大麦糠プロアントシアニジンのヒアルロニダーゼ、 リポキシゲナーゼ阻害活性及び抗補体活性

玉川浩司*・飯塚崇史*・池田彰男*・小池 肇*・長沼慶太*・小宮山美弘**

Inhibitory Effects of Proanthocyanidins Isolated from Barley Bran on Hyaluronidase Activity, Soybean Lipoxigenase Activity and Complementary Activity

Koji TAMAGAWA*, Satoshi IIZUKA*, Akio IKEDA*, Hazime KOIKE*,
Keita NAGANUMA* and Yoshihiro KOMIYAMA**

* Research and Development Center, Hakubaku Co., Ltd.,
3492 Aoyagi, Masuho-cho, Yamanashi, 400-0501

** The Yamanashi Industrial Technology Center, 2517, Katsunuma,
Katsunuma-cho, Yamanashi, 409-1316

The effects of proanthocyanidin (dimer and trimer) isolated from BPE (a polyphenol extract from barley bran) on hyaluronidase activity, soybean lipoxigenase activity and complementary activity *in vitro* were studied in comparison with catechins. Inhibition to these activities was depended on BPE concentration. Inhibition of proanthocyanidins to hyaluronidase was more effective than that of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epigallocatechin, however, less effective than that of (-)-epigallocatechin gallate ((-)-EGCG) and (-)-epicatechin gallate ((-)-ECG). The inhibitory effects of proanthocyanidins on lipoxigenase activity were found to be higher than those of catechins. The anti-complementary activities of proanthocyanidins except procyanidin B 3 were found to be same or more effective than those of (-)-EGCG and (-)-ECG. These results suggested that BPE and proanthocyanidins isolated from BPE might be good inhibitors to inflammation and allergic reaction. (Received, Feb. 16, 1999 ; Accepted, Apr. 14, 1999)

著者らはこれまで、食用大麦を製造する際、大量に発生する大麦糠中のポリフェノール成分に着目し、そこから抽出した大麦ポリフェノール抽出物BPE (Polyphenol extract from barley bran) 及びその主ポリフェノール成分であるプロアントシアニン類の機能特性について検討してきた。その結果、BPE が優れた抗酸化能及び活性酸素消去能を有していること¹⁾ や BPE より分離精製したプロデルフィニジン類がカテキン類と比較して、同等あるいはそれ以上の活性酸素消去能²⁾、生体モデル系における脂質酸化抑制作用³⁾ を有していることを明らかにした。また、ガン予防に関係する機能と

して、抗変異原性²⁾ やゲニステイン⁴⁾ やダイゼイン⁵⁾ と同様に、白血病細胞の分化を促進して脱ガンに至らせる作用を有していた⁶⁾。

近年、ポリフェノール成分の新たな機能特性として抗アレルギー作用が着目されている。緑茶^{7)~9)}、シソ¹⁰⁾¹¹⁾ 及び甜茶¹²⁾ 等に含まれるポリフェノール成分が、種々のアレルギー反応を抑制することが報告されている。また、最近では、これらの成分を既製の食品に添加した抗アレルギー効果を補足した食品 (プラス食品) の開発が行われている¹³⁾。実際にポリフェノール類を有効成分とした茶カテキン、シソエキス、甜茶エキス等を添加して

* (株)はくばく研究開発センター (〒400-0501 山梨県南巨摩郡増穂町最勝寺 3492)

** 山梨県工業技術センター (〒409-1316 山梨県東山梨郡勝沼町勝沼 2517)

抗アレルギー作用を期待した食品が製品化されている¹⁴⁾。

そこで著者らは、大麦糠より分離したポリフェノール抽出物 BPE に抗アレルギー作用があるか否かを検索するための基礎的な特性を、幾つかのアレルギー活性測定法を用いて検討した。また、BPE の主ポリフェノール成分であるプロアントシアニジン類の作用についても同様にカテキン類と比較検討した。

実験方法

1. 大麦糠からのポリフェノール抽出物 BPE の抽出及びプロアントシアニジンの分離

既報¹⁾と同方法にて、n-ヘキサンにより脱脂した六条大麦(カナダ産, B1602, 1995 年度収穫)の搗精糠(歩留まり 80~90% 区分) 1 kg より、Folin-Denis 法¹⁵⁾での測定により (+)-カテキン換算で 28.7% のポリフェノール類を含む大麦ポリフェノール抽出物 (BPE) 10 g を作製した。BPE からプロアントシアニジンの分離は McMURROUGH らの方法¹⁶⁾に準じ調製した。すなわち、メタノールで平衡化した Sephadex LH-20 (ファルマシア社製) カラム (920×30 mm I.D.) に、大麦ポリフェノール抽出物 1.0 g を吸着させ、メタノールにて流量 1.5 ml/min の条件で溶離し、溶出液の 280 nm の吸光度を測定した。各プロアントシアニジンの精製は ODS-3 (GL サイエンス社製, 250×20 mm I.D.) 分取用カラムを用い、脱イオン水とメタノール (共に 0.2% ギ酸含有) の直線的な濃度勾配により溶出、分離した。精製後の各プロアントシアニジンの純化程度は、ODS-80 Ts (TOSO 社製, 250×4.0 mm I.D.) 分析用カラムで調べた。また、LC-MS (M-1200AP, 日立製作所社製) により分子量を確認した。分離精製したプロアントシアニジンの化学構造を Fig. 1 に示した。大麦プロアントシアニジンと抗アレルギー活性を比較したカテキン類は、市販の特級試薬 (シグマ社製) を使用した。

2. ヒアルロニダーゼ阻害活性試験

測定法については、KAKEGAWA らの方法¹⁷⁾に準じた。すなわち、脱イオン水に溶解した試料 (BPE については反応系濃度で 10~300 mg %, プロアントシアニジン及びカテキン類については 0.1~2.0 mM となるように調製) 100 μ l に酵素溶液 (ヒアルロニダーゼ Type IV-S From Bovine Testes, シグマ社製-8 mg を酢酸緩衝液 (pH 4.0) 2 ml に溶解) 50 μ l を加えた。37°C で 20 分間放置後、酵素活性化溶液 (Compound 48/80, シグマ社製-2 mg 及び $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 mg を酢酸緩衝液 4 ml

Fig. 1 Structures of proanthocyanidins isolated from BPE

に溶解) 100 μ l を加えた。更に 37°C で 20 分間放置して、基質溶液 (ヒアルロン酸 (鶏冠製, 和光純薬工業社製) 8 mg を酢酸緩衝液 10 ml に溶解) 250 μ l を加えて、37°C で 40 分間反応させた。その後、0.4 N 水酸化ナトリウム 100 μ l を加え反応を停止させた後、ホウ酸カリウム溶液 (0.8 M ホウ酸水溶液 100 ml に水酸化カリウム 2.24 g を加え溶解) 100 μ l を加え、沸騰水浴中にて 3 分間加熱した。室温まで水道水で冷却後、p-ジメチルベンズアルデヒド試液 (p-ジメチルベンズアルデヒド 5 g を氷酢酸 44 ml, 10 N 塩酸 6 ml に溶解, 用時水酢酸にて 10 倍希釈) 3.0 ml を加え、37°C で 20 分間放置後の 585 nm の吸光度 (ヒアルロン酸がヒアルロニダーゼによって分解された N-アセチルグルコサミンの生成量) を測定した。尚、試料の代わりに脱イオン水を用いたものを対照とし、各試料、対照について酵素溶液を入れないブランクを設定し、次式により阻害活性 (%) を算出した。
ヒアルロニダーゼ阻害活性 (%) = $[1 - \{ \text{試料 OD 値} - \text{試料ブランク OD 値} \} / \{ \text{対照 OD 値} - \text{対照ブランク OD 値} \}] \times 100$

3. 大豆由来リボキシゲナーゼの阻害活性の測定法

測定法は KOMODA らの方法¹⁸⁾に準じた。各試料を溶解したメタノール溶液 (BPE については、反応系濃度で 2~10 mg %, プロアントシアニジン及びカテキン類については、20~100 μ M となるように調製) をホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 2.0 ml に加えてよく混合した。次にホウ酸緩衝液に溶解した大豆由来リボキシゲナーゼ (シグマ社製, type I-B) 溶液 20 μ l (1000 unit に相当) を加え、5 分間室温で放置した。その後、エタノールに溶解した

4.18 mM リノール酸溶液 50 μ l を加え、25°C にて 234 nm の吸光度により、20 分間の間リポキシゲナーゼの残存活性による共役ジェンの生成を確認した。尚、阻害活性は試料溶液の代わりに 50% メタノール溶液を添加したものを対照とし、以下の式により算出した。

阻害活性 (%) = $[1 - (\text{試料を添加した系の1} \sim 20 \text{分間のOD値の増加}) / (\text{対照の1} \sim 20 \text{分間のOD値の増加})] \times 100$

4. 抗補体活性の測定法

測定法は DAY らの方法¹⁹⁾ に準じた。すなわち、15 ml 容のスクリーキャップ付き遠沈管を用いて、pH 7.5 に調製した 0.15 mM CaCl_2 、0.50 mM MgCl_2 及び 0.1% ゼラチンを含むベロナル緩衝液 (GVB^{2+}) 2 ml と試料 (BPE については反応系濃度で 5~100 mg %, プロアントシアニン及びカテキン類については 10~500 μ M となるように調製) 200 μ l を混合攪拌した。更に脱イオン水に溶かしたヒト血清 (補体コントロール 0.5 ml 用、デンカ生研製) 溶液 10 μ l を入れて攪拌した。次に GVB^{2+} に希釈した感作ヒツジ赤血球 (デンカ生研製) 溶液を 200 μ l 添加・攪拌した後、37°C の水浴中で 60 分間反応させた。その後、氷水中にて 10 分間放置し、反応を停止させた。反応液を 2000 rpm で 10 分間遠心分離し、未溶血の赤血球を分離した後、その上澄み液の 540 nm における吸光度を測定した。尚、試料の代わりに脱イオン水を用いたものを対照とし、各試料、対照について血清を入れないブランクを設定し、次式により抗補体活性を求めた。

抗補体活性 (%) = $[1 - \{ \text{試料OD値} - \text{試料ブランクOD値} \} / \{ \text{対照OD値} - \text{対照ブランクOD値} \}] \times 100$

結果及び考察

1. BPE のヒアルロニダーゼ活性に対する阻害

BPE がヒアルロニダーゼ活性に及ぼす影響を検討した。結果を Fig. 2 に示す。BPE は濃度依存的にヒアルロニダーゼ活性を阻害し、300 mg % では、55% の阻害率を示した。ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸の加水分解酵素であり I 型アレルギー (即時型) に関与するケミカルメディエーターの 1 つであるヒスタミンと同時に肥満細胞や好塩基球から脱顆粒により遊離する。本酵素は炎症に深く関与する酵素であるとされ、数種の抗アレルギー薬においてヒアルロニダーゼの阻害と肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制に正の相関が認められている²⁰⁾。BPE がヒアルロニダーゼ活性を阻害したことは、BPE が I 型アレルギーに関与する炎症を抑制する可能性を示唆している。

Fig. 2 Inhibitory effect of BPE concentration on hyaluronidase activity

The percentage inhibition (mean of two experiments) was calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\{1 - (\text{Sample OD 585 nm} - \text{Sample blank OD 585 nm})\}}{(\text{Control OD 585 nm} - \text{Control blank OD 585 nm})} \times 100$$

2. BPE より分離したプロアントシアニン及びカテキンのヒアルロニダーゼ活性に対する阻害

BPE より分離したプロアントシアニン及びカテキンのヒアルロニダーゼ活性に及ぼす影響を検討した。結果を Fig. 3 に示す。プロアントシアニン類においては、プロデルフィニンジン T 2 及びプロシアニンジン T 4 の IC_{50} 値 (50% 阻害濃度) がそれぞれ 0.4 mM 及び 0.55 mM を示し、(-)-ECG 及び (-)-EGCG に匹敵するヒアルロニダーゼ阻害活性を示した。しかし、ヒアルロニダーゼ活性をより高い比率で阻害する濃度は、(-)-ECG 及び (-)-EGCG と比較して小さかった。他のプロアントシアニン類の酵素阻害活性は、(+)-C, (-)-EC 及び (-)-EGC と比較して大きかった。

FACINO らは、牛精巣由来のヒアルロニダーゼ活性に

Fig. 3 Inhibitory effect of proanthocyanidins isolated from BPE and catechins on hyaluronidase activity

The values are means of two experiments.

A: Proanthocyanidins B: Catechins —■—, Prodelphinidin B3; —○—, Procyanidin B3; —△—, Prodelphinidin T1; —●—, Prodelphinidin T2; —▲—, Prodelphinidin T3; —□—, Procyanidin T4; ---○---, (-)-Epicatechin; ---■---, (+)-Catechin; ---△---, (-)-Epigallocatechin; ---●---, (-)-Epicatechin gallate; ---▲---, (-)-Epigallocatechin gallate

対するブドウ種子由来のプロシアニジン（平均分子量1800）の阻害効果について検討しており、カテキンは効果がなかったが、プロシアニジンの IC_{50} 値は80 μ Mであったと報告している²¹⁾。また、プロシアニジンB1 (PB1), B2 (PB2) 及びC1 (PC1) とエピカテキンの抗ヒアルロニダーゼ活性は、PC1>PB2>PB1>エピカテキンの順に大きかったと報告されている²²⁾。これらの実験結果の傾向は、本報での結果とよく一致しており、プロアントシアニジン類がBPEのヒアルロニダーゼ活性の阻害に深く関与していることが推察された。

3. BPEの大豆由来リボキシゲナーゼ活性の阻害

BPEが大豆由来リボキシゲナーゼに及ぼす影響を検討した。結果をFig. 4に示す。BPEは濃度依存的にリボキシゲナーゼを抑制し、10 mg %では、52%の阻害活性を示した生体内においてリボキシゲナーゼ代謝産物は、アレルギーや炎症と密接な関係があると考えられており²³⁾、BPEが生体内においても同様の効果を示すことが期待される。

4. BPEより分離したプロアントシアニジン及びカテキン類の大豆由来リボキシゲナーゼ活性の阻害

プロアントシアニジン及びカテキンのリボキシゲナー

Fig. 4 Inhibitory effect of BPE concentration on soybean lipoxygenase activity

The values are means of two experiments.

ゼに及ぼす影響を検討した。結果をFig. 5に示す。プロアントシアニジン類においては、リボキシゲナーゼの IC_{50} 値でプロデルフィニジンT1及びT2が阻害活性が最も大きく、その値は約32 μ Mであった。次いでプロデルフィニジンT3 (41 μ M)、プロシアニジンT4 (44 μ M)の順であった。これらの成分は100 μ Mで90%以上の阻害活性を示した。プロアントシアニジンの2量体、即ちプロデルフィニジンB3及びプロシアニジンB3はプロアントシアニジン3量体と比較してその阻害活性は小さかった。しかし、カテキン類の中で酵素阻害活性が大きかった(-)-EGCG及び(-)-ECGと比較すると、その阻害活性は大きかった。(-)-EGC, (-)-EC及び(+)-Cは100 μ Mの反応系濃度においても、酵素阻害活性は30~40%でありプロアントシアニジン類と比較してその効果は非常に小さかった。

Hoらは、カテキンの大豆由来15-リボキシゲナーゼ活性測定時の阻害活性における IC_{50} 値は、(-)-EGCG, (-)-ECG及び(-)-EGCが10~21 μ Mであったのに

Fig. 5 Inhibitory effects of proanthocyanidins isolated from BPE and catechins on soybean lipoxygenase activity

The values are means of two experiments.

A : Proanthocyanidins B : Catechins

Symbols are the same as those in Fig. 3.

対し, (—)-EC は $140\ \mu\text{M}$ と阻害活性が非常に小さかったと報告している²⁴⁾. この傾向は, 本試験の結果と比較し, (—)-EGC の阻害活性度が大きい点が異なるが, 酵素の調製法あるいは精製度の違いによるものと推定された. これらのことから, 大麦糠より分離した BPE のリボキシゲナーゼ抑制能にプロアントシアニジン, 特にプロデルフィニジンが強く関与しているものと思われた.

5. BPE の抗補体活性

BPE が補体の活性化に及ぼす影響を検討した. 結果を Fig. 6 に示す. BPE は濃度依存的に補体の活性化を抑制し, $100\ \text{mg}\%$ 濃度では, 82% の補体価を抑制した. 補体系は炎症やⅡ型 (細胞障害型, 細胞融解型) 及びⅢ型 (免疫複合型, アルサス型) アレルギー反応の病体生理に重要な役割を果たしている²⁵⁾. また, 補体価の抑制は抗アレルギー活性の指標の一つと考えられており²⁶⁾, BPE がⅡ型及びⅢ型アレルギー反応を抑制する可能性が示唆された.

6. BPE より分離したプロアントシアニジン及びカテキン類の抗補体活性

プロアントシアニジン及びカテキンが補体活性に及ぼす影響を検討した. 結果を Fig. 7 に示す. プロアントシアニジンにおいては, プロデルフィニジン T1 の IC_{50} 値 (補体価を 50% 阻害する濃度) が $52\ \mu\text{M}$ と最も大きく, $200\ \mu\text{M}$ で 90% 以上の補体価の抑制を示した. 次いでその作用が大きかったのは, プロデルフィニジン T2 であ

Fig. 6 Effect of BPE concentration on anti-complementary activity

The values are means of two experiments.

Activity (%) was calculated by the equation used in Fig. 2.

Fig. 7 Effects of proanthocyanidins isolated from BPE and catechins on anti-complementary activity

The values are means of two experiments.

A : Proanthocyanidins B : Catechins

Symbols are the same as those in Fig. 3.

り、その IC_{50} 値は(−)-EGCGに匹敵した。プロデルフィニンT3、B3及びプロシアニジンT4は(−)-ECGとほぼ同等の補体価の抑制を示した。プロシアニジンB3は、他のプロアントシアニジンと比較してその効果はかなり小さかったが、(−)-EC及び(+)-Cと比較すると大きかった。

SHAHATらはバラ科の葉や果物よりルチンやケルセチンなどのフラボノイド類、エピカテキン及びプロアントシアニジン類を分離精製し、それらの感作ヒツジ赤血球に対する抗補体価について検討しており、プロアントシアニジン類がエピカテキンと比較し、補体価の抑制がかなり大きいことを報告している²⁷⁾。本結果はこれらの結果を確認するものであり、大麦のプロアントシアニジン、特にプロデルフィニンが、BPEの感作ヒツジ赤血球に対する補体作用の抑制に貢献していることが判明した。

本研究では大麦ポリフェノール抽出物(BPE)及びその主ポリフェノール成分であるプロアントシアニジンの*in vitro*での抗アレルギー作用を検討したものであり、抗アレルギー作用に関する直接の証明については、動物実験等により確認する必要があると考えられる。

要 約

大麦糠由来のポリフェノール抽出物BPE及びそこから分離精製したプロアントシアニジン類(2量体及び3量体)について、幾つかの抗アレルギー活性測定法を用い、その効果を検討した。

(1) BPEは、生体内における炎症に深く関与しているヒアルロニダーゼ活性を濃度依存的に抑制した。また、その主要ポリフェノール成分であるプロアントシアニジン類の抗ヒアルロニダーゼ活性は、(−)-EGCG及び(−)-ECと比較して、小さかったが、(−)-EGC、(−)-EC及び(+)-Cよりは大きかった。

(2) 大豆リボキシゲナーゼ活性についても濃度依存的に抑制し、また、その主要ポリフェノール成分であるプロアントシアニジン類の抗リボキシゲナーゼ活性は、カテキン類と比較して大きいことが判明した。

(3) 感作ヒツジ赤血球における補体価の抑制はBPEの濃度に依存して大きくなった。また、その主要ポリフェノール成分であるプロアントシアニジン類の抗補体活性は、(−)-EGCG及び(−)-ECと同等あるいはそれ以上の効果を示した。

文 献

- 1) 玉川浩司・飯塚崇史・福島 誠・遠藤好司・小宮山美弘：食科工，**44**，512 (1997)。
- 2) 玉川浩司・飯塚崇史・小堀真珠子・新本洋士・津志田藤二郎：食科工，**45**，420 (1998)。
- 3) 玉川浩司・飯塚崇史・池田彰男・小池 肇・長沼慶太・小宮山美弘：食科工，**46**，106 (1999)。
- 4) CONSTANTINOU, A., KIGUCHI, K. and HUBERMAN, E.: *Cancer Res.*, **50**, 2618 (1990)。
- 5) JING, Y., NAKAYA, K. and HAN, R.: *Anticancer Res.*, **13**, 1049 (1993)。
- 6) TAMAGAWA, K., FUKUSHIMA, S., KOBORI, M., SHINMOTO, H. and TSUSHIDA, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1483 (1998)。
- 7) MATSUO, N., YAMADA, K., SHOJI, K., MORI, M. and SUGANO, M.: *Allergy*, **52**, 58 (1997)。
- 8) SHIRAI, T., SATO, A., CHIDA, K., HAYAKAWA, H., AKIYAMA, J., IWATA, M., TANIGUCHI, M., RESHAD, K. and HARA, Y.: *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **79**, 65 (1997)。
- 9) MATSUO, N., YAMADA, K., YAMASHITA, K., SHOJI, K., MORI, M. and SUGANO, M.: *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **32**, 340 (1996)。
- 10) 山本浩代：食品と開発，**32**，41 (1997)。
- 11) IMAOKA, K., INOUE, S., TAKAHASHI, T. and KOJIMA, Y.: *Arerugi* (in Japanese), **42**, 74 (1993)。
- 12) 中原光一：フードケミカル，**9**，44 (1995)。
- 13) 仁科淳良：Food Style 21, **2**，69 (1998)。
- 14) 仁科淳良：Food Style 21, **2**，69 (1998)。
- 15) A.O.A.C.: Official and Tentative Methods of Analysis of A.O.A.C., 8th Ed., P. 144 (1955)。
- 16) McMURROUGH, I., LOUGHREY, M. J. and HENNIGAN, G.P.: *J. Sci. Food. Agric.*, **34**, 62 (1983)。
- 17) KAKEGAWA, H., MATSUMOTO, H. and SATO, T.: *Chem. pharm. Bull.*, **33**, 642 (1985)。
- 18) KOMODA, T., MORIMITSU, Y., HIROTA, H. and HIROTA, A.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 924 (1995)。
- 19) DAY, N.K., WINFIELD, J.B., GEE, T., WINCHESTER, R., TESHIMA, H. and KUNKEL, H.G.: *Clin. Exp. Immunol.*, **26**, 189 (1976)。
- 20) KAKEGAWA, H., MATSUMOTO, H. and SATO, T.: *Chem. pharm. Bull.*, **33**, 642 (1985)。
- 21) FACINO, M. R., CARINI, M., ALDINI, G., BOMBARDELLI, E., MORAZZONI, P. and MORELLI, R.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **44**, 592 (1994)。
- 22) 亀山眞由美：生物と化学，**36**，766 (1998)。
- 23) 川岸舜朗・森光康次郎：生化学実験法 38 食品中

- の生体機能調節物研究法, 川岸舜朗編, p. 85, (1996).
- 24) Ho, C.T., CHEN, Q., SHI, H., ZHANG, K.Q. and ROSEN, R.T.: *Preventive Medicine*, 21, 520 (1992).
- 25) 小島保彦: *Food Style* 21, 2, 25 (1998).
- 26) 近藤美由紀・丁 宗鉄・山田陽城・清原寛章・大塚恭男: 和漢薬, 16, 76 (1983).
- 27) SHAHAT, A.A., HAMMOUDA, F., ISMAIL, S.I., AZZAM, S.A., BRUYNE, T.D., LASURE, A., POEL, B.V., PIETERS, L. and VLIETINCK, A. J.: *Planta Med.*, 62, 10 (1996).
- (平成 11 年 2 月 16 日受付, 平成 11 年 4 月 14 日受理)
-