

エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の抗不安効果

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	鷲家, 勇紀 西川, 友章 藤野, 槌美
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	63巻9号
掲載ページ	p. 394-404
発行年月	2016年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



報 文

エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の抗不安効果

鷺家勇紀, 西川友章, 藤野槌美*

名古屋製酪株式会社 中央研究所 バイオ開発室

Anxiolytic Effect of Non-degassed Roasted Coffee Bean Extracts in Mouse

Yuki Washiya, Tomoaki Nishikawa and Tsuchiyoshi Fujino*

Biodevelopment Division, Central Institute Nagoya Seiraku Co. Ltd.,
310 Nakasuna-cho, Tempaku-ku, Nagoya-Aichi, 468-0065

The functional difference of non-degassed and degassed coffee bean extracts was clarified by examining the anxiolytic effect of the two coffee bean extracts in mouse. We previously reported that degassing greatly decreased the concentration of volatile compounds in coffee extracts and influenced the functional effect of coffee. Anxiolytic-like behavior in mice was found to be significantly reduced ($p < 0.05$) by the administration of non-degassed roasted coffee bean extracts, whereas there was no effect following the administration of degassed roasted coffee bean extracts. Moreover, the concentrations of two sulfur compounds, one pyrrole compound, and four pyrazine compounds were decreased by degassing, and the anxiolytic-like behavior of mice was significantly reduced ($p < 0.05$). To elucidate the underlying mechanism, we examined the influence of a neurotransmitter receptor antagonist on the anxiolytic effect. Our findings show that GABA_A receptor and Dopamin D₁ receptor are involved in the anxiolytic effect of non-degassed coffee. (Received Mar. 31, 2016; Accepted Jun. 10, 2016)

Keywords : coffee, degassing, elevated plus-maze test, anxiolytic effect, flavor

キーワード : コーヒー, エージング処理, 高架式十字迷路試験, 抗不安効果, 香気成分

コーヒーノキ (*Coffea Arabica L.*) はエチオピア原産のアカネ科の常緑樹でその種子から調製されるコーヒーは嗜好飲料として世界中で親しまれている。その飲用の歴史は西暦 900 年頃に遡り, 当時は胃薬, 眠気覚まし, 滋養強壮などの薬として, コーヒーの種子を煎じて飲用されていた。その後, 1300 年頃より焙煎して飲用されるようになり, 1400 年代中頃には庶民にも広く親しまれるようになってきた。コーヒーの美味しさを決定する要因として, 焙煎過程でコーヒーの種子に含まれる糖類, タンパク質などから熱分解によって生成される, 多種多様な香気成分の存在が挙げられ, 近年の分析技術の進歩によって, 900 成分以上もの香気成分が同定されている¹⁾。近年, 香気成分の生理活性も明らかになっており, 例えばリラックス効果²⁾³⁾ など, 自律神経系への効果をもたらすことが報告されている。また筆者らも, コーヒー中に含まれる香気成分の一種である「ピラジン類」を主要な有効成分とする, 腸管 IgA の産生促進作用⁴⁾, 血中の IgG と IgA の産生促進作用⁵⁾, また, 「硫黄化合物類」などを主要な有効成分とする, 血中の IFN- γ , IL-2, IL-12 などのサイトカイン増加効果⁶⁾ を報告している。

煎りたてのコーヒー焙煎豆は, 焙煎過程において生成した大量の炭酸ガスを蓄えている。これをそのまま包装容器に封入すると, 放出された炭酸ガスが包装容器中に充満し, 膨張, 破裂させることがある。そこで市場に流通する量産された包装済みのコーヒー焙煎豆は, エージングと呼ばれる炭酸ガスのガス抜き処理が施されている。一方, 近年エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆を流通可能にする技術が開発されている。これは焙煎したコーヒー豆を直ちに急速冷凍後, 冷凍または冷蔵保存によって炭酸ガスの放出を抑制する技術である⁷⁾⁸⁾。

コーヒー焙煎豆に対するエージング処理の影響について筆者らが検証した結果, エージング処理は, コーヒー抽出液中の多くの香気成分を減少させると共に, 腸管 IgA, 血中の IgG や IgA の産生促進効果, および血中の IFN- γ , IL-2, IL-12 の増加効果を消失させていることが示唆された^{4)~6)}。このように焙煎後のエージング処理は, コーヒー抽出液の機能性に影響することが徐々に明らかになりつつある。そこで本研究では, 香気成分による精神ストレス緩和効果に注目し, エージング処理がコーヒー抽出液の機能性に及ぼす影響について行動薬理学的手法を用いて検証した。

実験方法

1. コーヒー焙煎豆抽出液の調製

エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液、およびエージング処理したコーヒー焙煎豆抽出液は、以下の手順で調製した。

コーヒー焙煎豆は、コーヒー生豆(ブラジルサントス No. 2)を家庭用焙煎機 i-ROAST (Hearthware Home Products, Inc 製)によって、色差計 ND1001DP (日本電色工業社製)による色調の L 値が 22 になるまで焙煎した。エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆は、焙煎終了後、ただちにテスト用プラスチックフリーザーによって急速冷凍 (-17°C 以下)を行い、コーヒー焙煎豆の余熱を除去した。急速冷凍後、500 ml 容のアルミパウチに焙煎豆を 30 g ずつ充填、密閉し、 -30°C にて保存した。

コーヒー焙煎豆のエージング処理は、焙煎後、豆の温度が常温程度になるように風冷してから行った。エージング処理の温度条件は 28°C として、96 時間保持することで炭酸ガスを放出させた後、 -30°C にて保存した。なお処理時間は、コーヒー焙煎豆を常温以上に保持した時、その炭酸ガス放出量が収束状態となる⁹⁾ 96 時間に設定した。またエージング処理中に放出した炭酸ガスがアルミパウチ内圧を上昇させ、ガス放出を妨げる可能性があることから、24 時間に 1 度、アルミパウチ内の炭酸ガスを放出した。

続いて、以上のように調製した各コーヒー焙煎豆から抽出液を調製した。各コーヒー焙煎豆はボンマックコーヒーカッター BM650 (ラッキーコーヒーマシーン社製)を使用して中細挽きに挽いた。その後、挽き豆と 90°C の熱湯の比率が 1:10 の比率となるように混合して、2 分間静置した。静置後、混合液を数回攪拌して、氷冷した 200 ml 容の三角フラスコ内にペーパーろ過 (アドバンテック東洋製, No. 2 ろ紙) 処理したコーヒー抽出液を各試験に供した。

2. 香気成分の分析

コーヒー抽出液中の香気成分の分析は、固相抽出マイクロファイバー (以下, SPME ファイバー)(Superco 製, DVB/Carboxen/PDMS) をコーヒー抽出液に浸漬して、吸着した成分を GC/MS にて分析した。すなわち、20 ml 容の GC 用スクリュウキャップ付きバイアル瓶 (Gerstel 製) にコーヒー抽出液を満量である 20 ml、および内部標準物質として 100 ppm シクロヘキサノールを $5\ \mu\text{l}$ 充填して、密閉後、 60°C 20 分間予備保温したコーヒー抽出液中に SPME ファイバーを 30 分間浸漬して抽出液中の香気成分を吸着後、 250°C に保持したインサート中で 3 分間脱離させた。GC は 7890 A, MS は 7000B (何れも Agilent technology 製)、カラムは VF-WAXms (Varian 製 $60\ \text{m} \times 0.25\ \text{mm} \times 0.39\ \text{mm}$, $0.25\ \mu\text{m}$) を用いた。GC の試料注入条件はスプリットレス、昇温条件は 40°C 5 分保持後、 100°C までは $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $100\sim 230^{\circ}\text{C}$ は $8^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 230°C 5 分保持した。MS の測定条件はス

キャンモード、イオン源温度 230°C 、イオン化電圧 70 eV とした。検出成分の同定は各 GC/MS スペクトルを PBM アルゴリズム、NIST データベース、および各成分の標準品のマススペクトルをそれぞれ照合して決定した。各成分のピークエリアは、定性解析ソフト (Agilent technology 製, Mass Hunter Qualitative Analysis) を用いて算出した。

各成分の定量は、MS の測定条件として SIM モードを用いて分析を行った。各成分の分析結果を、定量解析ソフト (Agilent technology 製, Mass Hunter Quantitative Analysis) を用いて検量線を作成して、定量を行った。使用試薬は、acetaldehyde は和光純薬工業製、2,3,5-trimethylfuran, 2-ethyl-5-methylpyrazine, furfurylpropionate はシグマアルドリッチ製、それ以外の試薬は東京化成工業製の試薬を使用して、何れも特級グレードを用いた。

3. 試験動物

試験動物は ICR マウス (5 週齢, 雄性) を日本エスエルシー株式会社から購入し、室温 $23\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12 時間 (午前 7 時 30 分~午後 7 時 30 分) の明暗サイクルの環境下で飼育した。飼育ケージにはポリカーボネート樹脂製ケージ ($270\ \text{mm} \times 440\ \text{mm} \times 187\ \text{mm}$, 夏目製作所製)、床敷きには木材チップを使用し、ケージ当たり 5-6 匹のマウスを収容し、飼育した。水と飼料 (日本クレア製 CE-2 固形飼料) は自由摂取とした。試験動物は入手後 1 週間の馴化期間を経て、試験に供した。

なお本実験では「実験動物の飼育並びに保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号)」、および「めいらくグループ動物実験等に関する規程並びに実験動物の飼育及び保管等に関する基準」を遵守して実施した。

4. 抗不安効果の評価

本試験では、行動薬理学的手法を用いて、各投与サンプル群 ($n=8$) の抗不安効果を評価した。また各評価試験は、室内照度 200 ルクス、室温 $23\sim 25^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の環境下で、13:00-17:00 の時間帯に実施した。投与サンプルとして、実験方法 1. に準じて調製したエージング処理していないコーヒー焙煎豆の抽出液、エージング処理したコーヒー焙煎豆の抽出液、カフェイン水溶液 (ガス抜きの有無による抽出液中の濃度に差異はなかった)、および香気成分標準品溶液を供した。各サンプルの投与量決定にあたり、dose レスポンスを 3 段階 (2.5, 5, および $10\ \text{ml}/\text{kg b.w.}$) 検討し、最もレスポンスの高かった $10\ \text{ml}/\text{kg b.w.}$ を投与量とした。投与は、各評価試験の 30 分前に胃ゾンデを用いて強制経口投与を行った。また対照群には、コーヒー抽出液投与群への投与量、および投与方法に準じて蒸留水を投与した。

(1) オープンフィールド試験

本試験に用いた装置は、直径 60 cm の円形フィールド周囲に高さ 50 cm の壁を備えている。円形フィールドは、同

表1 エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液中の各香気成分濃度⁴⁾

グループ名	化合物名	含有濃度(ppm)	グループ名	化合物名	含有濃度(ppm)	
aldehyde 類	acetaldehyde	8.3	pyrazine 類	pyrazine	0.6	
	pentanal	0.8		2-methylpyrazine	16.0	
	2-methylbutanal	2.3		2,5-dimethylpyrazine	5.0	
	3-methylbutanal	2.1		2,6-dimethylpyrazine	6.2	
furan 類	furan	0.9		ethylpyrazine	4.8	
	2,5-dimethylfuran	0.1		2,3-dimethylpyrazine	2.2	
	2,3,5-trimethylfuran	0.2		2-ethyl-5-methylpyrazine	0.6	
	3-methyltetrahydrofuran	0.2		2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	0.2	
	2-acetylfuran	0.3		硫黄化合物類	dimethylsulfide	3.3
	furfurylpropionate	0.2			thiophene	4.2
ketone 類	2,3-butandione	4.8			2-methylthiophene	2.0
	3-hexanone	0.1			3-methylthiophene	1.9
	2,3-pentanedione	2.1		4-methylthiazole	1.0	
	2-hexanone	0.1		pyridine/pyrrole 類	1-methylpyrrole	3.4
	2-methyl-3-hexanone	0.7	3-methylphenol		3.5	
		pyridine	3.8			
		trimethyloxazole	1.0			
		2,5-dimethyl-1 H-pyrrole	1.2			

※エージング処理 (96 時間) によってコーヒー抽出液中への残存量が 80% 以下になった成分

心円状に直径 20 cm, および直径 40 cm の円で分けした。直径 40 cm の円の外周フィールドを均等に 16 分割し, 直径 40 cm の円内にも均等に 8 分割した。すなわちフィールド内は直径 20 cm の中央円を含む計 25 区画より成る。試験はサンプルを投与してから 30 分後, マウスをフィールド中央円へ放し, 5 分間行動観察を行った。測定項目は, 区画移動回数に対する中央円内への進入回数の割合と, 試験時間 5 分間に対する中央円への滞在時間の割合を不安様行動の指標とした。通常, 新奇環境に曝されたマウスはフィールド中央部へ近づくことはないため, 中央円への進入回数が多い, または滞在時間が長いほど不安様行動が減少したと評価した。また自発的活動量の指標として, 区画間を移動した回数を測定した。

(2) 高架式十字迷路試験

本試験に用いた高架式迷路試験装置は, 長さ 30 cm, 幅 5 cm の 2 本のアームが垂直に交差したものをを用いた。またクロズドアームは高さ 15 cm の側壁があり, オープンアームは高さ 2 mm の滑り止め防止の側壁を設置した。なお, 2 本のアームは床面から 50 cm の高さに設定した。試験は, サンプルを投与してから 30 分後, マウスを 2 本のアームが交差するプラットホーム (5 cm × 5 cm) 上に, 頭部がオープンアームの方に向くように放し, 5 分間行動観察を行った。測定項目は各アームへの総進入回数に対するオープンアームへの進入回数の割合, および試験時間 5 分間に対する滞在時間の割合を不安様行動の指標とした。オープンアームへの進入回数の割合, または滞在時間の割合が増加するほど不安様行動が減少したと評価した。

5. 有効成分の特定

既報^{4)~6)}でエージング処理によってコーヒー焙煎豆抽出液への残存量が 80% 以下であった 33 成分 (表 1) を対象として, 高架式十字迷路試験によって各成分投与群 ($n=8$) における抗不安効果を検証した。

投与サンプルは, 表 1 に記載の 33 成分を基本骨格に基づき 6 つのグループに分けて調製した。すなわち, aldehyde 類 (acetaldehyde, pentanal, 2-methylbutanal, および 3-methylbutanal の 4 種混合), pyrazine 類 (pyrazine, 2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine, 2-ethyl-5-methylpyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine の 8 種混合), pyridine/pyrrole 類 (1-methylpyrrole, 3-methylphenol, pyridine, trimethyloxazole, および 2,5-dimethyl-1 H-pyrrole の 5 種混合) に分類した水溶性成分は, 各標準品試薬を蒸留水に溶解し, furan 類 (furan, 2,5-dimethylfuran, 2,3,5-trimethylfuran, 3-methyltetrahydrofuran, 2-acetylfuran および furfurylpropionate の 6 種混合), ketone 類 (2,3-butandione, 3-hexanone, 2,3-pentanedione, 2-hexanone, および 2-methyl-3-hexanone の 5 種混合), および硫黄化合物類 (dimethylsulfide, thiophene, 2-methylthiophene, 3-methylthiophene および 4-methylthiazole の 5 種混合) に分類した, 水に難溶性の成分は, 各標準品試薬を 0.1% CMC 水溶液に分散して, それぞれ調製した。単一成分の投与サンプルについても同様に, 蒸留水, または 0.1% CMC 水溶液を溶媒として調製した。また各投与サンプルの成分濃度は, 表 1 に示す濃度とした。なお表 1 に示す各成分濃度は, エージング処

理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液中の各成分の濃度である。各標準品溶液の投与量と投与方法は、実験方法 4. のコーヒー抽出液に準じた。

6. 抗不安効果の作用機構の検討

情動調整に関与する GABA_A, セロトニン 1A, ドーパミン D₁, およびアデノシン A_{2A} などの神経伝達物質受容体の、エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の抗不安効果への関与を検証するため、本試験では、各受容体の拮抗剤を用いて、抗不安効果を有する試料の効果の変化から、効果に関与する受容体を検討した。すなわち、GABA_A 受容体の拮抗剤 (bicucurine, 和光純薬工業製) は 5mg/kg b.w., セロトニン 1A 受容体の拮抗剤 (WAY 100135, 和光純薬工業製) は 10mg/kg b.w., ドーパミン D₁ 受容体の拮抗剤 (SCH23390, シグマアルドリッチ製) は 30 μg/kg b.w., およびアデノシン A_{2A} 受容体の拮抗剤 (SCH58261, シグマアルドリッチ製) は 5mg/kg b.w., それぞれ腹腔内投与し、同時に抗不安効果を有する試料 [エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液, または主要な有効成分として特定した香り成分 7 成分の混合物 [組成 (濃度): 2-methylpyrazine (16.0 ppm), 2,5-dimethylpyrazine (5.0 ppm), 2,6-dimethylpyrazine (6.2 ppm), ethylpyrazine (4.8 ppm), 2-methylthiophene (2.0 ppm), 3-methylthiophene (1.9 ppm), および 2,5-dimethylpyrrole (1.2 ppm)] を強制経口投与してから 30 分後, 高架式十字迷路試験によって 5 分間行動観察を行った。その結果, 抗不安効果が弱体化, 或いは消失したら, ブロックした受容体が抗不安効果に関与すると判断した。なお, 各群の供試数は何れも $n=8$ とし, 評価指標は 4 (2) の同試験に準じた。

7. 統計処理

各実験のデータは平均値±標準誤差で示した。統計処理は一元配置分散分析 (ANOVA) によって等分散性の有意性を確認した後, Post-hoc 試験には Dunnet 法, または Tukey 法を用いて有意差検定を行った。有意差の判定は, $p<0.05$ の水準で行った。なお, 統計処理には Excel 統計 Ver. 5.0 を使用した。

実験結果および考察

1. 各コーヒー焙煎豆抽出液の抗不安効果の検証

コーヒー豆の焙煎後のエージング処理によって, コーヒー焙煎豆抽出液中の多くの香り成分は減少する^{4)~6)}。そこでエージング処理がコーヒー焙煎豆抽出液の抗不安効果へ及ぼす影響を検証するため, エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液 (以下, エージングしていないコーヒー), エージング処理したコーヒー焙煎豆の抽出液 (以下, エージングしたコーヒー) をそれぞれマウスに強制経口投与して, オープンフィールド試験, および高架式十字迷路試験によって抗不安効果を検証した。なお, コーヒー抽出液中に含まれるカフェインが, 抗不安効果などの情動

調整に影響する可能性があることから, コーヒーと同濃度のカフェインを摂取した時の挙動も検証した。

(1) オープンフィールド試験

エージングしていないコーヒー, エージングしたコーヒー, および各々のコーヒー抽出液と同濃度のカフェイン水溶液をマウスに強制経口投与してから 30 分後, 5 分間行動観察を行った。なお, エージングの有無によってコーヒー中のカフェイン濃度に差異は無く, 両者共に 50 mg/100 ml であった。

試験の結果, 自発的活動量を示す区画間移動回数は, エージングしていないコーヒー, エージングしたコーヒー, およびカフェイン水溶液の何れを投与した群においても, 対照群と比較すると僅かな増加が見られたが, 有意な差は認められなかった。また, 増加の程度は 3 群共に同等であった (図 1A)。このことから, 投与試料の違いがマウスの活動量に差を与えないことが分かった。

次に不安様行動の評価指標では, エージングしていないコーヒーを投与した群は, フィールド中央円における滞在時間の割合が対照群に比べ有意に増加した。一方, エージングしたコーヒーを投与しても, 中央円における滞在時間の割合は対照群, 或いはカフェイン水溶液群と同等であった。なお, 中央円への進入回数の割合は, 対照群以外の群に増加傾向が認められ, 増加量は 3 群共に同等であった (図 1B, C)。

以上のことから, エージング処理をしていないコーヒーの経口投与によって, 抗不安効果を示すことが示唆された。一方, エージング処理の有無に関わらず, コーヒー抽出液の摂取によって, 中央円への進入回数, および自発的活動量に増加傾向が認められた。またカフェイン投与群は, 各コーヒー抽出液群と同様の傾向が認められたことから, 不安行動の減少はカフェインによる影響と考えられる。カフェインの摂取は, 軽度の不安ストレス軽減効果をもたらす¹⁰⁾, 自発運動量を亢進させるとの報告があり¹¹⁾¹²⁾, 本試験の結果はそれらの報告と合致していた。

(2) 高架式十字迷路試験

オープンフィールド試験と同様, 各試料を強制経口投与してから 30 分経過後に 5 分間行動観察を行った。

試験の結果, エージングしていないコーヒーを投与した群は, 対照群と比較して, オープンアームへの進入回数, および滞在時間の割合がそれぞれ有意に増加した。一方, エージングしたコーヒーを投与した群は, 対照群に比べオープンアームへの滞在時間の割合に有意な差はないが, 増加傾向が認められ, カフェイン水溶液でも同様の結果であった (図 2)。

以上のように, エージングしていないコーヒーは 2 種類の薬理行動学的な評価方法によって, 抗不安効果を有することが示唆された。一方, エージングしたコーヒーにおいても, 僅かに不安様行動を緩和したが, これはカフェイン

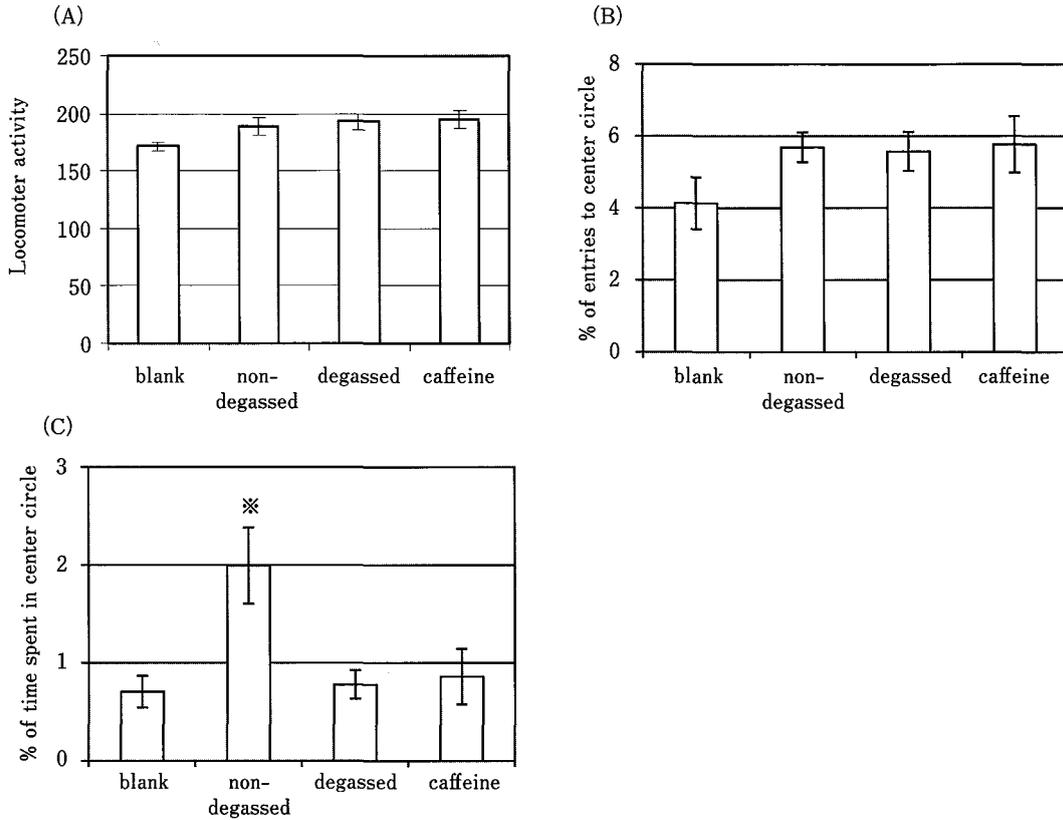


図1 オープンフィールド試験による抗不安効果の評価

エージング処理していないコーヒー焙煎豆の抽出液 (non-degassed), エージング処理をしたコーヒー焙煎豆の抽出液 (degassed), 各コーヒー抽出液と同じ濃度のカフェイン水溶液 (caffeine) を強制経口投与 30分経過後に5分間計測を行った。

(A) 総画移動回数

(B) 各区画の総移動回数に対する中央円への進入回数の割合 [(中央円への進入回数/各区画への総進入回数)×100 (%)]

(C) 試験時間に占める中央円滞在時間の割合

[中央円での滞在時間 (秒)/試験時間 (300秒)×100] (%)

棒グラフは平均値±標準誤差 (n=8) を示した。post-hoc 試験に Dunnet 法を用い有意差検定を実施して、対照群 (blank) との間に有意差 (p<0.05) が認められた群に「※」を付した。再現試験は各2回実施した。

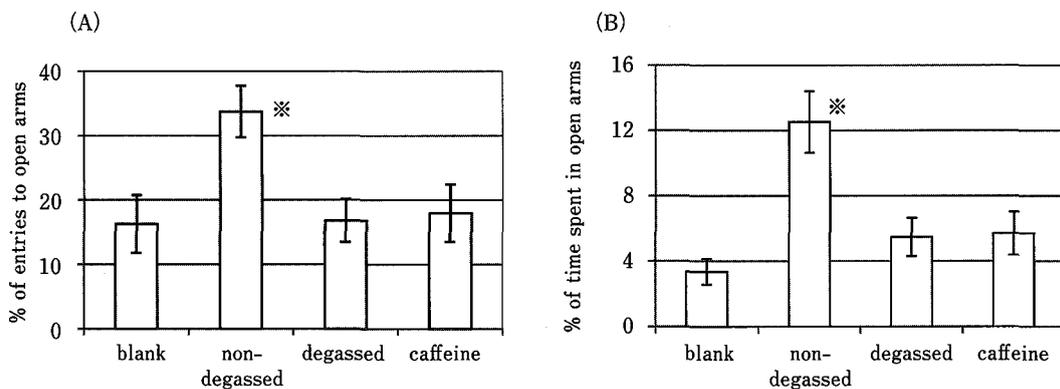


図2 高架式十字迷路試験による抗不安効果の評価

エージング処理していないコーヒー焙煎豆の抽出液 (non-degassed), エージング処理をしたコーヒー焙煎豆の抽出液 (degassed), 各コーヒー抽出液と同じ濃度のカフェイン水溶液 (caffeine) を強制経口投与 30分経過後に5分間計測を行った。

(A) 各アームへの総進入回数に対するオープンアームへの進入回数の割合

[(オープンアームへの進入回数/各アームへの総進入回数)×100 (%)]

(B) 試験時間に占めるオープンアーム滞在時間の割合

[オープンアームでの滞在時間 (秒)/試験時間 (300秒)×100] (%)

棒グラフは平均値±標準誤差 (n=8) を示した。post-hoc 試験に Dunnet 法を用い有意差検定を実施して、対照群 (blank) との間に有意差 (p<0.05) が認められた群に「※」を付した。再現試験は各2回実施した。

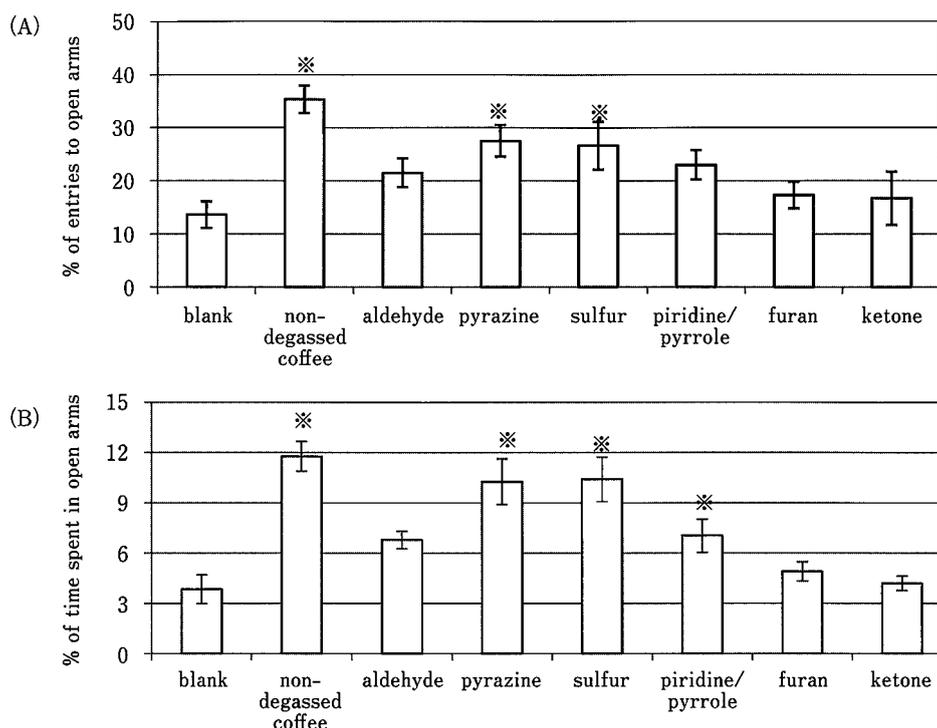


図 3 高架式十字迷路試験による抗不安効果の評価

non-degassed coffee (エージング処理していないコーヒー), aldehyde (acetaldehyde, pentanal, 2-methylbutanal, および 3-methylbutanal の 4 種混合物), pyrazine (pyrazine, 2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine, 2-ethyl-5-methylpyrazine, および 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine の 8 種混合物), sulfur (dimethylsulfide, thiophene, 2-methylthiophene, 3-methylthiophene, および 4-methylthiazole の 5 種混合物), pyridine/pyrrole (1-methylpyrrole, 3-methylphenol, pyridine, trimethyloxazole, および 2,5-dimethyl-1H-pyrrole の 5 種混合物), furan (furan, 2,5-dimethylfuran, 2,3,5-trimethylfuran, 3-methyltetrahydrofuran, 2-acetylfuran および furfurylpropionate の 6 種混合物), ketone (2,3-butandione, 3-hexanone, 2,3-pentanedione, 2-hexanone, および 2-methyl-3-hexanone の 5 種混合物) を強制経口投与 30 分経過後に 5 分間計測を行った。

(A) 各アームへの総進入回数に対するオープンアームへの進入回数の割合 [(オープンアームへの進入回数/各アームへの総進入回数)×100 (%)]

(B) 試験時間に占めるオープンアーム滞在時間の割合

[オープンアームでの滞在時間 (秒)/試験時間 (300 秒)×100 (%)]

棒グラフは平均値±標準誤差 ($n=8$) を示した。post-hoc 試験に Dunnett 法を用い有意差検定を実施して、対照群 (blank) との間に有意差 ($p<0.05$) が認められた群に「※」を付した。再現試験は各 2 回実施した。

の影響と考えられ、エージングしていないコーヒーのような顕著な効果は認められなかった。エージングによってコーヒーの抗不安効果が顕著に低下したことから、エージング処理によって減少する成分が、この効果に関与することが考えられた。

2. 有効成分の特定

有効成分の特定は、既報でエージング処理によってコーヒー焙煎豆抽出液における残存量が 80% 以下であった 33 成分 (表 1) を対象として試験を行った。33 成分を基本骨格に基づき 6 つのグループに分けて、抗不安効果を検証した。すなわち、aldehyde 類 (acetaldehyde, pentanal, 2-methylbutanal, および 3-methylbutanal の 4 種混合), pyrazine 類 (pyrazine, 2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine, 2-ethyl-5-methylpyrazine, および 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine

の 8 種混合), pyridine/pyrrole 類 (1-methylpyrrole, 3-methylphenol, pyridine, trimethyloxazole, および 2,5-dimethyl-1 H-pyrrole の 5 種混合), furan 類 (furan, 2,5-dimethylfuran, 2,3,5-trimethylfuran, 3-methyltetrahydrofuran, 2-acetylfuran および furfurylpropionate の 6 種混合), keton 類 (2,3-butandione, 3-hexanone, 2,3-pentanedione, 2-hexanone, および 2-methyl-3-hexanone の 5 種混合), および硫黄化合物 (dimethylsulfide, thiophene, 2-methylthiophene, 3-methylthiophene および 4-methylthiazole の 5 種混合) の 6 つのグループの、各香気成分標準品の混合物をマウスに投与し、高架式十字迷路試験を用いて抗不安効果を検証した。なお投与した各試料の成分濃度は、表 1 記載の既報のエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液の各成分と同じ濃度とした。各香気成分混合物における、高架式十字迷路試験におけるマウスの不安様行動に対する

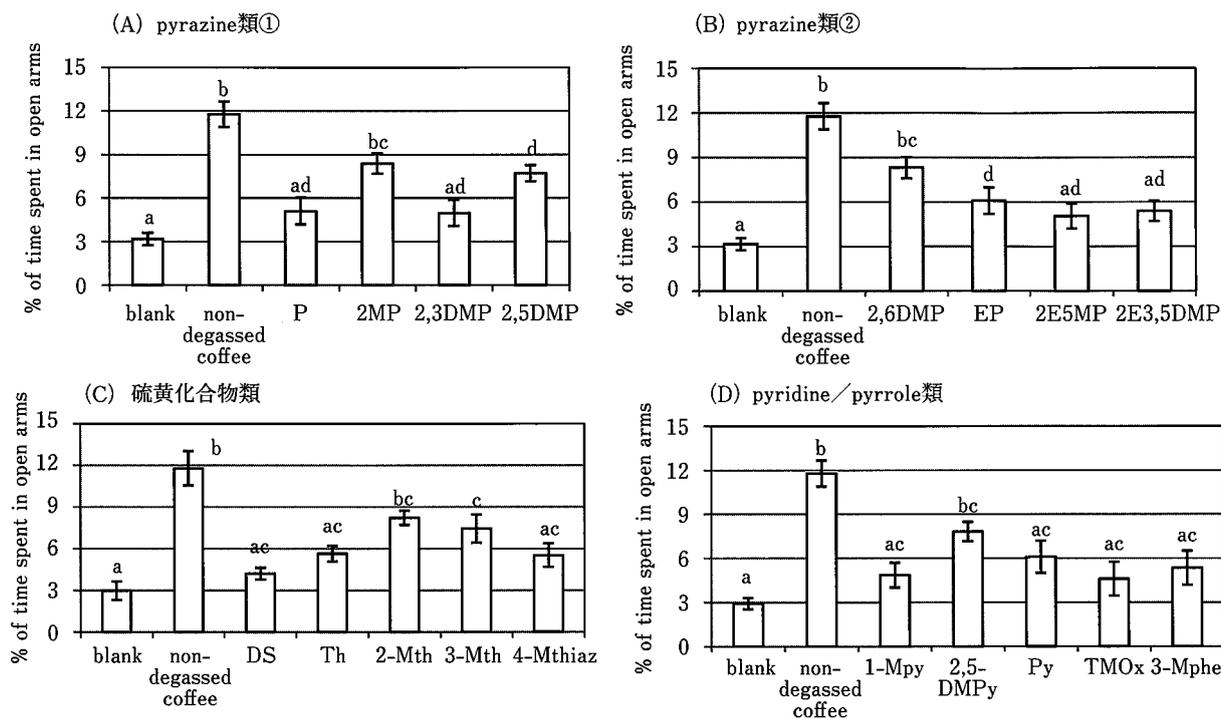


図4 高架式十字迷路試験による抗不安効果の評価 (試験時間に占めるオープンアーム滞在時間の割合)

- (A) pyrazine 類 ①: pyrazine (P), 2-methylpyrazine (2MP), 2,3-dimethylpyrazine (2,3DMP), 2,5-dimethylpyrazine (2,5-DMP)
 (B) pyrazine 類 ②: 2,6-dimethylpyrazine (2,6-DMP), ethylpyrazine (EP), 2-ethyl-5-methylpyrazine (2E5MP), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (2E3,5DMP)
 (C) 硫黄化合物類: dimethylsulfide (DS), thiophene (Th), 2-methylthiophene (2-Mth), 3-methylthiophene (3-Mth), 4-methylthiazole (4-Mthiaz)
 (D) pyridine/pyrrole 類: 1-methylpyrrole (1-Mpy), 2,5-dimethylpyrrole (2,5-DMPy), pyridine (Py), trimethyloxazole (TMOx), 3-methylphenol (3-Mphe)
 エージング処理していないコーヒー (non-degassed coffee), または各香り成分溶液を強制経口投与してから 30 分経過後に 5 分間計測を行った。

[オープンアームでの滞在時間 (秒) / 試験時間 (300 秒) × 100] (%)

棒グラフは平均値 ± 標準誤差 (n=8) を示した。post-hoc 試験に Tukey 法を用い有意差検定を実施して、異なる英文字間に有意差 (p < 0.05) ありとした。再現試験は各 2 回実施した。

影響を検証した結果、pyrazine 群、硫黄化合物群において、オープンアームへの滞在時間および進入回数の割合が、対照群に対して有意に増加した (図 3A)。また pyridine/pyrrole 群においても滞在時間の割合が、対照群に比べ有意に増加した (図 3B)。一方、それ以外のグループに効果は認められなかった。以上の結果から、pyrazine 群の 8 成分、硫黄化合物群の 5 成分、pyridine/pyrrole 群の 5 成分の何れかが、抗不安効果に関与すると考えられた。そこで、次に抗不安効果に関与する可能性のある香り成分 18 成分を、それぞれマウスに投与して、高架式十字迷路試験にて各成分の抗不安効果を検証した。なお、投与に供した各成分溶液の濃度は、表 1 記載の既報のエージングしていないコーヒーと同じ濃度とした。有効成分の可能性のある各成分の抗不安効果を検証した結果、pyrazine 類のうち、2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine の 4 種類、硫黄化合物うち、2-methylthio-

phene, 3-methylthiophene の 2 種類、2,5-dimethylpyrrole の 7 種類をそれぞれ投与することによって、対照群に対し、オープンアームへの滞在時間の割合が有意に増加した (図 4)。また 2-methylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, 2-methylthiophene, 2,5-dimethylpyrrole に至っては、オープンアームへの進入回数の割合も、対照群に対し有意に増加した (図 5)。

以上のように、エージング処理をしていないコーヒーに認められた抗不安効果には、pyrazine 類のうち、2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine の 4 種類、硫黄化合物のうち 2-methylthiophene, 3-methylthiophene の 2 種類、2,5-dimethylpyrrole の計 7 成分が主要な有効成分と推定された。また主要な有効成分のうち、2,5-dimethylpyrazine, ethylpyrazine, および 3-methylthiophene の 3 成分は、単一投与の効果が、エージングしていないコーヒーよりも有

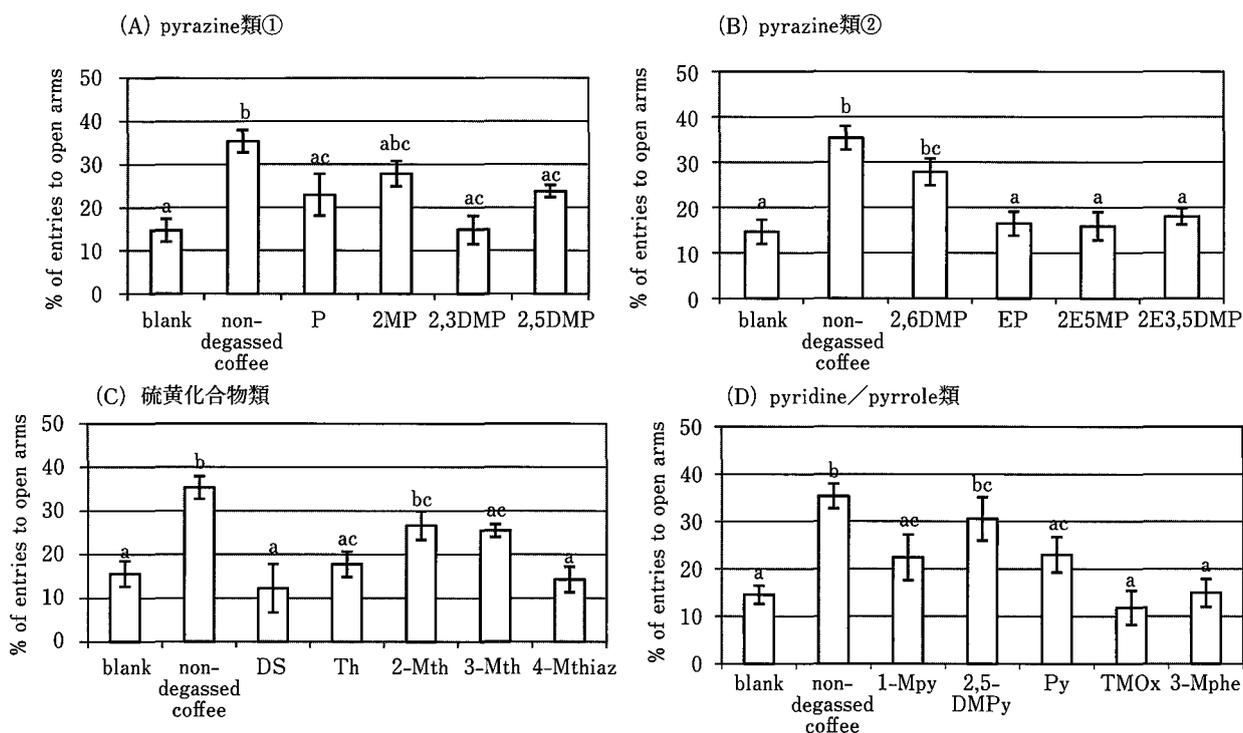


図 5 高架式十字迷路試験による抗不安効果の評価 (各アームへの総進入回数に対するオープンアームへの進入回数の割合)

- (A) pyrazine 類 ① : pyrazine (P), 2-methylpyrazine (2MP), 2,3-dimethylpyrazine (2,3DMP), 2,5-dimethylpyrazine (2,5DMP)
- (B) pyrazine 類 ② : 2,6-dimethylpyrazine (2,6DMP), ethylpyrazine (EP), 2-ethyl-5-methylpyrazine (2E5MP), 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (2E3,5DMP)
- (C) 硫黄化合物類 : dimethylsulfide (DS), thiophene (Th), 2-methylthiophene (2-Mth), 3-methylthiophene (3-Mth), 4-methylthiazole (4-Mthiaz)
- (D) pyridine/pyrrole 類 : 1-methylpyrrole (1-Mpy), 2,5-dimethylpyrrole (2,5-DMPy), pyridine (Py), trimethyloxazole (TMOx), 3-methylphenol (3-Mphe)

エージング処理していないコーヒー (non-degassed coffee), または各香気成分溶液を強制経口投与してから 30 分経過後に 5 分間計測を行った。

[(オープンアームへの進入回数/各アームへの総進入回数) × 100 (%)]

棒グラフは平均値 ± 標準誤差 (n=8) を示した。post-hoc 試験に Tukey 法を用い有意差検定を実施して、異なる英文字間に有意差 (p<0.05) ありとした。再現試験は各 2 回実施した。

意に低く (図 4, 5), 効果の強さに差異が認められた。このように、有効成分単一の効果のエージングしていないコーヒーの効果よりも低いことから、恐らく各有効成分が相加的にコーヒーの抗不安効果に関与すると考えられる。

3. 作用機構の検討

次に、エージングしていないコーヒー、および、有効成分と特定された香気成分 7 成分の混合物 [組成 (濃度) : 2-methylpyrazine (16.0 ppm), 2,5-dimethylpyrazine (5.0 ppm), 2,6-dimethylpyrazine (6.2 ppm), ethylpyrazine (4.8 ppm), 2-methylthiophene (2.0 ppm), 3-methylthiophene (1.9 ppm), および 2,5-dimethylpyrrole (1.2 ppm)] の作用機構を検討した。動物の情動調整には GABA, セロトニン, ドーパミンなどの神経伝達物質, およびその受容体に関与することが知られている。そこで、エージングしていないコーヒーの抗不安効果に、どの受容体に関与するか、各受容体の拮抗剤を用いて検証した。

その結果, GABA_A 受容体の拮抗剤 bicuculline (5 mg/kg i.p.), ドーパミン D₁ 受容体の拮抗剤 SCH23390 (30 μg/kg i.p.) を投与することによって、エージングしていないコーヒー、または抗不安効果を有する香気成分 7 成分の混合物の効果が消失した (図 6A, C, 図 7A, C)。一方、セロトニン 1A 受容体の拮抗剤 WAY100135 (10 mg/kg i.p.), アデノシン A_{2A} 受容体の拮抗剤 SCH58261 (5 mg/kg i.p.) の投与では、エージングしていないコーヒー、または抗不安効果を有する香気成分 7 成分の混合物の効果に対する影響は認められなかった (図 6B, D, 図 7B, D)。

以上のように、エージングしていないコーヒーの抗不安効果に、GABA_A 受容体、並びにドーパミン D₁ 受容体の関与が示唆された。エージングしていないコーヒーと同様、GABA_A 受容体、並びにドーパミン D₁ 受容体に関与し、抗不安効果を示す成分として、サフランの主要な香気成分 safranal¹³⁾⁻¹⁵⁾ や、牛乳由来のテトラペプチド β-

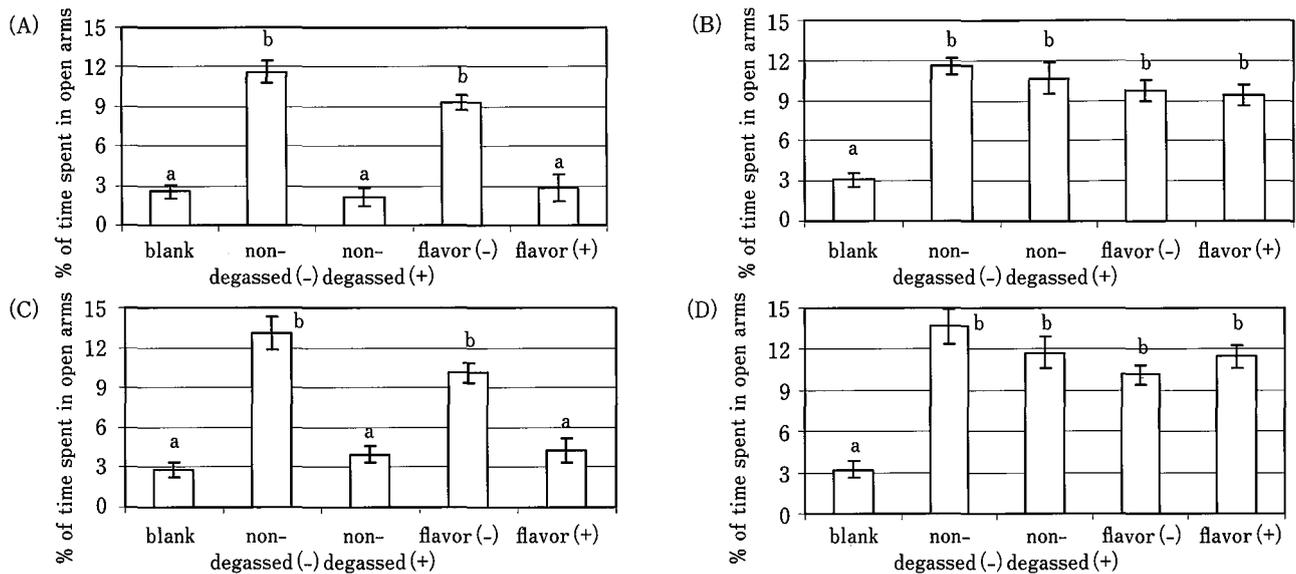


図6 神経伝達受容体拮抗剤の投与による抗不安効果への影響 (試験時間に占めるオープンアーム滞在時間の割合)

エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液 (non-degassed), および主要な有効成分 (2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine, 2-methylthiophene, 3-methylthiophene, および 2,5-dimethylpyrrole の7種混合物 (flavor) の抗不安効果に対する, 神経伝達物質受容体の拮抗剤を腹腔内投与した時の影響を検証した

[-]: 拮抗剤未投与, (+): 拮抗剤投与]

(A) GABA_A 受容体拮抗剤の bicuculine (5 mg/kg i.p.), (B) セロトニン 1A 受容体拮抗剤の WAY100135 (5 mg/kg i.p.), (C) ドーパミン D₂ 受容体拮抗剤の SCH23390 (30 μg/kg i.p.), および (D) アデノシン A_{2A} 受容体拮抗剤の SCH58261 (5 mg/kg i.p.)

[オープンアームでの滞在時間 (秒)/試験時間 (300 秒) × 100] (%)

棒グラフは平均値 ± 標準誤差 (n=8) を示した. post-hoc 試験に Tukey 法を用い有意差検定を実施して, 異なる英文字間に対有意差あり (p < 0.05) とした. 再現試験は各2回実施した.

Lactotensin¹⁶⁾ が知られている. safranal は, GABA_A 受容体を活性化し, ドーパミンの再吸収を阻害することで抗不安効果を示すことが報告されている. ガス抜きしていないコーヒーにおいても, 同様の作用機構を有する可能性があるが, 詳細については, 今後さらに検討が必要である. また有効成分の作用経路として, 胃内投与後に腸吸収を経て血中へ移行し, 血液脳関門を通過して脳内の中枢神経へ直接働きかける経路, 或いは胃内投与後に腸内で迷走神経系の刺激を通じて中枢神経へ間接的に働きかける経路が考えられる. 今回有効成分として特定した7成分の体内動態は, どれも経口摂取後に腸吸収を経て血中へ移行する点, また分子量 100 付近の低分子量物質であることから, 血液脳関門を通過し, 直接脳内に作用すると考えられる. 詳細な作用経路を明らかにするためには, 作用機構と同様, さらに詳細な検討が必要である.

これまでにコーヒーを飲むだけでなく, 香りを嗅ぐことによってもリラックス感が得られ, 緊張感を保持できる効果があることは経験的に知られており, 最近ではコーヒーの揮発性成分を嗅ぐことによって抗不安様のストレス緩和作用を有する²³⁾ ことが報告されていたが, 有効成分や作用機構は明らかでなかった. 今回, コーヒーの抗不安効果に関与する主要な香気成分, および神経伝達物質受容体の一

端が明らかになったことによって, コーヒーの情動調整作用の全容が解明される足がかりになると考えられる.

要 約

市販のコーヒー焙煎豆には, 通常エージング処理が施されており, この処理によって, コーヒー抽出液中の多くの香気成分が減少するだけでなく, 機能性にも影響することが明らかになってきている. そこで本研究ではマウスにエージング処理をしていないコーヒー焙煎豆, または 28°C, 96 時間エージング処理したコーヒー焙煎豆からそれぞれ抽出したコーヒー抽出液投与による抗不安効果を検証した.

高架式十字迷路試験における抗不安効果を検証した結果, エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液の飲用は不安様行動を有意に減少することが示唆された. この抗不安効果には, 硫黄化合物 2 成分, pyrrole 類 1 成分, および pyrazine 類 4 成分がそれぞれ関与し, どれもエージング処理によって減少する成分であった.

以上の結果から, 焙煎直後のコーヒー焙煎豆の抽出液に認められた高い抗不安効果は, 焙煎豆のエージング処理によって消失することが分かった. さらに, エージング処理していないコーヒーの抗不安作用に関するメディエーター

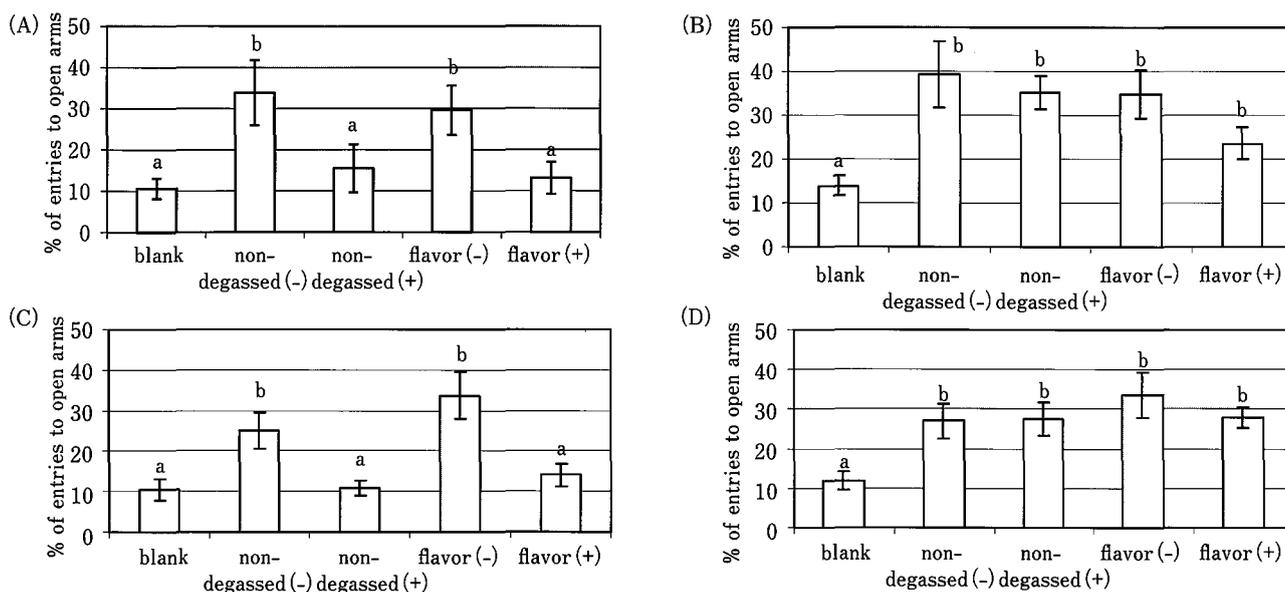


図7 神経伝達受容体拮抗剤の投与による抗不安効果への影響 (各アームへの総進入回数に対するオープンアームへの進入回数の割合)

エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の抽出液 (non-degassed), および主要な有効成分 (2-methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, ethylpyrazine, 2-methylthiophene, 3-methylthiophene, および 2,5-dimethylpyrrole の7種混合物 (flavor) の抗不安効果に対する, 神経伝達物質受容体の拮抗剤を腹腔内投与した時の影響を検証した

〔(-): 拮抗剤未投与, (+): 拮抗剤投与〕

(A) GABA_A 受容体拮抗剤の bicuculine (5mg/kg i.p.), (B) セロトニン 1A 受容体拮抗剤の WAY100135 (5 mg/kg i.p.), (C) ドーパミン D₂ 受容体拮抗剤の SCH523390 (30 μg/kg i.p.), および (D) アデノシン A_{2A} 受容体拮抗剤の SCH58261 (5mg/kg i.p.)

〔(オープンアームへの進入回数/各アームへの総進入回数) × 100 (%)〕

棒グラフは平均値 ± 標準誤差 (n=8) を示した. post-hoc 試験に Tukey 法を用い有意差検定を実施して, 異なる英文字間に 有意差あり (p < 0.05) とした. 再現試験は各2回実施した.

を検証した結果, GABA_A 受容体, ドーパミン D₁ 受容体の関与が示唆された.

文 献

- 1) Buffo, R.A. and Cardelli Freire, C., Coffee flavor : an overview. *Flavour Fragr. J.*, **19**, 99-104 (2004).
- 2) 古賀良彦, 小長井ちづる, 濱田麻由子, 黒坂英夫, コーヒー豆の種類の違いによる香りのリラクゼーション効果の差異, 日本味と匂学会誌, **8**, 343-346 (2001).
- 3) 林 泰資, 曾我部咲, 服部幸雄, マウス行動分析によるコーヒー揮発成分のストレス緩和作用, 日本栄養・食糧学会誌, **64**, 323-327 (2011).
- 4) 鷺家勇紀, 西川友章, 藤野植美, エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆の腸管 IgA 産生促進効果, 日本食品科学工学会誌, **60**, 286-294 (2013).
- 5) 鷺家勇紀, 西川友章, 藤野植美, エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液のマウス血中の IgG, および IgA の産生促進効果, 日本食品科学工学会誌, **61**, 433-438 (2014).
- 6) 鷺家勇紀, 西川友章, 藤野植美, エージング処理をしていないコーヒー焙煎豆抽出液のマウス血中サイトカイン量の増加効果, 日本食品科学工学会誌, **62**, 534-540 (2015).
- 7) 日比治雄, 山梨浩利, 風味良好なコーヒー焙煎豆及びコーヒー挽き豆の製造方法, 日本特許第 2105521 号 (1996-11-06).
- 8) 日比孝吉, コーヒー焙煎豆の保存方法, 日本特許第 4795375 号 (2011-08-05).
- 9) 田村吉美, 泉谷希光, コーヒー豆焙煎後のガス発生に関する研究, 共立女子短期大学家政科紀要第 33 号 (1990).
- 10) Hayashi, Y., Sogabe, S., Hattori, Y. and Tanaka, J., Anxiolytic and hypnotic effects in mice of roasted coffee bean volatile compounds. *Neurosci. Lett.*, **531**, 166-169 (2012).
- 11) Fredholm, B.B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A. and Zvartau, E.E., Action of caffeine in the brain with special reference factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 83-133 (1999).
- 12) Garrett, B.E. and Griffiths, R.R., The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **57**, 533-541 (1997).
- 13) Hosseinzadeh, H. and Noraei, N.B., Anxiolytic and hypnotic effect of Crocus sativus aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytother. Res.*, **23**, 768-774 (2009).
- 14) Schmidt, M., Betti, G. and Hensel, A., Saffron in phytotherapy : pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr.* **157**, 315-319 (2007).
- 15) Lechtenberg, M., Schepmann, D., Niehues, M., Hellenbrand, N., Wünsch, B. and Hensel, A., Quality and functionality of saffron : quality control, species assortment and affinity of extract and isolated saffron compounds to NMDA and sigma-1 (sigma-1) receptors. *Planta Med.*, **74**, 746-772 (2008).
- 16) Hou, I.C., Suzuki, C., Kanegawa, N., Oda, A., Yamada, A.,

Yoshikawa, M., Yamada, D., Sekiguchi, M., Wada, E., Wada, K. and Ohinata, K., β -Lactotensin derived from bovine β -lactoglobulin exhibits anxiolytic-like activity as an agonist

for neurotensin NTS (2) receptor via activation of dopamine D (1) receptor in mice. *J. Neurochem.* **119**, 785-90 (2011).
(平成 28 年 3 月 31 日受付, 平成 28 年 6 月 10 日受理)
