

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：34510

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560950

研究課題名(和文) 培養細胞を用いた食品成分の抗酸化性評価法

研究課題名(英文) Evaluation of antioxidant activity of foods using cultured cell

研究代表者

寺嶋 正明 (Terashima, Masaaki)

神戸女学院大学・人間科学部・教授

研究者番号：30172092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：標準抗酸化性物質と食品成分の抗酸化性を培養細胞を用いて評価した。まず、Wolfe & Liu によって提案された培養・分析条件を本研究の分析対象に合うように修正した。修正した方法を使ってフェルラ酸、アスコルビン酸などの抗酸化性を測定し、その有効性を確かめた。次に、野菜の抗酸化性を評価した。ハクサイ、ダイコン、ホウレンソウ、タマネギの相対濃度0.001における蛍光抑制率はそれぞれ56%、52%、32%および26%であった。市販野菜ジュースの6銘柄が示す抗酸化性についてもこの方法で評価した。3銘柄が相対濃度0.1において非常に高い蛍光抑制率(70%以上)を示した。

研究成果の概要(英文)：Antioxidant activities standard antioxidants and foods were evaluated using a cultured cell. Culture condition and analytical conditions proposed by Wolfe & Liu has been modified to fit our experimental conditions. The modified method was applied to ferulic acid, ascorbic acid etc. to check the validity. This modified protocol was applied to evaluate antioxidant activities of vegetables. Inhibition ratio of relative fluorescence intensity at the relative concentration 0.001 of Chinese cabbage, radish, spinach, and onion was 56%, 52%, 32% and 26%, respectively. Antioxidant activities of six brands of commercialized vegetable juice were also evaluated by this method. Three brands showed very high inhibition ratio of relative fluorescence intensity (> 70%) at the relative concentration 0.1.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：抗酸化性 動物細胞 野菜 野菜ジュース ペルオキシラジカル

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗酸化性と健康維持の関係 生体内では多種多様な酸化還元反応が生じているが、そのバランスを保つことが健康維持に非常に重要であることが近年の研究で明らかにされた。特に細胞内でのエネルギー産生に伴って発生する活性酸素種の処理が重要である。生体内にはスーパーオキシドジズムターゼに代表される酵素系が活性酸素種の無害化に大きな働きをしている。また、食品に含まれる抗酸化活性を持つ物質の摂取が酵素系の働きを補う重要な役割をしていることが明らかになってきた。生体内での酸化還元反応のバランスを保つことが、生活習慣病を防ぎ、長寿をかなえる重要な要素であるとの認識が確立されつつある。

(2) 食品成分の抗酸化性評価

活性酸素種にはスーパーオキシド、過酸化水素、ペルオキシラジカル、ヒドロキシラジカル、次亜塩素酸イオンなど多様な分子が存在し、酸化する対象分子、反応性などが異なっている。また、抗酸化性を示す物質もこれらの活性酸素種との反応性はそれぞれ異なっている。したがって、食品成分の示す抗酸化性をどのように評価するかは非常に大きな課題であり、いまだ確立された方法はない。申請者はミオグロビンの構造変化を利用した抗酸化性評価法を確立した(平成 18-19 年度科研費課題番号 18560754)が、これは試験管内での反応に基づくものであり、生体内に近い環境での抗酸化評価については未検討であった。培養細胞 HepG2 を利用した抗酸化性評価法が米国の Wolfe らによって報告されており(*J Agric Food Chem.* 2007 55, 8896-8907)、この手法がどの程度正しく抗酸化性を評価できるかに注目が集まっていた。

2. 研究の目的

本研究では培養細胞を利用して、食品成分の抗酸化性を評価する手法を確立することを目的に以下の項目について検討した。

(1) HepG2 細胞の培養条件、分析条件を最適化すること。

(2) フェルラ酸、アスコルビン酸など標準物質を対象に抗酸化性を評価すること。

(3) 野菜ホモジネート上清が示す抗酸化性を評価すること。

(4) 市販の野菜ジュースが示す抗酸化性を評価すること。

3. 研究の方法

(1) HepG2 細胞の培養条件、分析条件の最適化

Wolfe らの方法をもとに、培地の種類、抗生物質添加の有無、FBS 濃度を変えて HepG2 を培養し、増殖速度、培養の安定性を検討した。また、蛍光発生剤である DCFH-DA の溶媒が蛍光分析の安定性に及ぼす影響を検討した。

(2) 標準物質の抗酸化性

フェルラ酸、アスコルビン酸、カプサイシン、ヘスペリジン、カルノシンが HepG2 内で DCFH のペルオキシラジカルによる分解を抑える指標である蛍光抑制率を 50 ~ 200 μ M の範囲で測定し、抗酸化性を評価した。

(3) 野菜ホモジネートの抗酸化性

ハクサイ、ダイコン、ホウレンソウ、タマネギについて、同重量の蒸留水とともに、食品用ミキサーでホモジナイズした。ガーゼで繊維分を除去した後、10,000rpm、15 分の遠心分離を行い上清を回収した。さらに、滅菌フィルターでろ過したものを実験試料として調製した。滅菌した蒸留水で希釈することにより、蛍光抑制率の濃度依存性を検討した。

(4) 野菜ジュースの抗酸化性

市販の野菜ジュース 6 銘柄を対象とした。遠心分離 (10,000 rpm \times 1 min) した後、上清を回収し、0.22 μ m のフィルターで滅菌した。滅菌した蒸留水で希釈して試料とした。

4. 研究成果

(1) HepG2 細胞の培養条件、分析条件の最適化

培地を WME (Williams' Medium E) から DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) に変更し、DMEM には開封後、ペニシリン/ストレプトマイシンを 5ml 添加し、FBS の濃度を 10 パーセントに変更することで、より安定して培養をすることが可能になった。また、DCFH-DA の溶媒を PBS 緩衝液から DMS に変更することで蛍光強度が安定した。これは DCFH-DA の溶解性が増し、細胞内に移行する DCFH-DA 量が増加したことによると考えられた。それ以外の条件は Wolfe らの方法に従って抗酸化性評価を行った。

(2) 標準物質の抗酸化性

フェルラ酸、アスコルビン酸、カプサイシン、ヘスペリジン、カルノシンが細胞内で示す抗酸化性を評価することができた。一例として、フェルラ酸の蛍光抑制率とフェルラ酸濃度の関係を図 1 に示す。蛍光抑制率が高いほど、抗酸化活性が強いことを示している。

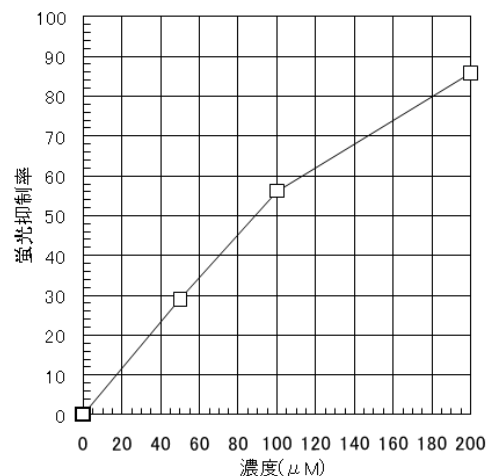


図1 フェルラ酸の蛍光抑制率

図1より、100~200 μM の低濃度でも高い抗酸化性を示していることが分かった。測定した標準物質の100 μMにおける蛍光抑制率を表1に示す。

表1 標準物質の蛍光抑制率

物質名	蛍光抑制率 (%)
フェルラ酸	58
アスコルビン酸	35
カプサイシン	84
ヘスペリジン	32
カルノシン	42

培養細胞 HepG2 を用いて細胞内におけるペルオキシラジカルに対する抗酸化性を良好に評価できていることが実証され、カプサイシンが非常に高い抗酸化性を示すことが明らかとなった。

(3) 野菜ホモジネートの抗酸化性

ハクサイ、ダイコン、ホウレンソウ、タマネギについて HepG2 を用いて抗酸化性を評価した。その1例として、ハクサイの蛍光抑制率と相対濃度の関係を図2に示す。

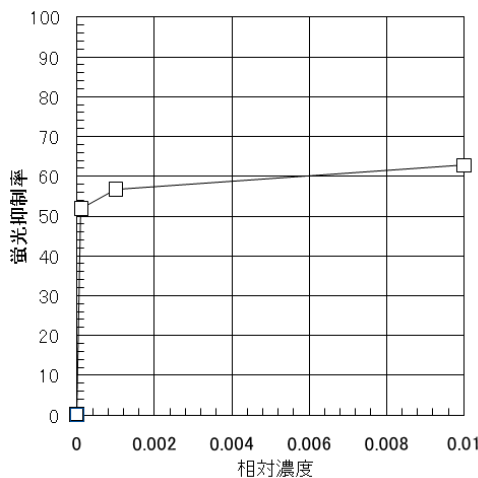


図2 ハクサイの蛍光抑制率

図2より相対濃度が 0.0001 の非常に希薄な試料でも約 50%と高い蛍光抑制率と示すことが明らかとなった。測定した試料の相対濃度 0.001 における蛍光抑制率を表2に示す。

表2 野菜が示す相対蛍光率

野菜	蛍光抑制率 (%)
ハクサイ	56
ダイコン	52
ホウレンソウ	32
タマネギ	26

野菜の種類によって異なる蛍光抑制率を示すことが明らかとなった。

(4) 野菜ジュースの抗酸化性

市販の野菜ジュース6銘柄(野菜生活 100 オリジナル、野菜 Days 野菜&フルーツミックス、野菜生活 100 fruity salad、野菜生活 100 ゆずミックス、野菜生活 100 ラ・フランス mix、野菜一日これ一本)が培養細胞内で示すペルオキシラジカルに対する抗酸化性を蛍光抑制率を指標に評価した。その1例として、野菜生活 100 ゆずミックスが示す蛍光抑制率と相対濃度の関係を図3に示す。

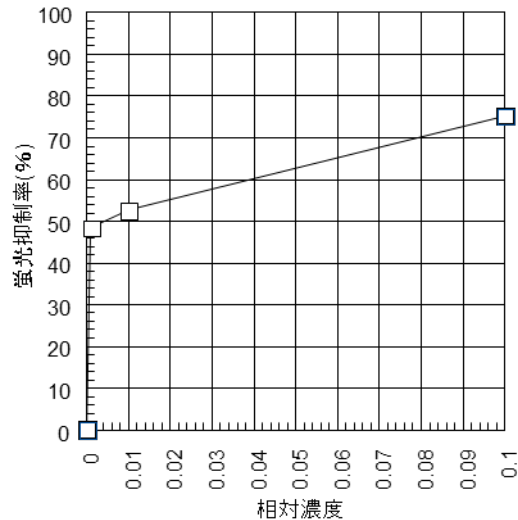


図3 野菜生活 100 ゆずミックスの相対蛍光強度

図3より相対濃度 0.1 においても70%以上の高い蛍光抑制率を示すことが明らかとなった。6種類の銘柄が相対濃度 0.1 において示す蛍光抑制率を表3に示す。

表3 野菜ジュースが示す蛍光抑制率

銘柄	蛍光抑制率 (%)
野菜生活 100 オリジナル	15
野菜 Days 野菜&フルーツミックス	100
野菜生活 100 fruity salad	92
野菜生活 100 ゆずミックス	48
野菜生活 100 ラ・フランス mix	74
野菜一日これ一本	42

蛍光抑制率は銘柄によって大きく異なった。含まれている成分は多種類の野菜を基本に、特に抗酸化性が高いとされている野菜、果実ジュースなどが添加されているが、ジュースに含まれている成分と蛍光抑制率の相関は見られなかった。成分濃度が不明なため、今後これらの点についても検討する必要がある。

以上の研究により、培養細胞 HepG2 を用い

て安定に培養し、抗酸化性を評価できる条件を設定でき、標準物質で抗酸化性との相関性を検証したうえで、野菜、野菜ジュースがペルオキシラジカルに対して示す抗酸化性を評価することができた。

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

渡辺良子, 深田陽子, 生山加菜, 三浦由紀子, 松村紗季, 寺嶋正明, "動物細胞を用いた野菜の抗酸化性評価", 日本食品工学会第14回年次大会, 2013年8月10日, 京都市

渡辺良子, 松村紗季, 寺嶋正明, "動物細胞を用いた抗酸化性評価", 日本食品工学会第13回年次大会, 2012年8月9日, 札幌市

渡辺良子, 松村紗季, 寺嶋正明, "培養細胞を用いたポリフェノール化合物の抗酸化性評価", 化学工学会第76年会, 2011年3月24日, 小金井市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺嶋 正明 (TERASHIMA, Masaaki)

神戸女学院大学・人間科学部・教授

研究者番号: 30172092

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

渡辺 良子 (WATANABE, Ryoko)

神戸女学院大学・人間科学研究科

博士後期課程