

# 乳発酵食品チーズの機能性

## — 抗腫瘍活性 —

東海大学農学部：井越 敬司

### 要 約

チーズの機能性を、抗腫瘍活性の視点から、ヒト前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞を用い、チーズ中のガン細胞増殖抑制とその成分の検索を目的として研究した。12種類の各種市販チーズ（モッツアレラ、カマンベール、ブリー、モンタニャール、ポンレベック、ブルー、ダナブルー、ゴータ、グリエール、エメンタール、エダム、パメザンチーズ）を凍結乾燥後、メタノール可溶性画分を調製し、その活性について調べた。その結果、非熟成チーズや乳酸菌熟成チーズではほとんど活性は認められず、白カビチーズ（カマンベール、ブリー）、青カビチーズ（ブルー、ダナブルー）およびウオッシュチーズ（モンタニャール、ポンレベック）において高い増殖抑制活性が認められた。また、活性はチーズの熟成率（水溶性窒素/全窒素）と高い相関性（ $r=0.943$ ）を示した。細胞増殖抑制をアポトーシスの視点、すなわちDNAのヌクレオソーム単位での断片化を電気泳動で調べた結果、活性の認められたチーズにおいてDNAのラダー化が検出された。従って、チーズによるガン細胞増殖抑制はアポトーシスによる細胞死であることが示された。次いで、熟度の異なるブルーチーズを用いて調べた結果、熟成の進んだチーズにおいてガン細胞増殖抑制活性が高く、またアポトーシス誘導におけるDNAのヌクレオソーム単位での断片化が検出された。従って、ガン細胞増殖抑制成分はチーズ熟成中に生成する成分が関与するものと考えられた。

3カ月熟成ブルーチーズを材料に、ガン細胞増殖抑制をもたらす成分を分離・精製しその構造について調べた。ブルーチーズの凍結乾燥物から得られたメタノール可溶性画分からヘキササン抽出、ODSカラムによる分離後、 $^1\text{H-NMR}$ にて精製物質の構造について調べた。その結果、脂肪酸であることが推定された。また、ガスクロマトグラフィーにて脂肪酸を特定した結果、ガン細胞増殖抑制成分はパルミチン酸、オレイン酸およびミリスチン酸であることが明らかにされた。市販のこれら脂肪酸の細胞増殖抑制活性とアポトーシス誘導能について調べた結果、いずれの脂肪酸においてもガン細胞増殖抑制とアポトーシス誘導が認められた。各チーズのパルミチン酸とオレイン酸の合計量と細胞増殖抑制活性の相関性について調べた結果、これら脂肪酸の合計量とガン細胞増殖抑制活性には正の相関関係（ $r=0.8939$ ）が認められた。従って、チーズのガン細胞増殖抑制成分はパルミチン酸とオレイン酸であることが明らかとなった。

キーワード：チーズ、熟成、機能性、ガン細胞増殖抑制、脂肪酸、パルミチン酸、オレイン酸

### 研究目的

日本におけるガンは1981年以後心臓病や脳卒中を抜いて死亡原因の1位となっている。今やガンは我が国において最悪の病気として恐れられるようになり、その対策が重要な課題になっている<sup>1)</sup>。しかし、ガンの治療は、薬の副作用などの問題が多く、治療法が完全に確立していないのが現状である。従って、ガンにならないこと、すなわちガンの予防が大事であることが認識されてきて

いる。

1990年代以降、生理機能を持った食品が次々と発表され、生体に対して有効な機能を持った食品を摂取することでガンを予防するという考えが注目された。すなわち、食品あるいはその成分には変異原性物質や発がん物質に対してその作用を減弱させる性質のあるものが見出され、ガンの予防に有効な食品も多数報告された<sup>2-4)</sup>。アメリカの国立がん研究所では、食品に含まれているガン予防物質を積極的にとることによって、ガンを半減させようというデザイナーフーズプログラムが実施されている。そしてどのような食品にガン予防の可能性があるかについて様々な視点から研究されてきている。デザイナーフーズの頂点に立つ食品のひとつとしてニンニクがあり、ニンニクはデザイナーフーズプログラムの素材として最も注目されている。実際にニンニク抽出液やニンニクに含まれるイオウ化合物の、腫瘍細胞の増殖抑制効果や移植腫瘍に対する抗腫瘍効果、化学発ガン動物モデルを用いた発ガン予防効果などが数多く報告されている。

デザイナーフーズプログラムの食品は全て野菜や果物など植物由来の食品であり、ガン予防の視点からの研究での材料も多くは植物由来の食品が中心である。しかし、動物性食品にはガン予防になるような食品はないのであろうか。例えば発酵乳やチーズなど動物由来の食品に抗腫瘍性はないのであろうか。最近、発酵乳のガン予防の視点からの研究が盛んに行われてきており<sup>5-7)</sup>、幾つかの知見が得られ、動物性食品においてもガン予防として位置付けられる食品が見出されてきている。

チーズは発酵乳と同じ乳発酵食品で、基本的製造は発酵乳と同じミルクと乳酸菌で作られるが、幾つかの点で異なる。すなわち、①発酵乳は発酵時間が数時間だが、チーズは短いもので1カ月、長いものでは数年熟成させる。②発酵乳の場合、供試微生物としては乳酸菌が主体だが、チーズは一次スターターとして乳酸菌を使用し、チーズの種類によっては二次スターターとして *Propionicbacterium freudenheichii* や *Brevibacterium linens* などの細菌、 *Penicillium camemberti* などの白カビ、 *Penicillium roqueforti* などの青カビあるいは *Kluyveromyces lactis* や *Geotrichum candidum* などの酵母菌、等を添加したチーズもあり、供試される微生物の種類は多い。③チーズは発酵乳と異なり開放系で作られるため、雑菌が入りやすく、スターター以外の微生物が熟成にも関与している、等が挙げられる (Table 1参照)。従って、チーズはその種類も豊富で(800種類以上あるといわれている)、またその長い熟成によりミルクの成分は様々な成分へと変化し、発酵乳とは比べ物にならないほど多様な風味および組織を有する。

従来チーズの研究は風味や組織形成の視点から多くは研究されてきており、最近注目されている食品の三次機能の視点からの研究はまだ少ない。そこで我々は発酵乳以上に多様な成分を含有しているチーズにガン予防食品としての可能性があるのではないかと考え、チーズのガン細胞増殖抑制について研究することとした。すなわち本研究は、ヒト前骨髄性白血病細胞であるHL-60細胞を用い、チーズのガン細胞増殖抑制とその成分の検索を目的としておこなった。

## I ガン細胞増殖抑制に対する熟成チーズの効果

本実験ではガンのモデルとして白血病細胞であるHL-60細胞を用い、本細胞の増殖抑制とアポトーシス誘導におけるチーズの機能性について明らかにすることを目的とした。すなわち、市販チーズ12種類を用いて、これらチーズのガン細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導について調べた。

## 材料及び方法

### 1. 供試チーズ、熟成率の測定および細胞

供試した12種類の市販チーズは熊本市内のチーズ専門店あるいはデパートより購入した。その種類と販売会社等、ラベルに表示されている内容をTable 2に示した。また、ブルーチーズは雪印乳業(株)より提供された。

各種市販チーズの熟成率、すなわち全窒素量(Total nitrogen:TN)に対する水溶性窒素量(Water soluble nitrogen:SN)はマクロケルダール法により求めた。タンパク質の分解にはケルテック2020Digestor(フォスフォジャパン株式会社)、窒素蒸留にはケルテック2200Kjeltec(同社)を用いた。得られた全窒素量および水溶性窒素量から以下の式より熟成率(SN/TN)を算出した。

$$\text{SN/TN (\%)} = (\text{水溶性N/全N}) \times 100$$

### 2. 細胞および材料

細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入したHL-60ヒト前骨髄性白血病細胞を用いた。牛胎児血清、ペニシリン・ストレプトマイシン、RPMI培地およびジメチルスルホキシドはシグマアドリッチ(株)、ヘキストおよびトリパンブルーはギブコ(株)、各種脂肪酸はナカライテスク(株)およびCell Counting Kit-8は(株)同仁化学研究所よりそれぞれ購入した。

### 3. チーズからの活性画分の抽出

チーズをそのまま凍結乾燥後、乳棒およびすり鉢を用いて破碎し、チーズ凍結乾燥物1gに対してメタノール16mlを加えた。ポリトロンを用いて破碎・抽出し、抽出後、遠心分離(12,000rpm、20分、25°C)を行なった。得られた上清をエバポレーターで乾固し、同量のジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した。これをチーズメタノール可溶性画分(CMF)とし、本実験に用いた。

### 4. 細胞培養および細胞増殖抑制活性測定

本細胞にはウシ胎児血清(FBS)10%とペニシリン・ストレプトマイシン1%を含むRPMI1640を培地として用いた。また、培養は37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で行った。細胞数は、トリパンブルーで染色後生細胞をトーマ血球計算盤により顕微鏡下で測定した。

活性は次のように測定した。継代培養によって80%以上のコンフルエント状態になった細胞を $2 \times 10^5$  cells/mlになるように調製し、調製後96穴プレートの各ウェルに100  $\mu$  lずつ播種した。播種後、CMFを1  $\mu$  l (1%)添加し、24 h培養した。培養後、各ウェルにCell Counting Kit-8を10  $\mu$  l添加し、インキュベーターで3 h反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度(450nm)を測定し、次式にて、細胞増殖抑制率(%)を求めた。

$$\text{細胞増殖抑制活性 (\%)} = 100 - \text{生存率 (\%)}$$

$$\text{生存率 (\%)} = [(As - Ab1) / (Ac - Ab2)]$$

As = 試料添加の吸光度    Ab1 = サンプルブランクの吸光度

Ab2 = 培地ブランクの吸光度    Ac = 試料無添加の吸光度

## 5. アポトーシスの検出

### 1) 核の形体学的変化

継代培養によって活性化されたHL-60細胞を、細胞数が $2 \times 10^5$  cells/mlとなるように調製し、5ml用Dishに5ml播種した。播種後、CMFを $50 \mu\text{l}$ 添加し、インキュベーターにて6~12h培養した。培養後、インキュベーターからDishを取り出し、遠心分離(1,000rpm、1分)を行った。遠心分離後、パストールピペットで、スピッツチューブを傾けながら上清を吸引除去した。除去後、沈殿した細胞に8%グルタルアルデヒドを $1 \mu\text{l}$ 加え、よくピペッティングした。その後、マイクロチューブに移して室温で30分反応させた。反応後、遠心分離(2,000rpm、 $20^\circ\text{C}$ 、3分)を行い、上清はマイクロチューブを傾けて除去した。除去後、PBS (-)を $1\text{ml}$ 添加し、ボルテックスミキサーで攪拌した。攪拌後、遠心分離(2,000rpm、 $20^\circ\text{C}$ 、3分)を行い、上清を除去した。除去後、PBS (-)  $20 \mu\text{l}$ およびヘキスト33258溶液 $4 \mu\text{l}$ を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌後、遮光下で保管した。保管後、蛍光顕微鏡にてアポトーシス小体を観察した。

### 2) 核の生化学的変化

継代培養によって活性化されたHL-60細胞を、細胞数が $2 \times 10^5$  cells/mlとなるように調製し、2ml用Dishに2ml播種した。播種後、CMFを $20 \mu\text{l}$ 添加し、インキュベーターにて6h培養した。培養後、細胞をよくピペッティングした後に2本のマイクロチューブに $1\text{ml}$ ずつ分注し、遠心分離(1,800rpm、 $20^\circ\text{C}$ 、5分)をした。遠心分離後、マイクロチューブを傾けて上清を除去し、沈殿した細胞にPBS (-)を $1\text{ml}$ 添加した。添加後、ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離(1,800rpm、 $20^\circ\text{C}$ 、5分)をした。遠心分離後、上清を廃棄し、一方のマイクロチューブに1M Tris-HClバッファー(pH7.4)  $0.1\text{ml}$ 、0.5M EDTA (pH8.0)  $0.2\text{ml}$ 、10% TritonX-100 からなる細胞溶解液を $130 \mu\text{l}$ 添加し、よくピペッティングした。その後、もう一方のマイクロチューブにサンプルを移し、よくピペッティングを行い、10分水中静置した。水中静置後、遠心分離(1,3000rpm、 $4^\circ\text{C}$ 、5分)を行い、得られた上清からゆっくり $100 \mu\text{l}$ とり、別のマイクロチューブに移した。その後、RNaseA溶液を $2 \mu\text{l}$ 加えて、 $37^\circ\text{C}$ で1時間放置した。その後、Proteinase K溶液を $3 \mu\text{l}$ 添加し、 $50^\circ\text{C}$ で30分間反応させた。反応後、5M NaCl  $20 \mu\text{l}$ およびイソプロパノール $120 \mu\text{l}$ を添加し、 $-20^\circ\text{C}$ で一晩静置した。静置後2%アガロース電気泳動にて泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、トランスイルミネーターにてDNAラダーの観察を行った。

## 結果および考察

本研究ではガンのモデルとして一般的に良く使用される白血病細胞であるHL-60細胞を用い<sup>8-11)</sup>、本細胞の増殖抑制とアポトーシス誘導におけるチーズの機能性について明らかにすることを目的とした。ガン予防の視点において食品あるいは食品由来の成分の抗腫瘍活性に関する研究が多くなされ、報告されている。しかし、発酵乳製品であるチーズに関しては全くない。そこで市販チーズ12種類を用いて、まずチーズの熟成率について調べ、次いでこれらチーズのガン細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導について調べた。

### 1. チーズの熟成率

市販12種類のチーズにおける熟成率(SN/TN)を測定した。その結果をTable 3に示した。ポンレベックなどのウォッシュタイプ、ブリーやカマンベールなどの白カビ熟成タイプおよびダナブ

ルーやブルーチーズなどの青カビ熟成チーズにおいて、60%以上の高い熟成率が認められた。一方、非熟成チーズであるモッツァレラは最も低い熟成率(5.6%)を示した。乳酸菌熟成およびプロピオン酸熟成チーズは20~30%の値を示した。

## 2. チーズのHL60細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導効果

CMFのHL-60細胞増殖に及ぼす影響について調べ、その結果をFig. 1に示した。その結果、モッツァレラ（非熟成チーズ）やゴータ、エダムおよびパルメザンチーズなどの乳酸菌熟成タイプではほとんど活性が認められなかった。また、一次スターターとして、プロピオン酸菌を使用したグリエールおよびエメンタルなどのスイスチーズにおいても同様の結果であった。一方、モンタニヤール、ポンレベックなどのウォッシュタイプ、ブリーやカマンベールなどの白カビ熟成タイプおよびダナブルーやブルーチーズなどの青カビ熟成タイプにおいて、非常に高い細胞増殖抑制効果が認められた(60–85%)。なお、各ウェルに添加したメタノール抽出チーズ試料は凍結乾燥チーズ62.5  $\mu$ gに相当する。

次に同試料を用いてアポトーシス誘導効果についてDNAラダー形成を指標に検討した。すなわち、抽出物添加6時間後のDNAを抽出し2%アガロース電気泳動にかけ、その結果をFig. 2に示した。その結果、Fig. 1において増殖抑制が認められなかった乳酸菌熟成タイプおよびスイスチーズでは、アポトーシスに特徴的なヌクレオソーム単位でのDNAの断片化は明確には検出されなかった。しかし、細胞増殖抑制活性の高かったウォッシュおよびカビチーズにおいては、DNAの断片化が検出された。従って、これらチーズ抽出物における細胞死はアポトーシス誘導によるものと考えられた。

さらに、乳酸菌熟成チーズのゴータ、プロピオン酸熟成チーズのグリエール、白カビチーズのカマンベール、青カビチーズのブルーおよびウォッシュタイプのポンレベックチーズを使用し、抽出試料濃度を変えてHL-60細胞増殖抑制について調べた。その結果をFig. 3に示した。細胞増殖抑制の見出せなかったゴータおよびグリエールチーズにおいては添加濃度を変えても活性に大きな影響は認められなかった。しかし、増殖抑制の認められたカマンベールおよびブルーチーズにおいては濃度依存的に活性の上昇が認められた(Fig. 3A)。また、活性の認められたこれらチーズにおけるアポトーシス誘導についてアガロースゲル電気泳動で調べた。その結果、濃度依存的にアポトーシス誘導効果が認められた(Fig. 3B)。以上のことから、これらチーズにはアポトーシスを誘導しHL-60細胞の増殖を抑制する成分の存在が示された。

次いで各チーズの熟成率と細胞増殖抑制率の相関性について調べた。その結果(Fig. 4)、細胞増殖抑制活性と熟成率の間には高い相関性が認められ( $r=0.943$ )、熟成の進んだチーズにおいて高い細胞増殖抑制が示された。従って、チーズ中の細胞増殖抑制成分は熟成中に生成するものであることが示唆された。前報告で、チーズにおける抗酸化活性成分は熟成中に生成されるペプチド等であると報告したが、ガン細胞増殖抑制成分も同様に熟成中に生成される成分であることが知られた。そこで熟成の異なるブルーチーズを用い、細胞増殖抑制活性についてさらに検討した。

## 3. 熟度の異なるブルーチーズのHL-60細胞増殖抑制とアポトーシス誘導効果

0から3ヶ月間、熟成させたブルーチーズの熟成率(SN/TN)および、これらブルーチーズより調製したCMFのHL-60細胞増殖抑制効果と熟成率を求め、その結果をFig. 5に示した。その結果、熟成の進行とともに、熟成率および細胞増殖抑制率の増加が認められ、両者は非常に高い相関関係( $r$

=0.985) が認められた。また、ブルーチーズの熟成ごとのアポトーシス誘導効果を調べ、その結果をFig. 6Aに示した。その結果、0および1カ月熟成ブルーチーズに比べ熟成の進行した2および3カ月熟成チーズにアポトーシス誘導効果が明確に認められた。また、3か月熟成チーズの試料を用い細胞の核形態変化をヘキストにより染色し、蛍光顕微鏡により観察した (Fig. 6B)。その結果、アポトーシスに特徴的なアポトーシス小体が見出された。以上のことから、ブルーチーズのアポトーシス誘導による細胞増殖抑制成分は熟成中に生成する成分と考えられた。

牛乳やその発酵生産物が数種のガン細胞に対して細胞毒性的な性質を有することが報告されている<sup>12-13)</sup>。また、酵母由来プロテアーゼで分解した脱脂乳はHL-60細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが示されている<sup>14)</sup>。そこでブルーチーズに見出されるガン細胞増殖抑制成分がどのような成分であるかについてさらに明らかにするため、ブルーチーズからガン細胞増殖抑制成分を分離・生成し、その構造を明らかにすることとした。

## II ブルーチーズからのHL60細胞増殖抑制成分の分離精製および構造決定

Iにおいて細胞増殖抑制活性およびアポトーシス誘導効果が認められたブルーチーズを材料に増殖抑制成分の分離精製およびその構造について検討した。

### 材料および方法

#### 1. 供試チーズおよび細胞

3ヶ月熟成ブルーチーズは雪印乳業(株)より提供された。細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入したHL-60ヒト前骨髄性白血病細胞を用いた。

#### 2. チーズからの活性画分の抽出

ブルーチーズを凍結乾燥後、チーズ凍結乾燥物30gに対してメタノール200mlを加えた。ポリトロンを用いて破碎・抽出した。抽出後、遠心分離 (12000rpm、20分、25℃) 後、得られた上清をブルーチーズメタノール可溶性画分 (BMF) として、本実験に用いた。

#### 3. 分離・精製

ブルーチーズからの細胞増殖抑制活性成分の分離・精製についてはFig. 7に示したスキームにて行った。すなわち、凍結乾燥ブルーチーズのメタノール抽出画分より、ヘキサン抽出を1回行い、トリグリセロールを含む成分を除去した。さらに同様にヘキサン処理を5回行い、5回分を濃縮した後85%メタノールに溶解させ、ODSカラム (コスモシールAR-II) にて活性画分を分離した。溶出は85%メタノールを使用し、流速0.8ml/分、注入量10 $\mu$ l、検出は示差屈折計 (RID) で行った。

#### 4. 構造決定

コスモシールAR-IIにて分離し、得られた活性画分のHL-60細胞増殖抑制成分は<sup>1</sup>H-NMRおよびガスクロマトグラフィーにより決定した。すなわち、<sup>1</sup>H-NMRはJOEL  $\alpha$  500 (日本電子株式会社) を用い、試料を重クロロホルムに溶解後、テトラメチルシランを内部標準に使用し、行った。

ガスクロマトグラフィーにはガスクロマトグラフGC-8A (島津製作所)、カラム:SILAR-5CP, 10% Chromosorb W80/100HP D-5011 (1.5mX3.2mm I. D.: 島津製作所) を用いた。分析条件は、カラム温度

200℃、検出温度230℃、インジェクション温度230℃で行い、試料は脂肪酸メチル化キット（ナカライテスク株、京都）によりメチルエステル化したものを使用した。また、標準脂肪酸として市販の脂肪酸（ナカライテスク株、京都）を用いた。

## 結果および考察

熟成3ヶ月のブルーチーズ凍結乾燥物よりメタノール抽出画分(BMF)を調製し、Fig. 7に示したステップを経て精製した。すなわち、メタノールにより抽出したBMFにヘキサンを等量加えた後、ヘキサンおよびメタノール層のどちらに活性が存在するかについて調べた。その結果、ヘキサン層には活性が認められず、メタノール層に活性が認められた(Fig. 8A)。ヘキサン層にはトリグリセロールを中心とした中性脂肪がTLCにより検出された。そこで、さらにメタノールにヘキサンを加え、ヘキサン処理を5回行い、メタノールとヘキサン層の活性について調べた。その結果、活性はヘキサン層に強く認められた(Fig. 8B)。次いで、このヘキサン層をエバポレーターで濃縮乾固後、85%メタノールに溶解させ、ODSカラム(コスモシルAR-II)に負荷させた。負荷後、同溶媒で試料を溶出した。検出はRID、流速は0.8ml/minで行った。その結果をFig. 9に示した。溶出されたピークは8画分に分画され、それぞれの画分はエバポレーターにて濃縮乾固後、DMSO30  $\mu$  lに溶解させ、細胞増殖抑制活性について調べた。その結果、フラクション4および5(Fr4、Fr5)に強い活性が認められた。

そこでこれら活性画分を<sup>1</sup>H-NMRによりその構造について検討した。その結果をFig. 10に示した。Fr4は<sup>1</sup>H-NMRスペクトルで1個のプライマリーメチル基[ $\delta$  0.88 (3H, t,  $J$  = 7.0 Hz)]および1個のカルボニル基に隣接するメチレン基[ $\delta$  2.35 (2H, t,  $J$  = 7.5 Hz)]ならびに多数のアリファティックプロトン[ $\delta$  ca. 1.65 (2H, m)、ca. 1.26 (24H, m)]由来のシグナルを示した。このことから、Fr4は炭素数16個の飽和脂肪酸、即ちパルミチン酸と推定された。一方、Fr5は<sup>1</sup>H-NMRスペクトルより、主成分と副成分がおよそ 11:4よりなる混合物と示唆された。すなわち、本スペクトルの主成分由来のシグナルは、先のFr4で観察されたシグナル[ $\delta$  0.88 (t,  $J$  = 6.7 Hz); ca. 1.63 (m); 2.35 (t,  $J$  = 7.3 Hz)]に加え、2個のオレフィンプロトン[ $\delta$  ca. 5.34]および2個の二重結合に隣接するメチレン基[ $\delta$  ca. 2.01]由来のシグナルを与えた。さらに、これらシグナルの積分曲線の詳細な解析から、Fr5は1個の二重結合を有する炭素数18個の不飽和脂肪酸を主体とした成分で、その他炭素数14-16個よりなる飽和脂肪酸の混合物と考えられた。そこでFr4およびFr5をメチルエステル化後、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸の同定を行い、その結果をFig. 11に示した。その結果、Fr4はパルミチン酸と保持時間が完全に一致し、Fr4はパルミチン酸と同定された。一方、Fr5は3ピーク認められ、主要ピークはオレイン酸と保持時間が一致した。従って、Fr5の主要成分はオレイン酸と同定され、その他二つのピークは保持時間からミリスチン酸とパルミチン酸であることが知られた。そこで市販のパルミチン酸とオレイン酸およびブルーチーズ由来のパルミチン酸とオレイン酸のコクロマトグラフィーをODSカラムによるHPLCにて行い、その結果をFig. 12に示した。その結果、市販パルミチン酸とオレイン酸はチーズ由来のそれらと完全に保持時間が一致し、重なったピークとして見出された。

以上のことから、Fr4はパルミチン酸、Fr5はミリスチン酸とパルミチン酸を含むオレイン酸を主体とした成分であることが明らかとなり、チーズ中のHL-60細胞増殖抑制成分はチーズ中に存在する遊離のパルミチン酸、オレイン酸およびミリスチン酸であることが示唆された。

そこで既知パルミチン酸、オレイン酸およびミリスチン酸を用い、HL-60細胞に対する細胞増殖抑制活性について調べ、その結果をFig. 13に示した。その結果、3種類の脂肪酸に増殖抑制活性が認められ、そのIC<sub>50</sub>はパルミチン酸、オレイン酸およびミリスチン酸それぞれ25.1、27.2および25.6 μg/mlでパルミチン酸が若干高いがほぼ同様の活性であった。また、これら脂肪酸によるアポトーシス誘導について調べたところパルミチン酸およびオレイン酸ともにアポトーシスに特徴的なヌクレオソーム単位でのDNAの断片化が明確に検出された(未発表データ)。ブルーチーズ中の主要な遊離脂肪酸はパルミチン酸とオレイン酸であることが報告<sup>14)</sup>されている。本実験でもFr4および5の主要成分はパルミチン酸とオレイン酸であった。このことからチーズ中のHL-60細胞増殖抑制における寄与においてミリスチン酸は少なく、パルミチン酸とオレイン酸が主体であることが強く示唆された。

そこで各種チーズ(Fig1に示した)からブルーチーズと同様に抽出、ヘキササン処理した後のODSカラムによるFr4およびFr5の分離を行なった(Fig. 14)。その結果、ガン細胞増殖抑制の活性が低かったゴダヤグリエールチーズはFr4や5は少なく、活性の高かったカマンベールやポンレベックチーズでは多く出現した。そこで、各チーズのこれらピークの量(ピーク面積)とFig. 1の細胞増殖抑制との相関性について求めた。その結果をFig. 15に示した。その結果、両者の関係において相関係数0.8939と高い相関性が認められた。従って、チーズにおける白血病細胞HL-60の細胞増殖抑制にはパルミチン酸、オレイン酸が大きく関与していると考えられた。

HL-60細胞を使用し、食品由来の増殖抑制成分の検索は多くなされており、今までにお茶<sup>15)</sup>、ニガウリ<sup>16, 17)</sup>、小豆<sup>18)</sup>等から明らかにされ、その成分の一つとしてポリフェノールが指摘されている。一方、Haradaら<sup>19)</sup>は紅藻類のひとつである*Amphiroa zonata*が高い選択的細胞毒性をヒト由来白血病細胞において見出し、その成分がパルミチン酸であることを報告している。また、白血病細胞に対してパルミチン酸12.5–50 μg/mlの濃度において選択的細胞毒性があること、またそのアポトーシス誘導を報告しているが、このパルミチン酸濃度は本実験で見出したパルミチン酸のIC<sub>50</sub>値25.1 μg/mlとよく一致した<sup>19)</sup>。

パルミチン酸やオレイン酸がどのようなメカニズムでアポトーシスを誘導しているかについては定かではないが、溝谷ら<sup>20)</sup>はHeLa細胞を用い、オレイン酸のアポトーシス機構について報告し、オレイン酸によるアポトーシスはカスパーゼ非依存性経路の関与を示している。今後はこれら脂肪酸によるHL-60細胞のアポトーシス誘導機構についてさらに検討しなければならないと考えている。

## 引用文献

- 1) 松原 聡、他、がんの生物学、裳華房 (1992)
- 2) 篠原 和毅、他、栄養と健康のライフサイエンス、1 (1) :4-32 (1996)
- 3) 富田 勲、HEALTH DIGEST、6 (1) :1-8 (1991)
- 4) 小清水 弘一、HEALTH DIGEST、7 (4) :1-10 (1992)
- 5) Hosono, A., Yoshimura, A. and Otani, H., Netherlands Milk and Dairy J., 41:239-246 (1987)
- 6) Tanabe, T., Otani, H. and Hosono, A., Milchwissenschaft, 46:622-625 (1991)
- 7) Kitazawa, H., Toba, T., Adachi, S. and Kumano, N., Milchwissenschaft, 42:578-579 (1987)
- 8) Gorczyca, W., Gong, J., Ardelt, B., Traganos, F., and Darzynkiewicz, Z., Cancer Res.

- 53:3186-3192 (1993)
- 9) Roy, M. K., Kuwabara, Y., Hara, K., Watanabe, Y., and Tamai, Y., *J. Dairy Sci.*, 85:2065-2074 (2002)
- 10) Kawaii, S., and Lansky, E. P., *J. Med. Food*, 7:13-18. 2004.
- 11) Yu, F., Lu, S., Yu, F., Shi, J., McGuire, P. M., and Wang, R., *J. Pharm. Pharmacol.*, 60:253-259 (2008)
- 12) Ito, M., M. K. Roy, Kurihara, K., Watanabe, Y., Kuwabara, Y., Nagai, S., and Tamai, Y., *Food Sci. Technol. Int.*, 4:125-129 (1998)
- 13) Mader, J. S., Salsman, J. S., Conrad, D. M., and Hoskin, D. W., *Mol. Cancer Ther.*, 4:612-624 (2005)
- 14) Collins, Y.C., McSweeney, P.L.H., and Wilkinson, M.G., *International Dairy J.*, 13:841-866 (2003)
- 15) 勝部 拓矢、他、日本食品科学工学会誌、49(3):195-198 (2002)
- 16) 江藤 公美、他、日本食品科学工学会誌、49(4):250-256 (2002)
- 17) 小堀 真珠子、他、日本食品科学工学会誌、53(8):408-415 (2006)
- 18) 伊藤 智広、他、日本食品科学工学会誌、49(5):339-344 (2002)
- 19) Harada, H., *Anticancer Research*, 22:2587-2590 (2002)
- 20) 溝谷 香壽美、他、埼玉医科大学雑誌、29(2):117-123(2002)

Table 1 発酵乳とチーズの比較

比較項目	発酵乳	チーズ
ミルク	牛 山羊乳	牛乳、水牛乳、山羊乳、羊
スターター微生物	乳酸菌	乳酸菌 <i>Penicillium roqueforti, camemberti</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Brevibacterium lines</i> <i>Propionibacterium freudenheichi</i>
その他の微生物	なし	多数存在
発酵・熟成期間	4時間	1ヶ月～2～3年
乳成分変化		
乳糖	乳酸	もともと少ない
タンパク質	微量	大きい
脂肪	ない	大きい
代謝産物	少ない	多い

**Table 2 Information of Cheeses**

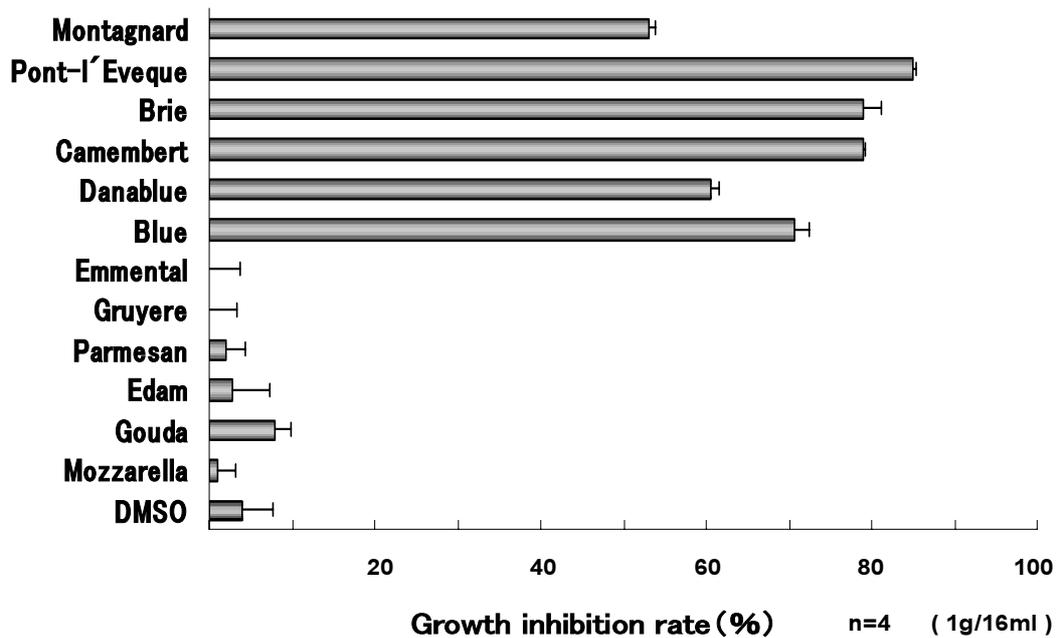
	<b>Cheese</b>	<b>Dealer (Import)</b>	<b>Note</b>
<b>Soft Cheese</b>	Camembert	Funvino Co.,Ltd	Mould-ripened Type
	Brie	Aso Farm Land Co.,Ltd	
	Montagnad	The Cellar Co.,Ltd	Wash-type
	Pont-l'Eveque		
Mozzarella	Aso Farm Land Co.,Ltd	Non-ripened Type	
<b>Semi-hard Cheese</b>	Danablu	Koukou Fishery Co.,Ltd	Mould-ripened Type
	Blue	Snow Brand Co.,Ltd	
	Gouda	Chesco Co.,Ltd	Lactic Acid Bacteria-ripened Type
<b>Hard Cheese</b>	Gruyere	Nippon Mycella Co.,Ltd	Propionic Acid Bacteria-ripened Type
	Emmental		
	Edam	Chesco Co.,Ltd	Lactic Acid Bacteria-ripened Type
<b>Super-hard Cheese</b>	Parmesan	Aso Farm Land Co.,Ltd	Mould-ripened Type

**Table 3 Ripening rate of cheese**

---

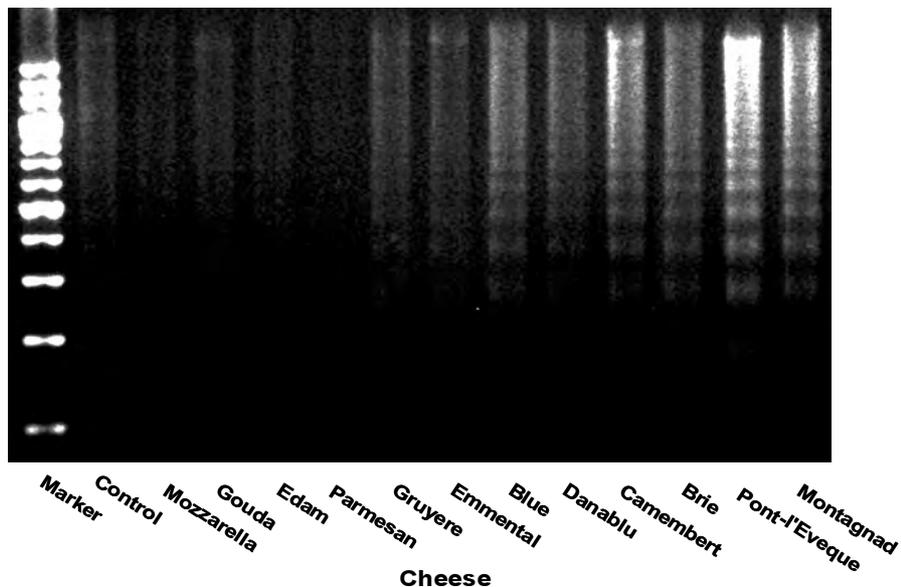
<b>Cheese</b>	<b>Ripening rate (%) (Water soluble N/Total N)</b>
<b>Mozzarella</b>	<b>5.6</b>
<b>Camembert</b>	<b>71.7</b>
<b>Brie</b>	<b>70.0</b>
<b>Pont-l'Eveque</b>	<b>77.6</b>
<b>Montagnard</b>	<b>60.5</b>
<b>Danablu</b>	<b>59.9</b>
<b>Blue</b>	<b>59.8</b>
<b>Gouda</b>	<b>24.5</b>
<b>Gruyere</b>	<b>32.1</b>
<b>Emmental</b>	<b>26.2</b>
<b>Edam</b>	<b>25.9</b>
<b>Parmesan</b>	<b>31.7</b>

---



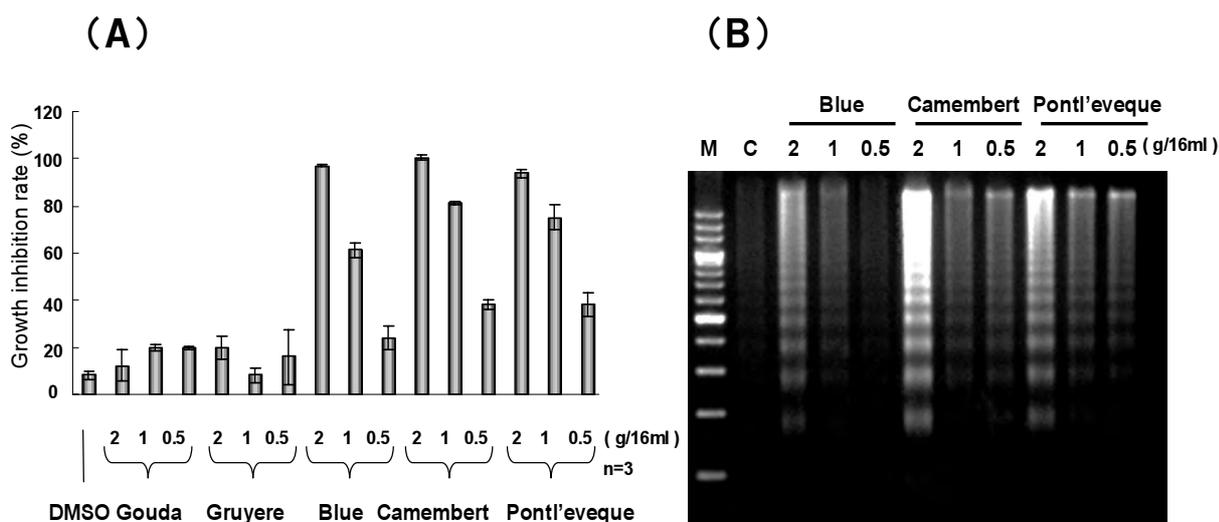
**Fig.1 Growth inhibition in HL-60 cells by CMS**

HL-60 cells were incubated with CMS for 24hr and viable cell number was detected with WST-8.



**Fig.2 DNA fragmentation patterns by agarose-gel electrophoresis**

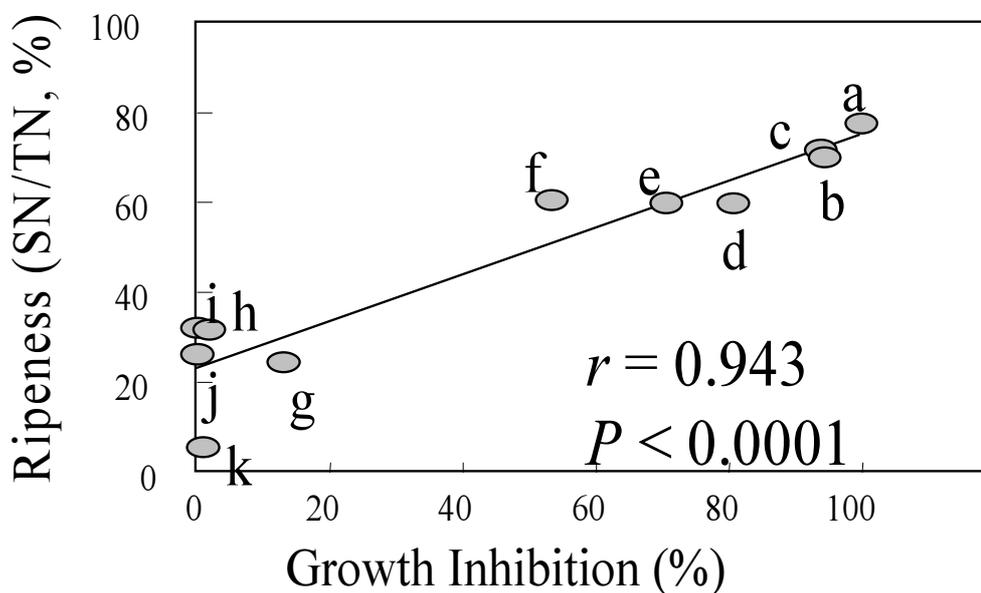
DNA was extracted from the HL-60 cells treated with CMS for 6hr.



**Fig. 3 Growth inhibition rate(A) and DNA fragmentation patterns(B) by agarose-gel electrophoresis**

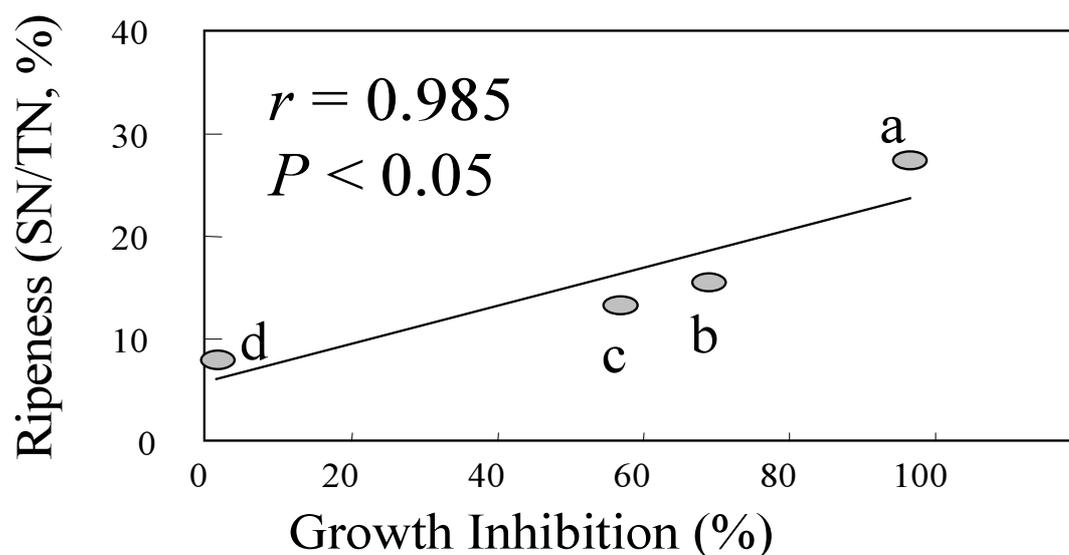
(A) Effect of concentration of CMS on growth inhibition .

(B) Effect of concentration of CMS on DNA fragmentations patterns by agarose-gel electrophoresis.



**Fig. 4 Relationship of 10 different commercial cheeses between the ripening rate and the growth inhibition rate determined in HL-60 cells.**

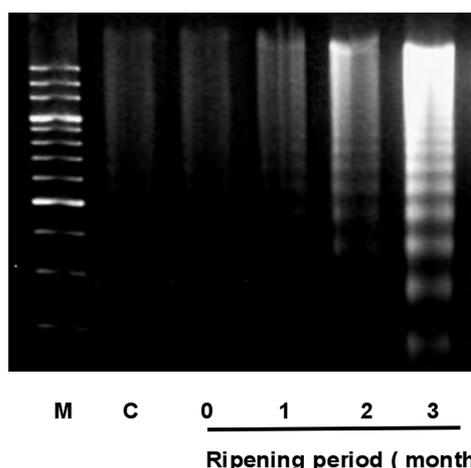
Each data point corresponds to cheese samples as follows; Pont-l'Eveque (a), Brie (b), Camembert (c), Blue (d), Danablue (e), Montagnard (f), Gouda (g), Parmesan (h), Gruyere (i), Emmental (j), and Mozzarella (k).



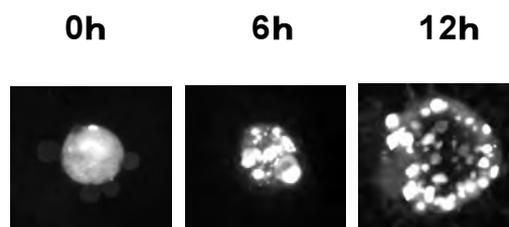
**Fig. 5. Relationship of Blue cheese with various ripening periods between the ripening rate and the growth inhibition rate determined in HL-60 cells.**

Each data point corresponds to Blue cheese samples after 3-month (a), 2-month (b), 1-month (c), and 0-month (d) ripening, respectively.

(A)



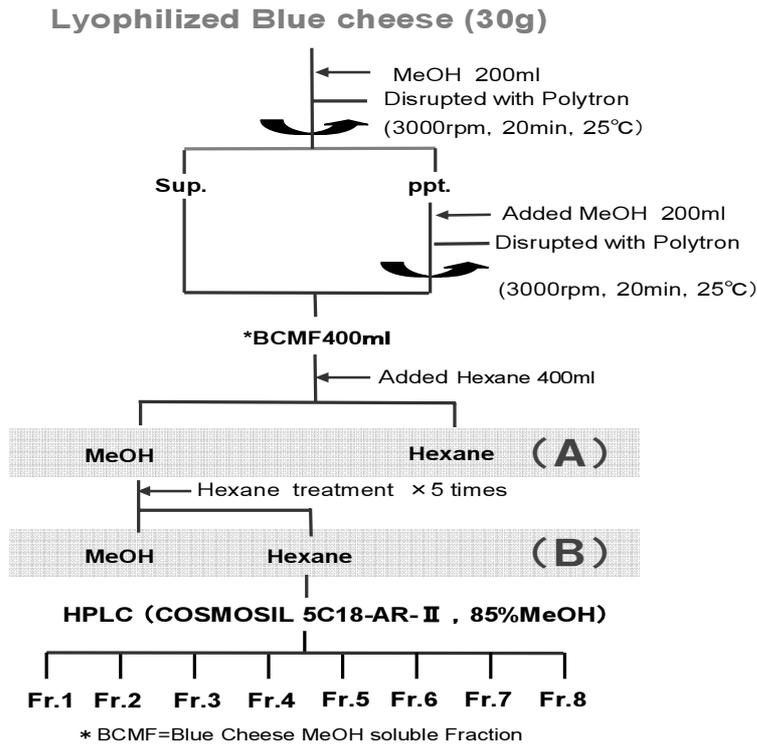
(B)



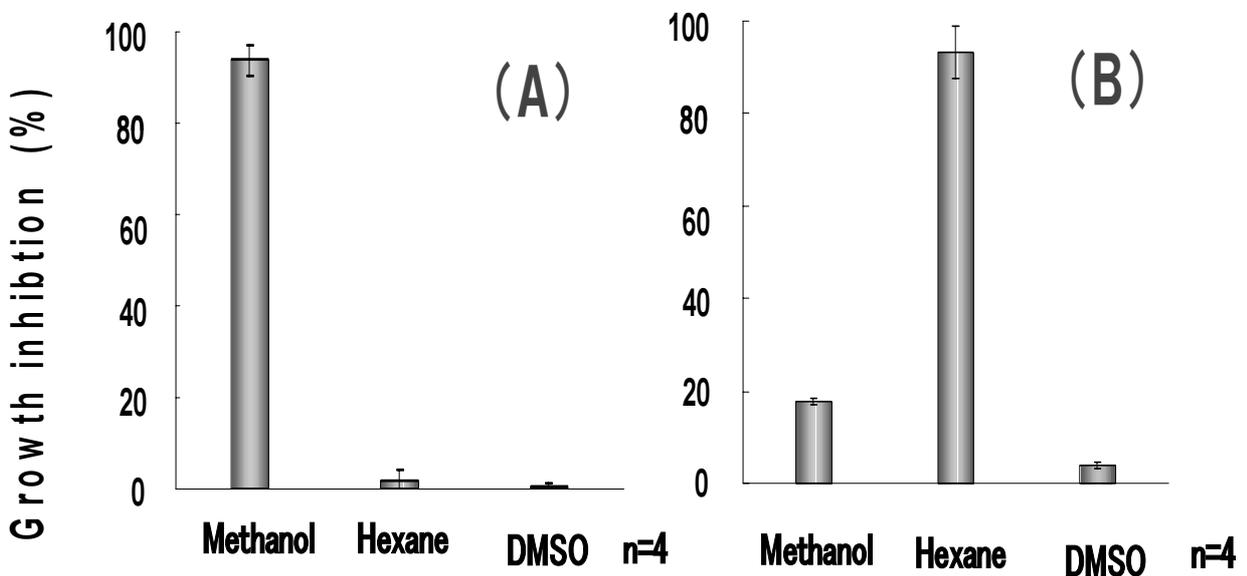
**Fig. 6 DNA fragmentation patterns (A) by agarose-gel electrophoresis and Nuclear morphology (B) of HL-60**

DNA was extracted from the HL-60 cells treated with CMS for 6hr.

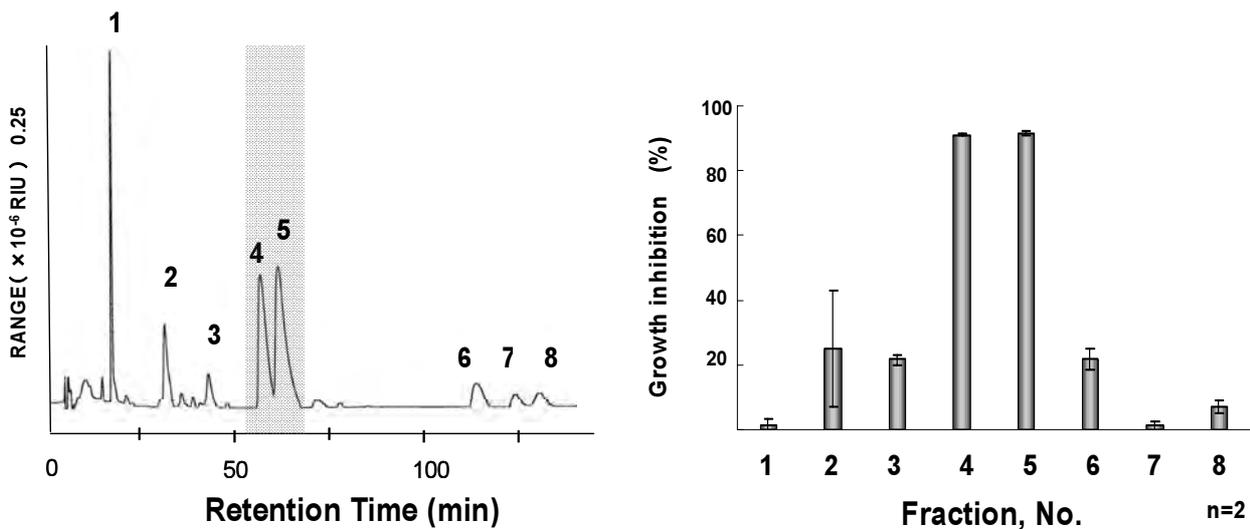
HL-60 cells were treated for 6 and 12 hr with CMS from Blue cheese ripened for 3 month and then stained with Hoechst 33258.



**Fig.7 Scheme for purification of active compound from Blue cheese**

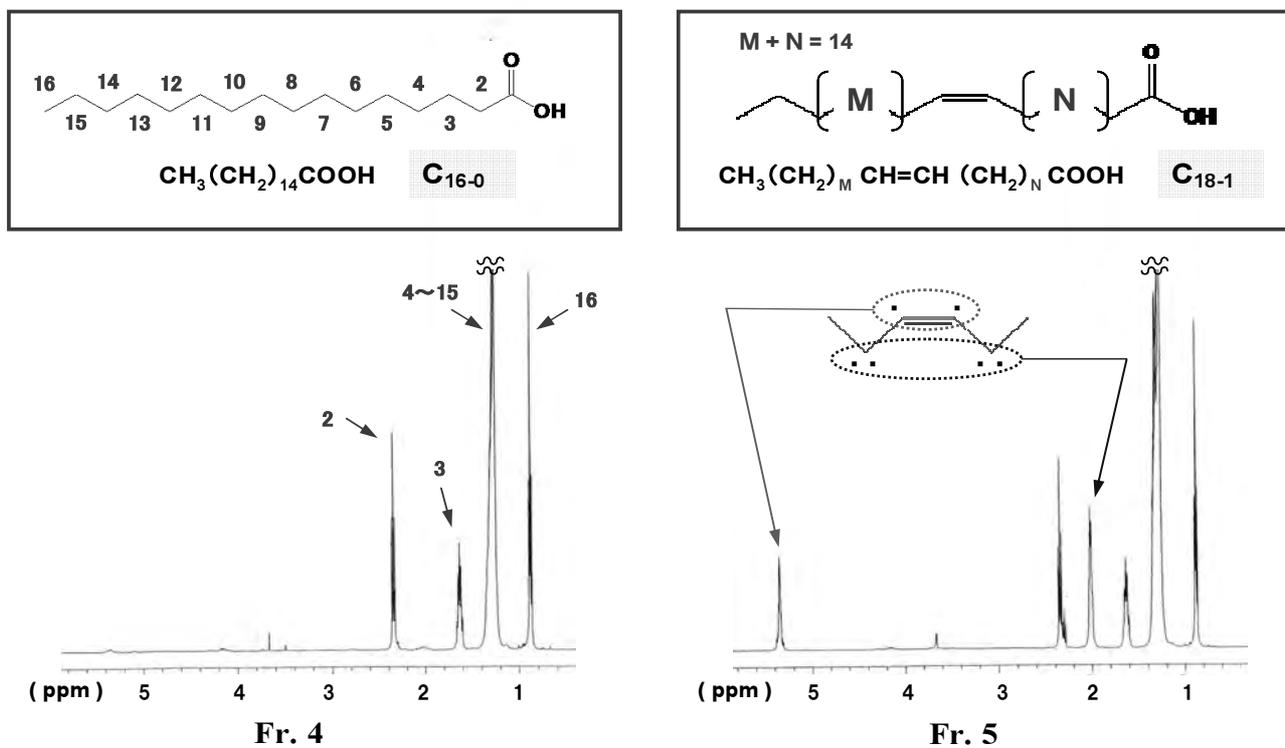


**Fig. 8 Growth inhibition of methanol and hexane fraction**

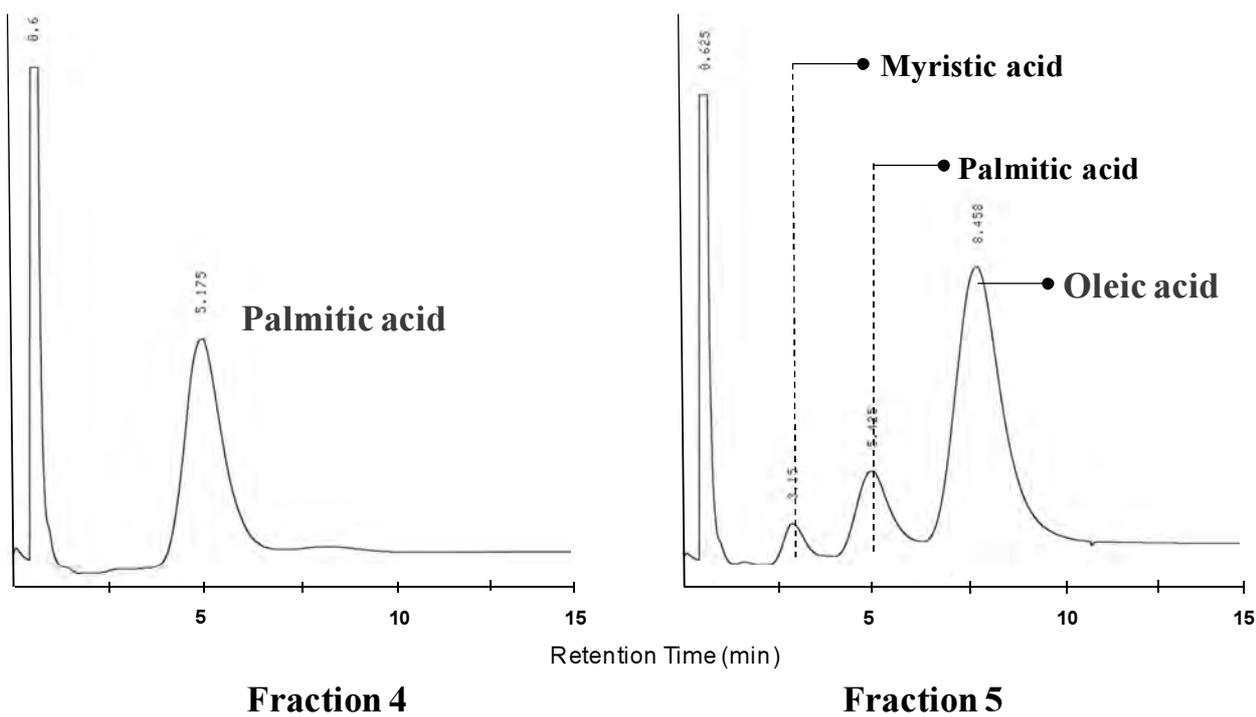


**Fig.9 Separation of HL60 growth inhibition substance by reversed-phase HPLC.**

Column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II (4.6 × 250mm), Flow rate: 0.8ml/min  
 Mobile phase:85%Me-OH, Detector:RID

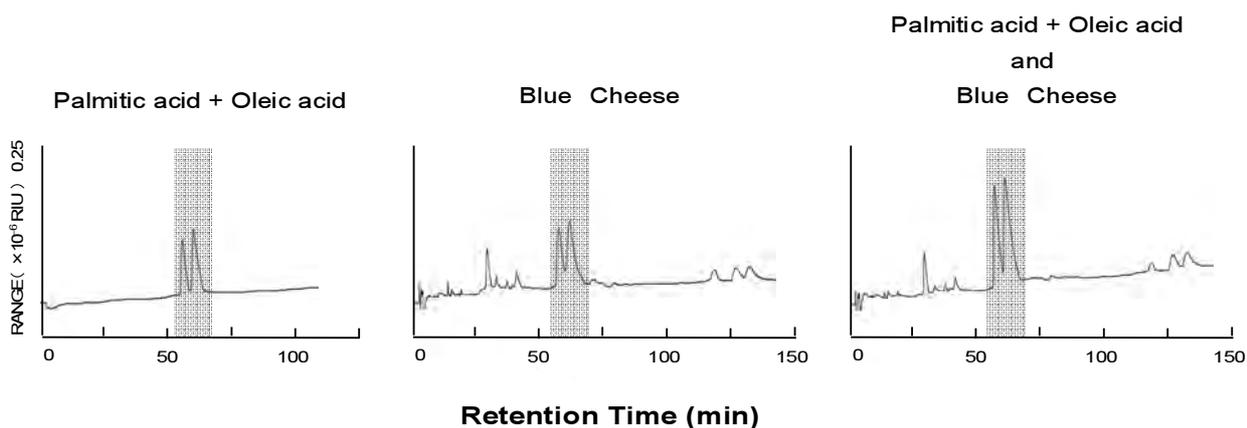


**Fig.10 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Fr.4 and Fr.5 (in pyridine-d<sub>5</sub>,500Hz).**



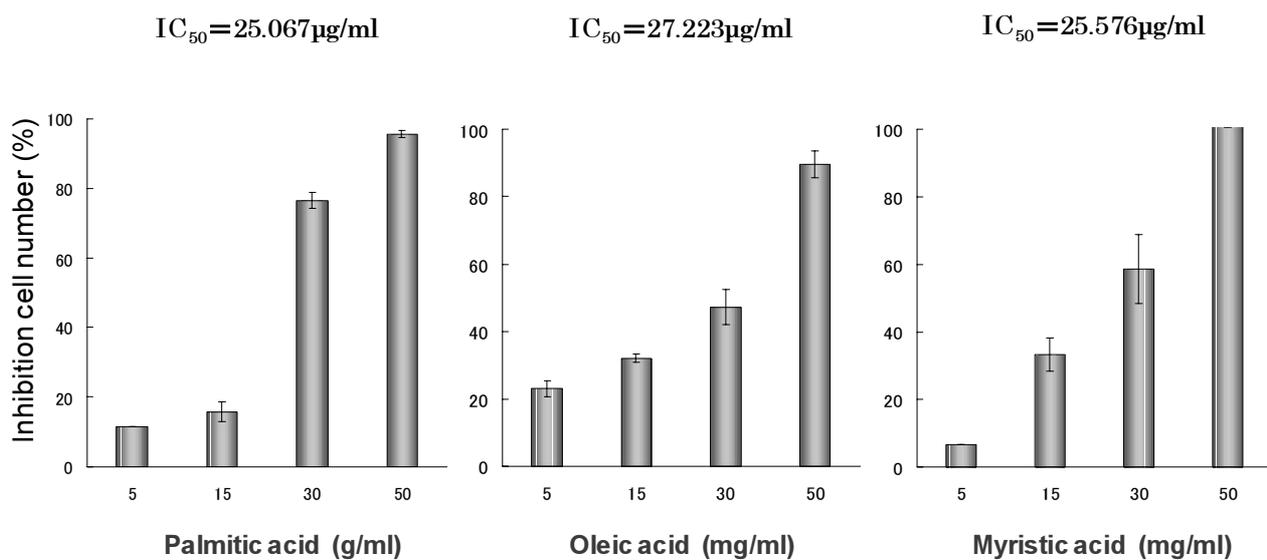
**Fig. 11 Gas chromatography of Fraction 4 and Fraction 5**

Column : 10%SP-2300Supelcoport INJ/DET : 200°C Column Temperature : 230°C  
 carried gas : N<sub>2</sub> (2kg/cm<sup>2</sup>), H<sub>2</sub> (0.6kg/cm<sup>2</sup>), Air (0.6kg/cm<sup>2</sup>)

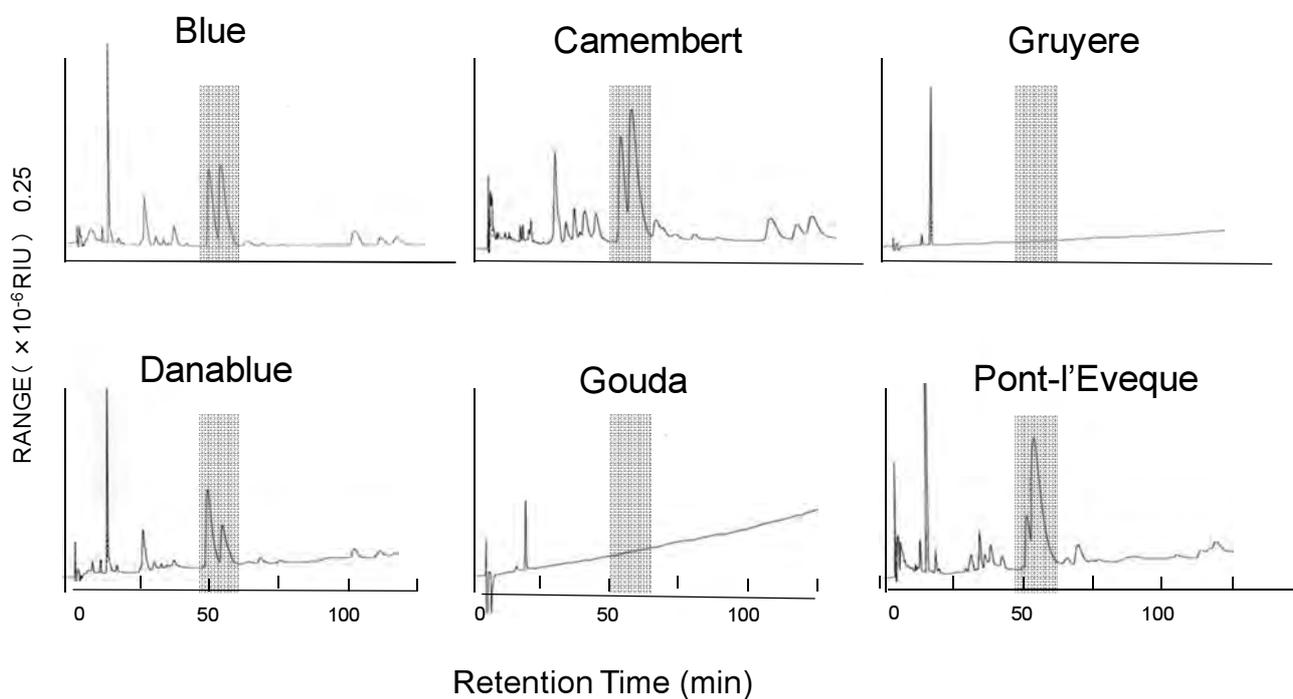


**Fig. 12 Co-chromatography of fatty acids from Blue cheese and standard.**

Column: COSMOSIL 5C18-AR- II (4.6 × 250mm) , Flow Rate: 0.8ml/min  
 Mobile Phase: 85%Me-OH . Inject volume: 10 μl

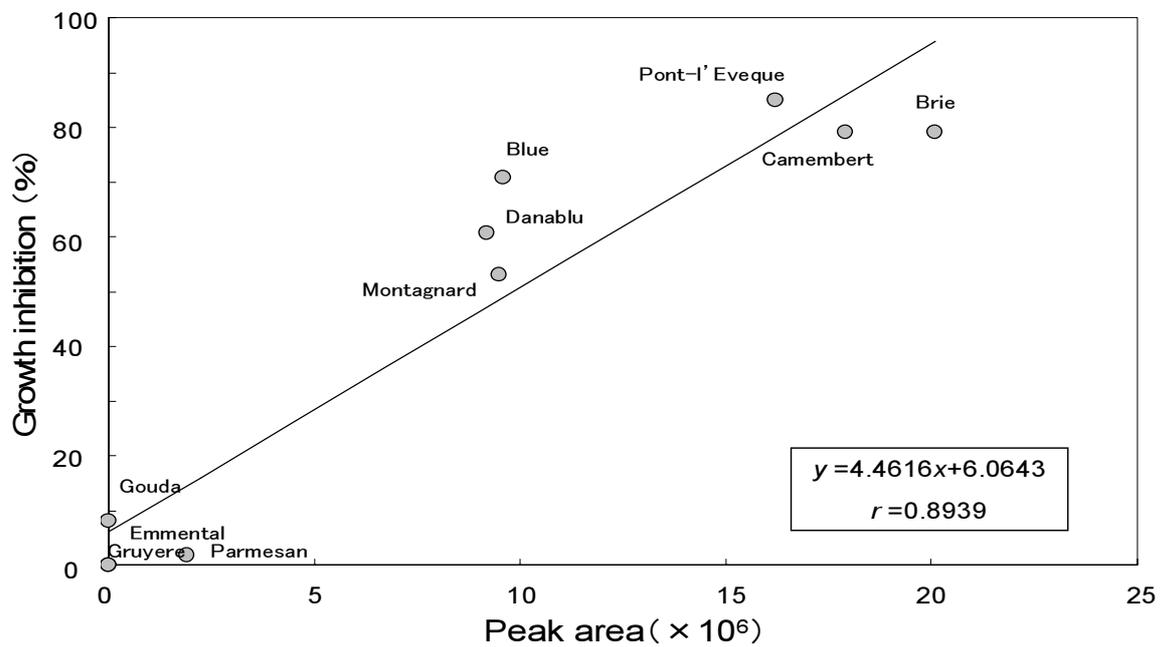


**Fig.13** The growth inhibition of palmitic acid , oleic acid and myristic acid.



**Fig.14** HPLC profile of palmitic acid and oleic acid from cheese

Column: COSMOSIL5C18-AR- II (4.6 × 250mm)  
 Flow Rate: 0.8ml/min  
 Mobile Phase:85%Me-OH    Inject volume: 10μl



**Fig. 15 Relationship between fatty acid content (Peak area) and growth inhibition rate.**