

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590633

研究課題名（和文） ラジカル捕捉剤を用いた新規酸化ストレスマーカー測定法の開発と臨床的有用性の検証

研究課題名（英文） Novel Marker of oxidative stress by new radical trap agent

研究代表者

佐藤 圭創 (SATO KEIZO)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：00315293

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスは、三大成人病など様々な疾患の発症・進展に関与することから、フリーラジカルにより引き起こされる酸化ストレスに対する正確なバイオマーカーの発見と測定法の開発が求められている。申請者は、この電子スピン共鳴法を改良し、簡便かつ汎用性に富むキット及び測定システムの確立をめざす。具体的には、申請者と同仁化学研究所で作成した、新規ラジカル捕捉剤

5-diphenylphosphoryl-5-methyl-pyrroline-*N*-oxide (DPPMP0) および一酸化窒素測定剤 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (C-PTIO) の優れた特性（反応速度が速い、安定性が高い、脂溶性が高い）をもとに、反応液を有機溶媒で抽出することで、脂質ラジカルや一酸化窒素を高感度に検出でき、かつ検体が長期間保存できることを見出し、ヒト全血のフリーラジカルバランスを、有機溶媒抽出法を用いた電子スピン共鳴法で直接測定する測定法の精度の改善と簡便化を行い完了した。また、健常人での個体内変動、個体間変動の検討を行い、個体内変動、個体間変動や正常値などの検討を終了した。現在、キットが完成し、ヒトでの検討をおこなっている。

研究成果の概要（英文）：

We found that Novel Marker of oxidative stress by new radical trap agent using our developed new spin trap agent, 5-diphenylphosphoryl-5-methyl-pyrroline-*N*-Oxide (DPPMP0). It is very useful for free radical detection in not only chemical, cellular, enzymatical system but also *in vivo* human system by using ESR spin trap extraction method with DPPMP0.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床、医療・福祉、薬学、感染症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 酸化ストレスは、三大成人病をはじめ、糖尿病、感染症・炎症、急性肺傷害、老化など様々な疾患病態と深く関連している

(Biochem. J. 401: 1, 2007) ことから、正確で簡便な酸化ストレスマーカー測定法の開発が強く求められている。しかし、現在使用されている酸化ストレスマーカー測定法の

多く(化学発光、8-OHdG、cytochrome C 還元法、NBT 還元法、ヘキサノイルリジン、アクロレイン、タンパク質過酸化物質など)は、*in vitro*の限られた実験では有用であるものの、生体試料そのものを用いた実験や*in vivo*のフリーラジカル検出においては、試料中の金属、還元性物質、蛋白、酸素濃度によるアーチファクトが多く、再現性の良い結果が得られない(Free Radic. Biol. Med. 43: 506, 2007)。さらに、これらの方法は間接的なマーカーであり、フリーラジカルにより引き起こされる酸化ストレスを直接検出できないため、信頼性が高くかつフリーラジカルを直接検出可能な酸化ストレスマーカー測定法の開発が必用とされている。一方、酸化ストレス病態に抗酸化剤での治療を試みた場合(New Eng. J. Med. 357: 562, 2007)の治療効果評価や、酸化ストレスに関係の深い酵素の遺伝多型と疾患感受性に関する研究(Pharmacol. Ther. 112: 501, 2006)において個別化予防・治療を目指す場合に、酸化ストレスの測定が必要であるにもかかわらず、現行の酸化ストレスマーカーでは正確な評価が出来ないために、抗酸化及び個別化治療の発展の障害となっている。

(2)フリーラジカルを直接測定可能な電子スピン共鳴法(以下 ESR 法)は、ラジカルに対する特異度は高いものの、感度が低いために*in vivo*検体での測定は困難であった。申請者は、米国 NIH の Ronald P. Mason 教授との共同研究で、ラジカル捕捉安定化剤を用いた ESR 法を改良し、動物実験モデルにおいて*in vivo*でのフリーラジカル生成を直接測定する方法を確立した(FASEB J. 16: 1713, 2002, Am J. Resp. Crit. Care Med. 171: 379, 2005)。この方法を用いて、ブレオマイシン急性肺障害におけるラジカルの役割(Biol. Pharm. Bull. 31: 1855, 2008)、緑膿菌肺炎マウスモデルによる病態の解析

(Free Radic. Biol. Med. に投稿中)を行っている。しかし、この方法には、ラジカル捕捉剤の毒性、不安定性、除水操作・抽出操作・濃縮操作が煩雑という欠点があり、これらの欠点を解決し、ヒトに応用可能な新規ラジカル捕捉剤を切望していた。また、一酸化窒素(NO)の測定においては、熊本大学の赤池孝章教授との共同研究で 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-3-oxide-1-oxyl

(PTIO)を用いた NO 検出法を発見した(Biochemistry 32: 827, 1993)。この方法を用いて、がん(Jpn. J. Cancer Res. 85: 331, 1994)やショック(Biochem. Biophys. Res. Commun. 202: 923, 1994)やインフルエンザ感染(Am J. Resp. Crit. Care Med. 157: 853, 1998)での NO の生成を確認した。しかし、本方法も、感度が低いため生体試料の測定は問題点が多く残されていた。一方、研究分担者の中川らは、酸化ストレスに関係の深い酵素の遺伝多型と疾患感受性に関する研究から、グルタチオン S-転移酵素(以下 GST)の遺伝的欠損とカルバマゼピンによる肝障害(Pharmacogenomics 8: 435, 2007)やアルコール性肝障害(Clin. Pharm. Ther. 81:

634, 2007)、さらに糖尿病

(Pharmacogenomics 8: 1307, 2007, Toxicol. Lett. 178, 143, 2008)等との関連を明らかにし、疾患の発症や病態発現における酸化ストレスの重要性について薬理遺伝学的観点から検討している。このような背景のもと、同仁化学研究所(研究協力者)が合成したラジカルとの反応速度が高くかつ半減期の長い新規ラジカル捕捉剤 5-diphenylphosphoryl-5-methyl-pyrroline-N-oxide (DPPMPO, Bull. Chem. Soc. Jpn. 80, 758, 2007, Biochem. Biophys. Res. Commun. 370: 93, 2008)と一酸化窒素測定剤(C-PTIO)を用いた新しい酸化ストレスマーカー測定法の開発を開始した。すなわち、DPPMPO や C-PTIO を用いて患者から採取した全血中の脂質由来フリーラジカルと NO を測定するという独創的な方法の開発である。その結果、DPPMPO を用いた全血中のフリーラジカル測定では、今までのラジカル捕捉剤に比べて脂質由来フリーラジカルに対する反応速度が早く、5 倍以上に高感度であり、さらに抽出されたラジカルの半減期も 10 倍以上長く長時間安定で、保存が可能なことを発見した。また、C-PTIO を用いた NO 測定では有機溶媒抽出を行うことで、高感度かつ安定な測定系の開発を可能とした。加えて、この方法では、除水操作、濃縮操作を必用とせず、検体処理が簡便である事も判明した。以上より、この DPPMPO および C-PTIO を使用した全血中のフリーラジカル測定法を改善・発展させ、簡便でかつ汎用性のある新規酸化ストレスマーカー測定キットの開発をめざすとともに、本法の臨床的有用性を確認するために、疾患モデルの各種病態における検討、さらには GST の遺伝的欠損に伴う酸化ストレス状態の差を測定して、薬理遺伝学的研究を病態生化学で実証することを計画した。

## 2. 研究の目的

酸化ストレスは、三大成人病など様々な疾患の発症・進展に関与することから、フリーラジカルにより引き起こされる酸化ストレスに対する正確なバイオマーカーの発見と測定法の開発が求められている。しかし、現在使用されている酸化ストレスマーカーの多くは、生体試料そのものを用いた実験や*in vivo*のフリーラジカル検出においては、アーチファクトが多く、再現性の良い結果が得られない。何よりも、これらは、ラジカル生成の間接的なマーカーであり、フリーラジカルにより引き起こされる酸化ストレスを直接検出できない。一方で、フリーラジカルを直接測定する電子スピン共鳴法は、有用であるものの測定感度が低いこと、検体の保存ができないこと、測定には高額な機器と熟練が必要であることなどの問題があった。申請者は、この電子スピン共鳴法を改良し、簡便でかつ汎用性に富むキット及び測定システムの確立をめざす。具体的には、申請者と同仁化学研

究所で作成した、新規ラジカル捕捉剤 5-diphenylphosphoryl-5-methyl-pyrroline-N-oxide (DPPMPO) および一酸化窒素測定剤 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (C-PTIO) の優れた特性 (反応速度が速い、安定性が高い、脂溶性が高い) をもとに、反応液を有機溶媒で抽出することで、脂質ラジカルや一酸化窒素を高感度に検出でき、かつ検体が長期間保存できることを見出した (特許出願中 2008-57368)。この方法をもとに、ヒト全血のフリーラジカルバランスを、有機溶媒抽出法を用いた電子スピン共鳴法で直接測定する独創的な方法を開発中である。さらに、本法の完成によって、当教室で集積中の酸化ストレスに関する酵素と疾患感受性についての薬理遺伝学的知見を病態生化学的に解明することを目指す。すなわち本課題は、三大成人病をはじめとする各種疾患での酸化ストレスの病態解析や治療薬の開発などに応用可能な、新規バイオマーカーを測定する汎用性の高い測定キットを開発して、医学薬学領域のニーズに応えることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は、新規ラジカル捕捉剤を用いて、簡便でかつ汎用性が高く、臨床的有用性の高い新規酸化ストレス測定キットの作成をめざす。そのために必要な研究内容は、新規酸化ストレスマーカー測定キット作成のための基礎データの収集と臨床的有用性確認のための臨床症例由来試料の測定に大きく分けられる。基礎データの収集として、測定法の精度の改善と簡便化、動物実験モデルを用いた確認、ヒトでの個体内変動、個体間変動、既存の酸化ストレス測定法と比較をおこなう。その上で、同仁化学研究所との共同研究でキットの試作をおこない、そのキットを用いて各種疾患における臨床研究での有用性の検討を行う。

### 4. 研究成果

酸化ストレスは、三大成人病など様々な疾患の発症・進展に関与することから、フリーラジカルにより引き起こされる酸化ストレスに対する正確なバイオマーカーの発見と測定法の開発が求められている。申請者は、この電子スピン共鳴法を改良し、簡便でかつ汎用性に富むキット及び測定システムの確立をめざす。具体的には、申請者と同仁化学研究所で作成した、新規ラジカル捕捉剤 5-diphenylphosphoryl-5-methyl-pyrroline-N-oxide (DPPMPO) および一酸化窒素測定剤 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (C-PTIO) の優れた特性 (反応速度が速い、安定性が高い、脂溶性が高い) をもとに、反応液を有機溶媒で抽出することで、脂

質ラジカルや一酸化窒素を高感度に検出でき、かつ検体が長期間保存できることを見出し、ヒト全血のフリーラジカルバランスを、有機溶媒抽出法を用いた電子スピン共鳴法で直接測定する測定法の精度の改善と簡便化を行い完了した。また、健康人での個体内変動、個体間変動の検討を行い、個体内変動、個体間変動や正常値などの検討を終了した。現在、このデータを基礎とし、糖尿病患者における酸化ストレス状態の把握する予備研究を開始している。

さらに、我々の発明した測定システム (図1) が、酵素学的系 (図2)、細胞系 (図3)、臨床の患者などの血液 (図4) で測定できるかどうかの確認を行った。その結果、本システムが、xanthine oxidase を用いた酵素学的フリーラジカル産生系 (図2)、ヒト好中球を用いたフリーラジカル産生系 (図3)、臨床の患者などの LPS 刺激血液および脂質過酸化物添加血液 (図4) などの測定で有用であることを確認した。

図1 ESRスピントラップ抽出法

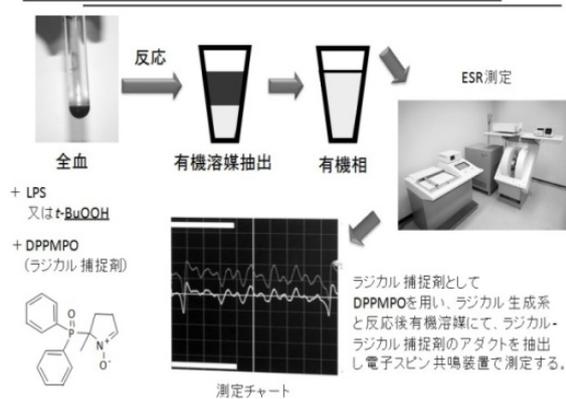


図2 酵素を用いた検討

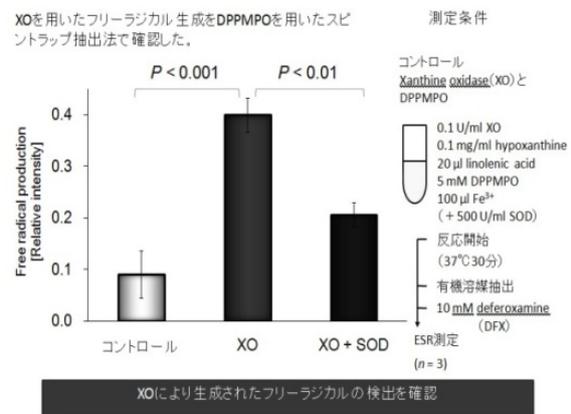


図3 細胞を用いた検討

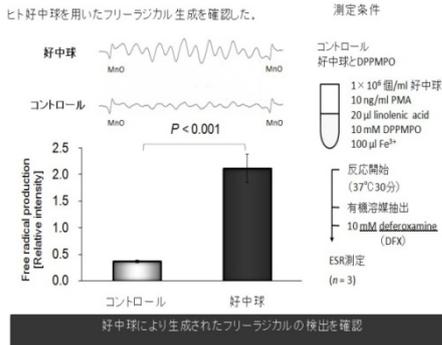
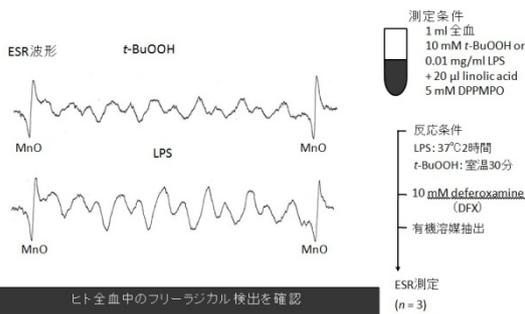
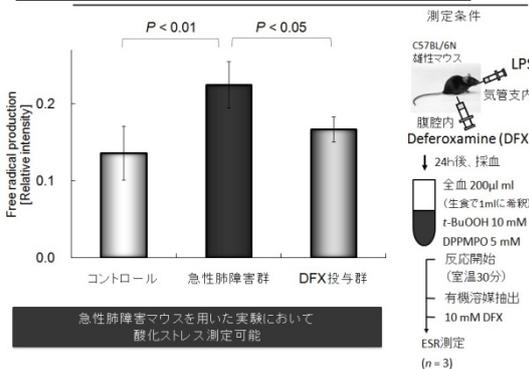


図4 ヒト全血を用いた測定



次に、このシステムが真に in vivo の系で、可能かどうかを確認するために、LPS を経気道的に投入した、マウス急性肺障害モデルで、血液中のフリーラジカル生成を検討した。その結果、in vivo 実験でも、本方法を用いた解析が可能であることを確認した (図 5)。

図5 急性肺障害マウスの酸化ストレス測定

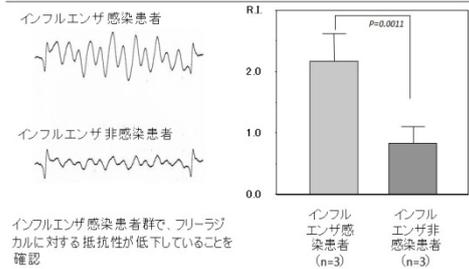


さらに、これらの測定が実際の臨床患者において使用できるか検討するために、フリーラジカル生成が亢進している可能性が高いインフルエンザ感染患者の血液を用いて検討した。その結果、図 6 に示すように、インフルエンザ感染患者においてラジカル生成が亢進していることが確認された。

これらの結果から、この測定法の有用性が確認されたと考える。

図6

全血抗酸化活性に対するインフルエンザ感染の影響



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tanaka K, Azuma A, Miyazaki Y, Sato K, Mizuhisima T, Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis, Chest、査読有、2012、in press、
- ② Sato K, Corbett J, Mason RP, Kadiiska MB, In vivo evidence of free radical generation in the mouse lung after exposure to Pseudomonas aeruginosa bacterium: an ESR spin-trapping investigation, Free Radic Res、査読有、46 巻、2012、645-55、
- ③ Kondo Y, Ishithuka Y, Kadowaki D, Kuroda M, Tanaka Y, Nagatomi M, Irikura M, Hirata S, Sato K, Maruyama T, Hamasaki N, and Irie T, Phosphoenolpyruvic Acid, an Intermediary Metabolite of Glycolysis, as a Potential Cytoprotectant and Anti-oxidant in Hela Cells、Biol. Pharm. Bull、査読有、35 巻、2012、1-6、
- ④ Tanaka K, Tanaka Y, Miyazaki Y, Namba T, Sato K, Aoshiba K, Azuma A, Mizushima T, Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on pulmonary emphysema、J PharmacolExpTher、査読有、338 巻、2011、810-818、

[学会発表] (計 5 件)

- ① 佐藤 圭創、(特別講演)リウマチ性疾患と肺病変、福岡地区リウマチ教育研修会、2011. 12. 11、福岡
- ② 佐藤 圭創、(特別講演)感染症の現在・過去・未来—病態を考えた未来の感染症治療を目指して—、第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会、2011. 11. 24、沖縄

- ③ 佐藤 圭創、(特別講演)マクロライドの  
新作用としての気道炎症抑制作用、生体  
機能と創薬シンポジウム、2011. 9. 1、東  
京
- ④ 佐藤 圭創、(特別講演)呼吸器感染にお  
ける炎症抑制の最前線、第 59 回日本化  
学療法学会総会 イブニングセミナー4、  
2011. 6. 24、札幌
- ⑤ 佐藤 圭創、(特別講演)インフルエンザ  
の劇症化機序とマクロライドの役割、第  
73 回耳鼻咽喉科臨床学会 総会・学術講  
演会、2011. 6. 24、長野

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**佐藤 圭創 (SATO KEIZO)**

九州保健福祉大学・薬学部・教授

**研究者番号：00315293**

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

