研究ノート

小豆餡のポリフェノール量, SOD 様活性および 培養細胞における活性酸素の産生抑制

神谷 育, 藤岡宏樹*, 鎌田美乃里, 池田恵一, 馬目佳信

東京慈恵会医科大学・医学部

Functional Investigation of Sweet Red Bean Pastes as Anti-oxidant Food :
Polyphenol Contents, Superoxide Dismutase Activity,
and Inhibitory Effects on Reactive Oxygen Species

Iku Kamitani, Kouki Fujioka*, Minori Kamada, Keiichi Ikeda and Yoshinobu Manome

The Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461

Adzuki bean (*Vigna angularis*) contains abundant polyphenols, and their anti-oxidant effects have attracted the attention of many researchers. Although the effects of uncooked Adzuki beans and Adzuki bean juice have been reported, the effects of Adzuki bean pastes (sweet red bean paste) have not yet been clarified. Since sweet red bean pastes are easily incorporated into the diet as desserts or snacks, we investigated the polyphenol content and reactive oxygen species (ROS) inhibitory activity of the pastes. From these results, the sweet red bean pastes contained 37.1-62.7 mg of polyphenols per 100 g of bean paste, and exhibited superoxide dismutase (SOD)-like activity and ROS inhibitory effects in Jurkat cells.
(Received Feb. 19, 2015 ; Accepted Mar. 20, 2015)

Keywords : Adzuki bean, sweet bean paste, polyphenol, anti-oxidant, ROS

キーワード : アズキ, 餡, ポリフェノール, 抗酸化, 活性酸素種

活性酸素種 (ROS) やフリーラジカルは, 生命活動によるエネルギー産生の副産物として生成されている¹⁾. この ROS は低濃度において生体防御などの良い効果を示す反面, 高濃度では癌, 糖尿病, 心疾患, 認知症などの疾病の発症や老化の促進に影響を与えられられている¹⁾⁻³⁾. 特に, 現代社会においては大气汚染などの環境要因, 不規則な生活習慣, 精神的ストレスなどの影響で, ROS が過剰になりやすく, 酸化ストレスを受けやすい状況にある⁴⁾. このため, 適量の抗酸化成分の摂取が推奨されている.

抗酸化成分には, ビタミン類やポリフェノールが知られているが, 本研究では, 古くから食されてきたアズキ (*Vigna angularis*) 由来のポリフェノールの機能性に着目する. アズキのポリフェノールには, クロロゲン酸, カテキン, プロアントシアニンなどがあり⁵⁾, これらの作用として, (1) マウスにおける肝臓保護作用⁶⁾, および血中グルコース濃度の上昇抑制効果⁷⁾, (2) 糖尿病モデルラットにおける糖尿病性腎症の軽減効果⁸⁾, 更に, (3) ヒトにおける LDL コレステロールの低下⁹⁾, および血清トリグリセリド濃度の抑制効果¹⁰⁾ が報告されている.

しかしながら, これらの機能性を調査した研究の多くは, アズキそのものや煮汁を用いた研究である. アズキ関連食品で最も利用されている「餡」¹¹⁾ については, 製餡時におけるポリフェノールの残存割合⁹⁾ は報告されているものの, 生化学的な機能まで調査された報告は少ない. この理由の一つとして, 製餡工程でポリフェノールなどの成分が溶出し⁹⁾¹²⁾, 含量が減少してしまうことが考えられる. 相馬らの報告⁹⁾ では, 餡に残存するポリフェノール量は, 原料アズキの含量に対して 13.2% であり, 渋きり水や煮汁中に 84.1% が溶出したとの結果が示されている.

一方, 餡は子供から大人まで手軽に摂取できることから, 日常の食生活に取り入れやすい. このため, アズキや煮汁で報告されてきた機能性を確認できれば, 餡を効果的に食生活に取り入れることで健康増進につながることを期待される.

そこで本研究では, 菓子に含まれている小豆餡 (つぶ餡・こし餡) のもつ抗酸化機能を明らかにするため, (1) ポリフェノール量, (2) superoxide dismutase (SOD) 様活性, および (3) 培養細胞における ROS の抑制効果の観点から

検討を行なった。

1. 実験方法

(1) 試料

市販の饅頭（小豆つぶ餡・こし餡）から、加糖餡を約 1.3~1.5 g 採取した。採取した餡から、畑井らによるポリフェノール抽出法⁵⁾を参照し、次のようにポリフェノールを抽出した。90℃の超純水、または、70% メタノール 10 mL と混和した後、餡を乳鉢ですり、90℃で 30 分抽出、上清を 0.45 μm フィルターでろ過した。

一方、乾燥小豆は、10 粒（約 1.4 g）を超純水 20 mL に浸漬し暗所で一晩静置、上清を分離した（以下、灰汁と記載）。予備検討の結果、乾燥小豆は一晩の吸水によって約 2 倍の重量を示すことがわかっている（データ未掲載）。次に、この水を吸収した乾燥小豆（以下、小豆）を 90℃の超純水、または 70% メタノール 20 mL と混和して乳鉢ですり、90℃で 30 分抽出、上清を 0.45 μm フィルターでろ過した。また、小豆から分離した灰汁は、そのまま 0.45 μm フィルターでろ過して試料とした。

(2) ポリフェノール濃度の測定

ポリフェノール濃度の測定は鈴木らの手法¹³⁾を参照し、フォーリンデニス法を用いた。各抽出物を超純水で 2 倍希釈し、フォーリンデニス試薬 (Fluka)、および 10% 炭酸ナトリウム溶液を添加した（試料：超純水：フォーリンデニス試薬：10% 炭酸ナトリウムの容量比 = 1 : 1 : 2 : 2）。20 分静置後、上清を採取し 700 nm の吸光度を測定した。カテキン ((+)-catechin hydrate, 東京化成工業株式会社) の検量線から、各試料の原液のポリフェノール濃度（カテキン相当値）を計算し、平均値 ± 標準偏差 ($n=3$) で表示した（表 1）。

(3) SOD 様活性の測定

各抽出物を 10 倍、100 倍、1000 倍希釈した後、SOD Assay Kit-WST（同仁化学研究所）を用いて測定し、製品のプロトコルを参照して、対照溶媒に対する活性酸素阻害率（%）を SOD 様活性として算出した。

(4) 培養細胞における ROS の測定

ヒト T 細胞性白血病細胞株 Jurkat 細胞は、ウシ血清を 10% 含む RPMI 培地で培養した。ROS 検出のため Bass らの方法¹⁴⁾を参照し、Jurkat 細胞株 1.3×10^5 cells/mL に対して、20 μM の 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, Sigma) を添加して 30 分培養した。次に、各抽出物を 100 倍希釈で添加し、更に 30 分培養した。その後、酸化剤として 50 μM の *tert*-butyl hydroperoxide (70% in Water) (TBHP, 東京化成工業) を添加して 1 時間培養¹³⁾、ROS によって酸化された 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) の蛍光をプレートリーダーで測定した（励起波長 485 nm/蛍光波長 535 nm）。

また、測定に与える抽出物や TBHP の蛍光、および細胞の自家蛍光の影響を除くため、DCFDA を添加したものと

表 1 各抽出物のポリフェノール濃度

	つぶ餡 (μg/mL)	こし餡 (μg/mL)	小豆 (μg/mL)	灰汁 (μg/mL)
水抽出	81.5±1.8	55.6±0.4	217.7±10.6	403.7±4.7
メタノール抽出	81.5±0.3	40.8±1.0	103.7±0.9	

添加しなかったものの差分から ROS の蛍光強度を求めた。

結果は、抽出溶媒（メタノール、または水）を細胞に添加した時の ROS の蛍光強度に対して相対値を求め、平均値 ($n=6$) で示した（図 3）。有意差の検定は、Bonferroni/Dunn 法による多重比較検定（危険率 5%）を Statcel3（オーエムエス出版）で行なった。

(5) 相関係数の計算

Excel 2013 (Microsoft) を用いて Pearson の相関係数と p 値を算出した（有意水準： $p<0.05$ ）。

2. 実験結果および考察

(1) 餡抽出物のポリフェノール濃度

各試料から抽出されたポリフェノール濃度（カテキン相当値）を表 1 に示す。ポリフェノール濃度は、乾燥小豆を一晩水で浸漬した灰汁に含まれる 403.7 μg/mL が最も高かった。次に、水抽出画分では小豆の 217.7 μg/mL が最も高く、つぶ餡 81.5 μg/mL、こし餡 55.6 μg/mL と続いた。一方、メタノール抽出画分では、小豆が 103.7 μg/mL、つぶ餡 81.5 μg/mL、こし餡 40.8 μg/mL であった。

本検討から得られたポリフェノール濃度は灰汁、小豆、つぶ餡、こし餡の順に減少する傾向にあり、この結果は灰汁や小豆の種皮にポリフェノールが多く含まれるという既報論文の結果と矛盾しない⁵⁾。また、本検討では 1.3~1.5 g の餡に対して、10 mL の溶媒で抽出を行なっている。このため、水抽出画分のポリフェノール濃度を基準にした場合、本検討で用いたつぶ餡の試料 100 g には 54.3~62.7 mg、こし餡の試料 100 g には 37.1~42.8 mg のポリフェノールが含まれていると推定される。

(2) 餡抽出物の SOD 様活性

次に、各抽出物のもつ ROS 分解効果を検討するため、SOD 様活性を測定した（図 1）。10 倍希釈した抽出物が示した SOD 様活性に着目すると、水抽出画分では灰汁が 67.0% と活性が最も高く、小豆（48.0%）、つぶ餡（16.5%）、こし餡（4.5%）と続いた。メタノール抽出画分でも、小豆（32.4%）、つぶ餡（33.5%）、こし餡（12.6%）の順であった。

先述のポリフェノール濃度の結果（表 1）と SOD 様活性との相関を図 2 に示す。両者の相関係数は 0.918 ($p<0.05$) であり、ポリフェノール濃度と SOD 様活性は高い相関関係にあることが示された。

以上の結果から、餡には SOD 様活性を示す抗酸化成分が保持されていることが明らかとなった。また、この活性とポリフェノール濃度には高い相関が認められることから、本測定で観察された SOD 様活性にはポリフェノール

図 1 各抽出物の SOD 様活性

図 2 各抽出物のポリフェノール濃度と SOD 様活性の相関

の関与が示唆された。

(3) 餡抽出物による培養細胞への ROS 抑制効果

次に、これらの抽出物による、培養細胞の ROS 抑制効果を検討した。抽出溶媒を対照とした時の ROS の相対値を示す (図 3)。今回検討したつぶ餡、こし餡、小豆、灰汁の全ての抽出画分は、対照と比較して ROS を有意に抑制した。

更に、それぞれの画分のもつ ROS の抑制効果を比較する (図 3)。本検討で用いたつぶ餡とこし餡を比較した結果、メタノール画分・水抽出画分ともに、つぶ餡の方が ROS を有意に抑制した。また、メタノール抽出画分 (図 3 (a)) において、つぶ餡と小豆には有意差は無かったが、こし餡は小豆に比べて ROS の抑制効果が有意に低かった。一方、水抽出画分 (図 3 (b)) のつぶ餡とこし餡は、小豆や灰汁と比較して、ROS の抑制効果は有意に低かった。

以上の結果から、本検討で用いた餡の抽出物は、小豆や灰汁と比べて効果が低い場合があるものの、細胞内の ROS に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。また、今回用いたつぶ餡の抽出物は、こし餡に比べて ROS の抑制

効果が高いことを示した。

更に、ROS に対するポリフェノール濃度、および SOD 様活性の相関を検討した (図 4)。その結果、SOD 様活性と細胞内の ROS には相関が認められ ($r = -0.820$, $p < 0.05$; 図 4 (a)), ROS の抑制に SOD 様活性が寄与していることが示唆された。しかしながら、ポリフェノール濃度と ROS の関係には、有意な相関を認めることができなかった ($r = -0.550$, $p = 0.201$; 図 4 (b))。図 4 (b) の結果からは、ポリフェノール濃度を基準にした場合、メタノール画分の方が低濃度で ROS を抑制しやすい傾向が観察される (図 4 (b))。このため、抽出溶媒として用いたメタノールと水の違いが、餡・小豆から抽出される成分や細胞への浸透性・代謝に影響を与えていると考えられ、相関に影響を与えた可能性がある。今後、それぞれの抽出成分の分析や細胞への溶媒の影響を検討することで、より効果的な餡の摂取法の解明につながると考えられる。

これまでの研究では、アズキそのものや煮汁のもつ機能性を調査した研究が多かったが、本研究では、饅頭に含まれる餡にも抗酸化作用 (SOD 様活性、および培養細胞系における ROS 抑制効果) があることを初めて明らかにした。しかしながら、本検討は 1 種類のつぶ餡とこし餡で比較したものであり、今後、他の製品についても検討していく必要があるものと考えられる。

ヒトを対象とした小豆の機能性研究では、小豆煮汁加工飲料の 4 週間摂取によって血中 LDL コレステロールを低下させた報告⁹⁾ や、小豆煮汁の摂取によって血清中のトリグリセリドが抑制された報告がある¹⁰⁾。これらの研究で用いられた小豆飲料 (175 g にポリフェノール 105 mg 含有) や小豆煮汁 (150 g にポリフェノール 880 mg 含有) と比較して、饅頭 1 個の餡 (約 20 g) の推定ポリフェノール含量は低く (つぶ餡: 10.9–12.5 mg; こし餡: 7.4–8.6 mg)、効果については予測することができない。

しかしながら、餡は饅頭の他、あんぱん、餅、団子など多様な形で日常生活に取り入れやすく、アズキポリフェノールの摂取を継続する上でメリットとなるだろう。今

図3 各抽出物の細胞内 ROS の抑制効果

各棒グラフは、対照溶媒に対する ROS の相対値を示す。棒グラフ上の記号は次の画分と有意差（危険率 5%）があることを示す。a：対照溶媒（水、またはメタノール）；b：つぶ餡；c：こし餡；d：小豆；e：灰汁。また、メタはメタノールを示す。

図4 細胞内 ROS に対する SOD 様活性、およびポリフェノール濃度の相関

後、小豆餡を長期的に摂取した際の効果の検討、一緒に摂取される事の多い緑茶との相互作用の調査、更に製餡時におけるポリフェノールの維持・強化法の開発を行なっていくことで小豆餡の機能性を活用した健康増進につながるものと期待される。

3. 要約

餡頭に含まれるつぶ餡とこし餡について、ポリフェノール量、SOD 様活性、および培養細胞における ROS の抑制効果を検討した。本検討で用いたつぶ餡とこし餡は共にポリフェノールが残存しており、SOD 様の抗酸化活性があること、また添加培養により Jurkat 細胞株の ROS を抑制することを示した。

本研究を遂行するに当たり、SOD 様活性の評価を補助

して頂いた東京慈恵会医科大学の門沙央理氏、三浦茉莉子氏、細胞培養の補助を行なって頂いた野村真弓氏、試料の準備に協力して頂いた秋吉宏平氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水, 鈴木敬一郎, 谷口直之, 酸化ストレスと健康, 生物試料分析, **32**, 247-256 (2009).
- 2) Ristow, M., Mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat. Med.*, **20**, 709-711 (2014).
- 3) Kawagishi, H. and Finkel, T., ROS and disease : finding the right balance. *Nat. Med.*, **20**, 711-713 (2014).
- 4) 石川祐子, 食品素材・成分の抗酸化性「平成 20 年度農水産物機能性活用推進事業報告書」財団法人食品産業センター編（東京）, pp. 19-58 (2009).
- 5) 畑井朝子, 奥瀬一郎, 嵯峨紘一, 長岡泰良, 小豆子実フェノール成分のメタノールによる抽出条件の検討及び種皮部

- と子葉部の含量差異について, 日本調理科学会誌, **29**, 31-36 (1996).
- 6) 小嶋道之, 山下慎司, 西 繁典, 斉藤優介, 前田龍一郎, 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, 日本食品科学工学会誌, **53**, 386-392 (2006).
- 7) 小嶋道之, 西 繁典, 斉藤優介, 弘中和憲, 前田龍一郎, 小豆ポリフェノールの単回および継続投与が血中グルコース濃度に及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌, **54**, 50-53 (2007).
- 8) 佐藤 伸, 小豆種皮による糖尿病性腎症の軽減効果について, 日本未病システム学会雑誌, **11**, 299-303 (2005).
- 9) 相馬ちひろ, 小豆抗酸化成分の生理調節機能とその変動, 豆類時報, **47**, 18-24 (2007).
- 10) Maruyama, C., Araki, R., Kawamura, M., Kondo, N., Kigawa, M., Kawai, Y., Takanami, Y., Miyashita, K. and Shimomitsu, T., Azuki bean juice lowers serum triglyceride concentrations in healthy young women. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, 19-25 (2008).
- 11) 畑井朝子, 小豆あん粒子形成に関する調理科学的研究, 函館短期大学紀要, **28**, 1-73 (2001).
- 12) 土田廣信, 伊藤友美, 水野雅史, 木村忠彦, 小原章裕, 斉藤史恵, アズキ餡製造時に生ずるアズキ渋きり水の抗菌活性, 日本食品科学工学会誌, **55**, 606-611 (2008).
- 13) 鈴木 誠, 渡辺敏郎, 三浦麻子, 原島恵美子, 中川靖枝, 辻啓介, Folin-Denis 法による総ポリフェノール量測定のための抽出溶媒の検討, 日本食品科学工学会誌, **49**, 507 (2002).
- 14) Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M. C. and Thomas, M., Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.*, **130**, 1910-1917 (1983).
- (平成 27 年 2 月 19 日受付, 平成 27 年 3 月 20 日受理)