

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008 ~ 2009
 課題番号： 20700583
 研究課題名 (和文) 黒大豆種皮エキスの抗アレルギー作用に及ぼす調理の影響に関する研究
 研究課題名 (英文) Study on effect of cooking on anti-allergenicity of black soybean hull extract
 研究代表者
 比江森 美樹 (HIEMORI MIKI)
 岡山県立大学・保健福祉学部・助教
 研究者番号： 80326412

研究成果の概要 (和文)：「黒大豆種皮エキス」は抗アレルギー作用を有する。本研究では、その作用成分として、RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制効果を指標にして、シアニジン-3-O-β-D-グルコシド (C3G) に加え、プロシアニジを同定した。さらに、黒大豆を日常摂取することを考慮し、黒大豆を調理し、調理操作に伴う作用成分の量的変動とそのアレルギー抑制効果への影響を検討した。その結果、調理により C3G は分解されるが、その分解産物がアレルギー抑制効果を有し、黒大豆を調理した際にもその効果が維持されることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)： Black soybean hull extract has anti-allergenicity. In the present study, we identified procyanidin as one of the active compounds in addition to cyanidin-3-O-β-D-glucoside (C3G) by measuring the inhibition of the degranulation in RBL-2H3 cells as an index of anti-allergenicity. Furthermore, we investigated the effects of cooking on the fate of active compounds in black soybean and its anti-allergenicity. As a result, we showed that the degraded product derived from C3G had anti-allergenicity and the function in black soybean was retained after thermal cooking, while C3G was degraded by thermal cooking.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：黒大豆、抗アレルギー作用、シアニジン-3-O-β-D-グルコシド、プロシアニジン、調理

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーをはじめとするアレルギー疾患は年々増加し、現代病ともいわれる社会的問題であり、ヒトが健康で豊かな

食生活を営むうえで、非常に深刻な問題を提起している。従って、アレルギーは早急に解決すべき重要な課題の一つである。

食物アレルギーに代表される I 型アレルギー

ギーは、外界から侵入した食品などのアレルギーとそれに特異的な IgE 抗体との反応により生じる炎症反応である。IgE 抗体が生体内における免疫担当細胞である好塩基球やマスト細胞表面に存在する IgE 抗体のレセプターに結合し、そこにさらに抗原が架橋結合することにより、細胞内から化学伝達物質が放出され、アレルギー症状を呈すると考えられている。従って、アレルギー疾患に関する研究は、大別して、抗原側と生体側の調節の2つに分類することができる。

本研究では、アレルギー疾患の解決策の一端として、生体側の調節を目的とし、食品成分によるアレルギー反応の抑制に着目した。食品由来の機能性成分は、医薬品と比べて、日常の食生活において習慣的に摂取することが可能であり、アレルギーの予防から緩和、治療へと幅広く対応できると考えられる。

黒大豆種皮に多く含まれる C3G を主体とするアントシアニンに関して、その抗アレルギー作用についての情報は、国内は勿論、国外においても限定されている。また、既報の食品由来の抗アレルギー作用については、対象食品が茶や果物類に偏っていることに起因し、抽出した茶や生の食品そのものにおける作用成分の含有量とその効果に関する研究は存在するが、食品を調理・加工した際の抗アレルギー作用に関する情報は少ない。

既に、「黒大豆種皮エキス」に注目し、これまでラット好塩基球様白血病株化細胞(RBL-2H3)の抗原抗体反応により引き起こされる脱顆粒抑制効果を指標に、本エキスに抗アレルギー効果を認めている。さらに、その作用成分の一つがシアニジン-3-O-β-D-グルコシド(C3G)であることを特定するとともに、C3Gの他にも抗アレルギー作用に大きく寄与する成分Xの存在を認めている。

2. 研究の目的

I型アレルギーに対して抑制効果を発揮する物質を含む食品素材は、アレルギーの予防や患者の症状の緩和に役立つことが期待される。既に、「黒大豆種皮エキス」に注目し、ラット好塩基球様白血病株化細胞(RBL-2H3)を用い、抗原抗体反応により引き起こされる脱顆粒抑制効果を指標にして、本エキスに抗アレルギー作用を認めている。さらに、その作用成分の一つがC3Gであることを特定しているが、その他にも抗アレルギー作用に大きく寄与する成分Xが存在する。

そこで、本研究では、「黒大豆種皮エキス」の抗アレルギー作用の全体像を明らかにし、本エキスのアレルギー抑制に有効な食品素材としての活用を目指し、有効成分Xの同定を試みた。

次いで、作用成分の熱やpH安定性を検討したのち、黒大豆を日常摂取することを前提として黒大豆を調理し、調理操作に伴う作用成分の量的変動とそのアレルギー抑制効果への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗アレルギー成分の単離

黒大豆種皮エキスを Atlantis™ dC₁₈ (Waters) 逆相カラムを装備した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)において、分画・濃縮後、RBL-2H3細胞のアッセイにより抗アレルギー作用成分を追跡した。すなわち、IgE抗体として抗ジニトロフェニル抗体を、抗原にはジニトロフェニル-アルブミンを用いた抗原抗体反応において、黒大豆種皮エキス画分の共存下、脱顆粒反応により細胞より放出されるβ-hexosaminidaseを測定し、各画分の脱顆粒抑制効果を検討した。さらに、単離された成分について、酸加水分解後のHPLCパターンおよび質量分析から、有効成分を同定した。

(2) 抗アレルギー作用成分の熱・pH安定性

熱安定性の検討は、標準品のC3Gを50μg/mLに蒸留水にて希釈し、100°Cで加熱後、一定時間ごとに取り出し、HPLCにて定量した。なお、同時に、C3Gの分解産物であることが報告されているプロトカテキュ酸(PCA)も定量した。

pH安定性については、C3Gを0.05, 0.1, 0.25 mMの各濃度にて、pH 2.0, 7.0, 12において、室温にて12時間放置した後、HBSにて中性に調整し、RBL-2H3細胞による脱顆粒抑制効果を検討した。

(3) 抗アレルギー作用成分C3Gおよびその分解産物の脱顆粒抑制効果

C3Gを含有する黒大豆の調理後の脱顆粒抑制効果の解析の一環として、C3Gの加熱分解産物として報告されているPCAならびにフロログルシナルデヒド(PGA)の脱顆粒抑制効果について、各々の標準品を用いて検討した。なお、C3Gのアグリコンであるシアニジン(C)についても比較検討した。抑制効果はIC₅₀値として表した。

(4) 黒大豆種皮の抗アレルギー作用に及ぼす調理の影響

黒大豆を用いてガスコンロ上でフツ

素加工鍋と圧力鍋にて煮豆を作成し、加熱方法の違いに加えて、重曹ならびに鉄の存在が黒大豆の抗アレルギー効果ならびに作用物質に与える影響について検討した。煮豆は煮汁を煮含めた後、凍結乾燥し、グラインダーにて粉碎後、酸性エタノールにてアントシアニンを含む成分を抽出し、濃縮し、試料とした。使用時まで-30℃にて保存し、適宜希釈の後に各分析に用いた。

4. 研究成果

(1) 抗アレルギー成分の単離および同定

クロマニン-10 (素材機能研究所) を蒸留水に溶解後、逆相カラムにアプライし、0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配により成分を分離した (Fig. 1)。各ピークに含まれる成分について濃縮後、脱顆粒抑制効果を検討したところ、カラムに強く吸着したピーク 1 に高い抑制効果を確認した (Fig. 2)。最終的に、HPLC にて溶出条件を変更し、目的の有効成分を含むピークを単離した。有効成分は、酸加水分解後にシアニジンを生じたことよりプロシアニジンであることが示された (Fig. 3)。

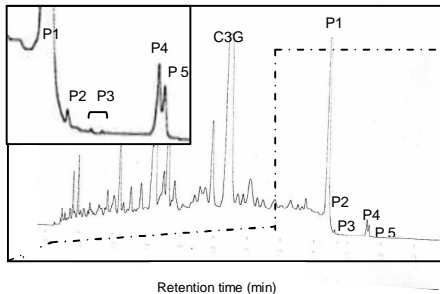


Fig. 1 HPLC profiles of Kuromanin with an Atlantis TMdC18 column.

Kuromanin was separated and fractionated. The partially enlarged profile was shown in the insert in the panel. Peaks 1-5 were collected (P1-5). Each fraction was concentrated and dissolved in HBS and used for β -hexosaminidase assay.

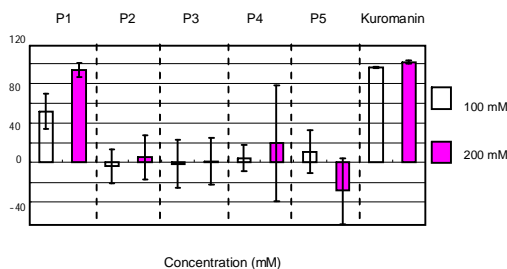


Fig. 2 β -hexosaminidase assay of the fractions obtained from Kuromanin separated by the Atlantis TMdC18 column.

The results are expressed as the percentages of β -hexosaminidase release in left side. Each value represents the mean \cdot SD (n=4).

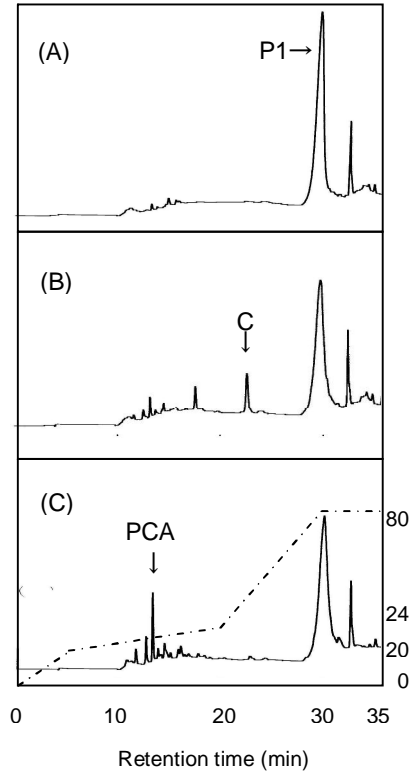


Fig. 3 HPLC profiles of hydrolyzed P1 with an Atlantis TMdC18 column.

P1 was hydrolyzed with HCl at 90°C and analyzed by HPLC. HPLC profiles of P1 hydrolyzed for 0h (A), 1 h (B), and 5 h (C) were shown. C and PCA express the peaks corresponding to cyanidin and protocatechuic acid respectively. Left and right scales express absorbance at 280 nm and concentration of acetonitrile (%) respectively.

(2) 抗アレルギー作用成分の熱・pH安定性

C3GのpH安定性については、はいずれの濃度においても、pH 2.0 および 7.0 において、12時間の加熱後も安定であった (Fig. 4)。一方、熱安定性については、100°Cにて30分間の加熱により、その大部分が分解して、PCAを生成し、熱に対して不安定であることが明らかになった (Fig. 5, 6)。なお、プロシアニジンについては、十分な量が単離できなかったことから検討に至らなかったが、予備実験的に、プロシアニジンの単離品は酸性下で分解されやすいことが示された。

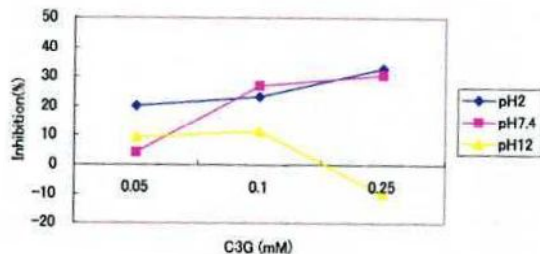


Fig. 4 Effect of pH on β -hexosaminidase release.

C3G adjusted to pH 2, 7.4, 12 was incubated for 12 h at room temperature and readjusted to pH 7.4 with HBS. These samples were used for β -hexosaminidase assay. The results are expressed as the percentages of β -hexosaminidase release.

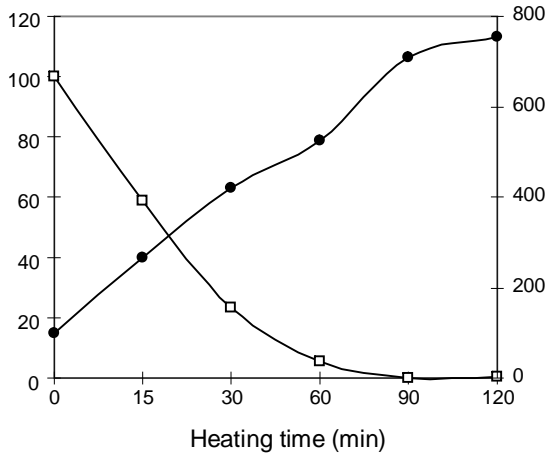


Fig. 5 Conversion of C3G to PCA during thermal treatment.

Authentic C3G dissolved in distilled water (50 μ g/mL) was heated at 100 $^{\circ}$ C for 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min. The contents of C3G and PCA are expressed as the percentages of those obtained at given times to that in non-treated sample. Opened square and closed circle express ratio of C3G and PCA respectively.

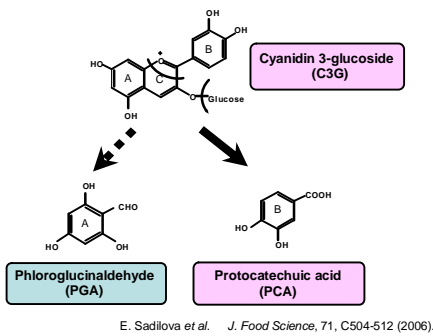


Fig. 6 Thermal degradative pathway of C3G.

(3) 抗アレルギー作用成分 C3G およびその分解産物の脱顆粒抑制効果

C3G は中性下における加熱やアルカリ性下において不安定であり、分解され易いことが示された。そこで、C3G の加熱分解産物の標準品を用いて、脱顆粒抑制効果を検討した。その結果、PCA は C3G と同等、PGA はより強い効果を示した (Table 1)。

Table 1 Effect of various compounds on β -hexosaminidase release.

Compound	IC ₅₀ value (mM)
Cyanidin-3-O- β -D-glucoside(C3G) (C3G)	1.050
Cyanidin (C)	0.079
Protocatechuic acid (PCA)	0.920
Phloroglucinaldehyde (PGA)	0.146
Protocatechuic acid and Phloroglucinaldehyde (PCA + PGA)	0.217

(4) 黒豆種皮の抗アレルギー作用に及ぼす調理の影響

調理済み黒大豆の RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制効果は、生豆と比較して低濃度で効果を発揮したことから、調理後にその抑制効果は高くなることが示された (Table 2)。テフロン加工鍋よりも圧力鍋でその効果は高かった。また、添加物の影響は、鉄釘および重曹のいずれの存在下でも抑制効果が高いことが示された。しかし、使用した鍋の種類によりその影響は異なることから、更に検討を要する。

一方、調理後の有効成分の存在量については、C3G はいずれの調理操作においてもその含有量が著しく低下することが明らかになった (Fig. 6)。一方、C3G の分解産物である PCA は、生大豆では未検出であったのに対し、全ての加熱により生成され、その生成量は C3G の残存量と負の相関し、PCA が C3G の分解産物であることを裏づける結果であった。しかし、C3G の減少量の全てを PCA の生成量で説明することはできず、PGA も未検出であった。

従って、調理後の黒大豆の脱顆粒抑制効果は、種皮由来の C3G の分解産物である PCA による効果の維持に加えて、胚乳に由来する他の成分の影響を考慮する必要性が示唆された。

Table 2 Effect of cooking and additives on β -hexosaminidase release in black soybean.

Cooking method	Additive	IC ₅₀ value (mg/mL)
Raw	-	5.968
Teflon-coated pan	-	4.833
	NaHCO ₃	2.643
	Iron nail	<5.0
	Iron nail + NaHCO ₃	4.754
Pressure cooker	-	3.742
	NaHCO ₃	4.023
	Iron nail	3.071
	Iron nail + NaHCO ₃	3.197

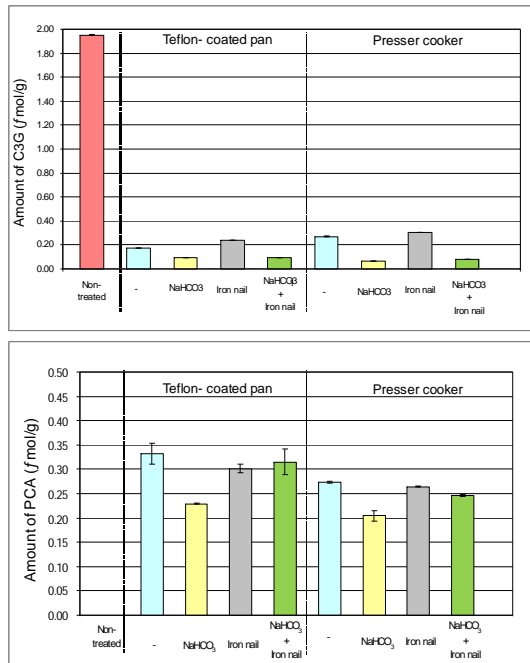


Fig. 6 Effect of various cooking on amounts of C3G and PCA in black soybean.

Black soybeans were cooked with a pan coated by teflon and a pressure cooker on gas top. The cooked black soybean were freeze-dried and ground. C3G and PCA were extracted with acidic ethanol from the dried powder. Amounts of the compounds were quantified by HPLC with reverse-phase C₁₈ column using each authentic. Results are expressed as the amounts of C3G and PCA. Each value represents the mean \pm SD (n=2).

以上の結果から、黒大豆は加熱調理において、主要な抗アレルギー成分の一つである C3G は分解されるが、その分解物の PCA が機能成分の一つとして抗アレルギー効果が維持されることが明らかになった。本研究は、黒大豆の抗アレルギー作用は、加熱後にも維持・増強され、その効果は生黒大豆に含まれる有効成分の調理による分解産物に起因すること、ならびに黒大豆を日常の食生活で摂取する形態においても、その抑制効果を利用できることを示すものである。

最近、C3G の生体内での代謝産物として、PCA が注目されており、中国のグループは、その *in vivo* による抗アレルギー効果を報告している。PCA が C3G の生体代謝産物であるか否かは未だ議論中であり、報告者は予備実験的に代謝産物ではないと考えている。よって、PCA の給源としては、天然の食品に存在するか、あるいは C3G の調理過程で生ずる分解産物として摂取する可能性が高いと考えている。いずれにしても、本研究の成果は食生活の実態に則した食品を摂取する形態での検討結果として、今後、国際学術雑誌への発表を行なう予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) M. Hiemori, E. Koh, A. Mitchell I. (2009) Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. japonica var. SBR). *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, 57(5), 1908-1914.

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 比江森美樹, Koh Eunmi, E. Mitchell Alyson, 鈴木麻希子、木本眞順美、山下広美、辻英明、カリフォルニア産黒米におけるアントシアニンの分析および炊飯によるアントシアニンへの影響、日本調理科学会平成 20 年度大会、平成 20 年 5 月 30 日、椛山女学園大学
- (2) 比江森美樹, Koh Eunmi, E. Mitchell Alyson, 鈴木麻希子、木本眞順美、山下広美、辻英明、カリフォルニア産黒米のアントシアニンの分析および炊飯におけるアントシアニンの挙動、第 13 回 日本フードファクター学会学術集会 JSOFF2008、平成 20 年 11 月 17 日、タワーホテル船堀
- (3) M. Hiemori, E. Koh, M., and A. E. Mitchell. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. japonica var. SBR). 5th International Workshop on Anthocyanins, 平成 21 年 9 月 15 日~18 日, Nagoya University
- (4) M. Hiemori, E. Koh, M. Suzuki, M. Kimoto, H. Yamashita, H. Tsuji, and A. E. Mitchell. Behavior of anthocyanins in California black rice (*Oryza sativa* L. Japonica var. SBR) during various cooking. 19th International Congress of Nutrition, 平成 21 年 10 月 4 日~9 日, Bangkok, Thailand
- (5) 比江森美樹、生野めぐみ、濃野仁美、鈴木麻希子、木本眞順美、山下広美、辻英明、アントシアニンおよびその分解産物の機能性について-抗酸化性及びアレルギー抑制効果-, 第 14 回 日本フードファクター学会学術集会 JSOFF2009, 平成 21 年 11 月 15 日~17 日, 神戸大学百年記念館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比江森 美樹 (HIEMORI MIKI)
岡山県立大学・保健福祉学部・助教
研究者番号： : 80326412