

学 位 論 文 要 旨

氏 名 前田 剛希

題 目 沖縄県産野菜の抗酸化能及び抗酸化成分に関する研究
(Studies on antioxidant activities of Okinawan vegetables and those antioxidant substances)

沖縄は他府県とは異なる食文化をもち、独特の食材を多く利用している地域である。沖縄の伝統的な食スタイルは海藻、緑黄色野菜、葉草、脂肪の摂取が多く、食塩の摂取は少ない。興味深いことに、沖縄は国内で最も豚肉を消費する高脂肪摂取地域であるにもかかわらず、動脈硬化症に起因する心臓病、脳溢血などの循環器系疾患による死亡が少ない。この現象は、沖縄で伝統的に利用されてきた食材が循環器系疾患の原因である動脈硬化症を予防していることを予想させるものである。沖縄で日常的に食べられている野菜に抗動脈硬化作用を有する抗酸化成分のポリフェノールが多く含まれていることも十分に期待される。そこで本研究では、沖縄で利用されている野菜の抗酸化能および抗酸化成分を明らかにすることを目的として、次の実験を行った。

まず、県内で入手した茎・葉菜類、果菜類 45 品目について、ポリフェノール含量、DPPH ラジカル(DPPH \cdot) 消去能を調べた。さらに高ポリフェノール含量で DPPH \cdot 消去能が強かった野菜については、スーパーオキシドラジカル(O $_2^{\cdot-}$) 消去能、*t*-BuOO ラジカル(*t*-BuOO \cdot) 消去能など複数の実験系で抗酸化能を評価した。ホソバワダンについては抗酸化成分を明らかにするために、ポリフェノールを単離・同定した。得られたホソバワダンポリフェノールは、動脈硬化予防作用を明らかにするために、動脈硬化の初発要因である LDL に対する抗酸化能を測定した。また、ホソバワダンポリフェノールの体内動態を明らかにするために、ラットにホソバワダン抽出物を投与し、ポリフェノール成分の血中濃度を調べた。

以上の実験を行った結果、次の知見を得た。

1) ニシヨモギ、リュウキュウヨモギ、ホソバワダン、エンサイ、ヤエヤマカズラ、スイゼンジナ、ボタンボウフウ、ウイキョウなど沖縄伝統野菜 8 品目は高ポリフェノール含量で、強い DPPH \cdot 消去能を示した。これらの野菜は O $_2^{\cdot-}$ 、*t*-BuOO \cdot 消去能なども強い活性を示した。2) ホソバワダンから抗酸化成分として 5 種類のポリフェノールを単離し、D(+)-chicoric acid(ChA), chlorogenic acid(ChgA), caffeic acid(CA), luteolin 7-*O*- β -D-glucopyranoside(LU-glc), luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide(LU-glc)であることを明らかにした。3) ホソバワダンポリフェノールの中で LU-glc, LU-glc, CA は強い LDL 抗酸化能を示し、ホソバワダンに多量に含まれる ChA の活性はやや弱かった。含量を考慮すると、ホソバワダンの LDL 抗酸化能には ChA, LU-glc, LU-glc が大きく影響しているものと考えられた。4) ホソバワダン抽出物をラットに経口投与(ChA 200 mg/Kg 体重) すると、投与後 15 分の血漿には ChA(2.9 \pm 1.6 μ g/mL) が検出された。glucuronidase/sulafatase 処理後の血漿から luteolin(LU) が検出されたことから、LU-glc などの LU 誘導体は、血中では LU のグルクロン酸或いは硫酸抱合体として存在すると推察された。

以上の結果から、沖縄県産野菜には高ポリフェノール含量で強い抗酸化能を示すものが多く含まれており、ホソバワダンは、動脈硬化予防作用が期待される ChA や LU 誘導体を摂取するのに効率的な食材であると考えられた。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Gouki Maeda
題 目	Studies on antioxidant activities of Okinawan vegetables and those antioxidant substances (沖縄県産野菜の抗酸化能及び抗酸化成分に関する研究)

Okinawa has the different food culture and unique foods compared other regions in Japan. The traditional food culture of Okinawa is rich in seaweed, greenish-yellow vegetables, medicinal plants, and fat, and low in salt. Especially, it should be noted that Okinawa is a high-fat-ingestion area due to high consumption of pork; however, the Okinawa population had a low death rate from circulatory organ system diseases resulting from arteriosclerosis, such as cardiopathy and cerebral hemorrhages. Okinawan traditional foods are thought to be responsible for anti-arteriosclerosis action. Therefore, many phenolic compounds as antioxidants for anti-arteriosclerosis are expected to be present in vegetables eaten daily in Okinawa.

In this study, I used 45 vegetables eaten in Okinawa, especially green vegetables and fruit-vegetables, and determined their phenolic contents and DPPH radical (DPPH·) scavenging activities. The vegetables with high phenolic contents and strong DPPH· scavenging activities were evaluated on another anti-oxidant assay systems, that is, superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging activity, *tert*-butylhydroperoxyl radical (*t*-BuOO·) scavenging activity, and β -carotene-fading activity. I also isolated and identified several antioxidants from Hosobawadan (*Crepidiastrum lanceolatum*), and determined their anti-low density lipoprotein (LDL) oxidative activity. Furthermore, I examined the levels of antioxidants in rats plasma after oral administration of Hosobawadan extract.

As a result, high phenolic contents and strong DPPH· scavenging activities were observed in the extracts from Nishiyomogi, Ryukyuyomogi, Hosobawadan, Ensai, Yaeyamakazura, Suizenjina, Botanbouhuu and Uikyuu. Eight of these vegetables are edible traditional plants in Okinawa. These vegetables also showed strong radical scavenging activities for the $O_2^{\cdot-}$ and *t*-BuOO·. On the other hand, it was found to contain five antioxidative phenolic compounds, D(+)-chicoric acid (ChA), chlorogenic acid (ChgA), caffeic acid, luteolin 7-*O*- β -D-glucopyranoside (LU-glc), and luteolin 7-*O*- β -D-glucuronide (LU-glc) in Hosobawadan. LU-glc and LU-glc had strong anti-LDL oxidative activities. ChA as major polyphenol in Hosobawadan showed moderate activity. It was considered that the strength of anti-oxidative activity for LDL in Hosobawadan mainly depended on ChA, LU-glc and LU-glc. ChA was detected in the rat plasma with the maximum level of $2.9 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$ after 15 min of oral administration of Hosobawadan extract (ChA 200 mg/Kg body weight). Moreover, luteolin (LU) was detected in the rat plasma treated with glucuronidase/sulfatase, suggesting that LU derivatives in a plasma existed as LU conjugates.

In conclusion, it is suggested that Hosobawadan is an efficient dietary source of chicoric acid and luteolin derivatives for anti-arteriosclerosis materials.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	前田 剛希
審査委員	主査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球大学 教授 田幸 正邦
	副査 佐賀大学 教授 柳田 晃良
	副査 鹿児島大学 教授 林 國興
	副査 宮崎大学 教授 窄野 昌信
審査協力者	琉球大学 助教授 和田 浩二
題 目	沖縄県産野菜の抗酸化能及び抗酸化成分に関する研究 (Studies on antioxidant activities of Okinawan vegetables and those antioxidant substances)
<p>沖縄の伝統的な食スタイルは緑黄色野菜，薬草，海草，脂肪の摂取が多く，食塩の摂取は少ないことに特徴がある。さらに興味深いことに，沖縄は国内で最も豚肉を消費する高脂肪摂取地域であるにもかかわらず，動脈硬化症に起因する心臓病，脳血管障害などの循環器系疾患による死亡が少ない。これらのことから，沖縄で日常的に食されてきた食材には，抗動脈硬化作用を有する抗酸化成分が多く含まれていることが期待される。本研究では，沖縄でよく利用されている野菜の抗酸化能及び抗酸化成分を明らかにした。</p> <p>まず，沖縄県内で入手した茎・葉菜類，果菜類45品目について，ポリフェノール含量，DPPHラジカル（DPPH\cdot）消去能を調べた。ポリフェノール含量が高く，強いDPPH\cdot消去を示した野菜については，スーパーオキシドラジカル（O$_2^{\cdot-}$）消去能，<i>t</i>-BuOOラジカル（<i>t</i>-BuOO\cdot）消去能などの複数の抗酸化能を評価した。次にホソバワダンについては抗酸化成分であるポリフェノールを単離・同定し，動脈硬化の発病要因のひとつである酸化低密度リポタンパク質（LDL）生成に対する影響を評価した。さらにホソバワダンポリフェノールの体内動態を明らかに</p>	

するために、ラットにホソバワダン抽出物を投与し、ポリフェノール成分の血中濃度を調べた。以上の実験を行った結果、次のような知見を得た。

1) 沖縄伝統野菜8品目（ニシヨモギ、リュウキュウヨモギ、ホソバワダン、エンサイ、ヤエヤマカズラ、スイゼンジナ、ボタンボウフウ、ウイキョウ）において高ポリフェノール含量と強いDPPH・消去能が認められた。これらの野菜では $O_2^{\cdot-}$ 、*t*-BuOO・消去能においても強い活性を示した。

2) ホソバワダンからD(+)-chicoric acid (ChA), chlorogenic acid (ChgA), caffeic acid (CA), luteolin 7-O- β -D-glucopyranoside (LU-glc), luteolin 7-O- β -D-glucuronide (LU-gluc) の5種類のポリフェノールを単離し、同定した。

3) ホソバワダンポリフェノールの中でCA, LU-glc, LU-glucは強いLDL抗酸化能を示した。ChAの活性はやや弱かったが、量的には最も多く含まれていた。したがって、ホソバワダンのLDL抗酸化能にはChA, LU-glc, LU-glucが大きく影響していると推察された。

4) ホソバワダン抽出物をラットに経口投与（ChA 200 mg/Kg体重）すると、投与後15分の血漿にChA ($2.9 \pm 1.6 \mu\text{g/mL}$) が検出された。さらにこの血漿を glucuronidase/sulfatase処理することによりluteolin (LU) が検出されたことから、LU-glcなどのLU誘導体は、血中でグルクロン酸あるいは硫酸抱合体として存在することが推察された。

以上の研究は、沖縄県産野菜には高ポリフェノール含量で強い抗酸化能を有する野菜が多くあること、さらに沖縄の伝統野菜であるホソバワダンは動脈硬化予防が期待されるChAやLU誘導体を含み、それらの成分は血中にも移行することを初めて明らかにしたものである。従って、本論文は食品栄養学の分野において優れた新知見を提供しており、博士（農学）の学位論文として十分な価値を有すると判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏 名	前田 剛希
審査委員	主査 琉球大学 教授 屋 宏典
	副査 琉球大学 教授 田幸 正邦
	副査 佐賀大学 教授 柳田 晃良
	副査 鹿児島大学 教授 林 國興
	副査 宮崎大学 教授 窄野 昌信
審査協力者	琉球大学 助教授 和田 浩二
実施年月日	平成19年1月26日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。）	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査、副査及び審査協力者の6名は、平成19年1月26日（金）の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	前田 剛希
<p>[質問 1] 沖縄県において肥満人口が増加している点と、野菜の摂取量が減少している点についてどの程度の逆相関が得られているのか？</p> <p>[回答 1] 肥満人口や生活習慣病の増加、野菜摂取量の減少については、厚生労働省や社会保険庁の統計資料があるが、両者の相関についてはデータを確認していない。</p> <p>[質問 2] スライド 18 のサンプルの活性は濃度を統一して比較すべきでは？</p> <p>[回答 2] 御指摘の通りだと考えます。投与量をモル濃度換算あるいは濃度換算して表記すべきだと思います。</p> <p>[質問 3] スライド 27 の数値は正しいのか？</p> <p>[回答 3] ホソバワダンの総ポリフェノール含量は Folin-Denis 法で、個々のポリフェノール含量は単離した化合物を標準物質に用いた HPLC 法でそれぞれ分析しているので、個々のポリフェノールの合計と総ポリフェノール含量は一致しない。</p> <p>[質問 4] スライド 35 の LDL 酸化のデータが、全体の活性と大きく異なっているのはなぜでしょうか？</p> <p>[回答 4] 測定した成分の抗酸化力だけでなく、その他の抗酸化成分による活性が加わっていることや、相乗効果による活性の増大が、各成分の活性の合計と、全体の活性が異なる原因として考えられる。</p> <p>[質問 5] 沖縄県で男女の長寿に大きな差があるのはなぜでしょう？</p> <p>[回答 5] 男性の方が外食が多いこと、また外食一食当たりの絶対量が多いためカロリー摂取量も多くなっていることが一つの原因として考えられると思います。</p> <p>[質問 6] 抗酸化の測定方がいろいろあるが、スクリーニング法にはどれが最適と考えられますでしょうか？</p> <p>[回答 6] DPPH・消去能は正確には抗酸化能ではなく単純にラジカルの消去を見ているだけだが、簡単なので良く用いられる方法。抗酸化能を指標としたスクリーニングに用いるには適していると思う。</p> <p>[質問 7] 2 種類の配糖体について報告しているが、野菜中にはどのような配糖体が存在するのでしょうか？</p> <p>[回答 7] 多種多様存在しており、フラボノイドに関してはフリーよりも配糖体として存在する場合が殆どである。</p> <p>[質問 8] ホソバワダンにイソクロロゲン酸は含まれているのでしょうか？</p> <p>[回答 8] 含まれております。</p> <p>[質問 9] 野生種と栽培種との間で抗酸化物質の濃度に違いはあるのでしょうか？</p> <p>[回答 9] 抗酸化物質は植物が自己防御のために産生するものであることから、沖縄のような光、温度等の環境ストレスが強い環境ではこれらが多量に作られている可能性が指摘されており、従って、生育環境が異なる野生種と栽培種で違いがあると考えられる。</p> <p>[質問 10] チコリ酸の吸収率はどの程度でしょうか？</p> <p>[回答 10] 本実験では多量に投与して、血中への移行をしらべているが、吸収率については計算をしていない。しかしながら、ポリフェノールの例を参考にするとかなり低いと推測されます。</p> <p>[質問 11] Lut 配糖体は吸収はどのような形で行われているのでしょうか？</p> <p>[質問 11] Lut は吸収に際して糖が切断され吸収されると思われれます。</p> <p>[質問 12] 配糖体と、糖が切断された化合物では、抗酸化能に差はあるのでしょうか？</p> <p>[回答 12] 配糖体の方が活性が若干弱いとの報告がありますが、実際測定してみますと両者間にそれほど差は無いようである。</p> <p>[質問 13] なぜホソバワダンを調べたのでしょうか？</p> <p>[回答 13] その他の沖縄産野菜についてはよく調べられていること、また、ホソバワダンは比較的食事に用いられる量が多いためです。</p> <p>[質問 14] ホソバワダン中の苦味成分は抗酸化物質でしょうか？</p> <p>[回答 14] 苦味成分として単離していないので不明です。</p>	