

# 沖縄伝統野菜の低密度リポタンパク質(LDL)の酸化抑制能

前田剛希

ポリフェノールは動脈硬化の初発要因とされる低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein ; LDL) の酸化を抑制することから、ポリフェノールを多く含む食品には動脈硬化の予防効果が期待される。沖縄の伝統野菜はポリフェノール含量が多く、抗動脈硬化作用を有することが予想される。本研究では、サクナやニガナ、フーチバーなどの伝統野菜 10 品目のポリフェノール含量と LDL 抗酸化能の測定を行い、比較検討した。その結果、サクナ、イチヨーパー、フーチバー、ニガナなどポリフェノール含量の多い野菜ほど LDL 抗酸化能は強い傾向にあった (相関係数  $r^2 = 0.7382$ )。さらに、サクナからはクロロゲン酸、ニガナからは D(+)-チコリ酸とルテオリン-7-O-β-D-グルクロニドを LDL 抗酸化成分として分離・同定した。これらの結果は、LDL の酸化を抑制するポリフェノールを多く含むサクナなど、沖縄の伝統野菜が動脈硬化の予防に有用な食素材になる可能性を示唆した。

## 1 はじめに

沖縄では苦いものほど滋養になるという考え方から、サクナやニガナ、フーチバーなどの苦みを呈する野菜が頻繁に食べられている。また、これらの野菜は薬草としても利用されている。普段の食事に薬草を取り入れるという医食同源的な考え方を基本とする沖縄の伝統的な食スタイルは長寿の要因のひとつと考えられ<sup>1)</sup>、注目を浴びている。このため沖縄の食材を利用した健康食品などの加工食品が数多く市場に流通するようになり、機能性に関する研究も盛んに行われている。最近では、サクナやニガナ、フーチバーなどは高ポリフェノール含量で DPPH ラジカル消去能も強いことが明らかにされている<sup>2)3)</sup>。

食品に含まれるポリフェノールの多くは抗酸化能を有するため、活性酸素やフリーラジカルが起因している様々な生活習慣病に対し、予防効果が期待されている。例えば、カテキンやフラボノイドなどのポリフェノールは、動脈硬化の初発要因とされる低密度リポタンパク質 (Low density lipoprotein ; LDL) の酸化を抑制することが明らかにされている<sup>4)</sup>。通常、LDL は細胞表面に存在する LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれ、コレステロールを細胞に供給する。この際、フィードバック調節機構の働きによりコレステロールは必要な量だけ細胞に供給される。ところが酸化修飾を受けた LDL は、LDL 受容体に認識されずに血中の単球が分化したマクロファージに異物として認識される。マクロファージは酸化 LDL をスカベンジャー受容体を介して際限なく取り込み、最終的には泡沫化して血管内膜を肥厚させ、動脈硬化症を引き起こす (図 1)。さらに酸化 LDL は、単球の血管内皮細胞への接着促進と内膜への遊走化、マクロファージの保持促進と増殖誘導、血管内皮細胞の損傷、血管平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走と増殖を誘導し、動脈硬化を促進させる<sup>5)</sup>。従って、LDL の酸化を抑制する食

素材や、その活性成分には、動脈硬化の予防および進展の遅延効果が期待される。

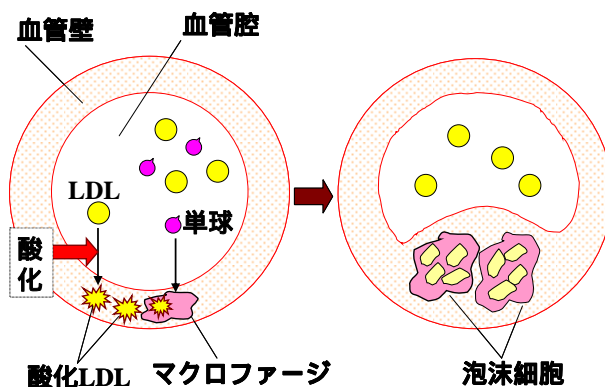


図 1 動脈硬化発症の模式図

マクロファージは酸化 LDL を貪食する。マクロファージは泡沫細胞化して動脈壁に集積、血管内腔が狭窄する。

沖縄は動脈硬化に起因する虚血性心疾患による死亡が少ない地域であったことから、沖縄の伝統食材は抗動脈硬化作用を有していることが期待される。しかしながら、いまだ科学的裏付けを示す報告はない。そこで本研究では、沖縄の伝統食材の中でもよく食されているサクナやニガナ、フーチバーなどの抗動脈硬化作用を明らかにすることを目的として、ポリフェノール含量、LDL 抗酸化能を調べた。さらにサクナとニガナについては、LDL 抗酸化能に關与する成分を分離、同定したので報告する。

## 2 実験方法

### 2-1 試薬

ヒト LDL は株式会社 SAKURA INC. から購入した。2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)とクロロゲン

酸(5-caffeoylquinic acid)は和光純薬工業(株)から購入した。D(+)-チコリ酸とルテオリン-7-O-β-D-グルクロニドはニガナから単離して用いた<sup>3)</sup>。その他の試薬は、市販の特級試薬をそのまま使用した。

## 2-2 試料

試料は2004年に沖縄県那覇市の小売店で入手した伝統野菜10品目を試験に供した(表1)。試料の皮や種、茎などの非可食部は除去し、凍結乾燥した。乾燥物はミルで粉碎して分析試料とした。

表1 供試品目一覧

品目*	和名、その他呼称	学名	部位
イーチョーバー	ウイキョウ	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	葉
ウンチェー	エンサイ	<i>Ipomoea aquatica</i> Forsk.	茎葉
エーヤマカンダバー	ヤエヤマカズラ	<i>Ipomoea batatas</i> LAM.	茎葉
サクナ	ボタンボウフウ	<i>Peucedanum japonicum</i> Thunb.	葉
シマナー	カラシナ	<i>Brassica juncea</i> Czern.et Coss.	葉
ニガナ	ホソバワダン	<i>Crepidiastrum lanceolatum</i> Nakai	葉
ハンダマ	スイゼンジナ	<i>Gynura bicolor</i> DC.	葉
フーチバー	ニシヨモギ	<i>Artemisia princeps</i> Pamp.	葉
ゴーヤー	ニガウリ	<i>Momordica charantia</i> L.	果肉
野菜パパイヤ	パパイヤ	<i>Carica papaya</i> L.	果肉

\* 試料名はおきなわ伝統的農産物データベース(<http://traddb.pref.okinawa.jp/dentou/mainMenuGuest.do>)を参考にした。

## 2-3 試料溶液の調製

凍結乾燥試料(生鮮物重量で1.6g相当量)に80%エタノール8mLを加え、80℃で30分間抽出した。抽出液は3000rpm、15分間の遠心分離を行い、上清を試料溶液とした。

## 2-4 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量はFolin-Denis法<sup>3)</sup>で測定した。すなわち、蒸留水で適宜希釈した試料溶液2mLにフォーリン試薬2mLを加えて3分後、10%炭酸ナトリウム溶液2mLを加えて室温で1時間静置し、700nmの吸光度を分光光度計(UV-160A、(株)島津製作所)で測定した。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は生鮮物重量100gあたりの没食子酸相当量として算出した。

## 2-5 LDL抗酸化能の測定

LDL抗酸化能はHiranoら<sup>4)</sup>の方法を改変して測定した。酸素飽和したPBS(pH7.4)で調製したヒトLDL2225μL(112μg protein/mL)に2.5mMEDTA100μLと試料溶液125

μL(生鮮物相当量0~2.0mg/mL)を加えてよく混合した。反応は20mM2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)エタノール溶液50μLを加えて37℃保温下で開始させ、6分毎に234nmの吸光度を測定した。LDL抗酸化能は、測定開始後からO.D.が0.1増加するまでにかかった時間(Lag timeと表示)を比較して評価した。

## 2-6 サクナ、ニガナのLDL抗酸化成分の分離・同定

サクナおよびニガナに含まれるLDL抗酸化成分の分離は以下の手順で行った。サクナとニガナの凍結乾燥試料2gに50%エタノール50mLを加え、80℃で30分間抽出し、3000rpm、10分間の遠心分離で上清を得た。上清を濃縮乾固後、蒸留水25mLに再溶解し、ヘキサン、酢酸エチル、ブタノールで順次分配した。回収したそれぞれの画分を濃縮乾固後、80%エタノール25mLに再溶解した。各画分のLDL抗酸化能を測定し、活性が確認された画分については、さらに分離・精製を繰り返した。

成分分析は、Waters製のLC/MSシステム(Alliance 2695 HPLC、Micromass Quattro micro API)を用いて、次の条件で分析した。

HPLC条件;カラム:YMC-Pack Pro C18(100×3.0mm I.D.、(株)YMC)、移動相;A)0.1%ギ酸およびB)0.1%ギ酸/メタノール、グラジエントパターン:0→50%B(0~8min、リニアグラジエント)、50→90%B(8~11min、リニアグラジエント)、流速:0.35mL/min、カラム温度:35℃、検出波長:330nm。MS条件;イオン化:ESI法(負イオンモード)、キャピラリー電圧:3.0kV、乾燥ガス流量:700L/hr(N<sub>2</sub>ガス)、乾燥ガス温度:350℃。成分は、溶出時間とUVおよびMSスペクトルの標準物質との一致で同定した。

## 3 実験結果および考察

### 3-1 沖縄の伝統野菜の総ポリフェノール含量とLDL抗酸化能

沖縄の伝統野菜には強いDPPHラジカル消去能を有する抗酸化物質のポリフェノールが多く含まれている<sup>2)3)</sup>。また、カテキンやフラボノイドなどのDPPHラジカル消去能が強いポリフェノールは、LDL抗酸化能も強いことが明らかにされている<sup>4)</sup>。LDLの酸化は、マクロファージ由来泡沫化細胞により血管内膜が肥厚するアテローム性動脈硬化症の初発要因である(図1)。また、酸化LDLは動脈硬化促進作用も併せ持つ<sup>5)</sup>。したがって、LDLの酸化を抑制する食品や成分は動脈硬化の予防だけでなく、疾病の進展を抑制する作用を示すことも期待される。

今回、代表的な沖縄伝統野菜10品目のポリフェノール含量を調べた。サクナのポリフェノール含量が最も多く、次いでイーチョーバー、フーチバーが同程度の含量であった(図2)。

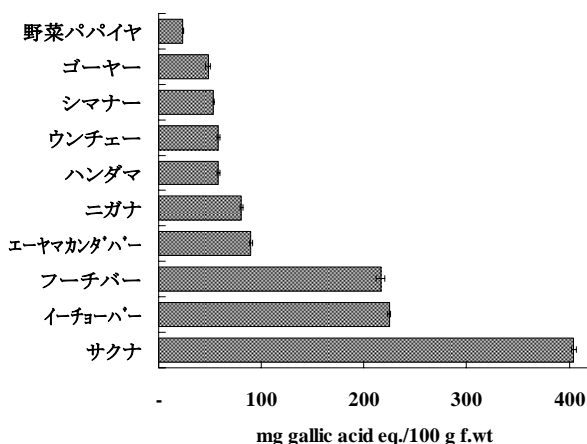


図2 沖縄の伝統野菜のポリフェノール含量

これら 10 品目の LDL 抗酸化能を測定した結果、フーチパーやサクナ、イーチョーパーなどの活性が著しく強く、次いでニガナやハンダマ、ウンチェーなどの活性が強かった(図3)。一方、ポリフェノール含量の少ない野菜パパイヤ、ゴーヤー、シマナーの活性は弱かった。

供試した 10 品目の LDL 抗酸化能とポリフェノール含量の関係を調べた。図4に示されるように、ポリフェノール含量の多い野菜は LDL 抗酸化能も強かった(相関係数;  $r^2 = 0.7382$ )。また、サクナやフーチパーのように回帰直線から大きくずれている品目もあり、LDL 抗酸化能の強さには、ポリフェノールの含量だけでなく組成も大きく影響していることが推察された。さらに興味深い点は、今回評価した品目の中で、サクナ、フーチパーなど一回の摂取量あるいは食べる機会の少ない野菜ほど、相関図上で右上に位置した。これらの野菜は高ポリフェノール含量で LDL 抗酸化能が強かった。各々の野菜の調理法で見ると、右上に位置するサクナ、フーチパー、イーチョーパーは、汁物の具材など香味野菜的な利用が多く、一度に摂取する量は少ない。やや左下に位置するニガナ、ハンダマ、ウンチェー、エーヤマカンダパー、シマナーは炒め物や、和え物、汁物など調理法はバラエティに富み、一食あたりの摂取量も比較的多い。左下部に位置するゴーヤーと野菜パパイヤは炒め物が主な調理法で一度に食べる量も多く、非常にポピュラーな食材である。この2品目の食回数と摂取量は、10品目中最も多いことが予想される。このことから、単位重量あたりの成分含量や活性は異なっている、日常の摂取法(調理法)と、摂取量の違いを考慮した場合には、品目間の差はそれほど大差ないものと考えられる。従って、実際の食生活の中で、沖縄県民は伝統野菜を有効活用しているとも考えられる。

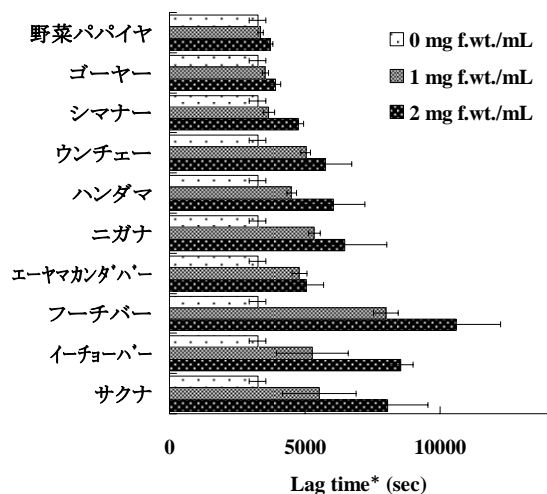


図3 沖縄の伝統野菜の LDL 抗酸化能

\* Lag time; 反応開始後 O.D 234 nm が 0.1 増加する時間を Lag time とした。

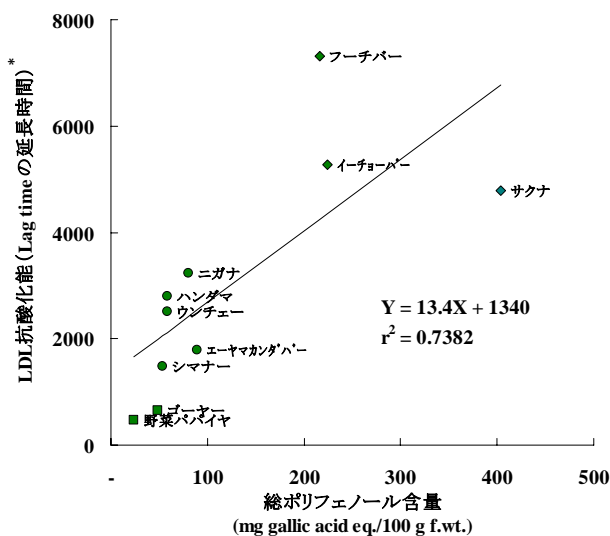


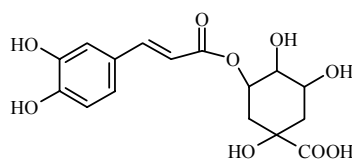
図4 沖縄の伝統野菜のポリフェノール含量と LDL 抗酸化能の関係

\* LDL 抗酸化能; Sample 2 mg f.wt./mL 添加時の Lag time と Sample 0 mg/mL 添加時の Lag time の差

### 3-2 サクナとニガナの LDL 抗酸化成分

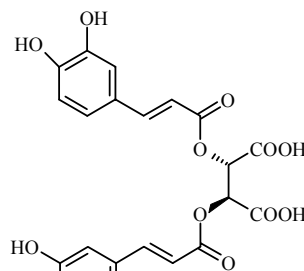
サクナの LDL 抗酸化成分は図 5 に示す手順で分離した。はじめに、サクナ可食部凍結乾燥粉末の熱水、50%エタノールおよびエタノール抽出液の LDL 抗酸化能を調べた。その結果、50%エタノール抽出液が強い活性を示した（データ省略）ので液液分配を行い、活性の強いブタノール相を HPLC で 5 つの画分（Frc. 1 - 5）に分けた。LDL 抗酸化能は Frc. 2 にのみ確認され、UV、MS スペクトル分析の結果、活性成分はクロロゲン酸であることを確認した（図 6）。クロロゲン酸はサツマイモなどに豊富に含まれ、抗酸化能<sup>6)</sup>、メラニン生成抑制作用<sup>7)</sup>、抗菌活性<sup>8)</sup>、肝障害軽減作用<sup>9)</sup>など様々な機能性を有することが明らかにされている。

ニガナについても、サクナと同様に分離を行った。ニガナの場合には、50%エタノール抽出液のブタノール相より分画した Frc.2 と Frc.4 に強い活性があった。これら 2 画分にふくまれる成分の UV スペクトル、溶出時間を標準物質と照合した結果、Frc.2 はルテオリン-7-O-β-D-グルクロニド、Frc.4 は D(+)-チコリ酸であった（図 7）。チコリ酸は抗酸化能<sup>3)</sup>、血管平滑筋弛緩作用<sup>10)</sup>、抗 HIV 作用<sup>11)12)13)</sup>などの生理機能を示すことが明らかにされており、風邪によく効くハーブとして欧米諸国で人気の高いエキナセアに多く含まれるポリフェノールである<sup>11)14)</sup>。ルテオリン-7-O-β-D-グルクロニドはルテオリン誘導体である。アグリコンであるルテオリンはシソなどに豊富に含まれるフラボノイドとして知られ、強い LDL 抗酸化能<sup>4)15)</sup>の他に、抗アレルギー活性<sup>16)</sup>、抗炎症作用<sup>17)</sup>などの作用を有することが明らかにされている。

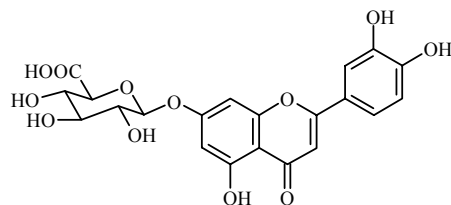


Chlorogenic acid

図 6 サクナの LDL 抗酸化成分



D(+)-Chicoric acid



Luteolin-7-O-β-D-glucuronide

図 7 ニガナの LDL 抗酸化成分

このような生理活性成分を含むサクナやニガナには、栄養素という側面のみではなく、機能性食材としての利用も大いに期待できる。しかしながら、食品成分が機能を発揮するためには、生体内における成分の吸収性・代謝動態が重要な要因となる。サクナの LDL 抗酸化成分として同定したクロロゲン酸などカフェ酸誘導体の体内吸収性については様々な報告がある。クロロゲン酸やイソクロロゲン酸は体内へ吸収されにくいものと考えられている<sup>18)-21)</sup>。クロロゲン酸が体内に吸収されると速やかにカフェ酸とキナ酸に分解され、血中ではフェルラ酸あるいはイソフェルラ酸抱合体などカフェ酸の代謝物として存在する<sup>22)23)</sup>。一方、ニガナに含まれているチコリ酸は、代謝を受けずに血中へ移行していることを著者らは明らかにした<sup>24)</sup>。ルテオリングルクロニドについては、ルテオリンやルテオリングルコシド<sup>25)</sup>と同様に、血中ではルテオリン抱合体となっているものと推察される。このように、体内に吸収されて血中に移

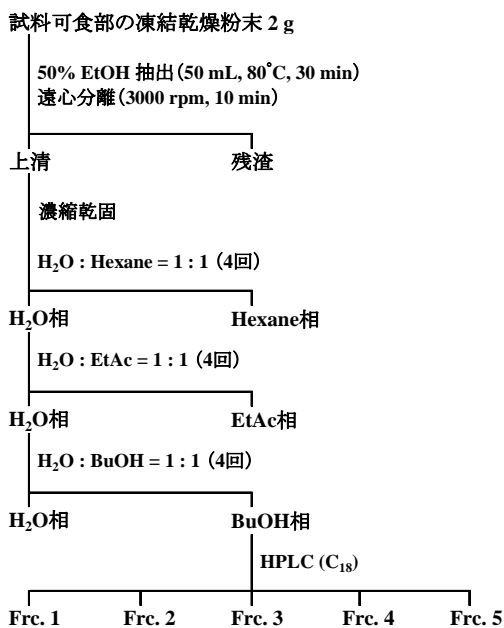


図 5 LDL 抗酸化成分の分離スキム

行した成分あるいは代謝物は生体内酸化を予防しているものと考えられる。

例えば、ヒトにおける茶カテキン抽出物の摂取試験では血中カテキン濃度の増加に伴い血中LDLの抗酸化性が上昇すること<sup>26) 27)</sup>、ラットにおけるケルセチン経口投与試験では投与後の血中にケルセチン抱合体が検出され、血漿の抗酸化性も上昇すること<sup>28)</sup>が明らかにされている。

本研究では、LDL抗酸化能を示した野菜の摂取が血中の被酸化性に及ぼす影響については検討していないが、活性成分あるいはその代謝物が生体内で抗酸化作用を発揮していれば動脈硬化に抑制的に作用する可能性がある。沖縄伝統野菜にはその効果が十分に期待できるものと思われる。

#### 4 まとめ

- 1) 沖縄の伝統野菜 10品目についてポリフェノール含量、LDL抗酸化能を測定した結果、サクナ、イーチョーバー、フーチパー、ニガナなどの沖縄の伝統野菜は高ポリフェノール含量で、強いLDL抗酸化能を有していた。また、ポリフェノール含量の多い野菜ほどLDL抗酸化能も強かった(相関係数  $r^2 = 0.7382$ )。
- 2) サクナにはLDL抗酸化成分のクロロゲン酸、ニガナにはD(+)-チコリ酸とルテオリン-7-O-β-D-グルクロニドが含まれていた。

本研究は平成16-17年度伝統的農産物振興戦略策定事業の一環として実施した。一部の内容(図2~4)については、沖縄県農業試験場(現沖縄県農業研究センター)の平成16年度の研究成果を活用した。

#### 参考文献

- 1) 新城澄枝, 山本茂, 沖縄の長寿食; 食生活の実験的検証, 「沖縄の長寿」, 尚弘子, 山本茂編(学会センター関西, 大阪), pp. 79-100 (1999).
- 2) 須田郁夫, 沖智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一, 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, 食科工, **52**, 462-471 (2005).
- 3) Maeda, G., Takara, K., Wada, K., Oki, T., Masuda, M., Ichiba, T., Chuda, Y., Ono, H. and Suda, I., Evaluation of antioxidant activity of vegetables from Okinawa prefecture and determination of some antioxidative compounds. *J. Food Sci. Technol. Res.*, **12**, 8-14 (2006).
- 4) Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O. and Kondo, K., Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Scie Vitaminol.*, **47**, 357-362 (2001).
- 5) 二木鋭雄, 野口範子, 動脈硬化と酸化ストレス, 「酸化ストレス・レドックスの生化学」, 谷口直之, 淀井淳司・日本生化学会編, (共立出版, 東京), pp.112-116 (2000).
- 6) 村山徹, 小堀真珠子, 新本洋士, 津志田藤二郎, 食用ギクの抗酸化性の評価及びその成分の同定, 園芸学会誌, **67** 別2, p.158, (1998).
- 7) 下園英俊, 小堀真珠子, 新本洋士, 津志田藤二郎, サツマイモ抽出物によるマウスメラノーマ細胞のメラニン生成抑制, 食科工, **43**, 313-317 (1996)
- 8) 堂ヶ崎知格, 新藤哲也, 古畑勝則, 福山正文, *legionella pneumophila* に抗菌活性を示すコーヒー成分の化学構造について, 薬誌, **122**, 487-494, (2002)
- 9) Kapli, A., Koul, I.B. and Suri, O.P., Antihepatotoxic effects of chlorogenic acid from *anthocephalus* -cademba, *Phytotherapy research*, **9**, 189-193 (1995)
- 10) 桜井信子, 飯塚徹, 中山繁樹, 船山浩子, 野口万里子, 永井正博, キクニガナおよびスギナより得られたカフェ酸エステル系の血管平滑筋弛緩作用, 薬誌, **123**, 593-598 (2003).
- 11) Lamidey, A.M., Fernon, L., Pouysegu, L., Delattre, C. and Quideau, S., A convenient synthesis of the Echinacea-derived immunostimulator and HIV-1 integrase inhibitor (-)-(2R, 3R)-chicoric acid. *Helv. Chim. Acta*, **85**, 2328-2334 (2002).
- 12) Pluymers, W., Neamati, N., Pannecouque, C., Fikkert, V., Marchand, C., Burke, T.R.Jr., Pommier, Y., Schols, D., Clercq, E.D., Debyser, Z. and Mitvrouw, M., Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 641-648 (2000).
- 13) King, P.J. and Robinson, W.E.Jr., Resistance to the anti-human immunodeficiency virus type 1 compound L-chicoric acid results from a single mutation at amino acid 140 of integrase. *J. Virol.*, **72**, 8420-8424 (1998).
- 14) Perry, NB., Burgess, E.J. and Glennie, VL., Echinacea standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1702-1706 (2001).
- 15) Brown, J. E., Rice-Evans, C. A., Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro, *Free Rad. Res.*, **29**, 247-255 (1998).
- 16) Ueda, H., Yamazaki, C., Yamazaki, M., Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1197-1202 (2002).
- 17) Wingard, D. L., Turiel, J., Long-term effects of exposure to diethylstilbestrol, *West. J. Med.*, **149**, 551-554 (1988).
- 18) Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H.

- and Terao, J., Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5496-5500 (2000).
- 19) Takenaka, M., Nagata, T. and Yoshida, M., Stability and bioavailability of Antioxidants in Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2689-2691 (2000).
- 20) Olthof, R.M., Hollman, C.H.P. and Katan, B.M., Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutri.*, **131**, 66-71 (2001).
- 21) Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F. and Scaccini, C., Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5735-5741 (2002).
- 22) Gonthier, M.P., Verny, M.A., Besson, C., Rémésy, C. and Scalbert, A., Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J.Nutr.*, **133**, 1853-1859 (2003).
- 23) Wittmer, S.M., Ploch, M., Windeck, T., Müller, S.C., Drewelow, B., Derendorf, H. and Veit, M., Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine*, **12**, 28-38 (2005).
- 24) 前田剛希, 広瀬直人, 屋宏典, 高良健作, 和田浩二, ホソバワダン (*Crepidiastrum lanceolatum* Nakai) に含まれる LDL 抗酸化成分とラットにおける血中動態, 食科工, 投稿中.
- 25) Shimoi, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H. and Kinae, N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside in rats and humans. *FEBS Lett.*, **438**, 220-224 (1998).
- 26) 富田多嘉子, 食品と循環器疾患 - 茶カテキンの動脈硬化, 脳卒中進展抑制効果を中心に -, 日本栄食誌, **57**, 21-26 (2004).
- 27) 田子元美, 海野知紀, 角田隆巳, 近藤和男, 茶の機能性 II - 緑茶の LDL 酸化予防効果について -, 食品工業(東京) **4.30**, pp. 27-32 (2002).
- 28) Morand, C., Vanessa, C., Claudine, M., Catherine, B., Christian, D. and Christian, R., Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am. J. Physiol.* **275**, 212-219 (1998).