

牡蠣肉エキスおよび牡蠣ガラの微量元素の定量

安井裕之¹⁾, 田和理市¹⁾, 中川淳子¹⁾, 桜井弘¹⁾, 松田芳和²⁾,
太田隆男²⁾, 柴田幸雄²⁾, 松下緑治³⁾, 高田実弥³⁾

(¹⁾ 京都薬科大学・代謝分析学*, (²⁾ 日本クリニック(株)・中央研究所**,

³⁾ 京都大学・原子炉実験所***)

Determination of Trace Elements in Oyster Extract and Oyster Shell

Hiroyuki YASUI¹⁾, Riichi TAWA¹⁾, Atsuko NAKAGAWA¹⁾, Hiromu SAKURAI¹⁾, Yoshikazu MATSUDA²⁾
Takao OHTA²⁾, Yukio SHIBATA²⁾, Rokuji MATSUSITA³⁾, Jitsuya TAKADA³⁾

¹⁾ *Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University,*
²⁾ *Japan Clinic Co., Ltd., Central Research Institute,* ³⁾ *Research Reactor Institute, Kyoto University.*

Zinc is a very important nutrient in normal reproductive and embryonic developments of mammals. It has been reported that the oyster extract contains a high level of zinc. The trace elements in the oyster extract as well as shell were determined by neutron activation analysis (NAA). The oyster extract and shell were prepared from Oyster (*Crassostrea gigas*). All samples were lyophilized and portions of the samples were pulverized for NAA at Research Reactor Institute of Kyoto University. Each element in the samples was determined with the corresponding peak area of γ energy after (n, γ) reaction. On the other hand, the oyster extract, that contains the antioxidants such as natural radical scavengers and metalloproteins, is strongly suggested to scavenge reactive oxygen species (ROS) including superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$) and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and thus inhibit the lipid-peroxidation in the biological systems such as microsomes. The ROS scavenging and anti-lipid-peroxidative activities of oyster extract (high molecular weight fraction : HOE) were studied with cytochrome c reduction and ESR-spin trapping methods, and TBA assay using rat liver micro-

* 所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

** 所在地：京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

*** 所在地：大阪府泉南郡熊取町野田 (〒590-04)

somes, respectively. The amounts of the element in oyster extract were observed to be in the following order : Cl > Na > Zn > Br > Fe > Cr > Mn > Se, while those in oyster shell were found to be in the order of Ca > Sr > Na > Fe > Cl > Al > Cr > Zn > Br > Mn. Zn was determined in both oyster extract and shell, in which HOE contains the highest level of Zn (0.38mg Zn/1g of dry weight sample). HOE scavenged dose-dependently both superoxide anion and hydroxyl radicals, and inhibited the Fe³⁺-ADP-induced NADPH-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes, although they were very weak. From these results, it is suggested that the oyster extract is a useful diet which not only involves many important nutrients but prevents oxidative stresses in mammals.

近年、微量元素の生体内機能が研究者のみならず、社会的にも興味の対象となっている^{1), 2)}。Znは多彩な機能を有し生体の恒常性を調節している。したがって、Zn欠乏は小人症、胎児の成長遅延、性腺機能不全症、味覚異常、腸性肢端皮膚炎などの多くの病態をひき起こすが、これらの症状はZn投与により改善される。また、ZnはSH酵素の酸化防御や、FeやCu依存性のラジカル反応阻害作用があるために、抗酸化性や創傷治癒効果も報告されている³⁾⁻⁵⁾。従来より肝臓病や糖尿病の治療食として用いられてきた牡蠣は、Znを多く含む身近な食品類の代表であり、可食部1gあたりに0.4mgのZnが含まれると報告されている^{6), 7)}。今回、生牡蠣抽出物の牡蠣肉エキスおよび牡蠣ガラ中の亜鉛を中心とした微量元素に着目して、それらの含有量を放射化分析法により定量した⁸⁾。さらに、牡蠣肉エキスが有する活性酸素種の消去活性および脂質過酸化反応の阻害作用を併せて検討した^{9), 10)}。

方 法

1. 試 料

ま牡蠣 (*Crassostrea gigas*) は1996年の広島産を使用し、剥き身にして用いた。

2. 試料の抽出および分画

ま牡蠣 1kg に対して蒸留水 500mL を加え、2時間 80℃ の熱水で抽出し、粗抽出液とした。この抽出液を、限外ろ過法で分画し、粗抽出液 (上清) と分画した高分子画分 (高分子) 並びに低分子画分 (低分子) をそれぞれ 140℃ で熱乾燥させ、試料として用いた。また、ま牡蠣の貝殻を粉末にしたもの (牡蠣ガラ)、およびそれを 1000℃ で高熱処理した 1000℃ 焼成の牡蠣ガラ (Ca1000c) も試料として用いた。

3. 中性子放射化分析

5種類の牡蠣肉エキスもしくは牡蠣ガラのうち、液状抽出物は凍結乾燥して粉末とした後、また粉末状抽出物および牡蠣ガラはそのまま測定用サンプルとした。各微量元素の総量は、京都大学原子炉実験所において中性子放射化分析法により、30秒照射による短寿命元素分析と60分照射による長寿命元素分析の二種類の測定を行い定量した。

4. 活性酸素種消去活性および脂質過酸化反応阻害作用

放射化分析法により、最も亜鉛含量が高かった高分子画分を選択して、さらに活性酸素消去活性について検討した。スーパーオキシドアニオン ($\cdot\text{O}_2^-$) は、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ系により発

生させ、シトクロームc法に基づいて550nmの吸光度変化により測定した。ヒドロキシラジカル ($\cdot O_2$) は、 $FeSO_4$ と H_2O_2 を用いるフェントン反応により発生させ、ESRスピントラップによるDMPOスピニアダクトのシグナル強度により測定した⁹⁾。

また、ラット肝ミクロソームに $Fe^{3+}/ADP/NADPH$ 系を加えて脂質過酸化反応を誘発させ、生成された過酸化脂質量をTBA法により測定した¹⁰⁾。高分子画分のこれら2つの活性酸素種の除去活性、および脂質過酸化反応の阻害作用をそれぞれ検討した。

結果と考察

生牡蠣熱水からの抽出上清、高分子画分、低分子画分、および牡蠣ガラ、牡蠣ガラ1000℃焼成 (Ca1000c) に含まれる微量元素を中性子放射化分析法により定量した結果、乾燥重量1gの試料中に1 μ g以上含まれていた元素は、牡蠣肉エキスでは8種類、牡蠣ガラでは10種類であった (Fig. 1, Fig. 2)。各元素の含量については、抽出上清中では $Cl > Na > Zn > Br > Fe > Cr > Mn > Se$ の順番であった。一方、牡蠣ガラ中では $Ca > Sr > Na > Fe > Cl > Al > Cr > Zn > Br > Mn$ の順番であった。

5種類全ての牡蠣肉抽出物および牡蠣ガラからZnが検出された。Zn含量は高分子画分>上清>低分子画分> Ca1000c>牡蠣ガラの順であり、高分子画分には、乾燥重量1gあたり0.38mgの高Zn量が含まれていた。一方、牡蠣ガラとCa1000cにはCaが検出され、乾燥重量1gあたり牡蠣ガラでは30mg、Ca1000cでは50mgが見出され、高いCa含量が示された。他の金属元素については、糖代謝に関与することが知られているCrが5種類全ての試料中にはほぼ同量に0.02-0.03mg程度含まれていた。また、貧血を防止する鉄が低分子画分以外の4種類の試料中 (0.1-0.3mg) に含まれていた。Feと比較するとごく少量 (0.003-0.008mg) ではあるが、Mnも同様に低分子画分を除いた全ての試料中に含有されていた。さらに、牡蠣肉エキス中のFeとMnは、エキス中にある高分子に結合して存在することが明らかとなった (Fig. 1)。牡蠣は、糖尿病や肝臓病の治療食として用いられてきたが、牡蠣肉エキス中には確かに生

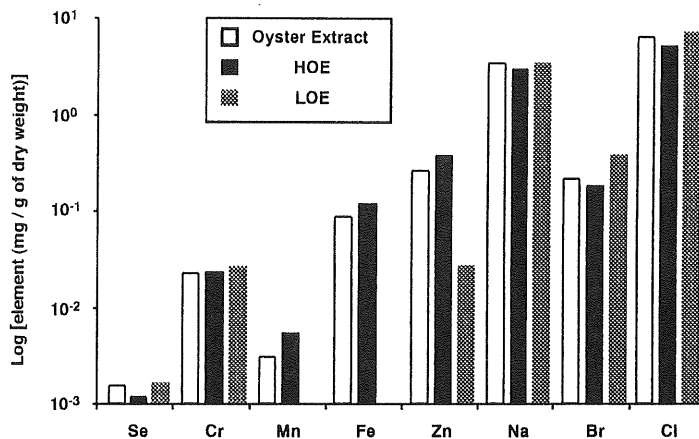


Fig. 1 Amounts of elements in oyster extract, and high(HOE) and low (LOE) molecular fractions of oyster extracts determined by neutron activation analysis

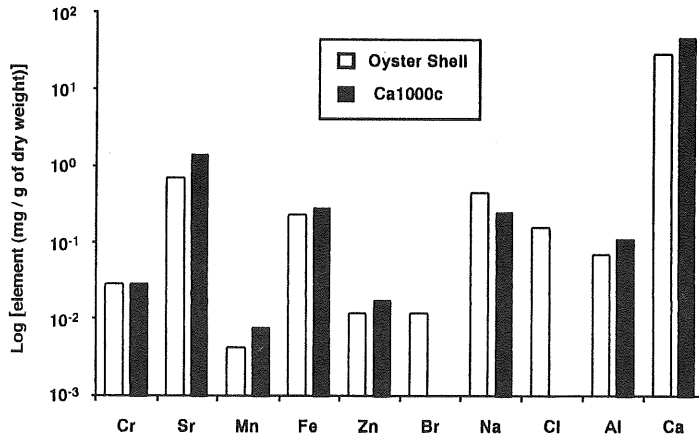


Fig. 2 Amounts of elements in oyster shell, and heat-treated oyster shell at 1000°C determined by neutron activation analysis

Table 1. ROS Scavenging and Anti-lipidperoxidative Activities

IC ₅₀ to ·O ₂ ⁻ (n=3)			
HOE	1.63 ± 0.09	(mg/mL)	[1/20000]
Cu chlorophyllin	1.82 ± 0.66	(μg/mL)	[1/23]
SOD	0.08 ± 0.01	(μg/mL)	[1]
IC ₅₀ to ·OH (n=3)			
HOE	3.00 ± 0.23	(mg/mL)	
Trolox	0.42 ± 0.12	(mg/mL)	
Ascorbic acid	1.04 ± 0.02	(μg/mL)	
IC ₅₀ to lipid peroxidation (n=3)			
HOE	2.61 ± 0.16	(mg/mL)	
D, L- α-Tocopherol	6.50 ± 1.81	(μg/mL)	
Baicalein	0.04 ± 0.01	(μg/mL)	

牡蠣に匹敵するほどのZn量が含まれており、CrやFeなどの有効な微量元素も含有されていた。

Zn含量が最も高かった牡蠣肉エキスの高分子画分について、活性酸素種の消去活性および脂質過酸化反応の阻害作用を測定した結果、濃度依存的に·O₂⁻や·OHを消去し、脂質過酸化を抑制することが見出された。Table 1には、コントロールに対する活性酸素種を50%阻害する消去剤の濃度であるIC₅₀値を示した。·O₂⁻ではSODに対する濃度比も併せて示した。亜鉛を含んだ有効成分が、エキスの活性体であるかどうかを現段階ではまだ判断できないため、重量濃度で表している。牡蠣肉抽出エキスの高分子画分は、

活性酸素種による障害から生体を保護する機能を有していると考えられるが、亜鉛を含めた各微量元素含量と、活性酸素消去活性および脂質過酸化反応阻害作用との関連性についてはこれからの課題である。

今後は、放射化分析法では測定できなかった銅などの他の微量元素についても、原子吸光法により定量する予定である。また、牡蠣肉エキス中の亜鉛をはじめとした各微量元素の化学形を同定して、生体保護作用を示す成分が何であるかを検討していく必要がある。

文 献

- 1) 桜井 弘 (1996) 金属は人体になぜ必要か, 講談社ブルーバックス, 東京
- 2) 桜井 弘編 (1997) 元素111の新知識, 講談社ブルーバックス, 東京
- 3) 桜井 弘, 田中英彦編 (1994) 生体微量元素, 廣川出版, 東京
- 4) 桜井 弘, 田中 久編 (1994) 生物無機化学 (第2版), 廣川出版, 東京
- 5) 日本化学会編 (1995) 微量金属の生体作用, 学会出版センター, 東京
- 6) 桜井 弘 (1998) 亜鉛は糖代謝・成長・味覚に必須のミネラル, ハート出版, 東京
- 7) 日本食品無機質成分表 (第3版)
- 8) 桜井 弘, 横山 陽編 (1995) 放射薬品学概論, 廣川出版, 東京
- 9) Tsuji, A., S. Oka, Y. Sano, R. Matsushita, J. Takada and H. Sakurai (1995) Biomed. Res. Trace Elements, 6 : 101
- 10) Hino, T., S. Kawanishi, H. Yasui and H. Sakurai (1998) Biochim.Biophys.Acta., 1425 : 47