

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790037

研究課題名（和文） ナノ FIA システムを用いた新規リアルタイム TRAP 測定法の開発とその応用研究

研究課題名（英文） Development of new real-time TRAP measurement method with nano-FIA system and its application

研究代表者

和田 光弘 (Wada Mitsuhiro)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40295093

研究成果の概要（和文）：新規に開発したマイクロダイアリス法を組み合わせたナノ FIA システムを用いてラットに抗酸化剤を投与した場合の血液中の抗酸化活性をモニタリングし、その有用性を評価した。投与抗酸化剤にはアスコルビン酸（ASA）を用い、尾静脈注射、腹腔内投与及び経口投与と異なる投与経路を用いた場合の血中抗酸化活性の違いを評価した。

ASA 投与によって血液微量透析液の抗酸化活性は上昇し、投与後 6 時間まで持続した。その際、時間 - 反応曲線から算出した AUC(Quenching effect (%)×min) はそれぞれ 16260±1739 (i.v.), 12873±2152 (i.p.) 及び 6668±2251 (p.o.) であり、AUC 0-360 の割合を静脈内投与と比較すると、腹腔内投与では 78.4±9.5 %、経口投与では 39.0±13.4 % であった (n=3)。さらに ASA 投与によって増加した抗酸化活性が ASA 酸由来であることを、1) 透析液に対するアスコルビン酸オキシダーゼ処理によりその活性が消去されたこと及び 2) 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法を用いた HPLC-UV 法により ASA の定量を行うことで確認した。採取した血液透析液にアスコルビン酸オキシダーゼ処理を行うと、その抗酸化活性は ASA 投与前と同程度にまで低下した。また透析液の抗酸化活性と血中アスコルビン酸濃度との間には高い相関性が見られた($r=0.915$)。以上の結果から、今回開発したマイクロダイアリス法を組み合わせたナノ FIA 法は ASA 投与後の *in vivo* ラット血液抗酸化活性の経時的測定に有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Real time evaluation method of *in vivo* antioxidative effect in rat blood after administration of ascorbic acid (ASA) was studied. The antioxidative effect in small amount of samples (500 nL) was measured by nano-flow injection analysis method with chemiluminescence detection hyphenated with microdialysis method. Antioxidative effects of blood microdialysates obtained from rats administered 50 mg/kg ASA through different routes (intravein: i.v., intraperitoneal: i.p. and *per os*: p.o.) were evaluated. The increased effects were kept up till 360 min after administration. The AUC₀₋₃₆₀ (antioxidative effect %×min) were 16,260 ± 1,739 (i.v.), 12,873 ± 2,152 (i.p.) and 6,668 ± 2,251 (p.o.), respectively. On the other hand, antioxidative effects in brain microdialysates were not observed by the dose (50 mg/kg). Additionally the fact, which ASA was the source of antioxidative effect in microdialysate, was cleared by disappearing of the effect by treatment with ascorbic acid oxidase. Furthermore, the concentration of ASA in microdialysate determined was correlated with that of antioxidative effect ($r=0.915$).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、臨床化学

1. 研究開始当初の背景

現在、日本国内のみならず欧米諸国においても食品の抗酸化能を *in vitro* で評価する方法として、Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) 法が主流になっており、この標準化が進められている。一方、生体中の抗酸化能評価法としてはチオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) 法、TRAP 法などが用いられているほか、低密度リポ蛋白 (LDL) 過酸化阻害能による評価や、酸化ストレスマーカーとして 8-イソプロスタグランジン F_{2α} の測定、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG) の測定が行われている。これ等の内、TRAP は一般的に生体試料の抗酸化能の指標の一つであり、2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)(ABTS) または 2,2'-azobis(2-amino-propane)(ABAP) のラジカル生成による吸光度^{1,2)}あるいは生成したラジカルとルミノールの反応による化学発光強度³⁻⁵⁾が、生体試料中の抗酸化成分の存在により減少し、これがバックグラウンドレベルまで回復するまでの時間を TRAP とすると定義されている。TRAP の強度は、代表的な抗酸化剤である Trolox をコントロールに用い、その当価値であらわすのが一般的である。また本反応において生成するラジカル種はペルオキシラジカルであり、TRAP は主に chain-reaction breaking antioxidant potential を評価するといわれている。一部に TRAP が、尿酸、総ビリルビン、ビタミン類及び血漿タンパク性総チオール量に化学量論因子 (Stoichiometric factor) を乗じた総和を指す場合があるが⁶⁾、本申請では前者の定義を用いている。

これまでにアテローム性動脈硬化症の重篤度との関連性⁷⁾やプロリン及びハロペリドールを投与し、酸化ストレスを負荷したラット脳中の TRAP 測定によるストレス防御効

果の評価や^{4,5)}、ビタミンなどのサプリメント摂取と TRAP との関連性についての検討が行われている^{7,8)}。特に血漿 TRAP 値は体内のレドックスバランスを反映していると考えられており、健康状態を反映するパラメータとしてその測定は注目を集めている。

参考文献

- 1) L. Niculescu *et al.*, *J. Cell Mol. Med.*, **5**, 285-294 (2001).
- 2) M.J. Shin *et al.*, *Int. J. Cardiol.*, **118**, 173-177 (2007).
- 3) R.L. Torres *et al.*, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **37**, 185-192 (2004).
- 4) D. Delwing *et al.*, *Neurosci. Res.*, **52**, 69-74 (2005).
- 5) F.R. Agostinho *et al.*, *Neurochem. Res.*, **32**, 1343-1350 (2007).
- 6) S. Kharb, *Int. J. Gynecol. Obstet.*, **69**, 23-26 (2000).
- 7) A. Goyal *et al.*, *BJU Int.*, **99**, 1456-1450 (2007).
- 8) N. Pellegrini *et al.*, *J. Nutr.*, **137**, 93-98 (2007).

2. 研究の目的

申請者らは血液マイクロダイアリス (MD)を用いて、リアルタイムに TRAP 測定が可能な方法の構築を目的としている。MD 法は、微小な半透膜性のプローブを介して、体液や組織間隙における遊離物質を経時的に回収できる手法であり、当研究室でも実験動物を用いた薬理学的研究や、薬物動態学的研究に適用してきている。本研究は、1) NFIA 測定ユニットを用いることにより超微量試料での測定が可能となる、及び2) リアルタイムにかつ迅速に TRAP 測定が可能となる点を特徴あるいは独創的であると考え以下の項目を検討した。

1) NFIA 測定ユニットは、特徴として従来の FIA の特徴である迅速性・高精度性に加えて、極微量 (ナノリットルレベル) の試料量での測定が可能となるため、マウスなどの小動物を用いた MD に適用可能であり、生体中

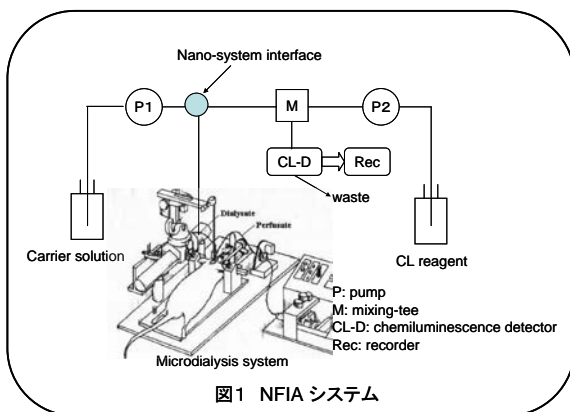
での化合物の生理活性を評価するプレクリニカルな研究にも適用可能となり、本研究に本システムを使用することでその特徴を最大限に引き出せると考えた。これまでに超極微小流量による FIA システムは開発されているが、これを MD 法と組み合わせた、抗酸化能測定に応用した報告は申請者の知る限り無い。

2) 本研究は、リアルタイムな TRAP 測定により実験動物を用いて病態発現あるいは抗酸化剤摂取と TRAP 変化の経時的な変化を評価可能であるため、抗酸化作用を有する医薬品や抗酸化サプリメントの抗酸化効果の動態を評価することが可能になると考えており、医薬品開発のためのスクリーニング法としても応用可能であると考えている。

さらに MD 法は、血液の他に脳などの臓器にも適用可能である。そこで将来的には脳 MD に適用する計画である。抗酸化化合物が脳組織にてその抗酸化能を発揮するためには脳-血液関門を通過する必要があり、血液中で強い抗酸化能を発揮しても、それが脳組織において有効であるとは限らない。本研究では MD 法を用いて標的組織である脳透析液中での抗酸化能を測定するため、脳選択的抗酸化剤の探索にも応用可能である。これまでに多くの医薬品あるいは食品の抗酸化能評価法が報告されているが、そのいずれにも組織特異的な効果を狙うという視点で行われていなかった。また MD 法は、この他多くの臓器に適用可能であることから、本研究の成功により適用範囲は大きく広がる可能性を有していると考えている。本申請は、組織選択的な抗酸化物質の探索という点で将来的には、さらに独創性を発揮できると考えている。

3. 研究の方法

NFIA システムは、キャリアー溶液及びルミノール化学発光試薬の 2 流路からなり、試料導入は微小透析液を採取して行った (図 1)。



MD 条件 : Wistar male rats (230~310 g) にカルバミド酸エチル (1.5 g/kg) を腹腔内投与

し麻酔を施した後、頸静脈に再生セルロース膜製プローブ (膜長 4 mm) を挿入した。灌流液として aCSF を、流速 2.0 μ L で 1 時間平衡化した後、得られた微量透析液をサンプル溶液とした。

Nano-FIA 条件 : carrier solution として 60 U/L peroxidase (POD) /50 mM phosphate buffer (pH 7.4)、luminol solution として 425 μ M luminol/50 mM carbonate buffer (pH 9.9) をそれぞれ 0.12 mL/min で送液し、生じた化学発光 (CL) を検出した。抗酸化活性評価はサンプル投与により減少する CL から以下の式を用いて算出した。

$$\text{Quenching effect (\%)} = \frac{\text{CL}(\text{blank}) - \text{CL}(\text{sample})}{\text{CL}(\text{blank})} \times 100$$

ASA 投与 : MD プローブ平衡化後、ラットにアスコルビン酸 (ASA, 50 mg/kg) を尾静脈 (i.v.)、または腹腔内 (i.p.) に投与し、投与後 6 時間まで一定間隔で微量透析液を採取した。

4. 研究成果

新規に確立した MD 法を組み合わせたナノ FIA システムを用いてラットに抗酸化剤を投与した場合の血液中の抗酸化活性をモニタリングし、その有用性を評価した。投与抗酸化剤には ASA を用い、尾静脈注射、腹腔内投与及び経口投与と異なる投与経路を用いた場合の血中抗酸化活性の違いを評価した。

ASA 投与によって血液微量透析液の抗酸化活性は上昇し、投与後 6 時間まで持続した。その際、時間 - 反応曲線から算出した AUC (Quenching effect (%) \times min) はそれぞれ 16260 \pm 1739 (i.v.)、12873 \pm 2152 (i.p.) 及び 6668 \pm 2251 (p.o.) であり、AUC 0-360 の割合を静脈内投与と比較すると、腹腔内投与では 78.4 \pm 9.5 %、経口投与では 39.0 \pm 13.4 % であった (n = 3、図 2)。

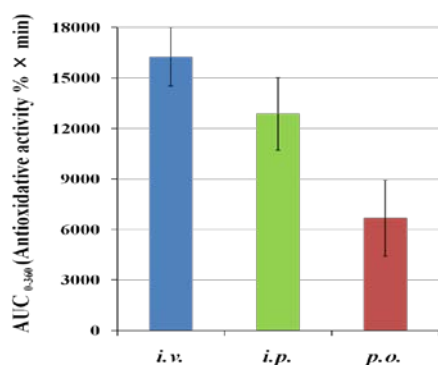


図2 各種投与経路によるASA投与後のラット血漿中抗酸化活性能

さらにASA投与によって増加した抗酸化活性がASA由来であることを、1)透析液に対するアスコルビン酸オキシダーゼ処理によりその活性が消去されたこと及び2)2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法を用いたHPLC-UV法によりASAの定量を行うことで確認した。採取した血液透析液にアスコルビン酸オキシダーゼ処理を行うと、その抗酸化活性はASA投与前と同程度にまで低下した。また透析液の抗酸化活性と血中ASA濃度との間には高い相関性が見られた($r=0.915$ 、図3)。以上の結果から、今回開発したMD法を組み合わせたナノFIA法はASA投与後の*in vivo*ラット血液抗酸化活性の経時的測定に有用であることが示された。

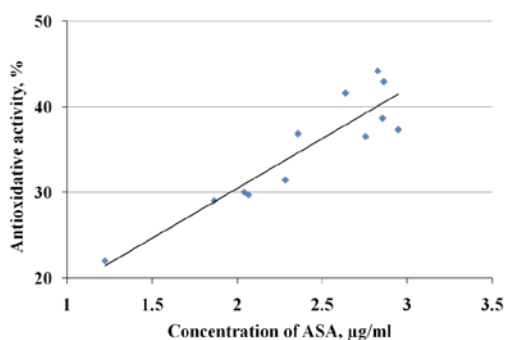


図3 ASAと抗酸化活性の相関性

意義、重要性：本抗酸化活性評価法は他の抗酸化能を有する食品、あるいはサプリメントの生体での抗酸化活性の評価に適用可能であると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

1. R. Ikeda, M. Wada, T. Nishigaki, K. Nakashima: Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species, *Food Chem.*, **113**, 1169-1172 (2009).
2. S. Ahmed., N. Kishikawa, K. Ohyama, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda: Selective determination of doxorubicin, doxorubicinol in rat plasma by HPLC with photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection, *Talanta*, **78**, 94-100 (2009).
3. J. Zhang, S. Jinnai, R. Ikeda, M. Wada, S. Hayashida, K. Nakashima: A simple HPLC-fluorescence method for quantitation of curcuminoids and its application to turmeric products, *Anal. Sci.*, **25**, 385-388 (2009).
4. S. Ichinose, M. Nakamura, M. Maeda, R. Ikeda, M. Wada, M. Nakazato, Y. Ohba, N. Takamura, T. Maeda, K. Aoyagi, K. Nakashima: A validated HPLC-fluorescence method with a semi-micro column for routine determination of homocysteine, cysteine and cysteamine, and the relation between the thiol derivatives in normal human plasma, *Biomed. Chromatogr.*, **23**, 935-939 (2009).
5. 本多 隆、和田光弘、中島憲一郎：長崎県の大気中ポリ塩化ビフェニルの定量とその汚染特性評価、*分析化学*, **58**, 211-220 (2009).
6. T. Honda, M. Wada, K. Nakashima: PCBs and PCDD/DFs in waste oil illegally-dumped and neglected for more than 20 years, *J. Environ. Sci. Health Part A*, **44**, 654-660 (2009).
7. K. Ohyama, N. Kishikawa, K. Matayoshi, L.A. Adutwum, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda: Sensitive determination of 1- and 2-naphthol in human plasma by HPLC-fluorescence detection with 4-(4,5-diphenyl-1*H*-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a labeling reagent, *J. Sep. Sci.*, **32**, 2218-2222 (2009).
8. K. Ohyama, K. Oyamada, N. Kishikawa, M. Arakawa, Y. Ohba, M. Kamino, M. Wada, K. Nakashima, N. Kuroda: Investigation of novel peptide chiral selectors prepared by solid-phase synthesis with a *tert*-butoxycarbonyl amino acid, *Chromatographia*, 1501-1504 (2009).
9. M. Wada, K. Abe, R. Ikeda, S. Harada, N. Kuroda, K. Nakashima: Enhancement of peroxyoxalate chemiluminescence intensity by surfactants and its application to detect detergent, *Talanta*, **81**, 1133-1136 (2010).
10. M. Wada, M. Kira, H. Kido, R. Ikeda, N.

Kuroda, T. Nishigaki, K. Nakashima: Semi-micro flow injection analysis method for evaluation of quenching effect of health foods or food additive antioxidants on peroxyxynitrite, *Luminescence*, in press (2010).

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 和田光弘、福永裕子、山形浩介、池田理恵、Suleiman M. Al-Khalil、中島憲一郎: 化学発光フローインジェクション分析法による西アジア原産植物の活性酸素種消去能評価、第 70 回分析化学討論会、和歌山（2009）。
2. 和田光弘、池田理恵、黒田直敬、中島憲一郎: 健康食品素材の抗酸化能評価、第 3 回薬学研究フォーラム in 東京、東京（2009）。
3. 和田光弘、中路洋輔、池田理恵、黒田直敬、中島憲一郎: マイクロダイアリシス-セミマイクロフローインジェクション法によるラットにおける抗酸化能測定法の開発、第 24 回バイオメディカル分析科学シンポジウム、宮城、（2010）。
4. 和田光弘、中路洋輔、池田理恵、黒田直敬、中島憲一郎: マイクロダイアリシス-セミマイクロフローインジェクション分析 (MD-SMFIA) 法によるラット血液および脳内抗酸化活性評価、第 59 回分析化学学会年会、宮城、（2010）。

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 光弘 (WADA MITSUHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：40295093