

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：33929

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500975

研究課題名(和文) 香酸カンキツ果汁のストレス緩和作用に関する研究

研究課題名(英文) Study of suppressive effect to stress of sour citrus juice

研究代表者

三宅 義明 (Miyake, Yoshiaki)

東海学園大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：20369581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：香酸カンキツ果汁のストレス緩和作用の追究にあたり、まず、地域特産の香酸カンキツに含有する機能性成分の特徴を調べた。新姫(三重県熊野地区特産)からフェルラ酸誘導体を、マイヤーレモンから4-ヒドロキシゲイ皮酸誘導体の新規抗酸化物質を見出した。各香酸カンキツの抗酸化活性は、ユーレカレモン、スタチ、新姫が高かった。エルゴメーターによる運動中にユーレカレモン果実粉末で調製されたレモン果実水を摂取した場合、運動後の休憩で自律神経の副交感神経活動が活発になることが見られ、ストレス緩和作用が示された。レモン果実に含まれるフラボノイド、香気成分が影響していると示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the study of suppressive effect to stress by intake of sour citrus juice, the characteristic of functional compounds in sour citrus fruits, indigenous products, was examined basally. Ferulic acid derivative, a new antioxidant, was isolated from nihime (indigenous product at Kumano in Mie prefecture). 4-Hydroxy cinnamic acid derivative, a new antioxidant, was identified from meyer lemon. Eureka lemon, sudachi, and nihime exhibited high antioxidative activity of sour citrus fruits. It was suggested that the intake of the lemon fruit water, prepared by the addition of eureka lemon fruit powder to water, during exercise using an exercise bike has a tendency to increase the parasympathetic nerve activity, after exercise rest and has suppressive effect of stress. Flavonoids and aroma constituents in lemon fruit were suggested to influence to the effect.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：カンキツ ストレス

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会となった我国では、国民の生活の質を向上するには国民の健康維持、健康増進が重要であり、健康に深く関わる食物が重要視されてきている。国内外において食品と健康に関する研究が進み、高血圧、肥満、動脈硬化などの生活習慣病の予防に働く食品の健康機能作用が分かってきた(Walker *et al.*, *J. Hum. Nutr. Diet*, 23, 344-352, 2010; 門脇, *食品と開発*, 45, 7-10, 2010)。生活習慣病の予防には、食事のバランスを健全にすることと、健康機能を持つ食品の積極的な摂取が勧められている(Sirtori *et al.*, *Nutr. Res. Rev.*, 22, 244-261, 2009; 須貝, *食品機能学への招待*, 三共出版, 1999)。

最近、疾病に関わる身体疲労や精神疲労のストレスを緩和する食品の健康機能に関する研究が注目されており(Singh *et al.*, *J. Math. Biol.*, 49, 20-34, 2004; 佐藤三佳子, *Food Style*21, 13, 35-37, 2009)、本研究ではストレス緩和に関わる果物に着目した。果物はビタミン、ミネラルが豊富で、食事バランスから毎日の摂取が勧められており、さらに、色素や香気等の特徴的な健康機能成分が知られている(Bermejo *et al.*, *Public Health Nutr.*, 10, 266-272, 2007; 田中, *果実日本*, 54, 18-21, 1999)。最近の研究では、温州みかんに含まれる γ -クリプトキサンチンに骨粗しょう症、糖尿病予防効果が報告され(Wang *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 164, 576-585, 2006; 向井ら, *Food style*21, 11, 35-37, 2007)、これは国産温州みかんの消費啓蒙活動に活用されている。

レモンなどの香酸カンキツ果実に含まれるフラボノイド、クエン酸、香気成分は、健康機能の効果が期待されている(三宅, *バイオサイエンスとインダストリー*, 64, 20-22, 2006)。香酸カンキツ果実は、ミカン、マンダリン類と比較すると嗜好性の改善による品種改良が少ないため、野生型、近原種が多く、特有な機能性成分の存在が期待できる。また、国内では地域特産品として生産されており、地域の食文化に影響を与えている。地域特産品の消費啓蒙に繋がり、地方経済に貢献できると考えた。このような背景から、香酸カンキツ果実のストレス緩和作用を調べ、また、有効な果実飲料を作成し、その有効性を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究「香酸カンキツ果汁のストレス緩和作用に関する研究」は、レモン、ユズ、スダチなど、酸度や香り立ちが高い香酸カンキツ果実に着目し、果汁摂取によるストレス緩和作用の健康効果を明らかにする。香酸カンキツは、飲料、食品、調味料として広く利用されており、他の果物と比較すると果汁、果皮に含まれる色、酸味、香気成分に特徴がある。近原種が各地域に残存している果実で、多くの健康機能性成分を含有している。そこで、

各種疾病の要因となるストレスに対して香酸カンキツ果汁の摂取による緩和作用を評価し、また、同果汁に含まれる健康機能成分の特徴を明らかにし、ストレス緩和作用と健康機能を有する果汁飲料の作製、評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3.1. 実験材料

ユーレカレモン(愛媛産)、マイヤーレモン(三重県熊野産)、小笠原・島レモン(東京都小笠原産)、ユズ(和歌山産)、スダチ(徳島産)、カボス(大分産)、シークワサー(沖縄産)、ユウコウ(長崎産)、ゲンコウ(佐賀産)を入手した。熟度(未熟、成熟)の異なる各果実を各構造部位(フラベド、アルベド、ジョウノウ膜、砂じょう、種)に分別し、凍結乾燥し、その後粉砕して粉末試料を調製した。また、各カンキツの果汁は果実を手搾りして調製した。

3.2. 抗酸化成分の単離と活性測定

果実試料をメタノールにて抽出し、逆相樹脂を用いたクロマトグラフィー、高速クロマトグラフィー(HPLC)にて物質を単離した。単離物質の同定は、既知報告の物質についてはHPLCにて標準物質との溶出時間の一致から行った。この方法では同定できない物質は、核磁気共鳴分析($^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$)、質量(MS)分析等により同定した。単離物質の抗酸化活性は、酸素ラジカル吸収能(ORAC)(Wu *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4026-4037, 2004)、2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル捕捉能から測定した(Miyake *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1911-1919, 2007)。

3.4. 香酸カンキツの成分定量と抗酸化活性

各果実の粉末試料はアセトン・水・酢酸溶液(AWA 溶液)を用いて抽出した。果汁と抽出液は固相抽出処理にてフェノール性物質を含む疎水性画分を調製した。同画分に含まれるフラボノイド、フェニルプロパノイド、クマリンはHPLCにて定量した。香酸カンキツの抽出液の抗酸化活性はORACまたはDPPHラジカル捕捉能により測定した。

3.3. ストレス負荷実験の測定条件の検討

ストレス負荷実験の測定条件を検討するため、クレペリン計算による作業負荷、階段昇降やエルゴメーターによる運動負荷を検討した。ストレス度の測定として、唾液中クロモグラニンA量の変動、気分プロフィール検査(POMS)、心拍変動(時間領域計測、周波数領域計測)の測定を検討した。

3.5. 運動負荷時のレモン飲料摂取によるストレス測定

6名の健康な男性被験者(平均年齢21.5歳)は、エルゴメーターを用いて20分間、110~120 bpmの心拍数で運動負荷をした。運動強度は、心拍数と運動強度換算(カルボネン法)により運動強度56~61%、主観的運動強度(RPE)が「12: やや楽」の中程度の運動

強度であった。被験者は運動中にレモン飲料を摂取したい時に自ら自由に経口摂取し、運動終了時に飲料の全量を完全に飲み終えた。レモン飲料は、レモン水、レモン果実水、はちみつレモン水、はちみつレモン果実水の4種類で各500gを作製した。レモン水とレモン果実水は、水にレモン果汁(40g)と果実粉末(1g)をそれぞれ添加した。また、各はちみつ飲料は、上記飲料レシピにはちみつ(4g)を添加した。運動前、運動直後、運動後の30分間休憩時に、指尖心拍変動を計測し、心拍変動の時間領域計測から心拍標準偏差(SDNN)と身体ストレス指標(PSI)を解析し、心拍変動の周波数領域計測から、総自律神経活動(TP)、交感神経指標(LF/HF)、副交感神経指標(HF)を解析し、自律神経活動動態を調べた。

実験内容は東海学園大学研究倫理委員会にて承認を得て、実験対象者にインフォームドコンセントを得た後に実験を実施した。

4. 研究成果

4.1. 香酸カンキツから新規抗酸化物質の単離

マイヤーレモンから新規抗酸化物質の4-ヒドロキシケイ皮酸誘導体(Meyerin)を単離同定できた。この研究結果を学会発表(下記学会発表3)し、論文投稿して受理された(下記雑誌論文2)。また、食品製造の業界誌にも紹介した(下記雑誌論文5)。Meyerinは、マイヤーレモンに比較的多く含有し、果皮部分に多く存在していた。また、新姫果実から新規抗酸化成分のフェルラ酸誘導体を単離同定できた。同物質は、高い抗酸化活性を有し、果皮、果汁に存在していた。この研究結果を論文投稿にした(*Food Science Technology Research*へ投稿中)。

4.2. 香酸カンキツの機能性成分の定量と抗酸化活性

各香酸カンキツに含まれる機能性成分として、フラボノイド、フェニルフラボノイド、クマリンの分布と含有の特徴を調べた。各香酸カンキツ果実にはフラボノイドのヘスペリジンが広く分布し、比較的高含有であった。各果汁にはフェニルプロパノイドのフェルラ酸モノグルコシドが広く存在していた。

マイヤーレモンは、白血病細胞HL-60の分化誘導活性の報告(Tang *et al.*, *Cancer Sci.*, 98, 471-177, 2007)がある5,7-ジメトキシクマリンが果皮のフラベドに特徴的に多く含有していた。この研究結果は、学会発表し(下記学会発表1)論文投稿して受理された(下記雑誌論文1)。また、食品製造の業界誌にも紹介した(下記雑誌論文5)。

これまでに機能性成分の研究報告がない小笠原・島レモンについては、未熟果実、成熟果実の分析からマイヤーレモンと類似したフラボノイド、フェニルプロパノイド、クマリンの組成であり、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用の報告(Kang *et al.*, *J. Nat.*

Prod., 64(5), 683-685, 2001)がある7-メトキシ-5-プレニロキシクマリンが果皮のフラベドに特徴的に多く含有していた。この研究結果は学会発表(下記学会発表2)し、論文投稿して受理された(下記雑誌論文3)。また、食品製造の業界誌にも紹介した(下記雑誌論文5)。

各香酸カンキツの抗酸化活性は、レモン、スダチ、新姫が高く、抗酸化活性を有するフラボノイド、フェニルフラボノイドの含有量と相関があった。この研究結果は学会発表した(下記学会発表3)。

4.3. ストレス測定条件の検討

香酸カンキツ果汁のストレス緩和作用を追究するため、ヒトへのストレス負荷の適性条件とストレス度測定の方法を検討した。実験結果の再現性を検討し、エルゴメーターによる運動負荷を行い、心拍変動測定から身体ストレスの変動、自律神経活動の変動を解析する方法が本研究の実験に適していると判断した。香酸カンキツは、抗酸化性が高活性であることからユレカレモンを実験材料に選定した。そして、実験被験者はエルゴメーターによる運動負荷中に各種レモン飲料を摂取した。運動前、運動直後、運動後の休憩時に指尖心拍変動の測定により身体ストレスや自律神経活動の動態を解析し、レモン飲料摂取による運動負荷ストレスへの緩和作用を調べた。

4.3. 運動負荷時のレモン果汁摂取によるストレス測定

心拍変動の時間領域計測により、レモン果実水、レモン果実はちみつ水の摂取は、休憩後の心拍標準偏差(SDNN)の上昇、身体ストレス指標(PSI)の低下傾向が示された。また、心拍変動の周波数領域計測により、レモン果実水の摂取で、休憩後の総自律神経活動(TP)、副交感神経指標(HF)の上昇傾向がみられた。このような結果から、運動中のレモン果実水の摂取は、運動後の休憩時に身体ストレスを低下し、副交感神経活動の向上といったリラックス効果、ストレス緩和作用が得られることが示唆された。この研究結果は学会発表(下記学会発表4)し、論文投稿して受理された(下記雑誌論文4)。フラボノイドのヘスペリジンには副交感神経活動の亢進作用の報告(Takumi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 707-715, 2010)があり、レモン果実に含まれるヘスペリジンが同効果に影響を与えていることが示唆された。また、カンキツ香気成分は自律神経活動への影響が知られており(石川ら, *Aroma Res.*, 3, 126-130, 2002)、これらも影響が示唆された。

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5件)

1. マイヤーレモンに含まれるフラボノイド、クマリンの特徴, 三宅義明, 井藤千裕, 糸魚川政孝, *日本食品科学工学会誌*, 58(4), 178-181, 2011.
2. A novel trans-4-hydroxycinnamic acid derivative from Meyer lemon (*Citrus meyeri*). Miyake Y, Ito C, Itoigawa M. *Food Chemistry*, 135, 2235-2237, 2012.
3. 小笠原・島レモンに含まれるフラボノイド, フェニルプロパノイド, クマリン類の特徴, 三宅義明, 井藤千裕, 糸魚川政孝, *日本食品科学工学会誌*, 60(1), 38-42, 2013.
4. 運動中のレモン飲料摂取が自律神経活動動態に及ぼす影響, 三宅義明, *日本食生活学会誌*, 24(3), 149-153, 2013.
5. 果実・果汁飲料と機能性成分(9)レモンの効能と機能性, 三宅義明, *食品と容器*, 54(8), p466-471, 2013.

〔学会発表〕(計4件)

1. マイヤーレモンに含まれる機能性成分の特徴, 三宅義明, 井藤千裕, 糸魚川政孝, *日本食品科学工学会*(第58回大会, 仙台, 2011年9月10日)
2. 小笠原・島レモン(菊池レモン)に含まれるフラボノイド、クマリン、フェニルプロパノイドの特徴, 三宅義明, 井藤千裕, 糸魚川政孝, 近藤 健, 窪田理美, *日本食品科学工学会*(第59回大会, 札幌, 2012年8月30日)
3. 国産香酸カンキツ果実に含まれるフェノール性物質の特徴, 三宅義明, 平野義晃, 井藤千裕, 糸魚川政孝, *日本栄養・食糧学会*(第67回大会, 名古屋, 2013年5月26日)
4. 運動中のレモン飲料摂取が自律神経活動動態に及ぼす効果, 三宅義明, 小野木壮志, 奈良村武志, 三浦峻宏, *日本食生活学会*(第46回大会, 千葉, 2013年6月1日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕(計0件)

6. 研究組織

研究代表者

三宅 義明 (代表)

研究者番号: 20369581