

# 黒糖の抗ストレス作用と作用成分の解析

金城 由希子

2020

## 目次

第1章 緒論 .....	1
第2章 黒糖摂取がヒトの精神的ストレスに及ぼす影響	
2.1. 緒言 .....	7
2.2. 実験方法	
2.2.1. 被験者 .....	8
2.2.2. 精神的ストレス負荷 .....	9
2.2.3. 唾液中ストレスマーカーの測定 .....	9
2.2.4. 精神状態における主観的評価 .....	10
2.2.5. 黒糖試料 .....	11
2.2.6. HPLC を用いた黒糖試料の糖組成 .....	11
2.2.7. HPLC を用いた黒糖試料のアミノ酸の定量 .....	12
2.2.8. ストレス負荷試験スケジュール .....	12
2.2.9. 統計学的処理 .....	13
2.3. 結果および考察	
2.3.1. 黒糖摂取が唾液中ストレスマーカーに及ぼす影響 .....	14
2.3.2. 黒糖摂取が精神状態の主観的評価に及ぼす影響 .....	17
2.4. 小括 .....	20
第3章 黒糖摂取が急性ストレス負荷マウスのストレス反応に及ぼす影響と ストレス反応抑制作用に関与する黒糖中成分の特定	

第1節	黒糖および黒糖中成分の摂取が急性ストレス負荷マウスの血清中 ストレスホルモンに及ぼす影響	
3.1.1.	緒言.....	30
3.1.2.	実験方法	
3.1.2.1.	実験材料および試薬.....	31
3.1.2.2.	HPLC を用いた伊平屋島産黒糖の糖組成.....	32
3.1.2.3.	HPLC を用いた伊平屋島産黒糖のアミノ酸の定量.....	32
3.1.2.4.	黒糖中非糖類成分の抽出.....	32
3.1.2.5.	マウスを用いた急性ストレス負荷試験.....	33
3.1.2.6.	血清の調製.....	34
3.1.2.7.	血清中コルチコステロン濃度の測定.....	35
3.1.2.8.	血清中グルコース量の測定.....	35
3.1.2.9.	統計学的処理.....	35
3.1.3.	結果および考察	
3.1.3.1.	黒糖および黒糖中成分の投与がマウス体重および肝臓重量に及 ぼす影響.....	35
3.1.3.2.	黒糖および黒糖中成分の摂取がマウスにおける急性ストレス応 答に及ぼす影響.....	36
3.1.4.	小括.....	39
第2節	黒糖中非糖類成分 (NSC) 摂取が急性ストレス負荷マウスの血清中 ストレスホルモンおよび生体内抗酸化作用に及ぼす影響	
3.2.1.	緒言.....	47
3.2.2.	実験方法	

3.2.2.1.	試薬 .....	48
3.2.2.2.	NSC の分画 .....	48
3.2.2.3.	各 NSC 画分の総ポリフェノール含量の測定 .....	49
3.2.2.4.	ORAC 値の測定 .....	50
3.2.2.5.	ABTS ラジカル消去活性の測定 .....	51
3.2.2.6.	DPPH ラジカル消去活性の測定 .....	51
3.2.2.7.	マウスを用いた急性ストレス負荷試験 .....	51
3.2.2.8.	血清の調製 .....	53
3.2.2.9.	肝臓ホモジナイズ上清の調製 .....	53
3.2.2.10.	血清中コルチコステロン濃度の測定 .....	53
3.2.2.11.	肝臓中タンパク質量の測定 .....	53
3.2.2.12.	血清および肝臓中 ABTS ラジカル消去活性の測定 .....	54
3.2.2.13.	肝臓中 SOD 活性の測定 .....	54
3.2.2.14.	統計学的処理 .....	55
3.2.3.	結果	
3.2.3.1.	各 NSC 画分の総ポリフェノール含量および抗酸化活性 .....	55
3.2.3.2.	各 NSC 画分を摂取したマウス体重、平均摂餌量および肝臓重量 .....	56
3.2.3.3.	各 NSC 画分を摂取したストレス負荷マウス血清中コルチコステロン濃度 .....	56
3.2.3.4.	各 NSC 画分を摂取したストレス負荷マウス血清および肝臓中 ABTS ラジカル消去活性 .....	56

3.2.3.5.	各 NSC 画分を摂取したストレス負荷マウス肝臓中 SOD 活性..	57
3.2.4.	考察.....	57
3.2.5.	小括.....	61
第 4 章	黒糖中フェノール化合物の検出と黒糖中非糖類成分 (NSC) および フェノール化合物の摂取が慢性ストレス反応に及ぼす影響	
第 1 節	黒糖の抗ストレス作用に關与する黒糖中フェノール化合物の検出	
4.1.1.	緒言.....	69
4.1.2.	実験方法	
4.1.2.1.	試薬 .....	70
4.1.2.2.	50%MeOH 抽出 NSC 画分の分画 .....	70
4.1.2.3.	総ポリフェノール含量の測定.....	71
4.1.2.4.	DPPH ラジカル消去活性の測定 .....	71
4.1.2.5.	HPLC を用いた成分分析.....	71
4.1.3.	結果および考察.....	71
4.1.4.	小括.....	74
第 2 節	黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷し た高脂肪食給与マウスのストレスホルモンと脂質状態に及ぼす影響	
4.2.1.	緒言.....	79
4.2.2.	実験方法	

4.2.2.1.	試薬 .....	81
4.2.2.2.	ABTS ラジカル消去活性の測定 .....	81
4.2.2.3.	ORAC 値の測定.....	81
4.2.2.4	LC-MS を用いた NSC 画分中 HAP および HBA の定量 .....	81
4.2.2.5.	高脂肪食給与マウスにおける慢性ストレス負荷試験 .....	82
4.2.2.6.	血清の調製 .....	83
4.2.2.7.	肝臓ホモジナイズ上清の調製.....	83
4.2.2.8.	血清中コルチコステロン濃度の測定 .....	83
4.2.2.9.	肝臓中タンパク質量の測定 .....	83
4.2.2.10.	肝臓中トリグリセリドおよび総コレステロール量の測定.....	84
4.2.2.11.	肝臓中マロンジアルデヒド量の測定 .....	84
4.2.2.12.	統計学的処理.....	84
4.2.3.	結果および考察	
4.2.3.1.	黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスのストレスホルモンに及ぼす影響.....	85
4.2.3.2.	黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスの体重、摂取エネルギーおよび脂肪組織量に及ぼす影響.....	87
4.2.3.3.	黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスの肝臓の脂肪蓄積に及ぼす影響.....	88
4.2.3.4.	黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスの肝臓中脂肪の過酸化に及ぼす影響 .....	90
4.2.4.	小括.....	92

第 5 章 総括.....	100
謝辞.....	104
参考文献.....	105

## 第1章

### 緒論

近年、人々は、日常生活の中でストレスを感じる場面が多くなっている。ストレスとは、元々「物体に圧力を加えることで生じる歪み」を意味する物理学の用語であった。Selye (1936) は、寒さ、暑さ、有害な薬品などの様々な外的刺激が①副腎皮質の肥大、②胸腺・リンパ節・脾臓の萎縮、③十二指腸の出血と潰瘍化の3症候を示すことを見出した。これら生体が示す非特異的反応の総称として「ストレス」と定義し、またその反応を引き起こす外的刺激をストレッサーと呼んだ。現在では、ストレスが内分泌系 (hypothalamic-pituitary-adrenal : HPA 軸) や交感神経系 (sympathetic-adrenal-medullary : SAM 軸) の調節系を活性化することが明らかとなっており、ストレッサーは視床下部を經由して、ストレスホルモンや神経伝達物質を分泌することで、心拍数の増加、血圧や血糖上昇などの反応を起こすことも分かっている (Selye, 1950 and 1976) (Fig. 1-1)。本来、生体が示すストレス反応は、ストレッサーに対する生体の防御機構として必要不可欠である。しかし、過剰なストレスは、生体の恒常性に影響を与え、うつ病や認知障害のような精神障害、腫瘍形成、心血管障害や中枢神経系の神経変性など、様々な疾患の病因に直接および間接的に関係することが明らかとなっている (Chiba *et al.*, 2012; Papadopoulos and Cleare, 2012; Steptoe and Kivimaki, 2012)。さらに、ストレスは生体内のエネルギー必要量を増加させることによって、反応性の高い活性酸素種 (ROS) 量も増大させる。過剰な ROS の発生は、タンパク質のカルボキシル化、DNA 損傷や脂質の過酸化を引き起こし、老化、がん、アルツハイ

マー病やパーキンソン病などの慢性的な健康問題を引き起こすことも報告されている (Boyd and McGuire, 1991; Collins, 1999; Floyd, 1999)。また、慢性的な酸化ストレスは、非アルコール性脂肪肝疾患の病因や悪化にも深く関わる (Younossi *et al.*, 2018)。このようなストレス関連疾患は、現代人にとって生命に関わる病気であり、その予防や改善は極めて重要である。そこで、ストレス関連疾患の予防策の一つに、生体内で生理活性を示す成分の摂取が有効とされている。例えば、フラボノイド配糖体やテルペノイド類を主要成分とするイチョウ (*Ginkgo biloba* L.) の葉エキスの投与は、150 分間または 7 日間の拘束による急性および慢性ストレス負荷マウスのストレスホルモン分泌や血糖上昇を抑制することが見出されている (Rai *et al.*, 2003)。また、ハーブの 1 つであり、ヒペリシンやヒペルフォリンを含有するセントジョーンズワート (*Hypericum perforatum* L.) は、セロトニンやドーパミンの再取り込みを阻害することで、ストレスが原因となるうつ様症状を緩和する働きをもつことが報告されている (Müller, 2003)。このことから、植物由来の抗ストレス食品の利用は、健康的な生活の手助けになることが期待される。

一方で、セントジョーンズワートやイチョウの葉エキスのような植物由来の抗ストレス食品は、日常生活の中で気軽に入手しがたい。そこで、我々は、抗ストレス食品となり得る身近な食材として、沖縄の特産品である黒糖に注目した。黒糖は、サトウキビ (*Saccharum officinarum* L.) 搾汁液をそのまま加熱濃縮し、水分を蒸発することによって製造される含蜜糖である。黒糖はこれまで、血清コレステロール上昇抑制作用や血糖上昇抑制作用などの機能が報告されている (Henry, 1968; Ishibashi *et al.*, 1992)。黒糖は、糖類に加えて  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)

をはじめとするアミノ酸、ミネラル、ポリコサノール類やフェノール化合物などのサトウキビ由来成分を豊富に含んでおり（和田ら、2011; Asikin *et al.*, 2012; 広瀬ら、2015）、いくつかの黒糖中成分は、抗ストレス作用に関連している。例えば、糖類は、生体内の分解酵素によってグルコースに分解される。このグルコースが血液によって脳に運ばれてエネルギー源となり、気分状態の改善やストレスの軽減がもたらされる可能性が示唆されている（上西ら、2004; 内藤・坂元、2005）。アミノ酸である GABA は、抗ストレス効果に加えて、心理的ストレス状態の緩和による睡眠の質向上効果も報告されている（Yoto *et al.*, 2012; Yamatsu *et al.*, 2015）。さらに、黒糖に含まれるフェノール化合物は、抗酸化活性や LDL 酸化阻害活性が報告されている（Takara *et al.*, 2002; Kurosawa *et al.*, 2005）。現在、登録されている機能性表示食品の中で「ストレス軽減」として登録されている成分には、抗酸化成分が多いことから（阿部、2019）、抗酸化成分によるストレス軽減も期待される。このように、黒糖には抗ストレス作用に関連のある成分を含んでいるが、これまで黒糖の抗ストレス作用に関する報告はほとんどなかった。

そこで、本研究では、黒糖の抗ストレス作用を検討するため、ヒトを対象にストレス負荷試験を行い、黒糖摂取が唾液中ストレスマーカーおよび主観的な精神状態にどのような影響を与えるか検証した。また、マウスを用いて黒糖中成分の投与を伴う急性および慢性ストレス負荷試験を行い、生体内ストレスマーカーに及ぼす影響を調べるとともに、黒糖の成分分析を行い、解析することで黒糖中の抗ストレス作用成分の特定を試みた。

まず、第2章では、ヒトを対象に精神的ストレス負荷試験を実施し、黒糖摂取による唾液中ストレスマーカーの変動を調べるとともに、精神状態をはかるア

ンケート調査を行うことで、黒糖摂取が精神的ストレスに及ぼす影響を生化学的および心理学的に評価した。さらに、ストレス負荷前および後に摂取した場合の 2 パターンの摂取時間を設けることで、精神的ストレス負荷に対して影響を与える黒糖摂取のタイミングに関する検証も行った。

次に、抗ストレス作用に関わる黒糖中成分を特定するため、第 3 章第 1 節では、抗ストレス作用が期待される黒糖中成分を経口投与した BALB/c マウスに急性ストレス負荷試験を実施し、マウスの血清中ストレスホルモン濃度およびグルコース量を測定した。次いで、第 1 節の結果から黒糖の抗ストレス作用には、黒糖の糖類以外の成分、非糖類成分 (NSC) が関係していることを見出したため、第 2 節では異なる濃度のメタノール (MeOH) で抽出した 4 種の NSC 画分を用いて、*in vitro* 試験における総ポリフェノール含量および抗酸化活性の測定に加え、急性ストレス負荷マウスの血清中ストレスホルモン濃度および生体内抗酸化活性を測定し、評価した。

第 3 章では、4 種の NSC 画分のうち、50%MeOH で抽出した NSC 画分が抗ストレス作用を顕著に示したことから、第 4 章では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてこの画分の成分分析を行い、黒糖の抗ストレス作用に関与する成分の検出を行った。さらに、黒糖を日常的に摂取することを想定すると、長期投与した場合の抗ストレス作用についても検証の必要があると考えられる。このことから、高脂肪食を伴った慢性ストレス負荷マウスに、検出されたフェノール化合物 2 種を投与試料に用いて、慢性ストレス負荷試験を行い、マウスの血清中ストレスホルモン濃度を測定した。さらに、過剰な栄養摂取下における長期的なストレス暴露は、脂肪肝疾患を含む代謝障害のリスクの増加と関連する

ことも報告されていることから (Ryan, 2014; Cheng *et al.*, 2017)、ストレス負荷マウスの肝臓における脂質状態を調べ、評価した。

以上のように、本研究では、ストレス負荷試験により、黒糖の抗ストレス作用について評価するとともに、生体内ストレスマーカーに及ぼす影響および黒糖中成分分析を行うことで黒糖中の抗ストレス作用成分に対して解析を行い、特定を試みた。

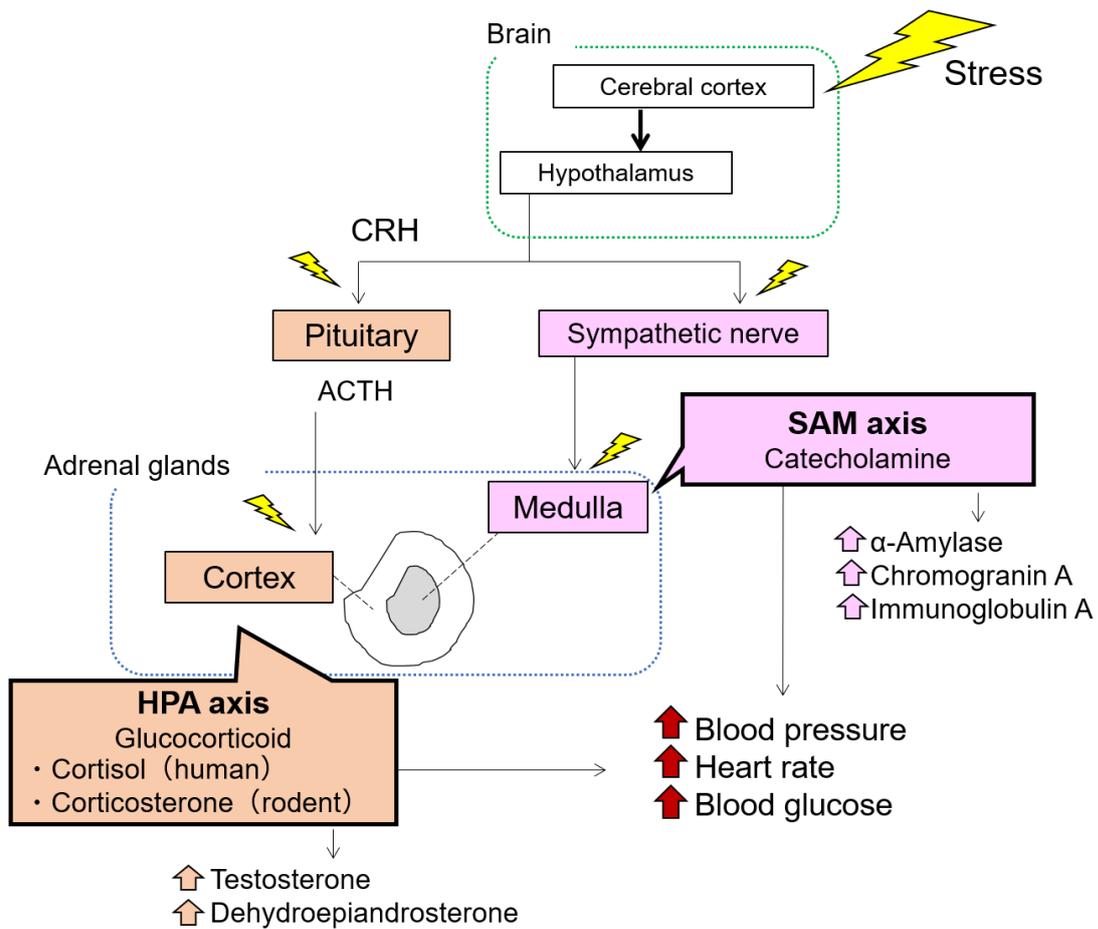


Fig. 1-1 Stress mechanism.

Various stressors are acting through the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA)-axis and the sympathetic-adrenal-medullary (SAM)-axis.

CRH = corticotropin-releasing hormone; ACTH = adrenocorticotropic hormone

## 第2章

### 黒糖摂取がヒトの精神的ストレスに及ぼす影響

#### 2.1. 緒言

ヒトがストレスを受けると、脳から視床下部—脳下垂体—副腎皮質へと刺激が伝わる内分泌系（hypothalamic-pituitary-adrenal：HPA 軸）と視床下部—交感神経系—副腎髄質へと反応が伝わる交感神経系（sympathetic-adrenal-medullary：SAM 軸）が活性化する（Fig. 1-1）。HPA 軸が活性化すると、体が動かなくなり、行動意欲が減退する「すくみ反応」が現れる。SAM 軸が活性化すると、血圧上昇や発汗が起き、恐れと怒り感情が混合して生じる「逃走または闘争反応」と呼ばれる行動制御が現れる。この HPA 軸および SAM 軸の活性を調べる方法として、各反応系を反映する生理活性物質（ストレスマーカー）の測定がある。HPA 軸の活性を反映する物質としては、肝臓の糖新生や筋肉のタンパク質代謝を促進する副腎皮質ホルモンの「コルチゾール」、性ホルモンの源となる「デヒドロエピアンドロステロン」および男性ホルモンの「テストステロン」などがある。SAM 軸の活性を反映する物質としては、グリコシド結合を加水分解する消化酵素の「 $\alpha$ -アミラーゼ」、副腎髄質から分離された糖タンパク質であり、カテコールアミンと共存する「クロモグラニン A」および抗体の一種で、粘膜表面に分泌される「分泌型免疫グロブリン A」などがある。これらは、ストレス負荷方法によって変動があるが、急性ストレスに対して増加を示すという報告がある（山口、2007）。このようなストレスマーカーは、血漿や唾液腺を經由して唾液へと

移行することから、最近のストレス研究では唾液を利用してストレスマーカーを定量し、生体の急性ストレス応答を生化学的に評価する（田中・脇田、2011）。加えて、ヒトを対象としたストレス研究では、個人が感じるストレスを主観的レベルでとりあげる精神的ストレス評価法も多用されている。この主観的評定によるストレスの測定は、質問用紙への回答を求めることにより、簡単かつ迅速にその測定値を得ることができる。

本章では、黒糖摂取がヒトの精神的ストレスに及ぼす影響について調べるため、ヒトを対象として精神的ストレス負荷試験を実施し、唾液中ストレスマーカーの定量による生化学的評価および質問紙法を用いた主観的評価を行うとともに、ストレス負荷前に黒糖を摂取した場合を「ストレス緩和効果」、ストレス負荷後に黒糖を摂取した場合を「リラックス効果」として評価し、黒糖の抗ストレス作用について検証した。

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 被験者

ストレス負荷試験の被験者は試験内容の説明を受け、同意した 22～39 歳の計 13 名（男性 4 名、女性 9 名）とした。心理学的評価は 13 名、生化学的評価はその内の 11 名の唾液を用いて実施した。書面にて実験の概要と個人情報保護について説明したうえで、了解を得られたものに承諾書の署名を求めた。被験者には試験開始 1 時間以内に飲食および口腔清掃を行わないよう指示した。また、ストレス負荷試験中に体調などに異常を感じたときには被験者自らの判断で直ちに申し出るよう指示した。本研究では、研究計画書を琉球大学臨

床研究倫理委員会の承認（疫学研究倫理審査番号：29）を得て、実施した。

### 2.2.2. 精神的ストレス負荷

被験者は、内田クレペリン検査紙（株日本・精神技術研究所、東京）に準ずる計算負荷が課された。内田クレペリン検査は、羅列した隣り合った数字を加算していき、答えの一桁の数字だけを書き込む方法である。この検査は心理的ストレスを与える課題として、長年にわたり広く用いられている（Sumiyoshi *et al.*, 1998）。被験者は、できるだけ早く正確に計算を行うように指示され、15分間の計算作業を実行した。

### 2.2.3. 唾液中ストレスマーカーの測定

被験者からの唾液は、唾液試料採取用器具（Saliva collection aid、Salimetrics社）を用いて採取した。被験者は、チューブとつながったポリプロピレン製のストローに口をつけ、5分間で約1 mLの唾液をチューブに集めた。採取した唾液は、実験終了まで氷上で保管した。実験終了後、唾液の入ったチューブを遠心（16,000 g、5分間、25°C）し、上清を滅菌したマイクロチューブに小分けして測定まで冷凍庫（-30°C）にて保存した。13人の被験者の内2人の被験者は唾液の分泌量が少なく、唾液サンプルを得ることはできなかった。唾液中のストレスマーカーは市販のキットを用い、それぞれ説明書に従って定量した。唾液中コルチゾール（Cort）、デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）、テストステロン（TS）、 $\alpha$ -アミラーゼ（Amy）、分泌型免疫グロブリンA（Ig-A）は、Salivary EIA Kit（SALIMETRICS社製、USA）を使用した。唾液中

クロモグラニン A (CgA) は、クロモグラニン A 測定 EIA キット (矢内原研究所、静岡) を使用して、定量した。唾液中ストレスマーカーは、唾液摂取ごとに平均値を算出し、各ストレスマーカーの初期値を 100% とした相対値 (%) に換算した。

#### 2.2.4. 精神状態における主観的評価

気分状態の主観的評価として、Visual Analog Scale (VAS) および Profile of Mood States (POMS) を用いた。VAS は、一過性のストレスを主観的な感情の変化に着目して、簡易的に評価することができる。この VAS は、白紙に 100 mm の線を引き、直線の左端を最小値、右端を最大値とした時に現在被験者が感じる位置に線を引いて示す方法である (Aitken, 1969) (Fig. 2-1)。今回は、最小値をストレス無し、最大値をこれまで想像できる最大のストレス値と設定し、被験者自身が直感的に現在感じるストレス度合いを直線に線引きし、最小値から線引きした所までの線の長さをストレス値として評価した。

POMS は数十項目で構成される気分を評価する質問紙法の一つで、被験者がおかれる条件により変化する一時的な気分、感情状態を 6 つの尺度で測定することができる (Welsh *et al.*, 2002)。今回は、日本語版 POMS 短縮版 (30 項目) より本試験に適した 24 項目の質問から、緊張および不安感を示す「緊張」、自信喪失感を伴った抑うつ感を示す「抑うつ」、意欲や活力の低下・疲労感を示す「疲労」、思考力低下・当惑を示す「混乱」、敵意などの「怒り」の 5 つのネガティブな感情気分に加え、元気さや活力を示し、ポジティブな感情の「活力」の 6 つの気分尺度を評価した (Fig. 2-2)。各質問における気分尺度は、「緊

張」が質問番号 1・6・12・15・18、「抑うつ」が質問番号 7・11・14・19、「疲労」が質問番号 3・13・17・20・21、「混乱」が質問番号 5・16・22、「怒り」が質問番号 2・9、「活力」が質問番号 4・8・10・23・24 に該当する。「まったくなかった」(0点)から「非常に多くあった」(4点)までの5段階評価を行い(質問番号 22 のみ反対の得点設定)、尺度毎に合計得点(粗得点)を算出して、標準化得点(T得点)に換算した。T得点の計算は、次式を用いて行った。

$$T \text{ 得点} = 50 + 10 \times (\text{粗得点} - \text{平均点}) / \text{標準偏差}$$

#### 2.2.5. 黒糖試料

黒糖試料は、市販の沖縄県多良間島産黒糖((株)黒糖本舗垣乃花、沖縄)を用いた。黒糖は、ミキサーを用いて粉末化した後、10%水溶液になるように純水で溶解した。被験者は、調製した10%黒糖水溶液を50 mL(黒糖5 g相当量)飲用した。

#### 2.2.6. HPLC を用いた黒糖試料の糖組成

分析対象となる黒糖試料中の糖類は、D (+) スクロース、D (+) グルコースおよび D (-) フルクトースとした。移動相 200 mM NaOH を調整・脱気し、カラム CarboPac PA1 (10  $\mu$ m $\times$ 4 mm $\times$ 250 mm)、ガードカラム CarboPac PA1 (4 mm $\times$ 50 mm)、検出器 ED40 を備えた HPLC (LC20 Chromatography Endosure) にて分析を行った。シリンジで HPLC に試料及び標準液を 10  $\mu$ L 注入し、移動相の流量は 1 分あたり 1 mL で行った。D (+) グルコースおよび D (-) フルクトースはピークの高さ、D (+) スクロースはピーク面積値を

基に、各糖は黒糖 100 g あたりの平均含量 (g) で算出した。測定は 3 回ずつ (n=3) 行った。

#### 2.2.7. HPLC を用いた黒糖試料のアミノ酸の定量

黒糖のアミノ酸分析は、沖縄県農業研究センター内にて、オートサンプラ (SIL-30AC Nexera 島津製作所) による自動プレカラム誘導体化アミノ酸 HPLC 分析を手引きに従って、以下の条件で行った。カラムは YMC Triart C18 1.9  $\mu\text{m}$  (3.0 mm I.D.  $\times$  75 mmL)、カラム温度は 35°C、検出器は RF-20Axs (検出波長は Ex : 266 nm、Em : 450 nm)、黒糖試料およびアミノ酸混合標準溶液 (250  $\mu\text{mol/L}$ ) の注入量は 1  $\mu\text{L}$ 、流量は 1 分あたり 0.8 mL で行った。移動相 A は 20 mmol/L リン酸 (カリウム) 緩衝液 (pH 6.5)、移動相 B はアセトニトリル / メタノール / 水=45 / 40 / 15 を使用し、移動相の初期 B 濃度は 11% とした。測定は 3 回ずつ (n=3) 行い、各アミノ酸は、黒糖 100 g あたりの平均含量 (mg) で算出した。

#### 2.2.8. ストレス負荷試験スケジュール

ストレス負荷試験のスケジュールを Fig. 2-3 に示した。被験者は、ストレス負荷のみを与えた場合 (control 試験) に加え、黒糖溶液をストレス負荷直前に摂取した場合 (pre-intake 試験) および黒糖溶液をストレス負荷直後に摂取した場合 (post-intake 試験) の計 3 回 (1 回につき約 2 時間) のストレス負荷試験に参加した。ストレス負荷に対して被験者の「慣れ」が生じないように、各試験は 5 日以上間隔を空けて実施した。被験者は、ストレス負荷前において 40

分間の安静期を設けた。次いで、15 分間の内田クレペリン検査を受けた後、60 分間の回復期を設けた。安静期および回復期は、常に座位状態でリラックスするように指示した。Pre-intake 試験および post-intake 試験での被験者は、黒糖溶液 50 mL をストレス負荷 1 分前またはストレス負荷 5 分後に摂取し、口腔内に黒糖が残らないよう水 50 mL を飲用した。Control 試験での被験者は、黒糖溶液の代わりに水 50 mL を飲用した。唾液摂取は、安静期に 2 回（試験開始 20 分および 35 分後）、回復期に 4 回（試験開始 55 分、75 分、95 分および 115 分後）の計 6 回行った。主観的評価として VAS は、唾液摂取時と同じタイミングで計 6 回（試験開始 20 分、35 分、55 分、75 分、95 分および 115 分後）行い、POMS は計 3 回（試験開始 20 分、55 分および 115 分後）実施した。

#### 2.2.9. 統計学的処理

結果は全て平均値±標準偏差で表した。統計処理は、統計解析ソフトエクセル統計 2010（株式会社社会情報サービス、東京）を用いて行った。唾液中ストレスマーカーの各平均値の有意差検定は、安静期および回復期の各ストレスマーカーの初期値（相対値 100%として）と比較し、Dunnnett の多重比較検定を用いた。検定の結果は、初期値と比較して  $P < 0.05$  または  $P < 0.01$  の場合を有意差ありと判定した。主観的評価（VAS および POMS）の各平均値の有意差検定は、control 試験時の値と pre-intake 試験および post-intake 試験時の値の差を比較し、 $t$  検定を用いた。検定の結果は、control 試験時の値と比較して  $P < 0.05$  または  $P < 0.01$  の場合を有意差ありと判定した。

## 2.3. 結果および考察

### 2.3.1. 黒糖摂取が唾液中ストレスマーカーに及ぼす影響

Control 試験および pre-intake 試験における唾液中ストレスマーカー値の変動を Fig. 2-4 に示した。Control 試験において、ストレス負荷直後（試験開始 55 分後）の唾液中ストレスマーカー値は、全て初期値と比較して高い値を示した。特に、SAM 軸を反映する CgA、Amy および Ig-A の相対値は、160%以上まで増加した。HPA 軸を反映する Cort、DHEA および TS の相対値でも増加（約 105~130%）したが、増加率は SAM 軸を反映するストレスマーカーと比べて小さかった。これらの結果から、本試験における 15 分間の内田クレペリン検査は、SAM 軸および HPA 軸どちらのストレス経路も活性化し、特に SAM 軸に影響を与えることが示唆された。一方、pre-intake 試験における全ての唾液中ストレスマーカー値は、control 試験時と比べて、全体的に低い値を示した。特に、ストレス負荷直後における唾液中 Amy の分泌は、ストレス負荷前の黒糖摂取によって有意に ( $P < 0.05$ ) 抑制された。したがって、ストレス負荷前の黒糖摂取は、短時間でストレス負荷による SAM 軸および HPA 軸の活性に影響を与えたことから、精神的ストレスに対して抑制効果があること示唆された。ただし、ストレス負荷直後の Cort 分泌だけは、抑制効果が見られなかった。

対照的に、control 試験および post-intake 試験における回復期の唾液中 Cort、TS、CgA および Amy の値は、それぞれの初期値と比較して大きな差は見られなかった (Fig. 2-5)。むしろ、post-intake 試験における回復期の唾液中 DHEA 値は、ストレス負荷から 40 分後まで変化はなかったが、ストレス負荷 60 分

後において初期値と比較して有意な ( $P < 0.05$ ) 増加を示し、control 試験時と比べて高い値を示した。Post-intake 試験における回復期の唾液中 IgA 値は、ストレス負荷 20 分後に初期値と比較して有意に ( $P < 0.05$ ) 低値を示し、ストレス負荷 40 分後も control 試験時と比べて低い値を示していたが、ストレス負荷 60 分後には control 試験時と同程度となった。この post-intake 試験における DHEA および IgA 値の変動については不明である。これらの結果から、ストレス負荷後の黒糖摂取は、ヒトにおけるストレスに対して何らかの影響を与えるが、ヒトの精神的ストレスに対する抑制効果はあまり期待できないと考えられた。

まず、ストレス負荷前の黒糖摂取が、唾液中ストレスマーカーの分泌に影響を与えた黒糖中成分として、糖類および GABA が挙げられた。黒糖には、約 90%の糖類が含まれており、その中でもスクロースが約 88%を占め、残りはグルコースおよびフルクトースとなっている (Table 2-1)。黒糖を摂取した後、体内においてスクロースが分解されて血中グルコース量が増加する。グルコースは、脳の主要なエネルギー源であり、認知機能に関わる神経活動の活発化や認知的要求は、脳におけるグルコース利用の増加に関連していることが示唆されている (Benton *et al.*, 1996)。さらに、グルコースは、血漿中セロトニンを増加させる。セロトニンは、脳内の神経伝達物質のひとつであり、快楽や興奮、不安や怒りを司るノルアドレナリンやドーパミンの働きを制御し、精神を安定させる働きをもつ。セロトニン分泌は、HPA 軸および SAM 軸におけるストレス反応に影響を与えることが確認されている (Fuller, 1981; Cryan and Leonard, 2000; Maninger *et al.*, 2009)。以上のことから、黒糖中糖類が唾液中ス

トレスマーカーの分泌に影響を与えた可能性がある。一方で、糖類によるこれらの作用は、血糖値の上昇と下降の速度および度合いに依存すると考えられる。Benton ら (2003) の研究では、ヒトやラットの学習能力は、食後血糖値の上昇度が高い食品の摂取に比べて、食後血糖値の上昇度が低い食品の摂取後 120~220 分に向上したことが明らかとなっている。他の研究でも、血中グルコース値が平常に戻った時、糖質豊富な食品を摂取した 120~220 分後にその性能の向上が見られた (Markus, 2003)。本試験における pre-intake 試験では、黒糖摂取 15 分後という比較的短時間で、ストレス抑制効果が現れており、血中グルコース値と効果が現れる時間関係が、Benton らや Markus の報告と一致していないことから、本試験の結果は、他のメカニズムに寄与している可能性が示唆された。

GABA は中枢神経系に大きく関わることが知られている。動物実験における GABA の投与は、血中成長ホルモン濃度を増加し、脳のタンパク質合成速度を速め、記憶や学習能力のような脳機能を向上し、自然発症性高血圧症の血圧速度を低下することが分かっている (Yamakoshi *et al.*, 2007; Tujioka *et al.*, 2009)。また、ヒトの中枢神経系活動に対する GABA 摂取の効果も、多く報告されている。藤林ら (2008) の研究では、30 mg の GABA 摂取は、中枢神経系および副交感神経系の全体的な活動を増進し、リラクゼーション効果を誘発した。また、Nakamura ら (2009) の研究では、ストレス負荷を与える 15 分前に、GABA (28 mg) を含むチョコレート摂取させ、15 分間の計算作業によるストレスを負荷し、心拍変動 (HRV) および唾液中 CgA 量を測定してストレスに対する効果を評価した結果、GABA を含むチョコレート摂取は、スト

レス負荷によって上昇した HRV を素早く通常値まで戻し、唾液中 CgA 濃度の増加も抑制した。これにより、GABA にはストレス抑制効果があることが示唆された。しかし、本試験で用いた黒糖 100 g に含まれる GABA 量は、3.5 mg であった (Table 2-1)。本試験では黒糖 5 g の摂取であったため、GABA の摂取量は約 0.175 mg しかなく、他の研究と比べてかなり少量となることから、pre-intake 試験で見られた黒糖のストレス抑制効果は、GABA だけに起因するものではないと考えられた。したがって、唾液中ストレスマーカー軽減作用は、糖類、GABA だけではなく、それ以外の黒糖中成分の関与が示唆された。

### 2.3.2. 黒糖摂取が精神状態の主観的評価に及ぼす影響

ストレスに対する黒糖摂取の影響を被験者が主観的に評価するため、被験者の精神状態を VAS および POMS を用いて調べた。Fig. 2-6 には、13 人の被験者の VAS 値の変動を示した。Control 試験における被験者の VAS 値はストレス負荷後、急激に増加し、60 分間かけて初期値まで減少した。一方、pre-intake 試験におけるストレス負荷直後および回復期の VAS 値は、control 試験時と比較して有意に ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ) 低い値を示した (Fig. 2-6A)。一方で、post-intake 試験における VAS 値は、全体を通して control 試験時の VAS 値と有意差はみられなかった (Fig. 2-6B)。

同様に、pre-intake 試験におけるストレス負荷直後の「抑うつ」および「混乱」気分の POMS スコアは、control 試験時と比較して、有意に ( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ) 低い値を示した (Fig. 2-7)。また、pre-intake 試験におけるストレス負荷 60 分後の「活気」気分の POMS スコアは、control 試験時と比較して、高い

値を示した。一方で、**post-intake** 試験では、「疲労」気分を除く全ての POMS スコアにおいて、**control** 試験時と大きな違いは見られなかった (Fig. 2-8)。

POMS スコアの結果から、ストレス負荷前の黒糖摂取は、精神的ストレスによる「緊張」、「抑うつ」、「疲労」および「混乱」のようなネガティブな感情を緩和し、ストレス負荷による「活力」の低下を抑制する傾向が見られた。しかし、ストレス負荷後の黒糖摂取には、このような傾向は見られなかった。最近の研究では、唾液中ストレスマーカーの分泌による生化学的評価と VAS や POMS を用いた精神状態の主観的評価の間に相関があることが分かっている。例えば、健康的な被験者の唾液中 Cort 値は、社会的ストレス試験後に明らかに増加した。この増加は、ネガティブ感情を示す VAS 値の増加と関連し、その後は VAS 値の減少とともに唾液中 Cort 値も徐々に低下した (Izawa *et al.*, 2013)。

さらに、内田クレペリン検査によってストレスに暴露された健康的な被験者は、GABA の摂取によって、「緊張」、「抑うつ」、「怒り」および「疲労」気分を示す POMS スコアおよび VAS 値とともに、唾液中 CgA 値も有意に減少した。同様に、本試験の結果でも、**pre-intake** 試験および **post-intake** 試験における唾液中 DHEA、TS、CgA、Amy および IgA 値の変動と VAS 値および POMS スコア結果を比較すると、どちらも、**pre-intake** 試験結果の方が **post-intake** 試験結果よりもストレス抑制効果を示した。

したがって、本実験において、ストレス負荷前における 5g の黒糖摂取は、HPA 軸を反映する唾液中 DHEA および TS の分泌を抑制するとともに、SAM 軸を反映する唾液中 CgA、Amy および IgA の分泌も抑制した。さらに、主観的評価から、「緊張」、「抑うつ」、「疲労」および「混乱」気分を緩和し、「活力」

気分を向上させることが示唆された。このことから、黒糖摂取はヒトにおける精神的ストレスをポジティブに変化する可能性が示唆されるとともに、HPA軸およびSAM軸のストレス反応系、どちらにも作用する可能性が示唆された。また、生化学的および主観的評価ともにストレス負荷後の黒糖摂取よりも、ストレス負荷前の黒糖摂取黒糖の方がストレス抑制効果を示したことから、ストレスに対する黒糖摂取は、「リラックス効果」よりも「ストレス緩和効果」として摂取する方がより効果が得られる可能性が示唆された。一方で、この抗ストレス作用に関与する黒糖中成分の特定できなかつたため、今後、黒糖中の糖類、GABAに加えて、糖類以外の成分のストレス抑制効果を調べる必要があると考えられた。

## 2.4. 小括

本章では、ヒトを対象として、黒糖摂取の精神的ストレスに及ぼす影響について検証した。唾液中ストレスマーカーの測定では、クレペリン検査によるストレス負荷前に5gの黒糖を摂取した場合、コントロールと比較して、唾液中ストレスマーカー（HPA軸を反映するデヒドロエピアンドロステロンおよびテストステロン、SAM軸を反映する $\alpha$ -アミラーゼ、クロモグラニンAおよび分泌型免疫グロブリン）の分泌が抑制された。一方、ストレス負荷後の黒糖摂取では、その分泌抑制作用は示さなかった。また、主観的評価として、ストレス負荷前に黒糖を摂取した場合、コントロールと比較して、VAS値の低下を示し、POMSにおいても、5種類のネガティブ因子（緊張、抑うつ、疲労、混乱および怒り）が、低い値を示すとともに、ポジティブ因子（活力）については高い値を示した。しかし、ストレス負荷後に黒糖を摂取した場合は、VASおよびPOMSの値にコントロールとの違いが認められなかった。したがって、ストレスに対する黒糖摂取は、ストレス負荷前の黒糖摂取による「ストレス緩和効果」が得られ、ストレス負荷後の黒糖摂取による「リラックス効果」はあまり期待できない可能性が示唆された。また、ストレス負荷前の黒糖摂取は、HPA軸活性による「すくみ反応」およびSAM軸活性による「闘争・逃走反応」の行動制御に影響を与えるとともに、ヒトにおける精神的ストレスをポジティブに変化する可能性が示唆された。

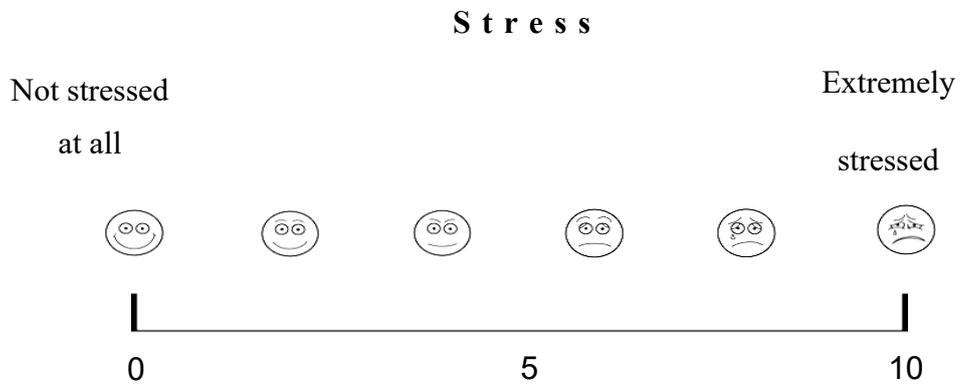


Fig. 2-1 Visual Analog Scale (VAS) evaluation.

回答欄	まったくなかった	少しあった	まあまああった	かなりあった	非常に多くあった
	0	1	2	3	4
1 気がはりつめる					
2 怒る					
3 ぐったりする					
4 生き生きする					
5 頭が混乱する					
6 落ち着かない					
7 悲しい					
8 積極的な気分だ					
9 ふきげんだ					
10 精力がみなぎる					
11 自分はほめられるに値しないと感じる					
12 不安だ					
13 疲れた					
14 がっかりしてやる気をなくす					
15 緊張する					
16 考えがまとまらない					
17 へとへとだ					
18 あれこれ心配だ					
19 気持ちが沈んで暗い					
20 だるい					
21 うんざりだ					
22 物事がてきぱきできる気がする					
23 元気がいっぱいだ					
24 活気がわいてくる					

Fig. 2-2 Questionnaire created based on a shortened version of the Profile of Mood States (POMS)<sup>TM</sup>.

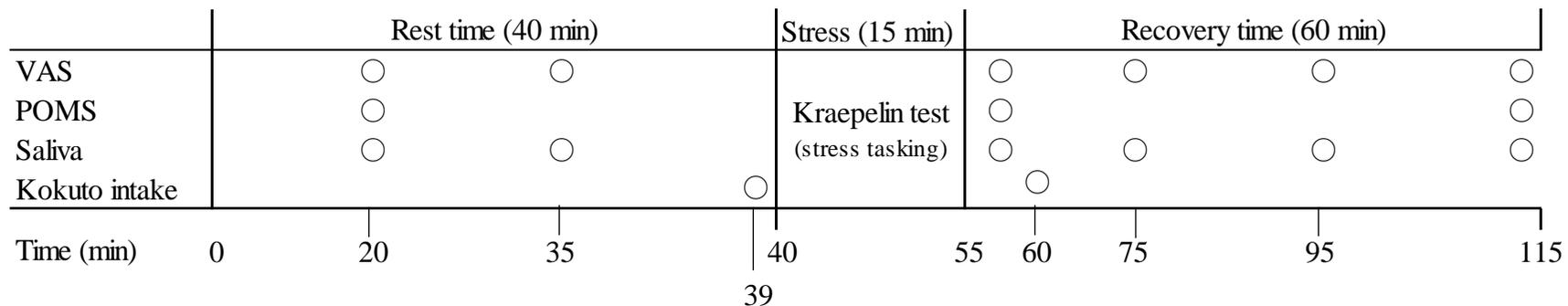


Fig. 2-3 Time schedule of the mental stress task with or without Kokuto intake.

VAS = Visual analog scale; POMS = Profile of Mood States; Saliva = Saliva collection for stress marker assays; Kokuto intake = Kokuto is administrated 1 min before (pre-intake group) and 5 min after the Krepelin test (post-intake group)

Water intake instead of the Kokuto solution is control condition.

The subjects underwent the Uchida-Krapelin psychodiagnostics test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period).

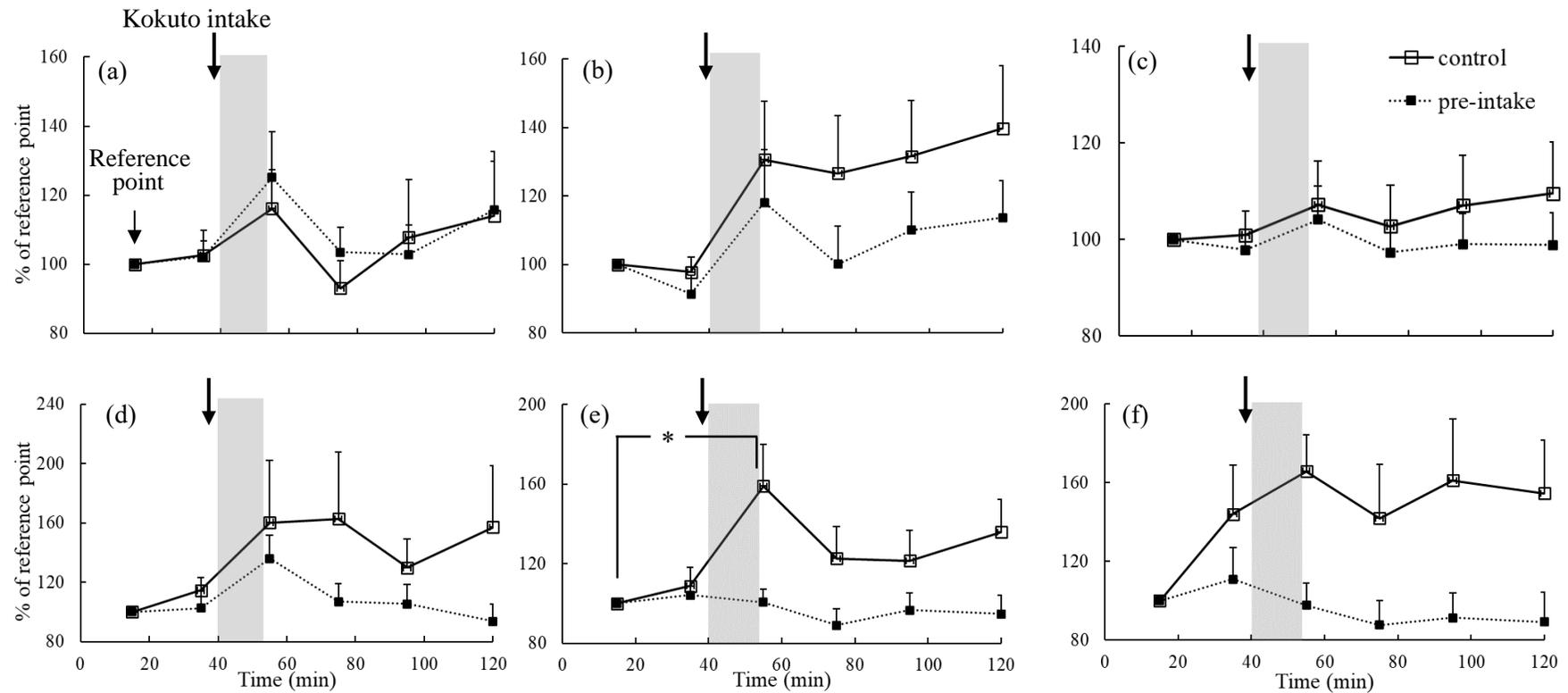


Fig. 2-4 Effects of oral Kokuto intake before a stress task on six salivary stress markers, namely Cort (a), DHEA (b), TS (c), CgA (d), Amy (e), and IgA (f), before and after the task.

Value are shown as means  $\pm$  standard error (n=11). \* $P < 0.05$  (vs reference point)

The subjects underwent the Uchida-Kreapelin psychodiagnostics test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period). Solid arrow represents the time of Kokuto intake.

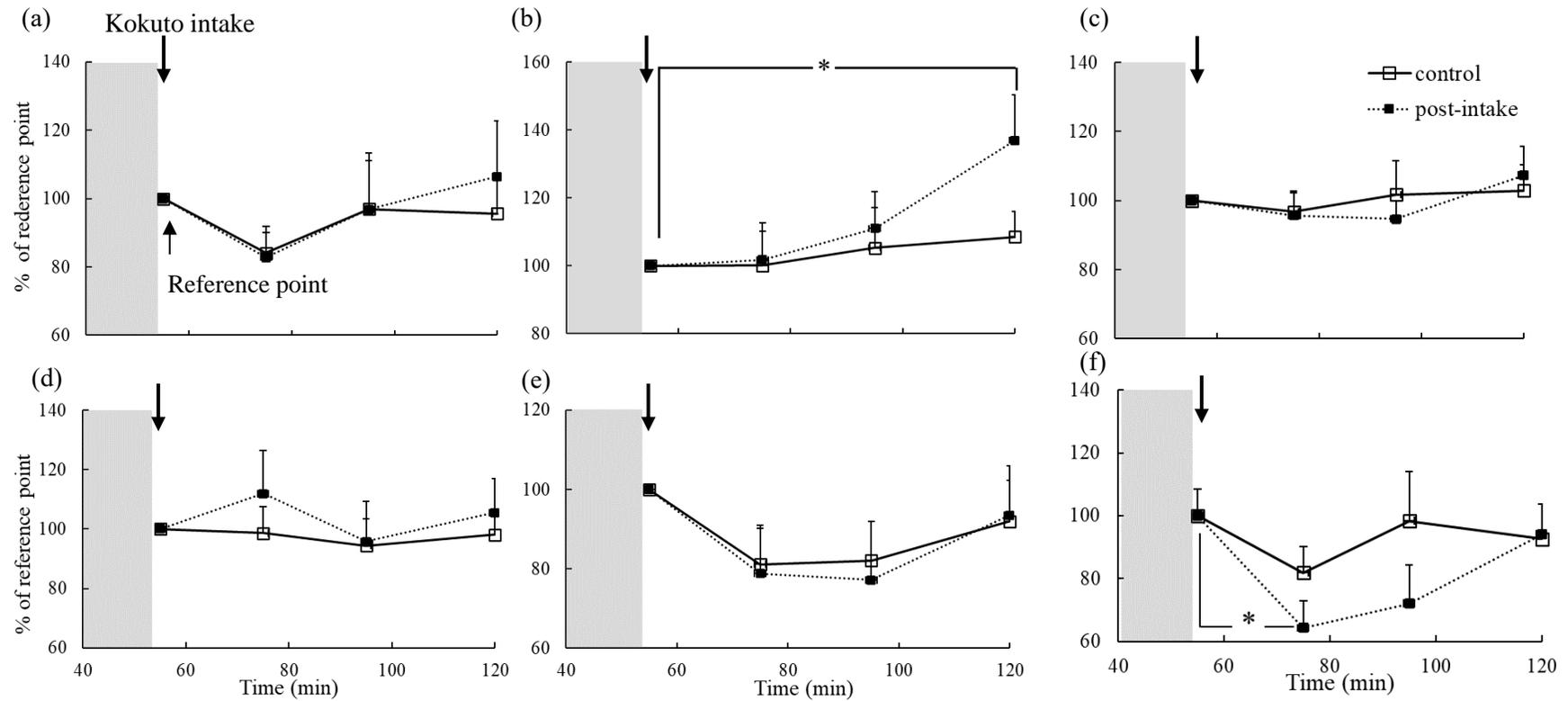


Fig. 2-5 Effects of oral Kokuto intake after a stress task on six salivary stress markers, namely Cort (a), DHEA (b), TS (c), CgA (d), Amy (e), and IgA (f), after the task.

Value are shown as means  $\pm$  standard error (n=11). \* $P < 0.05$  (vs reference point)

The subjects underwent the Uchida-Kreapelin psychodiagnostics test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period). Solid arrow represents the time of Kokuto intake

Table 2-1 Sugar and amino acid composition of Kokuto processed from sugar cane at Taramajima

Sugar content (g/100 g Kokuto)	
D-(+)-Sucrose	87.5
D-(+)-Glucose	0.8
D(-)-Fructose	1.2
Total	89.5
Amino acid content (mg/100 g Kokuto)	
Aspartic acid	56.5
Glutamic acid	15.7
Asparagine	164.0
Serine	11.4
Glutamine	2.5
Histidine	3.5
Glycine	3.1
Threonine	2.9
Citrulline	3.9
Arginine	2.6
Alanine	16.0
$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)	3.5
Tyrosine	2.4
Cysteine	5.5
Valine	7.5
Tryptophan	8.0
Methionine	4.2
Phenylalanine	28.8
Isoleucine	2.2
Leucine	2.5
Lysine	2.5
Total	349.1

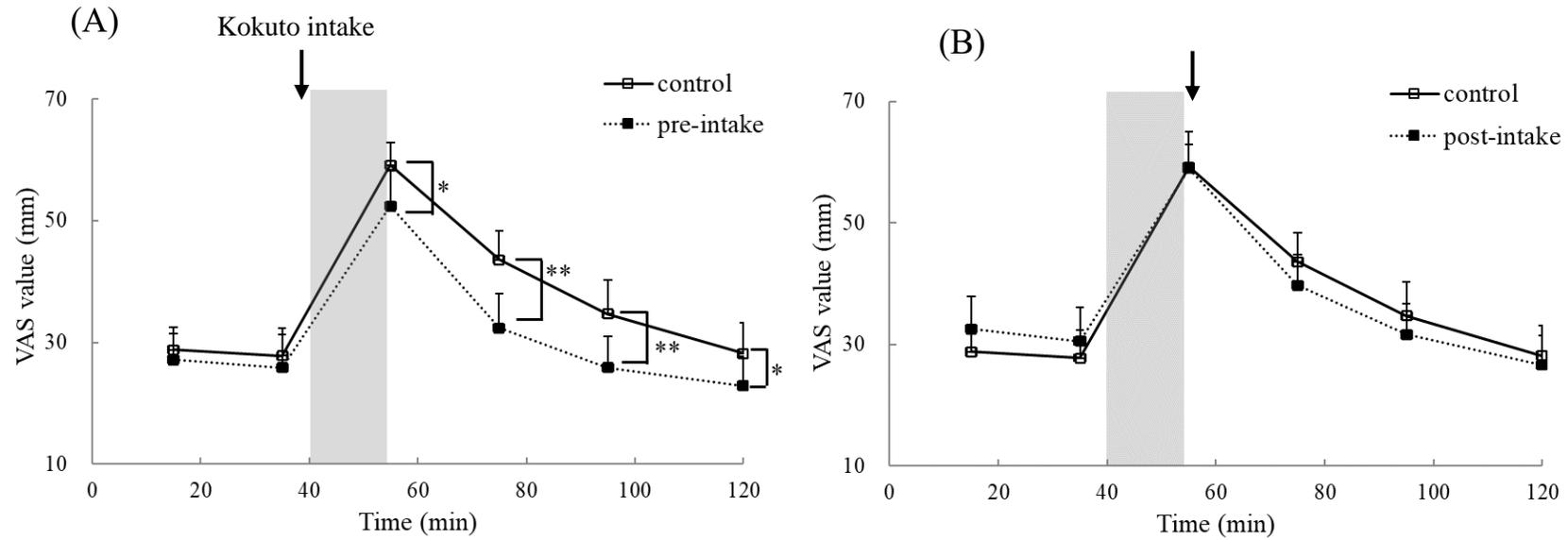


Fig. 2-6 Subjective stress changes after a mental stress task as assessed using the visual analog scale.

Each value is expressed as mean  $\pm$  standard error (n=13).

Oral Kokuto intake 1 min before (pre-intake; A) and 5 min after the Kraepelin test (post-intake; B)

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (vs reference point)

The subjects underwent the Uchida-Kraepelin psychodiagnostics test from 40 min to 55 min (total 15 min) as a mental stress task (stress task period). Solid arrow represents the time of Kokuto intake.

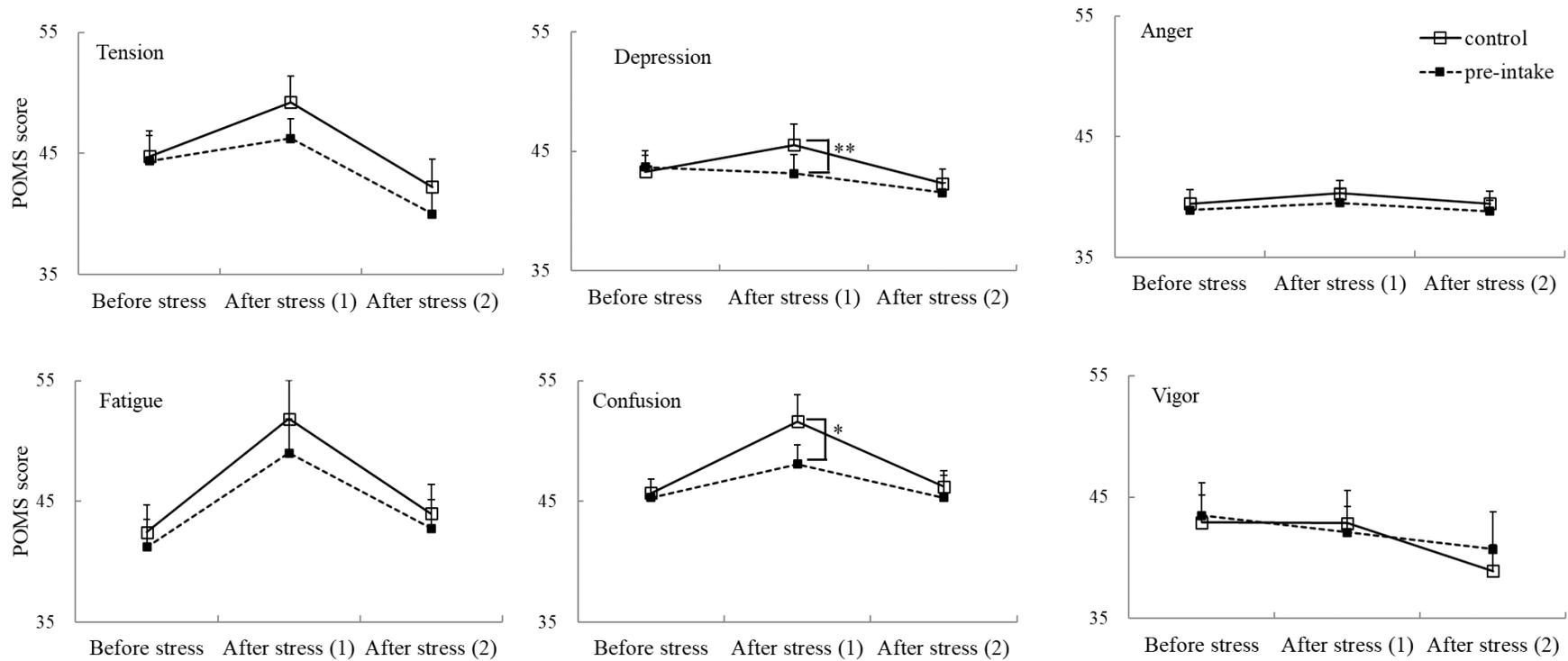


Fig. 2-7 Changes in mood states after a mental stress task as assessed using the Profile of Mood States.

Kokuto intake 1 min before the Kraepelin test (pre-intake).

After stress (1) and (2) represent the first and last POMS assessments, respectively, after the Kraepelin test.

Each value is expressed as mean  $\pm$  standard error (n=13).

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (vs control)

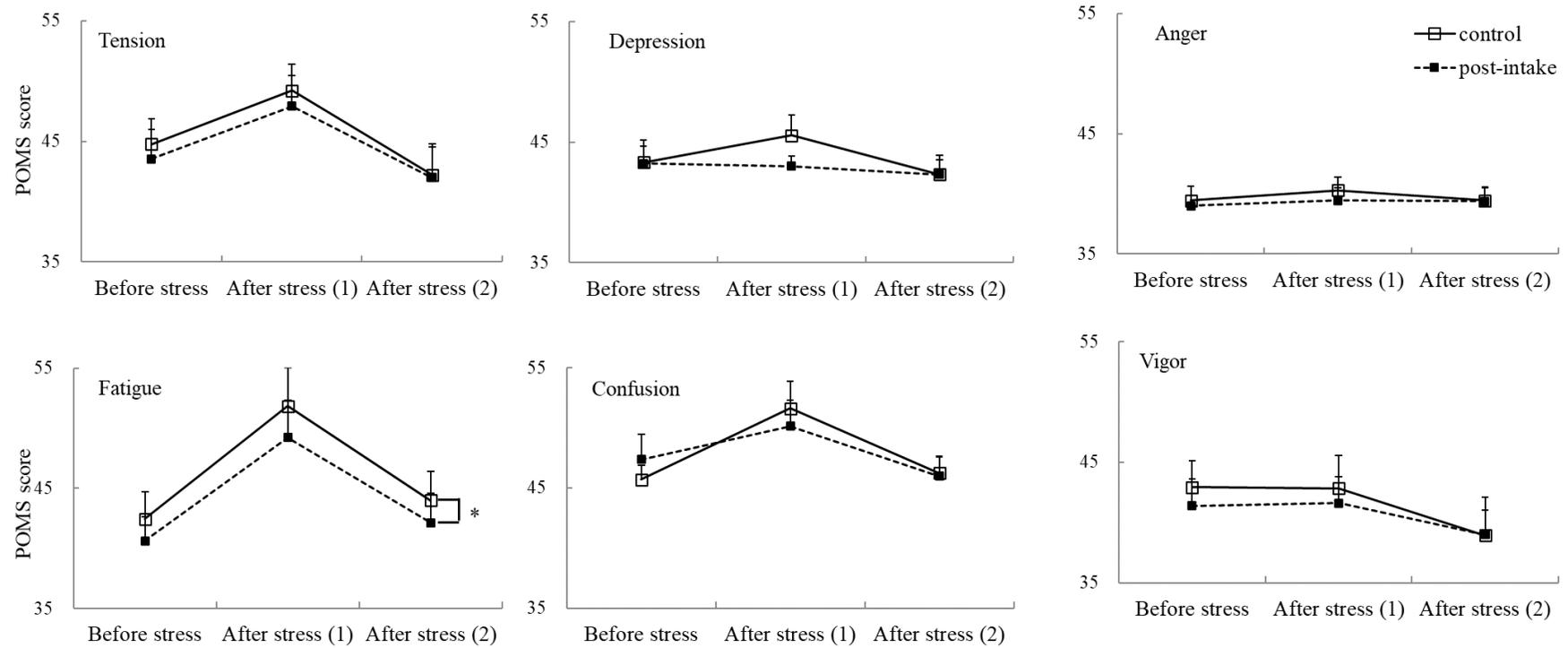


Fig. 2-8 Changes in mood states after a mental stress task as assessed using the Profile of Mood States.

Kokuto intake 5 min after the Kraepelin test (post-intake).

After stress (1) and (2) represent the first and last POMS assessments, respectively, after the Kraepelin test.

Each value is expressed as mean  $\pm$  standard error (n=13).

\* $P < 0.05$  (vs control)

## 第3章

### 黒糖摂取が急性ストレス負荷マウスのストレス反応に及ぼす影響と

#### ストレス反応抑制作用に関与する黒糖中成分の特定

### 第1節

#### 黒糖および黒糖中成分の摂取が急性ストレス負荷マウスの

#### 血清中ストレスホルモンに及ぼす影響

##### 3.1.1. 緒言

急性ストレスを受けると、HPA 軸のストレス応答ホルモンである糖質コルチコイド（ヒトではコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロン）が分泌され、初期行動として「すくみ反応」の1つ、行動意欲の減退などが起こる。さらに、糖質コルチコイドは、肝臓における糖新生を促進するとともに、筋肉における糖利用を抑制することから血糖状態に影響を与える（土田・宮地、1997）。このことから、血中の糖質コルチコイドおよびグルコース濃度を測定することで、急性ストレス負荷による HPA 軸の活性およびそれに付随する血糖状態を評価することができる。

第2章では、ヒトを対象として15分間のクレペリン検査による精神的ストレス負荷試験を行い、ストレス負荷前後に唾液中ストレスマーカの測定および主観的な精神状態の評価を行った。その結果、ストレス負荷前の黒糖摂取は、HPA 軸のストレス応答物質である唾液中テストステロンや SAM 軸のストレス応答物質である唾液中 $\alpha$ -アミラーゼなどの分泌を抑制し、主観的な気分の改

善に寄与することが示唆された。このことから、黒糖摂取による精神的ストレス低減作用の可能性が示された。また、そのストレス低減効果に関わる黒糖中の成分については、糖類、GABA、フェノール化合物およびメイラード反応生成物が挙げられた。そこで、挙げられた成分のストレス低減効果について検証するため、候補成分を事前摂取し、ストレス負荷試験を行い、ストレス応答を調べる必要がある。本ストレス試験において、ヒトでは、試料の安全確認、均一なストレス負荷や生活環境の制限を整えるのが困難である。そのため、ばらつきを抑え、データの精度や再現性を高めるために、マウスを代替で用いることが望ましい(新井ら、2014)。

すなわち、黒糖に加えて、糖類、糖類以外の成分(ポリフェノール化合物やメイラード反応生成物を含む)およびGABAをBALB/cマウスに7日間事前投与し、1時間の拘束による急性ストレス負荷試験を実施した後、血清中コルチコステロン濃度およびグルコース量の測定によるストレス評価を行うことで、黒糖摂取がマウスにおける急性ストレス反応に及ぼす影響を調べるとともに、ストレス抑制効果に関連する黒糖中成分を特定することを試みた。

### 3.1.2. 実験方法

#### 3.1.2.1. 実験材料および試薬

実験材料となる黒糖は、2014年に沖縄県伊平屋島で製造され、沖縄県黒砂糖協同組合(沖縄)から得られた。試薬として、スクロース、フルクトースおよびグルコースは、ナカライテスク株式会社(京都)から購入した。GABAは、Sigma-Aldrich(St. Louis, MO., USA)から購入したものをを用いた。

### 3.1.2.2. HPLC を用いた伊平屋島産黒糖の糖組成

伊平屋島産黒糖の糖組成は、HPLC を用いて分析した。分析方法や測定条件、算出方法は、2.2.6.に準じて行った。伊平屋島産黒糖の糖組成は、D (+) グルコースおよび D (-) フルクトースはピークの高さ、D (+) スクロースは面積値を基に、各糖は黒糖 100 g あたりの平均含量 (g) で算出した。検体 1 点に対して 3 回の測定 (n=3) を行った。

### 3.1.2.3. HPLC を用いた伊平屋島産黒糖のアミノ酸の定量

伊平屋島産黒糖のアミノ酸量は、HPLC を用いて分析した。分析方法や測定条件、算出方法は、2.2.7.に準じて行った。総アミノ酸および各アミノ酸量は、黒糖 100 g あたりの平均含量(mg) で算出した。検体 1 点に対して 3 回の測定 (n=3) を行った。

### 3.1.2.4. 黒糖中非糖類成分の抽出

黒糖中非糖類成分 (Non-centrifugal Sugar Component ; NSC) の抽出は、高良ら (2010) の方法を参考にして、以下の方法で行った。すなわち、黒糖 200 g を精製水 1 L に溶解し、20%黒糖水溶液を作成した。この黒糖水溶液は、遠心分離機 (CR20GⅢ、日立工機株式会社、東京) を用いて遠心分離 (1,690 g、15 分間、10°C) した後に、上清をろ紙 (No.1、アドバンテック東洋株式会社、東京) を用いて吸引ろ過した。その後、分子量 1000 以上の化合物を吸着する芳香族系合成吸着剤 Diaion® HP-20 樹脂 (三菱化学株式会社、東京) 200 g をろ液に加え、振とう器 (NR-80、タイテック株式会社、埼玉) を用いて 1 時間振とうし、1 L の

精製水で洗浄した後、底部に脱脂綿で栓をしたガラスカラムに充填した。その後、25、50、75 および 100%MeOH 水溶液（各 1 L）で HP-20 樹脂に吸着した成分を溶出し、各溶出液を混合した。得られた溶出液は、ロータリーエバポレーター（東京理化学器械株式会社、東京）を用いて減圧濃縮した。その後、凍結乾燥機（FDU-2000、東京理化学器械株式会社、東京）を用いて、凍結乾燥して得られた凍結乾燥物を NSC とした。この NSC の収率は、1.00%であった（Fig. 3-1-1）。

#### 3.1.2.5. マウスを用いた急性ストレス負荷試験

実験動物は、BALB/c 系雄性マウス（7 週齢、体重  $23.7 \text{ g} \pm 0.8 \text{ g}$ ）を日本チャールス・リバー株式会社（神奈川）より購入した。マウスは、標準的な実験室条件下（室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50～60%、明暗 12 時間サイクル（明期 8:00～20:00））で飼育され、市販固形試料 CE-2（日本クレア株式会社、東京）および水道水を自由摂取させた。全マウスの体重を測定し、平均体重および標準偏差が均一になるよう 6 群（1 群 6 匹）に振り分け、Blank（水投与、ストレス負荷なし）群、Control（水投与、ストレス負荷あり）群、黒糖投与（黒糖水溶液投与、ストレス負荷あり）群、糖類（糖類水溶液投与、ストレス負荷あり）投与群、NSC 投与（NSC 水溶液投与、ストレス負荷あり）群および GABA（GABA 水溶液投与、ストレス負荷あり）投与群の 6 群を設定した。ストレス負荷試験スケジュールは Fig. 3-1-2 にあるように、5 日間予備飼育した後、7 日間連続で Blank および Control 群には精製水  $150 \mu\text{L}$  を定時に胃ゾンデを用いて 1 日 1 回、経口投与した。本試験では、黒糖の抗ストレス作用成分を特定することを目的としているため、試料の投与量を高濃度に設定し、黒糖、NSC 画分および GABA 投与群は、

それぞれ黒糖 2 g/kg body weight (BW)、NSC 410 mg/kg BW（黒糖 100 g に含有する NSC 量）および GABA 2.5 mg/kg BW（黒糖 100 g に含有する GABA 量）（Table 3-1-1）になるよう精製水に溶解して濃度を調製し、経口投与した。糖類群は、スクロース、グルコースおよびフルクトースを Table 3-1-1 の黒糖中糖組成に基づいて配合（スクロース：グルコース：フルクトース=52.8：1：1.2）し、精製水に溶解して 2 g/kg BW になるよう濃度を調製して経口投与した。体重および給餌前後の重量測定は 1 日に 1 回、試料投与後に行った。摂餌量は、給餌前後の重量から動物数で除して、1 匹当りの 1 日の平均摂餌量を算出した。ストレス負荷は 7 日目に試料投与を終えた後、Blank 群以外のマウスをステンレス製のメッシュシートで作成した拘束器具（縦 16 cm×横 11 cm）（Fig. 3-1-3）に一匹ずつ拘束し、1 時間室温で放置した。拘束によるストレス負荷が終了して 30 分後に断頭器（IS-26、株式会社イシハラ、佐賀）を用いてマウスを屠殺し、切断部分から採血を行った。また、採血後のマウスから肝臓を採取し、肝臓重量も測定した。

尚、本動物実験は、琉球大学動物実験規則（平成 19 年 6 月 26 日制定）に従い、動物実験計画書を作成し、琉球大学動物実験委員会の審議および承認（承認番号、第 A201602 号）を受けた後に実施した。

#### 3.1.2.6. 血清の調製

マウスより採血して得られた血液は、冷蔵（4°C）で一晩静置した。翌日、血液を遠心分離（1,000 g、15 分間、4°C）し、新しいチューブに上清を採取した。再度、遠心分離（3,500 g、5 分間、4°C）して、上清より血清を得た。その後、滅菌したマイクロチューブに小分けし、測定まで冷凍保存（-30°C）した。

### 3.1.2.7. 血清中コルチコステロン濃度の測定

抗ストレスホルモンであるコルチコステロンの血清中濃度は、市販のキット (DetectX® Corticosterone EIA Kit, Arbor Assays LLC, USA) を用いて、ELISA 法にて測定した。血清中コルチコステロン濃度は、血清 1 mL あたりのコルチコステロン含量 (ng) で示した。

### 3.1.2.8. 血清中グルコース量の測定

血清中グルコース量は、グルコース CII-テストワコー (和光純薬株式会社、大阪) を用いて、説明書に従って測定した。血清中グルコース量は、血清 1 dL あたりのグルコース含量 (mg) で示した。

### 3.1.2.9. 統計学的処理

統計処理は、統計解析ソフトエクセル統計 2010 (株式会社社会情報サービス、東京) を用いて行った。平均値の差の検定は一元配置分散分析法および Tukey-Kramer 法を用いた多重比較によって行った。いずれの検定においても、 $P < 0.05$  の場合を有意差ありと判定した。

## 3.1.3. 結果および考察

### 3.1.3.1. 黒糖および黒糖中成分の投与がマウス体重および肝臓重量に及ぼす影響

Table 3-1-2 には、試料投与前日 (Day 0) およびストレス負荷前日 (Day 6) の体重、体重 100 g あたりの肝臓重量を示した。全ての項目において、試料投与前群

は、精製水 150  $\mu$ L を連続投与した Blank 群および Control 群と比べて、有意な差は示さなかった。危険ドラッグなどの薬物は、マウスに対する 2 日間の単回投与で中毒性に依存し、体重増加の抑制や肝臓重量の低下が見られることもあるが（多田ら、2016）、本試験で用いた試料は、7 日間の投与においても、体重や肝臓重量に有意な変化を示さなかったことから、今回用いた試料の投与量では毒性を示す可能性は低いと考えられた。Blank 群および Control 群の摂食量は有意な差はなかった。投与群の中で、NSC 群の摂餌量は最も少ない量となったが、体重に変化はなかった。

### 3.1.3.2. 黒糖および黒糖中成分の摂取がマウスにおける急性ストレス応答に及ぼす影響

Fig. 3-1-4 に各群の血清中コルチコステロン濃度を示した。Control 群の血清中コルチコステロン濃度は、Blank 群と比べて、有意に ( $P < 0.01$ ) 高値を示した。ICR マウスに対して 24 時間の拘束ストレスを負荷させると、血清中においてコルチコステロンが過剰分泌するという報告があることから（渡辺ら、2011）、本試験における拘束具による 1 時間の拘束ストレスでも十分にストレス負荷がかかっていることが明らかとなった。さらに、コルチコステロンは、糖新生を促進するため、血糖値を上昇させることが分かっている。そこで、各群の血清中グルコース濃度を Fig. 3-1-5 に示した。Control 群の血清中グルコース量は、Blank 群と比べて高値を示したが、有意な差を示さなかった。ストレス負荷による血糖値の上昇は、ストレス負荷 60 分後がピークとなり、その後、徐々に低下するとの報告があることから（春日ら、1999）、ストレス負荷から解放し、断頭までの 30

分間に血糖値が低下し、有意な差を示さなかったと考えられる。

黒糖投与群の血清中コルチコステロン濃度は、Control 群と比べて、約 30%低い値を示した。このことから、急性ストレス負荷による血清中コルチコステロンの分泌増加は、黒糖摂取によって抑制する可能性が示唆された。さらに、NSC 投与群の血清中コルチコステロン濃度も、Control 群と比べて、約 30%低い値を示したことから、本試験における黒糖のコルチコステロン分泌抑制作用は、NSC 中成分が関与している可能性が示唆された。黒糖に含まれる NSC の一つとして、フェノール化合物が挙げられる。サトウキビには、フェノール化合物が含まれていることが報告されており (Colombo *et al.*, 2006)、NSC には、サトウキビ由来のフェノール化合物が含まれていることが確認されている。(前田・萩、2008)。フェノール化合物であるイタドリ (*Polygonum cuspidatum*) 由来のレスベラトロールの投与が、慢性ストレス負荷マウスの HPA 軸活性を抑制し、抑うつ行動を改善したとの報告もあることから (Liu *et al.*, 2014)、黒糖中フェノール化合物が HPA 軸活性抑制に寄与する可能性がある。さらに、黒糖中フェノール化合物は、抗酸化活性を有する (Takara *et al.*, 2002)。「ストレス軽減」が確認されている機能性成分には、抗酸化成分が多いことから (阿部、2019)、ストレス抑制効果は黒糖中成分の抗酸化活性が関与している可能性も示唆された。

また、GABA 投与群の血清中コルチコステロン濃度は、Control 群と比べて、約 20%低い値を示した。これまで、GABA 摂取は、SAM 軸活性を反映するストレスマーカーの分泌を抑制したという報告が多く、HPA 軸活性を反映する糖質コルチコイドに対する影響については、あまり報告がなかった。しかし、本試験では GABA 摂取が、1 時間の拘束ストレスを負荷されたマウス血清コルチコ

テロン分泌をわずかに抑制することが示された。しかしながら、NSC 摂取ほどの分泌抑制効果は見られなかった。

NSC および GABA 投与群の結果とは対照的に、糖類投与群の血清中コルチコステロン濃度は、Control 群と比べて、高い値を示した。その要因として、血糖値の変動が関与している可能性がある。糖類投与群の血清中グルコース濃度は、Blank 群と比べて、有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。糖類の投与量は 2 g/kg BW と高濃度であり、過剰なスクロース摂取は、血糖状態を乱し、糖質コルチコイドが過剰分泌することから (溝口、2013)、糖類群のコルチコステロン分泌増加は、過剰なスクロース摂取による血糖状態に乱れによることが示唆された。しかし、黒糖の投与量も 2 g/kg BW と糖類と同じ投与量であり、黒糖投与群の血清中グルコース濃度も、Blank 群と比べて、有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示したにもかかわらず、黒糖投与群の血清中コルチコステロン濃度は Control 群よりも低値であった (Fig. 3-1-4)。したがって、黒糖中には、血糖状態の乱れによる糖質コルチコイドの分泌増加をも抑制する成分が含まれている可能性が示唆された。

#### 3.1.4. 小括

本節では、黒糖摂取がマウスにおける急性ストレス応答に及ぼす影響を調べるとともに、黒糖の抗ストレス特性に関与する黒糖中成分を特定するため、黒糖、糖類、非糖類成分 (NSC) および GABA をマウスに事前投与し、1 時間の拘束による急性ストレス負荷試験を実施し、血清中コルチコステロンおよびグルコース濃度の測定によるストレス評価を行った。その結果、黒糖摂取は、急性ストレスマウスにおける血清コルチコステロン分泌を抑制したことから、黒糖は、HPA 軸活性によるストレスホルモン分泌を抑制し、HPA 活性による初期行動「行動意欲の減退」を緩和する可能性が示唆された。さらに、この黒糖のストレスホルモン分泌抑制作用は、黒糖に含まれる NSC が関与している可能性が示唆された。

Table 3-1-1 Sugar and amino acid composition of Kokuto processed from sugar cane at Iheyajima

Sugar content (g/100 g Kokuto)	
D-(+)-Sucrose	84.4
D-(+)-Glucose	1.6
D(-)-Fructose	1.9
Total	87.9
Amino acid content (mg/100 g Kokuto)	
Aspartic acid	40.6
Glutamic acid	12.1
Asparagine	66.1
Serine	12.0
Glutamine	1.9
Histidine	2.3
Glycine	3.0
Threonine	2.9
Citrulline	56.8
Arginine	1.6
Alanine	21.0
$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)	2.9
Tyrosine	2.0
Cysteine	4.3
Valine	5.9
Tryptophan	7.3
Methionine	3.6
Phenylalanine	22.9
Isoleucine	2.0
Leucine	2.5
Lysine	2.5
Total	276.5

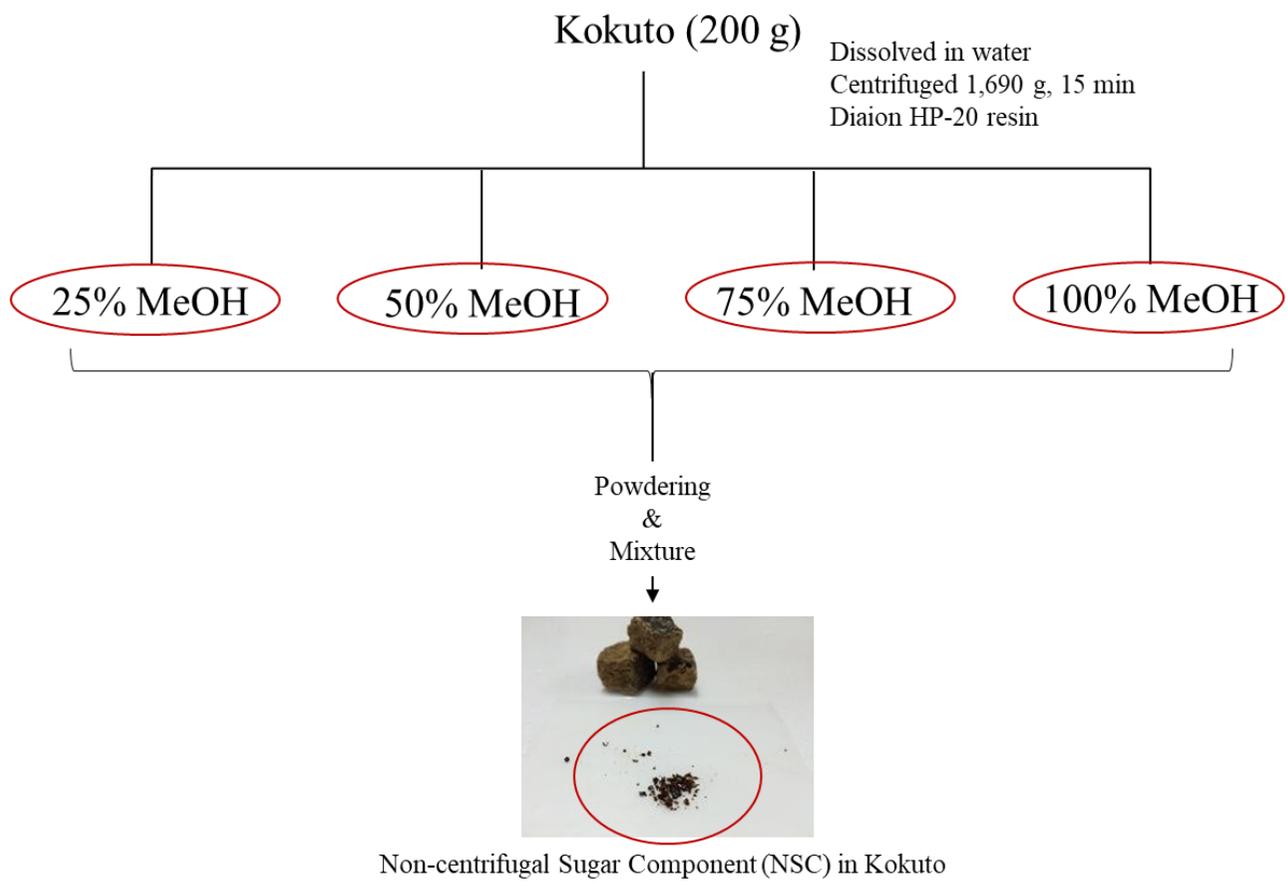


Fig. 3-1-1 Extraction of non-sugar components (NSCs) in Kokuto.

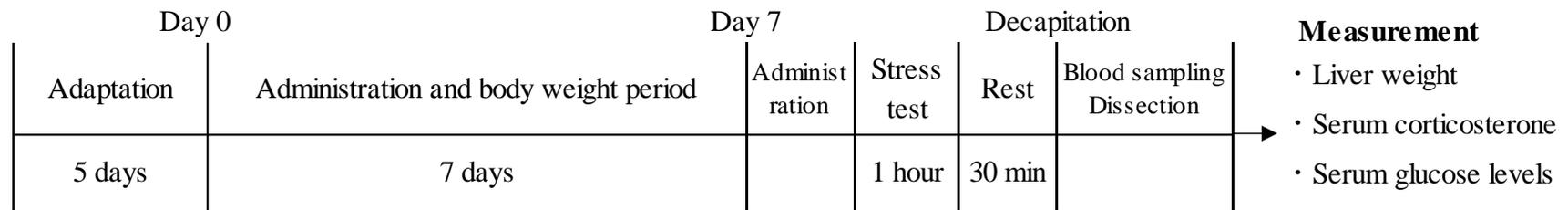


Fig. 3-1-2 Time schedule of the acute restraint stress test in mice.

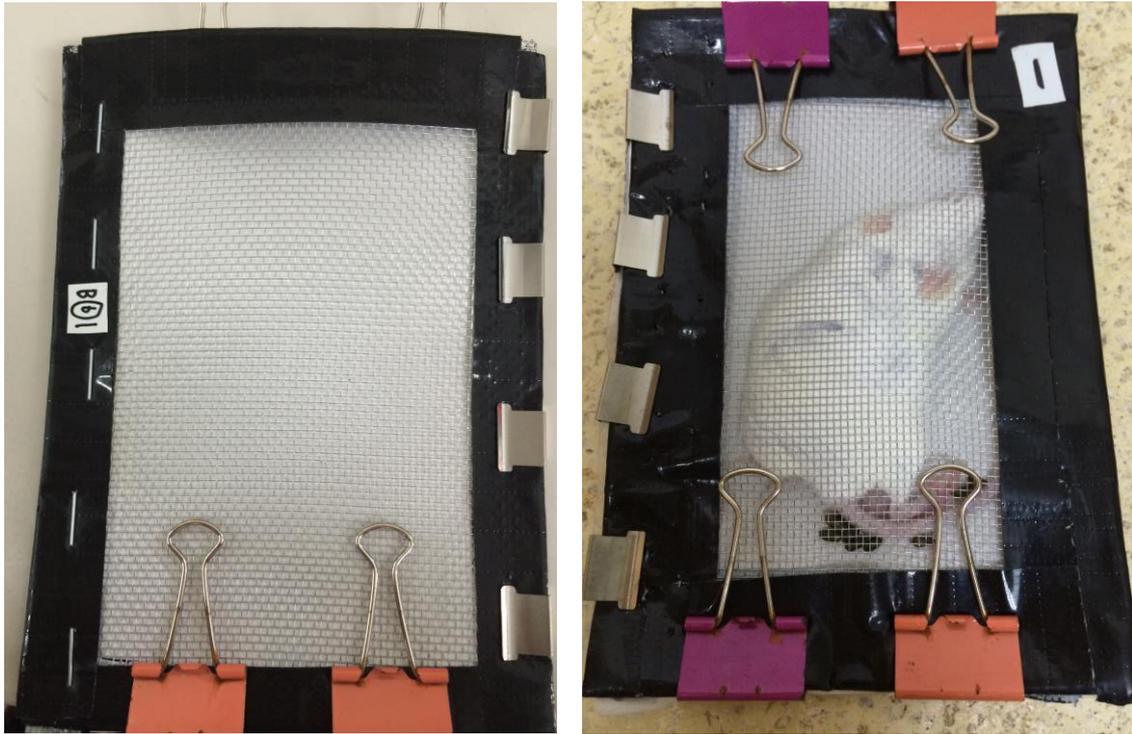


Fig. 3-1-3 A custom-built restrainer trap (left) and restraint-stressed mice (right).

A custom-built restrainer trap is 16 cm length and 11 cm wide.

Table 3-1-2 Body weight, food intake and liver weight of mice administered with various samples

Group	Body weight (g)		Food intake (g/day)	Liver weigh (g/100 g BW)
	Day 0	Day 6		
Blank	24.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	25.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.1 <sup>ab</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
Control	25.0 ± 1.2 <sup>a</sup>	25.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>a</sup>
Kokuto	25.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	26.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
Sugar	25.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	25.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.3 <sup>a</sup>
NSC	24.6 ± 1.0 <sup>a</sup>	25.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>a</sup>
GABA	24.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	25.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.3 <sup>a</sup>

Different letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); Kokuto = group treatment with Kokuto (stressed); Sugar = group treatment with sugar (stressed); NSC = group treatment with non-sugar component in Kokuto; GABA = group treatment with  $\gamma$ -aminobutyric acid

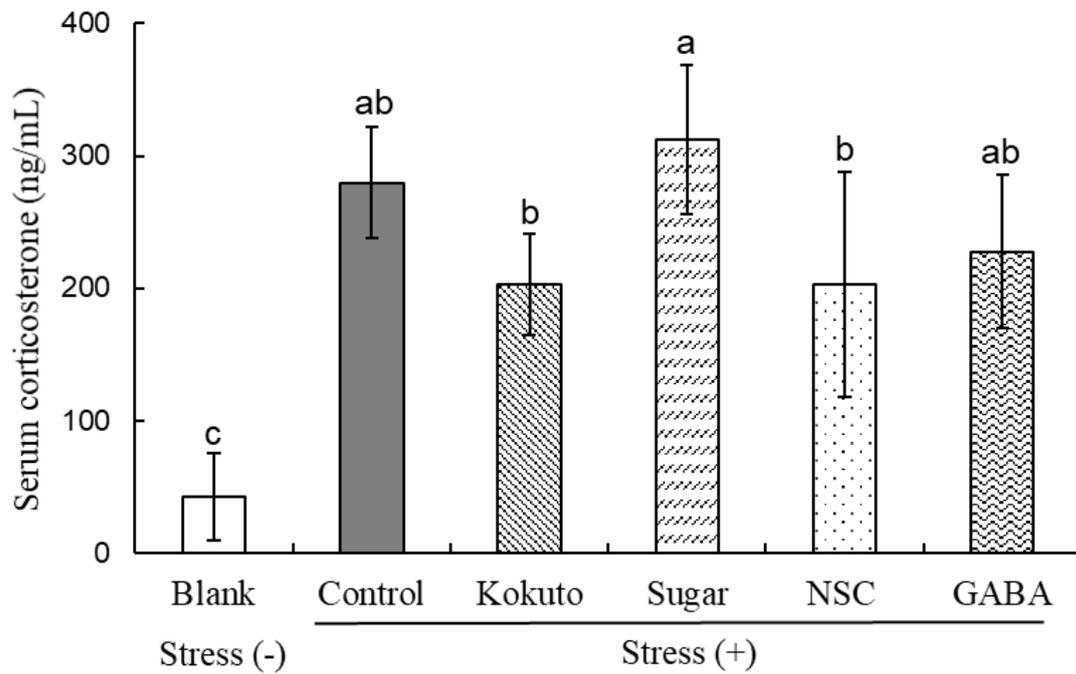


Fig. 3-1-4 Serum corticosterone levels of acute stressed mice administered with various samples.

Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); Kokuto = group treatment with Kokuto (stressed); Sugar = group treatment with sugar (stressed); NSC = group treatment with non-sugar component in Kokuto; GABA = group treatment with  $\gamma$ -aminobutyric acid

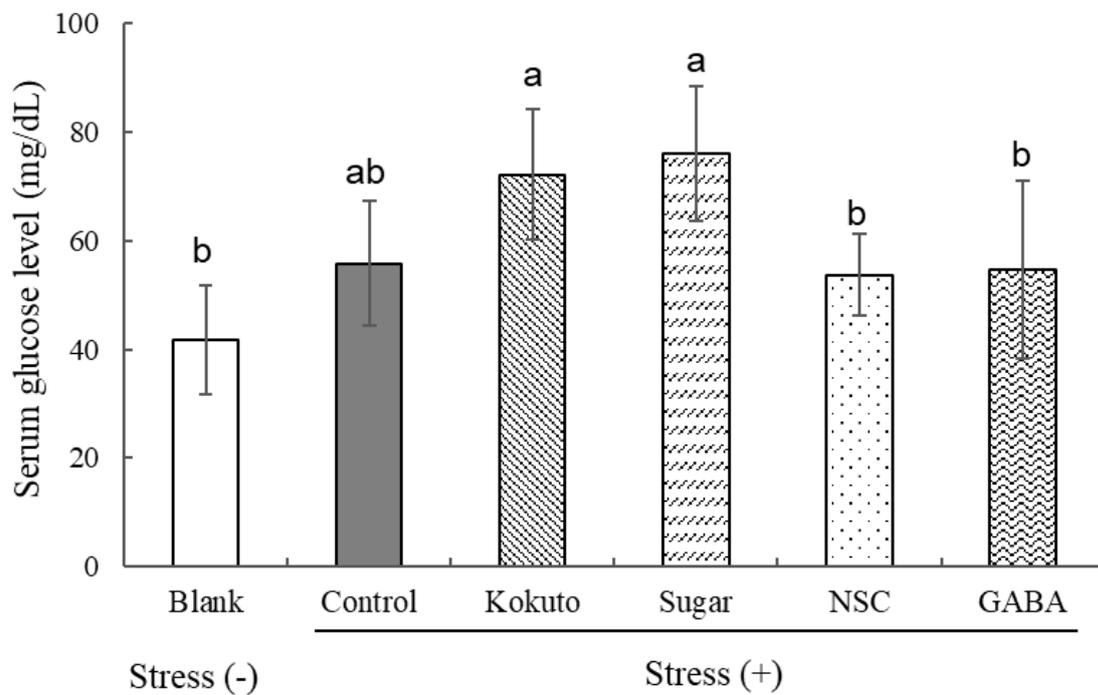


Fig. 3-1-5 Serum glucose levels in acute stressed mice administered with various samples.

Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); Kokuto = group treatment with Kokuto (stressed); Sugar = group treatment with sugar (stressed); NSC = group treatment with non-sugar component in Kokuto; GABA = group treatment with  $\gamma$ -aminobutyric acid

## 第 2 節

### 黒糖中非糖類成分 (NSC) 摂取が急性ストレス負荷マウスの 血清中ストレスホルモンおよび生体内抗酸化作用に及ぼす影響

#### 3.2.1. 緒言

急性ストレスを受けると、HPA 軸のストレス応答ホルモンである糖質コルチコイドが分泌されるとともに、エネルギー必要量が増大することで、活性酸素種 (ROS) が発生する。ROS は、体内の免疫機能や感染防御に関して重要な働きをするが、過剰に ROS が発生すると、老化やがん、生活習慣病の発症を引き起こす。生体内では、スーパーオキシドジスムターゼのような内因性の抗酸化酵素に加え、カロテノイドやカテキン類など外因性の抗酸化物質が抗酸化機能として備わっており、ROS 産生を抑制し、酸化障害から保護する役割を担っている。しかし、ストレス負荷によって過剰に ROS が生成されると、生体内抗酸化機能が低下し、ROS とのバランスが崩れることから、ストレス反応を緩和することだけではなく、生体内抗酸化機能の低下を予防することも重要である。

第 3 章第 1 節では、黒糖摂取がマウスにおける急性ストレス応答に及ぼす影響を検証するとともに、ストレス抑制効果に関連する黒糖中成分を特定するため、黒糖、糖類、非糖類成分 (NSC) および GABA を投与し、急性ストレスマウスにおける血清中コルチコステロン濃度に及ぼす影響を評価した。その結果、黒糖摂取によって急性ストレスマウスにおける血清コルチコステロン分泌を抑制する可能性が示唆された。さらに、NSC を投与したマウスの血清中コルチコステロン濃度も低い値を示したことから、黒糖のストレス抑制効果に NSC が関

与している可能性が示唆された。NSC 中の抗ストレス作用が期待されている成分として、フェノール化合物がある。フェノール化合物は、抗酸化活性を有し、抗酸化成分は抗ストレス作用に関連があることから、NSC 中フェノール化合物に焦点を当てて、黒糖のストレス抑制作用に関わる成分を探索することとした。

本節では、黒糖のストレス抑制効果を特定するため、NSC 中フェノール化合物に焦点を当て、第 1 節で用いた粗 NSC を極性の異なる溶媒を用いて、さらに 4 種類の分画物を調製し、各 NSC 画分の総ポリフェノール含量および抗酸化活性を測定するとともに、ストレス負荷試験を行い、各 NSC 画分を摂取した拘束ストレスマウスにおける血清中コルチコステロン濃度および生体抗酸化活性を測定し、評価した。

### 3.2.2. 実験方法

#### 3.2.2.1. 試薬

2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)、trolox、2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) は和光純薬株式会社(大阪)で購入したものを用いた。ポリフェノール試薬および炭酸ナトリウムはナカライテスク株式会社(京都)で購入し、フルオレセインナトリウム塩および 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO., USA) より購入した。その他の試薬類は、和光純薬株式会社の特級試薬を用いた。

#### 3.2.2.2. NSC の分画

NSC の分画は、3.1.2.4.の方法を改変して行った。すなわち、第 3 章第 1 節で

用いた伊平屋島産黒糖 3 kg を 15 L の精製水に溶解し、遠心分離機（CR20GIII、日立、東京）を用いて遠心分離（1,690 g、15 分間、10°C）した。吸引ろ過した後、芳香族系合成吸着剤 Diaion® HP-20 樹脂（三菱化学株式会社、東京）3 kg をろ液に加えて吸着させ、振とう器（NR-80、タイテック株式会社、埼玉）を用いて 1 時間振とうした。吸着した HP-20 樹脂は、10 L の精製水で洗浄し、底部に脱脂綿で栓をしたガラスカラムに充填した。その後、25、50、75 および 100%メタノール（MeOH）水溶液（各 5 L）で HP-20 樹脂に吸着した成分を溶出した。得られた各溶出液はロータリーエバポレーター（東京理化機器社、東京）を用いて減圧濃縮後、凍結乾燥機（FDU-2000、東京理化学器械株式会社、東京）を用いて凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物は 25、50、75 および 100% MeOH 画分（Fig. 3-2-1）とした。この 4 種類の画分は、総ポリフェノール含量の測定、抗酸化活性の測定およびマウスストレス試験の試料として用いた。

### 3.2.2.3. 各 NSC 画分の総ポリフェノール含量の測定

各 NSC 画分を 10 mg を 50% MeOH 水溶液に 10 mL に溶解し、試料溶液として用いた。各 NSC 画分の総ポリフェノール含量は、Payet ら（2006）の方法を一部改訂してフォーリンチオカルト法にて測定した。すなわち、96 ウェルプレート（PerkinElmer 社）に、試料溶液または没食子酸 20  $\mu$ L、精製水 40  $\mu$ L、100% MeOH 20  $\mu$ L および精製水で 2 倍希釈したフォーリンチオカルト試薬 15  $\mu$ L を混合した。5 分後、2%炭酸ナトリウム 75  $\mu$ L を全ウェルに加え、室温で 15 分間静置した後、マイクロプレートリーダー（PowerWave XS2、BioTek 社）を用いて 750 nm の波長で吸光度を測定した。検量線は没食子酸を用いて作成し、総ポリ

フェノール含量を各 NSC 画分 1 g あたりの没食子酸当量 (mg GAE/g) として算出した。

#### 3.2.2.4. ORAC 値の測定

各 NSC 画分の ORAC 値は、Prior ら (2003) の方法を一部改変し、oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法にて測定した。黒底 96 ウェルマイクロプレート (住友ベークライト株式会社、東京) の各ウェルに、3.2.2.3. で調製した各試料溶液または Trolox 25  $\mu$ L、90 nM フルオレセイン溶液 150  $\mu$ L を加えて、37°C で 10 分間静置した。その後、31.7 mM AAPH 溶液 75  $\mu$ L を加えて攪拌後、37°C に設定した蛍光プレートリーダー (BioTek 社、Synergy HT、USA) を用い、フルオレセインの蛍光強度 (Ex : 485 nm、Em : 535 nm) の経時変化を、AAPH 添加 1 分後から 1 分間隔で 60 分間測定した。X 軸に測定開始後の時間を、Y 軸にその時間のフルオレセインの蛍光強度をとったグラフを作成し、蛍光強度の軸と時間軸とグラフの軌跡によって囲まれた面積 (Area Under Curve : AUC) を次式より算出した。

$$AUC = (0.5 \times f_{1\text{min}} + f_{2\text{min}} + \dots + 0.5 \times f_{60\text{min}}) / f_{0\text{min}} \times 2$$

$$f_{x\text{min}} = \text{測定開始 } x \text{ 分後のフルオレセインの蛍光強度}$$

得られた Trolox の AUC から、ブランクの AUC を引いた値 (netAUC) を用いて、各 Trolox 溶液の濃度を Y 軸に、各 Trolox 溶液の netAUC を X 軸にとったグラフより、一次回帰式を算出し、この回帰式から、各 NSC 画分 1 g あたりの Trolox 当量 ( $\mu$ mol TE/g) として ORAC 値を算出した。

### 3.2.2.5 ABTS ラジカル消去活性の測定

ABTS ラジカル消去活性は、Miller ら (1996) の方法に従って行った。5 mM ABTS 水溶液 20 mL に約 0.5 g の二酸化マンガンを加え、室温で 30 分間攪拌し、ろ紙および PVDF シリンジフィルターを用いてろ過した。この ABTS ラジカルカチオン反応液は、75 mM リン酸ナトリウム緩衝液で吸光度を  $0.7 \pm 0.02$  (734 nm) に調製した。96 ウェルプレートを用いて、3.2.2.3.で調製した各試料溶液または Trolox 20  $\mu$ L に ABTS ラジカルカチオン反応液 200  $\mu$ L (ブランクには 75 mM リン酸ナトリウム緩衝液 200  $\mu$ L) を加え、60 分間静置した。反応後は、マイクロプレートリーダー (PowerWave XS2) を用いて、室温で 10 秒間攪拌、1 分間静置した後に 743 nm の吸光度を測定した。各 NSC 画分 1 g あたりの ABTS ラジカルカチオン消去活性は、Trolox 当量 ( $\mu$ mol TE/g) として算出した。

### 3.2.2.6. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は、Takahashi ら (2012) の方法に従って行った。すなわち、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 3.2.2.3.で調製した各試料溶液または Trolox、200 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) をそれぞれ 50  $\mu$ L 入れ、0.4 M DPPH 溶液 50  $\mu$ L を加えて攪拌し、25°C で 20 分間静置後、マイクロプレートリーダーで 517 nm の吸光度を測定した。標準物質には Trolox を用い、各 NSC 画分 1 g あたりの Trolox 当量 ( $\mu$ mol TE /g) として DPPH ラジカル消去活性を算出した。

### 3.2.2.7. マウスを用いた急性ストレス負荷試験

実験動物は、BALB/c 系雄性マウス (7 週齢、体重 23.2 g  $\pm$  1.1 g) を日本チャ

ールス・リバー株式会社（神奈川）より購入した。マウスは、標準的な実験室条件下（室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50～60%、明暗 12 時間サイクル（明期 8:00～20:00））で飼育され、市販固形試料 CE-2（日本クレア株式会社、東京）および水道水を自由摂取させた。全マウスの体重を測定し、平均体重および標準偏差が均一になるよう 6 群（1 群 5 匹）に振り分け、Blank（PBS 投与、ストレス負荷なし）群、Control（PBS 投与、ストレス負荷あり）群、各非糖類画分投与群として、25% MeOH（25% MeOH 画分投与、ストレス負荷あり）群、50% MeOH（50% MeOH 画分投与、ストレス負荷あり）群、75% MeOH（75% MeOH 画分投与、ストレス負荷あり）群および 100% MeOH（100% MeOH 画分投与、ストレス負荷あり）群を設定した。Fig. 3-1-1 にあるように、本ストレス負荷試験のスケジュールは、5 日間予備飼育した後、7 日間連続で Blank および Control 群には PBS 150  $\mu\text{L}$ 、各非糖類画分投与群には、3.1.2.5. の NSC 画分投与量を参考に、7 日間投与において毒性がないと想定される量および作用成分が特定できるよう高濃度となる量を検討し、各 NSC 画分マウス体重 1 kg 当たり 200 mg 濃度になるよう各試料（25%、50%、75% および 100% MeOH 画分）を PBS に溶解し、定時に胃ゾンデを用いて 1 日 1 回経口投与した。体重および給餌前後の重量測定は 1 日に 1 回、試料投与後に行った。摂餌量は、給餌前後の重量から動物数で除して、1 匹当りの 1 日の平均摂餌量を算出した。ストレス負荷方法および屠殺までの流れは 3.1.2.5. と同様であり、屠殺後は切断部分から採血を行い、採血後のマウスから肝臓を採取した。

尚、本動物実験は琉球大学動物実験規則（平成 19 年 6 月 26 日制定）に従い、動物実験計画書を作成し、琉球大学動物実験委員会の審議および承認（承認番

号：第 A2017105) を受けた後に実施した。

#### 3.2.2.8. 血清の調製

血清の調製方法は、3.1.2.6.と同様の方法で行い、得られた血清は、滅菌したマイクロチューブに小分けして、測定まで冷凍保存（-30°C）した。

#### 3.2.2.9. 肝臓ホモジナイズ上清の調製

採取した肝臓は、重量を測定し、すぐに液体窒素を用いて瞬間凍結させ、冷凍保存（-80°C）した。肝臓のホモジナイズは、200 mg の肝臓をマイクロチューブ（2 mL）に加えた後、冷却した PBS（100 mmol/L、pH 7.4）1 mL を加え、氷上にてハンディマイクロホモジナイザー（PHYSCOTRON® NS-310EIII、マイクロテック・ニチオン株式会社、千葉）を用いて、10 秒間のホモジナイズ（2000 rpm）を 3 回行った。その後、遠心分離（3,000 g、15 分間、4°C）し、得られた上清をマイクロチューブに小分けして、分析まで-80°C で保存した。

#### 3.2.2.10. 血清中コルチコステロン濃度の測定

マウスの血清中コルチコステロン濃度は、3.1.2.7.と同様の方法で定量した。血清中コルチコステロン濃度は、血清 1 mL あたりのコルチコステロン含量（ng）で示した。

#### 3.2.2.11. 肝臓中タンパク質量の測定

肝臓中のタンパク質含量は、高感度で反応が速いタンパク質検出用試薬であ

るクマシーブリリアントブルーを用いた市販のキット (Protein Quantification Kit-Rapid、 同仁化学研究所、熊本) を使用し、定量した。肝臓ホモジナイズ上清 1 mL 中のタンパク質量 (mg) を算出し、3.2.2.12.の肝臓中 ABTS ラジカル消去活性におけるタンパク質量換算の計算に用いた。

#### 3.2.2.12. 血清および肝臓中 ABTS ラジカル消去活性の測定

血清および肝臓中 ABTS ラジカル消去活性の測定は、3.2.2.5.に準じて行い、血清 1 mL および肝臓中タンパク質 1 mg あたりの Trolox 相当量 ( $\mu\text{mol TE} / \text{mL serum or mg of protein in liver}$ ) として算出した。

#### 3.2.2.13. 肝臓中 SOD 活性の測定

肝臓中における、活性酸素種となるスーパーオキシドを消去する生体内抗酸化酵素 SOD の活性は、水溶性ホルマザンを生じるテトラゾリウム塩 WST-1 の還元反応を用いた SOD 測定キット (SOD Assay-kit WST、同仁化学研究所、熊本) を用いて測定した。すなわち、本キットの説明書に従い、キサンチンオキシダーゼの反応によって生成させたスーパーオキシドを、WST-1 と試料中のスーパーオキシド消去物質を競合させて測定を行った。WST 法における単位は、「WST 還元 50%阻害を示す肝臓中ホモジナイズ上清 20  $\mu\text{L}$  に含まれる SOD 量が 1 単位 (U) である」と定義されているため、これに従って計算した。肝臓中 SOD 活性は、肝臓中タンパク質 1 mg あたりの SOD 活性値 (U / mg of protein in liver) として算出した。

#### 3.2.2.14. 統計学的処理

統計処理は、統計解析ソフトエクセル統計 2010 (株式会社社会情報サービス、東京を用いて行った。平均値の差の検定は一元配置分散分析法および Tukey-Kramer 法を用いた多重比較によって行った。いずれの検定においても、 $P < 0.05$  の場合を有意差ありと判定した。

#### 3.2.3. 結果

##### 3.2.3.1. 各 NSC 画分の総ポリフェノール含量および抗酸化活性

Table 3-2-1 に 4 種の NSC 画分の総ポリフェノール含量を示した。50%および 75% MeOH 画分の総ポリフェノール含量は 25%および 100% MeOH 画分と比べて、有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。すなわち、4 種の NSC 画分の中で、50% MeOH 画分が、最も高いポリフェノール含量を示した。また、各 NSC 画分の ORAC 値、DPPH ラジカル消去活性および ABTS ラジカル消去活性も Table 3-2-1 に示した。ORAC 法は生体での酸化反応に近いラジカル種の消去を反映し、DPPH および ABTS ラジカル消去活性は、単一化合物酸化防止剤の抗酸化能を反映する。50%および 75% MeOH 画分の ORAC 値は、25%および 100% MeOH 画分と比較して、有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。さらに、50%および 75% MeOH 画分の ABTS ラジカル消去活性も、25%および 100% MeOH 画分と比較して、有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。さらに、50% MeOH 画分の DPPH ラジカル消去活性は、4 種の NSC 画分の中で、最も高い値を示した。抗酸化活性評価の結果をまとめると、50% MeOH 画分の抗酸化活性が最も高く、次いで 75% MeOH 画分、25% MeOH 画分および 100% MeOH 画分の順となった。

### 3.2.3.2. 各 NSC 画分を摂取したマウス体重、平均摂餌量および肝臓重量

Table 3-2-2 には、試料投与前日 (Day 0) およびストレス負荷前日 (Day 6) の体重、1 匹あたりの 1 日の平均摂餌量、体重 100 g あたりの肝臓重量を示した。6 日目における各 NSC 画分投与群の体重および肝臓重量は、PBS 150  $\mu$ L を投与した Blank 群および Control 群と比べて、有意な差は示さなかった。Control 群の摂餌量は、Blank 群の摂餌量と比べて有意な差はなかったが、100%MeOH 投与群の摂餌量は、Blank 群および Control 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した。

### 3.2.3.3. 各 NSC 画分を摂取したストレス負荷マウス血清中コルチコステロン濃度

各群の血清中コルチコステロン濃度を Fig. 3-2-2 に示した。Control 群の血清中コルチコステロン濃度は、Blank 群と比べて、有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。一方、50% MeOH 群の血清中コルチコステロン濃度は、Blank 群と有意差はなく、Control 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した。また、25% MeOH 群および 100% MeOH 群の血清中コルチコステロン濃度は、Control 群と比べて、約 30%低い値を示し、75% MeOH 群の血清中コルチコステロン濃度は、Control 群と比べて、約 10%低い値となった。

### 3.2.3.4. 各 NSC 画分を摂取したストレス負荷マウス血清および肝臓中 ABTS ラジカル消去活性

急性ストレス負荷マウス血清および肝臓における ABTS ラジカル消去活性を Fig. 3-2-3 に示した。Control 群の血清中 ABTS ラジカル消去活性は、Blank 群と比べて、有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した (Fig. 3-2-3A)。一方、NSC 画分を摂取した 4 群の血清中 ABTS ラジカル消去活性は、Control 群と比べて約 10%程度高い値を示した。また、肝臓中 ABTS ラジカル消去活性の結果においても、Control 群は、Blank 群と比べて、有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した (Fig. 3-2-3B)。一方で、NSC 画分を摂取した 4 群の肝臓中 ABTS ラジカル消去活性は、Control 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。NSC 画分を摂取した群の血清および肝臓中 ABTS ラジカル消去活性において、各群の間で有意な差は見られなかった (Fig. 3-2-3A および Fig. 3-2-3B)。

#### 3.2.3.5. 各 NSC 画分を摂取したストレス負荷マウス肝臓中 SOD 活性

Fig. 3-2-4 にマウス肝臓中 SOD 活性の結果を示した。Blank 群および Control 群の間で有意差は見られなかったが、50%MeOH 群のマウス肝臓中 SOD 活性は、Control 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。また、25% MeOH 群、75% MeOH 群および 100% MeOH 群の肝臓中 SOD 活性は、Control 群と比べて約 10%程度高い値を示したが、有意差を示さなかった。

#### 3.2.4. 考察

本節では、第 1 節で用いた粗 NSC を極性の異なる 4 種類の NSC 画分に調製し、各 NSC 画分の総ポリフェノール含量および抗酸化活性を測定するとともに、ストレス負荷試験を行い、各 NSC 画分を摂取した拘束ストレスマウスにおける

血清中コルチコステロン濃度および生体抗酸化活性を測定し、黒糖中 NSC がマウスのストレス反応に及ぼす影響を調べた。初めに、ストレス負荷試験において、投与試料となる各 NSC 画分の内容物や投与量は、体重や肝臓重量に有意な変化を示さなかった (Table 3-2-2)。したがって、本試験で用いた各 NSC 画分の 7 日間の投与は、体重や肝臓重量に有意な変化を示さず、毒性を示す可能性は低いと考えられた。しかし、6 群のうち、100%MeOH 画分投与群の摂餌量は最も少なく、体重増加も少ないことから、100%MeOH 画分の長期投与は、生体に影響を与える可能性がある。

ストレス刺激によって HPA 軸が活性し、糖質コルチコイドが分泌される。本試験では、1 時間の拘束による急性ストレス負荷によって、マウスのコルチコステロンが分泌した。一方で、50%MeOH 画分の経口摂取は、ストレス負荷のみのマウスと比べて、コルチコステロンの分泌を有意に抑制した (Fig. 3-2-2)。このことから、黒糖のストレス抑制作用に関与する成分は、この 50%MeOH 画分に存在している可能性が示唆された。さらに、この画分は、投与試料に用いた 4 種の NSC 画分の中で、最も総ポリフェノール含量が多く、高い抗酸化活性を示した (Table 3-2-1)。ソバスプラウトから分離され、抗酸化活性を持つフラボノイドの投与は、24 時間の拘束ストレスを負荷したマウスのコルチコステロン分泌を抑制したとの報告がある (Watanabe and Ayugase, 2008)。このように、抗酸化性フェノール化合物がストレス刺激による HPA 軸の活性を抑制することが報告されていることから、50%MeOH 画分中ストレス抑制作用の関与成分について、抗酸化活性が関与している可能性がある。しかし、一方で、50%MeOH 画分の次に、ポリフェノール含量および抗酸化活性が高い値を示した 75%MeOH 画分 (Table

3-2-1) の摂取は、4 つの NSC 画分の中で、ストレス負荷によるコルチコステロンの分泌抑制作用が最も弱い結果となった (Fig. 3-2-2)。本結果は、フラボンやフラバノールなどのフェノールおよびテルペノイドが含まれ、抗酸化活性も認められているカルケージャ (*Baccharis trimera*) 抽出物の投与が (Oliveira *et al.* 2013)、ストレス負荷ラット血漿中コルチコステロン濃度に変化を与えなかった Mendes ら (2007) の報告と一致している。以上のことから、本試験では、*in vitro* 試験による抗酸化活性とコルチコステロン分泌抑制の関係は不明瞭であったが、抗ストレス作用成分に抗酸化成分が多いことや、本試験においてポリフェノール化合物が多く、高い抗酸化活性を有する 50%MeOH 画分がコルチコステロン分泌抑制を示したことから、黒糖の抗ストレス成分を特定するために、ポリフェノール含量および抗酸化活性を指標として、50%MeOH 画分の成分分析を行う必要があると考えた。

本試験では、1 時間の拘束ストレス負荷によって、マウス血清および肝臓中 ABTS ラジカル消去活性が低下を示した (Fig. 3-2-3A および Fig.3-2-3B)。Li ら (2013) の報告も同様に、急性拘束ストレス負荷マウスの血漿および肝臓の ORAC 値は、著しく低下を示したとの報告があり、本結果と一致した。ストレス反応では ROS が発生することから、本試験における急性ストレス負荷によって生体内抗酸化機能が低下したと考えた。一方で、各 NSC 画分の投与は、ストレス負荷による血清および肝臓中抗酸化活性の低下を抑制した。各 NSC 画分の抗酸化活性では、50% MeOH 画分 > 75% MeOH 画分 > 25% MeOH 画分および 100% MeOH 画分という順で違いがあったが (Table 3-2-1)、生体内における抗酸化低下抑制作用は、各 NSC 画分投与群間で有意な差は見られなかった (Fig. 3-2-3A

および Fig.3-2-3B)。この *in vivo* および *in vitro* における結果の違いは、抗酸化活性を示すフェノール化合物の異なる生体利用性による可能性が高い。摂取したフェノール化合物の生体内利用は、化学構造や糖鎖の種類によって異なり、吸収性の違いも分かれる。多くは、腸管上皮細胞内に取り込まれ、加水分解されてアグリコンとなり、抱合されて血中に放出され、肝臓でもメチル化・抱合体化されて水溶性となり、排出もしくは一部で大腸から吸収されて肝臓で二次代謝を受ける。この一連の流れによって、活性を有する化合物と体内に存在する代謝物は異なり、抗酸化活性の違いが生じると考えられる（越阪部、2016; Martins *et al.*, 2016)。次いで、本試験のストレス負荷によってマウス肝臓中 SOD 活性も低下を示したが、各 NSC 画分の投与は、肝臓中 SOD 活性の低下を抑制し、特に 50% MeOH 画分を摂取したマウスの肝臓中 SOD 活性は有意に高い値を示した (Fig. 3-2-4)。生体内抗酸化酵素である SOD は、ROS の 1 つであるスーパーオキシドを過酸化水素から水や酸素に変える反応を触媒し、ROS を消去する働きをもつ。フェノール化合物の中には、SOD 様活性を示す化合物が多くあることに加えて、Liu ら (2010) は、フェノール化合物であるケルセチンの摂取が、ラットの肝臓において、肝障害によって低下する SOD の mRNA 発現レベルを著しく増加することを報告している。さらに、フェノール化合物であるレスベラトロールは、生体内抗酸化成分である還元型グルタチオンの比率を上昇させ、SOD 活性を上昇させることが分かっていることから (Momuken *et al.*, 2011)、50%MeOH 画分中には単一もしくは複数の化合物によって、SOD 様活性を有するか、もしくは SOD 量を増加するフェノール化合物が存在する可能性が示唆された。

本節の結果をまとめた概略図を Fig. 3-2-5 に示した。

### 3.2.5. 小括

本節では、黒糖の抗ストレス作用に関与する成分を特定するため、黒糖の非糖類成分（NSC）に焦点を当て、異なる極性の溶媒を用いて、NSC を 4 種類に分画し、各 NSC 画分の総ポリフェノール含量および抗酸化活性を測定するとともに、ストレス負荷試験を行い、各 NSC 画分を摂取した拘束ストレスマウスにおける血清中コルチコステロン濃度および生体抗酸化活性を測定し、評価した。その結果、4 つの NSC 画分の内、50%MeOH で抽出した NSC 画分のポリフェノール量および抗酸化活性は、最も高い値を示した。さらに、50%MeOH 画分の経口投与は、1 時間の拘束ストレスによる血清中コルチコステロンの分泌だけでなく、誘発される血清および肝臓中抗酸化活性の低下も抑制した。また、この 50%MeOH 画分に存在する単一または複数のフェノール化合物は、生体内で SOD 様活性を有するか、もしくは肝臓中 SOD 量を増加する可能性が示唆された。

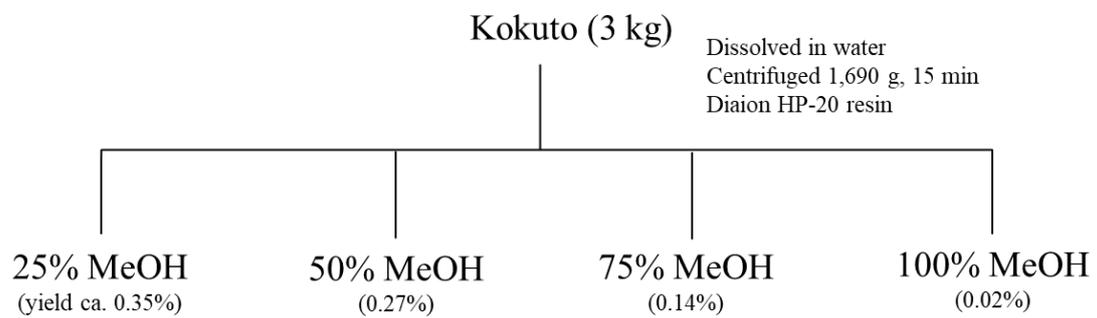


Fig. 3-2-1 Fractionation of non-sugar components (NSCs) in Kokuto.

Table 3-2-1 Total phenolic content and antioxidant activity (ORAC value, ABTS radical-scavenging activity, and DPPH radical-scavenging activity) of non-sugar component (NSC) fractions

Fraction	Total phenolic content (mg GAE/g)	ORAC value ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	ABTS radical-scavenging activity ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	DPPH radical-scavenging activity ( $\mu\text{mol TE/g}$ )
25% MeOH	113.8 $\pm$ 13.3 <sup>b</sup>	2594.2 $\pm$ 21.2 <sup>b</sup>	1459.0 $\pm$ 48.3 <sup>b</sup>	204.5 $\pm$ 26.9 <sup>b</sup>
50% MeOH	159.4 $\pm$ 15.8 <sup>a</sup>	4386.2 $\pm$ 175.8 <sup>a</sup>	2032.0 $\pm$ 226.4 <sup>a</sup>	295.2 $\pm$ 28.0 <sup>a</sup>
75% MeOH	140.1 $\pm$ 16.6 <sup>a</sup>	4741.3 $\pm$ 498.2 <sup>a</sup>	1862.8 $\pm$ 147.6 <sup>a</sup>	233.5 $\pm$ 23.3 <sup>ab</sup>
100% MeOH	89.8 $\pm$ 12.9 <sup>b</sup>	2474.9 $\pm$ 305.5 <sup>b</sup>	1344.9 $\pm$ 56.0 <sup>b</sup>	217.4 $\pm$ 42.4 <sup>ab</sup>

63

Values are means  $\pm$  SD (n=3).

Different letters in the same row indicate significant differences between samples ( $P < 0.05$ ).

GAE = gallic equivalents; TE = Trolox equivalents; ORAC = oxygen absorbance capacity

Table 3-2-2 Body weight, food intake and liver weight of mice administered with each non-sugar component (NSC) fraction

Group	Body weight (g)		Food intake (g/day)	Liver weigh (g/100 g BW)
	Day 0	Day 6		
Blank	23.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	25.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	3.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.2 <sup>a</sup>
Control	22.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	23.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.3 <sup>a</sup>
25%MeOH	23.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	24.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>	5.9 ± 0.3 <sup>a</sup>
50%MeOH	23.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	24.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.4 <sup>ab</sup>	5.5 ± 0.3 <sup>a</sup>
75%MeOH	23.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	24.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.5 <sup>ab</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
100%MeOH	23.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	23.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	6.0 ± 0.4 <sup>a</sup>

Values are means ± SD. For each column, different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); 25%MeOH = group treatment with 25%MeOH NSC fraction (stressed); 50%MeOH = group treatment with 50%MeOH NSC fraction (stressed); 75%MeOH = group treatment with 75%MeOH NSC fraction (stressed); 100%MeOH = group treatment with 100%MeOH NSC fraction (stressed)

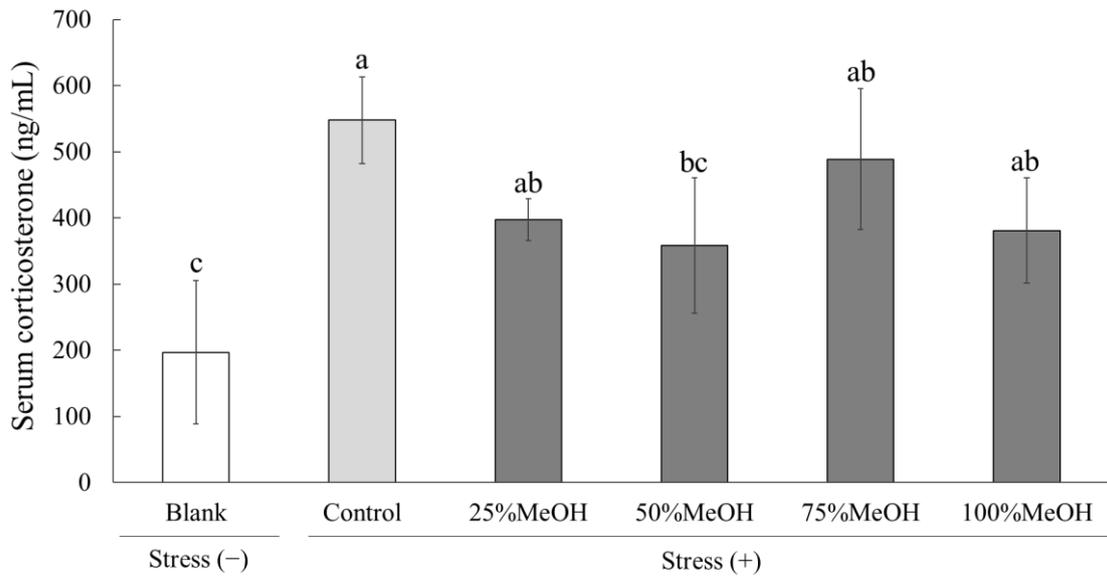


Fig. 3-2-2 Serum corticosterone levels of acute stressed mice administered with each non-sugar component (NSC) fraction.

Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ )

Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); 25%MeOH = group treatment with 25%MeOH NSC fraction (stressed); 50%MeOH = group treatment with 50%MeOH NSC fraction (stressed); 75%MeOH = group treatment with 75%MeOH NSC fraction (stressed); 100%MeOH = group treatment with 100%MeOH NSC fraction (stressed)

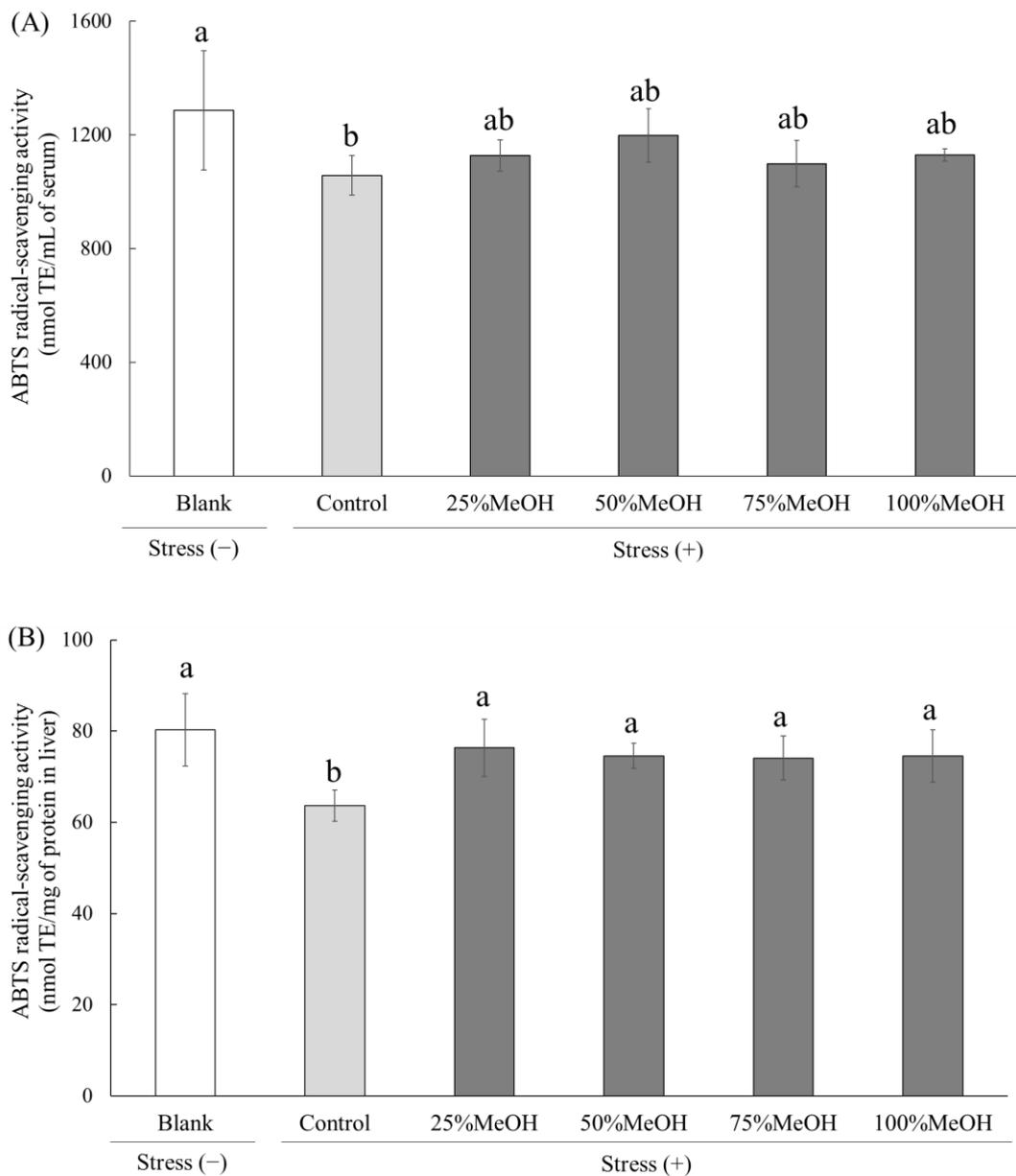


Fig. 3-2-3 ABTS radical-scavenging activity in serum (A) and liver (B) of acute stressed mice administered with each non-sugar component (NSC) fraction.

Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); 25%MeOH = group treatment with 25%MeOH NSC fraction (stressed); 50%MeOH = group treatment with 50%MeOH NSC fraction (stressed); 75%MeOH = group treatment with 75%MeOH NSC fraction (stressed); 100%MeOH = group treatment with 100%MeOH NSC fraction (stressed)

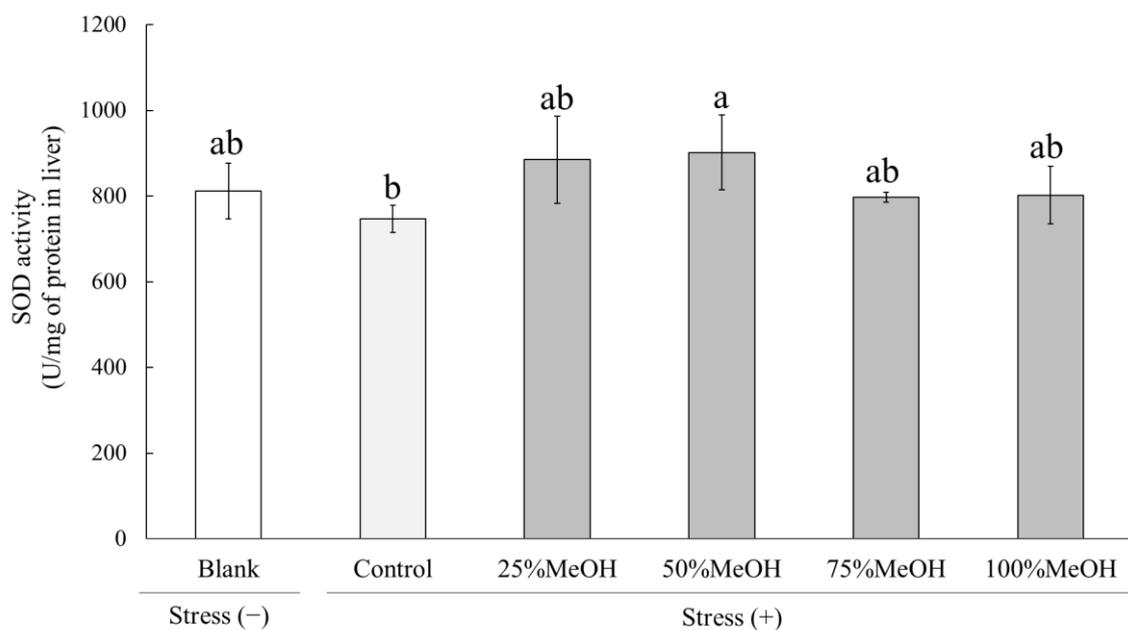


Fig. 3-2-4 SOD activity in liver of acute stressed mice administered with each non-sugar component (NSC) fraction.

Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

SOD = superoxide dismutase; Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); 25%MeOH = group treatment with 25%MeOH NSC fraction (stressed); 50%MeOH = group treatment with 50%MeOH NSC fraction (stressed); 75%MeOH = group treatment with 75%MeOH NSC fraction (stressed); 100%MeOH = group treatment with 100%MeOH NSC fraction (stressed)

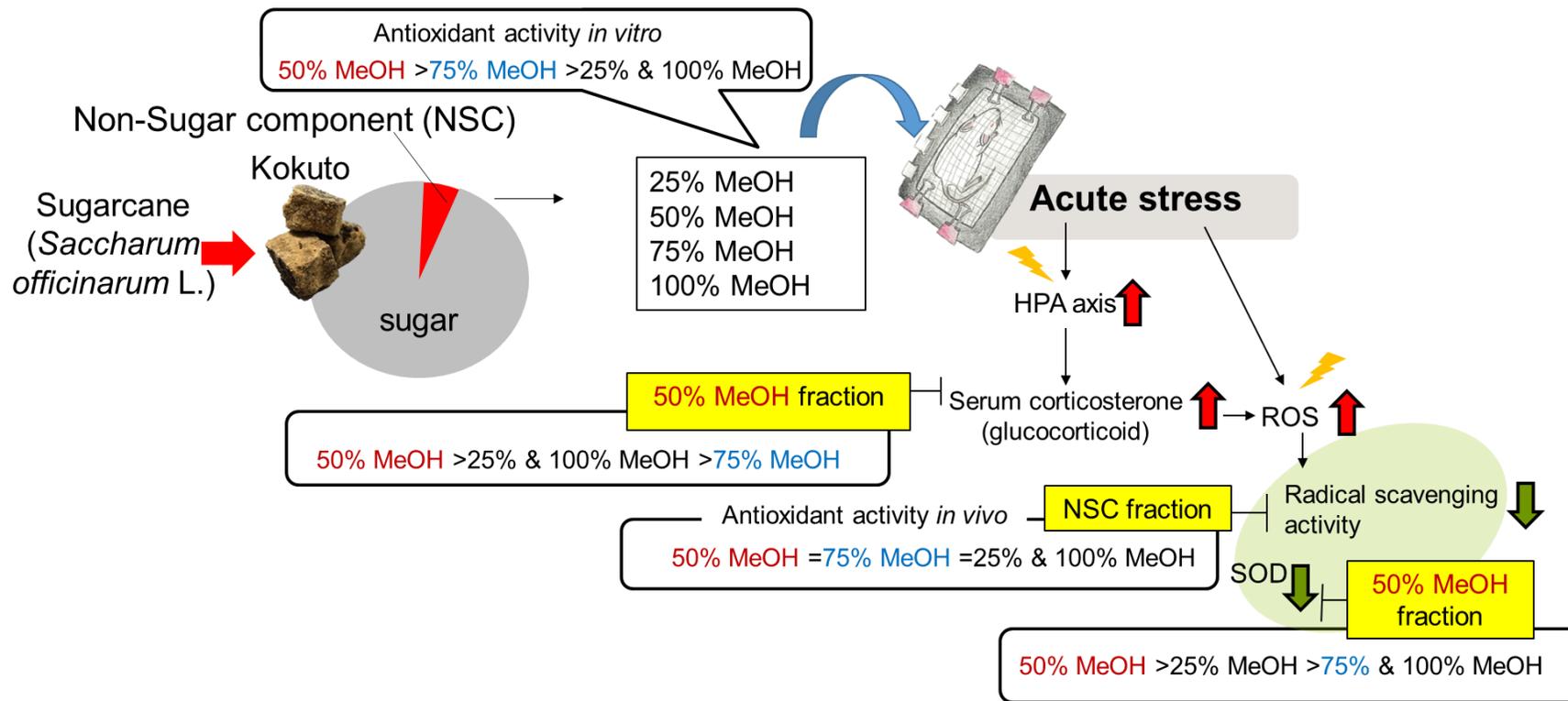


Fig. 3-2-5 Schematic representation.

## 第4章

### 黒糖中フェノール化合物の検出と黒糖中非糖類成分（NSC）およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス反応に及ぼす影響

#### 第1節

##### 黒糖の抗ストレス作用に関与する黒糖中フェノール化合物の検出

###### 4.1.1. 緒言

第3章では、黒糖由来成分（糖類、 $\gamma$ -アミノ酪酸および非糖類成分）の投与を伴うマウスにストレス負荷試験を行い、生体内ストレスマーカーを測定した結果、黒糖の抗ストレス作用には、非糖類成分（NSC）が関与している可能性が示唆された。そこで、NSC中の抗ストレス作用成分を絞り込むため、NSCを異なる極性の溶媒（25%、50%、75%および100%MeOH）を用いて4つに分画し、急性ストレスマウスに経口投与した結果、4つの画分のうち、フェノール化合物が多く、高い抗酸化活性を有する50%MeOHで抽出したNSC画分は、1時間の拘束による血清中コルチコステロンの分泌だけでなく、生体内抗酸化活性の低下も抑制した。したがって、この50%MeOHで抽出したNSC画分に、黒糖の抗ストレス作用に関与する成分が含まれている可能性が示唆された。そこで、黒糖中の抗ストレス作用成分を特定するため、この50%MeOHで抽出したNSC画分をさらに分画し、各フラクションの総ポリフェノール含量および抗酸化活性が高いフラクションを選定し、高速液体クロマトグラフィーを用いて成分分析し

て、黒糖中フェノール化合物の検出を試みた。

#### 4.1.2. 実験方法

##### 4.1.2.1. 試薬

*p*-ヒドロキシベンズアルデヒドは、和光純薬株式会社（大阪）で購入した。*p*-ヒドロキシアセトフェノンは、ナカライテスク株式会社（京都）で購入し、*p*-クマル酸は、東京化成工業株式会社（東京）から購入したものをを用いた。スカフトシドおよびイソスカフトシドは、Takara ら（2002）の報告より、黒糖から分離・精製し、核磁気共鳴および紫外線-可視光吸収スペクトルに基づいて同定したものをを使用した。その他の試薬は、和光純薬株式会社（大阪）より購入した。

##### 4.1.2.2. 50%MeOH 抽出 NSC 画分の分画

第3章第2節において、伊平屋島（沖縄県）産黒糖から 50%MeOH を用いて分画した NSC 画分の水溶液は、Toyopearl HW-40C ゲル（東ソー株式会社、東京）を充填したガラスカラムに流し、20%、40%および 60%MeOH 濃度で分画した。各 MeOH 濃度溶出液は、フラクションコレクター（CHF161RA、アドバンテック東洋株式会社、東京）にて回収し、その吸光度は UV1800 分光光度計（株式会社島津製作所、京都）を用いて 240、270 および 320 nm で測定した。特徴のある紫外吸収に従って、回収した溶出液を 5 つのフラクション（Fr. 1～Fr. 5）に分けた（Fig. 4-1-1）。各フラクションは、ロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥機で凍結乾燥して粉末化した。

#### 4.1.2.3. 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量の測定は 3.2.2.3. に準じて行い、各フラクションの総ポリフェノール含量は、各フラクション 1 g あたりの没食子酸当量 (mg GAE/g) として算出した。

#### 4.1.2.4. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性の測定は 3.2.2.6. に準じて行い、各フラクションの DPPH ラジカル消去活性は、各フラクション 1 g あたりの Trolox 当量 ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) として算出した。

#### 4.1.2.5. HPLC を用いた成分分析

NSC 画分から分離した Fr. 3、Fr. 4 および Fr. 5 (Fig. 4-1-1) の成分分析は、以下の条件によって HPLC 分析を行った。カラムは Develosil<sup>®</sup> ODS-MG-3 (3.0×150 mm) を使用し、カラム温度は 40°C、注入量は 1  $\mu\text{L}$  で、流速は 0.4 mL/min、移動相 A は 0.1% 酢酸水溶液、移動相 B はアセトニトリルを使用した。測定時間は 30 分間であり、グラジエント条件は 0~25 分 (B 液) 10~60%、25~30 分 (B 液) 60% とした。UV 検出器は波長 280 nm で測定を行った。これらは、外部標準品の UV スペクトルおよびクロマトグラフィーの保持時間により同定を行った。

#### 4.1.3. 結果および考察

本節では、抗酸化活性を指標として、黒糖の抗ストレス作用成分を特定するため、50%MeOH で抽出した NSC 画分を 5 つに分画し、各フラクション (Fr. 1~Fr. 5) の総ポリフェノール含量および抗酸化活性を測定し、Table 4-1-1 に結果を示した。最も総ポリフェノール含量が多いのは Fr. 5 であり、没食子酸等量 200 mg 以上のポリフェノール量を有するフラクションは、Fr. 3、Fr. 4 および Fr. 5 という結果となった。一方、DPPH ラジカル消去活性が最も高いのは Fr. 4 であり、次いで、Fr. 5、Fr. 3、Fr. 2 および Fr. 1 という順に活性値は低くなった。今回、黒糖の抗ストレス効果の作用成分として、抗酸化性フェノール化合物に焦点を当てていることから、5 つのフラクションの中で総ポリフェノール量が少なく、抗酸化活性が低い Fr. 1 および Fr. 2 は除外し、総ポリフェノール含量が多く、抗酸化活性が高い Fr. 3、Fr. 4 および Fr. 5 に焦点を当て、HPLC を用いて成分分析を行った。Fr. 3 および Fr. 4 から 5 つのフェノール化合物を検出した (Fig. 4-1-2)。Fr. 3 からは、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド (peak a)、*p*-ヒドロキシアセトフェノン (peak b)、スカフトシド (peak c) およびイソスカフトシド (peak d) の 4 種類を同定し、Fr. 4 から *p*-クマル酸 (peak e) を同定した。Fr. 5 は夾雑物が多く、化合物の同定には至らなかった。検出された 5 つのフェノール化合物の構造式は、Fig. 4-1-3 に示した。

検出された 5 つのフェノール化合物は、以前からサトウキビ搾汁液、糖蜜や黒糖中に存在していることが明らかとなっており、それに加えて、抗ストレス作用に関連する機能性も報告されている。例えば、サトウキビ糖蜜抽出物に含有し、抗酸化活性を示す *p*-ヒドロキシベンズアルデヒドは、GABA アミノ基転移酵素

(GABA-T) 活性の阻害による抗不安効果が報告されている (Ha *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2007)。すなわち、脳内において主要な抑制性神経伝達物質である GABA をコハク酸セミアルデヒドに分解する GABA-T 活性を阻害することで、脳内 GABA 量を増加し、不安感を軽減する可能性が示唆されている。さらに、既に黒糖中で検出されている *p*-ヒドロキシアセトフェノンは、抗酸化作用と抗コリンエステラーゼ作用を有することが報告されている (Payet *et al.*, 2005; Hacibekiroğlu *et al.*, 2011)。コリンエステラーゼは、コリンエステルをコリンと有機酸に分解する酵素であり、交感神経の興奮を抑制するアセチルコリンを分解する。このことから、*p*-ヒドロキシアセトフェノンの摂取は、アセチルコリンの分解を阻止し、ストレス負荷による交感神経の興奮や、それに付随する血糖値および血圧上昇を緩和する可能性がある。次いで、サトウキビ搾汁液から検出されているスカフトシドおよびイソスカフトシドは、高い DPPH ラジカル消去活性を示すという報告がある (Colombo *et al.*, 2006; Vila *et al.*, 2008)。最後に、サトウキビの糖蜜や黒糖中に存在することが確認されている *p*-クマル酸は、生体内抗酸化活性に加えて (Yeh and Yen, 2006; Payet *et al.*, 2006; Duarte-Almeida *et al.*, 2011)、GABA の活性を示し、高架式十字迷路パラダイムを用いた軽度から中程度のストレスによるラットの不安症状を軽減する可能性が示唆されている (Scheepens *et al.*, 2014)。したがって、この 5 つのフェノール化合物は、抗酸化活性を有するとともに、黒糖の抗ストレス作用に関与している可能性がある。

#### 4.1.4. 小括

急性ストレス負荷マウスに対して、抗ストレス作用を示した 50%MeOH で抽出した NSC 画分の成分分析を行った結果、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド、*p*-ヒドロキシアセトフェノン、スカフトシド、イソスカフトシドおよび *p*-クマル酸の 5 つの抗酸化活性を有するフェノール化合物が検出された。この 5 種のフェノール化合物は、黒糖の抗ストレス作用に関与している可能性が示唆された。

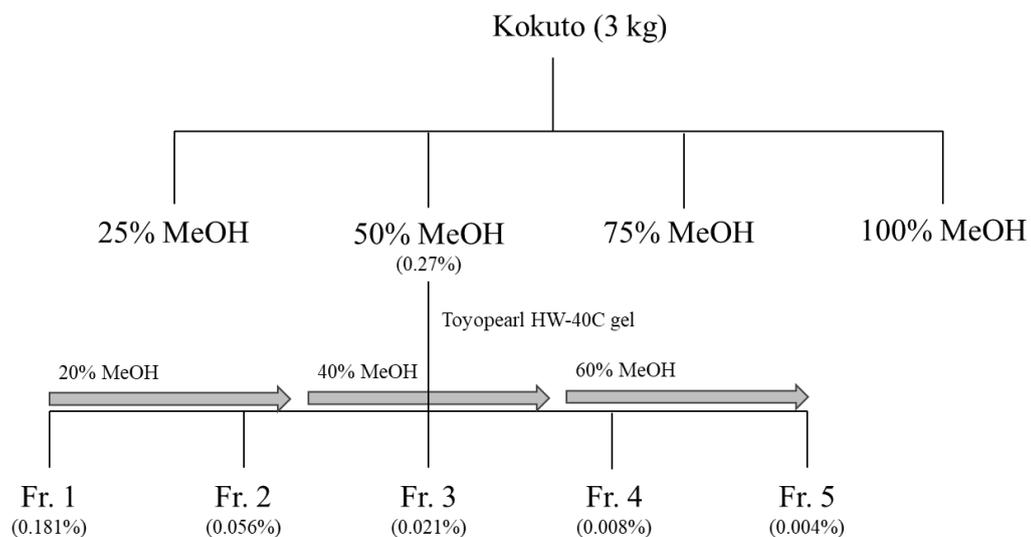


Fig. 4-1-1 Fractionation of non-sugar components (NSCs) using 50%MeOH in Kokuto. Each fraction yield is expressed as the percentage of the solid content.

Table 4-1-1 Total phenolic content and DPPH radical-scavenging activity of five fractions separated from the 50% MeOH fraction

Fraction	Total phenolic content (mg GAE/g)	DPPH radical-scavenging activity ( $\mu\text{mol TE/g}$ )
Fr. 1	120.6 $\pm$ 14.9 <sup>d</sup>	338.9 $\pm$ 14.5 <sup>d</sup>
Fr. 2	191.8 $\pm$ 10.6 <sup>c</sup>	578.2 $\pm$ 5.6 <sup>c</sup>
Fr. 3	200.0 $\pm$ 13.4 <sup>bc</sup>	685.4 $\pm$ 55.7 <sup>b</sup>
Fr. 4	230.5 $\pm$ 15.1 <sup>ab</sup>	859.1 $\pm$ 42.7 <sup>a</sup>
Fr. 5	242.7 $\pm$ 15.1 <sup>a</sup>	696.8 $\pm$ 14.5 <sup>b</sup>

Value are means  $\pm$  SD (n=3).

Different letters indicate significant differences between samples ( $P < 0.05$ ).

GAE = gallic acid equivalents; TE = Trolox equivalents

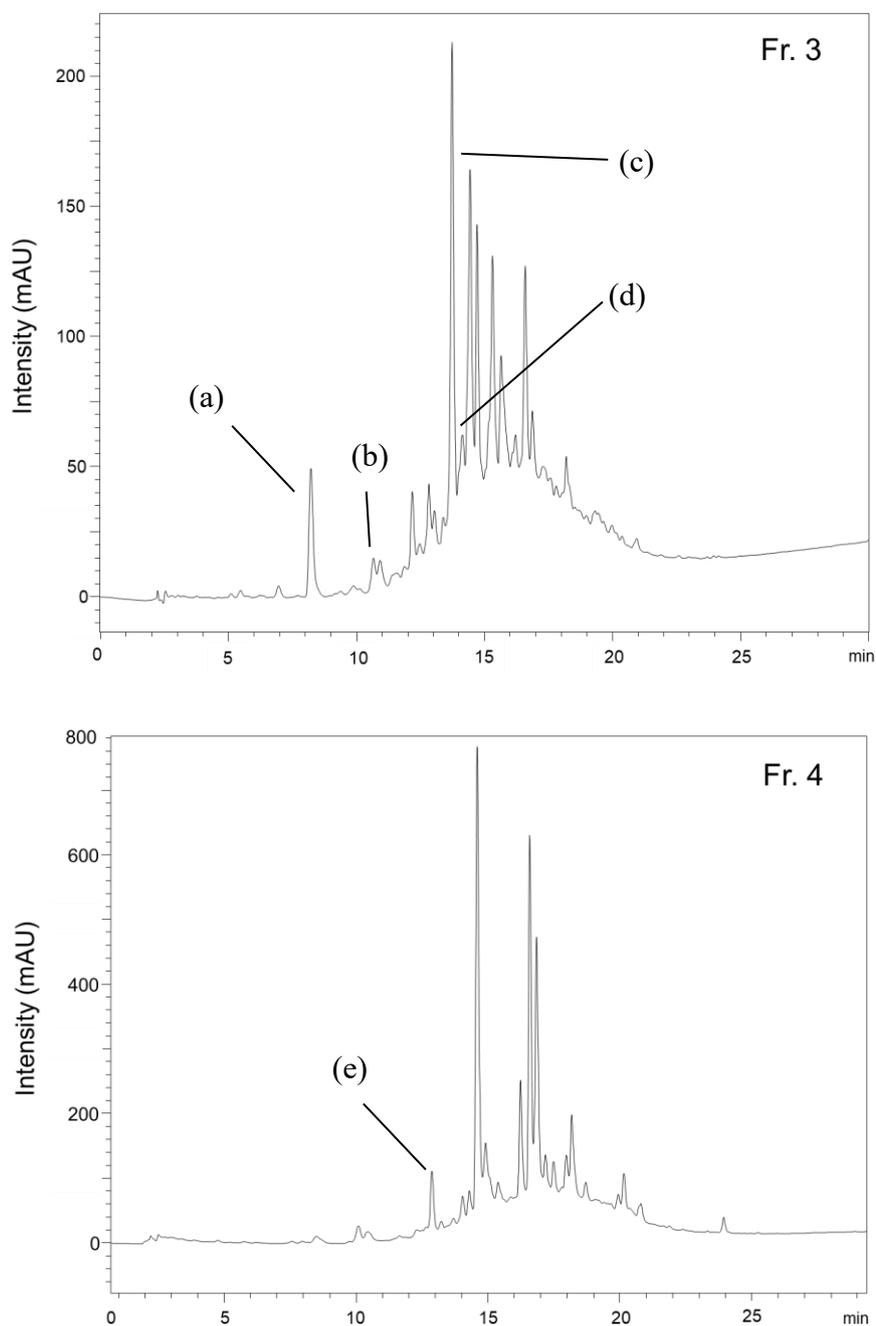
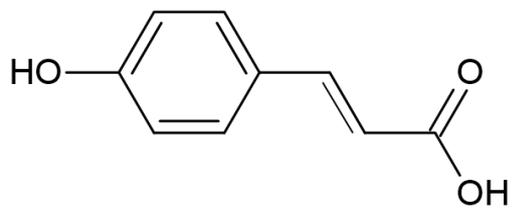
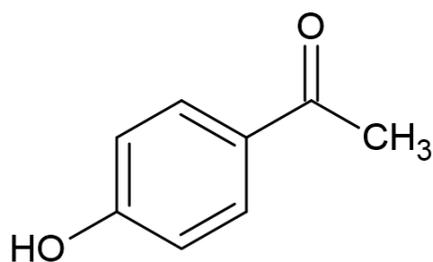


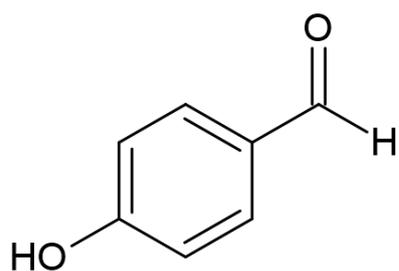
Fig. 4-1-2 Phenolic constituent profiles of fractions 3 and 4 (Fr. 3 and Fr. 4) separated from the 50%MeOH fraction, as identified in HPLC analyses at wavelength of 280 nm. The identified phenolic compounds (peak (a)-(e)) were as follow: *p*-hydroxybenzaldehyde (a), *p*-hydroxyacetophenone (b), schaftside (c), isoschaftside (d), and *p*-coumaric acid (e).



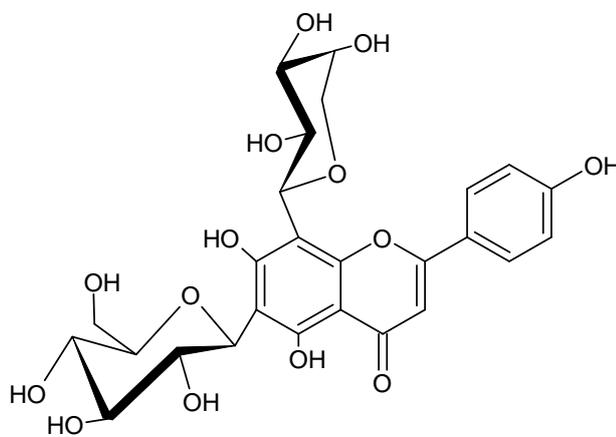
*p*-Coumaric acid



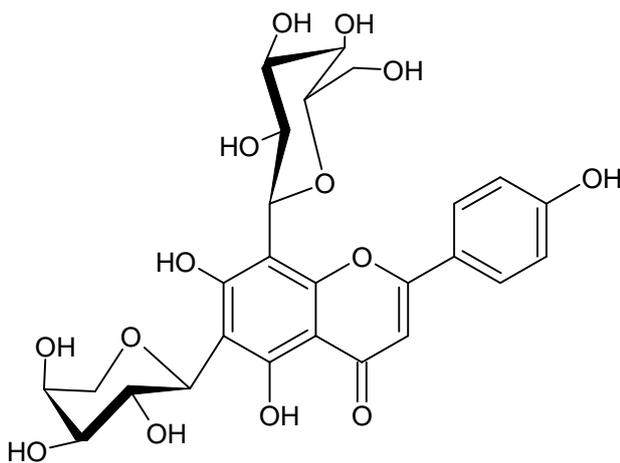
*p*-Hydroxyacetophenone



*p*-Hydroxybenzaldehyde



Schaftoside



Isoschaftoside

Fig. 4-1-3 Chemical structure of detected five phenolic compounds in Fr.3-4 separated from NSC fraction extracted by 50%MeOH using HP-20 resin.

## 第2節

### 黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷した 高脂肪食給与マウスのストレスホルモンと脂質状態に及ぼす影響

#### 4.2.1. 緒言

環境の変化が激しい現代社会において、人々は日常生活の中で長期的なストレスを抱えるとともに、食生活が乱れ、脂肪の多い食事を摂ることが増えている。過度の長期的なストレス暴露は、うつ病、不安障害や不眠症などの慢性ストレス疾患を誘発するとともに (Chiba *et al.*, 2012)、非アルコール性脂肪肝や高脂血症のような脂質代謝に関わる疾患の発症にも関与する (Friedman *et al.*, 1958; Younossi *et al.*, 2018)。さらに、慢性ストレス負荷は、活性酸素種を発生させ、酸化ストレス状態を引き起こす。肝臓内における酸化ストレスは、脂肪肝から脂肪肝肝炎に移行する慢性肝疾患の進展に重要な役割を果たしていることが示唆されている (堀江ら、2006)。加えて、高脂肪食 (High fat diet : HFD) を与えた 12 週間の慢性ストレス負荷ラットは、普通食を与えた慢性ストレス負荷ラットよりも、肝臓における脂肪蓄積および脂質過酸化分解生成物量が多い結果となったことから (Kuo *et al.*, 2007)、HFD 摂取によって慢性ストレス負荷による肝臓の脂肪蓄積および過酸化は増悪することが見出された。以上より、HFD 摂取下における長期的なストレス反応は、肝臓中脂肪の蓄積および過酸化状態を引き起こし、結果的に重篤な疾患を導くため、その予防策を講じることは現代社会において極めて重要である。対策の一つとして、例えば、抗酸化成分を有する漢方薬

の四逆散は、マウスのうつ様行動を軽減するとともに、肝臓中トリグリセリド量を正常化し、肝臓中の過酸化物を減少することが報告されている (Cheng *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2012)。このことから、抗酸化成分を有する抗ストレス食品の摂取は、HFD 摂取下における慢性ストレス反応を緩和するだけでなく、慢性ストレスに起因する肝臓の脂質状態の変化も予防する可能性がある。

第 4 章第 1 節では、黒糖中の抗ストレス作用成分を特定するため、第 3 章の第 2 節でストレスホルモン分泌抑制作用を示した 50%MeOH 抽出した NSC 画分 (NSC 画分) をさらに分画し、各フラクションの総ポリフェノール含量および抗酸化活性が高いフラクションを選定し、高速液体クロマトグラフィーを用いて成分分析した。その結果、5 つの抗酸化性フェノール化合物 (*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド、*p*-ヒドロキシアセトフェノン、スカフトシド、イソスカフトシドおよび *p*-クマル酸) を同定した。

本節では、同定された 5 つのフェノール化合物のうち、容易に入手でき、抗ストレス作用が期待できる *p*-ヒドロキシベンズアルデヒドおよび *p*-ヒドロキシアセトフェノンに着目して、抗ストレス作用の検証を行った。すなわち、慢性ストレス負荷 HFD 給与マウスに NSC 画分、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒドおよび *p*-ヒドロキシアセトフェノンの投与を行い、血清中コルチコステロン濃度を測定するとともに、肝臓中のトリグリセリド、総コレステロール量および脂質過酸化分解生成物であるマロンジアルデヒド量を測定し、NSC 画分および黒糖中フェノール化合物 (*p*-ヒドロキシベンズアルデヒドおよび *p*-ヒドロキシアセトフェノン) が慢性ストレス負荷マウスのストレスホルモンと脂質状態に及ぼす影響

を検証した。

#### 4.2.2. 実験方法

##### 4.2.2.1. 試薬

*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド (HBA)、硫酸アンモニウム、トリクロロ酢酸およびチオバルビツール酸は、和光純薬株式会社 (大阪) で購入した。*p*-ヒドロキシアセトフェノン (HAP) は、ナカライテスク株式会社 (京都) で購入した。その他の試薬は、和光純薬株式会社 (大阪) の特級試薬を用いた。

##### 4.2.2.2. ABTS ラジカル消去活性の測定

ABTS ラジカル消去活性の測定は、3.2.2.5.に準じて行い、各試料 1 g あたりの Trolox 相当量 ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) として算出した。

##### 4.2.2.3. ORAC 値の測定

ORAC 値の測定は、3.2.2.4.に準じて行い、蛍光強度を経時的に記録したグラフの曲線下面積を算出し、得られた回帰式から、各試料 1 g あたりの Trolox 当量 ( $\mu\text{mol TE/g}$ ) として ORAC 値を算出した。

##### 4.2.2.4. LC-MS を用いた NSC 画分中 HAP および HBA の定量

NSC 画分中 HBA および HAP 量は、Mellegård ら (2009) の方法を参考に LC-MS を用いて測定し、NSC 画分 1 g あたりの HBA および HAP 量 ( $\mu\text{g}$ ) として算

出した。また、検体 1 点に対して 3 回の測定 (n=3) を行った。

#### 4.2.2.5. 高脂肪食給与マウスにおける慢性ストレス負荷試験

実験動物は、C57BL/6J 系雄性マウス (7 週齢、体重  $22.5 \text{ g} \pm 1.1 \text{ g}$ ) を日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川) より購入した。マウスは、標準的な実験室条件下 (室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、明暗 12 時間サイクル (明期 8:00~20:00)) で飼育され、飼料および水道水を自由摂取させた。5 日間予備飼育した後、マウスの体重を測定し、平均体重および標準偏差が均一になるよう 5 群 (1 群 6 匹、体重  $22.8 \pm 1.0 \text{ g}$ ) に振り分け、Blank (水投与、ストレスなし) 群、Control (水投与、ストレスあり) 群、NSC 画分投与 (NSC 画分投与、ストレスあり) 群、HBA 投与 (HBA 水溶液投与、ストレスあり) 群および HAP 投与 (HAP 水溶液投与、ストレスあり) 群を設定した。本試験スケジュールは、Fig. 4-2-1 に示すように、Blank 群以外のマウスは、拘束器具を用いて 1 日 1 時間拘束し、この拘束ストレスを 28 日間負荷した。試験の間、全てのマウスは高脂肪飼料 High-Fat Diet 32 (日本クレア株式会社、東京) を飼料とした。また、体重測定は 1 日 1 回、試料投与後に行なった。Blank および Control 群は蒸留水  $150 \mu\text{L}$  を 1 日 1 回経口投与し、NSC 画分投与群、HBA 投与群および HAP 投与群は、各試料水溶液 ( $100 \text{ mg/kg BW}$ ) を定時に胃ゾンデを用いて経口投与した。HBA および HAP は、市販の試薬を使用し、各試料の投与量は、高濃度かつ毒性のない投与量を検討して設定した。ストレス負荷が終了して 30 分後に、断頭器を用いてマウスを屠殺し、切断部分から採血を行った。また、採血後のマウスから腎周囲脂肪組織、精巣上

体脂肪組織および肝臓を採取し、組織重量の測定を行った。

尚、動物実験は琉球大学動物実験規則（平成 19 年 6 月 26 日制定）に従い、動物実験計画書を作成し、琉球大学動物実験委員会の審議および承認（承認番号：第 A2018076）を受けた後に実施した。

#### 4.2.2.6. 血清の調製

血清の調製方法は、3.1.2.6.と同様の方法で行い、得られた血清は、滅菌したマイクロチューブに小分けして、測定まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 4.2.2.7. 肝臓ホモジナイズ上清の調製

肝臓ホモジナイズ上清は、3.2.2.9.と同様の方法で調製し、得られた上清はマイクロチューブに小分けして、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 4.2.2.8. 血清中コルチコステロン濃度の測定

血清中コルチコステロン濃度は、3.1.2.7.と同様の方法で定量した。血清中コルチコステロン濃度は、血清 1 mL あたりのコルチコステロン含量 (ng) で示した。

#### 4.2.2.9. 肝臓中タンパク質量の測定

肝臓中のタンパク質含量は、3.2.2.11.の方法に準じて測定した。肝臓中のタンパク質含量は、肝臓ホモジナイズ上清 1 mL 中のタンパク質量 (mg) を算出した。

#### 4.2.2.10. 肝臓中トリグリセリドおよび総コレステロール量の測定

血清および肝臓中トリグリセリド (TG) および総コレステロール (TC) の測定は、Yamasaki ら (2019) の方法に準じて行った。血清および肝臓ホモジナイズ上清中 TG および TC は、トリグリセリド E-テストワコーおよび総コレステロール E-テストワコー (富士フイルム和光純薬株式会社、熊本) を用い、説明書に従って測定した。

#### 4.2.2.11. 肝臓中マロンジアルデヒド量の測定

脂質過酸化分解生成物である肝臓ホモジナイズ上清中マロンジアルデヒド (MDA) の定量は、Jamall および Smith (1985) の方法を改変して行った。すなわち、マイクロチューブに肝臓ホモジナイズ上清 90  $\mu\text{L}$  および飽和硫酸アンモニウム 18  $\mu\text{L}$  を加えて混合した。次いで、14%トリクロロ酢酸 30  $\mu\text{L}$  を加えて 5 分間静置した後、遠心 (12,000 g、10 分間、4°C) し、上清を得た。新品なチューブに得られた上清または MDA 標準溶液 110  $\mu\text{L}$  を入れ、0.8%チオバルビツール酸溶液 110  $\mu\text{L}$  を混合した。その後、65°C で 45 分間保温し、その上清を 0.2  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルターに通した後、各上清 100  $\mu\text{L}$  を 96 ウェルプレートに入れ、マイクロプレートリーダー (PowerWaveXS2、BioTek 社、USA) を用いて 532 nm の吸光度を測定した。

#### 4.2.2.12. 統計学的処理

統計処理は、統計解析ソフトエクセル統計 2012 (株式会社社会情報サービス、

東京を用いて行った。平均値の差の検定は一元配置分散分析法および Tukey-Kramer 法を用いた多重比較によって行った。いずれの検定においても、 $P < 0.05$  の場合を有意差ありと判定した。

#### 4.2.3. 結果および考察

##### 4.2.3.1. 黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスのストレスホルモンに及ぼす影響

各群における HFD 給与マウス血清中コルチコステロン濃度を Fig. 4-2-2 に示した。慢性ストレスを負荷した Control 群の血清中コルチコステロン濃度は、Blank 群と比べて有意に ( $P < 0.01$ ) 高い値を示した。ストレス刺激は、糖質コルチコイドの分泌を誘発することから、本試験における慢性ストレス負荷は、HPA 軸を活性化し、糖質コルチコイドの分泌を引き起こすことが示唆された。一方で、NSC 画分および HAP 投与群の血清中コルチコステロン濃度は、Control 群と比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した。HBA 投与群の血清中コルチコステロン濃度は、Control 群と有意な差は示さなかった。したがって、HFD 給与マウスにおける NSC 画分および HAP の経口摂取は、慢性ストレス負荷で誘導されるコルチコステロンの分泌を抑制したことから、黒糖の抗ストレス作用には HAP が関与する可能性が示唆された。これまで、HAP のストレスホルモン分泌抑制に関する報告はなく、メカニズムについては不明瞭である。フェノール化合物摂取がストレスホルモンの分泌を抑制するメカニズムの例として、ケルセチンは、脳内に蓄積し、視床下部を標的部位として、ストレス反応に関わる細胞内 MAPK

情報伝達系を制御する。これにより、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの発現上昇を抑えて HPA 軸に作用し、最終的にストレスホルモンの分泌を抑制すると推測されている (寺尾、2010)。さらに、ケルセチンは、セロトニンを酸化的に代謝する酵素の活性を阻害し、脳内セロトニン量の低下を抑制するとともに、脳内の酸化障害を抗酸化活性で保護することで中枢神経を保護し、抗うつ作用を示す (寺尾、2015)。したがって、HAP のストレスホルモン分泌抑制メカニズムを明らかにするため、HAP の脳内蓄積を確認するとともに、HAP が視床下部における細胞内の情報伝達経路やセロトニン代謝酵素に影響を及ぼすかどうか調べる必要がある。また、HAP の抗コリンエステラーゼ作用が、抗ストレス作用に関与するかどうか今後検討すべき課題である。HBA は、GABA-T 活性阻害により、脳内 GABA 量を増加し、抗不安作用を示すとの報告があり (Ha *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2006)、抗ストレス作用が期待されたが、本試験における HBA の経口投与は、慢性ストレス負荷による血清コルチコステロンの分泌増加に影響を与えない結果となった。これは、Jung ら (2006) の報告では、試料の投与方法が静脈投与であることに加え、本試験と異なるストレス負荷方法を用いていることが要因として挙げられた。

さらに、抗酸化活性とストレスホルモン分泌抑制に何かしら関連があると推測し、NSC 画分、HBA および HAP の ORAC 値および ABTS ラジカル消去活性を測定した (Table 4-2-1)。NSC 画分の ABTS ラジカル消去活性は、HBA および HAP の ABTS ラジカル消去活性と比べて有意に ( $P < 0.01$ ) 高い値を示した。対照的に、HBA および HAP の ORAC 値は、NSC 画分の ORAC 値と比較して、有

意に ( $P < 0.01$ ) 高い値を示した。HAP と HBA の *in vitro* 試験での抗酸化活性に有意差はないが、ストレス負荷試験において、HAP 摂取のみストレスホルモン分泌を抑制した (Fig. 4-2-2) ことから、本試験では、*in vitro* 試験における抗酸化活性とコルチコステロン分泌抑制に関係性は見られなかった。抗酸化活性の評価方法により異なる結果 (Table 4-2-1) となった要因の1つとしては、測定原理の違いがある。ORAC 法は、抗酸化物質がラジカルに水素原子を供与することで基質の酸化を抑制する原理に基づき、ABTS 法は、抗酸化物質がラジカルや酸化物に 1 電子を供与し、基質を還元する原理に基づく (山内ら、2014)。比較的、生体内の抗酸化活性を反映する ORAC 法では、HBA および HAP は高い ORAC 値を示した。NSC 画分 1 g あたりの HBA および HAP 含量は、それぞれ 203  $\mu\text{g}$  および 35  $\mu\text{g}$  (図表なし) と極めて少量であるが、多くのフェノール化合物が NSC 画分の抗酸化活性を形成している場合、高い ORAC 値を示した HBA および HAP は、NSC 画分の抗酸化活性に大きく寄与している可能性があると考えられた。

#### 4.2.3.2. 黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスの体重、摂取エネルギーおよび脂肪組織量に及ぼす影響

Table 4-2-2 には、マウスの平均体重、摂取エネルギーおよび脂肪組織重量を示した。28 日目における Control 群の平均体重は、Blank 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した。HAP 投与群の平均体重も、Blank 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示したが、NSC 画分および HBA 投与群の平均体重は、Blank 群と有意な差を示さなかった。このように、各群の平均体重に差が見られたが、摂

取エネルギーは、各群間に有意差は見られなかった。また、Control 群の脂肪組織重量は、Blank 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した。NSC 画分、HBA 投与群および HAP 投与群の脂肪組織重量は、Control 群と有意な差は見られず、脂肪組織重量は部位による違いもなかった。ストレス刺激は、脂肪分解を促進し、白色脂肪組織の増加を阻害して体重減少をもたらすことが分かっている (Bowers *et al.*, 2004)。本試験結果においても、慢性ストレス負荷したマウスの平均体重および脂肪組織の重量は、ストレスのない Blank 群と比較して有意に減少したことから、ストレス刺激によって脂肪が分解され、体重減少が生じたと考えられた。

#### 4.2.3.3. 黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスの肝臓の脂肪蓄積に及ぼす影響

Table 4-2-3 には、マウスの肝臓重量、肝臓中タンパク質量、肝臓中 TG および TC 値を示した。Control 群の肝臓重量は、Blank 群と比較して有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。また、NSC 画分、HBA および HAP 投与群の肝臓重量は、Control 群と有意な差を示さなかった。次いで、Control 群の肝臓中タンパク質量は、Blank 群と比べて有意に ( $P < 0.01$ ) 低下した。この肝臓中タンパク質量の減少は、酸化ストレスに起因する肝細胞の損傷が原因の一つに挙げられる (Ochanda *et al.*, 2016)。一方、NSC 画分、HBA および HAP 投与群の肝臓中タンパク質量は、Control 群と比べて有意に ( $P < 0.01$ ) 高い値を示した。したがって、NSC 画分は、慢性ストレス負荷によって誘発される肝細胞の損傷に対して保護効果を有し、

その効果には NSC 画分に含まれる HBA および HAP が関与している可能性が示唆された。

さらに、Control 群の肝臓中 TC および TG 量は、Blank 群と比べて有意に ( $P < 0.01$ ) 高い値を示した。慢性ストレス負荷によって糖質コルチコイドが長期的に分泌すると、生体内では脂肪の門脈系循環を誘発し、肝臓および血管組織における異所性脂肪の蓄積を促進する (Dallman *et al.*, 2003; He *et al.*, 2017)。本結果においても、慢性ストレス負荷によって血清中コルチコステロン分泌が増加したことから (Fig. 4-2-2)、肝臓の脂肪蓄積増加は、慢性ストレス負荷によるコルチコステロンの長期的な曝露が要因の一つであることが明らかとなった。一方で、NSC 画分投与群の肝臓中 TC および TG 量は、Control 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示したことから、NSC 画分の経口摂取は、慢性ストレス負荷による肝臓中 TG および TC の蓄積を抑制した (Table 4-2-3)。NSC 画分の経口投与は、血清中コルチコステロンの分泌も抑制したことから (Fig. 4-2-2)、NSC 画分の経口摂取は、血清中コルチコステロン分泌を抑制することで肝臓の脂肪蓄積増加を予防した可能性が示唆された。しかし、HAP の経口投与は、慢性ストレス負荷による血清中コルチコステロンの分泌を抑制したにもかかわらず、肝臓中 TG 量の増加に対してあまり影響を与えなかった (Table 4-2-3)。HAP の経口投与は、肝臓の脂肪蓄積増加を予防する程、血清中コルチコステロンの分泌を抑制しなかったと考えられる。HAP は肝臓中コレステロールレベルを調節する胆汁分泌促進作用を有するとの報告があり (Deng *et al.*, 2016)、HAP 投与群の肝臓中 TC 量は Control 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した。さらに、

HBA 投与群の肝臓中 TG 量は、Control 群と比べて約 40%低い値を示した。これは、HBA が脂肪細胞の脂質代謝に関与する遺伝子の発現を調節することに関係していると考えられる (Park *et al.*, 2011)。したがって、HBA および HAP は、様々なメカニズムを通じて慢性ストレスを受けたマウスの脂肪蓄積に対する NSC 画分の予防効果に寄与している可能性が示唆された。

#### 4.2.3.4. 黒糖中 NSC およびフェノール化合物の摂取が慢性ストレス負荷マウスの肝臓中脂肪の過酸化に及ぼす影響

慢性ストレスは、ROS の細胞内レベルの増加による酸化ストレスを引き起こす (Flaherty *et al.*, 2017)。肝臓への酸化的損傷は、脂質過酸化生成物である MDA レベルを調べることで確認できることから、マウスの肝臓中 MDA 量を Fig. 4-2-3 に示した。Control 群の肝臓中 MDA 値は、Blank 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 高い値を示した。脂質および糖質が豊富に含まれる食事と組み合わせた慢性ストレス負荷は、肝臓中 MDA 値の増加につながる可能性があるとして報告されている (Fu *et al.*, 2010)。さらに、肝臓における酸化ストレスは、進行性の肝硬変および肝細胞癌を引き起こす可能性がある (Kawanaka *et al.*, 2004; Adams *et al.*, 2005)。一方、NSC 画分および HAP 投与群の肝臓中 MDA 量は、Control 群と比べて有意に ( $P < 0.05$ ) 低い値を示した。したがって、HFD 給与マウスにおける NSC 画分および HAP の経口摂取は、慢性ストレス負荷による肝臓の過酸化脂質反応の増加を抑制した。本試験において、*in vitro* での抗酸化活性測定では、HBA および HAP の間で有意な差はなかったが (Table 4-2-1)、HAP を経口投与した群の肝

臓中 MDA 値のみ、Control 群と比べて有意に低い値を示した (Fig. 4-2-3)。その要因として、HAP は HBA よりも生体内利用が高い可能性がある。さらに、HAP は SOD を含めた生体内抗酸化酵素の活性を増大させることも報告されている (Chang *et al.*, 2017)。したがって、NSC 画分の経口投与は、慢性ストレス負荷によって誘発される肝臓中脂質過酸化に対して抑制効果を有し、この効果は HAP の生体内抗酸化酵素の活性化が寄与している可能性が示唆された。本試験結果をまとめた概略図は Fig. 4-2-4 に示した。

一方で、NSC 画分からは、5つのフェノール化合物が検出されており、今回は HBA および HAP のみ検証したが、HBA および HAP 以外の3つのフェノール化合物も抗ストレス効果が期待される。このことから、今後は *p*-クマル酸、スカフトシドおよびイソスカフトシドの抗ストレス効果の検証も行う必要がある。

#### 4.2.4. 小括

本節では、黒糖中 NSC が慢性ストレス反応に及ぼす影響および黒糖中フェノール化合物である HBA および HAP の黒糖の抗ストレス作用への関与を検証するため、高脂肪食給与マウスを対象に、慢性ストレス負荷試験を行い、NSC 画分、HBA および HAP を摂取したマウスの血清中コルチコステロン、肝臓中 TG 量、TC 量および MDA 値を測定し、評価した。その結果、NSC 画分の経口摂取は、高脂肪食摂取下における 28 日間の拘束ストレス負荷による血清中コルチコステロン分泌増加を抑制した。さらに、NSC 画分の経口摂取は、慢性ストレス負荷による肝臓の脂肪蓄積だけでなく、肝臓の脂質過酸化も予防した。この作用は、抗酸化酵素（SOD を含む）の活性を増加する HAP の生体内抗酸化活性が関与している可能性が示唆された。

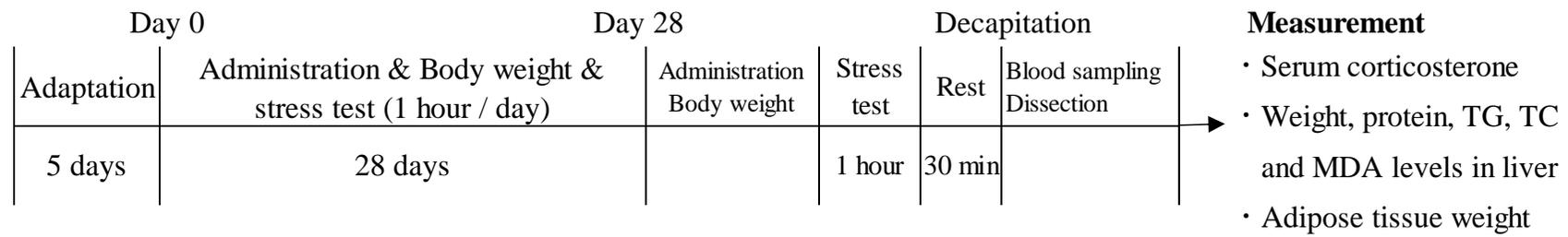


Fig. 4-2-1 Time schedule of the chronic restraint-stress test in mice.

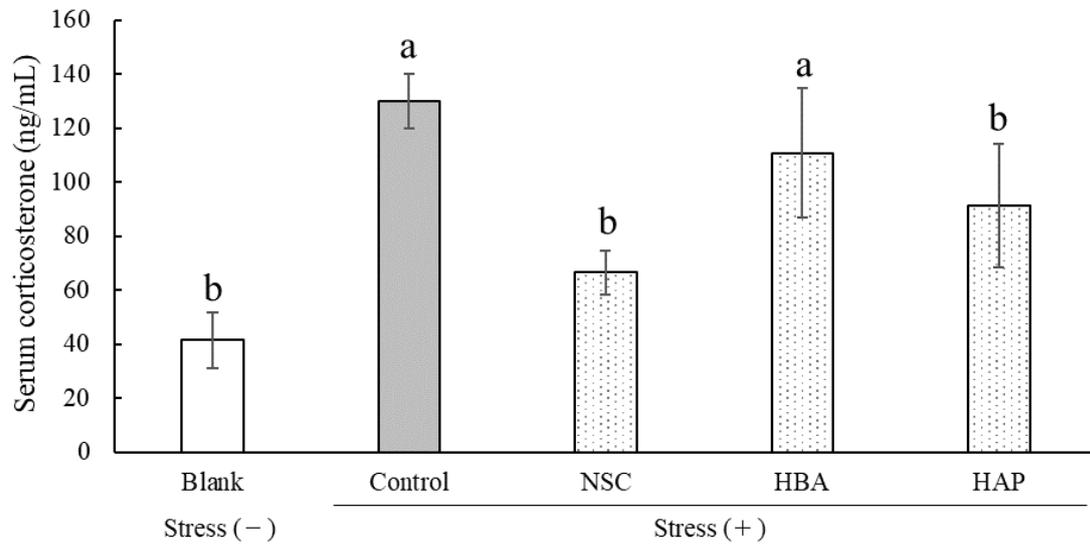


Fig. 4-2-2 Serum corticosterone levels in chronic stressed HFD-fed mice.

Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

HFD = high fat diet; Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); NSC = group treatment with non-sugar component fraction (stressed); HBA = group treatment with *p*-hydroxybenzaldehyde (stressed); HAP = group treatment with *p*-hydroxyacetophenone (stressed)

Table 4-2-1. Antioxidant activities (ABTS radical-scavenging activity and ORAC value) of NSC fraction, HBA and HAP

	ABTS radical-scavenging activity ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	ORAC value (mmol TE/g)
NSC fraction	$1121.5 \pm 7.2^a$	$4.7 \pm 0.4^b$
HBA	$1.0 \pm 0.2^b$	$27.6 \pm 3.4^a$
HAP	$9.5 \pm 3.0^b$	$31.3 \pm 8.7^a$

The ABTS radical-scavenging activity and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value are expressed as trolox equivalent (TE) antioxidant capacity. Value are means  $\pm$  SD (n=3). For each column, different letters indicate significant differences between samples ( $P < 0.05$ ). NSC = non-sugar component; HBA = *p*-hydroxybenzaldehyde; HAP = *p*-hydroxyacetophenone

Table 4-2-2 Body weight, energy intake, adipose tissue weight in chronically stressed HFD-fed mice

Group	Body weight (g)		Energy intake (kcal/day)	Adipose tissue weight (g/100 g BW)		
	Day 0	Day 28		Kidney	Testes	Whole
Blank	22.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	30.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	10.9 ± 3.0 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.4 <sup>a</sup>
Control	22.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	27.0 ± 1.5 <sup>bc</sup>	11.4 ± 4.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.6 <sup>b</sup>
NSC	22.9 ± 1.1 <sup>a</sup>	27.5 ± 1.3 <sup>abc</sup>	11.8 ± 3.9 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.5 <sup>b</sup>
HBA	22.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	28.9 ± 1.5 <sup>ab</sup>	11.2 ± 3.8 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.4 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.6 <sup>b</sup>
HAP	22.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	26.2 ± 0.8 <sup>c</sup>	10.9 ± 3.5 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.6 <sup>b</sup>

96

Values are means ± SD. For each column, different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

HFD = high fat diet; Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); NSC = group treatment with non-sugar component fraction (stressed); HBA = group treatment with *p*-hydroxybenzaldehyde (stressed); HAP = group treatment with *p*-hydroxyacetophenone (stressed)

Table 4-2-3 Liver weight, liver protein content, liver TG and TC levels in chronically stressed HFD-fed mice

	Liver weight (g)	Protein in liver (mg/g tissue)	TG in liver (mg/g protein)	TC in liver (mg/g protein)
Blank	1.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	119.6 ± 4.7 <sup>a</sup>	12.2 ± 4.4 <sup>c</sup>	5.2 ± 0.5 <sup>c</sup>
Control	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	93.5 ± 2.4 <sup>b</sup>	29.5 ± 7.2 <sup>a</sup>	7.6 ± 0.9 <sup>a</sup>
NSC	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	108.6 ± 3.7 <sup>a</sup>	17.8 ± 4.0 <sup>bc</sup>	6.4 ± 0.2 <sup>b</sup>
HBA	1.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	109.8 ± 4.6 <sup>a</sup>	21.7 ± 3.0 <sup>abc</sup>	7.2 ± 0.5 <sup>ab</sup>
HAP	1.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	111.2 ± 11.2 <sup>a</sup>	26.4 ± 6.7 <sup>ab</sup>	6.4 ± 0.3 <sup>b</sup>

Values are means ± SD. For each column, different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

HFD = high fat diet; Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); NSC = group treatment with non-sugar component fraction (stressed); HBA = group treatment with *p*-hydroxybenzaldehyde (stressed); HAP = group treatment with *p*-hydroxyacetophenone (stressed); TG = triglyceride; TC = total cholesterol

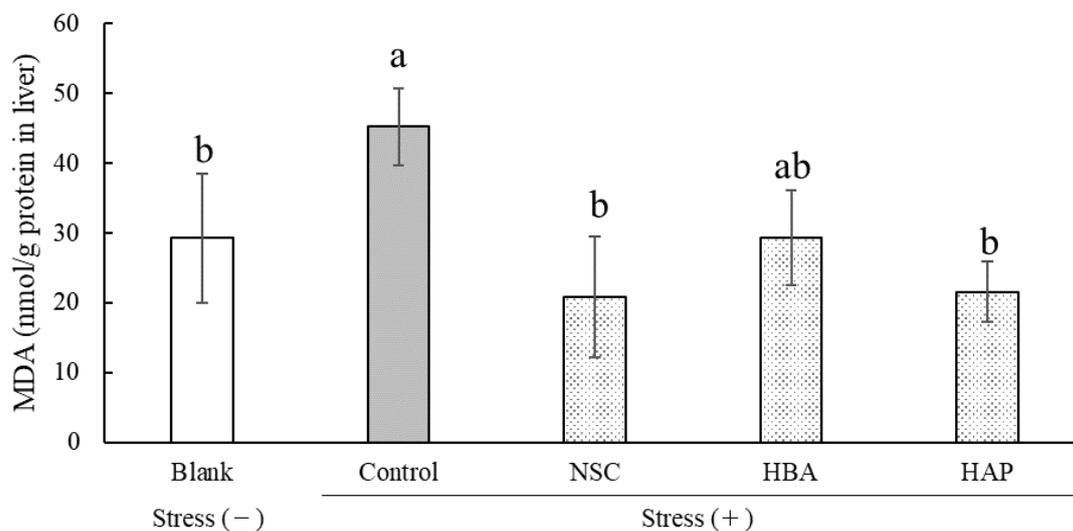


Fig. 4-2-3 Hepatic malondialdehyde (MDA) levels in chronically stressed mice fed HFD. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

HFD = high fat diet; Blank = blank group (no stress); Control = control group (stressed); NSC = group treatment with non-sugar component fraction (stressed); HBA = group treatment with *p*-hydroxybenzaldehyde (stressed); HAP = group treatment with *p*-hydroxyacetophenone (stressed)

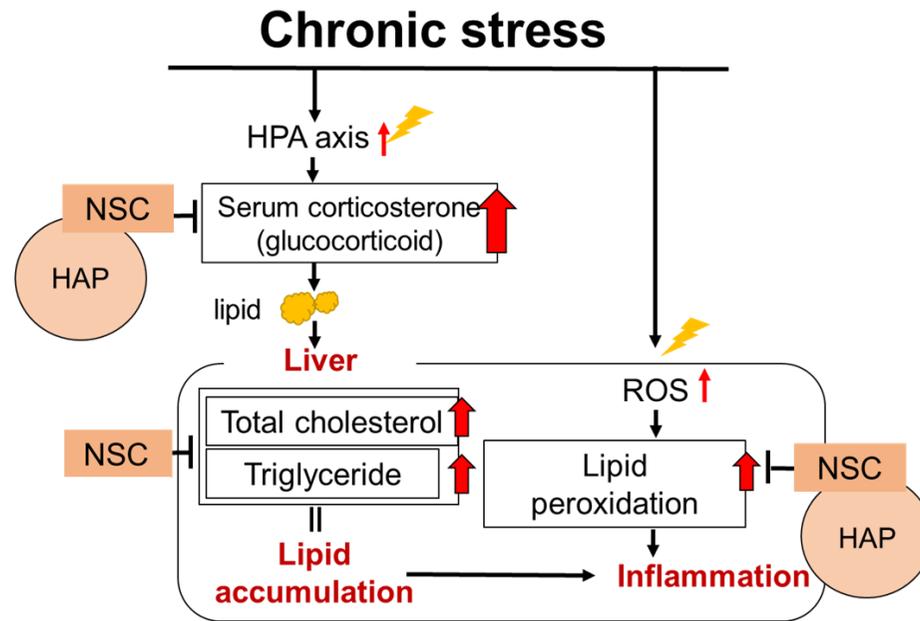
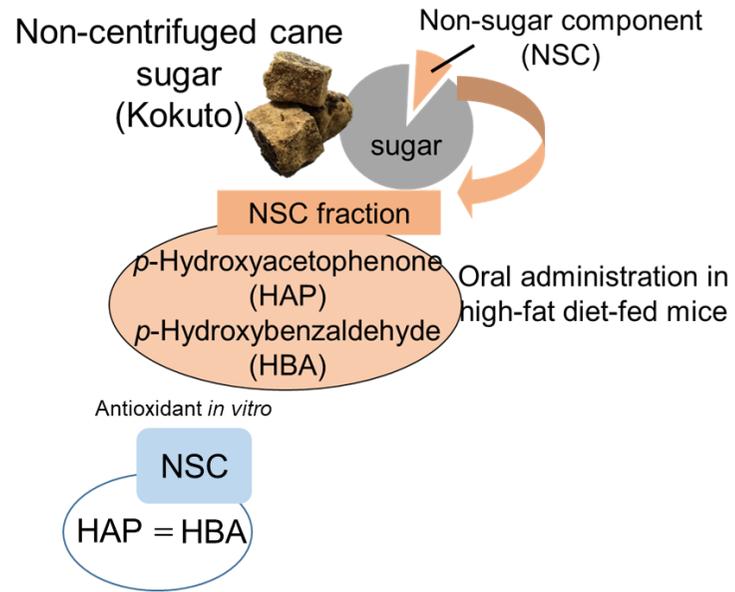


Fig. 4-2-4 Schematic representation.

## 第5章

### 総括

近年、社会環境が変化していく中で、人々は多くのストレスを抱えている。ストレスは、内分泌系（HPA 軸）や交感神経系（SAM 軸）を活性化し、ホルモン分泌することで、心拍数の増加、血圧や血糖上昇させる。さらに、長期的なストレス刺激は、うつ病、自律神経失調症や認知障害のような精神疾患の原因となる。さらに、ストレス刺激は、エネルギー必要量を増加させることで過剰に活性酸素種を発生し、がん、アテローム動脈硬化症やアルツハイマー病などの疾患の発症リスクが高める。これらの病気を予防し、健康を維持するために、抗ストレス作用を有する植物性食品の摂取が重要視されている。沖縄県の特産物である黒糖は、サトウキビ (*Saccharum officinarum* L.) の絞汁液を原材料とし、これを加熱濃縮して製造される含蜜糖である。黒糖には、糖類、アミノ酸やフェノール化合物など、サトウキビ由来成分が豊富に含まれており、これらは抗ストレス作用が期待されている。糖類は、脳におけるエネルギー源となり、気分状態を改善し、ストレスを軽減する可能性がある。アミノ酸である GABA は、抗ストレス効果および睡眠の質向上効果が報告されている。さらに、黒糖に含まれるフェノール化合物は、抗酸化活性や LDL 酸化阻害活性が報告されている。現在、「ストレス軽減」として登録されている機能性表示食品には、抗酸化成分が多いことから、抗酸化成分によるストレス軽減も期待される。このように、黒糖には抗ストレス作用に関連のある成分を含んでいるが、これまで黒糖の抗ストレス作用に関する報告はほとんどなかった。そこ

で、本研究では、ヒトを対象として精神的ストレス負荷試験を実施し、唾液中ストレスマーカーの定量による生化学的評価および質問紙を用いた主観的評価を行い、黒糖の抗ストレス作用を評価した。また、黒糖中の抗ストレス作用に関与する成分を特定するために、マウスを対象に急性および慢性ストレス負荷試験を実施し、黒糖中成分がストレス応答に及ぼす影響を調べるとともに、HPLCを用いた成分分析を行い、解析した。

まず、第2章では、黒糖摂取が精神的ストレスに及ぼす影響を調べるために、ヒトを対象として15分間の内田クレペリン検査による精神的ストレス負荷試験を実施し、被験者の唾液中ストレスマーカー定量による生化学的評価および精神状態をはかる質問紙を用いた主観的評価を行った。さらに、ストレス負荷前の黒糖摂取を「ストレス緩和効果」、ストレス負荷後の黒糖摂取を「リラックス効果」として、摂取タイミングの違いによる黒糖のストレス評価も検証した。その結果、ストレス負荷前の黒糖摂取は、HPA軸を反映する唾液中デヒドロエピアンドロステロンおよびテストステロンの分泌を抑制するだけでなく、SAM軸を反映するクロモグラニン、 $\alpha$ -アミラーゼおよび分泌性免疫グロブリンAの分泌も抑制した。また、視覚的アナログスケールを用いた主観的評価では、ストレス負荷前の黒糖摂取において、黒糖を摂取しない場合と比べてストレス値が有意に低値を示した。一方、ストレス負荷後の黒糖摂取は、黒糖を摂取しない場合と有意な差はなかった。さらに、気分状態をはかる主観的評価では、ストレス負荷前の黒糖摂取において、混乱や抑うつ気分のようなネガティブ気分を緩和し、活力気分を回復させた。したがって、ヒトにおけるストレス負荷前の黒糖摂取による、精神的ストレス緩和効果が得られることが実証

された。

次いで、第3章では、黒糖の抗ストレス作用に關与する成分を特定するため、黒糖に加えて、抗ストレス作用が期待される糖類、黒糖中非糖類成分 (NSC) および GABA を7日間事前投与したマウスを用いて1時間の拘束による急性ストレス試験を実施し、血清中ストレスホルモン濃度を測定した。その結果、黒糖および黒糖中 NSC 画分の摂取は、ストレス負荷による血清中ストレスホルモン分泌を抑制する傾向が認められた。このことから、黒糖の抗ストレス作用には、NSC が關与している可能性が示唆された。そこで、NSC に焦点を当て、25%、50%、75%および100%MeOH を用いて抽出した、極性の異なる4種のNSC画分を急性ストレス負荷マウスに7日間事前投与し、血清中ストレスホルモン濃度および生体内抗酸化活性を調べた。その結果、4種のNSC画分の中で最もフェノール化合物が多く、高い抗酸化活性を示した50%MeOH で抽出したNSC画分(50%MeOH画分)の摂取は、急性ストレス負荷による血清中ストレスホルモンの分泌を抑制するだけでなく、生体内抗酸化活性の低下も抑制した。さらに、この画分中には、生体内抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様活性を示す、もしくは肝臓中SOD量を増加させるフェノール化合物が含まれている可能性が示唆された。

第3章の結果から、黒糖の抗ストレス作用に關与する成分は、50%MeOH画分中にあると考え、第4章では、このNSC画分を20%、40%および60% MeOHを用いて5つのフラクションに分画し、総ポリフェノール含量が多く、抗酸化活性の高いフラクションを選定して、高速液体クロマトグラフィーを用いて成分分析を行った。その結果、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド(HBA)、*p*-

ヒドロキシアセトフェノン (HAP)、スカフトシド、イソスカフトシドおよび *p*-クマル酸の 5 つの抗酸化性フェノール化合物が検出された。そこで、容易に入手可能であり、抗ストレス作用が期待できる HBA および HAP に注目し、慢性ストレスを負荷した高脂肪食給与マウスを対象として、50%MeOH 画分、HBA および HAP の投与がストレス反応に与える影響を調べた。その結果、50%MeOH 画分および HAP の経口摂取は、高脂肪食摂取を伴う慢性ストレス負荷による血清中ストレスホルモンの分泌増加を抑制したことから、HAP は黒糖の抗ストレス作用に寄与する可能性が示唆された。また、50%MeOH 画分の摂取は、高脂肪食および慢性ストレス暴露に起因する肝臓中脂肪の蓄積だけではなく、肝臓中脂肪の過酸化も予防した。さらに、この作用には、HAP の生体内抗酸化活性が寄与している可能性が示唆された。

以上、本研究は、黒糖の新たな機能性として、黒糖の抗ストレス作用を実証し、ストレス反応を抑制する黒糖中成分を絞り込んで検証および解析し、黒糖中フェノール化合物である HAP の生体内抗酸化活性が、黒糖の抗ストレス作用に関与することを見出した。

本研究は、黒糖の抗ストレス作用に関する初めての報告であり、ストレス関連疾患予防のための機能性食品として、黒糖の開発および活用に大きく資することを期待したい。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の進め方や論文の書き方など、全てにおいて終始ご指導、ご鞭撻賜りました、琉球大学農学部和田教授ならびに高橋誠博士に深甚の謝意を表します。

また、懇切なご指導と校閲を賜りました鹿児島大学農学部の候徳興教授、佐賀大学農学部の永尾晃治教授、琉球大学農学部の玉城一准教授および琉球大学熱帯生物圏研究センターの屋宏典教授に深く感謝いたします。

また、本研究の実験や分析にご協力頂いた琉球大学農学部の上地俊徳准教授ならびに高良健作教授、沖縄県農業研究センター農業システム開発班の皆様に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、実験にご協力頂きました琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科食品機能科学分野食品化学研究室および資源利用科学研究室の皆様  
に心より御礼申し上げます。

## 参考文献

- 阿部皓一 (2019). 機能性表示食品の動向と問題点. *ビタミン*, 93, 123–127.
- Adams, L.A., Lymp, J.F., Sauver, J.S., Sanderson, S.O., Lindor, K.D., Feldstein, A., and Angulo, P. (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology*, 129, 113–121.
- Aitken, R.C. (1969). Measurement of feelings using visual analogue scales. *Proc. R. Soc. Med.*, 62, 989–993.
- 新井裕幸, 倍味繁, 田原俊介, 伊藤晋介, 中原夕子, 守本亘孝, 小林伸好, 板野泰弘, 山口高史, 丹羽一夫, 関二郎, 志垣隆通, 中村和市 (2014). 疾患モデル動物の意義と役割 医薬品研究開発に求められる疾患モデル動物. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)*, 144, 126–132.
- Asikin, Y., Takahashi, M., Hirose, N., Hou, D.X., Takara, K., and Wada, K. (2012). Wax, policosanol, and long chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114, 583–591.
- Benton, D., Parker, P.Y., and Donohoe, R. (1996). The supply of glucose to the brain and cognitive functioning. *J. Biosoc. Sci.*, 28, 463–479.
- Benton, D., Ruffin, M.P., Lassel, T., Nabb, S., Messaoudi, M., Vinoy, S., Desor, D., and Lang, V. (2003). The delivery rate of dietary carbohydrates affects cognitive performance in both rats and humans. *Psychopharmacology*, 166, 86–90.
- Bowers, R.R., Festuccia, W.T.L., Song, C.K., Shi, H., Migliorini, R.H., and Bartness, T.J. (2004). Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell

- number. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.*, 286, 1167–1175.
- Boyd, N.F., and McGuire, V. (1991). The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radical Biol. Med.*, 10, 185–190.
- Chang, C.W., Chen, Y.C., Lin, Y.C., and Peng, W.H. (2017). *p*-Hydroxyacetophenone suppresses nuclear factor- $\kappa$ B-related inflammation in nociceptive and inflammatory animal models. *J. Nat. Med.*, 71, 422–432.
- Cheng, F., Ma, C., Wang, X., Zhai, C., Wang, G., Xu, X., Mu, J., Li, C., Wang, Z., Zhang, X., Yue, W., Du, X., Lian, Y., Zhu, W., Yin, X., Wei, Z., Song, W., and Wang, Q. (2017). Effect of traditional Chinese medicine formula Sinisan on chronic restraint stress-induced nonalcoholic fatty liver disease: a rat study. *BMC Complementary Altern. Med.*, 17, 203–212.
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M.C., Wakabayashi, C., and Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 39, 112–119.
- Collins, A.R. (1999). Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *BioEssays*, 21, 238–246.
- Colombo, R., Yariwake, J.H., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., and Hostettmann, K. (2006). On-line identification of further flavone *C*- and *O*-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. *Phytochem. Anal.*, 17, 337–343.
- Cryan, J.F., and Leonard, B.E. (2000). 5-HT<sub>1A</sub> and beyond: the role of serotonin and its

- receptors in depression and the antidepressant response. *Hum. Psychopharmacology*, 15, 113–115.
- Dallman, M.F., Pecoraro, N., Akana, S.F., Fleur, S.E., Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Laugero, K.D., and Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food”. *PNAS*, 100, 11696–11701.
- Deng, Y., Yu, P., Huang, X., He, X., Yin, M., and Liu, M. (2016). Effects of *p*-hydroxyacetophenone on bile secretion and blood lipid levels in rats. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 34, 507–510, 525.
- Duarte-Almeida, J.M., Salatino, A., Genovese, M.I., and Lajolo, F.M. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. *Food Chem.*, 125, 660–664.
- Flaherty, R.L., Owen, M., Fagan-Murphy, A., Intabli, H., Healy, D., Patel, A., Allen, M.C., Patel, B.A., and Flint, M.S. (2017). Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 19, 35.
- Floyd, R.A. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222, 236–245.
- Friedman, M., Rosenman, R.H., and Carroll, V. (1958) Changes in the serum cholesterol and blood clotting time in men subjected to cyclic variation of occupational stress. *Circulation*, 17, 852–861.
- Fu, J.H., Sun, H.S., Wang, Y., Zheng, W.Q., Shi, Z.Y., and Wang, Q.J. (2010). The effects of a fat- and sugar-enriched diet and chronic stress on nonalcoholic fatty liver disease

in male Wistar rats. *Dig. Dis. Sci.*, 55, 2227–2236.

藤林真美, 神谷智康, 高垣欣也, 森谷敏夫 (2008). GABA 経口摂取による自律神経活動の活性化. *日本栄養・食糧学会誌*, 61, 129–133.

Fuller, R.W. (1981). Serotonergic stimulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Neuroendocrinology*, 32, 118–127.

Guimarães, C.M., Gião, M.S., Martinez, S.S., Pintado, A.I., Pintado, M.E., Bento, L.S., and Malcata, F.X. (2007). Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. *J. Food Sci.*, 72, C039–C043.

Ha, J.H., Lee, D.U., Lee, J.T., Kim, J.S., Yong, C.S., Kim, J.A., Ha, J.S., and Huh, K. (2000). 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain., *Journal of Ethnopharmacol*, 73, 329–333.

Hacibekiroğlu, I., and Kolak, U. (2011). Antioxidant and anticholinesterase constituents from the petroleum ether and chloroform extracts of *Iris suaveolens*. *Phytother. Res.*, 25, 522–529.

He, Z., Lv, F., Ding, Y., Huang, H., Liu, L., Zhu, C., Lei, Y., Zhang, L., Si, C., and Wang, H. (2017). High-fat diet and chronic stress aggravate adrenal function abnormality induced by prenatal caffeine exposure in male offspring rats. *Sci. Rep.*, 7, 14825–14833.

Henry, A.S. (1968). Serum cholesterol and glucose levels in rats fed refined and less refined sugars. *J. Nutr.*, 97, 237–242.

広瀬直人, 前田剛希, 高良健作, 和田浩二 (2015). 沖縄産黒糖の常温保存にお

- ける物理化学的およびフレーバー特性の変化. 日食保蔵誌, 41, 253–259.
- 堀江義則, 日比紀文, 石井裕正 (2006). 肝疾患と酸化ストレス. 日消誌, 103, 789–796.
- Ishibashi, G., Hori, K., and Okita, T. (1992). Hypocholesterolemic effect of palm sugar in rats fed high cholesterol diet. *Asean Food. J.*, 7, 161–162.
- Izawa, S., Sugaya, N., Kimura, K., Ogawa, N., Yamada, K.C., Shirotaki, K., Mikami, I., Hirata, K., Nagano, Y., and Nomura, S. (2013). An increase in salivary interleukin-6 level following acute psychosocial stress and its biological correlates in healthy young adults. *Biol. Psychol.*, 94, 249–254.
- Jamall, I.S., and Smith, J.C. (1985). Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 80, 33–42.
- Jung, J.W., Yoon, B.H., Oh, H.R., Ahn, J.H., Kim, S.Y., Park, S.Y., and Ryu, J.H. (2006). Anxiolytic-like effects of *Gastrodia elata* and its phenolic constituents in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 261–265.
- 春日繁男, 牛島光保, 森原直明, 板倉洋一, 仲田義啓 (1999). マウスのストレス性高血糖に対するニンニク抽出液 (AGE) の作用. 日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*), 114, 191–197.
- Kawanaka, M., Mahmood, S., Niiyama, G., Izumi, A., Kamei, A., Ikeda, H., Suehiro, M., Togawa, K., Sasagawa, T., Okita, M., Nakamura, H., Yodoi, J., and Yamada, G. (2004). Control of oxidative stress and reduction in biochemical markers by Vitamin E treatment in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Hepatol. Res.*,

29, 39–41.

Kuo, L.E., Kitlinska, J.B., Tilan, J.U., Li, L., Baker, S.B., Johnson, M.D., Lee, E.W., Burnett, M.S., Fricke, S.T., Kvetnansky, R., Herzog, H., and Zukowska, Z. (2007). Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat. Med.*, 13, 803–811.

Kurosawa, T., Itoh, F., Nozaki, A., Nakano, Y., Katsuda, S., Osakabe, N., Tsunone, H., Kondo, K., and Itakura, H. (2005). Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 179, 237–246.

Li, W.X., Li, Y.F., Zhai, Y.J., Chen, W.M., Kurihara, H., and He, R.R. (2013). Theacrine, a purine alkaloid obtained from *Camellia assamica* var. *kucha*, attenuates restraint stress-provoked liver damage in mice. *J. Agr. Food Chem.*, 61, 6328–6335.

Liu, C.M., Zheng, Y.L., Lu, J., Zhang, Z.F., Fan, S.H., Wu, D.M., and Ma, J.Q. (2010). Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 29, 158–166.

Liu, D., Xie, K., Yang, X., Gu, J., Ge, L., Wang, X., and Wang, Z. (2014). Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. *Behav. Brain Res.*, 264, 9–16.

前田剛希, 荻貴之 (2008). 沖縄産純黒糖の抗酸化能と糖類分解酵素阻害活性. 沖工技報, 10, 1–5.

Maninger, N., Wolkowitz, O.M., Reus, V.I., Epel, E.S., and Mellon, S.H. (2009). Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA)

- and DHEA sulfate (DHEAS). *Front. Neuroendocrinology.*, 30, 65–91.
- Markus, C.R. (2003). Interaction between food, stress and mood. In: Wadson, D., Dodds, F. (eds), *Performance functional foods*, (Woodhead Publishing Ltd., Cambridge) 5–17.
- Martins, N., Barros, L., and Ferreira, I.C.F.R. (2016). *In vivo* antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends Food Sci. Technol.*, 48, 1–12.
- Mellegård, H., Stalheim, T., Hormazabal, V., Granum, P.E., and Hardy, S.P. (2009). Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 45, 85–90.
- Mendes, F.R., Tabach, R., and Carlini, E.A. (2007). Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytother. Res.*, 21, 517–522.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., and Rice-Evans, C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.*, 384, 240–242.
- 溝口徹 (2013). 『アレルギーは「砂糖」をやめればよくなる！』青春出版社.
- Momuken, I., Stevens, L., Bergouignan, A., Desplanches, D., Rudwill, F., Chery, I., Zahariev, A., Zahn, S., Stein, T.P., Sebedio, J.L., Pujos-Guillot, E., Falempin, M., Simon, C., Coxam, V., Andrianjafiniony, T., Gauquelin-Koch, G., Picquet, F., and Blanc, S. (2011). Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *FASEB J.*, 26, 3646–3660.
- Müller, W.E. (2003). Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol. Res.*, 47, 101–109.
- 内藤まゆみ, 坂元章 (2005). 「こころの栄養としての砂糖—砂糖摂取によるスト

レス低減の検討—」『砂糖類情報』, 独立行政法人農畜産業振興機, 11.

Nakamura, H., Takishima, T., Kometani, T., and Yokogoshi, H. (2009). Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in humans: assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. *Int. J. Food. Sci.*, 60, 106–113.

Ochanda, S.O., Rashid, K., Wanyoko, J.K., Ngotho, M., Faraj, A.K., Onyango, C.A., Wachira, F.N., and Maranga, D.N. (2016). Fortification of alcoholic beverages (12% v/v) with tea (*Camellia sinensis*) reduces harmful effects of alcohol ingestion and metabolism in mouse model. *BMJ Open Gastro.*, 3, 1–9.

Oliveira, De C.B., Comunello, L.N., Maciel, E.S., Giubel, S.R., Bruno, A.N., Eduardo C.F. Chiela, E.C.F., Lenz, G., Gnoatto. S.C.B., Buffon, A., and Gosmann G. (2013). The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in siha cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules*, 18, 11022–11032.

越坂部奈緒美 (2016). ポリフェノールパラックス 生体利用性と機能性の矛盾. *化学と生物*, 54, 726–731.

Papadopoulos, A.S., and Cleare, A.J. (2012). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 8, 22–32.

Park, S., Kim, D.S., and Kang, S. (2011). *Gastrodia elata* Blume water extracts improve insulin resistance by decreasing body fat in diet-induced obese rats: vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde are the bioactive candidates. *Eur. J. Nutr.*, 50, 107–118.

Payet, B., Sing, A.S.C., and Smadja, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane

- brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: determination of their polyphenolic and volatile constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 10074–10079.
- Payet, B., Sing, A.S.C., and Smadja, J. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7270–7276.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., and Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3273–3279.
- Rai, D., Bhatia, G., Sen, T., and Palit, G. (2003). Anti-stress effects of Ginkgo biloba and Panax ginseng: a comparative study. *J. Pharmacol., Sci.*, 93, 458–464.
- Ryan, K.K. (2014). Stress and metabolic disease. In “Sociality, hierarchy, health comparative biodemography: A collection of papers”, ed. by M. Weinstein, and M.A. Lane. National Academies Press, Washington, D.C., pp. 247–268.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, 138, 32.
- Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. Med.*, J., 17, 1383–1392.
- Selye, H. (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.*, 115, 53–56.
- Scheepens, A., Bisson, J.F., and Skinner, M. (2014). *p*-Coumaric acid activates the GABA-A receptor *in vitro* and is orally anxiolytic *in vivo*. *Phytother. Res.*, 28, 207–211.

- Sumiyoshi, T., Yotsutsuji, T., Kurachi, M., Itoh, H., Kurokawa, K., and Saitoh, O. (1998). Effect of mental stress on plasma homovanillic acid in healthy human subjects. *Neuropsychopharmacology*, 19, 70–73.
- Stephens, A., and Kivimaki, M. (2012). Stress and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.*, 9, 360–370.
- 多田幸恵, 高橋博, 湯澤勝廣, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 海鉦藤文, 猪又明子, 保坂三継 (2016). 危険ドラッグ短期間投与によるマウスの肝臓及び腎臓への影響. 東京健安研セ年報, 67, 295–301.
- Takahashi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., and Kitamoto, D. (2012). Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, show antioxidant and protective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts. *J. Oleo Sci.*, 61, 457–464.
- 高良健作, 金城聡子, 松井大吾, 与儀誠一, 仲宗根洋子, 和田浩二 (2010). 黒糖の非ショ糖画分におけるフェノール性抗酸化成分. 日農化会誌, 74, 885–890.
- Takara, K., Matsui, D., Wada, K., Ichiba, T., and Nakasone, Y. (2002). New antioxidative phenolic glycosides isolated from Kokuto non-centrifuged cane sugar. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 66, 29–35.
- 田中喜秀, 脇田慎一 (2011). ストレスと疲労のバイオマーカー. 日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*), 137, 185–188.
- 土田恭代, 宮地幸隆 (1997) グルココルチコイド. 日本臨牀, 55, 174–178.
- Tujioka, K., Ohsumi, M., Horie, K., Kim, M., Hayase, K., and Yokogoshi, H. (2009).

- Dietary c-aminobutyric acid affects the brain protein synthesis rate in ovariectomized female rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 55, 75–80.
- 寺尾純二 (2010). メンタルヘルスを支える栄養科学—食品成分の抗うつ様活性評価—. *四国医誌*, 66, 123–126.
- 寺尾純二 (2015). 酸化ストレスを制御する食品機能成分の活性発現機構に関する統合研究. *日栄・食糧会誌*, 68, 3–11.
- 上西一弘, 石田裕美, 庄司伸絵 (2004). 「砂糖の適時・適正摂取は身体の働きにどのように影響するか」『砂糖類情報』, 独立行政法人農畜産業振興機構, 10.
- Vila, F.C., Colombo, R., Lira, T.O., and Yariwake, J.H. (2008). HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. *J. Braz. Chem. Soc.*, 19, 903–908.
- 和田浩二 (2011). 沖縄県特産物の機能性成分と加工利用に関する食品化学的研究. *日食保蔵誌*, 37, 17–27.
- Watanabe, M., and Ayugase, J. (2008). Anti-stress effects of flavonoids from buckwheat sprouts in mice subjected to restraint stress. *Food Sci. Technol. Res.*, 14, 253–260.
- 渡辺満, 六角啓一, 鮎瀬淳 (2011) 紫ニンジン色素抽出物の拘束ストレス負荷マウスに及ぼす効果. *日食科工会誌*, 58, 7–15.
- Welsh, R.S., Davis, J.M., Burke, J.R., and Williams, G. (2002). Carbohydrates and physical/mental performance during intermittent exercise to fatigue. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 6, 723–731.
- Wen, J., Qiao, Y., Yang, J., Liu, X., Song, Y., Liu, Z., and Li, F. (2012). UPLC–MS/MS determination of paeoniflorin, naringin, naringenin and glycyrrhetic acid in rat

- plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Si-Ni-San decoction. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 66, 271–277.
- 山口昌樹 (2007). 唾液マーカーでストレスを測る. 日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*), 129, 80–84.
- Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M., and Kawasaki, T. (2007). Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 165–173.
- Yamasaki, K., Sugamoto, K., Arakawa, T., Nishiyama, K., and Yamasaki, M. (2019). Chronic intake of high dose of blueberry leaf extract does not augment the harmful effects of ethanol in rats. *PeerJ*, 7, e6989.
- Yamatsu, A., Yamashita, Y., Maru, I., Yang, J., Tatsuzaki, J., and Kim, M. (2015). The improvement of sleep by oral intake of GABA and apocynum venetum leaf extract. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 61, 182–187.
- 山内良子, 深水さやか, 小浜友紀子, 島村智子, 柏木丈拵, 受田浩之, 穂山浩, 松井利郎, 石川洋哉 (2014). 酸化防止剤力価評価を目的とした DPPH および ABTS ラジカル消去能評価法の特性比較. 日食保蔵誌, 40, 55–63.
- Yeh, C.T., and Yen, G.C. (2006). Modulation of hepatic phase II phenol sulfotransferase and antioxidant status by phenolic acids in rats. *J. Nutr. Biochem.*, 17, 561–569.
- Yoto, A., Murao, S., Motoki, M., Yokoyama, Y., Horie, N., Takeshima, K., Masuda, K., Kim, M., and Yokogoshi, H. (2012). Oral intake of  $\gamma$ -aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system during stressed condition induced by mental

tasks. *Amino Acids*, 43, 1331–1337.

Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., and Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 15, 11–20.