

黒大豆ポリフェノールの抗酸化作用と血流改善作用

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	難波,文男
発行元	日本醸造協会
巻/号	108巻6号
掲載ページ	p. 413-419
発行年月	2013年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



黒大豆ポリフェノールの抗酸化作用と血流改善作用

醤油、味噌、納豆をはじめとして、わが国の発酵食品の原料には大豆が多く用いられている。発酵食品は、健康的な食生活にとって有用であることが研究の結果から知られるようになり注目を集めている。大豆は、植物性タンパク質の供給源として栄養的にわが国の食生活を支えるとともに、食物繊維、オリゴ糖、ポリフェノール等の各種成分を含むことから健康機能の面からも注目されている。また、大豆は発酵食品の主要な原料として重要な位置を占める農作物である。著者は、大豆の中でも黒大豆に着目して、そのポリフェノール成分の健康機能に関する研究を行ってこられた。そこで、黒大豆ポリフェノールの機能について、研究データを交えながらわかりやすく解説していただいた。

難 波 文 男

はじめに

高血圧や糖尿病、脂質異常症、肥満などに加え、最近話題のメタボリックシンドロームなど、様々な生活習慣病により、血管内皮機能が低下する^{1,2)}。これらの疾患は、食生活の欧米化にともなう栄養バランスの偏りや、日々の運動不足が原因であると考えられている。血管内皮機能が低下した状態が長く続けば、動脈硬化の悪化、さらにはプラーク（粥腫）の不安定化を引き起こし、最終的には脳卒中や心筋梗塞などの重篤な疾患につながる。血管内皮機能の低下はまた、血流不足の原因にもなり、冷え症や肩凝りなど、普段自覚する身体症状にも深く関与する。しかし、この動脈硬化の初期段階である血管内皮機能の低下は可逆的であるため、血管内皮機能の低下した状態を早期に発見し、さらにはその機能を高める介入をすることができれば、動脈硬化の予防につながると考えられる。

また、酸素を呼吸する生物の体内では、吸収した酸素の1～2%が活性酸素になると言われている。その他にも我々は空気汚染や紫外線、薬物、喫煙等によっても活性酸素による酸化ストレスに晒されている。肌の老化からアルツハイマー病やガンなどの重篤な病気まで、活性酸素の影響はきわめて大きなものであり、

一説には全ての疾病の85%に活性酸素が関与していると言われている。当然、血管内皮細胞もまた酸化ストレスによる傷害を受け、血管の収縮拡張を調節する一酸化窒素（NO）の産生が低下（または不活化）することで、血流の不足が生じる³⁾。あるいは血中のコレステロールが酸化LDLとなり動脈硬化の原因となる。そこで体内の活性酸素による酸化ストレスを制御することが、健康を維持する上で大変重要になってくる。酸化ストレスから体を守るため、あるいは老化を防止するためには、食品から抗酸化作用をもつ成分を摂取することが非常に効果的であると考えられる。以上の理由から、我々は、生体内で抗酸化作用を発揮し、血管内皮機能を改善する機能性食品を開発する意義があると考えている。

古来より食されてきた黒大豆は、生薬として利用され、漢方の書物の中には様々な効能を有すると記されている⁴⁾。特にその血流改善効果（活血）については、複数の書物（神農本草経、補欠肘后方、張文中）に見られる（第1表）。また実際に黒大豆の煮汁の摂取により血流の促進、高血圧や狭心症が改善したという臨床報告もある⁵⁾。黒大豆の煮汁を飲むことが血液の循環に良いことは民間療法としても広く知られるものであり、当社が一般消費者に対し行なったアンケートで

Effects of Black Soybean Polyphenol on Antioxidant and Blood Flow Improvement.
Fumio NANBA (Fujicco Co., Ltd.)

第1表 漢方における黒大豆の効能

文献名	効能
神農本草経	活血, 利尿, 風邪, 解毒
名医別録	利尿
食経	利尿, 便秘
食療本草	膝痛, 脚気
本草拾遺	風邪, 健康増進
本草綱目	利尿, 解毒
本草彙言	腎燥, 盗汗
補欠肘后方	活血
張文中	活血, 利尿
普濟方	消渴病
全幼心鑑	風邪
飲片新參	風邪, 解毒, 脳を清める
現代実用中薬	利尿, 解毒, 強壯
薬材学	目を明らかにする

も、黒大豆の健康効果で最も連想されるのが「血液をサラサラにする」効果であった。しかしながら、黒大豆の血流改善効果、あるいはそのメカニズムに関する科学的なエビデンスはほとんどないのが現状である。

また、『本草綱目』には、大豆には黒色、白色、黄色、褐色、青色、まだらの数色があるが、黒色のものだけが薬として用いられる、とある。黒大豆は種皮の色を除いては、基本的には他の大豆と変わるところはなく、つまり上記の薬学書に記されたさまざまな薬効は、種皮の色素成分に由来すると考えられる。この色素成分は、アントシアニン、プロアントシアニジンを中心とするポリフェノール類であり、黄大豆の種皮にはほとんど含まれない(第2表)。

ポリフェノールは優れた抗酸化作用を持つ物質であり、血流改善効果だけでなく、様々な生理活性が期待される。しかし、黒大豆に含まれるポリフェノールは非常に水溶性が高く、煮豆や納豆などの形態へと加工する過程で、その大部分が流出してしまう。そのため、我々が通常食するような方法では黒大豆ポリフェノール

第2表 大豆種皮に含まれるポリフェノール

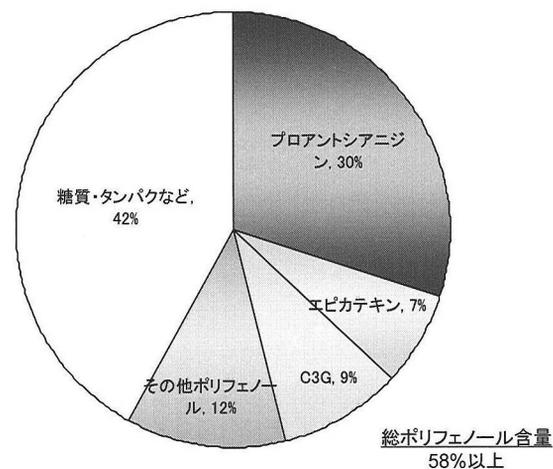
	ポリフェノール含量 mg/g (種皮)
黄大豆 (トヨコマチ) 種皮	1.8
黒大豆 (光黒) 種皮	88.5

ルを効率よく摂取することが難しいと言える。そこで我々は、確実に黒大豆ポリフェノールを摂取することができるように、食品素材としての黒大豆ポリフェノールを開発した。

1. 黒大豆ポリフェノール素材『クロノケア SP』の開発

『クロノケア SP』は黒大豆の種皮を原料として抽出した粉末状の食品素材である。黒大豆の種皮のみを硫酸酸性の熱水で抽出し、樹脂精製を行なうことでポリフェノール含量を高めている。樹脂精製後、濃縮し、デキストリンによる濃度調整を経て噴霧乾燥を行ない、粉末状にしたものがクロノケア SP である。クロノケア SP は全体の約 60% がポリフェノールであり、その組成としては、プロアントシアニジン (PA)、エピカテキン (EC)、シアニジン 3 グルコシド (C3G) が主な構成要素となっている (第1図)。

PA とはカテキンまたはエピカテキンが重合したものである。一般に、体内に吸収されて生理活性を有効に発揮するのは主に比較的低分子のものであり、高分子のものはほとんど血中に吸収されないと考えられている。ブドウ種子や松樹皮などを原料とする PA 素材は、分子量の大きなものを多く含むため、水への溶解性が低い。低分子の PA は体内への吸収性が高く、抗酸化作用等の生理活性を発揮しやすいと考えられ、水溶性も高い。クロノケア SP は 10 量体以下の低分子の PA を多く含むように製造されており(特許取得済)、



第1図 クロノケア SP の成分組成

水溶性にも優れ、飲料や一般食品等への高度な加工適性を有している。

C3Gは、アントシアニン的一种であり、酸性溶液中で鮮やかな赤色を示す。ブルーベリーなどでよく知られるように、アントシアニンには視機能改善作用があり⁶⁾、黒大豆にも「目を明らかにする」作用のあることが記載されている漢方書もある。C3Gはアントシアニンの中でも最も抗酸化作用の強い物質の一つであるが⁷⁾、クロノケアSPに含まれるアントシアニンのうち90%以上がC3Gであり、デルフィニジンやマルビジン等を多く含むブルーベリーとは組成の点で大きく異なっている。

ECは、カテキンの光学異性体であり、抗酸化作用をはじめとして様々な効果が報告されている⁸⁾。

クロノケアSPはこれらポリフェノールを高濃度に含有し、安定性については、原末の状態でも水溶液の状態でも極めて安定なものである。

安全性については、原料の黒大豆は長年にわたって日本や中国で食されており、食経験から安全であると考えられる。さらにマウスを用いた6ヶ月間反復投与毒性試験⁹⁾をはじめ、ラットによる急性毒性試験やAmes試験など、十分な検証を行ない、その安全性が確認されている。

2. 黒大豆ポリフェノールの機能性

2.1 クロノケアSPの抗酸化作用

黒大豆は老化を防止する食品としても古来より利用

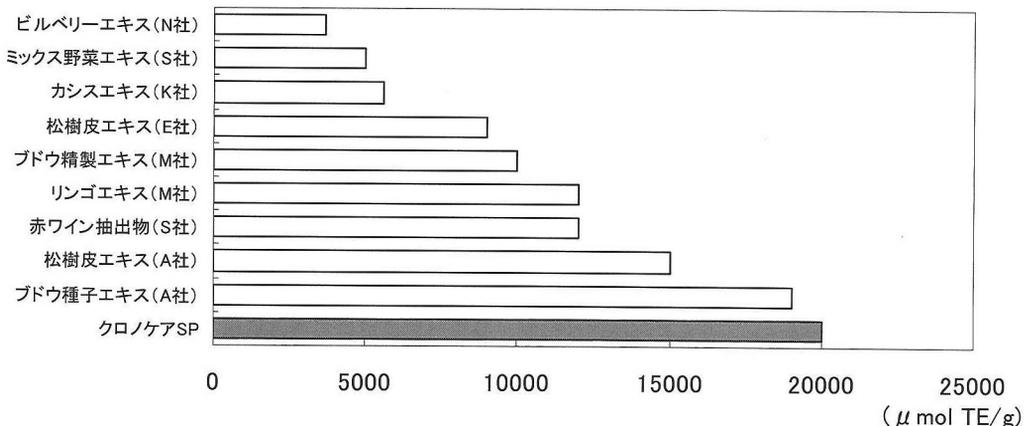
され、「本草綱目」には、毎朝黒大豆を摂ると年老いても衰えない、という記述が見られる。クロノケアSPは黒大豆種皮のポリフェノールを主成分としているため、非常に高い抗酸化作用を有する。

in vitro 試験

極めて高いORAC値を示し、その他にもDPPHラジカル消去活性やSOD様活性も同様に高い値を示した(第2図)。

培養細胞試験

クロノケアSPの生物への抗酸化作用を調べるために、我々はまずマウス脂肪細胞(3T3-L1細胞)を用いた試験を行なった。脂肪細胞は細胞内に脂肪を蓄積し肥大すると活性酸素を発生させ、これが代謝異常の原因になる。クロノケアSPを培地に添加し12時間培養すると、脂肪細胞において活性酸素の産生に関与するNADPH oxidase subunit¹⁰⁾のmRNA発現が抑制された¹¹⁾。さらに糖代謝や脂質代謝に重要な役割を持つアディポネクチンのmRNA発現量も増加し、エネルギー代謝が改善することが明らかとなった。また、血管内皮細胞への作用としては、ウシの大動脈内皮細胞を用いた試験で、高濃度グルコースの環境下で培養した際の細胞内活性酸素の生成を大幅に抑制することがわかった。



第2図 クロノケアSPのORAC値
他社ポリフェノール素材とのORAC値の比較。値はトロロックス換算値。

動物試験

次にクロノケア SP の *in vivo* における抗酸化作用を確認するために、Wistar ラットを用いた投与試験を行なった。その結果、高脂肪食を与えたラットでは、クロノケア SP を混餌により投与（2週間、200mg/kg/日）することで、血液および肝臓組織、さらには大脳組織中の過酸化脂質量を示す TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) が有意に低下した（第3図）。脳は不飽和脂肪酸が多く含み、活性酸素の影響を受けやすいため、酸化ストレスの調節はきわめて重要である。クロノケア SP の摂取は、血中や肝臓組織だけでなく、脳の老化を防止する上でも有効である可能性が示唆された。

ヒト投与試験

生体内における抗酸化作用はヒトに対する投与試験においても確認された。健康者5名に対し、クロノケア SP100mg またはプラセボ食（デキストリン）を単回投与し、経時的に採血を行ない、血漿中に含まれる TBARS を測定した。その結果、クロノケア SP 摂取から 60 分後に、プラセボ食を摂取した場合と比較して TBARS が有意に低下した（第4図）。これらのことから、クロノケア SP は生体内でも抗酸化作用を発

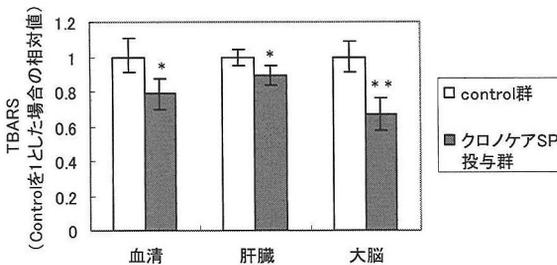
揮することが示された。

2.2 クロノケア SP の血流改善作用

培養細胞試験による NO 産生促進効果の検証

黒大豆ポリフェノールが、漢方の書物に記されている通り、血流改善作用を有するかどうかを調べるために、我々はまず、ウシの大動脈内皮細胞を用いた試験を行なった。NO (Nitric oxide) は、血管内皮細胞から産生され、血管内皮機能を調節している。血管内皮細胞から産生される NO には、血管拡張作用（降圧作用）、血小板凝集抑制作用（抗動脈硬化作用）、単球などの白血球が細胞に接着したり内皮細胞下組織に浸潤するのを防ぐ作用、血管平滑筋細胞の増殖を抑制する作用、などがある¹²⁾。また高血糖の状態では血管内皮細胞の NO 産生能が低下することが知られている¹³⁾。

細胞をコンフルエントになるまで培養した後、クロノケア SP を培地に添加し、37℃、5% CO₂ 条件下で 72 時間培養した。なお、血管内皮細胞の NO 産生能を低下させる目的で培地のグルコース濃度を 33mM とし、高血糖状態を模した環境で培養を行なった。そして細胞の NO 産生量を評価するために培地中の NO 代謝産物 (NO₂⁻/NO₃⁻) 濃度を測定し、さらに、NO 産生酵素 (eNOS) の mRNA 発現量をリアルタイム



第3図 ラットへの投与試験による組織中過酸化脂質 (TBARS)

動物: Wistar ラット, 雄性, 7週齢

投与方法: 高脂肪食に、200mg/kg 体重/日となるよう混餌。

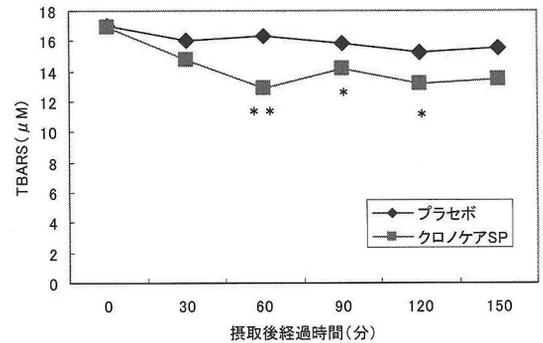
投与期間: 14日間

評価: 投与開始より14日後に解剖し、血清、各種組織を摘出。それらに含まれる過酸化脂質

(TBARS)量を測定した。

* . . . p < 0.05

** . . . p < 0.01



第4図 クロノケア SP のヒトに対する抗酸化作用

デザイン: クロスオーバー

被験者: 健康男性5名

摂取方法: 単回投与試験 [クロノケア SP-100mg またはプラセボ食(デキストリン)]

評価: 経時的に血漿を採取し、酸化剤を加えた際の過酸化脂質(TBARS)量を測定した。

* . . . p < 0.05

** . . . p < 0.01

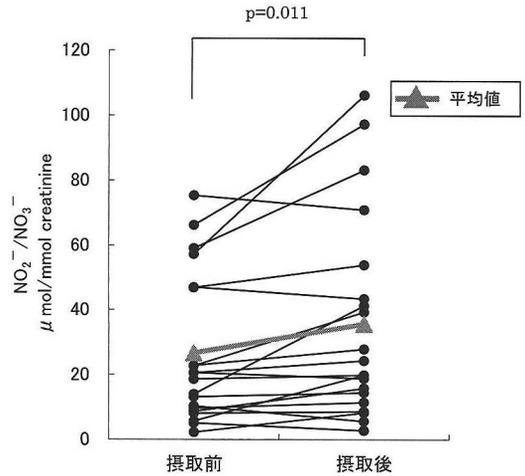
PCR 法によって測定した。

結果、クロノケア SP を添加することで、用量依存的に培地上清中の NO 量が増加した (第 5 図 A)。また、eNOS (NO 合成酵素) 阻害剤である L-NAME を同時に添加することで、クロノケア SP の NO 産生促進作用はキャンセルされた。また、eNOS の mRNA 発現量についても、クロノケア SP の添加により用量依存的に eNOS の発現量が増加した (第 5 図 B)。一方、Positive Control として設定したアスピリン添加群では HG 群と比較して変化が見られなかった。アスピリンは、NO 合成酵素を活性化することで細胞の NO 産生能を亢進させるが、遺伝子レベルでは作用しないことが報告されており¹⁴⁾、本試験の結果はこれと合致する。すなわち、アスピリンは酵素活性レベルで作用するのに対し、クロノケア SP は mRNA レベルで NO 産生を促進するという、異なったメカニズムで作用していることが示唆された¹⁵⁾。

ヒト試験

次に、クロノケア SP の NO 産生促進作用がヒトに対しても有効であるかどうかを調べるために、健常な男女 20 名を対象としたヒト摂取試験を行なった。クロノケア SP を 1 日 60mg、1 週間摂取させ、摂取前後での尿中 NO 代謝産物濃度を測定した。その結果、

20 名中 15 名の尿中 NO 代謝産物濃度が摂取前と比較して上昇し、統計的に有意な差が確認された (第 6 図)。このことから、クロノケア SP の NO 産生促進作用は



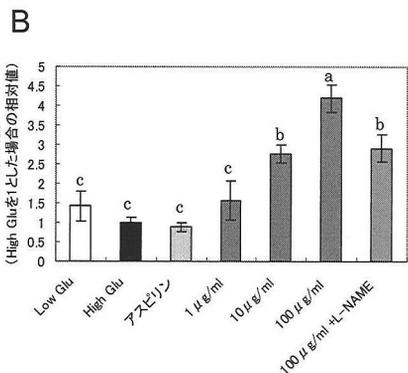
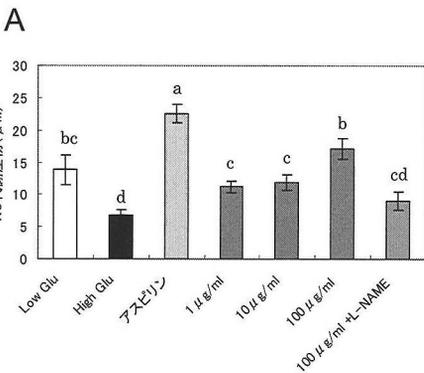
第 6 図 クロノケア SP 摂取による尿中 NO 代謝産物の変化

デザイン：オープン (プラセボなし)

被験者：健常男性 18 名、女性 2 名

サンプル摂取：クロノケア SP100mg/日、1 週間

評価：クロノケア SP の摂取前後で早朝の尿を採取し、NO 代謝産物濃度 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ として) を測定した。また、測定値は尿中クレアチニンにより補正した。



第 5 図 クロノケア SP の NO 産生促進作用

細胞：ウシ大動脈内皮細胞

培地：DMEM + グルコース (High:33mM または Low:5.5mM)

96well プレートに 3200cells/well の濃度で細胞を播種し、37°C - 5% CO₂ で 24 時間静置し、培地を交換した。さらに 24 時間の培養後、培地を除き、各試料を添加した培地に交換した。37°C - 5% CO₂ で 72 時間培養後、培地上清を回収し、NO 測定に供した。

異なるアルファベット間で p < 0.05 (Tukey 多重検定)

ヒトにおいても有効であることが確認された。クロノケア SP による NO 産生の促進は、上述の抗酸化作用や、アディポネクチンの充進による脂質代謝の改善も関与していると考えられる。

また、血流が不足することによる障害の一つに「冷え症」があるが、これについてもクロノケア SP が有効に働くかどうかを調べるために、ヒトに対する単回投与試験を行なった。被験者は問診アンケートにより冷え症と判断された女性4名で、クロノケア SP-500mg またはプラセボ食（デキストリン）を一回のみ摂取させた。摂取後 40 分間の安静期間を置き、しかる後に 15℃ の冷水に左手首までを 1 分間浸すことで低温負荷を与えた。その直後からの体温の回復度合いを、経時的にサーモグラフィカメラで体表面の温度を確認した。さらに、指先の 5 点の温度を任意に取り、平均値をプロットした。その結果、クロノケア SP を摂取した場合、明らかに低温負荷からの体温の回復が促進されることがわかった（第 7 図）。指先の温度については、プラセボ食と比較して、低温負荷から 15 分後に、最大で 6℃ の差が認められた。このことから、クロノケア SP の摂取により、いわゆる「冷え症」の改善が期待できる。しかしながら、この単回投与試験においては、クロノケア SP の摂取から時間的に極めて早い段階で血流増加、体温上昇の効果が現れており、作用メカニズムとしては上述の培養細胞による試験で示唆されたような、血管内皮細胞の NO 産生能の上

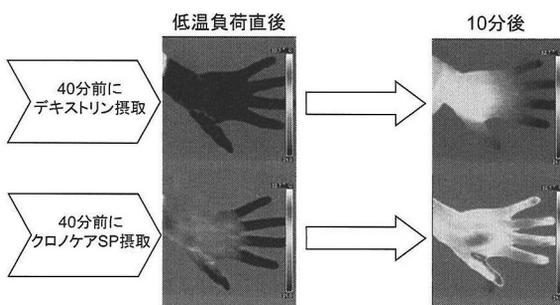
昇によるものではない可能性が高い。単回投与による冷え症改善作用のメカニズムの解明については今後の課題である。

まとめ

黒大豆の種皮を原料として、ポリフェノールを高濃度を含む素材、「クロノケア SP」を開発した。この素材について、*in vitro* 試験、培養細胞系および動物、ヒトへの投与試験によって抗酸化性の確認、そしてウシ大動脈内皮細胞およびヒト投与試験により血流改善作用を確認した。クロノケア SP は他の原料由来のポリフェノール素材と比較しても高い ORAC 値を示し、特にヒトへの単回投与試験では摂取後 60 分で血液中の酸化抵抗性が有意に上昇した。また、高グルコース環境下で培養された血管内皮細胞の機能に対しては、NO 産生能を改善し、それは eNOS の mRNA 発現レベルを上昇させることによると考えられた。さらにヒトへの投与試験では、クロノケア SP を摂取することで、尿中に排出される NO 代謝産物が増加し、クロノケア SP の血管内皮機能に対する作用（NO 産生能の改善）はヒトにおいても確認されたと言える。さらに、ヒトへの単回投与試験では、低温負荷した際の体温上昇を促進することが示され、冷え症に対する有効性が期待できることも明らかとなった。

おわりに

黒大豆の種皮にはプロアントシアニジン、アントシアニンなどのポリフェノールが多量に含まれる。これらの物質が漢方と言われるところの様々な効能に寄与していると考えられ、その多様な効能の基礎には高い抗酸化作用が関係していると思われる。偏った食生活により生活習慣病のリスクが高まった我々にとって黒大豆ポリフェノールは、血管内皮機能の改善をはじめとして、日々の健康増進のために役立つことが期待される。黒大豆ポリフェノールを主成分とするクロノケア SP は、非常に高い抗酸化作用を有しているため、血流改善作用の他にも異なった生理活性が期待できる。実際、我々のこれまでの研究では、血糖値上昇抑制効果¹⁶⁾や美白効果¹⁷⁾、肝機能改善効果¹⁸⁾、そして脳機能改善効果¹⁹⁾を示唆するデータも得られている。今後は黒大豆ポリフェノールの多様な機能性をさらに追及していくとともに、その作用メカニズムについても



第 7 図 クロノケア摂取による低温負荷後の体表面温度変化

冷え症女性 2 名に、クロノケア SP (500mg) またはデキストリンを充填したカプセルを単回投与し、40 分後に 15℃ の水に 1 分間左手首まで浸水し、低温負荷した。低温負荷直後と 10 分後にサーモグラフィカメラで、表面の温度を観察した。

より詳細な研究を行なっていく必要があると考えている。また、消費者の健康を維持・増進する上で、この食品素材を広く普及するためにも、より簡便で安心な活用の方法を工夫していく必要もあると考える。

〈フジッコ株式会社〉

文 献

- 1) Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS.: *Circ Res.* **89**, 793-798 (2001).
- 2) Scalera F, Borlak J, Beckmann B, Martens-Lobenhoffer J, Thum T, Täger M, Bode-Böger SM.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24**, 1816-1822 (2004).
- 3) Feng Z, Wei RB, Hong Q, Cui SY, Chen XM.: *Cell Biol Int.* **34**, 1055-1061 (2010).
- 4) 野崎豊：大豆月報。2・3月合併号 p18-30 (1997)
- 5) 福渡靖, 菊池祐二, Ting R.: 東方医学巻. Jun 25;17 (2) :15-27 (2001)
- 6) Matsumoto H, Nakamura Y, Tachibanaki S, Kawamura S, Hirayama M.: *J Agric Food Chem.* **51**, 3560-3563 (2003)
- 7) Wang H, Cao G, Prior RL.: *J Agric Food Chem.* **45**, 304-309 (1997)
- 8) FFI ジャーナル：Vol.209 No.3 FFI Report 「カテキン」(2004)
- 9) Fukuda I, Tsutsui M, Yoshida T, Toda T, Tsuda T, Ashida H.: *Food Chem Toxicol.* **49**, 3272-3278 (2011)
- 10) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I.: *J Clin Invest.* **114**, 1752-1761 (2004)
- 11) (社) 日本栄養・食糧学会：第 64 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集, p206 (2010)
- 12) 戸田昇：CLINICIAN, No.456, 2-6 (1996)
- 13) Kimura C, Oike M, Koyama T, Ito Y.: *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **280**, E171-E178 (2001)
- 14) Yi TN, Zhao HY, Zhang JS, Shan HY, Meng X, Zhang J.: *Chin Med J.*, **122**, 3055-3061 (2009)
- 15) 難波文男, 吉田正, 伊藤千秋, 戸田登志也：(社) 日本農芸化学会：2012 年度大会講演要旨集 (2012)
- 16) Kanamoto Y, Yamashita Y, Nanba F, Yoshida T, Tsuda T, Fukuda I, Nakamura-Tsuruta S, Ashida H.: *J Agric Food Chem.*, **59**, 8985-8993 (2011)
- 17) 田村真也, 難波文男, 伊藤千秋, 吉田正, 戸田登志也：FRAGRANCE JOURNAL 9 月号, 73-76, (2011)
- 18) (社) 日本農芸化学会：日本農芸化学会大会講演要旨集, p135 (2011)
- 19) 難波文男：食品工業, **54**, 65-74 (2011)