

抗がん作用のある天然物質の機能性に関する研究(その2)

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部

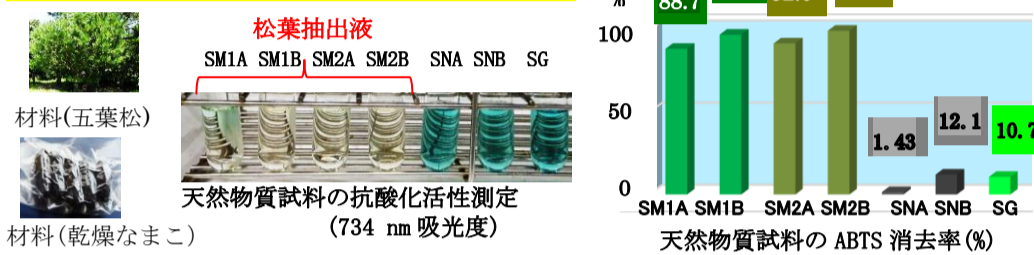
はじめに

抗がん剤は、がんの有効な治療法のひとつとして使用されている。がん細胞以外の正常な細胞にも作用し、副作用を伴うことも知られている。医療現場では抗がん剤による副作用の軽減が課題となっている。一方、天然物質の抽出物に抗がん効果が示され利用されている事実がある。私たちは抗がん作用を有すると知られる天然物質の機能性(抗菌性、抗真菌性、抗酸化性)と抗がん効果の関連性について調べたいと考えた。抗真菌性は、がん細胞生育抑制に関係し、抗酸化性は、活性酸素除去効果や免疫細胞活性化によるがん発生予防に有効と考えた。先行研究(2022.6~2022.12)において、天然物質(松葉、なまこ、ゴーヤ)の抽出物を試料として機能性試験を行った。その結果、松葉抽出液に高い抗酸化活性、なまこ抽出液にやや高い抗真菌活性がみられた。2023年4月から追加試料としてニンニク抽出液を試料として抗菌、抗真菌活性試験、抗酸化活性試験をインビトロで試みた。その結果、ニンニク抽出液に極めて高い抗菌、抗真菌活性がみられた。ニンニク成分の高抗真菌性は、抗がん作用に関連する可能性を示唆している。又、ニンニク抽出液の抗(真)菌活性力を抗生物質、抗真菌物質の活性力と比較した。併せて報告する。

1. 先行研究(まとめ)

実験1: 抗がん用に民間療法で使用されている天然物質(松葉、なまこ、ゴーヤ)抽出液の機能性試験(抗菌、抗真菌、抗酸化性)を行った。試料(抽出液)は松葉(10mM酢酸 Buffer)をSM1A、同(50%エタノール)をSM1B、市販松葉粉末(10mM酢酸 Buffer)をSM2A、同(50%エタノール)をSM2B、乾燥なまこ(10mM酢酸 Buffer)をSNA、同(50%エタノール)をSNB、ゴーヤ搾汁液をSGとした。

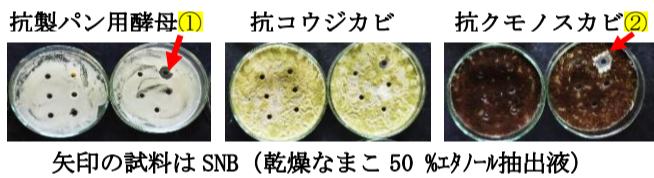
天然物質抽出液の抗酸化活性測定(ABTS法)結果



考察: 試料(松葉抽出液)SM1A, SM1B, SM2A, SM2Bは抗酸化活性が高くABTSラジカル消去率は88.7~99.7%と高率を示した。抽出溶媒の比較では、50%エタノールが10mM酢酸 Bufferよりやや高い活性がみられたが、ほぼ同程度なので、松葉の水溶性抽出成分に強力な抗酸化物質が含まれ、免疫力向上効果が期待され、がん発生予防効果に関与する可能性を秘めている。

実験2: 天然物質抽出液の抗真菌活性測定(寒天穿孔平板法)結果

検定真菌は市販パン酵母(日清フーズ製)、市販コウジカビ(岐阜県厚生産業製)、クモノスカビ(NBRC標準株)を使用し、YM寒天(酵母用)、PDA培寒天を検定培地とした。方法は寒天穿孔平板法で行い、30℃で約3日間の培養後、阻止円の有無と直径を計測した。考察: 乾燥なまこの50%エタノール抽出液からは市販酵母に直径11.0mm(①)、クモノスカビに直径12.0mm(②)の阻止円が形成され抗真菌活性を示した。10mM酢酸 Buffer抽出液に活性がみられなかったため、乾燥なまこの抗真菌成分が脂溶性である可能性が示唆される。乾燥なまこ含有の抗真菌成分は抗がん効果(がん細胞増殖抑制)に関与すると考えられる。

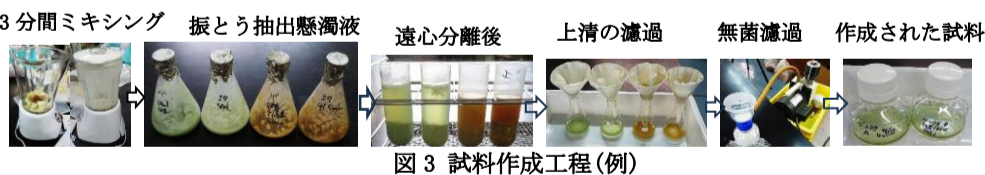


2. ニンニクの機能性探索

世界中の料理に欠かせない「にんにく」は、滋養強壯の食材として知られている。防腐剤、医薬品など食品以外の目的でも用いられてきた。1990年にはアメリカ国立がん研究所の「デザイナーフーズ計画」によって、最もがん抑制効果の高い食品として「にんにく」が選ばれた。ニンニクの健康効果とりわけ抗がん効果を裏付けるべく成分の機能性(抗菌性、抗真菌性、抗酸化性)についてインビトロで実験を行った。ニンニクの健康効果がいくら大きくても多用すると副作用があり適量摂取が好ましい。実験は試料を生ニンニクと加熱済ニンニクに分けて作成した。

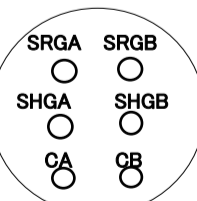
2-1) 準備

(材料) 国内産ニンニク(図1)、加熱したニンニク(図2)
(溶媒) 10mM酢酸 Buffer(pH5.0)、50%エタノール
(検定(真)菌種類) コクリア菌、大腸菌、枯草菌、製パン用酵母、検定用酵母NBRC標準株、コウジカビ、クモノスカビ
(検定培地) ミューラーヒントン寒天、YM寒天、PDA寒天
(試薬) ABTSラジカル
試料の作成は生ニンニク(RG: raw garlic) 50gに溶媒{10mM酢酸 Buffer(A)※、50%エタノール(B)} 100mLを加えミキシング、懸濁液を7℃で24時間振とう抽出した(図3)。



2-2) ニンニク抽出液の抗菌・抗真菌活性試験

方法は寒天穿孔平板法で行った。平板培地上に検定菌前培養液6種類をそれぞれ100μL滴下しコンラージ棒で塗抹した。次に、コルポラーを使用して、直径6mmの穿孔を培地上に作成し、その穿孔に試料を30μL注入した。比較試料として溶媒の10mM酢酸 Buffer(CA)、50%エタノール(CB)を同様に供試し35℃で2日間培養した。試料は図4に示した培地の穿孔位置に注入した。結果と考察: 培養後の観察から阻止円の有無と直径を計測し、3回の平均を表に表示した(図5表1)。



生ニンニク抽出液は極めて高い抗菌活性を示した(表1)。溶媒抽出の比較では、50%エタノール抽出液の方がやや高い活性を有した。通常、ニンニクの多くは加熱処理後に食するが、加熱したニンニク抽出液の抗菌活性は著しく低下した。抗菌物質のアリシンは加熱により抗菌性の弱い成分に変化したと考えられる。極めて強い抗菌性を有するニ

ンニク成分に感染症予防の効果が期待される。又、生ニンニク抽出液は高い抗真菌活性を示した。製パン用酵母やクモノスカビに対して極めて高い抗真菌活性がみられた。溶媒抽出の比較では、50%エタノール抽出液の方がやや高い活性を示したが、ほぼ同等の活性力であることから、ニンニク抽出液に含まれる抗真菌活性成分の多くは水溶性であると思われる。ニンニクの抽出成分には抗がん作用(がん細胞増殖抑制)を発揮する可能性を有すると考える。但し、ヒトの正常細胞(真菌)に対する強い働きが予想され、その副作用が懸念される。

表1 天然物質試料の抗(真)菌活性試験(阻止円直径mm)

試料種類 \ 検定(真)菌	コクリア菌(G+)	大腸菌(G-)	枯草菌(G+)	製パン用酵母	コウジカビ	クモノスカビ
ニンニク(生) SRGA	26.0	20.0	24.5	22.5	12.0	>30
" SRGB	29.0	22.0	25.0	23.5	14.5	>30
ニンニク(加熱)SHGA	8.5	7.5	7.0	7.0	-	12.0
" SHGB	8.0	7.0	-	-	-	9.0

阻止円の直径20mm以上を強い抗(真)菌力(太字強調)、直径12~20mm未満をやや強い抗(真)菌力(太字)、直径7~12mm未満を弱い抗(真)菌力(細字)、阻止円の認められないものをマイナス(-)とし、抗(真)菌力なしと判定した。コントロールとしてのCA, CBは抗(真)菌力がみられなかったため表から削除した。

2-3) 抗酸化活性試験

測定方法はABTS法で行った。試験管に7mMABTSラジカル溶液(吸光度0.7absに調整)を3mL採り各試料(SRGA, SRGB, SHGA, SHGB)溶液30μLを添加した。添加後攪拌し常温で4分間インキュベート後、734nmにおける吸光度を測定した。結果と考察: 測定結果から試料のABTSラジカル消去率を以下の式から計算した(図6, 7表2)。



$$\text{ラジカル消去率(\%)} = \frac{C - (S \div D)}{C} \times 100$$

(Cはコントロール, Sは試料の吸光度値でDは試料の希釈倍率)

図6 ニンニク試料の抗酸化活性測定(734nm吸光度)

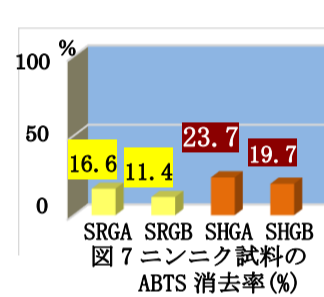


表2 ニンニク質試料の抗酸化活性測定(ABTS消去率%)

試料種類・抽出液 g/ml	希釈倍率 D	吸光度 (abs) S	ラジカル消去率(%)
ニンニク(生) RGA 20/20	1	0.584	16.6
" RGB 20/20	1	0.620	11.4
ニンニク(加熱)HGA 20/20	1	0.534	23.7
" HGB 20/20	1	0.562	19.7
CA (10mM酢酸 Buffer)		0.700	
CB (50%エタノール)		0.700	

ニンニク抽出液は先の実験で高い抗酸化活性を有した松葉抽出液と比較すると活性は低く免疫力向上は期待できない。生、加熱による比較では、やや加熱ニンニクの方が活性が高く、加熱により抗酸化成分の生成が示唆された。抽出溶媒の比較では、50%エタノール抽出液より50mM酢酸 Bufferの方がやや高い活性がみられた。

3. ニンニクと抗生物質・抗真菌物質の抗(真)菌活性(比較)

3-1) ニンニク試料(生ニンニク50gを純水100mLに抽出)を先と同じ方法で抗(真)菌活性試験を試み、形成された阻止円(図8)の直径を計測した。検定(真)菌: コクリア菌 大腸菌 枯草菌 製パン用酵母 検定用酵母 コウジカビ クモノスカビ

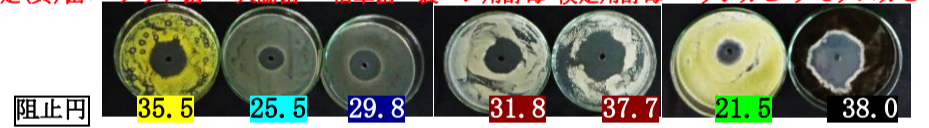


図8 ニンニク抽出液の抗(真)菌活性試験(阻止円mm)

3-2) 抗生物質(ストレプトマイシン SM、テトラサイクリン TC、アミノシリン ABPC-図9)は0.1gを10mLの純水に、又、抗真菌剤(フルコナゾール-図10)は0.04gを10mLのエタノール(99.5%)に溶き、希釈して試料を作成し、抗(真)菌活性試験に供試した。各希釈濃度による阻止円をニンニク試料と比較し、ニンニク試料の抗(真)菌活性力に相当する薬剤濃度を決定した(表4, 5太字協調)。

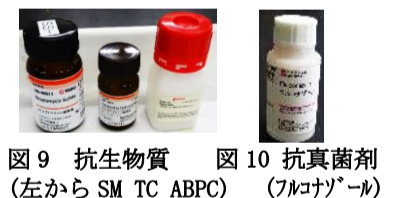


図9 抗生物質 図10 抗真菌剤 (左から SM TC ABPC) (フルコナゾール)

結果と考察: 表4 抗生物質(SM, TC, ABPC)の抗菌活性試験(阻止円mm)

抗生物質種類・検定菌濃度 μg/ml	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5
SM・コクリア菌	33.5	30.0	23.0	18.0	10.0	7.0	-	-	-	-	-
大腸菌		25.5	24.0	20.0	13.0	10.0	-	-	-	-	-
枯草菌			30.0	27.0	20.0	16.5	12.8	-	-	-	-
TC・コクリア菌	33.0	28.5	25.5	20.5	15.0	13.0	8.0	7.0	7.0	-	-
大腸菌		21.0	17.5	15.0	13.5	12.8	10.3	9.5	-	-	-
枯草菌			29.5	245	20.0	20.0	15.0	12.0	-	-	-
ABPC・コクリア菌							35.5	33.5	24.0	21.0	18.0
大腸菌		23.0	15.5	11.0	10.0	-	-	-	-	-	-
枯草菌			30.0	28.5	25.0	20.3	23.3	18.2	17.3	13.8	-

表5 抗真菌剤(フルコナゾール)の抗真菌活性試験(阻止円mm)

抗真菌剤・検定菌濃度 μg/ml	2048	1024	512	256	128	64
製パン用酵母	23.5	17.5	15.0	12.0	6.5	-
検定用酵母	27.0	23.0	17.5	14.0	6.5	-
コウジカビ	±	±	±	±	±	±
クモノスカビ	±	±	±	±	±	±

ニンニク試料の抗菌活性力はSM, TC濃度128~512μg/mLに相当した。APBCは細菌の種類により相当する濃度に大きな差が生じたが抗生物質を補完できる可能性が期待される。抗真菌剤(フルコナゾール)は酵母に対して高濃度(最大2048μg/mL)で活性を有したが(図11)、ニンニク試料の活性力には及ばず、カビに対して活性はみられず、ニンニク試料に相当する薬剤の濃度は決定できなかった。ニンニクの高い抗真菌活性力は抗がん効果に関係すると考える。アメリカ国立がん研究所ファクトシートによれば、「検証した臨床試験は少なく結論が困難」という現況にあるが、抗がん剤を補完できる天然物質としての期待が一層高まった。

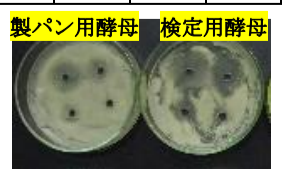


図11 フルコナゾールの抗真菌活性試験例(μg/ml) (左上2048, 右上1024) (左下512, 右下256)

