

ナス浅漬加工時の下漬液から得られるナスニンの  
食品機能性に関する研究

2017. 9

伊藤 和子

## 目次

第1章 序論	1-6
第2章 ナスニン含有色素粉末のナス下漬液からの調製とその機能性評価	7-22
第1節：緒論	7
第2節：実験方法	7
第3節：実験結果および考察	13
第3章 ナスニン含有色素粉末のシクロデキストリン包接体の調製, 色調安定性 および機能性評価	23-40
第1節：緒論	23
第2節：実験方法	24
第3節：実験結果および考察	28
第4章 ナスニンのナスニン含有色素粉末からの単離精製とその機能性寄与評価	41-53
第1節：緒論	41
第2節：実験方法	41
第3節：実験結果および考察	44

第5章	マウス培養細胞を用いたナスニンの機能性評価	54-67
第1節	緒論	54
第2節	実験方法	55
第3節	実験結果および考察	59
第6章	総合考察	68-74
	謝辞	75
	引用文献	76-88

## 第1章

### 序論

ナス (*Solanum melongena*) は、インド東部が原産地とされているナス科の野菜である<sup>1)</sup>。インドから西部へは、5世紀より前に古代ペルシャやアラビア半島に伝わった。ヨーロッパでは13～15世紀になって地中海沿岸で栽培されるようになり、アメリカでは、伝来以来たくさんの品種が作られている。一方、インドから東部には、東南アジア・チベットから中国まで幅広い地域へと広がった。日本には中国、朝鮮半島および東南アジアからの、大きく3系統のルートで導入され、奈良時代にはすでに栽培されていたと考えられている<sup>2)</sup>。平安時代の延喜式には、ナスの栽培方法が記されている<sup>3)</sup>。その後、各地方に根づいた各種の品種が現在も栽培されており、地方の食生活を根強く支える野菜となっている。在来品種のナスとしては、日本の南方では枝葉の大型な晩生種が、北にいくにしたがい枝葉が小さく分枝性で小葉の品種が見られる。平成26年度のナスの国内栽培面積は約9,570ヘクタール、生産量は約248,600tで、主産地は高知県、熊本県である<sup>4)</sup>。夏秋ナスの収穫の最盛期は6月～10月であり、170種以上の品種の中で、浅漬け加工には千両、千両2号、筑陽、黒陽などが使用されている。

ナスは淡泊な味で他の食材と合わせやすく、漬物や煮物にすると調味料の味がしみこみやすい。また、油を良く吸収し相性が良いので、揚げ物や炒め物にもよく用いられる。ナスの漬物の代表的なものとしては、浅漬けが挙げられる。日本の漬物生産量における浅漬けの位置は、次のとおりである。1998年には生産量1,113,275tのうち、浅漬けが186,742tで1位であったが、2010年では生産量866,817tのうち、浅漬けは155,263tであり、2位となった。代わってキムチが191,188tで1位となっていた<sup>5)</sup>。

ナス浅漬けの標準的な製造工程は次のようなものである。ナスを水洗し、ナス重量の6%の食塩および0.6%の焼ミョウバンとともに輪転機にて皮の部分に少々の傷をつける。ナス重量と同量の0.6%ビタミンC溶液に投入し、冷蔵庫中で3日間ほど漬け

込む（下漬工程）。下漬したナスを取り出し、調味液を入れた袋に入れ密封し、製品となる<sup>3)</sup>。

ナスの浅漬加工では、食塩・ミョウバン等の加工材料とともに、ナスの紫色色素であるナスニンを含む美しい色調の上記下漬液が多量発生する。例えば、国内有数のナス浅漬製造企業の例では、年間4千tから5千tのナスを使用して浅漬けを生産し、その際、年間2千tを超える下漬液が発生するが、その全てが有償廃棄されている<sup>4)</sup>のが現状である。

一方、食品機能性研究のこれまでの歴史を振り返ってみると、飽和脂肪酸とコレステロール摂取量が多い欧米諸国にありながら、フランス人は他の欧米諸国の人々よりも心臓疾患罹病率が低い現象が、フレンチパラドックスとして知られていた<sup>5)</sup>。この要因の一つとして、フランス人にみられる赤ワインの高い摂取量が指摘されるようになり、その解明から食品機能性研究が始まった。その結果、赤ワインに含まれるレスベラトロールなどのポリフェノールによって、低比重リポタンパク質(LDL)の酸化が抑制されることが判明した<sup>6)</sup>。これを契機としてケルセチン、ルチンなどのフラボノール、エピカテキンやエピカテキンガレートなどのフラバノール類をはじめとする各種フラボノイド類を含む広範囲のポリフェノール類の食品機能性研究が活発に行われてきた<sup>7),8)</sup>。さまざまな色調を有するアントシアニンもポリフェノール類として、その生理機能に注目が集まるようになった<sup>9)</sup>。

しかし、複雑な化学構造を有するアントシアニンは単一成分が得にくいことや、pHに依存して変化することなどから、他のポリフェノールより機能性研究の開始時期が遅れたが、現在では、質量分析や核磁気共鳴分析など有用な機器分析手段の著しい向上などもあって、アントシアニンに関する機能性研究が盛んに行われている。これまで、酸化ストレス制御に関する研究<sup>10)</sup>をはじめ、ブルーベリーアントシアニンの視覚改善機能に関する報告<sup>11)</sup>、紫トウモロコシ色素による体脂肪蓄積抑制作用に関する報告<sup>12)</sup>、紫サツマイモ・赤キャベツエキスおよび紫トウモロコシのエキスによる大腸ガン抑制作

用などが報告されている<sup>13),14)</sup>。

特有の紫色を呈するナスの果皮には約4種類のアントシアニンが含まれており、その含有量の90%が、モノアシルアントシアニンであるナスニン(図1-1)である<sup>15)</sup>。これまでのナスニンの代表的な機能性研究としては、ジピリジル系の除草剤として広く使用されてきたパラコートが強力な酸化ストレスを抑制する効果に関する報告<sup>16)</sup>がある。すなわち、ナスニンは、体内に取り込まれたパラコートから生成するパラコートフリーラジカルおよびスーパーオキシドアニオンを効果的に消去することにより、生体内酸化ストレスを防御するという報告である。さらに、ガラクトサミン腹腔内投与によって引き起こされる肝障害に対するナスニン投与の影響を調べた研究では、基本飼料の対照群に比べて、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの活性上昇が抑制されるという結果が得られている<sup>17)</sup>。また、このような報告とともに、総コレステロール減少効果<sup>18),19)</sup>、脂質過酸化に対する防御能<sup>20),21)</sup>、血管新生抑制作用<sup>22)</sup>および肝臓保護作用<sup>23)</sup>等、ナスニンはさまざまな機能性を有することが報告されている。また、ナスニンの化学構造上の基本骨格となるデルフィニジンには、アポトーシス誘導活性も認められている<sup>24)</sup>。さらに、ナスニンは、生体内でもその構造を保っていることが報告されている<sup>25)</sup>。

しかし、アシル化アントシアニンの中でもナスニンは、中性溶液中(pH7.0)では最大吸収波長における吸光度値から求めた色素残存率(50%)が96分と非常に不安定な色素であることと<sup>26)</sup>、ナスから抽出する場合、油脂分を豊富に含むナス皮からの抽出が困難であるなどの問題点があり、これまで機能性素材や色素としての利用はほとんどされていない現状がある。特に、ナスの浅漬加工に際して発生する多量の下漬液には原料ナスから溶出するナスニンをはじめ、ナスの有用成分が豊富に含まれると考えられるが、これまで、それらを回収し有効利用を図るための研究は皆無であった。

ナス下漬液中に溶出するナスニンは、添加されているミョウバン分子を構成するアルミニウムイオンと結合して安定なメタロアントシアニンを生成している<sup>27)</sup>ため、抽出

操作においても変質することが少ない。また、ナス皮から抽出する時のような、油脂分の分離操作やナスニンを安定化させるためのピクリン酸を用いた塩化物化等、煩雑な過程を経ることなく安定な状態の水溶液で利用可能である。ナス下漬液はこのような利点とともに、食経験が豊富なナス由来成分を含有することから、上記のような高い機能性を有する天然色素素材として、さまざまな食品・化粧品等への有効利用を図ることが期待できる。

さらに、ナスにはアントシアニン色素であるナスニンの他にも、血糖値上昇抑制作用<sup>28)</sup>、血圧改善作用<sup>29)</sup>、発がん抑制作用<sup>30)</sup>、抗酸化作用<sup>31)</sup>など数多くの機能性が報告されているクロロゲン酸（図 1-2）が含まれており、ナスの下漬液中にも著量のクロロゲン酸の存在が予想されることから、下漬液からナスニンとともにクロロゲン酸の両成分を含む有用な機能性を持つ再生物を調製できると考えられる。このように、現状では廃棄対象でしかないナスの浅漬加工に伴う下漬液は、その有効利用が望まれている。

これまで、食品加工の過程で生じるさまざまな廃液等を再利用する研究としては、ヤマブドウ果汁の搾りかすからポリフェノールを抽出する方法<sup>32)</sup>、塩蔵ラッキョウおよびニンニク漬液から電気透析法を用いて有用成分であるフルクタン・フルクトースおよびアリインを回収する方法<sup>33)</sup>、また、梅加工産業で生じる梅廃液（梅酢）をイオン交換膜および精密ろ過膜を使用して有効成分であるムメフラールを濃縮して梅エキスを製造する方法<sup>34)</sup>など多数の研究事例のほかに、大豆食品の製造で生じる大量の大豆煮汁中のタンパク質を酵素処理し、ペプチドおよびアミノ酸に変換後、濃縮・乾燥処理を検討した報告<sup>35)</sup>も知られている。

以上のような研究状況の下で、本研究では、ナスの浅漬加工時に発生する多量の下漬液に含まれる機能性ポリフェノールであるナスニン及びクロロゲン酸を主体とする有用成分の利用性を高めることを目的として、これらの有用ポリフェノール類の効果的な回収方法、回収色素成分の粉末化による安定性確保及び得られた色素含有粉末の抗酸化性、抗アレルギー性及び抗炎症性に関する機能性評価を行った。本論文はこれらの研究

結果をまとめたもので、以下の全6章からなる。

本章の序論に続いて第2章では、ナス下漬液からナスニン含有粉末を調製する方法を検討し、得られた粉末の抗酸化性を ORAC 法にて評価した結果を述べて考察した。次いで第3章では、第2章で得られた粉末の水溶解性を高めかつ酢酸臭の低減を図る目的で、シクロデキストリンによる包接を試み、作製した包接体の機能性評価を行った結果をとりまとめて考察した。さらに、調製したシクロデキストリン包接体の実用化に重要な性質と考えられる安定性の評価も行った。第4章では、ナスニン単体での機能性を明らかにするため、合成吸着剤・ゲルろ過用担体・高速液体クロマトグラフ等を用いてナスニンの単離精製を行い、得られた精製物の抗酸化性及び抗アレルギー性について検討した結果を論述した。続いて第5章では、第4章で得られたナスニン精製物について、マウス由来マクロファージ細胞株である RAW264 細胞を用いて抗炎症及び抗酸化性を評価し、その結果をとりまとめて考察した。最後に、第2章から第5章で述べた研究結果について、第6章において総合考察を行った。

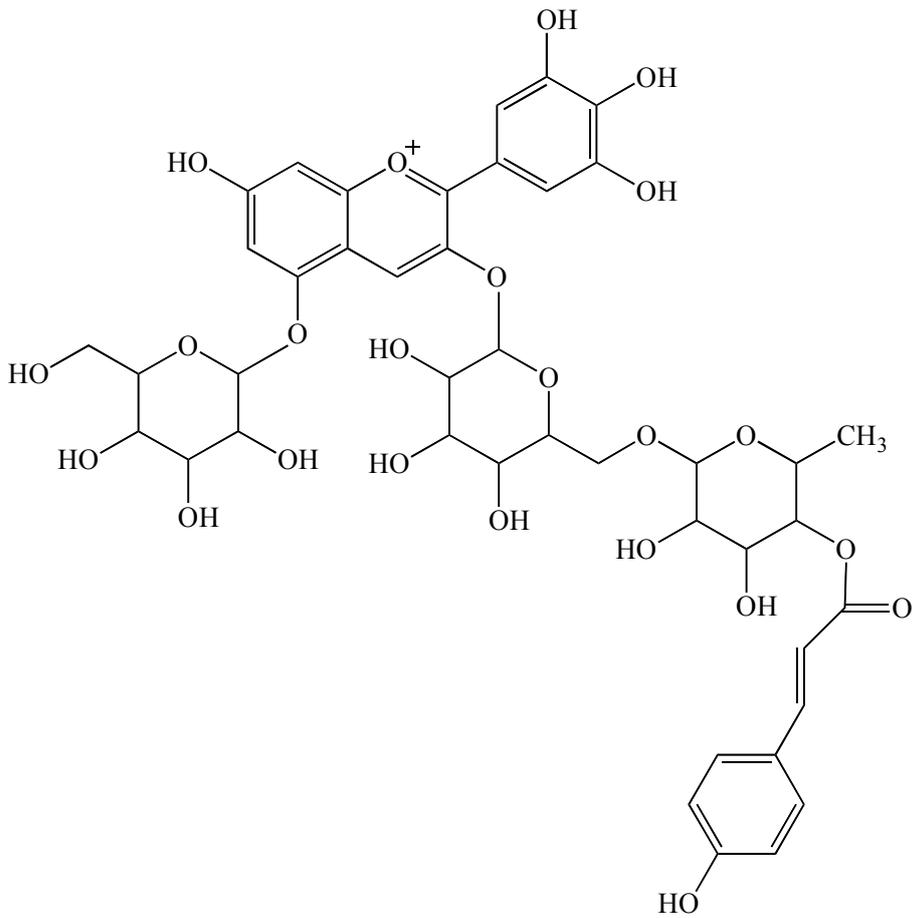


図 1-1 ナスニン ( $C_{42}H_{47}O_{23}$ ) の化学構造

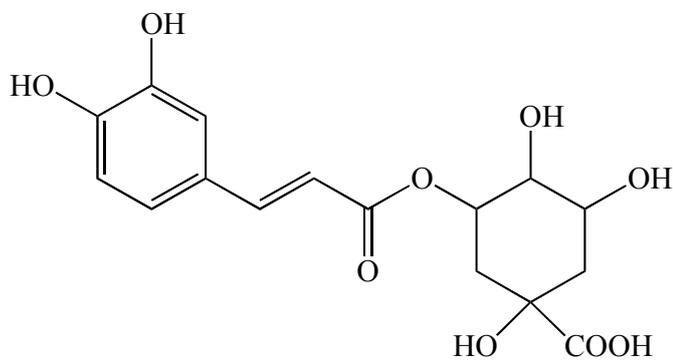


図 1-2 クロロゲン酸 ( $C_{16}H_{18}O_9$ ) の化学構造

## 第2章

### ナスニン含有色素粉末のナス下漬液からの調製とその機能性評価

#### 第1節 緒論

ナス浅漬け製造時に発生するナス下漬液中のナスニン及びクロロゲン酸を主体とする有用成分の利用性を高めることを目的として、ナスニンの効果的な回収方法について合成吸着剤を用いて検討するとともに回収色素の粉末化を試みた。さらに、得られたナスニン含有色素粉末の抗酸化性を ORAC 法により評価した。

#### 第2節 実験方法

##### 1. ナス下漬液

ナス下漬液は、浅漬メーカーである(株)荒井食品(栃木県さくら市)から入手した。この浅漬メーカーでは、図2-1に示すような工程でナスの浅漬が製造される。すなわち、ナスを、食塩・アルミニウムミョウバンとともに輪転機に入れて攪拌して皮に少し傷をつけることにより、各資材をナス果実に染み込ませる。さらに、3日間5℃にて漬け込む。その後、ナス果実を取り出して調味漬けにする。この工程で発生する漬液がナス下漬液(図2-2)である。

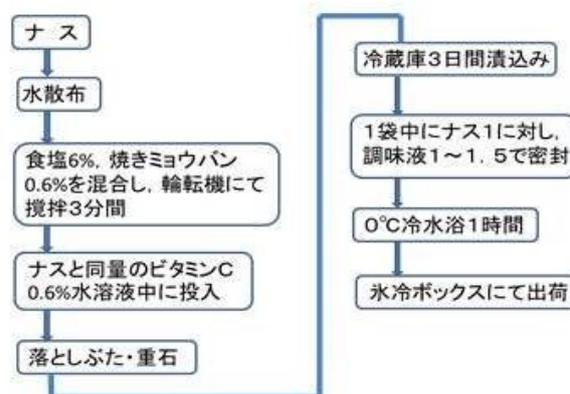


図 2-1 ナス浅漬け製造工程

## 2. 試薬・資材

クロロゲン酸は(株)MP バイオ製を用いた。ピクリン酸、リン酸は和光純薬(株)製の特級を用いた。クロマトグラフ用ポリアミド C-200 及び 2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ジヒドロクロライド (AAPH) は同じく和光純薬(株)製を用いた。アセトニトリルは関東化学(株)製の液体クロマトグラフ用を使用した。フルオレセインナトリウム塩 (FL- Na) 及び 6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (Trolox) は Sigma- Aldrich 社製を使用した。その他の試薬は、関東化学(株)の特級試薬を使用した。

## 3. ナスニン標準品の調製

Kuroda らの方法<sup>36),37)</sup>に従って、凍結乾燥したナス皮（品種名：千両二号）粉末（60 g）からピクリン酸塩として抽出したものを、ポリアミド C-200 カラムクロマトグラフィー（カラムの大きさ：内径 20 mm, 長さ 240 mm; 溶離液：メタノール, 700 mL にて溶出）を用いて精製することにより 500 mg のナスニン粉末を得た。なお、後述する HPLC 分析によるピークの総面積値との対比による純度は、72.6%であった。



図 2-2 ナス下漬液

ナス浅漬けの製造過程で生じ、現在は廃液処理後、廃棄されている。

#### 4. ナスニン、クロロゲン酸、食塩及びアルミニウムの分析方法

##### (1) ナスニンおよびクロロゲン酸の定量

Sugimoto らの方法<sup>38)</sup>を参考にして HPLC を用いて定量した。すなわち、1% (w/w) 塩酸メタノール溶液：蒸留水 = 1 : 1 の液にサンプルを溶解し、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し検液とした。HPLC 分析は以下の条件下で行った<sup>4)</sup>。

装置：日本分光 LC-2000

カラム：日本分光 CrestPak C18 T-5 (250 mm  $\times$  4.6 mm I.D.)

溶離液：0.5% (w/v) リン酸/アセトニトリル (80 : 20)

流速：0.6 mL/min

検出波長：ナスニン；534 nm；クロロゲン酸；330 nm

##### (2) 食塩の定量

モール法で定量を行った。カラムからの溶出液に 7.5% (w/v) クロム酸カリウムを指示薬として添加し、0.05 M 硝酸銀溶液で微橙色になるまで滴下し、滴定値から塩分量を算出した。

##### (3) アルミニウムの定量

誘導結合プラズマ質量分析装置（島津製作所 ICPS-8000）により定量した。測定時のプラズマ条件は以下のとおりである。

高周波出力：1.2kW

分光器温度：36~40 $^{\circ}\text{C}$

トーチ観測高：11 mm

クーラントガス流量：14 L/min

プラズマガス流量：1.2 L/min

キャリアガス流量：0.8 L/min

ページガス : ON

なお、ガスはすべてアルゴン（純度 99.95%以上）を用いた。また、測定波長は 396.153 nm で行った。

また、標準添加法を用いることによりサンプルのマトリックスの影響を少なくした。すなわち、各試料の 10 倍希釈液とアルミニウムの 1, 2, 5, 10 ppm 標準溶液を、それぞれ 1 : 1 になるように添加して測定したデータから検量線を作成し、強度が 0 になる値から試料における含有量を求めた。

## 5. 色素画分の調製条件の検討

### (1) 試料

前述のナス下漬液を用いた。

### (2) 合成吸着剤によるナスニン吸着性能の比較

三菱化学製の 5 種（HP-20, SP-207, HP2MG, SP-700, SP-70）の合成吸着剤を用い、ナスニン吸着性能をバッチ法により試験した。前処理として次の操作を行った。各合成吸着剤 100mL にエタノールを約 200mL 加えて上清を除去する操作を 2 回繰り返す。その後、エタノールで洗浄した各合成吸着剤に、蒸留水を約 200mL 加えて上清を除去する操作を 2 回繰り返した。前処理した各合成吸着剤 10 mL をナス下漬液 200 mL に加え、5 分おきに攪拌しながら 1 時間混合した。その後、ろ過してろ液の 534 nm における吸光度を島津 UV-2450 型分光光度計により測定し、その減少率で吸着性能を評価した。また、最大吸着量を測定するために、最も高い吸着性能を示した合成吸着剤約 70 mL を充填した長さ 30 cm、内径 20 mm のガラス製カラムを用意した。通液速度 (SV : Space Velocity) が約 5 になるように流量を調整し、ここにナス下漬液を吸着させながら、排出液が着色した時点を終点とし、ここまでの通液量を比較した<sup>4)</sup>。

(3) ナス下漬液から HP-20 カラムによる食塩及びミョウバン／アルミニウムの除去  
とナスニンの回収

長さ 30 cm, 内径 20 mm のガラス製カラムに, 合成吸着剤 HP-20 約 70 mL を充填し, SV を 5 前後に調整した. ここにナス下漬液 700 mL を通して紫色の色素を吸着させ, さらに 200 mL の蒸留水で洗浄した. カラムへの吸着開始時から洗浄水が流出し終わるまで 100 mL ごとに排出液を採取し, 食塩およびアルミニウム量を測定した. これにより, 下漬液中の食塩とミョウバン由来のアルミニウムがどの程度除去できるかを調べた.

次いで, 80~99.5%(v/v)のエタノールまたは 1~5 M の酢酸水溶液によりナスニンを溶出させ, 溶出画分の乾燥重量を測定して, ナスニンを含む色素画分の回収量を比較した<sup>4)</sup>.

(4) 大容量カラムによるナスニン画分の調製及び成分分析

上記(3)の結果を基にして, 長さ 100 cm, 内径 30 mm のガラス製カラムに 600 mL の合成吸着剤 HP-20 を充填し, ここに 30 L のナス下漬液を通してナスニンを吸着させた.

次いでカラムを 2.5 L の蒸留水で水洗し, カラム内から食塩が除去されたことを確認後, 5 M 酢酸 2 L を用いて色素画分の溶出を行った. 溶出液を 100 mL ごとに分別採取し, それぞれの真空凍結乾燥粉末を得て, 上記条件の HPLC 分析によりナスニン及びクロロゲン酸含有量を測定した<sup>4)</sup>.

6. ORAC 値によるナスニン含有色素粉末の抗酸化性評価

上記 5 で得られたナスニン含有色素粉末の抗酸化性は ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法<sup>39)</sup>で測定した. ORAC には H-ORAC (水溶性抗酸化物質) と L-ORAC (脂溶性抗酸化物質) が存在しており, 別々に評価する方法として開発されている. したがって, 以下のとおりそれぞれに抽出操作を行って分析を行った.

HP-20 カラムで得られた色素画分の凍結乾燥粉末 0.5 g にヘキサン：ジクロロメタン =1：1 を 10 mL 添加し，室温で 30 秒間攪拌後，3,000 rpm (kubota 製 8410 型) で 10 分間遠心分離し，上清を採取した．この操作を 2 回繰り返した後，上清の溶媒を窒素気流下で除去し，アセトン 500  $\mu$ L 及び 7%(w/v) RMCD (ランダムメチル化シクロデキストリン) 50%(v/v) アセトン溶液 (RM 溶液) 500  $\mu$ L を加えて攪拌し，L-ORAC 分析用試料とした．また，沈殿はアセトン：超純水：酢酸=70：29.5：0.5 (AWA 溶液) 5 mL を加え，30 秒間攪拌後，超音波洗浄機にて 37°C, 5 分間処理した．これを室温に 10 分間静置後，30 秒間攪拌し，3,000 rpm (kubota 製 8410 型) で 10 分間遠心分離して得られる上清を採取した．この操作を 2 回繰り返し，採取した上清を合わせ，H-ORAC 用試料とした．L-ORAC は次の通り分析した．96-well マイクロプレートの検量線用 well に Trolox 溶液を各 25  $\mu$ L ずつ分注した．対照として RM 溶液を 25  $\mu$ L 分注した．RM 溶液により 100 倍に希釈したサンプル溶液をサンプル用 well に 25  $\mu$ L 分注し，分析用緩衝液である 75 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に溶解した 94.4 nM の FL-Na 溶液 150  $\mu$ L をすべての well に分注した．振とう攪拌後，蛍光強度 (測定開始時の値) をマイクロプレートリーダー (テカンインフィニット F200) で測定 (Ex. 485 nm, Em. 520 nm) した．続いて使用直前に調製し 37°C に加温した AAPH 溶液 25  $\mu$ L を，同じく 37°C に加温したマイクロプレートのすべての well に加えて振とう攪拌後，添加 2 分後から同様に測定した．また，H-ORAC は次のとおり分析した．96-well マイクロプレートの検量線用 well に Trolox 溶液を各 20  $\mu$ L ずつ分注した．対照として上記分析用緩衝液を 20  $\mu$ L 分注した．同じく分析用緩衝液により 10,000 倍に希釈したサンプル溶液をサンプル用 well に 20  $\mu$ L 分注し，同緩衝液に溶解した 94.4 nM の FL-Na 溶液 200  $\mu$ L をすべての well に分注した．振とう攪拌後，蛍光強度 (測定開始時の値) をマイクロプレートリーダー (テカン インフィニット F200) で測定 (Ex. 485 nm, Em. 520 nm) した．続いて使用直前に調製し 37°C に加温した AAPH 溶液 75  $\mu$ L を，同じく 37°C に加温したマイクロプレートのすべての well に加えて振と

う攪拌後，添加 2 分後から蛍光強度を測定した．L-ORAC は 1 分おき，H-ORAC は 2 分おきに 90 分間測定を繰り返し，得られた蛍光強度グラフの軌跡と時間軸によって囲まれた面積を Trolox 溶液と比較し，Trolox 当量として算出した<sup>4)</sup>．

### 第 3 節 実験結果および考察

#### 1. ナス下漬液の性状

ナス下漬液の性状について分析した結果を表 2-1 に示した．ここに見られるように，本研究で使用したナス下漬液は，3.3% (w/v)前後の食塩と，約 150 ppm のアルミニウムを含み，また，pH は 3.3 前後であり，ナスニンによる鮮やかな紫色とナス浅漬に特有の漬物臭を有していた．また，ナス下漬液の可視光部及び紫外部の吸収スペクトルを図 2-3 に示した．pH 3.3 における可視光部の最大吸収波長は紫色を反映して 566 nm であった．紫外部の吸収では 250 nm 及び 320 nm に極大吸収を示した<sup>4)</sup>．ナスニンのように分子内に *p*-クマール酸を結合したアシル化アントシアニンや，クロロゲン酸のようにコーヒー酸を分子内に有するポリフェノール類は 280～330 nm 付近に紫外部吸収を示すこと<sup>40)</sup>が知られており，図 2-3 の紫外部吸収スペクトルは本下漬液中にナスニン以外にもクロロゲン酸などの存在を示唆している．

#### 2. ナスニン含有色素粉末調製方法

##### (1) 合成吸着剤の選定

本研究では，大量に排出されるナス下漬液から，ナスニンを含む有用成分を効率的に回収することが目的であることから，一度に多くの液体の処理が可能と見られる合成吸着剤の利用を考え，各種吸着剤のナスニン吸着性能を比較した．その結果を表 2-2 に示した．吸着率は，合成吸着剤の種類により，63.7%から 86.1%と，約 22%の差が見られた．そこで，以後のナスニン含有色素粉末の調製実験では，最も吸着率の高かった HP-20 を使用することにした．この吸着剤におけるナスニンの最大吸着量を知るために 70 mL

の HP-20 樹脂で試験したところ、ナス下漬液 6.8 L に相当するナスニン吸着能を有していた。このことから、合成吸着剤 HP-20 は、1 mL 当たりナス下漬液約 100 mL 中の色素成分を吸着できると考えられた<sup>4)</sup>。

表 2-1 ナス下漬液の性状

pH	塩分濃度(%)(w/v)	アルミニウム濃度 (ppm)	臭気
3.31±0.27	3.26±0.76	147.82±0.75	漬物臭

表 2-2 使用合成吸着剤のナス色素の吸着性能

種 類	ナス色素吸着率 (%)
HP-20	86.1±0.8
SP-207	63.7±0.8
HP2MG	68.3±0.1
SP-700	75.0±1.2
SP-70	78.3±1.6

3回の測定値の平均±標準偏差で示した。

吸着率：各合成吸着剤と試料下漬液の攪拌処理（5分ごと、1時間）前後で測定した 534 nm における吸光度の割合（処理前の吸光度に対する（処理前—処理後）の吸光度の割合）として表示した。

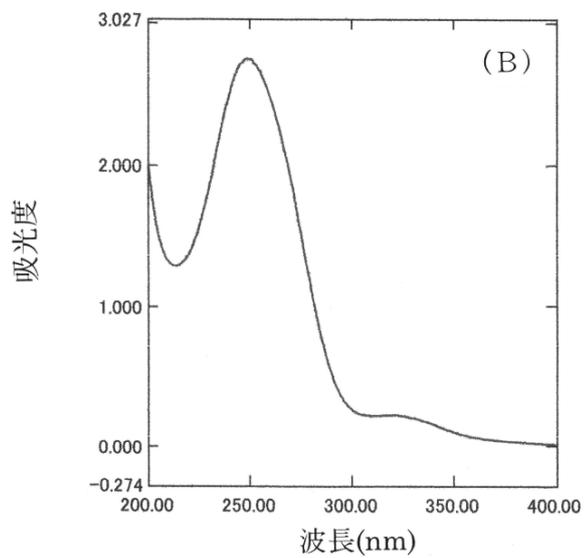
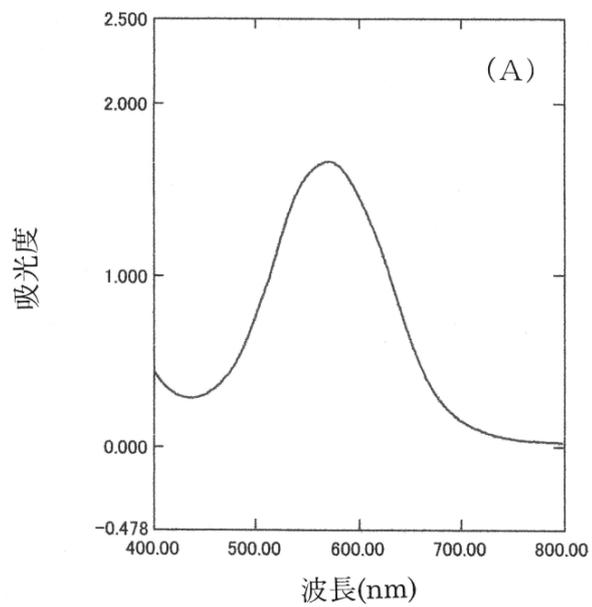


図 2-3 ナス下漬液の可視光線及び紫外線の吸収スペクトル

(A) : 可視部吸収スペクトル

(B) : 紫外部吸収スペクトル

## (2) ナス下漬液から食塩及びミョウバン／アルミニウムの除去

約 70 mL の HP-20 を充填したガラス製カラム（長さ 30 cm，内径 20 mm）にナス下漬液 700 mL を通液後，蒸留水 200 mL で洗浄する過程で排出される 100 mL ほどのフラクション中の食塩及びアルミニウムの分析結果を図 2-4 及び図 2-5 に示した．食塩とアルミニウムの脱着挙動はほぼ同じであり，洗浄水が排出するまでの全 900 mL 中に，食塩の 95.7%，アルミニウムの 99.1%がそれぞれ HP-20 カラムへの通液，洗浄処理によって除去されることが確認された<sup>4)</sup>．

また，この通液および洗浄過程では，カラムに吸着した紫色の色素画分は全く移動しないことが確認された．これらの理由としては，合成樹脂が有する数十から数百オングストロームの細孔にアルミニウムと結合したナスニンやクロロゲン酸は捕捉されるが，塩化ナトリウムやアルミニウムミョウバンなどの無機物質は捕捉されないまま排出されたものと考えられる．本研究ではナス下漬液中のナスニンなどの有用成分を，その機能性を活かした食品などに利用することを念頭においているため，これらの成分から塩化ナトリウム及びミョウバン由来のアルミニウムを除去しておくことが重要である．また，下漬液からの大量回収においては，さらにスケールを大きくしたカラムを用いる精製操作が必要になることから，塩化ナトリウムとアルミニウムが除去されたかどうかを簡単に知る方法が求められた．この点については本実験の結果から，塩化ナトリウムとアルミニウムミョウバンは HP-20 カラム上で類似した挙動を示すことが明らかになったことから，HP-20 カラムに下漬液を通液してナスニンとクロロゲン酸を吸着させ，水による洗浄処理後に，排出液の塩化ナトリウム濃度を分析するだけで除去の程度を知ることができた．このことは，下漬液のカラム処理をスケールアップする上で役立つ結果であった．さらに，ナス下漬液の特有の漬物臭についても，この吸着・洗浄操作で除去されることが明らかになった<sup>4)</sup>．

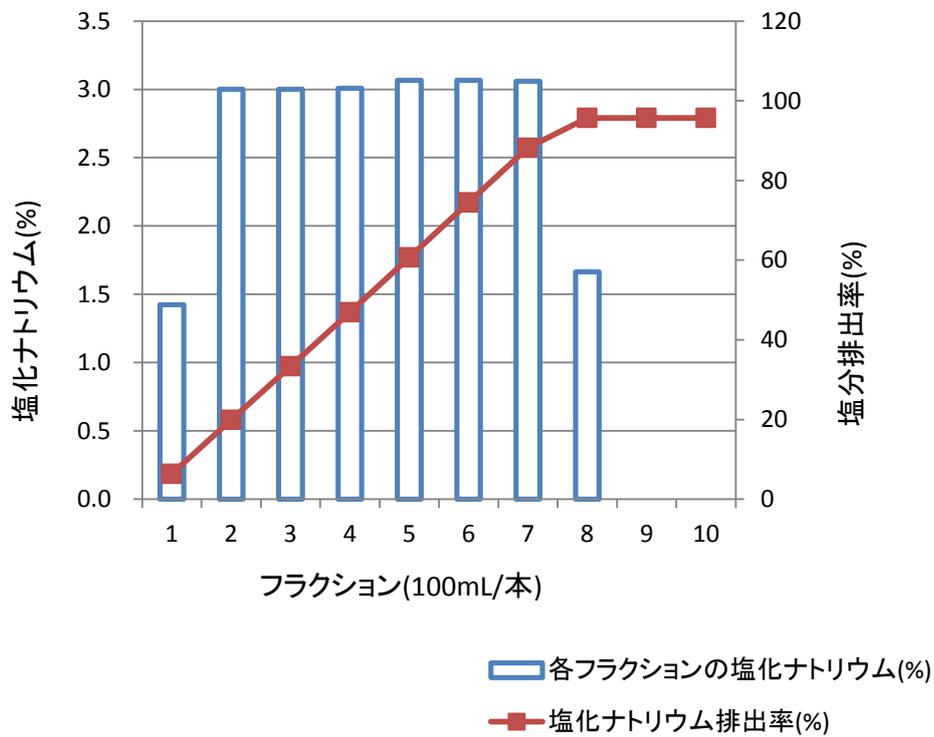


図 2-4 各フラクシオン中の塩化ナトリウム排出量と排出率 (%)

吸着・洗浄中の 100 mL ごとの排出液に含まれる塩化ナトリウムを分析した。

排出率：フラクシオンに排出された塩化ナトリウム積算値のナス下漬液に含まれる塩化ナトリウムに対する割合として表示した。

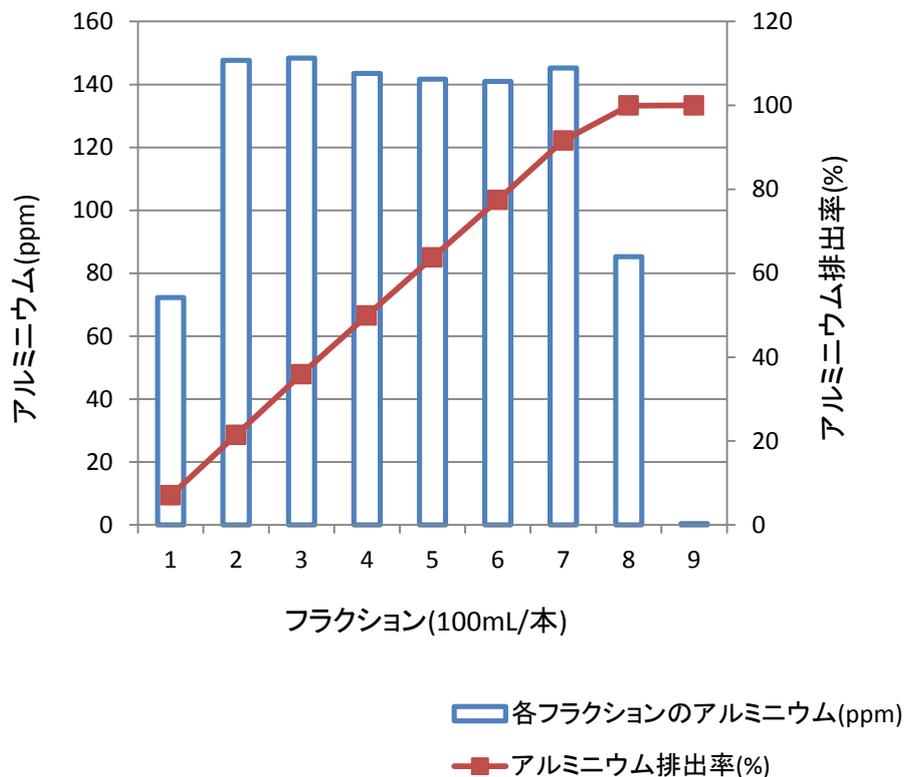


図 2-5 各フラクション中のアルミニウム排出量と排出率 (%)

吸着・洗浄中の 100 mL ごとの排出液に含まれるアルミニウムを分析した。

排出率：フラクションに排出されたアルミニウム積算値のナス下漬液に含まれるアルミニウムに対する割合として表示した。

### (3) 吸着色素画分の回収方法

次に、HP20 カラムに吸着されたナスニンの回収方法について、エタノール溶液と酢酸溶液を用いて検討した。エタノール溶液による回収では、80% (v/v) エタノール水溶液 70 mL と、99.5% (v/v) エタノール 100 mL を用いて溶出した。紫色の色素の溶出が見られなくなった時点で溶出を停止した。溶出液中のエタノールをロータリーエバポレーターで除去後、真空凍結乾燥し、紫色の色素粉末 18.6 mg を得た。

一方、酢酸水溶液による回収では、1 M 酢酸から 5 M 酢酸まで 1 M ずつ濃度を上昇させながら、順次 200 mL を通液して紫色の色素の溶出状況を目視により検討した。その結果、5 M 酢酸を用いることにより、色素成分が濃縮されて溶出され、カラム内に色素成分の残存はほとんど見られなくなった。この溶出液を真空凍結乾燥し、紫色のナスニン含有色素粉末 292.8 mg を得た。ここに得られた粉末中のナスニン含有量と下漬液を真空凍結乾燥して得られる分画前の乾燥粉末中のナスニン含有量とを HPLC 分析により比較し、上記の各回収方法によるナスニンの回収率を算出した。

その結果、エタノールを用いた場合の回収率は 31%であったのに対し、酢酸水溶液を用いた方は 87%であり、5 M 酢酸水溶液により効率良く回収できることが確認された。この理由としては、分子内にプラスに荷電したオキシニウムイオンを有するナスニン分子が、カラム内でマイナスに荷電した酢酸のカルボキシル基との間で結合を生じ、安定なフラビニウム型の分子状態が形成される結果、合成吸着剤の細孔に捕捉されていたナスニンが、多孔質樹脂から脱着していくものと考えられる<sup>4)</sup>。

#### (4) 大容量カラムによるナスニン含有画分の調製及び成分分析

上記(3)における回収試験の結果に基づき、600 mL の HP-20 を充填したカラム（長さ 100 cm，内径 30 mm）を用いてナスニンを含む色素画分の調製を試みた。その結果を図 2-6 に示した。5 M 酢酸溶液を用いて溶出したところ、ナスニンはフラクション No. 3 から溶出し始め、No. 21 まで続いたが、大半はフラクション No. 5 から No. 16 までの画分に (1200 mL) 溶出した。これらのフラクションをそれぞれ真空凍結乾燥後、その一定量を用いて HPLC 分析を行ったところ、図 2-6 に示すように同じフラクションにナスニンとともにクロロゲン酸が混在していた。HPLC 分析で得られた典型的なクロマトグラムを図 2-7 に示した。これらの結果から、HP-20 カラムによるナスニンの回収ではクロロゲン酸の混入は避けられないものと考えられた。しかし、クロロゲン酸は前述のとおり抗酸化性が高い機能性物質であることから、あえて両者が混在する色素粉

末として回収することにした。この大容量カラムにより 30 L の下漬液から回収されたナスニン含有色素粉末は 13.37 g であり、このうち、ナスニンは 2.02 g、クロロゲン酸は 1.03 g 含まれていた。また、水分は 0.01 g 含まれていた<sup>4)</sup>。

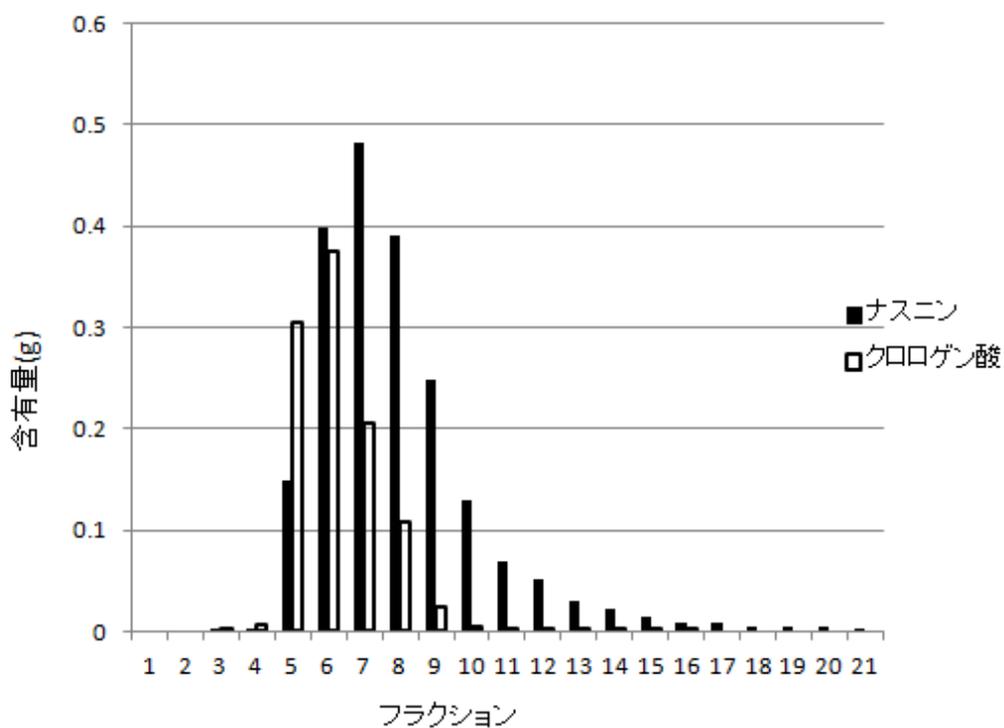


図 2-6 5M酢酸水溶液により溶出された各フラクション中のナスニン及びクロロゲン酸の含有量

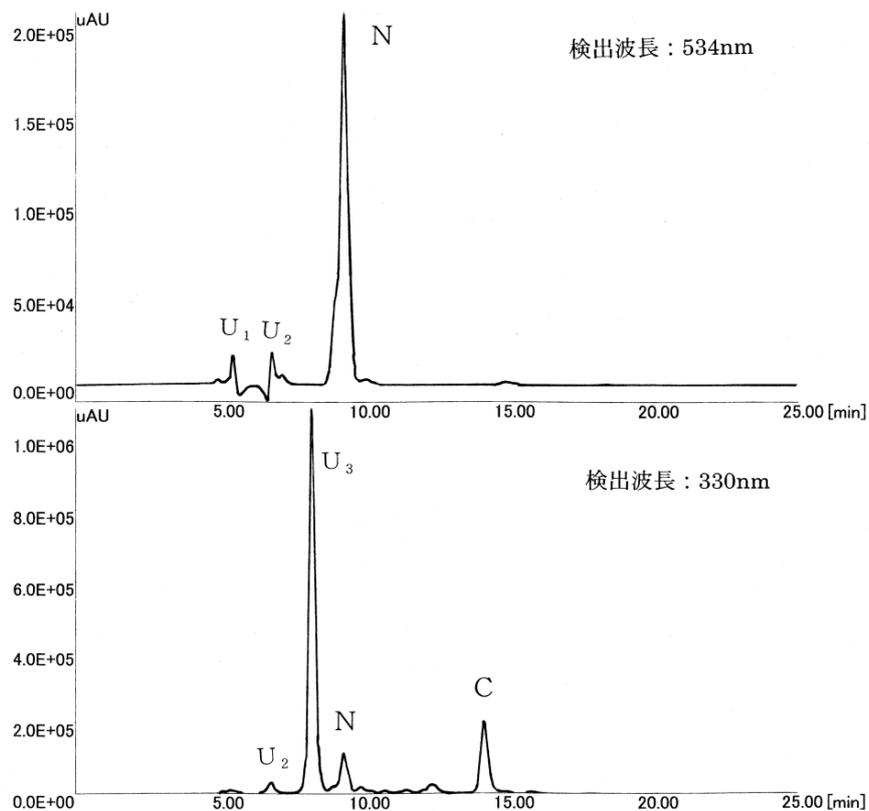


図 2-7 5M酢酸水溶液により溶出されたフラクション No.7 の  
HPLC クロマトグラム

サンプル：図 2-5 におけるフラクション No.7

N：ナスニン C：クロロゲン酸 U<sub>1</sub>～U<sub>3</sub>：未同定物質

(5) 調製されたナスニン含有色素粉末の抗酸化性評価

上記のように調製されたナスニン含有色素粉末の抗酸化性について ORAC 値<sup>41),42)</sup>による評価を行った結果を、陽性対照として測定したクロロゲン酸標準品、ナス皮を凍結乾燥し粉碎した粉末（以下、ナス皮粉末）及び実験方法 3 で作製したナスニン標準品の ORAC 値と合わせて表 2-3 に示した。調製したナスニン含有色素粉末は、1 g 当たり

10432  $\mu\text{mol}$  の Trolox 当量の ORAC 値であり，クロロゲン酸標準品の 69.4%に相当する抗酸化性を有することがわかった．また、ナス皮粉末の抗酸化性は，クロロゲン酸標準品の 7.1%に相当し，ナスニン標準品の抗酸化性は，クロロゲン酸とほぼ同等であった<sup>4)</sup>．

表 2-3 色素粉末の ORAC 値

	L-ORAC	H-ORAC	Total ORAC	相対活性
	( $\mu\text{mol}$ of TE*/g )			(%)
ナス皮粉末	35.5 $\pm$ 0.9	1025.4 $\pm$ 4.3	1060.9 $\pm$ 5.2	7.1
ナスニン含有 色素粉末	33.7 $\pm$ 0.9	10398.0 $\pm$ 36.6	10431.7 $\pm$ 37.5	69.4
ナスニン標準品	198.8 $\pm$ 1.9	14779.6 $\pm$ 89.1	14978.4 $\pm$ 91.0	99.7
クロロゲン酸 標準品	21.0 $\pm$ 0.8	15007.2 $\pm$ 86.0	15028.2 $\pm$ 86.8	100

\*TE : Trolox Equivalent

なお、調製されたナスニン含有色素粉末には、クロロゲン酸以外にもいくつかの未同定の物質も混在したが、これらが抗酸化性に関与しているかどうかは本研究では明らかにできなかった。

以上、さまざまな機能性を持ちながら、ナス皮からの抽出が困難であり、安定性も乏しいため標準品も市販されていないナスニンを含有する色素を、現在は廃棄されているナス浅漬の下漬液から回収し、粉末化することができた。このナスニン含有色素粉末には、利用上問題となる食塩及びミョウバン由来のアルミニウムはほとんど含まれず、比較的高い抗酸化性を示すことから、食品のみならず、化粧品など<sup>43)</sup>も含めて今後の利用性の検討が望まれる<sup>4)</sup>。

## 第3章

### ナスニン含有色素粉末のシクロデキストリン包接体の調製, 色調安定性および機能性評価

#### 第1節 緒論

前章において、ナス下漬液からのナスニンおよびクロロゲン酸を含有する色素粉末（以下ナスニン含有色素粉末）の効果的な調製法を示した。しかしながら、この方法で調製したナスニン含有色素粉末は水への溶解度が低く、また HP20 樹脂から脱着する際に用いた酢酸が少なからず残存するため、やや強い酢酸臭を有するといった問題があり、この粉末を広く食品あるいは化粧品に利用するためにはこれらの問題点を改善する必要がある<sup>44)</sup>。

そこで、水への溶解性の改善と酢酸臭の低減を図るため、上記のナス下漬液から得られるナスニンを含有する色素溶液にシクロデキストリン(CD)を添加・攪拌処理した後、粉末化を試みた。CD は、さまざまな機能性成分の水溶性向上<sup>45)~48)</sup>に用いられており、また、臭気成分をマスキングする効果<sup>45)</sup>も認められている。したがって、CD の利用が上記問題点の改善に有効と考えた。一方、ナス下漬液から得られるナスニン含有色素粉末は強い抗酸化性を有するので、CD との包接処理がこの抗酸化性にどのように影響するのかを評価した。また、ナスニン含有色素粉末の CD との包接物（以下 CD 包接体）のヒアルロニダーゼ阻害活性も評価した<sup>44)</sup>。

上記 CD 包接体については、期待される機能性と赤から青ないし紫色の色調を活かして、食品や化粧品への活用が望まれる。しかし、一般にナスニンを含むアントシアニンが植物体から分離すると非常に不安定になる物質であることから、その実用化のためには、CD 包接体としての安定性評価も求められる。そこで、CD 包接体を異なる温度と遮光または蛍光灯照射条件下で保存した場合の色調と抗酸化性における安定性評価を行うとともに、これらの安定性を他の植物色素と比較検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. ナス下漬液からナスニン含有色素粉末の調製

ナスの浅漬け加工の工程で生じるナス下漬液を用い、前章で確立した方法により、ナスニン及びクロロゲン酸を含むナスニン含有色素粉末を調製した。

### 2. 試薬

クロロゲン酸は(株)MP バイオの製品を、 $\beta$ -及び $\gamma$ -CD は塩水港精糖 (株) 製のデキシーパール高純度品を、特級リン酸及び 2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ジヒドロクロリド(AAPH)は和光純薬(株)の製品を、そして、アセトニトリルは関東化学(株)製の液体クロマトグラフ用を使用した。フルオレセインナトリウム塩(FL-Na) , 6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(Trolox), ヒアルロニダーゼ (TypeIV-S) 及びヒアルロン酸ナトリウムは Sigma-Aldrich 社製品を用いた。デルフィニジンは(株)常磐植物化学研究所の製品を使用した。柴朴湯は(株)ツムラ製を用いた。その他の試薬は、関東化学(株)製の特級試薬を使用した<sup>44)</sup>。

合成吸着剤 (HP-20) は三菱科学(株)製を、紫イモ色素、赤キャベツ色素およびシソ色素は神戸化成(株)製、赤ダイコン色素は三菱化学フーズ(株)製、紫ニンジン色素は理研ビタミン(株)製を用いた。

### 3. ナスニン含有色素粉末の溶解性の検討

ナスニン含有色素粉末を、ヘキサン・アセトン・エタノール・蒸留水それぞれの溶媒中で攪拌・遠心分離し、不溶であった割合から逆算することにより溶解した割合を求めた。

### 4. ナスニン含有色素粉末の CD との処理条件の検討

#### (1) ナスニン及びクロロゲン酸の定量

調製したナスニン含有色素粉末中のナスニン及びクロロゲン酸は、第 2 章の実験方法 4 に記載の方法により、HPLC を用いて定量した。

#### (2) ナスニン含有色素粉末の水溶解性の評価

ナスニン含有色素粉末 47.3 mg に 2 mL の蒸留水を加えて攪拌後、3,000 rpm (kubota 製 8410 型) で 10 分間遠心した。沈殿物を 2 mL の 5 M 酢酸水溶液に溶解し、さらに 5 M 酢酸水溶液で 80 倍に希釈後、ナスニンの極大吸収波長である 532 nm における吸光度を測定した。対照には、同重量のナスニン含有色素粉末を同様に 5 M 酢酸溶液に溶解、希釈したものをを用いた。その同波長における対照の吸光度との差から、蒸留水への不溶割合を求めて溶解性を評価した<sup>44)</sup>。

#### (3) ナスニン含有色素粉末の $\beta$ -または $\gamma$ -CD 包接による水溶性改善の評価

上記(1)で得られたナスニン含有粉末 47.3 mg を 5 M 酢酸溶液 20 mL に溶解し、ナスニンとクロロゲン酸の合計モル数に対する  $\beta$ -または  $\gamma$ -CD のモル数の比率を、1 ~ 4 と変化させた各 CD を添加して 2 時間攪拌した後、真空凍結乾燥して粉末化した。この粉末に、蒸留水 2 mL を加えて攪拌した後、3,000 rpm (kubota 製 8410 型) で 10 分間遠心した。この上清を、蒸留水で 20 倍に希釈して、分光光度計(島津製作所 UV-2450)を用い、ナスニン水溶液の極大吸収波長 586 nm における吸光度を測定した。この方法により各 CD による包接の最適比率を検討した。得られた最適比率で攪拌時間を 10 ~ 120 分間変化させることにより、包接の最適時間を検討した。また、残った沈殿に 5 M の酢酸溶液を 2 mL 加えて沈殿をすべて溶解させ、さらに 5 M の酢酸溶液を用いて 80 倍に希釈し、この溶液条件におけるナスニンの最大吸収波長 532 nm における吸光度を測定し、水に不溶性のナスニンの割合を求めることにより、ナスニンの水溶性改善を評価した。同重量のナスニン含有色素粉末をいずれの CD との包接処理をすることなく 5 M 酢酸溶液に溶解させたものを対照として、包接された割合を算出した<sup>44)</sup>。

## 5. $\gamma$ -CD 包接による酢酸臭低減の検討

酢酸臭の分析は、Headspace Sorptive Extraction (HSSE) 法とガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) を組み合わせることにより行った。すなわち、 $\gamma$ -CD 包接体 250.9 mg (ナスニン含有色素粉末 100 mg に相当) を 15 mL のガラス容器に採取し、そのヘッドスペース部分に臭気吸着剤 (Twister, Gerstel 社製) を装着して 40°C、1 時間ヘッドスペースガスを吸着させた。また、CD 包接処理を行わない同量のナスニン含有色素粉末についても、同様にヘッドスペースガスを捕集した。これを、GC-MS 装置の加熱脱着装置に装着し、以下の条件で GC-MS 分析を行い、脱着された酢酸の量を  $\gamma$ -CD 包接処理の前後で測定することにより、比較した<sup>44)</sup>。

### GC-MS 分析条件

装置 : GC 6890N, MS 5973 Agilent Technologies 社製

カラム : HP-5MS (30m, 0.25mm, 0.25  $\mu$  m, Agilent Technologies 社製)

オープン温度 : 40°C (3min) – 10°C/min 昇温 – 150°C – 20°C/min 昇温 – 250°C (5min)

ヘリウム流速 : 1mL/min

ヘッドスペース成分の脱着温度 : 20°C (1min) – 60°C/min 昇温 – 210°C (4min)

## 6. $\gamma$ -CD 包接体の機能性評価

### (1) ORAC 法による抗酸化性評価

調製したナスニン含有色素粉末の  $\gamma$ -CD 包接体の ORAC 値は第 2 章、実験方法 6 で述べた方法により測定した。

### (2) 抗アレルギー性評価

掛川らの方法<sup>49)</sup>により、以下のように測定した。 $\gamma$ -CD 包接体の水溶液 (50 mg/mL) 0.1 mL に 0.05 mL のヒアルロニダーゼ溶液 (0.1 M 酢酸緩衝液 (pH4.0) に 4.0 mg/mL

となるように溶解)を混合し、37°Cで20分間保持した。次いで0.1 mLの酵素活性化液(0.1 M 酢酸緩衝液に Compound 48/80 を 0.5 mg/mL, 塩化カルシウムを 3.8 mg/mL となるように溶解)を添加し、37°Cで20分間保持後、0.25 mLのヒアルロン酸ナトリウム溶液(0.1 M 酢酸緩衝液に 0.8 mg/mL となるように溶解)を添加して37°Cで40分間保持した。これに0.1 mLの0.4 M NaOHと0.1 mLのホウ酸カリウム溶液(0.8 M ホウ酸水溶液に水酸化カリウムを 22.4 mg/mL となるように溶解)を添加し、沸騰水中で3分間加熱後、急冷した。ここに3 mLの*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液(5 gを氷酢酸 44 mL, 10 M 塩酸 6 mLに溶解し、使用時に氷酢酸で10倍希釈)を加え、37°Cで20分間反応させ、585 nmの吸光度を測定した。試験対照には蒸留水を使用し、阻害率を求めた。また、比較のための陽性対照として、抗アレルギー剤の漢方薬である柴朴湯<sup>50)</sup>を用いた<sup>44)</sup>。

## 7. $\gamma$ -CD 包接体の調製

合成吸着剤(HP-20 三菱化学(株)製)600 mlを充填したカラムに、下漬液50 Lを通してナスニンなどのポリフェノールを吸着させ、蒸留水4 Lで水洗し、下漬液中の塩分がほぼ除去されたのを確認した。その後、5 M 酢酸 1.8 Lで抽出を行った。抽出液のナスニン及びクロロゲン酸含有量を前章で述べた HPLC (LC2000, 日本分光(株))法により分析し、その結果に基づいてナスニン及びクロロゲン酸の含有量と $\gamma$ -CDの量が1:1となるように混合して包接処理を行った。これを真空凍結乾燥後、粉末化し、 $\gamma$ -CD 包接体を調製した。

## 8. $\gamma$ -CD 包接体の安定性評価

上記のように調製した $\gamma$ -CD 包接体を、遮光条件下で栃木県の平均湿度である70%に設定した恒温恒湿槽において、温度条件20°Cと、40°Cでそれぞれ85日間保存し、色調の変化について多光源分光測色計(日本電色工業製 SZ-シグマ 90)を用いて評価し

た.

#### 9. $\gamma$ -CD 包接体水溶液の安定性評価

CD 包接体および比較対照として用いた 5 種類の植物色素（紫イモ色素，赤キャベツ色素，赤シソ色素，赤ダイコン色素，紫ニンジン色素）を，酢酸緩衝液（pH 3.6）に溶解し，波長 530 nm における吸光度を分光光度計（島津製作所製 UV-2450）で測定し，吸光度が 0.25 となるように希釈したものを以下の安定性評価に用いた．

温度安定性については，遮光条件下で 20℃及び 40℃で保存し，各試料液の 1，4，および 7 日後の色素残存率を測定することにより評価した．光安定性については，10℃において，約 10,000 ルクス（晴天時の窓際の明るさ）の光を蛍光灯で照射し，同様に 1，4，および 7 日後の色素残存率を測定することにより評価した．

#### 10. $\gamma$ -CD 包接体水溶液の色調および抗酸化性評価

実験方法 9 で述べた方法で調製した  $\gamma$ -CD 包接体の水溶液について，pH 3.6 および pH 4.6 における色調を，比較対象として用いた他の植物性色素の水溶液と比較した．また，実験方法 6 の (1) に記述した方法により， $\gamma$ -CD 包接体水溶液および比較用の植物色素の水溶液についても ORAC 値を測定し，抗酸化性を比較した．

### 第 3 節 実験結果および考察

#### 1. ナスニン含有色素粉末の溶解性測定

ナスニンは水溶性のアントシアニン色素であるが，合成吸着剤によるナス下漬液からの抽出操作及び 5 M 酢酸溶液を用いた溶出操作により濃縮され，色調安定化のために添加されているミョウバン由来のアルミニウムの影響で，溶解性の低いキレート化合物に変化していると考えられた．そこで，まず，ナスニン含有粉末の各種溶媒への溶解性を測定し，その結果を表 3-1 に示した．蒸留水への溶解性は 32%であり，沈殿物はター

ル状であった<sup>44)</sup>。特に、蒸留水に対する溶解性が30%程度と低いことから、この粉末をそのまま化粧品や食品に利用する上では大幅な改善が必要であると考えられる。

**表 3-1 ナス下漬液由来ナスニン含有色素粉末の溶解性**

溶 媒	溶解性(%)
ヘキサン	—*
アセトン	1.2±0.1
エタノール	6.3±0.2
蒸留水	31.6±0.2

※:溶解せず

3回測定値の平均±標準偏差で示した。

## 2. ナスニン含有色素粉末のβ-またはγ-CD包接による水溶性改善

上述のように、ナスニン含有色素粉末を食品・化粧品等に活用するためには、水溶性を向上させることが不可欠である。CDは環状のオリゴ糖であり、コエンザイムQ10やイソフラボン等の水溶性の低い機能性成分の水溶性向上に用いられている物質である<sup>45)~48)</sup>。このことから、ナスニン含有色素粉末においても水溶性改善の効果が期待できると考えられた<sup>44)</sup>。

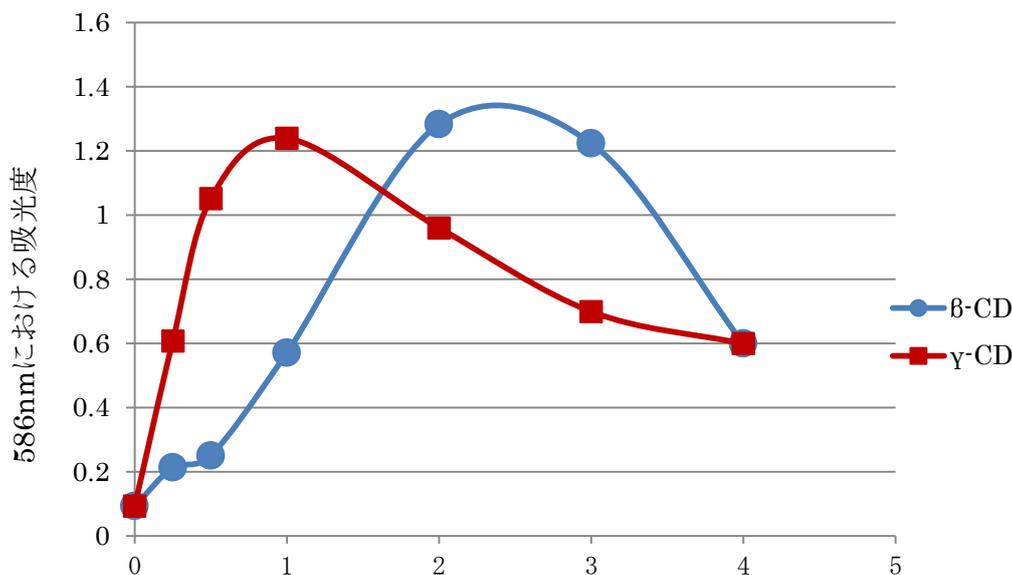
よく知られているように、CDは、包接とよばれる方法により対象物質（以下ゲスト物質）を疎水性の環状構造の中に取り込み、複合体を形成する。その際のゲスト物質とCDとのモル比は、整数であるとされている<sup>51)</sup>。今回調製したナスニン含有色素粉末中には、ナスニンが20.2%、クロロゲン酸は33.5%含まれており、これらの濃度をモル濃度に変換して、ナスニンとクロロゲン酸を合わせた合計モル数と整数比の割合でCDを添加し、検討を行った<sup>44)</sup>。

### (1) 最適混合比率の検討

CD の代表的な種類には、 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD 及び  $\gamma$ -CD があり、その環の大きさから、 $\alpha$ -CD はアルキル基、 $\beta$ -CD はベンゼン環、 $\gamma$ -CD はナフタレン環を包接するとされている<sup>52)</sup>。このことと、ナスニン及びクロロゲン酸の構造から推測し、 $\beta$ -CD と  $\gamma$ -CD により包接されるのではないかと予想し、その2種類について検討を行った<sup>44)</sup>。得られた結果を図 3-1 に示した。

$\beta$ -CD では、ナスニン含有色素粉末中のナスニンとクロロゲン酸の合計モル数との比率が2倍及び3倍の場合に、溶解している色素の吸光度から推定される水溶性の向上が示された。また、 $\gamma$ -CD ではモル数比が1の場合に溶解している色素の吸光度から推定される水溶性が最大になることが明らかになった<sup>44)</sup>。

ナスニン含有色素粉末に混在するクロロゲン酸も、その分子構造から同時に包接されると推測されたため、ナスニンとクロロゲン酸の合計モル数に基づいて検討を行ったが、クロロゲン酸を指標とした水溶性改善については検討を行わなかった<sup>44)</sup>。CD 包接体の水への溶解性が改善されれば、クロロゲン酸もナスニンと共にその抗酸化機能が発揮されるものと期待される。



ナスニン及びクロロゲン酸の合計モル比に対する  $\beta$ -CD または  $\gamma$ -CD の添加比率

図 3-1 ナスニン及びクロロゲン酸の合計モル比に対する  $\beta$ -CD または  $\gamma$ -CD の添加比率と吸光度の関係

586 nm における吸光度で抗酸化性粉末の水溶性を評価した。

各 CD の比率：抗酸化性粉末中のナスニン及びクロロゲン酸のモル数（合計値）との比率。

## (2) 最適 CD 処理時間の検討

(1) で明らかになった最適比率を維持しつつ、攪拌時間を変化させることにより、最適 CD 処理時間の検討を行った結果を図 3-2 に示した。 $\gamma$ -CD では 10 分間の攪拌で最適比率検討の際の吸光度の最大値近くまで上昇したが、 $\beta$ -CD では、ナスニンとクロロゲン酸の合計モル数に対する  $\beta$ -CD の比率が 2 倍と 3 倍の二つの条件においても、60 分間の攪拌が必要であることが明らかになった。さらに、上記  $\beta$ -CD の比率が 3 倍の条件では 60 分以上攪拌を行うと、かえって徐々に吸光度が減少する傾向が見られた<sup>44)</sup>。

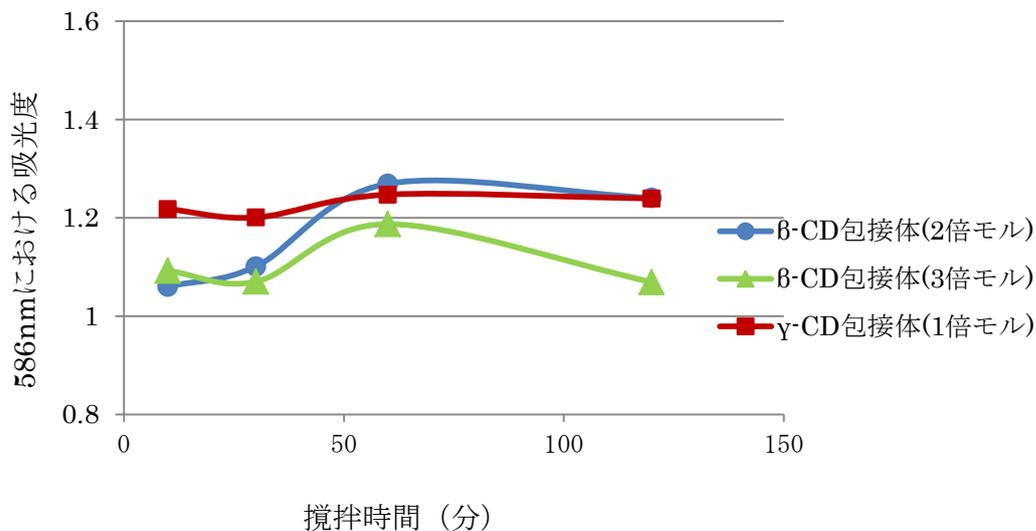


図 3-2 最適比率における攪拌時間と吸光度の関係

最適比率におけるナスニン含有粉末の水溶性を、586 nm における吸光度で評価した。

以上の検討から、ナスニン含有色素粉末の水溶性の向上には、 $\gamma$ -CD をナスニン及びクロロゲン酸のモル数と 1 : 1 となるよう添加して 10 分以上攪拌することが、反応時間短縮の点から最適であると考えられた。なお、この条件における水溶性は 81% であり、包接前のその 32% から約 2.5 倍と大きく向上することが確認された<sup>44)</sup>。

以上のように調製された  $\gamma$ -CD 包接体については、今回検討した機能性とともに、紫色の色調も合わせて、食品・化粧品において大いに利用価値があると考えられるため、図 3-3 に包接体を写真で示し、表 3-2 にその色調の分光測色計による測定結果を示した。



図 3-3 ナスニン含有色素の  $\gamma$ -CD 包接体

ナス下漬液を合成吸着剤で処理した溶出液に、 $\gamma$ -CD をナスニンおよびクロロゲン酸の合計モル数と 1 : 1 となるように添加して攪拌し、フリーズドライで乾燥粉末とした。

表 3-2 ナスニン含有色素の  $\gamma$ -CD 包接体の色調

	L*	a*	b*
$\gamma$ -CD 包接体	29.47±0.02	7.85±0.01	-20.35±0.03

3回測定値の平均±標準偏差で示した。

L\* : 明度

a\* : 値が正の場合は赤方向, 負の場合は緑方向

b\* : 値が正の場合は黄方向, 負の場合は青方向

### 3. $\gamma$ -CD を用いた包接による酢酸臭低減

CD には、水溶性向上の他にも、臭いのマスキング効果、苦みの緩和効果、熱や光による分解抑制効果など、さまざまな効果があることが知られている<sup>45)</sup>。このことから、 $\gamma$ -CD を用いた包接による、HP-20 カラムを用いて回収されるナスニン含有色素粉末に残留する酢酸臭の低減効果を検討した<sup>44)</sup>。

$\gamma$ -CD による包接前のナスニン含有色素粉末の採取量を変化させ、ヘッドスペース中に発散する酢酸量の GC-MS 分析を行った。まずは包接前の粉末の重量(x)と酢酸ピーク面積値(y)との関係を調べて計算式、 $y=281.97x+5.16$  ( $R^2=0.9891$ )を得た。

次に  $\gamma$ -CD 包接体について同様に酢酸を分析し、上記の関係式から包接前の粉末からの酢酸臭の低減率を算出した。その結果、 $\gamma$ -CD 包接体から発散される酢酸は、包接前のナスニン含有色素粉末のその 19%まで減少したことが確認された。

以上のことから、 $\gamma$ -CD による包接処理は、ナスニン含有粉末の水溶性の向上だけでなく、回収時に残留する酢酸臭の大幅な低減にも有効であることが明らかになった。

#### 4. $\gamma$ -CD 包接体の機能性評価

##### (1) 抗酸化性評価

ナスニン含有色素粉末、その  $\gamma$ -CD 包接体にデルフィニジン標準品も加えて、それらの抗酸化性を ORAC 値で評価し、その結果を表 3-3 に示した。また、デルフィニジン標準品の抗酸化性に対するそれぞれの相対活性も表 3-3 に示した。 $\gamma$ -CD 包接体では  $\gamma$ -CD の添加によりナスニン及びクロロゲン酸の濃度が低下する。包接前の粉末に比べ、包接体は約 2.5 倍の重量になるため、計算上、ORAC 値は包接前の粉末の 40% になると考えられるが、測定値は 49.5%であり、計算値と比較して高い値であった。 $\gamma$ -CD 包接体は 1 g あたり 5,159  $\mu\text{mol}$  の Trolox 当量であり、これはデルフィニジン標準品の 56.2%の相対活性に相当することから、 $\gamma$ -CD を用いる包接によってもナスニン含有色素粉末は強い抗酸化性を保持することが示された<sup>44)</sup>。

表 3-3 ナス下漬液由来ナスニン含有粉末およびナスニン包接体のORAC値

	L-ORAC	H-ORAC	Total ORAC	相対活性
	(μ mol of TE*/g)			(%)
ナスニン含有色素 粉末	33.7±0.9	10398.0±36.6	10431.7±37.5	113.7
γ-CD 包接体	5.1±0.5	5154.3±23.3	5159.4±23.8	56.2
デルフィニジン 標準品	21.6±1.2	9151.5±31.2	9173.1±32.4	100

\*TE : Trolox Equivalent

3回測定値の平均±標準偏差で示した。

## (2) 抗アレルギー性評価

アレルギー症状はI型からIV型に分類されている。I型は即時型ともいわれ、気管支喘息やアレルギー性鼻炎などが疾患例である。ヒアルロニダーゼは、I型に関与し、ヒスタミンと同時に肥満細胞から遊離し、結合組織に多く分布するヒアルロン酸を加水分解して、炎症を重度にする<sup>50)</sup>。抗酸化性成分はヒスタミン放出を抑制することでI型アレルギー反応を直接阻害することが知られており、その活性はジフェノール構造を有するカテコール化合物よりトリフェノール構造を持つピロガロール化合物の方が強く、構造依存性が認められる<sup>53)</sup>。ナスニンはトリフェノール構造を有し、また、クロロゲン酸はジフェノール構造を持つことから、作製したγ-CD包接体には抗アレルギー活性が期待された。ヒアルロニダーゼ阻害活性とヒスタミン遊離抑制には正の相関関係があることが知られている<sup>50)</sup>ことから、γ-CD包接体のヒアルロニダーゼ阻害活性について検討した<sup>44)</sup>。

γ-CD包接体の抗アレルギー性をヒアルロニダーゼ阻害率として評価した結果を表3-4に示した。γ-CD包接体は、抗アレルギー製剤として使用されている柴朴湯とほぼ

同等の阻害率を示し、アレルギー症状を抑える素材としての活用も期待できることが示された。なお、 $\gamma$ -CDによる包接前のナスニン含有色素粉末の抗アレルギー活性については、この粉末の水溶性が低いため、本研究では評価しなかった<sup>44)</sup>。

表 3-4  $\gamma$ -CD 包接体の抗アレルギー性

ヒアルロニダーゼ阻害率 (%)	
$\gamma$ -CD 包接体	91.2±1.3
柴 朴 湯	92.0±1.3

3回測定値の平均±標準偏差で示した。

#### 5. $\gamma$ -CD 包接体の安定性評価

$\gamma$ -CD 包接体を第2節8の条件で12週間保存し、その間の色調の変化について、L\*a\*b\*表色系で評価したところ、図3-4および図3-5に示す結果が得られた。そこに見られるように、20°C保存条件ではほとんど変化はみられなかったが、40°C保存条件では、a値（赤色度）が減少して-b値（青色度）が増加し、色調が紫色から青色に変化した。この結果から、なるべく低温で保存することが望ましいと考えられる。

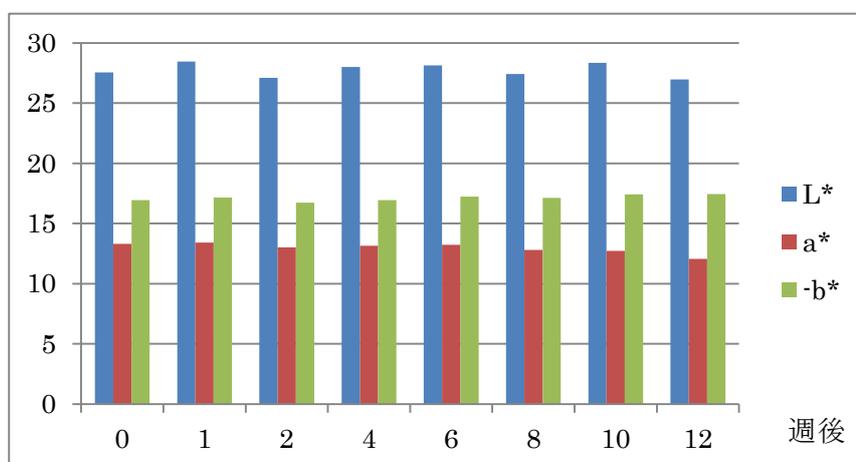


図 3-4 20°C保存  $\gamma$ -CD 包接体の色調変化

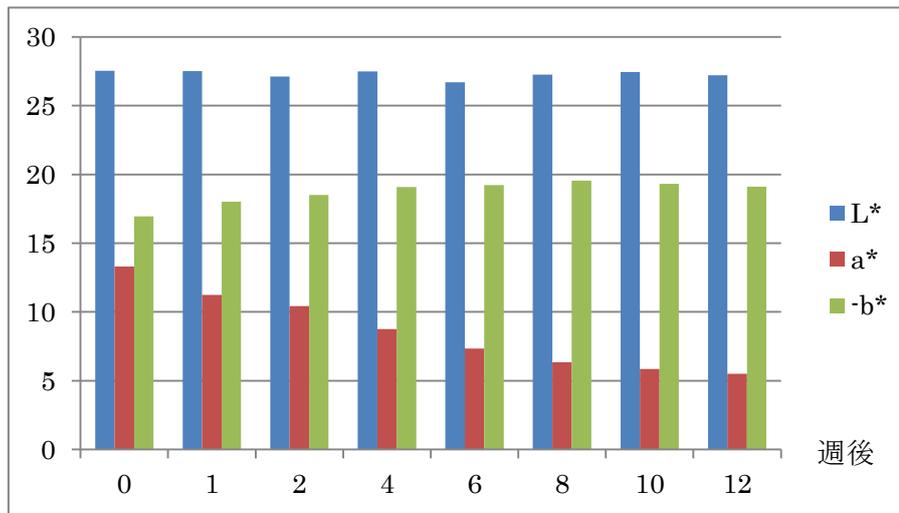


図 3-5 40°C保存  $\gamma$ -CD 包接体の色調変化

#### 6. $\gamma$ -CD 包接体水溶液の色調の安定性評価

$\gamma$ -CD 包接体とともに、紫イモなど 5 種類の植物色素の水溶液を第 2 節 9 の方法により調製後、1, 4, および 7 日間保存後の 530 nm における吸光度を測定して色調の安定性を比較した。その結果、温度安定性については、20°Cでの保存条件では他の植物性色素とほぼ同等の安定性を保持していた（図 3-6）が、40°Cでの保存条件では安定性が低下する（図 3-7）ことが示された。また、光安定性については、紫ニンジン色素と同等の安定性を保持していた（図 3-8）。

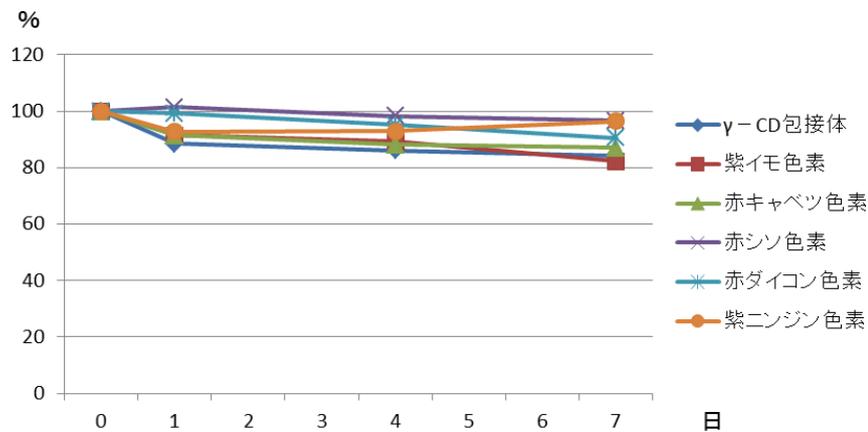


図 3-6 20°Cにおける安定性

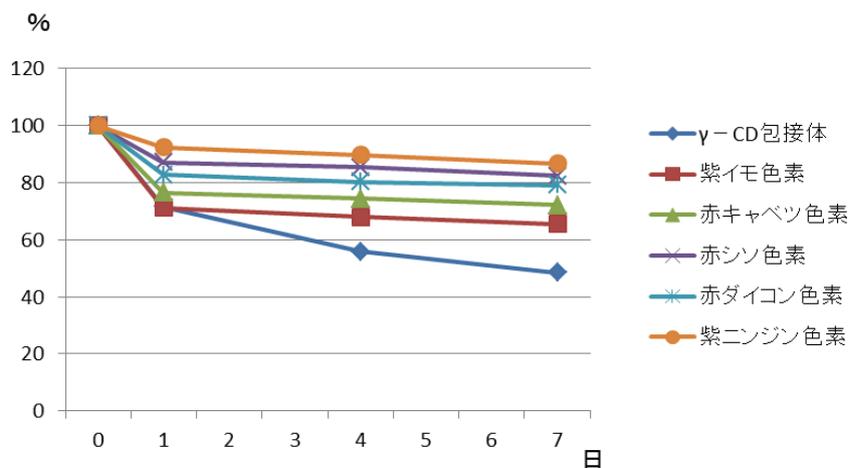


図 3-7 40°Cにおける安定性

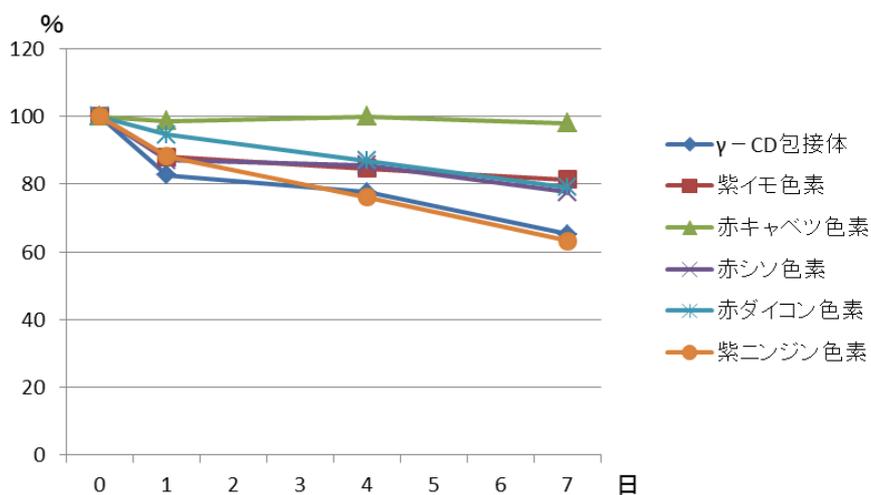


図 3-8 光安定性

#### 7. γ-CD 包接体水溶液の色調および抗酸化性評価

γ-CD 包接体と紫イモなど植物色素の各水溶液を pH 3.6 または pH 4.6 に調整してそれぞれの色調を比較した結果を図 3-9 及び図 3-10 に示した。γ-CD 包接体は、他の植物色素と比較して、青色側にシフトした特徴的な色調を持つことが示された。また、水溶液の抗酸化性を ORAC 法で評価した結果、表 3-5 に示すように、γ-CD 包接体は他の植物性色素と比較して高い抗酸化性を有していた。

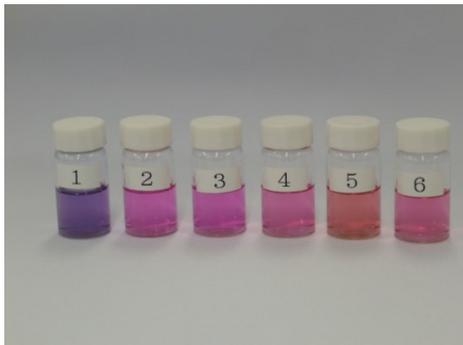


図 3-9 pH3.6 における色調

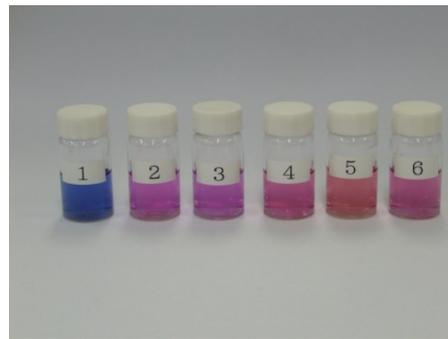


図 3-10 pH4.6 における色調

1 :  $\gamma$ -CD 包接体, 2 : 紫イモ, 3 : 赤キャベツ, 4 : 赤シソ, 5 : 赤ダイコン,  
6 : 紫ニンジン

表 3-5 CD 包接体および植物性色素水溶液の H-ORAC 値

	H-ORAC 値 ( $\mu$ mole of Trolox Equivalent/g)
$\gamma$ -CD 包接体	4.4
紫イモ色素	0.6
赤キャベツ色素	0.5
赤シソ色素	3.2
赤ダイコン色素	1.1
紫ニンジン色素	0.4

以上,  $\gamma$ -CD を用いてナス下漬液から回収したナスニン及びクロロゲン酸を含むナスニン含有色素粉末の水溶性の向上を検討し,  $\gamma$ -CD による包接体は水溶性が大きく改善されることを確認した. また,  $\gamma$ -包接体の機能性を評価した結果, ORAC 値でデルフィニジンの 56% に相当する抗酸化性と柴朴湯に匹敵する抗アレルギー効果を持つ

ことも明らかにした。一方、安定性については、 $\gamma$ -CD 包接体を粉末状態で保存した場合の色調は 20℃で 85 日間安定であり、20℃の水溶液で保存した場合は紫イモ、赤キヤベツなど試験した 5 種類の植物色素とほぼ同等の安定性を有することが確認できた。

さらに、 $\gamma$ -CD 包接体は上記の植物色素と比較して、酸性域において青色系の特徴的な色調を示すとともに、比較的高い抗酸化性を示した赤シソの色素を上回る抗酸化性を示すことも明らかになった。

今後は、ナス下漬液から得られるナスニン含有色素粉末の  $\gamma$ -CD 包接体の機能性と安定性あるいは特徴的な色調を活かして、この  $\gamma$ -CD 包接体を広く食品・化粧品に活用するための検討が望まれる。

## 第4章

### ナスニンのナスニン含有色素粉末からの単離精製とその機能性寄与評価

#### 第1節 緒論

第2章でナス下漬液からナスニンおよびクロロゲン酸を含む抗酸化性色素粉末の調製を行い、第3章では、この色素粉末の $\gamma$ -シクロデキストリン包接体( $\gamma$ -CD包接体)を調製し、その抗酸化性や抗アレルギー性とともに水溶解性や安定性などを評価した。これらの色素粉末とその $\gamma$ -CD包接体について、抗酸化性や抗アレルギー性の評価を行ったところ、ORAC値を指標とした抗酸化性が包接前の色素粉末と $\gamma$ -CD包接体の両者に、また、ヒアルロニダーゼ活性を指標とした抗アレルギー活性が $\gamma$ -CD包接体に認められた。しかし、ナス下漬液から回収されるナスニン含有色素粉末やその $\gamma$ -CD包接体の実用化にあたっては、上記の各機能性がどの物質に由来するのかを明らかにする必要がある。特に $\gamma$ -CD包接体の材料でもあるナス下漬液から回収される色素粉末中のナスニンが上記の両機能性の主たる要因物質として作用し得るのかを確認する事は重要である。

そこで、ナス下漬液からナスニンを精製し、得られたナスニン精製物のORAC値による抗酸化性およびヒアルロニダーゼ活性による抗アレルギー性を評価し、そのナスニン含有粉末における寄与度を調べた<sup>54)</sup>。

#### 第2節 実験方法

##### 1. 試料

ナス浅漬け工程で生じるナス下漬液<sup>1)</sup>を用いた。

##### 2. 試薬

合成吸着剤(HP-20)は三菱科学(株)製を、ゲルろ過用担体(LH-20)、フルオレセイソナトリウム塩、6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(Trolox),

ヒアルロニダーゼ (TypeIV-S) 及びヒアルロン酸ナトリウムはそれぞれ SIGMA 製を用いた。クロロゲン酸は (株)MP バイオ製を用い、アセトニトリルは関東化学 (株) 製の HPLC グレードを用いた。柴朴湯は (株) ツムラ製を使用した。その他の試薬は、関東化学 (株) 製の特級試薬を使用した。ナスニン標準品は第 2 章の実験方法 3 で述べた方法に従ってナス表皮から調製し、 $-25^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫内に密封保存しておいたものを使用した<sup>54)</sup>。

### 3. ナス下漬液中のナスニンとクロロゲン酸の分画及び精製

合成吸着剤 (HP-20) (長さ 100 cm, 内径 30 mm のガラスカラムに 500 mL 充填) にナス下漬液 40 L を通液 (10 mL/min) してナスニンを吸着させ、蒸留水 1 L で下漬液に含まれる塩分を流去させた。その後、1%トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有メタノール 350 mL にて溶出させ、溶出液を 40 mL に減圧濃縮した。その 1 mL をゲルろ過用担体 (LH-20) (長さ 30 cm, 内径 10 mm のガラスカラムに 20 mL 充填) に通液 (0.2 mL/min) し、メタノールで溶出することによりナスニンとクロロゲン酸の分画 (2 mL ずつ採取) を行った。ナスニン及びクロロゲン酸の HPLC 分析は以下の条件で行った<sup>54)</sup>。

装置：フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M20A) 付き HPLC (島津製作所製)

カラム：Gemini-Nx (4.6×250 mm, Phenomenex 社製)

溶離液：0.5% (w/v) リン酸：アセトニトリル (85：15); 流速：1 mL/min

オーブン温度：40°C

検出波長：ナスニン；534 nm, クロロゲン酸；330 nm

### 4. HPLC を用いたナスニンの精製

上記 3 の方法で得られたナスニン含有画分 60  $\mu\text{L}$  を以下の HPLC 分析に供し、ナスニンピークの分取を繰り返して精製した<sup>54)</sup>。

装置およびカラム：島津製作所 Prominence; カラム：L-column2 ODS (10×250 mm)

溶離液：0.5% (w/v) リン酸：アセトニトリル (85：15)；流速：3 mL/min

オープン温度：40℃

検出器：フォトダイオードアレイ検出器

## 5. LC-MS/MS によるナスニン精製物の分析

ナスニンの同定は、UHPLC システム (Nexera X2；島津製作所製) に接続したエレクトロスプレーイオン化源付トリプル四重極リニアイオントラップ装置 (QTRAP 5500；AB Sciex 社製) にて行った。

UHPLC 条件は、カラム：Kinetex F5 (2.1×150 mm, Phenomenex 社製), 移動相：0.1% (v/v) 酢酸水溶液中のアセトニトリル割合を 10→50%/1.5 min, 50→99%/7 min にてグラジエント上昇させ, 99%にて 3 min 保持, 流速：0.2 mL/min, カラムオープン温度：30℃, 注入量：2 μL とした。

MS/MS スペクトルはリニアイオントラップ (LIT) によりポジティブイオンモードでのプロダクトイオン (m/z 40～950) を記録した。測定条件として, イオン源:400℃, カーテンガス：20 psi, 衝突活性化解離(CAD)ガス：7 psi, イオン源ガス：80 psi, イオン源ガス-2：70 psi, ポジティブイオンモードにおけるイオンスプレー電圧：5,500V にそれぞれ設定した。ガスはすべて窒素を用いた。また, デクラスタリング, エントランス及びコリジョンセルイグジット各電位は, 60, 10, 15 V を維持した。クロマトグラムとマススペクトルは AB Sciex Analyst ソフトウェアを用いて解析した<sup>54)</sup>。

## 6. ORAC 値によるナスニン精製物の抗酸化性評価

上記 4 で得られたナスニン精製物の抗酸化性を第 2 章の実験方法 6 で述べた方法により測定した。なお, 今回の対象物質はすべて水溶性抗酸化性物質であることから, 通常, 脂溶性物質に適用することが多い L-ORAC 値は使用せずに, H-ORAC 値のみで評価<sup>55)</sup>した。

## 7. ヒアルロニダーゼを用いたナスニン精製物の抗アレルギー性評価

掛川らの方法<sup>49)</sup>により，前章のように測定した．比較のための陽性対照として柴朴湯を用い，それぞれの IC<sub>50</sub> 値を算出して比較した．

### 第3節 実験結果および考察

#### 1. ナス下漬液からのナスニンとクロロゲン酸の分画および分取 HPLC による精製

ナス下漬液には，ナスニンとともにクロロゲン酸のほか，ナスニン以外のアントシアニンも共存している．従って，ナス下漬液から回収されるナスニン含有粉末の機能性に対するナスニンの寄与を正確に評価するには，できるだけ精製度を高めたナスニンを用いて検討する必要がある．そこで，ナスニン含有粉末中で最も含有量の多いクロロゲン酸との分離を目指し，HP-20 樹脂及びゲルろ過クロマトグラフィー用担体である LH-20 カラムを用いて分画を行った<sup>54)</sup>．

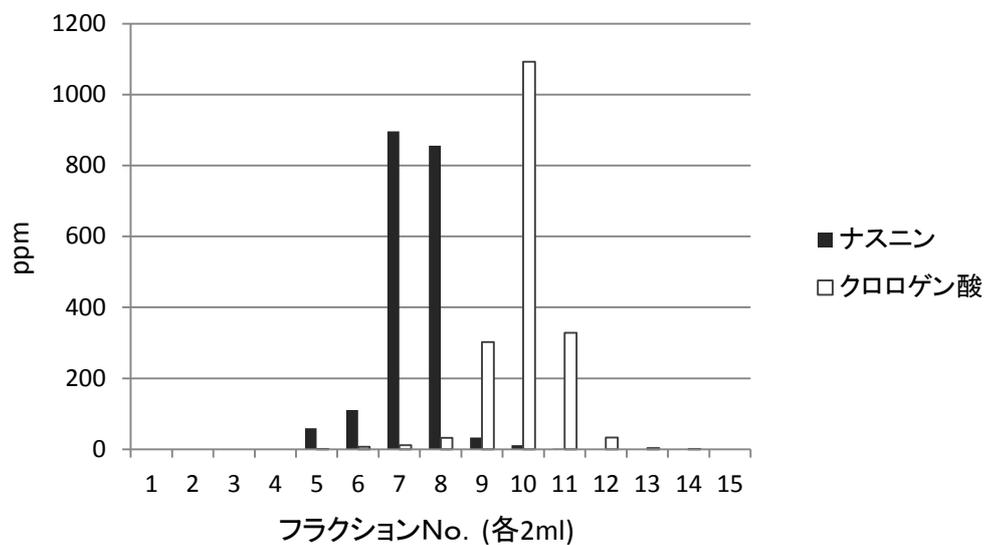
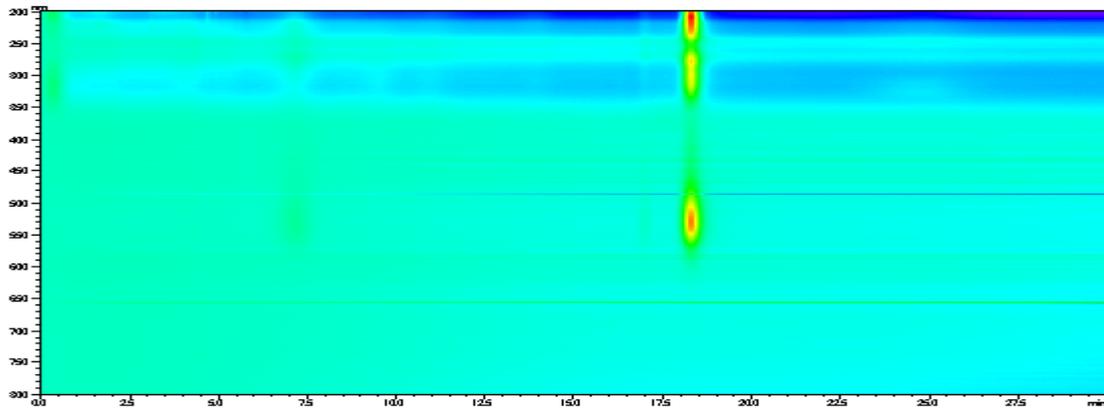


図 4-1 LH-20 カラムを用いた 100%メタノールによる分画

実験方法 4 の LH-20 カラムにおけるナスニン及びクロロゲン酸の分画結果を図 4-1 に示した。この結果から、ナスニンとクロロゲン酸は互いに分離がなされたと考えた。両成分の HPLC 分析により、分画前のナスニン含有粉末中に占めるナスニンとクロロゲン酸のそれぞれの含有割合は、20.2%と 33.5%であった<sup>54)</sup>。



波長  
(nm)

分析時間(min)

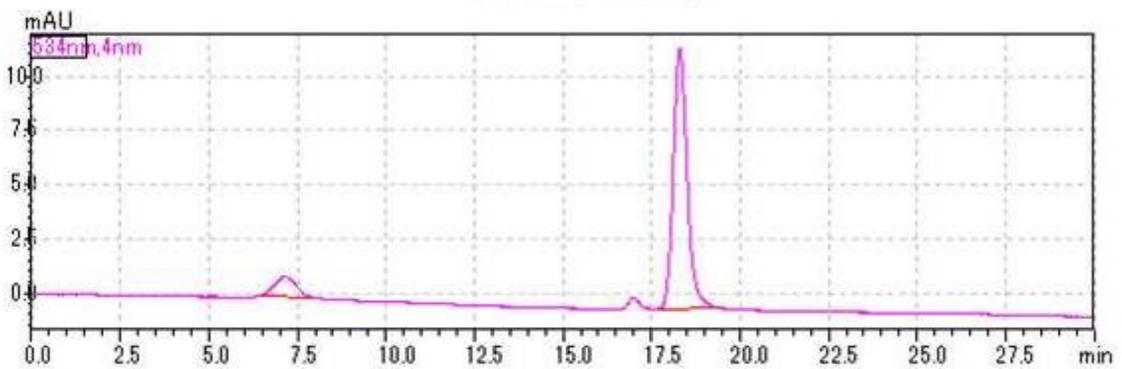


図 4-2 フォトダイオードアレイ（上図）及び 534nm におけるクロマトグラフ  
（下図）によるナスニン精製物分析結果

次に、このナスニン画分からさらに分取 HPLC を繰り返して得られた精製ナスニン画分を減圧濃縮後、真空凍結乾燥して粉末 0.6 mg を得た。この粉末をメタノール 1.5 mL に溶解して上述のフォトダイオードアレイ HPLC により分析し、得られたフォトダイオードアレイ等高線グラフ及び検出波長 534 nm におけるクロマトグラフを図 4-2 に示した。534 nm における総ピーク面積値に占めるナスニンピークの割合から、UV-VIS 吸収を持つ物質中の精製度 96% のナスニンが得られた。この精製粉末を以下、ナスニン精製物と呼ぶ<sup>54)</sup>。

## 2. LC-MS/MS によるナスニン精製物の分析

ナスニン精製物とともに実験方法(2)で述べたナスニン標準品の LC-MS/MS 分析を行った。図 4-3 にナスニン精製物及びナスニン標準品のイオンクロマトグラムを示した。また、図 4-4 にナスニン精製物から検出された各ピークに対応したプロダクトイオン質量スペクトル (ポジティブモード) を示し、合わせて得られた質量スペクトルとして記録された各プロダクトイオンに対応すると推定された化学構造を図 4-5 に示した<sup>54)</sup>。

なお、ナスニン標準品から得られたプロダクトイオン質量スペクトルについては、ナスニン精製物の質量スペクトルとほとんど差異が認められなかったため、ここには図示しなかった。分析したナスニン精製物及びナスニン標準品からはいずれも 4 つのピークが検出され (図 4-3)、そのうち、ピーク A と C はまったく同じ質量スペクトルを、またピーク B と D もともに同じ質量スペクトルを示し、これらはいずれも分子イオンに相当する  $m/z$  919 のイオンシグナルを有していた。しかし、ピーク A と C の両ピークと、ピーク B と D の両ピークの質量スペクトルの間には、ナスニン分子中の桂皮酸部分の構造を含むフラグメントイオンと推定された  $m/z$  303、 $m/z$  293 及び  $m/z$  147 のシグナル強度において顕著な違いが見られた。これらの結果は、同時並行して分析したナスニン標準品において検出された 4 つのピーク (図 4-3 : A', B', C', D') の質量スペクトルについても全く同じであり、また、質量スペクトルはこれまで報告されているナス果皮色素の LC-MS/MS 分析の結果<sup>55)</sup>とも一致していた。図 4-6 に示すようにナスニンには *cis*、*trans* 異性体が知られており、逆相 HPLC カラムでは *cis*-ナスニンの方が *trans*-ナスニンより早く溶出することが知られている。今回の LC-MS/MS 分析で使用した Kinetex F5 カラムは逆相カラムである。これらのことから、ピーク A と C が *cis* 体であり、ピーク B と D が *trans* 体であろうと推察された。また、これらのプロダクトイオンの組成の一致から推定するとそれぞれ 2 つずつの同一質量スペクトルを示すピークのうち、一方はアノマー位の立体異性体の可能性も考えられたが、本研究では確認することはできなかつた<sup>54)</sup>。

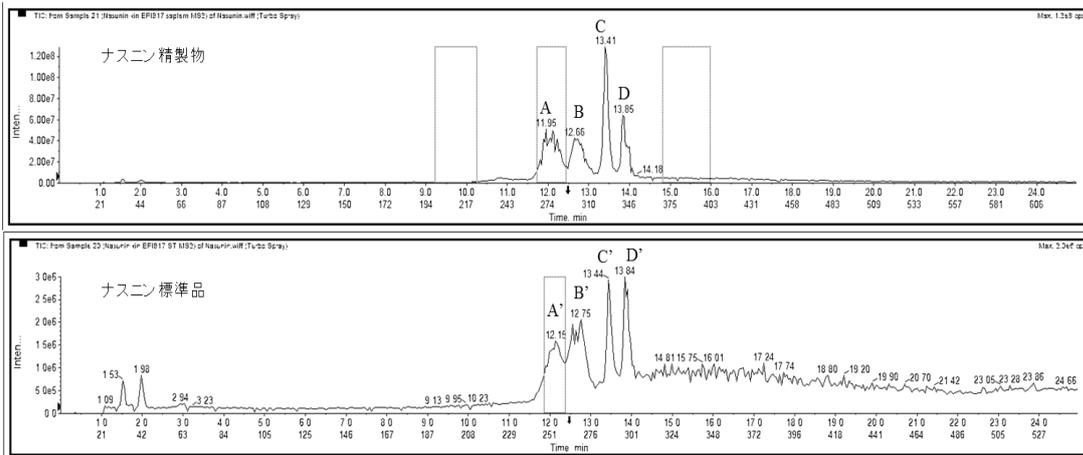


図 4-3 ナスニン精製物とナスニン標準品のトータルイオンクロマトグラム

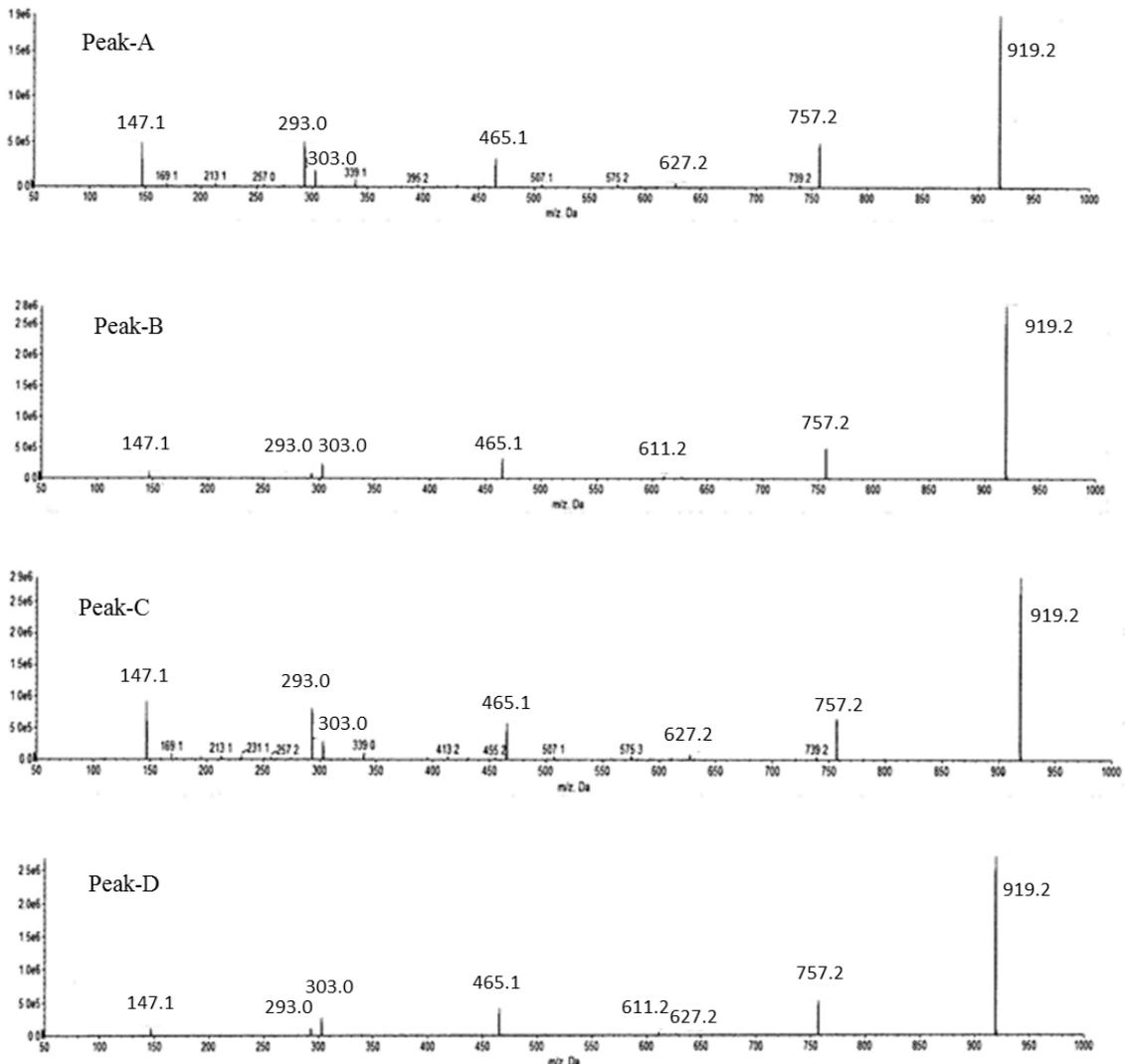


図 4-4 ナスニン精製物の LC-MS/MS 分析: Peak-A, B, C, D のプロダクトイオンスペクトル

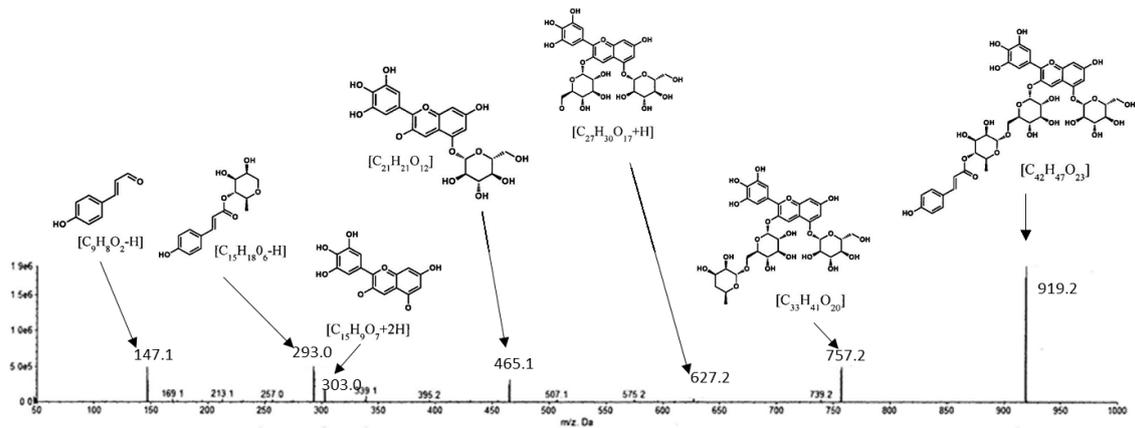


図 4-5 各プロダクトイオンに対応する推定化学構造

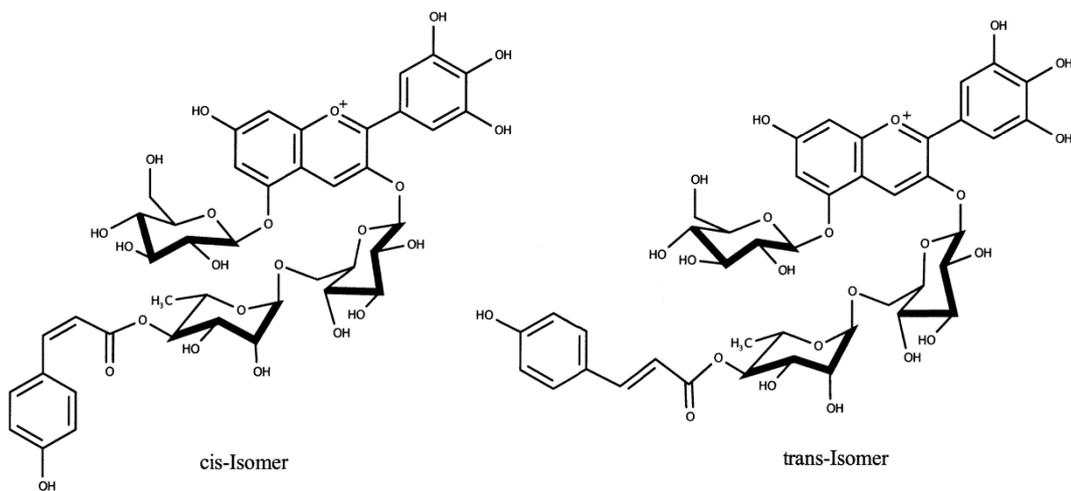


図 4-6 ナスニン (Delphinidin3-[4-(*p*-coumaroyl)-L-rhamnosyl (1,6) glucopyranoside]-5-glucopyranoside) のシスおよびトランス異性体の化学構造

以上のように、得られた質量スペクトルはナスニンのそれとよく一致したことから、ナス下漬け液から精製された粉末はナスニンであることが確認された<sup>54)</sup>。

### 3. ナスニン精製物の抗酸化性の評価

上記のように得られたナスニン精製物の抗酸化性を、ORAC法で評価した結果を精製前のナスニン含有粉末のH-ORAC値と合わせて表4-1に示した。また、表4-1にはクロロゲン酸標準品のH-ORAC値及びデルフィニジン標準品のH-ORAC値を1としたときのそれぞれの相対抗酸化活性も示した<sup>54)</sup>。

ナスニン精製物は、デルフィニジン標準品の1.45倍という強い抗酸化性を示し、ナスニン標準品の値とほぼ一致した。また、上述のようにナスニン含有粉末中に占めるナスニンの割合は20.2%であり、クロロゲン酸のそれは33.5%であったことから、ナスニン精製物及びクロロゲン酸標準品のH-ORAC値にそれぞれの含有率を乗じることにより、ナスニン含有粉末の抗酸化性に対するそれぞれの寄与度を算出した。それらを表4-2に示した。ここに見られるように、ナスニン精製物の抗酸化性に対する寄与度は約26%であり、ナスニン含有粉末の抗酸化性にはナスニン以外の成分の寄与が約74%あり、そのうち約48%はクロロゲン酸によるものと考えられた<sup>54)</sup>。

ナスには、ナスニン・クロロゲン酸以外にも、ポリフェノール<sup>57),58)</sup>、ビタミンC<sup>59),60)</sup>、イソクロロゲン酸<sup>61)</sup>といった抗酸化性を持つ成分が含有されていることが知られている。上記の結果から、ナスニン含有色素粉末の抗酸化性には、ナスニン以外にも上記のような種々の成分の関与が推察された<sup>54)</sup>。

表 4-1 デルフィニジンを基準とした精製ナスニンと  
下漬液由来ナスニン含有色素粉末の抗酸化性

	H-ORAC ( $\mu\text{mol of TE}^*/\text{g}$ )	相対活性
ナス下漬液由来 ナスニン精製物	13250 $\pm$ 99	1.45
ナス下漬液由来 ナスニン含有粉末	10398 $\pm$ 37	1.14
クロロゲン酸標準品	15007 $\pm$ 86	1.64
デルフィニジン標準品	9152 $\pm$ 31	1.00

\*TE : Trolox Equivalent

3回測定値の平均 $\pm$ 標準偏差で示した.

表 4-2 ナス下漬液由来ナスニン含有色素粉末の抗酸化性に対する  
ナスニンおよびクロロゲン酸の寄与度

	H-ORAC ( $\mu\text{mol of TE}^*/\text{g}$ )	相対寄与度 (%)
ナス下漬液由来 ナスニン含有粉末	10398 $\pm$ 37	100.0
ナス下漬液由来 ナスニン精製物	2677 $\pm$ 20	25.7
クロロゲン酸	5027 $\pm$ 29	48.3

\*TE : Trolox Equivalent

3回測定値の平均 $\pm$ 標準偏差で示した.

#### 4. ナスニン精製物の抗アレルギー性の評価

前章までの研究において、ナス下漬液由来ナスニン含有色素粉末は、 $\gamma$ -CD 包接体にすることにより水溶性の大幅な増大及び酢酸臭の低減化がなされることが明らかになった。その際、この $\gamma$ -CD 包接体には、抗アレルギー性製剤として使用されている柴朴湯と同等のヒアルロニダーゼ阻害活性も認められている。そこで、本章に述べる研究では、この阻害効果がナスニンとクロロゲン酸のどちらによるものかを明らかにするために、ナスニン精製物とともに、クロロゲン酸及び陽性対照として柴朴湯のヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した。それぞれの 50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を算出し、前章で述べた $\gamma$ -CD 包接体の値とともに表 4-3 に示した<sup>54)</sup>。

なお、ナスニンとクロロゲン酸の分子量を合わせたものと、 $\gamma$ -CD の分子量が 1 : 1 になるように混合しているため、 $\gamma$ -CD 包接体中のナスニン含有色素粉末の割合は 39.9%である。ナスニン含有色素粉末中のそれぞれの含有率から計算すると、 $\gamma$ -CD 包接体中のナスニンは 8.1%、クロロゲン酸は 13.4%となる<sup>54)</sup>。

表 4-3 に見られるように、ナスニン精製物はヒアルロニダーゼ阻害活性をまったく示さず、クロロゲン酸が柴朴湯の 6.7 倍に相当する IC<sub>50</sub> : 2 mg/mL という強いヒアルロニダーゼ阻害活性を示した。このことから、ナスニンはヒアルロニダーゼの阻害には全く寄与せず、これまで報告されているナスニン含有粉末の CD 包接体に見られたヒアルロニダーゼ阻害活性は、共存しているクロロゲン酸を含むナスニン以外の成分に起因していると考えられる。しかし、抗アレルギー性はヒアルロニダーゼ阻害活性のみで説明できるものではなく、抗原刺激後のカルシウム流入抑制<sup>62)</sup>や好酸球における PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)- $\gamma$  の発現<sup>63)</sup>等、さまざまな機序で起こると考えられ、これらについては今後の検討課題である<sup>54)</sup>。

表 4-3 ナスニン精製物及びクロロゲン酸の抗アレルギー性

	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
γ-CD 包接体	20.2 ± 1.2
ナスニン精製物	N. D.
クロロゲン酸	2.00 ± 0.6
柴朴湯	13.4 ± 0.8

注) N.D. : 阻害活性不検出

3回測定値の平均±標準偏差で示した.

抗アレルギー性はヒアルロニダーゼ阻害活性によって測定し,

50%阻害濃度で示した.

以上, ナスニン精製物を LC-MS/MS にて分析し, cis 体と trans 体が混在していることを確認し, ナスニン含有色素粉末の H-ORAC 値への寄与度は, 両異性体を含むナスニンが約 26%, クロロゲン酸が約 48%であることを明らかにした. また, ナスニン精製物にはヒアルロニダーゼ阻害活性は認められなかったが, ナスニン含有色素粉末の構成成分であるクロロゲン酸は, 強い阻害活性を持つことが明らかになった. 今後, ナス下漬液から得られるナスニン含有色素粉末の抗酸化性を活かし, また, 天然の着色料としての側面<sup>64)</sup>も利用した食品・化粧品への活用が図られることが期待される.

## 第5章

### マウス培養細胞を用いたナスニンの機能性評価

#### 第1節 緒論

第4章でナスニン精製物の抗酸化性及び抗アレルギー性に関する機能性評価を行ったが、本章では、実際の生体での働きを知るために、マウスの培養細胞を用いて検討した。すなわち、デルフィニジンの約1.5倍というナスニンの強力な抗酸化作用に着目し、活性酸素と密接に関係していることが知られている炎症反応に対する効果を検討した。炎症反応は自然免疫系の反応であり、外部からの病原体などの侵入を防ぐ役割がある。しかし、過剰な炎症反応は生体にダメージを与え、様々な病態に繋がることが知られている<sup>65)</sup>。マクロファージは炎症反応の中心的役割を果たしている細胞であり、腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) やインターロイキン (IL), 活性酸素種, 一酸化窒素 (NO), プロスタグランジン類 (PG) など、様々な炎症性メディエーターを産生する<sup>66)</sup>。これらの過剰な産生は敗血症や関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、アレルギー疾患などの病態の増悪に関与している<sup>67)</sup>ことから、それらの過剰な産生を制御する必要がある。また、炎症時に産生される活性酸素に起因する酸化ストレスは直接的に生体にダメージを与えるだけでなく、細胞内のセカンドメッセンジャーとして炎症反応の増悪に関与しており<sup>68)</sup>、抗酸化物質がこれらの反応を抑制することが報告されている<sup>69)</sup>。したがって、強力な抗酸化作用をもつナスニンは、マクロファージの炎症反応を抑制することが期待される。そこで以下では、マクロファージの炎症性メディエーター産生に対するナスニンの効果、すなわち、マウスマクロファージをリポ多糖 (LPS) で刺激した際に放出される炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-6) 及び化学メディエーターである一酸化窒素 (NO) の産生能と細胞内活性酸素量の変化について測定した。

さらに、ストレスや炎症性サイトカイン、および紫外線等の刺激により活性化され、免疫反応や炎症反応において中心的役割を果たす転写因子のひとつである NF- $\kappa$ B の

活性化についても評価した。NF- $\kappa$ B は、不活性な状態では I $\kappa$ B $\alpha$  等の阻害タンパク質と結合して細胞質に存在しているが、LPS 等の刺激を受けると、IKK(I $\kappa$ B kinase) 複合体が活性化され、I $\kappa$ B $\alpha$  をリン酸化することが知られている。その結果、I $\kappa$ B $\alpha$  が分解されることで、NF- $\kappa$ B が阻害タンパク質から遊離し、隠されていた核移行シグナルが表在化して、NF- $\kappa$ B が核に移行し活性化される。その結果、炎症反応に関する遺伝子の転写が促進されるので、NF- $\kappa$ B の核移行抑制は炎症反応やアレルギー疾患等の抑制につながると考えられる。このことから、ナスニンの NF- $\kappa$ B 核移行抑制についても評価を行った。

## 第2節 実験方法

### 1. 試薬

ダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)およびリポ多糖(LPS, from *Escherichia coli* 055:B5)は Sigma-Aldrich 製を用いた。ウシ胎児血清(FBS)は HyClone Laboratories 製を用いた。プロテアーゼインヒビター、ホスファターゼインヒビター、ペニシリンGおよびストレプトマイシン、N-アセチルシステイン(NAC) は和光純薬工業(株)製を用いた。Cell Counting Kit-8 (WST-8)は(株)同仁化学研究所製を使用した。マウス TNF- $\alpha$  および IL-6 の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)キットは eBioscience 社製を、ウエスタンブロットティング用検出キット (Clarity Western ECL Substrate kit) は Bio-Rad 製を用いた。2',7'-ジクロロジヒドロフルオレシンジアセテート(DCFH-DA)は Molecular Probes 製を使用した。その他の試薬は特級を用いた。

### 2. 抗体

NF- $\kappa$ B p65 マウスモノクローナル抗体は Cell Signaling Technology(NF- $\kappa$ B p65: #6956S)製を使用した。グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH: sc-32233)

および一酸化窒素合成酵素 (iNOS: sc-7271), マウスモノクローナル抗体(Lamin B1: sc-6214), ヤギポリクローナル抗体およびホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)が結合した抗ヤギ IgG 二次抗体(anti-goat IgG-HRP: sc-2033)は, Santa Cruz Biotechnology 製を用いた. HRP が結合した抗マウス IgG (anti-mouse IgG-HRP: NA931) および抗ウサギ IgG 二次抗体(anti-rabbit IgG-HRP: NA934)は, GE Healthcare 製を使用した.

### 3. ナスニンの精製

第4章で述べた方法によりナスニンを単離精製した. 精製したナスニンをジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し, 最終的に 0.2%未満となるようにした. 以下では, この精製ナスニンを単にナスニンと称する.

### 4. 細胞培養

マウス由来マクロファージ細胞株である RAW264 細胞は理化学研究所細胞銀行より分与された. 細胞は 100 U/mL ペニシリン G, 100 µg/mL ストレプトマイシンおよび 10% FBS 含有 DMEM で, CO<sub>2</sub> インキュベーター (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) を用いて培養した.

### 5. 細胞生存率の測定

RAW264 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well となるように 96 穴プレート(Thermo Fisher Scientific 製)に播種し, 24 時間培養して接着させた. 細胞を各種濃度のナスニンとともに 24 時間培養し, 生細胞数を Cell Counting Kit-8 で測定した.

### 6. TNF- $\alpha$ および IL-6 産生量の測定

RAW264 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well となるように 24 穴プレートに播種し, 接着後,

各濃度のナスニンで1時間処理し、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の LPS で 6 時間刺激した。培養上清中の TNF- $\alpha$  および IL-6 量は ELISA キットにより測定した。

#### 7. 一酸化窒素 (NO) 産生量の測定

培養上清中の NO 濃度の測定は、NO の代謝産物である亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) を Griess 試薬で測定することにより評価した<sup>70)</sup>。RAW264 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well となるように 24 穴プレートに播種し、接着後、各濃度のナスニンで1時間処理し、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のリポ多糖 (LPS) で 24 時間刺激した。培養上清を 96 穴プレートに移し、等量の Griess 試薬 (1% スルファニルアミドおよび 0.1% ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩を 2.5% リン酸水溶液に溶解したものを加え、540 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (MULTISKAN FC, Thermo Scientific 製) で測定した。

#### 8. 細胞分画

培養細胞を氷冷したリン酸緩衝食塩水 (pH7.4) で2回洗浄し、4°Cにて1,000 $\times$ gで5分間遠心分離を行った。細胞ペレットの5倍量の低張緩衝液 (10mM HEPES (pH7.4), 10mM KCl, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM ジチオスレイトール, プロテアーゼインヒビター, およびホスファターゼインヒビターを含む)に再懸濁した。細胞を氷中に15分静置して膨潤させたのち、ダウンズ型ホモゲナイザーを用いて、細胞を20ストロークホモゲナイズした。その後4°Cにおいて1,000 $\times$ gで5分間遠心分離し、上清を細胞質画分(CF)とした。沈殿を上述と同じ低張緩衝液で1度洗浄し、核抽出緩衝液(400mM NaCl, 10%(v/v) グリセリン, 1mM ジチオスレイトール, プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビターを含有する低張緩衝液)に再懸濁し、30分間氷中に静置した。これを15,000 $\times$ gにて20分間遠心分離し、上清を核画分 (NF) とした。

## 9. ウェスタンブロッティング

各画分の抽出は上記 8 で、細胞タンパク質の抽出はプロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビターを加えたラジオイムノプレシピテーションアッセイ (RIPA) 緩衝液を用いて調製した。タンパク質量は Bradford 法<sup>71)</sup>により測定した。タンパク質 (10-40  $\mu$ g/lane) はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (アトー製) に転写した。PVDF 膜を 0.1% Tween 20 を含むトリス緩衝食塩水 (TBST, pH7.6) に溶解させた 5% 牛血清アルブミン中 で 1 時間ブロッキングしたのち、目的の一次抗体を 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、二次抗体とさらに 1 時間反応させた。次いで TBST で 3 回洗浄後、Clarity Western ECL Substrate kit (Bio-Rad Laboratories, Cat.# 170-5060) によりバンドを可視化した。

## 10. 細胞内活性酸素の測定

細胞内活性酸素の測定は蛍光プローブである DCFH-DA を用いた。細胞培養液に 10  $\mu$ M DCFH-DA を加え、20 分間細胞に取り込ませた後、その蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて、励起波長 485nm、測定波長 535nm で測定した。

## 11. 統計解析

測定データは、平均値±平均値の標準誤差 (SEM) で表した。統計処理は、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer の多重比較検定を行い、*p* 値が 0.05 以下の場合、統計的に有意な差があると判断した。

### 第3節 実験結果および考察

#### 1. ナスニンの細胞生存率への影響

ナスニンの濃度を  $10\ \mu\text{M}$ ,  $20\ \mu\text{M}$ ,  $40\ \mu\text{M}$ ,  $80\ \mu\text{M}$  と変化させ、細胞生存率を評価した結果、図 6-1 に示す通り、ナスニンは  $80\ \mu\text{M}$  までは細胞生存率に影響を与えないことが判明した。

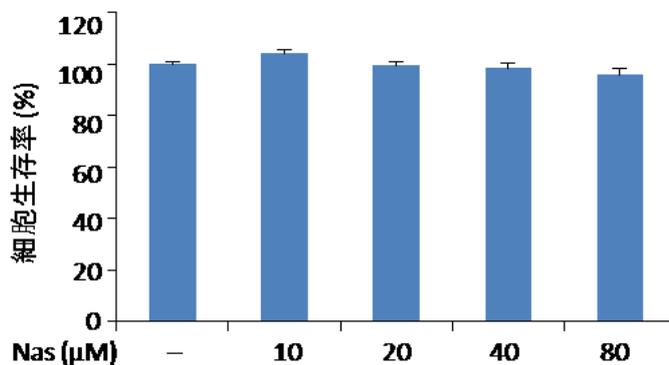


図 6-1 ナスニン添加による細胞生存率への影響

Nas( $\mu\text{M}$ ) : ナスニン濃度 n 数 : 4

#### 2. LPS 刺激による炎症性サイトカインの抑制

ナスニン濃度を  $10\ \mu\text{M}$ ,  $20\ \mu\text{M}$ ,  $40\ \mu\text{M}$ ,  $80\ \mu\text{M}$  と変化させ、LPS で刺激した際に産生される炎症性サイトカイン ( $\text{TNF-}\alpha$  および  $\text{IL-6}$ ) 量及び化学メディエーターである一酸化窒素 (NO) 量への影響を評価した。その結果を図 6-2, 図 6-3, 図 6-4 に示した。

$\text{TNF-}\alpha$  産生抑制では、ナスニン濃度  $0, 10, 20\ \mu\text{M}$  と  $40, 80\ \mu\text{M}$  では有意な差が認められた。  $\text{IL-6}$  産生抑制では、ナスニン濃度  $0, 10, 20\ \mu\text{M}$  と  $80\ \mu\text{M}$  の間で有意な差が認められた。  $\text{NO}$  産生抑制では、 $\text{TNF-}\alpha$  と同様にナスニン濃度  $0, 10, 20\ \mu\text{M}$  と  $40, 80\ \mu\text{M}$  で有意な差が認められた。これらの結果から、ナスニンは濃度依存的に炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。

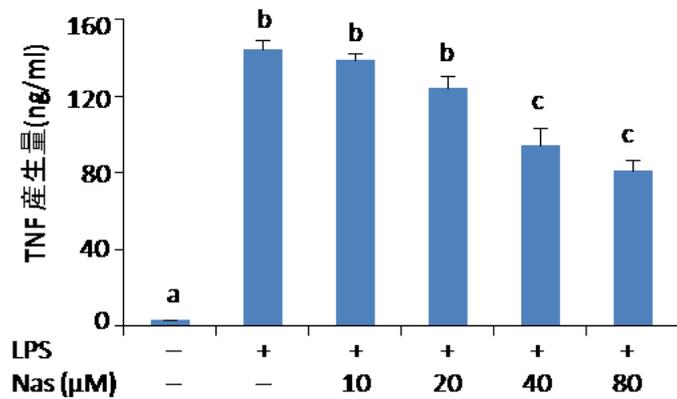


図 6-2 ナスニン濃度による TNF- $\alpha$  産生抑制

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas( $\mu$ M): ナスニン濃度 n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

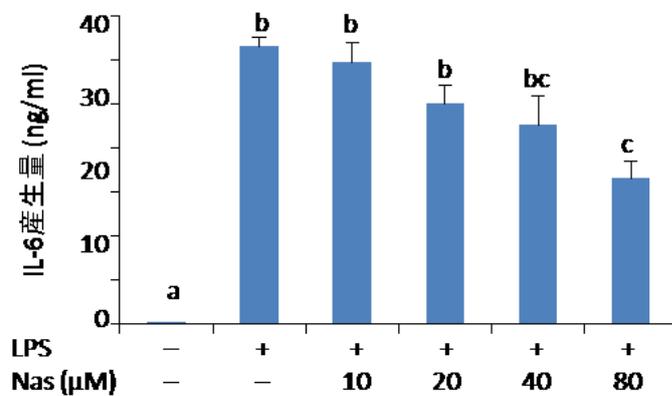


図 6-3 ナスニン濃度による IL-6 産生抑制

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas( $\mu$ M): ナスニン濃度 n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

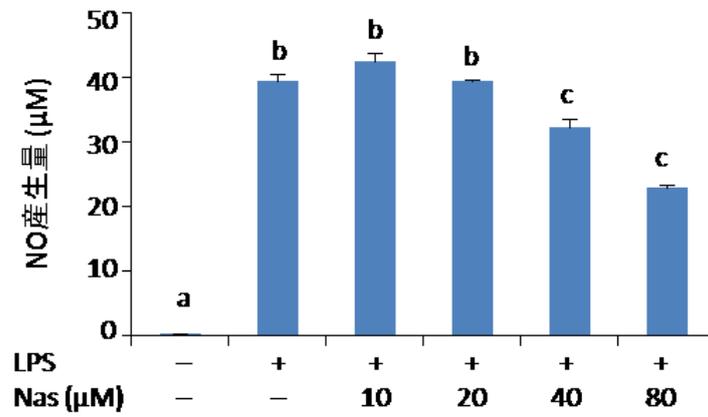


図 6-4 ナスニン濃度による NO 産生抑制

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas(μ M): ナスニン濃度 n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

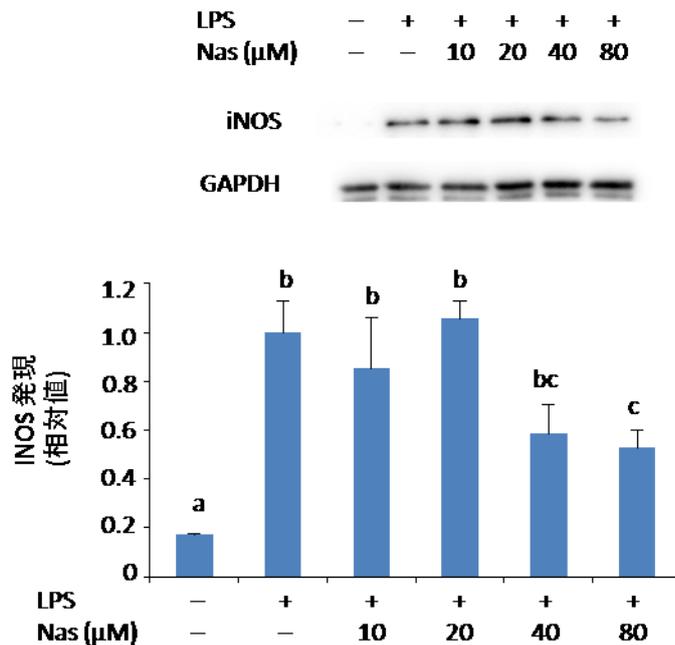


図 6-5 誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) 発現に対するナスニンの作用

上図 : iNOS と GAPDH のウエスタンブロッティング

下図 : 同じ実験を 3 回繰り返して、LPS のみのグループ iNOS/GAPDH の発現量を 1 とした際の相対値

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas( $\mu\text{M}$ ): ナスニン濃度 n 数 : 3

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

マクロファージの NO 産生は、誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) 発現に依存していることが知られていることから、iNOS タンパクの発現量をウエスタンブロッティングで解析した結果を図 6-5 に示した。ナスニンは NO 産生量と同様に iNOS の発現も濃度依存的に抑制した。また、ナスニンは NO ラジカルと直接結合することで、NO を消去しているのではないことを確認している (データは示さず)。以上の結果から、ナスニンは LPS 刺激による炎症性メディエーター産生を抑制することが明らかとなった。また、iNOS 発現の結果からナスニンは細胞内の活性化シグナルを調節していることが示唆

された。

### 3. 細胞内活性酸素レベルへのナスニンの影響

ナスニンが細胞内の活性化シグナルを調節しているかどうかを検討するため、セカンドメッセンジャーである細胞内活性酸素レベルへの影響を調べた。すなわち、ナスニン濃度を  $10\ \mu\text{M}$ 、 $20\ \mu\text{M}$ 、 $40\ \mu\text{M}$ 、 $80\ \mu\text{M}$  と変化させ、LPS で刺激した時の細胞内活性酸素レベルへの影響を評価した結果を図 6-6 に示す。ここに見られるように、ナスニンは有意に、かつ濃度依存的に細胞内活性酸素レベルを低下させることが明らかになった。

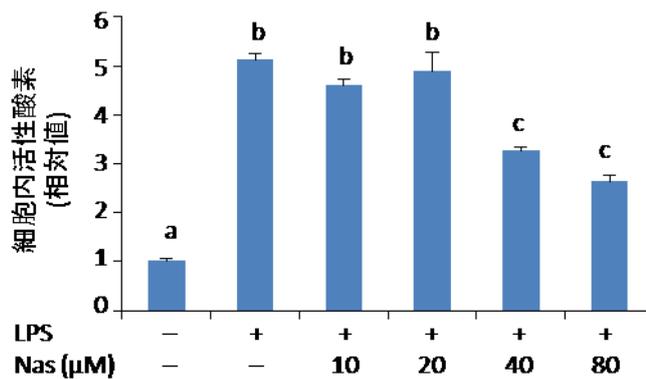


図 6-6 LPS により誘導される細胞内活性酸素に対するナスニンの作用

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas( $\mu\text{M}$ ): ナスニン濃度 n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

### 4. NF- $\kappa$ B の核移行に対するナスニンの作用

ナスニンが、NF- $\kappa$ B の核移行を抑制するかどうかを調べた結果を図 6-7 に示した。通常時には細胞質画分 (CF) に存在する NF- $\kappa$ B が、LPS で刺激すると核画分 (NF) に移行した。しかし、ナスニンで処理すると核画分の NF- $\kappa$ B が低下しており、NF-

$\kappa$  B の核移行が抑制されることが明らかとなった。この図からわかるように、ナスニンは NF- $\kappa$  B の核移行を抑制しており、その後起きる炎症反応に関与する因子の転写も抑制することが考えられた。

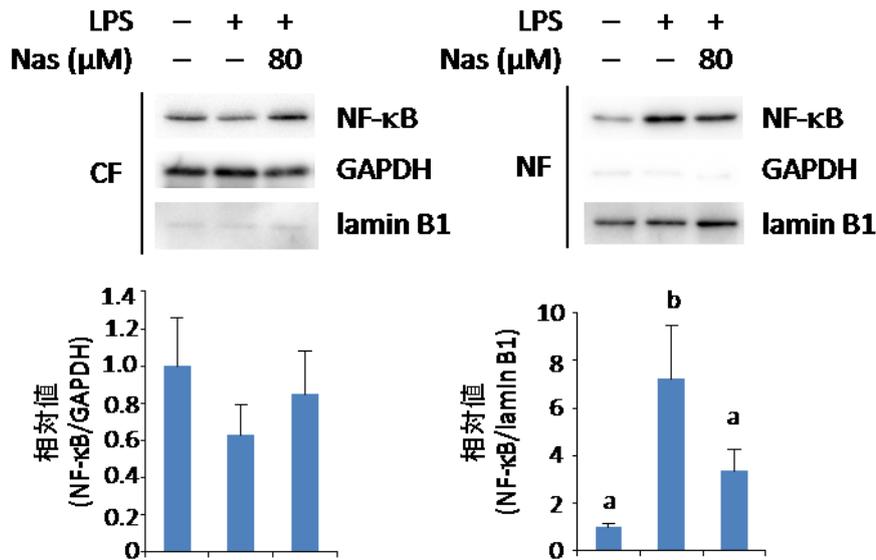


図 6-7 LPS により誘導される NF- $\kappa$  B の核移行に対するナスニンの作用

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas( $\mu$  M): ナスニン濃度 n 数: 3

CF:細胞質画分, NF:核画分

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

## 5. NF- $\kappa$ B の核移行抑制のメカニズムについて

LPS による NF- $\kappa$  B の活性化には細胞内活性酸素が関与していることが数多く報告されている<sup>72),73)</sup>。すなわち、ナスニンによる NF- $\kappa$  B の核移行抑制は細胞内の活性酸素を低下させたことに起因することが考えられる。そこで、NF- $\kappa$  B の活性化を抑制することが知られている抗酸化性物質である N-アセチルシステイン (NAC) を用い、炎症性メディエーター産生をナスニンと比較した<sup>74)</sup>。

図 6-8, 6-9, 6-10, 6-11 に見られる通り, ナスニンは TNF- $\alpha$ , IL-6, NO 及び細胞内活性酸素のいずれに対しても産生抑制作用を示し, これらの作用は NAC により再現できた. このことから, ナスニンは NAC と同様にその抗酸化性によって NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し, 炎症性メディエーター産生を抑制することが示唆された.

以上, マクロファージの炎症反応に対するナスニンの関与を検討した結果, LPS で刺激した際に産生される炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$  および IL-6)量に加えて化学メディエーターである一酸化窒素 (NO) の産生量を濃度依存的に抑制し, 同じく LPS で刺激した際の細胞内活性酸素レベルも有意かつ濃度依存的に低下させることが明らかになった. さらに, NF- $\kappa$ B の核移行も抑制されることが判明した. 活性酸素はセカンドメッセンジャーとして NF- $\kappa$ B の活性化に関与し, 炎症性メディエーター産生を制御すること<sup>75)</sup>, 抗酸化物質がその活性化機構を抑制すること<sup>76)</sup>が報告されていることから, ナスニンは自身の持つ抗酸化性によって細胞内活性酸素を低下させることで NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し, その結果, TNF- $\alpha$  や IL-6, NO の産生を低下させたと考えられる. このことは, ナスニンと代表的な抗酸化物質である NAC との比較から強く支持される. 以上, 本章での検討により, ナスニンの高い抗酸化性に関するメカニズムの一端を解明することができ, 炎症性疾患に対する効果も期待できることが明らかとなった.

これまで, ナスニンの機能性に関する報告の中で, マクロファージの炎症反応への影響を明らかにした報告は見られない. 本研究で得られた結果は, 新たに生体内におけるナスニンの抗炎症効果を示唆するものとして重要な知見である.

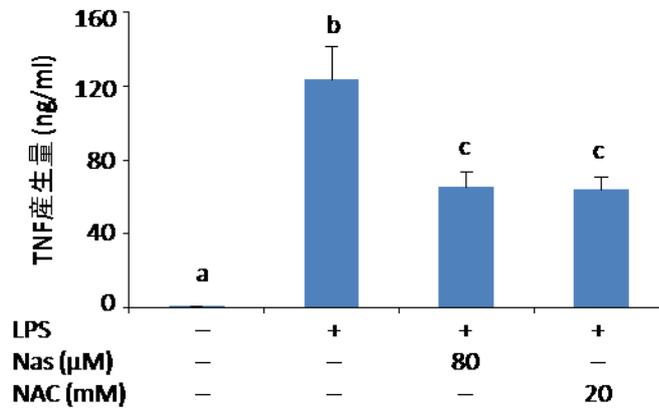


図 6-8 ナスニン濃度および N-アセチルシステイン濃度による TNF- $\alpha$  産生抑制

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas ( $\mu$ M): ナスニン濃度 NAC (mM): N-アセチルシステイン濃度

n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

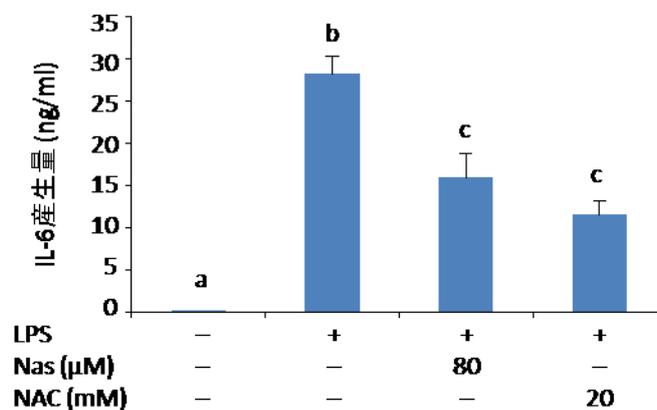


図 6-9 ナスニン濃度および N-アセチルシステイン濃度による IL-6 産生抑制

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas ( $\mu$ M): ナスニン濃度 NAC (mM): N-アセチルシステイン濃度

n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

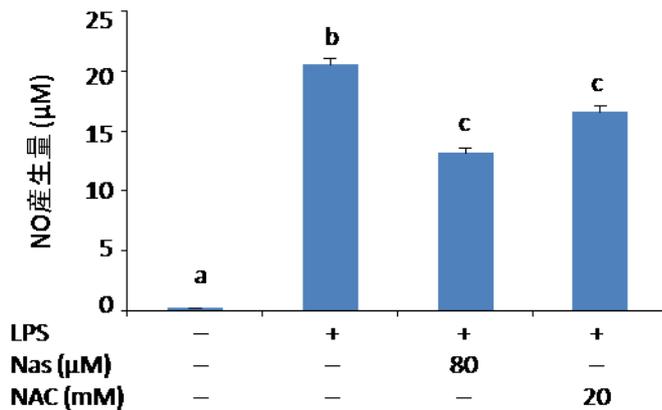


図 6-10 ナスニン濃度および N-アセチルシステイン濃度による NO 産生抑制

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas (μM): ナスニン濃度 NAC (mM): N-アセチルシステイン濃度

n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

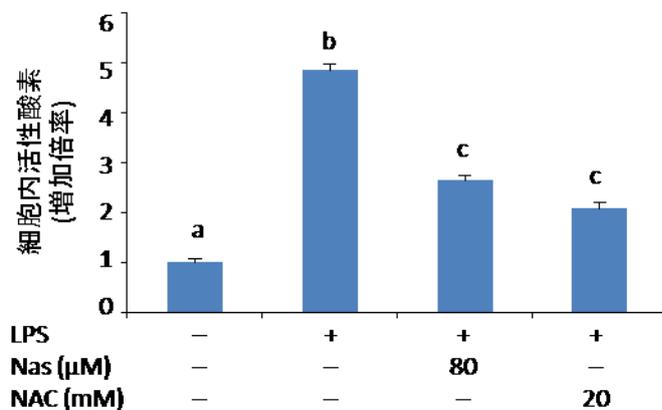


図 6-11 ナスニン濃度および N-アセチルシステイン濃度による細胞内活性酸素抑制

LPS-:LPS による刺激なし, LPS+:LPS による刺激あり

Nas (μM): ナスニン濃度 NAC (mM): N-アセチルシステイン濃度

n 数: 4

異なるアルファベットは統計的に有意な差があることを示している

## 第6章 総合考察

ナス (*Solanum melongena*) は、古来より日本で栽培されてきた野菜であり、地方ごとに品種改良がなされ、さまざまな調理法により人々の食生活を支えてきた。なかでもナスの浅漬は、日本人の食卓を美しい紫色で彩る名脇役としての位置を占めてきた。

ナスに含まれるアントシアニン色素であるナスニンには、強い抗酸化性、総コレステロール減少効果、脂質過酸化に対する防御能および抗血管新生活活性等が認められている。しかし、アントシアニンの中でも非常に不安定な部類に属しており、また、ナス皮には豊富な油脂分が含まれていることなどから、抽出して有効利用されることはなされていないのが現状である。

ところで、ナス浅漬を生産する際に大量に排出される下漬液は廃棄物として処理されているが、そこには、著量のナスニンが含まれており、浅漬加工時に添加されているミョウバンのアルミニウムイオンと結合して安定な形態になっている。さらに、下漬液にはナス皮の油脂分は含有されないため、脱塩して濃縮できれば、高い機能性を有する天然色素素材として有効活用が期待できる。また、下漬液中には、血糖値上昇抑制作用、血圧改善作用、発ガン抑制作用および抗酸化作用など、数多くの機能性が報告されているクロロゲン酸も含有されている。そのため、あわせて回収・利用できれば、さらに機能性の高い素材の開発が可能と思われる。

しかし、素材化に成功した後にも、色素としての安定性や利用のしやすさなどの課題が考えられる。さらに、ナスニンの機能性については、タマネギ、リンゴなど他の野菜や果実由来のポリフェノールと比べて研究事例が少ないという現状もある。

以上のことから、本研究ではまず、ナス下漬液の性状について調査し、次いで下漬液からナスニンを抽出する条件について検討を行った。その結果の詳細を第2章に記述した。ナス下漬液は pH 3.3 前後であり、可視光部の最大吸収波長は 566 nm、紫外部の極大吸収波長は 250 nm 及び 320 nm を示した。また、下漬液からナスニンを抽出す

る条件を検討した結果では、合成吸着剤 HP-20 が最も効果的であり、わずか 70 mL の HP-20 は 6.8 L の下漬液中のナスニンを吸着する能力を有していた。その後、水で洗浄することで、塩分、アルミニウムミョウバンおよび特有の漬物臭は除去されることが示され、食品・化粧品等への利用に適していると考えられる。HP-20 に吸着したナスニンの回収方法の点では、5 M 酢酸を用いることで、濃縮された状態で溶出でき、その回収率は 87% であったが、ナスニンとともに、下漬液に含まれるクロロゲン酸も同時に溶出された。そのため、ナスニンとクロロゲン酸の相互分離を試み、それぞれの HP-20 からの溶出パターンを解析した結果、両者を相互に分離することは困難であった。しかし、クロロゲン酸はナスニン同様に高い機能性を持つ物質であることから、両者が混在する色素素材として回収し、利用することが好ましいと考えた。

この色素素材を真空凍結乾燥して粉末化し、その抗酸化性を ORAC 法にて評価した結果、回収された色素粉末は、1 g 当たり  $10432 \mu\text{mol}$  の Trolox 当量の ORAC 値を示し、ナスニンおよびクロロゲン酸標準品の約 7 割に相当する高い抗酸化性を有することが明らかとなった。このようにして、さまざまな機能性を持ちながら、これまでナス皮からの抽出が困難であり安定性も乏しいナスニンを、現在は廃棄されているナス下漬液から、クロロゲン酸等とともに素材化する手法を確立した。この素材化した色素粉末を、ナスニン含有色素粉末と呼ぶこととした。

しかし、ナスニン含有色素粉末は水への溶解性が低く、HP-20 からの溶出時に用いた酢酸が残存して、酢酸臭を発するという問題点があり、食品や化粧品に利用するにはこれらを改善する必要があった。そこで、第 3 章では、さまざまな機能性成分の水溶性向上および臭気成分のマスキングに用いられている環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CD) による包接処理を検討した。この検討において、CD による包接処理が抗酸化性にどのような影響を及ぼすのかという点と合わせて、抗アレルギー性の指標の一つであるヒアルロニダーゼ阻害活性についても評価した。さらに、調製した CD 包接体の温度あるいは光安定性についても検討した。

CDのうち、 $\beta$ -CDはベンゼン環、 $\gamma$ -CDはナフタレン環を包接できるとされている。CDによる包接は、ナスニンとともにクロロゲン酸も同時に行われると考えられることから、ナスニンとクロロゲン酸の合計モル数に基づき検討を行った。その結果、 $\beta$ -CDではナスニンとクロロゲン酸の合計モル数がその2~3倍が最適であり、60分間の攪拌が必要であった。一方、 $\gamma$ -CDではナスニンとクロロゲン酸の合計モル数と同じモル数が最適であり、10分間で包接が終了した。これらの結果から、 $\gamma$ -CDによる処理が有効と結論づけた。この処理により調製した $\gamma$ -CDによる包接体を、 $\gamma$ -CD包接体と呼ぶこととし、この後の機能性および安定性の検討に用いた。

$\gamma$ -CD包接体による酢酸臭の低減を検討した結果、臭気として立ち上るヘッドスペース中の酢酸量は、包接前の19%まで低減しており、ナスニン含有色素粉末の $\gamma$ -CD処理は有効であることが示された。さらに、抗酸化性についても検討し、 $\gamma$ -CD包接体のORAC値は1g当たり5,159 $\mu$ molのTrolox当量であり、デルフィニジン標準品の56%の相対活性に相当することから、包接後も高い抗酸化性を保持していることが示された。 $\gamma$ -CD包接体の抗アレルギー性については、ヒアルロニダーゼ阻害率として評価した結果、抗アレルギー製剤として使用されている柴朴湯とほぼ同等の阻害率を示し、 $\gamma$ -CD包接体は抗アレルギー症状を抑える素材としても期待できると考えられる。

$\gamma$ -CD包接体の機能性と色調を活かして、食品・化粧品に活用していくためには、その安定性評価も重要である。そこで、20°Cおよび40°Cで12週間保存して、 $\gamma$ -CD包接体の色調の変化を調査した結果、20°C保存では、ほとんど色調に変化は認められなかったが、40°Cでは、保存期間が長くなるにつれて、色調が紫色から青色へと変化していくことがわかった。そのため、なるべく低温での保存が、利用する上で望ましいと考えられる。また、 $\gamma$ -CD包接体は、20°Cでの保存では、紫イモや赤キャベツなどの植物色素と比較して、ほぼ同等の安定性を保持していたが、40°Cでは安定性が低下することが判明した。光安定性については、紫ニンジンの色素と同等の安定性を有していた。

さらに、 $\gamma$ -CD 包接体と試験に用いた植物色素の水溶液について抗酸化性を ORAC 法で比較した結果、 $\gamma$ -CD 包接体は高い抗酸化性を持つことがわかった。したがって、安定性では多少劣る面があるものの、美しい色調と機能性を兼ね備えた素材であることが明らかになった。

しかし、ナス下漬液から得られる  $\gamma$ -CD 包接体には、ナスニンとクロロゲン酸の他、ナスニン以外のアントシアニンも共存しているものと推察されることから、上述の抗酸化性あるいは抗アレルギー性がどの物質に由来するのかを明らかにする必要がある。そこで、第 4 章では、ナス下漬液からナスニンを精製し、得られたナスニン精製物を用いて各機能性を評価し、ナスニン含有粉末における寄与度を調べた。

ナスニンの精製度を高めるために、ナスニン含有粉末中で最も含有量の多いクロロゲン酸との分離を目指し、HP-20 樹脂およびゲルろ過クロマトグラフィー用担体である LH-20 カラムを用いて分画を行った<sup>54)</sup>。その後、HPLC により分取操作を繰り返して得られた精製ナスニン画分を真空凍結乾燥して、精製度 96%の粉末を得た。これをナスニン精製物と呼ぶこととした。

ナスニン精製物を LC-MS/MS 分析にて解析したところ、ナスニン標準品の質量スペクトルとよく一致していることから、ナス下漬液中でもナスニンはその構造を保持していることが確認された。また、ナスニン含有色素粉末の抗酸化性に対するナスニンとクロロゲン酸の寄与度を算出した結果、ナスニンが 26%、クロロゲン酸が 48%であり、その他の成分によるものが 26%であった。ナスには、ナスニン・クロロゲン酸以外にも、ポリフェノール、ビタミン C といった抗酸化性を持つ成分が含有されている<sup>54)</sup>ことから、さまざまな成分の関与が推察された。さらに、ナスニン含有粉末の抗アレルギー性への寄与度を、ヒアルロニダーゼ阻害活性を測定することで評価した結果、ナスニン精製物にはヒアルロニダーゼ阻害活性は全く認められなかったが、クロロゲン酸は柴朴湯の 6.7 倍という強い活性を示した。したがって、ナスニン含有色素粉末の抗アレルギー性は、クロロゲン酸を含むナスニン以外の成分が寄与していると考えられる。しか

し、抗アレルギー性はさまざまな機序で引き起こされるものであり、ヒアルロニダーゼ阻害活性のみでは評価できないので、これについての詳細は今後の検討課題になる。

第5章では、ナスニンの実際の生体内での抗酸化作用を知るために、マウス由来マクロファージ細胞株である RAW264 細胞を用いて、活性酸素と密接に関係していると考えられる抗炎症反応への関与を評価し、さらに、アレルギー疾患等の抑制にもつながると考えられる NF- $\kappa$ B 核移行抑制についても評価した。

ナスニン濃度を変化させて、LPS で上記のマウス由来マクロファージ細胞を刺激した際に産生される炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  および IL-6) 量および化学メディエーターとしての一酸化窒素 (NO) 量への影響を評価した結果、いずれもナスニンにより濃度依存的に抑制されることが明らかになった。また、マクロファージの NO 産生は、律速酵素である誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) 発現に依存していることが知られていることから、iNOS タンパク質の発現量をウエスタンブロッティングで解析したところ、炎症性サイトカインと同様に、ナスニンは濃度依存的に iNOS タンパク質の発現を抑制することが確認された。これらのことから、ナスニンは LPS 刺激による炎症性メディエーター産生を抑制することが明らかになり、活性化シグナルを調節していることが示唆された。

また、同じくナスニン濃度を変化させて LPS で刺激した際の RAW264 細胞内の細胞内活性酸素産生への影響を評価した結果、やはり濃度依存的に活性酸素の産生レベルを低下させることが明らかになった。次に、ストレスや炎症性サイトカインおよび紫外線等の刺激により活性化され、免疫反応において中心的役割を果たす転写因子のひとつである NF- $\kappa$ B の核移行抑制について検討した。

通常時には細胞質画分 (CF) に存在する NF- $\kappa$ B が、LPS で刺激すると核画分 (NF) に移行したが、ナスニンで処理すると核画分の NF- $\kappa$ B が低下しており、NF- $\kappa$ B の核移行が抑制されることが明らかとなったことから、ナスニンは NF- $\kappa$ B の核移行を抑制しており、その後に起きる免疫反応や炎症反応に関与する因子の転写も抑制することが

考えられる。

また、LPSによるNF- $\kappa$ Bの活性化には細胞内活性酸素が関与していることが数多く報告されている<sup>72),73)</sup>。そこで、抗酸化物質であるとともにNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制することが知られているN-アセチルシステイン(NAC)<sup>74)</sup>を用い、炎症性メディエーター産生に対する作用をナスニンのそれと比較した。その結果、ナスニンの炎症性メディエーター産生を抑制する作用はNACにより同様に再現できた。このことから、ナスニンはNACと同様にその抗酸化性によってNF- $\kappa$ Bの活性化を抑制し、炎症性メディエーター産生を抑制することが示唆された。

第5章での検討において、ナスニンがマクロファージの過剰な活性化を抑制することを確認したが、その裏付けとなる研究としては、ナスニンのアグリコンであるデルフィニジンが、マクロファージのシクロオキシゲナーゼ(COX)-2(炎症性サイトカインにより誘導される)の発現を低下させ、プロスタグランジン(PG)E2(血管透過性の亢進、血管拡張および発痛に関与し、炎症反応を進行させる)産生を低下させるという報告<sup>76),77)</sup>があり、アントシアニン類がマクロファージの活性化を阻害することを示唆している。これまで、ナスニンそのものについてはそのような報告は知られていないが、ナスニンは生体内でそのまま吸収されるという報告<sup>78)</sup>があるので、本研究で得られた結果から推察すれば、ナスニンはそのアグリコンであるデルフィニジンと同様な作用を持っているものと考えられる。このように、第5章に述べた研究では、生体内で予想されるナスニンの高い抗酸化性に関するメカニズムの一端を解明することができ、ナスニンは炎症性疾患に対する効果も期待できることが明らかとなった。

以上、本研究において、ナスの浅漬加工時に発生する下漬液からナスニン含有色素粉末の効果的な回収とその $\gamma$ -CD包接体の調製による、水溶性の改善、酢酸臭の低減及び色調の安定化を図る方法を確立した。また、ナスニン含有色素粉末が持つ抗酸化性あるいは抗アレルギー性に対する主要ポリフェノールであるナスニンおよびクロロゲン酸の寄与度を明らかにした。さらに、ナスニンを精製することによりナスニン単体での

機能性, 特に, マウス由来のマクロファージの炎症反応への影響を初めて明らかにした.

以上、本研究の成果は、ナス浅漬加工に伴って発生する廃棄物の有効利用にとって有用であるだけでなく、学術的にも食品研究分野の重要な知見となるものと考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり，多大なる御指導，御助言をいただきました宇都宮大学農学部教授 吉澤史昭先生，同名誉教授 宇田靖先生，同教授 橋本啓先生ならびに同大学バイオサイエンス教育研究センター助教 謝肖男先生に厚く御礼申し上げます。

また，細胞を用いる実験において多大なる御指導，御助言をいただきました獨協医科大学講師 小松渡先生に心より御礼申し上げます。

さらに，本研究に多大なる御協力をいただきました株式会社荒井食品の皆様，栃木県産業技術センターの皆様心より御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) 山田貴義：まるごと楽しむナス百科，農山漁村文化協会，pp.14-18（2000）
- 2) 川城英夫編：新 野菜つくりの実際 果菜Ⅰ（ナス科・マメ類），川城英夫編，農山漁村文化協会，pp. 78-81（2012）
- 3) 前田安彦：漬物学ーその化学と製造技術，（株）幸書房，pp. 98-101（2002）
- 4) 伊藤和子，阿久津智美，大山高裕，渡邊恒夫，山崎公位，角張文紀，吉成修一，荒井一好，橋本啓，宇田靖：ナス下漬液からナスニンおよびクロロゲン酸を含む抗酸化性粉末の調製，*日本食品科学工学会誌*，60，30-37（2013）
- 5) Renaud, S. and de Lorgeril, M. : Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart Disease, *The Lancet*, 339, 1523-1526（1992）
- 6) Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and kinsella, J.E. : Inhibition of Human LDL Oxidation by Resveratrol, *The Lancet*, 341, 1103-1104（1993）
- 7) 下位香代子：健康素材の機能研究 植物フラボノイドの機能性，*食品と開発*，33（3），24-26（1998）
- 8) 大久保勉：食品加工用素材のすべて（第28回）機能性素材 [3] フラボノイド，緑茶カテキン，*食品と容器*，46（9），502-507（2005）

- 9) 吉元誠, 山川理, 須田郁夫 : 機能性色素による食品のデザイン 3 紫サツマイモの生理機能, *食品と開発*, 33, 15-17 (1998)
- 10) Tsuda, T., Ohshima, K., Osawa, T. and Kawakishi, S. : Antioxidative Pigments Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris L.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 248-251 (1994)
- 11) 伊藤三郎 : ブルーベリーの機能と効果, ブルーベリーの最新事情と将来展望, *食品工業*, 41, 16-21 (1998)
- 12) Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T., Uchida, K. and Aoki, H. : Dietary Cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside-rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. *Journal of Nutrition*, 133, 2125-2130 (2003)
- 13) 香田隆俊, 大西邦義 : 機能性食品素材 紫トウモロコシ色素の機能性, *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 210, 744-750 (2005)
- 14) Hagiwara, A., Yoshino, H., Tamano, S., Aoki, H., Koda, T., Nakamura, M., Imada, K., Ito, N. and Shirai, T. : Prevention by Natural Food Anthocyanins, Purple Sweet Potato Color and Red Cabbage Color, of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo [4,5-b] Pyridine (PhIP)-associated Colorectal Carcinogenesis in Rats Initiated with 1,2-Dimethylhydrazine, *The Journal of Toxicological Sciences*, 27, 57-68 (2002)

- 15) 津久井亜紀夫, 林 一也 : アントシアニン—食品の色と健康—, 大庭理一郎, 五十嵐喜治, 津久井亜紀夫編著, 建帛社, pp.92-93 (2000)
- 16) Kimura, Y., Araki Y., Takenaka, A. and Igarashi, K : Protective Effects of Dietary Nasunin on Paraquat-induced Oxidative Stress in Rats, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63, 799-804 (1999)
- 17) Sugimoto, E., and Igarashi, K. : Preventive Effect of Dietary Nasunin on Galactosamine-induced Liver Injury in Rats, *Food Science and Technology Research*, 9, 94-99 (2003)
- 18) 五十嵐喜治 : 非栄養素ポリフェノールの探索研究と生理機能解析, *日本栄養・食糧学会誌*, 64, 127-135 (2011)
- 19) Kayamori, F. and Igarashi, K. : Effects of Dietary Nasunin on the Serum Cholesterol Level in Rats, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 570-571 (1994)
- 20) Noda, Y., Kneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A. and Packer, L. : Antioxidant Activity of Nasunin, an Anthocyanin in Eggplant Peels, *Toxicology*, 148, 119-123 (2000)
- 21) 五十嵐喜治 : 食品素材としてのアントシアニンの新しい機能, *New Food Industry*, 45, 33-40 (2003)

- 22) Matsubara, K., Kaneyuki, T., Miyake, T. and Mori, M., Antiangiogenic Activity of Nasunin, an Antioxidant Anthocyanin, in Eggplant Peels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6272-6275 (2005)
- 23) 林美央, 道嶋俊英, 勝山陽子, 三輪章志, 川嶋正男, 矢野俊博, 榎本俊樹 : 県産農産物を活用した機能性食品の研究, *石川県工業試験場研究報告*, 54, 57-64 (2005)
- 24) 小堀真珠子 : アントシアニンの癌抑制効果-ビルベリーアントシアニンの癌細胞アポトーシス誘導効果-, *医学のあゆみ*, 204, 55-59 (2003)
- 25) Ichiyangi, T., Terahara, N., Rahman, M. M. and Konishi, T. : Gastrointestinal Uptake of Nasunin, Acylated Anthocyanin in Eggplant, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5306-5312 (2006)
- 26) 寺原典彦, 紺谷靖英, 斎藤規夫, 筏島豊 : チョウマメ花色素の構造と有効利用に関する研究 (第3報) 数種のアントシアニンとの安定性の比較, *日本食品工業学会大会講演集*, 35, 75 (1990)
- 27) 中林敏郎 : 食品の変色の化学, 木村進, 中林敏郎, 加藤博通編著, 光琳, pp. 24-26 (1995)
- 28) 立石絵美, 韓立坤, 奥田拓道 : ラットにおける食後の血糖値に及ぼすコーヒー豆の熱水抽出物の影響, *栄養学雑誌*, 62, 323-327 (2004)

- 29) Suzuki, A., Kagawa, D., Ochiai, R., Tokimitsu, I. and Saito, I. : Green Coffee Bean Extract and its Metabolites have a Hypotensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats, *Hypertension Research.*, 25, 99-107 (2002)
- 30) Shimizu, M., Yoshimi, N., Yamada, Y., Matsunaga, K., Kawabata, K., Hara, A., Moriwaki, H. and Mori, H. : Suppressive Effects of Chlorogenic Acid on N-methyl-N-nitrosourea- induced Glandular Stomach Carcinogenesis in Male F344 Rats, *The Journal of Toxicological Sciences*, 24, 433-439 (1999)
- 31) Nattella, F., Nardini, M., Giannetti, I., Dattilo, C. and Scaccini, C. : Coffee Drinking Influences Plasma Antioxidant Capacity in Humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6211-6216 (2002)
- 32) 長澤孝志, 小浜恵子, 山下和彦 : ヤマブドウ機能性成分の新規抽出法による食品素材の開発, *食品工業*, 51, 20-25 (2008)
- 33) 北村英三 : 電気透析による塩蔵野菜漬液からの有用成分の回収, *埼玉県工業技術センター北部研究所研究報告*, 26, 80-83 (2001)
- 34) 金山裕亮 : 食品未利用資源の活用法を考える 3 梅廃液の有効利用, *食品と開発*, 43, 20-22 (2008)
- 35) 岩崎賢一, 久保将人 : 大豆煮汁の有効利用技術の開発, *日本醸造協会誌*, 102, 810-814 (2007)

- 36) Kuroda, C. and Wada, M. : The Coloring Matter of Eggplant (Nasu),  
*Proceedings of the Imperial Academy of Japan*, 9, 51-52 (1933)
- 37) Kuroda, C. and Wada, M. : The Coloring Matter of Eggplant (Nasu) Part  
II, *Proceedings of the Imperial Academy of Japan*, 11, 235-237 (1935)
- 38) Sugimoto, E., Igarashi, K., Kubo, K., Molyneux, J. and Kubomura, K. :  
Protective Effects of Boysenberry Anthocyanins on Oxidative Stress in  
Diabetic Rats, *Food Science and Technology Research*, 9, 345-349 (2003)
- 39) 沖智之, 竹林純, 山崎光司 : O R A C法, 食品機能性評価マニュアル集 第II  
集, 食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編, 日本食品科学  
工学会, pp. 79-86 (2008)
- 40) 林孝三 「植物色素-実験・研究への手引き」, (株) 養賢堂, pp.170-171 (1980)
- 41) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, 山崎光司, 津志田藤二郎 : 食品の抗酸化能測定法の  
統一化を目指して-O R A C法の有用性と他の測定法との相関性-, *化学と生物*,  
47, 237-243 (2009)
- 42) 津志田藤二郎 : 標準となる抗酸化能測定法の選定と抗酸化指標の表示について  
-特にポリフェノール系抗酸化指標について-, *食品と開発*, 45, 4-6 (2010)

- 43) 香田隆俊：食品着色料としてのアントシアニンの利用と最近の開発動向，アントシアニンの科学-生理機能・製品開発への新展開-，津田孝範，須田郁夫，津志田藤二郎編著，建帛社，pp. 207-227 (2009)
- 44) 伊藤和子，阿久津智美，渡邊恒夫，吉澤史昭，宇田靖：シクロデキストリン包接によるナス下漬液由来ナスニン含有粉末の品質改善および機能性評価，*日本食品科学工学会誌*，62，201-206(2015)
- 45) 寺尾啓二：食品開発者のためのシクロデキストリン入門，服部憲治郎監修，日本食糧新聞社，2004
- 46) 吉井英文：シクロデキストリンの食品加工への応用，*日本食品科学工学会誌*，51，647-655 (2004)
- 47) 寺尾啓二：シクロデキストリンによる機能性成分の可溶化・分散化技術，*食品と開発*，42，4-8 (2007)
- 48) 寺尾啓二，岡本陽菜子，古根隆広，生田直子，上梶友記子，中田大介，奥野直，重福京子，松本衣代，梶原苗美：スポーツニュートリションとしてのコエンザイムQ10- $\gamma$ シクロデキストリン包接体，*食品と開発*，47，80-83 (2012)

- 49) Kakegawa, H., Matsumoto, H. and Sato, T. : Activation of Hyaluronidase by Metallic Salts and Compound 48/80, and Inhibitory Effect of Anti-Allergic Agents on Hyaluronidase, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 642-646 (1985)
- 50) 増田勝己, 石原良子, 今川ゆかり, 谷政八 : 食用野草のヒアルロニダーゼ阻害活性と抗補体活性, *仁愛女子短期大学研究紀要*, 37, 47-51 (2004)
- 51) 高橋圭子, 蕪木和孝, 成澤俊明 : エストラジオール-シクロデキストリン包接化合物の分子構造 : 多成分混在系の分子構造推定, *東京工芸大学工学部紀要*, 35, 87-94 (2012)
- 52) 和田幸樹 : シクロデキストリンの粉末化基材としての利用, *食品工業*, 28-32 (2009)
- 53) 山田耕路 : 多機能性食品の開発に関する研究, *日本栄養・食糧学会誌*, 65, 59-64(2012)
- 54) 伊藤和子, 阿久津智美, 渡邊恒夫, 謝肖男, 小松渡, 吉澤史昭, 宇田靖 : ナス下漬液由来粉末の ORAC 値およびヒアルロニダーゼ阻害活性に対するナスニンの寄与, *日本食品科学工学会誌*, 64, 43-49(2017)
- 55) 若木学, 渡辺純, 石川(高野)祐子 : 産地および収穫時期の違いがハウレンソウ・小松菜・トマト・キュウリの抗酸化能に及ぼす影響, *食品総合研究所研究報告*, 78, 65-71 (2014)

- 56) 森山洋憲：ナス果皮アントシアニンの LC-MS 分析，*高知県工業技術センター研究報告*， 40, 11-15 (2009)
- 57) 大庭理一郎，五十嵐喜治，津久井亜紀夫編著：アントシアニン—食品の色と健康—， 建帛社， pp. 92-93 (2000)
- 58) Azuma, K., Ohyama, A., Ippoushi, K., Takeuchi, A., Saito, T., Fukuoka, H. and Ichiyonagi, T. : Structures and Antioxidant Activity of Anthocyanins in Many Accessions of Eggplant and its Related Species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10154-10159 (2008)
- 59) 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会編集：日本食品標準成分表 2010， 全国官報販売共同組合， pp. 92-93 (2010)
- 60) Kadivec M., Znidarcic D., Pozrl T. and Kopjar M. : Potential of Eggplant Peel as By-product, *Acta Alimentaria*, 44, 126-131 (2015)
- 61) 竹内若子，大橋千浩，木学量子，角野史佳，平井菜穂子：ナスポリフェノール量がラジカル捕捉活性および抗酸化活性に及ぼす影響，*名古屋女子大学紀要*， 50, 53-58 (2004)
- 62) 伊藤智広：植物乳酸発酵エキス OM-X(R)による I 型アレルギー抑制作用，*バイオインダストリー*， 31, 52-59 (2014)

- 63) 福井奈緒子：アレルギー性鼻炎における好酸球と PPAR $\gamma$  の役割, *臨床免疫・アレルギー科*, 61, 282-284 (2014)
- 64) 津田孝範, 須田郁夫, 津志田藤二郎編著：アントシアニンの科学—生理機能・製品開発への新展開—, 建帛社, pp. 207-225 (2009)
- 65) 菅波孝祥, 小川佳宏：炎症疾患としての肥満／メタボリックシンドローム, *炎症—全体像を知り慢性疾患を制御する* (松島網治編), *実験医学増刊*, 32 (17), pp.201-207 (2014)
- 66) 吉村昭彦, 長谷川英一, 武藤剛：炎症とサイトカイン, *サイトカインによる免疫制御と疾患* (吉村昭彦, 上阪等, 村上正晃, 善本隆之編), *実験医学増刊*, 28 (12), pp.20-28(2010)
- 67) 吉川敏一：フリーラジカルの医学：京都府立医科大学雑誌, 120(6), 381-391 (2011)
- 68) Hou De-xing, Tong Xuhui, Luo Dong, Fujii M. and Terahara N. : Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus Anthocyanin, Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells through Reactive Oxygen Species-Mediated Mitochondrial Pathway, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 440, 101-109 (2005)

- 69) Komatsu W., Ishihara K., Murata, M., Saito, H., and Shinohara, K. :  
Docosahexaenoic Acid Suppresses Nitric Oxide Production and Inducible  
Nitric Oxide Synthase Expression in Interferon- $\gamma$  Plus  
Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Macrophages by Inhibiting the  
Oxidative Stress, *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 1006-1016 (2003)
- 70) Bradford MM : A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of  
Microgram of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,  
*Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 (1976).
- 71) Schulze-Osthoff K., Bauer M. K. A., Vogt M. and Wesselborg S., : Oxidative  
Stress and Signal Transduction, *International Journal for Vitamin and  
Nutrition Research*, 67, 336-342 (1997).
- 72) 田中芳明, 石井信二, 浅桐公男, 深堀優, 七種伸行, 橋詰直樹, 吉田素, 小松  
崎尚子, 升井大介, 東館成希, 八木実 : 酸化ストレスと抗酸化療法 : *日本静脈  
経腸栄養学会雑誌*, 31, 3-12 (2016).
- 73) Kuntz Sabine, Kunz Clemens, Rudloff Silvia : Inhibition of Pancreatic  
Cancer Cell Migration by Plasma Anthocyanins Isolated from Healthy  
Volunteers Receiving an Anthocyanin-rich Berry Juice, *European Journal  
of Nutrition*, 56, 203-214(2017)

- 74) Liu Xiaozhen, Nie Shaoping, Huang Danfei and Xie Mingyong :  
Nonylphenol Regulates Cyclooxygenase-2 Expression via Ros-activated  
NF- $\kappa$  B Pathway in Sertoli TM4 Cells, *Environmental Toxicology*, 30,  
1144-1152 (2015)
- 75) Lee Sang Gil, Kim Bohkyung, Yang Yue, Pham Tho X., Park Young-ki,  
Koo Sung I., Chun Ock K., Lee Ji-young, and Manatou Jose : Berry  
Anthocyanins Suppress the Expression and Secretion of Proinflammatory  
Mediators in Macrophages by Inhibiting Nuclear Translocation of NF- $\kappa$  B  
Independent of NRF2-mediated Mechanism, *The Journal of Nutrition  
Biochemistry*, 25, 404-411 (2014).
- 76) De-Xing Hou, Yanagita T., Uto T., Masuzaki S. and Fujii M. :  
Anthocyanidins Inhibit Cyclooxygenase-2 Expression in LPS-Evoked  
Macrophages: Structure-Activity Relationship and Molecular Mechanisms  
Involved, *Biochemical Pharmacology*, 70, 417-425 (2005).
- 77) Sogo T., Terahara N., Hisanaga A., Kumamoto T., Yamashiro T., Wu S.,  
Sakao K. and De-Xing Hou : Anti-inflammatory Activity and Molecular  
Mechanism of Delphinidin 3-Sambubioside, a *Hibiscus* Anthocyanin,  
*Biofactors*, 41, 58-65 (2015)

78) Ichiyanagi, T., Kashiwada, Y., Shida, Y., Ikeshiro, Y., Kaneyuki, T., and Konishi, T. : Nasunin from Eggplant Consists of Cis-Trans Isomers of Delphinidin 3-[4-(p-coumaroyl)-L-rhamnosyl (1→6) glucopyranoside]-5-glucopyranoside, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9472-9477 (2005)

#### 参考 URL

- i) 農林水産省：ナス「どこからきたの？」  
[http://www.maff.go.jp/j/agri\\_school/a\\_tanken/nasu/01.html](http://www.maff.go.jp/j/agri_school/a_tanken/nasu/01.html)
  
- ii) 農林水産省：平成 26 年産 野菜生産出荷統計 <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyo>
  
- iii) 社団法人 食品需給研究センター：食品製造業の生産動向調査より漬物生産量  
<http://www.tsukemono-japan.org/statistics/documents/seisannryou-nennpou.pdf>