

万田酵素のフリーラジカル消去作用について

河合 元子^{*1,*2} 松浦新吾郎^{*2} 森 昭胤^{*1}

要 約

万田酵素は、黒糖や種実類を原料とした健康食品として用いられている。本実験では、この万田酵素の *in vitro* でのフリーラジカル消去作用を検討した。その結果、万田酵素は脂溶性の 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル、水溶性のスーパーオキシドおよびヒドロキシラジカルを濃度依存的に消去した。

このことより、万田酵素の生体での作用機序の一つとしてフリーラジカル消去作用が考えられる。

はじめに

万田酵素は茶褐色、エキス状で甘味があり、黒糖、種実、柑橘類を主な原料とし多段階的発酵を経て作られた自然発酵食品である。近年、発酵食品や漢方薬などのフリーラジカル消去作用が報告されており、生体内でのフリーラジカルが関与して生じる疾病への作用が期待されている。

そこで本研究では、電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いて *in vitro* での万田酵素のフリーラジカル消去作用についての検討を行った。

* 1 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門, * 2 万田発酵株式会社

実験方法

1. 実験材料

万田酵素は万田発酵株式会社より提供を受けたものを用いた。これに 100 ml リン酸 buffer (pH7.8) を加え 10% 溶液とし、これを希釈することにより実験に用いた。万田酵素は Table 1 の原材料を用い、Fig. 1 のような製造工程を経て製造される。

2. 試 薬

Hypoxanthine (HPX), DPPH, diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA) は、Sigma Chemical

Free Radical Scavenging Action of MANDA

Motoko Kawai (Department of Neuroscience, Institute of Molecular and Cellular Medicine, Okayama University Medical School) et al.

Table 1 万田酵素の主要原材料名

原材料名		%
大粒果実	リンゴ, カキ, バナナ, パイナップル	22.3
小粒果実	アケビ, マタタビ, イチジク, ぶどう, 山桃など	3.8
柑橘類	ネーブル, ハッサク, みかん, 夏みかん, ゆずなど	14.0
根菜類	ゴボウ, ニンジン, ニンニク, レンコン等	5.3
穀類	玄米, もち米, 麦, 米等	8.1
豆・ゴマ類	大豆, 黒ゴマ, 白ゴマ	5.2
海藻類	コンブ, ヒジキ, ノリ	5.3
糖類	黒糖等	33.4
その他	はちみつ, 澱粉等	2.6
計		100.0

社製のものを, xanthine oxidase (XOD) は Boehringer Mannheim 社製のものを, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide は, LABOTEC 社のものを用いた。

3. スペクトル

DPPH ラジカル: 30 μM DPPH ethanol 溶液を 100 μl に, サンプルを 100 μl 加え, 攪拌し扁平セルに移した後, 正確に 60 秒後に掃引を開始した。

Superoxide ラジカル: 2 mM hypoxanthine 50 μl, 10.98mM DTPA 35 μl, サンプル 50 μl, DMPO 15 μl と 0.32unit xanthin oxidase suspension (XOD) 50 μl を加え, 攪拌した。DMPO-O₂⁻ adduct は XOD を加え, 60 秒後に掃引を開始した。

Hydroxyl ラジカル: 1mM FeSO₄ と 1 mM DTPA 75 μl, サンプル 50 μl, 0.184M DMPO 20 μl, 1 mM H₂O₂ 75 μl を取り攪拌した。DMPO-OH adduct は H₂O₂ を加えた後 60 秒後に掃引を開始した。

以上のサンプルを以下の条件により測定を行った。

Magnetic field : 335 ± 5mT

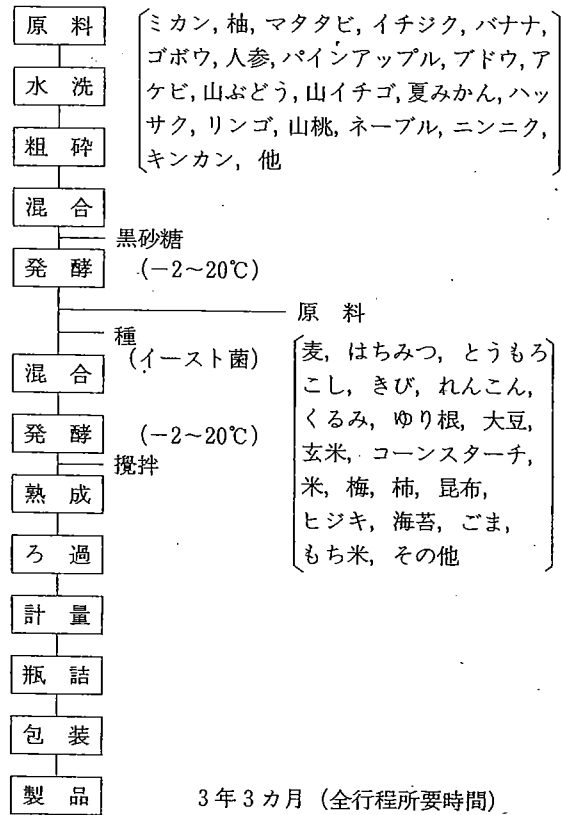


Fig. 1 Schematic diagram of preparation of MANDA

Response : 0.3s

Sweep time : 0.5 (DPPH) min

2 (superoxide radical) min

0.5 (hydroxyl radical) min

Amplitude : 7.9 × 10² (DPPH)

1.6 × 10³ (superoxide radical)

1.6 × 10³ (hydroxyl radical)

Moduration : 100 Hz 0.8G

Power : 8mV

実験結果

1. DPPH ラジカル

30 μM の DPPH ethanol 溶液は, ESR により DPPH ラジカルに特有な 5 本のシグナルが検出される。この溶液に万田酵素のリン酸 buffer 溶液

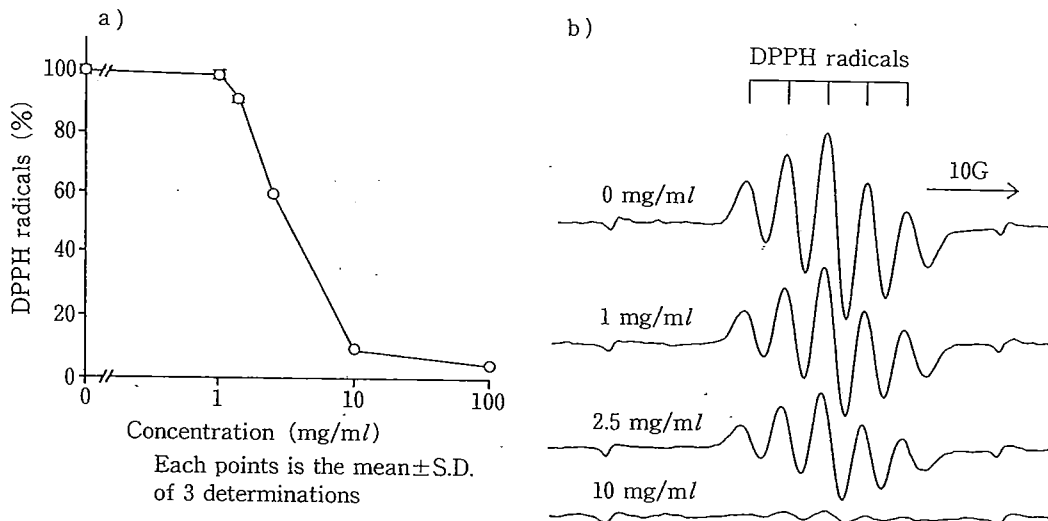


Fig. 2 Effect of MANDA concentration on DPPH radicals (a) and concentration-dependent effect (b)

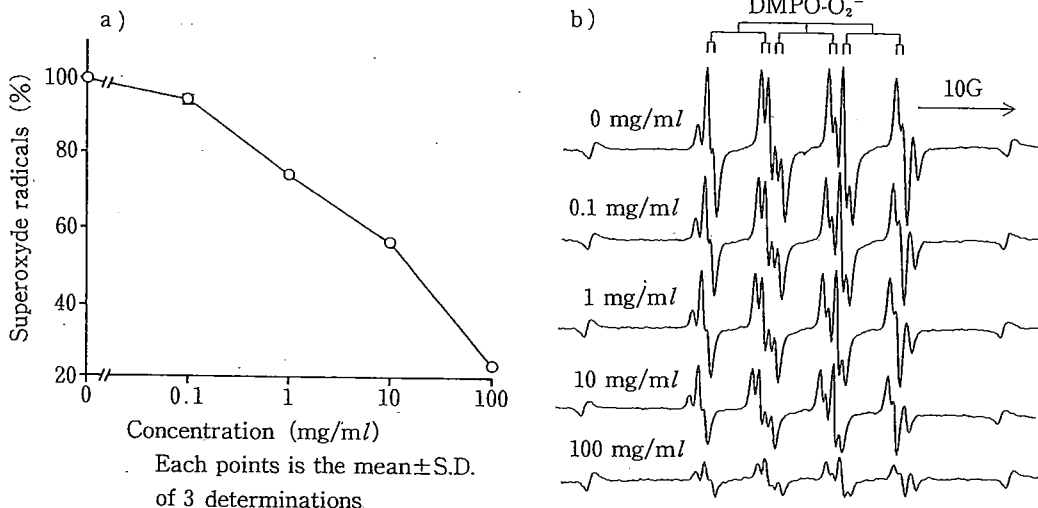


Fig. 3 Effect of MANDA concentration on superoxide radicals (a) and concentration-dependent effect (b)

を加えていくと、濃度依存的に DPPH ラジカルを消去し、10 mg/ml 溶液は DPPH のシグナルを完全に消去した (Fig. 2)。IC₅₀ (50%消去する濃度) は 4.3 mg/ml であった。

2. スーパーオキシドラジカル

HPX-XOD 系において発生するスーパーオキシドラジカルはスピントラップ剤である DMPO

により adduct されると 12 本のシグナルが検出される。この系に万田酵素のリン酸 buffer 溶液を加えていくと、シグナルが濃度依存的に消去される (Fig. 3)。IC₅₀ は 28.0 mg/ml であった。

3. ヒドロキシルラジカル

Fenton 反応により・OH ラジカルを発生させ、同様に DMPO により adduct すると 4 本のシグ

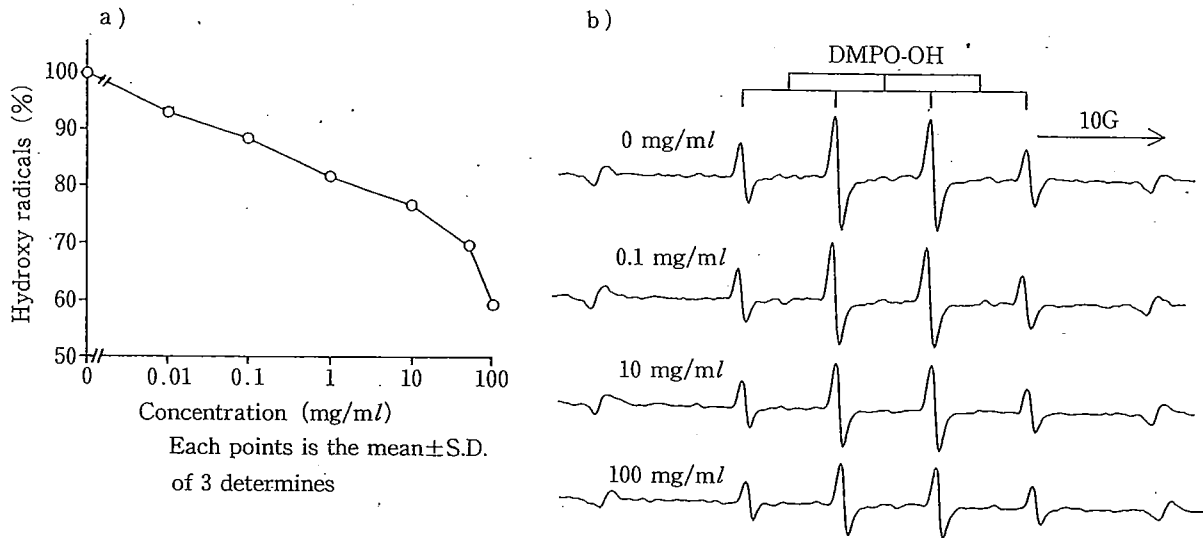


Fig. 4 Effect of MANDA concentration on hydroxyl radicals (a) and concentration-dependent effect (b)

ナルが検出される。この系に万田酵素のリン酸 buffer 溶液を加えるとシグナルが消去した (Fig. 4)。

考 察

発酵食品、高等植物エキスおよび漢方薬などで数多くのフリーラジカル消去作用の報告がなされている¹⁻⁵⁾。また、大豆の発酵食品である味噌は、他に乳ガンを抑制すること、蛋白質分解酵素の inhibitor としてその抗癌作用が報告されている⁶⁾。

本実験において我々は *in vitro* での3種のフリーラジカルにおける万田酵素の検討をした結果、万田酵素はフリーラジカルを消去することが明らかになった。よって、万田酵素の *in vivo* での作用機序の一つとして、フリーラジカルと関連して生ずると考えられている炎症や組織障害などの抑制作用も示唆される。また、味噌と同様に抗癌作用も期待される^{7,8)}。さらに、老化のフリーラジカル説も唱えられていることから抗老化に対する作用も期待され^{9,10)}、今後、老化モデルなどを用いてさらに研究を進めていきたい。

文 献

- 1) Santiago, L. A., Hiramatsu, M. & Mori, A. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38 : 297~304, 1992
- 2) Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Kohno, M. & Mori, A. : *Excerpta Medica*, 120~127, 1988
- 3) 奥田拓男, 吉川敏一 (編) : “フリーラジカルと和漢薬”, 国際医書出版, 1989
- 4) Liu, J., Edamatsu, R., Hamada, H. & Mori, A. : *Neurosciences*, 16 : 623~630, 1990
- 5) Liu, J. & Mori, A. : *Neuropharmacology*, 31 : 1287~1298, 1992
- 6) Fitzsimons, J. T. R., Orson, N. V. & El-Aaser, A. A. : *Biochem. physiol.*, 93A : 285~290, 1989
- 7) Hirayama, T. : *Nutr. Cancer*, 3 : 223~233, 1982
- 8) 平山 雄 : 泌尿紀要, 33 : 1550~1555, 1987
- 9) Liu, J. & Mori, A. : *Mechanism of Ageing and Development*, 71 : 23~30, 1993

Free Radical Scavenging Action of MANDA

Motoko Kawai^{*1,*2}, Shingoro Matsuura^{*2} and Akitane Mori^{*1}

Abstract

MANDA is a brown, sweet and sticky natural health food commercially sold in Japan. It is made by yeast fermentation of cane sugar, fruits, seeds, vegetables and seaweeds for more than 39 months.

Their effects on free radicals were examined by electron spin resonance spectrometry using spin trapping agent 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO). It was observed that 100mg/ml MANDA scavenged 41% of DMPO-OH spin adducts (20×10^{15} spins/ml) generated by $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ -diethylenetriaminepentaacetic acid system. 75% of DMPO- O_2^- spin adducts (6.8×10^{15} spins/ml) generated by hypoxanthine-xanthine oxidase system and 99% of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals (99×10^{15} spins/ml) were quenched by using 50 mg/ml of MANDA.

References

- 1) Santiago, L. A., Hiramatsu, M. & Mori, A. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **38** : 297~308, 1992
- 2) Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Kohno, M. & Mori, A. : *Excerpta Medica*, 120~127, 1988.
- 3) Okuda, T. & Yoshikawa, T. (ed.) : "Free Radicals and Wakanyaku", Kokusai Isho Shuppan, 1989
- 4) Liu, J., Edamatsu, R., Hamada, H. & Mori, A. : *Neurosciences*, **16** : 623~630, 1990
- 5) Liu, J. & Mori, A. : *Neuropharmacology*, **31** : 1287~1298, 1992
- 6) Fitzsimons, J. T. R., Orson, N. V. & El-Aaser, A. A. : *Biochem. Physiol.*, **93A** : 285~290, 1989
- 7) Hirayama, T. : *Nutr. Cancer*, **3** : 223~233, 1982
- 8) Hirayama, T. : *Hinyokika-kiyo*, **33** : 1550~1555, 1987
- 9) Liu, J. & Mori, A. : *Mechanism of Ageing and Development*, **71** : 23~30, 1993

* 1 Department of Neuroscience, Institute of Molecular and Cellular Medicine, Okayama University Medical School, * 2 MANDA Fermentation Co., Ltd.