

氏名（本籍・生年月日）	松岡 聖典（愛知県・昭和61年2月17日）		
学位の種類	博士（理学）		
学位記番号	甲 第 115 号		
学位授与の日付	平成28年9月30日		
学位授与の要件	信州大学学位規程 第5条第1項該当		
学位論文題目	Electrochemiluminescence and sonochemiluminescence of lucigenin and their applications in antioxidant capacity analysis (抗酸化能分析を志向するルシゲニンの電気化学発光と超音波化学発光に関する研究)		
論文審査委員	主査 金 継業 教授	尾関 寿美男 教授	
	樋上 照男 教授	小田 晃規 教授	
	崔 博坤 教授		

### 論 文 内 容 の 要 旨

酸素はその4電子の還元過程で、スーパーオキシドアニオンラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素( $H_2O_2$ )、ヒドロキシルラジカル( $\cdot OH$ )といった活性酸素種(Reactive oxygen species, ROS)を生成する。生体内で発生したROSはタンパク質を変性させたり、DNAにダメージを与えたりして、癌や血管障害の原因になるとされている。近年、食品に含まれるポリフェノール類などのROSを消去する能力(抗酸化能)を持つ物質(抗酸化物質)の探索が注目されており、特に $O_2^{\cdot-}$ に対する抗酸化能の評価法の開発が求められている。本研究では、 $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能をより簡便かつ選択的に測定するために、 $O_2^{\cdot-}$ の生成・検出・反応制御を行う電気化学発光反応(ECL)と超音波化学発光(SCL)システムを構築し、反応の解明と制御に関する基礎研究を行った。これらの研究結果を踏まえて、酵素などの活性酸素を発生させる試薬を用いない、新たな抗酸化能の評価方法を提案した。

本論文は5章から成り、第1章では序論として本研究の背景及び目的を述べた。まず、活性酸素種の特徴やその検出方法について、現在までに明らかにされていることを概観した。次に、研究に用いたECL及びSCLの原理について述べた。最後に、分析化学的観点から、本研究の意義を述べた。

第2章では、ルシゲニン( $Luc^{2+}$ )のカソードイックECL反応を検討し、それを用いたフェノール類化合物の $O_2^{\cdot-}$ に対する抗酸化能分析を行った。電気化学発光(Electrochemiluminescence: ECL)は、化学発光分析を拡張した形として注目されており、励起種を電極反応によって生成するところが特徴である。 $Luc^{2+}$ のカソードイックECL反応について、電極表面に生成した $O_2^{\cdot-}$ と $Luc^{2+}$ の還元中間体である $Luc^{\cdot+}$ との電気化学後続反応によって生じるジオキセタン型中間体を経て、これが分裂することによってN-メチルアクリドンの励起化学種(NMA\*)

を生成し、そのエネルギーが  $\text{Luc}^{2+}$  に遷移して  $\text{Luc}^{2+}$  から発光するというメカニズムを明らかにした。ECL 強度は溶存酸素の濃度に依存し、また、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  を分解する酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を添加すると ECL 強度がほとんど消光されることから、この ECL は  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に起因するものであると確かめられた。また、過酸化水素を添加しても ECL 強度の変化が見られないことから、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  に対して選択的に応答していることが分かった。この ECL 系にフェノール類化合物を共存させると、SOD と同様に ECL 発光強度が減少した。これは  $\text{O}_2^{\cdot-}$  がフェノール類化合物によって消去されたためだと考えられる。ここで、試料(フェノール類化合物)を添加していないときの ECL 発光強度を基準として、試料を添加した際に得られた ECL 発光強度の阻害率 (inhibition rate) を抗酸化能評価の尺度として用いて、フェノール類化合物の抗酸化能を評価した。カフェイン酸、ケルセチンとカテキンは  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に対して大きな抗酸化能を示す一方、サリチル酸などの抗酸化能は極めて小さく、ミセル増感 Enzyme/CL 法による結果との相関が認められた。

第 3 章では、水溶液中におけるルシゲニンの超音波化学発光の観測について報告し、この反応の反応機構を提案した。超音波照射で生成された化学種により引き起こされる発光反応は超音波化学発光 (Sonochemiluminescence: SCL) と呼ばれている。ここでは、 $50 \mu\text{M}$  の  $\text{Luc}^{2+}$  を含む酸素飽和した水溶液の中に少量のアルコールを共反応物として添加することで強い SCL を示すことを見出し、その反応機構を次のように解明した。① キャビテーションの気/液界面反応領域において水が熱分解され、 $\cdot\text{OH}$  が生成し、それがアルコールを酸化し、還元性のアルコールラジカル ( $\cdot\text{R}'\text{OH}$ ) を生成する。②  $\cdot\text{R}'\text{OH}$  は溶存酸素をおよび  $\text{Luc}^{2+}$  を還元して、それぞれ  $\text{O}_2^{\cdot-}$  と  $\text{Luc}^{\cdot+}$  を生成する。このふたつのラジカル種が反応することでジオキセタン型中間体 ( $\text{Luc}(\text{OO})$ ) が生成し、それが分解して励起状態の NMA を生成する。③その後、分子間エネルギー移動過程によってエネルギーが  $\text{Luc}^{2+}$  に移動し、 $\text{Luc}^{2+}$  が励起され、励起状態の  $\text{Luc}^{2+}$  が基底状態に落ちる際に発光が生じる。 $\text{Luc}^{2+}$  の SCL は、このように超音波によって生じた還元性化学種に起因する反応経路と分かった。また、キャビテーションの気/液界面反応領域で生成したラジカル種が溶液のバルク相へ拡散し、発光反応がバルク溶液中で起きていることを、CCD カメラによって発光分布を撮影し、明らかにした。

第 4 章では、 $\text{Luc}^{2+}$  の SCL 反応を利用した抗酸化能評価の可能性を検討した。ルミノール系の SCL に比べて  $\text{Luc}^{2+}$  の SCL 強度は SOD の濃度に依存して消光し、SCL の強度は  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に対して特異的であることが確認できた。SCL の消光反応は、定常状態において  $\text{O}_2^{\cdot-}$  に対する  $\text{Luc}^{2+}$  と抗酸化物質との競争反応によるものと考えられる。この系において抗酸化物質と  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の二次反応速度定数を求め、抗酸化能との相関を考察した。

第 5 章では、本研究において得られた結論と今後の課題について述べた。