

平成18年度シーズ発掘試験研究報告書

報告日：平成19年3月22日

課題名：雑穀由来抗高血圧症食品素材の開発と応用

研究期間：平成18年8月18日～平成19年2月28日

1. 担当コーディネータ

氏名(役職)	清水 義治 (産学官連携コーディネータ)	印
所属機関名	国立大学法人信州大学 産学官連携推進本部	
連絡先	所在地	〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村 8304
	TEL/FAX	0265-77-1647/0265-77-1315
	E-mail	Ikuko_Fukuzawa@su-oasis.jm.shinshu-u.ac.jp

2. 代表研究者 (代表研究者のみ記入してください。)

氏名(役職)	中村 宗一郎 (農学部教授)	印
所属機関名	信州大学農学部	
連絡先	所在地	〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村 8304
	TEL/FAX	0265-77-1609/0265-77-1609
	E-mail	snakamu@shinshu-u.ac.jp

3. 共同研究者 (受託研究契約を締結した共同研究機関の場合のみ記入してください。)

氏名(役職)		
所属機関名		
連絡先	所在地	
	TEL/FAX	
	E-mail	

5. 試験研究の結果報告

(1) 試験内容

① 燕麦グロブリン由来 ACE 阻害活性ペプチドの調製

燕麦からできるだけ化学試薬を用いない方法で、食品グレードの安全な“ACE 阻害活性ペプチド含有試料”を調製することを試みた。すなわち、図1に示すように、まず、エタノール沈殿とアミラーゼ処理とを組み合わせることによって、燕麦粉末から、グロブリンタンパク質を高濃度に含む画分を分離し、次に、それをペプシンで処理し、遠心分離して得られた上清液を凍結乾燥することによって、簡単かつ迅速にペプチド含有試料を調製することを試みた。

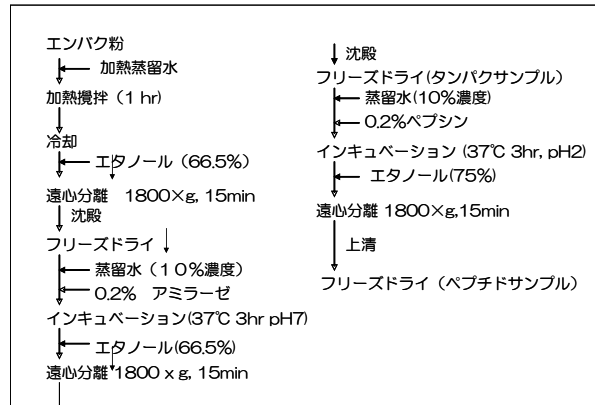


図1 ペプチド含有試料の調製法

② 動物実験による抗高血圧効果の確認

調製されたペプチド試料の動物実験による抗高血圧効果については、高血圧発症ラットを用いて調べた。すなわち、7週齢の雄ラット (SHR/NCr1Cr1j, 日本チャールスリバー(株)) を入手し、1週間馴化後に実験を開始した。22±3°C, 湿度 60±15%, 換気回数 12~15 回/時間および照明 12 時間 (7~19 時) /日に設定した飼育室において、1匹/1 ケージ (ステンレス製ケージ) で飼育した。飼料には、MF (オリエンタル酵母工業株式会社製) を、飲料水には水道水を用いてステンレス製給餌器及び給水瓶にて自由摂取させた。生理的食塩水を用いて 50mg/mL の供試液を要事調製し、毎朝 1 回、体重 1 kg あたり 0.3g の投与量になるように、ラット用経口胃ゾンデを用いて強制経口投与した。ペプチド試料のかわりに生理的食塩水を投与したものを対照区とした。血圧測定には、非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A, 株ソフトロン) を用い、1 週間に一度、ペプチド試料投与直後と 6 時間後に心拍数及び血圧 (収縮期, 拡張期, 平均) を測定した。1 回の測定に際しては、1 匹の動物で連続 5 回測定し、経時的な収縮期血圧, 平均血圧, 拡張期血圧, 心拍数の変化を追跡した。投与実験は 5 週間行い、最終日にはペプチド試料投与直後及びそれ以降 3 時間間隔で 3 回の合計 4 回の血圧測定を実施した。

③ 食品衛生学的安全性試験及び官能評価

供試試料の食品衛生学的な安全性を評価するために、微生物を用いた変異原性試験とマウスを用いた動物実験を行った。変異原性試験としては、エイムズテスト及びレックアッセイを行った。エイムズテストは、プレインキュベーション法によって行った。すなわち、1% 検液 0.1 mL, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5 mL, 及び塩基対置換型突然変異株 *Salmonella typhimurium* TA 100 (hisG46) あるいはフレームシフト型突然変異株 *S. typhimurium* TA 98 (his D3052) の一夜培養液 0.1 mL を順次滅菌試験管に加え、37°C で 20 分間振盪した後、これにトップアガー 2 mL を加え混合後、最少グルコース寒天培地 (Vogel-Bonner/ブドウ糖寒天培地) 平板上に一様に広げ固化させ、37°C で 48 時間培養し、復帰突然変異によって出現したコロニー数をカウントすることによって行った。出現したコロニー数が、陰性対象区と比較して 2 倍以下の場合に陰性と判定した。陽性対

象区には 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide(AF-2)を用いた。レックアッセイには、*Bacillus subtilis* H17 株 (Rec+) 及び *B. subtilis* M45 株 (Rec-) を用いた。一夜培養した供試菌液を白金耳を用いてトリプトン酵母エキス寒天平板上に中央で交わるように画線し、交点に滅菌ろ紙を乗せ、試験液を 10-30 μ L 注入し、風乾後、37°C で 24 時間培養した。発育阻止帯の長さを測定し、H17 株と M45 株の発育阻止帯の長さの差が 1.5mm 以上あれば、陽性と判定した。標準変異原性物質には AF-2 を用いた。動物実験は、OECD 化学物質毒性試験指針(1981)に準拠し、10 週齢の ICR 系 (Cr1j:CD1) 雄マウスを用いて単回投与による急性毒性試験を行った。1 週間馴化後、投与前には 4 時間絶食させ、体重 kg あたり 5 g の試料をマウス用胃ゾンデによって強制単回投与 (n=6) し、投与後、3 日間引き続き飼育し、3 日後に体重変化及び活動状況を観察することによって行った。対照区には生理的食塩水を用いた。

また、食品素材として用いるためには味が重要であることから、7 名からなるパネルリスト〔男 4 名 (平均年齢 22 歳)、女 3 名 (平均年齢 23 歳)〕による官能検査を行った。純水を用いてペプチド試料の 1 % 水溶液を調製し、その甘味、塩味、苦味、酸味及び旨みについての評価を試みた。

④乳・乳製品プロトタイプ作成

ペプチド試料を乳及び乳製品へ添加した際の色調、味、食感の変化に関する官能検査を行った。すなわち、市販の牛乳 (乳脂肪分 3.5% 以上、乳固形分 8.3% 以上、130°C 2 秒間殺菌乳) 及びプレーンヨーグルト (乳脂肪分 3.0%、乳固形分 9.5%、はっ酵乳) を購入し、1 % 濃度になるようにペプチド試料を添加し、よく混合したものを用いて、7 名からなるパネルリスト〔男 4 名 (平均年齢 22 歳)、女 3 名 (平均年齢 23 歳)〕による官能検査を行った。対照区には、ペプチド試料未添加のものを用い、両者間の評価結果に有意差があるか否かについて調べた。

⑤高血圧症のボランティアによる予備的な実験

高血圧症ボランティアによる予備試験は、ブリティッシュコロンビア大学 (カナダ) の Dr. Shuryo Nakai (アメリカ化学会賞受賞者、世界のトップ 100 高頻度引用文献研究者) に依頼して実施した。

(2) 得られた成果

①研究データ、試作物、論文/発表、特許等の成果について

種々の食品タンパク質の一次配列のアライメントを実施した結果、燕麦タンパク質には ACE 阻害活性を示すとされているペプチド配列が多く含まれていることが明らかにされた。そこで本研究では、まず、燕麦由来ペプチドサンプルを大量に調製する方法の検討を行った。その結果、図 2 に示すように、調製処理を進めるに従って、収率は著しく減少するものの含有ペプチド濃度は有意に上昇した。最終試料中には 29.78% (窒素係数 5.62) のペプチドが含有されていることが示された。この方法をスケールアップして実施したところ、1 kg の燕麦粉から 24.75 g の供試ペプチドを調製することができた。

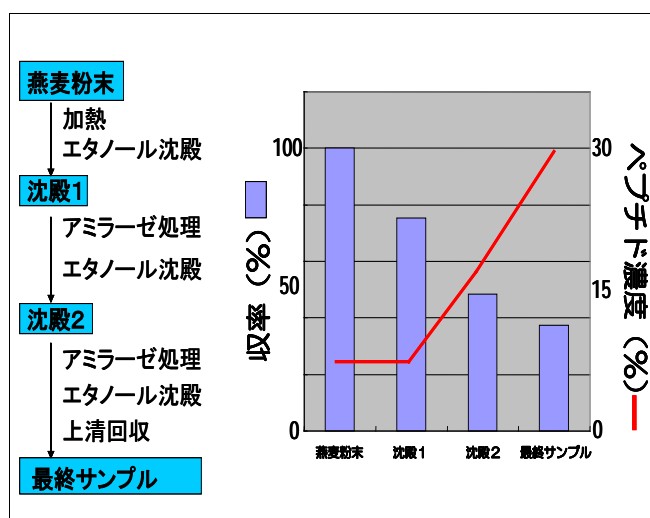


図 2 供試ペプチドの収率

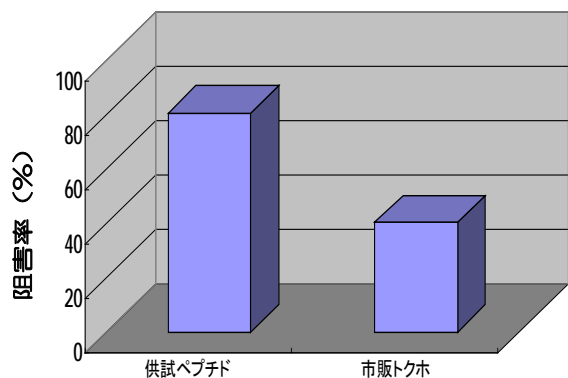


図3 in vitroでのACE阻害活性

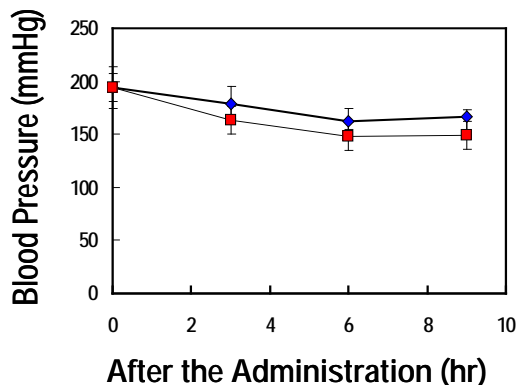


図4 SHRラットに対する投与効果
投与後の最高血圧の経時的変化を示す。◆, 対象区 (n=6); ■, 供試ペプチド区 (n=6)

図3に供試ペプチド及び市販の特定保健用飲料のACE阻害活性の測定結果を示す。両者のペプチド濃度はほぼ同一に揃えてあり、供試ペプチドは、市販の特定保健用飲料に比べてほぼ2倍のACE阻害活性を示すことが明らかにされた。そこで、動物を用いたin vivo効果についての実験を行うことにした。その結果、図4に示すように、体重1kgあたり0.3gの供試ペプチドを毎朝、5週間強制投与することを経た高血圧自然発症性の雄ラット (SHR/NCr1Cr1j) は、5週間目において、対象区に比べ、有意 ($p < 0.05$) に血圧を下げる事が明らかにされた。エイムズ法、レックアッセイ、マウスに対する急性毒性試験のいずれにおいても供試ペプチドの食品衛生学的な安全性が確認された。また、7名のパネラリストによる官能試験を実施した。供試ペプチドの1%水溶液の甘味、塩味、苦味、酸味及び旨みについて2点嗜好評価法 (二項検定) により調べたところ、純水との間に有意な差 ($p < 0.05$) は認められなかった。そこで、ペプチド試料を用いた乳・乳製品プロトタイプ作成の可能性について検討した。すなわち、市販の牛乳及びプレーンヨーグルトに1%濃度になるように供試ペプチドを添加し、7名のパネラリストによる評価を試みたところ、供試ペプチド添加のものと無添加のものとの間には、色調、味、食感において有意差 ($p < 0.05$) がないことが示された (以上の成果は、平成19年3月24日~27日に東京で開催される日本農芸化学会において発表する予定である)。また、平行して、ブリティッシュコロンビア大学医学部の2名の医師の指導の元に、80歳男性高血圧症患者 (体重67kg) に対しての効果が試された。燕麦グロブリンタンパク質を5g経口摂取し、投与後3時間の血圧を測定した結果、通常180-200mmgの最高血圧が132-136mmgとなり、燕麦グロブリンタンパク質に有意に ($p < 0.05$) 血圧を低下させる効果があることが認められた。

②当初掲げた目標 (値) との比較, 達成状況について

当初予定では高血圧症患者のボランティアを募り、乳・乳製品プロトタイプの人における実際の効果について調べる予定であった。しかし、時間的余裕がなく、商品モデルの作成及びそれらを用いたヒト実験を実施できなかった。今後、前述した実験結果を整理し、このような実験を実施できる環境を整えたい。

③得られた研究成果から、実用化の見通しについて

動物実験、食品衛生学的安全性試験、及び乳・乳製品へ添加した際の官能試験では、当初目的に掲げていたような良い結果を得ることができた。今後は、これらの結果にヒトを対象とした実験結果を加えることができれば、今回大量調製に成功することのできた“ACE阻害活性ペプチド”を“雑穀由来抗高血圧症食品素材”として利用することの可能性は高いと考えられる。

(3) 今後の展開

① 本結果を受けて平成19年度内に実施予定の活動について

本研究成果を受けて、日穀製粉株式会社（本社：長野市南千歳1丁目16番地2）が燕麦由来のACE阻害活性ペプチドを乳及び乳製品に添加した商品プロトタイプの試作を請け負ってくれることになっており、平成19年度にはヒトを対象にした実験を含めて同社との共同研究を開始する予定である。

② 今後の実用化に向けた長期的な展望について

燕麦からできるだけ化学試薬を用いない方法で、食品グレードの安全な“ACE阻害活性ペプチド含有試料”を簡単かつ迅速に調製することを試みた。その結果、1kgの燕麦粉から約25gの活性ペプチドを含むペプチド試料を調製することに成功した。燕麦は、kgあたりの単価は数百円と安価であることから、地域特産の雑穀の高度有効利用、高付加価値化を齎し、地域イノベーション創出に繋がるものと期待される。また本研究では、まず動物実験の結果、食品衛生的安全性の結果、パネリストによる官能検査の結果については、予測したとおりの良い結果が得られたので、今後はこれにヒトを対象にした実験結果を含めることができれば、新しい機能性食品素材として実用化の見通しは明るいものと考えられる。

(4) 知的財産権について

① 試験の結果得られた知的財産権について

今後、日穀製粉株式会社（本社：長野市南千歳1丁目16番地2）との共同研究を推進し、活性ペプチド調製法など得られた研究成果については、国立大学法人信州大学と共同で発明出願できればと考えている。

② 今後の知財権確保について

燕麦から活性ペプチドを高度に含有する画分をきるだけ化学試薬を用いない方法で簡単迅速に調製する方法についてのノウハウが、本研究の知的財産権確保の上で重要であると考えられる。今後は、得られた活性ペプチドの利用範囲を乳・乳製品からその他の飲料や加工食品へと広げるものの可能性についても検討し、知的財産権の確保をはかりたい。

(5) 今後のフォローアップ等について（コーディネータ記載）

本研究は、申請者らが開発したコンピュータプログラムを用いて、種々の食品タンパク質から有力なACE阻害活性ペプチド配列を有するものをスクリーニングするところから出発しており、得られた研究成果の新規性は高い。今後、ヒトを対象にした実際の血圧降下効果について調べたデータが追加されれば、抗高血圧症食品素材として実用化される可能性は高いものと判断される。従って、今後、ヒトを対象にした研究が可及的速やかに実施されるよう、学内に設置されている“ヒトを対象とした研究に関する倫理委員会”でコンセンサスがえられるような環境整備をフォローアップし、また、長野県内企業（日穀製粉株式会社）との共同でこのペプチド試料を含む商品プロトタイプの開発がすすむようフォローアップしたい。