

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2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

これまでにアスパラガスの抽出物にアレルギー性炎症を引き起こす脱顆粒反応を阻害する作用やアトピー性皮膚炎モデルマウスの皮膚炎症状を改善する効果を認め、その活性成分の一つが糖脂質とリン脂質である可能性を見出してきた。本報では、卵白アルブミン免疫アレルギーモデルマウスへの影響の評価及びアスパラガスリン脂質のサブクラスの活性を調べた。その結果、アスパラガス糖脂質とリン脂質のマウスへの経口投与により、アレルギーのマーカー因子として知られる血液中 IgE 濃度が低減することを確認した。また、アスパラガスから精製したリン脂質サブクラスの脱顆粒阻害活性を解析した結果、活性の強さは $PA > PG = PE > PI > PC$ であることを突き止めた。これらの知見は、アスパラガス及びその抽出物を活用した機能性素材の開発に繋がるものであった。

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開発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たな取組として注目されている。なかでも、社会問題となっているアレルギー疾患を予防・緩和する機能性素材の開発に対する期待は大きい。

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^{3,4)}。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及びその糖脂質画分、リン脂質画分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状を改善することを明らかにしてきた⁵⁻⁷⁾。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、炎症抑制効果やメタボリックシンドローム予防効果、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⁸⁻¹¹⁾、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はなく、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、本報ではアトピー性皮膚炎以外のアレルギー疾患にも抗アレルギー効果が期待できるか、卵白アルブミンを用いて作製したアレルギーモデルマウスへの影響を評価した。また、脱顆粒反応阻害活性を有する活性成分の特定を試みた。

2. 実験方法

2.1 アスパラガス抽出物の調製

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。このアスパラガス粉末に 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、得られた濾液をアスパラガス抽出物とした。

2.2 アスパラガス脂質の抽出及び分画

アスパラガス脂質の抽出は図 1 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等量のクロロホルム（Wako）を加え、よく振盪した後に、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。

2.3 アスパラガスリン脂質の精製

アスパラガスリン脂質は、リン脂質画分をシリカゲルを用いた薄層クロマトグラフィーにより展開し、スポットを回収することにより分離した。その際、展開溶媒はクロロホルム/メタノール/酢酸/水(20/3.5/

2.3/0.7, v/v/v/v), もしくはクロロホルム/エタノール/水/トリエチルアミン(30/35/7/35,v/v/v/v)を使用した。

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¹²⁾。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℃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℃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 卵白アルブミン免疫アレルギーモデルマウスを用いた抗アレルギー試験

6 週齢、メスの BALB/c マウスは九動から購入した。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。

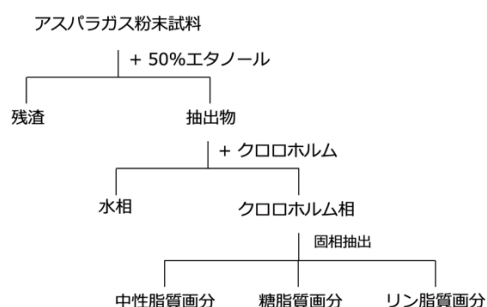


図 1 アスパラガス脂質の抽出方法

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), または糖脂質画分 (10 mg/kg/day), リン脂質画分 (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。マウスのアレルギー反応を誘導するため, 試験開始初日に卵白アルブミン (OVA, SIGMA) と水酸化アルミニウム (Al/OH_3 , Wako) の混合物 (20 μg OVA/1 mg $\text{Al}(\text{OH}_3)/\text{mL}$) を腹腔内に投与した。この投与は 4 週間の試験期間中, 1 週間に一度, 計 4 回行った。試験開始 28 日後にマウス血清中の総 IgE 及び OVA 特異的 IgE 量を酵素抗体法により測定した。

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

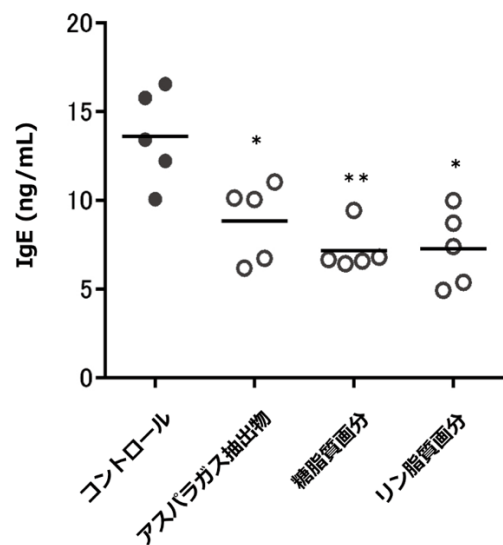
3.1 糖脂質及びリン脂質画分の卵白アルブミン免疫アレルギーモデルマウスへの影響

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 OVA の連続投与により作製した OVA 免疫アレルギーモデルマウスを用いて評価した。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), 糖脂質画分 (10 mg/kg/day), リン脂質画分 (10 mg/kg/day) をそれぞれ経口投与したマウスでは, コントロール群と比べ, 血漿中の総 IgE 濃度が低下した (図 2 a)。また, 同様に糖脂質画分とリン脂質画分を投与したマウスでは, 有意に OVA 特異的 IgE 濃度も低下した (図 2 b)。

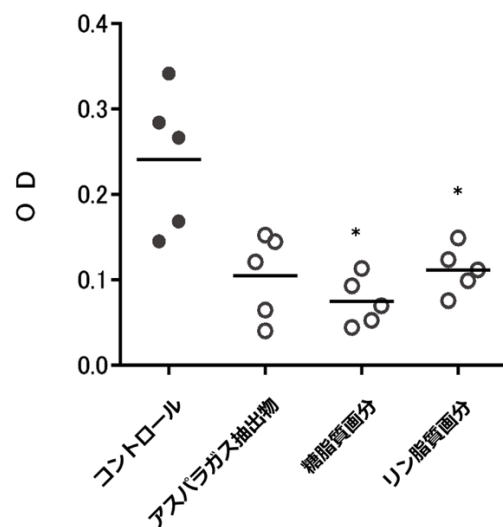
IgE はマスト細胞や好塩基球といった細胞の表面に存在する高親和性 IgE 受容体 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ に結合し, アレルゲンと架橋することにより脱顆粒反応を引き起こす生体因子である。これまでに著者らは, 糖脂質画分とリン脂質画分の経口投与が脱顆粒反応の阻害だけでなく, アトピー性皮膚炎モデルマウスの血中総 IgE 濃度を低下させることを明らかにしてきた⁷⁾。従って, アスパラガス抽出物, 糖脂質画分, リン脂質画分の経口投与に OVA 特異的 IgE 濃度を低下させる効果が認められたため, アトピー性皮膚炎以外の I 型アレルギー疾患の予防, 改善にも有用であることが示唆された。

3.2 脱顆粒阻害活性を有するアスパラガスリン脂質の特定

著者らは, これまでの研究でアスパラガスの糖脂質画分とリン脂質画分が RBL-2H3 細胞の脱顆粒反応を阻害することを報告してきた⁷⁾。本報では, より含有量の多いリン脂質に焦点を当て, TLC を用いてリン脂質を phosphatidic acid (PA), phosphatidyl-



(a) 血中総 IgE 濃度

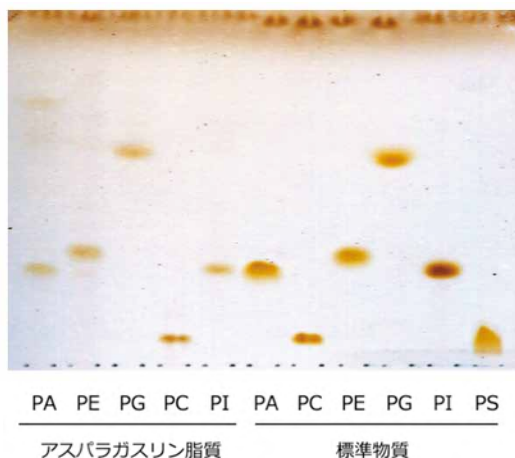


(b) OVA 特異的 IgE 濃度

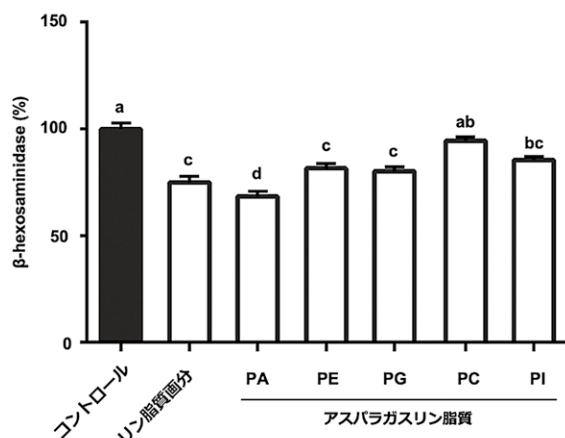
図 2 アスパラガス抽出物画分の OVA 免疫アレルギーマウスへの影響

測定値は 5 連の実験の平均値であり, エラーバーは±標準誤差を表す。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs コントロールを示す。

choline (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI) に分画した(図 3a). 得られた画分の脱顆粒反応への影響を調べた結果, 抑制活性は $PA > PG = PE > PI > PC$ の順であることが分かった(図 3b). リン脂質の機能については, PE や PI の経口投与が血中コレステロール濃度を低減させること^{13,14}, PC や PI の投与が血中アディポネクチン濃度の上昇や脂質代謝の制御を通して非アルコール性脂肪肝疾患を改善すること^{15,16}, アルツハイマー病の発症を抑制する機能があることなどが示唆されている¹⁷. 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



(a) アスパラガスリン脂質の TLC 解析



(b) β -ヘキソサミニダーゼ放出率

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. 図中の異なるアルファベットは有意差を示す ($p < 0.05$).

生を抑制する抗炎症作用を有することを認めていたが^{18,19}, 脱顆粒阻害作用や抗アレルギー作用に関する報告はなく, 本研究で見出した機能は極めて新規性の高いものである. 興味深いことに Ivanova らは, 様々なリパーゼで処理し, 細胞膜を構成するリン脂質の分布を変化させた RBL-2H3 細胞で脱顆粒反応が生じることを報告している²⁰. また, 脱顆粒反応は二重リン脂質からなる細胞膜と炎症の原因である顆粒を内包する顆粒膜が融合することにより引き起こされることがよく知られている. これらの知見は, 本研究と同様に主要な細胞膜構成成分であるリン脂質が免疫反応に関与することを示唆するものである. しかしながら, 食餌性や外因性のリン脂質が脱顆粒反応に関与することを明らかにするためには, さらなる研究が必要である.

4. おわりに

本研究では, アスパラガス抽出物及びその糖脂質及びリン脂質画分が OVA を用いて作製したアレルギーモデルマウスの血中 IgE 濃度を低下させることを明らかにしたことから, I 型アレルギーの予防や症状の緩和に有用である可能性を見出した. また, 脱顆粒反応阻害成分の一つがリン脂質であり, その活性の強さは $PA > PG = PE > PI > PC$ であることを突き止めた.

以上, 本研究で得た知見は, アスパラガスの機能性素材として有用であることを示唆するものであった.

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.

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) 岩元彬, 柘植圭介, 鶴田裕美, 浜島弘史, 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), 平成 30 年度佐賀県工業技術センター報告, 7-12 (2018)
- 8) Nishizawa M, Kano M, Okuyama T, Okumura T, Ikeya Y, Anti-inflammatory effects of enzyme-treated asparagus extract and its constituents in hepatocytes, *Funct Food Health Disease*, **6**(2), 91-109 (2016)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) Murata M, Imaizumi K, Sugano M, Effect of dietary phospholipids and their constituent base on serum lipids and apolipoproteins in rats, *J Nutr*, **112**(9), 1805-1808 (1982)
- 14) Imaizumi K, Mawatari K, Murata M, Ikeda I, Sugano M, The contrasting effect of dietary phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on serum lipoproteins and liver lipids in rats, *J Nutr*, **113**(12), 2403-2411 (1983)
- 15) Jiang Y, Noh SK, Koo SI, Egg phosphatidylcholine decreases the lymphatic absorption of cholesterol in rats, *J Nutr*, **131**(9), 2358-2363 (2001)
- 16) Buang Y, Wang YM, Cha JY, Nagao K, Yanagita T, Dietary phosphatidylcholine alleviates fatty liver induced by orotic acid, *J Nutr*, **21**(7-8), 867-873 (2005)
- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) Ivanova PT, Cerda BA, Horn DM, Cohen JS, McLafferty FW, Brown HA, Electrospray ionization mass spectrometry analysis of changes in phospholipids in RBL-2H3 mastocytoma cells during degranulation, *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**(13):7152-7157 (2001)