

氏 名 (生年月日) ^{にし}西 ^の野 ^{あずさ}梓 (1984 年 4 月 20 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 科 学)

学 位 記 番 号 論 博 薬 科 第 2 号

学位授与の日付 2021 年 3 月 20 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 エンドグループに五員環構造を有するカロテノイドの活性酸素種に対する
抗酸化機構ならびにヒト血中分布特性に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 安 井 裕 之

(副査) 教 授 山 本 昌

(副査) 教 授 松 田 久 司

論 文 内 容 の 要 旨

序章

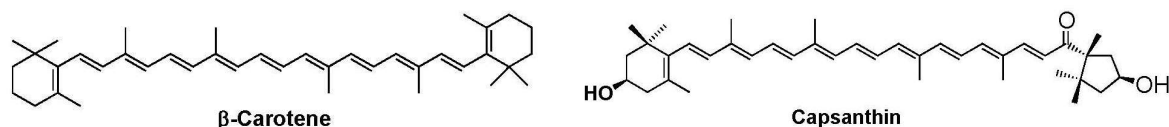
急速な高齢化や生活習慣病の増加と言った社会的背景から、予防医療の普及を図るわが国では、食事由来の機能性成分を有効活用して健康維持・増進を積極的に推進しようとする施策は重要である。がんや生活習慣病など様々な疾病には、多くの先行研究から体内で産生される活性酸素種 (ROS) が関与することが示唆されている。一方で、食事由来の抗酸化成分や天然物質が ROS の関与する疾病の予防に対して部分的に有効であると、疫学研究や介入研究により示されている。代表的な抗酸化物質であるカロテノイド類は、植物が生合成する炭素数 40 のポリエン鎖を共通骨格とする化合物群の総称であり、ポリエン鎖両端の化学構造の多様性により、現在、自然界には 750 種類以上が同定されている。ヒトは日常の食事から β -カロテンやルテインなど種々のカロテノイドを摂取しており、これらは常に生体内に存在する。そのため、カロテノイドの有する生理機能やヒトの健康維持への寄与についての研究が活発に行われ、多くの研究報告がされている。しかしながら、カロテノイドの多様な生理機能の要である抗酸化活性について、それらの ROS に対する化学反応機構の詳細は明らかにされておらず、化学構造に付随する物理化学的性質の詳細は不明である。

そこで、著者はカロテノイドの多様な化学構造に依存した抗酸化機構に関する化学反応論の検証を目的として本研究に着手した。また、そこから見出された五員環構造を有するカロテノイドの抗酸化物質としての有用性を検証するため、ヒト介入試験を実施した。

第1章 エンドグループの構造が異なる7種類のカロテノイドと ROS との化学反応機構ならびに ROS 消去活性評価

カロテノイドの抗酸化活性が主に $^1\text{O}_2$ の物理的消去により決まることは周知の知見であるが、ROS との脱水素反応による化学的消去に関する報告は極めて少ない。そこで、化学構造の異なる代表的カロテノイド (食事性の β -カロテンとゼアキサンチン、機能性食品に用いるアスタキサンチン、特徴的な末端構造を有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチン、フコキサンチン) について、ROS ($^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$) との化学反応産物の経時的解析ならびに消去活性評価を LC-MS/MS 法及び

ESR スピントラップ法を用いて行った。



その結果、検討したカロテノイドは共通して、ROS 由来の分子と末端の炭素間二重結合で付加反応する活性を有し、最終的な生成物としてエンドペルオキシドまたはエポキシドの酸化代謝物を生成すること、及びその化学反応性は ROS の種類と末端の化学構造との組み合わせに関係することがわかった。すなわち、 $^1\text{O}_2$ については物理的消去が主であり、 $^1\text{O}_2$ との化学反応性が低い五員環構造を有するカプサンチン、カプソルビン、ミチロキサンチンが最も消去活性に優れている一方、 $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ については化学的消去によるものであり、五員環構造を有するカロテノイド類が $\cdot\text{OH}$ との反応性が高く、最も優れた消去活性を有することが示された。

第2章 ヒト介入試験におけるパプリカ由来カロテノイドの経口摂取による循環血液への移行性評価

カプサンチンが $^1\text{O}_2$ や $\cdot\text{OH}$ に対する優れた消去活性を有することが示されたため、ヒトがカプサンチンを経口摂取すれば循環血液中の抗酸化力が促進して、血液や血管性疾患の予防への貢献が期待できると考えた。そこで、ヒトへの適用性を確認するため、カプサンチンを高含有する赤パプリカ由来のカロテノイド類（カプサンチン 47%、 β -カロテン 13%、クルルビタキサンチン A 8%、 β -クリプトキサンチン 8%、その他 24%）の健常人へのサプリメントーションを実施し、それらの血中への移行性、ならびに通常食由来の血中カロテノイド全体に及ぼす影響について、血漿及び赤血球中のカロテノイドを分離定量することで評価した。

その結果、カプサンチン、クルルビタキサンチン A、 β -クリプトキサンチンの有意な血中濃度上昇及び血中の総カロテノイド濃度の上昇が確認され、サプリメントーションによって健常人の循環血液中へ吸収されることが明らかとなった。さらに、それらの血液中のカロテノイド濃度上昇効果は血漿よりも赤血球で顕著であることが明らかとなった。

第3章 ヒト介入試験におけるパプリカ由来カロテノイドの運動機能改善効果の検証

赤血球は常に酸素分子と接しているために ROS への曝露リスクが高く、さらに赤血球膜の構成成分として不飽和脂肪酸を多く含むために ROS による化学構造的な酸化変性を受けやすい。赤血球膜の酸化変性はその物理化学的性質を変化させ、酸素運搬に関わる重要な要素である赤血球変形能の低下を惹起する。著者は、ヒトがカプサンチンを含むパプリカ由来カロテノイドを摂取すれば、赤血球中のカロテノイド濃度が上昇し、赤血球膜の酸化変性を抑制することで酸素運搬能が改善すると考えた。そこで、その評価方法として、酸素要求量の増大ならびに多量の ROS 発生が想定される有酸素運動負荷条件下での効果検証を実施した。健常人をパプリカ由来カロテノイド摂取群とプラセボ摂取群に分け、4 週間に渡る被験食摂取期間の前後で一定強度のトレッドミル運動を行い、運動中の呼気ガス分析を行った。

その結果、4 週間の摂取後にパプリカ由来カロテノイド摂取群ではプラセボ群に対し有意に酸素摂取量が減少し、運動機能が改善することが明らかとなった。

総括

カロテノイドの抗酸化活性は末端の化学構造に関連した ROS との化学反応性に依存し、五員環構造をもつカロテノイド類が優れた抗酸化活性を示すことを見出した。そこで、代表的な五員環カロテノイドであるカプサンチンの健常人での介入試験を行い、経口摂取により血漿および赤血球中へ吸収され、カロテノイド濃度の上昇効果をもたらすことを確認した。その効果は特に赤血球で顕著であったことから、赤血球の酸素運搬能に着目し、カプサンチン摂取による運動負荷時の呼気ガス分析を実施し、カプサンチンの摂取により有意に運動中の酸素摂取量が減少し、運動機能が改善することを実証した。

論文審査の結果の要旨

緒言

急速な高齢化や生活習慣病の増加から、国内では予防医療の普及が推進されている。食品由来の機能性成分を有効に活用して健康維持や増進を推進する施策は予防医療にとって重要である。様々な疾病への関与が示唆される活性酸素種（ROS）に対して、食品由来の抗酸化性天然物質が作用することで、ROS の関与する疾病の予防に部分的に有効である事実が疫学研究や介入研究により示されている。代表的な抗酸化物質であるカロテノイド類は、炭素数 40 のポリエン鎖両端の化学構造の多様性により自然界には 750 種類以上が同定されており、ヒトの健康維持への寄与について多くの研究報告がされている。

しかし、カロテノイドの多様な生理機能の要である抗酸化活性は、ROS に対する詳細な化学反応機構が未だ明確ではなく、加えてヒトへの適用の際に鍵となる、多様な化学構造に関連した経口吸収や血中分布の詳細も不明である。そこで、西野氏は、カロテノイドの多様な化学構造に依存した抗酸化機構に関する化学反応の解明を検討し、そこから見出された五員環構造を有するカロテノイドの抗酸化物質としての有用性をヒト介入試験により検証した。

審査結果の要旨

第1章 両端構造が異なるカロテノイド類と ROS との化学反応機構ならびに消去活性

カロテノイドと ROS との脱水素反応による化学的消去の報告は極めて少ない。西野氏は、化学構造の異なる代表的カロテノイドについて、ROS との化学反応産物の経時的変化ならびに ROS 消去活性を LC-MS/MS 法及び ESR スピントラップ法を用いて詳細に解析した。その結果、検討したカロテノイドは共通して、ROS 分子と末端の炭素間二重結合で付加反応する特徴を有し、最終生成物としてエンドペルオキシドまたはエポキシドの酸化代謝物を生成すること、及びその化学反応性は ROS の種類と末端の化学構造との組み合わせに関係することを、初めて明らかにした。即ち、 $^1\text{O}_2$ についてはエネルギー遷移に基づく物理的消去が主で、 $^1\text{O}_2$ との化学反応性が低い五員環構造を有するカプサンチンが最も消去活性に優れており、一方で $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ については化学的消去が主で、五員環構造を有するカロテノイドが $\cdot\text{OH}$ との反応性が高く、優れた消去活性を有することを明らかにした。

第2章 ヒト介入試験におけるカロテノイドの経口摂取による循環血液への移行性

カプサンチンが $^1\text{O}_2$ や $\cdot\text{OH}$ に対する優れた消去活性を有することが明らかとなり、ヒトの経口摂取によりカプサンチンが循環血液中に移行できれば、血液や血管性疾患の予防への貢献が期待できる。西野氏はヒトへの適用性を実証するため、カプサンチンを高含有する赤パブリカ由来のカロテノイド類を健常人へサプリメンテーションし、それらの血中への移行性について、血漿及び赤血球中のカロテノイドを分離定量することで評価した。その結果、カプサンチン、クルルビタキサンチンA、 β -クリプトキサンチンの有意な血中濃度の上昇が確認され、サプリメンテーションによる健常人の循環血液中への吸収が初めて明らかとなった。加えて、血液中のカロテノイド濃度の上昇効果は、赤血球内でより顕著であることも明らかとなった。

第3章 ヒト介入試験におけるカロテノイドの運動機能改善効果の検証

赤血球は酸素分子と常に接しているためROSへの曝露が大きい。不飽和脂肪酸を多く含む赤血球膜は、構造的な酸化変性や物性変化を受けやすく、酸素運搬に関わる細胞変形能の低下を惹起する。西野氏は、ヒトがカプサンチンを摂取することで赤血球中のカロテノイド濃度が上昇し、膜の酸化変性を抑制できれば、酸素運搬能が改善するとの仮説を立て、有酸素運動負荷条件下での効果判定を実施した。健常人をカロテノイド摂取群とプラセボ群に分け、4週間に渡る被験食摂取期間の前後で一定強度のトレッドミル運動を行い、運動中の呼気ガス分析を行った。その結果、4週間後のカロテノイド摂取群ではプラセボ群に対し有意に酸素摂取量が減少し、運動機能が改善することが明らかとなった。

審査の結論

西野氏の行った研究内容と成果は、医薬品の開発研究と類似した薬学研究のプロセスそのものであり、薬学的な概念や理論及びそれらの方法と実践を、パブリカ由来のカロテノイド類の実証研究に組み込んだものである。食品由来の機能性成分に関する従来の評価研究の内容と比べ、西野氏が明らかにしたカロテノイドに関する新しい知見は多くあり、他との優位性は高いものと判断される。西野 梓氏は、本論文の研究内容及び執筆を独立して完遂した能力を有しており、本学の薬科学博士として相応しいと結論する。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬科学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。