

原著論文

食用大麦の *in vitro* および *in vivo* における 抗酸化作用についての検討

Antioxidant activities of Barley in *in vitro* and *in vivo*.

庄 條 愛 子 ・ 今 井 も も こ ^{*1}
吉 澤 み な 子 ^{*2} ・ 中 野 長 久 ^{*3}

キーワード 抗酸化活性、大麦、浸水ストレス

I. はじめに

大麦は主に焼酎、ビールなどの醸造原料として消費されており、コメ、コムギ、トウモロコシなどの食用イネ科穀類と異なり多糖として β -(1-3)グルカンを豊富に含む¹⁾²⁾。このことから近年、腸内細菌叢の改善作用、食後高血糖の改善を目的とした食物繊維の供給源としても注目されている^{3)~5)}。大麦は条性の違いにより二条大麦と六条大麦に分類され、種子（胚乳部分）が大きい二条大麦は主に醸造原料、二条大麦に比べて種子が小さい六条大麦は麦茶、押し麦などの食品として利用されている。

一般家庭での大麦の利用方法としては、麦茶や米と混合して炊飯する麦飯が多い。麦飯は加熱保温した際に褐変することが知られているが、これは大麦に含まれるポリフェノール成分

の酸化が原因である⁶⁾⁷⁾。日本人が主食とするコメなどのイネ科穀類の種子にはフェルラ酸などのポリフェノール類が豊富に含まれており⁸⁾⁹⁾、押し麦には精白米の3倍以上のフェルラ酸が含まれている。また、大麦にはカテキンやプロアントシアニジンなどのポリフェノール成分も含まれており、強い抗酸化性や抗変異原性を持つことが報告されている^{10)~13)}。

大麦は安価であり麦飯などのかたちで手軽に利用可能なことから、本研究では、上述した大麦の食品としての生体調節成分（三次機能）であるポリフェノールの *in vitro* および *in vivo* での抗酸化作用について検討した。

II. 材料および方法

1. 大麦の調整と抗酸化活性測定

・大麦の調整

^{*1} 大阪府立大学大学院総合リハビリテーション学研究所

^{*2} 大手前大学健康栄養学部

^{*3} 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

本実験には(株)奥本製粉から分与頂いた三重県産六条大麦ファイバースノーを用いた。外皮付き大麦は家庭用精米機(MBR-C2、(株)山本電気、福島)を用いて、外皮を完全に除去した精製大麦(搗精歩留まり約80%)と外皮を30%除去した七分搗きにした。大麦の搗精歩留まり(%)は、精製大麦重量/外皮付き大麦重量×100で算出した。搗精した大麦は小型製粉機(粉エースA-7型製粉機、(株)國光社、名古屋)で市販大麦粉と同じ粒径になるように製粉した。この精製大麦粉と七分搗き大麦粉を用いて、抗酸化活性測定および動物投与試験を実施した。

・ In vitro における抗酸化活性の測定

玉川ら¹¹⁾、園田ら¹³⁾の方法に従い、精製大麦粉と七分搗き大麦粉の水溶性抗酸化成分の抽出、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去能ならびに2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)ラジカル消去能を測定した。

大麦粉を80%アセトン/蒸留水に懸濁して水溶性抗酸化成分のみを抽出した。遠心分離後、上清部を96ウェルプレートでDPPH(和光純薬工業、大阪)溶液またはABTS(和光純薬工業)溶液と混合して室温で20分間放置し、マイクロプレートリーダー(iMarkマイクロプレートリーダー、バイオラッド、California、USA)で520nmおよび630nmの波長にて測定を行った。測定結果はラジカル消去能を有するTrolox(和光純薬工業)当量($\mu\text{mol TE}/\text{mg}$)に換算した。

2. 動物投与試験

動物投与試験は、大阪府立大学動物実験委員会の承認(動物実験21-118)を得て実施した。

表1 成体ラット飼料(AIN-93M)組成

(%)	対照	七分搗き大麦粉
塩化コリン	0.25	0.25
DL-メチオニン	0.18	0.18
ミネラルミックス	3.50	3.50
ミルクカゼイン	14.00	14.00
ビタミンミックス	1.00	1.00
精製大豆油	4.00	4.00
β 化コーンスターチ	46.57	41.57
α 化コーンスターチ	15.50	15.50
グラニュー糖	10.00	10.00
セルロースパウダー	5.00	—
七分搗き大麦粉	—	10.00
合計	100.00	100.00

上記方法で調整した七分搗き大麦粉は表1の組成で調整した成体ラット飼料AIN-93Mのセルロースおよび β 化コーンスターチと置き換えて10%添加した。

Wistarラット(7週齢、雄、紀和実験動物、和歌山)を対照飼料で一週間の馴化飼育した後、体重および摂食量により一群あたり5匹ずつに群わけした。各試験群のラットは、対照飼料および試験飼料で2週間飼育した。飼育は室温 $23\pm 2^\circ\text{C}$ 、明暗調節下(8:00~20:00)の動物実験室で行い、自由摂食・摂水させた。

3. ストレス負荷、胃潰瘍面積の計測、組織染色および in vivo における抗酸化活性の測定

飼育期間終了時にTakagiらの方法¹⁴⁾に従って各群のラットを24時間絶食させた後、ストレスケージに入れて頸部まで 23°C の水浴に6時間浸漬して、水浸拘束ストレス負荷処理を行った。ストレス負荷後、イソフルラン麻酔下で下大静脈から静脈血液を採取した。

胃組織は噴門部をクリップで結束した後に幽門部からゾンデを用いて10%中性緩衝ホルマリン溶液(和光純薬)約5mlを注入して胃全

体を十分に膨化させ、幽門部を結束した後、胃全体を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬した。組織固定 24 時間後に胃大湾部に沿って切開し、標本台に伸展して胃組織全体をデジタルカメラで撮影した。記録した画像はパソコンに取り込み、胃全体および胃体部に発生した線状の潰瘍部の面積を面積測定自動ソフト LIA 32 ([http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shinkan/LIA 32](http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shinkan/LIA32/)) により計測した。潰瘍抑制率の算出には、以下の式を用いた。

$$\text{潰瘍抑制率 (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{七分搗き大麦粉群潰瘍面積}}{\text{対照群潰瘍面積}} \times 100 \right)$$

胃表面および粘膜の状態を観察するため、胃体部の組織をパラフィン包埋し、薄切後に組織の一般染色法であるヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とムコ多糖を濃桃色に染色する過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色した。パラフィン包埋～組織染色標本の作製は、株式会社アップライドメディカルリサーチ (大阪) に依頼した。組織染色後の切片は倒立型蛍光顕微鏡 BIOREVO (BZ-9000、(株)キーエンス、大阪) で観察した。

解剖時にサンプリングした静脈血液を用いて、in vivo における大麦の抗酸化活性の評価として血しょう superoxide dismutase (SOD) 活性および 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 濃度を測定した。これらの測定には、市販のキット TBARS Assay Kit (ZeptoMetrix Corporation, New York, USA)、SOD Assay Kit WST-1 (同人化学研究所、熊本) を用いた。

4. 統計解析

すべてのデータは平均値 ± 標準誤差で表した。有意差検定は、2 群間の比較には対応の無

い Student t-test および多群間の比較には Bonferroni/Dunn 多重比較検定を実施した (Stat View, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)。

III. 結果および考察

1. 大麦の抗酸化活性

DPPH および ABTS ラジカル消去活性による大麦の抗酸化活性は、図 1 および 2 にまとめた。精製大麦粉および七分搗き大麦粉の DPPH ラジカル消去能は 12.8 および 23.6 $\mu\text{M Trolox/mg}$ 、ABTS ラジカル消去能は 18.9 および 37.9 $\mu\text{M Trolox/mg}$ であり、いずれの測定方法でも七分搗き大麦粉は精製大麦粉に比べて約 2 倍のラジカル消去能力を示した。園田らは種々の大麦品種の胚乳部と糠層の抗酸化活性を DPPH ラジカル消去法で測定し、大麦の抗酸化活性は胚

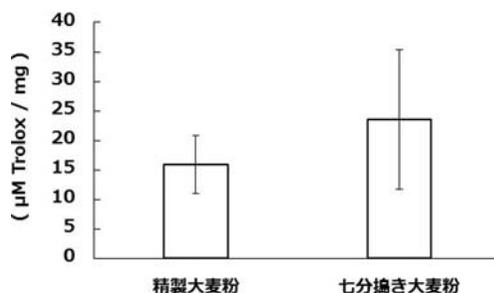


図 1 DPPH ラジカル消去活性による大麦の抗酸化活性

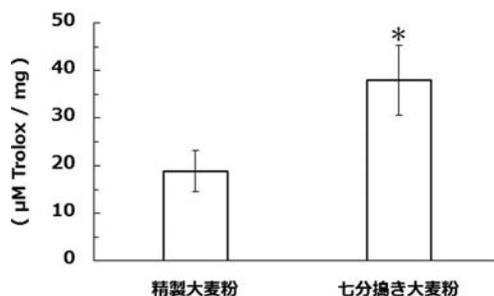


図 2 ABTS ラジカル消去活性による大麦の抗酸化活性
* 有意差あり ($p < 0.05$)

乳部に比べて糠層で約 6.7 倍高いこと、総水溶性ポリフェノール量、結合性フェルラ酸量と DPPH ラジカル消去能は正の相関をしめすことを明らかにしている¹³⁾。本研究で精製大麦粉に比べて七分搗き大麦粉でラジカル消去能が高い理由は、大麦の外皮に存在するポリフェノール類や結合性フェノール類に起因すると推察された。

また、本研究では *in vitro* での抗酸化活性評価として DPPH ラジカル消去法および ABTS ラジカル消去法の二つ試験を実施した。一般に、DPPH ラジカルは安定であるため反応性が高いヒドロキシル基としか反応しないが、ABTS カチオンラジカルではヒドロキシル基に対する選択性が低い。そのため、ABTS カチオンラジカルは、DPPH ラジカルでは反応しないフラボノイドとの間でもラジカル消去反応を生じることが知られている¹⁵⁾。また、この二つの試験は試験のしやすさから、天然物の抗酸化活性を測定するには汎用されている¹⁶⁾。本研究において精製大麦粉および七分搗き大麦粉いずれにおいても DPPH ラジカル消去法に比べて ABTS ラジカル消去法の値が高い傾向が観察されたことから、大麦にはフラボノイドなどの反応性の低いヒドロキシル基を持つポリフェノール類も含まれることが推察された。

2. ストレス負荷による胃潰瘍、組織染色および *in vivo* 抗酸化活性

試験期間中の対照群、七分搗き大麦粉群の総摂取食量及び体重増加量は表 2 にまとめた。両者の値はいずれも差が認められないことから、七分搗き大麦粉はラットの食嗜好および成長に悪影響を及ぼすものではないことが明らかとなった。

水浸拘束ストレス負荷後の胃潰瘍面積および

表 2 総摂取食量および体重増加量

	総摂取食量(g)	体重増加量(g)
対照群	114.4±5.8	311.8±8.9
七分搗き大麦粉群	119.9±8.0	298.7±14.0

表 3 胃潰瘍面積および潰瘍抑制率

	潰瘍面積(mm ²)	潰瘍抑制率(%)
対照群	15.1±4.6	—
七分搗き大麦粉群	6.5±2.7	57.1

潰瘍抑制率は表 3 にまとめた。対照群および七分搗き大麦粉群の胃潰瘍面積は 15.2 mm² および 6.5 mm² であり、統計学的に有意差は認められないものの七分搗き大麦粉投与群では著しく低い値を示した。また胃組織 HE 染色 (図 3) および PAS 染色 (図 4) では、正常時、ストレス負荷前および負荷後のいずれにおいても、対照群に比べて七分搗き大麦粉群では胃組織の崩壊の抑制 (図 3、点線囲み) と胃粘膜の肥厚化 (図 4、点線囲み) が観察された。

ストレス負荷ラットの *in vivo* 抗酸化活性は図 5 および 6 にまとめた。ストレス負荷前の対照群、七分搗き大麦粉群の血中 TBARS 濃度は 1.83 および 2.12 nmol/ml、ストレス負荷後は 3.20 および 2.36 nmol/ml であり、対照群ではストレス負荷により脂質の過酸化が有意に促進された。対照群、七分搗き大麦粉群の血中 SOD 活性はストレス負荷前は 12.33 および 29.72%、ストレス負荷後は 12.50 および 25.56% であり、ストレス負荷によりその活性は低下するものの、いずれの時点でも七分搗き大麦粉の摂取により過酸化を補足する能力は有意に高い値を示した。胃潰瘍の形成は O₂・ラジカル、一重項酸素¹O₂、ヒドロキシルラジカル OH⁻などの活性酸素 (Reactive Oxygen Species, ROS) による組織損傷が原因であり、浸水拘束ストレスや火傷によるストレスでは胃粘膜層での脂質過酸

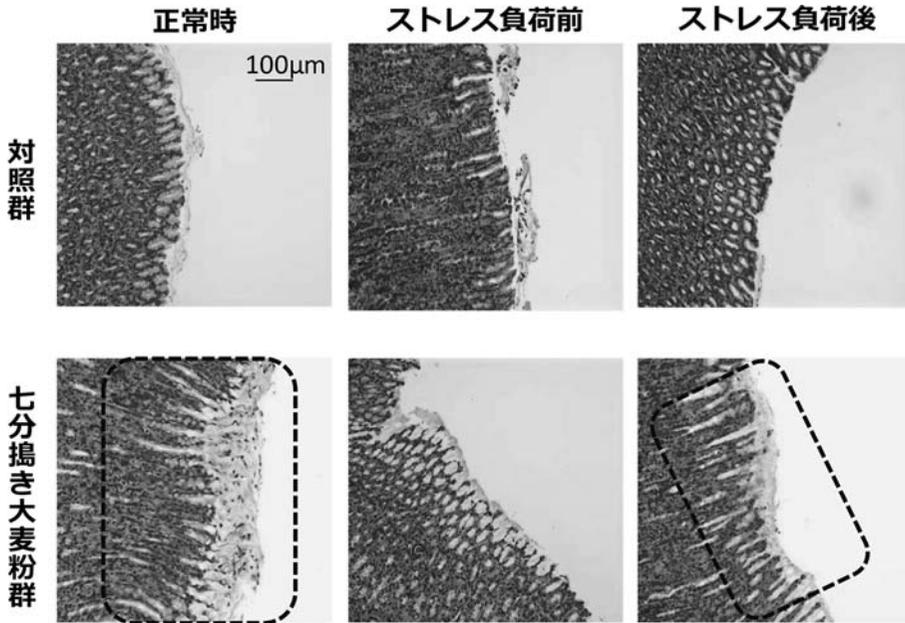


図3 水浸拘束ストレス前後の胃組織 (HE 染色)

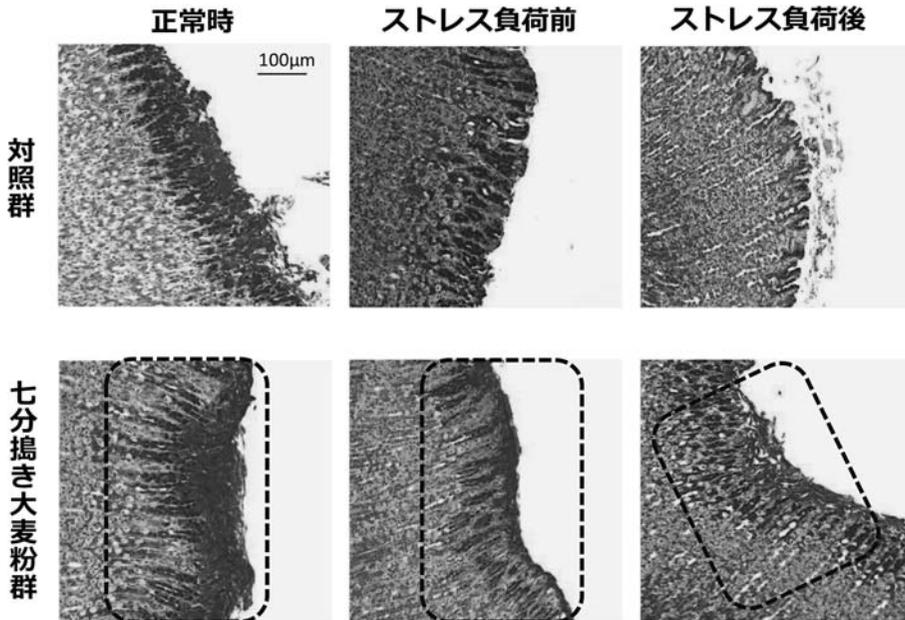
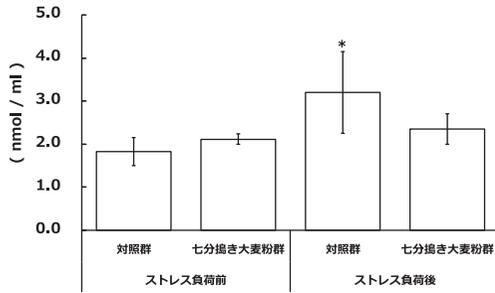


図4 水浸拘束ストレス前後の胃組織 (PAS 染色)

化が亢進することが報告されている。また、グルタチオンや SOD などの抗酸化物質を投与することにより水浸拘束ストレス負荷による胃潰瘍形成が抑制されることから、ストレス負荷に

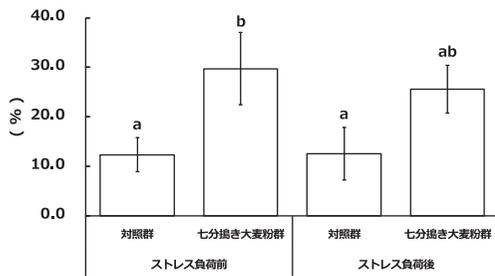
よる胃潰瘍は抗酸化物質により抑制されることが考えられる¹⁷⁻²⁰⁾。

さらに、非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug; NSAID) 誘



*有意差あり (p<0.05)

図5 ストレス負荷前後の血しょうTBARS濃度



異符号間に有意差あり (p<0.05)

図6 ストレス負荷前後の血しょうSOD活性

発性胃潰瘍における冬瓜葉の抽出物の抗酸化作用の評価では、抗酸化活性を有する天然物の経口摂取により胃粘膜だけでなく血液中の過酸化脂質濃度も有意に低下することが報告されている²¹⁾。また、カミメボウキ (バジル) 葉の抗酸化作用の評価では、胃潰瘍誘発により血中過酸化脂質が上昇し、SOD活性は低下するが、抗酸化活性を有するカミメボウキ葉抽出物の経口投与により血中過酸化脂質は低下し、SOD活性が上昇することが報告されている²²⁾。

本研究の結果とこれらの報告から、本研究においても七分搗き大麦粉の摂取により血中SOD活性が上昇することでROS類の活性が抑制され、組織の損傷と脂質の過酸化が抑制されることから胃潰瘍の形成が抑制されたと考察できる。

以上の結果から、七分搗き大麦粉は糠層に由来するポリフェノールを多く含むことから完全

に精白した精製大麦粉に比べて高い抗酸化性作用が期待できること、抗酸化作用による脂質過酸化の抑制によりストレスによる胃潰瘍を抑制することが推察できる。

食品の生体調節作用 (三次機能) を目的とした市場流通品目が増大しているなか、市販の大麦加工品の種類も増加している。従来から利用度の高い押し麦、白麦、米粒大麦だけでなく、搗精度の異なる大麦も販売されている。大麦は調理が容易で一回当たりの摂取も多いこと、胚乳部分にもポリフェノールやβ-グルカンを含むことから、本研究で評価した糠部分を比較的多く含む七分搗き大麦と精製度の類似したものだけでなく、搗精度の高い押し麦などを日常的に積極的に活用することで、抗酸化作用をはじめとする大麦の多様な生体調節作用 (三次機能) が期待できると考えられる。

引用文献

- 1) M. S. Izydorczyk, J. Storsley, D. Labossiere, A. W. MacGregor and B. G. Rossnagel. Variation in total and soluble β-glucan content in hullless barley: effects of thermal, physical, and enzymic treatments. *J. Agric. Food Chem.* 48(4), 982-989 (2000)
- 2) S. E. Ullrich, J. A. Clancy, R. F. Eslick, R. C. M. Lance. β-glucan content and viscosity of extracts from waxy barley. *Journal of Cereal Science.* 4(3), 279-285 (1986)
- 3) J. Li, T. Kaneko, LQ. Qin, J. Wang, Y. Wang, A. Sato. Long-term effects of high dietary fiber intake on glucose tolerance and lipid metabolism in GK rats: comparison among barley, rice, and cornstarch. *Metabolism.* 52(9), 1206-10 (2003)
- 4) 中村カホル、池上幸江、滝田聖親、印南 敏 大麦の食後血糖上昇抑制機序に関する研究 *東邦醫學會雑誌* 43(2), 157-166 (1996)
- 5) M. B. Lynch, T. Sweeney, J. J. Callan and J. V. O'Doherty. Effects of increasing the intake of dietary β-glucans by exchanging wheat for barley on nutrient digestibility, nitrogen excretion, intes-

- tinal microflora, volatile fatty acid concentration and manure ammonia emissions in finishing pigs. *Animal*, 1(6), 812-819 (2007)
- 6) 神山紀子、藤田雅也 オオムギ粉の加熱褐変におけるポリフェノール成分の影響 四国農業試験場報告 65, 1-7 (2000)
- 7) 神山紀子、長嶺 敬、村田容常 炊飯麦の保温による褐変とフラバノール成分の関係 日本食品科学工学会誌 57(9), 372-379 (2010)
- 8) 西沢千恵子、太田剛雄、江頭祐嘉合、真田宏夫 穀類のフェルラ酸含量 日本食品科学工学会誌 45(8), 499-503 (1998)
- 9) L. Dykes, L. W. Rooney. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World* 52(3), 105-111 (2007)
- 10) 玉川浩司、飯塚崇史、福島 誠、遠藤好司 大麦糖のポリフェノール抽出物の抗酸化能 日本食品科学工学会誌 44(7), 512-515 (1997)
- 11) 玉川浩司、飯塚崇史、池田彰男、小池 肇、長沼慶太 大麦糠プロアントシアニジンの抗酸化性 日本食品科学工学会誌 46(2), 106-110 (1999)
- 12) 玉川浩司 大麦糠のポリフェノール成分の機能特性とその利用に関する研究 日本食品保蔵学会誌 27(2), 83-97 (2001)
- 13) 園田啓介、吉田淳子、橋本俊二郎 大麦中の抗酸化活性の評価およびフェノール性有機酸含量の測定 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要 43, 265-269 (2011)
- 14) K. Takagi and S. Okabe The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. *Jap. J. Pharm.*, 18, 9-18 (1968)
- 15) V. Roginsky and E. A. Lissi. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.*, 92(2), 235-254 (2005)
- 16) 高橋 学、樋口誠一 県内植物資源に由来する機能性ポリフェノールの探索 埼玉県産業技術総合センター研究報告、第5巻, 81-85 (2007)
- 17) D. Das, D. Bandyopadhyay, M. Bhattacharjee and R. K. Banerjee. Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology & Medicine* 23(1), 8-18 (1997)
- 18) D. Das, D. Bandyopadhyay, M. Bhattacharjee. Oxidative inactivation of gastric peroxidase by site-specific generation of hydroxyl radical and its role in stress-induced gastric ulceration. *Free Radical Biology & Medicine* 24(3), 460-469 (1999)
- 19) S. Kwiecien, T. Brzozowski, S. J. Konturek. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *J. Phys. Pharm.* 53(1), 39-50 (2002)
- 20) M. Bhattacharjee, S. Bhattacharjee, A. Gupta and R. K. Banerjee. Critical role of an endogenous gastric peroxidase in controlling oxidative damage in *H. pylori*-mediated and nonmediated gastric ulcer. *Free Radical Biology & Medicine* 32(8), 731-743 (2002)
- 21) R. K. Kath and R. K. Gupta. Antioxidant activity of hydroalcoholic leaf extract of *Ocimum sanctum* in animal models of peptic ulcer. *Indian J Physiol Pharmacol.* 50(4), 391-396 (2006)
- 22) B. V. Shetty, A. Arjuman, A. Jorapur, R. Samanth, S. K. Yadav, N. Valliammai, A. D. Tharian, K. Sudha and G. M. Rao. Effect of extract of *Benincasa hispida* on oxidative stress in rats with indomethacin induced gastric ulcers. *Indian J Physiol Pharmacol.* 52(2), 178-182 (2008)