

2020年3月11日発行

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)分析法による 魚缶に含む残り汁の抗酸化能評価

鶴 崎 美 徳

相模女子大学 栄養科学部 健康栄養学科

相模女子大学紀要 VOL.83 (2019年度)

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 分析法による魚缶に含まれ残り汁の抗酸化能評価

鶴 崎 美 徳

相模女子大学 栄養科学部 健康栄養学科

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay-based evaluation of anti-oxidant activities of leftover soup present in canned fish

Yoshinori TSURUSAKI

Faculty of Nutritional Science, Sagami Women's University, Sagami-hara, Japan

Organisms including humans use oxygen to maintain life activities. Oxygen transforms itself into highly responsive reactive oxygen species (ROS) even in normal conditions. ROS actively participates in cellular transmitters and immune functions. However, excessive production of ROS acts as a contributing factor for the development of various diseases, such as arterial sclerosis, myocardial infarction, cancer, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, cataract, bronchial asthma, ulcerative colitis, diabetes, autoimmune disorders, as well as aging.

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay is a method for evaluating anti-oxidant activities of both hydrophilic antioxidant compounds (H-ORAC) and lipophilic antioxidant compounds (L-ORAC). In this study, we evaluated the anti-oxidant activities of leftover soup present in canned Sabah or tuna. The results revealed that the H-ORAC values of leftover soup in canned Sabah and tuna were 1404 and 1198 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$, respectively. Our findings provide evidence that the leftover soup in canned fish possesses anti-oxidant properties.

Keywords : 魚缶, 抗酸化能, H-ORAC (親水性-酸素ラジカル吸収能)

緒言

我々ヒトを含む好気性生物は、大気中に存在する酸素を利用して、生命活動を維持している。呼吸で取り込まれた酸素の大部分はエネルギーの産生に用いられるが、この酸素は様々な刺激を受けることにより、平常時でも数%は反応性の高い活性酸素種に変化する。活性酸素種として代表的なものに、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、一重項酸素などが挙げられる。活性酸素種は細胞伝達物質や免疫機能において積極的に利用されているが、その一方で、過剰に活性酸素種が産生することにより、タンパク質、脂質、DNAなどを酸化し、タンパク質の変性、脂質の過酸化、遺伝子の損傷を引き起こし、種々の疾病（動脈硬化、心筋梗塞、がんのほかに、パーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、白内障、気管支喘息、潰瘍性大腸炎、糖尿病、自己免疫疾患など）の発症や老化をもたらす要因となっている^{1), 2)}。我々ヒトの生体内では、このような活性酸素種の障害から防御するために、抗酸化防御機構が備わっているが、活性酸素種の産生と抗酸化防御機構とのバランスが崩れた状態を酸化ストレスと呼ぶ。生体内における抗酸化防御機構として、スーパーオキシド消去酵素、過酸化水素消去酵素などの内因性の酵素系に加え、アスコルビン酸（ビタミンC）、 α -トコフェロール（ビタミンE）、緑茶に含まれるカテキン、赤ワインに含まれるレスベラトロール、ゴマに含まれるセサモールなど外因性の抗酸化物質もある²⁾。

抗酸化能の測定法として、原理の異なる多種多様な測定法が存在する。その中でも、米国においては、生活習慣病に関わるとされる277品目の果実・野菜などの食品の抗酸化能をOxygen radical absorbance capacity (ORAC) 分析法により測定している。ORAC分析法は、水溶性成分の抗酸化能 (H-ORAC) だけでなく、脂溶性成分の抗酸化能 (L-ORAC) も定量することができる^{3), 4)}。

近年、食品の機能性成分の探索が盛んに行われている。魚介類に多く含まれている機能性成分としては、抗動脈硬化に関与するドコサヘキサエン酸 (DHA)、高血圧予防に関与するエイコサペンタエン酸 (EPA)、肝機能改善に関与するタウリンなどが知られている。抗酸化能に関与する機能性成分としては、鮭、えび、かになどに多く含むアスタキサンチンなどが挙げられる。しかしながら、魚缶などの加工食品に含まれている残り汁についての機能性

成分に関しては、未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、魚缶の中でもサバ、およびマグロ水煮缶に含む残り汁について、ORAC分析法を用いて抗酸化能 (H-ORAC 値) を評価した。

実験方法

(1) 試料および試薬

測定試料として、サバ水煮缶 (STIフードホールディングス社)、およびマグロ水煮缶 (はごろもフーズ社) を使用した。12,000 rpm、15分の遠心分離の後、その上清液を希釈し分析に用いた。試薬は、2, 2'-Azobis (2-methylpropion-amidine) dihydrochloride (AAPH) (Aldrich社)、6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) (Aldrich社)、Fluorescein (Na Salt) (FL) (SIGMA社) を用いた。

(2) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 分析法^{5)~7)}

全ての試薬は37℃の75 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて調整した。96穴マイクロプレート (Coster No. 3792) (Corning社) に、100倍希釈した測定試料、およびFL (終濃度; 30.6 nM) を加え、Multi Grating Microplate Reader SH-9000 (CORONA Electric社) により、FLの蛍光強度 (Em.: 485 nm, Ex.: 520 nm) を測定した。その後、AAPH溶液 (終濃度; 31.25 mM) を加えた後、経時変化を測定した。スタンダードにはビタミンEの安定な同族体であるTrolox (6.25, 12.5, 25 and 50 μ M)、ブランクには75 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。H-ORAC値は100 mLあたりのTrolox 当量 (μ mol TE) として示した。各測定試料の分析は3回ずつ行った。

結果と考察

4通りの標準物質Trolox濃度 (6.25, 12.5, 25 and 50 μ M) でそれぞれORAC分析を行い、経時的な蛍光測定を行った結果を図1に示した。さらに、4点の異なる濃度のTroloxを用いて、抗酸化標準曲線を生成した (図2)。サバ水煮、およびマグロ水煮缶に含む残り汁を用いて経時的な蛍光測定を行った結果を図3に示し、H-ORAC値は表1に示した。サバ水煮、およびマグロ水煮に含む残り汁のH-ORAC値の平均値はそれぞれ1404 μ mol

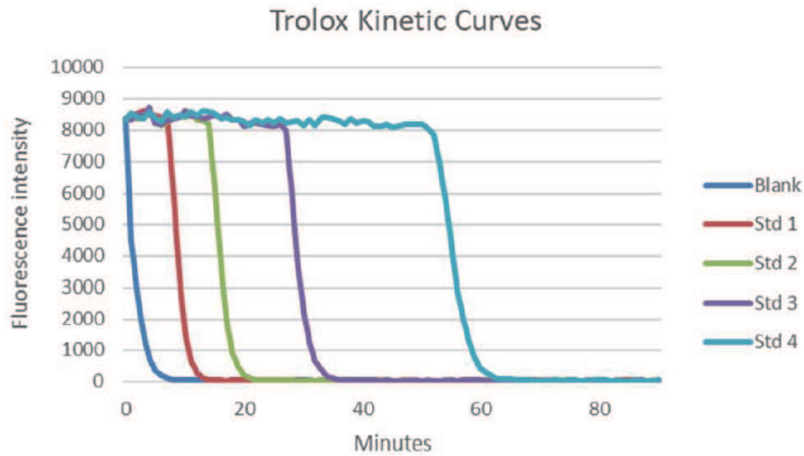


図1. 標準物質 Trolox の各濃度における経時的な蛍光測定結果 (Std 1: 6.25 μ M, Std 2: 12.5 μ M, Std 3: 25 μ M, Std 4: 50 μ M)

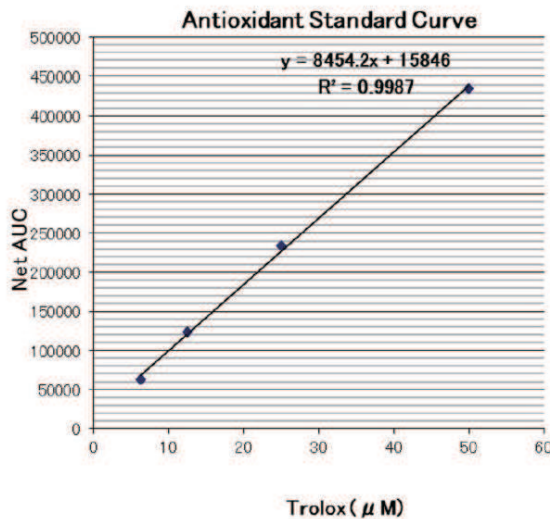


図2. 各蛍光測定データをもとにして作成した抗酸化標準曲線

TE/100 mL、1198 μ mol TE/100 mLとなり、サバ水煮に含む残り汁のほうが高い数値を示した。

いであ株式会社、食品・生命科学研究所の抗酸化食品のH-ORAC値のデータベースによると、グレープフルーツ2,146 μ mol TE/100 mL、赤ワイン1,080 μ mol TE/100 mL、紅茶796 μ mol TE/100 mLであり⁸⁾、今回測定した魚缶に含む残り汁の抗酸化能はおよそ赤ワインと同等の値を示した。赤ワインには抗酸化作用を示すポリフェノールが含まれていることが知られている。

近年、微量元素セレンが高濃度に含まれるマグロ血合肉から、有機セレン化合物が抽出され、「セレノネイン」と命名され、構造が明らかとなった。セレノネインはマグロ類以外にも、サバ類、ブリ類などの回遊性魚に広く分布されることが見出された。また、抗酸化作用をもつアミノ酸、エルゴチオネインやTroloxと比較し、さらに強い抗酸化能を有していることが明らかとなった⁹⁾。

本研究において、魚缶に含む残り汁の抗酸化能を明らかとしたが、今後、魚缶の残り汁に含まれる抗

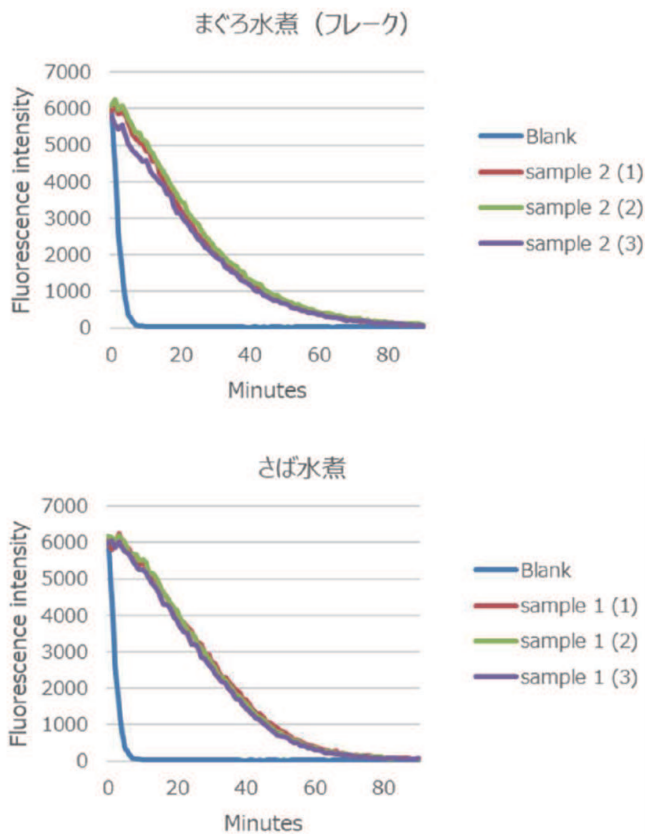


図3. 各試料（100倍希釈）の経時的な蛍光測定結果

表1. 各試料のH-ORAC値

Description	Parameter	N	ORAC Value (μmol TE/100 mL)			
			Mean	Well 1	Well 2	Well 3
Sample 1 さば水煮	H-ORAC*	3	1404	1442	1427	1344
Sample 2 まぐろ水煮	H-ORAC*	3	1198	1203	1286	1106

酸化成分を明らかにするために、更なる検討が必要である。

謝辞

本研究を行うにあたり、試薬調整ならびにORAC測定にご協力をいただいた、いであ株式会社、食品・生命科学研究所に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 渡辺 純, 沖 智之, 竹林 純, 山崎光司, 津志田藤二郎. 食品の抗酸化能測定法の統一化を目指して. 化学と生物. 2009, vol. 47, No. 4, p. 237-243.
- 2) 中村成夫. 活性酸素と抗酸化物質の化学. 日医大医会誌. 2013, vol. 9, No.3, p. 164-169.
- 3) 渡辺 純, 沖 智之, 竹林 純, 山崎光司, 津志

田藤二郎. 抗酸化能測定法であるH-ORAC法の
室間共同試験. 日本食品科学工学会誌. 2010,
vol. 57, No. 12, p. 525-531.

- 4) 伊藤満敏, 大原絵里, 小林 篤, 山崎 彬, 梶亮
太, 山口誠之, 石崎和彦, 奈良悦子, 大坪研一.
有色素米の抗酸化能とポリフェノール含量の測
定. 日本食品科学工学会誌. 2011, vol. 58, No.
12, p. 576-582.
- 5) Boxin O., Maureen HW., and Ronald L. P.
Development and validation of an improved
oxygen radical absorbance capacity assay
using fluorescein as the fluorescent probe. J.
Agric. Food Chem. 2001, 49, 4619-4626.
- 6) Ronald L. P., Ha H., Liwei G. et al. Assays for
hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity
(oxygen radical absorbance capacity
(ORACFL)) of plasma and other biological and
food samples. J. Agric. Food Chem. 2003, 51,
3273-3279.
- 7) Xianli W., Gary R. B., Joanne M. H. et al.
Lipophilic and hydrophilic antioxidant
capacities of common foods in the United
States. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 4026-
4037.
- 8) フナコシ株式会社 親水性ORAC法による抗
酸化力の分析受託サービス (<https://www.funakoshi.co.jp/contents/4767>), 2019年12月12
日
- 9) 山下倫明, 今村伸太郎, 藪 健史, 石原賢司,
山下由美子. 水産物由来のセレン: セレノネイ
ンの栄養生理機能. Biomed Res Trace
Elements. 2013, vol. 24, No. 4, p. 176-184.