



食品成分の簡便かつ高感度な抗酸化測定システムの紹介

目次

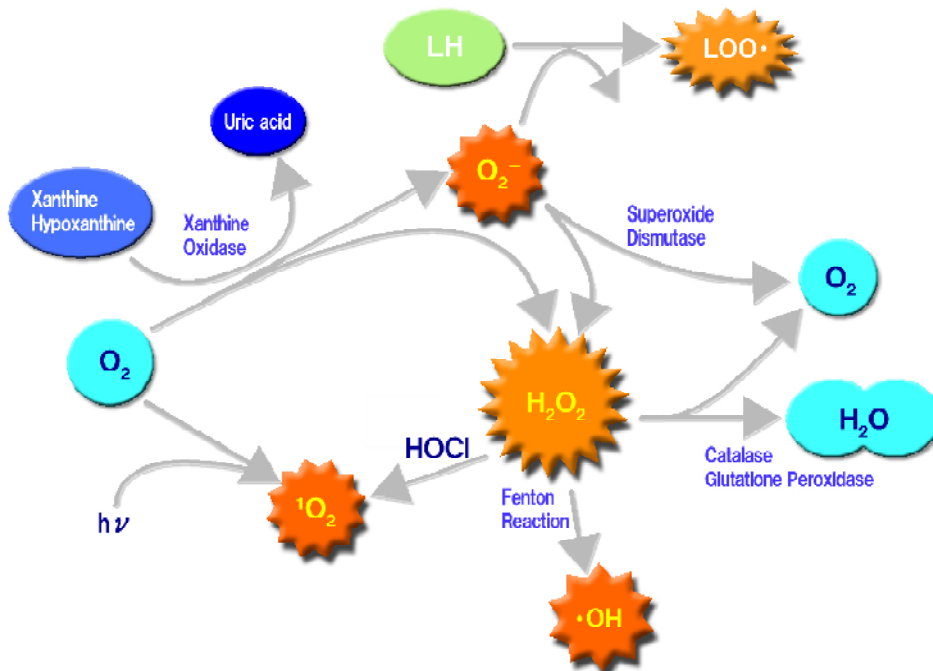
はじめに	1 頁
1. 活性酸素とは	1 頁
2. 抗酸化とは	2 頁
3. 活性酸素/抗酸化能の測定方法	2 頁
4. 化学発光法	3 頁
5. 化学発光法を用いた抗酸化能測定	3 頁
6. おわりに	4 頁
参考文献	4 頁
応用例1	5 頁
発光法を利用した市販食品(ドライフルーツ)の抗酸化能の確認	
応用例2	8 頁
アズキ加工中に得られる溶液の抗酸化能測定	

はじめに

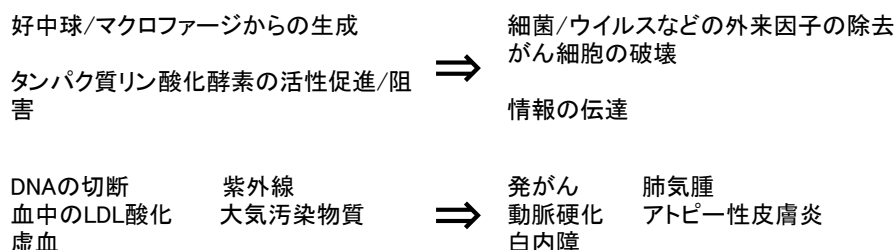
食品には、1次（栄養）、2次（嗜好・感覚）および3次（生体調節）機能という3つの機能があるとされている。近年これらのうち、生活習慣病の予防という点から、生体調節機能への関心が高まっており、特定保健用食品や栄養機能食品などのカテゴリーも考案されている。さまざまな生体調節機能のうち抗酸化能も活性酸素が関与する生活習慣病に対する予防効果が期待できる。ここでは、活性酸素および抗酸化物質に関しての概要およびその測定系を紹介する。

1. 活性酸素とは

活性酸素とは、一般的には O_2 -ラジカル、一重項酸素 (1O_2)、 $\cdot OH$ および H_2O_2 などが狭義の活性酸素となるが、広義では、それらに加え脂質過酸化物質や O_2 を生成しやすい有機ラジカルなど生体内分子を酸化するものも含める。これらの活性酸素の生成は下図のようになっている。



では、活性酸素は生体内でどのような挙動をしているかというと、次の2つに大別される。1つは、生体内において酸化障害の原因として働く場合である。例えば、血液内に存在する低密度リポタンパク質（LDL）は、酸化されるとマクロファージに取り込まれ、泡沫細胞化して血管内皮細胞の障害などを引き起こして動脈硬化を招く。もう1つは、生体内における防御機構や情報伝達の担い手として働く場合がある。例えば好中球やマクロファージなど初期段階で活動する免疫系では、その細胞から活性酸素を発生し外来因子の除去をおこなっている。



2. 抗酸化とは

それぞれの活性酸素には、活性酸素消去酵素および消去因子が存在する。これらによって生体内の過剰な活性酸素が消去されバランスを保っている。消去酵素としては、 O_2^- を H_2O_2 と O_2 にするSOD (Superoxide Dismutase)、 H_2O_2 を H_2O と O_2 にするカタラーゼなどがある。消去因子としては、特定の活性酸素を消去するスカベンジャーと呼ばれるものと、何種類かの活性酸素を消去する抗酸化剤とがある。スカベンジャーとしては先ほどのSODや一重項酸素に対する β -カロチンなどがあり、抗酸化剤としては、ビタミンC (アスコルビン酸)、E (トコフェロール) あるいはフラボノイド (カテキンなど) などがある。

活性酸素	ラジカルスカベンジャー	抗酸化剤
O_2^-	SOD	アスコルビン酸 グルタチオン
H_2O_2	カタラーゼ グルタチオンペルオキシダーゼ	
$RO\cdot/ROO\cdot$		アスコルビン酸 グルタチオン ビタミンE
$\cdot OH$	D-mannitol 安息香酸 ギ酸 エタノール DMSO	グルタチオン ビタミンE
一重項酸素	β カロチン	アスコルビン酸 ビタミンE

3. 活性酸素 / 抗酸化能の測定方法

活性酸素の直接的な検出は、その活性が非常に高いためほとんど不可能とされている。そのため多くの測定方法は活性酸素の試薬による変化を検出したり、活性酸素による酸化生成物をとらえることでおこなわれている。また、抗酸化能の測定も活性酸素、検出試薬と抗酸化物の競合反応となり間接的な方法となる。一般的には活性酸素-抗酸化能の測定方法としては、次のような方法がある。

チトクロームC還元法は、分光学的手法としては最も一般的なもので、測定方法が簡便でSODの酵素単位の決定にも使用されている。その反面、チトクロームCを直接還元する物質が混在する場合の検出には適さない。NBT法も同様にキサンチンオキシダーゼに

よって還元されてしまうので正確な検出には注意を要する。ESR法は、それぞれのラジカルを同時に検出することが可能であるが装置、試薬が高価であり、測定の再現性に関しても熟練を要するなど運用面での注意が必要である。

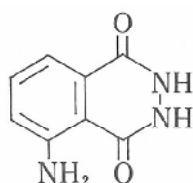
活性酸素/抗酸化能測定法

チトクロームC還元法	O_2^-
NBT還元法	O_2^-
ESR法	$O_2^- / \cdot OH$
化学発光法	$O_2^- / {}^1O_2 / \cdot OH / LOOH$
カタラーゼ法	H_2O_2
蛍光法	H_2O_2
ヨウ素滴定法	LOOH
チオバルビツール酸値	LOOH / Aldehyde
CL-HPLC	LOOH
DPPHラジカル法	DPPH

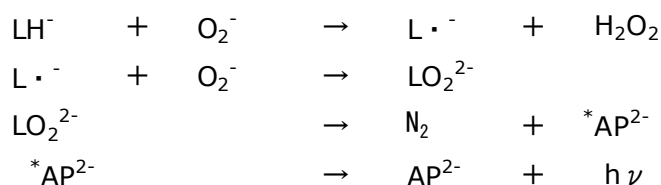
DPPHラジカル法は、安価・簡便な方法であるがDPPHラジカルが生体内で生じるラジカルでないため、生体内での効果の指標にならない。吸光度法の欠点である着色成分を多く含む試料では精度が落ちる等の欠点もある。

4. 化学発光法

化学発光は、簡単にいうと「化学反応により物質が励起状態となり、その状態から基底状態に戻る際に発光する現象のこと」をいう。ここでの化学反応はほとんどの場合が酸化反応で、つまり物質が酸化することにより励起状態となり最終的に発光する。この反応に用いられる物質（発光基質）にはルミノール、ルシゲニン、CLA、MCLAなどがある。ルミノール（5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオン）は、HRP（Horse Radish Peroxidase）-H₂O₂を用いたELISAやWetsern Blottingでの検出に利用されている。この物質の化学発光反応は、アルカリ性水溶液下（pH10～11）で、酸素、オゾン、過酸化水素、次亜塩素酸などの酸化剤と重金属イオン、ペルオキシダーゼ、ヘムタンパク質などの触媒



ルミノール

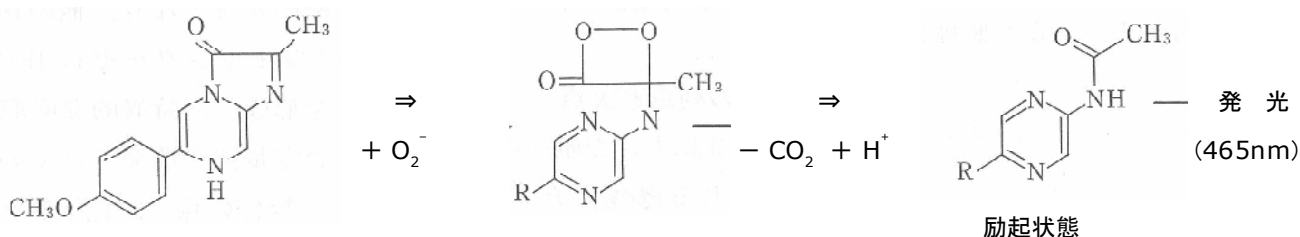


LH⁻ : ルミノールモノアニオン

*AP²⁻ : 励起アミノフタル酸

とともに酸化反応をする際に発光する。O₂⁻とルミノールとの発光機構は次のように考えられている。

また、MCLA（ウミホタルルシフェリン誘導体：Cypridina luciferine analog）、CLAは次のような過程で発光するとされている。



MCLAとO₂⁻の反応による推定化学発光過程

（活性酸素測定マニュアル：浅田浩二・中野稔・柿沼カツ子 編 p21を一部改編）

5. 化学発光を用いた抗酸化能測定

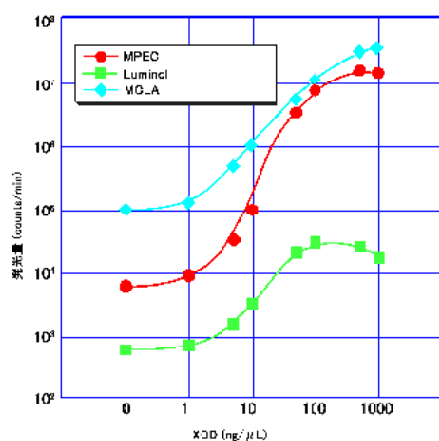
化学発光は、前述のように発光基質が酸化することにより発光する。つまり、目的物質の存在下における発光阻害を確認することにより、発光基質の物質による酸化阻害＝抗酸化能を測定することが可能となる。発光基質は、前述のように数種類あるので目的とする活性酸素種によって選択する。ここでは、われわれの発光試薬（MPEC）を用いた場合も含めてその実際を述べる。発光基質の酸化には、O₂生成系の中でもSOD活性測定で一般的にもちいられているヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ（Hypoxanthine-xanthine oxidase）の系を利用する。

		活性酸素検出	SOD活性測定
XOD	1.3munit~1.3unit/mL	60μL	60μL
Hypoxanthine	3.6mM	50μL	50μL
発光試薬	300μM	10μL	10μL
SOD	0.3~300unit/mL	-	10μL
Total		300μL	300μL

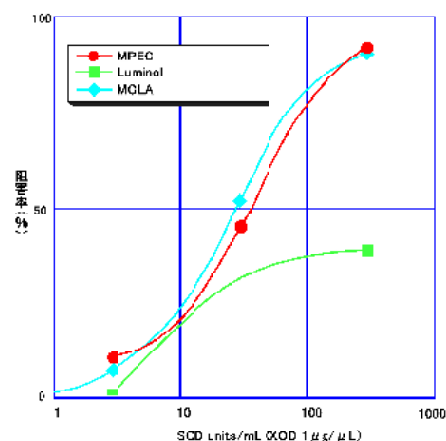
実際の測定では生成した O_2^- を発光試薬と反応させルミノメータにて測定する。SOD活性の測定は、SODを添加しない状態の発光積算値（a）と、添加した状態の発光積算値（b）を測定し、次式から阻害率が算出される。

$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - (b) / (a)) \times 100$$

SODの濃度をいくつか調整しておくことによって、阻害率の検量線を作成する。実試料を同様に添加し、その発光積算値によって、阻害率が算出される。



(a) O_2^- の発光による検出



(b) SODの発光阻害 (%)

(a) は、XOD濃度依存的な発光、(b) は特定濃度のXOD (1 μ g/ μ L) におけるSODの発光阻害率 (%)。

6. おわりに

活性酸素/抗酸化能測定にはさまざまな方法があるが、発光を用いることのメリットとして、測定サンプルを希釈することが可能、測定が迅速などのことが考えられる。また、われわれの用いた発光試薬は、その他に広いpH範囲での測定にも利用可能という点で有利であると考えられる。今後の課題としてさまざまな食材を用いた検討をおこなうこと、特に中性以外で安定な物質の抗酸化能の確認などを検討していきたい。

最後に、本研究を行なうにあたりご指導をいただいた名古屋大学 故中村 英士教授に感謝いたします。また、本研究は(財)食品産業センターの委託により実施いたしました。

参考文献

- 浅田浩二・中野稔・柿沼カツ子編、活性酸素測定マニュアル、講談社
 谷口直之編、活性酸素実験プロトコル、秀潤社
 今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店

【応用例1】発光法を利用した市販食品（ドライフルーツ）の抗酸化能の確認

発光法による抗酸化能評価の有効性を市販ドライフルーツについて確認した。比較対照として社内で日常飲まれている煎茶の抗酸化能測定もおこなった。抗酸化能測定には、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ（Hypoxanthine-Xanthine oxidase）系で生成する O_2^- と化学発光試薬との発光反応を利用した。

■ 方法

1. 試料抽出条件

☐ ドライフルーツ

- ① ドライフルーツ 1g に対して 0.1N HCl : 4mL を加え、10 分間ホモジナイズ。
- ② ホモジナイズした試料を 5,000rpm、3 分間遠心後、0.45 μ m フィルターにてろ過。
- ③ 計測時に 0.1N NaOH にて 1:1 したものを濃度 1 とし、蒸留水にて 2 または 10 倍希釈し試料とした。

☐ 煎茶

- ① 煎茶 1g に対し 43mL の熱水を加え 1 分間放置後、ろ過したものを濃度 1 とし、蒸留水にて 2 または 10 倍希釈し試料とした。

2. 抗酸化能測定条件

☐ Blank

発光試薬（MPEC 300 μ M）；10 μ L
Xanthine oxidase（XOD）（100ng/ μ L [0.1unit/mL]）；60 μ L
100mM Potassium Phosphate Buffer（pH7.5）；180 μ L

☐ Sample

抽出液；10 μ L
発光試薬（MPEC 300 μ M）；10 μ L
Xanthine oxidase（XOD）（100ng/ μ L [0.1unit/mL]）；60 μ L
100mM Potassium Phosphate Buffer（pH7.5）；170 μ L

3. 測定

上記試料をルミネッセンサーにセットし、内蔵分注ポンプにて Hypoxanthine（HX）（0.72mM）50 μ L を添加後、60 秒間測定した。次式より発光阻害率を算出し、抗酸化能の指標とした。

$$\text{阻害率（\%）} = [1 - \text{Sample発光量} / \text{Blank発光量}] \times 100$$

■ 結果

図1の様に煎茶では、濃度依存的に発光が阻害されたが、市販ブルーベリー（A社）では、図2の様に、顕著な阻害は確認できなかった（●は、緑茶中のカテキンの主成分であるエピガロカテキンガレート（EGCG）の標品）。

ブルーベリーは、アントシアニン類の色素を豊富に含んでいる。これには視覚改善作用があり、ヨーロッパではすでに医薬品として用いられている。また、この機能以外にも抗酸化作用がある。しかし、上記結果では、抗酸化作用は確認できなかった。

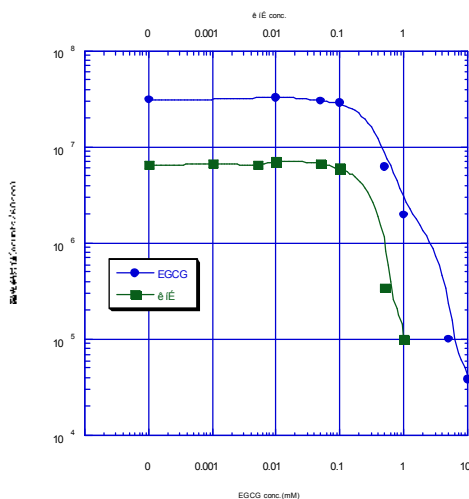


図 1. 煎茶の発光阻害

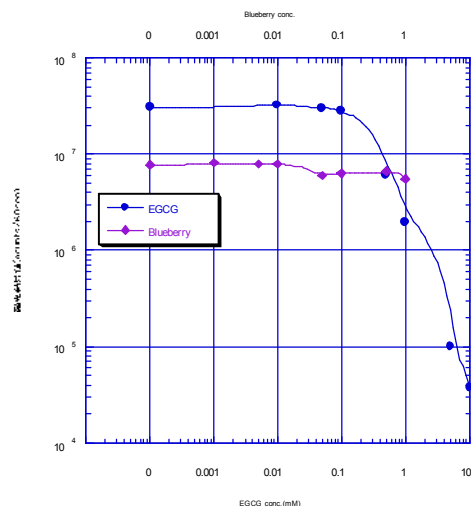


図 2. ブルーベリーの発光阻害

その理由として、

- ① 用いた試料がドライフルーツ化や加糖処理など加工されていることによって抗酸化能が確認できなかった。
 - ② 色素がうまく抽出できていない。
 - ③ 試料量が少ないなど試料の抽出方法が悪い。
- などが考えられる。

ドライフルーツは数多く市販されており、外見・味も変わるため、他社ドライフルーツを購入し抗酸化能の確認をおこなった。試料は、ドライブルーベリー、ゴールデンレーズンおよびプルーンの3種を使用した。試料調製は前述のブルーベリーと同様。

図3の様に、ドライブルーベリー、ゴールデンレーズンにおいて濃度依存的な発光阻害が見られた。また、プルーンも濃度依存的な発光阻害は見られないが阻害することは確認できた。

以上のことから、ブルーベリーには抗酸化能はあるが、ドライフルーツとなっても抗酸化能を失っていないことが確認できた。最初に測定をおこなったA社のブルーベリーに関しては、図2～4で示す通り、濃度依存的な発光阻害は確認できなかった。試料調製時の量を1gから2gに増やし比較しても大きな差は得られなかった。抽出の際にA社の物は茶褐色であったのに対し、B社の物は酸性条件において鮮やかな赤紫色であった。

また、試料の外見・味なども異なり何らかの加工処理が施されており、これが抗酸化能に影響を与えている可能性が考えられる。

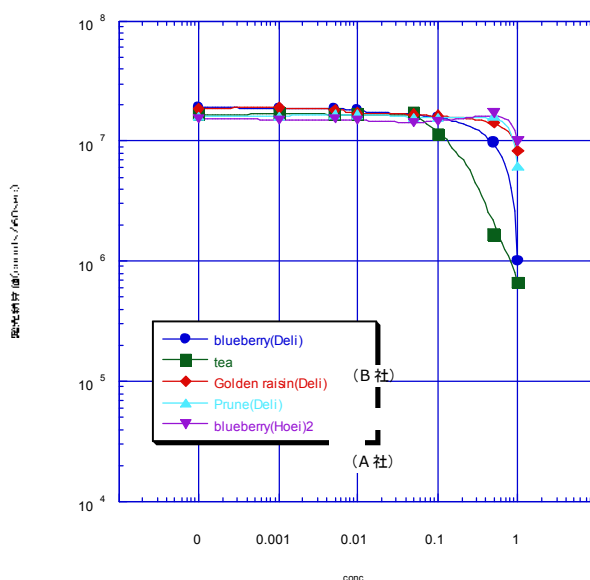


図3. ドライフルーツの発光阻害

blueberryA社は、それぞれ抽出時の試料2gでおこなった。

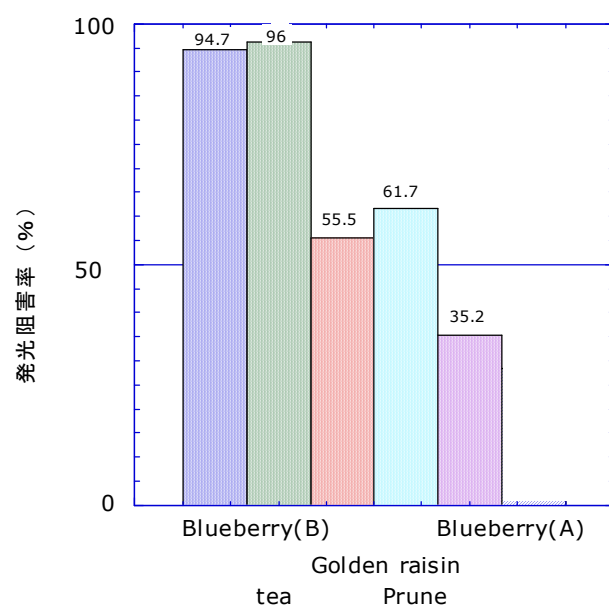


図4. ドライフルーツの発光阻害

bluberryA社およびB社は、それぞれ抽出時の試料を2gおよび1gでおこなった。

【応用例2】アズキ加工中に得られる溶液の抗酸化能測定

アズキ加工工程中では、「渋切り」という工程で大量の煮汁が廃棄される。この廃棄煮汁には、色素やタンニン、ポリフェノールなど、様々な水溶性成分の溶出が考えられる。よって廃棄煮汁の機能性、特に抗酸化能の確認を化学発光法にて行った。

(1)アズキの煮汁および渋切りにおける抗酸化能測定

2種類のアズキにおける、煮汁および渋切りを用いて抗酸化能を確認した。

実験方法

標準的なスーパーオキシドの発生系を用い、試料の有無による発光値の違いから発光阻害率を確認する。

測定試料：アズキAおよびBの渋切りおよび煮汁

渋切り：原料豆に4倍量の水を加えて、98℃、25分間加熱後得た溶液。

煮汁：渋切り後の豆にさらに原料の2倍量の水を加えて、98℃、10分間加熱後得られた溶液。

スーパーオキシド発生系：キサンチンオキシダーゼ-ヒポキサンチン

キサンチンオキシダーゼ	100ng/μL	60μL
発光試薬(MPEC 300μM)		10μL
試料または100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)		10μL
100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)		170μL
ヒポキサンチン	0.72mM-100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)	50μL

発光試薬：MPEC

計測

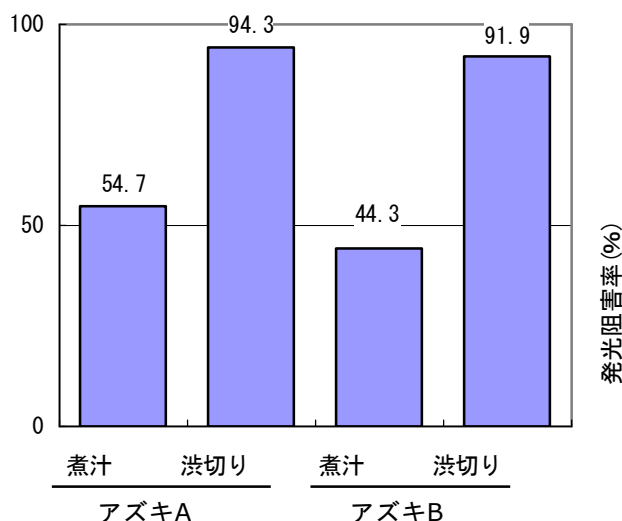
96well plateにキサンチンオキシダーゼ、発光試薬、緩衝液および試料を加える。ルミネッセンサーJNRにセットし、ポンプでヒポキサンチンを分注し分注後10秒間の発光積算値を測定した。ブランクは、上記から試料とキサンチンオキシダーゼを、コントロールは、試料を入れない状態で計測を行った。

抗酸化能は下式にて算出した。

$$\frac{(1 - (\text{試料の発光値} - \text{ブランク値}) \times 100)}{(\text{コントロールの発光値} - \text{ブランク値})}$$

結果

どちらのアズキも煮汁よりも渋切りの方が、より発光阻害する事が確認できた。このことから、渋切りに抗酸化成分がより多く移行していることが推測される。



アズキ加工中に得られる溶液の抗酸化能

(2) アズキ渋切りの希釈系列による抗酸化能測定

アズキ A および B の渋切りはどちらも 90% 以上の抗酸化能が確認できた。更にどちらのアズキ渋切りがより抗酸化能が高いのかを確認するため、それぞれのアズキ渋切りの希釈系列を作製し、比較を行った。

実験方法

2つの試料の希釈系列を作製し、スーパーオキシドに対する試料濃度依存的な発光阻害を確認、比較した。

測定試料

前述(1)で使用したアズキ A および B の渋切りを、蒸留水にて希釈し試料とした。

スーパーオキシド発生系

前述(1)と同様に調整した。

発光試薬：MPEC

計測

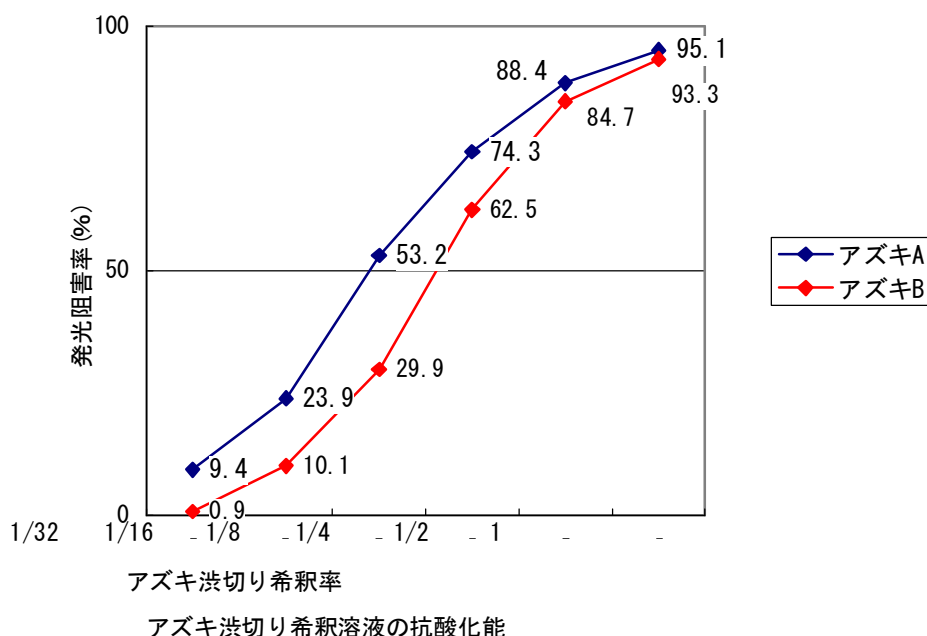
96well plate にキサンチンオキシダーゼ、発光試薬、緩衝液および試料を加える。ルミネッセンス JNR にセットし、ポンプでヒポキサンチンを分注後 10 秒間の発光積算値を測定した。ブランクは、上記から試料とキサンチンオキシダーゼを、コントロールは、試料を入れない状態で計測を行った。

抗酸化能は下式にて算出した。

$$(1 - (\text{試料の発光値} - \text{ブランク値}) / (\text{コントロールの発光値} - \text{ブランク値})) \times 100$$

結果

アズキ A の発光阻害率は、1/8 希釈溶液で 53.2% であった。一方、アズキ B は、同じ希釈率で 29.9% であった。この様に、アズキ A の方がアズキ B より、同じ希釈溶液で高い発光阻害を示すことが確認できた。また計測に用いた渋切りは、同じ製造過程を経て得られていることから、2種類のアズキにおいて、渋切り中の排出成分の違い、あるいは成分比率などが異なる可能性が示唆された。



0.1=10 ⁻¹	deci	d	one tenth of
0.01=10 ⁻²	centi	c	one hundredth of
0.001=10 ⁻³	milli	m	one thousandth of
0.000 001=10 ⁻⁶	micro	μ	one millionth of
0.000 000 001=10 ⁻⁹	nano	n	one billionth of
0.000 000 000 001=10 ⁻¹²	pico	p	one trillionth of
0.000 000 000 000 001=10 ⁻¹⁵	femto	f	one quadrillionth of
0.000 000 000 000 000 001=10 ⁻¹⁸	ATTA	a	one quintillionth of



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- ペリスタポンプ
- クロマトグラフ
- 電気泳動分析機器

- DNA分析機器
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- バイオ研究機器
- 医療分析装置

- 本 社 〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-32 ☎(03) 3814-4861 (代表) ☎(03) 3814-4868
◆技術サービス ☎(03) 3814-4794 (代表) ☎(03) 3814-4856
■技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-8 ☎(03) 5818-7560 (代表) ☎(03) 5818-7563
センター (東京都許可 医療機器製造業)
■大阪支店 〒530-0054 大阪市北区南森町2-1-7 ☎(06) 6365-7121 (代表) ☎(06) 6365-7125

■URL <http://www.atto.co.jp/>

■本 社 e-mail: info@atto.co.jp

■大阪支店 e-mail: osaka@atto.co.jp