

# 亜熱帯生物資源から血圧上昇抑制作用を有する機能性素材の選択

鎌田靖弘、照屋 亮、市場俊雄、蓋盛直哉<sup>1</sup>、世嘉良宏斗<sup>1</sup>、上地若菜<sup>1</sup>

本研究では、地域新生コンソーシアム事業の研究共同体が有する高度な要素技術を総合化して、沖縄で今後発展が見込まれる健康食品素材および医薬品素材を提供することを目標とする。今年度はまず、降圧作用、すなわち高血圧症患者が最も多く利用している薬の薬理作用であるアンジオテンシン変換酵素阻害活性（以下ACE阻害活性と称する）を有する素材情報を基に、共同研究体である（株）沖縄発酵化学と製品化を見据えた生物資源の選択を行った。その結果、資源量が確保でき、且つ経済性に富み、市場性に合致した素材として、パッションフルーツの果皮を選択した。更に、パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質は、分子量5,000以下の親水性物質で且つ亜鉛をキレート化する物質であることが分かった。

## 1 はじめに

本研究は平成15年度地域新生コンソーシアム事業「ゲノム機能解析による沖縄生物資源からの創薬シーズ開発」というテーマで、図1のような研究体制と役割の下、研究を行った。

厚生労働省発表の「平成14年患者調査の概況」によると、高血圧性疾患の総患者数（継続的な治療を受けていると推測される患者数）は698万5,000人である。また同省の「平成13年度国民医療費の概況」によると、高血圧性疾患の医療費は1兆8,758億円で、平成12年度に比べて1.2%も増加している。更に60歳以上の約60%（2人に1人以上）が、高血圧症あるいは境界域の高血圧にあり、生活習慣病による死亡者の約36%は、血圧が高いことに起因していると報告されている<sup>1)</sup>。このようなデータから推測すると、高血圧症に悩む日本人は約4,000万人にのぼ

ると考えられており、高血圧症の病態改善機能およびその予防機能を有する食品素材の市場および対象消費者の規模はとてつもなく巨大なものである。

そのような背景の下、本事業は新規医薬、健康食品開発を図る事を目的とし、DNAチップを用い、沖縄県産有用生物資源抽出物、各種治療薬や生理活性物質の各種ヒト細胞に及ぼす作用を遺伝子発現レベルで解析し、高血圧症治療のための創薬シーズの探索を行うことである。そこで本研究では、当センターが保有する素材の機能性情報<sup>2-10)</sup> および（株）沖縄発酵化学が提案する素材から、降圧作用、すなわち高血圧症患者が最も多く利用している薬の薬理作用であるACE阻害活性を有する素材情報を基に、共同研究体である（株）沖縄発酵化学と共同で、製品化を見据えた生物資源の選択を行った。

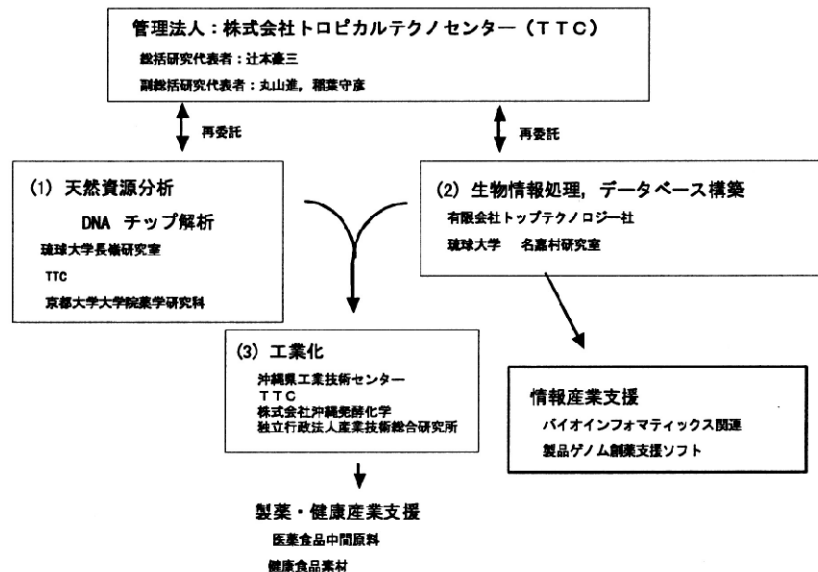


図1 本研究開発における研究体制と役割

1 株式会社沖縄発酵化学

## 2 実験方法

### 2-1 素材の選択方法

まず、当センターが保有する沖縄天然資源および(株)沖縄発酵化学が提案する素材から、降圧作用の可能性のある生物資源を選択する。その際の選択基準は以下に述べる4つの視点で行った。

- ①高血圧症患者が最も多く服用している薬の作用点であるACE阻害活性を有すること。
- ②経済性に優れた素材であること。
- ③資源量として確保できること。
- ④市場性に合致した素材であること。

### 2-2 素材の選定

共同研究体である(株)沖縄発酵化学からは、パッションフルーツ果汁およびその絞り粕(以下果皮と称す)、ヤエヤマアオキ(ノニ)茎部および葉部、ヒラミレモン果汁、コヘンルウダ葉部、製品A、製品Bの8素材を、センターからは、保有している精製物54種類(フラボノイド43種、カフェ酸エステル7種、タンニン2種、その他フェノール2種)および保有している生物資源296素材の中から、伝統食材や安全性も考慮し、候補素材としてリュウキュウヨモギ、ニシヨモギ、パパイヤおよびヘチマの4素材を選択し、実験に供した。

### 2-3 素材の調製

素材であるパッションフルーツは、果汁、種子および果皮に分離した後、凍結乾燥を行った。その他の生素材は65℃、12時間の温風乾燥を行った。抽出溶媒は水、50%及び100%エタノール溶液とし、振とう抽出を行った。すなわち、乾燥重量で1.0gの試料を10~20mlの溶媒量とともに混合し、振とう機を用い、振とう数;290回 $\text{min}^{-1}$ 、抽出時間;2時間で振とう抽出を行った。各々得られた抽出液は最終的に0.45 $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過し、実験に用いた。

### 2-4 精製物のサンプル調製

1mg/mlの濃度で100%ジメチルスルフォキシド(以下DMSOと称す)溶液にて保存している精製物を、ACE阻害活性に影響しない10%DMSO濃度に希釈し、最終的に0.45 $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過したものを、サンプルとし実験に供した。

### 2-5 ACE阻害活性試験

#### 2-5-1 HPLCを用いる方法

HPLCを用いたACE阻害活性の測定方法は、既報<sup>2,11)</sup>に準じて測定した。すなわち基質として、ヒプリル-L-

ヒスチジル-L-ロイシンを用い608mM塩化ナトリウムを含むホウ酸緩衝液(pH8.3、50mMホウ酸ナトリウム-200mMホウ酸)に基質濃度が7.6mMとなるように溶解した。ACE(SIGMA社製)はウサギ胚由来のものを用い、上記ホウ酸緩衝液に60 $\times 10^3\text{U/ml}$ となるように溶解した。ACE阻害活性は、ACE溶液とサンプルを混合し5分間ブレインキュベートした後、基質を添加し30分間反応させ、遊離した馬尿酸量を以下のようなHPLCシステムで測定した。ACE阻害率(%)は、以下のような計算式で求めた。

$$\text{ACE阻害活性}(\%) = 100 - \frac{\text{被検液を添加した場合の馬尿酸生成量}}{\text{コントロールにおける馬尿酸生成量}} \times 100$$

#### HPLC測定条件

システム: SCL-6B(島津社製)、  
 カラム:  $\mu$ -Bondasphere C8(WATERS社製) 内径4.6mm、全長150mm、  
 移動相: A液0.1%TFA、B液アセトニトリル、B液1.0% $\rightarrow$ 63%(20分)直線勾配、  
 流速: 1ml/min、注入量: 50 $\mu\text{l}$ 、検出器: SPD-6AV(島津社製) 検出波長: 228nm

#### 2-5-2 吸光度計を用いる方法

HPLCを用いる方法の欠点として、反応生成物である馬尿酸をHPLCで定量分析するため、1検体あたり45分も要し、結果を見ながら判断するACE阻害活性成分の分離・精製には、律速となった。

また、県内企業のニーズとして、高額な分析機器が不要な、活性測定方法が求められていた。そこで、吸光度計で測定する山本ら<sup>12)</sup>や斎藤ら<sup>13)</sup>の方法に準拠して測定しようとした。しかしながら、その方法では合成基質と反応生成物である馬尿酸が混入して分析されるため、活性成分の分離精製を行っていくためには、基質の混入をできるだけ避けた抽出方法が必要となった。また、ACE等の試薬類の経費も考慮して、できるだけスケールダウンさせた方法の確立が必要となった。

そこで、HPLC法で得られるデータを比較対照として、吸光度計を用いた方法の確立を行った。すなわち、図2のように、まずHPLCを用いる方法での酵素反応系を1/2にスケールダウンさせた。次に反応停止液として0.5NHClを500 $\mu\text{l}$ 加え、反応生成物を抽出するために、酢酸エチルとヘキサンの割合を9:1にした混合溶媒を1,200 $\mu\text{l}$ 加えた。その後、有機溶媒層を遠心減圧乾燥(35℃、60min)にて乾固させ、蒸留水1,000 $\mu\text{l}$ にて再溶解した後、吸光度計を用いて吸収波長228nmで測定した。

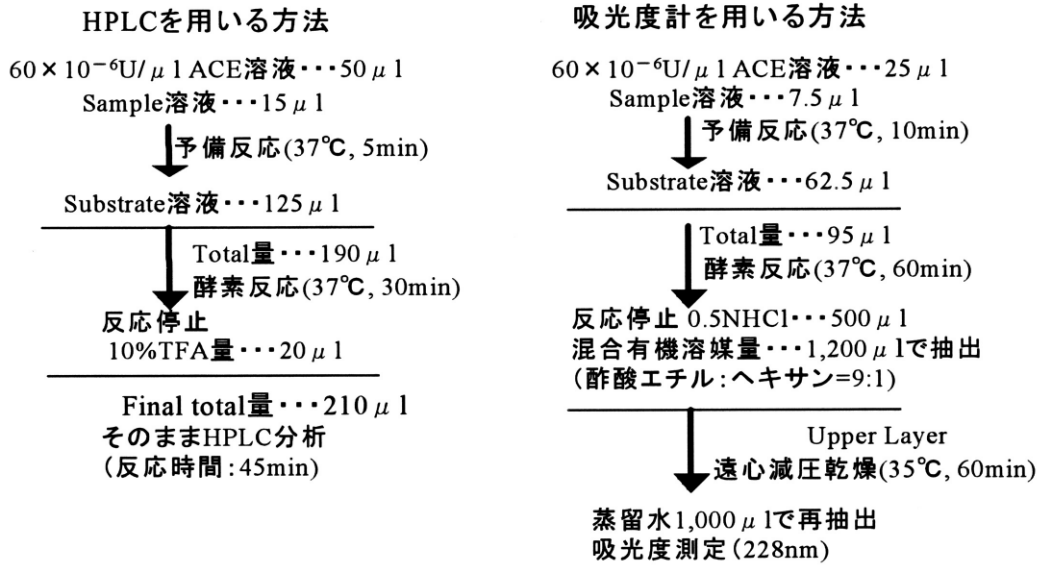


図2 吸光度計を用いた場合のACE阻害活性試験

## 2-6 ポリフェノールの定量試験

ポリフェノール量はフォーリン・デニス法<sup>14)</sup>によって定量し、カテキンを標準物質として検量線を作成し、カテキン量換算値で算出した。

## 2-7 パッションフルーツ果皮からのACE阻害物質の抽出条件の検討および大量調製

パッションフルーツ果皮中に含有するACE阻害物質を効率よく抽出する条件(温度および時間)検討を行った。すなわち、パッションフルーツ果皮1.0gに対し水20mlを添加し、温度は室温および100°C、時間は1時間および3時間でACE阻害活性とポリフェノール量を測定した。また、分子量分画として、分子量(以下M.W.と称す)5,000の限外濾過膜(Millipore社製)を用いて分画を行った。また、その結果を基に、大量調製法を確立した。

## 2-8 クエン酸の定量分析

パッションフルーツ果皮中のクエン酸含量は以下のように測定した。

### イオンクロマトグラフィー分析条件

システム: DX-120 (ダイオネクス社製)、カラム: Ion Pack ICE-AS1 (ダイオネクス社製)、  
 溶離液: 2.0mmol/lオクタンスルホン酸、流速: 0.5ml/min  
 サプレッサー: AMMS-ICE-II (再生液5.0mmol TBAO-H)、検出器: 電気伝導度検出器

## 2-9 塩化亜鉛添加した場合のACE阻害活性試験

パッションフルーツ果皮抽出物の部分精製された画分10 μlに、1, 5, 10, 20, 30及び40 μMの塩化亜鉛を各々40 μl添加し、37°C、10分間予備反応した後、塩化亜鉛含有サンプルとした。その後は2-5-2の吸光度を用いる方法でACE阻害活性試験を行った。

## 3 結果と考察

### 3-1 候補素材中のACE阻害活性

(株)沖縄発酵化学からの8素材のACE阻害活性試験の結果を図3に示す。その結果、いずれの素材でもACE阻害活性は認められたが、最も高い阻害率を示したのがパッションフルーツ果皮であり、ポジティブコントロールである26nMのカプトプリル以上の阻害活性を示した。

そこで、活性の比較的強かったパッションフルーツ果皮および果汁、ヤエヤマアオキ(ノニ)茎部および葉部、コヘンルウダ葉部を用いて、各溶媒(水、50%及び100%エタノール溶液)による抽出を行い、ACE阻害活性を比較した。その結果、図4に示すように、パッションフルーツ果皮の水抽出物中のACE阻害活性が最も高い値を示した。

次に、当センターの候補素材の水および50%エタノール抽出液中のACE阻害活性を図5に示す。その結果、いずれの素材にもACE阻害活性は認められたが、パイア水抽出液が最も強い阻害活性を示した。

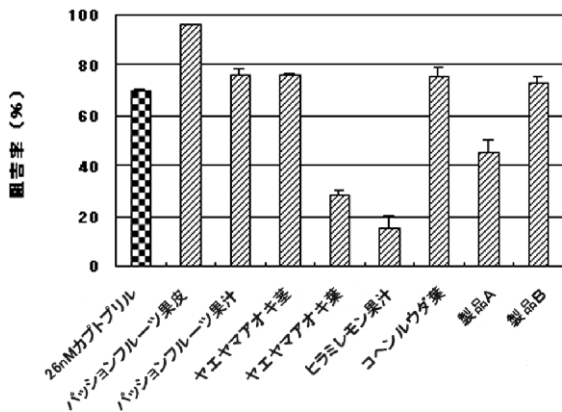


図3 (株) 沖縄発酵化学からの供与サンプル水抽出液中のACE阻害活性

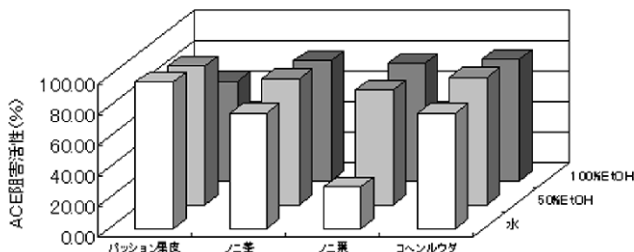


図4 (株) 沖縄発酵化学からの供与サンプルにおける各溶媒抽出液中のACE阻害活性

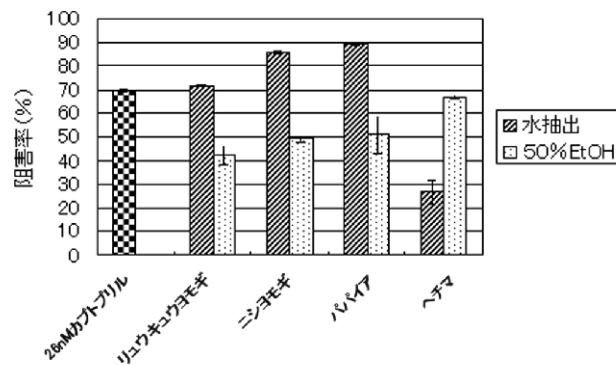


図5 候補サンプルにおける水および50%エタノール抽出液中のACE阻害活性

### 3-2 素材の選択

3-1の結果から、高血圧症患者が最も多く利用している薬の薬理作用であるACE阻害活性を有し、経済性に富んだ素材であり、資源量として確保でき、市場性に合致した素材を当センターと(株)沖縄発酵化学で検討した結果、パッションフルーツの果皮を第一候補素材として選択した。パッションフルーツは和名がクダモノトケ

イトウ、学名が*Passiflora edulis*であり、ブラジル南部原産である<sup>15)</sup>。現在、沖縄でも本島南部を中心に栽培されており、果実は生食として用いられる他、果実を搾汁して得られる果汁はジュースやフルーツワインの原料として工業的にも利用されている。しかしパッションフルーツ果実は多肉質であり、得られる果汁は全果実重量の約50%と歩留まりが低く、残りの絞り粕(果皮)は廃棄物として処理されている。(株)沖縄発酵化学においてもパッションフルーツ果皮の有効利用を検討しており、今回の試験結果から、今後、製品化可能性に最も有望と考えられた。

### 3-3 精製物のACE阻害活性

当センターが保有している精製物54種類(フラボノイド43種、カフェ酸エステル7種、タンニン2種、その他フェノール2種)についてACE阻害活性試験を行った。その結果、データは示さないが、対照(10%DMSO)に対して、統計的に有意( $p < 0.05$ )に阻害活性があった化合物は、ケブラグ酸とケンフェロール- $\beta$ -グルコシドであった。しかし、これら化合物のACE阻害率はいずれも20%弱であり、強い阻害活性を持つ物質ではなかった。

以上の結果からACE阻害活性を強力に有する化合物は、1mg/ml in 100%DMSO溶液をイオン交換水で10倍希釈した場合には確認できなかった。その理由としては、用いたACE阻害活性の評価系が本来、水溶性成分を主に測定する系であること、10倍希釈した際に、成分が沈殿したのもあり、正確に精製物濃度に対応する活性値として測定されなかったのも原因であると考えられた。今後は溶媒の種類や溶質濃度を検討する必要がある。

### 3-4 パッションフルーツ果皮の抽出条件の検討

パッションフルーツ果皮からACE阻害物質を抽出するための条件検討を行った。この場合、溶媒はすべて水であり、溶媒と素材の関係は1g/20mlで行った。その結果、データは示さないが抽出温度は常温でも100℃でも、また抽出時間は1時間でも3時間でもACE阻害活性に差は認められず、いずれも阻害率約82%であった。更に、パッションフルーツ果皮抽出物の限外濾過による分子量分画を行った結果、M.W.5,000以下の画分にACE阻害活性が確認された。以上の事から、パッションフルーツ果皮中に含有するACE阻害物質の抽出条件としては、温度は常温、時間は1時間でも効率よく抽出されることが分かった。一方、ポリフェノール濃度は図6に示すように、常温よりも100℃の方が、また1時間抽出よりも3時間抽出の方が濃度が増加した。この事から、ACE阻害物質がポリフェノール以外の成分であると推察された。

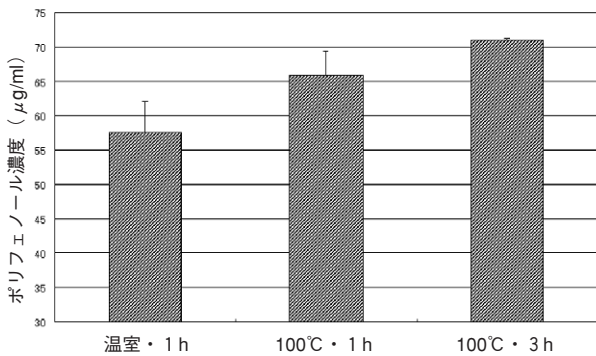


図6 水抽出条件とポリフェノール濃度の関係

### 3-5 パッションフルーツ果皮抽出物の大量調製

大量調製の手順を図7に示す。3-4に示したように、パッションフルーツ果皮から大量調製を行う条件として、

常温、1時間でもACE阻害物質は抽出されることが分かった。しかしながら、製品化を考慮した大量調製では微生物制御の面等から、温度70°C、2.5時間の抽出条件が適していると考えられた。またその際、水抽出液は、粘性の高い多糖類と推測される物質が多く含まれていたため、100%エタノールを同量加えて、不純物を沈殿除去した後、珪藻土濾過を行った。次に限外濾過を行うにあたり、試験研究レベルではM.W.5,000の分画を行ったが、処理時間をかなり要するため、製品化を考慮してM.W.10,000で限外濾過を行った。濾液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固を行った。その結果、750gのパッションフルーツ果皮凍結乾燥物から107.7gの粘性の強い限外濾過後の濃縮物を得た。そこで回収率は約14.3%、精製率は6.34倍となった。またこの濃縮物中のACE阻害活性におけるIC<sub>50</sub>を求めた結果、750 µg/mlであった。

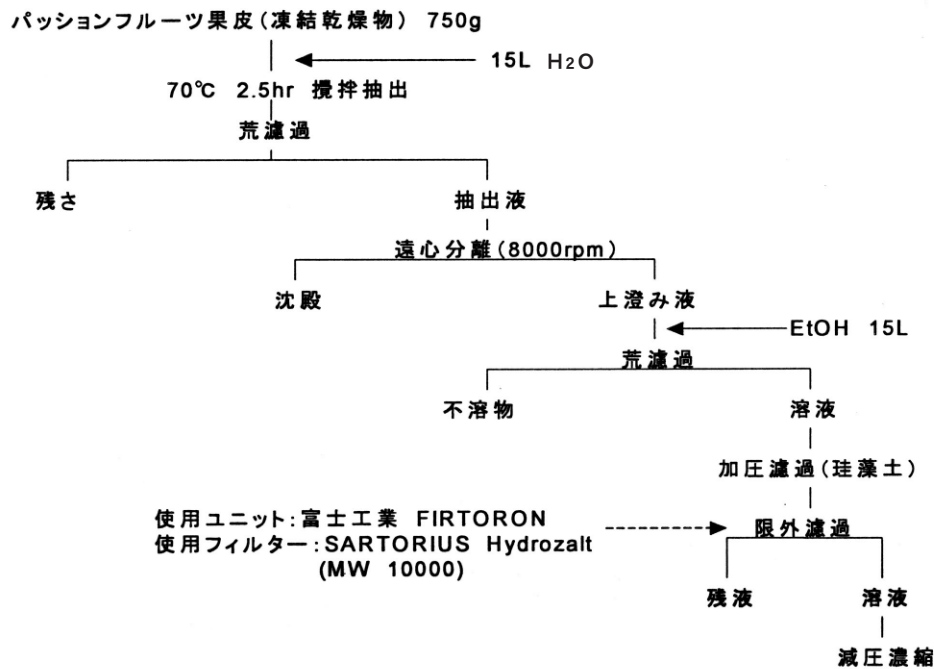


図7 パッションフルーツ果皮抽出物の大量調製法

### 3-6 パッションフルーツ果皮抽出物中のクエン酸濃度

近年、クエン酸が健康によいと注目されていることから、パッションフルーツ果皮抽出物(限外濾過後の減圧濃縮物)中のクエン酸含量を測定した。その結果、その含有量は73.4 µg/mlであった。そこで、クエン酸溶液のACE阻害活性のIC<sub>50</sub>を求めたところ、750 µg/mlであった。このことから、パッションフルーツ果皮中のクエン酸はACE阻害活性に影響していないことが示唆された。

### 3-7 吸光度計を用いる方法でのACE阻害活性試験

HPLCを用いた方法と、今回定めた抽出条件での吸光

度計を用いる方法において、評価法の精度を調べるために、ポジティブコントロールであるカプトプリルのACE阻害率に対する用量反応曲線とACE阻害活性のIC<sub>50</sub>を求めた。その結果を図8に示す。吸光度計を用いた方法では、基質の影響が若干生じるため、ブランクとして酵素反応しない場合の吸光度値を差し引いた。その結果、基質の影響を差し引いた場合の吸光度法では、HPLCを用いた方法とほぼ同じカプトプリルのACE阻害率に対する用量反応曲線となり、IC<sub>50</sub>は同一の4 µMとなった。そこで、次からの実験では、吸光度計を用いる方法でACE阻害活性試験を行った。

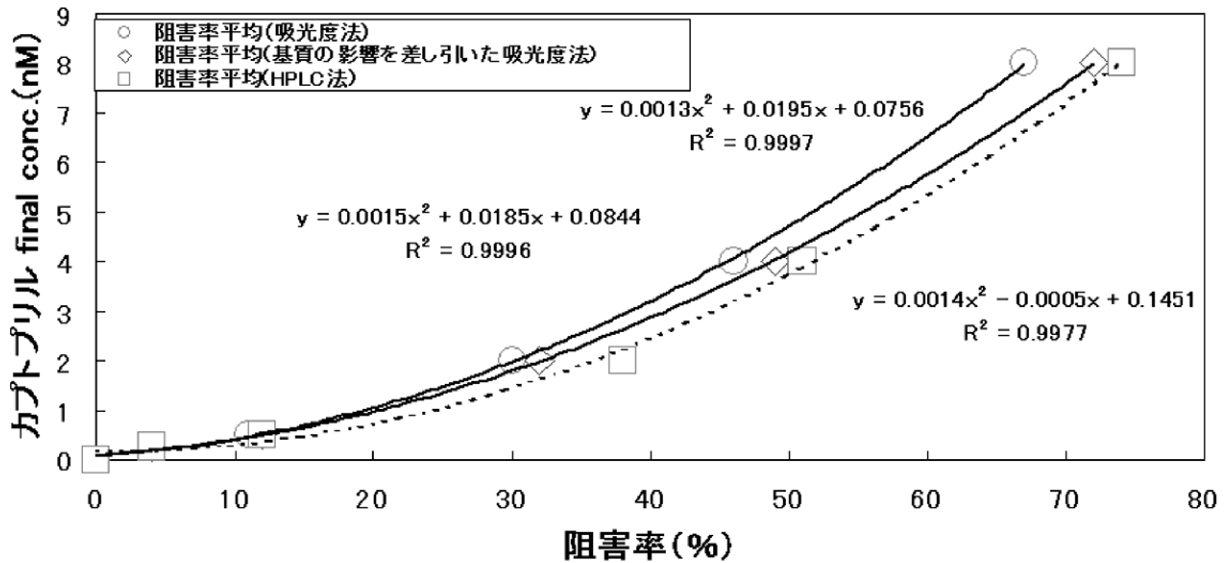


図8 HPLCを用いる方法と吸光度計を用いる方法でのカプトプリルのACE阻害率に対する用量反応曲線の比較

### 3-8 塩化亜鉛添加がパッションフルーツ果皮抽出物中のACE阻害活性に及ぼす影響

これまで報告されている天然物由来のACE阻害物質は、大きく分けてタンパク分解酵素等で得られたペプチド<sup>16)</sup>とポリフェノール類<sup>17)</sup>である。「血圧が高めの方に」でなじみ深い、厚生労働省の特定保健用食品として認可を受けている製品中の有効成分は大多数、ペプチドであり、これらペプチドは基質特異性を有するため、その安全性が認められている<sup>1)</sup>。一方、酵素阻害には拮抗阻害、非拮抗阻害、混合型等様々な形式がある。アンジオテンシン(I)変換酵素は、亜鉛を含む酵素であることが知られている<sup>18)</sup>。原らは茶成分のACE阻害能についてカテキン類およびテアフラビン類に強いACE阻害活性を有することを見出し、更にこれらポリフェノール類のキレート能による阻害でないことを確かめるために、塩化亜鉛添加試験を行っている<sup>17)</sup>。そこで、3-7で述べた吸光度計を用いたACE阻害活性評価法を用いて、パッションフルーツ果皮抽出物に塩化亜鉛を添加することによって、ACE阻害活性がどのような影響を受けるか検討を行った。サンプルは他の影響を避けるため、部分精製された画分を用い、塩化亜鉛を添加した後、ACE阻害活性を測定した。その結果、図9に示すように、濃度依存的に活性が低下した。このことから、原らが報告しているポリフェノール類とは異なり、パッションフルーツ果皮抽出物中のACE阻害作用はキレート能による阻害であることが示唆された。

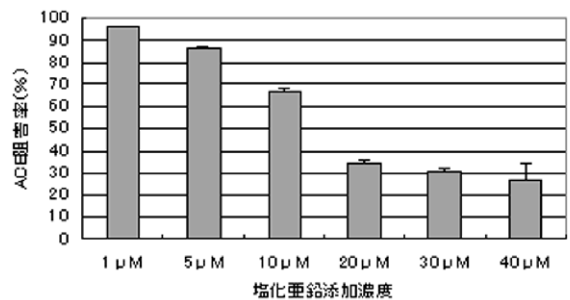


図9 部分精製したサンプルにおける塩化亜鉛添加後のACE阻害活性

### 3-9 今後の課題と取組み

高血圧症患者が最も多く服用している薬の作用点であるACE阻害活性評価技術を用いて、降圧作用の可能性のある生物資源を選択し、今後発展が見込まれる健康食品素材および医薬品素材を開発することを目標としてきた。その結果、パッションフルーツの果皮が選択できた。

近年、ACE阻害活性以外の作用点で血圧降下を有する天然成分として、γアミノ酪酸 (GABA) が注目されている。GABAは神経系を介した作用で血圧上昇抑制効果を有すると報告されている<sup>19)</sup>。そこで、今後の課題としては、まずパッションフルーツ果皮抽出物を動物に投与して血圧上昇抑制作用を有することを確認する。次に、その作用がACE阻害活性に起因するのか、GABA等のその他の作用によるのか研究を進める必要がある。なぜなら、パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質は、亜鉛

をキレート化する作用があるため、キレート作用物質が果たして生体で効能がでるのか、逆に毒性は出ないのかを調べる必要があり、報告されているような酵素阻害の特異性<sup>17)</sup>等も調べなければならない。

#### 4 まとめ

以上の結果をまとめると以下のことが判明した。

- (1) 素材304種類（センター296種、(株)沖縄発酵化学8種）の中から、高血圧症患者が最も多く利用している薬の薬理作用であるACE阻害活性を有する素材を1次スクリーニングした。次に資源量が確保でき、且つ経済性に富み、市場性に合致した素材を検討した結果、パッションフルーツの果皮を選択した。
- (2) 血圧上昇抑制の関連物質として報告されているクエン酸またはポリフェノール含量を、パッションフルーツ果皮抽出液中において測定した結果、本活性との関連物質ではないと推察された。
- (3) 吸光度計を用いるACE阻害活性評価法を導入することができた。その際、若干の基質の混入率(吸光度=0.03)が存在したので、ブランクを設けて差し引くことで生成物のみを抽出することができ、HPLCを用いた方法と全く同じ阻害活性を示すまで、精度を改善できた。
- (4) パッションフルーツ果皮中のACE阻害物質の性質として、M.W.5,000以下の親水性物質で且つ亜鉛をキレート化する物質であることが分かった。

- 8) 豊川哲也、鎌田靖弘、照屋正映、上地美香、新垣美香、市場俊雄 沖縄県工業技術センター研究報告第5号、pp.55-60、(2003)
- 9) 鎌田靖弘、知花寛、久保田めぐみ、比嘉めぐみ、宇根桐子、有銘興博、大山朝賢 沖縄県工業技術センター研究報告第5号、pp.91-98、(2003)
- 10) 豊川哲也、鎌田靖弘、照屋正映、上地美香、新垣美香、市場俊雄 沖縄県工業技術センター研究報告第5号、pp.99-102、(2003)
- 11) Cushman, D. W., Cheung, H. S., *Biochem. Pharmacol.*, 20, p 1637 (1971)
- 12) 山本節子、戸井田一郎、岸井和郎、日胸疾会誌、第18巻、pp. 297-303 (1980)
- 13) 斎藤義幸、中村圭子、川戸章嗣、今安聡、日本農芸化学会誌、第66巻、pp.1081-1087(1992)
- 14) Folin, O. and Denis, W. J. *Biol. Chem.*, 22, pp.305-308(1915)
- 15) 堀田満編集、世界有用植物事典、pp.779-780(1996)
- 16) 丸山進、バイオサイエンスとインダストリー、第47巻、pp.1182-1186 (1989)
- 17) 原征彦、松崎妙子、鈴木健夫、日本農芸化学会誌、第61巻、pp.803-808(1987)
- 18) Cushman, D. W., Cheung, H. S., E. F. Sabo and M. A. Ondetii, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 21, p176 (1978)
- 19) 福渡靖、佐藤信紘、河盛隆造、渡辺嘉朗、吉田勝美、劉影、松田和也、藤井明、鶴澤昌好、佐藤良二、東方医学、第17巻、pp.1-7 (2001)

#### 参考文献

- 1) 中川邦男、日本の健康機能食品 トクホ[特定保健用食品]、ブックマン社、pp.63-66(1999)
- 2) 豊川哲也、鎌田靖弘、与座江利子 沖縄県工業技術センター研究報告第2号、pp.35-57、(2000)
- 3) 鎌田靖弘、豊川哲也 沖縄県工業技術センター研究報告第3号、pp.77-89、(2001)
- 4) 豊川哲也、鎌田靖弘、山城利枝子、比嘉賢一、吉田安彦、花城薫 沖縄県工業技術センター研究報告第3号、pp.91-95、(2001)
- 5) 鎌田靖弘、豊川哲也、照屋正映、吉田安彦、花城薫、新垣美香、上地美香 沖縄県工業技術センター研究報告第4号、pp.77-84、(2002)
- 6) 鎌田靖弘、豊川哲也、市場俊雄 沖縄県工業技術センター研究報告第4号、pp.85-92、(2002)
- 7) 鎌田靖弘、豊川哲也、比嘉賢一、藤野哲也、有銘興博、与那覇恵 沖縄県工業技術センター研究報告第4号、pp.111-117、(2002)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。