

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700897

研究課題名(和文) ESRスピントラップ法を活用した複数活性酸素種に対する食品の抗酸化能評価法の開発

研究課題名(英文) Development of an electron paramagnetic resonance spin trapping method for analysis of the scavenging capacities of food samples for multiple ROS

研究代表者

亀谷 宏美 (KAMEYA, HIROMI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品安全研究領域・主任研究員

研究者番号：20585955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ESRスピントラップ法を活用した複数活性酸素種に対する食品の抗酸化能評価法の開発を行った。ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドラジカル、アルコキシルラジカル、ペルオキシラジカル、アルキルラジカル、一重項酸素について、ラジカル生成に光分解を用いた、最適な測定条件を決定した。開発した手法により54種の野菜抽出液を測定し、標準物質当量として再現性高く抗酸化能を評価することができた。同一抽出液をORAC法で測定した結果、ヒドロキシラジカルに対する抗酸化能力はORAC法と相関はなかった。しかし、スーパーオキシドラジカルとアルコキシルラジカルに対する抗酸化能はORAC法と高い相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：We have developed an electron spin resonance (ESR) spin trapping method for analysis of the scavenging capacities of food samples for multiple ROS, utilizing the same photolysis procedure for generating each type of radical. The optimal measuring conditions of hydroxyl, superoxide, alkoxy, peroxy, alkyl radical, and singlet oxygen scavenging capacity were determined. Quantification of radical adducts was found to be highly reproducible, with variations of less than 4%. The optimized EPR spin trapping method was used to analyze the scavenging capacities of 54 different vegetable extracts for multiple radicals, and the results were compared with oxygen radical absorption capacity values. Good correlations between the two methods were observed for superoxide and alkoxy radicals, but not for hydroxyl.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ESR スピントラップ法 酸化評価

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 活性酸素種には様々な種類があり、生活習慣病の発症に深く関わっていることが明らかになっている。生体はこれらの活性酸素種に対して個別の抗酸化機能を有している。現在、国内・国外での抗酸化能評価は ORAC 法が広く利用されている (Sanchez-Moreno C., Food Sci. Tech. Int., 8,121-137, 2002)。しかし、ORAC 法は AAPH からアルコキシラジカルを発生させて抗酸化能を評価する手法であるため、他の活性酸素種に対する抗酸化能力を評価することはできない。

(2) ESR スピントラップ法は、短寿命の活性酸素種を捕捉して直接的に測定する唯一の手法で、多くの活性酸素種を対象としている。しかし、ESR スピントラップ法には統一化された測定プロトコールがなく、複数の異なる活性酸素種に対する抗酸化能を求めて総合的に評価する方法もまとめられていない。さらに、食品を対象とした ESR スピントラップ法についての報告はほとんどない。これは、従来の ESR スピントラップ法がスーパーオキシドラジカル発生系に酵素、スピントラップ剤に遮光冷凍保存の DMPO を用いるなど、使用する試薬の取り扱いや活性を保つ管理が困難で再現性に乏しいこと、従来のスピントラップ剤によるアダクト(活性酸素をトラップした化合物)の半減期は 1 分程度と非常に短く、ESR 計測するためには安定に欠けることが理由としてある。

(3) 近年開発されたスピントラップ剤 CYPMP0 (2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2,5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide)は安定な粉末試薬で、アダクトの半減期は 15 分以上と長い。種々の活性酸素種とアダクトを形成することが可能で、その ESR スペクトルは理論解析により個々の活性酸素種に特徴的であることが報告されている (Kamibayashi M.etal., Free Radical Res., 40, 1166-1172, 2006)。CYPMP0 は優れたスピントラップ剤であるが非常に高価な新規スピントラップ剤であるため、これを用いた研究の報告は少ない。医療分野では、CYPMP0 を用いた紫外線照射による新しいヒドロキシラジカル発生系 (Endo N. et al., J. Clin. Biochem. Nutr., 45(2), 193-201, 2009)、アルコキシラジカル発生系 (Khoris S., Analytical Biochem., 386, 167-171, 2009)の報告がある。しかし、食品分野で CYPMP0 を用いた研究報告はなかった。

## 2. 研究の目的

(1) これまで報告者は、食品の酸化ストレスの影響解析には食品が持つ「抗酸化能力の変化」の追跡が有用と考え、食品に適した ESR スピントラップ法の開発に取り組んできた。その過程で従来の測定法の問題点を体感し、ESR スピントラップ法による食品の抗酸化

能力の統一的な測定プロトコール確立の重要性を認識した。そこで、安定な活性酸素発生試薬の導入と、ESR 測定条件の精密化により、従来の問題点を解決した ESR スピントラップ法の開発を着想した。

(2) 本研究では、スーパーオキシドラジカル、アルコキシラジカル、ヒドロキシラジカルに加え、一重項酸素、過酸化ラジカルに安定な発生系を開発し、これら 5 種の活性酸素種に対する抗酸化能評価の統一的な測定法を確立し、食品の新たな品質評価法に発展させることを目的とした。

(3) 本研究により、抗酸化能力を個々の活性酸素種に対する能力として評価することが可能となる。これまでの抗酸化能評価法では得られなかった食品の新たな能力を明らかにすることができ、食品の新たな品質評価法の確立に役立てることができる。さらに、これまで統一の測定手法がなかった ESR スピントラップ法のマニュアル化を行うことで、ESR スピントラップ法が汎用性を持ち、食品分野のみならず医療分野での ESR スピントラップ法の適用が期待される。

## 3. 研究の方法

報告者は ESR スピントラップ法を用いた食品の抗酸化能評価法を報告している。この手法についてアルコキシラジカル( $RO\cdot$ )を例に説明する。

(1) 発生試薬(AAPH)に紫外線を 5 秒間照射して活性酸素( $RO\cdot$ )を発生させる。

(2)  $RO\cdot$ をスピントラップ剤(CYPMP0)で捕捉してアダクトとして計測する(ブランク)。

(3) (1)と同様に発生させた  $RO\cdot$ に食品を加える。

(4)  $RO\cdot$ は食品中のタンパク質やアミノ酸などの生体分子、ビタミンなどの内在性抗酸化物質と反応して消去される。

(5) 残った  $RO\cdot$ を CYPMP0 で捕捉してアダクトとして ESR で測定し、ブランクからの信号減衰率から食品の抗酸化力を算出する。

本研究では、上記(1)から(5)による手法を発展させて、スーパーオキシドラジカル、アルコキシラジカル、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、過酸化ラジカルへの食品が有する個別の抗酸化能評価法を確立した。

(1) 活性酸素種の発生系および ESR 測定条件の確立

### 活性酸素種の発生系の検討

本研究では、報告者の基礎研究をもとに表 1 に示した活性酸素に対して右側に示した発生試薬の組み合わせにおける発生系を検討した。これらの発生系については、すでに報告されているものも含まれるが、例えば、ヒドロキシラジカルについても一般的に使用されている 1%過酸化水素が最適濃度であ

るか検討された結果は報告されていない。そこで、全ての発生系について、発生試薬の濃度、紫外線照射時間を詳細に検討して、観測されるアダクトの量が最大となる条件を確立し、活性酸素種発生のための条件を最適化した。

表1 発生試薬

活性酸素種	発生試薬
スーパーオキシドラジカル	B <sub>2</sub>
アルコキシラジカル	AAPH
ヒドロキシラジカル	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
一重項酸素	Pterin
過酸化ラジカル	<sup>t</sup> BuOOH

#### ESR 測定条件の検討

アダクトは活性酸素種により観測されるスペクトルが異なる。そこで最もアダクトのスペクトルが明瞭に観測される数値を求め、ESR 機器の磁場範囲、マイクロ波強度、磁場変調の測定パラメーターの最適化をはかった。

#### (2) 標準評価物質の選定と ORAC 法との比較

複数の活性酸素種に対する食品の抗酸化能力評価 ESR スピントラップ法で求めた抗酸化能力は、スーパーオキシドラジカルを SOD ユニットとして評価するように、標準物質当量として表される。標準物質には他に Trolox、GSH などがあり、それぞれ消去することができる活性酸素種が異なる。ESR スピントラップ法では基準となる標準物質が明確に定められていない。そこで、各活性酸素種を特異的に消去する物質を検討し、個々の活性酸素種ごとに標準物質を選択した。

開発した ESR スピントラップ法を用いて食品が有する抗酸化能力を複数の活性酸素種に対する能力として評価した。さらに、同じ食品を ORAC 法で測定し、開発した手法から得られた各抗酸化力との相関を求めた。相関関係が得られない場合、食品成分から要因を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 活性酸素種の発生系および ESR 測定条件の確立

各活性酸素種の発生系は次のようになった。スーパーオキシドラジカルはリボフラビンに波長 500 ~ 600 nm の可視光を 60 秒照射して発生させた。アルコキシラジカルは AAPH に、ヒドロキシラジカルは過酸化水素に、一重項酸素は Pterine に、過酸化ラジカルは tert-ブチルヒドロペルオキシドに、アルキルラジカルは DMSO を含む過酸化水素に、それぞれ波長 300 ~ 400 nm の紫外線を 5 秒照射して発生させた。全ての発生系について、発生試薬の濃度、光照射時間から最も観測されるアダクト量が多い条件を求めた。当初の計画では 5 種の活性酸素種について検討する計

画だったが、新たにアルキルラジカルを加えた 6 種の活性酸素種について検討することができた。これら研究結果より、6 種の活性酸素種全てについて、簡易で再現性の高い光照射発生系を開発することができた。

また、検討に用いた Bruker BioSpin 株式会社製の EMX-plus X-band では、磁場範囲 3 520 ± 100 G、マイクロ波強度 6 mW、磁場変調 1.00 G のとき、スピントラップ剤と活性酸素種によって生成されるアダクトが最適に観測された。

以上、6 種の活性酸素種について、同一計測機器を用い、光反応によって活性酸素種を発生、同一測定パラメーターによって観測可能にした。

##### (2) 標準評価物質の選定

ESR スピントラップ法で求めた抗酸化能力は、スーパーオキシドラジカルを SOD ユニットとして評価するように、標準物質当量として表される。標準物質には他に Trolox、GSH などがあり、それぞれ消去することができる活性酸素種が異なる。また、確立した本計測法は活性酸素種発生系に紫外線 (UV) を用いているため、UV によって分解することがない標準物質を選択する必要がある。スーパーオキシドラジカルと一重項酸素は GSH (Glutathione)、アルコキシラジカルは Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)、ヒドロキシラジカルはマンニトール (mannitol)、過酸化ラジカルは - リポ酸 (lipoic acid)、アルキルラジカルは CYPMPPO が本計測法に適していることを確認し、6 種の活性酸素種について、抗酸化能力を表す標準物質を選択することができた。

以上、抗酸化能を評価するために不可欠である標準物質について、全ての活性酸素種に適した物質を選択し、実際に食品の抗酸化能計測及び評価を可能にした。

##### (3) 食品の抗酸化能評価と ORAC 法との比較

本研究で開発した ESR スピントラップ法により 54 の異なる野菜の抽出液が有する抗酸化能を測定し、標準物質当量として評価することができた。本手法の抗酸化能評価法は、ラジカルアダクトの信号強度をアダクト量として定量、アダクト量を活性酸素種ごとに適切な標準物質当量として算出し、抗酸化能として評価した。同一試料等を複数回計測した結果、標準偏差は 4% 未満であり、非常に再現性の高い評価法であると結論した。開発した ESR スピントラップ法で計測した野菜の抽出液は、ORAC 法で定められた手法によって抽出された溶液を使用した。同一抽出液を測定し、抗酸化能を評価することで、その結果を正当に比較検討することができた。その結果、ヒドロキシラジカルに対する抗酸化能力は ORAC 法と相関はなかった。しかし、スーパーオキシドラジカルとアルコキシラジカルに対する抗酸化能は ORAC 法と高い相関が認め

られた。

以上、ESR スピントラップ法により複数の活性酸素種に対する食品の抗酸化能評価法を確立したことは、食品の抗酸化能を総合的な活性産消去能として評価するために不可欠のことであり、非常に重要な成果であるといえる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

Hiromi Kameya, Jun Watanabe, Yuko Takano-Ishikawa, Setsuko Todoriki, Comparison of scavenging capacities of vegetables by ORAC and EPR, Food Chemistry, 査読有, 145, 2013, 866-873

DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.015  
Hiromi Kameya, Mitsuko Ukai, Photochemical method to evaluate oxidation levels in heat-treated vegetable oil: comparison with peroxide-value and acid-value, Journal of Food Science and Engineering, 査読有, 3, 2013, 299-307

<http://www.davidpublishing.org/show.html?13233>

菅野友美、川村翔栄、原田栄津子、亀谷宏美、鶴飼光子、大澤俊彦、キノコ熱水抽出物のESR スピントラップ法によるラジカル捕捉活性評価とORAC法、日本食品科学工学会誌、査読有、60、2013、173-178

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/nskkk/60/4/60\\_173/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/nskkk/60/4/60_173/_pdf)

鶴飼光子、川村翔栄、岸田敬吾、亀谷宏美、ESR スピントラップ法による緑茶のスーパーオキシドラジカル捕捉活性計測方法、日本調理科学会誌、査読有、46、2013、45-50

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience/46/1/46\\_45/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience/46/1/46_45/_pdf)

Shigeru Oowada, Nobuyuki Endo, Hiro mi Kameya, Masashi Shimmei, Yashige Kotake, Multiple free-radical scavenging capacity in serum, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, 51, 2012, 117-121

DOI: 10.3164/jcbrn.11-113

亀谷宏美、鶴飼光子、ESR スピントラップ法によるインスタントコーヒーのヒドロキシラジカル抗酸化評価、日本調理科学会誌、査読有、45、2012、33-36

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience/45/1/45\\_33/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience/45/1/45_33/_pdf)

伊藤友美、亀谷宏美、鶴飼光子、澱粉-モノアシルグリセロール系における加熱生成ラジカルの解析、日本調理科学会誌、査読有、45、2012、285-288

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience/45/4/45\\_285/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cookeryscience/45/4/45_285/_pdf)

Hiromi Kameya, Mitsuko Ukai, New ESR detection method of hydroxyl radical scavenging activity of blue berry, Journal of Materials Science and Engineering, 査読有, 1, 2011, 347-351

<http://www.davidpublishing.org/show.html?1550>

〔学会発表〕(計5件)

亀谷宏美、食品を試料としたESR スピントラップ法での計測、第1回 MULTIS 研究会、2013年4月14日、同志社大学(京都府)

亀谷宏美、川村翔栄、岸田敬吾、中村秀夫、鶴飼光子、等々力節子、ESR スピントラップ法による光照射を用いたスーパーオキシドラジカル捕捉能計測方法、日本食品科学工学会第59回大会、2012年8月28日、藤女子大学(北海道)

亀谷宏美、齊藤希巳江、等々力節子、ESRを用いた加熱植物オイル中のフリーラジカル検討、日本食品化学会第18回総会・学術大会、2012年6月22日、五島軒(北海道)

東谷裕之、亀谷宏美、鶴飼光子、亀谷宏美、脂溶性スピントラップ剤 CYPMPPO 誘導体の合成、日本化学会第92春季年回、2012年3月26日、慶應義塾大学(神奈川県)

亀谷宏美、齊藤希巳江、等々力節子、ESR スピントラップ法とORAC法による照射大豆の抗酸化性評価、日本食品科学工学会第58回大会、2011年9月7日、東北大学(宮城県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀谷 宏美 (KAMEYA, Hiromi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品安全研究領域・主任研究員

研究者番号：20585955