

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25年5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592336

研究課題名（和文）新規ハイスループレット口臭検査法の開発を目指した基礎的研究

研究課題名（英文）Development of high-throughput analysis for mouth odor

研究代表者

伊藤 博夫（ITO HIRO-O）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40213079

研究成果の概要（和文）：歯周病の重症度との関連が指摘されているメチルメルカプタンの高感度定量分析法を確立するため、エルマン試薬を基盤とした新規メチルメルカプタン蛍光標識剤を合成開発した。さらに、合成開発した蛍光標識剤を用いて濃度既知のメチルメルカプタンガスを試料として分析したところ、分析結果は実濃度に近い値を示した。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a high-sensitive method of analysis of methyl mercaptan, which is the major cause of odor in the mouth air and has been suggested to be related to periodontal disease, we have designed and synthesized modified Ellmann's reagents for fluorescent labeling of methyl mercaptan. In addition, we have successfully analyzed samples containing known concentration of methyl mercaptan utilizing these reagents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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：歯学・社会系歯学

キーワード：口臭検査、歯周病、有機化学、エルマン試薬、チオール捕捉反応、ハイスループレット処理、メチルメルカプタン

1. 研究開始当初の背景

近年、口臭に対する人々の関心が高まっており、15歳以上の国民の約15%は自分の口臭で悩んでいると報告されている（平成11年度保健福祉動向調査）。自分の口臭を自分で感じることは殆ど不可能であることから、客観的な口臭検査のニーズが高まっている。

現状では、ガスクロマトグラフィーやセンサーチップを使用した呼気からの直接的な揮発性硫黄化合物検出法が用いられている。ガスクロマトグラフィーによる呼気分析は高価で大掛かりな装置を必要とするため、大学病院などのごく一部の口臭専門外来で実施されているに過ぎない。設備の問題は、仮

に臨床検査センター等に分析を外注することが可能であれば解決されるが、呼気の直接分析は試料採取後ただちに行うことが必須であるため、外注は不可能である。また、センサーチップを用いた比較的安価な小型測定器で得られる結果は、専門的臨床診断・治療の情報としては質的に不十分であるに加えて、集団検診への応用を考えた時には処理速度も不十分である。

一方、有機化学あるいは創薬化学の分野においては、グルタチオンなどの生体内チオールやカテプシン類などの酵素システイン残基に対して、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いる。したがって、口臭原因物質の硫黄化合物も、化学反応による捕捉・誘導体化という有機化学的アプローチによって、従来の直接的検出法に代わる簡便、迅速、高性能な間接的検出法の開発の可能性が期待できる。この方法が用いられれば、誘導体化され液相に捕捉された検体では、気体状の検体では不可能であった保存や輸送への対応が可能になり、これによって口臭検査のハイスループット化の実現が期待される。

2. 研究の目的

病的口臭の主因であり、偏性嫌気性の歯周病原細菌によって産生されるメチルメルカプタンを液相で検出するシステムの開発を目指して、チオール類との化学選択的反応が期待でき、かつ反応生成物の分光学的検出が可能なる標識化合物を設計・合成する。溶液中メチルメルカプタンとの反応性、生成物の安定性、検出感度等の観点から、捕捉標識反応剤の分子設計の至適化を進める。並行してメチルメルカプタンガスの液相中への捕捉反応条件を探索し、口臭検査への応用を目指した有機化学的メチルメルカプタンガスの間接測定法の基盤確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) エルマン試薬に汎用蛍光発色団を導入した新規メチルメルカプタン蛍光標識剤の分子設計ならびに合成の検討

対称ジスルフィドである 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)とチオール類との反応性を利用し、チオール-ジスルフィド交換反応によって生成する 5-チオ-2-ニトロ安息香酸を 412 nm 付近の可視吸収スペクトルにより検出するチオール類の比色定量法は、エルマン法として知られている。そこで、エルマン試薬からニトロ基とカルボキシル基を除去し、ジスルフィド結合のオルト位にヒドロキシメチル基を導入した化学構造を分子設計の基盤とし、分離分析の高感度化と高速化を目的に、ダンシル基等の汎用蛍光発色団や励起二量体形成が可能な 2 個のピレン骨格

を組み込んだ対称型エルマン試薬等を新規メチルメルカプタン蛍光標識剤として設計し、これを合成する。

(2) 新規メチルメルカプタン蛍光標識剤のチオール類捕捉反応条件の最適化とチオール類捕捉能の評価

合成した各種標識剤の物性を評価し、良好な物性を示すジフェニルジスルフィド誘導体から化学構造の最適化を行い、メチルメルカプタンのモデル化合物としてプロピルメルカプタンを用いたチオール類捕捉実験を液相において実施する。チオール類捕捉反応を実施するにあたっては、反応条件最適化のために種々の溶媒系を用い、反応温度とも合わせて詳細に検討する。

(3) 気液二相系におけるメチルメルカプタン捕捉反応の検討

常温にて気体状態であるメチルメルカプタンの捕捉標識反応を、濃度既知のメチルメルカプタン試料ガスを用いて、小型ガス吸接管を反応容器に使用し、気液二相系にて実施する。

4. 研究成果

(1) 新規メチルメルカプタン蛍光標識剤の分子設計ならびに合成の検討

エルマン試薬として知られる 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸、DTNB)の化学構造を基盤として、母核ジスルフィド化合物にエステルまたはエーテル結合を介して 2 分子のピレン構造を導入した新規メチルメルカプタン蛍光標識剤 1 および 2 を分子設計し (Figure 1)、その合成に着手した。

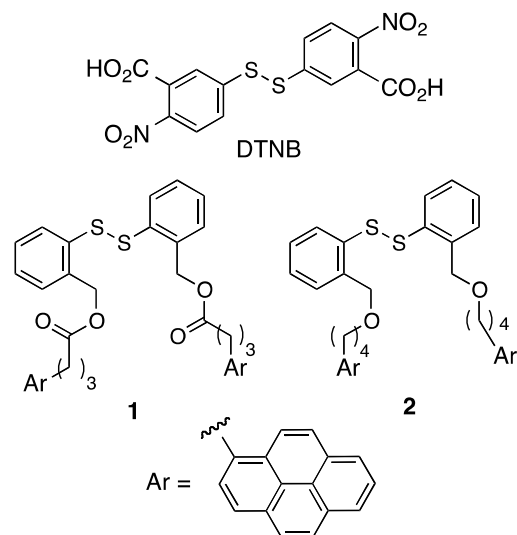


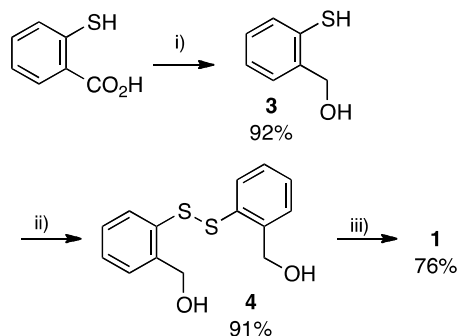
Figure 1

チオサリチル酸のカルボキシル基を水素化リチウムアルミニウムによりヒドロキシメチル基へと還元して 3 を得た後、キシレン

中で活性炭を用いた酸化反応により、ジフェニルジスルフィド誘導体 **4** へと変換した。最後に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC·HCl) と 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) を用い、1分子の **4** と 2分子の 1-ピレン酪酸を脱水縮合することで **1** の合成に成功した (Scheme 1)。

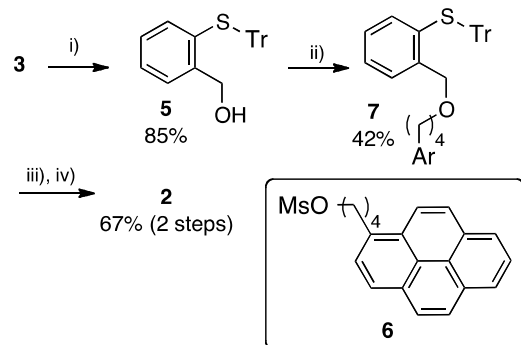
また、**3** のチオール基をトリチル基で保護して得られた **5** と、1-ピレン酪酸より合成した **6** を、水素化ナトリウム存在下に縮合することで **7** へと変換した。最後に、酸性条件下で **7** のトリチル基を脱保護し、活性炭を用いた酸化反応によりジフェニルジスルフィド誘導体 **2** の合成を達成した (Scheme 2)。

Scheme 1



Reagents and conditions: i) LiAlH_4 (1.8 mol eq), THF, rt; ii) activated carbon (110 wt%), xylene, rt \rightarrow 50 °C; iii) 1-pyrenebutyric acid (2.1 mol eq), EDC · HCl (3 mol eq), DMAP (0.2 mol eq), CH_2Cl_2 , rt.

Scheme 2



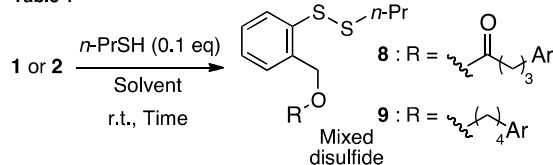
Reagents and conditions: i) TrOH (1.2 mol eq), TFA (2 mol eq), CHCl_3 , rt; ii) NaH (2 mol eq), **6** (1.08 mol eq), DMF, rt \rightarrow 70 °C; iii) TFA- Et_3SiH - CH_2Cl_2 (2 : 1 : 5), rt, iv) activated carbon (100 wt%), xylene, rt \rightarrow 60 °C.

(2) 新規メチルメルカプタン蛍光標識剤の新規メチルメルカプタン蛍光標識剤のチオール類捕捉反応条件の最適化とチオール類捕捉能の評価

新規メチルメルカプタン蛍光標識剤 **1** および **2** を用いるチオール類捕捉標識反応の条件

を、液相反応にて詳細に検討した。その結果、Table 1 に示す反応条件下、メチルメルカプタンのモデル化合物として用いたプロピルメルカプタンと、蛍光標識剤 **1** および **2** のチオール-ジスルフィド交換反応はスムーズに進行し、目的のメルカプタン捕捉体である混合ジスルフィド **8** および **9** を良好な収率で与えた。さらに、蛍光標識剤 **1** および **2** とプロピルメルカプタンの反応で得られたメルカプタン捕捉標識体の濃度と反応液中に添加したプロピルメルカプタンの濃度の相関を精査した結果、蛍光標識剤 **1** を用いた反応の相関係数は 0.998 (プロピルメルカプタン濃度 $8.3 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-5}$ mol/L)、蛍光標識剤 **2** を用いた反応の相関係数は 0.997 (プロピルメルカプタン濃度 $8.3 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-6}$ mol/L) となり、いずれの標識剤を用いた場合も両者の濃度間に良好な直線性が認められた。以上の結果より、Table 1 に示す反応条件をチオール類捕捉標識反応の最適条件として以下の実験を行った。

Table 1



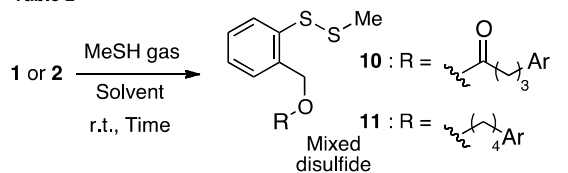
Run	Reagent	Solvent	Time (min)	Yield of mixed disulfide
1	1	THF / 1M K_2CO_3 aq. (5 : 1)	5	quant. (8)
2	2	Dioxane / 1M NaOH aq. (5 : 1)	30	74% (9) (quant. ^a)

a) Determined by HPLC [COSMOSIL 5C₁₈-MS-II MeCN/THF/H₂O (70:20:10), 1 mL/min, 345 nm] analysis.

(3) 気液二相系におけるメチルメルカプタン捕捉反応の検討

蛍光標識剤 **1** および **2** を用い、常温にて気体状態であるメチルメルカプタンの捕捉標識反応を、濃度既知のメチルメルカプタン試料ガスを用いて気液二相系にて実施した。反応容器には、小型ガス吸尿管を使用した (Table 2)。その結果、蛍光標識剤 **2** を用いた場合に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析によるメチルメルカプタン捕捉標識体 **11** の検出に成功した。さらに、**11** のピーク面積より算出される試料ガス中のメチルメルカプタン濃度は 257 ppb であり、実験に用いた試料ガスの実濃度 (332 ppb) に近い値を示した (Table 2, Run 2)。

Table 2



Run	Reagent	MeSH gas ^{a)} (ppb)	Solvent	Detection of mixed disulfide
1	1	500	THF / 1M K ₂ CO ₃ aq. (5 : 1)	x ^{b)}
2	2	332	Dioxane / 1M NaOH aq. (5 : 1)	○ ^{c)} (257 ppb) ^{d)}

a) Supplied from a gas generator (Permeater). b) TSK-GEL ODS-80Ts, MeCN/H₂O (100:1), 1 mL/min, 344 nm. c) COSMOSIL 5C₁₈-MS-II MeCN/THF/H₂O (70:20:10), 1 mL/min, 345 nm. d) Determined by HPLC analysis.

本研究で合成開発した上記チオール類蛍光標識剤の化学構造ならびに反応性を基盤とするならば、架橋化学構造等の最適化により、実用的な新規メチルメルカプタン蛍光標識剤の合成開発が達成でき、ひいては新しい口臭検査法の開発へつながるものと期待される。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 宮城 紫 他、OPA 法を基盤とした新しい口臭検査法の開発. 日本薬学会第 133 年会、2013. 3. 30、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ② 宮城 紫 他、オルトフタルアルデヒド法を基盤とした新規メチルメルカプタン蛍光標識法、第 51 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、2012. 11. 11、サンラポーむらくも (松江市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 博夫 (ITO HIRO-O)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号 : 40213079

(2) 研究分担者

佐野 茂樹 (SANO SHIGEKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号 : 20226038

(3) 連携研究者

福井 誠 (FUKUI MAKOTO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号 : 50325289

中尾 允泰 (NAKAO MICHiyASU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号 : 60550001