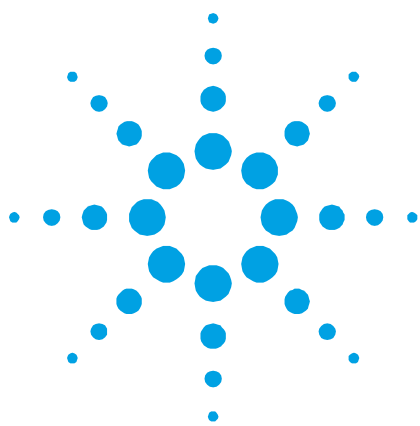




ORAC 分析用の Agilent Cary Eclipse を用いたヒト血清中の抗酸化能力の測定

アプリケーションノート

著者

Daren Fyfe PhD
Agilent Technologies, Inc.
Mulgrave, Victoria 3170,
Australia

概要

酸素分子から ATP を生成するには電子が必要なため、有酸素生活においては、生物有機体が活性酸素種 (ROS) に曝されることを避けることができません。ROS は、不対電子 (O_2^- , OH^-) を含むものと、他の分子 (H_2O_2 , $HOCl$) からの電子を励起する能力を有するものの 2 つのグループに分類されます。これらの種は、生体分子に直接損傷を与えるか ROS が 1 つの分子から他の分子へ渡される場合に、連鎖反応を引き起こします。この結果、細胞膜およびタンパク質のような細胞構造に多大な損傷を与えます。

生物は酸化促進と抗酸化の適切なバランスを維持するために常に競争しなければならないため、有毒な燃料分子のこの相いれない要求が生命科学では重要になります。バランスが酸化促進の方向に振れていた場合には、通常の状態で起こりうる酸化ストレスは、食事によってもたらされるさまざまな抗酸化酵素、タンパク質および抗酸化物質によって制御されます。ROS に対するこれらの防御が衰弱したり、あるいは欠乏したりすると、アルツハイマー病、自己免疫疾患、癌、循環器疾患、糖尿病、複数の硬化および関節炎を含む様々な慢性疾患に関係した損傷の要因になります¹。その一方、免疫システムにおいて、ROS は重要な役割があるため、そのレベルを低くしてはいけません。したがって、血中の酸化還元電位を常時監視し、制御することが必要になります。これらの制御の有効性を測定する方法の 1 つは、ROS よりも安定している血清中の抗酸化物質の全レベルを測定し、間接的に ROS のレベルを測定することです。血漿中の抗酸化物質は、感度および異なった抗酸化物質の間での干渉から引き起こされる難点があることから、ほとんどの場合、個別には測定されません²。



Agilent Technologies

はじめに

全抗酸化能力を測定するために、いくつかの手法がありますが、ほとんどの文献では以下の3つの手法(あるいはそれらに派生する手法)が参照されています。

1. FRAP (血漿中の鉄減少能力³⁾)
2. TEAC (トロロクス等価抗酸化能力⁴⁾)
3. ORAC (酸素ラジカル吸収能力⁵⁾)

ORAC 測定法は最も多く用いられている手法で、抗酸化状態の正確な指標になっています。吸光度よりも蛍光の測定に基づいていることが、その主な理由です²。この手法は、感度を向上し、試薬の抗酸化のモル比を大きく下げることができるため、サンプルと試薬の間の交差反応が最小限になります。さらに、ORAC 手法では「全ラジカル消去能」を測定します。これは「カーブの下全面積」の計算を可能とし、完了するまで反応が行われるという点でユニークです。

ORAC 分析は、以下の原理で行われます。1つのサンプルをフリーラジカルを発生させるシステムに加え、フリーラジカルの活動の阻害を測定します。計算された結果は、サンプルの抗酸化能力に関係しています。AAPH (2,2'-アゾビス (2-アミノプロパン) 二酸化塩) をフリーラジカルの発生に使い、R-PE (R-フィコエリトリン) をフリーラジカルの攻撃の標的に使います。フリーラジカルは1回の時間依存方法において、蛍光クエンチを引き起こす R-PE タンパク質の構造変化の要因となります。

ここでの実験は、温度調節器付きのマルチセルアクセサリが取り付けられた Agilent Cary Eclipse を用いて ORAC 分析を容易に行えることを実証することを目的としています。

装置

- Agilent Cary Eclipse 蛍光分光光度計
- ペルチェ温調マルチセルホルダー (電子制御スターラ内蔵)

- 温度コントローラ
- 温度プローブ
- マグネチックスターラ
- クォーツキュベット

試薬

はじめに、0.75 M K_2HPO_4 と 0.75M Na_2HPO_4 をそれぞれ 61.1:38.9 (v/v) の比で混ぜ合わせ、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、75mM、pH 7.0) を作成しました。この混合液を MilliQ 水で希釈し、pH を 7.0 に調整しました。

ヒト血清。健康なボランティア (20~24 歳、絶食していない人) の血液 (20 ml) を血清凝固チューブ (Greiner Laboratories) に採取しました。これらを 10 分間、2500 x g で遠心分離しました。血清を採取し、分析する前に PBS 中でさらに希釈 (1:100 v/v) しました。

フィコエリトリン (R-PE、Sigma Laboratories)。5.9 ml の PBS 中に 1 mg の PE を溶解した 0.17 mg/ml の原液を作成しました。この溶液をさらに希釈し、3.38 mg/l の希釈標準溶液を作成しました。

AAPH (2,2'-アゾビス (2-アミノプロパン) 二塩酸塩、分子プローブ)。ユニバーサルキュベット中の 868 mg の AAPH に 10 ml の PBS を加え、320 mM の新鮮な希釈標準溶液を作成しました。これは、分析に使用するまで低温で保存しました。

トロロクス (6-水酸基-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸、Sigma Laboratories)。200 ml の PBS 中に 5.0 mg のトロロクスを溶解して原液 (100 μ M) を作成しました。

手順

メソッドは Cao および Prior ² によって説明されているものを採用しました。このメソッドでは、マルチセルホルダー (温度プローブとスターラアクセサリ付き) が Eclipse のサンプルチャンバに組み込まれています。ペルチェ温度を 37 °C に設定しました。

R-PE の最適な励起および発光波長を見つけるため、スキャンアプリケーションを使用して、クォーツキュベット中の 3 ml の希釈標準溶液を測定し、R-PE の励起および発光スペクトルを得ました。

3 本のクォーツキュベットのそれぞれに、以下の溶液を加えました。2738 μ l R-PE 希釈標準溶液、37 μ l PBS および 150 μ l トロロクス標準、ブランク (PBS) あるいは血清希釈標準溶液。それらのキュベットをマルチセルホルダーの 4 か所のうちの 3 か所に置きました。小さな (3 mm 長) マグネティックスターをそれぞれのキュベットに入れ、10 分間、平衡にするため溶液を撹拌しました。

それぞれのサンプルにおいて、蛍光強度の変化速度を記録するためにカイネティクスアプリケーションを使用しました。最適な励起および発光波長は、分析中に使用したステップ 1 で決定しました。測定パラメータを図 1 に示します。

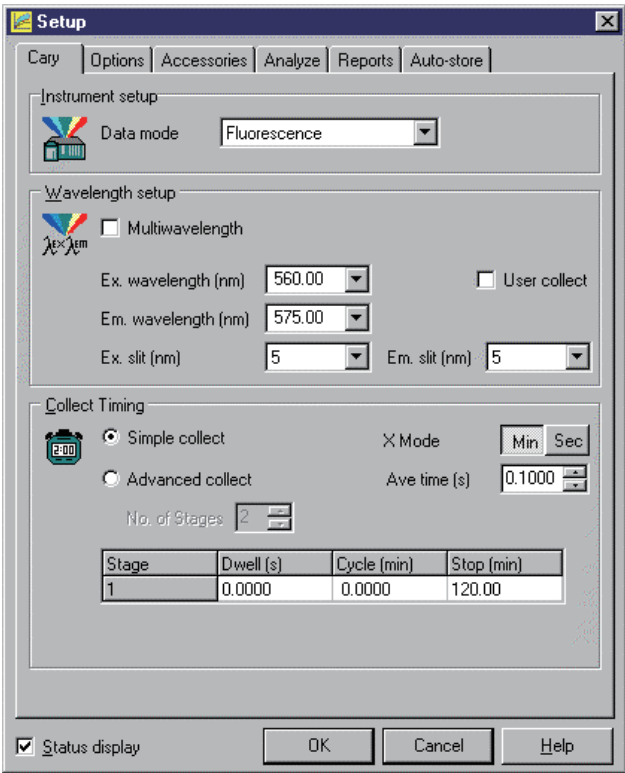


図 1. ORAC 分析用の測定パラメータ

AAPH:PBS の混合比が 50:50 (v/v) の 75 μ l を添加し、それぞれのキュベット中で反応を開始しました。

結果

血清、トロロクス標準、ブランクの 3 つのサンプルのそれぞれについて、時間に対する強度のグラフを Cary Eclipse ソフトウェアを用いて作成しました。それを図 2 に示します。

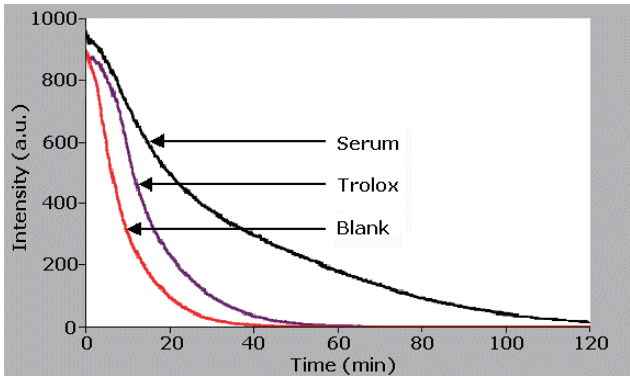


図 2. AAPH による R-PE のフリーラジカル攻撃についての時間と蛍光強度。(1) 抗酸化物質 (ヒト血清) またはトロロクスにより防御した場合 (2) 抗酸化物質の防御がない場合 (ブランク)

データ分析

それぞれのサンプルについてカーブ (S) の下の全面積を測定するため「積分機能」を使用しました。全抗酸化能力 (または ORAC 値 (μ M)) は、以下の式により計算しました。

$$\text{ORAC 値 } (\mu\text{M}) = 20k (S_{\text{Sample}} - S_{\text{Blank}}) / (S_{\text{Trolox}} - S_{\text{Blank}})$$

ここで、 k はサンプル希釈率です。

カーブ (S) の下の全面積と ORAC 値を表 1 に示します。

図 1. ブランク、トロロクスおよび血清サンプルについての (S) および ORAC 値。図 2 のデータから抽出

サンプル	S (A.U.)	ORAC 値 (mM)
ブランク	8485	n/a
トロロクス	14008	1
血清	31299	8.23

考察

結果は、テストされた 3 つのサンプル (図 2) が明らかに識別されていることを実証しています。ブランクと血清のグラフでは、R-PE の蛍光が AAPH からのフリーラジカル攻撃によって徐々に弱められるにしたがって、カーブが指数関数的に減衰していることを示しています。

蛍光の減衰速度 (ブランクに対して) は、血清および、それより少ないトロロクスにより遅くなりました。これは、血清がお互いを保つために付加的な方法で作用する一連の酵素を含んでいることが原因だと考えられます⁶。このことは、トロロクスのカーブ (図 2) の初めに見られるショルダーで説明できます。トロロクス分子は、ある時点 (約 10 分) までフリーラジカルを吸収することがあります。その時点からは、1 つのトロロクス分子がフリーラジカルで飽和し、フリーラジカルをさらに吸収したり、攻撃に対して他のトロロクス分子を防御することができなくなります。これが他のトロロクス分子で発生し、フリーラジカル攻撃 (カーブの急勾配の部分) に対して R-PE を防御するためのトロロクスサンプルの能力が指数関数的に減少します。

人間のサンプルの ORAC 値は、8.23 mM と算出されました。この値は、Cao および Prior² によって示された値 (3.1 mM) よりかなり大きい値です。以下の理由が考えられます。

この研究では、血清のサンプルを得たボランティアは 20~24 歳ですが、Cao と Prior の研究でのボランティアは平均で 70 歳でした。

この研究で用いた血清は、絶食していないボランティアから得ましたが、Cao と Prior の研究でのボランティアは、一晩中、絶食していました。

結論

マルチセルアクセス付きの Agilent Cary Eclipse 装置は、ORAC 分析および ORAC 値を計算するのに適しています。この分析には、正確な温度制御が必要です。このシステムでは、ペルチェ制御と連続して均一に攪拌できるマグネティックスターを用いて、4 つまでのサンプルの温度制御 (37 °C においてセル間の温度差が ± 0.2 °C) が効率的に行われます。装置の感度と速度を考慮すると、反応回数を増加し、スループットを最適化するために、AAPH の濃度を増加する (または血清のサンプルをさらに希釈する) ことが重要になります。

さらに、モノクロメータをベースとした Eclipse のスキャン機能は、スペクトルが特徴づけられていない新しい種類のレドックス感受性の調査に適した手法を提供します。

参考文献

1. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. Free radicals in biology and medicine. (1999): Third edition, Clarendon Press, Oxford.
2. Cao G., Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin chem* (1998); **44(6)**: 1309-15.
3. Benzie IFF., Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power' : The FRAP assay. *Analytical biochem* (1996): **239**: 70-6.
4. Rice-Evans C., Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods enzymol* (1994): **234**: 279-93.
5. Cao G., Prior RL. The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods enzymol* (1999), v. **299** 'Antioxidants and Oxidants' Part A; 50-62. Ed. Lester Packer; Academic Press.
6. Saucier CT., Waterhouse AL. Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *J agric food chem* (1999): **47(11)**: 4491-4.

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Published December 18, 2012

Publication Number 5990-7963JAJP



Agilent Technologies