

論文

ESR・放射線照射法によるスーパーオキシドアニオンおよび
OHラジカル消去能の評価中川 清子*¹⁾ 関口 正之*¹⁾Evaluation of counter-activity to eliminate superoxide anion and OH radical
using ESR combined with radiolysisSeiko Nakagawa*¹⁾, Masayuki Sekiguchi*¹⁾

An aqueous solution containing 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) was set to the flowing system using a pump and irradiated with X-ray (voltage: 450 kV, current: 10 mA) in N₂O bubbling to produce OH radicals. OH radicals were trapped by DMPO and detected with ESR as the DMPO-OH adduct. The yield of DMPO-OH decreased along with the increase in quantity of anti-oxidants (p-coumaric acid, mannitol, and thymidine). The obtained relative reaction rates with the OH radical reasonably agreed with those previously obtained by pulse radiolysis. An aqueous solution containing sodium formate and 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (CYPMPO) was irradiated with low-energy electron beam (voltage: 250 kV, current: 1 mA, velocity of the conver: 60 m/min) to produce superoxide anion (O₂⁻). O₂⁻ were trapped by CYPMPO and detected with ESR as the CYPMPO-HO₂ adduct. The yield of CYPMPO-HO₂ decreased along with the increase in quantity of added polyphenols (hydroquinone, catechol and caffeic acid).

キーワード: スピントラップESR, 放射線照射, OHラジカル, スーパーオキシドアニオン, 抗酸化物質

Keywords: Spin-trapping ESR, Radiolysis, OH radical, Superoxide anion, Anti-oxidants

1. はじめに

生体内では、代謝の過程や紫外線の暴露などにより、OHラジカル、一重項酸素、スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)などの活性酸素種が生成することが知られている。これらの活性酸素種は、酸化ストレスとなり発ガンや疾病の原因になる。このため、抗酸化物質を含んだ食品が付加価値の高い食品として注目され、抗酸化作用の評価に関する需要が高まっている。活性酸素消去能の測定法としては、DPPH(2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル・ラジカル)の消去能を分光測定する方法、フルオレセインなどの蛍光物質の酸化度を測定する方法(ORAC法)、活性酸素由来のラジカルを電子スピン共鳴(ESR)で測定する方法などがある。

ESR法は、活性酸素種の発生源とラジカルを捕獲するスピントラップ剤を含んだ水溶液に試料を添加し、光照射などで生成した活性酸素種のESRスペクトルを測定する。試料の添加により、生成する活性酸素種由来のラジカル量が減少すれば、抗酸化性があると評価される。このように、ESR法は特定の活性酸素種を生成させて測定できる、実際の生体内での反応系に近いなどの理由により正確な評価法として期待されている。

ESR法において、ほとんどの研究例では、水銀ランプの紫外線を過酸化水素水に直接照射してOHラジカルを生成している。しかし、抗酸化物質の一種であるフェノール類は、水銀ランプの紫外線を吸収し、電子を放出することがわかっている⁽¹⁾。放出された電子は、過酸化水素と反応し、さらにOHラジカルを生成するため、正確な評価ができない可能性がある。我々は、過酸化水素: 1~1.25 mM(ただし、Mはmol/dm³である)、DMPO(5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド、スピントラップ剤): 200~500 μMの系に300~400 nmの紫外線を選択的に照射することで、この波長域に吸収を持たないポリフェノール類(カテコール、レスルシノール、ヒドロキノン、ピロガロール)のOHラジカル消去能が評価可能であることを確認した⁽²⁾⁽³⁾。しかし、食品に含まれるカテキン類やアントシアニン類などの多くのポリフェノール類は300~400 nmの波長域にも吸収があり、食品からの抽出液のOHラジカル消去能を過酸化水素水の紫外線分解を利用して正確に評価することは難しい。

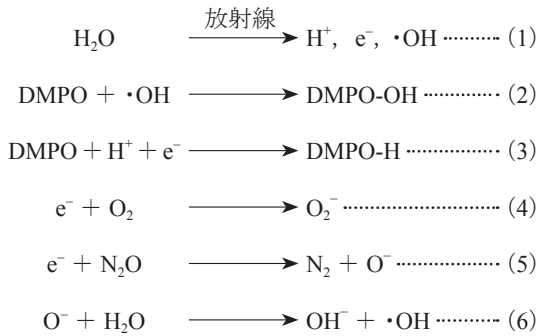
一方、放射線防護の観点から、水の放射線分解で生成するOHラジカルやO₂⁻と化学物質の反応速度について多くの研究が行われてきた^{(4)~(6)}。そこで、水の放射線分解とESR法を組み合わせた抗酸化能評価法について検討することとした。

事業名 平成26年度 基盤研究

*¹⁾ バイオ応用技術グループ

2. OHラジカル消去能の評価

2.1 実験方法 水に放射線照射すると、OHラジカル以外の活性種として、溶媒和電子やプロトンが生成する(反応1)。溶媒和電子およびプロトンが存在すると、スピントラップ剤と反応する(反応3)。ここで電子捕獲能力の高い亜酸化窒素を添加すると、溶媒和電子をOHラジカルに変換することができ(反応5-6)、OHラジカルのみをスピントラップすることが可能となる⁽⁶⁾。



DMPO水溶液と抗酸化物質を溶解した水溶液をそれぞれpH: 6.8で調整し亜酸化窒素でバブリングした後、液体クロマトグラフ用のポンプを利用して混合してフローさせ、コリメーターにより直径1 cmの照射野でX線を照射した(図1参照)。X線は450 kV, 10 mAとし、照射時間と線量は送液の速度で制御した。照射後、扁平セルに導入された試料をそのままESRで測定し、生成したDMPO-OHラジカルを定量した。

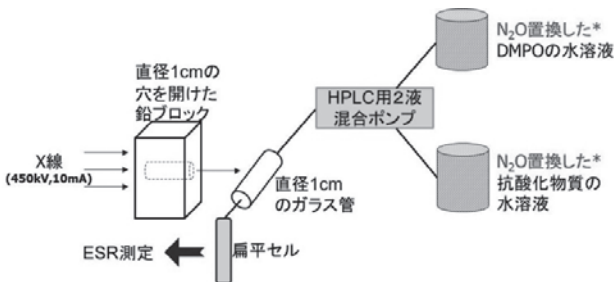


図1. OHラジカル消去能評価用装置概要

2.2 結果および考察 生成したDMPO-OHがOHラジカルとの反応で減少しない送液速度を検討するため、平均照射時間から単位時間あたりのDMPO-OHの生成量を求めた(図2)。送液速度に対するDMPO-OHの生成量は、2~4 ml/min程度で飽和し、OHラジカルとの反応が無視できると考えられる。送液速度を4 ml/minとしDMPOの濃度を変化させたところ、DMPO-OHの生成量は、20 μM以上ではほぼ一定であった(図3)。

送液速度: 4 ml/min (照射線量: 0.5 Gy程度), DMPO濃度: 50 μMで、チミジンを添加した時のESRスペクトルの変化を図4に示す。チミジンの添加によって、生成するDMPO-OHラジカルが減少した。

DMPOとOHラジカルの反応速度を k_1 、抗酸化物質とOH

ラジカルの反応速度を k_2 、抗酸化物質無添加および濃度[S]で添加した時のDMPO-OHの生成濃度をそれぞれ $[\text{DMPO-OH}]_0$ 、 $[\text{DMPO-OH}]_t$ とすると、

$$[\text{DMPO-OH}]_0 / [\text{DMPO-OH}]_t = 1 + k_2[\text{S}] / k_1[\text{DMPO}]$$

と表すことができる。

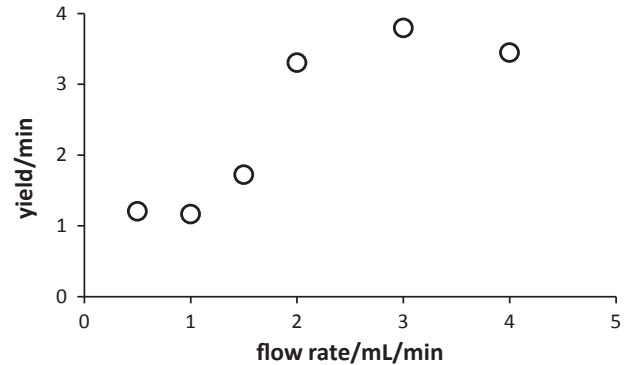


図2. 流速とDMPO-OH生成割合の関係

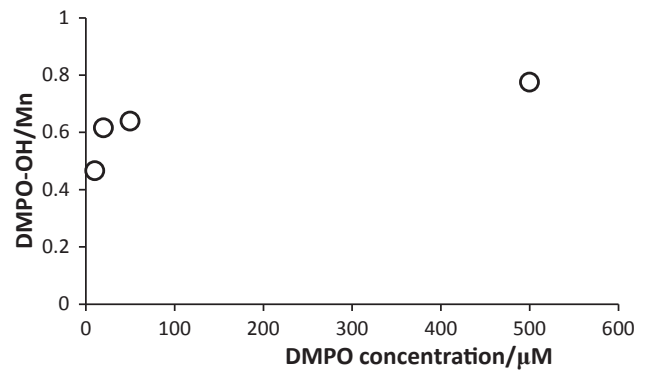


図3. DMPO濃度とDMPO-OH生成量の関係

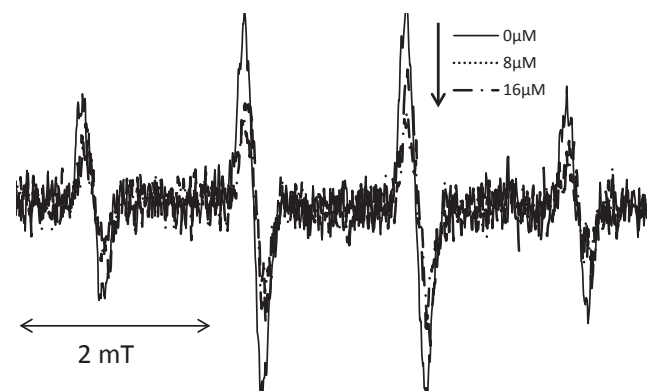


図4. チミジン添加によるDMPO-OH生成量の減少

図5は、 $[\text{DMPO-OH}]_0 / [\text{DMPO-OH}]_t$ を抗酸化物質とDMPOの濃度比に対してプロットしたものである。図5の傾きはDMPOに対する抗酸化物質のOHラジカルとの反応速度の比(k_2/k_1)であり、傾きが大きいほど反応速度が大きい(表1・第2カラム)。p-クマリン酸のOHラジカルとの反応速度を1.0とした時の相対比(第3カラム)は、パルス電子線を照射して活性種の吸光度の時間分解測定から得られた反応速度定数の相対比(第5カラム)とよく一致した。

p-クマリン酸は300 nm付近に吸収があり, 過酸化水素水の紫外線分解ではOHラジカル消去能の正確な評価が難しい。表1の結果から, 水の放射線分解を利用することで, 精度の高いOHラジカル消去能の評価ができることがわかった。

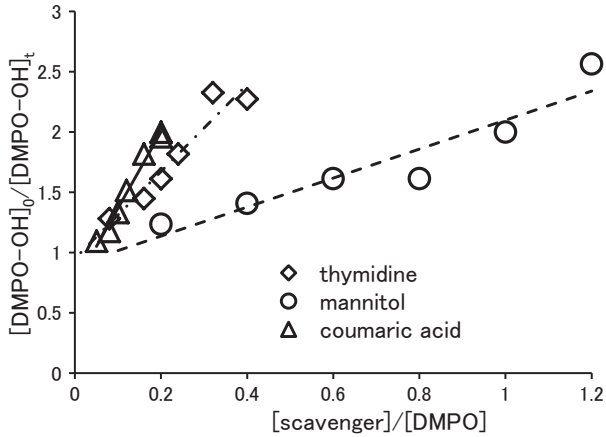


図5. OHラジカルに対するp-クマリン酸, チミジン, マンニトールとDMPOの反応速度の比較

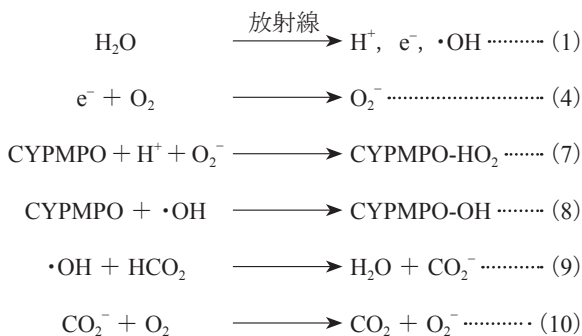
表1. OHラジカル消去能の比

	図5の傾き ^{a)}	相対比 ^{b)}	速度定数 ^{c)} /10 ⁹ M ⁻¹ s ⁻¹	相対比 ^{d)}
p-クマリン酸	6.3	1.00	8.7	1.00
チミジン	3.6	0.57	4.8	0.55
マンニトール	1.2	0.19	1.5	0.17

- a) 本測定で得られたDMPOに対するOHラジカルとの反応速度比
- b) aのp-クマリン酸を1とした場合の相対比
- c) パルスラジオリシス法により得られた反応速度定数⁽⁴⁾
- d) cのp-クマリン酸を1とした場合の相対比

3. スーパーオキシドアニオン消去能の評価

3.1 実験方法 水の放射線分解で生成した溶媒和電子は, 酸素存在下で酸素と反応してO₂⁻が生成する(反応4)。しかし, O₂⁻のスピントラップ剤との反応は遅いため, OHラジカルが存在するとOHラジカルをトラップしたラジカルが生成してしまう(反応8)。そこで, ギ酸ナトリウムを溶解し, OHラジカルをO₂⁻に変換する(反応9-10)⁽⁶⁾。また, DMPO-HO₂の寿命は数分と短いため, スピントラップ剤はCYPMPO (5-(2,2-ジメチル-1,3-プロポキシシクロフォスピロル)-5-メチル-1-ピロリン-N-オキシド)を使用した。



CYPMPO濃度: 1~2 mM, ギ酸ナトリウム1 Mとポリフェノール類(ヒドロキノン, カテコール, コーヒー酸)を溶解した水溶液(pH: 6.8) 50 μLを直径5 mm, 高さ2 mmのステンレス製容器に入れ, 両面テープで照射用トレイに, 固定した。容器にアルミ箔をかぶせ, 低エネルギー電子線照射(電圧: 250 kV, 電流: 1 mA, コンベア速度: 60 m/min, 平均照射線量: 約500 Gy)した(図6参照)。照射した試料は, 毛細管にサンプリングしてESRスペクトルを測定し, 生成したCYPMPO-HO₂ラジカルを定量した。

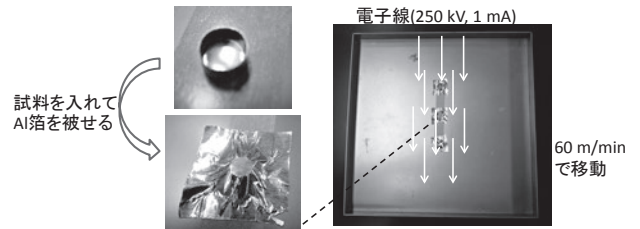


図6. O₂⁻消去能評価のための低エネルギー電子線照射における試料のセットアップ

3.2 結果および考察 CYPMPO-HO₂ラジカルのESRスペクトルを図7に示す。O₂⁻消去能の評価には, ○で囲った低磁場領域で信号を測定した。コーヒーに含まれるポリフェノールの一種であるコーヒー酸を添加した際のCYPMPO-HO₂ラジカルの変化を図8に示す。コーヒー酸の添加量が

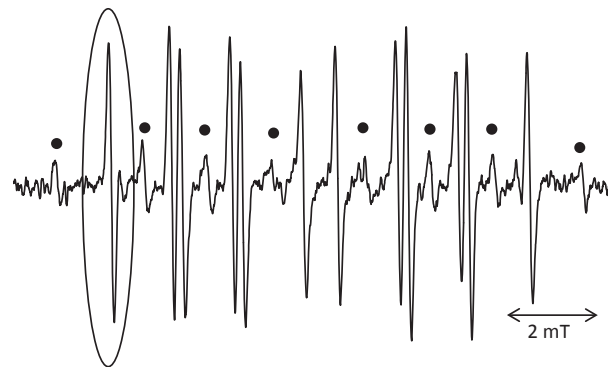


図7. CYPMPO-HO₂のESRスペクトル
●は, CYPMPO-H

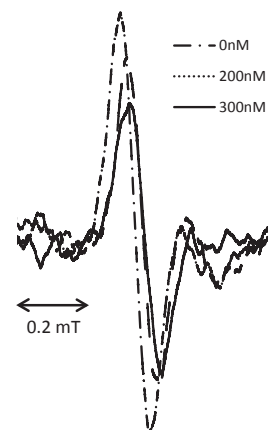


図8. コーヒー酸添加によるCYPMPO-HO₂の減少

増加するにしたがって、CYPMPO-HO₂ラジカルの生成量が減少した。

[CYPMPO-HO₂]₀/[CYPMPO-HO₂]_tをポリフェノール類(ヒドロキノン, カテコール, コーヒー酸)とCYPMPOの濃度比に対してプロットすると一次に比例した(図9参照)。三種のポリフェノール間で減衰の効率はほとんど変わらないことがわかった。ヒドロキノンおよびカテコールとO₂⁻の反応は、OH基におけるプロトンと対になった電子の移動を伴う反応機構で説明できる⁽⁷⁾。カテコールにプロペン酸が結合した構造を持つコーヒー酸においても、カテコールと同じ反応機構により同等のO₂⁻消去能を示すことは妥当であると考えられる。以上より、低エネルギー電子線照射を利用してO₂⁻消去能を評価できることが確認できた。

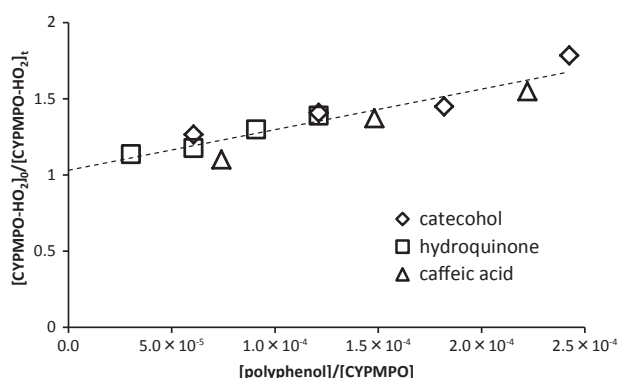


図9. O₂⁻に対するポリフェノールとCYPMPOの反応速度の比較

4. まとめ

水の放射線分解とスピントラップESR法を組み合わせることで、OHラジカルおよびスーパーオキシドアニオンの消去能評価が可能であることがわかった。今後、食品抽出液の測定が可能であることを確認し、食品の抗酸化能評価や化粧品紫外線除去能評価の試験に繋げていく。また、O₂⁻消去能評価の精度の向上に向けて、電子線照射用フローセルの開発を進めていく。

(平成27年7月22日受付, 平成27年8月11日再受付)

文 献

- (1) K. Ohara, A. Shimizu, Y. Wada, and S. Nagaoka: "Photochemical formation and decay of tocopheroxyl radical in vitamin E emulsion: A laser-photolysis study", *Photochem Photobiol A*, Vol.210, pp.173-176 (2010)
- (2) 中川清子, 関口正之: 「ESRを利用したOHラジカル消去能測定システムの検討」, 東京都立産業技術研究所研究報告, No.7, pp.122-123 (2012)
- (3) S. Nakagawa: "Estimation of Relative Reaction Rate of Hydroxy Radical with Poly-hydroxy Benzenes: ESR Spin Trapping Combined with UV-A Photolysis", *Anal. Sci.*, Vol.29, pp.377-380 (2013)
- (4) G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, and A. B. Ross: *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Vol.17, p.513 (1988)
- (5) W. Bors, C. Langebartels, C. Michel, and H. Sandertmann Jr.: "Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage", *Phytochemistry*, Vol.28, pp.1589-1595 (1989)