

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 315327

(P2003 - 315327A)

(43)公開日 平成15年11月6日(2003.11.6)

| (51) Int. Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マ-ト* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|---------------|
| G 0 1 N 33/02 | | G 0 1 N 33/02 | 2 G 0 4 5 |
| 24/08 | | 33/483 | E |
| 33/483 | | 33/493 | A |
| 33/493 | | 33/53 | M |
| 33/53 | | 33/577 | B |

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 4 数) 最終頁に続く

| | | | |
|----------|---------------------------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願2002 - 126287(P2002 - 126287) | (71)出願人 | 596156174 吉川 敏一 京都府宇治市菟道荒槇1 - 51 |
| (22)出願日 | 平成14年4月26日(2002.4.26) | (71)出願人 | 502152148 中神 倭文夫 埼玉県蕨市中央3丁目5番6号蕨ハイリーハイ ツ502号 |
| | | (71)出願人 | 502151716 毬山 利一 東京都台東区根岸2丁目17番1号 |
| | | (74)代理人 | 100069899 弁理士 竹内 澄夫 (外 1 名) |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体レドックス均衡度の測定による抗酸化能の評価方法

(57)【要約】

【課題】生体のレドックス均衡度の測定による抗酸化能の評価方法を提供する。

【解決手段】レドックス均衡度が式、レドックス均衡度 = (投与後抗酸化指数 / 投与後酸化指数) / (投与前抗酸化指数 / 投与前酸化指数) によりあらわされる。抗酸化指数は、ブチルヒドロペルオキシドラジカルを5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシドが捕捉することにより生じるDMPO-00Lラジカルの血清添加によるシグナル強度の減衰率を磁気共鳴スピン装置により定量的に測定することにより得られる抗酸化能を10階級数度数分布により決定して指数化することにより得られ、酸化指数は、尿の8-ヒドロキシデオキシグアノシンを定量的に測定することにより得られる酸化能を10階級数度数分布により決定して指数化することにより得られる。レドックス均衡度が1.0を越える値の場合、抗酸化作用があるとし、レドックス均衡度100の場合、最も優れた抗酸化作用を有するものとして評価する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】食品および/又は薬物の抗酸化能の評価方法であって、

食品および/又は薬物の投与前後の血清および尿を用いてレドックス均衡度を求める工程、およびレドックス均衡度より食品および/又は薬物の抗酸化能を評価する工程、

を含み、

ここで、レドックス均衡度が以下の式、

レドックス均衡度 = (投与後抗酸化指数 / 投与後酸化指数) / (投与前抗酸化指数 / 投与前酸化指数)

によりあらわされ、

抗酸化指数は、ブチルヒドロペルオキシドラジカルを5, 5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO) が捕捉することにより生じるDMPO-OOLラジカルの血清添加によるシグナル強度の減衰率を磁気共鳴スピン装置により定量的に測定することにより得られる抗酸化能を、1から10の10階級数度分布により決定して指数化することにより得られ、

酸化指数は、尿の8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) を定量的に測定することにより得られる酸化能を、1から10の10階級数度分布により決定して指数化することにより得られる、ところの方法。

【請求項2】請求項1に記載の方法であって、前記磁気共鳴スピン装置による定量的測定は、100mMブチルヒドロペルオキシド、50μ/gmlメトヘモグロビン、10mM DMPO、および0.1mMジエチレントリアミンペンタアセテックアシッドを、10mMリン酸緩衝液中で反応させる工程、

前記反応開始1分後に、前記磁気共鳴スピン装置によりDMPO-OOLラジカルのシグナル強度を測定する工程、および以下の式、

ラジカル酸化能 = DMPO濃度 / シグナル強度50%抑制濃度を用いることによりラジカル酸化能を求める工程、を含む、ところの方法。

【請求項3】請求項1に記載の方法であって、前記尿の8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の定量的測定は、モノクロナール抗体を用いた酵素免疫測定方法により行われる、ところの方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、食品および/又は薬物の抗酸化能の測定技術に関するものであり、特に、生体のレドックス均衡度の測定による食品および/又は薬物の抗酸化能の評価する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より、食品・薬物の抗酸化能を測定するための方法が多く知られている。たとえば、吸光度測定法、化学発光法あるいは磁気共鳴スピン装置などを用いて、食品・薬物投与前後の活性酸素種を定量するこ

とにより、目的とする食品・薬物の活性酸素消去能を測定する方法や、脂質過酸化反応によって生じる過酸化物の定量を行うこと、又は溶存酸素濃度の変化を測定することにより、目的とする食品・薬物の活性酸素消去能を測定する方法である。

【本発明が解決しようとする課題】

【0003】食品・薬物の試験管内での抗酸化能の評価は、活性酸素との反応速度定数の測定を含む詳細な検討がすでに可能となっている。しかし、実際の食品・薬物を実際に生体に投与した場合に、測定される抗酸化能が、食品・薬物そのものの機能であるのか、又は食品・薬物の分解・代謝産物の効果であるのかが不明瞭である。また、食品・薬物の摂取による生体応答の影響などを考慮する必要があるが、これらを考慮して測定を行うことは、従来方法では困難である。このため、食品・薬物を生体に投与した場合に、それらが実際にどの程度の抗酸化能を発揮しているかどうかについては、推測の域を出ていないのが現状である。

【0004】近年、代替医療の進歩に伴い、摂取した食品、漢方などの東洋医学的薬物が生体において、がん、糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病に有効であることが示唆されているものの、そのメカニズムについては完全には解明されていない。このため、摂取した食品、漢方などの東洋医学的薬物が生体において、どの程度の抗酸化能を発揮しているかどうかを定量的に評価する方法が必要とされている。

【0005】

【課題を解決するための手段】本願は、同一の遺伝子をもち、同じ環境下で飼育された動物を用いて、食品および/又は薬物投与前後の血清、尿を用いてレドックス均衡を測定し、該レドックス均衡度により当該食品・薬物の抗酸化能を評価する方法を提供する。本発明の方法によると、食品・薬物の吸収、代謝、生体応答に関係無く、食品および/又は薬物投与前後のレドックス均衡度を測定し、食品・薬物の抗酸化能を定量的に評価することが可能となる。

【0006】本発明の発明者らは、鋭意研究を行った結果、以下の式で定義される、食品および/又は薬物投与前後の抗酸化指数および酸化指数から得られるレドックス均衡度が、食品・薬物の抗酸化能を評価するために、極めて有用であることを見出した。

レドックス均衡度 = (投与後抗酸化指数 / 投与後酸化指数) / (投与前抗酸化指数 / 投与前酸化指数)

【0007】ここで、抗酸化指数とは、後述のように、磁気共鳴スピン装置による新規な方法により血清で測定して得られたラジカル消去能を、任意に1点より10点までに指数化したものをいう。

【0008】また、酸化指数とは、生体内酸化的DNA損傷を尿中の8-ヒドロキシグアノシン (8-OHdG) の定量により測定して得られる生体内酸化度を、任意に1点より

10点までに指数化したものをいう。

【0009】レドックス均衡度は0.01より100までの値をとりうるが、1.0を越える値の場合に、投与した食品・薬物に抗酸化作用があったと評価し、レドックス均衡度100の場合に、最も優れた抗酸化作用を有する食品・薬物と評価することにより、食品・薬物の抗酸化能を定量的に決定することが可能となる。

【0010】

【発明の実施の形態】本願は、同一の遺伝子をもち、同じ環境下で飼育された動物が用いられる。この動物に、抗酸化能を評価しようとしている食品および/又は薬物を投与し、投与の前後の血清、尿を用いてレドックス均衡度を測定することにより、食品・薬物の抗酸化能を評価する方法を提供する。

【0011】抗酸化能の評価に用いられるレドックス均衡度は、以下の式により定義される。

【0012】レドックス均衡度 = (投与後抗酸化指数 / 投与後酸化指数) / (投与前抗酸化指数 / 投与前酸化指数)

【0013】<抗酸化指数> 抗酸化指数とは、磁気共鳴スピンスピン装置による測定から、次のようにして得られるラジカル消去能Rを、任意に1点より10点までに指数化したものをいう。磁気共鳴スピンスピン装置による測定は、ブチルヒドロペルオキシドラジカルをスピン捕捉剤5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド(DMPO)が捕捉した結果生じるDMPO-OOLラジカルを磁気共鳴スピンスピン装置により定量的に測定し、血清を添加することにより生じるシグナル強度の減衰率を測定することにより行われる。ラジカル消去能Rはシグナル強度の50%抑制率とDMPO濃度より以下の式で計算される。

ラジカル消去能 R = [DMPO] / 50%抑制濃度

【0014】好適には、磁気共鳴スピンスピン装置による測定は、100mMブチルヒドロペルオキシド、50μg/mlメトヘモグロビン、10mM DMPO、0.1mM ジエチレントリアミンペンタアセテックアシッドを10mMリン酸緩衝液中で反応させ、開始1分後に磁気共鳴スピンスピン装置でDMPO-OOLシグナル強度を測定することにより行われる。

【0015】上記の方法を用いて求めた様々なラジカルスカベンジャーのラジカル消去能Rを以下に示す。

【表1】

各種活性酵素消去剤のラジカル消去能

| スカベンジャー | 50%抑制濃度 | R |
|---------------|---------------------------|-----|
| Cu,Zn-SOD | >100 U/ml | - |
| Catalase | >4,000 U/ml | - |
| β-Carotene | >0.2 mg/ml | - |
| Ascorbic acid | 4.4 × 10 ⁻⁵ M | 227 |
| Uric acid | 3.6 × 10 ⁻⁴ M | 28 |
| α-Tocopherol | 7.0 × 10 ⁻⁴ M | 14 |
| Glucose | >4.5 × 10 ⁻³ M | - |
| Glutathione | 4.1 × 10 ⁻⁴ M | 24 |
| Albumin | >5.0 g/ml | - |
| Bilirubin | >10mg/dl | - |

【0016】本発明の方法の従来技術を超える有利な特徴は、シグナル強度の抑制率F (0< F < 1) から血清等のラジカル消去能を決定できることである。すなわち、本発明では、DMPO 1 M 相当のラジカル消去能を1U/Lと定義することにより、血清のラジカル消去能を定量することができる。本発明の方法を用いて測定した健康成人9名の測定値の平均は0.293 + 0.014 U/Lであった。

【0017】<酸化指数> がん、糖尿病、動脈硬化などの成因に深く関与する現象として遺伝子発現の異常が注目されている。アポトーシスや細胞回転に関与する遺伝子の発現異常が疾患の発症・進展の引き金になっていることが最近の研究により明らかにされてきている。これら遺伝子発現の異常の誘因となるのが環境因子、炎症などにより生じる酸化ストレスであり、その最も代表的かつ信頼のおける酸化的DNA損傷の指標が8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)である。本発明では、尿中の8-ヒドロキシグアノシン(8-OHdG)の定量により測定して得られた生体内酸化度を、任意に1点より10点までに指数化したものを酸化指数として扱う。

【0018】ここで、8-OHdGの測定はモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法により、定量的に測定される。

【0019】以下に糖尿病動物を用いた実験成績を提示し、食品の抗酸化能の評価に尿中8-OHdGの測定が極めて有用であることを示す。

【0020】実験

レプチン受容体欠損自然発症糖尿病db/dbマウス(ヒト2型糖尿病類似の動物モデル)を用いて実験を行った。レプチン受容体欠損自然発症糖尿病db/dbマウスの一群に対して、抗酸化能が試験管内で証明されているアスタキサンチン(カロテノイド色素のひとつで海洋甲殻類に多く存在する)を0.02%混餌として与えた。対照群のレプチン受容体欠損自然発症糖尿病db/dbマウスには、アスタキサンチンを与えなかった。表2に、両者の6週令db/dbマウスを3ヶ月間飼育した結果を示す。

【0021】

【表2】

5
レプチン受容体欠損自然発症糖尿病 db/db
マウスに対するアスタキサンチンの効果

| 群 | 尿中アルブミン量 ($\mu\text{g/day}$) | 尿中 8-OHdG 量 (ng/day) |
|-----------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 対照群 | 234.4+71.6 | 336.1+68.7 |
| アスタキサンチン群 | 68.6+13.4# | 135.6+41.1# |

#p<0.05 vs 対照群

【0022】表2より、アスタキサンチンを与えない対照群のdb/dbマウスでは、経時的に尿中アルブミン排泄量が増加している。また、示さないが、対照群のdb/dbマウスでは、腎臓の組織像もメザンギウム細胞の増殖を認めており、ヒト糖尿病性腎症と類似の病態であることがわかる。この実験より、抗酸化能を有するアスタキサンチンは、尿中8-OHdG排泄量を有意に抑制し、糖尿病性腎症の進展を有意に抑制することがわかる。以上より、尿中の8-OHdGを測定は、マウスにおける酸化的DNA損傷の有用な指標となりうることが明らかである。

【0023】本発明の方法はヒト尿への応用も容易である。健常成人について測定した値は、以下の通りである。

【0024】

【表3】

健常人尿中 8-OHdG 排泄量

| 性別 | 数 | 8-OHdG 濃度 ($\mu\text{g/mg}$ クレアチン) |
|----|----|--|
| 男性 | 25 | 6.818±0.364 |
| 女性 | 34 | 8.394±0.376 |

それぞれの値は平均値±標準誤差で示した。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/577

識別記号

F I

G 0 1 N 24/08

テ-マコード¹ (参考)

5 1 0 P

(72)発明者 吉川 敏一

京都府宇治市菟道荒槇 1 - 51

Fターム(参考) 2G045 AA15 CA26 CB03 DA13 FA36

FB01 FB03 GC30

*【0025】このように、動物においても、ヒトにおいても、尿中8-OHdGの測定法は酸化的DNA損傷の指標として有用であることから、食品・薬物の酸化能の測定に有用であることが明らかである。

【0026】より一般的には、食品・薬物などの抗酸化能のスクリーニング法として確立する目的で、抗酸化指標と同じように、多数検体(ヒト200名、動物100匹)の測定を行い、その10階級度数分布より、最低値群に1点、最高値群に10点とする酸化指数を決定することができる。

【0027】<レドックス均衡度の測定および抗酸化可能の評価>以上のようにして求められる抗酸化能および酸化能を、以下の式

$$\text{レドックス均衡度} = (\text{投与後抗酸化指数} / \text{投与後酸化指数}) / (\text{投与前抗酸化指数} / \text{投与前酸化指数})$$

に挿入してレドックス均衡度を求める。求められたレドックス均衡度は、0.01より100までの値をとりうるが、1.0を越える値の場合に投与した食品・薬物に抗酸化作用があったとして評価し、レドックス均衡度100の場合、最も優れた抗酸化作用を有する食品・薬物として評価する。

*【0028】

【発明の効果】以上のような本発明の方法を用いると、食品・薬物の吸収、代謝、生体応答に関係無く、食品投与前後のレドックス均衡度を測定することにより、食品・薬物の抗酸化能を定量的に評価することができる。

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 通过测量生物氧化还原平衡评价抗氧化能力的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2003315327A | 公开(公告)日 | 2003-11-06 |
| 申请号 | JP2002126287 | 申请日 | 2002-04-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 吉川俊 中上师祖丈夫 Kasayama俊 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 吉川俊 中上师祖丈夫 Kasayama俊 | | |
| [标]发明人 | 吉川敏一 | | |
| 发明人 | 吉川 敏一 | | |
| IPC分类号 | G01N24/08 G01N24/10 G01N33/02 G01N33/483 G01N33/493 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/577 | | |
| CPC分类号 | G01N33/50 G01N24/10 G01N33/02 G01R33/60 | | |
| FI分类号 | G01N33/02 G01N33/483.E G01N33/493.A G01N33/53.M G01N33/577.B G01N24/08.510.P | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA15 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/DA13 2G045/FA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/GC30 | | |
| 其他公开文献 | JP3955914B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过测量生物体的氧化还原平衡来评估抗氧化能力的方法。ZSOLUTION：氧化还原平衡用公式表示，氧化还原平衡=（剂量后的抗氧化指数/剂量后的氧化指数）/（剂量前的抗氧化指数/剂量前的氧化指数）。为了获得抗氧化指数，基于当5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物捕获丁基氢过氧化物自由基时由DMPO-OOL自由基引起的血清添加引起的信号强度的下降比率来计算抗氧化能力。通过磁共振旋转器测量，并且将抗氧化能力转换成基于10级频率分布的指数。通过基于测量的尿液的8-羟基脱氧鸟苷计算氧化能力并基于10级频率分布转换成指数来获得氧化指数。当氧化还原平衡超过1.0时，抗氧化是有效的，并且当氧化还原平衡为100时，抗氧化是最有效的。Z

| スカベンジャー | 50%抑制濃度 | R |
|----------------------|------------------------|-----|
| Cu,Zn-SOD | >100 U/ml | - |
| Catalase | >4,000 U/ml | - |
| β -Carotene | >0.2 mg/ml | - |
| Ascorbic acid | $4.4 \times 10^{-5}M$ | 227 |
| Uric acid | $3.6 \times 10^{-4}M$ | 28 |
| α -Tocopherol | $7.0 \times 10^{-4}M$ | 14 |
| Glucose | $>4.5 \times 10^{-3}M$ | - |
| Glutathione | $4.1 \times 10^{-4}M$ | 24 |
| Albumin | >5.0 g/ml | - |
| Bilirubin | >10mg/dl | - |