

「あおり PG」の定量に影響を及ぼさない県産素材に関する研究

Effects of regional ingredients on Aomori PG quantification

川嶋 草平

県内事業者におけるサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン（以下、「PG」。）を使用した商品開発の促進、機能性表示食品等への届出支援及び PG 関連商品のブランド力強化を目的に、PG の定量に影響を及ぼさない県産素材の探索をおこなった。

青森県内でブランド化、あるいは今後ブランド化が期待される農作物を中心に試料を選定し、PG 標準品の添加回収試験を実施した。PG の分離、定量にあたっては消費者庁 HP「機能性表示食品届出情報」中の「『A0+PG TABLET』からのサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの分析方法」1) を参考に実施した。

モヤシ（胚軸）、カブ（塊根様部位（胚軸））、トウガラシ、トウモロコシ、ニンニクでは液体クロマトグラム上での PG の分離が良好であり、PG 標準品の添加量と回収量に良好な相関がみられたことから、PG の定量は可能であることが明らかとなった。一方で、モヤシ（子葉）、カブ（葉）、エダマメ、トマトでは液体クロマトグラム上での PG の分離が困難であり、回収率の低下や試料由来成分によるピーク検出の妨害が見られたことから、既存の手法を用いた PG の定量は困難であると考えられた。

本事業では、PG の定量が可能な県産素材 5 種類を明らかにした。機能性表示食品届出で必要となる加工食品中の PG の定量化について、組み合わせ可能な県産素材を県内企業に示す事で、付加価値の高い PG 配合商品の開発が期待される。

表 1 農産物乾燥粉末中における PG の添加回収試験

サンプル名	PG の分離	添加回収試験
		(PG 添加濃度：0.25, 0.5, 1.0mg/mL)
モヤシ	子葉部：不可	子葉部：回収率：82.3～94.3%
	胚軸部：可能	胚軸部：回収率：87.7～92.5%
カブ	葉部：不可	葉部：回収率：71.4～100.2%
	胚軸部：可能	胚軸部：回収率：94.3～101.1%
トウガラシ	可能	回収率：90.2～102.1%
トウモロコシ	可能	回収率：89.5～108.6%
エダマメ	不可	回収率：58.6～63.2%
ニンニク	可能	回収率：95.7～102.8%
トマト	不可	回収率：83.4～97.1%
シイタケ	不可	保持時間の変動により回収不可

1. 目的

サケ鼻軟膏由来プロテオグリカン（以下、「PG」。）の定量に影響を及ぼさない県産素材を探索する事で、県内企業におけるPGを使用した商品開発の促進、機能性表示食品等への届出支援及びPG関連商品のブランド力強化を目的とした。

2. 背景

広義のプロテオグリカンは動物組織における細胞外マトリックスの重要な構成成分で、分子量数万から数十万のコアたんぱく質に糖鎖であるグリコサミノグリカンが数本から数十本結合した生体高分子である。プロテオグリカンの役割として、主に皮膚の水分保持や関節の潤滑作用の他、近年の研究では日焼け抑制効果や腸内細菌群の調整作用などについて報告がある^{1,2)}。

PG市場は拡大しており、令和2年3月時点で県内企業を中心に発売された健康食品や化粧品などの累計製造品出荷額は271.3億円となり、7年間で約50倍に増加した。また、青森県では医療・健康福祉分野における産業振興を目的に「青森ライフイノベーション戦略セカンドステージ」を実施しており、この戦略の中でPGを核とした健康・美容関連産業クラスターの形成を目指している。令和元年には、青森県内では初めてとなるPG配合商品の機能性表示食品が誕生した。

一方で、機能性表示食品の届出には食品中に含まれる機能性関与成分を定量し、その試験方法等について明らかにする必要がある³⁾が、これまで食品に含まれるPGの定量は困難とされてきた。PGの定量方法としては、カルバゾール硫酸法によりウロン酸量を測定し間接的にPGを定量する方法の他、塩化セシウム沈降平衡遠心法やイオン交換クロマトグラフィーによりPGを分離し、示差屈折計により検出する方法などが挙げられる⁴⁾。しかし、前者の手法は特異性が低くPG由来ではないウロン酸も検出する、後者の分離方法は煩雑かつ費用がかかるといった課題がある。また分解された低分子化状態のPGでは機能性が変化する事が知られているため、分子量を維持したPGを定量する必要がある⁵⁾。

これまでの研究で、錠剤に含まれるPGについて、限外ろ過膜及びゲルろ過カラムによる分離と示差屈折計による測定を組み合わせた定量方法を開発した。この手法では、錠剤中に含まれるセルロースや乳糖などの影響を受けず、分子量を維持した状態のPGの定量を行う事が可能である。一方で、一部のたんぱく質や多糖はその分子構造などの性質がPGと類似しており、これらの成分が多く含まれる農産物等を原料としてPGと組み合わせた場合、既存の手法での定量が困難になる場合がある。そこで、本事業では既存の手法で、PGの定量に影響を及ぼさない県産素材を探索する事とした。

3. 実施内容

(1) 装置

小型凍結真空乾燥装置：アルバック販売株式会社、DFM-10-04

高速冷却遠心機：HITACHI、himac CR20F

高速液体クロマトグラフ：株式会社島津製作所、Prominence(装置構成：ポンプ LC-10ADvp、示差屈折計検出器：SPDM10Avp、インジェクター：SIL-10ADvp、カラムオーブン：CTO-10ACvp、デガッサー：DGU-14A、インターフェイス：SCL-10Avp、データ処理：CLASS-VP)

(2) HPLC 分析条件

カラム：TSKgel G5000-PWXL ϕ 7.8×300mm (東ソー)

カラム温度：40℃

移動相：50mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)

流速：0.5mL/min

分析時間：30min

注入量：50 μ L

(3) 試料

青森県内でブランド化されている、あるいは今後ブランド化が期待される農産物を中心に試料を選定し、モヤシ、カブ、トウガラシ、トウモロコシ、エダマメ、シイタケ、ニンニク、トマトを用いた。また、モヤシについては子葉と胚軸、カブについては葉と塊根様部位(胚軸)に分けた。選定した試料は可食部を-80℃で予備凍結し、真空凍結乾燥機を用いて7日間凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物をミルサーで粉碎し、0.5mmメッシュのふるいにかけて乾燥試料粉末とした。

(4) 標準品

5℃で保存したPG(株式会社角弘)を、デシケーター内で1時間乾燥してから使用した。

(5) 試料溶液の調製

50mL容チューブに乾燥試料粉末250mgを量り取った。また同様に量り取った乾燥試料粉末に、PG標準品2.5mg、5mg及び10mgをそれぞれ添加した。なお、PGの添加量は既存の錠剤型PG配合商品のPG含有量(250mgあたり5mg)を参考に決定した。

量り取った試料に50mMリン酸緩衝液(pH6.8)10mLを加えた後、ボルテックスミキサーで攪拌し、15分間の超音波処理を行った。9,000rpm、10分間の遠心分離を行った後、上清を回収し、事前に50mMリン酸緩衝液(pH6.8)で洗浄したろ紙(ADVANTEC、定性濾紙No.131)でろ過した。遠心分離で得られた残渣に50mMリン酸緩衝液(pH6.8)10mLを加え、同様に超音波処理、遠心分離及び上清のろ過をおこなった。この操作を2回繰り返し、得られたろ液を全て合わせ50mLに定容した。

定容した試料5mLを事前に蒸留水で洗浄した公称分画分子量100kDaの限外ろ過膜(Merk, Amicon Ultra-15)に加え、3,500rpm、30分間の遠心分離を行った。透過液を廃棄した後、蒸留水10mLを加え同様に遠心分離する事で、低分子の夾雑物を除去した。この操作を5回繰り返し、得られた濃縮液を回収し50mMリン酸緩衝液(pH6.8)で5mLに定容した。調製した試料溶液は-30℃で凍結保存し、分析時に室温で解凍後、0.45 μ mフィルターでろ過しHPLCへ注入した。

(6) 検量線の作成

標準品を50mMリン酸緩衝液(pH6.8)に溶解し、0.05、0.1、0.2mg/mLの標準溶液を調製した。調製した標準溶液は-30℃で凍結保存し、分析時に室温で解凍後、0.45 μ mフィルターでろ過しHPLCに注入した。得られたピーク面積から検量線を作成し、PGの定量を行った。

4. 結果及び考察

図1~2に標準品及びブランク、図3~12に乾燥試料粉末250mgにPG標準品5mgを添加した試料溶液のクロマトグラムを示した。

標準溶液のクロマトグラム(図1)では保持時間16.1分に良好なピークが確認された。モヤシ(胚軸)、カブ(塊根様部位(胚軸))、トウガラシ、トウモロコシ、ニンニクのクロマトグラムでも保持時間16.1分付近に形状が良好なピークが確認され、試料由来成分のピークも確認されなかった。このことから、限外ろ過及びゲルろ過カラムによりPGと試料由来成分の分離が可能である事が明らかとなった。

一方で、モヤシ(子葉)、カブ(葉)、エダマメ、トマトのクロマトグラムでは、保持時間16.1分付近にピークが確認されたものの、試料由来と思われる成分の妨害を受け、良好なピーク形状は得られなかった。これらの試料については、たんぱく質や多糖など分子量がPGと近い成分が多く含まれているため、限外ろ過及びゲルろ過カラムでのPGの分離が困難であることが示された。また、シイタケについては、試料由来成分のピークは確認されず、PGの分離は可能である事が確認された。しかし、PGと思われるピークの保持時間は標準品から1.2分ほどずれており、良好なピーク形状も得られなかった。これについては、シイタケなどたんぱく質分解酵素を含む試料ではPGが分解され、保持時間が標品より遅くなったと考えられる。

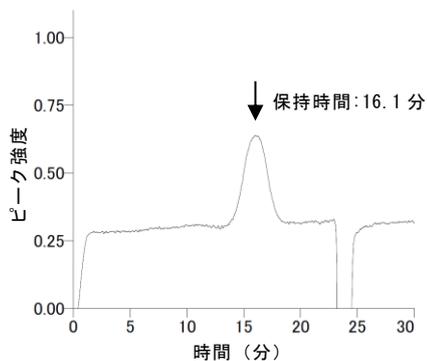


図1 PG標準品

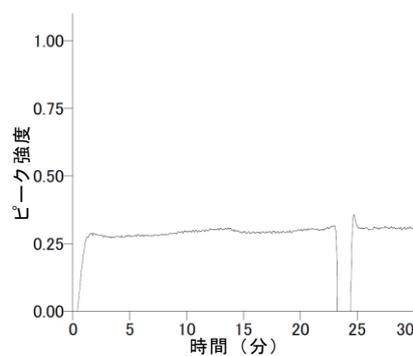


図2 ブランク

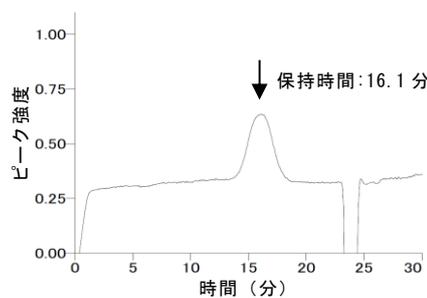


図3 モヤシ(胚軸)

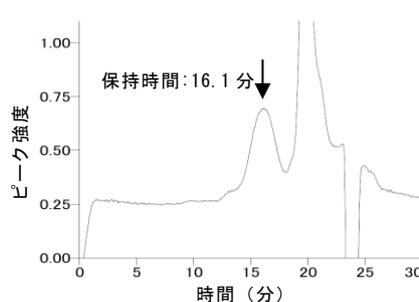


図4 モヤシ(子葉)

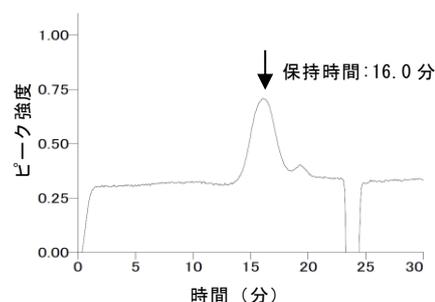


図5 カブ(塊根様部位(胚軸))

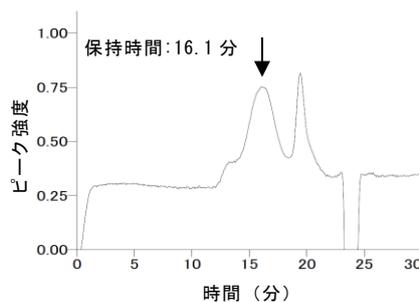


図6 カブ(葉)

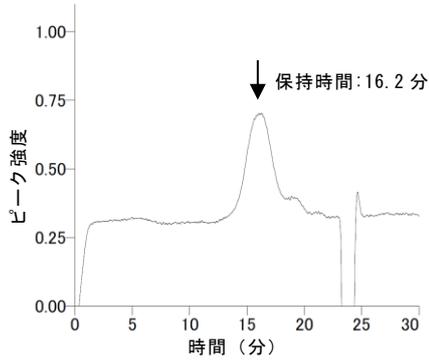


図 7 トウガラシ

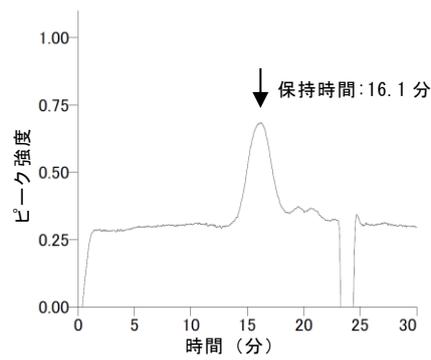


図 8 トウモロコシ

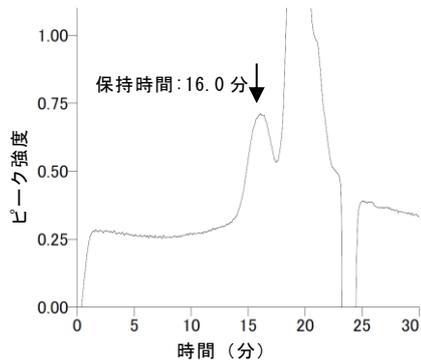


図 9 エダマメ

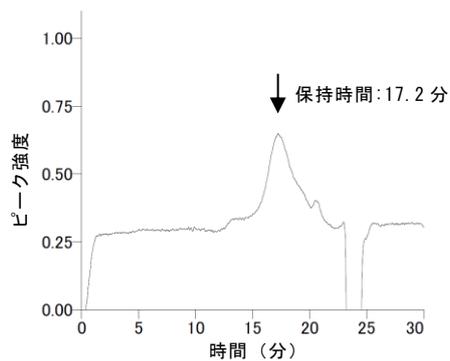


図 10 シイタケ

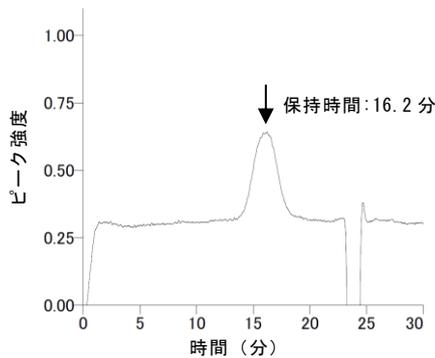


図 11 ニンニク

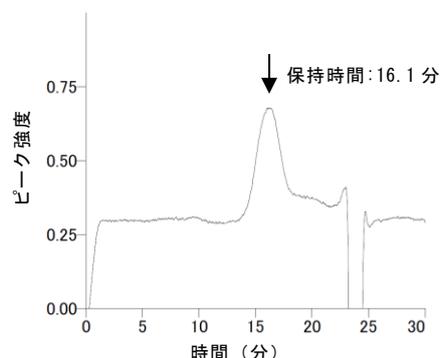


図 12 トマト

次に、PG の定性が困難だったシイタケを除いた、各試料における PG の添加回収試験の結果を表 1 に示した。

クロマトグラム上で PG の分離が良好だったモヤシ (胚軸)、カブ (塊根様部位 (胚軸))、トウガラシ、トウモロコシ、ニンニクでは、PG の添加量 2.5~10mg の範囲で回収率が 88~102% と良好な結果が得られた。また、クロマトグラム上で PG の分離が困難だったモヤシ (子葉) では 82~94%、トマトでは 83~97% と回収率では良好な結果が得られたが、ピーク面積の算出にあたり試料由来成分の影響を受けている点を考慮する必要がある。一方で、カブ (葉) では回収率が 71~100% と PG 添加量に間でばらつきが見られた。エダマメでは回収率が 60% を下回った。

表 1 PG 添加回収試験

試料	PG 添加量 (mg)	回収率 (%)	
モヤシ	2.5	94	
	子葉	5	82
	10	82	
	2.5	93	
	胚軸	5	89
	10	88	
カブ	2.5	71	
	葉	5	91
	10	100	
	2.5	102	
	塊根様部位 (胚軸)	5	94
	10	101	
トウガラシ	2.5	91	
	5	102	
	10	90	
トウモロコシ	2.5	109	
	5	90	
	10	100	
エダマメ	2.5	63	
	5	59	
	10	59	
ニンニク	2.5	103	
	5	96	
	10	100	
トマト	2.5	86	
	5	83	
	10	97	

以上の結果より、限外ろ過及びゲルろ過カラムで PG が良好に分離できる試料においては、PG の定量化は可能である事が明らかとなった。一方で、クロマトグラム上での PG の分離が困難な試料においては、回収率の低下や試料由来成分によるピーク検出の妨害などから、既存の手法での定量が困難であると考えられた。また、シイタケのように酵素を多く含む試料では、PG は分解され本来の構造を維持できない事が明らかとなった。

今後、PG を含有した加工品開発の支援をするにあたり、原料に含まれるたんぱく質や多糖などの除去、酵素や製造工程における PG の分解などを考慮し、原料ごとの特性にあわせた PG の定量方法

について研究を進める必要がある。

5. 事業効果

本事業では、PGの定量が可能な県産素材5種類を明らかにした。機能性表示食品届出で必要となる加工食品中のPGの定量化について、組み合わせ可能な県産素材を県内企業に示す事で、付加価値の高いPG配合商品の開発が期待される。

6. 文献

- 1) 後藤昌史, 末川裕, 花田友香子, 柿崎育子, 山本和司, 加藤陽治, サケ鼻軟骨熱水抽出物の経口摂取による日焼け抑制効果 - 無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験 -, 応用糖質科学会誌, 6 (2), 138-146(2016).
- 2) Asano K, Yoshimura S, Nakane A, Alteration of Intestinal Microbiota in Mice Orally Administered with Salmon Cartilage Proteoglycan, a Prophylactic Agent, PLoS ONE 8, e75008(2013).
- 3) 公益財団法人日本健康・栄養食品協会, 機能性表示食品 - 届出試料作成の手引書 - 2020, 公益財団法人日本健康・栄養食品協会, 94-96(2020).
- 4) 日本生化学会, 新生化学実験講座3糖質Ⅱプロテオグリカンとグリコサミノグリカン, 東京化学同人, 3-14(1990).
- 5) 加藤陽治, 農水産物の糖質に関する研究, 日本食品化学工学会誌, 63, 293-305(2016).