

バイオ技術を利用した地域農林産物からの 新規機能性食品の開発 (第2報)

木村 英生・長沼 孝多・小松 正和・恩田 匠

Development of Functional Food made from Local Agricultural Products (2nd Report)

Hideo KIMURA, Kota NAGANUMA, Masakazu KOMATSU and Takumi ONDA¹

要 約

山梨県産果実、スモモ、ブドウ、モモ、ウメ、カキ、ネクタリン、リンゴ、ナシ及びサクランボの9種類を対象に、そのアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性および動物細胞の脱顆粒抑制性 (抗アレルギー活性) を調査した。果実中で高い (ACE) 阻害活性を示したのはスモモであった。また脱顆粒抑制性を示したのはウメとナシであった。

Abstract

The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting activity and the antiallergic activity of plum, grape, peach, mume, persimmon, nectarin, apple, pear and cherry were investigated. Plum showed the high ACE inhibiting activity as compared with other fruits. Mume and pear showed the inhibitory effect of degranulation from RBL-2H3 cells.

1. 緒 言

高血圧や糖尿病などの生活習慣病の増加、また花粉症や食物などによるアレルギー発症者の増大により、ヒトの健康に対する関心は益々高まる傾向にある。このような状況下で、食品には高血圧予防、抗ガン及び抗アレルギーなどの機能性が求められ、食品開発においては、疾病予防が期待できる「機能性」の付与・増強が重要視されてきている。

一方、山梨県は果樹王国として全国に知られ、モモ、ブドウ、スモモは生産量日本一を誇る。また、甲州小梅で知られるウメの産地でもあり、さらにカキ、サクランボ、リンゴ、ナシなど、気候や風土などその地域の特徴を生かした果樹栽培が盛んである。このように、県内には豊富に果実類が存在し、県産果実を対象にした試験研究では、品種改良、栽培方法及び食品加工などについての成果が数多く報告されているが、機能性評価についての研究報告は未だ少ない状況にある。

しかし、全国的には野菜、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活かされている。

そこで本研究では、山梨県の特徴でもある果実類を対象に、各種機能性評価や機能性成分の解析を行い、生活

習慣病やアレルギーなどに対する予防効果を持つ新しい機能性食品の開発を試みることにより、地域資源の高度利用、高付加価値化及び食品関連企業の発展を促すことを目的とした。

前報²⁾では県産果実を対象に、抗酸化活性を評価し、活性の主要な原因物質がポリフェノールであることを報告した。今回は、県産果実の高血圧予防効果 (アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性) と抗アレルギー活性 (脱顆粒抑制性) について評価した。

2. 実験方法

2-1 供試果実

供試果実には、モモ (日川白鳳)、ブドウ (甲州)、スモモ (太陽)、ウメ (豊後)、ナシ (幸水)、カキ (富有)、リンゴ (ふじ)、ネクタリン (フレーバトップ) 及びサクランボ (高砂) を用いた。これらの果実はいずれも山梨県産であり、県内の農園 (農家)、農協などの直売所、スーパーなどで購入した。

2-2 分析試料の調製²⁾

果実 (全果: 果皮及び果肉) 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抽出を行い、ろ紙 (ADVANTEC No. 2) でろ過した。ろ液はすべて合わせて45℃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. 5 C) でろ過したものを分析試料とした。

2-3 アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性評価試験

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, 試料抽出液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As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Ab1とした。

試料抽出液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Ac, Ab2とした。

ACE阻害率 (%) は、 $\{1 - (As - Ab1) / (Ac - Ab2)\} \times 100$ で算出した。試料抽出液は適宜希釈し、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

抗アレルギー性は、アレルギーに関与するマスト細胞の脱顆粒モデル系³⁾を使用し、脱顆粒抑制性を測定する

ことにより評価した。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をヒューマンサイエンス振興財団より購入) 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社) で一晩培養 (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となるように200 μ lずつ播種して一晩培養 (37℃, 5%CO₂) した。各wellに抗DNP-IgE抗体 (Monoclonal Anti-DNP, SIGMA社) 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社) 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、100mMクエン酸バッファーに溶解した3.3mM p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside (和光純薬) を100 μ l加えて混和後、25分間 (37℃) 反応させた。2.0M グリシンバッファーを100 μ l加えて反応を停止し、マイクロプレートリーダー (SUNRISE CLASSIC, テカンジャパン) 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遊離量を定量した。また分析試料の代わりにPBS (-) を添加した場合の β -hexosaminidase遊離量を対照として、測定用試料の脱顆粒抑制率を求めた。

なお、分析試料のマスト細胞傷害性は、LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラ) により測定した。

3. 結果および考察

3-1 県産果実のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性

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1)。9種の果実中では、スモモ (太陽) が最も高い阻害活性を示し、3.8 (g/100ml) であった。続いてブドウ (甲州) とリンゴ (ふじ) がそれぞれ5.8, 10.2 (g/100ml) であった。モモ、ナシ、カキ、ウメ、ネクタリン及びサクランボは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⁴⁾。このACEの働きを阻害することにより、高血圧症の治療が可能である。今回果実中で特に高い阻害活性を示したスモモには、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高いことが示唆された。

表1 果実のACE阻害活性

種類	品種名	ACE阻害活性 (IC50; g/100ml)
スモモ	太陽	3.8
ブドウ	甲州	5.8
リンゴ	ふじ	10.2
モモ	日川白鳳	>20
ナシ	幸水	>20
カキ	富有	>20
ウメ	豊後	>20
ネクタリン	フレーバートップ	>20
サクランボ	高砂	>20

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⁶⁻¹⁰⁾されているが、原ら¹¹⁾によって茶成分のポリフェノール類(カテキン類やシアフラビン類)にもACE阻害活性があることが報告されている。

スモモについて、阻害物質の同定は実施していないが、前報⁹⁾において、スモモ類は他の果実と比較して高いポリフェノール量を示すことが明らかになっている。また今回スモモに次いで高い阻害活性を示したブドウやリンゴも、他の果実と比較して高いポリフェノール量を示しており、ポリフェノールがACE阻害の主要な原因物質である可能性も考えられた。

3-2 県産果実の脱顆粒抑制性

供試果実の脱顆粒抑制性を表2に示した。分析試料の添加濃度は、マスト細胞の傷害率が20%以下となる分析試料の濃度をLDH Cytotoxicity Detection Kitを使用して決定した。供試果実のうち、甲州、日川白鳳、幸水および豊後の分析試料の添加により、マスト細胞の脱顆粒抑制が認められた。抑制率は、それぞれ5.7、1.6、13.6および18.0%であった。

また、脱顆粒抑制性が認められた甲州、日川白鳳、幸水および豊後について、試料濃度をさらに2倍、4倍に希釈したときの脱顆粒抑制性を図1に示した。豊後は、試料濃度3.1、6.3および12.5mg/mlのとき脱顆粒抑制率8.7、13.1および18.0%であった。また幸水は、添加試料濃度12.5、25.0および50.0mg/mlのとき脱顆粒抑制率6.4、4.9および13.6%であった。甲州および日川白鳳は、脱顆粒抑制率が5%前後かそれ以下と低く、脱顆粒抑制性は微弱であると考えられた。

以上の結果から、供試果実の中で幸水、豊後に脱顆粒抑制性が認められ、特に豊後は測定用試料の添加濃度に依存的な脱顆粒抑制性が認められた。

マスト細胞の脱顆粒抑制を示す農産物(活性成分)には、ジャバラ(ナリルチン)¹²⁾、茶(カテキン類)¹³⁾、リンゴ(ポリフェノール類)¹⁴⁾、トマト(ナリルチンカルコン)¹⁵⁾などがあり、活性成分は主にポリフェノール

類やフラボノイド類である。幸水や豊後の脱顆粒抑制性においても、これらの物質が関与していると考えられる。

表2 果実の脱顆粒抑制性

種類	品種名	試料添加濃度 (mg/ml)	脱顆粒抑制性 (%)
スモモ	太陽	12.5	ND
ブドウ	甲州	50.0	5.4
リンゴ	ふじ	12.5	ND
モモ	日川白鳳	50.0	1.4
ナシ	幸水	50.0	13.6
カキ	富有	50.0	ND
ウメ	豊後	12.5	18.0
ネクタリン	フレーバートップ	25.0	ND
サクランボ	高砂	50.0	ND

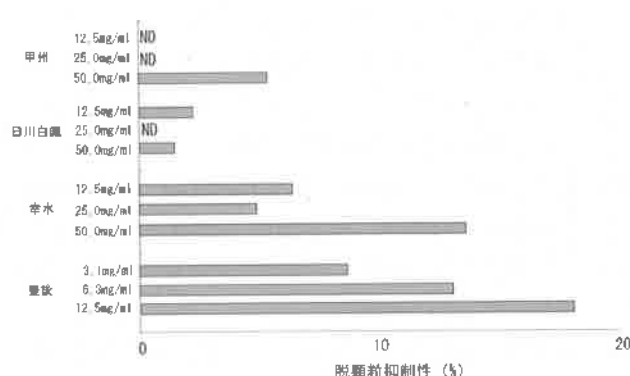


図1 甲州、日川白鳳、幸水、豊後の脱顆粒抑制性

4. 結 言

県内産果実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、スモモが最も高い阻害活性を示した。

また県内産果実の抗アレルギー性(脱顆粒抑制性)について調査したところ、ウメ(豊後)及びナシ(幸水)に脱顆粒抑制性が認められた。特に、豊後は測定用試料の添加濃度に依存的な脱顆粒抑制性が認められた。

以上の結果から、これらの果実を素材とすることで、高血圧予防効果や抗アレルギー性を有する機能性食品を開発できる可能性が示唆された。特に、スモモは、前報⁹⁾で報告したように高い抗酸化活性も示すことから、スモモを素材とすることで、抗酸化活性と高血圧予防効果を持つ機能性食品を開発できる可能性が高いと考えられる。

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) 木村英生・辻 政雄・恩田 匠・長沼孝多：山梨県工業技術センター研究報告, vol.19,p.6 (2005)
- 2) 辻 政雄・木村英生：山梨県工業技術センター研究報告, vol.15,p.34 (2000)
- 3) 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)
- 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) 川岸舜朗編著：食品中の生体機能調節物質研究法, 学会出版センター, p.116 (1997)
- 6) 川村幸雄：食品工業, 33,p.20 (1990)
- 7) 千葉英雄・吉川正明：化学と生物, 29,p.454 (1991)
- 8) 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,p.85 (2005)
- 9) Yokoyama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M. : Biosci. Biotechnol.Biochem, 56 ,p.1541 (1992)
- 10) 野村明・月原百合香：高知県工業技術センター研究報告, 35,p.13 (2004)
- 11) 原征彦・松崎妙子・鈴木建夫：農芸化学会誌, 61, p.803 (1987)
- 12) 木村美和子, 山西妃早子, 尾崎嘉彦, 実宝智子：和歌山県工業技術センター研究報告, p.1 (2003)
- 13) 山本(前田)万里：食品の包装, 36, p.77 (2005)
- 14) T. Kanda, H. Akiyama, A. Yabagida, M.Tanabe, Y.Goda, M. Toyoda, R. Teshima, Y. Saito : Biosci. Biotechnol.Biochem, 62,p.1284 (1998)
- 15) 小幡昭雄：キッコーマン技術情報, p.4-7 (2003)