

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450178

研究課題名(和文)機能性食品の抗酸化能評価法に関する基盤的研究

研究課題名(英文)Basic Research for the Evaluation of Antioxidant Activity of Functional Food

研究代表者

安西 和紀 (Anzai, Kazunori)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70128643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：各種機能性食品の抗酸化能評価法として、ESR-スピントラッピング法および脂質過酸化評価法の2つについて基礎的な検討をおこなった。フェントン反応によるヒドロキシルラジカル発生系については2価鉄イオン濃度がシグナル強度に複雑な影響を与えることがわかり、測定対象の各種機能性食品が発生系の2価鉄イオン濃度に影響を与えないことを確認する必要があることが明らかになった。脂質過酸化評価法の1つとして赤血球の溶血を用いる方法の改良法を見だし、特に脂溶性化合物の抗酸化化成評価に使える可能性が示された。また、脂質過酸化における鉄イオンの役割が系によって異なることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：ESR-spin trapping and methods for the measurement of lipid peroxidation were examined for the application to evaluate antioxidant activities of various functional foods. Biphasic dependency of the generation of hydroxyl radical on the Fe<sup>2+</sup> concentration was observed when Fenton reaction was used. This finding suggests that effects of functional foods on the concentration of Fe<sup>2+</sup> should be considered when Fenton reaction is used to generate hydroxyl radical for the evaluation of hydroxyl radical scavenging activity of the samples. As one of evaluation methods for lipid peroxidation, a technique using hemolysis of red blood cells was examined. The method was improved and various antioxidants were examined by this technique. This method may be useful for the evaluation of lipophilic antioxidants. Results suggesting different roles of Fe<sup>2+</sup> on lipid peroxidation were also obtained.

研究分野：生物物理化学

キーワード：フェントン反応 ヒドロキシルラジカル 2価鉄イオン ESRスピントラッピング法 脂質過酸化 溶血  
抗酸化活性

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで放射線等により発生する活性酸素・フリーラジカルが生体障害をもたらす機構について、分子レベルから丸ごとの動物のレベルまでの様々なレベルで研究してきた。また、そのような活性酸素・フリーラジカルによる障害を防御する化合物について研究してきた。これらの研究を通じて、活性酸素・フリーラジカルによる障害を考える上では一口に活性酸素・フリーラジカルといってもそれがどのような種類のものであるかを明らかにするが重要であることを明らかにした。また、抗酸化物質を投与した後の生体への効果も単純ではないことも抗酸化物質による放射線防護の研究から実感した。本研究は、機能性食品等の抗酸化能評価法に関するいくつかの問題点について、将来の実用を見据えた基盤的検討を行おうと sita ものである。

機能性食品の抗酸化能評価には ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法がよく用いられている。ORAC 法は、fluorescein のような蛍光物質の蛍光が活性酸素の作用により低下することをビタミン E 誘導体で抗酸化活性を有する Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) を基準に測定する方法であり、比較的簡便である点では優れている。しかしながら、ORAC 法では測定している抗酸化活性が 1 種類の活性酸素種に対してだけであることが第 1 の問題点である。ORAC 法における蛍光強度の低下は、活性酸素による fluorescein 分子の構造変化によると考えられる。一般に活性酸素種には、ヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、スーパーオキシドラジカル ( $\cdot\text{O}_2^-$ )、過酸化ラジカル ( $\text{ROO}\cdot$ )、一酸化窒素 ( $\text{NO}\cdot$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) 等の様々なものがあるが、ORAC 法で測定している活性酸素種としては過酸化ラジカル ( $\text{ROO}\cdot$ ) と考えられている。すなわち、ORAC 法による評価では、過酸化ラジカル以外の活性酸素消去活性については評価していないことになる。抗酸化活性を有する機能性食品等が生体に有効に作用する時には、過酸化ラジカル以外の活性酸素種の消去能も関与していると予想されることから、過酸化ラジカル以外の活性酸素種に対する抗酸化能も調べて総合的に評価する必要がある。このような目的のためには ESR スピントラッピング法が最も適している。ESR スピントラッピング法は、発生させる活性酸素種を変え、又、スピントラッピング剤を変えることにより様々な活性酸素種の消去能の測定に使用できる。そこで、抗酸化物質において ORAC 法で測定される抗酸化能と、ESR スピントラッピング法で測定される活性酸素種ごとに対する抗酸化能を比較検討することが重要になってくる。

## 2. 研究の目的

機能性食品は、現代社会では健康維持のための重要な手段として認識され、一般大衆からの需要も大きくなっている。中でも抗酸化能を有するものについては、活性酸素・フリーラジカルが様々な疾患や病態の原因なると考えられることから、大きな関心が寄せられている。しかしながら、機能性食品の抗酸化能の評価については、2つの問題がある。1つは、機能性食品そのものの抗酸化活性をきちんと評価する方法がまだ十分に確立されていないことであり、2つめは、物質としての抗酸化活性と、それを摂取した後の生体が受ける効果との関係についての理解が不十分であるということである。本研究では、まず1つめの課題を克服するために、抗酸化物質そのものの抗酸化活性の評価法を改善することにより、抗酸化活性を有する機能性食品の評価のための基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ESR スピントラッピング法を用いたヒドロキシルラジカル測定法の検討

X-band ESR 装置 (JEOL) を使用し、石英製扁平セルを用いて測定を行った。 $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度を 0.5 mmol/L に固定し、 $\text{FeSO}_4$  濃度を 0~2.5 mmol/L の範囲で変化させ、DMPO (2.5 mmol/L) と 1 分間の反応で生成する DMPO-OH アダクトを測定した。DMPO-OH アダクト (ニトロキシルラジカル) に対する鉄の影響を検討するため、0.01 mmol/L の 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (4-hydroxy-TEMPO) に種々の濃度の  $\text{FeSO}_4$  を添加し、経時的にシグナル強度を測定した。

### (2) 赤血球の溶血を用いた抗酸化活性評価法の検討

赤血球の溶血が起こると、赤血球膜が破れヘモグロビン (Hb) が漏出する。すなわち、その Hb を測定することで溶血の指標とすることができる。馬血液を室温の条件にて遠心分離法により生食で三回洗浄し、沈殿を生理食塩水で 5 倍希釈することにより 20% 赤血球液を調製した。20% 赤血球液 5 mL に 100 mM AAPH を 5 mL 加え 37 °C にて放置して経時的に 1 mL ずつサンプリングした。遠心分離を行い、上清 0.4 mL を試験管に採取し、水を 2.6 mL 加えて分光光度計 (SHIMADZU の UV-2550) の試料とした。100% (完全) 溶血の試料は、20% 赤血球液を水で 7.5 倍に希釈して調製した。

## 4. 研究成果

### (1) ESR スピントラッピング法を用いたヒドロキシルラジカル測定法の検討

DMPO-OH シグナル強度に対する  $\text{FeSO}_4$  の濃度の影響

DMPO-OH アダクトのシグナル強度 ( $\text{Mn}^{2+}$  に対する相対強度) は  $\text{FeSO}_4$  の濃度の増加に伴い減少し、 $\text{FeSO}_4$  を 2.5 mmol/L

まで増加させると、DMPO-OH アダクトのシグナルはほとんど検出されなかった。

しかし、低濃度領域について、より細かく濃度を変化させたところ、FeSO<sub>4</sub> の濃度が 0.06 mmol/L まではシグナル強度は濃度の増加に伴い増加していることが確認された。すなわち、FeSO<sub>4</sub> の濃度がある一定量までは、Fenton 反応により発生した・OH が DMPO とアダクトを形成し、ESR で測定可能であるが、FeSO<sub>4</sub> が高濃度になると DMPO-OH アダクトが消失、もしくはアダクトが形成されていないことが確認された。これにより、DMPO-OH アダクトの寿命あるいは形成に鉄が影響していることが示唆された。

この原因として、Fenton 反応で発生される・OH 量そのものへの影響、DMPO と・OH アダクト形成過程への鉄の影響、形成された DMPO-OH アダクトへの鉄の影響 (DMPO-OH アダクトの還元) が考えられる。

Fenton 反応において発生される・OH 量について、FeSO<sub>4</sub> 濃度変化による影響を検討するため、デオキシリボースの・OH による分解物をチオバルビツール酸法により測定したところ、FeSO<sub>4</sub> 濃度 1 mM まではデオキシリボースの分解物の上昇が認められた。このことから、FeSO<sub>4</sub> 濃度 1 mM までは FeSO<sub>4</sub> 濃度の増加に伴う・OH の増加が示唆された。従って、FeSO<sub>4</sub> 濃度増加に伴い DMPO-OH アダクトが検出されなくなる原因に、・OH 産生量の減少は関与していないといえる。

また、低濃度と高濃度の FeSO<sub>4</sub> で Fenton 反応を行い DMPO-OH アダクトのシグナル強度を経時的に測定したところ、時間とともにシグナル強度が減少し、高濃度の FeSO<sub>4</sub> を用いた方が早い減少を示すことから、DMPO-OH アダクト形成時ではなく、アダクト形成後に対して FeSO<sub>4</sub> が影響を与えていることが示された。

DMPO-OH アダクトが鉄による還元を受けられる可能性を検討するため、4-hydroxy-TEMPO に FeSO<sub>4</sub> を添加し、シグナル強度を比較したところ、FeSO<sub>4</sub> 濃度の増加によりシグナル強度は減少した。また、FeSO<sub>4</sub> を添加後の時間とともにシグナルは小さくなることが確認された。

以上の結果より、Fenton 反応で鉄濃度を過剰に増大させると、DMPO-OH アダクトのシグナルが検出されなくなった原因として、鉄による DMPO-OH アダクトの還元が関与している可能性が示唆された。従って、Fenton 反応により・OH を発生させ DMPO-OH アダクトを ESR で検出する際、鉄の濃度に注意する必要があることが示された。

DMPO-OH シグナル強度に対する pH の影響

リン酸緩衝液を用いた場合、ただの H<sub>2</sub>O の系に比べて DMPO-OH アダクトのシグナル強度の減少は遅くなった。最初のシグナル

強度を 100% とした時の経時変化をグラフにし比べると、リン酸バッファーなしの方は時間が経つにつれ大きくシグナル強度が減少し、シグナル強度の半減期が約 30 分後であり、60 分後には約 22% 残っていたのに対し、リン酸バッファーありの方は、シグナル強度の減少が非常に遅く 60 分後でも約 84% 残っていた。

緩衝液の pH を変化させたところ、DMPO-OH アダクトのシグナル強度が変化したことから、pH も重要な条件のひとつであることが示唆された。

## (2) 赤血球の溶血を用いた抗酸化活性評価法の検討

赤血球の溶血により漏出した Hb は、ラジカル発生剤として使用した AAPH と反応して Hb のスペクトルに別の吸収帯が現れることがわかった。すなわち、Hb スペクトルのピーク (540 nm、570 nm) では溶血の正しい定量ができない事が明らかになった。あらかじめ調製した Hb に AAPH の濃度を変えて加えてスペクトルを測定したところ 2 つの等吸収点 (523 nm、590 nm) が存在する事がわかった。

すなわち溶血の定量には等吸収点を使用すればよく、吸光度の大きい 523 nm を用いることにした。

赤血球の溶血は AAPH 添加後 60 分くらいで起こったが、水溶性抗酸化剤 (アスコルビン酸、尿酸、Epi-カテキン、エダラボン) を加えることで溶血までの時間が延長した。Epi-カテキン、エダラボンは用量依存的な抗酸化作用を示さなかった。脂溶性抗酸化剤 ( $\alpha$ -Tocopherol、 $\alpha$ -Tocopherol acetate、 $\alpha$ -Tocopherol succinate、 $\gamma$ -Tocopherol dimethylglycine) では溶血反応を頭打ちにするという現象が見られた。この結果より、本手法は脂溶性抗酸化剤の評価に使用可能であることがわかった。今後、実験方法を更に検討し改良していくことが必要である。

## 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 8 件)

1. Hong Z, Kase Y, Moritake T, Gerelchuluun A, Sun L, Suzuki K, Terunuma T, Yasuoka K, Kumada H, Anzai K, Sakurai H, Sakae T, Tsuboi K. (2013) Lineal energy-based evaluation of oxidative DNA damage induced by proton beams and X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* **89** (1), 36-43. 査読あり
2. Hiroko P. Indo, Ikuo Nakanishi, Kei Ohkubo, Hsiu-Chuan Yen, Manako Nyui, Sushma Manda, Ken-ichiro Matsumoto, Kiyoshi Fukuhara, Kazunori Anzai, Nobuo Ikota, Hirofumi Matsui,

Yukiko Minamiyama, A. Nakajima, H. Ichikawa, S. Fukuzumi, Toshihiko Ozawa, Chiaki Mukai, Hideyuki J. Majima (2013) Comparison of in vivo and in vitro antioxidative parameters for eleven food factors. *RSC Advances*. **3**, 4535-4538. 査読あり

3. Kazunori Anzai, Megumi Ueno, Ken-ichiro Matsumoto, Nobuo Ikota, Jiro Takata (2014) Gamma-tocopherol-N,N-dimethylglycine ester as a potent post-irradiation mitigator against whole body X-irradiation-induced bone marrow death in mice. *J. Radiat. Res.* **55**, 67-74. 査読あり

4. Megumi Ueno, Minako Nyui, Ikuo Nakanishi, Kazunori Anzai, Toshihiko Ozawa, Ken-ichiro Matsumoto, Yoshihiro Uto (2014) Scavenging of reactive oxygen species induced by hyperthermia in biological fluid. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **54**, 75-80. 査読あり

5. 安西和紀、“安定ニトロキシラジカルを主に用いた ESR 法の生体応用に関する研究”、電子スピンスイエンズ、**11** (通号 20) , 4-11 (2013) 査読無し

6. Hsin-Ling Yang, Pei-Jane Huang, Yi-Ru Liu, K. J. Senthil Kumar, Li-Sung Hsu, Te-Ling Lu, Yi-Chen Chia, Tokuko Takajo, Anzai Kazunori, and You-Cheng Hseu (2014) *Toona sinensis* Inhibits LPS-Induced Inflammation and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells via Suppression of Reactive Oxygen Species and NF-B Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**, Article ID 901315, 16 pages 査読あり

7. 上野恵美、松本謙一郎、安西和紀、高田二郎、“担がんマウスを用いた炭素イオン線による腫瘍抑制に対する放射線防御剤の及ぼす影響”、ビタミン E 研究の進歩 XVI、19-22 (2014) 査読無し

8. Matsumoto K, Ueno M, Nakanishi I, Anzai K (2015) Density of hydroxyl radicals generated in an aqueous solution by irradiating carbon-ion beam. *Chem Pharm Bull*, **63** (3), 195-199. 査読あり

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 安西和紀、“放射線による活性酸素生成、生体障害、およびその防御”、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2013.6.13-14) 名古屋

2. 関根(鈴木)絵美子、中西郁夫、上野恵美、下川卓志、松本謙一郎、今井高志、安西和紀、村上健、“ラット胸腺細胞を用いた抗酸化剤のスクリーニング”、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2013.6.13-14) 名古屋市

3. 中西郁夫、稲見圭子、野村昌吾、和氣司、大久保敬、福原潔、鎌田正、安西和紀、福住俊一、小澤俊彦、松本謙一郎、望月正隆、“ビタミン C およびその誘導体の非水溶媒中におけるフリーラジカル消去反応”、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会(2013.6.13-14) 名古屋市

4. 安西和紀、松本謙一郎、中西郁夫、“活性酸素と防護”、日本放射線影響学会第 56 回大会 (2013.10.18-20) 青森市

安西和紀、上野恵美、“被ばく後の投与で有効な放射線障害防護剤”、日本放射線影響学会第 56 回大会 (2013.10.18-20) 青森市

5. 関根(鈴木)絵美子、中西郁夫、上野恵美、和氣司、小川幸大、下川卓志、松本謙一郎、安西和紀、村上健、“天然抗酸化物質の放射線防護活性スクリーニングとラジカル消去能の定量的評価”、第 52 回電子サイエンス学会年会 (SEST2013) (2013.10.24-26) さいたま市

6. 高城徳子、田口貴将、福間隆元、楊新玲、張淑貞、土田和徳、窪田洋子、安西和紀、“抗酸化評価のためのスピントラップ法における Fenton 反応の検討”、第 52 回電子サイエンス学会年会 (SEST2013) (2013.10.24-26) さいたま市

7. Emiko Sekine, Ikuo Nakanishi, Megumi Ueno, Yukihiko Ogawa, Tsukasa Waki, Takashi Shimokawa, Ken-ichiro Matsumoto, Kazunori Anzai, Takashi Murakami, “Radioprotective and radiomitigable activity screening of natural antioxidants and the quantitative evaluation”, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (2014.3.23-26) Kyoto, Japan

8. 安西和紀、上野恵美、松本謙一郎、高田二郎、“放射線被曝後投与でマウスの骨髄死を防御するビタミン E 誘導体  $\gamma$ -TDMG”第 17 回 Vitamin E Update Forum (2014.8.6) 東京

9. 関根(鈴木)絵美子、小川幸大、安田大輔、高橋恭子、中西郁夫、上野恵美、松本謙一郎、安西和紀、増野匡彦、村上健、“抗酸化活性尿酸アナログのラット胸腺細胞を用いた放射線防護活性評価”、第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2014.9.4-5) 京都市

10. 高城徳子、塗木勇介、横井杏沙、安西和紀、“赤血球の溶血を指標としたビタミン E 関連化合物の抗酸化能評価”、第 26 回ビタミン E 研究会 (2015.1.9-10) 東京

11. 阿部真也、福間隆元、田口貴将、高城徳子、土田和徳、窪田洋子、安西和紀、“フェントン反応によるヒドロキシラジカル発生系における鉄イオンの影響”、日本薬学会第 135 年会 (2015.3.25-28) 神戸市

12. 高城徳子、三宅大輔、土田和徳、窪田洋子、安西和紀、“TEMP (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone) を用いた一重項酸素の測定”、日本薬学会第 135 年会 (2015.3.25-28) 神戸市

13. Kazunori Anzai, Megumi Ueno, Ken-ichiro Matsumoto, Jiro Takata, “g-TDMG and Zn-yest, radiation mitigators, did not affect the carbon beam-induced growth inhibition of Xenograft tumor on mice”, 15th International Congress of Radiation Research (2015.5.25-29) Kyoto,

Japan

14. 安西和紀、塗木勇介、横井杏沙、高城徳子、“赤血球の溶血を指標とした抗酸化能評価”、第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2015.6.11-12) 鹿児島市

15. Nuruki Y., Yokoi A., Takajo T. and Anzai K., “Evaluation method for antioxidant activity of various compounds using an azo-compound-induced hemolysis of erythrocytes”, 7<sup>th</sup> Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia 2015) (2015.11.29-12.1)

Chiang Mai, Thailand

16. 安西和紀、“一般シンポジウム：新たな医療機器開発へ向けた異分野融合研究の最前線，総括”日本薬学科第 136 年会 (2016.3.26-29) 横浜市

〔図書〕(計 3 件)

1. 安西和紀、“第 6 章 治療における放射線生物学”，in 「医学物理の理工学 -下巻-」，上坂充、中川恵一、西尾禎治、金井達明 監修、pp. 133-152、2013 年、養賢堂

2. 安西和紀、“放射線防護剤”，in 「岩波生物学事典 (第 5 版)」，2013 年、岩波書店

3. 安西和紀、“活性酸素・フリーラジカルと酸化ストレス”，in 「酸化ストレスの医学 改訂第 2 版」，吉川敏一監修、内藤裕二、豊國伸哉編、pp.2-9、2014 年、診断と治療社

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安西 和紀 (ANZAI KAZUNORI)  
日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70128643

(2) 研究分担者

窪田 洋子 (KUBOTA YOKO)  
日本薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60271417

土田 和徳 (TSUCHIDA KAZUNORI)  
日本薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：50406633

高城 徳子 (TAKAJYO TOKUKO)  
日本薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：80424068