

V 農産物・食品の抗酸化能評価法開発と測定の意義

1. はじめに

ヒトのような好気性生物は、呼吸により酸素を取り込んで生きるためのエネルギーを生産している。このとき体内に取り込まれた酸素の一部は、エネルギー代謝の際に電子伝達系において還元を受け、スーパーオキシド（アニオン）ラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) および一重項酸素 (1O_2) などの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) と呼ばれる物質に変わる (表1)¹⁾。このような活性酸素種は、もともと、細菌やウイルスの感染時におけるマクロファージの病原体排除機構をはじめとする生体防御に関わるなど、健康維持に重要な役割を果たしている。しかし、反応性が非常に高いため、ひとたび過剰となると生体中のタンパク質や脂質、あるいは核酸などの高分子と反応してタンパク質の変性や過酸化脂質の生成、遺伝子傷害などを起こし、これが生活習慣病の発症や老化の促進をもたらすと考えられている。

これらの生体成分の酸化傷害を防ぐために、生体にはスーパーオキシドディス

表1 生体内でのフリーラジカル・活性酸素種の発生

	生成する活性酸素種 ・フリーラジカル	成因	生成する場所
内因性 (細胞内)	$O_2^{\cdot-}$	呼吸鎖からの電子の漏洩	ミトコンドリア
	$O_2^{\cdot-}$	NADPH-Cu+P-450還元酵素	小胞内
	$O_2^{\cdot-}$	P-450	核
	H_2O_2	グリコール酸オキシダーゼ	ペルオキシソーム
	NO	尿酸オキシダーゼ NOS	細胞質
内因性 (細胞外放出)	$O_2^{\cdot-}$, NO, H_2O_2	活性化(免疫反応)	マクロファージ
	$O_2^{\cdot-}$, NO, OCl^- , H_2O_2	活性化(免疫反応)	好中球
	$O_2^{\cdot-}$, NO, H_2O_2	活性化(免疫反応)	血管内皮細胞
	NO	情報伝達(記憶形成など)	中枢神経細胞
外因性	フリーラジカル	薬物(代謝)	肝細胞小胞体
	フリーラジカル	食物、アルコール(代謝)	肝臓・消化管
	OH^{\cdot} , LO^{\cdot} , $\cdot OOH$, LOO^{\cdot}	金属(過酸化物の分解)	
	OH^{\cdot} , $\cdot OOH$	光・紫外線	皮膚・眼
	$\cdot OH_2$	放射線	不特定
	$O_2^{\cdot-}$, NO	熱(炎症、免疫反応)	
	OH^{\cdot}	超音波	
	NO, NO_2 , フリーラジカル	タバコ	肺胞・口腔・食道
	NO_x	大気汚染物質 酸素・オゾン	肺胞 眼・肺
	$O_2^{\cdot-}$, NO	病原体(免疫反応)	
$O_2^{\cdot-}$, NO, OCl^-	虚血-再灌流(免疫反応) 精神的ストレス	血管内壁	

ムターゼ (SOD) やカタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼのような活性酸素種を除去するメカニズムが備わっており, それと同時に, 生体中に存在する低分子量の抗酸化物質もその除去に働いている。しかし, 加齢等により活性酸素の除去能力が一部低下することに加え, 現代では大気汚染や紫外線などの環境要因や喫煙等の生活習慣, 精神的ストレスなどにより, 生体内での活性酸素種の産生と除去のバランスが崩れやすくなっている。そのため, 活性酸素種を消去しきれない, つまり酸化ストレスを受けやすい状況であると言える。このことから, 生体に備わったメカニズムに加え, 食事等により外部から抗酸化物質を体内に取り入れることが健康の維持に重要と考えられるようになってきている。

2. 抗酸化能²⁾とは

抗酸化能とは酸化を防ぐ能力のことを指し, 食品等の酸化変性を防ぐ機能から, 植物や動物などの生体防御機能までを含む非常に広い範囲の概念である。一般に, 生体調節機能の中で抗酸化能と称する場合には, 特に生体中において生体成分 (脂質・タンパク質・核酸など) の酸化を抑制する作用を指すことが多い。このような抗酸化作用, 生体の持つ酸化傷害に対する防御機構には, 大きく分けて4つの段階があると考えられている³⁾。1番目が酸化ストレスの原因となる内因性・外因性の活性酸素種・フリーラジカルそのものの発生を防ぐこと (予防的抗酸化物質: preventive antioxidants), 2番目がフリーラジカル等の捕捉による連鎖反応開始の抑制や連鎖反応成長の阻止 (ラジカル捕捉型抗酸化物質: radical-scavenging antioxidant), 3番目が障害を受けた生体分子の修復や再生 (修復・再生型抗酸化物質: repair and *de novo*), そして最後の4番目が必要に応じて抗酸化酵素などを産生し, 特定の場に遊走させること (適応機能: adaptation) である。

ラジカル捕捉型抗酸化物質は, ラジカル反応の抑制や連鎖的酸化反応の担い手となるものを捕捉する活性を有する物質であり, 一般的な抗酸化物質として考えられている。このため, 特に農産物・食品の抗酸化能としては, 直接的にこの活性を示す場合が多い。フリーラジカルや活性酸素の反応性はその種類によって異なり, 反応性と安定性 (寿命) はほぼ反比例しており, さらに生体膜の透過性も拡散という点から重要となる (表2)⁴⁾。たとえば, ヒドロキシルラジカルの場合, それ自体の反応性が非常に高いことから, 抗酸化作用の発現には抗酸化物質の反応性の高さよりも, 濃度の方が重要と考えられている。このように, 活性酸素種の中でも反応性や反応機構などに違いがあることから, それらの除去作用を示す抗酸化物質の種類にも違いが生じていると考えられる。

3. 農産物・食品の抗酸化能測定の意義

我が国は, 2007年に総人口に対して65歳以上の高齢者人口が占める割合 (高

表2 活性酸素種・フリーラジカル等の反応性

活性酸素種・フリーラジカルの種類	多価不飽和脂肪酸からの活性水素引き抜き($M^{-1}s^{-1}$)	二重結合への付加($M^{-1}s^{-1}$)	寿命	生体膜透過性
ヒドロキシル(HO^{\cdot})	10^9	10^9	very short	
チール(RS^{\cdot})	10^7	?	short	
アルコキシル(LO^{\cdot})	10^6	10^6	short	
ペルオキシル(HO_2^{\cdot} , LO_2^{\cdot})	10^2	10		
スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)	0	0		低
過酸化水素(H_2O_2)	0	slow	long	高
ヒドロペルオキシド($LOOH$)	0	slow		
一重項酸素(1O_2)	0	10^5		高
オゾン(O_3)	slow	10^6		
二酸化窒素(NO_2)	slow	slow		高
一酸化窒素(NO)				高
ペルオキシナイトライト($ONOO^{\cdot}$)				
<u>Hypochlorite(ClO^{\cdot})</u>				

吉川:抗酸化物質のすべて(1998)より

齢化率)が21.5%となり、世界で最も早く超高齢社会に突入している。特に、生産年齢人口(15～64才)の減少というだけでなく、健康寿命と平均寿命に男性で9.13年、女性で12.68年という大きな差があり⁵⁾、その間は日常生活に何らかの支障をきたしている(介護等を必要とする)ことから、それに伴う社会的負担の増大などが社会問題となっている。平均寿命と健康寿命との差が拡大すれば、さらなる介護医療費の増大につながることから、「疾病予防と健康増進、介護予防などを通じて、平均寿命と健康寿命の差を短縮し、個人の生活の質の低下を防ぐとともに、社会保障負担の軽減をはかる」という、健康寿命を延ばすための試みが厚生労働省を主体として進められている。

国民の健康寿命を延ばすために、主に生活習慣病の予防を目的として「適度な運動」「適切な食生活」「禁煙」などが推進されている。特に生活習慣病をはじめとする疾病の多くは生体内酸化ストレスの関与が示唆されていることから、「適切な食生活」、つまり食事が重要な鍵となると考えられる。前述のように食品に含有される種々の抗酸化物質は、生体内で生じる活性酸素種を消去し生体成分の酸化を防ぐことにより、健康の維持・増進に寄与すると期待されており、これまで食品の抗酸化能については数多くの研究が行われてきた。たとえば、野菜や果物を多く摂取するグループでは、発症要因として活性酸素種の関与が示唆されている脳卒中などのリスクが低下する⁶⁾ことから、野菜や果物の抗酸化能は疾病リスクの低減に有効ではないかと期待されている。

このような背景から、抗酸化成分の摂取量の目安として、消費者や食品産業界からも生鮮食品や加工食品への抗酸化能測定値の表示に対する期待が高まっている。しかし、体外から摂取する抗酸化物質が、本当に疾病リスクの低下に役立つのか、あるいは有効と判断された場合でも抗酸化物質を総量としてどの程度摂取

すればよいのかなどを明らかにするには、介入研究や疫学研究が求められるが、そのためには農産物・食品に含まれる抗酸化物質の総量を示す基準が必要である。また、食生活の中でどの程度の抗酸化物質量を摂取しているかを知るには、日常摂取する食品に含有される抗酸化物質、あるいは抗酸化能のデータベースが不可欠である。抗酸化物質は種類も多いため、個々の物質の抗酸化能を測定し、その総和を求めることは不可能であることから、抗酸化能を総量として評価するために、多種多様な抗酸化能測定法が開発されてきたが、それぞれに一長一短があり、異なる測定方法では値を比較することができないという問題が生じていた。そこで、抗酸化物質摂取の健康への効果を明らかにするためにも、まずその基礎技術となる農産物等の抗酸化能（抗酸化物質の活性酸素種消去能力の総量）を測るための妥当性の確認された抗酸化能測定法の確立が望まれている。

さらに、妥当性が確認された抗酸化能測定法を用い、我が国の農産物・食品を対象に、品種や栽培条件と抗酸化能の関係、加工・流通条件と抗酸化能の関係、あるいは品目毎の抗酸化能の分布と代表値を明らかにすることにより、抗酸化能を指標とした農産物の高付加価値化と品種選抜・栽培条件の最適化をはかり、高機能農産物の生産につなげることも可能となる。

4. 標準化に向けた抗酸化能測定法の選択

活性酸素種・フリーラジカル等は、前述のとおり反応性が高く寿命が短い、あるいは濃度が低いなどの理由から、そのものを直接測定することは難しい。そこで、抗酸化能の測定においては、フリーラジカル等による反応生成物を測定する方法を中心に検討されている。農産物や食品の抗酸化能の測定は古くから行われており、測定原理が異なる多種多様な方法が開発されてきた（表3）が、同じ抗酸化物質であっても測定方法によって得られる値が異なるため、異なる方法

表3 活性酸素種・フリーラジカル等の反応性

略称	分析方法		分析機器 の汎用性 の有無	生体への 利用可能性	測定メカニズム	検体の親油性 ・親水性
	正式名称	簡便性				
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity	++	+	+++	HAT-based method	+++
TRAP	Total Radical-trapping Antioxidant Parameter	---	--	+++	HAT-based method	--
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasm	+++	+++	--	SET-based method	---
CUPRAC	Copper Reduction Assay	+++	+++		SET-based method	---
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	+	+	-	SET-based method	+++
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay	+	+	-	SET-based method	-
TOSC	Total Oxidant Scavenging Capacity	-	-	++	HAT-based method	---
LDL oxidation	Low-Density Lipoprotein Oxidation	-	+++	+++	HAT-based method	---
PHOTOCHEM	Photochemiluminescence	+	--	++	?	+++

AOU研究会ウェブサイト (<http://www.antioxidant-unit.com/>) より抜粋

による測定値を相互に比較することはできない。例えば、渡辺らは我が国で古くから使用されてきた DPPH ラジカル消去活性測定法と後述する ORAC 法を用いて抗酸化物質を測定し、その相関性を報告している⁷⁾。それによれば、抗酸化能の測定原理が前者は ET (electron transfer) 反応であるのに対し、後者は HAT (hydrogen atom transfer) 反応 (表 4) と異なるため、ほとんど相関は認められていない。このことは、抗酸化能の測定値を比較するためには統一された方法で測定することが必要であることを示している。さらに、抗酸化能の表示を見据えた場合、誰がどこで分析しても同じような測定値が得られること (妥当性) が確認された方法を用いることが必要となる。そこで、我々はこれまでに報告された抗酸化能評価法のうち、酸素ラジカル吸収能力 (oxygen radical absorbance capacity: ORAC) 法を選定し、測定法の妥当性確認を行うこととした。その理由として、ORAC 法は 1) 脂質過酸化連鎖反応に重要な役割を果たすペルオキシラジカルに類似したラジカルを用いた中性付近の pH での反応系を用いる。2) そのため、血清や臓器のホモジネートなどの生体成分も同一の基準で評価可能であり、たとえば抗酸化物質を実験動物に投与し、その前後の血清抗酸化能の変化などを追うこともできるなど測定結果の生体適合性が高い。3) 蛍光プレートリーダーでの測定が可能で汎用性が高く、測定のコストが安価であるなどの面で優位であると考えられるためである。また、ORAC 法ではカロテノイドなどの有する抗酸化能である一重項酸素消去活性を測定できないことから、愛媛大学で開発された一重項酸素消去活性 (singlet oxygen absorption capacity: SOAC) 法についても、測定法の改良と妥当性確認を行っている。

5. ORAC 法の妥当性確認

ORAC 法は、96 穴 マイクロプレートを用い、試料と蛍光プローブである fluorescein の混合液にラジカル発生剤である AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) dihydrochloride) を加えてペルオキシラジカル (ROO^\cdot) を発生

表 4 抗酸化活性測定法の反応機序

	HAT-based method (Hydrogen atom transfer: 水素原子供与)	SET-based method (Single electron transfer: 一電子供与)
測定機序	抗酸化物質がラジカルに水素原子を供与することにより、基質の酸化を抑制する。	抗酸化物質がラジカルや酸化物などに一電子を供与することにより、基質を還元する。
特徴	反応が速い。 測定が pH や溶媒に依存しない。 水素原子が移行する反応はラジカルの連鎖反応に重要な反応であることから、より生体に関連性が高い。	反応が遅い。 測定が pH に依存する。 抗酸化物質が持つ還元力はラジカル除去活性には直接関連しないが、抗酸化物質として重要なパラメーターである。
測定系の例	ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant parameter) TOSC (Total Oxidant Scavenging Capacity) LDL (Low density lipoprotein) 酸化反応	FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) CUPRAC (Copper Reduction Assay) TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去

させ、このペルオキシラジカルにより分解される fluorescein の蛍光強度の低下を経時的に測定し、その減少曲線下の面積 (AUC: area under the curve) を求める方法である⁸⁾。このとき、抗酸化物質 (もしくは Trolox (トロロックス): ビタミン E 類似物質) の存在下で測定した AUC からブランクの AUC を引いた差 (net AUC) を計算して、濃度既知の Trolox における net AUC に対する相対値を求め、抗酸化能を Trolox 当量に換算して表す (図 1)⁷⁾。

農産物・食品には種々の抗酸化物質が含まれるため、ORAC 法で抗酸化能を測定する際は、親水性の抗酸化物質はリン酸緩衝液 (水溶性の反応系) 中で測定する親水性 ORAC (H-ORAC) で評価し、親油性抗酸化物質は親油性 ORAC (L-ORAC) で測定する。H-ORAC 値は原法ではアセトン: 水: 酢酸 70: 29.5: 0.5 の組成からなる混合溶液に抽出される画分の測定値であり、ポリフェノールやアスコルビン酸などに由来する抗酸化能を評価する。それに対し、ヘキサン: ジクロロメタン 1:1 の溶液に抽出される親油性画分を L-ORAC 値として測定する。Wu らは、ランダムにメチル化された β -シクロデキストリンを溶解促進剤として使用 (7% β -シクロデキストリンを含む 50% アセトン水溶液) することにより、水溶性の反応系で親油性成分の活性を L-ORAC 値として測定できることを報告しており⁹⁾、L-ORAC は脂溶性ビタミンであるトコフェロールやゴマリグナンなどの測定に用いられる。

ORAC 原法では、Trolox 標準液もしくは試料溶液 (20 μ L) の 75mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 希釈液と 94.4nM フルオレセイン溶液 / 75mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 200 μ L) の混合液に、31.7mM AAPH 溶液 / 75mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 75 μ L) を加え、蛍光強度 (Ex 485nm 近傍, Em 530nm

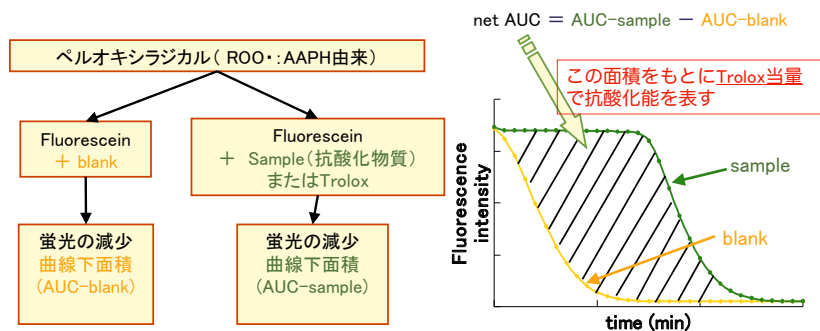


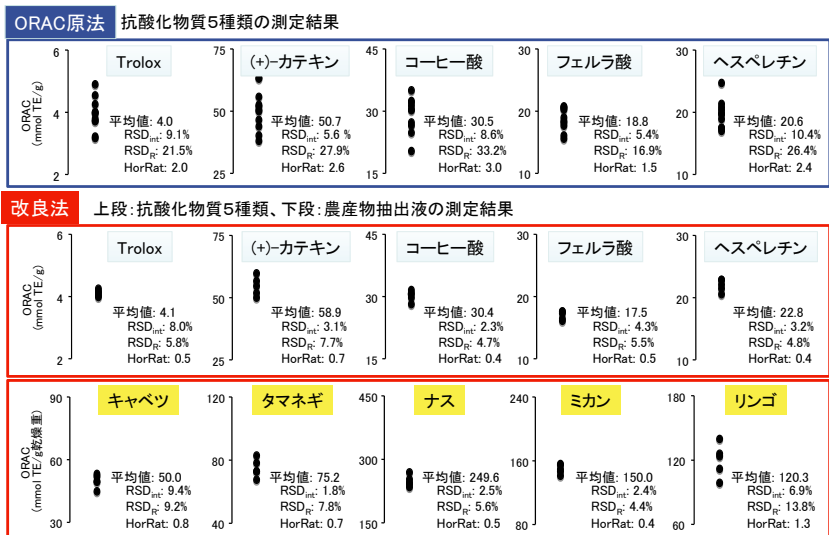
図 1 ORAC (酸素ラジカル吸収能力) 法測定原理

AAPH 由来のペルオキシラジカル ($\text{ROO}\cdot$) により分解される Fluorescein の蛍光強度を測定し、抗酸化物質 (もしくは Trolox) 存在下の減少曲線の面積 (AUC: Area Under the Curve) から blank の AUC を引いた差 (net AUC) の、濃度既知の Trolox での net AUC に対する相対値を求め、Trolox 当量に換算して、抗酸化力とする。

近傍)を2分間隔で90分間測定する。しかし、原法に基づいて5種類の抗酸化物質溶液(10.0 mg/L)を用いて測定を行った結果、室間再現性があまり良好ではなく、HorRat値が2を超える物質が存在した(図2上段)¹⁰⁾。そこで、このばらつきの原因を調べた結果、96穴プレートにおけるウェル間の温度ムラ、Trolox標準液や試料溶液の分注精度、AAPH溶液添加後の溶液の不均一さ等の問題が考えられた。また、室間再現精度の低い試料では、測定時における試料溶液の希釈倍率が高いほど、算出されるH-ORAC値が大きくなる傾向が認められた。原法では試料溶液の希釈倍率測定者に委ねられているが、測定時における試料の希釈倍率が測定者間で大きく異ならないよう収束させる工夫が必要であると考えられた。そこで、表5に示したような改良を加え、最終的に改良法の妥当性を確認することができた(図2)。これは、抗酸化能のような機能性評価法で妥当性確認を行った初めての例である。

6. 妥当性が確認された抗酸化能評価法の普及

妥当性の確認された改良H-ORAC法の分析手順書は食品総合研究所のウェブサイト(<http://www.naro.affrc.go.jp/nfri/>)から請求が可能である。ORAC法では前述のように、農産物に含まれる抗酸化成分をポリフェノールやビタミンC



*HorRat: 分析法が妥当かどうかを判断する基準で、ハーモナイズド・プロトコールでは0.5~2.0の間であれば分析法が妥当であるとされる

図2 ORAC原法と改良法による室間共同試験結果

農研機構 2012年主要成果 (www.naro.affrc.go.jp/project/results/2012/310a0_02_54.html より)

のような水に溶けやすい物質とビタミン E のような油に溶けやすい物質に分けて抽出し、それぞれの抗酸化能を測定 (H-ORAC および L-ORAC) し、その和を抗酸化能 (ORAC 値) 総量として表す。そこで、L-ORAC 法についても原法に改良を加えた方法を確立し、妥当性確認のための室間共同試験が終了した¹¹⁾ことから、現在分析手順書の公開に向けた準備を進めている。さらに、農産物・食品の抗酸化能評価にあたっては、凍結乾燥粉末を試料として用いることが多いため、凍結乾燥粉末からの抽出、測定という一連の操作についての妥当性確認も行う予定である。

また、農産物に含有される代表的な抗酸化物質は、ポリフェノールとカロテノイドである。ポリフェノール類の抗酸化能については、ORAC 法により評価できるが、カロテノイドの抗酸化能は作用機序の違いにより ORAC 法で評価することはできない。そこでカロテノイド系抗酸化物質の測定法として、愛媛大学の向井らを中心に一重項酸素消去活性測定法である SOAC (singlet oxygen absorption capacity) 法 (図 3) が確立され¹²⁾、食品総合研究所をセンターラボとする妥当性確認への取り組みが進んでいる。SOAC 法についても、室間共同試験が終了し、妥当性が確認されたことから、論文の公表後に手順書の公開を行う予定にしている。

7. 抗酸化能評価法の今後

今後は、ポリフェノール系抗酸化物質の ORAC 値とカロテノイド系抗酸化物質の SOAC 値を測定することにより農産物の抗酸化能を評価し、疫学研究等を通じて健康に対する影響を明らかにできると考えている。また、本法により測定

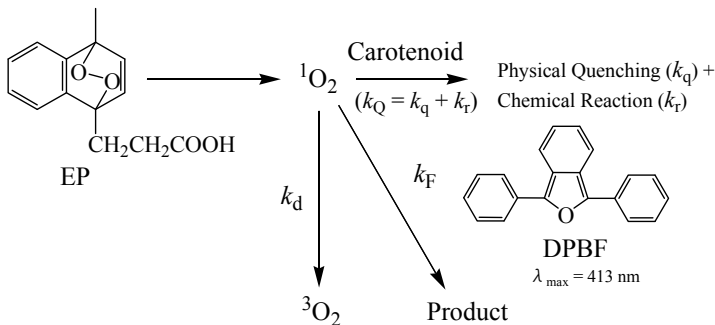


図 3 SOAC (一重項酸素消去活性) 法測定 の原理
(一重項酸素消去速度 (k_Q) 測定法)

EP (エンドペルオキシド) の熱分解により発生する一重項酸素が DPBF (1,3-ジフェニルイソベンゾフラン) を分解し、DPBF の持つ 430nm の特異的吸光が減少する事を利用し、 α -トコフェロールに対する半減期の値から算出する。

した農産物等の抗酸化能データベースの構築も同時に進めている。抗酸化能データベースは抗酸化物質の摂取と健康の維持・向上への関わりを科学的に明らかにするためにも必要であり、さらに農産物の高付加価値化に向けた抗酸化能の表示にも役立つと期待される。

また、食品として抗酸化物質を摂取した場合の生体内での働きを明らかにするためには、消化・吸収による生体への取り込みや、吸収後の存在形態などを明らかにしていく必要がある。ORAC法では血液などの生体成分も測定が可能であることから、動物等に食べさせた後、その血液の抗酸化能を評価する試験と組み合わせることも今後の研究方向として期待される。

8. 謝辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト「安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発」（食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発）および「食料生産地域再生のための先端技術展開事業」において行われた。

（食品機能研究領域 機能性成分解析ユニット 石川 祐子）

引用文献

- 1) 井上正康編著：活性酸素と医食同源 分子論的背景と医食の接点を求めて、共立出版株式会社 (1996)
- 2) 二木鋭雄他編集：成人病予防食品の開発，シーエムシー出版 (1998)
- 3) 二木鋭雄他編：抗酸化物質 フリーラジカルと生体防御，学会出版センター (1994)
- 4) 吉川敏一編著：抗酸化物質のすべて，先端医学社 (1998)
- 5) 厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会 第2回健康日本21（第二次）推進専門委員会資料
<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/sinntyoku.pdf>
- 6) Feng J. He *et al.*: Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies, *Lancet*, **367**(9507), 320-326 (2006)
- 7) 渡辺純他：食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して ORAC法の有用性と他の測定法との相関性，*化学と生物*, **47**(4), 237-243 (2009)
- 8) 沖 智之：ORAC法，食品機能性評価マニュアル集第Ⅱ集，食品機能性評価支援センター技術普及資料等検討委員会編集 p79-86 (2008)
- 9) Xianli Wu *et al.*: Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, **52**(12), 4026-4037

(2004)

- 10) Watanabe J. *et al.*: Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.* **28**(2), 159-165 (2012)
- 11) Watanabe J. *et al.*: Improvement and interlaboratory validation of lipophilic oxygen radical absorbance capacity: Determination of antioxidant capacities of lipophilic antioxidant solutions and food extracts. *Anal. Sci.* **32**(2), 171-175. (2016)
- 12) Ouchi, A. *et al.*: Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoid and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. *J. Agric. Food Chem.*, **58**(18), 9967-9978. (2010)