

# 論文内容要旨（和文）

平成24年度入学 大学院博士後期課程

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏名 齋藤佑



## 論文題目 活性酸素の単独発生系の検討と活性酸素消去能評価への応用に関する研究

本論文は、活性酸素により引き起こされる様々な疾病、酸化、老化、劣化にかかわる反応を理解し、それらを分析的に評価する上で重要な活性酸素の単独発生系と、その応用の一つとして重要な活性酸素消去能評価への応用をまとめたものである。

活性酸素の中でも、体内ではじめに生成する酸素の励起種である一重項酸素、同様に酸素から1電子還元で生じるスーパーオキシド、さらに体内で最終的にラジカル連鎖反応を引き起こす過酸化ラジカルに着目し、それぞれの単独発生系と、競争反応とESRスピントラップ法を用いた消去能評価方法への応用を検討した。スピントラップ試薬は、一重項酸素以外に対して最も実績のあるDMPO (5,5-diethyl pyrroline 1-oxide) をもちい、一重項酸素に対しては新規のスピントラップ試薬を検討した。一重項酸素の発生系としては有機色素を用いる光増感法を検討し、コストパフォーマンスの立場から、有機合成によらずに入手可能な市販試薬の使用でその改善を試みた。スーパーオキシドの消去能評価では、新規に擬フローインジェクション法と命名した手法をESRスピントラップ法に拡張することで、後続反応の影響を受けにくい評価法を開発した。過酸化ラジカルについては、これまでに報告例がなかった水溶性の過酸化ラジカル発生系を新規に確立し、消去能評価を行った。

以下に各章の概略を述べる。

第1章では、活性酸素とその評価方法についてまとめ、本研究の重要性、目的について述べた。

第2章では、本研究に使用する基本原理と分析方法について述べた。ESRスピントラップ法と競争反応による活性酸素消去能評価についてまとめた。

第3章では、一重項酸素の単独発生系と、カルテノイド類化合物の一重項酸素消去能について、光増感法による一重項酸素発生系の条件検討を行い、これまで用いてきた加熱分解法と比較検討した。これまで一重項酸素の単独発生系としては、当研究室ではナフタレン誘導体エンドペルオキシドを用いて加熱分解法で行われてきたが、この試薬は有機合成により得るか、最近国内の試薬メーカー1社のみが販売を開始したものを高額で購入するしか方法がなく、公定法のような汎用的な分析法を目指すには、試薬の汎用性とコストパフォーマンスの立場から問題があった。そこで、汎用試薬として入手しやすい有機色素を用いる光増感法による一重項酸素の単独発生系の条件検討をおこなった。また、一重項酸素と選択性に反応し、安定なアダクトを形成する試薬は、合成により得られるDRD156とよばれるピラゾール誘導体以外に選択性が事実上なく、一重項酸素の発生系と同様に試薬の汎用性とコストパフォーマンスの立場から問題があった。そこで、光線力学的治療への応用を目的として研究され、一重項酸素を選択性に捕捉する事が報告されたピロリン誘導体が一重項酸素の消去能評価への応用可能か条件検討を行った。これらの条件検討の結果から見いだされた条件を用いて、一重項酸素の消去能が高いとされるカルテノイド類の化合物の消去能評価を行った結果、類似の実験系や試薬を用いた研究報告例と比較出来るような結果を得た。

第4章では、スーパーオキシドの単独発生系と消去能評価において問題となる後続反応の影響を受けにくい実験手法として、ペリスタルチックポンプを用いた擬フローインジェクション法を開発し、スーパーオキシドの消去能評価

を行い、従来法と比較検討した。また、スーパーオキシドの消去能評価の対象は、スーパーオキシドの消去能が高い事が知られているポリフェノールと総称されるフェノール類の化合物を用いた。スーパーオキシドの消去能評価は、総ポリフェノール量の分析と同時に行われるため、本研究でも比色分析法の1種であるFolin-Ciocalteu法を用いて総ポリフェノール量の定量を行った。数種類のポリフェノールについてスーパーオキシドの消去能評価と総ポリフェノール量の定量を行った結果、スーパーオキシドとの2次反応速度定数を決定する事ができた。ポリフェノールの骨格中にカテコール骨格やピロガロール骨格を有するものは高いスーパーオキシド消去能を有する傾向がみられた。さらに実試料として野菜や山菜類を対象として、スーパーオキシドの消去能と総ポリフェノール量の定量を行った結果、総ポリフェノール量の多いものほど、スーパーオキシドの消去能が高い傾向が得られた。

第5章では、シクロデキストリン誘導体とアゾ化合物 AIBNを用いて新規に水溶性の過酸化ラジカルを単独で発生する発生系を確立した。これまで利用してきたORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) 法では、水溶液中でアゾ化合物 AAPH由来のラジカルが過酸化ラジカルではなく酸化ラジカルである事、ORAC法から得られる消去能評価の結果に食品などの健康増進や抗酸化などの効果が直接的に関連性ない事などが問題となつており、ORACに変わる過酸化ラジカルの消去能評価の手法が望まれているが、水溶性の過酸化ラジカル発生系が確立されていなかった。そこで、様々な報告例があるシクロデキストリンやその誘導体を用いて水溶液系に非水溶性の化合物を可溶化させる手法に着想を得て、非水溶液系で過酸化ラジカルを生成するAIBNを水溶液に可溶化させる事で水溶性の過酸化ラジカル発生系を確立する事に成功した。この水溶性の過酸化ラジカルを用いて過酸化ラジカルに対する消去能評価が可能である事を示した。

第6章では、以上の結果を踏まえて、本研究の結言を述べる。試薬の汎用性とコストパフォーマンスの立場から、DMPOをスピントラップ試薬としてESRスピントラップ法と競争反応に基づく消去能評価を検討し、スーパーオキシドに対しては後続反応の影響を受けにくい擬フローインジェクション法を新規に開発し、過酸化ラジカルについては新規な水溶性の過酸化ラジカル発生系を確立した。一重項酸素に対しては新たにピロリン系スピントラップ試薬を検討し、一重項酸素の発生系としては有機色素を検討したが、既存の方法以上の結果を得るには至らなかつた。今後、本研究で確立された方法を用いた研究が消去能評価に利用される事が期待される。

# 学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

平成27年 2月17日

理 工 学 研 究 科 長 殿

## 課程博士論文審査委員会

主査 木島龍朗  
副査 尾形健明  
副査 野田博行  
副査 波多野豊平  
副査



学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	バイオ工学専攻 バイオ化学分野 氏名 齋藤佑		
論文題目	活性酸素の単独発生系の検討と活性酸素消去能評価への応用に関する研究		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	平成27年 1月27日～ 平成27年 2月10日
論文公聴会	平成27年 2月10日	場所	工学部3号館2307室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	平成27年 2月10日

### 学位論文の審査結果の要旨 (1,000字程度)

本論文は、活性酸素により引き起こされる様々な反応を理解し、それらを分析的に評価する上で重要な活性酸素の単独発生系と、その応用として重要な活性酸素消去能評価への応用をまとめたものである。従来の活性酸素に対する消去能評価は、ラジカル種ごとの消去能評価が行われていない点に大きな問題点であった。その解決法としてラジカル種ごとに評価可能なスピントラップ ESR 法と競争反応を用いた消去能評価を提案し、活性酸素として一重項酸素、スーパーオキシド、過酸化ラジカルに着目し、それぞれの単独発生系と消去能評価への応用を検討した。第1章では、研究背景と活性酸素評価方法についてまとめ、本研究の重要性、目的について述べ、第2章では本研究の基本原理と分析方法について述べている。第3章では、光増感法による一重項酸素発生系条件や一重項酸素トラップ剤の検討を行い、従来の加熱分解法と比較検討した。光増感法と加熱分解法を発生系に用いたカロテノイド類化合物の消去能評価から類似の報告例と比較出来るような結果が得られる事を確認したが、光増感法は評価できないカロテノイド化合物が存在するなど今後の条件検討によって光増感法が利用可能であることが新たに提起された。新規な一重項酸素トラップ剤については pH 依存性があり、更なる検討の余地があることに言及している。第4章では、スーパーオキシドの消去能評価の問題点であった後続反応の影響を受けにくい実験手法として、擬フローインジェクション法を開発し、ポリフェノール類についてスーパーオキシド消去能評価を行い、本法の有用性を示した。第5章では、シクロデキストリン誘導体とアゾ化合物を用いて新規な水溶性過酸化ラジカルを単独で発生する発生系を確立した。本法で得たラジカルが水溶性過酸化ラジカルである事を確認し、その過酸化ラジカル発生系が消去能評価に有用である事を示した。第6章では、以上の結果を踏まえて、本研究の結言を述べ、今後の研究の方向性についてまとめた。

本論文で得られた結果は、今後知見が蓄積される事で、活性酸素の消去能評価の公定法として利用される事が期待され、これらの研究成果は、英文誌 Studies in Science and Technology, Volume 3, Number 2, pp151-156 (2014) に掲載された。また、2編(英文)を国際会議で口頭発表し、12編(和文)を国内学会で口頭発表した。従って、本論文は学術的にも工学的も価値があるものと認め、博士(工学)学位論文として合格と判定する。

### 最終試験の結果の要旨

博士論文公聴会における質疑応答により審査を行ったが、研究の進め方、関連する知識、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。