

ラジカル消去活性の測定法とヤマブドウ抗酸化性に関する研究

小浜 恵子^{*}、岸 敦^{*}、米倉 裕一^{**}、大澤 純也^{*}、
澤井 秀幸^{***}、長澤 孝志^{***}

簡便、高感度かつ多試料を測定可能なラジカル消去活性測定法を確立するため、DPPH ラジカル消去活性、リノール酸メチルペルオキシド生成抑制、oxygen radical absorbance capacity (ORAC) を利用して検討し、ヤマブドウを試料として実際に測定を行った。ラジカル消去活性は試料のポリフェノール含量とほぼ比例し、いずれの方法でも試料間の差を検出することが可能であった。ORAC は検出感度が非常に高く、1000 倍に希釈した試料での検出が可能であった。また、試験管内でのタンパク質の非酵素的糖化抑制を測定したところ、ヤマブドウジュース搾汁残渣の効果が非常に大きかった。

キーワード：ラジカル消去活性、ヤマブドウ、糖化変性

Estimation of Radical Scavenging Activities Using Various Methods and Antioxidant Activity of Wild Grapes (*Vitis coignetiae*)

KOHAMA Keiko, KISHI Atsushi, OHSAWA Junya,
SAWAI Hideyuki and NAGASAWA Takashi

To develop simple and sensitive methods for measuring radical scavenging activities, evaluation was done using three different analyses: DPPH radical scavenging activities, AAPH-induced lipid oxidation and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). Each of the methods were useful for screening, in particular, ORAC was suitable to test for small amounts because of the high sensitivity. Using these methods, juice and wine made from wild grapes (*vitis coignetiae*) were measured, and the activities were correlated to polyphenol contents. Skin-seed mixture, after squeeze, showed the highest activity in these methods. In addition, skin-seed mixture strongly prevented production glycated protein as well as G-rutin *in vitro*.

key words : radical scavenging activity, wild grape, glycation

1 緒 言

生体内で発生する様々な酸化ストレスは生活習慣病発症に大きく関わっており、酸化ストレスに関連する活性酸素種等を生体内で防御可能な食品への期待は大きい。たとえば、お茶のカテキンや赤ワインのポリフェノールなどラジカル消去能を有する食品素材が酸化ストレスを低減するものとして注目されている。

食品素材中のラジカル消去作用は様々な方法によって測定されている。有色の安定ラジカル DPPH の退色を測定する方

法¹⁾、電子スピン共鳴 (ESR) により活性酸素種を測定する方法¹⁾、ラジカルにより進行する不飽和脂肪酸の酸化を、生じる脂質ヒドロペルオキシド量で測定する方法²⁾などが用いられている。ESR は直接ラジカルをみるものであるが、他のほとんどはラジカル消去活性を間接的に測定しており、通常は2つ以上の原理に基づく方法で測定し総合評価することが多い。

本報告では、岩手県内の農林水産物中から高いラジカル消去活性を有するものを検索して有効利用するため、多種試料

* 応用生物部 (現在 食品技術部)

** 醸造技術部

*** 岩手大学農学部

を簡便に評価可能な3種類の測定法構築を試みた。試料としてはヤマブドウを用い、必要量や感度の検討を行った。また、深刻な糖尿病合併症を引き起こす、タンパク質の非酵素的糖化反応の抑制についても比較検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 分析試料

試料として、岩手県林業技術センターで選抜された7系統のヤマブドウ(涼実紫1,2,4,5号、川井1、衣川、山形2)を除梗後、圧搾、加熱抽出したジュース、破碎後に種皮とともに通常通りかもし仕込みを行ったワイン及び圧搾残滓を用いた。圧搾残滓は適量の水を添加して抽出した後、凍結乾燥して得た粉末を0.2mg/mlとなるように水に溶解して用いた。参考として市販のヤマブドウジュースも試料とした。

2-2 総フェノール及びアントシアニン含量の測定

総フェノール量はFolin-Denis法により測定し、没食子酸相当量として算出した。アントシアニンモノマー含量は、Wrolstadらの方法³⁾により測定した。ジュース、ワイン試料を75倍に希釈してpH1.0及びpH4.5における520nmと700nmの吸光度からcyanidin-3-glucoside相当量として算出した。

2-3 ラジカル消去活性の測定

ラジカル消去活性は原理の異なる以下の方法で測定した。有色ラジカルであるDPPHの消去活性は木村らの方法⁴⁾に準じて測定した。試料を5,10,25,50倍に希釈して96穴プレートに10 μ lずつ分注したものに50%(V/V)エタノールに溶解した200 μ M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazol, ナカライテスク)を185 μ l加えて5分間振とうした。マイクロプレートリーダーにより550nmの吸光度を測定しラジカル消去による退色活性を没食子酸相当量として表示した。試料は3点分析した平均値とした。

脂質酸化の抑制活性についてはモデルとしてリノール酸メチルを用いた。試料160 μ lに、リノール酸メチル132 μ l及び50mMリン酸緩衝液(pH7.4, tween20を1.2%含む)8mlを加えた。Vortexにより2分間混合後、超音波によりミセル化した。2mlをガラスバイアルにとり、ラジカル開始剤として0.2M AAPH(2,2'-azobis(2-amino-propane) dihydrochloride)100 μ lを加えて37、3時間振とうした。反応液をメタノールで20倍に希釈し、HPLCによってリノール酸メチルヒドロペルオキシドを以下の条件で定量した。カラム、Waters Symmetry C18 5 μ 3.9 $\times$ 150mm、溶媒、水:メタノール(20:80)、

流速1ml/min、検出波長、234nm。生成量は試料無添加時のリノール酸メチルヒドロペルオキシドピークエリア値を100として生成率で表示した。メタノールに溶解した α -トコフェロールを対照として用いた。

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)を指標としたラジカル消去活性はCaoらの方法⁵⁾に準じて測定した。0.2nMの β -phycoerythrin(75mMリン酸緩衝液pH7.0)を170 μ l、96穴プレートに分注し、試料を100倍、1000倍に希釈して10 μ l添加した。対照として、2, 0.2, 0.02mMのTroloxを添加した。37にて10分間静置後、0.2M AAPHを20 μ l加え、2時間後に蛍光イメージアナライザー(FMBIO11、宝酒造製)によりラジカルによる蛍光退色の防止作用(Ex:532nm,検出フィルター605nm)を測定した。

2-4 糖化タンパク質生成抑制能の測定

糖化タンパク質生成抑制能は次のように測定した。BSA-Fructose溶液(20mg/mlBSA、500mM fructose、0.2g/l Na₂S₂O₃、200mM P-K buffer(pH7.4))を試験管に3.96ml分注後、試料を40 μ l加え37で5日間インキュベートした。対照としては水溶性のG-ルチン(東洋製糖)を用いた。Controlには200mM P-K bufferを加えた。インキュベート終了後、氷冷した20%TCAを4ml加えて混和、遠心分離によって沈殿を回収し、さらに10%TCAで2回洗浄した後、200mM P-K buffer 7mlに完全に溶解させた。生成した糖化タンパク質は蛍光強度によって測定し(Ex 350nm, Em 425nm) Controlを0としたときの生成阻害率で表示した。

3 結果および考察

3-1 試料中の総フェノール含量とDPPHラジカル消去活性

図1にヤマブドウ試料の総ポリフェノール量およびアントシアニンモノマーの占める量を示した。ヤマブドウのアントシアニンはmalvidin-3,5-diglucosideが主であると報告されているが、本報告ではcyanidin-3-glucosideのモル吸光係数を便宜上用いた。図2にはDPPHラジカル消去能を示した。総ポリフェノール量とDPPHラジカル消去活性は、ほぼ比例していた。ただし川井1、山形2は総ポリフェノールが比較的高いものの、ラジカル消去活性は他と比較してやや低めであった。DPPHラジカル消去活性は、アントシアニン量よりもポリフェノール量と相関すると報告されており、これらはアントシアニンモノマーの占める割合が高いことが原因と思われる。

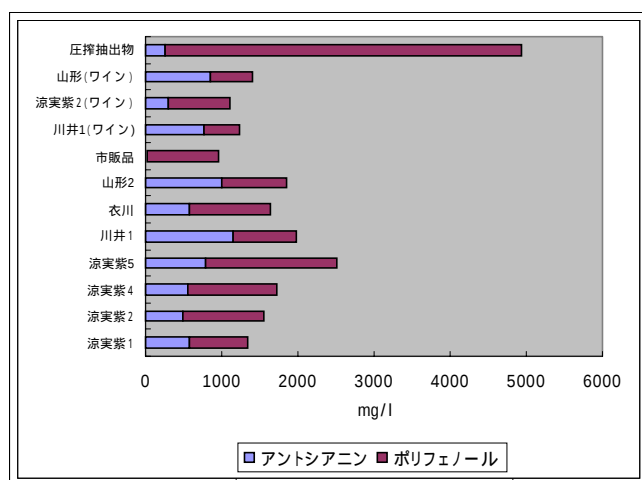


図1 ポリフェノール・アントシアニン含量

る。しかし、これらは色調が濃くジュース向きとして期待されており、他と比べて劣るものではない。市販品のヤマブドウジュースでは長期間貯蔵されるため、アントシアニンモノマーはほとんど検出されなかった。压榨残滓抽出液は多量のポリフェノールを含んでいた。

3-2 各測定法によるラジカル消去活性の比較

压榨残滓抽出液、および涼実紫2、4、5号のヤマブドウジュースを用いてリノール酸メチルヒドロペルオキシド生成抑制によるラジカル消去活性を測定した結果を α -トコフェロールの濃度 25, 62.5, 125 $\mu\text{g/ml}$ とした場合とともに表1に示した。压榨残滓、ヤマブドウジュース系統間とのラジカル消去活性の差はこの手法でも測定可能であった。

また、同サンプルのORACを指標としたラジカル消去活性を解析した結果を図3に示す。ラジカル消去活性を有するものとしてTroloxを対照とし、試料の代わりに水を添加しControlとした。1,000倍に希釈した試料でラジカル消去活性が検出可能であり、残滓とヤマブドウジュースとの差、さら

表1 ヒドロペルオキシド生成による測定

	ヒドロペルオキシド生成率(%)
Control	100.0
α -トコフェロール 125 $\mu\text{g/ml}$	46.1
α -トコフェロール 62.5 $\mu\text{g/ml}$	52.5
α -トコフェロール 25 $\mu\text{g/ml}$	58.2
压榨残滓	43.6
涼実紫5	44.5
涼実紫4	48.0
涼実紫2	47.0

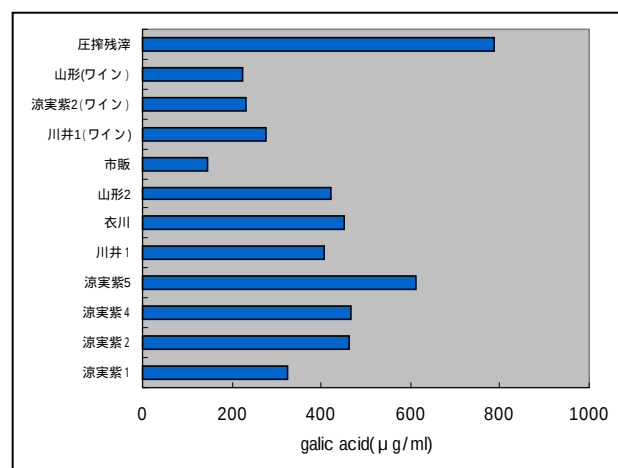


図2 DPPH ラジカル消去活性 (没食子酸相当)

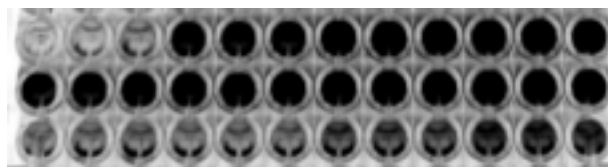
に涼実紫5号と2、4号とのラジカル消去活性の差も検出可能であった。蛍光イメージアナライザーの感度を1/2 (感度25%)に落とした時の100倍に希釈した試料とTroloxの比較結果は、ヤマブドウジュースが0.02mM Troloxと同等以上の消去活性を持つことを示しており、压榨残滓抽出液はそれ以上の活性を有していた。多検体を処理可能で、感度が非常に高いことから、スクリーニングや活性物質の分画に有効と思われる。蛍光プレートリーダーを用いれば、定量測定も可能である。

以上のことから、これら2種の方法は、DPPH ラジカル消去活性と同様に有効な測定方法であり、併用することでより正確なラジカル消去活性を評価可能であると考えられる。

1) 試料の配置 (各3)

Control	0.02mM Trolox	0.2mM Trolox	2mM Trolox
10^2 倍涼実紫2	10^2 倍涼実紫4	10^2 倍涼実紫5	10^2 倍压榨残滓
10^3 倍涼実紫2	10^3 倍涼実紫4	10^3 倍涼実紫5	10^3 倍压榨残滓

2) 検出感度50%



3) 検出感度25%

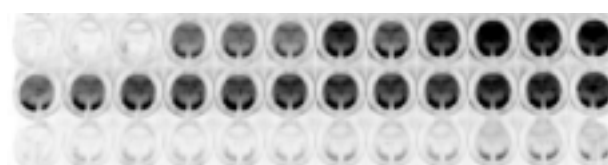


図3 ORACによる測定

3 - 3 糖化タンパク質生成抑制活性

3 - 1 で測定に用いた試料を用いて糖化タンパク質生成抑制活性を測定した結果を、G - ルチンを用いた場合とともに図4に示した。ジュースの抑制活性の差はDPPHラジカル消去活性と同様の傾向を示した。ワインの総ポリフェノールはジュースよりも低い(図1)糖化抑制はむしろ高い値を示した。また、圧搾残滓抽出液の活性が飛び抜けて高いことから、種子中フェノール化合物の抑制活性が高いものと推察している。対照として用いた抗酸化性を有するG - ルチンは糖尿病の病態として体内に蓄積する糖化タンパク質(後期反応生成物: advanced glycation end products)の生成を *in vivo* で抑制すると報告されている。そのメカニズムの1つはラジカルの消去と考えられている。10mM G - ルチンよりも高い抑制活性を圧搾残滓抽出物は有しており、澤井ら⁶⁾によれば本報告で用いた圧搾残滓抽出物を糖尿病ラットに摂取させた場合、肝臓と腎臓における糖化タンパク質の生成を抑制する興味深い結果を得ている。今後、さらに検討をすすめる予定である。

4 結 言

岩手県内の農林水産物の有効利用のため、多試料を同列に比較評価可能な3種類のラジカル消去活性測定法の構築を試みた。DPPHラジカル消去活性、リノール酸メチルペルオキシド生成抑制、oxygen radical absorbance capacity (ORAC)を利用して検討し、ヤマブドウを試料として実際に測定を行った。ラジカル消去活性は試料のポリフェノール含量とほぼ比例し、いずれの方法でも試料間の差を検出することが可能であった。ORACは検出感度が非常に高く、1000倍に希釈した試料での検出が可能であった。また、試験管内でのタンパク質の非酵素的糖化抑制を測定したところ、ヤマブドウの圧搾残滓抽出物は顕著に抑制していた。今後、構築した評価方法を用いて食品素材のスクリーニングを行うとともに、ヤマブ

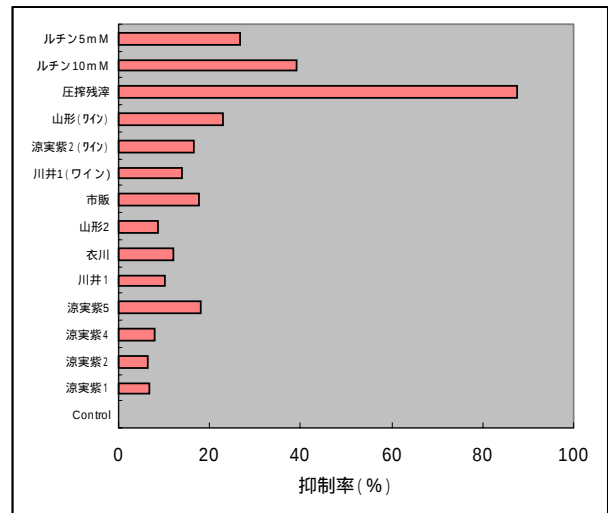


図4 糖化タンパク質生成抑制

ドウ圧搾残滓中の高活性成分の分析と利用について検討を進める予定である。

本研究は県林業技術センター特用林産部との共同研究において、供与いただいたヤマブドウを用いて実施したものであり、関係各位に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 篠原和毅、鈴木建夫、上野川修一編：食品機能研究法、光琳(2001)
- 2) 五十嵐脩、島崎弘幸編：過酸化脂質・フリーラジカル実験法、学会出版センター(1995)
- 3) Wrolstad, R. E. : Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley & Sons (2001)
- 4) 木村俊之、山岸賢治、鈴木雅博、新本洋士：日食工誌 49, 257 (2002)
- 5) Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A. H. B., Wang, H. : Clin. Chem., 41, 1738(1995)
- 6) 澤井秀幸ら：日本栄養・食糧学会大会講演要旨集(2003)