

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14413

研究課題名(和文)食品が持つ酸化ストレス抑制効果における直接的な活性酸素種消去能の寄与について

研究課題名(英文)Studies on the contribution of reactive oxygen species scavenging ability to the oxidative stress suppressing effect of foods

研究代表者

若木 学(Wakagi, Manabu)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・主任研究員

研究者番号：50710878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食餌誘導性肥満モデルマウスを用いて食品による酸化ストレス軽減効果の検討を行った。肥満による酸化ストレス誘導はマウスの週齢が関与しており、加齢によって酸化LDLコレステロール値など酸化ストレス障害が増加した。一方、リノール酸の過酸化物質(HODEs; hydroxyoctadecadienoic acids)は、6週齢から9週間の高脂肪食給餌でも有意に血中濃度が増加した。食品による酸化ストレス軽減効果について、イチゴやトマトは高脂肪食摂取による肥満や高血糖状態を抑制しない条件でも、酸化ストレス軽減に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HODEsは、酸化LDLコレステロール値などの従来の酸化ストレスマーカーに比べて若齢期からの高脂肪食給餌でも有意に血中濃度が増加したことから、早期酸化ストレスマーカーとして利用できることが示唆された。また、肥満による酸化ストレス障害は加齢によって増加することが示唆された。更に、酸化ストレスを惹起する活性酸素種がマウスの週齢によって異なることが示唆された。食品の直接的な活性酸素種消去能の酸化ストレス軽減への寄与に関しては、傾向は認められたものの更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the antioxidant effects of foods in high-fat diet induced obese mice were investigated. The induction of oxidative stress by obesity was related to the age of mice, and oxidative stress disorders such as oxidized low-density lipoprotein cholesterol blood levels increased with age. On the other hand, linoleic acid oxidation products (HODEs; hydroxyoctadecadienoic acids) significantly increased blood levels in 15 weeks old mice fed with high-fat diet for 9 weeks. Regarding the effect of foods on reducing oxidative stress, strawberries and tomatoes did not inhibit obesity or hyperglycemia caused by high-fat diet, but they contribute to reducing oxidative stress.

研究分野：食品科学

キーワード：活性酸素種消去能 ORAC SOAC HODEs

1. 研究開始当初の背景

スーパーオキシドラジカルや一重項酸素などの活性酸素種は、病原体を直接攻撃するなど生体防御に関わり、健康維持に重要な役割を果たしている。その一方で、生体にはスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼのような抗酸化酵素も備わっており、活性酸素種のバランスが調整されている。しかしながら、肥満、喫煙等の生活習慣や精神的ストレスなどによりバランスが崩れると、過剰な活性酸素種がタンパク質や脂質、あるいは DNA などの生体構成成分と反応して、タンパク質の変性や過酸化脂質の生成、遺伝子損傷を起こし、生活習慣病の発症や老化の促進をもたらすと考えられている。そのため、生体に備わった機構に加え、抗酸化物質を体内に取り込むことで健康維持を図ることが考えられるようになってきている。食品の抗酸化作用は、直接的に活性酸素種を消去するものと生体内における抗酸化酵素の活性化を促し、間接的に活性酸素種を消去するものがある。食品成分による直接的な活性酸素種消去作用は、フリーラジカル捕捉と一重項酸素消去に分けられる。それらを測定する方法として、Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)法や Singlet Oxygen Absorption Capacity (SOAC)法がある。ORAC 法や SOAC 法は、食品に含まれている多様な抗酸化物質の抗酸化性を個々に測定するのではなく、それらの抗酸化活性の総量を簡便に測定することができる。

近年、日本人高齢女性において食事の ORAC で評される抗酸化能と高齢者に見られる身体機能や活動量の低下や疲れとの間に有意な負の相関が認められたことが報告された (Kobayashi S, et al., 2017)。しかし先に述べたとおり、食品成分の抗酸化機能には直接的な活性酸素種消去能以外の薬理活性も考えられ、食品摂取による疾患のリスク軽減や予防効果が示されても活性酸素種消去能の値だけでそれらの効果を見積もることは疑問が残されている。そのため食品が持つ直接的な活性酸素種消去能の疾病予防への寄与を明らかにする必要があり、それには活性酸素種消去能による直接的な酸化ストレス軽減効果を正しく評価できる生体内マーカーが必須となる。

生体内酸化ストレスマーカーには、酸化 LDL コレステロールやミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性などがよく用いられている。近年、リノール酸の過酸化物の hydroxyoctadecadienoic acids (HODEs) は様々な構造異性体を持ち、酸化ストレスが原因とされる生活習慣病患者の血中において高濃度で存在することが報告された (Bjelakovic G, et al., 2007)。また、HODEs の異性体はラジカル酸化由来のものの一重項酸素由来のものが明確に区別できることが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、個々の抗酸化成分ではなく食品の活性酸素種消去能の総体に着目し、食品による酸化ストレス軽減効果を多角的に評価し、活性酸素種消去能が生体内の酸化ストレス抑制への寄与率を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、食品としてトマト果汁、イチゴ、緑茶、および柑橘果実飲料を用いた。トマト果汁およびイチゴは凍結乾燥して粉碎し、その凍結乾燥粉末を餌に混ぜて投与した。緑茶および柑橘果実飲料は市販品のものをそれぞれ 4 倍、または 2 倍希釈して自由摂取させた。食品の活性酸素種消去能の測定には、ORAC 法、または SOAC 法を用いた。動物実験では、C57BL/6 マウス (6 週齢または 12 週齢) に普通食または高脂肪食を 9 週間自由摂取させ、摂餌量、摂水量、および体重の測定を行い、食品摂取による影響を観察した。試験終了時には、肝臓、精巣上体脂肪、および血液を採取し、臓器は重量測定を行った。肝臓におけるマクロファージ解析として、抗 CD11c 抗体、抗 F4/80 抗体、および 7-ADD で細胞を染色し、BD FACSCanto™ II を用いてフローサイトメトリー解析を行った。血中の生化学的マーカーとして、血中グルコース量、インスリン量、遊離脂肪酸量、総コレステロール量、LDL コレステロール量、HDL コレステロール量、トリグリセリド量、レプチン量、および HbA1c 量を測定した。血中の酸化ストレスマーカーとして、酸化 LDL コレステロール量、および MPO 活性は市販のキットを用いて、HODEs 量は LC-MS/MS を用いて測定した。肝臓における遺伝子発現解析として、TNF-、SOD1、および Nrf2 の mRNA 量を測定した。

4. 研究成果

トマト果汁の試験では、遠心分離によりパルプ分を除去することでカロテノイド総量を低下させたトマト果汁 (上清画分) を対照として用いた。それぞれの凍結乾燥粉末の抗酸化能を測定したところ、トマト果汁を遠心分離することにより総 ORAC 値が 6 割程度、SOAC 値が 1 割程度まで低下した。これらの凍結乾燥物を混餌 (餌 1 g 当たり約 0.33mL の果汁を添加) した普通餌 (AIN-93M ベース)、高脂肪餌をそれぞれ調製し、C57BL/6 マウス (6 週齢、雄) に 9 週間投与した。試験

期間中の摂餌量および摂水量に群間の差異は認められなかった。9週間投与後の体重および脂肪重量は高脂肪食群で普通食群より有意に高くなったが、果汁摂取の影響は認められなかった。血中の生化学的マーカーでは、血中グルコース量、総コレステロール量、LDL-コレステロール量において、高脂肪食群は普通食群に比べ、有意に高い値を示した。しかし、果汁摂取は生化学的マーカーに影響しなかった。また、フローサイトメトリー解析の結果、肝臓における炎症性マクロファージ(M1マクロファージ)および抗炎症性マクロファージ(M2マクロファージ)の存在量はいずれの群間においても変化は認められなかった。更に、酸化ストレスマーカーである酸化LDLコレステロール量およびMPO活性も変化は認められなかった。これらの結果より、9週間の高脂肪食摂取は肥満および高血糖状態を惹起させたが、酸化ストレスへの影響は少ないことが示唆された。一方、HODEs量は高脂肪食摂取により有意に増加し、果汁摂取により下がる傾向が認められた。また、高脂肪食摂取によりフリーラジカル由来HODEsは有意に増加したが、一重項酸素由来HODEsは有意な増加は認められなかった(図1)。抗酸化能の違いによる影響に関して、活性酸素種消去能が影響する傾向は認められたものの、その効果を十全に説明できるものではなかった

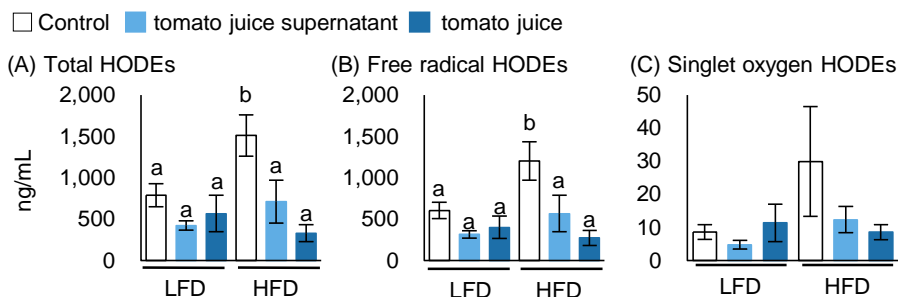


図1. トマト果汁摂取による血中のHODEs量に及ぼす影響

た。本試験の結果より、HODEsは早期酸化ストレスマーカーとして利用できることが示唆された。また、投与を開始するマウスの週齢が酸化ストレスへの影響に関与することが考えられた。

イチゴの試験では、2品種のイチゴを用いた。それぞれの凍結乾燥粉末の抗酸化能を測定したが、違いは認められなかった。これらの凍結乾燥粉末を混餌(4%重量)した普通餌(AIN-93Mベース)、高脂肪餌をそれぞれ調製し、C57BL/6マウス(12週齢、雄)に9週間投与した。試験期間中の摂餌量および摂水量に群間の差異は認められなかった。9週間投与後の体重および脂肪重量は高脂肪食群で普通食群より有意に高かった。血中の生化学的マーカーにおいて、HbA1c量、総コレステロール量、HDLコレステロール量、およびレプチン量は高脂肪食群で普通食群より有意に高く、血中グルコース量、LDLコレステロール量、遊離脂肪酸量、およびインスリン量は高い傾向を示した。しかし、イチゴ摂取は生化学的マーカーに影響しなかった。また、フローサイトメトリー解析の結果、高脂肪食摂取により肝臓におけるM1マクロファージ量は増加したが、イチゴ摂取による影響は認められなかった。次に、血中の酸化ストレスマーカーの測定をしたところ、高脂肪食摂取により酸化LDLコレステロール量およびMPO活性は増加し、イチゴ摂取によりその増加を有意に抑制した。また、HODEs量も高脂肪食摂取により有意に増加し、イチゴ摂取により有意に抑制した。高脂肪食摂取によりフリーラジカル由来HODEsは変化しなかったが、一重項酸素由来HODEsは有意に増加した(図2)。イチゴの品種によって影響は若干異なることが示唆さ

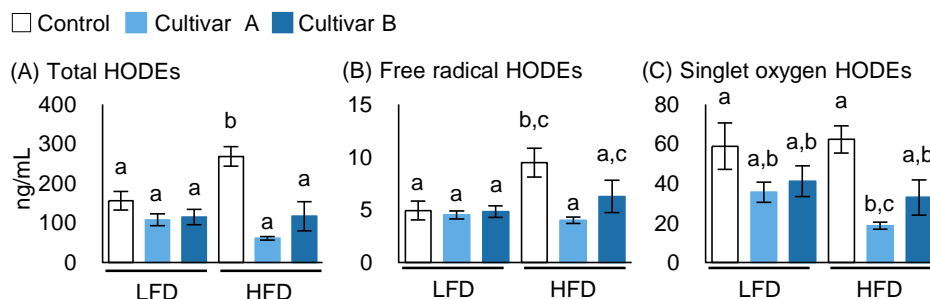


図2. イチゴ摂取による血中のHODEs量に及ぼす影響

れたが、抗酸化能の違いはなかったことから成分の違いによる影響であることが示唆された。本試験の結果より、高脂肪食を給餌するマウスの週齢を6から12週齢に変更することで酸化ストレスマーカーが増加することが分かった。また、生成されるHODEs異性体の違いにより、酸化ストレスを惹起する活性酸素種がマウスの週齢によって異なることが示唆された。

緑茶の試験では、市販の緑茶9種類のH-ORAC値を測定し、抗酸化能が高かった緑茶(HT)と対照となる緑茶(LT)を選抜した。HT、およびLTのH-ORAC値はそれぞれ15.21、および8.25 mmol TE/Lだった。C57BL/6マウス(12週齢、雄)を普通食群(D12450J、リサーチダイエツ社)およ

び高脂肪食群(D12492、リサーチダイエツト社)に分け、それぞれの群に水、4倍希釈したHT、あるいは4倍希釈したLTを9週間投与した。試験期間中の摂餌量および摂水量に群間の差異は認められなかった。9週間投与後の体重および脂肪重量は高脂肪食群で普通食群より有意に上昇したが、緑茶摂取による影響は認められなかった。しかしながら血中の生化学的マーカーにおいて、高脂肪食摂取による影響が認められなかった。次に、フローサイトメトリー解析の結果、高脂肪食摂取により肝臓におけるM1マクロファージ量は増加する傾向を示し、緑茶摂取はその増加を抑制する傾向が認められたが、いずれも有意な差は認められなかった。また、血中の酸化ストレスマーカーの測定したところ、酸化LDLコレステロール量およびMPO活性は高脂肪食摂取により高い傾向を示し、それに対して緑茶は抑制する傾向を示した。本試験では、高脂肪食摂取による肥満の誘導は行われたが、それ以外の生体内の有意な変動が観察されなかった。このことから、マウスの週齢だけでなく給餌する餌組成やそれに応じた給餌期間も十分に考慮する必要があったと考えられる。

柑橘果実飲料の試験では、市販の柑橘果実飲料2種(ウンシュウミカンおよび河内晩柑)を用いた。抗酸化能(H-ORAC値)を測定した結果、ウンシュウミカン、および河内晩柑のH-ORAC値はそれぞれ14.4、および9.13 mmol TE/Lだった。C57BL/6マウス(12週齢、雄)を普通食群(D12450J、リサーチダイエツト社)および高脂肪食群(D12492、リサーチダイエツト社)に分け、それぞれの群に水、水で2倍希釈した柑橘果実飲料を10週間投与した。試験期間中の摂餌量および摂水量に群間の差異は認められなかった。10週間投与後の体重、肝臓重量、および精巣上体脂肪重量は高脂肪食群で普通食群より増加し、柑橘果実飲料は高脂肪食摂取による体重および肝臓重量増加を有意に抑制したが、精巣上体脂肪重量には影響は認められなかった。また、柑橘果実飲料は高脂肪食摂取による血中グルコース量およびインスリン量の上昇を抑制しなかった。一方、柑橘果実飲料は高脂肪食摂取による酸化LDLコレステロール量の増加抑制、および肝臓中のM1マクロファージの増加抑制効果が認められた。抗酸化能の違いによる影響に関して、抗酸化能が高いウンシュウミカン摂取群の方が酸化LDLコレステロール量やM1マクロファージ量が低い傾向は認められたが、有意な差はなかった。また本試験では、柑橘果実飲料による抗肥満効果が認められた為、食品の持つ抗酸化能による影響が観察されにくい結果となった。

本研究の結果より、HODEsは酸化ストレス障害を惹起する活性酸素種を評価できるだけでなく、従来の酸化ストレスマーカーに比べて早期の酸化ストレスマーカーとして利用できることが示唆された。また、肥満による酸化ストレス障害は加齢によって悪化し、原因となる活性酸素種も変化することが示唆された。食品の直接的な活性酸素種除去能の酸化ストレス軽減への寄与に関しては、傾向は認められたものの更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manabu Wakagi, Masao Goto, Naoto Hashimoto, Yuko Takano-Ishikawa
2. 発表標題 Strawberry decrease oxidative stress in high-fat diet-induced obese and diabetic mice
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------