

イチゴ葉の抗酸化活性及び酵素阻害活性の検討

Study of anti-oxidant and enzyme inhibitory activity of strawberry leaves

人見英里¹⁾、小林奈央¹⁾、吉本菜美¹⁾

Eri Hitomi¹⁾, Nao Kobayashi¹⁾, Nami Yoshimoto¹⁾

要旨

果実収穫後に廃棄されているイチゴ葉の有効利用をはかることを目的として、イチゴ葉の抗酸化活性及び酵素阻害活性の検討を行った。山口県防府市で栽培された2品種のイチゴ「紅ほっぺ」「おいCベリー」の葉部を乾燥させたものを試料として80%エタノールで抽出し、総ポリフェノール量、抗酸化性の指標としてDPPHラジカル捕捉活性、膵リパーゼ、マルターゼ、 α -アミラーゼ、チロシナーゼの各種酵素阻害活性の測定を行った。その結果、いずれの品種においてもDPPHラジカル捕捉活性を示した。酵素阻害活性では、いずれの品種においてもリパーゼ阻害活性が強く、チロシナーゼ阻害では中程度の活性を示し、マルターゼ及び α -アミラーゼ阻害活性は強くなかった。ポリフェノール量とこれらの活性に高い相関がみられたことから、これらの作用は葉に含まれるポリフェノールによるものと推察された。

Abstract

We investigated the antioxidant and enzyme inhibitory activity of strawberry leaves for the purpose of effective utilization of the strawberry leaves discarded after fruit harvest. The dried leaves of two strawberry cultivars (Benihoppe and OiCberry) grown in Hofu City, Yamaguchi Prefecture, were extracted with 80% ethanol. The total polyphenol content, DPPH radical scavenging activity, pancreatic lipase, maltase, α -amylase and tyrosinase inhibitory activities were measured. As a result, DPPH radical scavenging activity was exhibited in all cultivars. In enzyme inhibitory activity, lipase inhibitory activity was strongest. Moderate activity was shown by tyrosinase inhibition, and maltase and α -amylase inhibitory-activities were not strong. Because of the strong correlation between the amount of polyphenol and these activities, these effects were inferred to be due to polyphenols contained in the leaves.

キーワード：イチゴ葉、抗酸化活性、酵素阻害活性

keywords : strawberry leaves, anti-oxidant activity, enzyme inhibitory activity

1) 山口県立大学 看護栄養学部 栄養学科

Yamaguchi Prefectural University, Faculty of Nursing and Human Nutrition, Department of Human Nutrition

*連絡先 hitomi@yamaguchi-pu.ac.jp

Corresponding Author : hitomi@yamaguchi-pu.ac.jp

序論

イチゴ(オランダイチゴ、学名 *Fragaria × ananassa*) はバラ科の多年草である。食用にされるのは果実(花托部)であり、果実収穫後の葉や茎については特に利用されることもなく、廃棄されるのが現状である。イチゴ葉部等、未利用部分についての研究は、イチゴ果実の研究に比べ非常に少ないのが現状である。

これまでのイチゴ葉の機能性に関する研究として、「あまおう(甘王)」葉部の50%エタノール抽出物には抗酸化活性、チロシナーゼ阻害活性及びヒアルロニダーゼ阻害活性があること、その阻害物質は加水分解性タンニンである agrimonin であることが報告されている¹⁾。また、「レッドパール」の葉と萼(がく)を用いた研究では、葉に含まれる isoquercitrin, quercetin-3-*o*-glucoside 及び kaempferol-3-*o*-glucuronide が抗アレルギー作用(ヒアルロニダーゼ阻害活性、ヒスタミン遊離抑制活性)を持つことが報告されている²⁾。また、イチゴ茎葉には、強い α -アミラーゼ阻害活性があるという報告³⁾がある一方、 α -グルコシダーゼ阻害活性は認められなかったという報告¹⁾もある。

そこで、本研究では山口県で栽培されているイチゴ葉(「紅ほっぺ」「おいCベリー」)を用い、生活習慣病予防につながる機能性として *in vitro* 系で消化酵素である α -アミラーゼ、マルターゼ、膵リパーゼの各酵素阻害作用の検討を行うとともに、石鹼や化粧品等、食品以外での利用の可能性を探る目的でチロシナーゼ阻害作用の検討を行った。

実験方法

(1) 供試試料

平成25年及び平成26年に山口県防府市のイチゴ専業農家で栽培されたイチゴ「紅ほっぺ」、「おいCベリー」の果実収穫後(5月下旬~6月上旬)の葉部を用いた(写真1、2)。葉は流水にて洗浄し表面の汚れを取り除き、ペーパータオルにて水気を拭き取ったものをフリーザーバッグに入れ、使用まで-20℃の冷凍庫にて凍結保存した。

凍結保存したイチゴ葉は家庭用小型乾燥機(SP-1、株式会社木原製作所)による熱風乾燥(45℃、2時間)あるいは真空凍結乾燥機(DRZ350WC、株式会社アドバンテック)により凍結乾燥を行った。



写真1 紅ほっぺ葉部



写真2 おいCベリー葉部

(2) イチゴ葉抽出液の調製

イチゴ乾燥葉 5.0g を粉碎し、45ml の 80% エタノールを加えて 4℃ にて 5 日間静置し抽出した。その後、2,500rpm (1,190 × g)、25 分、10℃ で遠心分離(高速大容量冷却遠心機 7000、久保田商事株式会社)して得られた上清をイチゴ葉抽出液として各測定に用いた。

(3) 総ポリフェノール含量の測定

抽出液中の総ポリフェノール量は、既報⁴⁾に準じて測定した。測定はイチゴ葉80%エタノール抽出液を100倍希釈した試料を用いた。結果は没食子酸当量として、乾燥イチゴ葉1g中の総ポリフェノール量(mg/g乾燥重量)に換算して表した。

(4) DPPH ラジカル捕捉活性の測定

抽出液のDPPHラジカル捕捉活性は、既報⁴⁾に準じて測定した。

アスコルビン酸で作成した標準曲線を用いて、捕捉活性をアスコルビン酸(AsA)当量で表した。

(5) 酵素法による総ビタミンC量の測定

-20℃にて凍結保存した各イチゴ生葉20.0gを100mlの1.5%メタリン酸を用いてホモジナイズ後、微量高速遠心機(テーブルトップマイクロ冷却遠心機3500、久保田商事株式会社)で10,000rpm(9,200×g)、10分、4℃で遠心分離し上清を得た。この上清を0.45μm孔径のメンブレンフィルターを用いて濾過したものを試料として用いた。ビタミンCの定量は、食品分析キット(F-キットL-アスコルビン酸、J.K.インターナショナル)を用いて行った。

(6) 隣リパーゼ阻害活性の測定

隣リパーゼ阻害活性の測定は、既報⁵⁾に準じて測定した。試料は0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10(mg乾燥葉/ml)となるようにイチゴ葉抽出液原液(100mg乾燥葉/ml)を蒸留水にて希釈して用いた。

(7) α-アミラーゼ阻害活性の測定

α-アミラーゼ阻害活性の測定は、α-アミラーゼ(α-amylase Type VI-B: From Porcine Pancreas, SIGMA A3176)を用い、既報⁴⁾に準じて測定した。試料は10、25、50、75、100(mg乾燥葉/ml)となるようにイチゴ葉抽出液原液(100mg乾燥重量/ml)を80%エタノールにて希釈して用いた。

(8) マルターゼ阻害活性の測定

マルターゼ阻害活性の測定は、ラット腸管アセトン粉末(SIGMA I1630)から抽出した粗酵素液を用い、既報⁴⁾に準じて測定した。試料は10、25、50、75、100(mg乾燥葉/ml)となるようにイチゴ葉抽出液原液(100mg乾燥葉/ml)を0.1Mリン酸緩衝

液(pH6.0)にて希釈して用いた。

(9) チロシナーゼ阻害活性の測定

測定は豊川らの方法⁶⁾をもとに行った。すなわち、96wellマイクロプレートに1/15Mリン酸緩衝液(pH6.8)100μl、各濃度に希釈した試料20μl、2.5mM 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine(L-DOPA, SIGMA)50μlを入れて混和し、23℃にて3分間プレインキュベートした。その後、40U/mlチロシナーゼ(SIGMA T3824)40μlを入れて混和し、すぐに、23℃に設定したマイクロプレートリーダー(Synergy™ MX BioTek Instruments, Inc.)にて、475nmにおける吸光度を10分間継続して測定した。濃度ごとにブランクを置き、試料の測定値からブランクの測定値を減じた値をもとに、以下の式から阻害活性を算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = 100 - \left\{ \frac{(As_{10} - Ab_{10}) - (As_0 - Ab_0)}{(Ac_{10} - Ac_0)} \times 100 \right\}$$

As₀、10：試料の反応0、10分後の測定値
 Ab₀、10：試料ブランクの反応0、10分後の測定値
 Ac₀、10：コントロールの反応0、10分後の測定値

試料は、5.0、10.0、20.0(mg乾燥葉/ml)となるようにイチゴ葉抽出液原液(100mg乾燥葉/ml)を蒸留水にて希釈して用いた。

結果

(1) イチゴ葉の水分

イチゴ葉を食品用乾燥機で熱風乾燥(45℃、2時間)、あるいは凍結乾燥によって乾燥させ、その減少分を水分とみなした。その結果を表1に示す。その水分量は55%から65%であった。

(2) 総ポリフェノール含量

イチゴ葉抽出液の総ポリフェノール含量を表2に示す。総ポリフェノール含量は「紅ほっぺ」が「おいCベリー」に比べ、やや少ない結果となった。

(3) 総ビタミンC量

イチゴ葉の総ビタミンC量を表3に示す。ビタミンCは乾燥前の凍結葉を用いて測定したため、品種別の結果を示す。「紅ほっぺ」が「おいCベリー」に比べ、ややビタミンC含量が高いという結果となった。

(4) DPPH ラジカル捕捉活性

イチゴ葉抽出液のDPPHラジカル捕捉活性を表4に示す。「紅ほっぺ」と「おいCベリー」の熱風乾燥試料は、ほぼ同等の捕捉活性を示したが、「おいCベリー」の凍結乾燥試料は熱風乾燥試料に比べ、高い捕捉活性を示した。

(5) 蔞リパーゼ阻害活性

イチゴ葉抽出液の蔞リパーゼ50%阻害濃度を表5に示す。イチゴの品種、乾燥法を問わず、1mlあたり0.3mgから0.6mgという低濃度において、蔞リパーゼ活性を50%阻害した。

(6) マルターゼ阻害活性

イチゴ葉抽出液のマルターゼ50%阻害濃度を表6に示す。蔞リパーゼ活性阻害と比べると品種の

別なく1mlあたり36mg、42mgという高濃度において、マルターゼ活性を50%阻害した。

(7) α - アミラーゼ阻害活性

イチゴ葉抽出液のα - アミラーゼ50%阻害濃度を表7に示す。1mlあたり68mg～81mgという高濃度において、α - アミラーゼ活性を50%阻害した。α - アミラーゼ阻害には、マルターゼを50%阻害するよりも高濃度を要した。

(8) チロシナーゼ阻害活性

イチゴ葉抽出液のチロシナーゼ50%阻害濃度を表8に示す。品種、乾燥法によらず1mlあたり18mg前後の濃度において、チロシナーゼ活性を50%阻害した。

表1 イチゴ葉の水分量

試料・乾燥方法	水分量(%)
「紅ほっぺ」・熱風乾燥	54.8±4.5
「おいCベリー」・熱風乾燥	62.4±2.9
「おいCベリー」・凍結乾燥	64.6±0.4
平均±標準偏差 (n=3)	

表2 イチゴ葉抽出液の総ポリフェノール量

試料・乾燥方法	総ポリフェノール量(mg*/g乾燥重量)
「紅ほっぺ」・熱風乾燥	29.8±1.4
「おいCベリー」・熱風乾燥	40.2±1.5
「おいCベリー」・凍結乾燥	44.8±1.4
平均±標準偏差 (n=3) *没食子酸当量	

表3 イチゴ葉の総ビタミンC量

試料	総ビタミンC (mg/100g)	還元型ビタミンC量 (mg/100g)
「紅ほっぺ」	12.0±0.5	ND
「おいCベリー」	7.9±1.0	ND
平均±標準偏差 (n=3) ND:検出されず		

表4 イチゴ葉抽出液のDPPHラジカル捕捉能

試料・乾燥方法	AsA 当量($\mu\text{mol/g}$ 乾燥重量)
「紅ほっぺ」・熱風乾燥	356.2 \pm 46.5
「おいCベリー」・熱風乾燥	393.8 \pm 116.9
「おいCベリー」・凍結乾燥	564.2 \pm 54.1

平均 \pm 標準偏差 (n=3)

表5 イチゴ葉抽出液のリパーゼ50%阻害濃度 (IC₅₀)

試料・乾燥方法	IC ₅₀ (mg 乾燥葉/ml)
「紅ほっぺ」・熱風乾燥	0.292
「おいCベリー」・熱風乾燥	0.279
「おいCベリー」・凍結乾燥	0.592

表6 イチゴ葉抽出液のマルターゼ50%阻害濃度 (IC₅₀)

試料・乾燥方法	IC ₅₀ (mg 乾燥葉/ml)
「紅ほっぺ」・熱風乾燥	35.9
「おいCベリー」・熱風乾燥	41.6
「おいCベリー」・凍結乾燥	—

表7 イチゴ葉抽出液の α アミラーゼ50%阻害濃度 (IC₅₀)

試料	IC ₅₀ (mg 乾燥葉/ml)
「紅ほっぺ」・熱風乾燥	68.1
「おいCベリー」・熱風乾燥	75.7
「おいCベリー」・凍結乾燥	81.2

表8 イチゴ葉抽出液のチロシナーゼ50%阻害濃度 (IC₅₀)

試料	IC ₅₀ (mg 乾燥葉/ml)
「紅ほっぺ」・熱風乾燥	18.1
「おいCベリー」・熱風乾燥	18.3
「おいCベリー」・凍結乾燥	17.3

考察

本研究では、「紅ほっぺ」と「おいCベリー」の2品種のイチゴ葉を用いて検討を行った。

「紅ほっぺ」は「章姫」と「さちのか」を交配して育成された品種であり静岡県農業試験場で開発され、2002年に農林登録（第10371号）された品種である⁷⁾。「おいCベリー」は「9505-05」と「さちのか」を交配して育成された品種で、独立行政法人農研機構九州沖縄農業研究センターで開発され、2012年に農林水産省に登録（第22113号）された品種である⁸⁾。

これらのイチゴ葉を45℃あるいは凍結乾燥にて乾燥させた試料を用いて検討を行った。この乾燥条件については、レモンバーム葉において最適な乾燥条件を検討し、45℃乾燥が最適であると見出した柚木崎らの報告⁹⁾を参考とした。比較的低温の温風で乾燥させることにより高温乾燥に比べ、含有成分を保持することができると考えられた。なお、データは示していないが「紅ほっぺ」葉をイチゴハウス内で数日間天日乾燥させた試料についても総ポリフェノール量、DPPHラジカル捕捉活性を検討したところ、両項目ともに45℃2時間乾燥試料とほぼ同等であり、このことから、一度に大量の葉を処理できる天日乾燥も利用可能であると考えられた。

本研究のイチゴ葉に含まれるポリフェノール量とDPPHラジカル捕捉活性との相関を調べたところ、相関係数 $r=0.761$ と高い正の相関を示した。一方、葉に含まれる総ビタミンC量とDPPHラジカル捕捉活性との相関は相関係数 $r=-0.427$ であり、負の相関を示した。これらのことから、イチゴ葉の抗酸化活性は含まれるポリフェノールに因るところが大きいと考えられた。Meyersら¹⁰⁾は、8品種のイチゴ果実においてポリフェノール含量と抗酸化活性（酸素ラジカル消去活性）の間に $r=0.79$ という高い相関を認めたことを報告しており、果実だけでなく葉においても同様にラジカル消去を行う本体がポリフェノール類であることが推察された。

本研究において、イチゴ葉の80%エタノール抽出液による消化酵素活性阻害作用が最も顕著であったのは隣リパーゼ阻害であり、マルターゼ、 α -アミラーゼ阻害に比べ、1/100オーダーの濃度で阻害作用を示した。また、チロシナーゼ阻害活性についても、作用が強いと言えるほどではないが、阻害活性があることが確認された。

これまで、オランダイチゴ果実や葉の隣リパーゼ阻害作用について報告されたものはほとんどなく、本研究を端緒として今後、その詳細な検討が必要であると考えられる。本研究は、乾燥葉の抽出液を用いた実験のみであるため、酵素阻害を行う成分が何であるかを同定する検討は行っておらず、その作用が何によるものかについては未知である。しかし、ポリフェノール含量とそれぞれの酵素阻害活性との相関を調べたところ、隣リパーゼでは $r=0.726$ 、 α -アミラーゼでは $r=0.891$ 、チロシナーゼでは $r=0.967$ とそれぞれ高い相関がみられたことから、ポリフェノール類が酵素阻害に関わっていることが考えられる。西ら¹¹⁾は、ラズベリーやブラックベリー等、各種ベリー類果実に含まれるポリフェノールにより隣リパーゼ阻害が認められ、それはアントシアニンなどのモノマー型ポリフェノールではなく、オリゴマー型のポリフェノールによることを報告している。また、藤枝ら³⁾は、イチゴ茎葉に含まれるポリフェノールであるdavuricinT1が α -アミラーゼ阻害作用を示し、そのアシル基が多く分子量が大きいほど阻害活性が強いことを報告している。このような知見から、今後、本研究で用いた「紅ほっぺ」「おいCベリー」葉についてもポリフェノール類を抽出し詳細な検討をする必要があると考えられる。

山田ら¹²⁾はイチゴ5品種「とよのか」、「ひのみね」、「女峰」、「はるのか」、「はるよい」の葉部におけるポリフェノール含量には品種差異が認められるものの、主要成分はプロシアニジン類(+)-catechinおよびprocyanidin B3であり、その含量比はほぼ1:1であることを報告している。また、イチゴ葉中のポリフェノール含量には季節変動があり、低温期（冬期）は品種に関わらず高いポリフェノール含量を示すものの、高温期（夏期）では高含量の品種と低含量の品種があり、ばらつきが認められた事も併せて報告されている。中でも「とよのか」においては、これらのポリフェノール含量が3月から4月に低下、さらに6月から8月にかけて低下し変動が比較的頻繁なタイプであると判別された。本研究で用いたイチゴ2品種はいずれも「とよのか」由来の系統から交配されて誕生した品種であることから、ポリフェノール含量において同様の変動パターンをとる可能性が考えられる。本研究では、果実収穫後の5月下旬から6月初旬の葉を用いており、ポリ

フェノールの有効利用を考える場合には、葉の採取時期についても検討が必要である。

さらに、イチゴ葉を食品等として利用する場合、残留農薬も課題の1つである。イチゴは栽培過程において、病害虫対策として収穫直前まで使用が許可されている農薬もある¹³⁾。イチゴ葉については残留基準が定められていないものの、食品衛生法ではこのような残留基準が定められていない農薬、飼料添加物及び動物用医薬品において、0.01ppmを超えて残留する食品の販売等が禁止されている¹⁴⁾。よって、葉を食品等として利用する場合には、果実収穫と葉の収穫を共に可能とするような栽培方法を検討することが必要となると考えられる。

本論文の一部は、日本食品科学工学会第61回大会(2014年8月、福岡市)及び第11回日本栄養改善学会中国支部学術総会(2015年7月、山口市)にて発表した。

謝辞

本研究を実施するにあたり、快くイチゴ葉を提供して下さった山本農園 山本文志様、イチゴ葉試料の調製にご協力をいただきました山口県農林総合技術センター 平田達哉様、本学教員 園田純子准教授に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 大原祐美、河越義晴、蒲田靖志、野崎勝則、森本正則、駒井功一郎：イチゴ葉に含まれる生理活性物質、近畿大学資源再生研究所報告、7、45-55、2009.
- 2) 寺内正裕、松尾健、豊田安基江、金森久幸、柴田賢哉、藤原朋子、甲村浩之、伊藤栄治、中津沙耶弥香、武藤徳男：イチゴ葉の抗酸化作用及び抗アレルギー作用、生薬学雑誌、61、18-23、2007.
- 3) 藤枝美穂、田中隆、河野功：イチゴ葉に含まれる α -アミラーゼ阻害活性成分について、日本薬学会年会要旨集、125th、4、p.155、2005.
- 4) 三上奈々、藤野加奈子、繁田真弓、加藤元土、人見英里：ブレンド健康茶およびその原料茶葉における抗酸化活性および糖質分解酵素阻害活性の評価、山口県立大学学術情報(看護栄養学部紀要)、6、5-11、2013.
- 5) 人見英里、磯村裕佳、三浦由紀子：山口県徳地産カワラケツメイ茶の機能性、山口県立大学学術情報(看護栄養学部紀要)、5、57-62、2012.
- 6) 豊川哲也、与那嶺都乃：沖縄県産植物のチロシナーゼ阻害活性、沖縄県工業技術センター研究報告書、10、61-63、2008.
- 7) 品種登録データベース 紅ほっぺ(2017年11月14日検索)
<https://www.weblio.jp/content/%E7%B4%85%E3%81%BB%E3%81%A3%E3%81%BA>
- 8) 独立行政法人 農研機構九州沖縄農業研究センターホームページ、おいCベリー(2017年11月14日検索)
<http://www.naro.affrc.go.jp/patent/breed/0300/0301/001491/index.html>
- 9) 柚木崎千鶴子、酒井美穂、小坂妙子、堂園眞澄、窄野昌信、福田亘博：レモンバーム葉のラジカル消去活性に及ぼす乾燥温度の影響、日本食品科学工学会誌、55、293-298、2008.
- 10) Meyers, K.J., Watkins, C.B., Pritts, M.P., Liu, R.H.: Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries., Journal of Agricultural and Food Chemistry., 51, 6887-6892, 2003.
- 11) 西繁典、齋藤優介、小疇浩、弘中和憲、小嶋道之：小果実に含まれるポリフェノールの血糖値上昇抑制とリパーゼ阻害活性、Res. Bull. Obihiro. Univ., 29、31-38、2008.
- 12) 山田修平、元森美奈雄、中島寿亀、國武久登、森欣也、中村典義、辻聡宏、田中政信、石丸幹二：イチゴのポリフェノール成分、日本食品化学会誌、5、201-205、1998.
- 13) データブック農業図鑑、いちご対象農薬一覧(2017年11月14日検索)
http://www.nougyo.com/data/chem/chem15_strawberry.html
- 14) 厚生労働省ホームページ、食品衛生法等の一部を改正する法律について(ポジティブリスト制関係)(2017年11月14日検索)
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0627-22a.html>