

## ソバの実麴中の抗アレルギー成分に関する研究

森 久美子\*・神田さゆり\*・江崎秀男\*・中村好志\*

Anti-allergic Ingredients in Buckwheat Koji Fermented with *Aspergillus saitoi*

Kumiko MORI, Sayuri KANDA, Hideo ESAKI and Yoshiyuki NAKAMURA

### 1. はじめに

近年、国民の3人に1人は何らかのアレルギー疾患をもつと言われ、その数は急増しており、その予防や治療法が重要な課題となっている。アレルギー疾患の増加には、結核や寄生虫症などの感染症の減少、食生活をはじめとする生活習慣の変化、環境汚染、ストレスの増加などが関与していると言われる。このような状況の中で、医薬品などに頼らず、アレルギー反応を抑制する食品の開発が求められている。最近、種々の食品成分がアレルギーの予防や症状の軽減に有効であることが明らかにされ<sup>1)~3)</sup>、このような成分を活用した抗アレルギー食品の開発が注目されている。また、乳酸菌や麴菌などを用いた発酵食品に含まれる成分がアレルギーを抑制するという報告<sup>4)~7)</sup>もあり、発酵食品にかかる期待は大きい。

ところで、ソバの実は、穀類の中では唯一、フラボノイドのルチンを含み、またタンパク質のアミノ酸組成も優れている。現代の食生活で不足しがちな食物繊維や亜鉛の含量も高く、人の健康維持・増進に役立つことが期待される食品素材の一つである<sup>8)</sup>。また、ソバの実はポリフェノール量も多く、DPPH ラジカル消去活性が強いことも知られている<sup>9)</sup>。

一方、麴菌は、我が国においても古くから清酒や甘酒、味噌や醤油などに利用されてきた。味噌などの発酵食品においては強い抗酸化性の付与に役立っている<sup>10)~11)</sup>。また、*Aspergillus saitoi*をはじめとする黒麴菌も焼酎や酢の醸造に用いられてきた。麴菌は日本人が古来より親しんできた食用微生物であり、まさに日本の「国菌」といえる<sup>12)</sup>。これらの麴菌は、さまざまな酵素類を豊富に産生し、食品素材の機能性を高める可能性をもっている。このように、麴菌の安全性と食物に与える高い機能性、嗜好性は、日本のみならず世界でも注目されつつある。

本研究では、アレルギー症状の緩和あるいは予防を目的として、麴菌の一種である *A. saitoi* を用いてソバの実麴を調製し、ヒスタミン放出抑制の指標となるヒアルロニダーゼ阻害活性を測定した。また、そのヒアルロニダーゼ阻害成分を分画するとともに、マウス

---

\* 生活科学部 管理栄養学科

腹壁法を用いた抗アレルギー作用について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試菌株および試薬

ソバの実麴の調製には、泡盛用黒麹菌（孢子）*A. saitoi* IAM 2210を使用した。各種試薬類は入手可能な限り、特級品または同等品を使用した。

### 2.2 実験動物

3週齢 ddY 系雄性マウス（SPF）を日本 SLC より購入した。飼育環境は、室温25℃、湿度50%、明暗サイクル12時間（明期8:00–20:00）とし、飼育期間中、飼料（CE-2）と水は自由摂取させた。マウスは1ケージ2–3匹で飼育し、1週間の予備飼育後、1群5–7匹で試験に供した。

### 2.3 発酵日数の異なるソバの実麴の調製

ソバの実（中国産）200gを同量の水に4℃で18時間浸漬し吸水させた後、オートクレーブで加熱処理（121℃、20分間）した。この蒸煮ソバの実に0.2% Tween 80で懸濁させた *A. saitoi* の孢子懸濁液（孢子数 $9.5 \times 10^6$ 個/mL）60mLを接種し、シャーレに分配後、温度30℃、湿度60%の人工気象器で培養を行った。この間、発酵日数1日目、2日目、3日目、4日目、6日目のソバの実麴を取り出し、これらを直ちに冷凍した。また、麹菌接種直後のものを発酵日数0日目の麴として同様に冷凍した。凍結乾燥後、コーヒーマイルで粉末化し、凍結乾燥粉末（freeze dried powder: FDP）を調製した。

### 2.4 ヒアルロニダーゼ阻害活性の測定

発酵日数の異なるソバの実麴の FDP 150mg ずつを精秤し、ここに70%エタノール6mLを加え、振とう抽出（20℃、18時間）を行った。遠心分離（3500rpm、20分間）後、得られた上清を試料溶液として、そのヒアルロニダーゼ阻害活性を Morgan-Elson 法を応用した掛川らの方法<sup>13)</sup>に従って測定した。すなわち、試料溶液100μLにヒアルロニダーゼ酵素溶液50μLを加えプレインキュベート（37℃、20分間）し、酵素活性化溶液（Compound 48/80）100μLを加えて、さらにプレインキュベート（37℃、20分間）を行った。その後、ヒアルロン酸基質溶液250μLを加えインキュベート（37℃、40分間）し、0.4N 水酸化ナトリウム100μLで反応を停止させた。なお、この反応における酵素および基質の最終濃度は、それぞれ17.7units/500μLおよび200μg/500μLである。反応を停止させた溶液にホウ酸カリウム溶液100μLを加え加熱（100℃、3分間）した後、流水中で室温まで冷却した。ここに *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液3mLを加えインキュベート（37℃、20分間）し、ヒアルロニダーゼ反応によって生成された D-グルコサミン量を585nmの吸光度（A<sub>585</sub>値）で測定した。この時、試料溶液の代わりに抽出溶媒のみを加えた対照および酵素溶液の代わりに緩衝液を加えた盲検も同時に行い、下記の計算式にてヒアルロニダーゼ阻害率を算出した。

ヒアルロニダーゼ阻害率 (%)

$$= \{1 - (\text{試料 } A_{585} \text{ 値} - \text{試料盲検 } A_{585} \text{ 値} / \text{対照 } A_{585} \text{ 値} - \text{対照盲検 } A_{585} \text{ 値})\} \times 100$$

## 2.5 XAD-2カラムクロマトグラフィー

アレルギー抑制作用を示す物質をより多く含む分画物を得るために、合成吸着材である Amberlite XAD-2 を用いてカラムクロマトグラフィーを行った。発酵 6 日目のソバの実麴より 70% エタノール抽出物を調製し、この抽出物を XAD-2 カラム (60 i.d.×400mm) の上層に充填した。溶離液として水、40% メタノール、80% メタノール、メタノール、アセトンを順次 3 L ずつ流すことにより、活性物質の分画を行った。各溶出液は減圧濃縮し、シラップとしてその収量を求めた。

## 2.6 マウスにおける抗アレルギー作用の評価

ソバの実麴 70% エタノール抽出物および XAD-2 カラム分画物は、滅菌水に懸濁させ 75mg/mL に調製し、ステンレス製胃ゾンデにて 28 日間、強制経口投与 (0.2mL/マウス/日) した。非投与群は滅菌水を同様に経口投与した。また、陽性対照として用いたジフェンヒドラミンは 1 mg/mL に調製し、惹起当日のみ経口投与 (0.2mL/マウス/日) した。

マウスにおける抗アレルギー作用の評価には、片岡らが開発した腹壁 (Abdominal wall: AW) 法<sup>14)</sup>を用いた。感作には、卵白アルブミン (OVA) 2.0mg/mL に等容のフロイント不完全アジュバント (FIA) を加えエマルジョン化したものを用い、本飼育開始後 14 日目にマウスの腹腔内に投与した。

この AW 法では、腹壁上に惹起される色素漏出斑の径を測定して評価を行う。しかし、この評価法には色素漏出斑の濃淡が考慮されないなどの問題点がある。本実験では、Katayama *et al.* の方法<sup>15)</sup>を改良して、漏出した色素を抽出し、その吸光度を測定する方法を用いた。すなわち、色素漏出斑を切り取り、1N 水酸化カリウム 0.25mL を加えて振とう抽出 (37°C, 18 時間) した後、0.6N リン酸：アセトン = 5 : 13 (v/v) 2.25mL を加え、遠心分離 (3000rpm, 15 分間) により得られた上清の吸光度 (620nm) を測定した。また、エバンスブルーのみを投与したマウスの腹壁を盲検として用い、下記の計算式にて抑制率を算出した。

抑制率 (%)

$$= 100 - \{(\text{試料投与 } A_{620} \text{ 値} - \text{盲検 } A_{620} \text{ 値} / \text{非投与 } A_{620} \text{ 値} - \text{盲検 } A_{620} \text{ 値})\} \times 100$$

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 発酵日数の異なるソバの実麴の生育状況

*A. saitoi* IAM 2210 を接種したソバの実麴は、発酵 1 日目には菌糸の伸長が旺盛に進み、ソバの実麴の表面は白い菌糸体で覆われていた。2 日目の麴においては孢子形成が始まり、その後発酵日数の経過とともに孢子着生が進行し、麴は徐々に黒色化した。6 日間の製麴によって孢子着生はほぼ終了した。

### 3.2 各種ソバの実麴のヒアルロニダーゼ阻害作用

ヒアルロニダーゼは生体内におけるヒスタミン放出に先立ち、活性が上昇するとされている。また、ヒアルロニダーゼ阻害活性が上昇するとヒスタミン放出が抑制されることから、ヒアルロニダーゼ阻害活性は抗アレルギー作用の指標となる可能性をもつ。発酵日数の異なるソバの実麴の70%エタノール抽出液を用いて、ヒアルロニダーゼ阻害活性を調べ、その結果を図1に示した。発酵3日目、4日目、6日目の麴の阻害率は、それぞれ47.4%、56.0%、92.4%であり、最も阻害率の低かった発酵1日目の麴と比較して阻害率は発酵日数の経過、孢子着生の進行とともに有意に上昇した。乳酸菌や麹菌を用いた発酵食品には、このヒアルロニダーゼ阻害活性があることが報告されている<sup>4)~7)</sup>が、今回、我々が調製したソバの実麴にも高いヒアルロニダーゼ阻害活性があることが確認された。この中で最も強いヒアルロニダーゼ阻害活性を示した6日目麴を以後の実験試料として用いることにした。

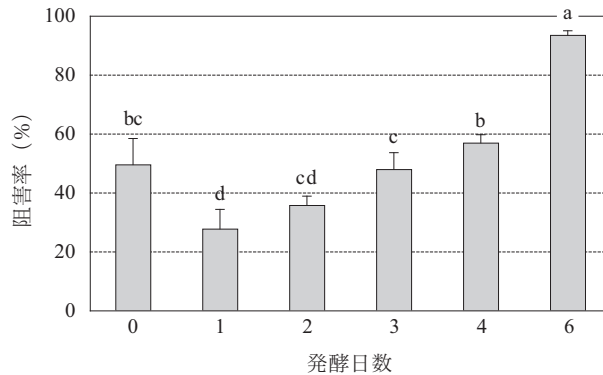


図1 発酵日数の異なるソバの実麴70%エタノール抽出液のヒアルロニダーゼ阻害活性

平均値±標準偏差 (n=3), 異なるアルファベットは有意差を示す ( $p < 0.05$ , Tukeyの多重比較)。

### 3.3 XAD-2カラム分画物のヒアルロニダーゼ阻害作用

ヒアルロニダーゼ阻害作用を示す物質をAmberlite XAD-2カラムクロマトグラフィーにより分画した。分画には6日目麴456gより得られた70%エタノール抽出物44.7gを使用し、各溶媒で順次溶出させた。その各分画物の収量を表1に、またその構成比率を図2に示した。蒸留水、40%メタノール、80%メタノール、メタノール、アセトン分画物の収量は、それぞれ12.8g、9.3g、10.3g、5.4g、3.8gであり、その総量は41.6gとなり、70%エタノール抽出物の90%以上が回収された。

これらのXAD-2カラム分画物を用いてヒアルロニダーゼ阻害活性を調べた。最終濃度10 $\mu$ g/500 $\mu$ Lで試験した結果を図3に示した。40%メタノール、80%メタノール、メタノール分画物の阻害率は、それぞれ7.7%、46.8%、90.1%を示した。この結果より、ヒアルロニダーゼ阻害物質は80%メタノール分画物およびメタノール分画物に溶出されることが分かった。

表1 ソバの実麴70%エタノール抽出物の XAD-2 カラム分画物の収量

XAD-2カラム分画物	収量 (g)
水	12.8
40%メタノール	9.3
80%メタノール	10.3
メタノール	5.4
アセトン	3.8
合計	41.6

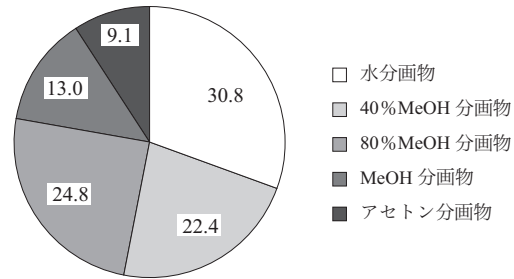


図2 ソバの実麴70%エタノール抽出物の XAD-2 カラム分画物の構成比率 (%)

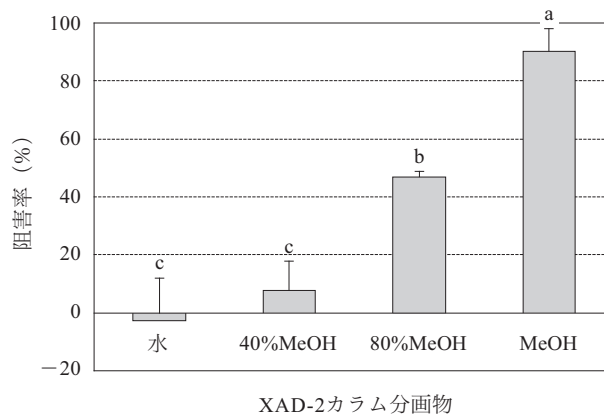


図3 ソバの実麴 XAD-2カラム分画物の ヒアルロニダーゼ阻害活性

平均値±標準偏差 ( $n=3$ ), 異なるアルファベットは有意差を示す ( $p<0.05$ , Tukey の多重比較)。

図2より, ヒアルロニダーゼ阻害活性が高値を示した80%メタノールおよびメタノール分画物は全体の37.8%を占めていることが分かった。そのため, ソバの実麴のヒアルロニダーゼ阻害活性にはこれらの画分に含まれる成分が大いに寄与していると考えられる。

### 3.4 ソバの実麴抽出物の抗アレルギー作用

AW 法は, タンパク質抗原をマウスに腹腔内投与 (感作) し, 感作成立後同一のタンパク質抗原を腹腔内投与 (惹起) したときに生じる抗原特異的アナフィラキシー反応を評価するものである<sup>16)</sup>。ヒアルロニダーゼ阻害活性の結果より, ソバの実麴70%エタノール抽出物にはヒアルロニダーゼ阻害活性があることが分かった。そこで, まず, ソバの実麴70%エタノール抽出物を経口投与試料として, マウスにおける抗アレルギー作用の評価をAW 法にて行った。その結果を図4に示した。縦軸の吸光度 (620nm) は, 腹壁上に惹起された色素漏出斑の色素漏出量を示している。色素漏出量とは, すなわち抗原抗体反応により肥満細胞の脱顆粒によって放出されたヒスタミンなどの化学伝達物質により亢進した

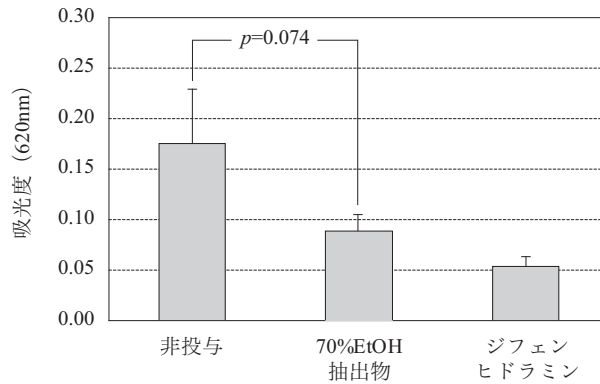


図4 ソバの実麴70%エタノール抽出物の抗アレルギー作用  
 平均値±標準誤差 (n=5-7), t検定による比較。

血管透過性値を表しており<sup>14)</sup>, その値が低いほど, アレルギーを抑制していることを意味する。ソバの実麴70%エタノール抽出物を28日間, マウスに経口投与することにより, 70%エタノール抽出物投与群では非投与群に比較して色素漏出量を49.7%抑制した ( $p=0.074$ )。一方, 陽性対照として用いたジフェンヒドラミン投与群では, その抑制率は69.1%であった。この結果より, ソバの実麴70%エタノール抽出物は, 医薬品には及ばないが, 抗アレルギー作用をもつことが示唆された。

### 3.5 XAD-2カラム分画物の抗アレルギー作用

ソバの実麴70%エタノール抽出物に含まれるヒアルロニダーゼ阻害物質は, XAD-2カラムクロマトグラフィーにより80%メタノール分画物およびメタノール分画物に多く含まれることが分かった。このヒアルロニダーゼ阻害活性の結果を踏まえ, マウスにおける抗アレルギー作用の評価をAW法にて行った。その結果を図5に示した。XAD-2カラム

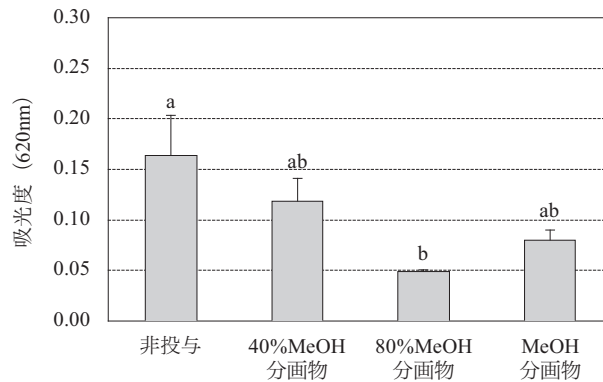


図5 ソバの実麴 XAD-2カラム分画物の抗アレルギー作用  
 平均値±標準誤差 (n=5-7), 異なるアルファベットは有意差を示す ( $p<0.05$ , Tukeyの多重比較)。

分画物をマウスに28日間、経口投与することにより、80%メタノール分画物およびメタノール分画物投与群では非投与群と比較して色素漏出を抑制した。特に80%メタノール分画物投与群では69.9%の抑制率を示し、有意に抑制した。一方、メタノール分画物投与群では抑制率は50.9%と80%メタノール分画物投与群よりも低い値を示し、この結果はヒアルロニダーゼ阻害活性の結果とは異なる傾向であった。

#### 4. ま と め

アレルギー疾患が急増する現代社会において、医薬品に頼らない、食品によるアレルギーの軽減や緩和が求められている。

本研究では、健康食品として注目を浴びているソバの実を原料として、これに日本の伝統的な発酵食品に使われてきた麴菌の一種である黒麴菌 *A. saitoi* を接種することで、ソバの実麴を調製した。

発酵日数の異なるソバの実麴70%エタノール抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性は発酵日数の経過とともに上昇し、6日目において最も高い阻害率を示した。また、その6日目麴70%エタノール抽出物のXAD-2カラム分画物のヒアルロニダーゼ阻害活性を同様に測定したところ、80%メタノール、メタノール分画物で高い活性を示すことが分かった。

他方、マウスを用いたAW法においても、ソバの実麴70%エタノール抽出物は抗アレルギー作用を示し、特にそのXAD-2カラム分画物の80%メタノール分画物投与群ではアレルギー反応を有意に抑制した。

以上、本研究では、*in vitro* だけでなく *in vivo* においてもソバの実麴中の抗アレルギー成分を確認することができた。今後、この80%メタノール分画物およびメタノール分画物中の活性成分を分離・精製するとともに、抗アレルギー作用のメカニズムについても検討したい。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、AW法をご指導くださいました武庫川女子大学薬学部扇間昌規先生ならびに片岡裕美先生に感謝の意を表します。また、ソバの実をご提供いただきました吉村穀粉株式会社に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Yamamoto, T., Yoshimura, M., Yamaguchi, F., Kouchi, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A. and Kikuchi, M., Anti-allergic activity of naringenin chalcone from a tomato skin extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68** (8), 1706-1711 (2004).
- 2) 小谷麻由美, 藤田晃人, 田中敏郎, ヒト好塩基球細胞およびマウスにおける柿の葉抽出物のアレルギー抑制効果, 栄食誌, **52** (3), 147-151 (1999).
- 3) Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R. and Saito, Y., Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (7), 1284-1289 (1998).
- 4) 前田有美恵, 増井俊夫, 杉山清, 横田正実, 中込和哉, 田中秀興, 高橋宇正, 小林利彰, 小

- 林栄人, 茶抽出液の Hyaluronidase 阻害活性, 食衛誌, **31** (3), 233-237 (1990).
- 5) 菅野信男, 上東治彦, 森山洋憲, 山崎祐三, 久武睦夫, 白糖を原料とした乳酸飲料の機能性について, 醸協, **95**, 665-671 (2000).
- 6) 近藤徹弥, 戸谷精一, 穀類発酵物の食品機能性の探索, 愛知県産業技術研究所研究報告, **3**, 120-121 (2004).
- 7) 井口隆文, 川田あゆみ, 有満瞳, 渡辺敏郎, Mazumder Tapan Kumar, 永井史郎, 武藤徳男, オバルブミン感作鼻炎マウスに対する大麦醗酵エキスの効果, 食科工, **54** (2), 61-66 (2007).
- 8) 渡辺満, 伊藤美雪, ソバ芽生えのフェノール性化合物量に及ぼす光の影響, 食科工, **50** (1), 32-34 (2003).
- 9) 渡辺満, 伊藤美雪, ソバ地上部の生育ステージによる抗酸化能とフラボノイド組成の変動, 食科工, **49** (2), 119-125 (2002).
- 10) Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y. and Osawa, T., New potent antioxidative *o*-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63** (9), 1637-1639 (1999).
- 11) 江崎秀男, 渡部綾子, 増田均, 大澤俊彦, 川岸舜朗, 豆味噌醸造中のオルトジヒドロキシイソフラボンの生成と変動, 食科工, **48** (3), 189-195 (2001).
- 12) 一島英治, 日本の国菌コウジキン, 醸協, **99**, 83 (2004).
- 13) 掛川寿夫, 松本仁, 佐藤利夫, 種々の抗炎症剤のヒアルロニダーゼ阻害作用, 炎症, **4** (4), 437-438 (1984).
- 14) 片岡裕美, 津田明子, 津田祥美, 馬場明子, 吉田晴美, 福井久恵, 西口美紀, 田中和美, 扇間昌規, 伊藤誉志男, 即時型アレルギー反応の誘発と検出のための腹壁法 (AW 法) の確立と応用, 衛生化学, **44** (4), 277-288 (1998).
- 15) Katayama, S., Shionoya, H. and Ohtake, S., A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiology and Immunology*, **22** (2), 89-101 (1978).
- 16) 林千嘉子, 片岡裕美, 佐藤まさ江, 重岡優子, 島中麻貴子, 真鍋佳代子, 扇間昌規, 伊藤誉志男, 腹壁法 (AW 法) における食品中のタンパク質の影響, 日本食品化学, **8** (1), 27-32 (2001).