

## ピオーネ皮部を使ったジュースの健康への影響

益岡 典芳・汪 達紘\*・小柏 道子\*\*・宮下 晃一\*\*\*

中家 照雅\*\*\*\*・石原 浩二・浜田 博喜

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

\*岡山大学大学院医歯薬学総合研究科公衆衛生学分野

\*\*岡山学院大学人間生活学部食物栄養学科

\*\*\*宮下酒造株式会社

\*\*\*\*財団法人淳風会健康管理センター

(2007年10月1日受付、2007年11月2日受理)

### 要旨

ワイン製造に使われた葡萄ピオーネ皮部をエチルアルコール-水で抽出、濃縮してジュースを作製した。このジュースはアミノ酸および抗酸化物質を豊富に含むことがわかった。そこで、本ジュースを利用した機能性食品の開発を目的として、ヒトへの影響を調べるため、飲用試験を行った。その結果、健康への好影響が示唆される美味しいジュースであることがわかった。

### 1. 緒言

ピオーネ (pione, *Vitis labrusca Bailey*) は日本で交配され、改良された葡萄である。日本国内では年間 20,600 トン、そのうち岡山県では 8,010 トンが生産されている<sup>1)</sup>。一般にピオーネの皮部は、実と一緒に食べられている。しかしながら、ワイン製造や加工食品では、ピオーネの皮部は通常廃棄されている。著者らは、大量に廃棄されるピオーネ皮部に注目し、皮部を有効利用する目的で研究を始めた。Fuhrman らは、葡萄の皮部には抗酸化活性を持つポリフェノールが豊富に含まれること<sup>2)</sup>を報告している。また、我々もピオーネ皮部にエタノールを加え濃縮抽出液を作製して、その液がアミノ酸を豊富に含み、高いラジカル消去活性を持つことを明らかにしてきた<sup>3)</sup>。本研究では、この抽出液よりジュースを作製し、ヒト飲用試験を行って健康への効果を調べたので報告する。

### 2. 方法

#### 2-1. ピオーネ皮部から抽出液の作製とヒト試験用ジュースの調製

ピオーネ皮部を 50% エタノールに漬け 72 時間静置し抽出した。アルコール含有抽出液を減圧濃縮し、アルコールをほぼ完全に除いた濃縮ピオーネ皮抽出液 (以降、皮抽出液と略す) を作製した。皮抽出液は低温殺菌 (65°C, 30 分) して、ジュース作製まで冷蔵保存した。ヒト試験に必要なピオーネ皮ジュースとコントロールジュースは皮抽出液と市販グレープ濃縮果汁 55HP (坂本香料, 東京) を使って、それぞれ作製した。比較的長期にわたるヒト飲用試験を行うため、ピオーネ皮ジュースは皮抽出液に水、濃縮果汁、糖類を加えて味を調節した。コントロールジュースは濃縮果汁、糖類、クエン酸を加えてピオーネ皮ジュースとほぼ同じ pH と味に調製した。

#### 2-2. 試験用ジュースの分析

アミノ酸は L-8500 型アミノ酸分析計 (日立, 東京) で分析した。アントシアニン濃度は 538 nm での HPLC 分析で, keracyanin chloride (cyanidin-3-O-rutinoside chloride, Extrasynthese S.A.,

France) を標準物質として求めた。ポリフェノール濃度は Folin-Ciocalteu 試薬を使って、没食子酸濃度として求めた<sup>4)</sup>。1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 活性は Blois の方法で測定し、DPPH ラジカルがスカベンジングされる DPPH 濃度として表示した<sup>5, 6)</sup>。

### 2-3. ヒトでの飲用試験

ピオーネ皮抽出液のヒトの健康への影響を調べる目的で、岡山大学疫学研究倫理委員会の承認 [「ピオーネ皮抽出液のヒト試験」申請代表者：益岡典芳(岡山大学大学院医歯学総合研究科)承認 2004 年 8 月 24 日] を受けて飲用試験を行った。このヒトによる飲用試験は、8 週間 (2004 年 10 月から 12 月まで)、大学生ボランティア 57 名 (18-26 歳, 男性 26 名, 女性 31 名) で行った。

同意を得た学生を無作為 2 群割付により、ピオーネ皮ジュース飲用群 (皮飲用群と略す) とコントロールジュース飲用群 (コントロール群と略す) に分け、皮飲用群はピオーネ皮ジュースを、コントロール群はコントロールジュースを 1 日 180ml 任意の時間に 56 日間飲用した。被験者・調査員に被験者の群分けについて告知しない二重盲検試験で行った。ジュース飲用前と飲用後において、体重、身長、体脂肪率、加速度脈波、血圧の測定を行った。加速度脈波は加速度脈波計 SDP-100 (フクダ電子、東京) で測定した。また、血液、尿を採取して、血液中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性、過酸化脂質、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸、尿酸、血液流動性と尿中の 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH dG と略す)、クレアチニン を測定した。また、被験者の食生活の影響因子を調べる目的で食事調査 (3 日間を 2 回) を行い、各ジュース飲用の感想についてはアンケート調査 (1 回) を行った。

## 3. 結果

### 3-1. ピオーネ皮部から抽出液と試験用ジュースの調製

ワイン製造に使われたピオーネ皮部 (サッポロワイナリー、岡山県赤磐郡、冷凍保存) 湿重量 220 kg を 50 % エタノール 400 L に漬け 72 時間静置し抽出した。アルコール含有抽出液を減圧濃縮した。皮抽出液のアルコール含量は 0.65 % で、152 L 得られた。

最終的に作製した試験用ジュースの組成を表 1 に示した。作製したピオーネ皮とコントロールジュースでは、色の濃さに違いがあるので有色瓶 (青色) につめることで、差を目立たなくした。ピオーネ皮とコントロールジュースのアミノ酸分析を表 2 に示す。コントロールジュースと比べて皮ジュースはアミノ酸が豊富で、特にアルギニン、アラニン、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) が高濃度であった。抗酸化活性と pH を表 3 に示した。皮ジュースは高い抗酸化活性を持っていた。

表 1 飲用試験用のジュースの組成

	コントロールジュース (%)	ピオーネ皮ジュース (%)
ピオーネ皮抽出液	-	20.0
グレープ濃縮果汁	2.0	2.0
フルクトース	2.0	2.0
スクロース	0.5	0.5
アスコルビン酸	0.05	0.05
クエン酸	0.1	-
水	95.35	75.45

### 3-2. ヒトでの飲用試験

ヒト試験は最終的に皮飲用群 29 名コントロール群 27 名のデータが得られた。(試験データ回収率 98%) 各群の体脂肪率、血圧、加速度脈波測定、血液中の AST、過酸化脂質、総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸、尿酸、血液流動性測定、尿中の 8-OHdG / クレアチニンの測定結果を表 4 に示した。

アンケート調査では、飲酒、喫煙、運動、サプリメント・果汁・緑茶、緑黄野菜、果物の摂取については、皮飲用群とコントロール群の差はなかった (データ不掲載)。また、皮飲用群とコントロール群の 1 日の栄養素等摂取量を比較すると、皮飲用群のビタミン B<sub>1</sub>, C および多価不飽和脂肪酸

の摂取量が有意に少ないことが明らかになった(表5)。ビタミン B<sub>1</sub> および多価不飽和脂肪酸の摂取量の差は小さく、皮飲用群のビタミン C 平均摂取量は推奨量(100 mg/日)に達していることから、コントロール群を皮飲用群の対照として使用した。試験用ジュースの味についてのアンケート調査の結果を図1に示した。ピオーネ皮ジュースが美味しい、まあまあ美味しいと答えた被験者は6割強であった。

表2 ジュースのアミノ酸含有量(μmoles/L)

アミノ酸	コントロールジュース	ピオーネ皮ジュース
Asp	25.4 ± 0.2*	84.6 ± 1.2*
Thr	42.8 ± 0.3	246.4 ± 0.8
Ser	39.2 ± 0.8	210.8 ± 2.3
Asn	23.2 ± 1.2	55.1 ± 1.6
Glu	49.4 ± 1.1	216.0 ± 3.5
Gln	47.1 ± 0.1	336.7 ± 0.7
Pro	29.2 ± 0.3	263.5 ± 1.0
Gly	12.6 ± 0.2	48.4 ± 0.7
Ala	641.4 ± 0.7	1743.1 ± 6.6
Val	18.5 ± 1.0	157.4 ± 3.4
Met	7.4 ± 0.1	16.5 ± 0.3
Ile	10.5 ± 0.0	64.8 ± 1.7
Leu	15.0 ± 0.0	131.9 ± 3.1
Tyr	4.5 ± 0.1	46.6 ± 0.5
Phe	13.1 ± 0.2	118.6 ± 1.0
GABA	54.3 ± 0.3	395.0 ± 2.9
Lys	3.7 ± 0.0	35.4 ± 1.1
His	15.7 ± 0.3	119.0 ± 0.6
Arg	253.7 ± 0.7	2387.6 ± 5.0

GABA: γ-アミノ酪酸

\*平均値 ± 標準偏差 (3回測定)

表3 ジュースの抗酸化活性と pH

	コントロールジュース	ピオーネ皮ジュース
アントシアニン (μmoles/L)*	31.6 ± 0.2	76.1 ± 2.9
ポリフェノール (mmoles/L)**	0.61 ± 0.05	2.21 ± 0.10
スカベンジング活性 (mmoles/L)***	3.29 ± 0.30	10.7 ± 0.5
pH	3.74	3.62

\*アントシアニン濃度 (keracyaninとして)。

\*\*ポリフェノール濃度 (没食子酸として)。

\*\*\* DPPH ラジカルがスカベンジングされる濃度。

#### 4. 考察

ピオーネ皮抽出液は、GABAの含有量が多く抗酸化活性が高いため、その抽出液の飲用はヒトの健康へ及ぼす影響が期待される。ヒトで飲用試験を行うため、ワイン製造で生じるピオーネ皮にアルコールを加え抽出液を作り、濃縮した皮抽出液を作製した。皮抽出液は味覚的に高濃度過ぎるので、長期間の飲用に適するように皮抽出液を希釈してピオーネ皮ジュースを調製した(表1)。ピオーネ皮ジュースはコントロールジュースと比較して、アラニン、GABA、アルギニンなどのアミノ酸類を豊富に含んでいた(表2)。抗酸化活性成分のアントシアニンは約2.4倍、ポリフェノールは約3.6倍多く含んでいた(表3)。DPPHラジカル消去活性も約3.3倍高い抗酸化活性を示した。また、ここでアントシアニン濃度とポリフェノール量を比較すると、皮ジュースにはアントシアニン以外のポリフェノール抗酸化成分(カテキン、フラボン、タンニンなど)を含むことが示唆された。

表4 飲用試験前後の検査値<sup>a</sup>

検査項目名	コントロール群		皮飲用群	
	試験開始前 (n=27)	試験終了時 (n=27)	試験開始前 (n=29)	試験終了時 (n=29)
体脂肪率(%)	21.4 ± 7.3	22.6 ± 7.6*	22.9 ± 5.8	24.3 ± 5.9*
最大血圧(mmHg)	122 ± 14	121 ± 17	119 ± 14	117 ± 12
最小血圧(mmHg)	69 ± 9	68 ± 9	67 ± 9	65 ± 8
加速度脈波計値(age)	28 ± 7	26 ± 7	31 ± 8	27 ± 5*
AST(IU/L)	16 ± 3	18 ± 5	15 ± 3	18 ± 5*
過酸化脂質(nmol/L)	0.96 ± 0.34	0.83 ± 0.27	1.08 ± 0.37	0.90 ± 0.41
総コレステロール(mg/dL)	173 ± 37	183 ± 35*	170 ± 28	186 ± 32*
HDL-コレステロール(mg/dL)	54 ± 13	60 ± 17*	54 ± 14	62 ± 16*
中性脂肪(mg/dL)	82 ± 42	92 ± 59	100 ± 48	95 ± 48
遊離脂肪酸(mEq/L)	0.37 ± 0.19	0.50 ± 0.37	0.32 ± 0.16	0.43 ± 0.29
尿酸(mg/dL)	5.1 ± 1.0	4.7 ± 1.0*	5.0 ± 1.4	4.7 ± 1.3
血液流動性(sec)	44 ± 3	47 ± 7*	46 ± 7	47 ± 9
尿8-OHdG(ng/mg of Cr)	6.1 ± 3.7	5.2 ± 5.4	6.0 ± 4.4	5.4 ± 5.6

<sup>a</sup> 平均値 ± 標準偏差 (3回測定), \* $p < 0.05$  (コントロール群試験前後の比較, Mann-Whitney  $U$ -test)

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  (ピオーネ皮群試験前後の比較, Mann-Whitney  $U$ -test), AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, 血液流動性: 血液流動性測定装置による血液通過時間, Cr: クレアチニン。

表5 飲用試験時の栄養素等摂取量

	コントロール群 (n=27)	皮飲用群 (n=29)
エネルギー (kcal)	1783 ± 359	1605 ± 415
たんぱく質 (g)	56.3 ± 13.9	49.5 ± 15.2
脂質 (g)	59.6 ± 16.4	50.2 ± 13.7*
炭水化物 (g)	249.0 ± 45.6	232.2 ± 65.3
ナトリウム (mg)	3341 ± 879	3015 ± 754
カリウム (mg)	1612 ± 501	1402 ± 454
カルシウム (mg)	375 ± 139	320 ± 103
マグネシウム (mg)	150 ± 44	130 ± 45
リン (mg)	763 ± 209	660 ± 194
鉄 (mg)	5.6 ± 1.6	4.9 ± 1.7
亜鉛 (mg)	6.1 ± 2.0	5.4 ± 2.2
銅 (mg)	0.83 ± 0.23	0.73 ± 0.26
マンガン (mg)	1.91 ± 0.45	1.74 ± 0.71
レチノール (μg)	174 ± 194	109 ± 45
カロテン (μg)	1594 ± 1041	1631 ± 1022
レチノール当量 (μg)	492 ± 314	429 ± 240
ビタミン D (μg)	3.4 ± 2.6	3.0 ± 2.8
ビタミン E (μg)	6.6 ± 2.5	5.4 ± 1.9
ビタミン K (μg)	148 ± 92	110 ± 78
ビタミン B <sub>1</sub> (mg)	0.83 ± 0.24	0.70 ± 0.20*
ビタミン B <sub>2</sub> (mg)	0.95 ± 0.28	0.87 ± 0.26
ナイアシン (mg)	11.1 ± 3.6	9.6 ± 4.2
ビタミン B <sub>6</sub> (mg)	0.74 ± 0.25	0.65 ± 0.27
ビタミン B <sub>12</sub> (μg)	3.2 ± 2.2	2.5 ± 2.1
葉酸 (μg)	179 ± 72	144 ± 56
パントテン酸 (mg)	4.08 ± 1.25	3.57 ± 1.17
ビタミン C (mg)	194 ± 73	154 ± 45**
飽和脂肪酸 (g)	12.40 ± 5.05	11.05 ± 3.32
1価不飽和脂肪酸 (g)	17.68 ± 6.39	14.67 ± 4.64
多価不飽和脂肪酸 (g)	11.58 ± 3.96	9.28 ± 3.67*
コレステロール (mg)	230 ± 116	207 ± 108
食物繊維 総量 (g)	8.4 ± 2.8	7.3 ± 2.5
食塩相当量 (g)	8.5 ± 2.2	7.7 ± 1.9

栄養素等摂取量は、3日間の食事調査を2回行ったものの平均値である。

数値は平均 ± 標準偏差 (3回測定)を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Mann-Whitney  $U$ -test)。

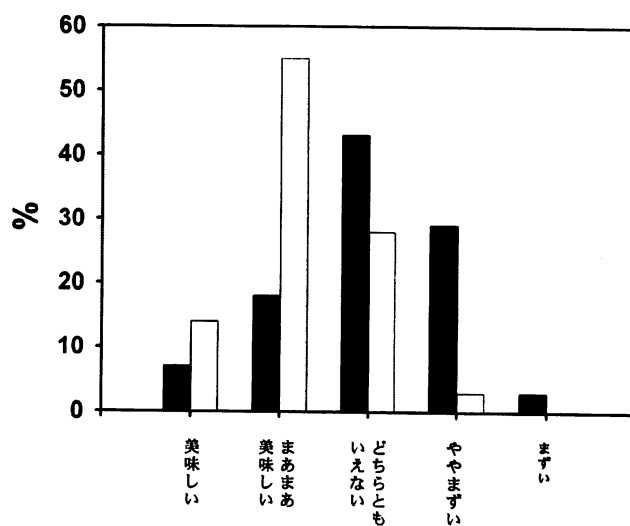
このピオーネ皮ジュースの飲用は、GABA 含量が多いことから、血圧の下降に役立つと思われる<sup>7)</sup>。また、ヒトの体内で起こる種々の酸化ストレスにより生じる過酸化脂質の量は食事に含まれる抗酸化化合物により調整されている<sup>8, 9)</sup>。体内に過酸化脂質が蓄積すると、老化およびがんの原因になりやすいことが報告されている<sup>10-12)</sup>。高い抗酸化活性をもつピオーネ皮ジュースの飲用は、過酸化脂質の蓄積を予防することが期待される。

作製したジュース 8 週間の飲用試験の結果を表 4 に示す。飲用試験期間中に異常な症状を訴えた被験者や、試験後の血液検査で血清 AST 活性の異常な上昇がみられた被験者はいなかった。皮飲用群の加速度脈波、血中過酸化脂質、中性脂肪、HDL-コレステロール、血圧、尿中の 8-OHdG などの分析値は、飲用前後と比較して、改善傾向がみられた。皮ジュース中の GABA から期待された血圧の下降は、被験者の血圧が正常なためか僅かであった<sup>13)</sup>。皮ジュース中の抗酸化活性によると思われる血中過酸化脂質濃度の低下<sup>8, 9)</sup>、DNA 損傷の軽減による尿中の 8-OHdG 減少<sup>14)</sup>が見られた。加速度脈波計から得られる加速度脈波、血管推定年齢について改善が見られた。加速度脈波は年齢以外に老化、血圧などによって影響される<sup>15)</sup>。従って、値の改善は皮ジュースの抗酸化活性による酸化リポタンパク質の減少とそれによる動脈硬化遅延効果に、GABA による血圧の下降作用が加わったものと説明できる。しかし、加速度脈波値以外は、コントロール群と比較して、有意の差が認められなかったことから、健康への効果については更に検討が必要であろう。また、体脂肪率、BMI (データ不掲載)、総コレステロール値などは皮飲用群とコントロール群の両方に増加がみられた。これらの増加は季節的な影響 (10 月から 12 月に試験実施) によるものと思われる。

試験ジュースの味に対するアンケート調査ではピオーネ皮ジュースは、コントロールジュースに比べて好評であり、若者の味覚嗜好に合っていることがわかった (図 1)。これらのことは飽食の時代と言われている現代にあっても、ピオーネ皮部の資源としての有効利用の可能性が示せたと考えている。

現在は、ピオーネ皮の有効成分と機能性の解明、および、新しい食品、食材開発への基礎的研究を行っている。

図 1 飲用したジュースの評価



黒：コントロール群 (n=27)、灰：皮飲用群 (n=29)

謝辞

本研究は文部科学省学術高度化推進事業 岡山理科大学「社会連携研究推進事業 地域社会とのコラボレーションによるQOL向上の一体的アプローチ」の研究の一環として行なわれた。また、「バイオアクティブおかやま」(現「おかやまバイオアクティブ研究会」)の御協力に感謝いたします。

## 文献

- 1) 岡山県農政企画課編 おかやまの農林水産業が分かるデータ 2005.  
(<http://www.pref.okayama.jp/norin/nosei/statistics/index.html>)
- 2) Fuhrman, B., Volkova, N., Suraski, A. and Aviram, M. 2001, White wine with red wine-like properties: increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of derived white wine. *J. Agr. Food Chem.*, 49, 3164 - 3168.
- 3) 浜田博喜, 益岡典芳, ピオーネ皮成分の機能性物質の分離と生理機能の解析: 新素材の開発 第6回「バイオアクティブおかやま」セミナー抄録 2004, pp. 5 - 6.
- 4) Nasr, C.B., Ayed, N. and Metche, M., 1996, Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Z Lebensm Unters Forsch*, 203, 374 - 378.
- 5) Blois, M. S., 1958, Antioxidant determinations by using of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- 6) Kubo, I., Masuoka, N., Ha, T. H. and Tsujimoto, K., 2006, Antioxidant activities of anacardic acids. *Food Chem.*, 99(3), 555-562.
- 7) Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saitoh, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M., and Kawasaki T., 2007, Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing  $\gamma$ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 165 - 173.
- 8) Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarinen, R., Rissanen, H., Helovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., and Aromaa, A., 2002, Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 560 - 568.
- 9) Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., and Noguchi, N., 2005, Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 668 - 676.
- 10) Yagi, K., Lipid peroxides and human disease. 1987, *Chem. Phys. Lipid* 45, 337 - 341.
- 11) Sugawara, H., Tobise, K., Minami, H., Uekita, K., Yoshie, H., and Onodera, S., 1992, Diabetes mellitus and reperfusion injury increase the level of active oxygen-induced lipid peroxidation in rat cardiac membranes. *J. Clin. Exp. Med.* 163, 237 - 238.
- 12) Kok, F. J., Popple, G., Melse, J., Verheul, E., Schouten, E. G., Kruyssen, D. H. C. M., and Hofman, A., 1991, Do antioxidants and polyunsaturated fatty acids have a combined association with coronary arteriosclerosis? *Arteriosclerosis* 86, 85 - 90.
- 13) Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., and Sansawa, H., 2003, Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 57, 490 - 495.
- 14) Okazaki Y, Iqbal M, and Okada S., 2005, Suppressive effects of dietary curcumin on the increased activity of renal ornithine decarboxylase in mice treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Biochim Biophys Acta.*, 1740(3), 357 - 366.
- 15) Takada, H, Washino, K., Harrell, J.S., and Iwata, H., 1996-1997, Acceleration plethysmography to evaluate aging effect in cardiovascular system. Using new criteria of four wave patterns. *Med. Prog. Technol.*, 21, 205 - 210.

## The effect of juice made from Pione grape-skin extract

Noriyoshi MASUOKA, Da-Hong WANG\*, Michiko KOGASHIWA\*\*,  
Koichi MIYASHITA\*\*\*, Terumasa NAKAIE\*\*\*\*, Kohji ISHIHARA,  
and Hiroki HAMADA

*Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science,  
1-1 Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan*

*\*Department of Public Health, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and  
Pharmaceutical Science, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700-8558, Japan*

*\*\*Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Services, Okayama Gakuin University,  
787 Aruki, Kurashiki 710-8511, Japan*

*\*\*\*Miyashita Sake Brewery Co., Ltd., 184 Nishigawara, Okayama 703-8258, Japan*

*\*\*\*\*Junpukai Foundation Health Maintenance Center, 2-3-1 Daiku, Okayama 700-0913, Japan*

(Received October 1, 2007; accepted November 2, 2007)

For utilization of grape-skin, a little used byproduct of winemaking, we prepared a grape-skin extract from Pione grape-skin with aqueous ethanol and made a concentrated juice. We indicated that the juice contains plenty of amino acids and antioxidants. We also found that it is safe and beneficial for humans to consume. Most of the subjects reported that the juice made from Pione grape-skin extract is tasty.

**Keywords:** Pione grape-skin; grape-skin juice; biomass; antioxidant activity.