

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00785

研究課題名(和文) オリーブ葉ポリフェノールが魚類組織・細胞に及ぼす機能性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of dietary effects of olive leaf polyphenol on fish tissues and cells

研究代表者

小川 雅廣 (Ogawa, Masahiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：10398034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：オリーブ葉を投与した養殖魚の筋組織と細胞を分析した。オリーブ葉を給餌した実験区ハマチと無給餌の対照区魚の筋肉の破断強度を比較したところ、実験区は歯ごたえが強く、歯切れがよいこと、冷蔵保存しても軟化しにくいことが分かった。また実験区の筋肉はコラーゲン量が多く、丈夫な筋内膜構造をしていた。同様の結果はマダイでもみられた。線維芽細胞にオリーブ葉のポリフェノールを添加したところコラーゲン量が濃度依存的に増えた。このことから、オリーブ葉ポリフェノールが線維芽細胞に作用して魚肉の食感向上につながったと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of olive leaf (OL) powder supplemented to fish feed on muscle of cultured fish yellowtail. Fish reared with feed containing OL powder (OLP-diet fish) had more elastic muscle than fish with control diet (Ct fish). Microstructure observation of muscles showed that OLP-diet fish has more rigid endomysium structure than Ct fish. Furthermore, ordinary muscle of OLP-diet fish had higher collagen content than that of Ct fish. Similar result was obtained in another cultured fish red sea bream. Fibroblast cell treated with OL polyphenol (PP) caused the increase in collagen amount. Since collagen fiber in endomysium is responsible for the texture of muscle, feeding OL to cultured fish will make the texture of muscle harder. The present study suggests that OL powder is useful feed additive to enhance texture of cultured fish muscle through strengthening collagen structure in muscle.

研究分野：食品科学

キーワード：オリーブハマチ コラーゲン ポリフェノール 歯ごたえ 線維芽細胞 肝細胞 オレウロペイン

### 1. 研究開始当初の背景

香川県産のオリーブ葉粉末を飼料に混ぜて2週間以上食べさせた養殖ハマチ(オリーブハマチとして商標登録)は、脂がのっているのに身が締まってさっぱりした味わいで魚の生臭さも少ないことから首都圏の百貨店などで好評を博している。唯一科学的に証明されているのは、血合い筋の褐変速度が従来の養殖ハマチと比べて遅いということだけである。オリーブハマチについてそれ以外のことは科学的にほとんど明らかになっていない。オリーブ葉には葉の乾燥重量に対して約10%ものPPが含まれており、代表的なものにオレウロペイン(OLP)、ヒドロキシチロソール、ベルバシコシド、ルテオリンがある。なかでもOLPは全PPの約70%を占めるオリーブ葉の主要PP成分で、オリーブの仲間には含まれないオリーブ特有のものである。OLPのヒトへの効能としては血糖値低下作用や老化防止作用などが報告されているが、OLPをはじめとしたオリーブ葉に含まれるPP成分が魚に及ぼす機能性に関する科学的知見は絶対的に不足している。

### 2. 研究の目的

オリーブ葉の乾燥粉末を飼料に混ぜて飼育した養殖ハマチは、変色しにくい肉質でさっぱりした味わいであることから消費者に人気が高い。このような特徴はオリーブ葉に多量に含まれるPPによるものと考えられているが、その理由については科学的にほとんど明らかになっていない。本研究では、オリーブ葉由来PPがハマチなど魚類の組織や細胞に及ぼす影響を生化学的手法により解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ハマチ及びマダイの飼育方法

3000尾のハマチ(平均体重3kg)を高松市沖の小割生簀(10m×10m×3.5m)で、2%のオリーブ葉粉末を添加したモイストペレット(餌)を1日1回飽食給餌して飼育した。給餌を始めて25日目の給餌後30分経過後に魚5尾を回収し、すぐに採血し血漿を得た。また、魚体は三枚におろした。対照区ハマチは、オリーブ葉粉末を含まないモイストペレットを餌として与え、実験区と同様の方法で飼育した。マダイについては、34尾の幼魚(平均体重45g)を、500Lの海水の入った水槽中で、8%のオリーブ葉粉末を添加したドライペレット(餌)を1日1回飽食給餌して飼育した。20日目の給餌後1日経過してから15尾、40日目の給餌後に1日経過後に残りの19尾を回収し、採血後、三枚におろした。対照区マダイは、オリーブ葉粉末を含まない餌を与えて、実験区と同様の方法で飼育した。

#### (2) 普通肉の破断強度測定

ハマチ背側普通肉の頭部後方より魚体の後方約三分の一までのフィレを筋線維の方向と垂直に1.0cmの厚さに切断した。切り出した肉片の破断強度を楔型のプランジャーを装着したクリープメーター(破断モード)で測定した。

#### (3) 筋肉タンパク質の定量及びプロテアーゼ活性測定

背側普通肉から、筋形質タンパク質、筋原線維タンパク質、酸可溶性コラーゲンを常法に従って調製した。各画分のタンパク質量はBiuret法で求めた。マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)活性およびカテプシンB活性は、筋形質タンパク質画分に人工基質MOCAc-PLGL-A<sub>2</sub>pr(DNP)-AR-NH<sub>2</sub>とZ-RR-MCAをそれぞれ加えて活性測定を行った。筋肉中のヒドロキシプロリン(Hyp)量は筋肉タンパク質をアルカリ加水分解した後、永谷ら(1986)の方法で求めた。

#### (4) 筋肉組織の微細構造観察

背側普通肉を固定、包埋、切片作製し、アザン染色して光学顕微鏡で観察した。また、筋内膜の構造は、グルタルアルデヒドで普通筋を固定後、2N NaOHに浸漬して筋原線維を溶解させ、オスミウムで固定後、走査型電子顕微鏡で観察した。

#### (5) オリーブ葉抽出液の調製とPPの定量

オリーブ葉粉末から80%エタノールで抽出を行った。この抽出物をオリーブ葉抽出液(OEx)とした。PPの濃度はOLPを標準物質としてFolin-Ciocalteu法で求めた。細胞中のOLP濃度は、細胞を破碎後、除蛋白質処理を行った試料溶液をHPLCにかけて求めた。

#### (6) 細胞培養とOEx処理

ウナギ由来肝細胞Hepa-T1(RCB1156)と金魚鱗由来線維芽細胞GAKS(RCB1452)を、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で28(Hepa-T1)または37(GAKS)でコンフルエントに達するまで培養した。トリプシン処理で回収した細胞懸濁液中の細胞数をトリパンブルー染色で求めた。所定の細胞濃度となるように培地で希釈してディッシュに播種し24h培養した。OExまたはOLPをPP濃度が所定の濃度になるように無血清培地で希釈し、細胞に添加し24h培養を行った。その後、細胞の上清画分を可溶性コラーゲン濃度とMMP活性の測定用試料とした。ディッシュ上の細胞をトリプシン処理して回収した細胞懸濁液を、細胞内のOLP濃度とグルタチオン(GSH)濃度の測定用試料とした。また、トリプシン処理後のディッシュに残ったコラーゲンを沈着コラーゲ

ン濃度測定用試料とした。

#### (7) コラーゲンの定量と MMP 活性

コラーゲンの濃度は、コラーゲン染色液 (Direct Red 80) を用いた色素結合法で求めた。MMP 活性は (3) の MMP 活性と同じ基質を用いて測定した。

#### (8) 酸化ストレス軽減効果

OEx を濃縮乾固し、得られた固体を少量の DMSO で溶解し無血清培地で PP 濃度が 0.5~5.0 ppm になるように希釈した。GAKS に添加後、24h 培養した。PBS で洗浄後、0.5~2.0 mM に希釈した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を細胞に添加し 1h 酸化ストレスを与えた後、Cell Counting Kit-8 で生細胞数を求めた。

#### (9) 細胞内 GSH の定量

細胞を超音波で破碎し、遠心分離した上清を除蛋白質処理した溶液の GSH 濃度を DTNB 法で求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) オリーブハマチの特徴

##### 普通肉の物性

ハマチ普通肉の破断特性を調べた。オリーブ葉粉末を投与した実験区ハマチと投与しなかった対照区ハマチとも、歪率 20% 付近から急激に荷重が増加した (図 1)。荷重の増加率は実験区の方が対照区よりも大きかったことから、実験区ハマチ肉の方が歯ごたえが強いと分かった。また、破断点での荷重 (破断荷重) の値には両区に違いがなかったが、破断点での歪率 (破断歪率) は実験区が対照区よりも 14% 小さいことより、実験区ハマチ肉の方が歯切れがよいと分かった。

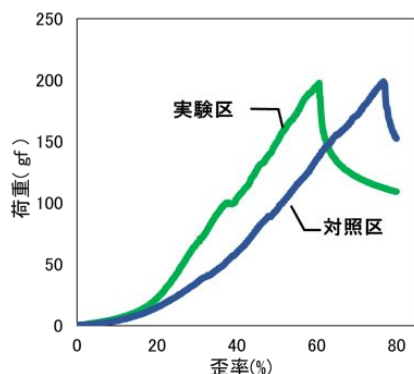


図 1 . ハマチ背側普通肉の破断特性

普通肉の水分含量と脂質含量は両区に違いがみられなかったが、コラーゲン含量は実験区の方が対照区よりも有意に高かった (表 1)。このことから実験区ハマチ肉の歯ごたえの強さに筋肉中のコラーゲンが関与していることが示唆された。

表 1 . ハマチ背側普通肉の成分

	対照区	実験区
水分含量 (%)	63.61 ± 0.33	63.04 ± 0.74
脂質含量 (g/g muscle)	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.02
コラーゲン量* (mg/g muscle)	2.21 ± 0.55 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.53 <sup>b</sup>

数値の上付き文字の違いは有意差 ( $P < 0.05$ ) ありを示す

\* コラーゲン量 = Hyp 量 × 9.75 で求めた

#### 普通肉の軟化速度

普通肉を冷蔵保存したときの破断荷重の変化を図 2 に示す。両区とも冷蔵保存時間とともに破断荷重が低下した。この低下は筋肉の軟化現象によるものである。しかし軟化速度は実験区ハマチ肉の方が対照区よりも有意に遅かった。対照区の破断荷重は 3 日間で 40% 減少したのに対し、実験区ではわずか 20% の減少であった。このことより実験区ハマチの筋肉は軟化が起きにくいことが分かった。

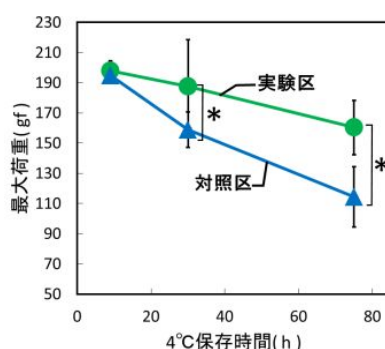


図 2 . 冷蔵保存中のハマチ普通肉の破断荷重の変化

3 日間冷蔵保存した普通肉の筋内膜のコラーゲン線維構造を比較した。実験区の筋内膜のコラーゲン線維の方が対照区のものよりも密で丈夫な構造をしていた (図 3)。

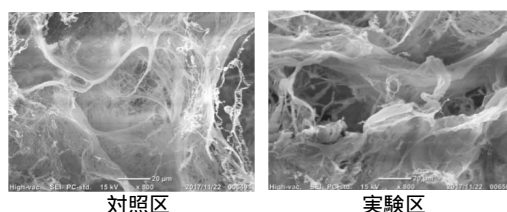


図 3 . 3 日間冷蔵保存したハマチ普通肉の筋内膜の構造

実験区ハマチの筋肉の軟化が起こりにくかった原因を探るために、筋肉の酸可溶性コラーゲン量、MMP 活性、カテプシン B 活性の冷蔵保存中の変化を調べた。保存 1 日目から 3 日目にかけて両区のコラーゲン量はともに減少していたが、その減少率は実験区の方が低かったことより、実験区ハマチ肉の方が保存後も分解されずに残存するコラーゲン量が多いと考えられた。MMP 活性は保存 0 日目では実験区の方が対照区よりも低かった。しかし 1 日目以降は両区に差がなかった。カテプシン B 活性は、保存 0 日目から 3 日目に

かけて実験区の方が対照区よりも低かった。このように実験区の MMP 活性とカテプシン B の活性が対照区よりも低かったことが、実験区の普通肉のコラーゲン線維が冷蔵保存しても分解されにくい要因の一つと考えられた。以上のことより、オリーブ葉粉末を与えたハマチは、与えなかったハマチよりも、筋肉中のコラーゲン線維が多く、また冷蔵保存してもコラーゲン線維の分解が起きにくいと分かった。この丈夫で分解されにくいコラーゲン線維が、オリーブハマチ筋肉の軟化を遅らせていると考えられた。

#### ハマチ魚体内での PP の動態

オリーブ葉粉末をハマチに食べさせることで、筋内膜のコラーゲン線維が丈夫になることが分かった。この効果にはオリーブ葉の成分が筋肉に入って作用したものと考えられる。オリーブ葉には多量の PP が含まれるので、オリーブ葉由来 PP のハマチ体内の局在を調べた。実験区ハマチの血漿、肝臓、筋肉組織を破砕し、PP の分析を行ったが、オリーブ由来 PP は検出されなかった。しかし、実験区ハマチの血漿の抗酸化活性は、対照区のそれよりも 3.9 倍高かった (図 4)。

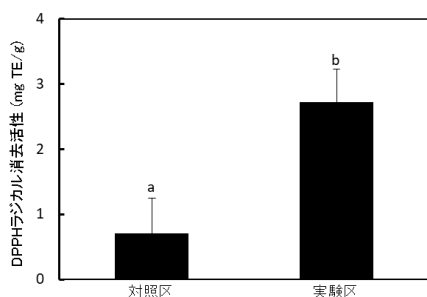


図 4. ハマチ血漿の抗酸化活性

オリーブ葉の PP が腸から血液に吸収されるのかを調べるために、オリーブ葉の主要 PP である OLP の腸管吸収を、ハマチの反転腸管を使って調べたところ、全体の約 1% の OLP が腸管から吸収されることが分かった。

以上のことより、オリーブ葉の PP は腸管から一部吸収されるが、魚体内で代謝されて、その代謝産物が抗酸化活性を血液中で示すものと考えられる。

#### (2) オリーブマダイ筋肉の特徴

オリーブ葉粉末を投与したマダイ普通筋中の各種筋肉タンパク質の含量を対照区と比較した。オリーブ葉粉末を 20 日間投与したマダイの筋形質タンパク質量は対照区の魚のそれと有意差はなかったが、筋原線維タンパク質量と酸可溶性コラーゲン量は対照区のものよりも約 1.5 倍高かった (表 2)。しかしながら、コラーゲンに特異的に含まれるアミノ酸ヒドロキシプロリン (Hyp) の量と

筋肉中のコラーゲナーゼ活性すなわち MMP 活性は、対照区のものほとんど同じであった。オリーブ葉粉末を 40 日間投与したマダイにおいても、20 日間投与の結果と同様の傾向 (筋原線維タンパク質と酸可溶性コラーゲンの含量が対照区よりも多い) であった。筋肉中の Hyp 含量が両区でほぼ同じであるにもかかわらず、筋肉から抽出される酸可溶性コラーゲン量は実験区の方が多かったのは、対照区の筋肉ではコラーゲンの分解が進んでおり遊離の状態の Hyp、もしくは Hyp を含有するコラーゲンペプチドの状態が存在している可能性が考えられる。

表 2. オリーブ葉粉末 20 日間投与マダイの筋タンパク質含量

	対照区	実験区
筋肉の水分含量 (%)	74.69 ± 0.61	74.41 ± 0.73
筋形質タンパク質 (mg/g muscle)	38.34 ± 8.34	38.20 ± 6.40
筋原線維タンパク質 (mg/g muscle)	112.1 ± 22.4 <sup>a</sup>	169.1 ± 21.5 <sup>b</sup>
酸可溶性コラーゲン (mg/g muscle)	0.95 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.26 <sup>b</sup>
Hyp 量 (mg/g muscle)	0.38 ± 0.067	0.33 ± 0.089
MMP 活性 (units/g)	119.88 ± 5.67	105.80 ± 2.31

数値の上付き文字の違いは有意差 ( $P < 0.05$ ) ありを示す

オリーブ葉粉末を 40 日間投与したマダイ筋肉の構造を対照区と比較した。赤色で示された筋線維の直径は、実験区の方が対照区のマダイよりも太い傾向があった (図 5 (A))。また、筋線維の周りで紫色に染色されるコラーゲン線維は、対照区よりも実験区マダイの方が濃かった。この紫色は筋線維を覆う筋内膜のコラーゲン線維であることから、実験区の方が対照区よりも筋内膜のコラーゲン線維が多いといえる。電子顕微鏡で観察した筋内膜には、両区ともハニカム構造がみられるが、その構造は実験区の方が対照区よりも厚く丈夫であった (図 5 (B))。

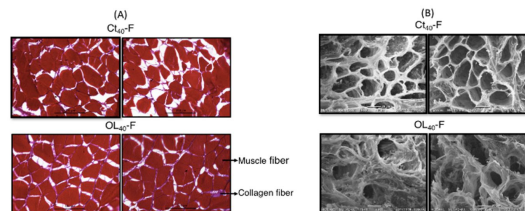


図 5. オリーブ葉粉末を 40 日間投与したマダイの普通筋の微細構造

(A)アザン染色、(B)アルカリ浸軟処理後の筋内膜構造、Ct40-F は対照区、OL40-F は 実験区を示す

以上より、オリーブ葉粉末をマダイに与えると、筋肉中の筋線維が太くなり、また筋線維の周りの筋内膜も太く丈夫になることが分かった。

### (3) OLP の細胞への取り込み

(2) で OLP はハマチの腸管から吸収されることが明らかになった。そこで OLP が細胞内に取り込まれるか否かを魚類の培養細胞を使って調べた。肝細胞 Hepa-T1 と線維芽細胞 GAKS を、OLP を含む培地で培養した後、細胞内の OLP を調べた。Hepa-T1 では、1h インキュベート後の細胞内に OLP が存在した(図6)。18h 後にも OLP は存在したが、その量は1h インキュベートしたときよりも減った。このことから OLP は Hepa-T1 にそのまま取り込まれるが、長時間のインキュベーションによって代謝あるいは細胞外へ排出されてしまうことが分かった。

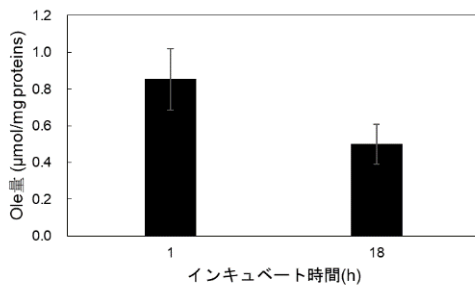


図6 . Hepa-T1 細胞内の OLP 量

一方、GAKS では2h と18h インキュベートしても細胞内に OLP は検出されなかった。しかし、培地中の OLP 量はインキュベーションの時間経過とともに減少していったことから、OLP は細胞に取り込まれずに細胞外で分解されたか、あるいは細胞に取り込まれて即座に代謝されてしまったものと思われる。以上のことより、OLP の細胞内での取り込みや代謝挙動は細胞によって異なると思われる。

### (4) オリーブ葉 PP の線維芽細胞への作用 コラーゲン産生への影響

ハマチとマダイはオリーブ葉粉末を摂取すると、筋肉中のコラーゲン量が増え、筋内膜が強固になることが明らかとなった。筋肉中でコラーゲンの合成を担うのは線維芽細胞であることから、PP 等のオリーブ葉由来成分が筋肉中の線維芽細胞によるコラーゲンの分解を抑制あるいはコラーゲンの合成を促進することが推測される。そこでオリーブ葉抽出物 OEx が線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響を調べた。線維芽細胞が分泌する沈着コラーゲン量は PP の濃度依存的に増加しており、5ppm の PP 添加では 94% 増えた(図7)。なお、OLP でも同様の実験を行ったが、OLP には OEx ほどの強いコラーゲン産生促進効果はなかった。以上のことより、OEx には線維芽細胞のコラーゲン産生を促進する効果があること、その効果は OLP 以外の成分によることが示唆された。

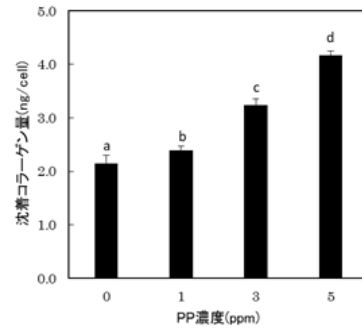


図7 . OEx 処理した GAKS の沈着コラーゲン量

### 酸化ストレス軽減効果

約 10% の PP を含むオリーブ葉粉末は高い抗酸化性を示す。そこで、OEx の抗酸化性を、GAKS を使って調べた。OEx で 24h 処理した GAKS は未処理の GAKS よりも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で酸化ストレスを与えても生存している細胞数が多かった(図8)。また、細胞の生存率は PP 濃度が高いほど高かった。このことより OEx には酸化ストレスを軽減する効果があることが分かった。

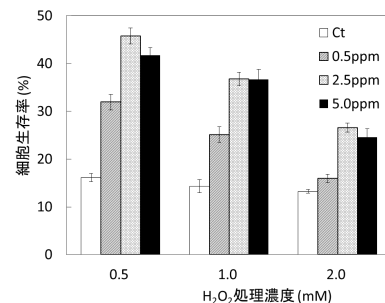


図8 . GAKS における OEx の酸化ストレス軽減効果

### コラーゲン産生が増加する要因

GAKS に OEx を添加するとコラーゲン産生量が増加した。コラーゲン産生量が増えたのは、OEx が細胞外のコラーゲン線維のコラゲナーゼによる分解を抑制したか、あるいは OEx が細胞内でのコラーゲンの合成を促進したかのいずれか、またはそれら両方の影響によるものと考えられる。このことを検証するために、まず細胞外でのコラーゲンの分解に関わる MMP の酵素活性を調べた。OEx で処理した GAKS の MMP 活性は無処理のものとは有意差がなかった(図9)。

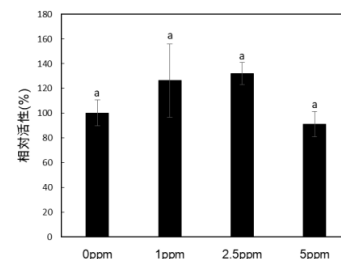


図9 . OEx 処理した GAKS のコラゲナーゼ活性

次に、OEx の細胞内でのコラーゲン合成への影響を調べた。成熟型コラーゲンの合成にはアスコルビン酸(ASC)が必要不可欠である。このASCを効率的に供給するには、細胞内のGSHの働きが重要である。また、オリーブ葉の抽出物は、ヒト線維芽細胞のGSHの産生を促進することが報告されている(Kaneko et al., 2008)。そこで、OEx及びOLPがGAKSの細胞内のGSH量に及ぼす影響を調べた。OLPをGAKSに加えてもGSHは増えなかったが、OExを加えるとGSH量は3.3倍に増えた(図10)。

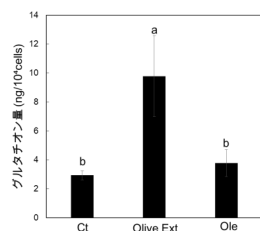


図10. OEx処理したGAKSのGSH量

コラーゲン産生促進作用をもつOExによってGAKS細胞内のGSH量が増加したのに対し、促進作用がほとんどないOLPではGSHが増えなかったことより、細胞内のGSH量が増えたことがコラーゲンの産生に関わっている可能性が高まった。細胞内でGSHが増えることがASCの生成を促進し、その結果としてコラーゲンの産生促進に寄与した可能性が考えられる。また、GSHはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の解毒作用を有することから、図8の酸化ストレス軽減効果にも細胞内のGSH量の増加が関与したのかもしれない。

#### (5)まとめ

本研究の結果からハマチやマダイにオリーブ葉粉末を投与すると筋肉のコラーゲン量が増えることが明らかとなった。筋肉のコラーゲン量が増え、コラーゲン線維が丈夫になることで、刺身の歯ごたえが向上し、筋肉の軟化が遅れることを明らかにした。オリーブ葉粉末によるコラーゲンの増加の要因は、オリーブ葉粉末中の成分が筋肉に局在する線維芽細胞のなかに入り、GSH量を増やすことによる可能性が示唆された。このような作用を有するオリーブ葉由来成分を同定するには至らなかったが、本研究の成果は、オリーブ葉粉末の給餌が養殖魚の肉質改善につながることを科学的に証明したもので、今後の養殖魚の高品質化に有用な情報といえる。

#### <引用文献>

永谷康典、武藤馨章、佐藤宏、飯島昌夫、ヒドロキシプロリンの改良定量法、薬学雑誌、106巻、1986、41-46

Kaneko, I., Chiba, T., Hayamizu, K., and Tsuji, T., Effect of a Supplement Containing Olive Leaf Extract against Ultraviolet Light-Induced Tanning: A Double-Blind Placebo-Controlled Study, *Anti-Aging Medicine*, 5巻、2008、78-81

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計1件)

M.A. Arsyad, T. Akazawa, C. Nozaki, M. Yoshida, K. Oyama, T. Mukai, M. Ogawa, Effects of olive leaf powder supplemented to fish feed on muscle protein of red sea bream, *Fish Physiology and Biochemistry*, 査読有、in press  
DOI: 10.1007/s10695-018-0521-1

##### [学会発表](計4件)

小川雅廣, 大山憲一 他、オリーブ葉給餌が養殖ブリの歯ごたえに及ぼす影響、日本食品科学工学会 第64回大会、2017年

Masahiro Ogawa, Kenichi Oyama et al., Effect of olive leaf powder supplemented to fish feed on biochemical properties of red sea bream muscle, The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium "Fisheries Science for Future Generations" (国際学会)、2017年

##### [その他]

ホームページ等

[https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/?page\\_id=110#page\\_110\\_tb\\_members-7](https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/?page_id=110#page_110_tb_members-7)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小川 雅廣 (OGAWA, Masahiro)  
香川大学・農学部・教授  
研究者番号: 10398034

##### (2)連携研究者

大山 憲一 (OYAMA, Kenichi)  
香川県・水産試験場・主任研究員  
研究者番号: 70544360