

令和元年6月21日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00818

研究課題名(和文) 日常的な食材の機能性活用をめざす高フラボノイド食摂取と生体内炎症マーカーの検討

研究課題名(英文) Research on the inflammatory biomarkers in human after consuming the flavonoid-enriched meals fixed by normal daily food for utilizing food functionality.

研究代表者

市川 陽子 (Ichikawa, Yoko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：50269495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食材に炒め、煮などの調理を行い、調理終了後の時間経過によるフラボノイド含有量等に対する影響を検討した。調理終了後48時間までにおいて、フラボノイド含有量等の変化に有意差はなく保持されていた。

高フラボノイド食の短期継続摂取が炎症マーカーに与える影響をヒト介入試験で検討した。高フラボノイド食は、フラボノイドを豊富に含む食材を用い、エネルギーやPFC比率に配慮して調製した。BMI25以上の肥満者6名を対象に、介入群には高フラボノイド食を、対照群には低フラボノイド食を1週間継続的に摂取させた。その結果、日常的に抗酸化ビタミンを摂取している対象ではフラボノイドの機能性が增强される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で検討した食材、調理方法に関しては、消費期限が48時間以内に設定される弁当・惣菜等の中食商品においてフラボノイドの機能性が保持できる可能性が示された。本結果は、中食におけるヘルシーメニューへの科学的根拠の付与、保健指導への応用など、食環境整備の上で意義があると考えられる。

また、フラボノイド含有量を高めた食事の継続摂取では、軽度肥満男性のうち、ビタミンAおよびCの習慣的な摂取量が日本人の食事摂取基準(2015年版)の推奨量を上回っていた者において、炎症性サイトカインの低減効果が現れた。さらなる検証が必要であるが、疾病予防に寄与する食事ベースでの食品機能性活用方法の提示につながると思われる。

研究成果の概要(英文)： We examined influences of flavonoid content by the passage of time after adding cooking operations such as boiling and stir-frying foodstuff. The flavonoid content was maintained without significant difference until 48 hours after the end of cooking.

The human intervention study was conducted for examining the effects of short-term continuous intake of flavonoid-rich meals on inflammatory markers. The flavonoid-rich meals fixed by foodstuff rich in flavonoids with consideration for energy and protein, fat, carbohydrate balance (PFC ratio).

The subjects were six obese people with a more than body mass index (BMI) of 25. As test meal, the intervention group consumed the flavonoid-rich meals and the control group consumed the low-flavonoid meals for one week. The results showed that the daily intake of antioxidant vitamins may enhance the functionality of dietary flavonoids.

研究分野：フードマネジメント

キーワード：フラボノイド 調理変化 ヒト試験 生体内炎症指標 機能性活用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポリフェノールの一種であるフラボノイドは、抗酸化活性やアポトーシス誘導等の様々な機能性を有していることや、野菜、果物などに幅広く含まれていることなどから、食事として摂取しやすく、また日常的な摂取により、がんや心疾患などの疾患の発症を予防できる可能性があると考えられている。一方で、ケルセチンの高濃度暴露による DNA 損傷の報告などもあることから機能性成分の長期間、高濃度摂取での安全性、有効性についての知見は不十分といえる。我々は、サプリメント等のように機能性成分が高濃度になる可能性が極めて低く、安全性の高い、日常的な食材で構成される食事から機能性成分を摂取した場合の、疾病リスク低減効果について、検討を試みている。

2. 研究の目的

- 1) 中食における食事由来のフラボノイド摂取の有効性を明らかにすることを目的に、食材に調理操作を加え、調理終了後から時間経過による影響について検討した。
- 2) ヒト介入試験を実施し、血中フラボノイド濃度の変化を指標に調理操作を加えた単品のフラボノイド食を摂取した時の吸収・代謝について検証した。
- 3) 高フラボノイド食を用いて、高フラボノイド食の短・中期的な継続摂取が与える疾病リスク低減効果について、血中の炎症マーカー（炎症性サイトカインの遺伝子発現量等）を指標に検討した。

3. 研究の方法

1) 食材中の機能性成分に調理の種類および調理後の時間経過が及ぼす影響

(1) 食材の選定及び調理操作

玉ねぎ、豆腐、大豆、黒豆の4種の食材を試料とした。調理操作は、炒め、煮、電子レンジおよび生を加えた4種類とした。さらに、弁当や惣菜を家庭で喫食する中食を想定し、調理操作を行ってから測定までの時間を変えて測定を行った。この保存時間は調理終了後0時間、24時間、48時間の3点に設定した。また、保存は4の冷蔵庫内にて行った。

(2) フラボノイド類、総ポリフェノール量、抗酸化活性の測定

フラボノイド類の測定は、乾燥粉末を酵素加水分解処理後、メタノールにて抽出し、フラボノイドアグリコンをHPLCにて測定した。総ポリフェノール量は、Folin-Ciocalteu法を用いて測定した。抗酸化活性は、DPPHラジカル消去活性を用いて測定した。

2) 玉ねぎ摂取時のケルセチンの体内動態に対する調理操作の影響

(1) 試験食（玉ねぎ）について

試験食に用いた玉ねぎ200gを3mm幅の薄切りにして調理し、15mlの濃口醤油をかけたものを試験食とした。調理操作は、「生」「炒め」「煮」「レンジ」の4種類とした。

(2) フラボノイド低減食について

ヒト試験で用いる対照食として申請者らが開発・報告しているフラボノイドをほとんど含有していない食事（フラボノイド低減食 0.24 mg / meal 以下）(Sakakibara H. *et al*, 2012)を用いた。

(3) 被験者

被験者は、静岡県立大学に在籍する学生7名（男性4名、女性3名）で、年齢 22.0 ± 1.5 歳、BMI $21.3 \pm 1.7 \text{ kg/m}^2$ であった。

(4) 研究デザイン

試験1日目、2日目は、フラボノイド低減食を1日3食（合計6食）摂取し、これをウォッシュアウト期間とした。3日目の朝食に試験食（玉ねぎ）を、昼食・夕食にはフラボノイド低減食を摂取した。試験3日目の朝食摂取前、摂取後1、2、3、4、6時間に肘正中皮静脈より採血を行った。同時に、朝食摂取後から翌日の朝食摂取前（午前9時）まで、24時間蓄尿を行った。また、試験期間中の飲水は、水のみを自由摂取とした

(5) 血液、尿サンプルの測定

血漿中のフラボノイドは、酵素加水分解処理後、酢酸エチルにて抽出した。尿中のフラボノイドは、酵素加水分解処理後、Sep - Pak C18を用いて抽出した。その後、LC / MSにてケルセチン濃度を測定した。

3) 日常的な食材を用いた高フラボノイド食摂取が生体内炎症マーカーに与える影響

(1) 被験者

被験者は男性6名で、被験者の条件は、薬剤やサプリメントの服用なし、BMI 25であることの2点を満たす一般健常人および健常学生とした。

(2) 研究デザイン

試験1日目の朝食から試験3日目の朝食まで、フラボノイド低減食を合計7食摂取してもらい、これをウォッシュアウト期間とした。試験3日目の昼食から試験10日目の朝食まで、1サイクル目はフラボノイド低減食を、2サイクル目はこれまでに開発した高フラボノイド試験食を、合計21食摂取してもらった。採血は1サイクルの試験期間中、3日目の昼食摂取前および10日目の昼食摂取前の2回行った。また、試験2日目の昼食摂取後から試験3日目の昼食摂取前および試験9日目の昼食摂取後から試験10日目の昼食摂取前まで、24時間蓄尿を行った。試験期間中の飲料は水のみ自由摂取とした。

(3) 被験者の日常的な摂取栄養量の推定

被験者の日常的な摂取栄養量について、エクセル栄養君^R食物摂取頻度調査 Food Frequency Questionnaire Based on Food Groups (FFQg) Ver. 4.0調査票を被験者に配布・回収した、専用ソフトを用いて解析した。

(4) 血液、尿サンプルの測定

血球細胞中のIL-1、IL-6、IL-8、IL-18、TNF- α の5種類の炎症性サイトカインの遺伝子発現量をRT-PCRで測定した。

4. 研究成果

1) 食材中の機能性成分に調理の種類および調理後の時間経過が及ぼす影響

フラボノイド含有量では、豆腐の煮汁において0時間と48時間の間に有意な変動（0.6 mg / 100g FW 1.1 mg / 100g FW）がみられたが、その他の試料では保存時間の違いによる有意な変化は確認されなかった。また、総ポリフェノール含有量、抗酸化活性では、いずれの調理操作においても、保存時間の違いによる有意な変化はみられなかった。それゆえ、本研究で扱った食材および調理方法を用いるものに関しては、調理から喫食まで時間のかかる中食であっても、フラボノイドの機能性は保持されることが示唆された。

2) 玉ねぎ摂取時のケルセチンの体内動態に対する調理操作の影響

個人内における調理法と血中ケルセチン濃度の間に有意な変化はみられなかった。また、

血中ケルセチン濃度、ピークまでの到達時間については個人差が大きかった。

尿中に排泄されたフラボノイドは高フラボノイド試験食中のフラボノイド量に対する尿中排泄量の割合を吸収率として算出した。その結果、調理法によるケルセチン吸収率の違いについて有意差は見られなかった。

3) 日常的な食材を用いた高フラボノイド食摂取が生体内炎症マーカーに与える影響

フラボノイド低減食の介入前と高フラボノイド食の介入前、フラボノイド低減食の介入後と高フラボノイド食の介入後、フラボノイド低減食の介入前後、高フラボノイド食の介入前後のそれぞれにおける各炎症性サイトカインの Ct 値について、Wilcoxon の符号付順位検定を行ったところ、いずれにおいても有意差は観察されなかった。そこで、炎症性サイトカインの遺伝子発現量については、個人内の変動に着目し、検討を行った。フラボノイド低減食の介入前の遺伝子発現量を「低前 / 低前」(= 1)、フラボノイド低減食の介入前を 1 としたときのフラボノイド低減食の介入後の遺伝子発現量を「低後 / 低前」、フラボノイド低減食の介入前を 1 としたときの高フラボノイド食の介入前の遺伝子発現量を「高前 / 低前」、フラボノイド低減食の介入前を 1 としたときの高フラボノイド食の介入後の遺伝子発現量を「高後 / 低前」として表した。また、各被験者の遺伝子発現量の変動を図 1 に示した。

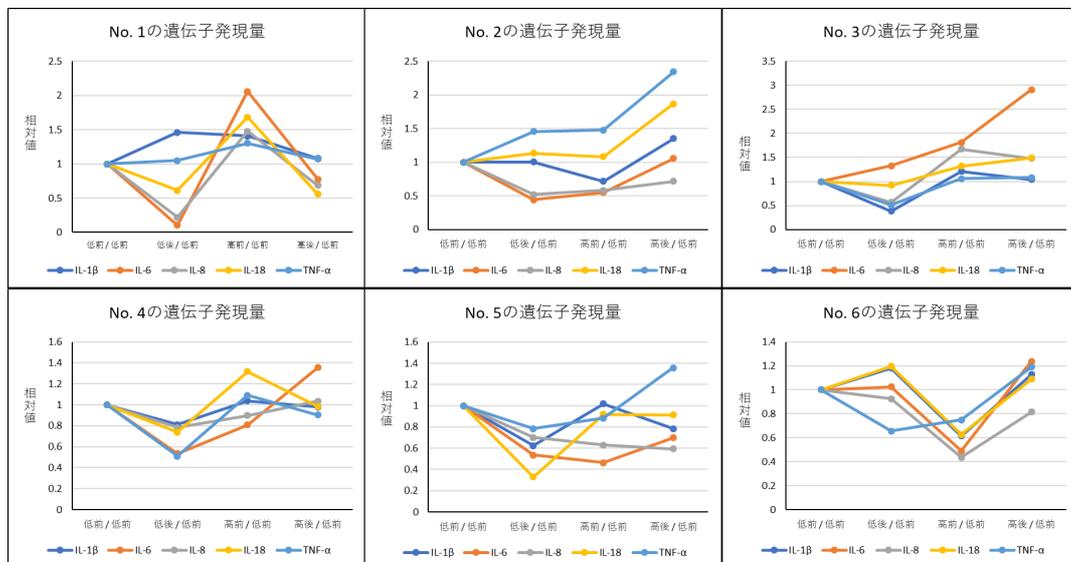


図 1. 各被験者の遺伝子発現量の変動

全被験者において、フラボノイド低減食の介入により、全てまたは一部の炎症性サイトカインに遺伝子発現量の低下が見られた。No. 3, No. 4, No. 5 では、高フラボノイド食の介入により、一部の炎症性サイトカインで遺伝子発現量の低下が見られた。一方、No. 2, No. 6 では高フラボノイド食の介入により全ての炎症性サイトカインの遺伝子発現量が増加した。

さらに、介入前の遺伝子発現量に対する、介入前後での遺伝子発現量の低下量の割合を遺伝子発現量の低下率と定義し、フラボノイド低減食の介入および高フラボノイド食の介入による低下率を、それぞれ下の算出式〔1〕により求めた。

遺伝子発現量の低下率(%)

$$= \{ 1 - (\text{介入後の遺伝子発現量} / \text{介入前の遺伝子発現量}) \} \times 100 \quad [1]$$

被験者ごとに、炎症性サイトカインの遺伝子発現量の低下率を図 2 に示した。フラボノイド低減食の介入時に比べ、高フラボノイド食の介入時で低下率が高い値を示したのは、No. 1 の IL-1 , IL-18, TNF- 、No. 3 の IL-1 , IL-8 のみであった。No. 2, No. 4, No. 5, No. 6 においては、全ての炎症性サイトカインにおいて、フラボノイド低減食の介入時に比べ、高フ

ラボノイド食の介入時で低下率が低い値を示した。

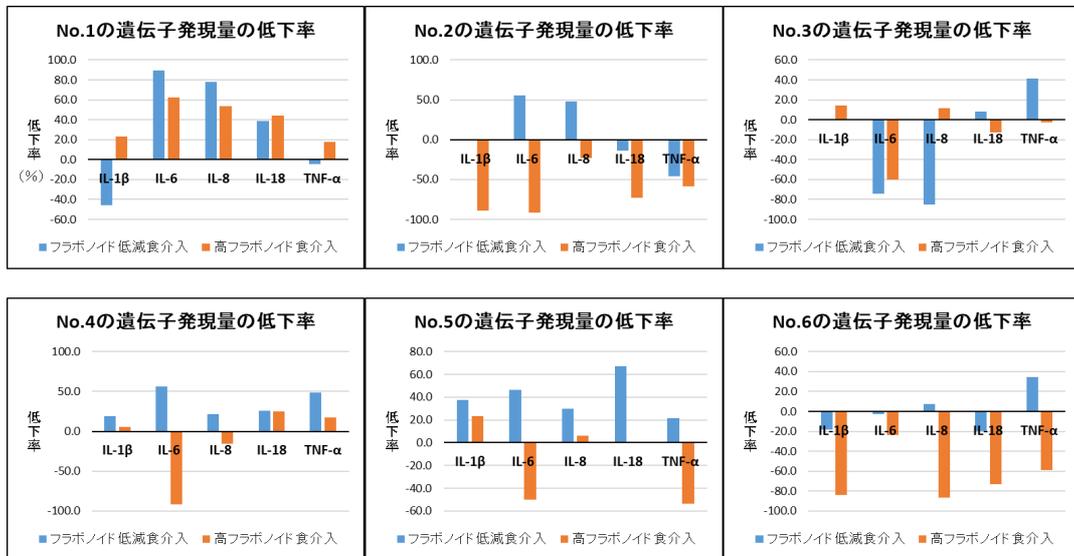


図 2. 各被験者の遺伝子発現量の低下率

図 1 より、フラボノイド低減食の介入では、全被験者で、測定を行った炎症性サイトカインにおいて遺伝子発現量の低下が見られた。この理由として、栄養バランスの整った食事を継続的に摂取したことにより、栄養状態が改善され、炎症が緩和されたと推察できる。

フラボノイド低減食の介入時に比べ、高フラボノイド食の介入時の方が大きな低下率を示したのは、No. 1 における IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、No. 3 における IL-1 β 、IL-8 のみであった。この 2 名におけるこの結果には、習慣的な摂取栄養量が影響していると考えられる。FFQg の結果より、この 2 名は、抗酸化能をもつビタミン A およびビタミン C の推定摂取量が日本人の食事摂取基準 (2015 年版) における推奨量の値を上回っていた。さらに、この 2 名はトコフェロールについても、その推定摂取量が目安量を上回っていた。Lee ら (Lee J H. *et al*, 2010) は、ビタミン A 誘導体の一種である all-trans-レチノイン酸が EGCg の作用を増強することを報告している。また、Yamashita ら (2016) は、ビタミン E の一種である α -トコトリエノールがバイカレインの作用を増加させることを報告している。これらの報告から、ビタミン A やビタミン E を習慣的に多く摂取している No. 1, No. 3 では、フラボノイドの機能性が増強された可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yasuda MT., Sakakibara, H., Shimoi, K.: Estrogen- and stress-induced DNA damage in breast cancer and chemoprevention with dietary flavonoid. *Genes Environ.*, 査読有
Published online 2017 Feb 1. doi: 10.1186/s41021-016-0071-7 (2017)

〔学会発表〕(計 7 件)

鈴木杏奈, 萬年遼, 大原裕也, 大槻尚子, 下位香代子, 市川陽子: 玉ねぎ摂取時のケルセチンの体内動態に対する調理方法の検討. 第 73 回日本栄養・食糧学会大会 (静岡) 講演要旨集, p.248, 2019 年 5 月

川崎杏香, 萬年遼, 大槻尚子, 下位香代子, 市川陽子: 食材中の機能性成分に調理の種類および調理後の時間経過が及ぼす影響. 第 73 回日本栄養・食糧学会大会 (静岡) 講演要旨集, p.249, 2019 年 5 月

萬年遼, 佐野文美, 市川陽子: 食材中の総ポリフェノール量およびフラボノイド量に調理が及ぼす影響. 第 65 回日本栄養改善学会学術総会 (新潟) 講演要旨集, p.179, 2018 年 9 月

萬年遼, 佐野文美, 市川陽子: 日常的な食品素材を用いた高フラボノイド食摂取による生体内抗炎症作用の検討. 第 64 回日本栄養改善学会学術総会 (徳島) 講演要旨集 p.236, 2017 年 9 月

萬年遼, 保田倫子, 佐野文美, 熊澤茂則, 合田敏尚, 下位香代子, 市川陽子: 日常的な食品素材を用いた高フラボノイド食摂取によるフラボノイド類の体内動態および生体内炎症マーカーの関連. 第 11 回日本ポリフェノール学会年次大会 (金沢), p.31, 2017 年 8 月

萬年遼, 保田倫子, 細谷孝博, 佐野文美, 熊澤茂則, 合田敏尚, 下位香代子, 市川陽子: ヒトにおける日常的な食品素材を用いた高フラボノイド食摂取後のフラボノイド類の体内動態の検討. 第 70 回日本栄養・食糧学会学術大会 (兵庫) 講演要旨集, p.321, 2016 年 5 月

隈本美佳子, 保田倫子, 細谷孝博, 萬年遼, 佐野文美, 下位香代子, 市川陽子: 食材のフラボノイド・総ポリフェノール含有量および抗酸化活性に調理が及ぼす影響についての検討. 第 70 回日本栄養・食糧学会学術大会 (兵庫) 講演要旨集, p.321, 2016 年 5 月

6 . 研究組織

(1)研究分担者

下位 香代子 (SHIMOI KAYOKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号: 10162728

合田 敏尚 (GODA TOSHINAO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号: 70195923

望月 和樹 (MOCHIZUKI KAZUKI)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号: 80423838

(2)連携研究者

保田 倫子 (YASUDA-TORII MICHIKO)

椋山女学園大学・講師

研究者番号: 00707036

佐野 文美 (SANO AYAMI)

常葉大学・健康プロデュース学部・講師

研究者番号: 20563399