研究ノート

エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の マウス血中の IgG および IgA の産生増強効果

鷲家勇紀, 西川友章, 藤野槌美*

名古屋製酪株式会社中央研究所バイオ開発室

Enhancement of Serum Immunoglobulins G and A Production by Non-degassed Roasted Coffee Bean Extract

Yuki Washiya, Tomoaki Nishikawa and Tsuchiyoshi Fujino*

Biodevelopment Division, Central Institute, Nagoya Seiraku Co. Ltd.,
310 Nakasuna-cho, Tempaku-ku, Nagoya, Aichi 468-0065

We found that many volatile compounds were decreased from coffee extracts through a degassing process performed in commercial roasted coffee beans. Extracts of non-degassed roasted coffee beans enhanced serum IgG and IgA production in mice. Moreover, we found that 2,5-dimethylpyrazine and 2,6-dimethylpyrazine, which were decreased by degassing, were mainly involved in the effect. In addition, 2-methylpyrazine enhanced serum IgG production. These results indicate that non-degassed roasted coffee bean extract include sufficient volatile compounds to enhance serum IgG and IgA production in mice. (Received Apr. 23, 2014; Accepted May 30, 2014)

Keywords : coffee, degassing, flavor, immunoglobulin, pyrazine

キーワード : コーヒー, エージング処理, 香気成分, 免疫グロブリン, ピラジン

コーヒーの機能性に関する研究は、1820年にコーヒーの機能性成分としてカフェインが分離されるなど、古くから行われてきた。最近では、コーヒー抽出液中の含有成分であるピリジニウム化合物の脳卒中抑制効果¹⁾、カフェインのパーキンソン病のリスク軽減²⁾、フェルラ酸の高血圧改善効果³⁾など、様々な有効性が報告されている。また揮発性成分によるリラックス効果⁴⁾、ストレス緩和効果⁵⁾、抗不安効果⁶⁾など、精神衛生上の改善効果をもたらすことが報告されている。このようにコーヒーの機能性は、コーヒー抽出液中の含有成分、並びにコーヒーから揮散する揮発性成分に認められている。

煎りたてのコーヒー焙煎豆は、焙煎過程において生成した大量の炭酸ガスを蓄えている。これをそのまま包装容器に封入すると、放出された炭酸ガスが包装容器中に充満し、膨張、破裂させることがある。そこで市場に流通する量産された包装済みのコーヒー焙煎豆は、エージングと呼ばれる炭酸ガスのガス抜き処理が施されている。一方、近年エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆を流通可能にする技術が開発されている。これは焙煎したコーヒー豆を直ちに急速冷凍後、冷凍または冷蔵保存することによって炭酸ガスの放出を抑制する技術である⁸⁾⁹⁾。

筆者らは、エージング処理の有無によるコーヒー抽出液の含有成分量、および機能性の差異について前報で検証した。その結果、エージング処理によって多くの揮発性成分が減少することが明らかになった。またエージング処理されていないコーヒー焙煎豆に高い腸管 IgA 産生誘導効果が認められ、エージング処理時間の経過と共に効果が弱まることを報告した¹⁰⁾。

このように焙煎後のエージング処理による揮発性成分の減少が、機能性に影響することが明らかになってきた。本研究では、エージング処理の有無によるコーヒーの機能性の差異をさらに検証するため、マウスにおける血中の免疫グロブリン産生増強効果を検証した。

1. 実験方法

前報¹⁰⁾に準じて、以下の(1)から(8)の実験材料、評価方法を用いて検証を行った。

(1) コーヒー焙煎豆抽出液の調製

コーヒー焙煎豆は、コーヒー生豆(ブラジルサントス No. 2)をL値22まで焙煎した。焙煎終了後、テスト用プラスチックフリーザーによって急速冷凍(−17℃以下)を行い、コーヒー焙煎豆の余熱を除去した。急速冷凍後、500ml容のアルミパウチに焙煎豆を30gずつ充填、密閉した。エージン

表 1 エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液中の各揮発性成分濃度¹⁰⁾

グループ名	化合物名	含有濃度 (ppm)	グループ名	化合物名	含有濃度 (ppm)
aldehyde 類	acetaldehyde	8.3	pyrazine 類	pyrazine	0.6
	pentanal	0.8		2-methylpyrazine	16.0
	2-methylbutanal	2.3		2,5-dimethylpyrazine	5.0
	3-methylbutanal	2.1		2,6-dimethylpyrazine	6.2
furan 類	furan	0.9		ethylpyrazine	4.8
	2,5-dimethylfuran	0.1		2,3-dimethylpyrazine	2.2
	2,3,5-trimethylfuran	0.2		2-ethyl-5-methylpyrazine	0.6
	3-methyltetrahydrofuran	0.2		2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	0.2
	2-acetylfuran	0.3	含硫化合物類	dimethylsulfide	3.3
	furfurylpropionate	0.2		thiophene	4.2
ketone 類	2,3-butandione	4.8		2-methylthiophene	2.0
	3-hexanone	0.1		3-methylthiophene	1.9
	2,3-pentanedione	2.1		4-methylthiazole	1.0
	2-hexanone	0.1	混合群	1-methylpyrrole	3.4
	2-methyl-3-hexanone	0.7		3-methylphenol	3.5
				pyridine	3.8
				trimethyloxazole	1.0
				2,5-dimethyl-1H-pyrrole	1.2

※エージング処理 (96 時間) によってコーヒー抽出液中への残存量が 80 % 以下になった成分

グ処理をしていないコーヒー焙煎豆はアルミパウチ内に密閉後、直ちに -30°C にて保存した。一般的な製造工程と同様の条件 [常温 (25°C) 以上で 48~168 時間保持] を用い、48, 72, 96 および 168 時間エージング処理後、 -30°C にて保存した。なおエージング処理中に放出した炭酸ガスがアルミパウチ内圧を上昇させ、ガス放出を妨げる可能性があるため、アルミパウチ内の揮発性成分を含む炭酸ガスを 24 時間に 1 度放出した。

以上のように調製した各コーヒー焙煎豆は中細挽きにした後、挽き豆重量に対し 10 倍量の熱湯 (90°C) を混合して 2 分間静置して抽出した。その後数回攪拌し、ろ過処理したコーヒー抽出液を各試験に供した。

(2) 揮発性成分の分析

20 ml 容の GC 用スクリュキャップ付きバイアル瓶にコーヒー抽出液を満量である 20 ml、および内標準物質として 100 ppm cyclohexanol を 5 μl 充填して、密閉した。その後、 60°C 20 分間予備保温して、固相抽出マイクロファイバー (Superco 製, DVB/Carboxen/PDMS) に抽出液中の揮発性成分を 30 分間吸着させた。分析条件は以下の通りとした。GC/MS は 7890A/7000B (Agilent 製)、カラムは VF-WAXms (Varian 製, $60\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.39\text{ mm}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$) を用いた。

GC の条件は注入口温度 250°C 、スプリットレス、昇温条件は 40°C 5 分保持後、 100°C までは $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $100\sim 230^{\circ}\text{C}$ は $8^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 230°C 5 分保持した。MS の測定条件はスキャンモード、イオン源温度 230°C 、イオン化電圧 70 eV とした。

(3) 試験動物の飼育

試験動物は ICR マウス (6 週齢, 雄性) を日本エスエル

シー株式会社から購入し、室温 $23\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間 (午前 7 時半~午後 7 時半) の明暗サイクルの環境下で飼育した。水と飼料 (日本クレア製 CE-2 固形飼料) は自由摂取とした。試験動物は入手後 1 週間の馴化期間を経て、試験に供した。

なお本実験では「実験動物の飼育並びに保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)」, および「めいらくグループ動物実験等に関する規程並びに実験動物の飼育及び保管等に関する基準」を遵守して実施した。

(4) エージング処理時間の異なるコーヒー焙煎豆の血中 IgA, IgG, および IgM の増強効果の検証

エージング処理時間の異なるコーヒー焙煎豆抽出液における、血中の IgA, IgG, および IgM の産生増強効果を 4 週間検証した。投与サンプルとして、(1) に準じて調製した 5 種類のエージング処理時間の異なる焙煎豆抽出液 (エージング処理なし, エージング処理 48 時間, 72 時間, 96 時間および 168 時間) を供した。なお、コーヒー抽出液の投与量は 10 ml/kg b.w. とし、1 日 1 回、胃ゾンデを用いて強制経口投与を行った。

(5) 有効成分の特定

前報でエージング処理によってコーヒー焙煎豆抽出液への残存量が 80 % 以下であった 33 成分 (表 1) を対象として、血中の IgG, および IgA 産生増強効果を 4 週間検証した。

aldehyde 群, ketone 群, pyrazine 群, および混合群に分類した水溶性成分は、各標準品試薬を蒸留水に溶解し、furan 群, 含硫化合物群に分類した水に難溶性の成分は、

図 1 エージング処理時間の異なるコーヒー焙煎豆抽出液による血中免疫グロブリン濃度の推移

エージング処理時間の異なるコーヒー焙煎豆の抽出液をマウスに4週間投与して、血中のIgG (A), IgA (B), およびIgM (C) の各濃度の推移を測定した。各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。群間の有意差が認められた投与期間のみ英文字を示し、異なる文字間で有意差 ($p<0.05$) ありとした。再現試験は各2回実施した。

各標準品試薬を0.1%CMC水溶液に分散して、それぞれ調製した。また投与に供する各標準品溶液の濃度は、表1に示すエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液中の各成分と同じ濃度に調整した。各標準品溶液の投与量、投与方法は、(4)のコーヒー抽出液に準じた。なお使用試薬は、acetaldehydeは和光純製、2,3,5-trimethylfuran、2-ethyl-5-methylpyrazine、furfurylpropionateはシグマアルドリッチ製、それ以外の試薬は東京化成工業製の試薬を使用し、何れも特級グレードを用いた。

(6) 効果を有するpyrazine化合物3成分の混合効果の検証

血中IgGの産生増強効果を示した2-methylpyrazine、2,5-dimethylpyrazine、2,6-dimethylpyrazineのpyrazine化合物3成分の混合効果を4週間検証した。

投与サンプルとして、各pyrazine化合物の混合液、比較品としてエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液を供した。なお投与に供するpyrazine化合物溶液は、表1に示すエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液中の各成分と同じ濃度に調整した。またエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液は、(1)に準じて調製した。なお、各標準品溶液、コーヒー抽出液の投与量、投与方法は、(4)のコーヒー抽出液に準じた。

(7) 血中のIgG、IgA、およびIgMの濃度測定

血中のIgG、IgA、およびIgMの各濃度の測定は、Mouse Immunoglobulin ELISA Quantitation kit (Bethyl Laboratories, Inc製)、およびマイクロプレートリーダー(DSファーマ製、Viento808)を用い、そのプロトコルに従い測定した。

(8) 統計処理

各実験のデータは平均値±標準誤差で示した。統計処理は分散分析(ANOVA)によって等分散性の有意性を確

認した後、Post-hoc試験にはTurkey-kramer法、Steel-Dwass法を用いて有意差検定を行った。有意差の判定は、 $p<0.05$ の水準で行った。

2. 結果および考察

(1) エージング処理時間の異なるコーヒー焙煎豆の血中のIgG、IgA、およびIgMの増強効果の検証

コーヒー焙煎豆のエージング処理によって、コーヒー抽出液中の多くの揮発性成分は減少する¹⁰⁾。そこでエージング処理時間の異なる(0~168時間)コーヒー焙煎豆の抽出液をマウスに投与して、マウスの血中におけるIgG、IgA、およびIgMの各濃度の経時的変化を指標として、効果を評価した。

血中IgGに対する効果を検証した結果、エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液を投与した群は投与2週間後以降、対照群に対し有意に増加した。さらに投与3週間後以降、全試験群中、最も高い値を保持しながら推移した。

一方、エージング処理時間の経過と共に、血中IgGの産生効果が弱くなった。すなわち、エージング処理が48時間以内であれば、投与2週間後以降、血中のIgG濃度が対照群に対し有意に増加したが、処理時間が72時間を超過すると、対照群に対し有意差は認められなかった(図1A)。

次に血中IgAに対する効果を検証した。血中IgGと異なり、投与3週間後においてもエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液に効果は認められなかった。

投与4週間後、エージング処理時間が48時間以内であれば血中IgA濃度が対照群に対し有意に増加した。一方、処理時間が72時間を超過すると効果は認められないことが分かった(図1B)。

また血中IgMに対する効果を検証した結果、エージン

図2 エージング処理によって減少する揮発性成分の各標準品混合物による血中IgG, IgA濃度の推移

エージング処理によって減少する揮発性成分の各標準品混合物をマウスに4週間投与して、血中のIgG (A), IgA (B)の各濃度の推移を測定した。各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。群間の有意差が認められた投与期間のみ英文字を示し、異なる文字間で有意差 ($p<0.05$) ありとした。再現試験は各2回実施した。

グ処理が48時間以内のコーヒー焙煎豆の抽出液を投与した群に投与1週間後までは増加傾向が認められた(図1C)。しかし投与1週間以降は、対照群に対して全ての群に有意差は認められなかった。

以上の結果から、エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆に、血中のIgG, およびIgAの産生増強効果が認められた。更に、エージング処理時間の経過と共に、その効果が弱まることが分かった。すなわち、エージング処理時間が48時間以内であれば効果は認められるが、処理時間が72時間を超過すると効果は認められないことが分かった。これらの結果から、血中のIgG, およびIgAの産生増強効果にはエージング処理によって減少する成分の関与が考えられた。

(2) 有効成分の特定

有効成分の特定は、前報¹⁰⁾でエージング処理によってコーヒー焙煎豆抽出液への残存量が80%以下であった33成分(表1)を対象として試験を行った。33成分を基本骨格に基づき6つのグループに分け、各組成の各標準品水溶液をマウスに投与して、血中のIgG, およびIgAの産生増強効果を検証した。なお投与した各試料の成分量は、表1記載の前報のエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の各成分と同じ濃度とした。

試験の結果、pyrazine群の血中IgGは投与2週間以降、血中IgAは投与4週間後、対照群に対し有意に増加した(図2)。一方、それ以外のグループは投与4週間後におい

ても対照群に対し有意差は認められなかった。

以上の結果から、pyrazine群の8成分のいずれかが、マウスの血中のIgG, およびIgAの産生増強効果に関与すると考えられた。

そこで、有効成分を特定するため、pyrazine群の8成分をそれぞれマウスに投与して、血中のIgG, およびIgAの産生増強効果を検証した。なお各pyrazine化合物溶液は、表1記載の前報のエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の各成分と同じ濃度とした。

試験の結果、2-methylpyrazineを投与した群は、投与3週間後に血中IgGに効果が認められた(図3A)。また2,5-dimethylpyrazine, および2,6-dimethylpyrazineを投与した群は、投与3週間後に血中IgGにおいて、投与4週間後に血中IgAにそれぞれ効果が認められた(図3)。一方他の成分は、対照群に対し効果は認められなかった。これらの結果から、血中IgG産生増強効果においては3種類のpyrazine化合物が、血中IgA産生増強効果においては2種類のpyrazine化合物が、有効成分であることが推定できた。

有効成分と推定された成分は、単独摂取の場合に比べ、複数摂取の方が、より高い血中IgG産生増強効果を示した(図2A, 図3A)。これは効果を有するpyrazine化合物を複数摂取することにより、相加的に効果を増強したためと推察される。

(3) 効果を有するpyrazine化合物の混合効果

図 3 各 pyrazine 化合物による血中 IgG, IgA 濃度の推移

各 pyrazine 化合物をマウスに 4 週間投与して、血中の IgG (A), IgA (B) の各濃度の推移を測定した。各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。群間の有意差が認められた投与期間のみ英文字を示し、異なる文字間で有意差 ($p<0.05$) ありとした。再現試験は各 2 回実施した。

効果を有する pyrazine 類の、複数摂取による相加的な効果を検証するため、血中の IgG 産生増強効果が認められた pyrazine 化合物 3 成分すべてを投与した場合の効果を検証した。すなわち、2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine 混合物の血中 IgG 産生増強効果を検証した。pyrazine 化合物の混合液は、表 1 記載の事前のエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の各成分と同じ濃度に調整した。

その結果、pyrazine 化合物 3 成分の混合物の血中 IgG 産生増強効果は、エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液と同等であった (図 4)。

以上の結果から、エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆に認められた血中 IgG 産生増強効果には、2-Methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine の 3 成分が、主要な有効成分であることが分かった。

以上のことから、コーヒーにおける血中 IgG, および血中 IgA の産生増強効果を保持するには、コーヒー焙煎豆のエージング処理をしない、或いは処理時間を極力短くすることによって、有効成分である 2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine の減少を抑制することが重要である。

今回有効成分として特定した 3 成分の作用機構については今後の研究課題であるが、体内のサイトカインの産生状況やリンパ球サブセットの分布状況の検証によって、作用機構の解明が進むものと期待できる。

図 4 効果を有する pyrazine 化合物による血中 IgG 濃度の推移

2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine の混合物、エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液を 4 週間投与して、血中 IgG 濃度の推移を測定した。各値は平均値±標準誤差 ($n=5$) で示した。群間の有意差が認められた投与期間のみ英文字を示し、異なる文字間で有意差 ($p<0.05$) ありとした。再現試験は各 2 回実施した。

3. 要 約

市販のコーヒー焙煎豆は、通常エージング処理が施されている。エージング処理によってコーヒー抽出液中の多くの揮発性成分が減少する。エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆は、血中の IgG, および IgA の産生増強効

果を誘導する。関与する成分は 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine であった。血中 IgG の産生増強効果には 2-methylpyrazine も関与した。これらの成分は何れもエージング処理時間の経過と共に減少する成分であった。以上の結果から、エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液は、血中の IgG, および IgA の産生増強効果を有することが分かった。エージング処理は焙煎豆中の有効成分の減少を招き、血中の IgG, および IgA の産生増強効果を弱めることが分かった。

文 献

- 1) Kalaska, B., Piotrowski, L., Leszczynska, A., Michalowski, B., Kramkowski, K., Kaminski, T., Adamus, J., Marcinek, A., Gebicki, J., Mogielnicki, A. and Buczek, W., Antithrombotic effects of pyridinium compounds formed from trigonelline upon coffee roasting. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 2853-2860 (2014).
- 2) Lee, K. W., Im, J. Y., Woo, J. M., Grosso, H., Kim, Y. S., Cristovao, A. C., Sonsalla, P. K., Schuster, D. S., Jalbut, M. M., Fernandez, J. R., Voronkov, M. and Junn, E., Neuroprotective and anti-inflammatory properties of a coffee component in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, **10**, 143-153 (2013).
- 3) Alam, M. A., Sernia, C. and Brown, L., Ferulic acid improves cardiovascular and kidney structure and function in hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **61**, 240-249 (2013).
- 4) 古賀良彦, 小長井ちづる, 濱田麻由子, 黒坂英夫, コーヒー豆の種類の違いによる香りのリラクゼーション効果の差異, 日本味と匂学会誌, **8**, 343-346 (2001).
- 5) 林 泰資, 曾我部咲, 服部幸雄, マウス行動分析によるコーヒー揮発成分のストレス緩和作用, 日本栄養・食糧学会誌, **64**, 323-327 (2011).
- 6) Hayashi, Y., Sogabe, S., Hattori, Y. and Tanaka, J., Anxiolytic and hypnotic effects in mice of roasted coffee bean volatile compounds. *Neurosci. Lett.*, **531**, 166-169 (2012).
- 7) 中林敏郎, 鈴木邦男, 焙煎によるコーヒー豆組織の変化, 日本食品工業学会誌, **33**, 779-782 (1986).
- 8) 日比治雄, 山梨浩利, 風味良好なコーヒー焙煎豆及びコーヒー挽き豆の製造方法, 日本特許第 2105521 号 (1996.11.06).
- 9) 日比孝吉, コーヒー焙煎豆の保存方法, 日本特許第 4795375 号 (2011.08.05).
- 10) 鷺家勇紀, 西川友章, 藤野槌美, エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の腸管 IgA 産生増強効果, 日本食品科学工学会誌, **60**, 286-294 (2013).

(平成 26 年 4 月 23 日受付, 平成 26 年 5 月 30 日受理)