

SH基量の減少を指標とした牛血漿の抗ラジカル活性測定法の検討

田中正仁・中野 洋・岩間裕子・神谷 充・塩谷 繁
(九州沖縄農業研究センター)

Masahito Tanaka, Hiroshi Nakano, Yuko Iwama, Mitsuru Kamiya and Shigeru Shioya :
Measurement of Anti-radical Capacity by SH Decrement in Plasma from Holstein Dairy Cattle

高温環境下において高い生産性を維持している家畜は強い酸化ストレスに曝されており、暑熱環境下で乳中¹⁾および血中²⁾の酸化タンパク質が増加し、血中の還元成分の一つであるSH基濃度が低下する³⁾。しかし、暑熱環境下における潜在的なラジカル消去能力の変動については報告が少ない。そこで、乳牛個体の潜在的抗酸化活性を評価するために、インビトロ下でのラジカル発生試薬添加による血漿中SH基減少量を指標とした抗ラジカル活性測定法について検討した。

1. 材料および方法

ホルスタイン種泌乳牛から得た新鮮血漿にラジカル発生試薬である2,2'-Azo-bis (2-amidinopropane) (ABAP)を最終濃度0から50mMで添加し、34℃, 38℃, 42℃で120分間反応させ、経時的にSH基濃度を5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) による波長412nmの吸光度を用い測定した。さらに、血漿のSH基濃度と還元型グルタチオンのABAPによる酸化様式の違いやSH基酸化に対するアスコルビン酸の影響を調べた。

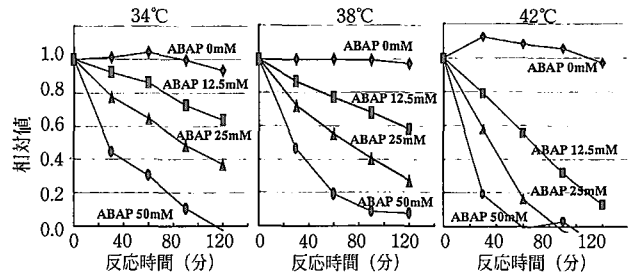
2. 結果および考察

ABAPの添加による血漿の白濁等、肉眼的変化は認められなかった。また、各種温度における120分の反応時間中にABAP無添加区の著しいSH基濃度減少はみられなかった(第1図)。牛血漿中のSH基濃度は、ABAP試薬の添加によって減少し、その程度はABAP添加量(0から50mM)および反応温度(34℃から42℃)と反応時間(0から120分)に依存した(第1図)。このことは、生体内においても発生するラジカル量に依存した酸化ストレスが加わること、同じラジカル量でも環境温度が高いほど酸化ストレスが強いことを示唆している。抗ラジカル活性の評価に関しては、第1図で反応時間との関係に直線性が高く、上下に大きく変動幅が取れる相対値0.5付近、さらに牛個体の体温を考え合わせ、反応温度38℃, ABAP25mMで60分間反応させた後のSH基濃度と反応前のSH基濃度の差をもって抗ラジカル活性とした。上記条件に従って、本来SH基以外にビタミンCやビタミンEなどの様々な抗ラジカル成分を含んでいる血漿とSH基だけをもつ還元型グルタチオンを用いてSH基濃度の減少量を比較したところ、還元型グルタチオンのSH基の減少速度が著しく速かった(第2図)。このことは、本方法で評価している抗ラジカル活性にはSH基以外の抗ラジカル成分の活性をも包含していることを示唆している。そこで、還元型グルタチオン単体と、それにSH以外の還元成分であるアスコルビン酸(最終濃度1mM)を添加した区でSH基の減少量を比較した。SH基の減少量はアスコルビン酸添加区で少なく(第3図)、SH基以外の還元成分によってラジカルによるSH基の酸化が抑制されていることが示された。すなわち、インビトロにおける新鮮血漿にラジカルを添加し、酸化されるSH基量を指標とした抗ラジカル活性評価法は、SH基以外の抗酸化・還元性成分を含む総合的な潜在的

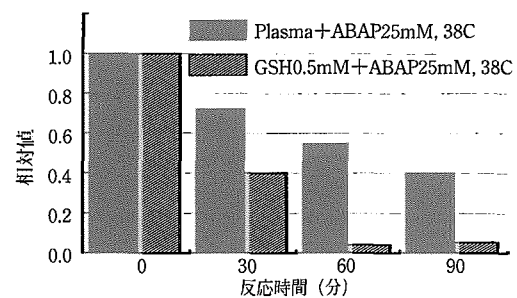
抗ラジカル活性評価法として有効であることが示された。ラジカルを介した酸化ストレスによる過酸化脂質や酸化タンパク質の蓄積⁴⁾は、アポトーシスを誘発し⁵⁾、細胞・組織の代謝活性を低下させる。これらの酸化ストレスが極大になる夏季高温環境下において抗ラジカル活性を個体ごとに評価することは、酸化ストレスによる乳牛の生産性低下防止の観点から重要であると考えられる。

引用文献

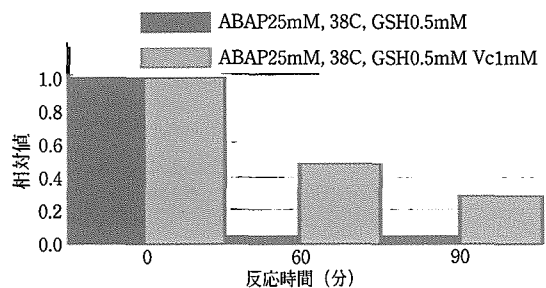
- 1) 田中正仁・岩間裕子・織田 潤・塩谷 繁：九農研 61, 102, 1999.
- 2) 田中正仁・岩間裕子・塩谷 繁：九農研 62, 108, 2000.
- 3) 田中正仁・岩間裕子・神谷 充・塩谷 繁：九農研 64, 107, 2002.
- 4) Shawn, W. F., P. L. Moseley and G. R. Buettner : FEBS Lett. 431 : 285-286, 1998.
- 5) Tan, S., Y. Sagara, Y. Liu, P. Maher and D. Schubert : J. Cell Biol. 141 : 1423-1432, 1998.



第1図 牛血漿のSH濃度の減少に及ぼすABAP濃度、反応温度および反応時間の影響



第2図 SH濃度の減少における牛血漿と還元型グルタチオンの比較



第3図 牛血漿のSH濃度の減少に及ぼすアスコルビン酸添加の影響