

甘酒のアンジオテンシン I 変換酵素阻害作用

江 崎 秀 男*・長谷川 淑 己*

Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Effect of Amazake

Hideo ESAKI and Yoshiko HASEGAWA

1. はじめに

令和元年の主な死因の全死亡者に占める割合を眺めてみると、第1位の悪性新生物（腫瘍）が27.3%，第2位の心疾患（高血圧性を除く）が15.0%，第3位の老衰が8.8%，第4位の脳血管疾患が7.7%，第5位の肺炎が6.9%となっている（令和元年 人口動態統計（確定数）の概況 厚生労働省）¹⁾。これらの値からも明らかなように、心疾患と脳血管疾患を含む循環器疾患はがんと並んで日本人の主要死因であり、これらの疾患の死亡・罹患率の改善が求められている。

また、この循環器疾患の主要な危険因子として高血圧性疾患があり、その患者数は9,937,000人であり（平成29年 患者調査の概況 厚生労働省）²⁾、主な傷病の総患者数と比較する（糖尿病：3,289,000人、脂質異常症：2,205,000人、悪性新生物：1,782,000人、心疾患：1,732,000人、脳血管疾患：1,115,000人）と最も多い割合を占めている。この高血圧性疾患を予防・改善するためには、日常の食生活の習慣を見直すことが望まれる。

高血圧の発症には種々の要因が関与しているが、特に食品成分との関連が深いものとしてアンジオテンシン変換酵素（Angiotensin I-converting enzyme：ACE）阻害作用がある。ACEは、腎臓のプロテアーゼ・レニンが血液中の糖たんぱく質（アンジオテンシンノーゲン）に作用して生成するアミノ酸10個のデカペプチド（DRVYIHPFHL）からなるアンジオテンシン I に作用して、昇圧ホルモンであるアンジオテンシン II（DRVYIHPF）を生成する反応を触媒する酵素である。アンジオテンシン II は全身の動脈を収縮させるとともに、副腎皮質からアルドステロンを分泌させる。このアルドステロンはナトリウムの再吸収を促進させるため、循環血液量が増加して血圧上昇をひき起こす。従って、アンジオテンシン II の生成を抑制することで、血圧上昇を制御することが可能となる。

私たちが日常の食事から摂取している食品成分が、このACEの酵素反応を抑制（阻害）すれば、アンジオテンシン I からアンジオテンシン II への変換量を減少させることになり、生体内での血圧上昇抑制効果が期待される。鈴木ら³⁾は、117種類の食品のACE阻害能を

* 生活科学部 管理栄養学科

調べ、食品中には様々なACE阻害物質が存在することを示唆した。川上ら⁴⁾は、種々のハーブ水抽出物のACE阻害能を報告している。また、伊澤ら⁵⁾はキノコ類のACE阻害活性についてスクリーニング試験を行うとともに、活性成分としてニコチアナミンを報告している。ACE阻害作用を示す食品の研究は多く行われているが、一方では、たんぱく質の加水分解物であるペプチド類の血圧降下作用（「血圧が高めの方に適する」という表示）を目的とした数多くの特定保健用食品（ラクトリペプチド、ノリペントペプチド、ローヤルゼリーペプチドなど）が市場に出回っている。

近年、甘酒の栄養価の高さや健康機能に対する関心が高まっている。吉川ら⁶⁾は甘酒摂取が肌へ及ぼす効果を報告している。森ら⁷⁾は甘酒摂取による便通へ及ぼす効果を報告している。また、倉橋⁸⁾は麹甘酒の成分・機能性・安全性について解説している。

本研究では、精米歩合の異なる米と米麴を使用して糖化時間の異なる各種甘酒を試作し、これらのACE阻害活性を調べることにした。

2. 実験方法

2.1 実験試料

製造元の異なる6種類の甘酒（MN甘酒，MR甘酒，HK甘酒，MS甘酒，YM甘酒，KN甘酒）は、愛知県長久手市のスーパーより入手した。甘酒の試作には、岐阜県産（2018年）のハツシモの精白米，5分搗き米，玄米の3種類を，また甘酒用米麴（冷凍品）は愛知県豊橋市の株式会社ビオックより入手し，これらを使用した。

2.2 市販甘酒10%エタノール抽出原液の調製

6種類の市販甘酒を懸濁した後，乳鉢に50gを採取し，十分にホモゲナイズした。その36.0gに100%エタノール4.0mLを加え，十分に攪拌した。その後，遠心分離（12000rpm，室温，20分間）を行い，各種甘酒の10%エタノール抽出原液を回収した。この抽出原液を用いてACE阻害活性を測定した。

2.3 市販甘酒のACE阻害活性の測定

ACE阻害活性の測定は，前報⁹⁾に従って行った。ACEは株式会社SIGMAのウサギ肺アセトンパウダー（Lung acetone powder from rabbit，L0756）を使用し，その300mgに125mMホウ酸緩衝液（pH8.3）9.0mLを加え，4℃で一晩抽出した。その後，遠心分離（15000rpm，4℃，20分間）を行い，得られた上清をACE酵素液とした。基質は株式会社ペプチド研究所のHHL（hippuryl-L-histidyl-L-leucine）（Bz-Gly-His-Leu・H₂O，3064）を使用し，その26.1mgに125mMホウ酸緩衝液（pH8.3）10.0mLを加えて溶解した（5.33mM HHL溶液）。

各種市販甘酒10%エタノール抽出原液50μLに5.33mMHHL溶液を150μL加え，予備加温した（37℃，5分間）。その後，ACE酵素液100μLを加え，37℃で60分間加温した。エタノール700μLを加えて酵素反応を停止させた後，遠心分離（12000rpm，4℃，10分間）を行い，上清を回収した。その上清10μLを試料溶液として，生成した馬尿酸量（試料群の馬尿酸生成量）をフォトダイオードアレイ検出器（SPD-M10A，Shimadzu）装備の三次

元 HPLC（ポンプ：LC-10AT，カラムオープン：CTO-10AC）を用いて測定した。HPLC の分析条件は，カラム：Develosil ODS-UG-5（4.6mm i.d.×250mm，NOMURA CHEMICAL CO., LTD.），カラム温度：35℃，溶離液：メタノール：水：トリフルオロ酢酸（20：80：0.1，v/v/v），流速：0.7mL/分，注入量：10μL，検出波長：228nm とした。

本実験では，各試料溶液 1 種類につき 3 検体の抽出液（n=3）を用いて酵素反応を行った。また，対照試験として，各試料溶液の代わりに抽出溶媒である 10% エタノールを用いた 3 検体も同様に酵素反応を行い，生成した馬尿酸量（コントロール群の馬尿酸生成量）を測定した。各試料溶液の阻害活性は，次式を用いて算出し，阻害率（%）として表した。

$$\text{阻害率}(\%) = [1 - (\text{試料群の馬尿酸生成量} / \text{コントロール群の馬尿酸生成量})] \times 100$$

2.4 甘酒の試作

甘酒の試作は，精白米，5 分搗き米，玄米の 3 種類と甘酒用米麴を用いて行った。これらの 3 種類の米 320g ずつを洗米し，ザルにあげた後，全量が 2800g になるように水を加え，一晩室温で浸漬を行った。その後，炊飯器（Panasonic SR-SA182）を使用してお粥モードで炊飯した。炊き上がったお粥を 65℃ まで放冷した後，全量が 2800g になるように熱湯を加えた。ここに，前日から冷蔵庫で解凍しておいた甘酒用米麴（4℃）320g を加えた後，ハンドブレンダー（Panasonic MX-S101-W）を使用して約 3 分間ホモゲナイズした。お粥と米麴が均質化されたもの（その一部（糖化：0 時間）をポータブル糖度計（京都電子株式会社 BX-1）で Brix% 値を測定するとともに，50mL 容遠心チューブ（CFT5000）に採取した。これを沸騰水中で 15 分間の酵素失活を行った後，流水中で冷却した。残りのお粥・米麴は 60℃ の恒温水槽を使用して糖化反応を進行させた。糖化 0.5，1，1.5，2，3，4，5，24，25 時間ごとに Brix% 値を測定するとともに，各糖化時間の甘酒の一部を 50mL 容遠心チューブに採取し，同様に酵素失活および冷却を行った。これらの各糖化時間の甘酒は，遠心分離（KUBOTA 3740，12000pm，25℃，15 分間）を行い，上清を回収した。この上清 9.0mL にエタノール 1.0mL を加え，各糖化時間の甘酒 10% エタノール抽出原液を調製した。

2.5 試作甘酒の ACE 阻害活性の測定

2.4 で調製した精白米，5 分搗き米，玄米を原料とした 3 種類の甘酒の各糖化時間の甘酒 10% エタノール抽出原液およびその希釈液（2 倍希釈液，3 倍希釈液）を実験試料として，2.3 で述べた方法で ACE 阻害活性の測定を行い，各試料溶液の阻害率を求めた。

2.6 試作甘酒中の ACE 阻害活性物質の分離

5 分搗き米を原料とした甘酒（糖化 25 時間）の 10% エタノール抽出原液 70mL に，Amberlite IR120 強酸性陽イオン交換樹脂（H 形）70mL を加えた後，2 日間振とうした。その後，樹脂と樹脂に吸着しなかった溶液（非吸着溶液）を分別し，樹脂はさらに 2N アンモニア水で吸着成分の溶出を行い，アンモニア溶出溶液を回収した。

これらの溶液を用いて，シリカゲルプレート（Merck 社，Silica gel 60 F₂₅₄）による薄層クロマトグラフィー（展開液：*n*-BuOH/AcOH/H₂O = 4/1/1（v/v/v））を行い，ニンヒドリ

ン陽性物質の検出を行った。

アンモニア溶出溶液は、エバポレーターを用いてアンモニアを除去するとともに溶媒を留去し、シラップ (2.8g) を回収した。このシラップ 0.75g を用いて TOYOPEARL HW-40F ゲルろ過カラムクロマトグラフィー (2.2cm i.d.×40cm) による活性物質の分離を行った (溶離液: 10% EtOH, 流速: 0.5mL/分, 各フラクション: 5mL)。

得られた各フラクション (F) の 225nm における吸光度を測定し (島津紫外可視分光光度計 UV-1800), 溶出パターンを作成した。得られたゲルろ過各フラクションを用いて, ACE 阻害活性の測定および薄層クロマトグラフィーによるニンヒドリン陽性物質の検出を行った。

3. 結果

3.1 市販甘酒の ACE 阻害作用

製造元の異なる 6 種類の市販甘酒 (MN 甘酒, MR 甘酒, HK 甘酒, MS 甘酒, YM 甘酒, KN 甘酒) の 10% エタノール抽出原液 (実験方法 2.2) の ACE 阻害活性を図 1 に示した。いずれの甘酒においても阻害作用が認められたが, 特に YM 甘酒は, 80% 近くの高い阻害率を示し, KN 甘酒より有意に ($p < 0.05$) 強い阻害活性を示した。しかし, 他の 4 種類の甘酒との間には有意差は認められなかった。

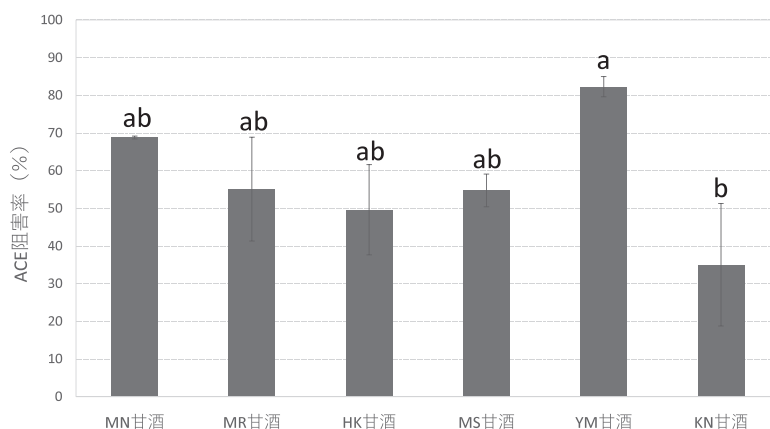


図 1 市販甘酒 10% エタノール抽出原液の ACE 阻害作用
それぞれのグラフの値は, 平均値 ± 標準偏差 ($n=3$) を示す。異なるアルファベットは, 有意差 ($p < 0.05$, Tukey) があることを示す。

3.2 精白米, 5 分搗き米, 玄米を使用した甘酒試作時の Brix 値の変動

甘酒の試作は, まず原料として精白米と甘酒用米麴を用いて行い, 糖化 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 24, 25 時間ごとに, 精白米甘酒の一部を採取し糖度計で Brix% 値を測定した。また, 5 分搗き米および玄米を原料として, 同様に 5 分搗き米甘酒および玄米甘酒を試作し, 各糖化時間における甘酒の Brix% 値を測定した (実験方法 2.4)。これらの結果を図 2 に示した。この図から明らかなように, 糖化 0 時間における Brix% 値は, 精白米甘酒で 19.7, 5

甘酒のアンジオテンシン I 変換酵素阻害作用

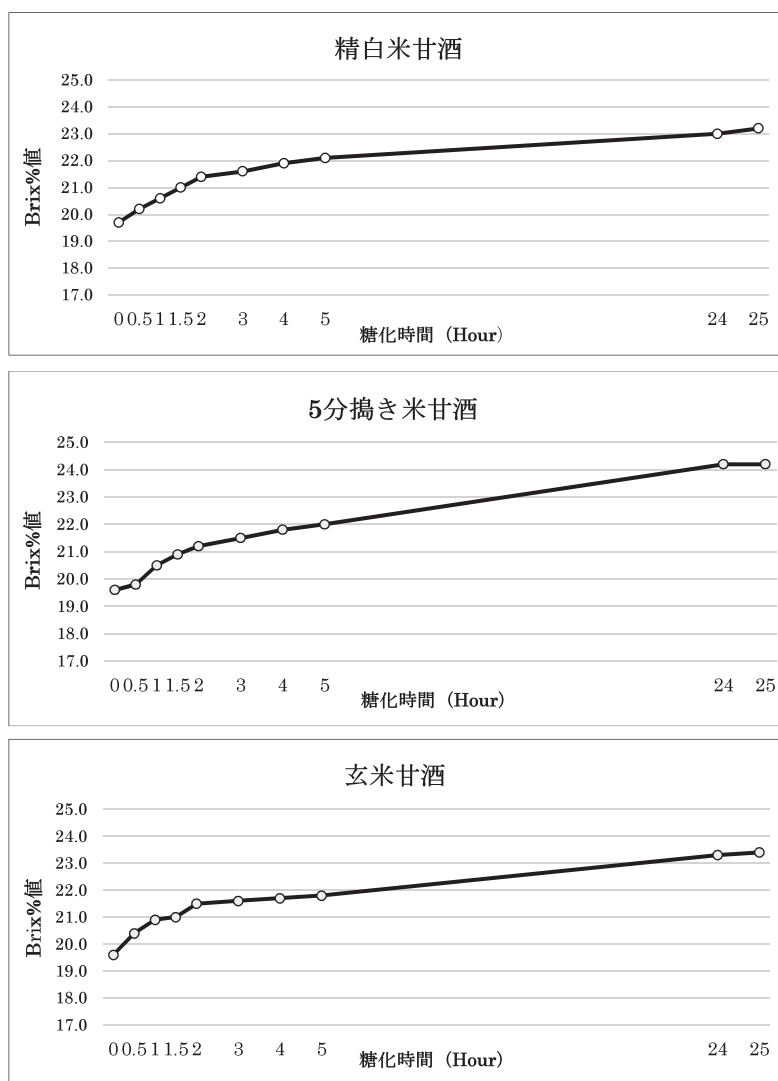


図2 精白米甘酒、5分搗き米甘酒および玄米甘酒の糖化に伴う Brix 値の変動

分搗き米甘酒で19.6，玄米甘酒で19.6となり，ほぼ同じであった。これらの甘酒はいずれのものにおいても，糖化時間の経過とともにほぼ同様にBrix%値は上昇し，5時間後には精白米甘酒で22.1，5分搗き米甘酒で22.0，玄米甘酒で21.8を示した。しかし，25時間経過後では，精白米甘酒（Brix%値：23.2）と玄米甘酒（Brix%値：23.4）の間ではBrix%値は近似していたが，5分搗き米甘酒ではその値が24.2となり，精白米甘酒や玄米甘酒より多少高いBrix%値を示した。

3.3 精白米甘酒，5分搗き米甘酒，玄米甘酒の糖化に伴う ACE 阻害活性の変動

実験方法2.4および2.5で調製した各糖化時間の甘酒10%エタノール抽出原液の3倍希釈

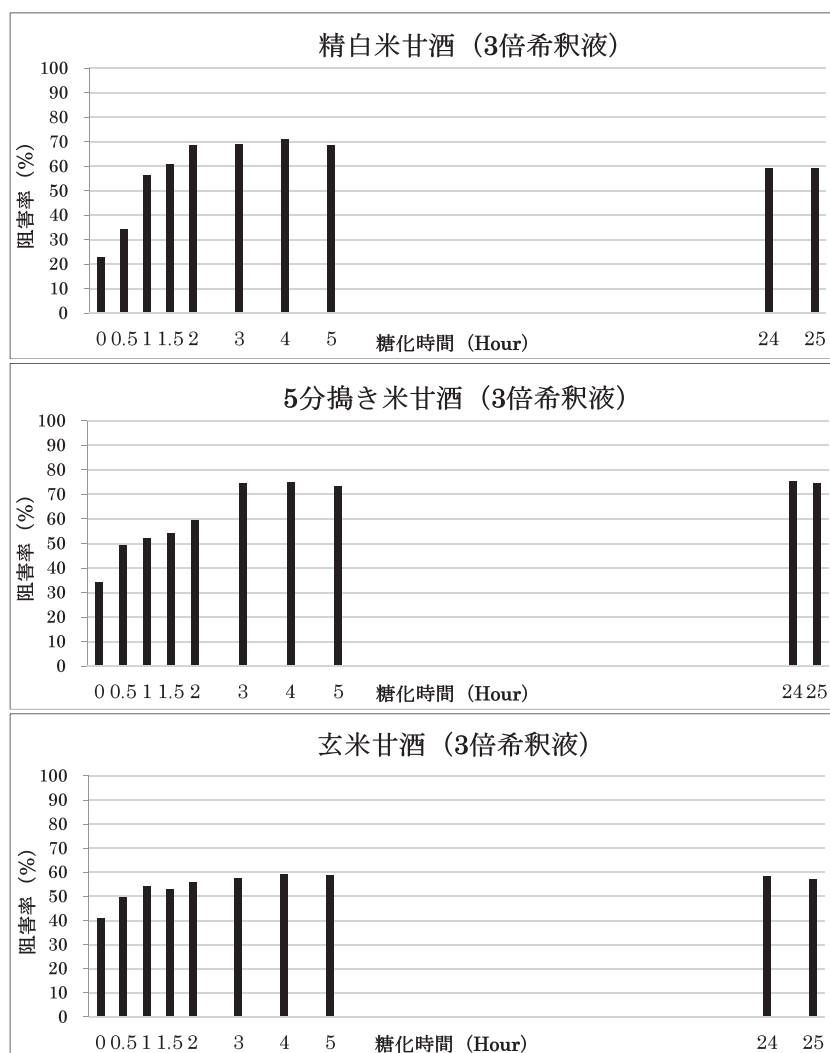


図3 精白米甘酒、5分搗き米甘酒および玄米甘酒の糖化に伴うACE阻害活性の変動

液のACE阻害活性の変動を図3に示した。糖化時間の経過に伴うACE阻害率の上昇は、糖化0時間から4時間の間で進行した。いずれの甘酒においても糖化時間4時間で高い阻害率を示した(精白米甘酒:71.1%, 5分搗き米甘酒:74.9%, 玄米甘酒:59.4%)が, 玄米甘酒の阻害率は精白米甘酒や5分搗き米甘酒より低い値であった。また, これらの甘酒の糖化25時間後のACE阻害率は, 5分搗き米甘酒では糖化4時間後とほぼ同じ値(74.6%)であったが, 精白米甘酒および玄米甘酒においては, ACE阻害率は低下し, それぞれ59.7%および56.8%を示した。

3.4 試作甘酒中のACE阻害活性物質の分離

5分搗き米甘酒(糖化25時間)の10%エタノール抽出原液を試料として, Amberlite

IR120強酸性陽イオン交換樹脂（H形）を用いて分画した溶液（非吸着溶液とアンモニア溶出溶液）の薄層クロマトグラフィーを行ったところ、アンモニア溶出溶液に多くのニンヒドリン陽性物質が検出された。

アンモニア溶出溶液の一部（シラップ0.75g）を用いて、TOYOPEARL HW-40Fゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。各フラクション（F）の225nmにおける吸光度を測定し、溶出パターンを作成した（図4）。F14から吸光度がわずかに上昇し、その後F19から著しく吸光度の上昇が始まり、F21～22で吸光度は最大となり、大きなピークがみられた。また、F33付近にもそれに次ぐピークが観察された。

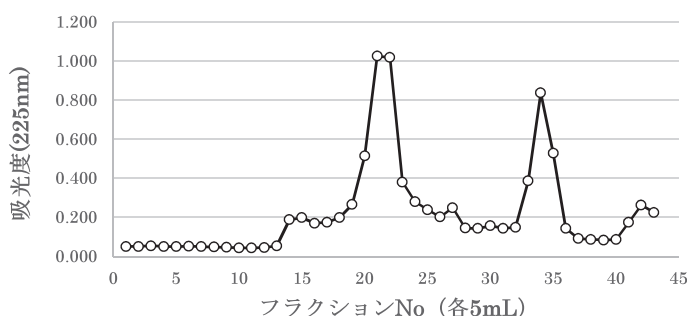


図4 TOYOPEARL HW-40Fゲルろ過クロマトグラフィーの溶出パターン

3.5 ゲルろ過クロマトグラフィーの各フラクションのACE阻害活性

TOYOPEARL HW-40Fゲルろ過クロマトグラフィーで得られた各フラクションのACE阻害活性を図5に示した。F17, F19, F21～F25の各フラクションに、40%以上の阻害率が認められた。また、F30およびF31においても30%程度の阻害率が確認された。

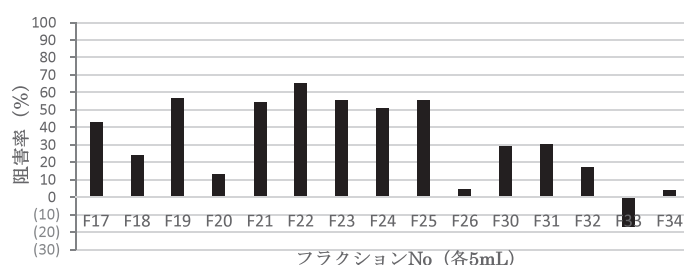


図5 ゲルろ過クロマトグラフィーの各フラクションのACE阻害活性

3.6 ゲルろ過クロマトグラフィーの各フラクション中のニンヒドリン陽性物質

TOYOPEARL HW-40Fゲルろ過クロマトグラフィーで得られた各フラクション中のニンヒドリン陽性物質を図6に示した。F17～F22においては、Rf値0.11および0.23を示すニンヒドリン陽性スポットが検出された。F23にはRf値0.23および0.27のスポットが、F24にはさらにRf値0.41のスポットが検出された。また、F25およびF26にはRf値0.50のスポッ

トも検出された。

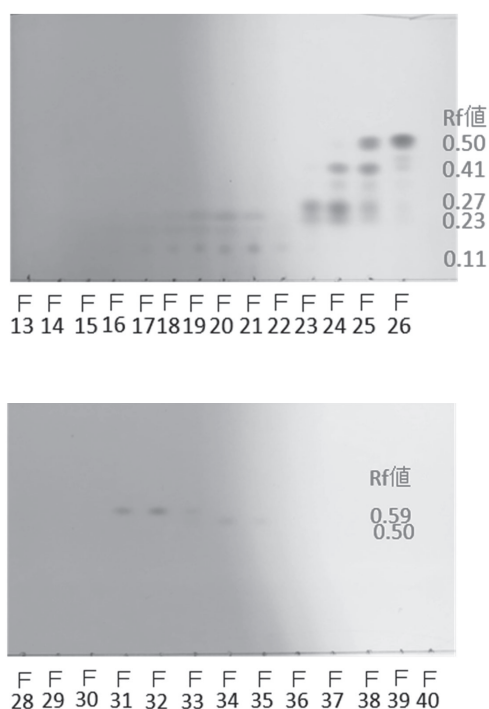


図6 ゲルろ過クロマトグラフィーの各フラクション中のニンヒドリン陽性物質

4. 考察・まとめ

本研究では、先ず製造元の異なる6種類の市販甘酒（MN甘酒，MR甘酒，HK甘酒，MS甘酒，YM甘酒，KN甘酒）の血圧上昇抑制に寄与するACE阻害作用を調べた。いずれの甘酒においても阻害作用が認められたが，製造元の違いによって阻害活性は異なっていた（図1）。YM甘酒は，特に強いACE阻害活性（阻害率：82.3%）を示した。それぞれの甘酒の阻害活性の差異については，様々な要因があると思われるが，甘酒の製造に使用した米の種類や米麴の製麴に使用した麴カビの種類などが関与していると考えられる。阻害活性が最も強かったYM甘酒は原料として玄米と米麴を使用しており，他の5種類の甘酒が米麴のみ，または米麴と米（精白米）を使用している点が異なっていることも，阻害活性の差異の一要因として考えられる。

そこで本研究では，同じ原料（岐阜県産のハツシモ）および甘酒用米麴（株式会社ビオック）を用いて甘酒の試作を試みるとともに，精米歩合の異なる米（精白米，5分搗き米，玄米）を用いて甘酒を調製（精白米甘酒，5分搗き米甘酒，玄米甘酒）し，精米歩合がACE阻害活性に及ぼす影響を調べた。

甘酒の糖化0，0.5，1，1.5，2，3，4，5，24，25時間ごとに，その一部を採取し糖度計

でBrix%値を測定した(図2)。3種類の甘酒のBrix%値は、糖化5時間後まではほぼ同様に上昇した。しかし、25時間経過後では、5分搗き米甘酒が精白米甘酒や玄米甘酒より多少高いBrix%値を示した。

糖化時間の経過に伴うACE阻害率の上昇も、いずれの甘酒においても、糖化4時間後まではほぼ同様に進行し、糖化4時間が最も高い阻害率を示した(図3)。その値は、精白米甘酒で71.1%、5分搗き米甘酒で74.9%、玄米甘酒で59.4%となり、5分搗き米甘酒が最も強い阻害活性を示した。また、この甘酒の阻害活性は糖化25時間後まではほぼ保持された。

本実験において、この5分搗き米甘酒のACE阻害活性を測定する場合、市販甘酒(実験方法2.2で調製した10%エタノール抽出原液)の阻害活性を測定した場合と同様に、まず各糖化時間の試作甘酒の10%エタノール抽出原液を用いて実験を行った。その結果、各糖化時間の甘酒の阻害率は70%から90%の高値を示し、糖化に伴うACE阻害活性の変動を明確にすることはできなかった。そこで、この10%エタノール抽出原液の各希釈液を用いて阻害活性の測定を繰り返した。図3の阻害率は、3倍希釈液を用いてACE阻害活性を測定した結果である。糖化4時間の甘酒の阻害率は74.9%であり、この阻害率を図1に示した各種市販甘酒(10%エタノール抽出原液)の阻害率と比較すると、本実験で試作した5分搗き米甘酒は、市販甘酒の3倍強の阻害活性をもつ甘酒と評価できる。

本研究では、最も高い阻害率を示した5分搗き米甘酒(糖化25時間)の10%エタノール抽出原液を用いて阻害活性物質の分離を試みた。Amberlite IR120強酸性陽イオン交換樹脂(H形)を用いた分画、さらにはTOYOPEARL HW-40Fゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて活性物質の分離(図4)を行い、分子量の異なるいくつかの物質が甘酒のACE阻害作用に寄与していることが分かった。今後は、これらの活性物質を各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製し、その化学構造を決定するとともに、ACE阻害作用の強い甘酒の創製についても検討することが望まれる。

謝辞

本研究は平成30年度および令和元年度の卒業研究において行われたものである。本研究を進めるにあたり、実験に取り組んでいただいた村上緋那さん、加古唯穂さんおよび大石桃子さんに厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省, 令和元年(2019)人口動態統計(確定数)の概況, 第6表 性別にみた死因順位(第10位まで)別死亡数・死亡率(人口10万対)・構成割合
https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei19/dl/10_h6.pdf
- 2) 厚生労働省, 平成29年(2017)患者調査の概況
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/index.html>
- 3) 鈴木建夫, 石川宣子, 目黒熙, 食品中のアンジオテンシンⅠ変換酵素阻害能について, 農化, **57**, 1143-1146 (1983)
- 4) 川上 晃, 茅原 紘, 忌部東洋, 只佐弘治, ハーブ水抽出物のアンジオテンシンⅠ変換酵素及びコラーゲン阻害能, 信州大学農学部紀要, **31**, 97-107 (1994)

- 5) 伊澤華子, 青柳康夫, キノコのアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性, 食科工, **53**, 459-465 (2006)
- 6) 吉川真理子, 稲垣宏之, 西村栄作, 橋本萌, 森本遥香, 矢野正一郎, 前田憲寿, 甘酒摂取が肌へ及ぼす効果の検討ーランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験ー, 薬理と治療, **46**, 1841-1849 (2018)
- 7) 森貞夫, 田仲結子, 渡部耕平, 山田美希, 守田稔, 松生恒夫, 酒粕と米麴を使用した甘酒の摂取による便通へ及ぼす効果の検討ーランダム化プラセボ対照並行群間比較試験ー, 薬理と治療, **47**, 759-765 (2019)
- 8) 倉橋 敦, 麴甘酒の成分・機能性・安全性, 生物工学, **97**, 190-194 (2019)
- 9) 志村亜希子, 及川佐枝子, 江崎秀男, HPLC法によるアンジオテンシン変換酵素阻害活性の測定と各種スプラウトの阻害活性, 椋山女学園大学研究論集, **46**号, 71-80 (2015)