

令和 5 年 3 月 14 日

逆転の発想で抗酸化力の測定に成功！ ～世界中で使われる総抗酸化力測定法を最適化～

【発表のポイント】

- 抗酸化力(抗酸化活性)の測定法は様々あるが、「酸素ラジカル吸収能測定法(略称:ORAC 法)」は世界中で使われている著名な測定法の一つ。
- 生物や食品が有する抗酸化成分には脂溶性と水溶性の 2 種類があり、ORAC 法はそれらを同時に測り総抗酸化力を算出することができる優れた手法。
- 従来の ORAC 法の測定手順では、水溶性の抗酸化力が著しく過小評価されている事を発見。
- 測定方法を改良することで適正な総抗酸化力を把握し、ORAC 法の最適化に成功。
- 本改良 ORAC 法により農畜水産物等の食品や生体が有する真の抗酸化力を評価し、抗酸化力が関係するアンチエイジング・サプリメントの開発等に貢献することが期待。

【概要】

我々の生活はストレスで溢れています。これは人間に限った話ではなく、人の手で飼育される動物や栽培される植物でも同様で、その予防と制御が動植物の健康と生産性に大きく影響します。生体にストレスを及ぼす発生源(ストレスャー)は様々ですが、体内で誘導されるストレスの多くは酸化ストレスであることが分かってきました。その酸化ストレスを防止するためには、生体が有する抗酸化力を把握し、それを維持してさらに増大することが重要です。従って、その実現には正確な抗酸化力測定法が必要です。しかし、世の中には様々な抗酸化力測定法が存在し、いずれも一長一短があってどの測定法がベストなのか未だに定かではありません。

東北大学大学院農学研究科の中野俊樹准教授、林 聡司氏、落合芳博教授、白川 仁教授、中国・魯東大学の Hui Yu 准教授、東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科の遠藤英明教授、Haiyun Wu 助教らの研究グループは、数ある抗酸化力測定法の中で最も有名かつ世界中で利用される手法の一つ「酸素ラジカル吸収能測定法(略称:ORAC 法)」の改良に取り組み、以下のことを明らかにしました。

ORAC 法は、脂溶性と水溶性の二つのタイプの抗酸化力を同一試料で測定し、総抗酸化力を評価できます。しかし、従来法の手順では、水溶性の抗酸化力が著しく小さく評価されている事を明らかにしました。そこで、従来行われてきた測定手順、すなわち脂溶性と水溶性の抗酸化力の測定順序を入れ替えることで、計測対象が有する真の総抗酸化力を正確に評価できる ORAC 法の改良と最適化に成功しました。この改良 ORAC 法により、生体や食品が本来有する真の総抗酸化力を評価することができます。従って、この改良 ORAC 法は、今後、抗ストレスやアンチエイジング等の機能を有する付加価値の高い食品やサプリメントの開発等への利用と貢献が期待されます。

【詳細な説明】

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\bullet-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\bullet\text{OH}$)、ペルオキシラジカル($\text{ROO}\bullet$)、過酸化脂質などの活性酸素は強い酸化力を有し、体内の様々な組織で発生します。一般的に活性酸素は、生体の抗酸化防御により消去され、その量は適切にコントロールされていますが、抗酸化力(抗酸化活性)を超えて過剰に生産されると細胞成分を酸化し傷害を与え、炎症、突然変異、がん等の種々の疾病の原因にもなると言われています。従って、生体や食品の抗酸化力を正確に把握することは重要です。この抗酸化力を測定する方法は様々提案されていますが、酸素ラジカル吸収能測定法 (Oxygen Radical Absorbance Capacity、以下 ORAC 法と称す)は、総抗酸化力を評価するための方法として広く知られ、世界中で使用されています。ORAC 法は、同一試料で生体組織や食品中の親水性 (H-) と親油性 (L-) の両方の抗酸化力を測定し、総抗酸化力を知ることができる極めて汎用性の高い測定方法です。

東北大学大学院農学研究科の中野俊樹准教授、林 聡司氏、落合芳博教授、白川 仁教授、中国・魯東大学の Hui Yu 准教授、東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科の遠藤英明教授、Haiyun Wu 助教らの研究グループは、従来の ORAC 法を改良して最適化し、重要な養殖対象魚種を用いてそれらの総抗酸化力を測定し、その改良 ORAC 法の有効性を明らかにしました。

生体や食品の抗酸化力を測定するためには、抗酸化に関わる成分を抽出しなければなりません。ORAC 法では複数の溶剤を使って成分を抽出します。研究グループでは、魚類組織を試料として ORAC 法の改良に取り組みました。まず肝臓を用いて、オリジナルの ORAC 法の測定手順に従い、有機溶剤のヘキサンとジクロロメタン (Hex/Dc) の混合液で親油性 (L-) ORAC 活性に関連する親油性抗酸化成分を調製しました。その後、アセトン、水および酢酸 (A/W/AA) の混合液を使用して、親水性 (H-) ORAC 活性に関連する親水性抗酸化成分を調製しました。次に、オリジナルの ORAC 法の測定手順を修正し、親油性と親水性成分の抽出順序と抽出に使用する試薬(溶剤)を変更しました。すなわち、親水性抗酸化成分をまず抽出調製し、その抽出試薬として A/W/AA の代わりに 75 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いました。その後、Hex/Dc を用いて親油性抗酸化成分を調製しました。驚くべきことに、この改良 ORAC 法により測定されたニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 肝臓の水溶性 ORAC 活性は、オリジナルの ORAC 法を用いた場合より 4 倍も高くなりました。対照的に脂溶性 ORAC 活性は、改良 ORAC 法とオリジナル法の間で差はなく、結果的に総抗酸化力は改良 ORAC 法を用いることで約 4 倍高くなることが判明しました(図 1)。

改良 ORAC 法による分析で、養殖現場で広く使用されている抗生物質の一つであるオキシテトラサイクリン(OTC)の過剰投与が、ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) の肝臓等の組織の総抗酸化力を低下させ、体内で酸化ストレスを誘導することが分かり

ました(図 2)。従って、養殖魚の健康や生産性の維持のためには、OTC や構造類似の抗生物質は用法容量を守り投与することが大切で、さらに、OTC 投与で誘導されるストレスによる副作用には、抗酸化物質の投与が効果的であると考えられます。

以上の ORAC 法に関する一連の研究により、従来のオリジナル ORAC 法を基に測定された生体組織と食品の総抗酸化力に関する過去の知見は、実際の抗酸化力よりかなり小さく評価されていることが明らかとなりました。本改良 ORAC 法は、発想の転換によるオリジナル法のシンプルかつユニークな修正で、生体や食品の総抗酸化力を評価するために最適化されています。今後、本法を抗酸化的な食品やサプリメントの開発、養殖魚や家畜の健康維持、そして食品の品質管理等に応用することが期待されます。

本研究成果は、米国 Society for Redox Biology and Medicine および欧州 Society for Free Radical Research が共同で発行する機関誌 *Advances in Redox Research* に掲載されました。

【論文情報】

雑誌名: *Advances in Redox Research*

タイトル: *Modification of the oxygen radical absorbance capacity assay and its application in evaluating the total antioxidative state in fish*

著者: 中野俊樹¹、林 聡司¹、落合芳博¹、白川 仁²、Haiyun Wu³、遠藤英明³、Hui Yu⁴

1: 東北大学大学院農学研究科水産資源化学分野

2: 東北大学大学院農学研究科栄養学分野

3: 東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科生体機能利用学研究室

4: 中国・魯東大学食品工学科海洋生物資源利用学研究室

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arres.2022.100049>

【研究支援】

本研究は、日本学術振興会の科研費(21K05767)および研究拠点形成事業「食の安全性の飛躍的向上を目指した農免疫国際研究拠点形成」、農林水産省農林水産政策研究所の「国産農水産物の国内外の需要動向を踏まえた供給体制に関する研究」、農林水産省農林水産技術会議の農林水産分野の先端技術展開事業のうち現地実証研究「多様な漁業種類に対応した操業情報収集・配信システムの構築」等の支援を受けて行われました。

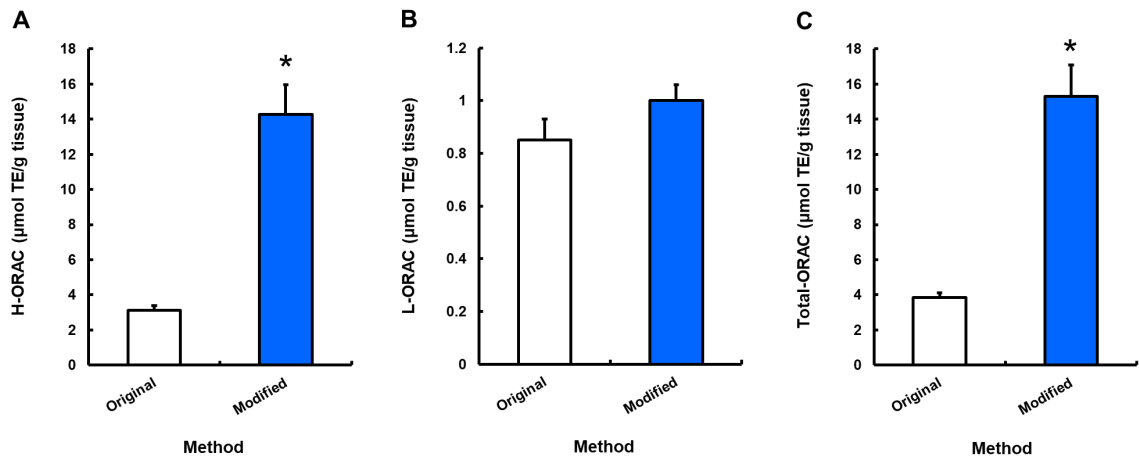


図 1 改良 ORAC 法によるニジマス肝臓の抗酸化力の比較

(A) 水溶性抗酸化力、(B) 脂溶性抗酸化力および (C) 総抗酸化力。図の棒グラフの中で白色がオリジナル ORAC 法、青色が改良 ORAC 法による抗酸化力の測定値。水溶性抗酸化力と総抗酸化力は、改良 ORAC 法の方がオリジナル法に比べ約 4 倍高いことが分かる。図中の * 印は、オリジナル法と改良法による測定値の間に統計的な違いがあることを示す。

(Advances in Redox Research 掲載の図を著者が改変)

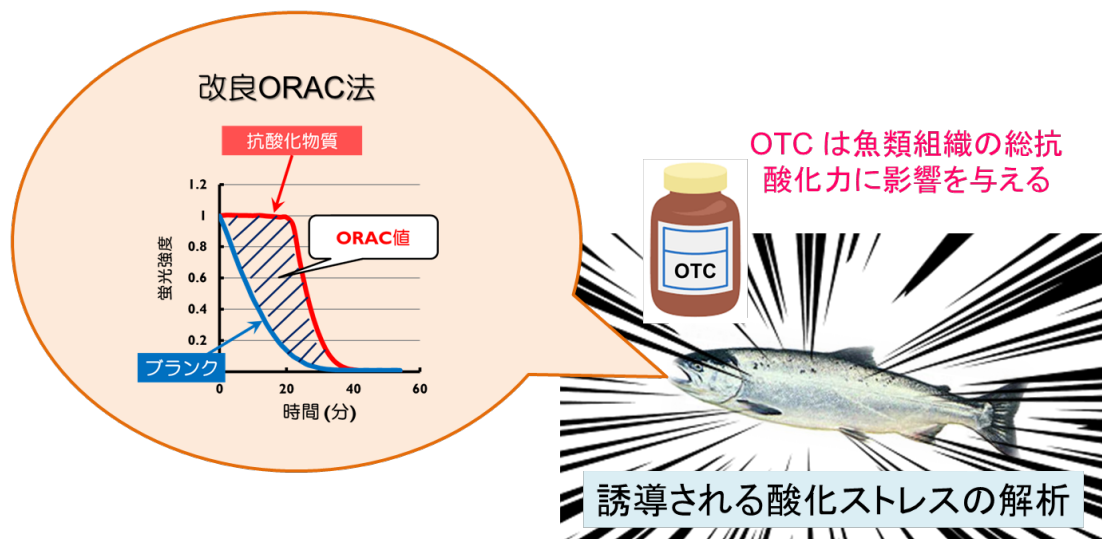


図2 抗生物質オキシテトラサイクリンは魚類に酸化ストレスを誘導する
改良 ORAC 法による測定で、養殖現場で汎用される抗生物質オキシテトラサイクリン（OTC）が、魚類組織の総抗酸化力を低下させ、そして体内で酸化ストレスを誘導することが明らかとなった。改良 ORAC 法は、体内で生じるストレスの質の評価と解析にも有効である。
(Advances in Redox Research 掲載のグラフィックアブストラクトを著者が改変)