原 著

人工消化による赤米および紫黒米の抗酸化能評価と
種雌豚への短期給与が酸化ストレス指標に及ぼす影響

松本光史・井上寛暁・山崎 信・村上 斉*・梶 雄次

農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター,
熊本県合志市須屋 2421, 861-1192* 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所,
茨城県つくば市池の台 2, 305-0901

(2012 年 4 月 1 日受付, 2012 年 5 月 30 日受理)

要 約 本研究は、豚の飼料としての赤米および紫黒米の抗酸化能を評価するとともに、暑熱環境下の種雌豚への給与が体内の抗酸化状態に及ぼす影響を明らかにするために、まず、トウモロコシと飼料用米、食用混合米、赤米、紫黒米の各玄米を 1mm 以下に粉碎して、塩酸ペプシン 4 時間、パンクレアチン 4 時間の人工消化を行い、上清中に遊離した抗酸化成分の活性を比較した。トウモロコシ 1g からは $17.5\mu\text{mol}$ (トロロックス当量) の抗酸化成分が、飼料用米と食用混合米からは 21.0 および $19.9\mu\text{mol}$ の抗酸化成分が、それぞれ遊離した。赤米と紫黒米からは 27.4 , $125.2\mu\text{mol}$ の抗酸化成分が遊離し、トウモロコシの約 1.6 倍、7.2 倍であった。また、紫黒米で、塩酸ペプシンの反応だけを行ってパンクレアチン反応は行わなかった場合でも、反応を全て行った場合の 91% 量の抗酸化成分が遊離した。次に、種雌豚 8 頭 (体重約 110kg) を用いて、給与試験を行った。室温は 32°C に設定して暑熱環境に保ち、20 日間の予備飼育の後、本試験を開始した。本試験は、1 期 7 日間の 4 期、4 飼料のラテン方格法で行った。試験期 7 日間のうち、最初の 4 日間はトウモロコシ主体の対照飼料 2.2kg を 1 日 1 回給与し、後半の 3 日間は、対照飼料あるいは、食用米、赤米、紫黒米の各玄米を 50% 配合した試験飼料 2.2kg を 1 日 1 回給与した。試験飼料給与 1 日目に、飼料給与直前、1 時間後、2 時間後、4 時間後の血漿抗酸化能を評価したところ、紫黒米 50% 配合飼料の給与により、摂食開始 1 時間後の血漿抗酸化能が有意に上昇した ($P<0.05$)。試験飼料給与 2 日目には尿中の 8-OHdG をクレアチニン比で比較したが、赤米および紫黒米給与の効果は見られなかった。

Estimation of Antioxidative Activity in Red and Black Rice with in vitro Digestion Method for Pigs and Evaluation of Antioxidant Status of Gilts Short-term Administered with Red and Black Rice

M. MATSUMOTO, H. INOUE, M. YAMAZAKI, H. MURAKAMI* and Y. KAJI

Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan

*National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan

連絡者: 松本光史 (E-mail: matsumom@affrc.go.jp Tel. 096-242-7749)

緒 言

九州沖縄地方などの西南暖地では夏季の暑熱の影響による家畜の生産性低下が顕著である。地球温暖化に伴い、飼育している豚が暑熱ストレスを受ける地域および期間が拡大すると推定されているため(高田ら, 2008), 暑熱対策は全国的にも重要なテーマである。暑熱環境下の家畜では体温の上昇が引き起こされ(松本ら, 2008), 酸化ストレスが亢進して繁殖性や乳生産などの低下が引き起こされていることが次第に明らかにされてきている(TAKAHASHI, 2011; TANAKA ら, 2008)。抗酸化物質の給与による暑熱対策について検討も進められており, SAKATANI ら(2007)は, 牛の受精卵を用いた検討で, 紫芋のアントシアニンが細胞内の酸化ストレスを低減し発生率を高めることを明らかにしている。離乳豚での検討では, マリオンベリーやチョコベリーなどのベリー類由来のアントシアニンが胃から血液中に吸収されること(Wu ら, 2004, 2005)や, ブルーベリー粉末を給与した場合に, 肝臓, 目, 脳でアントシアニンが検出されること(KALT ら, 2008)などが明らかにされている。しかし, 抗酸化物質の投与による豚の生産性改善の知見は乏しい。

一方, トウモロコシ価格の高騰への対応や食料安全保障の観点などから, 輸入トウモロコシに代わる豚の飼料原料として飼料用米の利用が拡大している。飼料用米と食用米との識別を確実にを行うために, 有色の飼料用米品種の育成が行われており, 有色素米の飼料利用方法の確立が求められている。古代米ともいわれる赤米や紫黒米などの有色素米には, アントシアニンなどの抗酸化成分が含まれていることが知られており(東ら, 1996; 山口ら, 2007), 豚が有色素米を消化吸収して体内で抗酸化成分を効果的に利用できれば, 有色素米は暑熱対策のための有効な飼料原料になると期待される。しかし, 有色素米を豚に給与して抗酸化成分の取り込みなどを詳細に検討した報告は見られない。

そこで, 本研究では, 豚の消化管(胃と小腸)を試験管内で再現した人工消化により, 豚の消化システムが有色素米から抗酸化成分を遊離させる

ことができるか否かを検討するとともに, 暑熱環境下の種雌豚に有色素米を給与して, 酸化ストレス指標に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

人工消化による有色素米の抗酸化能評価

人工消化は FURUYA ら(1979)や BOISEN と FERNÁNDEZ(1995)が報告している方法を基本にして, 以下の通り行った。消化酵素は, 豚胃粘膜由来ペプシン(1:10,000, 和光純薬工業)と, 豚膵臓由来パンクレアチン(和光純薬工業)を用いた。有色素米は, 赤米「夕やけもち」の玄米と, 紫黒米「朝紫」の玄米を準備し, 比較対照として, 飼料用米「まきみずほ」玄米, 食用の混合米玄米, および市販の加熱圧べんとうモロコシを用いた。1mm 以下に粉碎した試料 0.5g を 50ml のコニカルチューブに計り取り, 10ml の塩酸ペプシン溶液(0.2g のペプシンを 100ml の 0.02N 塩酸に溶かしたもの)を加えて, 39℃のウォーターバス中で振盪させながら 4 時間反応させた。次に, 2ml の 0.2M Tris 溶液と 4.5ml の 1N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて, pH を 7.5 に調整した後, 1ml のパンクレアチン溶液(50mg/ml)を加えて, 39℃のウォーターバス中で振盪させながら 4 時間反応させた。反応液に蒸留水を加えて 50ml に定容後, 遠心分離(1,700×g, 10 分, 4℃)した上清を用いて抗酸化能の測定を行った。抗酸化能の測定には, Randox Laboratories 社(英国)製の Total Antioxidant Status (TAS) キットを用い, 6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸(トロロックス)をスタンダードとしてラジカル消去能を測定した。

次に, 人工消化のペプシン塩酸溶液およびパンクレアチン溶液での反応ステップが, 抗酸化成分の遊離にどの程度関わるかを明らかにするために, 以下の実験を行った。紫黒米「朝紫」玄米を用いて, 人工消化液の代わりに蒸留水に懸濁して 0 あるいは 8 時間の反応を行ったもの, ペプシン塩酸溶液の反応後に中和してパンクレアチン溶液を加えずに反応させたもの, パンクレアチン溶液による反応まで全て行ったものを用い, 遠心上清中の抗酸化能を TAS キットにより評価した。

人工消化の実験はそれぞれ 2 回ずつ行った。統計計算には SAS を用い、分散分析および Tukey 法による多重比較を行った。

種雌豚への有色素米給与試験

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の動物実験等指針に則って計画し、九州沖縄農業研究センター動物実験委員会の承認を得て行った。LWD 交雑種の雌豚 8 頭（実験開始時の体重約 110 kg）を用いて、室温を 32℃ 一定に空調制御した単飼豚房で試験を行った。暑熱環境での 20 日間の予備飼育期間の後、本試験を開始した。予備飼育期間は市販の繁殖豚用飼料 2.2 kg を 1 日 1 回給与した。本試験は、1 期 7 日間の 4 期、4 飼料のラテン方格法で行った。試験飼料の配合割合は、表 1 に示すとおりである。試験期 7 日間のうち、最初の 4 日間は、前の期からの酸化成分の影響を排除するために、トウモロコシ主体の対照飼料 2.2 kg を 1 日 1 回給与し、後半の 3 日間は、対照飼料あるいは、食用米「ヒノヒカリ」、赤米「夕やけもち」、紫黒米「朝紫」の各玄米を 50% 配合した試験飼料 2.2 kg を 1 日 1 回給与した。試験飼料給与 1 日目には、飼料給与直前、1 時間後、2 時間後、4 時間後に採血を行い、

前述の TAS キットにより血漿の抗酸化能を評価した。試験飼料給与 2 日目には、飼料給与 2 時間後以降の最初の放尿時に尿を採取し、酸化ストレス指標の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) をクレアチニン比で比較した。なお、8-OHdG の測定は、New 8-OHdG Check（日本老化制御研究所）を、クレアチニンの測定は、ラボアッセイTMクレアチニン（Jaffe 法、和光純薬工業）を用いた。

統計計算は SAS を用いて次のとおり行った。血漿抗酸化能は、飼料給与直前の値と給与後の各時間における値の差をそれぞれ計算して用い、尿中 8-OHdG はクレアチニン比の値をそのまま用いて、個体、試験期、飼料を要因として分散分析を行った。飼料間に有意差が見られたものについては、Tukey 法により多重比較を行った。

結 果

人工消化による有色素米の抗酸化能評価

人工消化によって遊離した酸化成分は試料 1 g あたりのトロロックス当量として評価した。人工消化によってトウモロコシ 1 g からは 17.5 μmol の酸化成分が^a、飼料用米「まきみずほ」と食用

表 1. 種雌豚への給与試験に用いた飼料の組成 (%)

Table 1. Composition of experimental diets

	対照	ヒノヒカリ	夕やけもち	朝紫
トウモロコシ	81.85	31.85	31.85	31.85
玄米（ヒノヒカリ）	—	50.00	—	—
玄米（夕やけもち）	—	—	50.00	—
玄米（朝紫）	—	—	—	50.00
大豆粕	12.00	12.00	12.00	12.00
魚粉	2.00	2.00	2.00	2.00
アルファルファミール	1.00	1.00	1.00	1.00
第 3 リン酸カルシウム	2.00	2.00	2.00	2.00
食塩	0.30	0.30	0.30	0.30
ミネラル・ビタミンミックス ^a	0.85	0.85	0.85	0.85

^a 飼料 1 kg あたりの添加量は次の通り。鉄 45 mg, 銅 11 mg, 亜鉛 50 mg, マンガン 27 mg, ヨウ素 0.5 mg, ビタミン A 8,000 IU, ビタミン D 1,200 IU, ビタミン E 36.4 mg, ビタミン K 1.1 mg, チアミン 2.6 mg, リボフラミン 8.0 mg, パントテン酸 8.0 mg, ナイアシン 10.4 mg, ピリドキシン 3.9 mg, 葉酸 1.0 mg, コリン 347 mg, ビタミン B12 0.012 mg

図 1. 豚の消化管を想定した人工消化による有色素米からの抗酸化成分の遊離
 平均値±標準偏差, $n=2$, a-b 異符号
 間で有意差 ($P<0.05$) あり

Fig. 1. Elution of antioxidant component with in vitro digestion method

図 2. 紫黒米の人工消化における反応段階の違いが抗酸化成分の遊離に及ぼす影響
 平均値±標準偏差, $n=2$, a-d 異符号
 間で有意差 ($P<0.05$) あり

Fig. 2. Effects of in vitro digestion steps on elution of antioxidant components from black rice

の混合米の玄米 1g から 21.0 および 19.9 μmol の抗酸化成分が、それぞれ遊離して検出された。これに対して、有色素米である赤米「タやけもち」

および紫黒米「朝紫」からは 27.4 および 125.2 μmol の抗酸化成分が遊離し、トウモロコシの約 1.6 倍, 7.2 倍であった (図 1)。

朝紫の玄米を用いた人工消化のステップ別の検討では、塩酸ペプシンとパンクレアチンの反応をすべて行った場合に玄米 1g から遊離する抗酸化成分量 121.2 μmol と比較して、パンクレアチン反応を行わなかった場合でも 110.2 μmol (91%) が遊離した。消化酵素は用いずに水で 37°C, 8 時間反応させた場合でも、55.8 μmol (46%) が遊離して検出された (図 2)。

種雌豚への有色素米給与試験

いずれの飼料についても、給与後 30 分程度でほとんどが摂取され、1 時間後に残飼は見られなかった。紫黒米「朝紫」を 50% 配合した飼料を給与すると、トウモロコシや食用米「ヒノヒカリ」、赤米「タやけもち」をそれぞれ 50% 配合した飼料を給与した場合と比較して、摂食開始 1 時間後の血漿抗酸化能が有意 ($P<0.05$) に上昇した (図 3)。しかし、2 時間後、4 時間後と次第に低下して他の飼料の場合と有意差は見られなくなった。

尿中のクレアチニンあたりの 8-OHdG には、飼料間で違いは見られなかった (図 4)。

考 察

今回の研究で、豚の消化管を想定した人工消化により紫黒米から多量の抗酸化成分が遊離すること、その遊離の多くが胃内で起こると推定されること、種雌豚への短期給与試験で、紫黒米の給与後の血漿中抗酸化能が有意に上昇することなどを示した。

有色素米をはじめとして植物が持つ抗酸化成分を評価する場合、通常はエタノール、アセトン、ジメチルスルホキシドなどによる人工抽出によって成分分析を行うとともに、DPPH ラジカル消去活性などが評価される (木村ら, 2002; 溝渕ら, 2006)。我々はこれらの評価情報を元に、豚に給与する有色素米候補として赤米と紫黒米を選定したが、それらの抗酸化成分を豚が実際にどれだけ利用できるかを評価する簡便な実験系が必要であった。そこで、豚の飼料評価に用いられる人工消化試験法 (FURUYA ら, 1979; BOISEN と FERNÁNDEZ,

図 3. 暑熱環境下の種雌豚への有色素米飼料給与が血漿抗酸化能に及ぼす影響
 平均値±標準誤差, n=8, *P<0.05

Fig. 3. Effects of feeding of red or black rice on plasma anti-oxidative status of the gilts under high ambient temperature

図 4. 暑熱環境下の種雌豚への有色素米飼料給与が尿中 8-OHdG に及ぼす影響
 平均値±標準誤差, n=8, 有意差なし

Fig. 4. Effects of feeding of red or black rice on urine 8-OHdG level of the gilts under high ambient temperature

1995) を改良して, 市販の TAS キットによる抗酸化能評価と組み合わせることで, 豚の胃と小腸における消化反応を試験管内で再現して有色素米を評価した。最終的に検出された抗酸化能は, 赤米「タやけもち」ではトウモロコシの約 1.6 倍, 紫

黒米「朝紫」では約 7.2 倍であった (図 1)。これまでに, 赤米「タやけもち」と紫黒米「朝紫」は, 0.5~0.6 mg/g および 2 mg/g のアントシアニジン含有すると報告されている (山口ら, 2007) ことと比較すると, 今回の人工消化による抗酸化能評価の結果は, その比率にほぼ合致するものであった。我々が本研究で提唱する人工消化による抗酸化能の評価法では, 有機溶媒等の抽出を行わず, 豚の専門家が確立してきた豚の人工消化試験法を応用している。飼料は, 摂食によって豚の体内に入ると同様の環境にさらされる。胃のステップでは, 強酸性状態でペプシンによるタンパク質の分解を受け, また, 小腸のステップでは, pH が中性に戻されて, 膵臓から分泌される酵素群による分解を受ける。したがって, 最終的に上清中で検出される抗酸化能は, 豚の胃と小腸における消化酵素の反応で遊離してきたものであると同時に, 豚の胃と小腸における反応後も分解されずに活性を維持している成分と言うこともできる。人工消化後の上清で検出される抗酸化成分が, 胃や小腸から吸収されて血液中に入るか否かは, 次の段階での検証が必要だが, 豚の消化システムによる抗酸化能評価という観点から, 豚の飼料原料選定のための抗酸化能スクリーニングの手段として使えるものと考えられた。

有色素米の動物への給与試験では, LING ら (2001, 2002) が高コレステロール飼料を給与したウサギに赤米や紫黒米を給与することで, 血中の SOD などの抗酸化能を高めて酸化ストレスが低減され, 動脈のアテローム変性が抑制されることを報告している。また, XIA ら (2003, 2006) は, アポリポ蛋白 E 欠損マウスを用いた研究で, 紫黒米から抽出したアントシアニンを豊富に含む画分を投与することにより, ウサギの場合と同様に動脈のアテローム変性が抑制されることを報告している。WANG ら (2007) は, 紫黒米から抽出したアントシアニンを豊富に含む画分は, ヒトにおいても抗酸化状態を高めて炎症因子を抑制することにより冠動脈疾患を改善することを示している。このように, ウサギ, マウス, ヒトにおいて, 紫黒米や赤米などのアントシアニンは消化管から吸収されて血液中に移行し, 体内の抗酸化能を高め

ることが示唆されている。一方、離乳豚での検討ではあるが、抗酸化成分を大量に含むマリオンベリーやチョコベリーなどの粉末を給与すると、アントシアニンが胃から血液中に吸収されること(WUら, 2004, 2005)や、ブルーベリー粉末を給与した場合に、肝臓、目、脳でアントシアニンが検出されること(KALTら, 2008)などが明らかにされている。しかし、豚において有色素米を給与して抗酸化成分の取り込みなどを詳細に検討した報告は見られない。本研究では、暑熱環境下の種雌豚に有色素米を50%配合した飼料を短期制限給与して、血漿中および尿中の酸化ストレスマーカーの変動を検討した。その結果、紫黒米「朝紫」配合飼料を給与した場合に、給与1時間後の血漿抗酸化能が有意に上昇した(図3)。これは豚においても、紫黒米の抗酸化成分が消化吸収されて血漿中に移行することを強く示唆する結果である。給与した飼料は30分程度でほとんどが摂食され、給与1時間後の血漿抗酸化能が最も高くなったことと、人工消化のステップ別の検討(図2)で、胃相当の処理だけでも、胃・小腸相当処理後の91%の抗酸化成分が遊離して検出されたことから、紫黒米の抗酸化成分は胃から多くが吸収されたと考えられる。なお、2日間給与した後の尿中8-OHdGに有色素米(特に紫黒米)給与の効果が見られなかったのは、給与期間が短かったか、給与量が少なかったことが考えられ、今後の検討が必要である。

本研究においては、紫黒米の代表として「朝紫」を用いて検討をおこなった。近年、紫黒米では、秋田県の「小紫」(松本ら, 2006)、愛知県の「峰のむらさき」(坂ら, 2007)、農研機構・東北農業研究センターの「紫こぼし」(片岡ら, 2010)など、様々な品種が育成されている。今後、紫黒米の品種や抗酸化成分の量なども考慮に入れながら、暑熱環境下で特に強い酸化ストレスを受けると考えられる肥育後期豚や分娩時の繁殖豚などで給与試験を行い、酸化ストレスを低減して生産性を改善する技術として確立することが望まれる。

以上の結果をまとめると、豚の消化管を想定した人工消化により紫黒米から多量の抗酸化成分が遊離されること、暑熱環境下の種雌豚に紫黒米を

給与すると血漿中抗酸化能が有意に上昇することが明らかになった。

謝 辞

本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「自給飼料を基盤とした国産畜産物の高付加価値技術の開発(国産飼料プロ)」により行われたものである。本研究の遂行に当たり、プロジェクトリーダーとしてご助言いただいた山形大学の吉田宣夫先生と、畜産草地研究所の勝俣昌也上席研究員に深謝いたします。また、試験豚の管理や採材に協力いただいた九州沖縄農業研究センター業務第1科養豚班の彦坂 徹氏、村上伸二氏、長野秀範氏、坂本文彦氏、源 真生氏に感謝いたします。

文 献

- BOISEN, S. and J.A. FERNÁNDEZ : 1995, Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by in vitro analyses, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **51**, 29-43.
- FURUYA, S., K. SAKAMOTO and S. TAKAHASHI : 1979, A New in vitro Method for the Estimation of Digestibility Using the Intestinal Fluid of the Pig, *Br. J. Nutr.*, **41**, 511-520.
- 東 正昭・山口誠之・田村泰章・横上晴郁・小綿寿志・小山田善三・春原嘉弘 : 1996, 紫黒糯水稻新品種「朝紫」の主要特性, *東北農業研究*, **49**, 7-8.
- KALT, W., J.B. BLUMBERG, J.E. McDONALD, M.R. VINQVIST-TYMCHUK, A.E. FILLMORE, B.A. GRAF, J. M. O'LEARY and P.E. MILBURY : 2008, Identification of Anthocyanins in the Liver, Eye, and Brain of Blueberry-Fed Pig, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 705-712.
- 片岡知守・山口誠之・遠藤貴司・中込弘二・滝田正・横上晴郁・加藤 浩 : 2010, 極小粒の紫黒米糯品種「紫こぼし」の育成, *東北農研報*, **111**, 1-16.
- 木村俊之・山口誠之・鈴木雅博・山岸賢治・新本洋士 : 2002, 色素米のラジカル消去能, *東北農業研究*, **55**, 271-272.
- LING, W.H., Q.X. CHEN, J. MA and T. WANG : 2001, Red and Black Rice Decrease Atherosclerotic Plaque Formation and Increase Antioxidant Status in Rabbits, *J. Nutr.*, **131**, 1421-1426.

- LING, W.H., L.L. WANG and J. MA : 2002, Supplementation of the Black Rice Outer Layer Fraction to Rabbits Decreases Atherosclerotic Plaque Formation and Increases Antioxidant Status, *J. Nutr.*, **132**, 20-26.
- 松本光史・村上 斉・阪谷美樹・井上寛暁・梶 雄次 : 2008, 暑熱環境が肥育後期豚の深部体温と消化吸收能力に及ぼす影響, 栄養生理研究会報, **52**, 43-48.
- 松本眞一・眞崎 聡・川本朋彦・小玉郁子・畠山俊彦・加藤武光 : 2006, 水稻紫黒糯品種「小紫」の育成, 秋田県農業試験場研究報告, **46**, 21-40.
- 溝渕律子・岡本正弘・梶 亮太・田村克徳・富松高治・平林秀介・深浦壮一・八木忠之・西村実・山下 浩 : 2006, 水稻新品種「紅染めもち」の育成, 九州沖縄農業研究センター報告, **46**, 15-38.
- 坂 紀邦・寺島竹彦・工藤 悟・加藤恭宏・杉浦和彦・遠藤征馬・城田雅毅・井上正勝・大竹敏也 : 2007, 加工適性に優れた水稻紫黒糯の新品種「峰のむらさき」, 愛知県総試研報, **39**, 111-120.
- SAKATANI, M., I. SUDA, T. OKI, S. KOBAYASHI, S. KOBAYASHI and M. TAKAHASHI : 2007, Effects of Purple Sweet Potato Anthocyanins on Development and Intracellular Redox Status of Bovine Preimplantation Embryos Exposed to Heat Shock, *J. Reprod. Dev.*, **53**, 605-614.
- 高田良三・山崎 信・杉浦俊彦・横沢正幸・大塚誠・村上 斉 : 2008, 地球温暖化が肥育豚の飼養成績に及ぼす影響 —「気候温暖化メッシュデータ (日本)」によるその将来予測—, 日畜会報, **79**, 59-65.
- TAKAHASHI, M. : 2011, Heat Stress on Reproductive Function and Fertility in Mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, *Reprod. Med. Biol.*, **11**, 37-47.
- TANAKA, M., Y. KAMIYA, T. SUZUKI, M. KAMIYA and Y. NAKAI : 2008, Relationship between Milk Production and Plasma Concentrations of Oxidative Stress Markers during Hot Season in Primiparous Cows, *Anim. Sci. J.*, **79**, 481-486.
- WANG, Q., P. HAN, M. ZHANG, M. XIA, H. ZHU, J. MA, M. HOU, Z. TANG and W. LING : 2007, Supplementation of Black Rice Pigment Fraction Improves Antioxidant and Anti-Inflammatory Status in Patients with Coronary Heart Disease, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **16** Suppl 1, 295-301.
- WU, X., H.E. PITTMAN, III and R.L. PRIOR : 2004, Pelargonidin Is Absorbed and Metabolized Differently than Cyanidin after Marionberry Consumption in Pigs, *J. Nutr.*, **134**, 2603-2610.
- WU, X., H.E. PITTMAN, III, S. MCKAY and R.L. PRIOR : 2005, Aglycones and Sugar Moieties Alter Anthocyanin Absorption and Metabolism after Berry Consumption in Weanling Pigs, *J. Nutr.*, **135**, 2417-2424.
- XIA, M., W.H. LING, J. MA, D.D. KITTS and J. ZAWISTOWSKI : 2003, Supplementation of Diets with the Black Rice Pigment Fraction Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein E Deficient Mice, *J. Nutr.*, **133**, 744-751.
- XIA, X., W.H. LING, J. MA, M. XIA, M. HOU, Q. WANG, H. ZHU and Z. TANG : 2006, An Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice Enhances Atherosclerotic Plaque Stabilization in Apolipoprotein E-Deficient Mice, *J. Nutr.*, **136**, 2220-2225.
- 山口誠之・片岡知守・遠藤貴司・中込弘二・滝田正・横上晴郁・加藤 浩 : 2007, 赤米糯品種「夕やけもち」の育成, 東北農研研報, **107**, 1-13.

Estimation of Antioxidative Activity in Red and Black Rice with *in vitro* Digestion Method for Pigs and Evaluation of Antioxidant Status of Gilts Short-term Administered with Red and Black Rice

Mitsuhito MATSUMOTO, Hiroaki INOUE, Makoto YAMAZAKI,
Hitoshi MURAKAMI*, and Yuji KAJI

Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan

*National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan

The present study was conducted to elucidate the possibilities of red rice and black rice as the source of antioxidant component for pigs and the effects of feeding of red rice or black rice on anti-oxidative status of the gilts. Elution of antioxidant component from corn, two kinds of brown rice, red rice, and black rice were evaluated by *in vitro* digestion test. Corn and rice samples milled through 1mm screen were digested in test tube. HCl-pepsin reaction for 4 hours and following pancreatin reaction for 4 hours were performed in 39°C assuming in stomach and small intestine, respectively. After the centrifugation of the digests, the supernatants were subjected to total antioxidant status (TAS) kit to evaluate antioxidative activity. From 1 g of corn and two kinds of brown rice, antioxidant components were eluted by 17.5, 21.0, and 19.9 μmol (Trolox equivalent) respectively, while 27.4 μmol (1.6-fold of corn) was eluted from red rice. Significantly high level of antioxidant components elution was observed in black rice (125.2 μmol , 7.2-fold of corn). Furthermore, even when the step of pancreatin reaction was skipped, 91% of antioxidant component was detected in case of black rice. Next, Eight LWD gilts with the weight of about 110 kg were examined under high ambient temperature. After keeping at 32°C for 20 days, experimental period started also at 32°C. The experiment was done by a Latin square of 4 feeds x 4 terms (seven days for 1 term). For the first four days of examination term, 2.2 kg of control diet mainly consisted by corn was given to the gilts once a day. For the last three days of the examination term, 2.2 kg of the control diet or the experimental diets containing brown rice, red rice, or black rice by 50% respectively, was given to the gilts once a day. On the first day of experimental diet, blood samples were collected at 0, 1, 2, and 4 hours after feeding, and urine samples were collected on the next day. Blood plasma antioxidant status was evaluated with TAS kit. TAS value of the gilt fed black rice diet was significantly increased 1 hour after ingestion ($P < 0.05$), and fell gradually. A clear change was not seen in gilts fed control diet, brown rice diet, or red rice diet. Creatinine-adjusted urinary 8-OHdG concentration was measured to assess the oxidative stress, but no difference was observed.

Jpn. J. Swine Science, **49**, 3 : 109-116

Key words : red and black rice, antioxidant component, *in vitro* digestion method, oxidative stress, pig