

<平成 30 年度助成>

ヒハツモドキの特徴香によるストレス緩和や 脂肪蓄積抑制作用に関する基礎的研究

和田 浩二・大江 萌那・高良 健作・新垣 美香・高橋 誠
(琉球大学 農学部)

1. 背景および目的

ヒハツモドキ (*Piper retrofractum* Vahl) は東南アジア原産で、インドネシアやマレーシアで栽培されているコショウ属の植物である。日本では亜熱帯地域に位置する沖縄でのみ栽培されており、地元ではピパチ、ピパーツなどと呼ばれ、古くから香辛料として用いられてきた¹⁾。また、その加工法も乾燥、蒸し、焙煎と様々で、さらに未熟果や適熟果を生でおろして料理に利用する場合もあり、他の香辛料とくらべ、多様な食品に香りを利用できることが期待されている。一方、最近、食品の香りには抗ストレス作用、プルーセント効果といった脳機能の調節や記憶の維持に関わる新たな機能が注目されている^{2,3)}。特にストレスは、生体内の抗酸化活性の低下、肥満や動脈硬化症のようなメタボリックシンドロームを引き起こすことが指摘されているため、ストレスの緩和や低減が将来的にも重要な課題となっている。そこで本研究では、まずヒハツモドキのもつ香りのヒトの嗅覚への寄与を評価するために、におい嗅ぎ-GC (GC-O) により香りを構成する成分の質と強度を評価した。さらに、ヒハツモドキの香りの濃縮物である精油の香りが、急性ストレスの抑制効果およびストレスが誘発する活性酸素や脂肪蓄積に与える影響について分析した。

2. 材料および方法

2-1. ヒハツモドキの香気特性の解析

(1) 試料の調製および官能評価

琉球大学農学部亜熱帯フィールド科学教育研究セ

ンターで栽培・収穫した未熟果穂（緑色）18 g を天日乾燥後、120 °C で焙煎し電動ミルで粉碎した粉末を試料とした。官能評価は 8 名のパネリストにより言葉出した 6 項目、「グリーン」、「ウッディ」、「スパイシー」、「コショウ」、「甘い」、「酸っぱい」について、1（弱い）、2（やや弱い）、3（普通）、4（やや強い）、5（強い）の 5 段階で点数化した。全パネリストの評点の平均値を算出し、ヒハツモドキ試料の香りの特徴を解析した。

(2) 香気濃縮物の調製および香気成分分析

ヒハツモドキ試料をジクロロメタン（100 mL）に 1 時間浸漬して香気成分を抽出した。次に、本抽出物から高真空香気蒸留装置を用いて揮発性成分を分画後、濃縮して香気濃縮物 0.2 g を得た。得られた香気濃縮物を GC および GC/MS に供した。

(3) Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) による香気寄与成分の探索

ヒハツモドキの香気寄与成分について、AEDA 法により分析した。すなわち、調製した香気濃縮物をエタノールで 2ⁿ 倍ずつ希釈して GC-O 分析を行い、得られた Flavor Dilution (FD) 値を用いてアロマグラムを作成した。

2-2. ヒハツモドキ精油がマウスのストレス および脂質代謝に与える影響

(1) 供試材料および試料

ヒハツモドキ未熟果穂の乾燥物から日本薬局方の精油定量法⁴⁾を参考に精油の抽出を行い、得られた精油を動物実験の試料として用いた。

(2) 実験動物・配合飼料

C57BL/6J 系統のマウス（7 週齢、雄）を実験に

用いた。マウス導入後5日間は25℃、水および標準飼料を自由摂取させる条件で馴化した。標準飼料(ND)にはCE-2(日本クレア、水分8.7%;粗タンパク質25.1%;粗脂肪4.5%;炭水化物49.7%)、高脂肪飼料(HD)はHFD-32(日本クレア、水分6.2%;粗タンパク質25.5%;粗脂肪32.0%;炭水化物29.4%)を用いた。

(3) ストレス負荷および精油暴露方法

マウスを金網に密着状態で包み込むことで、ストレスを負荷した(拘束ストレス法)。また、動物搬送用の密閉ボックス(W 30 cm × D 60 cm × H 10 cm)内の中央に精油0.5%(+)または2.5%溶液(++)を浸み込ませたろ紙(50 mm)を置き、その後密閉してボックス内に香気雰囲気を作成し、精油暴露とした。

(4) ストレス試験のデザイン

本ストレス試験ではND給餌でストレス負荷なし(1. ブランクND)、HD給餌でストレス負荷なし(2. ブランクHD)、HD給餌でストレス負荷あり(3. コントロール)、HD給餌でストレス負荷と精油暴露あり(4. サンプル(+))および5. サンプル(++))の計5群(n=5)を設定した(図1)。マウスはSDまたはHDを17日間摂取させるとともに、サンプル群については給餌15日目より1時間の精油暴露(3

日間)を行った。試験最終日には精油を暴露後、さらに暴露状態で1時間のストレス負荷を実施(コントロールはストレス負荷のみの実施)し、ストレス負荷終了から30分後に安楽死させ、得られた血清よりストレスマーカー(コルチコステロン)の測定を行った。また、脂肪組織(腹壁および精巣上体)の摘出を行い、全重量、抗酸化活性(ABTS法)および脂肪細胞分化・糖代謝・エネルギー産生に関わる遺伝子群についてmRNA発現量をリアルタイムPCR装置により測定した。

3. 結果および考察

3-1. ヒハツモドキの香気特性

パネリストによる官能評価の結果、6つの用語の評価項目の中で最も評点が高かった項目は「スパイシー」であり、さらに「コショウ」、「甘い」が続いた(図2)。したがって、これらの官能特性がヒハツモドキの特徴的な香りのひとつと考えられた。次に、ヒハツモドキ試料をGCおよびGC/MS分析し、73成分を同定した。主要成分は、germacrene D(15.5%)、 β -bisabolene(10.0%)、 β -elemene(9.4%)、 β -caryophyllene(8.9%)、 α -humulene(8.1%)であり、炭化水素類が94.4%を占めていた。

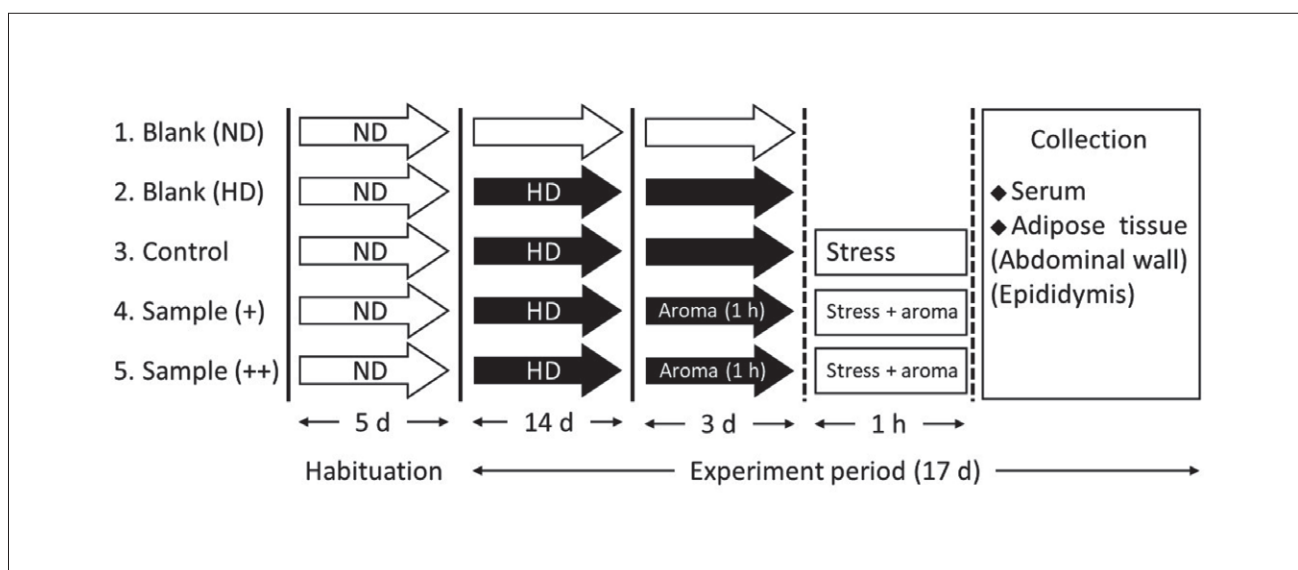


図1 ストレス試験のタイムスケジュール
ND, 標準飼料; HD, 高脂肪飼料
Sample (+), 0.5% 精油暴露群; Sample (++), 2.5% 精油暴露群

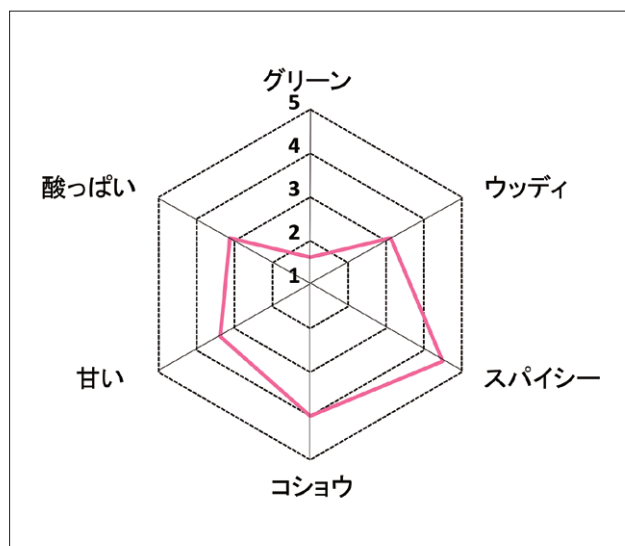


図2 ヒハツモドキ乾燥加工粉末の官能評価
1, 弱い; 2, やや弱い; 3, 普通; 4, やや強い; 5, 強い

次いでアルコール類が1.4%と多く、その中で linalool が1.3%含まれていた。また、3-phenylpropionic acid、methyl 3-phenylpropanoate、(*E*)-cinnamaldehyde などのフェニルプロパノイドが同定され、5,6-dihydro-2(*1H*)-pyridine-2-one、3 α ,4 α -epoxy-2-piperidone といったフェニルプロパノイド由来と推定される環状アミドも含まれていた。一方、AEDA 法により香気寄与成分を探索した結果、FD 値 16 から 512 の範囲で 26 成分のにおいを検知し、FD 値 128 以上の成分を A-H のアルファベットで図3に示した。最

も高い FD 値 512 を示したピーク A は、フローラルの linalool であった。FD 値 256 ではカaramel様の furaneol (ピーク H)、FD 値 128 では樟脳様の isoborneol (ピーク B)、クローブ様の未知成分 (ピーク C)、フローラルの geraniol (ピーク D)、スモークの guaiacol (ピーク E)、ファッティの tetradecenal (ピーク F)、メタリックの (*E*)-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (ピーク G) のにおいを検知した。以上の結果より、ヒハツモドキの甘い香りには furaneol、コショウには isoborneol、スパイシーには guaiacol と未知成分 (ピーク C) がそれぞれ寄与していることが示唆された。なお、本研究助成で実施したヒハツモドキ未熟果穂加工品の物理化学的特性やヒハツモドキ葉の香気特性の分析については、著者らの研究成果^{5,6)}を参照していただきたい。

3-2. ヒハツモドキの血清中ストレスマーカーおよび抗酸化活性に対する影響

本報告では紙面の都合上、ストレスと精油暴露の関係について報告する。急性ストレス負荷では、ブランク(HD)に対して有意な増加を示したコントロールに対し、精油を暴露したマウスは濃度依存的にコルチコステロン濃度が低下し、2.5% 溶液で有意差を示した (図4A)。一方、血清 ABTS ラジカル消去活

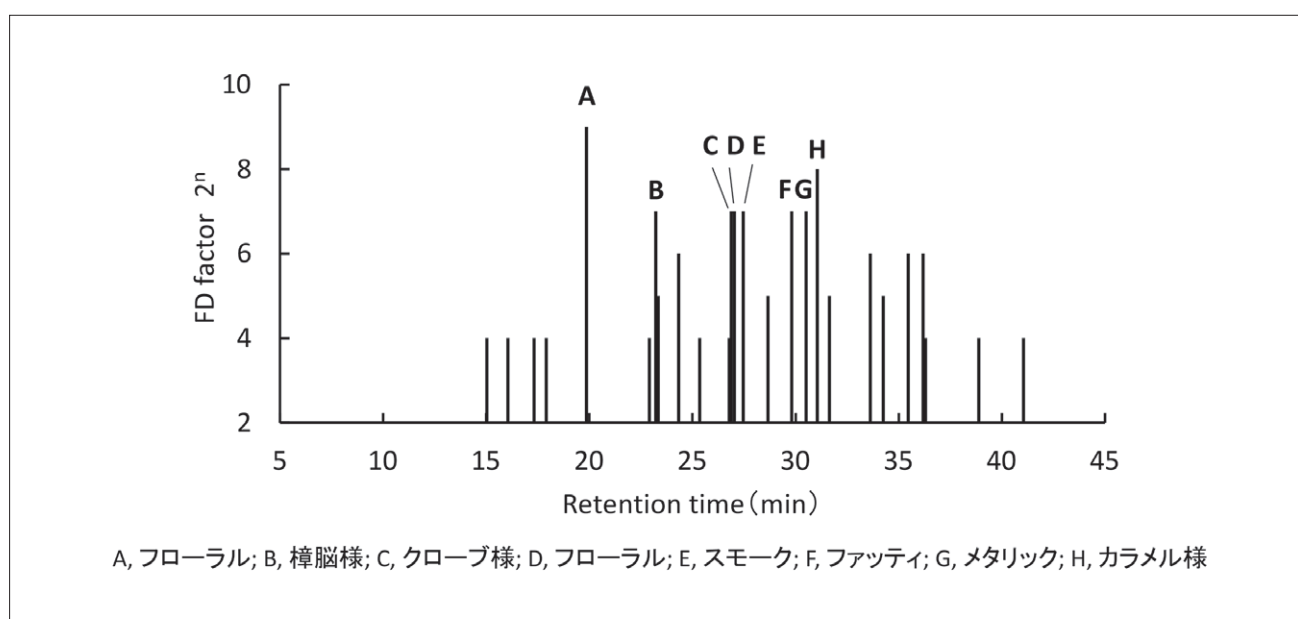


図3 ヒハツモドキ乾燥加工粉末のアロマグラム

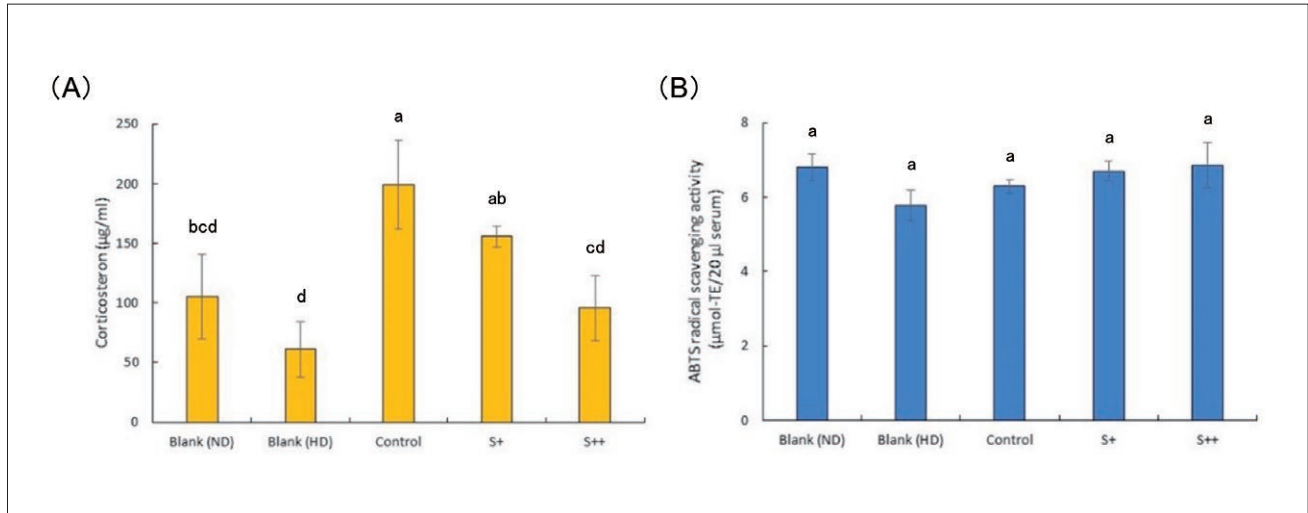


図4 ストレス試験マウスの血清中コルチコステロン濃度 (A) および抗酸化活性 (B)
S (+), 0.5% 精油暴露群; S (++), 2.5% 精油暴露群
異なるアルファベットは有意差あり ($P < 0.05$, Tukey's test)

性については、高脂肪摂取で若干の抗酸化活性値の減少を示したものの、本試験では全群において有意な変化はなかった (図 4B)。したがって、ヒハツモドキ精油の香りは嗅覚を通じて単回ストレスに対する抑制効果を示すことが示唆された。なお、著者ら^{7,8)}は黒糖を試料として、その抗酸化活性とストレス低減の関連や寄与成分を報告しており、ヒハツモドキ精油についてもさらなる研究展開が期待できる。

3-3. ヒハツモドキの脂肪蓄積および脂肪細胞に対する影響

17 日間の摂餌期間において、ブランク (HD) のマウスはブランク (ND) に比べて、腹壁および精巣上体脂肪重量の増加 (腹壁および精巣上体: $P < 0.01$) を示したが、単回ストレス負荷や精油暴露による各脂肪組織の有意な変化は見られなかった。そこで脂肪組織において、脂肪細胞分化・糖代謝・エネルギー産生に関係する因子の mRNA 発現を解析した。その結果、脂肪細胞分化に関わる PPAR γ の mRNA 発現は、腹壁および精巣上体においてコントロールに比べてサンプル群 (++) で上昇した (図 5A-1、2)。糖代謝 (Adipoq: 図 5B-1、2) および糖取込み (GLUT4: 図 5C-1、2) の発現には相関性が報告⁹⁾されているが、本試験ではそのような相関は示されなかった。しかし、サンプル群 (++) は脂肪の蓄積

部位によって異なる mRNA の発現を示し、糖代謝では精巣上体、糖取込みでは腹壁において発現上昇を示した。エネルギー産生に関わる UCP-2 は腹壁ではストレスによって有意な発現低下を示したが、サンプル群ではその低下を抑制した (図 5D-1、2)。

以上のことから、精油の暴露に着目すると、腹壁においてはコントロールと比べて脂肪細胞分化誘導、糖取込みおよびエネルギー産生に関する遺伝子発現の上昇が認められた。精巣上体については、コントロールと比べて脂肪細胞分化誘導、糖代謝に発現の上昇が示された。また、精油暴露は脂肪組織重量に影響を示さなかったが、これらの遺伝子発現の上昇は脂肪代謝に関与する可能性が考えられた。本研究において、ヒハツモドキの精油はストレスやメタボリックシンドロームの抑制・予防効果を示す可能性が見出されたことから、今後はヒハツモドキ精油のストレスおよび脂肪蓄積の低減に関連する香り成分を特定することで、ヒハツモドキ香気の機能性について、作用機序を含めて明らかにできるものと期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団および関係者の皆様に御礼を申し上げます。また、官能評

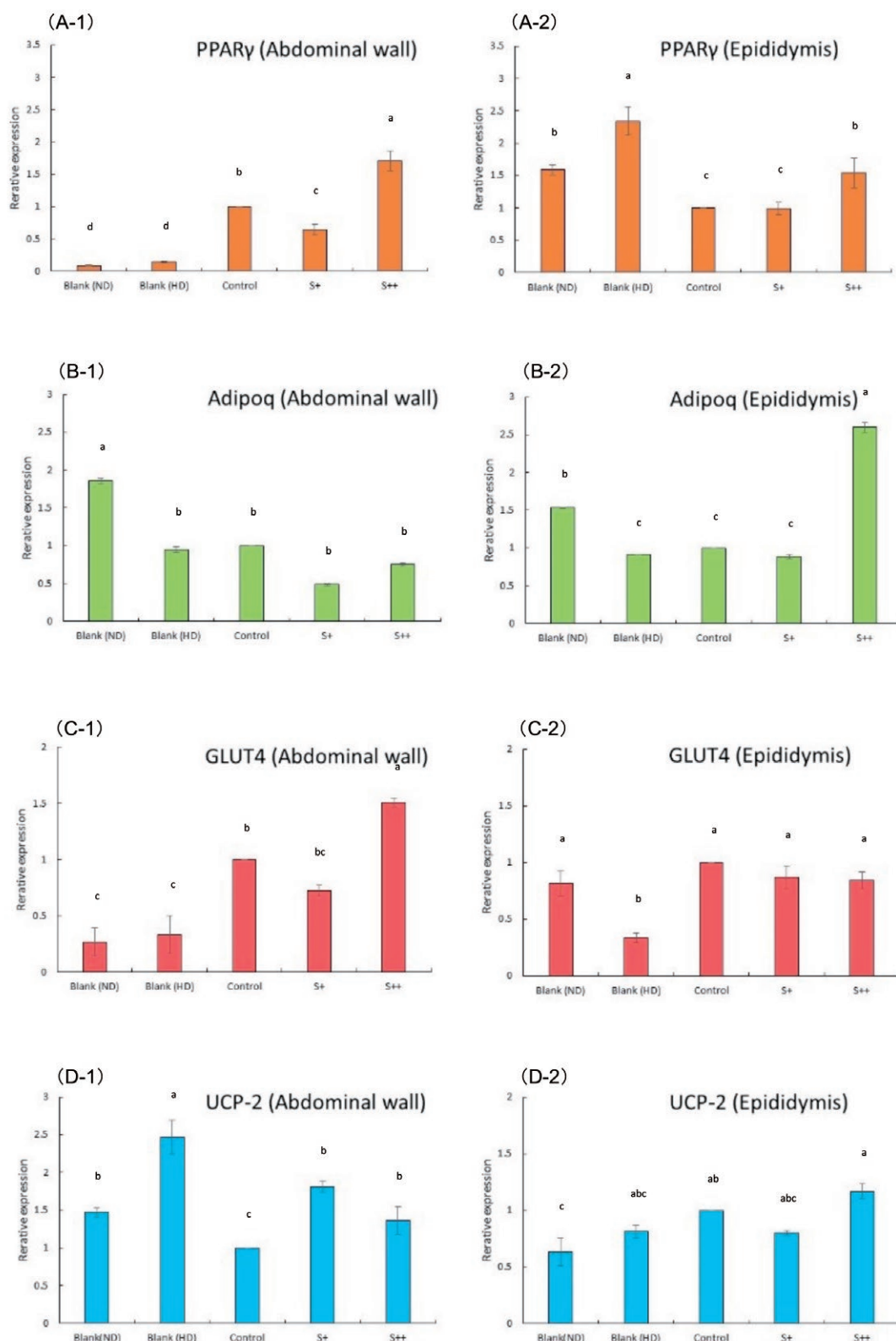


図5 ストレス試験マウスの精油暴露による腹壁 (1) および精巣上体 (2) の脂肪組織における
脂肪細胞分化・糖代謝・エネルギー産生に関する因子の mRNA 発現への影響
PPAR γ , (A) ; Adipoq, (B) ; GLUT4, (C) ; UCP-2, (D)
S (+), 0.5% 精油暴露群 ; S (++), 2.5% 精油暴露群
異なるアルファベットは有意差あり ($P < 0.05$, Tukey's test)

価と香気分析にご協力いただきました高田香料株式会社、堀内政宏氏に御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 大野豪, 根本明子, 宮里進, 東嘉弥真勇人, 宮城徳道, 山城信哉, 玉城盛俊, 沖縄県におけるヒハツモドキの地理的分布と生育環境の特徴, ならびに害虫等による被害・障害に関する予備的知見, *熱帯農業研究*, 9, 1-11 (2016)
- 2) 有村源一郎, 上村卓矢, 八代拓也, 植物アロマ成分を用いた有機栽培システムの開発とヒト健康増進効果への応用, 植物アロマの潜在能力に注目!, *化学と生物*, 57, 428-432 (2019)
- 3) 山本晃輔, 匂い手がかりによる自伝的記憶の想起現象 (プルースト現象) に関する新しい認知モデル, *AROMA RESEARCH*, 17, 112-115 (2016)
- 4) 第十七改正日本薬局方電子版 (2016), 一般試験法 精油定量法, p. 122, 厚生労働省
- 5) Takahashi, M., Ohshiro, M., Oe, M., Arakaki, M., Wada, K., Effect of roasting on the physicochemical and antioxidant characteristics of hihatsumodoki (*Piper retrofractum* Vahl) dried fruit, *Journal of the Japan Association of Food Preservation Scientists*, 46, 217-225 (2020)
- 6) Takahashi, M., Oe, M., Arakaki, M., Wada, K., Effect of leaf growth on the taste and aroma functions and antioxidant characteristics of hihatsumodoki (*Piper retrofractum* Vahl) leaf, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1002-1011 (2020)
- 7) Kinjo, Y., Takahashi, M., Hirose, N., Mizu, M., Hou, D.X., Wada, K., Anti-stress and antioxidant effects of non-centrifuged cane sugar, kokuto, in restraint-stressed mice, *Journal of Oleo Science*, 68, 183 ~ 191 (2019)
- 8) Kinjo, Y., Wada, K., Oe, M., Hou, D.X., Takahashi, M., Effects of *p*-hydroxybenzaldehyde and *p*-hydroxyacetophenone from non-centrifuged cane sugar, kokuto, on serum corticosterone, and liver conditions in chronically stressed mice fed with a high-fat diet, *Food Science and Technology Research*, 26, 501-507 (2020)
- 9) Jackson, R. M., Griesel, B.A., Gurley, J.M., Szweda, L.I., Olson, A.L., Glucose availability controls adipogenesis in mouse 3T3-L1 adipocytes via up-regulation of nicotinamide metabolism, *Journal of Biological Chemistry*, 292, 18556-18564 (2017)

Chronic stress and fat accumulation suppressing effects of aroma compounds from hihatsumodoki (*Piper retrofractum* Vahl) dried fruits on high-fat diet-induced obese mice.

**Koji WADA, Moena OE, Kensaku TAKARA, Mika ARAKAKI,
and Makoto TAKAHASHI**

Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus

The dried fruits of hihatsumodoki (*Piper retrofractum* Vahl) have a pungent taste and aroma, and are used in Okinawa, Japan as a traditional seasoning. In this study, the volatile aroma compounds contained in hihatsumodoki dried fruits were isolated, and their anti-stress and anti-obesity effects in high-fat diet-induced obese mice were evaluated.

The dried fruits of hihatsumodoki were cultivated at the Subtropical Field Science Center, University of the Ryukyus. Volatile compounds were isolated using a solvent-assisted flavor evaporation apparatus. The resulting extract was then analyzed using capillary GC and GC/MS, which led to the identification of 73 compounds, including germacrene D (15.5%), β -bisabolene (10.0%), β -elemene (9.4%), β -caryophyllene (8.9%), and α -humulene (8.1%) as major constituents. Application of aroma extract dilution analysis revealed 27 aroma compounds in the flavor dilution factor range from 16 to 512. The main contributors to the aroma of the dried fruits of hihatsumodoki were linalool (floral), isoborneol (camphor-like), unknown (clove-like), guaiacol (smoky), furaneol (caramel-like), and three others.

The essential oil obtained from the dried fruits of hihatsumodoki was also evaluated for its anti-stress and anti-obesity effects in the animal model. The inhalation of hihatsumodoki essential oil (concentration: 2.5%) significantly suppressed the secretion of stress hormones into serum in chronically stressed mice, compared with the control group, whereas the serum antioxidant activity showed no change in all groups. The inhalation of 2.5% essential oil also activated PPAR γ signaling in the adipose tissue of chronic stressed mice, and regulated adipocyte differentiation. In addition, the expression of GLUT4 (glucose uptake-related mRNA) in the abdominal wall, Adipoq (saccharometabolism-related mRNA), and UCP-2 (energy metabolism-related mRNA) in the epididymis were significantly induced by inhalation of 2.5% essential oil. These *in vivo* results demonstrated that the inhalation of the hihatsumodoki essential oil might diminish chronic stress, by suppressing stress hormones and regulating PPAR γ , GLUT4, Adipoq, and UCP-2. In summary, these results suggest potential anti-stress and anti-obesity effects.