総 説

リンゴポリフェノールの食品素材としての応用

庄 司 俊 彦^s

アサヒビール(株) 未来技術研究所

Application of Apple polyphenols for Food Ingredient

Toshihiko Shoji^s

Fundamental Research Laboratory, Asahi Breweries, Ltd.

は じ め に

リンゴは古代の神話や童話にも数多く登場し、親しまれてきた果物である。世界的にも広い地域で栽培され生食以外にも、発酵食品である果実酒のシードルや食用酢などに加工、利用されてきた。また、リンゴは「1 日一個のリンゴは医者を選ばせる」と言われ、健康に寄与する成分としては食物繊維やミネラル（特に、カリウム）などが考えられてきた。最近の研究からリンゴに含まれるポリフェノール類も様々な生理機能性を持つことが示されてきた。本総説では、リンゴポリフェノールの代表的な生理機能性である抗アレルギー作用、メラニン生成抑制作用を紹介するとともに、食品素材としての利用について解説してみたい。

1. リンゴポリフェノールの特徴

ポリフェノールはベンゼン環に多数の水酸基を持つ物質の総称で、植物性二次代謝産物のことを指す（カテコールアミン類などもポリフェノールと言うことになるが、ここでは除外する）。植物での本質的な機能に関しては未だ良く解明されているわけではないが、その多くは果物や花の着色成分などである。植物起源によってポリフェノールの種類や含有量が異なり、代表的な物としては、緑茶のカテキン類や大豆のイソフラボン類などが知られている。リンゴのポリフェノールとしては図1に示したように、フェノールカルボン酸類のクロロゲン酸や、フラボノイド類のカテキン類とその高重合体であるプロシアニジン類、赤色素であるアントシアニン類、ケルセチン配糖体やフロレチン配糖体が報告されている。これらの組成はリンゴの品種や産地、年などによっても異なるが、最も、多く含まれている成分はプロシアニジン類であり、生理機能性とい

う点からも注目される成分である。

プロシアニジン類はカテキン類（フラバン-3-オール類）が多数結合した物質である。植物によって構成されるフラバン-3-オール類の種類や結合の仕方、重合数が異なるため、多数の異性体が存在し、性質も異なっている。リンゴでは、エピカテキンが主要な構成単位となっており¹⁾、15量体までの存在が確認されている²⁾。「渋柿」を食べたときに、口の中がザラザラとなる原因物質で、「渋柿」のプロシアニジン類と唾液のタンパク質が結合することによって大きな分子が生じるためと考えられている。どんなタンパク質とも結合してしまうと考えられることから酵素とも結合して阻害活性を示すと考えられているが、実際は重合度依存的に各種機能性に対する活性に違いが見られる。以下、プロシアニジン類を中心にその生理機能性について解説する。

2. 生理機能性

リンゴポリフェノールの生理機能性については、世界的に *in vitro* での試験から大規模な疫学調査まで行われており、興味深い結果が報告されている。我々の研究では、抗酸化性³⁾ 以外に、抗うつ作用⁴⁾、抗アレルギー作用⁵⁾、脂質代謝制御機能、メラニン生成抑制作用⁶⁾、抗腫瘍活性⁷⁾ などが確認されている。なお、ホームページの applepolyphenol.com (<http://www.applepolyphenols.com>) には、世界中のリンゴポリフェノールの研究成果がまとめられ、閲覧可能となっているので参照されたい。

2-1 食物アレルギー予防

近年、アレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎、気管支喘息などアレルギー性疾患は、先進諸国において増加し、大きな社会問題となっている。我が国においても同様に、アレルギーの発症率は増加する傾向にあり、その原因は食生活の欧米化に伴う生活習慣によるものと考えられている。また、厚生労働省では平成14年4月から特定原材料5品

* 〒302-0106 茨城県守谷市緑1-1-21

^s 連絡先 (Corresponding author), toshihiko.shoji@asahibeer.co.jp

図 1

目（卵，牛乳，小麦，そば，落花生）の表示を義務化するなど，食物アレルギー患者への対策がなされている。

食品や腸内細菌などの異物に常にさらされている腸管粘膜は全免疫系の約 60% が存在していると言われている。通常生命維持に重要な食物性の異種蛋白質（抗原）に対して応答しない腸管免疫寛容が成立しており，アレルゲンが通過しても，アレルギーを発症することはないと考えられている。しかし，食物アレルギー患者では，食品由来のアレルゲンが何らかの理由で腸管粘膜のバリア機構を通過し，生体内へ吸収侵入した場合，IgE 抗体特異的な即時型のアレルギー反応を示す。

リンゴポリフェノールはヒスタミンなどのケミカルメディエーターの放出を抑制することが確認されている⁸⁾。そこで，卵アルブミン（OVA）の食物アレルギーモデルマウスに対するリンゴポリフェノールの影響について検討した。経口的に感作を誘導することが可能である肥満細胞遺伝的欠損マウス（ W/W^v マウス）に自由経口摂取させて，その影響を検討した⁹⁾。6 週齢の雌性 W/W^v マウスに OVA 1 mg/匹を 9 週間連日経口投与した。プロシアニジ

ン画分は OVA の連続経口投与開始の 1 週間前から組織採取日まで自由摂取させた。対照群には純水を投与した。

プロシアニジン類摂取群では対照群に比べて血清中 OVA 特異的 IgE 抗体価と IgG1 抗体価および IgG2a 抗体価が有意に ($p<0.05$) 減少したことからプロシアニジン類摂取が OVA の経口感作を抑制することが示唆された。また，IgE 抗体産生はプロシアニジン類の濃度に依存していた（図 2）。

また，マウス脾臓由来の培養脾細胞から産生される各種サイトカイン（IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-2 及び IFN- γ ）を指標に腸管免疫系を介した全身免疫系に及ぼす影響について検討した。その結果，プロシアニジン摂取群は対照群と比べ IL-2, IL-12 及び IFN- γ 産生には大きな変化がみられなかったが，IL-5, IL-6 及び IL-10 産生は抑制された（図 3）。これらのサイトカインは免疫応答に重要な役割を有するヘルパー T 細胞（Th）を分化させる際に重要な役割を果たし，Th1, Th2 細胞によって形成される免疫調節のバランス（Th1/Th2 バランス）を制御している。IL-5, IL-6 及び IL-10 は Th2 型の分化に関与しており，プロシアニジ

ンは Th2 型の分化を抑制することによって, Th1/Th2 バランスを改善することが示唆された (図 3)。

さらに, 小腸から腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) を分離精製し, サブセット解析を行った. 脾臓 T 細胞などの全身免疫系 T 細胞が $\alpha\beta$ T 細胞レセプター (TCR $\alpha\beta$) を発現し, 細胞表面マーカー CD4, CD8 の発現により 2 つのサブセット (TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$, TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $^+$) に分類されるのに対し, IEL には TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞が約半分を占め, CD4, CD8 α 鎖, CD8 β 鎖の発現とあわせて 5 つのサブセット (TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$, TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^+$ CD8 $^+$, TCR $\alpha\beta^+$

CD8 $\alpha\alpha^+$, TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$, TCR $\gamma\delta^+$ CD8 $\alpha\alpha^+$) に分類される. これらのサブセットの割合に対するプロシアニジン類の経口投与による影響を検討したところ, 対照群と比べ TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞組成比の有意な増加が認められた. また, その現象には濃度依存性が確認された (表 1). このことは, プロシアニジン類は経口感作誘導による TCR $\gamma\delta$ -T 細胞の減少を抑制することにより, OVA の経口感作を抑制し, 経口免疫寛容を誘導する可能性が示唆された. しかも, プロシアニジン類の構成単位であるカテキン類には腸管免疫寛容誘導能は観られなかった. プロシアニジン類の

図 2 リンゴプロアントシアニジン類の血清中 OVA 特異的抗体に与える影響

^a Bars represent mean values $\pm$ S.D. of 4 mice. ^b Bars represent mean values $\pm$ S.D. of 5 mice.

* $p < 0.05$ in comparison with control (saline).

図 3 脾臓細胞におけるサイトカイン産生に与えるリンゴ由来プロシアニジン類の影響

Bars represent mean values $\pm$ S.D. of 5 mice.

* $p < 0.05$ in comparison with control.

表 1 W/W^{*} マウスにおける腸管上皮リンパ球の表面抗原抗体の解析

	CD3+ β 7+ (T Cell)	CD4+CD8+ (TCR $\alpha\beta$ CD4CD8 $\alpha\alpha$)	CD4+CD8 α - (TCR $\alpha\beta$ CD4)	CD8 α +CD8 α - (CD8 $\alpha\alpha$)	CD8 α +CD8 β + (TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\beta$)	TCR $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ + (TCR $\gamma\delta$)	TCR $\alpha\beta$ + $\gamma\delta$ - (TCR $\alpha\beta$)
Control	82.6 $\pm$ 5.1	29.1 $\pm$ 5.7	15.8 $\pm$ 5.9	37.2 $\pm$ 6.1	32.5 $\pm$ 8.43	1.0 $\pm$ 0.7	90.3 $\pm$ 1.5
0.1% ACT	84.5 $\pm$ 5.5	29.0 $\pm$ 8.1	12.9 $\pm$ 5.9	38.3 $\pm$ 4.7	33.9 $\pm$ 11.0	2.2 $\pm$ 1.2	90.9 $\pm$ 1.6
0.5% ACT	88.9 $\pm$ 3.6	33.8 $\pm$ 5.1	16.4 $\pm$ 4.4	44.6 $\pm$ 5.4	30.5 $\pm$ 7.05	2.6 $\pm$ 1.0*	90.7 $\pm$ 2.3
1% ACT	90.1 $\pm$ 2.2*	25.3 $\pm$ 7.5	10.7 $\pm$ 2.0	49.9 $\pm$ 6.1	31.7 $\pm$ 8.4	10.1 $\pm$ 1.7*	84.7 $\pm$ 1.9*

* Significantly different from control at $p < 0.05$ respectively.

図 4 リンゴポリフェノールのメラニン生成抑制作用

B16 メラノーマ細胞の細胞増殖に影響の観られない濃度においてリンゴポリフェノールおよびプロシアニジン類は強いメラニン生成抑制作用を示した。

重合度と経口免疫寛容誘導との関係については今後の課題である。

2-2 メラニン生成抑制作用

メラニンとは、皮膚や毛髪の色などに関連している色素で、皮膚組織に存在しているメラノサイト（色素細胞）において生合成されている。通常は、生成した色素を皮膚組織へと転送しているが、紫外線（UV）などの刺激や老化による色素生成の異常によって、メラニン生成が亢進すると色素沈着やシミ、老人性色素斑などを生じる。また、UVによって発生する活性酸素によって皮膚組織に存在するコラーゲンの変成、減少を引き起こす。さらには、DNA 傷害によって皮膚ガンの原因となることも知られている。

そこで、培養細胞を用いてリンゴポリフェノールのメラニン生成抑制作用を検討した⁶⁾。各濃度に調製した試料を添加し、3日間培養後、B16 メラノーマ細胞内のメラニン生成量を求めた。その結果、図4に示したように、リンゴポリフェノールは細胞増殖に影響を与えない濃度において、濃度依存的にメラニン生成を抑制した。またリンゴポリフェノールから分画したプロシアニジン画分は、強いメラニン生成阻害活性を示したが、他のリンゴポリフェノール由来のフェノールカルボン酸類画分やフラボノール画分

（フロレチン配糖体類など）にはメラニン生成抑制作用は認められなかった。このことから、メラニン生成抑制作用には、プロシアニジン類が関与していると思われる。更に、重合度別にプロシアニジン類を分離し、そのメラニン生成抑制作用を検討した。その結果、3から5量体画分が強い抑制効果を示し、主要活性成分だと思われる（図5）。

次に、DBA/2N マウスを用いて UV 照射による色素沈着に与えるリンゴポリフェノールの影響について検討した。UV-B (180 mJ/cm²) を二週間連続照射し、耳介部での色素沈着を測定した。測定は、表皮を剥離後、ドーパ染色し単位面積当たりの陽性メラノサイトの数を求めた。1% プロシアニジン類を塗布することにより表皮の剥離などが少なくなった。特に、4量体（1%）群では炎症による皮膚の赤色も少なくなり、ドーパ陽性メラノサイト数はコントロールに比較して有意に ($p < 0.01$) 減少し、メラニン生成を抑制していた（図6）。また、表皮組織を観察するため中性ホルマリンで固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色し顕微鏡観察した。コントロールでは紫外線による表皮の肥厚および基底層の乱れが見られるのに対して、試料を塗布することによって肥厚が改善する傾向が見られた（図7）。一方、ビタミンC誘導体（1%）では、プロシアニジン類は

図 5 リンゴプロシアニジン類の重合度別メラニン生成抑制作用

図 6 ドーパ陽性メラノサイト数

14日間連続 UV-B (180 mJ/cm²) 照射後、マウス耳介部でのドーパ陽性メラノサイト数を測定した。

** : $p < 0.01$ % 有意 (対コントロール群)

どの効果は観られなかった。以上のことからリンゴポリフェノールは UV などによって受ける皮膚組織のダメージを改善する可能性が示唆された。

リンゴポリフェノールを経口摂取した場合に美白・美肌作用を示すかという点に関しては、重大な関心事であるが、リンゴポリフェノールやその成分であるプロシアニジン類は強い抗酸化作用を示すことから UV 照射による活性酸素の発生を抑え、皮膚組織を体内から防御することが期待される。

3. 食品素材としての応用

本稿で紹介したリンゴポリフェノールの機能性はいずれも食品として摂取した場合に、腸内環境という“ブラックボックス”が関与している。経口免疫寛容は腸内が直接の関連部位であるし、美白・美肌においては、摂取されたポリフェノールがそのまま、もしくは腸内細菌によって分解、代謝され体内に吸収された後、皮膚組織において抗酸化作用を発揮すると思われる。また、プロシアニジン類は吸収という点では、分子量が大きな成分であり、腸管から吸収されにくい成分であるが腸内細菌叢を変化させることで体内環境を整え、美容的な作用を示すのかもしれない。

普段の食生活などの生活習慣によってアレルギー、肥満、糖尿病、心臓病などのいわゆる生活習慣病を引き起こすことが知られている。リンゴポリフェノールは食品として摂取することで、アレルギーの予防や脂質代謝の制御によってこれら生活習慣病を予防することが期待される。また、日本は高齢化社会を迎え、より若く、美しく、楽しく年をとるアンチエイジングも大きな課題となっている。体内環境を整え、身体の内外をできるだけ健全な状態で維持することが重要であり、リンゴポリフェノールはその一助となるとと思われる。

4. おわりに

食品素材を安心して利用するためにはこれまで以上にその安全性が重要となっている。リンゴはこれまでの長い食経験に加え、抗変異原性や亜慢性毒性などの動物試験の結果、リンゴポリフェノール (Applephenon®) の安全性が確認され¹⁰⁾、米国 FDA が認可する Generally Recognized As Safe (GRAS) を取得することができた。

ヨーロッパでは、「An apple a day keep a doctor away」

図 7 UV 照射による皮膚組織への影響

UV 照射により基底層から表皮までの組織が乱れ、肥厚が観られるのに対して (①, コントロール), プロシアニジン 4 量体を塗布した組織では (②, 4 量体塗布群), 表皮組織の乱れもなく、肥厚も少ない。また、ドーバ染色により染色される細胞も少ない。ヘマトキシリン・エオジン染色 (③) とドーバ染色 (④)。

文 献

- 1) Shoji, T., Mustuga, M., Nakamura, T., Kanda, T., Akiyama, H. and Goda, Y., "Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by NMR at low temperature" *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 3806-3813 (2003).
- 2) Ohnishi-Kameyama, M., Yanagida, A., Kanda, T. and Nagata, T., "Identification of catechin oligomer from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry" *Mass Spectrometry*, **11**, 31-36 (1997).
- 3) Eberhardt, M.V., Lee, C. Y. and Liu, R.H., "Antioxidative activity of fresh apples" *Nature*, **405**, 903-904 (2000).
- 4) Yanagida, A., Kanda, T., Tanabe, M., Matsudaira, F. and Oliveira-Cordeiro, J.G., "Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on carcinogenic factors of mutans *Streptococci*" *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5666-5671 (2000).
- 5) Akiyama, H., Sakushima, J., Taniuchi, S., Kanda, T., Yanagida, A., Kojima, T., Teshima, R., Kobayashi, Y., Goda, Y. and Toyoda, M., "Antiallergic effect of apple polyphenols on the allergic model mouse" *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1370-1373 (2000).
- 6) Shoji, T., Masumoto, S., Kobori, M., Moriichi, N., Kanda T., Shinmoto, H. and Tsushida, T. "Procyanidins trimers-to-pentamers from Apple inhibited Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cells" *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6105-6111 (2005).
- 7) Hibasami, H., Shoji, T., Shibuya, I., Higo, K. and Kanda, T. "Induction of apoptosis by three types of procyanidin isolated from apple (*Rosaceae Malus pumila*) in human stomach cancer KATO III cells" *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 795-799 (2004).
- 8) Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R. and Saito, Y., "Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells" *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1284-1289 (1998).
- 9) Akiyama, H., Sato, Y., Watanabe, T., Nagaoka, M.H., Yoshioka, Y., Shoji, T., Kanda, T., Yamada, K., Totsuka, M., Teshima, R., Sawada, J., Goda, Y. and Maitani, T. "Dietary unripe apple polyphenol inhibits oral sensitization and food allergy in a marine model" *FEBS Letter*, **579**, 4485-4491 (2005).
- 10) Shoji, T., Akazome, Y., Kanda, T. and Ikeda M. "The toxicology and safety of apple polyphenol extract" *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 959-967 (2004).

(平成 17 年 11 月 10 日受理)

と言われ、リンゴが健康に良い果物の象徴であった。必ずしも、ポリフェノールだけで十分な機能が期待されるわけではないが、さまざまな素材との組み合わせにより、一層効果的で、広範囲な分野への応用が期待される。