

試験報告書

依頼者 認知機能サプリメント株式会社

一般財団法人

日本食品分析センター

東京都渋谷区元代々木町52番1号



検体 ヘルシアーナ水素

表題 NHDF細胞 細胞内抗酸化試験

2017 年(平成 29 年)03 月 06 日当センターに提出された上記検体について試験した結果をご報告いたします。

NHDF細胞 細胞内抗酸化試験

1 依頼者

認知機能サプリメント株式会社

2 検体

ヘルシアーナ水素

3 試験目的

生体内の過剰な活性酸素は生活習慣病や老化の原因の一つとされている。とりわけ、身体の最外層にある皮膚は、紫外線を浴びることで、細胞内に活性酸素が生成される。過剰の活性酸素は酸化ストレスとなり、タンパク質、脂質、糖及び核酸を酸化するため、その制御は重要な役割を果たすと考えられている。本試験では、皮膚真皮に存在し、真皮層を構成するコラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリクスを産生するヒト皮膚線維芽細胞(以下、「NHDF細胞」とする。)を用いて、細胞内で発生させた活性酸素に対する検体の抑制作用を調べる。

4 試験方法

1) 試験液の調製

検体を水に懸濁させ、1時間静置した後、遠心分離(15000 rpm, 1分間)し、上清を分取した。これを50 mg/mL試験液原液とし、培地で希釈して検体濃度2000, 1000及び500 μ g/mLの試験液を調製した。

2) 試験操作

NHDF細胞を96ウェルプレートに播種後一晩培養した。検体濃度2000, 1000及び500 μ g/mLの各試験液を添加し、37 $^{\circ}$ Cで4時間培養した(検体の終濃度は1000, 500及び250 μ g/mL)。培地のみを加えたものを未処置対照、ケルセチン[Cayman Chemical Company]を終濃度50 μ mol/Lとなるように加えたものを陽性対照として同様に試験を行った。培養後、緩衝溶液で洗浄し、活性酸素と反応して発蛍光を示す試薬であるCM-H₂DCFDAを5 μ mol/Lの濃度で50 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。細胞内の活性酸素発生試薬であるピオシアニンを終濃度100 μ mol/Lとなるように加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。主な試験条件を表-1に示した。

表-1 試験条件

細胞	NHDF細胞[タカラバイオ株式会社]
培地	線維芽細胞増殖培地2
緩衝溶液	Hanks' Balanced Salt Solution GlutaMAX-1 100×:1 vol%
活性酸素検出試薬	CM-H ₂ DCFDA
活性酸素発生試薬	ピオシアニン

3) 測定方法

マイクロプレートリーダー[SpectraMax M2e, Molecular Devices Corporation]を用い、CM-H₂DCFDAとピオシアニンの作用で細胞内に発生した活性酸素との反応により生じた発蛍光物質の蛍光強度を測定した(励起波長：493 nm, 蛍光波長：523 nm)。

4) 算出方法

未処置対照の蛍光強度に対する各試験液の蛍光強度から、次式により細胞内活性酸素発生率を算出した。陽性対照は各試験液と同様に算出した。

$$\text{細胞内活性酸素発生率(\%)} = \frac{\text{蛍光強度[Sa]}}{\text{蛍光強度[CN]mean}} \times 100$$

蛍光強度[Sa]：各試験液または陽性対照の蛍光強度 (n=3)

蛍光強度[CN]mean：未処置対照の蛍光強度の平均値 (n=3)

5 試験結果

細胞内活性酸素発生率を図-1及び表-2に示した。

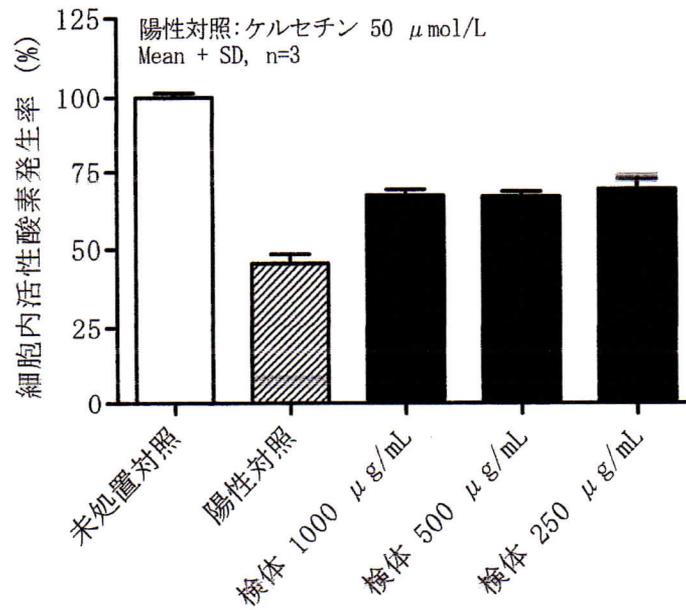


図-1 細胞内活性酸素発生率

表-2 細胞内活性酸素発生率

	細胞内活性酸素発生率 (%)				
	n=1	n=2	n=3	平均値	標準偏差
未処置対照	98.6	99.8	101.6	100	1.5
陽性対照	43.8	48.9	44.0	46	2.9
検体 1000 $\mu\text{g/mL}$	66.4	69.5	65.8	67	2.0
検体 500 $\mu\text{g/mL}$	65.0	68.4	67.0	67	1.7
検体 250 $\mu\text{g/mL}$	67.9	73.1	66.8	69	3.4

6 参考文献

- Wolfe, KL. et al. : J. Agric. Food Chem., 56, 8418-8426 (2008).
- Schwarzer, C. et al. : Free Radic. Biol. Med., 45, 1653-1662 (2008).

以 上