鹿児島県産の農水産物の利活用による健康の保持・増進

小松正治

国立大学法人　鹿児島大学水産学部　食品生命科学分野
〒890-0056　鹿児島市下荒田 4-50-20
TEL：099-286-4200

要旨

１　緒言

我が国における近年の人口構造の変化ならびに疾病構造の変化を反映して、医薬品の開発とともに食事を通じて疾病を予防あるいは治療することに社会の関心が高まっている。そこで、いわゆる「医食同源」や「民間療法」を科学的に実証することが求められる。我々は、これまでに毒性化合物の毒性発現機序の解明ならびに毒性を抑制する生物資源および天然化合物の探索を行ってきた。これまでの研究において、頭足類由来の Ceramide 誘導体の CAEP[1)]、柑橘類由来の Naringin[2)]、生薬イワジシャ由来の Acteoside[3)] 等の天然化合物にアオコ由来の肝臓毒 Microcystin-LR の細胞毒性の減弱能を見出した。そこで本研究では Microcystin-LR の毒性発現機序の解明ならびに毒性を抑制する鹿児島県特産の農水産物の探索を試みた。本報告書では、鹿児島県産の農産物として、喜界島固有種の島ミカン数種の抽出液を用いた Microcystin-LR の毒性抑制能について検討した結果を報告する。

２　理論

淡水または汽水域では、その富栄養化によりアオコが発生する。アオコを形成するシアノバクテリアには毒性物質を産生する種が存在し、*Microcystis* 属や *Anabaena* 属のシアノバクテリアは動物の肝臓に選択毒性を示す Microcystin-LR を産生する。肝臓毒 Microcystin-LR は、ヒト肝細胞の毛細血管側の類洞基底膜にのみ特異的に発現している有機アニオン輸送体 OATP1B3 を介して肝細胞に選択的に取り込まれ、タンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A を特異的かつ不可逆的に阻害することを引き金にして、細胞内にリン酸化タンパク質を蓄積させ、細胞の正常な営みを乱すことにより細胞毒性を誘導する（図１）[4)]。浄水施設の不具合により Microcystin 類が混入した腎臓透析患者用の透析液の使用に起因した、1996 年にブラジルで起きた大事故を契機に、世界保健機関（WHO）が Microcystin-LR の水道水中のガイドライン値を設定した。我が国においては、WHO のガイドライン値よりもさらに厳しい値を定め、また、水道法にける水質

基準の要検討項目にリストアップし、人間に対する健康影響の詳細の解明が期待されている。研究代表者らは、これまでに Microcystin-LR の肝臓選択毒性に関する分子メカニズムを解明するとともに Microcystin-LR がもつ新奇な機能性を発見した[1)~8)]。すなわち、Microcystin-LR は肝細胞に特異的に発現しているトランスポーターの OATP1B1 および OATP1B3 を介して肝細胞内に取り込まれ、①急性毒性による肝細胞死を引き起こし、肝機能不全を誘発する。一方、②慢性低濃度曝露では正反対に細胞増殖を活性化するが、何らかの原因で肝細胞の遺伝子に突然変異等の遺伝子異常が誘発されていれば、そのような細胞の異常増殖を誘発し肝臓がんの発がんプロモーターとして機能する。研究代表者らは OATP1B1 または OATP1B3 を人為的に発現させた培養細胞を使用した解析を行っているが、③細胞が死滅する程度の Microcystin-LR 曝露により、培養フラスコから剥離・浮遊した細胞が細胞死を回避、すなわちアノイキス抵抗性を示して生残し、その後、再接着する現象を見出した。さらにこの再接着細胞は形質が変化し、新たに Microcystin-LR に曝露しても耐性を示すほか、様々なストレスに抵抗性を示すことを見出した。また、上述の剥離・浮遊した細胞を除去後に④培養フラスコに接着を続けた細胞も形質を変化させ、細胞骨格が再編成され、様々なストレスに対して抵抗性を示すことが明らかになっている。研究代表者らは肝臓がんの発がんプロモーターの Microcystin-LR が肝臓がんの浸潤・転移にも関わっている可能性について関心を持ち基礎研究を行った。すなわち、Microcystin-LR が有す①の機能性（細胞毒性）の発現に対する生物資源、特に鹿児島県産の農産物の影響について、Microcystin-LR の細胞毒性抑制能を有す Naringin（図２）を含有する喜界島産の島ミカン各種を用いて検討した。

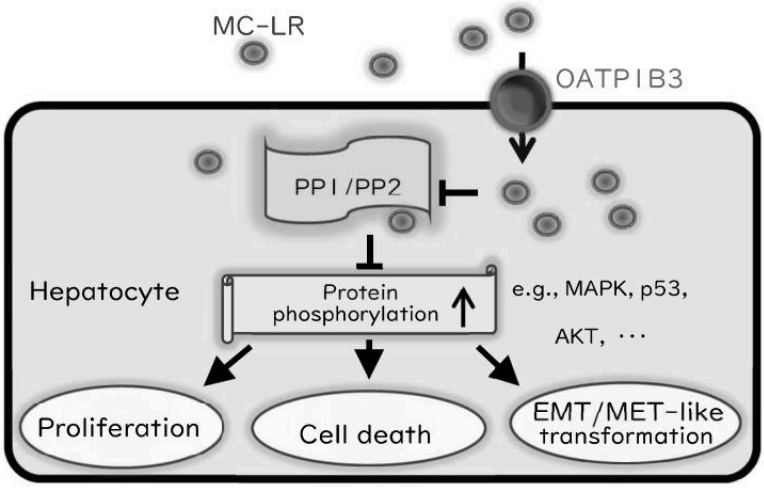


図１．肝臓毒 Microcystin-LR の細胞毒性の発現機序

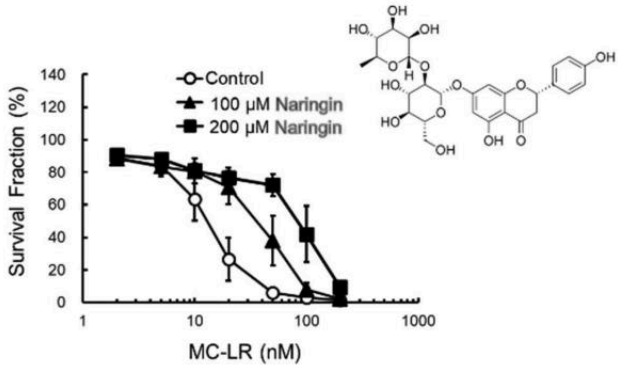


図２．Naringin が有す Microcystin-LR の細胞毒性抑制能

３　実験

3.1 材料

ロクガツミカン、シークー、カブチー、およびケラジミカンの葉、果皮、および果肉薄皮 10 g をそれぞれ約 3〜5 ㎜に刻み、80%エタノール 25 ml で 2 時間攪拌抽出し、ろ過残渣を除去したものを濃縮装置（コンビニ・エバポ）で 2 倍濃度に濃縮したものをロクガツミカン、シークー、カブチー、ケラジミカン、およびグレープフルーツの葉抽出液、果皮抽出液、および薄皮抽出液とした。また、ロクガツミカン、カブチー、ケラジミカンの果肉と作業中に抽出された果汁を乳鉢に集め破砕し、遠心分離後の上清を φ0.2 μm フィルターでろ過滅菌したものをロクガツミカン、カブチー、およびケラジミカンの果汁抽出液とした。

3.2 細胞培養

ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 に OATP1B3 を強制発現させた HEK293-OATP1B3 細胞は、MEM 培地に 10% FBS、100 units/mL penicillin、および 100 μg/mL streptomycin を含有する培地（MEM-10% FBS 培地）を用い、37℃、100%飽和湿潤、および 5% CO_2の条件で培養した。

3.3 各種柑橘類抽出液の Microcystin-LR の細胞毒性に対する影響

HEK293-OATP1B3 細胞を 96-well plate に播種（0.3×10^4 cell/well）し、37℃、5% CO_2 の条件下で 24 時間 MEM-10% FCS 中で無菌的に培養後、各種柑橘類の各部位の抽出液（20 μL/well）を細胞に曝露し、その直後に各終濃度の Microcystin-LR（10 μL/well）を細胞に複合曝露し、さらに 3 日間培養した。培養後に MTT 試薬（100 μL/well）を添加し、3 時間、37℃の条件下でインキュベートした。その後、96-well plate 内の培地を除去し、生じたホルマザンに DMSO（100 μL/well）を添加し、5 分間ミキサーで攪拌・溶解したのち、マイクロプレートリーダーで 570 nm における吸光度を測定し、細胞の生残率を算出し、各種柑橘類抽出液が有す Microcystin-LR の細胞毒性抑制効果を評価した。

3.4 統計処理

有意差の検定は、Mann-Whitney の U 検定で行った。

４　結果

喜界島在来の 4 種を含む柑橘類 5 種から調製した果皮、果肉薄皮の各抽出液、および果汁を用いた解析の結果、すべての種の果皮の抽出液において Microcystin-LR の細胞毒性に対し強い抑制効果が検出された（図３、表１）。一方、果汁および果肉薄皮抽出液では、その活性には種差が大きく、グレープフルーツが最も活性が高く、喜界島在来ミカンでは活性が比較的に弱かった（図３、表１）。果汁では島ミカンのなかでシークー

の活性が比較的高く、果肉薄皮抽出液では、シークーおよびケラジミカンの活性が比較的高い結果が得られた（図３、表１）。

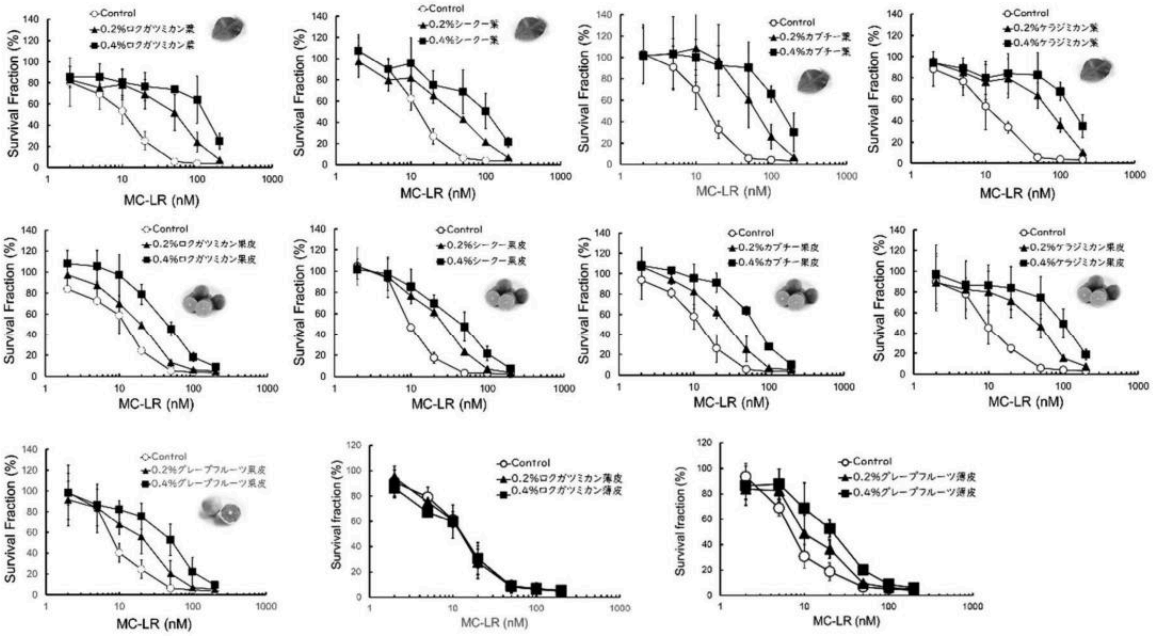


図３．各種柑橘類の各部位抽出液の Microcystin-LR の細胞毒性抑制能

表１．各種柑橘類の各部位抽出液の Microcystin-LR の細胞毒性抑制能（曝露量修飾係数（DMF））のまとめ

	DMF	
	0.5%	2%
ロクガツミカン果汁	1.17	0.75
シークー果汁	0.92	0.56
カブチー果汁	1.10	0.99
ケラジミカン果汁	0.92	0.87
グレープフルーツ果汁	0.50	0.23

	DMF	
	0.2%	0.4%
ロクガツミカン葉	0.22	0.09
シークー葉	0.31	0.12
カブチー葉	0.24	0.10
ケラジミカン葉	0.16	0.08
ロクガツミカン果皮	0.61	0.26
シークー果皮	0.36	0.22
カブチー果皮	0.40	0.18
ケラジミカン果皮	0.25	0.11
グレープフルーツ果皮	0.45	0.20
ロクガツミカン薄皮	0.98	1.06
シークー薄皮	0.92	0.64
カブチー薄皮	0.94	0.88
ケラジミカン薄皮	0.84	0.63
グレープフルーツ薄皮	0.68	0.31

５　考察

柑橘類ポリフェノールの Naringin は、その抗酸化活性とほぼ無関係に OATP1B3 を介した Microcystin-LR の細胞内取り込みを抑制することで Microcystin-LR の細胞毒性を抑制することを研究代表者らがすでに報告している [2)]。天然化合物の機能解析において、一般的に化合物単体で示す活性は、生物資源抽出液において同様の活性が検出されない場合が少なくない。そのような結果が得られる要因として、（１）非生理的に高濃度で天然化合物を実験動物や培養細胞に曝露している。（２）生物資源抽出液中に活性本体

の化合物の活性を打ち消す化合物等が混在する。（３）活性本体の化合物の標的分子に対して、より親和性の高い別の化合物が生物資源抽出液中に混在する可能性が推察される。本研究において、用いたすべての柑橘類の葉および果皮において十分に高い Microcystin-LR の細胞毒性を抑制する活性が得られた。以上の結果から検出された活性と Naringin の高含有部位との相関が推察されるとともに、Naringin と同様に OATP1B3 の輸送活性に影響を与える他の成分の存在の可能性もあり得ると推察された。OATP1B3 は Microcystin-LR ばかりでなく、生理的に有用な内在性基質も輸送することが知られている。OATP1B3 の輸送活性への影響が比較的少なく、かつ Microcystin-LR の細胞毒性を抑制し得る化合物の探索が望まれ、今後の解析が期待される。また、本研究では Microcystin-LR の第１機能（細胞毒性）への影響を検討したが、併せて第２（細胞増殖活性）ならびに第３（細胞の形質転換）への影響についても検討していくことが期待される。

今後、本研究をさらに発展させ、人々の健康の保持・増進ばかりでなく、鹿児島県の産業振興に寄与することが期待される。

６　結論

各種柑橘類の可食部の果肉および果肉薄皮ばかりでなく、むしろ非可食部の果皮および葉において Microcystin-LR の細胞毒性抑制活性が強く検出された。これらの部位には Naringin が含有されており、今後、Naringin またはそのアグリコンの Naringenin の含有量と活性強度の相関性について解析する必要性があるものの、Naringin が活性本体の少なくとも一部であることが強く示唆された。

７　謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたサンケイ科学振興財団に厚く感謝申し上げます。また、喜界島固有種の柑橘類数種のサンプリングにご協力いただいた鹿児島県大島郡喜界町役場農業振興課の榮岳海氏に感謝申し上げます。

８　引用文献

1) Masaharu Komatsu, Naoki Ichiyama, Takashi Kurimoto, Shota Takumi, Kazuhiro Shiozaki, Yasumasa Sugiyama, Tatsuhiko Furukawa, Seiichi Ando, Saki Itonori, and Hiroaki Saito.
Ceramide Aminoethylphosphonate from Jumbo flying squid *Dosidicus gigas* attenuates the toxicity of cyanotoxin microcystin-LR.
Fisheries Science, 79, 313-320, 2013.

2) Shota Takumi, Satoshi Ikema,Tamami Hanyu, Yusuke Shima,Takashi Kurimoto, Kazuhiro Shiozaki, Yasumasa Sugiyama, Ho-Dong Park, Seiichi Ando, Tatsuhiko Furukawa, and Masaharu Komatsu.

Naringin attenuates the cytotoxicity of hepatotoxin microcystin-LR by the curious mechanisms to OATP1B1- and OATP1B3-expressing cells.
Environmental Toxicology and Pharmacology, 39, 974-981, 2015.

3) Shota Takumi, Kairi Hashimoto, Masaru Tomioka, Mina Sato, Weijie He, Yumiko Komatsu, Shunji Aoki, Ryuji Ikeda, Kazuhiro Shiozaki, Tatsuhiko Furukawa, Masaharu Komatsu.
Acteoside from *Conandron ramondioides* reduces microcystin-LR cytotoxicity by inhibiting intracellular uptake mediated by OATP1B3.
Planta Medica, 89, 616-623, 2023.

4) Masaharu Komatsu, Tatsuhiko Furukawa, Ryuji Ikeda, Shota Takumi, Qingqing Nong, Kohji Aoyama, Shin-ichi Akiyama, Dietrich Keppler and Toru Takeuchi.
Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3.
Toxicological Sciences, 97, 407-416, 2007.

5) Qingqing Nong, Masaharu Komatsu, Kimiko Izumo, Hiroko P. Indo, Baohui Xu, Kohji Aoyama, Hideyuki J. Majima, Masahisa Horiuchi, Kanehisa Morimoto and Toru Takeuchi.
Involvement of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced cytogenotoxicity.
Free Radical Research, 41, 1326-1337, 2007.

6) Shota Takumi, Masaharu Komatsu, Tatsuhiko Furukawa, Ryuji Ikeda, Tomoyuki Sumizawa, Hitomi Akenaga, Yuta Maeda, Kohji Aoyama, Koji Arizono, Seiichi Ando,and Toru Takeuchi.
p53 plays an important role in cell fate determination after exposure to microcystin-LR.
Environmental Health Perspectives, 118, 1292-1298, 2010.

7) Hiroyuki Takano, Shota Takumi, Satoshi Ikema, Nozomi Mizoue, Yuki Hotta, Kazuhiro Shiozaki, Yasumasa Sugiyama, Tatsuhiko Furukawa, and Masaharu Komatsu.
Microcystin-LR Induces Anoikis Resistance to the Hepatocyte Uptake Transporter OATP1B3-expressing Cell Lines.
Toxicology, 326, 53-61, 2014.

8) Shota Takumi, Tai Shimono, Satoshi Ikema, Yuki Hotta, Petros Kingstone Chigwechokha, Kazuhiro Shiozaki, Yasumasa Sugiyama, Mitsuru Hashimoto, Tatsuhiko Furukawa, Masaharu Komatsu.
Overexpression of Carboxylesterase Contributes to the Attenuation of Cyanotoxin Microcystin-LR Toxicity.
Comparative Biochemistry and Physiology part-C, 194, 22-27, 2017.

9) Shota Takumi, Masaru Tomioka, Yasunari Yunoki, Risa Eto, Yumiko Komatsu, Kazuhiro Shiozaki, and Masaharu Komatsu.
Microcystin-LR-induced epithelial-mesenchymal transition-like cells acquire resistance to multi-toxins.
Toxicon, 2024, in press.

Maintaining and improving health through the use of agricultural and fisheries products from Kagoshima Prefecture.

Masaharu Komatsu

Division of Food and Chemical Biology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University
Address: 4-50-20 Shimoarata, Kagoshima 890-0056, Japan

Reflecting recent demographic transition and changes in disease structure in Japan, society including us is increasingly interested in the prevention and treatment of disease through diet as well as the development of pharmaceuticals. Therefore, there is a need to scientifically demonstrate the so-called 'medicine and food' and 'folk medicine'. We have been elucidating the mechanisms of toxicity of toxic compounds and searching for bioresources and natural compounds that attenuate the toxicity. We have already shown that the citrus polyphenol Naringin attenuates the cytotoxicity of the hepatotoxin Microcystin-LR using cultured cell lines expressing the hepatocyte uptake transporter OATP1B3. In this study, we investigated whether extracts of various citrus parts could attenuate the cytotoxicity of Microcystin-LR.

The cytotoxic attenuation activity of Microcystin-LR was strongly detected not only in the edible pulp and pulpy thin skin of various citrus fruits but also in the inedible peel and leaves. These results strongly suggest that Naringin is at least one of the active compounds, although there is a need for future analysis of the correlation between Naringin content in several citrus and the attenuation ability of Microcystin-LR cytotoxicity.

In the future, it is expected that this research will be further developed to contribute not only to the maintenance and promotion of people's health but also to the promotion of industry in Kagoshima Prefecture.