

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10256

研究課題名(和文) 液性検体含有メルカプタンの定量分析法開発への基礎的研究 口臭の疫学調査へ向けて

研究課題名(英文) Fundamental study for development of a quantitative analysis method for mercaptans in liquid samples: toward epidemiological surveys of halitosis

研究代表者

伊藤 博夫 (ITO, Hiro-0)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：40213079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：液体試料中のチオールの分析を口臭検査法に応用することを目的として、アミノ酸高感度定量分析法として汎用されているオルトフタルアルデヒド(OPA)法の改良应用に取り組んだ。新規のチオール捕捉試薬としてイミン中間体化合物合成を試みたが、十分な性能を示さなかった。一方、OPAの4位に種々の置換基を持つOPA類縁体を合成してn-プロパンチオールおよび3-アミノペンタンの3成分縮合反応により生成したイソインドール誘導体の位置異性体の構造と生成比を解析した結果、従来の理論であるイミン中間体を経由する反応経路よりも、ビスヘミアミナル中間体を経由する反応経路の方が主要な反応メカニズムである可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の口臭検査法は呼気ガスを検体としているが、唾液中に溶存する口臭物質の測定が可能になれば、検体処理能力や検査場面の拡大などの点において画期的な口臭検査法の開発につながる。本研究の結果、従来の理論であるイミン中間体を経由する反応経路よりも、ビスヘミアミナル中間体を経由する反応経路の方が主要な反応メカニズムである可能性が示され、これにより全く新しいチオール捕捉試薬の設計の方針が見出された。ビスヘミアミナル化合物を標的とした新規チオール捕捉試薬の開発により、液体に含有される口臭物質(メチルメルカプタン)の有機化学的検出法の開発を経た口臭の疫学調査への道筋が示唆された。

研究成果の概要(英文)：With the aim of applying the analysis of thiols in liquid samples to a halitosis testing, we attempted to improve the ortho-phthalaldehyde (OPA) method, which is widely used as a highly sensitive quantitative amino acid analysis method. An attempt was made to synthesize imine intermediate compounds as new thiol capture reagents, but they did not show satisfactory performance. On the other hand, OPA analogues with various substituents at the 4-position of OPA were synthesized. Analysis of the structures and product ratios of the positional isomers of isoindole derivatives produced by the three-component condensation reaction of n-propanethiol and 3-aminopentane showed that the reaction pathway via bis-hemiaminal intermediate may be the dominant reaction mechanism, rather than the reaction pathway via the imine intermediate, which has been believed in the conventional theory.

研究分野：医歯薬学(社会系歯学・予防歯学)

キーワード：予防歯学 口臭 歯周病 メチルメルカプタン(メタンチオール) ハイスルーブット分析 液体クロマトグラフィー 有機化学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

口臭を心配する人は多いが、自分の口臭は自分では分からず、また他人に嗅いでもらって判定されることにも大きな抵抗があり、客観的な機器分析のニーズが存在する。現在実用化されている、ガスクロマトグラフィーを用いた口臭の精密測定法や、センサーチップを用いたポータブル装置による簡易式口臭検査は、いずれも呼気ガスの直接分析であり、呼気検体を採取後直ちに測定する必要がある上に、複数検体を連続して測定する場合には、一検体の測定開始から次の検体の測定開始が可能になるまで10分以上の時間を要する。このため集団検診などに採用することは不可能であり、口臭の疫学的な実態も、これまで全く明らかになっていない。

口臭の大部分は口腔内の健康状態、特に歯周病と密接に関連する。研究代表者は、これまで主として歯周病予防に関する研究、ならびに公衆衛生活動に従事してきた。口臭の機器測定は、口腔健康状態の客観的評価指標および歯周病のスクリーニング検査として有望な可能性を持つが、現在の呼気ガスの直接測定では、所要時間と費用の問題から、集団検診や疫学調査への応用は困難である。

口臭の主成分は呼気中の揮発性硫黄化合物であり、特にメチルメルカプタン(メタンチオール)が重要であることが知られている。研究分担者の佐野が専門とする創薬化学・有機化学の分野では、生体内チオールに特異的に反応性を示す化合物の合成開発が活発に展開されてきた。佐野はシステインプロテアーゼ阻害剤の合成研究を行い、生体内チオール類と反応する有機化合物の合成に豊富な経験を有する。予防歯学を専門とする研究代表者は、佐野の協力を得て有機化学反応に基づく呼気ガス中の揮発性硫黄化合物の検出法の開発に取り組んできた。その中で、本研究計画の着想の基礎となる結果を得てきた。徳島大学では、健康科学と医療の融合を目指して医学、歯学、薬学、栄養学の4研究科を統合した大学院ヘルスバイオサイエンス研究部が2004年に設立され(2016年に医歯薬学研究部と改称)学問領域を越えた臨床化学の研究を展開しており、本学のこの環境の中から、歯学系の研究代表者と薬学系の研究分担者による前例のない斬新な共同研究が始まった。

最初に、エルマン試薬(5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸))を基盤にチオールの蛍光標識試薬の設計を行い、有望な数種の試薬の合成開発に成功した(基盤研究(C)22592336、2010~12年)。ここで気相の口臭物質の液相への補足段階における定量性の確保が解決すべき問題として現れた。共同研究を継続する中で、唾液を検査検体として使用し、溶存チオールを高感度測定する方策を考案し、そのための化学反応系の基盤として、アミノ酸分析法として汎用されるオルトフタルアルデヒド法(OPA法)を用いる戦略を提案した。アミノ酸分析法としてのOPA法を、チオール測定のための方法に変換するために、OPA、第一級アミン、チオールの3成分縮合反応の最終産物である不安定なイソインドール誘導体を、液体クロマトで分析できるまで安定化する必要があった。そこで基盤研究(C)(No.18K09912、2018~2020年)で、嵩高い置換基の導入による立体保護効果によるイソインドールの安定性の向上を検討した。トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン由来の嵩高いアミンを使用することでイソインドールの安定性が向上し、単離精製・定量分析が可能になるという仮説が証明されたが、イソインドールの安定性とチオールの反応性はトレードオフの関係にあることも明らかになった。これを解決するために、嵩高い第一級アミンの構造最適化の継続に加えて、反応中間体として予想されるイミンの合成を課題とする今回の新しい研究提案に至った。

現行のガス分析による口臭検査は、時間と設備の制約を大きく受けるため多検体処理が困難であり、集団検診へ応用することは不可能である。本研究は、歯周病由来の病的口臭の主原因であるメチルメルカプタン(別名メタンチオール)を標的として、液相におけるメチルメルカプタンの有機化学的な間接検出法を開発することによって、この問題を革新的に解決しようとするものである。本研究の結果、唾液を検体とする口臭検査法が開発されれば、新しい歯周病のスクリーニング検査としての応用も期待される。現行の時間と労力を要し侵襲性も懸念されるプロービングによる歯周組織検査法の代替法としての可能性も期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述の問題の革新的解決を目指し、歯周病由来の病的口臭の主原因であるメチルメルカプタン(別名メタンチオール)を標的に、液体検体に含有されるメチルメルカプタンの有機化学的な間接検出法を開発することを目的とする。このために、アミノ酸分析法として有名なオルトフタルアルデヒド法を化学反応の基盤として、分析対象をチオール類に改変するための分析用化合物を探索的に設計・合成し、反応生成物の安定性や検出感度等の観点から分子設計と反応条件の最適化を進め、精度の高い検査法の開発を目指す。将来的には大規模な口臭の疫学調査が可能となることを目指すものである。

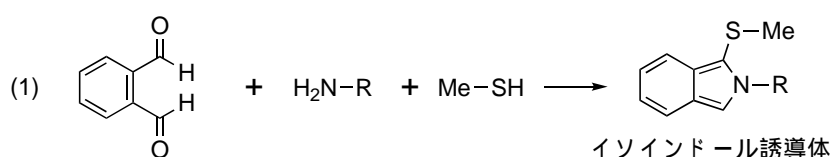
本研究課題の核心をなす学術的「問い」とは、ガス(呼気)ではなく液体(唾液)を検体とし

て使用する、高精度・高感度な口臭検査の実現可能性である。液体を検体を使用することで、その保存性と分析手法の違いにより、多検体自動処理への道が開かれる。集団検診や疫学調査への応用の可能性が見えてくる。

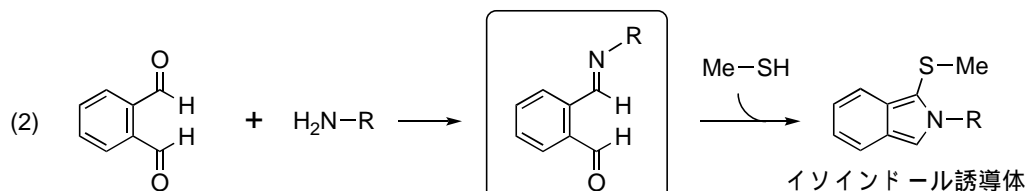
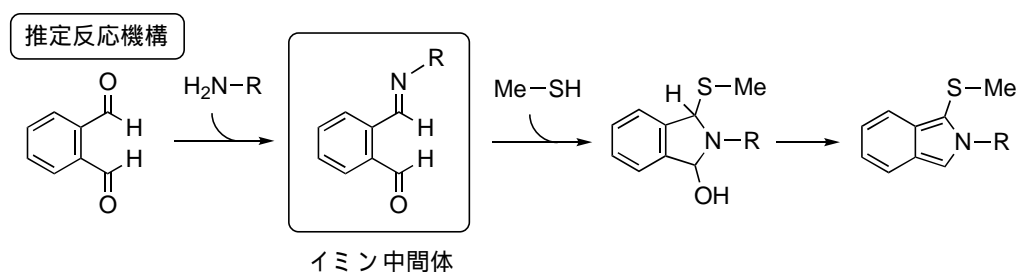
### 3. 研究の方法

#### (1) イミン型新規チオール分析試薬の分子設計および合成

既存のオルトフタルアルデヒド法 (OPA 法) によるアミノ酸分析では、OPA、第一級アミン、チオールの 3 成分縮合反応がイミン中間体を經由する 2 段階の反応で進行し、蛍光を有するイソインドール誘導体が生成すると考えられている (下図 (1))。第 1 段階で生成されるイミン中間体を単離精製し、チオール分析試薬として用いることができれば、チオールとの 2 成分による一段階の反応に単純化されることから、反応速度の大幅な向上が期待される。イミン中間体は一般に不安定なため、分析試薬として用いることは不可能だと考えられていたが、ごく最近、類似のイミン中間体をニッケルセンサー試薬として使用した論文が報告された (Dhanushkodi M et al., *Dyes and Pigments* 2020, 173, 107897)。この知見に基づき我々も、本研究において OPA 法を基盤とするチオール分析の改良を目的として、イミン型新規チオール分析試薬 (下図 (2)) の分子設計ならびに合成に取り組んだ。本実験におけるチオールとしては、約 15w/w% のメチルメルカプタンナトリウム水溶液を利用した。



オルトフタルアルデヒド (OPA)



オルトフタルアルデヒド (OPA)

イミン型新規チオール分析試薬

#### (2) ヒト由来検体の測定を模倣したシミュレーション・バイオ実験系の開発

人の唾液を用いた研究が、新型コロナウイルス問題のため困難になっていた。このこともあり、当研究の効率改善と将来的にも持続的な研究発展を推進するために、細菌培養によるシミュレーション実験系の構築に取り組んだ。

口臭産生の原因となる歯周病関連細菌の分離株を嫌氣的に (密閉状態で) 液体培養を行い、気相のガスをシリンジで採取し直ちにガス分析を行う。これが呼気ガスの口臭検査の模倣である。研究室に保有している口臭検査装置 (オーラルクロマ<sup>®</sup>、NISSHIA エフアイエス社製) を使用して、装置への最適添加量や希釈度等の検討を行った。並んで、培養液を採取し培養上清液の中のメチルメルカプタンを測定した。ここまでに我々が開発を進めてきたトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンの構造を基盤とした嵩高い第一級アミンを用いる 3 成分縮合反応 (OPA 法) に加えて、今回新たに開発するイミン型チオール分析試薬を用いて反応産物を高速液体クロマトグラフィーで分析する計画であった。試薬の分子種、温度・時間その他の反応条件を種々に変化させながら、どのような条件でどのような反応産物が得られるかを定量的に解析し、上述のメチルメルカプタンナトリウムを用いた実験結果に基づいて反応条件を絞り込み、口臭患者の唾液を検体とした測定のためのシミュレーション実験系の構築を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) イミン型新規チオール分析試薬の開発：分子設計および合成

既存 OPA 法によるアミノ酸分析では、OPA、第一級アミン、チオールの 3 成分縮合反応がイミン中間体を經由する 2 段階の反応で進行し、蛍光を有するイソインドール誘導体が生成すると考えられている。第 1 段階で生成されるイミン中間体を単離精製し、チオール分析試薬として用いることができれば、チオールとの 2 成分による一段階の反応に単純化されることから、反応速度の大幅な向上が期待される。イミン中間体をニッケルセンサー試薬として使用した論文 (Dhanushkodi M et al., *Dyes and Pigments*, 2020, 173, 107897) を基盤とし、OPA 法での生成が想定されるイミン中間体の別途合成を試みたが、上記論文記載の反応を再現することは出来なかった。このため新たに別の合成経路を考え出し、試行錯誤する必要が生じた。ここで、OPA ではなくフタリドを出発材料として 2-(イミノメチル)ベンジルアルコールを經由して、最終段階の酸化によりアルデヒド体を得る合成経路を検討した。目的とする 2-(イミノメチル)ベンジルアルコールが 2 工程収率 81% で得られた。この後、最終段階の酸化反応を詳細に検討し、イミン中間体合成の達成を目指した。

高い第一級アミンを 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンからより安定なイソインドールを与えることが期待される C3 対称第一級アミンに変更し、既存のオルトフタルアルデヒド法 (OPA 法) の第 1 段階での生成が想定されるイミン中間体の別途合成を検討した。出発原料を OPA から 2-プロモベンズアルデヒドに変更して、アルデヒドのカルボニル基を保護した状態でイミン構造を構築した後に脱保護することにより 2-(イミノメチル)ベンズアルデヒドへと変換するという合成経路を新たに検討した。イミン構造の構築に用いる高い第一級アミンを 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンからより安定なイソインドールを与える C3 対称第一級アミンであるトリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタンに変更することとし、ニトロメタンとアクリロニトリルを原料とする合成方法に取り組んだ。この結果、C3 対称のトリニトリル、トリカルボン酸、トリオールを經由し、最後にニトロ基をアミノ基に還元することでトリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタンを得た。

トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタンのヒドロキシ保護体を用いて、イミン中間体の別途合成を行った。そしてこのイミン中間体とチオールの 2 成分縮合反応を検討した。しかしながら合成された新規イミン中間体化合物はチオール捕捉用試薬として満足できる性能を示さなかった。

### (2) ヒト由来検体の測定を模倣したシミュレーション・バイオ実験系の開発

ヒトの唾液検体中のメチルメルカプタンの測定を模倣したバイオシミュレーション実験系の開発として、歯周病における口臭発生の主要原因と考えられる細菌 *Porphyromonas gingivalis* を嫌気培養し、培養上清液中のメチルメルカプタンを、OPA 試薬と 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンを加え、3 成分縮合反応によるメチルメルカプタンの検出を試みた。

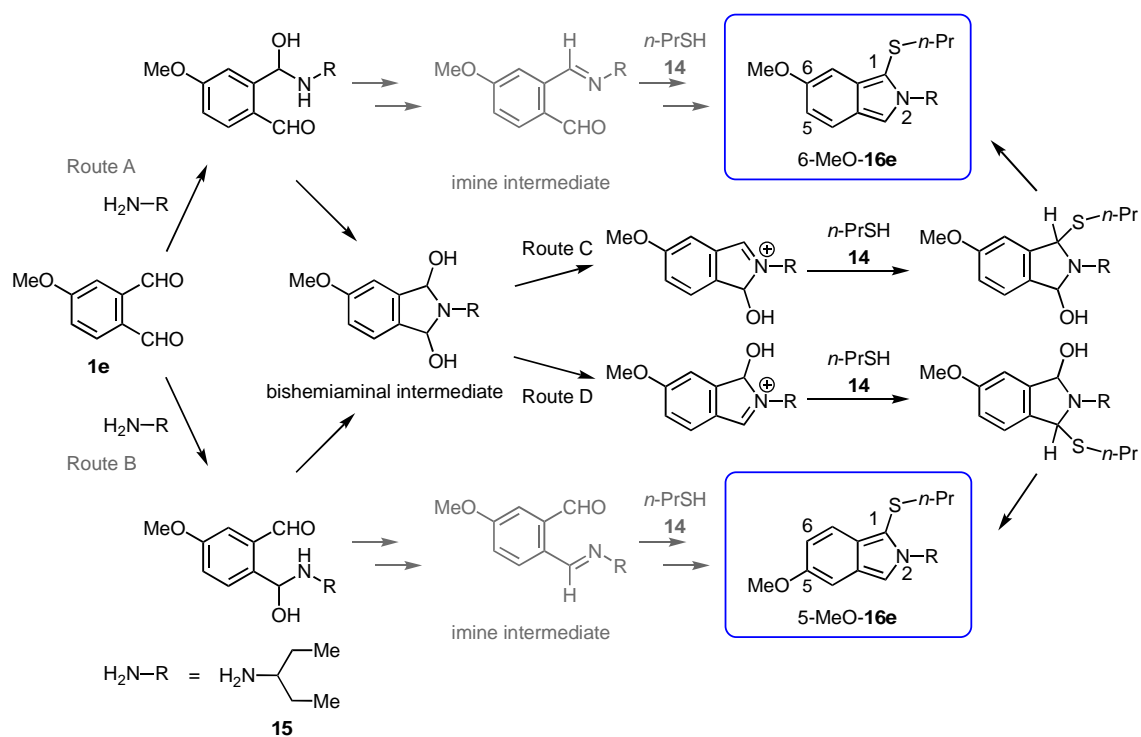
培養液検体の OPA 変法による反応後の薄層クロマトグラフィーにより、チオールの捕捉を示すイソインドールの生成が確認され、このシステムがシミュレーション実験系として使用可能であることが示唆された。しかしながら OPA 変法の反応産物の検出について、再現性・定量性が不十分であり、反応感度と最終生成物の安定性の十分な向上が必要であると考えられた。このまま 3 成分縮合反応系の OPA 変法で細菌培養液中のメチルメルカプタン検出に挑戦を続けることを控えて、進行中の 2 成分縮合反応系の改良と、新たに着想を得た 3 分子縮合反応系の改良などに優先して取り組むべきと判断した。

### (3) 4 位に置換基を有する OPA 類縁体を用いた 3 成分縮合反応によるイソインドールの合成

OPA よりも優れたチオール分析試薬の開発を目指して OPA の 4 位にフルオロ、プロモ、メチル、メトキシの各置換基を持つ 4 種の OPA 類縁体を 2-プロモベンズアルデヒドの 4 位置換体を原料として合成した。4 種の OPA 類縁体と n-プロパンチオールおよび 3-アミノペンタンの 3 成分縮合反応により生成したイソインドール誘導体の位置異性体の構造と生成比を  $^1\text{H-NMR}$  で解析した。この結果、4 位にフルオロ基やクロロ基といった電気陰性度の大きい原子を導入した OPA 類縁体の反応は、位置異性体比 1 : 1 でイソインドールを与えた。一方、4 位にメチル基やメトキシ基といった電子供与性置換基を導入した OPA 類縁体では、5 位に置換基を有する位置異性体が主生成物として得られた。したがって、従来理論であるイミン中間体を經由する反応経路よりも、ビスヘミアミナル中間体を經由する反応経路の方が主要な反応メカニズムである可能性が示された (Scheme 9)。さらに、従来想定されていた反応メカニズムによれば、電子供与性置換基を導入した OPA 類縁体は反応性が低下すると予想されたが、4 位にメチル基やメトキシ基を導入した OPA 類縁体は、電気陰性度の大きい原子を導入した OPA 類縁体よりも高い反応性を示した。以上により全く新しいチオール捕捉試薬の設計の道筋が発見された。すなわ

ち、ビスヘミアミナル化合物の反応性を高める電子供与性置換基の導入を分子設計の基軸とした新規チオール捕捉試薬の開発により、液体に含有される口臭物質(メチルメルカプタン)の有機化学的検出法の開発を経た口臭の疫学調査への道筋が示唆された。

Scheme 9



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakao Michiyasu, Nakamura Akihito, Takesue Tomoyuki, Kitaike Syuji, Ito Hiro-O, Sano Shigeki	4. 巻 7
2. 論文標題 Synthesis of Novel Phosphorus-Substituted Stable Isoindoles by a Three-Component Coupling Reaction of ortho-Phthalaldehyde, 9,10-Dihydro-9-oxa-10-phosphaphenanthrene 10-Oxide, and Primary Amines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 SynOpen	6. 最初と最後の頁 394 ~ 400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-2148-9433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本麻里衣、中尾允泰、佐野茂樹
2. 発表標題 ビス(3,4,5-トリフルオロフェニル)ホスホノ酢酸メチルのリン原子上でのチオールによる求核置換反応
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会（高知）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田卓也、宮生竜生、玉木直文、三木かなめ、伊藤博夫
2. 発表標題 MA-Tを用いた洗口が口臭と口腔細菌に及ぼす効果
3. 学会等名 第61回四国歯学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐野 茂樹  (SANO Shigeki)  (20226038)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授    (16101)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------