

氏名（本籍）	いのうえ ようこ 井上 葉子 （東京都）		
学位の種類	博士（学術）		
学位記番号	博乙 第 27 号		
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 15 日		
学位授与の要件	共立女子大学大学院学則第 41 条第 4 項該当		
論文題目	赤血球をバイオマーカーとする生体酸化ストレス評価法の新規考案と 緑茶カテキン類の抗酸化活性の再評価に関する研究		
論文審査委員	(主査)	教授 菌田 勝	
		教授 川久保 清	教授 熊谷 仁
		教授 上原 誉志夫	准教授 後藤 純子

論文内容の要旨

活性酸素種は、血管内皮細胞の賦活化、細胞内シグナル伝達、白血球の生体防御機能に関与するなど、生体恒常性の維持に不可欠な一面を担っている。しかし、ストレスや炎症などで活性酸素種が過剰に産生され、内因性抗酸化系で抗しきれない状態に陥ると、生体酸化障害が惹起され、心疾患をはじめとする様々な疾病発症・進展の引き金が下ろされるものと推論されている。

活性酸素が起因となる疾病は多数あるが、その一つに糖尿病の合併症の進展がある。糖尿病の三大合併症には網膜症、腎症及び神経症があり、糖尿病治療においては、これらの合併症を防ぐことが最重要課題となっている。これらの疾病は、高血糖により血管内皮細胞で産生された活性酸素種が血管内皮機能不全を誘発し、これが引き金となり発症すると推測されている。

このような観点から、酸化障害に対して生体を保護することの重要性は明白である。従って、生体内における抗酸化物質としての機能が期待される食品中の抗酸化性成分の探索やその作用機序に関する研究が活発になされてきている。

本論文では、緑茶の抗酸化活性などによる生体への保護的効果について詳細に検討すること、構築した食品微量成分の抗酸化能をより生体内に近い条件下で行う赤血球膜酸化障害評価法および経口摂取した食品微量成分の一過性高血糖惹起酸化ストレスに対する影響を試験する生体内酸化ストレス評価法を検証することを目的とした。

本論文は序章～第 6 章で構成されており、序章では、研究に至る背景と目的を述べた。

第 1 章では、緑茶のカテキン類である、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECg)、エピガロカテキンガレート (EGCg) の各々の抗酸化能を赤血球膜酸化障害により評価した。EGCg>ECg>EC>EGC の順で溶血抑制効果が認められ、ガロイル部分を持つカテキン類に強い抗酸化活性があることが示唆された。またガロイル部分をもつ EGCg が最も強い抗酸化能を持つとの結果が得られた。

第 2 章では、EGCg の抗酸化機序について詳細に検討した。赤血球は一重項酸素により膜脂質や膜タンパク質が酸化され、続く post-illumination により膜脂質過酸化連鎖反応の進展、膜タンパク質の酸化変性が引き起こされ、溶血に至ることが推察でき、EGCg は膜脂質と膜タンパク質の酸化を抑制することにより溶血を抑制していることが推察された。また、EGCg は、水溶性抗酸化物質とは異なり、一重項酸素を直接消去するだけでなく、赤血球膜内に取り込まれることにより強い抗酸化能を示すことが示唆された。

第 3 章では、血漿成分存在下における EGCg の抗酸化能について検討した。洗浄赤血球に EGCg を添加した結果と比べ、溶血抑制効果は 1/2 程度であった。さらに、全血に EGCg を添加、再洗浄を行い血漿成分と反応溶液中の EGCg を除去した EGCg 前処理全血赤血球では、EGCg の抗酸化効果はさらに低減したことから、全血に含まれる血清アルブミンと EGCg が結合する結果、抗酸化能は低下したと示唆された。

第 4 章では、構築した生体酸化ストレス評価法は食品微量成分の評価法として応用可能であるかを確認するため、麦めし摂取によるその影響を検討した。めしの摂取量の増加に伴い、血糖値及び酸化ストレスは上昇した。しかし、めし 360g 摂取において、酸化ストレスが亢進する群と酸化ストレスが検出できない群に分かれ、被験者により酸化ストレスの感受性が異なることが判明した。酸化ストレスが上昇した被験者に対し、麦めし摂取の影響を検討した結果、麦めし摂取は酸化ストレスの上昇を抑制させたが、血糖値には影響を及ぼさなかった。酸化ストレス値の上昇の抑制は、麦めしに含まれる食物繊維のみによるものではないことが推察された。また、本研究で構築した生体酸化ストレス評価法は生体内における食品微量成分の影響の検討に応用できることが示唆された。

第 5 章では、生体酸化ストレス評価法にて、緑茶摂取による酸化ストレス抑制効果について検討した。基準となるめし摂取の生体内酸化ストレス値が有意に上昇しなかったため、緑茶摂取の影響を明確に示すことができなかった。しかし、めし緑茶同時摂取は緑茶摂取 1 時間後めし摂取に比べ、血糖値の有意な上昇を抑制し、生体酸化ストレス値も低い傾向にあった。したがって、めし摂取による生体酸化ストレスの上昇を抑制するには、緑茶を同時に摂取するほうがその効果は期待できると考えられた。第 6 章は総括として第 1 章から第 5 章までの成果をまとめた。

生体内において、緑茶カテキン類、主に EGCg が赤血球膜内に取り込まれる可能性は本実験結果から示すことができなかったものの、めしと同時に摂取した緑茶は、グルコースの吸収を抑制し血糖値の上昇を緩慢にさせる結果、急激なグルコース代謝の低減をもたらす酸化ストレスを抑制するのではないかと推察された。また、構築した赤血球膜酸化障害評価法および生体酸化ストレス評価法は食品微量成分の評価法として利用可能であると示唆された。

論文の審査結果の要旨

核やミトコンドリアを欠損しているためその成熟後に抗酸化酵素の発現補充がなく、つまり、その分化時に保有した抗酸化キャパシティだけで生体酸化ストレスに抗する、謂わば、サイボーグであるヒト赤血球は、裏返せば、循環血中の酸化ストレス状況をリアルタイムに反映するバイオマーカーであると考えられる。特に食後一過性に生じると予想されるグルコースなどの熱量素の代謝に付随した活性酸素産生に起因する酸化ストレスを如実に受け止めているものの一つが赤血球と思考できる。従って、循環する赤血球は、生体が有する抗酸化活性と熱量素の代謝に由来する活性酸素のバランスを反映しているとすれば、随時に採取した赤血球の脆弱度を計測することにより生体の酸化ストレス状況をリアルタイムに判定することができると考えられる。しかし、採取した指頭血を被験者ごとに並べても何らその差異を認めるわけではない。そこで、サンプリングした 1 滴の指頭血全血に対して人為的な酸化ストレスを追負荷し、その溶血率に相違が認められないかとした仮説が本研究の根底にある。

本論文においては、肘静脈血から分離洗浄した赤血球を材料として研究が開始され、発展的に指頭血全血を用いた実験研究に移行している。本研究目的は、生体酸化ストレスのリアルタイムな計測方法の確定と、その方法を用いた所謂抗酸化活性を有するカテキンなどの再評価にその目的を置いている。

概要書に記載のとおり、第 1 章では、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECg)、エピガロカテキンガレート (EGCg) の各々の抗酸化能を赤血球膜酸化障害により評価し、 $EGCg > ECg > EC > EGC$ の順で溶血抑制効果が認められ、ガロイル部分を持つカテキン類に強い抗酸化活性があることが示唆され、またガロイル部分をもつ EGCg が最も強い抗酸化能を持つとの結果を得た。第 2 章では、EGCg の抗酸化機序について詳細に検討し、EGCg は膜脂質と膜タンパク質の酸化を抑制することにより溶血を抑制していることを推察した。第 3 章では、血漿成分存在下における EGCg の抗酸化能について検討し、血清アルブミンと EGCg が結合する結果、抗酸化能は低下するものと結論した。第 4 章では、構築した生体酸化ストレス評価法により、麦めし摂取によるその影響を検討した結果、めし 360g 摂取において、酸化ストレスが亢進する群と酸化ストレスが検出できない群に分かれ、被験者により酸化ストレスの感受性が異なることを明らかにした。また、酸化ストレス上昇の抑制は、麦めしに含まれる食物繊維のみによるものではないことを推察するとともに、本評価法は生体内における食品微量成分の影響の検討に応用できることの可能性を明らかにした。第 5 章では、めし緑茶同時摂取は緑茶摂取 1 時間後、めし摂取に比べ、血糖値の有意な上昇を抑制し、生体酸化ストレス値も低い傾向にあることを推定した。めしと同時に摂取した緑茶は、血糖上昇を緩慢にさせる結果、急激なグルコース代謝の低減をもたらした酸化ストレスを抑制するのではないかと推察するとともに、構築した生体酸化ストレス評価法は食品微量成分の評価法として利用可能であると結論した。審査員一同は、学位請求論文審査会並びに公聴会の結果を踏まえ、本論文を博士 (学術) の学位論文として価値あるものと認めた。