

# 食品中抗酸化成分の新規機能の探索

課題番号 13680150

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）

研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 岸 田 恵 津  
(兵庫教育大学 学校教育学部 助教授)

## 目次

緒言ならびに研究の概要	… 1
第1章 調理モデル系におけるビタミンCの安定性に及ぼす調味料の影響	… 5
第2章 調理過程におけるジャガイモのビタミンCの量的変動	… 23
第3章 TNF 誘導アポトーシスに対する抗酸化物質の効果と細胞内グル タチオンレベルとの関連	… 31

## 緒言ならびに研究の概要

食品中には、ビタミンE、ビタミンCなどのビタミン類をはじめ、フラボノイド、カロテノイドなど種々の抗酸化成分が存在し、食品の変性を防ぐと同時に、栄養成分としても体内で様々な役割を果たすとされている。しかし、これらの抗酸化成分は、試験管内では抗酸化作用を確かに持つものの、実際の食品中やその調理時、更には生体内でどの様な機能を果たしているかは未だ明らかでない点も多い。

例えば、ビタミンEやビタミンCが、油脂の酸化や食品の酸化変色を防御できることは広く認められている。しかし、調理時など、多数の食品成分が共存した場合の食品変性過程における抗酸化成分自体の変化や、水系での加熱調理時における脂質の過酸化、アミノ酸など脂肪以外の食品成分の酸化に対する抗酸化性食品成分の効果などに関しては、いずれも信頼できる情報が少ない。また、ほとんどの家庭科教科書に記載されている「ジャガイモのビタミンCは加熱調理に対して安定であり、ジャガイモはビタミンCの供給源である」ということについても、調理過程の種々の要因を含めて検討すれば、不明な点も残されている。

さらに、ビタミンEやビタミンCの体内での抗酸化作用の発現と疾病防御との関連についても明らかになっていない点が多い。例えば、よく知られているように、ビタミンC欠乏症はその抗酸化作用と直接的な関連はない。またビタミンE欠乏症はヒトでは知られておらず、ヒト遺伝性疾患のビタミンEによる治癒効果も、これがビタミンEの抗酸化作用自体の機能か否かは明らかではない。最近のビタミンE結合タンパク質欠損マウスの研究でも、不妊症以外の障害は見つかっていない。これらの知見は、抗酸化物質の摂取が生活習慣病の防御に役立つとする報告と必ずしも矛盾するものではないが、作用の限界性の現れと見ることも可能である。近年、大規模な疫学調査・臨床介入試験により抗酸化性食品成分の機能を証明しようとする試みがなされるようになったが、生活習慣病のような複雑な病態変化を伴う疾病群に対する抗酸化物質の防御効果を、より信頼度の高いものとするためには、同時に、その効果の発現メカニズムをより明確なものとする研究が必要とされている。

有益とされる抗酸化性食品成分の機能やその発現機構をより確かなものとするためには、解明しようとする機能の対象を限定したうえで、より正確な定量

法や明確なアッセイ系を用いた評価を行うことが必要となる。我々は、これまでに、マロンジアルデヒドの新規定量法(*Biochim. Biophys. Acta*, **1045**, 1990)やビタミンCの特異的・高感度定量法(*Anal. Chem.* **64**, 1992)を開発し、生体成分や食品系に適用してきた。一方、我々は、炎症反応の中心的なサイトカインである腫瘍壊死因子(TNF)により誘導されるアポトーシスを、ビタミンEが抑制する作用を持つことを証明し、アポトーシスと関わりのある疾病を食物由来の成分により治癒・予防できる可能性を示した(*J. Nutr.* **130**, 2000)。

本研究は以上の成果をもとに、また上記のような抗酸化物質研究の現状をふまえて計画、実施されたものである。主要な内容は、**I. 食品調理時における抗酸化ビタミンの動態**、及び **II. 生体内における抗酸化物質の新しい機能の探索**の2点であり、それぞれ以下の内容に焦点を絞って研究を進めた結果、次のような成果が得られた。

#### **I-1. 調理モデル系におけるビタミンCの安定性に及ぼす調味料の影響**

アスコルビン酸(AA)水溶液を 100°Cで加熱したときの安定性に及ぼす調味料の影響について調理モデル系で調べた。調味料は、日本料理でよく使われているものを使用し、AAの濃度は汁物や煮汁に近い濃度とした。加熱時間についても実際の調理を想定し、30分以内の反応で行った。本実験系でのアスコルビン酸の消失反応は、1次反応であった。AAの濃度が高いほど、速度定数が小さくなったが、減少量としてはほぼ一定であることから、100°C加熱においては、溶存酸素がAAの減少に関わっていることが示唆された。AA水溶液に調味料を加えて加熱すると、食塩はAAの減少を抑制したが、酒やみりんはほとんど影響を及ぼさなかった。しかし、醤油やみそ、風味調味料を添加すると、添加濃度依存的にAAが減少した。そして醤油やみそを添加することによって酸素が速く消費され、その後、嫌気的な条件下で反応が進行することが示唆された。これらの調味料がAAの分解を促進する要因として、鉄イオンだけではなく、アミノ酸も関与している可能性が考えられた。

#### **I-2. 調理過程におけるジャガイモのビタミンCの量的変動**

—家庭科教科書におけるジャガイモの調理特性に関する記載内容の検討とモデル実験によるビタミンC量の再評価—

家庭科教科書におけるジャガイモの成分及び調理特性に関する記載内容と指

導上の問題点を調べた。平成 10 年改訂の指導要領に準拠した中学・高等学校教科書には、VC の性質と調理損失に関する記載内容が理解しにくいという問題点も見られた。

続いて調理過程におけるジャガイモの VC 量の変化をモデル実験で調べた。1 個体のまま 5℃で保存すると、1 週間後まではもとのアスコルビン酸(AA)レベルが維持されていたが、その後徐々に減少し、8 週間後の残存率は約 40%であった。加熱後の AA の残存率は、「煮る」では 70 % (10 分)、50 % (20 分)であったのに対し、「焼く」では 95 % (160℃, 10 分)、「電子レンジ加熱」では 97 % (20 秒)と高いレベルに維持されていた。「煮る」場合の調味料が VC に及ぼす影響を調べたところ、ジャガイモ中の AA 量に対しては調味料の有無の間に有意差がなかったが、煮汁中の AA は、醤油を添加すると有意に減少した。

以上より、調理方法により VC の残存率が異なることが認められ、また方法によっては期待するほどの VC が摂取できない可能性が示されたので、教師はこれらの事実も認識して指導することが望まれる。

## II. TNF 誘導アポトーシスに対する抗酸化物質の効果と細胞内グルタチオンレベルとの関連

U937 細胞をビタミン E(VE)などの抗酸化物質で処理すると、腫瘍壊死因子(TNF)誘導アポトーシスが抑制される。この抑制効果が細胞内グルタチオン(GSH)レベルとどの程度対応するかについて検討した。

抗酸化物質(VE、N-アセチルシステイン、2-メルカプトエタノール、ブチルヒドロキシトルエン)を細胞に投与し、TNF 誘導のアポトーシスを評価したところ、抗酸化物質によりアポトーシスが濃度依存的に抑制されたが、その抑制率は 40-60%であった。

N-アセチルシステインや 2-メルカプトエタノール添加群では、無添加群よりも TNF 刺激時の GSH レベルが有意に高く維持されていたが、VE または BHT 添加群では GSH レベルの変動は小さく、細胞内 GSH レベルの変動で抑制効果のすべてが説明できるわけではないことが示された。

## 研究組織

研究代表者：岸田 恵津（兵庫教育大学 学校教育学部 助教授）

研究分担者：増澤 康男（兵庫教育大学 学校教育学部 教授）

## 交付配分額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	1,500	0	1,500
平成 14 年度	600	0	600
平成 15 年度	700	0	700
総計	2,800	0	2,800

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1) Y. Yamada, K. Kajiwara, M. Yano, E. Kishida, Y. Masuzawa, S. Kojo.

Increase of ceramides and its inhibition by catalase during chemically induced apoptosis of HL60 cells determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1532, 115 - 120, 2001 年 9 月

2) 岸田恵津、田尻美千子、矢埜みどり、増澤康男

栄養因子による TNF 誘導アポトーシスの制御：ドコサヘキサエン酸と抗酸化物質の抑制効果と作用機構、*生化学*、74 巻 8 号、1092、2002 年 8 月

3) 岸田恵津、新田文、田中麻衣子

調理過程におけるジャガイモのビタミン C の量的変動 — 家庭科教科書におけるジャガイモの調理特性に関する記載内容の検討とモデル実験によるビタミン C 量の再評価 —、*兵庫教育大学研究紀要* 第 23 巻 第 3 分冊、45-51、2003 年 3 月

### (2) 口頭発表

1) 岸田恵津、岩崎麻衣子、矢埜みどり、増澤康男

TNF 誘導アポトーシスに対する抗酸化物質の効果と細胞内グルタチオンレベルとの関連、第 74 回日本生化学会大会、2001 年 10 月

2) 岸田恵津、前田智子、西濱晶子、増澤康男

調理モデル系におけるビタミン C の安定性に及ぼす調味料の影響、日本調理科学会 平成 14 年度大会、2002 年 9 月

3) 岸田恵津、田尻美千子、矢埜みどり、増澤康男

栄養因子による TNF 誘導アポトーシスの制御：ドコサヘキサエン酸と抗酸化物質の抑制効果と作用機構、第 75 回日本生化学会大会、2002 年 10 月

## 第 1 章

### 調理モデル系におけるビタミン C の安定性に及ぼす調味料の影響

#### **Effects of Seasonings on the Stability of Ascorbic Acid in a Cooking Model System**

##### **Summary**

The thermolability of ascorbic acid (AA) in aqueous solution at 100 °C was assessed in the presence of various seasonings commonly used in Japanese style cooking. A model system approximated Japanese cooking with regard to the concentrations of AA and seasonings and the heating time. The decrease of AA in the reaction system of this experiment was a first-order reaction with respect to the concentration of AA loss. Although kinetic constants for AA loss decreased with increasing concentrations of AA (25 - 400 µg/ml), the absolute amounts degraded were almost the same for all AA concentrations, suggesting that dissolved oxygen is one of main factors affecting the stability of AA solutions during heating at 100 °C. When each seasoning was added to AA solution, salt stabilized AA and Japanese alcohol-containing admixtures, such as sake and sweet sake (mirin), did not have a significant effect on the stability. Conversely, soy sauce, miso (fermented soybean paste) and broth powder from skipjack accelerated the decrease of AA in a concentration-dependent manner. The kinetic study suggested that oxygen was rapidly consumed and AA loss accelerated by addition of soy sauce or miso to AA solution. Consequently it is likely that a reaction mechanism shifts from aerobic to anaerobic reaction and the forward reactions proceed. Of the constituents of Japanese seasonings, not only iron but also amino acids are involved in the acceleration of AA degradation. The presence of amino acids should be taken into account when considering the levels of AA in soups.

Key words: Ascorbic acid, Seasoning, Soy sauce, Salt, Amino acid

## **Introduction**

L-Ascorbic acid (AA), known as vitamin C, is widely distributed in both foods and biological systems. It is generally accepted that AA possesses antioxidant properties and is used in the food industry to delay oxidation. Moreover, antioxidant nutrients play a beneficial role in maintaining human health (1, 2). However, AA is a typical heat-sensitive nutrient and is easily oxidized. The degradation processes of AA are very complex and involve a number of oxidation/reduction and intermolecular rearrangement reactions. Numerous studies investigating the instability of AA during storage and thermal processing have been reported (3 - 8). However, these studies have been conducted in model systems at high AA concentrations (9 - 11), which do not reflect the degradation pattern during the usual cooking processes.

Vegetables are an important source of vitamin C. Boiling vegetables is one of the popular cooking methods in Japan, because it is possible to reduce the volume of vegetables and to eat more than just raw vegetables. Since AA is dissolved in the water phase when vegetables are boiled, it is recommended to have the soup. Moreover, various kinds of seasonings, such as salt, soy sauce and sake (rice wine), are added for taste. However, it is not known whether AA remains stable in soup or not.

The purpose of our study was to evaluate the stability of AA in a complex system such as cooking. As the first step of the study, a model system, which approximated Japanese cooking with regard to the concentrations of AA and seasonings, was applied. Soy sauce, miso (fermented soybean paste), broth powder from skipjack, salt, sake and sweet sake (mirin) were used as seasonings.

A recent report showed that dehydroascorbic acid (DHAA), orally administered into mice, showed very low vitamin C activity, and the determination of both AA and DHAA was recommended (12). Therefore post-column HPLC was used to separate AA and DHAA according to the method by Yasui and Hayashi (13). Results obtained using this HPLC method were in agreement with those using a specific and sensitive method reported previously (14).

Our data indicated that, among seasonings tested, soy sauce, miso (fermented soybean paste) and broth powder from skipjack accelerated the degradation of AA in a concentration-dependent manner. Of the constituents of Japanese seasonings, not only iron but also amino acids are involved in the acceleration of AA degradation.



## **Materials and methods**

### *Materials*

L-Ascorbic acid (AA) was purchased from Wako Pure Chemical Co. Ltd. (Osaka, Japan), and dehydroascorbic acid (DHAA) from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI). The seasonings used were commercially available. Soy sauce (Higashimaru and Kikkoman), miso (Takeya), sake (Kamiyui-Shuzo), mirin (Hinode) and broth powder from skipjack (Ajinomoto) were obtained from local sources in Japan. Other chemicals were of reagent grade.

### *Preparation of experimental model systems*

AA was dissolved in deionized water and aqueous AA solutions were prepared on the day of use. A 2 ml solution of AA (25 - 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was placed in a glass test tube (16 x 100 mm) with a screw cap, and the solution was heated in a water bath at 100 °C. Heating time was set within 30 min, which approximated practical cooking process. After heating, the reaction mixture was quickly cooled in an ice bath and 20% meta-phosphoric acid (1 mL) and 20 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mL) were added to the solution. The mixture was centrifuged or filtered through a syringe filter (0.45  $\mu\text{m}$ ) for HPLC. The reaction mixture was kept in a freezer at -85 °C before HPLC analysis.

For investigating the effects of seasonings on the stability of AA, each seasoning was added to the AA solution (50 or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and the total volume of reaction mixture was adjusted to 2 mL. AA concentration was determined from the amount generally used in cooking as follows: when potato (50 g), tomato (30 g), onion (40 g), carrot (20 g) and celery (20 g) per one person are used, the total AA content in foods is about 30 mg calculated from standard tables of food composition in Japan. If all of the AA is dissolved in 150 mL of soup, the AA concentration in the soup is approximately 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The concentration of each seasoning used was also determined from its concentration when used in cooking, and various levels were also examined. The final concentrations of sake, sweet sake (mirin), soy sauce, miso, broth powder and salt generally used in cooking are approximately 5%, 5 - 10%, 5 - 20%, 10%, 0.5%, and 1%, respectively.

To study the influence of pH on the stability of AA, the pH of the solution was adjusted to 5 and 6 by the addition of sodium phosphate and 0.1 M phosphate buffer, respectively.

### *Analysis of AA and DHAA*

AA and DHAA were simultaneously analyzed by HPLC with post-column conversion according to the method of Yasui and Hayashi (13) with slight modification. Briefly, HPLC was performed using a Shimadzu system equipped with a size exclusion column

(Shim-pack SCR-101N). Elution was at a flow rate of 1.0 mL/min with 10 mM oxalic acid containing 1 mM EDTA (pH 3.8) at 40 °C. Post-column reaction was with 100 mM sodium hydroxide containing 50 mM sodium borohydride at a flow rate of 0.5 mL/min and the detection was at 300 nm. Commercial DHAA was unsuitable for use as a standard because it contains significant amounts of impurities (15) and DHAA is gradually decomposed even if stored in a freezer. To analyze DHAA exactly, the purity of DHAA was assessed using a method reported previously (14).

#### *Data analysis and determination of kinetic parameters*

All results were obtained from at least three independent experiments, and the means were calculated. The standard deviation was shown with bars in figures, when necessary. All statistical analyses were carried out using SPSS (version 11.5; SPSS Inc, Chicago, IL) software. Significance of differences was defined as  $p < 0.05$ .

Reaction order was determined by plotting the natural logarithm of AA concentration versus time for a first-order reaction; the best fit line (determined using a linear regression model in the program of Excel) represented the reaction order.

## Results and discussion

### *Thermolability of ascorbic acid in aqueous solution*

AA solutions were prepared at different concentrations and heated for 30 min. The pH values of 25, 50, 100, 200 and 400  $\mu\text{g/mL}$  AA solutions were initially 4.2, 4.1, 3.9, 3.7 and 3.5, respectively, and these values did not change after heating. Figure I-1 shows the changes in AA and DHAA. As shown in Fig. I-1(a), AA levels decreased in accordance with heating time at all concentrations of AA. DHAA was detected within 10 min, and thereafter the ratio of DHAA to AA was less than 5%, indicating that DHAA did not accumulate. Accordingly, the residual level of AA could be used as a marker for estimating its stability under heating in boiling water. Based on experimental data, reaction order for AA loss under the present heating condition was determined. A plot of the natural logarithm of remaining ratio of AA versus time gave a straight line (Fig. I-1 (b)). Similar lines were given in other initial concentration of AA. Consequently, the degradation of AA in the reaction system could be first-order reaction. The kinetic constants ( $\times 10^{-2}$  / min) for AA loss were as follows: 25  $\mu\text{g/mL}$ , 5.79; 50  $\mu\text{g/mL}$ , 2.03; 100  $\mu\text{g/mL}$ , 0.74; 200  $\mu\text{g/mL}$ , 0.49; 400  $\mu\text{g/mL}$ , 0.28. The absolute amounts of AA decrease during 30 min heating were almost commensurate (40 - 60  $\mu\text{g}$  under the conditions of this study) at all concentrations of AA. When the reaction was carried out using a glass tube without a screw cap, the result obtained was similar to that with a cap. This is probably because anaerobic conditions were maintained in boiling water either with or without a cap. The level of oxygen dissolved at 26 °C under our experimental conditions was 5.6 mg/L. When a sample solution was flushed continuously with argon for 1 min, the argon-treated solution was more stable than the untreated one (data not shown). In addition, the rate of AA degradation in different experimental systems was shown to increase in the presence of oxygen (3, 5, 16). These results suggested that initially dissolved oxygen is one of main factors affecting the stability of AA solutions during heating at 100 °C.

### *Effects of seasonings on the stability of AA*

Several kinds of seasoning were added to AA solutions (100  $\mu\text{g/mL}$ ), and the effect of the seasoning on the heat stability of AA was estimated. Figure I-2 shows the time course of AA decrease in the presence of each seasoning. Heating of AA in the absence of any seasoning was used as a control. The remaining percentage of AA in the presence of sake was similar to that of AA alone, indicating that sake has little effect on AA stability (Fig. I-2 (A)). In addition, neither sweet sake (mirin) (Fig. I-2(B)) nor sucrose (data not shown)

affected AA stability.

The addition of soy sauce (light soy sauce) to AA solution accelerated AA degradation in the initial stages of heating within 5 min (Fig. I-2 (C)). The degradation was dependent on the concentration of soy sauce. After 10 min heating, the remaining percentage of AA did not change further for up to 30 min. When another soy sauce, dark soy sauce, was added to AA solution, the results obtained were similar to those obtained with the light one (data not shown).

When light colored miso (fermented soybean paste) was added to AA solution, the decrease pattern of AA was similar to that obtained with soy sauce (Fig. I-2 (D)). Addition of different colored- (dark or white) miso also affected AA stability in the same way as described above. In these experiments, the pH value of AA alone as a control was 4. However, the pH values in AA solutions with 1 – 16% soy sauce and 1 - 20% miso were 4.8 - 5.0 and 5.0 - 5.3, respectively. Since the pH difference might be involved in the seasoning-induced accelerated degradation of AA, the effect of pH on AA stability was further examined and is described in the next section. Addition of broth powder from skipjack resulted in a decrease pattern similar to that of soy sauce or miso (Fig. I-2 (E)).

In contrast, the addition of salt, in the form of sodium chloride, stabilized AA. After 30 min heating, the residual level of AA in the presence of 0.1 – 5% NaCl was significantly higher than that of AA alone (Fig. I-2 (F)). Eight percent soy sauce contains about 1% NaCl and this level of NaCl is sufficient to have a suppressive effect on AA decrease. However, the soy sauce had an accelerative effect, indicating that, in the decrease of AA, certain constituents of soy sauce with the accelerative activity overcome the suppression by salt.

Kinetic evaluation for AA loss was examined to study effects of seasonings. As shown in Fig. I-3, natural log of residual AA concentration was not well correlated with time up to 30 min when soy sauce or miso was added to AA solution, although a straight line was given in reaction system of AA alone. The line for the first-order reaction to evaluate effects of seasonings on AA loss was obtained in the reaction up to 10 min. Table I-1 shows kinetic constants for AA loss in the presence of each seasoning. The kinetic evaluation basically supported the results described above. In addition, it is suggested that AA loss is accelerated and oxygen is rapidly consumed up to 10 min by addition of soy sauce or miso to AA solution. Consequently it is likely that a reaction mechanism shifts from aerobic to anaerobic reaction and the forward reactions proceed. The mechanism of anaerobic degradation of AA has not been fully established (11).

Table I-1 also shows the effect of a mixture of seasonings on AA loss (system II). When salt, soy sauce and broth powder as a mixture were added to the AA solution, the

residual level of AA was significantly lower than with salt or broth powder alone, and the mixture of seasonings accelerated AA loss. These results showed that soy sauce affected AA decrease even in the presence of salt.

#### *Factors affecting AA stability*

Our next study focused on the stability of AA at different pHs or in the presence of iron or  $\alpha$ -amino acids such as glutamate, because this might explain the effect of soy sauce, miso and broth powder in accelerating the AA decrease. At first, the stability of AA was examined at different pHs (Fig. I-4). At pH 4, the residual AA was approximately 60% after 30 min heating. AA instability was accompanied by increasing pH, as indicated in many studies. The stability of AA with 8% soy sauce was compared with that of AA in solution at pH 5. The residual AA level with 8% soy sauce decreased after 5 - 10 min and was significantly lower than that of AA in the absence of soy sauce at pH 5. No significant difference was observed after 30 min heating. The time course of AA decrease was different between AA alone and AA with soy sauce, although the pH values were the same. These results suggest that the decrease of AA levels by soy sauce was not only due to the pH value.

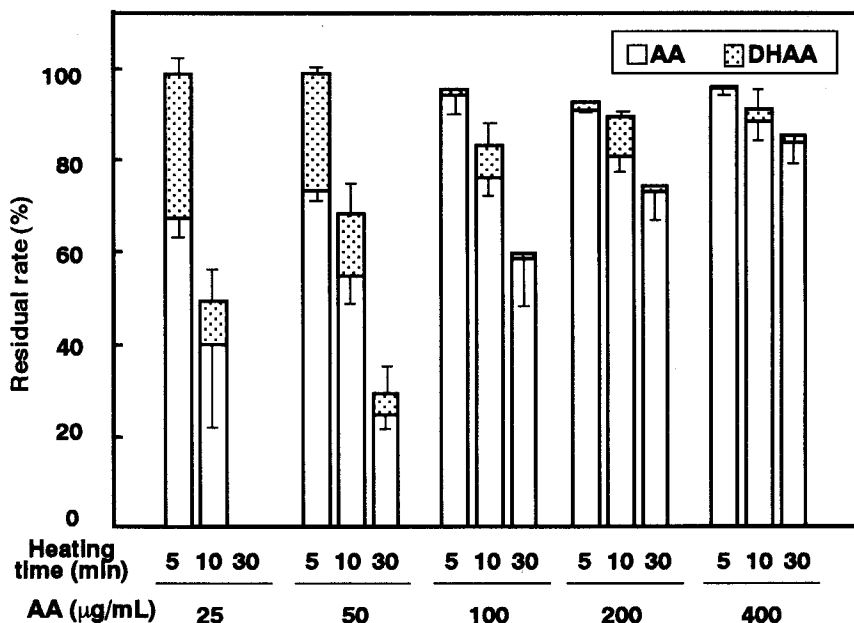
We next examined the effect of the iron in soy sauce on AA stability under our experimental conditions since previous studies have shown that Fe (III) reduced AA in aqueous solution (17 - 19). In addition, it was reported that high concentration of soy sauce (50 %) showed the accelerative effect on the decomposition of linoleic acid hydroperoxide due to iron ions (20). Ferric chloride ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) was used for the experiment. The final concentration of iron in the reaction mixture was 1  $\mu\text{g/mL}$ , which is equivalent to that of 8% soy sauce. As shown in Table I-2, the residual level of AA in the presence of iron was significantly lower than that of AA alone as indicated in literature (4, 17 - 20). Although the residual AA level with soy sauce was significantly lower than that with iron, the iron in soy sauce could be partially involved in the accelerated decrease of AA.

As the next experiment, sodium glutamate was added to AA solution. According to standard tables of food composition in Japan, 8% soy sauce contains approximately 0.1% glutamate. When sodium glutamate (0.01 - 1%) was added to AA solution, the pH value was 5.1 - 5.4. Accordingly, the pH of the AA solution as a control was adjusted to pH 5 in this experiment. As shown in Fig. I-5, residual AA levels with sodium glutamate decreased significantly up to 10 min and the decrease pattern was similar to that of soy sauce, suggesting that AA degradation is affected by the presence of amino acids. However, in contrast to the effect of soy sauce on AA loss, decrease of AA did not depend

on the concentration of sodium glutamate. As a next experiment, glycine, alanine or sodium aspartate was added to AA solution (pH 5.0) and heated for 10 min. As shown in Table I-3, the residual level of AA in the presence of each amino acid was lower than of AA alone. However, the decrease of AA did not depend on concentrations of amino acids examined as well as sodium glutamate, and no significant difference among amino acid groups was observed. The levels of DHAA were about 5 - 10% of the initial amount of AA regardless of concentrations of amino acids. On the other hand, it has been reported that AA reacts with amino acids or proteins to form brown pigments (21-23). These findings and our results indicate that amino acids in seasonings were involved in the acceleration of AA decrease.

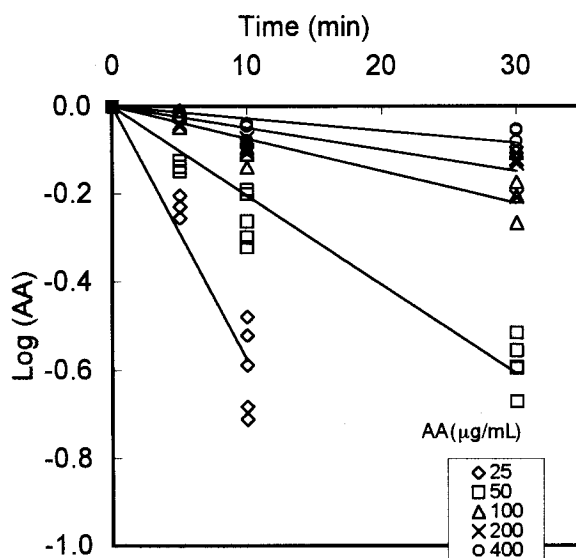
In relation to the stabilizing effect of NaCl on AA decrease, KCl, CaCl<sub>2</sub> or MgCl<sub>2</sub> was added to AA solution and heated for 30 min to determine whether these salts had the same effect as NaCl on the stability of AA (Table I-4). The residual level of AA without salt was 64.9%, while that with salt was significantly higher, about 80%. No significant difference was observed among the different salt groups. The suppressive mechanism of salt is not clear, but an ion protective effect associated with the ionic strength of the solutions may be related to AA stability.

Most seasonings, such as soy sauce and miso, are rich in umami and contain high amounts of amino acids and peptides, providing abundant precursors for the Maillard reaction. The Maillard reaction products formed in soy sauce have antioxidative activity and could retard oxidative rancidity (24, 25). Concerning effects of amino acids on the stability of linoleic acid hydroperoxide in the water phase, most amino acids stabilized hydroperoxides, except for cysteine (26). Conversely, the present study has indicated that, in addition to iron, amino acids in soy sauce, miso and broth powder involved in the acceleration of AA decrease, overcoming any protection conferred by salt. Since soy sauce or miso consists of a number of components, it is assumed that not a single factor but two or more factors are involved in AA degradation. At the present time, it is unclear how or what extent individual components in seasoning participate in AA degradation. Although the mechanism for the acceleration of AA decrease by amino acids in seasonings under the heating condition at 100°C has not been clarified, the presence of amino acids should be taken into account when considering the levels of AA in soups.

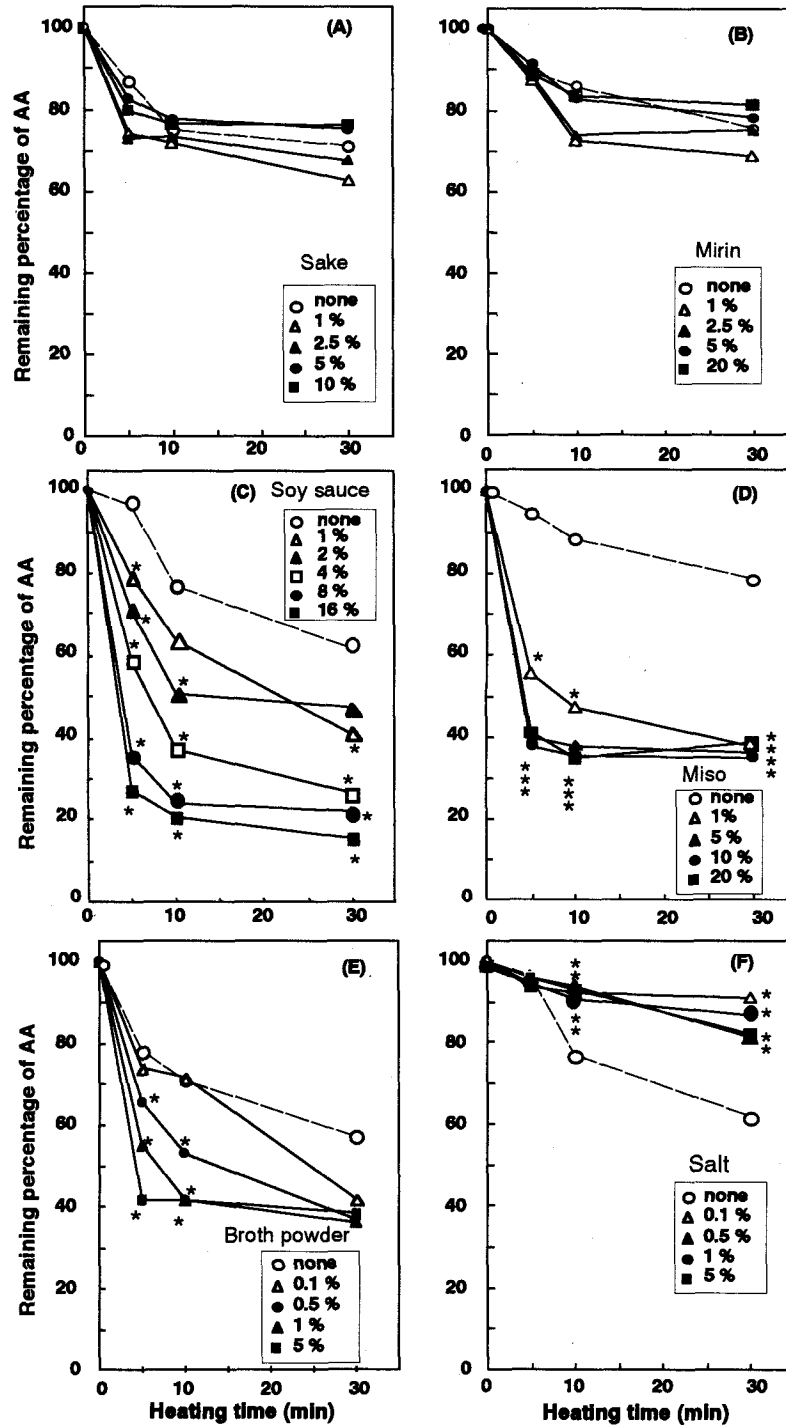


**Fig. I-1(a) Thermolability of ascorbic acid in aqueous solution.**

AA solutions (25 - 400 µg/mL) were heated in a water bath at 100 °C. After heating for 5, 10 and 30 min, reactions were terminated, and AA and DHAA were analyzed by HPLC as described in "Materials and Methods". The pH values of 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL solutions were 4.2, 4.1, 3.9, 3.7 and 3.5, respectively. The amount of AA at the initial point was taken as 100 % and DHAA was not detected at that time. Values are mean  $\pm$  SD (n = 4).



**Fig. I-1 (b) Relationship between heating time and natural logarithm of remaining ratio of AA.**



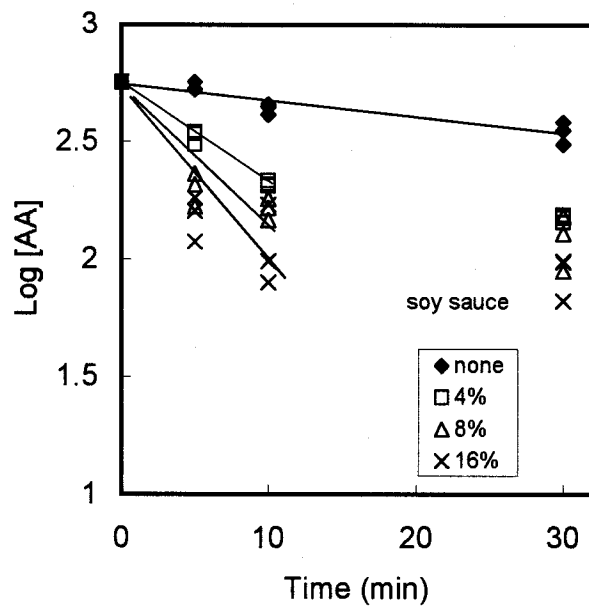
**Fig. I-2 Stability of ascorbic acid in the presence of seasoning.**

AA solution (100  $\mu\text{g/mL}$ ) was heated in the presence of seasoning. The final concentration of each seasoning in the reaction mixture is indicated in the appropriate figure. Data points represent mean,  $n = 3$  (sake, mirin, and broth powder) or  $n = 4$  (soy sauce, miso, and salt).

(A) sake, (B) mirin (sweet sake), (C) soy sauce, (D) miso, (E) broth powder, (F) salt

\*:  $p < 0.05$  (vs. none)





**Fig. I-3 Relationship between heating time and natural logarithm of residual AA concentration in the presence of soy sauce.**

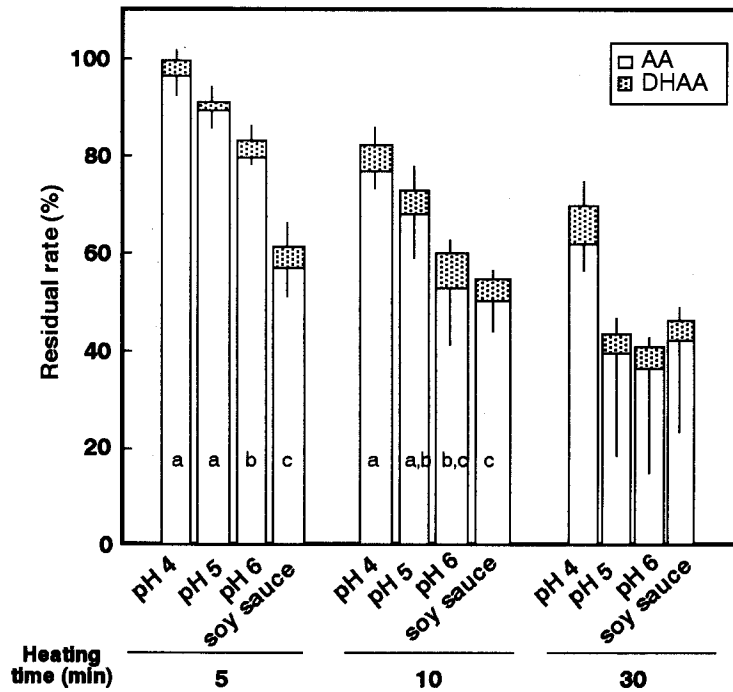
**Table I-1 Kinetic constants for AA loss in the presence of seasoning(s)**

	Kinetic constant (x 10 <sup>-2</sup> / min)	R <sup>2</sup>
System I <sup>1)</sup>		
Control (AA 100 µg/mL)	1.20	0.91
Sake (5 %)	1.11	0.87
Mirin (5 %)	1.29	0.93
Soy sauce (8 %)	5.65	0.92
Miso (10 %)	4.52	0.83
Broth powder (0.5 %)	1.40	0.96
Salt (1 %)	0.46	0.93
System II <sup>2)</sup>		
Control (AA 50 µg/mL)	0.94	0.99
Soy sauce (4 %)	4.33	0.99
Broth powder (0.25 %)	1.48	0.89
Salt (0.5 %)	0.42	0.89
Mixture <sup>3)</sup>	3.34	0.95

<sup>1)</sup> Kinetic constants were calculated from results (Fig. 2) obtained in 10 min heating.

<sup>2)</sup> AA (50 µg/mL) was heated for 10 min with or without seasoning(s).

<sup>3)</sup> soy sauce (4 %), broth powder (0.25 %), and salt (0.5 %)



**Fig. I-4 Stability of AA in buffer systems at pH 4, 5 or 6 and in 8% soy sauce.**

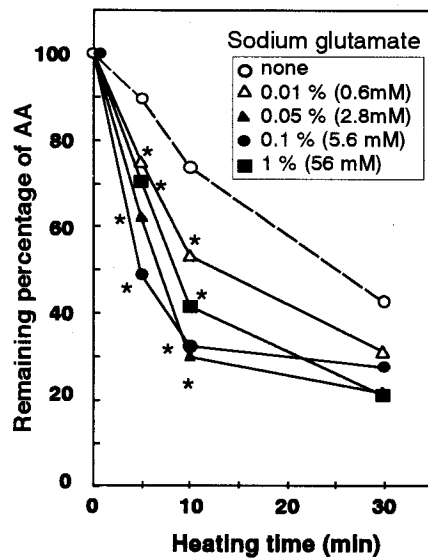
AA solution (100  $\mu\text{g/mL}$ ) was heated at different pH to compare with AA stability in 8% soy sauce. The pH of AA in the presence of soy sauce (8%) was 5. The amount of AA at the initial point was taken as 100% and DHAA was not detected at that time. Values are mean  $\pm$ SD (n = 5). Different letters indicate significant differences among means at each time point ( $p < 0.05$ ).

**Table I-2 Effect of iron on the stability of ascorbic acid**

Reaction mixture	Residual rate (%)	
	AA	DHAA
AA	89.6 ± 4.5 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
AA + Fe (III) <sup>1)</sup> (1 µg/mL)	51.9 ± 3.1 <sup>b</sup>	27.9 ± 0.9 <sup>b</sup>
AA + soy sauce (8%)	31.8 ± 14.3 <sup>c</sup>	7.4 ± 4.2 <sup>c</sup>

AA (50 µg/mL) was heated for 10 min with Fe (III) or soy sauce. The final concentration is indicated in parentheses. Results are expressed as the residual rate of AA or DHAA (mean ± SD, n = 5). The amount of AA at the initial point was taken as 100% and DHAA was not detected. Different superscript letters indicate significant differences among means in AA or DHAA (p < 0.05).

<sup>1)</sup> Ferric chloride (FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O)



**Fig. I-5 Effect of sodium glutamate on the stability of AA.**

AA solution (100  $\mu\text{g/mL}$ , pH 5.0) was heated with sodium glutamate.

The concentrations of sodium glutamate added are indicated in the figure.

Values are mean,  $n = 3$  (5 and 10 min) or  $n = 5$  (30 min).

\*:  $p < 0.05$  (vs. none)

**Table I-3 Effects of amino acids on the stability of ascorbic acid**

Reaction mixture	Residual rate (%)	
	AA	DHAA
AA	66.3 ± 5.2 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.3
AA + Glycine (1 mM)	42.2 ± 9.8 <sup>b</sup>	10.4 ± 2.9
(10 mM)	46.2 ± 9.8 <sup>a,b</sup>	8.4 ± 2.7
(50 mM)	47.3 ± 12.3 <sup>a,b</sup>	8.3 ± 4.1
AA	66.3 ± 5.2 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.3
AA + Alanine (1 mM)	47.5 ± 7.8 <sup>b</sup>	6.6 ± 1.0
(10 mM)	38.5 ± 5.7 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.8
(50 mM)	42.5 ± 5.6 <sup>b</sup>	5.6 ± 1.7
AA	66.3 ± 5.2	7.3 ± 1.3
AA + AspNa <sup>1)</sup> (1 mM)	51.0 ± 6.5	7.7 ± 0.6
(10 mM)	46.3 ± 9.2	6.0 ± 2.3
(50 mM)	71.5 ± 17.3	4.7 ± 1.0
AA	66.3 ± 5.2 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.3
AA + GluNa <sup>2)</sup> (1 mM)	36.3 ± 4.2 <sup>c</sup>	6.7 ± 1.1
(10 mM)	43.4 ± 17.9 <sup>a,c</sup>	5.3 ± 1.8
(50 mM)	55.3 ± 5.0 <sup>a,b</sup>	5.4 ± 1.1

AA (100 µg/mL, pH 5.0) was heated with each amino acid for 10 min. The final concentration of amino acid in reaction mixture is indicated in parentheses. Results are expressed as the residual rate of AA or DHAA (mean ± SD, n = 3). The amount of AA at the initial point was taken as 100% and DHAA was not detected. Different superscript letters indicate significant differences in each amino acid group (p < 0.05). <sup>1)</sup> Sodium aspartate, <sup>2)</sup> Sodium glutamate

**Table I-4 Effect of various salts on the stability of ascorbic acid**

Reaction mixture	Residual rate (%)
Ascorbic acid (AA)	64.9 ± 1.6
AA + NaCl	82.3 ± 5.5 *
AA + KCl	79.2 ± 3.9 *
AA + CaCl <sub>2</sub>	79.5 ± 4.7 *
AA + MgCl <sub>2</sub>	76.3 ± 6.6 *

AA (50 µg/mL) was heated for 30 min in the presence or absence of each salt. The final concentration of salt was 1%. Results are expressed as the residual rate of AA (mean ± SD, n = 4). The amount of AA at the initial point was taken as 100%.

\*, p < 0.05 (vs. AA)

## References

- 1) Rumsey SC, Levine M. 1998. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. *J Nutr Biochem* **9**: 116-130.
- 2) Padayatty SJ, Daruwala R, Wang Y, Eck PK, Song J, Koh WS, Levine M. 2002. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. *In: Handbook of antioxidants*, 2nd ed. (Cadenas E, Packer L, eds), p 117-145. Marcel Dekker, Inc. New York.
- 3) Kirk J, Dennison D, Kokoczka P, Heldman D. 1977. Degradation of ascorbic acid in a dehydrated food system. *J Food Sci* **42**: 1274-1279.
- 4) Dennison DB, Kirk JR. 1982. Effect of trace mineral fortification on the storage stability of ascorbic acid in a dehydrated food system. *J Food Sci* **47**: 1198-1200.
- 5) Solomon O, Svanberg U. 1995. Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8 °C. *Food Chem* **53**: 363-368.
- 6) Vernin G, Chakib S, Rogacheva SM, Obretenov TD, Párkányi C. 1998. Thermal decomposition of ascorbic acid. *Carbohydr Res* **305**: 1-15.
- 7) Kabasakalis V, Siopidou D, Moshatou E. 2000. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chem* **70**: 325-328.
- 8) Manso MC, Oliveira FAR, Oliveira JC, Frías JM. 2001. Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *Int J Food Sci Tech* **36**: 303-312.
- 9) Deutsch J C. 1998. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Anal Biochem* **255**: 1-7.
- 10) Yuan JP, Chen F. 1998. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *J Agric Food Chem* **46**: 5078-5082.
- 11) Broeck VI, Ludikhuyze L, Weemaes C, Loey AV, Hendrickx M. 1998. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *J Agric Food Chem* **46**: 2001-2006.
- 12) Ogiri Y, Sun F, Hayami S, Fujimura A, Yamamoto K, Yaita M, Kojo S. 2002. Very low vitamin C activity of orally administered L-dehydroascorbic acid. *J Agric Food Chem* **50**: 227-229.
- 13) Yasui Y, Hayashi M. 1991. Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by high performance liquid chromatography. *Anal Sci* **7** (supplement): 125-128.
- 14) Kishida E, Nishimoto Y, Kojo S. 1992. Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal Chem* **64**: 1505-1507.
- 15) Every D. 1996. Enzymatic method to determine dehydroascorbic acid in biological samples and in bread dough at various stages of mixing. *Anal Biochem* **242**: 234-239.
- 16) Laing BM, Schlueter DL, Labuza TP. 1978. Degradation kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity. *J Food Sci* **43**: 1440-1443.
- 17) Khan MMT, Martell AE. 1967. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J Am*

- Chem Soc* **89**: 4176-4185.
- 18) Hsieh Y-H P, Hsieh YP. 1997. Valence state of iron in the presence of ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid. *J Agric Food Chem* **45**: 1126-1129.
  - 19) Hsieh Y-HP, Hsieh YP. 2000. Kinetics of Fe (III) reduction by ascorbic acid in aqueous solutions. *J Agric Food Chem* **48**: 1569-1573.
  - 20) Nishiike T, Iwanaga T, Yamaguchi R, Takamura H, Matoba T. 2000. Effects of tea, wines, soft drinks, and seasonings on the stability of linoleic acid hydroperoxide. *J Home Econ Jpn* **51**: 1137-1143.
  - 21) Kurata T, Fujimaki M, Sakurai Y. 1973. Red pigment produced by the reaction of dehydro-L-ascorbic acid with  $\alpha$ -mino acid, *Agric Biol Chem* **37**: 1471-1477.
  - 22) Liao M-L, Seib PA. 1988. Chemistry of L-ascorbic acid related to foods. *Food Chemistry* **30**: 289-312.
  - 23) Kacem B, Cornell JA, Marshall MR, Shireman RB, Matthews RF. 1987. *J Food Sci* **52**: 1668-1672.
  - 24) Long LH, Kwee DCT, Halliwell B. 2000. The antioxidant activities of seasonings used in Asian cooking. Powerful antioxidant activity of dark soy sauce revealed using the ABTS assay. *Free Radical Res* **32**: 181-186.
  - 25) Chiou RY-Y, Ku K-L, Lai Y-S, Chang, L-G. 2001. Antioxidative characteristics of oils in ground pork-fat patties cooked with soy sauce. *J Am Oil Chem Soc* **78**: 7-11.
  - 26) Nishiike T, Ichikawa J, Kikugawa N, Takamura H, Matoba T. 1999. Effects of amino acids, sugars, and ascorbic acid on the stability of linoleic acid hydroperoxide in the water phase. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 1997-2000.



## 第2章

### 調理過程におけるジャガイモのビタミンCの量的変動

## 調理過程におけるジャガイモのビタミンCの量的変動

—家庭科教科書におけるジャガイモの調理特性に関する記載内容の検討とモデル実験によるビタミンC量の再評価—

Changes in vitamin C content of potato during cooking processes

— Description concerning cooking properties of potato in textbooks of home economics,  
and re-evaluation of content of vitamin C using a cooking model system —

岸田 恵津\* 新田 文\*\* 田中 麻衣子\*\*\*  
Etsu KISHIDA Aya NITTA Maiko TANAKA

ジャガイモはいも類の中でビタミンC (VC) 含量が比較的多く、一度に摂取する量も多いことからVCのよい供給源とされており、またジャガイモのVCは加熱に対して安定であるとされている。しかしこれまでの研究では、VCが特異性の低い方法で定量されているため、VCの量的変動については不明な点も存在する。そこで本研究では、まず家庭科教科書におけるジャガイモの成分及び調理特性に関する記載内容を検討した。平成10年改訂の指導要領に準拠した小学校の教科書には、VCの記載がなくなり、エネルギー源になることのみが扱われていた。中学・高等学校では炭水化物に加えてVCと食物繊維が扱われていたが、VCの性質と調理損失に関する記載内容が理解しにくいという問題点も見られた。

続いて調理過程におけるジャガイモのVC量の変化をモデル実験で調べた。本研究では、アスコルビン酸 (AA) とデヒドロアスコルビン酸 (DHAA) を特異的に分別定量できるポストカラムHPLC (high performance liquid chromatography) により評価した。なおAAとDHAAを合わせてVCとした。冷却貯蔵の影響を調べるために、ジャガイモを1個体のまま5℃で保存すると、1週間後まではもとのAAレベルが維持されていたが、その後徐々に減少し、8週間後の残存率は約40%であった。「煮る」「焼く」「電子レンジ加熱」で加熱した後のAAの残存率を比較すると、「煮る」では70% (10分)、50% (20分) であったのに対し、「焼く」では95% (160℃,10分)、「電子レンジ加熱」では97% (20秒) と高いレベルに維持されていた。「煮る」場合の調味料がVCに及ぼす影響を調べたところ、ジャガイモ中のAA量に対しては調味料の有無の間に有意差がなかったが、煮汁中のAAは、醤油を添加すると有意に減少した。今回得られた結果は、AAの絶対量としてはこれまで報告されている値よりも低かったが、加熱方法によるVCへの影響を相対的に残存率として比較すると、これまでの結果をほぼ支持するものであった。なお調味料がVCに及ぼす影響については、さらに検討する必要がある。

以上より、調理方法によりVCの残存率が異なることが認められ、また方法によっては期待するほどのVCが摂取できない可能性が示されたので、教師はこれらのことも理解して指導することが望まれる。

キーワード：ビタミンC、アスコルビン酸、ジャガイモ、調理、家庭科

Keywords : vitamin C, ascorbic acid, potato, cooking, home economics

### 1. 緒言

ジャガイモはいも類の中ではビタミンC (VC) 含量が比較的多く、一度に食する量も多いことからVCの供給源になりうる。平成10年度に使用されていた小・中・高等学校の家庭科教科書には、いも類の成分特性として、炭水化物 (でんぷん) を含むことに加えてVCを含み、ジャガイモはVCのよい供給源になることが記載されていた。

慣用名がVCであるL-アスコルビン酸 (AA) は、抗酸化性を有している。そしてAAが酸化されたデヒドロアスコルビン酸 (DHAA) もAAとVC効力が同等とされており、両者を合わせてVCと定義されている (なお本論文でも特に記載しない限り、AAとDHAAを合わせてVCとする)。AAは多岐に渡る生理作用を持ち、健康維持に

は不可欠であるが、ヒトはAAを体内で合成することができないので食品からAAを摂取している。しかしAAは熱の影響を受けやすく、酸化されやすい<sup>1) - 3)</sup>。一方、平成元年の指導要領に準拠した高等学校の家庭科教科書5社7冊中4冊に、いも類のVCは加熱調理でも比較的強い、または減少が少ないという記載があり、これに対して、VCの一般的な性質との違いがわかりにくいということが教員養成系の大学生から指摘された。

野菜類はVCの供給源として重要であり<sup>4)</sup>、通常何らかの調理操作を経て摂取するので、調理に伴う野菜類のVC量の変化に関する報告は、1980年頃から、わが国でも多くの研究者によりなされている<sup>5) - 12)</sup>。しかし、それらの多くは特異性が低いと指摘されている方法でVCが定量されており、必ずしも真の値を表しているとは限

\*兵庫教育大学第5部 (生活・健康系教育講座) \*\*兵庫教育大学 学校教育学部 平成10年度卒業生

平成14年10月21日受理

\*\*\*兵庫教育大学 学校教育学部 平成11年度卒業生

らない。また最近、DHAAのVCとしての効力は果たしてAAと同等であろうかという論文も出され、AAとDHAAを分別定量する必要性も指摘されている<sup>13)</sup>。

そこで本研究ではまず、大学生レベルでも理解しにくい点に着目して、ジャガイモを含むいも類の成分特性と調理性に焦点を当てて、家庭科教科書の記載の現状を調べ、問題点を探った。その結果、VCに関する内容が理解しにくい記載内容と関わっていることが示唆されたので、この点を検討するために、ジャガイモの調理過程でのVCの量的変動を、多数の試料が分析可能なモデル実験で調べた。なおジャガイモのVC含量については、大羽らにより、加熱調理や貯蔵に伴う変化が詳細に報告されているが<sup>9) - 11)</sup>、今回はAAとDHAAを特異的に分別定量できる方法を用いて再評価した。さらに日常の調理を想定し、調味料存在下でのVCの安定性に関する実験を新たに加えた。

## 2. 方法

### 2-1. 家庭科教科書の記載内容の整理

小学校と中学校については、平成10年度改訂の学習指導要領<sup>14)</sup>、<sup>15)</sup>に準拠し、13年に検定済みの教科書の各2社2冊を分析対象とした。高等学校については、平成11年学習指導要領<sup>16)</sup>に準拠した教科書を対象にしようとしたが、見本用しか入手することができなかつたので2社4冊の見本用を対象とした。教科書の中から、ジャガイモの調理性や成分、またVCの生理作用に関する用語や説明文の記載を表1の分類項目にしたがって整理した。

### 2-2. ジャガイモの調理過程におけるVCの変化を調べるためのモデル実験

#### 2-2-1. 試料

ジャガイモは加東郡社町内のスーパーマーケットで購入した北海道産のメイクインを使用した。L-アスコルビン酸(AA)は和光純薬株式会社製、デヒドロアスコルビン酸(DHAA)はAldrich社製を用いた。

#### 2-2-2. 冷却貯蔵

ジャガイモを1個体のまま8-10個ずつポリエチレン製の透明の袋に入れ、5℃で貯蔵した。購入した日を貯蔵開始日とし、経目的にジャガイモを3-5個取り出し、後述2-2-4の方法で分析試料を調製した。

#### 2-2-3. 調理モデル

使用するジャガイモ及び器具は、水道水で洗浄後、蒸留水でリンスして水気をペーパータオルで拭き取った。ジャガイモは、皮をむかずに、直径1.2cmのコルクボーラーでくり抜いて1.0cmの厚さに切断した。切断面のAAの酸化を防止するために、切断したジャガイモを直ちに5%メタリン酸溶液に浸した。そしてジャガイモを取り出し、ペーパータオルで水気を拭き取ってモデル

実験の試料に用いた。なお実験は、同じ設定条件で3回以上行い、結果を総合して分析した。

#### (1) 水浸漬モデル

100ml容ビーカーに脱イオン蒸留水(以後、「蒸留水」とする)を50ml入れ、その中に試料5切片を浸漬させた。浸漬時間を15、30、60分とし、ふたをしないで室温(22℃)で放置した。ビーカーは浸漬時間ごとに分けた。なお蒸留水のpHは6.2であった。

#### (2) 「煮る」モデル

200ml容ビーカーに蒸留水または調味液40mlとジャガイモ試料5切片(約20g)を入れ、時計皿で蓋をして加熱した。加熱開始から沸騰までは中火(ビーカーの周りから炎が出ない程度)で、その後、火を弱めたが沸騰状態を維持させた。なお開始時の水温は22℃、沸騰までに要する時間は、7-8分であった。調味液の組成は、文献を参考にして<sup>17)</sup>、薄口醤油(ヒガシマル製)8%、砂糖(台糖製)5%とした。

#### (3) 「焼く」モデル

ジャガイモ5切片をアルミホイル(30cm×30cm)に重ならないように並べ、ホイルを折りたたんでジャガイモを包み、ガスオープン(Rinnai RCK-7ES LPガス用)で160℃、10分間加熱した。

#### (4) 「電子レンジ加熱」モデル

ジャガイモ5切片をポリ塩化ビニリデンのラップフィルム(旭化成製)(20cm×30cm)の上に重ならないように並べ、フィルムを折りたたんでジャガイモを包み、電子レンジ(シャープ株式会社Hi-Cooker, RE-130, 1989年製、定格高周波出力500W)で加熱した。加熱時間は10、20、40秒としたが、硬さの点で20秒が最適であった。

#### 2-2-4. ジャガイモからのVCの抽出と定量

生ジャガイモの場合は、4-5個のジャガイモから上記方法で試料を作成し、その中からランダムに5切片(約20g)を選んだ。切片を5%メタリン酸の入った乳鉢へプラスチック製のおろし器を用いて約10gすりおろし、すりおろしたものを氷冷しながら15分間放置した。放置中に、光や大気の影響を防ぐために、ラップフィルムで、さらにその上からアルミホイルで乳鉢を覆った。15分間放置後、試料をメスシリンダーに移し、5%メタリン酸溶液を加えて全量を50mlにした。そしてメスシリンダーを上下に5回振った後、懸濁液の一部を分取し、13000 rpmで10分間遠心分離した。その上清液をポアサイズ0.45μmのフィルターで濾過し、HPLC分析用試料とした。なお、試料を氷冷しながら操作を行った。抽出した試料を褐色瓶に入れ、調製当日に分析する場合は、HPLC分析まで氷冷し、後日分析する場合は、分析直前まで-85℃で保存した。

加熱したジャガイモの場合は、おろし器ですりおろすとVCの抽出量が少ないことが予備実験から確認された

ので、以下の方法で抽出操作を行った。ジャガイモ5切片(約20g)を選び、1切片を2-4つに包丁で切った。そのうち約10gを部位差がでないように考慮して取り出して乳鉢に入れ、5%メタリン酸溶液に海砂を加えた中でジャガイモを押しつぶした。乳鉢中で15分間放置後、5%メタリン酸溶液を加えて全量を100mlにした。その懸濁液を85000rpmで10分間遠心分離し、上清液をポアサイズ0.45 $\mu$ mのクロマトディスクで濾過して分析試料とした。

上記の方法で調製した試料を、安居・林によるポストカラムHPLC法<sup>18)</sup>に準じてVC定量を行った。HPLCシステム及びカラム(Shim-pack SCR-101N)は島津製作所製を用いた。移動相は1mM EDTA/10mMシュウ酸(pH 3.8)を用い、流速は1.0ml/min、またポストカラム反応液は、50mM水素化ホウ素ナトリウム/100mM水酸化ナトリウムを用い、流速0.5ml/minで流した。検出は300nmで行った。定量の標準物質となるDHAAは、市販品は純度が低く、一定ではないので純度を調べた後に定量に用いた<sup>19)</sup>。なおAAとDHAAを合計して総VCとした。

### 3. 結果及び考察

#### 3-1. 家庭科教科書におけるジャガイモ及びVCの生

#### 理作用に関する記載

記載内容を項目に従って分類した結果を表1に示した。小・中・高等学校を通して学習する内容は、炭水化物を含み、エネルギー源になることである。平成元年の指導要領準拠の教科書では、ジャガイモの成分として小・中・高等学校のすべての段階の教科書に炭水化物(でんぷん)、VCを含むことが記されていた。しかし今回調べた教科書のうち、小学校ではビタミンに関する内容がなくなり、また小・中学校では「でんぷん」という名称も使われていなかった。10年度の指導要領の改訂により、小学校では栄養素の細かな働きを扱わないことになり、また調理実習項目からジャガイモの調理が必須ではなくなったためであろう。

中学校では、6つの基礎食品群を学習するところでも類の成分的特徴が扱われている。この食品群では、いも類は5群(穀類・いも類・砂糖)に含まれ、「おもな成分は炭水化物である」とされているが、「いも類は、VCや食物繊維も含んでいる」と記されており、いも類の特徴としてVCも含んでいることが扱われている。

高等学校では家庭一般等が、習得単位数の違いにより、家庭総合と家庭基礎に変わったが、いずれの科目でもジャガイモ及びVCに関する記載内容に違いが見られな

表1. 家庭科教科書におけるジャガイモ及びビタミンCの生理作用に関する記載

記載項目	小学校		中学校		高等学校		
	A	B	A	B	C	D	
ジャガイモについて							
ビタミンC	ビタミンC		○	○	○	○	
	貯蔵					損失は少ない	
	加熱調理					損失は少ない	
ビタミンC以外の成分	炭水化物		○	○	○	○	
	エネルギー源	○	○		○	○	
	水分が多い				○	○	
	長期保存不可					○	
	貯蔵しやすい					○	
	カリウム					○	
	食物繊維			○	○	○	○
	ソラニン						○
その他	体に害になる成分	○	○				
	一年中手に入りやすい	○					
	調理しやすい	○					
	選ぶ観点	○					
	変色を防ぐ方法	○	○				
収穫しやすい					○		
ビタミンCの生理作用			血管をしょうぶにする、傷の回復をよくする	傷の回復を早めるのに役立つ	酸化還元作用、細胞間の結合、組織の強度維持	細胞間の結合組織を強くする、細胞内の呼吸作用	

○印は記載があることを示す。A-Dは出版社

ったので、表1には家庭総合の記載内容を示した。C・Dの共通した記述は、いも類はエネルギー源になることに加えて、VCを含む、水分が多い、食物繊維に富むということである。改訂前の教科書6社7冊のうち4冊では、ジャガイモに含まれるVCは、貯蔵及び加熱調理において損失が少ないという内容が記載されていたが、Dには今回も記載されていた。これは調理経験の乏しい生徒にとって、解釈がむずかしい内容であると考えられる。高等学校では、食品群別摂取量のめやすを4群分類で学習する。この食品群では、いも類は、野菜・くだものとともに3群に入り、3群の栄養的特徴は、ビタミン・無機質などを含み、生理機能を調節する、とされている。このことから、いも類のVCの性質を取り上げて学ぶのかも知れない。さらに生徒の理解が困難であることが予想されるのは、「水分を多く含むため長期保存は不可である」と同時に「貯蔵しやすい」という貯蔵・保存に関する記述である。この記述は、以前の教科書7冊中4冊に見られたが、改訂後もD社では残っていた。このようにVCの性質と調理損失に関わる内容が指導する上で問題になる可能性が示唆された。

VCの生理作用については、同じ校種内での教科書間の差はほとんど見られなかった。マスメディアからの情報により、肌を白くする、しみ・そばかすを防ぐなどがVCの働きであるかのように一般に認識されているので、教師には、科学的な根拠に基づいた情報をわかりやすく説明することが求められる。

小・中・高等学校を通して記載されているのは、いも類は炭水化物を含むこと、中・高等学校ではVC及び食物繊維を含むことである。小学校ではジャガイモはエネルギー源になることや購入の仕方を中心に学び、中学校ではいも類に関する記載は少ないが、いも類にはVCも含まれ、またVCの栄養素としての働きを学ぶ。そして高等学校では、VCに対する貯蔵や加熱調理の影響へと及んでいる。このように繰り返して学習する内容を含んでいるが、指導内容は段階に応じて異なり、授業の深まりに差があると思われる。指導内容に深まりを持たせ、児童・生徒に食物への興味・関心を持たせるためには、教師は記述内容の科学的裏付けを理解する必要があり、また研究者は正しい情報を提供しなければならないと考える。

### 3-2. 調理過程におけるジャガイモのVCの変化

#### 3-2-1. 冷却貯蔵

ジャガイモは室温で保存される場合が多いが、購入後約1か月を経過すると発芽し、外観が悪化してゆく。しかし冷蔵庫で保存すると3-4か月間、外観が変わらないため常備菜として便利であるが、成分変化については外観ではわからない。そこで冷却貯蔵におけるVC量の

変化を調べた。庫内温度が5℃の冷蔵庫にジャガイモを入れて8週間保存し、経目的に試料を取り出してAAとDHAAを定量した。この実験は異なる時期に2回行ったため、購入直後のジャガイモ100g当たりのAAとDHAA量にやや差が見られた(1回目AA 18.7±3.8mg、DHAA 0.3±0.3mg、2回目AA 16.1±2.7mg、DHAA 1.2±0.9mg)。そこで購入直後の総VC量を100%とした残存率を算出して結果を表した(図1)。

1週間後、AAはほとんど変化がなかったが、2週間後から徐々に減少し、3週間後には開始時よりも有意に減少して、残存率は76%になった。5週間後にはさらに減少し、8週間後には残存率は42%であった。DHAAは微量の増加と減少をたどるが、ほとんど蓄積されることなく、総VCはAA量を反映していた。

他の品種のジャガイモの冷却貯蔵(4℃)に伴うVC量の変化については、大羽らによって調べられており<sup>9) - 11)</sup>、貯蔵2-3日後にAAがやや増加し、5日後あたりから減少傾向になることが示されている。この増加する現象については、低温ストレスによりAAの著しい消費が起こり、それを補うためのAA合成酵素活性が上昇し、オーバーシフト的にAA量が増加すると推察されている。我々は1週間より短い期間の検討を行っていないが、それ以後の傾向は同様であった。以上より、冷蔵庫でジャガイモを保存すると外観はほとんど変化がなく8週目でも十分食べることができると考えられる。また発芽とVC含量には関係がない。なお15℃に貯蔵した方が、4℃に貯蔵した場合よりもVC量の減少が小さいことが確認されている<sup>10) 11)</sup>。

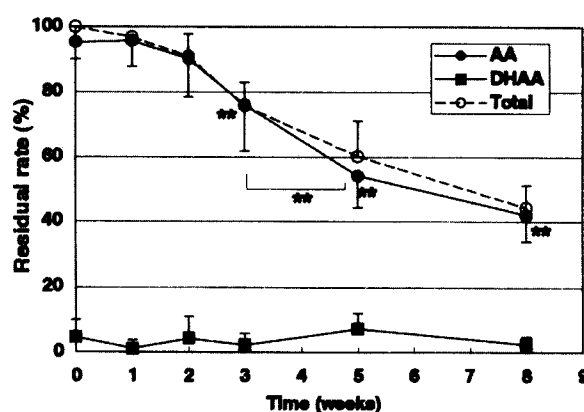


Fig.1 Changes in vitamin C content of potato during storage at 5°C

The amount of total VC (AA + DHAA) at the initial point was taken as 100%.

Results are expressed as the mean ±SD (n=6).

\*\*, p<0.01 (vs. AA at time 0)

## 3-2-3. 水浸漬の影響

一般に、ジャガイモの皮を剥いた後に、ジャガイモを水に浸ける。そこでVC量に及ぼす水浸漬の影響を調べた。本実験で用いたジャガイモのAAとDHAA量は、ジャガイモ100g当たりAA 10.8 ± 0.5mg、DHAA 1.8 ± 0.5mgであった。図2には、浸漬前のVC量を100%とした残存率で結果を示した。60分後の総VCは、浸漬前のVCよりも有意に減少したが、その他の時間、及びAA・DHAA量では有意な変化は認められなかった。

## 3-2-4. 加熱方法の違い

加熱方法として「煮る」「焼く」「電子レンジ加熱」を取り上げ、加熱方法の違いがVC量に及ぼす影響を、多数の試料が分析可能なモデル系で検討した。モデル系の試料の大きさは、日常の調理で調製されるものよりも小さめであるが、本研究では、まず加熱方法によってVC量の変化が異なるか否かを調べることを目的としているので、ここでは大きさについては考慮しなかった。食べることができる硬さになるまでの加熱時間は、加熱方法によって異なっており、「煮る」においては、10分ではやや硬く、20分ではかなり軟らかいという状態であった。「焼く」では、10分後に十分に軟らかく、適当な硬さになっていた。「電子レンジ加熱」では、10、20、40秒と加熱したところ、20秒が適当な硬さであった。「電子レンジ加熱」では、ラップフィルムで試料を覆ったにもかかわらず、他の加熱方法に比べて重量変化が著しく、20秒後では92.9%、40秒後では76.7%に減少していた。表2には、食べるのに適当な硬さに加熱した場合のVC量について得られた結果を示した。なお本実験で用いたジャガイモのAAは、ジャガイモ100 g当たり10-12

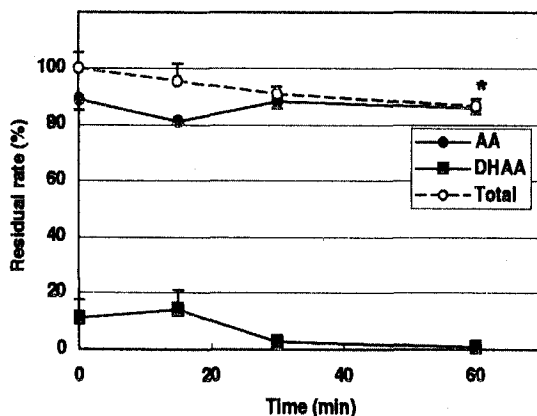


Fig.2 Changes in vitamin C content of potato during soaking in distilled water at 25°C

The amount of total VC (AA + DHAA) at the initial point was taken as 100%.

Results are expressed as the mean ± SD (n=3).

\*\*<sub>1</sub>, p<0.05 (vs. Total VC at time 0)

mg、DHAAは検出されず、加熱後もAAしか検出されなかった。結果は、生イモ中のAA量を100%とした残存率で表した。

「焼く」「電子レンジ加熱」では加熱後もAAの残存率は95-97%であり、有意な減少は認められなかった。また「焼く」については1個体のままアルミホイルに包んで200°Cで30分加熱した場合についてもAAの残存率を調べたところ、93.3 ± 6.6%とほとんど減少しなかった。これに対し、水を媒体とする「煮る」では10分、20分後ともにAAは有意に減少した。

## 3-2-5. 「煮る」における調味料及びジャガイモの形態の影響

ジャガイモは和風煮物として用いられることが多いので、醤油と砂糖を含む調味液中で煮る場合を想定した実験を行い、調味料添加がVCに及ぼす影響を調べた(図3)。

調味料無添加群では、先の表2で示したように、イモ中のAAは10分後に残存率が約70%と有意に減少し、さらに10分後から20分後にも有意に減少した(図3-A)。煮汁中には、AAがもとの約18%(10分後)、28%(20分後)存在し、煮汁とイモ中のAAを合わせると20分後でも生イモ中AAの約85%が残存していた。調味料が存在すると、10分後のイモ中AA残存率は58.5%で、調味料無添加群よりも有意に低くなっていた。しかし20分後のイモ中AA残存率は10分後と同程度であった。一方、煮汁中のAAは、調味料が存在すると残存率が低くなる傾向が見られたが、有意な差ではなかった。これらの結果から、醤油と砂糖とともにジャガイモを加熱すると、AAの減少が促進される傾向が示された。

次にAAの減少を促進するのは、醤油と砂糖のいずれかが、または両方であるのかについて検討した。なお加熱時間は15分とし、この条件では、イモは適当な硬さと形状を保っていた。図3-Bに示したように、調味料の有無にかかわらず、加熱15分後にはイモ中AAの残存率

Table 2. Effects of heating method on vitamin C content of potato

Method	Time	Residual AA in potato (%)
Raw		100
Boiling	10 min	70.2 ± 5.9 **
	20 min	57.8 ± 1.8 **
Baking <sup>1)</sup>	10 min	95.0 ± 8.8
Microwave	20 sec	96.7 ± 5.8

The amount of AA in raw potatoes was taken as 100%. DHAA was not detected in raw potatoes used in the present study. Results are expressed as the mean ± SD (n=4).

<sup>1)</sup> 160°C, \*\*, p<0.01 (vs. raw)

は50-54%と生イモよりも有意に低くなっていたが、グループ間での有意差は認められなかった。一方、煮汁中のAAについては、砂糖添加群と調味料無添加群での残存率は生イモの約40%であり、イモ中AAと合わせると約90%になり、高い残存率であった。なお調味料無添加群と砂糖添加群での有意差はなかった。これに対して、醤油添加群と醤油と砂糖添加群では残存傾向が似ており、煮汁中AAの残存率は、いずれも生イモの約17%であり、これは調味料無添加群、砂糖添加群よりも有意に低いという結果であった。以上より、和風煮物では砂糖と醤油で調味することが多いが、イモから煮汁に溶出したAAは醤油が存在すると不安定になり、AAが減少することが明らかになった。醤油がAAに及ぼす作用機構については検討中である。

これまでの結果から、水の存在下でジャガイモを加熱するとVCが溶出するが、「焼く」や「電子レンジ加熱」のようにイモから水への溶出を防ぐことができればVCは安定であり、残存することが示唆された。そこで最後に、「煮る」場合のVCの損失を防ぐための方法を提案するための実験を行った。すなわち、皮を除去せずに1個体のままと1/2に切ったもの（この場合切断面には皮がな

い）を蒸留水中で加熱した。1個体のままのものは、500ml容ビーカーに蒸留水250 mlとジャガイモ（100g前後）1個を入れて、30分間加熱した。2分の1に切断したものは、300ml容ビーカーに蒸留水200mlと切断したジャガイモ（40 g 前後）1個を入れて、20分間加熱した。どちらもアルミホイルで蓋をした。3検体以上のVCを定量した結果、1個体のままでは生に対してAAは98.5 ± 2.7%、2分の1に切断したものでは、95.6 ± 5.3%残存していた。以上の結果から、表皮部を除去せず、また切断面を小さくすることによりVCの流出を防ぐことができると考えられる。

本研究では、ジャガイモの調理過程でのVCの変化をAAとDHAAに分別し、特異的に定量して再評価を行った。本研究で用いたジャガイモのVC量は、これまでに報告されている結果<sup>9) - 11)</sup>よりも、絶対量としては低値であったが、相対的に評価した残存率については概ね支持するものであった。調味料のVCへの影響を検討した報告はなく、今回、醤油を添加すると、ジャガイモのVCにも影響を及ぼすことが示されたので、詳細について今後さらに検討する必要がある。一方、五訂食品成分表に示

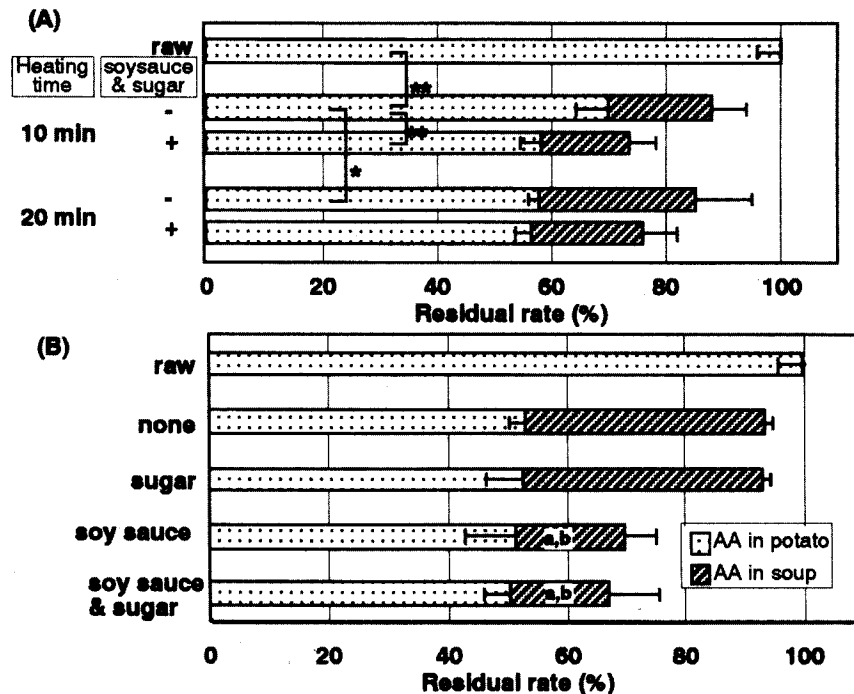


Fig.3 Changes in vitamin C content of potato during heating in boiling water.

(A) Effect of heating time and soy sauce (8%) and sugar (5%) on VC in potato and the soup. The amount of total VC (AA + DHAA) of raw potatoes was taken as 100%. However, DHAA was not detected in raw potatoes used in the present study. Results are expressed as the mean ±SD (n=3). \*\*, p<0.01 \*, p<0.05

(B) Effect of soy sauce (8%) and sugar (5%) on VC in potato and the soup. Potatoes were heated in boiling water in the presence or absence of soy sauce or (and) sugar for 15min. a, p<0.01 (vs. none); b, p<0.01 (vs. sugar)

されているジャガイモのVC量は100g当たり35mgであるのに対し、我々が購入したジャガイモのVC量は相対的に少なく、また購入時期によっても差があり、10月から12月に購入したものでは約10 mg、1月から2月では6-8 mg、4月から6月では12-15mgであった。この違いは、春イモと秋イモという収穫時期や収穫後の貯蔵状態や期間によると考えられ、購入する時点ですでにVC量に大きな差が生じている。さらに家庭での貯蔵方法や期間、加熱により、摂取する時点でのVCは、成分表に示されている値（蒸し15mg/100g、水煮21mg/100g）とも差があることが予想される。したがって調理方法によっては、期待するほどのVCが摂取できない可能性が示唆される。

日本では、ジャガイモの煮物は家庭和風料理の定番の一つに位置付けられており、ジャガイモは水を使い、さらに醤油中で加熱することが多い。焼いて供されるベークドポテトが多く食べられている欧米とは食べ方がやや異なる。ジャガイモのVCは、調理方法によっては高い割合で残存しており、安定であることが再確認できたが、日本で一般に行われている調理方法では、ジャガイモのVCは加熱に対して必ずしも安定ではないので、VCの損失は少ないと結論づけることはむずかしいと考える。

#### 参考文献

1. S. J. Padayatty, R. Daruwala, Y. Wang, P. K. Eck, J. Song, W. S. Koh, M. Levine: Vitamin C: From molecular actions to optimum intake. Handbook of antioxidants, second edition, edited by E. Cadenas and L. Packer, Marcel Dekker, New York, 117 - 145 (2002)
2. A. C. Carr, B. Frei: Vitamin C and cardiovascular diseases. Handbook of antioxidants, second edition, edited by E. Cadenas and L. Packer, Marcel Dekker, New York, 147 - 165 (2002)
3. 日本ビタミン学会 編：ビタミンハンドブック2. 水溶性ビタミン. 化学同人, 171 - 191 (1989)
4. 健康・栄養情報研究会 編：国民栄養の現状 平成12年厚生労働省国民栄養調査結果. 第一出版, 38 - 40 (2002)
5. 久保田紀久江, 桐淵壽子：甘藷の加熱調理に関する研究 (第3報) 甘藷を加熱調理した際のビタミンCの変化. 日本家政学会誌, 29, 144 - 147 (1978)
6. 桐淵壽子, 河嶋かほる：甘藷の加熱調理に関する研究 (第4報) 甘藷の加熱過程におけるアスコルビン酸酸化酵素活性とアスコルビン酸量との関係. 日本家政学会誌, 30, 217 - 222 (1979)
7. 桐淵壽子, 河嶋かほる：調理時におけるアスコルビン酸の変化. 日本家政学会誌, 38, 877 - 887 (1987)
8. 大羽和子：野菜の切断・放置、生食調理に伴うビタミンC量およびアスコルビン酸オキシダーゼ活性の変化. 日本家政学会誌, 41, 715 - 721 (1990)
9. 大羽和子：貯蔵、切断および加熱調理に伴うジャガイモのビタミンC含量の変化. 日本家政学会誌, 39, 1051 - 1057 (1988)
10. 大羽和子, 山本淳子, 小原明子, 石井現相, 梅村芳樹：ジャガイモ塊茎のビタミンC含量およびその合成酵素活性に及ぼす貯蔵温度の影響. 日本食品科学工学会誌, 45, 510 - 513 (1998)
11. 大羽和子, 山本淳子, 舟橋由美, 小原明子, 石井現相, 梅村芳樹：ジャガイモ塊茎の生育および冷却貯蔵に伴うビタミンC量およびその合成酵素活性の変化. 日本調理科学会誌, 32, 102 - 108 (1999)
12. 鈴木敦子, 永山スミ, 津久井亜紀夫：甘藷の品種別、部位別および加熱調理中のビタミンC量. 日本食生活学会誌, 7, 53 - 57 (1996)
13. Y. Ogiri, F. Sun, S. Hayami, A. Fujimura, K. Yamamoto, M. Yaita, S. Kojo: Very low vitamin C activity of orally administered L-dehydroascorbic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 227 - 229 (2002)
14. 文部省：小学校学習指導要領解説 家庭編, 開隆堂出版 (1999)
15. 文部省：中学校学習指導要領解説 技術・家庭編, 開隆堂出版 (1999)
16. 文部省：高等学校学習指導要領解説 家庭編, 開隆堂出版 (2000)
17. 香川芳子 監修：五訂食品成分表, 女子栄養大学出版部, 418 - 421 (2002)
18. Y. Yasui, M. Hayashi: Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by high performance liquid chromatography. Analytical Sciences, 7 (supplement) 125 - 128 (1991)
19. E. Kishida, Y. Nishimoto, S. Kojo: Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. Analytical Chemistry, 64, 1505 - 1507 (1992)



### 第3章

## TNF 誘導アポトーシスに対する抗酸化物質の効果と細胞内グルタチオンレベルとの関連

### 1. 序

アポトーシスに関する研究が進展し、単に組織傷害や炎症反応の結果とされてきた種々の病態にアポトーシスが関与することが明らかにされており、炎症反応の中心的なサイトカインである腫瘍壊死因子(TNF)は、アポトーシスを誘導することが示されている。また種々の疾病への関与が指摘されている活性酸素種は、直接細胞死を導く活性を持つが、その場合の細胞死の一部はアポトーシスのプロセスをたどる。

我々は、n-3系脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)を培養細胞のリン脂質膜に多く取り込ませることにより、TNFで誘導されるアポトーシスが抑制されること、またこのような効果はアラキドン酸やエイコサペンタエン酸(EPA)では見られず、DHAに特異的な効果であること、さらにはDHAと抗酸化ビタミンであるビタミンE(VE)を同時投与すると相加的に抑制効果が表れることを報告してきた(M. Yano et al. *J Nutr.* 130, 1095-1101, 2000)。これらの結果は、アポトーシスと関わりのある疾病を食物由来の成分により治癒・予防できる可能性を示唆している。

一方、グルタチオンが細胞内酸化還元レベルの変動の重要な指標の一つと考えられている。

そこで本研究では、生体内における抗酸化物質の新しい機能の探索として、まずTNFで誘導されるアポトーシスに対する抗酸化物質の効果を調べ、そして抗酸化物質によるアポトーシス抑制作用と細胞内グルタチオンレベルとの関連について検討した。

### 2. 方法

#### 2-1. 細胞培養

Human monocytic U937 cells は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク（大阪）から得た。

#### 2-2. アポトーシスの誘導と評価方法

細胞( $2 \times 10^6$  cells/ml)を1時間前培養した後、TNF (0.5 or 2 ng/ml)とシクロヘキ

シミド(CHI, 1 $\mu$ g/ml)を投与し、3 時間培養した。TNF 刺激後、核をヘキスト試薬で染色し、蛍光顕微鏡下で核の断片化を観察し、アポトーシスを評価した。

### 2-3. 抗酸化物質の投与方法

N-アセチルシステイン(NAC)と 2-メルカプトエタノール(2-ME)は、PBS に溶解してストック溶液を調製した。細胞( $2 \times 10^6$  cells/ml)を 1 時間前培養した後、NAC または 2-ME を投与し、その直後に TNF 刺激を行った。

VE、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)はエタノールに溶解したものをストック溶液とし、細胞培養液に投与する際の最終エタノール濃度を 0.25%とした。なお、このエタノール濃度は細胞培養に影響を及ぼさないことは確認済みである。細胞( $9 \times 10^5$  cells/ml)を VE、または BHT、BHA と 24 時間培養した。その後、細胞を洗い、 $2 \times 10^6$  cells/ml に調整し、抗酸化物質が存在しない状態で 1 時間前培養、そして TNF で細胞を刺激した。

抗酸化物質によるアポトーシス抑制率は次式により算出した。

$$100 \times \{(A-B) - (C-D)\} / (A-B)$$

A は、TNF により誘導されたアポトーシス細胞の割合(%)

B は、TNF の溶媒によって起こるアポトーシス細胞の割合(%)

C は、抗酸化物質存在下で TNF により誘導されたアポトーシス細胞の割合(%)

D は、抗酸化物質の溶媒によって起こるアポトーシス細胞の割合(%)

### 2-4. 細胞内総グルタチオンレベルの定量

細胞をトリクロロ酢酸(TCA)存在下で破碎してグルタチオンを抽出した。DTNB-グルタチオンレダクターゼを用いた Griffith の方法により総グルタチオン(GSH)を定量した。

### 2-5. 細胞内 GSH の除去

細胞( $1 \times 10^6$  cells/ml)を L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO, 0.5 – 50  $\mu$ M)で 24 時間処理することにより GSH レベルを低下させた。

### 3. 結果と考察

#### 3-1. TNF 誘導アポトーシスに対する各種抗酸化物質の影響

U937 細胞を血清存在下で CHI (1 $\mu$ g/ml)と TNF で 3 時間刺激したときのアポトーシス細胞の割合は、TNF0.5 ng/ml 投与では 20-30%、2 ng/ml 投与では 35-45%であった。

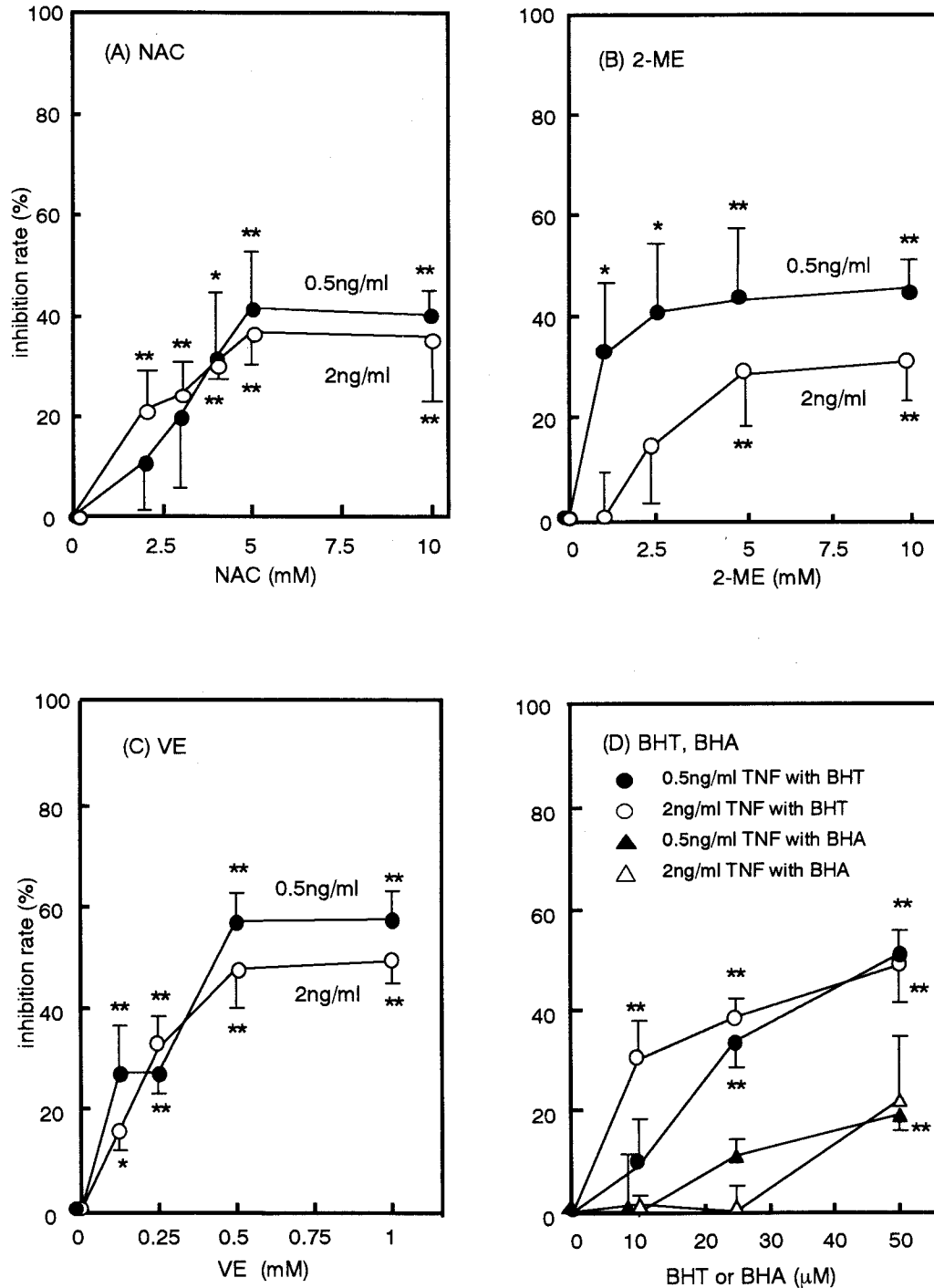
方法 2-3.に示した方法で U937 細胞に抗酸化剤を添加し、TNF で細胞を刺激した。添加した抗酸化物質の濃度とアポトーシス抑制率の関係を Fig. II-1 に示した。BHT を 24 時間添加した場合の細胞増殖については、50 $\mu$ M 以下ではコントロール (0.25%エタノール) と変わらなかったが (前日比 1.25 - 1.4)、100 $\mu$ M になるとコントロールに対して約 60%になった。また BHA 添加群の細胞増殖については、50 $\mu$ M 添加でコントロールの 95-100%、100 $\mu$ M では 80%であった。このため BHT と BHA の添加濃度は 50 $\mu$ M 以下とした。他の抗酸化物質による細胞増殖への影響については、Fig. II-1 に示した範囲の濃度では問題なかった。

NAC または 2-ME、VE、BHT の添加により、TNF 誘導のアポトーシスが濃度依存的に抑制されたが、その抑制率は 40-60%に留まっていた。このことより、TNF 誘導アポトーシス経路の一部に活性酸素種が関与していることが示唆された。

#### 3-2. 抗酸化物質存在下で TNF 刺激したときの細胞内 GSH レベルの変動

NAC(5mM)または 2-ME(5mM)を培地に添加し、添加直後に TNF で細胞を刺激した。そして刺激 45、90、180 分後の細胞内 GSH を定量した。抗酸化剤なし・TNF なし(vehicle)群の GSH レベルを 100%として結果を% control で表した (Fig. II-2)。なお、本実験で用いた U937 細胞 10<sup>6</sup> 個あたりの GSH 量は 4.5nmol であった。抗酸化物質を添加しない群(Fig. II-2 (A))では、TNF 投与により 45、90 分後に GSH レベルがやや変動したが、TNF なしの非刺激群と比べて有意な変動ではなかった。しかし 180 分後には、TNF0.5、2ng/ml いずれの刺激条件でも GSH レベルは非刺激群よりも有意に低下し、約 74%であった。NAC(Fig. II-2 (B))または 2-ME(Fig. II-2 (C))を添加すると、TNF 非刺激時の GSH 量は増加し、無添加に比し、NAC 添加・TNF 刺激 90 分後には約 160%、2-ME 添加では約 250%になった。この細胞を TNF 刺激すると細胞内 GSH 量は減少したが、NAC または 2-ME 添加群では、無添加群よりも GSH 量が高いレベルに維持されていた。

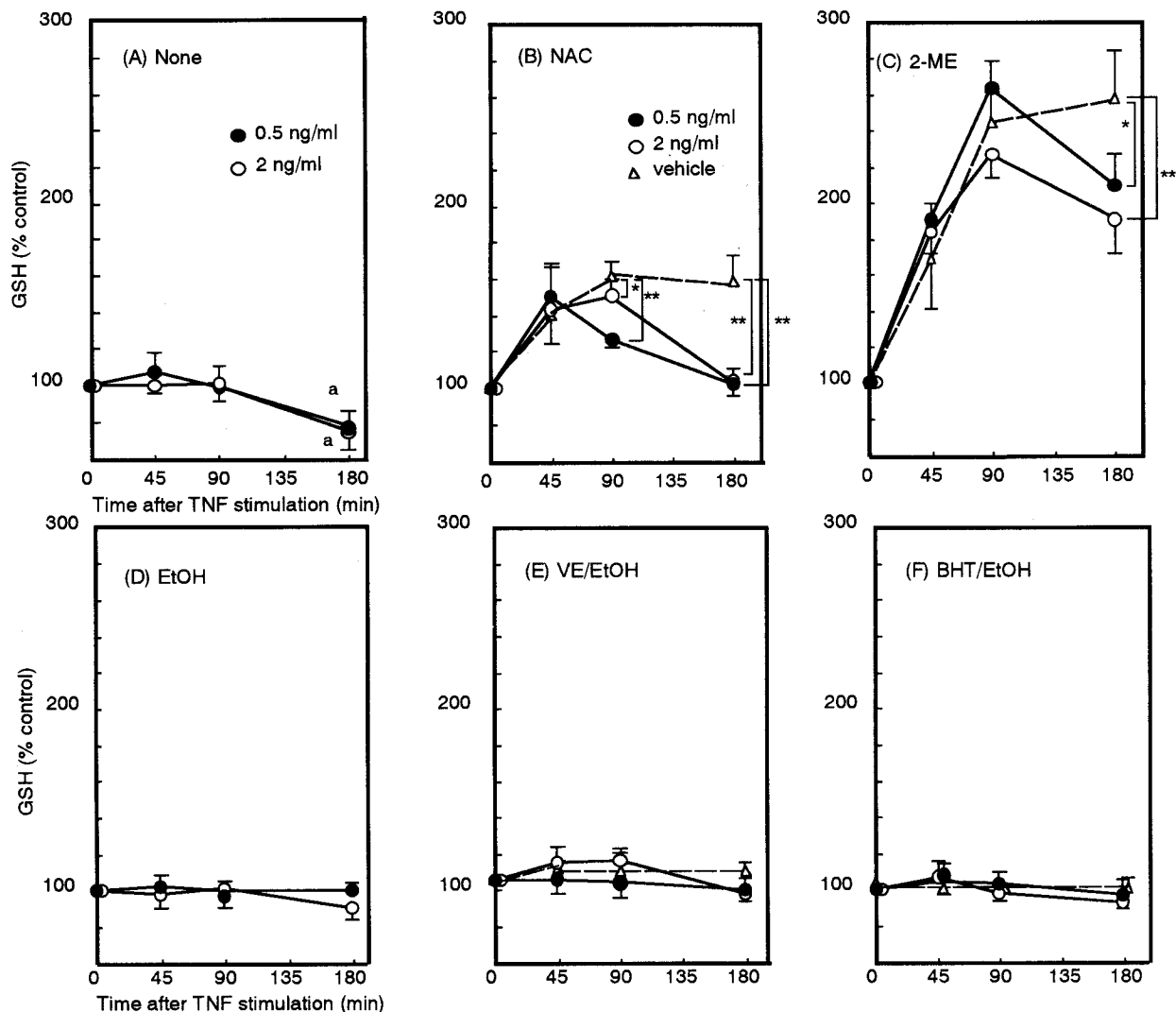
一方、VE(0.5 mM)または BHT(50  $\mu$ M)を添加して 24 時間培養した細胞では、GSH 量の有意な増加が認められず、TNF 刺激による GSH の有意な減少も見られなかった。VE、BHT の溶媒として使用したエタノール(最終濃度 0.25%)のみを添加した細胞でも TNF 刺激時において GSH 量は減少しなかった。GSH レベルは、エタノール添加によりその変動が押さえられ、TNF 刺激の影響を受けなくなったものと考えられる。



**Fig. II-1 Dose-dependent effects of antioxidants on TNF-induced apoptosis**

(A) (B) Cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were prewarmed for 1 h and treated with TNF (0.5 or 2 ng/ml) for 3 h in the presence of NAC (A) or 2-ME (B). (C) (D) Cells ( $9 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with VE (C), BHT or BHA (D) for 24 h. After the incubation, cells were washed, suspended in culture medium ( $2 \times 10^6$  cells/ml) and prewarmed for 1 h. Apoptosis was induced with TNF (0.5 or 2 ng/ml) for 3 h.

The percentage of inhibition rate was determined as described in the text. Values are mean  $\pm$  SD. Asterisks indicate significantly different from no antioxidant supplementation. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$



**Fig. II-2 GSH levels in cells treated with antioxidants in the course of TNF stimulation**

(A) (B) (C) Cells ( $4 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated for 1 h. After the preincubation, cells were treated with TNF (0.5 or 2 ng/ml) in the presence of 5 mM NAC (B) or 5 mM 2-ME (C), or in the absence of any antioxidant (A).

(D) (E) (F) A stock of VE or BHT was prepared in ethanol and the final concentration of ethanol was 0.25 %. Cells ( $9 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with 0.25 % ethanol (D), 0.5 mM VE (E) or 50  $\mu$ M BHT (F) for 24 h. After the incubation, cells were washed, suspended in culture medium ( $4 \times 10^6$  cells/ml), and preincubated for 1 h. Apoptosis was induced with TNF (0.5 or 2 ng/ml).

The GSH level of vehicle in the absence of antioxidant was taken as a control (100 %). Results are expressed percentage of time-matched control and are means  $\pm$  SD.

●, TNF 0.5 ng/ml; ○, TNF 2 ng/ml;  $\Delta$ , vehicle.

a,  $p < 0.01$  (vs. control); \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ .

### 3-3. GSH レベルの上昇または低下と TNF 誘導アポトーシスとの関連

NAC または 2-ME を添加すると、先に示したように、時間経過に伴って細胞内 GSH レベルが上昇した。このような細胞を TNF 刺激すると細胞内 GSH 量は減少したが、NAC または 2-ME 添加群では、無添加群よりも GSH 量が高いレベルに維持されていた。しかし、ここでは、予め GSH レベルを上げておらずに TNF 刺激を行った結果である。そこで、細胞内 GSH レベルを上昇させておけばアポトーシスの抑制が可能か否かを確かめるために、NAC または 2-ME を添加して 90 分後、細胞内 GSH レベルが上昇してから TNF で細胞を刺激した。Table II-1 には、アポトーシスの抑制率を示した。2-ME (5 mM) を TNF 刺激の 90 分前に添加群では、TNF 2ng/ml を投与するとアポトーシスの抑制率は有意に上昇した。しかし、0.5ng/ml でも上昇する傾向にあったが、有意な上昇ではなかった。一方、NAC 添加群では、予め添加して GSH レベルを上げておいても抑制率に影響がなかった。

次に、GSH レベルを下げたときのアポトーシスへの影響を調べた。GSH 合成阻害剤である BSO を培地に 24 時間添加することにより細胞内 GSH レベルを低下させ、その後 TNF で 3 時間刺激したときのアポトーシス細胞の割合を Table II-2 に示した。BSO を 24 時間添加した後の GSH レベルは表に示す通りである。GSH をコントロール (BSO 未処理) レベルの 75%にすると(BSO 1  $\mu$ M 添加)、TNF 0.5ng/ml で刺激したときのアポトーシス細胞の割合は、コントロールが 20.0%であったのに対し、27.6%と有意に増加していた。しかし BSO の濃度を上げて、GSH レベルを約 20%のレベルまで低下させても、アポトーシス細胞の割合は増加しなかった。TNF 2ng/ml 刺激群でも GSH レベルを下げると、ややアポトーシス細胞の割合が増加する傾向にあったが、有意な増加ではなかった。したがって、GSH レベルを低下させるとアポトーシス細胞が増加する傾向にあるが、説明できる範囲が限られていることが示された。

これまでの結果をもとに、GSH レベルとアポトーシス阻害率の関係を散布図に表した (Fig. II-3)。抗酸化剤によるアポトーシスの抑制効果と細胞内 GSH レベルとは弱い相関 ( $r = 0.65$ )にあるが、すべての抑制効果を GSH レベルの上昇によっては説明できないことがわかった。

**Table II-1 Effect of incubation time with antioxidant on TNF-induced apoptosis**

Antioxidant	TNF (ng/ml)	Incubation time (min)	
		0 <sup>1)</sup>	90 <sup>2)</sup>
Inhibition rate (%)			
NAC	0.5	49.2±0.4	46.3±19.2
	2	48.8±2.0	44.0±3.0
2-ME	0.5	52.4±10.8	59.3±7.2
	2	44.7±8.3	60.0±2.1 <sup>a</sup>

Cells ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated for 1 h. <sup>1)</sup>After the preincubation, NAC (5 mM) or 2-ME (5 mM) was added to the culture medium, and shortly thereafter cells were treated with TNF for 3 h.

<sup>2)</sup>After the preincubation, cells were pretreated with NAC or 2-ME for 90 min followed by the treatment with TNF for 3 h.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  (vs. 0 min)

**Table II-2 Effect of GSH reduction on TNF-induced apoptosis**

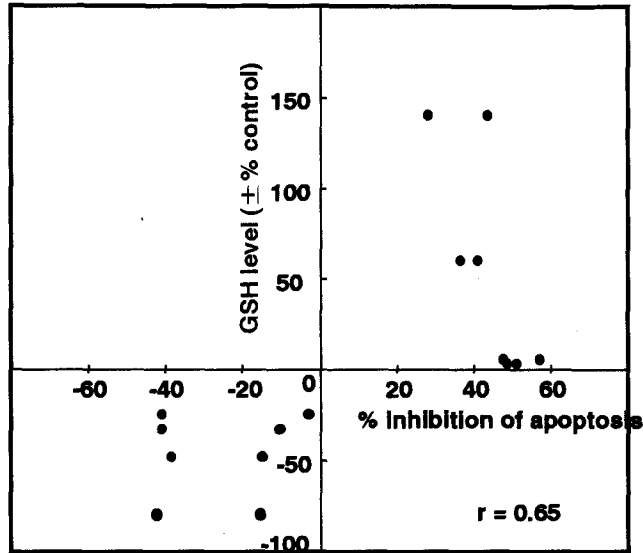
BSO ( $\mu$ M)	GSH level <sup>1)</sup>	TNF stimulation (ng/ml)		
		0	0.5	2
	(% control)	% apoptotic cells (% control)		
0	100	1.0±0.3	20.0±2.6 (100)	39.2±1.9 (100)
1	75.0±4.5	0.9±0.5	27.6±2.9 <sup>a</sup> (141)	40.1±0.7 (103)
5	51.9±3.7	1.0±0.2	27.3±1.2 <sup>b</sup> (138)	44.8±6.1 (115)
25	19.9±2.7	0.4±0.3	27.4±2.9 <sup>a</sup> (142)	44.3±2.0 (115)

Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were incubated with BSO for 24 h, and then treated with TNF for 3 h.

<sup>1)</sup> GSH level in cells after the BSO treatment

<sup>a</sup>  $p < 0.01$ , <sup>b</sup>  $p < 0.05$  (vs. without BSO)





**Fig. II-3 Relationship between GSH level and inhibition of apoptosis by antioxidants**

## 要約

抗酸化物質によるアポトーシス抑制作用とグルタチオン(GSH)レベルとの関連について調べた。

- (1) N-アセチルシステイン(NAC)、または 2-メルカプトエタノール(2-ME)、ビタミン E(VE)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)などの抗酸化物質により、TNF 誘導のアポトーシスは抑制されたが、その抑制率は 40 - 60 %にとどまった。
- (2) NAC または 2-ME を添加すると、TNF 非刺激時の GSH 量は増加していた(無添加に比し、NAC90 分添加で約 160%、2-ME 添加で約 250%)。この細胞を TNF で刺激すると細胞内 GSH 量は減少したが、NAC または 2-ME 添加群では、無添加群よりも GSH 量が高いレベルに維持されていた。
- (3) NAC または 2-ME を添加して 90 分後、細胞内 GSH レベルが上昇してから TNF で刺激すると、2-ME 添加群ではアポトーシスの抑制率が上昇する傾向が見られたが、NAC 添加群では変化がなかった。
- (4) VE または BHT を添加して 24 時間培養した細胞では、GSH 量の有意な増加が認められず、TNF 刺激による GSH の減少も見られなかった。VE、BHT の溶媒として使用したエタノール(最終濃度 0.25%)のみを添加した細胞でも TNF 刺激時において GSH 量が減少しなかった。GSH レベルは、エタノール添加によりその変動が押さえられ、TNF 刺激の影響を受けなくなったものと思われる。
- (5) GSH 合成阻害剤 BSO を  $1\mu\text{M}$  添加した細胞は、TNF 刺激(0.5ng/ml)によるアポトーシスを増加させたが、より高濃度の BSO により GSH レベルを更に減少させても、アポトーシスの割合は増加しなかった。

以上のことより、抗酸化物質によるアポトーシスの抑制効果と細胞内 GSH レベルとは弱い相関にあるが、すべての抑制効果を GSH レベルの上昇によっては説明できないことがわかった。