

博士論文

焙煎大麦抽出物(麦茶)の 健康機能性に関する研究

足海 洋史

目次

| | |
|---|----|
| 略称 | 3 |
| 緒言 | 4 |
| 第一章 焙煎大麦抽出物:麦茶のラット皮膚血流量に与える影響..... | 11 |
| 第二章 麦茶に含まれる香気成分:ピラジン化合物のラット皮膚血流量に与える影響 | 16 |
| 第三章 麦茶に含まれるジケトピペラジン化合物のラット皮膚血流量に与える影響..... | 30 |
| 第四章 麦茶摂取が冷水負荷時におけるヒト皮膚血流およびヒト皮膚温へ与える影響 | 45 |
| 第五章 麦茶摂取が冷房環境下におけるヒト皮膚血流量低下およびヒト皮膚温低下へ与える影響 | 56 |
| 第六章 麦茶摂取が冷房環境下における健常男女のヒト皮膚温低下へ与える影響..... | 68 |
| 第七章 総合討論 | 76 |
| 引用文献..... | 79 |
| 要旨 | 90 |

略称

| | |
|--------|--|
| 2-EP | 2-Ethylpyrazine |
| TMP | Trimethyl pyrazine |
| QOL | Quality of Life |
| NO | Nitric oxide |
| NE | Norepinephrine |
| Ach | Acetylcholine |
| L-NAME | N ^G -Nitro-L-Arginine methyl ester |
| ODQ | 1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one |
| GC | Gas Chromatography |
| MS | Mass spectrometry |
| He | Helium |
| NOS | Nitric Oxide Synthase |
| eNOS | Endothelial NOS |
| COX | Cyclooxygenase |
| cGMP | cyclic guanosine monophosphate |
| cAMP | cyclic adenosine monophosphate |
| Indo | Indomethacin |
| N.D. | Not detected |
| SIM | Selected ion monitoring |
| LC | Liquid Chromatography |
| Phe | Phenylalanine |
| Pro | Proline |
| Leu | Leucine |

緒言

1. 焙煎大麦抽出物(麦茶)

麦茶は、日本で昔から飲まれている飲み物である。麦茶は、焙煎した大麦を熱水抽出した飲み物である。一般的な麦茶の作り方を図 1 に示す。この焙煎工程によって、さまざまな物質変化が起こり、麦茶の風味を作り出している。一般的な麦茶は、六条大麦が用いられ、香ばしい香りをもつ飲み物として幅広いヒトに飲用されている。日本では、「麦こがし」「麦湯」とも呼ばれ、古くは平安時代から飲用された食経験も豊富な飲料である。麦茶は、カフェインが含まれずカロリーも低いため、子供や乳幼児でも飲用できる健康的な飲み物として幅広く飲用されている。

<通常の麦茶製法>



図 1 麦茶の作り方

2. 焙煎と香気成分

食品を焙煎するとメイラード反応が起こり、メイラード化合物と呼ばれる様々な化合物が生成される。特に、食品を焙煎することによって焙煎香と呼ばれる香ばしい香りが食品に付与されること等が知られている。コーヒーは、コーヒー生豆を焙煎機で焙煎することで、その独特な香りを有する。コーヒーは、焙煎度合いによって 3-mercapto-3-methylbutyl formate や 2-mercapto-3-methylbutyl acetate などの香気成分が生成され、浅煎りから深煎りまで特徴的な香りを付与している¹⁾。ココアやピーナッツなども焙煎工程によって、さまざまな焙煎香を生じさせる^{2,3)}。食品の香気成分は、リラックス効果などの有効性を知られており、焙煎によって生じる焙煎香にも健康機能性がある事が考えられる⁴⁾。焙煎によって生じるピラジン類は、それらの食品加工によって生成される焙煎香として知られている^{2,3)}。ピラジン化合物は、アミノ酸や糖が縮合反応することによって生じる複素環を有する化合物であり、血小板凝集抑制効果等が報告されており、新たな健康機能性の発見が期待される⁵⁾。

3. 焙煎と呈味成分

前項で述べたように食品を加熱するとメイラード反応が起こり、様々な化合物が生成される。これらの化合物は香りのみでなく食品の味への寄与も報告されている⁶⁾。例えば、タンパク質が含まれる食品を焙煎加工することにより生成されるジケトピペラジン:環状ジペプチドは、苦味に寄与することが報告されている⁷⁾。ジケトピペラジンは、複素環を有する六員環ペプチドであり、ペプチド構造を有しながらも環状構造を有する⁷⁾。ペプチドは、環状構造を有することで、立体的に安定かつペプチダーゼ等に分解されにくいという特長をもつ^{8,9)}。

これらのジケトピペラジンは、コーヒーなどの清涼飲料の苦味成分としても報告されており、食品の味の複雑さを説明する成分の1つとして研究されている⁷⁾。

食品の呈味成分が健康機能性に与える影響は、ポリフェノールなど含め幅広く報告されている^{10,11)}。Val-Tyr などのジペプチドは、血圧低下などの循環器への影響が報告されており、類似構造を有するジケトピペラジンにも循環器系に対する健康機能性が期待される^{12,13)}。

4. 血流の役割

血流は、血液の流れである¹⁴⁾。酸素やホルモンなどの生体調節因子は、血流:血液循環を介して体内を循環しており、血流は生体調節に重要な役割を担っている(表 1)¹⁴⁾。血流は、体温制御の観点でも重要な役割を担っている。体の熱エネルギー移動は血液を介して行われているため、「中枢から末梢への熱エネルギー移動」は血流によって制御される。そのため、血流は末梢組織の体温調節に重要な役割を担っている¹⁴⁾。

表 1 血流の役割

| |
|-------------------------|
| 酸素や二酸化炭素の運搬 |
| 栄養素(糖、脂質、アミノ酸、タンパク質)の運搬 |
| ホルモンなどのシグナル分子の運搬 |
| 体温調節 |
| 代謝老廃物の運搬(排出) |
| 水分量制御 |

5. 血流制御のメカニズム:血管収縮弛緩のメカニズム

血流は、血管の収縮・弛緩によって制御されている^{14,15)}。血管の収縮・弛緩は、血管平滑筋によって制御されている^{14,16)}。血管平滑筋は、血管平滑筋細胞が集まってできた組織であり、血管の構

造は図 2 に示すような構造になっている^{14,17)}。血管平滑筋細胞は、ギャップ結合で結合している^{14,18)}。このギャップ結合は、電気抵抗が少なく、神経活動などの活動電位が伝わるようになっている。

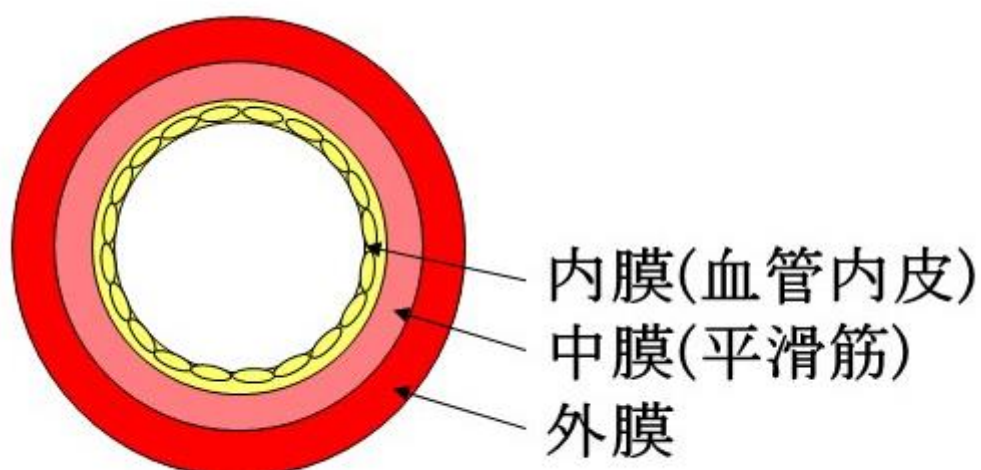


図 2 血管の構造

血管平滑筋内部は、アクチンやミオシンなどの繊維構造があり、これらの繊維構造の相互作用によって、収縮または弛緩が発生する^{14,19)}。血管平滑筋細胞の収縮メカニズムは、以下のとおりである。血管平滑筋の細胞膜における脱分極によって、細胞膜にある Ca^{2+} イオンチャネルが開き、 Ca^{2+} イオンが細胞外から細胞内へ流入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高くなる。細胞内 Ca^{2+} イオンは、カルモジュリンと結合することにより、ミオシンキナーゼを活性化させる^{14,20)}。これにより、ミオシンのリン酸化が起こり、血管平滑筋収縮(血管収縮)が誘導される。筋収縮が進むと、ミオシンフォスファターゼの働きにより、ミオシンの脱リン酸化が誘導され、収縮した血管平滑筋の弛緩が誘導される^{14,21)}。

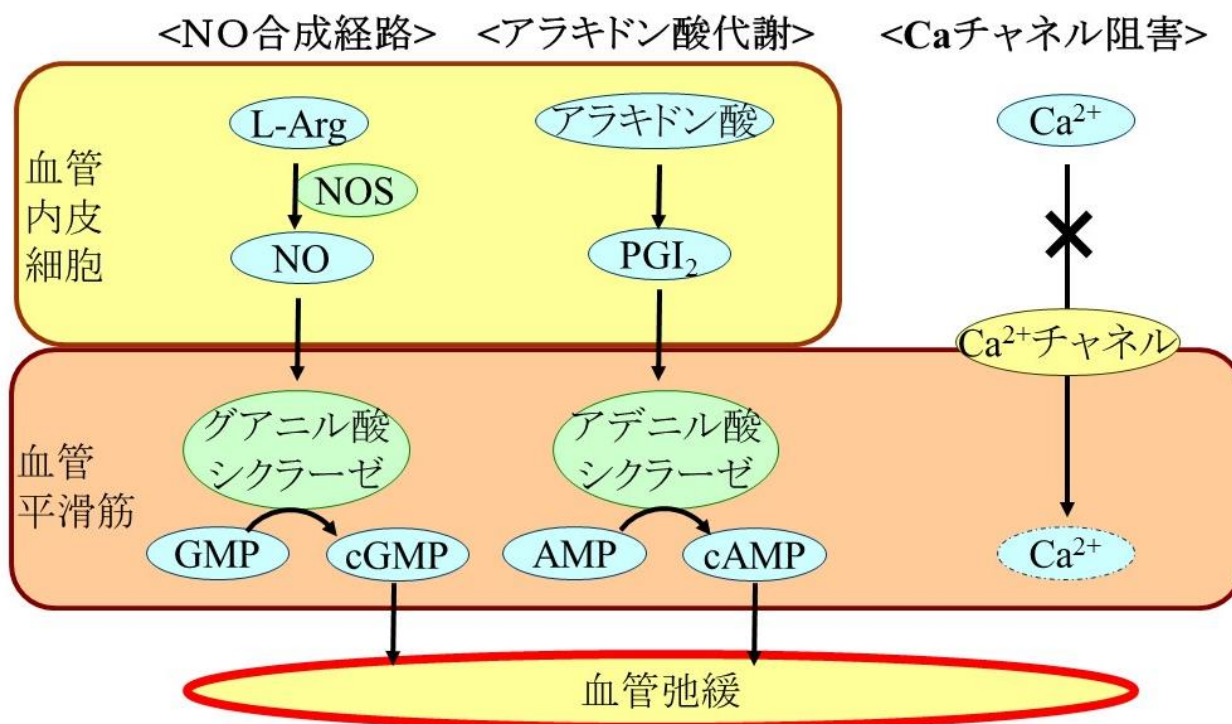


図3 血管の収縮・弛緩メカニズム

上述の血管平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度は、自律神経による調節と液性因子による調節を受けている^{22,23)}。

自律神経による調節は、以下のようなメカニズムで調節がされている。自律神経系は、平滑筋や心筋および腺を制御することで、循環・体温維持などの自律機能を調節している¹⁴⁾。皮膚などの末梢組織では、皮膚交感神経が皮膚血管を囲んでおり、交感神経優位になることでホスホリパーゼが活性化し、自律神経末端から Ca^{2+} が放出される。これにより、上述の血管平滑筋が収縮し、末梢血管が収縮する²³⁾。

液性因子による調節は、以下のようなメカニズムで調節がされている。血管は、血管平滑筋の内側に内皮構造を有しており、液性因子による調節は、血管内皮を介する経路と血管内皮を介さない経路がある²⁴⁾。

血管の収縮・弛緩を調節する液性因子の例を表2に示す²⁵⁻³⁰⁾。

表 2 血管収縮物質、血管弛緩物質の例

| | 化合物名 |
|----------|--------------------------|
| 血管収縮物質の例 | エンドセリン ²⁵⁾ |
| | アドレナリン ²⁶⁾ |
| | アンジオテンシン ²⁷⁾ |
| 血管弛緩物質の例 | 一酸化窒素 ²⁸⁾ |
| | プロスタサイクリン ²⁹⁾ |
| | セロトニン ³⁰⁾ |

6. 冷え性

冷え性は、手や足などの末梢組織の体温が低下し、冷えの自覚症状を感じる症状のことである(図 4)³¹⁻³³⁾。冷え性は、明確な疾病の概念ではないが、不定愁訴の代表的な例の1つである。不定愁訴は、自覚症状にもとづく心身の体調不良であり、不定愁訴を感じるにより生活の質(Quality of Life:QOL)は低下する。そのため、冷え性の症状を緩和することは、QOL の向上に対して重要である。



図 4 冷え性の症状

冷え性に関連が高い概念に、東洋医学の「瘀血(おけつ)」がある³⁴⁻³⁵⁾。瘀血は、血液循環が滞っている状態である³⁴⁾。血液循環が悪くなると、高血圧や動脈硬化などの疾病につながる³⁵⁾。この瘀血状態による末梢血流の低下は、自律神経のバランスが崩れることによる血管収縮によって末

梢血流量が低下することが関係している³⁶⁾。都市化された生活は、電車やオフィスなどさまざまな場所で冷房が使用されていることもあり、ストレスの影響などによって冷え性になりやすい環境になっているため、多くのヒト(特に女性)が冷え性に悩んでいる^{37,38)}。冷え性の症状として、末梢体温が低下しやすくなったりすることにより、睡眠の質が低下するなどの QOL が低下することもわかっている^{39,40)}

7. 本研究の概要

麦茶は、抗酸化効果や胃粘膜保護作用などの健康機能性が報告されているが、血流に関する健康機能性に関する報告は少ない^{41,42)}。また、麦茶に含まれる 2,3,5-Trimethylpyrazine(TMP)は、血液粘弾性を下げ、血液流動性を高めることが報告されている⁴³⁾。一方で麦茶が血管機能や末梢血流に与える影響は報告されていない。

そこで、本研究は「麦茶が血流などの循環器系および不定愁訴：冷え性に与える影響」の評価を目的とし、以下に示す内容の研究を行った。

第一章は、麦茶がラット皮膚血流量に与える影響を動物試験で評価し、麦茶のラット皮膚血流量増加効果を明らかにした。また、焙煎の有無によってその効果に違いがあることを確認し、焙煎度が高くなるにつれて、ラット皮膚血流量増加効果が強くなることを明らかにした。

第二章は、麦茶に含まれる香気成分であるピラジン化合物を明らかにし、それらの化合物がラット尾部血流に与える影響をラットへの単回投与試験で評価した。その結果、2-Ethylpyrazine (2-EP) のラット皮膚血流量増加効果を明らかにした。また、ラット腹部大動脈血管標本を用いた実験によって、2-EP の血管弛緩作用を明らかにし、その血管弛緩作用は血管内皮依存的な一酸化窒素：Nitric oxide (NO) 産生が関連していることを明らかにした。

第三章は、麦茶に含まれる香味成分であるジケトピペラジンを明らかにし、それらの化合物がラット尾部血流に与える影響をラットへの単回投与試験で評価し、cyclo (L-Pro-D-Phe) が最も強いラット皮膚血流量増加効果があることを確認した。また、ラット腹部大動脈血管標本を用いた実験によって、cyclo (L-Pro-D-Phe) の血管弛緩作用を明らかにし、その血管弛緩作用は血管内皮依存的な NO 産生が関連していることを明らかにした。

第四章は、麦茶が冷え性の自覚症状がある女性に対して、冷水負荷後のヒト皮膚血流量およびヒ

ト皮膚温度に与える影響をプラセボ比較二重盲検ランダム化並行群間比較試験で評価した。その結果、麦茶は、対照飲料と比較して、冷水負荷後の皮膚血流量を増加させ、皮膚温度を上昇させることを明らかにした。

第五章は、麦茶が冷え性の自覚症状がある男女に対して、冷房下でのヒト皮膚血流量およびヒト皮膚温低下に与える影響をプラセボ比較二重盲検ランダム化クロスオーバー比較試験で評価した。その結果、麦茶は、対照飲料と比較して、冷房下による皮膚血流量低下および皮膚温低下を抑制させることを明らかにした。また、その麦茶の血流量増加効果は、冷え性の自覚症状がある被験者に顕著な効果があることを明らかにした。

第六章は、麦茶が健常男女に対して、冷房下でのヒト皮膚温低下に与える影響をプラセボ比較二重盲検ランダム化クロスオーバー比較試験で評価した。その結果、麦茶は、対照飲料と比較して、冷房下による皮膚温低下を抑制させることを明らかにし、その麦茶の血流量増加効果は、性差に差がないことを明らかにした。

第七章は、第一章から第六章までの結果を総括した。

第一章 焙煎大麦抽出物:麦茶のラット皮膚血流量に与える影響

1. 概要

目的

麦茶が血流に与える影響を評価するために、「麦茶投与がラット皮膚血流量に与える影響」、及び「麦茶の原料となる焙煎大麦の焙煎度合いが、麦茶のラット皮膚血流量に与える影響」を評価した。

方法

ラット単回投与試験を行い、皮膚血流量を評価した。

結果

麦茶投与によって、ラット皮膚血流量が増加した。この効果は、焙煎度が高くなることによって強くなる傾向であった。

結論:

麦茶は、ラット皮膚血流量増加効果がある。その効果は、焙煎度が高くなることによって強くなる。

2. 実験方法

2-1. 試薬

麦茶の原料となる全ての大麦は、MCフード社より購入した。未焙煎大麦は、焙煎を行わない大麦を用いた。焙煎大麦は、その焙煎度の違いを明度によって分類した^{44,45)}。基準となる焙煎度をL=32とし、焙煎度が高い大麦の焙煎度をL=17、焙煎度が低い大麦の焙煎度をL=40とした。Urethan は、富士フィルム和光純薬より購入した。

2-2. 大麦抽出物の調製

各大麦抽出物は、大麦サンプル 100 g を沸騰した湯 1 L に入れ 30 分間抽出して作成した。

2-3. 動物飼育条件

Wistar ラットは、日本 SLC より購入した。ラットの飼育条件は、12 時間毎の明暗サイクル、室温: 24±2.0°C、湿度: 55±10%で行った。飼育時に使用した餌は、CE-2 (日本クレア社製)を用いた。

2-4. ラット皮膚血流量測定試験(大麦の焙煎有無の影響評価)

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。試験前日、16 時間の絶食を行った。麻酔は、Urethan 1g/kg を腹腔内投与して行った。皮膚血流量は、レーザードップラー血流測定器 ALF-21 (アドバンス株式会社、東京)を用いて行った⁴⁶⁾。アナログ信号をデジタル信号に変換するために、アナログデジタル変換器:Power-Lab (AD instruments, ニュージーランド)を用いた。レーザードップラー血流測定器の測定プローブをラット尾部に取り付け、ラットの皮膚血流量測定を行った。麻酔下のラットは、15 分間安静にし、血流量を安定にした。その後、麦茶サンプル(L=32)、未焙煎麦茶サンプル、または水を胃内投与(1 mL/kg)した⁴⁶⁾。なお、本動物実験は、キリン株式会社動物実験倫理審査委員会の承認を得て行い、倫理指針を遵守して行った。

2-5. ラット皮膚血流量測定試験(大麦の焙煎度の影響評価)

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。試験前日、16 時間の絶食を行った。麻酔は、Urethan 1g/kg を腹腔内投与して行った。皮膚血流量は、レーザードップラー血流測定器 ALF-21 (アドバンス株式会社、東京)を用いて行った。アナログ信号をデジタル信号に変換するために、アナログデジタル変換器:Power-Lab (AD instruments, ニュージーランド)を用いた。レーザードップラー血流測定器の測定プローブをラット尾部に取り付け、ラットの皮膚血流量測定を行った。麻酔下のラットは、15 分間安静にし、血流量を安定にした。その後、麦茶サンプル(L=40、L=32 または L=17)、または水を胃内投与(1 mL/kg)した⁴⁶⁾。なお、本動物実験は、キリン株式会社動物実験倫理審査委員会の承認を得て行い、倫理指針を遵守して行った。

2-6. 統計解析

各試験の統計量は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は Dunnett's test を用いて行い、有意水準は $p<0.05$ とした。

3. 実験結果

3-1. 麦茶投与がラット皮膚血流量へ与える影響

投与後 30 分後のラット皮膚血流量変化率を図 5 に示す。麦茶投与時のラット皮膚血流量は、水投与時のラット皮膚血流量と比較して、有意に高くなった(図 5)。また、麦茶投与時のラット皮膚血流量は、未焙煎大麦抽出物投与時のラット皮膚血流量と比較して、有意に高くなった(図 5)。未焙煎大麦抽出物投与時のラット皮膚血流量は、水投与時のラット皮膚血流量と比較して、有意な差は検出されなかった(図 5)。

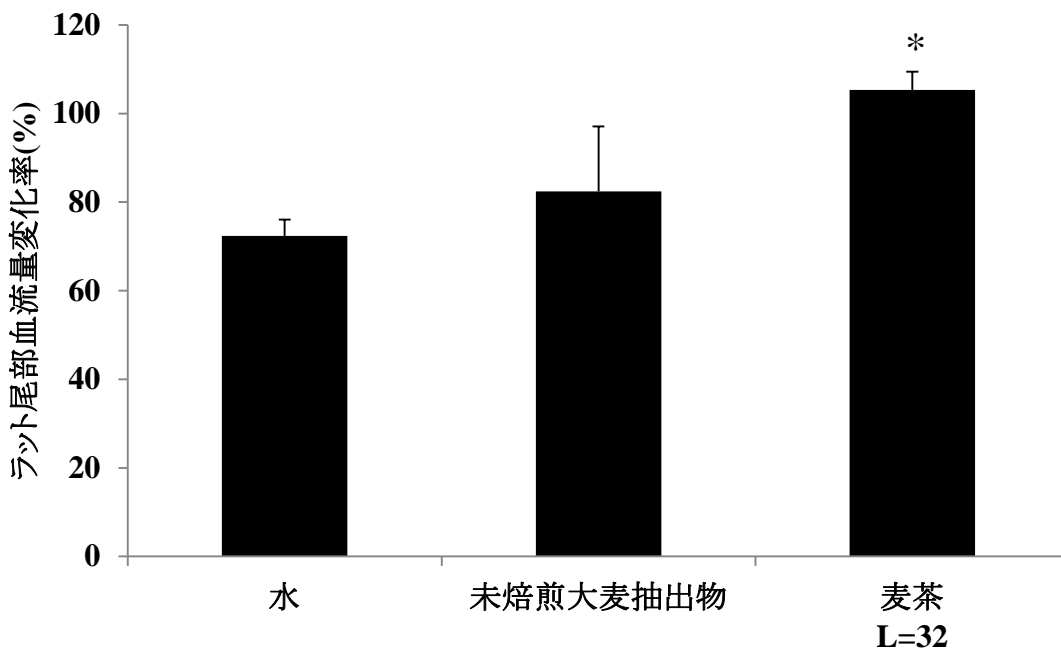


図 5 麦茶(L=32)または未焙煎大麦抽出物投与時のラット皮膚血流量変化
水(コントロール)、未焙煎大麦抽出物、麦茶(L=32)投与時のラット皮膚血流量に与える影響を、ラットへの単回投与試験で評価した(n=10)。投与前のラット皮膚血流量を 100%とし、投与後 30 分後の血流量変化率を評価した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、Dunnett 検定を用いた。有意水準は、 $p<0.05$ とした。

3-2. 麦茶原料の焙煎大麦の焙煎度が麦茶のラット皮膚血流量へ与える影響

投与後 30 分後のラット皮膚血流量変化率を図 6 に示す。麦茶投与群はいずれも、水投与群と比較して、ラット皮膚血流量が増加した。焙煎度が高くなるにつれて、ラット皮膚血流量が高くなった (図 6)。特に、基準となる焙煎度の大麦 (L=32)、および焙煎度が高い大麦 (L=17) 投与群は、有意に高い血流量を確認した。

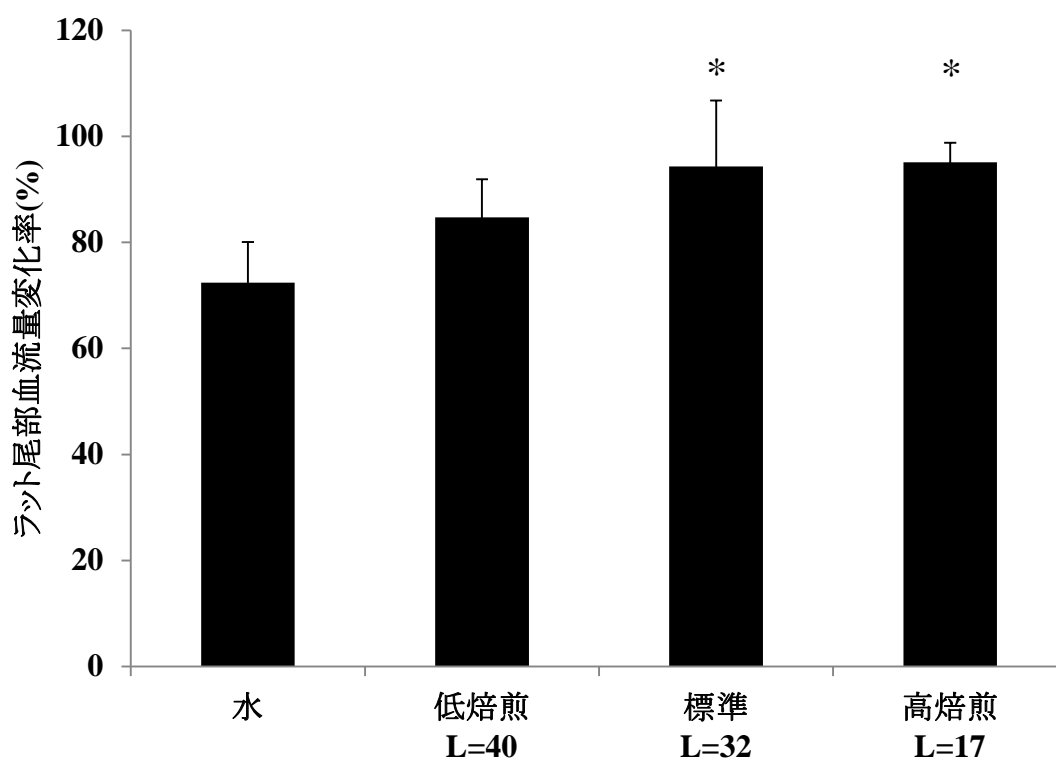


図 6 焙煎度の違いが麦茶のラット皮膚血流量増加効果に与える影響

水(コントロール)、焙煎度の低い麦茶 (L=40)、焙煎度が標準な麦茶 (L=32) または焙煎度が高い麦茶 (L=17) 投与時のラット皮膚血流量に与える影響を、ラットへの単回投与試験で評価した (n=10)。投与前のラット皮膚血流量を 100% とし、投与後 30 分後の血流量変化率を評価した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、Dunnett 検定を用いた。有意水準は、 $p<0.05$ とした。

4. 考察

今回得られた結果から、麦茶投与によってラット皮膚血流量が高くなることが明らかになった(図 5)。麦茶投与時のラット皮膚血流量は、未焙煎大麦抽出物投与と比較して、有意な高値を示したことから、焙煎によって生じる成分によって麦茶のラット皮膚血流量増加効果が発揮されている可能性が示唆された(図 5)。また、投与する麦茶に使用する焙煎大麦原料の焙煎度合いを比較したところ、焙煎度が高くなるほど麦茶の血流量増加効果が強くなっていたことから、上述の焙煎によって生じる成分が麦茶の血流量増加効果に重要な働きをもっていると考え(図 6)。

食品の焙煎によってカラメルやナッツのような様々な香りや呈味に寄与する成分が生成される⁴⁷⁾。麦茶も焙煎香や焙煎による味成分を有しており、これらの成分に血流制御に関連する成分があると考え。

過去の研究で、麦茶に含まれる 2,3,5-TMP の血液粘弾性低下効果が報告されている⁴³⁾。TMP はピラジン骨格を有する香気成分であり、焙煎によって生成される⁴⁸⁾。TMP は麦茶にも含まれていることから、これらの成分が麦茶のラット皮膚血流量に影響していると考え。また、ジケトピペラジン等、ピラジン化合物以外にも焙煎によって生じる化合物は報告されており、それらの成分の機能検証を行うことで、麦茶のラット皮膚血流量増加効果の関与成分を探索できると考える⁴⁹⁾。

5. 結論

麦茶はラット皮膚血流量増加効果がある。その効果は、原料大麦の焙煎度が高いほど強い効果がある。

第二章 麦茶に含まれる香気成分:ピラジン化合物のラット皮膚血流量に与える影響

1. 概要

第一章で「麦茶のラット皮膚血流量増加効果は、焙煎によって生じる成分が重要な役割をもっている可能性」を示唆した。そこで、第二章では、麦茶の焙煎香に含まれるピラジン化合物がラット皮膚血流量増加効果を有するか評価するために、ピラジン化合物の血管弛緩作用およびその作用機序を明らかにした。本章の概要は以下の通りである。

目的

麦茶に含まれる香気成分:ピラジン化合物がラット血流量に与える影響を評価するために、「ピラジン化合物の血管弛緩作用およびその作用メカニズム」、及び「ピラジン化合物のラット血流量への影響」を評価した。

方法

GC-MS を用いて、麦茶に含まれるピラジン化合物を分析した。

ラット腹部大動脈血管標本を用いた血管弛緩作用検証試験を行い、ピラジン化合物の血管弛緩作用評価および作用メカニズムを評価した。

ラット単回投与試験を行い、ピラジン化合物のラット皮膚血流量に与える影響を評価した。

結果

麦茶に 9 種類のピラジン化合物が含まれていた。ピラジン化合物は、大麦を焙煎することで生じるが、焙煎度が高くなることで麦茶中の総ピラジン量が減少した。

9 種類のピラジン化合物は、いずれも血管弛緩作用があり、2-EP が最も強い血管弛緩作用があった。2-EP の血管弛緩作用は、血管内皮細胞依存的な NO 産生経路を介していた。2-EP 投与によって、ラット皮膚血流量が増加した。

結論:

麦茶に含まれる香気成分:2-EP は、ラット皮膚血流量増加効果がある。その作用メカニズムは、血管内皮細胞依存的な NO 産生を介する血管弛緩である。

2. 実験方法

2-1. 試薬

麦茶の原料となる全ての大麦は、MCフード社より購入した。未焙煎大麦は、焙煎を行わない大麦を用いた。焙煎大麦は、その焙煎度の違いを明度によって分類した^{44,45)}。基準となる焙煎度を

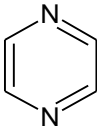
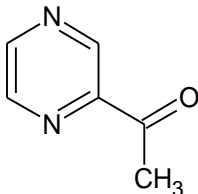
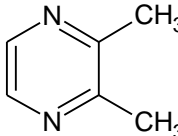
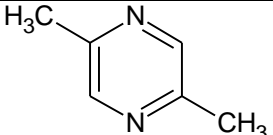
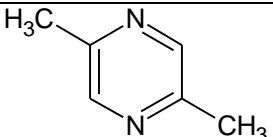
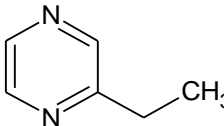
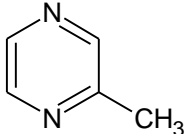
L=32 とし、焙煎度が高い大麦の焙煎度を L=17、焙煎度が低い大麦の焙煎度を L=40 とした。用いたピラジン化合物を表 3 に示す。用いたピラジン化合物は全て、東京化成工業より購入した。ノルエピネフリン (NE:Norepinephrine)、Ach、Indo は富士フィルム和光純薬より購入した。

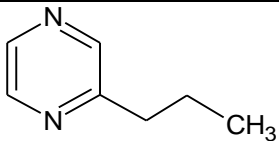
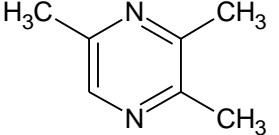
NG-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)は、株式会社 同仁化学研究所より購入した。

1H-[1,2,4] Oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) は、シグマアルドリッチから購入した。

Urethan は、富士フィルム和光純薬より購入した。

表 3 ピラジン化合物の構造式

| 化合物名 | CAS 番号 | 構造式 |
|----------------------|------------|--|
| Pyrazine | 290-37-9 |  |
| 2-Acetylpyrazine | 22047-25-2 |  |
| 2,3-Dimethylpyrazine | 5910-89-4 |  |
| 2,5-Dimethylpyrazine | 123-32-0 |  |
| 2,6-Dimethylpyrazine | 108-50-9 |  |
| 2-Ethylpyrazine | 13925-00-3 |  |
| 2-Methylpyrazine | 109-08-0 |  |

| | | |
|-------------------------|------------|--|
| 2-Propylpyrazine | 18138-03-9 |  |
| 2,3,5-Trimethylpyrazine | 14667-55-1 |  |

2-2. 大麦抽出物の調製

麦茶は、焙煎大麦(L=40,32,17 のいずれか) 100 g を沸騰した湯 1 L に入れ 30 分間抽出して作成した。未焙煎大麦抽出物は、未焙煎大麦 100 g を沸騰した湯 1 L に入れ 30 分間抽出して作成した。

2-3. ピラジン化合物の分析

ピラジン化合物の分析は、ガスクロマトグラフィー:GC-MS を用いて行った⁵¹⁾。麦茶または未焙煎大麦抽出物 5 ml をガラス試験管に入れ、2 M NaOH 500 μ L および NaCl 2g を添加した。その後、内部標準液(20 μ M 2-chloropyrazine) 500 μ L 添加し混合した。クロロフォルムと酢酸エチルを 1:1 で混合した抽出溶媒を作成し、4.5 mL を添加し、分液抽出を行った。遠心分離(3,000 rpm, 20 分間)を行い、上層(有機溶媒層)を全量回収した。その後、硫酸ナトリウムで脱水処理を行い、窒素下で 500 μ L まで濃縮を行った。この溶液にクロロフォルムを加えることで 1 mL に調製し、GC-MS に供した。GC-MS の条件は以下に示す通りである。

<GC-MS 条件>

カラム : HP-INNOWAX (0.25mm I. D. \times 60m 膜厚 0.25 μ m)
 気化室温度 : 200 $^{\circ}$ C
 昇温プログラム : 70 $^{\circ}$ C (2min) \Rightarrow 70 $^{\circ}$ C \Rightarrow 230 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C/min) \Rightarrow 230 $^{\circ}$ C (10min)
 スプリット比 : 1:2
 線速度 : 36.7cm/s
 キャリヤーガス : He
 イオン源温度 : 200 $^{\circ}$ C
 インターフェース温度 : 230 $^{\circ}$ C

2-4. 動物飼育条件

Wistar ラットは、日本 SLC より購入した。ラットの飼育条件は、12 時間毎の明暗サイクル、室温： $24\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度： $55\pm 10\%$ で行った。飼育時に使用した餌は、CE-2 (日本クレア社製)を用いた。いずれの動物実験も、キリン株式会社動物実験倫理審査委員会の承認を持って行い、倫理指針を遵守して行った。

2-5. ラット腹部大動脈を用いた血管弛緩作用評価試験

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。試験当日、2,5-Diethyl ether を用いて、麻酔をかけた後に解剖を行い、腹部大動脈を採取した。回収した腹部大動脈を 2 mm 長になるように切断し、血管標本を作製した。作成した血管標本は、Krebs バッファ (120 mM NaCl , 4.7 mM KCl , 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , $1.2\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 25.0 mM NaHCO_3 , and 10 mM glucose ; pH 7.35) 5 mL が満たされたマイクロージャーマグヌス UC-2TD (いわしや岸本医科産業株式会社、京都) の反応槽のフックに取り付けた(図 7)。反応槽の中は、95% O_2 / 5% CO_2 ガスの泡で満たされるようにした。

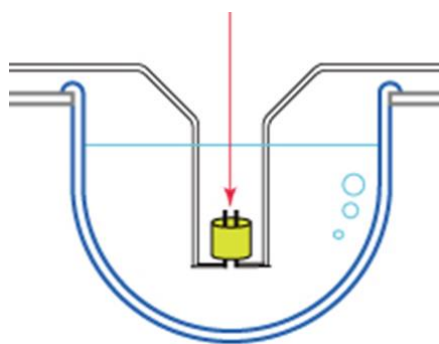


図 7 血管弛緩作用の評価方法

血管標本の収縮は、5 mM NE 溶液 50 μL をバスに添加して行なった (NE 終濃度 0.1 μM)。NE 添加による血管収縮後、0.1 μM Ach 溶液を添加し血管標本を弛緩させた。この時の Ach 添加時の弛緩量を 100%と定義した^{52, 53)}。その後、Krebs バッファ 5 mL で 3 回血管標本を洗浄した上で、再度 NE を添加し血管標本を収縮させた(NE 終濃度 0.1 μM)。その後、評価サンプルを添加し、0.1 μM Ach 添加時の弛緩量と比較した相対血管弛緩量を血管弛緩率とした。

$$\text{血管弛緩率} = (\text{評価サンプル添加時の弛緩量} / 0.1\ \mu\text{M Ach 添加時の弛緩量}) \times 100$$

血管内皮を除去した血管標本は、Krebs バッファを満たしたスライドグラス上で、血管標本をこする

ことで作製した⁵⁴⁾。この血管内皮を除去した血管標本を用いて、上述の血管弛緩率評価試験を行うことで、血管弛緩作用が血管内皮に依存しているか評価を行った。

用いた血管弛緩阻害剤及びその添加条件は表 4 の通りである。

表 4 血管弛緩阻害剤およびその添加条件

| 阻害剤名 | 阻害する酵素 | 阻害剤添加濃度 (終濃度) |
|--------------|--------------|----------------------------------|
| L-NAME | eNOS | 100 μM ⁵⁴⁾ |
| Indomethacin | COX-2 | 100 μM ⁵⁵⁾ |
| ODQ | cGMP cyclase | 50 μM ⁵⁶⁾ |

2-6. ラット腹部大動脈を用いた cGMP 産生評価試験

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。その後、2,5-Diethyl ether を用いて、麻酔をかけた後に解剖を行い、腹部大動脈を採取した。回収した腹部大動脈を 2 mm 長になるように切断し、血管標本作製した。作成した血管標本は、Krebs バッファ 5 mL に入れ、評価サンプルを添加し、37°C で 15 分間保存した。その後、血管標本を取り出し、Krebs バッファ 5 mL で洗浄した上で、0.1 mM HCl に添加し、マルチビーズショッカー MB2000(安井器械株式会社、大阪)を用いて、組織破壊を行った。組織破壊の方法は、機械説明書に従って行った。組織破壊した溶液は、遠心分離(15,000 rpm, 10 分間)を行い、上清を回収した。得られた上清の cGMP 濃度および総タンパク質濃度を測定した。cGMP 濃度は、Direct cGMP ELISA kit (Enzo Life Science 社、米国)を用いて測定し、タンパク質濃度は、Protein assay kit (Bio Rad 社、米国)を用いて測定した。測定方法は、それぞれ添付の説明書に従い測定を行った。タンパク質の標準曲線の標品は、Bovine serum albumin を用いた。血管標本中の cGMP 量は、抽出されたタンパク質量で補正して算出した⁵⁷⁾。

$$\text{cGMP 濃度} = \text{cGMP 量} / \text{タンパク質量}$$

2-7. ラット皮膚血流量測定試験

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。試験前日、16 時間の絶食を行った。麻酔は、Urethan 1g/kg を腹腔内投与して行った。皮膚血流量は、レーザードップラー血流測定器 ALF-21 (アドバンス株式会社、東京)を用いて行った。アナログ信号をデジタル信号に変換するた

めに、アナログデジタル変換器:Power -Lab (AD instruments, ニュージーランド)を用いた。レーザードップラー血流測定器の測定プローブをラット尾部に取り付け、ラットの皮膚血流量測定を行った。麻酔下のラットは、15 分間安静にし、血流量を安定にした。その後、ラットへサンプルを胃内投与(3.3 mL/kg)した⁴⁶⁾。

2-8. 統計解析

各試験の統計量は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は Dunnett's test を用いて行い、有意水準は $p<0.05$ とした。

3. 実験結果

3-1. 麦茶中のピラジン化合物

麦茶および未焙煎大麦抽出物のピラジン化合物分析結果を表 5 に示す。麦茶は 9 種類のピラジン化合物が含まれており、未焙煎大麦抽出物はピラジン化合物がほとんど含まれていなかった。最も多く含まれていた化合物は、2-Methylpyrazine であった。また焙煎強度を比較したところ、高焙煎は低焙煎、標準に比較して、総ピラジン類が少ない傾向であった(図 8)。高焙煎は、標準に比較して、有意に総ピラジン類が少なかった(図 8)。

表 5 大麦抽出物に含まれるピラジン化合物

| 化合物名 | 未焙煎 | 低焙煎 L=42 | 標準 L=32 | 高焙煎 L=17 |
|-------------------------|------|-------------|-------------|-------------|
| Pyrazine | N.D. | 0.99 ± 0.05 | 1.45 ± 0.07 | 1.09 ± 0.05 |
| 2-Acetylpyrazine | N.D. | 0.07 ± 0.01 | 0.08 ± 0.01 | 0.02 ± 0.00 |
| 2,3-Dimethylpyrazine | N.D. | 0.24 ± 0.01 | 0.25 ± 0.01 | 0.17 ± 0.01 |
| 2,5-Dimethylpyrazine | N.D. | 0.38 ± 0.02 | 0.29 ± 0.01 | 0.18 ± 0.01 |
| 2,6-Dimethylpyrazine | N.D. | 0.59 ± 0.03 | 0.51 ± 0.03 | 0.33 ± 0.02 |
| 2-Ethylpyrazine | N.D. | 0.28 ± 0.01 | 0.28 ± 0.01 | 0.21 ± 0.01 |
| 2-Methylpyrazine | N.D. | 2.85 ± 0.14 | 2.92 ± 0.15 | 2.05 ± 0.10 |
| 2-Propylpyrazine | N.D. | 0.01 ± 0.00 | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.00 |
| 2,3,5-Trimethylpyrazine | N.D. | 0.12 ± 0.01 | 0.09 ± 0.01 | 0.06 ± 0.01 |

単位は ppm, N.D.は検出限界以下。

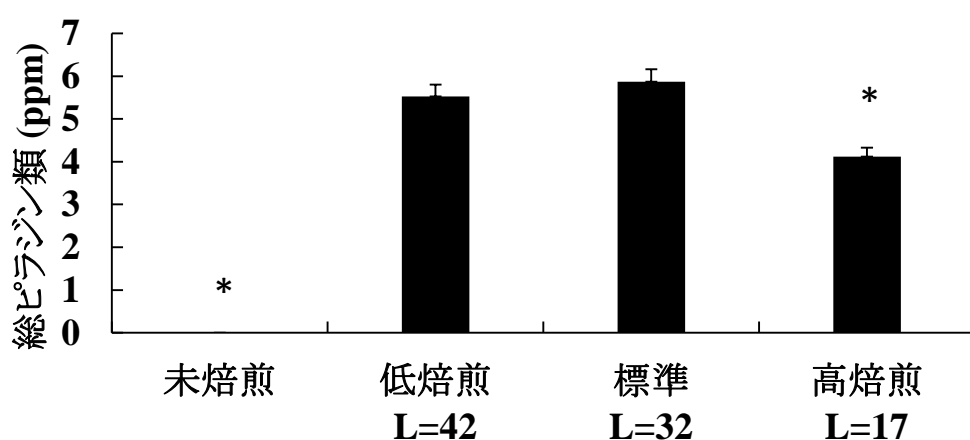


図 8 麦茶の焙煎度による総ピラジン類濃度変化

焙煎強度によるピラジン類生成量を比較した。総ピラジン類は、表 5 に示すピラジン化合物の総量を示す。結果は、平均値±標準誤差で示す(n=3) 。統計解析は、通常の標準(L=32)を基準とし、対応のない t 検定で評価した。

3-2. ピラジン化合物のラット血管弛緩作用

麦茶に含まれているピラジン化合物 9 種類の血管弛緩作用を比較した結果を図 9 に示す。今回評価したピラジン化合物の中では、2-EP が最も強い血管弛緩作用であった(図 9)。

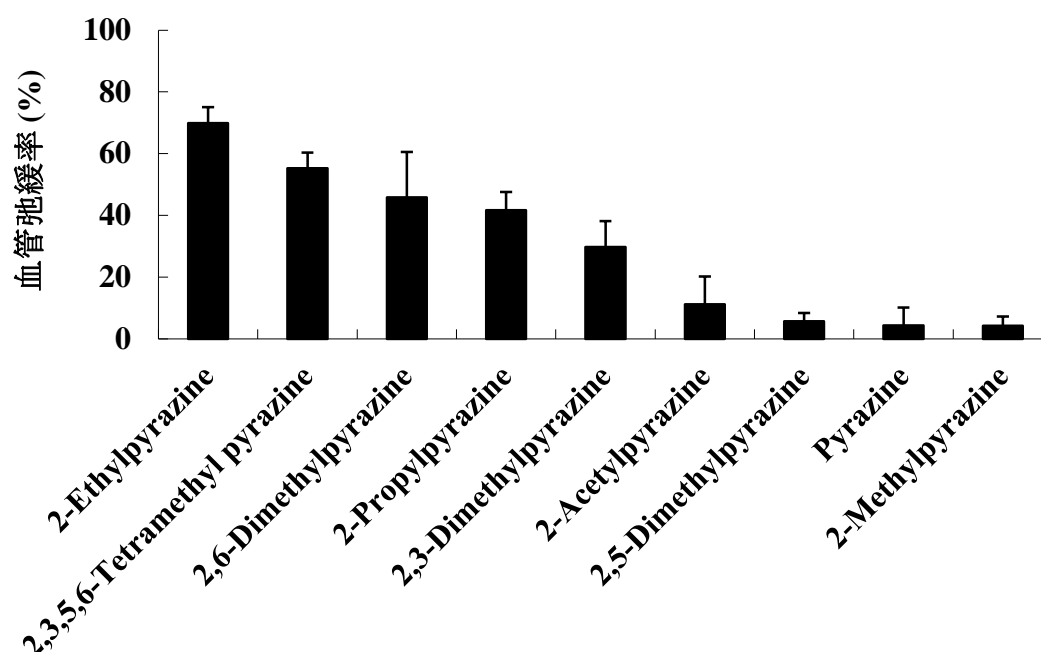


図 9 ピラジン化合物の血管弛緩作用

麦茶に含まれるピラジン 9 種類のラット大動脈血管弛緩作用を評価した(n=4)。1 μ M Phenylephrine で収縮させた血管に対して、各ピラジン化合物を終濃度 1 mM になるように添加した。1 mM ACh の弛緩率を 100%として、各化合物の血管弛緩作用を評価した。結果は、平均値±標準誤差で示す。

3-3. 2-EP のラット血管弛緩作用メカニズム

血管内皮剥離または阻害剤添加時の 2-EP の血管弛緩率の結果を図 10 に示す。2-EP の血管弛緩作用は、血管内皮の剥離、L-NAME 添加および ODQ 添加によって、消失した(図 10)。2-EP の血管弛緩作用は、Indo 添加によって、消失しなかった(図 10)。

2-EP 添加時の血管標本内の cGMP 量の結果を図 11 に示す。Ach は、陽性対象として評価した。その結果、血管標本内の cGMP 量は、2-EP 添加によって、有意に高くなった(図 11)。

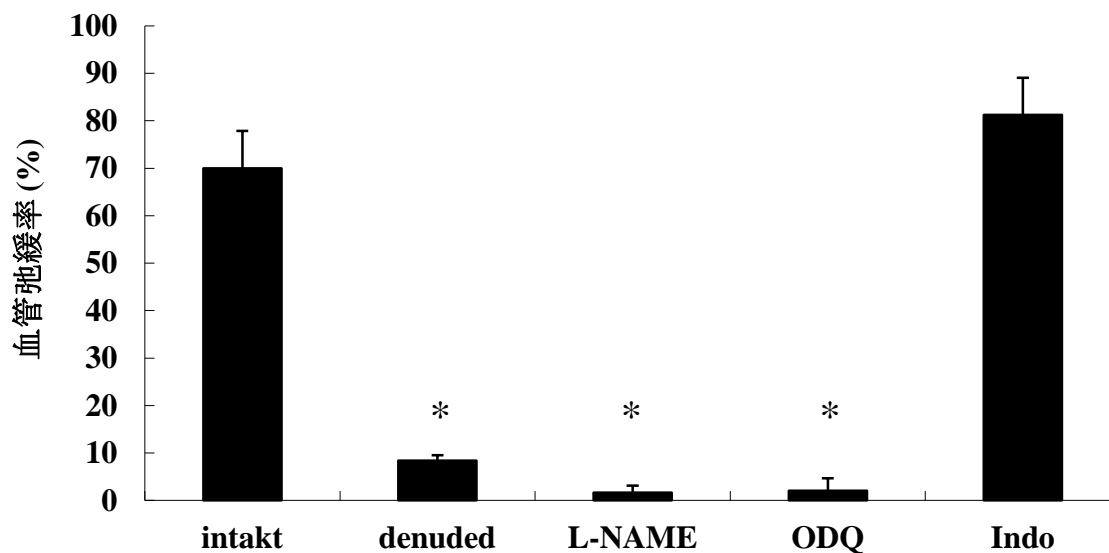


図 10 各阻害剤添加時の 2-EP の血管弛緩作用の作用メカニズム検証

2-EP の血管弛緩作用メカニズムを評価した。1 μ M Phenylephrine で収縮させた血管に対して、2-Ethylpyrazine を終濃度 1 mM になるように添加し、血管剥離または阻害剤存在下で 2-Ethylpyrazine の血管弛緩作用を評価した。1 mM Ach の弛緩率を 100%として、各化合物の血管弛緩作用を評価した(n=4)。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示す。統計解析は、通常の血管標本:intakt を基準とし、Dunnet 検定で評価した。

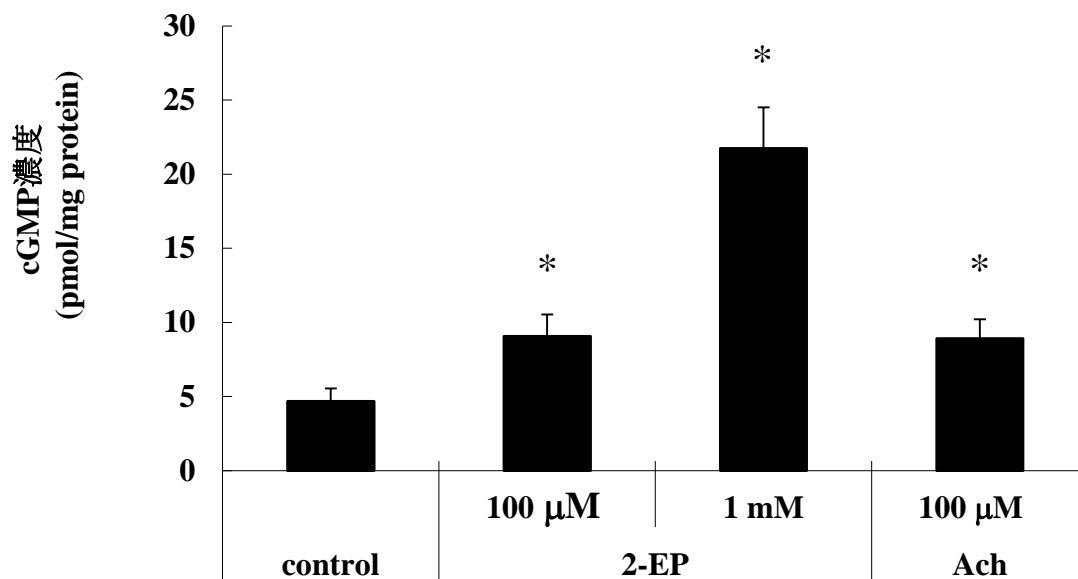


図 11 2-EP 添加時の血管標本中の cGMP 量

2-EP の血管標本における cGMP 量を評価した。1 μ M Phenylephrine で収縮させた血管に対して、2-EP を終濃度 100 μ M または 1 mM になるように添加した(n=4)。陽性対照として、100 μ MAch を用いた(n=4)。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示す。統計解析は、陰性対照(control)を基準とし、Dunnet 検定で評価した。

3-4. 2-EP 投与時のラット血流量

2-EP をラットへ単回投与した時のラット皮膚血流量変化の結果を図 12 に示す。

10 μ g/kg, 100 μ g/kg 2-EP 投与いずれの投与群も、水(control)投与時と比較して、ラット皮膚血流量が、有意に高くなった(図 12)。

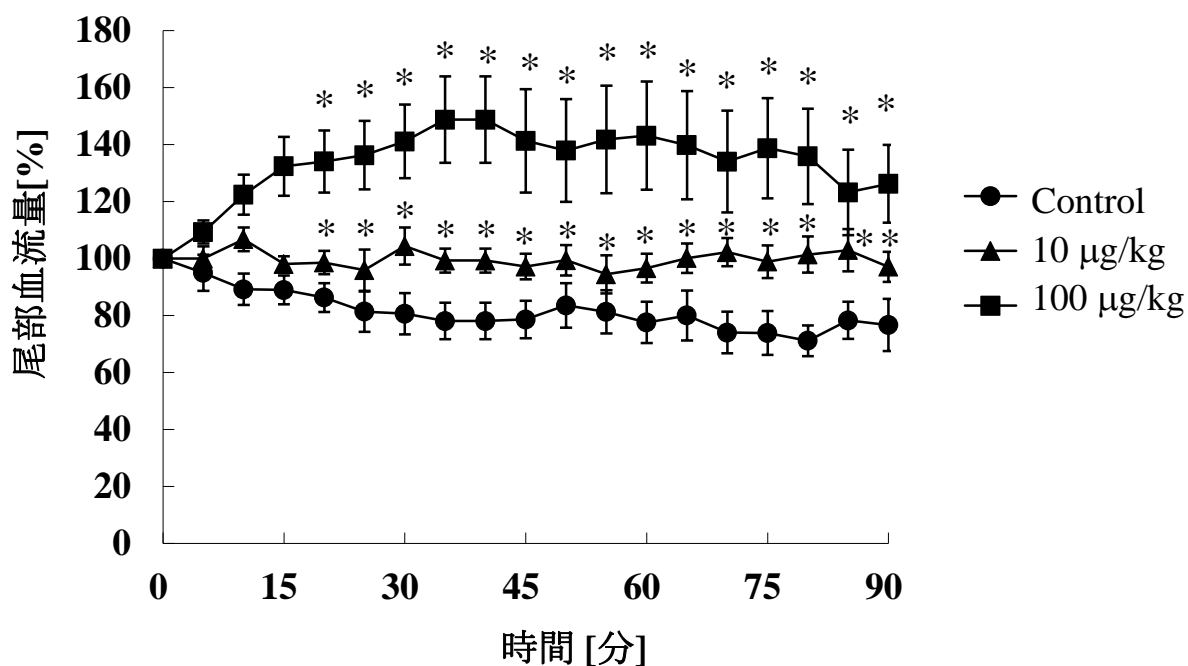


図 12 2-Ethylpyrazin 投与時のラット皮膚血流量

2-EP 投与時のラット皮膚血流量を評価した。水(コントロール)投与、10 µg/kg 2-EP 投与、または 100 µg/kg 2-EP 投与がラット皮膚血流量に与える影響を、ラットへの単回投与試験で評価した (n=10)。投与前のラット皮膚血流量を 100%とし、投与後の血流量変化率を評価した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、有意差検定は対応のない t 検定を用いた。有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

4. 考察

麦茶は、焙煎によって生じる特徴的な焙煎香がある⁴⁸⁾。焙煎香は、食品を焙煎することによって生成される成分によって付与される。この焙煎香を示す香気成分の1つとしてピラジン化合物が報告されている⁵⁸⁾。ピラジン化合物は、複素環構造をもつ化合物であり、麦茶のみならずピーナッツなど食品に幅広く含まれている成分である⁵⁹⁾。2,3,5-TMPは、中医学で使用されている川芎などにも含まれており、抗血小板作用などが報告されている^{60,61)}。

血流は血液の流れであり、血管は血流を制御する上で重要な働きをもっている^{14,15)}。血管が収縮する場合、血管内径が小さくなるため、血液は流れにくくなり血流量が低下する。一方で、血管が弛緩(拡張)する場合、血管内径が大きくなるため、血液は流れやすくなり血流量が増加する。これらのことから、血管の収縮弛緩は、血流量調節で重要な働きをしていると考える¹⁵⁾。

我々は、本研究によって、麦茶中に9種類のピラジン化合物が含まれていることを示した。また、これらのピラジン化合物は、原料大麦を焙煎することによって生じることが改めて確認できた。一方で、焙煎度合いが高くなりすぎると、麦茶中の総ピラジン量は低下した。この理由は、ピラジン化合物が香気成分であるために、「原料大麦の焙煎工程時に香気として空気中に拡散してしまった」もしくは「焙煎の加熱によってピラジン化合物が分解した」と考える。

麦茶中に含まれる9種類のピラジン化合物の血管弛緩作用を比較したところ、2-EPが最も強い血管弛緩作用を有していた。ピラジン化合物は、いずれも血管弛緩作用が確認されたが、化合物によってその力価が異なっていたことから、側鎖構造が血管弛緩作用の強弱に影響を与えると考える。

2-EPの血管弛緩作用の作用メカニズムを解明するために、血管内皮の剥離標本を用いて、血管弛緩作用を評価したところ、2-EPの血管弛緩作用は血管内皮の剥離によって消失した。このことから、2-EPの血管弛緩作用は、血管内皮依存的であることが示された。

血管内皮依存的血管弛緩には、2つの経路があることが知られている。NO産生を介したcGMP経路⁶²⁻⁶⁴⁾またはprostanoid産生を介したcAMP経路である⁶⁵⁻⁶⁷⁾。これらの経路のうちいずれを介しているかを評価するために、NOS阻害剤:L-NAMEまたはCOX-2阻害剤:Indo存在下での、2-EP血管弛緩作用を評価したところ、L-NAME存在下でその血管弛緩作用が消失した。このことから、2-EPの血管弛緩作用は、NO産生を介していることが示された。

血管内皮細胞で産生したNOは、血管平滑筋に作用し、グアニル酸シクラーゼを活性化させ、血管弛緩をさせる。そこで、グアニル酸シクラーゼ阻害剤であるODQ存在下での2-EP血管弛緩作用を評価したところ、ODQ存在下でその血管弛緩作用が消失した。この結果は、上述した2-EPの

血管弛緩作用が NO 産生に依存していることを支持している。さらに、血管標本内の cGMP 濃度を測定したところ、2-EP 添加時に cGMP 量も増加していることが示された。この結果も、2-EP の血管弛緩作用が NO 産生を介していることを支持している。

これらの結果から、2-EP の血管弛緩作用は、血管内皮依存的な NO 産生を介していると考ええる。

ラットへの単回投与試験で、2-EP 投与時のラット皮膚血流量は、水投与時と比較して、濃度依存的に高い値を示した。このことから、2-EP 投与によって、皮膚血流量が増加するといえる。また、過去の研究で、ウレタン麻酔はアドレナリン様作用を発揮し、自律神経を交感神経有意にすることが報告されている^{46,68)}。このことから、水投与時は、ウレタン麻酔によって交感神経優位になったため、皮膚交感神経が興奮し、末梢血管が収縮したことで皮膚血流量が低下したと考える。2-EP 投与によって、収縮した尾部血管が弛緩し、皮膚血流量が増加したと考える。

本研究では、2-EP の血管弛緩作用および皮膚血流量増加効果を明らかにした。また、その作用メカニズムは、血管内皮依存的 NO 産生を介した血管弛緩であることを示した。

我々は、血管内皮依存的 NO 産生に関連した受容体である Ach 受容体やヒスタミン受容体の阻害剤を用いて、2-EP の受容体探索を試みたが、2-EP の受容体を決定することができなかった(データ示さず)。TMP は、2-EP と類似のピラジン化合物であり、漢方原料である“川芎”などにも含まれている^{60,61)}。この化合物は、セロトニン受容体のアンタゴニスト作用することが知られており、2-EP もセロトニン受容体のアンタゴニストとして作用している可能性が推察される。また、TMP は、抗血小板凝集効果なども報告されていることから、2-EP にも同様の抗血小板凝集効果が期待される⁶⁹⁾。

また、一般的に血管弛緩作用を有する化合物は血圧低下も期待されるため、2-EP にも血圧低下効果なども期待される⁷⁰⁾。

第一章で示した麦茶(L=32)に含まれる 2-EP 量と等量の投与量をラットに単回投与する試験を行ったところ、2-EP 投与によってラット皮膚血流量増加効果が確認できたことから、2-EP が麦茶のラット血流量増加効果の主要な関与成分であると考えた(図 12)。しかし、麦茶の焙煎度合いが標準ならびに高焙煎でラット皮膚血流量が増加した図 6 の結果と今回のピラジン化合物の分析結果(図 8)より、ピラジン化合物濃度と麦茶に含まれる血流量増加効果が逆相関を示すことが明らかになった。従って、麦茶のラット皮膚血流量増加効果の関与成分は、ピラジン化合物以外である可能性が示唆された。これらの結果から、原料大麦を焙煎することによって生じるピラジン化合物以

外の化合物が、麦茶のラット皮膚血流量増加効果を説明する主要成分になると考える。

5. 結論

麦茶に含まれる香気成分である **2-EP** は、ラット皮膚血流量を増加させる。その作用メカニズムは、血管内皮依存的 **NO** 産生を介した血管弛緩である。しかし、定量分析結果から、**2-EP** は麦茶のラット皮膚血流量増加効果の一部を説明する成分である可能性が示唆された。

第三章 麦茶に含まれるジケトピペラジン化合物のラット皮膚血流量に与える影響

1. 概要

第一章で「麦茶のラット皮膚血流量増加効果は、焙煎によって生じる成分が重要な役割をもっている可能性」を示唆した。第二章では麦茶に含まれる香気成分であるピラジン化合物(特に 2-EP)が血管弛緩作用および血流量増加効果を有することを明らかにした。一方で、2-EP は麦茶のラット皮膚血流量増加効果を代表する関与成分ではない可能性が示唆された。

そこで、第三章では、麦茶に含まれる呈味成分:ジケトピペラジン化合物がラット皮膚血流量に与える影響を評価し、その作用機序を明らかにし、第一章で示した麦茶のラット皮膚血流量増加効果を代表する関与成分にジケトピペラジン化合物が適しているか検討した。本章の概要は以下の通りである。

目的

麦茶に含まれる呈味成分:ジケトピペラジン化合物がラット血流量に与える影響を評価するために、「ジケトピペラジン化合物のラット血流量への影響」および「ジケトピペラジン化合物の血管弛緩作用およびその作用メカニズム」を評価した。

方法

LC-MS を用いて、麦茶に含まれるジケトピペラジン化合物を分析した。

ラット単回投与試験を行い、ジケトピペラジン化合物がラット皮膚血流量に与える影響を評価した。

ラット腹部大動脈血管標本を用いた血管弛緩作用検証試験を行い、ジケトピペラジン化合物の血管弛緩作用評価および作用メカニズムを評価した。

結果

麦茶に 5 種類のピラジン化合物が含まれていた。ジケトピペラジン化合物は、大麦を焙煎することで生じ、焙煎度が高くなることで麦茶中の総ジケトピペラジン量が増加した。

ラット単回投与試験の結果、cyclo (L-Pro-D-Phe)が最も強いラット皮膚血流量増加効果があった。cyclo (L-Pro-D-Phe)は血管弛緩作用を有しており、血管内皮細胞依存的な NO 産生経路を介していた。

結論:

麦茶に含まれる呈味成分:cyclo (L-Pro-D-Phe)は、ラット皮膚血流量増加効果がある。その作

用メカニズムは、血管内皮細胞依存的な NO 産生を介する血管弛緩である。cyclo (L-Pro-D-Phe)は麦のラット皮膚血流量増加効果の主要成分ではある可能性が示唆された。

2. 実験方法

2-1. 試薬

麦茶の原料となる全ての大麦は、MCフード社より購入した。未焙煎大麦は、焙煎を行わない大麦を用いた。焙煎大麦は、その焙煎度の違いを明度によって分類した^{44,45)}。基準となる焙煎度を L=32 とし、焙煎度が高い大麦の焙煎度を L=17、焙煎度が低い大麦の焙煎度を L=40 とした。実験に供したジケトピペラジンの構造式を図 13 に示す。全てのジケトピペラジンは、ペプチド研究所株式会社より購入した。ジペプチド:L-Phe-L-Pro および L-Pro-L-Phe、NE、Ach、Indo は富士フィルム和光純薬より購入した。L-NAME は、株式会社 同仁化学研究所より購入した。ODQ は、シグマアルドリッチから購入した。

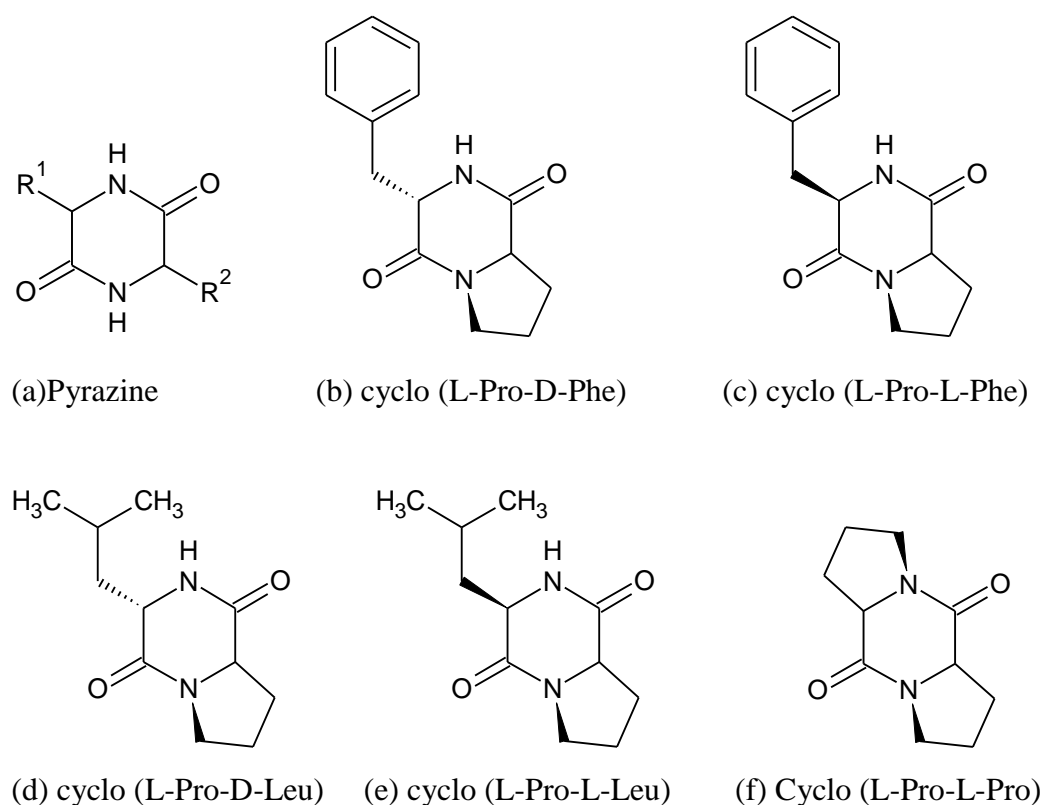


図 13 ジケトピペラジン化合物

2-2. 大麦抽出物の調製

麦茶は、焙煎大麦 100 g を沸騰した湯 1 L に入れ 30 分間抽出して作成した。

未焙煎大麦抽出物は、未焙煎大麦 100 g を沸騰した湯 1 L に入れ 30 分間抽出して作成した。

2-3. ジケトピペラジン化合物の分析

ジケトピペラジン化合物の分析は、LC-MS を用いて行った。用いた LC-MS は、Develosil column (C30-UG-3; 2.0 × 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) をカラムに用い、4000 QTRAP LC-MS system (AB Sciex, Tokyo, Japan) を検出器に用い、SIM (Selected Ioin monitoring) モードでを使用した。移動相は 0.1% ギ酸とアセトニトリルを用い、移動相の流速は 0.2 mL/min で行った。注入量は、麦茶または未焙煎大麦抽出物を 1 μ l である。移動層の条件は表 6 に示す通りである。用いたジケトピペラジンのマスペクトルを表 7 に示す。

表 6 移動層の条件

| 時間 | 移動層 |
|---------|------------------------------|
| 0-10 分 | 10% アセトニトリル 一定 |
| 10-30 分 | 10% アセトニトリルから 30% アセトニトリル |
| 30-40 分 | 100% アセトニトリル 一定 |

表 7 ジケトピペラジンのマスペクトル

| 化合物 | マスペクトル (m/z)* |
|---------------------|---------------|
| cyclo (L-Pro-D-Phe) | 245 |
| cyclo (L-Pro-L-Phe) | 245 |
| cyclo (L-Pro-D-Leu) | 211 |
| cyclo (L-Pro-L-Leu) | 211 |
| cyclo (L-Pro-L-Pro) | 195 |

*マスペクトルは、 $[M+H]^+$

2-4. 動物飼育条件

Wistar ラットは、日本 SLC より購入した。ラットの飼育条件は、12 時間毎の明暗サイクル、室温：24 \pm 2.0 $^{\circ}$ C、湿度：55 \pm 10% で行った。飼育時に使用した餌は、CE-2 (日本クレア社製) を用いた。動物実験は、キリン株式会社動物実験倫理審査委員会の承認を持って行い、倫理指針を遵守し

て行った。

2-5. ラット皮膚血流量測定試験

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。試験前日、16 時間の絶食を行った。麻酔は、Urethan 1g/kg を腹腔内投与して行った。皮膚血流量は、レーザードップラー血流測定器 ALF-21 (アドバンス株式会社、東京)を用いて行った。アナログ信号をデジタル信号に変換するために、アナログデジタル変換器:Power-Lab (AD instruments, ニュージーランド)を用いた。レーザードップラー血流測定器の測定プローブをラット尾部に取り付け、ラットの皮膚血流量測定を行った。麻酔下のラットは、15 分間安静にし、血流量を安定にした。その後、ラットへサンプルを胃内投与した⁴⁶⁾。

2-6. ラット腹部大動脈を用いた血管弛緩作用評価試験

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。試験当日、2,5-Diethyl ether を用いて、麻酔をかけた後に解剖を行い、腹部大動脈を採取した。回収した腹部大動脈を 2 mm 長になるように切断し、血管標本を作製した。作成した血管標本は、Krebs バッファ (120 mM, NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM NaH₂PO₄, 25.0 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose; pH 7.35) 5 mL が満たされたマイクロイージーマグヌス UC-2TD (いわしや岸本医科産業株式会社、京都) のバスのフックに取り付けた。バスの中は、95% O₂/ 5% CO₂ ガスの泡で満たされるようにした。5 mM NE 溶液 50 μL をバスに添加し、血管標本を収縮させた (NE 終濃度 0.1 μM)。NE 添加による血管収縮後、0.1 μM Ach 溶液を添加し血管標本を弛緩させた。この時の Ach 添加時の弛緩量を 100%と定義した^{52, 53)}。

その後、Krebs バッファ 5 mL で 3 回血管標本を洗浄した上で、再度 NE を添加し血管標本を収縮させた。その後、評価サンプルを添加し、0.1 μM Ach 添加時の弛緩量と比較した相対血管弛緩量を血管弛緩率とした。

血管弛緩率 = (評価サンプル添加時の弛緩量 / 0.1 μM Ach 添加時の弛緩量) × 100

血管内皮を除去した血管標本は、Krebs バッファを満たしたスライドグラス上で、血管標本をこすることで作製した⁵⁴⁾。この血管内皮を除去した血管標本を用いて、上述の血管弛緩率評価試験を行うことで、血管弛緩作用が血管内皮に依存しているか評価を行った。各血管弛緩阻害剤の添加条件は表 8 の通りである。

表 8 血管弛緩阻害剤の添加条件

| 阻害剤名 | 阻害する酵素 | 添加濃度 (終濃度) |
|--------|--------|----------------------------|
| L-NAME | eNOS | 100 μ M ⁴⁴⁾ |

2-7. ラット腹部大動脈を用いた NO 産生評価試験

Wistar ラットオス 8 週齢を 1 週間馴化飼育した。その後、2,5-Diethyl ether を用いて、麻酔をかけた後に解剖を行い、腹部大動脈を採取した。回収した腹部大動脈を 2 mm 長になるように切断し、血管標本作製した。作成した血管標本は、Krebs バッファ 5 mL に入れ、評価サンプルを添加し、37°C で 15 分間保存した。その後、血管標本を取り出し、Krebs バッファ 5 mL で洗浄した上で、0.1 mM HCl に添加し、マルチビーズショッカー MB2000(安井器械株式会社、大阪)を用いて、組織破壊を行った。組織破壊の方法は、機械説明書に従って行った。組織破壊した溶液は、遠心分離(15,000 rpm, 10 分間)を行い、上清を回収した。得られた上清の NO 産生量および総タンパク質濃度を測定した。NO 産生量は、NO₂/NO₃ Assay kit(同仁化学研究所、熊本)を用いて測定し、タンパク質濃度は、Protein assay kit (Bio Rad 社、米国)を用いて測定した。測定方法は、それぞれ添付の説明書に従い測定を行った。タンパク質の標準曲線の標品は、Bovine serum albumin を用いた。血管標本中の NO₂/NO₃ 産生量は、抽出されたタンパク質量で補正して算出した⁵⁷⁾。

2-8. cyclo (L-Pro-D-Phe)の立体構造が血管弛緩作用に与える影響評価

2-6 で示した血管弛緩作用試験を用いて、環状ジペプチド 2 種:cyclo (L-Pro-D-Phe)、cyclo (L-Pro-L-Phe)、および直鎖状ペプチド 2 種:L-Pro-L-Phe、および L-Pro-L-Phe の血管弛緩作用を比較した。各サンプルの添加濃度は終濃度:1mM で行った。

2-9. 統計解析

各試験の統計量は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は Dunnett's test を用いて行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 実験結果

3-1. 麦茶中のジケトピペラジン化合物

麦茶および未焙煎大麦抽出物のジケトピペラジン化合物分析結果を表 9 に示す。麦茶は、5 種類のジケトピペラジン化合物が含まれていた(表 9)。これらの 5 種類のジケトピペラジン量の総和:総ジケトピペラジン量は、焙煎度を高めることにより高値を示した(図 14)。

表 9 麦茶に含まれるジケトピペラジン化合物

| 化合物 | 未焙煎 | 低焙煎 L=40 | 標準 L=32 | 高焙煎 L=17 |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| cyclo (L-Pro-D-Phe) | N.D. | 0.50 ± 0.19 | 2.71 ± 0.85 | 6.97 ± 0.36 |
| cyclo (L-Pro-L-Phe) | 0.09 ± 0.02 | 0.68 ± 0.14 | 2.10 ± 0.73 | 3.89 ± 0.34 |
| cyclo (L-Pro-D-Leu) | N.D. | 0.57 ± 0.08 | 1.24 ± 0.57 | 2.25 ± 0.19 |
| cyclo (L-Pro-L-Leu) | 0.09 ± 0.02 | 1.02 ± 0.06 | 1.12 ± 0.69 | 1.59 ± 0.22 |
| Cyclo (L-Pro-L-Pro) | N.D. | 0.71 ± 0.10 | 1.56 ± 0.63 | 2.59 ± 0.25 |

単位は ppm、N.D.は検出限界以下

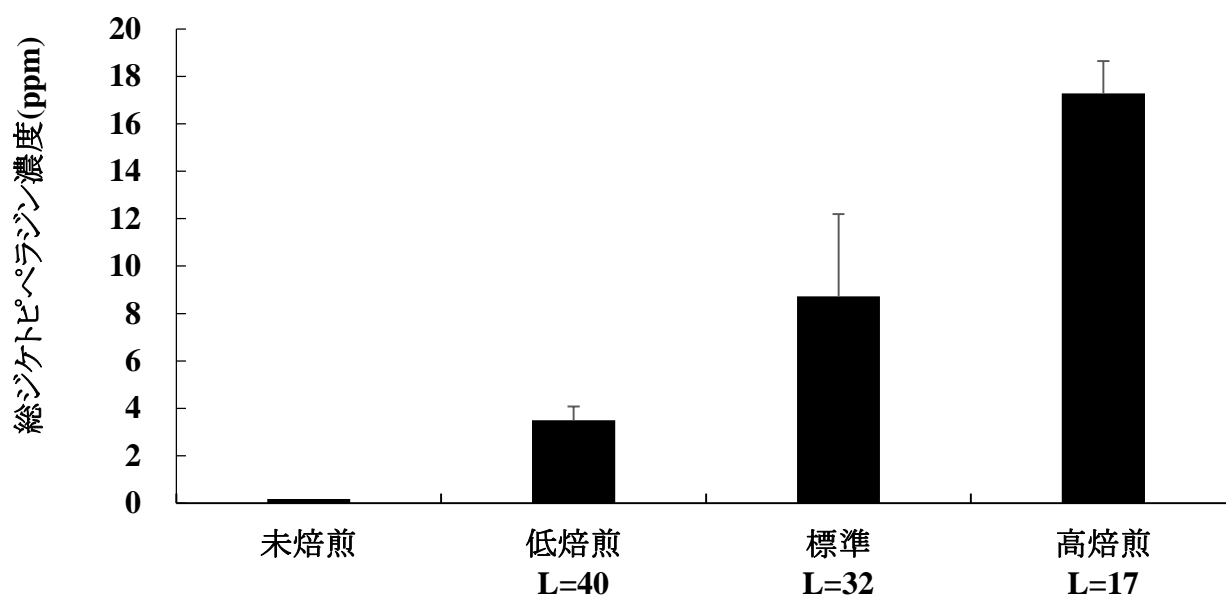


図 14 麦茶に含まれる総ジケトピペラジン量比較

焙煎強度によるジケトピペラジン類生成量を比較した。総ジケトピペラジン類は、表 9 に示すピペラジン化合物の総量を示す。結果は、平均値±標準偏差で示す。(n=3)

3-2. ジケトピペラジン投与がラット血流量に与える影響

サンプル投与後 30 分のラット皮膚血流量変化率を図 15 に示す。その結果、cyclo (L-Pro-D-Phe) および cyclo (L-Pro-D-Leu) が優位にラット皮膚血流量を増加させた(図 15)。また、(L-Pro-D-Phe) が最も強い効果であった(図 15)。

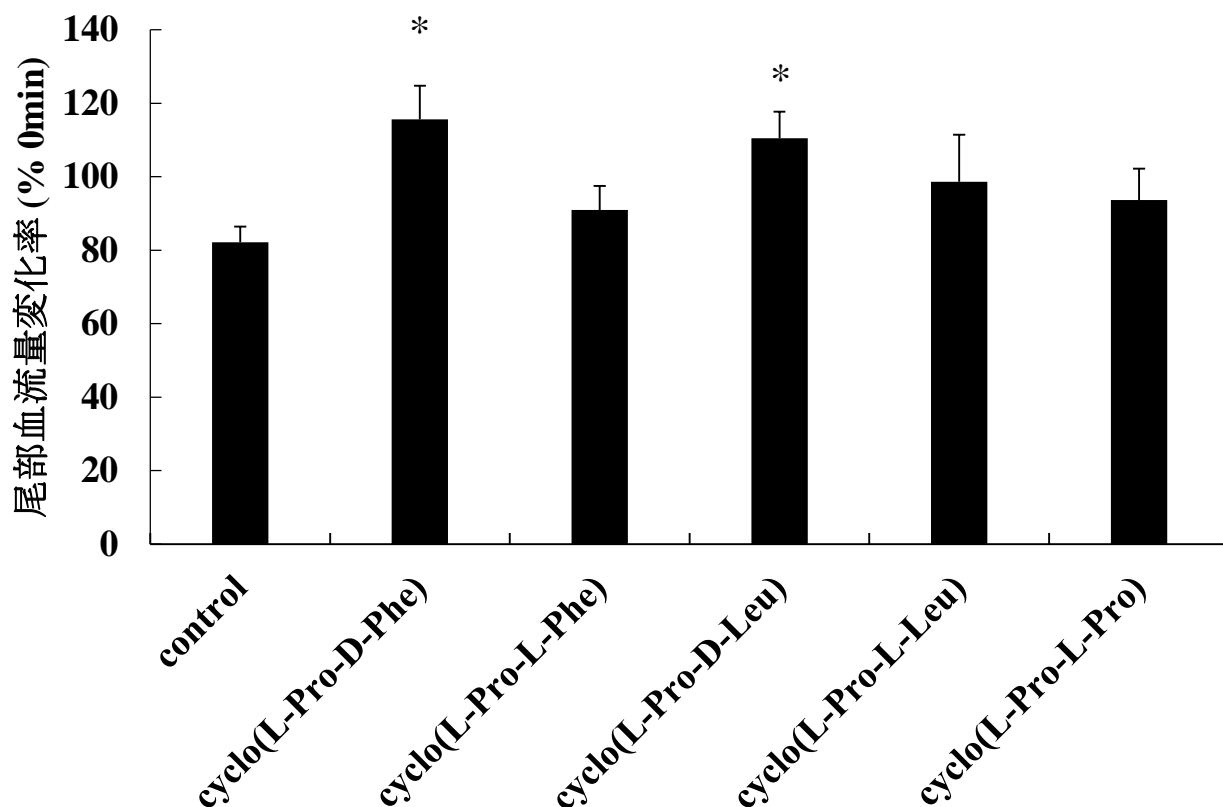


図 15 ジケトピペラジン投与時のラット皮膚血流量比較

ジケトピペラジン化合物がラット皮膚血流量に与える影響を、ラットへの単回投与試験で評価した (n=10)。投与量は 30 $\mu\text{g/kg}$ である。投与前のラット皮膚血流量を 100%とし、投与後 30 分の血流量変化率を評価した。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示す。統計解析は、対応のない t 検定を用いた。有意水準は、 $p<0.05$ とした。

3-3. cyclo (L-Pro-D-Phe) 投与がラット血流量に与える影響

cyclo (L-Pro-D-Phe) 投与濃度がラット皮膚血流量に与える影響を評価した結果を図 16 に示す。その結果、濃度依存的にラット皮膚血流量を上昇させることが示された(図 16)。

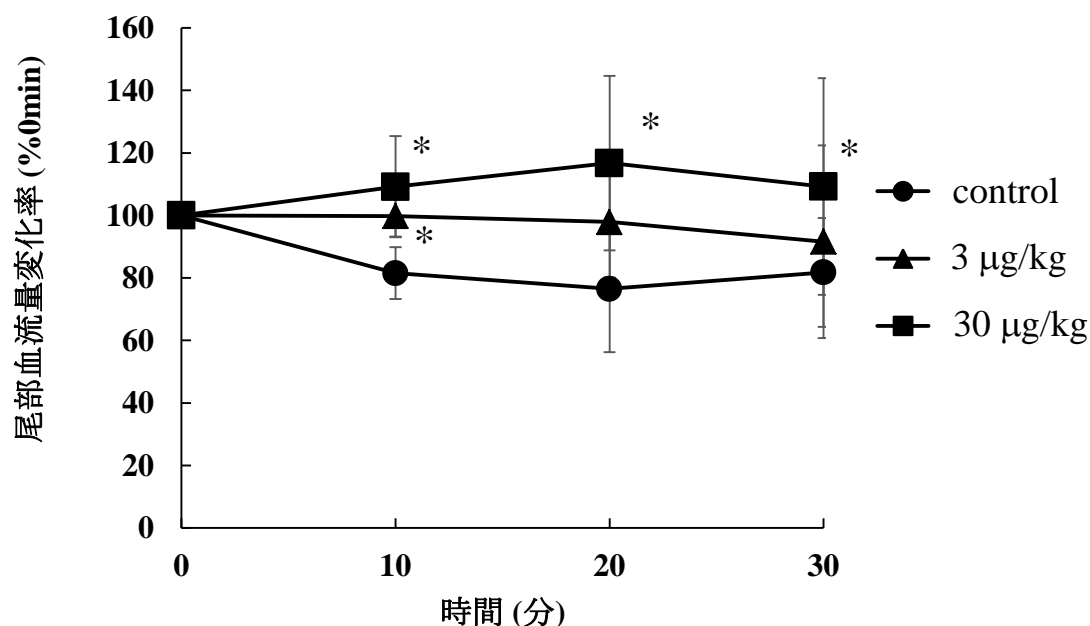


図 16 cyclo (L-Pro-D-Phe) 投与時のラット皮膚血流量比較

cyclo (L-Pro-D-Phe) がラット皮膚血流量に与える影響を、ラットへの単回投与試験で評価した (n=10)。投与量は 3 µg/kg または 30 µg/kg である。投与前のラット皮膚血流量を 100% とし、投与後の血流量変化率を評価した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のない t 検定を用いた。有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

3-4. Cyclo (L-Pro-D-Phe)のラット血管弛緩作用およびその作用メカニズム

ラット腹部大動脈を用いた Cyclo (L-Pro-D-Phe)の血管弛緩作用を評価した結果を図 17 に示す。Cyclo (L-Pro-D-Phe)は、血管弛緩作用を有していた(図 17)。Cyclo (L-Pro-D-Phe)の血管弛緩作用は、血管内皮の剥離または L-NAME 添加によって消失した(図 17)。

Cyclo (L-Pro-D-Phe)添加によるラット腹部大動脈血管標本中の NO 産生能を評価した結果を図 18 に示す。Cyclo (L-Pro-D-Phe)添加時の血管標本内の($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$)量は、非添加時と比較して、有意に高くなった(図 18)。

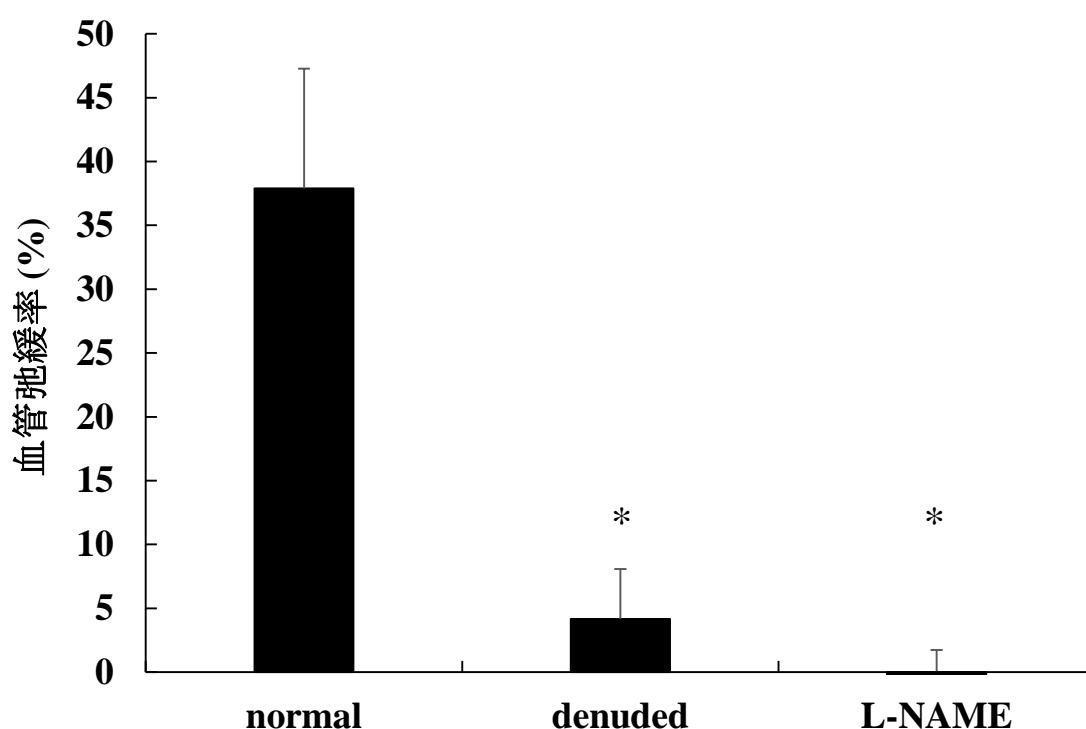


図 17 Cyclo (L-Pro-D-Phe)の血管弛緩作用および阻害剤添加の影響

Cyclo (L-Pro-D-Phe)の血管弛緩作用メカニズムを評価した。1 μM Phenylephrine で収縮させた血管に対して、Cyclo (L-Pro-D-Phe)を終濃度 1 mM になるように添加し、血管剥離または阻害剤存在下で Cyclo (L-Pro-D-Phe)の血管弛緩作用を評価した。1 mM ACh の弛緩率を 100%として、各化合物の血管弛緩作用を評価した(n=4)。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示す。統計解析は、通常の血管標本: normal を基準とし、Dunnett 検定で評価した。有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

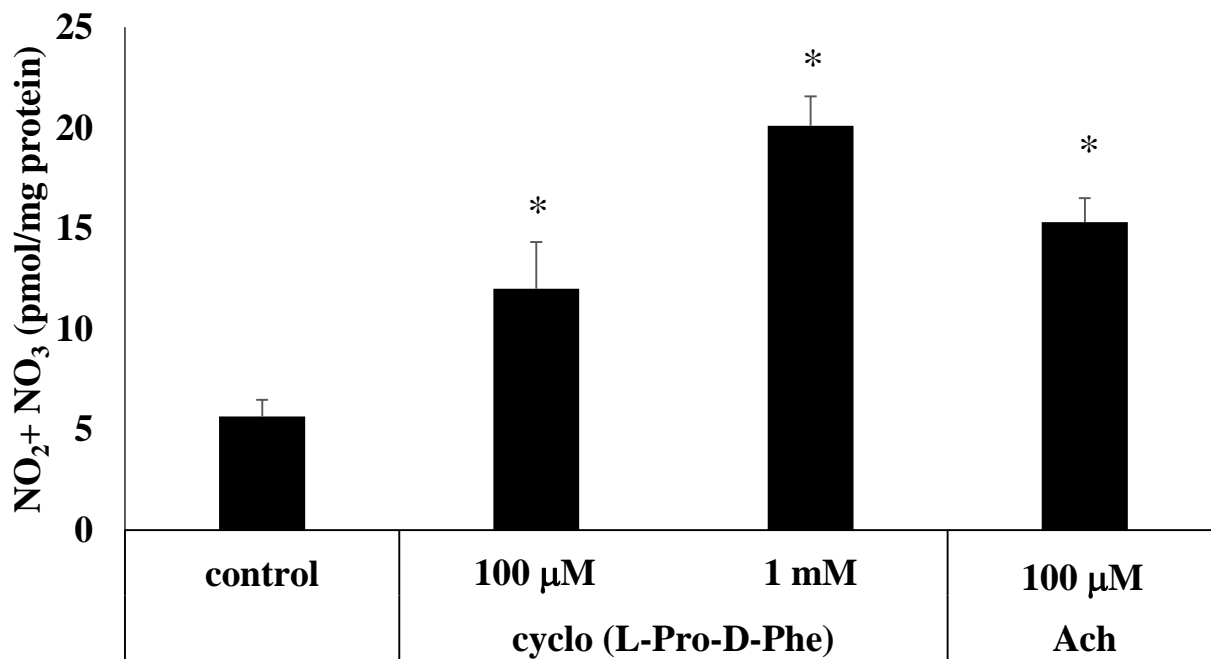


図 18 Cyclo (L-Pro-D-Phe)添加時の血管標本中の NO₂+NO₃ 産生量

Cyclo (L-Pro-D-Phe)の血管標本における NO₂+NO₃ 量进行评估した。1 μM Phenylephrine で収縮させた血管に対して、Cyclo (L-Pro-D-Phe)を終濃度 100 μM または 1 mM になるように添加した (n=4)。陽性対照として、100 μMAch を用いた(n=4)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、陰性対照(control)を基準とし、Dunnet 検定で評価した。

3-5. Cyclo (L-Pro-D-Phe)の立体構造がラット血管弛緩作用に与える影響評価

ラット腹部大動脈を用いた各 4 種類のペプチドの血管弛緩作用を評価した結果を図 19 に示す。Cyclo (L-Pro-D-Phe)が最も血管弛緩率が高く、Cyclo (L-Phe-L-Pro)と比較しても有意に血管弛緩率が高くなった。Cyclo (L-Phe-L-Pro)は、直鎖状のジペプチド:L-Phe-L-Pro および L-Pro-L-Phe と比較して有意に血管弛緩率が高くなった。L-Phe-L-Pro の血管弛緩率は、L-Pro-L-Phe と比較して有意な差はなかった。

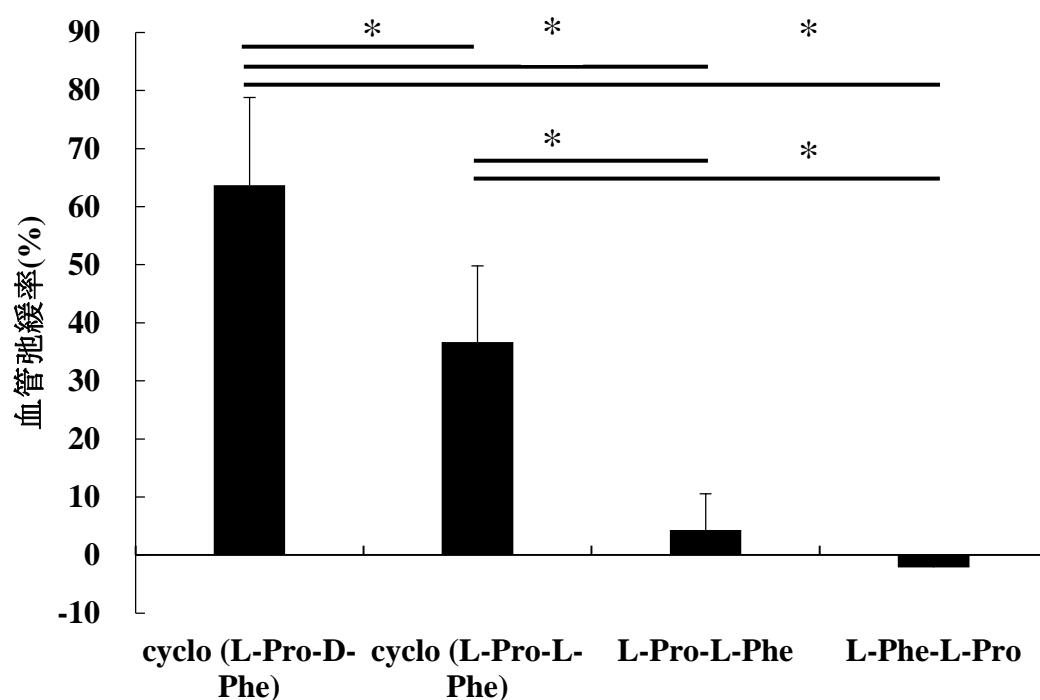


図 19 Cyclo (L-Pro-D-Phe) の立体構造がラット血管弛緩作用に与える影響

Cyclo (L-Pro-D-Phe)の血管弛緩作用メカニズムを評価した。1 μ M Phenylephrine で収縮させた血管に対して、各ペプチドを終濃度 1 mM になるように添加し、血管弛緩作用を評価した。1 mM ACh の弛緩率を 100%として、各化合物の血管弛緩作用を評価した(n=4)。結果は、平均値 \pm 標準偏差で示す。統計解析は、それぞれ対応のない t 検定で評価した。有意水準は、 $p<0.05$ とした。

4. 考察

ジケトピペラジンは、ジペプチドが環状化した環状ジペプチドである⁷¹⁾。このジケトピペラジンは、食品(特にタンパク質)の焙煎工程によって生成され、食品の呈味などの味に影響を与えることが知られている^{49,72)}。ジケトピペラジンはタンパク質の加熱分解時に、自己環状化反応によって生成

されるラクタム構造をもつ化合物である。ジケトピペラジンは、焙煎したコーヒー豆、ココア豆、牛肉などに含まれており、苦味などの呈味に影響を及ぼす事が報告されている⁷³⁻⁷⁵⁾。ジケトピペラジンはラクタム構造を有し、タンパク質分解時の自己縮合反応や酵素反応などによるジペプチドの環状化によって生成される^{76,77)}。このジケトピペラジンは、さまざまな生理作用が報告されている⁷⁸⁻⁸⁴⁾。

cyclo (His-Pro)は、thyrotropin releasing hormone が分解したときに生成されるジケトピペラジンとして報告されており、神経保護作用⁷⁸⁾、抗腫瘍効果⁷⁹⁾、抗炎症効果⁸⁰⁾、抗肥満効果⁸¹⁾、免疫調節効果⁸²⁾が報告されている。cyclo (Pro-Phe)は、アルツハイマー病に対する有効性が報告されている⁸³⁾。一方で、ジケトピペラジンの血流や血管に対する機能性は報告が少ない。

本研究によって、麦茶中にジケトピペラジンが含まれることが明らかになった(表 9)。また、ジケトピペラジンは、焙煎によって生成され、焙煎度合いが高くなっても減少しないことが示された(図 14)。大麦にはホルデインなどのタンパク質が多く含まれている⁸⁵⁾。このホルデインは、大麦種子に多く含まれており、分子量によって、B, C, D, γ ホルデインに分類される⁸⁵⁾。B ホルデインは、ホルデイン中に最も多い比率で含まれ、全ホルデインの 70-80%を占める。C ホルデインは 全ホルデインの 10-12%を占め、D および γ ホルデインの比率は低い⁸⁵⁾。大麦中に最も多く含まれる B ホルデインは、266 アミノ酸から構成され、Pro 残基を最も多く含有している(46 残基)⁸⁵⁾。また、Pro と Phe が連続するアミノ酸配列も 10 箇所存在していることから、大麦に含まれるタンパク質:B ホルデインは、Pro-Phe のジペプチドを多数含んでいると推察できる。これらのことから、麦茶製造における原料大麦焙煎処理により、B ホルデイン等のタンパク質が加水分解する過程で、Pro-Phe ジペプチドが縮合反応することによって、cyclo(Pro-Phe)のジケトピペラジンが生成されたと推察する⁸⁵⁾。また、焙煎度が高くなるほど trans 体(D-アミノ酸とL-アミノ酸の組み合わせ)のジケトピペラジン量が増加した。加熱によりアミノ酸は異性化することが報告されているため、焙煎度が強くなることにより熱エネルギーにより異性化反応が促進され、立体的に安定な trans 体のジケトピペラジンになったと推察する。

麦茶中のジケトピペラジンのラット血流量へ与える影響を評価したところ、cyclo(L-Pro-D-Phe)が最も強い血流増加効果を有していた。cyclo(L-Pro-D-Phe)は、麦茶中に最も多く含まれているジケトピペラジンであることから、麦茶の生理機能を代表する化合物である事が示唆された(図 16)。また、cyclo(L-Pro-D-Phe)は、濃度依存的に血流量を増加させることを確認した。ラット皮膚血流量増加効果が確認された麦茶は 1 mL/kg である。麦茶中に含まれる cyclo(L-Pro-D-Phe)は、30

ppm である。本研究において、cyclo(L-Pro-D-Phe) 30 ppm を 1mL 投与したところ、麦茶投与時と同様にラット皮膚血流量増加効果が確認できた(図 16)。このことから、cyclo(L-Pro-D-Phe) は、麦茶の血流量増加効果を代表する成分の 1 つである可能性が示唆された。

また図 19 に示す結果より、異性化反応が起こったジケトピペラジンに強い生理活性が認められたことから、立体構造がその有効性に重要な働きを担っていると考ええる。

cyclo(L-Pro-D-Phe) は、ラット血管弛緩作用も有していることを示した。その血管弛緩作用の作用メカニズムを解明するために、血管内皮の剥離標本を用いて、血管弛緩作用を評価したところ、cyclo(L-Pro-D-Phe) の血管弛緩作用は血管内皮の剥離によって消失した。このことから、cyclo(L-Pro-D-Phe) の血管弛緩作用は、血管内皮依存的であることが示された。

血管内皮依存的血管弛緩には、2 つの経路があることが知られている。NO 産生を介した cGMP 経路⁶²⁻⁶⁴⁾ または prostanoid 産生を介した cAMP 経路である⁶⁵⁻⁶⁸⁾。これらの経路のうちいずれを介しているかを評価するために、NOS 阻害剤:L-NAME 存在下での、cyclo(L-Pro-D-Phe) 血管弛緩作用を評価したところ、L-NAME 存在下でその血管弛緩作用が消失した。このことから、cyclo(L-Pro-D-Phe) の血管弛緩作用は、NO 産生を介していることが示された。

さらに、cyclo(L-Pro-D-Phe) 存在時の血管標本内の NO₂+NO₃ 濃度を測定したところ、その総量が cyclo(L-Pro-D-Phe) 依存的に高くなることを示した。このことから、cyclo(L-Pro-D-Phe) の血管弛緩作用は、NO 産生を介していることが示された。NO は非常に不安定で酸化しやすいため、直接定量することが難しいため、NO の酸化物である NO₂ および NO₃ の総量を測定した。

これらの結果より、cyclo(L-Pro-D-Phe) は、血管内皮依存的な NO 産生を介して、血管弛緩作用を発揮するといえる。

また、cyclo(L-Pro-D-Phe) の立体構造が血管弛緩作用に与える影響を評価したところ、環状構造および異性化が血管弛緩作用に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。直鎖状ペプチド:L-Pro-D-Phe または L-Phe-L-Pro では、血管弛緩作用が検出されなかった。一方で、cyclo(L-Phe-L-Pro) は直鎖状ペプチド:L-Pro-D-Phe または L-Phe-L-Pro と比較して、有意に血管弛緩作用が強くなった。このことから、ペプチドが環状構造を有することが、血管弛緩作用を発揮する上で重要であると言える。一般的に環状ペプチドは、直鎖状ペプチドと比較して、堅固な化学構造になる⁸⁶⁾。これにより立体安定性が高くなり、受容体のアゴニストとしての強く作用した結果、強い血管弛緩作用を発揮したと推察する。さらに、cyclo(L-Pro-D-Phe) は、cyclo(L-Phe-L-Pro) と比較して、強い血管弛緩作用を有していたことから、ジケトピペラジンのアミノ酸が異性化している事

がその血管弛緩作用に影響している可能性が示唆された。この結果は、ジケトピペラジン投与時のラット皮膚血流量増加効果を比較した結果と矛盾しない。これらの結果から、cyclo(L-Pro-D-Phe)は、環状構造を有していることとアミノ酸が D 体に異性化していることが重要であると考えられる。

麦茶原料の焙煎大麦の焙煎度合いとジケトピペラジン量を比較した結果(表 9)から、焙煎度が強くなるとにより総ジケトピペラジン量が増加し、アミノ酸の異性化も進むことが確認できた。このことから、焙煎度を高めることで、麦茶中の cyclo(L-Pro-D-Phe)の増やすことができ、その血管弛緩作用および血流量増加効果を強化することができると推察する。

ジケトピペラジンは、ジペプチドと同様に吸収・消化されることが過去の研究で報告されている⁸⁷⁻⁹⁰⁾。水間らは、cyclo (Gly-Phe) や cyclo (Ser-Tyr)などは、ペプチド輸送体:PEPT1 を介して吸収され、ペプチダーゼ等の消化酵素により代謝されることを報告している⁸⁷⁻⁹⁰⁾。また、ジケトピペラジンの一種である cyclo (Ala-Hyp)は、経口摂取から速やかに血中移行することも報告されている⁹¹⁾。この論文では、cyclo(Ala-Hyp)は Ala-Hyp と比較し、血中 AUC が 33 倍程度高くなることを報告している。このことからペプチドが環状化することで、その生体吸収効率が高まり、速やかな血中移行が起こっていると推察する。本研究で取り扱った cyclo(L-Pro-D-Phe)も同様に、経口投与後 PEPT1 を介して生体内に吸収・血中へ移行し、血管弛緩作用を発揮することによって、血流量増加効果を発揮したと考える。

ジケトピペラジンである cyclo(L-His-L-Pro)は、経口摂取後に、尿中に排泄されることが確認されている⁹²⁾。本研究で取り扱った cyclo(L-Pro-D-Phe)も同様に、尿中に排泄されると考える。

また、本研究では、cyclo(L-Pro-D-Phe)の受容体を明らかにすることができなかった。Ach 受容体やヒスタミン受容体などの阻害実験を行い検証したが、cyclo(L-Pro-D-Phe)の血管弛緩作用を阻害することができなかった(データ示さず)。De Petrocellisらは、ジケトピペラジン化合物が Transient receptor potential melastatin 8: TRPM8 のアゴニストになることを報告している⁹³⁾。また、TRPM8 アゴニストは、血管弛緩作用があることも報告されていることから、cyclo(L-Pro-D-Phe)も同様に TRPM8 が受容体になっている可能性も推察する⁹⁴⁾。

第一章で示した麦茶(L=32)に含まれる cyclo(L-Pro-D-Phe)量と等量の投与量でラット単回投与試験を行ったところ、cyclo(L-Pro-D-Phe)投与によってラット皮膚血流量増加効果が確認できたことから、cyclo(L-Pro-D-Phe)が麦茶中の主要な関与成分であると考えた。さらに、麦茶の焙煎度合いがラット皮膚血流量変化に与える影響評価の結果(図 6)と今回の cyclo(L-Pro-D-Phe)の分析結果

から、cyclo(L-Pro-D-Phe)濃度と麦茶に含まれる血流量増加効果が相関関係を示したことから、麦茶のラット皮膚血流量増加効果を代表する成分の 1 つは、cyclo(L-Pro-D-Phe)であると考える。

5. 結論

麦茶に含まれる呈味成分である cyclo(L-Pro-D-Phe)は、ラット皮膚血流量を増加させる。その作用メカニズムは、血管内皮依存的 NO 産生を介した血管弛緩作用である。また、cyclo(L-Pro-D-Phe)は、麦茶のラット皮膚血流量増加効果を代表する成分の 1 つである。

第四章 麦茶摂取が冷水負荷時におけるヒト皮膚血流およびヒト皮膚温へ与える影響

1. 概要

第一章で「麦茶のラット皮膚血流量増加効果は、焙煎によって生じる成分が重要な役割をもっている可能性」を示唆した。第三章では、麦茶に含まれる呈味成分：ジケトピペラジン化合物がラット皮膚血流量に与える影響を評価し、その作用機序を明らかにし、第一章で示した麦茶のラット皮膚血流量増加効果を代表する関与成分にジケトピペラジン化合物が適しているか検討した。

本章は、麦茶がヒト血流量に与える影響を評価した。本章の概要は以下の通りである。

目的

麦茶摂取が「冷え性の自覚症状がある女性の皮膚血流および皮膚温」に影響を与えるかを評価する。

方法

ヒト試験：プラセボ対照二重盲検平行群間比較法で評価した。冷え性の自覚症状がある女性を対象とし、麦茶摂取または対照飲料摂取時の冷水負荷後の皮膚血流量および皮膚温を比較した。

結果

麦茶摂取群は、対照飲料摂取群と比較して、有意に皮膚血流量および皮膚温が高くなった。

結論：

麦茶は、冷え性の自覚症状がある情勢に対して、冷水負荷後のヒト皮膚血流量増加効果および皮膚温上昇効果がある。

2. 実験方法

2-1. 倫理

本試験はヘルシンキ宣言⁹⁵⁾の趣旨にのっとり、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」⁹⁶⁾に従い、“キリン株式会社食品試験倫理審査委員会”へ、試験実施計画書、試験食品概要書、同意説明文書および同意書等の関係資料を提出し、同委員会の承認を経て実施した。

2-2. 対象者

被験者に対して、試験の目的、方法等について十分に説明し、試験参加の同意を文書で得たうえで実施した。試験対象者は、以下に示す選択基準に合致し、除外基準に該当しないヒトを選定

した。

<選択基準>

- ① 20 歳以上 40 歳未満の成人女性
- ② 冷え性の自覚症状がある者
- ③ 喫煙していない者
- ④ 自ら志願してインフォームドコンセントに同意した者

<除外基準>

- ① 血流に影響のある医薬品を摂取している者
- ② アルコールの過剰摂取の可能性のある者
- ③ 月経周期が不適な者
- ④ アレルギーを持っている者
- ⑤ 治療中の疾病がある者
- ⑥ 重篤な疾患(心疾患、糖尿病、腎疾患、肝疾患など)に罹患または既往歴がある者
- ⑦ 重度の貧血のある者
- ⑧ 妊娠または授乳の予定がある者
- ⑨ 質問表で不適と判断される者

2-3. 試験食品

本試験は、麦茶を香料等により香味を調整した飲料を被験飲料とした。被験飲料は 100 g の焙煎大麦を 4000 mL の熱水で抽出し、250 mL に分注した飲料を用いた。対照飲料は、香料および着色料によって被験飲料と外観および風味に区別がつかない飲料を用いた。試験飲料の栄養成分を表 10 に示す。

表 10 試験食品の栄養成分

| | 単位 | 被験飲料 | 対照飲料 |
|------------------------|------|------|------|
| 熱量 | kcal | 12 | 0 |
| タンパク質 | g | 3 | 0 |
| 脂質 | g | 0 | 0 |
| 炭水化物 | g | 0 | 0 |
| cyclo (L-Pro-D-Phe) | μg | 258 | 0 |

2-4. ジケトピペラジン化合物の分析

ジケトピペラジン化合物の分析は、LC-MS を用いて行った。用いた LC-MS は、Develosil column (C30-UG-3; 2.0 × 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) をカラムに用い、4000 QTRAP LC-MS system (AB Sciex, Tokyo, Japan) を検出器に用い、SIM (Selected Ion monitoring) モードでを使用した。移動相は 0.1% ギ酸とアセトニトリルを用い、移動相の流速は 0.2 mL/min で行った。注入量は、被験飲料または対象飲料を 1 μl である。移動層の条件は表 11 に示す通りである。用いた cyclo (L-Pro-D-Phe) のマスペクトルは、245 (m/Z) である。

表 11 移動層の条件

| 時間 | 移動層 |
|---------|-------------------------------|
| 0-10 分 | 10% アセトニトリル 一定 |
| 10-30 分 | 10% アセトニトリルから 30% アセトニトリルへ |
| 30-40 分 | 100% アセトニトリル 一定 |

2-5. 試験デザイン

本試験は、プラセボ対照ランダム化二重盲検平行群間比較法で実施した。試験実施に関与しないコントローラー（割付責任者）が被験者を 2 群にランダムに割り付けた後、群ごとに試験飲料を割り当てて、試験実施した。割付表はコントローラーが封緘し、割付表開封時まで密封保管した。これにより、被験者、試験実施者、解析担当者等、試験実施に関与した者の盲検化を行った。試験期間中、被験者はカフェインやビタミン K を含む食品の摂取を制限された。試験前日、被験者は過剰飲酒や過度な運動および血流に影響の与える飲食品の摂取を制限された。試験当日、被験

者は喫煙を制限された。

2-6. 皮膚血流量および皮膚温測定

試験当日のスケジュールを図 20 に示す。被験者は、綿の半袖 T シャツを着用した。試験室の環境は、室温を $25.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; 湿度を $52.5 \pm 7.5\%$; 風量を $< 0.1 \text{ m/sec}$ になるように設定した。被験者は、45 分間馴化を行った。被験者は、馴化開始から 35 分後に、試験食品を摂取した。被験者は、馴化終了後、左手を 15°C の冷水に 1 分間入れた。その後、被験者はいすに座り安静にした。左手の中指を測定場所とし、皮膚血流および皮膚温測定を行った。測定は、冷水負荷後 5, 10, 15, 20, 30 分後に行った。皮膚血流は、laser doppler blood perfusion imager (Periscan PIM 3 system; Perimed AB, Datavägen, Sweden)を用いて行い、皮膚温は、infrared thermography (H2640; Nippon Avionics Company, Tokyo, Japan)を用いて行った。

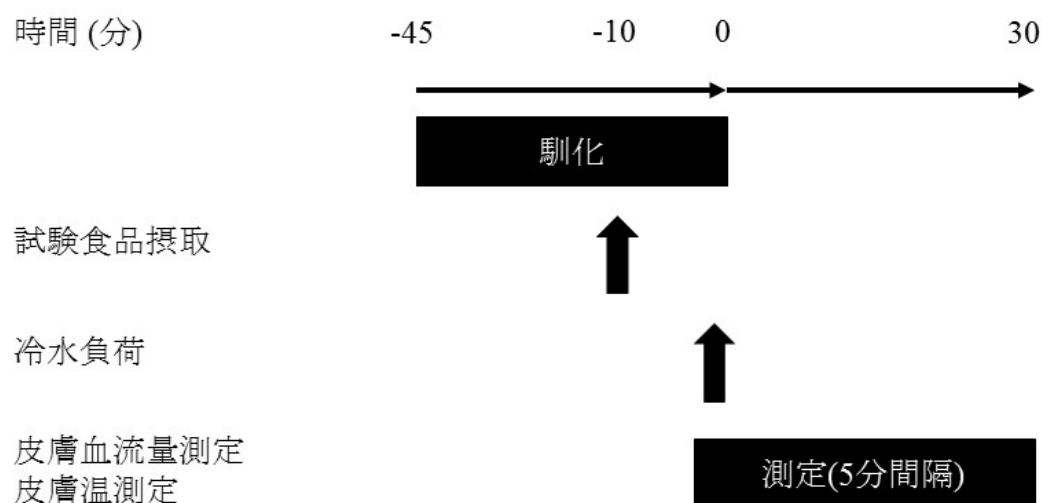


図 20 試験当日のスケジュール

被験者は、45 分間馴化を行った。試験食品摂取前に皮膚血流量および皮膚温を測定した。皮膚の測定場所は、左手の中指を用いた。試験食品摂取後 10 分後に、冷水負荷(15°C , 1 分間)を行った。その後、被験者は、椅子に座り安静にした。冷水負荷後 5 分毎に皮膚血流量および皮膚温を測定した(30 分間)。

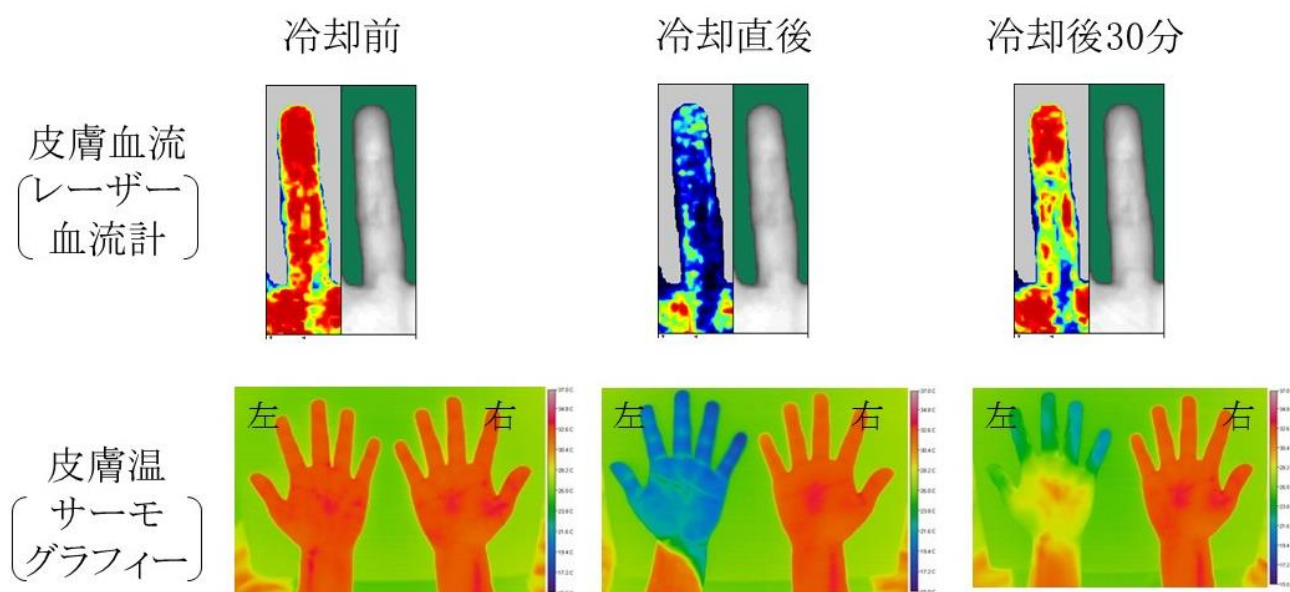


図 21 皮膚血流量および皮膚温測定

皮膚血流量測定および皮膚温測定の画像解析の様子を示す。皮膚血流量および皮膚温度が高い場合は赤色になり、低い場合は青く観察された。これらを画像解析ソフトで解析することで定量値にして解析を行った。

2-7. 統計解析

各試験の統計量は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は対応のない二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA)を用いて行い、有意水準は $p<0.05$ とした。

3. 実験結果

3-1. 被験者

本試験における被験者の組み入れから解析までの流れを図 22 に示す。被験者の一般背景を表 12 に示す。

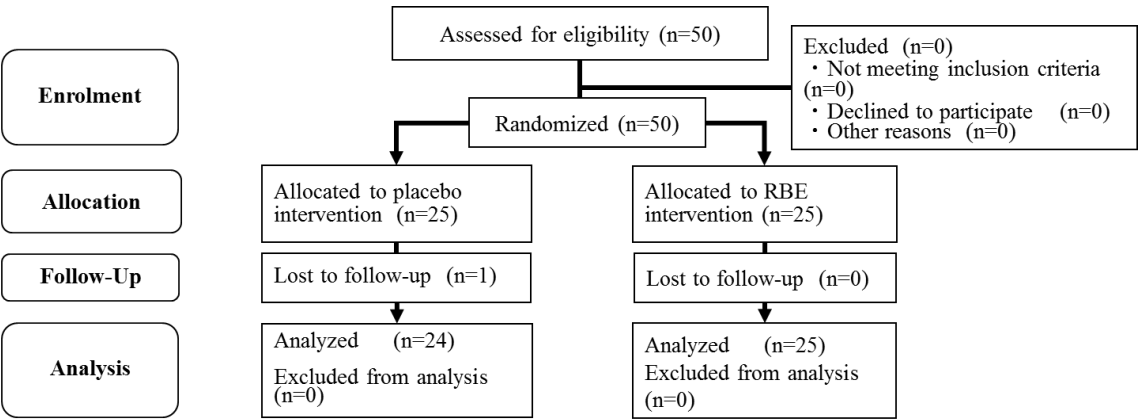


図 22 被験者の組み入れから症例固定の流れ

選択基準に合致し、除外基準に合致しない対象者 50 名を選抜し、ランダムに 2 群に割り付けを行った。対照群に割り付けられた 1 名が試験途中で脱落したが、それ以外の被験者(49 名)が、最後まで試験計画を実施した解析対象者とした。

表 12 被験者の一般背景

| 単位 | | 対照飲料群 (n=24) | | | 被験飲料群 (n=25) | | |
|-------|------------|-----------------|---|-----|-----------------|---|-----|
| 年齢 | 歳 | 28.5 | ± | 1.5 | 28.3 | ± | 1.5 |
| 身長 | cm | 160.3 | ± | 1.1 | 161.3 | ± | 1.1 |
| 体重 | kg | 51.7 | ± | 1.2 | 53.6 | ± | 1.3 |
| BMI | kg/m2 | 20.1 | ± | 0.5 | 20.6 | ± | 0.4 |
| 収縮期血圧 | mmHg | 107 | ± | 2.3 | 108.1 | ± | 2.3 |
| 拡張期血圧 | mmHg | 66.2 | ± | 1.7 | 65.8 | ± | 1.6 |
| 心拍数 | Number/min | 69.4 | ± | 1.8 | 69.5 | ± | 2.6 |

平均値±標準誤差

3-2. 麦茶摂取による冷水負荷後の皮膚血流量変化

麦茶摂取時の皮膚血流量は、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 23)。

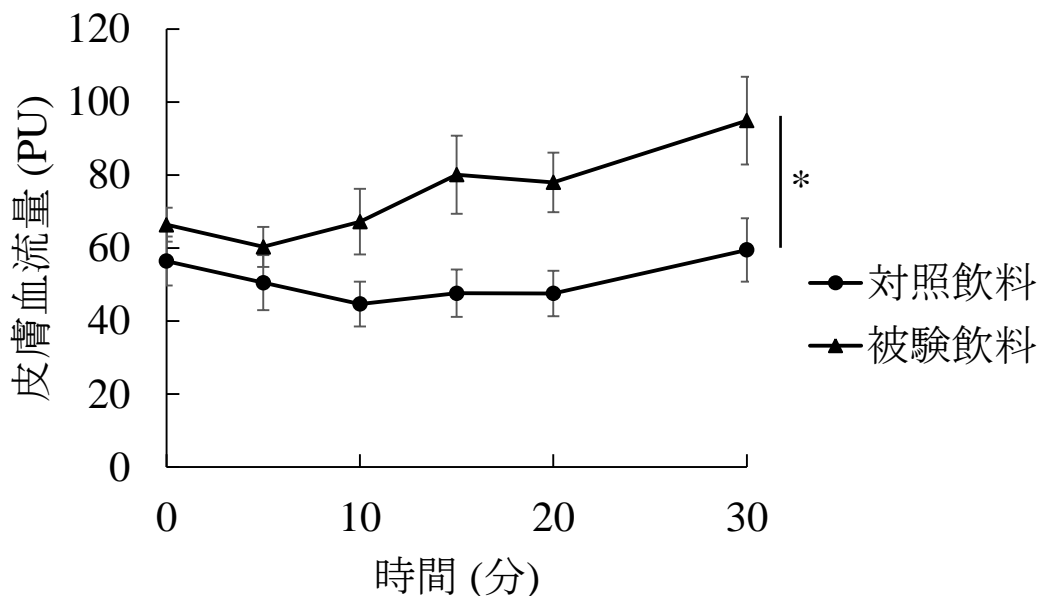


図 23 冷水負荷後の皮膚血流量

麦茶摂取における冷水負荷後の皮膚血流量を評価した。麦茶摂取群(n=25)は、対照飲料摂取群(n=24)と比較して、皮膚血流量が有意に高値を示した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のない二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA)で評価した。

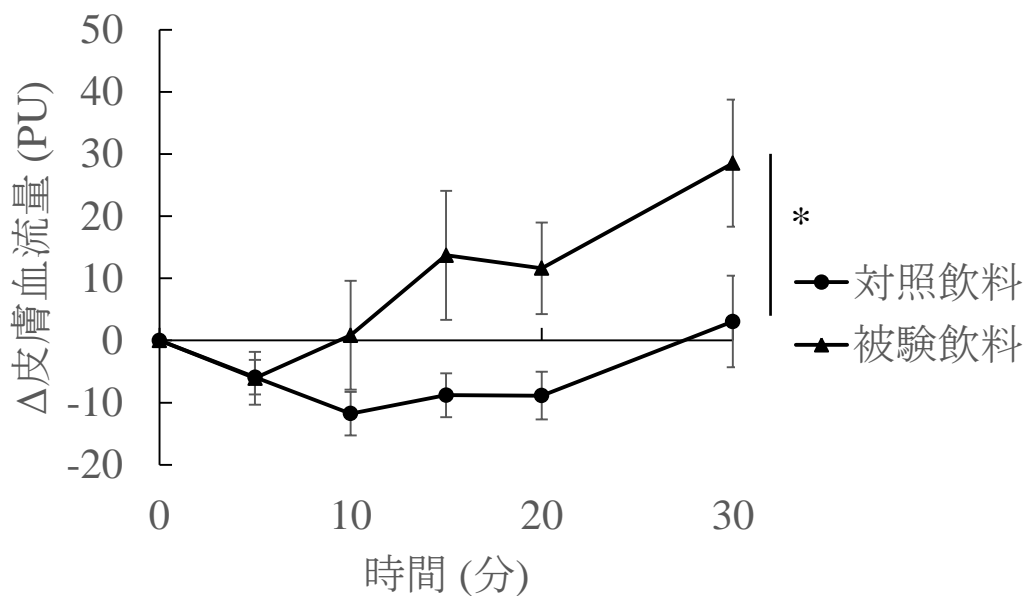


図 24 冷水負荷後の皮膚血流変化量

冷水負荷直後の皮膚血流量を 0 とし、麦茶摂取における冷水後の皮膚血流変化量を評価した。麦茶摂取群(n=25)は、対照飲料摂取群(n=24)と比較して、皮膚血流変化量が有意に高値を示した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のない二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA)で評価した。

3-3. 麦茶摂取による冷水負荷後の皮膚温変化

麦茶摂取時の皮膚温は、対照飲料摂取時と比較して、5,10,15,20,30 分後に高値を示した(図 25)。麦茶摂取時の皮膚温変化量は、対照飲料摂取時と比較して、5,10,15,20,30 分後に高値を示した(図 26)。

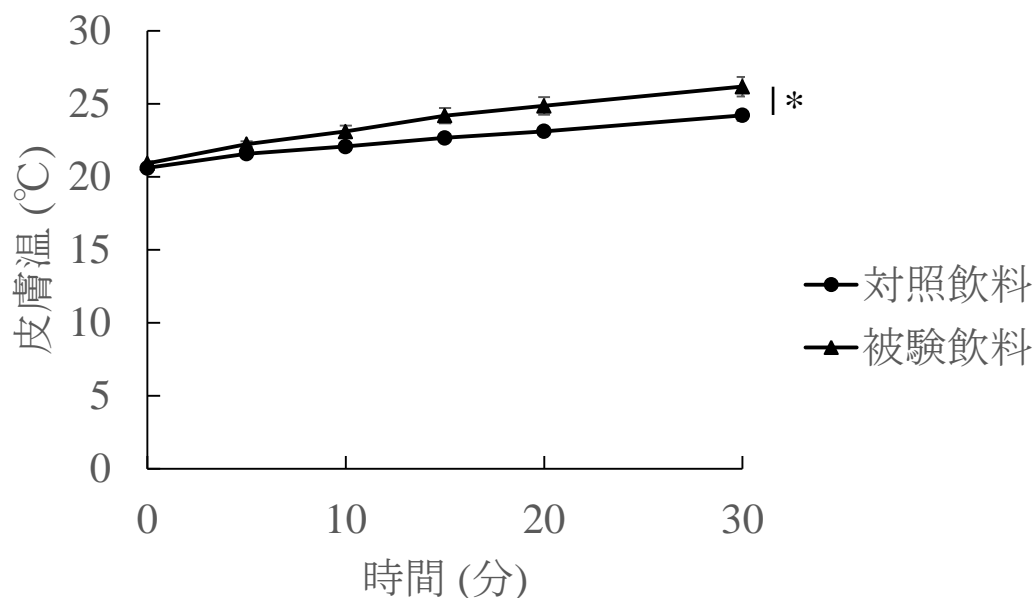


図 25 冷水負荷後の皮膚温

麦茶摂取における冷水負荷後の皮膚温に与える影響を評価した。麦茶摂取群(n=25)は、対照飲料摂取群(n=24)と比較して、皮膚温度が有意に高値を示した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のない二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA)で評価した。

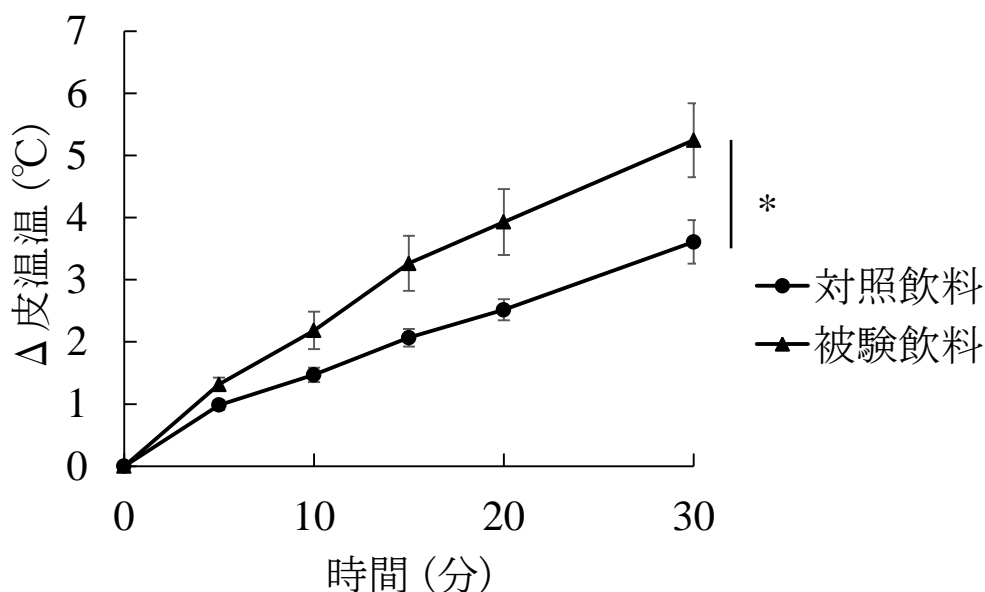


図 26 冷水負荷後の皮膚温度変化量

冷水負荷直後の皮膚温度を 0 とし、麦茶摂取における冷水後の皮膚温度変化量を評価した。麦茶摂取群(n=25)は、対照飲料摂取群(n=24)と比較して、皮膚温度変化量が有意に高値を示した。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のない二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

4. 考察

冷え性は、「からだの特定部位が冷たくなりやすく不快を感じやすい体質」である⁹⁷⁾。冷え性のヒトは、寒さに対する感受性が高いのみでなく、冷え性の症状が悪化することで、睡眠障害など精神活動や肩こりなどの QOL に影響を及ぼすことも報告されている^{97,98)}。従来冷え性を感じるヒトは、女性に多く、血流や代謝の低下が原因と考えられている⁹⁹⁾。女性は、男性と比較して、筋肉量が少なく上述の血流や代謝が低いと考えられている。冷えを感じる部位は、手足などの末梢組織であることが多い¹⁰⁰⁾。冷え性を改善する食品は、ココア、生姜やヘスペリジンなどさまざまな食品が研究されている¹⁰¹⁻¹⁰³⁾。

血流はヒトの恒常性維持に重要な働きを担っている¹⁴⁾。血流は、酸素やホルモンの運搬や浸透圧の維持・体温調節などの働きを担っている¹⁴⁾。冷え性は、末梢血流の低下による末梢組織の皮膚温低下が原因の一つと考えられている。

麦茶は、日本で伝統的に飲用されている清涼飲料である。第1章で麦茶の血流量増加効果を動物試験で示しており、ヒトでの血流量増加効果も期待される。そこで、本章では、麦茶摂取が冷え

の自覚症状がある女性の「冷水負荷後の皮膚血流及び皮膚温に与える影響」を報告する。試験方法は、プラセボ対象二重盲検平行群間比較法で行った。

一般的に、冷え性のヒトの血液循環機能：血流は、冷え性を感じないヒトと比較して、低下していることが報告されている¹⁰⁴⁾。血流は、さまざまな生体制御機能があるが、体温調節においても重要な役割を担っている¹⁴⁾。血流は、体の中枢から末梢組織へ熱エネルギー運ぶ役目を担っており、末梢血流が低下しやすいヒトは、末梢組織の体温が低下しやすく冷えを感じやすいと考えられている。

本章は、冷え性の自覚症状がある女性 48 名を対象に、麦茶摂取が冷水負荷後の皮膚血流量および皮膚温に与える影響を評価した。冷水負荷(左手を強制的に冷やしたこと)は、皮膚交感神経を活性化させ、皮膚血管収縮を引き起こし、皮膚血流量を低下させることが報告されている¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾。本研究においても、冷水負荷によって自律神経が交感神経優位になり、左手の皮膚血管を収縮させ、皮膚血流が低下したと考える。その後、血液循環が起こり、皮膚血流量が増加したことにより、体の中枢組織から末梢組織：皮膚への熱エネルギー移動が発生し、左手の体温が上昇したと考える。

麦茶摂取群は、対照飲料群と比較して、皮膚血流量および皮膚温が高くなった。これは、冷水負荷による血管収縮が麦茶摂取によって抑制されたと考える。麦茶摂取により皮膚血流量が増加し、多くの血液が末梢組織：皮膚を循環することで熱エネルギーが移動し、皮膚温が高くなったと考える。

我々は、第一章で麦茶摂取によるラット皮膚血流量増加効果を示している。本実験によって、この麦茶摂取の血流量増加効果は、冷え性の女性においても発揮されることが示された。

血流は、高血圧、動脈硬化、冷え性に関係があることが知られている¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾。本章で麦茶がヒト血流量増加効果を有していることを示した。このことから、麦茶摂取によって、高血圧や動脈硬化の改善も期待される。第三章で麦茶に含まれる cyclo(L-Pro-D-Phe)が、麦茶の有効成分の 1 つであることを示した。cyclo(L-Pro-D-Phe)は、血管内皮依存的 NO 産生による血管弛緩作用により、血流量増加効果を発揮していた。本章で確認された麦茶のヒト血流量増加効果も同様の作用メカニズムであることが推察する。

本結果は、冷水負荷時に限定されており、それ以外の負荷時の血流量増加効果での検証が必要であると考ええる。

5. 結論

麦茶摂取は、冷え症の自覚症状がある女性の冷水負荷後のヒト皮膚血流量およびヒト皮膚温を上昇させる。

第五章 麦茶摂取が冷房環境下におけるヒト皮膚血流量低下およびヒト皮膚温低下へ与える影響

1. 概要

第四章で、麦茶摂取が「冷え性を感じやすい女性に対して、冷水負荷時の皮膚血流量および皮膚温を高める」ことを報告した。本章では、麦茶摂取が、冷房環境下におけるヒト皮膚血流量低下およびヒト皮膚温低下に対する影響を評価した。また、冷えの自覚症状の有無によって、その有効性に違いがあるかを評価した。本章の概要は以下の通りである。

目的

麦茶摂取が「冷え性の自覚症状がある女性の皮膚血流および皮膚温」に影響を与えるかを評価する。

方法

ヒト試験：プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較法で評価した。冷え性の自覚症状がある女性を対象とし、麦茶摂取または対照飲料摂取時の冷房環境下での皮膚血流量および皮膚温を比較した。

結果

麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、冷房環境下での皮膚血流量および皮膚温が高くなった。

結論：

麦茶は、冷え性の自覚症状がある方に対して、冷房環境下でのヒト皮膚血流量および皮膚温低下を穏やかにする。

2. 実験方法

2-1. 倫理

本試験はヘルシンキ宣言⁹⁵⁾の趣旨にのっとり、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」⁹⁶⁾に従い、“キリン株式会社食品試験倫理審査委員会”へ、試験実施計画書、試験食品概要書、同意説明文書および同意書等の関係資料を提出し、同委員会の承認を経て実施した。

2-2. 対象者

被験者に対して、試験の目的、方法等について十分に説明し、試験参加の同意を文書で得たう

えで実施した。試験対象者は、以下に示す選択基準に合致し、除外基準に該当しないヒトを選定した。

<選択基準>

- ① 20 歳以上 65 歳未満の成人男女
- ② 喫煙していない者
- ③ 自ら志願してインフォームドコンセントに同意した者

<除外基準>

- ① 血流に影響のある医薬品を摂取している者
- ② アルコールの過剰摂取の可能性のある者
- ③ 月経周期が不適な者
- ④ アレルギーを持っている者
- ⑤ 治療中の疾病がある者
- ⑥ 重篤な疾患(心疾患、糖尿病、腎疾患、肝疾患など)に罹患または既往歴がある者
- ⑦ 重度の貧血のある者
- ⑧ 妊娠または授乳の予定がある者
- ⑨ 質問表で不適と判断される者

2-3. 試験食品

本試験は、麦茶を香料等により香味を調整した飲料を被験飲料とした。被験飲料は 100 g の焙煎大麦を 4000 mL の熱水で抽出し、250 mL に分注した飲料を用いた。対照飲料は、香料および着色料によって被験飲料と外観および風味に区別がつかない飲料を用いた。試験飲料の栄養成分を表 13 に示す。

表 13 試験食品の栄養成分

| | 単位 | 被験飲料 | 対照飲料 |
|------------------------|------|------|------|
| 熱量 | kcal | 12 | 0 |
| タンパク質 | g | 3 | 0 |
| 脂質 | g | 0 | 0 |
| 炭水化物 | g | 0 | 0 |
| cyclo (L-Pro-D-Phe) | μg | 250 | 0 |

2-4. 試験デザイン

本試験は、プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー比較法で実施した。試験実施に関与しないコントローラー(割付責任者)が被験者を2群にランダムに割り付けた後、群ごとに試験飲料を割り当てて、試験実施した。割付表はコントローラーが封緘し、割付表開封時まで密封保管した。これにより、被験者、試験実施者、解析担当者等、試験実施に関与した者の盲検化を行った。試験期間中、被験者はカフェインやビタミン K を含む食品の摂取を制限された。試験前日、被験者は過剰飲酒や過度な運動および血流に影響の与える飲食品の摂取を制限された。試験当日、被験者は喫煙を制限された。

2-5. 冷え性の自覚症状評価

寺澤式アンケートを用いて、被験者の冷え性の自覚症状を調査した²⁸⁾。寺澤式アンケートを表 14 に示す。以下に示す条件に合致した被験者を冷え性の自覚症状がある対象者とした。

<寺澤式アンケートを用いた冷え性の基準>

- ・重要項目が2項目以上
- ・重要項目が1項目および参考項目が2項目以上
- ・参考項目が4項目以上

表 14 寺澤式アンケート

| 重要項目 | |
|------|--|
| 1 | 他の多くのヒトに比べて“寒がり”の性分だと思う。 |
| 2 | 腰や手足、あるいは身体の一部に冷えがあつてつらい。 |
| 3 | 冬になると冷えるので電気毛布や電気敷布、あるいはカイロなどをいつも用いるようにしている。 |
| 参考項目 | |
| 1 | 身体全体が冷えてつらいことがある。 |
| 2 | 足が冷えるので、夏でも厚い靴下を履くようにしている。 |
| 3 | 冷房のきいているところは身体が冷えてつらい。 |
| 4 | 他の多くの人に比べてかなり厚着する方だと思う。 |
| 5 | 手足が他の多くの人より冷たい方だと思う。 |

2-6. 皮膚血流量および皮膚温測定

試験当日のスケジュールを図 27 に示す。被験者は、綿の半袖 T シャツを着用した。試験室の環境は、室温を $25.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; 湿度を $52.5 \pm 7.5\%$; 風量を $< 0.1 \text{ m/sec}$ になるように設定した。被験者は、30 分間馴化を行った。被験者は、馴化終了後、試験食品を摂取した。その後、被験者はいすに座り安静にした。左足の甲を測定場所とし、皮膚血流量および皮膚温測定を行った。測定は、試験食品摂取後 5 分間隔で 90 分まで行った。皮膚血流量は、レーザードップラー血流測定器 ALF-21 (アドバンス株式会社、東京)を用いて行い、アナログ信号をデジタル信号に変換するために、アナログデジタル変換器:Power -Lab (AD instruments, ニュージーランド)を用いた。レーザードップラー血流測定器の測定プローブを左足に取り付け、皮膚血流量測定を行った。皮膚温は、infrared thermography (H2640; Nippon Avionics Company, Tokyo, Japan)を用いて行った。

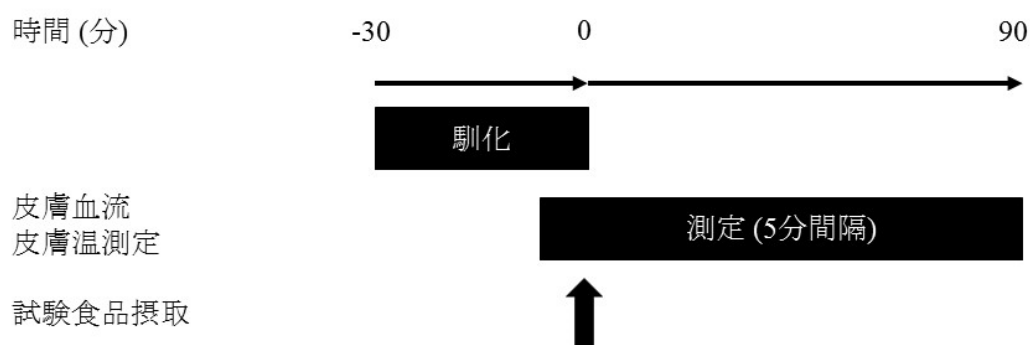


図 27 試験当日のスケジュール

2-7. 統計解析

各試験の統計量は、平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA)を用いて行い、有意水準は $p<0.05$ とした。

3. 実験結果

3-1. 被験者

被験者の流れを図 28 に示す。被験者背景を表 15 に示す。

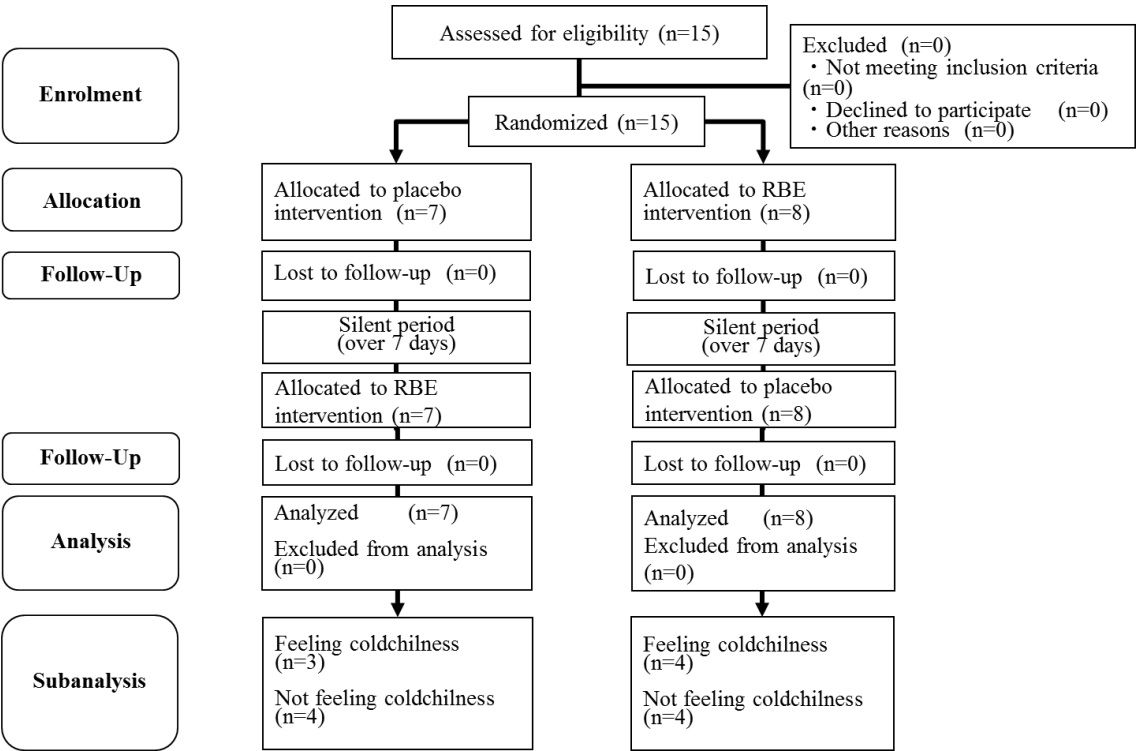


図 28 被験者の流れ

選択基準に合致し、除外基準に合致しない対象者 15 名を選抜し、ランダムに 2 群に割り付けを行った。全ての被験者が、最後まで試験計画を実施した解析対象者となった。

表 15 被験者背景

| 単位 | | 全被験者 (n=15) | |
|----|----|----------------|--------|
| 年齢 | 歳 | 35.3 | ± 8.4 |
| 身長 | cm | 165.5 | ± 7.8 |
| 体重 | kg | 62.8 | ± 10.2 |

平気値±標準誤差

3-2. 冷房環境下の皮膚血流量変化

対照飲料摂取時の皮膚血流量は、試験開始前と比較して、低下した(図 29)。麦茶摂取時の皮膚血流量は、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 29)。

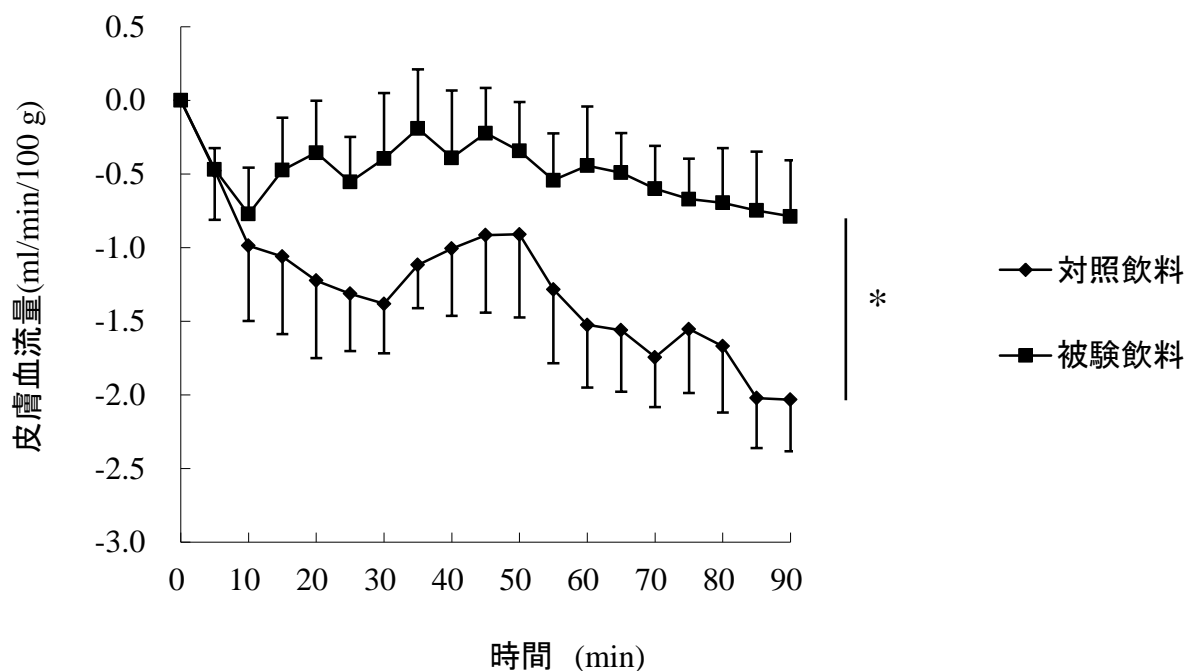


図 29 冷房環境下の皮膚血流変化量

測定開始後の皮膚血流量を 0 とし、麦茶摂取における冷房下での皮膚血流変化量を評価した。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚血流変化量が有意に高値を示した (n=15)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

3-3. 冷房環境下の皮膚温変化(冷えの自覚症状有無による層別解析)

対照飲料摂取時の皮膚血流量は、冷えの自覚症状の有無に関わらず、試験開始前と比較して、低下した(図 30,31)。麦茶摂取時の皮膚血流量は、冷えの自覚症状有の対象者の場合、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 30)。一方で、麦茶摂取時の皮膚血流量は、冷えの自覚症状無の対象者の場合、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 31)。

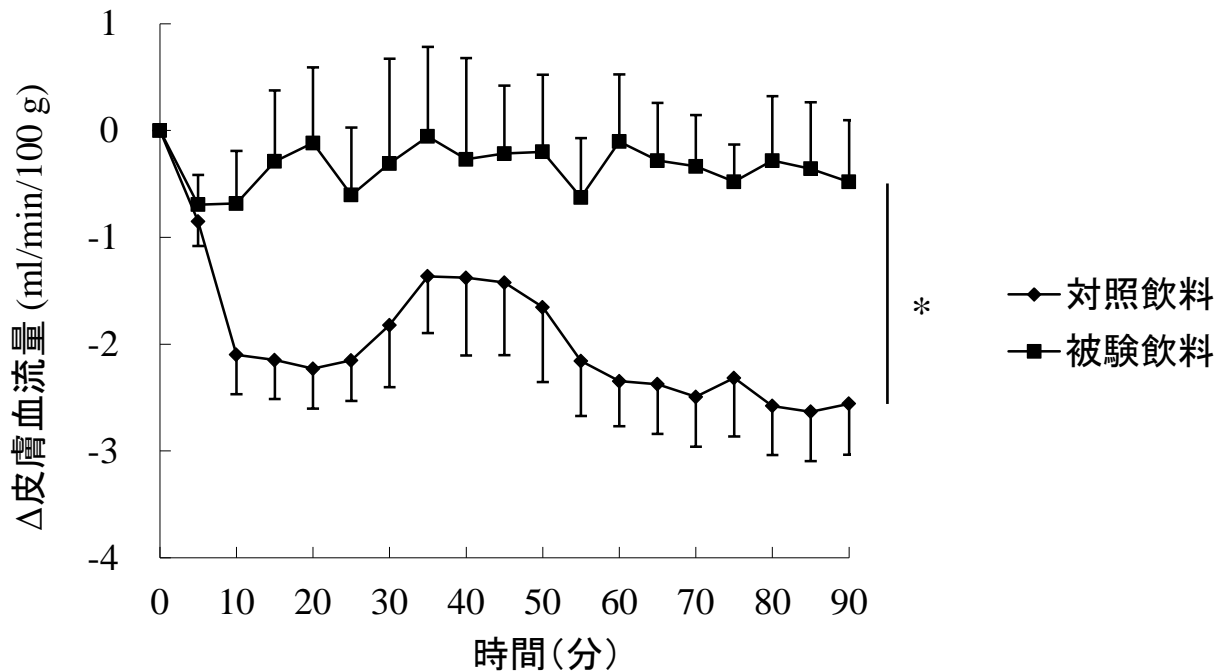


図 30 冷えの自覚症状があるヒトの冷房環境下の皮膚血流変化量

測定開始後の皮膚血流を 0 とし、麦茶摂取における冷房下での皮膚血流変化量を評価した。解析対象者は、寺澤法で冷えの自覚症状ありと判定された対象者のみである。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温度変化量が有意に高値を示した (n=7)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

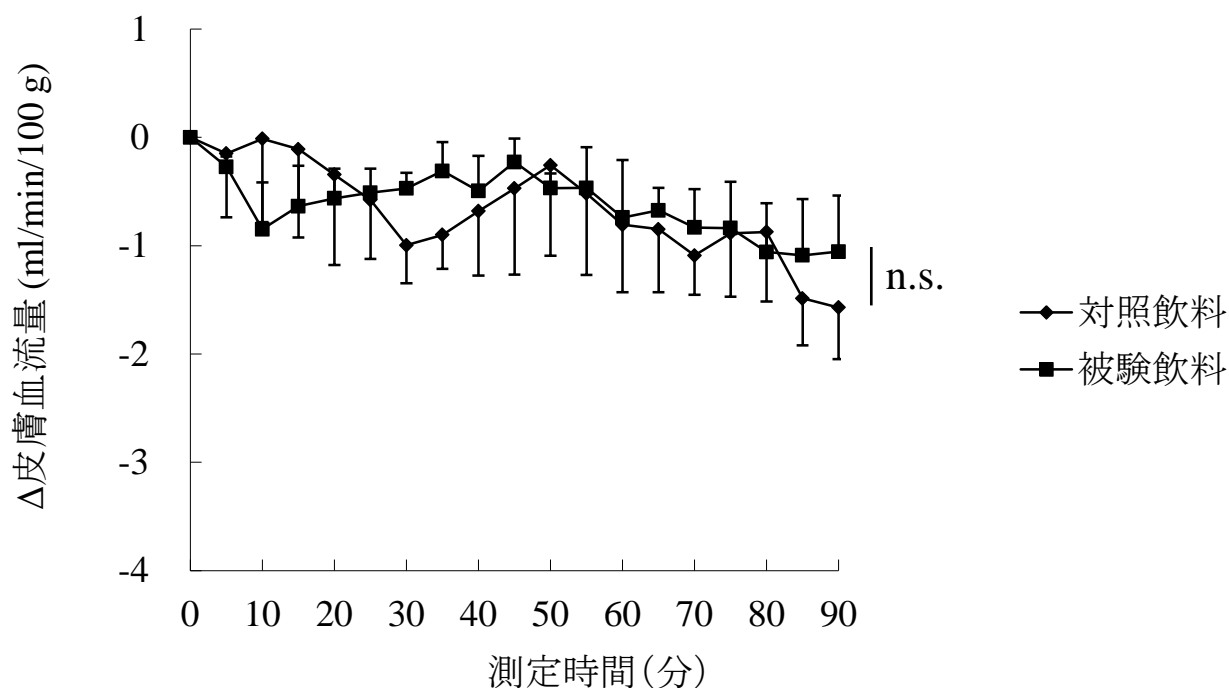


図 31 冷えの自覚症状がないヒトの冷房環境下の皮膚血流変化量

測定開始後の皮膚血流を 0 とし、麦茶摂取における冷房下の皮膚血流変化量を評価した。解析対象者は、寺澤法で冷えの自覚症状なしと判定された対象者のみである。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温度変化量が有意に高値を示した (n=8)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

3-4. 冷房環境下の皮膚温変化

対照飲料摂取時の皮膚温は、試験開始前と比較して、低下した(図 32)。麦茶摂取時の皮膚温は、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 32)。

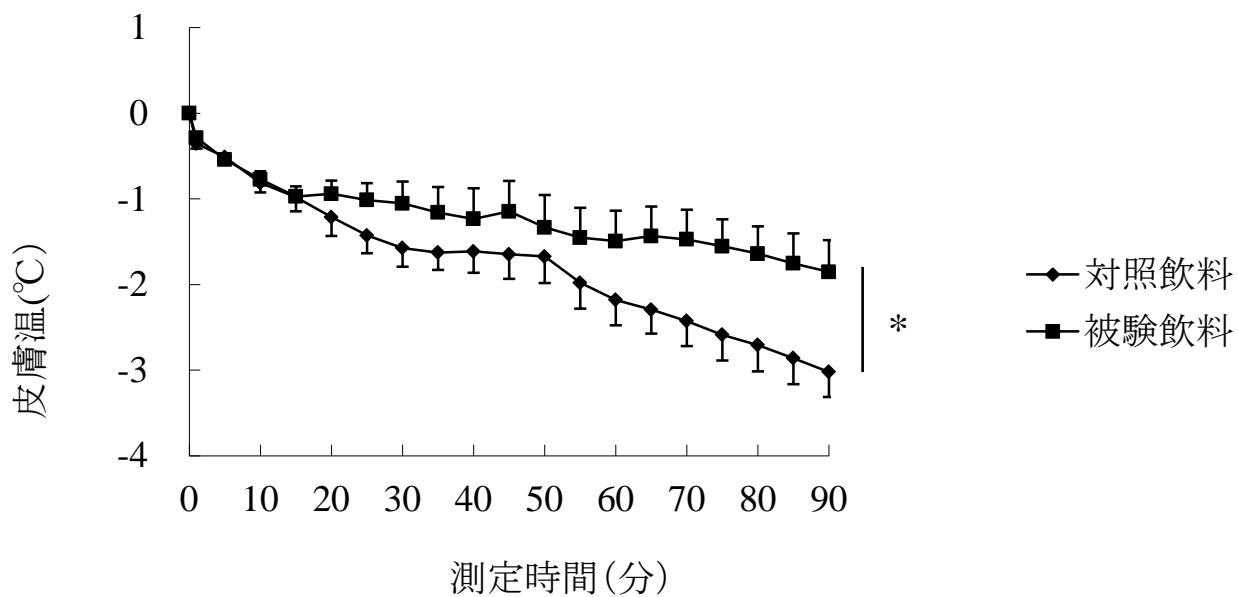


図 32 冷房環境下の皮膚温度変化量

測定開始後の皮膚温度を 0 とし、麦茶摂取における冷房下の皮膚温変化量を評価した。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温変化量が有意に高値を示した (n=15)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

3-5. 冷房環境下の皮膚温変化(冷えの自覚症状有無による層別解析)

対照飲料摂取時の皮膚温は、冷えの自覚症状の有無に関わらず、試験開始前と比較して、低下した(図 33,34)。麦茶摂取時の皮膚温は、冷えの自覚症状の有無に関わらず、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 33,34)。

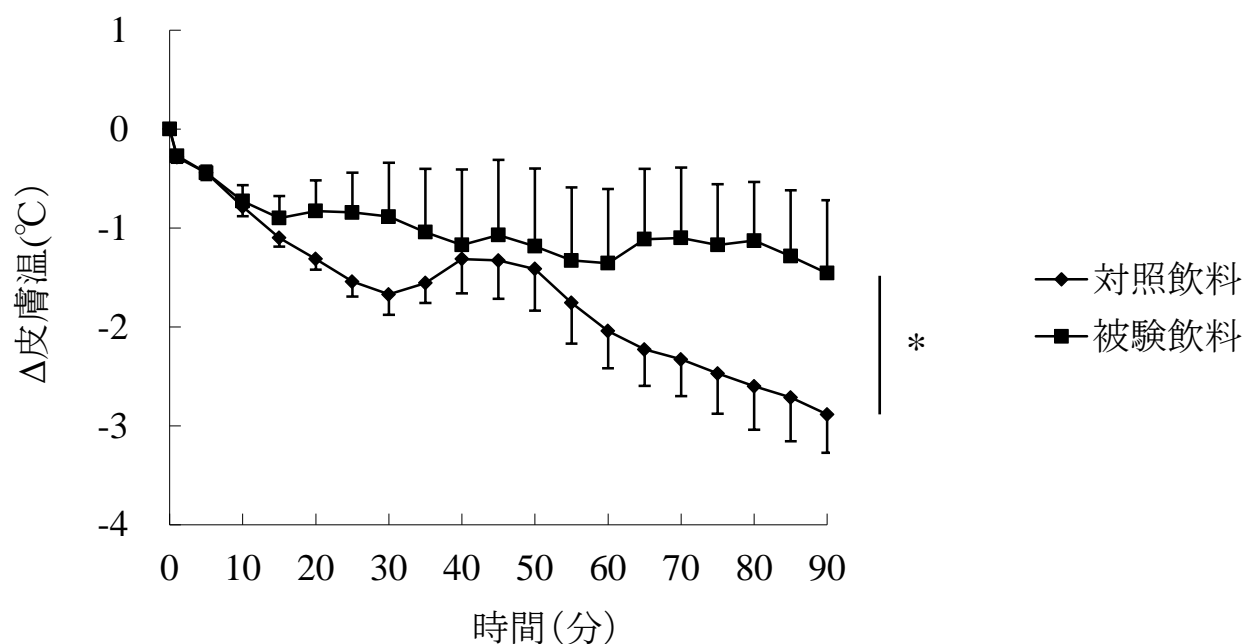


図 33 冷えの自覚症状があるヒトの冷房環境下の皮膚温変化量

測定開始後の皮膚温を 0 とし、麦茶摂取における冷房下での皮膚温変化量を評価した。解析対象者は、寺澤法で冷えの自覚症状ありと判定された対象者のみである。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温度変化量が有意に高値を示した (n=7)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

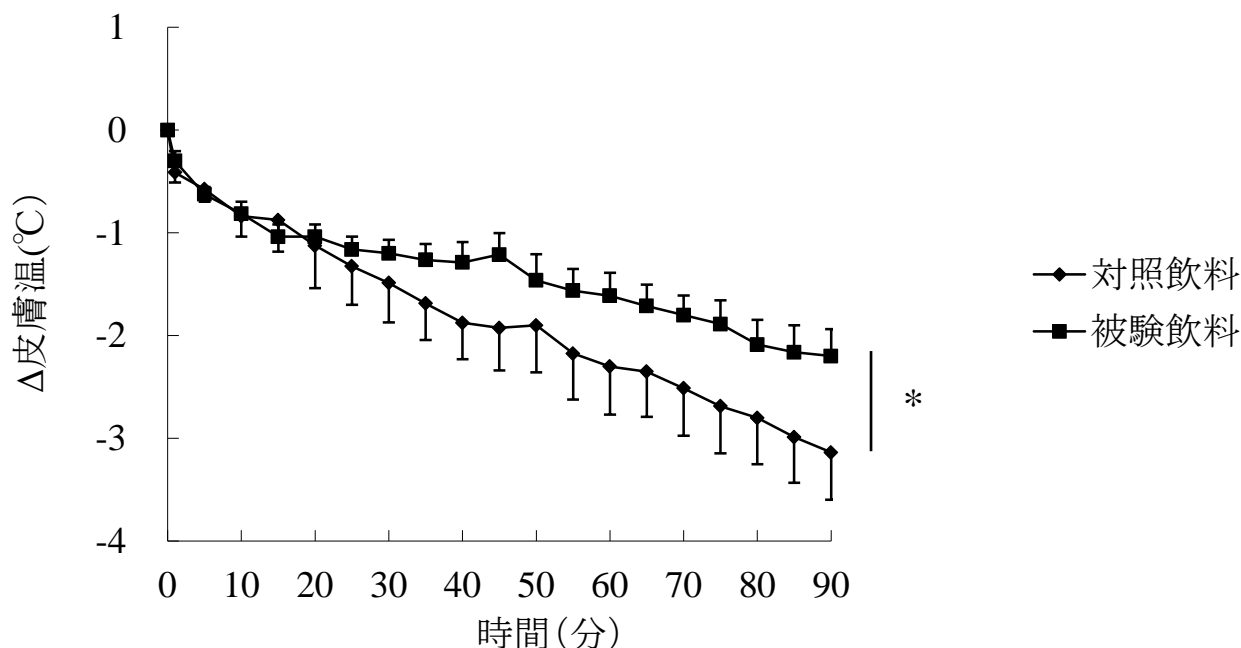


図 34 冷えの自覚症状がないヒトの冷房環境下の皮膚温変化量

測定開始後の皮膚温を 0 とし、麦茶摂取における冷房下での皮膚温変化量を評価した。解析対象者は、寺澤法で冷えの自覚症状なしと判定された対象者のみである。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温度変化量が有意に高値を示した (n=8)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

4. 考察

皮膚血流量および皮膚温が、対照飲料摂取時に低下した。このことから、冷房環境下によって皮膚血流量および皮膚温が低下する条件が確立できたと考える。ヒトは寒さを感じ、皮膚温が下がると、中枢体温維持をするために、皮膚交感神経を優位にさせ、皮膚血流量を下げることで熱エネルギーの消費を抑えることが報告されている¹¹¹⁾。

麦茶摂取時の皮膚血流量および皮膚温は、対照飲料摂取時の皮膚血流量および皮膚温と比較して、有意に高値を示していることから、麦茶は冷房環境下における皮膚血流量および皮膚温の低下を抑制すると言える。麦茶の血流量増加効果は、第四章で示した冷水負荷後のような急性的血流変化のみならず、本研究で行った冷房環境下のような緩やかな血流変化においても有効であると考ええる。

近代化した生活環境では、冷暖房などの使用により環境温を調整することが増えている。特に、電車などの公共交通機関やオフィスなどの仕事環境において、過剰な冷房使用により、冷えの自覚症状があるヒトの QOL が低下することなどが報告されている^{37,38)}。一方で、環境温の感じやすさはヒトによって異なり、同一環境温度でも冷えを感じやすいヒトと感じにくいヒトがいる¹¹²⁾。

そこで、寺澤法による冷えの自覚症状によって対象者を分けて層別解析を実施した結果、冷えの自覚症状がある対象者に顕著にその血流量増加効果が示された(図 33)。

冷えの自覚症状の有無は、対照飲料摂取時の皮膚温低下に大きな影響は与えなかった。一方で、冷えの自覚症状の有無は、対象飲料摂取時の皮膚血流量低下に大きな影響を与えた。冷えの自覚症状がある対象者は、冷えの自覚症状がない対象者と比較して、皮膚血流量の低下幅が大きくなった。

このことから、皮膚温の低下は同様であったが、血流量の低下は冷えの自覚症状がある対象者の方が大きかった。皮膚温低下に伴う自律神経調節が過敏に反応し、皮膚交感神経が刺激され、皮膚血流量が低下したと考える。よって、冷えの自覚症状がある対象者は、冷えの自覚症状がない対象者と比較して、皮膚血流量が低下しやすいと考える。このことは、従来の冷え性の研究報告と矛盾しない結果である¹¹³⁾。

このことから、冷え性の自覚症状がある対象者は、皮膚温低下に対して皮膚血流量低下がしやすい体質なため、麦茶摂取による皮膚血流量低下抑制効果が検出されやすくなったと考える。

冷え性は、中医学や漢方では、自律神経の失調に起因して起こると考えられており、自律神経失調症などの予兆とも考えられている^{38,101)}。このことから、麦茶を摂取することでこれらの自律神経失調症などの予防にも有効であることが推察される。また、日常的な生活において、過剰な冷房環境下におけるストレスによる QOL 低下を改善することが期待される。

5. 結論

麦茶は、冷房環境下のヒト皮膚血流量およびヒト皮膚温の低下を抑制する。麦茶の冷房環境下のヒト皮膚血流量の低下抑制効果は、冷え性の自覚症状がある対象者において、顕著に発揮される。麦茶の皮膚温度低下の抑制効果は、冷え性の自覚症状有無を問わず効果を発揮する。

第六章 麦茶摂取が冷房環境下における健常男女のヒト皮膚温低下へ与える影響

1. 概要

第五章で、麦茶摂取が「冷房環境下におけるヒト皮膚血流量およびヒト皮膚温低下をおだやかにする」ことを報告した。

本章では、麦茶摂取が、冷房環境下におけるヒト皮膚温低下に対する影響の再現性を確認するとともに、その効果が性差に影響を及ぼすか評価した。本章の概要は以下の通りである。

目的

麦茶摂取が「冷房環境下でのヒト皮膚温に与える影響」を評価し、その性差の影響を評価する。

方法

ヒト試験：プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較法で評価した。健常男女を対象者とし、麦茶摂取または対照飲料摂取時の冷房環境下での皮膚温を比較した。

結果

麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、冷房環境下での皮膚温が高くなった。その結果は、対象者を男性のみ、または女性のみでも同様であった。

結論：

麦茶は、冷房環境下でのヒト皮膚温低下を穏やかにすることの再現性が確認された。また、その効果は、性差によって違いがないことを確認した。

2. 実験方法

2-1. 倫理

本試験はヘルシンキ宣言⁹⁵⁾の趣旨にのっとり、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」⁹⁶⁾に従い、“キリン株式会社食品試験倫理審査委員会”へ、試験実施計画書、試験食品概要書、同意説明文書および同意書等の関係資料を提出し、同委員会の承認を経て実施した。

2-2. 対象者

被験者に対して、試験の目的、方法等について十分に説明し、試験参加の同意を文書で得たうえで実施した。試験対象者は、以下に示す選択基準に合致し、除外基準に該当しないヒトを選定した。

<選択基準>

- ① 20 歳以上 65 歳未満の成人男女
- ② 喫煙していない者
- ③ 自ら志願してインフォームドコンセントに同意した者

<除外基準>

- ① 血流に影響のある医薬品を摂取している者
- ② アルコールの過剰摂取の可能性のある者
- ③ 月経周期が不適な者
- ④ アレルギーを持っている者
- ⑤ 治療中の疾病がある者
- ⑥ 重篤な疾患(心疾患、糖尿病、腎疾患、肝疾患など)に罹患または既往歴がある者
- ⑦ 重度の貧血のある者
- ⑧ 妊娠または授乳の予定がある者
- ⑨ 質問表で不適と判断される者

2-3. 試験食品

本試験は、麦茶を香料等により香味を調整した飲料を被験飲料とした。被験飲料は 100 g の焙煎大麦を 4000 mL の熱水で抽出し、250 mL に分注した飲料を用いた。対照飲料は、香料および着色料によって被験飲料と外観および風味に区別がつかない飲料を用いた。試験飲料の栄養成分を表 16 に示す。

表 16 試験食品の栄養成分

| | 単位 | 被験飲料 | 対照飲料 |
|------------------------|------|------|------|
| 熱量 | kcal | 0 | 0 |
| タンパク質 | g | 0 | 0 |
| 脂質 | g | 0 | 0 |
| 炭水化物 | g | 0 | 0 |
| cyclo (L-Pro-D-Phe) | μg | 250 | 0 |

2-4. 試験デザイン

本試験は、プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー比較法で実施した。試験実施に関与しないコントローラー(割付責任者)が被験者を2群にランダムに割り付けた後、群ごとに試験飲料を割り当てて、試験実施した。割付表はコントローラーが封緘し、割付表開封時まで密封保管した。これにより、被験者、試験実施者、解析担当者等、試験実施に関与した者の盲検化を行った。試験期間中、被験者はカフェインやビタミン K を含む食品の摂取を制限された。試験前日、被験者は過剰飲酒や過度な運動および血流に影響の与える飲食品の摂取を制限された。試験当日、被験者は喫煙を制限された。

2-5. 皮膚温測定

試験当日のスケジュールを図 35 に示す。被験者は、綿の半袖 T シャツを着用した。試験室の環境は、室温を $25.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; 湿度を $52.5 \pm 7.5\%$; 風量を $< 0.1 \text{ m/sec}$ になるように設定した。被験者は、30 分間馴化を行った。被験者は、馴化終了後、試験食品を摂取した。その後、被験者はいすに座り安静にした。左足の甲を測定場所とし、皮膚温測定を行った。測定は、試験食品摂取後 5 分間隔で 90 分まで行った。皮膚温は、infrared thermography (H2640; Nippon Avionics Company, Tokyo, Japan)を用いて行った。

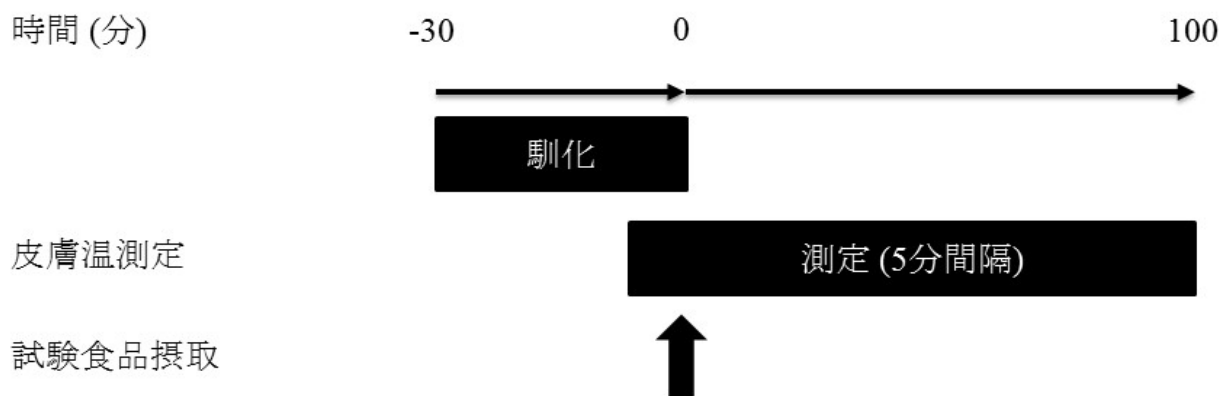


図 35 試験当日のスケジュール

2-7. 統計解析

各試験の統計量は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA)を用いて行い、有意水準は $p<0.05$ とした。

3. 実験結果

3-1. 被験者

被験者の流れを図 36 に示す。被験者背景を表 17 に示す。

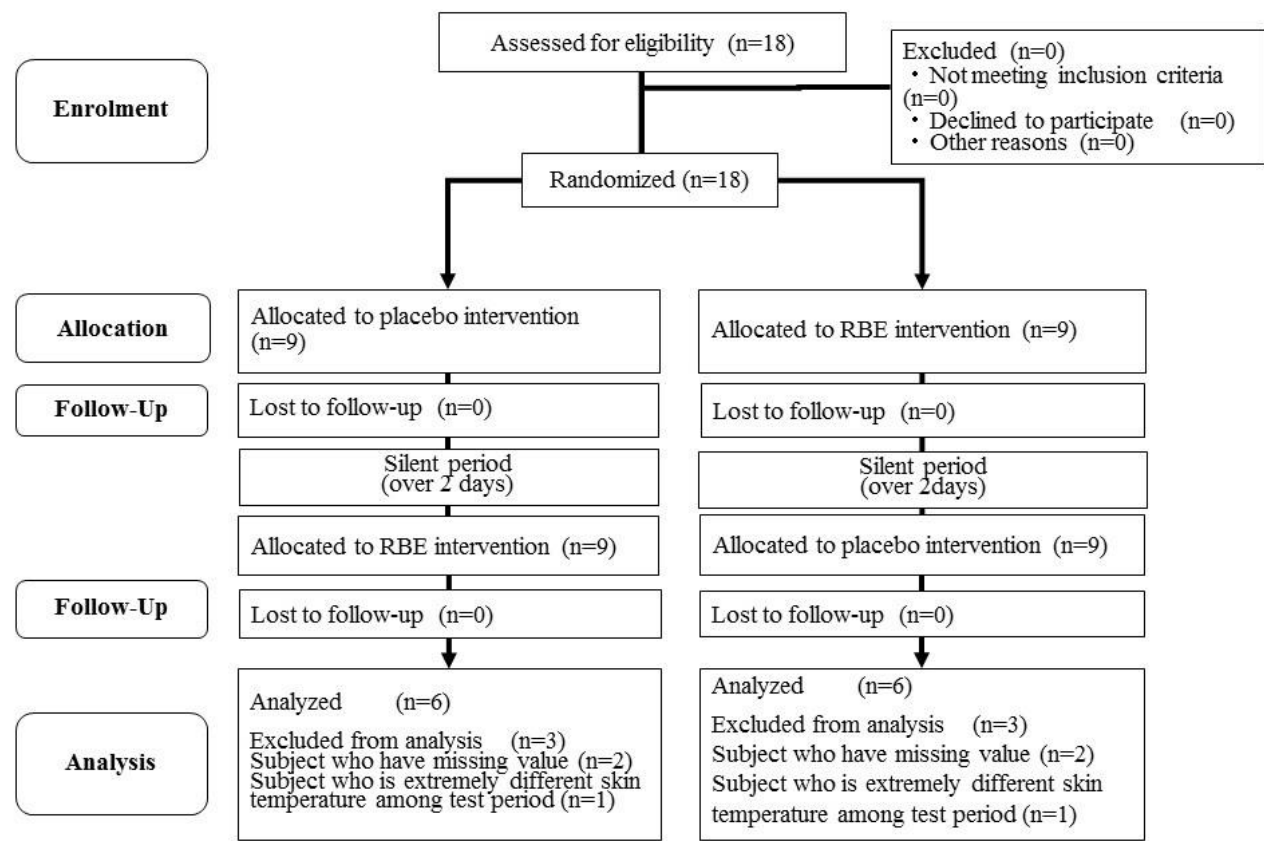


図 36 被験者の流れ

選択基準に合致し、除外基準に合致しない対象者 18 名を選抜し、ランダムに 2 群に割り付けを行った。全ての被験者が、最後まで試験計画を実施した対象者 12 名を解析対象者となった。

表 17 被験者背景

| 単位 | | 全被験者 (n=18) | |
|----|----|----------------|-------|
| 年齢 | 歳 | 33.4 | ± 6.5 |
| 身長 | cm | 167.9 | ± 8.6 |
| 体重 | kg | 58.5 | ± 7.4 |

平気値±標準偏差

3-2. 冷房環境下の皮膚温変化

対照飲料摂取時の皮膚温は、試験開始前と比較して、低下した(図 37)。麦茶摂取時の皮膚温は、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 37)。

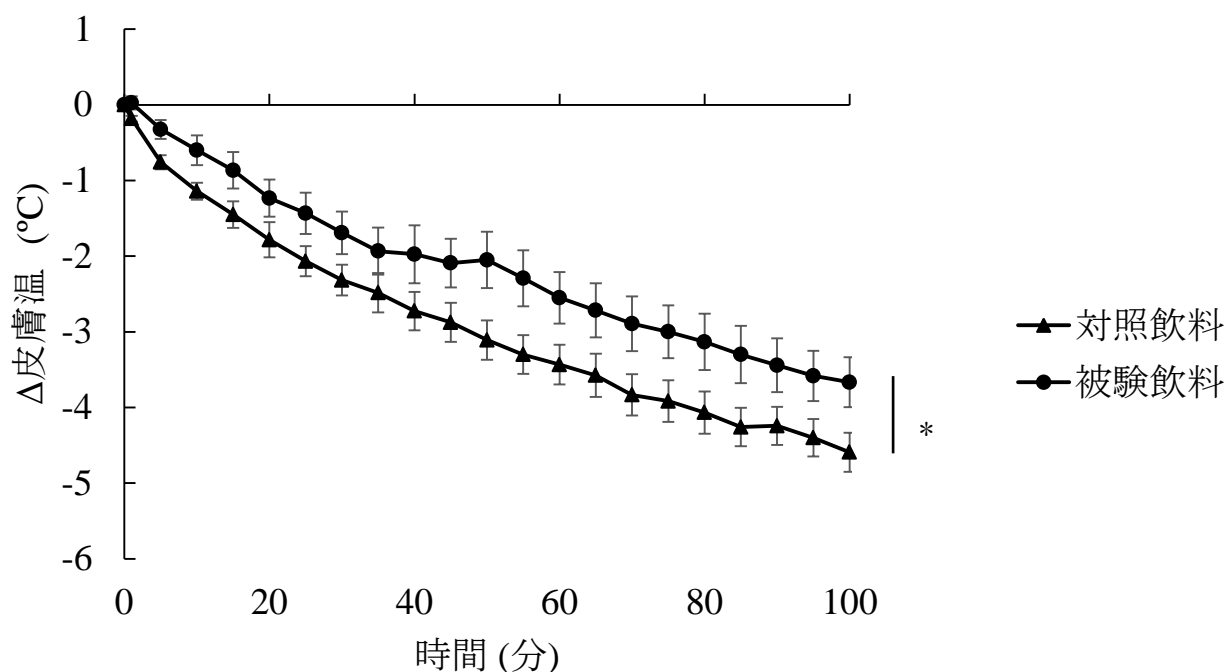


図 37 冷房環境下の皮膚血流変化量

測定開始後の皮膚温を 0 とし、麦茶摂取における冷房下での皮膚温変化量を評価した。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温変化量が有意に高値を示した (n=12)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

3-3. 冷房環境下の皮膚温変化(性別による層別解析)

対照飲料摂取時の皮膚温は、性差に関わらず、試験開始前と比較して、低下した(図 38,39)。麦茶摂取時の皮膚温は、性差に関わらず、対照飲料摂取時と比較して、高値を示した(図 38,39)。

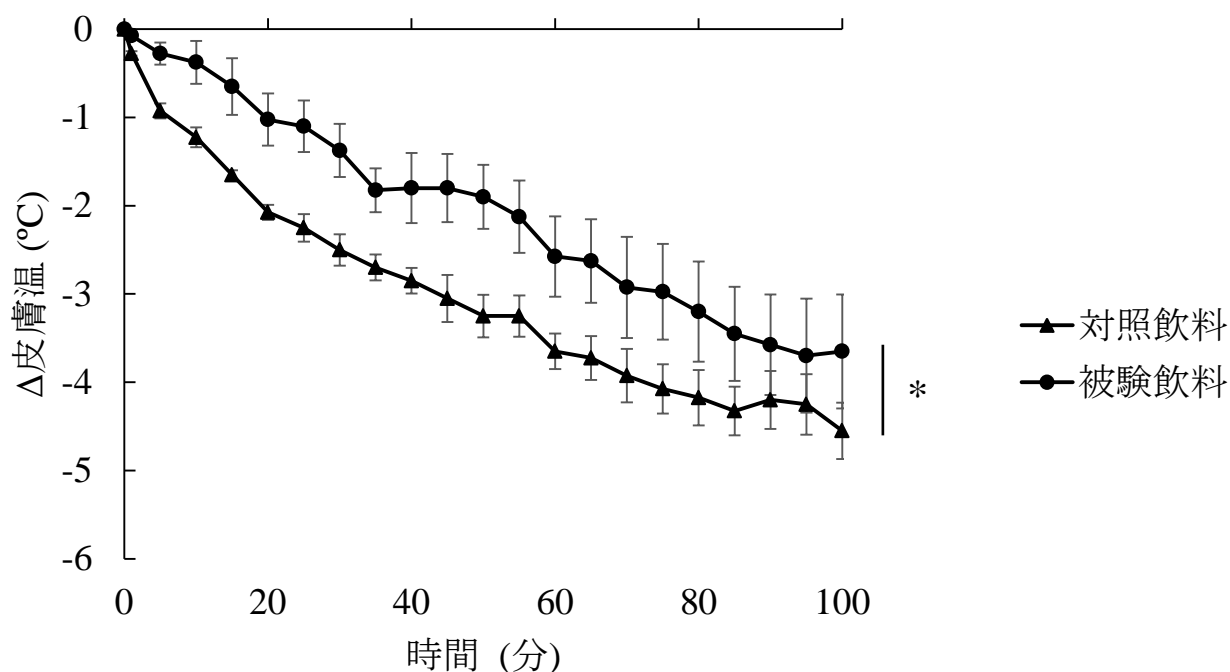


図 38 男性の冷房環境下の皮膚温変化量

測定開始後の皮膚温を 0 とし、麦茶摂取における冷房下での皮膚温変化量を評価した。解析対象者は、男性のみである。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温度変化量が有意に高値を示した (n=4)。結果は、平均値 \pm 標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

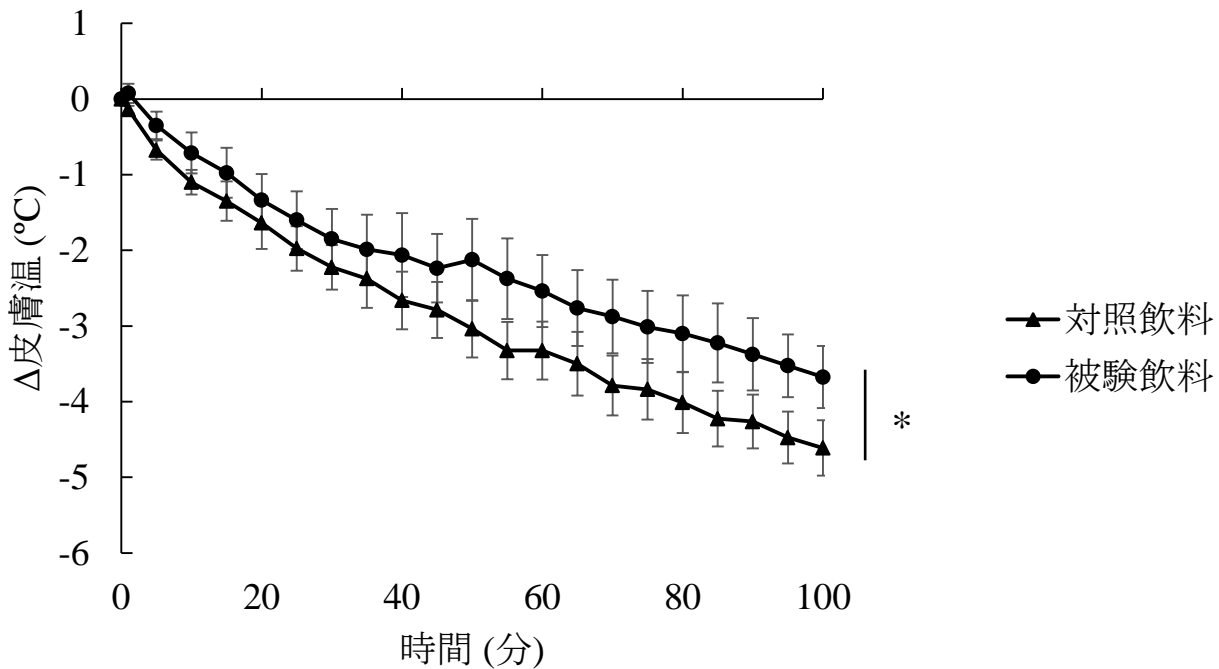


図 39 女性の冷房環境下の皮膚温変化量

測定開始後の皮膚温を 0 とし、麦茶摂取における冷房下の皮膚温変化量を評価した。解析対象者は、女性のみである。麦茶摂取時は、対照飲料摂取時と比較して、皮膚温度変化量が有意に高値を示した (n=8)。結果は、平均値±標準誤差で示す。統計解析は、対応のある二元配置反復測定分散分析 (Two-way factorial ANOVA) で評価した。

4. 考察

第五章で述べた試験と同様に、対象飲料摂取時に皮膚温が低下することを確認した。麦茶摂取時の皮膚温は、対照飲料摂取時の皮膚温と比較して、有意に高値を示していることから、麦茶は冷房環境下における皮膚温の低下を抑制することの再現性を確認できた(図 37)。

また、男女で性差があるか層別解析を実施した結果、男女いずれも麦茶摂取による皮膚温低下抑制効果が確認できた(図 38、39)。このことから、麦茶の皮膚温低下抑制効果は、性差に影響を受けずに発揮され则认为。

冷え性は、中医学や漢方では、自律神経の失調に起因して起こると考えられており、自律神経失調症などの予兆とも考えられている^{38,101)}。このことから、麦茶を摂取することでこれらの自律神経失調症などの予防にも有効であることが推察される。また、日常的な生活において、過剰な冷房環境下におけるストレスによる QOL 低下を改善することが期待される。

5. 結論

「麦茶が冷房環境下のヒト皮膚温の低下を穏やかにする効果」の再現性を確認した。その効果は、性差によって違いがない。

第七章 総合討論

本研究は、麦茶の健康機能性:特に血流量増加効果を明らかにすることを目的として実施した。麦茶の血流量増加効果を動物試験およびヒト試験で検証し、その有効性を確認した。また、麦茶の血流量増加効果を代表する関与成分として cyclo(L-Pro-D-Phe)を選抜し、その血管弛緩作用を明らかにした。

第一章では、麦茶の血流量増加効果を確認するために、ラットへの単回投与試験を行った。その結果、麦茶投与によるラット皮膚血流量の増加を見出した。さらに、麦茶の原料となる「大麦の焙煎度合い」が、その皮膚血流量増加効果に影響を与えることを見出した。麦茶の焙煎度合いが高いほど、ラット皮膚血流量増加効果が強く、焙煎によって生じる成分が麦茶の皮膚血流量増加効果に影響していることを示した。

本実験により、麦茶は血流量増加効果があり、その効果は麦茶原料の焙煎大麦の焙煎度が高くなるにつれて強くなることが明らかになった。

第二章では、麦茶に含まれる香気成分:ピラジン化合物の血流量増加効果を確認するために、ラット腹部大動脈を用いた血管弛緩作用評価、およびラットへの単回投与時の血流量評価を行った。まず、ピラジン化合物 9 種類が麦茶に含まれていることを GC-MS を用いて明らかにした。その 9 種類のピラジン化合物の血管弛緩作用を比較したところ、2-EP が最も強い血管弛緩作用を有していることを明らかにした。さらに、2-EP の血管弛緩作用は、血管内皮依存的な NO 産生が関与していることを明らかにした。また、2-EP 経口投与がラット皮膚血流量を増加させることも示した。しかし、麦茶の原料である焙煎大麦の焙煎度が高くなるにつれて、麦茶中の 2-EP 量が減少することが明らかになった。

本実験により、麦茶の香気成分:2-EP のラット血流量増加が明らかになり、その作用メカニズムは血管内皮依存的 NO 産生であることが明らかになった。しかし、2-EP が麦茶のラット血流量増加効果を代表する成分ではないことが示唆された。

第三章では、麦茶に含まれる呈味成分:ジケトピペラジン化合物の血流量増加効果を確認するために、ラット腹部大動脈を用いた血管弛緩作用評価、およびラットへの単回投与時の血流量評価を行った。ジケトピペラジン化合物 5 種類が麦茶に含まれていることを LC-MS を用いて明らかにした。その 5 種類のジケトピペラジン化合物のラット血流量増加効果を比較したところ、cyclo(L-Pro-D-Phe)が最も強いラット血流量増加効果を有していることを明らかにした。さらに、その作

用メカニズムが血管弛緩作用であり、血管内皮依存的な NO 産生が関与していることを明らかにした。

また、麦茶の原料である焙煎大麦の焙煎度が高くなるにつれて、麦茶中の cyclo (L-Pro-D-Phe) 量は増加した。

本実験により、麦茶の呈味成分:cyclo (L-Pro-D-Phe)のラット血流量増加が明らかになり、その作用メカニズムは血管内皮依存的 NO 産生であることが明らかになった。また、cyclo (L-Pro-D-Phe) が麦茶のラット血流量増加効果を代表する成分の 1 つであることを明らかにした。

第四章では、麦茶の血流量増加効果がヒトでも有効性を発揮するか検証するために、冷え性の自覚症状がある女性の冷水負荷後の皮膚血流量および皮膚温に与える影響評価を行った。試験方法は、プラセボ対照二重盲検平行群間比較法で行った。その結果、麦茶摂取によって、冷え性の自覚症状がある女性の冷水負荷後の皮膚血流量および皮膚温が高くなることを確認した。本実験により、麦茶の血流量増加効果はヒトでも有効であることを明らかにした。

第五章では、麦茶の血流量増加効果が第 4 章で示した冷水負荷以外の環境でも有効であるかを検証するために、麦茶摂取が冷房環境下のヒト皮膚血流およびヒト皮膚温に与える影響を評価した。試験方法は、プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較法で行った。その結果、麦茶摂取によって、冷房環境下の皮膚血流量および皮膚温低下が穏やかになることを確認した。その効果は、冷え性の自覚症状があるヒトに顕著に確認できた。

本実験により、麦茶のヒト血流量増加効果は冷水負荷時のみでなく、冷房環境下でも有効性があることが明らかにした。また、麦茶のヒト血流量増加効果は、冷え性の自覚症状が強い対象者に、顕著な効果を示すことが明らかにした。

第六章では、麦茶が冷房環境下の皮膚温に与える影響の再現性および性差が与える影響を評価するために、ヒト試験を行った。試験方法は、プラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較法で行った。その結果、麦茶摂取によって、冷房環境下の皮膚温低下が穏やかになることが確認できた。この有効性は、性差に関係なく有効性があることを示した。

本実験により、麦茶のヒト皮膚温低下維持効果の再現性が確認した。また、その効果は、性差に関係ないことが明らかにした。

以上の本研究結果から、麦茶はラットおよびヒトにおいて血流量増加効果を有し、ヒトの体温維持

に有効であると言える。また、麦茶の血流量増加効果の主要成分は、cyclo (L-Pro-D-Phe)であり、その作用メカニズムは血管内皮依存的 NO 産生を介した血管弛緩作用であると考ええる。

本研究では、麦茶に含まれるジケトピペラジン:環状ジペプチドの血管弛緩作用を明らかにした。ジケトピペラジンは、焙煎などの食品加工や微生物発酵などで生成されることが報告されている^{73,115)}。特にカカオは食品加工において強く焙煎することからも環状ジペプチド含量が非常に高い⁷⁴⁾。これらのことからカカオにも同様の血管弛緩作用が期待される。実際、カカオ含量が高いチョコレートは、血圧を下げる効果なども報告されている¹¹⁶⁾。従来はカカオに含まれるポリフェノールの有効性であることが示唆されているが、本研究で確認されたジケトピペラジンなどもカカオの血圧低下効果に寄与している可能性も考えられる。

麦茶は、伝統的かつ日常的に飲用されている清涼飲料であり、幅広いヒトに飲まれている。幅広く飲用されている麦茶であるが、その健康機能性に関する報告は非常に少ない。本研究は、初めて麦茶のヒト血流量増加効果および体温低下抑制効果が明らかにし、その関与成分や作用メカニズムを明らかにした。

麦茶は、日本ではかなり古くから飲用されており、多くの家庭で飲用されている。近年、麦茶は、「カフェインを含まない」「手に取りやすい(安価)」「味があきにくい」などの有用性から、清涼飲料市場において、毎年 5%以上の市場拡大をしており、多くのヒトの支持を得ている¹¹⁷⁾。このような日本人に馴染みの深く日常的に飲用している飲み物の健康機能性を明らかにしたことは、産業応用上非常に重要であると考ええる。

麦茶の喫食経験は非常に豊富であり、安全性も非常に高いと考える。麦茶は、日常的に生活の中で飲用されているため、継続性などの観点からも非常に利用しやすい健康習慣になると考える。

近年、「和食」が世界遺産に登録されるなど、日本の伝統的な食に対して、世界中から注目を浴びている。「和食」は文化としても重要であるが、健康的な食事という観点でも着目を浴びている^{118,119)}。このような背景の中、日本の伝統的かつ日常的な飲み物:麦茶の中に健康機能性を見出した点でも、本研究の価値は大きいと考える。

麦茶は日本で一般的な飲み物であるが、海外では飲用実績が少なく、世界的にはあまり知られて

いない。今後、本研究で明らかにした麦茶の健康価値を発信していくことで、日本国内にとどまらず、世界に「日本の伝統的かつ健康的な飲み物としての麦茶」を提案していきたいと考える。

また、麦茶の学術研究は、緑茶などと比較して、研究数が少ない。本研究で、その一端を解明することができたが、今後もさらなる学術研究の広がりが期待される。例えば、cyclo (L-Pro-D-Phe)の作用する受容体の解明や焙煎処理(食品加工)との組み合わせによる高機能性食品の開発等である。

近年、特定保健用食品や機能性表示食品等の食品の健康機能性に着目した製品開発が盛んに行われている^{120,121)}。本研究で得られた成果を活用した健康機能性食品の開発等がなされ、幅広い人々の健康に貢献することを期待する。

引用文献

1. Kumazawa K, Masuda H. (2003) Identification of odor-active 3-mercapto-3-methylbutyl acetate in volatile fraction of roasted coffee brew isolated by steam distillation under reduced pressure. *J Agric Food Chem.* **51**, 3079-82
2. Magi E, Bono L, Di Carro M. (2012) Characterization of cocoa liquors by GC-MS and LC-MS/MS: focus on alkylpyrazines and flavanols. *J Mass Spectrom.* **47**, 1191-7
3. Klevorn CM, Dean LL. (2018) A metabolomics-based approach identifies changes in the small molecular weight compound composition of the peanut as a result of dry-roasting. *Food Chem.* **240**, 1193-200
4. Nieber K. The Impact of Coffee on Health. (2017) *Planta Med.* **83**, 1256-63
5. Petruszewicz J, Yilinkou RG, Pilarski B, Kaliszan R. (1992) Antithrombotic activity of a new pyrazine derivative determined by the mouse antithrombotic assay. *Pharmacol Toxicol.* **70**, 448-52
6. Wakamatsu J, Stark TD, Hofmann T. (2016) Taste-Active Maillard Reaction Products in Roasted Garlic (*Allium sativum*). *J Agric Food Chem.* **64**, 5845-54
7. Borthwick AD, Da Costa NC. (2017) 2,5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **57**, 718-42
8. Craik DJ, Du J. (2017) Cyclotides as drug design scaffolds. *Curr Opin Chem Biol.* **38**, 8-16
9. Gould A, Camarero JA. (2017) Cyclotides: Overview and Biotechnological Applications. *Chembiochem.* **18**, 1350-63
10. Soares S, Kohl S, Thalmann S, Mateus N, Meyerhof W, De Freitas V. (2013) Different phenolic

- compounds activate distinct human bitter taste receptors. *J Agric Food Chem.* **61**, 1525-33.
11. Moore RJ, Jackson KG, Minihaue AM. (2009) Green tea (*Camellia sinensis*) catechins and vascular function. *Br J Nutr.* **102**, 1790-802
 12. Matsui T, Hayashi A, Tamaya K, Matsumoto K, Kawasaki T, Murakami K, Kimoto K. (2003) Depressor effect induced by dipeptide, Val-Tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensin system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **30**, 262-5
 13. Martin M, Kopalani I, Jannasch A, Mund C, Todorov V, Henle T, Deussen A. (2015) Antihypertensive and cardioprotective effects of the dipeptide isoleucine-tryptophan and whey protein hydrolysate. *Acta Physiol (Oxf).* **215**, 167-76
 14. 小澤 滯司、福田 康一郎. (2014) 標準生理学 第八版.
 15. Behringer EJ, Segal SS. (2012) Spreading the signal for vasodilatation: implications for skeletal muscle blood flow control and the effects of ageing. *J Physiol.* **590**, 6277-84
 16. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. (2015) Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf).* **214**, 33-50
 17. Ampey BC, Morschauser TJ, Lampe PD, Magness RR. (2014) Gap junction regulation of vascular tone: implications of modulatory intercellular communication during gestation. *Adv Exp Med Biol.* **814**, 117-32
 18. Ellinsworth DC, Sandow SL, Shukla N, Liu Y, Jeremy JY, Gutterman DD. (2016) Endothelium-Derived Hyperpolarization and Coronary Vasodilation: Diverse and Integrated Roles of Epoxyeicosatrienoic Acids, Hydrogen Peroxide, and Gap Junctions. *Microcirculation.* **23**, 15-32
 19. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. (2007) *Circ Res.* **100**, 607-21
 20. Takashima S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ J.* (2009) **73**, 208-13
 21. Takeya K, Wang X, Sutherland C, Kathol I, Loutzenhiser K, Loutzenhiser RD, Walsh MP. (2014) Involvement of myosin regulatory light chain diphosphorylation in sustained vasoconstriction under pathophysiological conditions. *J Smooth Muscle Res.* **50**, 18-28
 22. Mortensen SP, Saltin B. (2014) Regulation of the skeletal muscle blood flow in humans. *Exp Physiol.* **99**, 1552-8

23. Charkoudian N, Wallin BG. (2014) Sympathetic neural activity to the cardiovascular system: integrator of systemic physiology and interindividual characteristics. *Compr. Physiol.* **4**, 825–50
24. Hellsten Y, Nyberg M, Jensen LG, Mortensen SP. (2012) Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *J Physiol.* **590**, 6297-305
25. Kiowski W. (1991) Endothelial function in humans. Studies of forearm resistance vessels. *Hypertension* **18**, 1184-9.
26. Verberne AJ, Korim WS, Sabetghadam A, Llewellyn-Smith IJ. (2016) Adrenaline: insights into its metabolic roles in hypoglycaemia and diabetes. *Br J Pharmacol.* **173**, 1425-37
27. Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. (2011) A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides* **32**, 2141-50
28. Masaki T, Yanagisawa M, Goto K, Kimura S. (1990) Role of endothelin in mechanisms of local blood pressure control. *J Hypertens Suppl.* **8**, S107-12
29. Kadekaro M, Summy-Long JY. (2000) Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**, 450–9
30. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**, 663-5
31. Mylecharane EJ. (1990) Mechanisms involved in serotonin-induced vasodilatation. *Blood Vessels* **27**, 116-26
32. Nagashima K, Yoda T, Yagishita T, Taniguchi A, Hosono T, Kanosue K. (2002) Thermal regulation and comfort during a mild-cold exposure in young Japanese women complaining of unusual coldness. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1029–35
33. Nakamura S, Ichisato SM, Horiuchi S, Mori T, Momoi M. (2011) Pregnant women's awareness of sensitivity to cold (hiesho) and body temperature observational study: A comparison of Japanese and Brazilian women. *BMC Res. Notes* **4**, 278
34. Matsumoto C, Kojima T, Ogawa K, Kamegai S, Oyama T, Shibagaki Y, Kawasaki T, Fujinaga H, Takahashi K, Hikiami H, Goto H, Kiga C, Koizumi K, Sakurai H, Muramoto H, Shimada Y, Yamamoto M, Terasawa K, Takeda S, Saiki I. (2008) A Proteomic Approach for the Diagnosis of 'Oketsu' (blood stasis), a Pathophysiologic Concept of Japanese Traditional (Kampo) Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med.* **5**, 463-74
35. Kimura T, Asami T. (2016) Discrimination of hie and hiesho using toe blood pressure in young

women. *J. Integr. Med.* **14**, 436–46

36. Alawi KM, Aubdool AA, Liang L, Wilde E, Vepa A, Psefteli MP, Brain SD, Keeble JE. (2015) The sympathetic nervous system is controlled by transient receptor potential vanilloid 1 in the regulation of body temperature. *FASEB J.* **29**, 4285–98
37. Nagashima K, Yoda T, Yagishita T, Taniguchi A, Hosono T, Kanosue K. (2002) Thermal regulation and comfort during a mild-cold exposure in young Japanese women complaining of unusual coldness. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1029–35.
38. Terasawa, K. (1987) On the recognition and treatment of "Hie-Sho" (Chilphobia) in the traditional Kampoh medicine. *Jpn. J. Pharmacogn.* **41**, 85–96
39. Elam M, Wallin BG. (1987) Skin blood flow responses to mental stress in man depend on body temperature. *Acta Physiol. Scand.* **129**, 429–31
40. Van Someren EJ. (2006) Mechanisms and functions of coupling between sleep and temperature rhythms. *Prog Brain Res.* **153**, 309–24
41. Kajimoto, G., Murakami, C. (1999) Antioxidant activity of several commercial teas and their components. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **52**, 209–18
42. Duh PD, Yen GC, Yen WJ, Chang, LW. (2001) Antioxidant effects of water extracts from barley (*Hordeum vulgare* L.) prepared under different roasting temperatures. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1455–63
43. Suganuma H, Inakuma T, Kikuchi Y. (2002) Amelioratory effect of barley tea drinking on blood fluidity. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **48**, 165–8
44. 松岡 翼, 鮎澤 信昌, 小林 敏樹. (2010) 原料大麦の麦茶適性の簡易識別法の検討 日本作物學會紀事 **79**, 357–62
45. 細野 哲, 中村 和弘, 上原 泰, 牛山 智彦. (2008) 麦茶加工適性の高い大麦系統の選抜法について 北陸作物学会報. **43**, 85–7
46. Horii Y, Tanida M, Shen J, Fujisaki Y, Fuyuki R, Hashimoto K, Nijima A, Nakashima T, Nagai K. (2011) Skin application of urea-containing cream affected cutaneous arterial sympathetic nerve activity, blood flow, and water evaporation. *Skin Res. Technol.* **17**, 75–81
47. Joo K, Ho CT. (1997) Quantitative analysis of alkylpyrazines in regular- and low-fat commercial peanut butter preparations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 171–3
48. Guerra PV, Yaylayan VA. (2010) Dimerization of azomethine ylides: an alternate route to pyrazine formation in the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12523–9

49. Borthwick AD, Da Costa NC. (2017) 2,5-diketopiperazines in food and beverages: Taste and bioactivity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 718–42
50. Smith AL, Barringer SA. (2014) Color and volatile analysis of peanuts roasted using oven and microwave technologies. *J Food Sci.* **79**, C1895-906.
51. Wang S, Adhikari K, Hung YC. (2017) Acceptability and Preference Drivers of Freshly Roasted Peanuts. *J Food Sci.* **82**, 174-84
52. Wong KL, Chan P, Huang WC, Yang TL, Liu IM, Lai TY, Tsai CC, Cheng JT. (2003) Effect of tetramethylpyrazine on potassium channels to lower calcium concentration in cultured aortic smooth muscle cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **30**, 793–8
53. Cao W, Zeng Z, Zhu YJ, Luo W, Demura H, Naruse M, Shi Y. (1998) Effects of tetramethylpyrazine, a Chinese medicine, on plasma endothelin-1 levels during acute pulmonary hypoxia in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31**, S456–9
54. Jung MY, Bock JY, Baik SO, Lee JH, Lee TK. (1999) Effects of roasting on pyrazine contents and oxidative stability of red pepper seed oil prior to its extraction. *J Agric Food Chem.* **47**, 1700-4
55. Yanaga A, Goto H, Nakagawa T, Hikiami H, Shibahara N, Shimada Y. (2006) Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 2415–8
56. Sasaki Y, Suzuki M, Matsumoto T, Hosokawa T, Kobayashi T, Kamata K, Nagumo S. (2010) Vasorelaxant activity of Sappan Lignum constituents and extracts on rat aorta and mesenteric artery. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 1555–60
57. Nakamura Y, Matsumoto H, Todoki K. (2002) Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta. *Jpn. J. Pharmacol.* **89**, 29–35
58. Gray GA, Schott C, Julou-Schaeffer G, Fleming I, Parratt JR, Stoclet JC. (1991) The effect of inhibitors of the L-arginine/nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* **103**, 1218–24
59. Dorrance AM. (2007) Interleukin 1-beta (IL-1beta) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive, rats. *Vascul. Pharmacol.* **47**, 160–5
60. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by

- 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.* **48**, 184–8
61. Matsui T, Korematsu S, Byun EB, Nishizuka T, Ohshima S, Kanda T. (2009) Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K⁺ channel activations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2246–51
 62. Lahera V, Navarro-Cid J, Cachofeiro V, García-Estañ J, Ruilope LM. (1997) Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am. J. Hypertens.* **10**, 129–40
 63. Prior BM, Lloyd PG, Ren J, Li Z, Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL. (2003) Arteriogenesis: role of nitric oxide. *Endothelium*, **10**, 207–16
 64. Galea E, Golanov EV, Feinstein DL, Kobylarz KA, Glickstein SB, Reis DJ. (1998) Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia. *Am. J. Physiol.* **274**, H2035–45
 65. Lee MY, Leung SW, Vanhoutte PM, Man RY. (2004) Genistein reduces agonist-induced contractions of porcine coronary arterial smooth muscle in a cyclic AMP-dependent manner. *Eur J Pharmacol.* **503**, 165–72
 66. Abran D, Varma DR, Chemtob S. (1997) Regulation of prostanoid vasomotor effects and receptors in choroidal vessels of newborn pigs. *Am J Physiol.* **272**, R995–1001
 67. Hristovska AM, Rasmussen LE, Hansen PB, Nielsen SS, Nüsing RM, Narumiya S, Vanhoutte P, Skøtt O, Jensen BL. (2007) Prostaglandin E₂ induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* **50**, 525–30
 68. Himori N, Ishimori T. (1998) Different responses to beta-adrenoceptor blocking drugs of the blood pressure and heart rate in the urethane-anesthetized dog and rat. *Jpn. J. Pharmacol.* **47**, 71–80
 69. Clineschmidt BV, McGuffin JC, Pflueger AB. (1977) Central serotonin-like activity of 6-chloro-2-[1-piperazinyl]-pyrazine (CPP; MK-212). *Eur. J. Pharmacol.* **44**, 65–74
 70. Jiménez R, Duarte J, Perez-Vizcaino F. (2012) Epicatechin: endothelial function and blood pressure. *J Agric Food Chem.* **60**, 8823–30
 71. Borthwick AD. (2012) 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chem. Rev.* **112**, 3641–716
 72. Ryan, LA, Dal Bello F, Arendt EK, Koehler P. (2009) Detection and quantitation of 2,5-diketopiperazines in wheat sourdough and bread. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 9563–8

73. Ginz M, Engelhardt UH. (2000) Identification of proline-based diketopiperazines in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3528–32
74. Stark T, Hofmann T. (2005) Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.* **53**, 7222–31
75. Chen MZ, Dewis ML, Kraut K, Merritt D, Reiber L, Trinnaman L, Da Costa NC. (2009) 2,5-diketopiperazines (cyclic dipeptides) in beef: identification, synthesis, and sensory evaluation. *J. Food Sci.* **74**, C100–5
76. Fischer PM. (2003) Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. *J Pept Sci.* **9**, 9-35
77. Kanzaki H, Yanagisawa S, Nitoda T. (2004) Enzymatic synthesis of dehydro cyclo(His-Phe)s, analogs of the potent cell cycle inhibitor, dehydrophenylahistin, and their inhibitory activities toward cell division. *Biosci Biotechnol Biochem.* **68**, 2341-5
78. Prakash KR, Tang Y, Kozikowski AP, Flippen-Anderson JL, Knoblach SM, Faden AI. (2002) Synthesis and biological activity of novel neuroprotective diketopiperazines. *Bioorg Med Chem.* **10**, 3043–8
79. Cornacchia C, Cacciatore I, Baldassarre L, Mollica A, Feliciani F, Pinnen F. (2012) 2,5-diketopiperazines as neuroprotective agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **12**, 2–12
80. Mollica A, Costante R, Fiorito S, Genovese S, Stefanucci A, Mathieu V, Kiss R, Epifano F. (2014) Synthesis and anti-cancer activity of naturally occurring 2,5-diketopiperazines. *Fitoterapia* **98**, 91–7
81. Nishanth KS, Dileep C, Mohandas C, Nambisan B, Ca J. (2014) Cyclo(D-Tyr-D-Phe): a new antibacterial, anticancer, and antioxidant cyclic dipeptide from *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *J. Pept. Sci.* **20**, 173–85
82. Song MK, Rosenthal MJ, Song AM, Uyemura K, Yang H, Ament ME, Yamaguchi DT. (2009) Cornford, E.M. Body weight reduction in rats by oral treatment with zinc plus cyclo-(His-Pro). *Br. J. Pharmacol.* **158**, 442–50
83. Kim K, Kim NJ, Kim SY, Kim IH, Kim KS, Lee GR. (2015) Cyclo(Phe-Pro) produced by the human pathogen *Vibrio vulnificus* inhibits host innate immune responses through the NF- κ B pathway. *Infect. Immun.* **83**, 1150–61
84. Song MK, Bischoff DS, Song AM, Uyemura K, Yamaguchi DT. (2016) Metabolic relationship

- between diabetes and Alzheimer's Disease affected by Cyclo(His-Pro) plus zinc treatment. *BBA Clin.* **7**, 41–54
85. Holopainen UR, Pihlava JM, Serenius M, Hietaniemi V, Wilhelmson A, Poutanen K, Lehtinen P. (2014) Milling, water uptake, and modification properties of different barley (*Hordeum vulgare* L.) lots in relation to grain composition and structure. *J Agric Food Chem.* **62**, 8875-82
 86. Troeira Henriques S, Craik DJ. (2017) Cyclotide Structure and Function: The Role of Membrane Binding and Permeation. *Biochemistry.* **56**, 669-82
 87. Mizuma T, Masubuchi S, Awazu S. (1998) Intestinal absorption of stable cyclic dipeptides by the oligopeptide transporter in rat. *J Pharm Pharmacol.* **50**, 167-72
 88. Mizuma T, Masubuchi S, Awazu S. (1997) Intestinal absorption of stable cyclic glycylphenylalanine: comparison with the linear form. *J Pharm Pharmacol.* **49**, 1067-71
 89. Brandsch M, Knütter I, Thunecke F, Hartrodt B, Born I, Börner V, Hirche F, Fischer G, Neubert K. (1999) Decisive structural determinants for the interaction of proline derivatives with the intestinal H⁺/peptide symporter. *Eur J Biochem.* **266**, 502-8
 90. Tateoka R, Abe H, Miyauchi S, Shuto S, Matsuda A, Kobayashi M, Miyazaki K, Kamo N. (2001) Significance of substrate hydrophobicity for recognition by an oligopeptide transporter (PEPT1). *Bioconj Chem.* **12**, 485-92
 91. Taga Y, Kusubata M, Ogawa-Goto K, Hattori S. (2017) Identification of Collagen-Derived Hydroxyproline (Hyp)-Containing Cyclic Dipeptides with High Oral Bioavailability: Efficient Formation of Cyclo(X-Hyp) from X-Hyp-Gly-Type Tripeptides by Heating. *J Agric Food Chem.* **65**, 9514-21
 92. Roesel RA, Blankenship PR, Mobley EB, Coryell ME. (1986) Increased excretion of histidyl-L-proline diketopiperazine by infants receiving Pregestimil and Nutramigen formulas. *Clin Chem.* **32**, 865-7
 93. De Petrocellis L, Arroyo FJ, Orlando P, Schiano Moriello A, Vitale RM, Amodeo P, Sánchez A, Roncero C, Bianchini G, Martín MA, López-Alvarado P, Menéndez JC. (2016) Tetrahydroisoquinoline-derived urea and 2,5-diketopiperazine derivatives as selective antagonists of the transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel receptor and antiprostata cancer agents. *J. Med. Chem.* **59**, 5661–83
 94. Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P, Zholos AV. (2009) Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am. J.*

Physiol. Heart Circ. Physiol. **296**, H1868–77

95. Nakamura S. (2010) “Sensitivity to Cold”: A Concept Analysis. *Journal of Japan Academy of Nursing Science* **30**, 62-71
96. Tsuchiya M, Suzuki K, Inoue T, Higuchi K. (2005) A study on lifestyle and "Hiesho" among female high school students living in different climate conditions. *Japanese Journal of Health and Human Ecology* **71**, 207-18
97. Yoshino T, Katayama K, Munakata K, Horiba Y, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Watanabe K. (2013) Statistical analysis of hie (cold sensation) and hiesho (cold disorder) in kampo clinic. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2013**, 398458
98. Ogata Y, Kaneko K, to K, Kono K, Yamamoto M. (2017) Physiological Mechanism of Hiesho -Evaluation by Cardiovascular and Autonomic Dynamics-. *Japanese Journal of Nursing Art and Science* **15**, 227-34
99. Takumi H, Fujishima N, Shiraishi K, Mori Y, Ariyama A, Kometani T, Hashimoto S, Nadamoto T. (2010) Effects of alpha-glucosylhesperidin on the peripheral body temperature and autonomic nervous system. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 707-15.
100. 有山 愛, 森 由佳, 稲野 美穂, 灘本 知憲. (2009) ココア摂取がヒト体表温に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌 **56**, 628-38
101. 藤澤 史子, 灘本 知憲, 伏木 亨. (2005) ショウガ摂取がヒト体表温に及ぼす影響. 日本栄養・食料学会誌 **58**, 3-9
102. 世界医師会(World medical association). (2008) ヘルシンキ宣言:人間を対象とする医学研究の倫理的原則
103. 文部科学省、厚生労働省. (2015) 人を対象とする医学系研究に関する倫理指針
104. Drummond PD. (2006) Immersion of the hand in ice water releases adrenergic vasoconstrictor tone in the ipsilateral temple. *Auton Neurosci.* **128**, 70-5
105. Wakabayashi H, Wijayanto T, Kuroki H, Lee JY, Tochihara Y. (2012) The effect of repeated mild cold water immersions on the adaptation of the vasomotor responses. *Int J Biometeorol.* **56**, 631-7
106. Kusumi Y, Emori Y. (2009) Evaluation of hiesho using a cold-water load test in adult females. *Journal of Japan Academy of Midwifery* **23**, 241-50
107. González-Alonso, J. (2012) Human thermoregulation and the cardiovascular system. *Exp. Physiol.* **97**, 340–6

108. Prior, BM, Lloyd PG, Ren J, Li Z, Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL. (2003) Arteriogenesis: role of nitric oxide. *Endothelium* **10**, 207–16
109. Galea E, Golanov EV, Feinstein DL, Kobylarz KA, Glickstein SB, Reis DJ. (1998) Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia. *Am. J. Physiol.* **274**, H2035-45
110. Liu C, Yavar Z, Sun Q. (2015) Cardiovascular response to thermoregulatory challenges. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, H1793–812
111. Sakaguchi S. (2003) The Effect of Acupuncture Treatment on Hie Symptom. *Journal of the Japan Society of Acupuncture and Moxibustion.* **53**, 49-54
112. Masuda H. (2014) Effects of Winter Savory (*Satureja montana* L.) on Body Temperature in Humans Who Experience Cold Sensitivity. *Journal of Japan Association on Odor Environment.* **45**, 119-31
113. 岡田睦美, 宇野充子, 永野英子, 野村義治, 大平哲也, 佐藤眞一, 嶋本喬. (2005) 冷え症における冷水負荷サーモグラフィと循環器検診成績, 生活習慣との関連. *Biomedical Thermology*, **24**, 44-50
114. Yan S, Zhang R, Zhou X, Li P, He L, Liu B. (2013) Exploring effective core drug patterns in primary insomnia treatment with Chinese herbal medicine: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* **14**, 61
115. Kumar SN, Sreekala SR, Chandrasekaran D, Nambisan B, Anto RJ. (2014) Biocontrol of *Aspergillus* species on peanut kernels by antifungal diketopiperazine producing *Bacillus cereus* associated with entomopathogenic nematode. *PLoS One* **9**, e106041
116. Ferri C, Desideri G, Ferri L, Proietti I, Di Agostino S, Martella L, Mai F, Di Giosia P, Grassi D. (2015) Cocoa, blood pressure, and cardiovascular health. *J Agric Food Chem.* **63**, 9901-9
117. TPC マーケティングリサーチ株式会社. (2018) 2018 年 飲料総市場マーケティングデータ飲料新製品・商品戦略分析調査
118. Nagai N, Sakane N, Moritani T. (2008) Preventive Effects of a Low-fat and Low-calorie Japanese Food-based Diet in Young Women with Excessive Body Fat [in Japanese] *Journal of the Japan Diabetes Society* **51**, 889-98
119. 舘 博. (2016) 和食と糖尿病予防. 日本健康医学会雑誌 **24**, 275
120. 消費者庁. 特定保健用食品の表示許可等について(平成 26 年 10 月 30 日付け消食表第 259 号).

121.消費者庁. 機能性表示食品の届け出等に関するガイドライン(平成 30 年 3 月 28 日付け消食表第 156 号:

http://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/foods_with_function_claims/pdf/food_with_function_claims_180328_0001.pdf).

要旨

氏名 足海 洋史

指導教員 佐藤 隆一郎

論文題目

焙煎大麦抽出物(麦茶)の健康機能性に関する研究

序論

第一章 焙煎大麦抽出物:麦茶のラット血流量に与える影響

第二章 麦茶に含まれる香気成分:ピラジン化合物のラット血流量に与える影響

第三章 麦茶に含まれるジケトピペラジン化合物のラット血流量に与える影響

第四章 麦茶摂取が冷水負荷時におけるヒト皮膚血流およびヒト皮膚温へ与える影響

第五章 麦茶摂取が冷房環境下におけるヒト皮膚血流およびヒト皮膚温低下へ与える影響

第六章 麦茶摂取が冷房環境下において健常男女の皮膚血流および皮膚温低下へ与える影響

第七章 総合討論

発表論文

1. Ashigai H, Ikeshima E, Koizumi K, Nakashima K, Mizutani M, Yajima H. (2017)
2-Ethylpyrazine Induces Vasodilatation by Releasing Nitric Oxide in the Endothelium. *Biol Pharm Bull.* **40**: 2153-7
2. Ashigai H, Taniguchi Y, Matsukura Y, Ikeshima E, Nakashima K, Mizutani M, Yajima H. (2018)
Roasted Barley Extract Affects Blood Flow in the Rat Tail and Increases Cutaneous Blood Flow and Skin Temperature in Humans. *J Agric Food Chem.* **66**, 1251-7
3. Ashigai H, Mizutani M, Taniguchi Y, Matsukura Y, Nakashima K, Ikeshima E, Yajima H. (2018)
Roasted Barley Extract (Mugi-cha) Containing Cyclo(D-Phe-L-Pro) Prevents Lowering of the Cutaneous Blood Flow and Skin Temperature under Air Conditioning: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. *J Agric Food Chem.* **66**, 5901-6
4. Ashigai H, Mizutani M, Taniguchi Y, Matsukura Y, Nakashima K, Ikeshima E, Yajima H. (2019)
Roasted barley extract (mugicha) containing cyclo(D-Phe-L-Pro) prevents a decrease in skin temperature in cold conditions: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. In press.