



ORYZA OIL & FAT CHEMICAL CO., LTD.

月見草エキス

EVENING PRIMROSE EXTRACT

ピロリ菌感染予防作用

月見草エキス-PH

(粉末、食品用途)

月見草エキス-WSPH

(水溶性粉末、食品用途)

オリザ油化株式会社

ver. 3.3JT

ピロリ菌感染予防 食品素材

月見草エキス

EVENING PRIMROSE EXTRACT

1. はじめに

月見草は、アカバナ科マツヨイグサ属の植物です。これまで、その種子から搾油することのできる月見草油が広く知られてきました。この月見草油はヨーロッパでは医薬品として扱われております。成分として γ -リノレン酸が多く含まれていることが注目され、肥満、糖尿病をはじめ、高コレステロール血症やPMS（月経前症候群）など種々の疾病に対する治療効果があるとされてきました。

近年、植物種子中におけるポリフェノール類が脚光を浴びております。特に、種子中のポリフェノール類は、前述の油成分などの酸化を防ぐために種子自身が蓄えており、強い抗酸化性をもっているといわれ、油の酸化を防ぐ性質に加え、生体内において、様々な疾病の原因となる活性酸素を消去する働きがあります。オリザ油化（株）では植物種子中のポリフェノール類に着目し、機能性素材の研究開発をすすめてきました。今回、ご紹介いたします月見草エキスは、月見草種子からポリフェノール類を高濃度に濃縮したものです。オリザ油化（株）では、現在まで月見草エキスに、未だかつて類のないポリフェノール含有量と、非常に強い抗酸化作用及び抗糖尿病作用があることを見出してきました。今回、この月見草エキスに新規生理活性として**ピロリ菌に対する強い抗菌作用**があることを確認し、新しい訴求点をもった機能性食品素材として商品化いたしました。



月見草

2. 月見草エキスについて

(1) 月見草エキスの原料

月見草エキスは、月見草種子を原料として、ポリフェノール類を高濃度に濃縮し、商品化したものです。一般に月見草と呼ばれているものは以下の4種類です。

- ・コマツヨイグサ (*Oenothera laciniata*)
- ・マツヨイグサ (*Oenothera striata*)
- ・メマツヨイグサ (*Oenothera biennis*)
- ・オオマツヨイグサ (*Oenothera erythrosepala*)

月見草は、古くから主に北米や中国で栽培されています。北アメリカインディアンは全草をいろいろな疾病の治療、例えば腫れ物の治療に、根を痔疾の治療と体力増進に、種子を貴重な薬として使用してきた古い歴史があります。

現在、特に月見草種子は、健康補助食品の ω -3脂肪酸の原料として広く使われています。その他に、全草又は花の抽出物は、お茶として飲用されています。また、全草や根はピクルスとして食され、種子はスープに混ぜて飲まれ、マフィンに練り込んで食されるなどのいろいろな食習慣があります。さらに、最近では種子の抽出物を健康食品としても用いられています。このように、月見草は、古くから世界各地で多くの食経験のある素材と言えます。

(2) ポリフェノール含有量

月見草エキスと、これまでに、抗糖尿病作用などが知られている各種植物抽出物のポリフェノール含量を比較した結果、月見草エキスには他の植物抽出物に類を見ない、非常に多くのポリフェノールが含有されることを見出しました。

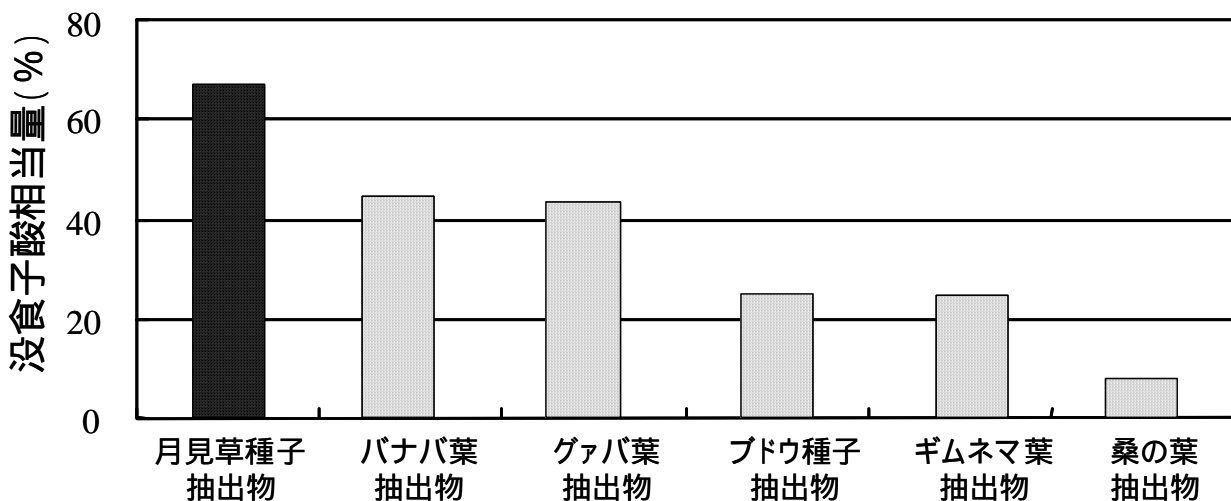


図 1.各種植物抽出物のポリフェノール含量比較

(3) 月見草エキスの機能性成分

月見草エキスの有効成分としては、ポリフェノールとして没食子酸、エラグ酸、ペンタガロイルグルコース (PGG)、カテキン、プロアントシアニジン (PAC) などを含有しています。没食子酸は抗酸化作用の他に収斂作用、エラグ酸はメラニン生成抑制作用、ペンタガロイルグルコースは抗炎症作用、カテキンは消臭作用や抗菌作用、プロアントシアニジンは動脈硬化予防作用など様々な機能が確認されています。これらの物質を豊富に含んだ月見草エキスは、新たにピロリ菌に対する抗菌作用を有していることがわかりました。

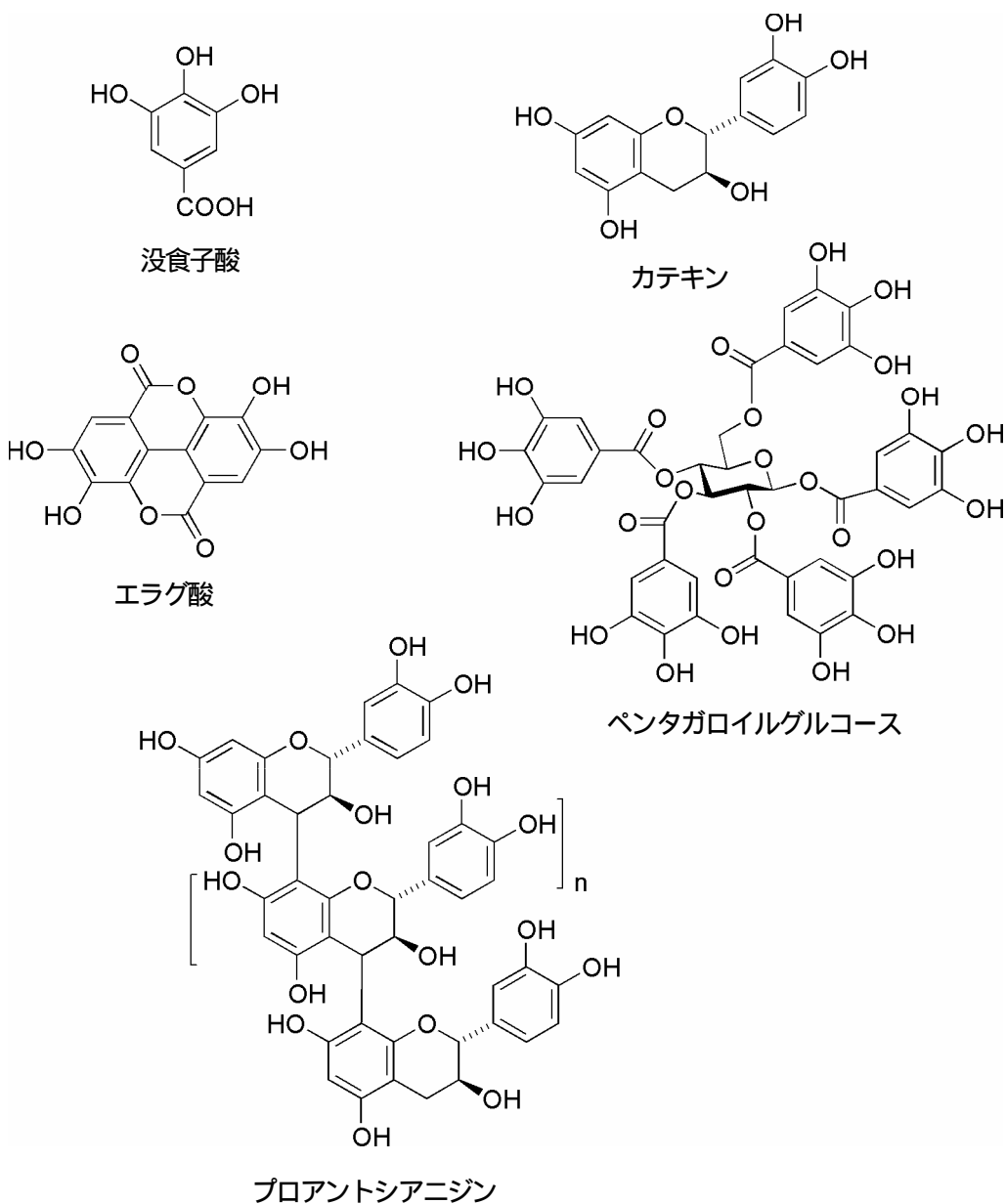
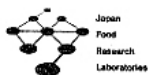


図 2.月見草エキスに含有される主なポリフェノール類

(4) 月見草エキスの抗酸化活性

電子スピン共鳴 (ESR) 法により、月見草エキスのスーパーオキシド消去活性を測定したところ、 3.5×10^5 単位/g という非常に強い抗酸化活性を有していることがわかりました。このような抗酸化活性を持つ食品の摂取は、各種生活習慣病予防に効果があるといわれています。



分析試験成績書

第 302010023-001 号
平成 14 年 01 月 21 日

依頼者 オリザ油化株式会社

検体名 月見草エキス-P

付記事項 * * * * *

財団法人

日本食品分析センター

東京本部 〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
大阪支所 〒550-0051 大阪府吹田市豊津町3番1号
名古屋支所 〒460-0015 名古屋市中区大須4丁目5番13号
九州支所 〒812-0034 福岡市博多区下呉服町1番12号
多摩研究所 〒260-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

平成 14 年 01 月 07 日当センターに提出された上記検体について分析試験した結果は次のとおりです。

分析試験結果

分析試験項目	結果	検出限界	注	分析方法
ス・N [•] -オキシド消去活性	3.5×10^5 単位/g		1	電子スピン共鳴 (ESR) 法

注1. J.M.McCord及びI.Fridovichが定義した単位 [J.Biol.Chem., 244, 6049 (1969)] に相当する消去能として、
以上

3. ピロリ菌について

(1) ピロリ菌の発見

ヘリコバクター・ピロリ《*Helicobacter pylori* (以下 *H.pylori*)》は1983年にオーストラリアのワレンとマーシャルという研究者により、初めて胃の中に存在していることが証明されました。ヘリコバクター・ピロリという名前の由来は、らせん状(ヘリコ)の菌の形態と、胃の幽門部(ピロリ)に多く存在することに由来しています。また鞭毛をヘリコプターのように回転させ移動します。感染経路はまだはっきりとはしていませんが、口を介した経口感染が大部分だろうと考えられています。



ピロリ菌の電子顕微鏡写真

Osaki et.al., J Med Microbiol.2002

(2) ピロリ菌に感染すると

ピロリ菌は、胃炎や消化性潰瘍の患者から高い確率で検出されることが多く、潰瘍の発生、さらに再発や難治化の一因として認められています。ヘリコバクター・ピロリは特に幽門部などの胃粘膜の粘液層や細胞間隙に生息し、自身が産生するウレアーゼにより胃内の尿素をアンモニア (NH_3) に転換します。周囲の酸を中和させ生息可能範囲を広げるとともに、このアンモニアが胃粘膜傷害に関与していると考えられています。この菌が幼少時に感染すると、急性胃炎、萎縮性胃炎などを経て分化型胃癌が発生しやすくなり、成人以降に感染した場合には、胃粘膜は萎縮せず、十二指腸潰瘍を起こしやすくなるといわれています。40歳以上になると、きわめて多くの方がピロリ菌に感染しており、その感染率は80%前後にのぼります。高齢者に多いのは昔の上下水道等の衛生環境が整っていなかったためと言われています。このようにピロリ菌に感染している人は多いのですが、もちろん全員が潰瘍になるわけではなく、ごく一部分の人が潰瘍になるわけです。日本人のピロリ菌感染者は約6000万人と言われていますが、ほとんどのピロリ菌感染者は症状もなく、普通の健康人となんら変わりありません。逆に、胃・十二指腸潰瘍の患者からみると、9割の患者がピロリ菌感染者なのです。

(3) ピロリ菌の除菌とそのデメリット

現在、ピロリ菌の除菌にはプロトンポンプ阻害剤 (PPI) + 抗菌剤 2 剤の三剤併用療法 (MACH 1 study) が有効であると言われています。その、除菌率は85%前後です。しかし、除菌療法により、50.5%の何らかの副作用が認められており、軟便、下痢などの消化器症状や味覚異常を起こすことがあります。軟便(13.7%)、水様便を含む下痢(8.8%)、異味感、苦味を含む味覚異常(2.6%)、発疹(1.4%)などの副作用が報告されています。また、除菌後6ヶ月以上にわたり経過を観察すると、除菌成功例のうち、3.9%に軽度の逆流性食道炎が発生するとの報告があります。これは、胃粘膜萎縮の強い胃潰瘍や胃炎ではヘリコバクター・ピロリ除菌により、低下していた胃酸分泌が改善(正常化)することが一因であろうと考えられています。

(4) ピロリ菌のライフスタイルと月見草エキスの抗菌作用

図3にピロリ菌の病原因子及びライフスタイルを示しました。ピロリ菌の病原因子には、ピロリ菌の構造物や産生物質などの細菌側病原因子のみならず、本菌感染に伴い宿主胃上皮細胞や免疫担当細胞が産生する宿主側病原因子も含まれています。

細菌側病原因子は、ウレアーゼ（尿素を分解しアンモニアを産生することにより胃酸を中和し、菌の胃内での持続感染を可能にさせる） 鞭毛（菌の運動をつかさどる） アドヘジン（胃上皮細胞への菌の付着に關与する） カタラーゼ（抗貪食作用） SOD（抗貪食作用） VacA（胃上皮細胞の空胞化） PAI（サイトカイン産生の誘導、Type 分泌装置） CagA（チロシン残基のリン酸化が細胞骨格に変化を与える） LPS（胃上皮細胞との免疫交差反応を惹起する） 熱ショック蛋白（付着因子としての作用及び免疫交差反応の惹起） NapA（白血球活性化因子） 宿主側病原因子は、IL-6、IL-8などのサイトカイン（炎症の惹起） 活性酸素（胃粘膜細胞の障害） 一酸化窒素（スーパーオキシドと反応して、DNA 障害性のあるパーオキシニトレートが生成される）などがあります。

月見草エキスは、殺菌作用を有し、また、細菌側病原因子の、宿主側病原因子の に働きかけることにより、ピロリ菌に対する抗菌作用を示します。詳しいデータは「4.月見草の機能性」に記載しています。

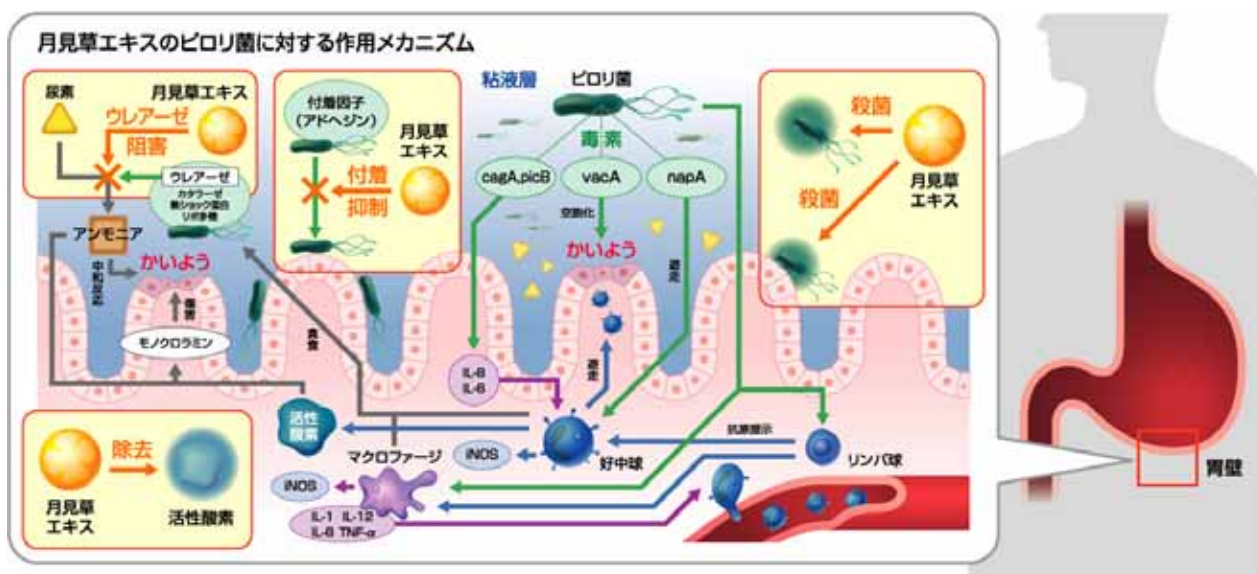


図3.ピロリ菌のライフスタイルと月見草エキスの抗菌作用

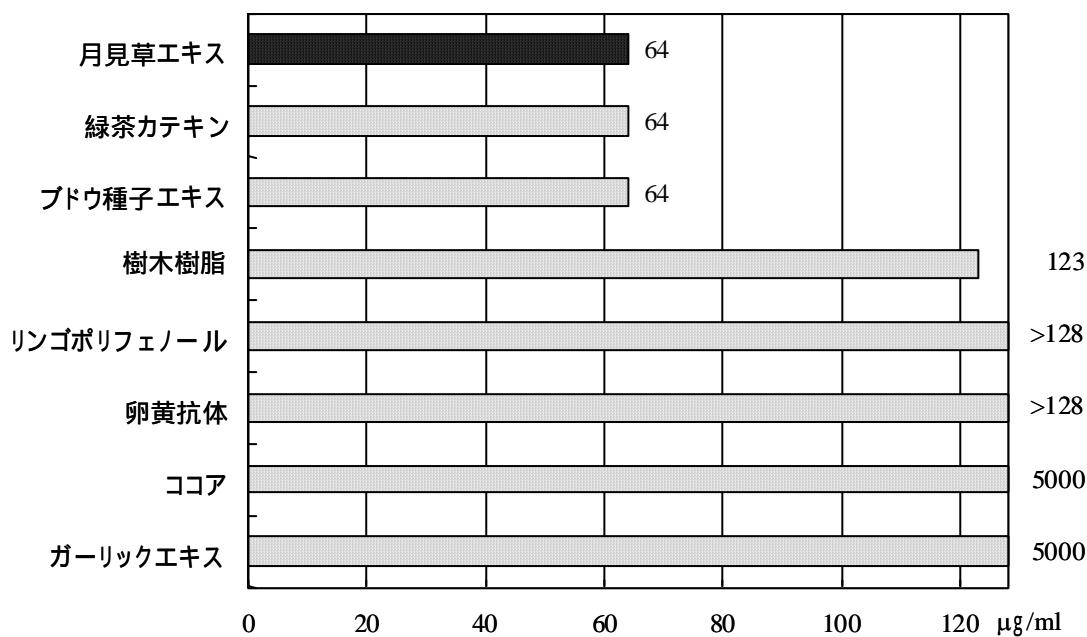
4. 月見草エキスの機能性

(1) ピロリ菌発育阻止作用

月見草エキスのMIC (最小発育阻止濃度) を、様々な植物抽出物と比較したところ、月見草エキスは64 μ g/ml (0.0064%) という非常に強い抗菌作用を有していることがわかりました。

ポリフェノール含量は、月見草エキスで64%、緑茶カテキンで80%以上、ブドウ種子エキスで100%、リンゴポリフェノールで100%です。それぞれのポリフェノール含量を比較すると、月見草エキスが含有するポリフェノールに非常に強い抗菌作用があることがわかります。

使用菌株は標準株 ATCC43503、ATCC43504、ATCC43579、ATCC49503、NCTC1163、臨床分離株 TK1003、TK1008、TK1021、TK1022、TK1023、TK1025、TK1029、TK1030、TK1036、TK1042、TK1402、KR2001、KR 2002、KR 2003、KR 2005、KR 2007、KR 2009、KR 2067、KR 2093 の計 24 株です。実験方法は寒天培地希釈法で行ないました。



は自社測定値, それ以外は文献及び資料から引用

図 4. 月見草エキスと他素材との比較

注：サンプルは次のような条件のものです。

月見草エキスは賦形剤を添加していないものを使用。

緑茶カテキンはポリフェノール80%以上のものを使用。

ブドウ種子エキスはポリフェノール100%のものを使用。

樹木樹脂は市販の樹木樹脂エキスを使用。

リンゴポリフェノールはポリフェノール100%のものを使用。

ココアは市販のココア粉末を使用。

ガーリックエキスはニンニク搾汁の凍結乾燥物を使用。

月見草エキス中の機能性成分の比較を行なったところ、ペンタガロイルグルコース (PGG) は、ピロリ菌に対する非常に強い抗菌作用を有することがわかりました。

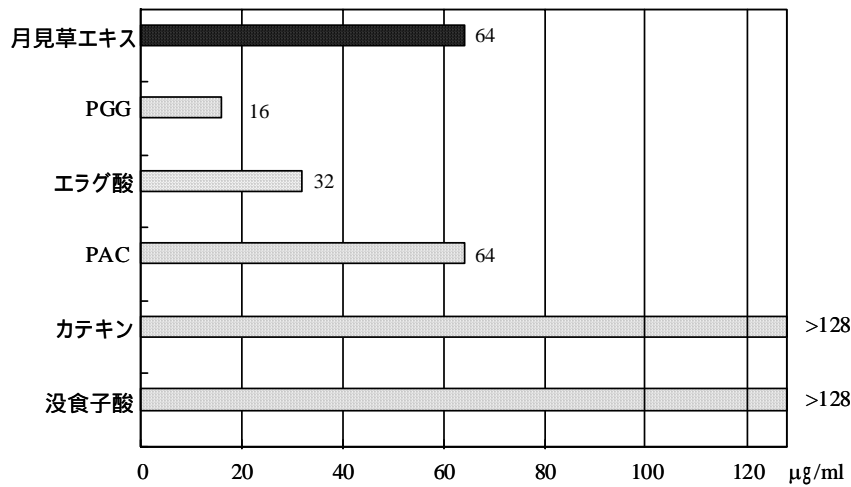


図5.月見草エキス中の機能性成分の比較

また、月見草エキスを添加した栄養がない条件下(生理食塩水など)でピロリ菌を培養したところ、月見草エキスは殺菌的な抗菌作用を示すことがわかりました。

図6を説明いたしますと、Y軸はピロリ菌数を示し、X軸は時間(h)を示しています。0µg/mlは月見草エキスを添加していないため、菌数に増減はありません。しかし、月見草エキスを添加した512、256µg/mlは2時間後には検出限界以下となり、128、64、32µg/mlでは24時間後に検出限界以下となりました。図を見ていただくとわかりますように、濃度依存的にピロリ菌数が減少していることがわかります。

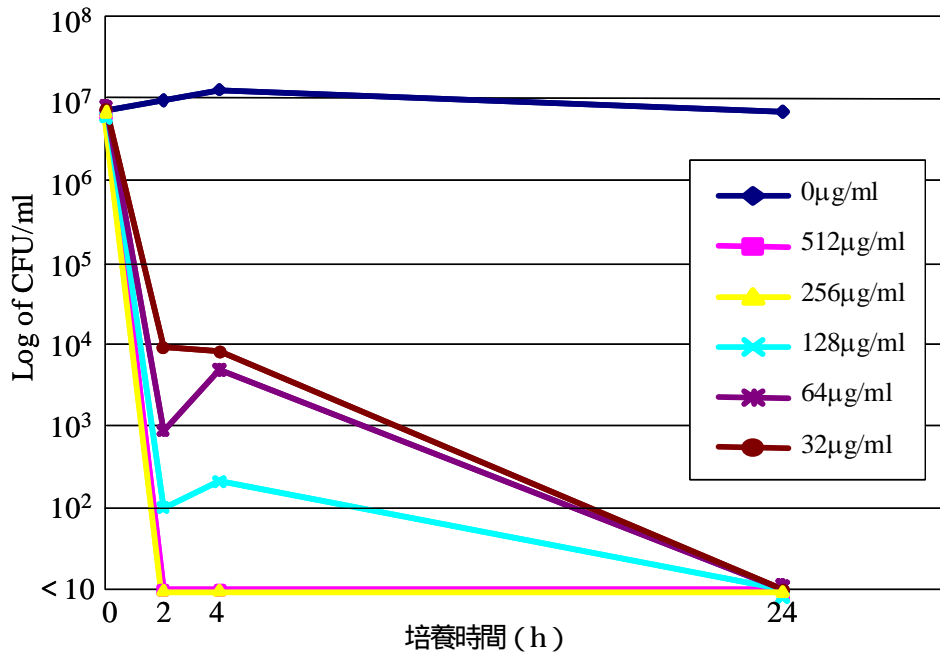


図6. *H. pylori*の生存率に及ぼす月見草エキスの効果

*H. pylori*臨床分離株TK1402株を使用. 菌株は微好気条件下7%ウマ脱繊維血加BHI寒天培地で培養後、ハンクス平衡塩溶液にて各濃度(512,256,128,64,32,0µg/ml)の月見草エキス存在下で振盪培養.0,2,4,24h後に0.1mlずつサンプリングして菌数を測定.

(2) ウレアーゼ阻害作用

ピロリ菌が、pHが非常に低い状態の胃の中で生存できるのは、ウレアーゼという酵素を用い、尿素をアンモニアにすることによって、胃内を中和するためです。そのため、ウレアーゼの作用を阻害すればピロリ菌は胃の中では生きていきません。また、このアンモニアは胃の粘膜や粘液の性質を変化させるため、胃壁が爛れて炎症を起こすこととなります。そこで、月見草エキスがウレアーゼ阻害作用を有しているかどうかを調べたところ、非常に強いウレアーゼ阻害作用を有していることがわかりました。

ウレアーゼ阻害作用は、ナタ豆由来ウレアーゼを用い、インドフェノール法にて試験を行いました。月見草エキスによるウレアーゼ阻害作用のIC₅₀は8.54μg/mlでした。したがって、月見草エキスにより、ヘリコバクター・ピロリが産生するウレアーゼの活性を阻害し、アンモニアの生成を防止して、アンモニアによる胃壁への障害を抑制することが期待できます。

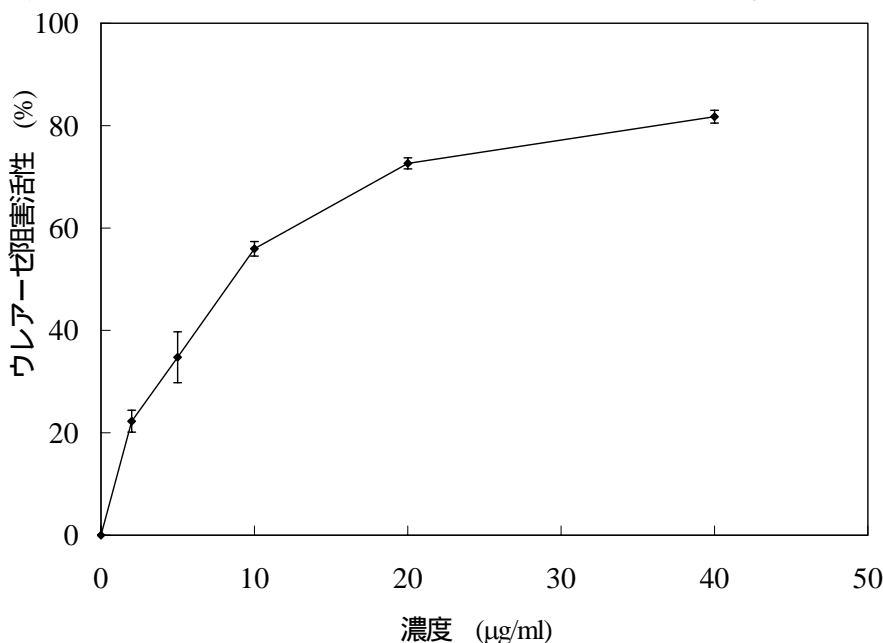


図7.月見草エキスによるウレアーゼ阻害作用

$$\text{ウレアーゼ阻害率(\%)} = \{(U_b - U_s) / U_b\} \times 100$$

$$\text{ウレアーゼ活性値(U)} = E_s - E_b$$

E_s: 酵素液を使用して測定した吸光度

E_b: 酵素液の代わりに緩衝液を使用して測定した吸光度

U_b: 抽出液の代わりに水を使用して測定したウレアーゼ活性値

U_s: 抽出液を使用して測定したウレアーゼ活性値

(3) ピロリ菌付着抑制作用

ピロリ菌は付着因子を持つことで、胃上皮細胞に付着し、胃内で生存できます。そこで、月見草エキスがピロリ菌の胃癌由来上皮細胞への付着抑制作用を有しているかどうかを調べたところ、16μg/mlで82.45%という非常に強い付着抑制作用を有していることがわかりました。したがって、月見草エキスにより、ピロリ菌が胃上皮細胞に付着することを抑制することで、ピロリ菌の感染を予防することが期待できます。

図8を説明いたしますと、Y軸が細胞数、X軸が蛍光強度を示しています。ピロリ菌に蛍光ラベルしているため、細胞にピロリ菌が付着していると蛍光強度が上がり、ピークは右へ移動します。は何も添加していないため、ピロリ菌は細胞に非常に多く付着し、ピークは右端に現れています。は細胞のみで、ピロリ菌を付着させていません。しかし、蛍光ラベルしなくても細胞は、少ないですが蛍光を発するので、ピークは左端に現れています。

図を見ていただきますと、月見草エキス 16 32 64μg/ml のようにピークが右から左へと変化してきます。これは、ピロリ菌が細胞に付着するのを月見草エキスが濃度依存的に抑制していることを示しています。

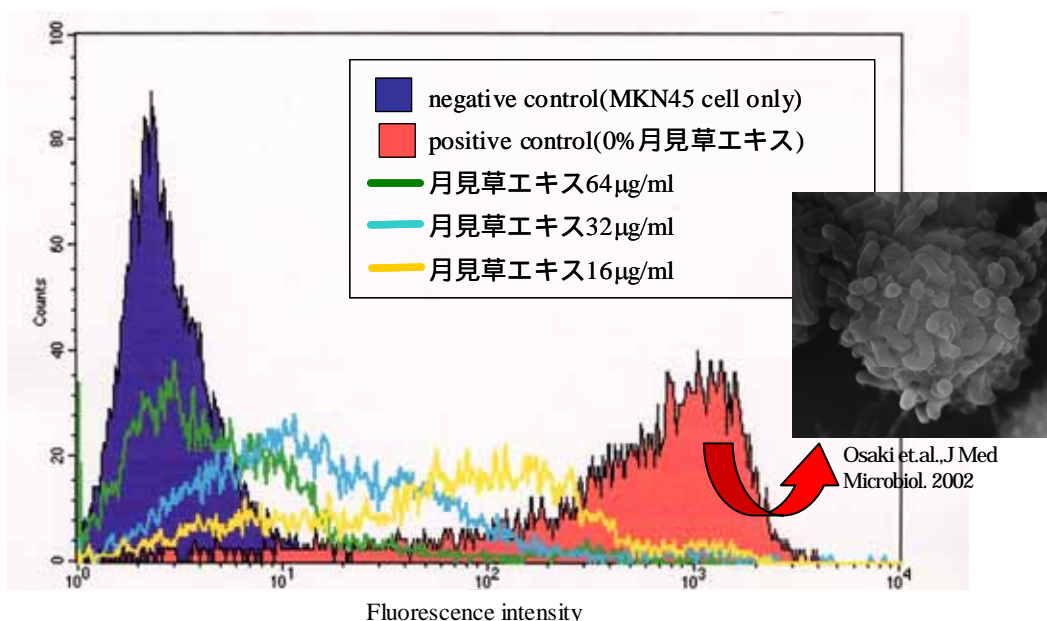


図8.月見草エキスの付着に及ぼす効果

*H. pylori*臨床分離株TK1402(以下TK1402株)を使用。菌株は微好気条件下7%ウマ脱繊維血加BHI寒天培地で培養後、 5×10^8 CFU/mlに調製し、親脂性蛍光色素PKH-2でラベルした後、各濃度(64,32,16μg/ml)の月見草エキスで、TK1402株及びヒト胃癌由来上皮細胞株(以下MKN45細胞)を室温にて30分間前処理し、次にTK1402株とMKN45細胞を混和し、1時間に反応させた。*H. pylori*のMKN45細胞への付着抑制はフローサイトメトリー(FCM)にて解析を行なった。

表1. *H. pylori*の付着に及ぼす月見草エキスの効果

月見草エキス濃度 (μg/ml)	平均蛍光強度 (付着抑制率 (%))
64	15.12 ± 61.51 (98.10)
32	54.23 ± 230.86 (98.18)
16	139.56 ± 236.01 (82.45)
0	795.03 ± 594.44 (0)

付着抑制率は、次式で求めた。
 月見草エキス未処理MKN45細胞の蛍光強度；A
 MKN45細胞onlyの蛍光強度；A
 月見草エキス処理MKN45細胞の蛍光強度；T
 $1 - (T / A - A) =$ 付着抑制率(%)

(4) ピロリ菌定着抑制作用

月見草エキスが動物実験において、ピロリ菌の胃上皮細胞に対する付着を抑制し、胃内への定着を抑制できるかどうかを調べたところ、動物実験においても、月見草エキスがピロリ菌の胃内への定着を抑制することがわかりました。したがって、月見草エキスにより、ピロリ菌が胃上皮細胞に付着することを抑制することで、ピロリ菌の感染を予防できることが、動物実験でも証明することができました。

実験方法としまして、スナネズミ(MGS/Sea, 9週齢, オス)を用いて、ピロリ菌臨床分離株 TK1402 株($1 \sim 3 \times 10^9$ CFU/ml)に月見草エキスが 1 mg/ml の濃度となるように添加し、経口接種(1 ml/匹, 1日1回, 連続2回)しました。経口接種1週間後、スナネズミを開腹し、胃粘膜を採取しました。次に、採取した胃粘膜を用い、*H.pylori* の 16SrRNA に特異的なものをプライマーとした RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)を行い、*H.pylori* の胃内への定着の有無を判定しました。

図9の説明をいたしますと、右端のバンドはピロリ菌の 16S rRNA (ピロリ菌特有の遺伝子)で、ピロリ菌が存在していることを示しています。コントロールの c を見ていただくと、5匹中、4匹にピロリ菌の存在が確認できます。また月見草エキス投与群の b を見ていただくと、スナネズミ 5匹中、1匹にピロリ菌の存在が確認できました。このことより、月見草エキスは、スナネズミ 5匹中、4匹においてピロリ菌が胃に定着することを抑制したことがわかります。

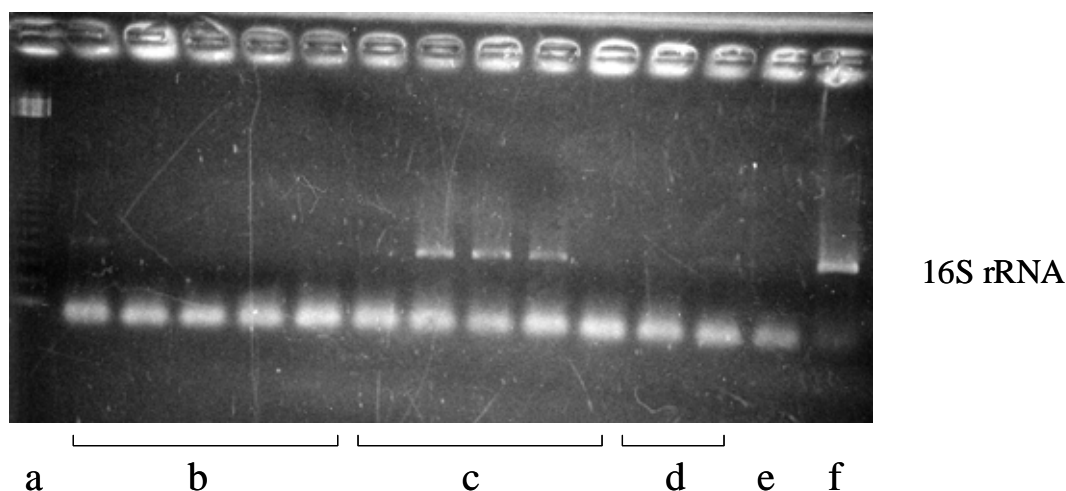


図9. 16S rRNA発現を指標としたRT-PCR法による感染スナネズミ(一週間)の胃粘膜中*H.pylori*検出結果

a; DNA Ladder, b; *H.pylori*+月見草エキス経口接種区, c; *H.pylori*経口接種区, d; *H.pylori*+アモキシシリン経口接種区, e; (-)control, f; (+)control. RTサーマルサイクル条件; 42 で45min, 反応後95 で15minで行った. PCRサーマルサイクル条件; 95 で10min, 変性後95 で45S, 57 で45S, 72 で1minを45 cycle行うことにより目的とするDNAを増幅した. またDNA除去を確認するためRTを行わない場合についても同様にPCRを行った. コントロール(G3PDH)のバンド, 450bpが全て陽性であることを条件に *H.pylori*-16Sのバンド, 501bpが確認されたものについて陽性, 確認されなかったものを陰性とした.

(5) ピロリ菌除菌作用

すでに感染しているピロリ菌に対して、月見草エキスが有効性を示すかどうかを確認するため、ddYマウスを用いてピロリ菌の除菌試験を行ないました。

その結果、下記の図に示すように、濃度依存的に菌数が低下することが確認されました。また、240mg/kgの投与群では7匹中3匹が検出限界以下となりました。

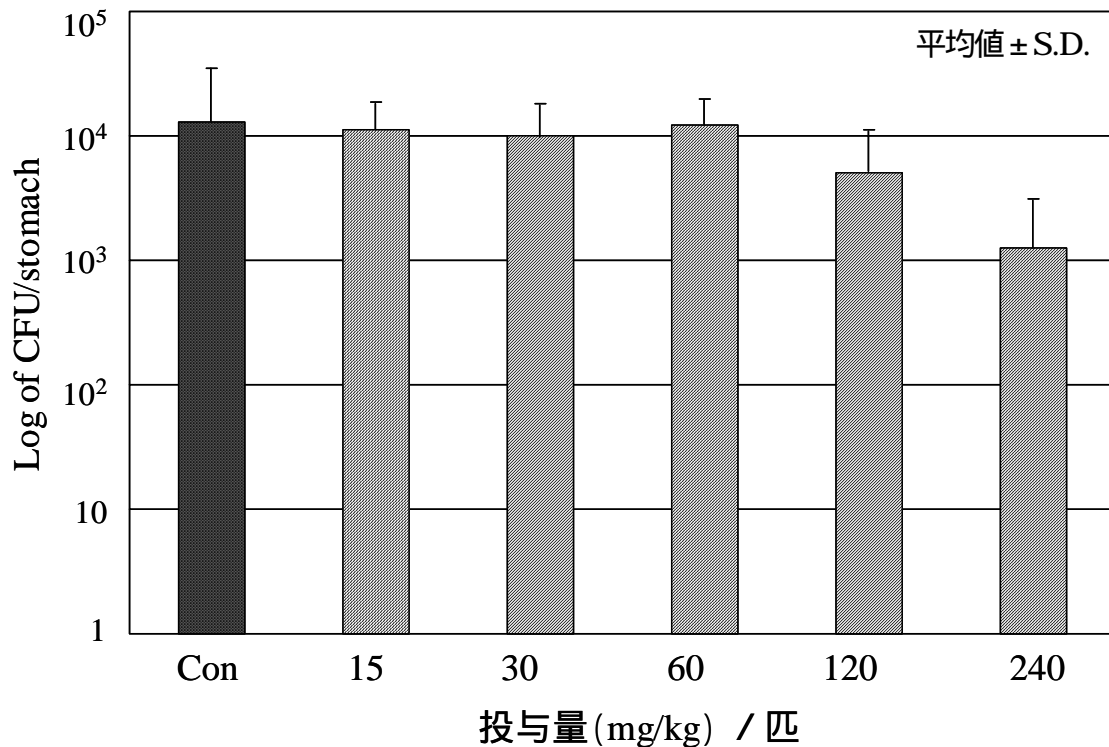


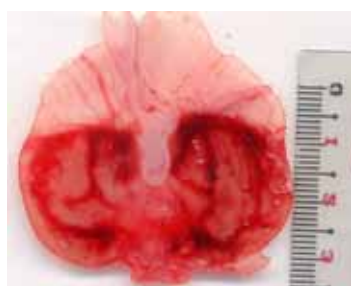
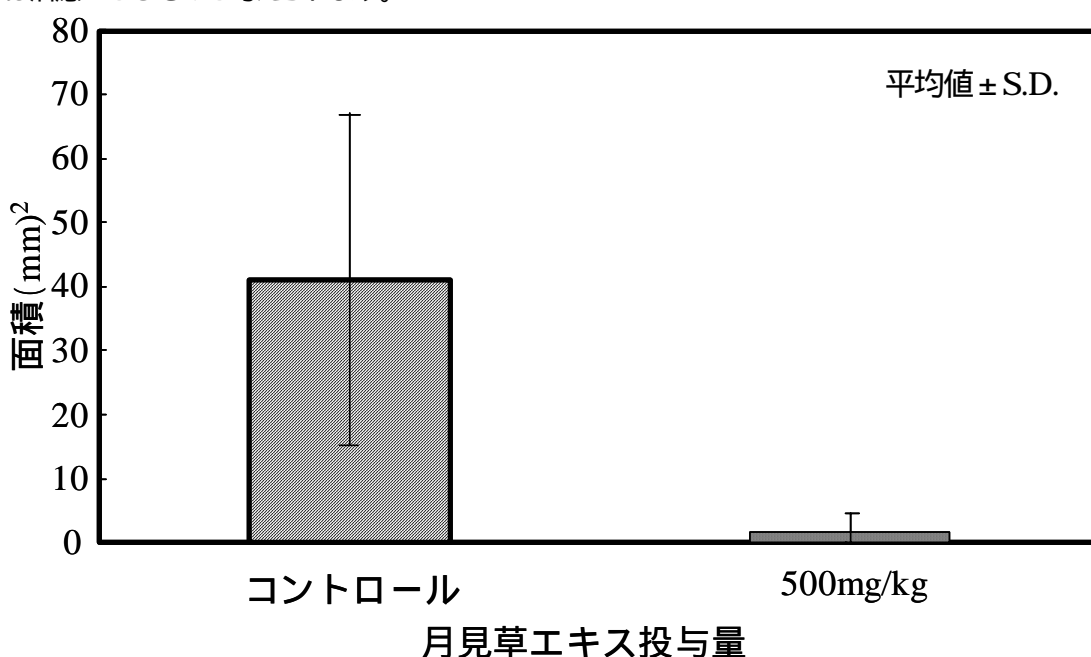
図 10. ddY マウスを用いた *H. pylori* 除菌作用

ddYマウス(4週齢,雄)を一晩絶食後, 10^8 CFU/mlの*H.pylori*を0.5ml / 匹経口投与し, さらに12時間後, 24時間後と同様の手法を用いて2回投与を行なった。2ヶ月間飼育後に, 1群あたり7匹に群わけし, 月見草エキス(15, 30, 60, 120, 240 mg / kg)を1日1回1週間連続経口投与を行なった。経口投与終了日の夜から, 一晩絶食し, 開腹後に胃粘膜をかきとり, これを*H.pylori*判定寒天培地に塗末後, 6日間培養し, 菌数を測定した。

(6) 抗潰瘍作用

ピロリ菌のウレアーゼによって尿素から生成されるアンモニアが胃十二指腸潰瘍の原因の一つと考えられています。そこで、アンモニアによる潰瘍モデルを用いて、月見草エキスの抗潰瘍作用の有無を評価しました。

その結果、下図のように、2%アンモニアを投与したラット(下図写真 cont. ; 赤く変色した胃粘膜が潰瘍発症部)における潰瘍係数の平均が 41.0 であるのに対して、月見草エキスを 500mg/kg 投与したラット(下図写真 500mg/kg ; 胃粘膜に赤く変色した部分が見当たらない)における潰瘍係数の平均は、1.6 となり、月見草エキスは、経口投与することによりアンモニア潰瘍に対する抗潰瘍作用を有することが明らかとなりました。この結果から、月見草エキスは胃腸粘膜に直接作用して潰瘍を予防または治癒させるものと考えられます。



cont.



500mg/kg

図11. アンモニア潰瘍モデルを用いた月見草エキスによる抗潰瘍作用

24時間絶食したウィスター(Wistar)系雄性ラット(体重280~300g)に、2%アンモニア水をラット100gあたり0.5ml(アンモニアとして10mg)を経口投与し、30分後エーテル致死せしめた。胃を摘出して2%ホルマリン8mlを胃内に注入して10分間固定した後、大弯に沿って切り開いた。損傷の面積(mm²)は、Scion Imageを用いて測定し、これを潰瘍係数とした。月見草エキスは5%量のアラビアゴム末で懸濁液とし、2%アンモニア水投与の30分前にラット100gあたり0.5ml経口投与した。また、対照群(cont.)には、5%アラビアゴム末液のみを投与した。

(7) 乳酸菌への影響

月見草エキスは胃内に生息するピロリ菌に対して発育阻止作用を有することから、腸内細菌である乳酸菌(いわゆる善玉菌)に対しての悪影響が懸念されます。そこで、月見草エキスが乳酸菌に対し、発育阻止作用を有するかどうかを検討しました。

その結果、下図に示すように、コントロール(cont.: 月見草エキス無添加)と月見草エキスを添加した群の菌数を比較した結果、両者間にほとんど差は見られませんでした。

月見草エキスに含まれるプロアントシアニジンやカテキンについては、すでに腸内細菌叢改善作用を有することが報告されており、月見草エキスにも同様の作用が期待できます。

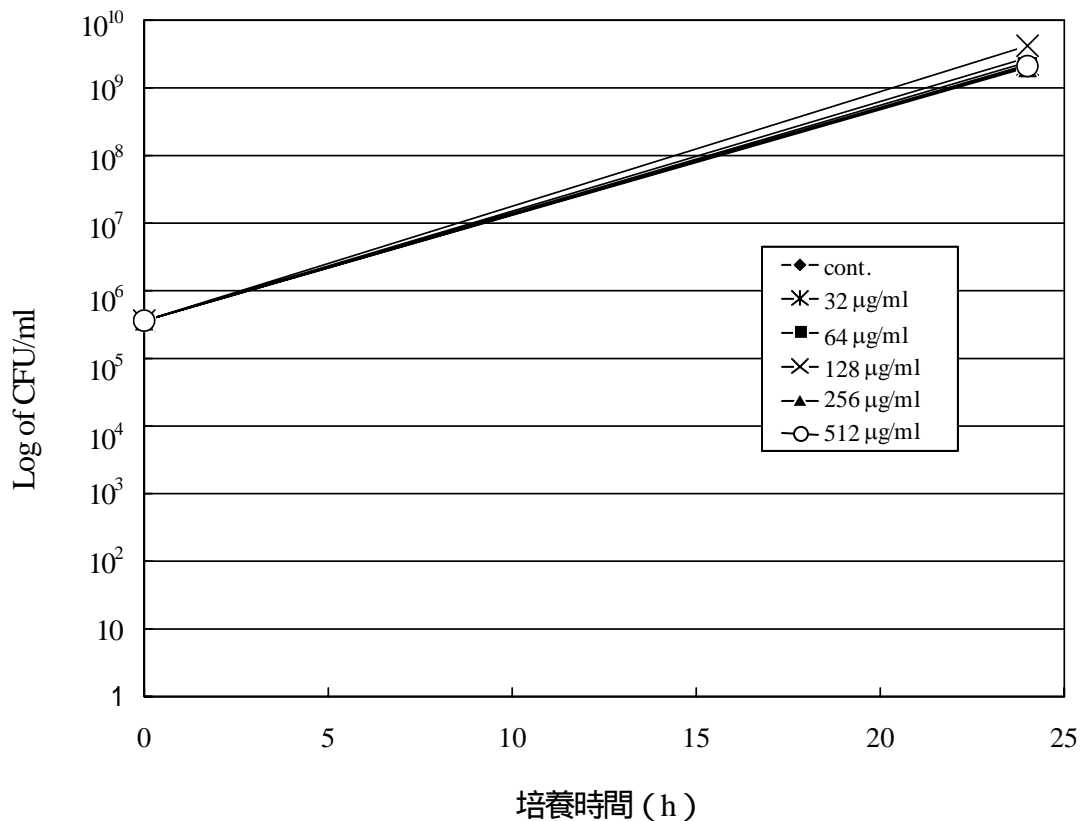


図12. 月見草エキスの乳酸菌に対する影響

(8) ヒト臨床試験

月見草エキスをヒトピロリ菌保菌者に摂取させて胃内ピロリ菌数および胃粘膜炎症に及ぼす効果を調べるために、臨床試験を実施しました。試験方法は、月見草エキス-PH120mg 摂取グループ5名、840mg 摂取グループ4名にわけ、月見草エキス-PHを充填したカプセルを、夕食終了時の2時間後、または空腹時に一度に8週間継続して摂取しました。検査項目は 尿素呼気テスト 糞便中ピロリ菌抗原検出試験（糞便中のピロリ菌抗原を測定、吸光度で菌数を判定） 血中のペプシノゲン / 比の測定（胃粘膜炎症の度合いがわかる検査）を行ないました。

その結果、月見草エキスは、胃粘膜の炎症を抑え、胃内ピロリ菌数を減少させる効果があることがわかりました。

尿素呼気試験

尿素呼気試験により、月見草エキスの胃内ピロリ菌に対する影響を検討しました。

ピロリ菌の感染及び除菌効果の判定には種々の検査方法がありますが、最も簡便で非侵襲性の試験法として広く実施されているのが尿素呼気試験です。¹³Cでラベル化した尿素を経口投与すると、胃内にピロリ菌が存在する場合には、その強力なウレアーゼ活性によりアンモニアと二酸化炭素に分解されます。¹³CO₂は消化管より血中に吸収され肺より呼気中に放出されます。呼気中の¹³Cの量を測定することでピロリ菌感染の有無を判定します。呼気¹³CO₂の値（UBT値）と胃内ピロリ菌数は、相関性があると考えられており、UBT値が減少すれば、胃内のピロリ菌数が減少していると考えられます。

測定結果を図13に示します。スタート時と比べて、摂取2ヵ月後には、低用量群及び高用量群とも、UBT値が減少していることがわかりました。この結果から、胃内のピロリ菌数が減少していると考えられます。

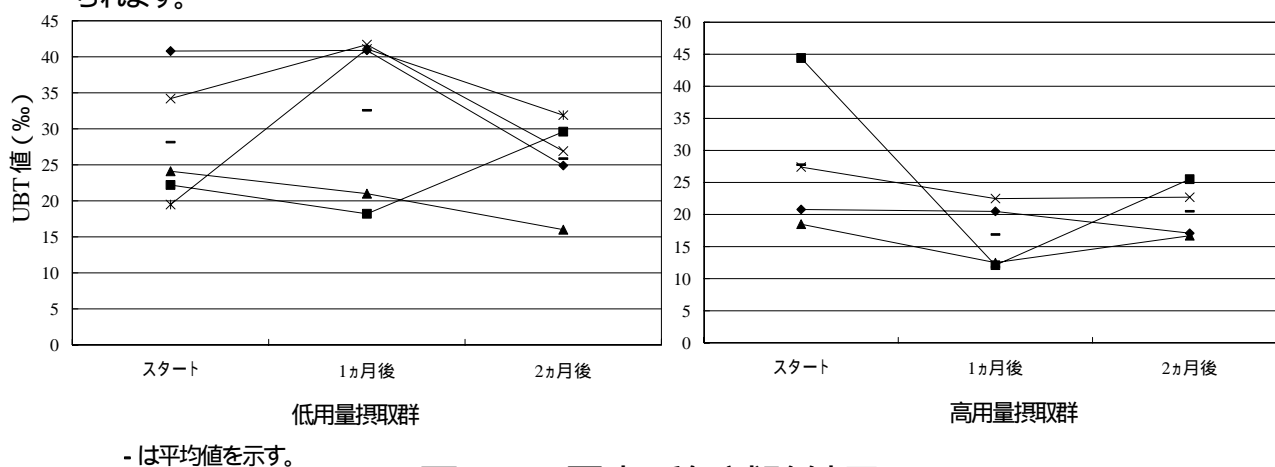


図 13. 尿素呼気試験結果

糞便中ピロリ菌抗原検出試験

便中のピロリ菌抗原をELISA法で検出する方法により、月見草エキスの胃内ピロリ菌に対する影響を検討しました。

糞便中ピロリ菌抗原検出試験は、近年開発された新しい方法ですが、糞便中のピロリ菌抗原をELISAで検出するものであり、尿素呼気試験等と比較してより直接的な検査方法であるといえます。測定値である吸光度が減少すれば、胃内ピロリ菌数が減少していると考えられています。

測定結果を図14に示します。スタート時と比べて、摂取2ヵ月後には、低用量群及び高用量群とも、糞便中ピロリ菌抗原検出値（吸光度）が減少していることがわかりました。この結果から、胃内のピロリ菌数が減少していると考えられます。

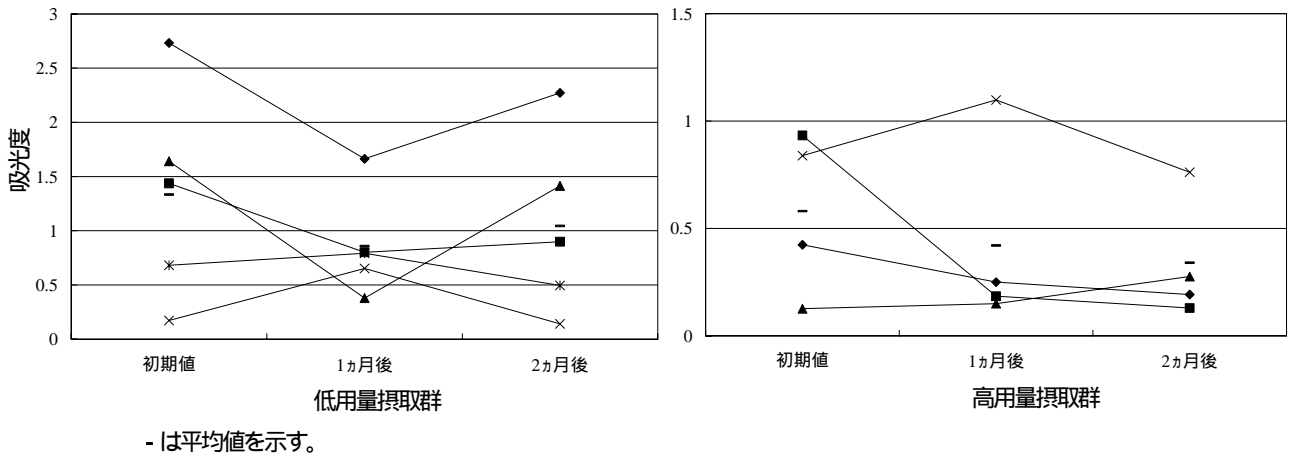


図 14. 糞便中ピロリ菌抗原検出試験結果

血中のペプシノゲン / 比の測定

血中ペプシノ - ゲン / 比を測定することにより、月見草エキスの胃粘膜炎症に対する影響を検討しました。

ペプシノ - ゲン / は、胃粘膜萎縮性胃炎などの指標として利用されています。胃粘膜の萎縮が進むとペプシノ - ゲン / が有意に低く、しかも萎縮が高度になるほど低値を示します。

測定結果を図 15 に示します。スタート時と比べて、摂取 2 ヶ月後には、低用量群及び高用量群とも、ペプシノ - ゲン / が増加していることがわかりました。この結果から、胃粘膜炎症が軽減していると考えられます。

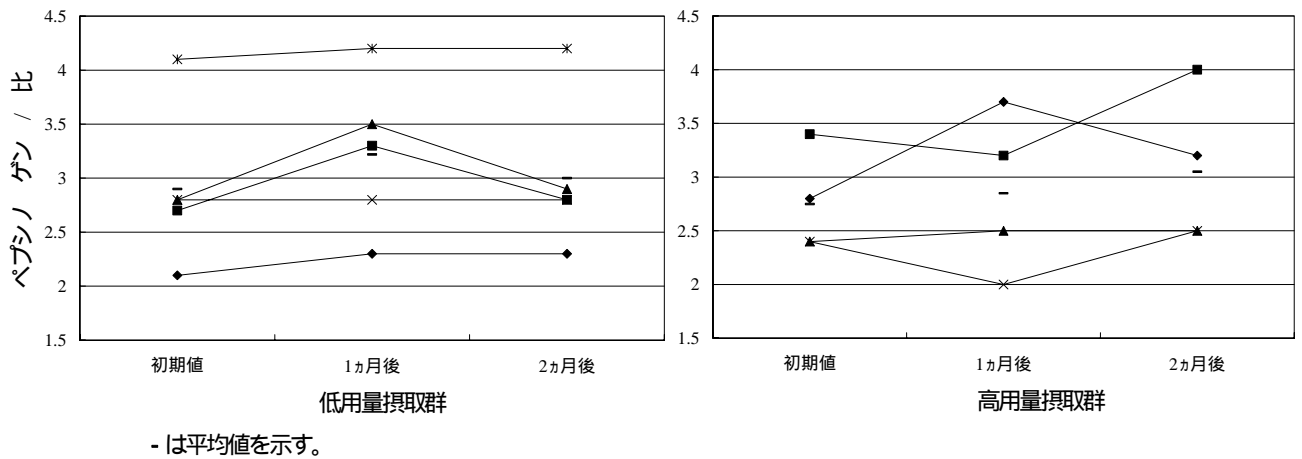


図 15. 血中のペプシノゲン / 比の測定結果

5. 月見草エキスの安定性

(1) 耐熱性

月見草エキスの有効成分は、通常の食品加工温度に対して安定です。

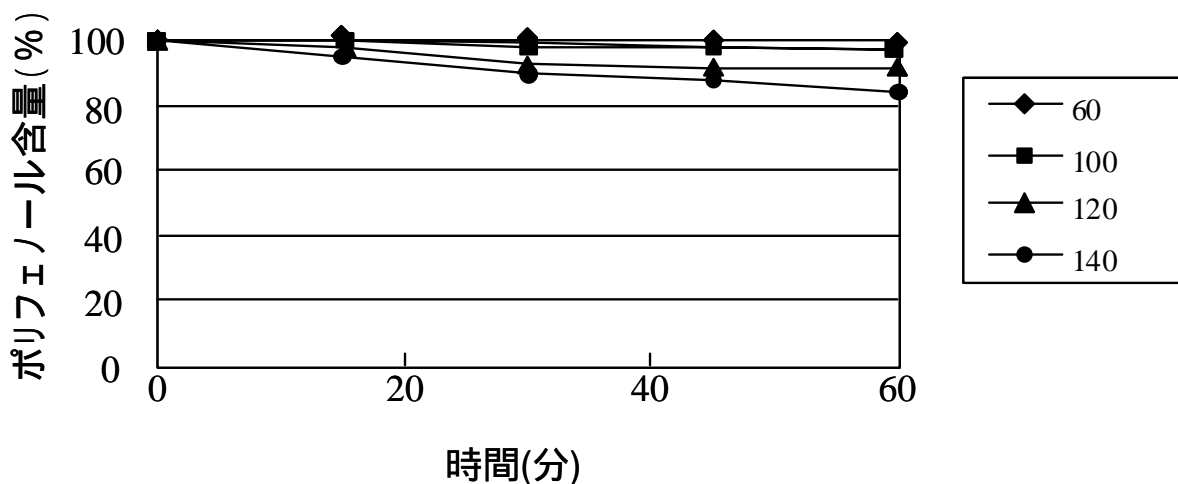


図 16. 月見草エキスの耐熱試験結果

加熱前、ポリフェノール量初期値を 100% とした。

(2) pH 安定性

月見草エキスの有効成分は、中性から酸性領域において特に安定です。アルカリ性条件下ではやや不安定で、長時間経過後に分解がみられますが、通常の食品の範囲内では全く問題なくご使用頂けます。

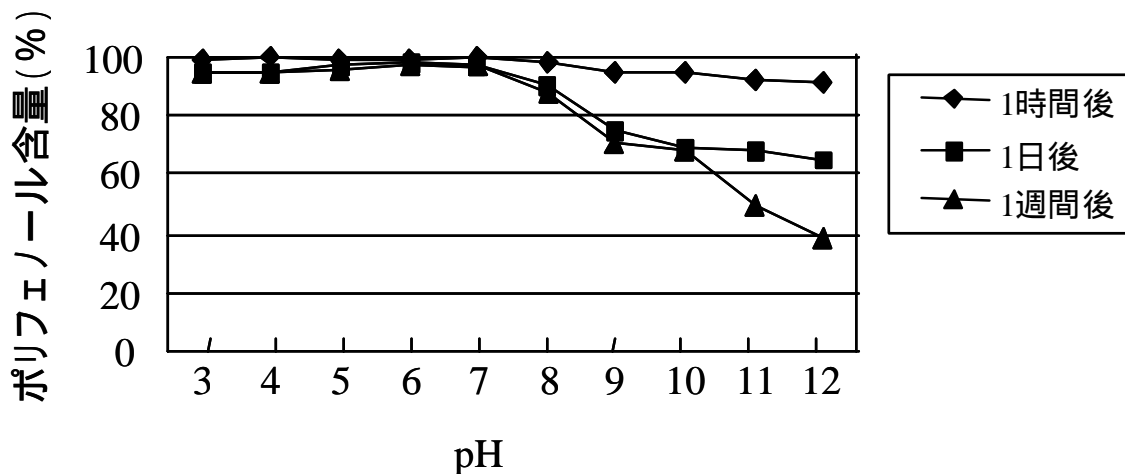


図 17. 月見草エキスの pH 試験結果

0.05%月見草エキス (80%メタノール溶液) にて試験
pH7 のときのポリフェノール量初期値を 100% とした。

6. 月見草エキスの推奨摂取量

月見草エキス - PH は 90 ~ 120mg/日を月見草エキス - WSPH は 180 ~ 240mg/日の摂取をおすすめします。

*月見草エキスは、厚生労働省より食品として認められた製品です。食品として安心してお使いいただけます。

7. 栄養成分

項目	月見草エキス-PH	月見草エキス-WSPH
水分	1.5g / 100g	2.0 g / 100g
タンパク質	2.2 g / 100g	2.6 g / 100g
脂質	1.6 g / 100g	0.1 g / 100g
灰分	1.2 g / 100g	6.4 g / 100g
糖質	93.2 g / 100g	86.1 g / 100g
食物繊維	0.3 g / 100g	2.8 g / 100g
ナトリウム	4.8mg / 100g	29.9mg / 100g
エネルギー	396kcal / 100g	356 kcal / 100g

月見草エキス-P 及び WSP の栄養成分分析値からの計算値

月見草エキス-P：試験依頼先 財団法人日本分析センター

試験成績書発行年月日 平成 12 年 8 月 25 日

試験成績書発行番号 第 300080303-002 号

月見草エキス-WSP：試験依頼先 財団法人日本分析センター

試験成績書発行年月日 平成 13 年 6 月 21 日

試験成績書発行番号 第 301060141-001 号

8. 月見草エキスの安全性

(1) 残留農薬

分析項目	結果	検出限界	分析方法
BHC	検出せず	0.02ppm	ガスクロマトグラフ法
DDT	検出せず	0.02ppm	ガスクロマトグラフ法
アルドリン	検出せず	0.01ppm	ガスクロマトグラフ法
ディルドリン	検出せず	0.01ppm	ガスクロマトグラフ法
エンドリン	検出せず	0.01ppm	ガスクロマトグラフ法
ダイアジノン	検出せず	0.05ppm	ガスクロマトグラフ法
パラチオン	検出せず	0.05ppm	ガスクロマトグラフ法
マラチオン	検出せず	0.05ppm	ガスクロマトグラフ法

試験依頼先 財団法人日本食品分析センター
 試験成績書発行年月日 平成12年8月24日
 試験成績書発行番号 第300080303-001号

(2) 急性毒性試験

5週齢のSD系ラット雌雄各17匹に月見草エキスを5000mg/kgの用量で経口投与し、温度 22 ± 3 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、餌、水自由摂取の条件下で14日間飼育しました。コントロール群には0.5%メチルセルロース水溶液を投与しました。その結果、観察期間を通じコントロール群及び月見草群の雌雄に死亡は認められませんでした。また、異常な体重変化はみられず、試験終了後の剖検においても臓器に異常は認められませんでした。従って、ラットに対する月見草エキスの致死量(LD₅₀)は5000 mg/kg以上と推察されました。

(3) 染色体異常試験

染色体異常誘発性をほ乳類培養細胞(CHL/IU)を用いて評価しました。用量は、短時間処理法の代謝活性化系の非存在下では75、106.1、150、212.1、300 μ g/ml、代謝活性化系の存在下では100、141.1、200、282.8、400 μ g/ml、連続処理法の24時間処理試験では39.5、59.3、88.9、133.3、200 μ g/ml、48時間処理試験では、19.8、29.6、44.4、66.7、100 μ g/mlのそれぞれ5用量とし、染色体の構造異常及び数的異常の出現頻度を調べました。その結果、月見草エキスは代謝活性化系の有無及び処理時間の長短に関わらずCHL/IU細胞に対して染色体異常誘発性を示さないことが証明されました。

(4) 復帰突然変異試験 (Ames 試験)

Salmonella typhimurium(ネズミチフス菌)菌株及び *Esherichia coli*(大腸菌)菌株 WP2uvrA を、Ames のプレート法を用いて検討しました。その結果、どの試験菌株についても月見草エキスのどの用量でも、代謝活性化のある場合またはない場合のいずれにおいても、復帰変異体コロニーの出現頻度に有意な増加は記録されませんでした。これらより、月見草エキスは非変異原性であると考えられました。

(5) マウスにおける小核試験

1群7匹のマウスに最大耐用量である200mg/kgとそれより低い2用量レベルとして100及び50mgの用量で腹腔内投与経路を用いて実施しました。動物は24あるいは48時間後に屠殺し、骨髓を抽出し、塗抹標本を作成して染色しました。多染性及び正染性赤血球を小核の存在について計測しました。ラッカセイ油を単回腹腔内投与またはシクロホスファミドを経口投与して、それぞれを溶媒対照及び陽性対照としました。その結果、同時溶媒対照群と比較して、月見草エキスを投与した動物に、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に有意な増加は認められませんでした。陽性対照物質は、小核を有する多染性赤血球の出現頻度に顕著な増加を引き起こしました。これらの結果から、月見草エキスは、非遺伝毒性であると考えられました。

9. 月見草エキスの応用例

利用方法	具体例
健康食品	ソフトカプセル、錠剤、ハードカプセル、等
食品	乳製品、ヨーグルト、ゼリー飲料、キャンディー、チューイングガム、グミ、錠菓、クッキー、チョコレート、ウエハース、ゼリー、ドリンク、等

10. 荷姿

月見草エキス-PH (粉末、食品用途)

月見草エキス-WSPH (水溶性粉末、食品用途)

5kg 内装：アルミ袋
外装：ダンボール包装

11. 保管方法

高温多湿を避け、暗所に保管して下さい。

12. 月見草エキスの表示例

月見草種子抽出物

月見草種子エキス

試験方法

図1. 各種植物抽出物のポリフェノール含量比較

あらかじめメタノール溶液で溶解したサンプルを食品機能研究法記載 Folin-Denis 法により測定した。標準物質としては没食子酸を用いた。

図4. 月見草エキスとその他の抗ピロリ菌素材との比較

*H. pylori*の使用菌株は、標準株5株、臨床分離株19株の計24株を使用した。これらの菌株は7%ウマ脱繊維血加ブルセラ寒天培地(Brucella Agar)を用い、微好気条件下(O_2 5%, CO_2 10%, N_2 85%)で継代培養後、10%ウシ胎児血清(FCS)添加ブルセラ液体培地(Brucella Broth)を用い、24時間、微好気条件下で培養を行なった。次に、10%FCS添加ブルセラ寒天培地にサンプルを各濃度で添加し、そこにブルセラ液体培地で培養した *H. pylori* を接種し、微好気培養 ($37^\circ C$, O_2 5%, CO_2 10%, N_2 85%) で4日間培養後、菌の増殖度を判定した。

図5. 月見草エキス中の機能性成分の比較

図2の方法と同様に行なった。

図6. *H. pylori*の生存率に及ぼす月見草エキスの効果

*H. pylori*臨床分離株 TK1402 株を使用。菌株は微好気条件下7%ウマ脱繊維血加ブレインハートインフュージョン(Brain Heart Infusion ; BHI)で培養後、ハンクス平衡塩溶液にて各濃度(512, 256, 128, 64, 32, 0 μ g/ml)の月見草エキス存在下で振盪培養。0, 2, 4, 24h後に0.1mlずつサンプリングして菌数を測定した。

図7. 月見草エキスのウレアーゼ阻害作用

ナタ豆由来ウレアーゼを用い、終濃度0.02単位/mlに調整した酵素液50 μ lと月見草エキスを試験管に加えてよく混合し、 $37^\circ C$ で15分間放置した後、400mM尿素添加100mMリン酸緩衝液を基質液として300 μ l添加し、直ちに振とうした。この混合液を $37^\circ C$ で15分間放置し、1Nの硫酸を100 μ l添加して反応を停止させた。得られた反応液に、溶液A(フェノール5.0g及びニトロプルシドナトリウム25mgを水500mlに溶解させたもの)2.5mlと溶液B(約300mlの水にリン酸水素二ナトリウム2.2g及び水酸化ナトリウム2.5gを溶解し、有効塩素10%以上の次亜塩素酸ナトリウム3.0mlを添加し、水で500mlとしたもの)2.5mlを添加し、 $65^\circ C$ で20分間放置した。上記ウレアーゼ1単位とは、尿素を加水分解して、 $25^\circ C$ で1分間に1マイクロモルのアンモニアを生成する活性として定義される。

得られた混合液について、波長630nmにおける吸光度からウレアーゼ活性値を測定し、ウレアーゼ阻害率を調べた。

図8. 月見草エキスの付着に及ぼす効果

*H. pylori*臨床分離株 TK1402 株(5×10^8 CFU/ml)を親脂性蛍光色素 PKH-2 でラベルした後、ヒト胃癌由来上皮細胞株(MKN45細胞)への付着性をフローサイトメトリー(FCM)にて解析を行なった。

図9. 16SrRNA 発現を指標とした RT-PCR 法による感染スナネズミ (1週間)の胃粘膜中 *H.pylori*

検出結果 スナネズミ (MGS/Sea,9 週齢,オス)を用いて, *H.pylori* の定着に及ぼす月見草エキスの効果を調べた。 *H. pylori* 臨床分離株 TK1402 株 ($1 \sim 3 \times 10^9$ CFU/ml) に月見草エキスが 1 mg/ml の濃度となるように添加し, 経口接種 (1 ml/匹, 1日1回, 連続2回) した。 経口接種1週間後, スナネズミを開腹し, 胃粘膜を採取した。次に, 採取した胃粘膜を用い, *H.pylori* の 16SrRNA に特異的なものをプライマーとした RT - PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) を行い, *H.pylori* の胃内への定着の有無を判定した。

図10. ddYマウスを用いた *H. pylori* 除菌作用

ddYマウス (4週齢,雄) を一晩絶食後, 10^8 CFU/ml の *H.pylori* を 0.5ml/匹 経口投与し, さらに12時間後, 24時間後と同様の手法を用いて2回投与を行なった。2ヶ月間飼育後に, 1群あたり7匹に群分けし, 月見草エキス (15,30,60,120,240mg/kg) を1日1回1週間連続経口投与を行なった。経口投与終了日の夜から, 一晩絶食し, 開腹後に胃粘膜をかきとり, これを *H.pylori* 判定寒天培地に塗布後, 6日間培養し, 菌数を測定した。

図11. アンモニア潰瘍モデルを用いた月見草エキスによる抗潰瘍作用

24時間絶食したウイスター (Wistar) 系雄性ラット (体重 280 ~ 300g) に, 2% アンモニア水をラット 100 g あたり 0.5ml (アンモニアとして 10mg) を経口投与し, 30分後エーテル致死せしめた。胃を摘出して 2% ホルマリン 8ml を胃内に注入して 10分間固定した後, 大弯に沿って切り開いた。損傷の面積 (mm²) は, Scion Image を用いて測定し, これを潰瘍係数とした。月見草エキスは 5% 量のアラビアゴム末で懸濁液とし, 2% アンモニア水投与の 30分前にラット 100 g あたり 0.5ml 経口投与した。また, 対照群 (con) には 5% アラビアゴム末液のみを投与した。

図12. 月見草エキスの乳酸菌に対する影響

乳酸菌 (NBRC NO.12005 *Lactobacillus brevis*) と月見草エキスを, MRS-broth 培地に添加し, 24h 培養した。その後, 培地 0.1ml を採取し, BCP 加プレートカウント寒天に塗布した。これを 48h 培養した後に菌数を測定した。

図13. 尿素呼吸試験結果**図14. 糞便中ピロリ菌抗原検出試験結果****図15. 血中のペプシノゲン / 比の測定結果**

月見草エキスをヒトピロリ菌保菌者に摂取させて胃内ピロリ菌数および胃粘膜炎症に及ぼす効果を調べるために, 臨床試験を実施した。試験方法は, 月見草エキス-PH120mg 摂取グループ 5名, 840mg 摂取グループ 4名にわけ, 月見草エキス-PH を充填したカプセルを, 夕食終了時の2時間後, または空腹時に一度に8週間継続して摂取した。検査項目は 尿素呼吸テスト 糞便中ピロリ菌抗原検出試験 (糞便中のピロリ菌抗原を測定, 吸光度で菌数を判定) 血中のペプシノゲン / 比の測定 (胃粘膜炎症の度合いがわかる検査) を行なった。

製品規格書

製品名

月見草エキス-PH

食 品

本品は、月見草すなわちアカバナ科メマツヨイグサ (*Oenothera biennis*) の種子より含水エタノールで抽出して得られた粉末で、没食子酸骨格を有するポリフェノール類を含有する。本品は定量するとき、ポリフェノールを 18.0%以上含む。

性状	淡赤褐色の粉末で、わずかに特有なにおいがある。	
ポリフェノール含量	18.0 %以上	(食品機能研究法記載 Folin-Denis 法)
乾燥減量	5.0 %以下	(衛生試験法, 1 g, 105℃, 2 時間)
純度試験		
(1) 重金属	10 ppm 以下	(食品添加物公定書, 一般試験法, 重金属試験法)
(2) ヒ素	1 ppm 以下	(食品衛生検査指針, ヒ素試験法)
一般生菌数	1×10^3 個 / g 以下	(衛生試験法, 標準寒天培地)
真菌数	1×10^2 個 / g 以下	(衛生試験法, ポテトデキストロース寒天培地 クロラムフェニコール添加)
大腸菌群	陰 性	(衛生試験法, BGLB 培地)

組 成	成分	含有量
	月見草種子抽出物	33 %
	澱粉分解物	67 %
		合計 100 %

製品規格書

製品名

月見草エキス-WSPH

食 品

本品は、月見草すなわちアカバナ科メマツヨイグサ (*Oenothera biennis*) の種子より熱水で抽出して得られた粉末で、没食子酸骨格を有するポリフェノール類を含有する。本品は定量するとき、ポリフェノールを 15.0%以上含む。

性状	薄茶色の粉末で、わずかに特有なにおいがある。	
ポリフェノール含量	15.0 %以上	(食品機能研究法記載 Folin-Denis 法)
乾燥減量	5.0 %以下	(衛生試験法, 1 g, 105℃, 2 時間)
純度試験		
(1) 重金属	10 ppm 以下	(食品添加物公定書, 一般試験法, 重金属試験法)
(2) ヒ素	1 ppm 以下	(食品衛生検査指針, ヒ素試験法)
一般生菌数	1 × 10 ³ 個 / g 以下 (衛生試験法, 標準寒天培地)	
真菌数	1 × 10 ² 個 / g 以下 (衛生試験法, ポテトデキストロース寒天培地 クロラムフェニコール添加)	
大腸菌群	陰 性 (衛生試験法, BGLB 培地)	

組 成	成分	含有量
	月見草種子抽出物	33 %
	澱粉分解物	67 %
		合計 100 %

商品企画からOEM生産まで お気軽に、ご相談ください。

オリザ油化は、健康に役立つ機能性をもつ
食品素材の開発をめざしています。

多品種の機能性食品素材を生産し、多くの
食品情報を有しております。

お気軽にお問い合わせください。

製造発売元：オリザ油化株式会社

本社

〒493-8001 愛知県一宮市北方町沼田 1 番地

TEL(0586)86-5141(代表) FAX(0586)86-6191

URL/<http://www.oryza.co.jp/> E-mail: info@oryza.co.jp

東京営業所

〒101-0041 東京都千代田区神田須田町 1-24-10 大東京ビル 5F

TEL (03)5209-9150 FAX (03)5209-9151 E-mail: tokyo@oryza.co.jp

「本資料は、学術的なデータ等に基づき作成しておりますが、当該製品を配合した消費者向け製品への表現
については、健康増進法や薬事法等の関連法規に従うようご注意ください。」

* 本書の無断複写及び、流用は、著作権法上の例外を除き、禁じられています。

* 本カタログに記載された内容は、都合により変更させていただくことがあります。

制定日 2003年10月7日

改定日 2007年12月4日



ORYZA OIL & FAT CHEMICAL CO., LTD.