総 説

抗酸化成分の機能評価法

宮澤 陽夫・仲川 清隆

東北大学大学院農学研究科 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

Evaluation of Antioxidant Activity of Natural Products

Teruo MIYAZAWA and Kiyotaka NAKAGAWA

Graduate School of Agriculture, Tohoku University

(1-1, Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai-shi 981-8555)

Abstract : The methods for evaluating antioxidant property of natural products in *in vitro* and *in vivo* lipid peroxidation systems are reviewed. Antioxidant activity of tocopherols, carotenoids, flavonoids and curcuminoids have been demonstrated against lipid peroxidation induced in microsomes, erythrocytes, plasma lipoproteins and in animal trials. Recently, *in vivo* antioxidant function of natural products was extensively investigated in humans together with explanation of their absorbability and metabolic fate.

Key words : antioxidant, lipid peroxidation, carotenoids, flavonoids, curcuminoids

1 はじめに

我国では平均寿命の伸長に伴って、動脈硬化や痴呆、ガンなどの老化性疾病に対する予防に大きな興味が持たれている。このような病気の予防には、日常の食生活の影響が大きく、緑黄色野菜や果物の摂取の有効性が、多くの疫学調査から明らかにされてきている^{1)~4)}。野菜や果物には、「抗酸化成分」が比較的多く含まれており、食品として摂取した抗酸化物質が、ヒトの体内で病気の原因になる活性酸素やラジカルの消去に役立っていると考えられるようになってきた (Fig. 1)。

抗酸化物質として良く知られているものには、脂溶性のビタミン E (α -トコフェロール) と水溶性のビタミン C (アスコルビン酸) がある。さらに一重項酸素の消

去剤であるビタミン A (レチノール) や β -カロチンの抗酸化性も広く認められている。これらの成分は、いずれも健康を維持するために必要な「抗酸化ビタミン」であり、実際に動脈硬化やガンの予防に有効であることが報告されている。一方、これらの抗酸化ビタミンに対して、ビタミンとしての機能はとくにないが、高い抗酸化力を示す天然成分が見出され、その生理効果が注目されている。すなわち、野菜、果物、豆類中のフラボノイドやイソフラボノイドをはじめとするポリフェノール類、香辛料中のクルクミノイドとカルノソールやロスマノール、胡麻の中のセサミン類やピノレジノール類、米糠中のフェルラ酸などであり (Table 1)、これらは総じて「天然抗酸化物質」と呼ばれている。その大きな特徴は、少なくとも試験管内 (*in vitro*) の実験では、ビタ

Fig. 1 Prevention of *in vivo* peroxidation by antioxidants.

ミン E と同等もしくはそれ以上の優れた抗酸化力を示すことである。食品から摂取した天然抗酸化物は、体内に備わる抗酸化防御系の能力をさらに高めるのに役立っていると考えられることができる。

1・1 抗酸化物質の *in vitro* の評価

抗酸化物質の作用は、(1) 活性酸素やラジカルの消去、(2) 過酸化物の還元と分解、(3) 過酸化酵素の阻害や抗酸化酵素の活性化などである (Table 2)。活性酸素やラジカルの消去とは、連鎖反応で生成したスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルなどを消去して自動酸化を阻止する作用である。フラボノイドなどのフェノール性抗酸化物の作用がこれに相当し、抗酸化成分自体が水素や電子の供与体になる (Fig. 2)。また、 β -カロチンやビタミン E で認められるように、一重項酸素のエネルギー準位を下げることで抗酸化性を示す物質もある。さらに、過酸化物の還元や分解作用のように、抗酸

化成分自体が連鎖反応で生じたヒドロペルオキシドなどの過酸化物をアルコールに還元・分解あるいは付加物 (アダクト) を形成して安定な非ラジカル化合物にするものもある。また、過酸化酵素の阻害としては、脂質過酸化を誘発するリポキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼなどの酸素添加酵素の不活性化があり、ポリフェノールやクルクミノイドにはこの作用が認められている。通常は、試験管内に抗酸化物質を加え、どのようなメカニズムでどれぐらい脂質過酸化が抑制されるのかを基準にして、抗酸化の評価が行われている。

1・2 抗酸化物質の *in vivo* の評価

抗酸化物質が試験管内 (*in vitro*) 実験で抗酸化力を示しても、生体内 (*in vivo*) で効果を発揮しなければ意味が薄れてしまう。抗酸化物の *in vivo* での作用を考えるとときには、いくつかの条件を満たさなければならない (Table 2)。摂取された抗酸化物質が消化・吸収を経て

Table 1 Antioxidative compounds found in foods.

Foods	Antioxidants
Vegetables, fruits, beans	Flavonoid (catechin, anthocyanin, etc.)
Beans	Isoflavonoid (daidzein, genistein, etc.)
Spices Turmeric	Curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, etc.)
Rosemary	Rosemary extracts (carnosol, rosmanol, etc.)
Sesame	Lignans (sesaminol, sesamol, pinoresinol, etc.)
Rice bran	Ferulic acid

Table 2 Functions and stipulations of antioxidants.

Functions
○Quenching of reactive oxygen species Quenching ability of superoxide, hydroxyl radical, and singlet oxygen.
○Quenching of free radicals Proton donation or chemical reactivity toward to alkoxyl peroxy, and alkyl radical.
○Reduction and decomposition of peroxides Reduction or decomposition of hydroperoxides, i. e., lipid hydroperoxide, to alcohols.
○Inhibition of peroxidative enzyme activity Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase
○Activation of antioxidative enzyme Activation of glutathione peroxidase and catalase
○Metal chelation
Stipulations
○Distribution to purposive region, e. g., organ, cell, and membrane, through the digestion and absorption
○Stability or modification of the chemical structure during digestion, absorption, and metabolism
○Effect of drug metabolism system, such as cytochrome P 450
○Lack of mutagenesis and carcinogenesis
○Delocalization of the oxidized antioxidant in particular organ, and its catabolism under the metabolic system

Fig. 2 Radical trapping with phenolic antioxidant.

目的とする器官・細胞・膜レベルにまで到達できなければならぬし、また吸収・代謝過程での化学構造の変化にも注意がいる。代謝過程での構造の変化により抗酸化力が変わり、低下する場合も考えられるし、逆に構造変化することで抗酸化力が上がる場合も考えられる。抗酸化物質の中には肝臓における P 450 などの薬物代謝系を大きく亢進させるものもあるため、この点の検討も場合によっては必要になる。もちろん変異原性・ガン原性があるてはならない。そして抗酸化物質が体内で抗酸化作用を示したときに生じるであろう酸化型の代謝物がそのまま細胞内に蓄積されてしまうのか、あるいは既存の代謝系によって異化され体外に排出されるのかの知見も必要になる。酸化型になった代謝物が特定の器官にのみ蓄積すれば、逆の効果として酸化促進作用を示すことも考えられる。理想的には、*in vitro* 系で優れた抗酸化効果を示した抗酸化物質が、*in vivo* においても十分な抗酸化力を発揮して、その酸化生成物が体内に蓄積せずに体外に異化され排出される天然成分が望ましい。しかし、多くの抗酸化物質、とくに新しく見出された天然抗酸化成分のほとんどが、これらの観点から評価された例はあまりない。抗酸化物質の体内での挙動を把握して、“どのような器官に、どのくらいの抗酸化効果が期待できる量の抗酸化物質が移行できるのか”という視点からのアプローチが今後はますます必要となる。

したがって本稿では、抗酸化物質を評価するために現在使われている *in vitro* 系の主な実験方法をはじめに紹介して、さらに *in vivo* における評価例を概説した。主に脂質に対する抗酸化に注目して、できる限り実際の研究例や筆者らの経験をまじえて以下に示した。

2 *In vitro* の抗酸化試験

2.1 脂質過酸化反応の阻害実験

脂質ヒドロペルオキシドの分解で生じたアルデヒドの

増減を測定することで抗酸化力を評価する。実際の試験法としては、ラットの肝臓ミクロソームを用いた方法や、赤血球膜ゴーストを用いた方法がよく使われている。また、脂質源として生体由来のものばかりでなく、リノール酸などの脂肪酸を使う場合も多い。

【実験例 1】ラット肝ミクロソームによる抗酸化試験

ラット肝ミクロソームに含まれている酵素（チトクロム P 450 レダクターゼ）が NADPH を電子供与体として鉄を還元し、生じた 2 価鉄により活性酸素が生成して、これが脂質過酸化を引き起こす (Fig. A)⁵⁾。そこで、この系に抗酸化物を添加して、影響を調べる。

実験方法：ラット肝ミクロソームの調製

ラットから摘出した肝臓を、5 倍量の 0.25 M シュクロース-20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4 ; 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ を含む) でホモジナイズした後、4℃, 12000 g で 15 分間遠心分離する。得られた上層を、再び 4℃, 105000 g で 60 分間遠心分離し、得られ

Fig. A

た沈殿物をミクロソーム画分として使用する⁶⁾。

実験方法：ミクロソーム脂質の過酸化

上記のミクロソーム画分を 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し、1 mL に 4.6 mg タンパク相当のミクロソームを含む濃度に調整する。エタノール 10 μ L に溶かした抗酸化物質を加え、よく混合する。100 μ L の ADP-FeCl₃ 溶液 (22 mM ADP, 1.3 mM FeCl₃, 50 mM トリス-塩酸緩衝液: pH 7.4) と 110 μ L の NADPH 溶液 (1 mM NADPH, 50 mM トリス-塩酸緩衝液; pH 7.4) および 1 mL の 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) を、上記で調製した 1 mL のミクロソーム懸濁液に添加して脂質過酸化反応を起こす。反応混液を一定時間 37℃ の水浴中でインキュベートした後、脂質ヒドロペルオキシドの生成量とその分解物であるアルデヒド量を測定する。筆者らは、ヒドロペルオキシドを化学発光検出-高速液体クロマトグラフ (CL-HPLC) 法^{7),8)}で、またアルデヒド量はチオバルビツール酸 (TBA) 法⁹⁾で測定している。

実験方法：ミクロソームへのカロテノイドの添加

エタノール 10 μ L に溶かしたカロテノイド (115 μ M β -カロテンまたは 115 μ M アスタキサンチン) を、1 mL のミクロソーム懸濁液に加え、1 分間穏やかに混合し、カロテノイドをミクロソーム膜脂質内に取り込ませる。このミクロソーム画分中 (ミクロソーム懸濁液を

105000 g, 60 分遠心分離した沈殿物) のカロテノイド量を測定すると、この条件下では懸濁液に加えたカロテノイドの約 75% がミクロソームに取り込まれたことがわかる⁶⁾。

Fig. 3 に示したように、ラット肝ミクロソーム膜脂質の酵素的な過酸化により、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) とホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PEOOH) の著しい生成が認められる⁶⁾。ミクロソームに抗酸化物質として β -カロテンやアスタキサンチンを取り込ませると、リン脂質ヒドロペルオキシドの増加が抑制される。例えば、過酸化開始 10 分間の PCOOH や PEOOH の蓄積量は、カロテノイドが無いと 2~4 倍に増加し、カロテノイドはとくに酸化初期に生ずる活性酸素を消去することでヒドロペルオキシドの蓄積を抑制していると考えられることができる。

【実験例 2】赤血球膜ゴーストによる抗酸化試験

ウサギ保存血液から調製した赤血球膜ゴーストに *t*-ブチルヒドロペルオキシド (*t*-BuOOH) を加えると、脂質の過酸化が誘導される。そこで、この系に抗酸化物質を加えて影響を調べる。

実験方法：赤血球膜ゴーストの調製

100 mL のウサギ保存血液 (市販品) に 100 mL の等張液 (10 mM リン酸緩衝液, 152 mM NaCl; pH 7.4)

Fig. 3 Production of phospholipid hydroperoxides in enzymic microsomal lipid peroxidation system, and its inhibition by β -carotene and astaxanthin⁶⁾.

を加え、混合の後、1500 g で 20 分間遠心分離して上層を除く。この操作を 3 回繰り返し、得られた沈殿物の赤血球画分に低張液 (10 mM リン酸緩衝液: pH 7.4) を 100 mL 加え、混合の後、20000 g で 40 分間遠心分離して上層を除き、得られた沈殿物を赤血球膜ゴーストとして使用する¹⁰⁾。

実験方法: 赤血球膜ゴーストの脂質過酸化

0.85 mL の赤血球膜ゴーストに、0.05 mL の 24 mM *t*-BuOOH 水溶液を加える。これにエタノール 0.1 mL に溶かした抗酸化物質を加え反応混液にする。この反応混液を一定時間 37°C の水浴中でインキュベートした後、TBA 法やウレア法¹⁰⁾などで脂質過酸化を調べる。

Tsuda ら¹¹⁾は、この赤血球膜ゴーストを用いた抗酸化試験により、フラボノイドであるアントシアニン (シアニジンとシアニジングルコシド) が、トコフェロールに匹敵する抗酸化力を持つことを認めている (Fig. 4)。この試験系では、配糖体であるシアニジングルコシドよりも、糖のはずれたアグリコンであるシアニジンの方が抗酸化力強いという結果が得られている。また、Sugiyama ら¹²⁾は、クルクミノイド (クルクミンとテトラヒドロクルクミン) について試験を行い、クルクミンよりもテトラヒドロクルクミンが強い抗酸化力を示すとしている。この分析では、抗酸化物が反応系の中でどのような状態で存在するのかについて考慮する必要がある。

【実験例 3】 リノール酸を用いた抗酸化試験

リノール酸の自動酸化に対する抗酸化成分の影響を調

Fig. 4 Production of malondialdehyde (MDA) in erythrocyte ghost membrane peroxidation system, and its inhibition by anthocyanin¹¹⁾.

べる。抗酸化物の対照としては、トコフェロール類や合成抗酸化剤である *t*-ブチルヒドロキシアニソール (BHA) がよく使用されている。

実験方法

10 mL のエタノールに 1.3% (w/v) 濃度になるようにリノール酸を加え、これに 10 mL の 50 mM リン酸緩衝液と 5 mL の蒸留水をさらに加えたものを反応混液とする。抗酸化物質は、エタノールに溶かして添加する。この反応混液を一定時間 40°C でインキュベート後、ロダン鉄法¹⁰⁾で脂質ヒドロペルオキシド量の増減を測定する。

Osawa ら¹⁰⁾は、この方法を用いて、胡麻に含まれているピノレジノール配糖体の高い抗酸化性を認めている (Fig. 5)。これによると、ピノレジノールには、対照として使用した α -トコフェロールと同等の抗酸化力があるとされる。また、ピレジノールのフェノール性水酸基に糖が結合したものは抗酸化性がなく、抗酸化におけるフェノール性水酸基の重要性がうかがわれる。この場合、フェノール性水酸基はプロトン供与体として作用すると考えられる。

【実験例 4】 リノール酸/ β -カロテン/リポキシゲナーゼ系による抗酸化試験

リポキシゲナーゼはリノール酸に酸素を付加してリノール酸ヒドロペルオキシドを生成する。生じたヒドロペルオキシドは、金属イオンなどにより分解され脂質アルコキシルラジカルやペルオキシルラジカルになり、脂質ラジカルの連鎖反応が起きる。この系に β -カロテンが存在すると、カロテンは脂質ラジカルにより酸化され、退色する。したがって、このリノール酸/ β -カロテン/リポキシゲナーゼの系に抗酸化物を加え、 β -カロテンの退色への影響を観ることで抗酸化力を評価する。

実験方法

はじめに以下の 3 種の反応溶液を調製する。1 mL の Mcllvaine 緩衝液 (0.8 mg/mL の Tween 80 を含む; pH 7.0) に 1.2 mg のリノール酸を分散させる。0.2 mg のリポキシゲナーゼ (126500 ユニット/mg) を 1 mL の水に溶解する。2.5 mg の β -カロテンを 10 mL のアセトンに溶かす。ついで、0.1 mL のリポキシゲナーゼ溶液 (2530 ユニット/0.1 mL) に、2.4 mL の Mcllvaine 緩衝液 (pH 7.0)、0.5 mL のリノール酸溶液、0.6 mL の β -カロテン溶液、そして 0.2 mL のエタノールに抗酸化物質を溶かしたものを、それぞれ加え混合する。この反応混液を一定時間 20°C でインキュベートした後、 β -カロテン由来の 460 nm の吸光度を測定する¹³⁾。

Igarashi ら¹³⁾は、この方法を用いて、アントシアニン (ナスニン、マルビン、ルプロブラッシン、およびこれらのアグリコンであるデルフィニジン、マルビジン、

Fig. 5 In vitro antioxidant test of pinoresinol glucoside using linoleic acid autoxidation system¹⁰⁾.
Final concentration of antioxidant ; 20 μ M.

シアニジン)の抗酸化力を測定している (Table 3)。これによると、抗酸化効果はナスニン>マルビン>ルプロブラッシンの順に強いとされる。また、これら3種の配糖体の中で、ナスニンだけがアグリコン (デルフィニン) よりも強い活性を示している。これは、ナスニンの中の *p*-クマール酸部分の抗酸化力によると考えられる。

【実験例 5】化学発光による抗酸化試験

脂質過酸化で生ずるペルオキシラジカル ($\text{ROO}\cdot$) は、ラッセル反応で2分子分解して、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) と励起カルボニル (RO^*) を生じる¹⁴⁾。励起カルボニル

はさらに周囲の分子状酸素 ($^3\text{O}_2$) を励起して、 $^1\text{O}_2$ を生じる。 $^1\text{O}_2$ の一部は不飽和脂質の二重結合に付加し、不安定な四員環過酸化物であるジオキセタン中間体を経て開裂し、再び励起カルボニル (RO^*) を生じる。 $^1\text{O}_2$ と励起カルボニルは基底状態に遷移する時に、そのエネルギーの一部を光として放出し、これが化学発光 (ケミルミネッセンス) として観測される (Fig. B)。そこで、この系に抗酸化物質を添加して、発光強度の変化からその効果を評価する¹⁵⁾。

Fraga¹⁶⁾ らは、Fig. 6 に示したように、マウス肝臓のホモジネートに *t*-BuOOH を添加して脂質過酸化を

Table 3 Antioxidative activity of anthocyanin on β -carotene bleaching by linoleic acid-lipoxygenase¹³⁾.

At pH 7, Incubation time	O.D. at 460 nm (% of initial)						Inhibitory ratio* after 5 min (%)
	0	1	2	3	4	5 min	
Control	100	84	68	52	39	28	0
+Nasunin	100	94	89	82	77	72	61
+Malvin	100	92	86	78	72	65	51
+Rubrobrassicin	100	85	73	61	50	42	28
+Delphinidin	100	92	84	76	67	59	43
+Malvidin	100	96	82	88	83	79	71
+Cyanidin	100	98	96	92	88	83	76
+V. E	100	99	98	97	97	97	96

Reaction mixture containing linoleic acid, β -carotene, lipoxygenase, and buffer solution was incubated at 20°C. The amount of β -carotene remained after fixed times was expressed as percent of the O.D. of reaction mixture at fixed times to that at 0 min (% of initial). *Inhibitory ratio (I.R., %) = $100 \times [(100 - P_c) - (100 - P_a)] / (100 - P_c)$, where P_c is the percent of initial for control, P_a is that for reaction mixture containing anthocyanin or vitamin E (V.E.).

Delphinidin-3-(p-coumaroylrutinoside)-5-glucoside (nasunin)

誘発させ、生じた化学発光に対するフラボノイド(カテキン)の効果を調べている。カテキンの抗酸化作用により効果的に化学発光が抑制されている。

2・2 ラジカルに対する反応性からの抗酸化性の評価

Fig. B

ラジカルの消去力の評価に使われているジフェニルピクリルヒドラジル法を述べる。

【実験例 6】ジフェニルピクリルヒドラジル(DPPH)

ラジカルを用いた抗酸化試験

紫色の安定ラジカルである DPPH ラジカルは、517 nm に紫外吸収を持つ。DPPH ラジカルは抗酸化物質の作用でラジカルでなくなると紫色が消失する(517 nm の吸光度の減少)ので、これの測定によりラジカル消去活性を評価する。

実験方法

3 mL のエタノールに DPPH を溶かして 100 μ M とし、これに 0.5 mL のエタノールに溶かした抗酸化物質を加えて混ぜる。一定時間後の 517 nm の吸光度を測定する¹⁷⁾。

Yoshida ら¹⁸⁾は、カテキン類(エピガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキン、エピカテキン)による DPPH ラジカルの消去活性を調べ、エタノール中でのラジカル消去力はエピガロカテキンガレート>エピカテキンガレート>エピガロカテキン>エピカテキンの順に強いと報告している。また、

Fig. 6 Chemiluminescence observed when *t*-butyl hydroperoxide was added to mouse liver homogenate, and its inhibition by catechin¹⁶⁾.

Sreejayan ら¹⁹⁾はクルクミノイド(クルクミン, デメトキクルクミン, ビスデメトキクルクミン)について試験して, ラジカル消去活性はクルクミン>デメトキクルクミン>ビスデメトキクルクミンの順であったとしている。

3 *In vivo* の抗酸化の評価

In vivo での抗酸化力の評価は, 抗酸化物の生体内での吸収と動態をあわせて考慮する必要がある。これまでに *in vitro* 系の実験で明らかにされてきた天然の抗酸化成分の動物体内での吸収と代謝についての検討例はあまり多くない。このため, 試験管実験で認められた抗酸化力が, 実際に生体内でどの程度期待できるかの判断が難しい場合がある。

ヒトの血漿には, ビタミン C が 30~150 μ M (5~26 mg/L), ビタミン E が 15~40 μ M (6~17 mg/L), β -カロテンが 0.3~0.6 μ M (0.2~0.3 mg/L) の濃度で存在している (Table 4)。したがって, 天然抗酸化物質が μ M 程度の濃度で, 抗酸化力を維持したままの形態で血漿に移行できているのであれば, ヒトの体内でも抗酸化作用を示す可能性が考えられる。十分に体内に吸収され, かつ活性酸素や過酸化物の生成・蓄積の抑制が認められた場合に, 目的とする天然抗酸化物質にヒト体内で抗酸化効果があるといえることになる。

ところで, *in vitro* 実験では, 抗酸化物質の抗動脈硬化作用を期待して, 血漿や低比重リポタンパク質 (LDL) に抗酸化物質を直接加えた実験が行われることが多い²⁰⁾。添加される抗酸化物の濃度は様々であるが, 血漿中のビタミン E などの抗酸化成分の濃度を考えれば, 1 m M 以下の添加量が望まれる。また, この

Table 4 Antioxidants in human plasma²⁰⁾.

Antioxidants	Plasma concentration (μ M)
Water-soluble	
Vitamin C	30~150 (5~26 mg/L)
Bilirubin	5~20
Glutathione	<2
Lipid-soluble	
Vitamin E	15~40 (6~17 mg/L)
Ubiquinol	0.4~1.0
Lycopene	0.5~1.0
β -Carotene	0.3~0.6
Lutein	0.1~0.3
Zeaxanthin	0.1~0.2
α -Carotene	0.05~0.1

ような *in vitro* 実験では, 血漿や LDL に脂質過酸化を誘発するために Cu^{2+} やアゾ化合物 (分解してラジカルとなる) を加え, これに対する抗酸化物の影響が評価される場合が多い。しかし, この試験管内の過酸化反応は, 血漿中のビタミン C や E が短時間のうちに完全に消失してしまうほどの過激な反応条件であることに留意されなければならない。健康なヒト体内で, 血漿中の抗酸化成分が枯渇するような過酸化反応はありえない。したがって, *in vitro* 系での抗酸化物質の効果の判定は, “極めて高濃度に加えられた抗酸化物質が過激な脂質過酸化反応の条件下で示す抗酸化作用” に依っていることになる。ヒト体内での脂質過酸化反応はそれほど過激な過酸化反応ではないであろうし, またこれを抑制するための抗酸化成分の濃度も比較的希薄である点を考慮すべきである。

【実験例 1】 β -カロテンの赤血球膜の抗酸化作用 実験方法

9 週齢 ddY 系雄マウスを 1 週間予備飼育して, 3 群に分ける。実験群は AIN-76 A 配合大豆油食に β -カロテンを 0.6% および 3.0% を添加したもの, あるいは β -カロテン無添加のコントロール食を 1 週間自由摂取させたものである。心臓からヘパリン採血し, 赤血球を調製する。赤血球膜のリン脂質ヒドロペルオキシド量は CL-HPLC 法で, また β -カロテン量は UV-HPLC 法で測定する²¹⁾。

Fig. 7 に示したように, β -カロテンの摂取量に応じた, 赤血球膜の β -カロテン含量が増加する。この時, 赤血球膜における PCOOH と PEOOH 生成蓄積量は, β -カロテンの摂取量に応じた減少が認められる (Fig. 7)。これらの結果は, β -カロテンが赤血球膜の重要な抗酸化因子であることを示している。老化赤血球は過酸化脂質を多く含むので, カロテンは赤血球を若く保つ作

Fig. 7 β -Carotene supplementation prevents the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice²¹⁾.

用があるともいえる。ヒトでは、痴呆症者の赤血球膜に過酸化リン脂質の異常蓄積が認められたが²²⁾、これを予防するための β -カロテンの有効性が示唆される。

【実験例 2】緑茶カテキンのヒトでの吸収と抗酸化効果

実験方法

健康男性 18 名に、緑茶 2 杯分に相当する 254 mg のカテキン (エピガロカテキングレート 82 mg を含む) を与える。飲用前と 60 分後の血漿エピガロカテキングレート (EGCg) 量を、フラボノイド分析用に開発された CL-HPLC 法²³⁾で測定する。また、血漿リポタンパクの過酸化の指標として過酸化リン脂質 (PCOOH) を測定する。更に、EGCg 量が高かった血漿について、*in vitro* の脂質過酸化実験を行い、カテキンが存在する血漿の脂質過酸化抵抗性を調べる。

Fig. 8 に示したように、カテキン摂取 60 分後の血漿では、摂取前に比べ EGCg の増加が認められる (摂取前 $<0.002 \mu\text{M}$; 投与後 $0.27 \mu\text{M}$)。一方、血漿 PCOOH 量は、カテキンを投与した 18 名中 16 名で減少しており

Fig. 8 Epigallocatechin gallate supplementation prevents the formation of lipid peroxide in human plasma²⁴⁾.

(摂取前 73.7 nM; 投与後 44.6 nM), 血漿の PCOOH と EGCg は逆相関 ($R=0.52$) を示す (Fig. 8)²⁴⁾。これらの血漿を過酸化実験に供すると、カテキン摂取前の血漿では著しい PCOOH の生成が認められるが、摂取後の血漿では脂質過酸化に対する抵抗性の増加が認められる。この時、血漿の抗酸化成分として EGCg がはじめに消失した後、トコフェロールとカロテノイドの減少が認められる。カテキンは抗酸化の緩衝剤であり、自ら先に酸化されることでトコフェロールの減少を防いでいるといえる。これらの結果は、ヒトにおいて、茶カテキンは血漿の抗酸化物質として十分に機能できることを示唆する。おそらく、日常的にお茶を飲む習慣があれば、血漿のカテキン量は、抗酸化力を発揮できる量に維持され、その結果として、動脈硬化の原因である血漿リポタンパクの酸化変性の抑制に役立っているとも考えられる。一方、果実などの赤色成分であるアントシアニン (シアニジングルコシド) について検討したところ、シアニジングルコシドのヒト血漿への吸収量は EGCg の 10~20 分の 1 程度であることがわかった²⁵⁾。すなわち、*in vitro* 実験での EGCg とシアニジングルコシドの抗酸化力はほぼ等しいが、ヒト体内への移行のし易さを加味すれば生体内では EGCg のほうがはるかに抗酸化成分として有効であると考えられた。

なお、ここで挙げた実験例以外にも、培養細胞における α -トコフェロールの抗酸化効果²⁶⁾、四塩化炭素投与ラットの肝臓での脂質過酸化に対する α -トコフェロール²⁷⁾やクルクミン²⁸⁾およびアントシアニン^{29),30)}の抗

酸化効果, ODS ラット (アスコルビン酸合成不能ラット) やモルモット (体内でアスコルビン酸を合成できない) でのアスコルビン酸による抗酸化の評価³¹⁾, セサミンやセサミノールによるラットの血漿や肝臓の α -トコフェロール濃度の増加³²⁾, ローズマリー抽出物を摂取したラットの肝臓のグルタチオン-S-トランスフェラーゼと NADPH-キノレダクターゼ活性の増加³³⁾, ヒトやモルモット表皮脂質のカロテノイドによる抗酸化の評価^{34), 35)}などが行われている。

(受付: 1998 年 6 月 15 日, 受理: 1998 年 7 月 13 日)

文 献

- 1) W.C. Willett, *Science*, **264**, 532 (1994).
- 2) M.G. Hertog, P.C.H. Hollman, M. Katan, *J. Agric. Food. Chem.*, **40**, 2379 (1992).
- 3) E.B. Rimm, M.J. Stampfer, A. Ascherio, E. Giovannucci, G.A. Colditz, W.C. Willett, *New Engl. J. Med.*, **328**, 1450 (1993).
- 4) S. Renaud, M. De Lorgeril, *Lancet*, **339**, 1523 (1992).
- 5) B.A. Svingen, J.A. Buege, F.O. O'Neal, S.D. Aust, *J. Biol. Chem.*, **254**, 5892 (1979).
- 6) K. Nakagawa, S.-D. Kang, D.-K. Park, G.J. Handelman, T. Miyazawa, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **43**, 345 (1997).
- 7) T. Miyazawa, T. Suzuki, K. Fujimoto, K. Yasuda, *J. Lipid Res.*, **33**, 1051 (1992).
- 8) T. Miyazawa, K. Fujimoto, T. Suzuki, K. Yasuda, *Methods Enzymol.*, **233**, 324 (1994).
- 9) J.A. Buege, S.D. Aust, *Methods Enzymol.*, **52**, 302 (1978).
- 10) 大澤俊彦, “食品中の生体機能調節物質研究法”, 学会出版センター (1996) p. 7.
- 11) T. Tsuda, M. Watanabe, K. Ohshima, S. Norinobu, S.-W. Choi, S. Kawakishi, T. Osawa, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2407 (1994).
- 12) Y. Sugiyama, S. Kawakishi, T. Osawa, *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 519 (1996).
- 13) K. Igarashi, T. Yoshida, E. Suzuki, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **40**, 138 (1993).
- 14) G.A. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3871 (1957).
- 15) 宮澤陽夫, “過酸化脂質実験法”, 医歯薬出版 (1983) p. 109.
- 16) C.G. Fraga, U.S. Martino, G.E. Ferraro, J.D. Coussio, A. Boveris, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 717 (1987).
- 17) N. Cotellet, J.L. Bernier, J.P. Catteau, J. Pommeroy, J.C. Wallet, E.M. Gaydou, *Free Rad. Biol. Med.*, **20**, 35 (1996).
- 18) T. Yoshida, K. Mori, T. Hatano, T. Okumura, K. Uehara, I. Komagoe, Y. Fujita, T. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1919 (1989).
- 19) N. Sreejayan, M.N. Rao, *Arzneimittel-Forsch.*, **46**, 169 (1996).
- 20) B. Frei, R. Stocker, B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **85**, 9748 (1988).
- 21) K. Nakagawa, K. Fujimoto, T. Miyazawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **1299**, 110 (1996).
- 22) T. Miyazawa, “in *Essential Fatty Acids and Eicosanoids*”, eds. by A. Sinclair, R. Gibo, Am. Oil Chem. Soc. (1993) p. 383.
- 23) K. Nakagawa, T. Miyazawa, *Anal. Biochem.*, **248**, 41 (1997).
- 24) 仲川清隆, 宮澤陽夫, 第 2 回 Japanese Society for Food Factors 学術集会講演要旨集 (京都市) p. 18 (1997).
- 25) 仲川清隆, 工藤 幸, 宮澤陽夫, 日本農芸化学会東北支部第 128 回例会講演要旨集 (仙台市) p. 2 (1998).
- 26) T. Suzuki, T. Miyazawa, K. Fujimoto, M. Otsuka, M. Tsutsumi, *Lipids*, **28**, 775 (1993).
- 27) T. Miyazawa, T. Suzuki, K. Fujimoto, T. Kaneda, *J. Biochem.*, **107**, 689 (1990).
- 28) Y. Kiso, Y. Suzuki, N. Watanabe, Y. Oshima, H. Hikino, *Planta Med.*, **49**, 185 (1983).
- 29) M. Mitcheva, H. Astroug, D. Drenska, A. Popov, M. Kassanova, *Cell. Mol. Biol.*, **39**, 443 (1993).
- 30) 須田郁夫, 古田 収, 西場洋一, 山川 理, 松ヶ野一郷, 杉田浩一, 日食工誌, **44**, 315 (1997).
- 31) M. Kinoshita, K. Fujimoto, T. Miyazawa, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **42**, 35 (1996).
- 32) K. Yamashita, Y. Iizuka, T. Imai, M. Namiki, *Lipids*, **30**, 1019 (1995).
- 33) K.W. Singletary, *Cancer Lett.*, **100**, 139 (1996).
- 34) 河野善行, 阪本興彦, 中村哲治, 宮澤陽夫, 油化学, **42**, 204 (1993).
- 35) K. Someya, Y. Totsuka, M. Murakoshi, H. Kitano, T. Miyazawa, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 315 (1994).

[総説]

食用油の劣化の測定法と今後の展開

梶 本 五 郎

神戸学院大学栄養学部 (〒651-2113 神戸市西区伊川谷町有瀬)

食用油は広く食品工場や家庭で使用されており、そして、代謝エネルギー源、脂溶性ビタミン類、必須脂肪酸の供給源である。食用油は空気、光、熱に連続的にさらされ化学変化をうける。ヒドロペルオキシドの二次反応生成物であるアルデヒド、ケトン、アルコール、酸、炭化水素が生じ、酸化の結果、異臭、貯蔵性および栄養価の損失が起こる。

自動酸化と熱酸化の複雑さは Fig. 1, Fig. 2 から明らかである。食用油の劣化の評価の方法を Table 1 に示す。それぞれに正確さと最適の測定が要求される。過酸化物質、アニシジン、カルボニル、酸、チオバルビツール酸、共役ジエンと泡高の測定法と今後の展開について解説し討議した。

(連絡者: 梶本五郎) Vol. 47, No. 10, 000 (1998)

[総説]

抗酸化成分の機能評価法

宮澤 陽夫・仲川 清隆

東北大学大学院農学研究科 (〒981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

天然抗酸化成分の *in vitro* と *in vivo* の脂質過酸化に対する効果の評価法を概説した。これまでに、トコフェロール類、カロテノイド、フラボノイド、クルクミノイドの抗酸化力が、ミクロソーム、赤血球膜、血漿リポ蛋白、そして動物実験によって明らかにされている。最近では、ヒト体内でのこれら天然成分の抗酸化力が、その吸収と代謝についての検討とともに、精力的に研究されている。

(連絡者: 宮澤陽夫) Vol. 47, No. 10, (1998)

[総説]

生体膜モデルの動的解析

中谷 陽一・ギィ・ウリソン

ルイ・パストゥール大学化学部天然物有機化学研究室

(フランス国ストラスブール市ブレーズ・パスカル通り 5 番地)

以前より筆者らは生体膜脂質成分の進化について研究を進めてきた。その中で、原核生物でのホパノイド、カロチノイドが真核生物でのコレステロールと同様に、生体膜を補強する役割を果しているという仮説を立てた。

この仮説を人工膜モデルで証明するため、まず両極性カロチノイドが脂質二分子膜中で膜貫通型配向をとっていることを、UV-VIS スペクトル解析などから明らかにした。続いて、リン脂質/コレステロール/光化学プローブのシステムで秩序ある二分子膜を構築し、この系で、直接的な光架橋法を用いてコレステロール分子の配向を調べた。その結果、コレステロール分子が膜面に垂直に挿入され、その側鎖は二分子膜の中央に位置し、その水酸基が水分との界面に面していることを解明した。

これらのテルペノイドの膜補強剤としての効果については、ベシクルでの浸透圧実験 (ストップド・フロー/光散乱測定)、および配向二分子膜での固体 ^2H -NMR 解析によって明らかにした。

(連絡者: 中谷陽一) Vol. 47, No. 10, 000 (1998)