

平成 22－23 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「全血を用いたヒト代謝系抗酸化能測定キットの開発」

研究開発成果等報告書

平成 25 年 2 月

委託者：九州経済産業局

委託先：株式会社同仁化学研究所

目次

	ページ
第 1 章 研究開発の概要.....	2
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標.....	2
1-2 研究体制.....	4
1-3 成果概要.....	4
1-4 当該研究開発の連絡窓口.....	7
第 2 章 本論	
2-1 技術の説明.....	8
2-2 開発項目【1】測定方法の確認、精度向上.....	11
2-3 開発項目【2】ラジカル種と抗酸化能の相関関係解析.....	19
2-4 開発項目【3】食品摂取によるラジカル変化.....	23
2-5 開発項目【4】商用受託分析実験.....	26
第 3 章 総括.....	29
別紙 別紙 1 開発キットについて.....	30
別紙 2 用語の説明.....	31

備考

1. 認定年度と認定番号

平成 22 年度認定事業（平成 22・08・11 九州第 26 号）

平成 23 年度認定事業（平成 23・04・01 九州第 190 号）

平成 23 年度認定事業（平成 24・02・15 九州第 6 号）

特定研究開発等計画認定番号九州 1 0 0 5 0 4 5

2 テーマと目的

「全血を用いたヒト代謝系抗酸化能測定キットの開発」

3. 実施期間

平成 22 年 9 月 1 日から平成 25 年 2 月 14 日まで

第1章 研究開発の概要

平成 22 年度および平成 23 年度の実施により、全血の抗酸化能を評価する工程を確立することができた。この工程確立においては、サンプルの取り方、保存、輸送方法など、生体から採取する段階から測定までの全てを管理する必要があるということが分かった。但し、個人の全血の抗酸化能の日間差はさほど大きくないと考えられるデータもある。従って、食事、飲酒、喫煙など、消化器系および呼吸器系からの外部物質の取り込みを制限することにより、その人の全血の抗酸化能を把握できるものと考えられる。また、ストレスの掛かり方が全血の抗酸化能に反映する可能性もあり、ストレスもコントロールする必要があるようなデータも出ている。また、全血が高い抗酸化能を示す人と低い人では、発酵食品摂取によって、抗酸化能の亢進の仕方に差がある事がわかり、評価に当たっては、抗酸化能の低い実験動物を使用する必要があると判断された。マウスにおいて抗酸化能の低い動物を作り出すために、ストレス負荷試験を行い、どのようなストレスが抗酸化能を低下させるかを調査した。その結果、通常ストレス負荷では全血の抗酸化能の低下を誘導することができなかった。一晩絶食させることにより、抗酸化能が低下することが分かったため、この条件を使用し、食品摂取の効果を調べた。また、動物種の差がどう反映するかを調べるためブタを使用した。平成 22 年度、23 年度に行ったウサギとヒトを含めた動物実験の結果を総括すると、食品摂取の全血抗酸化能に及ぼす効果は動物種によって異なり様ではないということである。これは、各動物の代謝の違いを反映しているのかもしれないし、摂取時のストレスの掛かり方の違いも関係しているかもしれない。生体という極めて複雑なシステムでの評価のため、これが一概にそれぞれの動物種でその傾向があると結論づけられた訳ではない。今後の更なるデータの蓄積が求められる。

本事業の目的の一つである、抗酸化活性の高い発酵食品の改良については、当初、3 か月熟成後 1 か月加熱加速熟成した味噌（3+1 カ月味噌）が、抗酸化活性が高く、且つ人への摂取によって、全血の抗酸化能が亢進することが確認できたが、醤油麴を用いて調製した味噌については、摂取による抗酸化能亢進は逆の方向になった。

今のところ、抗酸化能を亢進させる発酵食品の改良には、直接繋がっていないが、醤油の持つ抗酸化活性をそれぞれの分画ごとに測定することにより、どの分画部分に抗酸化能の高い成分が入っているかを確認することができた。これは、抗酸化能を持つ分子の確定に繋がると考えられ、サプリメントの効果のある食品となる可能性がある。原料や酵母、発酵工程を細かく検討することにより、新たな機能を持った発酵食品が調製できると考えられ、抗酸化能測定方法は、食品分析の手法となっていくかもしれない。但し、生体の抗酸化能が健康に重要な因子であることが明らかになる必要がある。

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

近年、病気の予防的観点、アンチエイジングの観点から抗酸化能のある機能性食品へ消費者の関心が高い。米国では国立老化研究所の指針に基づいてそれぞれの食品成分の抗酸化力を数値化

し、各食材やサプリメントに表示されてきている。しかしながら、この方法は食品の含有成分だけを対象としたもので、実際に生体内で抗酸化活性があるかどうかの判断には至っていない。日本の食文化の一つである発酵食品は従来法によって抗酸化値を規定できる食品ではなく、発酵食品の抗酸化機能は正当に評価されにくい。摂取した後の生体内での代謝的抗酸化能を測定することにより、極めて多くの成分の混合状態にある食品が持つ本来の総合的な抗酸化活性が評価できると考えられ、そのための手法の開発が必要である。

全血を用いて代謝系での抗酸化活性を測定するには、幾つかの大きな課題がある。一つは、血液に含まれる着色成分や微量金属、タンパク質などが測定に影響を与えること、もう一つは水系でラジカルを捕捉し測定に耐えるほど長時間安定なアダクトを形成する試薬がなかったことである。これらの課題を克服するために、新規試薬を用いより安定なアダクトを形成する方法を確立する必要がある。

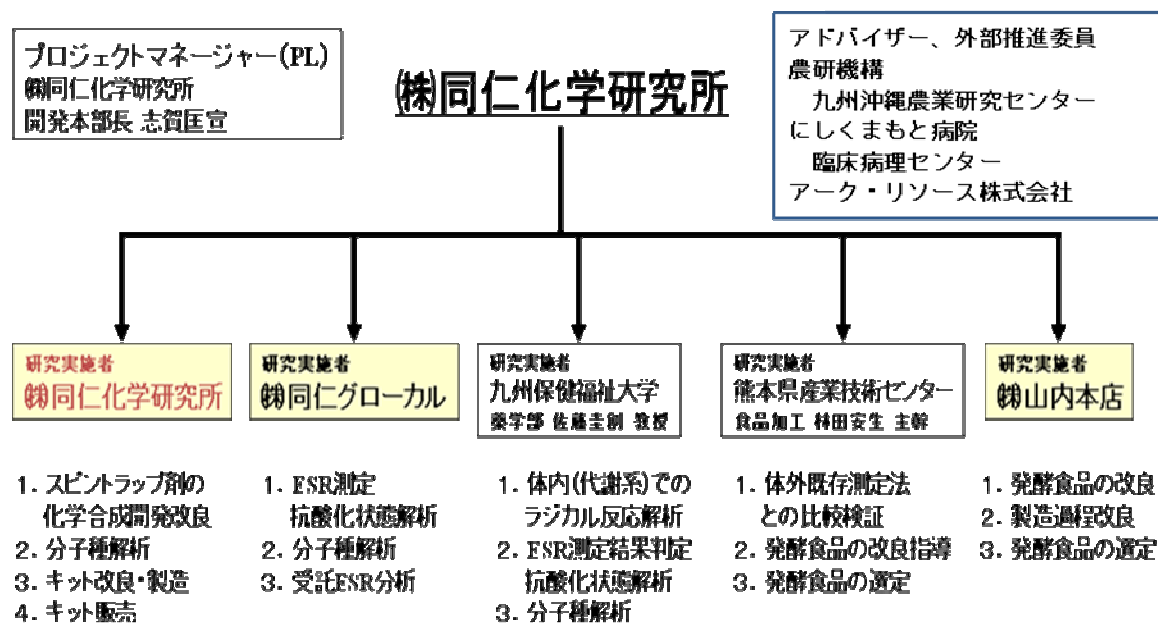
味噌自体の消費量は年々低下傾向にあるため、抗酸化能を謳い機能性食品としての位置付けを明確にすることによって、味噌の消費量を上向かせることができると考えられる。また、新たな発酵プロセスや素材を使用することにより、代謝系で抗酸化能が更に高い発酵食品を作り出すことができる。抗酸化能の変化を測定することは、食材の抗酸化機能を見るに留まらず、各種疾病の指標や投薬による治療効果の検証にも使用できると考えられる。

本事業の目的は、ヒト全血を用いて生体内の抗酸化能を測定できるキットを開発することであり、この事業によって製品化を行うことができた。しかし、生体内の抗酸化能が個人毎に違いがあるのか、あるとすればどの程度の違いか、また、どの程度の時間変化、日間変化があるのか、食事との相関はあるか、その違いや変化は、人が健やかに人生を送る上でどのような意味を持つのかなど、抗酸化が生体に及ぼす効果は明確でなく、本キットを使って疫学的に調査することで、何らかの相関が見えてくる可能性がある。人の平均寿命には地域差があり、これが食事や習慣に起因するものであれば、どのような因子が関与するかを分析する手段となりうる。また、抗酸化機能のレベルを向上させることが疾病の発症を抑制できるとのことになれば、継続的に測定するニーズが生まれる可能性がある。

また、昨年、米国農務省（USDA）の栄養データラボ（NDL）は、食品の抗酸化能の指標としてきた活性酸素吸収能力値（ORAC 値）データベースを彼らのウェブサイトから取り下げた。その理由は、人の健康状態を把握するための臨床試験結果と食品に含まれる ORAC 値で表示される抗酸化活性は相関しないという結果が得られたためである。今のところ、抗酸化能を持つ食品中の成分が直接体内で抗酸化性を示すという証拠もなく、また、抗酸化活性が健康にどう効果があるのかということも分かっていない状況がある。従って、抗酸化活性と健康の相関があるのかどうかを知る事が重要となり、開発された測定法を用いて相関研究が加速すれば、その結果が本事業の最も重要な成果となると考えられる。

1-2 研究体制

研究組織



1-3 成果概要

【1】測定方法の確認、精度向上

【1-1】ラジカルの安定化

- 本項目で目的としていた、Diphenyl-PMPO (DPhPMPO) を使って形成させたスピニアダクトを混合有機溶媒を使って抽出し安定化させて ESR で測定する方法を確立した。
- 商用ベースでの測定法としてキット化、マニュアル化するために、採血から測定までのプロセスを精査しその影響を調べ、測定者間差を含めて測定値の標準偏差を 3% 以内に収めることができた。
- 試薬キットとして製品化するに当たり、コンポーネントである *t*-BuOOH (*t*-ブチルヒドロペルオキシド) 水溶液が不安定であることが分かった。容器と空隙容量、保管温度などを検討した結果、安定化できる条件を見出し、キットの製品化の目途を立てることができた。キットは、個別研究者への展開、データ蓄積、論文化を経て販売へ移行する。

【1-2】試薬合成

- 更に安定なスピニアダクトを形成させるためのプローブ開発を検討したが、DPhPMPO よりも優れた機能を付加することはできなかったため、DPhPMPO の安定化を優先した。

- 主要コンポーネントである DPhPMPO のロット間差を見た。その結果、ESR ブランク値の変動もなく、フェントン反応によるシグナル強度にも差がみられなかった。合成工程を確実に行うことで、データの再現性の高い試薬が調製できることを確認した。

【1-3】発酵食品の抗酸化能の *in vitro*、*in vivo* 実験

- 発酵食品の抗酸化能を *in vitro* で評価し、「純搾り」醤油の抗酸化活性が高いことを見出し、醤油麹を使った「醤油味噌」として「のぼる 2 号」、「のぼる 3 号」を調製した。その結果、通常の味噌よりも *in vitro* での抗酸化活性が高くなることが分かった。
- 「のぼる 2 号」味噌について発酵熟成過程での成分変動の分析を行い、食品分析で一般的に使用される ORAC 法を用いて、それぞれの抗酸化能を測定した。その結果、ORAC 値は通常の味噌の 1.8 倍を示し、そのものの抗酸化活性は高いと考えられる。抗酸化活性は 1 カ月の加熱熟成で 1.7 倍、9 カ月間の加熱熟成によって 1.8 倍となっており、1 カ月の加熱熟成で抗酸化能が十分に亢進することが分かった。抗酸化能亢進は醤油麹の効果である可能性が示唆された。
- 実験動物を使って発酵食品の摂取効果を評価し、ヒト治験を行うこととし、ウサギを使用して、血液の抗酸化能の変動を調べた。その結果、ウサギは塩分に対する耐性が低いこと、草食性であり発酵食品の抗酸化能データをヒト用に代替することは難しいと考えた。そのためマウス、ブタを用いることにした。マウスを絶食させることで血中の抗酸化能が低下することが分かったため、絶食マウスを用いて食品摂取効果を見た。ウサギ、マウスおよびヒト治験で得られたデータと比較する目的で 3 種類の食品摂取による分析を行い、動物種による効果の違いを把握することができた。
- 食品摂取による血液の抗酸化能に及ぼす影響は動物種間で同じではない事が示された。目的とした、発酵食品の抗酸化能が直接ヒト全血の抗酸化能を亢進するという結果は見えておらず、最終的な結論は、開発したキットを使った今後の研究に委ねることになる。

【1-4】実験内容の検証

- 本測定法による全血および血漿の抗酸化能が定量的に測定できることを確認した。血液サンプルをバッファーで希釈したサンプルは、希釈率と高い相関があり、また、10%程度の血液量の差を認識することができた。
- 社内ボランティアとして個人の全血の抗酸化能の日々の変動を観察したところ、 $I_0/I-1$ 表記で 2 倍程度の変動があることが分かった (I_0 : サンプル添加していないラジカル強度、 I : サンプル添加したラジカル強度)。個人の全血の抗酸化能のこの変動が普通に見られるものなのかは分からないが、今後のデータの積上げにより明らかになっていくものと考えている。

【2】ラジカル種と抗酸化能の相関関係解析

【2-1】*in vitro*、*in vivo*でのラジカル種の分子種解析

- 平成 23 年度のウサギおよびヒトの血中ラジカル種の差異・変動解析 (SIEVE) による分子種解析の結果、ESR シグナルと連動する分子が見つかったが、分子構造の同定までには至っていない。但し、定量性のある分子も、再現性よく出てくる分子ではなく、個体間でも同じ分子が検出されてこないという課題があった。今回、さらにマウスおよびブタの血液分析を行ったが、動物種間で共通に検出される分子種は見出されていない。
- 抗酸化能が高かった純搾りの分画成分の分析を行った。その結果、純搾りの成分として 6 種類の分子を検出することができた。血液サンプルの LC/MS 分析データにその 6 種類の分子質量で検索をかけた。しかしながら、6 種類の分子とも、純搾り摂取マウスの血液サンプルからは検出されなかった。消化および代謝の過程において、分子が分解されていることが予想され、そのままでは検出されてこないと考えられた。従って、抗酸化能の発現を促す食品中の分子種を同定するには、単純に ESR のデータと分子量で相関する分子を見るだけでは全く不十分であり、MS/MS 分析や、生体内の代謝機構の中で、どのような分子に変化するかのシュミレーション技術を取り入れた分析が必要であると考えている。

【2-2】血中ラジカル量の変動確認

- 平成 22 年のヒト治験でのサンプルをはじめとして、実験動物としてウサギ、マウス、ブタを使った食品摂取実験で得られた血液サンプル 3000 種類を LC/MS 分析したデータを蓄積した。継続して差異・変動解析ソフト (SIEVE) を用いて、ESR データとの対比を手作業で行っている。数十万種類の分子それぞれについて確認作業を行うのは現実的でなく、上記で述べたようにシュミレーションを取り入れた分析手法が必要になってくる。このデータは将来の解析技術との組み合わせにおいて貴重なものとなると考えられる。

【3】食品摂取によるラジカル変化

【3-1】発酵食品摂取後の血液分析

- 被験者に発酵食品として「3+1 カ月味噌」「のぼる 3 号」と「純搾り」醤油、「ブルガリアヨーグルト」を摂取してもらい、全血の抗酸化能の変動を調べた。その結果、「純搾り」醤油と「3+1 カ月味噌」は被験者の初期抗酸化能値が低いグループではわずかながら摂取後に抗酸化能の亢進が見られ、初期抗酸化能値が高いグループでは変化がなかった。「ヨーグルト」では初期抗酸化能の値に関わらず、僅かに抗酸化能の亢進が見られた。一方「のぼる 3 号」味噌摂取後、全ての被験者の全血の抗酸化能が大きく低下するデータが得られた。思惑とは異なる結果であるが、治験者全員の抗酸化能の変動が採血時間毎でも同じ傾向を示したのは初めてである。通常、抗酸化能の変動は個体間差があると考えていただけに、「の

ぼる 3 号」摂取実験での全血サンプルが、どうしてシンクロナイズしたのかは不明であるし、興味深い結果である。ヒトが持つ何らかの共通の生体機能が「のぼる 3 号」摂取によって働いたことが示唆される。このような「のぼる 3 号」の摂取効果はブタやマウスでは見られない。

【4】 商用受託分析

【4-1】 検体種別毎の測定方法確立

- 本事業の根幹である全血サンプルの測定方法について詳細な検討を行った結果、採血直後の温度管理がデータの再現性を得る上で最も重要であることが分かった。採血直後に測定した数値と、特定の条件の下、輸送された同一サンプルを用いて測定した数値とは高い一致を見た。

【4-2】 検体処理方法の事例検証

- 多数の検体を一度に処理し、それをまとめて ESR で測定することを想定し、DPhPMPO と一般的に用いられる DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide) のスピニアダクトの安定性を評価した。その結果、スピニアダクト形成後に乾燥し固体状態とした DPhPMPO は 140 日以上安定であるという結果となった。一方 DMPO のスピニアダクトは乾燥工程に耐えなかったため、すぐに失活した。以上のことから、DPhPMPO のスピニアダクトは固体状態で長期に保管できるため、ESR がない施設でも本キットを使って ESR 用サンプルとして調製し、受託測定機関にて測定可能である。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

氏名：志賀 匡宣（しが まさのぶ）

所属：株式会社同仁化学研究所 試薬開発本部

電話：096-286-1515

ファクス：096-286-1525

E-mail：shiga@dojindo.co.jp

第2章 本論

2-1 技術の説明

本委託事業の根幹となる測定技術について説明する。ESR(電子スピン共鳴)装置を使ったラジカル分析は、サンプルに含まれる妨害物質の影響を受けにくいと、食品や生体成分の分析に多く用いられている。図1のESRスペクトル例に示すようにサンプルに含まれるラジカル量をシグナル幅として検出できるため、内部標準に用いられている二価マンガンのシグナル幅(Mn)からサンプルに含まれるラジカル量を決定できる。

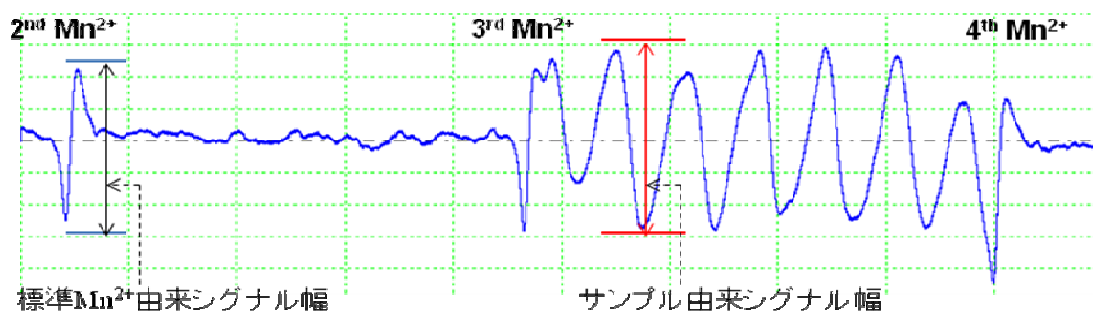


図1 ESR スペクトル例



図2 ESR 装置(日本電子社製 JES-FA100)

ラジカルは高反応性の酸化性物質であり、生体内においては老化やガンなどの疾病の原因物質の一つと考えられている。そのため、抗酸化能のある食品やサプリメントは、老化を抑える効果やガンなどの疾病にかかりにくくする効果が期待できると考えられている。したがって、発生したラジカルを消去する生体の能力が高いほど老化の進行が遅くなり健康体でいられる可能性がある。生体の抗酸化能は、ラ

ジカル消去能で評価することができると考えられるため、図 3 に示すように、ラジカル発生系を組込んで、サンプル添加によって減少するシグナル量から抗酸化能を評価するシステムを構築した。*t*-BuOOH はヘモグロビン触媒により各種ラジカルを発生する。そのラジカルを生体サンプル中の抗酸化性物質が消費し、消費されなかったラジカルは ESR プローブである DPhPMPO と反応してスピニアダクトを形成する。有機相へ抽出される安定なスピニアダクトは ESR で検出される。シグナル強度が小さくなれば *t*-BuOOH 由来のラジカルと反応する抗酸化性物質があることになり、減少量が抗酸化性物質の量とみなすことができる(図 4)。

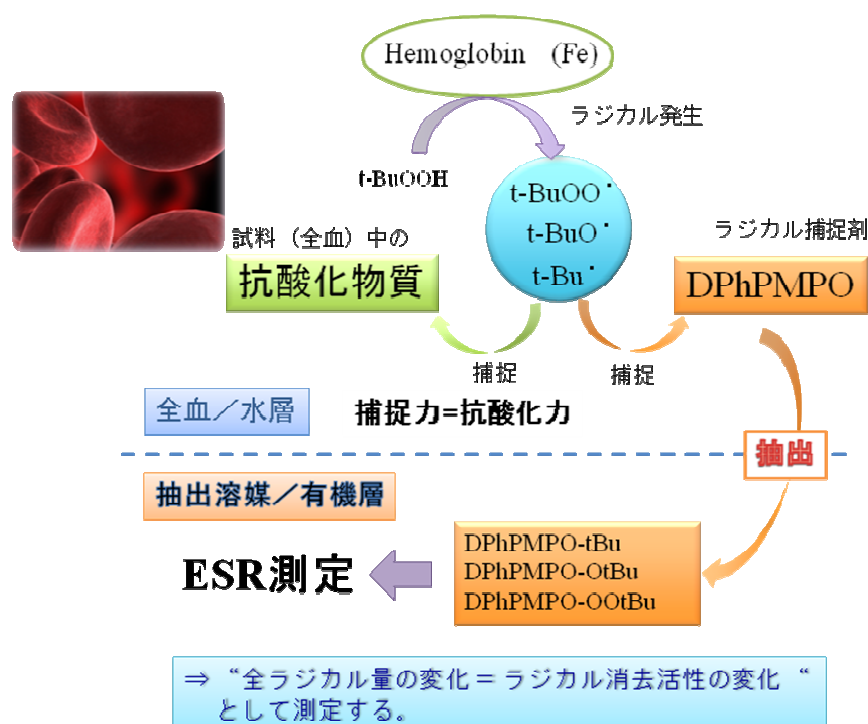


図 3 試料中の抗酸化物質の測定原理

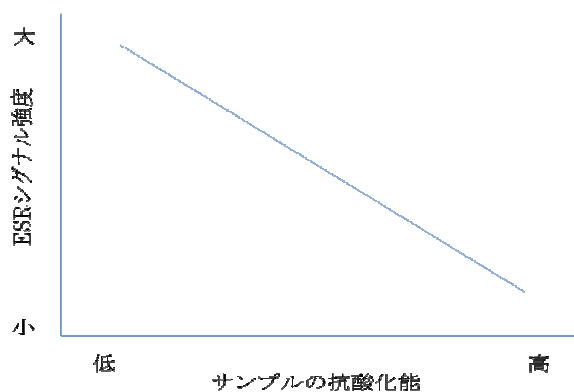
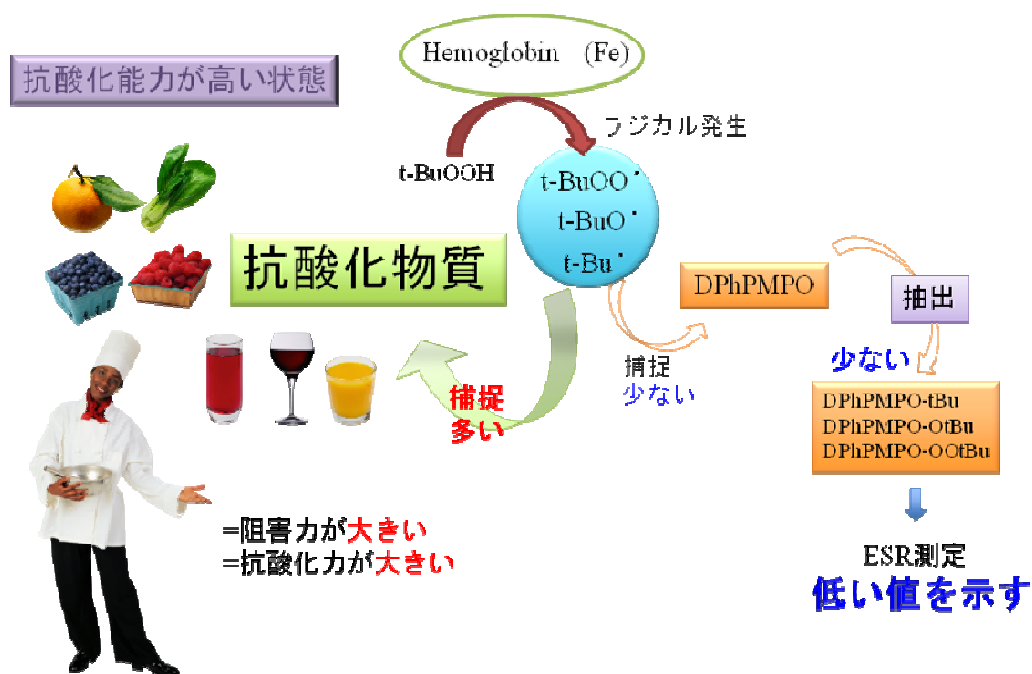
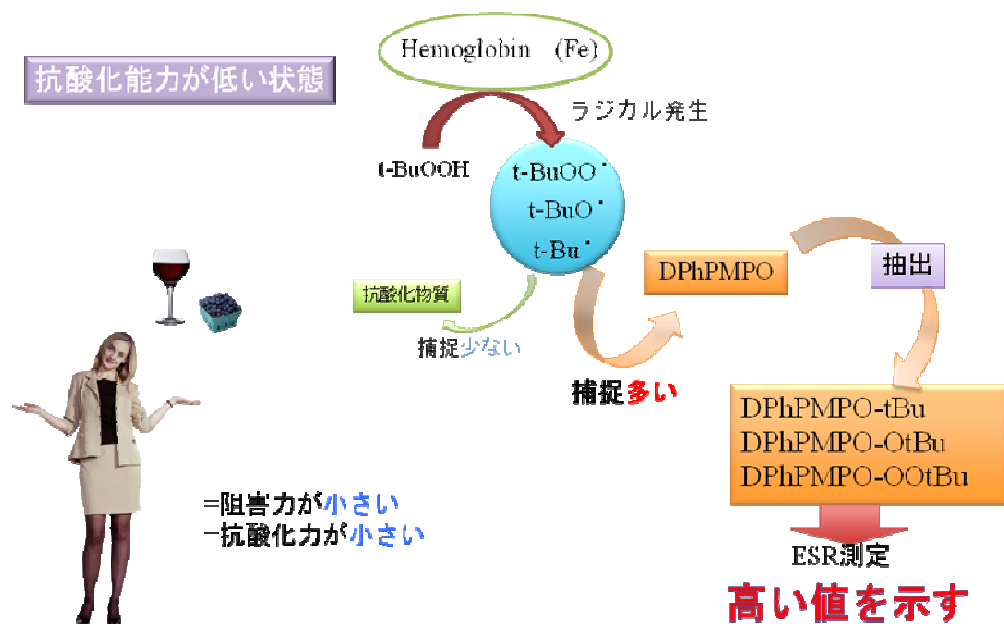


図 4 サンプル中の抗酸化能と ESR シグナルの関係

抗酸化能力が高い状態と低い状態での ESR 測定値への影響を下の図で示す。抗酸化性物質が多く存在している場合、発生したラジカルは抗酸化物質により捕捉され、結果的に DPhPMPO と反応し抽出されるスピニアダクトの量は少なくなる。



逆に、抗酸化性物質が少ない場合は、発生したラジカルの抗酸化性物質による消費量は少なく、多くのラジカルは DPhPMPO と反応し抽出されるため、スピニアダクトの量は多くなる。従って、スピニアダクトの量を測定することにより、サンプル中の有機ラジカルと反応する抗酸化性物質の絶対量を知ることができる。



2-2 開発項目【1】測定方法の確認、精度向上

2-2-1 開発項目【1-1】ラジカル安定化

DPhPMPO とそのスピニアダクトの分子構造を図 5 に示す。

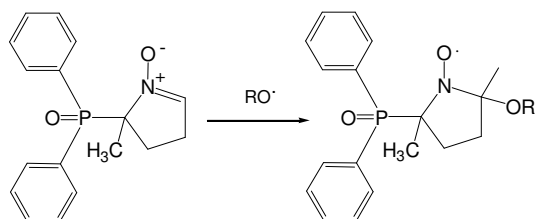


図 5 スピニアダクトの分子構造

DPhPMPO を使って形成させたスピニアダクトを混合有機溶媒を使って抽出し安定化させて ESR で測定する方法を確立した。抽出されるスピニアダクトの量や安定性は抽出溶媒によって大きく変わる。シグナル強度や有機溶媒の取り扱いやすさなどを勘案し、クロロホルム／メタノール (C/M) 混合溶媒を選択した。その後、サンプルとの反応条件や、溶媒抽出条件、遠心分離条件などを細かく検討し、比較的安定なスピニアダクトの形成と、各種サンプルでの再現性の高いデータ解析を行うことができる手法を開発することができた。

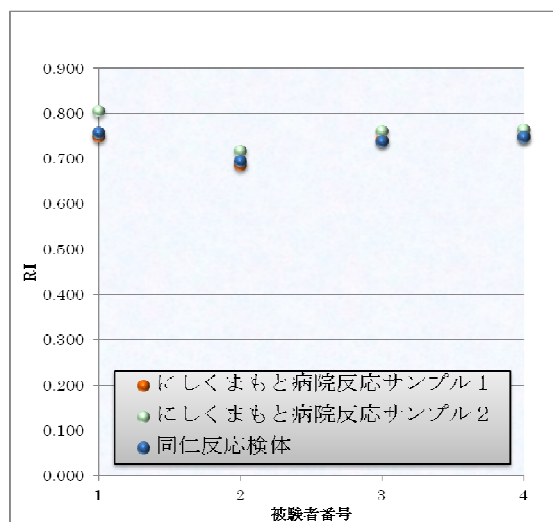


図 6 全血サンプル測定におけるヒト間差
ヒト全血をにしくまもと病院で処理したサンプルと規定された条件で搬送し同仁化学で処理したサンプルと比較。データは一致。

その手法をもとに、商用ベースでの測定法としてキット化、マニュアル化するために、採血から測定までのプロセスを徹底的に調査しその影響を調べた。その結果、採血後の血液サンプルの取扱方法や輸送容器内の温度のバラツキを抑え、サンプル調製を工程どおり行うことで、測定者間差を含めて測定値の標準偏差を 3% 以内に収めることができた (図 6)。

試薬キットとして製品化するに当たり、各コンポーネントの保存安定性を調査した。各コンポーネントのうち、*t*BuOOH (t-ブチルヒドロペルオキシド) 水溶液が不安定であることが分かった。そのため、*t*BuOOH 水

溶液用の容器と空隙容量、保管温度などを検討した結果、安定化できる条件を見出し、キットの製品化の目途を立てることができた。本事業完了後、個別研究者への展開、データ蓄積、論文化を経て販売へ進む。

2-2-2 【1-2】試薬合成

図7に示す合成ルートで、各種誘導体の合成を検討した。その結果、1種類の化合物を合成できたが、機能と合成難易度、原価等を勘案して、キットに組み込むには DPhPMPO が最も良いと判断した。

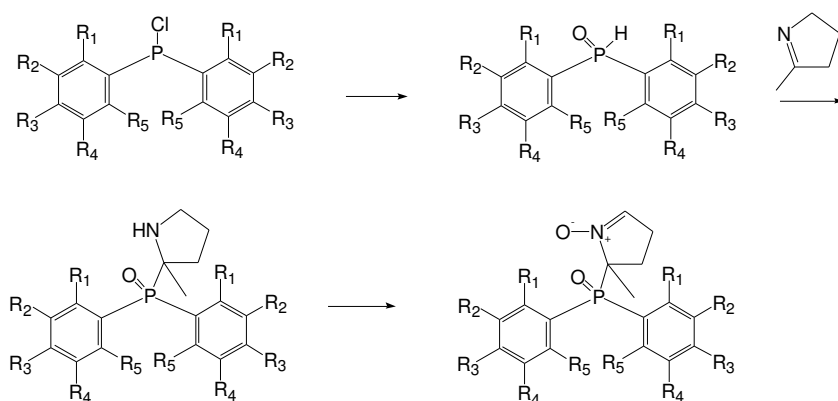


図7 Diphenyl 型スピントラップ剤の合成スキーム

次に、主要コンポーネントである DPhPMPO のロット間差を見るために、新たに1ロット（ロット3）の合成を行い、前ロット（ロット2）との比較を行った。それぞれの DPhPMPO による試験分析値、ラジカル測定値の変動を調べた。最も重要なブランク値の変動もなく、フェントン反応によるシグナル強度にも差がみられなかった。フェントン反応によるスペクトルを図8に示す。合成工程を確実に行うことで、データの再現性の高い試薬が調製できることを確認した。

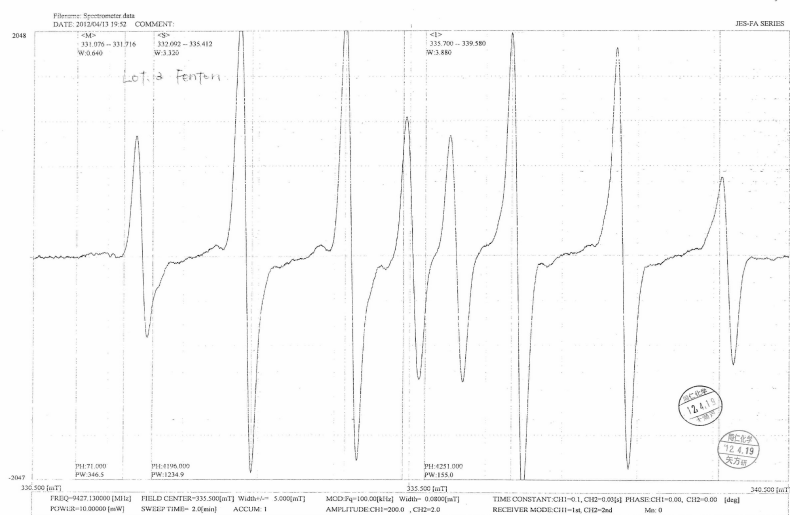


図8 ロット3のフェントン反応のシグナル

2-2-3 【1-3】発酵食品の抗酸化能の測定: *in vitro*

発酵食品として、株式会社山内本店から提供を受けた醤油、熟成期間の異なる味噌、原料が異なる味噌を評価、また、代表的な抗酸化活性を持つアヤマラサキ(芋)、抗酸化能がある飲料水などを用いて、*in vitro*で抗酸化活性を評価した。その結果、株式会社山内本店製の「純搾り」醤油の抗酸化活性が極めて高く、アヤマラサキよりも高い抗酸化活性を示した(図 9)。

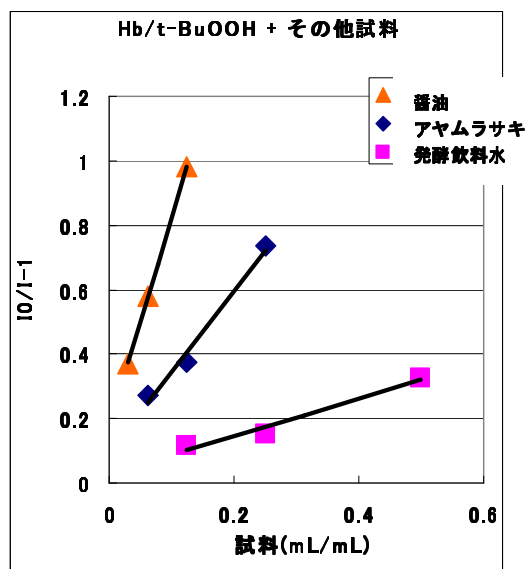


図 9 「純搾り」醤油とその他の抗酸化活性のある食品との比較

I₀: サンプルを含まない ESR シグナル強度

I: サンプルを含む ESR シグナル強度

傾きが大きいほど抗酸化活性が高い。

図 10 に食品の抗酸化活性を比較したデータを示す。「3 カ月合味噌追加熟成」は「3+1 カ月味噌」のことである。「3+1 カ月味噌」は第一回目ヒト治験に用いた。

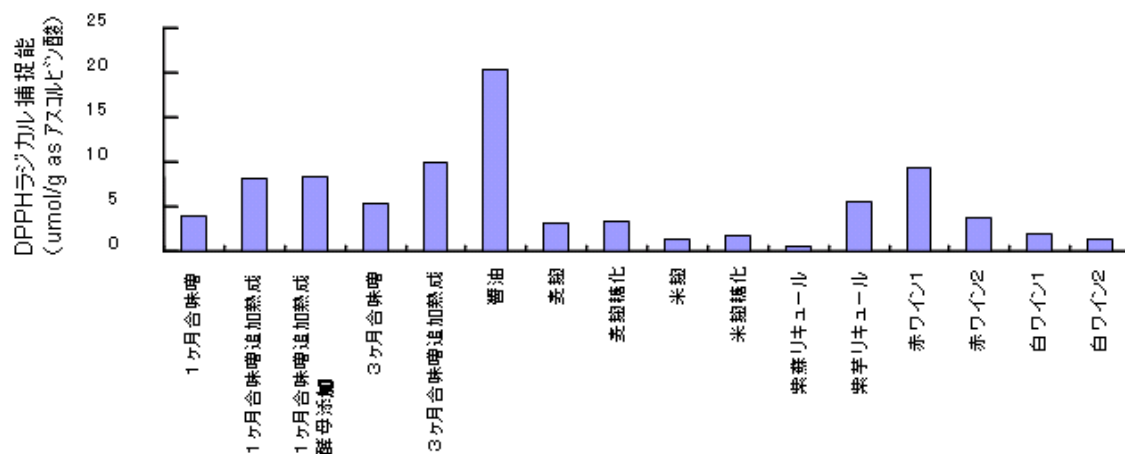


図 味噌等のDPPHラジカル捕捉能

図 10 各種食品の抗酸化活性の比較 (DPPH 法)

DPPH 法による活性比較から醤油の抗酸化活性が飛びぬけて高いことが分かる。醤油の抗酸化活性が高い理由として使用している麴が関係している可能性が考えられたため、醤油麴を使って味噌を調製することにした。一般に醤油麴はタンパクの分解活性が強く、液状化するため、調製は難しいと考えられた。図 11 に醤油味噌調製のフローを示す。この工程で「のぼる 2 号」、「のぼる 3 号」を調製し、「のぼる 3 号」を平成 24 年のヒト治験での摂取実験に用いた。

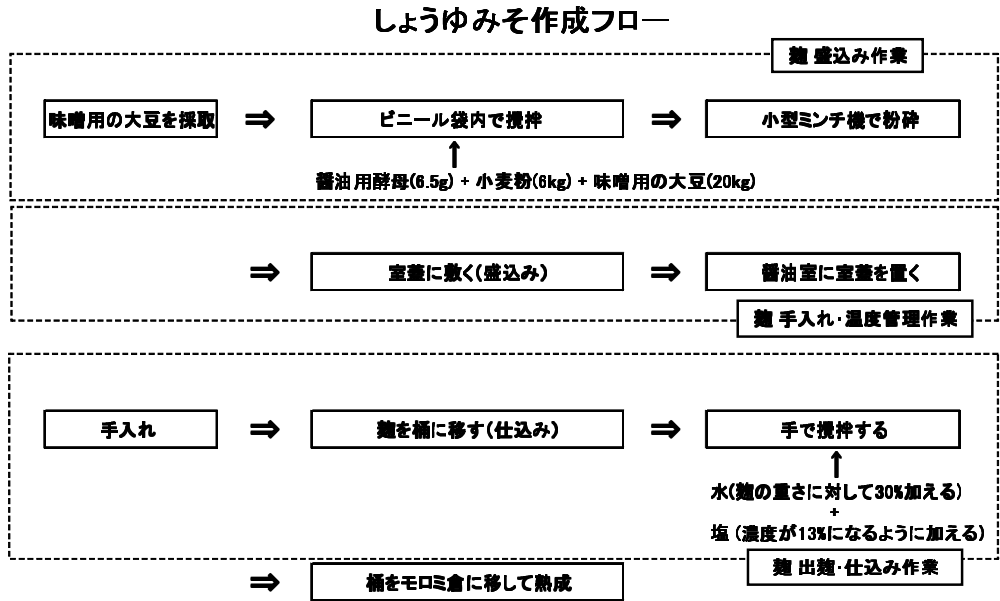


図 11 「醤油味噌」の製造フロー

「のぼる 2 号」については、更に加熱熟成させ、その構成成分および ORAC 値がどう変化するかを調べた。

Table Nutrition contents of Miso samples								
Sample	Aging periods (months)	water (w/w%)	Ash (w/w%)	Protein (w/w%)	Lipid (w/w%)	Carbon hydrate (w/w%)	Energy (k cal)	Sodium (mg%)
Noboru 2	1	42.8	14.2	12.8	6.2	24	203	5572
		(0.2)	(0.1)	(0.0)				(0.2)
	8	48.1	15.3	13.5	6.3	16.8	177.9	5762
		(0.5)	(0.0)	(0.1)				(92.0)
	9	48.3	15.3	13.6	6.5	16.3	178.1	5735
		(0.5)	(0.1)	(0.3)				(91.9)
Barley-Miso	3	46.5	11.1	9.4	5.1	27.9	195.1	4090
		(0.1)	(0.1)	(0.1)				(234.0)
Carbohydrate content calculated by subtraction of other contents from one hundred. Atwater constant, 4, 9, and 4 for protein, lipid, carbohydrate were used for energy calculation.								
Difference of duplicate experiments was shown in parentheses.								

表 1 「のぼる 2 号」調製味噌の成分表

表2 味噌サンプルのORAC値

サンプル	熟成期間 (月)	ORAC値 ($\mu\text{mol TE} / 100 \text{ g}$)
のぼる2号	1	1217
	8	1341
	9	1320
麦味噌	3	727

正確に4 gを図り測定した。ORAC値はWet味噌重量で表示した。

味噌より若干高い値を示したが、その差は大きくなかった。味噌試料のORAC値について、「のぼる2号」味噌は通常の麦味噌の1.7～1.8倍の値を示しており、通常の味噌とくらべ*in vitro*での抗酸化活性は高いことが示された。

2-2-4 【1-3】発酵食品の抗酸化能の測定: *in vivo*

発酵食品や抗酸化活性があると考えられている食品を実験動物を使って投与した。実験動物を使う目的は、測定の数値を増やすことと、発酵食品摂取の動物種による違いを見るためである。平成23年はウサギを使用し、平成24年はマウスおよびブタを用いた。

ウサギへの投与実験は、単回投与と連続投与による発酵食品の血液の抗酸化能の変化を測定した。ウサギの課題は食塩濃度の高い発酵食品に対して耐性が低いということと、草食性動物であるために、代謝が雑食性動物と異なる可能性があり、そのままヒト代替として評価ができるかどうかの判断が困難であるということである。また、ウサギの血液の抗酸化能は正常であり、発酵食品の摂取効果を判定するには、抗酸化能が低下した実験動物を使う必要があると判断した。そのため、マウスに対しては、ストレスを与えて抗酸化能を低下させたマウスの調製を試みた。

マウスに対するストレス負荷実験の結果、図12に示すように500 $\mu\text{g/kg}$ のFe-NTA腹腔内投与において生体内抗酸化能の変動が確認された。0.5～5 $\mu\text{g/kg}$ 領域のFe-NTA量ではコントロールと差が見られなかった。しかしながら、Fe-NTAの

「のぼる2号」は、熟成期間によらず暗赤色に着色しており、酵素分解による糖及びアミノ酸の生成、そして、メイラード反応は、通常の麦味噌より進行していたと思われる。また、熟成によって生成するアミノ酸と高い相関を示すホルモール態窒素についても、「のぼる2号」味噌の値は通常の麦味噌の1.4～1.5倍となっていた。なお、熟成8、9カ月の「のぼる2号」味噌のホルモール態窒素の値が熟成1カ月の「のぼる2号」

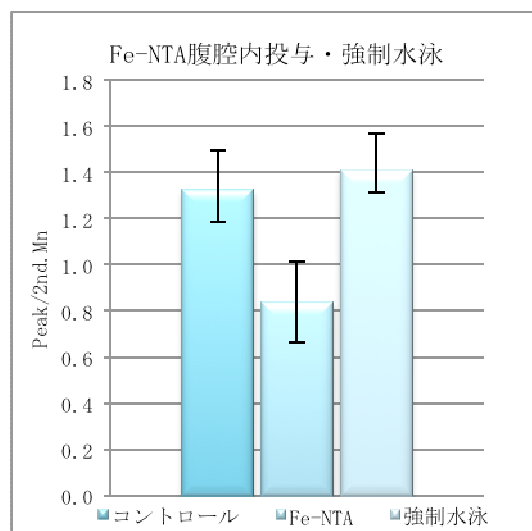


図12 Fe-NTA (500 $\mu\text{g/kg}$) 投与及び強制水泳による生体内ラジカル変動

大量投与では目的とした抗酸化能の低下（ラジカル量の上昇）ではなく、抗酸化能を亢進させる結果となった。閉所ストレス、強制水泳によるストレス負荷実験においては行動観察、解剖所見共にコントロールマウスと差は見られず、**ESR** による生体内抗酸化能にも大きな変化は確認されていない。これらの結果から今回検討したストレス負荷実験では、マウスの生体内抗酸化活性の低下を有意に誘導することはできていない。

■マウスへの発酵食品投与実験

ウサギを絶食下に置いて全血の抗酸化能は変化なかったが、マウスは絶食により全血の抗酸化活性が低下することが分かったため、以降の実験には、一夜絶食したマウスを用いることにした。マウス投与実験で使ったサンプルを以下に示す。

- ・醤油（純絞り）
- ・新規発酵味噌（のぼる 3 号）
- ・Sephadex G25 を用いた純搾り醤油分画成分
高分子フラクション、中分子フラクション、
低分子フラクション
- ・Sephadex G50 を用いた醤油分画成分
高分子フラクション、中分子フラクション、
低分子フラクション
- ・NaCl（対象物質）
- ・水（対象物質）

マウス血液サンプルを用いた **ESR** 測定の結果、図 13 に示すように、「純絞り」、「のぼる 3 号」、**Sephadex** による分画醤油を投与することにより、マウスの生体内抗酸化能亢進を確認することができたと同時に、最適なサンプル投与量が存在する可能性が示唆された。同じ純絞りであっても、投与量により生体内抗酸化活性の亢進、低下の両方の作用が確認された。

Sephadex G25 及び **G50** を用いて「純絞り」を高分子、中分子、低分子フラクションに分画し投与実験に用いた。フラクションの基準は、**MS** データ及び回収物の色味により概算で設定した。*in vivo*、*in vitro* ともに抗酸化活性の高い「純絞り」を分画することで高活性フラクションと低活性のフラクションに分離することができた。これにより、発酵食品に含有される抗酸化成分の探索・同定範囲を限定することが可能となり、より抗酸化活性の高い発酵食品を製造するための重要なデータとなる。また、抗酸化成分の同定・精製が可能となれば発酵食品由来の機能性食品開発などが可能になると考えられる。

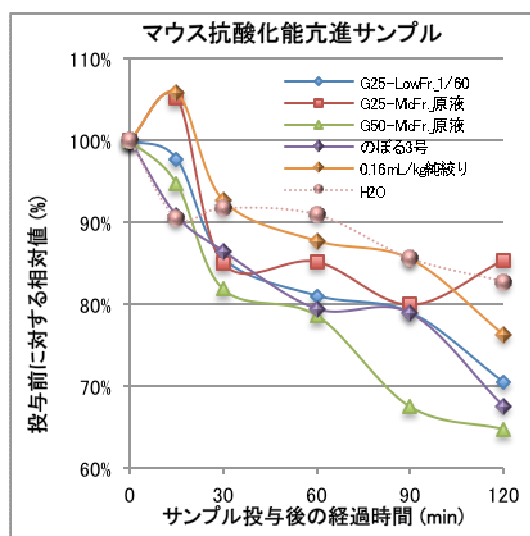


図 13 マウス生体内抗酸化活性の亢進が確認されたサンプルの変動推移

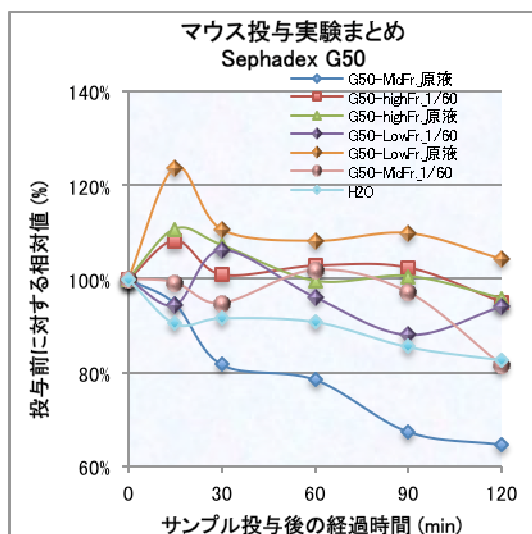


図 14 SephadexG50 を用いた醤油分画成分による生体内抗酸化活性への影響

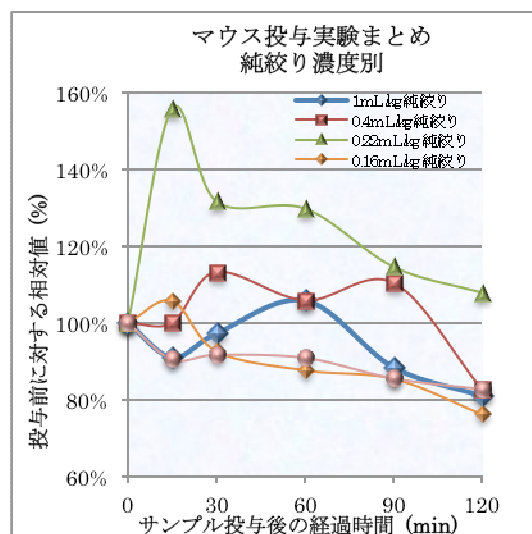


図 15 「純搾り」投与量による生体内抗酸化活性への影響

■動物種による発酵食品摂取変動：ブタ

雑食性であるブタを用いることで草食性であるウサギのもう一つの対照実験とすることを目的とし、実験動物の食性による相違を確認するために採血量の関係でマウスで不可能であった同一個体からの経時的な連続採血を実施した。

ブタ（食用雑種 ♂） $n=3$ に対して発酵食品を投与し、発酵食品投与前後（-60、-30、30、60、90、120 分）採血を行った。W.B.はヘパリンナトリウム（10 mg/ml）10 μ l 入のマイクロチューブに入れ転倒混和後、保存し、同仁化学へ運搬した。採血を実施したブタについては、2 週間のブラック期間を開けた上で次のサンプルを投与した。血液分析法は、マウスと同一である。

ブタ投与実験で使用したサンプルを以下に示す。

- ・醤油（純搾り）
- ・新規発酵味噌（のぼる 3 号）
- ・3%食塩水（対象物質）

ブタ投与実験での対象物質として使用した 3%食塩水はそれぞれのブタで変動はあるものの、全血の抗酸化活性の向上、低下は観察されていない。これをベースに、「のぼる 3 号」投与および「純搾り」投与実験における全血の抗酸化能の変動を比較すると、「のぼる 3 号」摂取ではわずかに抗酸化能の亢進が観察されるが、「純搾り」では 3%食塩水と有意な差は見られない（図 16、17）。「純搾り」は、ウサギやヒト投与実験で効果が観察されており（平成 23 年度成果報告書参照）、またマウスでは「純搾り」の摂取量によって効果が変動するデータがでていることから、ブタに最適な「純搾り」摂取量ではない可能性がある。

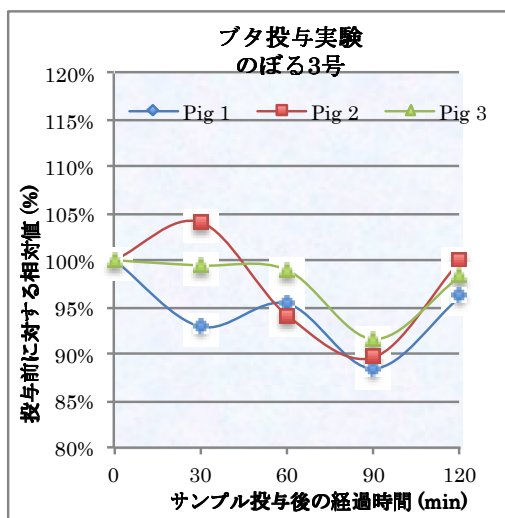


図 16 のぼる 3 号投与データ

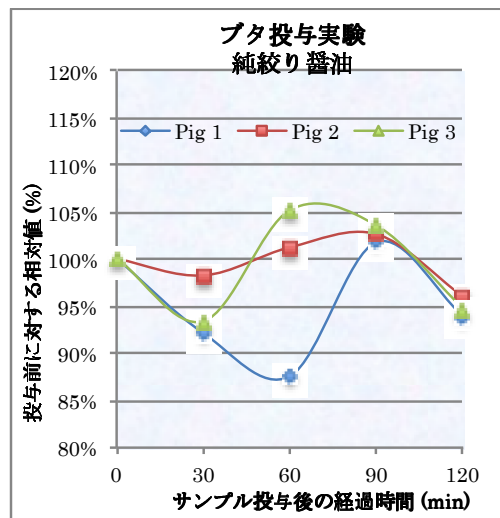


図 17 純搾り投与データ

実験動物として今回はマウスを集中的に使用した。まず、全血の抗酸化能低下モデルマウスの作成を検討したが、Fe-NTA 腹腔内投与実験では、逆に抗酸化能が亢進する結果となった。ウェブ情報では、Fe-NTA 投与により抗酸化能が低下し、そのマウスを使って緑茶の摂取効果を判断している。今回、Fe-NTA 投与が全血で評価した際に、逆に振れた理由は定かではないが、Fe-NTA により発生するラジカルによって、生体反応として血中の抗酸化能が急激に上昇した可能性がある。測定してみれば分かる事であるが、ラジカル消去分子として SOD (Super oxide dismutase) 活性が高くなっていることは容易に想像がつく。また、LPS 投与は全く変動がないという結果になっており、LPS により炎症を惹起しても全血の抗酸化活性には反映されないという結果になった。炎症が起きていないとは考えにくく、炎症が起これば、SOD 活性も高くなると予想され、これまでの常識とは矛盾する。

今回は、一夜食物摂取を断ったマウスは、全血の抗酸化活性が低下することが分かったため、絶食マウスをモデルマウスとして用いたが、一般的に予想されるストレス負荷方法では、血液の抗酸化能に影響を与えなかった。この結果から、全血の抗酸化活性は通常の刺激やストレスで変動するものではなく、食事のコントロールによって変動するものと考えられた。但し、食事が唯一のコントロール因子という訳ではない。

絶食マウスの実験から、「純搾り」の Shephadex G50 分画成分 (高分子量領域、中分子量領域、低分子量領域の三つに分画) のうち、中分子量領域の分画成分のマウスへの投与効果が高いことが分かった。中分子量領域にある分子種解析については、2-3 開発項目【2】ラジカル種の分析で述べる。また、全血の抗酸化能を向上させるのに適当な摂取量があることが分かった。適当な摂取量は個人レベルでも変動する可能性もあり、固定した数値とはならないかもしれない。中分子量領域にある分子の分離、投与実験を繰り返し、可能性のある分子の絞り込み、および構造解析を行い、分子種を特定できれば、抗酸化能を亢進させるための成分として、機能性食品に組み込まれる可能性もある。また、そのような機能性食品を用いて、健康と疾病との関連付けができると、新たな指標となり得る。

2-3 【2】ラジカル種と抗酸化能の相関関係解析

2-3-1 【2-1】血中ラジカル分子種解析

当初、ESR シグナル強度の変化とサンプルに含まれる成分量の変化（増減）が関連する分子を検出するために、LC/MS データを差異・変動解析ソフト（SIEVE）を使って解析した結果、相関ある分子が見出されたが、動物個体間で検出される分子ではなく、確実に相関する分子であるとの確証は得られていない。従って、抗酸化能を示す発酵食品中の分子は、直接血中で抗酸化活性を示すという極めて単純化したモデルを考えて、以下の実験を行った。

- 1) 発酵食品抽出物（Sephadex G50 分画成分／中分子量分画：G50 Mid）の分析
- 2) *in vitro* 測定で得られた ESR 試料の分析
- 3) *in vivo* 測定で得られた ESR 試料の分析

1)の実験で得られたデータの一つを図 18 に示す。分析の流れを次に示す。

- ① 各フラクションの分析結果より、トータルイオンクロマトグラフィー（以下 TIC）で検出される特徴的なピークを選択する。
- ② 上記①で選択した特徴的な TIC スペクトルを構成する MS スペクトルより検出されている分子種を確認する。
- ③ 上記②で確認された MS スペクトルについて、未精製の醤油と各フラクションの解析結果を比較することで確認された分子種が醤油由来であることを確認する。

ここでは、分画醤油成分の中で *in vitro*、*in vivo* 実験において最も抗酸化活性の高かった Sephadex G50 を用いた分画醤油中分子フラクション（以後 G50 Mid）を解析例として挙げる。

G50 Mid のネガティブで検出した TIC (TIC(-)) において、クロマトグラフの滞留時間 (RT) 2.2 min 付近に特有のピークが検出された。次に RT: 2.2 min の MS スペクトルにおいて、主なピークとして検出される分子質量 (m/z) =801 及び m/z =1048 に着目し、未分画純絞り由来の成分であるかを確認した。

それを、②、③と行い、G50 Mid において特徴的な成分である m/z =801, 1046, 249, 657, 793 は純搾り由来の成分であることが確認された。次に、それらの分子が 1) *in vitro* サンプル、および 2) *in vivo* サンプル分析で検出されるかをそれぞれの分子質量毎に調べた。その結果、どの質量分子も検出できなかった。

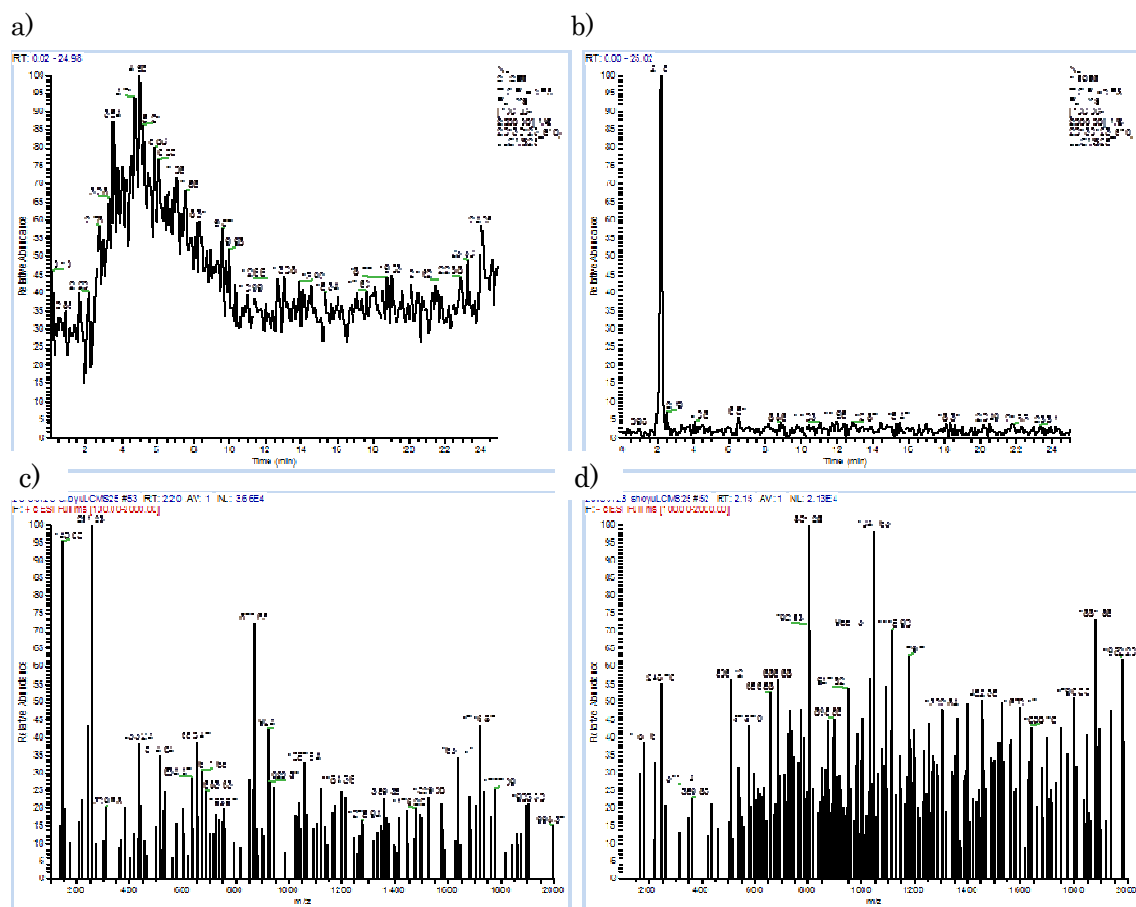


図 18 Sephadex G50 を用いた C/M 抽出物の TIC 及び RT:2.2min における MS スペクトル

a) ポジティブシグナル検出の TIC (TIC(+))

b) ネガティブシグナル検出の TIC (TIC(-))

c) チャート b)の 2.2 分のピークのポジティブシグナルの MS チャート

d) チャート b)の 2.2 分のピークのネガティブシグナルの MS チャート

2-3-2 開発項目【2-2】血中ラジカル量の変動確認

■測定サンプル

血液試料のデータ収集を行い、約 3000 サンプル分の分析データを保存した。対象は、ウサギ、マウス、ブタ、ヒトの全血 (WB) および血漿 (Plasma)、洗浄赤血球 (WRC) である。表 3 に、摂取させた試料例とサンプル数を示す。単回摂取サンプルと連続投与サンプルがあり、Day 表示してあるのは、連続投与時の血液サンプル採取日である。

表3 LC/MS 用サンプル

	WB sample	Plasma sample	WRC sample
20110810_Tan-TokHon	30	30	
20110817_Tan-HonJou	30	30	
20110824-0921_Ren-DatuJunShi			
<Day1	30	30	
<Day8	30	30	
<Day22	30	30	
<Day29	30	30	
20110907-0908_Ren_SyoMiso			
<Day1	30	30	
<Day2	30	30	
<Day8	30	30	
20110912-Tan-AyaMur	30	30	
20110914-Tan-JunshiboriGeneki	30	30	
20111005-1012_Ren-NaCl_H2O			
<Day1	30	30	
<Day8	30	30	
20111011_Kumadai			
<Kansensho		15	
<Kensa café		4	
20111026-Tan-X3Noboru1go	30	30	
20111031-Tan-X100_Noboru1go	30	30	
20111102_Tan-5%NaCl	30	30	
20111107_Tan-H2O	30	30	
20111109_Tan-Ayamurasaki-5mL_kg	30	30	
20111114_Tan-222mg-Moromi	30	30	
20111116_Tan-111mg-Moromi	30	30	
20111121_Tan-555mg-mL_KikkomanGenen	30	30	
20111124_Tan-1000mg-2mL-kg_KikkomanGenen	30	30	
20111128_Tan-333mg-mL-kg_2.9%Genen	30	30	
20111130_Tan-1000mg-2mL-kg_2.9%Genen	30	30	
20111205_Tan-ml-kg_BulgariaYogurt	30	30	

20111207_Tan-3ml-kg_BulgariaYogurt	30	30	
20111212_Tan-3mL-kg_Milk	30	30	
20111214__Tan-3mL-kg_shisodrink	30	30	
20111220_nishikumachiken	70	70	70
20111226_Tan-3mL-kg_datsuenJunshibori	30	30	
20120111_Ren_Yogurt			
<Day1	30	30	
<Day8	10	10	
<Day15	10	10	
<Day22	10	10	
<Day29	30	30	
20120116_Ren_Kenyo			
<Day1	30	30	
<Day8	10	10	
<Day15	10	10	
<Day22	10	10	
<Day29	30	30	
20120215_Tan-Ryokucha	30	30	
20120220_Tan-maccha	30	30	
20120222_Tan-Uroncha	30	30	
20120227_Tan-puarucha	30	30	
Total	1240	1259	70

■ 考察

サンプル数が多いことに加えて、差異・変動解析ソフトがあるとはいえ、多くの部分では手作業での解析であって効率が良くない。現在、全血、血漿等のデータの取り込みが終わった段階であり、これまでのような発酵食品に含まれる分子種や ESR 相関による検出から、分子質量による網羅的解析にシフトしていくことになる。

2-4 【3】食品摂取によるラジカル変化

2-4-1 【3-1】発酵食品摂取後の血液分析

発酵食品のヒトへの摂取効果を見るために、ヒト治験センターであるにしくまもと病院で各 10 名のボランティアを選別し、「純搾り」醤油、「3+1 カ月味噌」、「のぼる 3 号」味噌の投与実験を行った。治験センターでの発酵食品の摂取と採血時間を図 19 に示す。「3+1 カ月味噌」は通常の発酵熟成工程を 3 カ月行った後に 1 カ月加温熟成させた味噌である。

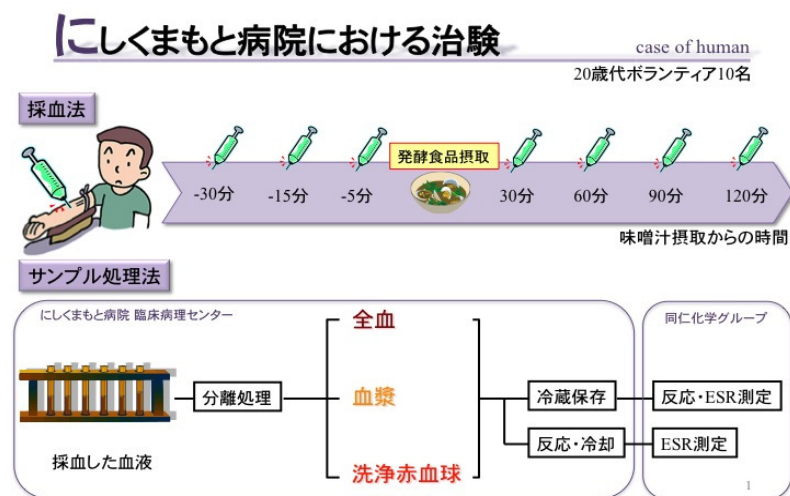
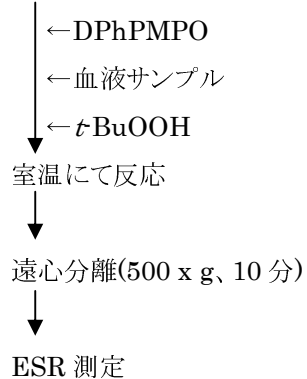


図 19 にしくまもと病院での採血及び分画処理法

採血された血液はサンプル処理方法に従って処理し、同仁化学まで搬送した。その後、下記の方法で ESR サンプルとし ESR を測定した。

2mL-Tube



それぞれの結果を図に示す。

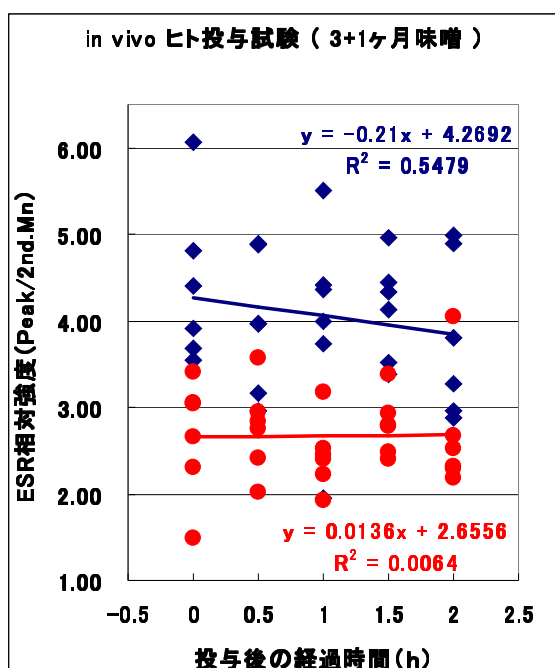


図20 「3+1ヵ月味噌」摂取による初期抗酸化能高値群と低値群の変動平均

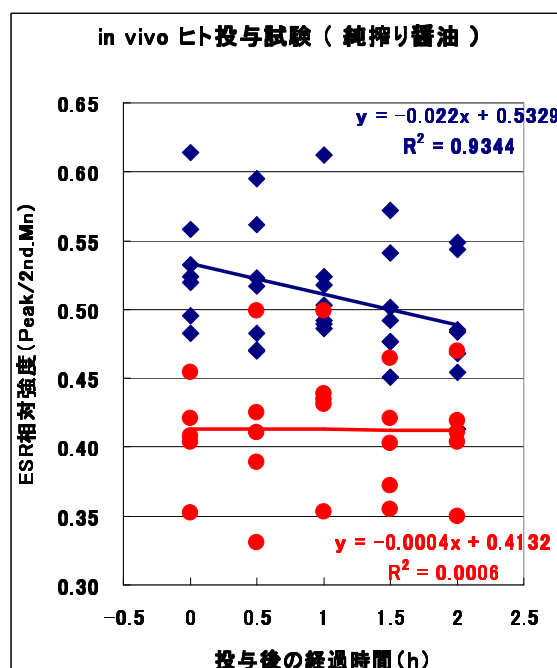


図21 「純搾り」醤油摂取による初期抗酸化能高値群と低値群の変動平均

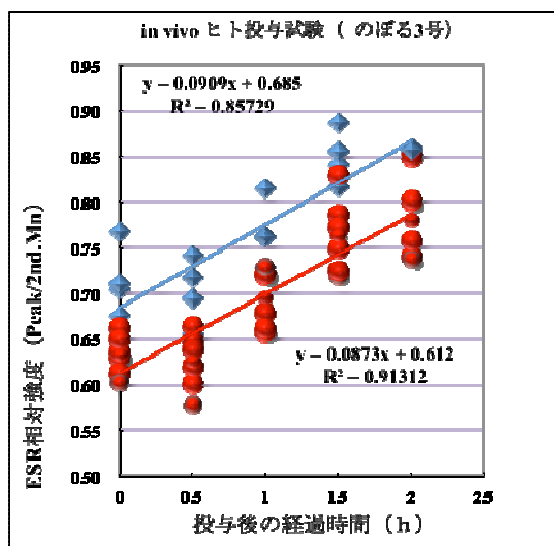


図 22 「のぼる 3 号」味噌摂取被験者の初期抗酸化能高値群と低値群の変動平均

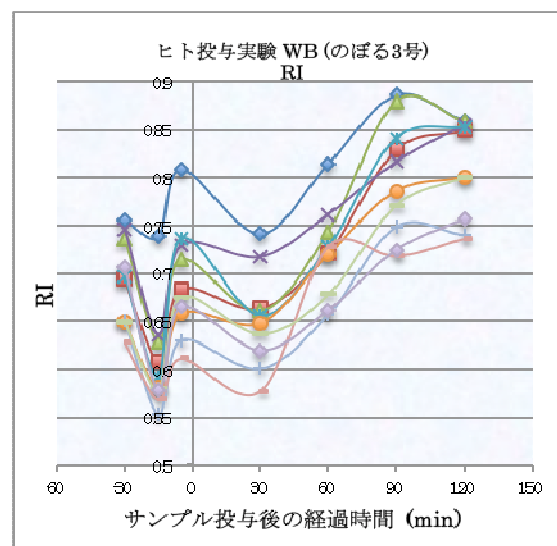


図 23 「のぼる 3 号」味噌摂取による被験者の RI の変動

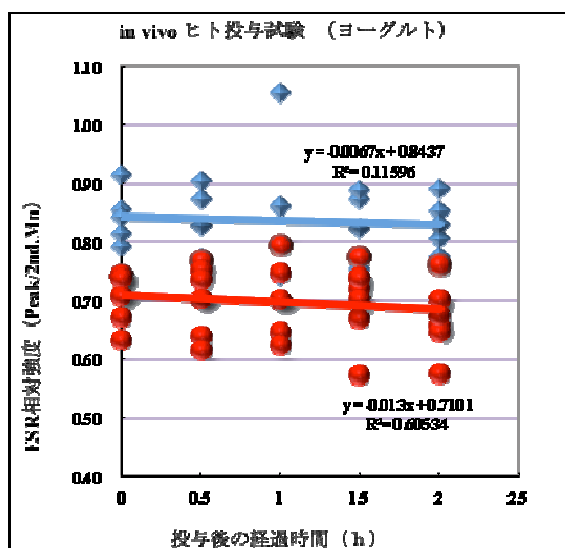


図24 「ブルガリアヨーグルト」摂取被験者の初期抗酸化能高値群と低値群の変動平均

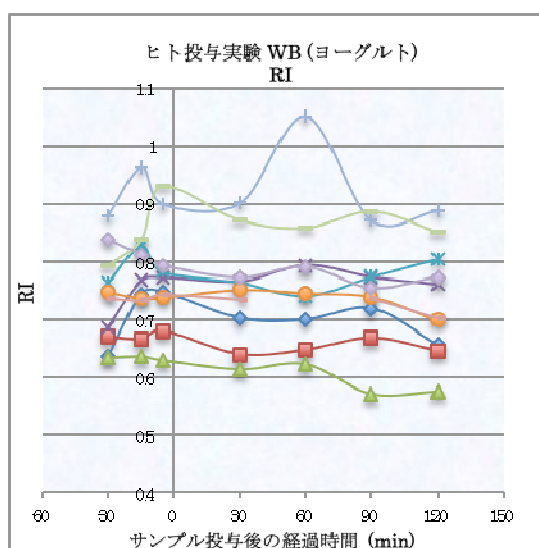


図 25 「ブルガリアヨーグルト」摂取による被験者の RI の変動

ヒト治験の結果から、「3+1カ月味噌」（図20）と「純搾り」（図21）の摂取後の抗酸化能の変動パターンは似通っており、初期抗酸化能低値群は摂取によって抗酸化能が亢進、高値群は変化しないという結果であった。一方、「ブルガリアヨーグルト」摂取は初期抗酸化能高値、低値群ともに僅かに亢進した（図24、25）。ところが、「のぼる3号」摂取群は、全ての被験者の全血の抗酸化能は同じパターンで波打ちながら低下する動きとなった（図23）。このようなパターンは動物実験でも観察されておらず、極めてユニークなものである。また、抗酸化活性の亢進が確認された「純絞り」と異なり、投与時の被験者の反応が悪く、匂いや味に対するストレスによる抗酸化能の低下になったとも考えられる。

動物・ヒト投与実験から発酵食品投与による生体内抗酸化活性の変動を捉えること可能になったことで、亢進・抑制の両面から生体抗酸化に対する有効成分を確認することができる。成分による最適濃度が異なるため、血中抗酸化能低下方向へ動いた「のぼる3号」投与実験結果も生体内抗酸化状態の劇的な変化の例として興味深い結果である。ラジカルを直接測定することで、差が確認できる事実は製薬、機能性食品開発への一助に成り得る。

2-5 開発項目【4】 商用受託分析実験

2-5-1 開発項目【4-1】 検体種別毎の測定方法確立

全血を送るに当たっては、サンプル取扱の条件も一定にすることが、データの信頼性を高めることになる。従って、採血直後からの血液サンプルの取扱方法を決定することを目的として実験を行った。

ヒト治験前スクリーニング

ヒト治験に際して、全血の初期抗酸化能が高い群と低い群に分けるため、事前に血液分析を行った。その際に、にしくまもと病院での採血後から同仁化学研究所での分析に至る工程が及ぼす影響を調べた。採血は三日間行い、全血を一定の条件で同仁化学研究所まで運び、サンプルの抗酸化能を測定した。

その結果、採血日によって全血の抗酸化能が変動しており、個人差と考えにくく、おそらく、にしくまもと病院での採血から同仁化学研究所に届いて測定するまでの、輸送条件が関与しているものと推察された。従って、ヒト治験サンプルを輸送するに当たり、管理を徹底する必要がある。但し、同日採血されたサンプル間の比較は可能である。本来の目的であるヒト治験に際して全血の初期抗酸化能高値群と低値群の分割は出来なかったため、全員を対象とし、当日の体調によって被験者とするかどうかを判断することにした。

温度管理

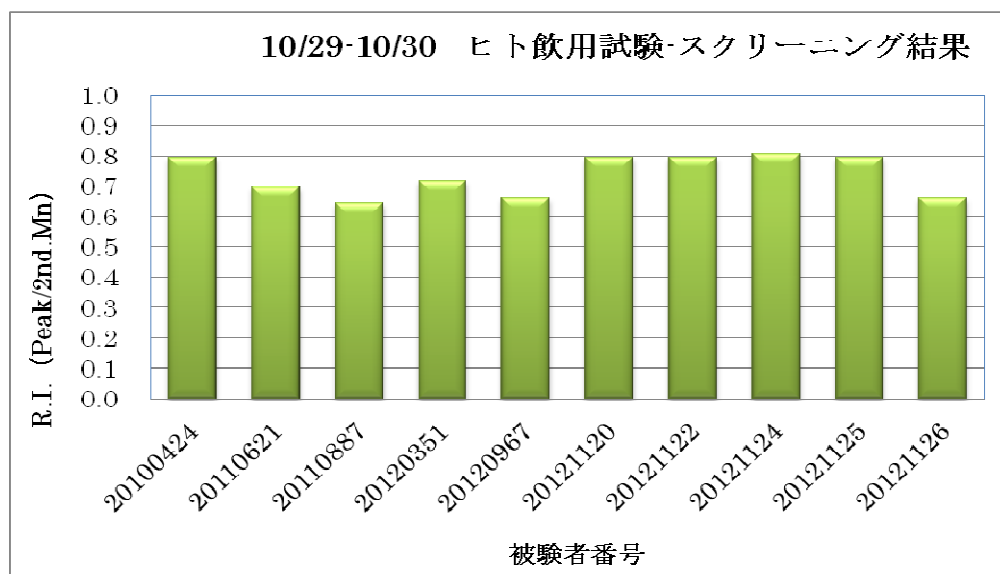


図 26 温度管理したヒト治験被験者の W.B.の抗酸化能の値

29 日、30 日採取の二群での抗酸化能の日間差はほとんど見られず、条件を一定に保つ限りにおいては、全血の抗酸化能は変化しないものと考えられる。

検体種別での測定方法については、全血を対象とする限り、採血直後からの工程管理が重要であり、工程はキットのマニュアルに従うことで、ばらつきの少ないデータを得ることができる状態にある。その他のサンプルとして、組織の抗酸化能も考えられるが、まだ、現時点では対象とは考えていない。全血との相関あるいは全血では見えない生体の抗酸化能の評価という点では、興味のあるサンプルである。但し、ヒトから数十 mg の組織を取って抗酸化能を測定することは現実性の乏しい話であり、動物実験で相関が出てくれば、全血だけが測定の対象となる。

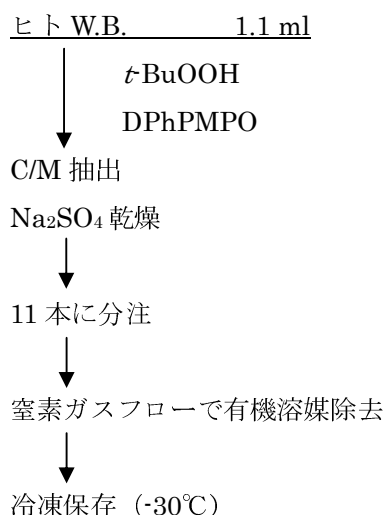
2-5-2 開発項目【4-2】検体処理方法の事例検証

キットの *in vitro* 評価

開発中のキットを評価するに当たり、*in vitro* で、xanthine oxidase 系、NADPH-P450 oxidoreductase 系、hemoglobin/ *t*BuOOH 系、好中球/LPS 系など一般的な酵素を用いたラジカル産生系を W.B.に付加した場合の測定値の変動、これに superoxide dismutase や catalase などのラジカル消去剤・酵素を加えた場合の W.B.変動について実験を行った。その結果、産生系、消去系共に十分に評価可能であることが確認された。

サンプル調製した ESR 測定用資料の安定性評価

ESR がない場合を想定して、調製後のサンプルの安定性を調べた。まず、以下の工程でサンプルを調製した。



保存したサンプルを一定時間（期間）ごとに取り出して、C/M（クロロホルム／メタノール混合溶媒） 0.25 ml で溶解し、ESR で測定した。バラツキを抑えるために標準サンプルとして

Tempol（安定ラジカル化合物）を用いた。

本反応における新しいスピントラップ剤の安定性を一般的によく使われているラジカル捕捉剤である DMPO と比較検討したところ、図 27 に示すように明らかに DPhPMPO の安定性が高いことが証明された。

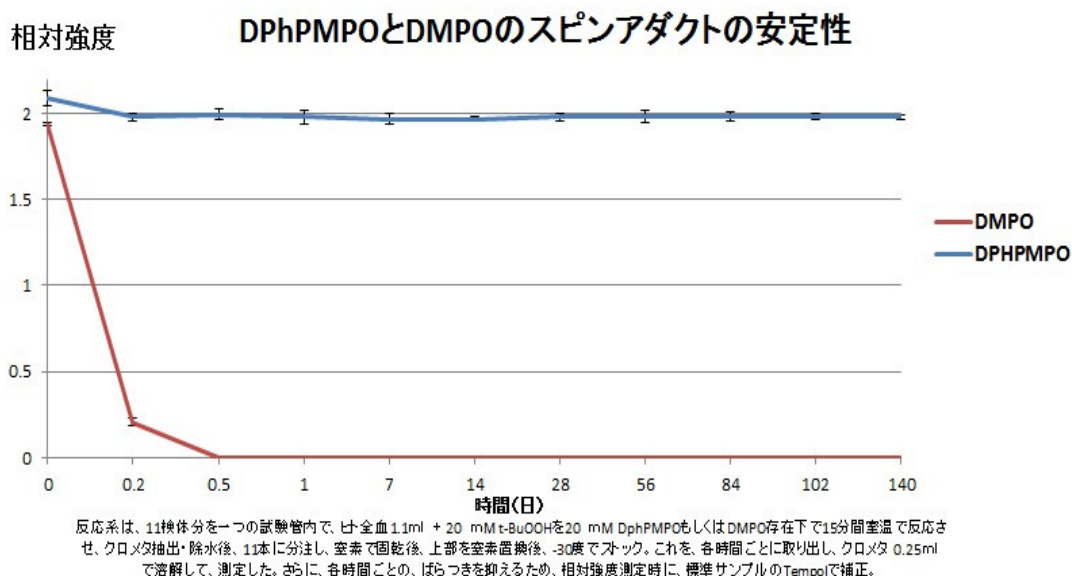


図 27 乾固したスピニアダクトの安定性評価

動物実験では、緑膿菌肺炎マウスで血中及び肺洗浄液中で明らかに酸化ストレス状態が更新していることが確認された。実際のヒトでは、健常人に抗酸化活性を持つサプリメントや経腸栄養剤を飲ませたときの全血中の抗酸化活性の変化や、慢性気道感染症患者における全血中の抗酸化能の変化を検討したところ、十分に計測可能であることが判明し、今後のヒトでの、発酵食品を用いた健常人及び病態での検討を行う補足的データが得られた。

以上の結果から、開発検討したキットは全血のラジカル測定において、実際のヒトでの測定系で用いることができる可能性が高いと示唆された。また、測定のテクニカルな問題点についても解決されており、今後の発酵食品を用いた研究への還元が期待される。

第三章 総括

本事業の目的は、ヒトの全血の抗酸化能を測定するためのキットを完成させることと、ヒトの抗酸化能を亢進させるための発酵食品を調製することであった。この事業を行っていく過程で、発酵食品の抗酸化能は、醤油が最も高く、味噌は醤油と比べて半分以下ということが分かった。従って、味噌の抗酸化能を亢進させるには、醤油麹を使って味噌を作ればよいのではという発想の下、「醤油味噌」を調製した。

「醤油味噌」は「のぼる 3 号」という名称でヒト投与実験に用いた。その結果、「のぼる 3 号」のヒト投与実験では、全ての被験者の全血の抗酸化能を低下させるというものであった。ところが、マウスやブタでは、全血の抗酸化能はわずかに更新するという結果を示した。これらのデータの再現性を確認する必要があるが、再現性があると仮定して、ここから言えることは、1) 発酵食品でも何らかの原因で抗酸化能を低下させることがある、2) 動物種間で摂取効果は、大きく異なる、ということであり、そのような挙動を取る理由として、ヒトに対してのみストレスを負荷させる要因があった、若しくは、「のぼる 3 号」の調製過程で生じる化合物（単体、複合体）が摂取によってヒト代謝系を刺激し全血の抗酸化能を低下させた、と考えられる。

今回の「のぼる 3 号」の結果は、目的とした「ヒト生体の抗酸化能を亢進させる」発酵食品を開発することからすると、逆のデータとなっており、抗酸化能を亢進させる発酵食品の開発には至っていない。但し、発酵熟成工程を変えることにより、抗酸化能に影響を与える発酵食品を調製することは可能である。単純に発酵食品の抗酸化活性を亢進させればよいということではないため、「のぼる 3 号」の成分を分離し、抗酸化能を低下させる物質を見つけることが出来れば、次の活動が見えてくるものと思われる。

ヒト全血の抗酸化能を測定するためのキットの開発は、コンポーネントの保存安定性データの継続的確認を行うことを除き終了した。この生体内抗酸化能測定に興味を持ち、且つ ESR 装置を所有している研究者への外部評価、並びに、データの蓄積を行いながら、株式会社同仁グローバル経由で販売を拡大していく。

以上

別紙 1

開発キットについて

キット名称：i-Strap W.B.

コンポーネント：4 種類

キットサイズ：10 サンプル用、30 サンプル用、100 サンプル用



図 48 それぞれのキットの写真

	販売予定価格（¥）
上：100 サンプル用	500,000
左下：30 サンプル用	200,000
右下：10 サンプル用	80,000

別紙 2

用語の説明

抗酸化能・抗酸化活性

酸化に対する防御機構として働く能力。酵素である生体内では SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）や、還元型グルタチオンなどが分子として代表的なものである。

初期抗酸化能

食品等の摂取前の抗酸化能の値

SOD（スーパーオキシドディスムターゼ）

スーパーオキシドを消去する酵素で、スーパーオキシドを過酸化水素と酸素に分解する。生じた過酸化水素はカタラーゼにより水と酸素に分解される。

ラジカル

不対電子を持つ極めて活性の高い分子種。その強い活性のため、生体内でダメージを与える化合物であるヒドロキシラジカルが有名である。

アダクト、スピニアダクト

ラジカルトラップ剤などを用いて安定化したラジカル分子。

ORAC 法

Oxygen Radical Absorbance Capacity（活性酸素吸収能力）の略。活性酸素種により分解される蛍光物質の蛍光強度減少量を Trolox との相対強度比で表示し、それぞれの検体の抗酸化力とする方法。単位は μ モル Trolox 当量/g で示される。

Trolox

化学名は 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid で、抗酸化活性を持ち、ORAC 法で抗酸化能を評価する際の標準物質として使用される。

DPPH 法

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl を用いてサンプルの抗酸化能を調べる方法。DPPH は 517 nm に吸収を持つ安定なラジカルで、抗酸化性化合物と反応すると吸収が消失する。その消失量から抗酸化活性を測定できる。

フェントン反応

鉄触媒によって過酸化水素からヒドロキシラジカル、ヒドロペルオキシドラジカルが発生する反応。

ESR (Electron Spin Resonance)

電子スピン共鳴法に基づくラジカル種、ラジカル量を分析する装置。

MS/MS 分析

タンデム質量分析法で、分子構造解析に用いられる。

差異・変動解析ソフト (SIEVE)

何らかの変化を加える前後でのシグナルの差、変化を解析するためのソフト。

スピントラップ剤、ラジカルトラップ剤

極めて不安定なラジカルを安定化する際に使用される化合物。一般的に電子スピン共鳴測定装置 (ESR) でラジカルを分析する際に使用する。

ヘパリンナトリウム

血液凝固を抑える薬剤で、採血の際に用いられる。

リポポリサッカライド、LPS

脂質や多糖からなるグラム陰性菌由来の高分子で、動物細胞に対して炎症等の生理現象を引き起こす。

LC/MS

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と質量分析装置 (MS) を繋ぎ一体化した装置で、液体クロマトグラフィーで混合物として存在する分子種を分離し、その後、質量分析装置で分子構造を解析するために使用される。HPLC は担体が充填された管の中を多くの成分を含むサンプルが流れていく際に、担体との分配や吸着度合いの違いによって分離し検出する方法。LC/MS の場合は、質量分析装置が検出装置になる。

HPLC

高速液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatography) の略で、混合物の分離分析や、化合物の純度検定に用いられる。

ホルモール態室素 (FAN)

アミノ酸を構成する窒素のことで、水溶性低分子ペプチドに含まれる窒素量であり、値が高いと旨味が多いとされる。

メイラード反応生成物

Maillard reaction。還元糖とタンパクやペプチドなどのアミノ酸化合物との縮合反応で、蛍光性化合物や重合物を精製する。食品の褐色化を引き起こす。