

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350114

研究課題名(和文) 紫黒米の調理過程で生成するアントシアニンの熱分解物の生体内抗酸化作用に関する研究

研究課題名(英文) The study of antioxidant activity of a degraded product derived from anthocyanin in purple-black rice during cooking

研究代表者

近藤 美樹 (Kondo, Miki)

徳島文理大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：80326412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：プロトカテキュ酸(PCA)は、紫黒米の主要色素であるシアニジン-3-グルコシド(C3G)の熱分解物である。PCAの抗酸化作用をモデル動物を用いてC3Gと比較した。さらに紫黒米摂取が脂質代謝に及ぼす影響を加熱・非加熱の差異に焦点を当てて検討した。PCA投与は鉄誘導性酸化マウスの血漿過酸化脂質の生成を抑制し、PCAの抗酸化作用はC3Gよりも高いことが示された。調理済み食餌性紫黒米は、高コレステロール高脂肪食飼育マウスの血漿HDL-コレステロール濃度の低下を有意に抑制した。以上より、調理済み紫黒米の摂取は脂質代謝異常を改善し、その効果にはPCAの抗酸化性の優位性が関与することが推察された。

研究成果の概要(英文)：Protocatechuic acid (PCA) is a degraded product derived from cyanidin-3-glucoside (C3G) during thermal cooking. In this study, the inhibitory effect of antioxidant activity of PCA was compared with C3G in vivo. Moreover, the effect of dietary purple-black rice on hyperlipidemia was examined in high-cholesterol and high-fat diet-fed mice. The thiobarbituric acid reactive substances levels of plasma and the renal homogenate were lower in mice administered PCA before the induction of oxidative stress with iron ions than that in mice administered C3G. Dietary purple-black rice led to increased HDL-cholesterol concentration in the plasma of mice. Furthermore, the improvement effect was higher in the cooked rice than that in the uncooked rice. These findings suggest that purple-black rice likely suppresses plasma lipid metabolism abnormalities. One of the probable reasons for this effective suppression by heating is the superior antioxidant properties of PCA, compared to C3G.

研究分野：食生活

キーワード：シアニジン-3-グルコシド プロトカテキュ酸 調理・加工 抗酸化作用 脂質異常症

1. 研究開始当初の背景

紫黒米に含まれるアントシアニン色素のシアニジン-3-グルコシド(C3G)は抗酸化作用に代表される多機能を有し、過剰な活性酸素を要因とする生活習慣病の予防の観点から注目されている。しかし、熱安定性や吸収性の低さが利用上の課題として挙げられる。黒大豆や紫黒米は消化吸収の面から加熱調理後に摂取される食品であるが、ヒトが食生活で摂取する形態による C3G の挙動や機能性を評価した研究が少ない。これまで我々は、食品中の C3G は調理・加工過程でプロトカテキュ酸(PCA)に分解されるが、PCA が C3G よりも高い抗酸化性および吸収性を有し、調理後の C3G 由来の機能性成分の本体は PCA であること示してきた。

2. 研究の目的

C3G の熱分解産物である PCA の抗酸化作用を中心とした生活習慣病の発症・進展抑制効果について、生体の酸化に起因する疾病モデル動物を用いて明らかにすることを目的とした。

すなわち、市販標品の C3G 及び PCA、さらに PCA の給源として実際の摂取形態に炊飯調理した紫黒米を試料として用い、生体内での有効性を明確にすることを目的に、(1) 急性な酸化誘導動物への PCA の単回投与による抗酸化作用を C3G と比較検討する。(2) 生活習慣病の疾病モデルとして高コレステロール血症動物を作製し、紫黒米(炊飯)ならびに PCA の長期間の継続摂取による疾病抑制効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 酸化モデル動物における C3G およびその熱分解物である PCA の抗酸化作用の検討

1-1) 酸化モデルマウスの作製

鉄の投与により腎臓を中心とした急性な酸化を誘導する疾病モデル動物とし、鉄ニトリロ三酢酸の投与により酸化ストレス動物を作成した。すなわち、ICR マウス、雄性、6週令に鉄ニトリロ三酢酸を体重 1kg あたり鉄 10 mg となるように腹腔内投与した。1 時間後に解剖して、ヘパリン存在下で全血を回収し、遠心により得られた血漿を酸化の指標として、活性酸素消去能(ORAC)、チオバルピツール酸反応物質(TBARS)を測定し、酸化誘導を鉄未投与群との比較により確認した。

1-2) C3G および PCA 投与酸化誘導マウスの血漿、腎臓・肝臓ホモジネートにおける抗酸化性の測定

C3G および PCA を各々 ICR マウス、雄性、6週令に、0.25 ならびに 0.5 mmol/kg の濃度でゾンデにて投与し、30 分後に、1-1) の方法に従い酸化誘導し、その 1 時間後に解剖して血液、腎臓、肝臓を採取した。血漿の TBARS 値ならびに ORAC 値を測定し、各組

織ホモジネートについては TBARS 値を測定した。比較対照として既知の抗酸化物質である、カテキンを同濃度にて用いた。

2-3) 抗酸化酵素の酵素活性の測定

抗酸化作用の作用機序の解明の一端として、組織ホモジネートから粗素液を調製し、活性酸素種の消去能を有する酵素群、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、グルタチオンレダクターゼ(GR)の酵素活性を Cayman Chem. Co.のキットを用いて測定した。

(2) 高コレステロール血症モデル動物における食餌性紫黒米(調理前後)の影響

2-1) 高コレステロール血症モデル動物の作製方法の確立

C57BL/6J マウス、雄性、4週令のマウスを1週間普通食にて予備飼育後、Jang らの基本組成(*Nutr Metab.* 2012, 9(1), 27.)に、高脂肪食を併用し、2%コレステロールならびに 40%脂肪(ラード)食により飼育した。

2-2) 試料の調製

2-3)の摂食実験に先立ち、餌に混合する紫黒米の調製を行った。精米により糠部分と胚乳に分け、胚乳部分を炊飯した後に糠を添加したものを未加熱用とし、一方、胚乳に糠を加えた後に炊飯したものを加熱用試料とした。また、比較として玄米及び精白米も同様に実施した。さらに、紫黒米については、糠のみも調製した。炊飯後の試料は急速凍結し、粉碎して用いた。

2-3) 摂食実験

2%コレステロール-40%脂肪食群(HCHFD)に2-2)で調製した各種米ならびに飯の粉碎試料を、スターチと重量で20%置換した餌を作成した。すなわち、非加熱・加熱の紫黒米群(PN・PC)および非加熱・加熱の玄米粉群(BN・BC)、加熱の胚乳群(Es)、非加熱・加熱の紫黒米糠群(PbN・PbC)、PCAの影響を直接的に検討する目的で、PCAの標準品1%添加群(PCA)を設けた。飼育期間中、体重測定及び摂食量を記録し、15週間飼育した。対照として、HCHFDに加えて普通食群(NF)を設定した。

2-4) 生化学マーカーの測定

15週間の飼育後、一晚絶食後に解剖し、和光純薬工業株式会社の各種生化学検査キットを用いて総コレステロール(T-CHO)、HDL-コレステロール(HDL-CHO)、LDL-コレステロール(LDL-CHO)(算出値)、中性脂肪(TG)、遊離脂肪酸(NEFA)を定量した。さらに、抗酸化性の検討を目的に、H-ORAC および TBARS を測定した。

4. 研究成果

(1) 酸化モデル動物における C3G およびその熱分解物である PCA の抗酸化作用の検討

1-1) C3G および PCA 投与が血漿 TBARS 値ならびに H-ORAC 値に及ぼす影響

鉄投与によって酸化誘導したコントロール群に対し、PCA 0.5 mmol/kg 投与群では、有意な TBARS 値の上昇抑制効果を認めた (Fig.1)。この効果は、既知の抗酸化物質であるカテキン 0.5 mmol/kg 投与群と同程度であったが、同濃度の C3G 群では、抑制効果は認められなかった。

一方、酸化ストレスモデルマウスの血漿 H-ORAC 値は、未処理と比較して、コントロール群では、有意に H-ORAC 値が低く、急激な酸化ストレスによる抗酸化能の低下が認められた。一方、試験物質を投与した全群で、コントロール群と比較して H-ORAC 値の低下抑制は認められなかった。

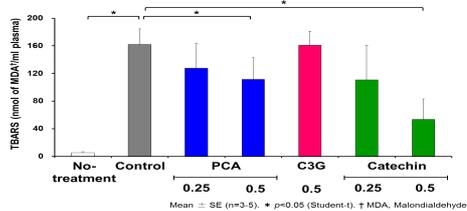


Fig. 1 Effects of C3G and PCA on plasma TBARS levels.

1-2) C3G および PCA 投与が腎臓・肝臓ホモジネートの TBARS 値に及ぼす影響

本研究で用いた酸化ストレスは、腎近位尿管に酸化的障害を起こすことが知られている。そこで、腎臓ホモジネートの TBARS 値を測定した。PCA 0.5 mmol/kg 投与群において、コントロール群に対して統計的に有意差は認められないものの、TBARS 値の低下傾向にあり、先の血漿と類似する結果を示した。一方、肝臓ホモジネートでは、何れの被験物質も TBARS 値の低下は認められなかった。

1-3) 腎臓ホモジネートの抗酸化酵素の挙動解析

SOD、CAT、GPx では、群間に差は検出されなかった。一方、GR は、コントロールや C3G 投与群と比較して、カテキンの低用量群で優位な活性上昇が認められたが、PCA 投与群や高濃度のカテキン投与群への影響は認められなかった (Fig. 2)。

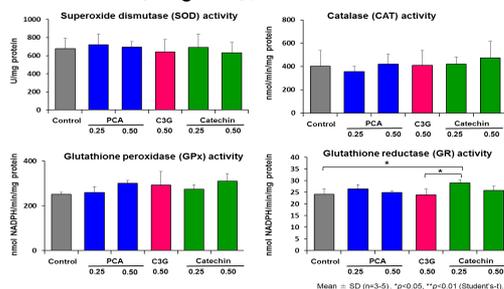


Fig. 2 Enzymatic activity in the kidney.

1-4) 肝臓ホモジネートの抗酸化酵素の挙動解析

肝臓の SOD 活性ではカテキン高用量群で有意な上昇が認められた (Fig. 3)。しかし、他の酵素活性や PCA 投与群での変化は認められなかった。一方、CAT は PCA の低用量群でカテキン高用量群に対して有意に上昇し、SOD により生成した過酸化水素を代謝するために活性が上昇したことも考えられるが、酸化誘導群では変化が無いことから、明確な説明には至らなかった。従って、被検物質を単回投与した本実験系では、腎臓と肝臓ともに、酵素活性に及ぼす影響は少ないものと考えられた。

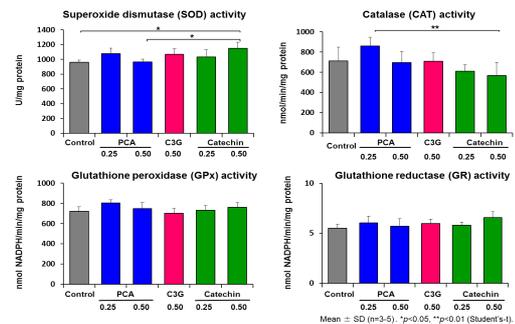


Fig. 3 Enzymatic activity in the liver.

最終的に、当該酸化モデル動物において、経口投与した PCA は C3G よりも速やかかつ高濃度で血中に移行する先行研究の結果と併せて考えると、主に PCA が血中で活性酸素消去能を示した結果、TBARS 値の上昇抑制をもたらしたと考えられた。

以上の結果から、PCA は鉄誘導性の酸化ストレスに対してカテキンと同程度の抗酸化性を発揮すること、さらに PCA の C3G に対する優位性が示された。

(2) 高コレステロール血症モデル動物における紫黒米 (調理前後) の影響

2-1) 米置換食餌が H-ORAC 値に及ぼす影響

ND と比較して、HCHFD は H-ORAC 値が低く、急激な酸化ストレスによる活性酸素消去能の低下が認められた (Fig. 4)。しかし、米由来物質置換群では、いずれの群においても、低下した H-ORAC 値を改善する効果は認められなかった。加熱の有無による違いでは、紫黒米で差異は認められず、玄米では t 検定による差は認められたものの、改善には至らなかった。一方、PCA 添加食は飼育中の体重減少が確認され、生化学マーカー値も異常値を示したため、データは未掲載である。

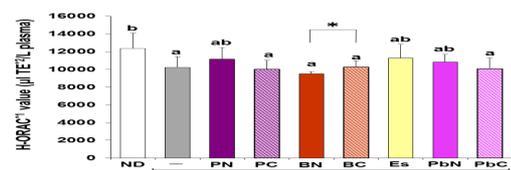


Fig. 4 Effects of the purple black rice on plasma H-ORAC values.

Mean \pm SD (n=5). Different letters; $p < 0.05$ (Tukey's test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's T-test). *¹H-ORAC, hydrophilic oxygen radical absorbance capacity; *²TE, trolox equivalent.

2-2) 各種米および加熱処理が血中・肝臓ホモジネートの TBARS 値に及ぼす影響

NF と比較して、HCHFD では血漿及び肝臓 TBARS 値の上昇は認められなかった (Fig. 5)。一般的に、高脂肪食での長期飼育は、酸化が促進される傾向にあるが、本実験では反対に、HCHFD で低値を示した。これは、HCHFD において NF より摂取エネルギーが少なかったことが影響し、酸化亢進していないことが要因と考えられる。ただし、HCHFD 群間の差は認められなかったことから、以降、HCHFD 群間の比較を行った。

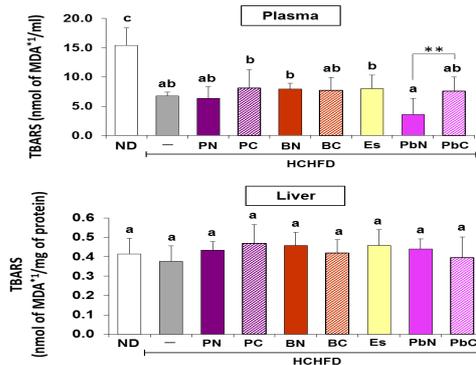


Fig.5 Effects of the purple black rice on plasma and liver TBARS values.

Mean ± SD (n=5). Different letters; p<0.05 (Tukey's test). *p<0.05, **p<0.01 (Student's T-test).

2-3) 各種米および加熱処理が血中脂質マーカーに及ぼす影響

TG は、NF と比較して HCHFD で低値を示した (Fig. 6)。この現象は、先の結果と同様に、摂取エネルギーの違いによるものと考えられた。高コレステロール高脂肪食のうち、摂取エネルギーが他の添加群より高い傾向を示した ES では、TG 値や NEFA が BD と同レベルを示した。

HCHFD において NF に対して HDL-CHO 濃度は低値を示し、一方で、LDL-CHO 濃度が上昇したことから、脂質異常モデルとなりうることを確認した。当該動物に対して、PC および BC では HDL-CHO 濃度は高値を示し、脂質の異常が改善された。紫黒米や玄米配合は、未加熱群よりも加熱群でコレステロール値の改善効果を示すことが明らかとなった。一方、他の生化学マーカー、H-ORAC 値ならび TBARS 値の群間の違いは認められなかった。

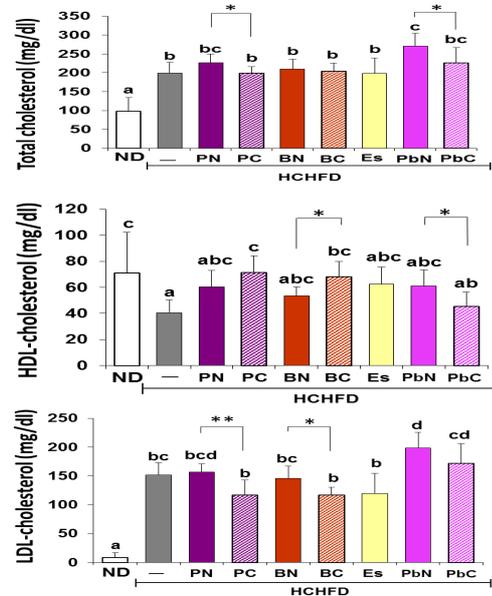
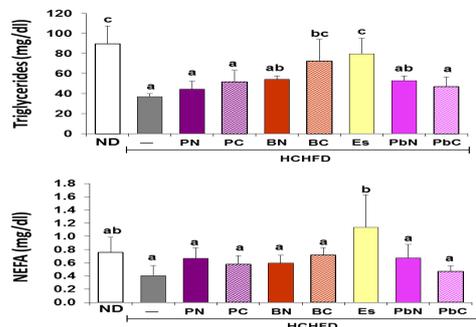


Fig.6 Effects of the purple black rice on the plasma lipid levels.

Mean ± SD (n=5). Different letters; p<0.05 (Tukey's test). *p<0.05, **p<0.01 (Student's T-test).

本研究では、調理済み紫黒米はコレステロール添加高脂肪食飼育マウスにおける血漿脂質異常を HDL-コレステロール濃度の低下抑制により改善することを明らかにした。日常生活において、白飯の一部を紫黒米に代替して継続摂取することで、血漿脂質異常の発症が抑制できる可能性を示すことができた。さらに、調理済み紫黒米の効果には、これまで得られている情報と合わせて考えると、C3G よりもその熱分解物である PCA が高い生体調節作用を有することから、PCA の関与が予測される。しかし、玄米でも同様のパターンを示したことや PCA 群での効果を検証できなかったことより、決定的な要因については不明である。

一方、普通食群に対する高脂肪食群における摂取エネルギーの低下は、後の別の実験において、高コレステロール発症効果が報告されている 0.5% コール酸を食餌に混合したことに起因することを確認した。そのため、標品を比較的多く添加した PCA 群で体重減少が認められたと考えられる。今後、より正確なデータを得るために、コール酸無添加高脂肪・高コレステロール食における検討が必要である。

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 1 件)

1. 近藤(比江森)美樹. アントシアニンに起因する生理活性の効果的な活用技術の確立と機能性食品の開発. 山陽技術振興財団, 山陽技術雑誌, 60, 6-11(2013).

〔学会発表〕(計 9 件)

1. M. Hiemori-Kondo, M. Fujikura and A. Nagayasu. Biological activities of cyanidin-3-O- β -D-glucoside and protocatechuic acid. 7th International Conference on Polyphenols and Health, Tours, France, 2015.10.27-30.
2. M. Hiemori-Kondo and A. Nagayasu. Comparison of antioxidant activities of anthocyanin and its degraded product by food processing. International Symposium on Dietary Antioxidants and Oxidative Stress in Health, Awagi Island, Japan, 2015.8.30-31.
3. M. Hiemori-Kondo and Yuki Uehara. Effects of roasting on pigment components and antioxidant activity in colored rice. 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, 2015.5.14-18.
4. 近藤(比江森)美樹、中川 咲良、永易 あゆ子. 食餌性紫黒米の血漿脂質レベル改善効果. 日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26-29 日、岡山
5. 中川 咲良、永易 あゆ子、近藤(比江森)美樹. 高脂肪食負荷マウスの血漿脂質レベルに及ぼす紫黒米摂取の影響. 日本農芸化学会 2014 年度中四国支部大会(第 40 回講演会)、2014 年 9 月 26, 27 日、徳島
6. M. Hiemori-Kondo, Sakura Nakagawa, A. Nagayasu. Antioxidant activities of anthocyanin and its thermal degraded product. 27th International Conference on Polyphenols & 8th Tannin Conference, Nagoya, Japan, 2014.9.2-6.
7. 近藤(比江森)美樹、永易 あゆ子、中川 咲良. アントシアニンの熱処理過程で生成する分解産物の生体における抗酸化性. 日本栄養・食糧学会第 68 回大会、2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日、北海道
8. 近藤(比江森)美樹、永易 あゆ子、中川 咲良. C3G ならびにその熱分解物である PCA の生体抗酸化性. 2014 年度農芸化学会大会、2014 年 3 月 27-30 日、川崎
9. M. Hiemori-Kondo, A. Nagayas. Antioxidant effect of bread using black rice (*Oryza Sativa* L. Japonica var. SBR). 20th International Congress of Nutrition, Granada, Spain, 2013.9.15-20.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

近藤 美樹 (KONDO, MIKI)
徳島文理大学・人間生活学部・准教授
研究者番号：80326412

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：