



Title	ESRを利用したフルオロキノロン系合成抗菌薬の光毒性並びに抗酸化剤エブセレン，プロブコールの作用発現機構に関する研究
Author(s)	新木, 哲也
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47249">https://hdl.handle.net/11094/47249</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	あら き てつ や 新 木 哲 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 20648 号
学位授与年月日	平成 18 年 9 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	ESR を利用したフルオロキノロン系合成抗菌薬の光毒性並びに抗酸化剤 エブセレン、プロブコールの作用発現機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正  (副査) 教授 田中 徹明 教授 北 泰行 教授 宇野 公之

#### 論 文 内 容 の 要 旨

近年、生体内で産生されるフリーラジカルや活性酸素種の作用が注目されている。フリーラジカルとは不対電子を有する物質の総称であるが、生体関連分野では一つあるいはそれ以上の不対電子をもつ非金属原子または分子をフリーラジカルと定義し、遷移金属とは区別している。また、活性酸素種にはスーパーオキシドアニオンラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )、ヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )、一重項酸素( $^1O_2$ )、過酸化水素などがあり、フリーラジカルであるものとそうでないものがある。

通常、生体内ではこれら活性酸素種が適度に存在し、病原菌等の侵入に対する生体防御の重要な一翼を担っている。しかし、何らかの要因でこれらが生体内で過剰に産生されると、細胞内物質が必要以上に酸化され、障害を引き起こされる可能性が生じる。一方、このような障害から生体を防御するものとして、種々の抗酸化剤の有効性が知られている。本研究は、電子スピン共鳴 (ESR) 法を利用してフリーラジカルおよび活性酸素種による生体障害の発現機構ならびにこれに対抗する抗酸化剤の作用機構を分子反応レベルで解明することを目的として行った。

まず、上記活性酸素種による障害の例として、フルオロキノロン系合成抗菌薬の副作用の一つである光毒性に着目した。フルオロキノロン系薬物は優れた抗菌薬として様々な感染症の治療に用いられているが、その副作用として光線過敏症等の光毒性が問題となっている。光線過敏症とは健康皮膚では反応が起きない程度の量の光線照射によって異常を示す疾患と定義されている。フルオロキノロン薬のこの光線過敏症に関する研究も数多く報告され、例えば、フルオロキノロン薬をマウスに経口投与後、直ちに紫外線照射を行うと用量依存的に光毒性を誘導することが報告されている。これらフルオロキノロン薬の光毒性は、肉眼的には耳介紅斑、病理組織学的には浮腫、軟骨組織周辺の結合組織に炎症性細胞の発生、特に好中球の浸潤として特徴づけられる。フルオロキノロン薬の光毒性に関する研究は、いずれも動物を用いた生物学的アプローチ、あるいは毒性発現に対するフリーラジカルスカベンジャー等の影響を評価する間接的な検討のみであり、フリーラジカル、活性酸素種など、光毒性発現の直接的要因とされている活性酸素種本体に関する分子機構的な研究はほとんどなされていない。また、フルオロキノロン薬の種類により光毒性が異なることが知られている。50%耳介厚増加誘発量 (ETID<sub>50</sub>) で評価すると、フルオロキノロン薬の光毒性の強さは次の順となった：LFLX>ENX>LVFX、CPFx。

そこで、種々のフルオロキノロン薬の光毒性と密接に関連があるとされている、フルオロキノロン薬の光分解過程に生成すると考えられる活性種の構造を ESR 法により明らかとすることを目的として実験に着手した。さらにその

活性種が特定されれば、ESR 法は、実験動物を用いず、かつ簡便な測定法であることから、フルオロキノロン薬の光毒性スクリーニング法として有用な手法となりうる可能性がある。そこで ESR 法によるフルオロキノロン薬の光毒性測定法を確立することを目的とし、検討を行った。

その結果、これら合成抗菌薬の光分解過程に生成する活性種として、炭素中心ラジカル CCR、ヒドロキシラジカル・OH、一重項酸素  $^1\text{O}_2$  を見出し、ESR を利用するこれらの簡便な検出方法を確立した。一方、光毒性が強いとされる 8 位がフッ素で置換されたフルオロキノロン系合成抗菌薬は、光照射下での CCR および  $^1\text{O}_2$  の産生能が高いことより、フルオロキノロン系合成抗菌薬の光毒性発現に対して、両活性種の寄与が大きいことが強く示唆された。従って、本研究で開発したフルオロキノロン系合成抗菌薬の光分解過程に産生される活性種の測定法は、光毒性の実験動物を用いない簡便な評価法として利用し得ると考えられる。

また、フルオロキノロン薬の一つであるシタフロキサシン (sitafloxacin : STFX) は、現在開発中の有望なフルオロキノロン薬である。STFX は、グラム陽性菌ならびにグラム陰性菌に対してバランスのとれた強力な抗菌活性と高い安全性を有しており、次世代のフルオロキノロン薬として期待されている。STFX は 8 位が Cl で置換されており、マウスを用いた研究等から、その光毒性は 8 位が F の LFLX や SPFX よりも弱いことが示されている。8 位が F で置換されたフルオロキノロン薬の光毒性については種々の報告がなされているが、8 位が Cl のものの光照射下での挙動に関する報告は皆無である。また、このものの光毒性がなぜ 8 位に F を有するフルオロキノロン薬よりも低いのかも不明である。そこで、STFX の光物性に関して、光分解物の構造、光分解の波長依存性および pH 依存性等を詳細に調べ、これらと光毒性との関連を検討した。また STFX の光安定性が特に塩素イオン共存下で向上することを見出した。この結果は、フルオロキノロン系合成抗菌薬の品質向上を計るに際して、物性面での有益な情報であり、新規フルオロキノロン薬の開発にも大いに役立つと考えられる。

次に、酸化ストレスから引き起こされる疾病に対抗する薬物、即ち抗酸化剤の作用を分子レベルでの解明を目的として ESR 法を中心に、特に抗酸化剤と活性酸素種に対する反応性について検討を行った。動脈硬化症、虚血障害、炎症など種々の疾患に活性酸素種、フリーラジカルや脂質過酸化の関与が明確となりつつある。生体内にて過剰に産生された活性酸素種は、高度不飽和脂肪酸からなる脂質を酸化し、脂質過酸化反応が進行する。その過酸化脂質が引き金となって様々な生理学的な異常、障害を引き起こすと考えられている。そのような障害に対し、抗酸化剤が有効であると考えられることから、様々な抗酸化剤が開発、または開発中である。抗酸化剤はその薬理作用から大きく三つのタイプに分類される。即ち、1) 予防型抗酸化剤、2) ラジカル捕捉型抗酸化剤、3) 修復、再生型抗酸化剤である。この内、2) の抗酸化剤が有するラジカル捕捉作用に着目し、二種類の抗酸化剤 (エブセレン、プロブコール) を例として選び、それらの活性酸素種との反応性を分子レベルでの解明を試みた。

ラジカル捕捉型抗酸化作用は、生体内で過剰に産生された活性酸素・フリーラジカル種等活性種を抗酸化剤が捕捉して、抗酸化剤自身が安定なラジカルとなり、活性種を消滅させ、連鎖反応を中断させることにより障害から生体防御する作用である。活性酸素種の内、スーパーオキシドアニオンラジカル (以下 SO と略) に注目し、抗酸化剤との反応性を調べた。SO は分子状酸素の 1 電子還元体であり、水溶液中では直ちに不均化反応により過酸化水素と酸素に変換される。SO は非水溶媒中では比較的安定であるが、活性、反応性はそれほど高くはない。しかし、SO より二次的に産生される過酸化水素やヒドロキシルラジカルは、極めて反応性に富み、高活性であること、また、虚血一再灌流時には、ヒポキサンチンやキサンチンオキシダーゼ量が増加し、この両者によって尿酸が生成する際、酸素を活性化し、大量に SO が産生、放出されること、も知られている。以上のように、抗酸化剤と SO との反応性、SO 消去能を明らかにすることは抗酸化剤の特性を理解する上で重要な知見となりうる。

抗酸化剤と SO との反応性、SO 消去能の測定法はシトクロム法、NBT 法、エピネフリン法および亜硝酸法などがよく利用されている。今回、エブセレン、プロブコールの抗酸化作用解明に ESR スピントラッピング法等を適用し、評価することを試みた。ESR スピントラッピング法は SO 消去活性測定法としてよく利用されている。しかし、ESR スピントラッピング法では抗酸化剤が SO のみならず、その DMPO ラジカル付加体を消去したり、さらにラジカル付加体と抗酸化剤が二次的に反応する可能性があり、ラジカル捕捉型抗酸化能を精密に評価することはできないという欠点を有している。そこでより正確かつ簡便に SO 消去活性を測定する手法の開発を目的として、電気化学的手法 (サイクリック・ボルタムメトリ法) の適用を検討し、評価法の確立を試みた。

今回調べた抗酸化剤の一つ、エブセレンは、有機セレン化合物で、脳梗塞、クモ膜下出血（SAH）の脳血管障害急性期を対象疾患とした治療薬である。エブセレンはグルタチオン・ペルオキシダーゼ様活性、即ち生成した過酸化物を分解する作用が最も良く知られた薬理活性である。しかし、それ以外にも様々な作用を有しており、例えば、アルキルペルオキシラジカルや、 $\alpha$ -トコフェロキシラジカルなどと直接的に反応することが報告されている。しかし、エブセレンのラジカル捕捉型抗酸化能に言及した報告はない。エブセレンの SO との反応性、及びその機構を解明することより、エブセレンのラジカル捕捉型抗酸化作用について分子レベルで解明することを目的とし、研究を実施した。

もう一つの抗酸化剤、プロブコールは高脂血症治療薬で、脳梗塞、クモ膜下出血（SAH）の脳血管障害急性期を対象疾患とした治療薬であり、特に血清総コレステロール低下作用が強い。プロブコールは LDL の酸化を防ぐ薬として知られている。*t*Bu 基にかこまれたフェノール性水酸基が疎水的環境にあるため、LDL の中でフリーラジカルが生成した場合、安定なフェノキシラジカルとして局在化することが可能であると考えられる。従って、プロブコールと活性酸素種との反応過程において、ラジカル連鎖反応を停止させ、ラジカル捕捉型抗酸化作用を発現することが十分期待できる。そこで、非水溶媒中におけるプロブコールと SO との反応について種々実験を実施した。さらにフリーラジカルとの反応に密接な関連があると考えられる、酸化還元挙動をより詳細に調べるため、非水溶媒系における電気化学的酸化反応についても検討した結果についても報告する。

次に、これらフルオロキノロン系合成抗菌薬の光毒性の活性種の生成抑制、制御等に関わる抗酸化剤の役割に関する検討を行った。抗酸化剤の種々薬理作用の内、ラジカル捕捉型抗酸化作用に着目し、特に水溶性の低い、二種類の抗酸化剤（エブセレン、プロブコール）を例として選び、特に脂溶性部位での抗酸化作用発現に着目し、非水溶媒系での抗酸化剤と SO との反応を調べた。SO は、フルオロキノロン系合成抗菌薬の光分解過程において、本研究で用いた ESR 法によっては直接観測はされなかったが、種々医薬品の光毒性の原因と考えられ、また、 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$  の前駆物質と成り得ることから、種々の抗酸化剤と SO との反応に関する知見は有用であると考え、SO との反応性を ESR スピントラッピング法により評価した。しかし、ESR スピントラッピング法では抗酸化剤が SO のみならず、その DMPO ラジカル付加体を消去したり、さらにラジカル付加体と抗酸化剤が二次的に反応する可能性があり、ラジカル捕捉型抗酸化能を精密に評価することはできないという欠点を有している。そこでより正確かつ簡便に SO 消去活性を測定する手法の開発を目的として、電気化学的手法（サイクリック・ボルタムメトリー法）の適用を検討し、評価法を確立した。

ESR 法やサイクリックボルタムメトリー法による検討の結果、エブセレン、プロブコールともに、非水溶液中、SO の消去作用を有することを明らかとし、さらにこれら抗酸化剤と SO との反応過程においてフリーラジカルが形成されることを実証し、エブセレン、プロブコールはラジカル捕捉型抗酸化作用を有することを示した。さらにフリーラジカルや反応生成物の化学構造を明らかとすることにより、抗酸化作用の分子反応機構に関する有用な知見を得た。

## 論文審査の結果の要旨

生体内で産生されるフリーラジカルや活性酸素種は、通常、適度に存在して病原菌等の侵入に対する生体防御の重要な一翼を担っている。しかし、何らかの要因でこれらが生体内で過剰に産生されると、細胞内物質が必要以上に酸化され、障害が引き起こされる。一方、このような障害から生体を防御するものとして、種々の抗酸化剤が開発されている。申請者は、電子スピン共鳴（ESR）法を利用してフリーラジカルおよび活性酸素種による生体障害の発現機構ならびにこれに対抗する抗酸化剤の作用機構を分子反応レベルで解明することを目的として研究を行なった。

申請者は、フルオロキノロン系合成抗菌薬の光毒性に着目した。フルオロキノロン系薬物は、その副作用として光線過敏症等の光毒性が問題となっている。そこで、種々フルオロキノロン薬の光分解過程に生成すると考えられる活性種の構造を ESR 法により分析した。その結果、フルオロキノロン薬水溶液に光照射を行うと活性種として、炭素中心ラジカル CCR、ヒドロキシラジカル  $\cdot\text{OH}$ 、一重項酸素  $^1\text{O}_2$  を生成することを見出し、光毒性の実験動物を用いない簡便な評価法として利用し得る測定法を確立した。

また、フルオロキノロン薬の一つであるシタフロキサシン（sitafloxacin : STFX）に着目し、光分解物の構造、光

分解の波長依存性および pH 依存性等を詳細に調べ、STFX の光安定性が特に塩素イオン共存下で向上することを見出した。この結果は、フルオロキノロン系合成抗菌薬の品質向上を計るに際して、有益な情報であり、新規フルオロキノロン薬の開発にも大いに役立つと考えられる。

次に、二種類の脳血管障害治療薬（エブセレン、プロブコール）の抗酸化作用について、特に活性酸素種の内、スーパーオキシドアニオンラジカル（以下 SO と略）に注目し、ESR スピントラッピング法等を用いて、評価した。その結果、エブセレン、プロブコールともに非水溶媒中、SO の消去作用を有すること、これら抗酸化剤と SO との反応過程においてフリーラジカルが形成されることを ESR により実証し、エブセレン、プロブコールはラジカル捕捉型抗酸化作用を有することを示した。さらに、電気化学的手法（サイクリック・ボルタムメトリ（CV）法）を用いて SO の再酸化波のピーク電流値を測定することにより、簡便に SO 消去活性を評価できることを見出した。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として十分価値のあるものと認められる。