

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10039

研究課題名(和文)キノロン系抗菌薬の新規酸化ストレス測定法を用いた、酸化・抗酸化能の評価

研究課題名(英文)Evaluation of oxidative / antioxidant capacity using a novel oxidative stress measurement method for quinolone antibacterial agents

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ニューキノロン系抗菌薬の酸化・抗酸化能を測定し、薬剤の酸化・抗酸化能を基礎にした新しいプロファイリングを作成するために、UVによるラジカル生成系、フェントン反応系、キサンチンオキシダーゼ系、好中球系などの生成系でラジカルを産生させ、これに各種ニューキノロンのラジカル生成増強及び消去作用を検討した。その結果、ニューキノロン系抗菌薬により、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシド、脂質ラジカル生成系に差があり、ラジカルによる細胞毒性抑制効果にも違いが確認された。以上より、ニューキノロン系抗菌薬の酸化・抗酸化能のプロファイリングすることが可能になり、病態による使い分けに寄与することができると思う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発したシームレスで簡便な酸化・抗酸化能測定試薬i-Strapを用いて、酸化・抗酸化能を基礎にニューキノロン系抗菌剤をプロファイリングすることが可能になった。その結果、感染病態における、ニューキノロン系抗菌剤の使い分けに有用だけでなく、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であり、医学薬学領域のニーズに応えることができ、社会的意義がある成果だと考える。

研究成果の概要(英文)：We measured the oxidative / antioxidant capacity of new quinolone antibacterial agents and create new profiling based on the oxidative / antioxidant capacity of the drug Using UV radical generation system, Fenton reaction system, xanthin oxidase system, neutrophils system. By producing radicals in a production system such as a system and adding various new quinolones to this, it was examined for each drug whether radical production was enhanced or eliminated. As a result, it was found that there are differences in the hydroxyl radical, superoxide, and lipid radical generation systems depending on the new quinolone antibacterial agent, and also in the cytotoxicity-suppressing effect induced by the radicals. Based on the above, it is possible to profile the oxidizing and antioxidant abilities of new quinolone antibacterial agents, and it is considered that it can contribute to the proper use depending on the pathological condition.

研究分野：薬学

キーワード：酸化ストレス ニューキノロン フリーラジカル ヒドロキシラジカル スーパーオキシド 脂質ラジカル

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

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。そこで、我々は、これまでの研究で、*in vitro*系から *in vivo*の系までシームレスな方法で、酸化・抗酸化能測定試薬 i-STrap を開発し、現在この方法および関連方法を用いた研究を行ってきた。

一方、14 員環、15 員環マクロライドの新作用などに代表とされるように、既存の抗菌薬のもとも持つ薬理活性以外の生物活性の研究が進んできており、これらの研究が、薬剤の付加価値を高めたり、副作用防止に役立つことがわかってきた。

一方、我々は、感染症治療において、重要な抗菌薬としての位置づけられるニューキノロン系抗菌薬が、致死性インフルエンザウイルス感染モデルにおいて、酸化ストレスを制御することで生存率が改善することを見出した (*PLoS One.* 2015 Jun 18;10(6):e0130248)。また、ニューキノロン系抗菌剤の種類によっては、むしろ病態が増悪することも確認した (データ未発表)。しかしながら、ニューキノロン系抗菌薬の酸化ストレス抑制機構について詳細に解析された事例はなく、ニューキノロン系抗菌薬のそれぞれの構造に依存した、活性酸素の生成抑制および生成促進活性についての網羅的な検討が必要と考えられる。

2. 研究の目的

感染病態において、「酸化ストレス」がその病態に深刻に関与していると考えられている。ニューキノロン系抗菌剤のような、既存・新規の薬剤においてもともと有する薬理活性に以外に、酸化・抗酸化能などの新たな生理活性が存在することで、新たな薬理活性の発現や副作用が生じる可能性がある。そこで、各種ニューキノロン系抗菌剤における、1) 抗酸化能 (ラジカル消去能) 2) 酸化能 (ラジカル生成能) を、酵素学的系、細胞系、ヒト全血中での酸化・抗酸化活性を、我々が開発したシームレスで簡便な酸化・抗酸化能測定試薬 i-STrap を用いて、酸化・抗酸化能を基礎にニューキノロン系抗菌剤をプロファイリングすることを目的とする。本課題は、感染病態における、ニューキノロン系抗菌剤の使い分けに有用だけでなく、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であり、医学薬学領域のニーズに応えるものであると考える。

3. 研究の方法

研究は、我々が開発した新規酸化・抗酸化能測定キット i-STrap を用いて、ニューキノロン系抗菌薬の酸化・抗酸化能を測定し、薬剤の酸化・抗酸化能を基礎にした新しいプロファイリングを作成する。そのために、まず代表的なニューキノロン系抗菌薬の酸化・抗酸化能測定法を用いて、予備実験を行い、測定条件を決定する。次に i-STrap 法を用いてすべてのニューキノロン系抗菌薬を比較検討する。その際、まず、*in vitro*系 (物理系、化学系、酵素系、細胞系) で評価する。さらに、この結果をもとに、著明な酸化・抗酸化能を持つ薬剤を選択し、i-STrap 法を用いて *in vivo*の動物実験及びヒト全血および血清を用いた系での評価を試みる。これらの研究は、分担研究者の赤崎さとみ助教、研究協力機関である、同仁化学研究所および米国 NIH/NIEHS の MASON 教授との共同研究で実施した。

1) 薬剤の酸化・抗酸化能測定システム開発のための基礎データの収集 (29 年度):

UV によるラジカル生成系、フェントン反応系、キサンチンオキシダーゼ系、好中球系などの生成系でラジカルを産生させ、これに薬剤代表的なニューキノロンを加えることで、ラジカル生成増強があるかそれとも消去するか薬剤ごとにプロファイリングする。酸化ストレスの測定は、DMPO (ラジカル捕捉剤) を用いた電子スピン共鳴装置を用いた方法、化学発光法な

どの従来法で検討する。

2) 1) すべてのニューキノロン系薬剤を i-Strap を用いて in vitro 系で測定する

1) で用いた薬剤を使い、i-Strap を用いて、UV によるラジカル生成系、フェントン反応系、キサンチンオキシダーゼ系、好中球系などの生成系でラジカルを産生させ、i-Strap を用いて測定し、既存法でプロファイリングした薬剤のパターンと同一か比較検討する。

3) 1) ~ 2) で出たデータと生物活性の比較

酸化ストレスで不活化される機能性タンパク質 1- アンチトリプシンの不活化反応と比較検討する。

ラジカル生成系は、キサンチンオキシダーゼ系、好中球系を用いて、1- アンチトリプシンの不活化反応を計測する。

4) ニューキノロン系薬剤の in vivo 活性の検討

緑膿菌感染マウスに投与した際のマウス中の全血、血清及び臓器レベルでの酸化・抗酸化活性を、i-Strap を用いて、また、感染病態にある患者全血や血清にニューキノロンを加えることで、酸化・抗酸化活性が変化するか検討する。

4. 研究成果

ニューキノロン系抗菌薬の酸化・抗酸化能を測定し、薬剤の酸化・抗酸化能を基礎にした新しいプロファイリングを作成するために、UV によるラジカル生成系、フェントン反応系、

キサンチンオキシダーゼ系、好中球系などの生成系でラジカルを産生させ、これに各種ニューキノロンを加えることで、ラジカル生成増強があるかそれとも消去するか薬剤ごとに検討した。その結果、UV によるラジカル生成系、フェントン反応系におけるヒドロキシラジカル消去活性は、キノロン間で大きな差は無かった。キサンチンオキシダーゼ系におけるスーパーオキシド生成抑制効果は、基本骨格中にハロゲンがあるものの消去活性が大きいことが分かった。好中球系でも、同様に、基本骨格中にハロゲンがあるものの消去活性が大きいことが分かった。次に、i-Strap を用いて in vitro 系で測定したところ、脂質ラジカルの関与があるためか、必ずしも、キサンチンオキシダーゼ系や好中球系で、効果が大きいものが、そのまま反映していなかった。そこで、t-BuOOH/Hemoglobin などの脂質ラジカル生成系を用いた、DMPO を使ったスピントラップ法を用いて、検討した結果、脂質ラジカルの消去活性は、これまでの含めた検討を行った結果、即ちスーパーオキシド生成抑、ヒドロキシラジカル生成抑制系とは、少し異なる抗酸化活性の挙動を示すことが判明した。

UV によるラジカル生成系、フェントン反応系、キサンチンオキシダーゼ系、好中球系以外に、脂質ラジカル系についての検討をおこなった、この t-BuOOH/Hemoglobin 系の脂質ラジカル系の結果もプロファイリングの項目に、加えて、in vitro の抗酸化活性のプロファイリング表は完成させることが可能となった。今後は、このプロファイリングの結果をもとに、細胞毒性阻害作用の検討をした。細胞毒性の検討結果、ラジカル生成抑制活性が強いものが、抗細胞毒性活性が強く、これは、ヒドロキシラジカル生成抑制活性とよく相関していた。また、ラジカル生成増強活性の強いものが細胞毒性も強く、スーパーオキシド産生増強系とよく相関していた。

	レボフロキサシン	シプロフロキサシン	モキシフロキサシン	スパラフロキサシン	ガレノキサシン
ヒドロキシラジカル抑制	↑↑↑	↑	↑	↑	↑↑↑
スーパーオキシド抑制	↑	↑	→	→	↑
ヒドロキシラジカル増強	→	→	→	↑	→
スーパーオキシド増強	↑	↑	↑	↑↑↑	→
細胞毒性抑制	↑	→	→	→	↑↑
細胞毒性増強	→	↑	↑	↑↑↑	

↑	軽度
↑↑	中程度
↑↑↑	強度
→	変化なし

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akazaki Satomi, Aoki Ryohei, Sato Keizo	4. 巻 66
2. 論文標題 Direct detection of diclofenac radical produced by ultraviolet irradiation using electron spin resonance method.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clinical Biochem and Nutrition,	6. 最初と最後の頁 193-197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbrn.19-91.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sato Keizo
2. 発表標題 Evaluation of in vivo human and animal oxidative stress by i-Strap methods. Symposium in Oxidative Stress & Medicine
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 圭創
2. 発表標題 i-Strapを用いた新規薬剤等の抗酸化活性の検討方法の
3. 学会等名 第9回 SFRR Asia（国際酸化ストレス学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 圭創
2. 発表標題 呼吸器疾患と酸化ストレス
3. 学会等名 第70回日本酸化ストレス学会学術集会シンポジウム「慢性炎症と酸化ストレス」（招待講演）
4. 発表年 2017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	赤崎 さとみ (Akazaki Satomi) (90780891)	九州保健福祉大学・薬学部・助教 (37604)	

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
---------	---------