

<平成26年度助成>

タクアン漬けの血圧上昇抑制作用およびその作用機序の解析

松岡 寛樹*・高橋 朝歌**・熊倉 慧***

(*高崎健康福祉大学大学院健康福祉学研究科食品栄養専攻、
東日本栄養医薬専門学校、*高崎健康福祉大学)

1. 緒 論

2013年、「和食」がユネスコの世界無形文化遺産に登録され、その基本は「ご飯と漬物と汁そしてお菜」にある。近年の日本人の食生活は、米飯中心の食欲を満たすための食事から、おかずが多い豊かな食事へと変化してきた。バブル景気以降、「食の欧米化」、「食の簡便化」は、肉や乳製品の需要を高め、食生活における油脂過剰摂取の傾向が強くなり、生活習慣病のリスクが高まっている。伝統的な和食素材においては、味噌や醤油は抗酸化因子や抗血小板凝集因子など多様な機能を有し^{1,2)}、味噌汁の摂取が食塩感受性の高血圧を抑制するだけでなく、脳・心・腎臓機能保護作用を有することが報告されている^{3,4)}。他方、1975年代の日本食がメタボリックシンドローム予防に有効との報告がなされ⁵⁾、個々の素材だけでなく、豊かになりつつ時代の食生活の健康効果に注目が集まっている。

食塩は、「塩梅」といった言葉に表されるように、「出汁」とともに素材の味を引きだす和食の基本である。これまで、疫学的研究により食塩の過剰摂取は昇圧を誘導し、漬物は過剰摂取の要因の一つとされてきた。食塩単独投与と異なり、食品では血圧上昇を抑制する食物繊維、アミノ酸・ペプチドやポリフェノールなどが同時摂取される。これらの食品成分は血管・臓器に対する保護効果も高く、それに起因する各種疾患を予防することが明らかになってきた。味噌においては、一日当たり3gの食塩摂取でも昇圧効果は示さないことが明

らかになっている^{3,4)}。

漬物の健康効果を考えるとき、前提として食塩過剰摂取と高血圧の議論が生じる。漬物由来の食塩量は約1gと低く、現代漬物は冷蔵技術と調味技術により十分に低塩化されているため、野菜の重要な摂取源であることは今も変わらない。漬物の機能性研究は、原料野菜の機能性成分や食物繊維についての間接的な研究結果から推定されることがほとんどである。漬物加工が直接的にメリットとなる数少ない研究として、乳酸菌によるプロバイオティクスならびにプレバイオティクスにすることが挙げられる。糠漬けやキムチにおいては、GABAが乳酸菌によって富化することが明らかになり⁶⁾、特に、血圧調節酵素阻害剤およびGABA富化糠床で漬けた野菜は抗高血圧作用を有することが報告されている^{7,8)}。これらのことから、漬物は原料野菜由来ならびに発酵熟成に由来する機能性因子が期待できる素材であるにも関わらず⁹⁾、その健康効果に関するデータは不足している。

これまで、我々はタクアン漬けの黄変化機構と黄色関連物質の機能性に着目した研究を進めてきた。その過程で、製造初期に行われる天日干しや塩押しといった漬物固有の脱水処理が、ダイコンの二次代謝に影響を及ぼすことを見出した。さらに、脱水過程で、微生物発酵非依存的にGABAの経時的な蓄積が起こるという知見を得た¹⁰⁾。そこで本研究では、GABAを蓄積させたタクアン漬けの摂取が、他のGABA含有食品と同様に抗高血圧効果を発揮できるかについて明らかにするこ

とを目的とした。

2. 実験方法

2-1 タクアン漬けの試作と試料の調製

2013年8～12月および2014年9～11月に高崎市内で栽培された「干し理想」ダイコンを用いた。日干し脱水および塩押し脱水を2週間行った後、それぞれ4℃下で1～2ヶ月間の塩蔵処理を行った。処理後、液体窒素による急速凍結後、凍結乾燥、冷凍粉碎を行い、実験用試料とした¹⁰⁾。乾燥粉末試料中の塩分は、純水で抽出し、電量滴定式塩分計で測定した。GABAは乾燥試料を塩酸加水分解し、OPA試薬によるプレカラム誘導体化によるHPLCにて測定を行った。

2-2 本態性高血圧モデルラットを用いたタクアン漬けの抗高血圧試験

ラットは4週齢の高血圧自然発症ラット (SHR/Hos) を日本エスエルシー株式会社より購入した。実験動物は、ステンレス製の5連ゲージに入れ、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 5\%$ に調節された飼育室で明時間(7:00～19:00)、暗時間(19:00～7:00)の光調節下で飼育した。試料は2013年産の1ヶ月間塩蔵した日干しタクアン漬けおよび塩押しタクアン漬けを用いた。飼料中の食塩濃度を0.6%とし、タクアン漬け由来のGABA濃度を基準として、低用量群(0.2mg/kg BW/日)、中用量群(1.0mg/kg BW/日)、高用量群(5.0mg/kg BW/日)になるように調製した。11週齢より投与を開始し、飼料と飲水は自由摂取させた(5匹/群)。陽性対照群(GABA群)としてGABAを溶かした水を与えた(1.0mg/kg BW/日)。尿サンプルは、ラットを代謝ゲージにいれ、17時～翌朝9時までの16時間尿を採取した。非観血式自動血圧測定装置(BP-98A、ソフトロン社)を用いて、心拍数、収縮期血圧ならびに拡張長期血圧の測定を行った。

2-3 食塩感受性高血圧モデルラットを用いたタクアン漬けの抗高血圧試験

4週齢雄性食塩感受性高血圧症ラット(Dahl-Iwai S: DIS/Eis)および4週齢雄性食塩抵抗性高血圧症ラット(Dahl-Iwai R: DIR/Eis)を日本エスエルシー株式会社より購入した。予備飼育では、粉末飼料(MF、オリエンタル酵母工業株式会社)と水道水を自由摂取させ、1週間の馴化飼育を行った。その後、飼料に食塩を添加し、さらに1週間の馴化飼育を行った。各タクアン漬け試料は、2-3と同様なGABA相当量になるように通常飼料に添加した。食塩濃度は飼料に対して8%になるように調製した。6週齢に達したDIS 25匹を収縮期血圧がほぼ平均的になるように1群5匹に分け、7週間の投与試験を行った。食塩群(対照群)、塩押し低用量群(L-SR群)、塩押し中用量群(M-SR群)、日干し低用量群(L-DR群)、日干し中用量群(M-DR群)とした。試験期間は、最も長く生存していた群の中で1匹目が死亡した段階で終了とした。尿サンプルは、ラットを代謝ゲージにいれ、絶食状態で17時～翌朝9時までの16時間尿を採取した。

2-4 高脂肪・高コレステロール食飼育ラットに対するタクアン漬け摂取の影響

7週齢雄性脳卒中易発性高血圧自然発症モデルラット(SHRSP/Izm)を日本エスエルシー株式会社より購入した。1週間の馴化飼育後、高脂肪食(1%食塩、0.5%コール酸、1.25%コレステロール、25%牛脂)により1週間の馴化飼育を行った。各タクアン漬け試料は、中用量群(正味乾燥重量として0.15%)ならびに低用量群(正味乾燥重量として0.03%)になるように通常飼料に添加した。9週齢に達したDIS 25匹を収縮期血圧がほぼ平均的になるように1群5匹に分け、7週間の投与試験を行った。食塩群(対照群)、塩押し低用量群(L-SR群)、塩押し中用量群(M-SR群)、日干し低用量群(L-DR群)、日干し中用量群(M-DR群)

とした。尿サンプルは、ラットを代謝ゲージにいれ、絶食状態で17時～翌朝9時までの16時間尿を採取した。

2-5 アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性試験

タクアン漬け粉末 0.5g に 5mL の純水もしくは 80%メタノールを加えて 4, 25, 40℃ で 24時間振とう抽出、または 80℃ で 1時間振とう抽出した。抽出後、遠心分離 (5000rpm, 20分) して上清を集めた。80%メタノール抽出により得た上清は、減圧濃縮でメタノールを除去後、純水で 5mL に定容した。ねじ付き試験管に、8mM Bz-Gly-His-Leu 80μL、2M NaCl 30μL、試料 10μL を加えて混合し、37℃ で 5分間プレインキュベーションした。ここに 60mU/mL ACE 80μL を加え、37℃ で 1時間反応させた。1M塩酸 50μL を加えて反応停止させた。ここに、キノリン 150μL、塩化ベンゼンスルフォニル 50μL を加えて呈色反応を行い、エタノールを 150μL 加えた。この反応液 180μL

をマイクロプレートにとり、492 nm の吸光度を測定した。

3. 結果および考察

3-1 本態性高血圧自然発症ラットを用いたタクアン漬けの抗高血圧試験

タクアン漬け摂取による SHR の収縮期血圧の変化を 図 1 に示した。1 回目の実験では日干しタクアン漬けおよび塩押しタクアン漬けともに高用量群ならびに中用量群で行った。2 回目の実験では、中用量群ならびに低用量群で行った。タクアン漬け摂取による飼育中の採水・採食量および体重増加率、解剖後の臓器重量に有意な群間差は認められなかった。1 回目の実験においては、H-DR ならびに H-SR 群の心拍数は飼育期間中 350bpm 前後を推移したが、他の実験群は実験開始時には心拍数は約 350bpm であり、終了時は 400bpm を越えていた。

収縮期血圧については、対照群において投与開

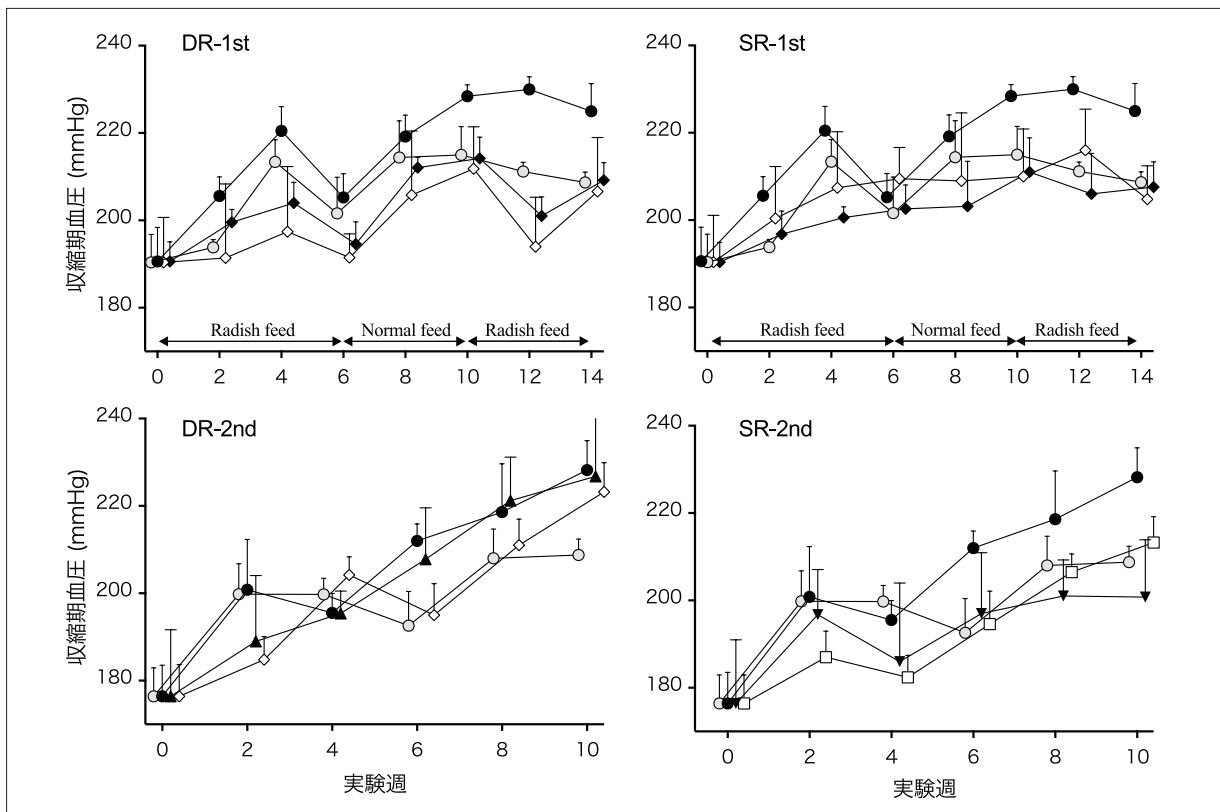


図 1 タクアン漬け摂取による本態性高血圧ラットの収縮期血圧の変化
 Symbols: ●:control, ○:GABA, ▲:L-DR, ◇:M-DR, ◆:H-DR
 ▼:L-SR, □:M-SR, ■:H-SR.

始時と比較して有意に上昇した。各投与群においては、収縮期血圧が約200 mmHgまで上昇したあたりから、血圧上昇抑制効果が認められた。DR群およびSR群とも高用量群と中用量群の間に用量依存的な抑制効果が見出された。DR群の低用量投与下では、血圧値が対照群とほぼ同等になったのに対し、SR群では中・低用量群の血圧の変化はほぼ同等であった。血液分析により総タンパク値やクレアチニン値の変化は認められず、BUN値が低下傾向にあったため、腎機能改善効果が示唆された。さらに、飼料摂取群のACE活性は対照群ならびにGABA群に対し、低値を示したことから、タクアン漬けにはGABA以外にも血圧上昇に関わるACE阻害因子を有する可能性を見出した。

3-2 食塩感受性高血圧発症ラットを用いたタクアン漬けの抗高血圧試験

タクアン漬け摂取による食塩感受性ラットの収縮期血圧の変化と死亡率の結果を図2に示した。飼育期間中、食塩負荷条件におけるDISラットの採水・採食量および体重増加率、解剖後の臓器重量に有意な群間差は認められなかった。タクアン漬け摂取により生存率は改善される傾向にあり、特にM-SR群は高い生存率を示した。血圧は3週目より上昇抑制傾向を示し、SR群は低用量群と中

用量群の間に用量依存的な抑制効果が認められた。心拍数については、対照群と比べてM-SR群は有意に低下した。血液分析により、SHRで低下が認められたBUNならびにACE活性に差は見られなかったが、SHRで変化の見られなかった血清クレアチニンは全ての投与群において低値を示した。電解質の分析においては、血中電解質濃度は一定に保たれていたが、それぞれの試料投与群において用量依存的に尿中Na/K比を上昇し、ナトリウム排出を亢進させた。タウリンについては、血中での変動は小さかったが、尿中ではSR群で用量依存的に増加した。タウリンは抗酸化性などの機能を有することから、心不全治療薬としても使われている。また、肝臓における含硫化合物の最終代謝産物として知られている。タクアン漬けにはタウリンが含まれていないが、その摂取によりタクアン漬け内含硫化合物の摂取により、合成が活性化したと考えられた。結果として、タウリン合成が活性化することで、心臓ならびに腎臓に対する負荷を軽減することで生存率の上昇に寄与すると推察された。さらに、血漿グルコースは対照群と比較し全ての投与群において有意に低値を示し、試料群間の比較においてもDR群はSR群より低下していたため、血糖上昇抑制効果が認められた。

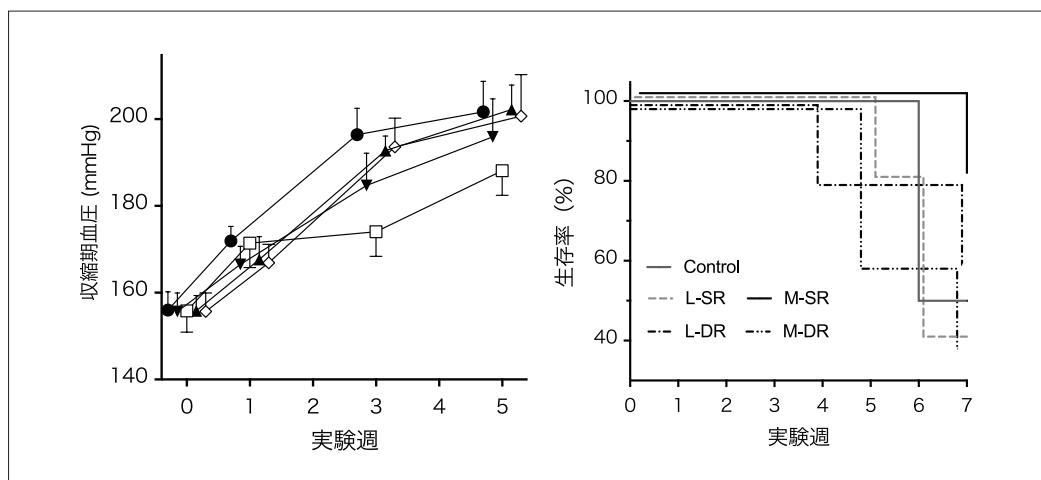


図2 タクアン漬け摂取による食塩感受性高血圧ラットの収縮期血圧と死亡率の変化
Symbols: ●:control, ▲:L-DR, ◇:M-DR, ▼:L-SR, □:M-SR

3.3 高脂肪・高コレステロール食飼育ラットに対するタクアン漬け摂取の影響

高脂肪・高コレステロール食によるタクアン漬け摂取のSHRSPに対する影響を検討した。本実験では、飼育期間中、全ての群で採水・採食量および体重増加率に有意な群間差は認められなかった。本飼料条件下ではタクアン漬けの摂取による収縮期血圧に対する影響はほとんど認められず、対照群と飼料群の間で顕著な違いは認められなかった(図3)。SHRやDISラットで行ってきた血液ならびに尿の生化学的パラメーターについても、血中クレアチンをやや低下させる傾向が認められるのみであった。また、飼料中の食塩含量が低いいためか、DISでみられた尿中Na/K比についても変化が認められず、ナトリウム排出亢進効果は確認できなかった。血中総コレステロールについても、群間差は認められなかった。

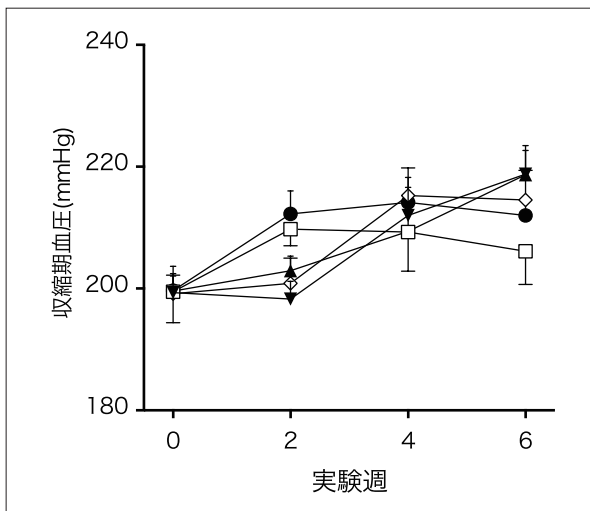


図3 タクアン漬け摂取による脳卒中易発性高血圧ラットの収縮期血圧の変化

Symbols: ●:control, ▲:L-DR, ◇:M-DR, ▼:L-SR, □:M-SR

3.4 タクアン漬け抽出物のアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性

SHRならびにDISラットに対する抗高血圧効果は、DR試料よりもSR試料において高い効果を示すことを明らかにした。そこで、SHRを用いた動物実験によりACE活性の低下が認められたため、DRならびにSRの乾燥粉末試料におけるACE阻

害活性試験の結果を図4に示した。その結果、両試料ともに80%メタノール抽出画分より水抽出画分の阻害活性が高くなった。さらに、抽出温度条件の検討を行ったところ、抽出温度に依存して阻害活性が上昇し、40℃による抽出条件で最も阻害活性が高くなった。また、DRならびにSR試料の塩分量は約40%であり、両試料ともに同等の阻害活性を示した。これらの結果から、両試料ともに類似した阻害活性因子を有しており、それらは高親水性であることが示唆された。また、抽出時の有機溶媒濃度や高温条件による影響を受け易いことから、水抽出画分では抽出時にプロテアーゼのような酵素による分解が進行し活性が増強することが考えられた。

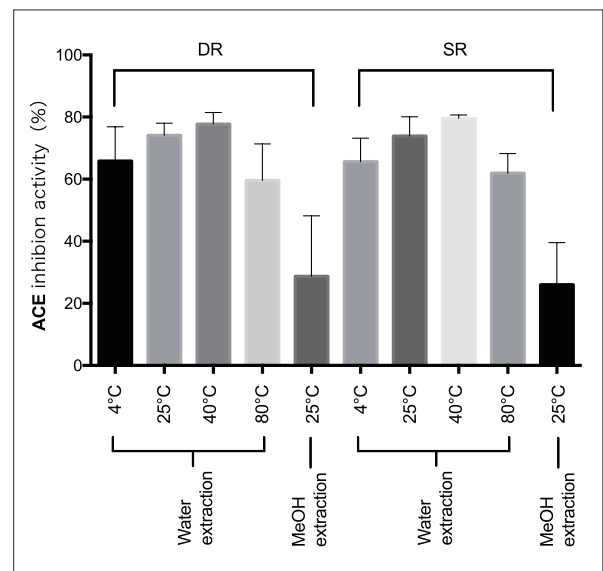


図4 異なる抽出温度ならびに抽出溶媒条件下によるタクアン漬けエキスのACE阻害活性

4. ま と め

本研究助成により、漬物業界の標準的な方法に基づいた製造されたタクアン漬けが、本態性ならびに食塩高負荷条件下における食塩感受性の高血圧モデルラットに対して、抗高血圧効果を有することを明らかにした。これらの実験により、タクアン漬けが血圧上昇を抑制するだけでなく、腎機能を改善することを見出した。一方、SHRSPを用いた実験では、高脂肪・高コレステロール食の

ため血圧が上昇しにくく、腎機能に対する影響は小さかった。各モデル動物における生化学的パラメーターは異なる傾向を示したことから、飼料条件や系統差の影響を受けやすいことが考えられ、作用機序を明らかにする十分なデータは得られなかった。

本研究では当初GABAの機能性に着目していたが、GABA投与量が同じになるよう飼料を調製したにも関わらず、SR群の血圧上昇抑制効果はDR群よりも高くなった。昇圧因子であるACE活性は、ポリフェノールやペプチドに阻害されやすく、GABAは阻害できない¹¹⁾。ダイコンと同じアブラナ科野菜の漬物である中島菜の水抽出画分にはACE阻害因子を有しているとの報告もあり¹²⁾、タクアン漬けの抗高血圧作用はGABAだけでなく、それ以外の阻害因子が関与していることが考えられた。抗高血圧効果の作用機序の解明のために、活性因子の構造解析は今後の重要な検討課題である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団ならびに関係各位に心から感謝を申し上げます。

文 献

- 1) H. Esaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(9), 1637 (1999).
- 2) H. Tsuchiya *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4167 (1999).
- 3) M. Yoshinaga *et al.*, *Nutrition*, **28**(9), 924 (2012).
- 4) D. D. Du *et al.*, *Clin. Exp. Hypertens.*, **365**(5), 359 (2014).
- 5) 本間太郎, 日本食品科学工学会誌, **60**(10), 541 (2013).
- 6) 愛宕世高, 食品と開発, **36**(6), 12 (2001).
- 7) K. Oda *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**(5), 882 (2014).
- 8) K. Oda *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**(2), 318 (2015).
- 9) 矢嶋信浩, 生物工学, **85**(7), 321 (2007).
- 10) 加藤亮, 日本食品科学工学会誌, **62**(10), 492 (2015).
- 11) 渡辺敏郎, 日本食品科学工学会誌, **49**(3), 166 (2002).
- 12) 三輪章志, 石川県農業総合研究センター, 2145 (1998).

Antihypertensive effect of *takuan-zuke* in hypertensive rats

Hiroki Matsuoka*, Asaka Takahashi**, Kei Kumakura***

*Graduate School of Food and Nutrition, Takasaki University of Health and Welfare

**Yamazaki College of Nutrition and Pharmaceutical

***Department of Health and Nutrition, Takasaki University of Health and Welfare

Introduction: *Takuan-zuke* is one of the most popular traditional foods in Japan. It is classified into *hoshi-takuan* and *shio-oshi-takuan* depending on the dehydration process used before the radish roots are pickled. The *hoshi-takuan* dehydration process is a sun-drying method, and the *shio-oshi-takuan* dehydration process is a pickling treatment that uses salt and pressing with stone weights (salt-pressed *daikon*). *Takuan-zuke* is originally made via a process of salt-aging the dehydrated radish roots in salt and/or rice bran. Nowadays, the term “*takuan-zuke*” indicates dehydrated radish roots that are further pickled in seasoning liquid for desalting and seasoning. Recently, we have reported that γ -aminobutyrate (GABA) levels in *takuan-zuke* increased during sun-drying and salt-pressing process of the radish root. GABA is a depressive neurotransmitter in the sympathetic nervous system, and it also has a physiological function of reducing blood pressure in mammals. In this study, we report the effect of supplementing *takuan-zuke* on the blood pressure in hypertensive rats.

Methods: The *shio-oshi-* (SR) and *hoshi-takuan* (DR) utilized in the present study were prepared by our laboratory. Dry powders of each feed type were obtained by freeze-crushing after lyophilization. *Measurements of blood pressure and heart rate.* Experimental 1: Eleven-week-old male SHR/Hos rats were fed MF diet (Oriental Yeast Co. Ltd.) containing 0.2, 1.0, and 5.0 (mg/kg body weight (bw)/day) GABA and 1.0% NaCl (w/w of feed) for 10-14 weeks *ad libitum*. Experimental 2: Six-week-old male Dahl S/Iwai (DIS) rats were fed a MF diet containing 0.2 and 1.0 (mg/kg bw/day) GABA and 8.0% NaCl (w/w of feed) for 7 weeks *ad libitum*. Experimental 3: Nine-week-old male DIS rats were fed a high fat and 1.0% NaCl diet containing 0.03% and 0.15% (w/w, after subtracting NaCl) *takuan* powders for 7 weeks *ad libitum*. Variables in the serum, plasma or urine were determined. Systolic blood pressure (SBP) and heart rate were measured using the tail-cuff method. *Determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity.* The *takuan* powders were extracted with water or 80% methanol at 4-40°C for 24 hours or 80°C for 60 min. The 80% methanol extract was concentrated *in vacuo* and diluted with water. These aqueous and methanol extracts were assessed by ACE-inhibitory activity assay *in vitro*.

Conclusion: We found that ingestion of *takuan-zuke* attenuated the increase in blood pressure in rats subjected to spontaneous and salt-induced hypertension with kidney and heart damages. Furthermore, the antihypertensive activity of SR *takuan* was higher than that of DR *takuan* under conditions of the equal GABA levels in feed. The serum levels of ACE of groups fed SR and DR *takuan* in SHR rats were lower than those in the control group. However, GABA showed no inhibitory activity against the ACE. These phenomena suggest that *takuan-zuke* has concomitant antihypertensive effects because of GABA and unknown ACE inhibitors. However, the mechanism of these effects is unclear. Further studies are needed to elucidate the underlying mechanisms and compounds in *takuan-zuke*.