

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：35304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700940

研究課題名(和文)加齢黄斑変性の予防を目的とした食品データベースの作成

研究課題名(英文)Creating a food database for the purpose of prevention of age-related macular degeneration

研究代表者

桐野 顕子(石川顕子)(KIRINO, AKIKO)

くらしき作陽大学・食文化学部・講師

研究者番号：10566574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：カロテノイド化合物のひとつであるルテイン及びゼアキサンチンは、加齢黄斑変性(AMD)の予防に寄与することが報告されている。本研究では、食品に含まれるAMDに対する有効成分量を明らかにすることを目的とし、高速液体クロマトグラフィーによる定量分析の条件を確立した。次いで、確立した方法を用いて、日本人が摂取する野菜などの食品を分析した結果、カボチャ、ホウレン草、小松菜に有効成分が豊富に含まれることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lutein and zeaxanthin, which are carotenoid compounds, have been reported that contribute to preventing age-related macular degeneration (AMD) by other researchers. In this study, we developed a method for the quantitative analysis of carotenoid compounds in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. Result of analysis of the vegetables the Japanese consume well, it has been revealed that lutein and zeaxanthin are included in pumpkin, spinach and komatsuna.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：カロテノイド 加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (AMD) は、年齢とともに黄斑色素量が減少することにより、物が歪んで見え、最悪の場合は失明する可能性がある眼疾患である。眼球の網膜、毛様体、虹彩、水晶体には、カロテノイド色素のひとつであるルテイン及びゼアキサンチンが存在し、なかでも黄斑色素として網膜中央に多く存在している。黄斑色素量の低値は、AMD の進行要因であるのか、或いは疾病により低値になったのかは明らかではないが、黄斑色素の少ない個体がより病気の進行をきたしやすいと推測されている。

ルテイン及びゼアキサンチンは通常体内では合成されないが、AMD 患者に対し、ルテインをサプリメントとして一日 10 mg 投与した場合、AMD の症状を改善させることが示されている (Ritcher S. et al. Optometry 2004)。その他の報告でも 10 mg / 日とするものが多く、AMD の予防目的においては、この値が現在のところ標準と考える。このように、サプリメントは AMD 予防において非常に効果的であると考えられるが、栄養学的な視点に立てば、日常の食生活の改善により健康増進を図り、疾病を未然に防ぐことが何よりも優先される。そこで、ルテイン及びゼアキサンチンを含む食物を日常的に摂取するなど食生活を工夫することにより、AMD の一次予防が可能であるのかどうかを検討する必要がある。そのためには、第一にどのような食品に有効な成分が豊富に含まれているのかを明らかにすることが望まれる。

ルテイン及びゼアキサンチンは、キサントフィル系のカロテノイド化合物であり、濃緑色野菜に豊富に存在することが知られている。これら食物中に含まれるカロテノイド化合物の含有量を示したデータベースは、米国農務省により既に公開されている (USDA Release 22. 2009)。我が国においては、同様のデータが作成されているものの、日本人がよく摂取する緑黄色野菜についてはまだ十分には検討されていない。従って、日本人向けのデータベースの構築が必要である。また、米国農務省が示す測定値においては、ルテインとゼアキサンチンは分別されておらず、両者を混合した値が示されている。ルテインとゼアキサンチンは互いに構造異性体の関係にあり、同じ働きを持つ成分として考えられてきた。一般に、食品中の存在量はゼアキサンチンよりもルテインが多いことから、当初はルテインに注目が集まっていた。しかし最近では、網膜の中心部にゼアキサンチンが多く、周辺部にルテインが多いという分布の違いから、両者は異なる働きを持つ可能性も考えられており、ゼアキサンチンの効能にも焦点が当てられている。そこで、これら 2 つの成分は完全に分離して検討することが望ましいと考える。このような状況下、本研究では AMD 予防の観点から、ルテイン及びゼアキサンチンを中心としたカロテノイド化合

物に着目し、これらの効率的な分別定量法を確立する。次いで、確立された分別定量法を用いて、食品中のカロテノイド化合物の含有量を明らかにする。

2. 研究の目的

カロテノイド化合物のひとつであるルテイン及びゼアキサンチンは、加齢黄斑変性 (AMD) の予防に寄与することが報告されている。昨今、食品が有する健康機能を利用し、疾病の予防もしくは治療の一端を担うことが期待されていることから、本研究では、下記の 2 項目を研究課題とする。

- (1) AMD 予防効果を有するルテインおよびゼアキサンチンをはじめカロテノイド化合物の分別定量法を確立する。
- (2) 日本人がよく摂取する食品に含まれるカロテノイド化合物の含有量を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料、試薬および器具

本研究に用いた実験材料および試薬、器具は以下に示した供給源より入手した。すなわち、実験に用いた食材は岡山県内のスーパーマーケットより入手した。カロテノイド化合物 (ルテイン、ゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン、 β -カロテン、 α -カロテン) は和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。また、その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。YMC Carotenoid C₃₀ カラム (3 μ m, 4.6 \times 150 mm) は、株式会社ワイエムシイ (京都) より購入した。

4. 研究成果

カロテノイド化合物の系統的な分析方法の開発

(1) C₃₀ カラムを用いた逆相 HPLC による標準カロテノイド化合物の分析

AMD 予防の有効成分であるルテインおよびゼアキサンチンを含むカロテノイド化合物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分別定量法の確立を行った。すなわち、カロテノイド化合物を良好に分離するために、溶媒の種類、溶出条件等を検討した。その結果、C₃₀ カラムを用い、メタノールを主溶媒とし、酢酸エチルを 15 分から 45 分の間に 0 - 20% の直線的濃度勾配とする溶出条件が、カロテノイド化合物の分別定量に最も適した方法であることが明らかとなった。流速は 1.0 ml/min である。カラムから溶出された成分は 450 nm における吸光度を測定することにより検出した。

Fig.1 には、上記の方法で分析して得られた 5 種の標準カロテノイド化合物 (ルテイン、

ゼアキサンチン, -クリプトキサンチン, -カロテン, -カロテン)の溶出パターンを示している. 図のように, 5種の標準カロテノイドは良好な分離を示した.

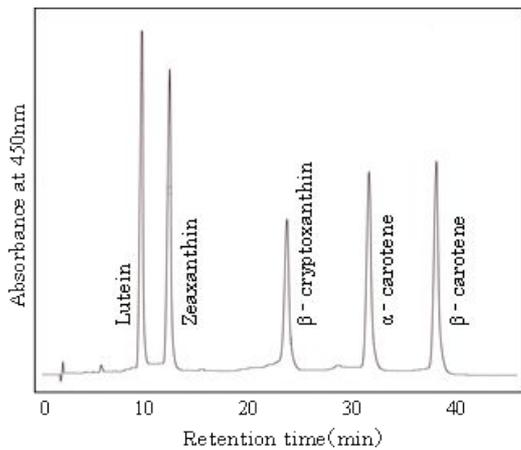


Fig.1 Elution pattern of authentic carotenoids on a YMC Carotenoid C₃₀ column.

(2) 植物性食品由来カロテノイド化合物の抽出条件の確立

カロテノイド化合物の HPLC 分析において, 野菜などの植物性食品に含まれるクロロフィルが妨害物質となる場合がある.

Fig. 2A に標準のクロロフィル a の HPLC 分析の結果とスペクトルを示した. Fig. 2B にはホウレン草の粗抽出液の溶出パターンを示している.

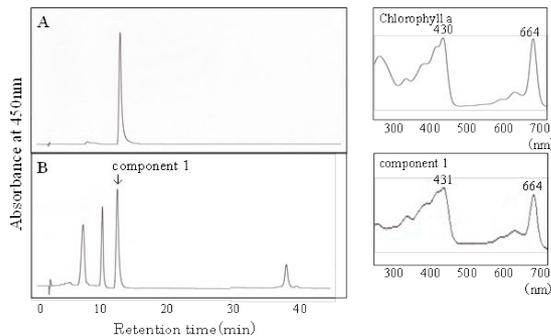


Fig.2 Elution Patterns of authentic chlorophyll a and spinach extract on a YMC Carotenoid C₃₀ column and spectra of authentic chlorophyll a and component 1 in UV and VIS regions.

A, authentic chlorophyll a ; B, spinach extract.

Fig. 2 に示すように, 標準のクロロフィル a と component 1 の溶出位置は一致している. さらに標準のクロロフィル a の最大吸収が 430,664(nm), component 1 の最大吸収が 430,664(nm)であり, 完全に一致している. これらの結果から component 1 はクロロフィル a であることが示される. また, クロロフィル a の溶出位置は, ゼアキサンチンの溶出位置とも重なっており, ゼアキサンチンの分

析において, クロロフィル a が妨害物質となりうることを確認された.

そこで, クロロフィルの除去を兼ねたカロテノイド化合物の抽出方法を検討した. 確立された抽出方法は下記の通りである. 試料を 100%エタノールにより抽出したのち, アセトン-ヘキサン (4:1, v/v) にて分配し, 上層をけん化処理に供した. けん化は, 60%水酸化カリウムを添加し, 70 °C の水浴で 30 分間保温することによって行った. けん化した抽出液にヘキサンと飽和食塩水にて分配し, ヘキサン層を HPLC 分析に使用した.

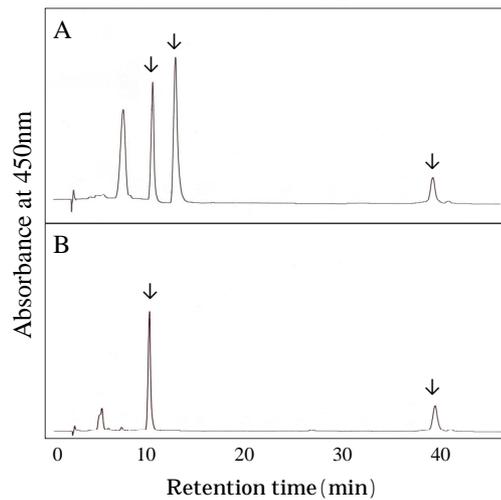


Fig.3 Elution Patterns of carotenoid compounds in spinach extract on a YMC Carotenoid C₃₀ column.

A, spinach extract was not saponified; B, spinach extract was saponified.

↓ represents the peak of lutein,

↓ represents the peak of chlorophyll a,

↓ represents the peak of β-carotene.

Fig. 3 は, ホウレン草の粗抽出液 (A) とけん化処理を行ったホウレン草抽出液 (B) の HPLC における溶出挙動を示している. 粗抽出液には, クロロフィル b, ルテイン, クロロフィル a/ゼアキサンチン, -カロテンの溶出時間を示すピークが見出された. Fig. 3B に示すように, けん化処理によりクロロフィルに相当するピークが完全に消失しており, 他の溶出位置にもピークは全く認められなかった.

以上の結果は, 野菜抽出液からクロロフィル化合物を除去し, カロテノイドの分析を良好に行うためには, けん化処理が有効であることを示している.

本法において, 抽出処理から分析に至る一連の過程におけるカロテノイド化合物の回収率は, 95%以上であり, 分析方法として十分に耐え得るものである.

植物性食品におけるカロテノイドの分析

確立された分析方法を用いて, 野菜に含まれるカロテノイド化合物の分析を行った. 日本人がよく摂取するホウレン草, 小松菜, 青

梗菜，ピーマン，ニラ，カボチャ，紫蘇，カイワレ大根，トウモロコシなどについて分析を行った。HPLC 分析の結果を Table 1 にまとめている。

分析に用いた食材の中で，特に，ほうれん草，小松菜，カボチャ，ニラ，赤とうがらし，紫蘇にルテインが豊富に含まれ、トウモロコシ，赤ピーマン，赤とうがらしにゼアキサントシンが多いことが明らかとなった。これらのうち，日本人の日常の摂取頻度および摂取量を考慮すると，ほうれん草，小松菜，カボチャが AMD 予防に有効であることが示唆された。

今後は，有効成分の含有量の多い食材に注目し，調理条件による成分の安定性について検討を行うことが課題である。

Table 1. Contents of the carotenoids in vegetables.

	Lutein ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Zeaxanthin ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Cryptoxanthin ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Carotene ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Carotene ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Spinach	9,300 \pm 860	-	-	-	5,050 \pm 530
Komatsuna	4,100 \pm 10	-	-	-	2,400 \pm 80
Qinggengcai	1,790 \pm 530	-	-	-	1,670 \pm 460
Carrot	90 \pm 10	-	20 \pm 20	1,020 \pm 100	2,130 \pm 240
Broccoli	1,260 \pm 530	5 \pm 2	3 \pm 2	5 \pm 1	590 \pm 210
Pumpkin	4,700 \pm 1,860	45 \pm 18	20 \pm 6	20 \pm 7	2,800 \pm 190
Sweet corn	460 \pm 80	340 \pm 70	-	-	-
Cucumber	840 \pm 160	-	-	-	330 \pm 40
white radish sprouts	2,700 \pm 290	-	-	-	1,860 \pm 240
Leek	5,250 \pm 660	-	-	-	3,640 \pm 840
Green pepper	1,380 \pm 240	-	-	-	730 \pm 50
Red pepper	1,020 \pm 640	490 \pm 320	100 \pm 30	-	180 \pm 40
Chili pepper	15,370 \pm 3,820	19,370 \pm 5,080	10,930 \pm 6,720	550 \pm 730	5,530 \pm 1,500
Penilla	8,500 \pm 4,400	-	-	-	6,420 \pm 2,540

Mean \pm SD (n=3)

5. 主な発表論文等

(研究代表者，研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 1 件)

石川顕子，原田真梨菜，尾花明，阪田功，鈴木麻希子，山下広美，木本真順美，辻英明．
野菜類におけるカロテノイド化合物の分析．
第 65 回 日本栄養・食糧学会大会．2011 年
5 月 14 日 東京．

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐野 顕子 (KIRINO AKIKO)

くらしき作陽大学・食文化学部・講師

研究者番号：10566574