

平成 30 年 4 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07431

研究課題名(和文)食品の抗酸化能力を評価する方法の開発

研究課題名(英文)Development of Antioxidative Absorption Capacity Assay Method for Foods

研究代表者

長岡 伸一 (Nagaoka, Shin-ichi)

愛媛大学・理工学研究科(理学系)・教授

研究者番号：30164403

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)：様々な抗酸化物質や食品が活性酸素の一つであるフリーラジカルを消滅させる能力を評価する方法(Aroxyl Radical Absorption Capacity (ARAC)法)、同様に一重項酸素を消滅させる能力を評価する方法(Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC)法)、およびフリーラジカルによりされた酸化されたビタミンEを再生する能力を評価する方法(Alfa-Tocopherol REcycling Capacity (ATREC)法)の開発と高度化を行った。得られたデータはデータベースに纏めて公表している。

研究成果の概要(英文)：An aroxyl radical absorption capacity assay-method (ARAC assay method), a singlet oxygen absorption capacity assay-method (SOAC assay method), and an alfa-tocopherol-recycling capacity assay-method (ATREC assay method) were developed for various antioxidants and foods, such as flavones, anthocyanidines, hydroxyanthraquinones, unsaturated fatty acids, carotenoids, catecholamines, pyrroloquinoline quinol, catechins, vegetable oils, rice bran extracts, and so on. The aroxyl radical is a model of free radical, which is, as well as singlet oxygen, one of the reactive oxygen species. The data obtained here are summarized as a database and available as AbsorptionCapacity.accdb on our website at http://chem.sci.ehime-u.ac.jp/~struct1/int_naga.pdf.

研究分野：反応化学

キーワード：食品機能

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では体重あたりの酸素消費量が増加するのに反比例して寿命が短くなる [1]。こうした寿命を縮める酸素の副作用は酸素から生じる活性酸素・フリーラジカルによる脂質の過酸化が引き起こしていると考えられている。天然抗酸化剤は、生体中の色々な組織に存在し、こうした活性酸素・フリーラジカルを除去し、代表的抗酸化剤であるビタミン E (α-トコフェロール、α-TocH) がフリーラジカルによって酸化されてしまえば元の α-TocH に再生して老化を防いでいる。国内外を問わず半数近い消費者が抗酸化力の情報を食品表示に取り入れてほしいと期待しているが [2]、老化防止に貢献している種々の食品や含まれる物質の抗酸化活性を評価する実用的で汎用的な方法は未だに確立していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、様々な食品や抗酸化物質が活性酸素の一つであるフリーラジカルを消滅させる能力を評価する実用的で汎用的な方法 (Aroxyl Radical Absorption Capacity (ARAC) 法)、同様に一重項酸素を消滅させる能力を評価する方法 (Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) 法) を確立・発展させ、フリーラジカルにより酸化された α-TocH を再生する能力を評価する方法 (Alfa-Tocopherol REcycling Capacity (ATREC) 法) の開発を行い、新たな食品の抗酸化活性の分析方法を創出することを目的とした。そして最終的には三つの方法を統合して抗酸化活性の分析方法として行政に提案することにより、食品の正確な抗酸化活性の表示に寄与することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ARAC 法ではシングルミキシングストップフロー分光法を用いて、フリーラジカルとしては合成したアロキシルラジカル (ArO \cdot) を使って、様々な抗酸化剤のフリーラジカル除去速度 (k_s) を求めることができる [3]。例としてエタノール (EtOH) 中でビタミン E (α-トコフェロール、α-TocH) が ArO \cdot を除去して α-トコフェロキシルラジカル (α-Toc \cdot) が生成する時間変化を図 1 に示す。ArO \cdot の吸光度が減少して、α-Toc \cdot の吸光度が増加しているのが分かる。α-TocH の濃度と ArO \cdot の減衰速度のプロットから k_s が求められる。求められたサンプルの k_s と α-TocH の k_s の値の比を ARAC 値とする。

(2) SOAC 法の概要を図 2 に示す。一重項酸素の発生剤として合成したエンドペルオキシド (EP) を使い、35℃ で熱分解により EP から生成される一重項酸素 (1O_2) を抗酸化剤とジフェニルベンゾフラン (DPBF) が競争しながら除去していく時間変化を DPBF の吸光度の減衰をモニターすることで追跡する。抗酸化剤の濃度と DPBF の減衰速度のプロットから一重項酸素除去速度 (k_Q) が求められる。こうして求められたサンプルの k_Q と α-TocH の k_Q の値の比を SOAC 値とする [4]。

(3) 開発した ATREC 法ではダブルミキシングストップフロー分光法を用い、様々な抗酸化剤のビタミン E 再生速度 (k_r) を求めることができる [5]。例としてエタノールと水の混合溶媒 (EtOH/H $_2$ O) 中でビタミン C (VitC) が α-Toc \cdot と反応して α-TocH が再生する時間変化を図 3 に示す。VitC の濃度と α-Toc \cdot の減衰速度のプロットから k_r が求められる。この方法を食品による α-TocH 再生能力評価に応用する。求められたサンプルの k_r と VitC の k_r の値の比を ATREC 値とする。

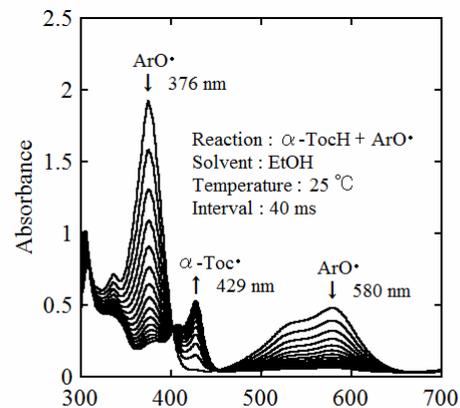


図 1 ARAC 法

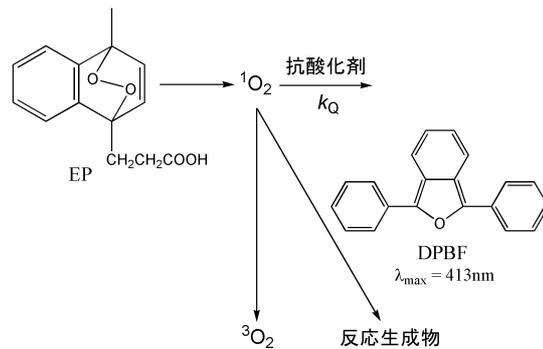


図 2 SOAC 法

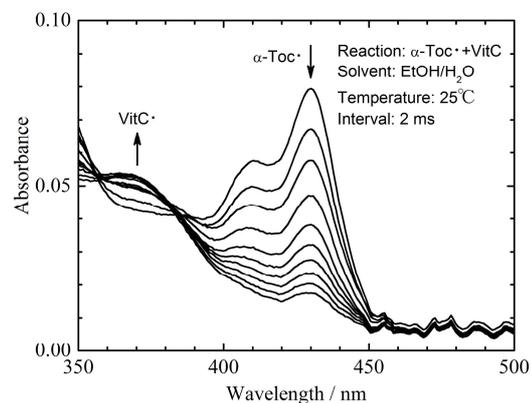


図 3 ATREC 法

(4) 食品の抗酸化活性評価方法の開発では、ARAC、SOAC、ATREC 値のような抗酸化活性値を測定する方法の開発と代表的抗酸化剤の活性値の決定、食品への予備的な応用を通して抗酸化活性を食品表示できるかどうかの検討、様々な抗酸化剤や複数の抗酸化剤などが共存する場合の測定、実際の生体に近い環境での測定、各種食品への本格的な応用とデータベース化、抗酸化活性評価方法の統合、大規模試験と食品表示としての行政への提案が必要である。ARAC、SOAC 法に関しては、¹が完了しているので、²を行った。ATREC 法に関しては、³の開発から着手した。これらの結果に基づいて ⁴を目指した。

4. 研究成果

(1)ARAC法

ARAC法を用いて、食品に含まれるフラボン類、アントシアニン類、ヒドロキシアントラキノン類、不飽和脂肪酸類、カロテノイド類、カテコールアミン類、ピロロキノリンキノール (PQQH₂) の抗酸化活性を均一溶媒中などで評価した。

一例として、図4にフラボン類がArO[•]を消去する際のスペクトル変化を示す。フラボン類とアントシアニン類のARAC値とSOAC値は正の相関を示した。これは両方の反応においてB環からの電子移動が重要な働きを示すためと考えられる。特にB環にピロガール構造やカテコール構造があると、電子供与性のために電子移動が活性になるのみならず、水素結合したO₁-H[•]・O₂-H部位におけるO₂-Hの結合次数が水素結合の分だけ減少して解離しやすくなるためARAC値が大きくなる。また、フラボン類のARAC値とSOAC値は励起状態分子内プロトン移動 (ESIPT) に基づいた紫外線防御作用とは負の相関を示した。ESIPTの結果は、節面モデル[6]で説明できることが分かった。

さらなる発展を目指して、本格的に均一溶媒中の食用油に應用して解析を進めている。

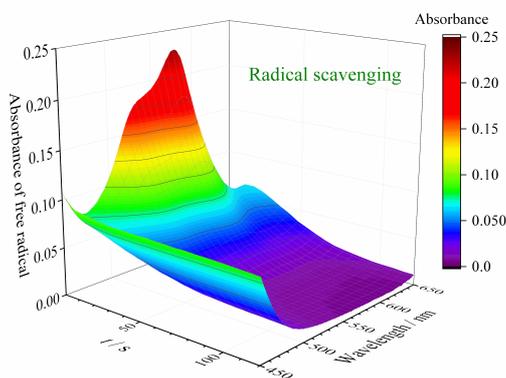


図4 25 のEtOH中での3,3',4'-トリヒドロキシフラボンによるArO[•]の消去における吸収スペクトルの変化。

(2)SOAC法

SOAC法を用いて、食品に含まれる ¹-TocHの抗酸化活性への均一溶媒中での金属イオンの効果、均一溶媒中や生体に近い環境であるミセル中の ¹-TocH、カロテノイド類、不飽和脂肪酸類の抗酸化活性を評価した。さらに、食品への本格的な応用として均一溶媒中で各種の米ぬか油のSOAC値を求めた。

一例として各種の米ぬか油のSOAC値を図5に示す。こうしたSOAC値の大部分は含まれるビタミンE類、カロテノイド類、¹-オキサノールのSOAC値によって説明することができる。品種によってSOAC値が一定でなく、「おっかもどし」の値が大きい。「おっかもどし」という品種名は、その品種を栽培したところ収穫が多かったので、口減らしに里帰りさせていたおかみさんと呼ばれていたことができた喜びを表わしたものとされている[7]。1で述べた生体生存に貢献する抗酸化能力の高さが収穫量に貢献している可能性がある。

また、一重項酸素消去について大韓民国済州島で行われた 27th International Conference on Photochemistryにおいて招待講演を行った。

さらなる発展を目指して、均一溶媒やミセル中のパーム油や大豆油など各種食用油についても解析を進めている。

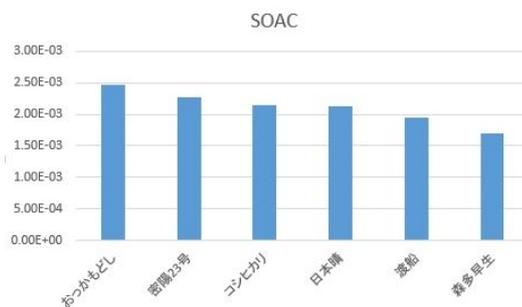


図5 各種の米ぬか油のSOAC値。

(3)ATREC法

ATREC法を開発して、緑茶に含まれるカテキン類に應用し、 k_r 、ATREC値、及び k_f の温度変化から活性化エネルギーを求めた。ATREC値が小さい場合は、正確な値を求めるためにシミュレーションを行った。図6に示すように重水素化溶媒中では k_f が著しく小さくなるとともに活性化エネルギーが著しく増大し、量子論的トンネル効果が反応において重要な働きをすることが分かった。3つの芳香環(A,B,G環)を持つカテキン類でATREC値を増加させる要因は、ピロガロール構造を持つB環 > カテコール構造を持つB環 > G環 > A環の順であることが分かった。また、こうした構造活性相関を分子軌道計算によって評価する準備を行った。

さらに、ATREC法はドーパミンなどのカテコールアミン類にも應用された。

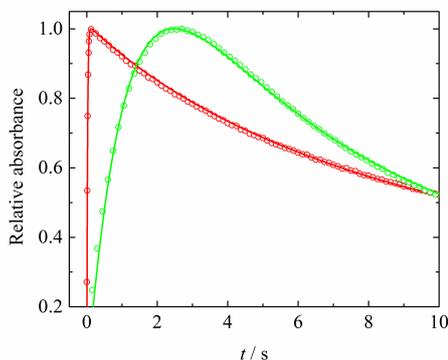


図 6 25 のエタノールと水の 1 : 1 混合溶媒中での $\cdot\text{Toc}\cdot$ の 429 nm における吸光度の立ち上がり と減衰の実験値(白丸)とシミュレーション結果(実線)。赤は軽水素溶媒、緑は重水素溶媒中での結果を示す。立ち上がり速度(k_r)と減衰速度(k_d)がともに重水素溶媒中で著しく遅くなっており、量子論的トンネル効果を示している。

(4)統合データベース化

研究成果は、14 編の論文として発表し、そのうちの 1 編は日本コンピューター化学会の精選論文に選ばれた。また、13 回の学会発表も行い、そのうちの 2 件は招待講演、3 件が国際学会での発表であった。そうした結果を元にして各種抗酸化剤や食品の ARAC、SOAC、ATREC 値のデータベースを更新して、以下のウェブで一般に公開している。
http://chem.sci.ehime-u.ac.jp/~struct1/int_naga.pdf に添付された AbsorptionCapacity.accdb.

(5) 行政への提案

行政との関わりに関しては、ARAC、SOAC、ATREC法を統合して農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「発展融合ステージ」に応募して大規模試験につなげることを目指していたが、未だに採択に至っていない。

(6)まとめと今後の展望

ARAC、SOAC、ATREC 値によって、食品のより正確な抗酸化活性を明らかにすることができることがわかった。こうした値を用いることによって、優れた抗酸化活性を持つ野菜・果実・食用油に付加価値が生じると考えられる。実際、一時期ラジカル消滅能力の目安である ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) 値をデータベース化して商品への表示が進んだ米国では、高い抗酸化活性を持つ果実「スーパーフルーツ」の提案が活発化し、サプリメントやヨーグルトでの商品化が

進み、新たなカテゴリーを形成して注目を集めていたが、ORAC 値は実際の抗酸化活性を必ずしも反映していないことが分かり、取り下げられた [8]。そのため ARAC、SOAC、ATREC 値が食品表示に採用されれば、一重項酸素消滅能力及び現状より広い範囲の食品に適用できるフリーラジカル消滅能力に関して抗酸化活性を切り口にした商品化が進み、「スーパーフルーツ」のような高付加価値を有する商品の市場構築が始まると考えられる。これ以上日本は抗酸化活性評価方法で世界に後れをとることはできない。今後ともこのような研究は学術的に重要であるだけでなく、社会的に見ても現在の急務であり続けるであろう。

我々はさらに ARAC、SOAC、ATREC 法の実用化を目指して、様々な食用油などの食品における抗酸化活性の解析、ミセルや牛胎児血清、ヒト血漿などのヒトの生体内環境に近い条件下での測定、分子軌道計算による抗酸化活性の予測、作成したデータベースの更新、そうしたデータベースに基づいてディープラーニングを行うことによる複雑系での ARAC、SOAC、ATREC 値の解釈と予測の研究を続けている。

< 引用文献 >

R. G. Cutler, Free Radicals in Biology IV, edited by W. A. Pryor, Academic Press, 1984, pp. 371-428.

後藤一寿、沖智之、消費者における食品選択基準と新たな表示に対する期待 - 日本・米国・英国を対象とする国際比較調査より -、日本フードシステム学会 2011 大会、3-5.

S. Nagaoka et al., J. Agric. Food Chem. **61**, 10054-10062 (2013)など.

A. Ouchi et al., J. Agric. Food Chem. **58**, 9967-9978 (2010)など.

主な発表論文等の雑誌論文の

S. Nagaoka and U. Nagashima, J. Phys. Chem. **94**, 1425-1431 (1990)など.

鳥山國士、看護学統合研究 **3**(2), 75-76 (2001).

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) of Selected Foods, release 2 (2010),

<http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=15866>.

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 14 件)

S. Nagaoka, Y. Bando, U. Nagashima, and K. Ohara, Correlation among Singlet-Oxygen Quenching, Free-Radical

Scavenging, and Excited-State Intramolecular-Proton-Transfer Activities in Hydroxyflavones, Anthocyanidins, and 1-Hydroxyanthraquinones, *J. Phys. Chem. A* **121**, 8069-8079 (2017), DOI: 10.1021/acs.jpca.7b07869、査読有。
K. Mukai, M. Yoshimoto, M. Ishikura, and S. Nagaoka, Kinetic Study of the Aroxyl Radical-Scavenging Activity of Five Fatty Acid Esters and Six Carotenoids in Toluene Solution: Structure-Activity Relationship for the Hydrogen Abstraction Reaction, *J. Phys. Chem. B* **121**, 7593-7601 (2017), DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b04570、査読有。
S. Nagaoka, H. Teramae, and U. Nagashima, Practical Training on Adding Polarization Function to Basis Set for Molecular Orbital Calculation of Ethylene, *J. Comput. Chem. Jpn. Int. Ed.* **3**, 2016-0068 (3 pages) (2017), DOI: 10.2477/jccjie.2016-0068、査読有。
K. Mukai, A. Ouchi, N. Azuma, S. Takahashi, K. Aizawa, and S. Nagaoka, Development of Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method. Measurements of the SOAC Values for Carotenoids and α -Tocopherol in Aqueous Triton X-100 Micellar Solution, *J. Agric. Food Chem.* **65**, 784-792 (2017), DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04329、査読有。
長岡伸一、高橋京香、中村明日香、小原敬土、向井和男、ビタミン E の一重項酸素消去速度に及ぼす金属塩の効果、*ビタミン E 研究の進歩 XVII*、53-56 (2016), <http://www.sunpla-mcv.com/vitaminE/>、査読無。
S. Nagaoka, H. Teramae, and U. Nagashima, Practical Training on Adding Polarization and Diffuse Functions to Basis Set for Molecular Orbital Calculation, *Aust. J. Educ. Chem.* **75**, 8-15 (2016), <https://www.raci.org.au/document/item/2492>、査読有。
K. Mukai, K. Nagai, Y. Egawa, A. Ouchi, and S. Nagaoka, Kinetic Study of Aroxyl-Radical-Scavenging and α -Tocopherol-Regeneration Rates of Five Catecholamines in Solution: Synergistic Effect of α -Tocopherol and Catecholamines, *J. Phys. Chem. B* **120**, 7088-7097 (2016), DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b04285、査読有。
S. Nagaoka, A. Nitta, A. Suemitsu, and K. Mukai, Tunneling Effect in Vitamin E Recycling by Green Tea, *RSC Adv.* **6**, 47325-47336 (2016), DOI: 10.1039/c6ra05986d、査読有。
K. Mukai, A. Ouchi, S. Nagaoka, M. Nakano, and K. Ikemoto, Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Is Reduced to Pyrroloquinoline Quinol (PQQH₂) by Vitamin C, and PQQH₂ Produced Is Recycled to PQQ by Air

Oxidation in Buffer Solution at pH 7.4, *Biosci. Biotech. Biochem.* **80**, 178-187 (2016), DOI: 10.1080/09168451.2015.1072462、査読有。
新井健文、長岡伸一、長嶋雲兵、寺前裕之、TDDFT 法による OHBA の吸光・発光スペクトルの理論的研究、*J. Comput. Chem. Jpn.* **14**, 209-210 (2015), DOI: 10.2477/jccj.2015-0061、査読有。日本コンピュータ化学会の精選論文に選出。
K. Mukai, E. Ishikawa, T. Abe, A. Ouchi, S. Nagaoka, K. Murata, T. Miyazawa, and K. Nakagawa, Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Seven Rice Bran Extracts in Ethanol Solution. Development of a Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC) Assay Method, *Biosci. Biotech. Biochem.* **79**, 2063-2072 (2015), DOI: 10.1080/09168451.2015.1069701、査読有。
K. Mukai, A. Nakamura, S. Nagaoka, A. Ouchi, and N. Azuma, Notable Effects of the Metal Salts on the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by α -Tocopherol in Ethanol Solution, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **88**, 1503-1510 (2015), DOI: 10.1246/bcsj.20150182、査読有。
長岡伸一、小原敬土、
UV
、Fragrance J. Korea **2015-7**, 88-93 (2015), <http://cosinkorea.mediaon.co.kr>、査読無。
長岡伸一、小原敬土、アロエ含有物による UV ケアの研究 - 紫外線防御と一重項酸素消去作用、*フレグランスジャーナル*、**43** (6), 67-72 (2015), <https://www.fujisan.co.jp/product/1281680952/>、査読無。

〔学会発表〕(計 13 件)

長嶋雲兵、田島澄恵、中山尚史、寺前裕之、長岡伸一、H₃⁺、H₃、H₃⁻の結合様式と構造、日本コンピュータ化学会 2017 秋季年会、2017 年 10 月、くまもと県民交流館パレオ(熊本県・熊本市)。
長岡伸一、化学反応を制御する一つの方法(招待講演)、日本真空学会 2017 年 9 月研究例会、2017 年 9 月、愛媛大学(愛媛県・松山市)。
K. Mukai, Y. Bandoh, S. Nagaoka, H. Itoh, E. Kobayashi, K. Nakagawa, Kinetic Study of the Scavenging Reaction of the Aroxyl Radical by Eight Kinds of Vegetable Oils in Solution. Development of an Aroxyl Radical Absorption Capacity (ARAC) Assay Method, The Asian Conference Oleo Science 2017 & the 56th Annual Meeting of the Japan Oil Chemists' Society, 2017 年 9 月、東京理科大学神楽坂キャンパス(東京都・新宿区)。
向井和男、大内綾、東長雄、高橋慎吾、

相澤宏一、長岡伸一、一重項酸素消去活性評価法 (SOAC 法) の開発: Triton X-100 ミセル溶液中におけるカロテノイド類とビタミン E の SOAC 値の評価、第 55 回電子スピンサイエンス学会、2016 年 11 月、大阪市立大学杉本キャンパス(大阪府・大阪市)。

坂東宥奎、川田耕司、向井和男、櫻井康博、服部玄、倉中綾、長岡伸一、野菜抽出物によるフリーラジカル消去活性評価法の開発、第 55 回電子スピンサイエンス学会、2016 年 11 月、大阪市立大学杉本キャンパス(大阪府・大阪市)。

小原敬土、古信裕、尾下愛美、長岡伸一、シコニン・ヒドロキシナフトキノン類の一重項酸素消去活性と励起状態分子内水素移動、2016 年日本化学会中国四国支部大会香川大会、2016 年 11 月、香川大学幸町キャンパス(香川県・高松市)。

平野恒夫、長嶋雲兵、寺前裕之、長岡伸二、拡張基底関数依存性について、日本コンピュータ化学会 2016 秋季年会、2016 年 10 月、島根大学松江キャンパス(島根県・松江市)。

Y. Bandoh, K. Ohara, S. Nagaoka, Correlation between Antioxidant and Excited-State

Intramolecular-Proton-Transfer Activities in Anthocyanidins and Hydroxyanthraquinones, 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry, 2016 年 4 月、Osaka City Central Public Hall (大阪府・大阪市)。

長岡伸一、高橋京香、中村明日香、小原敬土、向井和男、ビタミン E の一重項酸素消去速度に及ぼす金属塩の効果、第 27 回ビタミン E 研究会、2016 年 1 月、アルファあなぶきホール(香川県・高松市)。

小原敬土、北平有望、長岡伸一、近赤外発光スポット検出によるゲル中の一重項酸素寿命計測、2015 年日本化学会中国四国支部大会、2015 年 11 月、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)。

新井健文、長岡伸一、長嶋雲兵、寺前裕之、日本コンピュータ化学会 2015 年秋季年会、2015 年 10 月、函館市地域交流まちづくりセンター(北海道・函館市)。

S. Nagaoka, K. Ohara, Nodal-Plane Model in Photochemistry (招待講演), 27th International Conference on Photochemistry 2015 年 6 月、International Convention Center JEJU (ICC JEJU), Jeju Island, Korea.

新井健文、長岡伸一、長嶋雲兵、寺前裕之、TD DFT 法による分子内プロトン移動反応の理論的研究(3)、日本コンピュータ化学会 2015 春季年会、2015 年 5 月、東京工業大学大学院社会理工学研究科(東京都・目黒区)。

http://chem.sci.ehime-u.ac.jp/~struct1/int_naga.pdf に添付された AbsorptionCapacity.accdb を参照されたい。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 伸一 (NAGAOKA, Shin-ichi)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：30164403

(2) 連携研究者

小原 敬土 (OHARA, Keishi)
愛媛大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：10284390