

【総説】

酸化ストレス

Oxidative stress

金沢大学大学院医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学
(公衆衛生学)

神 林 康 弘

はじめに

酸素はヒトが生きていく上で欠かせない存在であるが、一方で、酸化ストレスにより毒性を示す両刃の剣である。酸化ストレスとは、“酸化促進物質が優勢になり酸化促進物質と抗酸化物質のバランスが崩れ、傷害が生じる可能性のあること”とSiesにより定義されている。酸化ストレスは、心血管疾患、癌、アレルギー疾患、炎症を初めとした多くの疾患や老化に関与している。活性酸素種・フリーラジカル(酸化促進物質)により脂質・タンパク質・DNAが酸化されて生成する酸化生成物の蓄積が、種々の疾患の要因になると考えられていた。しかし、酸化変性した物質は酵素により修復されたり、除去される。また、尿中に排泄される。例えば、過酸化リン脂質はホスホリパーゼA₂により加水分解されて過酸化脂肪酸が遊離し(神林ら, BBRC 245 (1998) 705), 未酸化の脂肪酸が付加することにより修復される。そこで、酸化促進物質や酸化変性された物質がシグナル伝達物質となり、種々の疾患の要因になることが考えられ、盛んに研究が行われている。

酸化ストレスが関与する疾患を予防するためには、ビタミンC, ビタミンE, コエンザイムQ₁₀などの抗酸化物質を摂取することが大切である。抗酸化能の高い抗酸化物質を摂取することが、疾患の予防に効果的だと考えられる。したがって、新しい抗酸化物質を探索することや評価することが、酸化ストレスが関与する疾患の予防には重要である。酸化ストレスの源となる活性酸素種・フリーラジカルの分子種は多様である。発生場所や、分子の化学的性質により、抗酸化物質の効果が変わってくる。抗酸化物質は、ラジカルに水素を与えることにより消去する。しかし、その反応性は分子種により異なる。例えば、ビタミンCとの二次反応速度定数k₂は、ヒドロキシラジカルが7.2×10⁹ M⁻¹s⁻¹で、スーパーオキシドが0.5-2.7×10⁹ M⁻¹s⁻¹であり、反応性が大きく異なる(反応速度vは次の式で求められる。v=k₂[ヒドロキシラジカル][抗酸化物質]; [物質]は濃度を示す)。

ミトコンドリアの電子伝達系からの電子の漏れ、虚血-再灌流、P450による化学物質の代謝、好中球や好酸球や単球の持つNADPHオキシダーゼなどが、生体中の活性酸素種・フリーラジカルの発生源である。また、ペルオキシダーゼも様々な物質を酸化して、ラジカルを生じさせ、疾患の要因になっていることが考えられる。代表的なペルオキシダーゼとして、好中球の持つミエロペルオキシダーゼや、好酸球が持つ好酸球ペルオキシダーゼが挙げられる。

本総説では、著者らが行った抗酸化物質の評価や、酸化され

た脂質による細胞内情報伝達や、ペルオキシダーゼによる酸化反応について、紹介する。

1. キノベオンAの一重項酸素消去能の評価¹⁾

抗酸化物質は、酸化ストレスが関与する疾患の予防に効果的であると考えられる(疫学的研究では、効果が示されていない研究も多くあるが、対象や抗酸化物質の摂取時期など、多くの検討すべき問題がある)。食品や植物から天然の抗酸化物質を探索し、新規の抗酸化物質を発見することは、酸化ストレス研究の1つの課題である。著者らは、キノベオンAに着目した(図1)。キノベオンAは、ベニバナ細胞を特殊な条件下で培養すると産生されるユニークな物質である。通常の条件下で培養したベニバナ細胞や、天然のベニバナからは産生されない。ベニバナは、食用油、漢方、化粧品などに利用されている有用な植物である。著者らは、キノベオンAが、鉄(Fe²⁺)-ADP系によるラット肝臓ミクロソームの酸化を抑制することや、過酸化水素やtert-ブチルヒドロペルオキシドによるウシ腎臓培養細胞の傷害を抑制することや、キサントニン/キサントニンオキシダーゼ系で発生させたスーパーオキシドを消去することを示した(金平ら, Life Sci 74 (2003) 87)。

一重項酸素には、¹Δgと¹Σgの状態があるが、溶液中では¹Σgの寿命はきわめて短く、¹Δgに失活する。¹Δg一重項酸素の寿命でも水溶液中で4 μsである。¹Δg一重項酸素は、(三重項)酸素より22.5 kcalだけエネルギーの高い状態である。一重項酸素は、好中球や好酸球から産生され、殺菌などに役立っている。一方、光増刊反応などで紫外線からエネルギーを受け取って生成した一重項酸素は皮膚や眼を攻撃し、傷害を与える。したがって、一重項酸素を除去することは、生体防御のために重要である。

一重項酸素発生源として過酸化水素と次亜塩素酸の反応など

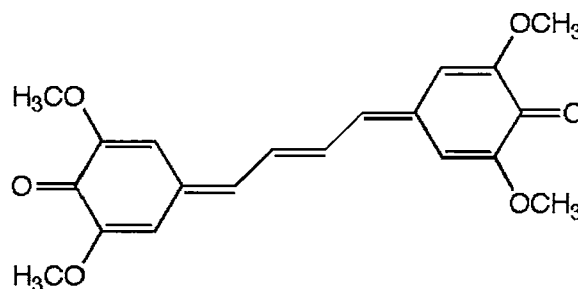


図1. キノベオンAの構造式

が使用されているが、それぞれの物質による作用もあり、問題があった。そこで、熱分解で一重項酸素を発生する3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid, 1',4'-endoperoxide (NEPO, 図2) を合成した(中野ら, FEBS Lett 432 (1998) 9)。NEPOから一重項酸素が発生すると、3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid (NPA) となる。メタノール/ジメチルスルホキシド (=9/1, v/v) 中では、NPAの最大吸収波長 (λ_{\max}) が287.4 nmであり、モル吸光度係数 ($\epsilon_{287.4 \text{ nm}}$) は7,800 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であった。37°C大気下におけるNEPO熱分解の一次反応速度定数は、 $1.91 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であった。NEPOからの一重項酸素発生効率は、ほぼ100%であった。これらのことから、t秒間の一重項酸素発生量 ($[^1\text{O}_2]_{\text{total}}$) は次の式1から計算できる。

$$[^1\text{O}_2]_{\text{total}} = [\text{NEPO}]_0 \times (1 - \exp(-1.91 \times 10^{-4} \times t)) \quad [\text{M}] \quad (1)$$

ここで、 $[\text{NEPO}]_0$ はNEPOの初濃度を示す。このように、発生する一重項酸素量を簡単に計算できるので、NEPOは化学量論的検討や反応速度の解析に適している。

37°C大気下、メタノール/ジメチルスルホキシド (=9/1, v/v) 中で、NEPOを用いて一重項酸素を発生させ、スクワレンの酸化を行った。キノベオンAによるスクワレン酸化の抑制から、50%阻害濃度を求め、代表的な一重項酸素消去物質である α -トコフェロール(ビタミンE)と β -カロテンと比較した。 β -カロテン ($13 \mu\text{M}$) < キノベオンA ($15 \mu\text{M}$) < α -トコフェロール ($316 \mu\text{M}$) であり、キノベオンAは強力な一重項酸素消去物質である β -カロテンと同等の一重項酸素消去能を持つことが分かった。

式2を用いると、キノベオンAや他の抗酸化物質と一重項酸素の二次反応速度定数 (k_Q) が求められる。

$$S_0/S_Q = 1 + (k_Q/k_d)[Q] \quad (2)$$

ここで、 S_0 と S_Q はスクワレン過酸化物の生成量を時間に対してプロットした時の抗酸化物質非存在下と存在下における傾きである。また、 $[Q]$ は抗酸化物質の初濃度である。 k_d は一重項酸素減衰の一次反応速度定数であり、メタノール中の値 $1.8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ を用いた。キノベオンAの k_Q は $1.15 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、 α -トコフェロール ($4.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) よりも大きく、 β -カロテン ($1.26 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) に匹敵するものであった。一重項酸素の消去には、化学反応と物理的消去がある。化学反応は二重結合に一重項酸素が付加する反応であり、物理的消去は振動や光として一重項酸素がエネルギーを消失することにより酸素に戻る現象である。酸化生成物量から、キノベオンAによる一重項酸素の消去は、物理的消去が大部分であることが分かった。キノベオンAは強力な一重項酸素消去能を持つので、一重項酸素が関与する皮膚疾患や眼疾患の予防に効果を示すかもしれない。

このように、化学的に抗酸化物質の評価を行うと、それぞれの抗酸化物質の能力が客観的な数値として表されるので便利である。しかし、化学的評価だけでなく、物理的な評価(反応場の問題)、細胞を用いた評価、動物を用いた評価など、様々な角度から抗酸化物質の評価を行うことが大切である。

2. 脂質過酸化物による細胞内情報伝達異常²⁾

ホスファチジルセリン過酸化物がマクロファージによるアポトーシス小体除去のための認識に大切であったり、カルジオリピン過酸化物がアポトーシスの過程でチトクロムcの遊離に関わっているなど、脂質の酸化物が細胞内情報伝達に重要な役割を果たしていることが分かってきた。著者らは、ジアシルグリセロールの酸化物に注目してきた。ジアシルグリセロールは、細胞内情報伝達に重要な役割を果たしているプロテインキナー

ゼCの活性化因子である。まず、大豆ホスファチジルコリンを原料として作成したジリノレオイルグリセロールの過酸化物や酸化物が、未酸化のジアシルグリセロールよりもラット脳粗精製プロテインキナーゼCを活性化することを示した(竹腰ら, BBRC 217 (1995) 654)。次に、1-パルミトイル-2-リノレオイルグリセロール過酸化物刺激が、未酸化のジアシルグリセロール刺激よりも、ヒト好中球スーパーオキシド産生能が強いことも示した(山本ら, FEBS Lett 412 (1997) 461)。さらに、ジアシルグリセロール過酸化物が生体中で生成する可能性についても示した(神林ら, Redox Rep 7 (2002) 29)。

生体中のホスファチジルコリンが持つ脂肪酸として多いのは、1位がパルミチン酸とステアリン酸で、2位がリノール酸とアラキドン酸である。これらの脂肪酸の組み合わせで構成されるジアシルグリセロールの過酸化物や酸化物のうち、好中球スーパーオキシド産生能が最も高いのはどれか興味を持たれた。どの分子種も、ジアシルグリセロール過酸化物 > ジアシルグリセロール酸化物 \geq ジアシルグリセロールの順で、好中球スーパーオキシド産生能が高かった。1位のパルミチン酸とステアリン酸の違いによる好中球スーパーオキシド産生能の差はなかったが、2位では、リノール酸 > アラキドン酸であった。最も好中球スーパーオキシド産生能が高かったのは、1-パルミトイル-2-リノレオイルグリセロール過酸化物であった。

好中球がスーパーオキシドを産生するには、プロテインキナーゼCの活性化が起こり、p47^{phox}などのNADPHオキシダーゼの細胞内因子がリン酸化され、膜に移行しチトクロムb558と結合する必要がある。1-パルミトイル-2-リノレオイルグリセロール過酸化物によりヒト好中球内でp47^{phox}がリン酸化された。p47^{phox}リン酸化の経時変化はスーパーオキシド産生の経時変化と類似

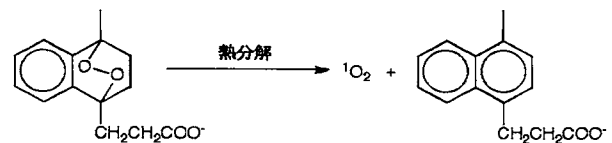


図2. NEPOの熱分解による一重項酸素の発生

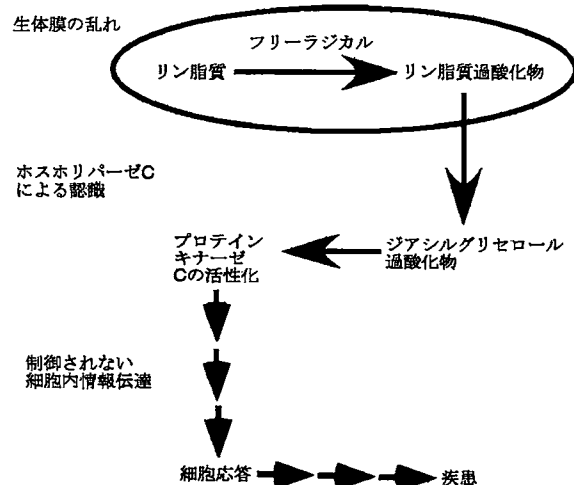


図3. 生体膜の酸化と制御されない異常な細胞内情報伝達

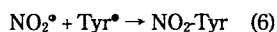
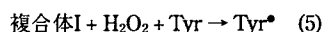
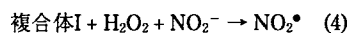
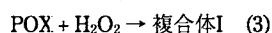
していた。1-パルミトイル-2-リノレオイルグリセロール過酸化物は、好中球内のPKCを活性化し、スーパーオキシドが産生されることが示唆された。

著者らは、フリーラジカルによる疾患発症機構を図3のように考えている。フリーラジカルにより生体膜が攻撃を受け、リン脂質過酸化物が生じる。この膜の乱れをホスホリパーゼCが認識し、加水分解によりジアシルグリセロール過酸化物が生じる。これが、細胞内のPKCを活性化することにより、レセプターを介さず制御されない異常な細胞内情報伝達が起こり、疾患の要因となると考えられる。膜の損傷が少なければ、生体膜修復のためのシグナルとなることも考えられる。

3. チトクロムcによるチロシンのニトロ化⁹⁾

ペルオキシダーゼによる酸化は、炎症部位におけるミエロペルオキシダーゼや、ウニ受精時のオボペルオキシダーゼや、タケノコのバンパーペルオキシダーゼなど、様々なペルオキシダーゼにより引き起こされる。ウニの卵が受精すると、オボペルオキシダーゼによりジチロシンが形成され受精膜を固くし、他の精子を受け付けなくなる。著者らは、ペルオキシダーゼによりチロシンやジチロシンが酸化されて生成したカチオンラジカルとペルオキシダーゼの複合体IIIが反応し励起状態となり、これが基底状態に戻る時に発光が起こることを示した(戸恒ら, ABB 369 (1999) 233)。つまり、かぐや姫の話しにあるように、竹を切ると光るのである。中野らは、タケノコを切った時に発光することを示し、緒言でかぐや姫の話しを引用している⁹⁾。

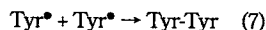
ニトロチロシンは、アレルギー疾患や炎症など窒素ストレス下で生成するバイオマーカーとして注目を集めている。ニトロチロシンの生成には、ペルオキシナイトライト経路とペルオキシダーゼ経路がある。ペルオキシダーゼ経路では、過酸化水素によりペルオキシダーゼ (POX) が酸化力の強い複合体Iとなる(式3)。亜硝酸イオン (NO_2^-) がペルオキシダーゼにより酸化され、二酸化窒素となる(式4)。チロシン (Tyr) もペルオキシダーゼにより酸化される(式5)。生成したチロシンラジカルと二酸化窒素が反応し、ニトロチロシン (NO_2^- -Tyr) が生成する(式6)。



この反応を触媒する生体内のペルオキシダーゼには、ミエロペルオキシダーゼや、好酸球ペルオキシダーゼや、ラクトペルオキシダーゼがある。西洋ワサビペルオキシダーゼもチロシンニトロ化反応を触媒する。ヘムを持つタンパクは、偽ペルオキシダーゼ活性を示す。偽ペルオキシダーゼ活性を持つヘモグロビンや、ミオグロビンや、ミクロペルオキシダーゼはチロシンニトロ化反応を触媒する。チトクロムcもヘムタンパクであり、弱い偽ペルオキシダーゼ活性を示すことが報告されており、チトクロムcによりチロシンニトロ化が起こるのか興味を持たれた。

過酸化水素存在下において、チトクロムcはチロシンをニトロ化した。ニトロチロシン生成量は、過酸化水素濃度、亜硝酸イオン濃度、チトクロムc濃度依存的であった(37°C大気下)。2.5 μM チトクロムcと、100 μM 過酸化水素と、1 mM亜硝酸イオンと、種々の濃度のチロシンでニトロ化反応を行ったところ、チロシンが50 μM の時にニトロチロシン生成量はピークとなり、それ以上の濃度になると減少した。チロシン濃度が濃い

とチロシンラジカル同士が接触する確率が高くなり、ジチロシンが生成するからだと考えられる(式7)。



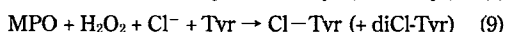
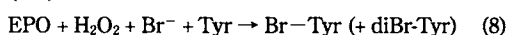
チトクロムcによるチロシンニトロ化反応は、カタラーゼ(過酸化水素の還元)や、アジ化ナトリウム(ヘムタンパクの阻害)や、尿酸(複合体Iの阻害、ラジカル消去)や、システイン(複合体Iの阻害、ラジカル消去)により抑制されることから、偽ペルオキシダーゼ活性が関与していることが分かった。チトクロムcの偽ペルオキシダーゼ活性は、pH 5~6で最大となり、ペルオキシダーゼと同様の傾向を示した。大気下、pH 7, 37°Cにおけるチトクロムcと過酸化水素の見かけ上の二次反応速度定数 (k_{app}) を求めたところ、 $4.2 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。この値は、報告されているミエロペルオキシダーゼ ($1.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) や好酸球ペルオキシダーゼ ($4.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) の値よりはるかに小さい値であった。これから判断すると、生体中ではチトクロムcによるチロシンニトロ化反応は起こりにくいと考えられる。しかし、アポトーシス時のチトクロムcの遊離など特殊な状況下では、チトクロムcによるチロシンニトロ化に意味があるのかもしれない。

4. 白血球の持つペルオキシダーゼにより生成される酸化ストレスマーカー⁹⁾

喘息は成人の3~4%の罹患率を示す比較的頻度の高い呼吸器疾患である。喘息の発症率は年々増加傾向にあり、この30年間に成人は3~4倍に、小児では8倍前後になっている。喘息による死亡率を見ると年々減少傾向にあるが、欧米諸国と比較すると未だ十分とは言えない。また、軽症・中等症の喘息患者の死亡率や、若年層での喘息による死亡率は増加している。よって、喘息のリスク評価を行える診断法は、喘息の死亡率低下など治療や予防に重要な役割を果たすと考えられる。

気管支喘息などのアレルギー疾患には好酸球が関与している。好酸球は活性化すると脱顆粒して、major basic protein, eosinophil cationic protein, eosinophil-derived neurotoxin, 好酸球ペルオキシダーゼを放出し、組織傷害を引き起こす。また、活性化された好酸球が産生するアラキドン酸代謝物、血小板活性化因子、スーパーオキシドなども炎症に関与する。このように、好酸球が活性化された場合、アレルギーや炎症を憎悪させる種々のメディエーターを放出・産生するため、好酸球の活性化を判断出来るバイオマーカーがあれば、アレルギー疾患のリスク評価が可能と考えられる。

好酸球の持つ好酸球ペルオキシダーゼ (EPO) と好中球の持つミエロペルオキシダーゼ (MPO) は、過酸化水素を使用してチロシンのハロゲン化反応を触媒する。議論の残っているところではあるが、好酸球ペルオキシダーゼは塩素イオン (Cl^-) より臭素イオン (Br^-) を好んで使用し、(ジ)プロモチロシンを生成させる(式8)。一方、ミエロペルオキシダーゼは臭素イオンより塩素イオンを好んで使用し、(ジ)クロロチロシンを生成させる(式9)。



したがって、(ジ)プロモチロシンは、好酸球活性化マーカーとして使用できると考えられる。(ジ)プロモチロシンを認識する抗体があれば、動物モデルを用いた喘息の病態解析や、喘息患者の重症度の診断に役立つはずである。そこで、著者らは抗(ジ)プロモチロシン抗体を作成した。

免疫原として、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に、プロモチロシンや、プロモヒドロキシベンズエートを付加して、ウサギに免疫したが、望んだ抗血清は得られなかった。次亜臭素酸を用いて (ジ) プロモ化した KLH を免疫原として用いると、(ジ) プロモ化したウシ血清アルブミン (BSA) を認識する抗血清を得ることが出来た。Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いて、得られた抗血清の抗原特異性を調べた。本抗血清は、(ジ) プロモ化した BSA とジプロモチロシンを付加した BSA を認識した (図4)。しかし、(ジ) クロロ化した BSA とジヨードチロシンを付加した BSA とも交差反応した (図4)。プロモチロシンを付加した BSA に対する本抗血清の反応は、チロシンや、ニトロチロシン ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$) や、アミノチロシン ($\text{NH}_2\text{-Tyr}$) を付加した BSA に対する弱い反応と変わらず、本抗血清はジハロゲン化チロシンを認識する抗体であることが分かった (図4)。(ジ) プロモ化 BSA を抗原とした低分子修飾チロシンを用いた competitive ELISA でも、同様の結果が得られた。次に、本抗血清の抗体価を調べた。1,000倍希釈した抗血清を用いた場合、非特異的な BSA との反応が認められた。3,000倍希釈して用いると、(ジ) プロモ化 BSA を特異的に認識した。反応性は弱くなるものの、10,000倍希釈でも、本抗血清は (ジ) プロモ化 BSA を認識した。免疫組織化学的検討も行った。ラット白血球を集め、サイトスピンによりプレートに塗布した。その後、過酸化水素処理、プロモ化反応、クロロ化反応、ニトロ化反応を、それぞれ行った。本抗血清によりプロモ化反応を行った好酸球は染色されたが、コントロールを含むその他の反応を行っ

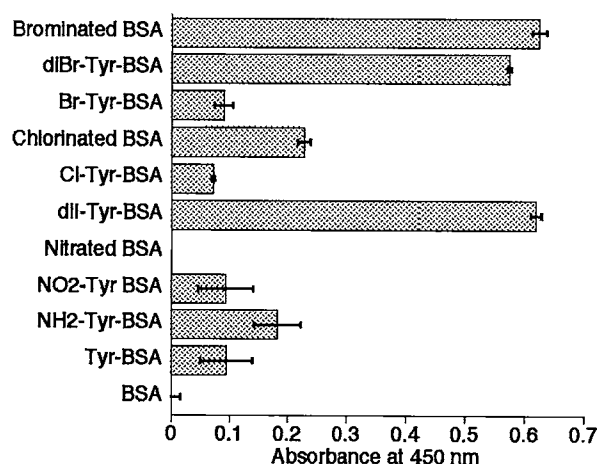


図4. 抗血清の抗原特異性。
n=3, 平均 ± 標準偏差。

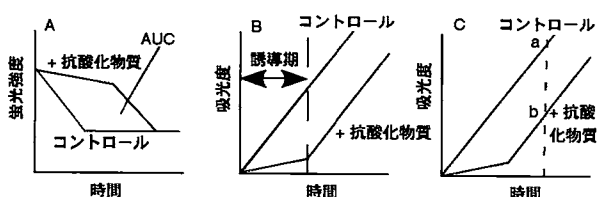


図5. 総抗酸化能測定系の評価法。

A: 曲線下面積, B: 誘導期, C: 一定時間後の値

た細胞は染色されなかった。現在のところ、ELISAと免疫組織化学の結果が違う理由は良く分からないが、ジプロモ化されるチロシンとジクロロ化されるチロシンのタンパク中の場所や、タンパクの種類が異なり、抗体がジクロロチロシンの生成した場所に物理的に接触出来なかったことが考えられる。ジプロモチロシンを認識するモノクローナル抗体も作成されたが⁶⁾、著者らの抗血清と同様にジハロゲン化チロシンを認識する抗体であった。プロモチロシンは、チロシンに臭素が一つ付加しただけなので、他のハロゲン化チロシン (塩素やヨウ素が一つ付加したチロシン) と区別するのは難しいと考えられる。特異的な抗プロモチロシン抗体を作成するのは難しいのかもしれない。本抗血清の抗原特異性など性質は分かっていたが、有用性については喘息患者や動物実験で証明しないと分からない。また、(ジ) プロモチロシン生成の意義についても今後の検討が待たれる。チロシンのリン酸化が細胞内情報伝達に不可欠なので、チロシンが (ジ) プロモ化されることにより細胞内で情報がうまく伝わらず異常をきたすことは十分考えられる。

5. 総抗酸化能測定系⁷⁾

血漿総抗酸化能 (Total Antioxidant Capacity; TAC) とは、ある条件の酸化に対する血漿全体の酸化抑制能のことである。1検体ずつ総抗酸化能を測定している報告が多い。96穴マイクロプレートを用いて多検体の血漿総抗酸化能を同時に測定出来れば、大量の検体を測定する必要がある疫学調査にも役立つし、抗酸化物質のスクリーニングにも利用できる。代表的な血漿総抗酸化能測定系には、Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), Total Radical Trapping Antioxidant Potential (TRAP), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) がある。ORACは、蛍光物質フルオレッセインのラジカル開始剤AAPHによる酸化分解を利用した抗酸化能測定系である。抗酸化物質存在下の曲線下面積 (Area Under the Curve; AUC) と非存在下の曲線下面積の差を用いて、抗酸化能が評価される (図5A)。ORACは、1992年に米国農務省と国立老化研究所により開発された。食品の抗酸化能評価法として使用されており、データが蓄積されている。日本でもAntioxidant Unit研究会が中心となって食品の抗酸化能のデータが収集されている。FRAPは、鉄の還元能 (鉄三価を鉄二価にする能力) を用いて、抗酸化能を評価するシンプルな方法である。TRAPでは、AAPHによるルミノール (酸化され化学発光を起こす) の酸化に対する抑制を指標として、抗酸化能を評価する。TEACは、ミオグロビンの偽ペルオキシダーゼ反応によるABTSの酸化を利用して、抗酸化能を評価する方法である。ABTSの酸化により生成するABTS^{•+}が持つ600 nmや734 nmの吸収を利用して、反応をモニターする。どの系も、水溶性ビタミンEであるトロロックスを基準としたトロロックス等量で結果が示されることが多い。しかし、それぞれの酸化系が異なり、異なる測定系の値を単純に比較することは出来ない。この点についても、Antioxidant Unit研究会で検討されている。総抗酸化能評価系の中で、生体内で起こり得る反応を利用しているのはTEACだけなので、著者らはこの方法を使用することにした。総抗酸化能の評価法として、曲線下面積以外に、ある一定時間反応後の変化 (図5C) や、酸化を抑制する時間 (誘導期) がある (図5B)。一定時間反応後の値を比較する場合、反応が終わってしまった後のデータになるかもしれないし、誘導期が続いているかもしれない、正確な比較が出来ない可能性がある。

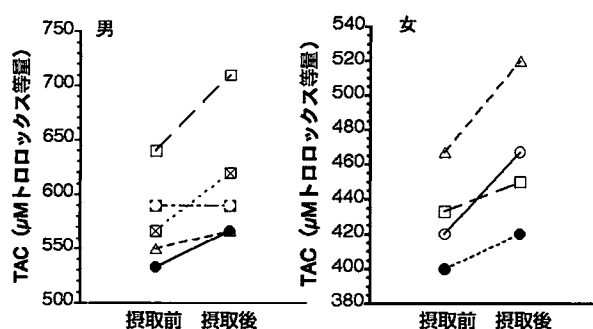


図6. 野菜ジュース摂取前後の血漿TACの変化。

左図：男 (n=6), 右図：女 (n=4).

対応のあるt検定で男女とも $p < 0.05$.

また、図中のaとbの値を比較することになるが、反応時間によってその比が変わってくる。そこで、著者らは誘導期を用いて総抗酸化能を評価することにした。

250 μM 過酸化水素存在下で、4.5 μM ミオグロビンによる3 mM ABTSの酸化を600 nmでモニターした。1回の測定で8穴使用し、25°C 大気下で反応を行い、5分間モニターした。この測定系の同一測定日における血漿総抗酸化能測定の変動係数は、1.6~4.1%であった (5検体)。異なる日に同じ血漿を測定しても、再現性が得られた。市販の野菜ジュースを1週間朝昼晩3回飲んだ時の血漿総抗酸化能の変化を検討した (図6)。男女とも、ほぼ全ての被験者で野菜ジュース摂取後の血漿総抗酸化能は上昇していた。

各々の抗酸化物質を測定したほうが多くの情報を得られるが、抽出操作などに時間がかかる。本測定系は簡便に多検体を測定できるため、疫学などで大量の検体の測定する場合に有用だと考えられる。また、新しい天然抗酸化物質の探索や、新規合成抗酸化物質のスクリーニングなどにも有用であると考えられる。血漿総抗酸化能には、多くの抗酸化物質が関与している。そのため、血漿総抗酸化能では微妙な変化の評価は難しい。動物実験などでは、血漿総抗酸化能に加え、個々の抗酸化物質を測定することが望ましい。

6. おわりに

酸化ストレスに関する様々な研究を行ってきたが、著者の一番の興味は“酸化ストレスと情報伝達”である。過酸化脂質による細胞内情報伝達について研究してきたが、チロシンの修飾によって細胞内情報伝達がどのように変化するかについても興味深い。また、1990年代後半からの研究で、様々なNADPH oxidaseのサブユニット (Nox) が白血球以外でも発現している

ことが分かった。さらに、NADPHオキシダーゼのサブユニットとペルオキシダーゼを持つDual oxidase (Duox) も発見され、活性酸素が種々の情報伝達に関与していることが考えられた。2008年には、文部科学省科学研究費補助金「新学術領域」で「活性酸素のシグナル伝達機構」が採択された。今後、“酸化ストレスと情報伝達”に関する研究が益々盛んになり、この分野が発展していくことが期待される。

謝 辞

本総説執筆にあたり、今までご指導いただいた先生方に感謝いたします。金沢大学医学系研究科環境生態医学・公衆衛生学教室前教授萩野景規先生 (現岡山大学教授) と現教授中村裕之先生には、化学出身の著者に、動物実験や統計学についてご指導いただきました。東京大学の工学部から大学院博士過程までご指導いただいた二本鋭雄先生 (現京都府立医科大学特認教授) と山本順寛先生 (現東京工科大学教授) には、脂質の酸化や抗酸化物質に関する研究を指導していただきました。日本抗体研究所では、故中野稔先生 (群馬大学名誉教授) にお世話になり、ペルオキシダーゼ反応を初めとした好中球による酸化反応や化学発光について勉強させていただきました。今まで著者が所属してきた研究室のみならず、中野先生が主催されていた中野学校の先生方にも感謝いたします。

文 献

- 1) Kambayashi Y, Takekoshi S, Nakano M, et al. Kinobeaon A, purified from safflower's culture cells, is a novel and potent singlet oxygen quencher. *Acta Biochim Polon* 52: 903-907, 2005.
- 2) Kambayashi Y, Takekoshi S, Tanino Y, et al. Various molecular species of diacylglycerol hydroperoxide activate human neutrophils via PKC activation. *J Clin Biochem Nutr* 41: 68-75, 2007.
- 3) Kambayashi Y, Hitomi Y, Kodama N, et al. pH Profile of cytochrome c-catalyzed tyrosine nitration. *Acta Biochim Polon* 53: 577-584, 2006.
- 4) Totsune H, Nakano M, Inaba H. Chemiluminescence from bamboo shoot cut. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1025-1029, 1993.
- 5) Kambayashi Y, Ogino K, Takemoto K, et al. Preparation and characterization of a polyclonal antibody against brominated protein. *J Clin Biochem Nutr* 44: 95-103, 2009.
- 6) Kato Y, Kawai Y, Morinaga H, et al. Immunogenicity of a brominated protein and successive establishment of a monoclonal antibody to dihalogenated tyrosine. *Free Radic Biol Med* 38: 24-31, 2005.
- 7) Kambayashi Y, Binh NT, Asakura HW, et al. Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate. *J Clin Biochem Nutr* 44: 46-51, 2009.