

各種食品の抗酸化能の測定と加工による 抗酸化能上昇の検討

田口 寛*・川野亜貴子・田村 雅文・奥村 克純・緒方 進

三重大学大学院生物資源学研究科

Determination of Antioxidative Activity in Various Foods and Investigation of Methods for Increasing Its Activity by Food Processing

Hiroshi TAGUCHI*, Akiko KAWANO, Masafumi TAMURA,
Katsuzumi OKUMURA, and Shin OGATA

Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507

Abstract

Main cause of life style-related disease, especially cancer, and aging is active oxygen species. The antioxidative substance-rich food may be effective for the prevention of life style-related disease and for anti-aging. Therefore the antioxidative activity of various common foods was determined by measuring the extinction degree of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical with ESR (electron spin resonance) spectrometer. And the food processing methods for increasing the antioxidative activity of several foods were investigated.

As the results, very high antioxidative activity was found in coffee, green tea, purple sweet potato, kiwi fruit, etc. The activity in raw garlic was increased more than 10 times by steaming. Also we found that the state of oxidative stress in cells was lowered by coffee, green tea, and purple sweet potato extract just like the positive control compound of ascorbic acid.

Key Words: prevention of life style-related disease, reactive oxygen species,
antioxidative activity in various foods, garlic, oxidative stress in cells

緒 言

酸素は、動物にとって必要不可欠なものであるが、生体内に取り込まれた酸素のおよそ2%が活性酸素に変化し、生活習慣病の主な原因になるなど、有害な作用を示す面もある。活性酸素は、がんを始めとする各種生活習慣病の発症や老化など、好ましくない多くの事象に深く関わっている。生活習慣病の根本的な原因は、その名のとおりの長年の生活習慣であり、その中でも特に食生活は非常

に重要なファクターとなっている。病気になるのも病気を予防するのも食品という二面性があるのが食品の特徴であり、発がん原因の第1位が食品で、全発がん原因の約35パーセントを占め、第2位のタバコの約30%を上回っている。他方で、食品中には、抗酸化物質を始めとするがん予防効果のある物質が含まれているものもあることも知られている。

そこで、健康増進・疾病予防の観点から、各種食品にどの程度の抗酸化能が存在するのかを、広

2007年3月6日受理

〒514-8507 津市栗真町屋町1577

* For correspondence (e-mail: hiroshi@bio.mie-u.ac.jp)

く検証することは、非常に重要なことであり、かつ研究として興味深いところである。

活性酸素は、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、及び一重項酸素がその代表的なものであり、最近では、一酸化窒素やペルオキシ亜硝酸イオンなどの酸化窒素化合物も話題になってきている。

スーパーオキシドアニオンは、摂取した食物からエネルギーを取り出す、つまり呼吸のときに生じる活性酸素である。また、一重項酸素は、紫外線などによって、皮膚や体内に発生するのが特徴である。さらに、ヒドロキシラジカルは、過酸化水素と金属イオンが反応する際に発生し、酸化力が最も強い活性酸素である。発生したこの活性酸素の体内に存在する時間は、わずか百万分の一秒などというような極めて短い時間であるにも関わらず、がんや成人病、老化の引き金となる率が最も高いと言われている。

活性酸素は、薬剤や紫外線照射などによる非生理的条件下においてだけではなく、生理的条件下でも常時生成されている。たとえば、好中球や単球などの生体防御のために異物貪食を行う際に発生するスーパーオキシドアニオンや、ミトコンドリアの電子伝達系から漏出する様々な活性酸素種などがその代表とされる。活性酸素は、ヒトの身体の中に侵入した細菌やウィルスを死滅させるという有効な働きをする一方で、体内で増えすぎるとDNAや細胞の脂質膜に作用し、遺伝情報の破壊や細胞膜の機能破綻を引き起こすことも知られており、これらが、発がんや老化の原因になるのである。

しかし、生体内には活性酸素を消去する物質が、いくつか含まれていることも近年明らかになっている。その代表的なものとしては、superoxide dismutase (SOD) やカタラーゼのような酵素であるとか、ビタミンE、ビタミンC (アスコルビン酸) やグルタチオンといったビタミンなどの低分子化合物などが挙げられる。例えば、生体内で発生した O_2^- は、SODによって過酸化水素に変えられ、過酸化水素は、さらにカタラーゼやグルタチオンペルオキシターゼなどの各種ペルオキシターゼによって水にまで還元されて無毒化される。従って、これらの antioxidant と oxidant のバランスが重要であり、何らかの理由で消去系が

不活性化されたり、活性酸素生成系が活性化したりすると、生体は酸化ストレスを受けるようになる。その結果として、活性酸素が、がん、糖尿病、動脈硬化、神経疾患、炎症性疾患などを引き起こすのである¹⁾。

ところで、がんの約3分の1は食生活のあり方が原因であるといわれているが、その一方で、さまざまな食品の中に、逆に発がんを抑制する物質も含まれていることが次第に明らかになってきているのは興味深いことである²⁾。また、愛知県がんセンターの2万人以上のヒトを対象とする疫学的調査の結果によると、コーヒーは、発がんのリスクを減らすことが明らかにされており、特に直腸がんに対しては、かなりの効果が見られている。さらに、お茶に関しても、胃がんなどに対しては、その発がんのリスクを抑えるという報告もされている³⁾。

また、ニンニクは、健康食品として非常に古い歴史を持っており、エジプト、ギリシャ、中国やインドの古い書物から医学的な用途で使われてきたことが明らかになっている。さらに、その後の研究から、がんや心臓病などの病気の予防に有効であることも知られている。アメリカのデザイナーフーズ計画においても、ニンニクは、がん予防効果が最も高い食品のグループに入っており、さまざまな研究や疫学的調査などによって、ニンニクのがん予防効果が明らかにされてきている⁴⁾。

ニンニクと抗酸化の関係を科学的に検討する際によく使われるのが Aged Garlic Extract (AGE) であり、これは生ニンニクからとった抽出液を室温で長期保存した結果得られる無臭の抽出液である。疫学的調査によると、生ニンニクとAGEを栄養補助的に摂取すると、AGEを与えられた被験者から単離された Low Density Lipoprotein (LDL) は、生ニンニクを摂取した、もしくは何も摂取していない被験者に比べ強い酸化抵抗を示した⁵⁾。

AGEは、水溶性アリルアミノ酸誘導体から構成されており、これは有機硫黄化合物や脂溶性アリル硫化物、さらにはフラボノイドやサポニンなどの根源物質となっている。脂溶性で揮発性のある有機硫黄化合物は、アリシンを含むことが知られており、ニンニクを細かく切り刻む際に酵素的に生産される化合物である。アリシンは一般に一

過性の物質であり酸化力を持つとされ、AGEには存在しない。したがって、アリシンはニンニク摂取後の血液中には検知されないため、体内での酸化力はほとんど無いと考えられる⁶⁾。

以上のような背景を受けて、ラジカル消去活性および抗酸化作用を持つ物質の検索や、各種食品が有する抗酸化能の程度を調べることは、実用上も重要で、非常に興味深いことであると言える。

そこで、多種類の一般的な食品をとりあげ、その酸化力力をさまざまな条件下で測定し、比較検討した。

実験方法

1. 測定試料と試薬

ニンニクは、(株)三健総合研究所(伊勢市)から、コーヒーの一部(スジャータレギュラーコーヒー)は、(株)めいらく(名古屋市)からの提供品である。それ以外は、津市内のスーパーマーケットや酒屋などで購入した。DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) はナカライテスク(株)から購入した。

2. ESR 測定

ESR (電子スピン共鳴装置) は、日本電子の ESR SPECTROMETER (JES-REIX) を使用し、その設定は、sweep width: $7.5 \times 1 \text{sec}$, frequency: 100 K, receiver mode: 1st, phase: 0°, field modulation width: $0.2 \times 1 \text{sec}$, receiver gain: $5 \times 100 \text{sec}$, time constant: 0.03secとした。今回、ラジカル発

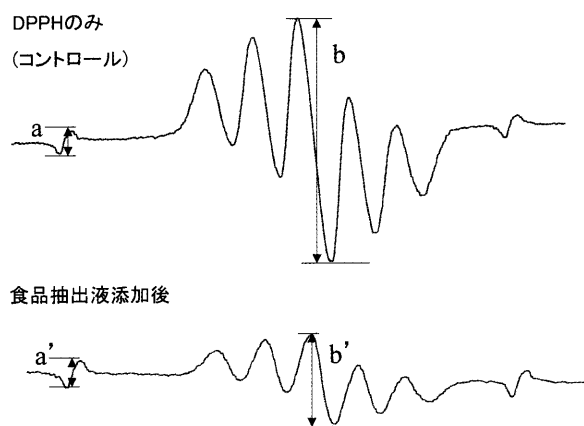


図1. ESRで測定したDPPHラジカルのピーク

生試薬として、長時間安定なDPPHラジカルを用いた。

測定試料と、終濃度 $30 \mu\text{M}$ となるようにエタノールに溶解したDPPHを混合し、ESRを用いてDPPHラジカルを食品中の抗酸化成分がどの程度消去するのかを測定した。そして、図1に示すように、コントロール区のMnピークの強度をa、DPPHのシグナルピークの強度をb、サンプル区のMnピークの強度をa'、サンプル区のDPPHシグナルピークの強度をb'としてサンプルのDPPHピークの強度に対する相対的なピーク強度の変化率を下記の式により求め、ラジカル消去率とした。

ラジカル消去率 (%)

$$= \{1 - (b'/a' \div b/a)\} \times 100 \quad (\text{式1})$$

3. 測定試料の抽出

食品を、飲料、ニンニク、サツマイモ類、野菜/果物、海産物、砂糖とに分類し、それぞれの食品の抗酸化能を測定し、比較した。使用する試料が液体や固体など違った形状を取るため、測定の際の抽出条件が異なり、全てを1つの基準で比較することが困難であったことがこのように分類した理由である。それぞれの抽出条件は以下に示すとおりである。

(1) 飲料

カン、ビンなどからそのまま15ml容の遠心チューブに取り出し測定した。コーヒーの残渣は、140mlの超純水と8gのレギュラーコーヒーでコーヒーを一度抽出した後、コーヒーの残渣を半分に分け、それぞれに5倍量の超純水、5倍量のエタノールを加えて沸騰湯浴中で5分間熱した。抽出液をそれぞれチューブに分注後遠心分離し、その上清を得て測定した。

インスタントコーヒーやドリップ式のコーヒーは、それぞれの市販の容器に書かれている指示に従った。

異なる焙煎度合いのコーヒー(モカコーヒー)の抗酸化能測定実験では、生のコーヒー豆、焙煎時間2~9分の焙煎コーヒー豆を、それぞれ8g秤取し、140mlの超純水で抽出して測定した。

(2) ニンニク

10g前後の三重県産の生ニンニクの鱗片を秤取

し、5倍容量の超純水と共に1.5分間ホモジナイズした後、遠心分離(3000 rpm, 10分, 0℃)して得られた上清を測定した。

ニンニクを蒸す時は、温度、湿度、時間を色々と変えて処理し、それらの抽出液の抗酸化能を比較検討した。

(3) サツマイモ類

可食部をニンニクの試料の調製法と同様に処理してから測定した。

(4) 野菜・果物

可食部をニンニクの試料の調製法と同様に処理してから測定した。

(5) 海産物

可食部をニンニクの試料の調製法と同様に処理してから測定した。

(6) 砂糖(カラメル)

種々の砂糖を22gに超純水を50ml加え、色の濃さを見ながらカラメル状になるまでかき混ぜながら加熱した。なお、スクロース・氷砂糖・テンサイ・黒砂糖・キビ砂糖・コーヒーシュガーのカラメルは、こげ茶色になるまで約15分加熱した。その後は、ニンニクの場合と同様に処理した。

4. 細胞内酸化ストレス状態の測定

5×10^5 cells/mlのヒト前骨髄性白血病細胞HL-60を懸濁した培地中に、上述のようにして調製したコーヒー、日本茶、紫イモの各試料を、培地量に対し、1/10もしくは1/100量加え、1時間CO₂インキュベーター中で前処理を行った。その後、McGowanらの方法⁷⁾に従い、DCFH-DA(Dichlorofluorescein diacetate: Molecular Probe社)を終濃度5μMとなるように添加し、さらに1時間CO₂インキュベーター中で処理を行った。続いて、終濃度0.05mMの過酸化水素で、10分間酸化ストレスを負荷した。そして、細胞を冷PBS(-)(Ca²⁺, Mg²⁺ free-Phosphate Buffered Saline)で2回洗浄した後、300μlの冷PBS(-)に懸濁し、FCM(flow cytometer: Becton Dickinson社: FACSCalibur)で、細胞の蛍光強度(検出器FL1: 530nm)を測定した。

結果と考察

DPPHラジカルエタノール溶液をESR法で測定すると、典型的な5本の特徴あるシグナルを示した。そこで今回は、図1に示すピークの最も大きい3本目のシグナルの強度を測って、式1に従って、各試料におけるDPPHラジカル消去率を求め、比較検討を行った。

測定結果を比較する際、式1のような計算方法を用いた。抗酸化能を示すグラフで、縦軸(ただし図4を除く)は相対抗酸化能を示している。なお、ニンニクやイモなどの乾燥した、もしくは固形の試料の測定では、5倍量の超純水を加えた分、その希釈率の補正を行っており、全ての試料の値は、同一重量当りの相対抗酸化力とみなせるものである。

1. 飲料の抗酸化能

コーヒーや緑茶の抗酸化能が非常に高いことが顕著であった(図2)。今回のこの結果は、緑茶やコーヒーが、胃がんや大腸ガンの予防に実際に効果が見られるという大規模な疫学調査の報告³⁾を、in vitroの実験から支持するものである。

(1) コーヒーの抗酸化能

種々のコーヒーの抗酸化能を比べたが、産地や製造元によって抗酸化能に大きな差が出た。また、インスタントコーヒーとドリップコーヒーの比較では、一般にどちらか一方の抗酸化能が高いと言うことはできなかった(図3)。つまり、インスタントかドリップかと、抗酸化能とは関係ないことが明らかになった。

(2) 焙煎度合いの異なるコーヒー豆の抗酸化能

焙煎していない生豆から、焙煎時間が9分間の、かなり深く焙煎して黒色に近くなった豆までを、経時的にサンプリングしてコーヒーを抽出し測定したところ、図4にその結果を示すように、浅煎りから深煎りまで焙煎しても、いずれも抗酸化能の上昇は見られず、むしろ焙煎によって、抗酸化能が生豆よりもやや低下する傾向が見られた。このことより、コーヒーの抗酸化能は、焙煎とは関係がないと考えられる。よって、食品を加熱すれば、抗酸化能が必ずしも上昇するとは限らないこともわかった。

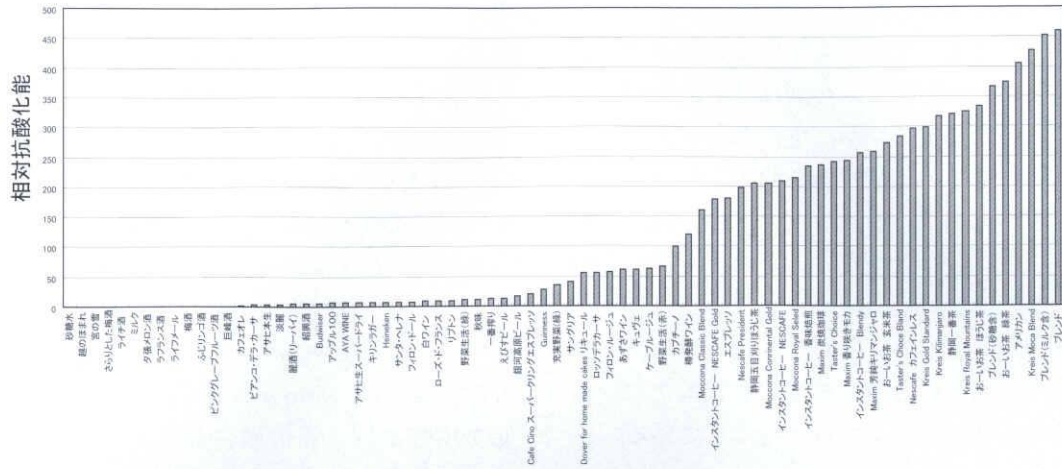


図2. 各種飲料の抗酸化能

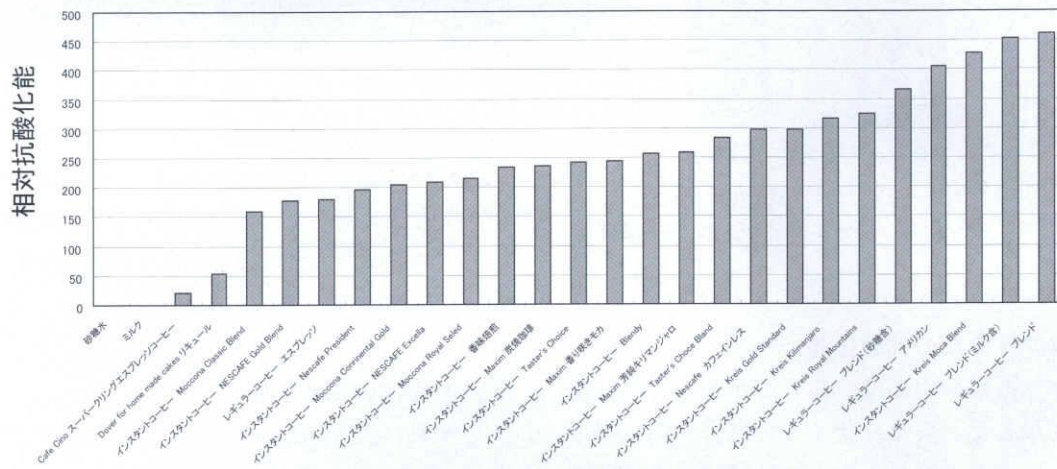


図3. 各種コーヒーの抗酸化能

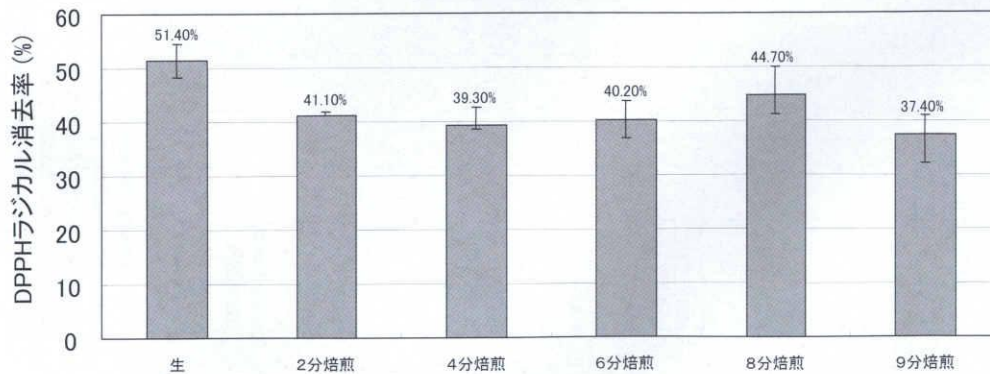


図4. コーヒーの焙煎度合いの違いによる抗酸化能の比較 (1000倍希釈時のDPPHラジカル消去率)

2. ニンニクの抗酸化能

生ニンニクを蒸した製品を、すでに健康食品として市販している関係で、今回はこの部分の詳細については公表できないが、生ニンニク、生ニンニクを蒸したものの抗酸化能を測定した結果の一例のみを図5に示す。これは上昇率の非常に低い例である。生ニンニクを蒸すことによって、その抗酸化能は、少なくとも生ニンニクの10倍以上、最大では約300倍も高まるが、そのメカニズムは不明であり、現在検討中である。ニンニクに関しては、別途詳細な報告をする予定にしている。

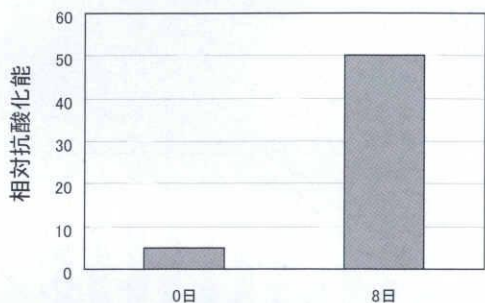


図5. 生ニンニクを蒸した時の抗酸化能の上昇温度70℃、湿度100%で8日間蒸したときの結果

3. サツマイモ類の抗酸化能

サツマイモ類の中では、紫イモが著しく高い抗酸化能を示した。また、紫イモの場合を例に挙げると、生のものと蒸したものでは抗酸化能に非常に大きな違いがみられた。生の紫イモの原液は、抗酸化能を90%示したのみであった。また、誤

差を考えても、干したイモである「きんこイモ」などにも、生のイモに比べれば高い抗酸化能があると言える。なお、紫イモチップス測定時には、エタノールを加えるとゲル状の物質が生成し、ESRによる解析の際、問題となったため、試料中のゲルを遠心分離により取り除き、得られた上清を測定した。以上の結果をまとめて図6に示す。紫イモの高い抗酸化力は、豊富に含まれるアントシアニンに由来するものと予想され、ラットを用いた実験では、ラットが本来保有している抗酸化能が増強されるとの報告があり、この報告をin vitroの実験から支持するものである⁸⁾。

4. 各種野菜・果物の抗酸化能

なお、梨、イチジク、キウイフルーツの測定時には、エタノールを加えるとゲル状の物質が生成したため、試料のゲルを遠心分離により取り除き、その上清を測定したが、柑橘類やトロピカルフルーツに若干の抗酸化能が見られ、キウイは他の試料と比べ、かなり高い抗酸化能を示した(図7)。なお、キウイフルーツは、培養細胞を用いた実験系において、酸化ストレスによるDNA損傷に対して防御効果を示す事が報告されている⁹⁾。

5. 海産物の抗酸化能

いずれにも、抗酸化能はほとんど検出されないか、非常に低い値であった(図8)。ただ、今回検討したサンプルの中では、他に比べて、甲殻類において、相対的に高い抗酸化能を示す傾向が認

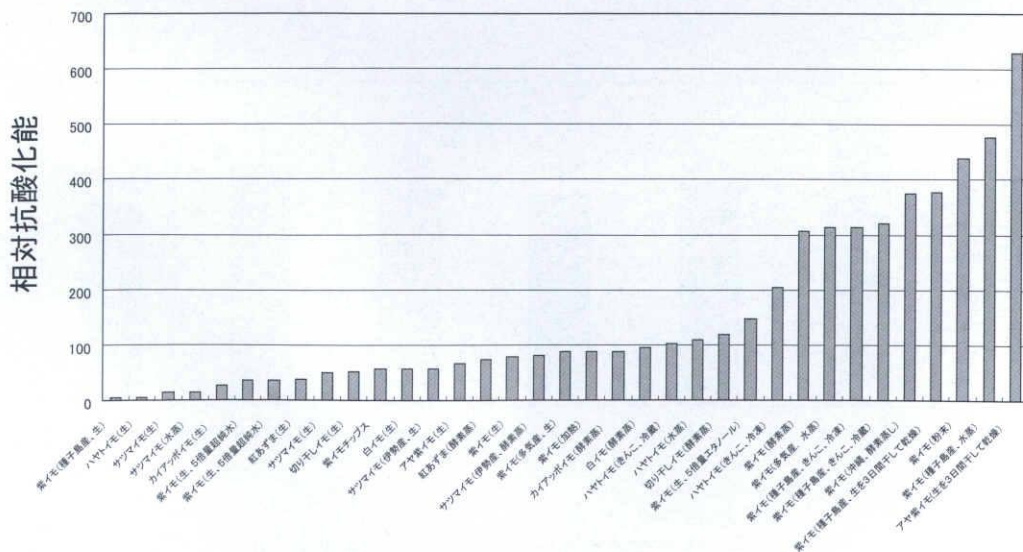


図6. 各種サツマイモ類の抗酸化能

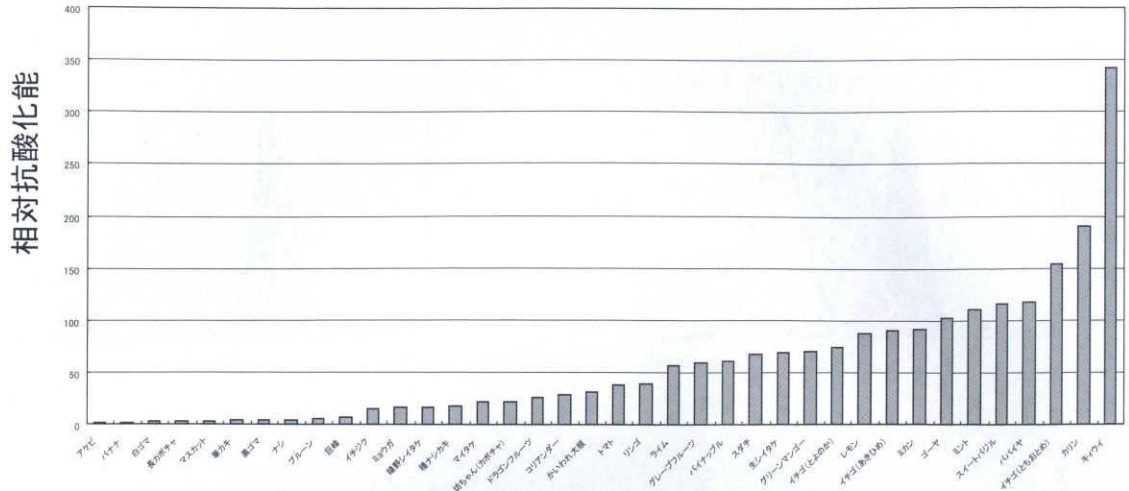


図7. 各種野菜・果物の抗酸化能

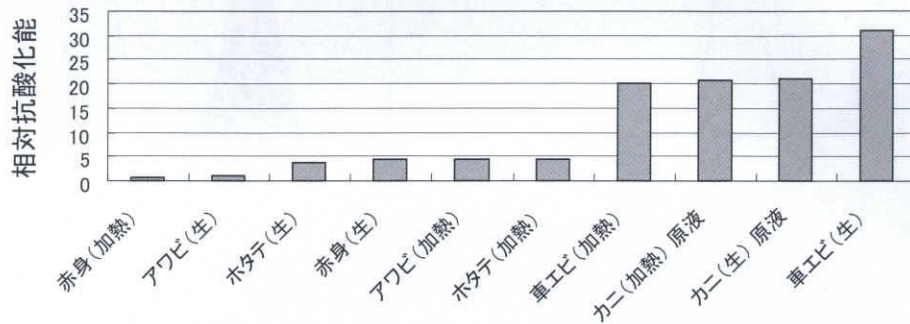


図8. 海産の動物性食品の抗酸化能

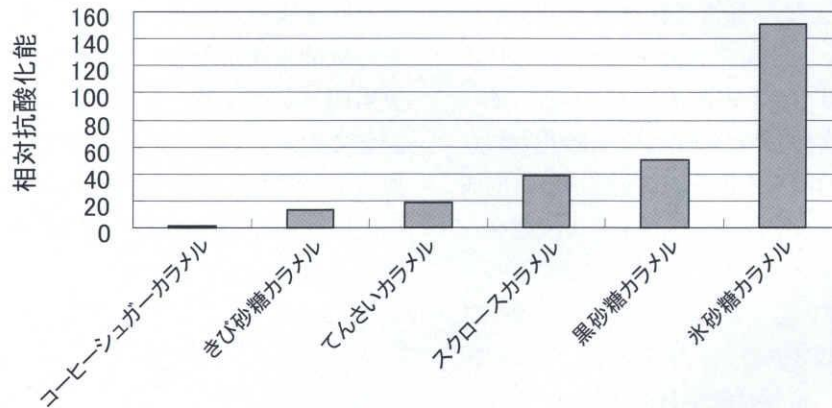


図9. 砂糖 (カラメル) の抗酸化能

められた。意外にも、近年、エビ¹⁰⁾、カニ¹¹⁾などにおいて、カタラーゼを始めとする抗酸化系酵素の解析や、カニへの紫外線によるDNAの酸化損傷の影響が検討される¹²⁾など、今回得られた実験結果との関連性を示唆する報告がなされつつあることは大変興味深い。

6. 砂糖 (カラメル) の抗酸化能

砂糖水には抗酸化能がほとんど無かったが、カラメルにすることで、抗酸化能を示した。さらに、カラメルの色が濃くなるにつれて、即ち加熱時間が長くなるにしたがって抗酸化能も高くなった。砂糖の種類では、氷砂糖から作ったカラメルが最も高い抗酸化能を示した (図9)。

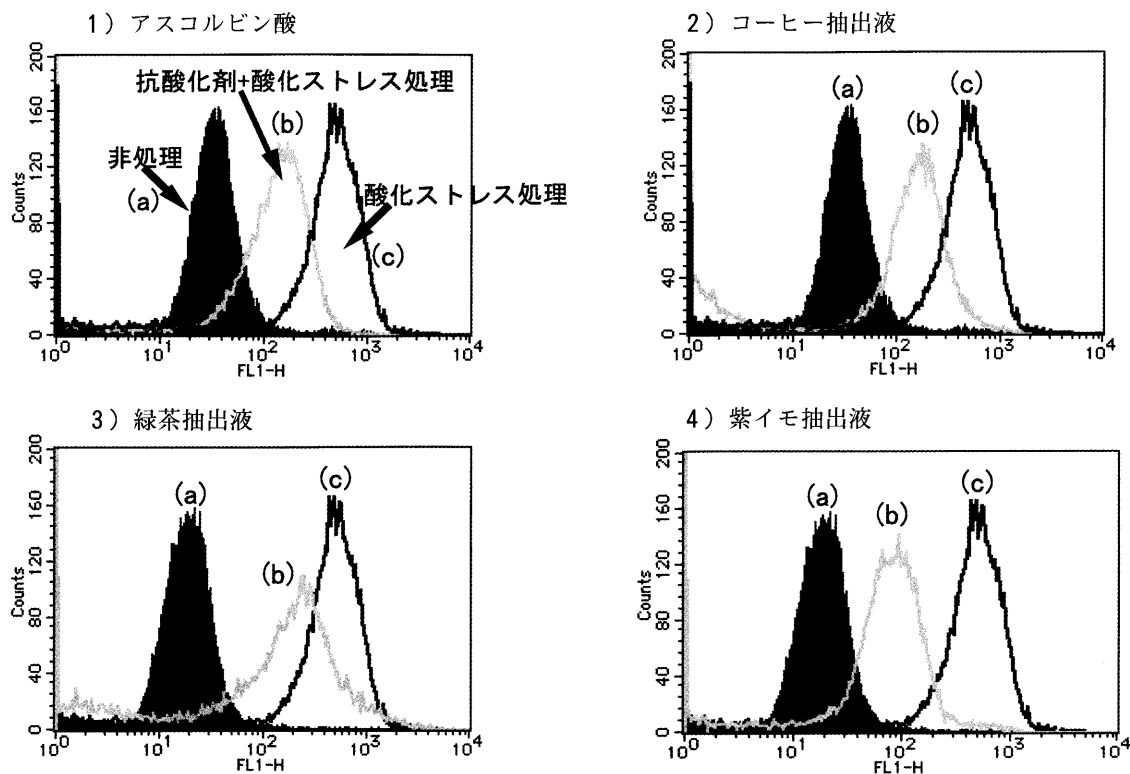


図10. 各試料を培地量に対して1/10加えた時の細胞内酸化ストレス状態におよぼす影響

7. 食品による細胞内酸化ストレス状態の低下

今回、細胞内酸化ストレス状態を解析するために用いた、DCFH-DAは、通常それ自体は蛍光を発しないが、細胞内に入り、エステラーゼの作用により脱アセチル化を受けると細胞内にとどまる。そして、その状態で活性酸素種が存在すると酸化され、蛍光物質であるDCF (dichlorofluorescein) が生成する。それにより、細胞内の酸化ストレス状態を、蛍光強度の増減によりモニターする事のできるプローブとして活用されている⁷⁾。フローサイトメーターによる解析結果は、ヒストグラム形式で示した。横軸は、相対蛍光強度、縦軸は細胞数、黒塗りのチャートは、非処理を表し、灰色のチャートは、過酸化水素による酸化ストレス処理した場合、実線のチャートは、アスコルビン酸または食品抽出液にて前処理した後、酸化ストレス処理した場合を表している。

培地の1/10量の食品抽出液を加えた場合には、コーヒー、緑茶、紫イモのすべてが、ポジティブコントロールであるアスコルビン酸（培地中の終濃度：0.1 mM）と同程度に酸化ストレスを抑える働きをしていた。したがって、コーヒー、緑茶、紫イモに含まれている抗酸化物質が細胞内に入り、

細胞内の酸化ストレスに対して緩和する働きを示したと言えよう（図10）。

今回の研究で、ニンニクは、蒸すことによって、その抗酸化能が大きく上昇するなどの興味深い事実も明らかになり、そのメカニズムも今後検討の課題である。さらに、これらの結果を応用した健康食品の開発・商品化にも取り組み、国民の健康増進・疾病予防や国の医療費の節減に、わずかなりとも寄与していきたい。

要 約

がんを始めとする生活習慣病や老化の原因の主なものとして活性酸素種がある。それゆえに、活性酸素種を消去する作用のある抗酸化物質を多く含む食品を、積極的に摂取すれば、生活習慣病の予防や老化の遅延に効果が出るのが期待できる。そこで、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカルの消去能をESR (電子スピン共鳴装置) で測定することによって、一般的な食品の抗酸化能を調べ、さらにその抗酸化能を高める加工法について検討した。

その結果、コーヒー、緑茶、紫イモ、キウイフルーツなどに、特に強い抗酸化能が検出された。また、生ニンニクは、蒸すことによって、抗酸化能が10倍以上も上昇することがわかった。コーヒー、緑茶、紫イモ抽出液は、アスコルビン酸と同様に、細胞内の酸化ストレス状態をも低下させることが明らかになった。

文 献

- 1) 井上貴司：成人病・ガン・老化は活性酸素が引き金だった，日東書院，68-69（1996）
- 2) 西野輔翼：がん抑制の食品，法研（1994）
- 3) INOUE, M., TAJIMA, K., HIROSE, K., HAMAJIMA, N., TAKEZAKI, T., KUROISHI, T. and TOMINAGA, S. (1998) Tea and coffee consumption and the risk of digestive tract cancers: data from a comparative case-referent study in Japan. *Cancer Causes and Control* **9**: 209-216.
- 4) MILNER, J. A. (2001) A historical perspective on garlic and cancer. *Amer. Soc. Nutr. Sci.* 1027 S-1031 S.
- 5) MUNDAY, J. S., JAMES, K. A., FRAY, L. M., KIRKWOOD, S. W. and THOMPSON, K. G. (1999) Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against in vitro oxidation. *Atherosclerosis*. **143**: 399-404.
- 6) BOREK, C. (2001) Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Amer. Soc. Nutr. Sci.* 1010 S-1015 S.
- 7) MCGOWAN, A. J., RUIZ-RUIZ, M. C., GORMAN, A. M., LOPEZ-RIVAS, A. and COTTER, T. G. (1996) Reactive oxygen intermediate (s) (ROI): common mediator (s) of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and apoptosis. *FEBS Lett.* **392**: 299-303.
- 8) HAN, K. H., SEKIKAWA, M., SHIMADA, K., HASHIMOTO, M., HASHIMOTO, N., NODA, T., TANAKA, H., FUKUSHIMA, M. (2006) Anthocyanin-rich purple potato flake extract has antioxidant capacity and improves antioxidant potential in rats. *Br. J. Nutr.* **96**: 1125-1133.
- 9) COLLINS, B. H., HORSKA, A., HOTTEN, PM., RIDDOCH, C., COLLINS, A. R. (2001) Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr. Cancer*. **39**: 48-53.
- 10) TAVARES-SANCHEZ, O. L., GOMEZ-ANDURO, G. A., FELIPE-ORTEGA, X., ISLAS-OSUNA, M. A., SOTELO-MUNDO, R. R., BARILLAS-MURY, C., YEPIZ-PLASCENCIA, G. (2004) Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **138**: 331-337.
- 11) ORBEA, A., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., SOLE, M., P ORTE, C., CAJARAVILLE, M. P. (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). *Aquat. Toxicol.* **58**: 75-98.
- 12) GOUVEIA, G. R., MARQUES, D. S., CRUZ, B. P., GERACITANO, L. A., NERY, L. E., TRIDADE, G. S. (2005) Antioxidant defenses and DNA damage induced by UV-A and UV-B radiation in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochem. Photobiol.* **81**: 398-403.