HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アロニアおよびハスカップ果実に含まれるアントシアニンの抗酸化能に関わる諸要因の解析
Author(s)	髙橋, あずさ
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11818号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11818
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60926
Type	doctoral thesis
File Information	Azusa_Takahashi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

アロニアおよびハスカップ果実に含まれるアントシアニンの抗酸化能に関わる諸要因の解析

北海道大学　大学院農学院
生物資源科学専攻　博士後期課程
髙橋　あずさ

目次

	項
緒言	1
第 1 章　アロニアおよびハスカップ果実に含まれる色素成分の特徴	5
第 2 章　果実内アントシアニン含量および組成に影響を及ぼす諸要因	12
第 1 節　アロニアの果実発育に伴うアントシアニン含量および組成の変化	12
第 2 節　野生ハスカップ果実アントシアニン含量の遺伝的多様性と栽培化に伴う変化	16
1) 果実の外部形質および含水率	17
2) アントシアニン含量	20
第 3 節　ハスカップアントシアニン含量の年次間変動	24
第 4 節　第 2 章の考察	27
第 3 章　果実のアントシアニン含量と総ポリフェノール含量および各種抗酸化能との関連	28
第 1 節　ハスカップ果実の総ポリフェノール含量および各種抗酸化能の遺伝的多様性	28
1. 総ポリフェノール	33
2. 抗酸化能	33
1) DPPH ラジカル捕捉活性値	33
2) ORAC 値	36
3) ESR スピントラップ法によるヒドロキシラジカル補足活性値	36
第 2 節　果実の総アントシアニン含量と総ポリフェノール含量および	39

各種抗酸化能との相関
第 4 章　ラット消化管におけるアントシアニン吸収動態の解明 45
第 1 節　アントシアニン組成の違いが吸収量に及ぼす影響 45
第 2 節　腸管におけるアントシアニン吸収量の経時的変化 55
第 3 節　アントシアニン吸収に及ぼすカプサイシンの影響 57
第 5 章　ラットの肥満および脂質代謝に及ぼすアントシアニン給餌の影響 60
第 1 節　肥満したラットに対する果実抽出色素給餌の効果 60
第 2 節　高脂肪飼料に添加した果実抽出色素によるラットの肥満予防効果 71
第 3 節　脂質の消化・吸収に及ぼす果実抽出色素の影響 76
第 6 章　果実抽出色素給餌がラットの血糖値および腎機能に及ぼす影響 84
第 1 節　　血糖値 84
第 2 節　　臭素酸カリウム誘発腎障害の改善 85
第 7 章　総合考察 95
摘要 99
謝辞 103
引用文献 104

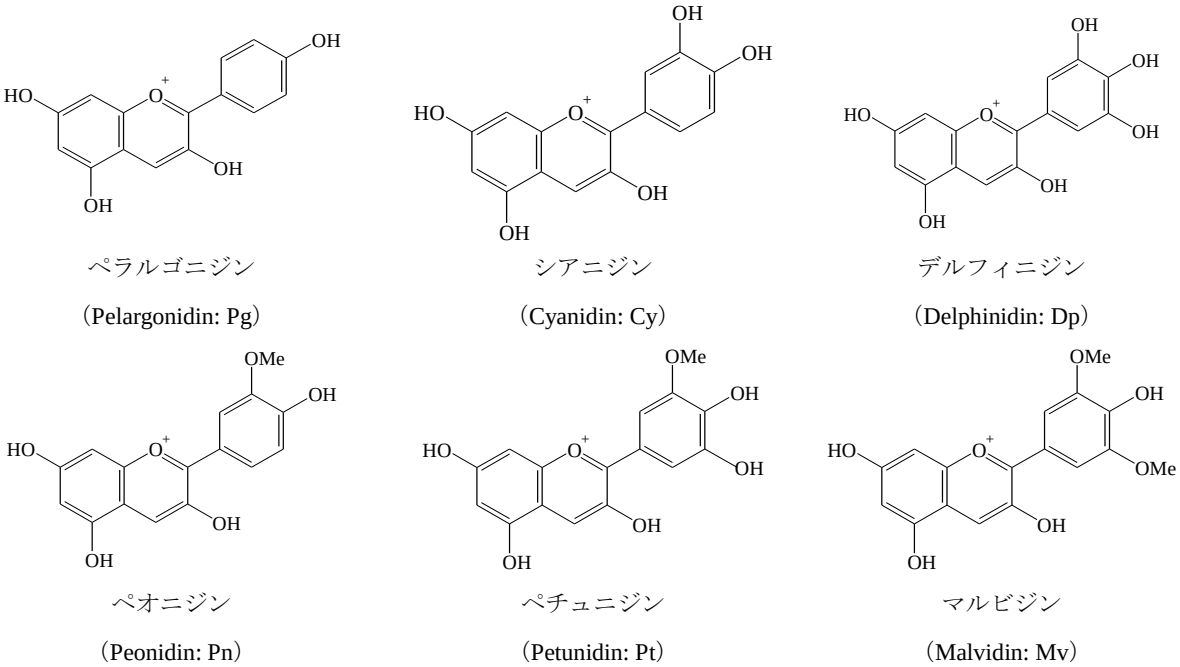
緒言

WHO 発行の報告書（2011 年版）によると、世界的規模でみたヒトの死因の第 1 位は、動脈硬化性疾患（心筋梗塞や脳梗塞など）で第 2 位はがんである。また、厚生労働省発表の死因統計（2011 年版）によれば、心血管疾患および脳血管障害が各々日本における全死亡原因の約 30 %を占め、第 1 位のがんに匹敵するものとなっている。このため、これらの疾患は、合わせて三大成人病と称される。三大成人病は、脂質代謝異常、高血圧、肥満および糖尿病などが複合的にかかわるほか（河田ら， 2008）、個人の生活スタイルがその発症に影響を及ぼすことから、生活習慣病とも言われる。近年、特に注目されているメタボリックシンドロームとは、「内臓脂肪の蓄積と、それを基盤にしたインスリン抵抗性、糖代謝異常、脂質代謝異常および高血圧を複数合併するマルチプルリスクファクター症候群で、動脈硬化になりやすい病態」と定義されている。つまり遺伝的な要因に加えて環境要因（過食や運動不足などの生活習慣）が発症に大きく影響すると考えられている。メタボリックシンドロームが、関わる種々の病態の鍵は肥満であり、特に内臓脂肪の蓄積が大きな問題となる。裏を返せば、内臓脂肪蓄積を抑制することで、生活習慣病の発症リスクを低減させることが可能であるとも言える。従って、食生活などの生活習慣を改善し肥満を抑制する取り組みは、三大成人病発症予防の観点からも重要と考えられている。

また、三大成人病の発症には、生体内の酸化ストレスが大きく関与することも指摘されている。すなわち、食品添加物、大気汚染、農薬、紫外線および喫煙などが原因となり人体内で発生する酸化物質はフリーラジカルを発生させ、酸素と反応してスーパーオキシドアニオンラジカルが生成する。これは、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の働きによって過酸化水素へと変換され、さらに金属イオンと反応して強毒性のヒドロキシラジカルとなる。これら一連の活性酸素種によって、過酸化脂質が生成するほか、DNA およびタンパク質に損傷が生じ、これが引き金となって動脈硬化およびがんを発症すると考えられている（仲ら，2006）。近年、活性酸素種の除去に有効な成分として、食品中の抗酸化化合

物（ポリフェノール、カロテノイド、ビタミン類等）に注目が集まっている。これらの多くは植物に由来するが、小果樹（ベリー類）果実に多量に含まれるアントシアニンは、赤ワインの色素性分としても知名度があり、人々の関心が高い。アントシアニンは、ポリフェノールの一種であるフラボノイド化合物で、基本骨格である 6 種類のアントシアニジンに糖およびアシル基などが結合した構造を有し、多種類が天然に存在する（第 1 図）。アントシアニンの色調は、アントシアニジンの種類によって異なり、B 環に結合する水酸基数の増加で濃色化し、メトキシル基の結合は淡色化をもたらすとされる（津田ら，2009）。また、pH に依存して色調は変化し、酸性側で赤色、塩基性側で青色を呈する。さらに、果実に含まれるアントシアニンの組成および含量は、植物種ごとに大きく異なることが知られている（横田、2011）。アントシアニンが持つ抗酸化機能性との関連では、マウスの肥満（Tsuda ら，1998）、メタボリックシンドローム（Vessal ら，2003; Clifton ら，2004）および高コレステロール血症（Sasaki ら，2007; Mulabagal ら，2009; Goupy ら，2009）、並びにラットの糖尿病（Stanely ら，2010）、がん（Galati ら，2004; Benavente-García ら，2008）およびアルツハイマー病発症（Shih ら，2010）の抑制にアントシアニン給餌が有効であることが報告されている。

北海道で広く栽培されている小果樹のうちアントシアニンを豊富に含むものとしてアロニア（*Aronia melanocarpa* (Michix) Eliiott）およびハスカップ（*Lonicera caerulea* L.）が挙げられ、これらの果実は健康食品素材としても注目されている。2006 年 3 月の北海道果樹農業振興計画の中で北海道産果実および加工品の需要拡大が謳われており、2011 年に出された方針の中でも継続して果樹産業の振興が目標として掲げられている。また、北海道が推進する戦略的食クラスター先導的モデル事業の 1 つでもある「道産小果実付加価値化モデル」の一環として「ベリーランド北海道」構想が掲げられており、北海道特産小果樹であるアロニアおよびハスカップを全国に広めるための普及活動も盛んに行われている。アロニアは、北アメリカ東部原産のバラ科低灌木で、北海道には約



第１図　アントシアニン基本骨格であるアントシアニジンの分子構造.

30 年前にロシア経由で伝来した。アロニア果実は、ロシアおよび東ヨーロッパでは高血圧やアテローム性動脈硬化症の発症予防に有効な食材として知られ、その効果には豊富に含まれるポリフェノール類が関与していると考えられている（Kokotkiewicz ら， 2010）。ハスカップは、スイカズラ科に属し、日本（北海道）にはクロミノウグイスカグラ（*Lonicera caerulea* L. var. *emphyllocalyx* Nakai）およびケヨノミ（*L. caerulea* L. var. *edulis*）の 2 変種が自生するが（田中ら， 1998）、このうちクロミノウグイスカグラが約 30 年前に栽培化された。しかし品種の分化は少なく、野生種の果実に含まれている成分の多様性については明らかにされていない。

このような背景から、本研究ではアロニアおよびハスカップに着目し、果実のアントシアニン組成および抗酸化能並びにラットの生体に及ぼす機能性を解明しようと考えた。すなわち、本論文の第 1 章では、アロニアおよびハスカップ果実に含まれるアントシアニンの特徴を明らかにするとともに、第 2 章では果実のアントシアニン含量および組成に影響を及ぼす諸要因を明らかにしようと考えた。第 3 章では、果実のアントシアニン含量と各種の方法で測定した抗酸化活性を比較し、アントシアニンが抗酸化に果たす能力を検証した。次に、第 4 章では、アロニアおよびハスカップ果実からアントシアニン含有色素を抽出し、ラットの腸管に投与した場合の腸管におけるアントシアニン吸収動態を明らかにしようとした。さらに、第 5 および 6 章では、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素をラットが摂取した場合の肥満および疾病発症の抑制効果について検討した。最後に第 7 章では、第 1～6 章で得られた結果に基づき、総合的な考察を加えた。

第 1 章 アロニアおよびハスカップ果実に含まれる色素成分の特徴

本研究で研究材料とするアロニアおよびハスカップ果実には、アントシアニンが多量に含まれていることが知られている。本章では、次章以降の研究を進めるための基礎として、これらの果実が含有する色素成分および抗酸化能の特徴を明らかにするため、アントシアニンが豊富なことで知られるビルベリー（ブルーベリーの一種）との比較を試みた。

材料および方法

1. 色素試料の作製

本論文では、研究全般にわたり大量の果実色素抽出物が必要となる。そこで、日本新薬（株）の協力のもと、市販のアロニアおよびハスカップ果実を 50 %（v/ v）エタノールで粗抽出し、スチレン - ジビニルベンゼン系合成吸着剤（ダイヤイオン HP-20）を用いて精製後、凍結乾燥して色素粉末を作製した。この場合、ブルーベリーの近縁種でアントシアニン含量が特に多いことで知られるビルベリー果実についても、同様に色素粉末を作製し対照として用いた。

2. アントシアニン分析

作製した色素粉末の純度を調べるため、各粉末 5mg を 10mL の 0.1% TFA 水溶液に溶解し、試料中のアントシアニンを A_{520} の吸光度に基づき、シアニジンを外部標準とする比色定量法によりシアニジン当量として算出した。また、アントシアニン組成は、横田（2011）の方法に従い測定した。すなわち、材料 20 mg にメタノール：水：ギ酸＝88 : 10 : 2（v/v）溶液を 500 μL 加え、室温で 30 分間振とう後に 10 分間遠心分離し、上清を回収した。この操作を 3 回繰り返し、回収した抽出液を遠心エバポレーターで約 100 μL に減圧濃縮した。分析は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF MS）により行った。アセトンに溶解飽和させたマトリックスの 2’, 4’, 6’-Trihydroxyacetophenone monohydrate（THAP）を抽出試料に等量混合後、分析用プローブ

に 0.7 μL ずつ上層・風乾し MALDI-TOF MS 装置（Voyager-DE® STR、Applied Biosystems 社製）を用いて、加速電圧 20 KV の陽イオン・リフレクターモードで測定した。この場合、試料は各材料につき 3 点ずつ作製し、それぞれを 3 回ずつ（1 材料につき 9 回）測定し、結果を平均値で表した。

3. 果実色素抽出液の抗酸化能評価

果実色素抽出液の抗酸化能は、ルミネッセンサー法により評価した。これは、ヒポキサンチンをキサンチンオキシダーゼで酵素処理する方法により人為的に発生させた活性酵素（スーパーオキシドアニオンラジカル：O^{2-}）を 2-Methyl-6-p-methoxyphenylethylimidazopyrazinone（MPEC）と反応させ、生成した蛍光物質を光学的に定量する方法で、同時に添加した試料の活性酸素（ラジカル）捕捉能を蛍光物質の減少率に基づき推定することができる。本研究では、材料 10 mg に 80 %エタノール 4,000 μL を加え、1 時間振とう後、4 ºC で 24 時間静置し、遠心分離（10,000 rpm、15 分間）した上清を試料とした。試料は各材料について 3 点ずつ作製した。この場合、各色素試料中のアントシアニン含有量が同じとなるように濃度を調整した（1mg/10 mL）。また、蒸留水の区（アントシアニン無添加）を設け対照とした。各試料溶液 20 μL とルミネッセンサー試薬キット（アトー（株））の酵素溶液（専用の緩衝液で 4 倍に希釈したもの）を混合後、発光試薬 （MPEC）と反応させ、ルミネッセンサー（PSN AB-2200, アトー（株））を用いて蛍光強度を測定した。

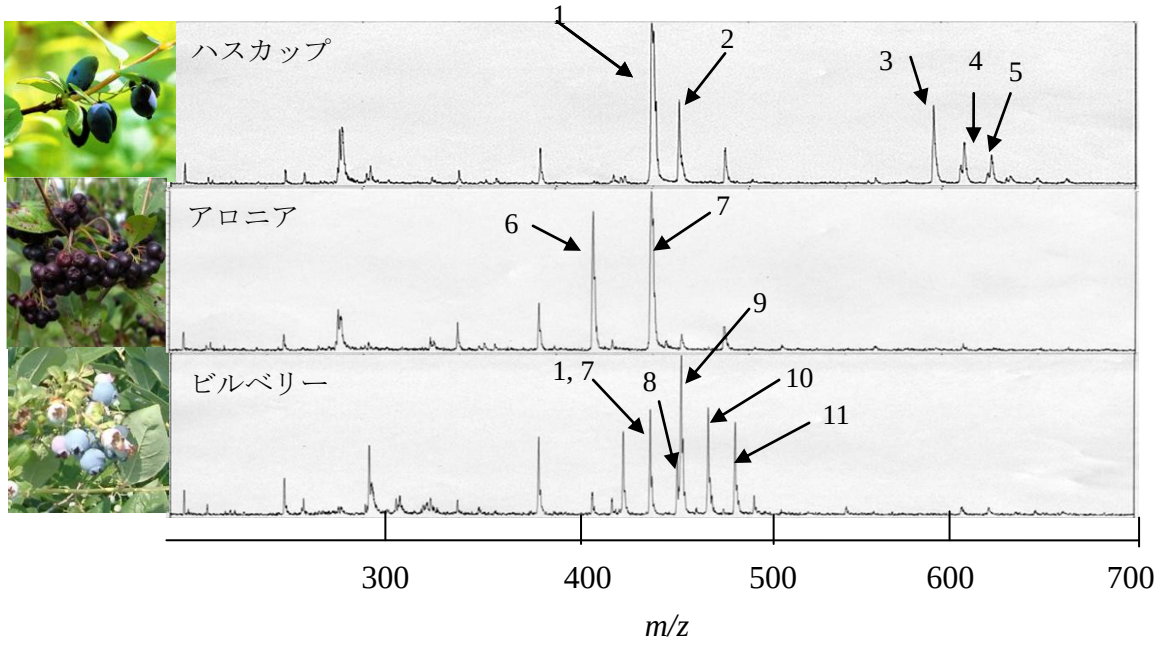
結果および考察

アロニア、ハスカップおよびビルベリー果実色素抽出液のアントシアニン純度を確認するため、各材料中のアントシアニンを A_{520} の吸光度に基づき比色定量法によりシアニジン当量として算出したところ、各々重量比で 23.0、13.3 および 35.0 %を占めることがわかった。次に、これらのアントシアニン組成を MALDI-TOF MS で調べた結果、各果実のアントシアニン組成は大きく異なっていた（第 1-1、1-2 図）。すなわち、ハスカップ果

実からは 449, 463, 595, 609 および 611 の分子イオンピークが検出され、これらの数値と Chaovanalikit ら（2004）の報告を照合し、果実に含まれるアントシアニンは、Cyanidin 3-glucoside (MW: 449、以下 Cy 3-glc)、Peonidin 3-glucoside (MW: 463)、Cyanidin 3-rutinoside (MW: 595)、Peonidin 3-rutinoside (MW: 609)、Cyanidin 3, 5-diglucoside (MW: 611)であるものと判断した。アロニア果実からは、449 および 419 の分子イオンピークが検出され、これらの数値と Chandra ら（2001）の報告を照合し、果実に含まれるアントシアニンは、Cyanidin 3-galacoside (MW: 449、以下 Cy 3-gal)および Cyanidin 3-arabinoside (MW: 419)であるものと判断した。また、比較のため分析したビルベリー（ブルーベリーの一種）の果実からは、449、449、463、465、479、493 の分子イオンピークが検出され、これらの数値と Chandra ら（2001）の報告を照合し、果実に含まれるアントシアニンは、Cy 3-gal (MW: 449)、Cy 3-glc (MW: 449)、Peonidin 3- galactoside (MW: 463)、Delphinidin 3-galactoside (MW: 465)、Petunidin 3-glucoside (MW: 479)、Malvidin 3-galactoside (MW: 493)であるものと判断した。これらのアントシアニン組成を MALDI-TOF MS のピーク高を基に果実ごとにまとめ、果実の種類間で比較したのが第 1-2 図である。同図から、アントシアニン組成は果実ごとに著しく異なっていることがわかる。すなわち、アロニアはアントシアニンの全種類がシアニジン系であるのに対し、ハスカップにはシアニジン系に加えわずかにペオニジン系が含まれ、ビルベリーには、4 種類の基本骨格を含む多種類のアントシアニンが含まれている点が大きな違いである。

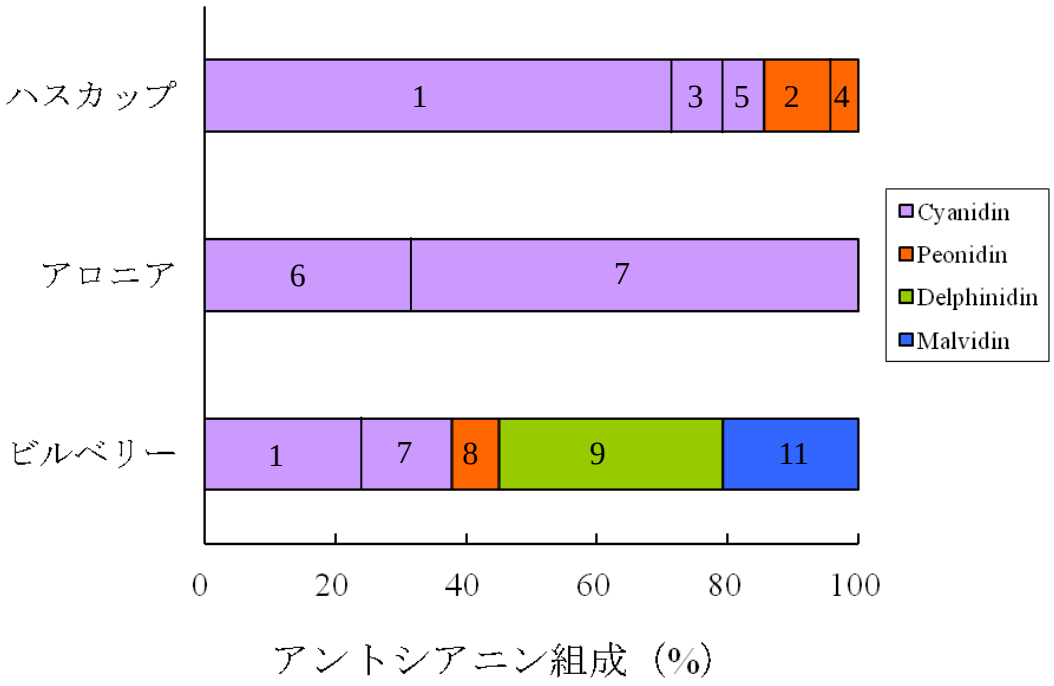
次に、各色素抽出液をアントシアニン含量が同じ濃度となるよう調整のうえ、抗酸化能を比較した結果、ハスカップおよびアロニア色素抽出液はビルベリーのそれと比べ有意（$P<0.05$, n=3）に高い抗酸化活性を示した（第 1-3 図）。

以上のことから、ハスカップおよびアロニア果実色素抽出液は、アントシアニン組成は異なるものの同程度の抗酸化能を有し、その強度はビルベリー果実色素抽出液に比べて高いことがわかった。従って、これら 3 種類の果実色素抽出物は、アントシアニン組成およ



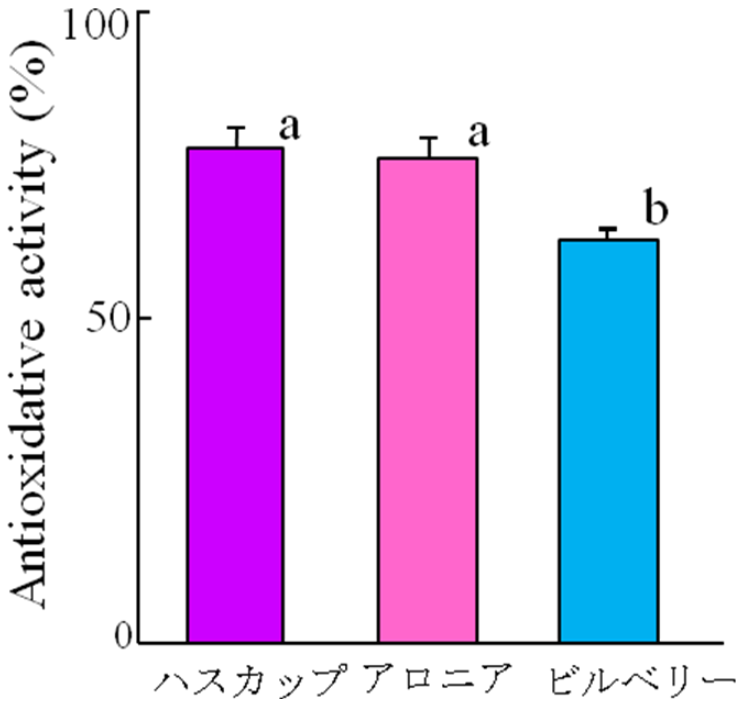
第 1-1 図　MALDI-TOF MS スペクトラムに見られる各種果実中アントシアニン組成の差異.

1. Cyanidin 3-glucoside (MW: 449), 2, Peonidin-3-glucoside (MW: 463), 3, Cyanidin 3-rutinoside (MW: 595), 4, Peonidin 3-rutinoside (MW: 609), 5, Cyanidin 3, 5-diglcoside (MW: 611), 6, Cyanidin 3-arabinoside (MW: 419), 7, Cyanidin 3-galactoside (MW: 449), 8, Peonidin-3-galactoside (MW: 463), 9, Delphinidin 3-galactoside, (MW:465), 10, Petunidin 3-glucoside (MW: 479), 11, Malvidin 3-glactoside (MW: 493).



第 1-2 図　各種果実に含まれるアントシアニンの基本骨格（アントシアニジン）に基づく組成比.
図中の数字はアントシアニンの種類を表し，その詳細は第 1-1 図を参照.

び抗酸化能に関して各々が特徴を有し、機能性を調べ、比較するための材料として優れているものと考えられる。なお、アントシアニン含量を一致させたにもかかわらず各抽出液の抗酸化能に顕著な違いが認められたことは、アントシアニンの種類ごとに抗酸化能が異なるか、あるいは抗酸化能に影響するアントシアニン以外の成分が抽出液中に含まれていた可能性を示している。



第 1-3 図　ハスカップ、アロニアおよびビルベリー果実色素のルミネッセンサー法による活性酸素補足活性の差異.
同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=3$）.

第2章　果実内アントシアニン含量および組成に影響を及ぼす諸要因

青果物中の機能性成分を論じる際、品種、収穫時期、部位または貯蔵などに伴う含有量の違いが問題となる。たとえば、ホウレンソウ中のビタミン C 含量が冬季に栽培された株で高いことは周知の事実であり、個々の材料について機能性成分含量の推移幅を知ることは重要である。従って、本研究でも果実に含まれるアントシアニン含量の違いを、多面的に捉えておく必要があると考えられる。本研究で扱う 2 種類の小果樹のうち、アロニアは国外から導入された樹種で、主に栄養繁殖により増殖されていることから、遺伝的変異幅は極めて小さい。一方、ハスカップは北海道で約 30 年前に野生種から栽培化された作物であり、遺伝的多様性を内包していると考えられる。しかし、果実形質の変異幅ならびに栽培化に伴うその変化についての報告は見当たらない。そこで本章では、ハスカップ野生個体群ならびに野生個体群の生息域から移植された栽培個体群について、果実形質（特にアントシアニン含量および抗酸化能）を調査し、その多様性および栽培化が及ぼす影響を明らかにしようとした。

第1節　アロニアの果実発育に伴うアントシアニン含量および組成の変化

材料および方法

1. 植物材料

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場（以下、北大農場）に栽培されているアロニアのロシア型（早生）およびアメリカ型（晩生）から 2014 年 7 月下旬～9 月上旬の 2 週間ごとに果実を採取し材料とした。

2. 果実の発育調査

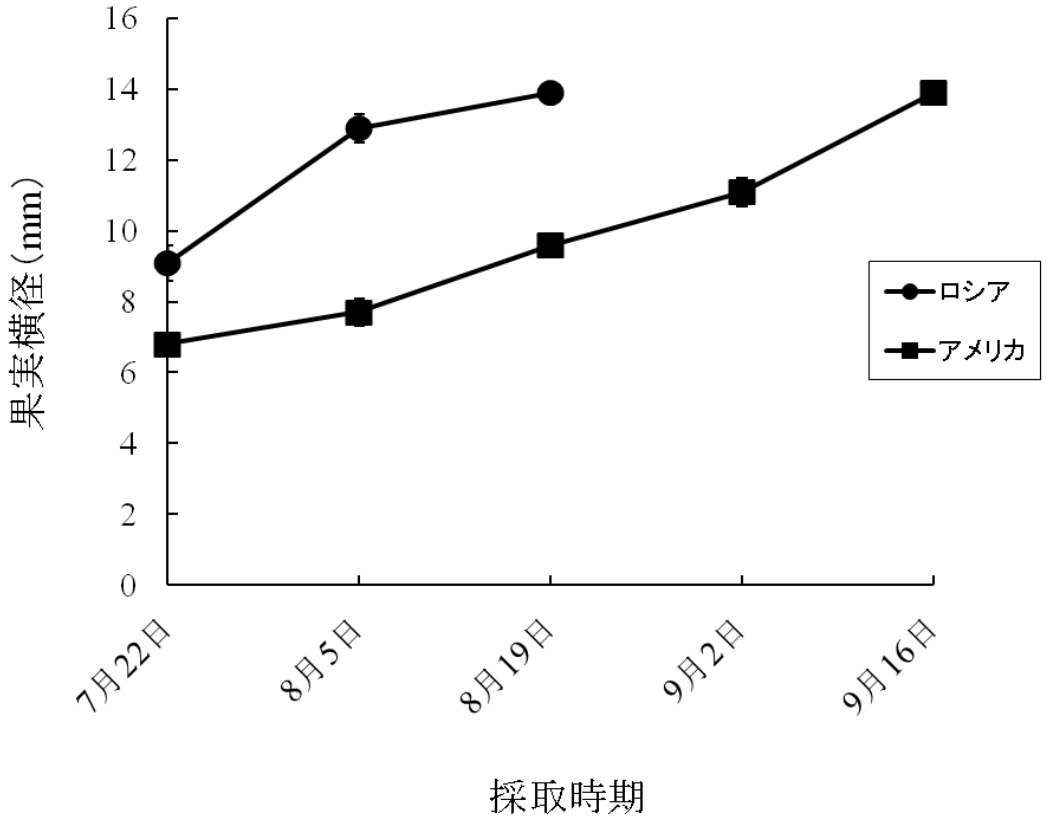
採取した果実のうち任意に選んだ 10 果の果実横径を定規で計測した。

3. アントシアニン分析

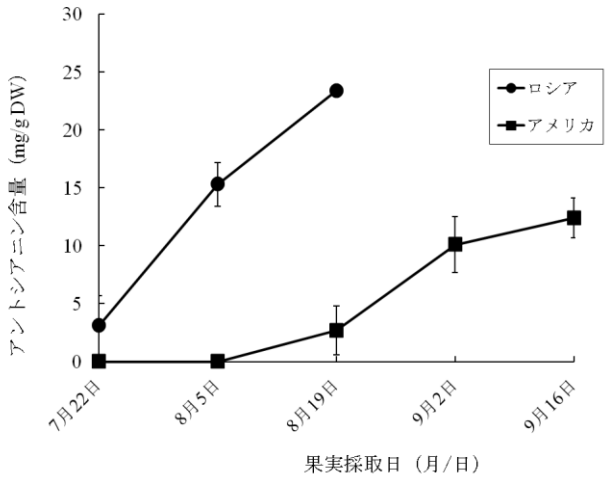
アントシアニン分析は、第 1 章の 2 と同様に MALDI-TOF MS を用いて行った。この場合、アントシアニンの定量を行うため、横田（2011）の方法に従い、試料作製時に材料 20 mg あたり 1 mg/mL の Malvidin 3, 5-diglucoside（Extrasynthese 社製）10μL を内部標準物質として添加した。検出された各アントシアニン（Cy 3-gal および Cy 3-ara）の含量は、別に作成した Malvidin 3, 5-diglucoside と Cyanidin 3-glc の検量線に基づき、材料 1g 当たりの Cyanidin 3-glc 相当量として算出した。

結果および考察

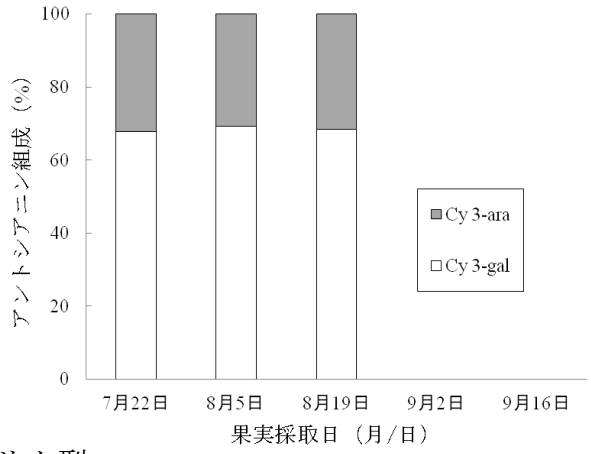
アロニア果実発育に伴う果実横径の経時的変化を第 2-1 図に示した。果実は、早生のロシア型が晩生のアメリカ型よりも早期に肥大した。しかし成熟期（ロシア型：8 月中旬、アメリカ型：9 月中旬）における果実の大きさはほぼ同程度となり、果実横径は 13~14 mm であった。この場合、成熟果の乾物当たりのアントシアニン含量には違いが認められ、ロシア型（24 mg/ gDW）がアメリカ型（13 mg/g DW）の約 2 倍の値を示した（第 2-2 図）。また、アントシアニン含量は、いずれも果実発育に伴い増加することが明らかとなった。しかし、アントシアニンの組成比を見ると、ロシア型およびアメリカ型を問わず Cy 3-gal が全体の 6~8 割を占め、果実発育に伴う顕著な違いも確認されなかった。従って、アントシアニン組成は、果実発育に伴い大きく変化しないものと考えられる。



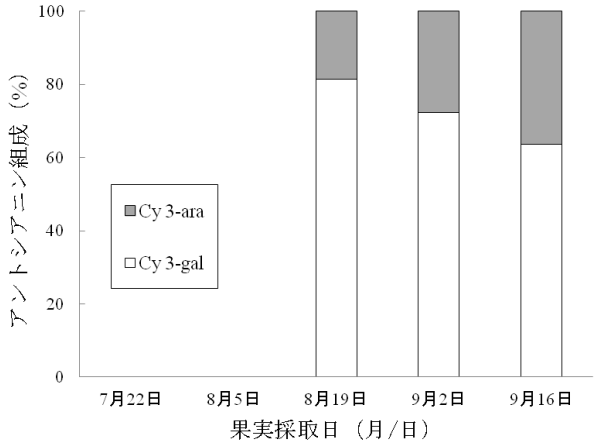
第 2-1 図　アロニア果実発育に伴う果実横径の変化.
平均値 ± SE (*n*=10).



ロシア型



アメリカ型



第 2-2 図　アロニア果実発育に伴うアントシアニン含量および組成の変化．含量は平均値 ± SE (*n*=3).

第 2 節　野生ハスカップ果実アントシアニン含量の遺伝的多様性と栽培化に伴う変化

材料および方法

1. 植物材料

2011 年の 6 月下旬から 7 月上旬にかけて、北海道苫小牧市柏原の勇払原野に自生する野生個体 100 株、ならびに約 20 年前に同一地区から任意に堀上げ北大農場（札幌市）に移植した株（約 50 株）のうち現存する 31 株から果実を採取した。なお、神田（1998）は、ハスカップ野生集団（30m×30m の方形区内に自生していた 79 株）を対象に葉のアイソザイム分析を行い、繁殖が自然交配に基づくことを明らかにしている。従って、同一自生地から任意に採集した栽培個体群（北大植栽）は、遺伝的背景が野生個体群のそれに極めて近いと考えられるため、野生株の栽培化に伴う形質の変化を追跡できるものと考えた。

2. 果実の外部形質および含水率の調査

サンプリング後､各系統について任意に選んだ 10 果を方眼紙上で写真撮影するとともに、果実全体の個数および生重を計測後、直ちに液体窒素中で急速凍結し、さらに凍結乾燥した。生重を果実数で除した値を 1 果重として用いた。また、凍結乾燥後の乾物重を計測し、生重との差から、系統ごとの果実含水率を算出した。さらに、撮影した写真から果実の縦径および横径を計測し、系統間で比較した。凍結乾燥した試料は、粉末化後、成分分析の材料として-20ºC の乾燥条件下に保存した。

3. アントシアニン分析

アントシアニンの分析は、本章、第 1 節の 3 の方法で行った。

結果および考察

1）果実の外部形質および含水率

野生個体群および栽培個体群果実の 1 果重、水分含量、縦径および横径を第 2-1 表に示した。1 果重は、栽培個体群が野生個体群の約 1.8 倍と大きく、縦径および横径も、栽培個体群が野生個体群に比べ大きな値を示した。この場合、果実の大きさおよび縦横比をみると、同一株内では変異が小さいのに対し、株間では顕著な違いが認められた（第 2-3 図）。この傾向は、野生個体群および栽培個体群で同様に認められた。一方、含水率に大きな差異は認められなかった（第 2-1 表）。以上の結果から、栽培化に伴い果実が大型化する傾向を示すこと、ならびに果実の形および大きさに顕著な系統間差のあることが考えられる。

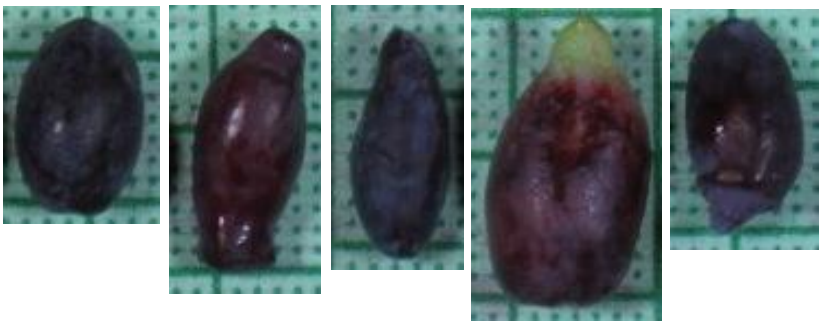
第 2-1 表　ハスカップの野生個体群および栽培個体から採取した果実における 1 果重、水分含量、縦径および横径

	栽培(*n*=31)	野生(*n*=100)
1 果重（g）	1.92 ± 0.44[z]	1.06 ± 0.01
水分含量（%）	86.54 ± 1.42	87.71 ± 0.28
縦径（mm）	169 ± 0.00	142 ± 0.01
横径（mm）	106 ± 0.00	95 ± 0.01

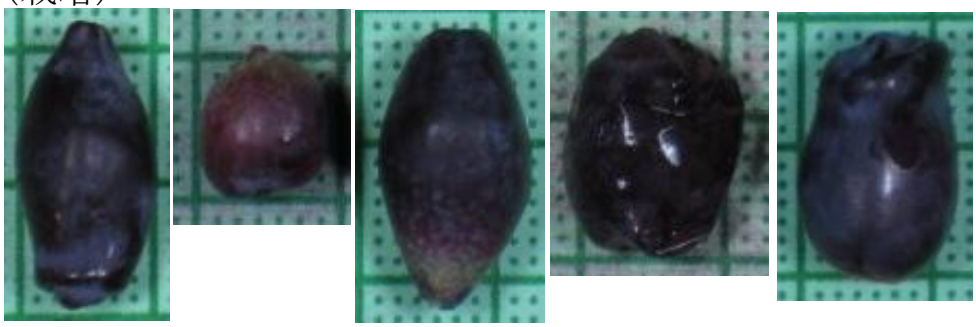
[z] 平均値 ± SE.

株間変異

（野生）

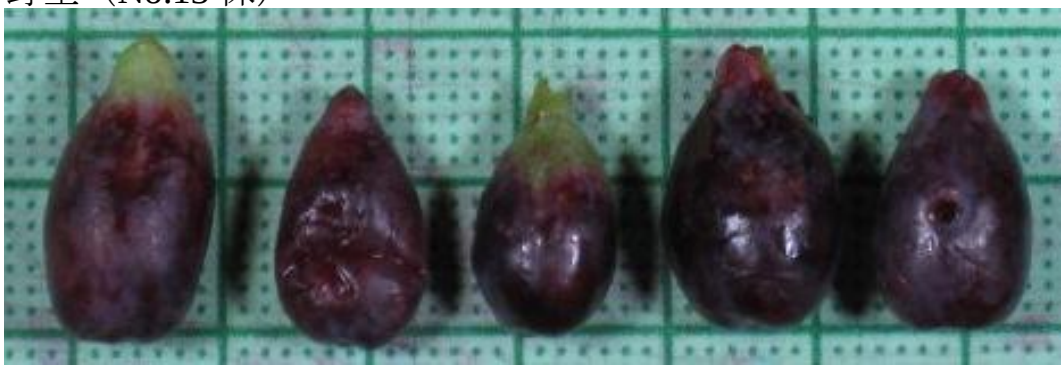


（栽培）

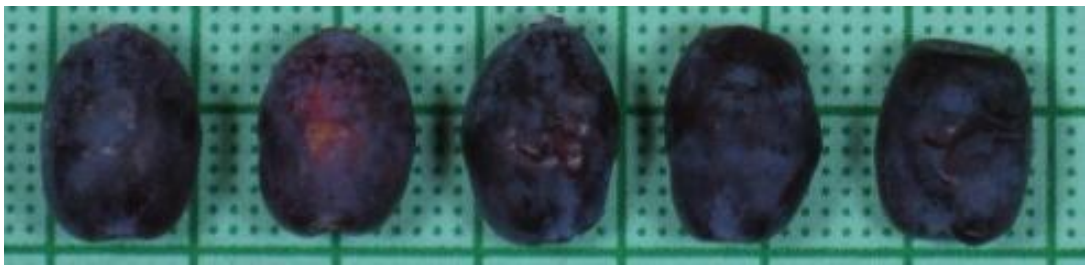


株内変異

野生（No.13 株）



栽培（No.20 株）

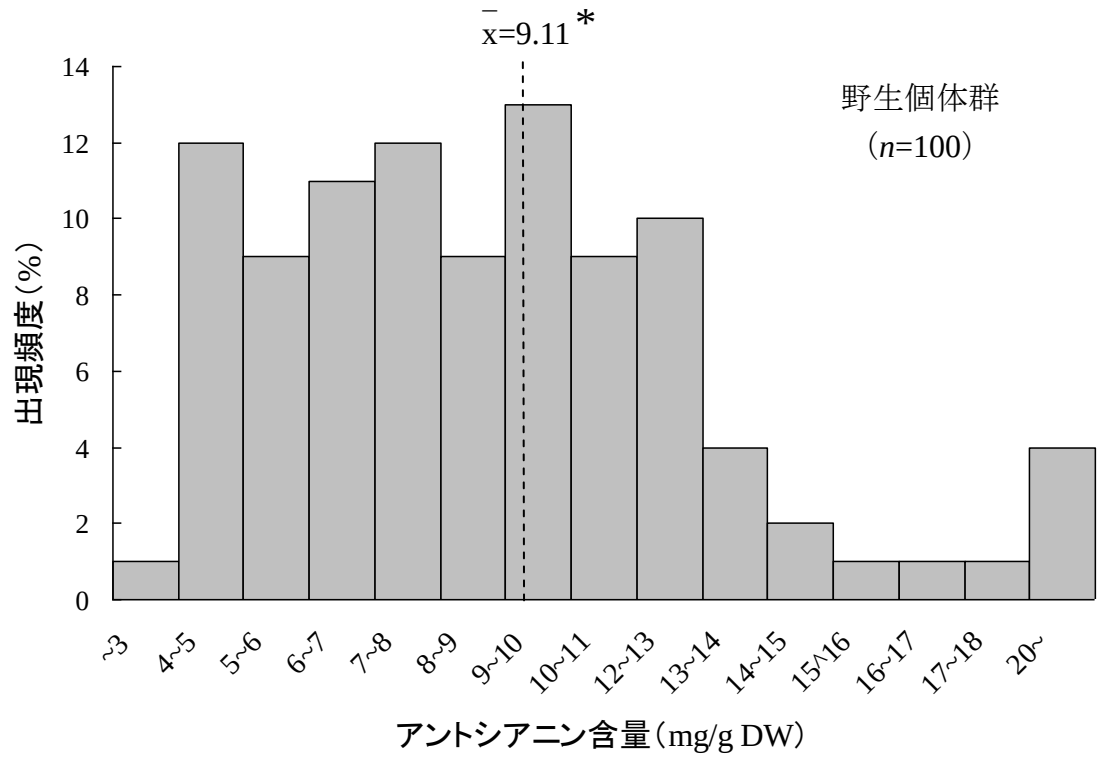


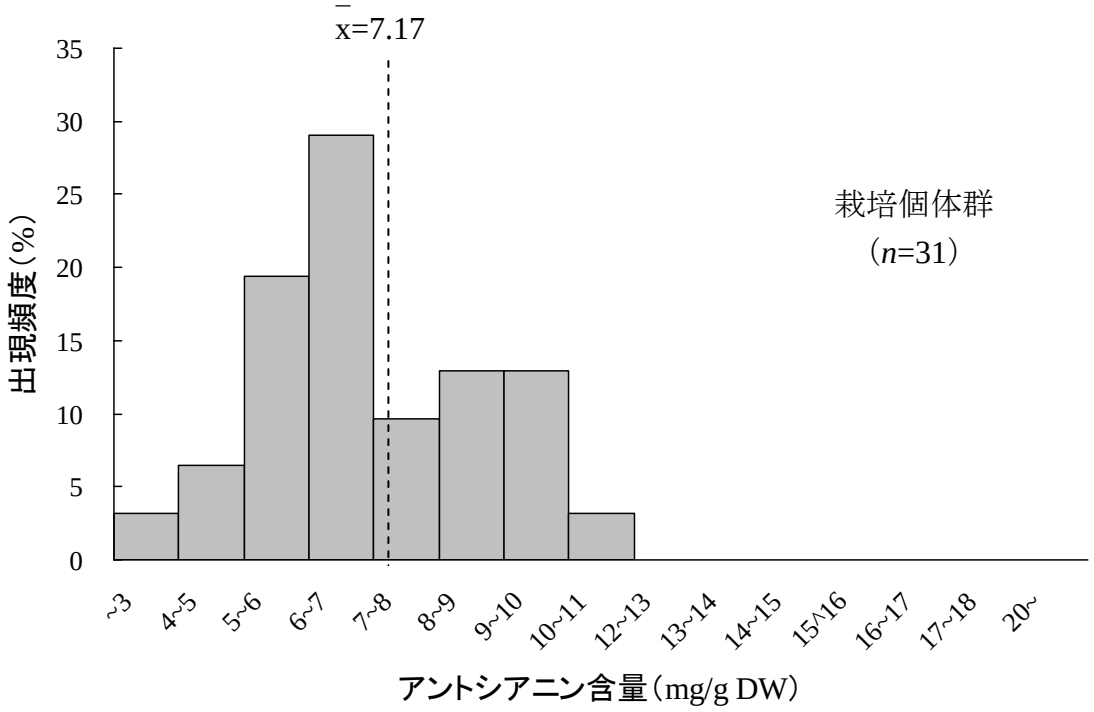
第 2-3 図　ハスカップ果実に認められる変異.

2) アントシアニン含量

野生および栽培個体群における総アントシアニン含量のヒストグラムを第 2-4 図に示した。野生個体群における各個体の果実総アントシアニン含量は 3-27 mg/g DW と幅広い分布を示し、平均値は 9.11±0.42 mg/g DW であった。この場合、9-10 mg/g DW の頻度が最も高かった。このヒストグラムは正規分布を示さなかった。一方、栽培個体群における総アントシアニン含量は、分布の幅は狭い（3-13 mg/g DW）が正規分布を示した。この場合、平均値は 7.17±0.36 mg/g DW であり、最も高い頻度は 6-7 mg/g DW に認められた。野生個体群の総アントシアニン含量の平均値は、栽培個体群のそれと比べて値が高く、両者に統計的有意差が認められた。従って、果実総アントシアニン含量は、環境条件の影響を受けやすいものと考えられる。

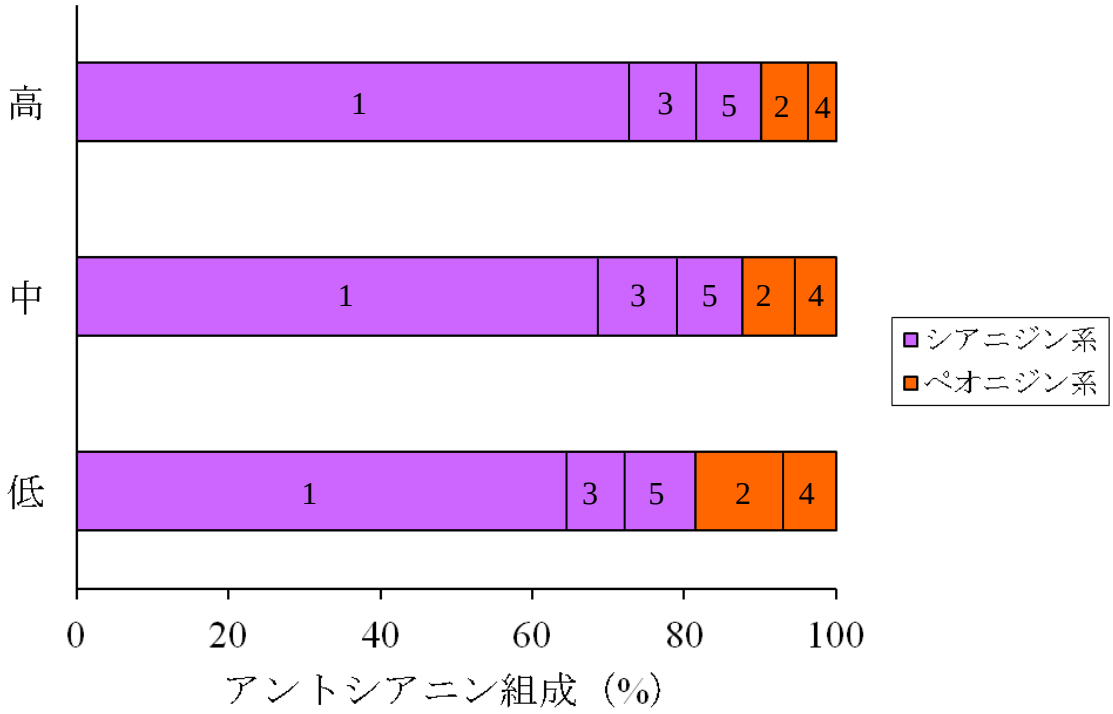
次に、野生個体群における果実アントシアニン組成を総アントシアニン含量の多少に基づき 3 段階に分けて第 2-5 図に示した。総アントシアニン含量が少ない果実（8 mg/g DW 以下）は多い果実（14 mg/g DW）に比べて Pn 3-glc の割合がやや高い傾向を示したが、その差は 10 %未満と小さかった。また、野生個体群と栽培個体群についてアントシアニン組成を比較した結果（第 2-6 図）、両者に大きな違いは認められなかったことから、アントシアニン組成は、種に特有の形質であると思われた。



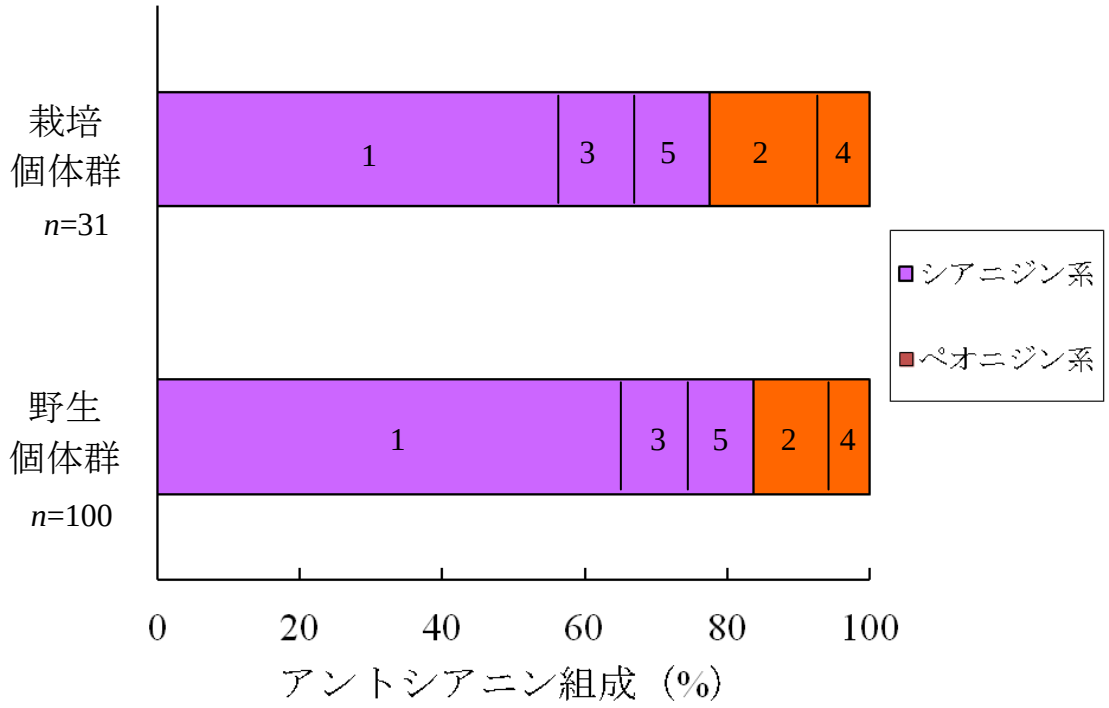


第 2-4 図　ハスカップ野生および栽培個体群における果実総アントシアニン含量のヒストグラム.

*P<0.05 で平均値間に有意差あり.



第 2-5 図　ハスカップ果実アントシアニン組成の総アントシアニン含量に基づく差異．野生個体群について調査．アントシアニン含量 : 高，14 mg/g DW 以上；中，8-14 mg/g DW；低，8 mg/g DW 以下．
図中の数字はアントシアニンの種類を表し，その詳細は第 1-1 図を参照．



第 2-6 図　ハスカップ野生および栽培個体群における果実アントシアニン組成の差異.
図中の数字はアントシアニンの種類を表し, その詳細は第 1-1 図を参照.

第 3 節　ハスカップアントシアニン含量の年次間変動

材料および方法

1. 植物材料

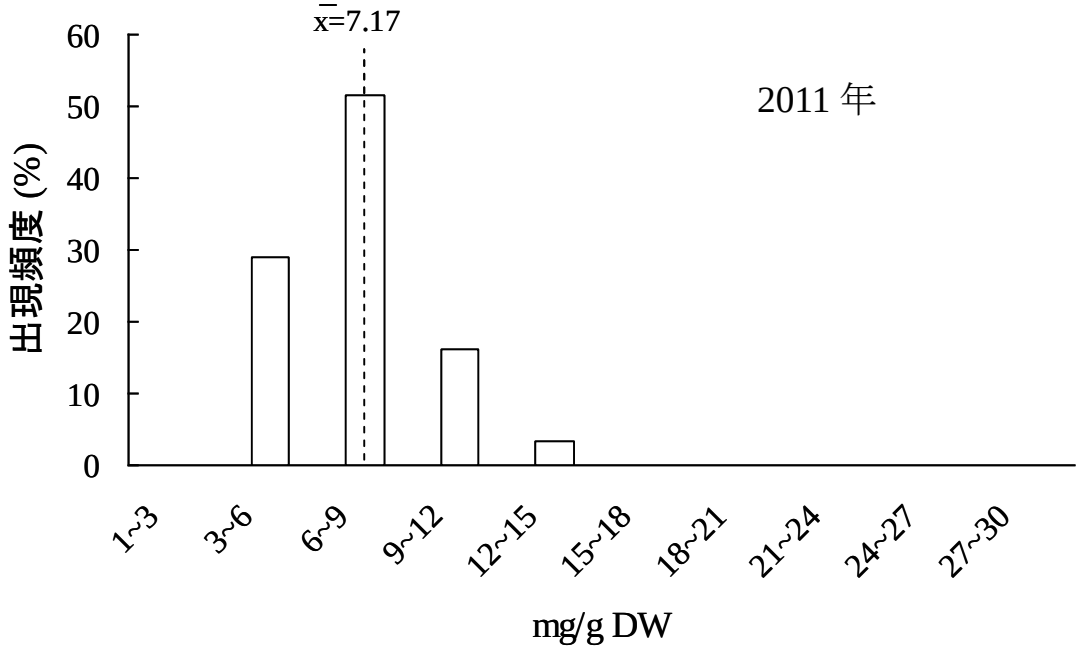
本章、第 2 節と同一のハスカップ栽培株（北大農場栽植 31 株）について、2011 および 2013 年の 6 月下旬から 7 月上旬に果実を栽培し、材料とした。

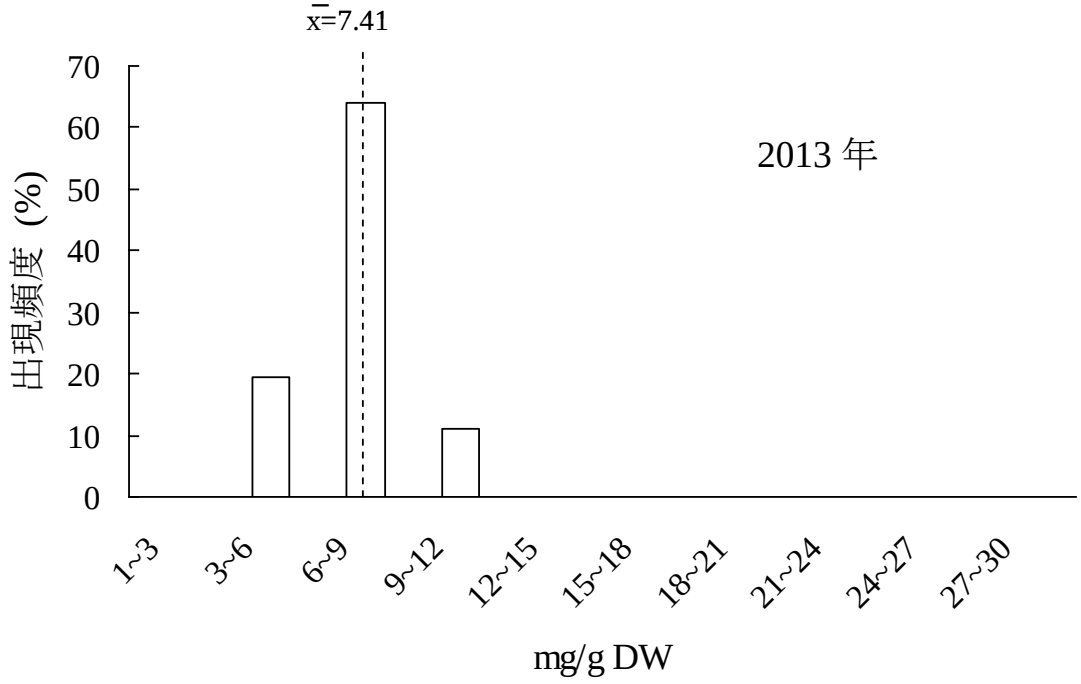
2. アントシアニン分析

アントシアニンの分析方法は本章、第 1 節の 3 と同様である。

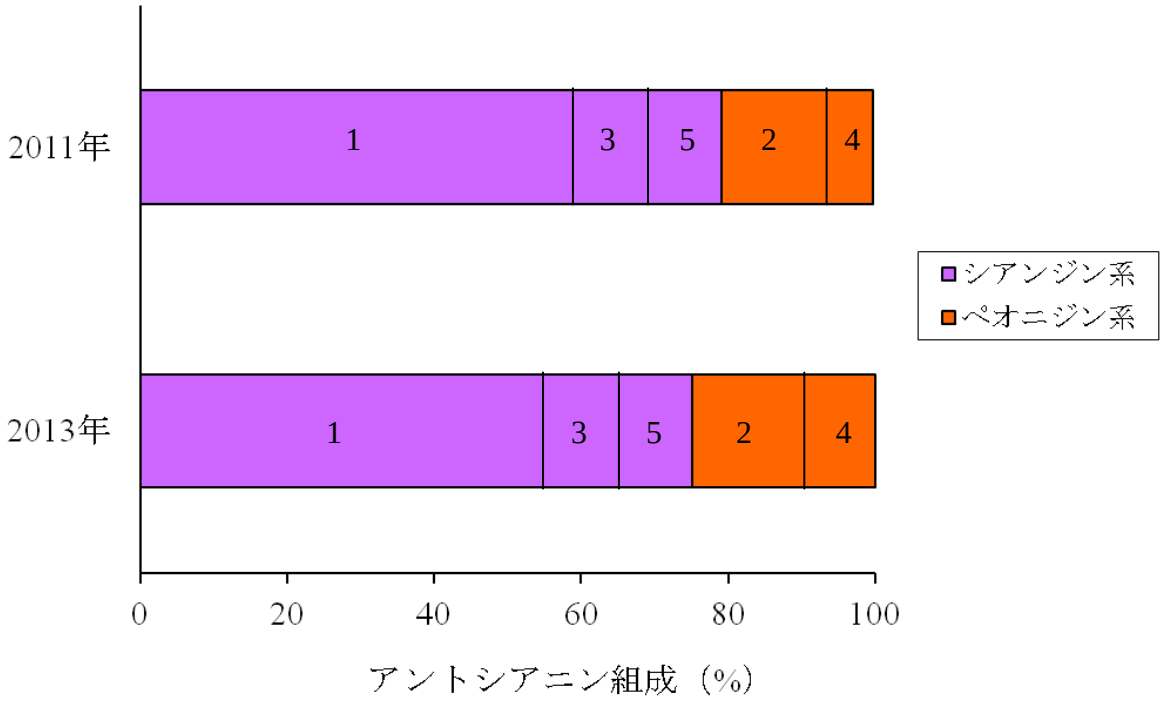
結果および考察

総アントシアニン含量を平均値間で比較すると、2011 年（7.17±0.36 mg/g DW）と 2013 年（7.40±0.32 mg/g DW）で顕著な差異は認められなかった（第 2-7 図）。また、ヒストグラムはいずれも正規分布を示した。次に、アントシアニン組成を年次間差で比較したところ（第 2-8 図）、両者に差異は認められなかった。





第 2-7 図　ハスカップ栽培個体群における果実総アントシアニン含量のヒストグラムの年次間差.



第 2-8 図　ハスカップ栽培個体群における果実アントシアニン組成の年次間差.
図中の数字はアントシアニンの種類を表し，その詳細は第 1-1 図を参照.

第 4 節　第 2 章の考察

第 2 章では、果実のアントシアニン含量に影響を及ぼす要因について検討した。アロニア果実の発育・成熟に伴うアントシアニン含量の変化を調べたところ、アントシアニンは果実成熟期に急速に果実内へ集積するが、アントシアニンの集積が始まったばかりの初期と果実成熟期でその組成を比較したところ、大差のないことが確認された。また、ハスカップの野生個体群 100 株と、同じ自生地から移植した栽培個体群 31 株についてアントシアニン含量を調査した結果、いずれも幅広い変異を内包しているが、アントシアニンが多い、中程度および少ない系統に分けてその組成を比較したところ大きな違いは認められなかった。また、野生個体群と栽培個体群を比べた場合にも、アントシアニン組成に顕著な違いは認められなかった。さらに、上記ハスカップの栽培個体群を用いて、年次間差を調べたところ、含量および組成に差のないことが明らかとなった。従って、果実アントシアニン組成は種固有の特徴であり、果実成熟程度の違い、個体間差および年次間変動の影響を受けにくいものと考えられる。

以上のように、果実に含まれるアントシアニンは、含量の多少とはかかわりなく種ごとに一定の組成を維持していたことから、抽出精製されたアントシアニンは果実の栽培条件の影響を受けず、各種に固有の安定した機能性を発揮することが考えられる。

第 3 章　果実のアントシアニン含量と総ポリフェノール含量および各種抗酸化能との関連

第 2 章では、抗酸化能が高いとされる成分のうち、アントシアニンに着目して、その系統間差および年次間差を調べた。抗酸化能を持つ食品成分が注目される理由は、緒言で述べたとおり、ヒトの生体内で発生する様々な活性酸素種を取り除き、三大成人病の予防効果が期待されるためである。活性酸素種としては、ヒドロキシラジカル（HO・）、スーパーオキシドアニオンラジカル（$O_2^{\cdot -}$）、ヒドロペルオキシラジカル（HO_2・）、過酸化水素（H_2O_2）、一重項酸素（・O_2）などが知られ、広義には活性酸素と不飽和脂肪酸との反応で生成する過酸化脂質なども含まれている。植物由来の抗酸化成分は、その種類ごとに除去可能な活性酸素種が異なるため、抗酸化能の評価は単純ではなく、これまでに様々な方法が考案されてきた。本章では、アントシアニンを含む果実由来の色素成分が持つ抗酸化能をより客観的に評価するため、広く用いられている 3 種類の方法（DPPH ラジカル補足活性法、ORAC 法、ESR スピントラップ法）を用いて果実の抗酸化能を評価し、アントシアニン含量との関連を見ようとした。また、アントシアニン以外の抗酸化成分の存在も考慮し、総ポリフェノール含量についても併せて調査した。

第 1 節　ハスカップ果実の総ポリフェノール含量および各種抗酸化能の遺伝的多様性

材料および方法

1. 植物材料

第 2 章、第 2 節で用いたものと同じ、ハスカップ野生個体群 100 株から採取した果実の凍結乾燥粉末を材料とした。

2. 分析方法

（1）総ポリフェノール含量の測定

材料 10 mg に 4 mL の 80 %エタノールを加え、1 時間振とう後、4 ºC で 24 時間静置し、4 ºC、2,000×*g* で 15 分間遠心分離した上清を測定試料とした。この場合、試料は 1 材料につき 3 つずつ作製した。次に、食品機能性評価マニュアル第Ⅱ集（(社）日本食品科学工学会）に基づき、60 μL の蒸留水を入れた 96 well マイクロプレート（FALCON 35-3072）に 10 μL の抽出試料を加え、2 倍希釈したフォーリン・チオカルト試薬（(株）関東科学）15 μL を加えて攪拌し、室温で 5 分間静置した。さらに、2%炭酸ナトリウム溶液 75 μL を加えて再度攪拌し、室温で 15 分間静置後、マイクロプレートリーダー（Powerscan HT, DS Pharma Biomedical）で A_{750} nm の吸光度を測定した。この場合、没食子酸の 5、10、50、100 mg/ mL 溶液を試料と同様の方法で測定し、検量線を作成した。試料中の総ポリフェノール含量を吸光度と検量線に基づき没食子酸当量（Gallic acid equivalent (GE) mg/g DW）として表した。

（2） DPPH ラジカル捕捉活性法

材料 10 mg に 4 mL の 80 %エタノールを加え、1 時間振とう後 4 ºC で 24 時間静置し、4 ºC、2,000×*g* で 15 分間遠心分離した上清を測定試料とした。この場合、試料は 1 材料につき 3 つずつ作製した。DPPH ラジカル補足活性の測定は、食品機能性評価マニュアル第Ⅱ集（(社）日本食品科学工学会）に基づいて行った。すなわち、96 well マイクロプレート(FALCON 35-3072)に抽出試料 100 μL および 200 mM MES buffer (pH6.0) 50 μL を加えて攪拌し、エタノールに溶解した 400 μM DPPH 溶液を 50 μL 加え、室温で 20 分間反応させた。次に、前述のマイクロプレートリーダーを用い A_{520} nm の吸光度を測定した。この場合、0.2 mM Trolox 溶液を準備し、試料と同様に測定を行い、検量線を作成した。各分析試料の吸光度および検量線に基づき DPPH 溶液 200 μL 中のラジカルを 50%補足すると推定される試料添加量（IC_{50}）を算出し、抗酸化能の指標とした。

（3）ORAC 法

材料 5 mg に 1 mL の MWA 溶液（メタノール：水：酢酸＝90: 9.5: 0.5, v/v/v）を加え、

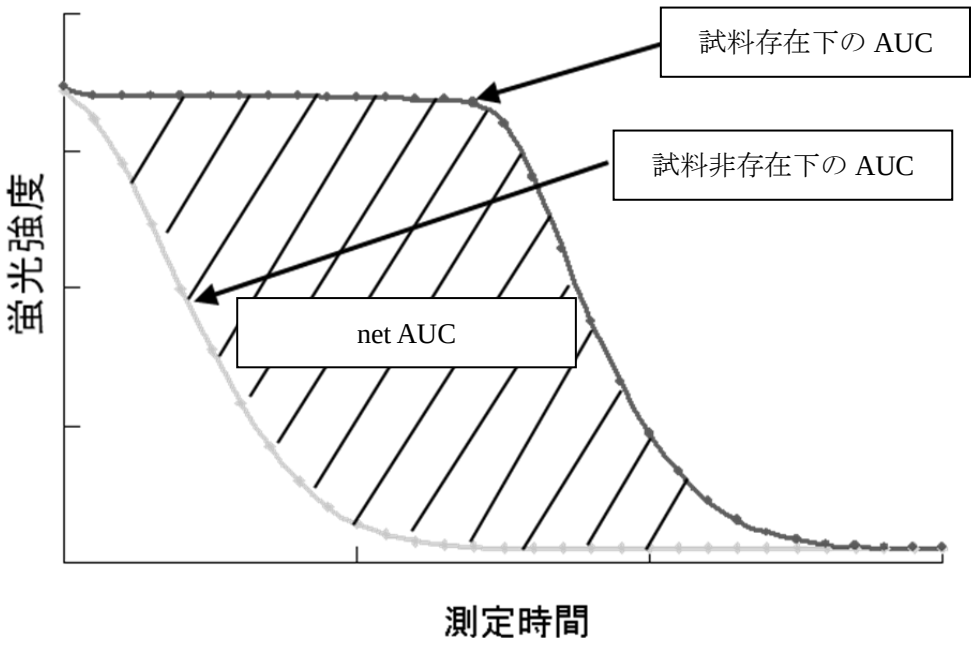
ミキサーで混和後、4 ºC、2,000×*g* で 15 分間遠心分離した上清を測定試料とした。この場合、試料は 1 材料につき 3 つずつ作製した。分析は、食品機能性評価マニュアル第Ⅱ集（(社）日本食品科学工学会）の方法に基づいて行った。すなわち、96 well マイクロプレート(FALCON 35-3072) の外周にリン酸緩衝液 (75mM , pH 7.4) を 35 µL ずつ分注し、次に Trolox 溶液および抽出試料各 20 µL を第 3-1 図に従って分注した。なお、blank にはリン酸緩衝液 20 µL を分注した。続いて、蛍光色素のフルオレセイン (94.4 nM) 溶液を 150 µL ずつ各ウェルに分注後、前述のマイクロプレートリーダーを用い、37℃ に保持した後、AAPH (31.7 mM)溶液を全ての well に 50 µL 加えて、蛍光強度 (励起波長：485 nm、 検出波長：520 nm) の経時変化を 2 分ごとに 90 分間測定した。測定後、AAPH 添加前の蛍光強度に対する各時間での蛍光強度の相対値をプロットし、曲線下面積（AUC: area under the curve）を算出し、試料存在下の AUC から非存在下の AUC を差し引いた AUC（net AUC）を求めた（第 3-2 図)。この場合、濃度既知の Trolox 溶液を準備し、試料と同様に測定を行い、検量線を作成した。各分析試料の net AUC と検量線に基づき各試料の ORAC 値を Trolox 当量(Trolox equivalent (TE) mmol/g DW)で示した。

（4）ESR スピントラップ法（ヒドロキシラジカル捕捉活性値）

材料 10 mg に 4 mL の 80 %エタノールを加え、1 時間振とう後 4 ºC で 24 時間静置し、4 ºC、2,000×*g* で 15 分間遠心分離した上清を測定試料とした。この場合、試料は 1 材料につき 3 つずつ作製した。分析は、菅野ら（2013）の方法に基づいて行った。スピントラップ法は、試料中に残存するヒドロキシラジカルとスピントラップ試薬の反応により生成するアダクト（反応生成物）の量を ESR 信号強度の差としてとらえ、抗酸化能を評価する方法である。すなわち、試料中に抗酸化物質が多く存在すれば、信号強度は小さくなる。この場合、ヒドロキシラジカルの発生源である 1%過酸化水素 50 µL、スピントラップ剤として 10 mM CYPMPO 20µL、試料 50 µL および 100 mM リン酸緩衝液（pH7.4）50 µL を加えた溶液を特製のシリンジ型試料容器（測定面は平板）に注入し、ESR 測定

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Blank	Trolox 50.0	Trolox 25.0	Trolox 12.5	Trolox 6.3	Trolox 6.3	Trolox 12.5	Trolox 25.0	Trolox 50.0	Blank	
C		Sample1 x 256	Sample2 x 256	Sample3 x 256	Sample4 x 256	Sample5 x 256	Sample5 x 16384	Sample4 x 16384	Sample3 x 16384	Sample2 x 16384	Sample1 x 16384	
D		Sample1 x 1024	Sample2 x 1024	Sample3 x 1024	Sample4 x 1024	Sample5 x 1024	Sample5 x 4096	Sample4 x 4096	Sample3 x 4096	Sample2 x 4096	Sample1 x 4096	
E		Sample1 x 4096	Sample2 x 4096	Sample3 x 4096	Sample4 x 4096	Sample5 x 4096	Sample5 x 1024	Sample4 x 1024	Sample3 x 1024	Sample2 x 1024	Sample1 x 1024	
F		Sample1 x 16384	Sample2 x 16384	Sample3 x 16384	Sample4 x 16384	Sample5 x 16384	Sample5 x 256	Sample4 x 256	Sample3 x 256	Sample2 x 256	Sample1 x 256	
G		Blank	Trolox 50.0	Trolox 25.0	Trolox 12.5	Trolox 6.3	Trolox 6.3	Trolox 12.5	Trolox 25.0	Trolox 50.0	Blank	
H												

第 3-1 図　プレートレイアウト.



第 3-2 図　ORAC 法の原理.

装置（JES-RE1X（日本電子製））にセット後、5 秒間紫外線を照射することでヒドロキシラジカルの生成およびスピントラップ反応の進行を促した。この場合、測定は共鳴磁場 335.5 mT、掃引磁場幅±7.5 mT、増幅率 400、変調磁場 0.1 mT、時定数 0.03 秒、掃引時間 2 分およびマイクロ波強度 6 mW で行った。また、濃度既知の L-アスコルビン酸溶液を準備し、試料と同様に測定を行い、検量線を作成した。各分析試料の ESR 信号強度および検量線に基づき各試料のヒドロキシラジカル捕捉活性を L-アスコルビン酸当量（Ascorbic acid equivalent (AE) mmol/g DW）として表した。

結果および考察

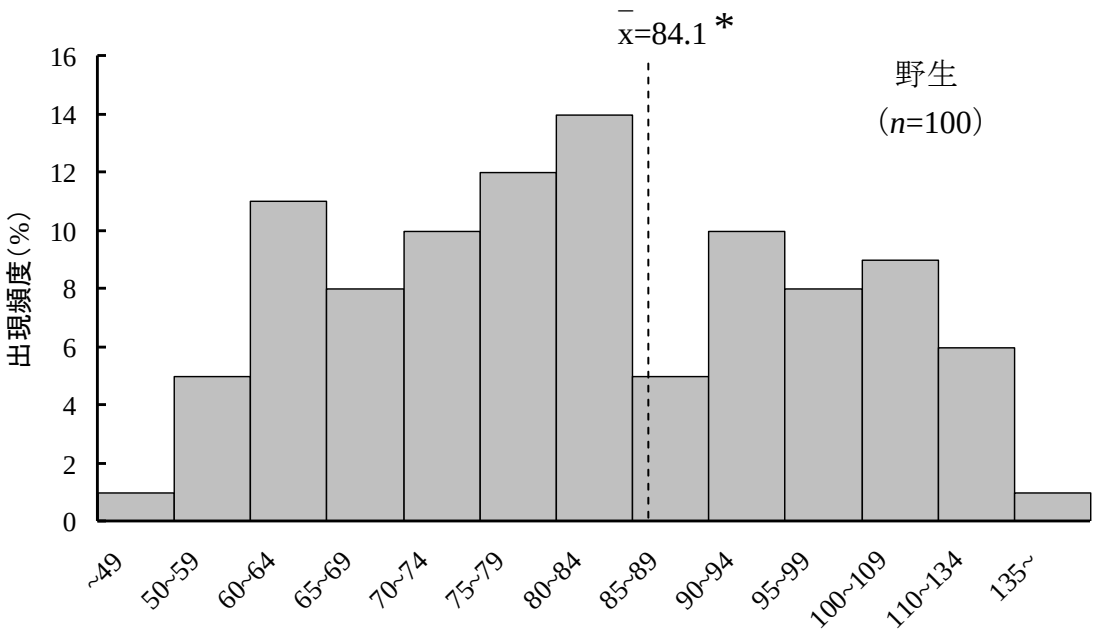
1. 総ポリフェノール

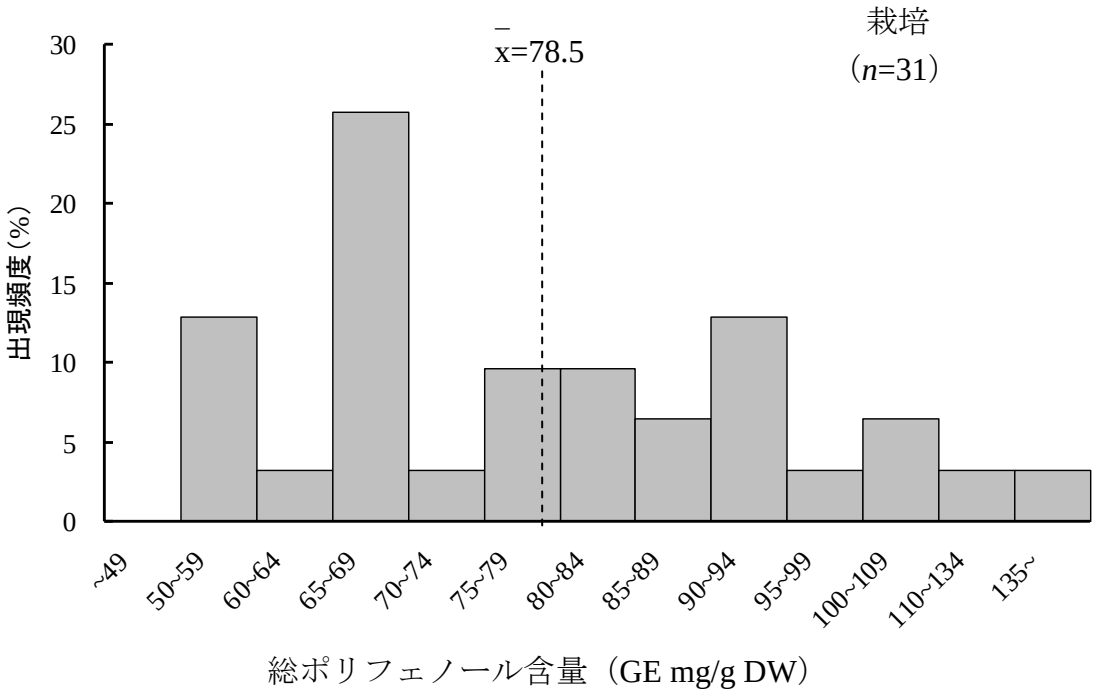
2011 年の栽培および野生個体群における総ポリフェノール含量のヒストグラムを第 3-3 図に示した。野生個体群の総ポリフェノール含量（没食子酸相当量）は、47.6ー263.3 GE mg/g DW と幅広い値を示し、平均値は 84.1±2.5 GE mg/g DW であった。この場合、80-84 GE mg/g DW の頻度が最も高かった。このヒストグラムは、統計解析の結果正規分布を示すことが確認された。また、栽培個体群の総ポリフェノール含量は、53.9ー139.6 GE mg/g DW の範囲に分布し、野生個体群に比べて分布の幅が狭くなった。この場合、平均値は 78.5±4.1 GE mg/g DW であり、最も高い頻度は 65-69 GE mg/g DW に認められた。統計解析の結果、このヒストグラムは正規分布を示さず、偏りが認められることがわかった。また、平均値を比べると野生個体群が栽培個体群より高く、両者の間に統計的有意差が確認された。

2. 抗酸化能

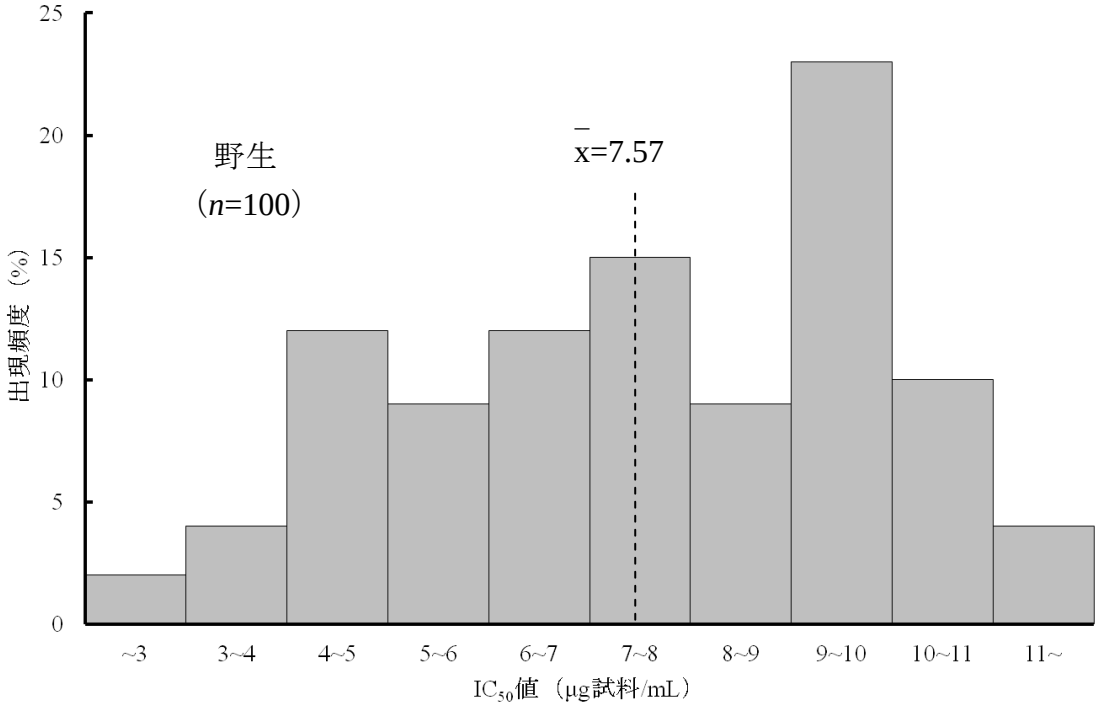
1) DPPH ラジカル捕捉活性値

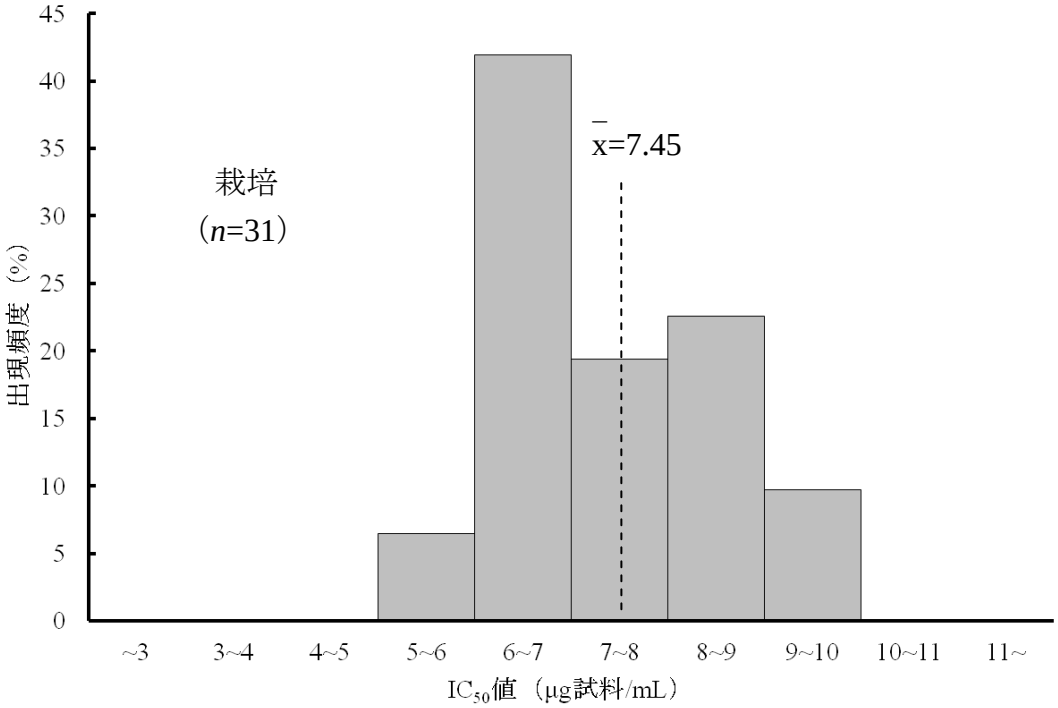
ハスカップ野生および栽培個体群における DPPH ラジカルを 50%補足すると推定される試料の添加量（IC_{50}）のヒストグラムを第 3-4 図に示した。IC_{50} 値は野生個体群で 3-11 µg 試料/mL、栽培個体群で 5-10 µg 試料/mL の値を示した。これらの平均値は、各々7.57





第 3-3 図　ハスカップ野生および栽培個体群における総ポリフェノール含有量のヒストグラム.
*P<0.05 で平均値間に有意差あり.





第 3-4 図　ハスカップ野生および栽培個体群における IC_{50} 値（DPP ラジカル捕捉活性値）のヒストグラム.

IC_{50} は、400 μM DPPH 溶液 50μL 中の DPPH ラジカルを 50%捕捉するのに必要な試料の添加量を表す. 数値が小さいほど抗酸化能が高いことを意味する.

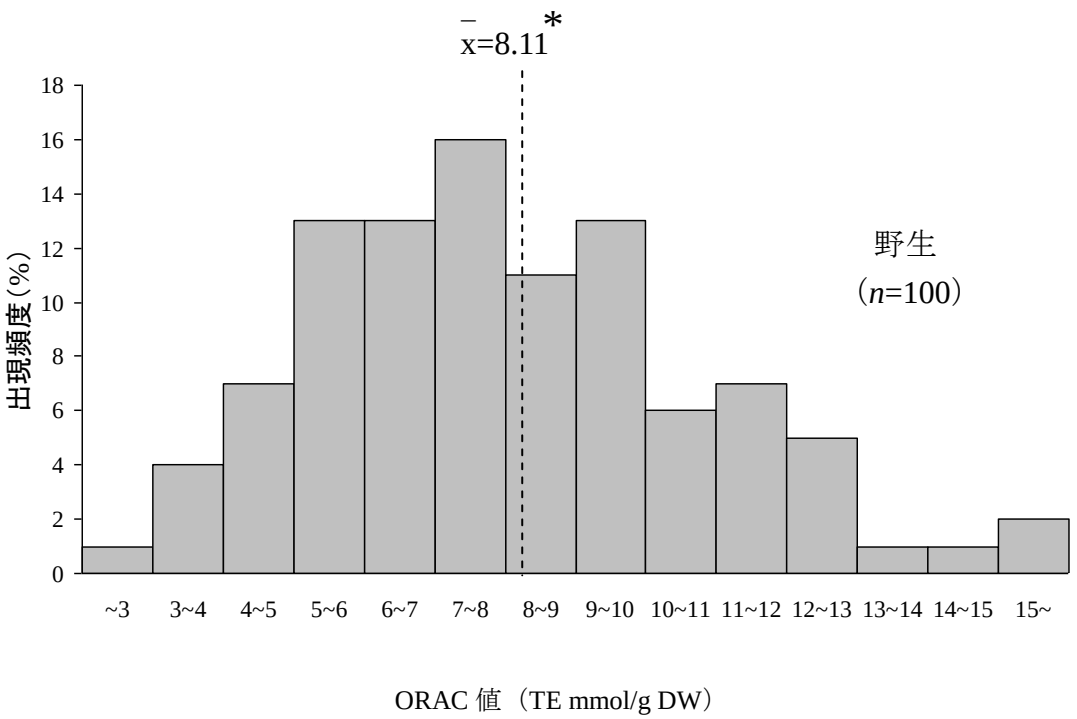
および 7.45 µg 試料/mL であり、ハスカップ果実に関する Palíková（2008）らの報告と同程度の値であった。これらのヒストグラムは正規分布を示さず、ばらつきが大きかった。また、野生個体群の中には最大値で 11.58 µg 試料/ mL の株が認められ、Palíková と Vasantha ら（2012）の報告にある値よりも高い抗酸化能を有していた。執行ら（2013）は、キイチゴ果実の抗酸化能について、野生種が栽培種よりも高い抗酸化能を有することを報告している。本研究では、野生個体群と栽培個体群の平均値間に差は認められなかったが、野生個体群中に特に抗酸化能の高い果実を着生する株が存在することが確認された。

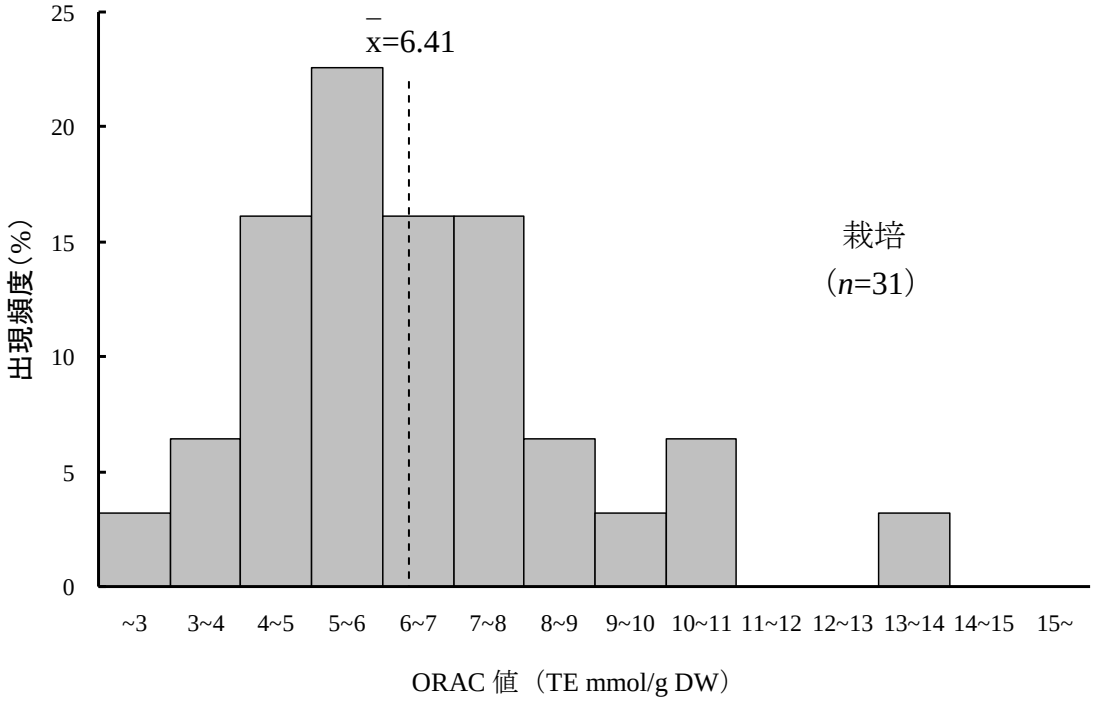
2) ORAC 値

2011 年の栽培および野生個体群における ORAC 値のヒストグラムを第 3-5 図に示した。野生個体群の ORAC 値（Trolox 当量）は、1.90ー18.50 TE mmol / g DW と幅広い値を示し、平均値は 8.11 ± 0.29 TE mmol / g DW であった。この場合、7-8 TE mmol / g DW の頻度が最も高かった。このヒストグラムは、統計解析の結果正規分布を示すことが確認された。また、栽培個体群の ORAC 値は、1.89ー13.78 TE mmol/g DW の範囲に分布し、野生個体群に比べて分布の幅が狭くなった。この場合、平均値は 6.41 ± 0.45 TE mmol / g DW であり、最も高い頻度は 5-6 TE mmol / g DW に認められた。統計解析の結果、このヒストグラムは正規分布を示さず、偏りが認められることがわかった。また、平均値を比べると野生個体群が栽培個体群より高く、両者の間に統計的有意差が確認された。

3) ESR スピントラップ法によるヒドロキシラジカル補足活性値

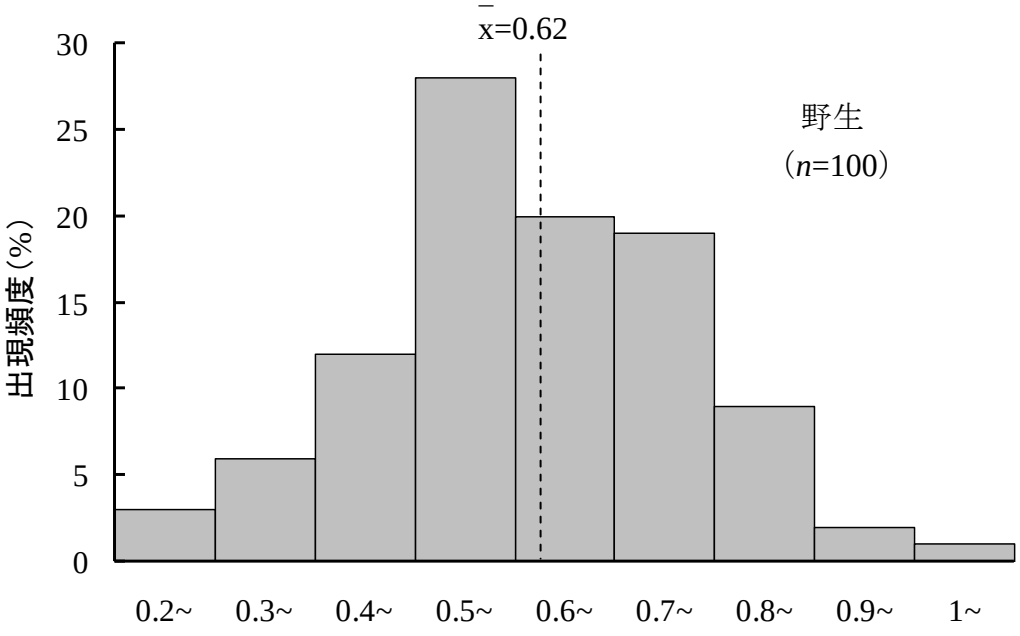
2011 年の栽培および野生個体群におけるヒドロキシラジカル捕捉活性値のヒストグラムを第 3-6 図に示した。野生個体群のヒドロキシラジカル捕捉活性値（L-アスコルビン酸相当量）は、0.21～1.22 AE mmol /g DW と幅広い値を示し、平均値は 0.62±0.0.2 AE mmol /g DW であった。この場合、0.5-0.6 AE mmol /g DW の頻度が最も高かった。このヒストグラムは、統計解析の結果正規分布を示すことが確認された。また、栽培個体群のヒド

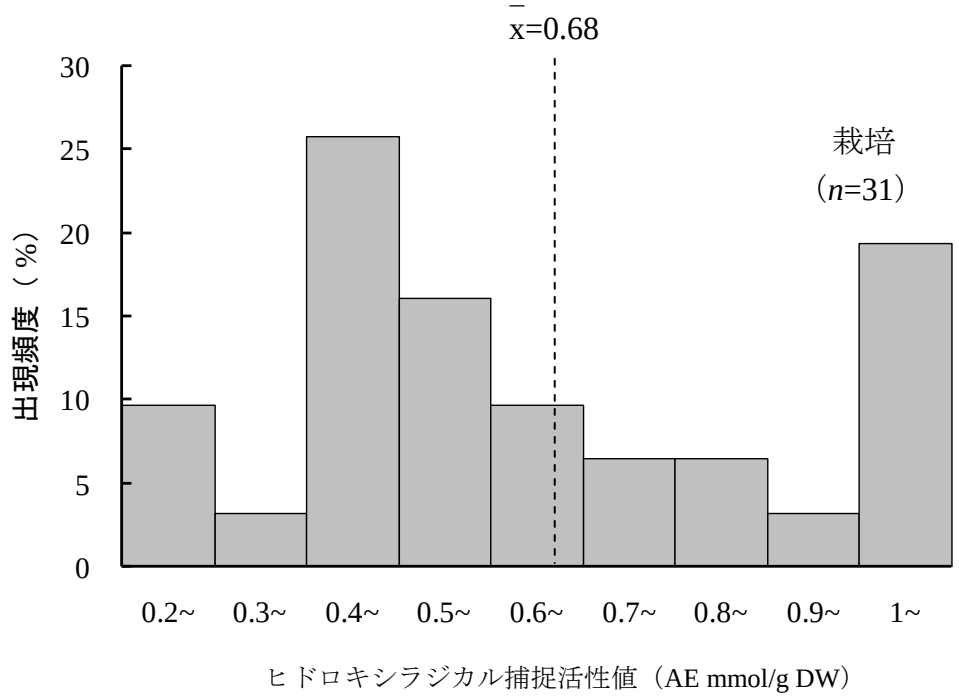




第 3-5 図　ハスカップ野生および栽培個体群における果実抗酸化能（ORAC 値）のヒストグラム（2011 年）.

*P<0.05 で平均値間に有意差あり.





第 3-6 図　ハスカップ野生および栽培個体群における果実の抗酸化能（ヒドロキシラジカル捕捉活性値）のヒストグラムの差異（2011 年）．ESR スピントラップ法による分析結果を示す．

ロキシラジカル捕捉活性値は、0.21～1.66 AE mmol /g DW の範囲に分布し、平均値は 0.68±0.01 AE mmol /g DW であり、最も高い頻度は 0.4-0.5 AE mmol /g DW に認められた。統計解析の結果、このヒストグラムは正規分布を示さず、偏りが認められることがわかった。

本項では、異なる 3 種類のラジカルに対する抗酸化能を野生および栽培個体群の間で比較した。その結果、いずれの場合も、栽培個体群の分布のばらつきは野生個体群のそれ小さくなることが確認された。従って、栽培化は果実抗酸化の変異幅を小さくするものと考えられる。

第 2 節　果実の総アントシアニン含量と総ポリフェノール含量および各種抗酸化能との相関

第 2 章、第 2 節では、ハスカップ野生個体群における果実アントシアニン含量の個体間差明らかにし、本章、第 1 節では、これらの試料の総ポリフェノール含量および 3 つの指標に基づく抗酸化能の個体間差を明らかにした。本節では、ハスカップ野生個体群果実のアントシアニン含量と総ポリフェノール含量および抗酸化能との間で回帰分析を行い、これらの関連性を明らかにしようとした。

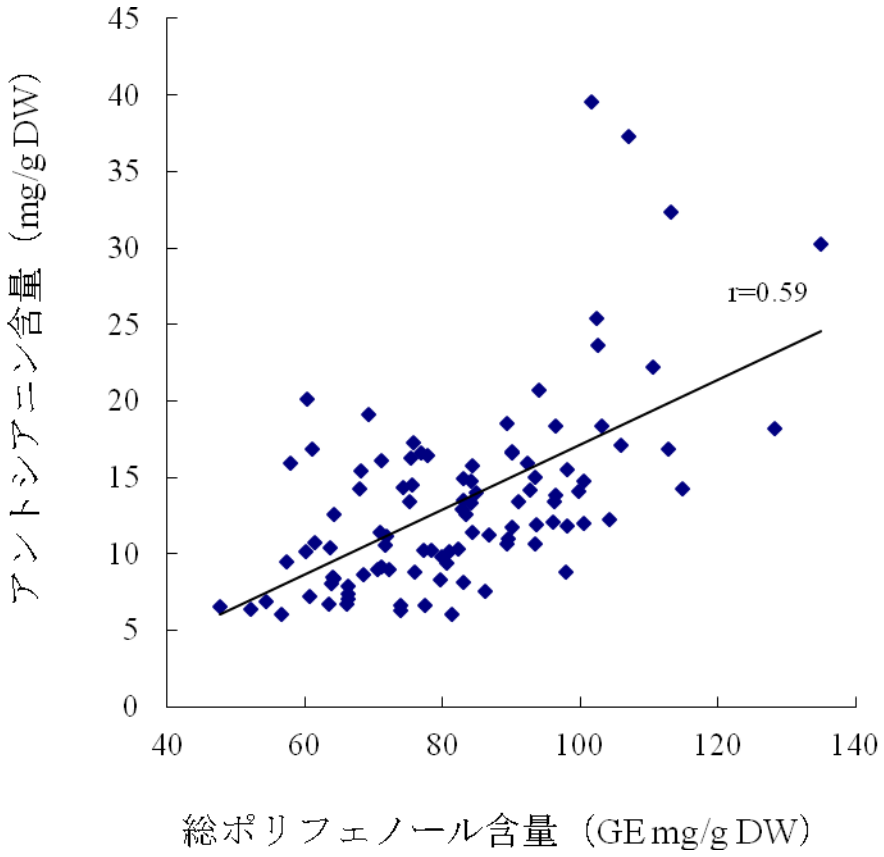
材料および方法

2011 年に採取したハスカップ野生個体群（n=100）の果実を測定し、得られた総アントシアニン含量（第 2 章、第 2 節)、総ポリフェノール含量（第 3 章、第 1 節）および各種抗酸化能（第 3 章、第 1 節）のデータ用い、回帰分析を行った。解析には、エクセル統計の単回帰分析ソフトを用いた。

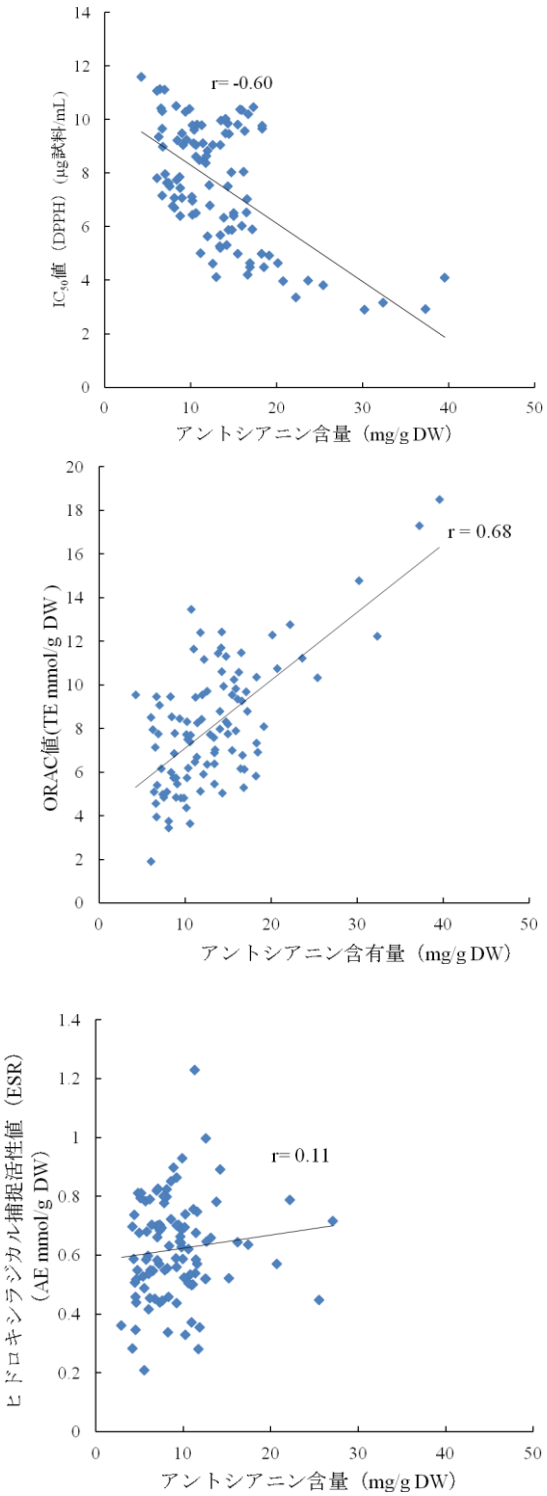
結果および考察

果実のアントシアニン含量と総ポリフェノール含量の回帰分析の結果、正の相関（r=0.59）が認められた（第 3-7 図）。伊藤ら（2011）は有色素米のアントシアニンとポリフェノール含有量に相関が見られることを報告しており、本研究の結果はこれと一致している。次に、総アントシアニン含量と各種抗酸化能との関連を第 3-8 図に示した。この場合、総アントシアニン含量と IC_{50} 値（DPPH）の間に負の相関（r=-0.60）が認められた。また、総アントシアニン含量と ORAC 値との間に正の相関（r=0.67）が認められた（第 3-8 図）。Wu ら（2004）は、ORAC 値の高い食品として、ベリー類、プラムおよびリンゴを挙げ、これらにアントシアニンが多く含まれていることを報告している。また、沖ら（2009）は、紫サツマイモの総アントシアニン含量と ORAC 値に高い正の相関があり、アントシアニンが主要な抗酸化成分であることを報告している。アントシアニンを含む野菜・果実飲料についても、DPPH ラジカル捕捉活性値および ORAC 値との間に相関のあることが確認されている（渡辺ら，2009）。一方、本研究で総アントシアニン含量と ESR スピントラップ法によるヒドロキシラジカル捕捉活性値との間に統計的に意味のある相関は確認できなかった。従って、アントシアニンはヒドロキシラジカルの消去に寄与していないものと考えられる。

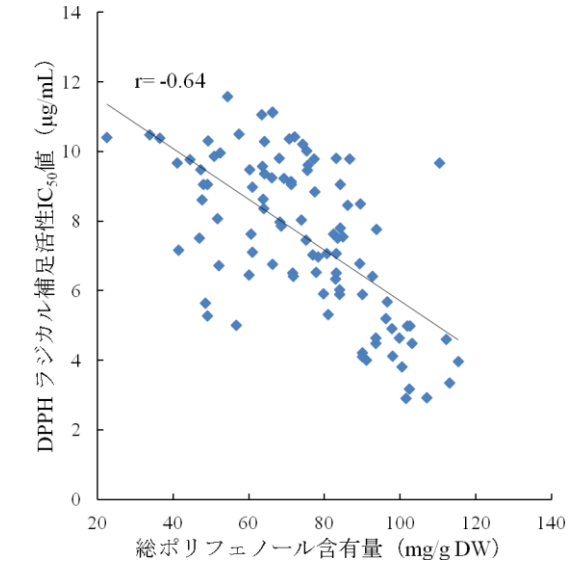
次に、総ポリフェノール含量と抗酸化能との関係を第 3-9 図に示した。総ポリフェノール含量と抗酸化性は高い相関を示すことが報告されているが（佐藤ら，2010）、本実験においても総ポリフェノール含量は IC_{50} 値（DPPH ラジカル補足活性）および ORAC 値との間に相関が認められたことから、抗酸化能の主体がアントシアニンを主体とするポリフェノールであることを裏付けた。また、総ポリフェノール含量と ESR 補足活性値との間には、アントシアニンの場合と同様に相関は認められなかった。この理由として、DPPH ラジカルおよび ORAC で捕捉されるペルオキシラジカルがポリフェノールのフェノール性水酸基と特異的に反応するのに対し、ヒドロキシラジカルはポリフェノール以外の成

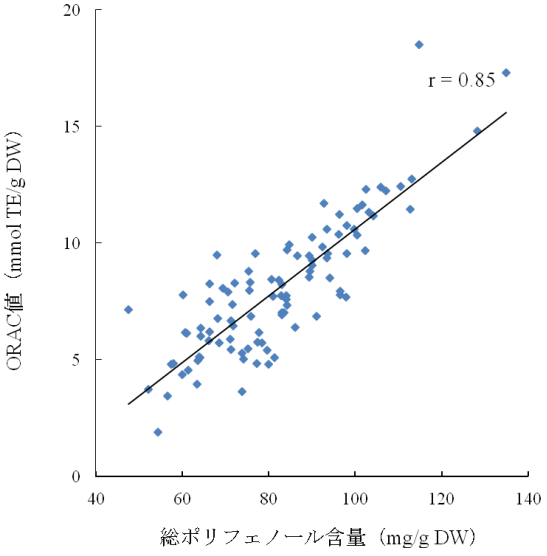


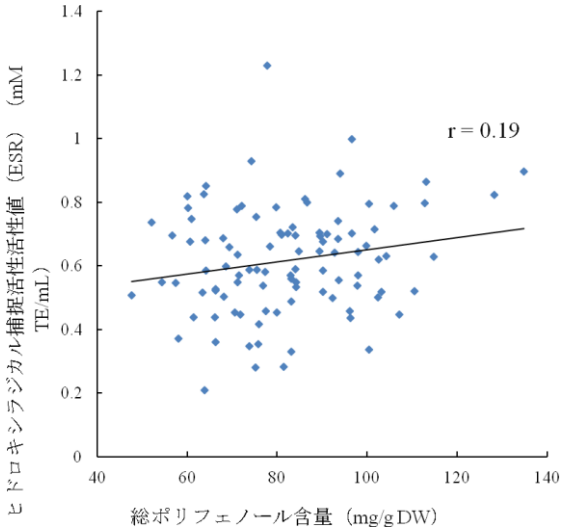
第 3-7 図　ハスカップ果実の総アントシアニン含量と総ポリフェノール含量の相関．2011 年に採取した野生個体群 100 株に関する分析結果に基づく．



第 3-8 図　ハスカップ果実のアントシアニン含量と各種抗酸化能の相関.
2011 年に採取した野生個体群 100 株に関する分析結果に基づく.







第 3-9 図　ハスカップ果実の総ポリフェノール含量と各種抗酸化能の相関.
2011 年に採取した野生個体群 100 株に関する分析結果に基づく.

分とも反応しやすいことが考えられる（磯辺ら，2003）。

以上の結果から、ハスカップ果実にみられる高い抗酸化能は、アントシアニンを主体とする総ポリフェノール含量に強く依存することが明らかとなった。

第4章　ラット消化管におけるアントシアニン吸収動態の解明

ヒト（動物）が果実を摂取した際、その含有成分が生体内で機能性を発揮するには、腸管から吸収される必要がある。しかし、この点に関する報告は現在のところ限られている。Miyazawa et al.（1999）は、2 種類のアントシアニン（Cy 3-glc および Cy 3, 5-diglc）をラットに経口投与し、腸管から吸収され血中に出現する量に差があることを報告した。また、Nurmi et al.（2009）は、ビルベリーおよびコケモモのピューレを単独またはオーツ麦のシリアルと一緒に摂取した場合の、ヒト生体内におけるアントシアニン代謝過程について報告している。前者は、精製された高純度のアントシアニンの吸収を、後者は他の食材と同時に摂取した場合の吸収後のアントシアニン代謝を見たものだが、アントシアニンが吸収される消化管の部位や、アントシアニンの種類ごとの吸収特性に関しては、未解明な点が数多く残されている。そこで本章では、ラットの消化管の一部を結紮し（結紮ループ法）そこに連結する血管から経時的に採血する方法により、アントシアニン吸収部位の特定を行おうと考えた。また、給餌するアントシアニン組成と血中に出現するそれを比較することにより、アントシアニンの種類ごとの吸収特性の違いを明らかにしようとした。

第 1 節　　アントシアニン組成の違いが吸収量に及ぼす影響

本節では、アロニアおよびハスカップ果実色素のアントシアニン組成の違いによる吸収および代謝の差異を調べるため、小腸結紮ループ作製後に門脈、下大静脈および胆膵液を採取し、アントシアニン含量を測定した。

材料および方法

1. 色素試料

第 1 章で用いたアロニア（Cy 3-gal）およびハスカップ（Cy 3-glc）の色素試料を実験

に供した。実験に際し、両者のアントシアニン濃度を一致させるため、各々1％（w/v）アントシアニン含量となるように溶液を調製した。

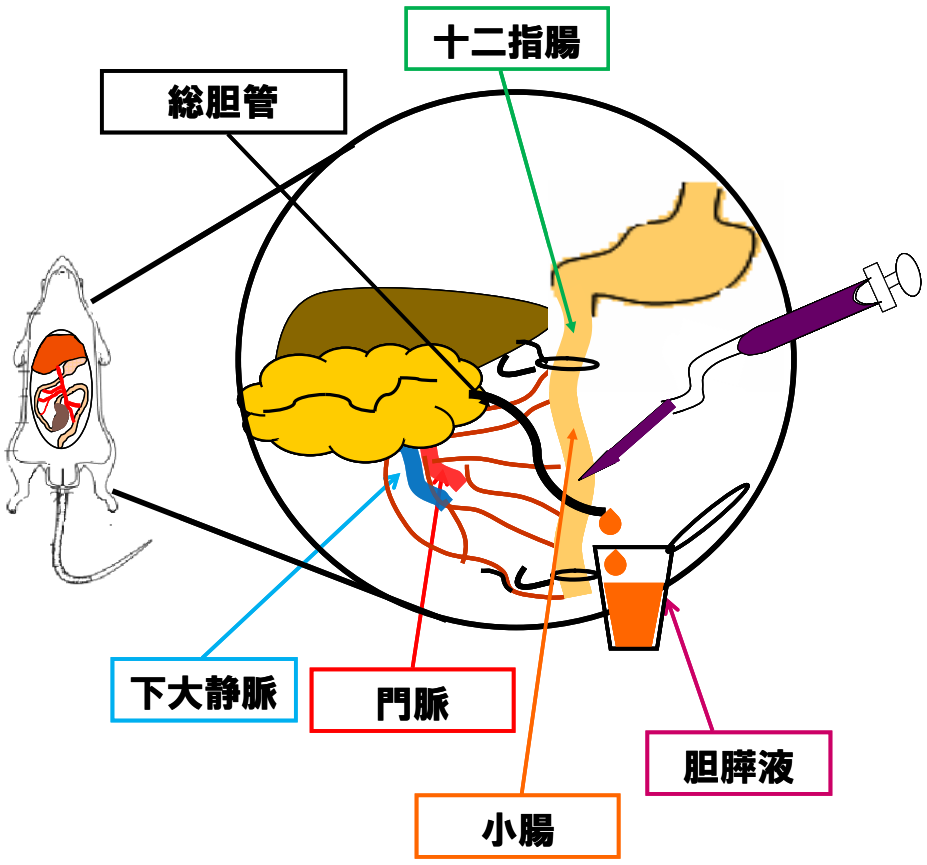
2. 動物実験手順（第 4-1 図および第 4-2 図）

雄性ラット （SD/SPF、6 週齢）12 匹を標準試料で 1 週間予備飼育後、12 匹の平均体重が各群で等しくなるように 2 群に分け、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素区とした。実験の前日から 24 時間絶食後，ソムノペンチル(ペントバルビタールナトリウム 45 mg/kg body weight) 麻酔下で、生中線に沿って上腹部 3cm を開腹後、小腸を綿棒で取り出し、回盲部を縫合糸 (No.4 FUTABA)で結紮後、十二指腸側から眼科用鋏で切り込みを入れた。

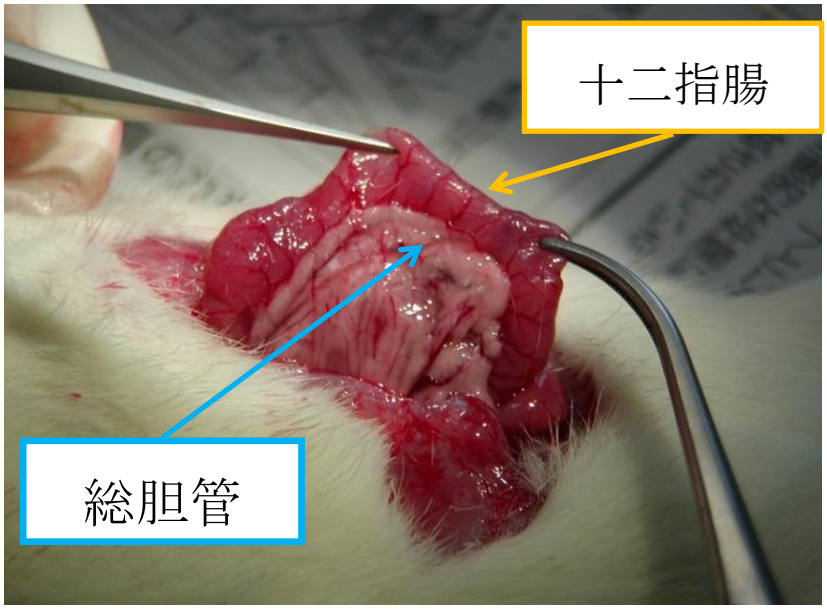
次に、アロニアおよびハスカップ色素溶液（1%アントシアニン）溶液 5 mL をそれぞれシリコーンチューブ（内径 2 mm）付 5 mL テルモシリンジで吸い上げ、十二指腸側の切り込みにチューブの先端を入れ、色素溶液を注入後に上記の縫合糸で固く結紮した（小腸結紮ループの完成)。小腸を再び腹腔内に戻し、0.9% NaCl で湿らせた脱脂綿を小腸上に乗せ、クレンメで開腹部を閉じた。その後、ラットを保温マット（37ºC）に乗せ、体温を保持した。色素溶液を小腸内に注入して 40 分経過後に胆膵液を採取するとともに門脈および下大静脈からを採血し（約 5 mL)、4°C，2,000× g で 20 分間遠心分離を行い、得られた血清（約 2 mL）を試験管に入れ、分析まで-20°C で保存した。

3. アントシアニン分析

1.5 mL プラスチックチューブに胆膵液または血清 100 μL および 0.1% トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液 (pH 1.2)100 μL を添加し、マイクロホモジナイザーで 30 秒間ホモジナイズし、ミキサーで 1 分間振とう後、4°C、2,000× g で 3 分間遠心分離した。上清 100 μL を固層抽出カラムの OASIS（Waters）に通し、アントシアニンを吸着させた後、0.1% TFA 水溶液（1 mL）で洗浄し、0.1% TFA-メタノール溶液（1 mL）で溶出した。溶液をアントシアニン分析の試料とした。アントシアニンの分析は、第 1 章では MALDI-TOF MS を用いたが、質量分析の場合、同じ分子量のアントシアニン（Cy 3-gal および Cy 3-glc）を分離すること



第 4-1 図　腸管結紮ループ実験の概要.



第 4-2 図　腸管結紮ループ実験に用いるラットの十二指腸および総胆管の写真.

ができない。そこで、本章では liquid chromatography/ electric spray ionization-mass spectrometry (LC/ESI-MS)を用いてアントシアニン分析を行った。この場合、HPLC のカラムには Mightysil RP-18 GP Aqua column 4.6×150 mm 5 μm（関東化学（株））を使用した。溶離液は、移動相 A に 0.1% TFA 水溶液、移動相 B に 0.1% TFA-メタノール溶液を使用し、流速 0.8 mL/ min、30°C でグラジエント分析を行った（A/B 溶離液比：0-5 分，85/15 を維持；5-20 分，85/15 から 40/60 で直線グラジエント；20-30 分，85/15 を維持）試料の注入量は 20 μL とした。検出には、DAD 検出器を用い、$A_{280\text{-}517}$ の吸光度を測定した。質量分析は、200-1, 000 *m/z* の範囲にあるアントシアニンの分子イオンピークの検出を行った。アントシアニンの定量は、外部標準法により行い、標品には Cy 3-glc および Cy 3-gal（Extra synthase 社）を用いた。

結果および考察

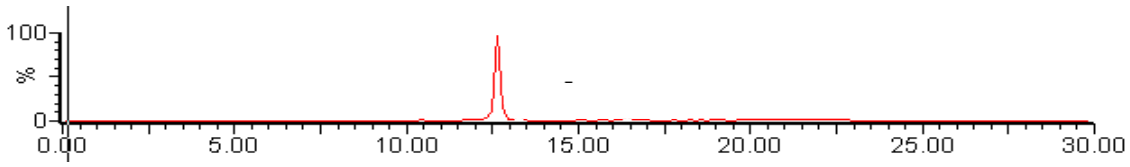
アロニアおよびハスカップ色素（1%（w/v）アントシアニン）を小腸に投与 40 分後の門脈血中アントシアニン濃度を測定した。採血部位として門脈を選択した理由は、小腸から吸収された後の栄養素はすぐに門脈血へ運ばれるためである。分析の結果、血清試料からアントシアニンのピークが検出された。検出された主要なピークをリテンションタイム、分子イオンピーク(*m*/z: 449)および UV スペクトル (517 nm)に基づき特定したところ、アロニアおよびハスカップ色素注入区の血清から検出されたアントシアニンは、各々Cy 3-gal および Cy 3-glc であることがわかった（第 4-3 図）。これらは、アロニアおよびハスカップ色素に含まれるアントシアニンの種類と一致していることから、各々の果実抽出物に含まれていたアントシアニンが、小腸から吸収されたことが証明された。この場合、両者の血中濃度を比較したところ、Cy 3-glc が Cy 3-gal に比べ有意に高い値を示した（第 4-4 図）。

次に、下大静脈血中のアントシアニン量を調べた。下大静脈は、門脈および肝臓を通過した後に続く血管である。アロニアおよびハスカップ色素を注入後の下大静脈血清中から門脈血と同様に Cy 3-gal および Cy 3-glc が各々検出された（第 4-5 図）。この結果か

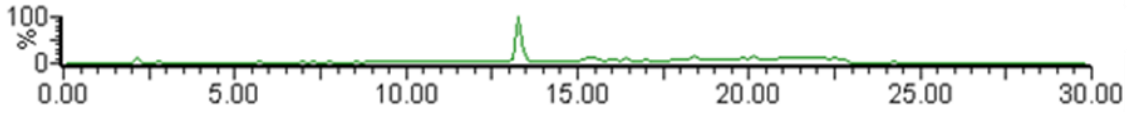
アロニア色素



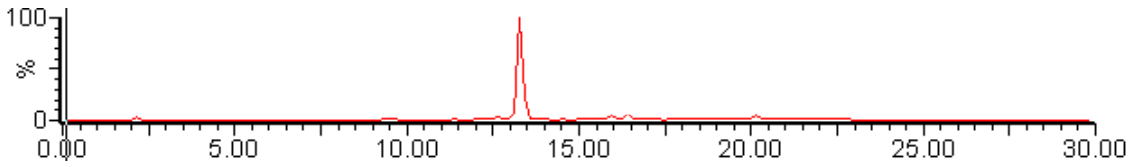
標品（Cy 3-gal）



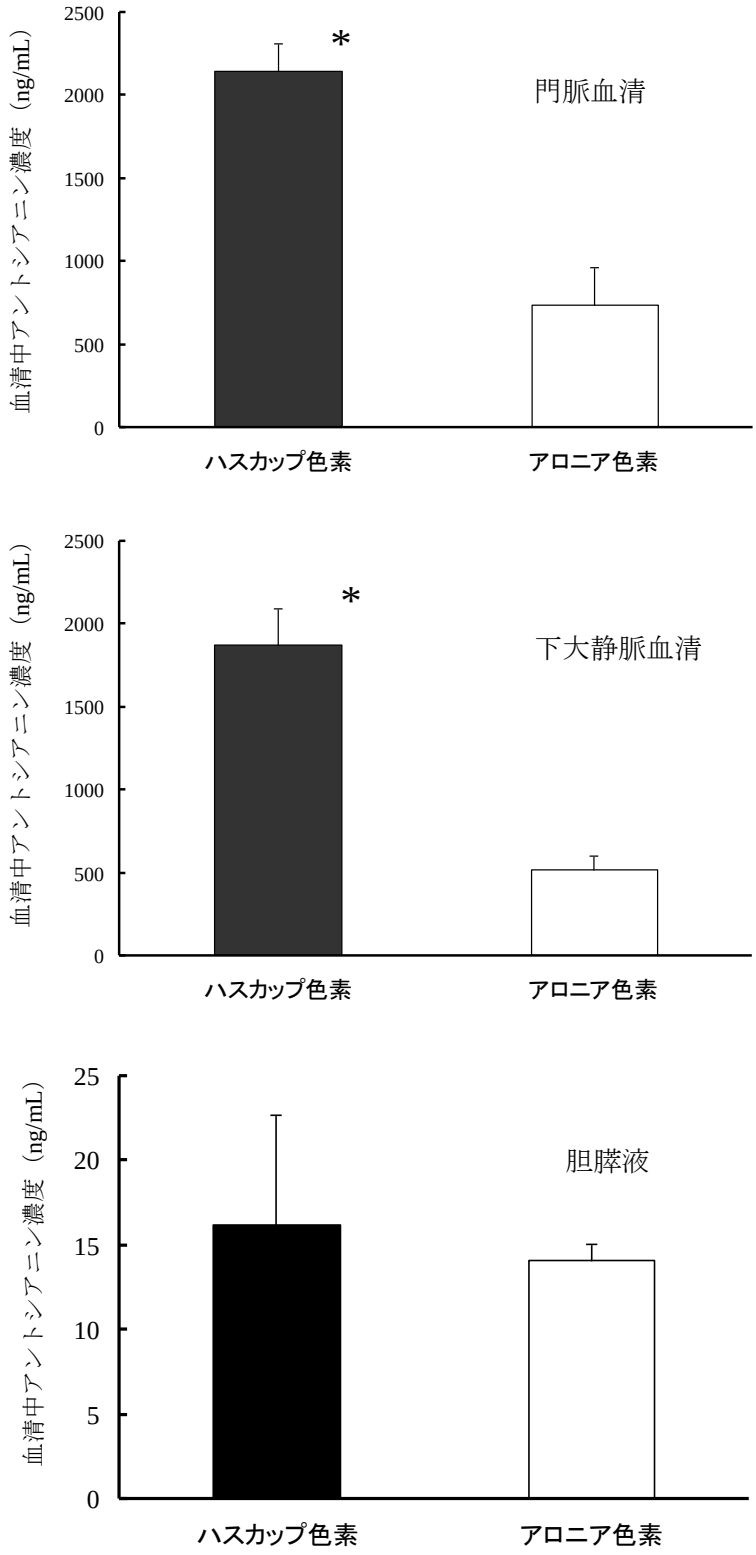
ハスカップ色素



標品（Cy 3-glc）



第 4-3 図　色素試料投与後のラット門脈血清から検出されたアントシアニンの LC/MS におけるクロマトグラム.

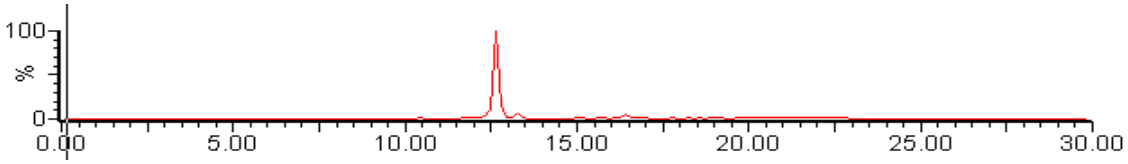


第 4-4 図　色素試料を投与したラット各種体液中（投与 40 分後）のアントシアニン濃度の差異．平均値±SE (*n*=6).
*P<0.05 で平均値間に有意差あり（Tukey 検定）.

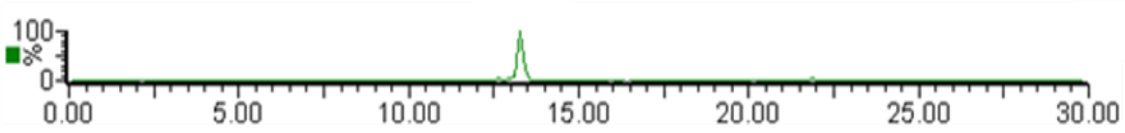
アロニア色素（Cy 3-gal）



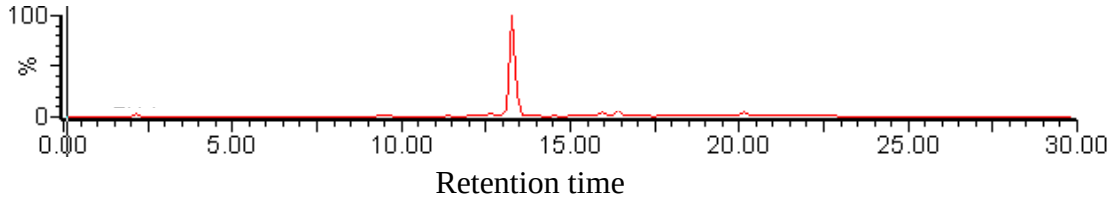
標品（Cy 3-gal）



ハスカップ色素（Cy 3-glc）



標品（Cy 3-glc）



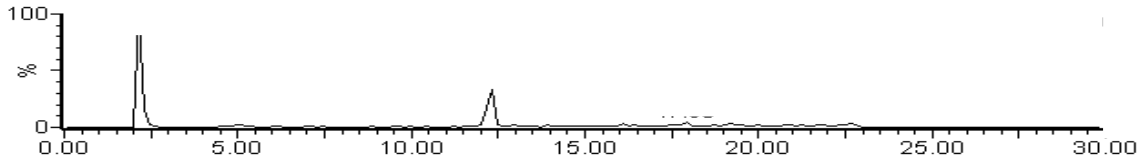
第 4-5 図　色素試料投与後のラット下大静脈血清から検出されたアントシアニンの LC/MS におけるクロマトグラム.

らアロニアおよびハスカップ色素中のアントシアニンは小腸から吸収された後の門脈および肝臓を経由して下大静脈へ移行し、全身を移動していることが明らかになった。この場合、両者の血中含有量を比較したところ、Cy 3-glc が Cy 3-gal に比べ有意に高い値を示した（第 4-4 図)。門脈および下大静脈血から検出されたアントシアニン濃度はどちらも Cy 3-glc が高かったことから、同じシアニジン系アントシアニンであっても、結合する糖の種類が異なると小腸での吸収量のあることが判明した。

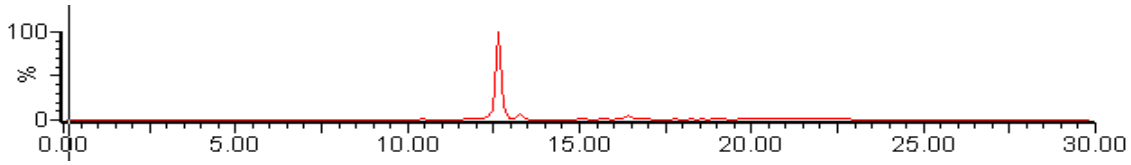
次に、アントシアニンの排泄経路を調べるため、胆膵液中のアントシアニンを同様に分析した結果、胆膵液からも門脈血および下大静脈血と同様のアントシアニンが検出された（第 4-6 図)。従って、小腸から吸収されたアントシアニンの一部は胆膵液中に排泄されたことが明らかになった。この場合、Cy 3-glc と Cy 3-gal で含有量に差は認められなかった（第 4-4 図)。アントシアニンのような水溶性色素が脂溶性の胆膵液中に存在することは稀であり、これらの色素が検出された事実は、アントシアニンが脂質代謝と関連する可能性のあることを示唆している。

以上述べたとおり、アロニアおよびハスカップ果実色素の主体であるアントシアニンの Cy 3-gal および Cy 3-glc は、いずれもラットの小腸において吸収されるが、その血中濃度には大きな差のあることがわかった。その原因として、小腸における吸収速度あるいは吸収後の代謝速度の違いが含量に影響したことが考えられる。この点を明らかにするため、次節では血中アントシアニン含量の経時的変化を調査することにした。

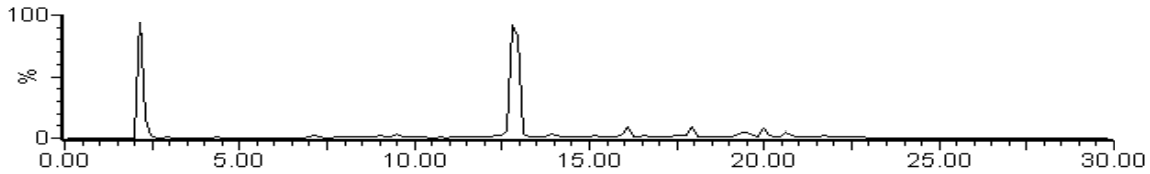
アロニア色素（Cy 3-gal）



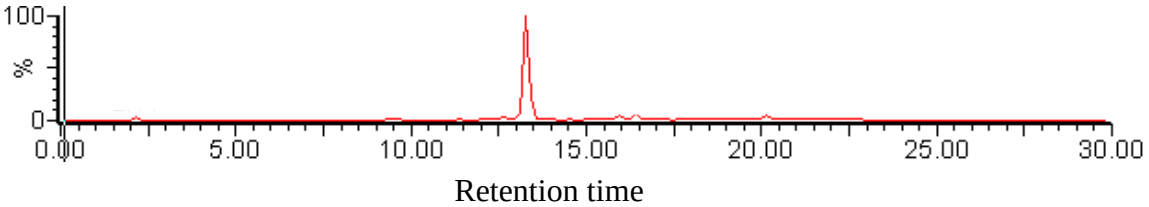
標品（Cy 3-gal）



ハスカップ色素（Cy 3-glc）



標品（Cy 3-glc）



第 4-6 図　色素試料投与後のラット胆膵液から検出されたアントシアニンの LC/MS におけるクロマトグラム.

第2節　　腸管におけるアントシアニン吸収量の経時的変化

第 1 節では、色素試料投入から 40 分経過後のラット血中アントシアニン濃度を調査し、アロニアおよびハスカップ色素の間に顕著な差が存在することを明らかにした。本節では、この原因を探るため、特に門脈血中に着目しアントシアニン濃度の経時的変化を調査した。

材料および方法

1. 色素試料の作製

色素試料は、本章、第 1 節と同じものを使用した。

2. 動物実験手順

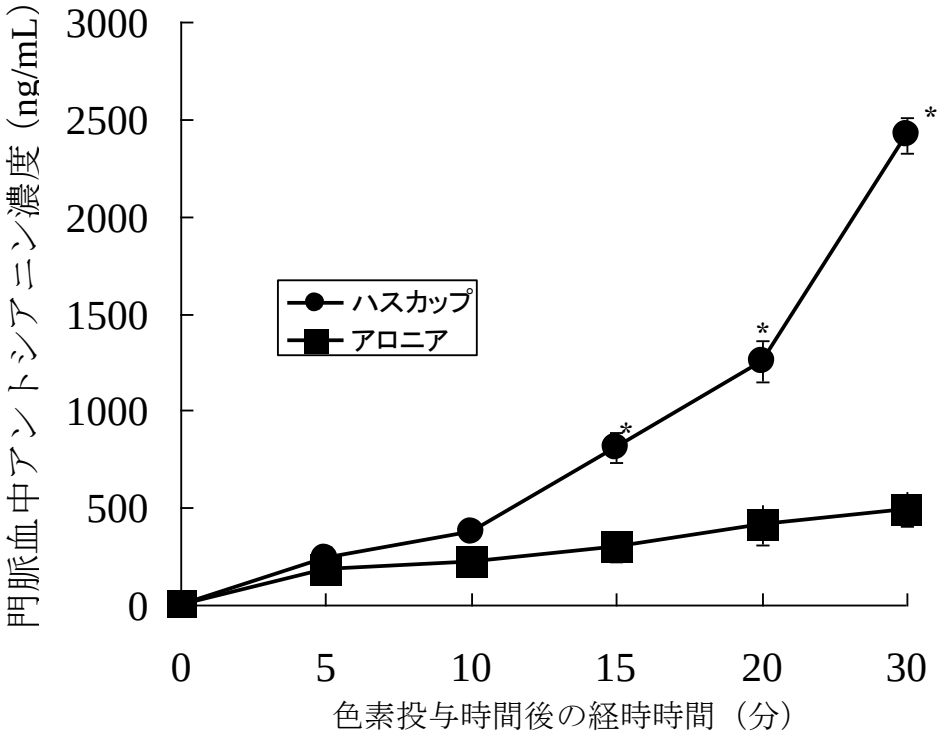
SD/ SPF 系雄性ラット 12 匹（7 週齢、体重 200g 前後）を 1 群 6 匹としてアロニア群およびハスカップ群の 2 群に分けた。それぞれのラットは実験の 24 時間前まで絶食させた。小腸結紮ループの作製は、本章、第 1 節と同様の方法で行った。小腸ループに各色素溶液を注入後、門脈にカテーテルを留置し、投与直前（0 分）、投与から 5、10、15、20 および 30 分後に採血（約 0.5 mL）し、4°C，2,000 ×*g* で 20 分間遠心分離を行い、得られた血清（約 0.2 mL）を 0.5 mL 容プラスチックチューブに入れ、分析まで-20°C で保存した。

3. アントシアニン分析

門脈血の前処理およびアントシアニン分析は、本章、第 1 節と同様の方法で行った。

結果および考察

アロニアおよびハスカップ色素試料注入後の門脈血中におけるアントシアニン含量を経時的に調査した結果、5～30 分後までアントシアニンが漸増し、Cy 3-gal（アロニア）および Cy 3-glc（ハスカップ）は各々小腸から吸収されることが確認された（第 4-7 図）。これら 2 種類のアントシアニンがラット小腸で吸収される点は、以前の報告と一致している（Wu ら，2002；Talavéra ら，2004；Mazza ら，2002； Cao ら，1999）。しかし、血中アントシア



第 4-7 図　アロニアおよびハスカップ果実色素を投与したラット門脈血中アントシアニン濃度の経時的変化.
平均値±SE (*n*=6).*P<0.05 で各経過時間における平均値間に有意差あり.

ニン濃度には、色素の種類に伴う大きな違いが認められ、Cy 3-gal よりも Cy 3-glc の血中濃度が高く推移した。この事実は、Cy 3-glc が Cy 3-gal に比べ腸管において吸収され易いことを示している。従って、アントシアニンは基本骨格が同一（シアニジン）でも、結合する糖の種類が異なれば、吸収され易さに違いを生じるものと考えられる。Cy 3-glc が Cy 3-gal よりも小腸からの吸収量が多いことは Talavéra（2004）らも指摘していて、その原因は小腸のナトリウム依存的グルコーストランスポーター（SGLT1）にあると述べている。また、アントシアニンに近い構造を持つフラボノール化合物（ケルセチン）の吸収にも同様に SGLT1 が関与している可能性が論じられている（Wolffram ら，2002；Walgren ら，2000）。本研究で、Cy 3-glc と Cy 3-gal の血中濃度に大きな開き（$P<0.05$）が認められたのが、投与から 15 分後以降であったことは、Cy 3-glc が SGLT1 を活性化するまでに若干のタイムラグがあったためと考えられる。

第3節　　アントシアニン吸収に及ぼすカプサイシンの影響

第 2 節で、アロニア果実含有アントシアニン（Cy 3-gal）の吸収効率が低いことを明らかにしたが、Nurmi ら（2009）は、他の食材との食べ合わせによりアントシアニン吸収が促進したことを報告している。カプサイシンは、トウガラシに含まれるアルカロイドで、食品成分の吸収促進に有効であるという報告がある（Nagumo ら，2007）。そこで、本節では Cy 3-gal の小腸での吸収に及ぼすカプサイシンの影響について検討した。

材料および方法

1. 色素試料

本章、第 1 節と同じアロニア色素試料にカプサイシンを 3 mg/5 mL の濃度で添加したものを処理区とし、カプサイシンの無添加区（対照）と比較した。

2. 動物実験手順

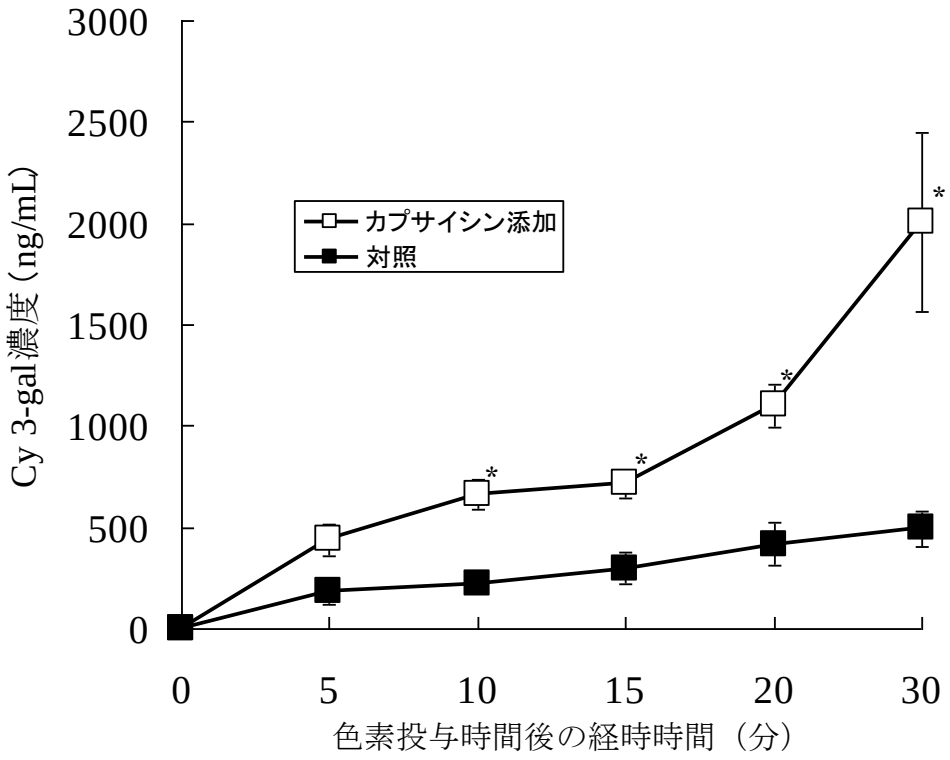
動物実験は、本章、第 2 節と同様の方法で行った。

3. アントシアニン分析

本章、第 2 節と同様の方法で行った。

結果および考察

カプサイシンを添加したアロニア色素試料投与後のラット門脈血中アントシアニン濃度を調べた結果、アロニア色素単独投与区（対照）よりもカプサイシンとともにアントシアニンを添加した区の血中アントシアニン濃度が、投与 10 分から 30 分後にかけて、いずれも 2 倍以上の値を示し、平均値間に統計的有意差が認められた（第 4-8 図）。カプサイシンは、小腸上皮細胞のタイトジャンクションを可逆的に開放すると言われている（Nagumo ら，2007）。すなわち、タイトジャンクションは、結合部の細胞質側にアクチンフィラメントなどを有し、これらの収縮および弛緩により開閉すると考えられているが、カプサイシンの作用で、小腸のコフィリン脱リン酸化が起こり、これを介して、タイトジャンクションが開放するものと考えられる（Nagumo ら，2008）。この点については、タイトジャンクションの形成と密接な関係をもつことが明らかとなっている経上皮電気抵抗（TER）を指標に調査が行われ、カプサイシンの添加により小腸上皮の透過性が増大することが立証されている（Isoda ら，2001）。従って、アロニア果実アントシアニン（Cy 3-gal）とカプサイシンを同時に投与した場合、カプサイシンの作用により小腸上皮細胞のタイトジャンクションが開放され、透過性が増大した結果、本来吸収されにくいはずの Cy 3-gal の吸収が促進されたものと考えられる。この結果は、単独では吸収されにくいアントシアニン（Cy 3-gal）であっても、カプサイシンと一緒に給餌することで吸収量が増大することを示しており、他の食品との食べ合わせにより腸管におけるアントシアニンの吸収促進が起こり得ることの実証例である。また、このカプサイシンの効果は、投与 10 分後以降に顕著となるものと考えられる。



第 4-8 図　アロニア色素（Cy 3-gal）とカプサイシンを同時に投与した場合のラット門脈血中アントシアニン濃度の経時的変化.
平均値±SE (n=6).*P<0.05 で各経過時間における平均値間に有意差あり.

第5章　ラットの肥満および脂質代謝に及ぼすアントシアニン給餌の影響

アントシアニンが持つ機能性の 1 つに抗肥満作用が挙げられる（野口ら，2011）。メタボリックシンドロームを予防することは、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常症などの発症予防にもつながる。そこで本章では、アロニアおよびハスカップ色素の給餌がラットの肥満に及ぼす影響を明らかにしようとした。

第1節　　肥満したラットに対する果実抽出色素給餌の効果

本節では、食餌性肥満ラットに高脂肪飼料および果実色素の混合飼料を与えたときの、ラットの肥満および脂質代謝改善に及ぼす色素の影響を調査した。

材料および方法

1. 飼料の作製

色素試料は、第 1 章と同じものを使用した。飼料は第 5-1 表の組成となるように作製した。すなわち、標準飼料（コーンオイル 50 g/kg）を対照とし、これにラード 200 g/kg を添加したものを高脂肪飼料とした。高脂肪飼料には、各種果実由来色素をアントシアニン濃度が 0.4% となるように添加した。また、果実色素を添加していない高脂肪飼料も用意し、処理対照とした。なお、飼料の重量調整はスクロースで行った。また。飼料中のミネラルミックスおよびビタミンミックスは、AIN-93G（Reeves et al. 1993）に準じて配合した。

第 5-1 表　飼料組成.

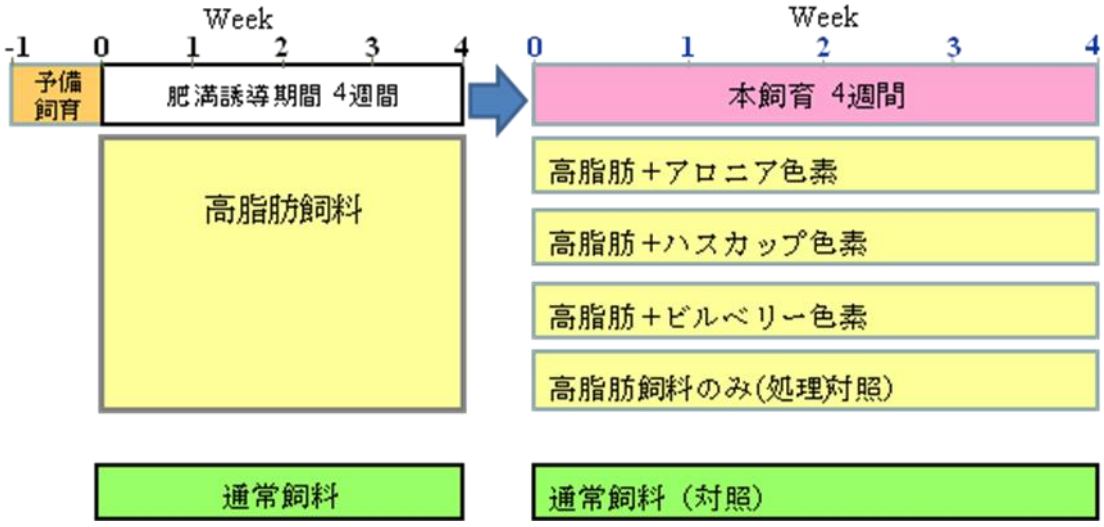
成分	高脂肪飼料				
	色素添加			無添加 (処理対照)	標準飼料 (対照)
	アロニア	ハスカップ	ビルベリー		
カゼイン	250.0	250.0	250.0	250.0	250.0
ミネラルミックス*	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
ビタミンミックス*	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
重炭酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
コーン油	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
ラード	200.0	200.0	200.0	200.0	—
ハスカップ色素	—	30.08	—	—	—
アロニア色素	17.39	—	—	—	—
ビルベリー色素	—	—	10.58	—	—
スクロース	385.11	372.42	391.92	402.5	652.5
合計	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00

*ミネラルミックスおよびビタミンミックスはAIN 93-Gに準じたものを使用した.

2. ラットの飼育および分析材料の採取

実験は第 5-1 図に示すスケジュールに沿って行った。SD/ SPF 系雄性ラット（4 週齢、体重 70 g 前後、三協ラボサービス（株）から購入）30 匹を個別にステンレス製網ケージに入れ、室温 23±1°C、湿度 55±10 %、12 時間の明暗サイクル（明期 AM 8:00-PM 20:00）に調整した飼育室で飼育した。始めに、1 週間市販飼料（CE-2:（株）日本クレア）を給餌し馴化させた後、処理区ごとの平均体重が等しくなるように組み換えを行った。次に、第 5-1 表の高脂肪飼料区のラット 24 匹には、色素無添加の高脂肪飼料を給餌した。

高脂肪飼料の給餌開始から 4 週間後に平均体重、血清総コレステロール濃度、血清中性脂肪濃度および血糖値を測定し、各値が均等となるように 1 群 6 匹の 4 群に組み替えた。このうち 3 群（各 6 匹）には、アロニア、ハスカップおよびビルベリー色素添加飼料をさらに 4 週間給餌した。色素無添加の高脂肪飼料を給餌した 1 群（6 匹）を処理対照とした。対照区のラット (6 匹) については、全期間標準試料を給餌した。これら一連の飼育期間中、飼料と飲料水は自由摂取とし、体重と摂取量を毎日測定した。また、1 週間毎に尾静脈採血を行い、血中中性脂肪濃度および総コレステロール濃度を富士ドライケム 3500 V（（株）富士フィルム）で、血糖値をグルテストエース R（(株）三和化学研究所）を用いて各々測定した。高脂肪飼料給餌終了後、ラットを 14 時間絶食させ、ソムノペンチル（ペントバルビタールナトリウム 45 mg/kg B.W）を腹腔内に投与し、麻酔下で解剖を行った。開腹後に腹部大動脈血を採取し、各種臓器および脂肪を摘出して重量を測定した。腹部大動脈血を 2, 000 ×*g* で 15 分間遠心分離し、得られた血清を-20 ºC で保存し分析材料とした。また、摘出後の臓器は液体窒素で急速凍結し、同様に-20 ºC で保存し分析に用いた。



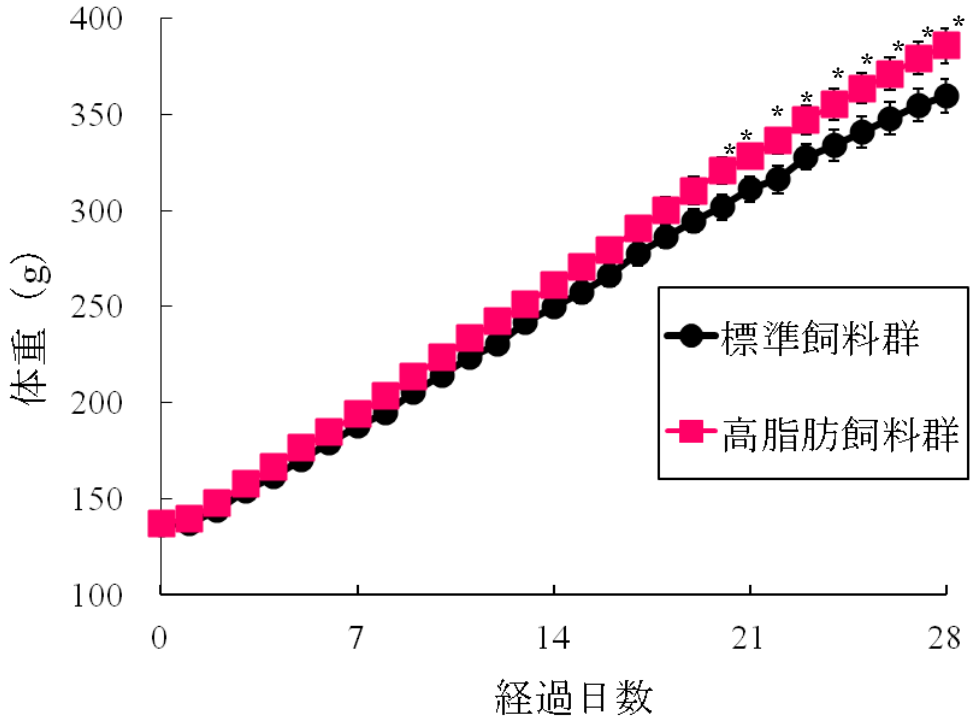
第 5-1 図　試験スケジュール.

3.肝臓中の脂質成分の分析

凍結乾燥（4 日間）後の肝臓組織を乳鉢で粉末化し、材料とした。脂質の抽出は、Folch ら（1957）の方法を改良して行った。すなわち、肝臓粉末 200 mg にクロロホルムーメタノール（2:1，v/v）混液 10 mL を加え、氷冷しながら Polytron を用いて約 2 分間ホモゲナイズし、ひだ付きろ紙（90 mm Advantec）で共栓付試験管（25 mL）にろ過した。器具等に付着した試料を共洗いで回収後、得られた抽出液をクロロホルムーメタノール（2:1, v/v）混液で 20 mL に定容し、0.37% (w/v) KCl 4 mL を加え、混合後、4 ºC の低温室に一晩静置した。分離したクロロホルム層と水層のうち、上層（水層）をアスピレーターで除去後、クロロホルムーメタノールー水（3:48:47，v/v/v）5 mL を静かに加え、同様に上層（水層）を除去する操作を 3 回繰り返した。得られた下層（クロロホルム層）を脂質抽出液としてメタノールで 20 mL に定容後、5 mL をリム付小試験管に分注し、窒素ガスを通気しながら 50 ºC で濃縮乾固した。次に、イソプロピルアルコール 2 mL に再溶解後、20 分間超音波処理したものを、試料溶液とした。総コレステロールおよび中性脂肪濃度の測定は、E-テストワコー（(株）和光純薬）を用いて行った。すなわち、試料溶液 0.02 mL および発色試薬 3.0 mL を混合し、37 ºC で 5 分間静置後、分光光度計を用いて A_{600} nm の吸光度を測定した。この場合、基準溶液および蒸留水（ブランク）も試料溶液と同様の方法で測定し、検量線を作成した。試料溶液の総コレステロールおよび中性脂肪濃度を吸光度と検量線に基づき mg/dL として表した。

結果および考察

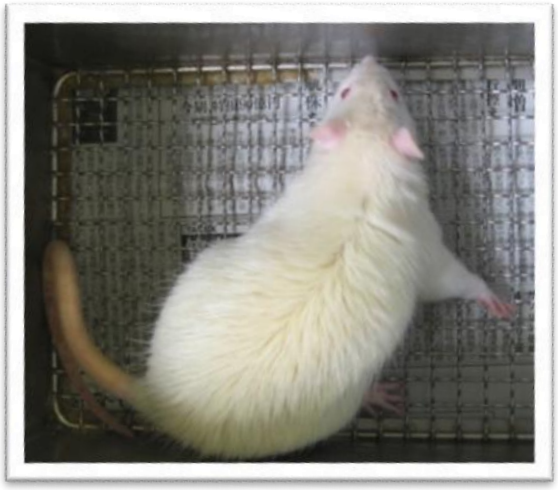
ラットは、各群ともに初日から順調な成長を示し、肥満誘導期間（4 週）経過後のラットの体重は、対照区で約 360 g 、処理対照区で約 385 g となり、高脂肪飼料を給餌したラットで有意に高い値を示した（第 5-2 図)。従って、この方法により食餌性肥満ラットを育成できることが確認された（第 5-3 図)。この食餌性肥満ラットにさらに色素添加高脂肪飼料



第 5-2 図　標準飼料および高脂肪飼料を給餌したラットの体重の変化.
*P<0.05 (n=6)



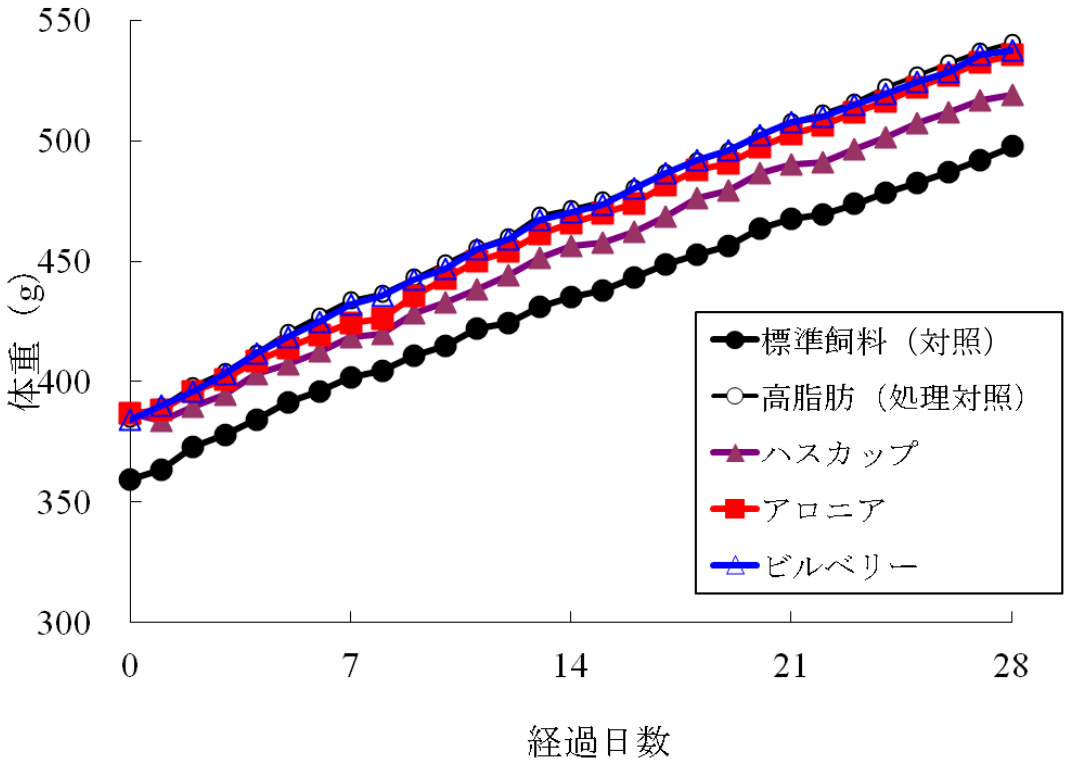
標準飼料給餌ラット



高脂肪飼料給餌ラット

第 5-3 図　標準飼料および高脂肪飼料を給餌したラットの体格の差異.

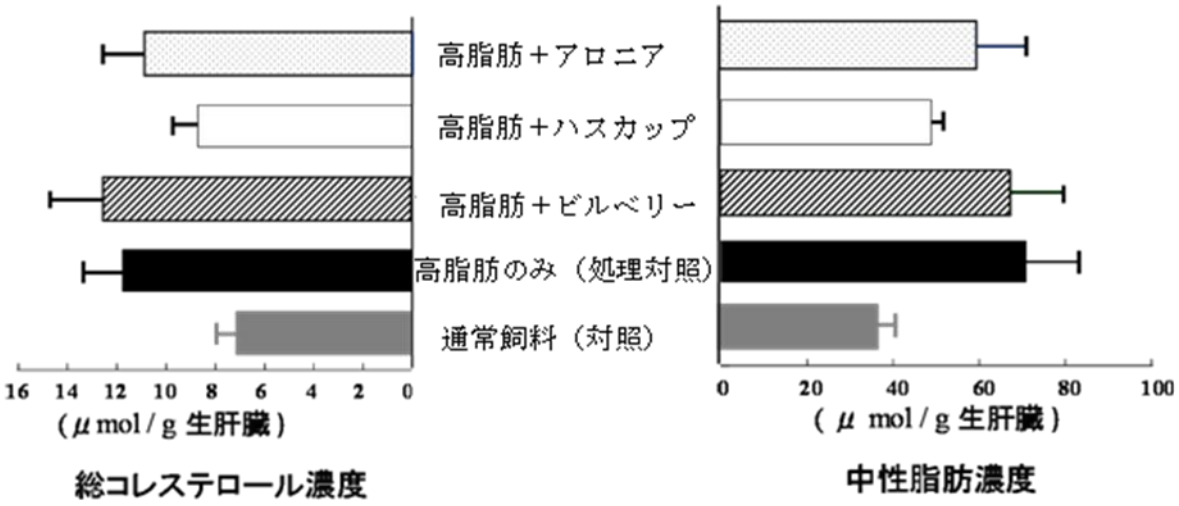
を給餌し肥満改善効果を調べたところ、本飼育終了時の高脂肪給餌区における最終体重（520-540 g）は、いずれも対照区（497 g）に比べて値が高く、色素添加に伴う大きな差異は認められなかった（第 5-4 図）。また、飼料総摂取量は、高脂肪飼料各区で 510-540 g /28day であったが、高脂肪飼料区間に差異は認められなかった（第 5-2 表）。さらに、飼料総摂取エネルギー量も、高脂肪飼料区で 2470-2615 kcal /28day と高く、飼料効率も、高脂肪飼料各区で高く推移し、いずれも色素添加に伴う差異は認められなかった（第 5-2 表）。さらに、肝臓中脂質を測定した結果、中性脂肪濃度および総コレステロール濃度は、高脂肪区で対照（通常飼料）区より高い値を示したが、各色素添加区と処理対照区間に差は認められなかった（第 5-5 図）。これらの結果から、肥満後に色素を摂取させても脂質代謝は改善されないことが明らかになった。



第 5-4 図　高脂肪飼料に添加した果実抽出色素が肥満ラットの体重増加に及ぼす影響.

第 5-2 表　高脂肪飼料に添加した果実抽出色素がラットの飼料摂取量、総摂取エネルギー量および飼料効率に及ぼす影響.

飼料	飼料総摂取量（g）	総摂取エネルギー量（kcal）	飼料効率（g）
高脂肪			
アロニア	531.26±13.60	2538.29±64.99	0.29±0.01
ハスカップ	509.99±11.25	2470.97±54.50	0.27±0.01
ビルベリー	544.11±21.69	2614.05±104.32	0.29±0.01
無添加（処理対照）	539.83±25.31	2615.59±122.64	0.30±0.01
標準（対照）	623.59±17.78	2330.46±66.46	0.23±0.01



第5-5図　高脂肪飼料に添加した果実抽出色素がラットの肝臓中中性脂肪および総コレステロール濃度に及ぼす影響.

第 2 節　高脂肪飼料に添加した果実抽出色素によるラットの肥満予防効果

前節で、肥満したラットに果実色素を給餌し、体重および脂質代謝に及ぼす影響を調べたところ、肥満改善効果は認められないことがわかった。そこで本節では、ラットに高脂肪飼料を与え肥満させる際、果実色素を同時に給餌することで、脂質代謝を改善し肥満を防止する可能性について検討した。

材料および方法

1. 飼料の作製

試験飼料は、本章、第 1 節と同じものを使用した。

2. ラットの飼育および分析材料の採取

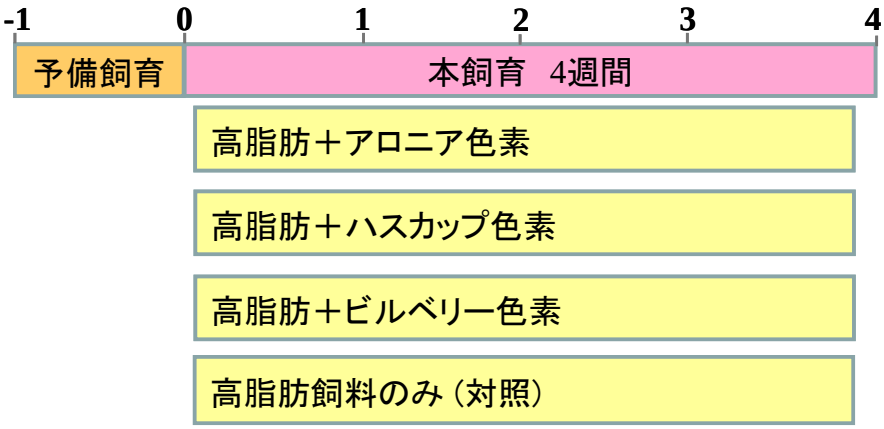
実験は、第 5-6 図に示すスケジュールに沿って行い、本章、第 1 節とは異なり、肥満誘導期間を設けず、はじめから高脂肪飼料および果実色素を合わせて給餌した。また、ラットの飼育および分析材料の採取は、本章、第 1 節と同様に行った。

3. 腹部大動脈血の分析

腹部大動脈血より得られた血清は、北海道 SRL（株）に分析を依頼し、血清総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪濃度および血糖値を測定した。

3. 盲腸の分析

-20ºC で冷凍保存した盲腸を半解凍し、大彎部を眼科用はさみで切り開き、内容物 1 g を秤量した。内容物と 5 倍量の蒸留水をポッター試験管に入れ、ポッターホモジナイザーを用いて 140 rpm/min で 1 分間ホモゲナイズした。混合液を遠心管（15 mL）に移し、pH メーターで pH を測定した。残りの盲腸内容物は遠心管に移し、4 日間の凍結乾燥後に乾燥重量を計量し、-20ºC で冷凍保存した。盲腸壁は蒸留水で洗い、ろ紙で挟んで水気を取り、生重量を測定した。

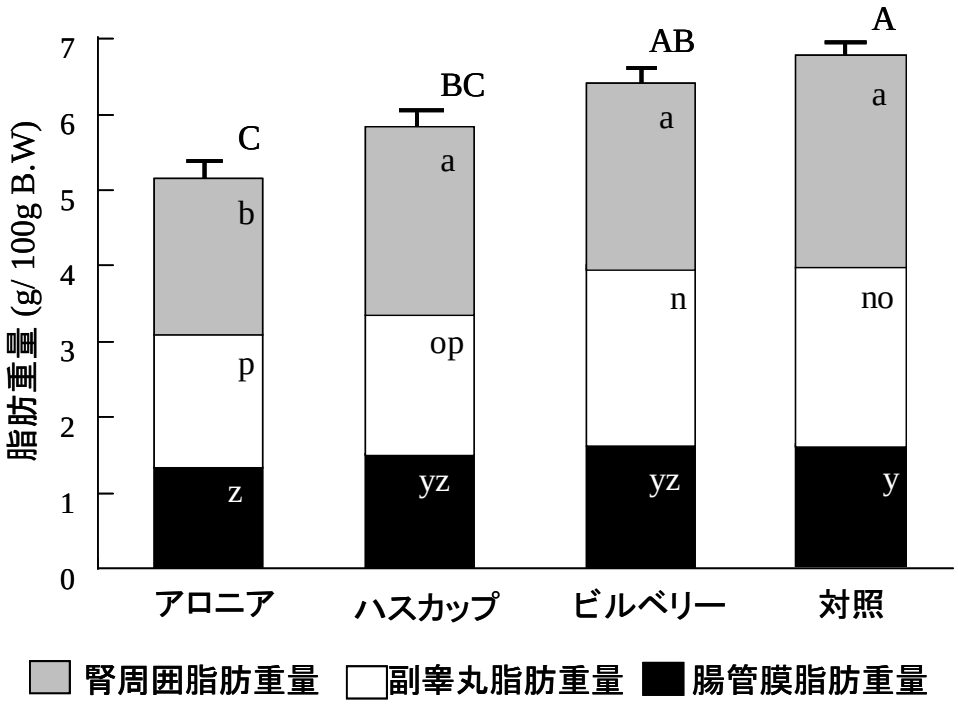


第 5-6 図　試験スケジュール.

結果および考察

ラットの各腹腔内脂肪組織総重量を第 5-7 図に示した。アロニア色素添加区の腎周囲、副睾丸周囲および腸間膜脂肪組織重量は、対照区およびビルベリー色素添加区よりも統計的に有意に低い値を示した。また、ハスカップ色素添加区の副睾丸周囲脂肪重量は、ビルベリー色素添加区のそれに比べ有意に値が低かった。さらに、アロニア色素添加区の腹腔内脂肪組織総重量は、対照区およびビルベリー色素添加区と比較して有意に値が低く、ハスカップ色素添加区のそれも対照区と比べて有意に低い値を示した。

以上の結果は、高脂肪飼料と一緒に給餌されたアロニアおよびハスカップ色素が、ラットの内臓脂肪蓄積を抑制したことを示している。その原因として、色素中の成分が脂質の吸収を抑制したことが考えられる。アントシアニン摂取と肥満との関係について、Tsuda ら（2003）は Cy 3-glc を豊富に含む紫トウモロコシ色素を給餌したマウスで肥満が抑制されたことを報告し、Wang ら（2012）も、Cy 3-glc 投与がマウスの高脂血症を低減することを報告している。また、アロニア抽出物と高フルクトース飼料を同時に給餌したラットにおいて内臓脂肪が低減したことも報告されている（Qin ら，2012）。さらに、クロロゲン酸およびプロシアニジンが、内臓脂肪の蓄積を抑制したとする報告もある（Cho ら，2010； Rodriguez de Stillo ら，2002；Ardévol ら，2013； Tosca ら，2003）。本研究で使用したアロニアおよびハスカップ色素試料には、アントシアニンの他にもこれらの物質が含有されていた可能性もあり、本研究で認められたラットの肥満を抑制する作用にはアントシアニンを含むポリフェノール化合物が複合的に関与したことが考えられる。次に、腹部大動脈血中脂質の分析結果を、第 5-3 表に示した。ハスカップ色素添加区の総コレステロール濃度および LDL コレステロール濃度並びに血糖値は、対照区に比べ値が低く、アロニア色素添加区の血糖値も低い値を示した。Ikeda ら（2003）および Chen ら（2011）は、ポリフェノールの一種として知られる茶カテキンが、胆汁酸ミセルの形成を阻害して



第 5-7 図　高脂肪飼料に添加した果実抽出色素が腹腔内脂肪重量に及ぼす影響.

同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=6$）.

第 5-3 表　高脂肪飼料に添加した果実抽出色素が血清中の脂質成分および血糖値に及ぼす影響.

処理	総コレステロール濃度	HDLコレステロール濃度	LDLコレステロール濃度	中性脂肪濃度	血糖値
			(mM/dL)		
アロニア	1.68 ± 0.08	0.51 ± 0.01	1.17 ± 0.07^{ab}	0.81 ± 0.06	8.20 ± 0.31^{b}
ハスカップ	1.59 ± 0.13	0.53 ± 0.03	1.06 ± 0.10^{b}	0.81 ± 0.16	8.25 ± 0.42^{b}
ビルベリー	1.73 ± 0.20	0.53 ± 0.06	1.20 ± 0.14^{a}	0.80 ± 0.08	8.47 ± 0.42^{ab}
無添加（対照）	1.73 ± 0.12	0.51 ± 0.02	1.22 ± 0.10^{a}	0.83 ± 0.14	9.17 ± 0.38^{a}

同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$p<0.05$, $n=6$）.

血中コレステロール濃度を低下させることを報告した。また、リンゴ果実のポリフェノールを高コレステロール飼料に添加してラットに給餌した実験でも、同様の結果が得られている（Ohta ら、2007）。本研究では、ハスカップの果実色素のみが血中コレステロールの低減に効果を発揮した。その理由として、色素中のアントシアニン以外の成分がコレステロールの低減に関与していた可能性が考えられる。

次に、果実色素が盲腸の重量および pH に及ぼす影響を第 5-4 表に示した。果実色素添加区の盲腸重量は、いずれも対照区に比べて有意に高い値を示した。この場合、盲腸壁重量に差は認められず、逆に盲腸内容物の乾物重および水分含量が色素添加区で増加していた。従って、各種色素の添加はラット盲腸の内容物を増加させたものと考えられる。この点について、He ら（2005）は、アントシアニンの盲腸内への蓄積が原因であることを報告している。すなわち、本研究で、色素の種類に伴う差が認められた原因は、アントシアニン組成の違いに伴う、小腸における吸収量の差に起因するものと考えられる。また、盲腸内容物の pH は、色素添加区でいずれも低下する傾向が認められた。この点については、腸内発酵が促進されると短鎖脂肪酸が生成し、これに伴い血中コレステロール濃度の低下が起きることが報告されている（Ebihara ら、1993）。また、盲腸内容物の pH は、腸内発酵の指標の 1 つとなっている（田辺ら、2008）。従って、本研究でも、色素添加区で腸内発酵が促進されたことが推測される。

第 3 節　脂質の消化・吸収に及ぼす果実抽出色素の影響

本章、第 1 および 2 節では、高脂肪飼料を長期間給餌した場合の果実抽出色素がラットの肥満および脂質代謝に及ぼす影響を調査し、色素給餌が血中脂質の低減に有効であることを明らかにした。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多い。そこで本節では、脂質投与直後の血中脂質量を経時的に調査するとともに、各種色素が膵リパーゼの活性を

第5-4表　高脂肪飼料に加えて給餌した果実抽出色素がラット盲腸の重量およびpHに及ぼす影響.

処理	盲腸重量 (g/100 g body)	盲腸壁重量 (g/100 g body)	盲腸内容物の乾物重 (g/100 g body)	盲腸内容物の水分量 (g/100 g body)	pH
アロニア	1.06 ± 0.04^{a}	0.22 ± 0.02	0.84 ± 0.05^{a}	0.57 ± 0.04^{a}	7.22 ± 0.08^{b}
ハスカップ	0.94 ± 0.09^{a}	0.19 ± 0.01	0.75 ± 0.09^{a}	0.53 ± 0.06^{a}	7.40 ± 0.03^{ab}
ビルベリー	0.93 ± 0.06^{a}	0.21 ± 0.03	0.72 ± 0.04^{ab}	0.48 ± 0.03^{ab}	7.30 ± 0.04^{ab}
無添加（対照）	0.68 ± 0.05^{b}	0.19 ± 0.01	0.49 ± 0.05^{b}	0.35 ± 0.03^{b}	7.57 ± 0.12^{a}

同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$p<0.05$, $n=6$）.

阻害する程度を *in vitro* で評価し、果実抽出色素が脂質の消化・吸収に及ぼす影響を明らかにしようとした。

材料および方法

1. 高脂質飼料の調製

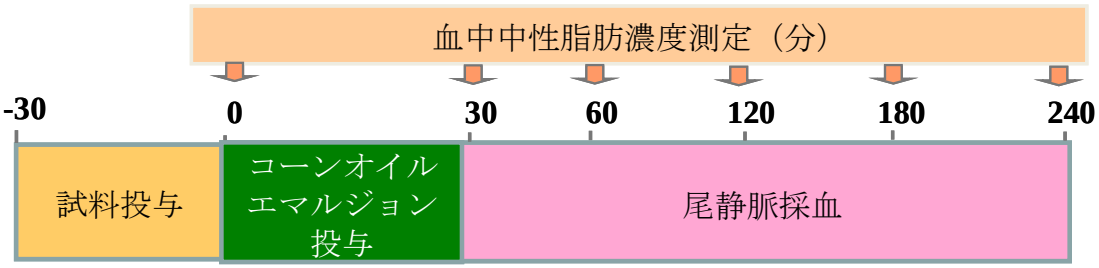
高脂質飼料（コーンオイルエマルジョン）は、Han ら（2005）の方法に従って調製した。すなわち、コーンオイル 3 mL、コール酸ナトリウム 50 mg（和光純薬（株））および蒸留水 3 mL の混液を Polytron を用いて約 5 分間ホモゲナイズ後、超音波処理を 15 分間行ったものをコーンオイルエマルジョンとした。また、果実抽出色素は各々アントシアニン 300mg/10mL の濃度に調製した。

2. ラットへの飼料給餌と血中中性脂肪の測定

実験は第 5-8 図に示すスケジュールに沿って行った。SD/ SPF 系雄性ラット 24 匹（6 週齢、体重約 200g）を 1 群 6 匹として体重の平均値が等しくなるように 4 群に分けた。一晩絶食後、無麻酔下で果実抽出色素溶液を体重 1 kg あたり 10 mL を胃ゾンデを用いて経口投与し、対照区には生理食塩水を投与した。その 30 分後にコーンオイルエマルジョンを体重 1 kg あたり 12.5 mL 投与した。投与直前、並びに投与 30、60、120、180 および 240 分後に非麻酔下でラットの尾静脈から採血した。血清中の中性脂肪含量の測定は、本章、第 1 節と同様に行った。

3. 膵リパーゼ活性阻害の評価

各種色素がブタ由来膵リパーゼ活性を阻害する程度の評価は、Kawasaki ら（2009）の方法に従って行った。すなわち、4-methylumbelliferyl oleate 4.4 mg、THF 1.25 mL および McIlvaine buffer (pH 7.4) 48.75 mL を混合した基質液 0.5 mL にブタ由来膵リパーゼ Type Ⅱ 液 0.25 mL（最終濃度 15 μg/mL）、McIlvaine buffer 0.2 mL および各種色素抽出溶液（1 mg/mL）0.05 mL を混合し、37 ºC で 30 分間反応させた。次に、反応液 0.2 mL に 0.1 M 塩酸 1 mL を

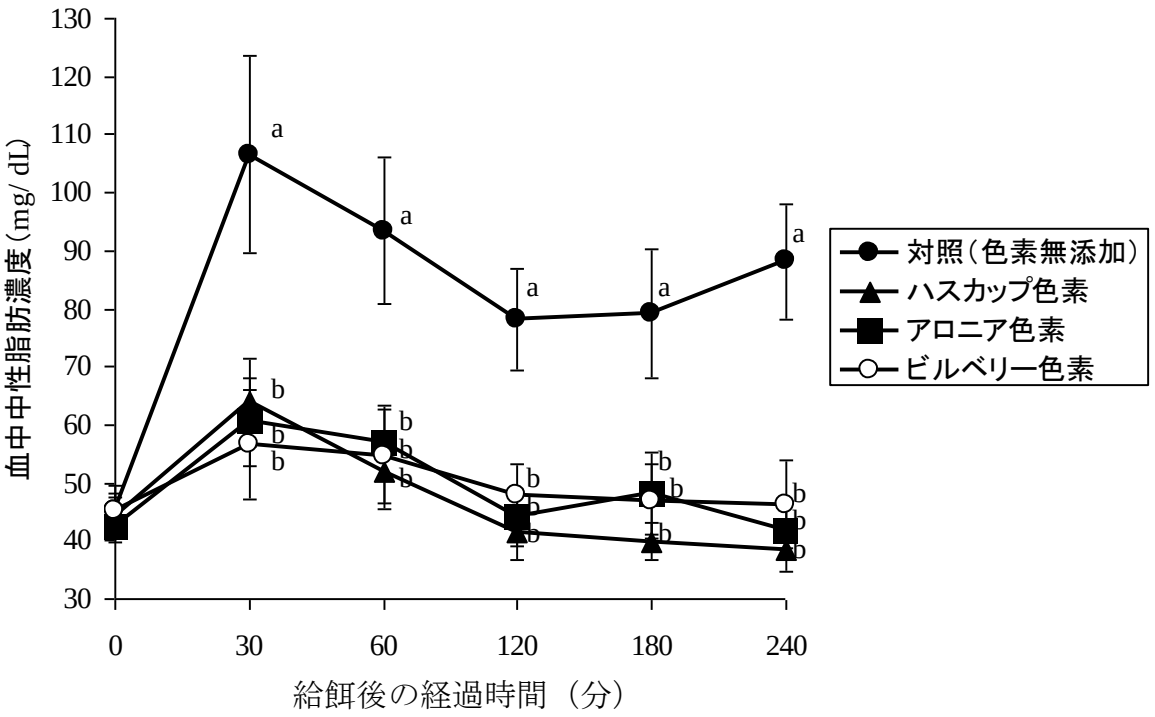


第 5-8 図　試験スケジュール.

加え、反応を停止させた。これに 0.1 M クエン酸三ナトリウム溶液 2 mL を加えて攪拌し、生成した 4-methylumbelliferone の蛍光強度を励起波長 360 nm, 蛍光波長 450 nm で測定した。この場合、比較のため没食子酸、プロトカテキュ酸および茶カテキン溶液を（1 mg/mL）別に準備し、色素溶液と同様に測定した。活性値は試料無添加の値に対する各試料溶液の活性値の割合（%）として算出した。なお、膵リパーゼ活性阻害値は、酵素活性を 50 %阻害するために必要な濃度を示す IC_{50} 値として算出した。これは、酵素活性阻害を表すための一般的な指標として用いられている値である。

結果および考察

色素投与区の血中中性脂肪濃度は、対照区（0.9% NaCl）に比べて脂質投与 30 分後から 240 分後まで顕著に低い値を示した（第 5-9 図）。また、この図から各時間の面積（血中濃度 - 時間曲線下面積 Area under the curve（AUC, mg/ dL·min））を求め、血中に存在していた中性脂肪の全体量を算出した。AUC は、体内に取り込まれた物質がどのくらいの濃度で、どの程度の期間にわたり血中を循環していたのかを示す指標である。アロニア、ハスカップおよびビルベリー色素添加区の AUC は各々 11,805±1,313、10,937±1,055 および 11,892±1,489 の値を示し、いずれも対照区のそれ（19937±2470 mg/dL·min）より有意に低い値を示した。この結果は、血中脂肪濃度の変動と同様の傾向を示したことから、血中中性脂肪濃度が低下した原因を明らかにするため、各色素が豚由来膵リパーゼ活性を阻害する程度を調べた。その結果、膵リパーゼ活性阻害値（IC_{50}）は、アロニア色素で 1.50、ハスカップ色素で 1.54±およびビルベリー色素で 1.67 を示し、茶カテキン 1.86 と同程度に高い値を示すことが明らかになった（第 5-5 表）。これらの結果から、アロニアおよびハスカップ色素は、高い膵リパーゼ阻害活性を有し、食後血中脂質の上昇を抑制した原因は、膵リパーゼの阻害にあるためと考えられる。すなわち、中性脂肪は摂取後に膵リパーゼにより脂肪酸とモノグリセリドに分解され、胆汁酸とミセルを形成し小腸上皮細胞内に吸収される



第 5-9 図　高脂質飼料と同時にラットに投与した果実抽出色素が血中中性脂肪濃度に及ぼす影響.
各経過時間における同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=6$）.

第5-5表　膵リパーゼ阻害活性に及ぼす果実抽出色素の影響.

添加物	膵リパーゼ活性阻害値 （IC_{50}）* (mg/mL)
果実抽出色素	
アロニア	1.50 ± 0.01
ハスカップ	1.54 ± 0.01
ビルベリー	1.67 ± 0.04
没食子酸	2.64 ± 0.04
プロトカテキュ酸	2.89 ± 0.08
茶カテキン	1.86 ± 0.02

*IC_{50} は、通常の膵リパーゼ活性が 50 %阻害された際の試料添加量（mg/mL）を表す。

ことが知られており、アントシアニンが膵リパーゼ活性を阻害（You ら，2011）した結果、小腸における脂質吸収量が低減したものと考えられる。

第 6 章　果実抽出色素給餌がラットの血糖値および腎機能に及ぼす影響

第 1 節　　血糖値

第 5 章、第 2 節で、高脂肪飼料にアロニアおよびハスカップ果実抽出色素を同時に給餌したラットで、血糖値の上昇が抑制されることを明らかにした。本節では、その原因を探るため、予め果実抽出色素を給餌したラットに高濃度スクロース溶液を投与し、血糖値上昇に及ぼす色素の影響を明らかにしようとした。

材料および方法

1. 試料の調製

スクロース溶液は、400 g/ L に調製した。果実色素試料は、第 1 章と同じものを使用した。また、両者のアントシアニン濃度を一致させるため、各々30 g/ L アントシアニン溶液を作製し、実験材料とした。

2. スクロース投与実験方法

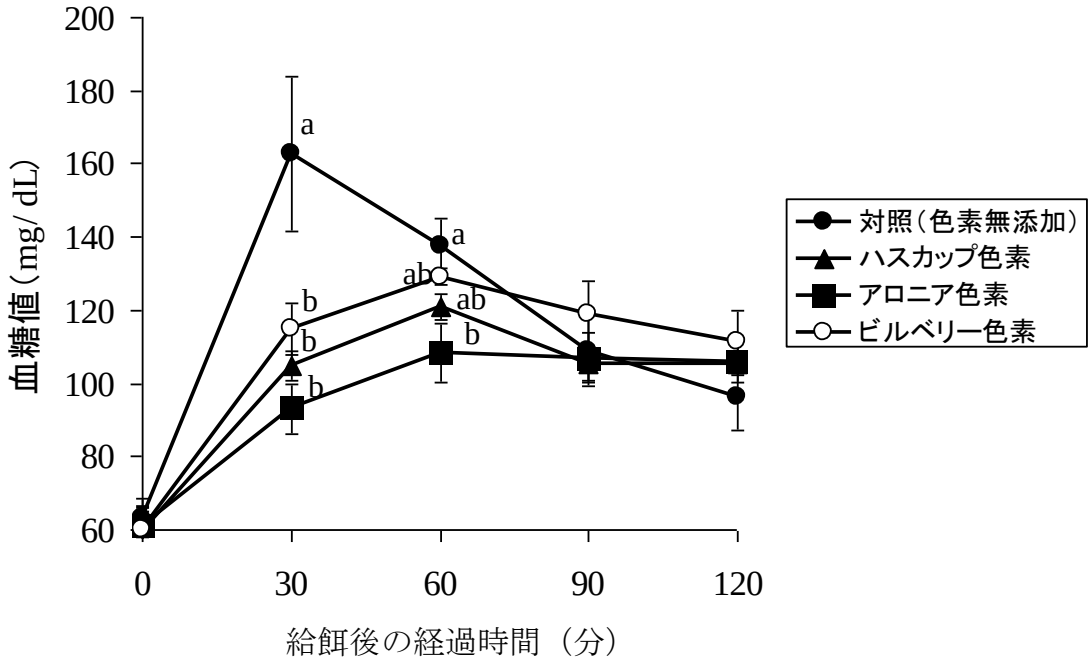
SD/ SPF 系雄性ラット 28 匹（6 週齢、体重約 200g）を 1 群 7 匹として体重の平均値が等しくなるように 4 群に分けた。一晩絶食後、無麻酔下で果実抽出色素溶液を体重 1 kg あたり 10 mL となるように経口投与した。対照として生理食塩水投与区を設けた。色素投与 30 分後に、スクロース溶液を体重 1 kg あたり 5 mL となるように胃ゾンデを用いて経口投与した。スクロース投与直前および投与から 30、60、90 および 120 分後に尾静脈から血液 5μL を採取した。血糖値の測定は、第 5 章、第 2 節と同様の方法で行った。さらに、血中濃度‐時間曲線下面積（AUC, mg/ dL·min）も算出し処理区間で比較した。

結果及び考察

対照（生理食塩水）区のラットの血糖値は、スクロース投与 30 分後には投与前（60 mg/dL）の 3 倍近い値（160 mg/dL）まで急速に上昇したのに対し、各色素添加区のラットでは、30 分後の血糖値上昇が抑えられた（第 6-1 図）。60-120 分後になると対照区の血糖値もやや低下したが、色素添加区の血糖値は、投与 30 分後の値近くで推移した。また、この時の血中濃度 - 時間曲線下面積（AUC, mg/ dL·min）を算出した結果、アロニア果実抽出色素区（10,840±580）およびハスカップ果実抽出色素区（11,522±308）が対照区（13,596±645）と比べ有意に低い値を示した。これらの結果から、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素はスクロースの分解を阻害し、小腸における単糖の吸収量を低下させ、血糖値上昇を抑えているものと考えられる。この点について、McDougall ら（2005）は、アントシアニンが α - グルコシダーゼ活性を阻害することを報告している。一方、Matsui ら（2002）は、サツマイモのペオニジン配糖体がグルコシダーゼおよびマルターゼの活性を阻害するが、スクラーゼ活性を阻害しないことを報告している。これらの事実は、スクロース分解に及ぼす影響がアントシアニンの種類ごとに異なることを示している。通常、ヒトが経口摂取する糖は、グルコースよりもスクロースの方が圧倒的に多い。本研究で、果実色素が血糖値上昇を抑える効果を有することが明らかになったことにより、糖尿病予防などにこれらの色素を活用する可能性が拓かれた。

第 2 節　臭素酸カリウム誘発腎障害の改善

第 1 章で、アロニアおよびハスカップ果実色素が、*in vitro* で高い抗酸化活性を示すことを明らかにした。また、アロニア色素は *in vivo* で肝障害に対して抑制効果を発揮することが報告されている（Krajka-Kuźniak ら，2009；Valcheva-Kuzmanova ら，2004）。そこで本節では、生体内抗酸化性の指標として新たに臭素酸カリウム誘発腎障害モデルラットを作製し、これを用いてアロニアおよびハスカップ果実の抗酸化能がラット生体に及ぼす機能を



第 6-1 図　高脂質飼料と同時にラットに投与した果実抽出色素が血糖値に及ぼす影響.
各経過時間における同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=7$）.

明らかにしようとした。

材料および方法

1. 試料の調製

腎障害を人工的に引き起こす試薬として臭素酸カリウム 200 mg/ mL を用意し実験に使用した。アロニアおよびハスカップ色素試料は、第 1 章と同じものを使用した。この場合、アントシアニン濃度を一致させるため、アントシアニン溶液は 300 mg/10 mL に調製した。

2. 臭素酸カリウム誘発腎障害ラットの作製および色素投与実験

腎障害モデルラットの作製は、Khan ら（2004）の方法で行った。雄性ラット （SD/SPF、6 週齢）32 匹を標準試料で 1 週間予備飼育後、32 匹の平均体重が各群で等しくなるように 4 群に分けた。ラットは実験の前日から 14 時間絶食させ、無麻酔下で果実抽出色素溶液を体重 1 kg あたり 10 mL を経口投与し、対照区には生理食塩水を投与した。投与から 1 時間後に、臭素酸カリウム（$KBrO_3$）を体重 1 kg あたり 1 mL 腹腔内投与し、その 24 時間後にソムノペンチル(45 mg/kg body weight) 麻酔下で解剖を行った。分析材料の採取は、第 4 章と同様に行った。

3. 腎臓中過酸化脂質（TBARS）の定量

腎臓中過酸化脂質の定量は、Ohkawa ら（1979）および五十嵐ら（1995）の方法に従い行った。すなわち、腎臓が 30% (w/v)になるように 1.15% KCl 水溶液を加え、Polytron でホモジナイズし、試料溶液とした。ネジ付き Pyrex 試験管に、試料溶液 100 µL、8.1% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液 200 µL、20%酢酸緩衝液(pH 3.5) 1,500 µL、0.8%ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）酢酸溶液 50 µL、0.8% チオバルビツール酸（TBA）溶液 1,500 µL、水 700 µL の順に加えた。試験管を密栓して攪拌後、5°C に 60 分間静置した。沸騰水中で 60 分間加熱後冷却し、水 1 mL、ブタノール-ピリジン混液 5 mL を加え激しく攪拌後、1,000×*g* で 10 分間遠心分離し、得られた上清を試料とした。分析には分光光度計を用い、A_{532} nm の

吸光度を測定した。この場合、色素試料無投与区を設け処理対照とした。また、$KBrO_3$を処理しない区も設け、対照とした。得られた数値から以下の計算式に基づき、試料湿重量 1 g 当たりの赤色色素量(TBARS)生成量（mmol/g）を算出し、過酸化脂質量の指標とした。

試料湿重量 1g から生成する赤色色素量（μmol/ g）＝

$$\frac{\text{試料の吸光度－対照液の吸光度}}{156,000^{*}} \times \frac{5.8^{**}}{10^{3}} \times \frac{10^{2}}{3} \times 10^{6}$$

*赤色色素の分子吸光係数

**試料の液量

4. 血清および腎組織が持つ抗酸化能の評価

抗酸化能は、ORAC 法を用いて第 3 章、第 1 節と同様の方法で測定した。

結果および考察

第 6-1 表に $KBrO_3$ を処理したラットの各種臓器重量に及ぼす各種果実抽出色素事前投与の影響を示した。対照区と処理対照区を比べると、肝臓、心臓および脾臓重量に顕著な差は認められなかったのに対し、腎臓重量は処理対照区で統計的に高い値を示し、腎障害特有の腎肥大が確認された。一方、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素事前投与区では腎臓重量が処理対照区に比べて低下しており、$KBrO_3$ 処理によって誘発された腎障害が軽度であったことを示していた。第 6-2 表には、ラットの血清中傷害マーカー値に及ぼす果実抽出色素事前投与の影響を示した。腎障害マーカーである血中尿素窒素および血中クレアチニン値は、アロニア色素区が処理対照区およびハスカップ色素区と比べて低い値を示したが、血中尿酸値については処理区間に差は認められなかった。さらに、血清中のトランスアミナーゼ活性を表す AST および ALT 値は、ハスカップ色素区および処理対照区で高かったのに対し、アロニア色素区では低かった。Kujawska ら（2013）は、臭素酸カリウム投与後にラットの AST および ALT 値が上昇することを報告しており、本研究においてアロニ

第 6-1 表　$KBrO_3$ を投与されたラットの臓器生重量に及ぼす果実抽出色素事前投与の影響.

処理	生重量（g）			
	肝臓	心臓	脾臓	腎臓
$KBrO_3$処理あり				
アロニア	3.94±0.11	0.38±0.01	0.27±0.22	1.01±0.06 b
ハスカップ	4.18±0.13	0.37±0.01	0.26±0.01	1.03±0.05 b
色素投与なし（処理対照）	3.96±0.20	0.39±0.01	0.31±0.01	1.17±0.02 a
$KBrO_3$処理なし（対照）	2.94±0.0	0.36±0.01	0.25±0.01	0.72±0.01

同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=8$）.
果実色素は、$KBrO_3$ 投与の 30 分前に投与.

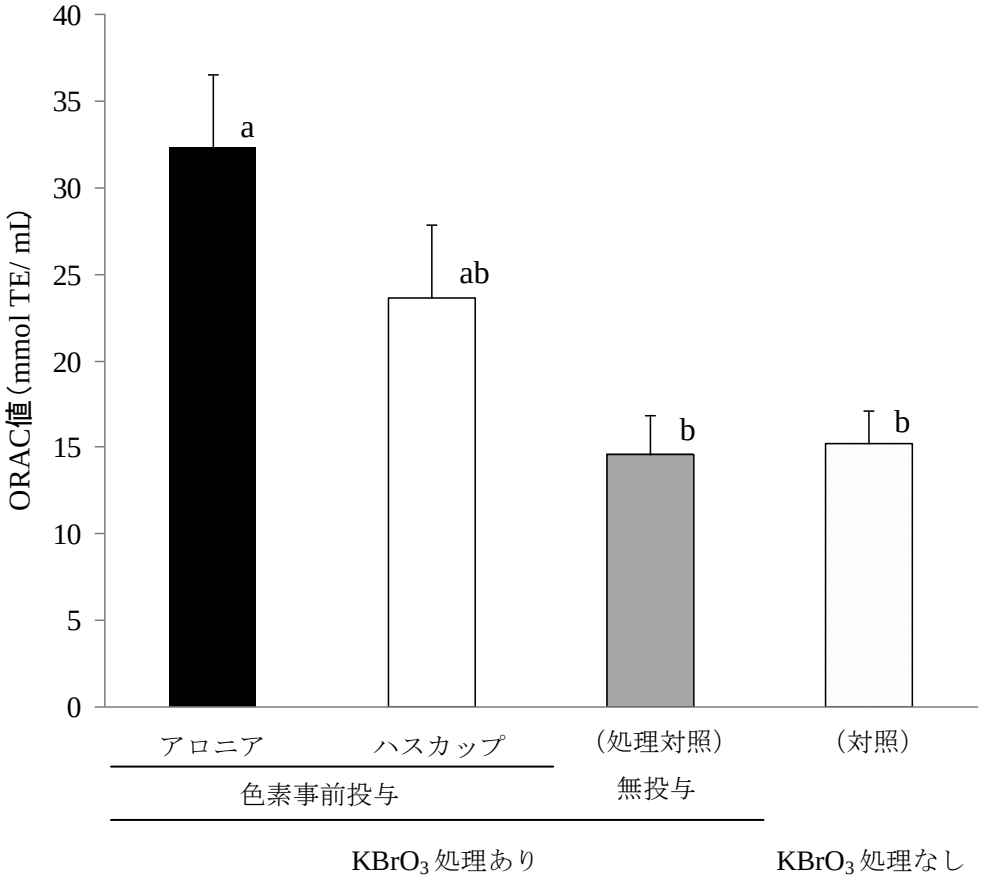
第 6-2 表　$KBrO_3$ を投与されたラットの血清中各種傷害マーカー値に及ぼす果実抽出色素事前投与の影響.

処理	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)	UA (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
$KBrO_3$処理あり					
アロニア	603±109 b	40±5 b	83.1±17.0 b	0.8±0.1	0.93±0.26 b
ハスカップ	1358±156 a	77±11 a	135.3±2.8 a	0.9±0.3	1.72±0.23 a
色素投与なし（処理対照）	1220±202 a	78±17 a	112.5±7.4 ab	0.9±0.2	1.23±0.14 ab
$KBrO_3$処理なし（対照）	204±103	28±6	11.0±0.9	1.7±0.2	0.28±0.12

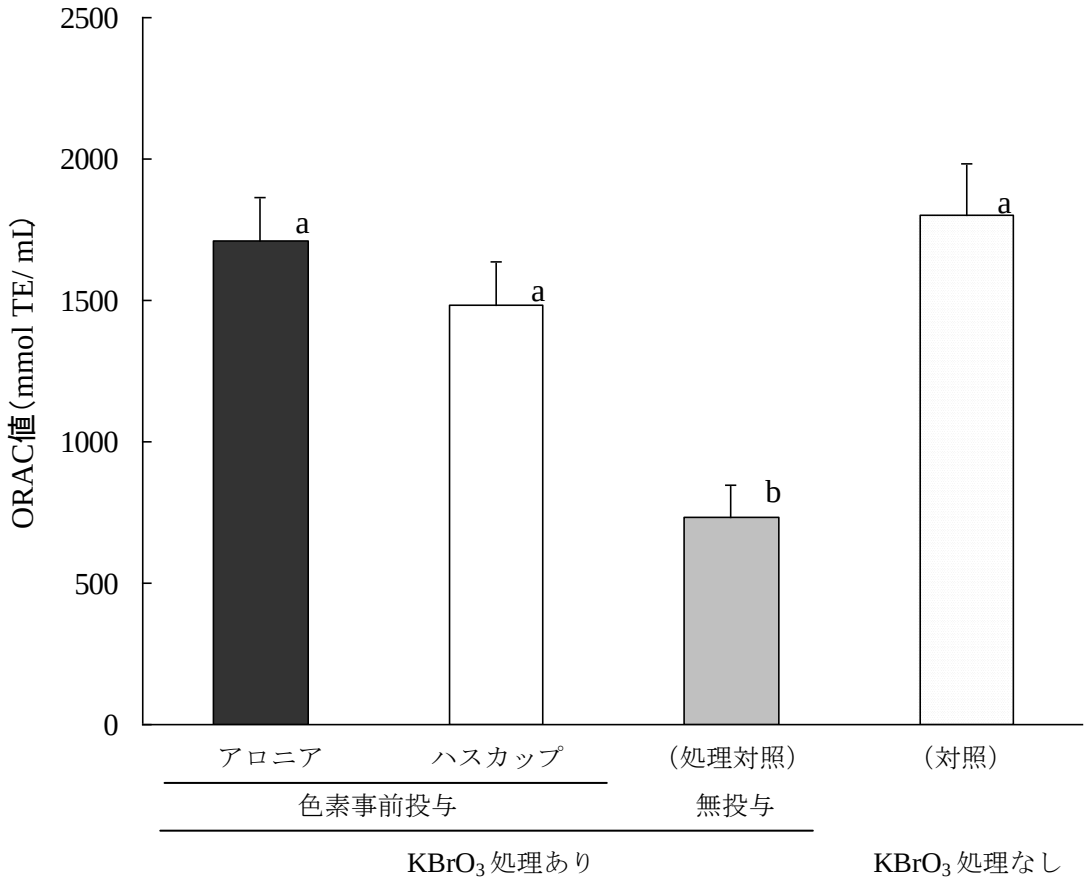
同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=8$）.
果実色素は、$KBrO_3$ 投与の 30 分前に投与.

ア色素投与ラットでは、腎障害の軽減だけではなく肝機能低下の改善も起きたものと考えられる。

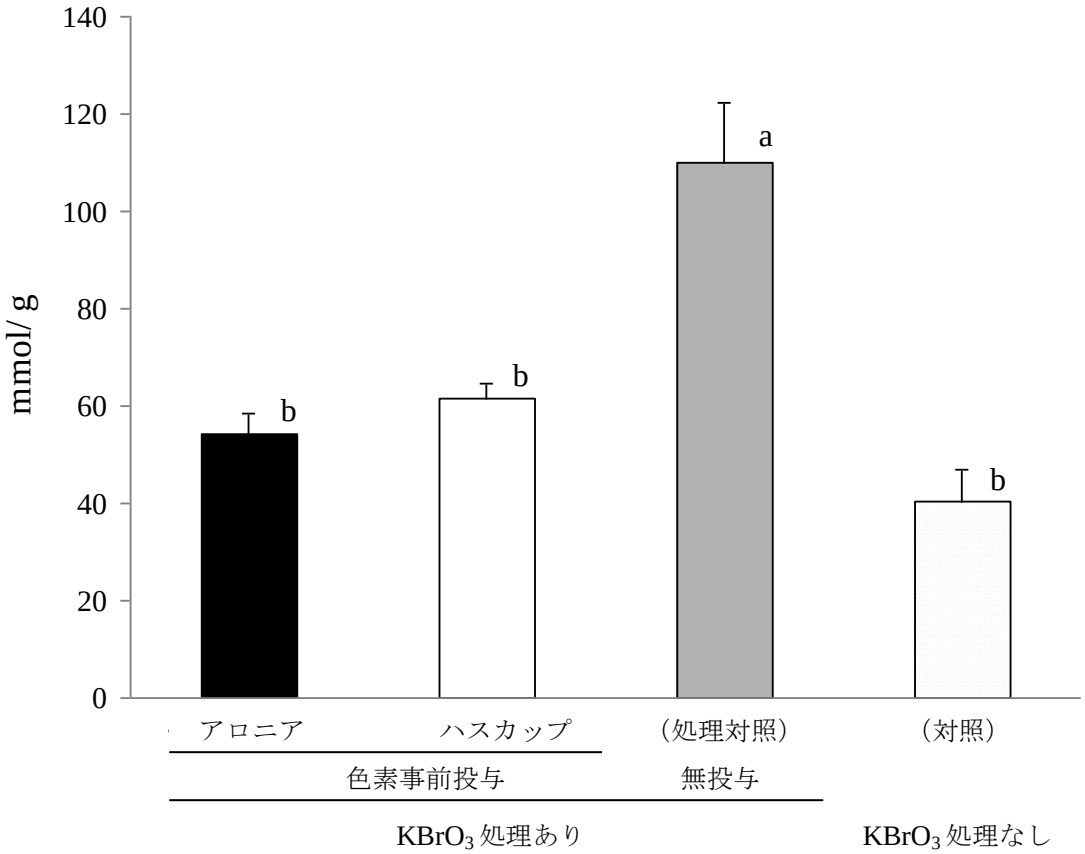
次に、血液および腎組織の抗酸化能に及ぼす果実色素事前投与の影響を調べたところ（第 6-2 図および第 6-3 図）、血清および腎臓の ORAC 値は、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素区が処理対照区に比べ有意に高い値を示した。さらに、腎臓中の過酸化脂質の指標である TBARS 量を調べたところ、アロニアおよびハスカップ色素事前投与区は処理対照区と比べて統計的に低い値を示した（第 6-4 図）。Bao ら（2008）は、臭素酸カリウム投与後のマウスの血清 ORAC 値がビルベリー色素を給餌した場合に有意に高い値を示すことを報告している。また、Kujawska ら（2013）は、臭素酸カリウム投与後のラット腎臓における TBARS 量の増加がリンゴジュースの投与で抑制され、これがプロシアニジン、エピカテキンおよびクロロゲン酸による酵素（グルタチオンペルオキシダーゼおよびグルタチオン S トランスフェラーゼ）活性の回復に基づくことを報告している。本研究ではグルタチオンペルオキシダーゼ等の酵素活性を測定していないので、アロニアおよびハスカップ抽出色素の作用機作については不明である。しかし、第 1 章で示したとおりアロニアおよびハスカップ果実抽出色素は強い抗酸化性を持つことから、これがラット体内の活性酸素を除去し、活性酸素によって引き起こされる腎障害を軽減したものと考えられる。



第 6-2 図　$KBrO_3$ を投与されたラット血清の抗酸化能（ORAC 値）に及ぼす果実抽出色素事前投与の影響.
同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=8$）.
果実色素は、$KBrO_3$ 投与の 30 分前に投与.



第 6-3 図　$KBrO_3$ を投与されたラット腎臓の抗酸化能（ORAC 値）に及ぼす果実抽出色素事前投与の影響.
同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=8$）.
果実色素は、$KBrO_3$ 投与の 30 分前に投与.



第 6-4 図　$KBrO_3$ を投与されたラット腎臓の TBARS 量に及ぼす果実抽出色素事前投与の影響.
同一英文字間に有意差なし（Tukey 検定；$P<0.05$, $n=8$）.
果実色素は、$KBrO_3$ 投与の 30 分前に投与.

第7章　総合考察

本研究では、北海道の主要な小果樹であるハスカップおよびアロニア果実のアントシアニンに着目し、果実のアントシアニン組成と抗酸化能およびアントシアニンを含む色素がラット成体に及ぼす影響について様々な観点から研究を行った。

第 1 章で、ハスカップおよびアロニア果実に含まれる色素成分の特徴を比較した結果、色素中のアントシアニン組成は大きく異なるが、同程度の抗酸化能を有し、その値はアントシアニンが豊富なことで知られるビルベリー色素に比べて高いことがわかった。この場合、アロニアおよびハスカップ色素のアントシアニン組成は、ビルベリーのそれと比べて単純であった。また、アントシアニン以外のポリフェノールも果実色素の抗酸化能に寄与している可能性が示唆された。

第 2~3 章では、遺伝的背景が極めて近いと考えられている北海道苫小牧市柏原の勇払原野に自生するハスカップの野生個体 100 株、並びに約 20 年前に同一地区から堀上げ北大農場（札幌市）に移植した栽培個体（約 50 株）のうち現存する 31 株から果実を採取し、機能性成分を調査した。その結果、アントシアニン含量について野生個体群は幅広い遺伝的多様性を内包していることがわかった。また、野生個体群のアントシアニン含量と総ポリフェノール含量および抗酸化能に正の相関が認められ、ハスカップの機能性成分はアントシアニン含量に依存していることが明らかになった。野生個体群と栽培個体群を比較したところ、総ポリフェノール含量および ORAC 値には、平均値間に顕著な差が認められ、機能性成分含量や抗酸化能が環境の違いにより変化することが明らかとなった。現在広く栽培されているハスカップ品種‘ゆうふつ’は、総アントシアニン含量、総ポリフェノール含量および抗酸化能が野生個体群の平均値と同程度の値を示している。現在の栽培品種は食味等を基準に選抜されたものであり、機能性成分および抗酸化能に着目して野生株から個体選抜を行えば、機能性に富んだ果実品質を有する品種の育成が可能であると思われ、そのためには野生個体群の保存が不可欠であると考えられる。また、果実アントシアニン

含量は、個体間差が大きく、年次、栽培環境および成熟段階の影響を受けやすい。一方、その組成を比べたところ、栽培条件を異にしても大きな違いは認められないことがわかった。従って、アントシアニン組成は種に特有の形質であり、果実から抽出・精製・濃縮されたアントシアニンの組成および抗酸化能は安定しているものと考えられる。この考えに基づき、第 4~6 章では、アロニアおよびハスカップ果実から抽出・精製したアントシアニン含有色素を用いて、ラット生体に及ぼす機能性を調査した。まず、第 4 章ではラット小腸におけるアントシアニンの吸収動態を調査した。小腸結紮ループ法を用いて、門脈および下大静脈血中アントシアニン濃度を測定した結果、ハスカップ果実に含まれる Cy 3-glc はアロニア果実中の Cy 3-gal よりも吸収され易いことが明らかになった。Wu ら（2002）、Talavéra ら（2003, 2004）および Felgines ら（2003）は、アントシアニジンに結合する糖の種類が異なると腸管での吸収量に差が認められることを報告しており、本研究の Cy 3-glc と Cy 3-gal の吸収量の違いはこの点に起因すると考えられる。本研究では、アロニアおよびハスカップ以外のベリー類に含まれるアントシアニンの吸収動態については調べていないが、横田（2011）は、北海道に自生するスノキ属野生種果実にも多様なアントシアニンが含まれていることを報告していることから、これらの利用を考える上でも、含有するアントシアニンの吸収動態について今後更に検討する必要がある。

次に、アロニア色素の主要なアントシアニンである Cy 3-gal は単独で吸収されにくいことが明らかになったため、他の食品成分との併用が小腸における Cy 3-gal の吸収に及ぼす影響について検討した。すなわち、腸管吸収と関連のあることが報告されているカプサイシンをアロニア色素に混ぜて実験を行った結果、カプサイシンを混合投与すると、Cy 3-gal の吸収量が投与 10 分後以降 2 倍以上に増加し、カプサイシンが Cy 3-gal 吸収を促進することが本研究により初めて明らかになった。カプサイシンは、小腸のタイトジャンクションを可逆的に開放する作用を有することが報告されている（Nagumo ら，2007）。従って、本研究でカプサイシン混合投与により Cy 3-gal 吸収量が増加した原因は、タイトジャンクションの

開放にあるものと考えられる。小腸上皮細胞のタイトジャンクションは、結合部の細胞質側にアクチンフィラメントなどを有し、これらの収縮および弛緩により開閉すると考えられている。カプサイシンの他にタイトジャンクションを開放させる物質として DFAⅢが報告されており（Mineo ら，2002）、DFAⅢとケルセチンを同時に投与すると、ケルセチンの体内吸収量が増加することが報告されている（Matsukawa ら，2009）。DFAIII の作用機序がカプサイシンと同一なものかについては不明であるが、アントシアニンの吸収に及ぼす DFAIII の効果についても今後検証する必要がある。いずれにしても、従来、腸管からの吸収が悪いとされてきたアントシアニンについて（Cao ら，1999, Mazza ら，2002）、吸収を促進させる物質の存在が明らかになったことから、アントシアニンを単独で摂取するのではなく、他の食品（成分）と組み合わせて摂取する（食べ合わせ）場合の生体調節機能に関する研究を今後推進する必要がある。

第 5 章では、ハスカップおよびアロニア色素のラット肥満および脂質代謝に及ぼす影響について検討した。まず、高脂肪給餌によって肥満させたラットに、果実抽出色素を与えたところ、肥満を改善するには至らなかった。次に、ラットを肥満させる過程で高脂肪飼料に果実色素を添加し、その効果を調べたところ、色素添加飼料を与えられたラットで、内臓脂肪の蓄積量が減少し、血中の脂質濃度も低下することが確認された。従って、アントシアニンを含む果実色素は、ラットの肥満防止に有効であることが明らかになった。この原因を探るため、コーンオイルエマルジョンを主体とした高濃度脂質と各種色素を合わせてラットに経口投与し、血中脂質濃度の変化を経時的に調べたところ、色素添加区ではいずれも血中脂質成分が少なくなることがわかった。さらに、各色素が膵リパーゼ活性に及ぼす影響を調べたところ、色素添加により膵リパーゼ活性が阻害されることが明らかになった。つまり、果実色素の添加がリパーゼの働きを妨げ、脂質の消化が抑制されることにより、腸管壁から吸収される脂肪の量を減少させ、血中脂質成分の濃度が低下したものと考えられる。従って、果実色素給餌によるラット肥満防止効果の一因は、脂肪分解酵素

（リパーゼ）活性の抑制であると考えられる。

第 6 章では、高濃度スクロースを投与したラットの血糖値上昇に及ぼす果実色素事前投与の影響について検討した。その結果、アロニアおよびハスカップ果実色素は血糖値の急激な上昇を抑制することが明らかになった。第 5 章においてアロニアおよびハスカップ果実色素を高脂肪飼料と同時に給餌したラットで認められた血糖値上昇抑制現象は、腸管内で起こるスクロースの酵素的分解を果実色素が阻害し単糖濃度を減少させた結果、血糖値の上昇が抑制されたものと考えられる。また、第 1 章で示したとおり、アロニアおよびハスカップ果実色素は、高い抗酸化活性を有するので、臭素酸カリウムの強い酸化作用により人為的に誘発した腎障害に及ぼす果実色素投与の影響を調べた。その結果、臭素酸カリウムを投与されたラットにおいて、血中および腎臓の ORAC 値は、アロニア色素を事前に投与した区で高い値を示すことが明らかなった。このことから、アロニア果実色素は、生体内で抗酸化能を発揮することにより、臭素酸カリウムが誘発する人為的腎障害を軽減することが初めて実証された。

以上述べたとおり、アントシアニンを豊富に含むアロニアおよびハスカップ果実は抗酸化能に富み、人体の健康増進に有益な食品と考えられる。しかし、その機能性については未解明な点も多く残されており、今後新たな機能性が解明されることも十分に考えられる。機能性が明らかになれば、関連する成分を豊富に含む品種を育成し、それを増加させる栽培技術を研究する必要がある。品種の育成には素材となる遺伝的多様性を内包した野生個体群の存在が不可欠であり、ハスカップの勇払原野自生集団のような遺伝資源の収集、保存を図ることが強く望まれる。

本研究で得られた知見がアロニアおよびハスカップの機能性成分育種および食品開発の礎となり、北海道の果樹産業発展に寄与することを願ってやまない。

摘要

本研究では、北海道の主要な小果樹であるアロニアおよびハスカップの果実に含まれるアントシアニンに着目し、アントシアニン組成および含量と抗酸化能との関連、並びにアントシアニンを含む果実抽出色素がラット成体に及ぼす影響について、様々な観点から研究を行った。内容の概要は、以下のとおりである。

1. アロニアおよびハスカップ果実に含まれる色素成分の特徴

(1) MALDI-TOF MS を用いてアロニア、ハスカップおよびビルベリー果実のアントシアニン組成を比較した結果、アントシアニン組成は果実ごとに著しく異なっていることが明らかになった。すなわち、アロニアはアントシアニンの全種類がシアニジン系であるのに対し、ハスカップにはシアニジン系に加えわずかにペオニジン系が含まれ、ビルベリーには、シアニンジン、ペオニジン、デルフィニジンおよびマルビジンを含む多種類のアントシアニンが含まれていることが判明した。

(2) ハスカップおよびアロニア色素抽出液は、ビルベリーのそれと比べ有意に高い抗酸化活性を示したことから、アントシアニンの種類ごとに抗酸化能が異なるか、あるいは抗酸化能に影響するアントシアニン以外の成分が抽出液中に含まれているものと推測される。

2. 果実内アントシアニン含量および組成に影響を及ぼす諸要因

(1) アロニア果実のアントシアニン含量は、果実発育に伴い増加した。この場合、アントシアニン組成に果実発育に伴う顕著な差異は認められなかった。

(2) ハスカップの野生個体群と栽培個体群（野生個体群と同じ遺伝的背景を有する）を比較したところ、果実の 1 果重は、栽培個体群が野生個体群の約 1.8 倍と大きく、縦径および

横径も、栽培個体群が野生個体群に比べ大きな値を示した。また、果実の大きさおよび縦横比を調べた結果、同一株内では変異が小さいのに対し、株間では顕著な違いが認められ、果実の形および大きさに顕著な系統間差のあることが明らかになった。

(3)　野生個体群の総アントシアニン含量の平均値は、栽培個体群のそれと比べて値が高く、両者に統計的有意差が認められた。従って、果実アントシアニン含量は、環境条件の影響を受けやすいものと考えられる。また、野生個体群と栽培個体群についてアントシアニン組成を比較したところ、両者に大きな違いは認められず、アントシアニン組成は、種に特有の形質であることがわかった。

(4)　2011 年と 2013 年で同じ栽培個体株を比較した結果、アントシアニンの総含量および組成には年次間変動が認められなかった。

(5)　以上の結果、アロニアおよびハスカップ果実のアントシアニン組成は種固有の特徴を有し、果実成熟程度の違い、個体間差および年次間変動の影響を受けにくいことが明らかとなった。

3. 果実のアントシアニン含量と総ポリフェノール含量および各種抗酸化能との関連

(1)　2011 年の野生個体群における総ポリフェノール含量のヒストグラムは、統計解析の結果正規分布を示すことが確認され、栽培個体群との間に統計的有意差が確認された。

(2)　野生個体群と栽培個体群の抗酸化能を DPPH ラジカル捕捉活性、ORAC 法および ESR スピントラップ法で比較したところ、異なる方法であっても、栽培個体群の分布のばらつきは野生個体群のそれよりも小さく、栽培化に伴い変異幅が小さくなることが明らかとなった。

(3)　ハスカップ野生個体群果実のアントシアニン含量と総ポリフェノール含量の回帰分析の結果、正の相関が認められた。また、アントシアニン含量と DPPH ラジカル捕捉活性値および ORAC 値との間で相関が認められたが、ヒドロキシラジカル捕捉活性値との間に統

計的に意味のある相関は確認できなかった。従って、アントシアニンはヒドロキシラジカルの消去に寄与していないものと考えられる。

(4)　総ポリフェノール含量も、総アントシアニン含量と同様に DPPH ラジカル補足活性値および ORAC 値と有意な相関を示したが、ヒドロキシラジカル捕捉活性値との間に相関は認められなかった。

4. ラット消化管におけるアントシアニン吸収動態の解明

(1)　小腸結紮ループ法を用いて、ラット小腸におけるアントシアニンの吸収動態を調査した。その結果、アロニアおよびハスカップ果実色素の主体であるアントシアニンの Cy 3-gal（アロニア）および Cy 3-glc（ハスカップ）は、いずれもラットの小腸において吸収され門脈および肝臓を経由して下大静脈へ移行するが、その血中濃度には大きな差が認められ、Cy 3-glc が Cy 3-gal に比べ血中濃度が高かった。

(2)　小腸に色素注入後の血中アントシアニン濃度を投与 30 分後まで経時的に調査したところ、Cy 3-glc の血中濃度は、Cy 3-gal よりも常時高い値で推移した。この結果は、Cy 3-glc が Cy 3-gal に比べ腸管において吸収されやすいことを示している。

(3)　吸収されにくい Cy 3-gal（アロニア色素）にカプサイシンを混合添加し、小腸に投与した結果、投与 15 分後以降の血中アントシアニン濃度はカプサイシン無添加（Cy 3-gal 単独添加）区に比べ 2 倍以上の高い値を示した。これは、カプサイシンがラット小腸におけるアントシアニンの吸収促進に有効に機能したことを示している。従ってアントシアニンと他の食品との食べ合わせにより、腸管における吸収促進が起こり得ることが実証された。

5. ラットの肥満および脂質代謝に及ぼすアントシアニン給餌の影響

(1)　食餌性肥満ラットにアロニアおよびハスカップ果実抽出色素を給餌したところ、体重、飼料効率および肝臓中脂質は処理対照区のラットと変わらず、肥満後のラットに果実抽出

色素を与えても脂質代謝は改善されないことが明らかになった。

(2)　高脂肪飼料にアロニアおよびハスカップ果実抽出色素を混合給餌した場合の、ラットの肥満に及ぼす色素の影響を見たところ、色素添加区における内臓脂肪の蓄積は、処理対照（高脂肪飼料単独給餌）区に比べて有意に低下した。

(3)　この場合、色素添加区の血中総コレステロールおよびLDLコレステロール濃度も、処理対照区に比べ値が低く、盲腸内容物のpHが色素添加区で低下した。色素添加区ではいずれも腸内発酵が促進された結果、血中コレステロール濃度が低下したものと推測される。

(4)　アロニアおよびハスカップ色素投与区の血中中性脂肪濃度が、処理対照区と比べて有意に低下した原因を探るため、膵リパーゼ活性に及ぼす色素給餌の影響を調査した。その結果、果実抽出色素は、いずれも膵リパーゼ活性を阻害した。従って、色素添加区で食後血中脂質濃度の上昇が抑制された原因は、膵リパーゼ活性の阻害に伴う、脂質分解および吸収の抑制にあるものと考えられる。

6. 果実抽出色素給餌がラットの血糖値および腎機能に及ぼす影響

(1)　アロニアおよびハスカップ果実抽出色素投与後の高濃度巣クロースを投与したラットの血糖値は、処理対照（色素無投与）区に比べて有意に低下した。この結果は、事前に投与した果実色素が、スクロース分解を阻害し、血糖値上昇を抑制したことを示している。

(2)　臭素酸カリウム投与（酸化ストレス）で人為的に誘発したラットの腎障害に及ぼす色素抽出物給餌の影響を調べたところ、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素区では腎臓重量の数値が処理対照（色素無添加）区のそれと比べて低下しており、果実色素給餌による腎障害の改善が確認された。

(3)　この場合、血清と腎臓におけるORAC値は、アロニアおよびハスカップ果実抽出色素添加区で高く、果実抽出色素の給餌によりラット生体内の抗酸化活性が上昇し、その結果腎障害が軽減されたものと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、多大なるご指導、ご助言、ご校閲の労を賜りました北海道大学大学院農学研究院准教授 鈴木 卓 博士に対し、心より御礼申し上げます。また、本論文作成に当たり、ご指導を賜りました北海道大学大学院農学研究院教授 増田 清 博士、同教授 原　博 博士、同助教 志村 華子 博士に深く感謝申し上げます。

藤女子大学名誉教授 知地英征 博士には、卒業研究時から一貫して多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました。衷心より厚く御礼申し上げます。

北海道教育大学函館校教授 鵜飼光子 博士には、ESR スピントラップ法の分析に際しご指導を賜りました。藤女子大学大学院人間生活学研究科講師 岡崎由佳子 博士には、研究実施および取りまとめに際し、ご指導を賜りました。藤女子大学人間生活学部食物栄養学科研究員 青柳幸恵 女史には、実験および分析機器の使用に際し、細部に渡りご指導・ご助言を賜りました。皆様に、心から感謝申し上げます。

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センターの杉山慶太 博士および嘉見大助 博士、同食品総合研究所の渡辺 純 博士、並びに株式会社機能性植物研究所の樋口央紀 博士には、本研究の実施に際し、数多くの貴重なご助言を賜りました。厚く、御礼申し上げます。

また、実験遂行に際しお世話になりました北海道大学大学院農学研究院園芸学研究室の阿部圭馬 氏、桑山健二 氏をはじめ院生、学生諸氏に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり、心身共に支え、いつも励ましてくれた母と祖母に心より深く感謝申し上げます。

さらに、本研究で犠牲となった全てのラットに深く感謝すると共に、心より哀悼の意を表します。

引用文献

Ardévol, A., Motilva, M.J., Serra, A., Blay, M., Pinent, M.

Procyanidins target mesenteric adipose tissue in Wistar lean rats and subcutaneous adipose tissue in zucker obese rat.

Food Chem. 141, 160-166 (2013)

Bao, L., Yao, X.S., Yau, C.C., Tsi, D., Chia, C.S., Nagai, H., Kurihara, H.

Protective effects of bilberry (Vacium mytillus L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice.

J. Agric. Food Chem. 56, 7803-7807(2008)

Basu, A., Du, M., Leyva, M. J., Sanchez, K., Betts, N. M., Wu, M., Aston, C. E., Lyons, T. J.

Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome.

J. Nutr. 140, 1582-1587(2010)

Benavente-García, O., Castillo, J.

Update on uses and properties of Citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity.

J. Agric. Food Chem. 56, 6185-6205 (2008)

Cadenas, S., Barja, G.

Resveratrol, melatonin, vitamin E, and pbn protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen $KBrO_3$.

Free Rdic Biol Med. 26, 1531-1537 (1999)

Cao, G., Prior, RL.

Anthocyanin are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract.

Clin. Chem. 45, 574-576 (1999)

Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G.

Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants.

Free Radic Biol. 14, 303-311 (1993)

Cao, G., Prior, R.L.

Anthocyanin are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract.

Clin. Chem. 45, 574-576 (1999)

Chen, Y.K., Cheung, C., Reuhl, K.R., Liu, A.B., Lee, M.J., Lu, Y.P., and Yang, C.S.

Effects of green tea polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate on newly developed high-fa t/western-style diet-induced obesity and metabolic syndrome in mice.

J. Agric. Food Chem. 59, 11862-11871 (2011)

Chovanalikit, A., Thompson, M.M., Wrolstad, R.E.

Characterization and quantification of anthocyanins and polyphenolics in blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.)

J. Agric. Food Chem. 52, 848-852 (2004)

Cho, A.S., Jeon, .SM., Kim, M.J., Yeo, J., Seo, K.I., Choi, M.S.,Lee, M.K.

Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice.

Food Chem Toxicol. 48, 937-43 (2010)

Clifton, P.M.

Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects.

J. Biomed Biotechnol. 5, 272-278 (2004)

Ebihara, K., Miyada, T., Nakajima, A.

Comparision of propionic acid and sodium propionate infused to the cecum and stomach on

hypocholesterolemic effect in rat fed a cholesterol-free, casein protein diet.

Nutr. Res.13, 1305-1311 (1993)

Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M.P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J.L., Rémésy, C.

Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucro-and sulfoconjugates in humans.

J. Nutr. 133, 1296-1301 (2003)

Goupy, P., Bautista-Ortin, A.B., Fulcrand, H., Dangles, O.

Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the DPPH radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid.

J. Agric. Food Chem. 57, 5762-5770 (2009)

Galati, G., O'Brien, P.J.

Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties.

Free Radic Biol Med. 37, 287-303 (2004)

韓立坤、Gong, X.J、河野志穂、齋藤雅人、木村善行、奥田拓道

ショウガの抗肥満作用について.

Yakugakuzasshi 125, 213-217 (2005)

Han, LK., Takaku T., Li, J., Kimura, Y., Okuda, H.

Anti-obesity action of oolong tea.

Int J Obes. 23, 98-105 (1999)

He, J., Magnuson, B.A., Giusti, M.M.

Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents-impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion.

J. Agric. Food Chem. 53, 2859-2866 (2005)

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.

Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.

Analytical Biochem. 95, 351-358 (1979)

五十嵐脩、島崎弘幸

過酸化脂質・フリーラジカル実験法

学会出版センター（1995）

磯辺由香、加瀬友美子、成田美代、小宮孝志

熱帯原産果実フェイジョア（*Feijoa Dellowiana* Berg）の抗酸化性.

日本家政学会誌 54, 945-949 (2003)

伊藤満敏、大原絵里、小林篤、山崎彬、梶亮太、山口誠之、石崎和彦、奈良悦子、大坪研一

有色素米の抗酸化能とポリフェノール含量の測定.

日本食品科学工学会誌 58, 576-582 (2011)

Isoda, H., Han, J., Tominaga, M., Maekawa, T.

Effects of capsaicin on human intestinal cell Caco-2.

Cytotechnology 36, 155-161 (2001)

Islam, K.B., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Yokota, A.

Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats.

Gastroenterology 141, 1773-1781 (2011)

Jurikova, T., Rop, O., Mlcek, J., Sochor, J., Balla, S., Szekeres, L., Hegedusova, A., Hubalek, J., Adam, V., Kizek, R.

Phenolic profile of edible honeysuckle berries (Genus *Lonicera*) and their biological effects.

Molecules 17, 61-79 (2012)

神田啓臣、荒木肇、鈴木卓、原田隆、八鍬利郎

アイソザイム遺伝子を利用した野生ハスカップの繁殖様式の検討.

園芸学会雑誌　別冊 67, 99 (1998)

河田照雄、 斉藤昌之、 小川正

肥満と脂肪エネルギー代謝―メタボリックシンドロームへの戦略―

建帛社（2005）

川崎健司、白水智子、勝井真紀

クリ皮から抽出されたポリフェノールの脂質吸収抑制効果.

日本食品科学工学会誌 56, 545-548 (2009)

Khan, N., Sultana, S.

Abrogation of potassium bromated-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats.

Toxicology 201, 173-184 (2004)

Kokotkiewicz A., Jaremicz, Z., Luczkiewicz, M.

Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine.

J. Med Food. 13, 255–269 (2010)

Kokotkiewicz, A., Jaremicz, Z., Luckiewicz, M.

Aronia plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modem medicine.

J. Med Food. 13, 255-269 (2010)

Krajka-Kuźniak, V., Szaefer, H., Ignatowicz, E., Adamska, T., Oszmiański, J., Baer-Dubowska, W.

Effect of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice on the metabolic activation and detoxication of carcinogenic N-nitrosodiethylamine in rat liver.

J. Agric. Food Chem. 57, 5071–5077 (2009)

Kujawska, M., Ignatowicz, E., Ewertowska, M., Adamska, T., Markowski, J., Jodynis-Liebert, J.

Attenuation of $KBrO_3$-induced renal and hepatic toxicity by cloudy apple juice in rat.

Phytother. Res. 27, 1214-1219 (2013)

Lätti, A.K., Riihinen, K.R., Kainulainen, P.S.

Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland.

J. Agric. Food Chem. 56, 190-196 (2008)

Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K.

Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar ayamurasaki can be achieved through the α-glucosidase inhibitory action.

J. Agric. Food Chem. 50, 7244-7248 (2002)

Matsukawa, N., Matsumoto, M., Shinoki, A., Hagio, M., Inoue, R., Hara, H.

Nondigestible saccharaide suppress the bacterial degradation of quercetin aglycone in the large intestine and enhance the bioavailability of quercetin glucoside in rats.

J. Agric Food Chem. 57, 9462-9468 (2009)

Matsumoto, M., Hara, H., Chiji, H., Kasai, T.

Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats.

J. Agric. Food Chem.52, 2226-2229 (2004)

増田俊哉、小山保夫、稲葉譲、戸井由紀子、荒田智裕、武田美雄、仲本勝男、国永秀樹、西里さおり、野中亮

沖縄産食薬用植物エタノール抽出物の抗酸化関連活性.

日本食品科学工学会誌 49, 652-661 (2002)

Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., Holub, B.J.

Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects.

J. Agric. Food Chem. 50, 7731-7737 (2002)

McDougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D.

Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α-amylase and α-glucosidase.

J. Agric. Food Chem. 53, 2760-66 (2005)

McGhie, T.K., Rowan, D.R., Edwards, P.J.

Structural identification of two major anthocyanin components of boysenberry by NMR spectroscopy.

J. Agric. Food Chem. 54, 8756-8761 (2006)

Meguro, S., Mizuno, T., Onizawa, K., Kawasaki, K., Nagagiri, H., Komine, Y., Suzuki, J., Matsui, Y., Hase, T., Tokimitsu, I., Shimasaki, H., Itakura, H.

Effects of tea catechins on diet-induced obesity in mice.

J. Oleo Sci. 50, 593-598 (2001)

Mineo, H., Hara, H., Shigematsu, H., Okuhara, Y., Tomita, F.

Melibiose, difructose anhydrid Ⅲ and difructose anhydride Ⅳ enhance net calcium absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions in vitro.

J. Nutr. 132, 3394-3399 (2002)

Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., Someya, K.

Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3, 5-diglucoside, into rats and humans.

J. Agric. Food Chem. 47, 1083-1091 (1999)

Mulabagal, V., Lang, G.A., DeWitt, D.L., Dalavoy, S.S., Nair, M.G.

Anthocyanin content, lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of sweet and sour cherries.

J. Agric. Food Chem. 57, 1239-1246 (2009)

仲佐輝子、竹中良、岡田夕子、沖中靖

ラットのパラコート誘発酸化ストレスに対するビルベリー(*Vaccinium myrtillus* L.)エキスの抑制効果.

日本食品科学工学会誌 53, 1-7 (2006)

Nagumo, Y., Han, J., Arimoto, M., Isoda, H., Tanaka, T.

Capsaicin induces cofilin dephosphorylation in human intestinal cells: the triggering role of cofilin in tight-junction signaling.

Biochem Biophys Res Commun. 355, 520-525 (2007)

Nagumo, Y., Han, J., Bellila, A., Isoda, H., Tanaka, T.

Cofilin mediates tight-junction opening by redistributing actin and tight-junction proteins.

Biochem Biophys Res Commun. 377, 921-925 (2008)

二木鋭雄、島崎弘幸、美濃真

抗酸化物質－フリーラジカルと生体防御－

学会出版センター（1997）

野口茜、守山明穂、峰尾茂、藤澤洋子、杉山まりか、坂口英

ボイセンベリー長期摂取がラットの脂質蓄積に及ぼす影響

日本栄養・食糧学会誌 64, 27-33 (2011)

Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., Voutilainen, S.

Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans.

J. Agric. Food Chem. 57, 2274-2281 (2009)

大田豊、船山誠、清野博威、佐見学、神田智正、庄治俊彦、大竹康之、長田恭一

リンゴポリフェノールによる易肥満性ラットの脂質代謝およびインスリン非依存性の改善.

日本食品科学工学会誌 54, 287-94 (2007)

沖智之、佐藤麻紀、吉永優、境哲文、菅原晃美、寺原典彦、須田郁夫

有色サツマイモの DPPH ラジカル消去能と ORAC（活性酸素吸収能）.

日本食品科学工学会誌 56, 655-659 (2009)

Palíková, I., heinrich, J., Bednář, P., Marhol, P., Křen, V., Cvak, L., Valentová, K., Růžička, F., Hola, V., Kolář, M., Šimánek, V., Ulrichová, J.

Constituents and antimicrobial properties of blue honeysuckle: A novel source for phenolic antioxidants.

J. Agric. Food Chem. 56, 11883-11889 (2008)

Palíková, I., Valentová, K., Oborná, I., Ulrichová, J.

protectivity of blue honeysuckle extract against oxidative human endothelial cells and rat hepatocyte damage.

J. Agric. Food Chem. 57, 6584-6589 (2009)

Qin, B., Anderson, R.A.

An extract of chokeberry attenuates weight gain and modulates insulin, adipogenic and inflammatory signaling pathways in epididymal adipose tissue of rats fed a fructose-rich diet.

Br. J. Nutr. 108, 581-587 (2012)

Oszmiański, J., Wojdyło, A.

Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity.

Eur. Food Res. Technol. 221, 809-813 (2005)

Queipo-Ortuño, M., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J.M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., Diaz, F.C., Andrés-Lacueva, C., Tinahones, F.J.

Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers.

Am J Clin Nutr. 295, 1323-1334 (2012)

Raudsepp, P., Anton, D., Roasto, M., Meremäe, K., Pedastsaar, P., Mäesaar, M., Raal, A., Laikoja, K., Püssa, T.

The antioxidative and antimicrobial properties of the blue honeysuckle(*Loniceracaerulea* L.), Siberian rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) and some other plants, compared to ascorbic acid and sodium nitrite.

Food Control 31, 129-135 (2013)

Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C.

AIN-93 perified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.

J. Nurt. 23, 1939-1951 (1993)

Rodriguez de Stillo, D. V., Hadley, M.

Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats.

J. Nutr Biochem. 13, 717-726 (2002)

Sasaki, R., Nishimura, N., Hoshino, H., Isa, Y., Kadowaki, M., Ichi, T., Tanaka, Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., Horio, F., Tsuda, T.

Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice.

Biochem Pharmacol. 74, 1619-1627 (2007)

佐藤明子、渡辺純、後藤真生、石川（高野）祐子

Oxygen radical absorbance capacity 法によるスモモの抗酸化活性評価.

日本食品科学工学会誌 57, 44-48 (2010)

Shih, P.H., Chan, Y.C., Liao, J.W., Yen, G.C.

Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry on senescence-accelerated mice and prevention of alzheimer's disease.

J. Nutr Biochem. 21, 598-605 (2010)

執行みさと、竹馬昂平、国武久登、小松春喜

日本原生キイチゴ属植物数種の育種素材としての評価.

園学研. 12, 335-342 (2013)

菅野友美、川村翔栄、原田栄津子、亀谷宏美、鵜飼光子、大澤俊彦

キノコ熱水抽出物の ESR スピントラップ法によるラジカル捕捉活性評価と ORAC 法.

日本食品科学工学会誌 60, 173-178 (2013)

Stanely, P., Prince, M., Sathya, B.

Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male wistar rats.

J. EJPHAR. 635, 142-148 (2010)

田中常雄、田中彰

ハスカップの品種・系統別化学成分含量と特性値.

日本食品科学工学会誌 45, 129-133 (1998)

Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J.L., Rémésy, C.

Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats.

J. Nutr. 133, 4178-4182 (2003)

Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.L., Rémésy, C.

Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats.

J. Nutr. 134, 2275-2279 (2004)

田辺賢一, 中村禎子, 奥恒行

難消化性オリゴ糖の性状の違いがラットの成長、高浸透圧性下痢誘発、脂質代謝、糞

便有害菌酵素活性ならびに短鎖脂肪酸産生に及ぼす影響.

日本食物繊維学会誌 12, 17-29 (2008)

Tosca, L. Zern, T. L., West, K. L, Fernandez, M. L.

Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta ovariectomized guinea pigs.

J. Nutr. 133, 2268-2272 (2003)

Tsuda, T., Horio, F., Osawa, T.

Dietary cyaniding 3-O-b-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats.

Lipids 33, 583-588 (1998)

Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., Osawa, T.

Dietary cyanidin 3-*O*-β-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice.

J. Nutr. 133, 2125-2130 (2003)

津田孝範、須田郁夫、津志田藤二郎

アントシアニンの科学―生理機能・製品開発への新展開―

建帛社 (2009)

Valcheva-Kuzmanova S, Borisova, P., Galunska, B., Krasnaliev, I., Belcheva, A.

Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats.

Exp Toxicol Pathol. 56, 195–201 (2004)

Vasantha Rupasighe, H.P., Yu, L., Bhullar, K.S. and Bors, B.

Haskap (*Lonicera caerulea*): A new berry crop with high antioxidant capacity.

Can. J. Plant Sci. 92, 1311-1317 (2012)

Vessal, M., Hemmti, M., Vasei, M.

Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats.

Comp. Biochem. Physiol.C. 135, 357-364 (2003)

Walgren, R. A., Lin, J. T., Kinne, R. K., Walle, T.

Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4 -beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 294, 837-843 (2000)

Wang, J., Kalt, W., Sporns, P.

Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis anthocyanins in highbush blueberries.

J. Agric. Food Chem. 48, 3330-3335 (2000)

Wang, Y., Zhang, Y., Wang, X., Liu, Y., Xia, M.

Supplementation with cyanidin-3-O-β-glucoside protects against hypercholesterolemia-mediated endothelial dysfunction and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.

J. Nutr. 142, 1033-1037 (2012)

渡辺純、沖智之、竹林純、山崎光司、津志田藤二郎

食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して.

化学と生物 47, 237-252 (2009)

Wolffram, S., Block, M., Ader, P.

Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine.

J. Nutr. 132, 630-635 (2002)

Wu, X., Cao, G., Prior, R.L.

Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry

or blueberry.

J. Nutr. 132, 1865-1871 (2002)

Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L.

Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common food in the united states.

J. Agric. Food Chem. 52, 4026-4037 (2004)

横田蘭

北海道に自生するスノキ属植物の栽培化と利用に関する研究.

北海道大学大学院　農学院　修士論文 (2011)

You, Q., Chen, F., Wang, X., Luo, P. G., Jiang, Y.

Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α-glucosidase and pancreatic lipase activities.

J. Agric. Food Chem. 59, 9506-9511 (2011)