

佐賀県産アスパラガスの新産業活用を目指した機能性素材開発（第 1 報）

食品工業部

岩元彬 柘植圭介 鶴田裕美

公益財団法人佐賀県地域産業支援センター

さがフード&コスメラボ 浜島弘史

アスパラガスの高付加価値化及び廃棄部分の有効利用を目的に、様々な溶媒で抽出したアスパラガス抽出物の脱顆粒反応への影響を検討した結果、50%エタノール抽出物と 80%エタノール抽出物で β -ヘキソサミニダーゼ放出抑制活性が確認された。また、その放出抑制率を指標に活性画分を精製したところ、糖脂質とリン脂質画分が活性画分である可能性を見出した。さらに、これらの画分のアトピー性皮膚炎モデルマウスへの影響を評価したところ、その経口投与は皮膚炎症スコアを低下させ、皮膚炎症症状の悪化を予防・緩和することが示唆された。

1. はじめに

近年、国民の健康志向の高まりに伴い、血圧の上昇抑制に有効な食品や体脂肪を減らす食品など健康機能の維持、改善が期待できる農作物素材を使用した機能性食品が数多く販売されるようになってきた。また、このような生理機能を有する食品素材は化粧品分野などでも広く利用され始め、地域農作物素材の高付加価値化や商品価値の低い廃棄部分の有効利用に繋がる新産業として注目されている。なかでも、本来無害なアレルゲンに対し、免疫応答が過剰に働くことにより誘導されるアレルギー疾患を予防・緩和する機能性素材は期待を集めている。

花粉症やアトピー性皮膚炎、気管支喘息などの I 型アレルギー症状を有する患者数は、世界中で急速に増加しており¹⁾、日本でも約 2 人に 1 人が何らかのアレルギー症状を罹患している²⁾。この I 型アレルギーは血液中のマスト細胞や好塩基球といった細胞が、脱顆粒反応により、ヒスタミンやロイコトリエンといった炎症物質を放出することにより、症状が亢進することが様々な研究により明らかになっている³⁾。そのため、マスト細胞や好塩基球の脱顆粒反応を抑制することは I 型アレルギーの予防や改善に繋がると考えられている。

著者らは、これまでに生体外疾患モデルを構築し、佐賀県内の農作物の機能性を評価してきた。その結果、佐賀県が 2,400t の収穫量(平成 29 年, 全国 3 位)を誇るアスパラガスから調製した抽出物に I 型アレルギーの発症に関与する脱顆粒反応を阻害する機能を見出した。また、アスパラガス抽出物の経口投与はアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚炎症症状を

改善することを明らかにしてきた^{4,5)}。最近の研究で、アスパラガスにはルチンやプロリン-3-アルキルジケトピペラジン、アスパラプチンといった成分が含まれ、メタボリックシンドローム予防効果や血圧上昇抑制効果、睡眠の質を高める効果など様々な生理機能を有することが報告されているが⁶⁻⁸⁾、アレルギーの予防・緩和に関する報告はなく、本研究で得られた知見は極めて新規性の高いものであった。加えて、このような脱顆粒反応阻害活性を有する抽出物はアスパラガスの可食部だけでなく、通常廃棄される切下部(根元部分)でも同様に得られることが示唆された。

このような背景から、アスパラガスの可食部や切下部を機能性素材として活用することが期待されるが、アスパラガスの抗アレルギー有効成分は明らかになっておらず、機能性素材としての有用性については判断できない状況にあった。

そこで、本研究ではアスパラガスの脱顆粒阻害活性を指標に、抗アレルギー有効成分の特定を試みた。

2. 実験方法

2.1 アスパラガス粉末試料の調製

アスパラガスは JA 佐賀中部より購入した可食部を用いた。アスパラガスは購入当日に、平山式低温スチーム電気鍋(スチーミング調理技術研究会)を用いて、90℃の水蒸気で 10 分間加熱処理した後に、凍結乾燥機(Labconco, FZ-12CS STD)を用いて乾燥させた。得られた乾燥物は粉碎機(大阪ケミカル, FM-1)で粉末化し、アスパラガス粉末試料とした。

2.2 アスパラガス抽出物の調製

アスパラガス粉末 150g に 5 L の 50% (v/v) エタノール水溶液を加え、室温で 4 時間攪拌した。これを吸引ろ過 (No.4A) にかけて、得られた濾液をアスパラガス抽出物とした。

2.3 アスパラガス抽出物の分画

2.3.1 アスパラガス成分の液液抽出

アスパラガス 50%エタノール抽出物から、図 1 に示すように当量のクロロホルム、酢酸エチル、*n*-ブタノールを用いて、連続的に成分を液液抽出した。

2.3.2 アスパラガス成分の固相抽出

アスパラガス成分の固相抽出は図 2 に示した方法で行った。アスパラガス 50%エタノール抽出物に当量のクロロホルム (Wako) を加え、よく振盪した後、水相とクロロホルム相を分離した。この有機相を濃縮し、得られたクロロホルム抽出物から、中性脂質、糖脂質、リン脂質の 3 つの脂質画分を分画した。まず、クロロホルム抽出物に対し、50 倍量の活性化したシリカゲル (Wako) をガラスカラムに詰め、カラム容量の 2 倍量のクロロホルムで洗浄した。これにクロロホルムに溶解させたクロロホルム

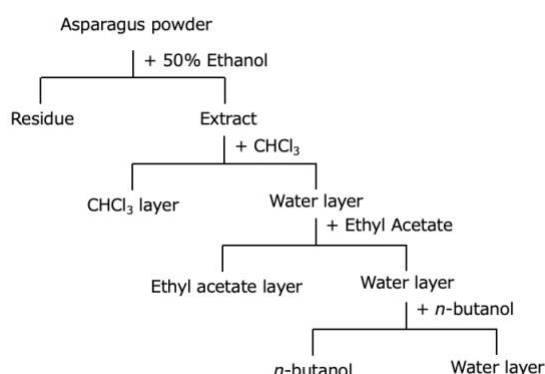


図 1 アスパラガス成分の液液抽出

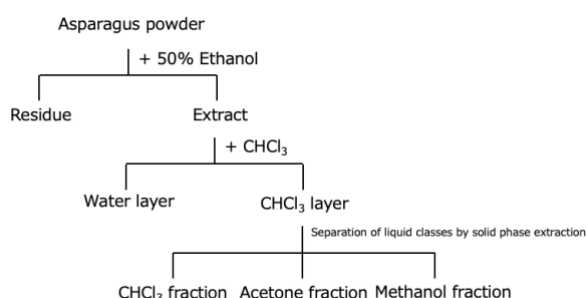


図 2 アスパラガス成分の固相抽出方法

抽出物を加え、続いて 10 倍量のクロロホルム、アセトン (Wako)、メタノール (Wako) を連続的に流下させた。抽出液はクロロホルム、アセトン、メタノールのそれぞれで回収し、濃縮して得られた抽出物を中性脂質、糖脂質、リン脂質画分とした。

2.4 ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 を用いた脱顆粒試験

アレルギー炎症反応の原因である脱顆粒反応は、脱顆粒中の酵素 β -ヘキサソミニダーゼの放出率で評価した⁹⁾。ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 (国立研究開発法人医学基盤・健康・影響研究所) は 10% ウシ胎児血清 (FBS, Gibco) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Gibco) で継代培養した。

対数増殖期の細胞をトリプシンで剥離後、Modified Tyrode (MT) buffer (pH 6.8, Sigma-Aldrich) で 2 回洗浄し、脱顆粒試験に使用した。5.0×10⁵ cells の細胞を終濃度 100 μ g/mL のアスパラガス抽出物を添加した 50 μ M Calcium ionophore A23187 含有 MT buffer で懸濁し、37°C で 30 分間反応させた。これに対し、サンプル溶媒である 0.05% (v/v) エタノール水溶液を添加し、同様に反応させたものをコントロールとした。5 分間氷冷後、10,000 x g で 3 分間遠心分離を行い、上清 50 μ L を回収した。これに 125 μ L の 0.1M Citrate buffer, pH4.0 に溶解した 2 mM 4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma-Aldrich) を加え、37°C で 30 分間反応させた。反応溶液に 250 μ L の 0.1M Carbonate buffer, pH10 を加えて反応停止後、200 μ L ずつ 96 ウェルマイクロプレートに分注し、415 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (M5-ZX, Molecular Devices) で測定した。 β -ヘキサソミニダーゼ放出率は以下の式(1)により算出した。

$$[\beta\text{-ヘキサソミニダーゼ放出率 } \%] =$$

$$\left(\frac{[A_{\text{Sample}}] - [A_{\text{Negative}}]}{[A_{\text{Positive}}] - [A_{\text{Negative}}]} \right) \times 100 \quad (1)$$

ここで、 $[\beta\text{-ヘキサソミニダーゼ放出率}]$ は反応液内の β -ヘキサソミニダーゼ放出率 (%) を、 $[A_{\text{sample}}]$ はアスパラガス抽出物を添加した場合の吸光度を、 $[A_{\text{positive}}]$ はコントロールにおける吸光度を、 $[A_{\text{negative}}]$ は Calcium ionophore A23187 を添加しなかった場合のコントロールにおける吸光度を示している。

2.5 アトピー性皮膚炎モデルマウスを用いた抗アレルギー試験

6 週齢、オスの NC/Nga マウスは日本 SLC から購入した。これらのマウスは 12 時間明暗転サイクルが保たれた SPF (Specific pathogen free) 環境下で飼育した。給餌及び給水は自由摂取とした。

アスパラガス抽出物 (500 mg/kg/day), または糖脂質 (10 mg/kg/day), リン脂質 (10mg/kg/day) の効果を評価するため, それぞれのサンプルを 1 日 1 回経口投与した。対照実験群であるコントロール群にはリン酸生理食塩水 (PBS) を投与した。マウスのアトピー性皮膚炎様症状を誘導するため, まず剃毛した胸部及び腹部, フットパットにエタノール/アセトン (3:1, v/v) に溶解した 5%ピクリルクロライド (東京化成工業) を塗布した。続いて, 4 日目から実験終了時までオリーブオイル (Filippo Berio) に溶解した 1%ピクリルクロライドを 1 週間間隔で背部及び耳介に塗布し, 皮膚炎を誘発させた。1 週間に一度皮膚炎症状を, (i) 発赤・出血, (ii) 浮腫, (iii) 脱毛・組織欠損, (iv) 乾燥, (v) 発疹を 0 (無し), 1 (軽度), 2 (中程度), 3 (重度) で点数化し, 評価した。

2.6 統計解析

得られたデータは, GraphPad PRISM version 6.0 (GraphPad Software Inc.) を用い, Tukey 検定で解析した。

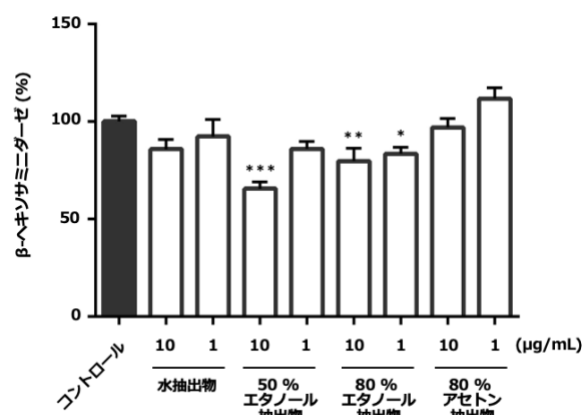
3. 結果及び考察

3.1 アスパラガス抽出物の脱顆粒反応への影響

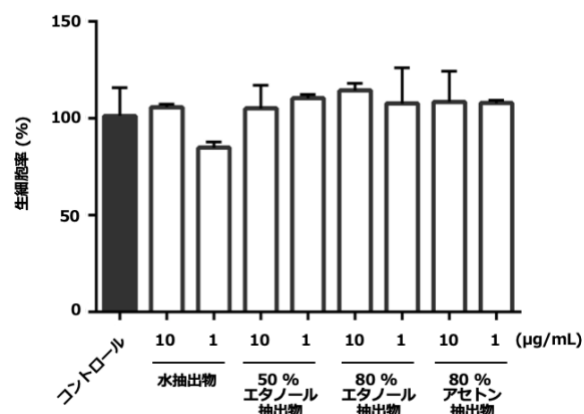
水, 50%エタノール, 80%エタノール, 80%アセトンを用いて抽出したアスパラガス抽出物の脱顆粒反応への影響を評価した。その結果, 図 3 に示すように水抽出物, 50%エタノール抽出物, 80%エタノール抽出物が β -ヘキソサミニダーゼ放出率を低下させた。また, この抑制は細胞生存率の低下によるものではなかった。したがって, アスパラガス抽出物中には脱顆粒反応を抑制する因子が含まれていることが示唆され, その抑制率は 50%エタノール抽出物, 80%エタノール抽出物, 水抽出物の順で低下することが示された。

3.2 脱顆粒反応阻害活性を有するアスパラガス成分の精製

50%アスパラガス抽出物中の脱顆粒反応抑制因子を精製するため, 図 1 に示すようにクロロホルム, 酢酸エチル, *n*-ブタノールを用いて, 連続的に成分を液液抽出し, 5 つの画分に分離した。これらの画



(a) β -ヘキソサミニダーゼ放出率



(b) 生細胞率

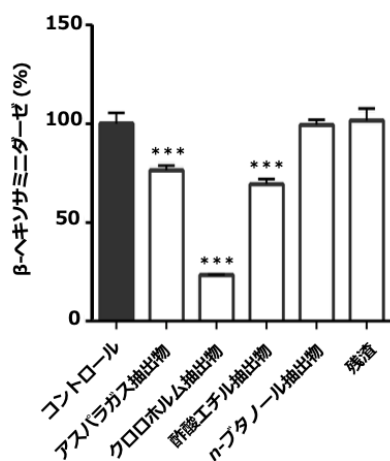
図 3 各溶媒で抽出したアスパラガス抽出物の β -ヘキソサミニダーゼ放出への影響

測定値は 3 連の実験の平均値であり, エラーバーは \pm 標準誤差を表す。* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs コントロールを示す。

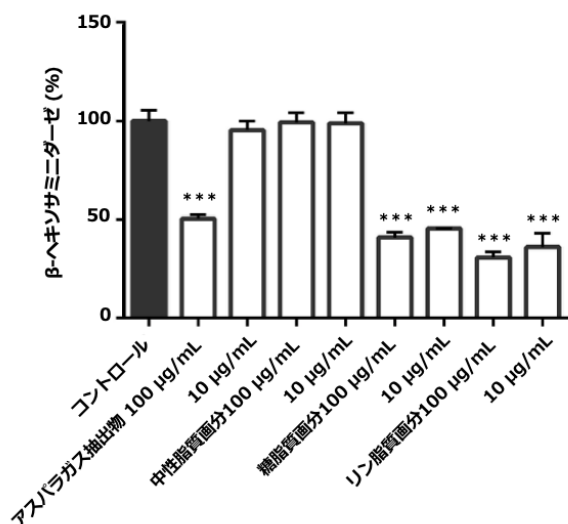
分の脱顆粒反応への影響を調べたところ, クロロホルム画分, 酢酸エチル画分では, β -ヘキソサミニダーゼ放出率が低下した (図 4 (a)). 特に, クロロホルム画分では強い抑制活性が確認された。続いて, 図 2 に示すように, アスパラガス 50%エタノール抽出物からクロロホルムにより抽出した画分を, シリカゲルを用いた固相抽出により, 中性脂質画分と糖脂質画分, リン脂質画分に分離した。これらの画分の β -ヘキソサミニダーゼ放出への影響を評価したところ, 糖脂質とリン脂質画分が著しく放出量を低下させた (図 4 (b)). これらの知見から, アスパラガス抽出物中の β -ヘキソサミニダーゼ放出抑制因子は糖脂質とリン脂質画分に含まれることが示唆された。

3.3 アスパラガス糖脂質及びリン脂質画分のアトピー性皮膚炎モデルマウスへの影響

アスパラガス 50%エタノール抽出物から分画した糖脂質とリン脂質画分のアレルギー反応への影響を検討するため、ピクリクロライドの連続塗布により作製したアトピー性皮膚炎モデルマウスへの影響を評価した。試験期間中、各群のマウス重量には有意な変化は認められなかった。アスパラガス抽出物 500 mg/kg/day を経口投与したマウスでは、コントロ



(a) アスパラガス抽出物のβ-ヘキソサミナーゼ放出への影響

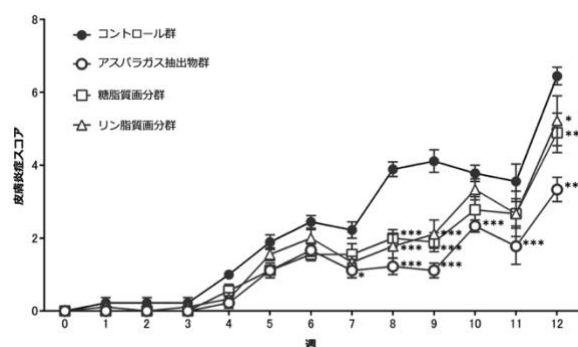


(b) アスパラガス抽出画分のβ-ヘキソサミナーゼ放出への影響

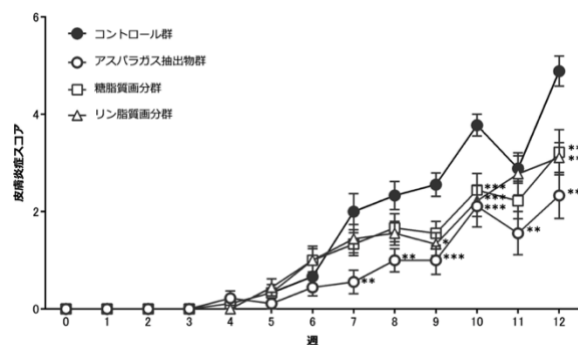
図 4 アスパラガス抽出物画分のβ-ヘキソサミナーゼ放出への影響

測定値は3連の実験の平均値であり、エラーバーは±標準誤差を表す。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロールを示す。

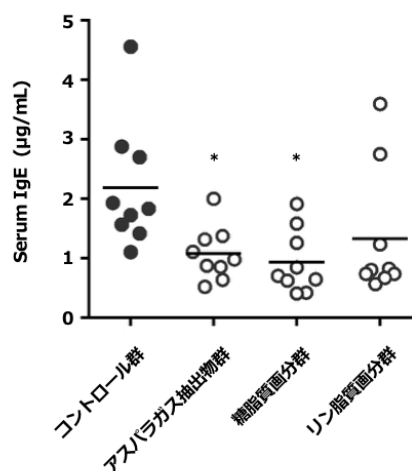
ール群と比べ実験開始7週目から有意に皮膚炎症スコアが減少した(図5(a-b))。また、糖脂質及びリン脂質画分を投与したマウスでは、8週目以降で背部や耳介で炎症スコアが低下した。これらのマウスの



(a) マウス背部の皮膚炎症スコア



(b) マウス耳介の皮膚炎症スコア



(c) マウス血中 IgE 濃度

図 5 アスパラガス抽出物画分のアトピー性皮膚炎モデルマウスへの影響

測定値は3連の実験の平均値であり、エラーバーは±標準誤差を表す。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロールを示す。

12 週目の血中 IgE 濃度を測定したところ、アスパラガス投与群と糖脂質投与群で IgE 濃度が有意に低いことが分かった (図 5 (c)). IgE は体内で脱顆粒反応を誘導する因子としてよく知られている生体因子である。従って、アスパラガス及び糖脂質画分、リン脂質画分はアトピー性皮膚炎の症状亢進を予防、もしくは改善することが示唆された。

これまでに、糖脂質やリン脂質は様々な生理機能を有することが知られており、著者らも海藻から抽出した糖脂質やリン脂質に、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 の炎症性サイトカイン産生を抑制する抗炎症作用を有することを認めている^{11,12)}。また、リン脂質においては脂質代謝改善作用やアルツハイマー病の発症を抑制する機能があることが示唆されている¹³⁾。しかしながら、アレルギーの予防や改善に関する報告はなかった。

本研究では、アスパラガスから得た糖脂質及びリン脂質画分がアレルギーの発症・亢進に関する脱顆粒反応を抑制することを RBL-2H3 細胞を用いた試験で見出し、さらにその経口投与がアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚炎症症状の悪化を予防もしくは緩和に有用である可能性を示した。佐賀県内では年間約 2,500t のアスパラガスが収穫されており、同時に 200t 以上の未利用部分 (切下部) が廃棄されている。今後、アスパラガスのさらなる機能研究が進むことにより、アスパラガスの高付加価値化及び未利用部分の有効活用に繋がることが期待される。

4. おわりに

アスパラガスの高付加価値化及び廃棄部分の有効利用を目的に、様々な溶媒で抽出したアスパラガス抽出物の脱顆粒反応への影響を評価し、50%エタノール抽出物と 80%エタノール抽出物に β -ヘキソサミニダーゼ放出抑制活性があることを見出した。

また、その放出抑制率を指標に活性画分を精製したところ、糖脂質とリン脂質画分に活性があることを確認した。

さらに、これらの画分のアトピー性皮膚炎モデルマウスへの影響を評価したところ、皮膚炎症症状の悪化を予防・緩和することが示唆された。

以上、本研究で得た有用機能をもつアスパラガス抽出物作製方法に関する知見は、アスパラガスを利用した機能性素材開発に役立つものであった。

なお、研究を実施するにあたって使用したマイクロプレートリーダーは、電源立地地域対策交付金で導入した装置である。

参考文献

- 1) Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Martell JAO, Platts-Mills TAE, Ring J, Thien F, Cauwenberge PV, Williams HC, Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003, *J Allergy Clin Immunol*, **113** (5), 832-836 (2004)
- 2) 厚生科学審議会疾病対策部会, リウマチ・アレルギー対策委員会「リウマチ・アレルギー対策委員会報告書 (2011)」
- 3) Iwamoto A, Inoue Y, Tachibana H, Kawahara H, Alkali-soluble pectin suppress IgE production in human myeloma cell line in vitro, *Cytotechnology*, **71**(2), 573-581
- 4) Iwamoto A, Inoue Y, Inoue Y, Yamada K, Tachibana H, Kawahara H, Anti-allergic effect of strawberry extract, *J Func Food*, **5**(4), 1947-1955 (2013)
- 5) 岩元彬, 瀬部和美, 特許第 6456996 号「 β -ヘキソサミニダーゼ放出抑制用及び/又は IgE 産生抑制用の組成物および、アレルギーの予防治療用及び/又は抗炎症用の組成物, 脱顆粒抑制用の組成物, 並びにその製造方法」
- 6) 岩元彬, 瀬部和美, 特許第 6456997 号「アスパラガス抽出物の製造方法」
- 7) Nishimura M, Ohkawara T, Kogami-Katsuyama, H, Sato H, Nishihira J, Improvement of blood pressure, glucose metabolism, and lipid profile by the intake of powdered asparagus (Lu Sun) bottom-stems and cladophylls, *J Tradit Complement Med*, **3**(4), 250-255 (2013)
- 8) 西村太輔, 高橋千尋, 香西慶理, アスパラガス擬葉摂取による睡眠改善効果, 日本食品化学工学会誌, **62**(3), 147-155 (2015)
- 9) Nakabayashi R, Tang Z, Nishizawa T, Mori T, Saito K, Top-down Targeted Metabolomics Reveals a Sulfur-containing Metabolite with Inhibitory Activity against Angiotensin-converting Enzyme in *Asparagus officinalis*, *J Nat Prod*, **78**(5), 1179-1183 (2015)
- 10) Ishida M, Nishi K, Watanabe H, Sugahara T, Inhibitory effect of aqueous spinach extract on degranulation of RBL-2H3 cells, *Food Chem*, **136** (2), 322-327 (2013)

- 11) 柘植圭介, 鶴田裕美, 佐藤真佐恵, 吉村臣史, 海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用(1)-スサビノリにおける抗炎症作用の探索-平成 24 年度佐賀県工業技術センター報告, 1-9 (2013)
- 12) 柘植圭介, 鶴田裕美, 佐藤真佐恵, 吉村臣史, 海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用(2)-スサビノリにおける抗炎症脂質の特定-平成 25 年度佐賀県工業技術センター報告, 19-28 (2014)
- 13) 柳田晃良, 機能性油脂による脂肪肝予防と脳機能改善作用, 脂質栄養学, 27(2), 173-185 (2018)