紫ニンジン色素抽出物の拘束ストレス負荷マウスに及ぼす効果

渡辺 満[§], 六角啓一*, 鮎瀬 淳

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター

* タキイ研究農場

Effects of Pigment Extracts from Purple Carrot (*Daucus carota*, L.) on the Reactions in Mice Subjected to Restraint Stress

Mitsuru Watanabe[§], Keiichi Musumi* and Jun Ayugase

National Agricultural Research Center for Tohoku Region,

4 Akahira, Shimokuriyagawa, Morioka, Iwate 020-0198

* Takii Plant Breeding Station, 1360 Hari, Konan, Shiga 520-3231

We investigated the effects of carotenoid and/or anthocyanin pigment extracts from purple carrot on the reactions induced by restraint stress in mice. Purple carrot contained β -, α -carotene, and phytoene as carotenoid compounds, and five anthocyanin compounds that contained cyanidin as aglycon. Aliquots of carotenoid and/or anthocyanin pigment extracts from purple carrot in an acidic detergent solution (citric acid, Tween 80) were administered intragastrically once per day for three days to mice, after which they were restrained for 24 h. Unrestrained mice were administered acidic Tween solution with or without free access to feed and water. Restraint stress induced elevation in plasma arteriosclerotic index, hepatic total cholesterol and the amount of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) of plasma and liver tissues in mice. In contrast, these variables were suppressed in the restraint mice that were administered purple carrot pigment extracts. Furthermore, additional effects of carotenoid and anthocyanin pigment extracts on a reduction in hepatic cholesterol level were observed. These results suggest that purple carrot pigment extracts have *in vivo* anti-stress effects against the reactions induced by immobilization in mice.

(Received Jun. 21, 2010 ; Accepted Jul. 29, 2010)

Keywords : purple carrot, carotenoid, anthocyanin, restraint stress, anti-stress

キーワード : 紫ニンジン, カロテノイド, アントシアニン, 拘束ストレス, 抗ストレス

現代はストレス社会とも言われるように、我々の周りにはストレス状態を引き起こす要因（ストレッサー）があふれている。ストレスの概念はカナダの生理学者である Seyle により導入されたものであり¹⁾、ストレッサーにより以下の反応が生体内で引き起こされることが明らかにされている。すなわち、大脳辺縁系で感知したストレッサーのシグナルは視床下部に伝達され、急性反応としての視床下部-交感神経-副腎髄質系（sympathetic-adrenomedullary, SAM system）の活性化による副腎髄質からのアドレナリン放出、および視床下部-脳下垂体-副腎皮質系（hypothalamic-pituitary-adrenocortical, HPA system）の活性化による、副腎皮質からの抗ストレスホルモンである、グルココルチコイド分泌が引き起こされる。グルココ

ルチコイドはストレス状態の改善作用を有するが、ストレッサーが継続的に生体に負荷されることにより、その血中レベルが高位に持続されると生体に様々な障害が生じることになる。その結果、ストレス状態は、免疫機能の低下、血糖、血圧、血中脂質の上昇などを引き起こす^{2)~4)}ばかりでなく、糖尿病発症のリスクを増加させることが報告されている⁵⁾。従って、ストレス状態を抑制する成分や食品の探索・利用は、近年、一層その重要性を増している。

抗ストレス効果の評価を目的とした動物へのストレス負荷法には、拘束ストレス、電撃ストレス、水浸拘束ストレス、寒冷ストレス、強制遊泳ストレス、強制走行ストレス、エーテルストレスなどがある⁶⁾。この中で拘束ストレス負荷モデルは、プラスチック製チューブ（遠心チューブ）あるいはステンレスメッシュ製のケージ内にマウスを保持（拘束）するものであり、15分~4時間⁷⁾、16時間⁸⁾、24時間⁹⁾などストレス負荷の時間は異なっているものの、単回

〒020-0198 岩手県盛岡市下厨川字赤平 4

* 〒520-3231 滋賀県湖南市針 1360

[§] 連絡先 (Corresponding author), wata@affrc.go.jp

でのストレス負荷の場合には急性ストレス負荷モデルとして利用されている。これに対して、1日1回のストレス負荷を数日から十数日繰り返す場合には、慢性ストレス負荷モデルとして利用される¹⁰⁾¹¹⁾。なお血中グルココルチコイドのレベルは、いずれのストレス負荷時間でもストレスを負荷しない群と比較して、高位に持続されることが確認されている。加えて拘束ストレス負荷したマウスでは、肝臓、血漿等のTBARS値の上昇が報告されており^{12)~14)}、生体内酸化ストレスの亢進により、脳に対してダメージを与える可能性、さらに加齢によって悪化する脳機能障害等につながる可能性が指摘されている¹⁴⁾。従って、拘束ストレス負荷時に認められる生体内酸化ストレス亢進を抑制する食品およびその成分を探索することは、ストレス負荷時の生体内酸化障害を抑制する上でも、非常に重要性が高いものと考えられる。

フラボノイド、アントシアニン、カロテノイドなどの植物色素群はいずれも抗酸化性を有する化合物群であるが、捕捉あるいは消去する活性酸素種および溶媒に対する溶解性等の化学的性質を異にする。これにより、摂取した場合の作用部位や抗酸化性に起因する生体内作用も、その特性に応じ異なる可能性がある。従って、異なる色素群を含む食品の色素抽出物を摂取した場合の生体に及ぼす影響を調査することは、その食品の効果を推定するのみならず、複数の色素群を食品から同時に摂取した場合の効果を考える上で、非常に有用と考えられる。今回試験に使用した紫ニンジンでは、内層部は通常のニンジンと同様にカロテノイドによる橙色を示すが、外層部はアントシアニンの蓄積により紫色であることから、ニンジンで期待されるカロテノイドの生体内効果に加え、アントシアニンの効果も期待できる。これまで紫ニンジンは、ジュース等加工用としての利用に限定されていたが、最近では生食可能な品種の開発も進んでいる。利用の幅が広がることで、今後の需要増加も見込まれる野菜である。

本報告では、初めに新規に開発された生食も可能な紫ニンジン品種のアントシアニンおよびカロテノイド両色素の組成を明らかにした。次に、紫ニンジン色素抽出物の抗ストレス作用を、拘束ストレス負荷マウスにより評価した。すなわちカロテノイドとアントシアニン抽出物を各々単独、あるいは同時に拘束ストレス負荷(単回)マウスに投与し、グルココルチコイド等のストレス応答パラメータに加え、拘束ストレス負荷により惹起される脂質代謝の悪化¹⁶⁾、過酸化脂質生成等の生体内反応に及ぼす影響を調査した。

実 験 方 法

1. 紫ニンジン

紫ニンジン(タキイ種苗(株), TCH-721)は2008年8月~12月にタキイ研究農場(滋賀県湖南市)において栽培・

収穫したものを用いた。収穫後のニンジンは -20°C で冷凍保存し、凍結乾燥後、振動粉碎機で微粉末にした。この粉末から、アントシアニンおよびカロテノイド色素抽出物を調製した。

2. アントシアニン色素抽出物

紫ニンジンに含まれるアントシアニンは、乾燥粉碎物0.2gに5mLの5%ギ酸を加え、 4°C で24時間抽出した。遠心後の上澄みを粗抽出物とし、これをSep-pak C18(日本ウォーターズ(株)製)を用いて固相抽出処理し、アントシアニン色素抽出物を調製した。具体的には、Sep-pak C18 Plus Short カラムを5mLのメタノールにて洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)5mLで平衡化した。カラムにギ酸抽出物を添加後0.1% TFA 5mLで洗浄し、次いで0.5% TFA:エタノール=2:8溶液5mLでアントシアニン含有画分を溶出した。溶出液は減圧乾固し、少量の0.1% TFAに溶解し使用まで 4°C で保存した。アントシアニン色素抽出物は、ダイオードアレイ検出器を接続したHPLC(アジレント(株), LC-1100)による紫外-可視光の吸収スペクトルの解析とともに、エレクトロスプレーイオン化(ESI)(ポジティブイオンモード, 4500 V)によるLC-MS(アプライドバイオシステムズ(株), QSTAR Pulsar-i)分析で、以下の条件で分析した。カラム: ODS (Symmetry 5C18, 日本ウォーターズ(株)製, 2.1 mm $\times$ 150 mm), カラム温度: 35°C , 溶離: アセトニトリルの濃度勾配 (9.5%~23%, 30 分間, 0.1% TFA 含む), 流量: 0.2 mL/min, 検出: 520 nm および 280 nm (200 nm~600 nm)。

3. カロテノイド色素抽出物

紫ニンジンに含まれるカロテノイドの抽出は、通常法¹⁵⁾を一部変更の上、下記のとおり実施した。アントシアニン抽出時と同様の乾燥粉碎物5gを使用し、ジクロロメタン:メタノール=2:1溶液100mLで抽出し遠心後上層を採取した。沈殿物にはジクロロメタンを添加し、抽出をさらに2回繰り返した。これら抽出物を合わせてフィルターを通過後、ヘキサン100mLと5%塩化ナトリウム100mLを加え穏やかに混合、その後静置し2層に分離させた。上層を回収し留去、ジエチルエーテル50mLに溶解した。これに1/10量の60%(w/v)水酸化カリウムを添加し、気相を窒素置換した。ケン化処理は暗所下、室温で16時間静置することにより実施した。これに等容のヘキサン:ジエチルエーテル=1:1溶液、5%塩化ナトリウム溶液を加え2層に分離させた。有機溶媒層を回収し5%塩化ナトリウムで洗浄後に減圧乾固し、少量のジエチルエーテルに溶解して使用まで -80°C で保存した。カロテノイド色素抽出物の組成は、ダイオードアレイ検出器を接続したHPLC分析、および大気圧化学(APCI)イオン化(ポジティブイオンモード, 450°C)によるLC-MS分析で以下の条件で行った。カラム: ODS (Symmetry 5C18, 日本ウォーターズ(株)製, 4.6 mm $\times$ 250 mm), カラム温度: 35°C , 溶離: エタノール:

アセトニトリル=2:8, 流量:1.0 mL/min. 検出:450 nm, 280 nm (200 nm~600 nm).

4. 設定動物群

6週齢の雄性ICRマウスは、日本クレア(株)から購入した。マウスは $23\pm1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55\pm10\%$, 明期・暗期それぞれ12時間の条件下で飼育した。また実験開始までの予備飼育期間は、飲水および餌(日本クレア, CE-2)の摂食は自由に行えるようにした。実験開始時の8週齢に、マウスを6群($n=8\sim9$)にランダムに分割した。分割時の動物の体重は、群間で有意差はなかった。設定動物群は以下のとおり。NC群:自由飲食・非拘束ストレス負荷群, NF群:絶飲食・非拘束ストレス負荷群, RC群:絶飲食・拘束ストレス負荷コントロール群, RA群:絶飲食・拘束ストレス負荷アントシアニン色素抽出物投与群, RP群:絶飲食・拘束ストレス負荷カロテノイド色素抽出物投与群, RPA群:絶飲食・拘束ストレス負荷カロテノイド+アントシアニン色素抽出物投与群。

本研究では、疎水性のカロテノイドと親水性のアントシアニンの混合物投与のため、色素抽出物の溶解には、酸性の界面活性剤溶液を使用した。すなわち保存しておいた色素抽出物は溶媒を留去し、9% Tween 80+0.09% クエン酸溶液(酸性 Tween 溶液)で2 mg/mL に溶解した。なお色素混合物溶液は、アントシアニン、カロテノイド各濃度が2 mg/mL である。これを1日1回、計3回マウス胃内にゾンデで20 mg/kg で投与した後、拘束ストレスを負荷した。色素抽出物を投与しないNC, NF, RC 群は酸性 Tween 溶液のみを投与した。動物実験は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物実験指針(平成18年6月1日付)を遵守して実施した。

5. 拘束ストレスの負荷

マウスへの拘束ストレスの負荷は、前法¹⁶⁾と同様に実施した。すなわち、色素抽出物または酸性 Tween 溶液の投与30分後、呼吸のための穴(直径0.4 cm)を先端部分に開けた50 mL のプラスチック製遠心チューブにマウスを入れ、ステンレスメッシュ製の蓋をして拘束し、24時間保持した。拘束解除後、ネブタール注射液による麻酔下で、ヘパリン処理したシリンジにより心臓から全採血し、その後肝臓を採取した。採取した血液は、遠心処理(11000×g, 4°C , 5分)により血漿を調製した。血漿および肝臓は、各項目の測定時まで -80°C で保存した。

6. 血漿コルチコステロンの測定

マウス血漿中抗ストレスホルモンであるコルチコステロンは、前報¹⁶⁾と同様の方法で測定した。すなわち、血漿にコルチゾールを内部標準として添加後、酢酸エチルで抽出し Hayashi¹⁷⁾らの方法により HPLC で定量した。

7. 血漿グルコースの測定

血漿グルコースは、グルコース C-II テストワコー(和光純薬(株)製)により測定した。

8. 肝臓組織からの脂質の抽出

肝臓組織からの総脂質の抽出は、Folch 法¹⁸⁾により以下のとおり実施した。0.4 g の肝臓に蒸留水1.6 mL を添加後、ガラスホモジナイザー内で磨砕しホモジネートを調製した。このホモジネートからクロロホルム:メタノール(2:1, v/v)により、総脂質を抽出した。抽出物は溶媒を除去後、10% Triton-X100 を含む2-プロパノールに溶解した。この脂質溶液を各脂質の分析に使用した。

9. 血漿および肝臓脂質の分析

血漿および肝臓の総コレステロール、トリグリセライド、血漿中のHDLコレステロールは、それぞれコレステロール E-テストワコー、トリグリセライド E-テストワコー、HDL コレステロール E-テストワコー(以上、全て和光純薬(株)製)を使用して測定した。

10. 血漿トランスアミナーゼの測定

肝臓等組織ダメージの指標である、血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)およびアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性は、トランスアミナーゼ CII-テストワコー(和光純薬(株)製)で測定した。

11. 血漿および肝臓組織中のチオバルビツール酸反応生成物(TBARS)の測定

肝臓組織のTBARS濃度の測定は、肝臓組織を10% (w/v) の1.2% 塩化カリウム溶液中で磨砕し、肝臓ホモジネートを調製した。このホモジネートを用い、Kikugawa¹⁹⁾の方法でTBARS濃度を測定した。血漿中のTBARS濃度の測定は、Yagi²⁰⁾の方法に基づいて実施した。

12. 肝臓ホモジネート中のタンパク含量の測定

肝臓ホモジネート中のタンパク量は、Protein Quantification Kit-Rapid(同仁化学(株)製)で測定した。

13. 統計処理

動物群間の有意差の検定は、一元配置の分散分析(ANOVA)およびTukey-Kramer法による多重比較を実施した。有意水準は5% ($P<0.05$)とした。

実験結果

1. 紫ニンジンアントシアニン抽出物の組成

紫ニンジンアントシアニン抽出物のHPLCクロマトグラムをFig. 1に示す。抽出物には、紫外-可視スペクトルからアントシアニンと推定された5つの主要なピーク(P1-P5)が認められた。LC-MS分析による、各ピークの分子イオン m/z はP1, 743 (M^+); P2, 581 (M^+); P3, 949 (M^+); P4, 919 (M^+); P5, 889 (M^+)であった。いずれのマススペクトルにも、 m/z 287の主要なフラグメントイオンが検出されたことから、各化合物はシアニジン(cyanidin)をアグリコンとして含むことが推定された。これらデータを、ブラックキャロット²¹⁾および紫ニンジンカルス²²⁾のアントシアニン組成と比較した。その結果、P1, cyanidin-3-(2"-xylopyranosyl-6"-glucopyranosyl-galactopyranoside);

Fig. 1 HPLC chromatogram (520 nm) of purple carrot anthocyanin extracts

P1, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-6''-glucopyranosyl-galactopyranoside) ; P2, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-glucopyranoside) ; P3, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-6''-sinapoyl-glucopyranosyl-galactopyranoside) ; P4, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-6''-feruloyl-glucopyranosyl-galactopyranoside) ; P5, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-6''-glucopyranosyl-galactopyranoside).

Fig. 2 HPLC chromatogram (A, 450 nm ; B, 280 nm) of purple carrot carotenoid extracts

P1, α -carotene ; P2, β -carotene ; P3, phytoene.

P2, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-glucopyranoside), P3, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-6''-sinapoyl-glucopyranosyl-galactopyranoside), P4, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-6''-feruloyl-glucopyranosyl-galactopyranoside), P5, cyanidin-3-(2''-xylopyranosyl-6''-glucopyranosyl-galactopyranoside) と同定した. シアニン当量として求めた, 各アントシアニンの抽出物中の割合 (w/w) は以下のとおり : P1, 8.0% ; P2, 31.2% ; P3, 40.6% ; P4, 18.5% ; P5, 1.6%.

2. 紫ニンジンカロテノイド抽出物の組成

紫ニンジンカロテノイド抽出物の HPLC クロマトグラムを, Fig. 2 に示す. 抽出物には 450 nm で検出された 2 つの主要なピーク (P1, P2) と 280 nm で検出された 1 ピーク (P3) の計 3 ピークが認められた. 450 nm のピークは, 標準物質 (シグマアルドリッチ (株) 製) との比較により, 通常のニンジンに含まれる β -(P2) および α -カロテン

(P1) と同定した. また, 280 nm で検出されたピーク (P3) はフィトエンに特徴的な吸収スペクトル ($\lambda_{\max}=280$ nm) を示し, m/z 536 (M)⁺ のイオンが検出された. 最終的にはフィトエン標準物質 (フナコシ (株) 製) との比較により, 同一化合物であることを確認した. これらカロテノイドの抽出物中の含量 (w/w) は以下のとおり : β -カロテン, 46.4% ; α -カロテン, 25.0% ; フィトエン, 28.6%.

3. 紫ニンジン色素抽出物の拘束ストレス負荷マウスに対する効果

(1) 血漿コルチコステロン量, グルコースに及ぼす影響
マウス血漿中の抗ストレスホルモンであるコルチコステロンの濃度, グルコース量を Fig. 3A, B に示す. 血漿コルチコステロン濃度は, RC 群において NC, NF 群に対して有意に増加した. すなわち, 拘束ストレスの負荷によりマウスがストレス状態にあることが示唆された. これに対し

Fig. 3 Effects of pigment extracts from purple carrot on plasma corticosterone (A), glucose (B), AST activity (C), and ALT activity (D) in restrained mice

NC, no restraint stress/control group; NF, no restraint stress/feeding group; RC, restraint stress/control group; RP, restraint stress/carotenoid group; RA, restraint stress/anthocyanin group; RPA, restraint stress/carotenoid+anthocyanin group. Data are mean $\pm$ SE. (A) (B) *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, (C) *** P < 0.001, (D) *** P < 0.001, * P < 0.05

て色素抽出物投与群では、RC 群と RP, RA 群には差が認められず、カロテノイド+アントシアニン色素抽出物を投与した RPA 群でコルチコステロン量が低下傾向にあった。一方、血漿グルコース量を NC 群以外の絶食群と比較すると、RC 群で NF 群と比較して有意に上昇していることから、拘束ストレスの負荷により血糖値上昇が惹起されたことが示された。これに対して色素抽出物投与群では、RC 群に対してアントシアニンを含む色素抽出物を投与した RA および RPA 群において、血漿グルコース量が低下する傾向が認められた。

(2) 血漿トランスアミナーゼ活性に及ぼす影響

Fig. 3C, D にマウス血漿 AST および ALT 活性を示す。

これらトランスアミナーゼ活性は、全ての拘束ストレス負荷動物群で非拘束群 (NC, NF 群) と比較して上昇した。すなわち、肝臓等組織が拘束ストレスの負荷によりダメージを受けていることが示唆された。拘束ストレス負荷動物群間では、AST, ALT とともに全ての色素抽出物投与群 (RP, RA, RPA) で RC 群に対して低下傾向にあった。

(3) 血漿脂質に及ぼす影響

Fig. 4 にマウス血漿脂質の測定結果を示す。血漿脂質では、総コレステロール量は NC および NF 群に対して拘束ストレス負荷動物群で上昇した。拘束ストレス負荷動物群間では、RC 群に対してアントシアニンを含む色素抽出物を投与した RA, RPA 群では低下傾向にあり、カロテノイ

Fig. 4 Effects of pigment extracts from purple carrot on plasma total cholesterol (A), HDL-cholesterol (B), and arteriosclerotic index (C) in restrained mice

NC, no restraint stress/control group; NF, no restraint stress/fasting group; RC, restraint stress/control group; RP, restraint stress/carotenoid group; RA, restraint stress/anthocyanin group; RPA, restraint stress/carotenoid + anthocyanin group. Data are mean $\pm$ SE. (A) *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, (B) ** P < 0.01, * P < 0.05, (C) *** P < 0.001, ** P < 0.01.

ドのみを投与した RP 群では有意に低下した (Fig. 4A). また HDL コレステロールは, RP 群以外の拘束ストレス負荷動物群で有意に増加した (Fig. 4B). これに対して動脈硬化指数 (総コレステロール-HDL コレステロール/HDL-コレステロール) は, カロテノイドのみを投与した RP 群では低下傾向にあったが, アントシアニンを含む色素抽出物を投与した RA 群および RPA 群では有意に低下した (Fig. 4C).

(4) 肝臓脂質に及ぼす影響

Fig. 5 にマウス肝臓脂質の測定結果を示す. 肝臓脂質で

Fig. 5 Effects of pigment extracts from purple carrot on hepatic triglycerides (A), and total cholesterol (B) in restrained mice

NC, no restraint stress/control group; NF, no restraint stress/fasting group; RC, restraint stress/control group; RP, restraint stress/carotenoid group; RA, restraint stress/anthocyanin group; RPA, restraint stress/carotenoid + anthocyanin group. Data are mean $\pm$ SE. (A) (B) *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05

は, トリグリセリドは拘束ストレス負荷により, いずれの拘束ストレス負荷動物群でも上昇したが, 色素抽出物投与群では有意差はないものの, RC 群に対していずれも低下傾向にあった (Fig. 5A). これに対して肝臓総コレステロール量は, RC 群では NC 群に対して有意に増加した. RC 群に対して, 色素抽出物の単独投与群である RP および RA 群では肝臓総コレステロール量は低下傾向であったが, カロテノイド+アントシアニン色素抽出物を投与した RPA 群では, RC 群に対して有意に低下した (Fig. 5B).

(5) 血漿および肝臓の脂質過酸化度 (TBARS) に及ぼす影響

血漿および肝臓の脂質過酸化度を Fig. 6 に示す. TBARS 濃度は血漿, 肝臓のいずれにおいても NC, NF 群に対して RC 群で増加し, 拘束ストレスの負荷によるマウス生体内

Fig. 6 Effects of pigment extracts from purple carrot on lipid peroxidation in plasma (A) and liver tissues (B) in restrained mice

NC, no restraint stress/control group; NF, no restraint stress/fasting group; RC, restraint stress/control group; RP, restraint stress/carotenoid group; RA, restraint stress/anthocyanin group; RPA, restraint stress/carotenoid + anthocyanin group. Data are mean $\pm$ SE. (A) *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05, (B) *** P < 0.001, * P < 0.05

酸化ストレスの亢進が示唆された。血漿では、RC 群に対して RA および RPA 群において TBARS 濃度は低下傾向にあり、RP 群では有意に低下した (Fig. 6A)。これに対して肝臓組織では、色素抽出物投与群 (RP, RA, RPA) は RC 群に対していずれも有意に TBARS 濃度が減少し、そのレベルは非拘束群である NC および NF 群と同等であった (Fig. 6B)。

考 察

日本では、今後高齢化に伴い医療費が著しく増加することが予想されている。現在、中でも糖尿病等を構成要因とするメタボリックシンドロームの患者数増加が顕著であり、喫緊の対応が必要となっている。こうした状況から、日々の食事によってメタボリックシンドロームを予防し健康を維持することは、消費者自身の利益であるばかりでなく、医療費抑制の観点からも極めて重要性が高い施策とな

ることが予想される。また、糖尿病発症にはストレスが関与していることも指摘されている²³⁾ ことから、生活習慣病予防の観点からも抗ストレス作用を有する食品や成分の活用が重要となる。我々はこれまでに、カテキン、フラボノイド等ポリフェノール類の抗ストレス作用を拘束ストレス負荷マウスで検討しており¹⁶⁾²⁴⁾、ポリフェノール等の抗酸化物質にはストレス時における生体内反応の抑制効果、すなわち抗ストレス作用が期待できることを明らかにしている。従って、植物色素類を初め様々な種類の抗酸化物質を含む野菜などの食品には、ストレス状態での障害抑制効果が期待できるものと考えられる。しかしながら現在の日本では、人口の減少に加え 1 人当たりの野菜消費量が減少していることから、国内の野菜消費量は継続して減少傾向にあり、その減少に歯止めはかかっていない。野菜の消費量増加のためにも、野菜および含有成分の生体内機能解明による科学的根拠の蓄積、および高機能性品種の育成が必要である。

試験に使用した生食可能な紫ニンジンには、カロテノイドとして通常のニンジンと同様の β -、 α -カロテンに加えフィトエンが主要化合物として含まれており、またアントシアニンとしては、これまでにブラックキャロットで報告されているシアニジン系アグリコンとする 5 つの主要アントシアニンが含まれていた。これら紫ニンジンから調製したカロテノイドおよびアントシアニン抽出物は、拘束ストレスの負荷によりマウス生体内で惹起される種々の反応に対して、抗ストレスホルモン、血漿グルコースなどの急性ストレスの負荷により変化するパラメータおよびトランスアミナーゼ活性に関しては、明確な効果は認められなかった。しかし拘束ストレスの負荷によって引き起こされる脂質代謝悪化の改善、および生体内酸化ストレスの亢進抑制効果が示唆された。特に血漿脂質では、総コレステロール量はカロテノイド投与群で有意に低下が認められ、動脈硬化指数はアントシアニンおよびカロテノイドとアントシアニンの同時投与により改善した。カロテノイドの脂質代謝改善作用については、マクロファージにおけるヒドロキシメチルグルタリル-CoA (HMG-CoA) レダクターゼ阻害によるコレステロール合成阻害作用²⁵⁾、ヒト試験での血清コレステロールの低下作用²⁶⁾ あるいは血液中 LDL-コレステロールの酸化抑制作用が報告されており²⁷⁾、またトマトに含まれるリコペンについては、ヒト試験で血漿 LDL-コレステロールの有意な減少が報告されている²⁸⁾。こうしたことからカロテノイドには、動脈硬化予防効果が期待できるとされている。一方アントシアニンについても、delphinidin-3-(*p*-coumaroyl)rutinoside-5-glucoside (ナスニン) やアシルシアニジンのパラコート酸化ストレス負荷ラットの動脈硬化指数改善が報告されている²⁹⁾³⁰⁾。以上の様にカロテノイド、アントシアニンではコレステロール代謝改善を含む脂質代謝改善作用が明らかにされており、本研究によ

り、拘束ストレス負荷時のマウスで悪化する脂質代謝においても、両色素群による改善が期待できることが明らかになった。今後は肝臓における脂質代謝関連酵素の遺伝子発現解析等により、マウス拘束ストレス負荷時のカロテノイド、アントシアニン、あるいは両者の混合物を同時投与した場合の脂質代謝改善作用に関して、メカニズムの解明を進める必要がある。

マウスへのカロテノイド、アントシアニン、両者の混合物のいずれの投与によっても今回の投与量 (20 mg/kg 体重) では、アントシアニンおよびカロテノイド+アントシアニン投与群で血漿の TBARS 濃度は減少傾向であり、カロテノイド投与群では有意に減少した、さらに肝臓組織では、全ての色素抽出物投与群で非拘束群と同様のレベルまで TBARS 濃度は減少した。食品カロテノイドの生体利用性は他の脂溶性成分と比較して低いことが知られており、動物種によってカロテノイドの体内蓄積が異なること、ヒト組織に蓄積されるカロテノイドの種類は摂取するものと比較して限られていることが知られている³¹⁾。またフラボノイド配糖体は、腸内細菌による加水分解後、アグリコンが吸収過程でグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体になることが知られており³²⁾、イチゴアントシアニンでも尿中にこれら抱合体が確認されている³³⁾。なおアントシアニンについては、カシスに含まれる 3 種のアントシアニン (cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-galactoside, delphinidin-3-rutinoside) のラットでの吸収率が異なること等、アントシアニンの構造によって吸収や排泄様式が異なること、また血中濃度が低いことが報告されている³⁴⁾。今回の試験では肝臓におけるカロテノイド、アントシアニンの分析は実施していないが、ビルベリーアントシアニン含有飼料の摂食では、マウスの肝臓、腎臓、肺等の組織にアントシアニンが検出されており、これら組織の中では、肝臓における濃度が最も高い³⁵⁾。紫ニンジン色素抽出物の投与により、肝臓や血漿における TBARS 濃度が減少したことから、小腸における吸収や代謝を経て肝臓への蓄積により、TBARS 濃度が減少したことが推察される。つまり、カロテノイドおよびアントシアニンは単独、あるいは両者の同時投与によっても生体内で抗酸化作用が期待できるものと考えられた。

カロテノイドとアントシアニンは、化合物としての特性等その性質を大きく異にするものの、どちらも拘束ストレス負荷時のマウス生体内における種々の生体内反応に影響し、動脈硬化指数の悪化、生体内酸化ストレスの亢進等を抑制することが示唆された。今回の各色素の投与量 (20 mg/kg 体重) では、色素混合物の投与により、色素単独投与では低下傾向であった肝臓総コレステロールが有意に低減した。これに対して肝臓の TBARS 濃度は、色素の同時投与群のみでなく投与したいずれの色素抽出物投与群でも、脂質過酸化度が低いレベルに抑制されていた。従って肝臓

の脂質過酸化度に関しては、低濃度の色素抽出物投与によって、両色素の相加的な効果が確認できる可能性がある。

今回の色素投与量で確認されたカロテノイド、アントシアニンの相加的な効果を含む種々の効果が低濃度の色素抽出物投与で認められれば、紫ニンジン摂食時のみならず、カロテノイドやアントシアニンを含む食品を同時に摂取した場合に、生体内効果が期待できるものと考えられる。

要 約

生食可能な紫ニンジン (タキイ種苗, TCH-721) のアントシアニンおよびカロテノイド色素組成を明らかにし、調製した両色素抽出物を拘束ストレス負荷マウスに投与して生体内反応に及ぼす影響を調査した。

(1) 紫ニンジンにはアントシアニンとして、いずれもシアニンをアグリコンとする 5 つの化合物が含まれていた。またカロテノイドとして、 β -および α -カロテン、フィトエンが含まれていた。

(2) 紫ニンジンから調製したカロテノイドおよびアントシアニン色素抽出物を各々単独、あるいは両者の混合物を拘束ストレス負荷マウスに投与したところ、拘束ストレス負荷により増加するマウスの血漿動脈硬化指数、血漿および肝臓の脂質過酸化度の増加がいずれも抑制された。

(3) 同じく拘束ストレス負荷マウスで増加する肝臓総コレステロールは、カロテノイドまたはアントシアニンを投与したマウスでは低下傾向にあったが、両色素の混合物投与により有意に低下し、カロテノイドとアントシアニンの相加的な効果が認められた。

これら結果から、紫ニンジンに含まれるカロテノイドおよびアントシアニン色素抽出物には両者の相加的な効果を含め、抗ストレス作用が期待できることが明らかになった。

文 献

- 1) Seyle, H., A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, **138**, 32 (1936).
- 2) 仙波恵美子, ストレス応答と免疫・アレルギー, アレルギー科, **12**, 313-321 (2001).
- 3) 春日繁男, 牛島光保, 森原直明, 板倉洋一, 仲田義啓, マウスのストレス性高血糖に対するニンニク抽出液 (AGE) の作用, *日薬理誌*, **114**, 191-197 (1999).
- 4) 宗像正徳, ストレスと血圧の関係は?, 肥満と糖尿病, **3**, 47-49 (2004).
- 5) Thernlund, G.M, Ludvigsson, J., Dahlquist, G., Sjoblad, S., Hansson, K., Hagglöf, B. and Ivarsson, S.A., Psychological stress and the onset of IDDM in children. *Diabetes Care*, **18**, 1323-1329 (1995).
- 6) 田中正俊, ストレスと神経伝達物質, 「運動とストレス科学」, 竹宮 隆・下光輝一編, (杏林書院, 東京), pp. 34-53 (2003).
- 7) Kohno, H. and Ohkubo, Y., Comparative glucoregulatory responses on mice to restraint and footshock stress stimuli. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 113-116 (1998).

- 8) Tan, Z. and Nagata, S., Superimposed cold stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal response during long-duration restraint stress. *J. UOEH.*, **24**, 361-373 (2002).
- 9) Iwakabe, K., Shimada, M., Ohta, A., Yahata, T., Ohmi, Y., Habu, S. and Nishimura, T., The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. *Immunol. Lett.*, **62**, 39-43 (1998).
- 10) Bagchi, D., Carryl, O.R., Tran, M.X., Bagchi, M., Garg, A., Milnes, M.M., Williams, C.B., Balmoori, J., Bagchi, D.J., Mitra, S. and Stohs, S.J., Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Mol. Cell. Biochem.*, **196**, 109-116 (1999).
- 11) Rai, D., Bhatia, G., Sen, T. and Palit, G., Anti-stress effects of *Ginkgo biloba* and *Panax ginseng* : a comparative study. *J. Pharmacol.*, **93**, 458-464 (2003).
- 12) 楊 志博, 浅見純生, 豊田佳子, 藤居 瓦, 諏訪芳秀, 田中隆治, ストレス負荷マウスにおけるがん転移促進に対するアスタキサンチンの抑制効果, 栄食誌, **50**, 423-428 (1997).
- 13) Kurihara, H., Koda, H., Asami, S., Kiso, Y. and Tanaka, T., Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. *Life Sci.*, **70**, 2509-2520 (2002).
- 14) Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M.K., Yeo, H.C., Mori, A. and Ames, B.N., Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J.*, **10**, 1532-1538 (1996).
- 15) 長尾昭彦, カロテノイド類, 「新・食品分析法 [Ⅱ]」, 日本食品科学工学会・食品分析研究会編, (光琳, 東京), pp. 123-145 (2006).
- 16) Watanabe, M. and Ayugase, J., Chiral separation of catechins in buckwheat groats and the effects of phenolic compounds in mice subjected to restraint stress. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6438-6442 (2009).
- 17) Hayashi, T., Kataoka, H., Semma, H. and Ito, Y., Effects of stress on allergic reaction. *Yakugaku Zasshi*, **121**, 753-759 (2001).
- 18) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S., A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).
- 19) 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**, 249-255 (1992).
- 20) Yagi, K., A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212-216 (1976).
- 21) Schwarz, M., Wray, V. and Winterhalter, P., Isolation and identification of novel proanthocyanins from black carrot (*Dacus carota* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5095-5101 (2004).
- 22) Glabgen, W.E., Wray, V., Strack, D., Metzger, J.W. and Seitz, H.U., Anthocyanins from cell suspension cultures of *Dacus carota*. *Phytochemistry*, **31**, 1593-1601 (1992).
- 23) 河盛隆造, 島田 聡, ストレスと糖尿病, 日本臨牀 **55** (増), 3577-583 (1997).
- 24) Watanabe, M. and Ayugase, J., Anti-stress effects of flavonoids from buckwheat sprouts in mice subjected to restraint stress. *Food. Sci. Technol. Res.*, **14**, 253-260 (2008).
- 25) Fuhrman, B., Elis, A. and Aviram, M., Hypocholesterolemic effect of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **233**, 658-662 (1997).
- 26) 山内 亮, カロテノイドによる血清コレステロール低下作用, ビタミン, **71**, 457-459 (1997).
- 27) Suganuma, H. and Inakuma, T., Protective effect of dietary tomato against endothelial dysfunction in hypercholesterolemic mice. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 78-82 (1999).
- 28) Oshima, S., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y. and Terao, J., Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen-mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2306-2309 (1996).
- 29) Kimura, Y., Araki, Y., Takenaka, A. and Igarashi, K., Protective effects of dietary nasunin on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 799-804 (1999).
- 30) Igarashi, K., Kimura, Y. and Takenaka, A., Preventive effects of dietary cabbage acylated anthocyanins on paraquat-induced oxidative stress in rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1600-1607 (2000).
- 31) 長尾昭彦, 第2章カロテノイドの吸収と代謝, 「カロテノイドの科学と最新応用技術」, (シーエムシー出版, 東京), pp. 116-124 (2009).
- 32) Day, A., J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Fauld, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R. and Williamson, G., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolyzed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.*, **468**, 166-170 (2000).
- 33) Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M.P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J.L. and Remesy, C., Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J. Nutr.*, **133**, 1296-1301 (2003).
- 34) Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi M. Tominaga, S., Hirayama, M. and Tsuda, T., Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1546-1551 (2001).
- 35) Sakakibara, H., Ogawa, T., Koyanagi, A., Kobayashi, S., Goda, T., Kumazawa, S., Kobayashi, H. and Shimoi, K., Distribution and excretion of bilberry anthocyanins in mice. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 7681-7686 (2009).

(平成22年6月21日受付, 平成22年7月29日受理)