

シリーズ：世界の健康食品のガイドライン・ガイダンスの紹介  
第3回

—欧州食品安全機関 (EFSA).  
抗酸化・酸化的損傷に関する機能性評価—

鈴木 直子 (SUZUKI Naoko)<sup>1\*</sup>      野田 和彦 (NODA Kazuhiko)<sup>1</sup>  
波多野 絵梨 (HATANO Eri)<sup>1</sup>      金子 拓矢 (KANEKO Takuya)<sup>1</sup>  
中村 駿一 (NAKAMURA Shunichi)<sup>1</sup>      柿沼 俊光 (KAKINUMA Toshihiro)<sup>1</sup>  
馬場 亜沙美 (BABA Asami)<sup>1</sup>      山本 和雄 (YAMAMOTO Kazuo)<sup>1</sup>

Key Words：欧州食品安全機関，ヒト試験，健康食品，抗酸化，紫外線，DNA 鎖切断

Introduction to Guidelines or Guidance for Health Food Products  
in the World: European Food Safety Authority (EFSA) series  
—Functional Assessment of antioxidants and oxidative damage—

Keywords: European food safety authority, clinical trials, health food, anti-oxidant, UV light, DNA strand breaks

**Authors:**

Naoko Suzuki<sup>1\*</sup>, Kazuhiko Noda<sup>1</sup>, Eri Hatano<sup>1</sup>, Takuya Kaneko<sup>1</sup>, Shunichi Nakamura<sup>1</sup>,  
Toshihiro Kakinuma<sup>1</sup>, Asami Baba<sup>1</sup>, Kazuo Yamamoto<sup>1</sup>

\*Correspondence author: Naoko Suzuki

**Affiliated institution:**

<sup>1</sup>ORTHOMEDICO Inc.

[2F Sumitomo Fudosan Korakuen Bldg., 1-4-1 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-0002, Japan.]

<sup>1</sup> 株式会社オルトメディコ \* 責任著者

〒112-0002 東京都文京区小石川 1-4-1 住友不動産後楽園ビル 2 階

Tel: 03-3818-0610 / Fax: 03-3812-0670

## はじめに

前回に引き続き、欧州食品安全機関 (European Food Safety Authority: EFSA) の発行するガイドランス (以下、EFSA ガイドランス) について隔月で紹介する。今回は、EFSA ガイドランスの「抗酸化・酸化的損傷に関する機能性評価」の中のアウトカムの設定や科学的根拠の説明などの内容を説明する。

### 1. 抗酸化に関するヘルスクレーム<sup>1)</sup>

EFSA ガイドランスでは、抗酸化作用を評価するためのアウトカムの種類などが記載されている。そこで、抗酸化作用を評価するためのアウトカムの種類、注意点などについて以下で説明する。

#### 1-1. 光酸化 (紫外線) を含む酸化的損傷からの体細胞および分子 (タンパク質, 脂質, DNA) に対する抗酸化物質の保護作用

タンパク質, 脂質, DNAなどを紫外線などの光酸化 (紫外線) を含む酸化的損傷から保護することは、有益な生理学的効果があると考えられている。実証の際、酸化的損傷からの保護を評価するアウトカムとして、総抗酸化能 (Total Reactive Antioxidant Potential; TRAP), トロロックス等価抗酸化能 (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC), 第二鉄還元/抗酸化能 (Ferric Reducing Antioxidant Potential; FRAP), 酸素ラジカル吸収能 (Oxygen Radical Absorption Capacity; ORAC), 鉄酸化性キシレノールオレンジ法 (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange; FOX) が用いられている。注意点については以下のように記載されている。

- ①ヨーロッパで発売される健康食品のヘルスクレームは、一般的に欧州連合が定めた食品の強調表示規則 (Regulation (EC) No 1924/2006) に定められているが、*in vitro*でのフリーラジカル消去能に関する、foods/constituentsの特性などの評価は、ヒトにおいても同様の生理学的な効果を発揮するか明確ではない。
- ②血漿全体の抗酸化力の評価は、EC No 1924/2006で要求されるヒトにおける有益な生理学的効果を示すかどうかという点において、議論の余地がある。
- ③「早期老化からの細胞の保護」, 「健康的な老化」などのヘルスクレームは、EC No 1924/2006で定められた基準に準拠していない。

#### 1-2. 生体内における抗酸化作用

EFSA ガイドランスでは、抗酸化作用は栄養素によるものと栄養素以外によるものと記載されている。そこで、栄養素による抗酸化作用と栄養素以外による抗酸化作用について説明する。

##### 1-2-1. 栄養素による抗酸化作用

栄養素であるビタミンや必須ミネラルの中には、細胞や分子を酸化的損傷から保護する酵素を活性化させるものがあることが分かっており、ビタミンC, ビタミンEおよびセレンは、DNA, タンパク質および脂質を酸化的損傷から保護する役割や作用機序が確立されていると述べている。また、これらの栄養の必須性については、栄養素の確立された生化学的役割, ヒトの抗酸化ネットワークもしくは抗酸化防御系にかかわる欠乏症状またはそれら全てに基づいて検証されていた。ヒト抗酸化ネットワーク/抗酸化防御システムにおけるこれらの役割は、多くの科学的根拠に基づき確立されている。

##### 1-2-2. 栄養素以外による抗酸化作用

栄養素以外による抗酸化作用は存在するが、以下のような注意点を述べている。

- ①ヒトにおける抗酸化ネットワークに属する酵素の機能に関与しているビタミンや必須ミネラルが供給されている状況では、細胞や分子の酸化的損傷からの保護について、抗酸化酵素の誘導が栄養素以外による影響とするには不十分である。同様に、血漿の全体的な抗酸化能の非特異的な変化も十分な根拠とできない。
- ②栄養素以外を評価するうえで、抗酸化酵素 {スーパーオキシドディスムターゼ (SOD), カタラーゼ (CAT), グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px), ヘムオキシゲナーゼ (HO) など} の特異的な誘導や、タチオンやグルタチオン/グルタチオンジスルフィド (GSH/GSSG) 比の低下抑制の測定結果は、これらの変化により体細胞や分子が酸化的損傷から保護される場合にのみ、有益な生理学的効果があると見なされ、生理学的効果は、*in vivo* (ヒト) での評価が求められる。TRAP, FRAP, TEAC, ORACまたはFOXも同様に、血漿の全体的な抗酸化能の非特異的な変化を *in vivo* (ヒト) での評価が求められる。

③紫外線などの光酸化によるダメージを含む酸化損傷から生体内の細胞、分子 (a. タンパク質, b. 脂質, c. DNA) を保護するといったヘルスクレームは、*in vivo* (ヒト) での評価が求められる。a~c に対する酸化損傷は、少なくとも1つの適切なバイオマーカーが必要であるが、これらは損傷と修復の2つのプロセスを含んでいる可能性や、他の無関係な物質やプロセスの影響を受ける可能性があるため、単独のバイオマーカーで評価することはできない。

EFSA ガイドラインでは、a~c に関する評価方法がまとめられているので、以下でそれらについて紹介する。

#### a: タンパク質の酸化損傷からの保護

- ① *in vivo* のタンパク質の酸化損傷の直接的な測定 (タンパク質中のアミノ酸の酸化変化の測定など) は、血漿中の分子を他の物質 (チロシンニトロ化生成物など) から同定・分離することが可能であれば、液体クロマトグラフィー質量分析法 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; LC-MS) などを使用する。
- ② ジニトロフェニルヒドラジン誘導体を用いた酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) によるタンパク質酸化生成物 (タンパク質カルボニルなど) の測定 {ジニトロフェニルヒドラジン (dinitrophenylhydrazine; DNPH) 誘導体後の抗ジニトロフェニル (antidinitrophenyl) 抗体を使用} は、血液また標識組織 (皮膚など) で直接評価する場合にのみ、*in vivo* のタンパク質の酸化損傷を測定する直接的なバイオマーカーと組み合わせて使用する。また、カルボニル基の DNPH 誘導体を含む比色分析などの従来の分析は、血漿サンプルに対して、*in vivo* におけるタンパク質の酸化損傷の少なくとも1つの直接的なバイオマーカーと組み合わせて使用する。

#### b: 脂質の酸化損傷からの保護

- ① 脂質の酸化損傷 (脂質過酸化) の直接的な評価は、24時間尿中の F2- イソプロスタンの変化を適切なクロマトグラフィーと質量分析 (ガスクロマトグラフィー質量分析や LC-MS など) を組み

合わせることで *in vivo* において可能である。なお、免疫学的測定は、他のプロスタノイドとの交差反応の可能性があるため、特異性が低く、F2- イソプロスタンの測定には適していない。

- ② 特異的なモノクローナル抗体などの免疫学的手法を用いて血液中の酸化 LDL を測定することで、*in vivo* における脂質過酸化の評価が可能である。
- ③ 化学発光液体クロマトグラフィー (CL-LC) を用いた血液や組織中の脂質ヒドロペルオキシド (ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド; PCOOH など) の測定は *in vivo* の脂質過酸化のマーカーとして用いられているが、PCOOH と F2- イソプロスタンを組み合わせて測定することが望ましい。
- ④ 脂質過酸化の評価指標として、チオバルビツール酸反応性物質、マロンジアルデヒド (Malondialdehyde; MDA), パラオキシソナーゼおよび共役ジエンなどは適切ではないが、血液や組織の MDA 濃度は、MDA 分析に適切な方法 (液体クロマトグラフィーなど) が使用された場合のみ、科学的根拠を支持するデータとして用いることができる。

#### c: DNA の酸化損傷からの保護

- ① 細胞の DNA 損傷を評価するコメットアッセイ (Single-cell Microgel Electrophoresis; SCGE) の改良版 (酸化したピリミジンを検出するためにエンドヌクレアーゼ III, 酸化したプリンを除去するためにホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼを使用など) を用いて、DNA の酸化損傷 (DNA の塩基の酸化) を *in vivo* で直接測定することができる。ただし、この方法は絶対値の測定ができず、対照との定量的な比較に使用する。例えば、生体内を循環しているリンパ球の評価は、細胞内 DNA の酸化損傷を直接反映する。
- ② 従来の SCGE を用いた DNA 損傷の測定は、DNA 鎖の切断を検出するものであり、酸化損傷を特異的に評価するものではない。また、*ex vivo* での Pro-oxidant challenges は、酸化修飾に対する抵抗性を確認する方法であり、*in vivo* での DNA の酸化損傷の評価として適切ではない。
- ③ 血液 (リンパ球など)、組織 (皮膚など) および尿中の 8- ヒドロキシ -2- デオキシ - グアノシ

ン (8-OHdG) の測定は、DNA の酸化的損傷の評価に用いられる。尿中の 8-OHdG は、細胞内の DNA 酸化を直接反映しないが、分析に適切な方法 (液体クロマトグラフィーなど) が使用されれば、DNA への酸化的損傷の直接測定と組み合わせる用いることができる。ただし、遊離の 8-OHdG は、酸化的損傷と切除修復に起因し、遊離塩基やヌクレオチドの酸化、他の核酸の酸化、サンプルの処理時の人為的な影響も関与する可能性がある。

## 2. DNA 鎖切断からの保護に関するヘルスクレーム<sup>1)</sup>

DNA の鎖切断は、DNA 修復過程で自然発生するが、環境因子 (変異原性物質、酸化促進物質および放射線など) によっても誘発される。このような DNA の鎖切断は、DNA の特性を変化させ、DNA の複製や翻訳の過程で異常を引き起こす可能性がある。したがって、細胞の機能を維持するために DNA を鎖切断から保護することは重要である。そこで、アウトカムは、*in vivo* で SCGE を測定する方法としていた (1-2-2 ③ c: DNA の酸化的損傷からの保護を参照)。注意点は以下の様に記載されている。

① DNA の鎖切断の抑制をヘルスクレームとした食品は、他の研究での再現性や、作用機序の根拠を示すべきである。

### おわりに

抗酸化作用を有する成分には、栄養素と栄養素以外のものが存在する。特定の栄養素に関しては、科学的根拠の存在が EFSA ガイドラインに記載されており、栄養素以外については科学的根拠を明確化させるための様々な評価法が紹介されていた。また、栄養素以外については、ヘルスクレームに対する適切性を評価するために、1つの測定方法だけでなく様々な測定を併せた総合的な判断が求められるものも存在する。また、DNA 鎖切断から保護することは、細胞機能を維持するうえで重要であるが、このヘルスクレームを謳う際には、作用機序の根拠や再現性を示すことが求められている。

本稿では、EFSA ガイダンスの中で「抗酸化・酸化的損傷に関する機能性評価」について紹介した。今回は EFSA ガイダンスである「骨・骨粗鬆症リスク低減に関する機能性評価」について、アウトカムの種類や注意点等について説明する。

## 参考文献

1. Turck D, Bresson J, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, *et al.*: Guidance for the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. *EFSA J.* **16**(1): 1–21, 2018