

総合論文

抗酸化活性評価のためのフローインジェクション分析システム

受田 浩之¹

Flow-injection analytical system for the evaluation of antioxidative activity

Hiroyuki UKEDA¹¹ Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe B-200, Nankoku-shi, Kochi 783-8502

(Received 21 November 2003, Accepted 13 January 2004)

Reactive oxygen species (ROSs) and various free radicals are known to cause serious diseases, such as cancer and arteriosclerosis, and to accelerate aging. In order to protect our health from oxidative stress, active research has been carried out on screening antioxidants that can quench or scavenge ROSs and free radicals formed in our body. In the present paper, several novel flow-injection analysis (FIA) systems are described for estimating the antioxidative activity rapidly and conveniently, as follows: (1) spectrophotometric and chemiluminometric FIA for estimating the superoxide dismutase (SOD) and superoxide anion-scavenging activity (SOSA), (2) amperometric FIA for monitoring the catalase activity, which can decompose hydrogen peroxide, (3) FIA for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity using electron spin resonance (ESR) as a detector, and (4) spectrophotometric FIA for 2,2'-azino-bis(3-benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical-scavenging activity. Applications to practical samples, such as biochemical materials and foods, are also described.

Keywords : flow-injection analysis; food analysis; reactive oxygen species; free radical; immobilized enzyme; chemiluminescence; electron-spin resonance; superoxide dismutase; catalase; review.

1 緒 言

好気性生物のエネルギーは主に酸化的リン酸化に依存しており、その生命の維持には膨大な量の酸素を必要とする。ちなみに、ヒト成人では日常生活の維持に1日約500リットルの酸素を消費している。酸素消費量は臓器、細胞及び個体の状態により著しく異なる。例えば、脳は体重の2%にも満たない臓器であるが、その酸素要求量は全身の約20%にも達する。生体内に取り込まれた酸素の数%は、常に種々の酵素代謝系により、スーパーオキシドアニオン(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル($OH\cdot$)、次亜塩素酸(ClO^-)、あるいは一重項酸素(1O_2)などの活性酸素に変化している。これらの分子種の多くは反応性が高く、生体内で脂質、タンパク質、核酸、糖質などを攻撃し、その機能を低下させる。この反応が過度に進

行すれば、各種疾病の発症や老化の促進が見られるようになる。一方、一重項酸素が不飽和脂肪酸に付加すると、ヒドロペルオキシドが生成する。これが引き金となりラジカル連鎖反応が進行して、様々な過酸化脂質ラジカルが生成する。ヒドロペルオキシドは、活性酸素の作用のみならず、酵素(リポキシゲナーゼ)や金属イオンの触媒作用でも生成する。高脂肪食が発がんのリスクファクターである理由は、この過酸化脂質ラジカルが原因であると考えられている¹⁾²⁾。

このような酸化ストレスに対して、生物は無防備ではなく、優れた防御システムによって自らを守っている。それらの役割を担うものを総称して抗酸化物(antioxidant)といい、その活性を抗酸化能と呼んでいる。我々は多種多様な抗酸化物を体内で産生したり、食物からとり入れている。それらのあるものは酵素、タンパク質などの高分子化合物であり、あるものは低分子量化合物である。これらを機能の面から次のように分類することができる³⁾。

¹ 高知大学農学部: 783-8502 高知県南国市物部乙200

- ① 活性酸素種、フリーラジカルの発生を未然に防ぐ抗酸化物質（スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼやペルオキシダーゼなど）。
- ② フリーラジカルを捕そく、安定化する抗酸化物（アスコルビン酸、トコフェロール、カロテノイドなど）。
- ③ 傷害を引き起こす酸化物の無毒化、排除、損傷の修復、損失の再生を行う抗酸化物（ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、デオキシリボ核酸（DNA）修復酵素など）。

生体を持つこの防御能を上回る量の活性酸素やフリーラジカルが生じると、重篤な病態を誘起し得る。したがって、生体の有する抗酸化能を評価することは、臨床化学的には個人の酸化ストレスに対する抵抗性を把握する上で重要な指針となる。また、日常の食生活において摂取される食品の抗酸化能の計測は、各食品の有する健康の維持・増進作用（生体調節機能）を評価する上でも重要である。

抗酸化能を評価する方法は、反応液中で発生させた活性酸素やフリーラジカルを直接分光学的にモニターする直接法と、それらと反応し得る各種プローブを試料と競合させる競合法とに分けられる。活性酸素やフリーラジカルは一般に反応性が高く、寿命が短いことから、正確な反応の制御が再現性の高い結果を得るために強く必要とされている。著者らはこの要求に対して、フローインジェクション分析（FIA）法の有する特性が極めて理想的であると考え、様々な抗酸化能評価システムの開発に取り組んできた。本論文では、著者がこれまでに開発した吸光光度法、化学発光法、電流計測法、電子スピン共鳴（ESR）法に基づく抗酸化能評価のための FIA システムについて概説する。

2 SOD 及び SOSA の FIA

酸素呼吸に必須の三重項酸素が 1 電子還元を受けると O_2^- に変わる。この O_2^- はキサンチン酸化酵素（XO）などの酵素反応や還元性物質の自動酸化で生成し、動脈硬化症、肺気腫などの発症にかかわっている⁴⁾。一方、生体は O_2^- の無毒化機構としてスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）を備えている。この酵素は 2 分子の O_2^- を不均化して酸素と過酸化水素に変換する反応を触媒し、 O_2^- の反応性を低下させる。これまでの研究から SOD は酸素呼吸をする生物の寿命を決定する因子の一つであること⁵⁾ や、SOD の糖化反応が糖尿病合併症の誘発に深く関与していることが示唆されている⁶⁾。そこで、生合成される SOD に加えて、SOD と同様に O_2^- を不均化したり、あるいは消去し得る成分を食品から積極的にとり入れ、老化や生活習慣病を抑えようとする考えがにわかに高まりを見せている。これに伴い、食品工業では、SOD 活性、並びに O_2^- 消去活性（superoxide anion-scavenging activity,

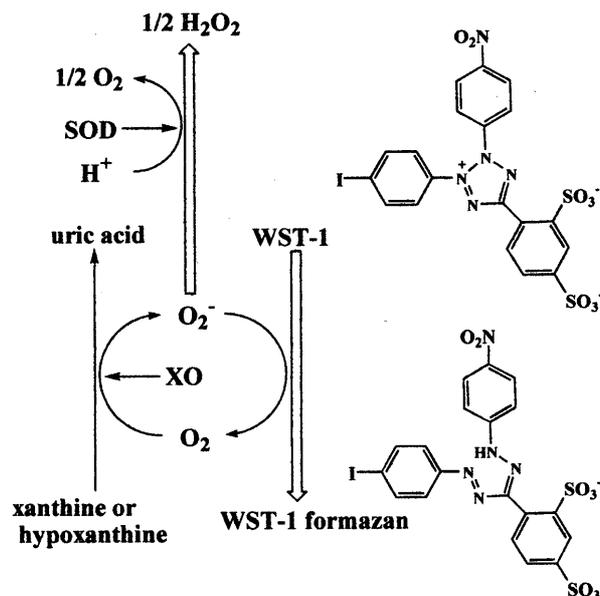


Fig. 1 Principle of WST-1 method²⁴⁾

SOSA) を有する成分の簡便なスクリーニング法の開発が必要とされている。

2.1 テトラゾリウム塩 WST-1 法

SOD 活性並びに SOSA の測定原理は基本的に同じである。その測定法としては、酵素反応で発生させた O_2^- の捕そく能力を発色プローブと競合させる間接法が一般的に利用されている。発色プローブとしては用いられているのは、ニトロブルーテトラゾリウム塩（NBT）である。この発色プローブ NBT を用いた NBT 還元法は、NBT が O_2^- により還元され水不溶性のブルーホルマザン（吸収極大 560 nm）を生じることを利用したものである。水不溶性であるため、長時間の分析では溶液が不均一になり測定の再現性に影響が出てくる。分光光度計のセルにも、このホルマザンが吸着するので取扱い難い。更に NBT は様々な還元性の物質で還元を受ける。この性質が糖尿病のマーカーであるメイラード反応中間体のケトアミンの定量に利用されている⁷⁾。NBT 法の最も大きな欠点は SOD の阻害曲線において SOD 濃度を高くしても 100% の阻害が得られないことである。これは NBT と O_2^- の発生に用いる XO との間の直接的な相互作用によるものと考えられている⁸⁾。発色プローブは簡便な分光光度計を用いた検出を可能とすることから、NBT の欠点を克服する発色プローブが開発されれば、その利用価値は高いと考えられた。

そこで著者らは、新しく合成された様々な水溶性のテトラゾリウム塩を SOD の活性測定に応用した結果⁹⁾¹⁰⁾、Fig. 1 に示した 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate sodium salt (WST-1)

が NBT の問題点を完全に克服した理想的な SOD 活性測定用の発色プローブであることを明らかにした。すなわち WST-1 は、水に対して数十 mM オーダーの高い溶解性を有しており、還元型ホルマザンも水可溶性であること、 O_2^- の発生系である XO と相互作用せず、SOD の阻害曲線が 100% に到達すること、また IC_{50} (コントロールに対して 50% の阻害を示す試料濃度) を示す SOD 濃度がアッセイ pH に大きく依存せず、一定の値を示すことなどの特徴を有する。この理想的な発色プローブを用いる WST-1 アッセイの測定原理を Fig. 1 に示す。本測定原理に基づいてマイクロプレートでの多検体測定を可能とした SOD assay kit-WST (同仁化学研究所製) が既に市販されるに至っている。なお、本キットのアッセイ pH は 10.2 である。試料の代わりに水を添加した際の吸光度変化を A_c (マニュアルでは A_{blank1})、試料添加での吸光度変化を A_s (同じく A_{sample}) とし、通常は阻害率 I (%) を

$$I = \{(A_c - A_s) / A_c\} \times 100$$

で計算できる。50% 阻害を与える試料の希釈倍率を正確に求め、その希釈倍率における試料溶液が IC_{50} 値を示す SOD 標品の濃度と等価であると考えて、試料原液、又は試料固体重量当たりの SOSA を算出する。

通常の生化学試料では、この式に基づいて SOD の活性測定が可能であるが、食品試料の場合には、試料成分による直接的な WST-1 の還元がどの程度起こっているかを常に知っておく必要がある。その評価は、XO 溶液の代わりに緩衝液 (キットでは dilution buffer に相当) を添加した系について吸光度変化 (A_b : マニュアルでは A_{blank2}) を測定し、 A_c と比較することで可能である。

各種嗜好性飲料に対する本法の適用性を調べるために、まず各試料の示す A_b の値を測定した。予想どおり、希釈していない各種嗜好性飲料を WST-1 と共存させると、 O_2^- の関与しない、食品試料による直接的な WST-1 の還元が起こることが観察された。この非特異的な妨害反応を抑えるために、各試料の複数の希釈系列を調製して、WST-1 に対する非特異的な還元の程度を調べた。コントロールの吸光度変化に対して、妨害物質である WST-1 還元性物質に由来する吸光度変化が 10% 以下 (A_b が A_c の 10% 以下) であれば、その妨害が無視できるレベルであると考え、その希釈倍率は赤ワインで 20 倍、緑茶で 100 倍、ココアで 30 倍、インスタントコーヒーで 30 倍であった。

本キットを用いて各食品の SOSA を測定した (Fig. 2)。各試料が 50% 阻害を示すときの希釈倍率は、赤ワインで 180~230 倍、緑茶で 3000 倍、ココアで 230 倍、インスタントコーヒーで 210 倍であった。これらの希釈倍率で

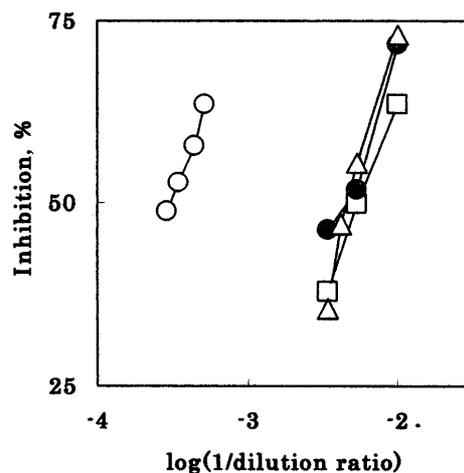


Fig. 2 Inhibition curves obtained by WST-1 method²⁴⁾

The food samples used were green tea (○), red wine (□), coffee (△) and cocoa (●).

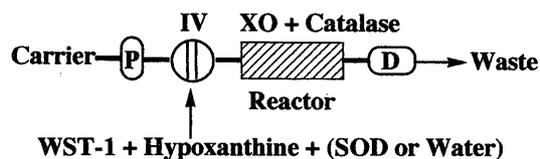


Fig. 3 FIA manifold for SOD assay¹²⁾

P: pump; IV: injection valve; D: detector

は、各試料で認められた WST-1 還元性物質の影響は、 A_c に対する A_b の比率で 3% 以下であり、その妨害は全く問題にならないレベルであることが明らかになった。また既報¹¹⁾で示したように、これらの希釈倍率では各嗜好飲料の XO 阻害活性は観察されない。本測定キットを用いて SOD 標品の IC_{50} を求めると 2.0 units/ml 以下であった。この濃度から考えて、本測定キットは標準 SOD に対して ESR 法の 2 倍以上の検出能を有することが判明した。

バッチ系で得られた以上の結果に基づき、本測定原理を FIA へ展開した¹²⁾。用いた FIA システムを Fig. 3 に示す。FIA システムでは測定に必要とされる O_2^- の発生のための XO を Sepharose に固定化し、迅速性の向上とともに、経済性の賦与も図った。更に XO の安定性を向上させるためにカタラーゼを同時に固定化した。試料溶液をヒポキサンチンと WST-1 を含む反応液と 9:1 の体積比で混合した後、その混合液 20 μ l を六方バルブでキャリア溶液中に注入した。ヒポキサンチンを基質として用いたのは、キサンチンよりも溶解度が高いことと、化学量論的に 2 倍の O_2^- を発生し得るという理由である。注入された試料と反応液は XO リアクター内で Fig. 1 に示したスキームに従い反応する。そこで各試料の阻害率を次のように定義

した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 \times (H_0 - H_1) / H_0$$

ここで、 H_0 と H_1 は、それぞれ水を試料とした際のピーク高と実際の試料で観測されるピーク高である。はじめに H_0 を比較することで各種条件の最適化を行った。その結果、WST-1及びヒポキサンチンの濃度として、それぞれ2 mMと3 mMを、またキャリア溶液の流量を0.4 ml/minとした。これらの最適条件でSOD標品の測定を行った (Fig. 4)。SOD濃度が高くなるにつれて、ピーク高は低くなり、50%の阻害を与えるSOD濃度、すなわち IC_{50} は2.7 $\mu\text{g/ml}$ であった。本条件では1時間当たり30検体以上の分析が可能であり、1試料を平均2分で分析できることから、従来のバッチ法の分析時間を10倍以上短縮することができた。また1か月にわたり分析を繰り返しても、ホルマザンの流路への吸着は全く認められず、水可溶性WST-1はFIAに十分適用できることが明らかとなった。本条件では、XOリアクターは200回の繰り返し測

定によってもほぼ一定のピーク高を示し、高い操作安定性を有していることが示された。本FIAシステムを用いてラット赤血球のSOD活性を測定し、NBT法で得られる結果と比較した (Fig. 5)。両者の間には高い直線的相関が認められ、迅速分析であるにもかかわらず、その分析結果は従来法の結果とよく一致することが明らかとなった。以上の結果から、WST-1法に基づくSODアッセイ用のFIAシステムはバッチ系の特徴に加えて、分析時間とコストの面で従来法よりも優れていることが示された。

2.2 化学発光-FIA法 (CL-FIA法)

自動化に適したフォーマットで、かつ高い検出感度を有するSOSA測定法の開発を目的として、化学発光プローブとしてルシゲニンを用いたSOSA測定用のFIAシステムの開発を行った (Fig. 6)¹³⁾。キャリア溶液として100 mMピロリン酸カリウム緩衝液 (pH 9.0)をペリスタ型マイクロチューブポンプにより流量1.0 ml/minで送液する。希釈した試料9体積を1 mMルシゲニンと250 μM ヒポキサンチンから成る試薬溶液1体積とあらかじめ混合

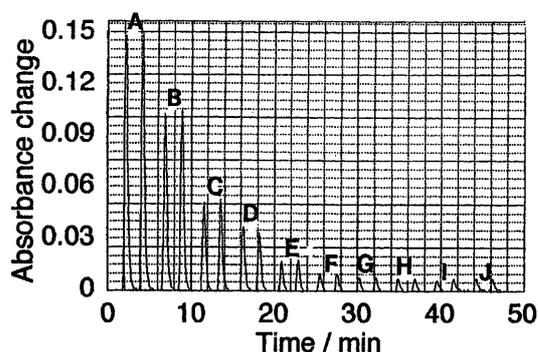


Fig. 4 Typical response curve of SOD preparation obtained by the present FIA method based on the use of WST-1¹²⁾

A: 0; B: 1; C: 2.5; D: 5; E: 10; F: 25; G: 50; H: 100; I: 250; J: 500 $\mu\text{g/ml}$

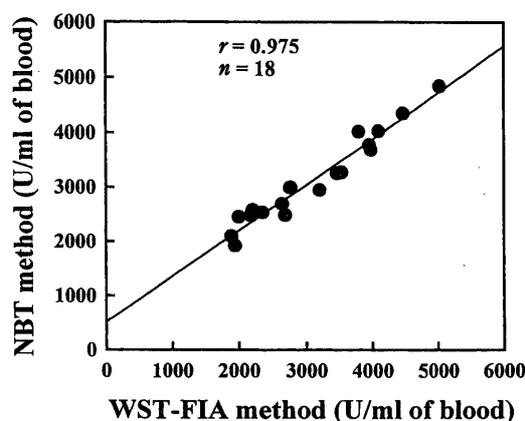


Fig. 5 Relationship between SOD activity in rabbit erythrocytes obtained by NBT method and the present FIA method based on the use of WST-1

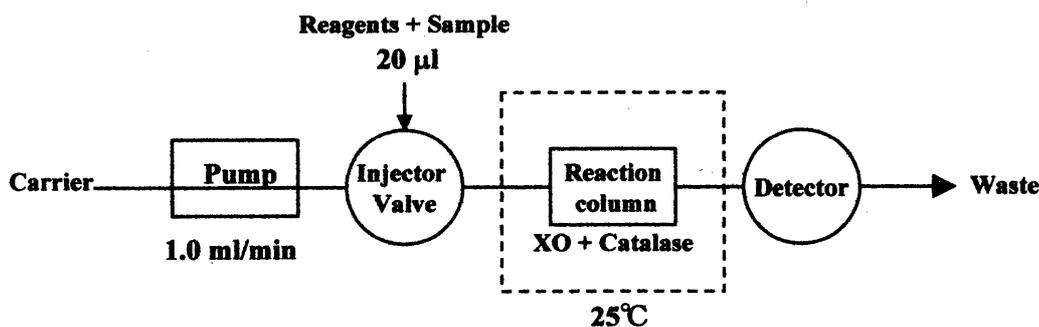


Fig. 6 Chemiluminometric FIA system for SOD¹³⁾

Detector: chemiluminescence detector

して、その 20 μl をオートサンプラーでライン中に注入する。試料は XO を固定化した酵素リアクター内へ運ばれる。なお、本リアクター内には、固定化 XO の安定性を高めるために、カタラーゼも同時固定化されている。ここでヒポキサンチンの尿酸への酸化に伴い発生する O_2^- に対してルシゲニンと試料中の O_2^- 消去物質の間で競合反応が起こる。試料の代わりに水を注入した際に観測される発光ピーク高を H_0 、また試料で観測される発光のピーク高を H_1 とすると、試料中の SOSA が高くなるにつれて H_1 は小さくなる。試料の阻害率 I (%) は次式で求められる。

$$I = 100 \times (H_0 - H_1) / H_0$$

他の方法と同様に 50% 阻害を与える試料の希釈倍率を正確に求め、その希釈倍率における試料溶液が、 IC_{50} 値を示す SOD 標品の濃度と等価であると考えて、試料原液、又は試料固体重量当たりの SOSA を算出する。

本法は連続流れ分析法であることから、これまでに開発された SOD 活性測定法の中で最も迅速な分析法である。SOD に対する実際の応答曲線を Fig. 7 に示す。流量 1.0 ml/min の条件では 1 時間当たり 60 検体の分析が可能である。

はじめに各種希釈系列の食品試料を、ヒポキサンチンを含まないルシゲニンのみを含む試薬溶液と混合して、食品由来の非特異的な化学発光が見られるかどうかを調べた。その結果、赤ワイン、緑茶、インスタントコーヒー、ココアのすべてで、100 倍希釈液においても非特異的な化学発光は見られないことが明らかとなった。SOD 標品に対する IC_{50} は 0.69 units/ml で、従来法と比較して最も高い検出感度を示した。この SOD 溶液と等価な活性を示す各食品試料の希釈倍率を求めた。その結果、 IC_{50} を示した希釈倍率は赤ワインで 3800 ~ 5800 倍、緑茶で 120000 ~ 150000 倍、インスタントコーヒーで 4100 倍、ココアで 4300 倍であった。したがって、この IC_{50} を示す希釈倍率では、非特異的な化学発光は関与していないことが明示された。本測定法で得られた SOSA と ESR で得られた結果との間には相関係数 0.908 の良好な直線関係が成立した ($n = 7$)。しかしながら、CL-FIA で得られた測定結果は ESR 法で得られた結果と比較して、3 ~ 10 倍の範囲で高くなることが明らかとなった。同様の傾向が WST-1 法との比較においても認められた。この理由として、ESR 法並びに WST-1 法と比較して、CL-FIA 法では O_2^- の発生に使用している XO を多孔性ビーズである Sepharose に固定化していることが原因ではないかと考えられた。すなわち、基準物質として用いた SOD は分子量約 32000 の高分子物質であることから、高い流量の流れの中では、多孔性

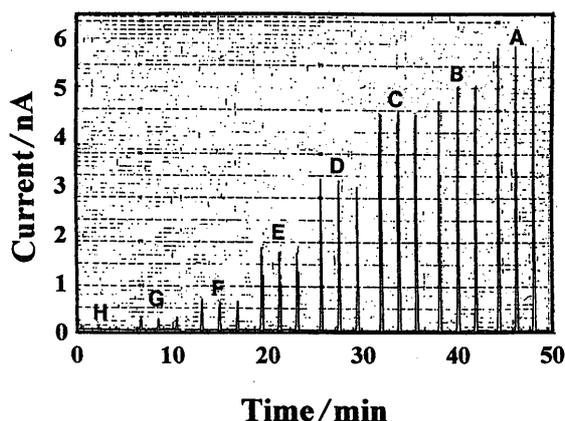


Fig. 7 Typical response curve of SOD preparation obtained by the present CL-FIA method¹³⁾

A: 0; B: 25; C: 50; D: 100; E: 250; F: 500; G: 1000; H: 2000 ng/ml

ポリマーのポア内部に対して拡散の制約を受けていると考えられる¹⁴⁾。したがって、SOD の示す IC_{50} 値は実際の固定化 XO 近傍の SOD 濃度よりも極端に高くなっているものと予想される。一方、食品試料中に存在する SOSA 物質はポリフェノール類などの物質で分子量的には SOD よりも小さく、拡散の制約を受ける程度が小さいと考えられる。その結果、分子量の違いによる固定化 XO 近傍での存在比率、すなわち分配率に違いが生じ、拡散の制約を受けない ESR 法や WST-1 法と比較して、見掛け上高い活性が現れたものと推察された。これを確認するために、SOD と比較して分子量の小さい SOSA 物質として Tiron (分子量 252) の IC_{50} を WST-1 法と本 FIA 法で求め、SOD で得られる両者の値と比較した。SOD に対する IC_{50} 値は 1.8 units/ml (WST-1 法) と 0.69 units/ml (CL-FIA 法) であったのに対して、Tiron の IC_{50} は 1.4 mM (WST-1 法) と 0.0030 mM (CL-FIA 法) となり、予想どおり SOD と比べて分子量の小さい SOSA 物質では FIA 法が高い検出能を示すことが明らかとなった。したがって、FIA 法が他の均一測定系と比べて高い SOSA 値を示したことは、逆に言えば、今回使用した食品試料中の SOSA 物質が SOD に比べて低分子量物質であったことを示唆している。

CL-FIA システムを用いて食品試料を 250 回にわたり分析しても、コントロールのピーク高が減少していく傾向は認められなかった。したがって、本 FIA システムは実際の食品試料の分析においても高い安定性を備えていることが明らかとなった。

本法は従来法に比べて検出感度が高く、更に迅速な方法である。更に本法で得られた食品試料の SOSA は ESR 法の結果と高い直線的な相関を示したことから、食品素材のスクリーニング法として高い実用性を有しているものと考えられた。

2.3 有用地域資源の検索への応用

九州の地域農産物である紫サツマイモのように、抗酸化物質の検索が地域産業の活性化に結びつく場合がある¹⁵⁾。そこで、上述の SOSA 測定法を駆使して高知県産食品の新規機能性素材としての有用性を調べてみた¹⁶⁾。

試料としては、高知県内で栽培・市販されているギャバロン茶、碁石茶、桑茶、シシトウ、インゲン豆、紫峰栗、オクラ、デラウェア、キュウリ、ミニトマト、乾燥アロエ、ビワ及びスモモを用いた。シシトウとオクラは総生産額が全国順位 1 位の特産品であり、碁石茶は数少ない日本の後発酵茶のひとつである。ビワとスモモについては、果肉、果皮、そして種子部位に区分して測定した。水抽出物の調製は次のように行った。茶葉試料 10 g に蒸留水 400 ml を加えてホモジナイズ処理し、5℃ で 48 時間静置して抽出し、汙過した後、更にメンブレンフィルターで処理し、実験に供した。茶葉以外の試料を調製する場合は、試料 10 g に 40 ml の蒸留水を加え、以下同様の操作で抽出を行った。

測定結果を Table 1 に示す。ESR 法と CL-FIA 法の相関を求めると、アッセイ pH が異なるにもかかわらず両者の測定結果の間には相関係数 0.997 の良好な直線的相関が認められた。この結果は、嗜好性飲料以外の様々な種類の食品試料に対しても、新規 SOSA 測定法である CL-FIA 法が、ESR 法と相関の高い測定結果を与えることを示すデータであり、様々な食品素材のスクリーニングに対して幅広い適用性があることが証明されたことになる。

一方、測定結果に注目すると、高知県産食品の水抽出物の中で、2つの茶葉、すなわちギャバロン茶と碁石茶の SOSA が特に高いことが明らかとなった。Noda らは ESR 法による測定の結果、緑茶抽出物の SOSA が 173100 ~ 206300 units/g であったと報告している¹⁷⁾。他方で、CL-FIA 法による碁石茶とギャバロン茶の SOSA を試料重量当たり換算すると、それぞれ 571000 units/g と 452000 units/g となる。CL-FIA 法を用いて市販品の緑茶を測定したところ、520000 units/g と 637000 units/g の値が得られた。2つの方法による比較の結果、ギャバロン茶と碁石茶の両茶葉の SOSA は、緑茶と同等あるいはそれ以上であることが判明した。

碁石茶とギャバロン茶はそれぞれ後発酵、又は嫌気処理によって製造されたものである。こうした製造方法が茶葉の抗酸化能に与える影響について、更に調べていく価値があると考えられた。本測定で、高知県の特徴的な茶葉の活性を明らかにすることができたことに加え、茶葉以外にも、スモモ種子などの高い活性を示す興味深い試料が見いだされた。これらの結果は本 CL-FIA 法が有用機能性食品素材の検索に実用的に利用可能であることを明示している。

Table 1 SOSA of bioresources produced in Kochi Prefecture obtained by ESR method and CL-FIA method

Sample name	ESR (units/g dry)	CL-FIA (units/g dry)
Anaerobically treated tea (Gaboroncha)	192000	1770000
Post-heating fermented tea (Goishicha)	216000	2230000
Mulberry tea leaf	11700	32700
Small sweet green pepper	2530	39600
Kidney bean	2780	269000
Chest nut	10600	17100
Okra	4500	11200
Delaware	700	258
Cucumber	2890	3920
Cherry tomato	38100	24700
Dehydrated aloe perrye	1100	12400
Loquat (pulp)	1060	2980
Loquat (peel)	3740	30600
Loquat (seed)	7700	9390
Plum (pulp)	1080	1670
Plum (peel)	10700	27900
Plum (seed)	81900	7370

3 カタラーゼ活性の FIA

カタラーゼは過酸化水素を水と酸素に分解する酵素である。過酸化水素はヒドロキシルラジカルの前駆体であるため、その分解に関与するカタラーゼは生体防御において重要な役割を担っている。カタラーゼ活性は通常、過酸化水素の吸光度変化をモニターすることで、また過酸化水素の分解で生じる酸素をクラーク型酸素電極でモニターすることで測定されているが¹⁸⁾、操作が煩雑であるため、より簡易で迅速な活性測定法の開発が必要とされている。そこで著者らは、カタラーゼの基質である過酸化水素を、固定化酵素を用いて連続的に発生させ、その分解に伴い生成する酸素をフロースルータイプのクラーク型酸素電極でモニターする新しいタイプのカタラーゼ活性計測用 FIA システムの開発を試みた。

臭化シアン活性化 Sepharose に下記の酸化酵素を各々固定化し、カラム (2 mmφ × 6 cm) に充填して酵素リアクターとした。2 流路系のフローシステムにおいて、一方のラインから基質を含むキャリアー溶液をペリスラ型マイクロチューブポンプによりリアクター内に送液し、過酸化水素を発生させるとともに、キャリアー溶液の酸素濃度を低下させた。もう一方のラインにカタラーゼ溶液 (20 μl) を注入し、過酸化水素の分解により生じる酸素をフローセルに設置したクラーク型酸素電極によりモニターした (Fig. 8)。ベースライン電流値を基準にしたピーク高からカタラーゼの検量線を作成し、試料の活性を求めた。酸化酵素として、グルコースオキシダーゼ (EC 1.1.3.4; from *Aspergillus niger*), XO (EC 1.1.3.22; from Butter milk),

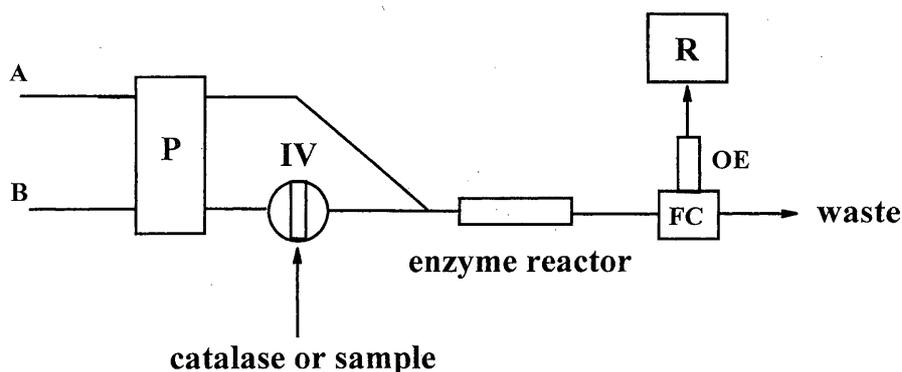


Fig. 8 Schematic diagram of FIA system for catalase activity

P: pump; IV: injection valve; FC: flow cell; OE: oxygen electrode; R: recorder

アルコールオキシダーゼ (EC 1.1.3.13; from *Candida boydii*), ウリカーゼ (EC 1.7.3.3; from yeast) を用いてシステムの最適化を行った。

まず、過酸化水素のオンライン発生系として用いる酸化酵素の比較を行った。0.25 g の臭化シアン活性化 Sepharose に対して、それぞれグルコースオキシダーゼ 3000 units, XO 1.9 units, アルコールオキシダーゼ 55 units, ウリカーゼ 48 units を固定化に供し酵素リアクターを調製した。各リアクターに 1.0 mM グルコース, 0.2 mM ヒポキサンチン, 0.5 mM エタノール, 0.4 mM 尿酸を送液して、ベースライン電流値の変化を調べた。500 分間の連続送液に対して、ウリカーゼは他の酸化酵素と比較して顕著に高い安定性を示した。この結果から、ウリカーゼが過酸化水素のオンライン発生酵素として最適であると判断した。ウリカーゼリアクターを用いて最適化を行い、キャリア溶液を 0.4 mM 尿酸を含む 100 mM リン酸塩緩衝液 (pH 8.0), 流量を 0.5 ml/min, 測定温度を 30°C に設定した。本最適条件で標品カタラーゼの活性測定を行ったところ、0~210 units/ml の範囲で、酵素活性とピーク電流値との間に直線関係が認められた。また検出限界は 21 units/ml ($S/N=4$) であった。210 units/ml カタラーゼを繰り返し測定した結果、1 時間当たり 15 検体の分析が可能で、ピーク電流値の変動係数は 1.5% ($n=5$) であった。

カタラーゼは生体内に存在するカルボニル化合物の修飾を受けることで急速に失活することが知られている¹⁹⁾。そこで本 FIA システムの実用的な利用を目的として、最適化したシステムをグリセルアルデヒドによるカタラーゼの失活反応のモニタリングに応用した。210 units/ml のカタラーゼを 37°C, pH 7.4 の生理的な条件において 10 mM 又は 25 mM のグリセルアルデヒドとインキュベートすることでカタラーゼの修飾を行った。インキュベートしてから 4 分ごとに試料を採取し、そのカタラーゼ活性を測定

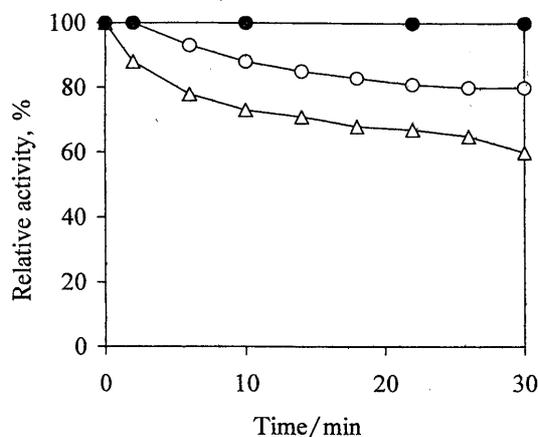


Fig. 9 Time course of catalase activity during the incubation with glyceraldehydes (0: ●; 10 mM: ○; 25 mM: △)

Catalase (210 units/ml) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 150 mM NaCl was incubated at 37°C. The activity was expressed as the relative one against the initial activity.

したところ (Fig. 9), インキュベート直後からの急速なグリセルアルデヒドによる失活が連続的にモニターできることが明らかとなった。この結果から本カタラーゼ活性測定用 FIA システムは、生化学領域や臨床検査の分野で実用的な利用が可能であることが示唆された。

4 ラジカル消去活性の FIA

不飽和脂肪酸の自動酸化に対する抗酸化能の測定には、リノール酸の自動酸化で生じたヒドロペルオキシドをロガン鉄法で吸光度分析する方法が、多くの研究者から信頼されており、現在でも多用されている。しかしながら、本測定には数時間から数日を要することから、これに替わる簡便性と迅速性に優れた様々な抗酸化活性評価法が開発されている。そのうち、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

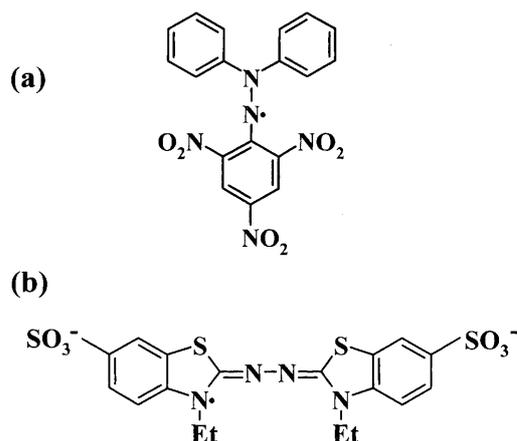


Fig. 10 Structure of (a) DPPH radical and (b) ABTS radical

(DPPH) や 2,2'-azino-bis(3-benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) などの発色性の安定ラジカルに対する消去作用を利用する方法が抗酸化剤の一次スクリーニングには用いられている (Fig. 10). 本項では, これらのラジカルに対する消去活性を簡易・迅速に評価するための FIA システムについて述べる.

4・1 DPPH ラジカル消去活性の FIA

食品成分のラジカル消去能を評価する際には用いられている DPPH ラジカルは特徴的な色を有していることから, 吸光度の低下によってそのラジカルの消去活性を評価できる. しかしながら, 食品成分には着色物質も含まれており, 試料によっては深刻な妨害を受ける可能性もある. 一般にラジカルの定性的・定量的な情報を得るには, ESR を用いるのが特異性の面から見て最善の方法である. しかしながら, ESR は測定操作が煩雑で, 多検体の分析には不向きであるという欠点を有している. そこで, 著者らは ESR 法の欠点を克服するために, 検出端に ESR を用いた新しい FIA システムの試作を行い, フリーラジカルの消去活性を簡易・迅速かつ特異的に評価する方法の確立を行った. ここではその最初の例として, DPPH ラジカルの消去活性評価システムの開発について述べる²⁰⁾.

著者らの知る限りでは, ESR を FIA の検出端に利用した研究は報告例がなかった. そこで本研究を始めるに当たり, まず ESR-FIA (著者らはこの方法を flow injection spin analysis: FISA と呼んでいる) によるフリーラジカルの定量的なモニターの可能性について検討した. 本実験では, シングルラインシステムを用いて, キャリヤー溶液として 50% のエタノールを流量 0.32 ml/min で送液した. ここに試料溶液 20 μ l を注入した. 注入された試料はミキシングコイルを通り, フロースルータイプのへん平セル (Fig. 11) に移送された. ESR 装置としては日本電子製の

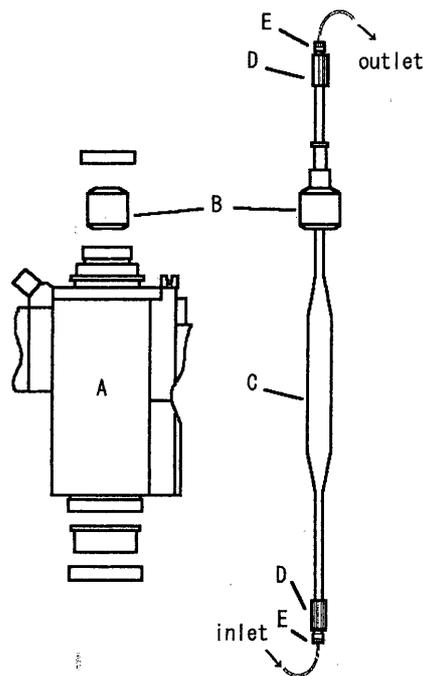


Fig. 11 Schematic diagram of flow-through cell²⁰⁾

The flat cell was inserted into the cavity (left side) and fixed with the Teflon holder. A: cavity of the ESR instrument; B: Teflon holder; C: flow-through flat cell; D: stainless union; E: connector

フリーラジカルモニター FR30 を用いた. 初めに, 75 μ M の DPPH をキャリヤー溶液として流しながらその ESR スペクトルを測定した. 得られた DPPH ラジカルのシグナルは, 送液をせずに得られるシグナルと全く変化はないことが明らかとなった. そこで, DPPH ラジカルのスペクトルにおいて最も大きなシグナル変化を示した 334.8 ~ 335.6 mT の範囲で, 注入した DPPH ラジカル溶液に対して得られるピーク高を比較した. その結果, 335.3 mT で最大のピーク高が認められたことから, この値を設定磁場とした. 本条件において, 異なる濃度の DPPH を注入したときの濃度とピーク高との間には, 良好な直線関係が成立した. 一般に ESR スペクトルは微分型で表現されるが, 磁場を固定して, 時間当たりでシグナル変化をモニターした際には, 得られるピーク高は濃度との間に直線的な相関を示すことが明らかとなった. したがって, ESR は FIA の検出端として実用的に利用可能であることが明示された.

これらの結果に基づいて, 次にダブルラインシステムを用いて DPPH ラジカル消去活性の FIA システムの開発を試みた (Fig. 12). A 液には 50% エタノールを, B 液には DPPH を連続的にシステムに送液すると, ベースラインとして一定の大きさの ESR シグナルが観測された. そこにオートサンプラーを使ってラジカルスカベンジャーを注入すると, その消去活性に従い, ラジカルシグナルが低下し

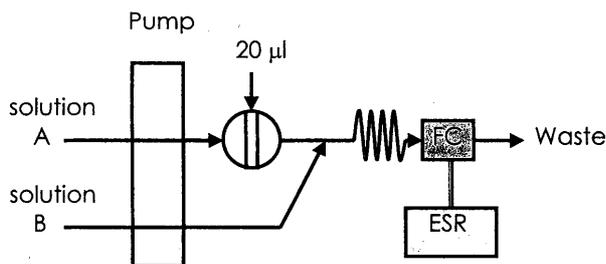


Fig. 12 Flow injection spin analytical system²⁰⁾

FC: flow-through cell

て、ネガティブピークが観測された。本システムに用いる DPPH ラジカルの濃度を 0.2 mM として、本システムに典型的な DPPH ラジカルスカベンジャーであるアスコルビン酸を注入したところ、濃度に依存したネガティブピークが観測された (Fig. 13)。アスコルビン酸濃度とピーク高との間には極めて高い直線的相関が認められた。更にビタミン E 誘導体の Trolox、並びにシステインについて各物質の濃度と観測されたピーク高との関係を調べたところ、これらの物質に関しても、両者の間に高い直線的相関が認められた (Fig. 13)。これら 3 つの DPPH ラジカルスカベンジャーの示した傾きには差が認められた。アスコルビン酸の傾きを 100 とすると、Trolox、システインの傾きはそれぞれ 90 と 42 であり、従来の分光学的方法で得られた文献値²¹⁾とよく一致した。なお、0.32 ml/min の流量では、1 時間当たり約 13 検体の分析が可能であった。

本法の実用的利用を目的に、様々な嗜好飲料に対して本法を適用し、従来法である高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で得られる DPPH ラジカル消去能との比較を行った。HPLC を用いる従来法と比較したところ、両者の方法で得られた各試料のラジカル消去能は、比較的高い一致性を示し、本 ESR-FIA 法は 1 検体、3 分程度の迅速な分析法であるにもかかわらず、実試料への適用性を有していることが明らかになった (Table 2)。

4.2 ABTS ラジカル消去活性の FIA

最近、食品や血清の総抗酸化活性が注目され、その評価に ABTS が用いられることが多い。一般に DPPH ラジカルの消去活性には 50% エタノール溶液が用いられるが、ABTS は水溶性であるため、水溶液中での分析も可能である。これまでに ABTS ラジカルカチオン消去活性測定のために開発された FIA システムは、あらかじめ過硫酸カリウムとの 12~16 時間の反応でラジカルを生成させる必要があった²²⁾。また、ラジカル発生に用いられる試薬が測定の際にも残存するため、測定に影響を与える可能性が考えられた。そこで本研究では、これらの欠点を解消した ABTS ラジカル消去活性測定法として、ペルオキシダーゼ

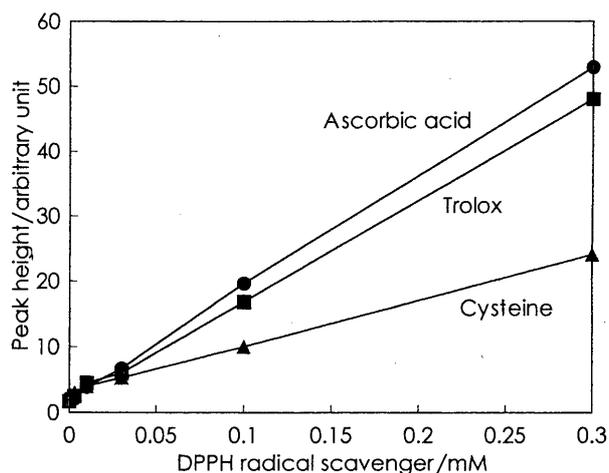


Fig. 13 Relationship between DPPH radical scavenger concentration and peak height obtained by the present FISA system²⁰⁾

Table 2 DPPH radical-scavenging activity of beverages

Beverages	Radical-scavenging activity (μmol Trolox equivalent per 100 ml) ^{a)}	
	FISA method (ESR)	HPLC (colorimetry)
Green tea	784	971
Oolong tea	310	351
Coffee	967	965
Red wine	752	943

a) Data are expressed as μmol Trolox equivalent per 100 ml of each sample and as the mean of triplicate.

(POD) を固定化したリアクターをライン中に組み込んだ FIA システムの開発を行った²³⁾。

本法で用いた FIA システムを Fig. 14 に示した。POD を固定化したリアクターに ABTS 溶液と過酸化水素を流し反応させることで、ABTS ラジカルを発生させた。もう一方の流路からは試料を注入し、ラジカル溶液と合流させ、ミキシングを経て、フロースルータイプの分光光度計へ送液した。

本法では、ABTS ラジカルを発生させるため、臭化シアン活性化 Sepharose に固定化した POD を用いた。POD は、その表面が糖質で覆われているため、まず POD を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化した後、過剰の 1,6-ジアミノヘキサンと反応させ、更に水素化ホウ素ナトリウムで還元処理し、アミノ化 POD を調製した。次に臭化シアン活性化 Sepharose を 1 mM HCl で膨潤させ、洗浄後、4°C にて固定化した。固定化したゲルをカラム (内径 2 mm × 長さ 35 mm) に充填し、リアクターとした。

本法で使用する測定波長を設定するため、ABTS ラジカルの 400~900 nm のスペクトルをアスコルビン酸の共存下でバッチ法を用いて測定したところ、734 nm と 417

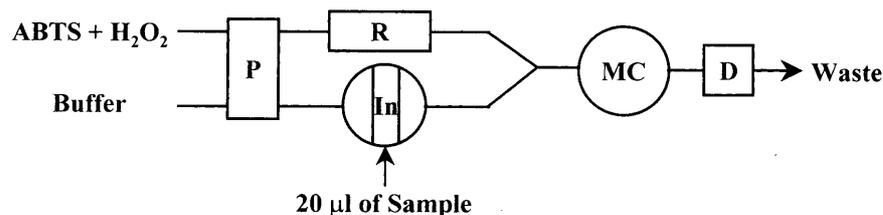


Fig. 14 FIA system for ABTS radical-scavenging activity

P: pump; IV: injection valve; R: peroxidase reactor; MC: mixing coil; D: detector

nm に極大吸収が認められた。また、アスコルビン酸の濃度に応じた直線的な吸光度変化がそれぞれの波長で認められたが、417 nm のほうが吸光度変化が大きく、より高感度な分析が期待できることから、以後の測定には 417 nm を用いた。

最適条件を設定するために、流量と過酸化水素濃度の影響を調べた。流量を 0.2~1.0 ml/min の範囲で変化させたところ、流量が大きくなるにつれてより吸光度が高くなったことから、以後の実験では流量を 1.0 ml/min とした。

ABTS の濃度を過酸化水素に対して過剰量である 1.8 mM に固定し、過酸化水素の終濃度を 0.02~0.12 mM まで変化させたところ、過酸化水素濃度が大きくなるに従って吸光度も増加した。過酸化水素濃度を 0.12 mM としたとき、ピーク高と水溶性ビタミン E 誘導体 Trolox 濃度との間には 0.01~0.25 mM の範囲で直線的な相関が認められた。また、過酸化水素濃度を 0.02 mM としたところ、Trolox に対する検出限界は 0.004 mM ($S/N=4$) であった。どちらの条件においても、リアクターは 2 日以上安定だった。また、この条件では 1 時間に最大 60 サンプルの測定が可能であった。

本法の実試料への適用性を検討するため、種々の抗酸化物質の ABTS ラジカル消去活性を測定した。Trolox は、エタノールに溶解し、アスコルビン酸は超純水に溶解した。試料の溶媒として用いたエタノールと超純水の影響を検討したところ、どちらの溶媒でも差は見られなかった。アスコルビン酸を含め 7 種類の標準 DPPH ラジカル消去物質の Trolox 等価活性 (TEAC) は従来法の値とよく一致した。また種々の嗜好性飲料についても従来法との比較を行った結果、両者の間には良好な一致が認められ ($n=8$, $r=0.998$)、本法が実試料に対しても高い適用性を有していることが明らかとなった。

5 結 語

本論文では、多くの病気の成因として、また老化の促進因子として知られる活性酸素やフリーラジカルの消去能、いわゆる抗酸化能を評価するための FIA システムについ

て紹介してきた。これらのシステムは酸化ストレスに対抗する生体の防御能を評価する上で、あるいは生体調節機能を有する食品の開発に実用的な利用が期待される。

活性酸素を含めたフリーラジカルは、一般的に不安定で寿命の短い化学種である。これらを対象とする抗酸化能の評価系において、再現性の高い結果を得るためには、正確な反応の制御が強く必要とされる。本論文で紹介したように、FIA 法では反応性の高い活性酸素やフリーラジカルと、試料との反応を再現性よくモニターできるだけでなく、それらのラジカルをライン中で発生させることも可能であり、不安定なラジカルの取り扱いが一般的なバッチ法と比べて、格段に容易になるという大きな特徴を有する。今後も更に他の活性酸素種やフリーラジカルを対象にした、簡易・迅速な抗酸化能評価システムを開発していきたいと考えている。

文 献

- 1) 今田伊助, 佐藤英介, 井上正康: 化学と生物, **37**, 411 (1999).
- 2) 澤 智裕, 赤池孝章, 前田 浩: 化学と生物, **40**, 15 (2002).
- 3) 二木悦雄: 化学と生物, **37**, 554 (1999).
- 4) 大柳善彦: “活性酸素と病気”, (1989), (化学同人).
- 5) 井上正康: “活性酸素と医食同源”, (1996), (共立出版).
- 6) H. Ukeda, Y. Hasegawa, T. Ishii, M. Sawamura: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 2039 (1997).
- 7) R. N. Johnson, P. A. Metcalf, J. R. Baker: *Clin. Chim. Acta*, **127**, 87 (1983).
- 8) S. I. Liochev, I. Fridovich: *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 408 (1995).
- 9) H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii, M. Sawamura: *Anal. Biochem.*, **251**, 206 (1997).
- 10) H. Ukeda, D. Kawana, S. Maeda, M. Sawamura: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 485 (1999).
- 11) 島村智子, 前田 進, 受田浩之, 沢村正義: 農化, **72**, 1181 (1998).
- 12) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana, M. Sawamura: *Anal. Sci.*, **15**, 353 (1999).
- 13) H. Ukeda, A. K. Sarker, D. Kawana, M. Sawamura: *Anal. Chim. Acta*, **468**, 137 (2001).
- 14) H. Ukeda, T. Ishii, M. Sawamura, H. Kusunose: *Anal. Sci.*, **9**, 617 (1993).
- 15) 沖 智之, 増田真美, 古田 収, 西場洋一, 須田

- 郁夫：食科工，**48**，927 (2001).
- 16) 森山洋憲，片山泰幸，中林錦一，受田浩之，沢村正義：食科工，**49**，679 (2002).
- 17) Y. Noda, K. Anzai, A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei, L. Packer: *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 35 (1997).
- 18) H. Ukeda, Y. Adachi, M. Sawamura: *Anal. Sci.*, **20**, 471 (2004).
- 19) H. Yan, J. J. Hardy: *Biochem. J.*, **328**, 599 (1997).
- 20) H. Ukeda, Y. Adachi, M. Sawamura: *Talanta*, **58**, 1279 (2002).
- 21) T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba, J. Terao: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1201 (1998).
- 22) N. Pellegrini, D. D. Rio, B. Colombi, M. Bianchi, F. Brighenti: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 260 (2003).
- 23) H. Ukeda, K. Nakabayashi, M. Sawamura: 投稿準備中.
- 24) 受田浩之，森山洋憲，川名大介，片山泰幸，中林錦一，沢村正義：食科工，**49**，25 (2002).

要 旨

生体内で生じる活性酸素種や種々のフリーラジカルが，生活習慣病や老化の成因であることが最近の多くの研究で明らかにされた．そこで，老化や生活習慣病の予防の観点から，それらの高い反応性を有する化学種を消去，又は捕そくする活性，いわゆる抗酸化能を有する薬剤の開発や食品成分の検索が活発に研究されている．本論文では，従来の抗酸化活性評価法に代わる簡易・迅速分析法として著者らが開発した新しいフローインジェクション分析システム，すなわち (1) 吸光光度法，並びに化学発光法に基づく酵素スーパーオキシドジスムターゼ活性，及びスーパーオキシドアニオン消去活性測定システム，(2) 過酸化水素を分解する酵素カタラーゼの活性評価システム，(3) 電子スピン共鳴を検出端に用いた 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ラジカル消去活性評価システム，及び (4) 吸光光度法による 2,2'-azino-bis(3-benzthiazoline-6-sulfonic acid) ラジカル消去活性測定システムについて紹介し，その応用例についても触れる．