

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 - 2008

課題番号：19550019

研究課題名（和文） 分散・懸濁系での天然抗酸化剤の活性酸素消去とスピンドYNAMIX

研究課題名（英文） Kinetics and Spin-Dynamics in Quenching Reactive Oxygen Species with Natural Antioxidants in Dispersion / Emulsion Systems

研究代表者

小原 敬士（OHARA KEISHI）

愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10284390

研究成果の概要：

飲料・食品・化粧品・医薬品などで注目されている分散・懸濁系での天然抗酸化剤による活性酸素種消去ダイナミクスの詳細を明らかにするため、油水分散エマルジョン、水油分散の逆ミセル系の油水界面で起こる抗酸化反応を過渡吸収法及び一重項酸素 (1O_2) 近赤外発光寿命法などの時間分解計測を用いて研究した。スーパーオキシドラジカルや 1O_2 が天然抗酸化剤により油水界面近傍で消去されるダイナミクスを直接観測することに成功し、反応速度定数が求められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学（4601）

キーワード：化学反応・懸濁系・抗酸化・活性酸素・一重項酸素・近赤外発光・スーパーオキシド・過渡吸収

1. 研究開始当初の背景

生体に含まれる成分の薬効作用・毒性は興味深く重要なテーマであり、多数の研究が精力的に行われている。特に、活性酸素・フリーラジカル（ HO_2H , LO_2H , $LO_2\cdot$, $LO\cdot$, $HO\cdot$, 1O_2 , $O_2\cdot$ ）が老化やそれに伴う疾病に深く関与することが明らかにされ、生体に含まれる種々の抗酸化剤が活性酸素種に対する生体防御機能を担うことから、抗酸化活性

の研究が注目を集めている。生体では細胞や微小器官を構成する生体膜中または体液などの液相と膜の界面において、複数の活性物質が作用していることが多くの研究で示唆されており（図1）、膜界面のような媒質境界領域で起こる反応のメカニズムを明らかにすることは重要な課題である。媒質境界の抗酸化過程では、素材の活性のみならず活性酸素種・抗酸化剤の溶存状態の相違や反応場へのアクセスダイナミクスがあらわな影響を

与えると想定され注目される。しかし、系を生体に近づけるほど光学的透明性の低下により分光測定が困難となり、詳細な検討が行えなかった。これまで医学・薬学・農学系の研究者による天然抗酸化剤の機能評価は、ヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$)、スーパーオキシドラジカル ($\text{O}_2\cdot$) および一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) などの活性酸素種発生系を用い、スピントラップと反応させて安定な補足ラジカルに変換し電子スピン共鳴 (ESR) で検出するか、ルミノールなどの化学発光や蛍光で検出する方法で定量化が行われてきた。これらの方法は不透明な系の抗酸化活性の研究に有効ではあるが、抗酸化剤と標準物質との競争反応を基礎とし、定常状態での検出強度と薬剤濃度との相関から活性を求める方法なので、他の過程による妨害を受けやすく、膜界面や多成分系で生じるような複雑な過程を詳細に検討することはできない。

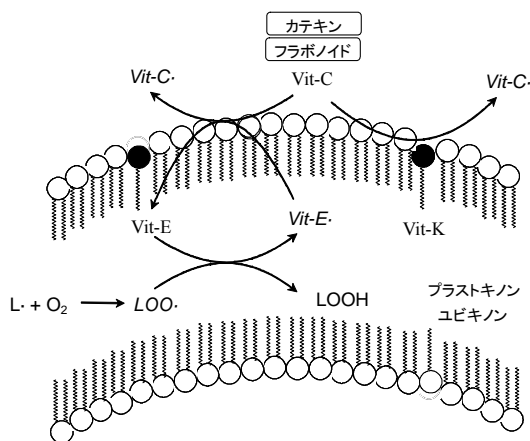


図1 生体膜界面での抗酸化反応

分散/懸濁系 (エマルジョン) は、牛乳や野菜ジュースなどの飲料・食品・化粧品などにみられる油と水のように相互溶解しない媒体からなる不均一系の一つで、血液など生体組織中にも見いだすことができる。近年では、医薬品・インクジェットプリンターインクや塗料などの身近な工業製品に盛んに応用され、酸化防止あるいは新機能の付加のためにますます重要性を増している。 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{O}_2\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ などの活性酸素は飲料・食品や工業製品の劣化も引き起こすので、分散/懸濁系における抗酸化過程の研究は、医薬・食品・工業に応用可能な有効な酸化防止技術を進展させる可能性がある。のみならず、分散/懸濁系における研究は、生体組織の *in vivo*, *in vitro*, モデル溶液系の研究群を接続し、生体の優れた抗酸化機能のメカニズムを解明する足がかりとなる。このような分散/懸濁系に対しては、従来の静的な活性酸素評価系ではなく、直接反応ダイナミクスを観測できる時間分解法を適用しなければならない。

2. 研究の目的

本研究では、研究実施者がこれまでに分散/懸濁系での研究のために開発してきた蛍光検出ストップフロー法・時間分解 ESR 法・ $^1\text{O}_2$ 近赤外発光寿命計測法など、光散乱や光学的透明度低下の影響を受けにくい時間分解計測法を複合的に用いて、光学的透明性が低い生体系や飲料等をモデルとする分散/懸濁液中に複数の天然抗酸化剤が含まれる多成分系の活性酸素種消去過程について、速度論的研究により詳細を明らかにすることを目的とする。系内のフリーラジカル・ $^1\text{O}_2$ などの反応成分、あるいは指標物質の濃度の時間変化を直接追跡することにより、天然抗酸化剤の抗酸化過程に含まれる複雑なスピンドイナミクスの詳細な検討が可能と考えられる。本研究の成果により、牛乳や野菜ジュース・乳酸菌飲料・血液あるいはインクジェットプリンターインクや塗料などのエマルジョンにおける反応ダイナミクスを直接測定できる広い分野で応用可能な評価法を提供するとともに、生体系における抗酸化の相乗効果・相殺効果のメカニズムの一端が明らかにできるものと期待できる。

3. 研究の方法

(1) $^1\text{O}_2$ 近赤外発光寿命測定法による $^1\text{O}_2$ 挙動の観測

従来にない高感度・高時間分解能の単一光子計数型近赤外発光寿命測定装置 (浜松ホトニクス C-7990-01, 既存) の利用により、重溶媒や発光増強溶媒を使用することなく 1274 nm の $^1\text{O}_2$ 発光強度の時間変化を現実に近い系で計測することが可能となった。この $^1\text{O}_2$ 発光計測は、 $^1\text{O}_2$ 動態を検討する上でもっとも信頼性の高い方法である。Rose Bengal による光増感で $^1\text{O}_2$ を発生させ、セル前面の観測により散乱と試料濁度の問題を解決し、分散/懸濁系の $^1\text{O}_2$ 挙動測定を可能とした。

(2) 過渡吸収・時間分解 ESR 法による天然抗酸化剤の活性酸素種消去過程の直接計測

ナノ秒レーザー励起過渡吸収測定装置 (ユニソク TSP-1000, 検出/解析システムを本研究費で購入) を用い、抗酸化剤が共存する系での光分解反応における短寿命ラジカルの過渡吸収の時間変化を測定した。試料の透明度に応じて光学セルを変更し分散/懸濁系の測定に適用した。また、市販の電子スピン共鳴装置 (JEOL FA-100, 既存) に改造を加えた時間分解 ESR 装置を用いて、短寿命ラジカル種の EPR スペクトル測定を試みた。

(3) ストップフロー法による天然抗酸化剤の活性酸素種消去過程の計測

ストップフロー測定装置（ユニソク RSP-1000F, 既存）を用い、モデルラジカル及び抗酸化剤の溶液を急速混合して、モデルラジカルの吸収またはラジカル還元体の蛍光の時間変化を計測することにより抗酸化反応過程を追跡した。分散/懸濁系に適用するために観測セルを変更した。

4. 研究成果

(1) ビタミン E エマルジョン中の¹O₂挙動

ビタミン E (VE) (Tocopherol) は、生体内で重要な働きをする脂溶性の抗酸化剤で、通常高い¹O₂消去活性を示す。VE は水に不溶であるが、水-エタノール混合溶媒等に微細な油滴として分散させることによりエマルジョンが得られる。置換基が異なる VE である α -及び δ -Tocopherol (α -TocH, δ -TocH) を水-エタノール (1:1) 溶媒に分散したエマルジョンで¹O₂発光の減衰速度 (k_d) を計測し¹O₂動態を検討した。この系での¹O₂減衰速度の VE 濃度依存性は特異な挙動を示し (図 2)、均一系で通常みられるような¹O₂消去過程では説明できない。 δ -TocH において、エマルジョン形成前の低濃度領域 ($[VE] < 5 \times 10^{-4} \text{ M}$) では VE による¹O₂消去のため濃度増大に伴い k_d が増大するが、エマルジョン形成域では k_d がほとんど一定となった。 α -TocH では低濃度域 ($[VE] > 2 \times 10^{-4} \text{ M}$) からエマルジョンを形成し、濃度増大に伴い顕著に k_d が減少した。 k_d が¹O₂の存在環境に敏感なことから、VE 油滴近傍の¹O₂挙動が主に捉えられたことが考えられる。

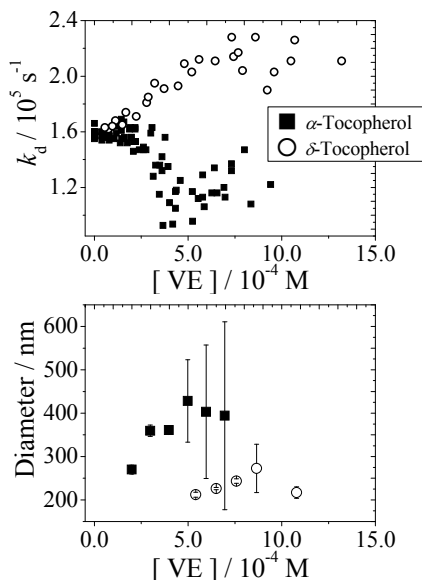


図 2 k_d と油滴粒径の $[VE]$ 依存性

動的光散乱法で計測した VE エマルジョン中の油滴粒径と¹O₂減衰速度 k_d の変化はよい相関を示した。 α -TocH の油滴粒径は濃度増大により大きく増大し、それとともに k_d が大きく減少する。さらに高濃度の領域では粒径の増大が停止しほぼ一定となるとともに、 k_d の変化も停止する。 δ -TocH の油滴粒径は α -TocH の 1/2 程度で、濃度増大に対する変化も小さい。この VE 間の相違は、メチル置換基数の違いにより油滴表面の疎水性が異なり、油滴の表面張力に影響するためと考えられる。 k_d の挙動は油滴粒子の表面積に相関すると考えられ、VE 油滴の表面近傍に¹O₂が捕捉され、環境媒体極性の低下により¹O₂減衰が顕著に遅くなったと考えられる。

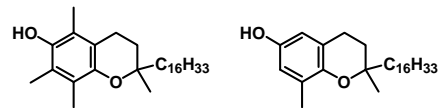


図 3 α -、 δ -Tocopherol の構造式

(2) ミセル系の¹O₂挙動と抗酸化剤の作用

SDS, CTAC ミセル, Aerosol OT (AOT) 逆ミセル系の¹O₂挙動と、それに対する脂溶性、水溶性の抗酸化剤の作用を¹O₂近赤外発光寿命測定により研究した。SDS, CTAC ミセル中の k_d は、水溶性の VE である Trolox の添加により特異な変化を示し、均一溶液相とミセル界面近傍の両者の¹O₂ダイナミクスの存在が示唆された (図 4)。また、逆ミセル溶液中ではビタミン C (VC) と VE が単独でも高い¹O₂消去活性を示す一方、共存系では VC の寄与が顕著となることから、主に水相に近い逆ミセル界面近傍で¹O₂消去が起こると考えられる。

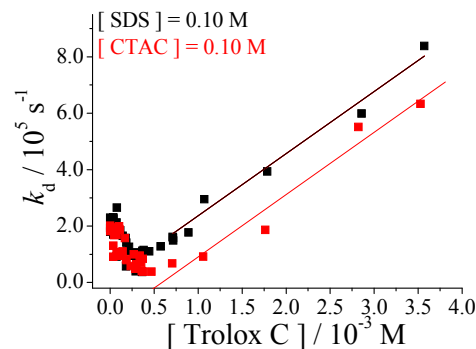
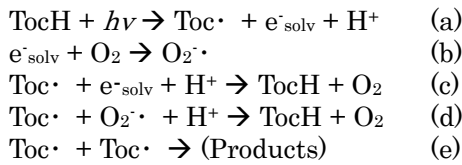


図 4 ミセル系での k_d の $[VE]$ 依存性

(3) 油水エマルジョン・逆ミセル系でのビタミン E 光分解過程と抗酸化反応

VE の紫外光分解によって生成するラジカルの消去過程について、水・エタノール混合溶媒に VE を分散した油水エマルジョン系と水油分散系の逆ミセル系において過渡吸収

法により検討した。266 nm 光による VE の光分解で生成する VE ラジカル (Toc \cdot) は 3 段階の減衰を示し、(c): < 1 μ s, (d): 10-200 μ s, (e): \sim s の過程と帰属された。特に過程(d)について O $_2\cdot$ と Toc \cdot の二次反応速度定数が $k_2 = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定され、拡散律速に準ずることが示された。VE の均一溶液では定常及び時間分解 EPR 測定で明瞭な Toc \cdot のスペクトルが観測されたが、CIDEP 強度は小さく、スピン分極生成を伴わない一重項経由の光イオン化による反応機構(a)を支持した。VE エマルジョン系では、定常 EPR スペクトルは観測されず、Toc \cdot の収量と寿命が小さくなっている過渡吸収の結果を支持した。



AOT 逆ミセル中に水溶性抗酸化剤のビタミン C (VC) を分散共存させた系の VE 光分解の過渡吸収測定を行い、逆ミセル界面での VC の Toc \cdot 消去への関与について調べた。反応(d)のみかけの速度定数 k_2 が VC 濃度に対して二次関数的に増大した(図 5)ことから、Toc \cdot と O $_2\cdot$ の両方がそれぞれ逆ミセル界面近傍で VC により消去される(f), (g)の過程の存在が確認された。

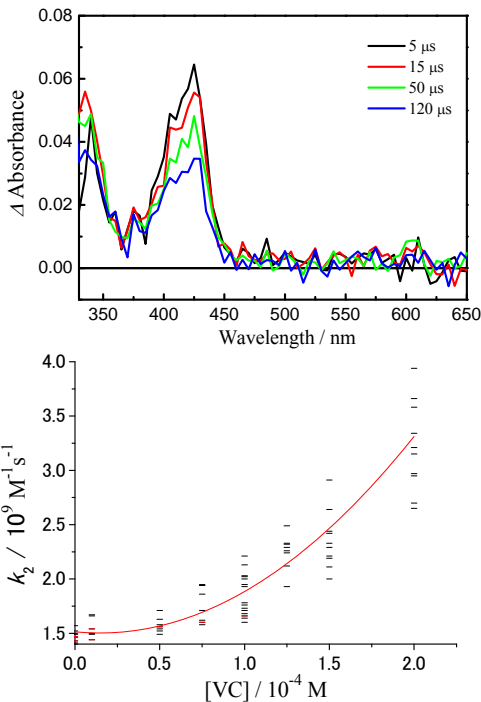
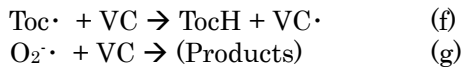


図 5 過渡吸収スペクトルと k_2 の [VC] 依存性

(4) VE エマルジョンのフリーラジカル消去と共存抗酸化剤の相乗効果

水-エタノール混合溶媒に α -TocH を分散した VE エマルジョンの Galvinoxyl (Gal) 及び DPPH フリーラジカル消去(h)の擬一次反応速度定数 (k_{obsd}) をストップフロー分光測定装置で計測した。さらに、VE, VC 共存による抗酸化の相乗効果の検討を行った。



k_{obsd} の VE 濃度依存性は特異な挙動を示し(図 6)、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ で屈曲する折れ線状となった。 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以上の濃度でエマルジョンを形成するので、この挙動は VE 油滴生成により溶液相の VE 濃度上昇が停止したためと解釈できる。従って、VE 油滴自体はラジカル消去にほとんど寄与していない。一方、VC を加えると k_{obsd} が大きく増大し、DPPH の場合 VC を含まない系からの予測より 30% 増となった。これは VE と VC の共存による相乗効果であり、一部は VC による Toc \cdot の還元で説明されるが、詳細は明らかでない。Gal では、さらに巨大な相乗効果が観測され、油滴近傍での VE と VC の相互作用が推測される。これらの相乗効果についてはさらに詳細な検討が必要と考えられる。

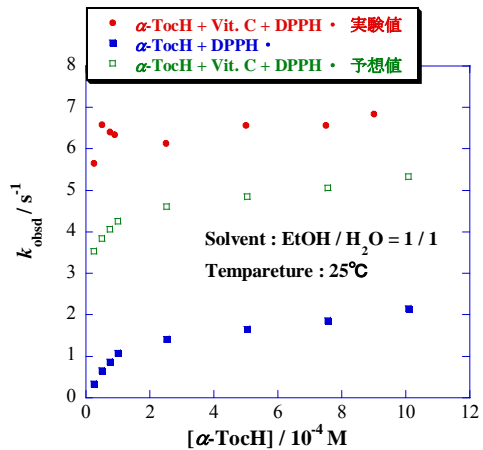


図 6 DPPH 消去の擬一次反応速度定数 k_{obsd} の [VE] 依存性

(5) 金属コロイド粒子の抗酸化活性の評価
化粧品などに応用され始めている金コロイドの抗酸化能評価系の確立を目指し、金コロイド溶液中の $^1\text{O}_2$ 挙動、フリーラジカル消去挙動の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

① Kazuo Mukai, Aya Ouchi, Akiko Mitarai, Keishi Ohara, Chihiro Matsuoka, "Formation and Decay Dynamics of Vitamin E Radical in the Antioxidant Reaction of Vitamin E", Bulletin of the Chemical Society of Japan, 82, 494-503 (2009), 査読有.

② Keishi Ohara, Yoko Ichimura, Shin-ichi Nagaoka, "Kinetic Study of Singlet-Oxygen Quenching by Caffeic Acid and Related Phenols", Bulletin of the Chemical Society of Japan, 82, in print (2009), 査読有.

③ Takuhiro Kakiuchi, Kazuo Mukai, Keishi Ohara, Shin-ichi Nagaoka, "Tunneling Effect in Antioxidant Reaction of Flavonoid", Bulletin of the Chemical Society of Japan, 82, 216-218 (2009), 査読有.

④ Kazuo Mukai, Aiko Tokunaga, Shingo Itoh, Yu Kanesaki, Aya Ouchi, Keishi Ohara, Shin-ichi Nagaoka, and Kouichi Abe, "Comparison between the free-radical-scavenging activities with vitamin E and ubiquinol in biological systems based on their reaction rates: A research account", Biofactors 32, 49-58 (2008), 査読有.

⑤ Keishi Ohara, Yoshimi Hashimoto, Chiaki Hamada, Shin-ichi Nagaoka, "Time-Resolved EPR Investigation on the Photoreactions of Vitamin K with Antioxidant Vitamins in Micelle Systems", Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry, 200, 239-245 (2008), 査読有.

⑥ Keishi Ohara, Takashi Origuchi, Kanako Kawanishi, Shin-ichi Nagaoka, "Behavior of Singlet Oxygen in Vitamin E Emulsion", Bulletin of the Chemical Society of Japan, 81, 345-347 (2008), 査読有.

⑦ Shin-ichi Nagaoka, Akiko Fujii, Megumi Hino, Mai Takemoto, Misaki Yasuda, Mariko Mishima, Keishi Ohara, Akane Masumoto, Hidemitsu Uno, Umpei Nagashima, "UV Protection and Singlet Oxygen Quenching Activity of Aloesaponarin I", The Journal of Physical Chemistry B, 111, 13116-13123 (2007), 査読有.

〔学会発表〕(計 10 件)

① 折口孝, 小原敬士, 長岡伸一, 「ビタミン E エマルジョンにおける一重項酸素発光寿命の油滴サイズ依存性」, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 30 日 (船橋).

② 池田明広, 小原敬士, 長岡伸一, 「AOT 逆ミセル中のビタミン E 光分解系でのビタミン C の抗酸化挙動」, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 27 日 (船橋).

③ 長岡伸一, 藤井亜紀子, 日野めぐみ, 竹本真唯, 保田三沙貴, 三島麻里子, 小原敬士, 榎本茜, 宇野英満, 長嶋雲兵, 「アロエサポナリン I の紫外線防御と一重項酸素消去の機能」, 第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2008 年 6 月 19-20 日 (京都).

④ 折口孝, 菊地香織里, 小原敬士, 長岡伸一, 「ビタミン E を含むミセル系における一重項酸素発光寿命」, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 28 日 (東京).

⑤ 吉本摩耶, 小原敬士, 長岡伸一, 「ビタミン E の不均一系での抗酸化反応の速度論的研究」, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 29 日 (東京).

⑥ K. Mukai, A. Tokunaga, S. Itoh, Y. Kanesaki, K. Ohara, S. Nagaoka, K. Abe, "Comparison between the Free-Radical-Scavenging Activities with Vitamin E and Ubiquinol in Biological Systems Based on the Reaction Rates", 5TH CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL COENZYME Q10 ASSOCIATION, 2007 年 11 月 9-12 日 (神戸).

⑦ K. Ohara, A. Shimizu, Y. Wada, S. Nagaoka, 「Photoinitiated Radical Reaction in the Vitamin E Emulsion」, 電子スピンスイエンズ国際会議-第 46 回電子スピンスイエンズ学会年会合同討論会(ISESS-SEST2007), 2007 年 11 月 6-9 日 (静岡).

⑧ 清水 亜由美, 和田 有紀, 小原敬士, 長岡伸一, 「不均一系におけるビタミン E の光化学反応の研究」, 第 1 回分子科学討論会, 2007 年 9 月 17-20 日 (仙台).

⑨ 折口孝, 小原敬士, 長岡伸一, 「Vitamin E Emulsion 系での一重項酸素寿命」, 第 29 回日本フリーラジカル学会/日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第 31 回大会 合同学会, 2007 年 6 月 9-10 日 (名古屋).

⑩ 吉本摩耶, 小原敬士, 長岡伸一, 「 α -Tocopherol 懸濁系での抗酸化反応の速度」, 第 29 回日本フリーラジカル学会/日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第 31 回大会 合同学会, 2007 年 6 月 9-10 日 (名古屋).

〔図書〕〔産業財産権〕〔その他〕なし

6. 研究組織

研究代表者

小原 敬士 (OHARA KEISHI)

愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10284390