

氏 名(本籍)	あし 芦	だ 田	しん 慎	や 也
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 第 7 1 5 号			
学位授与年月日	平 成 18 年 9 月 14 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭和 62 年 3 月 24 日 京都大学理学部 (生物系) 卒業			
学位論文題目	新規の抗酸化性・還元性評価系の開発とその応用に関する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	佐 藤	實
	(副 査)	教 授	谷 口	和 也
		教 授	宮 澤	陽 夫

論文内容要旨

序論

生体系における酸化ストレス防御及び食品の変質防止において、天然抗酸化性・還元性成分の重要性はますます高まっている。天然物中の抗酸化性成分・還元性成分を新たに探索するためには、疎水系、水系それぞれにおける抗酸化性・還元性の評価系が必要となるが、疎水系、水系それぞれにおける抗酸化性・還元性の既存評価系は、天然物の検索に応用する上で種々の問題点があると考えられた。たとえば、疎水系での抗酸化性の評価法としてよく利用されている重量法、AOM 試験等の手法は、脂質を保管して、脂質酸化の進行状況を重量増加や脂質ヒドロペルオキシド量の測定などにより評価するものである。これらの手法は、測定データを産業的に活用しやすい反面、抗酸化活性の判定に時間がかかる、試料量を多く要するなどの欠点がある。また、水系での還元性の評価法としては、フェリシアナイド法、XTT 法などが報告されているが、これらの手法は、それぞれ無機鉄、低分子有機成分が、電子の供与を受けて酸化型から還元型へと変化する量を測定する方法である。しかしながら、生体・食品などの複雑系において、酸化抑制の対象となるものは高分子成分が多く、これらの手法が還元性評価のモデル系として適切であるかは疑問が残る。

本研究では、天然物の検索に応用できる抗酸化性・還元性の評価系を、疎水系、水系それぞれにおいて新たに設定することとした。すなわち、疎水系での評価系としては、Miyazawa ら (1987) によって開発された極微弱発光による脂質ヒドロペルオキシドの微量定量法の反応機構を活用して、抗酸化成分の化学発光 (以下 CL) 消去能を定量的に評価する手法の確立を図った。また、水系での評価系として、オキシミオグロビン (以下 MbO₂) からメトミオグロビン (以下 metMb) への酸化速度の抑制作用を指標とする手法を新たに開発した。ミオグロビンはヘム鉄部分とそれを取りまくグロビン部分からなる蛋白質である。酸素を配位子とするヘム鉄の原子価が 2 価状態の MbO₂ は、水分子、水酸イオンなどの求核的攻撃を受け、スーパーオキシドの生成を伴いヘム鉄の原子価が 3 価に酸化されて metMb に変化する。還元性成分は、metMb のヘム鉄を一電子還元してデオキシミオグロビンとし、デオキシミオグロビンが酸素と結合し MbO₂ に還元するため、結果として MbO₂ の酸化抑制作用を示す。このことから、MbO₂ から metMb への酸化速度を指標とする還元性の評価系の構築を試みた。続いて、これらの手法に基づき各種食用・薬用植物の検索、活性成分の同定などを行うことによって、新規評価系の特性、特徴を浮かび上がらせることとした。さらに、水系での還元性の検討を行う中で有効性が認められた還元性・抗酸化性成分については、ネグトロ様マグロ加工品の変色抑制への応用について検討を加えた。

第 1 章 Chemiluminescence (CL) 法による疎水系での抗酸化性の評価系の開発

疎水系での脂溶性成分の抗酸化性評価系として、リノール酸メチルヒドロペルオキシド (以下 MLHPO) を、抗酸化性について評価する試料と共に一定量注入し、MLHPO と触媒としてのチトクローム C 及び発光増感剤としてのルミノールとの反応で生じる CL の試料添加による減衰率をフローインジェクション法で評価する手法 (CL 法) を設定した (Fig. 1)。本 CL 法により、抗酸化性低分子化合物 (BHT、ルチン、 α -トコフェロール、 γ -ト

コフェロール) の測定を行なった結果、抗酸化性成分の添加により濃度依存的に MLHPO 由来 CL の減衰が進み (Fig. 2)、CL を 50%抑制する濃度 (IC₅₀) により定量的な評価が可能と考えられた。既存の抗酸化性評価法であるロダン鉄法による測定結果との比較では、 α -トコフェロールにおいて CL 法が強い活性を示した以外は相関関係が認められた (Fig. 3)。

第 2 章 CL 法による各種植物の抗酸化性の検索およびセンブリ中の抗酸化成分としての xanthone 誘導体の同定

209 種類の食用・薬用植物のエタノール、ジエチルエーテル抽出物を CL 法で測定した結果、エタノール抽出物で 82 種、ジエチルエーテル抽出物で 25 種が 50%以上 CL 強度を減少させる結果となった。高活性を示したものは、既に抗酸化性の報告が多数なされている香辛料などの植物、あるいは有機酸を多量に含有する植物が多かった。エタノール抽出物で高活性を示したものが多かったのは、エタノール易溶の有機酸の影響により、CL 法でのルミノール発光が阻害されたためと推測された。

エタノール、エーテル両抽出物とも高い活性を示し、既存の抗酸化成分の報告がなかったセンブリ (*Swertia japonica*) について詳しい検討を行った。溶媒分画、Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー、TLC、溶媒再結晶処理などを組み合わせて、6 種類の化合物を CL 法による活性成分として単離した。各種機器分析結果から、各化合物はセンブリに存在が認められている xanthone 誘導体 (methylbellidifolin, methylswertianin, swertianin, bellidifolin, norswertianin, desmethylbellidifolin) と同定された (Fig. 4)。各 xanthone 誘導体の抗酸化性について、2,2'-azo-bis(2,4-dimethylvaleronitrile)誘導リノール酸メチル酸化試験により評価した結果、CL 法での活性が最も高かった bellidifolin が抗酸化性においても強い活性を有しており、その強さは、BHT と同程度であった (Fig. 5)。

第 3 章 オキシミオグロビン (MbO₂) 法による水系での還元性の評価系の開発

未凍結牛肉から精製した native な状態の MbO₂ を含む溶液を、還元性を評価する試料と共にインキュベートして、30°C、pH 6.0 における metMb への自動酸化速度の変化を吸光度測定により調べる方法 (MbO₂ 法) を設定した。MbO₂ の自動酸化速度は、30 μ M 濃度の MbO₂ を含む 3 ml の反応液を、30°C 設定の電子冷熱式恒温セルホルダーを備えた分光光度計中に保管して、3 波長 (730, 572, 525 nm) の吸光度測定によって測定した。試料添加による一次反応速度定数 (k_{obs}) の変化から、MbO₂ 酸化反応の阻害率 (以下 IR) を、 $\{(k_{\text{obs. blank}}) - (k_{\text{obs. sample}})\} / (k_{\text{obs. blank}})$ として数値化した。IR 値が高いほど試料によって MbO₂ 酸化が抑制されたことを表し、マイナスの IR 値は、試料添加によって逆に MbO₂ の酸化が促進されたことを示す。

本 MbO₂ 法によって水溶性の抗酸化性・還元性低分子化合物 (L-アスコルビン酸、グルタチオン、コウジ酸、没食子酸) の測定を行った (Table 1)。その結果、アスコルビン酸が最も高い酸化抑制効果を示した。コウジ酸、グルタチオンは、アスコルビン酸に劣るものの

若干の酸化抑制効果を示した。没食子酸は低濃度では弱い酸化抑制効果を示すのに対し、高濃度添加では逆に MbO₂ 酸化を促進する傾向（“Pro-oxidant” 作用）が見られた。没食子酸の酸化促進作用は、カタラーゼ添加により顕著に抑制された（Fig. 6）ため、過酸化水素などの活性酸素種の発生に由来するものと推察された。既存の水系還元性評価法であるフェリシアニド還元法、XTT 法で、同様に還元性化合物の活性測定を行った結果（Fig. 7）、各化合物は単純な濃度依存的な還元性を示し、MbO₂ 法で示された Pro-oxidant 作用については評価できないと考えられた。

第 4 章 MbO₂ 法による各種植物の還元性の検索

55 種の食用植物の水抽出物について、MbO₂ 法により還元性を調べた。IR 値により 5 段階（++ : IR = 50%以上、+ : IR = 10~49%、± : IR = -9 ~ 9%、- : IR = -49~-10%、-- : IR = -50% 以下）に分類すると、それぞれの区分に 11,8,6,2,28 種の試料が属する結果となった。

IR 値 50%以上の強い還元性を示した 11 種（パプリカ、大根、ニガウリ、レモン、トマト、キャベツ、みかん、白菜、オレンジ、アスパラガス、ピーマン）のうち、4 種（葉菜として白菜、果実としてレモン、果菜としてパプリカ、根菜として大根）を選択して、活性成分の検討を行った。各植物水抽出液の希釈度を 4 段階（10 倍, 30 倍, 100 倍, 300 倍）に変化させて IR 値を測定し、各抽出原液中のアスコルビン酸含量を希釈度で除して、各植物希釈液中のアスコルビン酸含量を横軸としてプロットした結果を Fig. 8 に示す。各植物抽出液の IR 曲線は、試薬アスコルビン酸の IR 曲線と相似した形状を示す結果となり、アスコルビン酸の影響が強く示唆された。

さらに、アスコルビン酸オキシダーゼ存在下でのパプリカ抽出液及び試薬アスコルビン酸の IR 曲線に及ぼす影響を調べた（Fig. 9）。その結果、パプリカ抽出液及びアスコルビン酸の各濃度での IR 値は、アスコルビン酸オキシダーゼの添加により著しく影響を受け、パプリカ、アスコルビン酸の活性はどちらも、ほぼ完全に消失する結果となった。これらの結果から、MbO₂ 法での活性を示した植物の還元性のほとんどすべてはアスコルビン酸に由来すると考えられた。

第 5 章 マグロ加工品への応用

第 3 章、第 4 章での検討で有効性が認められたアスコルビン酸、カタラーゼ、パプリカの応用を、実際の食品であるネギトロ様マグロ加工品（以下 ネギトロ）を対象として試みた。マグロ肉の色調の主体はミオグロビンであり、マグロを -18~-25℃の通常の冷凍食品保管温度帯によって貯蔵すると、速やかに metMb の生成、すなわちメト化に基づく変色が進行しその商品価値が消失することが知られている。従って、マグロには -40℃以下の“超低温”保管が通常利用されているが、還元性成分の利用によって通常冷凍温度で保管しても商品価値の維持が可能なネギトロの開発を目指した。ネギトロ色調の数値評価法として、反射率スペクトル測定による非破壊でのメト化率測定法を導入して、官能評価、

赤色度 (a^* 値) と併用する形で色調の評価を行なった。

アスコルビン酸を 0.03% 程度の低濃度添加し、酸素透過性包装によるネギトロは、 -18°C 長期保管後にも凍結中～解凍後～開封後を通じて好ましい色調を持続した (Fig. 10)。一方、アスコルビン酸を 0.3% 程度の高濃度添加し、酸素バリア性包装によるネギトロは、 -18°C 保管中に変色するが、開封後に好ましい色調に急激に変化し、それが長時間持続した (Fig. 11)。ネギトロのメト化率測定により、高濃度アスコルビン酸添加+酸素バリア性包装ネギトロは、冷凍保管中にメト化による変色が進むものの、解凍-開封後、アスコルビン酸の作用により metMb が還元化され、大気中の酸素と結合して MbO_2 に復元することにより、好ましい鮮紅色となることが示された (Fig. 12)。

高濃度アスコルビン酸添加ネギトロの、アスコルビン酸の Pro-oxidant 作用による変色はカタラーゼ添加によって抑制された (Fig. 13)。また、パプリカ粉末にはアスコルビン酸には劣るものの、ネギトロ変色抑制効果が認められた (Fig. 14)。

総合考察

天然物の検索に応用できる抗酸化性-還元性評価法として、疎水系における極微弱発光を利用した手法 (CL 法)、水系における MbO_2 の酸化速度を指標とする手法 (MbO_2 法) をそれぞれ開発した。

CL 法は、感度、測定時間などで優れた特性を有しているが、CL 減衰能と抗酸化活性との関連の薄さ、pH の影響などの欠点があると考えられた。CL 法により食用・薬用植物の検索を行ない、検索で高活性を示したセンブリについて活性成分の検討を行った結果、bellidifolin などの xanthone 誘導体を強力な抗酸化成分として同定した。このことから、CL 法は脂溶性抗酸化成分の検索、単離精製などに特に有用に活用できると考えられた。

MbO_2 法は、既存の還元性評価法であるフェリシアナイド還元法、XTT 法と比較した場合、測定の簡便性については劣るものの、感度、汎用性で優れている上に、還元性・抗酸化性のみならず Pro-oxidant 作用についても評価が可能な点に大きな特徴があると考えられた。この特性を生かすことによって、同一の成分がその濃度、状況などによって抗酸化・還元的に作用したり、逆に酸化促進的に作用したりすることがありうる酸化-還元系における活性測定法として、他の評価法では検知できない有用な情報を提供できる可能性があると考えられた。

MbO_2 法で高活性を示したアスコルビン酸などのネギトロへの利用を検討し、長期間の -18°C 保管を経ても商品価値を保つ 2 通りのネギトロ製法 (酸素透過性包装材料+低濃度アスコルビン酸添加、酸素バリア性包装材料+高濃度アスコルビン酸添加) を見出した。これらの手法は現在産業的に実用化されている。このように、モデル的評価系である MbO_2 法の結果を、マグロなどの実際の食品の酸化防止、変色抑制などに有効に活用できることが示されたため、今後の更なる応用展開が期待される。

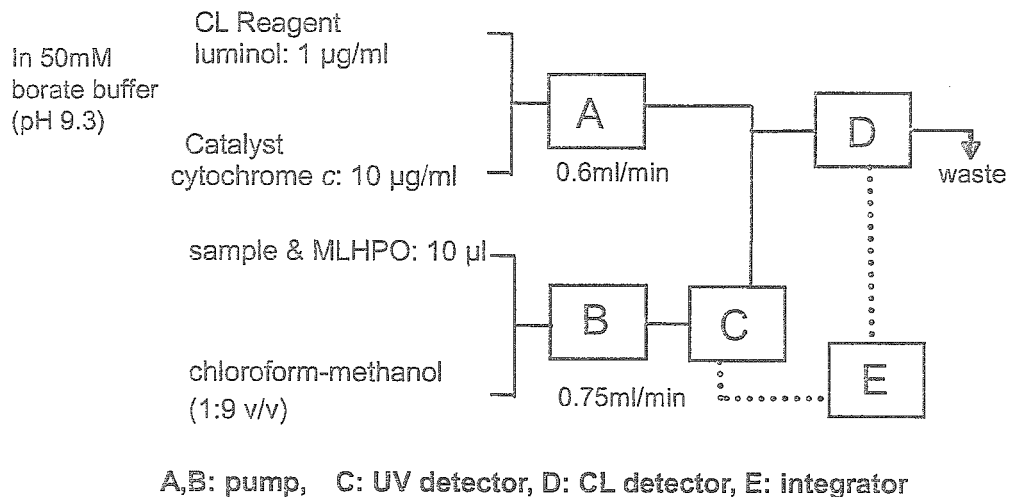


Fig. 1. Flow diagram of the CL method.

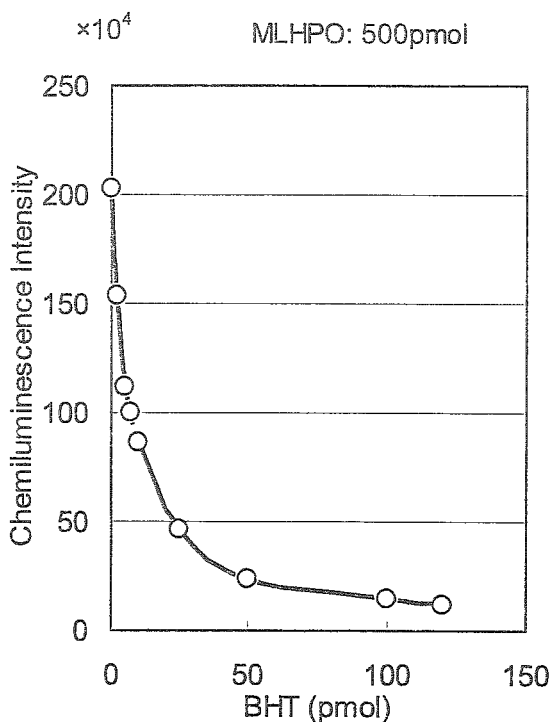


Fig. 2. Decrease of the CL intensity as a result of the addition of BHT.

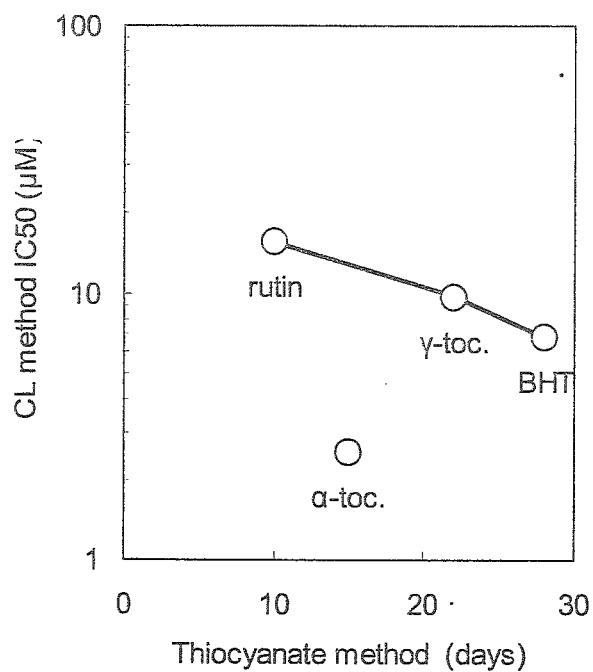


Fig. 3. Relationship between the CL method and the thiocyanate method.

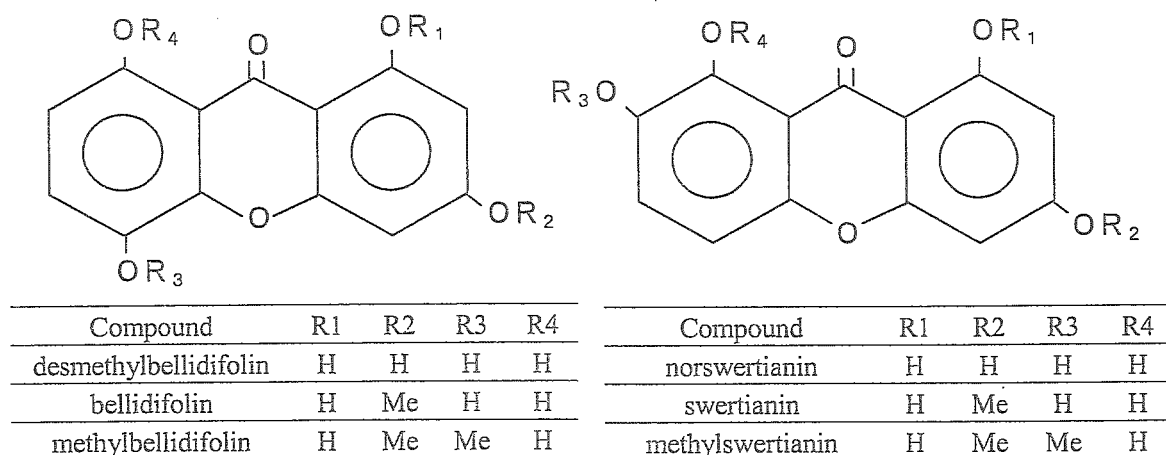


Fig. 4. Structures of xanthones isolated from *Swertia japonica*.

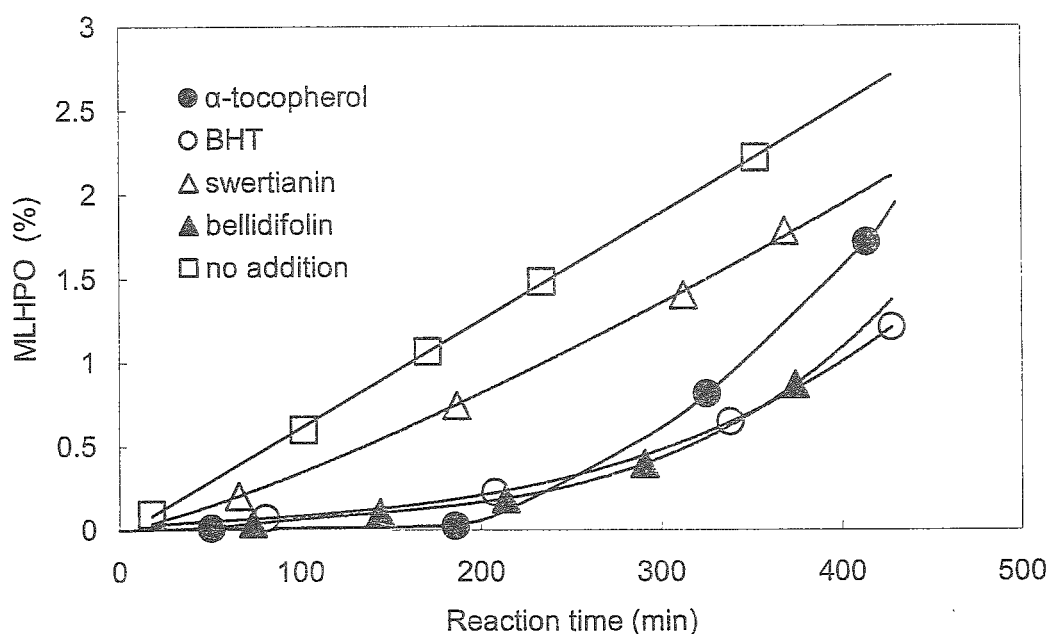


Fig. 5. Comparison of antioxidant activity of swertianin and bellidifolin with BHT and α -tocopherol on the oxidation of methyl linoleate. All antioxidant compounds were at a concentration of 0.18 mM.

Table 1. Comparison of inhibitory rate (IR) value of various compounds on oxidation of MbO₂.

Concentrations (μ M)	L-ascorbic acid	glutathione	kojic acid	gallic acid
3	69.4% \pm 0.6%	-0.2% \pm 4.2%	-7.2% \pm 4.4%	37.3% \pm 1.4%
10	71.8% \pm 0.7%	14.8% \pm 2.5%	6.3% \pm 5.8%	21.2% \pm 4.3%
30	71.9% \pm 0.6%	17.9% \pm 4.1%	13.9% \pm 2.4%	-0.3% \pm 5.8%
100	71.6% \pm 0.6%	24.0% \pm 3.5%	22.1% \pm 8.2%	-33.8% \pm 7.7%
300	74.0% \pm 0.5%	12.0% \pm 7.1%	33.8% \pm 3.1%	-82.4% \pm 11.9%

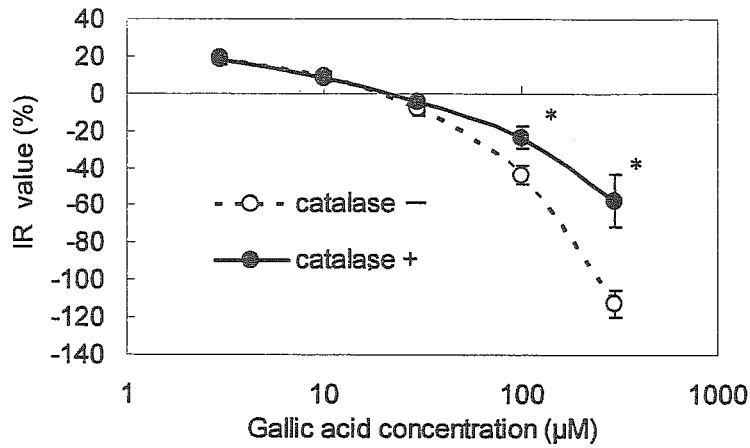


Fig. 6. Effect of catalase on the IR values of gallic acid in regard to MbO₂ oxidation. * p < 0.001.

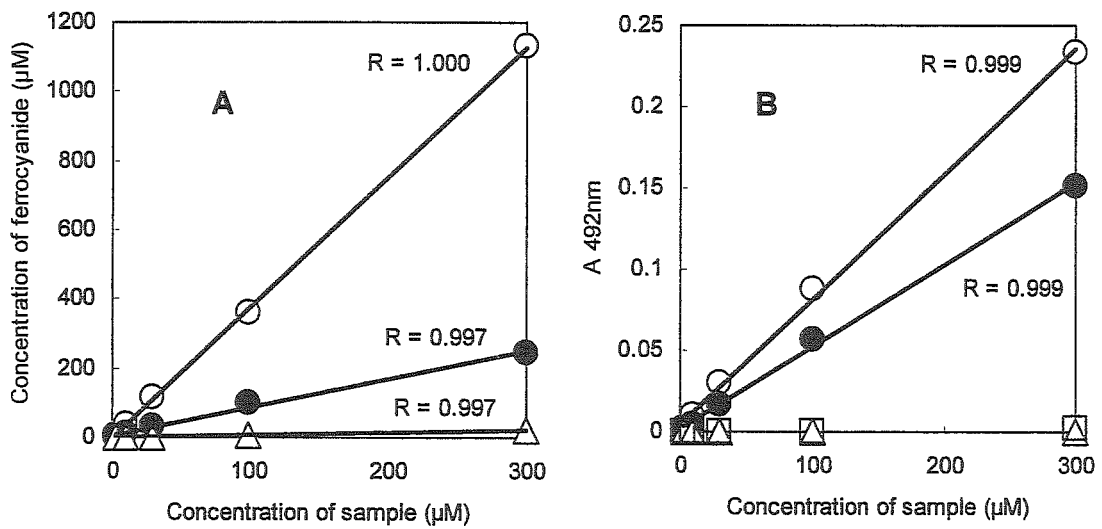


Fig. 7. Reductive effect of low molecular compounds against ferricyanide(A) and XTT(B). The reducibilities by (○); L-ascorbic acid, (●); glutathione, (△); kojic acid and (□); gallic acid are expressed. The effect of gallic acid in the ferricyanide assay could not be measured due to coloring.

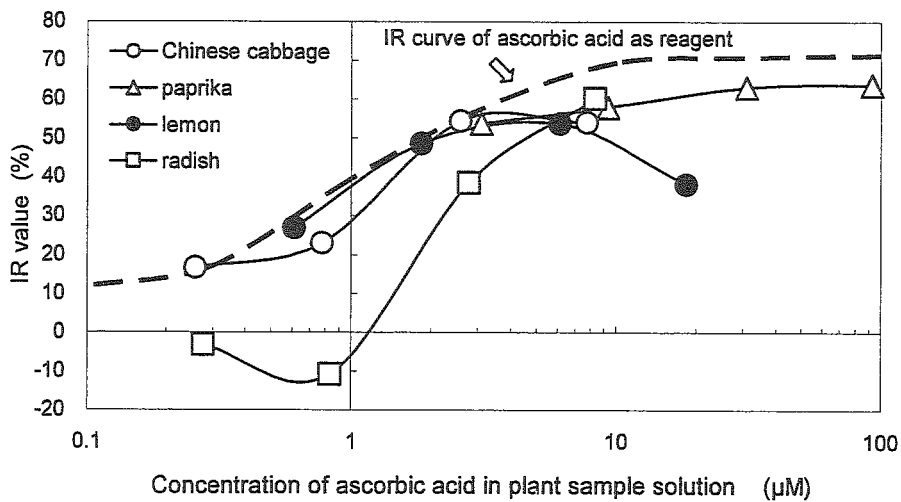


Fig. 8. Relationship between the change in the IR values of Chinese cabbage, lemon, paprika, and radish on MbO₂ oxidation, and their L-ascorbic acid concentrations.

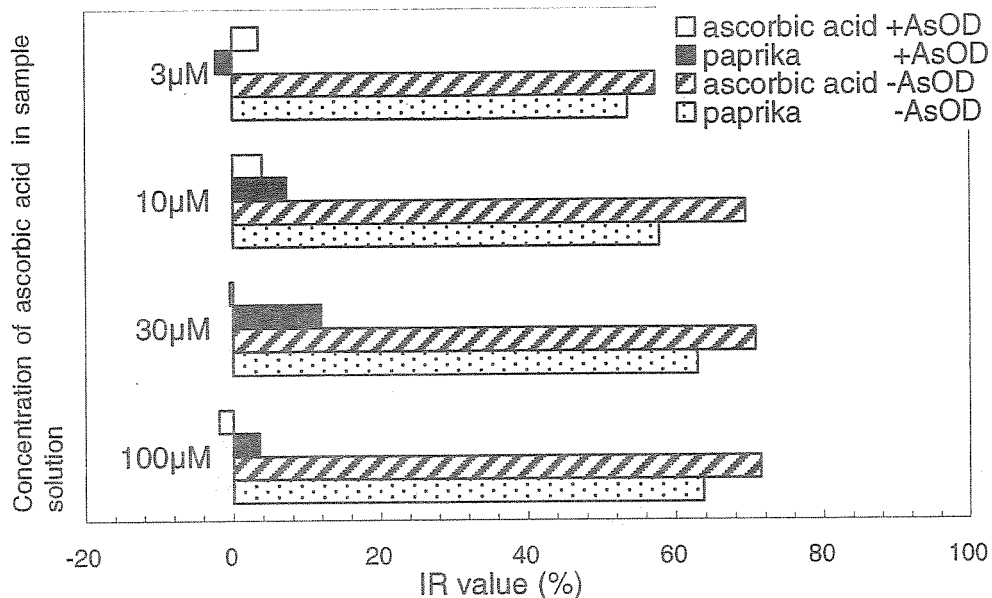


Fig. 9. Effect of ascorbate oxidase (AsOD) on the IR values of paprika and L-ascorbic acid as a reagent with regard to MbO₂ oxidation.

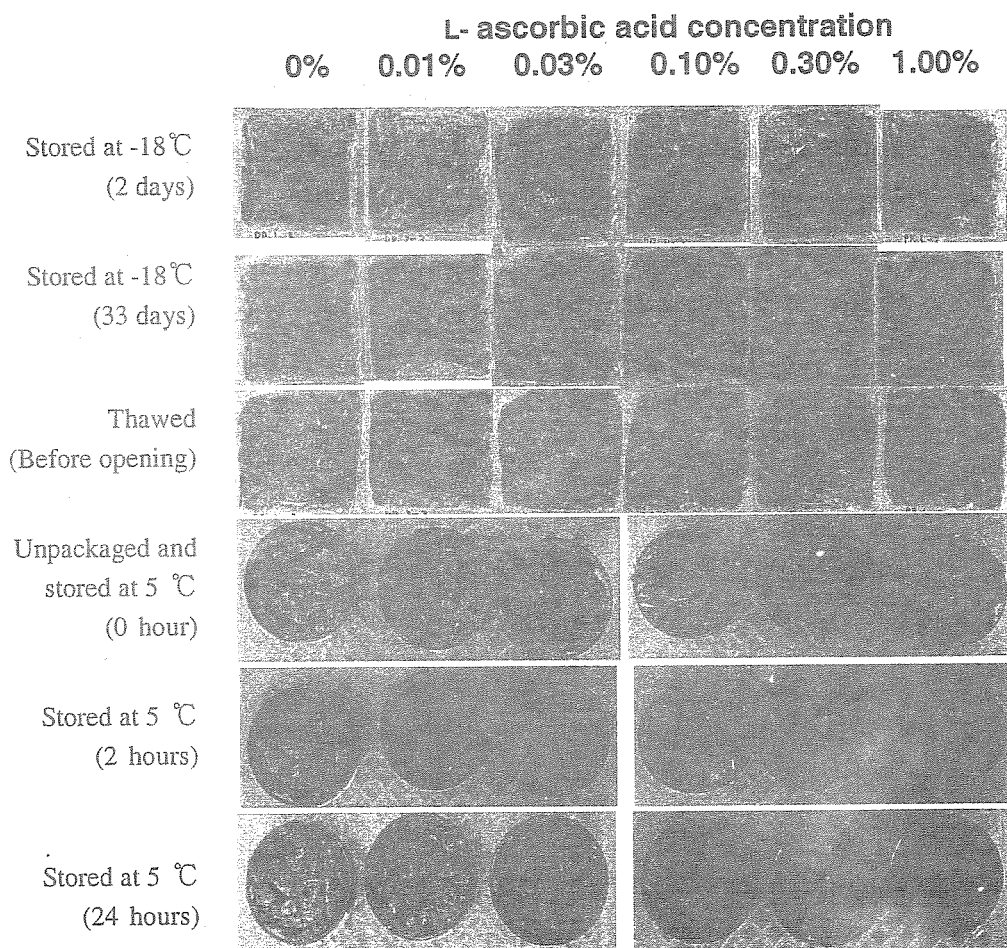


Fig. 10. Observation of the color changes of minced bigeye tuna meat "Negitoro" which were packaged in plastic film bags with high gas permeability (OPP/LLDPE). The "Negitoro" samples containing various concentration of L-ascorbic acid were stored at -18 °C and subsequently thawed, unpacked, and stored at 5 °C.

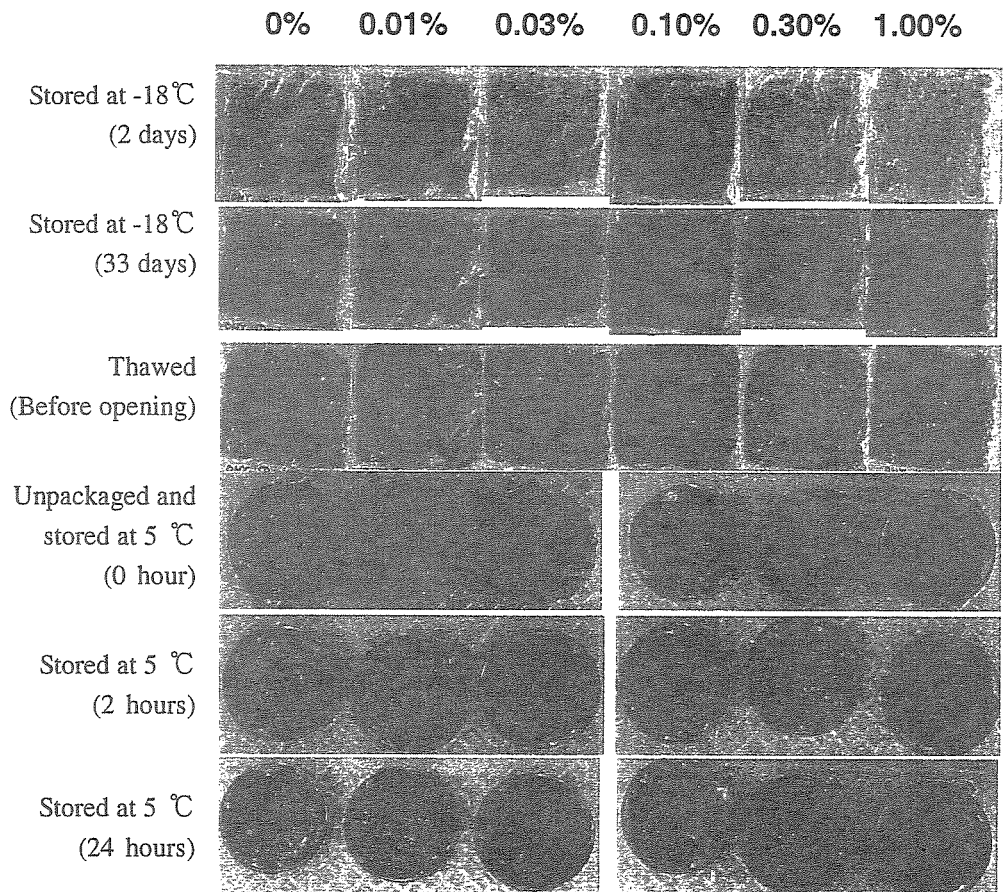


Fig. 11. Observation of the color changes of minced bigeye tuna meat "Negitoro" which were packaged in plastic film bags with low gas permeability (ONY/LLDPE). The "Negitoro" samples containing various concentration of L-ascorbic acid were stored at -18°C and subsequently thawed, unpacked, and stored at 5°C .

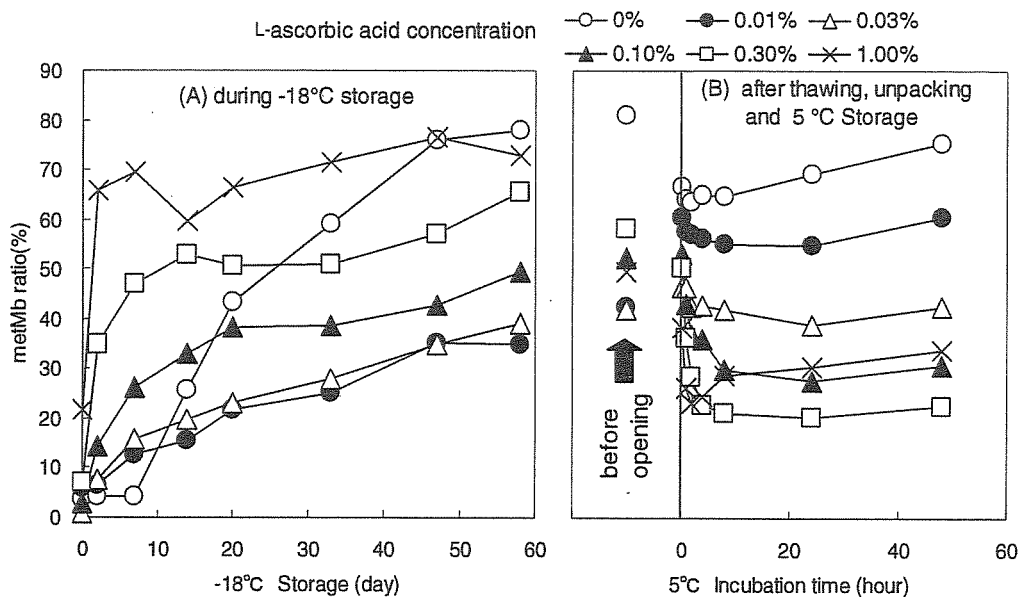


Fig. 12. The changes in the ratio of metMb of "Negitoro" which were packaged in plastic film bags with low gas permeability (ONY/LLDPE) during -18°C storage(A), and subsequently after thawing, unpacking, and during 5°C storage (B). The "Negitoro" samples containing various concentration of L-ascorbic acid.

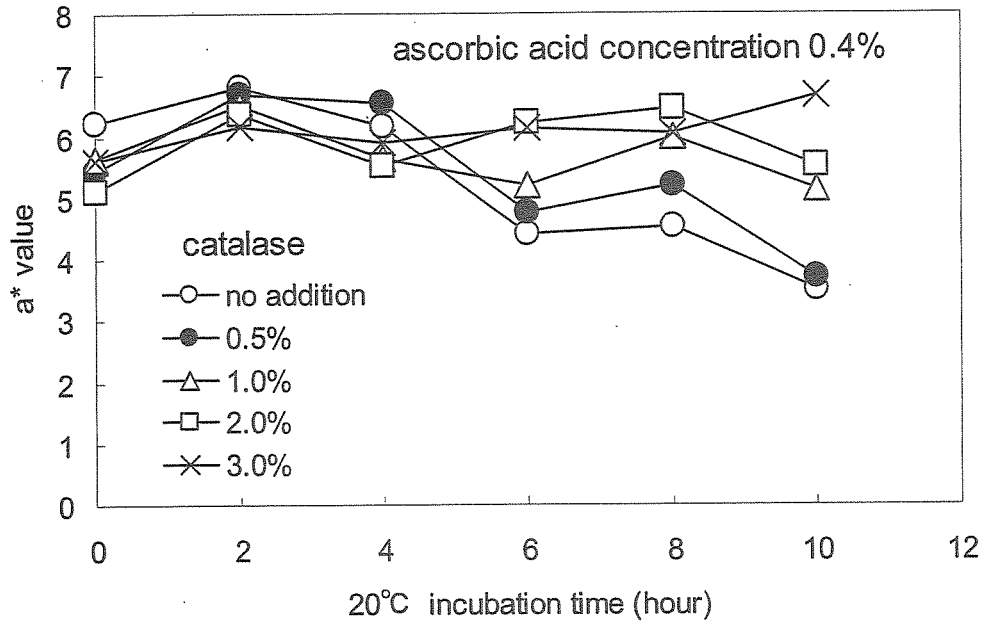


Fig. 13. The changes in a^* value of "Negitoto" with 0.4% of L-ascorbic acid and various concentrations of catalase (food additive grade) during 20 °C storage.

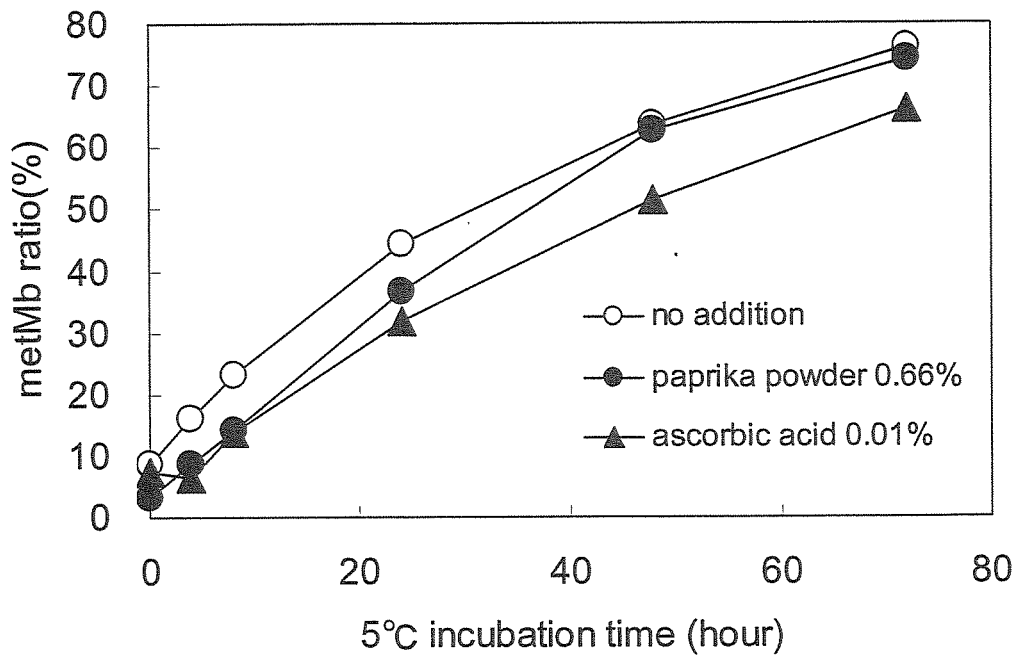


Fig. 14. The changes in the ratio of metMb of "Negitoto" with paprika powder or ascorbic acid during 5 °C storage.

論文審査結果要旨

生体系における酸化ストレス防御及び食品の変質防止において、天然抗酸化性・還元性成分の重要性はますます高まっている。天然物中の抗酸化性成分・還元性成分を探索するための抗酸化性・還元性の既存評価系は、天然物の検索に応用する上で疎水系、水系とも種々の問題点があると考えられた。そこで、本研究では、疎水系、水系それぞれでの抗酸化性・還元性の評価系を新たに開発し、それに基づき各種食用・薬用植物の検索、活性成分の同定などを行った。さらに、水系での還元性検索で活性を示した還元性成分の応用として、ネグトロ様マグロ加工品の変色抑制について検討を加えた。第1章では、疎水系での脂溶性成分の抗酸化性評価系として、リノール酸メチルヒドロペルオキシドとチトクロームC、ルミノールとの反応で生じる化学発光（CL）消去能を評価する方法（CL法）を設定した。CL法により各種低分子抗酸化性成分の測定を行なった結果、 α -トコフェロールにおいてCL法が強い活性を示した以外は既存の抗酸化性評価法であるロダン鉄法との相関関係が示された。第2章では、CL法で209種類の食用・薬用植物の検索を行なった。高活性を示したセンブリについてCL法を活性指標として活性成分の精製を行い、溶媒分画、各種クロマトグラフィー等により6種類のxanthone誘導体を活性成分として同定した。各xanthone誘導体はいずれも抗酸化性を有し、もっとも強いbellidifolinの抗酸化性は合成抗酸化剤BHTと同程度のものであった。第3章では、水系での水溶性成分の還元性評価系として、オキシミオグロビン（MbO₂）からメトミオグロビン（metMb）への酸化抑制を指標とする方法（MbO₂法）の開発を行なった。MbO₂法によって各種水溶性還元性成分の測定を行った結果、アスコルビン酸がもっとも高い還元性を示した。没食子酸は低濃度では酸化抑制・還元効果を示したのに対し、高濃度添加では逆に酸化促進傾向、すなわちpro-oxidant作用が認められた。本pro-oxidant作用はカタラーゼ添加により抑制されたため、過酸化水素などの活性酸素種の発生に由来すると考えられた。既存の還元性評価法であるフェリシアナイド還元法、XTT法では、高濃度没食子酸のpro-oxidant作用は評価ができなかった。MbO₂法は操作性、簡便性では既存法に劣るが、既存法で測定不能な還元性成分のpro-oxidant作用などを評価できることが示唆された。第4章ではMbO₂法で55種の食用植物の検索を行ない、高活性を示したパプリカなどを対象に検討を加えたところ、活性植物の還元性の殆どはアスコルビン酸に由来することが示された。第5章では、ネグトロ様マグロ加工品の変色防止を目的として、第3、4章の検討で有効性が認められたアスコルビン酸、カタラーゼ、パプリカの応用を試みた。その結果、アスコルビン酸の還元性を利用して、長期間の-18℃保管後にも解凍、開封後に変色せず商品価値を保つネグトロ製品の製法（酸素透過性包装材料+低濃度アスコルビン酸添加、酸素非透過性包装材料+高濃度アスコルビン酸添加）を確立した。

以上、これらの研究結果は、天然抗酸化性・還元性成分の検索、活性成分の単離精製などに有効に応用できる抗酸化性・還元性評価系を新規に開発し、その評価系を用いて新規抗酸化性成分の探索や還元性成分の活性評価の可能性を示した。それとともに、還元性成分の応用によってネグトロ製品の長期間の冷凍保管を可能とした。本技術は既に産業的に実用化されるなど、高く評価されている。よって、審査員一同は、これを博士（農学）の学位を授与するに値すると判定した。