

経口摂取可能なカキ果皮抽出物の乳癌由来 MCF-7 細胞に対する影響

井土 良一, 高橋 英史*, 稲田有美子*

The effect of persimmon peel extracts available for oral intake on MCF-7 human breast cancer cells

Ryoichi Izuchi, Hidehito Takahashi* and Yumiko Inada*

Persimmon (*Diospyros Kaki* Thumb.) peel is richer in carotenoids and polyphenols than pulp, but usually discarded. The objective of this study is to utilize persimmon peel effectively, so preparation of extract that can be available for food was attempted. Water-soluble extract (Ew) and 4 fractions of fat-soluble extracts (E1-4) were divided from extracted liquid from dried persimmon peel with 95% ethanol. Water-soluble extract (Ew) was richer in polyphenol, and fat-soluble extracts E2 were richer in β -cryptoxanthin than each other. Proliferation activity of MCF-7 cell, derived from human breast cancer, was increased by addition of 33.2 μ g/ml the water-soluble extract in RPMI 1640 medium. On the other hand, addition of 33.2 μ g/ml a fat-soluble extract (E2) inhibited the cell proliferation. These results suggest that persimmon peel extracts have some functionality, and it is possible to utilize the persimmon peel as valuable food material.

Key words: persimmon (kaki), peel, β -cryptoxanthin, carotenoid, polyphenol, extract

カキ (*Diospyros Kaki* Thumb.) は日本全国で栽培される果樹であるが、中国や韓国などの東アジアを中心に、ヨーロッパやオセアニアなど世界各地でも栽培されている^{1, 2)}。カキ果実には多くのビタミン、食物繊維、ミネラル、カロテノイド、ポリフェノールなど栄養成分や有効成分が含まれていることが知られている³⁾。一方、カキ果皮は果肉よりもカロテノイド、ポリフェノール、ミネラルなどを高濃度に含んでいるが^{4, 5)}、ほとんど未利用のまま廃棄されている。

有効成分を多く含むカキ果皮は利用価値が高いと考えられるが、カキ果皮は硬くて干し柿様の匂いもあるため、ほとんど食用にされることはない。したがって、そのままを食べるよりも、抽出物の形にする方が利用しやすいと考えられる。そこで、廃棄されるカキ果皮の食品向けの有効利用を目的として、水とエタノールのみを用いた抽出物の調製を試みた。また、ヒト乳癌由来の MCF-7 細胞を用いて各抽出物の細胞増殖活性を調べることによって、抽出物の機能性を評価した。

実験材料・方法

1. カキ果皮

長野県下伊那郡の農園より「市田柿」の果皮を入手した。干し柿製造時に排出され、天日で7日間乾燥されたもので、実験に供するまで -40℃で保存した。

2. 抽出条件（抽出温度と果皮の破碎有無）の検討

ミキサーを用いて粉碎した、あるいは未粉碎のカキ果皮 50 g に 95% エタノール 600 mL を加え、室温あるいは加熱還流 (78℃) 下で、攪拌しながら 2 時間抽出した。珪藻土で濾過して残渣を取り除き、濾液を減圧乾固して抽出物を得た (Table 1)。

3. 食品利用可能な抽出物の調製

抽出・分画方法を Fig. 1 に示した。粉碎したカキ果皮 20 kg を 95% エタノール 240 L に浸漬し、遮光下で攪拌しながら 1 時間加熱還流した。濾過して残渣を取り除き、減圧濃縮後に水を加えて沈殿物を析出させた。沈殿物は濾過により回収し (残渣 2)、濾液は減圧乾固し水溶性抽出物 (Ew) とした。残渣 2 を 95% エタノールに再溶解し、一次減圧濃縮、二次減圧濃縮を経て得られた乾固物を抽出物 1 (E1) とした。一次減圧濃縮時に析出した沈殿物 1 を回収して 95% エタノールに再溶解し、減圧濃縮後、濾過によりさらに沈殿物 2 と濾液 2 に分けた。沈殿物 2 は減圧乾固して抽出物 2 (E2) とし、濾液 2 も減圧濃縮・乾固して抽出物 3 (E3) とした。二次濃縮時に析出した沈殿物 3 は減圧乾固し、抽出物 4 (E4) とした。

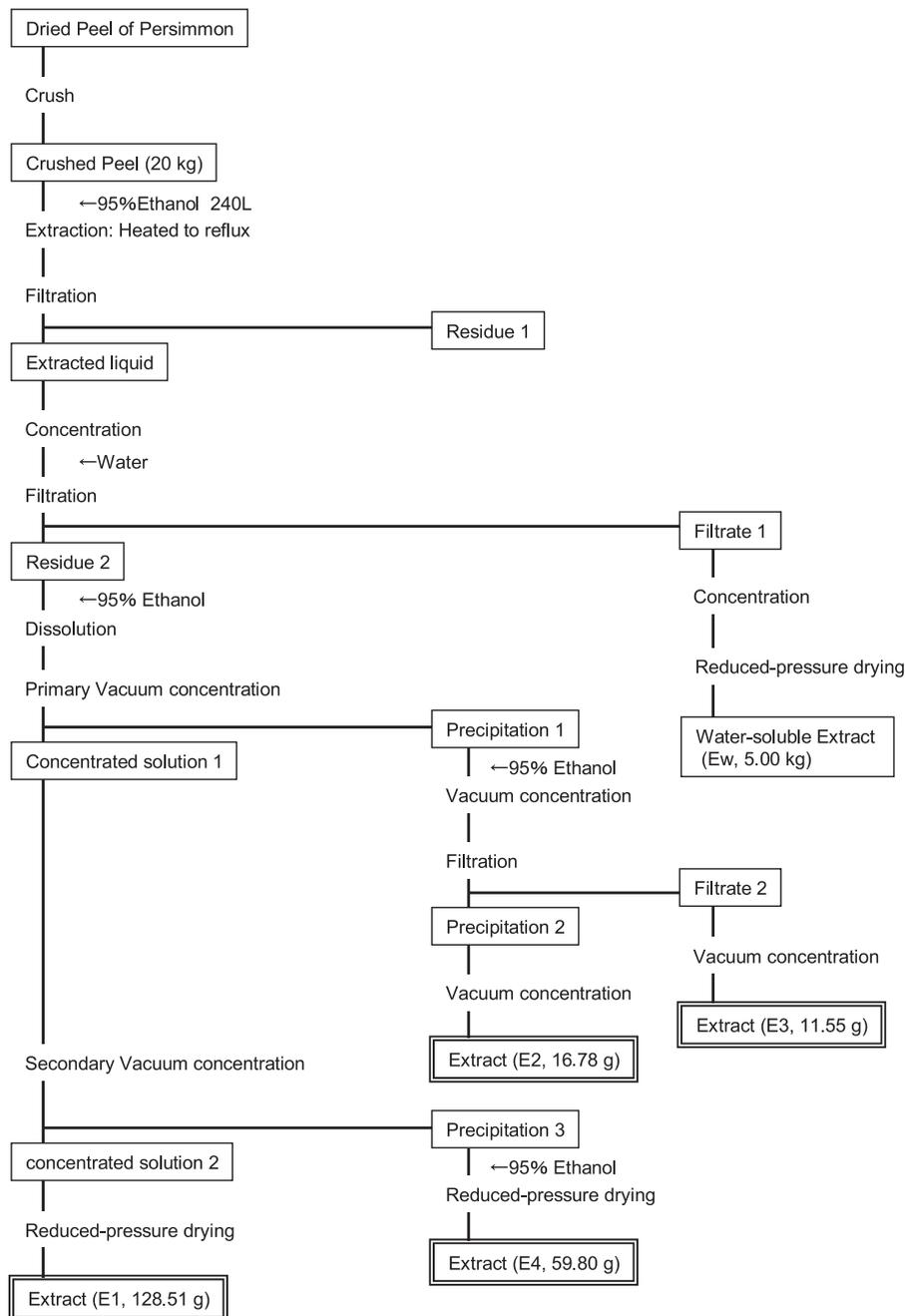
4. 試料中 β -クリプトキサンチン量の測定

試料 10 mg を MTBE 10 mL に溶解後、0.01% 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシトルエンを含むエタノール 10 mL と 60% 水酸化カリウム溶液 2 mL を加えた。遮光して窒素雰

Table 1 Effect of extraction condition on the yield of the extracts and β -cryptoxanthin from dried peel of persimmon.

Extraction condition		Yield of extract (g) ^a	β -Cryptoxanthin	
Temperature	Peel		Conc. ($\mu\text{g/g}$)	Total amount (μg)
Room Temperature	Non-Crushed	5.9	62.0	366
	Crushed	8.1	66.5	539
Heated to reflux	Non-Crushed	18.5	31.9	591
	Crushed	19.3	50.7	979

^a Yield of extract from 50 g of the peel.

**Fig. 1** Procedure of extraction from dried peel of persimmon using water and ethanol

雰囲気下 40°C で 1 時間反応させた。反応後の液を分液漏斗に移して MTBE 30 mL を加え、10% 食塩水 30 mL で 2 回洗浄した。MTBE 層を減圧下で乾固させた後、エタノールに溶解して 20 mL に定容した。孔径 0.2 μm のフィルター (Duo-filter, 株式会社ワイエムシィ) で濾過した後、HPLC で分析した。HPLC 装置は LC-20A (株式会社島津製作所) を用いた。移動相は (A) 0.1% 酢酸アンモニウム含有メタノール:MTBE:H₂O (81:15:4, v/v/v), (B) 0.1% 酢酸アンモニウム含有メタノール:MTBE (10:90, v/v) を用い、流速は 1 mL/min, 濃度勾配は 0 分; (A) 100%, (B) 0% → 60 分; (A) 0%, (B) 100% とした。分離カラムは C₃₀ カロテノイドカラム (長さ 250 mm × 内径 4.6 mm, 粒子径 5 μm ; 株式会社ワイエムシィ) を用い、カラム温度は 32°C, 注入量は 20 μL , 検出波長は 450 nm とした。 β -クリプトキサンチン標品 (EXTRASYNTHESSE) を用いて作成した検量線で定量した。

5. 試料中ポリフェノール量の測定

試料 1.0 g に水 100 mL を加え、80°C の湯浴中で 1 時間加熱した後、濾紙で濾過した。濾液に同量の 0.1 N Folin-Ciocalteu 試薬 (Merck KGaA) を加えて室温で 3 分間反応後、10% NaCO₃ 水溶液を加えて室温で 1 時間放置し、紫外可視分光光度計 UV-160A (島津製作所) で 700 nm の吸光度を測定した。タンニン酸標品 (和光純薬株式会社) を用いて検量線を作成し、ポリフェノールを定量した。

6. MCF-7 乳癌由来細胞の培養と細胞増殖活性試験

JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) 細胞バンクより入手したヒト乳癌由来 MCF-7 細胞を用いた。細胞は 24-well プレートに 10⁴ 個/well となるように播種し、37°C, 雰囲気中 CO₂ 濃度 5% の条件下で、10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 1 日培養した後、試料を添加した培地に交換して 3 日間培養した。培養後、トリクロロ酢酸沈澱により細胞内タンパク質を固定し、

sulforhodamine B で染色して波長 490 nm の吸光度を測定した。

培養細胞実験の添加試料は以下の方法で調製した。抽出物 E1, E2, E3, E4 は、DMSO に溶解し、培地中の DMSO 最終濃度が 0.5% (v/v), それぞれ培地への最終添加量が 1.1, 5.5, 11.1, 33.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように希釈した。Ew は 50% エタノールに溶解して 10.9 mg/ml 溶液とし、最終添加量が 1.1, 5.5, 11.1, 33.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう培地に添加した。陽性対照は 17 β -estradiol (E₂; 天然エストロゲン, 最終濃度 10 nM) を、陰性対照は DMSO (最終濃度 0.5% (v/v)) を用いた。それぞれの細胞増殖率は陰性対照の吸光度の平均値を 100 として算出した。

結果

1. 抽出条件 (抽出温度と果皮の破碎有無) の検討

カキ果皮の破碎および抽出時の加熱の影響を、 β -クリプトキサンチン抽出量を指標として検討した。室温抽出と加熱抽出のいずれの場合でも、 β -クリプトキサンチンの総抽出量は未破碎よりも破碎した方が約 1.5 倍に増加した。温度の比較では、未破碎と破碎果皮のいずれの場合も、加熱抽出したほうが β -クリプトキサンチンの総抽出量が 1.6 倍以上となった (Table 1)。試験した抽出条件では、破碎果皮から加熱抽出 (979 μg) する方法が β -クリプトキサンチンの総抽出量をもっとも多くできた。一方、 β -クリプトキサンチンの濃度は、室温抽出 (未破碎: 62.0 $\mu\text{g}/\text{g}$, 破碎: 66.5 $\mu\text{g}/\text{g}$) よりも加熱抽出 (未破碎: 31.9 $\mu\text{g}/\text{g}$, 破碎: 50.7 $\mu\text{g}/\text{g}$) のほうが低かった。しかし、濃度は相対値であることから、加熱で β -クリプトキサンチン以外の成分がより多く抽出されたためと考えることができる。以上より、以降の抽出操作は β -クリプトキサンチン抽出量が最も多く、さらに他の成分も多く抽出できることから、破碎果皮からの加熱抽出で行うこととした。

Table 2 Characteristics of the extracts from dried peel of persimmon by extraction using water and ethanol.

Sample	Amount of extracts (g) ^a	β -Cryptoxanthin Conc.(mg/g)	Polyphenol Conc. (mg/g)
E1	128.51	2.52	2.51
E2	16.78	6.50	<DL
E3	11.55	0.49	0.30
E4	59.80	2.78	1.15
Ew	5.00×10 ³	<DL ^b	5.50
Residue 1	-	0.09	0.56

^a Amount of extract obtained from 20 kg of the peel.

^b DL is detection limit.

2. 食品利用可能な抽出物の特徴

粉碎した果皮 20 kg から 95% エタノールで加熱環流抽出したものを分画し (Fig. 1), 数種類の抽出物を調製し, その特性を調べた (Table 2). 水溶性抽出物 (Ew) は他と比べて量が非常に多く, 常温では飴のように固まった. また濃縮液の段階では干し柿の様な甘い香りがあったが, 乾固した後はほとんど匂わなかった. 一方, 脂溶性抽出物の性状は, E1 と E4 は湿り気のある赤褐色の粘土状, E2 は赤色の乾燥粉末, E3 は黄色の乾燥粉末で, いずれも干し柿のような匂いはなかった.

各抽出物および残渣の β -クリプトキサンチン量, ならびにポリフェノール量 (タンニン酸換算) を測定した. β -クリプトキサンチン濃度が最も高かったのは E2 で 6.5 $\mu\text{g/g}$ であった. E1, E4 の β -クリプトキサンチン濃度は E2 より低く (2.52, 2.78 mg/g), ほぼ同じであった. Ew からは β -クリプトキサンチンは検出されなかった.

ポリフェノール濃度は Ew が最も高く 5.50 mg/g であった. 脂溶性抽出物のポリフェノール濃度は Ew より低く, E1 が 2.51 mg/g で最も高く, E4 はその約 1/2 程度, E3 は 1/8 程度であった. E2 からはポリフェノールは検出されなかった.

3. 抽出物の MCF-7 細胞増殖への影響

各抽出物の, 乳癌由来 MCF-7 細胞の増殖に対する影響を調査した (Fig. 2). 添加濃度 11.1 $\mu\text{g/ml}$ までは影響が見られなかったが, E2 では添加濃度 33.2 $\mu\text{g/ml}$ で, 増殖率が陰性対照 (DMSO 添加) の 66% に低下し, 有意に細胞増殖が抑制された. 一方, Ew では添加濃度 33.2 $\mu\text{g/ml}$ で陰性対照 (DMSO) と比べて 160% の増殖率で, 有意に細胞増殖が促進されることが分かった. しかし, その増殖率は陽性対照 (17 β -estradiol) と比較すると 1/2 以下であった. その他の E1, E4 では細胞増殖に影響はみられなかった.

考 察

1. 食品利用可能な抽出物

カキ果皮抽出物は糖質が多く, 疎水性有機溶媒を使用しないで脂溶性成分だけを取り出すことは非常に難しい. 一方, 食用には法的に疎水性有機溶媒は使用できないため, 唯一使用が許されているエタノールを用いて食用可能な抽出物を調製した (Fig. 1, Table 2).

それぞれの抽出物の特徴として, E2 は乾燥しているため容易に粉末にすることができ, ポリフェノールは検出されないが, 他の抽出物に比べて高濃度の β -クリプトキサンチンを含むため, これを添加することで β -クリプトキサンチン強化食品の製造が可能になると考えられる. 一方, E1, E4 は, E2 と比べて, β -クリプトキサンチン濃度は 50% 程度であるが, ポリフェノールが多く含まれているため, ポリフェノールを強化した食品製造に利用できると考えられる. さらに, これらの抽出物には干し柿様の匂いがないので, 食品に添加しやすいと考えられる. Ew は β -クリプトキサンチンなどのカロテノイド類を含んでいないが, ポリフェノールが脂溶性抽出物に比べて多く含まれているので, 脂溶性抽出物と合わせて利用することでポリフェノールをより強化するのに利用できるかもしれない. しかし, Ew は干し柿様の匂いがあり, 飴状で取扱いにくいので, 糖を除去するなどの前処理も必要と考えられる.

本研究では特に脂溶性成分である β -クリプトキサンチンに注目して分画を行い, それを含有する脂溶性抽出物を得ることができた. β -クリプトキサンチンを単一の画分として取り出すことはできなかったが, 分画によって高濃度の β -クリプトキサンチンを含む E2 のような抽出物を調製できる事が示された.

今回得られた抽出物に含まれている β -クリプトキサンチン, ポリフェノールの量はカキ果皮に含まれている量と

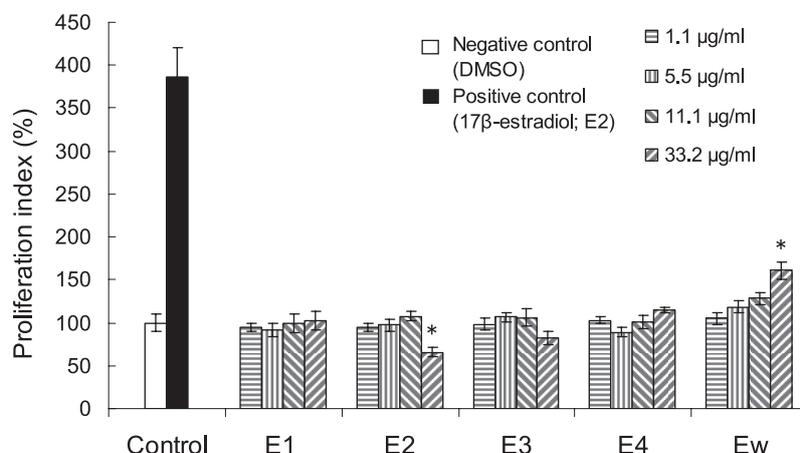


Fig. 2 Proliferation activity of MCF-7 cell by each extract from dried peel of persimmon

Values are mean \pm S.D.

Significant difference from negative control was observed at * $p < 0.05$.

比べて少なかった (Table 2). これは、残渣に成分が多く残った、あるいは加熱時に分解が起こったなど、抽出工程に原因があると考えられる。従って、抽出効率の向上と抽出操作中の損失を減らし、より効率よく抽出できるよう条件等の検討が必要と考えている。

2. 抽出物の MCF-7 乳癌細胞への影響

ヒト乳癌由来細胞である MCF-7 は、エストロゲンにตอบสนองして増殖率が顕著に高まる性質がある。エストロゲンは女性ホルモンの一つで、脂質代謝やインスリン作用機構など様々な生体調節に関わっている。女性におけるエストロゲン分泌の減少は、糖尿病や骨粗鬆症の発症リスクの上昇にも関係する。従って、MCF-7 細胞が何らかの応答を示す物質にはエストロゲン様活性があり、これらの疾病に対して有効な作用を持つ可能性があるといえる。例えば MCF-7 に対して弱いエストロゲン活性を持つ大豆については、骨粗鬆症や抗癌作用などの機能的が数多く研究されている⁶⁾。そこで、カキ果皮から得られた抽出物の MCF-7 細胞の増殖に対する活性を調べた。

細胞増殖促進活性を示した Ew は、 β -クリプトキサンチンが検出されず、ポリフェノール含量が多かった。フラボノイド類は MCF-7 細胞に対して細胞増殖促進活性を示すことが知られている⁷⁾。カキ果皮にはケルセチン⁸⁾ やプロアントシアニジン (タンニンの構成成分) などのフラボノイド類が含まれている^{3, 9)}。Ew にはこれらの成分が多く移行しており、細胞がそれらにตอบสนองしたと考えられる。

細胞増殖阻害活性を示した E2 には β -クリプトキサンチンが多く含まれていたが、ポリフェノールは検出されなかった。MCF-7 に対して細胞増殖阻害を示す成分として、ビタミン A やその前駆物質 (プロビタミン A) の β -カロテンなどが報告されている¹⁰⁾。 β -クリプトキサンチンもプロビタミン A 活性を持っており、生体内ではビタミン A と同様の働きをすると考えられることや、E2 には濃度は低いものの β -カロテンも含まれていた (β -クリプトキサンチンの 1/10 程度、データ省略) ことから、 β -カロテンによる細胞増殖阻害の可能性もある。一方、E2 以外の脂溶性抽出物 (E1, 3, 4) も β -クリプトキサンチンを含むが、その濃度が低かったため (1/2 以下) 阻害活性が表れなかったと考えられる。

3. まとめ

カキ果皮は繊維が多く、そのままでは食品として利用するには不向きな素材であるが、今回調製した抽出物であれば、食品添加物やサプリメントとして利用しやすくなる。また、いくつかの抽出物を組み合わせることで、果実よりも効率よく、 β -クリプトキサンチンやポリフェノールといった有効成分を経口摂取できるようになると考えられる。

Ew には乳癌由来 MCF-7 細胞の細胞増殖を促進し、弱いエストロゲン様活性を持つ成分が含まれている可能性がある。大豆^{6, 11)} やローヤルゼリー¹²⁾ のように健康食品に

利用される食材も弱いエストロゲン活性を持っていることから、Ew も健康食品素材となる可能性がある。また、脂溶性抽出物 E2 は乳癌細胞の増殖を抑制したことから、癌のリスクを抑える作用を持つ可能性もある。

本研究の結果は、カキ果皮から得られた抽出物は機能的食品素材として可能性があり、カキ果皮を価値のある食品素材として有効利用できる可能性を示唆するものである。しかし、細胞増殖に作用するメカニズムなど解明されていない点は多く残されており、今後さらに研究を進めていく必要があると考えている。

参考文献

- 1) 最新園芸大辞典編集委員会：最新園芸大辞典 第3巻，誠文堂新光社，東京，p.1258 (1969)
- 2) 山田昌彦：果樹園芸大百科 6，農産漁村文化協会，東京，p.109 (2000)
- 3) Mallavadhani U. V., Panda A. K., Rao Y. R.: *Phytochemistry*, **49**, 901-951 (1998)
- 4) 高橋英史，稲田有美子，井土良一：東洋食品工業短期大学・東洋食品研究所 研究報告書, **27**, 29-36 (2009)
- 5) Gorinstein S., Zachwieja Z., Foltá M., Barton H., Piotrowicz J., Zemser M., Weisz M., Trakhtenberg S., Martin-Belloso O.: *J Agric Food Chem*, **49**, 952-957 (2001)
- 6) Barnes S.: *J Nutr*, **134**, 1225S-1228S (2004)
- 7) Han D. H., Denison M. S., Tachibana H., Yamada K.: *Biosci Biotechnol Biochem*, **66**, 1479-87 (2002)
- 8) Ohguchi K., Nakajima C., Oyama M., Iinuma M., Itoh T., Akao Y., Nozawa Y., Ito M.: *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 122-4 (2010)
- 9) Lee Y. A., Cho E. J., Yokozawa T.: *Biol Pharm Bull*, **31**, 1265-9 (2008)
- 10) Prakash P., Russell R. M., Krinsky N. I.: *J Nutr*, **131**, 1574-80 (2001)
- 11) Messina M. J., Loprinzi C. L.: *J Nutr*, **131**, 3095S-108S (2001)
- 12) Miyata T.: *J Pharmacol Sci*, **103**, 127-31 (2007)