

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：27103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350101

研究課題名(和文) 抗酸化成分の相互作用解析と食品機能活用への展開

研究課題名(英文) Interaction analysis of antioxidants and application of their synergistic effects to functional foods

研究代表者

石川 洋哉 (ISHIKAWA, HIROYA)

福岡女子大学・国際文理学部・准教授

研究者番号：00325490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内抗酸化ネットワークに関わる成分間の相互作用をmedian effect analysisにより解析した。その結果、DPPHラジカル消去反応系において、カテコール・ピロガロール構造を有するポリフェノール類とチオール類との間で相乗効果を確認した。同様に、 α -トコフェロールとポリフェノール類での相乗効果も確認した。さらに、モデル細胞系(リボソーム系)において、ポリフェノール類とグルタチオンにおいて相乗効果を確認した。本研究の結果は、生体内抗酸化ネットワークにおいて上記化合物が相乗効果を発現する可能性を強く示唆しており、本成果は抗酸化物の有効利用に大きく寄与するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The interaction of antioxidants related to the physiological antioxidative network were investigated with median effect analysis of binary mixture of antioxidants. In the DPPH radical scavenging assay, the synergistic effects were observed on the combination of polyphenols, which have catechol and pyrogallol moiety, and thiols. Similarly, in the DPPH and linoleic acid peroxidation systems, the effect was observed in the combination of α -tocopherol and some polyphenols. In the liposome system as a model physiological system, the combination of some polyphenols and glutathione resulted in the synergistic effects. These results suggested that the combinations of above antioxidants would be useful in the physiological antioxidative network.

研究分野：食品分析学

キーワード：抗酸化成分 相乗効果 併用効果解析

1. 研究開始当初の背景

近年、疾病予防・老化予防（アンチエイジング）等の観点から、食品・天然物由来の抗酸化成分が注目され、数多くの報告がなされている。しかしながら、その報告のほとんどが有効成分の単離同定と個別の抗酸化能評価に留まっている。しかしながら、近年、酸化ストレス防御における抗酸化成分の生体内バランスの重要性が強く指摘され、抗酸化成分単独の効果ではなく、生体内に存在する抗酸化成分全体のバランスを考慮する必要があると考えられてきている。特に、生体内におけるビタミン C、ビタミン E、グルタチオン、 α -リポ酸、コエンザイム Q10 の相互作用ネットワークは抗酸化ネットワークと呼ばれ、各成分は単独で作用するだけでなく、他の抗酸化成分の再生（再活性化）に関与し、相乗的に作用していると言われている。新たな抗酸化成分を活用する場合には、生体内での抗酸化ネットワーク関連物質に対する相互作用を考慮し、「適切な量」を「適切な方法」で用いることが必須となる。

抗酸化成分間での相互作用が着目され、相乗効果が起こる可能性があることは確認されているが、「どのような条件下で、どの程度の相乗効果が起こるのか」、すなわち相乗効果の程度の見積りに関しては、十分な検証が行われていない。具体的には、抗酸化成分の相乗効果に関する報告は複数存在するが、相乗効果の見積りに用いた算出式の理論的根拠が明らかな論文は見当たらない。相殺効果についても同様であり、特に生体内で相殺効果が生じた場合には目的の効果が得られないため、重大な問題となる。

抗酸化物質間の相互作用は、予測された値（予測値）よりも実測値が大きければ相乗効果（synergistic effect）、小さければ相殺効果（antagonistic effect）、同等であれば相加効果（additive effect）と判定されるが、判定基準となる予測値の見積りは極めて難しい。我々は、有効な併用効果の解析法を模索し、薬剤の併用効果解析法として用いられてきた『Median effect analysis』を抗酸化食品成分併用効果の新規解析法として新たに提案した。本 Median effect analysis では、実験結果をもとに薬剤の反応型を推定し、反応型に応じた併用効果の解析を行うため、汎用性が極めて高い。さらに、本法により阻害割合に応じた CI (Combination Index) 値を算出することにより、併用効果を詳細に検討することが可能である。

2. 研究の目的

本研究は、相互作用解析に基づく、天然物由来の抗酸化成分の新たな活用法を提案することを目的とする。具体的には、生体内の抗酸化ネットワークに対して有効な抗酸化成分の選定と有効作用量の見積りを目的として、独自に適用を検討している Median effect analysis に基づいた相乗・相殺効果の

解析を行うとともに、その相互作用メカニズムの解明を試みた。また、選定された抗酸化成分の生体利用率、調理・加工時の安定性を考慮し、抗酸化物のマイクロカプセル化に関する知見の獲得を試みた。

3. 研究の方法

(1) 対象化合物

抗酸化物（酸化防止剤）として、 α -トコフェロール、エラグ酸、カテキン、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピガロカテキンガレート (EGCg)、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、ルチン、モリン、セサモール、フェルラ酸、没食子酸、アスコルビン酸を用いた。

(2) DPPH ラジカル消去活性測定法

試料溶液 200 μ L に 100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μ L を添加後、0.20 mM DPPH エタノール溶液 1 mL を添加し、10 秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて 30 分間静置した。30 分後、反応溶液の 517 nm における吸光度(As)を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール (Ac) とした。また、DPPH 溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率 (%) を求めた (下式)。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\text{Ac} - \text{As}}{\text{Ac}} \times 100$$

(3) ロダン鉄

0.1% リノール酸エマルジョン溶液 1 mL に対して 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) 500 μ L を添加後、100 mM AAPH 200 μ L 及びサンプル溶液 800 μ L を順次添加した。この反応液を 37°C で 5 時間インキュベーションした。その後、75% エタノール 4.7 mL、リノール酸反応溶液 100 μ L、30% チオシアン酸アンモニウム水溶液 100 μ L、20 mM 塩化鉄(II)溶液 100 μ L を順次添加・混合した。20 mM 塩化鉄(II)溶液の添加から正確に 3 分後に 500 nm における吸光度(As)を測定した。サンプル溶液の代わりに 99.5% エタノールを用いた際の吸光度をブランク (Ac) とし、試料の阻害率 (%) を DPPH 法と同様の式により算出した。

(4) リポソーム法

卵黄ホスファチジルコリン 5.6 mg をクロロホルム・メタノール(95:5(v/v))溶液 6 mL に溶解し、30 秒間攪拌した。0.5 mL ずつナスフラスコに分注した後、真空ロータリーエバポレーターと窒素ガスにて溶媒を留去した。0.01 M Tris-HCl buffer 0.7 mL を添加し、1 分攪拌後超音波処理を行った。溶液を孔径 100 nm のポリカーボネート膜に 21 回通すことに

よりリポソーム溶液を調製した。リポソーム溶液 1.0 mL を暗室で 37°C、5 分間プレインキュベーションを行った。AAPH 溶液 70 μ L を添加し 10 秒間攪拌後、暗所で 3 時間 (37°C) 反応させた。反応後のリポソーム溶液 300 μ L に 40 mM TBA 溶液 900 μ L を添加後 10 秒間攪拌し、沸騰水中で 35 分間加熱した。加熱後、氷水で冷却し、メタノール 300 μ L を添加した。その後、15 分間遠心分離 (10°C, 10000rpm) を行い得られた上清溶液 100 μ L を蛍光プレートリーダーで測定 (励起波長 525 nm、蛍光波長 560 nm) し、過酸化化物量を定量し、阻害率(%)を算出した。

(5) Median effect analysis

本法は、以下の式 (Median effect equation) に基づく解析方法である。

$$fa/fu = (D/Dm)^m$$

ここで、fa は阻害割合、fu は非阻害割合、D は dose (濃度)、Dm は Median effect (本実験では IC50) を生じる濃度、m は Hill 型の係数を示す。式を変形すると以下のようになり、

$$\log(fa/fu) = m \log(D/Dm)$$

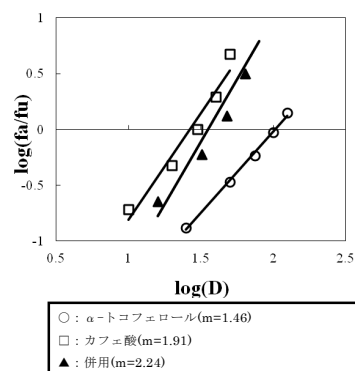
$\log(D/Dm)$ (あるいは $\log D$) を横軸に、 $\log(fa/fu)$ を縦軸にプロット (Median effect plot) することにより、傾き m を求めることが出来る。酸化防止剤単独及び併用時の Median effect plot から得られる m 値を基に、CI (Combination Index) 値を算出し併用効果を判定する (CI < 1 相乗効果, CI = 1 相加効果, CI > 1 相殺効果)。なお、本解析には、Hulinks 社 CalcuSyn (ver. 2.0) を用いた。

4. 研究成果

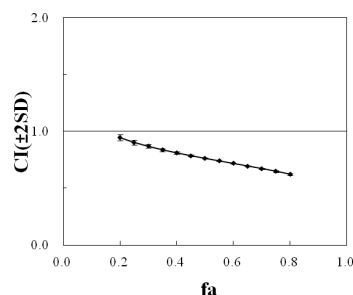
(1) α -トコフェロールと各種抗酸化物の併用効果解析

① DPPH 反応系 (アセトニトリル系)

アセトニトリル溶媒を用いて DPPH 法による α -トコフェロールと計 20 種類の抗酸化物との併用実験を試みた。実験の結果得られた (a) Median effect plot 及び (b) CI plot の一例を図 1 に示した。図 1 (a) の Median effect plot に示したように、実験の結果 α -トコフェロール (単独)、カフェ酸 (単独)、 α -トコフェロール・カフェ酸 (併用) 時の 3 本の用量依存直線が得られた。それぞれの直線の傾き (m 値) が算出され、m 値に基づき図 1 (b) の CI plot が得られた。 α -トコフェロールとカフェ酸併用時の CI plot では fa 値が 0.2 \leq fa \leq 0.8 の範囲において、CI 値がいずれも < 1.00 となっており、本組合せが相乗効果を発現することが確認された。さらに、fa 値の増加に伴い CI 値が顕著に減少 (fa=0.2 : 0.95 \pm 0.03 から fa=0.8 : 0.62 \pm 0.01) することも確認された。このことは併用時の濃度の増加に伴い相乗効果の程度が大きく増加することを示唆している。



(a) Median effect plot



(b) CI plot

図 1 α -トコフェロールとカフェ酸の併用効果

同様の傾向はケンフェロール、Q-3-G、ルチン、モリン、セサモール、プロトカテキ酸でも確認された。EC、カテキンとの組み合わせでも相乗効果を示すことが確認されたが、これらの組合せでは fa 値の増加に伴う CI 値の変化が小さく、相乗効果の程度が併用時の濃度の影響を受けにくいことが判明した。同様の傾向が EGC、EGCg でも確認されており、 α -トコフェロールとフラバン-3-オール類では相乗効果を発現するものの、添加濃度を増やしても大きな効果の増大は期待出来ないものと考えられた。 α -トコフェロールとミリセチンとの組合せでは、低濃度域 (fa=0.2) では相殺効果と判定されていたが、濃度の増加に伴い CI 値の低下が見られ、高濃度域 (fa=0.8) では相乗効果が確認された。同様の傾向が、エラグ酸、没食子酸、ピロカテコール、フェルラ酸の組合せで確認された。これらの組合せでは、 α -トコフェロールとの併用時の濃度が判定結果 (相乗・相殺) に特に重大な影響を与えることが明らかになった。今回供試した 20 種類の組合せの中で、相殺効果と判定されたのは、 α -トコフェロールとレスベラトロールとの組合せのみであった。

② リノール酸過酸化反応系 (ロダン鉄法)

ロダン鉄法を用いて、 α -トコフェロールと計 19 種類の抗酸化物の併用効果解析を試みた。実験の結果得られた (a) Median effect plot 及び (b) CI plot の一例として α -トコフェロールとミリセチンの併用効果解析を図 2 に示した。

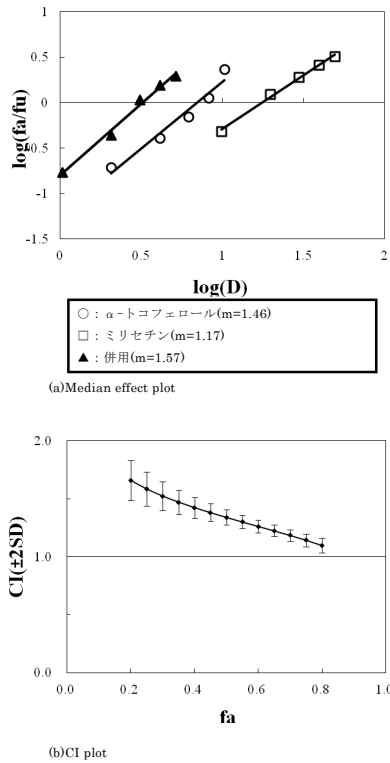


図2 α -トコフェロールとミリセチンの併用効果

図2のCI plotから、本組合せではいずれのfa値においても $1.00 < CI$ となっており、相殺効果と判定された。今回供試した組合せではほとんどがミリセチンの場合と同様の解析結果となり、ロダン鉄法による測定においては、 α -トコフェロールと他の抗酸化物の併用時にはほとんど相殺効果しか得られなかった。一方、DPPH法を用いた解析ではほとんどの組合せで相乗効果が確認されており、用いる反応系によって抗酸化物の相互作用が大きく異なることが明示された。上述のように、DPPHラジカル消去反応はSET反応に基づく評価法であるが、ロダン鉄法はHAT反応に基づく方法である。両者の反応メカニズムが異なることから、抗酸化物の相互作用の内容が異なる結果となった。ロダン鉄法のような水素原子供与反応系では、抗酸化物同士が緩やかな反応過程において拮抗的に作用し、また α -トコフェロールラジカルの再生反応が起こりにくいため、結果として抗酸化物間で相殺効果が生じたものと推察した。

(2) チオール化合物と各種抗酸化物の併用効果解析

①DPPH反応系（アセトニトリル系）

まず、グルタチオン（GSH）と計18種類の抗酸化物（カテキン、EC、EGC、ECg、EGCg、ケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン、Q-3-G、ルチン、モリン、フェルラ酸、ピロカテコール、没食子酸、セサモール、エラグ酸、プロトカテク酸、カフェ酸）の併用効果をDPPH法（水/エタノール系）により検討した。実験の結果得られた(a)Median effect

plot及び(b)CI plotの一例を図3に示した。

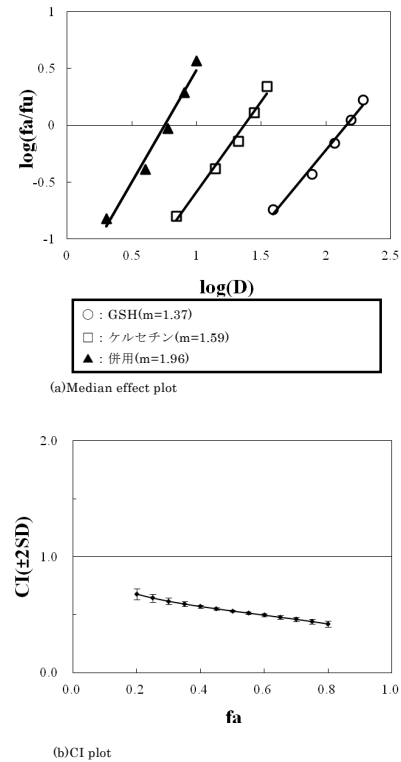


図3 GSHとケルセチンの併用効果

図3で示したように、GSHとケルセチン併用時のCI plotでは、fa値が $0.2 \leq fa \leq 0.8$ の範囲においてCI値がいずれも < 1.00 となっており、本組合せが相乗効果を発現することが確認された。さらに、fa値の増加に伴いCI値が顕著に減少($fa=0.2 : 0.68 \pm 0.05$ から $fa=0.8 : 0.42 \pm 0.03$)することも確認された。このことは併用時の濃度の増加に伴い相乗効果の程度が大きく増加することを示唆している。なお、同様の効果が、カテキン、ECなど多数で確認された（18化合物中13化合物）。今回供試した18種類の組合せの中で、相殺効果と判定されたのは、GSHとケンフェロールとの組合せのみであった。

GSHとの併用効果において、類似構造を持つ化合物間で相乗効果の程度を比較すると、ケルセチン>ミリセチン>ケンフェロールあるいは、カフェ酸>没食子酸>フェルラ酸の順となり、総じてカテコール>ピロガロール≫フェノールとなる傾向が確認された。

続いて、システイン（Cys）と各種抗酸化物の併用効果を検討した結果、18化合物中15化合物で相乗効果が確認された。相乗効果の程度（CI値）は、ミリセチン>ケルセチン>ケンフェロールあるいは、没食子酸>カフェ酸>フェルラ酸の順となり、ピロガロール>カテコール≫フェノールとなる傾向が確認され、GSHの場合と比較するとカテコールとピロガロールの効果が一部逆転する現象が確認された。

②リノール酸過酸化反応系（ロダン鉄法）

ロダン鉄法を用いて、GSH と計 13 抗酸化物の併用効果、Cys と計 6 抗酸化物の併用効果を解析した。

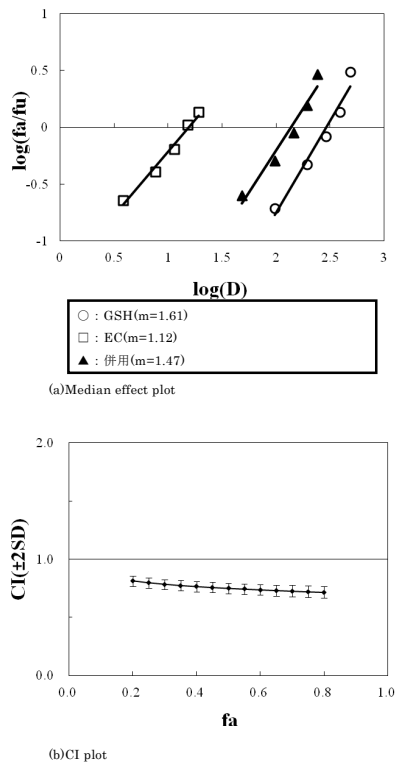


図 4 GSH と EC の併用効果

図 4 (a)Median effect plot 及び(b)CI plot に併用効果の一例を示した。GSH との併用では 13 化合物中 7 化合物において相乗効果が確認された。GSH と EC 併用時には、図 4 の CI plot でも明らかなように、 fa 値が $0.2 \leq fa \leq 0.8$ の範囲、すなわち供試した全濃度範囲において、CI 値が 0.7~0.8 の比較的大きな相乗効果が発現することが確認された。一方、エラグ酸との組合せでは、高濃度域では相乗効果 ($fa=0.8 : 0.77 \pm 0.02$) が確認されたが、低濃度域では逆に相殺効果 ($fa=0.2 : 1.40 \pm 0.10$) となり、相乗効果の濃度範囲が限定的なものであった。

Cys との併用効果は、供試した全ての 6 組合せで相乗効果が確認された。そのうち 4 組合せでは fa 全域において相乗効果となった。

続いて、ロダン鉄法を用いて、NAC と計 18 種類の抗酸化物の併用効果解析を試みた。その結果、ロダン鉄法による測定においては、18 化合物中 10 化合物の解析結果が $1.00 < CI$ となり相殺効果と判定された。上述のように DPPH 法を用いた場合にはほとんどの組合せで相乗効果が確認されており、両者の併用結果は全く逆の効果を示した。上記のように、DPPH 法とロダン鉄法では反応機構が大きく異なるため、併用時の相互作用も反応系の影響を大きく受けることが本実験の結果からも明示された。このことは、抗酸化物の併用

効果の解析には、目的に応じた抗酸化測定法の選択が極めて重要であること、すなわち対象となる活性酸素・ラジカルの種類や、食品の生体内での反応環境を十分考慮した抗酸化物間での相互作用解析の検討が必要であることを強く示唆するものであった。

③リポソーム反応系

リポソーム法において、膜外に局在したグルタチオン(GSH)と膜内に局在した計 6 種類の抗酸化物(ケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン、フェルラ酸、カフェ酸、没食子酸)の併用実験を試みた。実験の結果得られた (a)Median effect plot 及び(b)CI plot の一例を図 5 に示した。図 5 に示したように、GSH とケンフェロール併用時の CI plot では fa 値が $0.2 \leq fa \leq 0.8$ の範囲において、CI 値がいずれも < 1.00 となっており、本組合せが相乗効果を発現することが確認された。さらに、 fa 値の増加に伴い CI 値が顕著に増加 ($fa=0.2 : 0.44 \pm 0.03$ から $fa=0.8 : 0.69 \pm 0.03$) することも確認された。同様の傾向はミリセチン、フェルラ酸、カフェ酸でも確認された。ケルセチンとの組み合わせでも fa 値が $0.6 \leq fa \leq 0.8$ 相乗効果を示すが、濃度が低いと相乗効果が発現されないことが確認された。単一物質として膜内局在時の活性はケルセチン>ミリセチン>ケンフェロールであったのに対し、GSH との相乗効果の程度はケルセチン<ミリセチン≒ケンフェロールとなり、相乗効果の程度が個々の抗酸化力に依存しないことが示唆された。

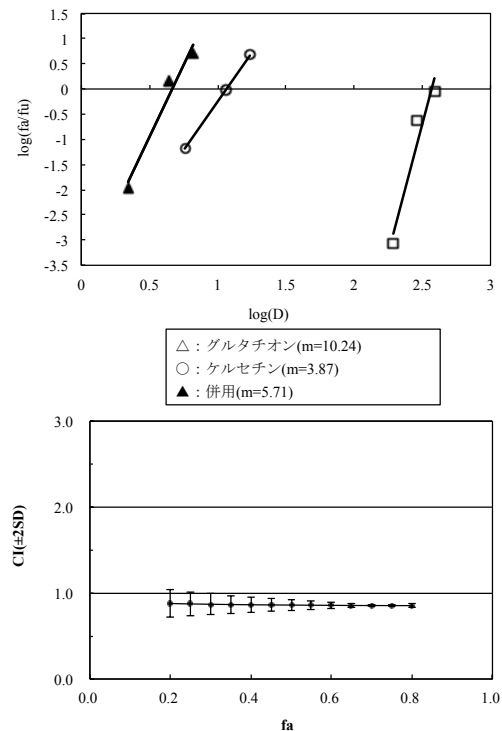


図 5 GSH とケンフェロールの併用効果

(3) まとめ

本研究では、median effect analysis を用いることにより、生体内抗酸化ネットワークに関わる化合物間の相互作用（相乗・相殺効果）を検討した。その結果、生体内の細胞膜での抗酸化に重要な α -トコフェロールと相乗・相殺効果を発現する抗酸化物を多数明らかにした。同様に、生体内では細胞膜外液中での抗酸化に重要なグルタチオン・システインなどのチオール化合物と相乗効果を発現する抗酸化物を多数明らかにした。さらに、相乗効果の発現に重要な抗酸化物の構造要因（カテコール、ピロガロール構造）を明示した。これらの成果は、生体内での抗酸化ネットワークの作用機作を解明する上で重要な知見と考えられる。また、本成果は、老化予防、健康維持を目的とした抗酸化物の利用における効率的な抗酸化物の利用方法に関する重要な知見と考えられた。すなわち、本研究で得られた組合せで抗酸化物を利用することにより、低用量で効果的な機能性を発現できる可能性が示唆された。さらに、リポソーム系での成果は、抗酸化物をリポソームカプセル化して提供する上での重要な知見を与えるものと考えており、本成果が今後の抗酸化物利用の一助となることを期待する。

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1件）

- ① 山内良子, 深水さやか, 小浜友紀子, 島村智子, 柏木丈広, 受田浩之, 穂山 浩, 松井利郎, 石川洋哉, 酸化防止剤力価評価を目的としたDPPHおよびABTSラジカル消去能評価法の特性比較、日本食品保蔵科学会誌、査読有、40(2), 55-63

〔学会発表〕（計8件）

- ① 山元 涼子, 藤田 睦, 山内 良子, 島村 智子, 柏木 丈広, 受田 浩之, 穂山 浩, 松井 利郎, 石川 洋哉, Median effect analysisによるチオール化合物と各種抗酸化物の相互作用解析、第50回化学関連支部合同大会 2013年7月6日(北九州)
- ② 山元 涼子, 藤田 睦, 山内 良子, 島村 智子, 柏木 丈広, 受田 浩之, 穂山 浩, 松井 利郎, 石川 洋哉, チオール化合物と各種抗酸化物のラジカル消去反応系における相乗効果、日本食品科学工学会第60回大会 2013年8月29-31日(東京)
- ③ 小浜友紀子, 山元 涼子, 山内 良子, 松井 利郎, 石川 洋哉, N-アセチルシステインと各種抗酸化物の相乗効果、日本農芸化学会2014年度大会、2014年03月27日-3月30日(東京)
- ④ 小浜友紀子, 山内 良子, 松井 利郎, 石川 洋哉, アセトニトリル系でのラジカル消去反応における抗酸化物の併用効果、

第51回化学関連支部合同大会 2014年6月28日(北九州)

- ⑤ 小浜友紀子, 山内 良子, 松井 利郎, 石川 洋哉, DPPH法とロダゲン鉄法における α -トコフェロールと各種抗酸化物の併用効果の比較、日本食品科学工学会第61回大会 2014年8月28-30日(福岡)
- ⑥ 小浜友紀子, 山内 良子, 小林弘司, 松井利郎, 石川 洋哉, 脂質過酸化反応における各種抗酸化物とチオール化合物の併用効果、日本農芸化学会2015年度大会、2015年03月26日-3月28日(岡山)
- ⑦ 山内 良子, 深川萌, 小浜友紀子, 石川 洋哉, システインおよびシステイン誘導体の脂質過酸化反応に対する併用効果、日本食品科学工学会第62回大会 2015年8月27-29日(京都)
- ⑧ 山内良子, 世古 なぎ, 圓口睦子, 石川洋哉、リポソームを用いた抗酸化能評価と抗酸化物の併用効果解析、日本農芸化学会2016年度大会、2016年03月27日-3月30日(北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 洋哉 (ISHIKAWA, Hiroya)
福岡女子大学・国際文理学部・准教授
研究者番号：00325490

(2) 研究分担者

清水 邦義 (SHIMIZU, Kuniyoshi)
九州大学大学院・農学研究院・准教授
研究者番号：20346836

山内 良子 (YAMAUCHI, Ryoko)
福岡女子大学・国際文理学部・助手
研究者番号：50638575