

原著

ミルクフルーツ（熱帯果樹）種子における生理活性効果

天川 雅夫¹⁾・秋山 秀彦²⁾・日下 雅友¹⁾・一原 直人¹⁾・Try Pros³⁾・加藤 亮二¹⁾

- 1) 純真学園大学保健医療学部検査科学科, 2) 藤田保健衛生大学医療科学部臨床検査学科
3) プノンペン市保健局救急部（カンボジア）

Physiological Activity from Chrysophyllum Cainito Linne (Star Apple) Seeds

Masao AMAKAWA¹⁾, Hidehiko AKIYAMA²⁾, Masatomo KUSAKA¹⁾,
Naoto ICHIHARA¹⁾, Try Pros³⁾, Ryoji KATO¹⁾

- 1) Department of Medical Laboratory Sciences, Junshin Gakuen University
2) Department of Medical Technology, Fujita Health University School of Health Sciences
3) Department of Emergency Medicine, Phnom Penh Municipal Health Department.

要旨: 植物種子には血液型特異的凝集素の含有をはじめ、リンパ球分裂促進作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用等、多様な生理活性を有することが知られている。今回、これらの種子の中で、熱帯果樹のひとつであるミルクフルーツ種子に高度な細胞溶解作用を有することを見出し、その細胞溶解の生理作用を明らかにする目的で研究を行った。検討内容は種子が持つ抗酸化力及び細胞溶解能で、抗酸化力の測定は従来から測定されてきたDPPH法、細胞溶解能は白血球癌細胞株であるHL60細胞と健常者の単核球（対照）を用いてMTT試験による細胞生存率について測定し、更に細胞の形態変化についてもパッペンハイム染色を用いて検討した。抗酸化力測定ではミルクフルーツ種子の種皮に高い抗酸化力を認め、胚乳にはその能力は認めなかった。一方、細胞溶解能についてはミルクフルーツの胚乳にHL60細胞の増殖の抑制を認め、種皮には認めなかった。HL60細胞の形態変化についてはクロマチンの凝縮、細胞の縮小化や核の断片化を認めたが、対照の健常者単核球には明らかな変化を認めなかった。

以上の結果からミルクフルーツ種子の種皮には抗酸化作用を認め、一方、HL60細胞の増殖抑制には胚乳が関与していた。この細胞増殖の抑制は細胞数の減少であり、そのメカニズムはアポトーシスあるいはネクローシスのいずれかが考えられる。

キーワード: ミルクフルーツ、種子、抗酸化力、DPPHラジカル消去活性測定法、細胞生存率測定

Abstract: It is well-known that plant seeds have several functions including: physiological activity; blood type specific hemagglutination; lymphocyte mitogen; anti-oxidant; anti-tumor; aging inhibitor and regulators for diabetes.

In this study, to clarify the physiological characteristics of the Chrysophyllum Cainito Linne (Star Apple) which is a fruit that has strong cytotoxicity functions.

Star Apple extract was considered because of its high anti-oxidant ability and cytotoxicity functions. The DPPH method was used in measuring its anti-oxidant ability and MTT assay was used for the general viability of HL60.

This was derived from acute promyelocyte leukemia cells and normal mononucleosis taken from a healthy person. Moreover, HL60 and mononucleosis were observed including the morphological change in Star Apple seed extract using Pappenheim staining.

As a result, a thin coat of Star Apple seed showed its anti-oxidant abilities but we didn't observe any change in cell numbers. Furthermore, a morphological change in HL60 with the addition of Star Apple seed endosperm was observed.

The aggregation of chromatin and reduction of the cell which included a fragmented cell nuclear. The endosperm of the Star Apple seed showed a reduction of the amount of cells and morphological change of the cell shape in the HL60 cell line.

We can infer that due to the mechanism in cell number reduction using the Star Apple seed endosperm apoptosis or necrosis can be induced.

Keyword: Chrysophyllum Cainito Linne, Seed, Anti-oxidant ability, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free-radical scavenging activity, MTT Assay

1. はじめに

植物種子にはリンパ球分裂促進作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用等、多様な生理活性を有することが知られている。例えば血液型特異的赤血球凝集作用を有する植物種子にはゴーヤ種子やリリマメ¹⁻³⁾、リンパ球分裂促進作用ではレンズマメ、アカインゲンマメおよびエンドウマメ⁴⁻⁵⁾、細胞凝集作用はダイズ、ソラマメおよびピーナッツ⁶⁾、フラボノイド由来成分による老化抑制作用はイチゴ種子⁷⁾に有することが報告されている。近年、このような多様な生理活性を有する植物種子を用いた研究が行われるようになり、高知大学では産学官連携による共同研究で地元の特産品の一つである枇杷種子から加工・抽出して得た抗酸化力の高いN-アセチルL-システイン(NAC)を、美容・ダイエット食品や飲料へ応用⁸⁾などがある。また、著者らも124種の植物種子〔果実類35品種、野菜類82品種(根菜類14品種、葉菜類26品種、果菜類42品種)、穀類2品種、香辛料類1品種および種実類4品種〕を用いて種子中の抗酸化力測定を行った結果、柿の種子に高い抗酸化力を有していることを見出し、この抗酸化物質が含まれる柿種子抽出液を糖尿病病態マウスに3ヶ月間経口投与した結果、血糖値の増加抑制を確認できた。更に、前述した124品種の植物種子について細胞溶解能を調べたところ、*Chrysophyllum Cainito Linne*の種子に高度な細胞溶解能があることを見出した。

*Chrysophyllum Cainito Linne*はアカテツ科の常緑樹(図1)で、東南アジアなどの熱帯地域に生

育しているが、この果実はゼリー状で白色の乳液を含んでいることから、カンボジアではミルクフルーツと呼ばれている。また、この果実を横に輪切りにすると星形の模様が浮き出ることから、英名ではスターアップルとも呼ばれている。カンボジアでは、このミルクフルーツの葉や樹皮は生薬として利用されているが、種子に含まれている成分の生理作用などは不明である。今回、このミルクフルーツ種子の生理作用を明らかにするため、抗酸化力および細胞溶解能について検討したので報告する。

2. 材料および方法

1) 材料

ミルクフルーツ種子はカンボジアのカンダール州産(図1)の種子約1kgを空輸で検疫後に入手した。

細胞溶解能に使用したAおよびB型の血球はアフーマジェン(オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス社)、O型血球は健常者の血液を用いた。また、細胞生存率の測定および細胞の形態学的変化は、急性前骨髄球性白血病細胞株であるHL60細胞を用い、その対照としては健常者の単核球を用いて検討した。

2) 方法

2)-1 ミルクフルーツ種子抽出液の作製

ミルクフルーツ種子の抽出液は、以下の方法で作製した。まず、種子を図2に示すように種皮と



図1 産地とミルクフルーツ ; *Chrysophyllum Cainito Linne* (Star Apple)

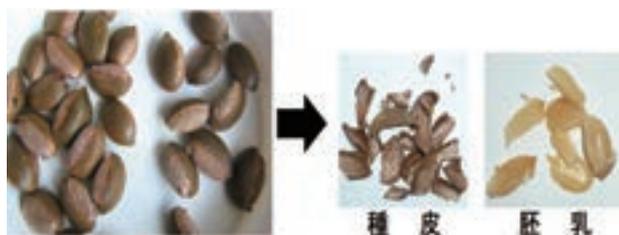


図2 ミルクフルーツ種子

胚乳に分け、それぞれ1gに対して10mLの生理食塩液（生食）を加え、乳鉢で磨り潰して抽出し、10,000 rpm 4℃ 30分間遠心した。遠心後の上清を回収し、紫外吸収法（280nm）よりタンパク濃度を求めた。

2)-2 ミルクフルーツ種子抽出液の抗酸化力測定
抗酸化力測定法として、従来から利用されている DPPH 法（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free-radical scavenging activity）を用いて測定した。

測定方法は、ミルクフルーツの種子、種皮および胚乳に分け、それぞれ500 μg/mLとなるように濃度調整した。サンプルを各々50 μLに0.1mM DPPH 溶液（同仁化学）および0.05M トリス塩酸緩衝液（pH7.4）を1mLずつ混和させ、室温で30分間反応後、517nmで吸光度を測定した。また、陽性対照は抗酸化力が高いことで知られているプロポリスを用いた。抗酸化力は試料吸光度値をブランク吸光度値で除した DPPH 残存率（%）として示した。

$$\text{DPPH 残存率 (\%)} = \left(\frac{\text{試料吸光度値}}{\text{ブランク吸光度値}} \right) \times 100$$

2)-3 ミルクフルーツ種子抽出液の細胞溶解能

i) 細胞溶解能

細胞は A, B および O 型の血球を用い、それぞれの血球を生食にて洗浄後、2% 血球浮遊液を作製した。ミルクフルーツの抽出液（原液 :10mg/ml）を生食で1,024倍まで2倍連続希釈し、各々50 μLと前述した2% 血球浮遊液50 μLずつ等量混和後、すぐに3,400rpm、15秒間遠心後、判定した。また、血球溶解の対照として0~3%の塩化ナトリウムの濃度勾配を作成し血球の浸透圧による溶解を調べたところ、0.3%以下の塩化ナトリウム

低張液で細胞溶解を呈することを確認した。

ii) 細胞増殖度に対する影響について

ミルクフルーツ胚乳抽出液添加による細胞増殖への影響の検討に MTT Cell Proliferation Assay Kit（Cayman 社）を用いた。その測定原理は細胞内に取り込まれた MTT（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid）は、ミトコンドリアの還元酵素により、テトラゾリウム塩がホルマザンに還元されて青色の色素を呈する。この色素量は代謝活性のある細胞数と相関するため、死細胞では色素は産生されない。

まず、細胞へ胚乳抽出液（10 μg/mL）を添加したものと、サンプル対照として PBS を添加した2群で比較した。健常者単核球（ 1×10^6 /mL）および急性前骨髄球性白血病細胞株である HL60細胞（ 1×10^6 /mL）をそれぞれ96穴培養プレート（FALCON 社）に100 μL 播種し抽出液を添加後、37℃、5%CO₂インキュベータにて24時間反応させた。反応後、MTT 試薬10 μLを添加し混和後、37℃、5%CO₂インキュベータにて3時間反応後、上清85 μLを除き、キットに含まれる溶解液100 μLを添加して混和後、細胞に取り込まれた色素を溶解してマイクロプレートリーダー（Bio-Rad Benchmark 社）で550nmにて吸光度測定した。対照には健常者単核球を用いた。

2)-4 ミルクフルーツ胚乳抽出液による HL60細胞の形態学的変化

HL60細胞（ 1×10^6 /mL）にミルクフルーツ胚乳抽出液を10 μg/mL 添加後、37℃、5%CO₂インキュベータにて24時間反応後、HL60細胞を浮遊させ回収し、1,000rpm、5分間遠心した。遠心後の沈渣を用いて細胞塗抹標本を作製し、パッペンハイム染色を行った。

パッペンハイム染色はメイ・グリュンワルド液で3分間固定後、その上に同量の1/150M リン酸緩衝液（pH6.4）を加え3分間染色し、水洗後、ギムザ染色液（ギムザ原液1滴/リン酸緩衝液1mL）に浸し10分間染色した。染色後、流水水洗し、ドライヤーで乾燥後、200倍で鏡検した。また、対照として健常者単核球を用いて、ミルクフルーツ胚乳抽出液添加による細胞の形態変化を同様のパッペンハイム染色で調べた。

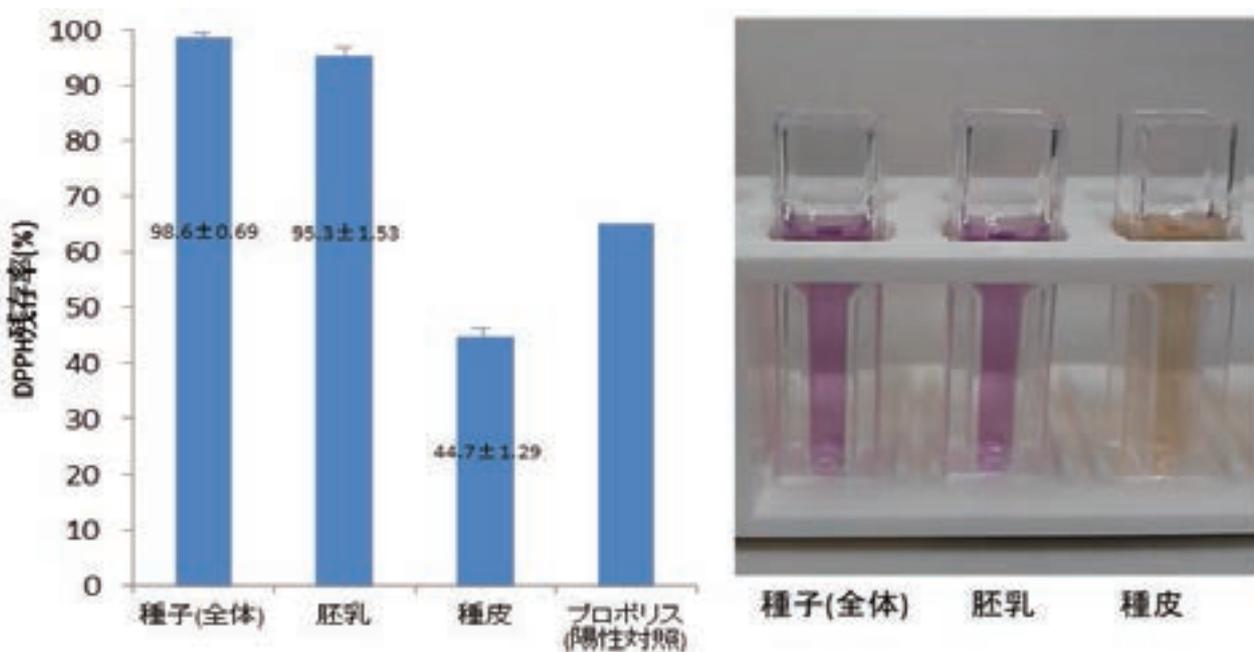


図3 ミルクフルーツ種子部位別による抗酸化力測定
DPPH ラジカル（紫色）に抗酸化物質を含む抽出液を加えると、DPPH ラジカルが消去され色が薄くなる。この色調を吸光度測定し抗酸化力を測定する。種皮に吸光度の減少が認められた。

3. 結果

3)-1 ミルクフルーツ種子抽出液の抗酸化力測定

ミルクフルーツ種子を種皮と胚乳に分けて抗酸化力測定 (n=5) を行った結果、図3に示すように種皮抽出液は種子（全体）および胚乳と比べ、その DPPH 残存率は44.7 ± 1.29%と低く、抗酸化力は顕著に高いことが確認できた。また、陽性対照のプロポリス（65.0%）と比べても抗酸化力が高い結果であった。一方、種子（全体）では DPPH 残存率は98.6 ± 0.69%，胚乳は95.3 ± 1.53%と抗酸化力は認められなかった。

3)-2 ミルクフルーツ種子抽出液の細胞溶解作用

i) 細胞溶解能

ミルクフルーツ胚乳抽出液では A, B および O 型血球のすべての血球において、1:128と最も高い溶解を認めた（図4）。種子全体では1:64、種皮は細胞溶解を認めなかったことから、胚乳中に細胞溶解を起こす成分が含有している可能性が示唆された（表1）。



図4 血球を用いたミルクフルーツ胚抽出液の細胞溶解能

表1 ミルクフルーツ種子の部位別による細胞溶解能

溶血素価	種子	種皮	胚乳
1:2	H	-	H
1:4	H	-	H
1:8	H	-	H
1:16	H	-	H
1:32	H	-	H
1:64	H	-	H
1:128	-	-	H
1:256	-	-	-
1:512	-	-	-
1:1024	-	-	-

H: 溶血
-: 不溶血

ii) 細胞増殖度に対する影響

ミルクフルーツ種子の胚乳部分において細胞溶解能が認められたことから、胚乳抽出液が細胞増殖への影響について MTT 試験で調べた。MTT 試験で健常者単核球において、対照の PBS 添加では O.D.550nm の 0.401 ± 0.012 に対して、ミルクフルーツ胚乳抽出液添加では 0.340 ± 0.013 であった。HL60細胞においては、対照の PBS 添加 O.D.550nm の値は 1.367 ± 0.015 に対して、ミルクフルーツ胚乳抽出液添加では 0.336 ± 0.031 であった。従って、胚乳抽出液添加24時間後の細胞生存率は HL60細胞においては $8.57 \pm 3.92\%$ 、健常者単核球では $62.0 \pm 5.11\%$ であった (図5)。

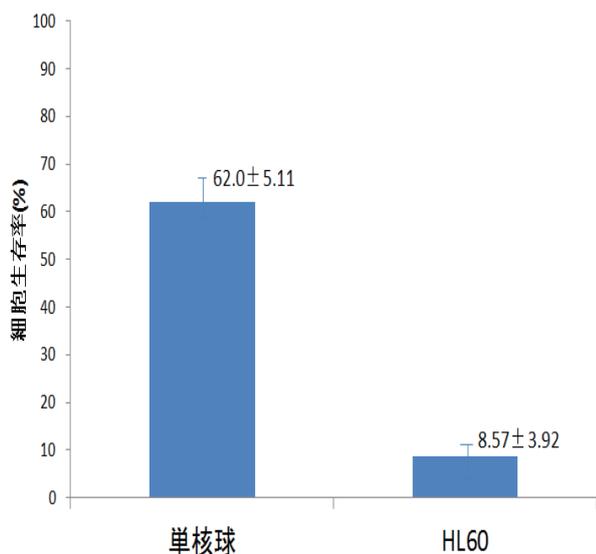


図5 胚乳抽出液添加24時間後の細胞生存率

3)-3 ミルクフルーツ胚乳抽出液による HL60細胞の形態学的変化

HL60細胞を用いてミルクフルーツ種子添加による細胞の形態変化について検討した。その結果、胚乳抽出液を添加した HL60細胞では核（クロマチン）の凝縮、細胞の縮小化および核の断片化が多数認められ、形態的な異常が顕著に認められた (図6矢印)。一方、対照として用いた健常者単核球の形態変化は認められなかった (データは示さず)。

4. 考察

植物は大気中の酸素から紫外線や放射線などの影響により産生される活性酸素によって酸化ストレスを受けている。このような環境下で生育するために、植物および種子には活性酸素を無毒化する強力な抗酸化物質やラジカルを消去する物質を有することが知られているが、その抗酸化物質の代表的なものにはポリフェノール、フラボノイド、カテキンやサポニンなどが挙げられる。ポリフェノールは多くの植物に含有され、光合成によって出来る植物の色素や苦味の成分で、主に動脈硬化や脳梗塞を防ぐ抗酸化作用を有すると言われている⁹⁾。日常生活で摂取する機会の多いフラボノイドはポリフェノールの一種で、僅かしか体内に吸収されない。一方、緑茶などに含まれるカテキンは抗酸化作用をはじめ、抗腫瘍作用¹⁰⁾、血圧上昇抑制作用¹¹⁻¹²⁾、血中コレステロール調節作用¹³⁻¹⁵⁾、血糖値調節作用¹⁶⁻¹⁷⁾、老化抑制作用¹⁸⁾、抗アレルギー作用¹⁹⁻²¹⁾ など多様な生理活性を有す

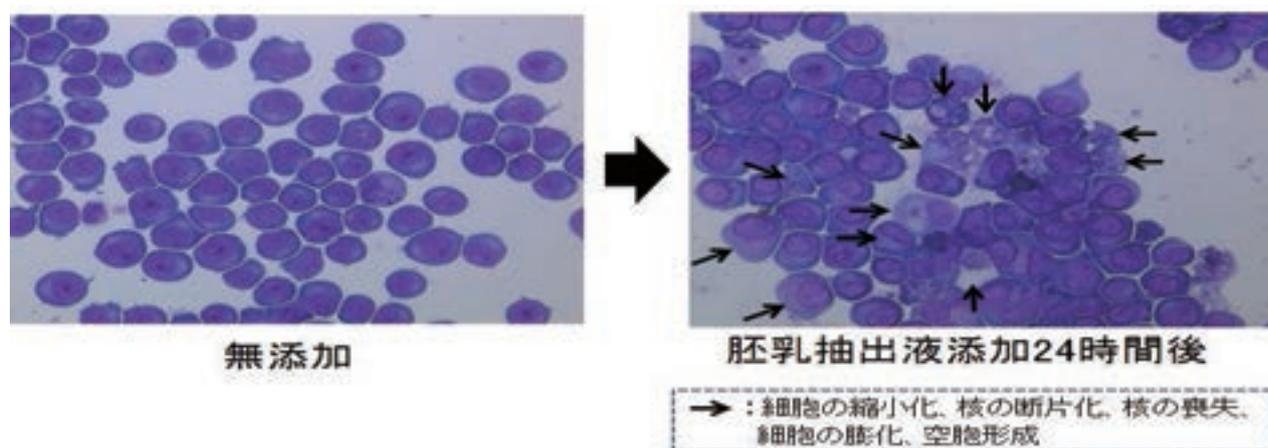


図6 胚乳抽出液添加24時間後の HL60細胞の形態学的変化

る。また、果実種子においてもシークワサーに含まれるフラボノイド類の一種であるノビレチンが抗酸化作用をはじめ、抗腫瘍作用や抗認知作用を有し、柿の種子に含まれる没食子酸が抗酸化作用を有することが知られている。このように植物の種子が様々な生理活性を持つことが明らかにされるなかで、我々は多くの植物種子を検討してきた。そこでミルクフルーツ種子が高度な細胞溶解をすることに着目し、その生理活性を明らかにする目的で抗酸化力および細胞溶解能について検討した。

まず、ミルクフルーツ種子における抗酸化力測定においては、従来から利用されている測定法である DPPH 法を用いた。DPPH 法は本来、不安定なラジカルを用いず、安定的な DPPH ラジカルという人工的に作られたラジカルの消去能を吸光度測定により求める方法である。DPPH ラジカルを溶媒に溶かすと紫色に呈するが、この溶液に抗酸化物質を含む抽出液を加えると、DPPH ラジカルが消去され色が薄くなる。この色調を吸光度測定し抗酸化力を測定する。この DPPH 法によるミルクフルーツの抗酸化力測定を行った結果、ミルクフルーツ種皮において抗酸化力が高いことが分かった。この水準は、抗酸化力の高いことが知られているプロポリスよりも約1.45倍高いことが確認できた。一般的に種子にはポリフェノールなどを含んでおり、有色であることが多い。そのため、食用色素を持つ野菜や植物には抗酸化力の高いことが多く知られているが、著者らの先行研究で柿の種皮においても抗酸化力が高く認められ、その抗酸化物質はポリフェノールの一種の没食子酸であることを確認した²²⁾。しかし、今回のミルクフルーツにおける抗酸化物質の同定は行っていないが、今後、HPLC-MS などを用いたミルクフルーツ種皮に存在する抗酸化物質の同定は必須である。

次に、ミルクフルーツの別の生理活性作用、すなわち細胞の溶解について HL60細胞を用いた MTT 試験による細胞生存率の測定および細胞形態の変化について検討した。

方法はヒト急性前骨髄球性白血病細胞株 HL60細胞と健常者単核球を用いてミルクフルーツ胚乳抽出液を添加して24時間後に測定した結果、

HL60細胞の生存率は24.6%と顕著な細胞数の減少が認められたのに対し、健常者単核球はこのような明らかな変化は認められなかったことから、HL60細胞特異的にミルクフルーツ胚乳抽出液が細胞数の減少を引き起こしたと考えられる。この現象については①細胞増殖への抑制②細胞死による細胞数の減少の2つのことが考えられる。これらのことを検討するために細胞の形態変化についてパッペンハイム染色を用いて検討した結果、前述と同様に健常者単核球では細胞死の誘導された単核球の顕著な増加は認められなかったのに対して、HL60細胞ではアポトーシスで起こる細胞の縮小、クロマチンの凝縮、核の断片化が認められた。また、ネクローシスで起こる細胞の膨化、核の喪失、縮小化や空胞形成を多数認め、細胞形態にも異常が顕著に認められた。このことは HL60細胞においては細胞の増殖が抑制されているのではなく、アポトーシスあるいはネクローシスの細胞の破壊による細胞数の減少と考えられた。

5. 結語

熱帯果樹であるミルクフルーツ種子は抗酸化力と細胞溶解作用を認め、特に胚乳抽出液は、白血病細胞株である HL60細胞に対して、核の断片化や細胞の縮小化を引き起こし、細胞数の減少を認めた。その作用はアポトーシスあるいはネクローシスのいずれかが考えられた。

6. 文献

- 1) BOYD WC, REGUERA RM. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J Immunol*, 62, 333-339, 1949.
- 2) Sumner, J.B., and Howell, S.F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. *J Bacteriol*, 32, 227-237, 1936.
- 3) 小川文子, 武市和彦, 高岡栄二. ABO 血液型検査に応用可能な植物レクチンの検索と基礎的検討. 高知県臨床検査技師会誌「こうち」, Vol.37, 95-99, 2008.
- 4) NOWELL PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res*, 20, 462-466, 1960.
- 5) Gorelik E. Cytotoxic effects of lectins. *Methods Mol Med*, 9, 453-459, 1998.
- 6) AUB JC, TIESLAU C, LANKESTER A. Reactions of

- Normal and Tumor Cell Surfaces to Enzymes, I. Wheat-Germ Lipase and Associated Mucopolysaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 50, 613-619, 1963.
- 7) Hsiou-Yu Ding. Extracts and Constituents of *Rubus chingii* with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Free Radical Scavenging Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3941-3949, 2011.
- 8) 西岡豊. 高知大学医学部附属病院薬剤部における産学官連携の取り組み. 国立大学法人高知大学国際・地域連携センター年報, 58-61, 2008.
- 9) Fukushima Y, Tashiro T, Kumagai A, Ohyanagi H, Horiuchi T, Takizawa K, Sugihara N, Kishimoto Y, Taguchi C, Tani M, Kondo K. Coffee and beverages are the major contributors to polyphenol consumption from food and beverages in Japanese middle-aged women. *J Nutr Sci.*, 22, 3, 1-10, 2014.
- 10) Suzuki Y, Miyoshi N, Isemura M. Health-promoting effects of green tea. *Proc. Jpn. Acad*, 88, 88-100, 2012.
- 11) Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.*, 134, 1, 38-42, 2004.
- 12) Kurita I, Maeda-Yamamoto M, Tachibana H, Kamei M. Antihypertensive effect of Benifuuki tea containing O-methylated EGCG. *J Agric Food Chem.*, 58, 3, 1903-1908, 2010.
- 13) Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 32, 6, 613-622, 1986.
- 14) Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta.*, 1127, 2, 141-146, 1992.
- 15) Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, Kobayashi M, Unno T, Tomoyori H, Goto H, Kawata Y, Imaizumi K, Nozawa A, Kakuda T. Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *J Nutr.*, 135, 2, 155-159, 2005.
- 16) Anderson RA, Polansky MM. Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem.*, 50, 7182-7186, 2002.
- 17) Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology*, 17, 1, 55-59, 2010.
- 18) Unno K, Fujitani K, Takamori N, Takabayashi F, Maeda K, Miyazaki H, Tanida N, Iguchi K, Shimoi K, Hoshino M. Theanine intake improves the shortened lifespan, cognitive dysfunction and behavioural depression that are induced by chronic psychosocial stress in mice. *Free Radic Res.*, 45, 8, 966-974, 2011.
- 19) Sano M, Suzuki M, Miyase T, Yoshino K, Maeda-Yamamoto M. Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *J Agric Food Chem.*, 47, 5, 1906-1910, 1999.
- 20) Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M, Sugano M. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure-inhibitory activity relationship. *Allergy.*, 52, 1, 58-64, 1997.
- 21) Maeda-Yamamoto M, Ema K, Shibuichi I. In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and ginger extract enhancement. *Cytotechnology.*, 55, 135-142, 2007.
- 22) 大西茂彦, 松岡博美, 井上昌子, 浅井貴子, 江郷知子, 天川雅夫. 香川県産富有柿種子に含まれる抗酸化性物質. 香川県産業技術センター研究報告, 12, 75, 2011.