

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350096

研究課題名(和文)迅速解析法による野菜の抗アレルギー活性成分の特定とその調理への影響

研究課題名(英文) rapid screening of anti-allergic substances in vegetables and fruits and evaluation of it during cooking process

研究代表者

田村 啓敏 (Tamura, Hirotoishi)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：00188442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果は次の4点である。1)迅速な機能成分の単離法として、QuEChERS法を開発できた。2)サツマイモでは、鳴門金時芋が強い活性を示し、玉ねぎでは、香川産のものが高い活性を示し、活性物質はquercetin 4'-glucosideであると明らかにした。タイ産のサツマイモの活性は弱かった。3)抽出物の活性試験結果と各成分の濃度との相関をPearson's correlation coefficientにより計算し、高い相関値から機能成分の選抜ができた。4)調理過程で抗アレルギー活性が変化しない、あるいは煮沸により活性が高まるということがわかり、調理が機能増進に役立つことが分かった。

研究成果の概要(英文)：For rapid screening of anti-allergic substances from edible plants, QuEChERS method for extraction and Pearson's correlation coefficient for selection of important target compounds were newly developed. Using these kinds of new techniques, sweet potatoes, Naruto kintoki, and onions were found to have great activities. Quercetin 4'-glucoside was responsible for anti-allergy of onions. During cooking of onions and sweet potatoes, Anti-allergy activity did not decrease. Moreover, in some cases, activity was increased during the processing and boiling. These results indicate the importance of cooking process in our daily life and also useful evidence for reduction of chemical drugs and keeping of our healthy life.

研究分野：食品機能化学

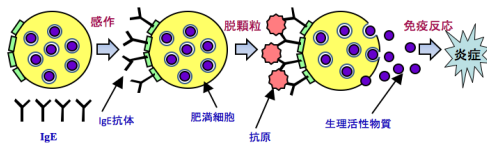
キーワード：抗アレルギー活性 QuEChERS サツマイモ 玉ねぎ 調理効果

1. 研究開始当初の背景

アレルギー症状で一般的な花粉症については、東京都が平成 23 年 1 月に発行した「東京都の花粉情報 平成 23 年版 花粉症一口メモ」に都内の花粉症患者数を調査したデータがある。これによると、平成 18 年度に都内の 3 地区で花粉症の実態調査を行っており、都内の推定有病率は 28.2% であり、約 3.5 人に 1 人がスギ花粉症であると推定されている（島しょ地域を除く）。過去の調査結果は、昭和 58 年度から昭和 62 年度までの調査で 10.0%、平成 8 年度の調査では 19.4% であったことから、スギ花粉症の患者数が増加していることが示されている。

アレルギー反応は、感作、脱顆粒、免疫反応の 3 つの段階からなる。アレルギー症状を予防上の観点から抑制するために、上述の感作と脱顆粒の段階を阻害することが重要である。抗炎症作用の期待できるオリーブをターゲットにこれまでに残渣（ポメス）中の脱顆粒抑制物質、すなわち抗アレルギー活性物質をラット由来の RBL2H3 細胞を用いて、探索し、有効成分を明らかにしてきた。また、各種果実、野菜からの抗アレルギー物質の報告は多数あるが、海外の野菜類との比較などから、日本でのアレルギー増加の原因究明のための系統的な検討がされていない。今回、タイと日本の野菜・果物成分に注目し、葉菜、茎菜、根菜や果物から高い抗アレルギー作用を有する品種、抗アレルギー有効物質の特定、成分含量の国際比較を行い、日本におけるアレルギー増加要因の一部を科学的に解明する。

I 型アレルギー発生機構



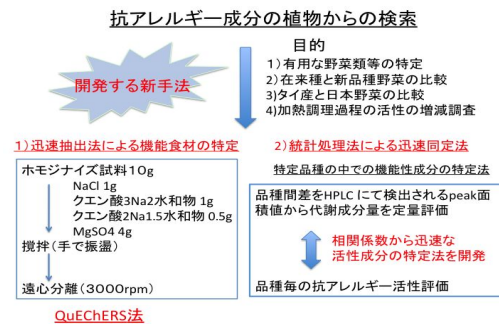
2. 研究の目的

抗炎症作用の期待できるオリーブをターゲットにこれまでに残渣（ポメス）中の脱顆粒抑制物質、すなわち抗アレルギー活性物質をラット由来の RBL2H3 細胞を用いて、探索し、セコイリドイド型の有効成分を明らかにしてきた。また野菜類の予備実験からお茶、野菜には抗アレルギー活性が高いものが多いことが知られている。しかし、食事からの腸管吸収を考えるとさらに有効な成分の探索が必要であり、そのため多数の野菜を分析する迅速解析法の確立も必要である。3 年間の研

究期間中にタイと日本の主要な食材（野菜と果物）50 種について RBL2H3 細胞の脱顆粒抑制を化学メディエーターであるヒスタミンやヘキサミンダーゼの放出量から、以下の 4 点を明らかにする。1) 有効な栽培品種を特定する。2) 野菜の新品種や在来品種の活性比較する。3) 簡易抽出法として QuEChERS 法の有用性を検証し、多数の品種分析を可能とする方法を確立する。4) 同一品種内での機能物質の検索には、HPLC で多数検出されるピークの面積と活性の活性相関係数から迅速な重要ピークの特定制法の確立を行う。

3. 研究の方法

簡易抽出法である QuEChERS 法と HPLC の検出ピーク的面積値と抗アレルギー活性の相関係数から微量な抗アレルギー活性成分を迅速且つ的確に同定する手法の開発を行う。次に、タイと日本の合計 50 種の野菜の抗アレルギー活性結果と特定野菜の品種内の活性の相違点を明らかにし、食習慣と食文化の違いとアレルギー患者数の違いに相関があるかどうか分析化学的手法により調査する。最後に加熱調理過程で、有効成分の増減を調べ、調理と抗アレルギーの関係に示唆を与えるデータを得る。



4. 研究成果

本研究は、日本のアレルギー疾患を患う人の数が、増加傾向にあり、医薬品の副作用の問題や医療費の削減の国民的な課題があるため、食を通じた抗アレルギー剤の開発を目的とするものである。特に、東南アジアではまだ少ない花粉症、食物アレルギーがなぜ日本など先進国、並びに都市部に多いのかについて諸説があるが、その科学的立証が求められている。今回は、東南アジアと日本の野菜類等について抗ヒスタミン活性や化学メディエーターの脱顆粒抑制作用に違いがあるのではないかと仮説に基づいて、有効成分の探索を行った。また、それら食材の調理中の有効成分の増減を明らかにした。

本実験の特徴は、多数の食材を対象とし、効率よく食品の活性成分の探索を行う必要がある。一方で、溶剤による食材から抽出を得る抽出条件の検討や含有される無数の成分の内、どの成分が有効成分であるのかを決定するには、従来の手法では、網羅的な成分の構造解析が必要と成る。よって目的の達成には、多大な時間を要する。そこで、今回は、迅速な食品成分の抽出法の確立、システマティックな機能成分の特定法の確立、調理過程との関係を明らかにすることを目的にした。

まず、抽出法の確立には、農薬分析に使われる QuEChERS 法を試みた。この方法は、性質の異なる農薬成分を簡便に網羅的に抽出できる手法の一つであり、今回の研究により、いち早く申請者が食品分野に応用し、食品成分、特に抗アレルギー活性成分の単離に有効であることを明らかにできた。よって大きな成果の一つと考えている。また、簡便に抽出物を単離した後、活性成分の特定のため、ラット RBL 2H3 細胞を使ったヒスタミン及び関連物質の RBL 2H3 細胞からの放出抑制値と抽出物中の各成分の存在量との相関係数から、相関係数の高い物質を抗アレルギー活性物質の候補物質とする考えに基づき、活性成分の特定、あるいは推定する手法を確立した。また、実際に、本手法に基づき数種の食材について、具体的な活性成分の同定、構造解析を行った。野菜や果物中のフラボノイド類には、I 型アレルギーを抑制する成分があることやお茶のカテキンなどフラボノイドには抗酸化作用があることはよく知られ、フラボノイドの化学構造と抗アレルギー活性や抗酸化活性との関連性に興味を持たれた。そこで、研究の最初の段階では、さまざまなフラボノイド類の RBL2H3 細胞の脱顆粒抑制作用を調べた。フラボノール一種であるイソラムネチンには強い脱顆粒抑制効果 (IC_{50} : $3.1 \mu\text{mol/L}$) があり、フラボノイドアグリコンであるルテオリンおよびケルセチンも同様に高い脱顆粒抑制活性を示した。脱顆粒抑制作用に共通する化学構造上の必要条件はフラボノイドの母核 C 環の C₂ 及び C₃ 位置の間に二重結合が存在すること、グルコースなどの配糖体が無いか少ないことが高活性には必須であることがわかった。一方、TBA 値から算出した抗酸化活性は、フラボノイドの B 環上の芳香族オルトジオールや 1,2-メトキシヒドロキシ構造は効果的であり、その他の部位での配糖体の存在は、抗酸化活性に影響しないことが明らかになった。従って、抗アレルギー活性および抗酸化

活性に必要なフラボノイドの部分構造は、両者で異なり、両活性への最適な物質を探索することは、新規食品開発には有益であると考えられた。

次に、約 80 種類の食材から QuEChERS 法により、活性の強い食材を探索したところ、サツマイモに高い活性があった。特に、鳴門金時果皮部分（周皮）の抗アレルギー成分が高かった。活性成分の探索のため、鳴門金時果皮部分 QuEChERS 抽出物を液液分配に供し、分配溶媒の極性の違いによって成分を分画した。水—ジクロロメタン、水—ブタノールで分配後、サツマイモに含まれる抗アレルギー活性試験と各分配された画分毎に、HPLC クロマトグラフ分析を行い、抽出物の各成分の含有量を定量的に分析した。抗アレルギー活性値と抽出物の各成分の含有量の間で、Pearson Correlation Coefficient 解析を行い、RT24.907min と 29.947min のピーク高い正の相関を得ることが出来た。また、RT16.6min と 19.28min のピークの相関係数は低かった。以上より、これらの 4 成分が鳴門金時果皮部分の主活性成分であると仮定した。

RT16.6min=ピーク 1、19.28min=ピーク 2、16.6min=ピーク 3、19.28min=ピーク 4 としてこれらの成分を分取 HPLC で単離した。これらの成分の活性値を IC_{50} 値で比較したところ、ピーク 3 ($IC_{50}=0.8 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$) > ピーク 4 ($IC_{50}=1.91 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$) > ピーク 1 ($IC_{50}=2.58 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) > ピーク 2 ($IC_{50}=12.13 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$) の順となることがわかった。ピーク 1、2 が酸加水分解によってピーク 3、ピーク 4 に変化したこと、各ピークの UV 吸収スペクトルより、ピーク 1、2 はフラボノール及びピーク 3、4 の配糖体であり、ピーク 3、4 はフラボノールの配糖体であることが推察された。

タイ産の芋類について、抗アレルギー活性試験を行ったところ、これらの 4 成分の総含有量と 10 サンプル果皮部分の QuEChERS 抽出物 $400 \mu\text{g/mL}$ における活性値の関係は、鳴門金時の場合、総含有量と活性値は比例して両方高かったが、PHEUAK HOM と MAN-THET と MAN-TET に活性が見られたものの、弱く、タイのアレルギーの罹患率が低いことと、食材の一つである芋類の抗アレルギー活性では、説明ができないため、今後は、広く一般に食用される食材を精査し、総合的なフラボノイド摂取量として比較する必要がある

ことがわかった。一方で、鳴門金時の周皮抽出物の活性は高温加熱しても、煮沸しても低減することなく、むしろ若干活性が高まることが見られ、調理処理過程が機能発現に影響を与えることが明確になった。

次に、香辛料、野菜、果実の中から、高い抗アレルギー活性を有する植物を探索したところ、ミント系植物には高い活性があることが分かった。そこで、オーデコロンミント葉から 5,6,4'-トリヒドロキシ-7,8-dimethoxyflavone (M6)、5,6,4'-トリヒドロキシ-7,8,3'-trimethoxyflavone (M7)、5,6-ジヒドロキシ-7,3'-4'-trimethoxyflavone (M8)、5,6-ジヒドロキシ-7,8,3'-4'-tetramethoxyflavone (M9) 及び 5,6-ジヒドロキシ-7,8,4'-trimethoxyflavone (M10) などメトキシ置換基を多く有するフラボン類を単離した。RBL-2H3 細胞に対する化合物 M6-M10 の IC_{50} 値はそれぞれ 6.7、2.4、5.6、3.0、および $6.1 \square \square M$ であった。特に、化合物 M7 と M9 は、これまで文献で報告されたフラボノイドより高い抗アレルギー活性 (IC_{50} $2.4 \square M$ および $3.0 \square M$) を示し、最も効果的なフラボノイドであることが明らかになった。今後、キャンディーなどとして活用すると、十分に薬理作用が期待される程度であることが判明した。

次に小豆島オリーブ残渣に着目し、小豆島で栽培される主要な品種であるミッション、ルッカ、およびマンザニロなど 4 種のオリーブの抗アレルギー活性成分を探索したところ、オリーブボメスの主要成分である 3,4-DHPEA-EA に強い抗アレルギー活性 (IC_{50} : $33.5 \pm 0.6 \mu g/mL$) があることが明らかになった。この活性値は、フラボノイド以外では非常に高い効果と考えられた。3,4-DHPEA-EA は、secoiridoid の一種で、加水分解によりヒドロキシチロソールとエレノール酸に分解し、抗アレルギー活性は弱くなることから、両者のエステル化は、抗アレルギー活性に必須要件であることが判明した。10 月に採取したミッション品種の緑のオリーブの搾りかすには $5033 \pm 118 mg/kg$ の 3,4-DHPEA-EA が存在し、ミッション品種は最も効果的な抗アレルギー特性をもつ品種であることが明らかになった。小豆島のオリーブオイル製造業者には、10 月期のオリーブオイルが中東などの富裕層に高額な価格で取引されるので、そのようなオリーブオイルにはさらに機能性の面で高付加価値があることが判明した。

最後に、毎日の食事の摂取量の多い、

タマネギに着目し、11 種のタマネギ (8 品種、地元の市場から 3 種類) の QuEChERS 抽出物の抗アレルギー活性を検討したところ、抗アレルギー活性には、 $IC_{50}=20.8$ から $310.1 \mu g/mL$ のばらつきが品種ごとにあり、抗アレルギー活性の観点から有用な品種があることが明らかになった。有効物質の探索には 11 種の QuEChERS 抽出物の HPLC クロマトグラムに現れた 34 のピーク面積と粗抽出物の抗アレルギー活性との相関係数から、quercetin 4'-glucoside (A22) に高い相関性 ($r=0.91$) が確認できた。さつき種のタマネギから quercetin 4'-glucoside (A22) を分離したところ、抗アレルギー活性 IC_{50} は $3.0 \pm 0.2 \mu g/mL$ となり、相関係数から予測したピーク成分に高い活性が確認できた。タマネギの高抗アレルギー活性物質はケルセチン 4'-グルコシドであり、配糖体である。配糖体でありながら、アグリコンに匹敵する高い抗アレルギー活性が見られたのは初めてであり、配糖体は体内吸収率も高いとの報告もあり、玉ねぎの利用面からも興味を持たれた。

フラボノイドの抗アレルギー活性に必要な化学構造上の特性を解明し、食品の素材から QuEChERS 法により簡便に抽出物を単離し、活性値と存在量の相関係数により、抗アレルギー活性物質を特定、あるいは推定する手法を確立した。また、オリーブの未利用資源や玉ねぎやミントの特定品種から高抗アレルギー物質の単離に成功し、明らかになった物質をリード化合物とする新薬や健康補助食品の開発につながる糸口ができた。

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 6 件)

- 1) Fengxian ZHU, Zhongming XU, Ronghua YANG, Lina YONEKURA, Hirotohi TAMURA. Antiallergic activity of rosmarinic acid esters is modulated by hydrophobicity, and bulkiness of alkyl side chain. *Biochemistry, Biotechnology and Biosciences*, 79 (7), 1178-1182 (2015).
- 2) Akihiko Sato and Hirotohi Tamura. High Antiallergic Activity of 5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-trimethoxyflavone and 5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone from Eau de Cologne Mint (*Mentha × piperita citrata*). *Fitoterapia*, **102**, 74-83 (2015).
- 3) Akihiko Sato, Ting Zhang, Lina Yonekura,

Hirotooshi Tamura. Antiallergic activity of quercetin 4'-glucoside in eleven onions (*Allium cepa*) quickly determined using QuEChERS method and Pearson's correlation coefficient. *J. Functional Foods*, **14**, 581-589 (2015).

- 4) Fengxian Zhu, Takayuki Asada, Akihiko Sato, Yoriko Koi, Hisashi Nishiwaki, and Hirotooshi Tamura, Rosmarinic Acid Extract for Antioxidant, Antiallergic and α -Glucosidase Inhibitory Activities, Isolated by Supramolecular Technique and Solvent Extraction from *Perilla* Leaves, *J. Agric. Food Chem.*, **62**(4), 885-892 (2014).
- 5) Akihiko Sato, Noboru Shinozaki and Hirotooshi Tamura Secoiridoid Type of Antiallergic Substances in the Pomace, Wasting Materials in Three Varieties of Japanese Olive (*Olea europaea*), *J. Agric. Food Chem.*, **62**(31), 7787-7795 (2014).
- 6) Akihiko Sato, Vipra Surojanametakul, Ting Zhang, Sayuri Tanaka, Shiori Okabe, Lina Yonekura, Toshiya Masuda, Warunee Varayanond and Hirotooshi Tamura. Antiallergic activity of various kinds of vegetables and fruits in Japan and Thailand. *Journal of Science and Technology (Vietnam Academy of Science and Technology)*, **52** (5B), 726-735 (2014).

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 朱 鳳仙, 徐 忠明, 西脇 寿, 高野 隼人, 米倉 リナ, 楊 榮華, 田村 啓敏,
ロズマリン酸ヘキシル化体の α -グルコシダーゼ阻害活性と抗菌活性に関する研究、日本食品科学工学会 2015 年度大会講演集、8 月、京都 (2015) p156
- 2) 朱 鳳仙、田村 啓敏, Rosmarinic acid and its cinnamic acid analogues contributing to a glucosidase and α -amylase inhibitory activities. 日本食品科学工学会 2014 年度大会講演集、8 月、博多 (2014) p149
- 3) Akihiko Sato, Vipra Surojanametakul, Ting Zhang, Sayuri Tanaka, Shiori Okabe, Lina Yonekura, Toshiya Masuda, Warunee Varayanond and Hirotooshi Tamura. Antiallergic activity of various kinds of vegetables and fruits in Japan and

Thailand. 2014 International symposium on Natural products R & D (ISNP2014), November 14-15, Da Lat, Vietnam, (2014).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田村 啓敏 (TAMURA Hirotooshi)
香川大学・大学院農学研究科・教授)

研究者番号 : 00188442