus officinalis* L.、タイム *Thymus vulgaris*、スペアミント *Mentha spicata* L.、レモンバーム *Melissa officinalis*（以上シソ科）、レモングラス *Cymbopogon citratus*（イネ科）、の6種を用いた。これらの試料はアルミパウチで包装されたものを、使用時まで4℃で保管し、ミルサー（IWATANI：IFM-8000DG）で粉碎し、-20℃の暗所で保存した。

2. 試薬

試料の抽出には、メタノール、酢酸、海砂、（和光純薬工業株式会社）、ヘキサン（ナカライテスク株式会社）、ジクロロメタン（関東化学株式会社）を、抗アレルギー活性評価には Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin Solution, Hanks' Balanced Salt Solution, Mouse monoclonal anti-dinitrophenol IgE (anti-DNP IgE: マウスモノクローナル抗体), Phosphate buffered saline (PBS) (-), Dinitrophenol - human serum albumin (DNP-HAS), Wortmannin, TritonX-100, Trypsin-EDTA Solution 1x（以上、Sigma-Aldrich Japan）、Fatal Calf Solution (FCS) (Cell Culture Technologies)、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム・6水和物、グリシン、p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside, dimethyl sulfoxide (DMSO)（以上、和光純薬工業株式会社）、Glucose、クエン酸、水酸化ナトリウム（以上、国産化学株式会社）、HEPES（同仁化学研究所）、Bovine serum albumin (BSA)（ナカライテスク株式会社）のいずれも試薬特級グレードのものを用いた。また、抗酸化能評価には、リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム、メタノール、酢酸、2,2'-Azobis (2-amidinopropane)

Dihydrochloride (AAPH)（以上、和光純薬工業株式会社）、FL sodium salt, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid；Trolox（Sigma-Aldrich Japan）を用いた。

3. 試料調製

Watanabe らの方法⁸⁾に基づき、粉碎した試料約 1 g を精秤し、高速溶媒抽出機（Dionex 社製：ASE-350）を用いて、ヘキサン：ジクロロメタン=1:1 (w/w) 溶液による抽出（溶媒を吸入して 70℃、5分間静置後、1500 psi の圧力で 60 秒間バージ x3 回）に引き続き、メタノール：水：酢酸（90：9.5：0.5、以下 MWA とする）（温度：80℃、以下同様）による連続抽出を行った。MWA 抽出液は 25 mL に定容し、抗アレルギー活性および抗酸化能評価測定用試料とした。また、ハーブティーとして飲用されることを想定し、熱水による抽出（200 mL 容メデイウム瓶に約 4 g の試料を精秤し、200 mL の MilliQ 水を加え、120℃、20分間オートクレーブ加熱）を行い、熱水抽出物とした。

4. 抗アレルギー活性評価

ラット好塩基球白血病（RBL-2H3）細胞の抗原特異的脱顆粒抑制試験により評価した。MWA 抽出液 5 mL を減圧乾固後 1 mL の DMSO に再溶解したものを評価に用い、井出らの方法³⁾に準じて行った。評価試料を 490 μg/mL となるよう MT (Modified Tyrode's) Buffer (pH7.3) に希釈した。24 well plate に 5.0×10^5 cell/mL となるよう播種、Anti DNP-IgE で一晚感作した RBL-2H3 に評価試料（ネガティブコントロール (NC) には MT Buffer、ポジティブコントロールには wortmannin）を加え、DNP-HSA 溶液にて抗原特異的脱顆粒を誘導した。培地上清に遊離する β -hexosaminidase 活性を測定することにより、脱顆粒抑制活性を評価した。

また、ハーブ抽出液が RBL-2H3 細胞の生存率に与える影響を確認するため、LDH Cytotoxicity Detection Kit（タカラバイオ株式会社、Cat No. MK401）を用いた細胞障害性試験および Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System（タカラバイオ株式会社、Cat No. MK400）を用いた増殖活性試験を行った。

5. 抗酸化能評価

Watanabe らの方法⁸⁾に従い、MWA 溶液抽出画分を試料とし、標準物質として Trolox を用い、AAPH 由来ペルオキシラジカルによる FITC の蛍光値の経時

変化を測定し、親水性 ORAC 法による抗酸化能の評価を行った。

6. 統計処理

抗アレルギー活性のデータは平均値±標準誤差 (SE) で表し、Dunnnett の多重検定により NC との比較を行った。

また、抗酸化能の統計処理は Tukey の方法により行った。

結果および考察

1. 抗アレルギー活性試験

ハーブの MWA 抽出物における脱顆粒抑制活性試験では、NC に対する百分率で、ハイビスカス (29.8%), ローズマリー (35.0), タイム (39.5), スペアミント (50.2), レモンバーム (105.2), レモンガラス (105.7)

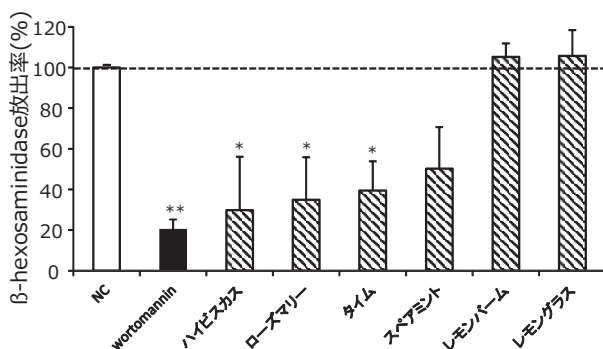


図1 ハーブ MWA 抽出物の脱顆粒抑制活性

値は平均値±SE で示した。(n=3)

Dunnnett の多重検定によりネガティブコントロール (NC) との比較を行い、** : 1%, * : 5% 水準で有意であることを示す。

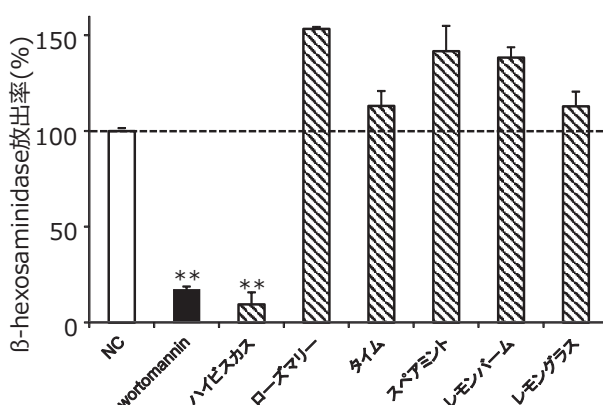


図2 ハーブ熱水抽出物の脱顆粒抑制活性

値は平均値±SE で示した。(n=3)

Dunnnett の多重検定によりネガティブコントロール (NC) との比較を行い、** : 1% 水準で有意であることを示す。

という β-hexosaminidase 放出率を示し (図1), ハイビスカス, ローズマリー, タイムは有意に脱顆粒を抑制した。また, 熱水抽出物に対する試験では, ハイビスカスのみが 9.5 % と有意に脱顆粒を抑制した (図2)。

MWA 抽出物の細胞障害性については, NC (-3.7%), wortmannin (9.1) およびレモンガラス (2.8) の細胞障害性は 10 % 以下に留まったが, ハイビスカス (10.8%), ローズマリー (18.9), タイム (20.3), レモンバーム (29.1), スペアミント (32.2) となり, スペアミントとレモンバームは NC に比べ有意な細胞障害性が認められた。同様に, 細胞の増殖に与える影響を検討したところ, DMSO, wortmannin, タイムには細胞増殖の抑制は認められなかったが, それ以外の 5 種類においては細胞増殖への影響が認められ, 特にハイビスカスは, NC に比べ, 有意に増殖を抑制した (データ略)。

さらに, MWA 抽出物において強い脱顆粒抑制活性を示した。ハイビスカスおよびローズマリーに対し用量依存性試験を行った (図3)。試料の最終試料濃度を 490, 245, 122.5, 61.25 μg/mL とし試験を行った結果, ハイビスカスでは, 490 および 245 μg/mL において NC に比べ有意に脱顆粒を抑制していたが, ローズマリーにおいては有意な差は認められなかった。

以上の結果より, 供試した 6 種類のハーブのうち, ハイビスカス, ローズマリー等では MWA 抽出物における脱顆粒抑制活性が確認され, ハイビスカスにおける効果は用量依存的事であることが明らかになった。また, ヒトがハーブティーとして飲むことを想定した熱水抽出物でも同様に試験を行い, 有機溶媒である MWA 抽出物と比較検討した。いずれの抽出物に

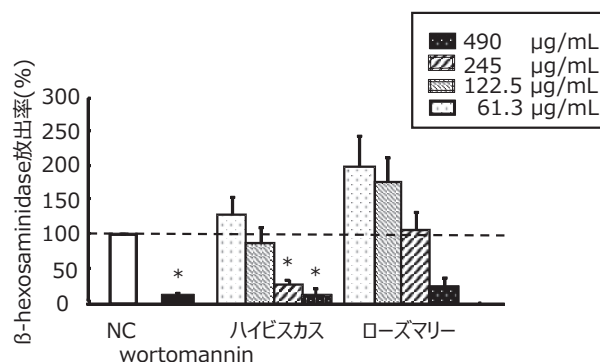


図3 ハイビスカスおよびローズマリー MWA 抽出物における用量依存的脱顆粒抑制活性の評価

値は平均値±SE で示した。(n=3)

Dunnnett の多重検定によりネガティブコントロール (NC) との比較を行い, * : 5% 水準で有意差があることを示す。

においても脱顆粒抑制活性が認められたのはハイビスカスのみであり、ローズマリー、タイム、スペアミントはMWA抽出物のみ強い脱顆粒抑制効果を示した。後者については、熱水抽出物では抑制が認められなかったことから、抑制活性の主体となる成分は熱水では抽出されにくいと考えられた。また、ローズマリーのMWA抽出物は高濃度においてのみ抑制を示した。

スペアミント、レモンバームはそれぞれ40%近い細胞障害率を示したが、これは、細胞障害による β -hexosaminidase 放出率の増加を示唆しており⁹⁾、脱顆粒抑制試験を行う際には試料の細胞障害性の有無を確認する必要があると考えられた。

WST-1による細胞増殖試験では、ハイビスカス、ローズマリー、タイム、スペアミントにおいて、有意な阻害が認められ、特にハイビスカスでは添加後30分ですでに増殖活性が低下しており、脱顆粒抑制活性試験においてもすでに細胞の活性に影響を与えている可能性が示唆された。ハイビスカスが細胞活性に影響を与えることに関してはHL-60細胞等でも報告されており¹⁰⁾、RBL-2H3細胞においても同様に細胞活性が抑制されたことが示唆された。

これらの結果から、ハイビスカス、ローズマリー、タイム、スペアミントのMWA抽出物(終濃度490 $\mu\text{g}/\text{mL}$)は、 β -hexosaminidase 放出抑制および細胞増殖抑制を示す事が明らかとなった。特にハイビスカスMWA抽出物はNCと比較し有意に抑制を示している事から、抗アレルギー活性が期待された。

2. 抗酸化能評価

H-ORAC法による抗酸化能評価では、ハイビスカス(686.7 $\mu\text{mol TE}/\text{g}$ 以下同じ)、ローズマリー(2301.7)、タイム(3723.3)、スペアミント(4268.4)、レモンバーム(4098.2)、レモングラス(856.1)の値を示した。供試した6種の中ではスペアミント、レモンバーム、タイムの3種が他に比べ高い値を示し、次いでローズマリー、レモングラス、ハイビスカスの順という結果となった(図4)。

高いH-ORAC値を示した3種およびそれに次ぐローズマリーは、いずれもシソ科に属し、抗酸化能を有するロスマリン酸を含んでいる。ロスマリン酸はカフェ酸の二量体でフェノール性水酸基4個を有し、高い抗酸化能を示す成分で、ローズマリー(7.2 mg/乾燥葉g)、タイム(23.5)、スペアミント(58.5)、レモンバーム(36.5)にという報告¹¹⁾があり、今回測定したH-ORAC値の高い順と完全に一致はしないものの、ロスマリン酸含有量

の高いハーブでは高いH-ORAC値が確認された。また、レモンバームについてはロスマリン酸の他、カフェ酸、プロトカテク酸等の抗酸化成分が検出されており、これらも高い抗酸化能に寄与しているものと考えられた¹²⁾。上記のカフェ酸等の抗酸化能はDPPHラジカル消去活性により評価されたものであるが、これらの成分はORAC法においても高い抗酸化能を有することが確認されている¹³⁾。また、多くのフラボノイドやフェニルプロパノイドのうち、オルトジフェノール構造やオルトトリフェノール構造をもたない化合物はDPPHラジカル消去活性をほとんど示さないが、ORAC法では抗酸化能を示す事も知られている。アカザ科であるハイビスカスにはクエン酸、リンゴ酸、アントシアニン、アスコルビン酸等の成分が含まれている¹⁴⁾。このうち、クエン酸は抗酸化協奏成分として、アントシアニンやアスコルビン酸(ビタミンC)は抗酸化成分として知られていることから、これらの成分が抗酸化能に寄与していると考えられる。イネ科のレモングラスはシトラール、シトロネラル、リナロール、リモネン等のテルペン類が含まれている^{15), 16), 17)}。これらのテルペン類は抗酸化能を有することが確認されている¹⁸⁾が、今回評価に用いたMWA抽出画分にはこれらの物質は抽出されないため、シソ科ハーブに比べるとH-ORAC値は低くなったと考えられる。

抗アレルギー性を示す食品はポリフェノールやフラボノイドを多く含有しているという報告があり、茶、ブロッコリー、タマネギの皮、ブドウや豆、シソおよびリンゴに含まれるポリフェノールにおいてRBL-2H3細胞に対する脱顆粒やヒスタミン遊離阻害作用が報告されている。ポリフェノールが脱顆粒を阻害するメカニズムとして、

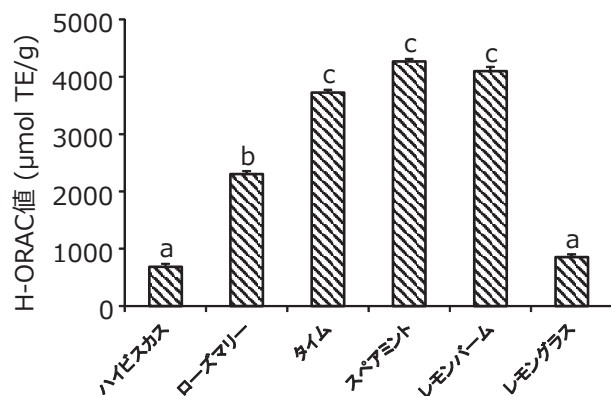


図4 ハーブ MWA 抽出物の抗酸化能 (H-ORAC 値) 値は平均値 \pm SE で示した。(n=3) Turkey の多重検定により、異なる英字は 5% 水準で有意差があることを示す。

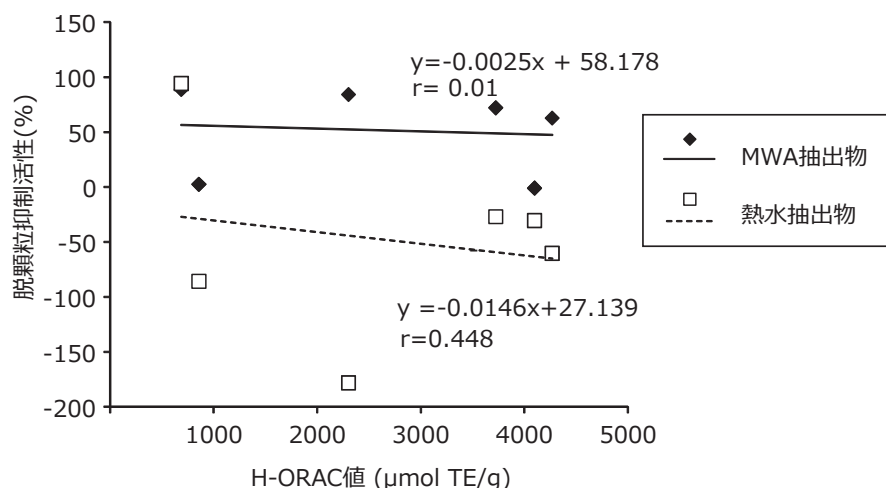


図5 ハーブ抽出物の脱顆粒抑制活性と抗酸化能の関係

IgE抗体と細胞表面のFcεR Iの結合阻害¹⁹⁾, または細胞内のリン酸化酵素の阻害が報告されている²⁰⁾.

ハーブにおいてもフラボノイド等のポリフェノールが多く含まれていることが知られていることから, 脱顆粒抑制による抗アレルギーと抗酸化の両方の機能を持つ可能性が想定されたが, 本試験の結果(図5)から脱顆粒抑制活性と抗酸化能の相関はMWA抽出物において $r = 0.01$, 熱水抽出物で $r = 0.448$ と高くなかった. このことから, 今回供試したハーブにおいて脱顆粒抑制活性を示す成分と, 抗酸化能成分とは異なると考えられた.

謝辞

本試験における試料調製ならびにORAC測定にあたり, ご協力をいただいた十山善子氏, 山本充子氏, 今野友美子氏に感謝申し上げます.

文献

- 1) 中谷延二監修(2011). 「スパイス・ハーブの機能と最新応用技術」, 株式会社シーエムシー出版, 東京.
- 2) 藤江歩巳, 久保田真紀, 梅村芳樹, 大羽和子(2001). オレガノ葉のポリフェノール化合物, 日本調理科学会誌, 34, 380-389.
- 3) 食品機能性評価センター・運営検討委員会編集(2009). 「食品機能性評価マニュアル集 第I集(改定2版)」, 社団法人 日本食品科学工学会, 94-99.
- 4) 厚生労働省(2012). リウマチ・アレルギー対策委員会報告書.
- 5) 高杉美佳子, 加藤雅子, 前田典子, 島田和子(2010). 乾燥ハーブ熱水抽出物によるケミカルメディエーター放出抑制作用, 日本食品科学工学会誌, 57, 121-127.
- 6) Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.*, 8, 244-257.
- 7) 柚木崎千鶴子(2009). ラジカル消去能, 日本食品科学工学会誌, 56, 549.
- 8) Watanabe, J., Oki, T., Takebayashi, J., Yamasaki, K., Takano-Ishikawa, Y., Hino, A., and Yasui, A. (2012). Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.*, 28(2), 159-165.
- 9) 葛谷 恒彦, 松口 貴子, 粉谷 真奈, 北尾 悟, 杉谷 義憲(2005). 食品抗酸化物による血管内皮細胞障害防止効果の解析(I): 血管内皮参加障害モデルの作成, 大阪樟蔭女子大学学芸学部論集, 42, 97-105.
- 10) Lo, C. W., Huang, H. P., Lin, H. M., Chien, C. T., Wang, C. J. (2007). Effect of Hibiscus anthocyanin-rich extract induces apoptosis of proliferating smooth muscle cell via activation of P38 MAPK and p53 pathway, *Mol Nutr Food Res.*, 51, 1452-1460.
- 11) Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A. R. and Hamedani, M. P. (2012). Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae

- family. *Pharmacogn Mag.*, **8**, 37-41.
- 12) Chen, J.H. and Ho, C.T. (1997). Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2374-2387.
 - 13) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 津志田藤二郎 (2009). 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指してORAC法の有用性と他の測定法との相関性, *化学と生物*, **47**, 237-243.
 - 14) 日本ハーブセラピスト協会 (2011), 「ハーブのある暮らしを実現するハーブ検定1級・2級」
 - 15) 佐藤 寛次, 浅野 誠, 野村 正幸, 中田 真一 (2005) レモングラス精油成分からアルデヒド類の簡便な分離・確認, *化学と教育*, **53**, 3998-4001.
 - 16) 小木曾加奈, 川上晃, 古田一匡, 牛越静子, 茅原紘 (2006). 貯蔵温度がレモングラス水中の成分と匂いに及ぼす影響, *長野県短期大学紀要*, **61**, 79-86.
 - 17) 河村 フジ子, 中村 まゆみ (1994). ラードの水煮におけるレモン添加ショウガの抗酸化効力について, *調理科学*, **27**, 260-264.
 - 18) 石川(高野) 祐子 (2008). 平成 20 年度「農水産物機能性活性推進事業」報告書, 19-58.
 - 19) 金子裕隆, 川村博幸, 熊谷武久, 渡辺紀之, 亀山真由美, 吉田充, 新本洋士 (2006). ラット白血病細胞 RBL-2H3 に対するイネポリフェノールの脱顆粒阻害作用, *日本食品工学会誌*, **53**, 416-422.
 - 20) Tokura, T., Nakano, N., Ito, T., Matsuda, H., Nagasako-Akasome, Y., Kanda, T., Ikeda, M., Okumura, K., Ogawa, H. and Nishiyama, C. (2005). Inhibitory effect of polyphenol-enriched apple extracts on mast cell degranulation in vitro targeting the binding between IgE and FcepsilonRI, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1974-1977.