

ケフィアニュース

KEFIR NEWS Volume 21. Number 2. (April 1, 2014)

編集・発行者 有限会社中垣技術士事務所 〒593-8328 大阪府堺市西区鳳北町10-39

アロニア果汁の機能成分について

ケフィアニュース Volume 20. Number 2 (August 1 2013)に、アロニア果実の機能性成分の研究を目的として、ブルガリア、日本両国で共同研究を行うためのARA【Aronia Research Association: アロニア研究会(略称: アラ)】を設立したとお知らせしましたが、初代ARA会長の大阪府立大学名誉教授中野長久先生が、昨年10月17日にプロヴディフ医科大学に招かれ“食品に含まれる機能性成分とその健康効果”について講演されました。

本号には、その講演内容から“アロニア果汁の生理機能”についてまとめていただきました。ケフィアニュースの読者の皆様は、これを読まれてアロニア果汁には、いろいろと健康に役立つ成分が含まれていることに驚かれることと思います。

しかし、アロニアジュースにはまだまだ未解明な成分やその働きがあると思いますので、ARAに参加してくださっている先生方の今後の研究に期待しています。

安心・安全の証—有機JAS認証



ドイツに本部を置く有機認証機関CERESが、日本の農水省の委託を受けブルガリアのARONIADA・AGRO LTD.のアロニア農場を調査し、農薬や化学肥料を使用していないオーガニック農場であると認証しました。

さらに同農場で収穫したアロニア果実を原料として食品添加物を使用せず、薬剤汚染の無いように管理された工場で製造しているを確認し、アロニア果汁 100%ジュースをオーガニック食品と認証しました。

冷凍果汁や濃縮果汁ではなく、オーガニック栽培された生果実を搾汁し、シーズンパックしたアロニア果汁 100%ジュースは、安心・安全を保障された天然の機能性飲料です。



ブルガリアの大学で講演する中野先生





大阪府立大学名誉教授・客員教授

大阪女子短期大学 学長

農学博士 中野 長久

[はじめに]

私がアロニア果汁と出会ったのは、大学の先輩である中垣社長との再会がきっかけです。以前からヨーグルトの家庭での作成原点であるケフィアを社会に発信されていたことは良く知っていました。そして私もこのケフィア乳酸菌を利用して時々ヨーグルトを作っていました。そして中垣社長と私が、共に大阪府堺市在住で、私が大阪府立大学で栄養生理学を研究母体として、食品の持つ健康維持機能の研究をしてきたことが、今回表題にもあるアロニア果汁の健康への影響を動物細胞や実験動物のマウスを使って検討する機会をいただいたところからこの話が始まりました。そしてこの実験から得られた結果をもとにして、更にヨーグルトとアロニアエキスを繋げて、これらに含まれる食品成分が健康増進に機能する可能性が大きいという成果について述べたい。

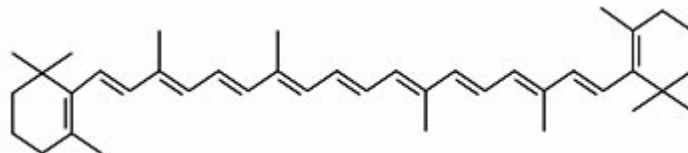
私たちは、生活の中でいろいろなストレスを味わう、食べることさえ身体はストレスと感じていると言えることから、そのストレスを緩和するのも食品成分の役割として存在すると信じています。生活習慣病は、日本人の三大死因である、がん、心臓病、脳血管障害の原因となる、糖尿病、高血圧、動脈硬化などの症状を指し、単純に考えて例えば食べ過ぎたり、偏った、脂肪分の多い、好きなものだけを食べたり、お酒を飲みすぎたり、朝ごはんを抜いたり等、食生活を乱すとそれがすべて私たちの身体はストレスとして感じて、病気の原因となってしまいます。規則正しい食習慣こそが、快いストレスとして生活習慣病を抑制することになります。そしてその過度なストレスを抑制してくれる食品成分が、これから述べるアロニアの身体機能調節因子としての可能性です。さらにこれがヨーグルトとの組み合わせで私たちの健康維持にどのような機能することが出来るかにも触れてみたい。

[アロニアとは]

アロニアが北米原産で、バラ科の灌木植物でその果実はブルーベリーに似た濃紫色で渋味と酸味の強い果汁を含んでいる。アメリカ原産でありながらロシアを経由してヨーロッパに移り、現在はポーランド、ブルガリアで果実生産が行われ、ジュースやジャムとして食卓に供されている。最近、わが国でも北海道、東北地方で栽培が始められている。

実は私は、中垣社長に紹介されるまでアロニアなる植物も果実も知らなかったのが実情である。そしてこの植物が機能性食品として非常に高い可能性を持つことを知りました。すなわち、フラボノイド系のポリフェノールである、ケルセチン、シアニジンが非常に多量

に多量に含まれること、更にカロテノイド系色素である β -カロテンやクリプトキサンチンが含まれることから、これらの成分が私たちの身体能力の調節に大きく寄与していることが考えられる。これらの化合物のヒトの細胞への効果、マウスでの動物実験での影響評価の成果をこの機会に紹介する。



β -カロテン

[ポリフェノールの抗酸化活性]

まず、良く知られているポリフェノール類の抗酸化活性をまず比較すると、アロニアに多く含まれるカロチノイド類の β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、フラボノイド類のケルセチンが高い抗酸化能を示すことがわかる。これらのポリフェノールは他の植物に含まれるレスベラトロール（ぶどう）、クルクミン（ウコン）、フェルラ酸（米ぬか）よりも高い濃度で含まれることを示している。

第1図 ポリフェノール類の抗酸化活性

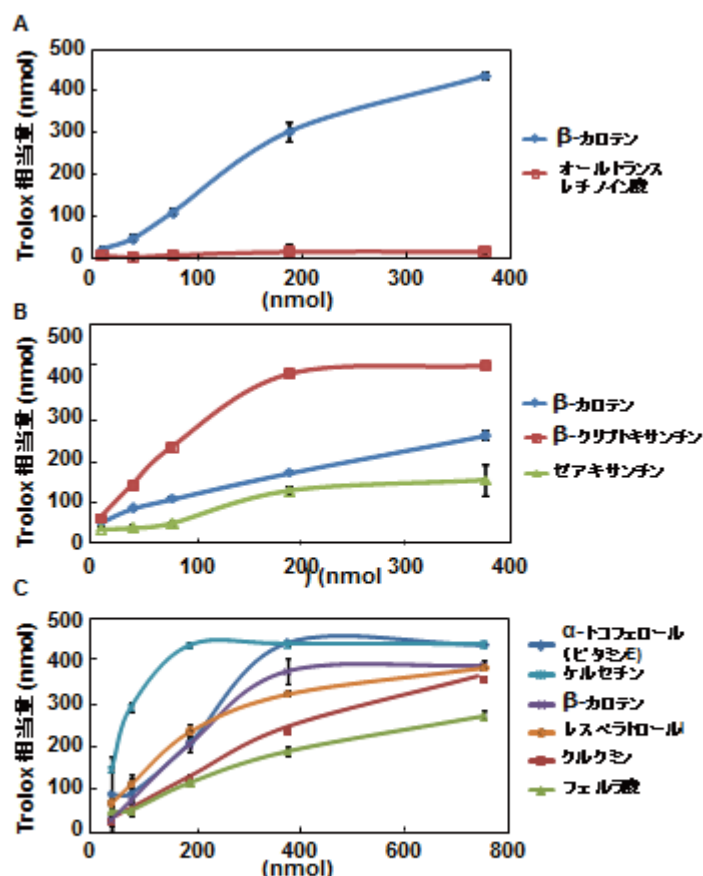


Fig. 5 ABTSを用いたラジカル消滅活性測定
(A) ATTRAと β -Caroteneとのラジカル消滅活性能を比較した。
(B) β -Caroteneと β -Cryptoxanthin, Zeaxanthinのラジカル消滅活性能を比較した。
(C) α -tocopherol, Quercetin, Resveratrol, Curcumin, Ferulic acidと β -Caroteneのラジカル消滅活性能を比較した。

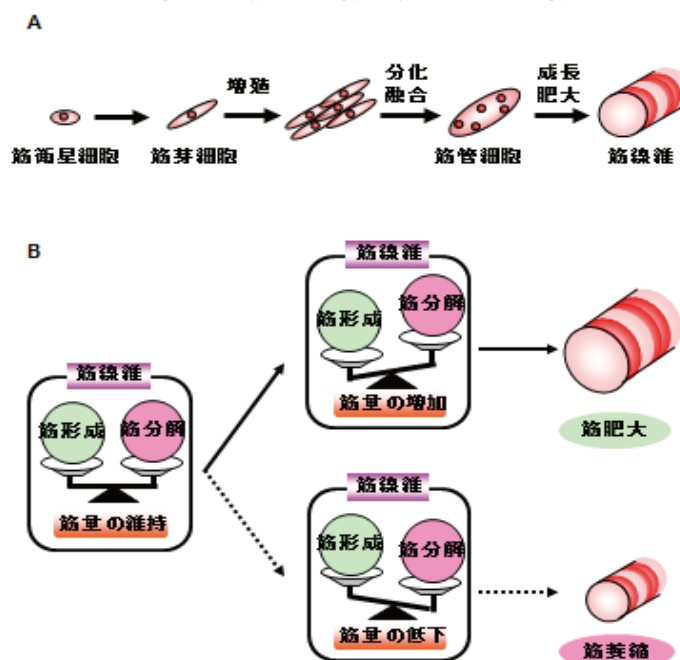
[筋細胞の分化・誘導へのカロテノイドの機能]

私たちが活動するということは、物理的に考えると骨格があり、その骨格に筋肉が腱を介している故に、骨格筋が随意筋として働いてくれて運動が成り立っている。これとは別に平滑筋と心筋を構成する不随意筋がある。骨格筋は姿勢の維持、運動など、物理的機能に加えて、糖の消費、グリコーゲンの合成・分解による血糖値の調節に加えて、アミノ酸（タンパク質）やエネルギーの貯蔵庫としても機能する重要な働きを持つ。男性では体重の約40%、女性は35%を占めるとされる。

私たちが運動不足になったり、寝たきりになると随意筋が極端に衰える。特に老化と共に筋肉量は減少を続け、筋力の著しい低下となって顕在化する。このような低下した筋力の回復を進めるためにはリハビリ期間を必要とする。加齢に伴い筋タンパク質の合成能が低下して、筋タンパク質の分解が大きくなると、物理的機能の低下だけでなく、先に述べたように代謝機能の低下が進み、著しい生活の質（QOL）の低下が引き起こされることになる。

筋肉細胞の分化・成長は筋衛星細胞から筋芽細胞を経て細胞融合から筋管細胞となり成長肥大して筋繊維を形造る（第2図A）。後でも述べるが、この筋肉の生成と分解は下図Bに示すように、私たちの筋肉組織は、筋形成（筋タンパク質合成）と分解のバランスが保たれているから昨日の顔と今日の顔は変化しないと言える。酸化ストレスなどにより分解が進むと廃用性筋萎縮や老化の進行に繋がる。このバランスの持続に大きく関与するのが、ビタミンA群レチノイン酸（RA）であり、最近私たちが明らかにした β カロテノイド化合物である。

第2図 筋肉組織の筋形成と分解

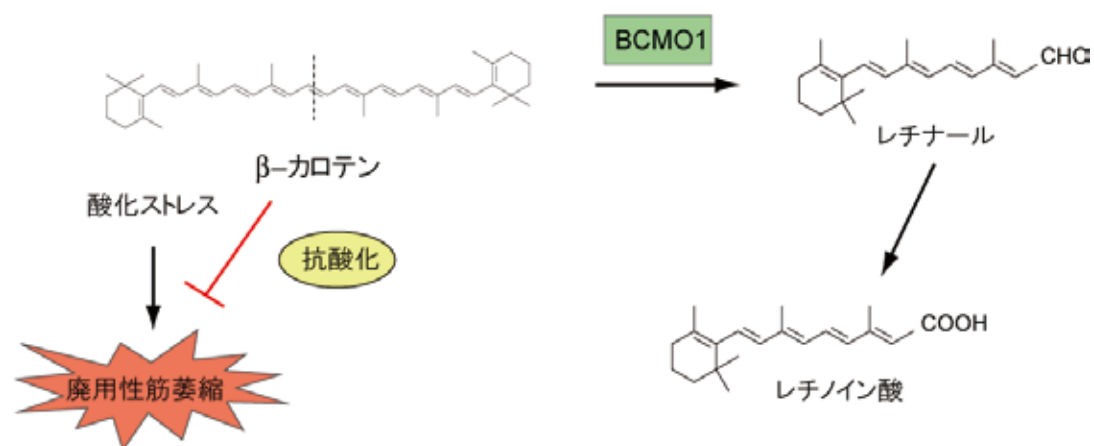


筋繊維とは（A）筋繊維は筋芽細胞が分化・融合して多核化して筋管細胞が形成・成長肥大化することで形成される。（B）筋繊維の筋形成と分解のバランスが崩れると筋肥大や筋萎縮が進行する。

カロテノイド類は植物に含まれる色素化合物の総称で、自然界には600種以上が見出されている。抗酸化機能もあり、私たちの身体には、 β -カロテン、リコペン、 β -クリプトキサンチン、ゼアキサンチンなど10種類くらいのカロテノイドが見出され、抗酸化作用と共にビタミンAのプロビタミン作用が良く知られている。カロテノイドは小腸、肝臓、腎臓、脳、胃、精巣、網膜色素上皮に認められる開裂酵素によって、ビタミンA（レチナール）が生成して機能する。レチノイド（ビタミンA誘導体）は生体内では、視神経刺激伝達に機能することは古くから知られている。最近ではさらに、器官発生など細胞核支配の形態形成制御、細胞の分化増殖制御という私たちの生命制御に関わる機能に強く関与していることが明らかになってきている。このビタミンAは前述したように、植物しか生成できないカロテノイドから、私たちの体内でビタミンに変換されて多岐にわたる機能を発揮している。アロニアはこのカロテノイドを多量に含み、特に、 β -カロテンと β -クリプトキサンチンが主に含まれ、レチノイドの供給源になっている（第3図）。

第3図 β -カロテンはレチノイン酸を誘導

β -カロテンの抗酸化活性とプロビタミンA活性



(Ogawa M., Kariya Y., Kitakaze T. et al., *Br J Nutr.*, 2013)

β -カロテンのプロビタミンAとしての機能に着目

骨格筋は全身に分布する組織であり、前述したように人の体重の35－40%を占める。骨格筋は運動器としての働きだけでなく姿勢の保持や糖の取り込み、脂質代謝も担っている。そのため、加齢や寝たきりなどにより骨格筋が萎縮すると、運動機能の低下はもちろん、肥満や糖尿病などの代謝疾患のリスクが上昇するなど、生活の質が大きく低下することは自明となっている。そのことから、骨格筋の萎縮を抑制または、骨格筋を増強させることは生活の質の向上のために重要となる。骨格筋は筋芽細胞が増殖し、分化・融合することで多核の筋管細胞となり、それがさらに成熟することで、骨格筋を構成する筋繊維になるといった特徴的な筋分化過程を経る。骨格筋形成に関する研究の多くは筋芽細胞が筋管細胞へと分化する過程が促進されるかどうかを評価している。そこで私達も筋芽細胞の筋管細胞への分化を

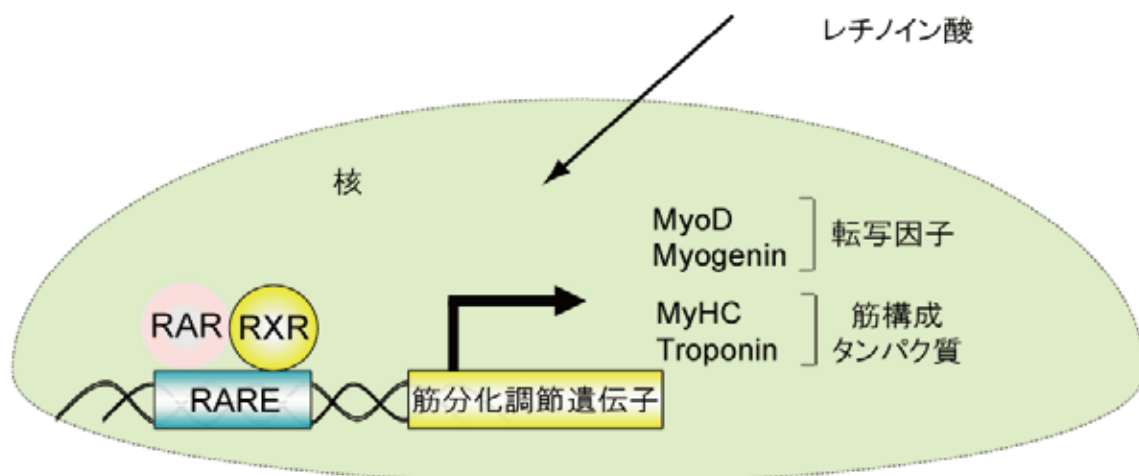
筋形成の促進と評価して、以前の研究で、骨格筋の萎縮を抑制するといった観点から、抗酸化作用をもつ β -カロテンに着目し、坐骨神経の切除により廃用性筋萎縮を誘発させたマウスの筋萎縮を抗酸化作用により抑制することを見いだした。 β -カロテンには抗酸化作用のほかに小腸粘膜細胞などに存在する酵素によって2分子のレチナール(ビタミンA群)に変換され、さらにレチノイン酸に変換されるといったプロビタミンAとしての作用も持つことはすでに述べた。私達はこのプロビタミンA作用に着目し、骨格筋における β -カロテンの影響を検討した。

レチノイン酸は活性型ビタミンAであり、発生や細胞の分化、増殖に関わる。また、レチノイン酸は核内受容体であるレチノイン酸受容体 (RAR) や、レチノイドX受容体 (RXR) のリガンド (結合体) として機能し様々な遺伝子の発現を調節する(第4図)。骨格筋においてもレチノイン酸はこれらの受容体を介して筋分化に関わる転写因子であるMyoDやMyogenin、筋構成タンパク質であるMyHC、Troponinの発現を亢進することが報告されている。

実際マウス筋芽細胞株であるC2C12細胞にオールトランスレチノイン酸 (ATRA、図中にはレチノイン酸と表示) を添加し、蛍光免疫染色法により、筋分化マーカーであるMyHC (筋構成タンパク質) の発現を検討したところATRAの濃度依存的にMyHCを発現した細胞の割合が増加した。また、筋芽細胞が筋管細胞へと分化すると多核化することから、DAPIで染色された核のうち、MyHCの発現した細胞内の核の割合を数値化したもので、fusion indexもATRAの濃度依存的に増加した。

第4図 レチノイン酸は筋形成を促進

レチノイン酸の受容体を介した作用



レチノイン酸は活性型ビタミンAであり発生や細胞の分化・増殖に関わる

核内受容体であるレチノイン酸受容体(RAR)やレチノイドX受容体(RXR)のリガンドとして機能し遺伝子の発現を調節する

骨格筋においては、未分化の細胞の筋細胞への分化や脂質代謝に関わる

このことから、 β -カロテンは抗酸化作用による筋萎縮の抑制だけでなく、プロビタミンAとしてRARを活性化し筋形成の促進にも寄与することが示唆されたので、次に β -カロテンを用いて筋分化に及ぼす影響を検討した。その結果、 β -カロテンはATRAと同様に濃度依存的に筋管形成を促進しfusion indexを増加させた。また、タンパク質レベルでも、 β -カロテンの濃度依存的に筋分化マーカーの発現が上昇し、mRNAレベル（遺伝子レベル）でも筋形成に関連する転写因子であるmyogeninや筋形成促進因子であるIGF-1の発現を上昇させた。また一方で筋形成抑制因子であるmyostatinの発現を減少が認められた。そこで、次に β -カロテンによる筋分化促進作用が、RARを介したものを評価するために、RARの転写活性をルシフェラーゼ活性として測定できるレポーターアッセイを用いてRAR活性を測定した。

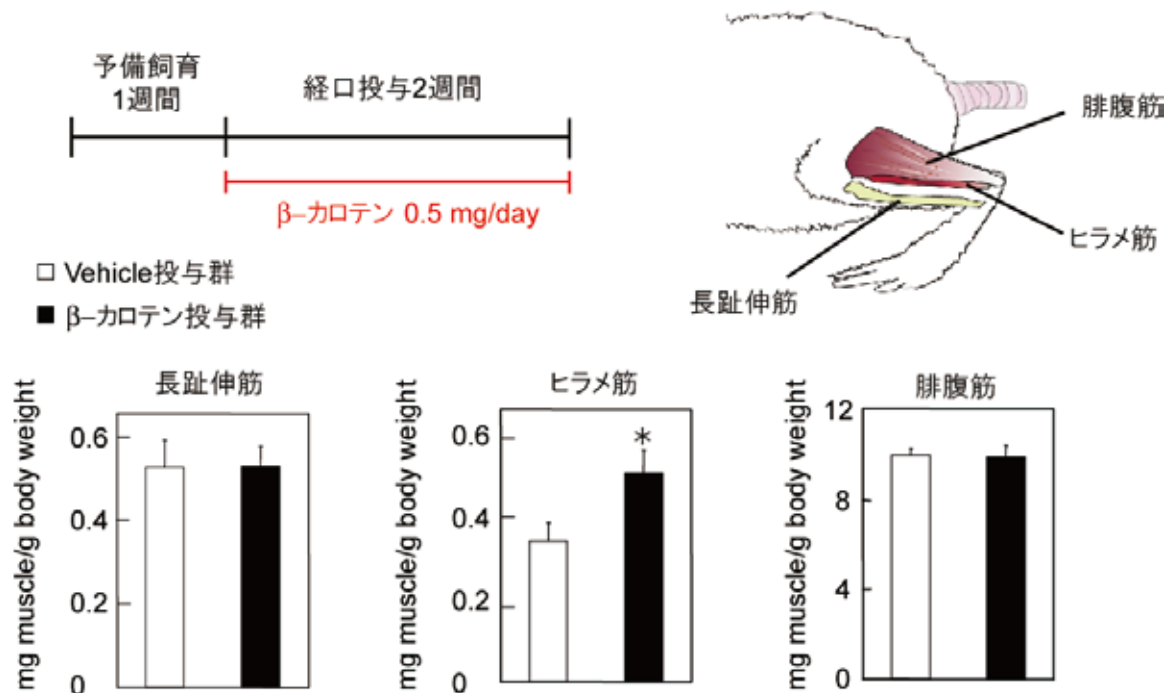
その結果、 β -カロテンの濃度依存的にRAR活性は上昇し、RARのアンタゴニストであるAGN193109（AGN）で処理するとAGNの濃度依存的にRAR活性は低下し、 β -カロテンによる筋分化促進もAGNの濃度依存的に抑制された。このことから、 β -カロテンはRARを介して筋分化を促進していることが明らかとなった。

さらにAGNを10 nM添加した際の、こちらのATRAと β -カロテンのRAR活性の違いに着目した。まず、AGNを添加する前のATRA 10nMと β -カロテン10 μ MのRAR活性は同程度であるので、もし β -カロテンによるRAR活性の上昇が β -カロテンがATRAに変換されることによる上昇ならば、AGN 10 nMの添加では β -カロテンによるRAR活性はATRAと同様に減少しないはずである。しかし、この結果でAGN 10nMの添加により、 β -カロテンによるRAR活性の上昇は阻害された。このことから、 β -カロテンによるRAR活性の上昇は、 β -カロテンから変換された、10nM以下のレチノイン酸と β -カロテン自体の関与による協奏的に発現するRAR活性であることが強く示唆された。また、低濃度のAGNにより活性が低下したことから β -カロテンのRARに対する親和性はATRAやAGNより低いことが考えられる。

そこで β -カロテン自体がRARを活性化させるかどうかを検討するために、 β -カロテンを2分子のレチナールに変換する酵素であるBCMO1をsiRNAを用いてノックダウンした状態でのRAR活性を測定した。その結果、BCMO1のノックダウンの有無に関わらず β -カロテンによりRAR活性は上昇し、また、BCMO1のノックダウンが筋分化に及ぼす影響を検討したところ、BCMO1のノックダウンの有無に関わらず β -カロテンにより筋分化は促進された。以上の結果から、 β -カロテンはレチノイン酸に変換されなくとも細胞核内でRARを活性化し筋分化を促進していると考えるのが妥当であると明らかになった。

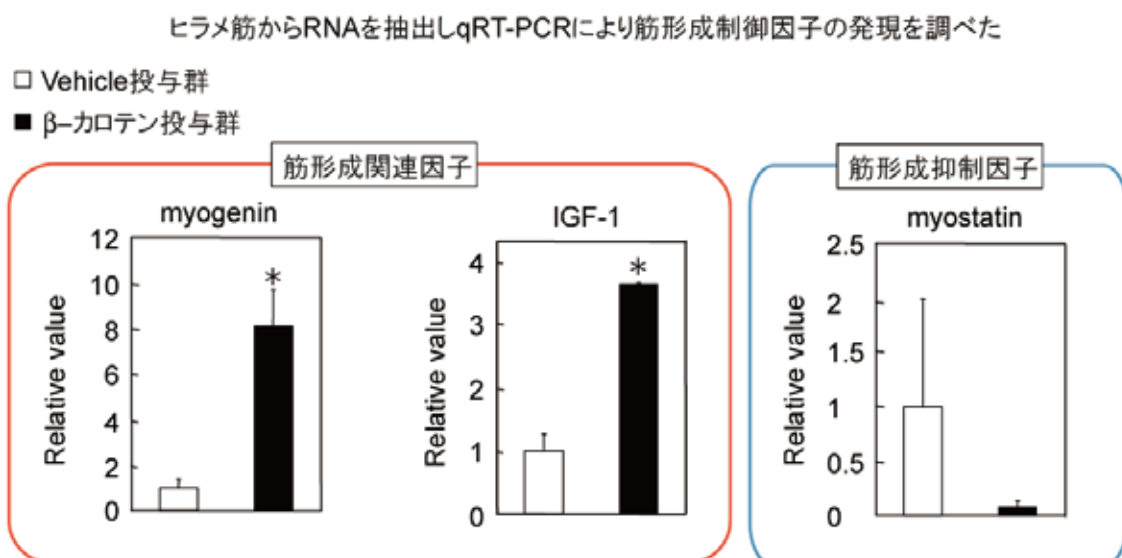
最後に、 β -カロテンによる筋形成促進効果がin vivo（生物体内で）においても効果が発揮されるかを検討するため、マウスに β -カロテンを1日あたり0.5mgずつ2週間投与した後に、マウスの後ろ肢から骨格筋を単離し筋重量を測定した。その結果、長指伸筋やヒフク筋では β -カロテン投与によって重量に変化がみられなかったが、遅筋タイプの筋肉であるヒラメ筋で β -カロテン投与群で筋重量が有意に増加した（第5図）。

第5図 β -カロテンの投与により骨格筋増加
マウスの骨格筋に及ぼす β -カロテンの影響



また、重量の増加したヒラメ筋からRNAを抽出し筋形成制御因子の発現を検討したところ、筋形成の促進に関わるmyogenin 1 やIGF-1の発現量が有意の増加し、一方で筋形成抑制因子であるmyostatinの発現は有意な差はなかったものの減少していた（第6図）。

第6図 β -カロテン投与による筋形成抑制因子への影響
マウスのヒラメ筋に及ぼす β -カロテンの効果(mRNA)



β -カロテンの摂取により筋形成促進因子の発現は上昇し、一方で筋形成抑制因子の発現は減少した

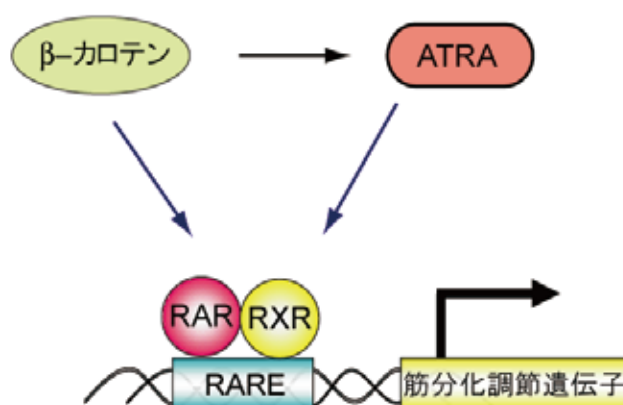
以上をまとめると下図のようになる。即ち、 β -カロテンにより筋形成は促進され、 β -カロテンはレチノイン酸に変換されなくとも β -カロテン自体でRARを活性化することが明らかになり、 β -カロテンを投与することでヒラメ筋の筋形成調節因子の発現が変化し、筋重量を増加させることが可能であることが分かった（第7図）。

第7図 β -カロテンの筋形成の促進

β -カロテンにより筋形成は促進された

β -カロテンはレチノイン酸に変換されなくとも β -カロテン自体でRARを活性化することが示唆された

β -カロテンを投与することでヒラメ筋の筋形成調節因子の発現が変化し、筋重量が増加した



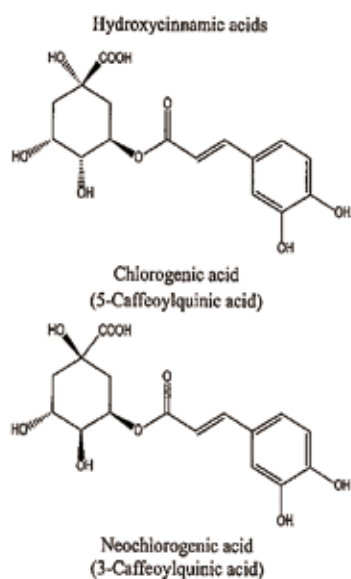
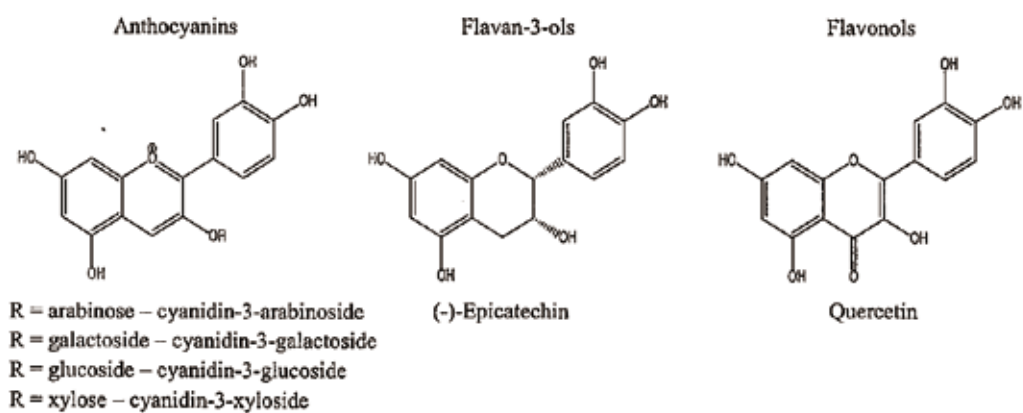
アロニア果汁には、 β -カロテン、 β -クリプトキサンチンが多く含まれ、これらが細胞の核内に入り、直接図中のRXRに結合して、あるいは酵素によりRA（レチノイン酸）となってRAR（レチノイン酸受容体）に結合して活性化を受け、骨格筋の分化を促進して、老化に伴う筋力の低下を抑制する。また、筋肉タンパク質の分解系をも抑制する機能も備えている可能性も最近の研究から示されつつある。

【フラボノイド類、イソフラボノイド類の生理機能】

アロニア果汁には、アントシアニン、エピカテキン、ケルセチンなどのフラボノイド化合物が多量に含まれる。例えば、ケルセチンは玉ねぎに含まれる化合物である。またこれらの化合物は、大豆類に含まれるイソフラボン類のダイゼインなどと構造類似体である。第8図にその化合物群の構造を大豆に含まれるイソフラボンと共に示す。そして、大豆のイソフラボン、ダイゼインは第9図に示すように、腸内細菌の酵素反応によりエクオール（S-Equal）に変換されることを見出した。そしてアロニアに含まれるケルセチンと大豆ダイゼインとエクオールを用いて、マウスのすい臓細胞INS-1細胞（インスリン分泌能を示す）に投与して、これらのポリフェノールの生理効果を見たところ、濃度に依存してグルコース投与に感能してインスリンの分泌が認められた（第10図）。またこの時の添加量は非常に低濃度で効果を示すことが明らかになった。またこれらのポリフェノールは、細胞の増殖も促進する可能性が認められた。すなわち、これらのポリフェノール類には、生活習慣病の予防効果がある

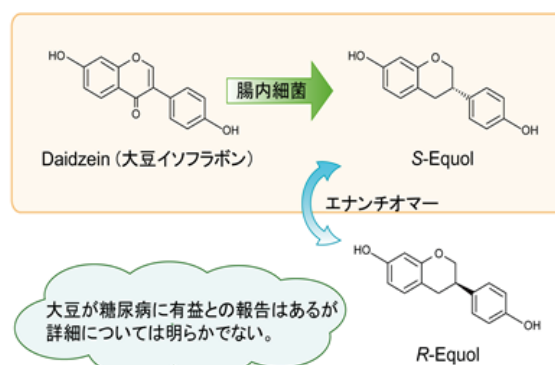
とを示すと考えられる。

第8図 アロニアジュースに含まれる主なポリフェノール類

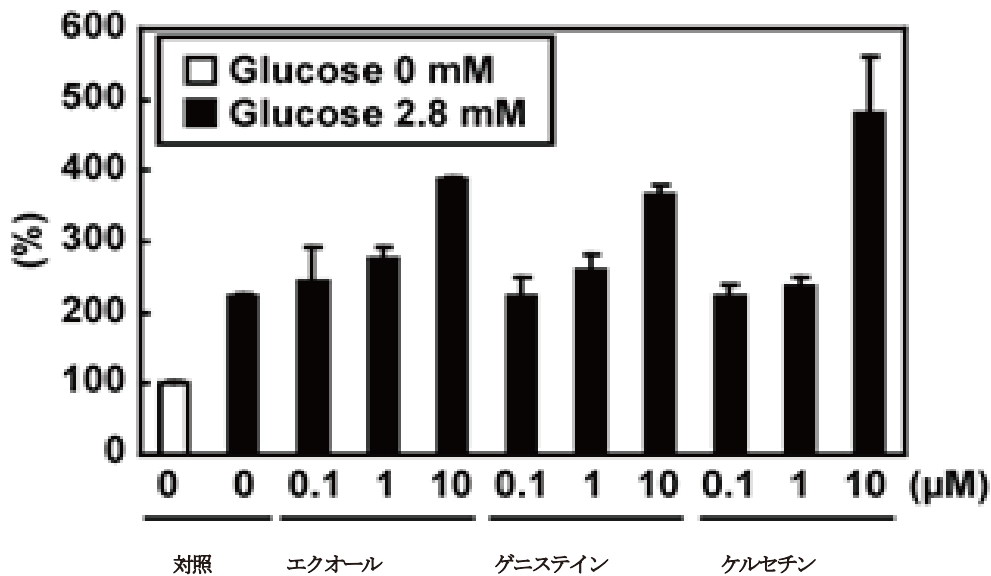


第9図 大豆イソフラボン(ダイゼイン)の構造と腸内変換

Equolについて



第10図 ポリフェノール類によるインスリン分泌



私たち動物界に属する生物群はすべて、アロニアを始めとして植物に直接、間接的に依存して生命を維持している。最近はそのだけでなく、生活習慣病の発病を抑制する効果もあることが明らかにされつつあり、それがフェノール性化合物に大きく依存していることも分かっている。さらにこれらの化合物がどのようなメカニズムで私たちの身体で老化を抑制したり、疾病から予防しているかが研究対象となり、遺伝子のレベルから明らかになってきている。

アロニアジュースにはここに述べたポリフェノール類よりもずっと多くの種類の化合物が含まれ、多分、多様な機能を私たちの身体に及ぼしていることは確実であり、すでにブルガリアの医学部の先生方が、栄養調査で肥満、糖尿病、高血圧、ガンなどを抑制する多様な生理機能があることを示している。私たちが行った分子的、遺伝子的な分野での純粋の化合物での実験成果も類似の機能があることを示しているので、今後、アロニアジュースの成分分析からそれ自身の化合物による研究を進めることが望ましい。

【要約と考察】

(文責：中垣剛典)

中野先生はアロニア果汁の生理機能のうち、次の3点を重点的に説明されました。

1) 抗酸化作用

第1図は、アロニア果汁に含まれているポリフェノール類、すなわちβ-カロテン、β-クリプトキサンチン、ケルセチンの抗酸化力が、他の植物に含まれているポリフェノールよりも強いことを示しています。

2) β-カロテンの筋形成の促進作用

β-カロテンの筋形成作用を説明する前に、サルコペニアという言葉を紹介します。

高齢になるに伴い筋肉量が減少していく現象をサルコペニアと言います。筋肉量は30歳頃がピークであり、その後加齢とともに低下します。サルコペニアは高齢化が進む日本で深

刻な健康問題です。例えば**四肢体幹の筋肉、嚥下筋、呼吸筋のサルコペニアが進めば、それぞれ寝たきり、嚥下障害、呼吸障害**となります。

ところが、中野先生はアロニア果汁が筋肉組織の分化と筋肉の増加に役立つと述べています。私たちの筋肉組織では、筋肉タンパク質の合成と分解が常に行われており、そのバランスが保たれています。活性酸素などの酸化ストレスによってバランスが崩れ分解が進むと老化が起こるのですが、アロニア果汁に含まれる β -カロテンは筋肉タンパク質の合成を促進すると述べています。

第2図に筋肉組織の筋の形成と分解のメカニズムを示しています。

第3図には β -カロテンの抗酸化力によって筋肉の委縮（老化）防ぎ、同時に β -カロテンは酵素によりレチノイン酸（活性型ビタミンA）に変換され、

第4図に示すようにレチノイン酸が筋分化調節遺伝子に作用して筋構成タンパク質を合成します。これらの結果を要約すると、 β -カロテンは抗酸化作用による筋委縮の抑制だけでなく、活性型ビタミンAとなって筋形成の促進にも寄与しています。

更に、中野先生はご自分で行った動物実験の結果から、 β -カロテンはレチノイン酸に変換されなくとも細胞内でレチノイン酸受容体（RAR）を活性化し、筋分化を促進していると述べています。

第5図には、生体内（in vivo）でも β -カロテンが筋形成促進効果を発揮しているかどうか検証した実験結果を示しています。第5図を見ると、マウスに β -カロテンを1日あたり0.5 mgずつ2週間投与したのち、マウスの後脚から骨格筋を単離し、筋重量を測定すると、遅速タイプの筋肉であるヒラメ筋は増加しました。

第6図では、 β -カロテンは筋形成促進因子の発現を増加させるが、筋形成抑制因子の発現を減少させることがわかります。

第7図は、 β -カロテンが筋形成を促進することを総括的に示しています。

すなわち、 β -カロテンにより筋形成は促進され、 β -カロテンはレチノイン酸に変換されなくとも β -カロテン自体でレチノイン酸受容体（RAR）を活性化して、筋形成促進因子の発現によって、筋重量が増加します。

これらの結果から、アロニア果汁は β -カロテン、 β -クリプトキサンチンなどのポリフェノールが多く含まれているので、これらのポリフェノールが骨格筋の分化を促進して、老化に伴う筋力の低下を抑制できることを示しています。つまり**アロニア果汁の飲用によって、サルコペニアの進行を抑制できる**可能性が示唆されています。

3) ケルセチンによるインスリン分泌

第8図に示したポリフェノール、すなわちアントシアニン、ケルセチンはなどいずれもフラボノイドに属します。第9図に示すように大豆のイソフラボン（ダイゼイン）が腸内細菌によってエクオールに変換されますが、エクオールに変換されると生理活性が高まることがわかっています。この例に見るようにフラボノイド類の生理活性は腸内細菌が依存しているので、アロニア果汁をケフィアやヨーグルトなどの発酵乳と一緒に食べることは合理的です。

第10図は**アロニア果汁に含まれているケルセチンがインスリンの分泌を促す**ことを示しています。この結果はアロニア果汁の飲用によって血糖値が下がり糖尿病の改善に役立ったというブルガリアの研究者等の臨床結果を裏付けるものであると考えられます。