

化学発光を用いた活性酸素／抗酸化能測定例

目次

はじめに	1頁
測定例 1) Superoxideの検出およびSuperoxide dismutaseによるSuperoxide除去活性	2頁
測定例 2) 過酸化水素の検出およびCatalaseによる過酸化水素除去活性	3頁
測定例 3) $\cdot\text{OH}$ ラジカルの測定およびクロロゲン酸による $\cdot\text{OH}$ ラジカル除去活性	4頁

化学発光を用いた活性酸素／抗酸化能測定

活性酸素の功罪

酸素を利用して生命活動をしている生物の多くは、膨大なエネルギーによって活発な生命活動ができるという メリットがある反面、酸素傷害の危険性というリスクを取り除くことはできません。例えば、臓器移植を行う 場合、取り出した臓器は一時的な低酸素状態と なり、移植後再び正常に機能を始める際に、高 酸素状態になります。この高酸素状態となるこ とで酸素ラジカルが生成し、障害が起こるとい われています（虚血／再灌流）。一方、免疫細胞 によるウィルスや病原性菌の除去、酸化還元による生体内でのシグナル伝達など、プラスの機 能もあります。この様に、活性酸素には2つの 面があります。これらの性質を理解し、様々な 分野で有効活用されています (table1).

table.1 産業界での利用

分野	用途	
農業	除草剤	雑草を除去する.
建築業	酸化チタン ラジカル発生剤	素材表面の正常を保つ. 汚染土壌など環境の清浄化.
食品	抗酸化物質	添加することで商品価値を高める.
医薬品	抗酸化物質	疾病状態からの回復.
香粧品	抗酸化物質	UVにより発生した活性酸素の防御.

活性酸素の種類と生体内抗酸化システム

活性酸素とは、狭義ではスーパーオキシド (O_2^-)、一重項酸素 (1O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、過酸化水素 (H_2O_2) といった、酸素ラジカルのことをさします。広義では、これらに脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) や脂質 ペルオキシラジカル (LOO \cdot) などの脂質過氧化物や、一酸化窒素 (NO)、ペルオキシナイトライト (ONOO $^-$)、次 亜塩素酸 (HOCl) なども含めます。

生体内での活性酸素生成は、 O_2^- は核膜や形質膜などの生体膜やミトコンドリアで発生します。また H_2O_2 は、 O_2^- を抗酸化酵素が処理する際に発生します。 $\cdot OH$ は、 H_2O_2 と遊離の金属とが反応することで発生します。 1O_2 は、 生体内色素に UV があてられることで発生します。過剰に発生した活性酸素は、生体内の抗酸化システムが消 去することでバランスを保っています。抗酸化システムには、 O_2^- に対しては Superoxide Dismutase、 H_2O_2 に対しては Catalase と、それぞれ抗酸化酵素があります。 1O_2 と $\cdot OH$ に対しては、抗酸化酵素はなく、 β カロチ ンなどの抗酸化物質により消去します。

活性酸素／抗酸化能測定法

活性酸素は、その反応性の高さから直接検出することはできません。よって検出には、発色試薬や発光試薬などと反応させ、試薬の変化により検出します。また抗酸化能は、任意の 方法で活性酸素を発生させ、活性酸素、抗酸化剤、検出試薬 の競合反応により得ます。

活性酸素の検出方法には、電子スピン共鳴法 (ESR 法)、発色 法、発光法などがあります (table2)。発光法は、Luminol や MCLA、MPEC を用いる方法です。発光試薬と活性酸素との反応 による発光反応を捉えて、相対量で判断します。多検体処理 が可能な点や、反応時間が短いなどがメリットです。

table.2 主な活性酸素／抗酸化能測定法

チトクロームC還元法	O_2^-
NBT還元法	O_2^-
ESR法	$O_2^- / \cdot OH$
化学発光法	$O_2^- / \cdot OH / ^1O_2 / LOOH$
DPPHラジカル法	DPPHラジカル

発光を用いた活性酸素／抗酸化能測定

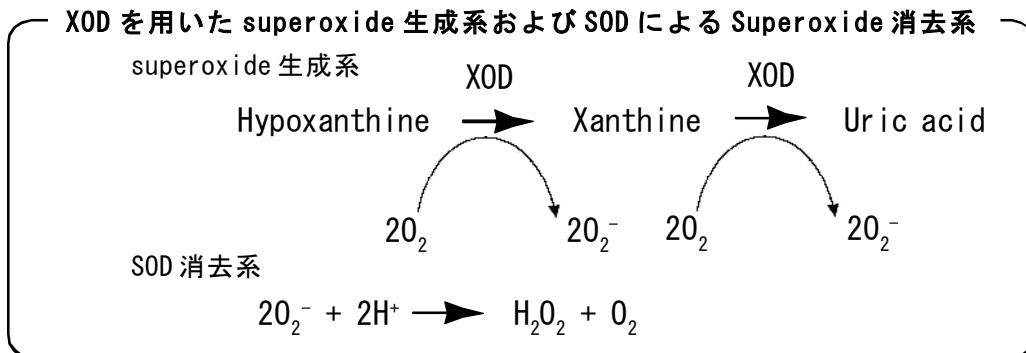
発光を用いて活性酸素の検出を行う場合、前述のようないくつかの発光試薬から、目的の活性酸素種との反応 性が高い試薬を選択して使用します。また、抗酸化能測定を行う場合は、活性酸素発生系に対して抗酸化物質 を添加し、抗酸化物質のある／なしによる発光により評価します。

以下に、酵素などによる活性酸素発生系を用いて、発光を用いた活性酸素および抗酸化能を測定した例をご紹介します。

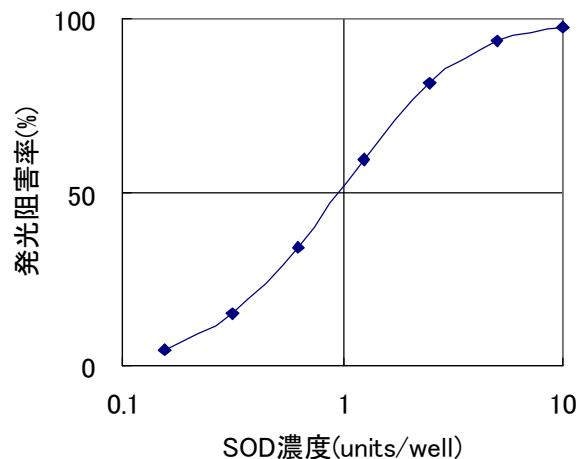
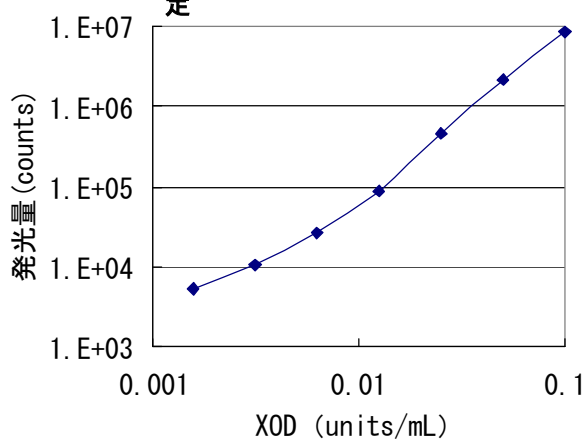
測定例 1)

Superoxide の検出および Superoxide dismutase による Superoxide 消去活性測定

Superoxide は、Xanthine oxidase を用いることで発生させることができます。よってこの条件下に発光試薬を添加することで Superoxide の検出を試みました。また、この発生系を用いて Superoxide dismutase による Superoxide の消去活性測定を行いました。



発光を用いた Superoxide の検出および Superoxide 消去活性測定



実験条件

試薬

- 酵素 Xanthine Oxidase
Sigma社の酵素を0.1M リン酸カリウム溶液 (pH7.5) で各濃度の溶液とした。
- 基質 Hypoxanthine
0.1M リン酸カリウム溶液 (pH7.5) で0.72mM溶液とした。
- 発光試薬 MPEC
300uM溶液を作製した。
- 抗酸化酵素 Superoxide dismutase
酵素を0.1M リン酸カリウム溶液 (pH7.5) で各unit数の溶液とした。

測定

黒色マイクロプレートに各溶液をそれぞれ以下の容量で分注。

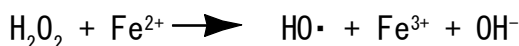
Superoxideの検出		Superoxide消去活性	
300uM MPEC	10uL	300uM MPEC	10uL
XOD (各濃度)	60uL	XOD (0.1units/mL)	60uL
SOD	-	SOD (各濃度)	10uL
緩衝液	180uL	緩衝液	170uL

装置にマイクロプレートを設定し、0.72mM HXを50uL分注。
分注と同時に1分間積算。

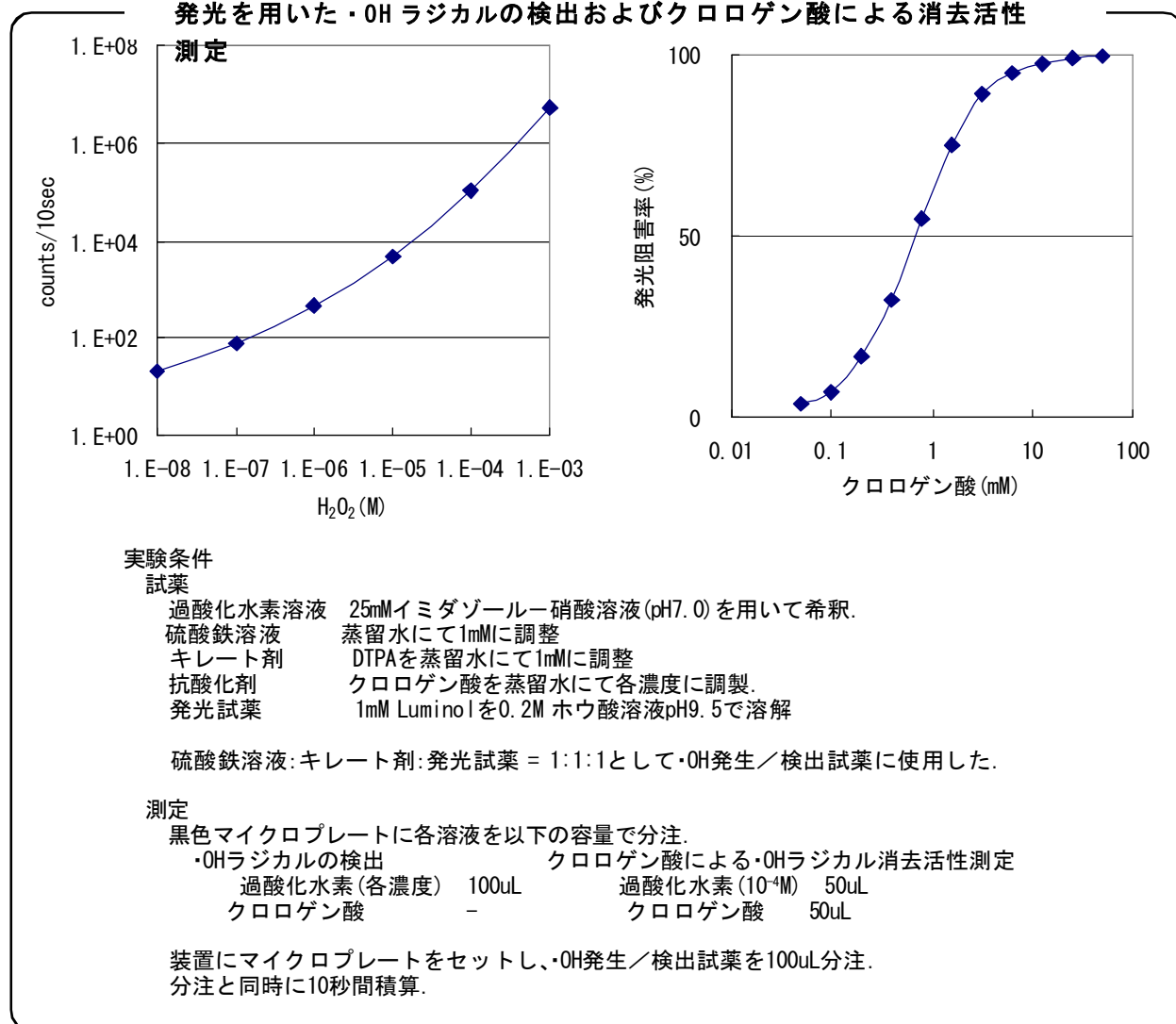
測定例 3)・OHラジカルの測定およびクロロゲン酸による・OHラジカル消去能測定

・OHラジカルは、生体内において過酸化水素とFe²⁺やCu⁺といった金属イオンとの反応(Fenton反応)により発生するラジカルで、酸素ラジカルの中でも反応性が最も高く、かつ寿命が短いラジカルです。また、脂質の過酸化や遺伝子の損傷などに直接関与していると考えられています。・OHラジカルはFenton反応により、実験レベルで発生させることができます。また・OHラジカルは、Luminolを用いて検出できることが知られています。よって、この発生系を用いてLuminolによる・OHラジカルの発光検出と、クロロゲン酸を用いた消去活性測定を行いました。

Fenton反応による・OHラジカルの発生



発光を用いた・OHラジカルの検出およびクロロゲン酸による消去活性



参考文献

- 1) O. Shimomura, Chun Wu, A. Murai, and H. Nakamura (1998) Evaluation of Five Imidazopyrazinone-Type Chemiluminescent Superoxide Probes and Their Application to the Measurement of Superoxide Anion Generated by *Listeria monocytogenes*. Anal. Biochem. 258, 230-235
- 2) Osamu Hirayama and Masakatshu Yida (1997) Evaluation of Hydroxyl Radical-Scavenging Ability by Chemiluminescence. Anal. Biochem. 251, 297-299
- 3) 浅田浩二・中野稔・柿沼カツ子編、活性酸素測定マニュアル、講談社
- 4) 谷口直之編、活性酸素実験プロトコール、秀潤社
- 5) 今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店

測定例 2) 過酸化水素の検出および Catalase による過酸化水素消去活性

過酸化水素は生体内では、SuperoxideがSODにより分解された際に発生することで知られています。比較的安定な活性酸素なため、生体内では長く、広範囲に拡散します。過酸化水素それ自体は反応性の低いものですが、金属イオンと反応することで反応性の高い・OHラジカルになります。

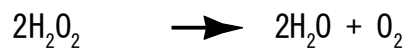
ここでは、Luminol-HRP (Horse Radish Peroxidase) を用いての検出および消去酵素による消去活性測定を行いました。

SODによる過酸化水素の発生および Catalase による過酸化水素の消去

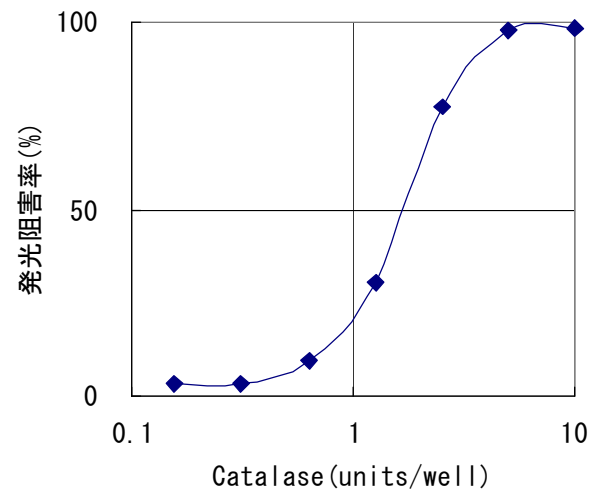
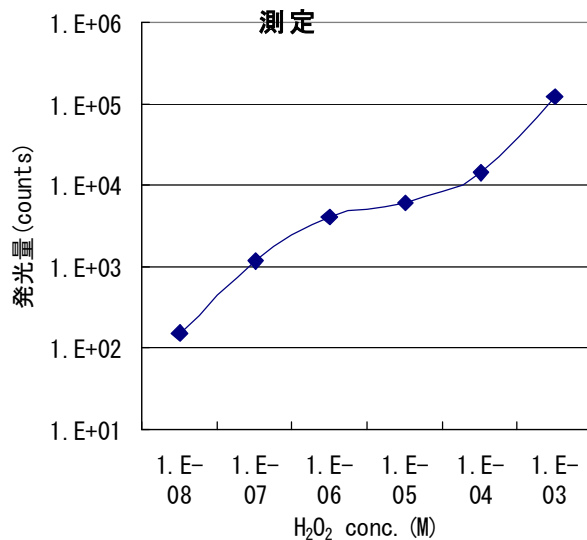
SOD 消去系



Catalaseによる過酸化水素消去系



発光を用いた過酸化水素の検出および Catalase 活性



実験条件

試薬

過酸化水素溶液 25mMイミダゾール-硝酸溶液 (pH7.0) を用いて希釈。
 発光試薬 Luminol 10mg + HRP 100 unit/100mL 0.2M ホウ酸溶液 pH9.5
 抗酸化酵素 catalase
 酵素を25mMイミダゾール-硝酸溶液 (pH7.0) で各unitの溶液に調製した。

測定

黒色マイクロプレートに各溶液を以下の容量で分注。

過酸化水素の検出		Catalase活性測定	
過酸化水素 (各濃度)	100uL	過酸化水素 (10 ⁻⁵ M)	50uL
Catalase	-	Catalase (各濃度)	50uL

装置にマイクロプレートをセットし、発光試薬を100uL分注。
 分注と同時に10秒間積算。

0.1=10 ⁻¹	deci	d	one tenth of
0.01=10 ⁻²	centi	c	one hundredth of
0.001=10 ⁻³	milli	m	one thousandth of
0.000 001=10 ⁻⁶	micro	μ	one millionth of
0.000 000 001=10 ⁻⁹	nano	n	one billionth of
0.000 000 000 001=10 ⁻¹²	pico	p	one trillionth of
0.000 000 000 000 001=10 ⁻¹⁵	femto	f	one quadrillionth of
0.000 000 000 000 000 001=10 ⁻¹⁸	ATTO	a	one quintillionth of



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- ペリスタポンプ
- クロマトグラフ
- 電気泳動分析機器

- DNA分析機器
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- バイオ研究機器
- 医療分析装置

- 本 社 〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-32 ☎(03)3814-4861 (代表) ☎(03)3814-4868
◆技術サービス ☎(03)3814-4794 (代表) ☎(03)3814-4856
- 技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560 (代表) ☎(03)5818-7563
センター (東京都許可 医療機器製造業)
- 大阪支店 〒530-0054 大阪市北区南森町2-1-7 ☎(06)6365-7121 (代表) ☎(06)6365-7125

■URL <http://www.atto.co.jp/>

■本 社 e-mail: info@atto.co.jp

■大阪支店 e-mail: osaka@atto.co.jp