

東海大学大学院令和元年度博士論文

フェノール性硫酸化代謝物の機能性と  
ハーブティーの抗酸化作用に関する研究

指導 安田 伸 教授

東海大学大学院生物科学研究科

生物科学専攻

菅原 進太郎

フェノール性硫酸化代謝物の機能性と  
ハーブティーの抗酸化作用に関する研究

2019

菅原 進太郎

## 目次

用語一覧	...1
要旨	...3
緒論	...6
本論	...10
第1章 熊本県産のハーブティーであるヤーコン茶葉の複数のフリーラジカル消去、還元力、特に異なるスーパーオキシドアニオンラジカル産生系における抗酸化作用	...10
第1節 緒言	
第2節 材料および方法	
第1項 材料および試薬類	
第2項 ヤーコン茶葉抽出物の調製	
第3項 総ポリフェノール含量の測定	
第4項 DPPH ラジカル消去活性の測定	
第5項 ABTS <sup>+</sup> ラジカル消去活性の測定	
第6項 Galvinoxyl ラジカル消去活性の測定	
第7項 CPZ <sup>+</sup> ラジカル消去活性の測定	
第8項 還元力の測定	
第9項 PMS-NADH-NBT 法による O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ラジカル消去活性の測定	
第10項 XOD により産生される O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ラジカルの測定	
第11項 細胞により産生される O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ラジカルの測定	
第12項 トリパンプルー色素排除法	
第13項 統計処理	
第3節 結果および考察	
第1項 ヤーコン茶葉抽出物の調製と総ポリフェノール含量	
第2項 ヤーコン茶葉のラジカル消去作用	
第3項 ヤーコン茶葉の酵素的 O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ラジカル産生に及ぼす抑制作用	
第4項 ヤーコン茶葉の細胞の O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ラジカル産生に及ぼす抑制作用	
第5項 ヤーコン茶および緑茶の総ポリフェノール含量と抗酸化力の比較	

- 第4節 小括
- 第5節 添付図表等

## 第2章 熊本県産のハーブティーであるモリンガ葉茶と茎茶の 特にスーパーオキシドアニオンラジカル産生系における ユニークな抗酸化作用 ...37

### 第1節 緒言

### 第2節 材料および方法

- 第1項 材料および試薬類
- 第2項 モリンガの葉茶と茎茶の茶抽出物の調製
- 第3項 総ポリフェノール含量の測定
- 第4項 総フラボノイド含量の測定
- 第5項 DPPH ラジカル消去活性の測定
- 第6項 ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定
- 第7項 Galvinoxyl ラジカル消去活性の測定
- 第8項 CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定
- 第9項 PMS-NADH-NBT 法による O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性の測定
- 第10項 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性の測定
- 第11項 XOD により産生される O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルの測定
- 第12項 細胞により産生される O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルの測定
- 第13項 クロロゲン酸およびカフェ酸の HPLC 分析
- 第14項 統計処理

### 第3節 結果および考察

- 第1項 モリンガ葉茶と茎茶の抽出物の調製および  
総ポリフェノール含量と総フラボノイド含量
- 第2項 モリンガ葉茶と茎茶のラジカル消去作用
- 第3項 モリンガ葉茶と茎茶の酵素的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル産生に  
及ぼす影響
- 第4項 モリンガの葉茶と茎茶の細胞の O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル産生に  
及ぼす抑制作用
- 第5項 モリンガの葉茶と茎茶中の抗酸化成分
- 第6項 モリンガ茶とヤーコン茶および緑茶の総ポリフェノール  
含量と抗酸化力の比較

### 第4節 小括

### 第5節 添付図表等

第3章	1-Naphthol、2-Naphthol およびそれらの硫酸化代謝物の ラジカル消去作用	...61
第1節	緒言	
第2節	材料および方法	
第1項	材料および試薬類	
第2項	DPPH ラジカル消去活性の測定	
第3項	ABTS <sup>+</sup> ラジカル消去活性の測定	
第4項	CPZ <sup>+</sup> ラジカル消去活性の測定	
第5項	肝ミクロソーム画分の調製と抗脂質過酸化活性の測定	
第6項	統計処理	
第3節	結果および考察	
第1項	硫酸化された 1-Nap および 2-Nap とそれらの非硫酸 体のフリーラジカル消去活性の比較	
第2項	フリーラジカル消去活性測定における Nap 誘導体の 構造特異性	
第4節	小括	
第5節	添付図表等	
	総括	...74
	参考文献	...77
	本論文に関わる報告	...87
	謝辞	...88

## 用語一覧

AAPH : 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride  
ABTS<sup>+</sup> : 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation  
ANOVA : Analysis of Variance  
CAE : Chlorogenic acid equivalent  
CE : (+)-Catechin equivalent  
CPZ<sup>+</sup> : Chlorpromazine cation  
Cr (VI) : Potassium dichrome,chromium (VI)  
DMSO : Dimethyl sulfoxide  
DPPH : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl  
DW : Dried weight  
EC<sub>50</sub> : The calculated half-maximal effective concentration  
EtOH : Ethanol  
FBS : Fetal bovine serum  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Hydrogen peroxide  
HRP : Horseradish peroxidase  
IC<sub>50</sub> : The calculated half-maximal inhibitory concentration  
MeOH : Methanol  
NADH :  $\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt (reduced form)  
Nap : Naphthol  
1-Nap : 1-Naphthol  
2-Nap : 2-Naphthol  
NapM : Methoxynaphthalene  
1-NapM : 1-Methoxynaphthalene  
2-NapM : 2-Methoxynaphthalene  
NapS : Naphthyl sulfate  
1-NapS : 1- Naphthyl sulfate  
2-NapS : 2- Naphthyl sulfate  
NBT : Nitroblue tetrazolium  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> : Superoxide anion  
OH : Hydroxyl  
ORAC : Oxygen radical absorbance capacity  
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate  
PMS : Phanazine methosulfate  
ROS : Reactive oxygen species

SULTs : Sulfotransferases

TCA : Trichloroacetic acid

TE : Trolox equivalent

TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity

Trolox : ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

WST-1 : 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4- disulfophenyl)-2*H*-tetrazolium,  
monosodium salt

XOD : Xanthine oxidase

## 要旨

キーワード：フェノール性化合物、硫酸化代謝物、ハーブティー、抗酸化作用、スーパーオキシドアニオンラジカル

我々の身体は低分子性の外来成分によって良きにも悪しきにも影響を受けることがある。例えば、フェノール構造を有するポリフェノール類などの食材成分は生体リズムの調節を担うために、生活習慣病予防またはリスク低減を企図した低分子生理活性物質の本体として考えられている。しかしながら健康有益性を提供する際には薬効や生理機能として、生体に不利益を与える際には毒性として評価されることも多い。我々の身体は外来成分を異物として認識し、それらを薬物代謝反応の過程で硫酸体などに代謝変換して体外に排出する仕組みを備えている。一般的にこの硫酸化代謝は活性成分を不活化に導く反応として知られている。このため、摂取後の標的化合物およびその代謝物の種類や量を計測し、生理機能性や毒性までを網羅的に解析する研究は、その複雑さゆえに未だ詳細な解明には至っていない。本研究では、フェノール性硫酸化代謝物の機能性を調べるため、naphthalene より薬物代謝後に生じるフェノール性一次代謝物 naphthol (Nap) および硫酸化二次代謝物を用いて、これらフェノール性化合物の代謝前後での抗酸化活性について比較評価することとした。次に、地域の健康食材の機能特性を調べるため、ポリフェノール成分に富む熊本県産のハーブティーであるヤーコン茶およびモリンガ茶を用いて活性酸素の 1 つスーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )ラジカルに着目した抗酸化作用の検証を行うこととした。

ナフタレンは燻蒸剤または農薬として広く使用される工業用化学物質である。肝臓にて代謝され、第 1 相薬物代謝反応においてシトクロム P450 の作用でフェノール性の異性体 1-naphthol (1-Nap) および 2-naphthol (2-Nap) が生成される。さらに第 2 相反応において硫酸化され、それぞれ 1-naphthyl sulfate (1-NapS) と 2-naphthyl sulfate (2-NapS) が生じる。これらをフェノール性化合物の代謝前後のモデルとして使用し、確立された 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)、2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation ( $ABTS^+$ ) および chlorpromazine cation ( $CPZ^+$ )ラジカルに対する 1-NapS と 2-NapS の抗酸化活性について定量的に調べ、さらにこれらの非硫酸化前駆体 1-Nap および 2-Nap との比較評価を行なった。EC<sub>50</sub> 値を算出して活性を比較した結果、1-NapS は 1-Nap よりも 5.60 から 7.35 分の 1 倍の低い抗酸化活性を有していた。対照的に、2-NapS は非硫酸体である 2-Nap と同等の活性を示した。

ヤーコン(yacon, *Smallanthus sonchifolius*)はアンデス原産のキク科スマランサ

ス属の一種で、南米アンデス原産の作物である。糖尿病、消化・腎障害を患う人々のための民間伝承薬としても知られる。塊根を食用とするほか、地上部はハーブティー等の地域に特化した健康食材としても消費されている。ここでは熊本県産ヤーコン茶の多面的なラジカル消去作用と還元力、特に異なる  $O_2^-$  ラジカル産生系に及ぼす抗酸化作用について調べた。その結果、MeOH、EtOH、酢酸エチルの各抽出物よりも熱水抽出物でより高いポリフェノール含量と収率ならびに DPPH ラジカルに対する抗酸化活性を認めた。ヤーコン茶熱水抽出物は DPPH、ABTS<sup>+</sup>、CPZ<sup>+</sup>および galvinoxyl の 4 種類の化成品ラジカル種に対して異なるレベルで抗酸化活性を示し、とくに  $O_2^-$  ラジカルに対しては phanazine methosulfate (PMS)-NADH-nitroblue tetrazolium (NBT)法および xanthine oxidase 法の両方で代表的な抗酸化剤である Trolox よりも強い抗酸化活性を示した。さらに、ヒト顆粒球好中球様細胞の  $O_2^-$  ラジカル産生に及ぼす同抽出物の影響を調べた結果、Trolox 処理時よりも細胞由来の  $O_2^-$  ラジカルを効果的に軽減させた。

モリンガ(*Moringa oleifera* L.)はケシ目ワサビノキ科であるインド原産の植物で、高温や乾燥に強く熱帯地域で広く栽培されている。野菜として食用とされるほか伝統的なアーユルヴェーダの薬用植物として炎症や感染症等の治療にも用いられてきた。ここでは熊本県産モリンガの葉茶と茎茶について、特に  $O_2^-$  産生系での特徴的な抗酸化作用について調べた。その結果、モリンガの両熱水抽出物は、DPPH、ABTS<sup>+</sup>、CPZ<sup>+</sup>および galvinoxyl の 4 種類の化成品ラジカル種に対して抗酸化活性を示すものの、Trolox よりも低いものであった。これに対し、PMS-NADH-NBT 法および xanthine oxidase 法においては Trolox よりも強い  $O_2^-$  ラジカル消去作用を示した。次に、ヒト顆粒球好中球様細胞の  $O_2^-$  ラジカル産生に及ぼすモリンガ茶熱水抽出物の影響を調べた結果、ここでもまた細胞由来の  $O_2^-$  ラジカルを効果的に軽減させた。活性成分に関する知見を得るため、HPLC による成分分析とモリンガ葉部中の 8 つの既知フェノール性化合物について抗酸化活性試験を行った。その結果、少なくともカフェ酸およびクロロゲン酸が、Trolox よりも強力で  $O_2^-$  ラジカル消去に特異的な抗酸化作用を有する物質である可能性を認めた。

本研究では、naphthalene 由来の硫酸化代謝物を用いて抗酸化活性を調べ、フェノール性化合物が薬物代謝の過程で硫酸化代謝されても、必ずしも常に活性が低下する訳ではないこと、硫酸化される位置に依存して活性が保持されることを明らかにした。次に、地域の健康食材の機能特性について検証し、熊本県産のヤーコン茶およびモリンガ茶が有する抗酸化作用として、とくに  $O_2^-$  ラジカルに対する特異性を明らかにした。我々の身体に影響を与えうる低分子性の外来因子の挙動や代謝、毒性または有効性等の機能特性を明らかにすることは、毒性学および食品機能科学の発展の面からも重要である。今後は、本研究で用

いたハーブティー中の抗酸化成分に加えて他のフェノール性化合物およびそれらの代謝物の機能性や毒性等についても比較検証を行う必要がある。現状では活性試験に供するほどの十分量の食材由来フェノール性硫酸体の入手が困難であるものの、代謝物合成法の検討とともに、代謝物を用いた活性の比較評価をより幅広く行うことよって、体内における機能性発現や毒性発現の機構解明も進むことと期待される。

## 緒論

本論文は、試験管レベルでの初期評価アッセイ技術を用いて、地域性のある健康食品と代謝物のフリーラジカル消去活性における抗酸化作用の特徴について調査することを目的としている。

熊本県は西側に海、中央に平野、東側に阿蘇山に代表される山間地域を有している。これらの地形の多様さから地域ごとに独特の気候が存在する。また、その地域毎に栽培に適した健康食材が各地に存在し、それらは地域の人々より親しみをもって食生活のなかで利用されている。その中でハーブティーとして熊本県内で市販されているものに、ヤーコン茶およびモリンガ茶がある。ヤーコン(*Smallanthus sonchifolius*)はアンデス原産のキク科スマランサス属の一種で、南米アンデス原産の作物である(Ojansivu et al., 2011)。塊根を食用とするほか、地上部はポリフェノールに富み、ハーブティー等の地域に特化した健康食材として消費されている。熊本県内では主に菊池市を中心に栽培されている。モリンガ(*Moringa oleifera* L.)はワサビノキ科ワサビノキ属であるインド原産の植物で、アーユルヴェーダのハーブであるとともに(Shih et al., 2011)、高温や乾燥に強く熱帯地域で広く栽培されている。ワサビノキとも呼ばれ、熊本県内では天草地域を中心に栽培されている。またこれらの農作物や農産物は、栽培環境や気候等の地域性をもって活性成分などの含有量等に差異が生じるため、その特性も異なる可能性がある(Leone et al., 2015)。

フリーラジカルは、酸化を助長することにより、病原菌や癌細胞に酸化ダメージを与える免疫機能の1つとしての役割を担う。一方、過度の酸化ストレスや過度の免疫応答などにより酸化バランスが破綻し酸化側に傾く場合には、フリーラジカルは自らを攻撃することで細胞や組織の機能不全や炎症など増悪の方向へと導くことがある(吉川, 2011)。フリーラジカルには、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )ラジカル、ヒドロキシル(OH)ラジカル、ペルヒドロキシルラジカルなどいくつかの種類が存在し、酸素フリーラジカルの1つに $O_2^-$ ラジカルがある。これは金属イオンの存在下で過酸化水素( $H_2O_2$ )と高反応性のOHラジカルを容易に生成する(Valko et al., 2005)。体内では、ミトコンドリアでの呼吸(Wiswedel et al., 1989)やNAD(P)H オキシダーゼ(Pagano et al., 1995)、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ(Kukreja et al., 1986)、一酸化窒素合成酵素 (Cosentino et al., 1998)、およびシトクロム P450 (Fleming et al., 2001)によって $O_2^-$ ラジカルが産生される。

Xanthine oxidase (XOD)は、 $O_2^-$ ラジカルの産生と同時にヒポキサンチンおよびキサンチンの酸化を触媒して尿酸を産生する重要な酵素である(Nishino et al.,

2008; Cantumedellin and Kelley 2013)。本酵素によって生成される過剰量の  $O_2$  ラジカルは、時として糖尿病、虚血-再灌流傷害および慢性心不全などの多種多様な病態の進行に関与していると考えられている(Pacher et al., 2006)。したがって、XOD を介する  $O_2$  ラジカル生成の評価は、これらの疾患リスクを予防しうる目的化合物をスクリーニングするための1つの手段としても考えられている (Kim et al., 2004; Pacher et al., 2006; Connor, 2009)。

このような背景のもと、地域に特化した食材や食品等は、地域限定であることより、これらの有する機能性研究や科学的エビデンスの研究もまた限定的である。そのため、生体での効果の是非を問う前に、食材中のポリフェノール類等の外来抗酸化物質による酸化防止を目的としたフリーラジカルを消去する特性等について試験管レベルで初期評価を行い、基礎研究や探索研究を推進することは重要である。

我々の身体は、生理活性成分の不活性化を担う薬物代謝反応系を備えており、第1相反応と第2相反応に大別される。第1相反応とは酸化、還元、加水分解などによって細胞内に取り込まれた低分子化学物質に水酸基、カルボキシ基、アミノ基などの極性基が付加され、水溶性を高める反応である。第1相反応の良く知られた事例としてはシトクロム P450 酵素ファミリー群が挙げられ、薬物代謝反応における水酸基付与の重要な働きを担っている(柴崎ら, 2009; 加藤ら, 2010)。次に第2相反応は、ステロイドホルモン、生理活性アミン、胆汁酸などの生体内物質の代謝に重要であり、薬物代謝の観点からは外来成分を細胞質可溶性硫酸転移酵素、グルクロン酸転移酵素およびグルタチオン-S-転移酵素などにより水溶性の高い硫酸体、グルクロン酸抱合体およびグルタチオン抱合体などに代謝変換することを指し、最終的に体内蓄積を回避するために生体内物質や生体外異物を体外に排出する。特に薬物代謝酵素の1つである硫酸転移酵素(SULTs)は、硫酸供与体である 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate から、OH 基またはアミノ基を含むアクセプター基質化合物への硫酸転移を触媒する酵素である(Lipmann, 1958)。硫酸化抱合は、一般に、基質化合物の不活性化とともに水溶性を高めることで、身体からそれらの排出を容易にすると考えられている(Mulder and Jakoby, 1990; Falany and Roth, 1993; Weinshilboum and Otterness, 1994)。また、ポリフェノール類などのフェノール性化合物の一部もまた硫酸体のような特徴的な代謝物に変換される。しかしながら、複雑な代謝後の一連の代謝物の入手は容易では無く、代謝物の網羅的な機能性研究を行うこともまた限定的である。そのため、活性本体となり得るフェノール性化合物とその代謝物の両方で活性の比較を行うことにより、代謝物の機能性までも含めた評価を行うことが重要である。

Naphthol (Nap)はナフタレン環に OH 基を1つ有する化合物で、広義にはフェ

ノール類に分類される芳香族化合物である(Fukami et al., 2008)。ナフタレン環にフェノール構造を内含する本フェノール性化合物の異性体 1-naphthol (1-Nap)および 2-naphthol (2-Nap)は SULTs の良い基質として知られており、第 2 相薬物代謝反応において硫酸化され、それぞれ 1-naphthyl sulfate (1-NapS)と 2-naphthyl sulfate (2-NapS)が生じる(Isozaki, 2001; Ayala et al., 2015)。また、1-NapS および 2-NapS は、市販試薬として入手が可能である。

本研究では、熊本県産のヤーコン茶およびモリンガ茶のフリーラジカルに及ぼす影響について調べることにし、代表的な抗酸化剤である Trolox の抗酸化活性と比較することにより、とくに  $O_2$ ラジカルに着目した試験管レベルでの検証と特徴付けを行うこととした。Trolox は  $\alpha$ -トコフェロールの水溶性類似化合物であり、試料のフリーラジカル消去能力を調べるための標準抗酸化剤として使用されるのみならず、各種抗酸化活性測定において Trolox 等量として抗酸化力を決定づける場合にも多く利用されている(Apak et al., 2007; Alam et al., 2013)。一方、フェノール性化合物の硫酸化代謝物のモデル化合物がどの程度フリーラジカルに対する抗酸化活性や特性を示すのかを本研究で調べることにした。現時点で *in vitro* の抗酸化アッセイを増やすと生体での抗酸化能と相関するとまで断言した報告がある訳ではない。しかしながら、抗酸化メカニズムも、測定系によっては結果が異なる可能性があり、1 手法のみで得られた抗酸化活性の結果を基に結論付けるべきではなく、複数の興味ある抗酸化活性測定法を組み合わせる必要がある(Alam et al., 2013)。

第 1 章では、熊本県産のヤーコン茶葉から調製した抽出物を用いて、4 種類の代表的な化成品ラジカル種である 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル(Blois, 1958)、2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)カチオン(ABTS<sup>+</sup>)ラジカル(Thaipong et al., 2006)、galvinoxyl ラジカル(Shi et al., 2001)、chlorpromazine カチオン(CPZ<sup>+</sup>)ラジカル(Nagaraja et al., 2014)、および活性酸素種(ROS)の 1 つである  $O_2$ ラジカルを標的に、ヤーコン茶がこれらのフリーラジカルを消去する特性について調べることにした。さらに、XOD 酸化酵素および細胞実験を含む異なる  $O_2$ 産生系における抗酸化作用について試験管レベルで調べることにし、抗酸化剤である Trolox を比較対象に用いることにした。

第 2 章では前章と同様に、熊本県産モリンガの葉茶と茎茶から調製した抽出物を用いて、4 種類の化成品ラジカルおよび  $O_2$ ラジカルを標的に、これらのフリーラジカル消去における特性について調べることにした。さらに、活性成分に関する知見を得るために、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析を試みることにした。

さらに第 3 章では、広義にはフェノール類に分類される Nap の異性体とそれらの硫酸体 NapS をフェノール性化合物の代謝前後のモデルとして使用し、

DPPH、ABTS<sup>+</sup>およびCPZ<sup>+</sup>ラジカルに対する 1-NapS と 2-NapS の抗酸化活性の測定と、これらの非硫酸化前駆体 1-Nap および 2-Nap の活性との比較を行うこととした。

## 本論

# 第 1 章 熊本県産のハーブティーであるヤーコン茶葉の複数のフリーラジカル消去、還元力、特に異なるスーパーオキシドアニオンラジカル産生系における抗酸化作用

### 第 1 節 緒言

ヤーコン(*Smallanthus sonchifolius*)は、南米のアンデス山脈を起源とし栽培されてきた植物である。過去数十年にわたり、ヤーコンはアジア(日本、韓国、台湾、海南、フィリピン)、オセアニア(ニュージーランド)およびヨーロッパ(チェコ共和国)などの他の地域にも導入されてきた。本植物の地下部位はサツマイモのような形状をしており、歴史的にも果物や野菜として食されてきた。現在では南米にてシロップ、ジュース、マーマレードなどにも利用される(Ojansivu et al., 2011; Delgado et al., 2013)。大部分が収穫後の残渣となるヤーコンの茎葉部分は、一部がハーブティーとしても利用されている。また、熊本県では、菊池市を中心にヤーコンの栽培が行われており、健康食材として利用したアイスクリームやキャンディー、酢漬けなどの加工食品の販売も行われている。ヤーコンは地域によっては食事療法を必要とする患者への代替食としても使用されており(Delgado et al., 2013)、糖尿病、消化器や腎臓の障害に苦しむ人々のための民間薬としても利用されてきた。このことは、ヤーコンが難消化性のフラクトオリゴ糖や、ヤーコンに特徴的なクロロゲン酸、カフェ酸やカフェオイルキナ酸などの有益なポリフェノールに富むことも理由の 1 つとして報告されている(Campos et al., 2012)。ヤーコン塊根部の研究では、抗酸化活性(Yan et al., 1999)、ラットの抗糖尿病効果(Oliveira et al., 2013)、ヒトの抗肥満(Genta et al., 2009)および糖尿病モデルラットにおける抗脂質異常症効果(Habib et al., 2011)などが報告されており、注目されている。さらに葉部は、抗真菌活性(Lin et al., 2003)、抗酸化活性(Valentova et al., 2005)および糖尿病モデルラットにおける血糖低下効果を有する(Aybar et al., 2001)との報告もある。地域に特化した食材や食品等は、地域限定であることより、これらの有する機能性研究や科学的エビデンスの研究もまた限定的である。生体での効果の是非を問う前に、酸化防止を目的としたフリーラジカルを消去する特性等について試験管レベルで検証を行い、基礎研究

や探索研究を推進することは重要である。

フリーラジカルは、酸化を助長することにより、病原菌や癌細胞に酸化ダメージを与える免疫機能の 1 つの役割を担う。一方、過度の酸化ストレスや過度の免疫応答などにより酸化バランスが破綻し酸化側に傾く場合には、フリーラジカルは細胞や組織を攻撃することで機能不全や炎症など増悪の方向へと導くことがある(吉川, 2011)。生物におけるフリーラジカルの影響が最初に提唱されて以降(Harman, 1956)、天然物や天然由来の抗酸化物質が酸化ストレスや酸化反応を調節できるかどうかを検証することに多くの関心が寄せられてきた。例えば、 $O_2^-$ ラジカル、OH ラジカル、ペルヒドロキシラジカル、 $H_2O_2$  および一重項酸素などの ROS に起因する過度の酸化ストレスは、正常な組織機能に有害な作用をもたらし、それによりアテローム性動脈硬化症(Droge, 2002)、ガン(Hail et al., 2008)、糖尿病(Sabu and Kuttan, 2002)、神経変性(Obata, 2002; Przedborski and Ischiropoulos, 2005)、肝硬変(Bruck et al., 2001)などの病的状態(Gutowski and Kowalczyk, 2013)ならびに老化プロセス(Weisburger, 2002)を引き起こすと考えられている。

重要な酸素フリーラジカルの 1 つに  $O_2^-$ ラジカルがあり、これは金属イオンの存在下で  $H_2O_2$  と高反応性の OH ラジカルを容易に生成することができる(Valko et al., 2005)。体内では、ミトコンドリアでの呼吸(Wiswedel et al., 1989)や NAD(P)H オキシダーゼ(Pagano et al., 1995)、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ(Kukreja et al., 1986)、一酸化窒素合成酵素 (Cosentino et al., 1998)、シトクロム P450 (Fleming et al., 2001)、xanthine oxidase (XOD) (Nishino et al., 2008; Cantumedellin and Kelley, 2013)等の酸化酵素によって  $O_2^-$ ラジカルが産生される。これらは通常、身体に備わっている抗酸化性の防御機構によってバランスが保たれており、不必要に自身の身体を攻撃しないように制御されている(吉川, 2011)。

XOD は、 $O_2^-$ ラジカルの産生と同時に hipoxanthine および xanthine の酸化を介して尿酸を産生する酸化酵素である(Nishino et al., 2008; Cantumedellin and Kelley, 2013)。本酵素による過剰な  $O_2^-$ ラジカルの産生は、糖尿病、虚血-再灌流傷害および慢性心不全などの多種多様な病態の進行に関連付けられる可能性が報告されている(Pacher et al., 2006)。一方、1 型糖尿病において活性化した XOD が過剰量のフリーラジカルを産生しているとの報告もある(Desco et al., 2002)。したがって、XOD を介する  $O_2^-$ ラジカルの抑制の評価は、これら疾患リスクを予防する目的化合物をスクリーニングするための 1 つの手段として考えられている(Kim et al., 2004; Pacher et al., 2006; Connor, 2009)。

本章では、熊本県産のヤーコン茶葉から調製した抽出物を用いて、4 種類の代表的な化成品ラジカル種である DPPH ラジカル(Blois, 1958)、ABTS<sup>+</sup>ラジカル

(Thaipong et al., 2006)、galvinoxyl ラジカル(Shi et al., 2001)、CPZ<sup>+</sup>ラジカル(Nagaraja et al., 2014)および ROS の 1 つ O<sub>2</sub><sup>-</sup> ラジカルを標的に、ヤーコン茶がこれらのフリーラジカルを消去する特性について調べることにした。また、特に異なる O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生系に及ぼす抗酸化作用について試験管レベルで調べ、抗酸化剤である Trolox を比較対象に用いることで、Trolox 等量に換算し、比較を行いやすくした。異なる O<sub>2</sub><sup>-</sup> ラジカル産生系は phenazine methosulfate (PMS)-NADH-nitro blue tetrazolium (NBT)法および XOD 酵素活性測定の両方で評価し、さらに活性型ヒト顆粒球好中球様細胞が産生する O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル産生系で評価した。また、ヘキサシアノ鉄酸カリウムを用いた還元力の測定を行った。

## 第 2 節 材料および方法

### 第 1 項 材料および試薬類

ヤーコン ‘サラダ・オトメ(SY201)’ は日本の栽培品種として登録されている(Sugiura et al., 2007)。熊本県菊池地域で栽培、加工ならびに販売されている同ヤーコンからの乾燥ハーブティーを、2011 年 3 月に熊本県菊池市内の小売店で購入した。Dimethylsulfoxide (DMSO)、ABTS、DPPH、Folin-Ciocalteu フェノール試薬、塩化鉄(III)、NBT、 $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide disodium salt (reduced form) (NADH)、PMS、ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム、ペルオキシ二硫酸カリウム、トリクロロ酢酸(TCA)、xanthine、バターミルク由来の 12.5 U XOD は、Nacalai Tesque Inc.(京都、日本)から購入した。Galvinoxyl および CPZ は東京化成工業(東京、日本)の製品を使用した。TCA で調製したウマ心臓からのシトクロム c および phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、ニクロム酸カリウム(Cr (VI))、RPMI-1640 培地、ハンクス平衡塩溶液(HBSS)を和光純薬工業株式会社 (大阪、日本)より購入した。6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1)は、同仁化学研究所(熊本、日本)より購入した。HL-60 ヒト前骨髄性白血病細胞(JCRB00085)は、Japan Collection of Research Bioresources JCRB 細胞バンク(東京、日本)より入手した。ウシ胎児血清(FBS)は Biowest (Nuaille, France)より購入した。他の薬品類については、市販されているもののうち、最上級のグレードのものを用いた。

## 第2項 ヤーコン茶葉抽出物の調製

以前に報告された手法(Oliveira et al., 2009)を一部改変し、異なる溶媒抽出によってヤーコン茶葉より4つの抽出物を調製した。粉碎した茶葉(乾燥重量) 5 g をコニカルビーカー内の MilliQ 水 250 ml 中に 90-100°C で 45 分間浸漬した。次に、茶葉混合物を遠心分離し、濾過した。濾液を凍結乾燥させ、これを熱水抽出物とした。以降の実験に使用するために、これを MilliQ 水中に再溶解した。Methanol (MeOH)、ethanol (EtOH) および酢酸エチル抽出物の調製では、粉碎茶葉 2.5 g を、41.67 ml の各々の溶媒中で、室温にて 10 分間、遠心管中で連続的に振盪しながら浸漬した。短時間の遠心分離後、上清を別のコニカルビーカーに回収した。抽出後の茶葉を、同量の溶媒で合計 3 回抽出し、共に濾過した。真空下で濃縮後に、各抽出物を得た。以降の実験に使用するために、各々の抽出物を DMSO に溶解した。

## 第3項 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量は、既法に基づいて測定した(Singleton and Rossi 1965)。試験サンプル 25  $\mu$ l および 10%炭酸ナトリウム溶液 125  $\mu$ l を含有する混合物を 10 倍希釈しておいた Folin-Ciocalteu フェノール試薬溶液(125  $\mu$ l)と反応させ、室温で 10 分間維持した。この反応溶液を、グレーティングマイクロプレートリーダー(SH-1000Lab、コロナ電気、茨木、日本)を用いて 600 nm での吸光度を測定した。クロロゲン酸を検量線の標準試料として使用した。サンプルや試薬に光学的な吸収があり、データに影響を及ぼす可能性がある場合には、各測定点でバックグラウンドを差し引くために並行した実験を行った。

## 第4項 DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は、既法に基づいて測定した(Blois, 1958)。サンプル溶液 10  $\mu$ l、70% EtOH 90  $\mu$ l および 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 100  $\mu$ l を混合して 200  $\mu$ l とした。コントロールおよびブランクにはサンプル溶液の代わりに MilliQ 水または DMSO を添加した。ポジティブコントロールには Trolox を使用した。これらに EtOH 中に溶解した 0.5 mM DPPH 溶液 50  $\mu$ l を加えて室温で 30 分間反応させた。それぞれのブランクには DPPH 溶液の代わりに 100% EtOH 50  $\mu$ l を添加した。そのうち 200  $\mu$ l を 96 ウェルプレートにそれぞれ移し換え、マイクロプレートリーダーを用いて 517 nm での吸光度を測定した。

DPPH radical scavenging activity (%) =  $[1 - \{(A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank}}) / (A_{\text{Control}} - A_{\text{Blank}})\}] \times 100$   
 $A_{\text{Sample}}$  はサンプルの存在下で測定された吸光度であり、 $A_{\text{Blank}}$  はサンプルも合成ラジカル溶液も存在しない場合に測定された吸光度である。 $A_{\text{Control}}$  は、試料が存在しない場合に測定された吸光度である。他の活性試験も同様の計算式を用いて計算を行った。

## 第5項 ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定

ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性は、既法に基づいて測定した(Thaipong et al., 2006)。サンプル 10  $\mu\text{l}$  に対してコントロールおよびブランクにはサンプル溶液の代わりに MilliQ 水または DMSO を添加した。ポジティブコントロールには Trolox を使用した。7.4 mM ABTS と 2.6 mM potassium persulfate をそれぞれ MeOH に溶解させ、1:1 で混合させたものを 14 時間暗所で転倒混和したものを ABTS-mixture とした。ABTS-mixture 150  $\mu\text{l}$ 、MeOH 2,900  $\mu\text{l}$  を混合させたものを ABTS-working solution とした。また、ブランクには 7.4 mM ABTS の代わりに MilliQ 水を添加した。そして、サンプル溶液 10  $\mu\text{l}$ 、ABTS-working solution (190  $\mu\text{l}$ ) を混合して 2 時間暗所で反応を行った。そのうち 180  $\mu\text{l}$  を 96 ウェルプレートにそれぞれ移し換え、マイクロプレートリーダーを用いて 734 nm での吸光度を測定した。

## 第6項 Galvinoxyl ラジカル消去活性の測定

Galvinoxyl ラジカル消去活性は、以下の方法に基づいて測定した(Shi et al., 2001)。簡潔に述べると、EtOH 228  $\mu\text{l}$  と 0.01 M クエン酸緩衝液(pH 6.0)、152  $\mu\text{l}$  中の 0.0167 mM galvinoxyl を含有する galvinoxyl アッセイ混合液 380  $\mu\text{l}$  を様々な濃度の試験試料 20  $\mu\text{l}$  に加えることにより反応を開始し、その後室温で 10 分間反応させた。得られた溶液の吸光度を 432 nm で測定した。標準試料として Trolox を用いた。試料の光学的吸収または試薬の非特異的な残留色がデータに影響を及ぼす可能性がある場合、各測定点でのバックグラウンドを差し引くために並行した実験を行った。Trolox を対照標準として使用した。

## 第7項 CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定

CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性は既法に基づいて測定した(Nagaraja et al., 2014)。サンプル 12.5  $\mu\text{l}$ 、100% EtOH 7.5  $\mu\text{l}$ 、EtOH 中に溶解した 10 mM CPZ ラジカル 20  $\mu\text{l}$ 、リン酸と 100% EtOH (1:1)ストック溶液 200  $\mu\text{l}$  を混合した。コントロールおよびブランクにはサンプルの代わりに MilliQ 水または DMSO を添加した。ポジティブ

ブコントロールには、Trolox を使用した。これらに 0.5 mM Cr (VI) 溶液 10  $\mu$ l を加えて室温で 10 分間反応させた。それぞれブランクには Cr (VI) 溶液の代わりに MilliQ 水 10  $\mu$ l を添加した。そのうち、200  $\mu$ l を 96 ウェルプレートにそれぞれ移し換え、マイクロプレートリーダーを用いて 530 nm として吸光度を測定した。

## 第 8 項 還元力の測定

還元力は  $\text{Fe}^{3+}$  から  $\text{Fe}^{2+}$  への鉄イオンの還元に基づいて、以下の方法(Oyaizu, 1986)により測定した。異なる濃度の試験試料 2.5  $\mu$ l、MilliQ 水 2.5  $\mu$ l、および 0.2 M リン酸緩衝液(pH 6.6) 24.15  $\mu$ l を含む反応溶液 29.1  $\mu$ l へ、1%ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム 20.9  $\mu$ l を加えることで反応を開始し、その後、50°C で 20 分間反応させた。その後、10% TCA 20.85  $\mu$ l および 0.05% 塩化鉄(III) 141.7  $\mu$ l を反応液中に添加した。得られた溶液の吸光度を 700 nm で測定した。増加した吸光度は、還元能力の増加を示す。吸光度 1 を 100% として算出した。

## 第 9 項 PMS-NADH-NBT 法による $\text{O}_2^-$ ラジカル消去活性の測定

既報(Gulcin, 2006; Wang et al., 2008)に従って、PMS-NADH-NBT 法を用いて  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去活性を測定した。1 mM NBT 20  $\mu$ l、0.1 mM PMS 20  $\mu$ l、250 mM KPB (pH 7.4) 40  $\mu$ l、MilliQ 水 90  $\mu$ l を混合し、合計 180  $\mu$ l とした。これらに 2 mM NADH を 20  $\mu$ l 添加し、室温で 10 分間反応を進行させた。得られた溶液の吸光度を 570 nm で測定した。参考文献を基に標準試料として Trolox を用いた(Wang et al., 2008)。

## 第 10 項 XOD により産生される $\text{O}_2^-$ ラジカルの測定

XOD によって酵素的に産生される  $\text{O}_2^-$  ラジカルの量は、酵素反応中の WST-1 ホルマザン形成の測定に基づいて行った(Ukeda et al., 1999)。まず基質である xanthine を 0.1 M NaOH で 5 mM になるように溶解させた。さらにそれを 2.5 mM となるように 0.1 M NaOH を用いて希釈した。次に XOD を 0.4 U/ml となるように 70 mM KPB b.f. (pH 7.5) を用いて希釈し、さらに 0.05 U/ml に希釈した。WST-1 を 0.7 mM になるように MilliQ 水を用いて溶解した。異なる濃度サンプル 10  $\mu$ l、280 mM KPB b.f. (pH 7.4) 40  $\mu$ l、2.5 mM xanthine 10  $\mu$ l と 2.8 mM WST-1 8  $\mu$ l、MilliQ 水 92  $\mu$ l の計 142  $\mu$ l をマスターミックスとした。これに 0.05 U/ml XOD 40  $\mu$ l を添加し、25°C で 15 分間反応させた。コントロールにはサンプルの代わりに DMSO または MilliQ 水を添加した。反応時間の 0 分と 15 分後に 450 nm で吸光

度を測定し、 $\Delta\text{Abs}$ .として算出した。標準試料として抗酸化剤の Trolox を用いた。

次に、XOD によって酵素的に生成された最終生成物である尿酸量を、酵素活性を測るために測定した。WST-1 を水で置換して酵素実験を上記と同様に行った。反応液を既法に基づき、290 nm の吸光度を測定した(Nguyen et al., 2004; Wang et al., 2008)。代表的な XOD 酵素阻害剤として allopurinol を使用した。

## 第 11 項 細胞により産生される $\text{O}_2^-$ ラジカルの測定

HL-60ヒト前骨髄性白血病細胞を5% FBS、100 U/ml penicillin Gおよび100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin sulfateを添加したRPMI-1640培地中、37°C、5%  $\text{CO}_2$ 環境下で日常的に維持した。細胞の $\text{O}_2^-$ ラジカル産生測定のために、既法に従って、DMSOに分化させたHL-60ヒト顆粒球好中球様細胞を準備した(Nakamura et al., 1998; Kim et al., 2002)。シャーレに10 ml中 $4 \times 10^5$  cells/mlの密度で播種した細胞を、1.25% DMSOの存在下で6日間培養し、顆粒球へと分化させた。HBSSで洗浄後、生細胞数をトリパンブルー色素排除法によって計測した。その後、分化した細胞を、 $1 \times 10^6$  cells/mlの密度でHBSSに懸濁し用意した。細胞懸濁液250  $\mu\text{l}$ を、試験サンプル1.25  $\mu\text{l}$ の存在下で、37°Cで15分間プレインキュベートした。細胞の $\text{O}_2^-$ ラジカル産生を誘導するために、DMSO中に溶解した20  $\mu\text{M}$  PMA 1.25  $\mu\text{l}$ と分光学的に $\text{O}_2^-$ ラジカルを検出するためにPBS中に調製した20 mg/mlのシトクロムc溶液12.5  $\mu\text{l}$ を予め混ぜておき、混合液13.75  $\mu\text{l}$ を予め調整した。この混合物を細胞懸濁液に添加し、次に37°Cでさらに15分間インキュベートした。細胞を直ちに氷冷水に5分間置いて $\text{O}_2^-$ ラジカル産生を停止させ、13,000  $\times g$ で1-2分間遠心して上清を回収した。そこに産生された $\text{O}_2^-$ ラジカルのレベルについて、550 nmでのシトクロムcの分光学的な吸光度の変化をもって測定した。

## 第 12 項 トリパンブルー色素排除法

トリパンブルー色素排除法のために、細胞懸濁液 10  $\mu\text{l}$  を等量の 0.4%トリパンブルー溶液(Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)と混合した。室温で3分間インキュベートした後、細胞をBurker-Turk型血球計算盤に載せ、倒立位相差顕微鏡(AE-30、株式会社島津理化、京都、日本)を用いてトリパンブルー浸透性(死)細胞または非浸透性(生)細胞として計測した。

## 第13項 統計処理

統計分析のために、データ値は、4回の実験から得られた平均値±標準偏差として表した。データの一部については、Excel 2004 (Microsoft Co., Redmond, Washington, USA)の統計アドオンソフトウェアプログラム(Statcel、オーエムエス出版、埼玉、日本)を使用して分析した。統計的差異は、スチューデントの *t* 検定を用いて  $P < 0.01$  または  $P < 0.001$  で有意であるとみなした。分散分析(ANOVA)と共に、post-hoc Bonferroni-Dunn 検定を用いて多重比較検定を行い、 $P < 0.05$  で有意差ありとみなした。

### 第3節 結果および考察

本章では、熊本県産のヤーコン茶のフリーラジカルに及ぼす影響について調べた。代表的な抗酸化剤である Trolox の抗酸化活性と比較することにより、特に  $O_2^-$  ラジカルに着目した試験管レベルでの検証と特徴付けを行うこととした。

#### 第1項 ヤーコン茶葉抽出物の調製と総ポリフェノール含量

最初に、異なる抽出法により4種類のヤーコン茶葉抽出物を調製した。沸騰した熱水に粉碎した茶葉 5.00 g を入れ、抽出物 1.39 g (抽出収率: 27.8%)を得た。MeOH、EtOH および酢酸エチルによる個々の抽出収量はそれぞれ、ヤーコン茶葉 2.50 g から 0.165 g (6.60%)、2.51 g から 0.119 g (4.74%)および 2.51 g から 0.0981 g (3.91%)であった(**Table 1-1**)。熱水抽出物より 27.8%の収率が得られ、他の3つの抽出方法抽よりも 4.21~7.11 倍高い収率であった。熱水抽出物 1 mg 中の総ポリフェノール量はクロロゲン酸相当量として 279  $\mu\text{g}$  であり、その値は他の3種の抽出物よりも 3.34-3.96 倍高かった。したがって、熱水抽出により 1 g の茶葉から 0.0776 g のポリフェノールを効果的に抽出することができ、その値は他の3つの抽出方法よりも 14.7-28.1 倍高かった。本研究で決定された収量および総ポリフェノール含量の値は、他の報告例にも類するものであった(Oliveira et al., 2009)。

#### 第2項 ヤーコン茶葉のラジカル消去作用

ヤーコン茶葉の熱水、MeOH、EtOH および酢酸エチル抽出物が、代表的なフリーラジカルに対してどの程度の抗酸化活性を示すのかを調べた。DPPH は、深紫色の安定したフリーラジカルであり、プロトン供与性の抗酸化剤が存在する

場合、脱色と共に還元型に変化する(Blois, 1958; Molyneux, 2004)。食品や食材中の抗酸化作用を推定するために、本法がよく使用される。先行実験を行なったところ、50-500  $\mu\text{g/ml}$  で試験した熱水抽出物が、75.3%-93.0%と強い DPPH ラジカル消去活性を示した(**Table 1-2**)。したがって熱水抽出物の  $\text{EC}_{50}$  値は、測定範囲外の 50  $\mu\text{g/ml}$  未満にあると推定された。試験した 50-500  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で、MeOH 抽出物、EtOH 抽出物および酢酸エチル抽出物は、500  $\mu\text{g/ml}$  で試験した際に最大 52.0%、81.0%および 72.6%の活性を示した。MeOH 抽出物、EtOH 抽出物および酢酸エチル抽出物の  $\text{EC}_{50}$  値は、それぞれ 480、292 および 324  $\mu\text{g/ml}$  であった。したがって、ヤーコン茶葉中に存在する水溶性ポリフェノールのような成分が、DPPH ラジカル消去能に大きく寄与している可能性がある。並行して行った標準試料である Trolox の  $\text{EC}_{50}$  値もまた、50  $\mu\text{g/ml}$  未満の測定範囲外であった。

ヤーコン茶葉抽出物の抗酸化活性については、1 手法のみで得られた結果をもとに結論付けるべきではなく、他の興味ある抗酸化活性測定法を組み合わせる必要がある(Alam et al., 2013)。次に、ヤーコン茶による鉄還元力の測定を行った。還元力のデータは一般的に 700 nm で測定される吸光度として示されるため(Oyaizu, 1986; Oktay et al., 2003)、吸光度の増加が還元力の増加を示す。既報に基づき本実験でも吸光度 1.0 の還元力が 100%の還元能に相当する任意の単位を導入した(Ferreira et al., 2007)。そこでは 0.5 の吸光度または 50%の還元能を与える有効濃度を、 $\text{EC}_{50}$  値と定義した。**Figure 1-1** に示すように、熱水抽出物は他の 3 つの抽出物よりも高い還元能を示した。即ち、水抽出物の  $\text{EC}_{50}$  値は 168  $\mu\text{g/ml}$  が得られ、MeOH 抽出物の 566  $\mu\text{g/ml}$ 、EtOH 抽出物の 1,009  $\mu\text{g/ml}$ 、酢酸エチル抽出物の 593  $\mu\text{g/ml}$  と比較しても、比較的低濃度の値を示した。熱水抽出物は、これら 4 種類の抽出物の中で、とくにラジカル消去能と共に電子を受容する還元性に効果的に寄与している可能性がある。鉄還元能を決定するためには、現在少なくとも以下の 3 つの方法が利用可能である。即ち、(i)ヘキサシアノ鉄(III)酸カリウムを用いた還元力試験(Oyaizu, 1986; Oktay et al., 2003)、(ii)トリピリジルトリアジン(TPTZ)を用いた鉄還元性抗酸化力(FRAP)法(Benzie and Strain, 1996; Pulido et al., 2000)および(iii) TPTZの代わりにフェナントロリンを用いた鉄還元力 ferric reduction capacity (FRC)法(Lim and Lim, 2013)がある。ある総説論文内で調査されているが、*in vitro* 抗酸化測定では FRAP 法よりも、還元力試験がより頻繁に用いられている(Alam et al., 2013)。したがって、本研究でも同還元力試験を選択した。最近の報告では、還元力試験と FRAP 法との間で、抗酸化剤を変えても同様の結果が得られる傾向にある(Cakmakci et al., 2015)。しかしながら、*in vivo* では脂質過酸化を標的にした測定がよく行われることから(Alam et al., 2013)、複数の抗酸化活性測定を行ううえでは、脂質過酸化に及ぼす影響も調べる必要があるかもしれない。例えば、ラジカル連鎖反応を介したりポソーム

またはβ-カロテン-リノール酸酸化系などの複数の抗酸化測定を用いて、抽出や溶媒の影響を調べるような研究も重要である。ヤーコン葉は、プロトカテキン酸、クロロゲン酸およびカフェ酸などの水溶性のフェノール性抗酸化物質を有している(Valentova et al., 2005, 2006)。したがって、これらのポリフェノール類がハーブティーとして加熱加工処理中に茶葉中に安定して存在し、その後も機能的効果をどの程度維持しているかを調べることもまた興味深いテーマである。現在までに我々の研究グループでは、ヤーコン葉部を加熱処理すると抽出効率が上昇するとともに抗酸化性ポリフェノール類が上昇する場合があることを認めている(data not shown)。

熱水抽出物の抗酸化効果を評価するために、DPPHラジカルおよび他の3つの代表的なラジカル消去活性測定においてさらに異なる濃度で試験を行った。**Figure 1-2A**に示すように、熱水抽出物およびTroloxは、濃度依存的なDPPHラジカル消去活性の上昇を示した。算出された茶抽出物のEC<sub>50</sub>値は28.1 μg/mlであり、一方でTroloxのEC<sub>50</sub>値は7.64 μg/mlであった。近年、抗酸化剤におけるいくつかの比較研究の重要性が高まっている。なぜなら、抗酸化物質によっては測定法が異なると活性が異なるケースがあるためである(Takebayashi et al., 2006; Tai et al., 2011, 2012; Nagaoka et al., 2013)。本研究で認められたヤーコン茶のラジカル消去作用がDPPH以外のラジカルに対しても普遍的に効果を発揮できるのかを調べることは興味深い。安定したカチオンラジカルであるABTSは、電子および水素供与能を有する親水性および疎水性の両方の抗酸化物質のラジカル消去活性をスクリーニングするために広く使用されている(Pellegrini et al., 1999; Re et al., 1999; Thaipong et al., 2006)。**Figure 1-2B**に示すように、ここでも茶抽出物の濃度依存的なABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性の上昇が同様に認められた。抽出物およびTroloxより算出されたEC<sub>50</sub>値は、それぞれ23.7および8.93 μg/mlであった。電子スピン共鳴法によく利用される安定なラジカルgalvinoxyl (Havenith et al., 2008)は、標的となるフェノール化合物の活性型ヒドロキシル基中に共鳴安定化したフェノキシルラジカルが形成される際の、水素供与能を測定するものとして利用される(Shi et al., 2001)。茶葉抽出物は濃度依存的にgalvinoxylラジカル消去活性の上昇を示し(**Figure 1-2C**)、茶抽出物およびTroloxより算出されたEC<sub>50</sub>値は、それぞれ3.06および0.571 μg/mlであった。他の2つの測定法と比較して、galvinoxylラジカル消去活性測定法では、より低いEC<sub>50</sub>値が得られる傾向にあったため、比較的感度の高いモデルとして使用できることが考えられた。茶葉抽出物のラジカル消去活性は、DPPHおよびABTS<sup>+</sup>ラジカルに対して約50 μg/ml付近の濃度で、galvinoxylラジカルに対しては8.0 μg/mlの濃度で最大レベルに達した。CPZは精神薬理学における統合失調症の治療のための神経遮断薬に用いられるものの、酸性下でCr(VI)(Nagaraja et al., 2014)またはFe(III)(Miftode et al., 2010)とともに

安定なカチオンラジカルを形成する特徴を有する。このことから、電子移動による抗酸化作用の解析にも用いられる。試験濃度範囲100-1,000  $\mu\text{g/ml}$ と比較的高濃度で、抽出物はCPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性の上昇を示した(**Figure 1-2D**)。抽出物およびTroloxで算出されたEC<sub>50</sub>値はそれぞれ475および3.16  $\mu\text{g/ml}$ であった。このとき、茶葉抽出物は1,000  $\mu\text{g/ml}$ で最大63%の消去活性を示すのみであった。CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定はリン酸を用いて実施しており、茶抽出物の抗酸化作用は強酸性環境下では0.5-5.9%まで低下し、消失しうることが示唆された(「材料および方法」の項を参照)。したがって、複数のフリーラジカル消去活性測定法によって食材の潜在的な抗酸化特性を明確にすることは重要であると考えられた。

上記で用いた4種類のフリーラジカルは、抗酸化作用のスクリーニングに利用可能なラジカルモデルである。しかしながら、これらのラジカル性の化学物質は*in vivo*では存在しない。次に熱水抽出物が、よく知られるROSの1つO<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルに対して抗酸化作用を示すことができるかを調べた。産生されたO<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルは、金属イオン存在下でさらにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と反応性のOHラジカルを形成し、それにより連鎖的な酸化をもたらすことが知られる(Valko et al., 2005)。Figure 1-3に示すように、茶葉抽出物はここでも濃度依存的なO<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性の上昇を示した。抽出物の活性は250  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で100%付近に達した。抽出物およびTroloxのEC<sub>50</sub>値は、それぞれ64.5および482  $\mu\text{g/ml}$ であった。先の4種類のラジカルモデルで得られた結果と比べて対照的に(**Figure 1-2**)、このO<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性測定では、抽出物はTroloxよりも7.47倍の強い抗酸化作用を示した。

加えて、近年注目されている抗酸化能評価方法の一つにORAC (Oxygen radical absorbance capacity、酸素ラジカル吸収能)法がある。一部で議論が残るものの、ORACは、体内で発生するペルオキシラジカルを標的とすることを特徴としており、DPPHラジカル消去活性試験と同様に抗酸化力を測定する際に利用される。次に、2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)ラジカルによるfluoresceinの分解を原理に、ORAC法を用いてヤーコン茶熱水抽出物の抗酸化力を測定した。ORAC法では、標準物質であるfluoresceinが、ラジカル発生剤であるAAPH溶液から発生したペルオキシラジカルによって、分解される蛍光強度を経時的に測定し、蛍光強度の軸と時間軸とのグラフの軌跡に囲まれた面積AUC (area under curve)を算出する(Prior et al., 2005; Watanabe et al., 2014)。ORAC法に基づく抗酸化力は、被験検体より得られた水溶性抽出物に起因する抗酸化力を示す。現状でのORAC測定法は、酢酸存在下での水系MeOH溶液(methanol:water:acetic acid = 90:9.5:0.5, MWA)を用いて溶解または希釈された水溶性画分としての試料のみを測定する方法(H-ORAC法)が公開されており、本実

験でもこれに準じて行なった(Watanabe et al., 2014)。最初に Trolox (**Figure 1-4A**) ならびにヤーコン茶熱水抽出物(**Figure 1-4B**)について、ORAC 測定における経時的な fluorescein の蛍光強度の低下を表す曲下面積値を求めた。このとき、異なる濃度の Trolox から得られた正味の AUC 値をもとに検量線を作成し、これを用いてヤーコン熱水抽出物の ORAC 値を算出した。その結果、1 g あたり  $2.81 \pm 0.15$  mmol の Trolox と同等の抗酸化力を有すること、ヤーコン茶葉 100 g あたり  $78.1 \pm 4.2$  mmol の Trolox と同等の抗酸化力を有することを明らかにした。本実験では熱水抽出物にのみ着目したため、*n*-hexane/dichloromethane (1:1, Hex/Dc)を用いた親油性画分の測定(L-ORAC)についてはここでは検討していない。したがって、茶葉や葉部全体の抗酸化力を測定する際には、水溶性抽出物のみならず脂溶性抽出物についても ORAC 法に基づく抗酸化力を測定し、それぞれ H-ORAC 値と L-ORAC 値として表すことにより、これらの総和として抗酸化力を示すことも可能である。

ヤーコン茶葉からの熱水抽出物中にどんな活性成分があり、 $O_2$ -ラジカル消去作用に応答しているのかは、依然として完全には解明されていない。これまでの報告で述べられているように、クロロゲン酸、カフェ酸およびフェルラ酸がヤーコンの葉部分からの主要なフェノール成分として単離および同定されている(Valentova et al., 2005, 2006)。次に活性成分についての知見を得るために、これら3つの既知の化学物質を $O_2$ -ラジカル消去活性測定に供した。異なる濃度 100-1,000  $\mu$ M で試験した中で、ともにカテシル基を有するクロロゲン酸とカフェ酸が 459  $\mu$ M (167  $\mu$ g/ml) および 620  $\mu$ M (35.0  $\mu$ g/ml) の  $EC_{50}$  値とともに、濃度依存的な消去活性を示したものの、フェルラ酸では約 10% の活性を示すのみであった (figure not shown)。Trolox と比較した際にこれら2つのカテコール性化合物は、OH ラジカル、一重項酸素、そしてまたアルコキシルラジカルを含むその他の ROS よりもむしろ $O_2$ -ラジカルに対して優れたラジカルスカベンジャーであることが電子スピン共鳴トラップ法で報告されている(Sueishi et al., 2014)。これらの化学物質の抗酸化能は、DPPH ラジカルおよび ABTS<sup>+</sup> ラジカル消去活性測定、還元力およびリノール酸過酸化測定法を含む様々な抗酸化活性測定によっては、Trolox により得られた活性のわずか 0.24 から 2.24 倍もの違いがある点も興味深い (Olszewska et al., 2012)。これらのカテコール構造を有するフェノール性化合物や恐らく他の候補となりうる化合物が、 $O_2$ -ラジカルに特異的な抗酸化物質として貢献している可能性がある。これらのポリフェノール類が茶葉加工中に安定して存在し、さらに生物活性を示すかどうかを調べることもまた、今後の課題の 1 つである。

上述の5種類のラジカル消去活性測定および鉄還元力法(**Figure 1-1**から**1-3**)にて熱水抽出物およびTroloxより得られた $EC_{50}$ 値を**Table 1-3**にまとめた。 $EC_{50}$ 値の

比に基づいて、茶抽出物の抗酸化作用は、「Trolox同等の抗酸化能力(TEAC)」値として定義することができる。DPPHラジカル消去活性測定においては、茶抽出物は、0.272倍(即ち27.2%)のTrolox相当の抗酸化能を有することが明らかになり、それにより、抽出物1 mgの算出されたTEAC値は0.272 mg (=1.09  $\mu$ mol) TEであった。熱水抽出物の27.8%の収率に従って(**Table 1-1**参照)、100 gのヤーコン茶葉は、7.56 g (= 30.2 mmol)相当のTEAC値を有すると推定される。ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定において、抽出物1 mgおよび茶葉100 g中の算出されたTEAC値は、それぞれ0.377 mg (=1.51  $\mu$ mol) TEおよび10.5 g (= 42.0 mmol) TEであった。Galvinoxylラジカルの場合、抽出物1 mgおよび100 gの茶葉のTEAC値はそれぞれ0.187 mg (=0.747  $\mu$ mol)のTEおよび5.20 g (= 20.8 mmol)のTEであった。CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定で得られた値は、抽出物1 mgおよび茶葉100 gあたりそれぞれ0.00665 mg (=0.0266  $\mu$ mol) TEおよび0.185 g (= 0.739 mmol) TEであった。O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性測定では、抽出物1 mgおよび茶葉100 gあたりのTEAC値は、それぞれ7.47 mg (=29.8  $\mu$ mol) TEおよび208 g (= 831 mmol) TEであった。さらに、還元力試験で得られた値は、抽出物1 mg当たり0.283 mg (=1.13  $\mu$ mol) TEおよび茶葉100 gあたり7.87 g (= 31.4 mmol) TEであった。これらDPPH、ABTS<sup>+</sup>、galvinoxyl、およびCPZ<sup>+</sup>ラジカルモデルならびに鉄還元力モデルで示された値とは対照的に、O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性測定でのみ、はるかに高いTEAC値が得られたことは注目すべき点である。したがって、複数の方法で食材の抗酸化作用を評価することは抗酸化力の特性を明らかにする上でも重要であり(Takebayashi et al., 2006; Tai et al., 2011, 2012; Nagaoka et al., 2013)、Troloxを標準物質としたTEAC値は、食材の抗酸化性を特徴づけるための有益な指標となることが示唆された。

複数のフリーラジカル消去活性測定法ならびに他の抗酸化活性測定がどの程度食材の潜在的な抗酸化特性を見積もるのに有効であるかを比較したり明確化することは重要である。次にこれらの5つのフリーラジカル消去活性測定と還元力試験との間で、熱水抽出物およびTroloxによって得られたEC<sub>50</sub>値どうしを比較した(**Table 1-3**)。これらの抗酸化活性測定は反応混合液中で1/20量の試験サンプルと共に行った。異なる6つの活性試験の中で、最も低いEC<sub>50</sub>値を示す場合には、この方法が高感度を持って抗酸化能を検出できる優れた方法であることを含意している。例えば、galvinoxylラジカル消去活性においては抽出物による 3.06  $\mu$ g/ml および Trolox による 0.571  $\mu$ g/ml という比較的low値が得られている。一方で、DPPH および ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性における EC<sub>50</sub> 値はいずれの場合も同等であり、抽出物でそれぞれ 28.1 および 23.7  $\mu$ g/ml、および Trolox でそれぞれ 7.64 および 8.93  $\mu$ g/ml であった。他方、CPZ<sup>+</sup>および O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性測定は、他の方法と比べても Trolox (それぞれ 3.16 および 482  $\mu$ g/ml EC<sub>50</sub> 値)と比較して TEAC 値に換算することにより、ヤーコン葉抽出物(それぞれ 475 および 64.5

$\mu\text{g/ml}$   $\text{EC}_{50}$  値)の特徴を明らかにすることのできる手法であった。これらの6つの抗酸化活性の中で中間値に位置した還元力試験における抽出物および Trolox の  $\text{EC}_{50}$  値は、吸光度をもとに任意の値を基準としているため、Trolox 相当の値として TEAC 値に換算する必要がある。還元力試験ならびに DPPH ラジカルおよび ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定から得られた抽出物あたりの TEAC 値はともに 0.3 付近の近似した値を示した。還元力は、DPPH フリーラジカル消去活性、 $\text{O}_2^-$ ラジカル消去活性、過酸化水素消去活性および金属キレート活性のような、他の抗酸化活性とともに測定される(Oktay et al., 2003)。還元力試験は、鉄イオンを基本としたレドックス反応に基づくメカニズムを利用しており、様々な食材の抗酸化能を測定するために開発されたものである(Oyaizu, 1986)。したがって、本研究で用いた複数のフリーラジカル消去活性測定法は、標的となるヤーコン茶のラジカル消去における特性を見出すのに有効であった。抗酸化作用を含む機能性評価では、効果的な作用濃度を  $\text{EC}_{50}$  値や  $\text{IC}_{50}$  値として算出する場合があるものの、実験条件や使用する標準物質が異なれば実験ごとに異なる結果が得られる可能性がある。そのため抗酸化活性測定時には Trolox が標準物質として利用されることが多い。 $\text{O}_2^-$ ラジカル消去活性や  $\text{H}_2\text{O}_2$  消去活性測定(Wang et al., 2008)を含む各種の抗酸化活性測定においても Trolox を比較対象とする場合や、Trolox 等量として抗酸化力が決定づけられる(Apak et al., 2007; Alam et al., 2013)。本実験条件で PMS-NADH-NBT 法における  $\text{O}_2^-$ ラジカル消去活性測定を行なった際の Trolox の  $\text{EC}_{50}$  値は  $482 \mu\text{g/ml}$  と、他のラジカル消去活性測定法と比べてもやや高値を示す傾向にあった。しかしながら、実験導入時に参考にした Wang らの論文では  $0.8 \text{ mg/ml}$  の Trolox 処理時に 54%の活性を得ており(Wang et al., 2008)、実験条件としては妥当であると思われる。一方、Ashokkumar ら(2009)は同様の実験で抗酸化剤として使用した butylated hydroxyl anisole (BHA)と butylated hydroxyl toluene (BHT)のそれぞれより  $60.11$  と  $7.67 \mu\text{g/ml}$  の  $\text{IC}_{50}$  (ここでは  $\text{EC}_{50}$  と同義)値を報告しており、標準物質の選択によっては得られる結果について解釈が異なってしまう可能性があることについても注意を要すると考察する。

### 第3項 ヤーコン茶葉の酵素的 $\text{O}_2^-$ ラジカル産生に及ぼす抑制作用

XOD は、xanthine から尿酸への酸化を触媒し、それによって  $\text{O}_2^-$ ラジカルを産生する酸化酵素の1つである(Kim et al., 2004; Pacher et al., 2006; Connor, 2009)。次に、ヤーコン茶葉抽出物が XOD 酵素反応系においても  $\text{O}_2^-$ ラジカルの産生を抑制することができるかどうかを調べた。この実験条件では、XOD によって産生された  $\text{O}_2^-$ ラジカル量について、WST-1 ホルマザンの発色により測定した(Ukeda et al., 1999)。Figure 1-5A に示すように、抽出物は濃度依存的に  $\text{O}_2^-$ ラジカ

ル量を抑制し、200  $\mu\text{g/ml}$  で最小レベルに達した。抽出物の  $\text{IC}_{50}$  値は 20.7  $\mu\text{g/ml}$  であった。代表的な抗酸化剤および酵素阻害剤の Trolox および allopurinol は、それぞれ 48.5 および 0.306  $\mu\text{g/ml}$  の  $\text{IC}_{50}$  値を示した。したがって、茶葉抽出物は、Trolox と比較して 2.34 倍の強い  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生抑制または消去作用を有するものの、allopurinol と比較して抑制の程度は 0.0148 倍(即ち 1.48%)であることが明らかとなった。

次に、茶葉抽出物が XOD 活性に与える影響を調べた。酵素活性は、報告に従って、反応中に最終産物として生じる尿酸量を基準に測定した(Nguyen et al., 2004; Wang et al., 2008)。Figure 1-5B に示すように、抽出物は XOD による尿酸産生を弱いながらも抑制し、 $\text{IC}_{50}$  値は 639  $\mu\text{g/ml}$  であった。Allopurinol は 0.449  $\mu\text{g/ml}$  の  $\text{IC}_{50}$  値を示し、Trolox もまた 336  $\mu\text{g/ml}$  の  $\text{IC}_{50}$  値とともに弱いながらも高濃度で阻害することを見出した。茶葉抽出物および Trolox は、0-200  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲でおよそ 80%から 100%の XOD 活性を維持していたことより、同濃度範囲内ではほとんど酵素阻害を示していない。これらの XOD を介した測定で得られた  $\text{IC}_{50}$  値を Table 1-4 にまとめた。両測定結果からの  $\text{IC}_{50}$  値の比率は、抑制作用の様式を示す指標として定義することができる。例えば、比率の低値は、サンプルが強い  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去作用を有することを意味し、一方で 1.00 に近い値は酵素阻害を律速としてサンプルがラジカル消去作用を十分に発揮していないことを意味する。ここでは茶葉抽出物は 0.0324 の低値を示し、その  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去能が優位であることを示している。

#### 第 4 項 ヤーコン茶葉の細胞の $\text{O}_2^-$ ラジカル産生に及ぼす抑制作用

ここでは、分化した HL-60 ヒト顆粒球好中球様細胞を用いて、ヤーコン茶抽出物が細胞の  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生に影響を及ぼすかどうか調べた。抽出物の存在下で細胞を 15 分間プレインキュベートし、その後シトクロム *c* の存在下 PMA で 15 分間刺激した。細胞の  $\text{O}_2^-$  ラジカルの産生量は、以前の報告に従ってシトクロム *c* の還元として分光学的に測定した(Jiwajinda et al., 2002; Kim et al., 2002)。Figure 1-6 に示すように、茶葉抽出物および Trolox の存在下で細胞をインキュベートすると、PMA により活性化した顆粒球細胞の  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生量が処理濃度依存的に抑制された。ヤーコン抽出物および Trolox より算出された  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ 65.7  $\mu\text{g/ml}$  および 1,000  $\mu\text{g/ml}$  超であった。したがって、抽出物の  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生における抑制効果は、Trolox よりも強力なものと考えられた。本研究で示された抽出物の抑制効果が細胞毒性によるものかどうかを調べるために、トリパンプルー色素を用いた細胞生存率の測定を並行して行ったものの、細胞生存率の有意な低下は認められなかった(figure not shown)。これまでに、

PMA が白血球細胞の NAD(P)H オキシダーゼを誘導して活性化したり (Murakami et al., 1997)、ケラチノサイトの XOD 系の活性化と誘導を導くことにより (Reiners and Pence, 1989)、 $O_2^-$ ラジカル産生が亢進することが報告されている。血液中の多形核白血球に由来する好中球などの顆粒球は、微生物および炎症反応に対する重要な防衛線であると考えられている。顆粒球がサイトカインまたは刺激剤によって活性化されると、フリーラジカルの 1 つ  $O_2^-$ ラジカルが産生され、病原菌や癌細胞に酸化ダメージを与える免疫機能の 1 つとしての役割を担う (Utsumi et al., 1992; Shintani 2013)。一方、過度の酸化ストレスや過度の免疫応答などにより酸化バランスが破綻し酸化側に傾く場合には、フリーラジカルは自らを攻撃することで細胞や組織の機能不全や炎症など増悪の方向へと導くことがある (吉川, 2011)。ヤーコン葉抽出物を高コレステロール血症ラットモデルに 14 日間にわたり投与したところ、血中の心臓障害マーカーが低下し炎症が軽減すること、さらに血中の過酸化物質等の酸化障害のパラメータとともに SOD 等の生体内酸化防御マーカーを改善できることが報告されている (Oliveira et al., 2017)。一方、アルコール性肝硬変の既往歴のある患者において、ヤーコン茶の多飲摂取が薬物性肝障害を発症させる可能性についての症例報告もある (田中ら, 2009)。本研究ではヤーコン茶抽出物が細胞毒性を伴わずに  $O_2^-$ ラジカル量を減少させることを見出した。しかしながら、生体に及ぼす影響の面では未解明の部分も多く、その作用の有益性や予期せぬ副作用などについては、結果の解釈時に一定の注意が必要であると考えられる。

## 第 5 項 ヤーコン茶および緑茶の総ポリフェノール含量と抗酸化力の比較

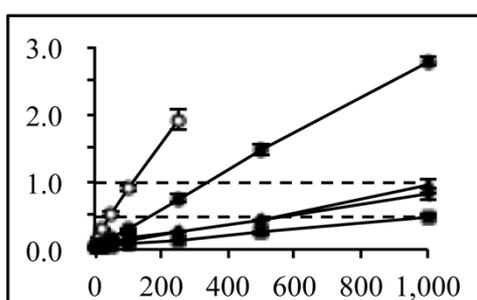
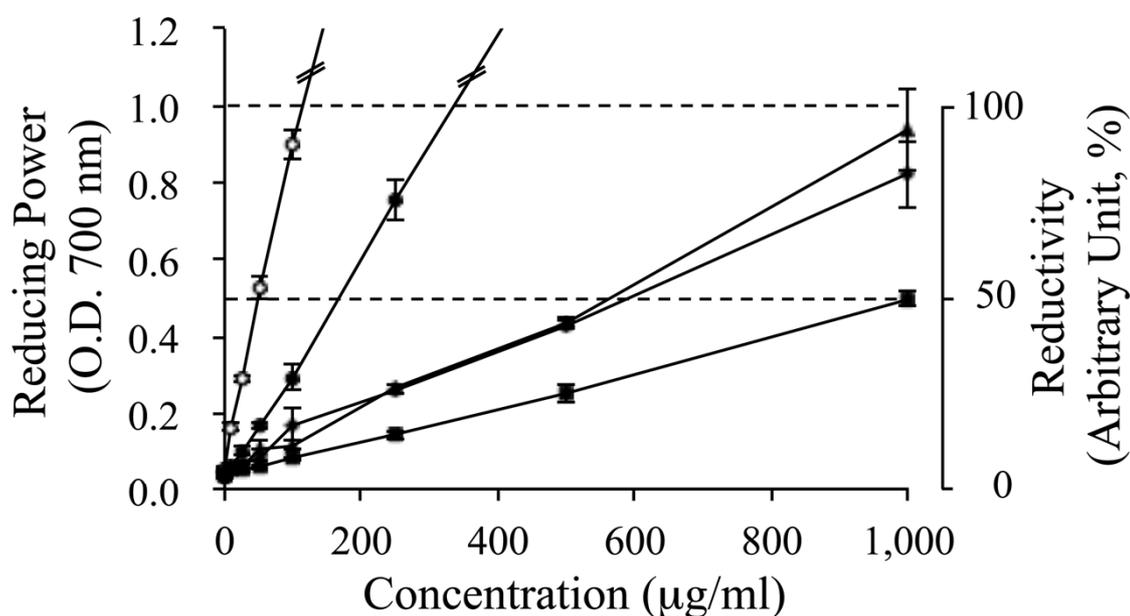
市販の 2 種類の緑茶 (A と B) を用いて追試を行い、本研究で用いたヤーコン茶より得た熱水抽出物とともに総ポリフェノール含量と DPPH ラジカル消去活性における TEAC 値の比較を試行的に行った。その結果、緑茶 A および緑茶 B からの抽出物 1 mg 当たり 526  $\mu\text{g}$  および 539  $\mu\text{g}$  の総ポリフェノール含量が認められた。先にヤーコン茶で得られた 279  $\mu\text{g}$  と比較すると、ヤーコン茶は緑茶の 51.8 ~ 53.0% 程度の総ポリフェノール含量を有していた (Figure not shown)。次に TEAC 値を基に抗酸化力を測定した結果、緑茶 A および緑茶 B からの抽出物 1 mg 当たり 4.77  $\mu\text{mol TE}$  および 5.08  $\mu\text{mol TE}$  の抗酸化力が認められた。先にヤーコン茶で得られた 0.272 mg TE (= 1.09  $\mu\text{mol}$ ) と比較すると、ヤーコン茶は緑茶の 21.5 ~ 22.9% 程度の抗酸化力を有していた (Figure not shown)。地域性のあるヤーコン茶の抗酸化活性や各種機能性の特徴付けを行なっていくためにも、国内で常飲される緑茶などと比較しながら、より詳細な成分含量や生物活性を調べる必要がある。さらに乾燥重量あたりで比較していくことも重要であり、どの程

度の効果が認められるのかを明らかにしていく必要がある。

#### 第4節 小括

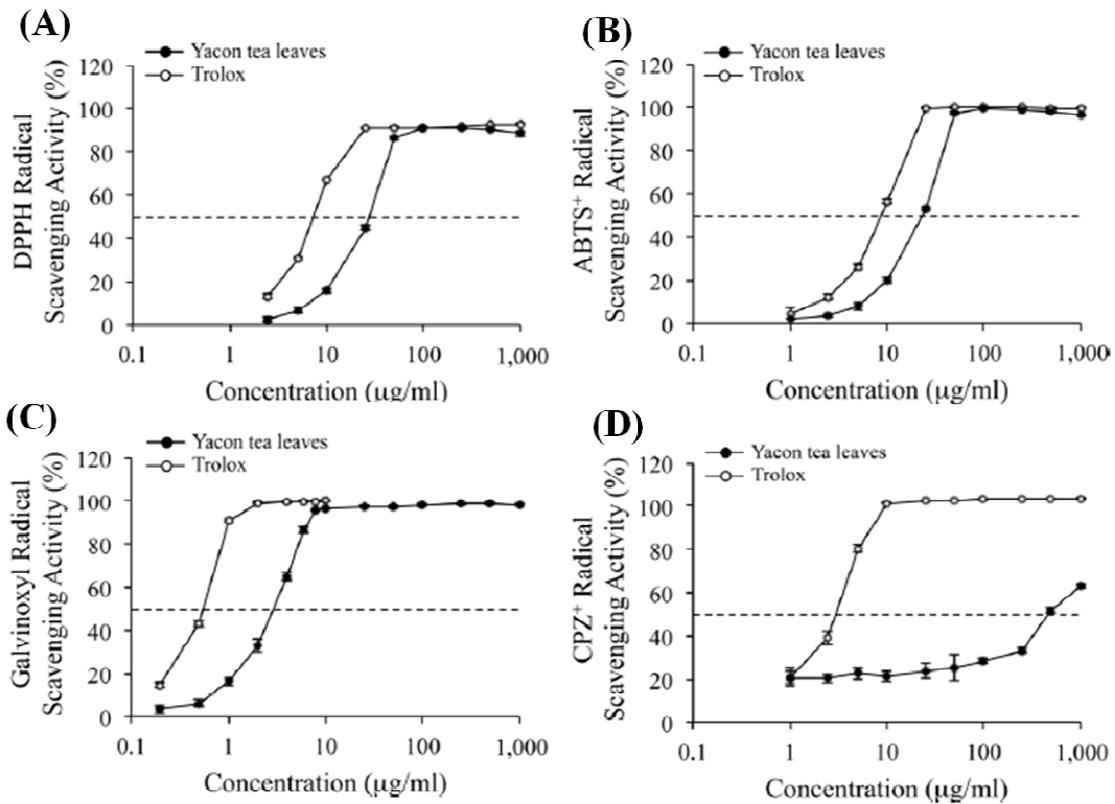
本章では、熊本県産ヤーコンハーブティーのラジカル消去作用、特に異なる $O_2^-$ ラジカル産生系に及ぼす抗酸化作用について試験管レベルで調べた。MeOH、EtOH、酢酸エチルの各抽出物よりも熱水抽出物でより高いポリフェノール含量と抽出収率ならびにDPPHラジカルに対する抗酸化活性を認めることができた。ヤーコン茶熱水抽出物はDPPH、ABTS<sup>+</sup>、CPZ<sup>+</sup>およびgalvinoxylの4種類の化成品ラジカル種に対して異なるレベルで抗酸化活性を示し、とくに $O_2^-$ ラジカルに対してはPMS-NADH-NBT法およびXOD法の両方で、代表的な抗酸化剤であるTroloxよりも強い抗酸化活性を示すことを明らかにした。活性型ヒト顆粒球好中球様細胞の $O_2^-$ ラジカル産生に及ぼす同抽出物の影響も検討し、ここでもTrolox処理時より $O_2^-$ ラジカルを軽減させることを見出した。しかしながら、地域性のある健康志向食品を用いた本研究の結果は、あくまでもフリーラジカルに対する抗酸化活性の特徴を試験管レベルで調べたものである。生体レベルでこれらのような効果を実証できるかどうかについては、今後同ヤーコンハーブティー中の活抗酸化成分が実際に生体内にどの程度吸収され、どの程度抗酸化作用が発揮されるのかを調べていく必要がある。

第5節 添付図表等

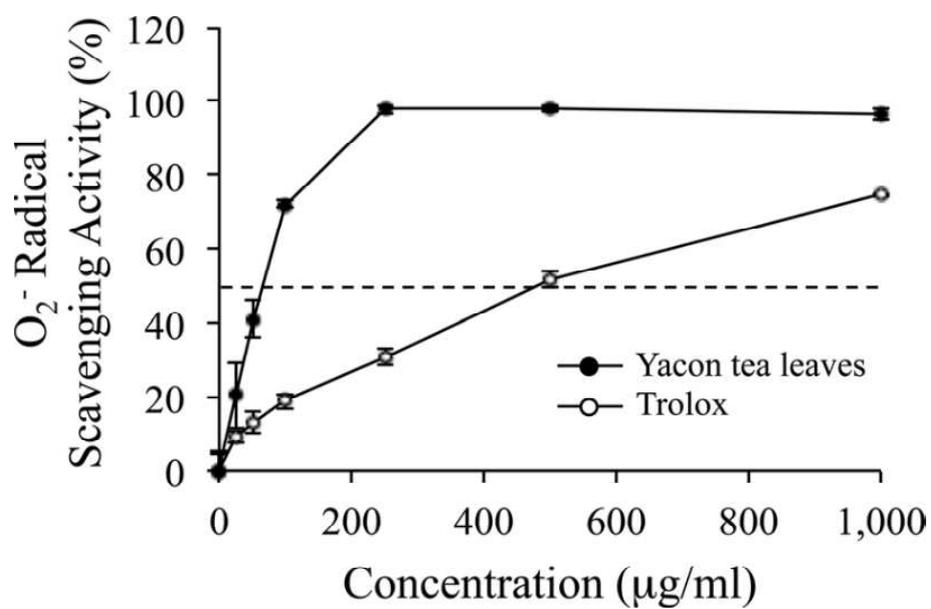


	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
● Hot-water extract	168±13 <sup>a</sup>
▲ Methanol extract	566±24 <sup>b</sup>
■ Ethanol extract	1,009±40 <sup>c</sup>
◆ Ethylacetate extract	593±26 <sup>b</sup>
○ Trolox	47.5±2.7 <sup>d</sup>

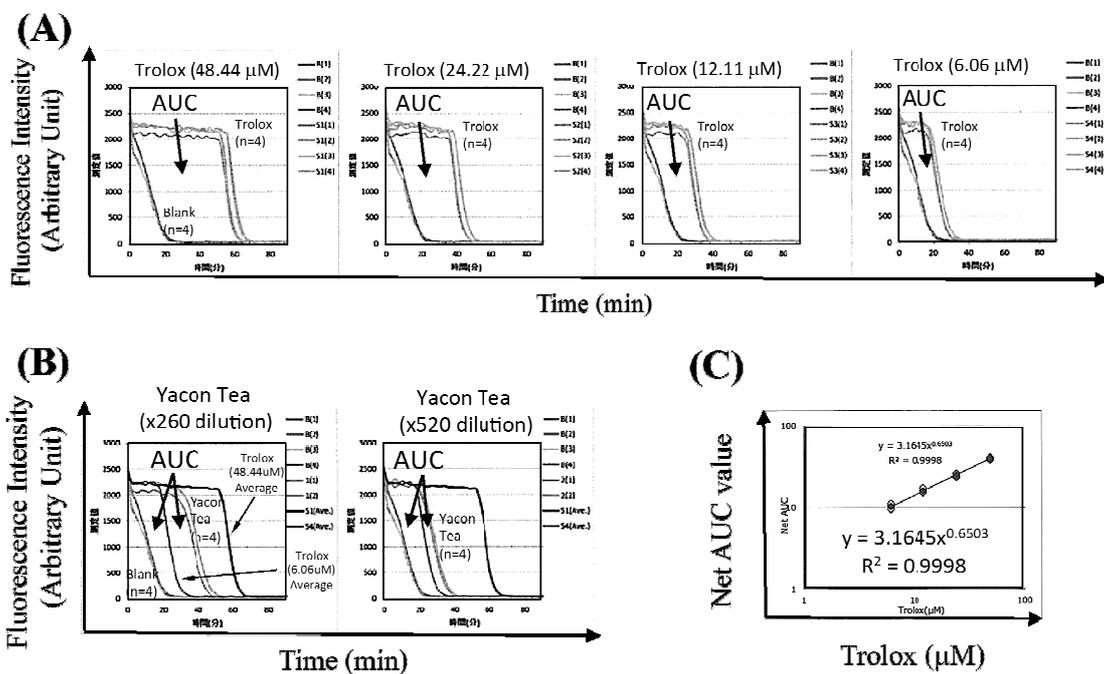
**Figure 1-1.** Antioxidative effect of four extracts from yacon tea leaves in reducing power assay. Data shown represent mean ± S.D. from four experiments. The final concentrations of each sample tested in this assay were 10, 25, 50, 100, 250, 500 or 1,000 µg/ml. An arbitrary unit is defined and included in the figure where the reducing power with 1.0 of absorbance is equal to 100% of reductivity. The effective concentration giving 0.5 of absorbance, or 50% reductivity, is assumed to be EC<sub>50</sub> (µg/ml) as described (Ferreira et al., 2007). The inset figure shows the whole region where the experimental data were obtained. EC<sub>50</sub> values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at  $P < 0.05$ . Trolox was used as the standard sample.



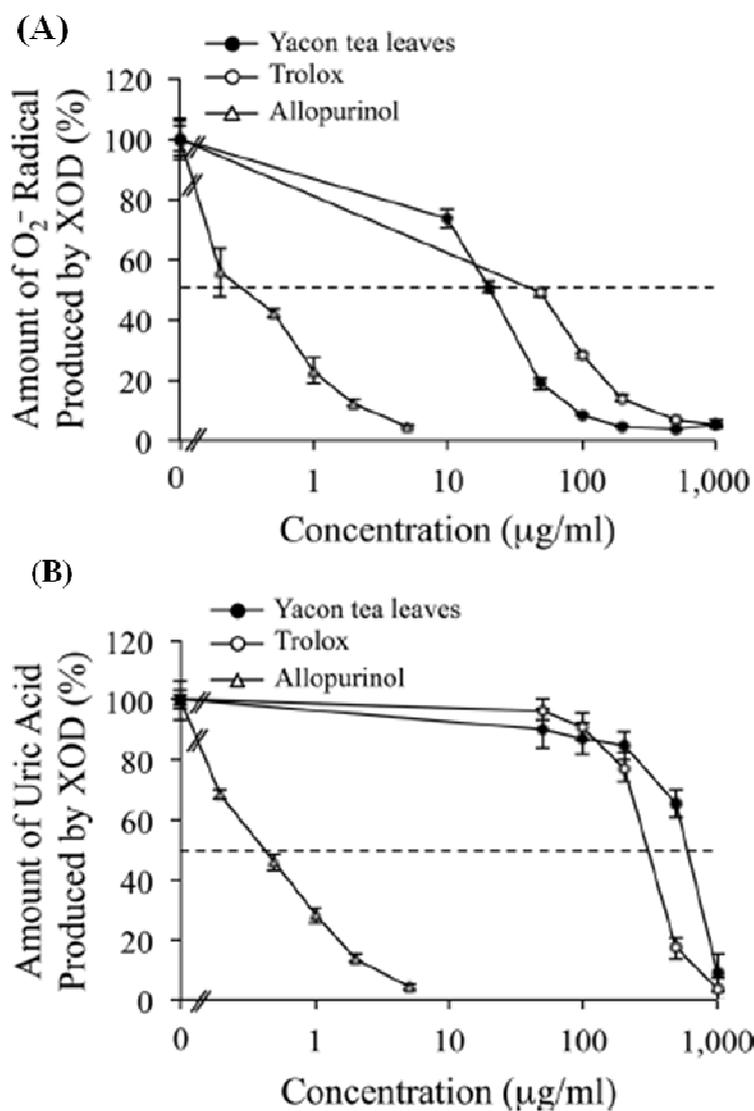
**Figure 1-2.** Antioxidative effect of hot-water extract from yacon tea leaves in DPPH radical (A), ABTS<sup>+</sup> radical (B), galvinoxyl radical (C), and CPZ<sup>+</sup> radical scavenging assays (D). Data shown represent mean  $\pm$  S.D. from four experiments. Trolox was used as the standard sample.



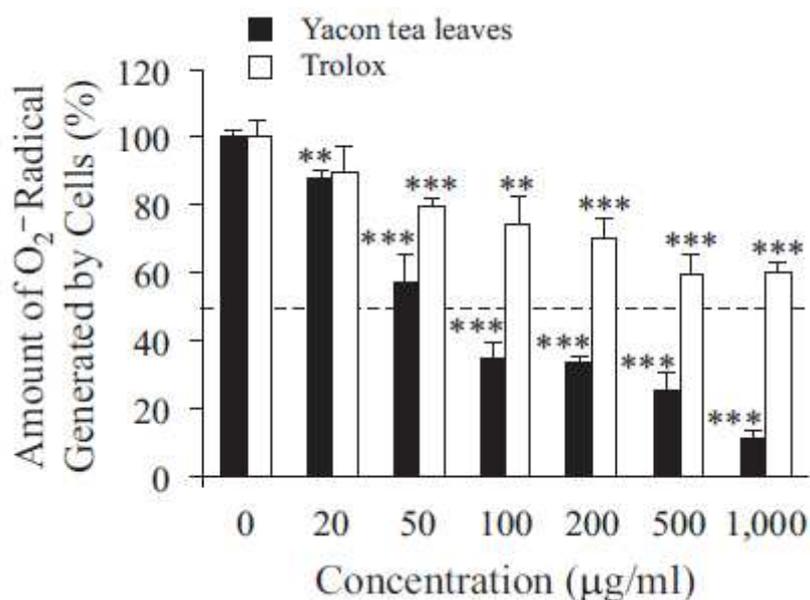
**Figure 1-3.** Effect of concentration of hot-water extract from yacon tea leaves in O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical scavenging assay in PMS-NADH-NBT system. Data shown represent mean ± S.D. from four experiments. Trolox was used as the standard sample.



**Figure 1-4.** Effect of concentration of trolox (A) and hot-water extract from yacon tea leaves (B) in ORAC assays. Figures indicate representative data from three experiments. In (C), Trolox was used as the standard sample for determining calibration curve.



**Figure 1-5.** Effect of concentration of hot-water extract from yacon tea leaves in XOD-mediated O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical (A) and uric acid generation assays (B). Data shown represent mean ± S.D. from four experiments. Trolox and allopurinol, respectively, were used as an antioxidant and an XOD-specific enzyme inhibitor. XOD; xanthine oxidase.



**Figure 1-6.** Effect of concentration of hot-water extract from yacon tea leaves and Trolox on the cellular  $O_2^-$  radical generation in PMA-stimulated granulocytic neutrophil cell model. HL-60 human leukemic cells were incubated in the presence of 1.25% DMSO for 6 days to undergo neutrophilic differentiation (see Materials and Methods section). The differentiated cells were preincubated with the test sample for 15 min at 37°C in a test tube and then exposed to PMA for another 15 min. The supernatants were collected and colorimetrically analyzed for determination of  $O_2^-$  radical level by the cytochrome *c* method. Data shown represent mean  $\pm$  S.D. from four experiments. Significant differences from individual untreated cells (control), \*\* $P < 0.01$  or \*\*\* $P < 0.001$ . PMA; phorbol 12-myristate 13-acetate.

**Table 1-1.** Yield of four different extracts from yacon tea leaves, and total polyphenol content in four extracts and yacon tea leaves by different extractions.

Extracts	Yield of extract (%)	Total polyphenol ( $\mu\text{g}$ CAE/mg of extract)*	Total polyphenol (mg CAE/100 g of tea leaves)*
Hot water	27.8	279 $\pm$ 11	7,756 $\pm$ 306 (0.0776)**
Methanol	6.60	80.0 $\pm$ 5.6	528 $\pm$ 37 (0.00528)
Ethanol	4.74	83.5 $\pm$ 8.8	396 $\pm$ 42 (0.00396)
Ethylacetate	3.91	70.5 $\pm$ 4.8	276 $\pm$ 19 (0.00276)

\*Data of total polyphenol shown represent mean  $\pm$  S.D. from four experiments. CAE, chlorogenic acid equivalent.

\*\*Data in parentheses indicate calculated amount of total polyphenol expressed as gram order of CAE per gram of tea leaves.

**Table 1-2.** Antioxidative effect of four extracts from yacon tea leaves in DPPH radical scavenging assay.

Extracts	DPPH Radical scavenging activity (%) at various concentrations*					
	0 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
Hot water	0.0 $\pm$ 1.5	75.3 $\pm$ 1.3	92.2 $\pm$ 0.2	93.0 $\pm$ 0.1	92.4 $\pm$ 0.1	<50 (28.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup> )**
Methanol	0.0 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 1.8	11.3 $\pm$ 3.2	26.4 $\pm$ 1.7	52.0 $\pm$ 1.2	480 $\pm$ 12 <sup>b</sup>
Ethanol	0.0 $\pm$ 0.4	10.9 $\pm$ 2.5	18.1 $\pm$ 2.4	43.8 $\pm$ 1.2	81.0 $\pm$ 2.3	292 $\pm$ 9 <sup>c</sup>
Ethylacetate	0.0 $\pm$ 0.4	10.8 $\pm$ 4.8	16.8 $\pm$ 1.1	40.7 $\pm$ 1.1	72.6 $\pm$ 2.8	323 $\pm$ 12 <sup>d</sup>
Trolox	0.0 $\pm$ 1.9	93.6 $\pm$ 0.1	93.4 $\pm$ 0.2	94.2 $\pm$ 0.1	94.5 $\pm$ 0.2	<50 (7.64 $\pm$ 0.06 <sup>e</sup> )

\*Data shown represent mean  $\pm$  S.D. from four experiments. The final concentrations of each sample tested were 50, 100, 250, or 500  $\mu\text{g/ml}$  in DPPH radical scavenging assay. EC<sub>50</sub> values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at  $P < 0.05$ . Trolox was used as the standard sample.

\*\*Data shown in parentheses indicate EC<sub>50</sub> values calculated from the data obtained in **Figure 1-2A**.

**Table 1-3.** EC<sub>50</sub> values and Trolox equivalent antioxidant capacity of hot-water extract from yacon tea leaves in five different free radical scavenging assays and ferric reducing power assay.

	EC <sub>50</sub> (µg/ml) of hot-water extract*	EC <sub>50</sub> (µg/ml) of Trolox*	TEAC (mg TE/mg of extract)**	TEAC (g TE/100 g of tea leaves)**
Free radicals				
DPPH radical	28.1±0.7 <sup>a</sup>	7.64±0.06 <sup>a</sup>	0.272	7.56
ABTS <sup>+</sup> radical	23.7±0.3 <sup>a</sup>	8.93±0.19 <sup>a</sup>	0.377	10.5
Galvinoxyl radical	3.06±0.15 <sup>b</sup>	0.571±0.014 <sup>a</sup>	0.187	5.20
CPZ <sup>+</sup> radical	474±13 <sup>c</sup>	3.16±0.16 <sup>a</sup>	0.00665	0.185
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical	64.5±5.8 <sup>d</sup>	482±23 <sup>b</sup>	7.47	208
Reducing power	168±13 <sup>c</sup>	47.5±2.7 <sup>c</sup>	0.283	7.87

\*Data shown represent mean ± S.D. from four experiments and values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at  $P < 0.05$ . Trolox was used as the standard sample. In four radical scavenging assays, EC<sub>50</sub> values indicate effective concentration at which the activity was 50%. In reducing power assay, EC<sub>50</sub> values indicate effective concentration at which the absorbance is 0.5, or the reductivity was 50% (see **Figure 1-1**).

\*\*Data shown represent mean value from four experiments. TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; TE, Trolox equivalent.

**Table 1-4.** IC<sub>50</sub> values and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical scavenging index of hot-water extract from yacon tea leaves, trolox, and allopurinol obtained in XOD-mediated O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical and uric acid generation assays

	IC <sub>50</sub> value (µg/ml)*		O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Radical scavenging index**
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical	Uric acid	Ratio of IC <sub>50</sub> values (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical / Uric acid)
Yacon tea leaves	20.7±1.4 <sup>a</sup>	639±50 <sup>a</sup>	0.0324
Trolox	48.5±0.9 <sup>b</sup>	336±7 <sup>b</sup>	0.144
Allopurinol	0.306±0.089 <sup>c</sup>	0.449±0.037 <sup>c</sup>	0.682

\*Data shown represent mean ± S.D. from four experiments and values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at  $P < 0.05$ . Trolox and allopurinol, respectively, were used as a standard antioxidant and an XOD-specific enzyme inhibitor. XOD; xanthine oxidase.

\*\*Data shown represent mean value from four experiments. O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radical scavenging index was defined as the ratio of IC<sub>50</sub> values (O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical / Uric acid).

## 第 2 章 熊本県産のハーブティーであるモリンガ葉茶と茎茶の特にスーパーオキシドアニオンラジカル産生系におけるユニークな抗酸化作用

### 第 1 節 緒言

モリンガ(*Moringa oleifera Lam*)はインド北西部のヒマラヤ山脈の南麓を原産とするワサビノキ科に属する草木の一種である。また、別名としてドラムスティックツリー、西洋ワサビノキ、ベンオイルツリー、ベンゾイルツリー、ワサビノキと日本語で呼称される。本植物は、インド、アフリカ、メキシコ、ハワイや東南アジアに加えて、日本の南部を含むアジア地域の多くの熱帯・亜熱帯諸国で広く生育している (Stohs and Hartman, 2015; Shih et al., 2011)。また、熊本県では、天草市を中心に栽培が行われており、健康食材として利用した加工食品の販売も行われている。本植物は、歴史的には炎症や感染症治療のための野菜やアーユルヴェーダのハーブまたは薬用植物として用いられてきたものの、飲食でも利用されている(Shih et al., 2011)。モリンガの葉部分は、ハーブティーとして加工され、健康食材として消費されている。最近の研究では、モリンガが抗高血糖、抗脂質異常症のための抗酸化物質、組織保護、鎮痛、抗潰瘍、抗高血圧、放射線防護および免疫調節作用を含む広範囲の生物活性を有し、*in vitro* および *in vivo* で薬効を有するとの報告がある (Stohs and Hartman, 2015)。地域に特化した食材や食品等は、地域限定であることより、これらの有する機能性研究や科学的エビデンスの研究もまた限定的である。生体での効果の是非を問う前に、酸化防止を目的としたフリーラジカルを消去する特性等について試験管レベルでの検証を行い、基礎研究や探索研究を推進することは重要である。

モリンガ葉の抗酸化作用については数多く報告されている(Stohs and Hartman, 2015; Leone et al., 2015)。そこでは、タイのモリンガ葉の熱水抽出物は、DPPH ラジカルにおける抗酸化作用および  $\text{Cu}^{2+}$  誘発低密度リポタンパク質の酸化物(酸化 LDL)に対する抑制作用を有することが *in vitro* で示されている。また、モリンガ抽出物は *in vitro* および *ex vivo* の両方において抗脂質過酸化作用を有している (Chumark et al., 2008)。しかしながらモリンガ葉のラジカル消去による抗酸化力は、おそらく使用される抽出溶媒や栽培地の気候などの違いのため、異なる結果を示す可能性がある(Shih et al., 2011; Siddhuraju and Becker, 2003)。インドのモリンガから異なる溶媒により調製された各画分は、*in vitro* での  $\beta$ -カロテン退色、

還元力、DPPH ラジカル消去、鉄イオンキレート化、脂質過酸化および DNA ニックングアッセイにおいてやはり異なる抗酸化作用を示す(Verma et al., 2009)。一方で、熊本県産のモリンガ茶がフリーラジカルに対してどの程度の抗酸化力を有し、 $O_2^-$ ラジカルに対して特徴的な抗酸化能力を示すかについては、未だ不明である。

Troloxは、 $\alpha$ -トコフェロールの水溶性類似化合物である(Scott et al., 1974)。過去数十年にわたり、ABTS<sup>+</sup>ラジカルによる電子遷移(ET)反応やペルオキシルラジカル発生剤であるAAPHによる水素原子遷移反応のORACなどの活性試験時に、Troloxはサンプルのフリーラジカル消去能力を調べるための標準抗酸化剤として、広く使用されてきた(Apak et al., 2007; Alam et al., 2013)。さらに、第二銅イオン還元抗酸化作用、ABTS<sup>+</sup>、第二鉄還元抗酸化力、フェリシアン化物、Fe(III)-フェナントロリンおよびCe(IV)といった各種の抗酸化活性測定において、Trolox等量(TE)として抗酸化力が決定付けられることも多い(Apak et al., 2007)。前章では、熊本県産のハーブティーとしてヤーコン茶がTroloxよりも強い抗酸化作用を有する事例について明らかにした(Sugahara et al., 2015)。

本章では、前章と同様に、熊本県産のモリンガ茶から調製した熱水抽出物を用いて、4種類の代表的な化成品ラジカル種である DPPH ラジカル(Blois, 1958)、ABTS<sup>+</sup>ラジカル(Thaipong et al., 2006)、galvinoxyl ラジカル(Shi et al., 2001)、CPZ<sup>+</sup>ラジカル(Nagaraja et al., 2014)および ROS の 1 つ  $O_2^-$  ラジカルを標的に、モリンガの葉茶と茎茶がこれらのフリーラジカルを消去する特性について調べることとした。さらに、活性成分に関する知見を得るために、HPLC による分析を試みることとした。

## 第 2 節 材料および方法

### 第 1 項 材料および試薬類

熊本県天草市で栽培ならびに市販されているモリンガの茶葉と茎茶(若茎部分を使用)の 2 種類の乾燥茶葉製品を、株式会社彩農園(熊本、日本)より 2013 年に入手した。Trolox、フェノールレッドナトリウム塩および horseradish peroxidase (HRP)は Sigma-Aldrich, Co. (St Louis, MO, USA)から購入した。ABTS、DPPH、Folin-Ciocalteu phenol reagent、NBT、NADH、PMS、potassium peroxodisulfate、trichloroacetic acid、xanthine およびバターミルク由来の 12.5 U/mL XOD はナカライテスク(京都、日本)から購入した。Galvinoxyl および CPZ は、東京化成工業(東京、日本)の製品を使用した。 $H_2O_2$  は三徳化成工業株式会社(宮城、日本)から購入した WST-1 は、同仁化学研究所(熊本、日本)から購入した。Cr (VI)、RPMI-1640

medium、HBSS、cytochrome *c* from horse heart prepared using trichloroacetic acid および PMA は、富士フイルム和光純薬株式会社(東京、日本)から購入した。HL-60 ヒト前骨髄球性白血病細胞(JCRB00085)は、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク(大阪、日本)から入手した。FBS は Biowest (Nuaille, France)から購入した。他の薬品類については、市販されているもののうち、最上級のグレードのものをを用いた。

## 第 2 項 モリンガの葉茶と茎茶の茶抽出物の調製

モリンガ葉茶および茎茶の抽出物は、既存の熱水抽出の方法を参考に一部を改変し、熱水抽出物として調製した(Sugahara et al., 2015; Nishimura et al., 2016)。ティーパックから乾燥モリンガ葉茶および茎茶約 2 g を MilliQ 水 100 ml に 95°C で 20 分間浸漬した。遠心分離および濾過後、モリンガ茶残渣をさらに 2 回連続して抽出した。熱水抽出物は、3 つの濾液の混合物より凍結乾燥後に得た。これを水に再溶解させ実験に使用することとした。

## 第 3 項 総ポリフェノール含量の測定

第 1 章第 2 節第 3 項と同様の方法で測定した。

## 第 4 項 総フラボノイド含量の測定

総フラボノイドの量は既法に基づいて測定した(Chang et al., 2006)。試験サンプル 25  $\mu$ l を水 125  $\mu$ l および 5%亜硝酸ナトリウム溶液 7.5  $\mu$ l と 6 分間混合し、次に 10%塩化アルミニウム溶液 15  $\mu$ l と室温で 5 分間混合した。その後、1 mM NaOH 50  $\mu$ l および MilliQ 水 27.5  $\mu$ l を混合物合計 250  $\mu$ l に添加し、連続的に振とうしながら 5-10 分間インキュベートした。この反応溶液について、マイクロプレートリーダーを用いて 510 nm での吸光度を測定した。(+) -Catechin を検量線の標準試料として使用した。サンプルや試薬に光学的な吸収があり、データに影響を及ぼす可能性がある場合には、各測定点でバックグラウンドを差し引くために並行した実験を行った。

## 第 5 項 DPPH ラジカル消去活性の測定

第 1 章第 2 節第 4 項と同様の方法で測定した。

## 第 6 項 ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定

第 1 章第 2 節第 5 項と同様の方法で測定した。

## 第 7 項 Galvinoxyl ラジカル消去活性の測定

第 1 章第 2 節第 6 項と同様の方法で測定した。

## 第 8 項 CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定

第 1 章第 2 節第 7 項と同様の方法で測定した。

## 第 9 項 PMS-NADH-NBT 法による O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性の測定

第 1 章第 2 節第 9 項と同様の方法で測定した。

## 第 10 項 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性の測定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 依存的な HRP を使用したフェノールレッドの酸化を原理とする既法に基づいて測定した(Wang et al., 2008; Fowler et al., 2003)。異なる濃度の試験試料 5  $\mu$ l、10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、50 mM グルコース 10  $\mu$ l、MilliQ 水 63  $\mu$ l および 250 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4) 20  $\mu$ l を含む混合液 100  $\mu$ l に 5 mM フェノールレッドおよび 0.01 mg/ml HRP 10  $\mu$ l を添加した。反応は、120  $\mu$ l の最終容量で、室温で 10 分間行った。0.1 M 水酸化ナトリウム 20  $\mu$ l で反応を停止させた。この反応溶液を、マイクロプレートリーダーを用いて 610 nm での吸光度を測定した。(+)Catechin を検量線の標準試料として使用した。

## 第 11 項 XOD により産生される O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルの測定

第 1 章第 2 節第 10 項と同様の方法で測定した。

## 第 12 項 細胞により産生される O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルの測定

第 1 章第 2 節第 11 項と同様の方法で測定した。

### 第 13 項 クロロゲン酸およびカフェ酸の HPLC 分析

既報をもとに (Liu et al., 2011)、グラジエントポンプ、カラムオーブン、マニュアルインジェクター、および UV/VIS 検出器(Jasco Co., Tokyo, USA)を備えた Jasco LC-2000 PLUS シリーズとともに YMC-Pack ODS-A カラム(4.6×150 mm)(ワイエムシィ、京都、日本)を用いて HPLC-UV 分析を行った。カラムを 30°C に維持し、検出波長は 350 nm、流速は 1.0 ml/min とした。移動相 A (0.25%酢酸水溶液、v/v)および移動相 B (MeOH)のグラジエント溶出を 85%A および 15%B で開始し、65%A および 35%B になるように 15 分間上昇させ、次いで 5 分間維持した。その後 50 分間かけて 100%B にまで上昇させ、これをさらに 10 分間維持した。次に、設定上 60.1 分で 10 分間、初期条件の 85%A および 15%B にて 10 分間リカバリした。Chromato-REC レコーダーおよび Chromato-PRO ソフトウェア(ランタムインスツルメンツ、京都、日本)を用いて、クロマトグラムデータを記録および分析した。最初の移動相(85%A および 15%B)中に 2 mg/ml または 10 mg/ml となるように予め調製しておいたモリンガ茶抽出物を 0.45 μM Millex-LH 濾過後に、20 μl ずつ HPLC に注入した。試験サンプル中のクロロゲン酸およびカフェ酸のピークの真正性は、それらの標準物質とのコクロマトグラフィーによって確認した。

### 第 14 項 統計処理

最初に各々の熱水抽出物を、モリンガ葉茶および茎茶からそれぞれ調製し、以下の実験に用いた。HPLC 分析の際には、新しいバッチの熱水抽出物を調製した。統計分析のために、データ値は、3 回または 4 回の実験から得られた平均±標準偏差として表した。データは、Excel 2011 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA)の統計アドオンソフトウェアプログラム(Statcel 4、オーエムエス出版、埼玉、日本)を用いて分析した。2つの群間の統計的差異は、スチューデントの *t* 検定を用いて  $P < 0.01$  または  $P < 0.001$  で有意であるとみなした。1 因子分散分析 (ANOVA)と共に、post-hoc Tukey-Kramer 検定を用いて多重比較検定を行い、 $P < 0.01$  で有意差ありとみなした。

### 第3節 結果および考察

本章では、熊本県産のモリンガの葉茶と茎茶のフリーラジカルに及ぼす影響について調べた。代表的な抗酸化剤である Trolox の抗酸化活性と比較することにより、特に  $O_2^-$  ラジカルに着目した試験管レベルでの検証と特徴付けを行うこととした。さらに、活性成分に関する知見を得るために、HPLC による分析を試みた。

#### 第1項 モリンガ葉茶と茎茶の抽出物の調製および総ポリフェノール含量と総フラボノイド含量

最初に、2.08 と 2.05 g の乾燥モリンガ葉茶および茎茶それぞれから、熱水抽出物 0.69 g (33.2%) および 0.44 g (21.5%) を得た (**Table 2-1**)。葉茶抽出物 1 mg 中の総ポリフェノール含量は 76.0  $\mu\text{g}$  であり、茎茶抽出物の 1.24 倍であった。このことより、乾燥葉茶 100 g から熱水抽出によりポリフェノール 2,524 mg を効率的に抽出することができると考えられる。これは茎茶の場合の 1.91 倍であることを認めた。茶抽出物 1 mg 中の総フラボノイド含量は 31.1  $\mu\text{g}$  であり、茎茶抽出物の 4.51 倍に相当した。したがって、100 g の乾燥葉茶から熱水抽出により 1,032 mg のフラボノイドを抽出することができ、これは茎茶の 6.97 倍であることを認めた。既報によると、10 種類の抽出物の情報を収載した総説において、モリンガ葉部のポリフェノール含量は、乾燥重量 100 g あたり 1,536-12,200 mg の範囲にあり、総フラボノイド含有量は、100 g あたり 96.1-8,660 mg の範囲にあるとされる (Leone et al., 2015)。本研究で得られた熊本県産のモリンガ茶中のこれらの測定値は、以前に報告されたものと比較可能な量であった。しかしながら、異なる抽出溶媒、生育環境、葉の種類(葉または若葉)、そして用いた検量線によっては値が異なってくる可能性もある (Leone et al., 2015; Siddhuraju and Becker, 2003)。我々の先行実験では、モリンガ茶葉の EtOH 抽出物が、熱水抽出物と比べて低い収量(葉茶の 2.39% および茎茶の 0.83%) および低い総ポリフェノール含量(乾燥葉の茶 100 g 中に 86.5 mg および乾燥茎茶 100 g 中に 26.2 mg) を示していた。

#### 第2項 モリンガ葉茶と茎茶のラジカル消去作用

前章と同様に抗酸化作用を定量的に評価するために、2種類の熊本県産のモリンガ茶抽出物を用いて DPPH ラジカルおよび3つの他の代表的なラジカルに対する消去活性測定を行なった。**Figure 2-1A** に示すように、両抽出物ともに濃度

依存的に DPPH ラジカル消去活性の上昇を示した。Table 2-2 に示すように、ここで葉茶抽出物より算出された EC<sub>50</sub> 値(73.7 µg/ml)は、茎茶抽出物(173 µg/ml)よりも 2.35 分の 1 であった。本実験条件において、Trolox の EC<sub>50</sub> 値は 6.01 µg/ml であった。特に、葉茶抽出物は茎茶よりも有意に強い消去能を示したが、Trolox よりは低い活性であった。以前の報告では、台湾のモリンガが、茎部からよりも葉部からの MeOH 抽出物においてより強い DPPH ラジカル消去作用を有することが示されている(Shih et al., 2011)。抗酸化物質によっては、混合物の組成および研究者間のプロトコルの違いに応じて様々な活性を示すケースがあるため、いくつかの抗酸化試験法を用いて比較研究を行うことが重要である(Takebayashi et al., 2006; Tai et al., 2011; Nagaoka et al., 2013)。次に我々は、2つのモリンガ茶抽出物のラジカル消去作用が他のフリーラジカルに対してどの程度の抗酸化作用を示すのか調べた。Figure 2-1B に示すように、ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定において葉茶抽出物は(EC<sub>50</sub>: 40.1 µg/ml)、茎茶抽出物(EC<sub>50</sub>: 55.3 µg/ml)よりも有意に強い活性を示した。このときの Trolox の EC<sub>50</sub> 値は 5.95 µg/ml であった。Galvinoxyl ラジカル消去活性測定においても、葉茶抽出物(EC<sub>50</sub>: 6.91 µg/ml)は茎茶抽出物(EC<sub>50</sub>: 19.4 µg/ml)よりも強い活性を示した(Figure 2-1C)。このときの Trolox の EC<sub>50</sub> 値は 0.573 µg/ml であった。これら 3 種類の活性試験のなかで、galvinoxyl ラジカル消去活性はより低い EC<sub>50</sub> 値を示したため、これは比較的感受性の高いフリーラジカルモデルであると考えられた。CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定では、葉茶(EC<sub>50</sub>: 701 µg/ml)および茎茶抽出液(EC<sub>50</sub>: 371 µg/ml)ともに濃度依存性的かつ緩やかな活性の上昇が認められた(Figure 2-1D)。このときの Trolox の EC<sub>50</sub> 値は 3.97 µg/ml であった。強酸性環境下で CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定が実施されたため、葉の茶抽出物の抗酸化作用は酸性条件によって減衰することが示唆される。注目すべきことに、CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性を除く 3 種類のラジカル消去活性において、葉茶抽出物は茎茶抽出物よりも強い消去活性を示し、有意差が認められた(Table 2-2)。現時点では、茎茶が葉茶よりも強い CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性を示した理由については不明であるものの、食材由来のポリフェノールによっては pH による影響を受ける場合もあり(小嶋ら, 2006)、熱安定性や pH 安定性などとともに抗酸化活性や活性成分の特性を調べていくことも重要であることと考えられる。したがって、複数のフリーラジカル消去活性測定法によって食材の潜在的な抗酸化特性を明確にすることは重要であると考えられた。

次に、これらの茶抽出物が代表的な ROS として知られる O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルおよび H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対して抗酸化作用を有するか調べた。Figure 2-2A に示すように、葉茶抽出物は濃度依存的に O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性の上昇を示し、葉茶抽出物(EC<sub>50</sub>: 246 µg/ml)は茎茶抽出物(EC<sub>50</sub>: 501 µg/ml)よりも 2.04 倍の強い活性を有していた。このとき Trolox の EC<sub>50</sub> 値は、これら 2つの抽出物の値よりも有意に高いものであ

った(935  $\mu\text{g/ml}$ ) (**Table 2-2**)。一方で、茎茶抽出物( $\text{EC}_{50}$ : 648  $\mu\text{g/ml}$ )は  $\text{H}_2\text{O}_2$  消去活性測定において茎茶抽出物( $\text{EC}_{50}$ : >1,000  $\mu\text{g/ml}$ 、最大 25.3%)よりも高い活性を示した(**Figure 2-2B**)。このときの Trolox の  $\text{EC}_{50}$  値は 65.2  $\mu\text{g/ml}$  であった。以上より、DPPH、ABTS<sup>+</sup>、galvinoxyl および CPZ<sup>+</sup>ラジカルモデルで得られた結果とは対照的に、 $\text{O}_2^-$ ラジカル消去活性測定でのみ、モリンガの葉茶および茎茶の抽出物は、それぞれ Trolox よりも 3.80 倍および 1.87 倍の強い抗酸化力を示した。Trolox は、試験サンプルのフリーラジカル消去活性を調べるための標準となる抗酸化剤として広く使用されている(Apak et al., 2007; Alam et al., 2013)。そのため、モリンガ茶は Trolox よりも  $\text{O}_2^-$ ラジカルを介した酸化防止に優れていることが見出された。

上記の6つの抗酸化活性試験(**Figures 2-1**および**2-2**)において、モリンガ茶抽出物およびTroloxより算出された $\text{EC}_{50}$ 値を**Table 2-2**にまとめた。これらの茶抽出物の抗酸化作用は、試験試料とTroloxの $\text{EC}_{50}$ 値の比に基づくTEAC値として定義することができる。DPPHラジカル消去活性において、葉茶および茎茶の抽出物はそれぞれ、0.0815(即ち8.15%)および0.0347倍(即ち3.47%)程度のTrolox等量の抗酸化活性を有していた。抽出収率を考慮すると(**Table 2-1**)、100 gの乾燥葉茶および茎茶より、それぞれ2.71および0.746 gのTEAC値が算出された。他の消去活性測定では、CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性を除いて、モリンガ葉茶のTEAC値は茎茶の値よりもおおよそ高い傾向にあった。 $\text{O}_2^-$ ラジカル消去活性測定における、葉茶抽出物1 mg当たりのTEAC値(3.80 mg TE)は茎茶(1.87 mg TE)よりも2.03倍高かったものの、葉の乾燥重量100 gあたりの葉茶は126 g TEと、茎茶(40.2 g TE)よりも3.13倍高いことが判明した。興味深いことに、 $\text{O}_2^-$ ラジカル消去活性測定では、より高いユニークなTEAC値が認められた。したがって、複数の方法で食材の抗酸化作用を評価することは抗酸化力の特性を明らかにする上でも重要であり(Takebayashi et al., 2006; Tai et al., 2011; Nagaoka et al., 2013)、Troloxを標準物質としたTEAC値は、食材の抗酸化性を特徴付けるための有益な指標となることが示唆された。本研究で用いた複数のフリーラジカル消去活性測定法は、標的となるモリンガ茶のラジカル消去における特性を見出すのに有効であった。

### 第3項 モリンガ葉茶と茎茶の酵素的 $\text{O}_2^-$ ラジカル産生に及ぼす抑制作用

次に XOD 酵素法を用いて、モリンガの茶抽出物が  $\text{O}_2^-$ ラジカルの生成を阻害するかどうかを調べた。**Figure 2-3A** に示すように、両方の茶抽出物は濃度依存的に  $\text{O}_2^-$ ラジカルのレベルを抑制し、200  $\mu\text{g/ml}$  付近で最低レベルに達した。**Table 2-3** に示すように、葉茶および茎茶抽出物の  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ 28.8 および 71.4  $\mu\text{g/ml}$  であった。一方、代表的な抗酸化剤および XOD 特異的酵素阻害剤として

それぞれ使用された Trolox および allopurinol では、それぞれ 33.9  $\mu\text{g/ml}$  および 0.905  $\mu\text{g/ml}$  の  $\text{IC}_{50}$  値が得られた。したがって、葉茶抽出物は、統計学的な有意差をもって茎茶抽出物よりも 2.48 倍強い  $\text{O}_2^-$  ラジカル抑制能を有することが判明した。モリンガ茶抽出物が XOD 酵素活性を直接阻害している可能性もあるため、次に、これらの茶抽出物の XOD 活性への影響を調べた。Figure 2-3B に示すように、両抽出物および Trolox は 0-200  $\mu\text{g/ml}$  濃度範囲では、実質的に XOD 阻害を示しておらず、約 80%-100%の活性が残存していた。高濃度で試験時に認められた葉茶および茎茶抽出物の  $\text{IC}_{50}$  値はそれぞれ 1,744 および 1,478  $\mu\text{g/ml}$  であり、次いで Trolox では 331  $\mu\text{g/ml}$  の  $\text{IC}_{50}$  値が得られた。このとき、allopurinol は 1.03  $\mu\text{g/ml}$  の  $\text{IC}_{50}$  値を示した。

これらの XOD を介した測定で得られた  $\text{IC}_{50}$  値を Table 2-3 にまとめた。両測定結果からの  $\text{IC}_{50}$  値の比率は、抑制作用の様式を示す指標として定義される。例えば、比率の低値は、サンプルが強い  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去作用を有することを意味し、一方で 1.00 に近い値は、酵素阻害を律速としてサンプルがラジカル消去作用を十分に発揮していないことを意味する。Trolox の 0.102 の値と比較して、ここで得られたモリンガの葉茶および茎茶の抽出物は、それぞれ 0.0165 および 0.0483 と低値を示し、これらの  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去能が優位であることを示している。

#### 第 4 項 モリンガの葉茶と茎茶の細胞の $\text{O}_2^-$ ラジカル産生に及ぼす抑制作用

ここでは、分化した HL-60 ヒト顆粒球好中球様細胞を用いて、モリンガ茶抽出物が細胞の  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生に影響を及ぼすかどうか調べた。ヒト顆粒球好中球様細胞をモリンガ茶の熱水抽出物の存在下でインキュベートした。Figure 2-4 に示すように、PMA により活性化した細胞の  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生に対して両抽出物による濃度依存的な抑制効果が認められた。葉茶および茎茶抽出物の  $\text{IC}_{50}$  値はそれぞれ 160 および 184  $\mu\text{g/ml}$  であった。特に、 $\text{O}_2^-$  ラジカル産生に対する抽出物の抑制作用は、Trolox よりも効果的であった。これらの抽出物または Trolox を異なる濃度で細胞とともにインキュベートした場合、細胞生存率の有意な低下は観察されなかった(figure not shown)。本研究で用いた PMA 活性化型ヒト顆粒球様細胞モデルにおいて、モリンガの葉茶および茎茶の抽出物が NAD(P)H オキシダーゼや XOD などのオキシダーゼの発現や活性化を阻害するのか、直接  $\text{O}_2^-$  ラジカルの生成を抑制しているのかは未だ明らかになっていない。顆粒球がサイトカインまたは刺激剤によって活性化されると、フリーラジカルの 1 つ  $\text{O}_2^-$  ラジカルが産生され、病原菌や癌細胞に酸化ダメージを与える免疫機能の 1 つとしての役割を担う(Utsumi et al., 1992; Shintani, 2013)。一方、過度の酸化ストレス

や過度の免疫応答などにより酸化バランスが破綻し酸化側に傾く場合には、フリーラジカルは自らを攻撃することで細胞や組織の機能不全や炎症など増悪の方向へと導くことがある(Abraham, 2003; Mitra and Abraham, 2006; 吉川, 2011)。本研究ではモリンガ茶抽出物が細胞毒性を伴わずに $O_2^-$ ラジカル量を減少させることを見出した。しかしながら、生体に及ぼす影響の面では未解明の部分も多く、その作用の有益性や予期せぬ副作用などについては、結果の解釈時に一定の注意が必要であると考えられる。

## 第5項 モリンガの葉茶と茎茶中の抗酸化成分

本研究で用いた熊本県産のモリンガ茶に存在するどのような成分が特に $O_2^-$ ラジカルの消去や抑制に貢献しているかは、未だ不明のままである。モリンガの葉の部位には、ビタミンやポリフェノール、フラボノイド、フェノール酸、アルカロイド、タンニン、サポニン、シュウ酸、フィチン酸などの様々な成分や栄養素が含まれている(Leone et al., 2015)。活性成分について知見を得るために、モリンガ葉に認められている8つの入手可能なフェノール成分を標準物質として用意し、DPPHおよび $O_2^-$ ラジカル消去活性を測定することによりTEAC値を得ることとした。ここでは、総説にて報告されている3種類のフェノール酸であるカフェ酸、クロロゲン酸、没食子酸、5種類のフラボノイドであるエピカテキン、ケンフェロール、ミリセチン、ケルセチン、ルチンを選択して実験に使用した(Leone et al., 2015)。乾燥重量当たりでモリンガ中に報告されたこれらの含量をTable 2-4にまとめた。化合物レベルでDPPHラジカル消去活性測定を行った結果、没食子酸、ミリセチンおよびケルセチンは、2.00を超えるTEAC値を示した(Table 2-4)。エピカテキンおよびルチンもまた1.00を超えるTEAC値を示した。これらのデータは、それらの抗酸化力がTroloxの能力よりも優れていることを意味している。これら化合物を用いて $O_2^-$ ラジカル消去活性を測定した結果、85.3のTEAC値を有するミリセチンが最も高い抗酸化力を示した。没食子酸、ケルセチンおよびルチンもまた20.0以上のTEAC値を示し、8種類すべての化学物質のTEAC値で1.00以上の値が認められた。モリンガ茶の抽出物で認められたように、Troloxと比較して弱いDPPHラジカル消去能と $O_2^-$ ラジカルに特異的な強い消去能を有する成分についてこれら8つの中より検索した結果、カフェ酸とクロロゲン酸のみが当該のフェノール性化学物質である可能性がある。しかしながら、既報の含量を鑑みてもこれらの2つのフェノール酸はモリンガ葉中にはそれほど多くは含まれていないかもしれない(Leone et al., 2015)。

次に、カフェ酸およびクロロゲン酸が本研究で用いたモリンガの葉茶および

茎茶の熱水抽出物中にどの程度含まれるのかを HPLC により調べた。Figure 2-5A は 40  $\mu\text{g}$  の葉茶抽出物を注入した際の HPLC クロマトグラムを示し、Figure 2-5B および Figure 2-5C は 40  $\mu\text{g}$  および 200  $\mu\text{g}$  の茎茶抽出物を注入したときのクロマトグラムである。モリンガ茶中のそれら化合物の真正性は標準物質とのコクロマトグラフィーにより確認した(data not shown)。クロロゲン酸のピーク(1)は 40  $\mu\text{g}$  で注入された両方の抽出物サンプルで検出されたものの(Figure 2-5A および Figure 2-5B)、カフェ酸のピーク(2)は 40  $\mu\text{g}$  の葉茶抽出物(Figure 2-5A)および 200  $\mu\text{g}$  の茎茶抽出物(Figure 2-5C)で分析時に検出された。拡大挿入図に示すように、クロロゲン酸とカフェ酸の両方のピークを検出した。

Table 2-5 に示すように、茶葉中のクロロゲン酸およびカフェ酸の量は、乾燥茶葉重量 100 g 当たり 14.3 および 0.473 mg であった。熊本県産のモリンガ葉茶中より測定されたこれら 2 つのフェノール酸の量は、過去に報告された他国のモリンガ葉部と比較しても決して高い値ではなかったことより(葉茶乾燥重量 1 g 当たりクロロゲン酸は 0.143 mg、カフェ酸は 0.00473 mg に相当)、これらは、主要な成分とまでは言えないかもしれない。本研究で使用したモリンガ葉茶において認められたクロロゲン酸量は、茎茶よりも有意に高く、いずれにおいても同クロロゲン酸含量はカフェ酸よりもはるかに高値を示した。したがって、モリンガ葉茶で認められた茎茶よりも高い  $\text{O}_2$  ラジカル消去活性や抗酸化力は、部分的にはあるものの、クロロゲン酸に起因する可能性も十分に考えられる。モリンガは多くの熱帯および亜熱帯の国々で広く分布し(Stohs and Hartman, 2015; Shih et al., 2011)、本植物の化学組成は環境や気候および葉の部位等のほか(Leone et al., 2015; Siddhuraju and Becker, 2003)、品種系統に依存して、変わりうる可能性がある(Nouman et al., 2016)。近年、熊本県天草地域で栽培された熊本県産のモリンガの葉から、既知のカフェオイルキナ酸およびフラボノイド誘導体とともに、新規のカフェオイルキナ酸誘導体が同定されている(Kashiwada et al., 2012)。また、モリンガの果実および種子部位より、硫酸部分を有するベンジルグルコシノレート類が本植物に特徴的な化合物として同定されており、ガン細胞の抗増殖作用が見出されている(Dayal et al., 2013)。本研究で見出されたモリンガハーブティーのユニークな抗酸化作用もまた、地域性をもって生育する本植物の特徴的な化学成分組成に関連付けられるかもしれない。モリンガの葉や茎に存在するこれらの抗酸化成分が製茶加工時にも安定して存在し、そして *in vivo* で生物活性を発揮するかについての研究はさらなる調査を必要とする。

## 第 6 項 モリंगा茶とヤーコン茶および緑茶の総ポリフェノール含量と抗酸化力の比較

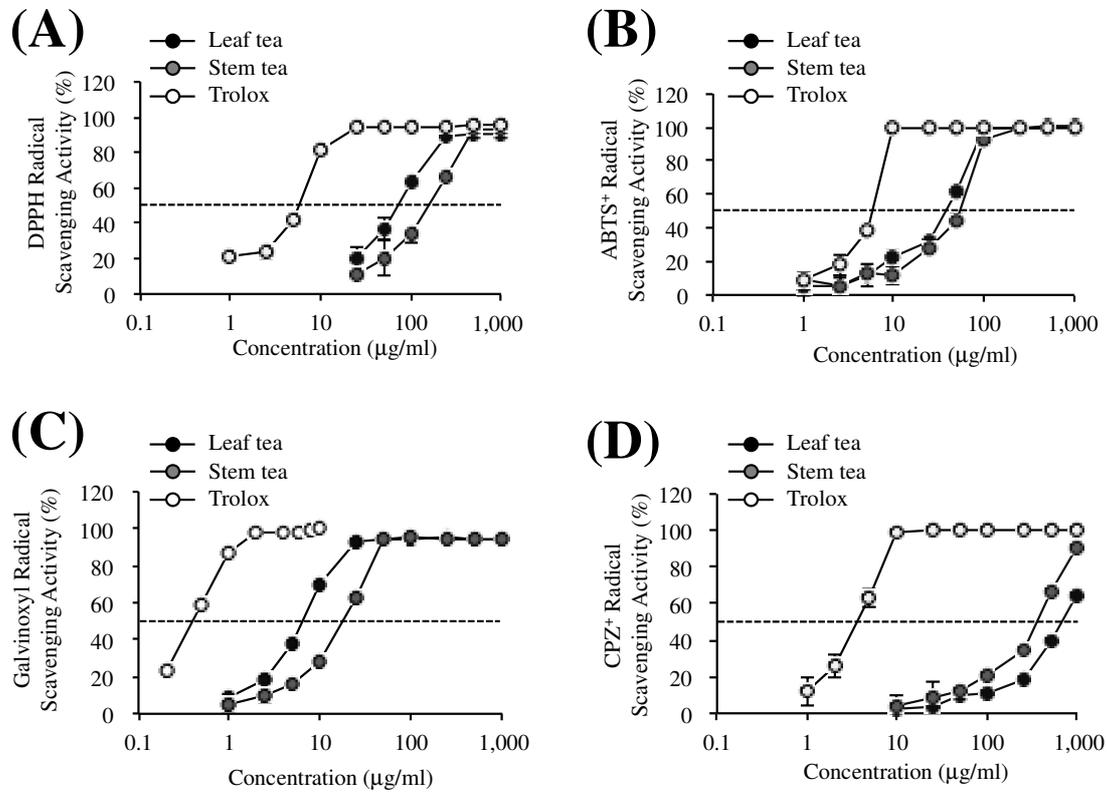
市販の 2 種類の緑茶 (A と B) を用いて追試を行い、本研究で用いたモリंगा茶と前章で用いたヤーコン茶より得た熱水抽出物とともに、総ポリフェノール含量と DPPH ラジカル消去活性における TEAC 値の比較を試行的に行なった。その結果、緑茶 A および緑茶 B からの抽出物 1 mg 当たり 526  $\mu\text{g}$  および 539  $\mu\text{g}$  の総ポリフェノール含量が認められた (Table 2-6)。先にヤーコン茶で得られた 279  $\mu\text{g}$  と比較すると、モリंगाの葉茶および茎茶の総ポリフェノール含量 76.0  $\mu\text{g}$  および 61.5  $\mu\text{g}$  は低いものであった。次に TEAC 値を基に抗酸化力を測定した結果、緑茶 A および緑茶 B からの抽出物 1 mg 当たり 4.77  $\mu\text{mol TE}$  および 5.08  $\mu\text{mol TE}$  の抗酸化力が認められた。先にヤーコン茶で得られた抽出物 1 mg 当たりの TEAC 値 1.09  $\mu\text{mol TE}$  と比較すると、モリंगाの葉茶および茎茶の TEAC 値それぞれ 0.326  $\mu\text{mol TE}$  および 0.139  $\mu\text{mol TE}$  はここでも低いものであった。地域性のあるモリंगा茶やヤーコン茶の抗酸化活性や各種機能性の特徴付けを行なっていくためにも、国内で常飲される緑茶などと比較しながら、より詳細な成分含量や生物活性を調べる必要がある。さらに乾燥重量あたりで比較していくことも重要であり、どの程度の効果が認められるのかを明らかにしていく必要がある。

### 第 4 節 小括

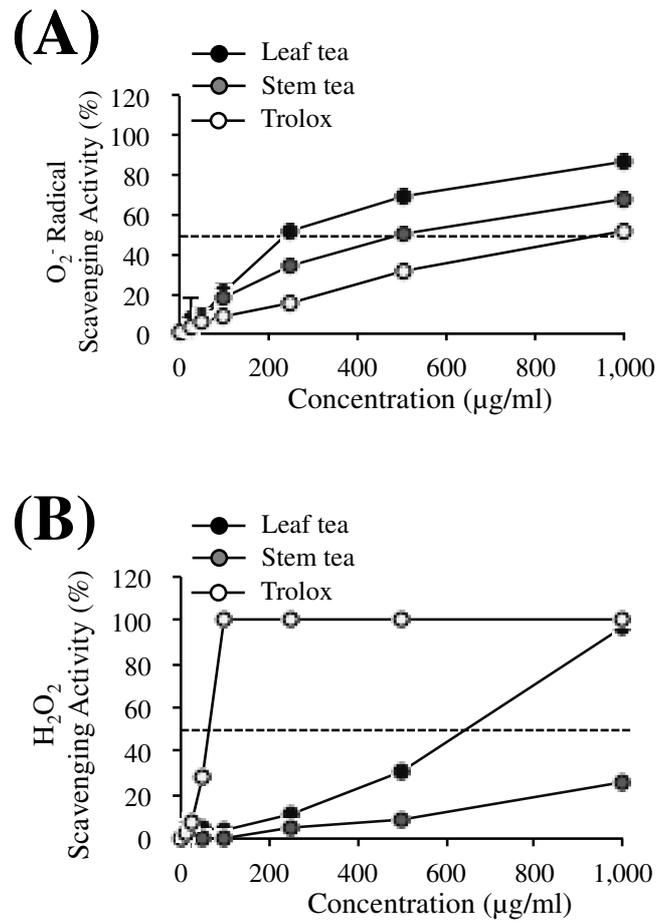
本章では、熊本県産のモリंगाの葉茶および茎茶のラジカル消去作用、特に異なる  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生系におけるユニークな抗酸化作用について試験管レベルで調べた。モリंगाの両熱水抽出物は、DPPH、ABTS<sup>+</sup>、CPZ<sup>+</sup> および galvinoxyl の 4 種類の化成品ラジカル種に対して抗酸化活性を示すものの、Trolox よりも低いものであること、これに対し、PMS-NADH-NBT 法および XOD 法においては Trolox よりも強い  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去作用を示すことを見出した。前章と同様に活性型ヒト顆粒球好中球様細胞の  $\text{O}_2^-$  ラジカル産生に及ぼすモリंगा茶熱水抽出物の影響を調べ、同じく低下させることを認めた。活性成分に関する絞り込みを行うため、モリंगा葉部中の 8 つの既知フェノール性化合物について Trolox の活性と比した際の抗酸化活性の特徴付けと HPLC による成分分析を行った。そこでは、主要な成分ではないものの少なくともモリंगा葉茶中のカフェ酸およびクロロゲン酸が、Trolox よりも弱い DPPH ラジカル消去活性とともに、Trolox よりも強い  $\text{O}_2^-$  ラジカル消去活性を有する特徴的な抗酸化物質である可能性を認めている。しかしながら、地域性のある健康志向食品を用いた本研究の結果は、

あくまでもフリーラジカルに対する抗酸化活性の特徴を試験管レベルで調べたものである。生体レベルでこれらのような効果を実証できるかどうかについては、今後これらハーブティー中の活抗酸化成分が実際に生体内にどの程度吸収され、どの程度抗酸化作用が発揮されるのかを調べていく必要がある。

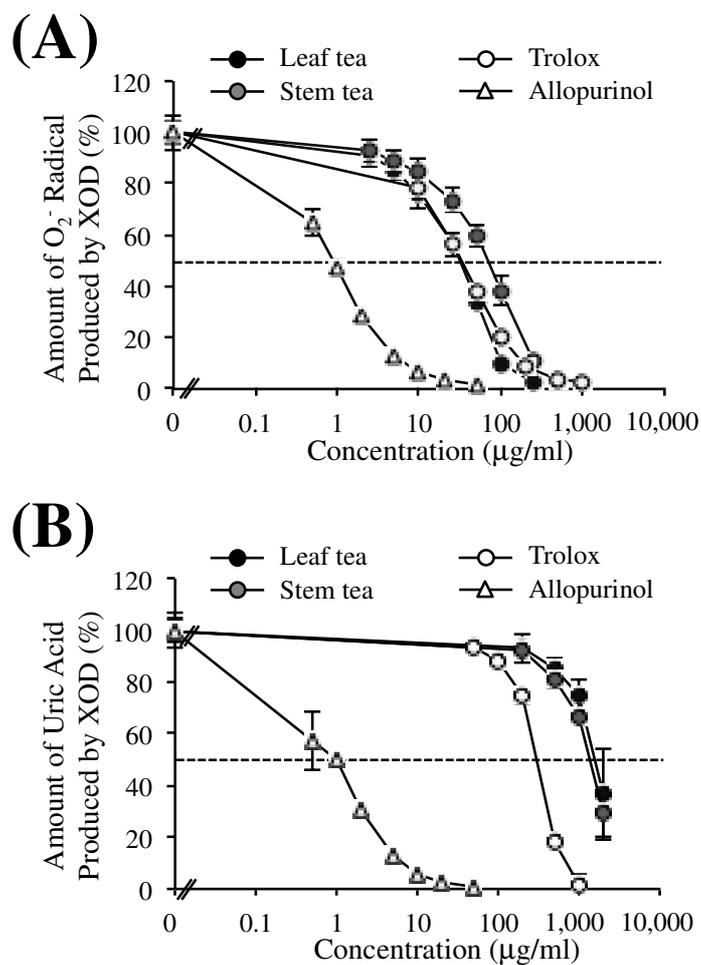
## 第5節 添付図表等



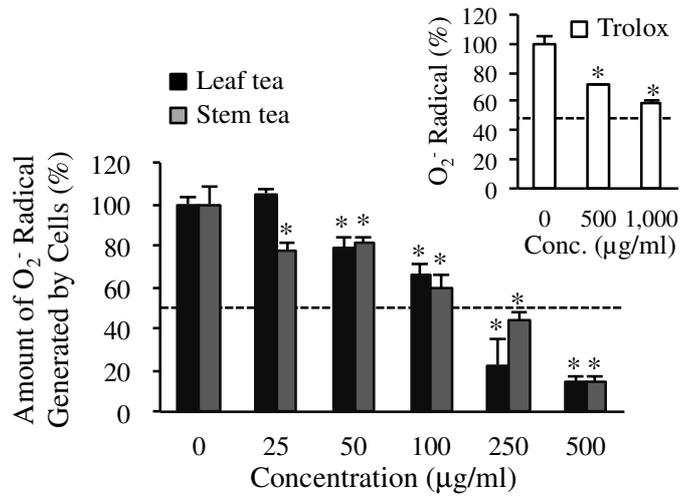
**Figure 2-1.** Antioxidative effects of the hot-water extracts from moringa leaf and stem teas in DPPH radical (A), ABTS<sup>+</sup> radical (B), galvinoxyl radical (C), and CPZ<sup>+</sup> radical scavenging assays (D). Data shown represent the mean  $\pm$  S.D. from four experiments. Trolox was used as a control standard.



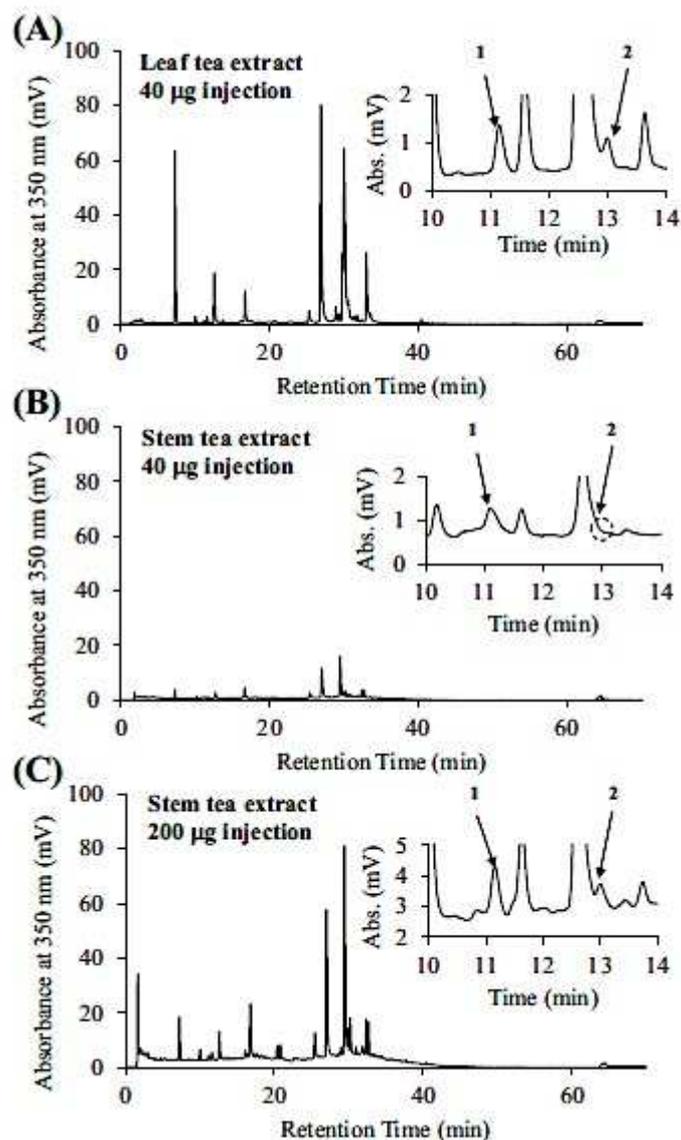
**Figure 2-2.** Antioxidative effects of hot-water extracts from moringa leaf and stem teas in O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical (A) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging assays (B). Data shown represent the mean ± S.D. from four experiments. Trolox was used as a control standard.



**Figure 2-3.** Effect of hot-water extracts from moringa leaf and stem teas in XOD-mediated O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical (A) and uric acid generation assays (B). Data shown represent the mean ± S.D. from four experiments. Trolox and allopurinol were used as a control antioxidant and an XOD-specific enzyme inhibitor, respectively. XOD; xanthine oxidase.



**Figure 2-4.** Effect of hot-water extracts from moringa leaf and stem teas and Trolox on cellular  $O_2^-$  radical generation in PMA-stimulated granulocytic neutrophil cell model. Data shown represent the mean  $\pm$  S.D. from four experiments. The inset figure indicates the data for Trolox used as a control standard. Significant difference from individual untreated cells (control) was considered at  $*P < 0.001$ . PMA; phorbol 12-myristate 13-acetate.



**Figure 2-5.** HPLC chromatograms of hot-water extracts from moringa leaf and stem teas. For HPLC analysis, another batch of individual extract was prepared from moringa leaf tea and stem tea, respectively. Leaf tea extract with 40 µg (A) and stem tea extract with 40 µg (B) or 200 µg (C) was applied to HPLC. Detection was carried out at 350 nm. The retention times for chlorogenic acid (1) and caffeic acid (2) were 11.2 and 13.0 min, respectively. The inset figure shows the enlarged region. Figure represents data from three repetitions.

**Table 2-1.** Yield of hot-water extracts from moringa leaf and stem teas, and amounts of total polyphenol and flavonoid.

	Yield of extract (%)	Polyphenol (CAE)		Flavonoid (CE)	
		( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of extract)	( $\text{mg}/100$ g of tea DW)	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of extract)	( $\text{mg}/100$ g of tea DW)
Leaf tea	33.2	76.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	2,524 $\pm$ 80 <sup>a</sup>	31.1 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	1,032 $\pm$ 135 <sup>a</sup>
Stem tea	21.5	61.5 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	1,322 $\pm$ 38 <sup>b</sup>	6.89 $\pm$ 1.54 <sup>b</sup>	148 $\pm$ 33 <sup>b</sup>

Data shown represent mean  $\pm$  S.D. from three experiments. Values not sharing a common superscript letter between leaf tea and stem tea are considered significantly different at  $P < 0.01$  using Student's *t*-test. CAE; chlorogenic acid equivalent, CE; (+)-catechin equivalent, DW; dried weight.

**Table 2-2.** EC<sub>50</sub> values and Trolox equivalent antioxidant capacity of hot-water extracts from moringa leaf and stem teas in five different free radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging assays.

Antioxidant assays	EC <sub>50</sub> (µg/ml)		Trolox	TEAC (mg TE/mg of extract)		TEAC (g TE/100 g DW)	
	Leaf tea	Stem tea		Leaf tea	Stem tea	Leaf tea	Stem tea
DPPH radical	73.7±6.9 <sup>a</sup>	173±15 <sup>b</sup>	6.01±0.21 <sup>c</sup>	0.0815	0.0347	2.71	0.746
ABTS <sup>+</sup> radical	40.1±2.2 <sup>a</sup>	55.3±4.2 <sup>b</sup>	5.95±0.24 <sup>c</sup>	0.148	0.108	4.91	2.32
Galvinoxyl radical	6.91±0.20 <sup>a</sup>	19.4±1.4 <sup>b</sup>	0.573±0.022 <sup>c</sup>	0.0829	0.0295	2.75	0.634
CPZ <sup>+</sup> radical	701±40 <sup>a</sup>	371±7 <sup>b</sup>	3.97±0.31 <sup>c</sup>	0.00566	0.0107	0.188	0.230
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical	246±22 <sup>a</sup>	501±37 <sup>b</sup>	935±40 <sup>c</sup>	3.80	1.87	126	40.2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	648±14 <sup>a</sup>	>1,000	65.2±0.7 <sup>b</sup>	0.101	<0.0652	3.35	<1.40

Data shown represent mean ± S.D. or mean values from four experiments. EC<sub>50</sub> values not sharing a common superscript letter among leaf tea, stem tea and Trolox are considered significantly different at  $P < 0.01$  using Tukey-Kramer test with following ANOVA. Trolox was used as a control standard. Data shown represent mean value from four experiments. TEAC; Trolox equivalent antioxidant capacity, TE; Trolox equivalent, DW; dried weight.

**Table 2-3.** IC<sub>50</sub> values and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical scavenging index of hot-water extracts from moringa leaf and stem teas, Trolox, and allopurinol obtained in XOD-mediated O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical and uric acid generation assays.

	IC <sub>50</sub> value (µg/ml)		O <sub>2</sub> <sup>-</sup> Radical scavenging index
	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical	Uric acid	Ratio of IC <sub>50</sub> values (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical / Uric acid)
Leaf tea	28.8±4.6 <sup>a</sup>	1,744±305 <sup>a</sup>	0.0165
Stem tea	71.4±9.8 <sup>b</sup>	1,478±147 <sup>a</sup>	0.0483
Trolox	33.9±3.6 <sup>a</sup>	331±7 <sup>b</sup>	0.102
Allopurinol	0.905±0.107 <sup>c</sup>	1.03±0.10 <sup>b</sup>	0.879

Data shown represent mean ± S.D. from four experiments. IC<sub>50</sub> values not sharing a common superscript letter among leaf tea, stem tea, Trolox and allopurinol are considered significantly different at  $P < 0.01$  using Tukey-Kramer test with following ANOVA. Trolox and allopurinol were used as a control antioxidant and an XOD-specific enzyme inhibitor, respectively. O<sub>2</sub><sup>-</sup> Radical scavenging index was defined as the ratio of IC<sub>50</sub> values (O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical / Uric acid). XOD; xanthine oxidase.

**Table 2-4.** List of representative eight phenolic constituents of moringa leaves and their TEAC values determined in DPPH and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical scavenging assays.

Chemical name	Reported content (mg/g DW)	TEAC (mmol TE/mmol sample)	
		DPPH radical	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical
Phenolic acids			
Caffeic acid	ND, 0.409 to 0.536	0.732±0.023 <sup>a</sup>	7.06±0.35 <sup>a</sup>
Chlorogenic acid	0.018 to 0.489	0.845±0.058 <sup>a</sup>	7.91±0.23 <sup>a</sup>
Gallic acid	ND, 1.03	2.41±0.11 <sup>b</sup>	28.8±11.3 <sup>b</sup>
Flavonoids			
Epicatechin	5.68	1.73±0.32 <sup>c</sup>	7.29±0.33 <sup>a</sup>
Kaempferol	ND, 0.04 to 4.59	0.972±0.046 <sup>a</sup>	13.6±0.7 <sup>ac</sup>
Myricetin	5.80	2.80±0.08 <sup>d</sup>	85.3±7.1 <sup>d</sup>
Quercetin	0.207 to 16.6	2.26±0.03 <sup>b</sup>	21.8±1.1 <sup>bc</sup>
Rutin	ND, 0.390 to 1.67	1.76±0.03 <sup>c</sup>	23.4±0.8 <sup>bc</sup>

Data shown represent the mean ± S.D. from four experiments. TEAC values not sharing a common superscript letter in individual assays are considered significantly different at  $P < 0.01$  using Tukey-Kramer test with following ANOVA. According to a review literature (ref, Leone et al., 2015), representative three phenolic acids and five flavonoids present in moringa leaves were selected. To determine TEAC values as mmol TE per mmol tested chemical, DPPH radical and O<sub>2</sub><sup>-</sup> radical scavenging assays of these chemicals were performed in this study. TEAC; Trolox equivalent antioxidant capacity, TE; Trolox equivalent, DW; dried weight.

**Table 2-5.** Amounts of chlorogenic acid and caffeic acid in moringa leaf and stem teas.

	Chlorogenic acid		Caffeic acid	
	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of extract)	( $\text{mg}/100$ g of tea DW)	( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of extract)	( $\text{mg}/100$ g of tea DW)
Leaf tea	$0.402 \pm 0.042^a$	$14.3 \pm 1.5^a$	$0.0133 \pm 0.0096^a$	$0.473 \pm 0.341^a$
Stem tea	$0.120 \pm 0.001^b$	$2.56 \pm 0.19^b$	$0.00571 \pm 0.00275^a$	$0.122 \pm 0.059^a$

For HPLC analysis, another batch of individual extract was prepared from moringa leaf tea and stem tea, with 35.5% and 21.4% of the yield, respectively. Data shown represent the mean  $\pm$  S.D. from three determinations in HPLC (see **Figure 2-5**; chlorogenic acid (1), caffeic acid (2)). Values not sharing a common superscript letter between leaf tea and stem tea are considered significantly different at  $P < 0.001$  using Student's  $t$ -test. DW; dried weight.

**Table 2-6.** EC<sub>50</sub> values and Trolox equivalent antioxidant capacity of hot-water extracts from moringa leaf and yacon leaf teas in DPPH radical scavenging assays and their polyphenol content.

	Polyphenol (CAE) ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ of extract)	TEAC (DPPH)	
		(mg TE/mg of extract)	( $\mu\text{mol TE}/\text{mg}$ of extract)
Yacon leaf tea	279	0.272	1.09
Moringa leaf tea	76.0	0.0815	0.326
Moringa stem tea	61.5	0.0347	0.139
Green tea A	526	1.20	4.77
Green tea B	539	1.27	5.08

Data shown represent mean values from four experiments. Trolox was used as a control standard. Data shown represent mean value from four experiments. CAE; chlorogenic acid equivalent, TEAC; Trolox equivalent antioxidant capacity, TE; Trolox equivalent.

## 第3章 1-Naphthol、2-Naphthol およびそれらの硫酸化

### 代謝物のラジカル消去作用

#### 第1節 緒言

我々の身体は、生理活性成分の不活性化を担う薬物代謝反応系を備えており、第1相反応と第2相反応に大別される。第1相反応とは酸化、還元、加水分解などによって細胞内に取り込まれた低分子化学物質に水酸基、カルボキシ基、アミノ基などの極性基が付加され、水溶性を高める反応である。第1相反応の良く知られた事例としてはシトクロム P450 酵素ファミリー群が挙げられ、薬物代謝反応における水酸基付与の重要な働きを担っている(柴崎ら, 2009; 加藤ら, 2010)。次に第2相反応は、ステロイドホルモン、生理活性アミン、胆汁酸などの生体内物質の代謝に重要であり、薬物代謝の視点からは外来成分を細胞質可溶性硫酸転移酵素(SULTs)、グルクロン酸転移酵素およびグルタチオン-S-転移酵素などにより水溶性の高い硫酸体、グルクロン酸抱合体およびグルタチオン抱合体などに代謝変換することを指し、最終的に体内蓄積を回避するために生体内物質や生体外異物を体外に排出する。特に薬物代謝酵素の1つである SULTs は、硫酸基供与体である活性硫酸体 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate から、OH 基またはアミノ基を含むアクセプター基質化合物への硫酸基の転移を触媒する酵素である(Lipmann, 1958)。硫酸化抱合は、一般に、基質化合物の不活性化に加えて水溶性を高めることで、それらの身体からの排出を容易にすると考えられている(Mulder and Jakoby, 1990; Falany and Roth, 1993; Weinshilboum and Otterness, 1994)。また、ポリフェノール類などのフェノール性化合物の一部もまた硫酸体のような特徴的な代謝物に変換される。しかしながら、複雑な代謝後の一連の代謝物の入手は容易では無く、代謝物の機能性研究を行うこともまた限定的である。さらに、代謝物の活性の減弱の程度に関する情報も現在のところ多くはない。そのため、活性本体となり得るフェノール性化合物とその代謝物の両方で活性の比較を行うことにより、代謝物の機能性までも含めた評価を行うことが重要である。

Naphthol (Nap)はナフタレン環に OH 基を1つ有する化合物で、広義にはフェノール類に分類される芳香族化合物である(Fukami et al., 2008)。ナフタレン環にフェノール構造を内含する本フェノール性化合物の異性体 1-Nap および 2-Nap は、SULTs の良い基質として知られており、第2相薬物代謝反応において硫酸化され、それぞれ 1-NapS と 2-NapS が生じる(Isozaki, 2001; Ayala et al., 2015)

(Figure 3-1)。特に、薬物代謝における酵素学的研究において、1-Nap および 2-Nap は、ある種のヒト SULTs、例えば SULT1A1、SULT1A3 および SULT1E1 のモデル基質としてしばしば用いられる(Allali-Hassani et al., 2007)。Nap のグルクロン酸抱合体ならびに硫酸抱合体は、Nap だけでなくナフタレン暴露された際に産生される代謝物としても認められている(Dechelotte et al., 1993; Ayala et al., 2015)。また、Nap の塗布による人への暴露試験では、尿から代謝物などが 3 日間にわたって検出され、グルクロン酸抱合体を上回るレベルの硫酸抱合体が認められている(Harkness et al., 1971)。最近の研究では、NapS のみならず、尿中のメルカプトール酸および *N*-アセチルグルタチオン抱合体を含む他のナフタレン代謝産物の存在もまた報告されている(Ayala et al., 2015)。産業界では、染料、香水、殺虫剤、防腐剤などの医薬品の製造、ゴム製品製造時の酸化防止剤として 1-Nap と 2-Nap が使用されている(Dorland, 2011; Shindy, 2016)。ナフトール類が広く市民生活に用いられていることに加えて、ヒトへの暴露のリスクを考慮すると、1-NapS および 2-NapS として生じた硫酸化代謝物は 1-Nap や 2-Nap の生化学的な活性または生物学的活性と効果と比べてどの程度の違いがあるのかを明らかにすることは興味深い問題の 1 つである。

しかしながら本章では、広義にはフェノール類に分類される Nap の異性体とそれらの硫酸体 NapS を、比較的入手可能なフェノール性化合物の代謝前後のモデルとして使用することとした。そこでは、DPPH、ABTS<sup>+</sup> および CPZ<sup>+</sup> ラジカルに対する 1-NapS と 2-NapS の抗酸化活性の測定と、これらの非硫酸化前駆体 1-Nap および 2-Nap の活性との比較を行うこととした。

## 第 2 節 材料および方法

### 第 1 項 材料および試薬類

ナフタレン、1-Nap、ABTS、DPPH、ペルオキシ二硫酸カリウム、リン酸はナカライテスク社(京都、日本)の製品を購入した。1-NapS は Research Organics Inc. (Cleveland, OH, USA)より購入した。1-メトキシナフタレン(1-NapM)、2-Nap、および Cr(VI)は、和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入した。2-NapS は Alfa Aesar (Ward Hill, MA)から購入した。2-メトキシナフタレン(2-NapM)および CPZ は、東京化成工業(東京、日本)から購入した。Trolox は Sigma-Aldrich, Co. (St Louis, MO, USA)から購入した。他のすべての化学物質は、市販されている最上級のグレードを使用した。Figure 3-1 に本研究で用いた Nap の異性体とそれらの誘導体の化学構造を示した。

## 第2項 DPPH ラジカル消去活性の測定

第1章第2節第4項と同様の方法で測定した。

## 第3項 ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定

第1章第2節第5項と同様の方法で測定した。

## 第4項 CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性の測定

第1章第2節第7項と同様の方法で測定した。

## 第5項 肝ミクロソーム画分の調製と抗脂質過酸化活性の測定

既法を参考にして、肝ミクロソーム画分を用いた抗脂質過酸化活性を測定した(Miyazawa and Nakagawa, 1998)。肝ミクロソーム画分を得るために、10 g の市販の鶏肝臓を 10 ml の 0.25 M スクロース溶液中 4°C でホモジナイズし、12,000 ×g で 15 分間遠心分離させた。回収した上清をさらに 105,000 ×g で 60 分間遠心分離させた。ミクロソームペレットを 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4)中に懸濁させた。ミクロソーム画分のタンパク質濃度は、BSA を標準とした Bradford の方法に基づいて測定した(Bradford, 1976)。

肝ミクロソーム画分の抗脂質過酸化活性は既法に基づいて測定した(Miyazawa and Nakagawa, 1998)。はじめに、サンプル 7.5 μl、0.691 mg/ml ミクロソーム画分 82 μl、ADP-FeCl<sub>3</sub>(予め 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4)中で調製した 22 μM ADP と 1.3 mM FeCl<sub>3</sub>) 12.3 μl と 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.4) 34.7 μl の計 136.5 ul を混合した。反応は 0.1 mM NADH 13.5 ul を添加して開始し、最終容量 150 μl 中、37°C で 20 分間進行させた。TCA/TBA/HCl 溶液(trichloroacetic acid 1,000 mg、2-thiobarbituric acid 37.5 mg を予め 0.25 M HCl 10 ml 中に調製) を 300 μl 添加して反応を停止させ、100°C で 15 分間加熱し、冷却後に、13,000 ×g で遠心分離した。得られた溶液のうち 200 μl を 96 ウェルプレートに移し、532 nm での吸光度を測定した。

## 第6項 統計処理

統計分析のために、4 回の実験から得られた平均±標準偏差として表した。データの一部については Excel 2004 (Microsoft Co., Redmond, Wash., USA)の統計ア

ドオンソフトウェアプログラム(Statcel、オーエムエス出版、埼玉、日本)を使用して、分析した。1 因子分散分析(ANOVA)とともに、post-hoc Bonferroni-Dunn 検定を用いて多重比較検定を行い、 $P < 0.05$  で有意差ありとみなした。

### 第3節 結果および考察

本章では、*O*-硫酸化された 1-Nap および 2-Nap を比較的入手可能なフェノール性化合物の代謝前後のモデルとして使用し、どの程度フリーラジカルに対する抗酸化活性や特性を示すのかを調べることにした。

#### 第1項 硫酸化された 1-Nap および 2-Nap とそれらの非硫酸体のフリーラジカル消去活性の比較

これまで 1-Nap はペルオキシラジカル試験モデルで反応性を示す抗酸化性の化合物として利用されてきた (Lissi et al., 2000)。Nap 異性体およびそれらの硫酸化された誘導体の生化学的効果は体系的に調査されていないため、始めにフリーラジカル消去活性測定系におけるこれら化合物の潜在的な抗酸化作用を調べた。抗酸化作用を評価するために、1-NapS 対 1-Nap および 2-NapS 対 2-Nap の組み合わせで、異なる 3 つのフリーラジカル消去活性測定を行なった。DPPH は、深紫色の安定したフリーラジカルであり、プロトン供与型の抗酸化剤によって還元されて無色になる(Blois, 1958; Molyneux, 2004)。Figure 3-2A に示すように、1-NapS は、非硫酸体 1-Nap ( $EC_{50}$ : 23.4  $\mu$ M)よりも低い DPPH ラジカル消去活性( $EC_{50}$ : 172  $\mu$ M)を示した。対照的に、2-NapS は、2-Nap の活性( $EC_{50}$ : 22.6  $\mu$ M)に匹敵するほどの DPPH ラジカル消去活性( $EC_{50}$ : 29.8  $\mu$ M)を示した(Figure 3-2B)。

安定したカチオンラジカルである ABTS は、電子および水素供与特性を示し、かつ親油性および疎水性両方の抗酸化剤のフリーラジカル消去活性をスクリーニングするために利用されている(Pellegrini et al., 1999; Re et al., 1999; Thaipong et al., 2006)。ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定において、2 組の試験化合物とも DPPH ラジカル消去活性測定で認められた際と同様の結果が観察された。Figure 3-2C に示すように、1-NapS は 1-Nap の活性( $EC_{50}$ : 11.2  $\mu$ M)よりも低い ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性( $EC_{50}$ : 75.4  $\mu$ M)を示したが、逆に 2-NapS および 2-Nap はそれぞれ 10.4 および 11.2  $\mu$ M の  $EC_{50}$  値と共に同等の強い活性を示した(Figure 3-2D)。

CPZ は精神分裂病の治療にも使用される神経弛緩薬である。Cr (VI) (Nagaraja et al, 2014)または Fe(III)(Miftode et al., 2010)誘導の酸化時に酸性条件下で安定なカチオンラジカルを形成することが示されていることから、電子遷移性の化合物の抗酸化作用を解析するために用いられている。Figure 3-2E に示すように、

1-NapS は、CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定において、1-Nap の活性( $EC_{50}$ : 20.9  $\mu$ M) よりも低い活性( $EC_{50}$ : 117  $\mu$ M)を示した。2-NapS および 2-Nap は、試験したすべての濃度で  $EC_{50}$  値を得ることが出来なかったものの(**Figure 3-2F**)、両サンプルともに 1,000  $\mu$ M の最大試験濃度でそれぞれ  $43.2 \pm 4.8\%$  および  $43.2 \pm 2.7\%$  とやや低いながらも同等の活性を示した。

**Table 3-1** は、3 つのラジカル消去活性測定法を用いて決定された Nap および NapS 異性体ならびに Trolox の  $EC_{50}$  値をまとめたものである。1-Nap および 2-Nap は、DPPH ラジカル消去活性測定においてそれぞれ 23.4  $\mu$ M vs 22.6  $\mu$ M の  $EC_{50}$  値を示し、同等の活性を有していた。同様の結果が、ABTS<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定においてもそれぞれ 11.2  $\mu$ M vs 11.2  $\mu$ M の  $EC_{50}$  値として観察された。一方、CPZ<sup>+</sup>ラジカルに対する 2-Nap の活性( $EC_{50}$ : > 1,000  $\mu$ M)は、1-Nap の活性( $EC_{50}$ : 20.9  $\mu$ M)よりも低いものであった。これらのデータは、CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定が強酸性環境下で実施されたため、2-Nap の抗酸化能力は酸性下で低減する可能性があることを示している。2 つの試験化合物からの  $EC_{50}$  値の比(または「 $EC_{50}$  値の比の逆数」)は、それらの活性間での定量的な差異を反映する。即ち、表中の下段にて算出された  $EC_{50}$  値の比(**Table 3-1**)は、1-NapS の DPPH、ABTS<sup>+</sup> および CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性は 1-Nap の活性よりも低く、定量的には 5.60-7.35 分の 1 であることを示している。これらの結果は、硫酸化が不活性化の代謝経路を担うという一般的な認識と一致している。したがって、1-NapS のラジカル消去活性は、代謝抱合前の 1-Nap のラジカル消去活性の 0.136-0.179 倍(13.6-17.9%)を示すことが判明した。対照的に、2-NapS は、DPPH および ABTS<sup>+</sup> ラジカル消去活性測定において 2-Nap に近似した効果を示した。算出された「1/ $EC_{50}$  値の比」により、2-NapS のラジカル消去活性が、2-Nap の活性の 0.758-1.08 倍(75.8-108%)の範囲であることが判明した。CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定では測定した濃度範囲内で 2-NapS および 2-Nap の  $EC_{50}$  値を決定することはできなかったものの、これらの 2 つの化合物間では同程度の活性が得られている (**Figure 3-2F** 参照)。

1-NapS がどのようにしてラジカルを捕捉し、化成品ラジカルにプロトンを供与するかは依然として不明のままである。本研究で使用した試験化合物が、ラジカル消去活性を持たずに使用した溶媒がラジカル反応を妨害したりラジカルと反応するなど、非特異的な反応によるものとの懸念があった。しかしながら、DPPH は、消去活性測定を開始する前に EtOH 溶媒中で調製し、自発的に生じる安定な化成品ラジカルである。ABTS は一晩かけてラジカル溶液を調製し、反応に用いている。対照的に、CPZ<sup>+</sup>ラジカル消去活性測定は、反応溶液中に Cr (VI) を添加することによって開始するものの、添加と同時に CPZ<sup>+</sup>ラジカルを生成させている。そこで、Cr (VI) と CPZ を混合し、予めラジカルを生成させたうえで

2-NapS を添加するという予備試験を行なったところ、やはり上記と同様の結果を得ている。したがって、2-NapS がこれらの実験で DPPH、ABTS<sup>+</sup>および CPZ<sup>+</sup> ラジカルの産生には恐らく直接干渉しないため、2-Nap を原因とする非特異的な反応によるものではないことと考えられる。本研究では、1-Nap、2-Nap、1-NapS および 2-NapS のこれら化合物をを DMSO に溶解して、ラジカル消去活性試験に供している。そこでは a) DMSO または 3 つの異なる反応液中でこれら 4 つの化学物質の沈殿物または結晶化は観察されず、b) これら 4 つの化学物質が反応液中に存在していても pH の変化は認められず、c) DMSO のみを添加したネガティブコントロールは MilliQ 水を用いた場合と比較して、これら 3 つのラジカル消去活性測定で大差ない結果を示すことを再確認している。したがって、これらの実験において、Nap および NapS 異性体のラジカル消去活性には溶媒が直接妨害しているという訳でも無いように考えられる。

現時点ではなぜ 1-NapS 対 1-Nap および 2-NapS 対 2-Nap がラジカル消去活性において異なる結果を示したのかは不明である。NapS の硫酸基は、二重結合のある状態でベンゼン環の sp<sup>2</sup> 炭素に結合している。場合によっては、硫酸化化合物の硫酸アニオンが、共鳴安定化した中間体を形成する良い脱離基として作用し得るものの、フェノール性の硫酸体では該当しないこともまた報告されている (Yi et al., 2006)。Nap 分子の特定の位置の硫酸基が、共鳴安定化した中間体を形成し得るか、または標的とするフリーラジカルを安定化するためのプロトン/電子/水素の供与体として作用することがメカニズムとして挙げられるのかについては、さらなる調査を要する課題となろう。O-H 結合解離エネルギーやエンタルピーだけでなく、異なる位置で標的となる水酸基の安定性についてもさらに検証を行う必要があり、有益な手掛かりを得られる可能性もある (Pino et al., 2006; Nantasenammat et al., 2008)。これまでに AAPH を用いたペルオキシラジカルに対する 1-Nap と 2-Nap の時間依存的な消去反応を調べた結果、同等か 1-Nap でやや強い傾向にあるとの報告例がある (Pino et al., 2006)。従って、ラジカルに対する反応性について考察する際には、標的とするラジカル種や反応条件についても考慮する必要があるかもしれない。また、ベンゼン環内のフェノールの位置による抗酸化力は、モノフェノールよりもむしろカテコール構造を始めとするジフェノール構造を持つ際に顕著である (Pino et al., 2006)。このため、本研究において 1-Nap と 2-Nap で見出されたような抗酸化活性の類似性 (Figures 3-2A と 3-2B, Figures 3-2C と 3-2D 参照) や差異 (Figures 3-2E と 3-2F 参照) が、他のフェノール性化合物でも同様に生じるかについては今後幅広く調べる必要がある。即ち、フェノールの位置によって生じるメカニズムなのかまたはナフタレン構造に特有なのかを慎重に考察すべきである。次に NapS と Nap より得られた抗酸化活性について化学量論的関連性について知見を得るため、以前の報告に

従って(Brand-Williams et al., 1995)、試験サンプルの化学量論値を決定した。「試験サンプルのモル数」/「DPPH ラジカルのモル数」における  $1/EC_{50}$  として定義される抗ラジカル力に基づいて、1-Nap、1-NapS、2-Nap、2-NapS および Trolox の化学量論値を算出した結果、それぞれ 0.468、3.45、0.451、0.596 および 0.621 が得られた。これら 5 つのうち、1-NapS のみが他のものよりも明らかに高い値を示した。これらの結果は、1-NapS との反応で減少した DPPH ラジカルの数が、他の試験化合物との反応で減少した DPPH ラジカルの数よりも極端に少ないことを意味していたことから、やはり反応性が低いことを認めた。実際には、ミックスベリーフルーツピューレ摂取時に、様々なフェノール性硫酸体がヒト血漿中に存在することが報告されている(Pimpao et al., 2015)。フラボノイドの一種であるケルセチンの硫酸化代謝物およびグルクロン酸代謝物によっては、ペルオキシナイトライト誘発性のヒト血清アルブミンのニトロ化を試験管レベルで効果的に軽減することができるという報告もある(Yokoyama et al., 2009)。硫酸化はこれらフェノール性化合物の生物学的活性を低下させる役割を担うことが一般的に考えられているものの、個々の硫酸化代謝物の活性の程度や違いについては、さらに 1 つ 1 つ個々に検討する必要がある。

## 第 2 項 フリーラジカル消去活性測定における Nap 誘導体の構造特異性

Nap および NapS のフリーラジカル消去活性について、化学構造上の特異性を理解するために、1-メトキシナフタレン(1-NapM)、2-メトキシナフタレン(2-NapM)およびナフタレンを含む Nap 誘導体を用いて、100 および 1,000  $\mu\text{M}$  の濃度で上述の 3 種類のフリーラジカル消去活性の測定を行った。**Figure 3-3A** に示すように、1-NapM、2-NapM およびナフタレンは、1-NapS および 2-NapS と比較して、DPPH ラジカル消去活性としてはより低値を示した。これらの結果より、1-Nap のフリーラジカル消去活性はナフタレン環の 1 位の-OH 基に依存し、その活性は *O*-硫酸化またはメトキシル化によって減少された可能性がある。興味深いことに、ナフタレン環の 2 位の-OH 基に依存するように思われた 2-Nap のフリーラジカル消去活性は、メトキシル化によって減少したものの、*O*-硫酸化では減少しなかった。このとき認められた 2-NapS および 1-NapS の DPPH ラジカル消去活性は、1-NapM、2-NapM、およびナフタレンよりも比較的高いものであった。したがって、ナフタレン骨格が必須である可能性も否定できないものの、フェノール化合物によっては、メトキシ化体ではなく、硫酸体で抗酸化能力を保持しているケースがあるように考えられる。これらの化合物を用いて ABTS<sup>+</sup> ラジカル消去活性測定を行った際にも、同様の傾向が観察された(**Figure 3-3B**)。Figures 3-3B および 3-3C では、1-NapM、2-NapM およびナフタレンが活性とし

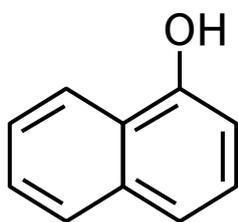
では最低値を示したことに留意したい。興味深いことに、1-NapS および 2-NapS の抗酸化活性は、これらのフリーラジカル消去活性試験において、1-NapM、2-NapM およびナフタレンの抗酸化活性の値よりも有意に高かった。

硫酸抱合された代謝物が生物学的活性を有しているかは未だ明らかではないものの、重要な課題として挙げられる。1-Nap と 2-Nap およびそれらの硫酸体である、1-NapS および 2-NapS を、本研究ではモデル化合物として選択した。前述のように、1-Nap と 2-Nap は、第 2 相薬物代謝研究において SULTs のいくつかのサブファミリーによる良好な基質としてしばしば使用されている (Allali-Hassani et al., 2007; Arand et al., 1987)。本研究に関連して、ヒト生体では、尿中の Nap が様々な作物に使用されるカルバリル(カルバメート殺虫剤; 1-ナフチルメチルカルバメート)暴露 (Sams, 2017) や職業上ナフタレンに暴露された労働者のためのバイオマーカーとして提唱されている (Preuss et al., 2003, 2004; Sams, 2017)。SULTs による生体異物の硫酸抱合は、生物活性を有する化合物の物理化学的特性を変化させ、生物学的活性の不活化をもたらすと広く考えられている (Mulder and Jakoby, 1990; Falany and Roth, 1993; Weinshilboum and Otterness, 1994)。以前の論文では、代謝抱合反応がフラボノイドの生物活性を調節し、影響を与えるとして議論されている (Beekman et al., 2012)。現状では薬物代謝後の代謝物については限られた情報しか得られないものの、グルクロニド化、メトキシル化および硫酸化を含む第 2 相抱合化反応は、必ずしもフラボノイドの作用の完全なる不活性化をもたらす訳ではない場合もあるようである。本研究で試験したラジカル消去活性試験は、すべて *in vitro* における単純な化学反応モデルである。生物学的により関連性のある評価試験を用いることにより、代謝物を含めた試験化合物の活性を決定付けることが将来的には有益であると考えられる。2-Nap および 2-NapS の抗脂質過酸化活性を調べるために、次に、ニワトリ肝臓から調製したミクロソーム画分を用いて実験を行った。様々な濃度の 2-Nap および 2-NapS をニワトリ肝ミクロソーム画分の存在下でインキュベートしたところ、それぞれ  $254 \pm 26 \mu\text{M}$  および  $245 \pm 6 \mu\text{M}$  の  $\text{EC}_{50}$  値とともに同程度の抗脂質過酸化活性が得られた (figure not shown)。本脂質過酸化モデル実験系においても 2-Nap および 2-NapS で同等の抗酸化活性が実証できた。本研究で示された結果より、Nap が硫酸化抱合された硫酸体生成物は、常に生物学的活性の低下が生じる訳ではない可能性がある、という別の観点での一例が認められた。Nap 異性体にとって、残存する抗酸化活性は硫酸化抱合の位置に依存する可能性があるものの、ここで認められた結果が、ナフタレン構造を有した場合に限るものなのかを慎重に調べていく必要がある。

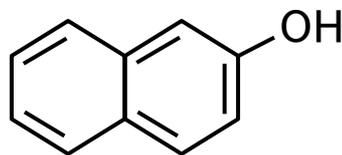
#### 第4節 小括

以上より、本章では *O*-硫酸化された 1-Nap および 2-Nap を広義のフェノール性化合物の代謝前後のモデルとして使用し、DPPH、ABTS<sup>+</sup> および CPZ<sup>+</sup> ラジカルに対する 1-NapS と 2-NapS の抗酸化活性を明らかにした。これらの非硫酸化前駆体 1-Nap および 2-Nap との比較を行ない、EC<sub>50</sub> 値を算出することによって活性を比較することで、1-NapS は 1-Nap よりも 5.60 から 7.35 分の 1 ほどの低い抗酸化活性を示すことを定量的に実証した。対照的に、2-NapS は非硫酸体である 2-Nap と同等の活性を示すことを見出した。したがって、薬物代謝の過程で硫酸化されたフェノール性化合物によっては、ナフタレン構造を有する等の場合には、必ずしも常にフリーラジカルに対する消去活性が低下する訳ではないこと、硫酸化される位置に依存して活性が維持されることを試験管レベルで明らかにした。

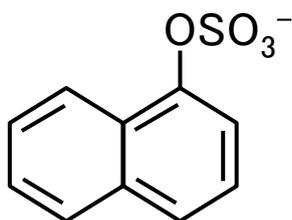
第 5 節 添付図表等



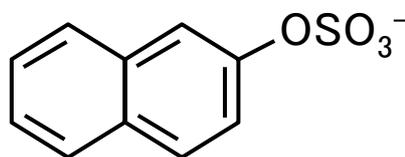
1-Naphthol



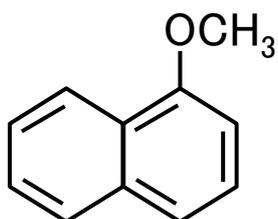
2-Naphthol



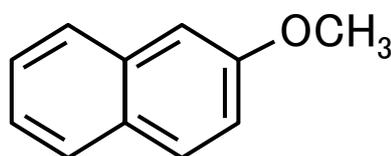
1-Naphthyl sulfate



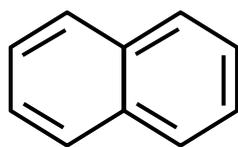
2-Naphthyl sulfate



1-Naphthylmethoxylate

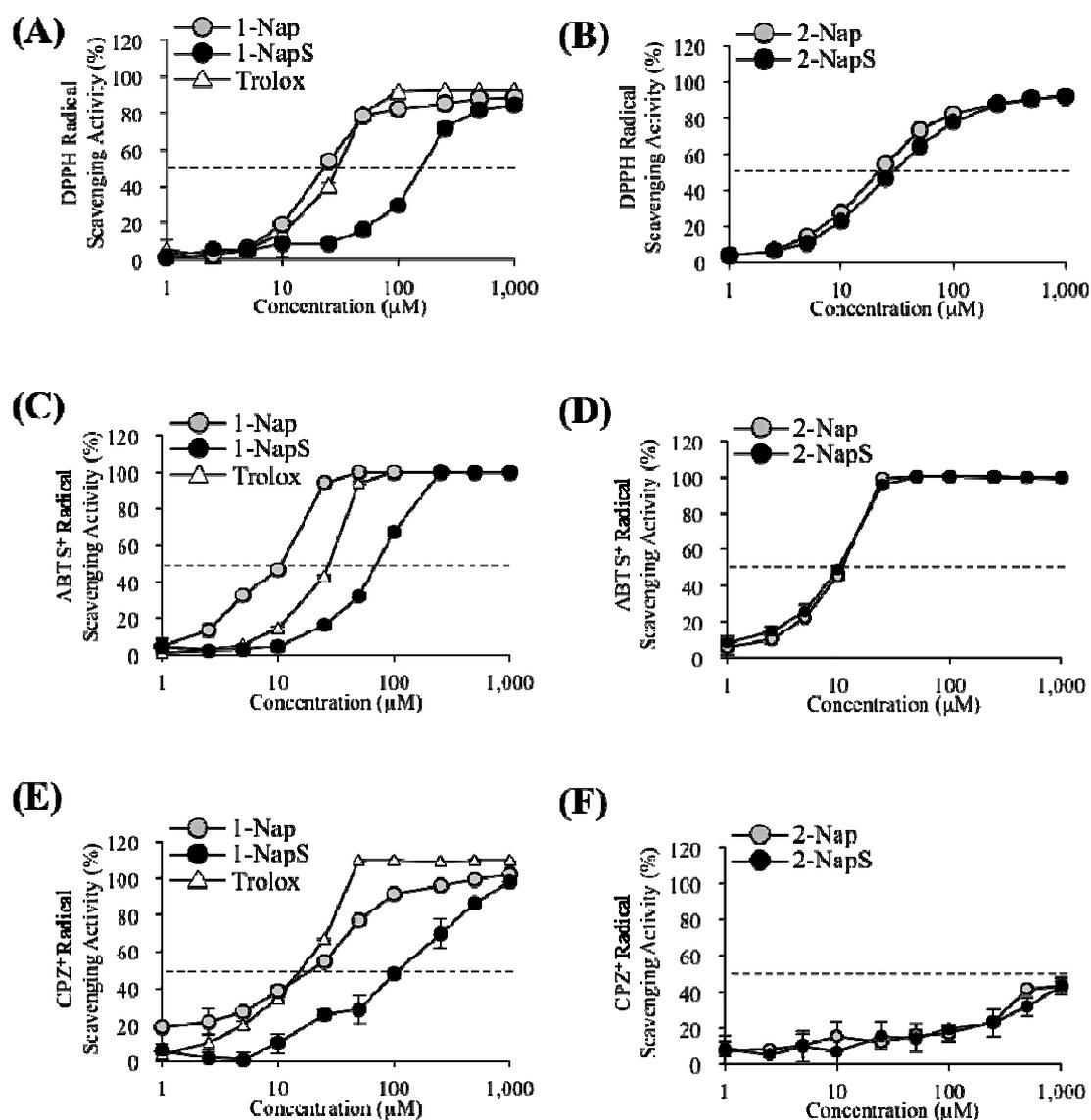


2-Naphthylmethoxylate

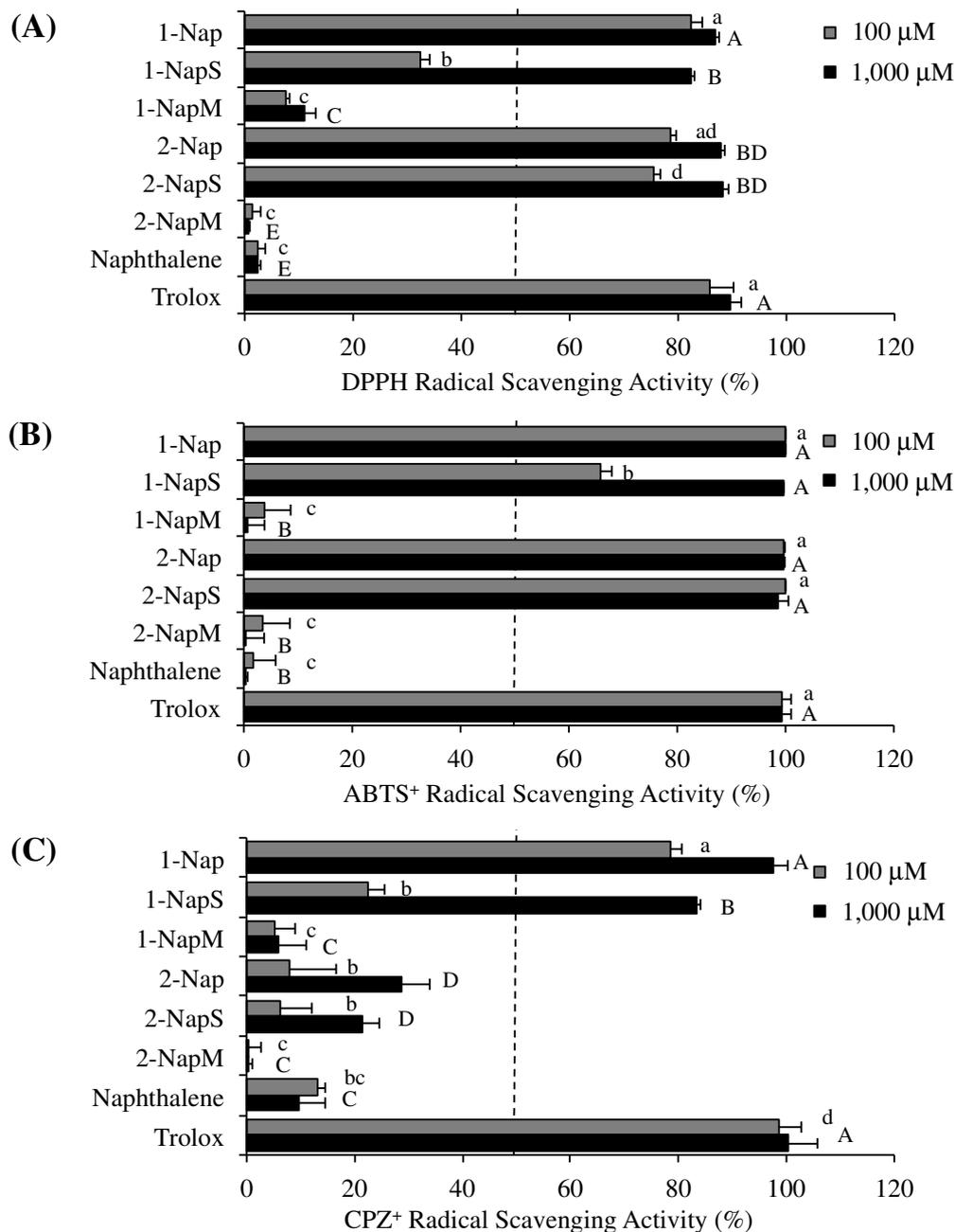


Naphthalene

**Figure 3-1.** Chemical structures of Nap isomers and their derivatives used in this study. Naphthol; Nap, naphthyl sulfate; NapS, naphthylmethoxylate (or methoxynaphthalene); NapM.



**Figure 3-2.** Antioxidative effects of Nap isomers and their sulfate-conjugate in DPPH (A and B), ABTS<sup>+</sup> (C and D), and CPZ<sup>+</sup> radical scavenging assays (E and F). 1-Nap (gray circle) and 1-NapS (black circle) were assayed in panels A, C, and E, while 2-Nap (gray circle) and 2-NapS (black circle) were used in panels B, D, and F. Data shown represent mean  $\pm$  S.D. from four experiments. Trolox (white triangle) was used as a control standard. Naphthol; Nap, naphthyl sulfate; NapS.



**Figure 3-3.** Antioxidative effects of Nap isomers and their derivatives in DPPH (A), ABTS<sup>+</sup> (B), and CPZ<sup>+</sup> radical scavenging assays (C). Activities were determined with each compound at 100  $\mu$ M (gray) and 1,000  $\mu$ M (black). Data shown represent mean  $\pm$  S.D. from four experiments and values not sharing a common superscript letter (small at 100  $\mu$ M, or capital at 1,000  $\mu$ M) are considered significantly different at  $P < 0.05$ . Trolox was used as a control standard. Naphthol; Nap, naphthyl sulfate; NapS, methoxynaphthalene; NapM.

**Table 3-1.** EC<sub>50</sub> values and ratio of EC<sub>50</sub> values of Nap isomers and their sulfate conjugate as determined in three different free radical scavenging assays.\*

	DPPH Radical	ABTS <sup>+</sup> Radical	CPZ <sup>+</sup> Radical
	EC <sub>50</sub> (μM)**		
1-Nap	23.4±0.7 <sup>a</sup>	11.2±0.3 <sup>a</sup>	20.9±0.4 <sup>a</sup>
1-NapS	172±2 <sup>b</sup>	75.4±1.1 <sup>b</sup>	117±18 <sup>b</sup>
2-Nap	22.6±0.5 <sup>a</sup>	11.2±0.5 <sup>a</sup>	>1,000
2-NapS	29.8±0.4 <sup>c</sup>	10.4±0.7 <sup>a</sup>	>1,000
Trolox	31.1±0.8 <sup>c</sup>	28.4±0.4 <sup>c</sup>	17.2±0.2 <sup>a</sup>
	Ratio of EC <sub>50</sub> values***		
1-NapS/1-Nap	7.35 (0.136)	6.73 (0.149)	5.60 (0.179)
2-NapS/2-Nap	1.32 (0.758)	0.929 (1.08)	-
1-Nap/2-Nap	1.04 (0.962)	1.00 (1.00)	-
1-NapS/2-NapS	5.77 (0.173)	7.25 (0.138)	-

\*Data shown represent mean ± S.D. from four experiments and values not sharing a common superscript letter are considered significantly different at  $P < 0.05$ . Trolox was used as a control standard.

\*\*EC<sub>50</sub> values indicate effective concentration at which the activity was 50% from the data obtained in **Figure 3-2**.

\*\*\*Data shown in parentheses indicate calculated '1/Ratio of EC<sub>50</sub> values'. Naphthol; Nap, naphthyl sulfate; NapS.

## 総括

本論文は、試験管レベルでの初期評価アッセイ技術を用いて、地域性のある健康食品と代謝物のフリーラジカル消去活性における抗酸化作用の特徴について調査することを目的とした。

熊本県は西側に海、中央に平野、東側に阿蘇山に代表される山間地域を有している。これらの地形の多様さから地域ごとに独特の気候が存在する。また、その地域毎に栽培に適した健康食材が各地に存在し、それらは地域の人々より親しみをもって食生活のなかで利用されている。地域性のある健康食材やハーブティーとして市販されているものに、熊本県産のヤーコン茶およびモリンガ茶がある。ヤーコンはポリフェノールに富むアンデス原産の植物で、熊本県内では菊池市を中心に栽培されており、モリンガはインド原産のアーユルヴェーダのハーブでワサビノキとも呼ばれ、天草地域を中心に栽培されている。一方、フリーラジカルは、酸化を助長することにより、病原菌や癌細胞に酸化ダメージを与える免疫機能の1つである反面、過度の酸化ストレスや過度の免疫応答などにより酸化バランスが破綻し酸化側に傾く場合には、フリーラジカルは自らを攻撃することで細胞や組織の機能不全や炎症など増悪の方向へと導くことがある。このような背景のもと、地域に特化した食材や食品等は、地域限定であることより、これらの有する機能性研究や科学的エビデンスの研究もまた限定的である。このため生体での効果の是非を問う前に、酸化防止を目的としたフリーラジカルを消去する特性等についても基礎研究や探索研究として試験管レベルでの検証を行うことは重要である。

本研究では、熊本県産のヤーコン茶およびモリンガ茶のフリーラジカルに及ぼす影響について調べ、とくに代表的な抗酸化剤である Trolox の抗酸化活性と比較することにより、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )ラジカルに着目した試験管レベルでの検証を行った。一方、我々の身体は活性成分の不活性化を目的とした薬物代謝系を備えており、ポリフェノール類などのフェノール性化合物の一部もまた硫酸体のような特徴的な代謝物に変換される。複雑な代謝後の一連の代謝物の入手は容易では無く、代謝物の機能性研究を行うこともまた限定的であり、さらに代謝物の活性の減弱の程度に関する情報も多くはない。そのため、活性本体となり得るフェノール性化合物とその代謝物の両方で活性の比較を行い、代謝物の機能性までも含めた評価が重要である。そこで、フェノール性化合物の硫酸化代謝物のモデル化合物がどの程度フリーラジカルに対する抗酸化活性や特性を示すのかを本研究で調べた。

第1章では、熊本県産ヤーコン茶のラジカル消去作用、特に異なる  $O_2^-$  産生系

に及ぼす抗酸化作用について試験管レベルで調べた。そこでは、MeOH、EtOH、酢酸エチルの各抽出物よりも熱水抽出物でより高いポリフェノール含量と収率ならびに DPPH ラジカルに対する抗酸化活性を認めた。ヤーコン茶熱水抽出物は DPPH、ABTS<sup>+</sup>、CPZ<sup>+</sup>および galvinoxyl の 4 種類の化成品ラジカル種に対して異なるレベルで抗酸化活性を示し、とくに O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルに対しては PMS-NADH-NBT 法および XOD 法の両方で、代表的な抗酸化剤 Trolox よりも強い抗酸化活性を示すことを明らかにした。活性型ヒト顆粒球好中球様細胞の O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル産生に及ぼす同抽出物の影響も検討し、ここでも Trolox 処理時より O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルを減少させることを見出した。抗酸化作用を含む機能性評価では、効果的な作用濃度を EC<sub>50</sub> 値や IC<sub>50</sub> 値として算出する場合があるものの、実験条件や使用する標準物質が異なれば実験ごとに異なる結果が得られる可能性がある。そのため抗酸化活性測定時には Trolox が標準物質として利用されることが多い。O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消去活性測定(Wang et al., 2008)を含む各種の抗酸化活性測定においても Trolox を比較対象とする場合や、Trolox 等量として抗酸化力が決定づけられる場合も多い (Apak et al., 2007; Alam et al., 2013)。

第 2 章では、熊本県産モリンガの葉茶と茎茶について、特に O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生系での特徴的な抗酸化作用について試験管レベルで調べた。そこでは、モリンガの両熱水抽出物は、DPPH、ABTS<sup>+</sup>、CPZ<sup>+</sup>および galvinoxyl の 4 種類の化成品ラジカル種に対して抗酸化活性を示すものの、Trolox よりも低いものであること、これに対し、PMS-NADH-NBT 法および XOD 法においては Trolox よりも強い O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去作用を示すことを見出した。さきと同様に活性型ヒト顆粒球好中球様細胞の O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル産生に及ぼすモリンガ茶熱水抽出物の影響を調べ、同じく減少させることを認めた。活性成分に関する絞り込みを行うため、モリンガ葉部中の 8 つの既知フェノール性化合物について Trolox と比べた際の抗酸化活性の特徴付けと HPLC による成分分析を行った。そこでは、主要な成分ではないものの、少なくともモリンガ葉茶中のカフェ酸およびクロロゲン酸が、Trolox よりも弱い DPPH ラジカル消去活性とともに、Trolox よりも強い O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカル消去活性を有する特徴的な抗酸化物質である可能性を認めた。

第 3 章では、*O*-硫酸化された 1-Nap および 2-Nap を広義のフェノール性化合物の代謝後のモデルとして使用した。DPPH、ABTS<sup>+</sup>および CPZ<sup>+</sup>ラジカルに対するこれら 1-NapS と 2-NapS の抗酸化活性について調べることにより、さらにそれぞれの非硫酸化前駆体 1-Nap および 2-Nap との比較評価を行なった。EC<sub>50</sub> 値を算出して活性を比較することにより、1-NapS は 1-Nap よりも 5.60 から 7.35 分の 1 ほどの低い抗酸化活性を示すことを認めた。対照的に、2-NapS は非硫酸体である 2-Nap と同等の活性を示すことを見出した。本研究では、燻蒸防虫剤または農薬として一般的に使用される化学物質ナフタレン(Sudakin et al., 2011)

より体内で薬物代謝時に生じる Nap およびその硫酸体を、代謝前後のモデル化合物として実験に用いた。そのため、外来異物の代謝と生理活性や毒性の差異、代謝の意義について研究を展開することもまた興味深い今後の課題として考えられる。現状では活性試験に供するほどの十分量の食材由来フェノール性硫酸体の入手が容易ではないものの、今後硫酸転移酵素による合成法または有機合成による代謝物合成法の検討とともに、代謝物を用いた活性の比較評価を幅広く行うことによって、体内における活性発現の機構解明も進むことと期待される。有機合成法は、化合物の安定性や硫酸基の結合部位における位置選択性が難しい側面があるものの、例えば既報による tyrosine *O*-sulfate の合成法(Jevons et al., 1963)等を応用利用することにより、低コストでも実施可能と思われる。一方、酵素反応では基質特異性をもって硫酸化させることが可能であるものの、十分量の硫酸転移酵素タンパク質と硫酸供与体である 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate の確保がまた必要となる。

以上より、本研究では、熊本県産の特色ある健康志向食品としてのヤーコン茶とモリンガ葉茶の熱水抽出物にポリフェノールが確かに含まれており、これらが保有する抗酸化作用の特徴として、Trolox と比較することで  $O_2^-$  ラジカルに対する特異性を明らかにした。次に薬物代謝の過程で硫酸化されたフェノール性化合物によっては、ナフタレン構造を有する等の場合には、必ずしも常にフリーラジカルに対する消去活性が低下する訳ではないこと、硫酸化される位置に依存して活性が維持されることを試験管レベルで明らかにした。しかしながら、これら地域性のある健康志向食品を用いた本研究の結果は、あくまでもフリーラジカルに対する抗酸化活性の特徴を試験管レベルで調べたものである。生体レベルでこれらのような効果を実証できるかどうかについては、今後これらハーブティー中の抗酸化成分が実際に生体内にどの程度吸収され、どの程度抗酸化作用が発揮されるのかを調べていく必要がある。健康食品等の生体に及ぼす影響評価については未だ議論的となっており、望まれない副作用や医薬品との相互作用等による生体機能の増悪化の助長についての可能性もあるため、慎重に考慮する必要がある。また、地域の農林水産物の付加価値向上と健康有益面から特色を見出してさらに利用促進を推進するにあたっては、一般的な緑茶や食材などとの比較や、熊本県内外のみならず国別の栽培地域や品種ごとに特徴付けと比較評価を行ない、疾病予防やリスク改善に向けて期待される効能の検証を生体レベルで着実に実証していくこともまた重要であると考えられる。

## 参考文献

- Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. (2003) Crit Care Med, 31, (4 Suppl), S195-S199.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. (2013) Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm J, 21, 143-152.
- Allali-Hassani A, Pan PW, Dombrowski L, Najmanovich R, Tempel W, Dong A, Loppnau P, Martin F, Thornton J, Edwards AM, Bochkarev A, Plotnikov AN, Vedadi M, Arrowsmith CH. (2007) Structural and chemical profiling of the human cytosolic sulfotransferases. PLoS Biol, 5, 1063-1078.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Ozyürek M, Celik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI, Ozyurt D. (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules, 12, 1496-1547.
- Arand M, Robertson LW, Oesch F. (1987) A fluorometric assay for quantitating phenol sulfotransferase activities in homogenates of cells and tissues. Anal Biochem, 163, 546-551.
- Ashokkumar D., Thamilselvan V, Senthilkumar GP, Mazumder UK, Gupta M. (2008) Antioxidant and free radical scavenging effects of *Lippia nodiflora*, Pharm Biol, 46, 10-11, 762-771.
- Ayala DC, Morin D, Buckpitt AR. (2015) Simultaneous quantification of multiple urinary naphthalene metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. PLoS One, 10, 1-16 (e0121937).
- Aybar MJ, Sanchez Riera AN, Grau A, Sanchez SS. (2001) Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. J Ethnopharmacol, 74, 125-132.
- Beekmann K, Actis-Goretta L, van Bladeren PJ, Dionisi F, Destailats F, Rietjens IM. (2012) A state-of-the-art overview of the effect of metabolic conjugation on the biological activity of flavonoids. Food Funct, 3, 1008-1018.
- Benzie IF, Strain JJ. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal Biochem, 239, 70-76.
- Blois MS. (1958) Antioxidant determinations by the use of the stable free radical. Nature, 181, 1199-1200.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem,

72, 248-254.

- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*, 28, 25-30.
- Bruck R, Shirin H, Aeed H, Matas Z, Hochman A, Pines M, Avni Y. (2001) Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. *J Hepatol*, 35, 457-464.
- Cakmakci S, Topdas EF, Kalin P, Han H, Sekerci P, Kose LP, Gulcin I. (2015) Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *Intl J Food Sci Technol*, 50, 472-481.
- Campos D, Betalleluz-Pallardel I, Chirinos R, Aguilar-Galvez A, Noratto G, Pedreschi R. (2012) Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* poepp. & endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chem*, 135, 1592-1599.
- Cantumedellin N, Kelley EE. (2013) Xanthine oxidoreductase- catalyzed reactive species generation: a process in critical need of reevaluation. *Redox Biol*, 1, 353-358.
- Chang C-H, Lin H-Y, Chang C-Y, Liu Y-C. (2006) Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *J Food Eng*, 77, 478-485.
- Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, Phornchirasilp S, Morales NP, Phivthong-Ngam L, Ratanachamnong P, Srisawat S, Pongrapeeporn KU. (2008) The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *moringa oleifera* lam leaves. *J Ethnopharmacol*, 116, 439-446.
- Connor M. (2009) Allopurinol for pain relief: more than just crystal clearance? *Br J Pharmacol*, 156, 4-6.
- Cosentino F, Patton S, D'Uscio LV, Werner ER. (1998) Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest*, 101, 1530-1537.
- Dayal B, Yannamreddy VR, Amin R, Lea MA, Attygalle AB. (2013) Bioactive compounds in *Moringa oleifera*: Isolation, structure elucidation, and their antiproliferative properties. In *Tropical and Subtropical Fruits: Flavors, Color, and Health Benefits*, (Patil BS, Jayaprakasha GK, Roa CO, Mahattanatawee K. eds.) Chapter 13, pp.203-219, ACS Symposium Series Vol. 1129. eBook, ACS Publications, Washington DC.
- Dechelotte P, Varrentrapp M, Meyer HJ, Schwenk M. (1993) Conjugation of 1-naphthol in human gastric epithelial cells. *Gut*, 34, 177-180.

- Delgado GT, Tamashiro WM, Marostica Jr MR, Pastore GM. (2013) Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. *Plant Foods Hum Nutr*, 68, 222-228.
- Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. (2002) Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes*, 51, 1118-1124.
- Dorland. (2011) *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*, 32nd Edition, pp.1231, Elsevier Saunders Philadelphia, PA.
- Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82, 47-95.
- Falany C, Roth JA. (1993) Properties of human cytosolic sulfotransferases involved in drug metabolism. In *Human Drug Metabolism: From Molecular Biology to Man*. (Jeffery, E.H. ed.), pp.101-115, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L. (2007) Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem*, 100, 1511-1516.
- Fleming I, Michaelis UR, Brendenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Buss R. (2001) Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res*, 88, 44-51.
- Fowler G, Daroszewska M, Ingold KU. (2003) Melatonin does not “directly scavenge hydrogen peroxide”: demise of another myth. *Free Radic Biol Med.*, 34, 77-83.
- Fukami T, Katoh M, Yamazaki H, Yokoi T, Nakajima M. (2008) Human cytochrome P450 2A13 efficiently metabolizes chemicals in air pollutants: naphthalene, styrene, and toluene. *Chem Res Toxicol*, 21, 720-725.
- Genta S, Cabrera W, Habib N, Pons J, Carillo IM, Grau A, Sanchez S. (2009) Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clin Nutr*, 28, 182-187.
- Gulcin I. (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217, 213-220.
- Gutowski M, Kowalczyk S. (2013) A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta Biochim Pol*, 60, 1-16.
- Habib NC, Honore SM, Genta SB, Sanchez SS. (2011) Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: biochemical approach. *Chem Biol Interact*, 194, 31-39.
- Hail N, Cortes M, Drake EN, Spallholz JE. (2008) Cancer chemoprevention: a radical perspective. *Free Radic Biol Med*, 45, 97-110.

- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300.
- Harkness RA, Beveridge GW, Davidson DW. (1971) Percutaneous absorption of 1-naphthol-(<sup>14</sup>C) in man. *Br J Dermatol*, 85, 30-34.
- Havenith RW, deWijs GA, Attema JJ, Niermann N, Speller S, de Groot RA. (2008) Theoretical study of the stable radicals galvinoxyl, azagalvinoxyl and wurster's blue perchlorate in the solid state. *J Phys Chem A*, 112, 7734-7738.
- Isozaki T, Tamura H. (2001) Epigallocatechin gallate (EGCG) inhibits the sulfation of 1-naphthol in a human colon carcinoma cell line, Caco-2. *Biol Pharm Bull*, 24, 1076-1078.
- Jevons FR. (1963) Tyrosine *O*-sulphate in fibrinogen and fibrin. *Biochem J*, 89, 621-624.
- Jiwajinda S, Santisopasri V, Murakami A, Kim OK, Kim HW, Ohigashi H. (2002) Suppressive effects of edible thai plants on superoxide and nitric oxide generation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 3, 215-223.
- Kashiwada Y, Ahmed FA, Kurimoto S, Kim SY, Shibata H, Fujioka T, Takaishi Y. (2001) New  $\alpha$ -glucosides of caffeoyl quinic acid from the leaves of *moringa oleifera* lam. *J Nat Med*. 66, 217-221.
- Kim HW, Murakami A, Nakamura Y, Ohigashi H. (2002) Screening of edible Japanese plants for suppressive effects on phorbol ester-induced superoxide generation in differentiated HL-60 cells and AS52 cells. *Cancer Lett*, 176, 7-16.
- Kim YJ, Chung JE, Kurisawa M, Uyama H, Kobayashi S. (2004) Superoxide anion scavenging and xanthine oxidase inhibition of (+)-catechin-aldehyde polycondensates. Amplification of the antioxidant property of (+)-catechin by polycondensation with aldehydes. *Biomacromolecules*, 5, 547-552.
- Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. (1986) PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res*, 59, 612-619.
- Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. (2015) Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: an overview. *Int J Mol Sci*, 16, 12791-12835.
- Lim CSH, Lim SL. (2013) Ferric reducing capacity versus ferric reducing antioxidant power for measuring total antioxidant capacity. *Lab Med*, 44, 51-55.
- Lin F, Hasegawa M, Kodama O. (2003) Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 2154-2159.
- Lipmann F. (1958) Biological sulfate activation and transfer. *Science*, 128, 575-580.

- Lissi EA, Pizarro M, Aspee A, Romay C. (2000) Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. *Free Radic Biol Med*, 28, 1051-1055.
- Liu L, Jiang W, Zhang L, Zhang Q. (2011) Chemical correlation between Shuanghuanglian injection and its three raw herbs by LC fingerprint. *J Sep Sci*, 34, 1834-1844.
- Miftode AM, Stefanache A, Stan M, Dorneanu V. (2010) Measurement of total antioxidant activity with chlorpromazine radical cation. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 114, 892-895.
- Mitra S, Abraham E. (2006) Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 732-741.
- Miyazawa T, Nakagawa K. (1998) Evaluation of antioxidant activity of natural products. *J Jpn Oil Chem Soc*, 47, 1073-1082.
- Molyneux P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26, 211-219.
- Mulder GJ, Jakoby WB. (1990) Sulfation. In conjugation Reactions in Drug Metabolism (Mulder, G.J. ed.), pp.107-161, Taylor and Francis, London.
- Murakami A, Kuki W, Takahashi Y, Yonei H, Nakamura Y, Ohto Y, Ohigashi H, Koshimizu K. (1997) Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion in ICR mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes. *Jpn J Cancer Res*, 88, 443-452.
- Nagaoka S, Nagai K, Fujii Y, Ouchi A, Mukai K. (2013) Development of a new free radical absorption capacity assay method for antioxidants: aroxyl radical absorption capacity (ARAC). *J Agric Food Chem*, 61, 10054-10062.
- Nagaraja P, Aradhana N, Suma A, Shivakumar A, Chamaraja NA. (2014) Quantification of antioxidants by using chlorpromazine hydrochloride: application of the method to food and medicinal plant samples. *Anal Sci*, 30, 251-256.
- Nakamura Y, Murakami A, Ohto Y, Torikai K, Tanaka T, Ohigashi H. (1998) Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate. *Cancer Res*, 58, 4832-4839.
- Nantasenamat C, Isarankura-Na-Ayudhya C, Naenna T, Prachayasittikul V. (2008) Prediction of bond dissociation enthalpy of antioxidant phenols by support vector machine. *J Mol Graph Model*, 27, 188-196.
- Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S. (2004) Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol Pharm Bull*, 27,

1414-1421.

- Nishimura T, Kabata K, Koike A, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. (2016) *In vitro* antiinflammatory effects of edible igusa soft rush (*Juncus effusus* L.) on lipoxygenase, hyaluronidase, and cellular nitric oxide generation assays: comparison with matcha green tea (*Camellia sinensis* L.). *Food Sci Technol Res*, 22, 395-406.
- Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. (2008) Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J*, 275, 3278-3289.
- Nouman W, Anwar F, Gull T, Amago N. (2016) Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven cultivars of *Moringa oleifera* lam. *Ind Corp Prod*, 83, 166-176.
- Obata T. (2002) Role of hydroxyl radical formation in neurotoxicity as revealed by *in vivo* free radical trapping. *Toxicol Lett*, 132, 83-93.
- Ojansivu I, Ferreira CL, Salminen S. (2011) Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends Food Sci Tech*, 22, 40-46.
- Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu OI. (2003) Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT – Food Sci Technol*, 36, 263-271.
- Oliveira GO, Braga CP, Fernandes AA. (2013) Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (poep.& endl.)] treatment. *Food Chem Toxicol*, 59, 256–260.
- Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. (2009) Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem Toxicol*, 47, 1507-1511.
- Oliveira PM, Coelho RP, Pilar BC, Golke AM, Güllich AA, Maurer P, da Costa Escobar Piccoli J, Schwanz M, Manfredini V. (2017) Antioxidative properties of 14-day supplementation with Yacon leaf extract in a hypercholesterolemic rat model. *R Bras J Biosci*, 15, 178-186.
- Olszewska MA, Presler A, Michel P. (2012) Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected *Sorbus* species. *Molecules*, 17, 3093-3113.
- Oyaizu M. (1986) Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44, 307-315.
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. (2006) Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol*

Rev, 58, 87-114.

- Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. (1995) An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*, 268, H2274-H2280.
- Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans C. (1999) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol*, 299, 379-389.
- Pimpao RC, Ventura MR, Ferreira RB, Williamson G, Santos CN. (2015) Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit puree. *Br J Nutr*, 113, 454-463.
- Pino E, Aspee A, Lopez-Alarcon C, Lissi E. (2006) Reactivity of hydroxynaphthalenes towards peroxy radicals. *J Phys Org Chem*, 19, 867-873.
- Preuss R, Angerer J, Drexler H. (2003) Naphthalene-an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health*, 76, 556-576.
- Preuss R, Koch HM, Wilhelm M, Pischetsrieder M, Angerer J. (2004) Pilot study on the naphthalene exposure of German adults and children by means of urinary 1- and 2-naphthol levels. *Int J Hyg Environ Health*, 207, 441-445.
- Prior RL, Hoang H, Gul, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsche-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem*, 51, 3273-3279.
- Przedborski S, Ischiropoulos H. (2005) Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 7, 685-693.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem*, 48, 3396-3402.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
- Reiners JJ Jr, Rupp T. (1989) Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase occurs during keratinocyte differentiation: modulation by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Invest Dermatol*, 93, 132-135.
- Sabu MC, Kuttan R. (2002) Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharmacol*, 81, 155-160.

- Sams C. (2017) Urinary naphthol as a biomarker of exposure: results from an oral exposure to carbaryl and workers occupationally exposed to naphthalene. *Toxics*, 5, 1-7.
- Scott JW, Cort WM, Harley H, Parrish DR, Saucy G. (1974) 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 51, 200-203.
- Shi H, Noguchi N, Niki E. (2001) Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol*, 335, 157-166.
- Shih MC, Chang CM, Kang SM, Tsai ML. (2011) Effect of different parts (leaf, stem and stalk) and seasons (summer and winter) on the chemical compositions and antioxidant activity of *Moringa oleifera*. *Int J Mol Sci*, 12, 6077-6088.
- Shindy HA. (2016) Basics in colors, dyes and pigments chemistry: A review. *Chem Int*, 2, 29-36.
- Shintani H. (2013) Isolation of neutrophils/assay of O<sub>2</sub><sup>-</sup> (superoxide anion radical) generation by cytochrome-*c* reduction. *Pharm Anal Acta*, 4, 243.
- Siddhuraju P, Becker K. (2003) Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem*, 51, 2144-2155.
- Singleton VL, Rossi JA Jr. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16, 144-158.
- Stohs SJ, Hartman MJ. (2015) Review of the safety and efficacy of *moringa oleifera*. *Phytother Res*, 29, 796-804.
- Sudakin DL, Stone DL, Power L. (2011) Naphthalene mothballs: emerging and recurring issues and their relevance to environmental health. *Curr Top Toxicol*, 7, 13-19.
- Sueishi Y, Hori M, Ishikawa M, Matsu-ura K, Kamogawa E, Honda Y, Kita M, Ohara K. (2014) Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species. *J Clin Biochem Nutr*, 54, 67-74.
- Sugahara S, Ueda Y, Fukuhara K, Kamamuta Y, Matsuda Y, Murata T, Kuroda Y, Kabata K, Ono M, Igoshi K and Yasuda S. (2015) Antioxidant effects of herbal tea leaves from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on multiple free radical and reducing power assays, especially on different superoxide anion radical generation systems. *J. Food Sci*, 80, C2420-C2429.
- Sugiura M, Nakanishi T, Kameno T, Doi Y, Fujino M. (2007) A new yacon cultivar, "Sarada otome". *Bull NARO West Reg Agric Res Cent*, 6, 1-13.
- Tai A, Sawano T, Ito H. (2012) Antioxidative properties of vanillic acid esters in

- multiple antioxidant assays. *Biosci Biotechnol Biochem*, 76, 314-318.
- Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. (2011) Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim Biophys Acta*, 1810, 170-177.
- Takebayashi J, Tai A, Gohda E, Yamamoto I. (2006) Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-*O*-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: a kinetic and stoichiometric study. *Biol Pharm Bull*, 29, 766-771.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*, 19, 669-675.
- Takebayashi J, Tai A, Gohda E, Yamamoto I. (2006) Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-*O*-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: a kinetic and stoichiometric study. *Biol Pharm Bull*, 29, 766-771.
- Ukeda H, Kawana D, Maeda S, Sawamura M. (1999) Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 485-488.
- Utsumi T, Klostergaard J, Akimaru K, Edashige K, Sato EF, Utsumi K. (1992) Modulation of TNF- $\alpha$ -priming and stimulation-dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys*, 294, 271-278.
- Valentova K, Lebeda A, Dolezalova I, Jirovsky D, Simonovska B, Vovk I, Kosina P, Gasmanova N, Dziechciarkova M, Ulrichova J. (2006) The biological and chemical variability of yacon. *J Agric Food Chem*, 54, 1347-1352.
- Valentova K, Sersen F, Ulrichova J. (2005) Radical scavenging and anti-lipoperoxidative activities of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts. *J Agric Food Chem*, 53, 5577-5582.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12, 1161-1208.
- Verma AR, Vijayakumar M, Mathela CS, Rao CV. (2009) *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food Chem Toxicol*, 47, 2196-2201.
- Wang B-S, Yu H-M, Chang L-W, Yen W-J, Duh P-D. (2008) Protective effects of pu-erh tea on LDL oxidation and nitric oxide generation in macrophage cells. *LWT -Food Sci Technol*. 41, 1122-1132.
- Watanabe J, Oki T, Takebayashi J, Takano-Ishikawa Y. (2014) Extraction efficiency of

- hydrophilic and lipophilic antioxidants from lyophilized foods using pressurized liquid extraction and manual extraction. *J Food Sci*, 79, C1665-C1671.
- Weinshilboum R, Otterness D. (1994) Sulfotransferase enzymes. In *Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity* (Kaufmann, F.C. ed.). pp.45-78, Springer-Verlag, Berlin.
- Weisburger JH. (2002) Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms. *Eur J Cancer Prev Suppl*, 2, S1-S7.
- Wiswedel I, Ulbricht O, Augustin W. (1989) Studies of lipid peroxidation in isolated rat heart mitochondria. *Biomed Biochim Acta*, 48, S73-S76.
- Yan X, Suzuki M, Ohnishi-Kameyama M, Sada Y, Nakanishi T, Nagata T. (1999) Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *J Agric Food Chem*, 47, 4711-4713.
- Yi L, Dratter J, Wang C, Tunge JA and Desaire H. (2006) Identification of sulfation sites of metabolites and prediction of the compounds' biological effects. *Anal Bioanal Chem*, 386, 666-674.
- Yokoyama A, Sakakibara H, Crozier A, Kawai Y, Matsui A, Terao J, Kumazawa S, Shimoi K. (2009) Quercetin metabolites and protection against peroxynitrite-induced oxidative hepatic injury in rats. *Free Radic Res*, 43, 913-921.
- 加藤隆一, 山添康, 横井毅. (2010) 薬物代謝学 医療薬学・医薬品開発の基礎として 第3版, pp.11-13, 東京化学同人, 東京都
- 小嶋道之, 森田武志, 齋藤優介, 西繁典 (2006) 8類の食用豆類に含まれるポリフェノールと抗酸化活性. *帯畜大報*, 27, 23-28.
- 柴崎正勝, 赤池昭紀, 橋田充, 栄田敏之, 山崎浩史, 灘井雅行. (2009) 薬物動態学, pp.87. 廣川書店, 東京都
- 田中友隆, 守屋尚, 高亀亜希, 実綿倫宏, 吉見聡, 村上英介, 沼田義弘, 岡信秀治, 久賀祥男, 大屋敏秀. (2009) アルコール性肝硬変を背景に発症したヤーコン茶による薬物性肝障害の1例, *日本消化器病学会雑誌*, 106, 834-839,
- 吉川敏一. (2011) フリーラジカルの医学 京府医大誌, 120, 381-391.

## 本論文に関わる報告

1. Sugahara S, Chiyo A, Fukuoka K, Ueda Y, Tokunaga Y, Nishida Y, Kinoshita H, Matsuda Y, Igoshi K, Ono M, Yasuda S. (2018.11) Unique antioxidant effects of herbal leaf tea and stem tea from *Moringa oleifera* L. especially on superoxide anion radical generation systems. *Biosci Biotechnol Biochem*, 82, 1973-1984.
2. Sugahara S, Fukuhara K, Tokunaga Y, Tsutsumi S, Ueda Y, Ono M, Kurogi K, Sakakibara Y, Suiko M, Liu M-C, Yasuda S. (2018.3) Radical scavenging effects of 1-naphthol, 2-naphthol, and their sulfate-conjugates. *J Toxcol Sci*, 43, 213-221.
3. Sugahara S, Ueda Y, Fukuhara K, Kamamuta Y, Matsuda Y, Murata T, Kuroda Y, Kabata K, Ono M, Igoshi K, Yasuda S. (2015.11) Antioxidant effects of herbal tea leaves from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on multiple free radical and reducing power assays, especially on different superoxide anion radical generation systems. *J Food Sci*, 80, C2420-C2429.

## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始ご懇意なるご指導を賜りました東海大学大学院生物科学研究科 食品機能科学研究室 安田伸教授に深甚の謝意を表します。

本論文のご校閲、ご助言を賜りました、天然物化学研究室小野政輝教授、食品生体調節学研究室 永井竜児教授、井越敬司 東海大学名誉教授、生物化学研究室 米田一成准教授に心より感謝申し上げます。

本研究にご協力およびご助言賜りました宮崎大学農学部 応用生物科学科生体分子機能化学研究室 水光正仁教授、同研究室榊原陽一教授、黒木勝久助教、アメリカ合衆国オハイオ州 トレド大学 薬学部 Ming-Cheh Liu 教授に御礼申し上げます。

東海大学農学部バイオサイエンス学科 食品機能科学研究室 河本佳奈江先輩、平山大二郎先輩には学部時代より実験のご指導をいただきました。ともに研究活動を通して励ましあった上田裕人氏をはじめ同研究室のメンバー各位、硫酸化代謝物研究メンバーの堤秀平氏、竹内良氏、福原久美子女史、徳永祐希氏、大川瑛梨子女史に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究活動を続けるに当たり、精神的、金銭的に支えてくれた両親に心から感謝致します。

2019年7月  
菅原 進太郎