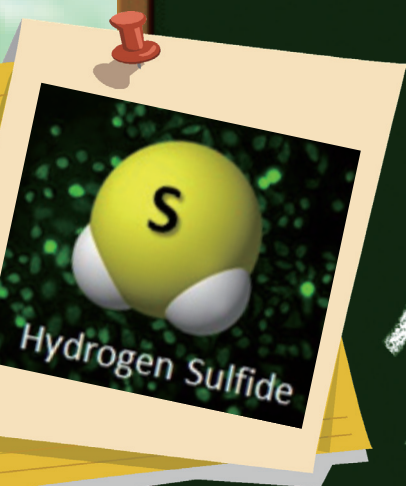


はじめてシリーズ3

はじめての 酸化ストレスマーカー 測定プロトコル

～カスタマーサポートの視点から～



目 次

I. はじめに	・ ・ ・ ・ 2
II. 活性酸素 (ROS) とは	・ ・ ・ ・ 2
III. 酸化ストレスマーカー	・ ・ ・ ・ 3
スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)	
カタラーゼ	
グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)	
グルタチオン	
ビリルビン	
8- ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG)	
8- ニトログアノシン	
AP site	
過酸化脂質 (LOOH)	
一酸化窒素 (NO)	
硫化水素 (H ₂ S)	
IV. 酸化ストレスマーカー測定試薬	・ ・ ・ ・ 7
SOD Assay Kit -WST	
GSSG/GSH Quantification Kit	
Total Glutathione Quantification Kit	
Anti-Nitroguanosine antibody	
-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting	
Liperfluo	
DPPP	
NO ₂ /NO ₃ Assay Kit	
V. 関連製品紹介	・ ・ ・ ・ 20
VI. 参考文献	・ ・ ・ ・ 22

I. はじめに

生命は酸素を利用することで、効率的にエネルギーを取り出すことが可能となり、大きく進化してきた。しかし、酸素の一部はその代謝過程で『活性酸素』と呼ばれる分子に変わる。この活性酸素はヒトの生命維持に重要な働きをしているが、過剰になると酸化ストレスに陥り細胞を傷つけ、疾病や老化の引き金になると考えられている。そのため、体内では活性酸素を消去するための様々な仕組み（抗酸化能）が働いている。

正常な状態では抗酸化能によって活性酸素は速やかに消去されるが、生体内の抗酸化機能で除去しきれない過剰な活性酸素が生じる場合、生体の構造や機能を担っている核酸、タンパク質や脂質を酸化して損傷を与え、構造や機能を障害する。このような、活性酸素が過剰に存在している状態、つまり、『活性酸素の生成と消去のバランスが崩れた状態』を【酸化ストレス】と呼ぶ。酸化ストレスはからだのサビつき度を表す指標と言われ、肥満や生活習慣病、認知症などの脳老化、疲労、白内障や肌老化など様々な疾病メカニズムに関与している。

小社ではこのような酸化ストレスの指標となる酸化ストレスマーカーを測定する製品をいくつか販売していることから、「自分が現在使用している酸化ストレスマーカー以外で、良い指標となるマーカーはないか」、「酸化ストレスマーカーを測定するサンプル（細胞・組織）の前処理をどうすればよいのか」などといった問い合わせが、多く寄せられる。本稿ではそのような方々のために、各酸化ストレスマーカーの説明や試料の前処理方法などをご紹介します。

II. 活性酸素 (ROS:Reactive Oxygen Species) とは

酸素分子 (O_2) に由来し、反応性の高い酸素種を総称して活性酸素または活性酸素種と呼ぶ。

酸素分子が 1 電子還元されて生成するスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) や 2 電子還元されて生じる過酸化水素 (H_2O_2)、 H_2O_2 が Fe^{2+} などによりさらに還元 (3 電子還元) されて生じるヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) などが挙げられる。今挙げた $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ に加え、一重項酸素 (1O_2) の 4 種類を狭義の活性酸素といい、広義には一酸化窒素 ($NO\cdot$)、二酸化窒素 ($NO_2\cdot$)、オゾン (O_3)、過酸化脂質 (LOOH) も活性酸素に含まれる (表 1)。また、放射線によって水から電子が放出される際にも活性酸素種が生成する。

$O_2^{\cdot-}$ は、 NO が存在するとパーオキシナイトライト ($ONOO\cdot$) に変換される。また、 $O_2^{\cdot-}$ は、自発的あるいはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の作用により、速やかに過酸化水素 (H_2O_2) と酸素 (O_2) に不均化される。 H_2O_2 はグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) やカタラーゼの存在下で水 (H_2O) と酸素 (O_2) になり、無毒化される。

表 1 主な活性酸素

スーパーオキシド アニオンラジカル	$O_2^{\cdot-}$
過酸化水素	H_2O_2
ヒドロキシルラジカル	$\cdot OH$
一重項酸素	1O_2
一酸化窒素	$NO\cdot$
二酸化窒素	$NO_2\cdot$
オゾン	O_3
過酸化脂質	LOOH

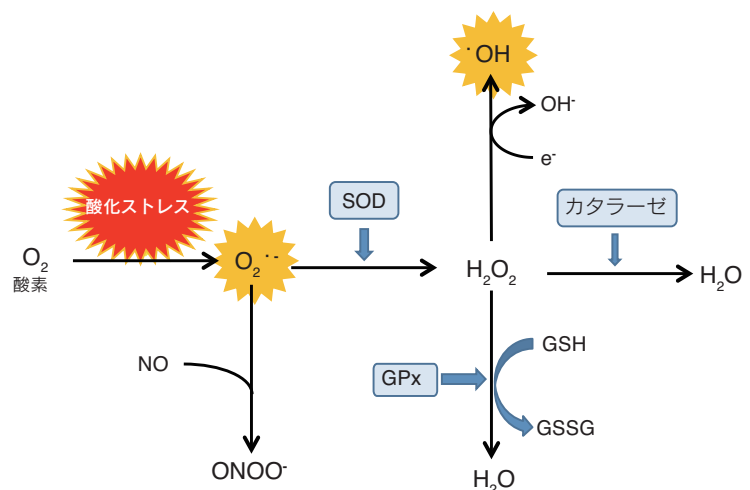


図 1 活性酸素関連図

III. 酸化ストレスマーカー

活性酸素 (ROS) の生体内での動きと酸化ストレスマーカーの関係を図 2 に沿って説明する。

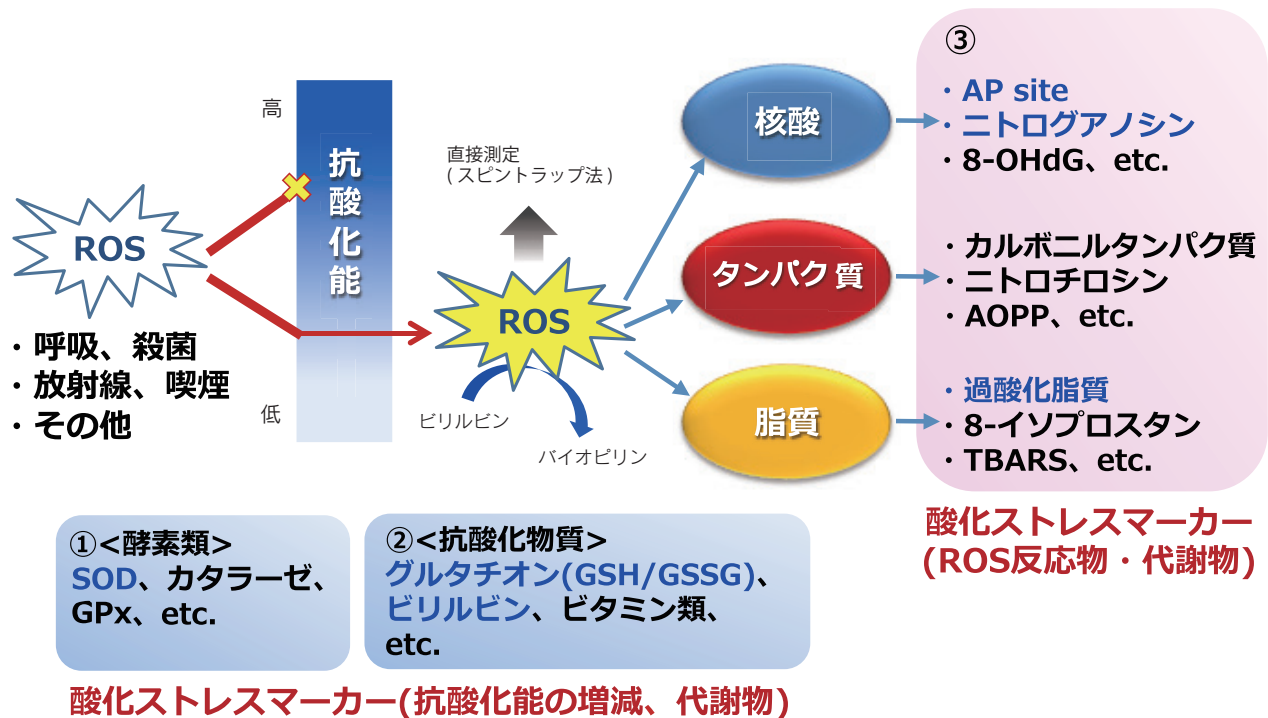


図2 活性酸素の生体内での動きと酸化ストレスマーカー

酸化ストレスマーカーは大きく分けて、①抗酸化酵素、②抗酸化物質、③活性酸素によって生じた生体内産物、の3つに分類される。抗酸化酵素とは『活性酸素を分解除去する酵素』を意味し、抗酸化物質とは『活性酸素を補足・中和して無毒化する物質』を示す。活性酸素によって生じた生体内産物とは『核酸やタンパク質などが酸化的障害を受け変異したもの、またはその代謝物』を示す。酸化ストレスの評価方法として、①②は抗酸化能の増減、代謝物量を確認、③は生体内産物そのもの、またはその代謝物量を確認する。

活性酸素は、放射線、喫煙、さらには日常生活における呼吸によっても生じる。この活性酸素を消去するために一番最初に立ち向かうのは①抗酸化酵素である。抗酸化酵素にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) などが挙げられる。

もしこの抗酸化酵素が消去できる量以上の活性酸素が生体内で発生していた場合、次に活性酸素に立ち向かうのは②抗酸化物質である。抗酸化物質にはグルタチオン、ビリルビン、ビタミン類などが挙げられる。

この抗酸化物質でも活性酸素を消去しきれなかった場合、活性酸素は核酸 (DNA)、タンパク質、脂質などを攻撃して損傷を与える。DNA やタンパク質、脂質などの分子は細胞を構成しており、これらが活性酸素により酸化変性されることによって、細胞機能をも障害される③。

活性酸素量を直接測定することが可能であれば、生体内の状態を一早く知ることができる。電子スピン共鳴装置 (Electron Spin Resonance: ESR) によってフリーラジカルに類する一部の活性酸素は直接、DMPO や Carboxy-PTIO などのスピントラップ剤の存在下で測定することが可能である。しかし、測定には高価な装置が必要であり、かつ、定量的な測定には技術を要することから簡単には測定ができない。一方、上記のような酸化ストレスマーカーは比較的簡便に測定が可能であり、酸化ストレスを評価するためによく用いられる。また、抗酸化機能に関わる物質量 (活性) の変動を知ることによって、酸化ストレスや病態の進行度合いを知ることができる。

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)

SOD は $O_2^{\cdot -}$ を酸素 (O_2) と過酸化水素 (H_2O_2) に不均化する酵素で、活性中心に銅イオンと亜鉛イオン (Cu/Zn-SOD)、またはマンガンイオン (Mn-SOD) のような金属イオンを持つ。

Cu/Zn-SOD は通常恒常的に発現し、すべての細胞質に大量に存在するが、とくに肝臓や赤血球などに多く存在する。Cu/Zn-SOD のノックアウトマウスで加齢に伴う難聴がひどくなり、若年から難聴をきたすようになることから、Cu/Zn-SOD は難聴防止に働いていると言われて¹⁾。

Mn-SOD はミトコンドリアに局在し、比較的安定なタンパク質である。また、腫瘍壊死因子 (TNF)- α 、リポポリサッカライド (LPS) などで発現が誘導され、細胞保護に働くことが知られている²⁾。Mn-SOD は様々な酸化ストレスが増加する状態で誘導を受ける場合が多く、一種の酸化ストレスマーカーである。

その他、細胞外や細胞膜に結合した状態で存在するアイソザイムの extracellular-SOD (EC-SOD) は、血漿中や細胞表面に生じた $O_2^{\cdot -}$ を消去する。

カタラーゼ

カタラーゼは過酸化水素を水と酸素に不均化させる酵素である。 $(2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2)$
肝臓・腎臓・血液などはカタラーゼ活性が高いと言われる。

表 2 マウス各組織のカタラーゼ活性³⁾

組織	活性	組織	活性
肝臓	34,000 ~ 68,000 (U/g 組織)	心臓	413 ~ 500 (U/g 組織)
腎臓	20,000 ~ 36,000	脳	78 ~ 91
脾臓	447 ~ 630	血液	2,600 (U/ml)

※ 3 種のマウスそれぞれ 3 ~ 6 匹の平均値。マウスの系統によって活性にバラつきが見られる。

脳の活性は血液の残存活性によると思われ、カタラーゼ活性は事実上 0 と考えられる。

グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)

GPx はグルタチオン存在下、生体内に生じた過酸化水素や過酸化物を消去する酵素である。活性部位にセレン (Se) を 21 番目のアミノ酸といわれる「セレノシステイン (Sec)」の形でもち、Se の高い求核性を利用して過酸化物をアルコール体へ還元する。この際、活性部位 Sec の SeH は SeOH へ酸化される。この SeOH は 2 分子のグルタチオン (GSH) から電子を受け取り、元の SeH へと還元される (図 3)。

また、GPx には 4 つのアイソザイムの存在が知られていて、それぞれ局在・役割が異なる。すなわち、各種臓器の細胞質やミトコンドリアに豊富に存在する cGPx, GPx1、肝臓・消化管の細胞質に存在する GIGPx, GPx2、血漿などの細胞外過酸化物を消去する eGPx, GPx3、細胞膜中のリン脂質過酸化物を消去する PH-GPx, GPx4 の 4 種類である。

なお、GPx と病態の関係としては、次のような報告がある。動脈硬化は低密度リポ蛋白質 (LDL) の酸化が引き金になると考えられているが、eGPx が LDL の酸化を抑制し、また、血中 Se 濃度と動脈硬化症発症に負の相関があるとされている⁴⁾。

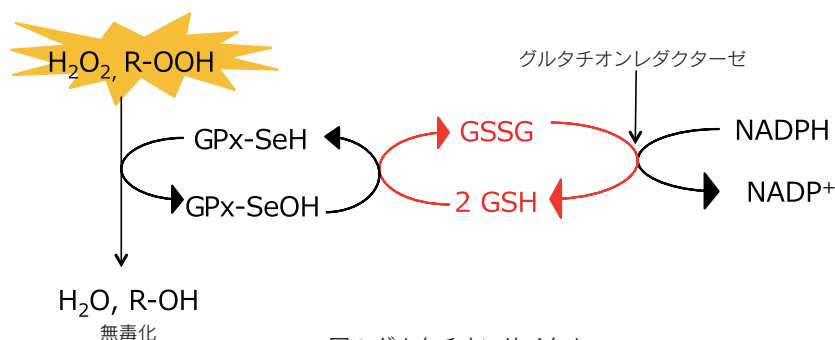


図 3 グルタチオンサイクル

グルタチオン

グルタチオンは細胞内に存在するSH基を有するトリペプチドであり、還元型GSHと酸化型GSSG(Glutathione-S-S-Glutathione)が存在する。GPxの項でも述べたように、 H_2O_2 を除去する抗酸化能に関わっており、還元型GSHは H_2O_2 を無毒化するため酸化型GSSGに変化する。GSSGはグルタチオンレダクターゼによってGSHへと再生される(図3)。健康な細胞と組織では還元型GSHが大部分を占める。酸化ストレスによって総グルタチオン量やGSH/GSSG比は変化するため、酸化ストレスの程度を把握するために用いられる⁵⁾。

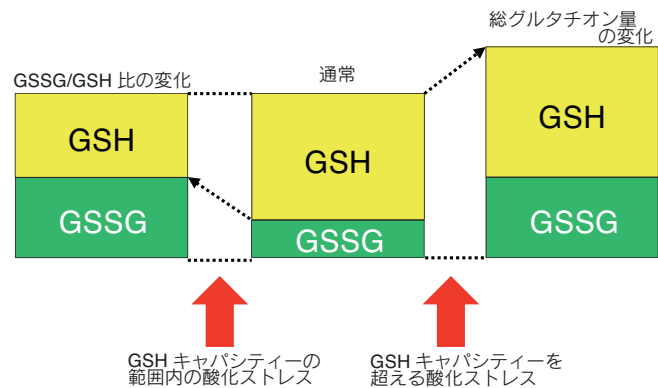


図4 酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの関係

ビリルビン⁶⁾

一般にビリルビンは神経毒性が高く、黄疸の原因として排泄されるべき有害物質と考えられている。一方、ビリルビンは『抗酸化物質』として働くこともわかってきた。ビリルビンは活性酸素と直接反応し、自身が酸化分解されることで活性酸素を還元的に消去する。この働きによってビリルビンより生じる酸化生成物は「バイオピリン」と総称される。ビリルビンが活性酸素を消去するとバイオピリンの生成が増加する。そのため、バイオピリンは酸化ストレスマーカーになると考えられており、動脈硬化等の疾患のみならず、心理的・社会的ストレスの指標として適用できる可能性が示唆されている。また、体内で生成したバイオピリンは速やかに尿中に排泄されるため、尿中バイオピリンはリアルタイム型の酸化ストレスマーカーとなりうる。

8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)⁷⁾

8-OHdGはDNAを構成する塩基の一つデオキシグアノシン(dG)の8位が活性酸素種によって酸化され、ヒドロキシル化した構造をもつDNA酸化損傷マーカーである。

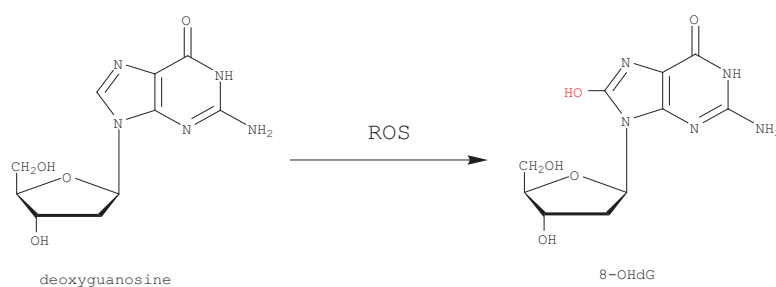


図5 活性酸素による deoxyguanosine のヒドロキシル化

染色体DNA上に発生した8-OHdGは修復酵素の作用により染色体DNAより切り出され細胞外に放出、血液を通して最終的に尿中に排出される。また、8-OHdGはDNA複製時にG→T変異を引き起こすため、染色体における8-OHdGの増加は発癌リスクの上昇に関連すると考えられている。糖尿病患者や糖尿病動物モデルの尿中には8-OHdGが増加しているとの報告もある⁸⁾。8-OHdGは化学的に安定な物質であり、2次代謝などを受けずに尿中に排出されることから、酸化ストレスの度合いを定量的に反映する酸化ストレスマーカーとして利用される。

8- ニトログアノシン

8- ニトログアノシンは $\text{NO}^\cdot$ と $\text{O}_2^{\cdot -}$ との反応から生じる ONOO^- や、ミエロペルオキシダーゼ / 亜硝酸イオン / 過酸化水素、などによってグアノシンがニトロ化されて生成する修飾核酸である。これまでに、ウイルス感染、がん、喫煙、などでグアニンのニトロ化が亢進していることが明らかになり、酸化ストレスの新しいバイオマーカーとして注目されている。また、8- ニトログアノシンの局在や量を調べることで、8- ニトログアノシン残基の役割や遺伝子損傷、発癌機構の解明に役立つことが期待されている。

AP Site

AP Site とは DNA 中の塩基損傷部位、apurinic/aprimidinic site(脱プリン / 脱ピリミジン部位) のことである。AP Site は、8-OHdG などの損傷を受けた塩基が正常な状態に修復される過程で切れ出されて生じる (図 6)。正常な修復系では AP- エンドヌクレアーゼによって選択除去されるが、何らかの原因で AP Site が修復されなかった場合、突然変異や発癌、細胞死の原因となる。また、活性酸素である $^\cdot\text{OH}$ が存在する系中に抗酸化能が期待される食品を添加すると AP Site 量が減少した、という報告もある⁹⁾。

そのため、AP Site を測定することは、酸化ストレス、抗酸化能測定の 1 つの目安になるといえる。

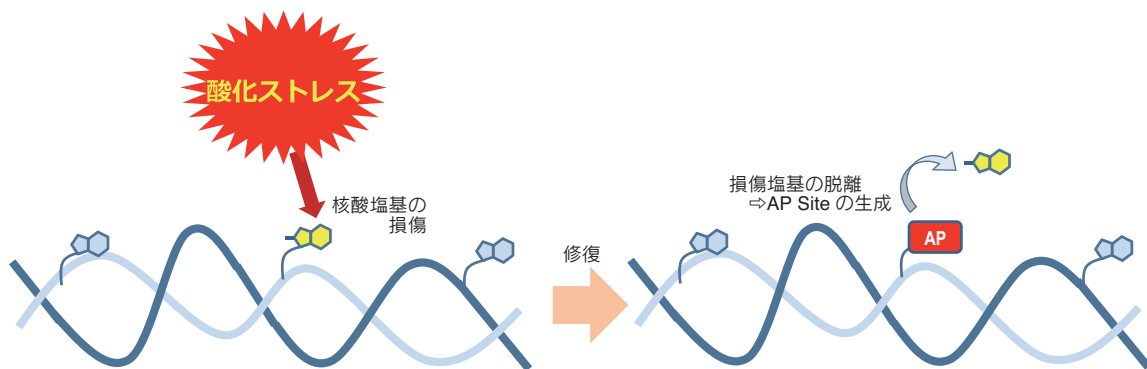


図 6 DNA 酸化的損傷、AP Site ができる過程

DNA の酸化的損傷の指標として、8-OHdG、8- ニトログアノシン、AP Site などが用いられるが、AP Site は 8-OHdG 以外の塩基修飾損傷、複製エラー修復時にも生じるため、AP Site と 8-OHdG の測定値は一致しないことが多い。DNA という一つの生体高分子への酸化的損傷を確認したい場合でも、複数種類の指標を用いて多角的に確認することが望ましい。

過酸化脂質 (LOOH)

血漿中や生体膜中の脂質の構成成分である多価不飽和脂肪酸 (Poly-unsaturated fatty acid:PUFA) は、不飽和部が活性酸素による攻撃を受けやすく、活性酸素により過酸化脂質になる。脂質 (LH) が $^\cdot\text{OH}$ のような活性酸素と反応し、水素原子を引き抜かれ、脂質ラジカル ($\text{L}^\cdot$) になる。この $\text{L}^\cdot$ は酸素分子と速やかに反応して、脂質ペルオキシラジカル ($\text{LOO}^\cdot$) となる。さらに $\text{LOO}^\cdot$ は他の脂質の水素原子を引き抜き、LOOH になる。酸化ストレスによる過酸化脂質の生成は、連鎖的に行われる。

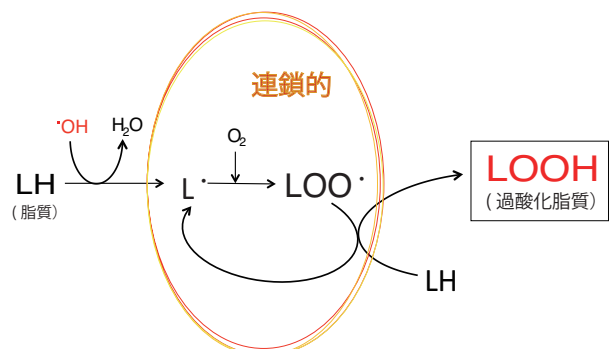


図 7 連鎖的な過酸化脂質生成

一酸化窒素 (NO)

NO は NO 合成酵素 (NOS) によってアルギニンから産生され、当初、血管平滑筋の弛緩因子として同定された。その後、生体内の様々な生理作用に深くかかわる重要なシグナル分子であることが分かってきた。NO はグアニル酸シクラーゼを活性化し、サイクリック GMP の産生を促し、この分子がさらに下流へと情報を伝達し、多彩な生理作用を引き起こす。

NO[•] は分子内に不対電子を一個もつフリーラジカルであり、ラジカルや金属イオンと高い反応性を示す。また、共存する活性酸素や金属と反応して、反応性に富む物質 (NO₂⁻, ONOO⁻) へと変換され、それらが核酸、脂質、タンパク質といった生体分子へ酸化損傷を与える。

硫化水素 (H₂S)

生体内ではシステインから酵素シスタチオニン β-シンターゼ (CBS)、シスタチオニン γ-リアーゼ (CSE)、または 3-メルカプトピルビン酸 サルファトランスフェラーゼ (3MST) によって産生されるシステインの最終代謝産物であり、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) に続く第三のシグナルガス分子として近年注目されている。H₂S は還元性なため抗酸化能を有し、この点が過酸化水素 (H₂O₂) を含め他のシグナル分子とは大きく異なる特徴である。インスリンの分泌抑制効果や神経伝達の調節、平滑筋の弛緩など多彩な生理作用が知られているが、詳細なメカニズムは不明な点が多い¹⁰⁾。

H₂S の pK_a は 6.8-7.0 であり、生理的条件下では殆どが解離型アニオン (HS⁻) として存在する。容易に酸化され、HSS⁻ や HSSS⁻ といったポリスルフィド (HS_n⁻)、あるいはスルフェン スルファ (S⁰) になると考えられ¹¹⁾、これらがタンパク質チオール基をスルフヒドリル化しペルスルフィド (-SSH) となる¹²⁾。チオール基はまた、NO や H₂O₂ とも反応し、それぞれニトロソチオール (-SNO) やスルフェン酸 (-SOH) を与える。これらの修飾はペルスルフィドとも相互作用し、複雑で多様なチオール基修飾のネットワークを生みだしている¹³⁾。修飾のメカニズムや生物学的な役割は殆ど解明されておらず、研究を進めるためのツールが切望されている。小社では *SulfoBiotics* という一連の試薬・キットを開発している。

IV. 酸化ストレスマーカー測定試薬

(1) SOD

S311 SOD Assay Kit-WST

SOD 活性を測定する方法としては、キサンチン/キサンチンオキシダーゼを O₂^{•-} 生成系とし、テトラゾリウム塩の還元反応を利用した NBT 法は操作が簡便であることから汎用されているが、生成するホルマザンが不溶性の沈殿物であることや、NBT(ニトロブルーテトラゾリウム)がキサンチンオキシダーゼと直接反応し 100% SOD 阻害率を測定することができないなどの問題をかかえている。小社の SOD Assay Kit-WST が基質として使用している WST-1 は、キサンチンオキシダーゼと直接反応しないため、100% SOD 阻害率を測定可能である。

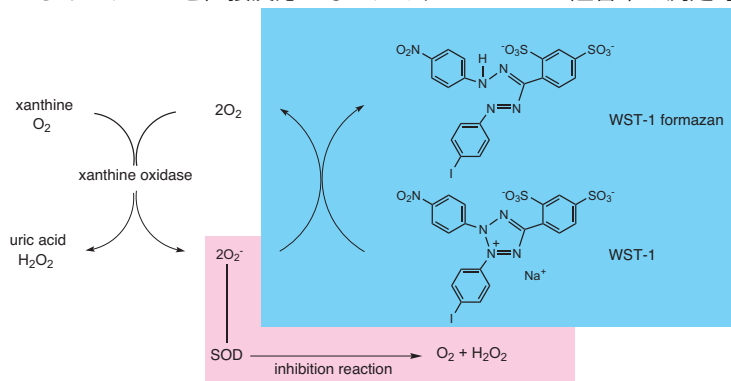


図 8 SOD Assay Kit-WST の測定原理図

本キットの詳細な原理は、小社のプロトコル集 (<http://www.dojindo.co.jp/technical/protocol.html>) をご覧頂きたい。

SOD Assay Kit-WST は酸化ストレスマーカー測定としてだけでなく、食品の抗酸化能 (SOD 様活性) 測定にも用いられる。生体試料をはじめ、緑茶などの食品を測定する際の前処理方法を次に紹介する。

<前処理例>

・血漿、赤血球³⁾

- 1) 最終濃度約 10 U/ml ヘパリン液となるように採取した血液 2 ~ 3 ml を遠心管に取る。
- 2) 0 ~ 4℃、600 ×g、10 分間遠心し、上清を希釈して血漿試料とする。
- 3) 沈殿に生理食塩水を加え元の量 (2 ~ 3 ml) とし、10 ml 用ガラス遠心管に 0.4 ml 採取する。
生理食塩水で 10 ml とし、0 ~ 4℃、600 ×g、10 分間遠心する。
- 4) 上清を除去後、沈殿をほぐし、生理食塩水で 0 ~ 4℃、600 ×g、10 分間遠心する。この洗浄操作を 2 回行う。
- 5) 上清を除去後、沈殿に 4.0 ml 蒸留水を加える。(赤血球が溶血して中の SOD が流出する。)
- 6) エタノール 1 ml とクロロホルム 0.6 ml を加える。
- 7) 共栓をしてシェーカーで約 15 分間強く振る。
- 8) 0 ~ 4℃、600 ×g、10 分間遠心し、層を乱さぬように遠心管を静かに取り出す。
- 9) 水 / エタノール層 0.1 ml を試験管に取り、蒸留水 0.7 ml を加え、赤血球試料とする。

※希釈の際には 0.25 % エタノールを使用してください。

・細胞

(HeLa: 9×10^6 cells, または HL60 : 1.2×10^7 cells)

- 1) PBS(Phosphate Buffered Saline) 1 ml で 2 回洗浄する。
- 2) PBS を除去後、ホモジナイザーあるいは超音波破碎機などを用いて細胞膜を破壊する。
- 3) 新たに PBS 1 ml を加え、良く混合する。
- 4) 0 ~ 4℃、10,000 ×g で 15 分間遠心する。
- 5) 上清を測定試料とする。

※希釈前で阻害率が 50% を超えていない場合には更に細胞数を増やして測定してください。

・組織³⁾

- 1) 生理食塩水でよく洗い、できるだけ脱血する。
- 2) 水分を濾紙などで注意深くふき取り、湿重量を測る。
- 3) 湿重量に対し 4 ~ 9 倍のショ糖緩衝液 (0.25 mol/l ショ糖, 10 mmol/l トリス塩酸緩衝液 pH7.4、1 mmol/l EDTA) を加え、組織をヒストロンなどを用いて破碎する。
- 4) テフロン製ホモジナイザーなどでよくホモジナイズする。
- 5) 10,000 ×g、60 分間遠心し、上清を測定試料とする。

< サンプル実測例>

本プロトコルで前処理したサンプルを SOD Assay Kit -WST で測定し、WST 法でユニットを規定した場合の結果

表 3 Total-SOD 実測例

赤血球	9720 U/ml of blood
血漿	335 U/ml of blood
ラット心臓	15712 U/g(湿重量)
ラット肝臓	142907 U/g(湿重量)
HeLa 細胞	73 U/ 1×10^7 cells
HL60 細胞	226 U/ 1×10^8 cells

※一測定例ですので、実際の測定値は異なることがあります。

・茶葉 (10 g)¹⁴⁾

- 1) 茶葉試料 10g に蒸留水 400ml を加えてホモジナイズ処理する。
- 2) 5℃で 48 時間静置して抽出する。
- 3) 48 時間後、ろ過 (No.2: アドバンテック東洋 (株)) し、さらにメンブレンフィルター (pore size 0.45 μ m: 富士フィルム (株)) でろ過したろ液を測定試料とする。

※緑茶等はその物自体に着色がありますが、100 倍程度に希釈すると測定に対する色の影響は回避可能です。希釈はキットの Dilution buffer または生理食塩水で行って下さい。

・ワイン¹⁵⁾

- 1) 直接メンブレンフィルターでろ過し、ろ液を測定試料とする。

※赤ワインなどはその物自体に着色がありますが、100 倍程度に希釈すると測定に対する色の影響は回避可能です。希釈はキットの Dilution buffer または生理食塩水で行って下さい。

・植物、野菜類

- 1) 蒸留水 (野菜の重量に対し 5 倍量程度) で 4℃、1 分間ホモジナイズする。
 - 2) ホモジネートをろ紙でろ過し、ろ液 (水による抽出物) を凍結乾燥する。
 - 3) 凍結乾燥したものを 0.1mol/l リン酸緩衝液 (pH7.4) に溶かし、これを測定試料とする。
- ※溶かしたものはなるべく早く使用してください。
- ※上記試料により得られた活性値は、水による抽出物の凍結乾燥後の重量もしくはホモジナイズ前の野菜重量当りの活性値とします。

本キット (WST 法) におけるユニット定義は次の通りである。

『WST 還元の 50% 阻害を示すサンプル溶液 20 μ l^{*}に含まれる SOD 量が 1 単位 (U) である』

つまり、『1U = IC₅₀ = WST の発色を 50% 阻害する時のサンプル濃度』となる。

※ 96 well プレート 1 well に 20 μ l のサンプル試料を添加し、反応させて SOD 様活性を測定する。

本キットを使用してユニットを算出するためには、サンプル原液濃度が IC₅₀ よりも高くなければならない。もしサンプル原液濃度が IC₅₀ に達しない場合にはユニット算出はできないが、全発色と比較した阻害率という形で SOD 活性を議論している報告もある。そのような報告の一例として、阻害率で SOD 活性を議論している論文報告を紹介させて頂く。サンプルはヒト唾液である。

S.-C. Kim *et al.*, "Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease", *J. Periodontal Implant Sci.*, **2010**, 40(4), 164–171.

次に、Mn-SOD のみの活性を選択的に測定したい場合の処理方法例を紹介する。

< Mn-SOD 活性の測定 > ¹⁶⁾

○ KCN (シアン化カリウム) を使用する Mn-SOD 測定例

- (1) 血液 20 ml に、20 ml の血球分離溶液 Polymorphprep (第一化学薬品株式会社) を加え、500 $\times$ g で 35 分間遠心分離させる。
- (2) 白血球を冷やした [0.25 mol/l ショ糖, 10 mmol/l Tris-HCl; pH 7.4] 溶液 1.2 ml に再懸濁させ、ホモジナイズ後、900 $\times$ g で 10 分間遠心分離させる。
- (3) 上清を 5,000 $\times$ g、10 分遠心分離させる。
- (4) 得られたミトコンドリア画分を冷やした [0.25 mol/l ショ糖, 10 mmol/l Tris-HCl; pH 7.4] 溶液 50 μ l に再懸濁させ、100,000 $\times$ g で 60 分間遠心分離させる。
- (5) 得られた上清を細胞質画分とする。
- (6) 各画分に 10 mmol/l シアン化カリウムを加える。(Cu/Zn SOD をマスキング)
- (7) SOD Assay Kit-WST の取扱い説明書に沿って測定する。

また、サンプル中にジエチルジチオカルバミン酸 (DDC; 終濃度 1 mmol/l) を添加することによっても Cu/Zn-SOD と EC-SOD の活性が阻害され、Mn-SOD の活性を選択的に測定できる ¹⁷⁾。

< 小社製品使用の論文報告情報 >

SOD Assay Kit-WST

血液	ラット血漿	M. Miyamura <i>et al.</i> , "Difference between Deep Seawater and Surface Seawater in the Preventive Effect of Atherosclerosis", <i>Biol. Pharm. Bull.</i> , 2004 , 27(11), 1784-1787 .
精漿	-	Y. Sakamoto <i>et al.</i> , "The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele", <i>BJU Int.</i> , 2008 , 101(12), 1547-1552.
植物	茶葉	森山洋憲 他, "高知県産茶および青果物に有するスーパーオキシドアニオン消去能の測定", 日本食品科学工学会誌, 2002 , 49(10), 679-682.
	碁石茶	島村智子 他, "碁石茶製造工程におけるカテキン含量とスーパーオキシドアニオン消去活性の変化", 日本食品科学工学会誌, 2008 , 55(12), 640-644.
	ワイン	受田浩之 他, "スーパーオキシドアニオン消去活性新規測定法の食品への応用", 日本食品科学工学会誌, 2002 , 49(1), 25-31.
	りんごポリフェノール	T. Matsui <i>et al.</i> , "Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K ⁺ channel activations.", <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 2009 , 73(10), 2246-2251.
	キノコからの抽出物	K. Yoshikawa <i>et al.</i> , "Novel Phthalide Compounds from Sparassis crispa (Hanabiratake), Hanabiratake A-C, Exhibiting Anti-cancer Related Activity", <i>Biol. Pharm. Bull.</i> , 2010 , 33(8), 1355-1359.

イワシすり身の アルカリプロテアーゼ分解物		森山洋憲 他, "イワシ筋肉アルカリプロテアーゼ加水分解物のスーパーオキシドアニオン 消去活性", 日本食品科学工学会誌, 2003 , 50(9), 392-398.
細胞	COS7 (アフリカミドリザル腎臓)	R. Iida <i>et al.</i> , "M-LP, Mpv17-like Protein, Has a Peroxisomal Membrane Targeting Signal Comprising a Transmembrane Domain and a Positively Charged Loop and Up-regulates Expression of the Manganese Superoxide Dismutase Gene", <i>J. Biol. Chem.</i> , 2003 , 278(8), 6301-6306.
	tat/293 mTat/293	K. Imai <i>et al.</i> , "Induction of OGG1 Gene Expression by HIV-1 Tat", <i>J. Biol. Chem.</i> , 2005 , 280(29), 26701-26713.
	正常ヒト表皮角化細胞 口腔扁平上皮癌細胞	T. Yamamoto <i>et al.</i> , "Green Tea Polyphenol Causes Differential Oxidative Environments in Tumor versus Normal Epithelial Cells", <i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> , 2003 , 307(1), 230-236.
	SW620 (ヒト結腸腺癌)	B. G. Heerdt <i>et al.</i> , "The Intrinsic Mitochondrial Membrane Potential of Colonic Carcinoma Cells Is Linked to the Probability of Tumor Progression", <i>Cancer Res.</i> , 2005 , 65 (21), 9861- 9867.
	keratinocyte (角化細胞)	H. R. Rezvani <i>et al.</i> , "Hypoxia-inducible Factor-1, a Key Factor in the Keratinocyte Response to UVB Exposure", <i>J. Biol. Chem.</i> , 2007 , 282(22), 16413-16422.
		H. R. Rezvani <i>et al.</i> , "Protective Effects of Catalase Overexpression on UVB-induced Apoptosis in Normal Human Keratinocytes", <i>J. Biol. Chem.</i> , 2006 , 281(26), 17999-18007.
	granulosa (顆粒細胞)	K. E. Valdez <i>et al.</i> , "Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation", <i>Reproduction</i> , 2005 , 130, 71-81.
真菌	酵母	Z. Wei <i>et al.</i> , "Olanzapine Protects PC12 Cells From Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide", <i>J. Neurosci. Res.</i> , 2003 , 73, 364-368.
	クリプトコッカス	L. Xiang <i>et al.</i> , "Anti-Aging Effects of Phloridzin, an Apple polyphenol, on Yeast via the SOD and Sir2 Genes", <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 2011 , 75(5), 854-858.
組織	マウス腎臓	A. R. Siafakas <i>et al.</i> , "Cell Wall-linked Cryptococcal Phospholipase B1 Is a Source of Secreted Enzyme and a Determinant of Cell Wall Integrity", <i>J. Biol. Chem.</i> , 2007 , 282(52), 37508-37514.
		H. Fujita <i>et al.</i> , "Reduction of Renal Superoxide Dismutase in Progressive Diabetic Nephropathy", <i>J. Am. Soc. Nephrol.</i> , 2009 , 20(6), 1303-1313.
		M. Kitada <i>et al.</i> , "Resveratrol Improves Oxidative Stress and Protects Against Diabetic Nephropathy Through Normalization of Mn-SOD Dysfunction in AMPK/SIRT1 Independent Pathway", <i>Diabetes</i> , 2011 , 60(2), 634-643.
	マウス脳	L. Esposito <i>et al.</i> , "Reduction in Mitochondrial Superoxide Dismutase Modulates Alzheimer's Disease-Like Pathology and Accelerates the Onset of Behavioral Changes in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice", <i>J. Neurosci.</i> , 2006 , 26(19), 5167- 5179.
	マウス膵臓	T. B. Mysore <i>et al.</i> , "Overexpression of Glutathione Peroxidase With Two Isoforms of Superoxide Dismutase Protects Mouse Islets From Oxidative Injury and Improves Islet Graft Function", <i>Diabetes</i> , 2005 , 54(7), 2109-2116.
	マウス心臓移植片	T. Hasegawa <i>et al.</i> , "Suppression of nitrosative and oxidative stress to reduce cardiac allograft vasculopathy", <i>Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.</i> , 2009 , 296, H1007-H1016.
	ラット腎臓	A Hamada <i>et al.</i> , "The Effect of Eriobotrya japonica Seed Extract on Oxidative Stress in Adriamycin-Induced Nephropathy in Rats", <i>Biol. Pharm. Bull.</i> , 2004 , 27(12), 1961-1964.
	ラット肝臓	J. Nishimura <i>et al.</i> , "Effect of Fenofibrate on Oxidative DNA Damage and on Gene Expression Related to Cell Proliferation and Apoptosis in Rats", <i>Toxicol. Sci.</i> , 2007 , 97(1), 44-54.
	ラット肝臓&大脳&小脳	N. Mori <i>et al.</i> , "Comparative study of activities in reactive oxygen species production/ defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity.", <i>Arch. Toxicol.</i> , 2007 , 81(11), 769-776.
	ヒト結腸直腸癌	M. Seike <i>et al.</i> , "Proteomic Analysis of Intestinal Epithelial Cells Expressing Stabilized β-Catenin", <i>Cancer Res.</i> , 2003 , 63, 4641-4647.

(2) グルタチオン

G257 GSSG/GSH Quantification Kit(GGQK)

T419 Total Glutathione Quantification Kit(TGQK)

グルタチオン濃度の測定法として、次の方法が利用されている。

1. Ellman 試薬である DTNB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) を使用して吸光度で測定
2. o- フタルアルデヒドを使用して蛍光光度法で測定
3. グルタチオンレダクターゼを用いて NADPH 減少量を吸光度で測定

この中で、小社では 1.Ellman 試薬を利用したグルタチオン濃度定量キットを取り扱っている。

総グルタチオンを定量するための Total Glutathione Quantification Kit と、GSH と GSSG を分別定量できる GSSG/GSH Quantification Kit は、酵素リサイクリング法を用いた DTNB の発色 ($\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$) を測定することによってグルタチオン濃度を比色定量するキットである。キットの詳細な原理は、小社のプロトコル集 (<http://www.dojindo.co.jp/technical/protocol.html>) をご覧頂きたい。

赤血球中の GSSG および GSH 濃度を、次に示す前処理例に従って操作後、本キットを用いた測定の結果、赤血球中の総グルタチオン濃度 $433 \mu\text{mol/l}$ (GSSG 濃度 $23 \mu\text{mol/l}$; GSH 濃度 $387 \mu\text{mol/l}$; GSSG/GSH=0.059) という値が得られた。一般的には赤血球中の GSSG 量は GSH 量の数%程度である。

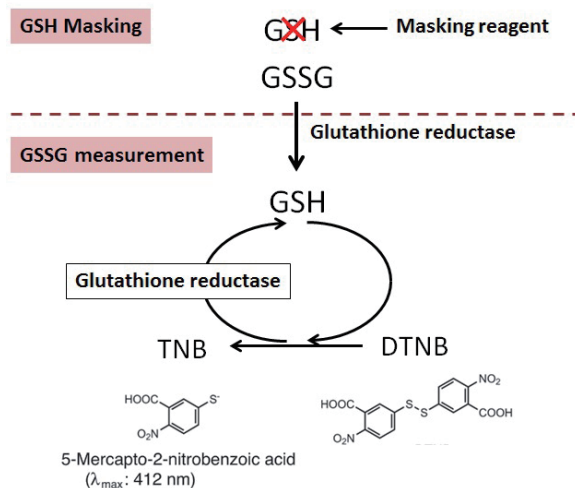


図 9 GSSG/GSH 分別定量の測定原理

<前処理例>

・細胞 (HL60 細胞: 1×10^7 cells)

- 1) $200 \times g$ で 10 分間、 4°C にて遠心し、上清を捨てる。
- 2) $300 \mu\text{l}$ の PBS で洗浄し、再度、 $200 \times g$ で 10 分間、 4°C にて遠心し、上清を捨てる。
- 3) 10 mmol/l の HCl を $80 \mu\text{l}$ 加え、凍結と溶解を 2 回繰り返して細胞膜を破壊する。
- 4) 5% スルホサリチル酸 (SSA) を $20 \mu\text{l}$ 加え、 $8,000 \times g$ で 10 分間遠心する。
- 5) 上清を新しいチューブに移す。
- 6) 純水にて SSA 濃度が $0.5 \sim 1\%$ になるように希釈したものを測定試料とする。

・赤血球

- 1) 抗凝固剤を加えた血液を、 $1,000 \times g$ で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 2) 上清を捨てる。
- 3) 4 倍量の 5% SSA で溶血する。
- 4) $8,000 \times g$ で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 5) 上清を新しいチューブに移す。
- 6) 純水にて SSA 濃度が $0.5 \sim 1\%$ になるように希釈したものを測定試料とする。

・組織

- 1) 5% SSA $0.5 \sim 1 \text{ ml}$ 中で組織をホモジナイズする。
(小社では、ドリル式ホモジナイザーを用いて、氷冷しながら $5 \sim 10$ 分間処理している)
- 2) $8,000 \times g$ で 10 分間遠心する。
- 3) 上清を新しいチューブに移す。
- 4) 純水にて SSA 濃度が $0.5 \sim 1\%$ になるように希釈したものを測定試料とする。

・植物 (レタスの葉と根)¹⁸⁾

- 1) サンプルを液体窒素により凍結後、乳鉢乳棒でホモジナイズする。
- 2) 5% SSA と 6.3 mmol/l diethylenetriaminepentaacetic acid を添加する。
- 3) $12,000 \times g$ で 10 分間 4°C にて遠心する。
- 4) 上清を新しいチューブに移す
- 5) 純水にて SSA 濃度が $0.5 \sim 1\%$ になるように希釈したものを測定試料とする。

※測定試料中の SSA の濃度が 1% を超えると測定に影響があるため、濃度が $0.5 \sim 1\%$ になるよう、測定前に希釈してください。

<小社製品使用の論文報告情報>

グルタチオン測定キット

細胞	A2780 (ヒト卵巣癌)	T. Tanaka <i>et al.</i> , "Increased Glutathione Level Is not Involved in Enhanced Bleomycin Sensitivity in Cisplatin-resistant 2780CP Cells", <i>Anticancer Res.</i> , 2008 , 28, 2663-2668.	TGQK
	A549 (ヒト肺癌基底上皮腺癌細胞)	S. Homma <i>et al.</i> , "Nrf2 Enhances Cell Proliferation and Resistance to Anticancer Drugs in Human Lung Cancer", <i>Clin. Cancer. Res.</i> , 2009 , 15, 3423-3432.	TGQK
	Dispersed parotid acinar cells (耳下腺腺房細胞)	K. Okabayashi <i>et al.</i> , "Effect of Oxidative Stress on Secretory Function in Salivary Gland Cells", <i>Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants</i> , 2012 , 189-200.	GGQK
	H-1 cell (口腔扁平上皮癌由来細胞株)	K. Negoro <i>et al.</i> , "Cross-resistance of platinum derivatives in H-1R, a cisplatin-resistant cell line", <i>Oncology Reports</i> , 2009 , 21, 443-449.	TGQK
	HEK293(ヒト胎児腎細胞) C. albicans(カンジダ)	E. Bornstein <i>et al.</i> , "Near-infrared Photoinactivation of Bacteria and Fungi at Physiologic Temperatures", <i>Photochem. Photobiol.</i> , 2009 , 85, 1364-1374.	TGQK
	HeLa (ヒト子宮癌細胞)	J. Z.-Park <i>et al.</i> , "Aldehydic DNA lesions in calf thymus DNA and HeLa S3 cells produced by bacterial quinone metabolites of fluoranthene and pyrene", <i>Carcinogenesis</i> , 2004 , 25(9), 1727-1733.	TGQK
	HepG2 (ヒト肝癌細胞)	K. Sugiyama <i>et al.</i> , "Thioredoxin-1 contributes to protection against DON-induced oxidative damage in HepG2 cells", <i>Mycotoxin Res.</i> , 2012 , 28(3), 163-168.	TGQK
	MNC (ヒト単核細胞)	A. Oriya <i>et al.</i> , "Individual Differences in the Radiosensitivity of Hematopoietic Progenitor Cells Detected in Steady-State Human Peripheral Blood", <i>J. Radiat. Res.</i> , 2008 , 49(2), 113-121.	TGQK
	初代ヒト肝細胞から 取り出したミトコンドリア	M. Nomura <i>et al.</i> , "Inhibition of hepatic Niemann-Pick C1-like 1 improves hepatic insulin resistance", <i>Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.</i> , 2009 , 297, E1030-E1038.	TGQK
	初代ラット肋骨細胞	L. Wang <i>et al.</i> , "Glutamate Inhibits Chondral Mineralization through Apoptotic Cell Death Mediated by Retrograde Operation of the Cystine/Glutamate Antiporter", <i>J. Biol. Chem.</i> , 2006 , 281(34), 24553-24565.	TGQK
単細胞 緑藻	コナミドリムシ	Y. Kabeya and S. Miyagishima, "Chloroplast DNA Replication Is Regulated by the Redox State Independently of Chloroplast Division in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ", <i>Plant Physiology</i> , 2013 , 161(4), 2102-2112.	GGQK
植物	レタスの根と葉	Z. He <i>et al.</i> , "Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in <i>Lactuca sativa</i> ", <i>Plant Science</i> , 2005 , 168(2), 309-318.	TGQK
組織	ラット肝臓&胆汁	X. Cui <i>et al.</i> , "Arsenic Speciation in Bile and Urine Following Oral and Intravenous Exposure to Inorganic and Organic Arsenics in Rats", <i>Toxicol. Sci.</i> , 2004 , 82(2), 478-487.	TGQK
	ラット腎臓&血漿	D. Ando <i>et al.</i> , "Effects of Glutathione Depletion on Hypoxia-induced Erythropoietin Production in Rats", <i>J. Physiol. Anthropol.</i> , 2009 , 28, 211-215.	TGQK
	ラット肝臓&大脳&小脳	N. Mori <i>et al.</i> , "Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity", <i>Arch. Toxicol.</i> , 2007 , 81(11), 769-776.	TGQK
	マウス肝臓	N. Miura <i>et al.</i> , "Diurnal variation of cadmium-induced mortality in mice", <i>J. Toxicol. Sci.</i> , 2012 , 37(1), 191-196.	GGQK
	マウス脳	M. Makinodan <i>et al.</i> , "Yi-Gan San Restores Behavioral Alterations and a Decrease of Brain Glutathione Level in a Mouse Model of Schizophrenia", <i>J. Brain Dis.</i> , 2009 , 1, 1-6.	TGQK
	マウス肺	K. Nagata <i>et al.</i> , "Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury", <i>Respiratory Medicine</i> , 2007 , 101, 800-807.	TGQK
	マウス腎臓	K. Yoh <i>et al.</i> , "Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice", <i>Genes to Cells</i> , 2008 , 13, 1159-1170.	TGQK
	マウス気管支肺胞洗浄液 (BALF)	T. Sato <i>et al.</i> , "Senescence Marker Protein-30 Protects Mice Lungs from Oxidative Stress, Aging, and Smoking", <i>Am. J. Respir. Crit. Care Med.</i> , 2006 , 174, 530-537.	TGQK
	ヒト脳	K. Murakami <i>et al.</i> , "SOD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase) Deficiency Drives Amyloid Protein Oligomerization and Memory Loss in Mouse Model of Alzheimer Disease", <i>J. Biol. Chem.</i> , 2011 , 286, 44557-44568.	TGQK

(3) 8- ニトログアノシン

AB01 Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody

抗 8- ニトログアノシンのポリクローナル抗体である。

- ・動物種：ウサギ (日本白色種)

AB02 Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody(Clone#NO₂G52)

抗 8- ニトログアノシンのモノクローナル抗体である。

- ・動物種：マウス (BALB/c)
- ・モノクローナル抗体サブタイプ：IgG1

< 使用例 1 >¹⁹⁾

- 1) 誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を発現させたヒト結腸癌由来株化細胞 (iNOS-SW480 細胞) を 10% FBS 含有 DMEM 中で培養する。
- 2) 細胞をアルコールで固定し、ブロッキング剤 (BlockAce; DS ファーマバイオメディカル株式会社) で処理する。
- 3) 10 µg/ml の Anti-Nitroguanosine antibody を一晩反応させ、その後 Cy3 を標識させた二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察する。

< 使用例 2 >²⁰⁾

- 1) インフルエンザ感染マウスの肺の凍結切片 (6 µm) を 2% 過ヨウ素酸-リシン-パラホルムアルデヒドで固定する。
- 2) 10 µg/ml の Anti-Nitroguanosine antibody を反応させる。
- 3) アルカリホスファターゼを標識させた二次抗体を反応させ、Vector red substrate kit I (Vector Laboratories) にて発色させる。

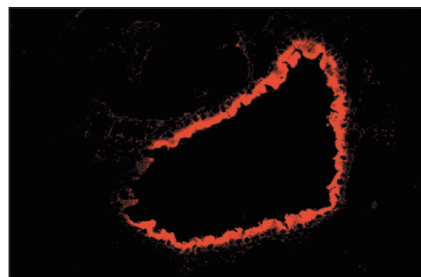
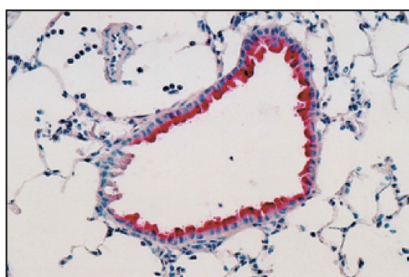


図 11 インフルエンザ感染マウスの肺上皮細胞の染色例

< 小社製品使用の論文報告情報 >

Anti-Nitroguanosine antibody

組織	ハムスター肝臓	S. Pinlaor <i>et al.</i> , "8-Nitroguanine formation in the liver of hamsters infected with <i>Opisthorchis viverrini</i> ", <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 2003 , 309(3), 567-571.
	マウス脳	F. Piao <i>et al.</i> , "Abnormal Expression of 8-Nitroguanine in the Brain of Mice Exposed to Arsenic Subchronically", <i>Industrial Health</i> , 2011 , 49, 151-157.
	マウス腎臓	K. Yoh <i>et al.</i> , "Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice", <i>Genes to Cells</i> , 2008 , 13, 1159-1170.
	マウス肺	T. Akaike <i>et al.</i> , "8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis", <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 2003 , 100(2), 685-690.
細胞	ヒト結腸癌由来株化細胞 (SW480 細胞)	J. Yoshitake <i>et al.</i> , "Nitric Oxide as an Endogenous Mutagen for Sendai Virus without Antiviral Activity", <i>J. Virol.</i> , 2004 , 78, 8709.

(4) AP site

DK02 -Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-

AP site と特異的に結合する ARP(*N*'-Aminooxy methylcarbonylhydrazino-D-biotin)) を用いて DNA をビオチン化し、96 穴マイクロプレートに固相化して試料 DNA 中の AP Site を簡便に定量できるキットである。

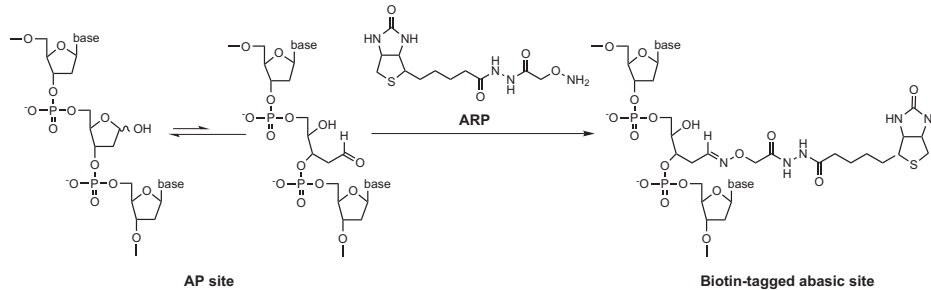


図 12 AP Site と ARP との反応

本キットには、AP Site 数が既定された標準 DNA が含まれており、既存のビオチン検出法を用いることによって AP Site の定量ができる。キットの詳細な原理は、小社のプロトコル集 (<http://www.dojindo.co.jp/technical/protocol.html>) をご覧頂きたい。

<小社製品使用の論文報告情報>

-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting-

DNA の由来	論文趣旨
DNA 購入 (サケ精巢由来)	R. Awatsuhara <i>et al.</i> , "Antioxidative activity of the buckwheat polyphenol rutin in combination with ovalbumin", <i>Mol. Med. Rep.</i> , 2010 , 3(1), 121-125.
CHO 細胞 (チャイニーズハムスター 卵巣細胞株)	D. R. McNeill <i>et al.</i> , "to Clinically Relevant Alkylators and Antimetabolites Impairment of APE1 Function Enhances Cellular Sensitivity", <i>Mol. Cancer Res.</i> , 2009 , 7, 897-906.
HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌細胞)	D. Dorjsuren <i>et al.</i> , "Diverse Small Molecule Inhibitors of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease APE1 Identified from a Screen of a Large Public Collection", <i>PLOS ONE</i> , 2012 , 7(10), e47974.
MEF 細胞 (マウス胎児線維芽細胞)	C. Vascotto <i>et al.</i> , "Functional regulation of the apurinic/aprimidinic endonuclease 1 by nucleophosmin: impact on tumor biology", <i>Oncogene</i> , 2013 , 1-12.
マウスから取り出した 胸腺細胞とリンパ節細胞	M. Ono, "Influence of Self-Stimulation of the Parasympathetic Nervous System on Lymphocyte Function and DNA Repair Function in Family Caregivers", <i>J. Nurs. Care</i> , 2013 , 2(1), 1000127.
T98G 細胞 (ヒトグリア芽細胞腫)	P. Iyer <i>et al.</i> , "Synthesis and Characterization of DNA Minor Groove Binding 2 Alkylating Agents", <i>Chem. Res. Toxicol.</i> , 2013 , 26(1), 156-168.
マウスバフィーコート (白血球層)	S. A. Nankervis <i>et al.</i> , "Consumption of a low glycaemic index diet in late life extends lifespan of Balb/c mice with differential effects on DNA damage", <i>Longevity & Healthspan</i> , 2013 , 2(4), 1-13.
マウス肝臓	K. Moriya <i>et al.</i> , "Tacrolimus Ameliorates Metabolic Disturbance and Oxidative Stress Caused by Hepatitis C Virus Core Protein", <i>Am. J. Pathol.</i> , 2009 , 175(4), 1515-1524.
マウス蝸牛殻、 マウス脳 (新皮質)	S. Someya <i>et al.</i> , "Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction", <i>Cell</i> , 2010 , 143(5), 802-812.
ラット外筋層	K. Choi <i>et al.</i> , "Impaired Integrity of DNA After Recovery From Inflammation Causes Persistent Dysfunction of Colonic Smooth Muscle", <i>Gastroenterology</i> , 2011 , 141(4), 1293-1301.
サンゴ	C. A. Downs <i>et al.</i> , "Heat-Stress and Light-Stress Induce Different Cellular Pathologies in the Symbiotic Dinoflagellate during Coral Bleaching", <i>PLOS ONE</i> , 2013 , 8(12), e77173
カキ (<i>C. virginica</i>)	I. O. Kurochkin <i>et al.</i> , "Cadmium affects metabolic responses to prolonged anoxia and reoxygenation in eastern oysters (<i>Crassostrea virginica</i>)", <i>Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.</i> , 2009 , 297, R1267-R1272.
細菌 (<i>Pseudoalteromonas</i> <i>carrageenovora</i>)	K. Nandakumar <i>et al.</i> , "Molecular level damages of low power pulsed laser radiation in a marine bacterium <i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i> ", <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> , 2006 , 42(5), 521-526.

< 使用例：Liperfluo >²¹⁾

①生細胞を用いた過酸化脂質のイメージング

- (1) SH-SY5Y 細胞を 6 well plate に播種 (6.0×10^5 cell/well) し、37℃で終夜インキュベート培養する。
- (2) 1 mmol/l Liperfluo/DMSO 溶液を、終濃度 20 μ mol/l になるように添加し、37℃、15 分インキュベートする。
- (3) 細胞外の Liperfluo を洗浄し、新しい培地を加える。
- (4) Cumen Hydroperoxide(終濃度:100 μ mol/l)、または、AIPH(終濃度:6 mM) を添加後、37℃で 2 時間インキュベートし、酸化ストレス刺激を与え過酸化脂質を生成させる。
- (5) 蛍光顕微鏡で観察する。

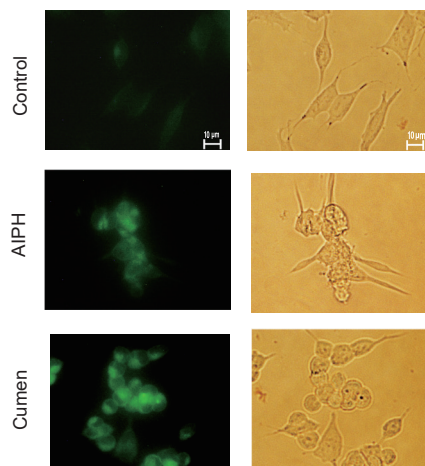
装置：Olympus IX -71 epifluorescent microscope

ミラーユニット：U-MNIBA3

(励起 488 nm, 蛍光 515/530nm バンドパスフィルター)

露光時間：10 sec

ISO 感度：800



(データ提供：同志社大学生命医科学部 野口範子先生)

Cumene: Cumene Hydroperoxide

図 13 Liperfluo を使用した生細胞過酸化脂質イメージング

②フローサイトメトリーを用いた細胞アッセイ

操作 (1) ~ (4) までは、①生細胞を用いた過酸化脂質のイメージングと同じ。

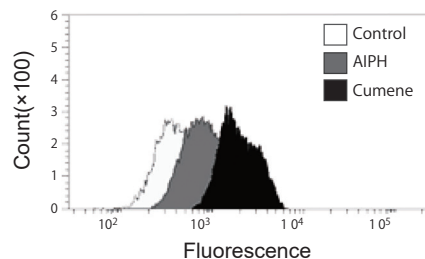
(5) PBS で細胞を洗浄後、PBS で細胞を回収する。

(6) フローサイトメトリーで測定する。

装置：BD FACSAriaTM II cell sorter.

(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)

レーザー：488 nm アルゴンレーザー



(データ提供：同志社大学生命医科学部 野口範子先生)

Cumene: Cumene Hydroperoxide

図 14 フローサイトメトリーを用いた細胞アッセイ

< 使用例：DPPP >²³⁾

① HPLC による血漿中過酸化物の定量

- (1) 採血した血液をヘパリン処理し、20 分以内に 3000 rpm、30 分間遠心分離して、ヒト血漿を得る。調製した血漿は 4℃で保存し、24 時間以内に脂質を抽出する。
- (2) 上記血漿 0.5 ml にメタノール 0.5 ml、ジクロロメタン 2 ml、及び内部標準として PC-NBD(1-Hexadecanoyl-2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine) のクロロホルム溶液 50 μ l を加えて激しく混和後、3000 rpm、5 分間遠心分離し、下層のジクロロメタン層を回収する。
- (3) 上層に 2 ml のジクロロメタンを加えて抽出を繰り返し、同様に下層のジクロロメタン層を回収する。
- (4) 得られたジクロロメタン層を合わせて、室温下、減圧濃縮し、窒素で常圧にもどし、クロロホルム - メタノール (2:1) 50 μ l に溶解した後、-20℃以下に保存し、72 時間以内にその 25 μ l を HPLC にかける。

※遠心分離は 4℃で行う。

※ジクロロメタンに抗酸化剤として BHT(ブチル化ヒドロキシトルエン) を 0.5 mg/ml となるように添加する。

(5)HPLC 条件

HPLC システムは図 15 参照

- ・ カラム：Develosil 60-3 (3 μ m, 4.6 mm ϕ ×50 mm)
- ・ 移動相：クロロホルム / 1- ブタノール / メタノール / 水 = 50 / 50 / 200 / 15
- ・ 流速：0.6 ml/ min
- ・ DPPP solution :3 mg / 400 ml in アセトン / メタノール = 1 / 3
- ・ 流速：0.3 ml/ min
- ・ Reaction coil：stainless-steel coil(0.5 mm ϕ ×20 m)
- ・ 反応温度：70℃
- ・ Cooling coil：stainless-steel coil(0.5 mm ϕ ×0.5 m)
- ・ 検出：UV/Vis 475 nm (内部標準検出)、蛍光 380 nm(励起 352 nm)

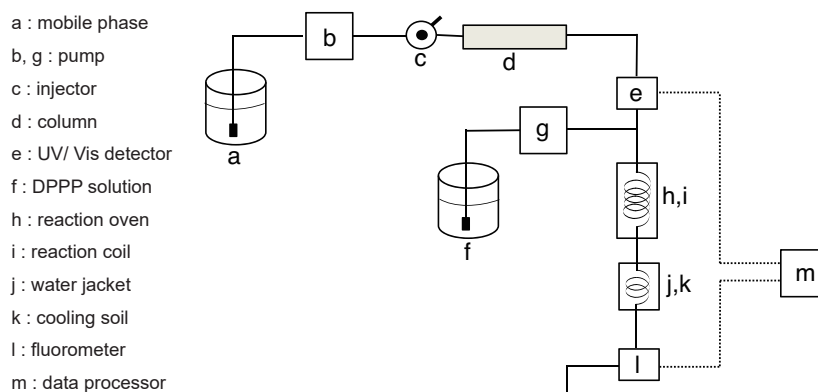


図 15 ポストカラム法、HPLC システム

(6) NO[•]

NK05 NO₂/NO₃ Assay Kit-CII(Colorimetric) ～ Griess Reagent Kit ～

NK08 NO₂/NO₃ Assay Kit-FX (Fluorometric) ～ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ～

NO[•]の代謝物はNO[•]と異なる生理活性を持ち、この代謝物が生体構成成分の過酸化を引き起こす。NO[•]量を測定することが、酸化ストレス状態を見ることに直接は繋がらないが、NO[•]の過剰な生成は酸化ストレス誘起への一原因となりうるため、NO[•]定量法を本項にて紹介する。

生体内で合成されたNO[•]はすみやかにNO[•]の代謝物であるNO₂⁻やNO₃⁻へと酸化される。NO[•]の定量はこの反応性のため、NO[•]を直接検出することは特別な装置等を使用しないと難しい。そこで、現在NO₂⁻やNO₃⁻を測定する方法が一般的になっている。この方法は、還元酵素等によりNO₃⁻をNO₂⁻に還元し、NO₂⁻の定量法として良く知られているGriess法(NO₂/NO₃ Assay Kit-C II)やDiaminonaphthalene法(NO₂/NO₃ Assay Kit-FX)を用いてNO₂⁻の総量を定量する。

キットの詳細な原理は、小社のプロトコル集 (<http://www.dojindo.co.jp/technical/protocol.html>) をご覧頂きたい。

NO₂/NO₃ Assay Kit-C II は 10 ～ 100 μmol/l、-FX は 1 ～ 10 μmol/l の濃度範囲の測定に適している。

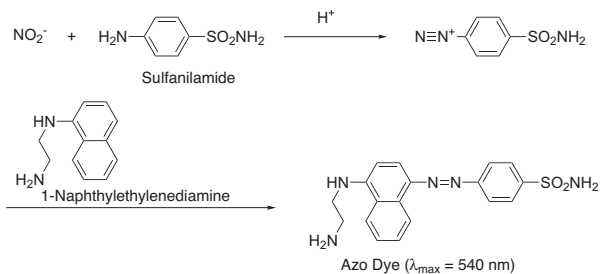


図 16 Griess 法 (NO₂/NO₃ Assay Kit-C II)

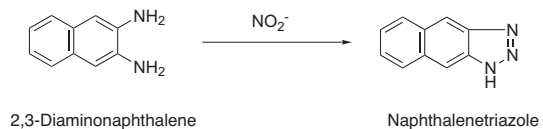


図 17 Diaminonaphthalene 法 (NO₂/NO₃ Assay Kit-FX)

<前処理例>

・細胞培養液

遠心分離 (例えば 1,000 ×g, 15 分間, 室温) し、上澄みを検体とする。

血清を添加している場合は、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane (UFC801008; Millipore 社) などで除タンパク (例えば 7,000 ×g, 20 分間, 4℃)) して測定試料とする。

・組織²⁴⁾

ホモジナイズ遠心後 (例えば 7,740 ×g) の上清を Ultrafree-MC centrifuge device (UFC3; Millipore 社) などで除タンパクして測定試料とする。

・血清、尿

Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane (UFC801008; Millipore 社) などで除タンパク (例えば 7,000 ×g, 20 分間, 4℃) して測定試料とする。

※抗凝固剤に EDTA やクエン酸を使用しているものは使用可能。ヘパリンは血液 1 ml 当り 0.01 mg の使用であれば測定に影響を与えないが、この濃度より高濃度の場合は測定結果に影響がでることが確認されている。
※除タンパク前、-20℃であれば、2 ヶ月間保存可能である。

<小社製品使用の論文報告情報>

NK05 NO₂/NO₃ Assay Kit-C II(Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~

血漿	SHR (高血圧自然発症ラット)	S. Sekine <i>et al.</i> , "Lowering Systolic Blood Pressure and Increases in Vasodilator Levels in SHR with Oral α -Linolenic Acid Administration", <i>J. Oleo Sci.</i> , 2007 , 56(7), 341-345.
	ラット血液 (凝固剤: EDTA)	P. E. Giriwono <i>et al.</i> , "Fermented Barley Extract Supplementation Maintained Antioxidative Defense Suppressing Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Liver Injury in Rats", <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 2011 , 75(10), 1971-1976.
細胞培養液	マクロファージ	O. Takeuchi <i>et al.</i> , "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6", <i>Int. Immunol.</i> , 2001 , 13 (7), 933-940.
	RAW 274.7 (マウスマクロファージ)	K. Shibata <i>et al.</i> , "Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells", <i>Int. J. Mol. Med.</i> , 2011 , 28(1), 73-79.
	ラット肺胞 マクロファージ	F. Saito <i>et al.</i> , "Inhibitory Action of Daunorubicin on Lipopolysaccharide-Stimulated Inducible-Type Nitric Oxide Synthase Induction in Alveolar Macrophages", <i>J. Pharmacol. Sci.</i> , 2005 , 99, 364-372.
	BAECS (正常ウシ大動脈内皮細胞)	J.-W. Xu <i>et al.</i> , "C-Reactive Protein Suppresses Insulin Signaling in Endothelial Cells: Role of Spleen Tyrosine Kinase", <i>Mol. Endocrinol.</i> , 2007 , 21(2), 564-573.
	EPC (血管内皮前駆細胞)	L. Yang <i>et al.</i> , "Cyclosporin A Suppresses Proliferation of Endothelial Progenitor Cells: Involvement of Nitric Oxide Synthase Inhibition", <i>Inter. Med.</i> , 2008 , 47, 1457-1464.
	HUVEC (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)	H.-M. Xu <i>et al.</i> , "The Mechanism of (R,R) ZX-5 on Increasing NO Release", <i>Int. J. Mol. Sci.</i> , 2010 , 11, 3323-3333.
	RAW 264(初代骨髄細胞)	R. Nakatsuka <i>et al.</i> , "Dilazep Decreases Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide and TNF- α Synthesis in RAW 264 Cells", <i>J. Pharmacol. Sci.</i> , 2010 , 113, 271-275.
組織	マウス皮膚	K. Nakai <i>et al.</i> , "Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin", <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 2006 , 103(12), 4616-4621.

NK08 NO₂/NO₃ Assay Kit-FX (Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~

血漿 & 回腸 (PBS を中に流し、漏れ出てきたもの)		Y. Takizawa <i>et al.</i> , "Changes in the Localization of Ileal P-Glycoprotein Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion", <i>Biol. Pharm. Bull.</i> , 2011 , 34(3), 408-414.
細胞培養液	3LL cell (ルイス肺がん由来細胞)	S. Igawa <i>et al.</i> , "Nitric oxide generated by iNOS reduces deformability of Lewis lung carcinoma cells", <i>Cancer Sci.</i> , 2004 , 95(4), 342-347.
	HUVEC (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)	T. Hirota <i>et al.</i> , "Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings", <i>Heart and Vessels</i> , 2011 , 26(5), 549-556.
	RAW 264(初代骨髄細胞)	K. Yuasa <i>et al.</i> , "Sudachitin, a polymethoxyflavone from Citrus sudachi, suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse macrophage-like RAW264 cells.", <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 2012 , 76(3), 598-600.
酵母をホモジナイズ		Y. Sasano <i>et al.</i> , "Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast", <i>Microbial Cell Factories</i> , 2012 , 11, 40

V. 関連製品紹介

< SOD 様活性測定キット >

製品名	容量	品コード	備考
SOD Assay Kit-WST	500 tests	S311	水溶性ホルマゼンを用いた、 100% SOD 阻害率測定が可能なキット

< グルタチオン定量キット >

製品名	容量	品コード	備考
GSSG/GSH Quantification Kit	200 tests	G257	酸化型 / 還元型グルタチオン分別定量キット
Total Glutathione Quantification Kit	100 tests	T419	全グルタチオン測定キット

< 8- ニトログアノシン検出関連試薬 >

製品名	容量	品コード	備考
Anti-Nitroguanosine polyclonal antibody	50 µg	AB01	抗ニトログアノシンポリクローナル抗体
Anti-Nitroguanosine monoclonal antibody (Clone# NO ₂ G52)	50 µg	AB02	抗ニトログアノシンモノクローナル抗体

< AP site 定量キット関連製品 >

製品名	容量	品コード	備考
-Nucleostain- DNA Damage Quantification Kit -AP Site Counting	20 samples	DK02	AP site を検出し、DNA 損傷部位を測定するキット

< 過酸化脂質関連試薬 >

製品名	容量	品コード	備考
Liperfluor	50 µg x 5	L248	細胞内過酸化脂質イメージング試薬
DPPP	10 mg	D350	過酸化脂質検出試薬

< NO₂/NO₃ 定量キット >

製品名	容量	品コード	備考
NO ₂ /NO ₃ Assay Kit-C I I (Colorimetric) ～ Griess Reagent Kit ～	100 回用	NK05	吸光度測定による NO 測定キット 10 ～ 100μmol/l の濃度域に適している
NO ₂ /NO ₃ Assay Kit-FX (Fluorometric) ～ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ～	200 tests	NK08	蛍光強度測定による NO 測定キット 1 ～ 10 μmol/l の濃度域に適している

< NO 測定関連 >

製品名	容量	品コード	備考
2,3-Diaminonaphthalene (for NO detection)	10 mg	D418	蛍光での NO ₂ ⁻ 検出試薬
Carboxy-PTIO	10 mg	C348	NO 消去剤
DTCS Na	10 mg	D465	NO スピントラップ剤
NOR3	10 mg	N390	NO 発生剤 (酸性側で安定)、FK409 と呼ばれる
NOC5	10 mg, 50 mg	N380	NO 発生剤 (アルカリ側で安定)
NOC7	10 mg, 50 mg	N377	NO 発生剤 (アルカリ側で安定)
NOC12	10 mg, 50 mg	N378	NO 発生剤 (アルカリ側で安定)
NOC18	10 mg, 50 mg	N379	NO 発生剤 (アルカリ側で安定)
Peroxynitrite 溶液	1 ml x 5	P332	45 mmol/l 以上の Peroxynitrite 溶液
SIN-1	25 mg	S264	Peroxynitrite 発生剤
L-NAME	1 g	N412	NOS 阻害剤

< その他 >

製品名	容量	品コード	備考
3-Deoxyglucosone	1 mg	D535	グルコース由来糖化反応生成物 (ジカルボニル化合物) 糖尿病合併症の指標として注目されている

VI. 参考文献

- 1) 朝日通雄, 谷口直之, “スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) とグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)”, 別冊医学のあゆみ 酸化ストレスと心血管疾患, 筒井裕之 編集, 医歯薬出版株式会社, **2007**, p19.
- 2) 鈴木敬一郎, 他, “CHAPTER3 生体の抗酸化システム (1) スーパーオキシドジスムターゼ系”, 酸化ストレスの医学, 吉川敏一 監修, 診断と治療社, **2008**, p23.
- 3) 浅田浩二 他, “活性酸素測定マニュアル”, 講談社サイエンティフィック, **1992**.
- 4) 高橋和彦, “CHAPTER4 生体の抗酸化システム (2) グルタチオンペルオキシダーゼ”, 酸化ストレスの医学, 吉川敏一 監修, 診断と治療社, **2008**, p31.
- 5) M. Asensi *et al.*, “Ratio of Reduced to Oxidized Glutathione as Indicator of Oxidative Stress Status and DNA Damage”, *Methods Enzymol.*, **1999**, 299, 267-276.
- 6) 山口登喜夫, 杉本昭子, “低分子抗酸化物質 (ビリルビンの抗酸化作用を主に)”, 生物試料分析, **2009**, 32(4), 281-288.
- 7) 西川武志, “生体酸化ストレスマーカー”, 月刊糖尿病, **2010/11**, 12(12), 90-99.
- 8) Y. hinokio *et al.*, “Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications”, *Diabetologia*, **1999**, 42(8), 995-998.
- 9) K. Harada *et al.*, “Efficacy of puffer fish (Takifugu rubripes) sauce in reducing hydroxyl radical damage to DNA assessed using the apurinic/apyrimidinic site method”, *Int. J. Mol. Med.*, **2007**, 20(3), 309-314.
- 10) 木村英雄, “硫化水素 (H₂S) の生理作用と医療応用”, 生化学, **2013**, 85, 63-75.
- 11) R. Greiner *et al.*, “Polysulfides Link H₂S to Protein Thiol Oxidation”, *Antioxidants & Redox Signaling*, **2013**, 19, 1749-1765.
- 12) B. D. Paul and S. H. Snyder, “H₂S signaling through protein sulfhydration and beyond”, *Mol. Cell Biol.*, **2012**, 13, 499-507.
- 13) Y. -M. Go and D. P. Jones, “The Redox Proteome”, *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 26512-26520.
- 14) 森山洋憲 他, “高知県産茶および青果物に有するスーパーオキシドアニオン消去能の測定”, 日本食品科学工学会誌, **2002**, 49(10), 679-682.
- 15) 受田浩之 他, “スーパーオキシドアニオン消去活性新規測定法の食品への応用”, 日本食品科学工学会誌, **2002**, 49(1), 25-31.
- 16) H. Fujimoto *et al.*, “Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease”, *Eur. Heart J.*, **2008**, 29, 1267-1274.
- 17) R. E. Heikkila *et al.*, “In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate”, *J. Biol. Chem.*, **1976**, 251(7), 2182.
- 18) Z. He, J. Li, H. Zhang and M. Ma, “Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*”, *Plant Science*, **2005**, 168(2), 309-318.
- 19) J. Yoshitake *et al.*, “Nitric Oxide as an Endogenous Mutagen for Sendai Virus without Antiviral Activity”, *J. Virol.*, **2004**, 78, 8709.
- 20) T. Akaike *et al.*, “8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(2), 685-690.
- 21) K. Yamanaka *et al.*, “A Novel Fluorescent Probe with High Sensitivity and Selective Detection of Lipid Hydroperoxides in Cells”, *RSC Adv.*, **2012**, 2 (20), 7894.
- 22) 真野純一, Sergey Khorobrykh, 尼子克己, “1. 代謝産物量の定量 d. 活性酸素種, 抗酸化物”, 低温科学, **2009**, 67, 179
- 23) 赤坂和昭 他, “高速液体クロマトグラフィーポストカラム法による血しょう及び血清中のホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの定量”, 分析化学, **1993**, 42, 27.
- 24) K. Nakai *et al.*, “Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103(12), 4616-4621.

< 製品に関するお問い合わせ先 >

株式会社同仁化学研究所 マーケティング部
〒 861-2202
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5
熊本テクノリサーチパーク
www.dojindo.co.jp/

