

小豆ポリフェノールの生体内抗酸化活性と肝臓保護作用

小嶋道之[§], 山下慎司, 西 繁典, 齋藤優介, 前田龍一郎*

帯広畜産大学食料生産科学

* 帯広畜産大学基礎獣医学

Antioxidative Effect and Liver Protective Action of Adzuki Polyphenol

Michiyuki Kojima[§], Sinji Yamashita, Sigenori Nishi, Yusuke Saito and Ryuichiro Maeda*

Food Production Science, Obihiro University, 11, nishi-2-sen, Inada-cho, Obihiro 080-8555

* Basic Veterinary Science, Obihiro University, 11, nishi-2-sen, Inada-cho, Obihiro 080-8555

The antioxidizing effect of Adzuki polyphenol (APP) was studied in *in vivo* and *in vitro* experiments. Serum specimens and homogenates of the liver and kidney obtained from the mice which had been given a drink (20 ml/d) containing 0.05% (w/v) APP for one week were less susceptible to oxidizing agents than those obtained from control mice. In particular, liver homogenates obtained from APP treated rats were significantly resistant to oxidizing agents. Increases in the serum GOT activity and production of lipid peroxides in the liver induced in response to an intraperitoneal injection of galactosamine and lipopolysaccharides were significantly suppressed in the mice which had been previously given 0.05% (w/v) APP for one week. The amounts of glutathione and GPx activity in the liver of the APP treated mice were significantly higher than those in the control mice. In view of these results, APP may have the following possible effects: it removes free radicals and reactive oxygen species produced during inflammation, it keeps both the glutathione level and the GPx activity in the body high and thereby suppresses production of lipid peroxides, and as a consequence, it suppresses aggravation of inflammation in the liver. IC₅₀ of APP for removal of DPPH radicals was 64.2 μmol/l (converted as a catechin quantity), which was about half of the value of catechin and vitamin C available in the market. Moreover, 2.5 ml solution of human LDL (protein concentration, 70 μg/ml) containing 80 μl of 0.05% APP was resistant to the oxidation-promoting action of 200 μmol/l copper sulfate: Oxidation of LDL started approximately one hour later in the presence of APP than in its absence. These results suggest that APP has both an antioxidative effect and a liver protective action. It was also found in this study that the main monomer type polyphenol in Adzuki was catechin-7β-glucoside.

(Received Feb. 10, 2006; Accepted Apr. 14, 2006)

活性酸素やフリーラジカルは、動物や植物の異化や同化など通常の生命活動においても少量生じている強力な酸化物質である¹⁾。これらは、大気汚染物質、喫煙、薬物、毒物および虚血・再還流などにより、一過的に生体内で生産され、それが過剰になると肝臓などの炎症や障害の引き金になると考えられている²⁻⁷⁾。また、日本人の約70%の肝障害はウイルス性で増加傾向にあるが、ウイルスが肝臓細胞内に入り込むと大量の活性酸素が発生して肝炎を起こす⁸⁾。肝臓は、薬物や毒物などの解毒作用をする臓器であり、腎臓やその他の臓器においても、解毒過程で生じるフリーラジカルによる脂質過酸化反応の進行は、細胞障害の原因となると報告されている⁹⁾⁻¹²⁾。しかし、活性酸素やフリーラジカルによる障害から細胞や組織を守る2種類の消

去機構が生体内に存在している⁵⁾¹³⁾¹⁴⁾。一つは、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD), グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx), カタラーゼ (CAT) などの抗酸化酵素群による消去機構であり、もう一方は、抗酸化ビタミン類 (ビタミンEやアスコルビン酸) やグルタチオン (GSH) など非酵素の低分子化合物による消去機構である。また、食事として外因的に摂取したポリフェノールなどの抗酸化物質が、過剰に生じた生体内活性酸素やフリーラジカルの除去を行い、その結果として生体内抗酸化物質であるGSHなどの消費を防いでいることが報告されている¹³⁾¹⁴⁾。

近年、地域の付加価値のある特産品、食材や加工品の探索を目的に、食品機能性研究がさかんに行われている¹⁵⁾¹⁶⁾。北海道特産の農産物の一つである小豆には、苦味・収斂味成分のポリフェノール類やサポニン類が含まれていて、民間伝承として効果が高いといわれているが、食品機能性成分の分離法や生理機能などに関する科学的な報

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11番地

* 〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11番地

§ 連絡先 (Corresponding author), kojima@obihiro.ac.jp

告は少ない¹⁵⁾。これまでに食用の豆類である大豆、インゲンマメ、リョクトウなどの抽出液を比較して、小豆抽出液に含まれる抗酸化活性が最も高いこと、抗酸化活性とポリフェノール含量との間には正の相関のあることを報告している¹⁵⁾が、豆類に含まれるポリフェノールの種類が異なることから、各豆類についての成分分析や機能性については個別に検討を進める必要のあることを示してきた。また、小豆を加熱加工する過程で生じる煮汁の多くは廃棄されているが、この廃液から利用可能な機能性化合物が分離されれば、廃液利用につながると考えられる。

本論文では、*in vivo* および *in vitro* 実験により、水溶性小豆ポリフェノールは、生体内抗酸化活性のあること、および肝臓保護作用に寄与していることを明らかにしたので報告する。

実験方法

1. 小豆ポリフェノールの調製

小豆 (*Vigna angularis* Ohwi et H. Ohashi, Erimo var.) は、2001年十勝産のエリモ品種を材料に用いた。乾豆3kgに3倍容の水を加えて加熱して煮沸15分後に、ガーゼで煮汁500mlを回収した。煮汁は直ちに冷却(4°C)後、1420×gで遠心した上清を、500mlのイオン交換樹脂DAIAION SP-850(三菱化学)に供し、2.5lの蒸留水で洗浄した。続いて1.5lの80%エタノールでポリフェノールを溶出し、濃縮乾固した後にエタノール可溶部を小豆ポリフェノール(APP)として、濃縮後フリーズドライして実験に用いた。一般成分はAssociation of Official Agricultural Chemists(AOAC)公定法¹⁷⁾に従い測定した。ポリフェノール量の測定¹⁸⁾は、0.05%APP(w/v)水溶液に等量のFolin試薬(ナカライテクス社)と10%(w/w)炭酸ナトリウム水溶液を加えて攪拌し、30°Cで30分間反応後、遠心上清(1420×g, 10分間)の760nmにおける吸光度を測定して(+)-カテキン(シグマ)相当量として算出した。モノマー型とオリゴマー型ポリフェノールの割合は、高畑らの方法に従って測定した¹⁹⁾。

2. *In vivo* 実験による抗酸化活性の測定

(1) APP投与によるマウス生体内抗酸化活性

マウスの取り扱いにはGuide for the Care and Use of Laboratory Animalsに従った。実験に用いた11週齢のddY雄マウス(日本医科学動物資材研究所)は、室温23±1°C、湿度60±5%、明暗周期12時間(明期7:00-, 暗期19:00-)、プラスチックケージを用いて5匹1組で飼育した。市販の固形飼料CE-2(オリエンタル酵母株式会社)は自由摂取、飲料は0.05%APP(w/v)水溶液を毎日20ml、一週間与えた。APP水溶液は、飲料水ボトルを遮光して毎日新しいものに取り替え、対照群には水を与えた。

マウスの肝臓と腎臓は、組織に対して9倍容(w/v)の0.9%生理食塩水を用いホモジネートとした。それらのホ

モジネートおよび血清0.5mlに対して、酸化促進剤の2,2-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩(AAPH)を50mmol/lになるように添加して37°C、1時間の酸化反応を行った²⁰⁾。別のチューブに反応液100μlを取り、100μlの8.1%ドデシル硫酸ナトリウム、750μlの20%酢酸緩衝液(pH 3.5)、750μlの0.8%チオバルビツール酸(TBA)を添加して攪拌後に1時間加熱した。反応後、2mlのn-ブタノール:ピリジン(15:1, w/w)を加え、得られた遠心上清の吸光度532nmの値からマロンジアルデヒド(MDA)量を算出した。テトラエトキシプロパン(1,1,3,3-tetraethoxypropane, シグマ)を標準物質としてTBA測定用の検量線を作成した。

(2) マウスの肝障害誘導に与えるAPP投与の影響

市販の固形飼料CE-2(オリエンタル酵母)と自由給水の11週齢のddY雄マウスは、5匹ずつ2群に分け、絶食14時間後にAPP水溶液(APP:95mg/kg, Control:水)を単回投与した。続いて、絶食15時間後に体重1kg当たり500mgのガラクトサミン(GalN, 和光純薬)と10μgのリポポリサッカライド(LPS, シグマ)を腹腔内に注射して肝障害を誘導した。GalNとLPSは、生理食塩水に溶解して用いた。誘導9時間後にエーテル麻酔して採血後、肝臓の摘出を行った。血液は4°Cで15分間、1000×gで遠心分離を行い得られた血清のグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)およびグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)酵素活性をTransaminase C II-Test(和光純薬)により測定した。また、肝臓は19倍容(w/v)の0.25mol/lスクロース水溶液を加えて氷上でホモジナイズ後、GSH量はCohnとLyeの方法²¹⁾、過酸化脂質量はKosugiの方法²²⁾により測定した。また、肝臓ホモジネートを4°Cで1時間、105000×gで遠心分離を行い得られた上清を用いて、抗酸化酵素の活性を測定した。CAT活性はBeersとSizerの方法²³⁾、SOD活性はPeskinとWinterbournの方法²⁴⁾、GPx活性はLawrenceとBurkの方法²⁵⁾、およびグルタチオンレダクターゼ(GR)活性はWorthingtonとRosemeyerの方法²⁶⁾、タンパク質量はBradford法²⁷⁾により測定した。

3. *In vitro* 実験によるAPPの抗酸化活性の測定

(1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH)ラジカル消去活性²⁸⁾は、0.05%APP水溶液(濃度を振る場合には蒸留水で希釈)2mlに等量の0.5mmol/l DPPHエタノール溶液と等量の100mmol/l Tris-HClバッファー(pH 7.4)を加えて攪拌して、暗所室温で15分間静置後に520nmにおける吸光度を測定してTrolox相当量として算出した。

(2) スーパーオキシドラジカル消去活性²⁹⁾は、濃度既知のAPP水溶液20μl、キサンチンオキシダーゼ(116mU, シグマ)20μl、以下に示す反応液960μlを加えて3分間攪拌後、560nmの吸光度から算出した。反応液は、1mol/l

の炭酸ナトリウムバッファー (pH 10.2) に溶解した 2 mmol/l Xanthine (2,6-Dioxopurine) 溶液 3 ml, 0.5 mmol/l ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 溶液 3 ml, 50 mmol/l のエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 溶液 (pH 8.0) 40 μ l を加え, 蒸留水で 20 ml に定容して調製した。

(3) 脂質の酸化抑制能は, 0.05% APP 水溶液, もしくは蒸留水を 20 μ l 添加した 0.25% Tween80 でエマルジョン化した 4.5 mmol/l リノール酸水溶液 10 ml に, 酸化促進剤である APPH を 50 mmol/l まで加え, 反応 4 時間後に生じた MDA 量を TBA 法²²⁾ で測定して評価した。

(4) カロテン退色阻止能の測定³⁰⁾ は, 以下に従い行った。550 μ l の β -カロテン溶液 (100 mg/100 ml CHCl_3 , 関東化学) とリノール酸溶液 (4 g/100 ml CHCl_3 , 和光純薬), 1100 μ l のツイーン 40 溶液 (20 g/100 ml CHCl_3 , 和光純薬) を遮光下で窒素乾固し, 110 ml の蒸留水および 9.8 ml の 0.2 mol/l リン酸バッファー (pH 6.8) を加えて攪拌した。この溶液 10 ml に対して 0.05% APP 水溶液 40 μ l もしくはコントロールとして蒸留水を用い, 攪拌後 50°C の恒温槽でインキュベートしながらカロテン量 (470 nm の吸光値) を経時的に測定した。

(5) 試験管内 Low-density lipoprotein (LDL) 酸化抑制能の測定は, 以下の方法で行った³¹⁾³²⁾。Na-EDTA 入りの真空採血管で採取した血液は, 1420 \times g, 4°C, 15 分間遠心して血漿を採取し, それに臭化ナトリウムを加えて比重を 1.21 とした (最終濃度 0.325 g/ml)。その上に 4 種類の比重の異なる臭化ナトリウム溶液; $d=1.15, 1.063, 1.019, 1.006$ をこの順に重層し, 4°C で 100 000 \times g, 20 時間超遠心した。比重 1.019-1.063 に相当する部分を取り, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で透析して LDL 画分とした。その画分のタンパク質量は Lowry 法³³⁾ により測定し, タンパク質が 70 μ g/ml になるように PBS で調製し, 5 日以内に使用した。2.5 ml の LDL 溶液に 80 μ l の 0.05% APP 水溶液, もしくはコントロールとして蒸留水を加え, 25 μ l の 20 mmol/l CuSO_4 (酸化促進剤) を添加して 37°C でインキュベート後, 5 分間隔で生成する共役ジエンの吸光度 234 nm を測定した。

4. APP の成分分析

APP の主要なモノマー型ポリフェノールの分離は HPLC (LC-6A, CTO-6A, SCL-6A, SPD-6A; 島津製作所) を用い, LUNA C18 カラム (25 \times 300 mm, Phenomenex 社), 溶媒 A; 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有蒸留水, 溶媒 B; 0.1% TFA 含有アセトニトリルを用い, 30 分間で溶媒 B; 8% から 30% までのリニアグラジエント条件で行った。また, カラム温度は 40°C, 流速は 1 ml/min, 波長 280 nm により検出を行った。また, フラクションコレクターにより 1 分毎に溶出液を採取して, 各画分の DPPH ラジカル消去活性²⁸⁾ を測定した。抗酸化活性の高い画分は, IR, MS, NMR で分

析した。

5. 統計処理

それぞれのデータは平均士標準偏差で表した。データ間の有意差検定は t-test にて行い, $p < 0.05$ を有意とした。

実験結果および考察

1. APP の特徴

小豆煮汁粉末には, 糖質が 49%, 灰分が 13%, タンパク質が 12% 含まれていて, ポリフェノールは約 13% であったが, それをイオン交換処理した APP のポリフェノール量は 56% 以上で, 煮汁の 4 倍以上に濃縮されていた。小豆種子 3 kg から今回調製した煮汁 500 ml 中の APP 量は, 45 mg であった。調製したこの APP には, オリゴマー型ポリフェノールを 6.5% 含んでいたが, 大部分がモノマー型小豆ポリフェノールであった。一般成分の差し引き割合から求めた APP の糖質は 33% であったが, アルカリ抽出法-グルコアミラーゼ・グルコースオキシダーゼ法³⁴⁾ により測定したデンプン含量は 67 mg/100 g で, デンプン以外の糖質であった。その糖質の解析は, 今後の課題である。

2. *In vivo* 実験による抗酸化活性

(1) APP 投与によるマウス生体内抗酸化活性

マウスに 0.05% APP を飲み水として 1 日に 20 ml を一週間与えたところ, 体重, 摂食量, 血清中の一般成分および肝障害の指標である GOT や GPT は, コントロールとほぼ同様で, 有意差は認められなかった。また, APP を与えたマウスの血清, 肝臓および腎臓ホモジネートに酸化促進剤である AAPH を添加して過酸化物質量を測定したところ, 血清および腎臓の MDA 量に有意差は認められなかったが, 肝臓の MDA 量はコントロールに比べて有意に低い値を示した (Table 1)。この結果は, 通常食を食べているマウスに APP を飲料として 1 週間投与すると, 肝臓の酸化抵抗性はコントロールより高くなることを示唆している。

今回, 与えた APP の大部分はモノマー型であるが, それらが体内で作用するためには吸収される必要がある。食餌成分の吸収性を検査する方法としては, 与えた後の血清中に存在する化合物を直接同定・定量する方法³⁵⁾ と, 血清に与える影響を検討することから判断する間接的な方法³⁶⁾ がある。しかし, 与えた化合物が生体内で分解されたり, 修飾されたりする可能性のある場合には, 血中への吸収を

Table 1 Lipid peroxide in mice which drank 0.05% APP and water for one week¹

| | 0.05% APP | Control |
|--------------------------|------------------|------------------|
| Plasma (nmol/ml) | 9.67 \pm 1.15 | 10.92 \pm 1.53 |
| Liver (nmol/mg protein) | 1.43 \pm 0.27* | 1.66 \pm 0.25 |
| Kidney (nmol/mg protein) | 2.47 \pm 0.34 | 2.64 \pm 0.44 |

¹ Values are means \pm standard deviations for 10 mice.

* $p < 0.05$

Table 2 Liver protection of APP

| | APP | Control |
|------------------------------------|-------------|------------|
| GOT (U/L serum) | 248.0±70.3* | 350.2±37.2 |
| MDA (μmol/g liver) | 0.15±0.03* | 0.19±0.03 |
| Glutathione (μmol/g liver) | 3.27±0.33* | 2.66±0.31 |
| GPx activity (U/mg protein) | 6.38±0.51* | 4.70±0.18 |
| Cu/Zn-SOD activity (kU/mg protein) | 1.44±0.05 | 1.44±0.08 |
| Mn-SOD activity (U/mg protein) | 30.0±1.3 | 28.3±1.2 |
| GR activity (U/mg protein) | 1.83±0.24 | 1.78±0.10 |
| CAT activity (U/mg protein) | 53.4±2.5 | 53.8±3.4 |

¹ Values are means± standard deviations for 10 mice.

*p<0.05

直接明らかにすることは難しい。今回の結果は、APPが血中に吸収されていることを間接的に示している。

(2) マウスの肝障害誘導に与える APP 投与の影響

ヒトの肝炎ウイルスは、マウスやラットなどには感染しないが、GalN や LPS を腹腔内注射してウイルス性肝障害類似の肝炎症状³⁷⁾ を起こさせることができる。GalN および LPS で肝炎症状を誘導したマウス肝臓の色調を肉眼的に観察したところ、コントロールでは局部的に黒く変色していたが、APP を投与したマウスの肝臓は通常マウスの肝臓とはほぼ同様の色調を示した(図省略)。また、肝障害の指標である血清 GOT 活性の上昇、および肝臓の過酸化脂質生成はコントロールに比べて有意に抑制された (Table 2)。APP を投与した肝炎誘導マウス肝臓ホモジネートの抗酸化酵素活性; CAT 活性, SOD 活性および GR 活性は、コントロールと同程度の値を示したが、GPx 活性および肝臓 GSH 量はコントロールの値よりも有意に高い値を示した (Table 2)。これらの結果より、APP 投与は GalN および LPS により生じる肝臓の脂質過酸化をコントロールよりも抑制すること、生体内 GSH 量を有意に上昇させること、GPx 活性を有意に上昇させることが判明した。肝障害の抑制には、GSH が重要な役割をしていることが報告されている^{38)~40)} ことから、APP が生体内 GSH 量をコントロールより上昇させたことが、肝臓の脂質過酸化や肝炎症状を抑制したのかもしれない。今後、APP 投与による GSH 合成や GPx の誘導の可能性についても検討する予定である。

3. *In vitro* 実験による APP の抗酸化活性

10 ml のリノール酸水溶液に 0.05% APP 水溶液 20 μl を添加して、AAPH を加えて脂質酸化反応を 4 時間行った時に生じた MDA 量は、コントロールの 37.0% であった。APP 水溶液の添加は、脂質の過酸化反応を顕著に抑制することが示唆された。また、ヒト LDL 溶液に最終濃度がカテキン相当量として 56.4 nmol/l の APP を添加して、酸化促進剤である 200 μmol/l の硫酸銅溶液を加え脂質の酸化により生じる共役ジエン (最大吸収波長 234 nm) 生成量

を経時的に測定したところ、コントロールの蒸留水を加えた場合に比べて、ヒト LDL の酸化開始が 1 時間以上も遅延されていた (Fig. 1)。これらの結果は、APP には生体内酸化抑制活性のあることを示唆している。

APP の DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、IC₅₀ はカテキン相当量で 64.2 μmol/l であり、市販の (+)-カテキンの IC₅₀ は 88.7 μmol/l、アスコルビン酸は 314.8 μmol/l、トロロックスは 81.0 μmol/l であった。また、APP に含まれるポリフェノール量と DPPH ラジカル消去活性の間には高い正の相関 ($r^2=0.975$) がみられた。また、APP のスーパーオキシド消去活性を NBT 法で測定したところ、IC₅₀ はカテキン相当量で 49.1 μmol/l であったが、アスコルビン酸および Trolox を用いて測定した時の IC₅₀ は 500 μmol/l 以上と顕著に高かった。また、APP に含まれるポリフェノール量とスーパーオキシド消去活性の間にも高い正の相関 ($r^2=0.990$) がみられた。

カテキン相当量で 7.8 μmol/l の APP を同濃度の β-カロテンに加えてカロテン退色阻止能を検討したところ、測定開始 12 時間後でさえ 98% 以上のカロテンが残っていたが、同条件で測定した蒸留水を用いたコントロールの 6 時間後のカロテン量は 36.5%、12 時間後には 16.4% まで退色していた (表省略)。

4. APP の成分

小豆煮汁の抗酸化活性を示す主要化合物の分離を目的に、0.05% APP 水溶液を逆相 HPLC で 1 分毎に分取して、それぞれの画分の DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、ピーク No. 7 に高い DPPH ラジカル消去活性が認められた (Fig. 2)。活性の高かったピーク No. 7 は、波長 280 nm のピークと重なっていて、小豆のモノマー型ポリフェノールの主要な活性成分であると判断した。

ピーク No. 7 の構造解析は、以下の機器分析の測定値から行った。ピーク No. 7 のスペクトラム分析では、最大吸収波長が 280 nm で、カテキンのそれ (281 nm) とよく一致した。ピーク No. 7 の IR 吸収スペクトラムは、1614, 1522, 1448, 1375, 1282, 1192, 1140 cm⁻¹ を示し、カテキンの

それ (1631, 1522, 1471, 1375, 1288, 1188, 1153 cm^{-1}) とよく一致した。また、ピーク No. 7 の FD-MS, FAB (-) の結果, $m/z452$ (M)⁺, $m/z475$ ($M+Na$)⁺, $m/z491$ ($M+K$)⁺, $m/z451$ ($[M-H]$)⁻ が認められ, 分子量は $m/z452$ であった。NMR 分析により (Table 3, Table 4), シアニジングルコシドとの比較から糖はグルコースであり, 糖とア

グリコンとの結合様式は, 糖のプロトンシグナルの 1 位と 2 位のカップリング係数 $J_{1,2}=6.6$ から, β 結合であると判断した。また, カテキンの NMR スペクトラムとの比較により, カテキンの 6 位と 8 位のプロトンピークのケミカルシフトがみられることから, カテキンの 7 位とグルコースがグリコシド結合していると判断した。また, 糖はガスク

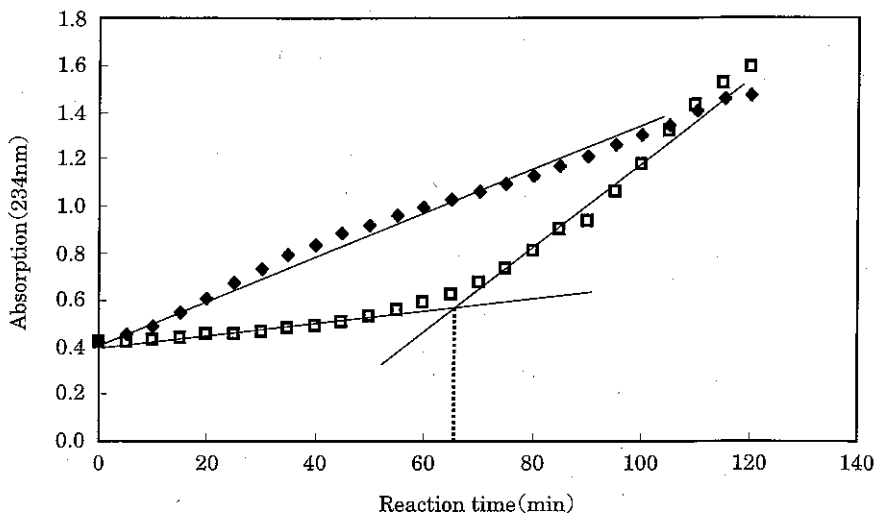


Fig. 1 Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by added APP

Each point denotes absorption at 234 nm. The oxidation of the LDL was induced at $200\mu\text{mol/l}$ CuSO_4 .
◆, control was added distilled water; □, 46.4 nM APP was added.

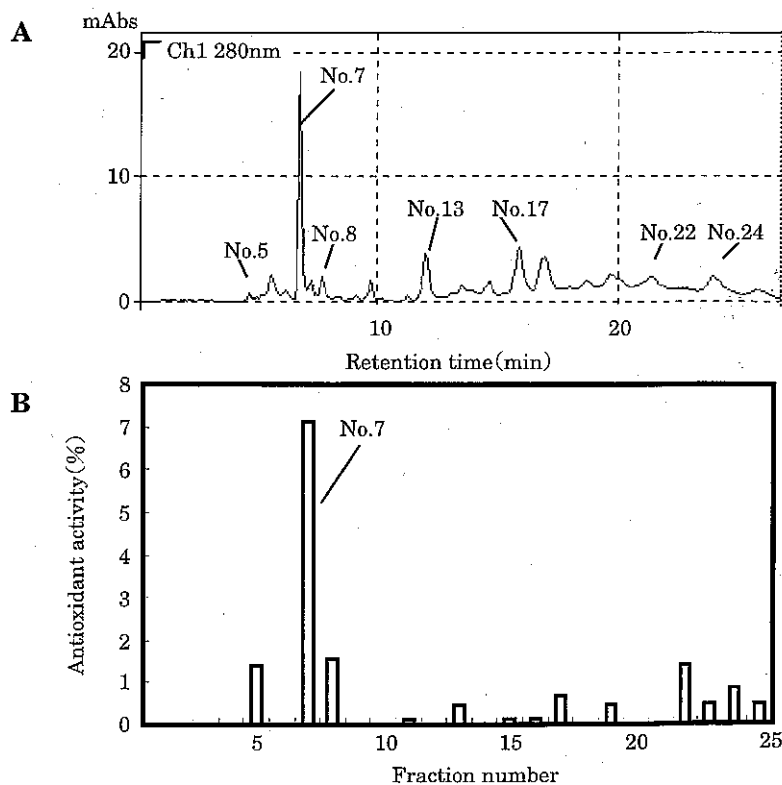


Fig. 2. RP-HPLC profile in APP (A) and DPPH radical scavenger activity of the fraction during each one minute period of RP-HPLC (B)

Table 3 ¹H-NMR spectra of Fraction No. 7 separated by RP-HPLC of APP and catechin

| | Fraction No. 7 | Catechin |
|-------|------------------------------------|----------|
| H-2 | 4.5211 | 4.6640 |
| H-3 | 3.9520 | 3.9960 |
| H-4a | 2.5269 | 2.5855 |
| H-4b | 2.7870 | 2.8689 |
| H-6 | 6.1489 | 5.9670 |
| H-8 | 6.1111 | 5.8974 |
| H-2' | 6.7778 | 6.8731 |
| H-5' | 6.6972 | 6.7925 |
| H-6' | 6.6728 | 6.7424 |
| GH-1 | 4.7592 | — |
| | (<i>J</i> _{1,2} =6.6 Hz) | |
| GH-2 | 3.3500 | — |
| GH-6a | 3.6687 | — |
| GH-6b | 3.8092 | — |

Table 4 ¹³C-NMR spectra of Fraction No.7 separated by RP-HPLC of APP and catechin

| | Fraction No. 7 | Catechin |
|---------|----------------|----------|
| C-2 | 83.123 | 83.654 |
| C-3 | 68.820 | 69.620 |
| C-4 | 28.749 | 29.333 |
| C-5 | 157.749 | 158.388 |
| C-6 | 97.660 | 97.023 |
| C-7 | 158.863 | 158.639 |
| C-8 | 97.103 | 96.250 |
| C-9 | 157.066 | 157.723 |
| C-10 | 102.386 | 101.569 |
| C-1' | 132.269 | 132.997 |
| C-2' | 115.402 | 116.016 |
| C-3',4' | 146.447 | 147.049 |
| C-3',4' | 146.501 | — |
| C-5' | 115.402 | 116.843 |
| C-6' | 120.320 | 120.814 |
| G-1 | 103.860 | — |
| G-2 | 75.055 | — |
| G-3,5 | 78.200 | — |
| G-4 | 71.533 | — |
| G-6 | 62.692 | — |

ロマトグラフィーでもグルコースが検出され、矛盾のないことを確認した。これらの結果は、ピーク No. 7 がカテキン-7β-グルコシドであることを示唆している。また、ピーク No. 7 以外の抗酸化活性が認められたピーク画分は、標品との溶出時間の比較や LC/MS による分子量イオンやフラグメントイオン等から判断して、ピーク No. 13 は、(M)⁻ が m/z289 のカテキン、ピーク No. 22 は、(M)⁻ が m/z609 のルチンであると判断した。また、ピーク No. 17 は、(M)⁻ が m/z755 のケルセチン配糖体、ピーク No. 24 は、(M)⁻ が m/z463 のケルセチングルコシドであると推定したが、ピーク No. 5 と No. 8 は構造推定できなかった。

要 約

in vivo および *in vitro* 実験により、小豆ポリフェノール (APP) の抗酸化活性の能力を検討した。マウスに 0.05% (w/v) APP 入りの飲料 (20 ml/日) を一週間与えて、その血清、肝臓および腎臓ホモジネートの酸化促進剤に対する影響を検討したところ、どれもコントロールのそれらに比べて酸化を受けにくく、特に肝臓ホモジネートでは有意に酸化抵抗性を示した。また、0.05% (w/v) APP を 1 週間、事前投与したマウスにガラクトサミンとリポポリサッカライドを腹腔内注射したところ、コントロールのそれらに比べて、血清 GOT 活性の上昇抑制や肝臓の過酸化脂質の生成が有意に抑制された。肝臓のグルタチオン量や GPx 活性は、コントロールのそれらよりも有意に高い値を保持していた。これらの結果から、APP は炎症により発生するフリーラジカル・活性酸素を消去し、生体内グルタチオン量と GPx 活性を高く保持して、過酸化脂質の生成を抑えることで、結果的に肝臓の炎症拡大を抑制している可能性が推察された。また、APP の DPPH ラジカル消去活性における IC₅₀ は 64.2 μmol/l (カテキン量として換算) であり、市販のカテキンやビタミン C の 1/2 量で同じ効果を示し

た。また、0.05% APP を 80 μl 添加した 2.5 ml のヒト LDL 溶液 (タンパク質 70 μg/ml) は、200 μmol/l の硫酸銅溶液による酸化促進に対して抵抗性を示し、APP 無添加の場合に比べて、LDL 酸化の開始時間を 1 時間程度遅延させた。これらの結果は、APP には生体の酸化防止効果や肝臓保護作用があることを示唆している。また、小豆の主要なモノマー型ポリフェノールは、カテキン-7β-グルコシドであることを明らかにした。

この研究に用いた小豆煮汁の提供、保存、運搬などにご協力いただきました細川製館 (北海道帯広市) に感謝します。また、この研究は日本豆類基金協会の資金援助を受け、帯広畜産大学 21 世紀 COE プログラム研究の一環として行った。

文 献

- 1) 中野 稔, スーパーオキシド, (第3回増補), (医歯薬出版), pp. 1-136 (1994).
- 2) 吉川敏一, 谷川 徹, 近藤元治, 活性酸素・フリーラジカル, 3, 163 (1992).
- 3) Nakayama, T., Kodama, M. and Nagata, C., Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion radical from cigarette smoke. *Cann.* 75, 95-98 (1984).
- 4) Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Free radicals in biology and medicine, pp. 323-332, Oxford Univ. Press (1989).
- 5) Fischer, L.J. and Hamburger, S.A., Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. *Diabetes*, 29, 213-216 (1980).
- 6) Granger, D.N., McCord, J.M., Parks, D.A. and Halliwell, B.,

- M.E., Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology*, **90**, 80-84 (1986).
- 7) Yoshikawa, T. and Kondo, M., Cellular Membrane (Ohnishi, S.T. and Ohnishi, T.) pp. 271-284, CRC Press (1993).
 - 8) 角田圭雄, 岡上 武, C型肝炎と酸化ストレス, 臨床消化器内科, **20**, 455-462 (2005).
 - 9) Yoshikawa, T., Takemura, S. and Kondo, M., *Acta Vitaminol. Enzymol.*, **4**, 311-318 (1982).
 - 10) Sagai, M. et. Al. Biological effects of diesel exhaust particles. I. In vitro production of superoxide and in vivo toxicity in mouse. *Free Rad. Biol. Med.*, **14**, 37-47 (1993).
 - 11) Yoshikawa, T., Free radicals and their scavengers in Parkinson's disease. *Eur Neurol.*, **33**, 60-68 (1993)
 - 12) Medvedev, Z.A., An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev.*, **65**, 375-398 (1990).
 - 13) Osawa, T., Yoshida, A., Kawakishi, S., Yamashita, K. and Ochi, H., Protective role of dietary antioxidants in oxidative stress, Oxidative Stress and Aging (Cutler, R.G., Packer, L., Bertram, J. and Mori, A., Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland (1995).
 - 14) Nakagawa, K., Ninomiya, M., Okubo, T., Aoi, N., Juneja, L.R., Kim, M., Yamanaka, K. and Miyazawa, T., Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3967-3973 (1999).
 - 15) 「大地からの健康学—地域特産と生活習慣病予防—」, (農林統計協会, 東京) pp. 155-165 (2001).
 - 16) Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4026-4037 (2004).
 - 17) 「新食品分析ハンドブック」(建帛社), pp. 15-193 (2000).
 - 18) Singleton, V.L. and Rossi, J.A. Jr., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **15**, 144-158 (1965).
 - 19) Takahata, Y., Kamiyama, M., Furuta, S., Takahashi, M. and Suda, I., highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5843-5847 (2001).
 - 20) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358 (1979).
 - 21) Cohn, V.H. and Lyle, J., A fluorometric assay for glutathione. *Anal. Biochem.*, **14**, 434-40 (1966).
 - 22) Kikugawa, K., Kojima, T., Yamaki, S. and Kosugi, H., Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. *Anal. Biochem.*, **202**, 249-55 (1992).
 - 23) Beers, R.F. and Sizer, I.W., A spectrophometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140 (1952).
 - 24) Peskin, A.V. and Winterbourn, C.C., A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin. Chim. Acta.*, **293**, 157-66 (2000).
 - 25) Lawrence, R.A. and Burk, R.F., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952-8 (1976).
 - 26) Worthington, D.J. and Rosemeyer, M.A., Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *Eur. J. Biochem.*, **67**, 231-8 (1976).
 - 27) Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54 (1976).
 - 28) Blois, M.S., Aitioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199-1200 (1958).
 - 29) Rosa, G.D., Duncan, D.S., Keen, C.L. and Hurley, L.S., Evaluation of negative staining technique for determination of CN-insensitive superoxide dismutase activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **566**, 32-39 (1979).
 - 30) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉, 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 食科工, **41**, 611-618 (1994).
 - 31) Steinberg, D., Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-921 (1989).
 - 32) Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M., Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.*, **6**, 67-75 (1989).
 - 33) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
 - 34) Dekker, R.F.H. and Richard, G.N., Determination of starch in plant material. *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 441-444 (1971).
 - 35) Nakagawa, K. and Miyazawa, T., Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **43**, 679-684 (1997).
 - 36) Belinky, P.A., Aviram, M., Fuhrman, B., Rosenblat, M. and Vaya, J., The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation. *Atherosclerosis*, **137**, 49-61 (1998).
 - 37) Sakaguchi, S. and Yokota, K., Role of Ca²⁺ on endotoxin-sensitivity by galactosamine challenge: lipid peroxide formation and hepatotoxicity in zymosan-primed mice. *Pharmacol. Toxicol.*, **77**, 81-6 (1995).
 - 38) Hentze, H., Gantner, F., Kolb, S. A. and Wendel, A., Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice. *Am. J. Pathol.*, **156**, 2045-56 (2000).
 - 39) Bajt, M.L., Ho, Y.S., Vonderfecht, S.L. and Jaeschke, H., Reactive oxygen as modulator of TNF and fas receptor-mediated apoptosis in vivo: studies with glutathione peroxidase-deficient mice. *Antioxid Redox Signal*, **4**, 733-40 (2002).
 - 40) Li, C., Liu, J., Waalkes, M.P. and Jaeschke, H., Gene array analysis of the hepatic response to endotoxin in glutathione peroxidase-deficient mice. *Toxicol. Lett.*, **144**, 397-406 (2003).

(平成 18 年 2 月 10 日受付, 平成 18 年 4 月 14 日受理)