

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292017

研究課題名(和文) 北方系ベリー類果実の抗酸化機能性評価に関わる諸要因の解析

研究課題名(英文) Analyses on multiple factors related to evaluation of antioxidant function of northern berries

研究代表者

鈴木 卓 (SUZUKI, Takashi)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30196836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ベリー類に含まれるアントシアニンなどの抗酸化成分が持つ機能に注目が集まっている。本研究では、北方系ベリー類(スノキ属、ブドウ属、キイチゴ属、ハスカップなどの栽培品種および北海道に自生する近縁種を含む)果実に含有する抗酸化成分の特徴(種・品種間差、年次変動など)を明らかにし、栄養学的な知見を広げようと考えた。また、DPPH、ORACおよびESRスピントラップ法を用いて各種ラジカルに対する抗酸化活性を測定し、含有成分との関連を調べた。さらに、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素をラットに給餌した場合の腸管におけるアントシアニン吸収動態、並びに脂質異常症および腎機能に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recent researches have focused on functions of antioxidants like anthocyanin in berries. In order to clarify yearly variations and species/cultivar differences that will present useful knowledge for nutrition of foods, component of antioxidants and antioxidant activities were examined with several northern berries (*Vaccinium*, *Vitis*, *Rubus*, *Lonicera*, etc.) including cultivars and wild species originating from Hokkaido, Japan. DPPH assay, ORAC assay and ESR spin trapping were employed for evaluating antioxidant activities against DPPH, ROO and OH radicals, respectively. Then, relationship between content of antioxidants and each antioxidant activity was statistically analyzed. Dynamics of anthocyanin absorption at intestine were examined using rats with or without feeding pigments from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and Haskap (*Lonicera caerulea*). Furthermore, the effects of feeding those pigments on improvement of hyperlipidemia and renal damage in rats were also investigated.

研究分野：園芸学

キーワード：小果樹 活性酸素種(ROS) 抗酸化 ラジカル捕捉活性 アントシアニン ポリフェノール 食餌性肥満ラット

1. 研究開始当初の背景

近年、「ブドウ(赤ワイン)やブルーベリー果実に含まれるアントシアニンが健康増進に効果的」という意識の広がりを受けて、ベリー類果実全般の生体調節機能(特に抗酸化能)に注目が集まっている。しかし、種、品種、栽培条件等の違いに伴う材料ごとの成分の特徴に関する情報は乏しい現状にある。また、青果物がもつ抗酸化能はこれまで多様な方法により評価されてきたが、基準が異なるため材料どうしを比較できないという問題がある。この理由として、生体内酸化の原因物質である活性酸素種が複数存在し、捕捉されるラジカルの種類が評価法ごとに異なる点が挙げられる。果実は、ポリフェノール化合物をはじめ、カロテノイドやアスコルビン酸など多種類の抗酸化成分を含有しており、含有成分と活性酸素種との対応関係を明らかにすることが求められている。

さらに、食物として摂取された果実含有成分がヒト(動物)の生体中で抗酸化機能を発揮するには、腸管から吸収されることが大前提となるが、その体内吸収および代謝に関連した情報も現状では限られている。例えば、アントシアニンが吸収される消化管の部位や、アントシアニンの種類ごとの吸収特性に関する情報など未解明の点が多数残されている。また、吸収されずに腸管内に残ったアントシアニンの機能についても、その解明が求められている。

2. 研究の目的

機能性成分を豊富に含む北方系ベリー類果実(アロニア、ハスカップ、ブルーベリー、ラズベリー、ブラックベリー、ブドウなど栽培種(品種・系統)に加え、北海道に自生する多数の野生小果樹(*Lonicera*、*Rubus*、*Vaccinium*、*Vitis*属など)が含有する機能性成分を解析するとともに、DPPH、ORACおよびESRスピントラップ法を用いて各種ラジカルに対する抗酸化能の評価を試み、それらの比較から各指標の有効性および果実含有成分との関連を明らかにする。

また、果実含有機能性成分のうち特にアントシアニンに着目し、生体解剖したラットの消化管の一部を結紮し(消化管結紮ループ法)そこに連結した血管から経時的に採血する方法により、消化管におけるアントシアニン吸収部位を特定する。さらに、給餌中のアントシアニン組成と血液中に出現するそれを比較し、血中濃度の変化を経時的に追跡することにより、アントシアニンの種類に基づく吸収動態の違いを明らかにする。また、吸収されずに消化管内に残ったアントシアニンが、消化管内の細菌叢および脂質代謝に及ぼす影響についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 機能性成分分析と抗酸化能評価
植物材料

ブルーベリーおよびスノキ属野生種: 2008~2010年8月に北海道中央農試(長沼町)果樹園のハイブッシュ・ブルーベリー8品種から果実を採取した。同年7~9月に、北海道林試(美幌市)見本園のオオバスノキ(*Vaccinium smallii*)およびイワツツジ(*V. praestans*)、美幌市公園内のナツハゼ(*V. oldhamii*)、新十津川町のアキシバ(*V. japonicum*)並びに比布町山林に自生しているクロウスゴ(*V. ovalifolium*)から成熟果を採取し材料とした。

キイチゴ類: 2010年7~8月に北海道林試の見本園に栽植されている野生種のクロイチゴ(*Rubus mesogaeus*)、クマイチゴ(*R. crataegifolius*)、エビガライチゴ(*R. phoenicolasius*)およびナワシロイチゴ(*R. parvifolius*)から、果実を採取した。また、農研機構北海道農研の圃場に栽植されている栽培種のラズベリー(*R. idaeus*)17品種ならびにブラックベリー(*R. fruitcosus*)2品種から同様に果実を採取し材料とした。

ハスカップ(*Lonicera caerulea*): 2011および2013年の6月下旬から7月上旬にかけて、北海道苫小牧市柏原の勇弘原野に自生する野生個体100株、ならびに約30年前に同一地区から堀上げ北大農場(札幌市)に移植した株(約50株)のうち現存する31株から果実を採取した。この場合、両年とも栽培株は同一の31株とし、野生株は任意に選んだ100株を用いた。

ヤマブドウ(*Vitis coignetiae*): 2013年10月に、北海道内各地のヤマブドウ野生株193株から果実を採取した。また、ヤマブドウを片親とする栽培品種‘清舞’および‘山幸’(十勝ワイナリー)‘北醇’および‘山ソーヴィニオン’(ばんけい峠のワイナリー)ならびに‘Yo’、‘イワマツ’、‘国豊’および‘ヒマラヤ’(マオイワイナリー)の全22株(栽培株)からも果実を採取し対照とした。

採取後の果実は、すべて凍結乾燥・粉末化し、分析まで-30℃で保存した。

実験方法

1) 果実含有成分の分析

果実の総ポリフェノール含量はフォーリンデニス法で、アントシアニン含量および組成はMALDI-TOF MSで、総アスコルビン酸(ビタミンC)含量は96穴マイクロプレートを用いてヒドラジン比色法で、遊離糖および有機酸含量はHPLCで各々分析した。

2) 抗酸化能の評価

DPPH法(DPPHラジカル捕捉活性値)、ORAC法(ROOラジカル捕捉活性値)、ESRスピントラップ法(OHラジカル捕捉活性値)を各材料について測定し、抗酸化成分含量との関連を調べた。なお、ESR法では、スピントラップ試薬としてCYPMPPOを使用した。

(2) ラット腸管におけるアントシアニン吸収動態の解析

2010年に収穫したアロニアおよびハスカ

ップの成熟果から、80%エタノールで抽出し、乾燥・粉末化したアントシアニン抽出物を材料とした。ラット小腸におけるアントシアニン吸収動態を調査するため、SD 系雄性ラット(7週齢)を24時間絶食後麻酔下で開腹し、作製した小腸結紮ループ中に抽出物1%アントシアニン溶液各5mlを注入した。注入5~30分後に、総胆管から胆汁液を採取し、門脈および下大静脈から採血した。これらの試料からアントシアニンを常法に基づき抽出し、LC-MSで分析した。

(3)ラットの脂質代謝、血糖値および抗酸化機能に及ぼすベリー類色素給餌の効果

アロニア、ハスカップおよびビルベリー果実の抽出色素は、日本新薬(株)が精製したものを使用した。

脂質を負荷したラットの血中脂質および血糖値上昇に及ぼす色素投与の効果:SD系雄性ラット(6週齢)に色素溶液を経口投与し、さらにその30分後にコーンオイルエマルジョン(CO)を経口投与し、経時的に血中中性脂肪(TG)およびグルコース濃度を測定した。また、色素投与が膵リパーゼ活性に及ぼす影響も調査した。

高脂肪飼料給餌ラットに対する色素の抗肥満効果:SD系雄性ラット(4週齢)に25%高脂肪飼料+0.4%色素添加飼料を4週間給餌し、解剖後に各種分析を行った。この場合、色素無添加群を設け、対照区とした。

4. 研究成果

(1) 機能性成分分析と抗酸化能評価

果実内成分の個体間差および年次変動

1)ハスカップ

野生100株および栽培31株について株ごとの平均値に基づきヒストグラムを作成し比較したところ、各形質は幅広い分布を示し、ハスカップ集団が多様性を内包していることが確認された。果実から検出された遊離糖は主に3種類で、その組成比はほぼ一定(果糖:ブドウ糖:ショ糖=51/45/4 wt%)であった。有機酸は主にクエン酸とリンゴ酸の2種類で、65%以上をクエン酸が占めていた。アントシアニンは10種類が検出され、このうちcyanidin 3-glucosideが約60%を占めていたが、その組成比に顕著な差は認められなかった。アントシアニン総含量を比べると、年次にかかわらず野生個体群は正規分布を示さず、顕著に高い値を示す個体の存在が確認された。また、栽培個体群では、年次にかかわらず果実が大型化し、有機酸含量およびアントシアニン含量の分散が小さくなる傾向が確認された。生育環境(土壌および日照条件等)の違いが果実形質に影響を及ぼしたものと考えられる。

2)ヤマブドウ

野生株果実から14種類のアントシアニンが検出された。この中には、ヤマブドウ果実に関する既報(Oh et al., 2008)にはない、3

種類のアントシアニンが含まれていた。測定した果実の諸形質(1果重、総糖含量、総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量)全てについて野生株のヒストグラムは正規分布を示した。また、野生株の1果重および総糖含量は栽培株のそれより小さく、逆に総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量は大きな値を示し、両者の平均値間に統計的有意差が認められた($p < 0.05$)。

次に、野生株を採集場所ごとに4地域に分け、各形質を比較したところ、生重量は道南で値が大きく、逆に総アントシアニン含量および総ポリフェノール含量は道北で値が大きく、いずれも他地域との間に統計的有意差($p < 0.05$)が認められた。従って、北海道に自生するヤマブドウの果実形質には、環境要因が影響を及ぼしているものと考えられる。また、栽培株は、野生株より果実が大きく糖を集積しやすい反面、アントシアニンなどのポリフェノール含量が少ない特徴を有することがわかった。

抗酸化成分と抗酸化能(各種ラジカル捕捉活性)との関連

1)スノキ属(*Vaccinium*)およびキイチゴ属(*Rubus*)

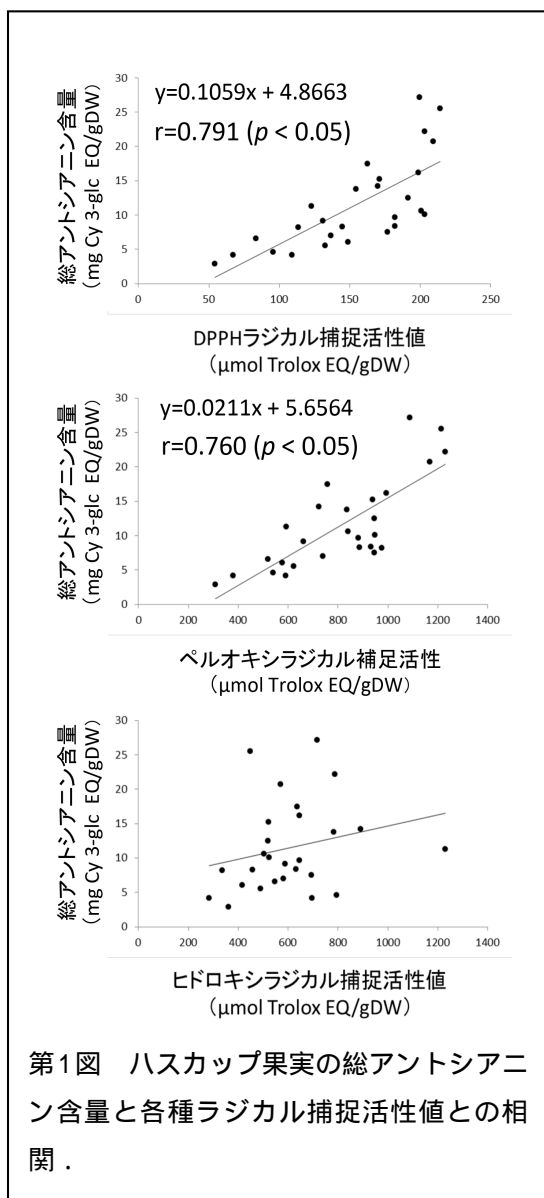
ブルーベリー栽培8品種およびスノキ属野生種(5種)から2008~2010年(3か年)に採取した果実について、DPPHラジカル捕捉活性と総アントシアニン含量との間に、 $r=0.86$ ($n=29$)の高い正の相関が認められた。従って、スノキ属果実の抗酸化能は、アントシアニン含量に大きく依存しているものと考えられる。

キイチゴ属では、総アントシアニン含量の種および品種間差は大きく、ブラックラズベリー'Black Cap'で最も高く、次いで野生種のクロイチゴが比較的高い値を示した。これらは、抗酸化活性値も高かった。一方、アントシアニン含量が少ない黄色果や赤色果のラズベリーも比較的高い抗酸化活性値を示したことから、これらの抗酸化能にアントシアニン以外の成分が関与している可能性が考えられる。

2)ハスカップ

北大農場に栽植してあるハスカップ栽培株(31株)について、2011年と2013年に採取した果実のDPPHラジカル捕捉活性値の相関を調べたところ、 $r=0.856$ ($n=31$)の高い正の相関関係が認められた。従って、果実抗酸化能の高低は、遺伝的影響を強く受けているものと考えられる。また、総アントシアニン含量と各種ラジカル捕捉活性値との相関を見たところ(第1図)、総アントシアニン含量はDPPHラジカル捕捉活性値およびペルオキシ(ROO)ラジカル捕捉活性値との間に強い正の相関関係を示したのに対し、ヒドロキシ(OH)ラジカル捕捉活性値との間に

は統計的に有意な相関は認められなかった (桑山ら, 園学研 13(別 2):96, 2014)



3) ヤマブドウ

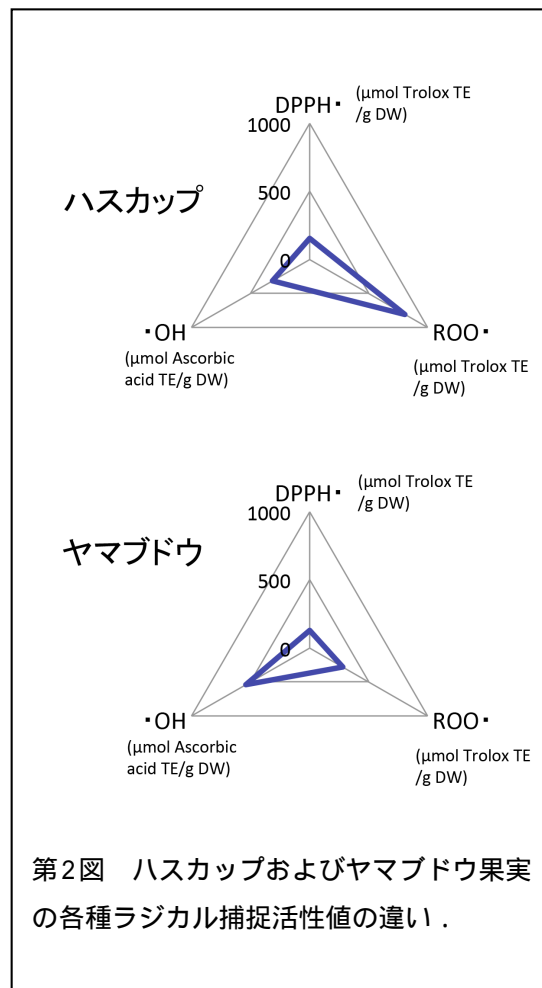
ヤマブドウ果実の各抗酸化活性値およびポリフェノール含量には、幅広い個体間差が認められた。そこで、これらの関連を調べたところ、DPPHおよびROOラジカル捕捉活性値と総ポリフェノール含量の間には、各々正の相関関係 ($r=0.78$ および $r=0.73$) が認められた。しかし、OHラジカル捕捉活性値と総ポリフェノール含量に相関関係は確認されなかった。また、総アントシアニン含量は、どの抗酸化活性値とも有意な相関を示さなかった。

以上のことから、ヤマブドウ果実に含まれるポリフェノール類は、DPPHおよびROOラジカルの捕捉に機能を発揮するが、スノキ属やハスカップ果実とは異なり、この作用にはアントシアニン以外の成分が寄与しているものと考えられる (堀川ら, 園学研 14(別 1):83, 2015; 堀川ら, 園学研 14(別 2):106,

2015)

4) ハスカップおよびヤマブドウ果実が持つ抗酸化能の特徴

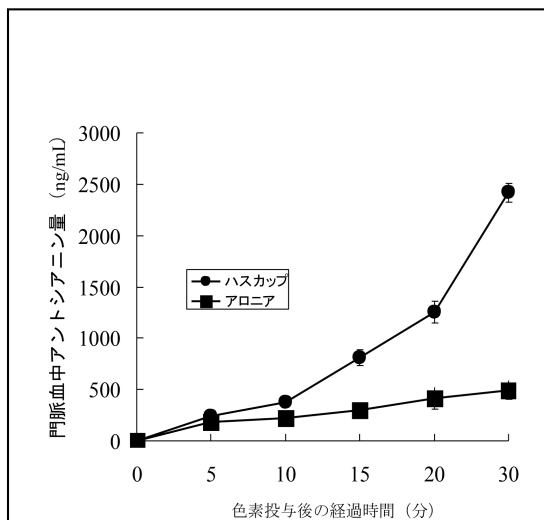
第2図にハスカップおよびヤマブドウ果実の抗酸化活性値を比較したレーダーチャートを示した。これによると、両果実で抗酸化活性値は大きく異なり、ハスカップはヤマブドウに比べ、ペルオキシラジカル捕捉活性値が高く、ヒドロキシラジカル捕捉活性値が低いという特徴を持つことが明らかになった。この事実は、複数のラジカル捕捉活性値を用いて、果実が持つ抗酸化能をより客観的かつ多面的に比較できることを示している。



(2) ラット腸管におけるアントシアニン吸収動態の解析

ラット小腸におけるアントシアニンの吸収動態を明らかにするため、胆膵液、門脈血および下大静脈血を調べたところ、その何れからアントシアニンが検出された。この場合、アロニアおよびハスカップ抽出物に含まれるアントシアニンの主体は、各々Cy 3-galおよびCy 3-glcであることがわかっている。アロニアおよびハスカップ抽出物を施用したラットから、各々Cy 3-galおよびCy 3-glcが検出されたことから、胆膵液および血液中に認められたアントシアニンは何れも施用

した色素抽出物に由来すると考えられる。従って、果実のアントシアニンは、小腸から吸収されることが確認された。また、アロニアとハスカップを比較すると、胆嚢液、門脈血および下大静脈血のすべてにおいて、アントシアニン濃度はハスカップで高い値を示した。施用した抽出液における Cy 3-glc および Cy 3-gal の濃度はほぼ同じであった点を考慮すると、Cy 3-glc は Cy 3-gal に比べ小腸での吸収が速いことが考えられる。そこで、色素抽出物施用後の門脈血中アントシアニン濃度を、タイムコースで追跡した結果、施用 15～30 分後に、ハスカップ色素施用区でアントシアニン濃度が顕著に高くなることを確認した（第 3 図）。この事実は、ラット腸管において Cy 3-glc は Cy 3-gal よりも吸収されやすいことを示しており、アントシアニンの種類により、腸管における吸収動態が異なることが明らかになった。



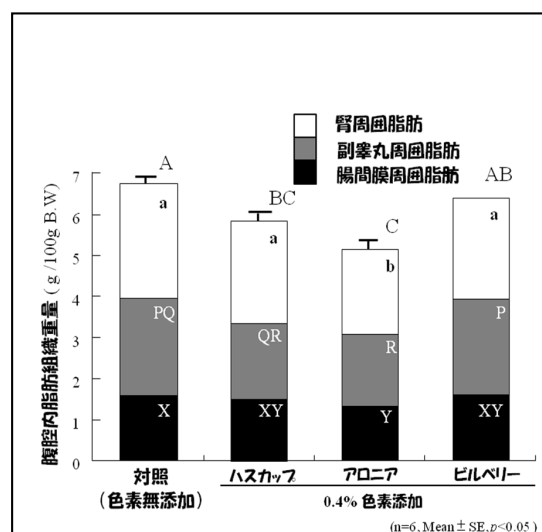
第3図 アロニアおよびハスカップ色素抽出液を小腸結紮ループ法により施用したラットにおける門脈血中アントシアニン濃度の推移。

(3)ラットの脂質代謝、血糖値および抗酸化機能に及ぼすベリー類色素給餌の効果

高脂肪試料給餌ラットの肥満および血中脂質組織に及ぼす色素添加の影響を見たところ、ハスカップ色素添加区の LDL コレステロール値が対照区と比べ有意に低く、アロニア色素添加区でも同様の傾向が認められた。また、これらの色素添加区では、血糖値および腹腔内脂肪組織の総重量が、何れも対照区より有意に低かった（第 4 図）。この場合、脂肪組織別で比較すると、アロニア色素添加区の腎および腸間膜周囲脂肪組織重量は、対照区およびビルベリー色素添加区と比べ有意に値が低く、アロニアおよびハスカ

ップ色素添加区の副睾丸周囲脂肪組織重量は、ビルベリー色素添加区のそれより有意に低い値を示した。従って、果実色素を添加した高脂肪飼料を比較的長期間（4 週間）摂取させたラットでは内臓脂肪が付きにくく、果実色素は内臓脂肪型肥満の抑制に効果のあることが明らかになった（Takahashi et al., 2014; 2015）。これと関連して、色素添加区は盲腸内の pH が低く、色素添加区と対照区で腸内細菌叢に顕著な差異が確認された。

さらに、ラットに臭素酸カリウムを経口投与して人為的に腎障害を誘発させる実験で、アロニアおよびハスカップ色素抽出物を同時に投与すると、腎障害が軽減されることを確認した。これは、アントシアニンを高濃度で含む色素抽出物の、高い抗酸化活性に依存することを確認した（高橋ら, 2015）。



第4図 飼料へ添加した果実色素が高脂肪給餌ラットの腹腔内脂肪組織重量に及ぼす影響。

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）

〔雑誌論文〕(計 8 件)

堀川謙太郎・志村華子・実山 豊・鶴飼光子・鈴木 卓, 2015, 北海道内各地で採集したヤマブドウ果実の 3 種類の抗酸化活性値とポリフェノール含量の関連, 園学研 14(別 2): 106 (査読無)

A. Takahashi, H. Shimizu, Y. Okazaki, H. Sakaguchi, T. Taira, T. Suzuki, H. Chiji, 2015, Anthocyanin-rich phytochemicals from aronia fruits inhibit visceral fat accumulation and hyperglycemia in high-fat diet-induced dietary obese rats,

Journal of Oleo Science, 64: 1243-1250 (査読有)

堀川謙太郎・志村華子・鈴木卓, 2015, 北海道内で採集したヤマブドウ果実の遊離糖およびアントシアニン含量の多様性, 園学研 14(別 1): 83 (査読無)

高橋あずさ・渡辺 純・坂口博英・岡崎由佳子・鈴木卓・知地英征, 2015, アントシアニン高含有アロニアおよびハスカップ果実抽出物は臭素酸カリウム誘導酸化障害を低減する, 日本食品科学工学会誌, 62: 235-241 (査読有)

阿部圭馬・松浦英幸・鶴飼光子・志村華子・鈴木卓, 2014, エゾワサビの主要な抗酸化成分ジフェルロイルスペルミンの同定, 園学研 13(別 2): 249 (査読無)

桑山健二・高橋あずさ・久保勇喜・志村華子・鈴木卓, 2014, ハスカップ野生個体群および同一自生地から移植した栽培個体群における果実多様性の差異, 園学研 13(別 2): 96 (査読無)

A. Takahashi, Y. Okazaki, A. Nakamoto, S. Watanabe, H. Sakaguchi, Y. Tagashira, A. Kagii, S. Nakagawara, O. Higuchi, T. Suzuki, H. Chiji, 2014, Dietary anthocyanin-rich Haskap phytochemicals inhibit postprandial hyperlipidemia and hyperglycemia in rat, Journal of Oleo Science, 63: 201-209 (査読有)

高橋あずさ・清水久恵・白崎はるの・福田絵里・坂口博英・知地英征・鈴木卓, 2013, アロニアおよびハスカップ果実色素給餌によるラット脂質異常症の改善, 園学研 12(別 1): 241 (査読無)

〔学会発表〕(計 2 件)

T. Suzuki et al., Comparison of anthocyanin component in fruits of blueberry cultivars and wild Vaccinium spp. originating from Japan related to antioxidant activity, 14th International Nutrition & Diagnostics Conference, September 2-5, 2014, Prague (Czech Republic)

M. Ukai, T. Suzuki et al., Radical scavenging activities of plant food using ESR spin trap method, 14th International Nutrition & Diagnostics Conference, September 2-5, 2014, Prague (Czech Republic)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木卓 (SUZUKI, Takashi)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 30196836

(2)研究分担者

鶴飼光子 (UKAI, Mitsuko)
北海道教育大学・教育学部・教授
研究者番号: 20160228

岡崎由佳子 (OKAZAKI, Yukako)
藤女子大学・人間生活学部・准教授
研究者番号: 30105712

(3)連携研究者

()
研究者番号: