

スマート(SMART NATURAL HYDROGEN)と日田天領水の抗酸化作 用に関する比較研究

鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科

教授・健康科学博士・漢医師

具 然和

1. 研究目的

近年、環境汚染やストレスなどの影響により、体内の活性酸素が問題となっている。癌、糖尿病、認知症・アルツハイマー病、脳梗塞、心筋梗塞、動脈硬化などの死因の過半数を超える疾病のおおよそが、活性酸素、つまりフリーラジカルによるものとされる。また、体内の酸化作用も大きな問題となっている。従って、本研究では、マウスにおける活性水素カプセル投与に対する抗酸化作用を検討した。

2. 研究方法

実験動物

日本エスエルシー株式会社にて Closed Colony として増産された ICR マウスを用いる。ICR マウス雄 8 週齢 30 匹を使用する。環境に慣れさせるために一週間予備飼育後、9 週齢の時から研究を行った。

実験環境

Conventional な条件下で飼育した。飼育室は、明期を AM6:00~PM6:00 としてライトコントロールをおこない、室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60~70%とする。飼料と水は自由に摂取させた。

投与方法

活性水素カプセルを投与ともに、10mg/kg 経口投与する。本研究で用いる活性水素カプセルは、(株)サクラから提供されたものを用いる。また、比較対照群として日田天領水を自由摂取させた。

カプセル成分

炭酸カリウム、硫酸第一鉄、結晶セルロース、米胚芽、硫酸マグネシウム、バラ花びら抽出物、海藻類抽出物(アスコフィラノドサム、メカブ)

方法

実験動物 ICR 雄マウス (8 週齢)

実験群 各群 10 匹 計 30 匹

- ① Control 群
- ② 日田天領水投与群
- ③ スマート投与群

日田天領水投与群には投与開始時に日田天領水を自由摂取させた。

各群 1 週間の予備飼育後、投与開始

投与方法: 毎日強制経口投与

投与濃度: スマートカプセル内容物 10mg/kg、

投与量: 10ml/kg

体重測定: 1 週間間隔

投与 2 週間後に、眼底採血により得た血清で SOD 様活性測定、ケミルミネッセンス法による抗酸化測定を行った。

血清中 SOD 活性度の測定方法

SOD 活性度の測定については、和光純薬工業株式会社製 SOD Activity Detection Kit を用いて、NBT 還元法による血清中の SOD 活性度の測定を行う。NBT 還元法は、 O_2^- の検出剤として、 NO_2^-TB (ニトロブルーテトラゾリウム) を用い、 O_2^- の生成反応 (キサンチン・キサンチンオキシターゼ) と SOD による不均化反応とを共役させ、 O_2^- による還元呈色が低下する程度を阻害率として SOD 活性度を求める方法であり、抗酸化活性を定量的に測定することができる。具体的な測定手順として、はじめに麻酔下のマウス心臓より、テルモ社製シリンジ (針: 23G) を用いて、全血の採血を行ない血液凝固防止ためヘパリン処理 (5 単位/ml) したのち、遠心分離 (Time: 15min、 $1.5 \times 1000rpm$) につぎにサンプルとして、検体 (S)、盲検 (BI)、検体盲検 (S-BI)、試薬盲検 (BI-BI) をたて、96 穴マイクロプレートに各サンプルを $10 \mu l/well$ ずつ分注を行う。その際の分注は、検体 (S) と検体盲検 (S-BI) には血清、盲検 (BI) と試薬盲検 (BI-BI) には蒸留水とした。各サンプルの分注後、発色試薬を $100 \mu l/well$ ずつ分注し、1 分間の攪拌を行った。攪拌後、検体 (S) と盲検 (BI) には酵素溶液、検体盲検 (S-BI) と試薬盲検 (BI-BI) にはブランク液を $100 \mu l/well$ ずつ分注し、再び 1 分間の攪拌後、 $37^\circ C$ で 28 分間インキュベートした。インキュベート後、各サンプルに反応停止液を $20 \mu l/well$ ずつ分注し、5 分間の攪拌後、東洋曹達株式会社製マイクロプレートリーダー MPR A4 (波長: 560nm) を用いて、各サンプルの吸光度を測定した。測定により得られた吸光度から (1) 式により SOD 活性度を求めた。

表1. 試薬内容および測定操作法

1) 試薬内容

- 発色試薬: 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0)、キサンチン 0.40 mmol/l
ニトロブルーテトラゾリウム (NO_2^-TB) 0.24 mmol/l
- 酵素溶液: 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0)、キサンチンオキシターゼ 0.049 単位/ml
- ブランク液: 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0)
- 反応停止液: ドデシル硫酸ナトリウム 69 mmol/l

2) 測定操作法

	本検		盲検	
	検体 (S)	盲検 (BI)	検体盲検 (S-BI)	試薬盲検 (BI-BI)
試薬	血清 $10 \mu l$	蒸留水 $10 \mu l$	血清 $10 \mu l$	蒸留水 $10 \mu l$
発色試薬	$100 \mu l$	$100 \mu l$	$100 \mu l$	$100 \mu l$
酵素液	$100 \mu l$	$100 \mu l$	—	—
ブランク液	—	—	$100 \mu l$	$100 \mu l$
37°C で 28 分間インキュベート				
反応停止液	$20 \mu l$	$20 \mu l$	$20 \mu l$	$20 \mu l$

水を対象として波長 560nm の吸光度を測定				
吸光度	E_S	E_{BI}	E_{S-BL}	E_{BL-BL}

$$\text{SOD 活性度 (阻害率\%)} = \frac{(E_{BI} - E_{BL-BL}) - (E_S - E_{S-BL})}{(E_{BI} - E_{BL-BL})} \times 100 \quad (1)$$

E_S : 検体の吸光度 E_{BI} : 盲検の吸光度 E_{S-BL} : 検体盲検の吸光度 E_{BL-BL} : 試薬盲検の吸光度

投与 2 週間後に、眼底採血により得られた血清をサンプルとして用いた。検体(S)と検体盲検(S-BI)には血清を、盲検(BI)と試薬盲検(BI-BI)には蒸留水を、各々96 well マイクロプレートに 8 μ L/well 加えた。分注後、発色試薬を 80 μ L/well 加え、検体と盲検には酵素液を、検体盲検と試薬盲検にはブランク液を 80 μ L/well 加えた。攪拌後、37°Cで 20 分間インキュベートした。インキュベート後、各サンプルに反応停止液を 160 μ L/well ずつ加え、攪拌後マイクロプレートリーダー(波長:560 nm)を用いて吸光度を測定した。

統計学的分析については、2 群間におけるノンパラメトリックな Wilcoxon 検定を統計処理に用いて、各群における SOD 活性度の有意差検定を行った。

血清からのラジカル阻止能の測定方法

AOA_{AAPH}

2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride(AAPH)は 37°Cに加温する事により分解し、ペルオキシラジカルを発生する。ペルオキシラジカルはルミノールに対し酸化剤として働くため、ルミノールの酸化還元反応により発光する (Fig.4)。その発光強度【count/min】を測定することにより radical scavenging されずに残ったペルオキシラジカルの量を測定しようとするものである。

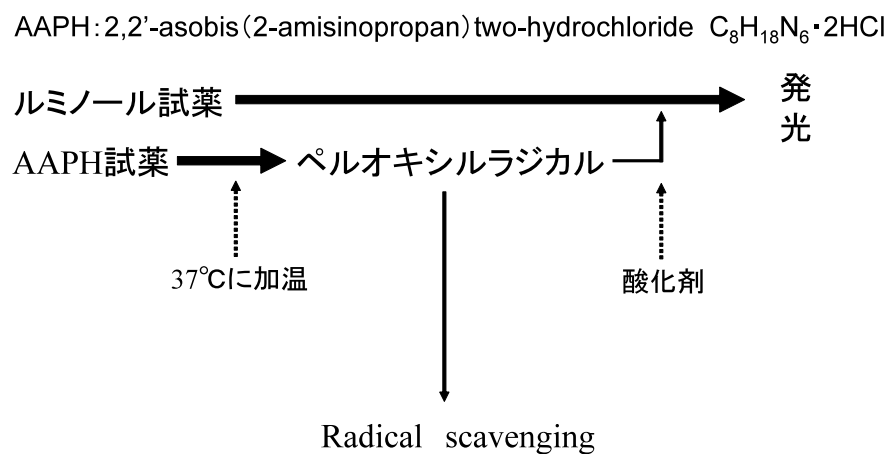


Fig.1.AAPH 抗酸化測定原理と過程

AOA_{AAPH}の測定

投与 2 週間後に、眼底採血により得られた血清をサンプルとして用いた。血清を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) にて 100 倍希釈とした。100 倍希釈した血清 200 μ L に AAPH (2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) 試液 200 μ L を加えて測定試料とした。試料をルミネッセンスリーダーに挿入し、2 分間 37°C で加温し、ルミノール試液 200 μ L を加え、20 秒間反応させた後発光量を測定し、ブランク液との相対比を求めて抗酸化活性度とした。測定試料は 1 検体につき 2 本作成し、発光量の平均値を用いた。また、ブランク液は 0.1 M リン酸緩衝液 200 μ L に AAPH 試液 200 μ L を加えた。

3. 研究結果

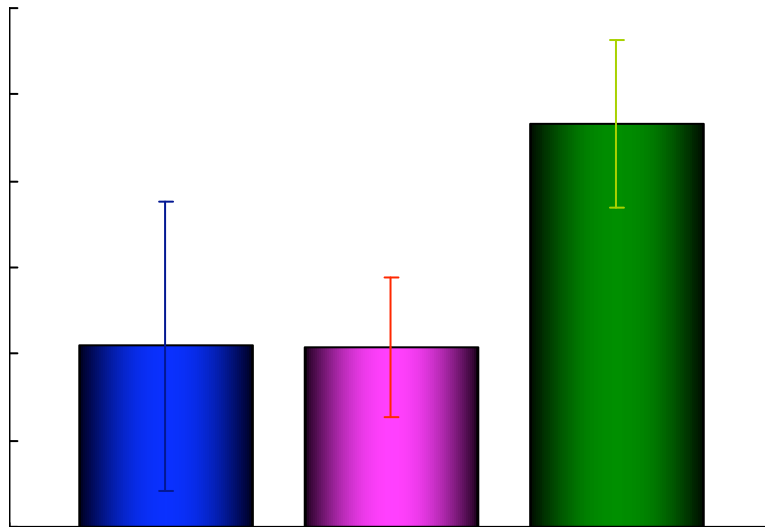


Fig.1. SOD activity of the test subjects. The results represent the means \pm S.E

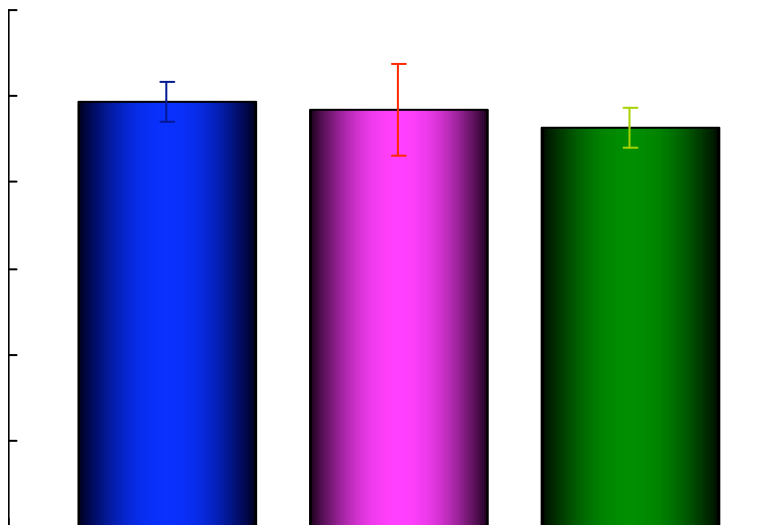


Fig.2. Antioxidation activity of the test subjects. The results represent the means \pm S.E

SOD 活性値は Control 群で $10.48 \pm 8.36\%$ 、日田天領水群は $10.34 \pm 4.03\%$ 、スマート投与群では $23.34 \pm 4.86\%$ であった。Control 群、日田天領水群に対して、スマート投与群にそれぞれ 12.86%の SOD 様活性値の上昇傾向が見られた。

ルミノール測定値は Control 群で 0.0245 ± 0.0012 counts、日田天領水群は 0.0242 ± 0.0027 counts、スマート投与群では 0.0232 ± 0.0012 counts であった。Control 群および日田天領水群に対してスマート群で count 数の減少傾向が見られた。

4. 考察

スマートに含まれる米胚芽、海藻類抽出物はビタミンEを含んでいる。ビタミンEは、抗酸化作用により、体内の脂質を酸化から守り、細胞の健康維持を助ける栄養素と報告されている。また、メカブに含まれる天然の多糖体は、自然治癒力すなわち免疫機能を調整する力のあることや、老化防止効果のあることも報告されている。セルロースは β -グルカンの一種であり、この β -グルカンも抗酸化能があると報告されている。よって、試験カプセル剤に抗酸化作用があることが示唆された。

5. 結論

スマートを摂取することにより、SOD 活性値の上昇、ケミルミネッセンス法による結果からラジカルスカベンジ能の上昇が見てとれたため、抗酸化作用があると示唆された。