

## 活性酸素種の高感度化学発光計測と生体成分分析及び健康食品評価への展開

和田光弘

**Sensitive Determination of Reactive Oxygen Species by Chemiluminescence Methods and Their Application to Biological Samples and Health Foods**

Mitsuhiro WADA

*Division of Analytical Research for Pharmacoinformatics, Course of Pharmaceutical Sciences,  
Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University,  
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki City 852-8521, Japan*

(Received March 15, 2008)

Sensitive and selective methods, based on chemiluminescence reactions, were introduced for determination of reactive oxygen species (ROS) and their applications to biological samples and health foods. First, a sensitive method for determination of  $H_2O_2$  by peroxyoxalate chemiluminescence (PO-CL) was developed. This method could be applied to determine small amounts of  $H_2O_2$  in cola drinks and bacterial contamination of food items. Secondly, the combination of immobilized enzyme column reactor, or ultraviolet irradiation system, with the PO-CL detection method was able to determine clinical substrates (*i.e.* choline-containing phospholipids, polyamines and D-amino acids) and organic peroxides. Also, an evaluation method of the quenching effect of luminol chemiluminescence against ROS was developed. The sensitive, rapid and precise measurement of the quenching effect against ROS such as superoxide, singlet oxygen, hydroxyl radical, peroxyxynitrite and hypochlorous ion was achieved. The proposed method could be applied to rosemary extracts, natural colorants and grape seed extracts.

**Key words**—reactive oxygen species; chemiluminescence; biological sample; health food

**1. はじめに**

活性酸素ラジカル、過酸化水素等の類縁化合物及び過酸化物を含めた広義の活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) は、ヒトにおいて重要な生理作用を有すると同時にその過剰な発生が疾患発症に深く関与する化合物群である。また食品中での ROS の発生は食品の品質や風味を損なう原因となる。<sup>1)</sup> そのため、生体あるいは日常摂取する食物群の中でこれらの定量は非常に有意義である。また一般にこれらの化合物群は生体において非常に短寿命で、極微量であることから高感度かつ高選択的な測定法が必要となる。

そこで筆者は高感度な過シュウ酸エステル化学発光 (Peroxyoxalate chemiluminescence; PO-CL) あ

るいはルミノール化学発光を用いる ROS 測定法を開発するとともに、これらを生体成分分析あるいは食品の品質評価に応用した。

**2. 過シュウ酸エステル化学発光検出を用いる過酸化水素の高感度測定法の開発とその実用分析への応用**

過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) は、生体中の ROS の一種であり、*in vitro* 試験では酸化ストレスの原因物質として用いられている。<sup>2)</sup> 臨床検査においては酵素反応との組み合わせによる間接的な測定での二次的な標的化合物として測定されている。また  $H_2O_2$  は食品添加物として食品の漂白を目的に用いられているが、弱いながらも発がん性が報告されていることからその測定が行われている。このようにその存在が広範な領域に及ぶ  $H_2O_2$  の高感度な定量法の開発により、広い分野への応用研究が可能になると考えた。そこで、 $H_2O_2$  の高感度な測定法として知られる PO-CL 系による超高感度定量法の開発を検討した。PO-CL 反応は、シュウ酸誘導体、酸化剤、蛍

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻臨床薬学講座医療情報解析学研究室 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

e-mail: m-wada@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、平成 19 年度日本薬学会九州支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

光物質と塩基触媒からなる発光反応であり、その反応機構は、まずシュウ酸誘導体と酸化剤 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) の反応により活性中間体 1 を生じ、これが共存する蛍光物質と電荷移動錯体を形成する。本錯体は不安定であるため、励起状態の蛍光物質と基底状態の二酸化炭素に分解し、ついで蛍光物質が基底状態に戻る際に発光すると考えられている (Fig. 1)。反応機構からも明らかのように PO-CL で生じる発光の量はそれぞれ共存する基質濃度に依存することから、これらを定量することが可能である。<sup>3,4)</sup>

本研究では  $\text{H}_2\text{O}_2$  を分析対象とし、CL 試薬には、PO-CL において強い発光を示すシュウ酸誘導体である bis (2,4,6-trichlorophenyl) oxalate (TCPO) あるいは bis [2-(3,6,9-trioxadecyloxycarbonyl)-4-nitrophenyl] oxalate (TDPO) と、蛍光物質には中島らが合成した、2,4,6,8-tetrathiomorpholinopyrimido [5,4-d]-pyrimidine (TMP)<sup>5)</sup> の組み合わせを用いた。<sup>6)</sup> さらに HPLC や酵素反応あるいは紫外線照射を組み合わせることで分析法に選択性を付加し、これらを臨床化学あるいは食品化学的な研究に応用した。

### 2-1. 過酸化水素の超高感度定量とその応用<sup>7,8)</sup>

$\text{H}_2\text{O}_2$  は逆相系の固定相ではほとんど保持されず、HPLC での分離が困難と考えられていたが、市販

の ODS カラムと水含量の高い溶離液を用いて分離・定量することが可能であった。検出下限 (S/N = 3) は注入量当たり 188 fmol と非常に高感度な分析法を開発することができた。応用として市販のコーラ飲料に適用し、これらが  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含むことを初めて明らかにした。

次に  $\text{H}_2\text{O}_2$  をフローインジェクション分析 (FIA)-PO-CL 検出する方法を用いて、食品に添加した  $\text{H}_2\text{O}_2$  が食品に繁殖したバクテリアの持つカタラーゼにより分解されることを利用して  $\text{H}_2\text{O}_2$  の減少から食品中のバクテリア汚染を簡便・迅速にスクリーニングする方法を開発した。検討では食中毒の原因となる大腸菌、黄色ブドウ球菌、エロモナス菌、シュードモナス菌及び枯草菌がそれぞれ  $10^5$ - $10^6$  個の菌数まで検出可能 ( $3\sigma$  of blank peak) であった。応用として即席スープのバクテリア汚染をモニタリングすることができた。本法は従来の生物発光法や溶存酸素法などと同程度の感度を有しており、さらに食品成分や溶存酸素の影響を受け難い等の利点を有していた。

**2-2. 過酸化水素生成を伴う酵素反応基質の定量<sup>9-11)</sup>** 上述したように CL 法に酵素反応を組み込むことで、分析法により高い選択性を付与することができるため、CL 測定系に  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成を伴う酵

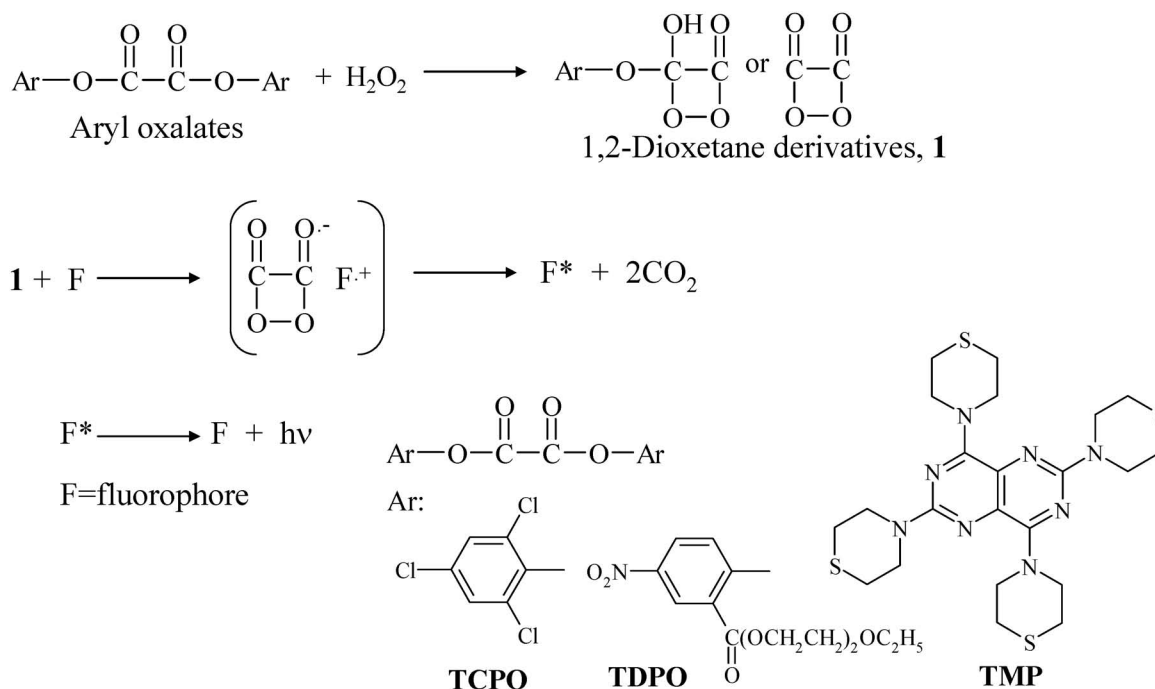


Fig. 1. Reaction Mechanism of PO-CL

素反応を組み込んだ酵素基質の高感度定量法の開発を試みるとともに生体試料への適応を検討した。基質にはコリン含有リン脂質,<sup>9)</sup> アセチルポリアミンやポリアミン群<sup>10)</sup> 及び D-アミノ酸<sup>11)</sup> を用いた。

Figure 2 は D-アミノ酸を分析する際に用いた FIA システムを示している。酵素を固定化したガラスビーズを充填したミニカラムをシステム内に導入し、オンラインで酵素反応を行うことで、FIA システムに注入した基質を  $H_2O_2$  へ変換し、生成した  $H_2O_2$  を CL 検出している。ここでは例としてコリン含有リン脂質の分析について説明する。ミニカラムに充填する固定化酵素にはホスホリパーゼ D 及びコリンオキシダーゼを用いた。本法によりホスファチジルコリン、その lyso-体及び血小板活性化因子などが測定可能であり、注入量当たり 1.5 pmol の検出下限が得られた。Figure 3 は標準リン脂質混合液及びこれを血清に添加した場合のレコーダーレスポンスを示している。また本法での健常人血清の測定結果と市販の測定キットとの相関を検討したところ両者はよく一致しており ( $r=0.936$ )、本法の信頼性を確認することができた。

**2-3. 紫外線照射による有機過酸化物の高感度定量<sup>12)</sup>** PO-CL 法では  $H_2O_2$  に関しては高感度に検出可能であるが、それ以外の過酸化物に対してはその感度は著しく低い。そこでシステム内に紫外線照射装置を組み込んだシステムを用いて有機過酸化物を  $H_2O_2$  に分解後、測定する系を検討した。Figure 4 (A) は  $H_2O_2$  及び紫外線照射後のクメンヒドロペルオキシドのレコーダーレスポンスを示している。紫外線照射することで 60 倍以上の感度の向上が達成された。また紫外線照射による発光種が

$H_2O_2$  であることをカタラーゼ固定化酵素カラムの導入により確認することができた [Fig. 4 (B)]. 本法を用いることで小麦粉の漂白剤として用いられる過酸化ベンゾイルの定量が可能であった。

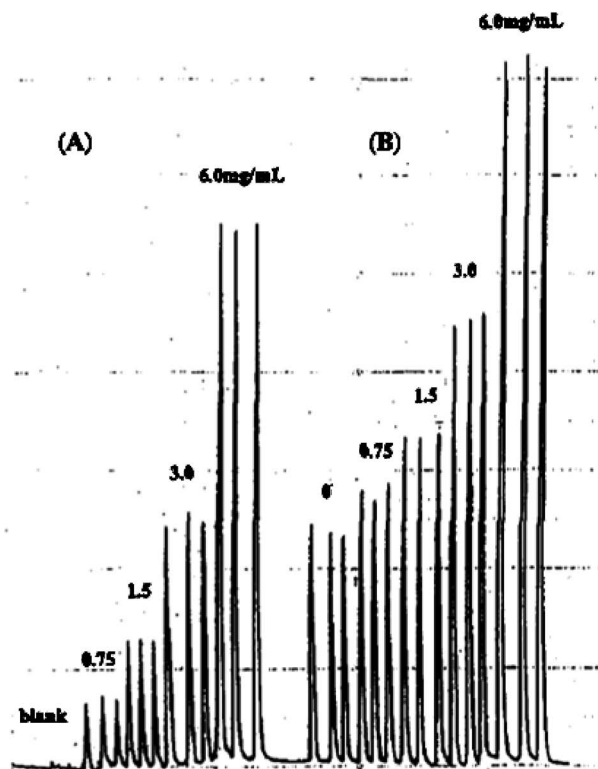


Fig. 3. Recorder Responses of (A) a Standard Mixture of Choline-containing Phospholipids and (B) Spiked Serum

FIA conditions are as in Section 2. Figures on the peaks are the concentrations of phospholipids in a standard mixture or spiked in serum. Printed from Ref. 9) with permission from Elsevier Sciences B.V.

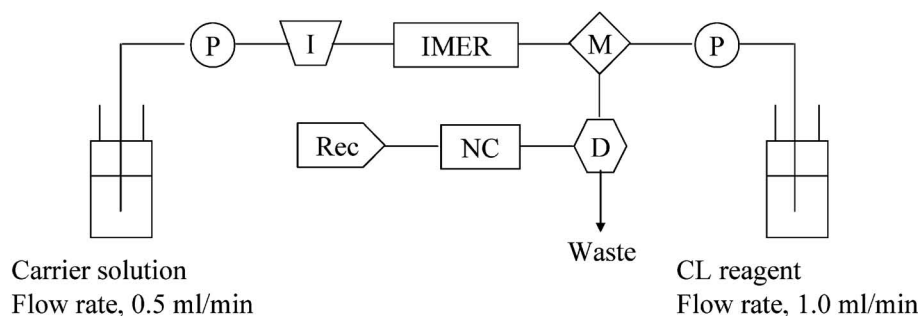


Fig. 2. FIA System for D-Amino Acids Measurement

P: pump, I: injector with a 10- $\mu$ l sample loop, M: mixing tee, D: chemiluminescence detector, NC: noise cleaner, Rec: recorder, IMER: immobilized enzyme column reactor (70 $\times$ 2 mm, i.d.).

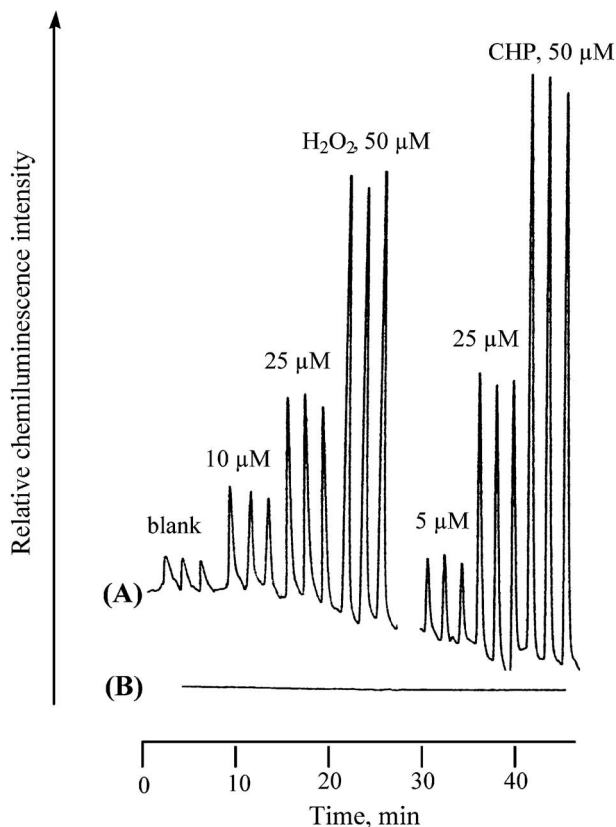


Fig. 4. Recorder Responses for (A) Hydrogen Peroxide and CHP, and (B) Those Obtained with Catalase Treatment  
Printed from Ref. 12) with permission from Elsevier Sciences B.V.

### 3. ルミノール化学発光法を用いる食品添加物あるいは機能性食品における活性酸素種消去能の評価法の開発

近年、国民の健康への関心が大きな高まりをみせ、健康補助食品や機能性食品の摂取により疾病を予防しようという試みが盛んになされている。その中でも抗酸化能あるいは ROS 消去能を有する食品あるいは添加物が注目を集めており、食品添加物やいわゆる健康食品として数多く市場に流通している。よってこれらの品質評価及び管理のための簡便かつ迅速な抗酸化能測定法の開発が望まれている。そこで FIA あるいはバッチ-化学発光検出システムによる簡便・迅速な ROS 消去能の評価法を開発し、これをスタチン系薬物及びその代謝物、<sup>13)</sup> 新規水溶性あるいは非水溶性ローズマリー抽出物、<sup>14)</sup> 多機能食品添加物として期待されるアントシアニン類<sup>15)</sup> 及び 4 種の天然色素<sup>16)</sup> の評価に適用した。ROS 消去能測定には化学発光試薬としてルミノールを使用した。ルミノールはスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) などの種々の ROS と反応し、励起状態のフ

タル酸ジアニオンが生成し、発光を生じる。したがって、ヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ )、パーオキシナイトライト ( $ONOO^-$ ) 及び  $O_2^-$  等の ROS とルミノールとの反応によって生じる化学発光に対して、抗酸化物質含有試料の添加による化学発光の減少率が ROS 消去能となる。ROS の発生反応として、 $O_2^-$  の発生には、ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系を、 $\cdot OH$  の発生には、フェントン反応などを用いており、いずれも水溶液中での発生反応である。<sup>17)</sup>

#### 3-1. ローズマリー抽出物の ROS 消去能評価<sup>14)</sup>

ローズマリーは古くから抗酸化活性を示すことが知られており、食品添加物など様々な用途に用いられている。ここでは水を含む極性の高い抽出液を用いて調製した新規抽出物 (水溶性: WS 及び非水溶性: NWS) と市販のヘキササン抽出物 (A-C) との ROS 消去能の比較を行い、その有用性をバッチ法を用いて評価した。評価した ROS は  $O_2^-$ 、 $^1O_2$ 、 $\cdot OH$ 、 $ClO^-$  及びリノレン酸自動酸化物である。用量-反応曲線から  $EC_{50}$  値を算出したところ、いずれの新規抽出物でも有意に高い消去能を示した。検討した ROS 消去能を Fig. 5 にレーダーグラフとしてまとめた。面積が大きいほど消去能が高く、新規 WS 抽出物とヘキササン抽出物を比較した場合、明らかに異なるパターンを示すことが分かり、各抽出物中での抗酸化成分の違いが予想された。ローズマリー中の水溶性抗酸化成分として知られるロスマリン酸やメトキシルテオリン-2-グルコシド (MLG) とパターンが類似していることから WS 抽出物でもこれらが抗酸化成分であることが推察された。

#### 3-2. 機能性天然色素の ROS 消去能評価<sup>12)</sup>

健康志向の高まりから、食品着色料として天然由来のものが多く用いられてきている。そこでこれまで ROS 消去能が知られていない着色料として用いられている天然色素の ROS 消去能を測定し、多機能食品添加物としての評価を行った。分析対象として紅こうじ (主成分: アザフィロン色素)、赤大根 (主成分: アントシアニン)、くちなし黄 (主成分: カロテノイド類) 及びくちなし青 (主成分: イリドイド色素) を用い、対照としてブドウ種子抽出物を用いた。ぶどう種子抽出物や赤大根で強い消去能を示したが、このほかにくちなし黄及びくちなし

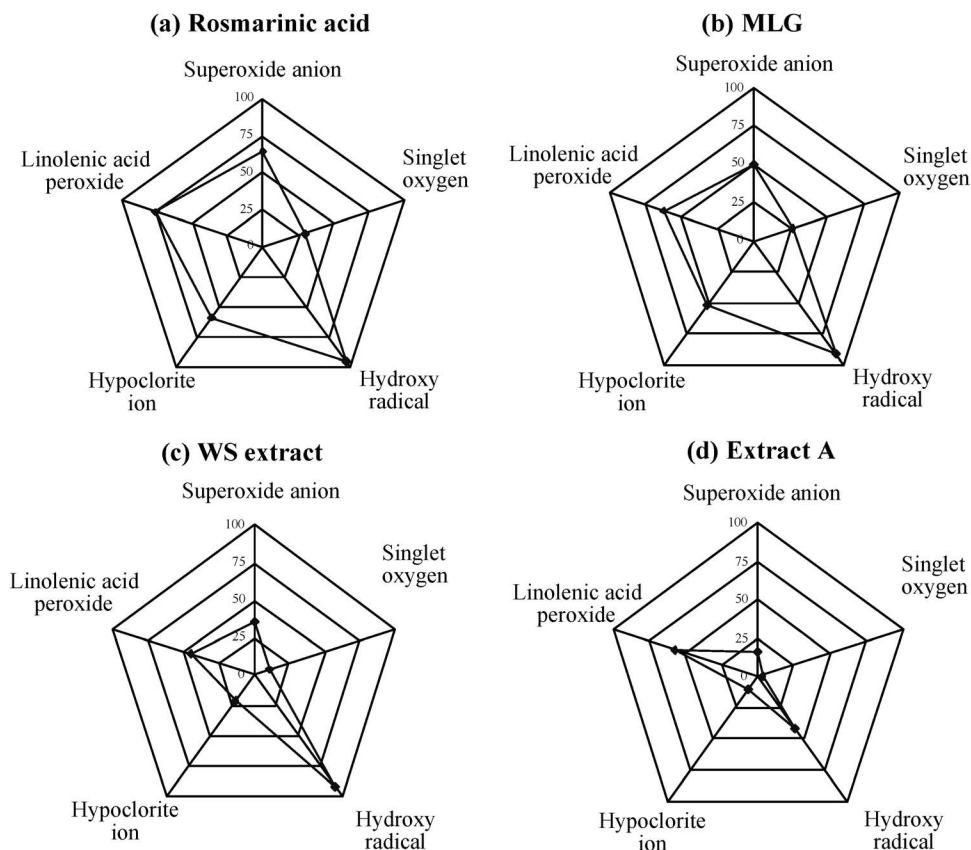


Fig. 5. Quenching Profile of Rosmarinic Acid (a), MLG (b) WS extract (c), and Extracts with Hexane (d) on Active Oxygen Species

Sample concentration, 0.2 mg/ml (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in final concentration). Printed from Ref. 14) with permission from Elsevier Sciences B.V.

青でも消去能を示すことを新たに明らかにした。現在、食品にむやみにアスコルビン酸などの抗酸化剤の添加を行うことで逆に食品中に ROS を生じさせる結果になることが問題になっているが、このように新たな消去能を有する添加物を見つけることで、食品への不要な添加を少なくすることができると考えている。

**3-3. FIA によるブドウ種子抽出物及びポリフェノールの ROS 消去能評価<sup>13)</sup>** これまでの消去能測定系を FIA に適用し、より迅速、簡便性さらには経済性に優れる分析法の開発を行った。FIA システムではキャリアー溶液と ROS 発生を引き金となる試薬の送液を行い、これに抗酸化試料とルミノールの混液を注入し、その発光を測定した。分析対象には、ぶどう種子抽出物とこれに含まれるポリフェノール類（カロコン、デルフィニジン、シアニジン、ペラルゴニジン及びレスベラトロール）を選択した。

Figure 6 には、 $\cdot\text{OH}$  及び  $\text{ONOO}^-$  に対するシアニ

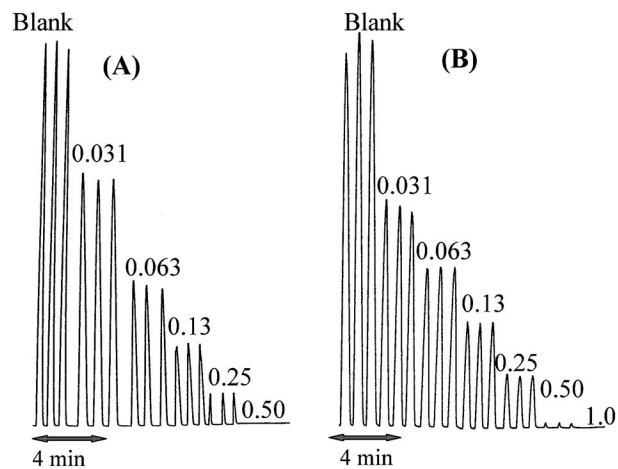


Fig. 6. Recorder Responses of Cyanidin against  $\cdot\text{OH}$  (A) and  $\text{ONOO}^-$  (B)

The numbers above peaks showed the sample concentrations ( $\mu\text{g}/\text{assay}$ ). FIA conditions were shown in Experimentals. Printed from Ref. 15) with permission from The Japan Society for Analytical Chemistry.

ジンのレコーダーレスポンスを示している。このように基質濃度に依存して発光の減少がみられ、1回の測定時間は1分以内と迅速な測定が可能であっ

た。用量-反応曲線から各 ROS に対する EC<sub>50</sub> 値を算出し、その消去能の評価を行ったところ、ポリフェノールの前駆物質であるカロコンでは全く消去能を示さなかったが、ポリフェノール類ではフラボノイドの B 環に相当する芳香環の水酸基の数に消去能が依存する傾向がみられた。この結果は他の抗酸化実験<sup>18)</sup>と同様であり、今回検討した水溶液中での各 ROS に対しても B 環の水酸基の数が ROS 消去能に寄与していることを明らかにした。本法は既報の抗酸化能評価法に比べ簡便、迅速かつ安価に ROS 消去能が測定可能であるという特徴を有していた。今後、生体試料の ROS 消去能測定法開発への展開が期待される。

### 5. まとめ

化学発光検出を用いて分析法の高感度化を図ることのメリットとして、1) これまで知られていなかった食品中の過酸化物の混在を明らかにすることができる、2) 測定に必要な試料量の削減が可能となる、などが挙げられる。特に後者は臨床検査など少量の試料で多項目の測定が求められる領域において非常に有用である。今回開発した分析法は、いずれも化学発光法を駆使した「実用分析」への展開を指向しており、報告された研究成果は薬学、臨床化学あるいは食品化学的な分野において有用であると考えられる。

**謝辞** 本研究に際し、長年に渡り懇切な御指導、御鞭撻頂いた長崎大学 中島憲一郎教授に心より感謝の意を表します。また多くの貴重な御助言と御指導頂きました長崎大学 黒田直敬教授並びに秋山修三名誉教授に深謝致します。長崎国際大学 大庭義史教授、長崎大学 中島弥穂子准教授、岸川直哉講師、大山 要助教及び三菱化学 城戸浩胤博士の諸氏には本研究において有益な御協力、御支援頂きましたこと、ここに御礼申し上げます。研究遂行には、医療情報解析学研究室の大学院生、4年生に多くの御協力を頂きましたこと感謝致します。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費の助成によりなされました、併せて御礼申し上げます。

### REFERENCES

1) Halliwell B., Gutteridge J. M. C., "Free Radicals in Biology and Medicine: fourth edi-

tion," Oxford University Press Inc., New York, 2007, pp. 1-267.

- 2) Jeffers P., Kerins S., Baker C. J., Kieran P. M., *Biotechnol. Prog.*, **23**, 138-145 (2007).
- 3) Li F., Zhang C., Guo X., Feng W., *Biomed. Chromatogr.*, **17**, 96-105 (2003).
- 4) Tsunoda M., Imai K., *Anal. Chim. Acta*, **541**, 13-23 (2005).
- 5) Nakashima K., Akiyama S., *Dyes Pigm.*, **12**, 21-26 (1990).
- 6) Nakashima K., Kuroda N., Kawaguchi S., Wada M., Akiyama S., *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**, 185-191 (1995).
- 7) Nakashima K., Wada M., Kuroda N., Akiyama S., Imai K., *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 2111-2126 (1994).
- 8) Wada M., Kabashima T., Kuroda N., Yoshimoto T., Katoh H., Hayashida S., Nakashima K., *Bunsekikagaku*, **51**, 123-126 (2002).
- 9) Wada M., Nakashima K., Kuroda N., Akiyama S., Imai K., *J. Chromatogr. B*, **678**, 129-136 (1996).
- 10) Wada M., Kuroda N., Ikenaga T., Akiyama S., Nakashima K., *Anal. Sci.*, **12**, 807-810 (1996).
- 11) Wada M., Kuroda N., Akiyama S., Nakashima K., *Anal. Sci.*, **13**, 945-950 (1997).
- 12) Wada M., Inoue K., Ihara A., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N., *J. Chromatogr. A*, **987**, 189-195 (2003).
- 13) Nakashima A., Ohtawa M., Iwasaki K., Wada M., Kuroda N., Nakashima K., *Life Sci.*, **69**, 1381-1389 (2001).
- 14) Wada M., Kido H., Ohyama K., Kishikawa N., Ohba Y., Kuroda N., Nakashima K., *Food Chem.*, **87**, 261-267 (2004).
- 15) Wada M., Katoh M., Kido H., Nakashima N. M., Kuroda N., Nakashima K., *Bunsekikagaku*, **55**, 931-936 (2006).
- 16) Wada M., Kido H., Ohyama K., Ichibangase T., Kishikawa N., Ohba Y., Nakashima M. N., Kuroda N., Nakashima K., *Food Chem.*, **101**, 980-986 (2007).
- 17) Cynshi O., Takashima Y., Katoh Y., Tamura K., *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**, 261-269 (1995).
- 18) Choi H. Y., Jhun E. J., Lim B. O., Chung I. M., Kyung S. H., Park D. K., *Phytother. Res.*, **14**, 250-253 (2000).