農産物等を対象とした低プロオキシダント性抗酸化抽出物の選抜・評価法の構築

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-03-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 黒川, 洋一, 眞柄, 佳奈, 高見, 勇成, 安藤, 賢司, 小林, 恭一, 大東, 肇 メールアドレス: 所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/36

［研究論文］

農産物等を対象とした低プロオキシダント性抗酸化抽出物の選抜・評価法の構築

黒川　洋一[1]、眞柄　佳奈[1]、高見　勇成[1]、
安藤　賢司[1]、小林　恭一[2]、大東　肇[1]

1．緒言

活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）は、酸素分子に由来する、反応性の高い分子群の総称であり、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素が知られている。ROSは、環境中などで物理的あるいは化学的に生じる場合も、生体内の代謝反応に伴って生じる場合もある。生体内で生じるROSは、病原性微生物やウイルスの感染に対する生体防御や、生体内のシグナル伝達など、生命現象に欠かせない役割を持つ。その一方で、過剰なROSは「酸化ストレス」として、タンパク質や遺伝子、生体膜などの生体高分子に酸化的障害を与えたり、細胞毒性や各種生活習慣病の要因となったりするほか、老化にも関わると考えられている[1－4]。

抗酸化物質には、このような「酸化ストレス」が関わる各種生活習慣病のリスク低減効果が期待されており、健康長寿やヘルスケア、医療等の多様な観点から注目される[1, 5]。特に、疾患の発症と深く関わる「生体高分子の酸化」を防ぐことができる化合物は、耳目を集める。しかしながら、抗酸化物質には、ROSの発生を促進し、ROSが関与する不均化反応により酸化物を生じるという事例[2－4]もあることから、抗酸化物質をヘルスケアなどの分野で活用するには注意が必要である[5, 6]。この場合、抗酸化物質による酸化物の発生は、その抗酸化物質の還元能に依存したROS発生能に依存する。本著者は、「生体高分子の酸化」を防ぐ低プロオキシダント性抗酸化物質を探索するために、還元能に加えて、ROS発生能の評価を行う必要があると考えた。

ROS発生能を持つ有名な抗酸化物質の例では、アスコルビン酸（ビタミンC）や、ケルセチン、カテキンなどのポリフェノール性抗酸化物質等が報告されている[7－11]。遷移金属存在下でのヒドロキシルラジカルの発生は、鉄イオン存在下での「Fenton反応」が有名であるが、鉄イオンよりも銅イオン存在下において、より同ラジカルが発生しやすい[1, 7, 10]。ポリフェノ

受付日　2019.11.1
受理日　2020.1.16
所　属　[1]福井県立大学・生物資源学部、[2]福井県食品加工研究所（現・仁愛女子短期大学・生活科学学科）

ール類を含む多くの抗酸化物質は「銅イオン還元能」を示し、銅（II）イオン（Cu^{2+}）を容易に銅（I）イオン（Cu^{+}）に変換する[1, 11]。生じたCu^{+}は過酸化水素と反応すると、ヒドロキシルラジカルを発生することが知られている[1, 7, 8]。

銅イオン還元能の評価には、Apakらにより考案されたcupric reducing antioxidant capacity（CUPRAC）法[12]がよく知られる。本法は、生物試料や食品などに含まれるアスコルビン酸、グルタチオンや、ポリフェノール類などの様々な抗酸化物質が銅を還元することを利用して、試料中の抗酸化物質の総合的な能力（総抗酸化能）を評価するものとして提唱されている。本法は、中性付近の生理的pHでの抗酸化能を簡便に評価できるため、食品のみならず、血液などの多様な生物試料を対象とした抗酸化能評価に使われており、健康との関連を持つ指標とみなされている[13]。従って、本研究においても、各種農産物抽出物の評価において銅イオン還元能を調べることとした。しかしながら、銅イオン還元能は必ずしも、ROS発生能を意味するものではなく、例えば、オイゲノールのようなカプサイシン型化合物は銅イオン還元能を示すがROS発生能を示さず、動脈硬化の指標である低密度リポ蛋白質（LDL）の酸化を促進しないことが報告されている[14, 15]。そこで、ROS発生能の評価には、銅イオンに依存したヒドロキシルラジカル発生条件下でのプラスミドDNA切断活性を指標として、抽出物のROS発生能を簡便かつ敏感に評価できる「Plasmid nicking assay」[7]を用いることとした。

また、「生体高分子の酸化」を防ぐことができる化合物の中には、ROS捕捉活性を持つ場合も予想される。本研究では、出来るだけ迅速かつ簡便な方法で、抽出物の抗酸化能を評価・選抜できることが望ましいことから、最も反応性の高いROSであるヒドロキシルラジカル発生に伴うルミノール化学発光に対する阻害活性を評価し、抗酸化能の高い抽出物を選抜することとした。ルミノールの化学発光は、銅などの遷移金属存在下での本ラジカルの発生を反映するもので[16]、本法は、室温、５分程度の反応で本ラジカルを検出できるため、抽出物のヒドロキシルラジカル捕捉活性を迅速かつ簡便に評価できると考えられた。

以上のように、本研究では、３つの評価方法、「銅イオン還元能アッセイ」、「Plasmid nicking assay」と「ルミノール化学発光阻害活性アッセイ」を併用することにより、高い還元能を持ちながら、ROS発生能が低い、またはヒドロキシルラジカル捕捉に優れた農産物等抽出物」を簡便に選抜する手法を確立し、新規の低プロオキシダント性抗酸化物質を見出すことを目的とした。

２．材料と方法

２－１．材料

「試薬」

銅（I）イオン特異的指示薬Bathocuproine disulphonate（BCS）[17]、ルミノールは、Sigma-

Aldrich 社より購入した。プラスミド DNA pBR322は、New England Biolab 社より購入した。塩化銅(II)六水和物 $CuCl_2 \cdot 6H_2O$ は、和光純薬より購入した。ジメチルスルホキシド(DMSO)はナカライテスク社より購入した。

「農産物抽出物」

福井県産の農産物あるいはハーブは、県内農家および関係機関など（田川農産、長谷川農園、越前夢ファーム、越前柿生産組合、谷川農園、田嶋牧場、瑞香園、あわらフルーツランド（以上、あわら市)、農園たや、有限責任事業組合ちそのかほり、JA 福井市（以上、福井市)、土田農園（勝山市)、食品加工研究所（坂井市)）から、ご供与いただいた。

食用油は、のむきのエゴマ（勝山市）またはオリザ油化（愛知県）からご供与いただいた他、市販品（韓国産）や和光純薬より購入した物を用いた。みかんやポンカンなどの柑橘類試料は伊方サービス（愛媛県）または、りらしおんかおりらぼ（敦賀市)、ショウガなどの試料は福田龍（大阪府)、アサイーなどの試料はフルッタフルッタジャパン（東京都)、アムラやザクロなどの試料はバイオアクティブジャパン（大阪府)、ブルーベリー、ラズベリーなどの試料はフルキャストウイン（福井市)、エキナケアなどの試料は鈴木ハーブ（茨城県）または常磐植物化学研究所（東京都）から、それぞれご供与いただいた。その他の茶、農産物などは、主に市販入手可能な物を購入して用いた。

農産物あるいは、ハーブなど約700種類の試料について、以下のようにエキスを調製した。乾燥農産物は、市販フォースミル(大阪ケミカル社)で均一に粉砕した後、1 mg あたり DMSO 1 ml を加えて室温でボルテックス（5分間）および、超音波洗浄機（パソリナ社 USC-1）による超音波抽出（5分間）に供した後、不溶物がある場合にはデカンテーションまたは遠心（20,000× g、室温、5分間）を行って、上清を抽出液とした。本研究では、食品成分の迅速な評価を行うため、不溶物が生じた場合でも、便宜上、見かけの抽出物濃度を 1 mg/ml として実験を行った。柿、枇杷、あるいはハーブなど、生の葉ものは、市販フードドライヤー（丸隆社）において、断らない限り40 ℃で24時間以上乾燥させたのち、上記と同様に粉砕し、抽出液を得た。油などの液体状試料は、DMSO で希釈した。得られたいずれの抽出物も、4 ℃で冷蔵保存した。

2－2．方法

2－2－1．「銅イオン還元能アッセイ」

銅イオン還元能は、銅（I）イオン指示薬 Bathocuproine の水溶性を改善した BCS[17] を用いて評価した。最終濃度0.5 mM　BCS、0.1 mM 塩化銅（II）を50 mM リン酸ナトリウムバッファー（pH 7.0）を用いて調製し、96穴プレート（ファルコン社）上で、37 ℃、30分間、試験サンプル（0.1 mg/ml）と反応させた（3連ずつ)。対照として、抽出物の代わりに、最

終濃度0.1 mMのケルセチンを含む条件でも実験を行い、ポジティブ・コントロールとした。銅イオン還元が起こった場合には、溶液はオレンジ色から褐色に呈色し、BCS-Cu(I)錯体形成の指標である480 nmでの吸光度が増加した（図１）。その後、モレキュラーデバイス社製プレートリーダーを用いて、480 nmの吸光度を測定し、バッファーのみ（ブランク）の吸光度を差し引いて、値を求めた。各サンプルとも３連で実験を行い、平均値と標準偏差を算出し、Abs_{480}の値が0.1以上を示した場合、銅イオン還元能があると判断し、各抽出物の銅イオン還元能の強さを以下のようにH～Lの４段階に分類した。

H：　Abs_{480}　0.3以上

HM：Abs_{480}　0.2以上0.3未満

LM：Abs_{480}　0.1以上0.2未満

L：　Abs_{480}　0.1未満

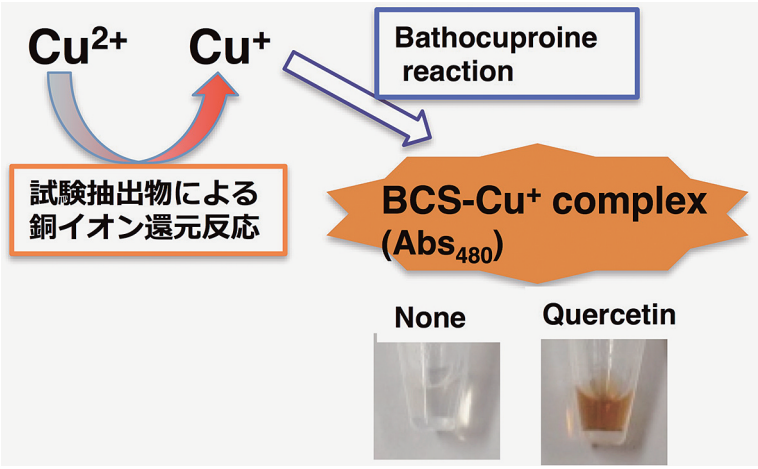

図１　銅イオン還元能の評価
試験抽出物（または、コントロールとしてケルセチン）による銅(II)イオンの還元に伴って生じる銅(I)イオンを、銅(I)イオン特異的指示薬BCSと反応させて生じるBCS-Cu^{+}錯体の持つ吸光度（Abs_{480}）を測定した。銅イオン還元能を持つ化合物または抽出物では、溶液はオレンジ色から褐色に呈色した。

２－２－２．「Plasmid nicking assay」

Aruomaらの方法[7]に従い、ヒドロキシルラジカルの発生に伴うプラスミドDNAの酸化的切断を評価した。最終濃度50 mMリン酸ナトリウム-150 mM　NaClバッファー（pH 7.4）中に、プラスミドDNA　pBR322　100 ng、塩化銅（II）（最終濃度0.2 mM）、および試験サンプル（0.1 mg/ml）を加えて反応溶液（総体積20 µl）とし、マイクロチューブ内で、37℃、60分間、水槽でインキュベートした。対照として、抽出物の代わりに、最終濃度0.1 mMのアスコルビン酸を含む条件でも実験を行い、ポジティブ・コントロールとした（プラスミド

DNA の酸化的分解が起こることを確認した)。反応終了後、10 μl を分取して、1％アガロースゲルにアプライし、100V、40分間電気泳動に供した後、エチジウムブロマイド染色を行い、短波長紫外線（260 nm）照射下で DNA の観察および撮影を行った。DNA の切断は、以下の構造変化を指標として判定した。

閉環状（covalently closed circular; ccc）プラスミド DNA は、アガロースゲル上で最も移動度が高く、先端側に検出されるバンドとして確認される。ヒドロキシルラジカル等の発生により閉環状 DNA が酸化された場合、DNA 鎖の酸化的切断が生じる[6)]。この際、酸化型プラスミド DNA は以下のように異なった移動度を持つバンドとして確認される。閉環状の二本鎖 DNA の一箇所が切断された開環状（nicked）プラスミド DNA は、最も移動度が低いバンドとして最上方に検出され、さらに、もう一方の DNA 鎖も切断された直線状（linear）プラスミド DNA は、これら両者の中間の移動度をもつバンドとして検出される。酸化がさらに進行した場合には、プラスミド DNA 全体が分解されるため、電気泳動上ではバンドとして確認されなくなる。

２－２－３．「ルミノール化学発光阻害活性アッセイ」

ヒドロキシルラジカル発生に伴うルミノールの化学発光を阻害する能力は、Parejo らの方法[16)]により評価した。最終濃度50 mM ホウ酸－水酸化ナトリウムバッファー（pH9.0）中で、最終濃度0.01 mM ルミノール、0.1 mM 塩化銅（II）、1.0 mM 過酸化水素、および試験エキス（0-0.1 mg/ml）の条件で、室温、５分間インキュベートした（96穴プレート（ファルコン社）を用い、いずれも３連ずつ)。対照として、抽出物の代わりに、最終濃度１mM の EDTA を含む条件でも実験を行い、ポジティブ・コントロールとした（ルミノールの化学発光が阻害されることを確認した)。その後、モレキュラーデバイス社製プレートリーダーを用いて、上記の反応液の450 nm の化学発光を測定した。抽出物に含まれる抗酸化物質によりヒドロキシルラジカルが捕捉されると、ルミノールの化学発光は阻害される。すなわち、抽出物のルミノール化学発光阻害を調べることにより、そのヒドロキシルラジカル捕捉活性を評価することができる。化学発光阻害率は、以下のように求めた。塩化銅および過酸化水素を酸化剤とし、Fenton 様反応によりヒドロキシルラジカルが発生する条件下で実験を行った。

$$\text{阻害率} = \frac{\{(\text{酸化剤添加時のルミノール化学発光値}) - (\text{酸化剤・試験抽出物添加時のルミノール化学発光値})\}}{\{(\text{酸化剤添加時のルミノール化学発光値}) - (\text{酸化剤非添加時のルミノール化学発光値})\}} \times 100$$

3．結果

3－1．抽出物のプラスミド DNA 切断能

検討した抽出物のうち、代表的な物の結果を図２、図３に示した。図２では抽出物の供試濃度を0.1 mg/ml として検討したところ、プラスミド DNA の未酸化型である閉環状 DNA 鎖のほかに、酸化型である開環状および直線状 DNA 鎖が検出される物があった。コシヒカリや大麦、ソバ粉では、閉環状のみが検出され、開環状は検出されなかった（図２上　レーン３、４、８、９）。ソバ殻やシソエキスでは、閉環状と開環状が同程度に検出された（同レーン10、12）。ポリフェノール由来の色素を含む黒米エキスまたは赤米エキスでは閉環状は検出されず、開環状に加え、直線状が検出された（同　レーン５、６）。従って、黒米または赤米エキスに最も強い DNA 切断能、ソバ殻やシソエキスには中程度の DNA 切断能があると考えられた。柑橘類では、ジャバラ粉またはユズ種子エキスで、ほぼ開環状のみが検出され（図２中　レーン３、７）、強い DNA 切断能が認められた。シークワーサー、コブミカン、青みかん。青ポンカンなどでも開環状が検出され、DNA 切断能が認められた（同　レーン６、８、12、14）。ショウガ類では、黒ショウガまたは赤ショウガでは開環状あるいは直線状が検出され、強い DNA 切断能が認められた（図２下　レーン９－10）、ナンキョウ、ガランガー、生姜（ショウキョウ）、乾姜（カンキョウ）では、多くの場合、開環状はほとんど検出されず、DNA 切断能を持たない、あるいは弱いと考えられた（同　レーン３－７）。対照的に、新生姜（福井、高知、徳島産）では、開環状が検出され、わずかに DNA 切断能を持つと考えられた（同　レーン11－14）。このような DNA 切断能は、抽出物が持つプロオキシダント能に基づくと考えられた。

また、図３では抽出物の供試濃度を変えて調べたところ、１μg/ml では閉環状しか見出されない抽出物でも、10または100 μg/ml の高濃度では、酸化型である開環状や直線状が検出される場合もあった。柿では、柿渋で直線状が検出された（図３上　レーン　５、８）。種子エキスでは、シソの実エキスまたはライチ種子エキスで直線状が検出された（図３中　レーン４、13）ほか、米胚芽発酵エキスまたは発芽ブロッコリーでは開環状が検出され（同　レーン７、10）、いずれも強い DNA 切断能が認められた。

山菜および南国ハーブでは、フキノトウやアセロラでは開環状が検出され（図３下　レーン４、10）、アムラでは開環状および直線状が検出された（同　レーン　13）。いずれも、強い DNA 切断能が認められた。

以上より、100 μg/ml（0.1 mg/ml）の抽出物で plasmid nicking assay を行うことで、プロオキシダント能の有無を判定できると考えられた。解析対象とした抽出物について、銅イオン存在下でのプラスミド DNA 切断活性を調査し、本研究では便宜上、プラスミド DNA 切断を10％以上進行させた場合を、ROS 発生能ありと定義した。

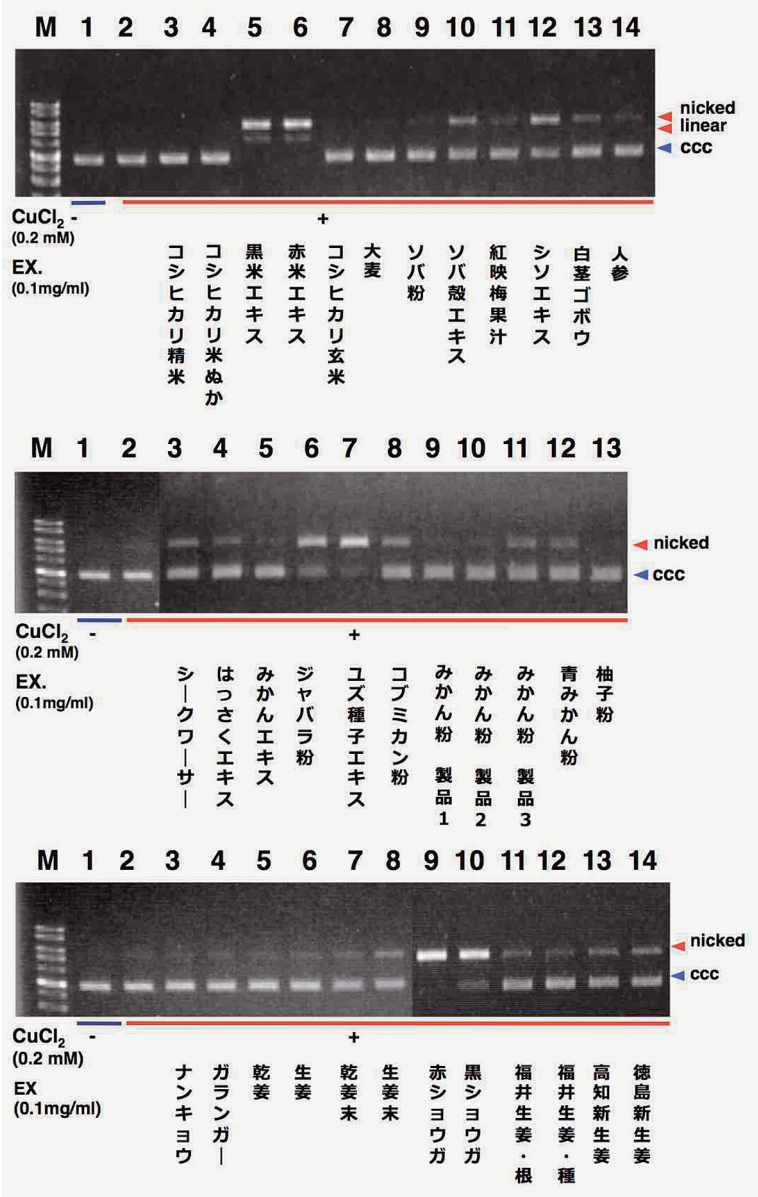

図２　各種農産物抽出物のプラスミド DNA 切断能

プラスミド DNA pBR322（100 ng）を50 mM リン酸ナトリウム-150 mM NaCl バッファー中で、図に示した最終濃度の塩化銅および各抽出物と共に37℃、１時間インキュベートした。その後、１％アガロースゲルにアプライし、100 V、40分間電気泳動に供し、エチジウムブロマイドで染色した。ccc は閉環状、nicked は開環状、linear は直線状を表す。

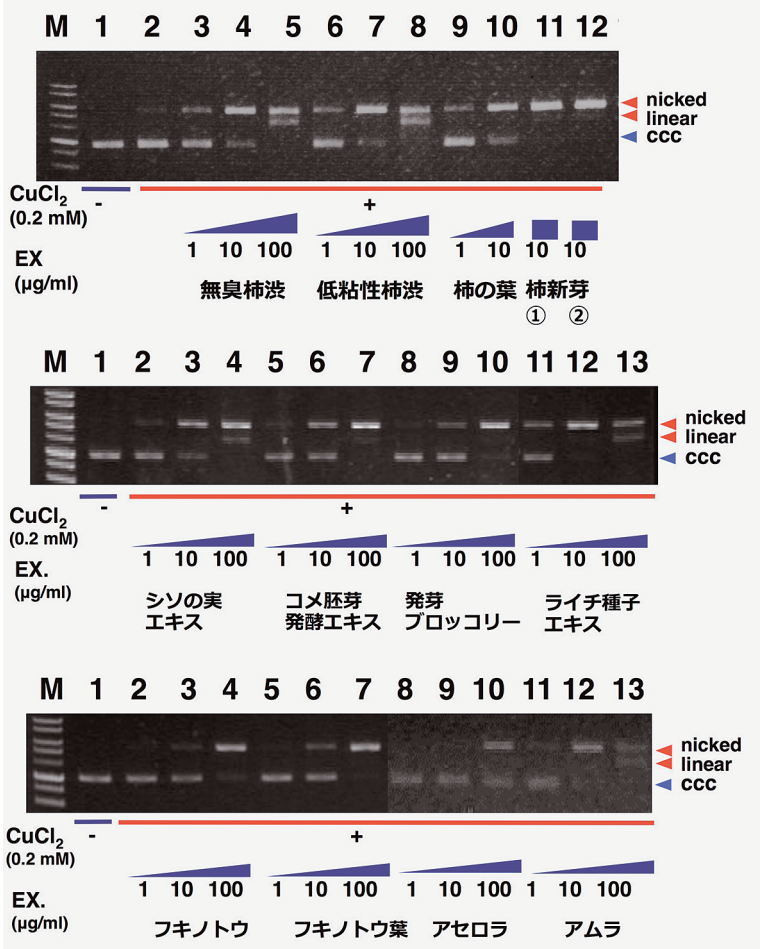

図３　各種農産物抽出物のプラスミド DNA 切断能の濃度依存性
図２と同様に実験を行った。ただし、抽出物の最終濃度は図に示したとおりである

３－２．銅イオン還元能とプロオキシダント能に基づく抽出物の評価判定

ついで、抽出物の供試濃度を0.1 mg/ml として銅イオン還元能を評価した（表１－５）。また、３－１のプラスミド DNA 切断活性の評価結果と合わせて、様々な農産物由来抽出物をａ～ｄの４グループに区分した（表１－５）。

グループ（ａ）：「銅イオン還元能、DNA 切断能共に高い」

銅イオン還元能で Abs_{480}が0.1以上、かつ、プラスミド DNA の酸化的切断率が10％以上

グループ（ｂ）：「銅イオン還元能を持つが、DNA 切断能は検出されない」

銅イオン還元能で Abs_{480}が0.1以上、かつ、プラスミド DNA の酸化的切断率が10％未満

グループ（ｃ）：「銅イオン還元能、DNA 切断能共に低い」

銅イオン還元能で Abs_{480}が0.1未満、かつ、プラスミド DNA の酸化的切断率が10％未満

表１　穀物類・根菜類・生姜類等抽出物の銅イオン還元能、プロオキシダント能、抗酸化能データ

		銅イオン還元能			プロオキシダント能	判定	抗酸化能	
		供試終濃度 0.1 mg/ml					ルミノール発光阻害率（%）	
		Abs480			DNA切断能		供試終濃度	
番号	サンプル名	判定	平均値	標準偏差			0.01mg/ml	0.1mg/ml
1	コシヒカリ精米（福井県）	L	0.021	0.001	×	c	36.0	
2	コシヒカリ米ぬか（福井県）	L	0.067	0.003	×	c	30.4	
3	黒米エキス （愛知県）	H	0.595	0.003	○	a	112.8	
4	赤米エキス （愛知県）	H	0.341	0.041	○	a	99.1	
5	コシヒカリ玄米（福井県）	L	0.016	0.001	×	c		32.9
6	大麦（生）（福井県）	L	0.036	0.001	×	c		30.5
7	大麦（焙）（福井県）	L	0.040	0.006	×	c		29.3
8	ソバ粉（福井県）	L	0.051	0.002	×	c	34.2	
9	ソバ殻エキスパウダー（福井県）	LM	0.169	0.010	○	a		71.6
10	ソバの葉エキス （愛知県）	H	0.355	0.004	○	a	112.2	
11	サトイモ親芋（福井県）	L	0.085	0.001	○	d		55.8
12	紅映梅果汁粉末（福井県）	L	0.021	0.002	×	c		64.3
13	シソエキス（福井県）	HM	0.228	0.002	○	a	63.5	92.6
14	蕃茄乾（トマト）（台湾）	L	0.041	0.001	○	d		55.4
15	トマト（トルコ）	L	0.020	0.001	×	c		73.9
16	ミディトマト（愛知県）	L	0.072	0.002	○	c	20.6	3.2
17	しめじ（三重県）	HM	0.295	0.002	×	b	29.9	
18	人参（福井県）	L	0.039	0.001	○	d		15.9
19	カラフル人参（白）（福井県）	L	0.022	0.001	×	c		8.3
20	カラフル人参（黄）（福井県）	L	0.028	0.001	×	c		22.5
21	カラフル人参（金時）（福井県）	L	0.036	0.002	×	c		31.7
22	カラフル人参（紫）（福井県）	L	0.069	0.005	×	c		51.1
23	河内赤カブの乾燥粉末（福井県）	L	0.056	0.001	○	d		34.7
24	黄金かぶ（福井県）	L	0.027	0.002	×	c		6.0
25	カラフル大根（赤丸大根）（福井県）	L	0.028	0.002	×	c		10.7
26	カラフル大根（紫大根）（福井県）	L	0.043	0.004	×	c		28.2
27	カラフル大根（紅くるり）（福井県）	L	0.098	0.002	○	d		48.0
28	ナンキョウの根（タイ）	L	0.091	0.001	×	c		88.5
29	ショウガ（タイ）	L	0.086	0.002	×	c		73.8
30	ガランガー（タイ）	LM	0.158	0.009	○	a	60.0	90.9
31	オオバンガジュツ（タイ）	L	0.068	0.005	×	c	38.0	
32	赤ショウガエキス （愛知県）	H	0.590	0.011	○	a	102.3	
33	黒ショウガエキス （愛知県）	H	0.319	0.024	○	a	54.7	107.5
34	Galangal dried root （タイ）	L	0.045	0.002	×	c		68.5
35	莪朮（ガジュツ）	L	0.038	0.003	×	c		35.9
36	新生姜（徳島県）	LM	0.124	0.004	○	a	43.0	76.0
37	生姜（根）（福井県）	L	0.070	0.002	×	c	39.0	80.3
38	生姜（種）（福井県）	LM	0.114	0.014	×	b	44.6	72.2
39	新生姜（鹿児島県）	L	0.088	0.002	×	c		62.8
40	新生姜（高知県）	LM	0.145	0.009	○	a		82.2
41	生姜パウダー（鹿児島県）	L	0.059	0.002	×	c		61.40
42	金時生姜粉末（三重県）	L	0.047	0.002	×	c		48.1
43	Ingwer生姜（ドイツ ）	L	0.083	0.008	×	c	37.3	73.0
44	Ingwer生姜茶（ドイツ ）	LM	0.102	0.002	×	b	28.6	72.4
45	乾姜末（大阪府）	L	0.098	0.003	×	c		82.9
46	生姜末（大阪府）	LM	0.142	0.003	○	a		82.6
47	乾姜（石川県）	L	0.057	0.002	×	c		55.1
48	生姜（石川県）	L	0.069	0.003	×	c		55.3
49	乾姜（兵庫県）	L	0.048	0.000	×	c		39.1
50	生姜（兵庫県）	L	0.082	0.001	×	c		58.0

銅イオン還元能の「L」、「LM」、「HM」、「H」は、それぞれ、Abs_{480}値が0.1未満、0.1以上0.2未満、0.2以上0.3未満、0.3以上であることを表す。DNA 切断能の「○」、「×」は、それぞれ、プラスミド DNA 切断が10%以上起こった、10%未満であったことを表す。
プロオキシダント能の判定は、銅イオン還元能とプラスミド DNA 切断能の結果に基づく物であり、「a」、「b」、「c」、「d」は、それぞれ、「銅イオン還元能を示す Abs_{480}値が0.1以上、かつ、プラスミド DNA 切断能が検出される」、「Abs_{480}値が0.1以上、かつ、プラスミド DNA 切断能は検出されない」、「Abs_{480}値が0.1未満、かつ、プラスミド DNA 切断能は検出されない」、「Abs_{480}値が0.1未満、かつ、プラスミド DNA 切断能が検出される」ことを表す。
サンプル名には、産地あるいは加工地を併記した。

グループ（d）：「銅イオン還元能低いが、DNA 切断能高い」

銅イオン還元能で Abs_{480}が0.1未満、かつ、プラスミド DNA の酸化的切断率が10％以上

３－１で ROS 発生能が確認されなかったコシヒカリや大麦、ソバ粉では BCS-Cu(I)錯体の形成を示す Abs_{480}の値は0.1未満であり、銅イオン還元能は検出されなかったことから、グループ（c）とした。一方、プロオキシダント能が検出されたソバ殻やシソエキスでは Abs_{480}の

表２　柑橘類・柿・桑・ブルーベリー抽出物の銅イオン還元能、プロオキシダント能、抗酸化能データ

		銅イオン還元能			プロオキシダント能	判定	抗酸化能	
		供試終濃度 0.1 mg/ml					ルミノール発光阻害率（%）	
		Abs480			DNA 切断能		供試終濃度	
番号	サンプル名	判定	平均値	標準偏差			0.01mg/ml	0.1mg/ml
51	コブミカンの葉（タイ）	L	0.065	0.0011	×	c		61.1
52	コブミカンの皮（タイ）	L	0.036	0.001	×	c		54.4
53	コブミカンの葉（タイ）	L	0.069	0.003	×	c	45.8	
54	Kaffir Lime（コブミカン）powder (タイ)	LM	0.100	0.001	○	a		66.5
55	Kaffir Lime（コブミカン） dried leaf（タイ）	L	0.065	0.002	×	c		42.4
56	マイヤーレモン（三重県）	L	0.089	0.001	○	d	44.6	
57	シークワーサーエキス（京都府）	L	0.093	0.002	○	d		66.5
58	はっさくエキス（京都府）	HM	0.223	0.003	×	b		23.8
59	みかんエキス（京都府）	L	0.027	0.001	×	c		37.6
60	ジャバラ粉 （和歌山県）	L	0.097	0.001	○	d	29.5	24.1
61	温州みかんエキス（愛知県）	H	0.342	0.014	○	a	52.8	
62	ユズ種子エキス（愛知県）	HM	0.270	0.029	○	a	59.5	
63	カボスパウダー	L	0.049	0.001	○	d		62.9
64	スダチ果皮パウダー（徳島県）	LM	0.121	0.011	○	a	24.1	68.6
65	チンピ（中国）	LM	0.161	0.001	×	b	36.1	77.6
66	陳皮（台湾）	LM	0.166	0.006	○	a	70.6	87.6
67	陳皮・刻（兵庫県）	LM	0.135	0.007	○	a	25.6	58.3
68	みかん皮（富山県）	LM	0.180	0.003	○	a	26.6	79.6
69	温州みかん皮（長崎県）	LM	0.185	0.001	×	b	33.1	102.8
70	みかん皮2016（福井県）	LM	0.162	0.002	○	a		84.2
71	みかん皮2015（福井県）	LM	0.163	0.001	○	b		88.3
72	サンショ（福井県）	H	0.319	0.006	○	a		68.8
73	みかんパウダー製品１（愛媛県）	LM	0.102	0.003	×	b		70.5
74	みかんパウダー製品２（愛媛県）	LM	0.107	0.003	×	b		72.2
75	みかんパウダー製品３（愛媛県）	LM	0.154	0.001	○	a		90.0
76	青みかんパウダー（愛媛県）	LM	0.197	0.002	○	a		94.3
77	柚子粉末（愛媛県）	L	0.031	0.000	×	c		26.3
78	青ポンカンパウダー（愛媛県）	HM	0.244	0.005	○	a		88.3
79	ポンカンパウダー（愛媛県）	LM	0.162	0.003	×	b		86.2
80	ブラッドオレンジパウダー（愛媛県）	LM	0.108	0.001	×	b		69.3
81	伊予柑スライス果皮（愛媛県）	L	0.022	0.001	×	c		29.6
82	みかんチップ（愛媛県）	LM	0.107	0.000	×	b		77.2
83	無臭柿渋（三重県）	H	0.323	0.007	○	a		96.3
84	低粘性柿渋（三重県）	H	0.330	0.002	○	a		105.0
85	柿の実（三重県）	L	0.031	0.002	×	c	−0.3	15.4
86	柿の皮（三重県）	LM	0.148	0.001	○	a	36.2	57.5
87	柿の葉	HM	0.296	0.005	○	a		79.2
88	柿の葉　（50℃乾燥）（福井県）	HM	0.248	0.021	○	a	34.3	82.0
89	柿の若葉（50℃乾燥）（福井県）	HM	0.235	0.022	○	a	40.3	77.7
90	柿の新芽（50℃乾燥）（福井県）	HM	0.255	0.009	○	a	60.6	100.9
91	枇杷の葉（中国）	HM	0.299	0.003	○	a		84.8
92	枇杷の若葉（福井県）	H	0.339	0.003	○	a		90.0
93	枇杷の葉（福井県）	H	0.324	0.001	○	a		87.1
94	桑の葉（福井県）	L	0.023	0.001	×	c		19.4
95	桑の葉（富山県）	L	0.030	0.001	×	c		9.5
96	桑の葉（東京都）	L	0.057	0.002	×	c	6.0	16.3
97	クワエキス（茨城県）	HM	0.2700	0.016	○	c	52.0	89.3
98	ブルーベリー・アーリーブルー（福井県）	H	0.306	0.005	○	a		96.3
99	ブルーベリー・ラビットアイ　ホームベル（福井県）	H	0.303	0.007	○	a		104.1
100	ブルーベリー・ハイブッシュ　ブルーヘブン（福井県）	H	0.303	0.005	○	a		95.0

表３　山菜類、ハーブ類抽出物の銅イオン還元能、プロオキシダント能、抗酸化能データ

		銅イオン還元能			プロオキシダント能	判定	抗酸化能	
		供試終濃度 0.1 mg/ml					ルミノール発光阻害率（%）	
		Abs480			DNA切断能		供試終濃度	
番号	サンプル名	判定	平均値	標準偏差			0.01mg/ml	0.1mg/ml
101	フキノトウ	H	0.315	0.006	○	a		101.4
102	菜の花	L	0.044	0.001	×	c		19.8
103	コシアブラ　（福井県）	L	0.041	0.002	×	c		48.4
104	コゴミ（長野県）	HM	0.282	0.005	○	a		57.3
105	ローズマリー（福井県）	LM	0.142	0.001	○	a		48.2
106	レモンバーム（福井県）	H	0.322	0.002	○	a		94.3
107	よもぎ（福井県）	H	0.113	0.007	○	a		83.1
108	スペアミント（福井県）	H	0.354	0.002	○	a		95.0
109	アップルミント（福井県）	HM	0.284	0.006	○	a		75.4
110	乾燥ペパーミント（富山県）	HM	0.260	0.005	○	a		78.5
111	ハッカ苗（福井県）	H	0.316	0.008	○	a		79.1
112	ペパーミント（福井県）	LM	0.173	0.009	○	a		68.9
113	ブラックミント（福井県）	HM	0.262	0.003	○	a		96.6
114	オーデコロンミント（福井県）	HM	0.276	0.020	○	a		95.0
115	グレープフルーツミント（福井県）	HM	0.261	0.005	○	a		100.5
116	パイナップルミント（福井県）	HM	0.218	0.005	○	a		89.7
117	タイム（福井県）	HM	0.223	0.006	○	a		60.7
118	オレガノ（福井県）	HM	0.286	0.012	○	a		69.3
119	スイートマジョラム（福井県）	LM	0.195	0.003	○	a		56.0
120	カモミールジャーマン花（福井県）	LM	0.123	0.007	○	a		39.5
121	レモングラス葉（福井県）	L	0.062	0.002	○	d		39.3
122	レモングラス茎（福井県）	L	0.049	0.003	×	c		37.1
123	フェンネル（福井県）	LM	0.143	0.008	○	a		52.8
124	バジル（福井県）	LM	0.179	0.004	○	a		56.0
125	レモンバーム（福井県）	H	0.336	0.004	○	a		92.9
126	ローズマリー（福井県）	HM	0.245	0.004	○	a		56.4
127	パクチー葉と茎（福井県）	L	0.081	0.002	×	c		25.7
128	パクチー実（タイ）	L	0.030	0.003	×	c		14.5
129	ラベンダー（50℃乾燥）製品１（福井県）	L	0.097	0.002	○	d		36.5
130	ラベンダー（部屋干し）製品１（福井県）	L	0.083	0.006	○	d		39.4
131	ラベンダー（50℃乾燥）製品２（福井県）	LM	0.103	0.006	○	a		54.2
132	ラベンダー（部屋干し）製品２（福井県）	L	0.080	0.001	○	d		53.8

値は0.1～0.2程度、強いプロオキシダント能が検出された黒米エキスまたは赤米エキスではAbs_{480}の値は0.3以上となった（表１）。これらは、いずれも、グループ（ａ）とした。

ショウガ類では、高いROS発生能が検出された黒ショウガまたは赤ショウガではAbs_{480}の値は0.3以上であり、グループ（ａ）とした（表１）。プロオキシダント能が検出されなかったナンキョウ、ガランガー、生姜（ショウキョウ）、乾姜（カンキョウ）では、多くの場合、Abs_{480}の値は0.1未満であり（表１）、グループ（ｃ）とした。対照的に、新生姜（高知、徳島産）では、ROS発生能が検出される物も見られた（表１）。

柑橘類では、コブミカン、シークワーサー、ジャバラ、カボス、柚子などではAbs_{480}の値は0.1未満であり、銅イオン還元能は検出されなかった。これら銅イオン還元能が低い抽出物のほとんどではROS発生能は検出されなかったことから、グループ（ｃ）であるとした。一方、ユズ種子エキス、みかん果皮、陳皮、ポンカンなどはAbs_{480}の値は0.1以上の値を示し、銅イオン還元能が検出された（表２）。興味あることに、銅イオン還元能を示した柑橘類では、ROS発生能が検出され、グループ（ａ）に分類される物（みかん果皮や陳皮、ユズ種子エキス、青ポンカンなど）と、ROS発生能が検出されず、グループ（ｂ）に分類される物（いくつかの

表４　茶葉類、食用油類抽出物の銅イオン還元能、プロオキシダント能、抗酸化能データ

		銅イオン還元能			プロオキシダント能	判定	抗酸化能	
		供試終濃度 0.1 mg/ml					ルミノール発光阻害率（%）	
		Abs480			DNA切断能		供試終濃度	
番号	サンプル名	判定	平均値	標準偏差			0.01mg/ml	0.1mg/ml
133	やぶきた葉（福井県）	H	0.307	0.005	○	a		75.3
134	やぶきた新芽（福井県）	H	0.309	0.002	○	a		81.5
135	なつめ茶（福井県）	HM	0.293	0.004	○	a	46.0	
136	白茎ゴボウ茶（福井県）	LM	0.102	0.002	○	a	43.5	81.7
137	桑の葉茶（福井県）	L	0.077	0.002	○	d	37.7	46.9
138	杜仲茶（福井県）	HM	0.232	0.003	○	a	50.4	73.5
139	メリンジョ茶（インドネシア）	L	0.040	0.001	×	c		35.5
140	月桃茶（沖縄県）	LM	0.190	0.005	○	a		61.7
141	長命草茶葉（沖縄県）	HM	0.057	0.002	○	a		28.2
142	ツボクサ茶葉（沖縄県）	HM	0.053	0.002	○	a	27.1	35.0
143	マンジェリコン茶（沖縄県）	HM	0.216	0.001	○	a	39.0	88.6
144	エゴマ油　製品１（福井県）	LM	0.112	0.005	×	b	24.7	73.1
145	エゴマ油　製品２（福井県）	H	0.342	0.008	×	b	11.6	16.4
146	エゴマ油（韓国）	H	0.334	0.010	×	b		26.0
147	バオバブ油2015（タンザニア）	L	0.057	0.002	×	c		54.9
148	アボカドオイル（大阪府）	L	0.092	0.010	×	c	15.6	12.2
149	ベルガモットオイル（（大阪府）	L	0.018	0.002	×	c	26.7	13.3
150	コーンオイル（大阪府）	LM	0.139	0.006	×	b	18.2	−15.6
151	グレープシードオイル（大阪府）	HM	0.245	0.017	×	b	10.6	−17.4
152	リンシードオイル（アマ油）（大阪府）	HM	0.293	0.021	×	b	17.1	−11.0
153	オリーブオイル（大阪府）	L	0.039	0.002	×	c	15.0	−26.7
154	レイプシードオイル（なたね油）（大阪府）	L	0.051	0.004	×	c	9.8	14.7
155	ローズヒップオイル（大阪府）	HM	0.279	0.012	×	b	12.4	22.7
156	ゴマ油（非焙煎）（大阪府）	L	0.053	0.004	×	c	−3.5	16.7
157	大豆油（大阪府）	L	0.067	0.002	×	c	5.3	4.4
158	玄米胚芽油　製品１（愛知県）	HM	0.259	0.025	×	b		29.4
159	玄米胚芽油　製品２（愛知県）	HM	0.240	0.013	×	b	14.0	35.4
160	米油（愛知県）	LM	0.183	0.010	×	b	10.4	26.0
161	シソ油（愛知県）	H	0.366	0.037	×	b	31.0	−0.6
162	月見草油（愛知県）	HM	0.206	0.005	×	b	37.1	14.9
163	キウイフルーツ油（愛知県）	H	0.394	0.018	×	b	33.8	11.7
164	イチゴ種子油（愛知県）	HM	0.292	0.004	×	b	37.6	7.5
165	ブラッククミン・シードオイル（東京都）	LM	0.179	0.022	×	b	50.6	102.0
166	ヘンプシードオイル（東京都）	LM	0.149	0.008	×	b		25.5

みかん果皮、陳皮などの試料）の両方が存在した（表２）。従って、みかん果皮や陳皮では、銅イオン還元能は有するが、ROS 発生能に関しては試料間でのバラツキがあることが示唆された。

ふきのとう、コゴミなどの山菜、ペパーミントやタイムなどのハーブ、やぶきた葉、杜仲茶、ゴボウ茶、月桃茶、長命茶などの茶には、高い銅イオン還元能、およびプラスミド DNA 切断能が検出されたことから、グループ（ａ）とした。（表３、４）。

アボカドオイル、ゴマ油、オリーブオイル、大豆油、レイプシードオイル（菜種油）、バオバブオイルなどの食用油には、銅イオン還元能はほとんど検出されず、プラスミド DNA 切断能も検出されなかったことから、グループ（ｃ）とした（表４）。グレープシードオイル、コーンオイル、ローズヒップオイル、リンシードオイル（アマニ油）、玄米胚芽油、シソ油、エゴマ油、月見草油、キウイフルーツオイル、ブラッククミンシードオイルなどの食用油は、銅イオン還元能は検出されたが、プラスミド DNA 切断能は検出されなかったことから、グループ（ｂ）とした（表４）。このように、食用油（約30種類）には、銅イオン還元能が低い物（ア

表５　その他の農産物抽出物の銅イオン還元能、プロオキシダント能、抗酸化能データ

		銅イオン還元能			プロオキシダント能	判定	抗酸化能	
		供試終濃度 0.1 mg/ml					ルミノール発光阻害率（%）	
		Abs480			DNA切断能		供試終濃度	
番号	サンプル名	判定	平均値	標準偏差			0.01mg/ml	0.1mg/ml
167	エゴマ粉（福井県）	H	0.397	0.006	○	a	70.8	99.1
168	なつめエキス（福井県）	H	0.326	0.004	○	a	57.0	
169	青パパイヤ乾燥（沖縄県）	L	0.028	0.001	○	d	19.2	
170	ゴーヤ乾燥（沖縄県）	L	0.041	0.003	○	d	37.3	
171	チアシード（京都府）	L	0.045	0.003	×	c	53.3	
172	ラズベリー（京都府）	HM	0.265	0.040	○	a	47.9	
173	クコの実（京都府）	LM	0.130	0.003	○	a		91.9
174	アロニア（京都府）	L	0.313	0.006	○	d	59.4	80.4
175	マコモ粉末（福井県）	L	0.020	0.005	○	d	35.1	58.5
176	Roselle powder (タンザニア)	LM	0.140	0.000	○	a		74
177	Baobab powder 製品１（タンザニア）	L	0.027	0.001	○	d		41.7
178	Baobab powder 製品２（タンザニア）	L	0.044	0.003	×	c	56.1	78.0
179	アセロラエキス （東京都）	HM	0.230	0.007	○	a		58.7
180	アムラエキス （東京都）	H	0.333	0.006	○	a	71.1	101.2
181	ザクロエキス（東京都）	H	0.308	0.003	○	a	77.9	104.1
182	ザクロシード（東京都）	L	0.073	0.002	○	d		74.4
183	バコパモニエラエキス（東京都）	HM	0.289	0.010	×	b	33.5	77.8
184	ブドウ種子エキス （東京都）	LM	0.184	0.007	×	b	75.2	97.6
185	ホーリーバジルエキス（東京都）	L	0.083	0.007	×	c	29.7	55.6
186	マキベリーフリーズドライパウダー（東京都）	H	0.314	0.005	○	a	17.5	73.8
187	マキベリーエキス （愛知県）	H	0.705	0.016	○	a	105.7	
188	モリンガリーフパウダー（東京都）	LM	0.170	0.041	○	a	4.0	51.6
189	アサイーエキスパウダー（東京都）	L	0.041	0.001	×	c		25.8
190	アサイーフリーズドライパウダー（東京都）	LM	0.159	0.007	○	a		69.7
191	ゴツコラサプリメント	LM	0.049	0.002	○	a	26	33.8
192	有機ゴジベリー（東京都）	L	0.086	0.000	○	d		86.1
193	有機カムカム（東京都）	HM	0.285	0.002	○	a		96.7
194	Echinacea Purpurea（東京都）	LM	0.123	0.003	×	b	2.1	52.6
195	エキナケアエキス（東京都）	HM	0.208	0.042	○	a	15.2	54.7
196	エチナシ葉エキス（茨城県）	L	0.029	0.001	×	c	16.8	−0.2
197	ホソババレンギク葉（茨城県）	L	0.078	0.001	×	c	14.7	11.9
198	エゾウコギエキス（東京都）	L	0.075	0.013	×	c	13.9	15.7
199	エゾウコギ根（兵庫県）	L	0.083	0.004	×	c		32.1
200	エゾウコギ（東京都）	L	0.052	0.000	×	c		8.7
201	オリザギャバエキス（愛知県）	HM	0.243	0.147	○	a	60.8	
202	コメ胚芽発酵エキス （愛知県）	H	0.351	0.005	○	a	93.1	
203	発芽ブロッコリーパウダー（愛知県）	H	0.451	0.064	○	a	109.9	
204	ブロッコリースプラウトエキス （愛知県）	H	0.338	0.012	○	a	107.5	
205	ライチ種子エキス （愛知県）	H	0.382	0.004	○	a	112.3	
206	月見草エキス （愛知県）	H	0.348	0.016	×	b	90.6	97.1
207	キウイ種子エキス （愛知県）	H	0.313	0.013	○	a	81.3	
208	クルミポリフェノール （愛知県）	H	0.564	0.041	○	a	106.3	
209	カンカエキス （愛知県）	H	0.332	0.020	○	a	105.8	
210	イチゴ種子エキス （愛知県）	H	0.319	0.004	○	a	77.8	
211	リンゴンベリーエキス （愛知県）	H	0.311	0.007	○	a	91.2	
212	ポリアミン （米胚芽由来）（愛知県）	L	0.021	0.001	○	a	43.2	104.1
213	ポリアミン （小麦胚芽由来）（愛知県）	L	0.030	0.004	○	b	62.7	105.8
214	明日葉粉末パウダー	L	0.063	0.003	○	d		32.4
215	マカエキス末（東京都）	L	0.023	0.001	×	c	11.7	29.1
216	霊芝エキス末（東京都）	HM	0.259	0.017	○	a	22.3	36.4

ボカドやオリーブなど)、高い物（グレープシードやアマニなど）の両方が存在したが、興味深いことに、ほとんどの試料でDNA切断能、すなわちROS発生能は認められなかった（表４）。

3－3．抽出物のルミノール化学発光阻害活性

ついで、抽出物の供試濃度を0.01または0.1 mg/ml としてルミノール化学発光阻害活性を評価した（表１－５）。

ROS 発生能が確認されず、低い銅イオン還元能を示したグループ（ｃ）のコシヒカリや大麦、ソバ粉ではルミノール化学発光阻害率は30％程度であった（表１）。一方、高い ROS 発生能が検出されたグループ（ａ）のソバ殻やシソエキスでは同阻害率は70％以上の高い値を示した（表１）。その他、グループ（ａ）の試料（ふきのとう、コゴミなどの山菜、ペパーミントやタイムなどのハーブ、やぶきたなどの茶、発芽ブロッコリーなどの食抽出物など）では、ルミノール化学発光阻害率は70％以上の高い値を示した（表３－５）。

ショウガ類では、グループ（ａ）の黒ショウガまたは赤ショウガ、グループ（ｃ）　のナンキョウ、生姜（ショウキョウ）、乾姜（カンキョウ）で、多くの場合、0.01または0.1 mg/ml で50％程度、あるいはそれ以上のルミノール化学発光阻害率が検出された（表１）。グループ（ａ）の新生姜（高知、徳島産）でも0.1 mg/ml で60％以上のルミノール化学発光阻害率を示した（表１）。

柑橘類では、コブミカン、シークワーサー、ジャバラ、カボス、柚子など、グループ（ｃ）抽出物のほとんどではルミノール化学発光阻害率は50％程度であった。一方、みかん果皮、陳皮、ポンカンなどはいずれも同阻害率は70％以上の高い値を示した（表２）。柑橘類では、青みかんや青ポンカンなど成熟度の低い試料は、グループ（ａ）であると考えられた。成熟度が高いと考えられる温州みかん果皮や陳皮試料では、グループ（ａ）およびグループ（ｂ）の両方が存在した。これらの抽出物のルミノール発光阻害率は、いずれも、概ね50％以上の高い値を示した（表２）。

柿では、柿渋、柿皮および柿の葉はグループ（ａ）、柿の実の破砕物はグループ（ｃ）であると考えられた。これらの試料のルミノール発光阻害率は、いずれも概ね50％以上の高い値を示した（表２）。

4．考察

本研究では、農産物や食用油など由来の抽出物について、その銅イオン還元能およびプラスミド DNA 切断能に基づいた分類を示した。この分類にルミノール化学発光阻害活性を組み合わせることで、低プロオキシダント性かつ抗酸化性抽出物を簡便に見出す方法となることが期待される。

銅イオン還元能およびプラスミド DNA 切断能が高い抽出物（グループ（ａ））では、ルミノール化学発光阻害活性が高いことが判明した。すなわち、これらの抽出物では、たとえ銅イオン還元能を示しても、ROS 発生能が高いことが示唆された。これらの抽出物が示した高い

銅イオン還元能およびROS発生能は、ポリフェノールやアスコルビン酸（ビタミンC）などのプロオキシダント能が高い成分によると推定される。

一方、銅イオン還元能を示すが、プラスミドDNA切断能が検出されない抽出物（グループ（b））、あるいは、銅イオン還元能およびプラスミドDNA切断能が検出されない抽出物（グループ（c））の中には、ルミノール化学発光阻害活性も高い（50%以上）抽出物が存在することが判明した。具体的には、柑橘類（みかん（皮あるいは粉）、ポンカン（粉）、陳皮など）、生姜類（福井生姜、タイショウガ、ドイツ生姜茶、乾姜など）、ブドウ種子エキス、バコパモニエラエキスなどの抽出物が挙げられた。以下、選別した抽出物の抗酸化能などについて考察する。

4－1．各グループの銅イオン還元能あるいはROS発生能について

4－1－1．「銅イオン還元能、ROS発生能共に高い」グループについて

黒米、赤米、緑茶、柿の葉、発芽ブロッコリー、フキノトウ、ベリー類、ハーブ類などの抽出物は、高い銅イオン還元能およびROS発生能を示し、本グループ（a）に分類した。これらの抽出物に含まれる、カテキン[18]などの化合物の銅イオン還元能およびROS発生能のためと考えられる。ところで、高プロオキシダント性化合物の中には、そのROS発生能に基づく、抗がん性を示す物もある[19, 20]。従って、高プロオキシダント性化合物は、使い方によっては有用な場合もあるが、前述したように、生体高分子の安定化剤としては適切ではないと考えられる。以下は、グループ（a）の抽出物で、高いROS発生能をもつと考えられる化合物について考察する。

黒米、ベリー類、ハーブ類などは、アントシアニンなどのポリフェノール[18, 21, 22]含量が高いことが報告されている。アントシアニンは高いROS発生能を持つこと[22]が報告されており、本研究の結果は、黒米などがROS発生能を持つことを支持した。

赤米や緑茶、枇杷の葉などは、化学反応性の高いプロアントシアニジンが重合した分子であるタンニンを含む[22]。タンニンにはROS発生能が報告されており[22, 23]、本研究の結果は、赤米などが高いROS発生能を持つことを支持した。

アスコルビン酸やプロビタミンCを含む試料（柿の葉など）で、高い銅イオン還元能およびROS発生能が検出されたことは、アスコルビン酸がROS発生能を持つこと[7]により説明できる。

黒ショウガ（別名クラチャイダム）では、規格成分である5,7ジメトキシフラボンのほか、5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボン（別名テクトクリシン）などのポリメトキシフラボノイドを多く含む[24]。後者には、*in vivo* で脂質の過酸化を促進する効果[25]が報告されており、今後、*in vitro* でのROS発生能に関する解析が望まれる。赤ショウガには、特有の含有成分である3*R*,5

S-[6]-ジンジャージオール以外にも、それぞれ、生姜（ショウキョウ）、乾姜（カンキョウ）の主成分である6-ジンゲロール、6-ショーガオールも含む。Shimodaらによれば、赤ショウガや生姜（ショウキョウ）に含まれる6-ジンゲロールに対して、赤ショウガや乾姜に含まれる6-ショーガオールや赤ショウガ特有成分である3*R*,5*S*-[6]-ジンジャージオールは、病原菌によるマクロファージ様細胞RAW264における一酸化窒素（NO）産生抑制効果が高いことが報告されている[26]。従って、6-ショーガオールや3*R*,5*S*-[6]-ジンジャージオールには抗酸化能があると示唆されたが、これら化合物の *in vitro* での抗酸化能あるいはROS発生能に関する報告は知られていない。今後、赤ショウガ由来抽出物が高プロオキシダント性を示したことを化合物レベルで解明することが望まれる。

以上より、これら抽出物において、「銅イオン還元能、ROS発生能共に高い」ことは、上述したプロオキシダント能が高い成分によると考えられる。

4－1－2．「ROS発生能が検出されない」グループについて

エゴマ油などの食用油や生姜、陳皮由来試料などは、「銅イオン還元能は示すが、ROS発生能は検出されない」グループ（b）に分類された。また、ポリフェノールなどのROS発生能を示す物質の含量が低い試料（米、麦など）、および、一部のショウガ由来試料などは「銅イオン還元能、ROS発生能共に検出されない」グループ（c）に分類された。すなわち、低プロオキシダント性が認められた。

高いルミノール化学発光阻害活性が検出されたエゴマ油では、ω3脂肪酸であるα－リノレン酸とω6脂肪酸であるリノール酸含量が高く（それぞれ50-70%、10-20%）[27]。また、シソ科の植物であるエゴマには、ロズマリン酸やフラボノイドなどのポリフェノール性抗酸化物質を含むことも知られている[28]。Masudaらによれば、一般に用いられる抗酸化能の指標である2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl（DPPH）ラジカル消去能を指標として、本ラジカル消去能を示すエゴマ油成分を解析したところ、ロズマリン酸やフラボノイドであるルテオリンに本ラジカル消去能が認められたほか、これらの化合物含量はエゴマ油の抗酸化能に違いを与えていると考えられた[29]。

ついで、ロズマリン酸とルテオリンのROS発生抑制効果に関する報告に基づき、エゴマ油が低プロオキシダント性を示した理由を考察する。Horváthováらによれば、ヒト骨髄性白血病細胞K562において、過酸化水素添加時のDNA一本鎖切断に対して、ルテオリンは高い抑制効果を示したことが報告されている[30]。一方、Murakamiらによれば、ロズマリン酸は *in vitro* において、遷移金属存在下でROSを発生し、プラスミドDNAの酸化的切断を促進したことが報告されている[31]。以上の結果より、ルテオリンにはROS発生抑制能が示唆された一方、ロズマリン酸にはROS発生促進能が示唆された。従って、本研究において、エゴマ油が

低プロオキシダント性を示したことはルテオリンによる可能性がある。今後、詳細な解析に関心が持たれる。

陳皮に含まれる成分としては、ヘスペレチン、ヘスペリジン、あるいはその代謝物など、抗酸化能を持つ化合物の存在が知られている[32−34]。これらの化合物では、鉄イオン等に対する還元能およびキレート能の両方が報告されている[34]ことから、陳皮が金属イオン還元能と抗酸化能の両方を示したことを裏付けると考えられる。ROS 発生能が低いと考えられる陳皮は、ROS 発生能が高いことが分かった青みかんや青ポンカンなどと比べると成熟度が高いと考えられる。これらの試料間でプロオキシダント能に差があった原因は、４－２－１で考察する。

薬草バコパモニエラは、インドの伝統医学アーユルヴェーダで使われてきたほか、介入試験においてヒトの記憶を定着させる効果が報告されている[35]。その成分バコパサイトは、「記憶の精度を高める」機能性表示食品として消費者庁から公表されている。本研究において、バコパモニエラ抽出物のプロオキシダント性が低く、抗酸化能が高いと示唆されたことは興味深い。今後、詳細な解析が望まれる。

４－２．試料間で、銅イオン還元能または ROS 発生能の差が見られた抽出物について

４－２－１．柑橘類について

柑橘類では、成熟度の低い試料（青みかんや青ポンカン、収穫年の東浦みかんなど）では、高い ROS 発生能が検出され、成熟度の高い試料（収穫２年目の東浦みかんや多くの陳皮）では、多くの場合、同活性は検出されなかった。柑橘類の皮には、プロオキシダント能の高いアスコルビン酸も含まれる[9]が、その他の成分にも着目してプロオキシダント能の変化で説明しうるか検証してみたい。

陳皮は、温州みかんまたはマンダリンオレンジの果皮を乾燥させた生薬であり、風邪薬や胃薬のほか、七味唐辛子やお屠蘇など、医薬および食の両面で使われる。日本薬局方[36]では、陳皮は「ウンシュウミカン *Citrus unshiu* Markowicz 又は *Citrus reticulata* Blanco（*Rutaceae*）の成熟した果皮である。本品は定量するとき，換算した乾燥物に対し，ヘスペリジン4.0％以上を含む」と定義されている。ヘスペリジンは、抗酸化物質であるポリフェノールの一種であり、毛細血管を拡張させて血流を改善する効果が知られる。干したみかんの皮を袋に入れ、風呂につける「みかん風呂」が体を温める効能を持つのは、香り成分であるリモネンの保温効果以外に、血流改善効果を持つヘスペリジンの性質にもよると考えられる。そのほかの成分としては、ビタミンＡ活性を持つカロテノイドである β-クリプトキサンチンも含む[32]。さらに、陳皮に含まれるポリフェノールの一種であるノビレチンには、アルツハイマー病モデルマウスにおいて、アミロイド β ペプチドの沈着を抑制する効果や記憶障害を改善させる効果が報告されており[37]、本成分を含む抽出物の効果についても関心が持たれる。フラボノイドであるヘスペリジ

ン、ノビレチン、ビタミンA様物質であるβ-クリプトキサンチンには抗酸化能が報告されている[32]。

陳皮の「陳」は「古い」という意味であり、中国では、古皮（10～15年もの）ほど優れた薬効があるとされる。ところで、日本薬局方の定義では、陳皮の製造上、乾燥後一定の期間をおくような決まりはない。従って、調査した陳皮あるいはみかん由来の試料にROS発生能の差が見られたことは、乾燥後の経過期間が異なるためかも知れない。ROS発生能の差は、東浦みかんの果皮を原料とする陳皮でも見られ、一年目の物ではROS発生能が検出されたが、二年目の物では検出されなかった。この果皮は、前者では明るいオレンジ色をしていたが、後者では全体に黒ずんだ色に変わっていた（図４）。東浦みかん由来の陳皮では、年次経過に伴ってROS発生能を持つ成分が減少した可能性がある。小松らによれば、生薬に使われる柑橘類の成熟に伴う成分量の調査から、いくつかの柑橘類において、ポリメトキシフラボノイドなどのポリフェノールの含有量は、成熟度による差はほとんどないことが示されている[38]。従って、陳皮におけるプロオキシダント能の低下は、代表的なプロオキシダント能を持つ抗酸化物質であるアスコルビン酸の低下が原因であるかも知れない。

図４　陳皮試料の外観（左：１年もの、右：２年もの）
図に示した温州みかん（敦賀市東浦産）の果皮を40℃で、一晩乾燥させた後、フードミキサーで粉砕した。

４－２－２．ショウガ類について

ショウガ類では、新生姜、および乾燥処理を施したショウガ由来試料（生姜（ショウキョウ）、乾姜（カンキョウ）など）の間には、プロオキシダント能や抗酸化能に大きな違いが見られた。黒ショウガ、赤ショウガでは、高いROS発生能およびルミノール化学発光阻害活性が認められた（表１）。対照的に、新生姜や、生姜（ショウキョウ）ではプロオキシダント能が高いサンプルも見出された（五社製品中一社）が、乾姜ではいずれもプロオキシダント能は検出されなかった（三社製品）（表１）。また、新生姜、生姜（ショウキョウ）、乾姜は、ほとんどの場合で50％以上のルミノール化学発光阻害能を示した（表１）。従って、ショウガ類では、高いROS発生能およびルミノール化学発光阻害能を持つ物（黒ショウガ、赤ショウガ）、および、採取後の処理などに応じてROS発生能が低下する物（新生姜、生姜（ショウキョウ）、乾姜）とが存在すると示唆された。

日本薬局方によれば、生姜（ショウキョウ）では乾燥重量あたり6-ジンゲロール0.3％以上を含むこと、乾姜では乾燥重量あたり6-ショーガオール0.1％以上を含むこととある[36]。陳皮の場合と同様に、これら生姜由来の生薬に含まれる抗酸化物質（6-ジンゲロール、6-ショーガオールなど）の含量だけではなく、ROS発生能・ルミノール化学発光阻害活性を併せて評価することは、その品質管理を行う上で重要な指標となる可能性があると考えられる。

５．おわりに

本研究では、農産物由来の抽出物について、その銅イオン還元能、およびプロオキシダント能に基づいた比較について検討してきた。試料中の抗酸化物質の種類や量の違いは、試料間でのプロオキシダント能の違いに反映されることが示唆され、プロオキシダント能の低い試料には、ヒドロキシルラジカル発生抑制能または捕捉能を持つ化合物が含まれる可能性が考えられた。今後、その様な性質を持つ新規抗酸化物質の発見に期待が持たれる。本アプローチは、将来的には、ヒドロキシルラジカル発生に伴う、生体高分子の酸化や細胞毒性の発現などを抑制できるような抗酸化物質含有抽出物を選抜する上で応用が期待される。

謝辞

貴重な試料をご供与いただいた関係方面各位に、御礼申し上げます。銅イオン還元能評価に関しご助言いただいた片野肇教授、ルミノール測定に関しご助言いただいた、日立アロカ(株)田中彩子氏に御礼申し上げます。データ測定を行っていただいた難波道代氏に感謝いたします。

本研究の一部は、福井県立大学地域貢献研究による支援を受けて実施されたものです。ご支援に対し、心より御礼申し上げます。

引用文献

1．吉川敏一ら、活性酸素・フリーラジカルのすべて　－健康から環境汚染まで－　丸善（2000）
2．Halliwell B, Gutteridge, JM, *Methods Enzymol.,* 186, 1-85 (1990)
3．Sakihama Y *et al., Toxicology,* 177, 67-80 (2002)
4．D'Autreaux B, Toledano MB., *Nat. Rev. Mol.Cell Biol.,* 8, 813-24 (2007)
5．黒川洋一、*生物工学会誌*、95,774 (2017)
6．和田光弘、*薬学雑誌*、128, 1031－36（2008）
7．Aruoma Oi. *et al., Biochem. J.,* 273,601-4 (1991)
8．Laughton MJ *et al., Biochem Pharmacol.,* 38, 2859-65 (1989)
9．Asplund KU *et al., Free Radic Res.,* 36,1271-76 (2002)
10．Jansson PJ *et al., Free Radic Res.,* 39, 565-70 (2005)
11．Asaad SF *et al., Chem Biol Interact.,* 137, 59-74 (2001)
12．Apak L *et al., J Agric Food Chem.,* 52, 7970-81 (2004)
13．Mira L *et al., Free Radic Res.,* 36,1199-208 (2002)
14．村上恵子ら、*Trace Nutrients Research,* 22,45-50 (2005)
15．Ito M *et al., Food Chem. Toxicol.,* 43, 461-466 (2005)
16．Parejo I *et al., J Pharmacol Toxicol Methods.,* 43, 183-90 (2000)
17．菊池洋一ら、*分析化学*、39, 301-5 (1990)
18．Eghbaliferiz S and Iranshahi M., *Phytother Res.,* 30,1379-91 (2016)
19．Anantharaju PG *et al., Nutr J.,* 15, 99 (2016)
20．Bordignon B *et al., Cancer Lett.,* 338, 317-27 (2013)
21．Hou DX *et al., Arch Biochem Biophys.,* 440,101-9 (2005)
22．田中隆、*薬学雑誌*、128, 1119-31 (2008)
23．Khan NS *et al., Chem Biol Interact.,* 125,177-89 (2000)
24．Sawasdee P *et al., Phytother Res.,* 23,1792-94 (2009)
25．Lee S *et al., Arch Pharm Res.,* 26, 43-46 (2003)
26．Shimoda H *et al., J. Med. Food,* 13, 156-62 (2010)
27．日本食品標準成分表2015年版（七訂）
28．Asif M, *Avicenna, J Phytomed.,* 2,169-78 (2012)
29．Masuda A *et al., J Nutr Sci Vitaminol,* 64, 466-72 (2018)
30．Horváthová K *et al., Neoplasma.,* 51, 395-99 (2004)
31．Murakami K *et al., Toxicol In Vitro.,* 21, 613-17 (2007)
32．松原義治、沢辺　昭義、*有機合成化学協会誌* 52, 318-27 (1994)
33．de Souza VT *et al., J Mol Recognit.,* 29, 80-7 (2016)
34．Yang HL *et al., J Agric Food Chem.,* 60, 522-32 (2012)
35．Roodenrys S *et al., Neuropsychopharmacology,* 27, 279-81 (2002)
36．第十七改正日本薬局方（2016）
37．Seki T. *et al., Geriatr Gerontol Int.,* 13, 236-38 (2013)
38．小松かつ子ら、*Annual Report Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University,* 24, 7-17 (1998)