海苔発酵エキスの投与が高血圧自然発症ラットの血圧に及ぼす影響

梅川逸人[§], 辰野拓也*, 王 姫, 平山 碧,
服部美香, 荒木利芳

三重大学大学院生物資源学研究科
* 株式会社永谷園

Effect of *Porphyra* Extract on Blood Pressure
in Spontaneously Hypertensive Rats

Hayato Umekawa[§], Takuya Tatsuno*, Ya Wang,
Midori Hirayama, Mika Hattori
and Toshiyoshi Araki

Graduate School of Bioresources, Mie University,
1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507
* Nagatanien Co., LTD., 1-17-8 Higashi-Rokugo,
Ota-Ku, Tokyo 144-8520

The effect of *Porphyra* extract (PE), containing 10.5% of γ -aminobutyric acid (GABA), on blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHRs) was examined. Single dose oral administration of PE (2 mg/kg of rat weight) in SHRs showed a significant reduction in systolic blood pressure. SHRs fed a diet containing PE at the level of 0.003% for 35 days showed a significantly lowered blood pressure compared to the control group. Moreover, these same rats showed lowered angiotensin I-converting enzyme (ACE) activities in the serum, abdominal aorta and lung. On the other hand, the concentration of PE producing 50% inhibition of rabbit lung ACE activity *in vitro* was 0.47 mg/ml. These results suggest that the lowered blood pressure of SHRs was due to GABA and some ACE inhibitory components in PE.

(Received Jun. 9, 2008; Accepted Jul. 3, 2008)

Keywords: γ -aminobutyric acid (GABA), angiotensin I-converting enzyme, hypotensive effect, *Porphyra* extract, spontaneously hypertensive rats (SHRs)

キーワード: 海苔発酵エキス, 高血圧自然発症ラット (SHR), γ -アミノ酪酸 (GABA), アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 降圧作用

我が国の重要な産業海草であるアマノリ (海苔) は、古くから食用としてなじみ深い。近年生活習慣病の予防に効果のある機能性物質が含まれていることが明らかとなってきた。すなわち、海苔のペブシン消化物から得られたオリゴペプチドの降圧作用¹⁾、海苔オリゴ糖による血清コレステロール低下作用²⁾や抗腫瘍作用³⁾などが報告されてお

り、健康食品としても注目されている。しかしながら、これら有用成分も細胞壁により消化吸収が妨げられているため、海苔の機能性物質の効率的な吸収を促進する加工技術の開発が求められている。

最近、 γ -アミノ酪酸 (GABA) を生産する乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*) を用いて、海苔を発酵させ、海苔発酵エキスを製造する技術が確立された⁴⁾。GABA は血管弛緩作用⁵⁾、交感神経抑制作用⁶⁾、ナトリウム利尿作用⁷⁾などにより、降圧効果を示すことが明らかにされている。

そこで本研究では、海苔発酵エキスを高血圧自然発症ラット (SHR) に単回または長期投与した際の血圧上昇抑制作用について検討した。

1. 実験方法

(1) 実験材料

海苔を乳酸菌で発酵させた海苔発酵エキスを使用した⁴⁾。すなわち、海苔 300 g、水 2 500 g およびクエン酸 25 g を 80°C で加熱混合した後、酸性プロテアーゼ (HBI 社製 オリエンターゼ 20A) 2.5 g を添加して 50°C で 24 時間処理し、グルタミン酸ナトリウム 50 g を加えて 120°C、30 分間加熱滅菌した。得られた佃煮状の海苔ペーストに、GABA 産生能を有する乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*) を植菌して 35°C で 3 日間発酵させ、発酵物を遠心分離 (12 000 × g, 10 分間) した上清を凍結乾燥して海苔発酵エキスを得た。海苔発酵エキスは 10.5% の GABA を含む。

試薬として GABA (ナカライテスク製) を用いた。

(2) 海苔発酵エキスのラットへの直接投与試験

高血圧自然発症ラット (SHR/Izm, 雄, 9 週令, 日本エスエルシー) を 1 群 7 頭として用いた。ラットは一定温度 (22°C) の動物室で飼育し、朝 8 時から 20 時までの 12 時間を明期とし、SHR 専用飼料 (SP) (船橋農場) で 1 週間予備飼育を行った後、2 群に分けた。実験飼料と水は自由摂取とし、16 時間絶食させた後、蒸留水に溶解した海苔発酵エキスをゾンデにて胃内に直接投与した。コントロールには蒸留水を用いた。血圧の測定は、非観血的血圧測定装置 (ソフトロン, BP-98A) を用いて 2 時間, 5 時間, 9 時間, および 24 時間後に行った。なお、動物実験は三重大学動物実験取扱規定に従って行った。

(3) 海苔発酵エキスの摂食試験

高血圧自然発症ラット (SHR/Izm, 雄, 5 週令, 日本エスエルシー) を 1 群 7 頭として用いた。ラットの飼育条件は予備飼育も含めて上記と同様で、餌と水は自由摂取とした。実験飼料は予備飼育と同様の SP をコントロール食とし、これに海苔発酵エキスを 0.001% および 0.003% 混合したものを調製した。また、GABA 単独の影響を検討するため、コントロール食に 0.000315% GABA を混合した飼料 (0.003% 海苔発酵エキスに含まれる GABA 量に相当) も調製した。血圧の測定は、上記と同じ装置を用いて 1 ないし 2 日おきに行った。

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* 〒144-8502 東京都大田区東六郷 1-17-8

[§] 連絡先 (Corresponding author), umekawa@bio.mie-u.ac.jp

Fig. 1 Effects of single oral administration of *Porphyra* extract on systolic blood pressure in SHR.

—○—, Control; —■—, 2 mg PE/kg B.W. Each point indicates mean of 7 SHRs and vertical bars represent S.E.M. Significant difference from control: ** $p < 0.01$.

(4) 組織 ACE 活性測定

飼育終了後, SHR をエーテル麻酔下にて開腹した後, 腹部大動脈より脱血屠殺し, 肺および腹部大動脈を摘出した。採取した血清の ACE 活性は血液を室温で 1 時間放置後, 遠心分離により血清画分を集め測定した。肺および腹部大動脈の ACE 活性画分については前報と同様の方法⁸⁾にて抽出した。以下の操作は特に断りがない限りすべて 4°C で行った。肺および腹部大動脈を摘出後, 直ちに 4 倍量の 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.9), 0.3 mol/L NaCl を加え, 氷中でポリトロンホモジナイザーを用いて均一化し, 44 000×g, 90 分間超遠心分離を行った。得られた沈殿物に再度上記の buffer を加え, 同条件で超遠心分離を行い洗浄した後, 4 倍量の 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.9), 0.3 mol/L NaCl, 0.5% Triton X-100 を加えて 1 時間抽出し, 1 000×g で 10 分間遠心して得られた上清をサンプルとした。ACE 活性測定は Lieberman の測定方法を改良した山本らの方法⁹⁾に準じて行った。すなわち, 1 mol/L NaCl を含む 0.1 mol/L sodium borate buffer (pH 8.3) に 12.5 mmol/L の hippuryl-His-Leu (シグマ) を溶解したものを 50 μL と上記サンプル溶液 75 μL を混合し, 37°C で 60 分間インキュベートした後, 1 mol/L HCl を 75 μL 加えて反応を停止した。遊離した馬尿酸を酢酸エチル 450 μL を加えて抽出し, 228 nm の吸光度を測定した。

(5) ACE 阻害活性の測定

ACE 阻害活性の測定は前述と同様の方法で行った。1 mol/L NaCl を含む 0.1 mol/L sodium borate buffer (pH 8.3) に 5 mmol/L の hippuryl-His-Leu と海苔発酵エキスを混合し, 0.004 unit ウサギ肺 ACE (シグマ) を加えて 37°C で 60 分間インキュベートした。反応は 1 mol/L HCl で停止し, 遊離した馬尿酸は(4)と同様の方法で測定した。試料の代わりに蒸留水を用いたものをコントロールとし下

Fig. 2 Effects of feeding of *Porphyra* extract on systolic blood pressure during the development of hypertension in SHR.

—○—, Control; —□—, 0.001% PE; —■—, 0.003% PE; —▲—, 0.000315% GABA. Each point indicates mean of 7 SHRs and vertical bars represent S.E.M. Significant difference from control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

記の式より阻害率を求めた。

$$\text{ACE 阻害率 (\%)} = 100 - \left\{ \frac{(\text{サンプル・ブランク})}{(\text{コントロール・ブランク})} \right\} \times 100$$

また, 上記の式から ACE 活性を 50% 阻害するのに必要なサンプル濃度を IC₅₀ とした。

(6) タンパク質の定量

タンパク質の定量はウシ血清アルブミン (シグマ) を標準物質として, Bio-Rad Protein Assay (バイオ・ラッドラボラトリーズ) 用いて行った¹⁰⁾。

(7) 統計処理

実験データは平均値±標準誤差で表した。有意差の検定はエクセル統計 2006 を用い, 等分散性の仮定が棄却されなかった場合は, Tukey の多重比較検定法で行ったが, 等分散性の仮定が棄却された場合は, クラスカル・ウォリス検定を行った (有意水準 1%, 5%)。

2. 実験結果および考察

(1) 海苔発酵エキスの SHR への単回投与試験

SHR の体重 1 kg あたり 2 mg の海苔発酵エキスを胃内に単回投与を行い, 経時的に収縮期血圧を測定し, その降圧作用について検討した結果を Fig. 1 に示す。海苔発酵エキス投与群は, 投与 5 時間後と 9 時間後にコントロール群に対して, それぞれ 28.0 mmHg および 17.7 mmHg 低値を示し, 有意な血圧降下作用が認められた。また, 海苔発酵エキス投与群は 24 時間後には投与前の最高血圧値付近まで戻ることが観察された。

(2) 海苔発酵エキスの SHR への 5 週間投与試験

実験飼料投与後の SHR の最高血圧の変化を Fig. 2 に示す。海苔発酵エキス投与群の血圧はコントロール群と比較して低値を示した。特に 28 日目から試験終了の 35 日目ま

Fig. 3 Effects of feeding of *Porphyra* extract on ACE activity in serum and tissues of SHR.

One unit of ACE is defined as the amount of enzyme required to produce 1 nmol of hippuric acid per minute. Each column indicates mean of 7 SHRs and vertical bars represent S.E.M.

Values not sharing the same superscripts are significantly different (b : $p < 0.05$, c, d : $p < 0.01$).

で、海苔発酵エキス 0.003% 群はコントロール群に対して有意に低値を示し、最も差が見られた 30 日目においてはコントロール群の 186.5 ± 5.5 mmHg に対し 24.8 mmHg 低値を示した ($p < 0.01$)。本実験に用いた海苔発酵エキスには 10.5% の GABA が含まれるため、海苔発酵エキス 0.003% を含む飼料には 0.000315% の GABA が存在する。GABA 0.000315% 群は GABA 標品を直接飼料に混合したもので、SHR の血圧はコントロール群より低値を示したものの有意差は認められなかった。Hayakawa らは SHR に対して GABA を 0.001% 含む飼料を長期間与え、有意な降圧効果を得ている¹¹⁾。本実験の GABA 0.000315% 群はその 3 分の 1 以下の含量であり、濃度的に十分な降圧作用が得られなかったものと考えられる。それに対し、海苔発酵エキス 0.003% 群は 0.000315% の GABA 量で有意な降圧作用を示している点から、海苔発酵エキスには GABA 以外に血圧降下作用を有する物質が含まれることが示唆された。なお、飼育期間中 SHR の体重は各群ともに順調に増加し、飼育終了時のラットの体重はそれぞれコントロール群で 313.5 ± 7.4 g、海苔発酵エキス 0.001% 群で 304.5 ± 4.8 g、0.003% 群で 306.7 ± 4.9 g、GABA 0.000315% 群で 318.0 ± 7.4 g であり、各群間で SHR の体重に有意差は認められなかった。

(3) SHR 組織の ACE 活性

海苔発酵エキス 5 週間投与後の SHR の血清、腹部大動脈、肺の ACE 活性を Fig. 3 に示す。海苔発酵エキス 0.003%

投与群は、血清、腹部大動脈、肺のいずれにおいてもコントロール群に対して有意に低値を示した。これら各組織の ACE 活性の低下は、吸収された海苔発酵エキスによるものと考えられた。また、血清と肺において GABA 0.000315% 群は、海苔発酵エキス 0.003% 群より作用は弱いもののコントロール群に対して低値を示した。Abe らは中枢神経系において GABA がレニンおよびアンジオテンシン II による血圧上昇を抑制することを報告しており¹²⁾、末梢においても GABA がレニン-アンジオテンシン系の血圧調節機構に関与している可能性が示唆された。

(4) 海苔発酵エキスの ACE 阻害活性

海苔発酵エキスの *in vitro* における ACE 阻害活性測定結果を Table 1 に示す。海苔発酵エキスは ACE 阻害作用 ($IC_{50} = 0.47$ mg/mL) を示した。GABA は *in vitro* では ACE 阻害作用を示さないことがすでに報告されており¹¹⁾、本実験においてもそれが確認された ($IC_{50} > 30$ mg/mL)。Fig. 3 で 0.000315% GABA 投与群が *in vivo* において弱い ACE 阻害活性しか示さないところから、0.003% 海苔発酵エキス投与による各臓器 ACE 活性の有意な低下作用は、海苔発酵エキスに含まれる何らかの ACE 阻害成分が主に関与しているものと考えられる。

本実験に用いた海苔発酵エキスには 10.5% の GABA が含まれており、海苔発酵エキス投与による血圧降下作用の一部は GABA によるものと考えられる。最近、醤油⁷⁾やジャガイモスナック菓子¹³⁾などに GABA を含有した食品

Table 1 Inhibition of ACE activity by *Porphyra* extract

Agents	IC ₅₀ (mg/ml)
PE	0.47
GABA	> 30

IC₅₀ value is defined as the concentration of each agents required to produce 50% inhibition of enzyme activity.

が、SHR の血圧を降下させることが報告されている。これらの実験において、GABA を含有する食品を SHR に投与した際の血圧降下の程度は、それら食品に含まれる GABA と等量の GABA 標品を与えた場合の血圧の変化とほぼ同様であるが、本研究においては、Fig. 2 に示すように、海苔発酵エキスを含有する GABA と等量の GABA 標品を SHR に与えた場合、降圧効果は著しく弱まる。Table 1 に示すように、海苔発酵エキスが ACE 阻害作用を示すことや Fig. 3 で海苔発酵エキスを投与した SHR の血清、腹部大動脈、肺の ACE 活性が有意に低下することなどから、海苔発酵エキスによる血圧降下作用は GABA と ACE 阻害成分の両方がラットに作用した結果と考えられる。

以上の結果から、海苔発酵エキスは非常に低濃度で降圧作用を示すことが明らかとなり、高血圧を予防する機能性食品としての利用が期待される。

3. 要 約

海苔発酵エキスを SHR の体重 1 kg あたり 2 mg を経口単回投与したところ、血圧降下作用が認められた。さらに、海苔発酵エキスを飼料中重量比で、0.001%、0.003% になるように混合し、35 日間摂取させ SHR の血圧上昇に及ぼす影響について検討したところ、血圧上昇抑制作用が認められた。また、長期投与試験終了後の SHR の血清、腹部大動脈、肺の ACE 活性が低下していた。

以上の結果より、海苔発酵エキスは SHR に対して降圧作用を示すこと、そして降圧物質として GABA に加えて ACE 阻害成分が血圧調節系に作用したためと推察される。

文 献

- 1) 斉藤雅信，萩野浩志，ノリオリゴペプチドとその主要成分

Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr のラットにおける血圧低下作用，栄食誌，**58**，117-184 (2005)。

- 2) 大住幸寛，川合正充，天野秀臣，野田宏行，ポルフィラン由来オリゴ糖の消化・発酵性と血清コレステロール低下作用，日本水産学会誌，**64**，98-104 (1998)。
- 3) 大住幸寛，川合正充，天野秀臣，野田宏行，スサビノリポルフィラン由来オリゴ糖の抗腫瘍活性，**64**，847-853 (1998)。
- 4) 熊谷道正，辰野拓也， γ -アミノ酪酸含有食品素材の製造方法，特許公開 2008-86292，(2008. 4. 17)。
- 5) Lai, F., Tanikella, T. and Cervoni, P., Effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on vasodilation in resistance-sized arteries isolated from the monkey, rabbit and rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12**, 372-376 (1988)。
- 6) Hayakawa, K., Kimura, M. and Kamata, K., Mechanism underlying γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **438**, 107-113 (2002)。
- 7) Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M. and Kawasaki, T., Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 165-173 (2007)。
- 8) 梅川逸人，中井伸行，吉田沙織，古市幸生，松永正好，たまり醤油粕の投与が高血圧自然発症ラットの血圧の及ぼす影響，食科工，**12**，655-658 (2006)。
- 9) 山本節子，戸井田一郎，岩井和郎，血清アンギオテンシン変換酵素測定法の検討，日本胸部疾患学会雑誌，**18**，297-303 (1980)。
- 10) Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)。
- 11) Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H. and Yamori, Y., Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and mormotensive Wiater-Kyoto rats. *Br. J. Nutri.* **92**, 411-417 (2004)。
- 12) Abe, M., Tokunaga, T. and Yamada, K., γ -aminobutyric acid and taurine antagonize the central effects of angiotensin II and renin on the intake of water and salt, and on blood pressure in rats. *Neuropharmacol.* **27**, 309-318 (1988)。
- 13) 野口智紀，中村和哉，長井 武，勝田真一，古賀秀徳， γ -アミノ酸を添加したジャガイモスナック菓子の高血圧自然発症ラットにおける血圧降下作用，食科工，**54**，75-81 (2007)。

(平成 20 年 6 月 9 日受付，平成 20 年 7 月 3 日受理)