ベニバナ色素の抗疾病食品素材としての機能開発

五十嵐　喜　治　・　柳　沼　里　江
(山形大学農学部生物生産学科)

1. はじめに

ベニバナ（Safflower）はキク科のベニバナ属の植物に相当し，その学名（*Carthamus tinctrius* L.）は属名，種名のいずれも染色の意味を表わし，日本では古くから，アイ，ムラサキとともに代表的な天然染料の材料として栽培されてきた。日本ではとくに山形県最上川流域でひろく栽培されており，最近では化粧品素材，生花用として平地でも栽培されるようになった。しかしながら，最近では中国からの安価なベニバナの輸入が行われ，わが国での栽培量は急速に減少しつつある。ベニバナ（紅花）の花びら色素には口紅，ほほ紅などの化粧品材料として使用されているカルタミンの他，食用色素としても利用可能な黄色のサフロミン類[1,2]が含まれており，その利用範囲は極めて多岐に渡っている。一方，ベニバナは薬草としても古くから使用されており，月経不順，冷え症，更年期障害，血行障害などに対する効果他，最近では発がん抑制作用，抗アレルギー作用なども注目されるようになり[3,4]，各種生理機能の開発・探索が行われつつある。

本研究では，ベニバナがお茶として飲用されていること，また口紅，ほほ紅などの材料となるカルタミンを調製するに先だって抽出する黄色色素が食品添加物として利用されていること等に注目し，ベニバナ黄色色素のうち最も多く含まれているサフロミンAおよびベニバナ熱水抽出エキスの抗疾病食品素材としての機能を開発するため，それらが老化の進行と密接に関わる生体酸化を防御する機能について正常あるいはパラコート酸化ストレス負荷ラットを用いて検討を行った。

2. 実験材料と方法

（1）　エキスとサフロミンAの調製：予め凍結したベニバナ花弁に脱塩水を加え，沸騰下，30分抽出を行った。No. 2のろ紙上で吸引ろ過後，残渣については再度，同条件下で熱水抽出を行った。ろ液を合一後，ロータリーエバポレーターを用いて減圧下濃縮し，凍結乾燥を行ってベニバナ抽出エキスとした。ODS HG-5（4.6×150mm，野村化学）カラムを用い，2％メタノールを展開溶媒A，50％メタノールを展開溶媒Bとする HPLC分析（40分で溶媒Bが100％となるリニアグラジエンド；流速，1.0m*l*/分；検出：410nm）の結果，サフロミンA含量は約5％であった。一方，濃縮液を遠心分離後，その上清をn-ブタノール－酢酸－水＝4：1：5（v/v，上層）を展開溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し，粗サフロミンA画分を得た。次いで，50％メタノールを展開溶媒とするセファデックスLH-20カラムクロマトグラフィーで精製を繰り返し，得られたサフロミンA画分を濃縮後，凍結乾燥を行ってサフロミンAとした。HPLC上での純度は80％で，その他の成分としてイソサフロミンCを約20％含む標品であった。

（2）　ESR分析：水酸ラジカル（・OH）消去活性は1mMのDETAPAC（Diethylene

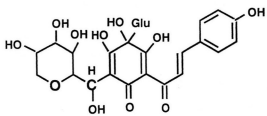

Fig.1 Chemical Structure of Safflomin A
Glu=Glucose

triaminepenta acetic acid）と1mMの硫酸第1鉄を含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.8）にサフロミンAあるいはエキス，さらにはDMPOと過酸化水素を加えて，1分後にシグナルを測定して算出した。スーパーオキシドアニオン（$\cdot O_2^-$）消去活性は2mMヒポキサンチンおよび1mM DETAPACを含むそれぞれの0.1mMリン酸緩衝液の混合液にサフロミンAあるいはエキス，さらにはDMPO，キサンチンオキシダーゼ（XOD）を加え，1分後にシグナルの測定を行い，消去活性を算出した。尚，測定機器には日本電子株式会社製ラジカルモニターFR-30を用いた。

（3） 飼料と動物：飼料は20%カゼイン食を基本食（20C食）とし，基本食にサフロミンAを0.05%あるいはベニバナエキスを0.83%を含む飼料をそれぞれ20C+Sa，20C+Se食とした。また，基本食に0.02%のパラコートを添加した飼料をそれぞれ，20C+PQ食とし，さらにSa，あるいはSeを添加した飼料をそれぞれ，20C+PQ+Sa，20C+PQ+Se食とした（**Table 1**）。飼料へのエキスの添加量は飼料中サフロミンAとして0.05%となるように調節した。動物には4週齢初体重60 g前後のウィスター系の雄ラットを用い，1群5-6頭としてそれぞれの飼料を11日間給与した。尚，ラットは個別のステンレス製ワイヤーケージに入れ，明暗サイクル12時間，室温22-25°C，湿度60%の条件下で飼育を行った。飼育最終日10時間絶食後，ネンブタール（大日本製薬）麻酔下開腹し，心臓からの採血と肝臓，肺の採取を行った。

（4） 溶血赤血球と肝ホモジネートの調製：採血した血液0.1mlを1.9mlの生理食塩水に加え，静かに撹拌・懸濁してから，1,400×gで10分間遠心分離を行い，赤血球と脂質過酸化物（TBARS=チオバルビツール酸反応生成物）を測定するための試料を調製した。赤血球は生理食塩水で洗浄後H_2Oで溶血し，カタラーゼ，グルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Px）の測定に使用した。また溶血赤血球に0.25倍容のエタノールと0.25倍容のクロロホルムを加えて撹拌後，

Table 1 Composition of the diets (%)

Ingredient	Diet					
	20C	20C+PQ	20C+Sa	20C+PQ+Sa	20C+Se	20C+PQ+Se
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
α-Cornstarch: Sucrose(2:1)	65.5	65.48	65.45	65.43	64.67	64.65
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Cornoil	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture[1]	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture[2]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Paraquat	—	0.02	—	0.02	—	0.02
safflomin A (Sa)	—	—	0.05	0.05	—	—
Safflower extract (Se)	—	—	—	—	0.83	0.83

20C, 20% casein diet; 20C+PQ, 20% casein diet with 0.02% paraquat; 20C+Sa, 20% casein diet with safflomin A; 20C+PQ+Sa, 20% casein diet with both 0.02% PQ and safflomin A; 20C+Se, 20% casein diet with safflower extract; 20C+PQ+Se, 20 casein diet with both 0.02% paraquat and safflower extract. [1]AIN-93G-MX and [2]AIN-93-VX were obtained from Oriental Co., Tokyo, Japan.

4℃下，1,400×gで5分遠心分離し，その上清を10mMリン酸緩衝液（pH7.8）に対して透析後，SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）の活性測定に用いた。

肝臓の各種抗酸化系酵素の測定には採取後直ちに切除した右葉部分をDel Boccioら[5]の方法に準じて調製した試料を用いて行った。即ち，切除した肝臓1gを予め冷却した1mM EDTAを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）5m*l*を用いてテフロン製ホモジナイザー中でホモジナイズを行った。次いで2倍容の2.3% KClを加えて再度ホモジナイズを行い，ホモジネートを4℃下，600×gで3分遠心分離を行った。得られた上清を4℃下，1,400×gで10分遠心分離を行い細胞破砕物を除去した。上清の一部を30Wの超音波装置（ブランソン1200モデル，ヤマト科学）で30秒づつ4回超音波処理を行い，次いで4℃下，10,000×gで20分遠心分離を行いミトコンドリア画分を沈澱として得た。沈澱を0.1Mリン酸緩衝液（pH 7.8）に懸濁後，超音波処理を2分行い，SODおよびカタラーゼ活性測定用試料とした。また上清は4℃下，100,000×gで60分遠心分離を行い，得られた上清をサイトゾール画分として，SOD，カタラーゼ，グルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Px）およびグルタチオンレダクターゼ（GSSG-R）の活性測定に使用した。

（5）酵素活性の測定：SOD活性は今成らの方法[6]に準じ，キサンチン－キサンチンオキシダーゼ－ニトロブルーテトラゾリュム（NBT）系を用いて，またカタラーゼ活性は富田らの方法に準じて分光光度法を用いて[7]，反応によって分解する過酸化水素の減少を240nmで経時的に測定して測定した。GSH-Px活性はLawrenceらの方法[8]に準じて基質として*t*-ブチルヒドロペルオキシドを使用し，また反応に基づくNADPHの減少を何らの方法[9]に準じて340nmで経時的に測定して測定した。SOD，カタラーゼ活性の1単位はそれぞれ，ヘモグロビンまたはタンパク質1mg当たりNBTからのジフォルマザン生成を50%阻害する酵素量，ヘモグロビンまたはタンパク質1mg当たり1分間に過酸化水素を1μmol分解する酵素量とした。GSH-Px，GSSG-Rの1単位はヘモグロビンまたはタンパク質1 mg当たり1分間にNADPHを1μmol分解する酵素量とした。

ヘモグロビンは和光純薬のヘモグロビンテストを用いて，またタンパク質はLowryらの方法[10]によって定量した。

（6）TBARSの測定：血清TBARS（チオバルビツール酸反応生成物）は八木の方法[11]に準じて測定し，血液1m*l*当たりのマロンジアルデヒド量（nmol）として算出した。肝臓のTBARS量は，その酵素活性測定用に調製したホモジネートを使用し，内山らの方法[12]によって定量した。

（7）脂質の分析：血清総コレステロール，トリアシルグリセロール，リン脂質濃度は，和光純薬から購入した市販キット，それぞれ，コレステロールE-テスト，トリグリセライドE-テスト，リン脂質B-テストを用い，酵素法で定量した。血清HDL-コレステロールは和光純薬製のHDL-コレステロールテストを用い，他のリポタンパク質をヘパリン－マンガン法で沈殿させた後[13]，酵素法で測定した。

肝臓脂質は凍結試料を用い，Folchらの方法[14]によって抽出・精製を行った。各脂質はコレステロールE-テストの代わりにモノテスト－コレステロール（ベーリンガーマンハイム山之内製）を使用し，その他は血清の場合と同様なキットを用いて測定した。

（8）還元型グルタチオンとシステインの定量：Takahashiらの方法[15]に準じて，採取後予め凍結を行った肝臓0.5gに5m*l*の0.0343M

EDTA と 5ml の30%メタリン酸を加え，氷冷下，ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズを行った。4℃下，2,500×g で15分遠心分離後，上清0.1ml に 5 N NaOH10μl，0.5Mホウ酸緩衝液（pH8.8）300μl，0.02M EDTA20μl，3 nM N-（9-acridinyl）maleimide（NAM）50μl を加えて20℃下で 3 時間反応を行った。DevelosilODS カラム（4.6×150mm，野村化学）を用い，Takahashi らの方法[15]と同様にして HPLC 分析を行った。

（9） 肺の分析：血液と肝臓を採取後，直ちに採取し，凍結保存した肺を TBARS と抗酸化系酵素の活性の測定に用いた。SOD，カタラーゼ，GSH-Px の活性測定では Paynter らの方法[16]に準じ，試料 1g を 5ml の0.2% Triton X-100（v/v）で 4℃下，ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズし，次いで，4℃下，10,000×g で30分遠心分離を行った。得られた上清に0.25倍容のエタノールと0.15倍容のクロロホルムを加えて攪拌後，4℃下，4,000×g で20分，遠心分離を行い，その上清を酵素の活性の測定に用いた。活性の測定法は肝臓の場合と同様にして行った。

（10） 統計分析：実験結果は平均値±標準誤差で表示し，二元配置分散分析を行った。効果（サフロミンAまたはベニバナエキスの有無，パラコートの有無，）および交互作用（サフロミンAまたはベニバナエキスの有無×パラコートの有無）の有意性は危険率 5 %で求めた。また，各群間の有意性（$p<0.05$）は，一元配置分散分析（ANOVA）を行った後，Dunncan の多重検定[17]を用いて検定した。尚，ANOVA の結果，有意な場合は各群間の有意性は Mann-Whitney 検定によって検定を行った[18]。

3. 結　果

（1） 活性酸素消去活性：動物実験に用いたベニバナエキス（Se）の HPLC パターンを **Fig.2** に示した。エキスに含まれるサフロミン中，最も多いのはサフロミンA（6.0%）で，次いでB，Cであった。サフロミンA，エキスの水酸ラジカル，スーパーオキシドアニオン消去活性の測定結果を **Fig.3**，**4** に示した。サフロミンA，エキスのいずれもラジカル消去活性を示したが，サフロミンAの1.5mg/ml 水溶液を用いた時の水酸ラジカル，スーパーオキシドアニオン消去活性はそれぞれ，8，60%，ベニバナエキスの10mg（サフロミンAとして0.6mg/ml）水溶液を用いた時の水酸ラジカル，スーパーオキシドアニオン消去活性はそれぞれ，22，88%を表示し，エキスにはサフロミンAの他，異なる活性酸素消去物質の存在が示唆された。

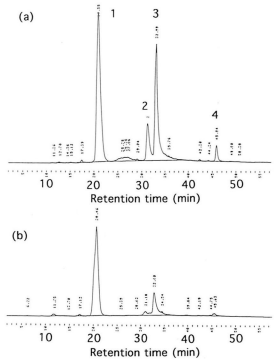

Fig.2 HPLC chromatograms of authentic Safflomins and safflower extract from Safflower Petals.
(a) authentic safflomins: 1, safflomin A; 2, safflomin C; 3, safflomin B; 4, isosafflomin C.
(b) safflower extract.

（2） サフロミンAの給与結果：基本食（20C），パラコート添加食（20C＋PQ），サフロミンA添加食（20C＋Sa），パラコート＋サフロミ

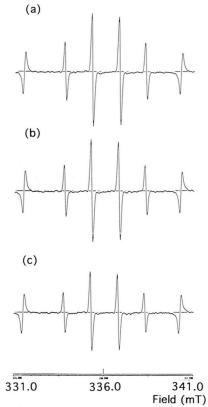

Fig.3 ESR spectra of spin adducts of ·OH generated by Fenton reaction in the presence of safflomin A or safflower extract.
(a) without sample, (b) in the presence of safflomin A, (c), in the presence of safflower extract. Measurement conditions: power, 4 mW; center field, 336.0 mT; sweep time, 2 min; modulation width, 79μT; time constant, 0.3 sec.

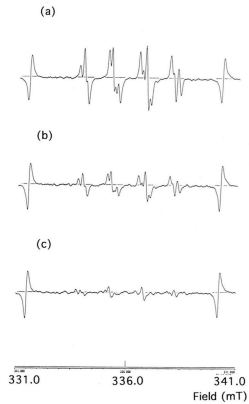

Fig.4 ESR Spectra of spin adducts of ·O_2 generated by hypoxanthine-xanthine oxidase system in the presence of safflomin A or safflower extract.
(a) without sample, (b) in the presence of safflomin A, (c), in the presence of safflower extract. Measurement conditions: power, 4 mW; center field, 336.0 mT; sweep time, 2 min; modulation width, 79μT; time constant, 0.3 sec.

ンA添加食（20C＋PQ＋Sa）を給与した時の飼料摂取量，体重の経日的変化を **Fig.5** に示した。飼料摂取量，体重増加量のいずれもサフロミンAの添加（20C＋Sa）による変動はみられなかったが，飼料へのパラコート添加で摂取量は8日以降，体重は9日以降に有意に低下した。また，パラコート添加食へのサフロミンA添加によって飼料摂取量，体重の低下は回復傾向にあったが有意な回復は認められなかった。

血清と肝臓のTBARS，ならびに赤血球と肝臓の抗酸化系酵素活性へのパラコート，サフロミンAの影響を **Table 2** に示した。赤血球カタラーゼ活性にはサフロミンAの影響が観察され，その給与により，活性が増加した。肝臓のSOD活性にはパラコートとサフロミンAの交互作用がみられ，サフロミンAによるパラコート給与時のカタラーゼ活性上昇作用が観察された。肝臓GSH-Px活性にもパラコートとサフロミンAの交互作用が観察された。肝臓ミトコンドリア画分のSOD，カタラーゼ活性はパラコートの給与で有意に低下し，カタラーゼ活性の低下は，サフロミンAの添加で抑制される傾向にあった。肝臓のTBARSはパラコートの給与で有意に上昇し，サフロミンAによって上昇が抑制される傾向を示した。

血清，肝臓脂質へのサフロミンAへの影響を **Table 3** に示した。肝臓中のトリアシルグリセロールはパラコートの給与で有意な低下を示し，そ

Table 2 Effects of safflomin A on the organ weights, serum and liver antioxidative enzyme activities, and TBARS of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Sa*1	20C+PQ+Sa*1	PQ*2	Sa*3	PQ×Sa*4
Initial body weight (g)	58.7±1.9	58.8±1.9	58.7±0.9	58.7±1.1	NS	NS	NS
Liver weight (g/100 g of body weight)	4.08±0.22	3.89±0.06	3.96±0.03	3.81±0.15	NS	NS	NS
Lung weight (g/100 g of body weight)	0.58±0.01[b]	1.18±0.08[a]	0.56±0.01[b]	0.94±0.08[a]	<0.002	<0.023	NS
Antioxidative enzyme activities in erythrocytes							
SOD (U/mg of Hb)	4.49±0.12	4.32±0.41	5.04±0.55	6.00±1.23	NS	NS	NS
Catalase (U/mg of Hb)	85±1[b]	101±8[ab]	126±11[a]	133±26[ab]	NS	<0.023	NS
GSH-Px (U/mg of Hb)	0.24±0.03	0.24±0.03	0.28±0.02	0.34±0.08	NS	NS	NS
in liver							
in cytosol fraction							
SOD (U/mg of protein)	3.14±0.16	3.01±0.12	2.97±0.08	3.35±0.08	NS	NS	<0.037
Catalase (U/mg of protein)	265±18	262±3	249±23	260±30	NS	NS	NS
GSH-Px (U/mg of protein)	0.70±0.06	0.58±0.05	0.63±0.05	0.79±0.07	NS	NS	<0.035
GSSG-R ($U\times10^{-2}$/mg of protein)	9.81±0.42	10.1±0.4	9.54±0.5	10.8±0.4	NS	NS	NS
in mitochondria fraction							
SOD (U/mg of protein)	4.48±0.52[a]	2.92±0.28[b]	4.19±0.35[a]	3.04±0.24[b]	<0.002	NS	NS
Catalase (U/mg of protein)	281±38[a]	88±7[b]	277±25[a]	116±9[b]	<0.002	NS	NS
Serum TBARS (nmol/ml of blood)	1.87±0.13	1.80±0.21	2.11±0.22	1.92±0.24	NS	NS	NS
Liver TBARS (nmol/mg of lipid)	0.85±0.04[b]	1.32±0.10[a]	0.87±0.03[b]	1.19±0.07[a]	<0.002	NS	NS

Values are Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflomin A (Sa) in diets. *4Interaction between PQ and Sa. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

Table 3 Effects of safflomin A on the serum and liver lipid concentrations of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Sa*1	20C+PQ+Sa*1	PQ*2	Sa*3	PQ×Sa*4
Serum lipids							
Total cholesterol (mmol/l)	1.86±0.06	1.96±0.23	1.98±0.06	1.75±0.21	NS	NS	NS
HDL-cholesterol (mmol/l)	1.47±0.03	1.58±0.18	1.70±0.09	1.38±0.18	NS	NS	NS
Triacylglycerol (mmol/l)	0.55±0.12[a]	0.23±0.03[b]	0.38±0.03[a]	0.25±0.01[b]	<0.027	NS	NS
Phospholipid (mmol/l)	1.45±0.10[a]	1.19±0.17[ab]	1.51±0.04[a]	1.01±0.05[b]	<0.002	NS	NS
Liver lipids							
Total cholesterol (μmol/g of liver)	4.74±0.19	4.58±0.15	4.83±0.13	4.54±0.34	NS	NS	NS
Triacylglycerol (μmol/g of liver)	11.6±1.7[a]	1.94±0.49[b]	10.6±1.0[a]	2.31±0.29[b]	<0.002	NS	NS
Phospholipid (μmol/g of liver)	16.7±0.2	17.4±0.2	16.5±0.3	16.5±0.54	NS	NS	NS

Values are Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflomin A (Sa) in diets. *4Interaction between PQ and Sa. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

の低下はサフロミンAの添加で抑制される傾向を示した。その他の脂質では基本食（20C）あるいはパラコート食（20C＋PQ）へのサフロミンA添加による有意な変動はみられなかった。

Table 4 に示すように肝臓のグルタチオン，システイン含量はいずれも，パラコートの給与で低下傾向を示し，サフロミンAの添加はその低下傾向を抑制する傾向にあった。肺のTBARSと抗

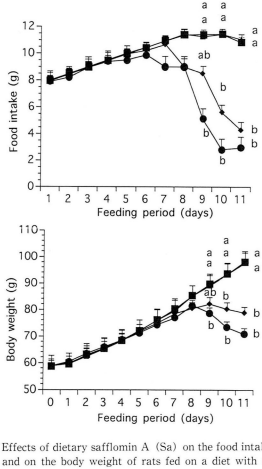

Fig.5 Effects of dietary safflomin A (Sa) on the food intake and on the body weight of rats fed on a diet with or without paraquat.
▲, 20C diet; ●, 20C+PQ diet; ■, 20C+Sa diet; ◆, 20C+PQ+Sa diet.
Each symbol is expressed as mean±SE. Values not sharing a common letter are significantly different at P<0.05 within each indicated day.

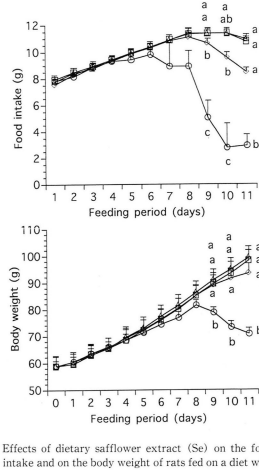

Fig.6 Effects of dietary safflower extract (Se) on the food intake and on the body weight of rats fed on a diet with or without paraquat.
△, 20C diet; ○, 20C+PQ diet; □, 20C+Se diet; ◇, 20C+PQ+Se diet.
Each symbol is expressed as mean±SE. Values not sharing a common letter are significantly different at P<0.05 within each indicated day.

Table 4 Effects of safflomin A on the liver glutathione and cysteine contents of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Sa*1	20C+PQ+Sa*1	PQ*2	Sa*3	PQ×Sa*4
GSH (μmol×10^{-3}/g of liver)	2.79±0.40	2.09±0.67	3.21±0.77	2.73±0.51	NS	NS	NS
Cys (μmol×10^{-2}/g of liver)	2.96±0.40	2.02±0.31	2.78±0.52	2.61±0.72	NS	NS	NS

Values are Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflomin A (Sa) in diets. *4Interaction between PQ and Sa. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

酸化系酵素活性を **Table 5** に示した。肺のSOD活性には，パラコートとサフロミンAの交互作用がみられ，サフロミンAはパラコートによる活性の上昇を抑制した。カタラーゼ活性はパラコートの給与により低下傾向，パラコートへのサフロミンAの添加でその低下が抑制される傾向にあった。

（3）　ベニバナエキスの給与結果：ベニバナエキス給与に伴う飼料摂取量と体重の変化を **Fig.6** に，また肝臓および肺重量，さらには血清，肝臓のTBARSと抗酸化系酵素活性の測定結果を **Table 6** に示した。体重100g当たり肺重量には，パラコート，ベニバナエキスの影響，さらにはパ

Table 5 Effects of safflomin A on the lung TBARS content and antioxidative enzyme activities of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Sa*1	20C+PQ+Sa*1	PQ*2	Sa*3	PQ×Sa*4
TBARS (nmol/g of lung)	131±7	120±5	133±1	120±8	NS	NS	NS
SOD (U/mg of protein)	2.99±0.08	3.45±0.23	3.39±0.16	2.98±0.14	NS	NS	<0.016
Catalase (U/mg of protein)	33.8±1.5	27.5±1.6	34.9±2.3	32.6±3.6	NS	NS	NS
GSH-Px ($U\times10^{-2}$/mg of protein)	6.7±1.2	6.3±0.6	5.6±0.5	5.8±1.0	NS	NS	NS

Values are Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflomin A (Sa) in diets. *4Interaction between PQ and Sa. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

Table 6 Effects of safflower extract on the organ weights, serum and liver antioxidative enzyme activities, and on the TBARS of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Se*1	20C+PQ+Se*1	PQ*2	Se*3	PQ×Se*4
Initial body weight (g)	58.7±1.9	58.8±1.9	58.7±1.6	58.8±2.0	NS	NS	NS
Liver weight (g/100 g of body weight)	4.08±0.22	3.89±0.06	3.96±0.14	3.66±0.11	NS	NS	NS
Lung weight (g/100 g of body weight)	0.58±0.01[c]	1.18±0.08[a]	0.55±0.01[c]	0.68±0.01[b]	<0.002	<0.002	<0.002
Antioxidative enzyme activities in erythrocytes							
SOD (U/mg of Hb)	4.49±0.12	4.32±0.41	5.08±0.43	6.15±0.78	NS	<0.041	NS
Catalase (U/mg of Hb)	85±1	101±8	110±13	129±18	NS	<0.039	NS
GSH-Px (U/mg of Hb)	0.24±0.03	0.24±0.03	0.26±0.04	0.37±0.06	NS	NS	NS
in liver							
in cytosol fraction							
SOD(U/mg of protein)	3.14±0.16	3.01±0.12	3.04±0.08	3.11±0.09	NS	NS	NS
Catalase(U/mg of protein)	265±18[ab]	262±3[a]	243±8[ab]	228±9[b]	NS	<0.021	NS
GSH-Px(U/mg of protein)	0.70±0.06	0.58±0.05	0.68±0.02	0.62±0.05	NS	NS	NS
GSSG-R ($U\times10^{-2}$/mg of protein)	9.81±0.42[b]	10.1±0.4[b]	10.4±0.2[b]	12.0±0.7[a]	NS	<0.016	NS
in mitochondria fraction							
SOD(U/mg of protein)	4.48±0.52	2.92±0.28	3.72±0.37	3.54±0.40	<0.047	NS	NS
Catalase(U/mg of protein)	281±38[a]	88±7[b]	226±23[a]	176±36[a]	<0.002	NS	<0.025
Serum TBARS (nmol/ml of blood)	1.87±0.13	1.80±0.21	1.73±0.13	1.64±0.16	NS	NS	NS
Liver TBARS (nmol/mg of lipid)	0.85±0.04[b]	1.32±0.10[a]	0.95±0.04[b]	0.92±0.07[b]	<0.006	NS	<0.002

Valuesare Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflower extract (Se) in diets. *4Interaction between PQ and Se. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

ラコートとベニバナエキスの交互作用が認められた。血清 TBARS には，パラコートおよびベニバナエキスの影響がみられなかったが，肝臓 TBARS にはパラコートの影響およびパラコートとベニバナエキスの交互作用がみられ，エキスはパラコートによる TBARS の上昇を抑制した。また，ベニバナエキスはパラコートによる体重100g 当たりの肺重量の有意な増加を有意に抑制した。赤血球 SOD およびカタラーゼ活性にはベニバナエキスの効果が観察され，エキスによる活性の上昇が観察された。肝臓サイトゾール画分のカタラーゼおよび GSSG-R 活性にはエキスの影響がみられ，エキスによりカタラーゼ活性は低下を，GSSG-R 活性は上昇を示した。またミトコ

Table 7 Effects of safflower extract on the serum and liver lipid concentrations of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Se*1	20C+PQ+Se*1	PQ*2	Se*3	PQ×Se*4
Serum lipids							
Total cholesterol (mmol/*l*)	1.86±0.06[a]	1.96±0.23[ab]	1.99±0.08[a]	1.65±0.04[b]	NS	NS	NS
HDL-cholesterol (mmol/*l*)	1.47±0.03	1.58±0.18	1.64±0.09	1.42±0.07	NS	NS	NS
Triacylglycerol (mmol/*l*)	0.55±0.12[a]	0.23±0.03[b]	0.54±0.11[a]	0.36±0.07[ab]	<0.012	NS	NS
Phospholipid (mmol/*l*)	1.45±0.10	1.19±0.17	1.52±0.05	1.16±0.10	<0.012	NS	NS
Liver lipids							
Total cholesterol (μmol/g of liver)	4.74±0.19	4.58±0.15	4.63±0.15	4.92±0.18	NS	NS	NS
Triacylglycerol (μmol/g of liver)	11.6±1.7[a]	1.94±0.49[c]	8.03±0.91[ab]	5.49±0.83[b]	<0.002	NS	<0.004
Phospholipid (μmol/g of liver)	16.7±0.2	17.4±0.2	16.8±0.3	17.9±0.6	<0.025	NS	NS

Values are Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflower extract (Se) in diets. *4Interaction between PQ and Se. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

Table 8 Effects of safflower extract on the liver glutathione and cysteine contents of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Se*1	20C+PQ+Se*1	PQ*2	Se*3	PQ×Se*4
GSH (μmol×10^{-3}/g of liver)	2.79±0.40[ab]	2.09±0.67[ab]	3.37±0.23[a]	2.15±0.15[b]	<0.033	NS	NS
Cys (μmol×10^{-2}/g of liver)	2.96±0.40	2.02±0.31	2.52±0.72	2.36±0.55	NS	NS	NS

Values are Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflower extract (Se) in diets. *4Interaction between PQ and Se. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

Table 9 Effects of safflower extract on the lung TBARS content and antioxidative enzyme activities of rats fed on the diets with or without paraquat.

	Diet group				ANOVA (P value)		
	20C*1	20C+PQ*1	20C+Se*1	20C+PQ+Se*1	PQ*2	Se*3	PQ×Se*4
TBARS (nmol/g of lung)	131±7[ab]	120±5[b]	138±1[a]	126±8[ab]	NS	NS	NS
SOD (U/mg of protein)	2.99±0.08	3.45±0.23	3.02±0.10	2.84±0.17	NS	NS	NS
Catalase (U/mg of protein)	33.8±1.5[bc]	27.5±1.6[c]	35.8±2.1[b]	42.8±3.4[a]	NS	<0.002	<0.010
GSH-Px (U×10^{-2}/mg of protein)	6.7±1.2	6.3±0.6	4.6±1.0	5.8±0.8	NS	NS	NS

Values are Means±SE of 5 or 6 rats per group. *1See legend to **Table 1**. *2Effect of paraquat (PQ) in diets. *3Effect of safflower extract (Se) in diets. *4Interaction between PQ and Se. Within rows, means with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

ンドリア画分のカタラーゼ活性はパラコートの給与で有意に低下し，ベニバナエキスの添加はその低下を抑制した。

血清および肝臓の脂質濃度を **Table 7** に示した。血清トリアシルグリセロール濃度にはパラコートの影響が観察され，その濃度が有意に低下した。またベニバナエキスの飼料への添加はその低下を緩和する傾向にあった。肝臓トリアシルグリセロール濃度にはパラコートの影響と，パラコートとエキスの交互作用がみられ，エキスはパラコートによるトリアシルグリセロールの低下を有意に抑制した。**Table 8** に示すように肝臓グルタチオン量にはパラコートの影響が観察され，その添加で低下傾向を示したが，ベニバナエキスの添加はその低下を抑制する傾向にあった。肝臓システイン量はパラコートの添加で低下傾向，パラコート添

加飼料へのエキスの添加で低下がわずかながら抑制される傾向にあった。

ベニバナエキスの肺TBARS，抗酸化系酵素活性への影響を **Table 9** に示した。TBARS値にはパラコート，エキスの影響がみられなかったが，カタラーゼ活性にはエキスの影響，さらにはパラコートとエキスの交互作用が観察され，エキスはパラコート給与時にカタラーゼ活性を上昇させる作用を示した。また，カタラーゼ活性はパラコートの給与で低下傾向，エキスの添加で低下の抑制作用を示した。SOD，GSH-Px活性にはパラコート，エキスの影響はみられなかった。

4. 考　察

ベニバナエキスに含まれる黄色色素のうち最も多い，サフロミンAは水酸ラジカル，スーパーオキシドアニオンのいずれも消去する活性を示したが，サフロミンA含量の少ないエキスの方が，サフロミンAよりも強いラジカル消去活性を示し，エキス中にはサフロミンAと異なるラジカル消去活性物質，あるいはサフロミンAの消去活性を助長する成分の存在することが示唆された。強い活性酸素消去能はベニバナエキスの活性酸素消去食品素材としての利用・開発の点から興味深い。パラコートによる生体内酸化ストレスはNADPH-シトクロムP-450還元サイクルによるスーパーオキシドアニオンの生成と，それに引き続く活性酸素種の生成が原因となることが知られていることから[19]，サフロミンA，ベニバナエキスの活性酸素消去能はこれらが生体内に取り込まれたさい，生体酸化に防御的に作用することが期待できる。

サフロミンAはパラコートによる飼育後半における飼料摂取量，および体重の減少を緩和する傾向を示し（**Fig.5**），パラコートによる生体内活性酸素の生成が原因となる酸化ストレスを防御する可能性を示した。また，肝臓ミトコンドリア画分におけるカタラーゼ活性のパラコート給与に伴う低下とサフロミンAの添加による回復傾向，肝臓TBARSのパラコートによる上昇とサフロミンA添加による上昇の抑制傾向（**Table 2**），肝臓トリアシルグリセロールのパラコート給与に伴う低下と，サフロミンA添加による低下の抑制傾向，さらにはパラコート給与に伴う肝臓還元型グルタチオン量の低下と，サフロミンA添加による低下の抑制傾向（**Table 5**）はいずれもサフロミンAが生体内酸化に防御的に作用していることを示唆しているものと推察される。パラコートが蓄積されやすい肺においては[20]TBARS，SOD，カタラーゼ，およびGSH-Px活性のいずれにおいても有意な差はなかったが，カタラーゼ活性はパラコートで低下傾向，パラコート食へのサフロミンAの添加でその低下が抑制される傾向にあった。

パラコート食へのベニバナエキスの添加は，パラコートによる飼育後半における飼料摂取量と体重の減少を有意に抑制した（**Fig.6**）。また，パラコートによる肝臓TBARSの有意な上昇を有意に抑制した。パラコート給与に伴う肝臓ミトコンドリア画分のカタラーゼ活性の低下もエキス添加で緩和されたが，緩和はベニバナエキスがサフロミンAに比べて遥かに強く（**Table 6**），ベニバナエキスの強い生体内酸化防御機能が推察された。ベニバナエキスにおいてはサフロミンAの場合とは異なり，肝臓の他，血清においてもパラコートによるトリアシルグリセロールの低下を抑制し，また肺におけるカタラーゼ活性ではその低下を抑制するより，むしろ上昇させる傾向にあり（**Table 7，9**），ベニバナエキスが生体内抗酸化系酵素の高い活性維持作用を通して生体酸化に防御的に作用することが推察された。

サフロミンA，ベニバナエキスのいずれも肝臓中の還元型グルタチオン濃度を上昇させる傾向にあり，活性の発現にグルタチオンを必要とする

GSH-Px，GSSG-R の円滑な活性発現に奏功するものと推察される。サフロミン類はフェノール性水酸基を有することから，その還元性を利用してパラコートによる生体内還元型グルタチオンの消費[21]を節約していることも十分考慮されるが，その詳細については検討が必要とされる。

飼料に添加したベニバナエキスの中のサフロミンA量はサフロミンA添加飼料中のサフロミンA量と同じことから，エキスの強い効果を考慮した場合，エキス中にはサフロミンAとは異なる生体酸化防御成分あるいは，サフロミンAの効果を助長する成分の存在することが推察され，今後の解明が待たれる。ベニバナの色素成分，特にサフロミン類の食品添加物としての利用は今回明らかにされたサフロミンAの生体酸化防御機能の点からその利用の拡大が期待されるが，精製前のエキスの状態での食品素材としての利用もその強い生体酸化防御機能の視点から，今後考慮すべき事項と考えられる。

5. 要　約

ベニバナに含まれる黄色色素の中で最も多いサフロミンA，およびベニバナの熱水抽出液（ベニバナエキス）の活性酸素消去活性，さらにはそれらが正常，およびパラコート酸化ストレス負荷ラットの血清・肝臓の脂質過酸化，脂質濃度，抗酸化系酵素活性に及ぼす影響について比較検討した。

サフロミンA，ベニバナエキスのいずれも *in vitro* において水酸ラジカル，スーパーオキシドアニオン消去活性を有すること，またサフロミンAよりベニバナエキスの方が消去活性の高いことがESRの測定結果より示された。

サフロミンAは飼育後半におけるパラコートによる飼料摂取量，体重の低下を緩和する傾向，また，パラコートによる肝臓脂質過酸化物（TBARS）の上昇を抑制する傾向，さらにはパラコートによる肝臓ミトコンドリア画分のカタラーゼ活性の低下の抑制，肝臓トリアシルグリセロール濃度と還元型グルタチオン濃度の低下を抑制する傾向を示した。

ベニバナエキスにおいてもサフロミンAと同じような効果を示したが，作用効果はサフロミンAに比べて遥かに強く，エキスにはサフロミンAとは異なる生体酸化防御機能性成分，あるいはサフロミンAの効果を助長する成分の含まれていることが推察された。

本研究を遂行するにあたり，研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団，また，既知試料としての各種サフロミン類をご恵与いただいた山形大学工学部小野寺準一教授に心から感謝の意を表します。

文　献

1) 小原平太郎，小野寺準一，佐藤慎吾：ベニバナの紅色色素カルタミン，山形大学紀要（工学），22巻2号，91-104 (1993)
2) J-I. Onodera, H. Obata, M. Osone, Y. Maruyama, and S. Sato: The Structure of Safflomi-A, a component of safflower yellow, *Chemistry* Letters., 433-436 (1981)
3) 水野瑞夫監修：日本薬草全書，p.556-568，新日本法規出版株式会社 (1995)
4) M. Toyoda, K. Tanaka, K. Hoshino, H. Akiyama, A. Tanimura, and Y. Saito: Profiles of Potentially Antiallergic Flavonoids in 27 Kinds of Health Tea and Green Tea Infusions, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2561-2564 (1997)
5) G. Del Boccio, D. Lapenna, E. Porreca, A. Pannelli, F. Savini, P. Feliciani, G. Ricci, and F. Cuccurulle: Aortic antioxidant defence mechanism: time related changes in cholesterol-fed rabbits, *Atherosclerosis*, 81, 127-135 (1990)
6) 今成登志男，広田元子，宮崎元一，早川和一，田村善蔵：Superoxide dismutase の活性測定法の改良，医学のあゆみ，101，496-497 (1977)
7) 富田勲，佐野満昭：過酸化脂質実験法，金田尚志，植田伸夫編，医歯薬出版，149-150頁

8) R.A. Lawrence and R.F. Burk: Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 952-958 (1990)

9) 何 普明，安本教傳：老化促進マウス赤血球の細胞齢によるグルタチオンペルオキシダーゼ活性と酸化タンパク質レベルの変化，日本栄養・食糧学会誌，43，121-125 (1990)

10) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.J. Farr and R.J. Randahl: Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem*, 193, 265-267 (1951)

11) K.Yagi: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochemical Medicine*, 15, 212-216 (1976)

12) M. Uchiyama and M. Mihara: Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test, *Anal. Biochem.*, 86, 271-278 (1978).

13) M. Burstein, H.R. Scholnick R. Morfin: Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J. Lipid Res.*, 11, 583-595 (1970).

14) J. Folch, M. Lees and G.H. Sloane-Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).

15) H.Takahashi, Y. Nara, H. Meguro and K.Tsujimura: A sensitive fluorometric method for the determination of glutathione and some thiols in blood and mammalian tissues by high performance liquid chromatography, *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1439-1445 (1979).

16) D. I. Paynter, R. J. Moir and E. J. Underwood: Changes in activity of the Cu-Znsuperoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with changes in dietary copper, *J. Nutr.*, 109, 1570-1576 (1979).

17) 柴田寛三：生物統計学序説，創文社（東京），pp64-78 (1974)

18) 市原清志：バイオサイエンスの統計学，南江堂（東京），pp90-99 (1990).

19) S. Kojima, Y. Miyazaki, T. Honda, M. Kiyozumi, H. Shimada, and T. Funakoshi: Effect of L-cysteine on toxicity of paraquat in mice, *Toxicology Letters*, 60, 75-82 (1992).

20) C. Bismuth, R. Garnier, F. J. Baud, J. Muszynski: Paraquat poisoning, An overview of current status, *Drug Safty*, 5, 243-251 (1990).

21) L. Eklow-Lastrom, L. Lossi, H. Thor, and S.Orrenius: Effects of oxidative stress caused by hyperoxia and diquat. A study in isolated hepatocytes. *Free Radical Res. Commun.*, 2, 57-68 (1986).

Development of Functions of Safflower Pigments as Food Material Availableto Prevent Disease

Kiharu Igarashi and Satoe Yaginuma

(Department of Bioproduction, Faculty of Agriculture, Yamagata University)

Safflomin A, which is the most abundant yellow pigment contained in safflower petals, and an extract prepared from petals by extracting them with boiled water (safflower extract) was analyzed for its radical scavenging activity *in vitro*. The protective effects of safflomin A and safflower extract from oxidative stress were also determined by measuring their effects on serum and liver lipid peroxidation and on the serum and liver lipid levels, as well as the antioxidative enzyme activities in rats with or without paraquat-induced oxidative stress.

Both the safflomin A and safflower extract showed hydroxyl radical and superoxide anion scavenging activities, with higher scavenging activity in the safflower extract than in the safflomin A, suggesting that it have other compounds which scavenge radicals or strengthen the radical scavenging activity of safflomin A.

Safflomin A tended to suppress a decrease in food intake and body weight, and to suppress an increase in the lipoperoxide (TBARS) content which was caused by paraquat feeding late in the feeding periods. Safflomin A also tended to suppress a decrease in the catalase activity in liver mitochondrial fraction and to suppress decreases in liver triacylglycerol and reduced glutathione levels in rats subjected to oxidative stress by paraquat. Safflower extract also acted preventively against paraquat-induced oxidative stress the same as did safflomin A. However, the activities of safflower extract were stronger than those in safflomin A, suggesting that other active compounds which may prevent oxidative stress *in vivo* or enhance the effects of safflomin A *in vivo*, may be involved in the extract.