

Original article

## Glycative stress-alleviating effects of black beans

Saki Yokota, Masayuki Yagi, Chieko Sakiyama, Yoshikazu Yonei

Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,  
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2025; 12 (4): 140-155

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

## 黒豆の糖化ストレス緩和作用

横田早貴、八木雅之、崎山智恵子、米井嘉一

同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター

### 抄録

**[目的]** 糖化反応は、還元糖並びに派生して生じたアルデヒドが生体内の蛋白質のアミノ基と非酵素的に結合し、終末糖化産物 (advanced glycation end products : AGEs) の生成に至る反応である。AGEsは加齢とともに身体のさまざまな組織・臓器に蓄積して炎症や着色、生理的機能低下を引き起こし、生活習慣病の発症や進展に関与する。本研究は、黒豆の糖化ストレス緩和作用を検証した。

**[方法]** 試料には市販の黒豆 7 品種と大豆 1 品種、イソフラボン 12 種、及び cyanidine-3-glucoside (C3G) を使用した。黒豆試料はフードプロセッサーを用いて粉碎後、80°Cの熱水で 1 時間抽出し、抽出液を得た。さらに別途、豆を種皮と子葉部に分けて同様に抽出液を得た。糖化反応抑制作用は、黒豆をヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) - Glucose 糖化反応モデルに添加後、加熱反応させ、蛍光性 AGEs 生成抑制作用を測定した。抗酸化作用は DPPH 法により測定した。抽出液のイソフラボン量及び C3G 量は、逆相 HPLC を用いて測定した。黒豆摂取における食後血糖抑制の影響の測定として  $\alpha$  グルコシターゼ阻害作用と黒豆摂取による血糖上昇抑制作用を測定した。

**[結果]** 糖化反応抑制作用は全試料の大豆、黒豆に認められた。大豆よりも黒豆の方が蛍光性 AGEs 抑制率は高かった。黒豆の種類ごとの蛍光性 AGEs 生成抑制率の比較では黒千石が最大で  $85.3 \pm 2.5\%$  (平均値  $\pm$  標準偏差) であった。黒豆の種皮と子葉部で分けた糖化反応抑制率はすべての品種において子葉部より種皮の方が高く、最大は種皮では  $99.7 \pm 0.28\%$ 、子葉部では  $58.5 \pm 1.05\%$  であった。抗酸化作用は全品種の黒豆

連絡先：教授 米井嘉一

同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター／

糖化ストレス研究センター

〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

TEL&FAX:0774-65-6394 e-mail: yyonei@mail.doshisha.ac.jp

共著者：横田早貴 ctug2031@mail4.doshisha.ac.jp;

崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2025; 12 (4): 140-155

本論文を引用する際はこちらを引用してください。

(c) Society for Glycative Stress Research

で認められた。黒豆（固形分濃度 7.5 mg/mL）の抗酸化作用は最大で 286.1  $\mu\text{mol}$ -Trolox 当量 / L であった。イソフラボン量は子葉部より種皮の方が多く存在した。C3G は種皮部にのみ認められた。

**【結論】** 黒豆は蛍光性 AGEs 抑制作作用、及び抗酸化作用を有し、糖化ストレス緩和作用を有する食品であることが示唆された。

**KEY WORDS:** 黒豆、糖化、終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs)、抗酸化能、cyanidine-3-glucoside

## はじめに

グルコースやフルクトースなどの還元糖は、生命活動において必要不可欠な栄養素である。しかし、これらの還元糖は、生体内の蛋白質のアミノ基と非酵素的に結合する。この反応は糖化反応 (glycation) と呼ばれ、糖化反応中間体産生を経て糖化最終生成物 (advanced glycation end products : AGEs) の生成に至る<sup>1)</sup>。身体におけるこの間の反応課程は、食後高血糖（特にグルコース濃度 140 mg/dL 以上の血糖スパイク）を契機として開環型グルコース／環状型グルコース平衡状態が乱れ、露出したアルデヒド基 (-CHO) と周囲の物質と反応連鎖を起こし、多種類の糖質由来短鎖アルデヒドを生成、これらが遊離脂肪酸と反応して別の脂質由来アルデヒドを生成する<sup>2,3)</sup>。我々はこの現象をアルデヒドスパークと名付けた<sup>4)</sup>。食品におけるメイラード反応課程では、開環型グルコースの露出したアルデヒド基と蛋白質やペプチドのアミノ基との反応（シフ塩基ならびにアマドリ化合物形成）に端を発するが、途中で生じた糖質由来アルデヒド (glyoxal: GO, methylglyoxal: MGO, 3-dooxyglucosone: 3DG) が中間体として作用して、様々な過程を経て AGEs を生成する。一方ヒトでは、アルデヒドスパークによって大量に生じたアルデヒドはカルボニル化を惹起するだけなく中間体としても作用し、メイラード反応に比べて短期間に生体内蛋白質を AGEs に変化させる。血中アルデヒドは血中物質や血管内皮細胞表面と反応するだけなく、細胞膜を通して細胞内や組織内蛋白質を修飾して AGEs 化して、その結果蛋白質の生理的な機能を障害する。

AGEs は加齢とともに身体のさまざまな組織・臓器に蓄積して炎症や着色、生理的機能低下を引き起こし、糖尿病合併症や眼疾患<sup>5)</sup>、皮膚老化<sup>6)</sup>、骨粗鬆症<sup>7)</sup>、アルツハイマー型認知症<sup>8)</sup>、動脈硬化症<sup>9)</sup>などの生活習慣病の発症や進展に関与する。糖化反応による老化や疾患リスクの一連の概念は糖化ストレスと呼ばれている。近年、糖化ストレスは老化を促進する危険因子の一つであるとされている。

黒豆 (Glycine max 'Kuromame') は植物性エストロゲンであるイソフラボンを含む大豆 (Glycine max (L.) Merrill) の仲間であること、そして、先行研究で酸化ストレス抑制

作用が報告されている<sup>10)</sup>。

糖化ストレスの低減には、高血糖の抑制、糖化反応の抑制、糖化反応生成物の分解・排泄などが挙げられる<sup>11,12)</sup>。本研究では黒豆の糖化ストレス低減作用に着目し、蛍光性 AGEs 生成抑制作作用、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用、黒豆摂取による血糖値上昇抑制作用を検証した。

## 方法

### (1) 試薬

糖化反応のモデル蛋白は、ヒト血清アルブミン (human serum albumins: HSA, lyophilized powder,  $\geq 96\%$ , agarose gel electrophoresis) を Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA) から購入して使用した。その他の試薬は特級または HPLC グレードのものを富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪市) またはナカライテスク株式会社 (京都市) から購入して使用した。

### (2) 試料の調製

試料には市販の黒豆 7 品種と大豆 1 品種 (**Table 1**)、イソフラボン 12 種、及び cyanidine-3-glucoside (C3G) を使用した。豆試料はフードプロセッサーを用いて粉碎後、80 °C の熱水で 1 時間抽出し、抽出液を得た。さらに別途、豆を種皮と子葉部に分けて同様に抽出液を得た。試料の固形分濃度 (mg/mL) は、5 mL の試料抽出液をアルミトレイにのせ、120 °C、120 分の乾燥前後で重量測定し算出した。実験には豆全体試料抽出液は固形分濃度が 3 mg/mL、7.5 mg/mL、10 mg/mL になるように、豆部位別試料抽出液は固形分濃度が 3 mg/mL になるように精製水で調製して使用した。配糖体 3 種、アグリコン 3 種をそれぞれジメチルスルホキシド、エタノールを添加して完全に溶解し、0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 2.6) で調節した。アセチル化配糖体 3 種、マロニル化配糖体 3 種は始めからエタノール溶解されたものを使用した。aminoguanidine (AG) は精製水で 1 mg/mL に調製した。acarbose は精製水で 3.3 mg/mL に調製した。

**Table 1. Sample profile.**

No.	Sample name	Production area	Manufacture/Seller	
1	Tanbabudoukuromame	Kyoto	Kyo no Kuromame Kitao	Black beans
2	Hikarikurodaizu	Hokkaido	JAJA Obihiro Kawanishi Agricultural Cooperative	Black beans
3	Hakodatekuromame	Hokkaido	TOMIZAWA SHOTEN CO., LTD.	Black beans
4	Tanbakuromame (bittyu) kuronowarai	Okayama	TOMIZAWA SHOTEN CO., LTD	Black beans
5	Gannkuimame	Iwate	TOMIZAWA SHOTEN CO., LTD	Black beans
6	Tanbakuromame (tobikiri)	Hyogo	TOMIZAWA SHOTEN CO., LTD	Black beans
7	Kurosengoku	Hokkaido	TOMIZAWA SHOTEN CO., LTD	Black beans
8	Daizu	Hokkaido	Hokuren Federation of Agricultural Cooperatives	Soybeans

### (3) 糖化反応抑制作用の検証

糖化反応抑制作用の検証にはヒト血清アルブミン-グルコース (HSA-Glucose) 糖化反応モデルを使用した<sup>13)</sup>。糖化反応液は、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)、2.0 mol/L glucose、40 mg/mL HSAを調製した後、それぞれ終濃度 0.05 mol/L、0.2 mol/L、8 mg/mL、試料を1/5濃度になるよう添加した。その後、糖化反応液を60°Cで40時間反応させた後、マイクロプレートリーダーでAGEs由来蛍光(励起波長370 nm/検出波長440 nm)を測定した。対照(reference: ref)は、黒豆の代わりに等量の精製水を加え、同条件で反応させた。蛍光性AGEs生成抑制作用の陽性対照にはAGEs生成阻害剤として知られているAG 1 mg/mLを試料と同量加えたものを使用した。蛍光値は5 µg/mL quinine sulfateの蛍光値を1,000としたときの相対値として算出した。蛍光性AGEs生成抑制率は以下の式に基づいて算出した。

$$\text{蛍光性 AGEs 生成抑制率 (\%)} = 100 - \{( \text{sample Glucose (+)} - \text{sample Glucose (-)} ) / ( \text{ref Glucose (+)} - \text{ref Glucose (-)} ) \} \times 100$$

また、IC<sub>50</sub>は複数濃度の蛍光性AGEs生成抑制率から検量線を作成し、回帰直線を求め、回帰直線  $y = 50$  とし、 $x$  の値を求めた。これより50 % 生成阻害濃度 (mg/mL) をIC<sub>50</sub>とした。

### (4) DPPH ラジカル消去活性の検証

DPPH ラジカル消去活性は、Troloxを標準物質としてその相当量を算出する方法で測定した<sup>14,15)</sup>。96穴プレートにTrolox 0 ~ 16 nmol/assayと試料 25 ~ 100 µL/assayを分注し、200 mmol/L MES緩衝液、800 µmol/L DPPH溶液を添加し室温で20分間反応後、プレートリーダーで520 nmの吸光度を測定した。DPPH ラジカル消去活性はTroloxで作成した回帰直線の傾きを用いて、試料の添加量に相当するTrolox量として求めた。豆全体試料は固形分濃

度7.5 mg/mL、豆部位別試料は固形分濃度3.0 mg/mLを使用した。

### (5) 逆相HPLCによる黒豆のイソフラボン分析

黒豆7品種と大豆1品種の種皮部と子葉部に含まれるイソフラボン12種の割合を測定するため、黒豆7品種の熱水抽出液と大豆の熱水抽出液を逆相HPLCにより分析した。HPLCによる分析条件はTable 2に示した。抽出液に含まれる配糖体3物質、アグリコン3物質、アセチル化配糖体3物質、マロニル化配糖体3物質の濃度は、各イソフラボン標準液の混合液のクロマトグラムのピーク面積をもとに検量線を作製し算出した。

#### 検量線作成

配糖体3種、アグリコン3種をそれぞれジメチルスルホキシド、エタノールを添加して完全に溶解し、0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 2.6) で調節した。アセチル化配糖体3種、マロニル化配糖体3種は始めからエタノール溶解されたものに、0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 2.6) で調節した。各試料 20 µL をTable 2の分析条件に設定したHPLCに注入し、測定した。これを繰り返し、各イソフラボンの保持時間 (RT: retention time) を確認した。イソフラボン6種 (配糖体3物質、アグリコン3物質) を混合し、0.01 mol/L リン酸緩衝液 (pH 2.6) で10 ~ 1,000倍に希釈し、検量線を作成した。アセチル化配糖体3物質、マロニル化配糖体3物質は1種ずつ2 ~ 1,000倍に希釈し、作成した。希釈した各混合試薬 20 µL を上記と同様の分析条件でHPLCに注入し測定した。

#### サンプルのイソフラボン量測定

サンプルを0.01 M リン酸緩衝液 (pH 2.6) で2 ~ 4倍に希釈した。希釈した試料溶液 20 µL をイソフラボン試薬検量線作成時と同様の分析条件でHPLCに注入し、測定した。それぞれの試薬検量線を用い、各サンプルのイソフラボン量を求めた。

## (6) 逆相HPLCによる黒豆のcyanidine-3-glucoside (C3G) 分析

黒豆7品種と大豆1品種の種皮部と子葉部に含まれるcyanidine-3-glucosideの割合を測定するため、黒豆7品種の熱水抽出液と大豆の熱水抽出液を逆相HPLCにより分析した。HPLCによる分析条件はTable 3に示した。抽出液に含まれるC3G濃度は、標準液の混合液のクロマトグラムのピーク面積をもとに検量線を作製し算出した。

### 検量線作成

C3Gを精製水で完全に溶解し、0.01 Mリン酸緩衝液(pH 2.6)で濃度を調節した。各試料20 μLをTable 3の分

析条件に設定したHPLCに注入し、測定し、C3Gの保持時間(RT: retention time)を確認した。そして、0.01 mol/Lリン酸緩衝液(pH 2.6)で10~1,000倍に希釈し、作成した。希釈した各混合試薬20 μLを上記と同様の分析条件でHPLCに注入し測定した。

### サンプルのC3G量測定

サンプルを0.01 mol/Lリン酸緩衝液(pH 2.6)で2~4倍に希釈した。希釈した試料溶液20 μLをC3G試薬検量線作成時と同様の分析条件でHPLCに注入し、測定した。それぞれの試薬検量線を用い、各サンプルのC3G量を求めた。

**Table 2. Isoflavones analysis HPLC conditions.**

Column	Cadenza CD-C18 (75 × 84.6 mm I.D.)		
Mobile Phase A	10.0 mmol/L (sodium) Phosphate Buffer (pH 2.6)		
Mobile Phase B	Acetonitrile		
Flow Rate	1.0 mL/min		
Column Temp	40°C		
Detection	UV270 nm		
Time Program	Time (min)	FUNK	VALUE
	0	B.Conc	7
	6	B.Conc	7
	20	B.Conc	20
	30	B.Conc	20
	40	B.Conc	40
	45	B.Conc	80
	45.01	B.Conc	7
	60	B.Conc	7
	60.01	STOP	

**Table 3. C3G analysis conditions.**

Column	Cadenza CD-C18 (75 × 84.6 mm I.D.)		
Mobile Phase A	10.0 mmol/L (sodium) Phosphate Buffer (pH 2.6)		
Mobile Phase B	Acetonitrile		
Flow Rate	1.0 mL/min		
Column Temp	40°C		
Detection	UV510 nm		
Time Program	Time (min)	FUNK	VALUE
	0.01	B.Conc	7
	6.00	B.Conc	7
	20.00	B.Conc	20
	20.01	B.Conc	80
	25.00	B.Conc	80
	25.01	B.Conc	7
	35.00	B.Conc	7
	35.01	STOP	

## (7) α-グルコシダーゼ阻害作用の検証

α-グルコシダーゼ阻害作用は、ラット小腸由来のα-グルコシダーゼと *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) を使用して測定した<sup>16)</sup>。50 mmol/L リン酸緩衝液(100 mmol/L NaCl を含む、pH 7.0)、7 mmol/L *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG)、0.5 mol/L Tris を調製した。α-グルコシダーゼは、ラット小腸アセトンパウダー(佐々木化学薬品、京都府京都市)を 50 mmol/L リン酸緩衝液(100 mmol/L NaCl を含む、pH 7.0) 中でホモジナイズし、遠心分離(13,000 × g、20 分間、4 °C) で得られた上清とした。陽性対照として 3.3 mg/mL acarbose を使用した。チューブに固体分濃度 7.5 mg/mL の試料および α-グルコシダーゼ溶液を分注し 37 °C で 5 分間、前反応させた。そこに 7 mmol/L *p*-NPG 溶液を加え 1 時間反応させた。その後、0.5 mol/L Tris を加えて反応を停止させた。反応液の一部を 96 穴プレートに分注し、400 nm の吸光度を測定し、α-グルコシダーゼ阻害作用を算出した。

## (8) 解析方法

測定値は平均値 ± 標準偏差で示した。

各成分の蛍光AGE形成阻害への寄与率(%)は、その成分および阻害効力に基づいて算出した。各成分に対して、その含有量(μg/g)に IC<sub>50</sub> 値(1/IC<sub>50</sub>)の逆数を掛けて理論的な阻害寄与を推定しました。寄付率(contribution rate)は、次の式に従い、推定されたすべての寄付の合計に対するパーセンテージとして表した。

$$\text{Contribution rate}_i (\%) = \frac{C_i \times (1/IC_{50,i})}{\sum_j C_j \times (1/IC_{50,j})} \times 100$$

ここで C<sub>i</sub> は成分 i の含有量、IC<sub>50,i</sub> は蛍光AGE形成の 50 % を阻害するために必要な濃度とした。

## (9) 黒豆の摂取が食後血糖に及ぼす影響

### 被験者

被験者は以下の選択基準に合致した 9 名とした(Table 4)。試験参加の同意取得時点での年齢が 20 歳以上 30 歳未満の男女。健康な者で慢性身体疾患がない人。本試験の目的、内容について十分な説明を受け、同意能力があり、よく理解した上で自発的に参加を志願し、書面で本試験参加に同意できる人。指定された試験日に来所でき、試験を受ける

ことができる人。試験責任医師が本試験への参加を適当と認めた人。

### 調査項目と検査内容

被験者は被験者背景調査として、年齢、既往歴、食物アレルギーの有無を被験者自身で調査票に記入すると共に、血液検査を受けた(Table 5)。試験は FreeStyle リブレ Pro (Abbott Laboratories, Chikago, USA) を使用し、試験期間中に測定した組織間質液中のグルコース濃度を 15 分毎に計測し、血糖値とした<sup>17)</sup>。

### 試験プロトコル

本試験は既報<sup>18-22)</sup>と同様に日本 Glycemic Index (GI) 研究会による統一プロトコル<sup>23)</sup>を参考に試実施した。被験者には試験期間中、以下の事項を遵守するように指導した。睡眠不足や暴飲暴食など、不規則な生活は避け、普段通りの生活をする。食事、運動、睡眠は本試験参加前と同様な量・質を維持するようにする。新たに、健康食品、サプリメント等の摂取開始は禁止する。その他、試験結果に影響を及ぼすと考えられることは禁止する。試験前日および当日は以下の事項を遵守するように指導した。事前検査および試験前日は過度な運動を禁止する。試験前日は 6 時間以上の睡眠をとる。試験前日より試験当日の試験終了まで、アルコールの摂取を禁止する。事前検査および試験の前日の夕食は脂質の多い物を避け、22 時以降に水以外の摂取をしない。試験当日は試験終了まで運動および発汗の可能性がある身体活動を禁止する。女性の場合、生理期間中は試験を実施しない。試験中は座位での安静待機とし、電話、睡眠、過度な頭脳活動(メール、パソコンなど)、身体活動を禁止する。試験食品摂取後、試験終了までは絶食する。

被験者はリブレ Pro センサーを試験の 2 日以上前に上腕外側部に自分自身で貼り付けた。リブレ Pro センサーの装着期間中は入浴、スイミング、運動などの制限をしなかった。試験は 10:00 に試験食品を 10 分間で摂取した。その後、被験者は座位でビデオを鑑賞し、試験が終了する 12:00 までリラックス状態を保てるようにした。

試験食品の摂取は一口 30 回以上咀嚼してから嚥下した。血糖値は試験食品を摂取する前(1 回目)、摂取開始 15 分後(2 回目)、30 分後(3 回目)、45 分後(4 回目)、60 分後(5 回目)、90 分後(6 回目)、120 分後(7 回目)に収集した測定値とした。

Table 4. Subjects profile.

	Unit	Total	Male	Female
Number of subjects		9	1	8
Age	years	22.8 ± 1.2	23	22.8 ± 1.3
Body height	cm	161.2 ± 7.8	170.8	160.0 ± 7.4
Body weight	kg	52.3 ± 7.3	60.5	51.3 ± 7.0
BMI		20.1 ± 2.3	20.7	20.0 ± 2.5

Results are expressed as mean ± standard deviation. BMI, body mass index.

**Table 5. Result of the blood chemistry test.**

test item	Unit	Measured value	Reference range
FBG	mg/dL	78.4 ± 5.0	70 - 109
HbA1c	%	5.1 ± 0.1	4.6 - 6.2
IRI	μU/mL	5.5 ± 2.2	1.7 - 10.4
Total cholesterol	mg/dL	191.0 ± 44.4	120 - 219
TG	mg/dL	76.9 ± 31.8	30 - 149
HDL-C	mg/dL	78.1 ± 11.8	40 - 85
LDL-C	mg/dL	103.6 ± 40.6	65 - 139

Results are expressed as mean ± standard deviation, n = 9, FBG, fasting blood glucose; IRI, immunoreactive insulin; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TG, triglyceride; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; γ-GT, γ-glutamyltransferase.

**Table 6. Nutrition facts of test food.**

Test food	Serving unit (g)	Energy (kcal)	Protein (g)	Fat (g)	Carbohydrates (g)
A	152	212	3	0	50
B	158	272.8	10.9	3.1	50
C	153.4	258.7	8.6	3.1	50

A, rice 150 g + seasoning 2.5 g; B, rice 138 g + Tanbabudoukuromame 20 g; C, rice 138 g + Kurosenngoku 15.4 g.

## 試験食品

本研究で用いた試験食品の栄養成分は各食品に表示されている数値を用いて計算し、一食あたりの炭水化物摂取量を50 gに統一した (Table 6)。本研究では、市販の包装米飯、ふりかけ、黒豆製品、を使用した。包装米飯は「サトウのごはん、新潟産コシヒカリ150 g」(佐藤食品工業、新潟県新潟市)を用いた。ふりかけは「のりたま」(丸美屋食品工業、東京都杉並区)を用いた。黒豆製品は2種類の「炒り黒豆(丹波ぶどう黒豆)」(北尾商事株式会社、京都府京都市)と「そのままカリッと黒豆のお菓子(黒千石)」(黒千石事業協同組合、北海道北竜町)を用いた。

試験食品はA～Cとし、摂取量は以下の通りとした。

A(基準食)：包装米飯150 g + ふりかけ2.5 g(総炭水化物量: 50 g)

B(試験食)：包装米飯138 g + 丹波ぶどう黒豆(総炭水化物量: 50 g)

C(試験食)：包装米飯138 g + 黒千石(総炭水化物量: 50 g)

試験食品はA～Cともに試験開始後10分間で摂取した。

## 安全性解析対象者の選択

安全性解析対象者は試験食品を一度でも摂取した被験者とした。

## 有効性解析対象者の選択

有効性解析対象者は所定の試験スケジュールおよび試験内容を全て終了した被験者のうち、以下に記載の解析対象除外基準に該当する被験者を除外した人とした。検査結果の信頼性を損なう行為が顕著に見られた人。除外基準に該

当していたことや、制限事項の遵守ができないことが摂取開始後に明らかになった人。

## 統計解析

試験の安全性評価と解析は安全性解析対象者とし、有害事象および副作用について症状、程度、頻度などを集計して評価した。試験結果の有効性解析は有効性解析対象者とし、試験食品摂取後の経時的な血糖値から、試験食品を摂取する前(1回目; 0分値)を差し引いた値を血糖変化値( $\Delta$ blood glucose;  $\Delta$ BG)、検査開始後120分までの血糖値変化の最高値を、最高血糖変化値( $\Delta$  Cmax; maximum blood glucose concentration)とした。血糖上昇曲線下面積(incremental area under curve; iAUC)は日本 Glycemic Index(GI)研究会の統一プロトコルに従って算出した<sup>23</sup>。統計解析には統計解析ソフト BellCurve for Excel(社会情報サービス、東京都新宿区)を用いた。血糖値は平均値±標準誤差(standard error: SE)で示した。試験結果の群間比較にはBonferroni法による多重検定の後、両側検定で危険率5%未満( $p < 0.05$ )を有意差あり(\*)、 $0.05 \leq p < 0.1$ を有意傾向あり(†)とした。

## 倫理基準

本研究は人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(文部科学省、厚生労働省告示)を遵守して実施した。試験は事前に被験者に対して試験内容を十分に説明し、本人が試験の参加を希望し、自主的な同意書の提出を受けて実施した。本研究は一般社団法人糖化ストレス研究会の「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会を開催し、試験の倫理性および妥当性について審議を行い、承認のもとに実施した(申請番号:#22003、承認番号:GSE 2022-003)。

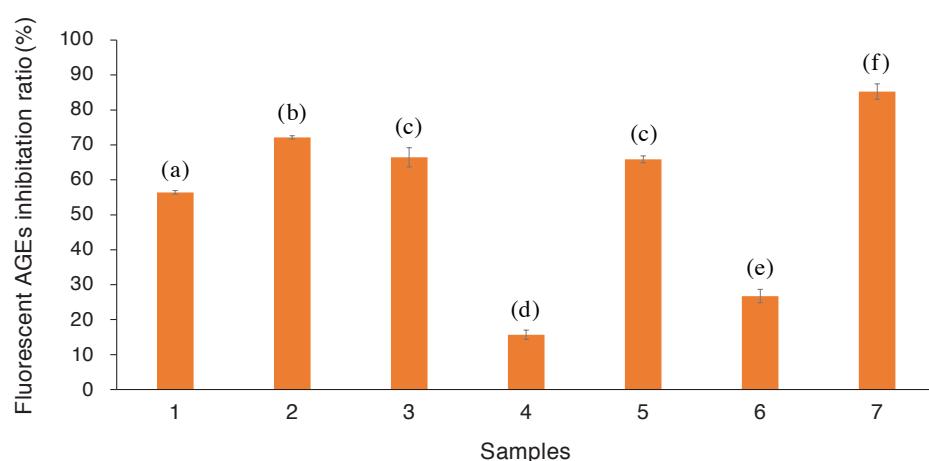
## 結果

### 黒豆の蛍光性AGEs生成抑制作用

7品種の黒豆の熱水抽出液、反応液終濃度1.5 mg/mLにおける蛍光性AGEs生成抑制率をFig. 1に示した。7品種すべての黒豆において15%以上の蛍光性AGEs生成抑制作用が認められ、平均値は $55.5 \pm 23.31\%$ （平均値±標準偏差、n=7）であった。蛍光性AGEs生成抑制率が最も高かったものは、黒千石（ $85.3 \pm 2.5\%$ 、n=3）、最も低かったものは、丹波黒豆（備中）黒の笑（ $15.7 \pm 0.3\%$ 、n=3）であった。黒豆品種間の蛍光性AGEs生成抑制作用は、丹波黒豆（備中）黒の笑と丹波黒豆（飛切）の2品種間を除くすべての品種において有意差が認められた（p<0.001）。

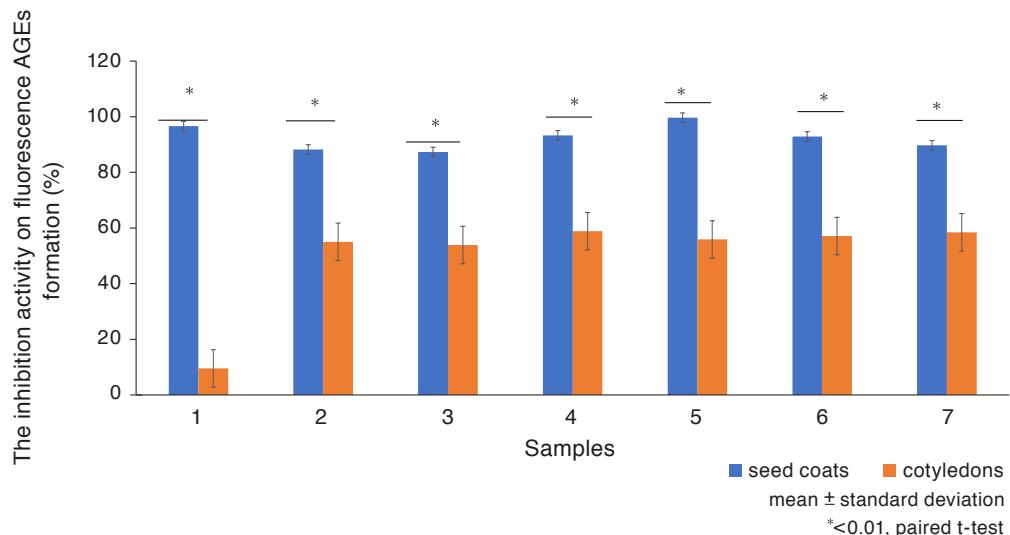
また、蛍光性AGEs生成抑制率50%濃度であるIC<sub>50</sub>を求めたところ、丹波ぶどう黒豆（0.943 mg/mL）>雁喰豆（0.894 mg/mL）>丹波黒豆（備中）黒の笑（0.892 mg/mL）>函館黒豆（0.886 mg/mL）>光黒大豆（0.702 mg/mL）>丹波黒豆（飛切）（0.267 mg/mL）>黒千石（0.122 mg/mL）の順でIC<sub>50</sub>が小さかったことから、この順で蛍光性AGEs生成抑制作用が大きかった。比較として測定した、大豆のIC<sub>50</sub>は2.61 mg/mLであった。ポジティブコントロールのAGのIC<sub>50</sub>は0.068 mg/mLであった。

黒豆7品種（部位別）の熱水抽出液、反応終濃度0.6 mg/mLにおける蛍光性AGEs生成抑制率を（Fig. 2）に示した。黒豆7品種の種皮抽出液はすべて蛍光性AGEs生成抑制作用が認められ、平均値が $92.6 \pm 4.18\%$ （平均値±標準偏差、



**Fig. 1. Inhibitory effect of Black beans (whole) on AGEs and intermediate formation in the HSA-Glucose reaction model.**

Results are expressed as mean ± SD. Black beans were introduced into glycation models containing 40 mg/mL HSA and 2.0 mol/L glucose (n = 3). After 40-hour incubation at 60°C, fluorescent AGEs were measured by Ex 370 nm / Em 440 nm. AGEs, advanced glycation endproducts; HSA, human serum albumin; SD, standard deviation.



**Fig. 2. Inhibitory effect of black beans (by part) on AGEs and intermediate formation in the HSA-Glucose reaction model.**

Results are expressed as mean ± SD, \*p < 0.01, paired t test, n = 3. Black beans were introduced into glycation models containing 40 mg/mL HSA and 2.0 mol/L glucose. After 40-hour incubation at 60°C, fluorescent AGEs were measured by Ex 370 nm/Em 440 nm. AGEs, advanced glycation endproducts; HSA, human serum albumin; SD, standard deviation.

$n = 7$ ）であった。最も大きかった品種は、雁喰豆で $99.7 \pm 0.28\%$  ( $n = 3$ )、最も小さかったのは函館黒豆で $87.3 \pm 0.68\%$  ( $n = 3$ ) であった。黒豆の子葉部においても7品種すべてにおいて抑制作用がみられた。黒豆7品種の子葉部抽出液の蛍光性AGEs生成抑制率の平均は $49.8 \pm 16.5\%$  (平均値 ± 標準偏差、 $n = 7$ )。最も大きかったのが黒千石で $58.5 \pm 1.05\%$  ( $n = 3$ )、最も小さかったのが丹波ぶどう黒豆で $9.51 \pm 0.93\%$  ( $n = 3$ ) であった。黒豆7品種すべての子葉部には抑制作用があり、抑制率の平均は $48.6 \pm 9.5\%$  (平均値 ± 標準偏差、 $n = 7$ )。最も大きかったのは、丹波黒豆（飛切）で $63.3 \pm 1.2\%$  ( $n = 3$ ) で最も小さかったのは、丹波黒豆（備中）黒の笑で $31.9 \pm 0.8\%$  ( $n = 3$ ) であった。また、種皮部 ( $n = 7$ )、子葉部 ( $n = 3$ ) でt検定を行ったところ  $p < 0.01$  となり、有意差が認められた。

比較として測定した大豆の蛍光性AGEs生成抑制率は子葉部においては $5.1 \pm 5.1\%$  ( $n = 3$ ) 種皮部においては $30.7 \pm 3.2\%$  ( $n = 3$ ) であった。

### イソフラボン12種、C3Gの蛍光性AGEs生成抑制作用

イソフラボンは配糖体3種、アグリコン3種において蛍光性AGEs生成抑制作用がみられた。IC<sub>50</sub>は、グリシテイン ( $5.88 \text{ ng/mL}$ ) > グリシチン ( $189 \text{ ng/mL}$ ) > ダイゼイン ( $7.01 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ ) > ダイジン ( $8.75 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ ) > ゲニスチン ( $20.3 \times 10^3 \text{ ng/mL}$ ) > ゲニステイン ( $1.02 \times 10^6 \text{ ng/mL}$ ) の順でIC<sub>50</sub>が小さかったことから、この順で蛍光性AGEs生成抑制作用が大きかった。ダイジンとダイゼイン、グリシンとグリシテインの2組では、配糖体よりもアグリコンの方が抗糖化作用が大きい結果となった。ゲニスチンとゲニステインにおいては、配糖体の方がアグリコンよりも抗糖化作用が大きいという結果になった。マロニル化配糖体、アセチル化配糖体では蛍光性AGEs生成抑制作用が認められなかった。C3GのIC<sub>50</sub>は $10.7 \mu\text{g/mL}$ となり、ゲニスチン、ゲニステインよりも抗酸化作用が大きいという結果になった。

### DPPHラジカル消去活性

黒豆のDPPHラジカル消去活性をFig. 3に示した。検証した全ての黒豆7品種にDPPHラジカル消去活性が認められ、平均値は $141 \pm 47.4 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$  (平均値 ± 標準偏差、 $n = 7$ ) であった。DPPHラジカル消去活性があつた品種のなかで最も高かったものは、黒千石 ( $247 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$ )、最も低かったものは、光黒大豆 ( $96.7 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$ ) であった。また、比較として大豆のDPPHラジカル消去活性についても測定した。大豆のDPPHラジカル消去活性は、 $128 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$  であった。

7品種の黒豆（部位別）のDPPHラジカル消去活性を (Fig. 4) に示した。黒豆においては種皮部の方が子葉部よりも作用が大きく、大豆においては子葉部の方が種皮部の作用が大きかった。種皮部における、DPPHラジカル消去活性の平均値は $369 \pm 131 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$  (平均値 ± 標準偏差、 $n = 7$ ) であった。DPPHラジカル消去活性があつた品種のなかで最も大きかったものは、黒千石 ( $550 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$ )、最も小さかったものは、丹波黒豆（備中）黒の笑 ( $154 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$ ) であった。子葉部におけるDPPHラジカル消去活性の平均値は $244 \pm 104 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$  (平均値 ± 標準偏差、 $n = 7$ ) であった。最も大きかったものは、丹波ぶどう黒豆 ( $336 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$ )、最も小さかったものは、丹波黒豆（備中）黒の笑 ( $11.8 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$ ) であった。また、比較として大豆 DPPHラジカル消去活性についても測定した。大豆のDPPHラジカル消去活性は、種皮部で $143 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$ 、子葉部 $501 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$  であった。大豆は種皮においては黒豆7品種よりも作用が小さく、子葉部においては、黒豆7品種よりも作用が大きかった。

固体分濃度 $0.1 \text{ mg/mL}$ のイソフラボン6種(配糖体3種、アグリコン3種)、C3Gを測定したところ、C3Gとイソフラボンではゲニステイン、ゲニスチンで作用が認められた。C3GのDPPHラジカル消去活性は、 $1,080 \mu\text{mol-Trolox当量/L}$  であった。

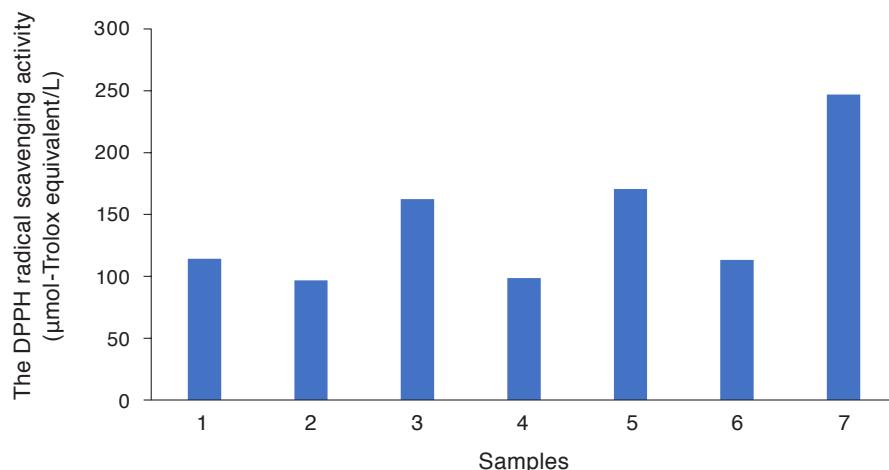
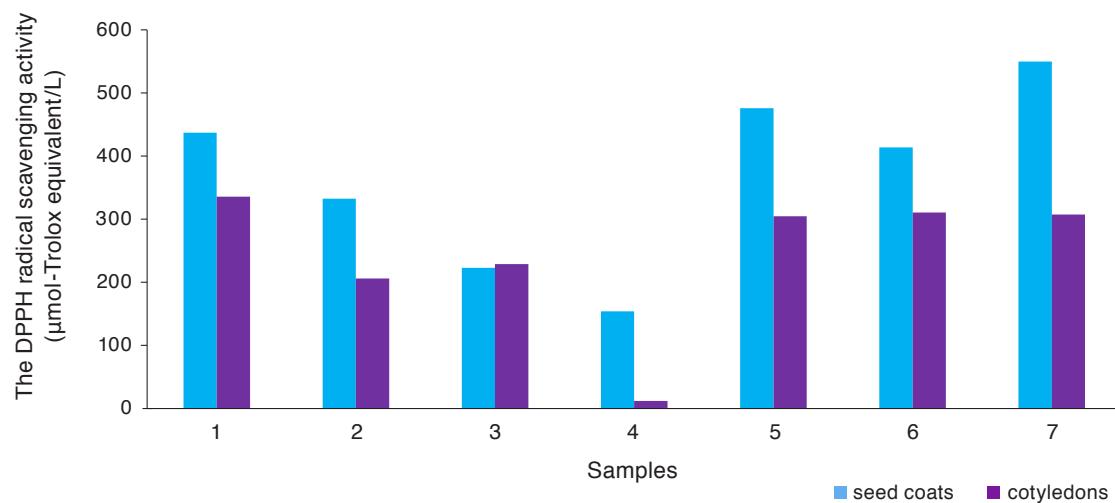
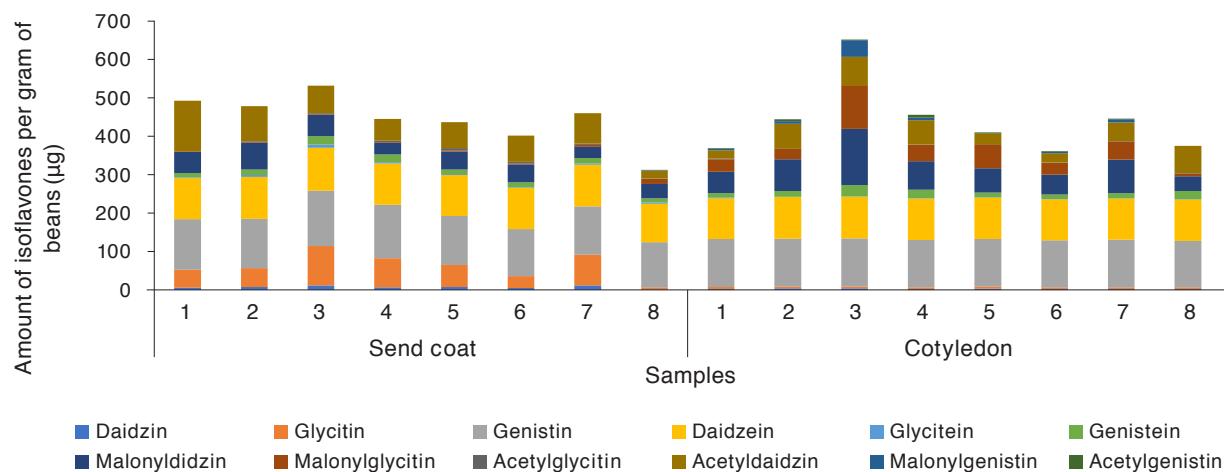


Fig. 3. Anti-oxidative activity of black beans (whole).

DPPH radical scavenging activity of black bean was measured by a method of calculating the equivalent amount of Trolox using it as a standard substance ( $n = 2$ ). DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

**Fig. 4. Anti-oxidative activity of black beans (by part).**

DPPH radical scavenging activity of black bean was measured by a method of calculating the equivalent amount of Trolox using it as a standard substance ( $n = 2$ ). DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

**Fig. 5. Isoflavone content per gram of beans determined by reversed-phase HPLC.**

Values are expressed as  $\mu\text{g}/\text{g}$  of beans.

量/L、ゲニステインは  $137 \mu\text{mol}\text{-Trolox 当量}/\text{L}$ 、ゲニスチンは  $33.1 \mu\text{mol}\text{-Trolox 当量}/\text{L}$  であった。

#### 逆相 HPLC による黒豆のイソフラボン、C3G 分析

まず、リテンションタイムは、ダイジン、グリシチン、ゲニスチン、マロニルダイジン、マロニルグリシチン、アセチルグリシチン、アセチルダイジン、マロニルゲニスチン、ダイゼイン、グリシテイン、アセチルゲニスチン、ゲニステインの順で、 $17.8 \pm 0.03$  分（平均値  $\pm$  標準偏差、 $n = 3$ ）、 $18.9 \pm 0.02$  分、 $21.8 \pm 0.03$  分、 $22.7 \pm 0.04$  分、 $23.1 \pm 0.04$  分、 $25.4 \pm 0.05$  分、 $26.0 \pm 0.20$  分、 $26.2 \pm 0.04$  分、 $28.3 \pm 0.04$  分、 $30.7 \pm 0.07$  分、 $32.5 \pm 0.13$  分、 $38.4 \pm 0.02$  分、であった。検量線を用いて計算された黒豆 7 品種、大豆 1 品種の種皮部、子葉部の各イソフラボン量を Fig. 5 に示した。

C3G のリテンションタイムは、 $13.0 \pm 0.0$  分（平均値  $\pm$

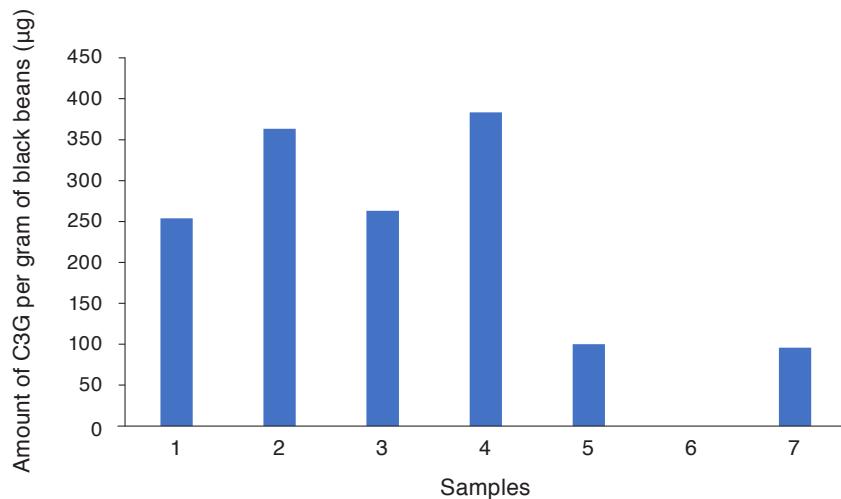
標準偏差、 $n = 3$ ）であった。黒豆 7 品種の子葉部、大豆の子葉部、種皮部では C3G は検出されなかった。また、丹波黒豆（飛切）の種皮部においては測定下限となった。検量線を用いて計算された黒豆 7 品種種皮部各 C3G 量を Fig. 6 に示した。

#### $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用

黒豆の熱水抽出液および  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用のポジティブコントロールである acarbose (終濃度:  $0.099 \text{ mg/mL}$ ) の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を Fig. 7 に示した。品種間に作用差は認められなかった。

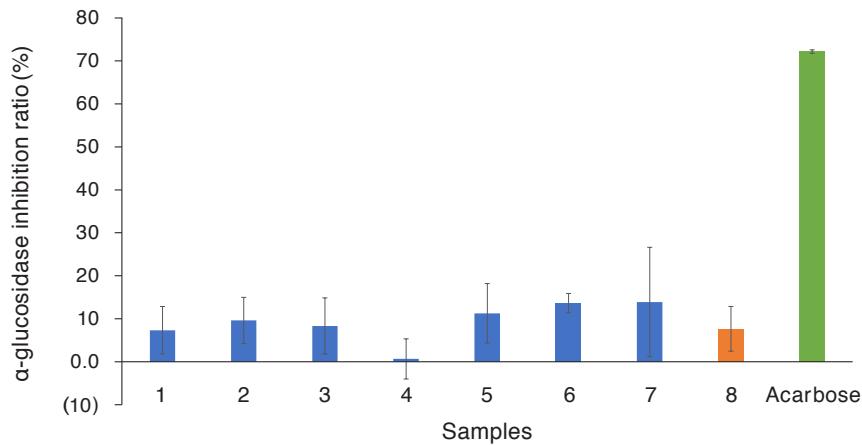
#### 黒豆の食後血糖抑制に及ぼす影響 安全性の評価

本試験において有害事象の報告はなかった。



**Fig. 6. C3G content per gram of black beans determined by reversed-phase HPLC.**

Values are expressed as  $\mu\text{g}/\text{g}$  of beans. C3G: cyanidin-3-glucoside.



**Fig. 7.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of black bean extracts.**

Samples were reacted with 0.9 U/mL  $\alpha$ -glucosidase and 7 mmol/L p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG) at 37°C for 1 h. Absorbance was measured at 400 nm (final concentrations: black bean extracts 0.225 mg/mL; acarbose 0.099 mg/mL,  $n = 2$ ).

## 有効性の評価

解析対象除外基準に該当する被験者はなかったため、試験参加者9名全員を有効性解析対象者とした。

## 有効性の解析

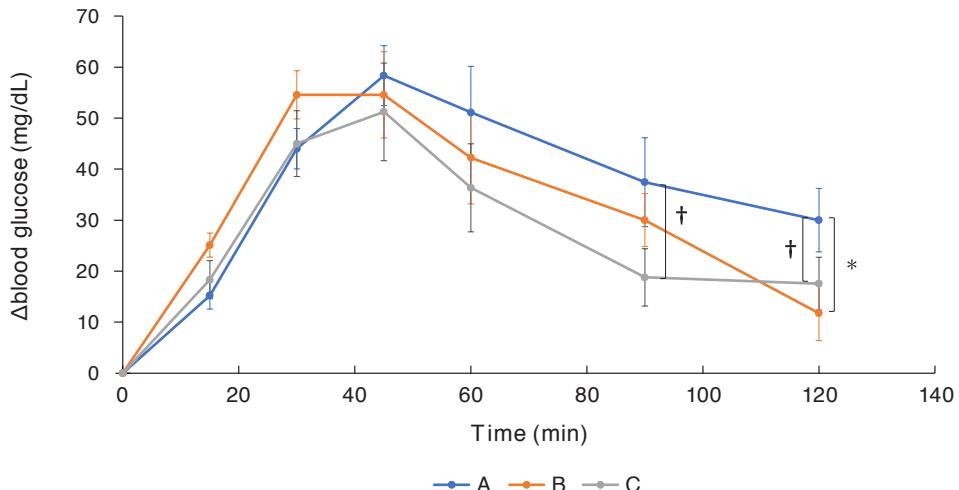
### ・全体解析

全体対象者全員（男性1名、女性8名、 $22.8 \pm 1.2$ 歳、身長 $161.2 \pm 7.8$ cm、体重 $52.3 \pm 7.3$ kg、BMI $20.1 \pm 2.3$ kg/m<sup>2</sup>）（平均値±標準偏差、 $n = 9$ ）が試験に参加した。試験開始後の血糖値変化（Δblood glucose; ΔBG）の推移を**Fig. 8**に示した。被験食摂取前の空腹時血糖値（0 min）は $78.2 \sim 85.2$ mg/dLで、被験者の血糖値は各被験食の摂取後上昇し、45分後に最高値となり、その後、120分後ま

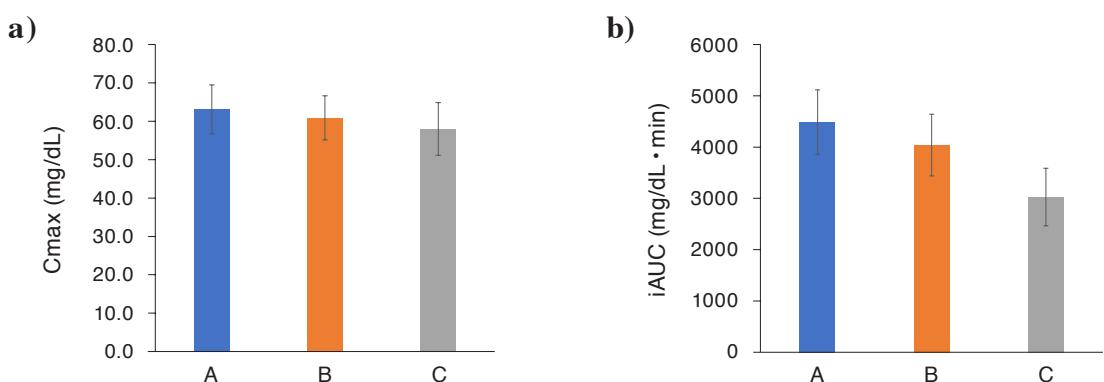
で低下した。

被験食品A摂取後のΔBGはBと比べΔ120分値（ $p < 0.05$ ）で高値であり、Cと比べて、Δ60分値、Δ120分値（ $p < 0.1$ ）で高値であった。ΔCmaxはA:  $63 \pm 6$  mg/dL（平均値±標準誤差、 $n = 9$ ）、B:  $61 \pm 6$  mg/dL（平均値±標準誤差、 $n = 9$ ）、C:  $58 \pm 7$  mg/dL（平均値±標準誤差、 $n = 9$ ）であった（**Fig. 9-a**）。ΔCmaxはAと比べてBが2.2 mg/dL（3.5%）低値であり、Cが5.1 mg/dL（8.1%）低値であった。

iAUCはA:  $4,490 \pm 630$  mg/dL·min、B:  $4,040 \pm 602$  mg/dL·min、C:  $3,360 \pm 562$  mg/dL·minであった（**Fig. 9-b**）。iAUCはAと比べてBが447 mg/dL·min（10.0%）低値であり、Cが1,460 mg/dL（32.6%）低値であった。

**Fig. 8. Changes in  $\Delta BG$  after ingestion of test meals.**

Values are mean  $\pm$  SE ( $n = 9$ ).  $\dagger 0.05 \leq p < 0.1$ ,  $* p < 0.05$  vs. standard meal (A), Bonferroni test.  
Test meal composition is shown in Table 6.  $\Delta BG$ , changes in blood glucose; SE, standard error.

**Fig. 9.  $\Delta C_{\text{max}}$  (a) and iAUC (b) after ingestion of test meals.**

Values are mean  $\pm$  SE ( $n = 9$ ). Test meal composition is shown in Table 6. iAUC: incremental area under the curve of  $\Delta BG$ ;  $\Delta BG$ , changes in blood glucose;  $\Delta C_{\text{max}}$ , maximum blood glucose level change; SE, standard error.

## 考察

### 黒豆の成分に関する先行研究

黒豆（黒大豆）は栄養豊富で、さまざまな健康効果が期待される機能性成分を多く含んでいる大豆（黄大豆）が持つ栄養素に加え、特に種皮に由来する成分が特徴的である。アントシアニン（黒大豆ポリフェノール）は黒い種皮の色素で、強い抗酸化作用を持つ。ブルーベリーなどにも含まれる。大豆イソフラボンは、黄色大豆と同様にエストロゲン類似作用を有する。その他、大豆タンパク質、食物繊維やオリゴ糖、配糖体のサポニン、ミネラル（鉄、カリウム、カルシウム、マグネシウム）、ビタミン（E, K, B群）を含む。脂質のレシチンは細胞膜の構成成分、コリンは神経伝達物質の材料になる。

### 黒豆に関する先行研究

#### 健康機能（循環器・代謝・骨・QOL）

黒豆は循環器系および代謝系に対する保護的作用を有す

る可能性が繰り返し報告されている。高血圧前症～ステージI高血圧患者を対象とした無作為化比較試験では、黒豆由来ペプチドの摂取により収縮期・拡張期血圧が有意に低下し、酸化ストレスマーカーも改善した<sup>24)</sup>。高血圧自然発症ラットや高脂肪食負荷ラットを用いた動物実験でも、黒豆エキスあるいは黒豆エキス粉末の長期投与により血圧低下、脂質代謝の改善、皮下脂肪組織における脂肪酸蓄積抑制などが報告されている<sup>25-28)</sup>。

インスリン抵抗性や糖代謝に関しては、黒豆アントシアニンが脂肪細胞分化やアディポネクチン発現を調節し、活性酸素種の抑制を介してインスリン抵抗性を改善しうることが示唆されている<sup>29-31)</sup>。骨・筋骨格系に関しては、カルシウムやマグネシウム等とともに黒豆を配合した骨強化補助食品が骨粗鬆症モデルマウスの大腿骨海綿骨量や骨密度を改善したとの報告や<sup>32)</sup>、黒豆茶など大豆イソフラボンを関与成分とする特定保健用食品が骨吸収マーカーを低下させ、更年期女性の骨粗鬆症予防に寄与する可能性が示されている<sup>33)</sup>。

さらに、黒豆煮汁の長期摂取試験においては、体脂肪率や血圧の低下とともに、便通や睡眠、疲労感など主観的QOL指標の改善が報告されており<sup>34)</sup>、黒豆納豆摂取が更年期不定愁訴や気分状態の改善に関連するとの報告もみられる<sup>35,36)</sup>。これらの知見は、黒豆が循環器・代謝・骨およびQOLに対して多面的な健康機能を有することを示唆している。

### 機能性成分と作用機序 (アントシアニン・イソフラボンなど)

黒豆の機能性は、種皮に豊富に含まれるアントシアニン類と、子葉部に多いイソフラボン、さらにはサポニンなど多様なポリフェノール・配糖体に由来すると考えられている<sup>37-39)</sup>。黒豆茶浸出液の分析では、イソフラボンおよびアントシアニンが浸出条件により大きく変動し、大豆イソフラボンを添加した一部製品では含有量が高いことが報告されている<sup>37)</sup>。サポニンについても、黒豆を含む各種大豆からsoyasaponin群が単離・定量されており<sup>38)</sup>、これらが抗酸化・脂質代謝調節等に関与する可能性が指摘されている。

細胞レベルでは、黒豆種皮抽出物が肝由来HepG2細胞において過酸化水素誘発性の細胞死を抑制し、ERKシグナル伝達の調節および総プロテインホスファターゼ活性の上昇を介して抗酸化・細胞保護作用を示すことが報告されている<sup>40)</sup>。また、ヒト胃上皮AGS細胞では、黒豆アントシアニンが *Helicobacter pylori* 誘発性の活性酸素産生、NF-κB活性化および炎症性遺伝子発現を抑制し、IL-8産生を低下させるなど抗炎症作用を示す<sup>41)</sup>。脂肪細胞系では、黒豆アントシアニンが3T3-L1細胞の分化やインスリンシグナル、GLUT4発現などに影響し、インスリン抵抗性を改善しうることが示唆されている<sup>29-31)</sup>。

血栓・血管機能に関しては、黒豆アントシアニン、とくにCyanidin 3-O-glucosideが血管内皮細胞において抗血栓性を示すこと<sup>42,43)</sup>、黒豆茶として摂取されるイソフラボンが閉経前後の喫煙者・非喫煙者における血流依存性血管拡張反応や動脈スティフネスに異なる影響を及ぼすことが報告されている<sup>44)</sup>。さらに、発酵黒豆含有飲料は鉄ニトリロ三酢酸誘発性腎酸化障害モデルラットにおいて脂質過酸化の抑制と抗酸化酵素活性の維持を示し<sup>45)</sup>、*Aspergillus awamori*発酵黒豆では腫瘍細胞に対する抗増殖作用とCu<sup>2+</sup>キレート化能が非発酵黒豆より強いことが報告されている<sup>46,47)</sup>。

また、黒豆を含む漢方処方構成生薬のエタノール抽出物がサイトカイン誘導甲状腺細胞障害やMHCクラスII異常発現を抑制するなど、免疫・炎症応答の調節作用も報告されている<sup>48,49)</sup>。

### 食品としての利用形態(茶、発酵飲料、納豆など)

黒豆は、煮豆や煮汁といった伝統的な家庭料理に加え、茶飲料、発酵飲料、発酵大豆食品、デザート、健康補助食品など、多様な形態で利用されている。飲料形態としては、市販黒豆茶や黒豆エキス含有飲料が多数存在し、イソフラボンやアントシアニンの浸出条件および含有量が詳細に検

討されている<sup>37,50)</sup>。黒豆のポリフェノールと米麹由来クエン酸を組み合わせたクエン酸飲料・クエン酸酢については、製造条件の最適化とともに、成長期ラットにおける血中脂質および肝機能指標に対する好影響が報告されている<sup>51-53)</sup>。また、黒豆エキス含有クエン酸飲料を用いた介入研究では、中高年者を対象に健康増進効果や主観的体調の改善が評価されている<sup>54)</sup>。

発酵食品としては、黒豆納豆が更年期不定愁訴や気分状態の改善を目的とした介入試験に用いられ<sup>35,36)</sup>、黒豆乳酸発酵食品はマウスを用いた実験で抗酸化能および便秘改善効果が報告されている<sup>55)</sup>。黒豆エキスあるいは黒豆ペプチドを用いた健康飲料・サプリメントは、前述のように血圧や酸化ストレス、腎機能などに対するランダム化比較試験や動物実験の対象となっている<sup>24,26,45)</sup>。

さらに、骨粗鬆症対策や糖尿病食において、黒豆と小魚を組み合わせた主食料理や、血糖値への配慮を行った黒豆寒天などのデザートレシピが提案されている<sup>56,57)</sup>。このほか、黒豆煮汁を日常的に飲用する習慣の健康影響を検討した研究<sup>34)</sup>、黒豆熱湯抽出物の呼吸器ウイルスに対する抗ウイルス活性や気道線毛運動促進作用を評価した基礎研究<sup>58)</sup>、黒豆を鉄鍋で調理することによる鉄摂取への寄与を検討した報告などもあり<sup>59)</sup>、黒豆は飲料から料理、機能性食品まで幅広い利用形態のもとでその機能性が評価されている。

### 安全性・リスク

黒豆は伝統的に食品として摂取してきたことから一般には安全性の高い食品と認識されているが、近年の症例報告や毒性試験からは、過剰摂取や特定の感受性を有する個人において注意すべきリスクも示されている。ラットを用いた28日間反復投与毒性試験では、黒豆熱水抽出物を最大5%含有する飼料を投与しても一般状態、体重、血液・生化学検査、臓器重量、病理組織学的所見に有害な変化は認められず、最大無毒性量(NOAEL)は雄3,618 mg/kg/日、雌4,066 mg/kg/日と推定されている<sup>60,61)</sup>。一方で、附子との共存条件下で黒豆が附子の急性毒性を軽減しうるとする報告もあり<sup>62)</sup>、漢方処方内での安全性調整因子としての役割が示唆されている。

ヒトでの有害事象としては、ソイプロテインを含む健康飲料・健康食品およびティーバッグタイプの黒豆茶の摂取後にアナフィラキシーを呈した3症例が報告されており、Gly m 3やGly m 4など特定の大豆アレルゲンコンポーネントとの関連が示されている<sup>63)</sup>。また、湯葉摂取後の食物依存性運動誘発アナフィラキシー症例において、皮膚プリックテストで黒豆を含む複数の大豆食品が陽性を示した報告もあり、大豆アレルギー患者における黒豆摂取には注意が必要である<sup>64)</sup>。

長期にわたり黒豆を多量に摂取した高齢女性で鉄過剰症が疑われた症例報告もあり<sup>65)</sup>、鉄強化料理や鉄鍋調理と組み合わせる場合には鉄摂取量への配慮が求められる<sup>59)</sup>。さらに、非常に高温の黒豆煮汁を摂取したことにより熱傷性食道潰瘍を来たした症例も報告されており<sup>66)</sup>、調理・摂食

時の温度管理も安全性の観点から重要である。

黒豆茶に含まれるイソフラボンについては、一般的な飲用範囲では安全と考えられる一方、大豆イソフラボンを添加した一部の黒豆茶製品ではイソフラボン含有量が高く、長期の過剰摂取に対する注意喚起がなされている<sup>33,37)</sup>。

一方で、黒豆を含む生葉抽出物がサイトカイン誘導性甲状腺細胞毒性やMHCクラスII異常発現を抑制するなど、免疫・炎症応答に対して保護的に働く可能性も報告されている<sup>48)</sup>。

総じて、黒豆は適量の範囲で摂取される限り安全性は高いと考えられるが、アレルギー素因を有する者や特定の基礎疾患を持つ集団においては、摂取量、調理法、製品中のイソフラボン含有量などに留意する必要がある。

## 本研究の知見

本研究では、市販黒豆7品種がHSA-グルコース系で蛍光性AGEs生成とDPPHラジカルを濃度依存的に抑制し、その主座が種皮部、とくにC3Gおよび一部イソフラボンであることを示した。また黒千石など品種間で抗糖化能に大きな差があり、黒豆添加ご飯の摂取試験では白飯のみと比べ食後血糖の△CmaxとiAUCが低下した。以上から黒豆は、抗糖化・抗酸化作用と食後血糖抑制作用を併せ持つ糖化ストレス緩和食品であることが新たに明らかとなった。

## 黒豆の蛍光性AGEs生成抑制作用

蛍光性AGEs生成抑制作用は黒豆7品種すべてで認められた。蛍光性AGEsとは励起波長370 nm/蛍光波長440 nmで検出されるAGEsの総称である。これらのAGEsの特徴として、黄褐色の蛍光性を有する事が挙げられる<sup>67)</sup>。蛍光性AGEsにはクロスリン（励起波長379 nm/蛍光波長

463 nm）やピロピリジン（励起波長370 nm/蛍光波長455 nm）などがあり、クロスリンは蛋白架橋性を有し、蛋白のAGEs化は組織の弾性や柔軟性の低下をもたらす<sup>67)</sup>。

本研究では、HSA糖化モデルを用いて、上記の条件で検出された蛍光値を蛍光性AGEs由来のものとし、抑制率を比較した。黒豆全7品種、大豆において蛍光性AGEs生成抑制作用が認められ、黒豆7品種が全て大豆より作用が大きかった。この事より、黒豆が大豆より蛍光性AGEsの生成を阻害し、体内の糖化ストレス緩和に働き、蛋白のAGEs化などを防ぐ可能性が大きいことが示唆された。

本研究では、蛍光性AGEs生成抑制作用における種皮部と子葉部の関与について、HSA-Glucoseモデルにおける蛍光性AGEs生成抑制作用の検証結果から、黒豆の種皮の方が子葉部よりも大きな蛍光性AGEs生成作用があることが分かった。一方、黒豆は子葉部の割合が大きいことから、豆全体に対する種皮部と子葉部の寄与率を算出すると子葉部の寄与の方が種皮部より大きかった。抗糖化作用を有する植物素材としてヤーコン (*Smallanthus sonchifolius*) や赤ルバーブの野菜やリンゴやマンゴスチンのフルーツに強い作用が報告されており、これらも黒豆同様、皮部の方が可食部より作用が強いことが報告されている<sup>68)</sup>。

また、HSAに対する黒豆（部位別）サンプルの蛍光性AGEs生成抑制におけるイソフラボン6種（配糖体3種、アグリコン3種）とC3Gの寄与率を算出したところ、Table 7のようになった。種皮部ではグリシチンの寄与率が最も大きく $83.5 \pm 6.0\%$ 、子葉部ではダイゼインの寄与率が最も大きく $72.6 \pm 3.0\%$ であった。また種皮部にのみで検出されたC3Gの寄与率が $44.9 \pm 9.1\%$ であった。このことから種皮部が子葉部より作用が大きい理由の一つとしてC3Gの寄与が示唆された。

**Table 7. Contribution rate (%).**

	Sample No.	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daizein	Glycitein	Genistein	C3G
Seed coat	1	9.9	82.2	31.3	43.3	0.0	22.9	53.2
	2	8.9	82.9	29.8	44.6	0.0	23.3	57.2
	3	3.9	79.2	20.8	37.9	0.0	19.4	59.2
	4	7.5	88.7	29.6	42.6	0.0	25.2	58.8
	5	7.7	75.2	25.7	38.9	0.0	19.0	43.8
	6	10.6	81.0	33.6	46.4	0.0	25.4	0.0
	7	14.6	94.9	30.6	44.9	0.0	23.9	48.2
Cotyledon	1	0.0	25.1	60.7	128.8	0.0	44.1	0.0
	2	0.0	36.9	39.4	65.9	0.0	31.7	0.0
	3	0.0	17.4	32.5	61.7	0.0	36.0	0.0
	4	0.0	29.5	34.7	60.3	0.0	33.8	0.0
	5	0.0	39.1	40.2	65.8	0.0	30.7	0.0
	6	0.0	32.4	37.2	63.1	0.0	27.5	0.0
	7	0.0	34.7	37.7	62.4	0.0	29.0	0.0

Contribution rates were calculated from the content of each component and its IC<sub>50</sub> value for inhibition of fluorescent AGE formation.

## 黒豆の糖化ストレス緩和作用

糖化ストレスを緩和するには、食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、糖化反応生成物の分解・排泄などが挙げられる<sup>8)</sup>。

本研究では、黒豆の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用は弱かったことから、黒豆による食後高血糖の抑制に $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用の影響は小さいと考えられた。先行研究において、マウスに黒豆に含まれるポリフェノールのプロシアニジンを単量体のエピカテキンから四量体まで経口投与し、GLP-1分泌促進効果を測定した研究において、黒大豆種皮由来のプロシアニジン高含有組成物やその化合物が、高血糖や肥満を抑制することが報告されている<sup>29)</sup>。そして、プロシアニジンの高血糖抑制の作用機序の一端は、消化管に存在するL細胞から分泌される消化管ホルモンのGLP-1分泌を促進し、それに伴ってインスリン分泌を増加させるインクレチン様作用を有していることが報告されている<sup>29)</sup>。

これらのことから、本実験の黒豆による食後高血糖抑制作用が確認された作用機序として、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害作用は弱いことが実験で示されたことから、黒豆に含まれるプロシアニジンがインクレチン様作用を発揮して、膵

$\beta$ 細胞におけるグルコース刺激起因性インスリン分泌の促進した可能性の関与が大きいと推測された。

本研究の結果は、黒豆がAGEsの生成を抑制することを示唆しており、黒豆が *in vitro* および *semi-in vivo* の両方で糖化ストレスを緩和することを示している。黒豆のAGEs分解補助作用については、今後検証する必要がある。

## 結語

この研究は、特にC3G やイソフラボンを豊富に含む種皮を持つ黒豆が蛍光AGEの生成を阻害し、抗酸化作用を発揮することが示した。食後の血糖値上昇抑制は、黒豆が糖化ストレスを減らす実用的な食事戦略であることを示唆している。

## 利益相反申告

本研究の遂行にあたり、利益相反に該当する事項はない。

## 参考文献

- 1) Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11: 3071-3109.
- 2) Yonei Y, Yagi M, Sato K, et al. Glycative stress: Molecular impacts and defense mechanisms. *Glycative Stress Res.* 2023; 10: 145-158.
- 3) Yonei Y, Saito Y, Yagi M, et al. From fatty liver to steatohepatitis: Involvement of aldehydes. *Glycative Stress Res.* 11: 79-93, 2024.
- 4) Yagi M, Takabe W, Wickramasinghe U, et al. Effect of heat-moisture-treated high-amylose corn starch-containing food on postprandial blood glucose. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 151-162.
- 5) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Med.* 2010; 7: 112-119.
- 6) Reiser KM. Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998; 218: 23-37.
- 7) Saito M, Fujii K, Soshi S, et al. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int.* 2006; 17: 986-995.
- 8) Reddy VP, Obrenovich ME, Atwood CS, et al. Involvement of Maillard reactions in Alzheimer disease. *Neurotox Res.* 2002; 4: 191-209.
- 9) Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986; 232(4758): 1629-1632.
- 10) Nanba F. Effects of black soybean polyphenol on antioxidant and blood flow improvement. *Journal of the Brewing Society of Japan.* 2013; 108: 413-419. (in Japanese).
- 11) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo aging in skin. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 12) Tanaka Y, Yagi M, Takabe W, et al. Anti-glycative effect of yogurt: Prevention of advanced glycation end product formation. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 25-31.
- 13) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Med.* 2012; 9: 125-134.
- 14) Oki T, Osame M, Masuda M, et al. Simple and rapid spectrophotometric method for selecting purple-fleshed sweet potato cultivars with a high radical-scavenging activity. *Breed Sci.* 2003; 53: 101-107.
- 15) Oki T, Masuda M, Furuta S, et al. Radical scavenging activity of fried chips made from purple-fleshed sweet potato. *Jpn Soc Food Sci Technol.* 2001; 48: 926-932 (in Japanese). doi: 10.3136/NSKJK.48.926\$
- 16) Oki T, Matsui T, Matsumoto K. Evaluation of alpha-glucosidase inhibition by using an immobilized assay system. *Biol Pharm Bull.* 2000; 23: 1084-1087. doi: 10.1248/bpb.23.1084\$
- 17) Bailey T, Bode BW, Christiansen MP, et al. The performance and usability of a factory-calibrated flash glucose monitoring system. *Diabetes Technol Ther.* 2015; 17: 787-794.

- 18) Yagi M, Shimode A, Yasui K, et al. Effect of a vinegar beverage containing indigestible dextrin and a mixed herbal extract on postprandial blood glucose levels: A single-dose study. *Glycative Stress Res.* 2014; 1: 8-13.
- 19) Ogura M, Yagi M, Nomoto K, et al. Effect of grapefruit intake on postprandial plasma glucose. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 60-68.
- 20) Yagi M, Kishimura Y, Okuda F, et al. Effect of yogurt on postprandial blood glucose after steamed riceintake. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 68-74.
- 21) Matsushima M, Yagi M, Hamada U, et al. Prevention of postprandial hyperglycemia by the combination of a staple food and a side dish. *Glycative Stress Res.* 2014; 1: 53-59.
- 22) Kawabata A, Yagi M, Ogura M, et al. Postprandial blood glucose level after intake of a bowl of rice topped with beef. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 67-71.
- 23) Japanese Association of the Study for Glycemic Index. Unified protocol (unified procedure). (in Japanese) <http://www.gikenkyukai.com/protocol.html>
- 24) Kwak JH, Kim M, Lee E, et al. Effects of black soy peptide supplementation on blood pressure and oxidative stress: A randomized controlled trial. *Hypertens Res.* 2013; 36: 1060-1066.
- 25) Tateiwa N, Tamaru S, Iwanaga H, et al. Effects of black soybean intake on blood pressure and lipid metabolites in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Abstract Book of the Annual Meeting of the Japanese Society of Nutrition and Food Science.* 2015; ACN2015: 276. (abstract in Japanese)
- 26) Udagawa H, Hanaoka S, Masuda M, et al. Long-term intake of black soybean extract and extract powder reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Abstract Book of the Annual Meeting of the Japanese Society of Nutrition and Food Science.* 2007; 61: 161. (abstract in Japanese)
- 27) Kowatari M, Seino N, Karimata T, et al. Effect of black bean extract on fatty acid composition of adipose tissue. *IEICE Technical Report.* 2012; 111: 197-200. (in Japanese) doi:10.1148/gijutsukyo.111.482.197
- 28) Sato D, Kowatari M, Seino N, et al. Effect of black soybean extract on fatty acid distribution in adipose tissue of high-fat diet-fed rats. *Journal of the Japan Diabetes Society.* 2012; 55(Suppl 1): S-115. (abstract Japanese)
- 29) Yamashita Y, Okabe M, Natsume M, et al. Cinnamtannin A2, a tetrameric procyanidin, increases GLP-1 and insulin secretion. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013; 77: 888-891.
- 30) Inaguma T, Han J, Isoda H. Effect of black bean anthocyanins on insulin resistance. *Associate Journal of Japanese Society for Medical Use of Functional Foods.* 2011; 7: 122. (in Japanese)
- 31) Inaguma T, Han J, Isoda H. Effect of black soybean extract on 3T3-L1 cell differentiation. *Proceeding of the Japanese Biochemical Society and Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan.* 2010; 83・33: 1P-1102. (abstract in Japanese)
- 32) Otani J, Ishikawa I, Ishida H, et al. The usefulness of bone-strengthening supplements aimed at improving bone mass. *The Journal of Hiroshima Dental Association.* 2009; 36: 24-30. (in Japanese)
- 33) Toda T. Evidence-based food development for bone health: "Soybean sprout tea" and "Black soybean tea" as foods for specified health uses for those concerned about bone health. *Clin Cal.* 2006; 16: 1693-1699. (in Japanese) doi: 10.11470/clincalz.16.1693
- 34) Liu Y, Fukuwatari Y, Kikuchi Y. Research on the effects of black bean broth on functional pathology (Mibyo). *Eastern Medicine.* 2001; 17: 15-27. (in Japanese)
- 35) Yoshiki T, Ohi N, Matsunaga Y. The effect of black soybean natto intake on menopausal symptoms. *Japanese Journal of Maternal Health.* 2005; 46: 190. (abstract in Japanese)
- 36) Hirokawa K. Mood-improving effects of black soybean natto: Targeting pre- and postmenopausal women. *Proceedings of The Japanese Psychological Association.* 2007; 71: 1258. (abstract in Japanese)
- 37) Nakata K, Kaneko A, Sakane Y, et al. Research on functional components and effective use of health tea drinks: (Part 2) Isoflavones and anthocyanins in black soybean tea. *Bulletin of Shizuoka Institute of Environment and Hygiene.* 2007; 49: 41-46. (in Japanese)
- 38) Kitagawa I, Yoshikawa M, Hayashi T, et al. Characterization of saponin constituents in soybeans of various origins and quantitative analysis by gas -lipid chromatography. *Yakugaku Zasshi.* 1984; 104: 162-168. (in Japanese) doi: 10.1248/yakushi1981.104.2\_162
- 39) Yamagishi T. Herbal medicine series: Black beans (Kuromame). *Medical Kanpo.* 2010; 458: 39-40. (in Japanese)
- 40) Hashimoto N, Oki T, Sasaki K, et al. Black soybean seed coat extract prevents hydrogen peroxide-mediated cell death via extracellular signal-related kinase signalling in HepG2 cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2015; 61: 275-279.
- 41) Kim JM, Kim KM, Park EH, et al. Anthocyanins from black soybean inhibit Helicobacter pylori-induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells. *Microbiol Immunol.* 2013; 57: 366-373.
- 42) Yamashita R, Kawao N, Nagai N, et al. Effect of black soybean anthocyanins on antithrombotic activity. *Japanese Journal of Pathophysiology.* 2009; 18: 26. (in Japanese)
- 43) Yamashita R, Kawao N, Ishida C, et al. Antithrombotic effect of black soybean anthocyanins. *Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis.* 2008; 19: 711. (in Japanese)
- 44) Hoshida S, Miki T, Nakagawa T, et al. Different effects of isoflavones on vascular function in premenopausal and postmenopausal smokers and nonsmokers: NYMPH study. *Heart Vessels.* 2011; 26: 590-595.
- 45) Okazaki Y, Iqbal M, Kawakami N, et al. A beverage containing fermented black soybean ameliorates ferric nitrilotriacetate-induced renal oxidative damage in rats. *J Clin Biochem Nutr.* 2010; 47: 198-207.
- 46) Chen YF, Chiang ML, Chou CC, Lo YC. Enhancing the antitumor cell proliferation and Cu<sup>2+</sup>-chelating effects of black soybeans through fermentation with Aspergillus awamori. *J Biosci Bioeng.* 2013; 115: 400-404.
- 47) Matsushita I, Kaneyuki T, Koyabu T, et al. Evaluation of the functionality of fermented black soybean extract. *Abstracts of Japan Society of Nutrition and Food Science.* 2007; 61: 157. (abstract in Japanese)
- 48) Shon YH, Lee HS, Kim CH, et al. Effect of herbal medicines on cytokine-induced cytotoxicity and major histocompatibility complex class II antigen expression in rat thyroid cells. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27: 371-374.
- 49) OhZuiun (Wang R). Mother's Warm Hand Healing: Beans (Part 2) Black Beans. *Kampo Kenkyu (Journal of Kampo Research).* 2004; 387: 108-111. (in Japanese)

- 50) Mikami N, Fujino K, Shigeta M, et al. Evaluation of antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of blended health tea and its raw tea leaves. *Journal of the University of Yamaguchi Prefectural University*. 2013; 6: 5-11. (in Japanese)
- 51) Yoshida M, Hosaka S, Kazuoka T, et al. Health effects of black soybean citric acid vinegar in growing rats. *The Japanese Journal of Health and Medical Science*. 2006; 15: 48-49. (abstract in Japanese)
- 52) Hosaka K, Sooka T, Tsutsumi K, et al. Development of a healthy beverage containing citric acid using black soybeans. *Proceeding of Annual General Meeting of the Japanese Society of Health and Medical Science*. 2006; 15: 36-37. (abstract in Japanese) doi: 10.20685/kenkouigaku.15.3\_36
- 53) Hosaka K, Sooka T, Tsutsumi K, et al. Development of a healthy beverage containing citric acid using black soybeans. *Journal of Japan Health Medicine Association*. 2008; 17: 19-24. (in Japanese) doi: 10.20685/kenkouigaku.17.2\_19
- 54) Ochiai H, Taniguchi T, Kodama T, et al. Evaluation of health promoting effects of black soybean extract containing citric acid beverage in humans. *Abstracts of the General Meeting of the Japanese Society of Public Health*. 2004; 63: 864. (abstract in Japanese)
- 55) Kato Y, Hayashibara K, Zhu J. Preparation of black soybean lactic acid fermented food with improved functionality: Evaluation of antioxidant capacity and constipation-improving effect in mice. *Abstract Book of the Annual Meeting of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*. 2007; 61: 171. (abstract in Japanese)
- 56) Hashimoto Y. Recommended recipes for osteoporosis prevention! Summer rice with ume, black beans, and small fish. *Nutrition Care*. 2018; 11: 739. (abstract in Japanese)
- 57) Nio K, Aso M. My Snack friendly to blood sugar level: (Part5) November snack (Cottage cheesecake/Black bean agar). *Diabetes Care*. 2017; 14: 986-988. (in Japanese)
- 58) Yamai M, Tsumura K, Kimura M, et al. Antiviral activity of a hot water extract of black soybean against a human respiratory illness virus. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003; 67: 1071-1079.
- 59) Kawamura F. Eating iron (1): Boiling black beans in an iron pot. *The Japanese Journal of Clinical Nutrition*. 1982; 60: 115. (abstract in Japanese)
- 60) Hagiwara A, Imai N, Numano T, et al. A twenty eight-day repeated dose toxicity study of black soybean extract in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Sci*. 2010; 35: 87-96. doi: 10.2131/jts.35.87
- 61) Hagiwara A, Imai N, Numano T, et al. 28-day repeated dose toxicity study of black soybean extract in rats. *J Toxicol Sci*. 2009; 34(Suppl): S193. (abstract in Japanese)
- 62) Yoshizaki F, Houga M, Takada M, et al. Effects of herbal drugs on the acute toxicity of Aconiti tuber in mice. *Journal of Traditional Medicines*. 1993; 10: 161-165. (in Japanese)
- 63) Adachi A, Hamaoka D, Moriyama T. Three cases of anaphylaxis due to soy protein-containing health drinks, health foods, and black bean tea. *Japanese Journal of Clinical Dermatology*. 2022; 64: 1476-1481. (in Japanese)
- 64) Arata K, Mineoka R, Ioka N, et al. A case of food-dependent exercise-induced anaphylaxis due to yuba (soy milk skin). *Japanese Journal of Clinical Dermatology*. 2020; 62: 1559-1563. (in Japanese)
- 65) Ario K, Mizuta Y, Nagatsuma G, et al. A case of iron overload possibly caused by black soybean intake. *Program and Abstract Book of the Kyushu Regional Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the Kyushu Regional Meeting of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society*. 2022; 119-113: 166. (abstract in Japanese)
- 66) Tamura T, Matsushima T, Miyakawa A, et al. A case of esophageal burn caused by black bean soup. *Gastroenterological Endoscopy*. 2011; 53(Suppl 1): 834. (in Japanese)
- 67) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 2. The Evaluation of Glycative Stress: Measurement of blood glucose, glycated proteins and intermediates. *Glycative Stress Res*. 2016; 3: 205-209.
- 68) Ishioka Y, Yagi Y, Ogura M, Yonei Y. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 22-34.