

活性酸素消去能評価を目的とする シーケンシャルインジェクション分析法の開発

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
生命薬科学専攻 薬品分析化学研究室 宮本 葵

[目的]

活性酸素種 (ROS) は反応性に富む酸素分子種の総称であり、生体内で多くの酸化反応に関わっている。ROS は呼吸によって体内に入った酸素が酵素代謝系で代謝されることで生じるが、日常生活のストレス、喫煙、飲酒によっても発生量が増加することが知られている。これら ROS には発生機構や酸化力、寿命の異なるいくつかの種類が存在し、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (1O_2)、次亜塩素酸イオン (ClO^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、一酸化窒素 (NO) 等が知られている。

生体内で生成した ROS は、体内に侵入してくる微生物に対する殺菌作用を有し、感染等から生体を防御している。一方で、過剰に発生した ROS は脂質、タンパク質、DNA 等と反応し、それらの機能を障害することにより、癌、脳梗塞、糖尿病等の疾患の発生や老化の促進等を引き起こす。これらのことから、過剰発生した ROS の消去は疾患の予防及び治療に有効であると考えられており、ROS が関与する疾患の予防及び治療を目的とした抗酸化物質含有医薬品及びサプリメントが注目を集めている。抗酸化物質の有効性の評価等を目的として、これまでに様々な ROS 消去能の測定方法が報告されているが、それらの多くは個々の ROS を区別せずに測定するものである。しかしながら、ROS は種類により性質が大きく異なることから、生体へ与える影響も異なってくると考えられる。従って、より詳細な抗酸化物質の評価のためにも、多種の ROS に対する消去能を個別に測定する必要がある。

そこで本研究では、各 ROS に対する消去能を簡便かつ迅速に測定するために、シーケンシャルインジェクション分析法 (SIA) とルミノール化学発光法 (CL) を組み合わせた方法の開発を行った。SIA 法では試薬及び試料溶液の吸引や混合、吐出等の操作を全てコンピュータで制御でき、測定の簡易・迅速化や自動化が容易な方法である。SIA 法による消去能測定法を確立すれば、抗酸化物質のスクリーニング等において非常に有用な手段となることが期待できる。

[結果と考察]

初めに、5 種類の ROS ($\cdot OH$ 、 O_2^- 、 1O_2 、 ClO^- 、NO) を対象として、これらに対する消去能を個別に測定する SIA-CL 法の開発を行った。一例として ClO^- 消去能測

定のための装置を Fig.1 に示す。

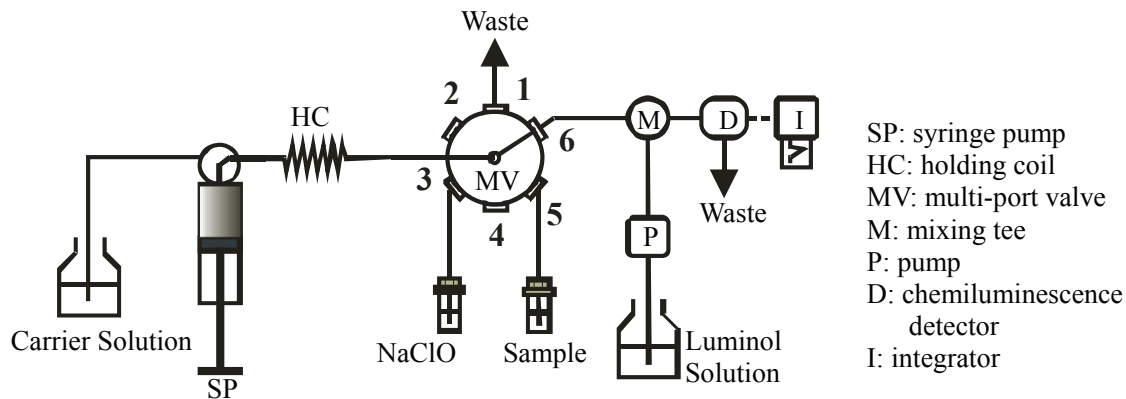


Fig. 1 SIA system for antioxidative activity against ClO^-

各 ROS の測定条件について最適化を行い、確立した SIA 法を抗酸化物質として知られている様々な化合物に適用したところ、これらの ROS 消去能を評価可能であることが確認できた。Fig.2 は ClO^- に対する抗酸化物質の消去能測定結果である。消去能は抗酸化物質の濃度の対数に比例して良好な直線性を示した。

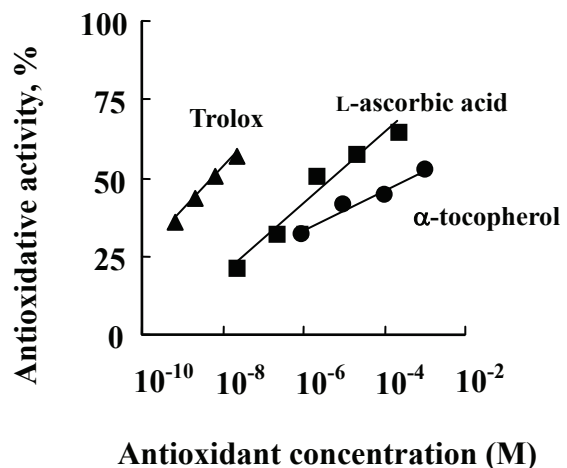


Fig. 2 Antioxidative activity of antioxidants against ClO^-

次に、各種の ROS に対する消去能の同一システムによる連続測定

の可能性を探る目的で、2 種の ROS 消去能測定法の統合を試みた。すなわち、2 台のシリンジポンプ及び 2 台のマルチポートバルブを組み合わせ、 O_2^- 及び NO 消去能の連続測定法を開発した。Fig.3 に開発した装置で測定した NO の特異的なスカベンジャーである 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (C-PTIO) による化学発光シグナルを示す。各々の ROS 消去能を交互に測定する SIA 操作を確立することで、1 検体の 2 種類の ROS に対する消去能を 2 分以内に測定可能であった。また、C-PTIO は濃度増加と共に NO に由来する CL 強度を減少させたが、 O_2^- に由来する CL 強度に影響を与えないことが明らかとなった。

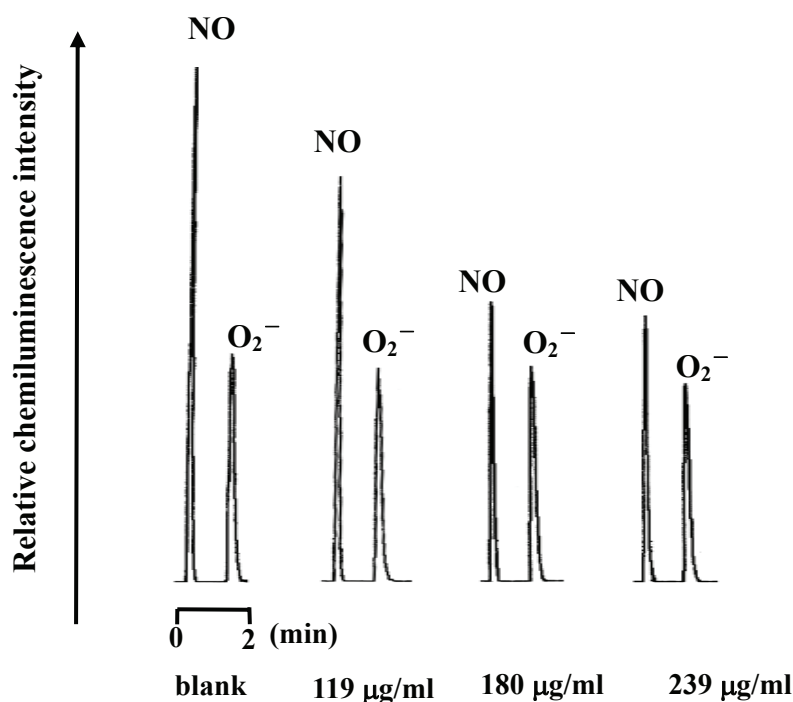


Fig.3 CL signals obtained for blank and C-PTIO

最後に、今回確立した SIA-CL 法を実試料へと応用し、その有用性を検証した。まず、食品及び医薬品の消去能評価への応用として、マルチビタミンサプリメントを用い、抗酸化物質含量と O_2^- 及び NO に対する消去能との関連性について調査した。その結果、抗酸化物質を最も多く含有するマルチビタミンサプリメントが、両 ROS に対し最も強い抗酸化活性を示した。従って、抗酸化ビタミンの含量はサプリメントが有する ROS 消去能に強く関与していると考えられた。次に、生体試料の消去能評価への応用として、健常及び糖尿病モデルマウスの血清が有する ROS 消去能の測定を 5 種の ROS に対して行い、疾患により生体が有する ROS 消去能がどのように変動するかを調査した。その結果、いくつかの ROS について健常マウスと糖尿病モデルマウス血清で消去能の違いが観測され、糖尿病によってもたらされる酸化ストレスにより、血清中の ROS 消去能に何らかの変化が生じている可能性が示唆された。従って、生体試料の ROS 消去能を測定することで、生体が受けた酸化ストレスを評価することが可能であると考えられる。

本研究で開発した SIA 法は、抗酸化物質の ROS 消去能を迅速かつ簡便に測定することが可能であった。従って、ROS が関与する疾患の予防や治療を目的とした機能性食品や薬剤の開発において、また、消去能を有する化合物の探索や生体が受ける酸化ストレス評価のような様々な分野での研究において本法は有用な手段と成り得ると考えられる。