

年度は、「既存添加物名簿収載品目リスト」に収載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる7種類の添加物を用い、10通りの組み合わせでDPPH法により活性測定を行い、その結果をMedian effect analysisにより解析し併用効果を判定した。今年度は、更に化合物を追加するとともに、活性測定法をWST-1法に変えて検討を行うことにより、Median effect analysisの有用性を詳細に検証した。

本年度は、さらに新規の抗酸化活性評価法として国内外で注目されているOxygen radical absorbance capacity (ORAC)法による疎水性酸化防止剤の抗酸化能評価を試みた。ORAC法による疎水性化合物の抗酸化能評価は、通常反応溶媒にランダムメチル化シクロデキストリンあるいはヒドロキシプロピルシクロデキストリンを加える形で行われているが、反応溶媒は指定されていない。すなわち、測定には50%アセトン水溶液あるいはAWA溶液(アセトン:超純水:酢酸=700:295:5)が用いられているが、適用の可否に関する詳細な検討は行われていない。そこで、今回は代表的な疎水性酸化防止剤であるトコフェロール類を対象に、ORAC測定に及ぼす反応溶媒の影響とシクロデキストリン添加の必要性を検討した。

B. 研究方法

(1) DPPHラジカル消去活性測定法

Choiらの方法を一部変更して行った⁵⁾。試験管に試料溶液200 μL、100 mM Tris-HCl buffer (pH7.4) 800 μL、0.20 mM DPPHエタノール溶液1 mLを添加し、10秒間激しく攪拌した後、暗所で常温にて30分間静置した。30分後、反応溶液の517 nmにおける吸光度(As)を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をコントロール(Ac)とした。また、DPPH溶液の代わりにエタノールを添加した場合の吸光度をブランクとした。コントロールの吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率(%)を求めた(下式)。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

(2) WST-1法

SOD Assay Kit-WST(同仁化学研究所製)の使用方法を一部改変して行った。96穴マイクロプレートに20 μLの試料溶液、200 μLのWST working solution、20 μLのEnzyme working solutionを順次添加し、マイクロプレートリーダーで攪拌した。Enzyme working solutionの添加から正確に10分後にマイクロプレートリーダーで450 nmにおける吸光度を測定した。試料の代わりに超純水またはエタノールを添加した際の吸光度をブランク1(B1)、Enzyme working solutionの代わりにDilution bufferを添加した場合の吸光度をブランク2(B2)(試料添加時)、ブランク3(B3)(超純水またはエタノール添加時)とした。ブランク1の吸光度に対する、試料添加時の吸光度の減少の割合から阻害率(%)を求めた(下式)。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{(B1 - B3) - (\text{サンプル} - B2)}{(B1 - B3)} \times 100$$

試料のSOSAは、スーパーオキシドジスムターゼ等価活性、すなわちSOD等価活性で示した。SOD単位は、「WST-1法において50%阻害を与える試料濃度がSOD 1 unitに相当する」と定義した。SOD等価活性とはIC₅₀をもたらずSOD濃度(Units/ml)とIC₅₀をもたらず試料濃度(mg/ml)が等しい活性を有するとみなし、試料1 mgあたりのSOSAをSOD単位(Units/mg)で示したものである。

(3) 併用効果の判定

併用効果の判定は、以下の式(Median effect equation)に基づく解析法であるMedian effect analysisにより行った。解析法の詳細については平成20年度の厚生科研研究報告書に記載している。

$$fa/fu = (D/Dm)^m$$

本実験では、各酸化防止剤（単独使用）について DPPH 法及び WST-1 法による活性測定を行った後、2 種類の酸化防止剤を各々の IC₅₀ 濃度の比（モル比）に近い割合で混合して、再度測定を行った。得られた測定結果を基に Median effect plot を行い、Combination Index (CI) 値を算出した。なお本実験では、一連の解析（Median effect plot の作成及び CI 値の算出）に、市販の解析ソフト（Biosoft 社 CalcuSyn ver. 2.0）を用いた。

(4) ORAC 法

Prior らの方法を一部変更して行った⁶⁾。96 穴マイクロプレートに 20 μL の試料溶液、200 μL の 94.4 nM Fluorescein working solution を添加し、10 分間 37°C でプレインキュベーションした後、励起波長 485 nm、蛍光波長 515 nm で蛍光強度を測定した。続いて、37°C で 10 分間プレインキュベーションした 31.7 mM 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) をマルチチャンネルピペットで 75 μL 添加し、直ちにマイクロプレートリーダーにセットした。攪拌後、測定温度 37°C、2 分間隔で 90 分間、蛍光強度を測定した。ブランクには試料溶液の代わりに試料溶媒を添加した。測定値から AUC を算出し、各試料の AUC からブランクの AUC を差し引いたものを netAUC とした。

$$AUC = (0.5 \times f_{8min} + f_{10min} + f_{12min} + \dots + f_{88min} + 0.5 \times f_{90min}) / f_{0min} \times 2$$

$f_{i \text{ min}}$: 測定開始 i 分後の蛍光強度

$$\text{netAUC} = \text{AUC}_{\text{Sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

標準溶液として用いた Trolox 溶液の netAUC を X 軸に、濃度を Y 軸にとったグラフより、二次回帰式 ($Y = ax^2 + bx + c$) を求め、この式から相対 ORAC を算出した。

$$\text{相対 ORAC 値 } (\mu\text{mol}/\mu\text{mol}) = [a \times (\text{netAUC}_{\text{Sample}})^2 + b \times (\text{netAUC}_{\text{Sample}}) + c] / [\text{Sample}]$$

C. 研究結果及び考察

(1) Median effect analysis による併用効果の解析

「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で単一の成分からなる 8 種類の添加物（カテキン、ケセルチン、セサモール、フェルラ酸、モリン、エラグ酸、*d*- α -トコフェロール、没食子酸）を用い、DPPH 法により 4 通り（昨年と合わせて計 14 通り）、WST-1 法で 8 通りの組み合わせで併用効果を検討した。判定結果は、表 1 にまとめて示した。なお、DPPH 法での結果に関しては、比較のために Fractional product method（19 年度厚生科学研究）の判定結果を併せて示した。

DPPH 法の Median effect analysis では、相乗効果 1 組、相加効果 7 組、相殺効果 6 組という判定結果が得られた。没食子酸及びエラグ酸を含む複数の組合せで相殺効果が認められたことが特徴的であった。また、Fractional product method の結果と比較すると、一致する組合せは 4 組しか無かったが、Fractional product method で相乗効果と判定された組合せでは相加性を僅かに上回る程度であったことを考慮すると、両者の判定結果は大きく異なるものではないと考えられた。しかしながら、Median effect analysis での反応型をみると、比較した 13 組の組合せが I あるいは III 型に該当していること、すなわち互いの酸化防止剤が排他的（拮抗的）に作用して反応していることが判明した。このことは、本実験での酸化防止剤混合系が Fractional product method の適用条件（互いの酸化防止剤が独立して作用）に合致しないことを示しており、Fractional product method が酸化防止剤併用効果の判定に適用困難であることが示唆された。

WST-1 法では、疎水性試料の測定が困難であったため、測定可能な計 8 通りの組合せで Median effect analysis による解析を行った。その結果、相乗 1 組、相加 3 組、相殺 4 組という判定結果が得られた（表 1）。DPPH 法と比較すると、5 通りの組合せで判定結果が一致していた。特に、没食子酸あるいはエラグ酸を含む 3 通りの組合せでは、両法で相殺効果と判定されたことから、これらの酸化防止剤の併用は相殺効果を招く危険性が高い

と考えられた。さらに、CIプロット(図1)により、fa値によりCI値が大きく変化する可能性があることが判明した。このことは、併用時の濃度条件により併用効果が異なる場合があることを示唆しており、この結果から、Median effect analysisではWST-1法の場合も濃度範囲に応じた併用効果の解析が可能であることが確認された。

(2) ORAC法による疎水性酸化防止剤の測定

「既存添加物名簿収載品目リスト」に記載されている天然物酸化防止剤の中で、代表的な疎水性の酸化防止剤である*d*- α -トコフェロール、*d*- δ -トコフェロールのORAC測定を試みた。反応溶媒としてリン酸塩緩衝液、50%アセトン水溶液(アセトン：超純水=1：1)、AWA溶液(アセトン：超純水：酢酸=700：295：5)を用いた。溶解助剤としてランダムメチル化シクロデキストリンを用い、その使用の有無による比較を行った。その結果、ランダムメチル化シクロデキストリン7%を含むAWA溶液でのみ、ORAC測定が可能であることが判明した。得られたORAC値は、*d*- α -トコフェロールで 0.65 ± 0.10 、*d*- δ -トコフェロールで 3.31 ± 0.81 であり、文献値(*d*- α -トコフェロール： 0.50 ± 0.02)⁷⁾とほぼ一致する結果となった。

D. 結論

昨年度に引き続き、薬剤の併用効果判定に汎用されているMedian effect analysisの適用性を検討した。8種類の添加物を用い、DPPH法により4通り(昨年と合わせて計14通り)、WST-1法で8通りの組み合わせで併用効果を検討した結果、DPPH法とWST-1法では概ね一致した結果が得られた。さらに、Median effect analysisによる反応型の検証により、酸化防止剤両者が排他的(拮抗的)に反応していることが明らかになり、併用効果の解析に使用実績のあるFractional product methodが適用困難であることが判明した。Median effect analysisでは濃度レベルに応じた判定も可能であり、本法の有用性があらためて示された。

ORAC法による疎水性酸化防止剤の測定では、ランダムメチル化シクロデキストリンとAWA溶液の組合せが最適であることが示された。

E. 研究発表

(1) 論文発表

松藤寛、佐々怜一郎、本間友輝、宮島拓臣、山崎壮、受田浩之、島村智子、松井利郎、松本清、山形一雄：抗酸化物質の2成分混合系におけるDPPHラジカル消去活性、日本食品科学工学会誌、56(3)、129-136(2009)

(2) 学会発表

井邊早春、石川洋哉、受田浩之、山崎壮、松井利郎、松本清：酸化防止剤混合系におけるDPPHラジカル消去活性測定とMedian effect analysisによる併用効果の判定 第46回化学関連支部合同九州大会(2009.7、北九州)

井邊早春、石川洋哉、受田浩之、山崎壮、松井利郎、松本清：Median effect analysisによる酸化防止剤混合系における併用効果の判定 日本食品科学工学会第56回大会(2009.9、名古屋)

参考文献

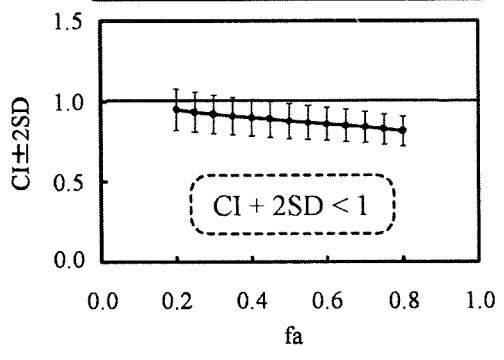
- 1) J. L. Webb *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol 1, pp 55-79, Academic press, New York (1963).
- 2) M. Doret et al., *Int. J. Obster. and Gynaec.*, **110**, 731-734(2003).
- 3) J. Shi et al., *J. Food Comp. Anal.*, **20**, 603-608 (2007).
- 4) T. C. Chou and P. Talalay *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 27-55(1984)
- 5) H-S. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4156-4161 (2000).
- 6) Prior, L. R. et al., *J. Agric. Food Chem.*, **51**(11), 3273-3279(2003)
- 7) D. Huang. et al., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1815-1821(2002)

表 1 併用効果の判定結果

物質名	反応型	Fractional product method (DPPH 法)	Median effect analysis	
			DPPH 法	WST-1 法
α-トコフェロール + ケルセチン	Ⅲ	相乗	相乗	—
α-トコフェロール + モリン	Ⅲ	相乗	相加	—
セサモール + フェルラ酸	I	相乗	相加	—
セサモール + カテキン	I or Ⅲ	相乗	相加	—
エラグ酸 + 没食子酸	Ⅲ	相乗	相加	相乗
カテキン + ケルセチン	I or Ⅲ	相乗	相加	相加
セサモール + エラグ酸	I	相乗	相殺	—
フェルラ酸 + 没食子酸	I	相乗	相殺	相加
モリン + カテキン	Ⅲ	相加	相加	相加
モリン + フェルラ酸	Ⅲ	相加	相加	相殺
α-トコフェロール + カテキン	不能	相加	相殺	—
カテキン + 没食子酸	I	相加	相殺	相殺
ケルセチン + 没食子酸	I	相加	相殺	相殺
フェルラ酸 + エラグ酸	I or Ⅲ	相殺	相殺	相殺

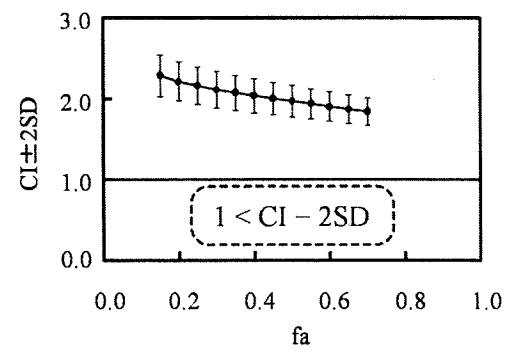
相乗効果

α -トコフェロール + ケルセチン



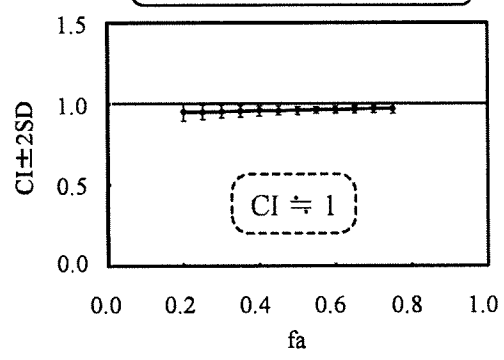
相殺効果

フェルラ酸 + エラグ酸



相加効果

フェルラ酸 + セサモール



高濃度: 相乗効果
低濃度: 相殺効果

α -トコフェロール + モリン

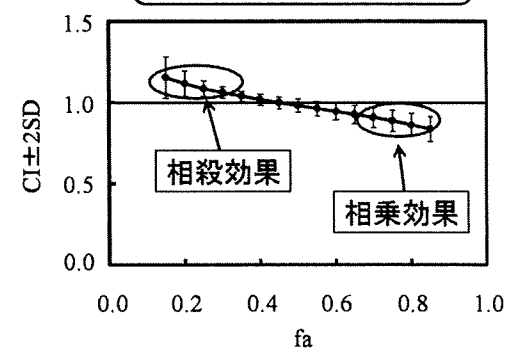


図1 CIプロット

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発

平成 21 年度分担研究報告書

抗酸化活性測定法の既存添加物の有効性評価への応用に関する研究

－既存添加物ドクダミ抽出物の有効性の評価－

研究分担者 多田敦子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部 主任研究官

研究協力者 石附京子 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部

研究要旨

既存添加物ドクダミ抽出物の有効性評価のため、含有抗酸化物質による抗酸化活性寄与率を求めた。DPPH 抗酸化活性測定法により、既存添加物ドクダミ抽出物と含有される各種化合物の試薬製品について抗酸化比活性値を測定した。添加物製品は明らかな抗酸化活性を有することが確認された。また各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化比活性値を昨年度報告した添加物製品中のクエルセチン配糖体他各種成分の定量値と掛け合わせることで、添加物製品全体の抗酸化活性への各含有成分の寄与率を求めた。その結果、添加物製品の活性の約 20%が、各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性により説明できることが明らかとなった。

A. 研究目的

既存添加物ドクダミ抽出物（英名：Dokudami extract）は、既存添加物名簿¹⁾に記載されている酸化防止剤の 1 つで、その定義は、「ドクダミの葉から得られた、イソクエルシトリンを主成分とするものをいう。」と記載されている。また、既存添加物名簿収載品目リスト²⁾の基原・製法・本質には、「ドクダミ科ドクダミ (*Houttuynia cordata* THUNB.) の葉より、エタノールで抽出し、精製して得られたものである。主成分はイソクエルシトリンである。」と記載されている。

昨年度までに、既存添加物製品として提供されたドクダミ抽出物 2 製品のフラボノド等の成分組成を LC/MS 分析により明らかにし報告した。また、ドクダミ *H. cordata* を基原とする生薬ジュウヤク製品の葉由来部の抽出物との成分組成との類似から、添加物製品の基原が *H. cordata* であることを確認した。

本研究では、既存添加物ドクダミ抽出物の酸化防止剤としての有効性を、DPPH 抗酸化活性

測定法により評価し、ドクダミ抽出物中の各成分の抗酸化活性寄与率を求めた。

B. 研究方法

B-1. 試料

既存添加物製品は、日本食品添加物協会を通じて入手した 2 製品 (D0-1, D0-2 と略す) を使用した。ドクダミ抽出物中のフラボノイド (Fig. 1) の分析用標品として、ルチン三水合物 rutin trihydrate : quercetin 3- \underline{O} - β -rutinoside trihydrate(1) (東京化成工業 (株), Cat. No. R0035), ヒペリン hyperin (ヒペロシド hyperoside) : quercetin 3- \underline{O} - β - \underline{D} -galactoside(2) (フナコシ (株), Cat. No. TKW P2202), イソクエルシトリン isoquercitrin : quercetin 3- \underline{O} - β - \underline{D} -glucoside(3) (関東化学 (株), Cat. No. 20311-96, 純度 92.2% (UV 254 nm における HPLC 面積百分率)), クエルシトリン quercitrin : quercetin 3- \underline{O} - α - \underline{L} -rhamnoside(4) (ChromaDex 社製, 和光純薬

工業(株)販売, Cat. No. ASB-00017170), クエルセチン二水和物 quercetin dihydrate(5) (和光純薬工業(株), Cat. No. 177-00401), クロロゲン酸 0.5 水和物: 3-caffeoylquinic acid hemihydrate (Fig.1, II): CAS No. 327-97-9: CA Index Name cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1, 4, 5-trihydroxy-, (1*S*, 3*R*, 4*R*, 5*R*)- (和光純薬工業(株), Cat. No. 039-14243) を用いた。

抗酸化活性測定用試薬として, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (和光純薬工業(株), Cat. No. 047-04051), (±)-6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox)

(Sigma-Aldrich 社, Cat. No. 23, 881-3), Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) (Sigma-Aldrich 社, Cat. No. T1503) を使用した。

上記以外の試薬・溶媒はすべて市販特級品または HPLC 用を使用した。

B-2. DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性の測定は, 島村らの方法³⁾に従った。すなわち, 50%エタノールに溶解した試料 0.2 mL に 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 0.8 mL, 0.2 mM DPPH-エタノール溶液 1.0 mL を順次添加し, 10 秒間攪拌後, 室温暗所下にて 30 分静置した。その後 517 nm の吸光度 (As) を測定した。試料溶液の代わりにエタノールを添加した際の吸光度をコントロール (Ac) として, 試料の消去率 (%) を以下の式(1)で求めた。また本実験では, 50%消去率をはさむ 2 点間での回帰直線より, 試料溶液が 50%消去率を与える濃度 IC₅₀ (μg/mL) を求めた。さらに Trolox を標準物質として同様の方法で IC₅₀ (μg/mL) を求め, 以下の式(2)を用い, 各試料のラジカル消去活性を Trolox

等価活性 (TEAC) として算出した。

$$\text{消去率 (\%)} = (Ac - As) / Ac \times 100 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$\text{TEAC} = \text{Trolox の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) / \text{試料の IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) \quad \dots \text{式(2)}$$

C. 結果及び考察

C-1. ドクダミ抽出物および含有成分の抗酸化活性

これまでの報告^{4), 5)}に, ドクダミから作製した抽出物の DPPH ラジカル消去活性を調べた例はあるが, 既存添加物ドクダミ抽出物製品についての報告は無く, また, 各含有成分によるラジカル消去活性寄与率を調べた報告は無い。そこでまず, 既存添加物 2 製品の DPPH ラジカル消去活性を調べた (Fig. 2)。2 製品とも濃度に依存して活性が上昇し, 消去率 60~70% を超える濃度から頭打ちを示す傾向が認められたが, 60% の消去率を示す濃度までは相関係数 0.99 以上の直線性を持ってラジカルを消去した。D0-1 および D0-2 の IC₅₀ 値は, それぞれ 658.0 ± 5.10 μg/mL および 289.9 ± 0.73 μg/mL, TEAC 値は 0.09 および 0.21 と算出された。

さらに, 添加物製品から検出された成分の試薬製品を用いて DPPH ラジカル消去活性を測定し, IC₅₀ 値および TEAC 値を求めた (Table 1)。試薬濃度 (μg/mL) は, 無水物換算で示した。なお, 試薬イソクエルシトリンのみは, LC/MS による分析の結果, 不純物としてクエルセチンを 4.31% 含有していたため, 不純物クエルセチンに起因するラジカル消去活性を差し引いて IC₅₀ 値を算出した。いずれの成分も TEAC 値が 1 より大きく, Trolox よりも強い DPPH ラジカル消去活性を示した。

C-2. 添加物製品中の各含有成分の抗酸化活性寄与率の算出

LC/MS による定量値⁶⁾ (Table 2) と DPPH ラジカル消去活性の IC₅₀ 値 (Table 1) を元に, 既

存添加物2製品における各含有成分の抗酸化活性寄与率を算出した(Table 3). 既報⁷⁾によると, 4-および5-caffeoylquinic acidのDPPHラジカル消去活性は3-caffeoylquinic acidとほぼ同じレベル(IC₅₀値が約0.9および1.2倍)であることから, 今回標品の入手不可であった5-および4-caffeoylquinic acidについては, 3-caffeoylquinic acidのIC₅₀値を用いて寄与率を算出し, caffeoylquinic acid類の合計寄与率として示した. その結果Table 3に示すように, 既存添加物2製品いずれにおいても, 抗酸化活性の約20%が, 各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性に起因することが明らかとなった.

D. 結論

既存添加物ドクダミ抽出物の有効性評価のため, 含有抗酸化物質による抗酸化活性寄与率を求めた. DPPH抗酸化活性測定法により, 既存添加物ドクダミ抽出物と含有される各種化合物の試薬製品について抗酸化比活性値を測定した. 添加物製品は明らかな抗酸化活性を有することが確認された. また各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化比活性値を昨年度報告した添加物製品中のクエルセチン配糖体他各種成分の定量値と掛け合わせることで, 添加物製品全体の抗酸化活性への各含有成分の寄与率を求めた. その結果, 添加物製品の活性の約20%が, 各種フラボノイドおよびクロロゲン酸の抗酸化活性により説明できることが明らかとなった. 本研究により得られた既存添加物ドクダミ抽出物製品の品質評価の結果は, 民間薬あるいは健康食品として市場に流通している各種ドクダミ製品の品質評価法を行う上でも有用と考えられる.

E. 参考文献

1. 厚生省告示第120号“既存添加物名簿”平成8年4月16日(1996)
2. 厚生省生活衛生局長通知“別添1 既存添

加物名簿収載品目リスト”(平成8年5月23日). 衛化第56号(1996)

3. Shimamura, T., Matsuura, R., Tokuda, T., Sugimoto, N., Yamazaki, T., Matsufuji, H., Matsui, T., Matsumoto, K., Ukeda, H., :Comparison of conventional antioxidants assays for evaluating potencies of natural antioxidants as food additives by collaborative study. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **54**, 482-487 (2007)
4. Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., :Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, **163**, 1161-1168 (2002)
5. Cho, E.J., Yokozawa, T., Rhyu, D.Y., Kim, S.C., Shibahara, N., Park, J.C., :Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine*, **10**, 544-551 (2003)
6. 厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業), 既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発,
平成20年度分担研究報告書, 既存添加物ドクダミ抽出物の成分分析(2009)
7. Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., Fujita, Y., :In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4893-4898 (2004)

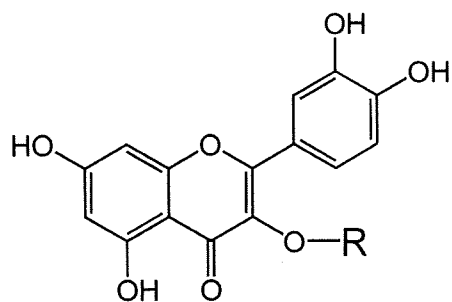
F. 研究発表

1. 論文発表

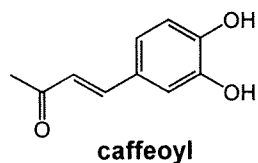
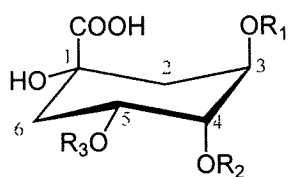
なし

2. 学会発表

- 1) 石附京子、多田敦子、高橋加奈、杉本直樹、松本清、受田浩之、松藤寛、山崎壮、河村葉子. LC/MS による既存添加物ドクダミ抽出物中の成分の定量と抗酸化活性測定. 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会 (2009. 10、函館).



No.	Compound	R
1	Rutin	Glc ^β -1-Rha
2	Hyperin	Gal
3	Isoquercitrin	Glc
4	Quercitrin	Rha
5	Quercetin	H



No.	Compound	R ₁	R ₂	R ₃
I	5-O-Caffeoylquinic acid	H	H	caffeoyl
II	3-O-Caffeoylquinic acid	caffeoyl	H	H
III	4-O-Caffeoylquinic acid	H	caffeoyl	H

Fig. 1 Structures of flavonoids and caffeoylquinic acid isomers in Dokudami extract

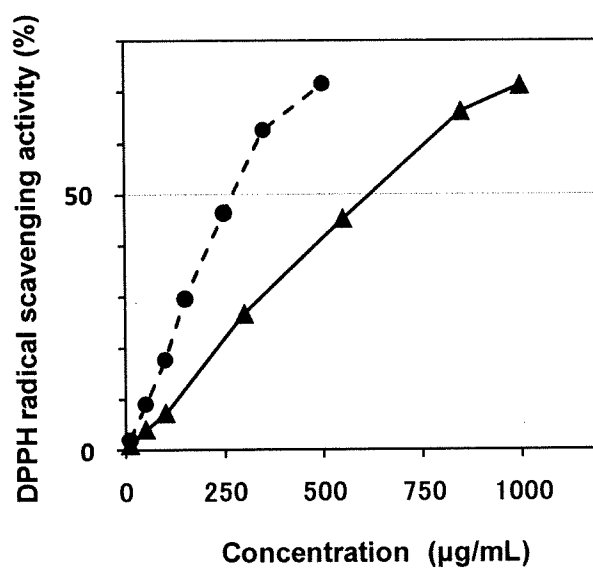


Fig. 2 DPPH radical scavenging activity of Dokudami extract products DO-1 (▲) and DO-2 (●).

Table 1 DPPH raddical scavenging activity of compounds identified in Dokudami extract products

Compound	IC ₅₀ value* (µg/mL)	TEAC**
3-Caffeoylquinic acid	30.9±0.42	1.95
Rutin	56.3±0.41	1.07
Hyperin	40.8±0.65	1.48
Isoquercitrin	50.5±0.73	1.19
Quercitrin	45.9±0.25	1.31
Quercetin	20.1±0.12	3.00

* IC₅₀ values were determined by regression linear and expressed as means ± SD (*n* = 3).

**TEAC are expressed as means (*n* = 3).

Table 2 Determination of flavonoids and caffeoylquinic acids in Dokudami extract products (DO-1 and -2) by LC/MS analysis

Compound	Concentrations** (%) in products	
	DO-1	DO-2
Caffeoylquinic acids*	0.55±0.037	0.91±0.001
Rutin	0.04±0.002	0.10±0.008
Hyperin	0.16±0.009	0.36±0.031
Isoquercitrin	0.05±0.001	0.11±0.004
Quercitrin	0.49±0.026	1.05±0.074
Quercetin	0.03±0.001	0.03±0.001

* 3-, 4- and 5-caffeoylquinic acids

** Concentrations (%) are expressed as means ± SD (*n* = 3).

Table 3 Contribution of each constituent to DPPH radical scavenging activity of Dokudami extract products

Compound	Contribution* (%) to the scavenging activity of	
	DO-1	DO-2
Caffeoylquinic acid	11.8	8.6
Rutin	0.5	0.5
Hyperin	2.6	2.6
Isoquercitrin	0.6	0.6
Quercitrin	7.0	6.6
Quercetin	0.9	0.4
total	23.5	19.3

* Contribution (%) are expressed as means ($n = 3$).

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
既存添加物の有効性と品質を確保するための規格試験法の開発
平成 21 年度分担研究報告書

天然酸化防止剤の品質劣化及び過剰使用の有害影響に関する研究
研究分担者 松藤 寛 日本大学生物資源科学部 准教授

研究要旨

天然酸化防止剤であるローズマリー抽出物およびチャ抽出物を高濃度で強制的に劣化させた際の、有害物質生成の可能性をヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた遺伝毒性試験により評価した。昨年度明らかとなったローズマリー抽出物を加熱した際に生じる小核誘発を示す遺伝毒性物質は、ヘキサシラン層へ移行しやすく、HPLC で 19～23 分に溶出する成分の可能性が示された。これらの成分は経時的に生成するが、低温下での生成は緩やかであった。しかし、検討した温度範囲（70～120℃）内での生成量はある一定時間後にプラトーに達し、更なる分解は起こらないと考えられた。ローズマリー抽出物にアスコルビン酸を添加したところ、濃度依存的に生成は抑制されることが判明した。一方、チャ抽出物の遺伝毒性を調べたところ、濃度依存的に小核誘発並びに遺伝子突然変異を示し、遺伝毒性陽性であった。しかし、カタラーゼを併用すると遺伝毒性は顕著に低下したことから、測定中に主成分であるカテキン類から生じる過酸化水素によって遺伝毒性を示したと考えられた。他方、加熱によって主成分が完全に分解したチャ抽出物の熱分解物も未処理と同等の遺伝毒性を示した。しかし、この熱分解物もカタラーゼを併用すると遺伝毒性は顕著に低下した。フラボノイド類は培地中で過酸化水素を発生することが知られており、これによりプロオキシダント活性や細胞への酸化障害が起きる可能性があることは指摘されているものの、本結果はフラボノイド類の分解物からも同様の条件下で過酸化水素が発生していることを示唆した。

A. 研究目的

近年、健康志向とあいまって、天然物由来の抗酸化物質は様々な疾病予防効果の観点から健康食品を中心として注目を集めている。一方、天然物であるので安全である、食品添加物として使用されているので安全であるという発想に基づく健康食品もあり、過剰摂取やプロオキシダント作用などの安全性が指摘、懸念されている。このことは、食品中でも天然酸化防止剤の劣化や過剰使

用により酸化防止剤のプロオキシダント作用による有害物質生成の可能性があり得る。従って、天然酸化防止剤の過剰使用や劣化による有害物質生成の可能性を調べると共に、有害物質生成を防ぐための成分規格、使用基準、適正使用に資する基礎的情報を得ることは、食品添加物としての天然酸化防止剤の安全性のみならず、天然酸化防止剤を食品として利用するに当たっても極めて有益となる。また、有害物質の特定化は、

その食品のハザードマーカ―となり、ハザード特性を解析する上で重要となる。

本研究では、過剰濃度で天然酸化防止剤を強制的に酸化劣化させ、一次スクリーニングとして有用なヒトリンパ芽球細胞株 TK6 による *in vitro* 遺伝毒性を用いて有害物質生成の可能性について検討した。

なお、化学物質の安全性評価（リスク評価）は、ハザード評価（有害性）と摂取量の両方によってなされ、ハザード評価は一般毒性試験や特殊毒性試験によって評価される。言い換えると、これらの評価を踏まえた上で披験物質が有害物質かどうか決定される。また、遺伝毒性物質も *in vitro* 試験で陽性を示した物質は *in vivo* 試験で確認され、さらに発ガン試験等の特殊毒性試験により評価されなければならないが、本研究ではその可能性を見出すことを目的とすることから、有害物質や遺伝毒性物質という文言を使用する。

昨年度、天然酸化防止剤の一つであるローズマリー抽出物を過剰濃度条件下で強制的に熱分解し、その遺伝毒性を調べたところ、ローズマリー抽出物そのものでは認められなかった小核誘発頻度が、熱分解物では濃度依存的に増加し、遺伝毒性物質が生成している可能性が示唆された（図 1）。

そこで、本研究では遺伝毒性物質の特定化とその生成抑制について検討した。また、他の酸化防止剤としてチャ抽出物について、同様の試験を試みた。

B. 実験方法

(1) 試料

ローズマリー抽出物（粉末試料）は昨年同様 DMSO に溶解した（15 mg/mL）。ま

た、チャ抽出物は遺伝毒性試験に要する最大濃度となるように、100 mg/mL となるように DMSO に溶解した。これらは使用するまで -20°C で保存した。

(2) 熱分解

スクリーキャップ付きの試験管に試料（10 mL）を入れ、ヒートブロック（95°C）で加熱し、熱分解させた。これらを経時的に HPLC に供し（適宜希釈後）、主要成分のピーク面積がほぼ半分、あるいはほぼ消失した分解物試料を作成し、以後の実験に用いることとした。なお、処理試料は複数本調製し、HPLC 分析前に混合し、分析終了後に再び試験管に戻すことにより、熱処理のばらつきを抑えることとした。

ローズマリー抽出物の HPLC 条件：カラム：Waters XBridge C18（4.6×150 mm, 5 μm）、溶媒：30% アセトニトリル（0.1%ギ酸含有）（0分）→80% アセトニトリル（0.1%ギ酸含有）（20分）→80% アセトニトリル（0.1%ギ酸含有）（10分）、流速：1.0 mL/min、検出波長：285 nm、温度：40°C。

チャ抽出物の HPLC 条件：カラム：Waters XBridge C18（4.6×150 mm, 5 μm）、溶媒：5% アセトニトリル（0.1%ギ酸含有）（0分）→80% アセトニトリル（0.1%ギ酸含有）（30分）→80% アセトニトリル（0.1%ギ酸含有）（5分）、流速：1.0 mL/min、検出波長：280 nm、温度：40°C。

(3) TK 遺伝毒性試験

TK 遺伝毒性試験は昨年同様、既報^{1,2)}にしたがい行った。すなわち、ヒトリンパ芽球細胞 TK6 に種々の濃度の試料を加えて 37°C で 4 時間処理した。新鮮な培地

(RPMI1640)で洗浄後、37°C、5% CO₂の条件下で培養した。処理直後から3日間の生細胞数をカウントし、無添加区と比較することにより細胞増殖率を求めた(細胞毒性として評価)。また処理直後から48時間後に小核が出現した細胞数を蛍光顕微鏡下でカウントすることにより小核誘発頻度を、処理直後から72時間後にトリフルオロチミジンを追加し薬剤耐性を獲得したtk遺伝子変異体を検出することによりtk遺伝子突然変異頻度を評価した。

また、カタラーゼを追加する際は、終濃度が5あるいは20 units/mLとなるようにTK6細胞に加え、直後に試料を加えて37°Cで4時間処理した。

遺伝毒性の評価は、濃度依存性があり、試料無添加区に対して2倍以上の小核誘発頻度あるいは遺伝子突然変異頻度を示したとき、遺伝毒性有りと判定した。

(4) 加熱したローズマリー抽出物の分画

29時間加熱したローズマリー抽出物50 mLに水50 mLを加えた後、順次、*n*-ヘキサン(100 mL)、酢酸エチル(100 mL)、1-ブタノール(100 mL)での分液処理(各々3回)を行った。濃縮後、少量のDMSOに再溶解し凍結乾燥により乾燥試料を得た。これらを3.0 mg/mLとなるようにDMSOに溶解し、遺伝毒性試験に供した。

C. 研究結果及び考察

(1) ローズマリー抽出物の熱分解による遺伝毒性物質生成について

1-1 遺伝毒性物質の探索

遺伝毒性物質の精製を目的として、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールによる

順次分画を試みた。図2に示したように、ローズマリー抽出物の加熱によって生じた分解物はヘキサン層または酢酸エチル層へ分画され、遺伝毒性物質はヘキサン層へ移行することが判明した。従って、加熱によって顕著に生じる19分~23分に出現するピーク成分が遺伝毒性を示す可能性が示唆された。

1-2 遺伝毒性成分の生成抑制について

19分から23分に溶出する成分のピーク面積を遺伝毒性成分の生成指標として、その抑制効果について検討した。まず、加熱温度について検討したところ、図3に示すように、温度を低下させることにより、生成は緩やかになることが判明した。しかし、検討した温度範囲内では、生成した物質の更なる分解は起こらず、その生成量はプラトーに達することから、安定した構造を有していると考えられた。

次いで、各種抗酸化物質(BHT、BHA、アスコルビン酸、トコフェロール)をローズマリー抽出物に添加し、遺伝毒性物質の生成抑制効果について検討した。その結果、アスコルビン酸は濃度依存的に顕著な抑制効果を示すことが明らかとなった(図4、5)。

今後、これらの構造決定を行うと共に、*in vivo*遺伝毒性等により毒性を示すかどうかを検討し、ハザードマーカーとしての可能性を追求する必要がある。

(2) チャ抽出物の熱分解による遺伝毒性物質生成の可能性について

2-1 チャ抽出物の遺伝毒性

チャ抽出物そのものの遺伝毒性を図6に示す。結果としてチャ抽出物は濃度依存的

に小核誘発および遺伝子突然変異を引き起こした。チャ抽出物の主成分はカテキン類であるが、*in vitro* 遺伝毒性試験において、緑茶カテキンは遺伝毒性陽性を示すことが知られている³⁾。ただし、*in vivo* 遺伝毒性では陰性を示す。これは、カテキン等のフラボノイド類を細胞培養液に加えた際に、フラボノイド類の分解が起こり、遺伝毒性を有する過酸化水素が生成することに起因するとされている^{4,5)}。そこで、カタラーゼを5あるいは20 units/mLとなるように細胞培養液に加えて試験したところ、細胞増殖率は顕著に回復し、また小核誘発頻度および遺伝子突然変異頻度もほとんど示さなくなり、チャ抽出物の遺伝毒性は過酸化水素によることが支持された(図7)。

2-2 加熱したチャ抽出物の遺伝毒性

図8に95°Cで加熱したときのチャ抽出物のクロマトグラムを示す。チャ抽出物の主要なピークは加熱162時間で半減し、340時間でピークは検出されなくなり、ほぼ完全に分解したと考えられた。280 nmのみの検出であるため、一概には言えないが、分解物由来のピークが検出されなかったことから、かなり低分子へと分解したと考えられた。そこで、これらの試料を用い、遺伝毒性試験を試みることにした。一方、光照射(5000 lx, 25°C)を試みたところ、チャ抽出物は500時間照射してもほとんど分解せず光に対して極めて安定であると考えられた。約2900時間(4ヶ月間)照射するとピークが半減したが、本試料に対しては以後の試験は行わないこととした。

図9に加熱したチャ抽出物の遺伝毒性試験の結果を示す。主成分が半壊している

162時間の試料はカテキン類が残存しているために遺伝毒性を示すことは容易に推察されたが、未処理と同等の遺伝毒性を示し、またほぼ完全に分解している340時間の試料も遺伝毒性を示した。

カタラーゼを添加した試験系でチャ抽出物の熱分解物(340時間)を評価してみたところ、細胞増殖率の回復並びに遺伝毒性の低下が観察された(図10)。従って、チャ抽出物の分解物も細胞培養液中で過酸化水素を生成し、結果として遺伝毒性を示したと考えられた。

Changら⁶⁾はチャ抽出物であるPolyphenonを用い、*in vitro* 遺伝毒性試験では陽性を示すものの、*in vivo* 試験では高濃度においても遺伝毒性を示さないことを報告している。このことから判断すると、チャ抽出物の熱分解物も生体内では遺伝毒性を示しにくいであろうと予想されるが、今後*in vivo* 遺伝毒性試験において確認する必要がある。

Longら⁴⁾やAkagawaら⁵⁾はフラボノイド類が培地中や中性バッファー中で過酸化水素を発生することを明らかにし、これによりプロオキシダント活性あるいは細胞への酸化障害が起きる可能性があること、またこれらフラボノイド類を培養細胞系で評価するときの注意を喚起している。一方、*in vivo* では生体内カタラーゼの作用や、酸素分圧が低いために、通常の摂取範囲内ではフラボノイド類のプロオキシダント的な作用は発現しにくいと考えられているが、過剰摂取に対してはプロオキシダント作用が危惧されている⁷⁾。

in vitro 遺伝毒性試験は一次スクリーニングとして利用されるが、フラボノイド類

のように過酸化水素を発生する試料に対しては陽性を示す。上述のように *in vivo* 試験はより生体内での安全性を評価しうるが、数千種類あるといわれるフラボノイド類を *in vivo* 試験にて調べることは容易ではない。また、本結果から明らかなように、フラボノイドの分解物からも過酸化水素が発生する可能性がある。偽陽性(False Positive)はやむを得ない側面もあるが、これを減らす、すなわち過酸化水素の除去を踏まえた *in vitro* 試験系の確立がフラボノイド類の評価には必要であると考えられた。今回の試験では、細胞に対してカタラーゼと試料を同時に加えた共反応系を利用したが、プレ反応での試験や、カタラーゼを十分量発現する細胞の樹立等が必要かも知れない。しかし、どの程度の酵素活性を必要とするのかということが、過剰摂取を評価する上では重要となる。

また、本実験では低分子にまで分解されていると予想される分解物からも過酸化水素が発生していることが示唆された。今後、構造的知見からの過酸化水素の発生についても検討する必要がある。

D. 結論

ローズマリー抽出物を加熱することにより生じた小核誘発を示す遺伝毒性物質の特定化と生成抑制効果について検討した結果、これらの遺伝毒性物質はヘキサシアン層へ移行しやすい物質であり、HPLC 分析により 19～23 分に溶出する成分である可能性が示された。この遺伝毒性物質は、低温下では生成は抑制されるが、検討した 70～120℃ の範囲内では経時的に増加し、その後生成量はプラトーとなることから、更なる分解

は起こらず、安定な物質であると考えられた。ローズマリー抽出物にアスコルビン酸を加えることにより、遺伝毒性物質の生成を抑制しうる事が判明した。今後、これらの構造決定を行うと共に、*in vitro* 遺伝毒性を示したこれらの成分が *in vivo* 遺伝毒性等により毒性を示すかどうかを検討し、これらがハザードマーカーとなり得るかどうかについて検討する必要がある。

チャ抽出物そのものは遺伝毒性を示したが、カタラーゼを加えることによりその遺伝毒性は低下した。従って、その遺伝毒性は主成分であるカテキン類より生成する過酸化水素の影響によると考えられた。また、チャ抽出物を加熱し、主成分が完全に分解した試料の遺伝毒性を調べたところ、未処理と同等の遺伝毒性を示した。しかし、熱分解物もカタラーゼ存在下では遺伝毒性が大きく低下したことから、その分解物からも過酸化水素が生成すると考えられた。過酸化水素の発生は過剰摂取時におけるプロオキシダント的作用を引き起こす可能性があることから、今後 *in vivo* 試験を含めた更なる知見が必要である。

なお、本研究は天然酸化防止剤の有害性を調べるためではなく、それが意図しない使用の際のハザード特性の解析、メカニズムの解析を目的とすることを付記する。

E. 研究発表

- (1) 発表論文
なし
- (2) 学会発表
なし

参考文献

- 1) H. Liber et al., *Mutat. Res.*, 94, 467-485 (1982).
- 2) 本間ら、*Environ. Mutagen. Res.*, 18, 107-111 (1996).
- 3) R. Ogura et al., *Food Chem. Toxicol.*, 46, 2190-2200 (2008)
- 4) L. H. Long et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 50-53 (2000)
- 5) M. Akagawa et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2632-2640 (2003).
- 6) P. Y. Chang et al., *Environment. Mol. Mutagen.* 41, 43-54 (2003).
- 7) 「機能性食品の安全性ガイドブック」
(株)サイエンスフォーラム (2007).

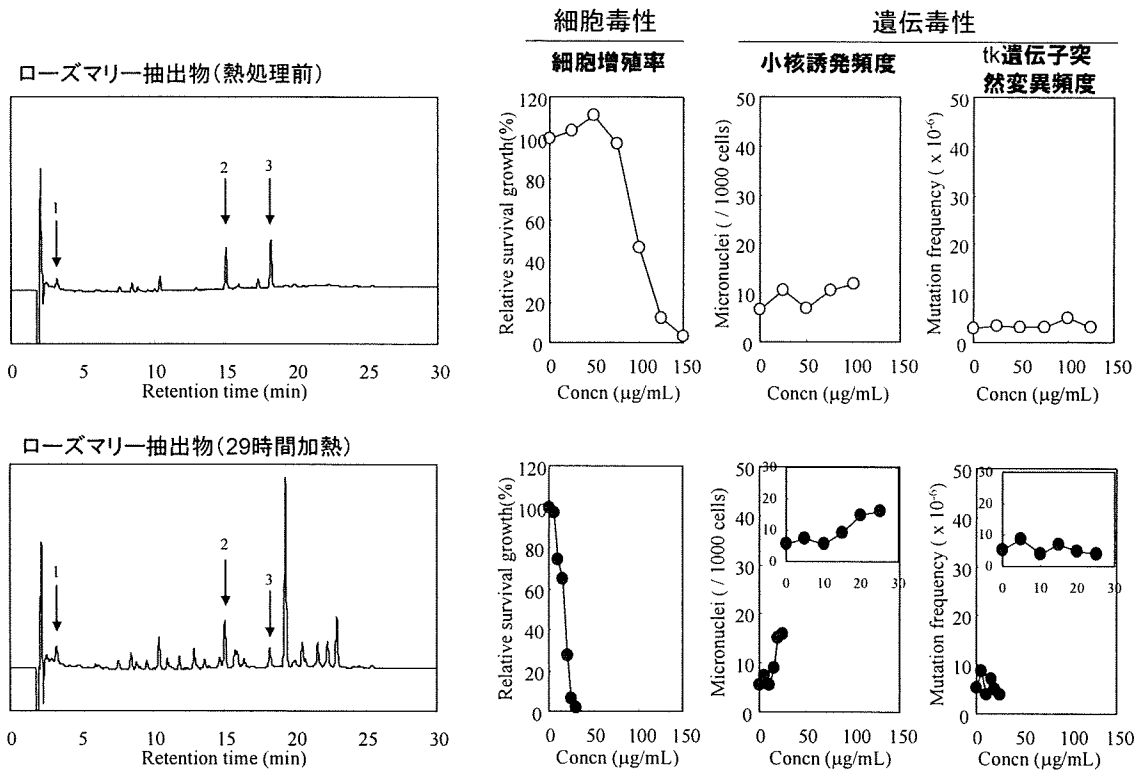


図1 加熱処理前後のローズマリー抽出物のクロマトグラムと遺伝毒性
 矢印1: ロスマリン酸, 2: カルノソール, 3: カルノシン酸

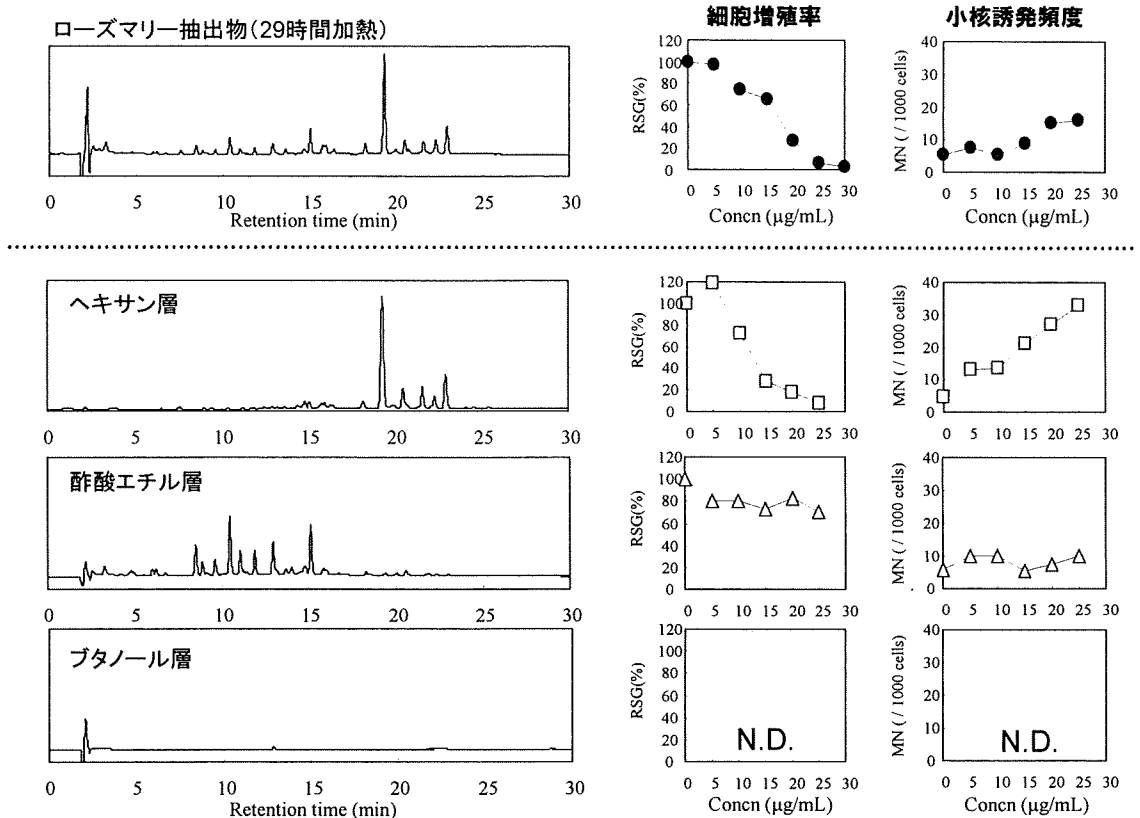


図2 加熱したローズマリー抽出物の各画分のクロマトグラムと遺伝毒性

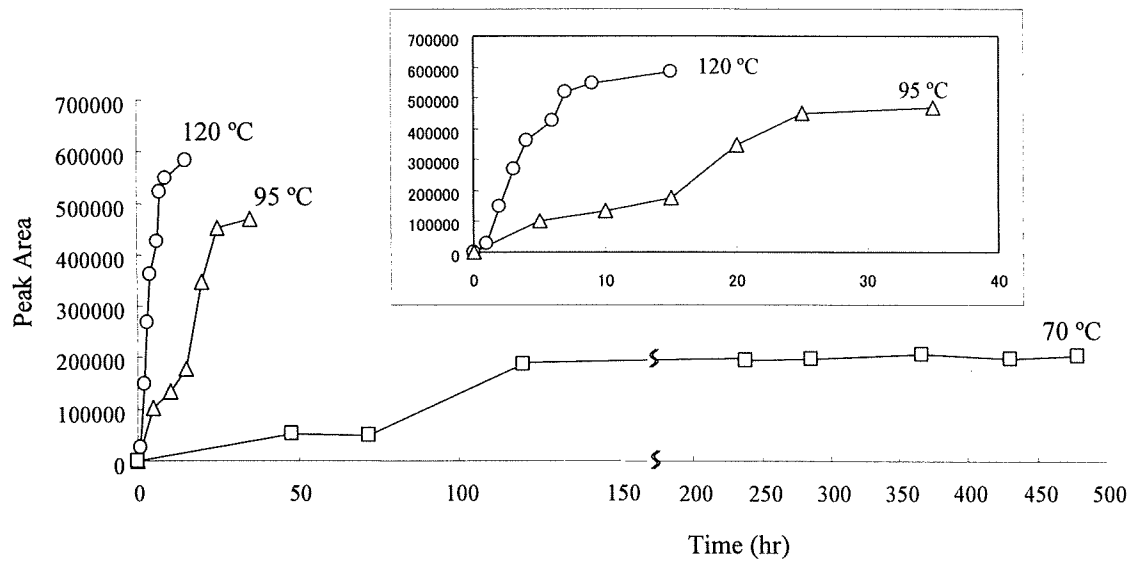


図3 遺伝毒性物質の生成に及ぼす加熱温度の影響

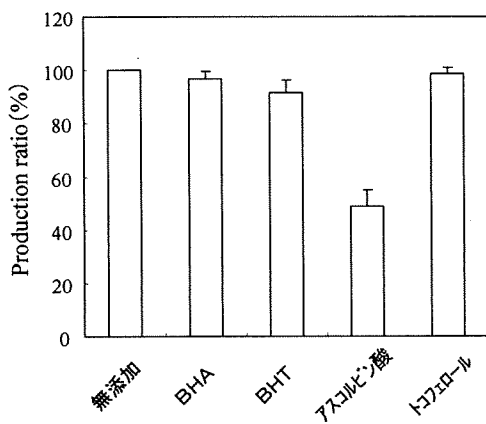


図4 各種抗酸化物質による遺伝毒性物質の生成抑制効果(95 °C、24時間)

抗酸化物質はDMSOに溶解し、ローズマリー抽出物に対して1.3 (w/w)%添加した。

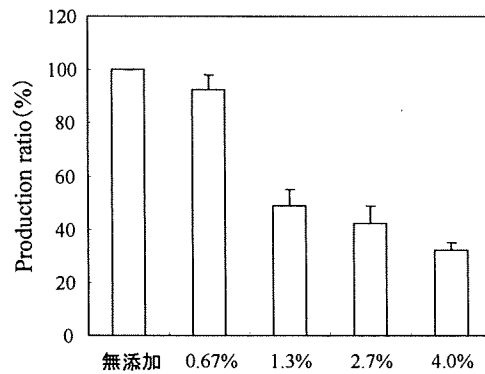


図5 遺伝毒性物質の生成に対するアスコルビン酸の効果(95 °C、24時間)