

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870521

研究課題名(和文) 抗酸化能を可視化できる化学発光イメージング技術の開発と新規抗酸化物質探索への応用

研究課題名(英文) Development of a chemiluminescence imaging system for the evaluation of antioxidative capacity

研究代表者

岸川 直哉 (KISHIKAWA, Naoya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科薬学系・准教授

研究者番号：90336181

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)：本研究では、抗酸化能の強さを画像として捉え、さらには抗酸化物質の局在を可視化できる化学発光イメージング技術の開発を行った。本法は、抗酸化物質と電子伝達体であるキノンとの間の酸化還元反応に伴って生じる化学発光を CCD カメラにより撮影するという原理に基づいている。マイクロプレートのウェル中の試料に、キノン及びルミノールを添加してから生じる発光を画像撮影して解析することで、多数の試料の抗酸化能を一斉に評価することが可能であった。さらに、食品の切片試料について化学発光イメージングを行ったところ、特徴的な化学発光強度の偏りが観察され、強い発光を与えた部位に抗酸化物質が集積していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A chemiluminescence imaging system for the evaluation of antioxidative capacity was developed. This chemiluminescence imaging system is based on the generation of reactive oxygen species through the redox reaction between quinone and antioxidant, followed by detection of the generated reactive oxygen by luminol. Intense chemiluminescence was observed by mixing of quinone and antioxidants such as L-ascorbic acid in the presence of luminol, and the chemiluminescence intensity was proportional to the concentration of the antioxidant. This chemiluminescence imaging system could be used for the simultaneous evaluation of antioxidative capacities of various food samples. Additionally, the proposed imaging system allowed the visualization of localization of antioxidant on the food slice.

研究分野：分析化学

キーワード：抗酸化物質 イメージング 化学発光 CCDカメラ キノン 可視化 酸化還元

1. 研究開始当初の背景

アスコルビン酸をはじめとする抗酸化物質は、活性酸素による酸化ストレスから生体を防御する機能を有することから、生体にとって有用な化合物である。近年では抗酸化効果を標榜する機能性食品が数多く市販されているほか、実際に様々な食品について抗酸化作用による健康維持効果が認められている。このようなことから、効率的な抗酸化食品の有効性評価や食品等の天然資源からの有用な抗酸化物質の探索に応用可能な抗酸化能の測定法が必要とされている。しかしながら、現在用いられている抗酸化能測定法の多くは、感度と選択性に劣る吸光光度法に基づく方法であり、1検体の測定に比較的長時間と労力を要することが問題となっている。さらに、測定の際には試料を粉碎しそのホモジネートを用いるため、試料中のどの部位に抗酸化物質が多く存在しているかの分布情報が消失してしまう問題があった。そのため、たとえ高い抗酸化能を有する物質が存在しても、その含有量が微量の場合、従来の測定方法では検出されない欠点があった。敢えて抗酸化物質の組織局在を調べる際には、予め試料を細かく分割し、その後それぞれの部位について抗酸化能を測定する必要があることから、食品からの抗酸化物質の効率的な探索は非常に困難であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では上記の問題を克服すべく、多数の試料の抗酸化能を画像として一斉に撮影後、画像解析を行うことで抗酸化能を迅速かつ高感度に評価する手法の開発を行うとともに、試料を直接イメージングして抗酸化物質の組織分布を可視化することにより試料中で抗酸化能が高い部位を検出する手法の開発を行った。

我々はこれまでに、抗酸化能に由来する化学発光を画像として検出するイメージング技術へと応用可能な反応を確立してきた。その内容とは、図1に示すように、キノンに還元剤（抗酸化物質）及び化学発光試薬ルミノールを添加することで、長時間持続する強い発光が生じるというキノンの酸化還元サイクルを利用する化学発光反応である。

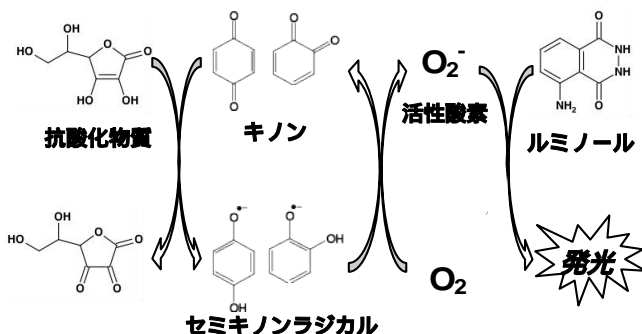


図1. キノンの酸化還元サイクルによる化学発光

この反応において、強い還元力を有する化合物ほど強い発光を与え、また還元剤濃度と発光強度との間に定量性があることを見出した。還元力を有する化合物は活性酸素による酸化を抑制することから優れた抗酸化能を示す。したがって、本発光反応を利用することで、抗酸化能を効率的に測定可能である。本化学発光反応は、抗酸化能の効率的な測定を可能とし、かつ、安定した発光を与えるという特徴を有するため、長時間持続する発光が必要とされる化学発光イメージングに特に適している。本研究では、本化学発光反応技術と高感度 CCD カメラを装備した撮影装置による化学発光イメージング技術とを組み合わせることにより、マイクロプレートアレイによる試料の抗酸化能の一斉測定と抗酸化物質の分布や動態を高精度に可視化計測し得る技術の開発を試み、以下の2点を軸として研究を展開した。

(1) 多数の試料が有する抗酸化能を一斉・迅速に評価できる発光画像解析測定法を開発する。さらに、開発した測定法を食品の抗酸化能スクリーニングへと応用することで、強い発光を示した食品（優れた抗酸化能を有する食品）を明らかにする。

(2) 抗酸化物質の組織学的な位置情報を検出する組織画像測定法を開発する。(1)で強い発光を示した食品について、試薬を添加したスライス切片を直接イメージングし、強く発光する部分（効果的な抗酸化物質を多く含む部分）を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 多数の試料の抗酸化能の迅速評価法

マイクロプレートのウェル中の抗酸化物質溶液に、ルミノール及びキノン溶液を順次添加後、冷却 CCD カメラを搭載した化学発光画像撮影装置内部にプレートを設置し、各ウェルから生じる化学発光を画像として撮影する。次に、食品試料についてフードプロセッサを用いて破砕後、その上清を水で希釈してからプレートのウェルに入れ、ルミノール及びキノン溶液を添加することで生じる発光を同様に画像測定する。得られた画像を解析して各ウェルの発光強度を抗酸化能の強さとして評価を行う。

(2) イメージングによる抗酸化能の分布解析

食品試料について、厚さ数 mm 程度の切片を作製し、これをルミノール溶液に数分間浸す。その後、取り出した切片にメナジオン溶液を添加した後で、そのまま画像撮影装置内部にセットし、食品切片から生じる発光を撮影する。得られた画像について強い発光が観察される部位を解析することで、強い抗酸化能を有する化合物が多量に存在している食品中の部位の特定を行う。

4. 研究成果

(1) 多数の試料の抗酸化能の迅速評価法

典型的な抗酸化物質であるアスコルビン酸標準溶液を入れたマイクロプレートのウェルに、ルミノール及びキノンの1種であるメナジオンを順次添加した後で生じる発光を CCD カメラにより撮影した。その結果、ウェル中で生じた発光を画像として撮影可能であり、その発光強度もアスコルビン酸の濃度の増加とともに増大することが確認された(図2)。



図2. アスコルビン酸標準溶液の化学発光画像

そこで、より効率よく発光を取得できるよう各種測定条件の最適化を行った。最初に、最低冷却温度の異なる2種類の CCD カメラ (-30 °C 及び -60 °C) を比較した結果、より冷却能力の高い CCD カメラほど高い発光が得られ、微量の抗酸化物質でも検出することが可能であった。次に、添加するキノンの種類の検討を行ったところ、メナジオンや9,10-フェナンスレンキノンといった酸化還元活性が高いとされているキノンを用いることで強い発光が得られることが明らかとなった。また、測定時間についても検討を行ったところ、画像撮影時間を長くすることで得られる発光強度は強くなる傾向にあったが、同時にバックグラウンド発光も上昇することから感度は低下し、結果として5分間という比較的短い測定時間の方が高感度であるという結果となった。反応条件の検討後のアスコルビン酸標準溶液の検出下限 (blank + 3SD) はおよそ 2 μM であった。

次に、果実や魚介類といった食品試料のホモジネートについて、本法により発光測定を行った。その結果、いずれの食品試料についてもルミノール及びキノンを添加後に発光が観察され、これらの食品が抗酸化物質を含んでいるという結果が得られた。本研究で検討を行った果実試料の中では、ミカンやイチゴが比較的強い発光を示すという結果が得られた(図3)。



図3. 食品ホモジネート希釈水溶液の化学発光画像

本研究で開発した手法は 96 ウェルマイクロプレートを用いる場合、最大で 96 個の試料の抗酸化能を一斉に測定可能であることから、迅速に多数の試料の抗酸化能を評価する手法として適していると考えられる。

(2) イメージングによる抗酸化能の分布解析

(1) の実験で強い発光を与えた食品試料のスライス切片をルミノール溶液に数分間浸した後、メナジオン溶液を添加してから画像撮影装置にセットし、切片から生じる発光を撮影した。その結果、いずれの食品試料についても切片上から発光が観察され、さらに特徴的な化学発光強度の偏りが生じていることも明らかにされた。例えば、イチゴの可食部の縦断面試料においては中心部の髄と呼ばれる白色の領域において強い発光が観察された(図4 矢印の部位)。

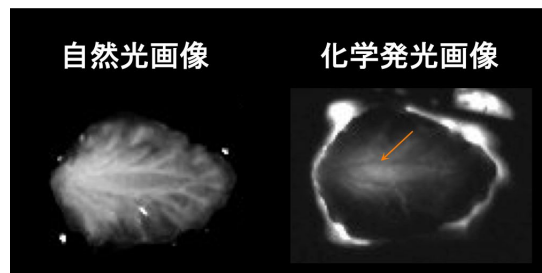


図4. イチゴ可食部の縦断面試片の自然光画像及び化学発光画像

また、ニンジンの輪切り切片については維管束と考えられる部位の内部領域で強い発光が観察された(図5 矢印)。さらに、ニンジンの縦断面試片より得られた化学発光画像を解析したところ、肩部と比較して先端部付近でより強い発光が観察されるという結果となった(図6)。

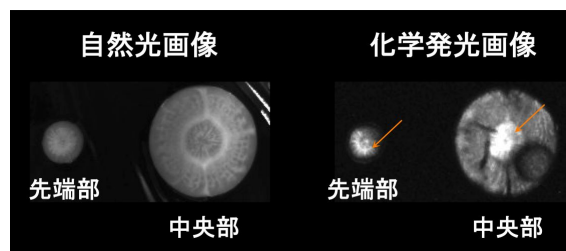


図5. ニンジンの輪切り切片の自然光画像及び化学発光画像

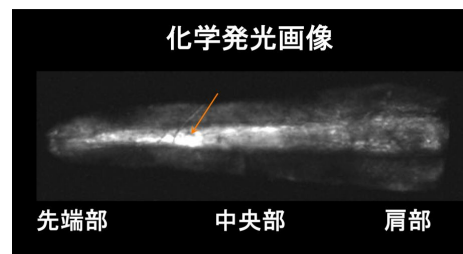


図6. ニンジンの縦断面試片の化学発光画像

したがって、本法により得られる化学発光強度の偏りは植物の成長・変化に伴う抗酸化成分の局在を反映して可視化していることが示唆された。また、植物由来の食品に加えて魚類であるキビナゴを背開きした試料について化学発光イメージングへと応用したところ、頭部近辺が他の部位よりも強い発光を与えるという結果となった。本法により強い発光が観察された部位に抗酸化物質が集積していると考えられることから、発光した部位を採取し、その内在成分を質量分析装置等により解析することにより、食品からの有用な新規抗酸化物質を発見できると期待される。

以上のように、本イメージング手法は比較的試料の形状を維持したままでの抗酸化能の測定が可能であり、食品中に含まれる新たな抗酸化物質の探索や抗酸化物質が植物の成長・変化に与える役割を明らかにするために有用な手法であると考えられる。

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)

[1] 崖川直哉、黒田直敬：化学発光法に基づく生体内活性酸素産生物質の解析, 薬学雑誌, 135(2):191-126, 2015. DOI: 10.1248/yakushi.14-00213-1 [査読有]

[2] El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Ohyama K, Imazato T, Ueki Y, Kuroda, N: Determination of human serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity via flow injection analysis with fluorescence detection after online derivatization of the enzymatically produced benzaldehyde with 1,2-diaminoanthraquinone, Anal Chim Acta, in press, 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2015.04.006 [査読有]

[3] Kishikawa N, Kondo N, Amponsaa-Karikari A, Kodamatani H, Ohyama K, Nakashima K, Yamazaki S, Kuroda N: Rapid determination of isoamyl nitrite in pharmaceutical preparations by flow injection analysis with on-line UV irradiation and luminol chemiluminescence detection. Luminescence 29 (1): 8-12, 2014. DOI: 10.1002/bio.2466 [査読有]

[4] Ohyama K, Kishikawa N, Matsuo A, Imazato T, Ueki Y, Wada M, Nakashima K, Kuroda N: Determination of the ratio between mercaptalbumin and nonmercaptalbumin by HPLC with fluorescence probe specifically binding to albumin. J Pharm Biomed Anal 88: 170-103, 2014. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.08.009 [査読有]

[5] Ali MF, Kishikawa N, Ohyama K, Mohamed HA, Abdel-Wadood HM, Mahmoud AM, Imazato T, Ueki Y, Wada M, Kuroda N: Chromatographic determination of low-molecular mass unsaturated aliphatic aldehydes with peroxyoxalate chemiluminescence detection after fluorescence labeling with 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole. J Chromatogr B 953-954: 147-152, 2014. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.02.009 [査読有]

[6] Imazato T, Shiokawa A, Kurose Y, Katou Y, Kishikawa N, Ohyama K, Ali MF, Ueki Y, Maehata E, Kuroda N.: Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column derivatization using 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole. Biomed Chromatogr 28(6): 891-894, 2014. DOI: 10.1002/bmc.3204 [査読有]

[7] Maeda Y, Kishikawa N, Ohyama K, Wada M, Ikeda R, Kuroda N: Fluorescence derivatization method for sensitive chromatographic determination of zidovudine based on the Huisgen reaction. J Chromatogr A 1355: 206-210, 2014. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.06.017 [査読有]

[8] El-Maghrabey MH, Kishikawa N, Ohyama K, Kuroda N: Analytical method for lipoperoxidation relevant reactive aldehydes in human sera by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. Anal Biochem 464: 36-42, 2014. DOI: 10.1016/j.ab.2014.07.002 [査読有]

[9] Ichibangase T, Ohba Y, Kishikawa N, Nakashima K, Kuroda N: Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H₂O₂. Luminescence 29(2) 118-121, 2014. DOI: 10.1002/bio.2513 [査読有]

[10] Elgawish MS, Shimomai C, Kishikawa N, Ohyama K, Wada M, Kuroda N: Development and validation of the first assay method coupling liquid chromatography with chemiluminescence for the simultaneous determination of menadione and its thioether conjugates in rat plasma. Chem Res Toxicol 26 (9): 1409-1417, 2013. DOI: 10.1021/tx400253k [査読有]

[11] Fathy Bakr Ali M, Kishikawa N, Ohyama K, Abdel-Mageed Mohamed H, Mohamed

Abdel-Wadood H, Mohamed Mohamed A, Kuroda N: Chromatographic determination of aliphatic aldehydes in human serum after pre-column derivatization using 2,2'-fural, a novel fluorogenic reagent. *J Chromatogr A* 1300: 199-203, 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.03.033 [査読有]

[12] Kishikawa N, Higuchi S, Ohyama K, Nakashima K, Kuroda N: A simple and rapid chemiluminescence assay for on-site analysis of paraquat using a portable luminometer. *Forensic Toxicol* 31(2): 301-306, 2013. DOI: 10.1007/s11419-012-0175-0 [査読有]

[13] Kishikawa N, Hammad SF, Ohyama K, Kubo K, Mabrouk MM, Nakashima K, Kuroda N: HPLC determination of chlorpropamide in human serum by fluorogenic derivatization based on the Suzuki coupling reaction with phenylboronic acid. *Chromatographia* 76 (11-12): 703-706, 2013. DOI: 10.1007/s10337-013-2451-5 [査読有]

[14] Kishikawa N, Ohyama K, Saiki A, Matsuo A, Ali MF, Wada M, Nakashima K, Kuroda N: A novel lophine-based fluorescence probe and its binding to human serum albumin. *Anal Chim Acta*, 780: 1-6, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.003 [査読有]

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 岸川直哉：電子伝達体・抗酸化剤の探索に有用な分析ツール, BIOtech 2014-第 13 回国際バイオテクノロジー展/技術会議, 東京ビッグサイト(東京都江東区), 2014 年 5 月 14 日.
2. 岸川直哉, Elgawish Mohamed Saleh, 大山 要, 黒田直敬: キノンとのマイケル付加体生成に基づくチオール類のプレカラム誘導体化 HPLC-化学発光定量法の開発, 第 74 回分析化学討論会, 日本大学工学部(福島県郡山市), 2014 年 5 月 24 日.
3. Naotaka Kuroda, Mohamed Elgawish, Naoya Kishikawa, Kaname Ohyama, Kenichiro Nakashima: Identification of quinone modified proteins in biological fluids using redox cycling based chemiluminescence assay The 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Uppsala (Sweden), 2014 年 6 月 25 日
4. 新藤敬梧 樋口 翔 岸川直哉 大山 要, 黒田直敬: パラコート及びジクワットのルミノール化学発光定量法の開発, 第 12 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2014), 箱根高原ホテル(神奈川県箱根町), 2014 年 7 月 14 日.
5. 岸川直哉: ルミネセンスを利用する分析試薬の開発と応用, 第 30 回緑陰セミナー, 釧路ロイヤルイン(北海道釧路市), 2014 年 7 月 20 日.
6. 上村周平, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: キノンの高効率検出を目的とする新規化学発光分析試薬の開発, 第 31 回日本薬学会九州支部大会, 第一薬科大学(福岡県福岡市), 2014 年 12 月 6 日.
7. 岸川直哉, 黒田直敬: 化学発光法に基づく生体内活性酸素産生物質の解析, 日本薬学会第 134 年会, 熊本市総合体育館(熊本県熊本市), 2014 年 3 月 29 日.
8. 岸川直哉, 鮫元健人, 劉 倩君, 太田 薫, 大山 要, 黒田直敬: キノンの酸化還元サイクルを利用するピロロキノリンキノンの発色定量法の開発, 北海道大学水産学部(北海道函館市), 2013 年 5 月 19 日.
9. 岸川直哉: 化学発光を利用する高感度かつ選択的なキノンの定量法の開発と生体分析への応用, 第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2013), 昭和大学薬学部(東京都品川区), 2013 年 8 月 3 日.
10. 坂口佑一郎, 岸川直哉, 大山 要, 和田光弘, 黒田直敬: 各種活性酸素を選択的に化学発光検出可能なシュウ酸エステル類の探索, 第 11 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2013), 清水テルサ(静岡県静岡市), 2013 年 8 月 29 日.
11. 上村周平, 岸川直哉, 大山 要, 黒田直敬: キノンの選択的検出を目的とする新規化学発光分析試薬の開発, 第 11 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2013), 清水テルサ(静岡県静岡市), 2013 年 8 月 29 日.
12. 黒田直敬, Elgawish Mohamed Saleh, 岸川直哉, 大山 要, 和田光弘: メナジオン及びそのチオエーテル誘導体の高速液体クロマトグラフィー/化学発光検出による同時定量法の開発, 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会, あわぎんホール(徳島県徳島市), 2013 年 8 月 31 日.
13. 岸川直哉, 宮本 葵, 樋口 翔, 大山 要, 黒田直敬: シーケンシャルインジェクション分析装置によるラジカル消去能の自動

測定法，日本分析化学会第 62 年会，近畿大学（大阪府東大阪市），2013 年 9 月 11 日．

14. 岸川直哉，Elgawish Mohamed Saleh，下舞千香子，大山 要，和田光弘，黒田直敬：メナジオン及びそのチオール抱合体の高選択的 HPLC 化学発光定量法の開発とラット血漿試料への応用，フォーラム 2013 衛生薬学・環境トキシコロジー，九州大学医学部（福岡県福岡市），2013 年 9 月 11 日．

15. 岸川直哉、宮本 葵、樋口 翔、大山 要、黒田直敬：新規ラジカルスカベンジャー探索を目的とするシーケンシャルインジェクション-ルミノール化学発光分析法，第 51 回フローインジェクション分析講演会，熊本大学工学部（熊本県熊本市），2013 年 11 月 8 日．

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：キノンを検出するための化合物および該化合物を用いたキノンの検出方法

発明者：黒田直敬、岸川直哉、大山 要，上村周平

権利者：長崎大学

種類：特許

番号：特願 2013-175654

出願年月日：2013 年 8 月 27 日

国内外の別：国内

6．研究組織

(1)研究代表者

岸川 直哉（KISHIKAWA Naoya）

長崎大学・医歯薬学総合研究科薬学系・准教授

研究者番号：90336181