

ラット尾静脈血を用いた包括的内因性抗酸化活性測定

鈴木 慧¹⁾，安達 修一¹⁾，菌田 勝²⁾

¹⁾ 大学院栄養科学研究科公衆衛生学研究室

²⁾ 共立女子大学大学院家政学研究科栄養学研究室

Application of comprehensive endogenous anti-oxidant activity measurement to whole blood from tail vein of rat.

SUZUKI Kei¹⁾，ADACHI Shuichi¹⁾，SONODA Masaru²⁾

¹⁾ Department of Public Health, Graduate School of Nutritional Science

²⁾ Department of Nutrition, Graduate School of Home Economic, Kyoritsu Women's University

Abstract

Measurement method for comprehensive endogenous anti-oxidant activity has been developed by Sonoda based on the mechanism of time dependent hemolysis after exposure to singlet oxygen generated under light-phthalocyanine reaction. It has been applicable to fingertip blood in human. However, it is difficult to apply to rat blood because of the readily hemolytic feature. By the modification of the measurement method for rat, it was demonstrated that zinc deficiency decreased the comprehensive endogenous anti-oxidant activity.

Key Words : reactive oxygen species, oxidative damage, zinc, red blood cell

はじめに

活性酸素による酸化ストレスは、癌や生活習慣病など様々な疾病に関係していることが注目されている¹⁾。酸化ストレスを評価する指標として過酸化脂質やDNAの損傷をみた8-OHdGなどのマーカーが知られているが^{2) 3)}、これらはどれも生体成分の二次産物であり、また一部分をみたものであって、体全体の酸化状態を評価するのは難しい。これらのことから菌田らにより、ヒトの指頭血を用いて、フ

タロシアニン（ALPcS）に光を照射して產生する一重項酸素を曝露することにより溶血反応を誘導させ、その溶血パターンから酸化・抗酸化のバランスを評価していく包括的内因性抗酸化活性測定が構築された⁴⁾。ヒトを対象とした実験では、糖質摂取と酸化ストレスとの関係性やビタミンCによる酸化ストレス抑制効果を示唆している⁵⁾。

ラットは実験対象として因子を明確に示唆することができるものであり、包括的内因性抗酸化活性測定に適応させていくことによって、酸化ストレスと

その因子の関係性をより探ることができると考えられる。しかし、ラットの赤血球はヒトとは異なり、生理食塩水（PBS）中では膠質浸透圧などにより形状が維持されずに溶血してしまうことが知られている⁶⁾。そのため、これまでの方法では、ラットを対象として実験を行うことが困難である。そこで本研究では、ラット赤血球は同種血清中では溶血がおさえられるという特徴⁶⁾をふまえ、ラットの尾静脈血を用いて包括的内因性抗酸化活性測定の方法について検討をした。

方法

1. 包括的内因性抗酸化活性測定

手順を図1に示した。ディッシュ（Becton Dickinson, Falcon35-1007, 60x15mm, polystyrene）にPBS 2695 μ L、アルミニウムフタロシアニンジスルホネート ALPcS (75 μ M) 300 μ L、血液 5 μ Lを加え反応溶液 3 mLとする。反応溶液にLED（Toshiba, LEL-BR9L-F, 9W）のシャーレよりの高さを調整し

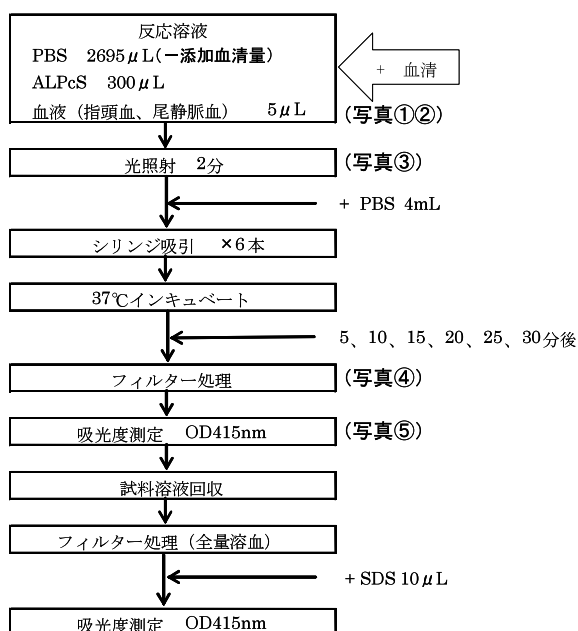
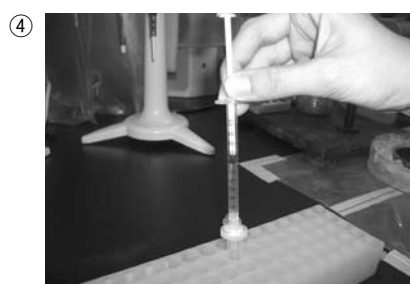
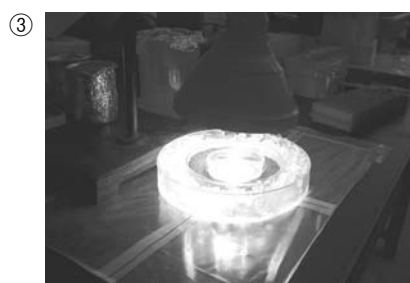


図1 指頭血またはラット尾静脈血を用いた包括的内因性抗酸化活性測定の手順
(①～⑤の写真を参照)



照度900～1000×10²LUXの光を2分間照射する。光照射後、加温したPBS 4 mLに反応溶液を加え攪拌し、1 mLシリンジ（Terumo, SS01T, ツベルクリン用）に6本吸引し、37℃にてインキュベートする。5、10、15、20、25、30分経過ごとに取り出し、あらかじめ蓋に1 %ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）10μL添加しておいた1.5mLマイクロチューブに、試料1 mLを30秒を目安に一定速度でフィルター（ADVANTEC, Dismic-13cp, 0.20μm）処理し、静かに混和する。マイクロプレートのwell二か所に280μLずつ入れ、OD415nmにて吸光度を測定（BioRad, model 680）する。測定後、元のシリンジにサンプルを回収し、再度もとのフィルターですばやく処理をして全量を溶血させる。well二か所に280μLずつ入れ、OD415nmにて吸光度を測定する。ブランクとして、0 %溶血をPBSで測定する。1回目の吸光度測定値を2回目の測定値で除した値を溶血の割合として評価を行う。

2. ラットの尾静脈血を用いた測定

包括的内因性抗酸化活性の測定をヒト赤血球より溶血しやすいラット赤血球へ適応できるか検討するため、エーテル麻酔下にラット尾静脈血（リングキャップス 5/10μL）を採取し、あらかじめ採血、分離したラット血清の添加量（PBS中の濃度）を変えて、1と同様の手順で測定を行った。照射時の反応

液中（全量 3 mL）血清濃度、① 0 %、② 10 %（300μL：PBS 2395μL）、③ 5 %（150μL：PBS 2545μL）、④ 1 %（30μL：PBS 2665μL）として測定した。

3. ラットにおける亜鉛欠乏の影響

F344ラット雌4週齢を日本SLCより購入し、1週間の予備飼育後に標準飼料摂取群と低亜鉛飼料群に分け、70週間飼育した。2の方法で尾静脈血を用いた包括的内因性抗酸化活性を測定した。

結果

結果を図2に示した。①は血清を添加せずに測定した結果であり、5分の時点で90%以上の溶血となった。PBS中でラット血液は容易に溶血することを確認した。②は血清10%添加した結果で、30分での溶血率が11%と溶血の抑制がみられた。血清5%添加した結果では（③）、30分での溶血率が20%に抑えられたが、②と比較すると溶血は進んだ。④は血清1%添加した結果で、30分まで経時的な一定割合の溶血がみられた。②～④の結果より、5%までの添加では溶血が抑制されすぎてしまい、一重項酸素の曝露誘発の溶血による評価が難しい。血清1%添加では、PBS中での溶血が抑制されつつも、その促進や抑制が評価できる範囲での溶血曲線を得られることが判った。

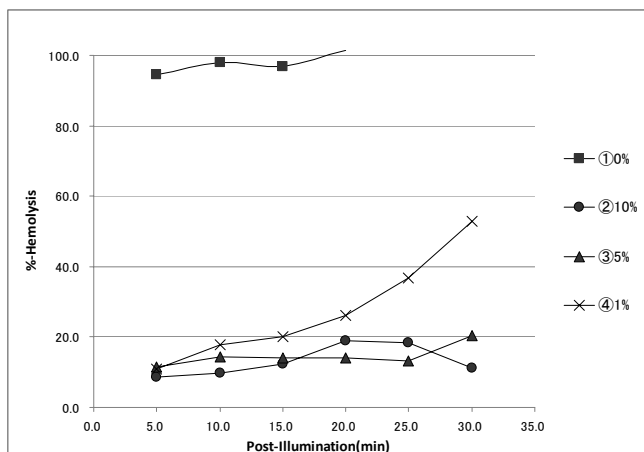


図2 ラット尾静脈血を用いた包括的内因性抗酸化活性測定における溶血性に対する血清添加の影響

これを応用して、亜鉛欠乏ラットと正常ラットにおける包括的内因性抗酸化活性測定を実施した。結果を図3に示した。亜鉛欠乏ラットでは、AUCが正常ラットに比べて有意に高く包括的抗酸化活性の低下が認められる結果となった。

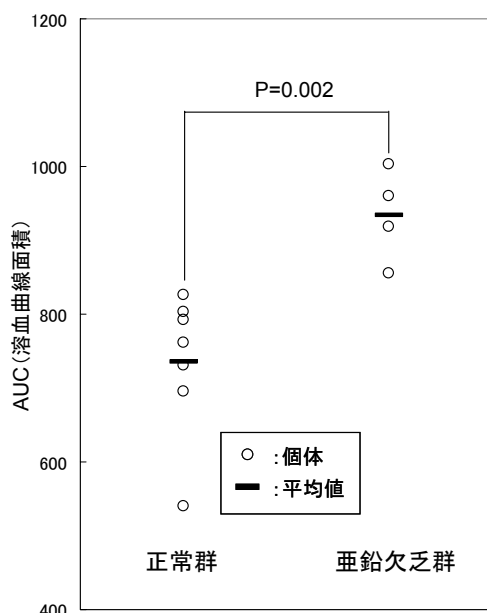


図3 亜鉛欠乏と正常ラットにおける包括的内因性抗酸化活性の違い

考察

本研究の結果より、血清添加がPBS中でのラット尾静脈血の溶血抑制に効果があり、ラットを用いた包括的内因性抗酸化活性測定が適応可能であろうと考えられた。これに基づいて実施した亜鉛欠乏の影響を検討した結果では、亜鉛欠乏が有意に本指標の低下をもたらしたことから活性酸素に対する防御機能が示唆される亜鉛の機能性を実験的に証明することができた。

酸化ストレスによる疾患などを予防や抑制することができる物質に多く関心がもたれているが、効果に対する科学的根拠が必ずしも明確でない現状である。この測定に実験動物が適応できることにより、酸化ストレスと関係していると想定される各種因子

についての検討が可能となるだろう。また、添加濃度は高すぎても溶血が抑制されすぎてしまい、評価が行えないため、適した濃度で実験を行うことがポイントとなるだろう。今後、評価に適した濃度についてさらに検討を進めていく必要がある。また、本研究で使用した血清は、別個体より採取したものであり、血清中の抗酸化物質が実験対象のラットの溶血に影響を与える可能性も考えられ、これらのことについての検討も必要であると考えている。

本研究の一部は、2010年度卒業論文（大熊佑希奈、小前沙羅、宮本夏海、柳田睦美）として実施した。

参考文献

- 1) 藺田勝. メタボリックシンドロームと酸化ストレス. ビタミン 80 (12), 613-616, (2006)
- 2) 二木鋭雄, 野口範子, 内田浩二. 酸化ストレスマーカー. 学会出版センター, 2005, 1-7p. (ISBN 978-4762230417)
- 3) 酒居一雄, 越智大倫, 竹内征夫. 酸化ストレスマーカー-8-OHdG. 生物試料分析 32 (4), 297-300 (2009)
- 4) 塩入麻由, 矢部えん, 井上葉子, 長浦亜希子, 藺田勝. 指頭血を試料とした生体内抗酸化能の推定方法に関する研究. ビタミン 81 (4) 115 (2007)
- 5) 塩入麻由, 矢部えん, 井上葉子, 長浦亜希子, 藺田勝. 指頭血による生体酸化包括的評価方法と糖質摂取惹起酸化ストレスのビタミンCによる抑制. ビタミン 82 (4) 304 (2008)
- 6) 民谷さち子, 金津赫生. ラット赤血球の溶血機転について. Journal of toxicological sciences 1 (1), 58 (1976)