

食品の抗酸化力評価法について

はじめに

近年、酸化ストレスが様々な疾患を引き起こす原因となると言われています。酸化ストレスとは、生体内で活性酸素が産生されて障害作用を発現する作用と、生体システムが直接活性酸素を解毒したり、生じた障害を修復する作用との間で均衡が崩れた状態のことを言います。酸化ストレスの原因は様々で、煙草の煙に含まれる有害物質を取り除くために白血球によって大量の活性酸素が生成されたり、紫外線が皮膚を通過して体内の酸素を刺激することにより過剰の活性酸素が生成されることが例としてあげられます。近年、過剰になった活性酸素を除去するために食品中の抗酸化物質で体内の抗酸化能を補うことが注目され、食品の抗酸化力を評価することが重要視されています。

そこで、今回は食品の抗酸化力評価法についてご紹介いたします。

活性酸素と抗酸化能について

金属が酸素に触れて放置されると錆びるように、酸素はもともと酸化力を持っています。これは酸素が不対電子を二つ持つと安定するという特殊な性質を持っているためです。この酸素がなんらかの影響で不安定な状態になり、酸化力が非常に強くなったものを活性酸素およびフリーラジカルと呼びます。活性酸素は化学反応を起こしやすい酸素種のことで一重項酸素、過酸化水素などが含まれます。フリーラジカルは不対電子を持ち、不安定で反応性の高い物質のことでスーパーオキシドラジカル、ヒドロキシラジカル、一酸化窒素や遷移金属が含まれます。スーパーオキシドラジカルとヒドロキシラジカルは、フリーラジカルでもあり活性酸素でもあります(図-1)。このため活性酸素は広い意味で反応性の高い物質、酸化力の強い物質全てを指すこともあり、活性酸素とフリーラジカルを同義として扱うことも多々あります¹⁾。

活性酸素は病気の元凶のように言われることが多いですが、体内に入り込んできた微生物、細菌及び毒物などを排除、分解する作用があり、生命にとって必要不可欠なものです。生体内で生成される活性酸素の例として、スーパーオキシドラジカル、過酸化水素及びヒドロキシラジカルがあります。これらはミトコンドリア内部で電子伝達系と TCA サイクルの過程で生成され、そのほとんどはミトコンドリア内部で水となりますが、少量の活性酸素がミトコンドリア外に放出されます。この

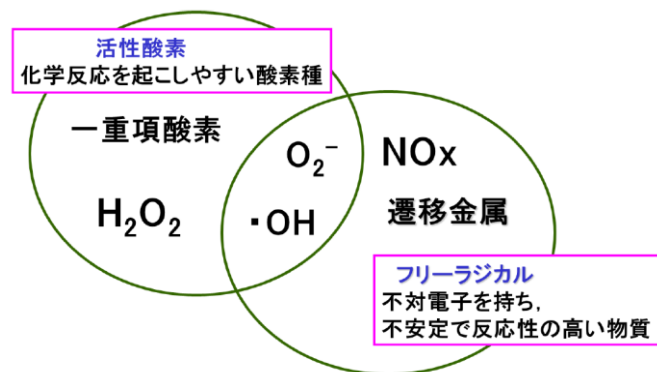


図-1 活性酸素とフリーラジカル

放出された活性酸素が体内の防御機構として使用され、さらに余った活性酸素は抗酸化能により無害化されます。その活性酸素を無害化する物質を抗酸化物質と呼びます。生体内での代表的な抗酸化物質にはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼなどの酵素があります。SOD はスーパーオキシドラジカルを酸素と過酸化水素に変え、カタラーゼはその過酸化水素を酸素と水に変えます。このように生体内の抗酸化能と活性酸素のバランスが取れている状態であれば活性酸素は生体内で適切に処理され、体は酸化されにくくなります。しかし、余剰の活性酸素が生体内の抗酸化能によって消去しきれない場合があり、この状態が前述の酸化ストレスとなります。

抗酸化力の評価法について

ある抗酸化物質があらゆる活性酸素を消去することができ訳ではなく、抗酸化物質毎に消去可能な活性酸素種が異なります。さらに抗酸化物質は種類が非常に多く、それぞれの活性酸素種に対する消去能の強さが異なるため、抗酸化物質の含量で抗酸化力を評価することはできません。このため、食品そのものがどの程度の抗酸化力を持つか評価する必要があります。今回は弊財団が受託しております抗酸化評価試験の中で理化学的手法を用いたスーパーオキシド消去活性、DPPH ラジカル消去活性および ORAC を紹介します。

① スーパーオキシド消去活性 (SOSA)

生体内にも存在するラジカルであるスーパーオキシドラジカルに対する消去能を電子スピン共鳴装置 (ESR) で測定する方法です。スーパーオキシドラジカルは活性酸素の中では反応性は低いですが発生する量は多く、その他の活性酸素の発生源でもあるので、SOSA を評価することは非常に重要です。ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼを混合すると酵素反応によりスーパーオキシドラジカルが発生しますが、スーパーオキシドラジカルは非常に不安定な物質ですので DMP0 のようなスピントラップ剤と反応させて安定化し、ESR で測定します。これをスピントラップ法といいます。この測定系に食品の抽出液を添加したときに、抗酸化物質が存在すればスーパーオキシドラジカルは消去され酵素反応により生じたラジカルのシグナルが小さくなります。このシグナルがどの程度小さくなるかで抗酸化力を評価します (図-2)。

よく SOSA=SOD 活性と考えられることがありますが、ビタミン C のような SOD ではない抗酸化物質もスーパーオキシドを消去しますので、SOD のみではなく、SOD 様の物質も含めた測定をしている点については注意が必要です。またこの方法は水系での試験となるため、脂溶性の抗酸化物質の評価には適していません。



図-2 ESR のシグナル

② DPPH ラジカル消去活性

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ラジカルという人工的に作られたラジカルに対する消去能を分光光度計で測定する方法です。DPPH ラジカル溶液は紫色に呈色しており、抗酸化物質によりラジカルが消去されるとその色が薄くなります。この色の濃淡を分光光度計で測定することにより抗酸化力を評価します。標準物質に Trolox を用い、Trolox 相当量 ($\mu\text{mol TE}$) として抗酸化力を評価します。この方法は試薬を混合して吸光度を測定する簡単な手法であるため、古くから利用されており抗酸化力を評価したデータが豊富にあります。また図-3 のように布のような固体の抗酸化力も測定できます。試料そのものに抗酸化力があれば DPPH 溶液に浸しておけば色は退色するので抗酸化力の有無を確認することができます。しかし、この評価法は生体内には存在しない DPPH ラジカルを使用しているため、生体内で実際に抗酸化力があるかはわからないという欠点があります。

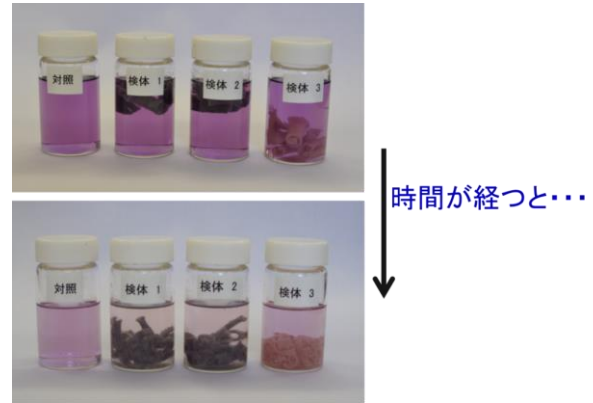


図-3 布の DPPH ラジカル消去活性

③ ORAC

ORAC は Oxygen Radical Absorbance Capacity の略で、1992 年米国農務省 (USDA) と国立老化研究所の研究グループが血漿の抗酸化能を測定するために開発した方法です。ラジカル発生剤として AAPH[2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride]を使用します。AAPH 溶液を 37°C にすることで発生したラジカルが酸素と反応してペルオキシドラジカルになるとされており、そのラジカルは蛍光物質であるフルオレセインを分解します。その結果、フルオレセインの蛍光強度は弱くなります。しかし、抗酸化物質が存在するとラジカルは消去されるのでフルオレセインの蛍光強度は持続します。この蛍光強度の衰退時間をマイクロプレートリーダーで経時的に測定して、得られた測定時間と蛍光強度のグラフの曲線下面積 (Area under Curve : AUC) から抗酸化力を測定します (図-4)。抗酸化力は DPPH ラジカル消去活性と同様に Trolox 相当量 ($\mu\text{mol TE}$) として評価されます。

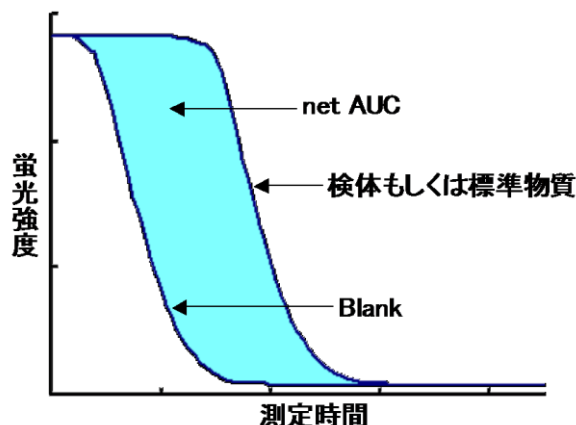


図-4 測定時間と蛍光強度

弊財団では、USDA 法と弊財団で開発した 50%エタノール抽出法を受託しています。USDA 法では水溶性の ORAC (H-ORAC) と脂溶性の ORAC (L-ORAC) を別々に測定し、両者の和を Total-ORAC とします。この方法は水溶性と脂溶性抗酸化物質のそれぞれの値が測定できる利点がある一方で、操作が煩雑なために時間がかかるという欠点もあります。そのため、簡易法として弊財団は 50%エタノールで抽出することで水溶性から脂溶性抗酸化物質まで幅広く抽出し測定する方法も使用しています²⁾。この方法は、50%エタノールでは十分に抽出されない脂溶性の抗酸化物質はあるものの、抽出操作が簡単かつ Total-ORAC の値に高い相関性があることが確認できました (図-5)。

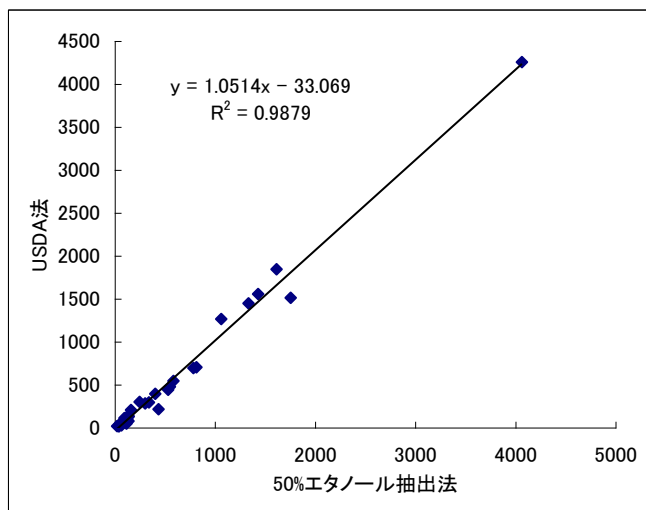


図-5 USDA 法と 50%エタノール抽出法の比較

(単位: $\mu\text{mol TE/g}$)

おわりに

現在の評価法ではどの手法を用いても全ての種類の活性酸素に対する抗酸化力を評価することはできません。例えば、野菜などのカロテノイドは一重項酸素と呼ばれる活性酸素を消去しますが、ORAC では評価することができず、別のラジカルを用いた方法で評価する必要があります。より正確に食品の抗酸化力を評価するためには、複数の方法を用いて食品の抗酸化力を総合的に評価することが必要です。さらに食品中の抗酸化物質は多様であるため、同じ方法でも選択した抽出方法により抗酸化力の値が変化することもあります。この問題点を解決するために国内では統一された方法の確立が AOU 研究会により進められています。

また、近年では試験管中ではなく生体内での抗酸化力を評価できるような評価法の開発も進められています。弊財団でもご紹介した方法以外に細胞を用いた評価方法での試験も受託しており、お客様の目的に応じたご提案を行い、お役に立てるよう努めてまいります。

参考文献

- 1) 中野 稔, 浅田 浩二, 大柳 喜彦 編: 活性酸素, 共立出版 (1988)
- 2) 吉田 泉ら, 健康・栄養食品研究, 12 (3), 11-17, 2009