

地域農産素材等の機能性解明と高付加価値製品の開発 (第2報)

木村 英生・長沼 孝多・小嶋 匡人・恩田 匠

Elucidation of Functionality of Local Agricultural Products and Its Application to Functional Food (2nd Report)

Hideo KIMURA, Kota NAGANUMA, Masahito KOJIMA and Takumi ONDA

要 約

山梨県産野菜品種を対象に、その血圧上昇抑制性（アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性）及び抗アレルギー性（ヒアルロニダーゼ阻害活性及び脱顆粒阻害活性）を調査した。野菜中で高いACE阻害活性を示したのは水かけ菜であった。またヒアルロニダーゼ阻害活性及び脱顆粒阻害活性の両者を示したのはきゅうり、クレソンとスイートコーン（ゴールドラッシュ及び味米）であった。

Abstract

The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting activity and the antiallergic activity of vegetable were investigated. Mizukakena showed the high ACE inhibiting activity as compared with other vegetable. Cress and Cucumber sweet corn (Gold rush and Mirai) showed the inhibiting activity of Hyaluronidase and the inhibiting activity of degranulation from RBL-2H3 cells.

1. 緒 言

近年、食品に求められる役割の中で、特に生体調整機能(病気の予防に働く等の機能)を持つことが重要になってきている。これに伴い、全国的に野菜、果実及び水産物などの地域産物を用いて、抗酸化、高血圧予防、抗ガン及び抗アレルギーなどの機能性の探索が活発に行われており、その成果は地域資源の高度利用や高付加価値化に生かされている。例えば、石川県では地域特産の「加賀野菜」について機能性評価を行い、伝統野菜の中島菜に血圧上昇抑制効果があることを見出し、これを用いた加工食品の開発に取り組んでいる¹⁾。

山梨県内においても、限られた地域で長年生産されてきた在来野菜（おちあいいも（丹波山村）、鳴沢菜（鳴沢村）、長禅寺菜（甲府市）、大野菜（身延町）など）は数多く見られる。また、地域の特産として認知されている大塚にんじん（市川三郷町）、やはたいも（甲斐市）、クレソン（道志村）、長かぶ（上野原市）などの野菜が存在する。

そこで、本研究では、山梨県内の農産物素材を対象に、その機能性を明らかにし、機能性成分を豊富に含む農産物の育成やこれら農産物を用いた新たな機能性食品開発を目的とした。本研究は山梨県工業技術センター、山梨県総合農業技術センター及び山梨県酪農試験場の3機関が担当し、工業技術センターでは、県産野菜を対象に、

その機能性を明らかにすることを研究目的としている。

今年度はこれら在来野菜類及び一般野菜類を対象として、その血圧上昇抑制性（アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性）及び抗アレルギー活性（ヒアルロニダーゼ阻害活性と脱顆粒阻害活性）について調査した。

2. 実験方法

2-1 供試野菜

供試野菜を表1に示した。これらの野菜はいずれも山梨県産であり、平成17～18年度に農園（農家）、農協などの直売所、スーパーなどで購入した。ここでは、山梨県の在来種である野菜を「在来野菜」とし、それ以外の

表1 供試野菜

区 分	名称・品種
在来野菜	大野菜、おちあいいも、長禅寺菜、水かけ菜（水菜、冬菜）、鳴沢菜、茂倉うり
一般野菜	クレソン、大塚にんじん、長かぶ、やはたいも（静岡早生）、ジャガイモ（メークイン、キタアカリ、男爵、アンデスレッド、デジマ）、スイートコーン（甘々娘、おひさまコーン）、味米、ゴールドラッシュ、モロヘイヤ、鳴沢菜、きゅうり、白うり、大根（浅尾ダイコン）、小松菜、トマト、ブロッコリー、水菜

野菜を「一般野菜」とした。

2-2 分析試料の調製

供試野菜(可食部)20gを細断し、破碎後の終濃度が80%となるよう99.5%エタノールを加え、15分間加熱還流を行った。冷却後ホモジナイズし、ろ紙(ADVANTEC No.2)でろ過した。残さは回収し、80%エタノールを加えて同様に加熱還流を行い、ろ紙(ADVANTEC No.2)でろ過した。ろ液はすべて合わせて45~50℃下で減圧濃縮を行い、蒸留水で50mlに定容した。この液をろ紙(ADVANTEC No.5C)でろ過したものを分析試料とした。

2-3 血圧上昇抑制性評価試験(アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性)

試験は堀江らの方法²⁾に従った。

2-3-1 試薬の調製

(1)リン酸緩衝液

600mMの塩化ナトリウムを含む400mMリン酸一カリウム水溶液と同濃度のリン酸二カリウム水溶液をpHが8.3となるように混合した。

(2)アンジオテンシン変換酵素基質液(A液)

アンジオテンシン変換酵素合成基質Hip-His-Leu(Hippuryl-L-histidyl-L-leucine, 和光純薬)2mgに対し、リン酸緩衝液1mlの割合で溶解した。

(3)アンジオテンシン変換酵素(ACE)液(B液)

アンジオテンシン変換酵素(ACE;ウサギ肺由来, SIGMA)0.1unitに対し、蒸留水4mlの割合で溶解させた。

2-3-2 操作

試験管にA液100 μ l, 分析試料100 μ lを加え、5分間37℃で保持した。次いでB液100 μ lを加え、攪拌した後、37℃で30分間酵素反応させた。1N塩酸250 μ lを加えて反応を停止させ、反応生成物(馬尿酸)を回収するため酢酸エチル1.5mlを加えて15秒間攪拌した後、遠心分離した(3000rpm, 10分間)。酢酸エチル層1mlを採取し、酢酸エチルを減圧乾燥機で除去した後、蒸留水1mlを加えて攪拌し、15分間静置して溶解させた。この液について、分光光度計を用いて228nmの吸光度を測定した。このときの吸光度をA_sとした。またB液100 μ lを加えずに37℃で30分間反応させ、1N塩酸を加えて反応を停止させた後、B液を加えた試験区も同時に行った。この吸光度をA_{b1}とした。

分析試料の代わりに蒸留水を用いた試験区も同時に行い、それぞれの吸光度をA_c, A_{b2}とした。

ACE阻害率(%)は、 $\{1 - (A_s - A_{b1}) / (A_c - A_{b2})\} \times 100$ で算出した。分析試料は適宜希釈し、それぞれの試料濃度のACE阻害率(%)を上記の操作で求め、阻害率と試料濃度のプロット上50%阻害に対応する試料量を読

み取り、IC₅₀とした。

2-4 抗アレルギー性評価試験

2-4-1 ヒアルロニダーゼ阻害活性

ASADAらの方法³⁾にしたがって測定し、阻害率で示した。すなわち、分析試料0.1mlに酵素溶液(0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)にHyaluronidase TypeIV-S from bovine tests (SIGMA)を4.0mg/mlとなるように溶解)0.05mlを混合し、37℃で20分間保持した。次いで酵素活性化液(酢酸緩衝液にCompound 48/80 (SIGMA)を0.5mg/ml, 塩化カルシウムを3.8mg/mlとなるように溶解)0.1mlを添加し、37℃で20分間保持した後、基質溶液(酢酸緩衝液にHyaluronic acid sodium salt from rooster comb (SIGMA)を0.8mg/mlとなるように溶解)0.25mlを添加して37℃で40分間保持した。これに0.4N NaOH 0.1mlとホウ酸カリウム溶液(0.8Mホウ酸水溶液に水酸化カリウムを22.4mg/mlとなるように溶解)0.1mlを添加し、沸騰水中で3分間加熱後、急冷した。p-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液3ml(p-Dimethylaminobenzaldehyde (和光純薬)5gを氷酢酸44ml, 10N HCl 6mlに溶解、使用時に氷酢酸で10倍希釈)を加え、37℃で20分間保持し、585nmの吸光度を測定した。分析試料の代わりに蒸留水を入れたものを対照とし、各分析試料と対照について酵素溶液を入れないものをブランクとして、吸光度を測定し、阻害率を求めた。

2-4-2 マスト細胞の脱顆粒阻害活性

アレルギーに関与するマスト細胞の脱顆粒モデル系⁴⁾を使用した。すなわち、マスト細胞(RBL-2H3, ラット好塩基球性白血病細胞株JCRB0023, ヒューマンサイエンス振興財団)を、10%ウシ胎児血清, 100unit/mlペニシリン, 100 μ g/mlストレプトマイシンを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (SIGMA)で晩培養(37℃, 5%CO₂)した。次に、マスト細胞を96well平底マイクロプレートに5.0 \times 10⁴cells/well(200 μ l/well)となるように播種して晩培養(37℃, 5%CO₂)しwellに付着させた。各wellに抗DNP-IgE抗体(Monoclonal Anti-DNP, SIGMA)を添加して2時間(37℃, 5%CO₂)培養することでマスト細胞を感作させ、PBS(-)で2回洗浄した後、希釈した分析試料を98 μ lずつ添加し、10分間培養(37℃, 5%CO₂)した。これにヒトDNP抗原(Albumin, dinitrophenyl human, SIGMA)を2 μ l添加して30分間培養(37℃, 5%CO₂)し、マスト細胞を脱顆粒刺激した。5分間氷冷して反応を止めた後、各wellの上清を50 μ lずつ別のマイクロプレートに移し、基質溶液(100mMクエン酸緩衝液にp-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (和光純薬)を3.3mMになるように溶解)を100 μ l加えて混和後、37℃で25分間反応させた。2.0M

グリシン緩衝液を100 μ l加えて反応を停止し、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定し、脱顆粒時に細胞内から放出された β -hexosaminidase活性を指標として、分析試料の阻害活性を評価した。また、分析試料の代わりにPBS (-)を添加した場合の活性を対照とし、分析試料の脱顆粒阻害率を求めた。

3. 実験結果および考察

3-1 野菜類の血圧上昇抑制性

ACE阻害活性は、ACE活性を50%阻害するために必要な試料濃度 (IC₅₀; g湿重量/100ml) で示した (表2, 表3)。

表2 在来野菜のACE阻害活性

供試野菜	ACE阻害活性 IC ₅₀ (g/100ml)
大野菜	>20
おちあいいも	>20
長禅寺菜	>20
鳴沢菜	>20
水かけ菜 (水菜)	8.8
水かけ菜 (冬菜)	10.6
茂倉うり	>20

在来野菜7種の中では、水かけ菜 (水菜) が最も高い阻害活性を示し、8.8 (g/100ml) であった。続いて水かけ菜 (冬菜) が10.6 (g/100ml) であり、その他の野菜は20.0 (g/100ml) 以上であった。

一方、一般野菜22種の中では、モロヘイヤ、クレソン及び野沢菜が9.0, 11.8及び15.6 (g/100ml) を示したが、その他の野菜は20 (g/100ml) 以上であった。

ACEは、不活性なアンジオテンシンIのC末端His-Leuを切断し、血管収縮などの強い血圧上昇作用を有するアンジオテンシンIIを生じさせ、一方で、強い血管拡張作用を有するブラジキニンを分解する働きをしている昇圧系酵素である。今回野菜中で阻害活性を示した水かけ菜などには、ACE阻害物質が含まれ、高血圧症の予防効果を示す可能性が考えられる。

ACE阻害物質については、食品タンパク質由来のペプチド型物質が数多く報告⁵⁻⁹⁾されているが、原ら¹⁰⁾によって茶成分のポリフェノール類 (カテキン類やテアフラビン類) にもACE阻害活性があることが報告されている。阻害物質の推定については、今後実施していきたい。

3-2 野菜類の抗アレルギー性

在来野菜のヒアルロニダーゼ阻害率と脱顆粒阻害率を表4に示した。また、一般野菜のヒアルロニダーゼ阻害率と脱顆粒阻害率を表5に示した。

表3 一般野菜のACE阻害活性

供試野菜	ACE阻害活性 IC ₅₀ (g/100ml)
大塚にんじん	>20
きゅうり	>20
クレソン	11.8
小松菜	>20
白うり	>20
大根 (浅尾大根)	>20
トマト	>20
長かぶ	>20
野沢菜	15.6
ブロッコリー	>20
水菜	>20
モロヘイヤ	9.0
やはたいも	>20
(スイートコーン)	
おひさまコーン	>20
甘々娘	>20
ゴールドラッシュ	>20
味来	>20
(ジャガイモ)	
アンデスレッド	>20
キタアカリ	>20
男爵	>20
デジマ	>20
メークイーン	>20

在来野菜7種と比較すると、水かけ菜 (冬菜) が5.9%、長禅寺菜が5.6%、水かけ菜 (水菜) が3.4%のヒアルロニダーゼ阻害率を示した。

一般野菜では、ブロッコリーが21.7%、モロヘイヤが20.3%、やはたいもが15.3%のヒアルロニダーゼ阻害率を示し、きゅうり、クレソン、スイートコーン (ゴールドラッシュ及び味来) が、ヒアルロニダーゼ阻害活性と脱顆粒阻害活性の双方を示した。

既報によると、野菜類の抗アレルギー活性には主にポリフェノールが関与する。強い抗アレルギー活性を示す

表4 在来野菜の抗アレルギー性

供試野菜	ヒアルロニダーゼ 阻害率 (%)	脱顆粒 阻害率 (%)
大野菜	0	0
おちあいいも	0	0
長禅寺菜	5.6	0
鳴沢菜	0	0
水かけ菜 (水菜)	3.4	0
水かけ菜 (冬菜)	5.9	0
茂倉うり	0	0

表5 一般野菜の抗アレルギー性

供試野菜	ヒアルロニダーゼ 阻害率 (%)	脱顆粒 阻害率 (%)
大塚にんじん	0	0
きゅうり	4.4	13.3
クレソン	5.6	8.9
小松菜	5.1	0
白うり	0	0
大根 (浅尾大根)	2.1	0
トマト	0	0
長かぶ	0	0
野沢菜	0	15.4
ブロッコリー	21.7	0
水菜	0	0
モロヘイヤ	20.3	0
やはたいも	15.3	0
(スイートコーン)		
おひさまコーン	3.6	0
竹々娘	0	0
ゴールドラッシュ	2.9	3.1
味米	2.7	15.8
(ジャガイモ)		
アンデスレッド	4.0	0
キタアカリ	3.0	0
男爵	2.3	0
デジマ	0	0
メークイーン	3.3	0

野菜には、トマト (加工用トマトの果皮)¹¹⁾、茶 (べにふうき)¹²⁾、タイム¹³⁾、エストラゴン¹³⁾などが報告され、いずれも特定のポリフェノールが関与している。本試験で野菜類が示したヒアルロニダーゼ阻害活性と脱顆粒阻害活性にもポリフェノールが関与している可能性が考えられる。しかし、阻害率は高くとも20%前後であり、既報の野菜類のように顕著な阻害活性を示す野菜類は見られなかった。また、既報¹⁴⁾のポリフェノール含有量とも特に相関は見られなかった。

4. 結 言

県産野菜のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性について調査したところ、水かけ菜が高い阻害活性を示した。

また県産野菜の抗アレルギー性 (ヒアルロニダーゼ阻害活性及び脱顆粒阻害活性) について調査したところ、数種の野菜で阻害活性を示すことが明らかになった。

謝 辞

動物細胞の脱顆粒抑制性を測定するにあたり、ご指導いただきました独立行政法人食品総合研究所の新本洋士先生、石川祐子研究員、ほか機能成分研究室 (現・機能性成分解析ユニット) の皆さまに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 榎本俊樹, 三輪章志, 吉村香奈子, 北村利夫: *New Food Industry*, 44, 31 (2002)
- 2) 農林水産省 農林水産技術会議事務局 食品総合研究所: 食品の機能評価マニュアル集, p.117 (1999)
- 3) ASADA M., SUGIE M., INOUE M., NAKAGOMI K., HONGO S., MURATA K., IRIE S., TAKEUCHI T., TOMIZUKA N., and OKA S.: Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells. *Biosci Biotech Biochem*, 61, 1030-1032 (1997)
- 4) 吉川雅之, 松田久司, 森川敏生: 平成14・15年度 文部科学省ハイテクリサーチセンター整備事業研究成果報告書: 京都薬科大学, 生理学 p.1-16 (2002)
- 5) 川村幸雄: 食品工業, 33, 20 (1990)
- 6) 千葉英雄・吉川正明: 化学と生物, 29, 454 (1991)
- 7) 小浜恵子・高橋亨・大澤純也: 岩手県工業技術センター研究報告, 15, 85 (2005)
- 8) Yokoyama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 56, 1541 (1992)
- 9) 野村明・月原百合香: 高知県工業技術センター研究報告, 35, 13 (2004)
- 10) 原征彦・松崎妙子・鈴木建夫: 農芸化学会誌, 61, 803 (1987)
- 11) YAMAMOTO T., YOSHIMURA M., YAMAGUCHI F., KOUCHI T., TSUJI R., SAITO M., OBATA A. and KIKUCHI M.: Anti-allergic Activity of Naringenin Chalcone from a Tomato Skin Extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (8), 1706-1711 (2004)
- 12) 山本 (前掲) 万里: 緑茶の抗アレルギー作用とがん転移阻害効果, 食科 I, 49 (10), 631-638 (2002)
- 13) WATANABE J., SHINMOTO H. and TSUSHIDA T.: Coumarin and Flavone Derivatives from Estragon and Thyme as Inhibitors of Chemical Mediator Release from RBL-2H3 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (1), 1-6 (2005)
- 14) 木村英生, 長沼孝多, 小松正和, 恩田匠: 山梨県工業技術センター研究報告, No.20, p.101-104 (2006)