

短 報

岡山県産農産物の抗酸化活性

川上 賀代子¹⁾, 松尾 泉里¹⁾, 守谷 智恵¹⁾, 畑中 唯史²⁾, 坪井 誠二¹⁾*

¹⁾ 就実大学薬学部生化学研究室, ²⁾ 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所

Antioxidant activity of agricultural products in Okayama Prefecture

Kayoko Kawakami¹⁾, Senri Matsuo¹⁾, Chie Moritani¹⁾, Tadashi Hatanaka²⁾, Seiji Tsuboi¹⁾*

¹⁾ Department of Biochemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

²⁾ Okayama Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries, Research Institute for Biological Sciences (RIBS), Okayama

(Received 20 October 2016; accepted 8 November 2016)

Abstract: Polyphenols, the most abundant antioxidants in the agricultural product, protects cells against reactive oxygen species induced oxidative stress. Therefore, the consumption of a diet rich in antioxidants like polyphenols may prevent various oxidative stress-related disease. The present study is aimed at assessing the antioxidant activity and the total polyphenol contents of agricultural products in Okayama Prefecture. The intracellular glutathione level in human hepatoblastoma HepG2 was significantly increased by chinese yellow chives extract treatment. The 50% ethanol extract of whole black grape “AuroraBlack” had the highest levels of DPPH radical scavenging activities and total polyphenols. Chinese yellow chives showed potent superoxide anion radical scavenging activity with IC₅₀ values of 0.89 mg/mL in comparison to glutathione (2.2 mg/mL). These results suggest that chinese yellow chives would provide a source of dietary anti-oxidants.

Keywords: antioxidant activity, polyphenol, agricultural products, chinese yellow chives, AuroraBlack

緒言

酸化ストレスは、糖尿病、動脈硬化、神経変性疾患をはじめ様々な疾病の発症や増悪化に関わると考えられている¹⁾。食事により外部から抗酸化物質であるポリフェノールを多く摂取したり、生体内の抗酸化物質であるグルタチオン量を高めたりすることは、酸化ストレスが関与する疾病の治療や予防に有効であることが期待される。こ

れまでに、さまざまな地域農産物の抗酸化活性が報告されており^{2,3)}、岡山県産についても桃や山ブドウの抗酸化作用が示されているが^{4,5)}、報告例は少ない。そこで、岡山県産農産物に細胞内グルタチオン上昇作用といった抗酸化作用を見いだすことができれば、岡山県産農産物の付加価値を高めることができる。

本研究では、岡山県産農産物について機能性食

品の開発の可能性を探るため、抗酸化活性、特にグルタチオン量上昇作用に注目し解析を行った。

方法

1. 試料の調製

岡山県産農産物 8 点 (黄ニラ, 岡山イチゴ (育成品種 130203T-27), おい C ベリー, さがほのか, シャインマスカット, オーロラブラック, 桃太郎トマト, 清水白桃) は岡山県農林水産総合センター農業研究所において栽培されたものを使用した。シャインマスカットとオーロラブラックは果実全体 (皮有) と果肉部分 (皮無) で抽出を行った。各農産物に蒸留水を加えフードプロセッサで破碎した。オーロラブラックについては 50 % エタノール (オーロラブラック皮有 E) で同様に破碎した。得られた抽出液を遠心分離し, 上清を凍結乾燥した。凍結乾燥試料を, 10 mg/mL になるようにミリ Q 水で溶解し, 試料とした。

2. 細胞内グルタチオン上昇活性の測定

ヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞を 3×10^5 cell/6 well plate に播種した。48 時間培養後, 各試料を 0.5 mg/mL になるように添加した。試料を添加していないものを control とした。24 時間後に細胞を回収し, 除タンパク後に全グルタチオン (還元型+酸化型) 量を DTNB 法を用いて測定した⁶⁾。細胞抽出液のタンパク量を測定し, タンパクあたりのグルタチオン量を算出した。

3. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の測定

有色安定ラジカルである DPPH のラジカル消去による退色を利用し測定を行った⁷⁾。試料 20 μ L を 96 穴プレートに添加し, 0.2 mM DPPH (東京化成工業) エタノール溶液を 180 μ L 添加した。暗所で 30 分静置後, 492 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。標準物質として Trolox (シグマアルドリッチ) を使用し, ブランクにミリ Q 水を使用した。結果は, Trolox の DPPH ラジカル消去による退色から検量線を作成し, Trolox 当量で示した。

4. スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) 消去活性の測定

試料 20 μ L を 96 穴プレートに添加し, 反応溶液 160 μ L [125 mM リン酸バッファー (pH 7.5), 20 μ L, 5 mM ヒポキサンチン 20 μ L, 2.5 mM ニトロブルーテトラゾリウム 1 μ L, ミリ Q 水 119 μ L] を添加後, 37°C, 5 分で加温した。0.34 mg/mL キサンチンオキシダーゼ (和光純薬工業) を 20 μ L 添加し, 595 nm の吸光度の変化をマイクロプレートリーダーで測定した。標準物質としてグルタチオンを使用した。50% O_2^- 消去活性 (IC_{50} 値) は試料の代わりにミリ Q 水を添加したときの消去率をコントロール (100%) として算出した。

5. 総ポリフェノール量の測定

総ポリフェノール量の測定は Folin-Ciocalteu 法を一部改変して行った⁸⁾。試料 15 μ L を 96 穴プレートに添加し, フォーリン-チオカルト試薬 (シグマアルドリッチ) 15 μ L を添加した。ミリ Q 水 140 μ L を添加し 3 分静置後, 10 % Na_2CO_3 30 μ L を添加した。1 時間静置後, 760 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。標準物質として没食子酸 (ナカライテスク) を使用し, 得られた検量線から総ポリフェノール量を算出した。

結果

1. 細胞内グルタチオン上昇活性

黄ニラ, マスカット, 清水白桃を添加することにより, 細胞内グルタチオン量が有意に上昇することが明らかとなった (図 1)。特に黄ニラはコントロールに比べてグルタチオン量が 1.7 倍上昇していた。

2. DPPH ラジカル消去活性

おい C ベリー, オーロラブラック皮有 E (エタノール抽出), さがほのか, 岡山いちごの順に高い DPPH ラジカル消去活性を示した (図 2)。一方, シャインマスカットや清水白桃には DPPH ラジカル消去活性はほとんど認められなかった。

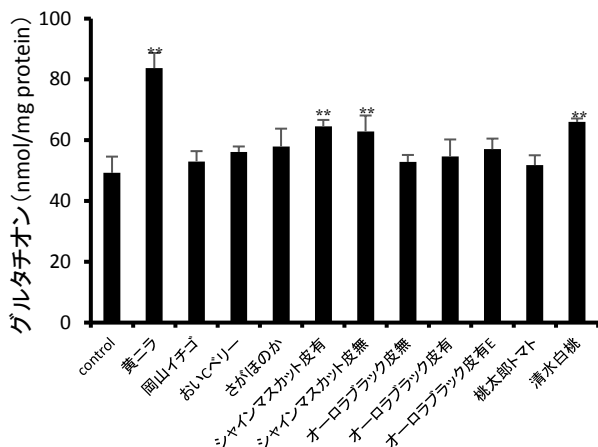


図1 岡山県産農産物の細胞内グルタチオン上昇活性
(0.5 mg/mL, n = 3, 平均±SD, **p<0.01 vs control)

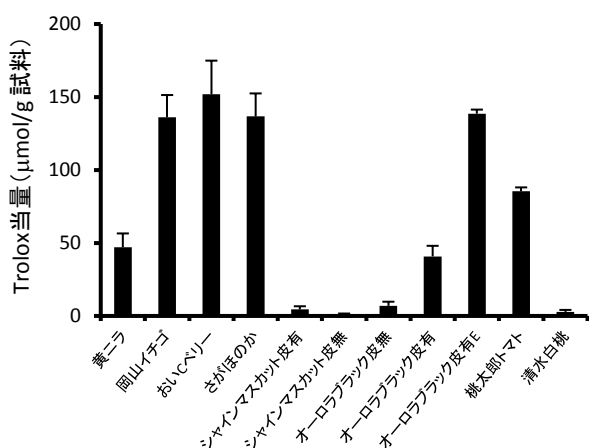


図2 岡山県産農産物のDPPHラジカル消去活性
(n = 3, 平均±SD)

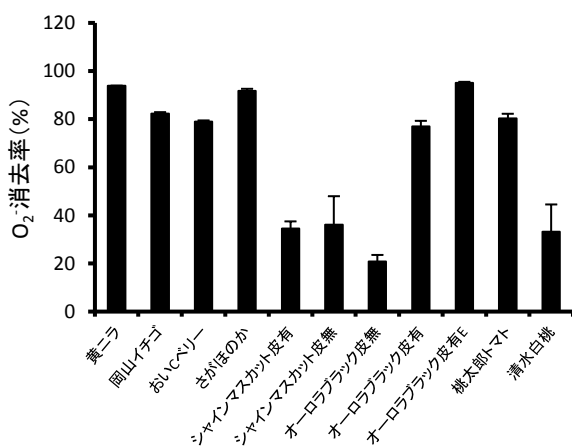


図3 岡山県産農産物のO₂⁻消去活性
(10 mg/mL, n = 3, 平均±SD)

表1 岡山県産農産物の50%O₂⁻消去活性
(n = 3, 平均±SD)

	IC ₅₀ (mg/mL)
グルタチオン	2.2 ± 0.7
黄ニラ	0.89 ± 0.02
岡山イチゴ	6.9 ± 0.8
おいCベリー	6.9 ± 0.5
さがほのか	3.1 ± 0.7
オーロラブラック皮有E	2.3 ± 0.6

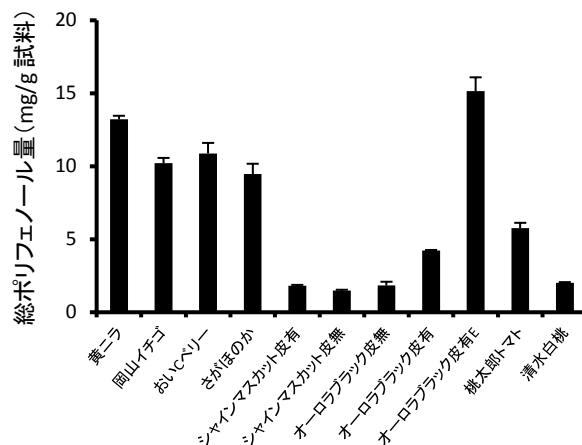


図4 岡山県産農産物の総ポリフェノール量
(n = 3, 平均±SD)

3. O₂⁻消去活性

O₂⁻消去活性を測定した結果、黄ニラ、岡山イチゴ、おいCベリー、さがほのか、オーロラブラック皮有E(エタノール抽出)に高いO₂⁻消去活性があることが明らかとなった(図3)。O₂⁻消去活性の高かった岡山県産農産物について50% O₂⁻消去活性(IC₅₀値)を求めた。その結果、黄ニラ、オーロラブラック皮有E(エタノール抽出)のIC₅₀値は、それぞれ0.89 mg/mL、2.3 mg/mLであった(表1)。また、黄ニラはグルタチオンよりも高いO₂⁻消去活性があることが明らかとなった。

4. 総ポリフェノール量

黄ニラ、岡山イチゴ、おいCベリー、さがほのか、オーロラブラック皮有E(エタノール抽出)の総ポリフェノール量が高いことが分かった(図4)。一方、シヤインマスカットや清水白桃の総ポリフェノール量が少ないことが分かった。

考察

岡山県産農産物の機能性評価のため、抗酸化活性（細胞内グルタチオン上昇活性、DPPH ラジカル消去活性、 O_2^- 消去活性）を調べた。黄ニラは他の岡山県産農産物に比べて高い細胞内グルタチオン上昇活性があることが明らかとなった（図1）。また、黄ニラは抗酸化物質であるグルタチオンよりも高い O_2^- 消去活性があることが明らかとなった（表1）。一方、DPPH ラジカル消去活性は他の農産物と比較して高い活性ではなかった。黄ニラが属するネギ属には含硫化合物（アリシン、アイリン、アホエン）が含まれており、血管内皮細胞にアリシンを添加するとグルタチオン量を上昇させるという報告がある⁹⁾。黄ニラの活性成分として含硫化合物が考えられるが、更なる研究が必要である。

農産物の抗酸化活性に寄与する成分としてアスコルビン酸やポリフェノールが挙げられるが、特にポリフェノールは抗酸化活性と相関が高いことが報告されている¹⁰⁾。そこで、岡山県産農産物の総ポリフェノール量を測定した（図4）。その結果、DPPH ラジカル消去活性の高かった岡山県産農産物（おいCベリー、オーロラブラック皮有E（エタノール抽出）、さがほのか、岡山イチゴ）は、総ポリフェノール量も高かった。いちごの中でもおいCベリーはアスコルビン酸含量が高い品種であり、ポリフェノールだけでなく、アスコルビン酸が抗酸化活性に寄与していると考えられる。

オーロラブラックは2003年に品種登録された岡山県の新しい黒いぶどう品種であり、皮が薄いので皮ごと食べられるのが特徴である。そこで、果実全体（皮有）と果肉部分（皮無）に分けて抗酸化活性を測定した。グルタチオン上昇活性はみられなかったが、DPPH ラジカル消去活性、 O_2^- 消去活性は皮有の方が高いことが分かった（図2, 3）。水抽出と含水エタノール抽出を比較すると含水エタノール抽出の方が活性が高かった。また、総ポリフェノール量も皮有、含水エタノール抽出の方が高かった（図4）。黒ぶどうの皮にはアント

シアニンが含まれており¹¹⁾、アントシアニンが抗酸化活性に寄与していると考えられる。

本研究により、岡山県農産物の機能性として、抗酸化活性、特に細胞内グルタチオン上昇作用のある農産物を明らかにすることができた。中でも、岡山県において生産量が全国の約7割を占めている黄ニラに細胞内グルタチオン上昇作用と O_2^- 消去活性が明らかとなった。これまで、黄ニラのアスコルビン酸量の報告があるが¹²⁾、機能性に関する研究はほとんどない。今後、黄ニラの機能性を明らかにするため、活性成分の同定や動物試験など、さらなる研究が必要である。

謝辞

本研究は岡山県外部知見活用型・産学官連携研究事業の一環として行いました。

引用文献

- 1) Reid M. and Jahoor F.: Glutathione in disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **4**, 65-71 (2001).
- 2) 伊藤 史, 水口 聡, 石々川 英樹: 愛媛県産地域農産物の抗酸化能および総ポリフェノール含量による評価. *愛媛県農林水産研究所報告.* **2**, 43-51 (2010).
- 3) 木村 俊之, 山岸 賢治, 鈴木 雅博, 新本 洋士: 農産物のラジカル消去能の検索. *日本食品科学工学会誌.* **49**, 257-266 (2002).
- 4) 高野 和夫, 笹邊 幸男: モモ‘ゴールデンピーチ’のラジカル消去活性. *岡山県農業研報.* **2**, 21-27 (2011)
- 5) 植木 啓司, 今井 孝, 岡本 五郎, 平野 健: 蒜山産ヤマブドウ果汁及びワインの全フェノール含とラジカル消去活性. *J. ASEV Jpn.*, **14**, 77-82 (2003)
- 6) Matsumoto S., Teshigawara M., Tuboi S. and Ohmori S.: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples using acrylonitrile as a thiol-blocking reagent. *Anal.Sci.* **12**, 91-95 (1996).

- 7) 木村 俊之, 山岸 賢治, 鈴木 雅博, 老田 茂:
農産物におけるラジカル消去能と総ポリフェノール量に関する一考察. *東北農業研究*. 237-238 (2005).
- 8) Kawakami K., Aketa S., Nakanami M., Iizuka S. and Hirayama M.: Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins, in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their alpha-amylase inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1380-1385 (2010).
- 9) Horev-Azaria L., Eliav S., Izigov N., Pri-Chen S., Mirelman D., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Jacob-Hirsch J., Amariglio N. and Savion N.: Allicin up-regulates cellular glutathione level in vascular endothelial cells. *Eur. J. Nutr.* **48**, 67-74 (2009).
- 10) 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. *日本食品工業学会誌*. **41**, 611-618 (1994).
- 11) Farhadi K., Esmailzadeh F., Hatami M., Forough M. and Molaie R.: Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chem.* **199**, 847-855 (2016).
- 12) 加賀田 江里, 村上 淳, 多田 幹朗, 北島 葉子, 笠間 基寛, 嶋田 義弘: 青ニラおよび黄ニラのビタミン C 含有量の周年変動. *中国学園紀要*. **13**, 1-6 (2014).