

論文内容要旨 (和文)

氏名 青山正明



論文題目 ヒドロキシルアミン体の酸化還元バランスを用いた新規な分析手法に関する研究

我々は安定ヒドロキシルアミン体ならびに機能性スピンプローブ (G-TEMPO)を用いた新規な分析方法を開発した。これらの方法をペルオキシダーゼ標識された免疫測定(HBs 抗原、スギアレルゲン)の定量と、植物におけるストレス応答機構の解明にそれぞれ応用した。

我々の開発した免疫測定系は、ペルオキシダーゼ活性を測定するために *p*アセタミドフェノール(*p*-AP)とイミダゾリン骨格を有する安定ヒドロキシルアミン体を用いている。上記の組み合わせに至るため、様々なフェノール化合物とヒドロキシルアミン体につき検討を行った。特に *p*-AP については30種類を超える誘導体を独自に合成した。ヒドロキシルアミン体を安定化させるため、用いる緩衝液の種類、pH、ヒドロキシルアミン体の調整液等は詳細な検討を行い決定した。測定原理は、過酸化水素共存下にて、ペルオキシダーゼの酸化作用により *p*-AP は *p*-AP ラジカル(フェノキシルラジカル)に変換される。*p*-AP ラジカルはヒドロキシルアミン体に酸化的に作用し、これを安定ラジカルに変換する。生成蓄積した安定ラジカルを ESR 装置で検出することによりペルオキシダーゼの高感度測定が可能となった。本法によるペルオキシダーゼの最低検出感度は 0.2 amol/test (S/N=1.5)であり、Kricka らが改良ルミノール発光法 (synergistic enhanced chemiluminescence 法)で達成した感度 5 amol/test を大幅にしのいでいる。

東北精機との共同研究により *p*-AP/ヒドロキシルアミン系に対応した全自動免疫測定装置 (RADIA-I:ビーズ対応、RADIA-II:マイクロプレート対応)二機種を試作を行った。山形大学医学部富樫らと青山は、本試作機 RADIA-I を用いた共同研究により、0.01 ng/ml の HBs 抗原の検出に成功した。本検出感度は PCR を用いた HBV の遺伝子検査の感度をしのいでいる。また従来法にてネガティブと判定された患者血液中に、微量の HBs 抗原が存在する症例を多々見いだすことができた。これらの結果を踏まえ、我々は *p*-AP/ヒドロキシルアミン系が従来法で陰性と判定された、肝炎患者のスクリーニングと診断に極めて有効と判断した。

p-AP/ヒドロキシルアミン系はペルオキシダーゼの他に過酸化水素の定量が可能である。過酸化水素の測定は夾雑物存在下の測定であり化学発光法、蛍光法では原理的に測定は困難である。現在過酸化水素の測定はトリンダー試薬を用いた発色法にて行われている。同一の測定系にて高感度免疫測定と過酸化水素測定がなされた報告はほとんどない。ラジカル計測は高い選択性を有するため両測定系への対応が可能であった。*p*-AP/ヒドロキシルアミン系による過酸化水素の

検出感度は 3.7 pg/test であり、発色法に比し 20 倍高感度であった。スーパー店頭にて販売されている天然水を購入し、過酸化水素の測定を試みた。その結果、天然水中には微量であるが過酸化水素が存在することが確認された。確認試験はカタラーゼ添加によるシグナル強度の減少にて行った。過酸化水素の生成のメカニズムは、微弱な紫外線による OH ラジカルの生成によることがモデル実験により確認された。本実験結果は食品の安定性を考える上で重要な成果と考えられた。

我々は pAP/ヒドロキシルアミン系を用いて、超高感度なスギ花粉抗原(Cry j 1)の測定系を開発した。Cry j 1 に対する検出感度は 3.5 pg/ml (S/N=1.5)であった。スギ花粉 1 個の Cry j 1 の平均値は 6 pg と報告されており、本法では 1 個以下の花粉数でも検出が可能であった。本測定系を用いて 2004 年度 2 月から 5 月末までの大気中 Cry j 1 の測定を行った。その結果、花粉数と大気中 Cry j 1 量の間には乖離の認められるケースが確認された。これは大気中に浮遊する Cry j 1 量はスギの種類、気象状況に強く影響されると推測された。超高感度な測定系の開発により、花粉症患者の症状発現前に有益な情報提供が可能となった。また花粉数情報と抗原量情報を同時に提供する必要性が明らかにされた。

植物のストレス応答を計測するための新規な配糖性スピンプローブ (G-TEMPO)を開発した。G-TEMPO はアスコルビン酸により容易にヒドロキシルアミン体に還元される。この意味で我々は G-TEMPO をヒドロキシルアミン体の一つに位置づけている。ヒドロキシルアミン体は主としてストレス応答により産生される酸素ラジカルにより酸化されシグナル強度の増加として観測される。ストレス負荷前後における経時的シグナル強度の変化を測定することが、本研究における最大のポイントであった。各種阻害剤(カルシウムキレート剤、カルモジュリン阻害剤、プロテインキナーゼ阻害剤等)と G-TEMPO を併用することにより、道家らの主張するシグナル伝達メカニズムが、コトネアスターの葉を用いた *in vivo* の実験にても検証された。

論文内容要旨 (英文)

氏名 青山正明



論文題目 Studies of novel analytical methods using redox balance of hydroxylamines.

We have developed novel analytical methods by using stable hydroxylamines (HTIO etc.) and functional spin probes (G-TEMPO etc), and applied the methods to horseradish peroxidase (HRP) labeled immunoassays (HBs antigen, Cry j 1) and direct observation of redox responses in plants, respectively.

The ESR measurement for analyzing HRP activity has been successfully carried out by using a combination of *p*-Acetamidophenol (*p*-AP) and hydroxylamines having imidazoline structure. We searched the best combination of various phenolic compounds and hydroxylamines. We originally synthesized over 30 *p*-AP analogs to reach the combination above. HTIO used as a trapper of the *p*-AP radical could be easily converted into the stable nitroxide radical. The concentration of the stable nitroxide enzymatically accumulated was determined by using ESR spectroscopy. The sensitivity of *p*-AP/HTIO system for HRP was 0.2 amol/test (S/N=1.5). This value was 25 times sensitive than Kricka's synergistic enhanced chemiluminescence method.

Aoyama and TSK Co. Ltd. have cooperatively developed full automatic instruments: RADIA-I & II for enzyme-immunoassays based on *p*-AP/HTIO system. Using RADIA-I, Aoyama and Togashi et al. tried to detect low level HBs antigen which could not be detected with conventional methods, and have succeeded in detecting HBs antigen as low as 0.01ng/ml. We have showed that *p*-AP/HTIO system is more sensitive than DNA assays using PCR method. Togashi et al. also reported *p*-AP/HTIO method is a powerful tool for screening and diagnosing HBV infection in patients with liver diseases who are negative for conventional HBV-related serological markers.

We have developed a super-sensitive method of Cry j 1 measurement using *p*-AP/HTIO system. The detection limit for Cry j 1 is 3.5 pg/ml (S/N=1.5). It is reported that the average content of Cry j 1 in each

Cryptomeria japonica pollen is about 6 pg, therefore, we can detect one grain or even less than one grain of the pollen by our method. Thus, by the measurement, it becomes possible to offer the useful information to sensitive *C. japonica* pollinosis patients before development of their symptoms.

A new functional glycosylated Spin Probe (G-TEMPO) was developed to measure stress response in plants. G-TEMPO is gradually reduced by ascorbic acid to the corresponding hydroxylamine, which is oxidized to the original radical generated as a response against stresses through an oxidative burst. We demonstrated the utilities of G-TEMPO *in vivo* as an indicator investigating the signal transition pathway in plants.

学位論文の審査及び学力確認の結果の要旨

平成17年 2月18日

理工学研究科長 殿

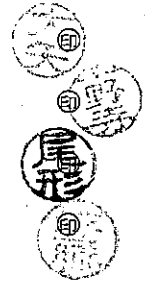
論文博士論文審査委員会

主査 大 矢 博 昭

副査 小 野 寺 準 一

副査 尾 形 健 明

副査 佐 藤 力 哉



学位論文の審査及び学力確認の結果を下記のとおり報告します。

記

1. 論文申請者

氏 名 青 山 正 明

2. 論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

ヒドロキシルアミン体の酸化還元バランスを用いた新規な分析手法に関する研究

3. 学位論文公聴会

開催日 平成17年 2月 8日

場 所 工学部9号館300-2号室

4. 審査年月日

論文審査 平成17年 2月 3日 ~ 平成17年 2月10日

学力確認 平成17年 2月10日 ~ 平成17年 2月17日

5. 学位論文の審査及び学力確認の結果 (「合格」・「不合格」で記入すること。)

(1) 学位論文審査 合格

(2) 学 力 確 認 合格

6. 学位論文の審査結果の要旨 (1,200字程度)

別紙のとおり

7. 学力確認の結果の要旨

別紙のとおり

別紙

氏名 青山正明

学位論文の審査結果の要旨

本論文は有機化合物の中でも容易にラジカル化するヒドロキシルアミン類の酸化還元バランスを電子スピン共鳴 (ESR) 法とうまく組み合わせて新規な高感度分析手法を研究したものである。ヒドロキシルアミン (HA) とは分子内に $>N-OH$ 原子団を有する化合物の総称で、溶液中に共存する活性酸素などの酸化剤により容易にニトロキシドラジカル: $>NO\cdot$ に変換される。また、当該ラジカルはビタミン C 等の還元剤により HA に戻る。この酸化還元バランスを利用して、当該ラジカルの ESR 信号を計測することにより、共存する目的物質の定量化を図ろうとするものである。

生化学検査法は多岐にわたるが最近では検査対象物質に免疫反応を適用し、酵素と過酸化水素を組み合わせて指標物質を化学増幅した後に蛍光法および発光法で定量している。しかし、これらは光検出であるため夾雑物質や不純物によるバックグラウンドも同時に検出するため選択性に欠けるのが現状である。他方、ESR 計測法は選択的に常磁性物質のみ観測するという特徴を有する。本論文ではこれを巧みに利用し、酵素免疫測定法 (EIA) と組み合わせ、特に応用性のある生化学検査、感染症ウィルス検査に応用して ESR 免疫測定法を確立している。また、HA の酸化還元バランスを利用して *in vivo* で植物のストレス応答機構を解明し、HA を用いた *in vivo* ESR 計測法の有効性を示している。

本論文は以下の章で構成されている。第 1 章および第 2 章で本研究の基礎をなす背景、目的、および目的達成のための基本戦略を述べ、第 3 章では ESR 免疫測定法のための試薬として最適 HA の合成とその電子状態の特徴を、さらに、第 4 章では当法に使われる酵素の基質であるフェノール化合物の合成およびそれらの性能比較を行っている。これらの実験結果に基づき、酵素基質として *p*-アセトアミノフェノール (PAP) を、最適 HA としてイミダゾリン骨格を持つ HA (HTIO) を選定している。5 章ではこれらの試薬を用いた ESR 測定条件: 緩衝液、温度、pH、最適試薬濃度、および混入金属イオン除去のためのキレート剤選択等の検討結果を示している。6 章では添加試薬を総合的に他の測定試薬と比較し、PAP/HTIO 系の優位性を示している。第 7 章では確立された計測手法および試薬系を用いて、人血清での B 型肝炎ウィルス抗原、大気中スギアレルゲン、天然水および日本酒中の微量過酸化水素、の定量に応用し、従来法に較べて格段の高感度性を有することを示している。第 8 章は上記計測手法を完全自動化した ESR 免疫測定装置の開発について述べたもので、開発装置は現在医学部に設置され、B 型肝炎の臨床検査に応用されており、PCR 法を凌ぐ感度を有することが示された。第 9 章および 10 章は HA の酸化還元バランスを活性酸素の測定および植物のストレス応答機構の解明に応用したもので前者では HTIO、後者ではスピンラベル剤 TEMPO のグルコース付加体を用いている。これらは適切な HA を選んで目的物質を高感度に計測する点に特徴があり、ESR 計測の高選択性を巧みに利用している。

これらの研究成果の根幹を成す計測原理は論文 1 (英文) に詳述されており、応用例を含めたその他の成果は論文 2 (英文) および 3 (和文) と 8 件の特許、6 編の参考論文として発表されている。中でも米欧中の特許取得は特筆に値する。よって、合格と判定する。

学力確認の結果の要旨

博士論文内容、博士論文公聴会における質疑応答、および個別面接諮問により審査を行い、研究の進め方、論理性、方法論の確かさ、学識、語学力、理解力など博士 (工学) として必要とされる能力を十分に備えていると認められたので合格と判定する。