

・ 分担研究者・研究協力者の報告書

15 . デヒドロアスコルビン酸の生理活性

研究協力者 奈良女子大学 教授 小城 勝相

研究要旨

ODSラットを使用して、12臓器でのアスコルビン酸及びデヒドロアスコルビン酸濃度を求めることにより、デヒドロアスコルビン酸のビタミンCとしての正確な生理活性を評価した。

A . 緒言

ビタミンC(C)はその強い還元力から抗酸化作用をもつことで有名なビタミンである。Cは通常体内で酸化されモノデヒドロアスコルビン酸になり、モノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼによって、アスコルビン酸に還元再生されるか、不均化反応によって生じたデヒドロアスコルビン酸(DHA)がグルタチオンやデヒドロアスコルビン酸レダクターゼによってアスコルビン酸に再生される。このサイクルによって再生されながら抗酸化作用を示す。

一方、貯蔵や調理の過程により食品中のCは酸化型のデヒドロアスコルビン酸(DHA)に変わる。DHAの生理活性は従来Cと同等と考えられている。しかしながら、DHAは中性条件で瞬間的に2,3-ジケトグルコン酸(DKG)に変換され、DKGはもはやDHAやCに変換されることはない。動物臓器中ではDHAはタンパク質によって保護されているため、この加水分解反応はおこらないが、経口投与して消化器系に存在するときにはそのようなことは考えにくい。

これまで経口投与によるDHAの活性を正確な測定法に基づいて評価した例はない。我々は、Cの正確な測定法を1992年に確立した(1)。この正確な方法でラット血漿のCを測定すると従来法の3分の1しかないことが判明した。C研究において最も基礎的な測定法に特異性がないことが判明したため、Cの研究は最初からやり直す必要がある。

CおよびDHAの生理活性を正確に評価することは栄養所要量の策定など国民生活にも深くかかわる重大事であり、社会的にも大きな意義を持つ。

これまで、上記のようにCの正確な測定法

を確立し、ヒトと同様遺伝的にCを合成できないODSラットを用いてそのC欠乏における12種類の臓器でのC減少速度を測定し4種類に分類できることを示した(2)。ODSラットを用いて生体内で実際にCとビタミンE(E)が相補的相互作用を行うことも証明した(3)。さらにストレプトゾトシン糖尿病(4)、各種化学物質たとえば、四塩化炭素(5)、チオアセトアミド(6)、D-ガラクトサミン(7)による肝障害において他の酸化ストレス指標(E、脂質ヒドロペルオキシド)に先駆けて変化するため酸化ストレスの鋭敏な指標になることを明らかにしてきた。

ODSラットは0.1%のCを含む飲料水で飼育すると正常に成長することがわかっている。これと同じ濃度の0.1%DHAで飼育したときの、12臓器でのC及びDHA濃度を求めることにより、DHAのCとしての正確な生理活性を評価した。

B . 実験方法

1) 実験動物の扱い

本研究はすべて、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月総理府告示第6号)を遵守して行った。

遺伝的にCを合成できないODSラット(雄、6週齢)を5群に分け、それぞれに異なる濃度のCを含む水で飼育した。正常な発育をする0.1% C、低濃度の水として0.03% C、0.01% C、さらにCが0%の欠乏群を用意した。DHAは0.1%DHAを含む水(DHAは中性条件で瞬間的にDKGに変換するので1 mMの塩酸水溶液に溶解した)で飼育した。飼料は、Cを含まないAIN-76に基づいた粉末飼料を用いた。

ラットは24±2、明暗サイクル12h/12h中で飼育した。

2) 血液, 各臓器の採取

実験開始から3週間後, ラットを開腹し, 血液を採取後, 生理食塩水で灌流した後, 11臓器(肝, 腎, 副腎, 脾臓, 肺, 心臓, 脳, 胃, 小腸, 大腸, 筋肉)を摘出した。

血液は新鮮な状態で4, 10,000 rpmで5分間遠心し, 上清の血漿を採取した。

各臓器をその5倍量のPhosphate buffered saline (PBS) {0.9%NaCl / 0.01 M phosphate buffer, pH7.2}を加えて氷中でガラステフロン製ホモジナイザーを用い, ホモジナイズした。ビタミンCの定量

[原理]

Cを酸化型アスコルビン酸{DHA+DKG}に変換し, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNPH)を反応させて生成するオサゾン(デヒドロアスコルビン酸ビス-ジニトロフェニルヒドラゾン)をHPLCで特異的に定量した(式1)。

アスコルビン酸の定量には, 比色定量法が広く用いられているが, この方法はDHA以外のケトン体などのカルボニル化合物とDNPHとの反応物をも含んでしまうため, アスコルビン酸を特異的に定量したことにはならない。そのため, 以前, 本研究室で開発したオサゾンのみをHPLCで分離定量する方法を用いた。

なお, 式1のオサゾンの構造は, ¹HNMR, ¹³CNMR, および相関NMRスペクトルを駆使して決定した。(1)

[実験操作]

今回の実験では, 総-アスコルビン酸, 酸化型C(デヒドロアスコルビン酸+2,3-ジケトグルコン酸)を定量した(図1)。

まず総-アスコルビン酸は, 5倍量のPBSでHomogenizeしたHomogenate 100μlに1% SnCl₂ / 20% HPO₃ 900μlを加えて除タンパクし, 10,000 rpmで5分間遠心し, その上澄みを100μl分取する。これに0.2% 2,6-ジクロロインドフェノール100μlを加え酸化した後, 1% SnCl₂ / 5% HPO₃ 50 μl, 2%ジニトロフェニルヒドラジン120 μlを加えて, 37 °Cで3時間反応させてオサゾンを生産させた。

オサゾン生成の反応後, 水 1 mlと酢酸エチル1 mlを加え, 激しく振とうした後, 3,000 rpmで5分間遠心し, 酢酸エチル層を600 μl取り出す。これをevaporatorで濃縮乾固し, アセトニトリル200 μlで溶解後, 10 μlをHPLCに供した。酸化型C(DHA+DKG)はインドフェノールによる酸化を行わず, 以下は同様の手順で行った。さらに, DKGは, DHAをジチオ

スレイトール(DTT)で還元してCに変換し, 同様の操作をすれば測定できる。今回は以下に述べるように酸化型Cが総Cの5%以下であったことからDKGの測定は行わなかった。

HPLCポンプは島津LC 10AD型, 検出器は島津SPD 10A, 記録計は島津C-R6A型クロマトパックを用いた。また, HPLCの条件としては, カラムはμBondasphere 5μC18 100Aカラム(Waters), 溶媒は0.1%トリエチルアミンを含む50%アセトニトリル pH 3.5, 流量 1 ml/min, 波長505 nmにて検出した。

本法によるCの検出限界は1 pmolであり, 回収率も定量的である。

C. 結果と考察

C欠乏群以外の体重は順調に増加した。この事実はDHAが一定のC活性を持つことを意味している。次にこれらの動物臓器のC濃度について検討した。

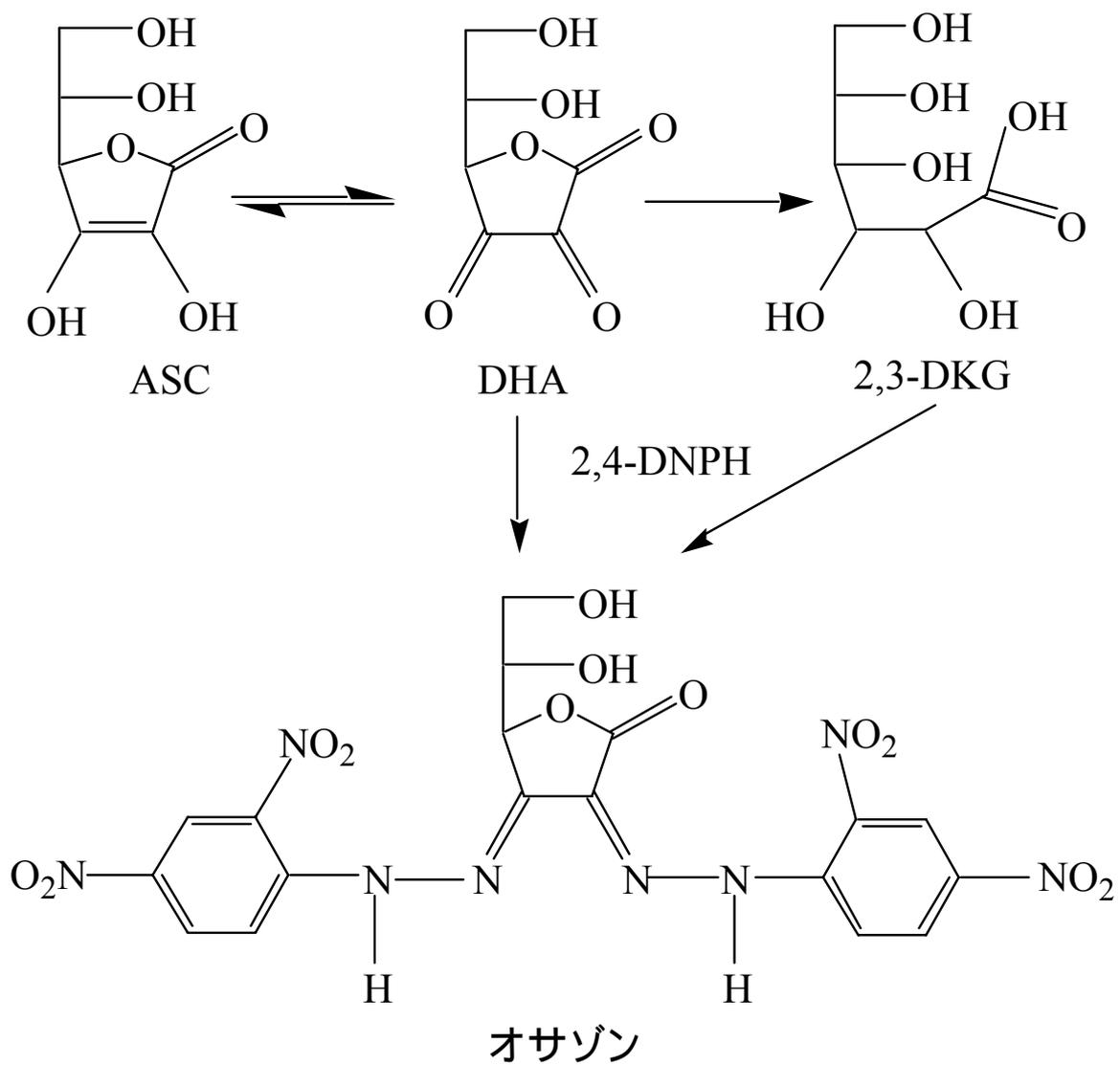
全臓器について酸化型C(DHA+DKG)はCの5%以下であったことから, DHAは吸収されたあと, 臓器ではCとして利用されていることは明らかである。図2には12臓器について, 0.1%-Cで飼育した対照群の臓器全C量を100%としたときの各群のC量の相対値を表すグラフを示した。この図より明らかのように, 0.1% DHAで飼育した群のC濃度は, 0.1%-C群(対照群)もしくは0.03%-C群に比べて有意に低かった。全12臓器で有意差が無かったのは0.01%-C群であったことから, 経口投与のDHAのC活性はCの10%であることが判明した。

以上の結果より, 栄養所要量を考える場合, 食品中のCは, DHAとCを区別して, しかも正確な測定法を用いて測定する必要性があると結論できる。

文 献

1. K. Kishida, Y. Nishimoto, and S. Kojo, Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 64, 1505-1507 (1992).
2. S. Tokumaru, S. Takeshita, R. Nakata, I. Tsukamoto, and S. Kojo, Change in the level of vitamin C and lipid peroxidation in tissues of the inherently scorbutic rat during ascorbate deficiency. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2748-2753 (1996).
3. K. Tanaka, T. Hashimoto, S. Tokumaru, H. Iguchi, and S. Kojo, Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J.*

- Nutr., 127, 2060-2064 (1997).
4. F. Sun, K. Iwaguchi, R. Shudo, Y. Nagaki, K. Tanaka, K. Ikeda, S. Tokumaru, and S. Kojo, Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin. Sci.*, 96, 185-190 (1999).
 5. F. Sun, C. Tsutsui, E. Hamagawa, Y. Ono, Y. Ogiri, and S. Kojo, Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1535, 186-191 (2001).
 6. F. Sun, S. Hayami, Y. Ogiri, S. Haruna, K. Tanaka, Y. Yamada, S. Tokumaru, and S. Kojo, Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1500, 181-185 (2000).
 7. F. Sun, E. Hamagawa, C. Tsutsui, N. Sakaguchi, Y. Kakuta, S. Tokumaru, and S. Kojo, Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by D-galactosamine in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 65, 101-107 (2003).



式 1

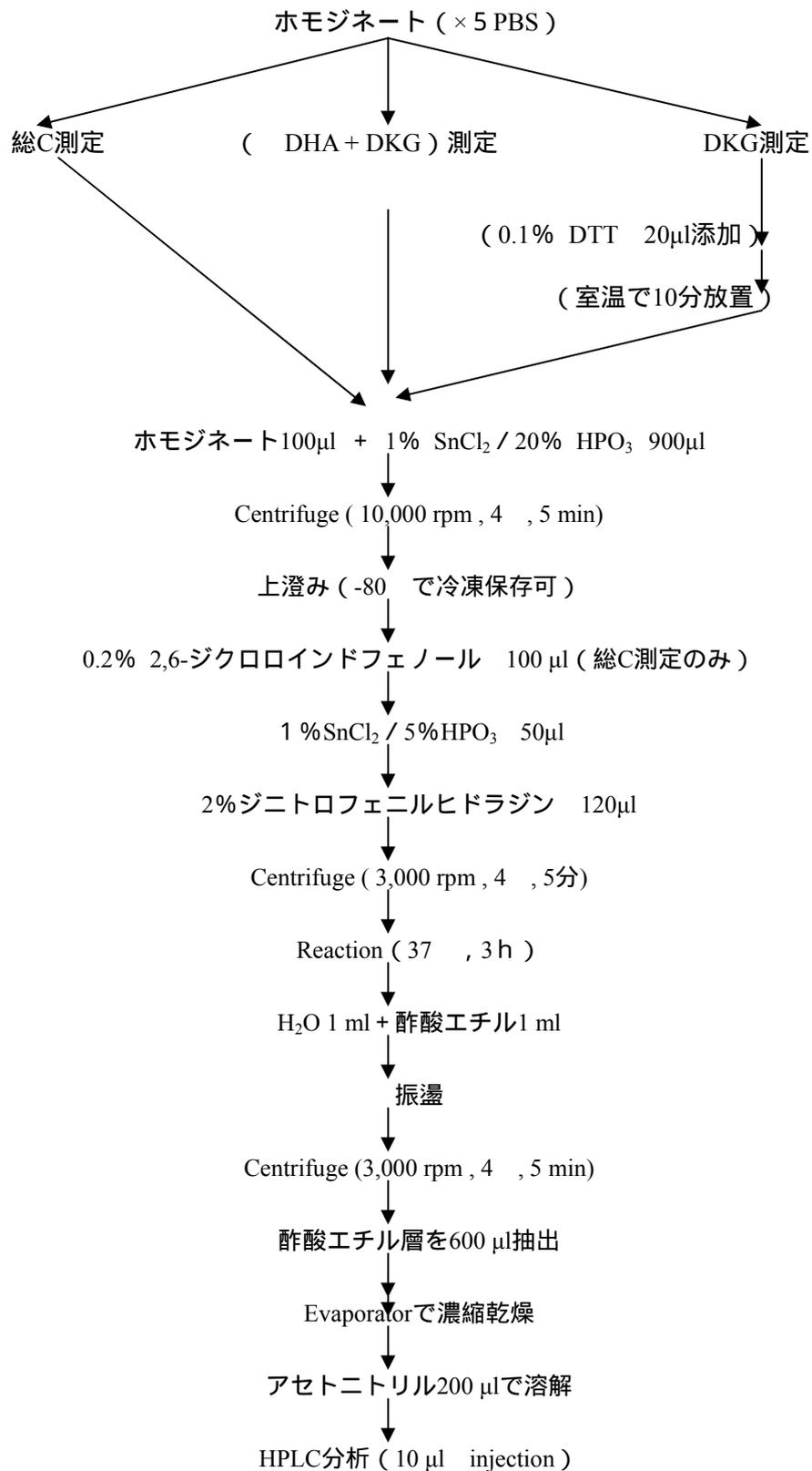


図1 . 実験操作方法の概略

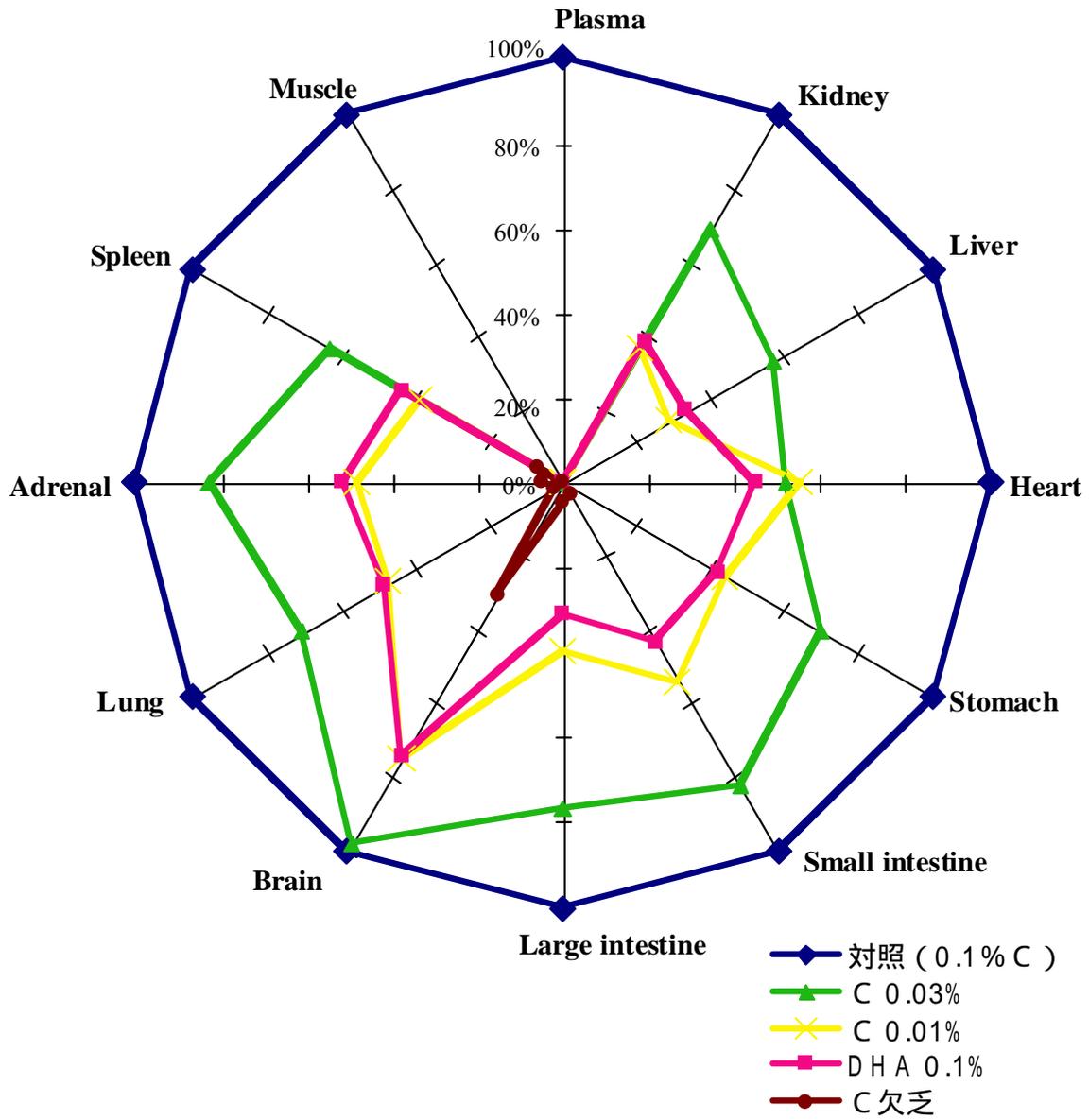


図2 . 对照群の臓器C濃度を100%としたときの各臓器C濃度の相対値