

博士論文

放射線障害における糖転移フラボノイドの

応用に関する研究

相澤 恭

目次

第1章 緒論

- 1-1 フラボノイドと糖転移フラボノイド
- 1-2 難水溶性フラボノイドの水溶性改善と生体吸収性
- 1-3 放射線防護剤・増感剤の開発状況
- 1-4 本研究の目的

第2章 モノグルコシルルチンを用いたフラボノイド複合体の作製

- 2-1 背景
- 2-2 実験概要
- 2-3 実験方法
 - 2-3-1 試薬の入手先
 - 2-3-2 フラボノイド原料の HPLC 装置による分析方法
 - 2-3-3 スプレードライ法によるフラボノイド複合体の作製方法
 - 2-3-4 フラボノイド複合体の電子顕微鏡による粉末形状の観察
 - 2-3-5 フラボノイド複合体の HPLC 装置による分析方法
- 2-4 実験結果
 - 2-4-1 フラボノイド原料の HPLC 装置による分析結果
 - 2-4-2 スプレードライ法によるフラボノイド複合体の作製結果
 - 2-4-3 フラボノイド複合体の HPLC 装置による分析結果
- 2-5 考察

第3章 フラボノイド複合体の機能性評価

- 3-1 背景
- 3-2 実験概要
- 3-3 実験方法
 - 3-3-1 試薬の入手先
 - 3-3-2 フラボノイド複合体の水溶液濃度の時間変化測定
 - 3-3-3 DPPH ラジカル消去活性を用いた抗酸化力評価
 - 3-3-4 統計処理
- 3-4 実験結果

- 3-4-1 フラボノイド複合体の水溶液濃度の時間変化測定結果
- 3-4-2 フラボノイド複合体の DPPH 法による抗酸化力評価結果
- 3-5 考察

第4章 フラボノイド複合体の細胞取り込み試験

- 4-1 背景
- 4-2 実験概要
- 4-3 実験方法
 - 4-3-1 細胞培養法および継代
 - 4-3-2 フラボノイド複合体の細胞透過試験
 - 4-3-3 フラボノイド複合体の細胞毒性試験
 - 4-3-4 統計処理
- 4-4 実験結果
 - 4-4-1 フラボノイド複合体の細胞透過試験結果
 - 4-4-2 フラボノイド複合体の細胞毒性評価結果 (30 分間処理)
 - 4-4-3 フラボノイド複合体の細胞毒性評価結果 (3 日間処理)
- 4-5 考察

第5章 フラボノイド複合体の放射線生物実験

- 5-1 背景
- 5-2 実験概要
- 5-3 実験方法
 - 5-3-1 細胞培養および放射線照射の照射条件
 - 5-3-2 細胞内 ROS (過酸化水素) のフラボノイド複合体による消去試験
 - 5-3-3 細胞内 ROS (放射線) のフラボノイド複合体による消去試験
 - 5-3-4 放射線照射における細胞増殖率試験
 - 5-3-5 コロニーアッセイ法による細胞生存率試験
 - 5-3-6 統計処理
- 5-4 実験結果
 - 5-4-1 細胞内 ROS (過酸化水素) のフラボノイド複合体による消去試験結果
 - 5-4-2 細胞内 ROS (放射線) のフラボノイド複合体による消去試験結果
 - 5-4-3 細胞増殖率におけるフラボノイド複合体の放射線防護効果試験
 - 5-4-4 コロニーアッセイ法による細胞生存率試験結果
- 5-5 考察

第6章 フラボノイド複合体の組み合わせ検討

6-1 背景

6-2 実験概要

6-3 実験方法

6-3-1 試薬の入手法

6-3-2 細胞培養法および継代

6-3-3 細胞内 GSH 濃度測定試験

6-3-4 統計処理

6-4 実験結果

6-4-1 細胞内 GSH 濃度測定試験結果

6-5 考察

第7章 結論と今後の課題

7-1 結論

7-2 今後の課題

謝辞

参考文献

略語一覽

AA: Ascorbic Acid
AA-2G: Ascorbic Acid 2-Glucoside
ASK1: Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATP: Adenosine Triphosphate
BUdR: 5-bromo-2'-deoxyuridine
CGTase: Cyclodextrin glycosyl transferase
CHO: Chinese Hamster Ovary
DCF: 2', 7'-dichlorofluorescein
DMSO: Dimethyl sulfoxide
DNA: Deoxyribonucleic acid
DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DSB: Double strand break
EMIQ: Enzymatically Modified Isoquercitrin
EMS: Enzymatically Modified Stevia
FCS: Fetal calf serum
FDA: Food and Drug Administration
5-FU: 5-fluorouracil
GSH: Glutathione-SH
H₂DCFDA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HES: Hesperetin
HPLC: High performance liquid chromatography
IQ: Isoquercitrin
JNK: c-jun N-terminal kinase
LET: Linear Energy Transfer
mBCl: monochlorobimane
MEM α : alpha Minimum Essential Medium

MGH: Monoglucosyl hesperidin
MGN: Monoglucosyl naringin
MGR: Monoglucosyl rutin
NAR: Naringenin
OD: Optical Density
PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS: Phosphate Buffered Saline
PDA: Photodiode array
PTFE: Polytetrafluoroethylene
QUE : Quercetin
ROS: Reactive Oxygen Species
RT: Retention time
RUT: Rutin
SEM: Scanning Electron Microscope
SOD: Superoxide dismutase
TRX1: Thioredoxin 1
UV: Ultra Violet

第1章 緒論

1-1 フラボノイドと糖転移フラボノイド

ポリフェノール的一种であるフラボノイドは、現在、誘導体を含めると5,000~8,000種類の化合物が確認され、その基本構造は、図1-1に示す通り、2つのベンゼン環（A環、B環）と、酸素原子を含む複素環（C環）で構成されている。フラボノイドについては、主に植物中に存在し、果物や野菜に広く含まれるケルセチンやルチンなどのフラボノール類、柑橘類に特徴的に含まれるヘスペリジンやナリンジンなどのフラバノン類、大豆などの豆類に含まれるイソフラボンなどのフラボン類、お茶やカカオなどに含まれるカテキンなどのフラバノール類などが代表的なフラボノイドとして挙げられる（図1-1）[1, 2]。

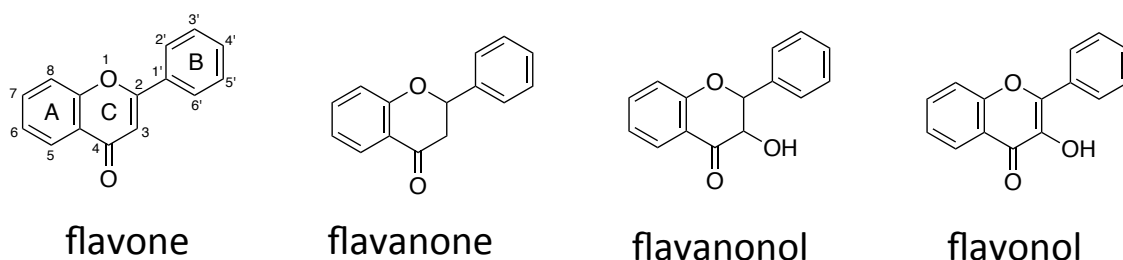


図1-1 フラボノイドの化学構造と分類

しかしながら、これらフラボノイドの多くは、水溶性が低いものが多く、特にケルセチンは、極めて水溶性が低く（室温で、3mg/L以下）、難水溶性の物質のため、消化管からの吸収率が低いことも知られている。そのため、ケルセチンやルチンはその酸化活性の高さから機能性素材として注目されているが、難水溶性であることが利用拡大の妨げとなっている[3-7]。これら、難水溶性フラボノイドの欠点を克服する方法の一つとして、フラボノイドを糖転移酵素により処理を行い、大幅に水溶性を改善する方法が提案された。このフラボノイドに糖転移するシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase)は、デンプンからシクロデキストリンを生成する酵素であるが、フラボノイドに糖転移をすることも出来る。この糖転移酵素で糖転移体となった糖転移フラボノイドのうち、現在確認されているものとして、糖転移ルチン、糖転移イソケルシトリン、糖転移ヘスペリジン、糖転移ナリンジンなどが挙げられる(図1-2)。フラボノイドではないが、ビタミンCとして有名なアスコルビン酸や天然の高感度甘味料であるステビアについても、その糖転移体が報告されている(図1-2)。これら配糖体はフ

ラボノイドの様に水溶性改善効果ばかりではなく、安定性や呈味改善など新たな機能が配糖化する事によって付加される。また、ヘスペリジンにグルコースを付加した糖転移ヘスペリジンは、水溶性が元のヘスペリジンに対して、1,000倍以上に改善することが報告されており、水溶性フラボノイドとして清涼飲料水などに使用されている。この糖転移ヘスペリジンは、高血圧ラットに対する血圧上昇抑制効果など、水溶性以外の機能性も報告されている[8, 9]。さらに、クエルセチンとルチンは、高い抗酸化活性や機能性を持ち、植物に広域に分布していることから、食品科学や栄養学の分野で広く研究の対象となっている（図1-2）。

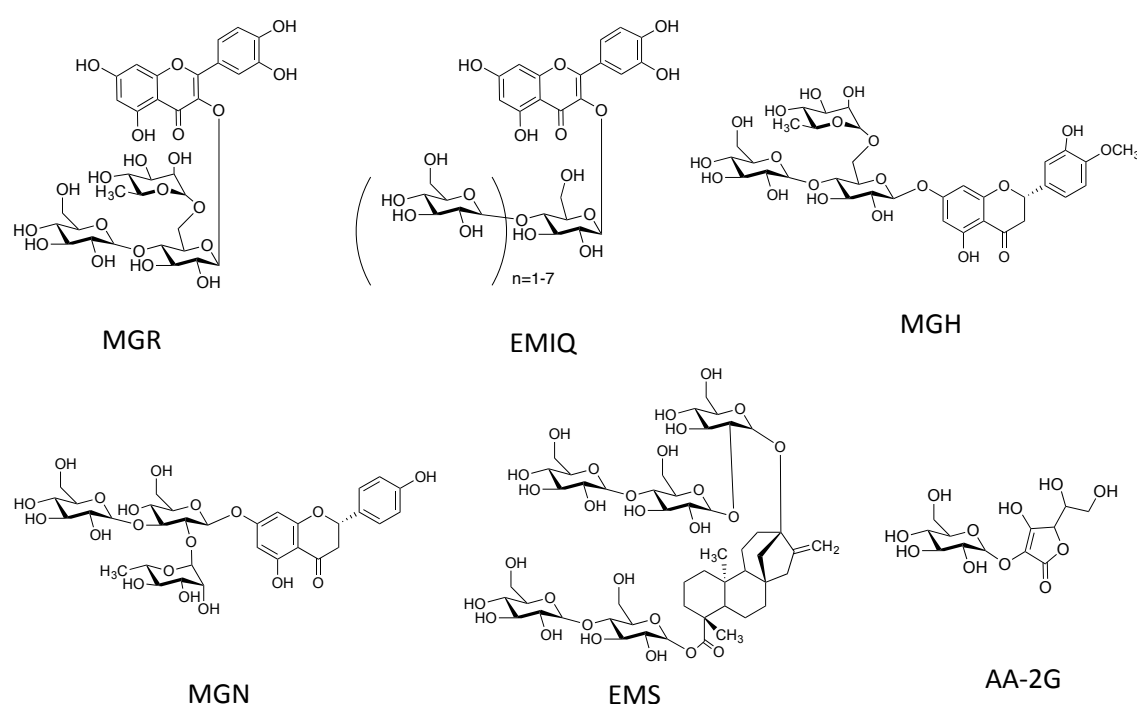


図1-2 代表的な酵素処理化合物の化学構造式

ルチンについては、そば、アスパラガスなど果物や野菜に広く含まれている代表的なフラボノール配糖体で、前述したヘスペリジンと同様にビタミン P 様物質としても知られ、食品添加物としての使用が認められている。しかしながら、このルチンにおいても、室温で130mg/L以下[5]と十分な水溶性がある状態とは言えず、水溶性改善のために、糖転移酵素による配糖化が行われている。このルチンを原料とした酵素処理ルチンとして、糖転移ルチン、糖転移イソクエルシトリンがあり、それぞれ製造法や機能性に特徴がある。糖転移イソクエルシトリン (EMIQ) は、ルチンに結合する配糖成分 (ルチノース) を加水分解酵素 (ヘスペリジナーゼ) によって、ラムノシル基を外してイソ

クエルシトリンとし、さらに糖転移酵素で、オリゴ糖を付加した配糖体である。この **EMIQ** は、アグリコンであるクエルセチンの3位にマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースなどのオリゴ糖が付加された混合物で、糖転移することで水溶性が大幅に改善するが、ルチンの特徴であるルチノースが存在しない。また、本研究で検討する糖転移ルチンは、ルチンを原料とするが、加水分解することなく、ルチノースに直接配糖化し、糖鎖整理したモノグルコシルルチンを主成分とする単一化合物である（図1-3）。モノグルコシルルチン（**Monoglucosyl rutin ; MGR**）は、ルチンにグルコースが一つ付加した化合物で、元のルチンに比べ、安全性や抗酸化力を維持しながら、10,000倍以上の水に対する溶解度の改善がされており、食品添加剤や化粧品原料として、食品、飲料品、化粧品と広く世界中で使用されている[10, 11]（図1-4）。この糖鎖の構造の相違によって、生体吸収性や細胞への取り込み効率に影響を与えるが、その点については、本研究のテーマに深く関連するため、次節で詳細に解説することにする。

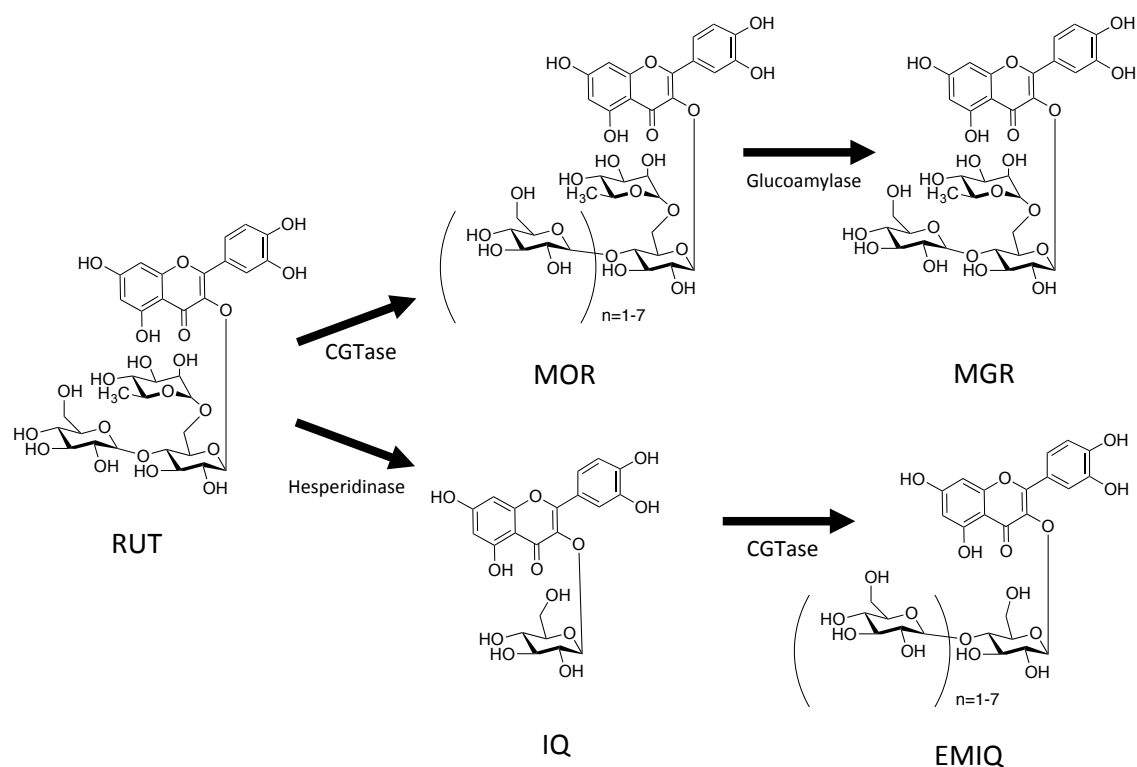


図1-3 モノグルコシルルチンおよびEMIAQの酵素を用いた合成方法

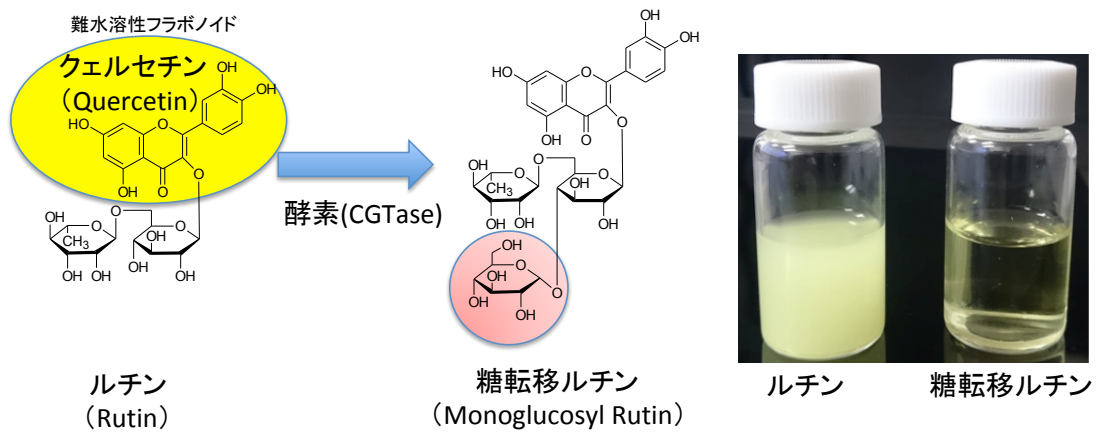


図 1-4 糖転移酵素によるルチンの水溶性改善効果

1-2 難水溶性フラボノイドの水溶性改善と生体吸収性

難水溶性フラボノイドの水溶性改善についての検討は、食品化学や栄養学の研究分野の主要なテーマとして、様々な方法が試みられており、界面活性剤や可溶化剤を用いてミセル化や可溶化をする方法や、難水溶性フラボノイドをメチル化や配糖化など化学修飾し、誘導體化する方法などが検討されている。本研究で取り上げた糖転移フラボノイドは、糖転移酵素を用いた配糖化による誘導體化の方法で水溶性を改善している。配糖化による利点としては、糖付加による安全性や安定性の確保ができるが、配糖化による水溶性の向上や分子量の増加が、逆に体内や細胞への吸収性を抑制する方向に働き、フラボノイドの生物学的利用能の低下を引き起こす。

これら配糖体化による体内吸収や細胞取り込み効率の低下という問題を解決するための方法として、クエルセチン配糖体である酵素処理イソクエルシトリンは、配糖成分であるルチノースから、ラムノースを取り除き、糖転移することによって、水溶性が向上しながら、ラムノースが残存しているルチンや糖転移ルチンに比べ、ラットに対する経口投与実験において、体内に吸収され易くなることが近年報告されている[12, 13]。

一方、本研究の対象となっているモノグルコシルルチンは、糖転移イソクエルシトリンと同様に、ルチンを原料にして、水溶性および体内吸収性を改善した糖転移フラボノイドである。糖転移イソクエルシトリンと異なり、ラムノースを除去しておらず、直接糖転移しているため、水溶性は改善されているが、体内吸収や細胞取り込み効率には課題が残る。実際に、ルチンに関しては、細胞への取り込み効率が、クエルセチンに比べ、数%程度に低下することが報告されており、モノグルコシルルチンにおいても、細胞取り込み効率については、さらに低下することが予測される。このようなモノグルコシルルチンの欠点を改善する方法として、モノグルコシルルチンの可溶化効果を利用したモノグルコシルルチンと難水溶性物質の混合製剤による生物学的利用能の改善方法が提案されている。この糖転移フラボノイドによる可溶化効果は、モノグルコシルルチンやモノグルコシルヘスペリジンなどの配糖体成分であるルチノースや、モノグルコシルナリンジンなどの配糖成分であるネオヘスペリジノースの様なラムノースを含む配糖体成分に糖転移したフラボノイドに見られる現象である。このフラボノイド複合体は、糖転移フラボノイドの配糖体部分（親水基）がアグリコン（疎水性）を取り囲んだ構造をとっており、この構造体の中に難水溶性物質が含有されることにより、難水溶性物質の水溶性が大幅に向上する（図1-5）。この手法によって、難水溶性医薬成分であるフルルビプロフェンの水溶性が約10倍以上向上することが報告されている[14]。また、これら難水溶性物質の水溶性向上とともに、動物を用いた経口投与試験において、フルル

ビプロフェンの血中濃度が約3倍向上していることも報告されており、体内吸収性の向上させることが期待される。さらに、他の可溶化製剤と異なる点として、糖転移フラボノイド自身の機能性が維持された状態で可溶化効果を示すことが挙げられる。即ち、糖転移フラボノイドが有する抗酸化力や紫外線吸収効果といった機能性が、難水溶性物質の水溶性改善だけでなく保護安定性に働くため、通常可溶化剤や界面活性剤に比べ、可溶化効果だけでないフラボノイドが持つ機能性も付加されるという利点がある[15]。

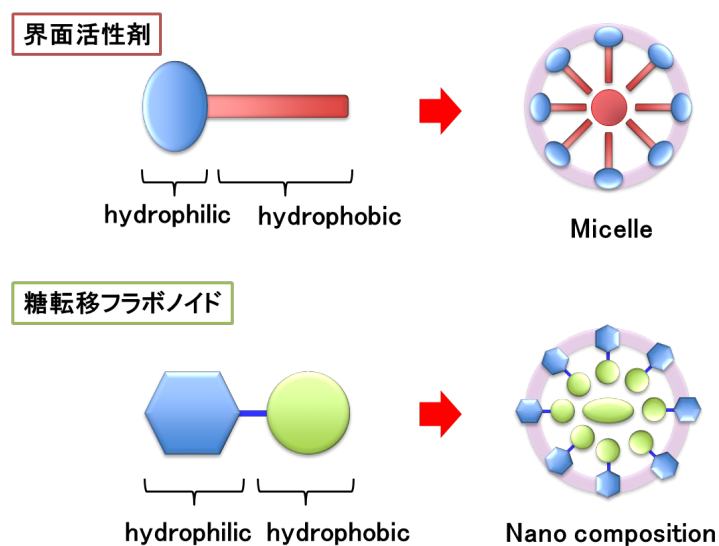


図 1-5 糖転移フラボノイドによる難水溶性物質の可溶化効果

1-3 放射線防護剤・増感剤の開発状況

放射線防護剤の開発は、冷戦時代に核兵器による兵士への放射線被曝を想定した放射線防護を目的とした薬剤の開発が発端となり、積極的に進められた。そのため、高線量、短時間、全身被曝といった条件で、優れた薬剤の開発が進められ、それら研究開発の成果として、SH 基を持つチオール化合物が防護効果に優れていることが分かった。その中で、アミフォスチン（WR-2721）は、米国ウォルターリード陸軍研究所にて開発されたチオール化合物であるが、現在、頭頸部癌の放射線治療により引き起こされる口腔乾燥症を防止するための医薬品として米国 FDA で唯一認められた放射線防護薬剤である[16, 17]。しかしながら、アミフォスチンは、放射線防護効果は強いが、副作用が高く、限定的な使用目的でしか利用されておらず汎用的な防護剤とは言い難い。

現在は、放射線の利用目的も変化しており、放射線治療や原子力発電などの平和利用へ用途拡大しており、それら放射線が発生する施設で作業する作業者の被曝を抑える放射線防護剤や放射線治療を受ける患者に必要な副作用緩和剤といった薬剤の使用目的が多様化している。そのような多様な要望を満たす薬剤開発は現在、開発当初の高線量、短時間、全身被曝といった使用条件から、低線量、長時間、部分被曝といった条件で使用することを前提とした低毒性で効果がある薬剤の開発が中心となっている。

近年検討されている放射線防護剤としては、有機合成化合物であるエダラボンが挙げられる。エダラボンは、フリーラジカルの消去剤として、急性脳梗塞における機能障害の改善薬として、医薬品として認められている薬剤で、放射線防護剤として期待されたが、細胞試験の結果から、添加するエダラボン濃度によって、放射線防護効果（高濃度）、放射線増感効果（低濃度）の両方の効果が確認された[18, 19]。また、天然由来の化合物としては、アスコルビン酸の検討が進められている。アスコルビン酸は、安全性が高く、抗酸化力も高いことから天然由来の放射線防護剤として期待されている[20]。しかしながら、アスコルビン酸は酸化され易く、生体内での安定性が低いため、有用性を発揮するためには、高濃度で使用するなどの課題がある。2011年の福島第一原発事故の際に支援に向かった自衛隊員の一部に試験的ではあるが、アスコルビン酸を予防的に服用した実績[21]などあり、副作用と効果のバランスにおいて、現段階で最も現実的な放射線防護剤と考えられる。

本研究の対象であるフラボノイドについても、近年の低毒性で持続的な摂取が可能な物質としての期待から、放射線防護剤としての検討が進められている。例えば、本研究でも取り上げたクエルセチンは、DNA プラスミドおよびヒト末梢血リンパ球を利用した試験において、放射線防護効果が確認されている[22]。また、大豆等のマメ科に含まれるイソフラボン的一种であるゲニステインは、ホルモン様の活性を持ち、抗酸化、抗

菌効果などの機能性を持つフラボノイドであるが、放射線防護効果があることが確認されており、マウスの急性放射線症候群（ARS）モデルを使った骨髄細胞の保護効果やヒトにおける放射線治療時の副作用緩和などの効果が報告されている[16]。また、本研究の対象であるモノグルコシルルチンに関しては、近年、放射線防護剤としての検討も進められており、動物細胞を用いた試験において放射線防護効果が確認されている[23]。しかしながら、モノグルコシルルチンを単独で放射線防護剤として使用する際に、高濃度で使用しなければ、放射線防護効果を発揮しないという課題が明らかになっている[23]。

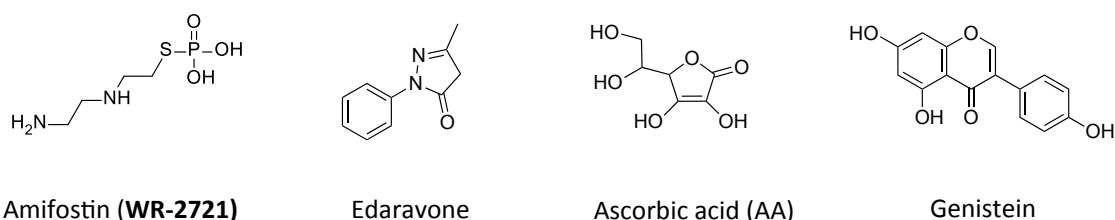


図 1-4 代表的な放射線防護剤

一方、放射線増感剤の開発は、放射線治療の技術進歩と共に近年注目されている。酸素効果が現れる低 LET 時の放射線治療法において、低酸素化した腫瘍細胞の放射線感受性の向上を目的とした薬剤の開発が中心に進められてきたが、現在の所、臨床試験において、副作用があることが分かり、ニトロイミダゾール骨格のニモラゾールが、唯一頭頸部癌治療用の増感剤として使用されている[24]。また、その他の増感剤としては、DNA 前駆体擬似物質として開発された BUdR（5-ブロモデオキシウリジン）と呼ばれるハロゲン化ピリミジンがあり、細胞内 DNA に取り込まれた後、DNA の立体構造に歪を生じさせることにより、放射線照射選択的に増感効果を発揮する[25]。臨床的には、脳腫瘍患者に対して、抗癌剤である 5-FU（5-フルオロウラシル）と併用した治験が試みられているが、有効な治癒率を上げるには至っていない[26]。フラボノイドにおいても、放射線増感剤としての検討が進められており、本研究の対象となるクエルセチンにおいても、小脳の髄芽腫(medulloblastoma)における薬剤スクリーニングの検討結果から、放射線増感剤としての有用性が細胞実験および動物実験で報告されている[27]。

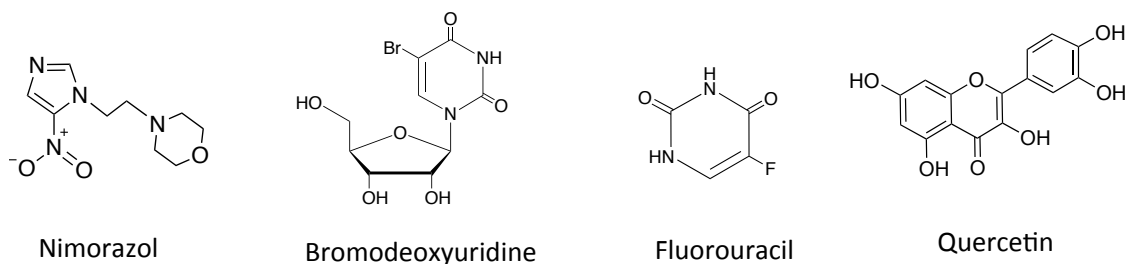


図 1-5 代表的な放射線増感剤

この様に、放射線防護・増感剤の開発は、有用性と副作用との間で一進一退して進められて来た経緯があり、放射線防護剤・増感剤共に決定的な薬剤が開発されていないのが現状である。特に、前述したエダラボンや本研究の対象となっているクエルセチンなどは同じ物質であっても、投与濃度や条件によって、放射線防護や増感効果の両面の性質を示すことが知られている（例えば、高濃度投与で放射線防護効果、低濃度投与で放射線増感効果など）。このような状況が、放射線防護剤・増感剤の開発をより複雑なものとしている。

そこで、本研究では現在の放射線防護剤が求められている低線量、長時間、部分被曝といった副作用の影響をなるべく少なくしたい環境で使用することに適した候補物質として、食経験が長く安全性に優れたフラボノイドや糖転移フラボノイドに着目して研究を進めた。

1-4 本研究の目的

本研究の目的は、糖転移フラボノイドを利用した新しい放射線防護剤の開発である。その目的を達成するために、糖転移フラボノイドの課題である細胞への取り込み効率の低さを改善する必要があると考え、糖転移フラボノイドと難水溶性フラボノイド（アグリコン）を混合製剤化したフラボノイド複合体を提案した。このフラボノイド複合体は、糖転移フラボノイドの可溶化効果を用いて、難水溶性フラボノイドの水溶性を上げ、かつ難水溶性フラボノイドの細胞への取り込み効果を期待した複合体である。本研究においては、糖転移フラボノイドとして放射線防護効果の報告があるモノグルコシルルチンを選択し、混合する難水溶性フラボノイドとしては、クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニンの3種類を選択した。

以下に、本研究で提案したフラボノイド複合体を用いた細胞取り込み効果および放射線防護剤としての作用メカニズムを以下に示す（図1-6）。

- ① モノグルコシルルチンと難水溶性フラボノイドを混合製剤化したフラボノイド複合体が、水溶液中で細胞に接触する。
- ② フラボノイド複合体は、細胞表面で分離し、モノグルコシルルチンは、細胞外もしくは細胞膜に残存し、難水溶性フラボノイドは、細胞内に導入される。
- ③ 細胞内に導入された難水溶性フラボノイドは、放射線によって細胞内に発生した活性酸素やDNA損傷などの影響を防護する。
- ④ 細胞外もしくは、細胞膜に残存したモノグルコシルルチンは、細胞外からの活性酸素による細胞膜もしくは細胞内への影響を低減化する。

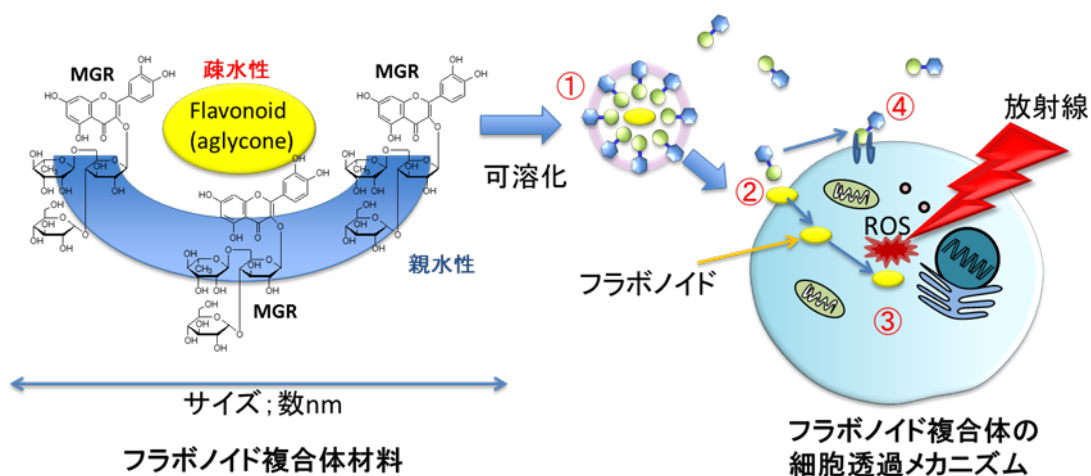


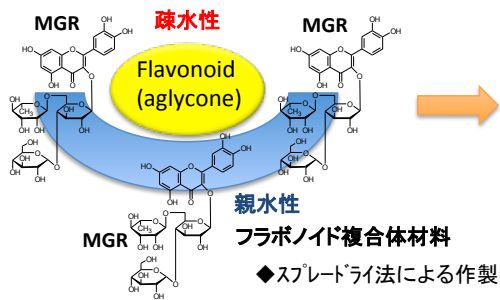
図1-6 フラボノイド複合体の細胞透過および放射線防護メカニズムの提案

本研究では、上記で提案したフラボノイド複合体の有効性と放射線防護剤としての可能性を検証するために、以下の進め方で実験を進めた（図1-7）。

- (1) 本研究で提案した3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）のスプレードライ法による作製とその分析手法を確立する（第2章）。
- (2) 作製したフラボノイド複合体の機能性評価として、フラボノイド複合体水溶液濃度の時間変化測定およびDPPHラジカルを用いた抗酸化活性評価を行い、その機能性を確認する（第3章）。
- (3) 細胞試験を用いて、フラボノイド複合体による難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）の細胞取り込み効果を確認する。また、フラボノイド複合体の細胞毒性試験を薬剤短時間（30分）処理および長時間（3日間）処理の2条件において確認を行う（第4章）。
- (4) 放射線生物実験によって、フラボノイド複合体による細胞内ROS上昇抑制効果の確認およびコロニーアッセイ法によるフラボノイド複合体の放射線防護剤としての可能性を確認する（第5章）。
- (5) フラボノイド複合体による細胞内レドックスへの影響を細胞内GSH濃度の測定試験によって確認し、本研究で作製した3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）のうち、最も放射線防護剤として最適な組み合わせについて検討を行う（第6章）。

上記試験を進めることによって、本研究で提案したフラボノイド複合体の有用性を示し、糖転移フラボノイドの新しい可能性を示すことが、本研究の最終目的である。

①フラボノイド複合体材料の作製



②機能性評価

- ◆溶解度測定(水溶液安定性)
- ◆DPPHラジカル消去試験(抗酸化)

⑤組み合わせ検討

- ◆細胞内GSH濃度試験
- ◆PARP阻害試験

④放射線防護効果の確認

- ◆細胞内ROS消去試験
- ◆コロニーアッセイ試験

③細胞を用いた検討

- ◆細胞導入試験
- ◆細胞毒性試験

図1-7 本研究における実験の進め方

第2章 モノグルコシルルチンを用いたフラボノイド複合体の作製

2-1 背景

本章では、モノグルコシルルチンを用いて難水溶性フラボノイドとのフラボノイド複合体の作製を行った。モノグルコシルルチンを含めた糖転移フラボノイドを利用した難水溶性物質の可溶化効果の検討は、糖転移フラボノイドの新たな機能性として、近年精力的に検討が進められているが、モノグルコシルルチンを用いた複合体製剤については、詳細な検討は始まったばかりで、報告事例も少ない[15, 28-31]。

本研究においても、先行研究と同様に難水溶性フラボノイド（アグリコン）を糖転移ルチンで可溶化製剤化する際に、噴霧乾燥法（スプレードライ法）と呼ばれる手法で粒子化を行った。このスプレードライ法は、図2-1に示す様な、1. 熱風発生装置、2. 噴霧装置、3. 乾燥室、4. サンプル回収装置の4つの要素で構成されるスプレードライ装置を用いて製造され、粉体化する目的物を含有する液体や懸濁液をノズルの細孔から噴霧し、瞬間的に乾燥して粉末化する方法である[32]。瞬間的に乾燥することから、粉末化による目的物へのダメージも少なく、また、混合物で噴霧乾燥した場合は、溶液中でのそれぞれの物質間の相互作用が、粉末の状態に引き継がれるため、溶液中で複合体構造を形成した状態で乾燥するため、本研究の目的に適した乾燥法である。また、噴霧乾燥法は、噴霧条件（溶液濃度、乾燥温度、噴霧速度など）によって、粉末の分子サイズ、形状、表面の状態を制御して乾燥することができるという特徴を持っている[33]。

また、本研究においてモノグルコシルルチンで複合製剤化の検討する難水溶性フラボノイドとして、モノグルコシルルチンのアグリコンであるクエルセチン、柑橘類に特徴的に含まれるヘスペリジンやナリンジンのアグリコンであるヘスペレチンおよびナリンゲニンを用いた。これら難水溶性フラボノイドは、試薬として入手が容易であるばかりでなく、フラボノイドの研究においても、安全性や機能性が詳細に検討されている物質であり、既に健康食品やサプリメントの原料として、市場に流通しているフラボノイドである。これら実績のあるフラボノイドは、本研究の目的である安全性が高く長期摂取を前提とした新しい放射線防護剤の開発において、適した物質であると考え選択した。

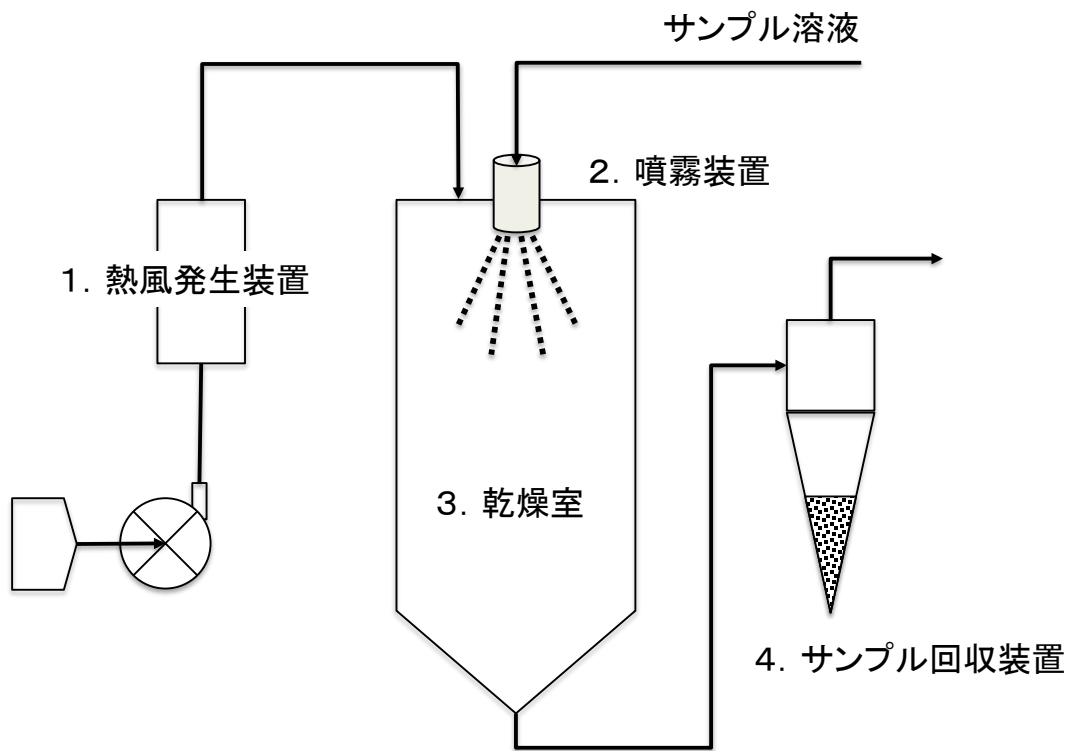


図 2-1 スプレードライ装置の構成

2-2 実験概要

本章では、モノグルコシルルチンを使用した3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）をスプレードライ法で作製し、さらに、作製したフラボノイド複合体の電子顕微鏡による外観を確認すると共に、含有する難水溶性フラボノイド（アグリコン）およびモノグルコシルルチンについて HPLC 装置を用いた定量方法を確立し、次章以降の実験に使用するフラボノイド複合体の濃度設定の根拠とすることを目的とした。

まず、フラボノイド複合体の原料となる難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）とモノグルコシルルチンそれぞれについて、HPLC 装置による保持時間、UV 吸収波長、ピーク面積の測定を行い、フラボノイド単独についての分析方法を確立した。さらに、フラボノイド複合体の作製については、原料となる難水溶性フラボノイドとモノグルコシルルチンを、目的とする配合比率に合わせ計量し、エタノール/水混合液に混合溶解した状態で、スプレードライ法によって乾燥させ粉末化した。また、作製したフラボノイド複合体は、目視と走査型電子顕微鏡によって粉末形状の観察を行う。さらに、作製したフラボノイド複合体中に含まれる難水溶性フラボノイドとモノグルコシルルチンの定量については、それぞれの原料の HPLC 分析結果から算出し確認した。

2-3 実験方法

2-3-1 試薬の入手先

モノグルコシルルチン (分子量 772.66 g/mol) は、東洋精糖株式会社より提供を受けた。ケルセチン二水和物 (化学用; 分子量 338.27 g/mol)、ヘスペレチン (化学用; 分子量 302.28 g/mol)、ナリンゲニン (化学用; 分子量 272.25 g/mol) は、和光純薬工業株式会社より購入した。また、ジメチルスルホキシド (DMSO) (特級)、エタノール (特級)、酢酸およびアセトニトリル (高速液体クロマトグラフィー用) は、関東化学株式会社より購入した。

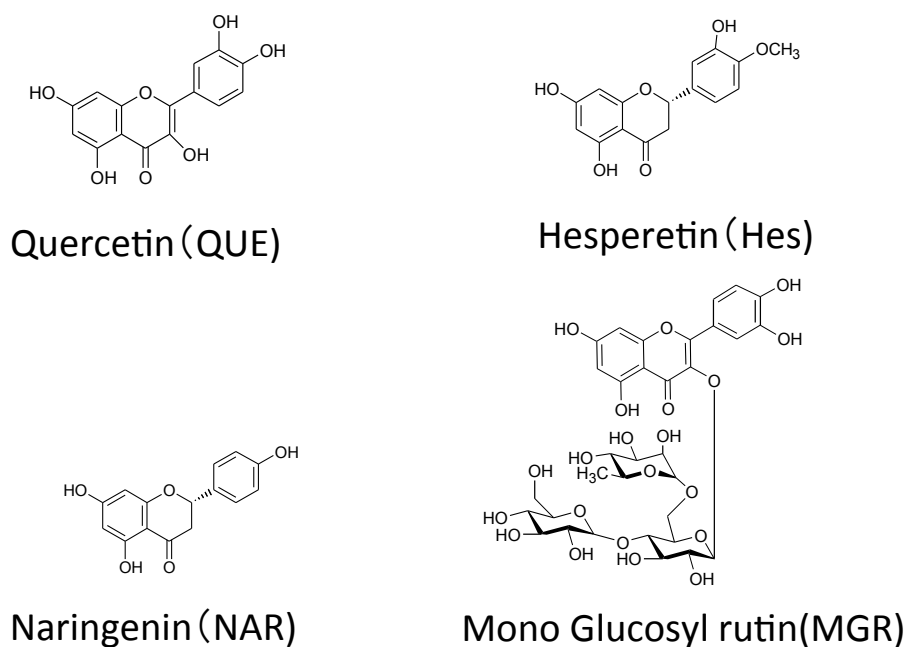


図 2-2 本研究で使用したフラボノイドの化学構造式

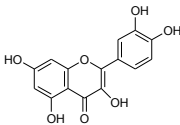
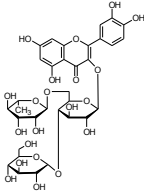
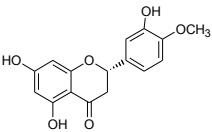
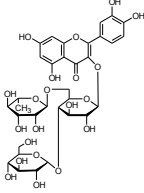
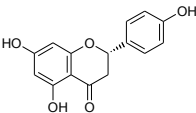
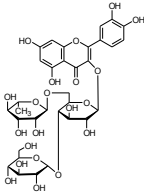
2-3-2 フラボノイド原料の HPLC 装置による分析手法

フラボノイド複合体の原料に用いたモノグルコシルルチンおよび難水溶性フラボノイド(クエルセチン、ヘスペレチン、ナリングニン)について、各 500 μ M となる様に、アセトニトリル/水=30/70 の混合溶液へ溶解した。難水溶性フラボノイドについては、予めジメチルスルホキシドに 500mM となるように溶解したものを、最終濃度でジメチルスルホキシドが 0.1% (V/V) となる様に添加した。また、HPLC 装置の測定条件は、HPLC 装置 (Alliance 2695, Waters MA USA) を使用して、PDA 検出器(Waters2996, Waters, MA, USA)波長 : 210~400nm 、カラム : Inert Sustain C18 5 μ m, 4.6 \times 250mm I.D.、移動相 : アセトニトリル/0.1vol%酢酸水溶液=30/70、流速 : 1.0ml/min、カラムオープン内温度 : 40 $^{\circ}$ Cであった。サンプル注入量は、5.0 μ l とし、測定は、3 回繰り返して行い、それぞれの UV 吸収波長 (nm) および保持時間 (分; Retention Time) について測定を行った。

2-3-3 スプレードライ法によるフラボノイド複合体の作製方法

難水溶性フラボノイド(クエルセチン、ヘスペレチン、ナリングニン)とモノグルコシルルチンを上記で測定した純度を用いて、それぞれ、モル比率 1 : 4 になる様にそれぞれ計量し、難水溶性フラボノイドについては、エタノールに予め溶解させ、完全に溶解した状態を目視で確認し、その後、モノグルコシルルチンを蒸留水に溶解したものを加え、最終的には、エタノール : 蒸留水=8 : 2 (体積比) の混合溶液の状態にする。この混合溶液を用いてスプレードライ装置 (CPL-2 ; 大川原製作所) にて乾燥し、粉末化を行った。スプレードライの条件として、乾燥室の入口温度は、120 $^{\circ}$ C、出口温度は、68 $^{\circ}$ Cとし、噴射空気圧は、0.2MPa、処理量は、4.6ml/min であった。また、スプレードライ乾燥した粉末は、デシケータ保存して十分に乾燥したものをその後の試験に用いた。また、本研究で作製した 3 種類のフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体) 粉末のそれぞれの配合比率と平均分子量を表 2-1 にまとめる。

表 2-1 本研究で作製したフラボノイド複合体

	Flavonoid Composite	Aglycone	Glucosyl Flavonoid
1	QUE/MGR Mixing ratio; QUE:MGR=1:4 (molar weight ratio) Average molar mass; 681.42g/mol	 Quercetin(QUE)	 Monoglucosyl rutin(MGR)
2	HES/MGR Mixing ratio; HES:MGR=1:4 (molar weight ratio) Average molar mass; 681.43g/mol	 Hesperetin(HES)	 Monoglucosyl rutin(MGR)
3	NAR/MGR Mixing ratio; NAR:MGR=1:4 (molar weight ratio) Average molar mass; 675.43g/mol	 Naringenin(NAR)	 Monoglucosyl rutin(MGR)

2-3-4 フラボノイド複合体の電子顕微鏡による粉末形状の観察

スプレードライ法により作製した3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）粉末の一部をそれぞれ導電性カーボン両面テープ（5 mm 幅；日新 EM）に接着し、オートカーボンコータ（JEC-560；日本電子）にて、内圧 5 Pa、蒸着電圧 4 V、蒸着時間 5 秒にてカーボン蒸着し前処理を行った。その後、走査型電子顕微鏡（JSM-IT300LV；日本電子）にて、印加電圧 15 kV、5,000 倍の倍率で、粉末形状の写真撮影を行った。

2-3-5 フラボノイド複合体の HPLC 装置による分析方法

3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）粉末を、モル平均分子量より各 500 μM となる様にそれぞれ計量し、アセトニトリル/水

の混合溶液へ溶解した。溶解したサンプルは、HPLC 装置 (Alliance 2695, Waters MA USA) を用いて、含有する難水溶性フラボノイドおよびモノグルコシルルチンの定量を行った。HPLC 装置の測定条件は、PDA 検出器(Waters2996, Waters, MA, USA)波長：210～400nm、カラム：Inert Sustain C18 5 μ m, 4.6 \times 250mm I.D.、移動相：アセトニトリル/0.1vol%酢酸水溶液=30/70、流速：1.0ml/min、カラムオープン内温度：40 $^{\circ}$ Cであった。サンプル注入量は、5.0 μ lとした。測定は、3回繰り返して行い、フラボノイド複合体の原料分析で得た難水溶性フラボノイドとモノグルコシルルチンのUV吸収波長と保持時間と比較することによりそれぞれの成分同定を行った。また、成分定量は、標準とした原料サンプル（標準品）のピーク面積を用いて検量線を作成し、絶対検量線法により計算した。

2-4 実験結果

2-4-1 フラボノイド原料の HPLC 装置による分析結果

(a) クエルセチンの HPLC 分析結果

クエルセチン (500 μ M) の HPLC 分析結果を以下に示す。UV 測定波長は 370nm で、保持時間 (RT) は 12.47 分、標準偏差 (SD) は ± 0.011 であった。

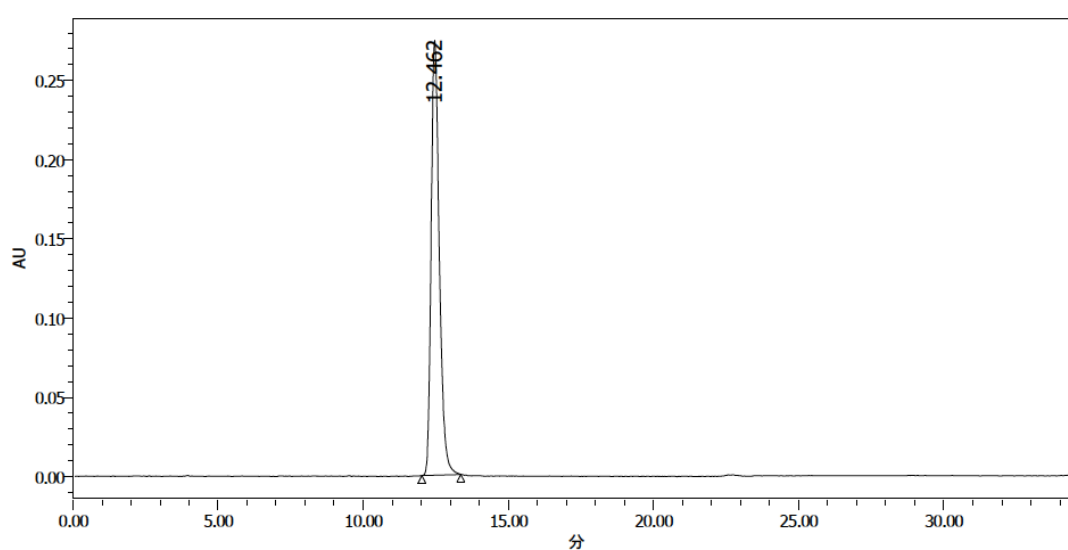


図 2-2 クエルセチンの HPLC チャート

表 2-2 クエルセチンの HPLC 分析結果

フラボノイド	保持時間 (min)	標準偏差(SD)*	UV 測定波長(nm)
QUE	12.47	± 0.011	370

* n=3 の平均値

(b) ヘスペレチンの HPLC 分析結果

ヘスペレチン (500 μ M) の HPLC 分析結果を以下に示す。UV 測定波長は 285nm で、保持時間 (RT) は 22.67 分、標準偏差 (SD) は ± 0.0083 であった。

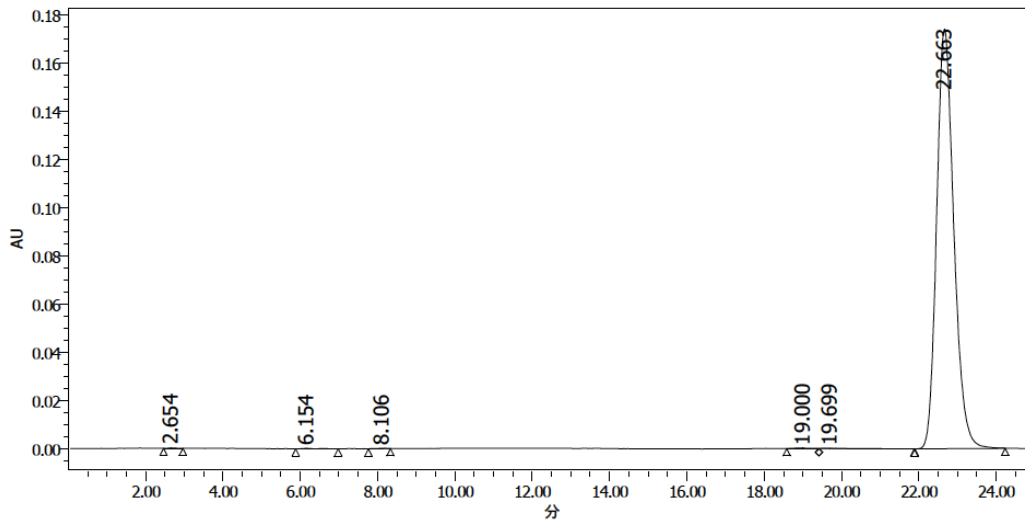


図 2-3 ヘスペレチンの HPLC チャート

表 2-3 ヘスペレチンの HPLC 分析結果

フラボノイド	保持時間 (min)	標準偏差(SD)*	測定波長(nm)
HES	22.67	±0.0083	285

* n=3 の平均値

(c) ナリンゲニンの HPLC 分析結果

ナリンゲニン (500 μ M) の HPLC 分析結果を以下に示す。UV 測定波長は 290nm で、保持時間 (RT) は 19.47 分、標準偏差は ± 0.0073 であった。

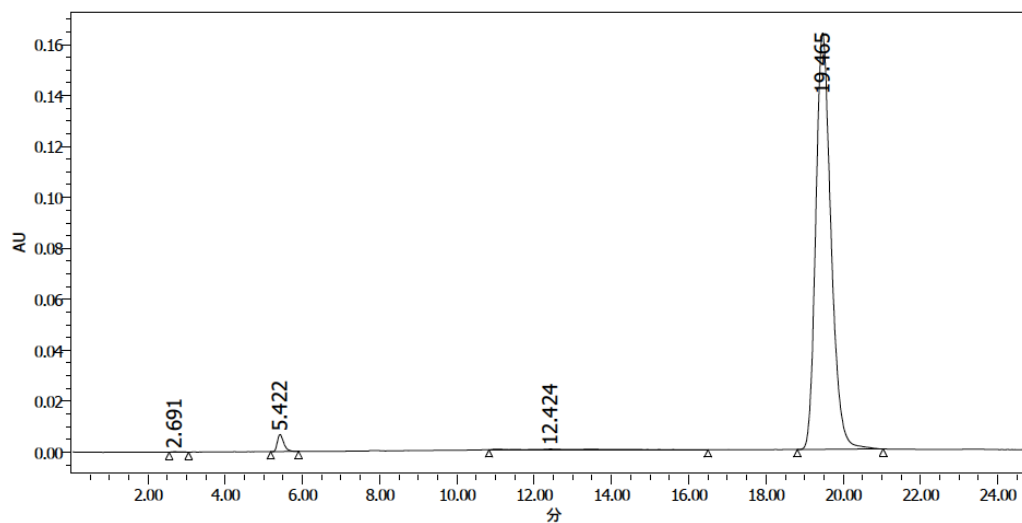


図 2-4 ナリンゲニンの HPLC チャート

表 2-4 ナリンゲニンの HPLC 分析結果

フラボノイド	保持時間 (min)	標準偏差(SD)*	測定波長(nm)
NAR	19.47	±0.0073	290

* n=3 の平均値

(d) モノグルコシルルチンの HPLC 分析結果

モノグルコシルルチン (500 μ M) の HPLC 分析結果を以下に示す。UV 測定波長は 355nm で、保持時間 (RT) は 7.02 分、標準偏差 (SD) は±0.006 であった。

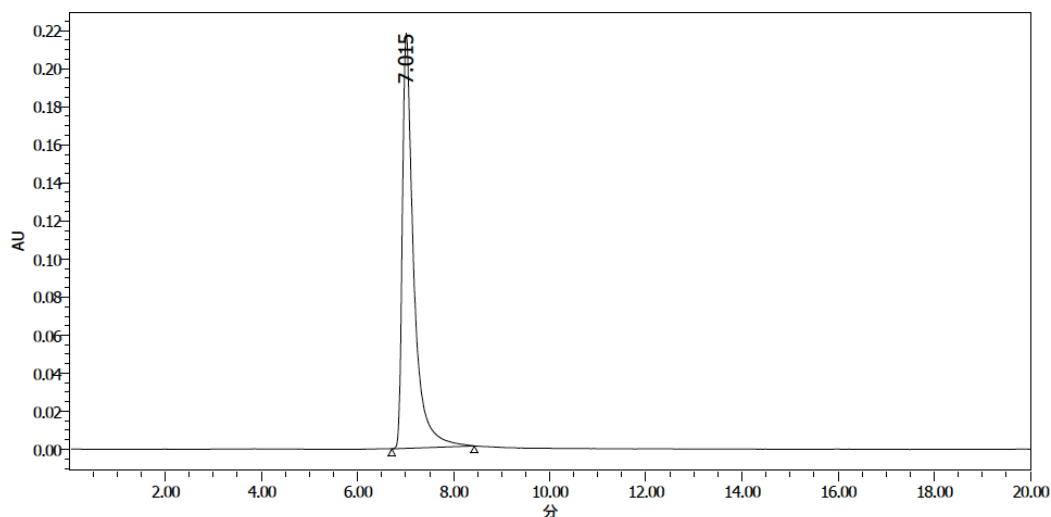


図 2-5 モノグルコシルルチンの HPLC チャート

表 2-5 モノグルコシルルチンの HPLC 分析結果

フラボノイド	保持時間 (min)	標準偏差(SD)*	測定波長(nm)
MGR	7.02	±0.006	355

* n=3 の平均値

2-4-2 スプレードライ法によるフラボノイド複合体の作製結果

本研究で作製した 3 種類のフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシル

ルチン複合体) 粉末の外観写真と走査型電子顕微鏡 (JSM-IT300LV ; 日本電子) による撮影結果を以下に示す。

(A) クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (QUE : MGR=1 : 4)

(1) 外観 ; 淡黄色粉末

(2) 走査型電子顕微鏡 (倍率 5,000×) による観察結果 ;

粒子径が 5 μ m 以下の球状な粉末であった。

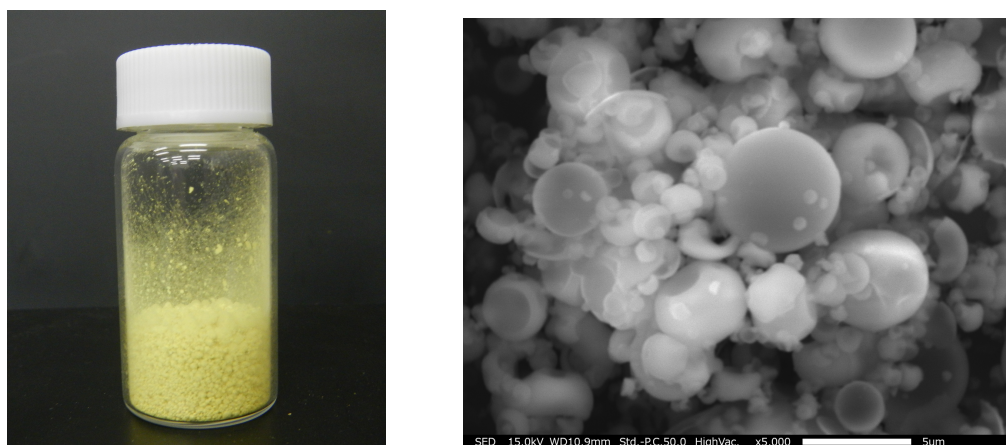


図 2-6 QUE/MGR 複合体粉末の外観および電子顕微鏡 (SEM) 写真

(B) ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (HES : MGR=1 : 4)

(1) 外観 ; 淡黄色粉末

(2) 走査型電子顕微鏡 (倍率 5,000×) による観察結果 ;

粒子径が 5 μ m 以下の球状な粉末であった。

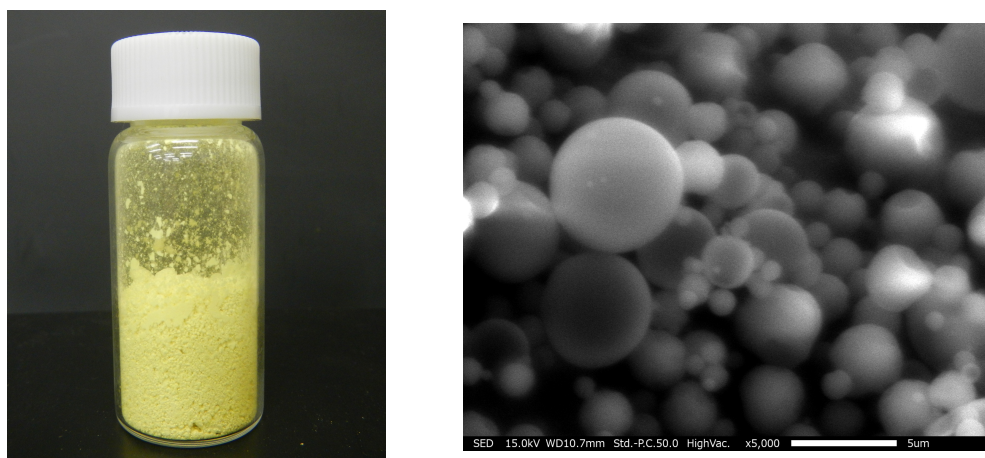


図 2-7 HES/MGR 複合体粉末の外観および電子顕微鏡 (SEM) 写真

(C) ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (NAR : MGR=1 : 4)

(1) 外観 ; 淡黄色粉末

(2) 走査型電子顕微鏡 (倍率 5,000×) による観察結果 ;

粒子径が 5 μ m 以下の球状な粉末であった。

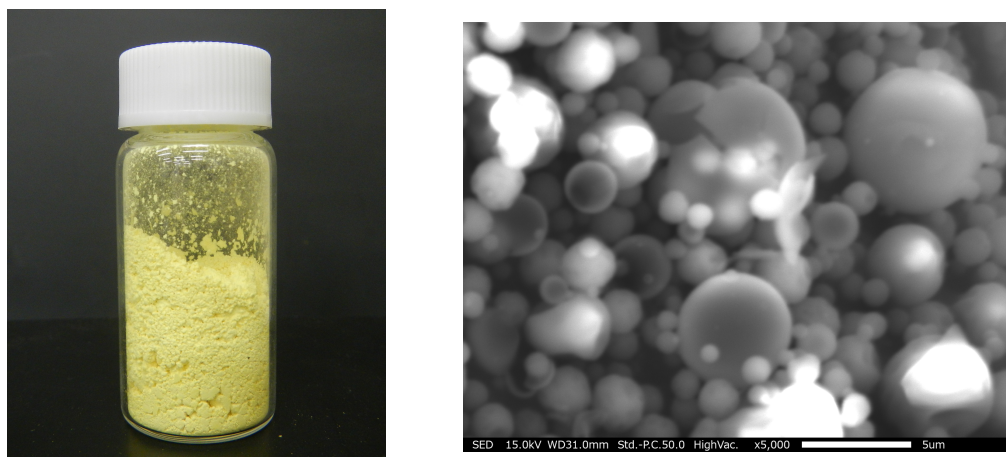


図 2-8 NAR/MGR 複合体粉末の外観および電子顕微鏡 (SEM) 写真

2-4-3 フラボノイド複合体の HPLC 装置による分析結果

上記で作製した 3 種類のフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体) 粉末をアセトニトリル/水 (30/70) の混合溶液にモル平均濃度で 500 μ M の濃度で溶解したものを HPLC 分析結果から算出した難水溶性フラボノイド (アグリコン) およびモノグルコシルルチン (MGR) のモル濃度 (μ M) を表 2-6 に示す。

表 2-6 本研究で作製したフラボノイド複合体の HPLC 分析結果

フラボノイド複合体	アグリコン濃度 (μ M)	MGR 濃度 (μ M)	アグリコン濃度/ MGR 濃度	複合体濃度 (μ M)
QUE/MGR	95.7	371.8	0.257	467.5
HES/MGR	97.5	380.8	0.256	478.3
NAR/MGR	96.1	378.0	0.254	474.1

n=3 の平均値

2-5 考察

本章では、3種類のフラボノイド複合体(クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体)粉末をスプレードライ法によって作製したが、その準備段階として、それぞれの複合体の原料となる難水溶性フラボノイドおよびモノグルコシルの HPLC 分析を行った。難水溶性フラボノイドについては、試薬グレード品を用いたため、純度も 95%以上と高く、単一成分であることが確認できた。また、モノグルコシルルチンについては、試薬として販売されていないため、分取用クロマト分離装置を用いて精製を行い、純度 100%のものを実験に使用した。

さらに、3種類のフラボノイド複合体(クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体)粉末の外観および走査型電子顕微鏡による観察を行ったが、何れのフラボノイド複合体も、球状粒子で、大きさも $5\mu\text{m}$ 以下の微小な粒子で形成されている点も類似しており、混合したアグリコンの種類に関係なく、ほぼ同様の可溶化状態で複合体形成し、粉末化されていることが分かった。

さらに、作製したフラボノイド複合体を HPLC 分析した所、難水溶性フラボノイドとモノグルコシルルチンとモル比率は変わらないもののフラボノイド複合体のモル平均濃度が、最大で 6.5%程度低くなっている。この原因として、スプレードライ乾燥後にフラボノイド複合体粉末に残存する水分が、その後のデシケータによる乾燥によっても除去されず、残っていると考察している。クエルセチンやモノグルコシルルチンの原料であるルチンは、水和物として安定化することが知られており、モノグルコシルルチンにおいても、同様の水和物として安定化する可能性が高く、デシケータ乾燥によって、水分を完全に除去することは難しいと推測している。以後の実験においては、この水分によるフラボノイド複合体の濃度低下を補正して、サンプル調整を行った。

第3章 フラボノイド複合体の機能性評価

3-1 背景

本章では、フラボノイド複合体の機能性評価の中で、フラボノイド複合体の水溶液安定性と抗酸化活性について評価を行うことにした。

まず、フラボノイド複合体の水溶液安定性についてであるが、フラボノイド複合体は、前述した糖転移フラボノイドの可溶化効果を用いて、難水溶性フラボノイドの溶解度を向上させるために提案された手法であり、本研究で作製したクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体については、既に先行研究によって、アグリコンであるクエルセチンの水に対する溶解度を約 40 倍上昇させることが報告されている[29]。また、水溶液中で数 nm 程度のナノ構造体を形成して存在し、モノグルコシルルチンとクエルセチンの配合比率が 20 : 1 (重量比) の場合、その可溶化状態が安定化すると報告されている。さらにこの様なナノ構造体を安定的に形成するためには、糖転移フラボノイドが有するアグリコン骨格部分と難水溶性物質の化学構造の間の相互作用 (相性) が重要となり、類似した化学構造の物質ほど可溶化効果が高いことが知られている[14, 34-38]。

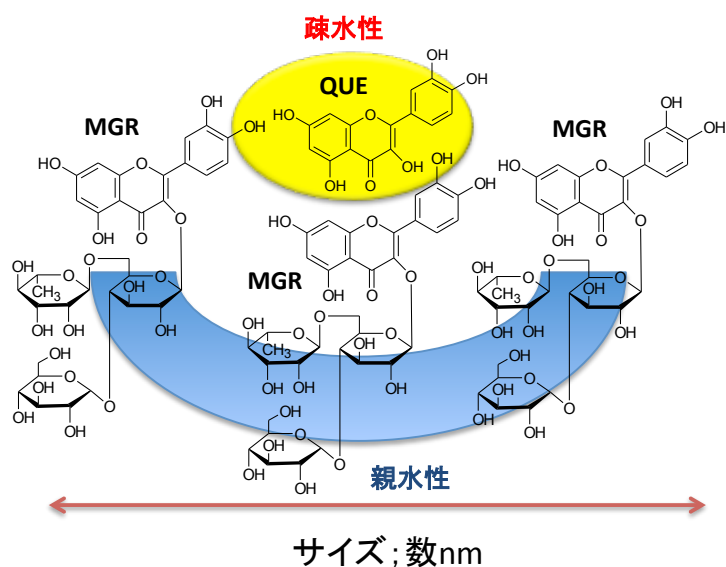


図 3-1 フラボノイド複合体の構造

また、フラボノイドを含めたポリフェノールの抗酸化活性については、フェノール性水酸基の数と位置が重要であり、フラボノイドの場合は、B環にカテコール構造を持つフラボノイドの抗酸化力が高い。B環のカテコール構造によるラジカル消去メカニズムについては、図3-2に示す通り、2段階のステップにより、B環のカテコールがジケトンとなりラジカルを消去する。また、クエルセチン、ナリンゲニン、ヘスペレチンの様にB環のOH基の数や修飾されると抗酸化活性が低下する。さらに、C環のOH基が配糖化によって、修飾されると抗酸化活性も低下するが、B環のOH基の影響ほど顕著ではない[1, 39, 40]。

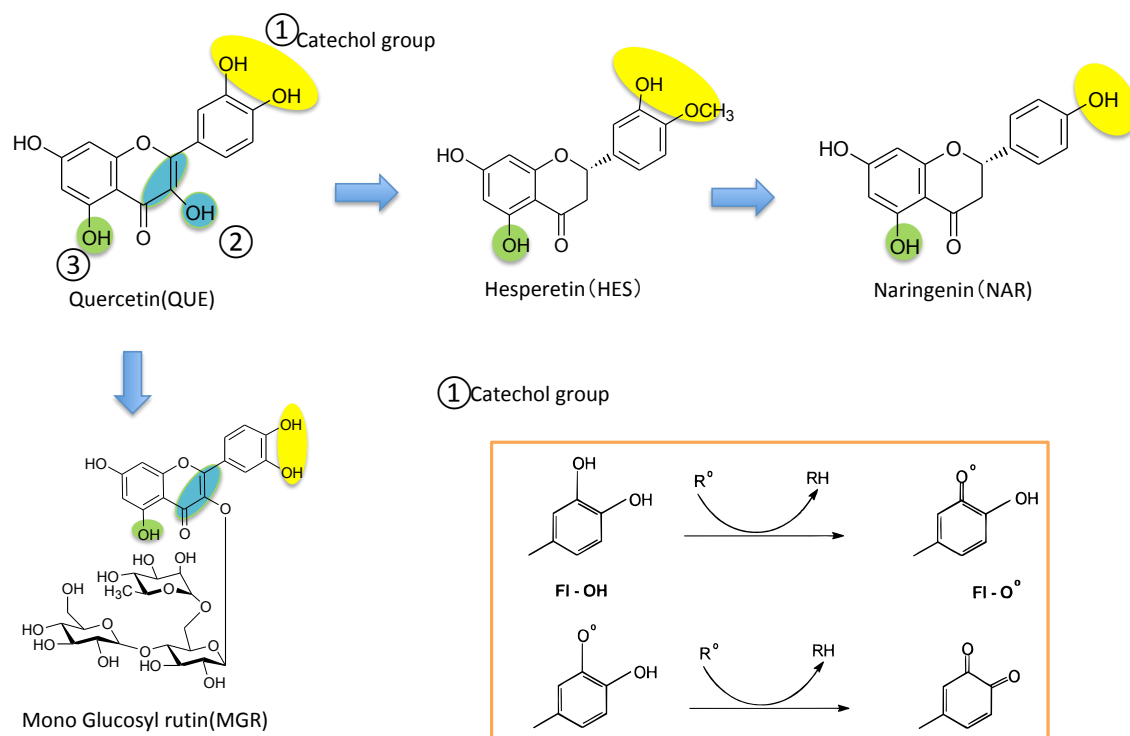


図3-2 フラボノイドの分子構造と抗酸化メカニズム

3-2 実験概要

本章では、前章で作製した3種類のフラボノイド複合体（ケルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）の水溶液中での安定性を確認するために、フラボノイド複合体に含まれる難水溶性フラボノイドの水溶液モル濃度の時間変化をHPLC装置で測定を行い、ジメチルスルホキシド（DMSO）との比較を行った。その際に、可溶化状態の見極めとして、水溶液を0.2 μ mの親水性PTFEメンブレンフィルターによる濾過し、その濾過液に含まれる難水溶性フラボノイドの量によって可溶化していると判断をした。

さらに、本研究で使用する難水溶性フラボノイドおよびフラボノイド複合体における抗酸化力の評価は、DPPH（1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl）ラジカルを用いた抗酸活性試験によって実施した。このDPPH法は、使用するDPPHラジカルの安定性が高く、再現性も良いことから、抗酸化物質の抗酸化活性の評価方法として最も一般的な方法である[41-44]。図3-3にその測定原理を示すが、DPPHラジカル溶液に抗酸化物質を添加することによって、DPPHラジカルが還元化され、色調が紫色（517nm）から、消色（淡黄色）する。その吸光度（OD₅₁₇）の差から、抗酸化物質が持つ抗酸化活性を測定する評価方法である。DPPHラジカルは、水には溶解しないため、通常アルコール（メタノール、エタノール）で溶解したものを使用し、水溶性の抗酸化物質を測定する場合は、アルコールと水を混合したDPPHラジカル溶液を用い測定を行う。

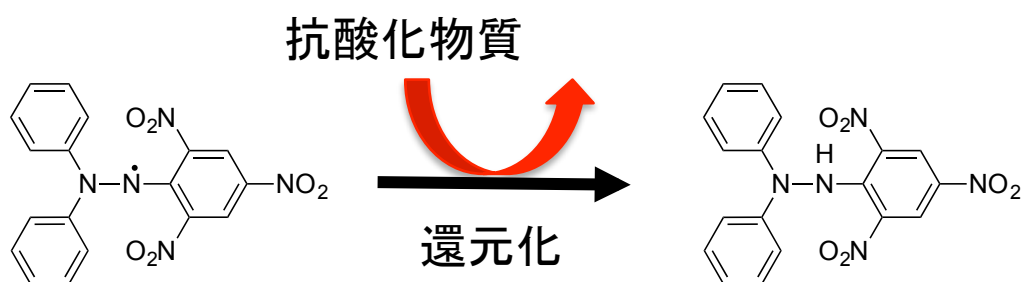


図3-3 DPPHラジカルの抗酸化物質による色調変化

3-3 実験方法

3-3-1 試薬の入手先

モノグルコシルヘスペリジン (>95.0% (HPLC) ; 分子量 772.70) およびモノグルコシルナリンジン (>90.0% (HPLC) ; 分子量 742.68) は、東洋精糖株式会社より提供を受けた。また、L-アスコルビン酸 (東京化成特級 ; 分子量 176.12)、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) フリーラジカル (>97.0% (HPLC) ; 分子量 394.32) は、東京化成工業株式会社より購入した。その他の試薬や溶媒は、試薬グレードのものをを用いた。また、親水性 PTFE 0.2 μ m メンブレンフィルターは、アドバンテック東洋株式会社のディスポーザブルメンブレンフィルターユニット (25HP020AN) を使用した。

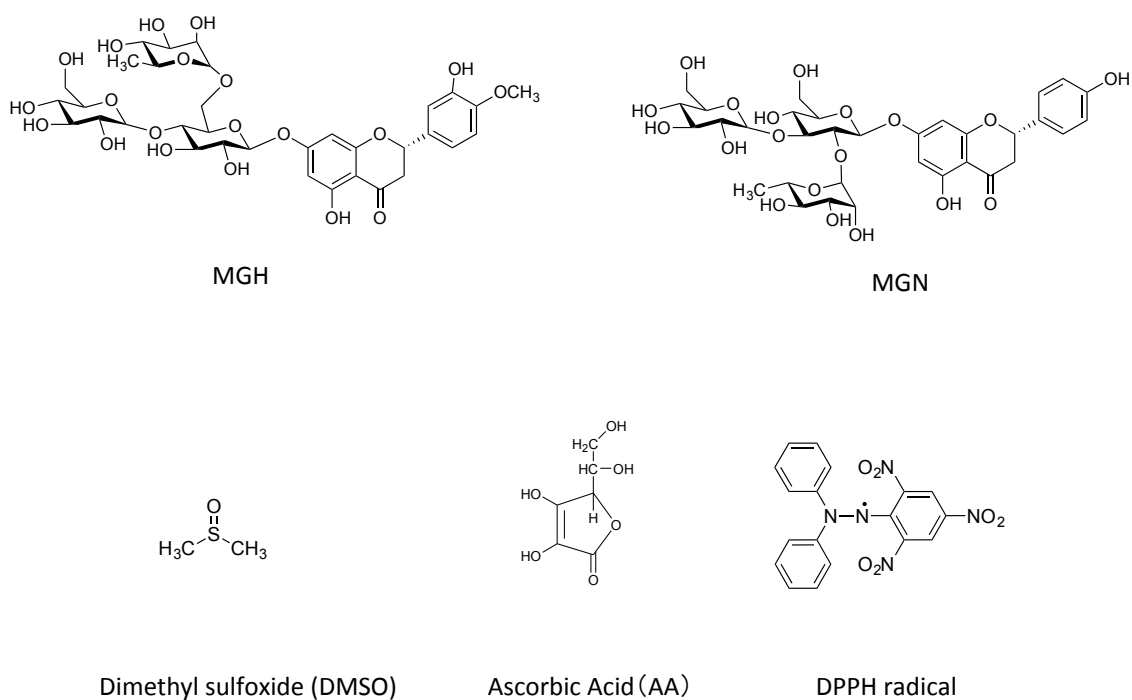


図 3-4 本章で使用した試薬の化学構造式

3-3-2 フラボノイド複合体の水溶液濃度の時間変化測定

フラボノイド複合体の水溶液の調整については、蒸留水 (DW ; 10ml) に、前述で作製した 3 種類のフラボノイド複合体 (ケルセチン/モノグルコシルルチン、ヘスペリジン/モノグルコシルルチン、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン) を、それぞれ平均

モル濃度で $500\ \mu\text{M}$ になる様に溶解した水溶液を準備した。ここで、それぞれのサンプルに含まれる難水溶性フラボノイドのモル濃度が、 $100\ \mu\text{M}$ になる様に調整した。さらに、比較用サンプルとして、可溶化剤を使用しない蒸留水のみ水溶液、および、ジメチルスルホキシド (DMSO) で高濃度 (500mM) に溶解した難水溶性フラボノイドを添加して混合調整した $1\%(\text{v/v})$ の水溶液を準備した。また、各サンプルについては、それぞれボルテックスミキサーで 1 分間以上攪拌して完全に溶解させ、測定時間 (5、10、20、40、60 分) 毎に水溶液中に含まれる難水溶性フラボノイドの濃度を測定した。濃度測定方法としては、 $0.2\ \mu\text{m}$ メンブレンフィルターを装着した 10m l シリンジに水溶解液 (1m l) をサンプリングし、加圧濾過する。その後、フィルタ濾過したサンプルを $700\ \mu\text{l}$ に対し、アセトニトリル $300\ \mu\text{l}$ を加えた後、HPLC 装置 (Alliance 2695, Waters MA USA) を使用して、難水溶性フラボノイドの定量を行った。HPLC 装置の測定条件は、PDA 検出器 (Waters 2996, Waters, MA, USA) 波長: $210\sim 400\text{nm}$ 、カラム: Inert Sustain C18 $5\ \mu\text{m}, 4.6\times 250\text{mm I.D.}$ 、移動相: アセトニトリル/0.1vol%酢酸水溶液 = 30/70、流速: 1.0ml/min 、カラムオーブン内温度: 40°C であった。サンプル注入量は、 $5.0\ \mu\text{l}$ とした。難水溶性フラボノイドの極大吸収波長 (クエルセチン; 370nm , ヘスペレチン; 285nm , ナリンゲニン; 270nm) におけるピーク面積 (μVs) を求め、標準サンプル (クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン; それぞれ $500\ \mu\text{M}$) のピーク面積 (μVs) との比から難水溶性フラボノイドの定量を行った。

3-3-3 DPPH ラジカル消去活性を用いた抗酸化力評価

(A) 難水溶性フラボノイドおよび糖転移フラボノイド単独での抗酸化力評価

難水溶性フラボノイド (クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン) は、予めジメチルスルホキシド (DMSO) に高濃度 (500mM) 溶解したものを準備し、50%エタノール/水混合溶液の中に、 2mM に調整したものを準備する。混合調整した難水溶性フラボノイド混合溶液を準備した 96-well プレートに各 $100\ \mu\text{l}$ 入れる。また、糖転移フラボノイド (モノグルコシルルチン、モノグルコシルヘスペリジン、モノグルコシルナリンゲニン) は、50%エタノール/水混合溶液に直接溶解し、 2mM に調整したものを同様に 96-well プレートに各 $100\ \mu\text{l}$ 入れる。そこに、各 well に、100%エタノールで溶解した DPPH ラジカル液 (モル濃度; $600\ \mu\text{M}$) を $100\ \mu\text{l}$ 添加する。最終的に、各 well 当たり、液量 $200\ \mu\text{l}$ (サンプル 1mM 、DPPH ラジカル $300\ \mu\text{M}$) の 75%エタノール/水混合溶液中に、ジメチルスルホキシド (DMSO) の濃度が、 $0.2\%(\text{vol/vol})$ となる。その後、プレート用振動台で攪拌し、十分に混合した後、暗所にて 30 分間静置する。その後、マルチプレートリーダー (SpectraMax M5、Molecular Devices、CA、USA) を使用し、

各 well の DPPH ラジカル吸収波長 (517nm) における吸光度 (OD₅₁₇) を測定する。また、測定サンプルの吸光度 (OD₅₁₇) とコントロール (サンプル未添加) の吸光度 (OD₅₁₇) との差をコントロールの吸光度 (OD₅₁₇) で規格化することによって、DPPH ラジカル消去活性 (%) を計算する (式 3-1)。

(B) フラボノイド複合体の抗酸化力評価

フラボノイド複合体 3 種類 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体) を、50%エタノール/水混合溶液の中に、それぞれ平均モル濃度で 2mM になる様に溶解したものを準備する。調整したフラボノイド複合体溶液を準備した 96-well プレートに各 100 μ l 入れ、さらに、50%エタノール/水混合溶液で 2 倍希釈を合計 3 段階行った (2mM、1mM、500 μ M)。

そこに、各 well に、100%エタノールで溶解した DPPH ラジカル液 (モル濃度; 600 μ M) を 100 μ l 添加する。最終的に、各 well 当たり、サンプルのモル濃度 (1mM、500 μ M、250 μ M)、DPPH ラジカルのモル濃度 300 μ M で、液量 200 μ l となり、混合溶液は、75%エタノール濃度となる。

その後、プレート用振動台で攪拌し、十分に混合した後、暗所にて 30 分間静置する。その後、マルチプレートリーダー (SpectraMax M5、Molecular Devices、CA、USA) を使用し、各 well の DPPH ラジカル吸収波長 (517nm) における吸光度 (OD₅₁₇) を測定する。また、測定サンプルの吸光度 (OD₅₁₇) とコントロール (サンプル未添加) の吸光度 (OD₅₁₇) との差をコントロールの吸光度 (OD₅₁₇) で規格化することによって、DPPH ラジカル消去活性 (%) を計算する (式 3-1) [45]。

$$\text{DPPH ラジカル消去活性 (\%)} = \frac{\text{OD}_{517} (\text{サンプル}) - \text{OD}_{517} (\text{コントロール})}{\text{OD}_{517} (\text{コントロール})} \times 100 \quad (\text{式 3-1})$$

3-3-4 統計処理

全ての実験は、3 回以上繰り返し行い、統計的有意性は、Prism 6 software (GraphPad Software, Inc.) を用いて、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差検定にて確認した。また、すべてのデータにおいて、 $p < 0.05$ (\$、#で表示) または、 $p < 0.01$ (\$\$, ##で表示) で統計的優位性を示し、エラーバーは、標準誤差を表す。

3-4 実験結果

3-4-1 フラボノイド複合体の水溶液濃度の時間変化測定結果

(A) クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体

クエルセチンの各可溶化剤（ジメチルスルホキシド、モノグルコシルルチン）による水溶液濃度の時間変化測定を行った結果を図3-5に示す。クエルセチンのモル濃度変化については、モノグルコシルルチンで可溶化したものは測定1時間後まで大きな濃度低下（ $69\mu\text{M}$ ）を示さなかったが、ジメチルスルホキシド（DMSO）で可溶化したものは、測定直後から濃度低下が始まり、測定1時間後にはクエルセチンのモル濃度は、 $1.9\mu\text{M}$ となった。これは、蒸留水で溶解したものと同一程度のモル濃度（ $2.0\mu\text{M}$ ）であった。

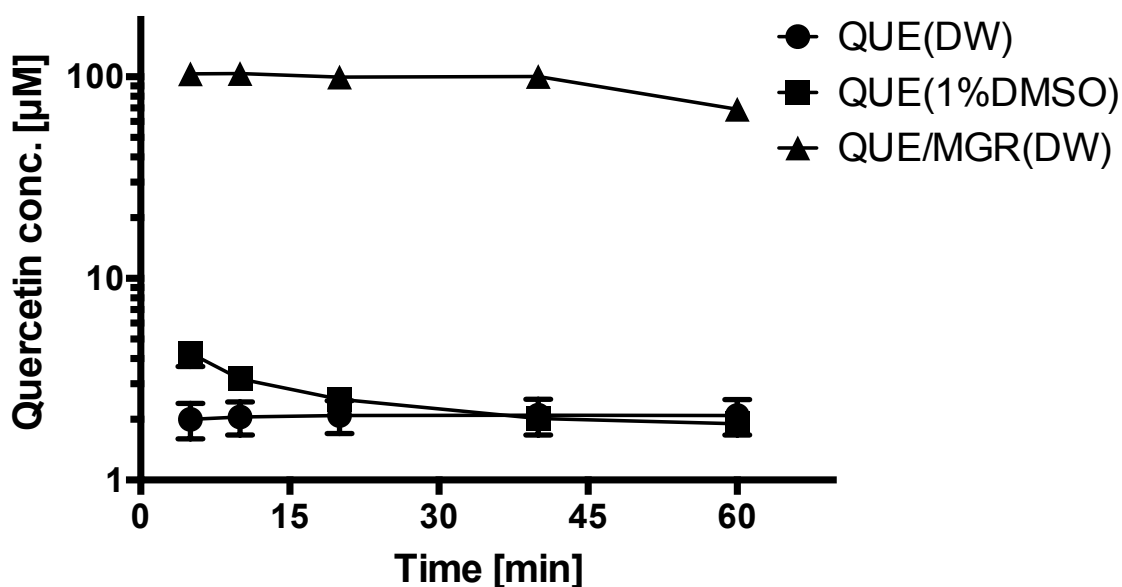


図3-5 クエルセチン水溶液濃度の時間変化

(B) ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体

ヘスペレチンの各可溶化剤（ジメチルスルホキシド、モノグルコシルルチン）による水溶液濃度の時間変化測定結果を図3-6に示す。ヘスペレチンのモル濃度変化について、ジメチルスルホキシド（DMSO）で可溶化したものは、測定直後から濃度低下が始まり、測定1時間後では $15\mu\text{M}$ と低下した。また、モノグルコシルルチンで可溶化されたものは、測定後1時間以内ではヘスペレチンのモル濃度低下は測定されなかった。

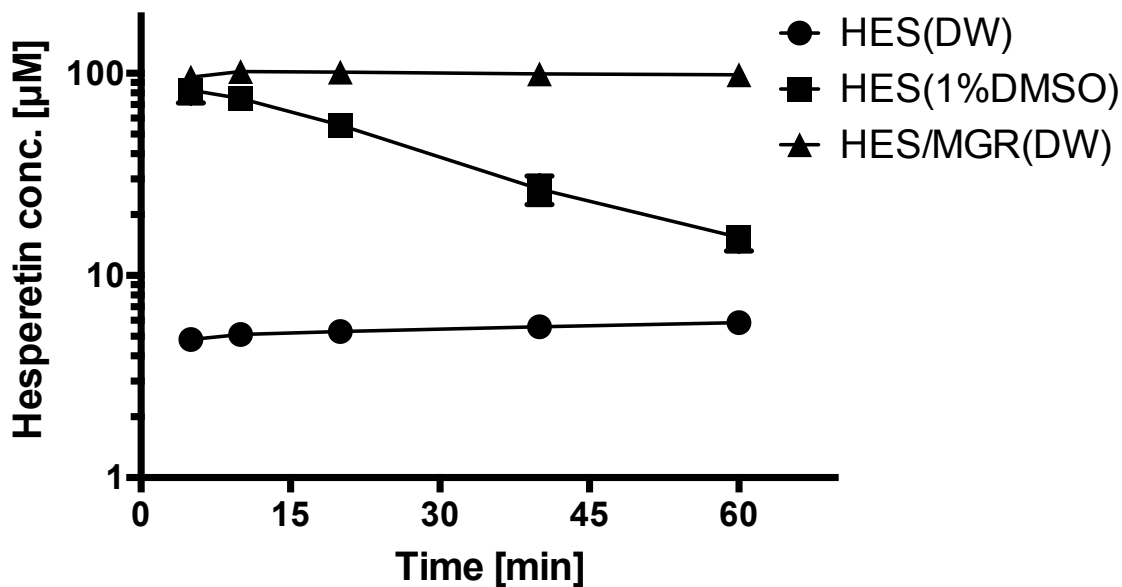


図 3-6 ヘスペレチン水溶液濃度の時間変化

(C) ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体

ナリンゲニンの各可溶化剤（ジメチルスルホキシド、モノグルコシルルチン）による水溶液濃度の時間変化測定結果を図 3-7 に示す。ナリンゲニンのモル濃度変化について、測定 1 時間後では、ジメチルスルホキシド（DMSO）で、 $76 \mu\text{M}$ 、モノグルコシルルチンで、 $91 \mu\text{M}$ となり、両可溶化剤共に測定後 1 時間以内では、可溶化された状態が持続し、ナリンゲニンの大幅なモル濃度低下は測定されなかった。

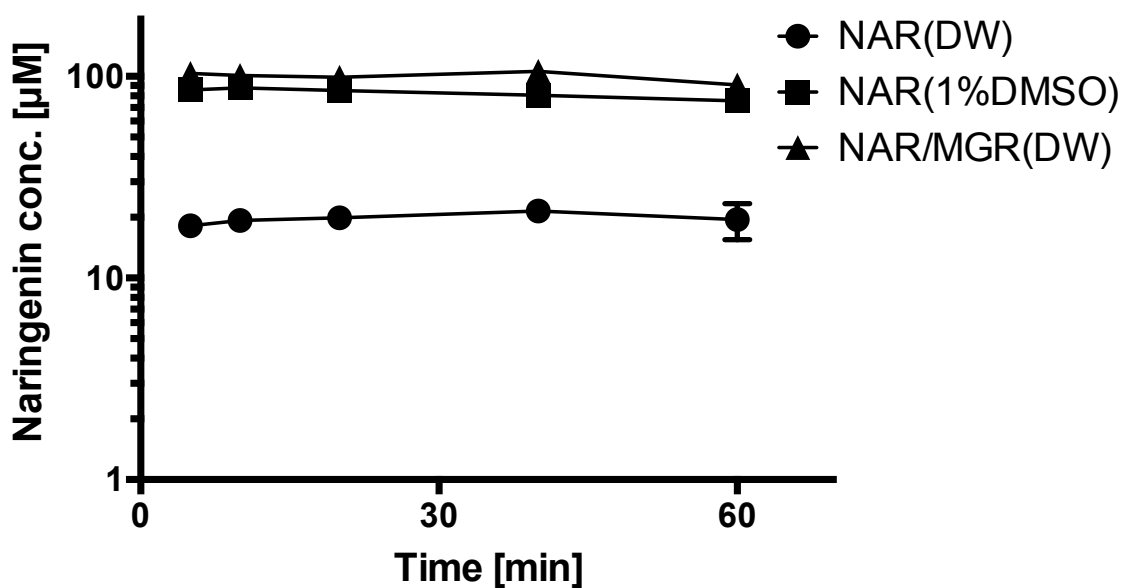


図 3-7 ナリンゲニン水溶液濃度の時間変化

3-4-2 フラボノイド複合体の DPPH 法による抗酸化力評価結果

(A) 難水溶性フラボノイドおよび糖転移フラボノイド

DPPHラジカル消去試験については、難水溶性フラボノイドとその糖転移フラボノイドの各 1 mMでの抗酸化力の比較を行った所、ケルセチン (97.4%) >モノグルコシルルチン (82.6%) >アスコルビン酸 (78.6%) >ヘスペレチン (31.0%) >モノグルコシルヘスペリジン (24.6%) >モノグルコシルナリンジン (17.1%) ≧ナリンゲニン (16.1%) の順番で抗酸化活性が高い結果であった。ケルセチン骨格のフラボノイドは、今回比較したフラボノイド骨格の中で最も抗酸化活性が高く、ヘスペレチン骨格とナリンゲニン骨格のフラボノイドは、それらに比べ低かった。また、難水溶性フラボノイド (アグリコン) とその糖転移フラボノイドとの抗酸化活性の比較において、ケルセチンおよびヘスペレチン骨格のフラボノイドに関しては、若干の抗酸化活性の低下が見られたが、ナリンゲニンの配糖体であるモノグルコシルナリンジンについては、配糖化による抗酸化活性の低下は見られなかった。

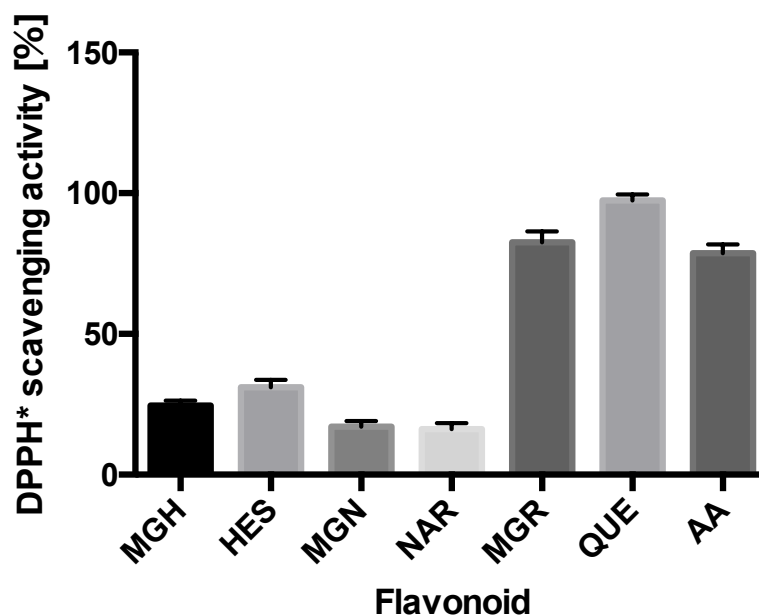


図 3-8 難水溶性フラボノイドおよび糖転移フラボノイド抗酸化力比較

(B) 難水溶性フラボノイドおよびフラボノイド複合体

500 μ M濃度における難水溶性フラボノイドとアスコルビン酸の比較試験において、クセルセチン (81.0%) やモノグルコシルルチン (65.9%) がアスコルビン酸 (60.0%) よりも抗酸化力が高く、ヘスペレチン (17.6%)、ナリンゲニン (4.3%) については、アスコルビン酸 (60.0%) に比べ低い抗酸化活性であった。

また、フラボノイド複合体およびモノグルコシルルチンとの比較においては、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (74.3%) >モノグルコシルルチン (65.9%) >ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (58.6%)、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (55.0%) の順番で抗酸化力が高い結果であった。特に、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (74.3%) が、今回作製した3種類のフラボノイド複合体の中で最も抗酸化力が高い結果であった。また、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (58.6%)、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (55.0%) においては、可溶化剤として使用したモノグルコシルルチンの抗酸化活性が高いため、複合製剤としてそれらに含有する難水溶性フラボノイド (ヘスペレチン、ナリンゲニン) 単独よりも抗酸化活性が高い結果となった。

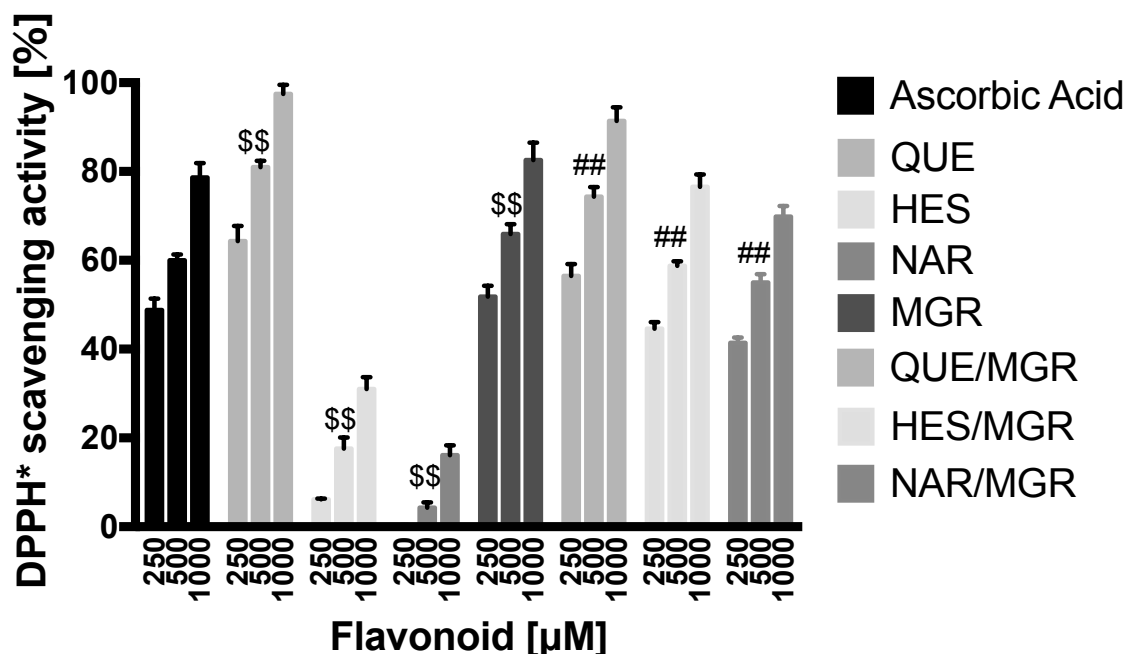


図 3-9 難水溶性フラボノイドおよびフラボノイド複合体の抗酸化力比較

3-5 考察

フラボノイド複合体水溶液の時間変化試験の結果から、難水溶性であるクエルセチンの可溶化剤として、モノグルコシルルチンはジメチルスルホキシド (DMSO) と比較して、優れたものであることが明らかになった。このことは、モノグルコシルルチンがクエルセチンを骨格とした界面活性剤と考えると、クエルセチンの可溶化効果が高いことは予測し易い。さらに、他の難水溶性フラボノイドであるヘスペレチンについても、モノグルコシルルチンによる可溶化は、ジメチルスルホキシド (DMSO) と比較し利点が見られた。これら難水溶性フラボノイドに対して、より高い可溶化効果を期待するのであれば、それぞれの糖転移化合物であるモノグルコシルヘスペリジンやモノグルコシルナリンゲニンを用いた方がより好ましいと考えられる。しかしながら、可溶化されるヘスペレチンやナリンゲニンは、難水溶性とは言え、クエルセチンに比べ水溶性が高く、モノグルコシルルチンでも十分な可溶化状態を維持することが本章の試験によって確認出来たことから、難水溶性フラボノイドの可溶化剤として3種類の難水溶性フラボノイドの内、最も溶解度が低いクエルセチンに合わせモノグルコシルルチンを選択することは、フラボノイド複合体におけるバランスの良い組み合わせであると考えられる。また、今回の実験で使用したフラボノイドの溶解条件は、PBS(-)にサンプルを投入し、1分間のボルテックス攪拌を行ったのみの簡易的な溶解法である。そのため、溶解度が低く、結晶性が高いフラボノイドの場合には、水溶液中での溶解が十分ではなく、析出を開始していると考えている。その結果、溶解度測定時のフィルタによって、それら結晶が水溶液中から取り除かれたため、溶解度が低下したと考えている。実験中に、クエルセチンについては、測定開始の5分後、また、ヘスペレチンについては、測定開始の20分後には、水溶液が濁り始めていることが目視で観測されたため、これら2つのアグリコンについては、ジメチルスルホキシド (DMSO) 1%の水溶液では、十分な溶解性が得られないことが明らかとなった。

次に、DPPHラジカルによる抗酸化活性の評価試験の結果から、以下の知見が得られた。まず、難水溶性フラボノイドおよび糖転移フラボノイド単独比較による試験結果から、フラボノイド骨格のB環にカテコール構造を持つ、クエルセチン骨格のフラボノイド (クエルセチン、モノグルコシルルチン) が、他のフラボノイド骨格および比較で用いたアスコルビン酸と比較しても、高い抗酸化力を示した。また、同じフラバン類のフラボノイドであるヘスペレチンやナリンゲニンの抗酸化活性の比較において、ヘスペレチンの方がナリンゲニンに比べ抗酸化活性は高かったことから、B環の構造 (水酸基の位置や数) がフラボノイドの抗酸化活性を決める重要な要素であること分かる。また、それぞれのフラボノイド骨格における配糖化による糖鎖の影響については、配糖化

による大きな抗酸化力の低下は見られなかったことから、配糖化によるフラボノイドの抗酸化活性の低下は、フラボノイド骨格中のフェノール性水酸基が糖転移により失われたことが原因であると推測される。

さらに、フラボノイド複合体の抗酸化活性の比較試験を行ったが、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体が、最も高い抗酸化活性を示し、可溶化剤としたモノグルコシルルチン単独よりも高い抗酸化活性を示した。一方、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体においては、可溶化剤として使用したモノグルコシルルチン単独よりも、抗酸化活性の低下は見られたが、同濃度のヘスペレチンやナリンゲニンよりも抗酸化活性が高い結果となった。このことは、ヘスペレチンやナリンゲニン単独では、アスコルビン酸よりも低い抗酸化活性のフラボノイドであっても、モノグルコシルルチンと組み合わせることにより、混合製剤としては抗酸化活性の低下を抑えることが出来る。

本章の結論として、モノグルコシルルチンは、抗酸化活性が高いクエルセチン骨格を持った糖転移フラボノイドであるため、可溶化剤として使用した場合、可溶化効果と同時に抗酸化活性を有する複合製剤の作製が可能となる。この様に、糖転移フラボノイドによるフラボノイド複合体製剤は、難水溶性フラボノイドの可溶化剤としての働きだけでなく、糖転移フラボノイドがもつ別の機能性も加味されたことにより、他の可溶化剤とは異なる機能性が付加された可溶化剤と言える。

第4章 フラボノイド複合体の細胞取り込み試験

4-1 背景

フラボノイドの細胞透過性に関する研究は、既に先行研究として進められており、細胞への取り込み効率やスピードや、フラボノイド構造と取り込み相関など様々検討されている。それらフラボノイドを用いた細胞試験において、課題となるのは、やはりフラボノイドの難水溶性の問題である。現状、細胞への難水溶性フラボノイドの添加試験においては、ジメチルスルホキシド (DMSO) が可溶化溶剤として多用されている。このジメチルスルホキシド (DMSO) は、難水溶性の物質を溶解させるために有用な有機溶媒として広く使われており、添加することで物質の膜透過性を向上させている。膜透過の作用メカニズムとして、ジメチルスルホキシド (DMSO) が細胞膜に細孔を形成することで難水溶性物質を細胞内に届けていると報告されている[46]。しかしながら、この作用メカニズムだと目的物を特異的に取り込むだけではなく、非特異的に他の物質も同時に取り込まれる危険性が増すことが考えられる。ジメチルスルホキシド (DMSO) がそのもの自身の毒性が低い割に副作用や細胞障害が生じる理由は、この非特異的な細胞吸収性にあると思われる[47]。さらに、ジメチルスルホキシド (DMSO) は、タンパク質の変性にも影響を与えているという報告[48]もあり、可溶化剤として使用する場合は、細胞への影響を少なくするために、なるべく低濃度で使用する事が望ましいと考えられる。実際に、ジメチルスルホキシド (DMSO) が可溶化剤として用いた難水溶性フラボノイドの細胞透過試験が行われ、フラボノイド添加から、15分から30分以内に細胞内に取り込まれ、細胞核までフラボノイドが到達していることが実験において報告されている[49-51]。しかしながら、この実験においてもあくまでもジメチルスルホキシド (DMSO) によって難水溶性フラボノイドを可溶化した条件での実験結果であり、難水溶性フラボノイドを単独で分散させて添加した試験ではない。

一方、本研究で検討を進めている糖転移フラボノイドを利用して難水溶性フラボノイドを可溶化した場合の最大の利点として、先に述べたジメチルスルホキシド (DMSO) などの有機溶媒としての影響を考えず、難水溶性フラボノイドを水溶化できる点である。この糖転移フラボノイドを利用した可溶化方法は、難水溶性物質の生物学的利用能 (バイオアベイラビリティ) の観点で大変興味深い現象であり、動物を用いた経口投与試験において、糖転移ルチンを用いて難水溶性の医薬品成分であるフルルビプロフェンの血中濃度が約3倍向上していることが既に報告されている。これらの報告は、糖転移フラボノイドによって、難水溶性物質の体内吸収性が向上することを示した報告であるが、糖転移フラボノイドを用いた難水溶性物質の可溶化製剤を用いた細胞試験により、糖転

移フラボノイドを用いて可溶化した難水溶性物質が、細胞取り込みに関してどのような影響を及ぼすかについては、先行研究の調査においても確認されていない。そこで、本章では、本研究で作製した 3 種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体）の細胞試験による細胞取り込み効果の確認を行い、従来の添加方法であるジメチルスルホキシド（DMSO）で難水溶性フラボノイドを可溶化して、同等の細胞取り込み効率を示すか否かを確認したい。

まず、フラボノイド複合体の原料となるモノグルコシルルチンは、クエルセチン配糖体であるルチンを原料にした糖転移フラボノイドである。ルチンは、そのアグリコンであるクエルセチンを配糖化することによって、大幅な毒性低減がなされており、クエルセチンの欠点である変異原性がルチンには見られないなど、より安全性の高いフラボノイドとなっている。しかしながら、その反面、配糖体のため細胞への取り込み効率は大幅に低下する欠点があり、モノグルコシルルチンについても、ルチンを更に糖転移した物質のため、同様に安全性は高いものの、細胞への取り込み効率が低いという課題は同様である（図 4-1）。この欠点は、本研究の最終目標である安全で効果が高い放射線防護剤の開発において放射線による主要な細胞障害が、細胞内で生じていることから、フラボノイドの細胞への取り込みは、重要な課題である。そこで、本研究ではモノグルコシルルチンの可溶化効果を用いたモノグルコシルルチンと難水溶性フラボノイドとの複合製剤によって、従来のモノグルコシルルチンの放射線感受性に加えて、細胞内での難水溶性フラボノイドの効果が加わることによって、より効果が高い放射線防護剤を見出すことを目的としている。

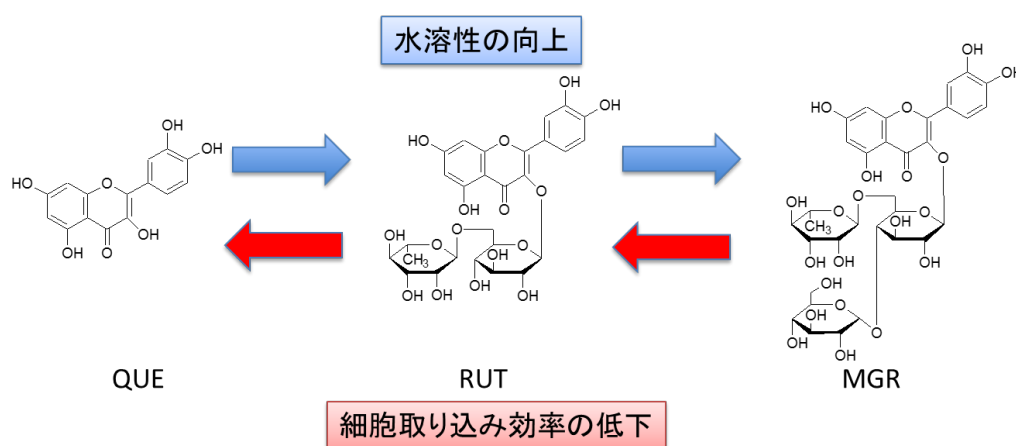


図 4-1 糖転移フラボノイドの課題

4-2 実験概要

本章では、本研究で作製した 3 種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体）を用いたアグリコンの細胞取り込み効果の確認を行うため、以下の 2 つの実験を行った。

まず、フラボノイド複合体によるアグリコンの細胞取り込み効果を直接確認するため、フラボノイド複合体を培養細胞に短時間処理（30 分）した後に、細胞を破碎し、破碎した細胞から抽出した細胞内に取り込まれたアグリコンを HPLC によって定量することによって、確認する実験方法を検討した[49]。

次に、フラボノイド複合体の細胞への影響（毒性）を確認するため、2 つの条件で細胞毒性試験を行った。①フラボノイド複合体を短時間処理（30 分）し、その後、細胞を洗浄し再び培地に移し替えて、培地で 3 日間培養した培養細胞の細胞増殖率を測定することによって、フラボノイド複合体の短時間処理（30 分）による細胞毒性における確認する実験および、②フラボノイド複合体を添加した培地でそのまま 3 日間培養した培養細胞の細胞増殖率を測定することによって、フラボノイド複合体の長時間処理（3 日）による細胞毒性を確認するという 2 つの条件である。この実験は、先に検討した短時間処理（30 分間）でのフラボノイド複合体によるアグリコンの細胞取り込み効果のみに注目した実験ではなく、より長時間（3 日間）でのフラボノイド複合体の細胞への影響を確認するための実験である[52]。また、この実験で細胞増殖率を算出するために、コールターカウンタを用いた細胞数の測定を行った。コールターカウンタは、1953 年に、W.H.Coulter によって原理が確立された電気的検知帯法（コールター原理）による細胞などの微小粒子数を測定する装置である。その原理は、電極を取り付けたガラスチューブの先端に微小な細孔（アパーチャー）を開け、その細孔を通った細胞を電気的に感知し、細胞数として測定する。この方法は、細胞数測定一般的な方法として広く使用されている[53]。

4-3 実験方法

4-3-1 細胞培養法および継代

細胞は、チャイニーズハムスターの卵巣由来細胞である CHO-K1 を、RIKEN BRC (理化学研究所) より入手し使用した。培地は、MEM α (alpha minimum essential medium;和光純薬)に 10% fetal bovine serum (FBS ; コーニング)と 1% antibiotics and antimycotics (Gibco)を加えた培地を用い、100mm 培養皿に 10ml の上記 MEM α 培地と CHO-K1 細胞を入れ、37°C、5% CO₂ 存在下のインキュベータ内で培養した。継代は、セミコンフルエントになった CHO-K1 細胞を、PBS (-) (和光純薬)を用いて洗浄後、Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Gibco) を用いて処理を行い細胞回収したものをコールターカウンタ Z1 (Beckman Coulter Inc.) で細胞数を測定し、再び、MEM 培地 (10%FCS) に適当数入れて継代した。また、全ての実験は、指数増殖期の細胞を使用した。

4-3-2 フラボノイド複合体の細胞透過試験

100mm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁したものを準備した。24 ウェルプレートに、MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁した CHO-K1 細胞を 3×10^6 個/dish になるように入れ、1 日間培養する。培養後は、培地をアスピレータで除去し、その後 PBS(-)5ml で 2 回洗浄後する。洗浄した細胞に PBS (-) 中に DMSO (1%) で溶解したフラボノイド (50 μ l) または、フラボノイド複合体 (250 μ l) を添加し、30min インキュベータ内に置く。ここで、フラボノイド複合体 (250 μ M) に含まれるアグリコン濃度は、50 μ M であるため、それぞれのサンプルに含まれるアグリコンの濃度は等しくして試験を行っている。その後、フラボノイドをアスピレータで除去し、PBS(-) 5ml で 4 回洗浄後する。セルスクレーパー(NUNC™ 179693)で細胞を剥離し、遠心機 (1400rpm) で回収した。その後、細胞の一部を、コールターカウンタ Z1 で、細胞数を計測した。回収した細胞を、PBS(-)100 μ l で懸濁して、メタノール 500 μ l を加え、氷中で、27G シリンジ(テルモシリンジ)で、ポンピング 20 回繰り返し、細胞を破碎後、遠心機 (15,000rpm) 細胞ペレットを落とし、その上清部分を回収した。回収した細胞上清を、0.2 μ m フィルタで濾過した後、HPLC 装置 (Alliance 2695) を使用して、含まれるフラボノイドの定量を行った。

4-3-3 フラボノイド複合体の細胞毒性試験

(A) 短時間処理 (30 分)

100mm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁したものを準備し、コールターカウンタ Z1 (Beckman Coulter Inc.) で細胞数を計測した。

次に 24well プレートに MEM α 培地 (10%FCS) に 400 μ l 入れ、剥離した細胞を MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁し、24-well プレートに 40,000 個/well 入れる。CO₂ インキュベータ内で 1 日間培養した後、培地をアスピレータで除去し、その後 PBS(-)500 μ l で 2 回洗浄後する。洗浄した細胞に PBS (-) で溶解したフラボノイド (200 μ l) を添加し、30 min インキュベータ内に置く。フラボノイドをアスピレータで除去し、その後 PBS(-)500 μ l で 2 回洗浄後する。コールターカウンタ Z1 で、細胞数を計測し、24-well プレートに、5,000 個/well の CHO-K1 細胞 (200 μ l) を入れる (well 当たりの最終培地量は、600 μ l)。3 日間、インキュベータ内で細胞培養を行った後、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)で洗浄後した。洗浄した細胞はトリプシン処理で剥離し、PBS(-)に懸濁した細胞をコールターカウンタ Z1 (Beckman Coulter, Inc.) で、細胞数を計測する。得られた細胞数から、薬剤未処理の細胞数で規格化を行い、相対細胞増殖率を計算した。

$$\text{相対細胞増殖率 (Relative Cell Growth)} = \frac{\text{薬剤処理細胞の総数 (個)}}{\text{薬剤未処理細胞の総数 (個)}} \quad (\text{式 4-1})$$

(B) 長時間処理 (3 日処理)

100mm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁したものを準備し、コールターカウンタ Z1 (Beckman Coulter Inc.) で細胞数を計測した。

次に 24well プレートに MEM α 培地 (10%FCS) に 400 μ l 入れ、同じ培地に溶解した薬剤を 200 μ l 添加し、各ウェルに様々な濃度 (3 倍段階希釈) になる様に希釈したものを準備する。その際に、難水溶性フラボノイド (クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン) の添加については、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、ジメチルスルホキシドの最終濃度が、0.2% (vol/vol) になる様に添加し、希釈に用いた培地についても、同様のジメチルスルホキシド (DMSO) 濃度を加えた。また、モノグルコシルルチンおよびフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体) については、そのまま計量し、培地に直接添加した。希釈準備が出来た状態で、培地に懸濁した CHO-K1 細胞を 24well プレートに、5,000 個/well の CHO-K1 細胞

を入れる。3日間、インキュベータ内で細胞培養を行った後、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)で洗浄後した。洗浄した細胞はトリプシン処理で剥離し、PBS(-)に懸濁した細胞をコールターカウンタ Z1 (Beckman Coulter, Inc.) で、細胞数を計測する。得られた細胞数から、薬剤未処理の細胞数で規格化を行い、相対細胞増殖率を計算し、グラフソフトウェア Prism 6 (GraphPad Software, Inc.)を用いてシグモイドフィッティングによる近似曲線化した後、細胞の生存率が 0.5 となる添加濃度である 50 %阻止濃度(IC₅₀)を算出し、薬剤間での IC₅₀ を比較し、フラボノイド複合体の細胞毒性を評価した。

4-3-4 統計処理

全ての実験は、3回以上繰り返し行い、統計的有意性は、Prism 6 software (GraphPad Software, Inc.)を用いて、スチューデントの t 検定もしくは、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差検定にて確認した。また、すべてのデータにおいて、 $p < 0.05$ (#で表示) または、 $p < 0.01$ (##で表示) で統計的優位性を示し、エラーバーは、標準誤差を表す。

4-4 実験結果

4-4-1 フラボノイド複合体の細胞透過試験結果

まず、ジメチルスルホキシド (DMSO) 1%で PBS(-)に溶解したクエルセチン (50 μ M) と PBS(-)のみで溶解したクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) の比較試験結果を図4-4に示す。CHO-K1細胞 (1×10^7 個) 当たり、クエルセチン (50 μ M) 添加細胞で、7.8 nmol/ 1×10^7 個、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 添加細胞で、11.9 nmol/ 1×10^7 個のクエルセチンが細胞内に含まれていることが確認された。また、クエルセチン (50 μ M) 添加細胞に比べ、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 添加細胞の方が、含有するクエルセチンが高い結果であった。しかしながら、両サンプル間の有意差について、t検定による有意差検定を行ったが、有意差は見られなかった。

次に、ジメチルスルホキシド (DMSO) 1%で PBS(-)に溶解したヘスペレチン (50 μ M) と PBS(-)のみで溶解したヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) の比較試験結果を図4-4に示す。CHO-K1細胞 (1×10^7 個) 当たり、ヘスペレチン (50 μ M) 添加細胞で、2.1 nmol/ 1×10^7 個、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 添加細胞で、3.8 nmol/ 1×10^7 個のヘスペレチンが細胞内に含まれていることが確認された。また、ヘスペレチン (50 μ M) 添加細胞に比べ、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 添加細胞の方が、含有するヘスペレチンが高い結果であった。しかしながら、両サンプル間の有意差について、t検定による有意差検定を行ったが、有意差は見られなかった。

次に、ジメチルスルホキシド (DMSO) 1%で PBS(-)に溶解したナリンゲニン (50 μ M) と PBS(-)のみで溶解したナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) の比較試験結果を図4-4に示す。CHO-K1細胞 (1×10^7 個) 当たり、ナリンゲニン (50 μ M) 添加細胞で、3.5 nmol/ 1×10^7 個、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 添加細胞で、5.9 nmol/ 1×10^7 個のナリンゲニンが細胞内に含まれていることが確認された。また、ナリンゲニン (50 μ M) 添加細胞に比べ、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 添加細胞の方が、含有するナリンゲニンが高い結果であった。しかしながら、両サンプル間の有意差について、t検定による有意差検定を行ったが、有意差は見られなかった。

最後に、3種類のフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体) 間によるアグリコンの取り込み効率およびモノグルコシルルチン (250 μ M) 単独投与について比較を行った。モノグルコシルルチン (250 μ M) 単独投与に関しては、

今回の試験条件では、検出することが出来なかった。同様に、フラボノイド複合体に含まれるモノグルコシルルチン (200 μ M) についても、検出できなかった。また、フラボノイド複合体における難水溶性フラボノイドの取り込み効率に関しては、クエルセチン>ナリンゲニン>ヘスペレチンの順番であった。一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差検定を行った所、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) とヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M)、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 間には、有意差 (##) が見られるが、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) とナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (250 μ M) 間には、有意差は見られなかった。

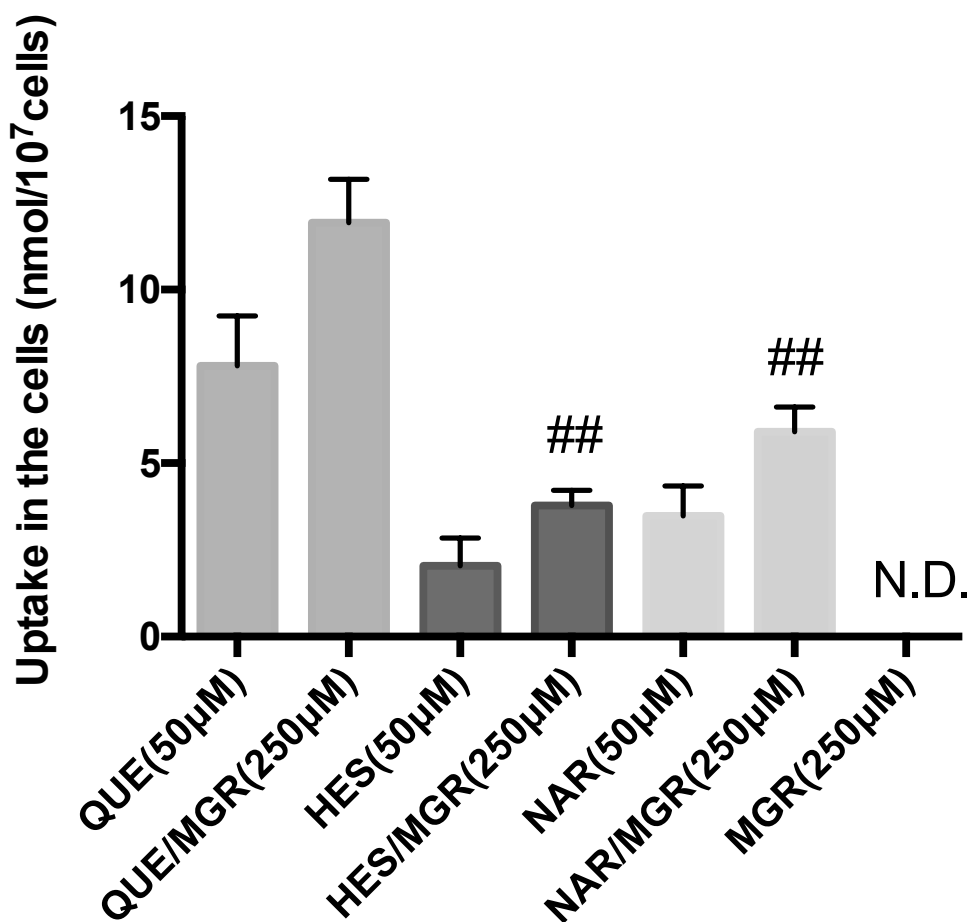


図4-2 フラボノイド複合体の細胞透過試験結果

4-4-2 フラボノイド複合体の細胞毒性評価結果（30 分間処理）

モノグルコシルルチンおよび3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）による短時間（30 分）処理における細胞毒性試験結果を図4-2に示す。モノグルコシルルチンは、今回検討した 250 μ M~5.0mM の範囲で、細胞増殖率の低下が見られなかった。また、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体については、1.25mM（クエルセチン 250 μ M、モノグルコシルルチン 1.0mM）から、一元配置分散分析（One-Way ANOVA）による有意差検定を行った所、有意（#）な細胞増殖率の低下が見られた。ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体については、5.0mM（ヘスペレチン 1.0mM、モノグルコシルルチン 4.0mM）から、有意（##）な細胞増殖率の低下がみられた。ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体についても、5.0mM（ナリンゲニン 1.0mM、モノグルコシルルチン 4.0mM）から、有意（##）な細胞増殖率の低下がみられた。

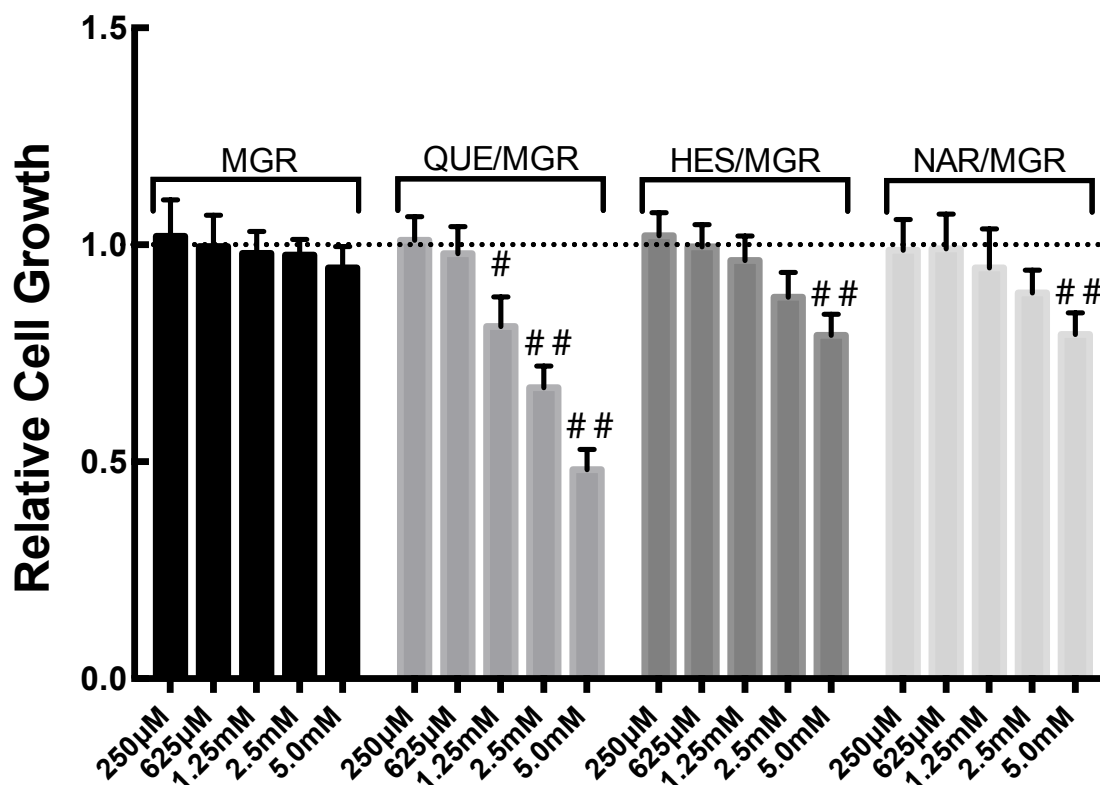


図4-3 フラボノイド複合体の細胞毒性評価結果（30 分間処理）

4-4-3 フラボノイド複合体の細胞毒性評価結果 (3日間処理)

① 難水溶性フラボノイドおよび糖転移フラボノイド

ジメチルスルホキシド(DMSO)0.2%によって可溶化した難水溶性フラボノイド(クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン) および糖転移フラボノイド(モノグルコシルルチン)の単独添加による試験結果を図4-3に示す。各フラボノイド単独での50%阻害濃度(IC₅₀)を比較すると、クエルセチン(IC₅₀=13.4 μM)、ヘスペレチン(IC₅₀=135 μM)、ナリンゲニン(IC₅₀=138 μM)に対して、モノグルコシルルチン(IC₅₀=703 μM)となり、難水溶性フラボノイドの中では、クエルセチンのIC₅₀が最も低く、細胞毒性が高いことを示している。また、ヘスペレチンおよびナリンゲニンは、細胞毒性の差は、見られなかった。また、モノグルコシルルチンは、他の難水溶性フラボノイド(クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン)に比べ、細胞毒性が大幅に低減していた。

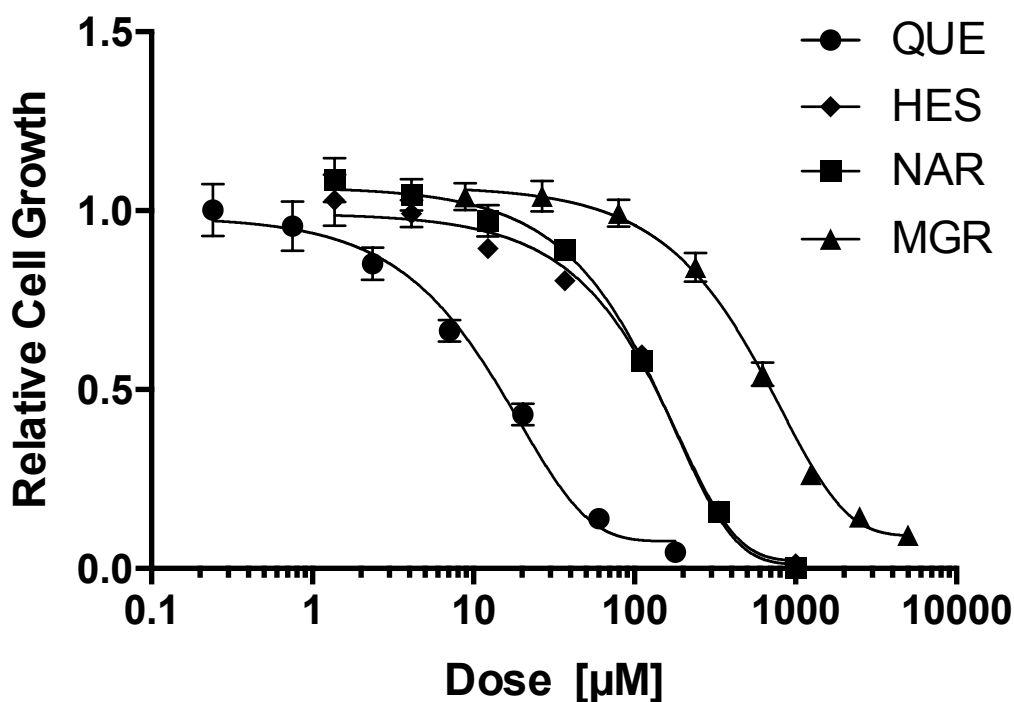


図4-4 難水溶性フラボノイドおよび糖転移フラボノイド比較

② クエルセチンとクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体

ジメチルスルホキシド (DMSO) 0.2%によって可溶化したクエルセチンとクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体の比較試験結果を図4-4に示す。それぞれの50%阻害濃度 (IC₅₀) を比較すると、クエルセチン (IC₅₀= 13.4 μM) に対して、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 (含有するクセルセチンに対して、IC₅₀= 14.5 μM) となり、ジメチルスルホキシド (DMSO) によって可溶化し単独添加したクエルセチンと、モノグルコシルルチンによって可溶化したクエルセチンは、その可溶化剤の種類に依存せずに共にほぼ同じ IC₅₀を示した。

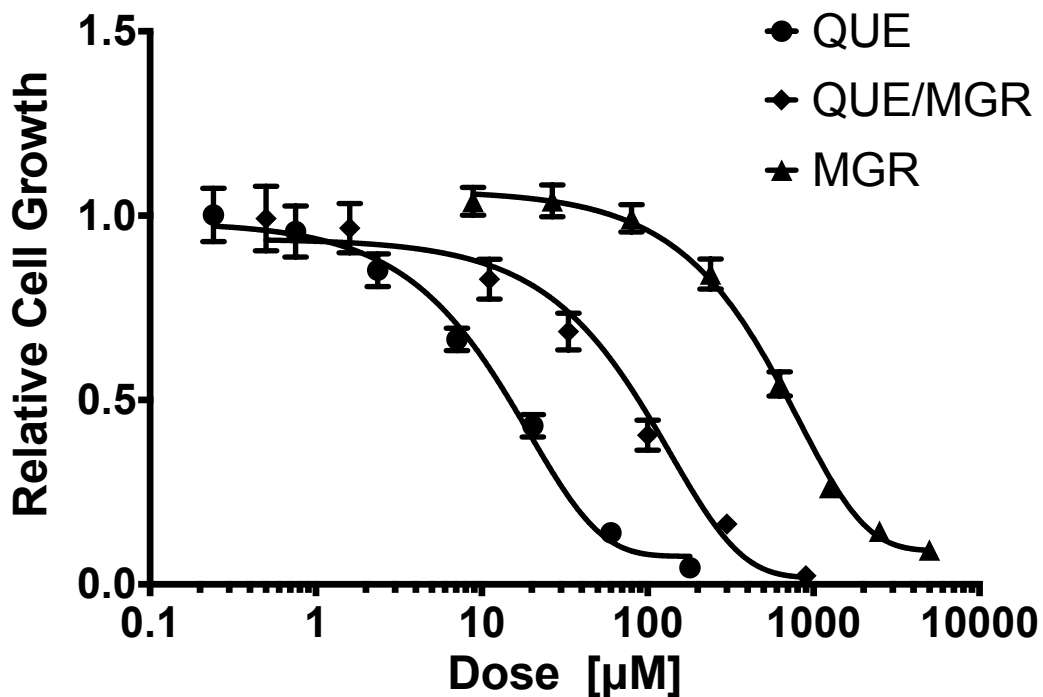


図4-5 クエルセチンとクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体比較

③ ヘスペレチンとヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体

ジメチルスルホキシド (DMSO) 0.2%によって可溶化したヘスペレチンとヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体の比較試験結果を図4-6に示す。それぞれの50%阻害濃度 (IC₅₀) を比較すると、ヘスペレチン (IC₅₀= 135 μM) に対して、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 (含有するヘスペレチンに対して、IC₅₀= 59 μM) となり、ジメチルスルホキシドによって可溶化したヘスペレチンと、モノグルコシルルチンによって可溶化したヘスペレチンでは、モノグルコシルルチンで可溶化したヘスペレチンの方が、IC₅₀が低下する結果となった。

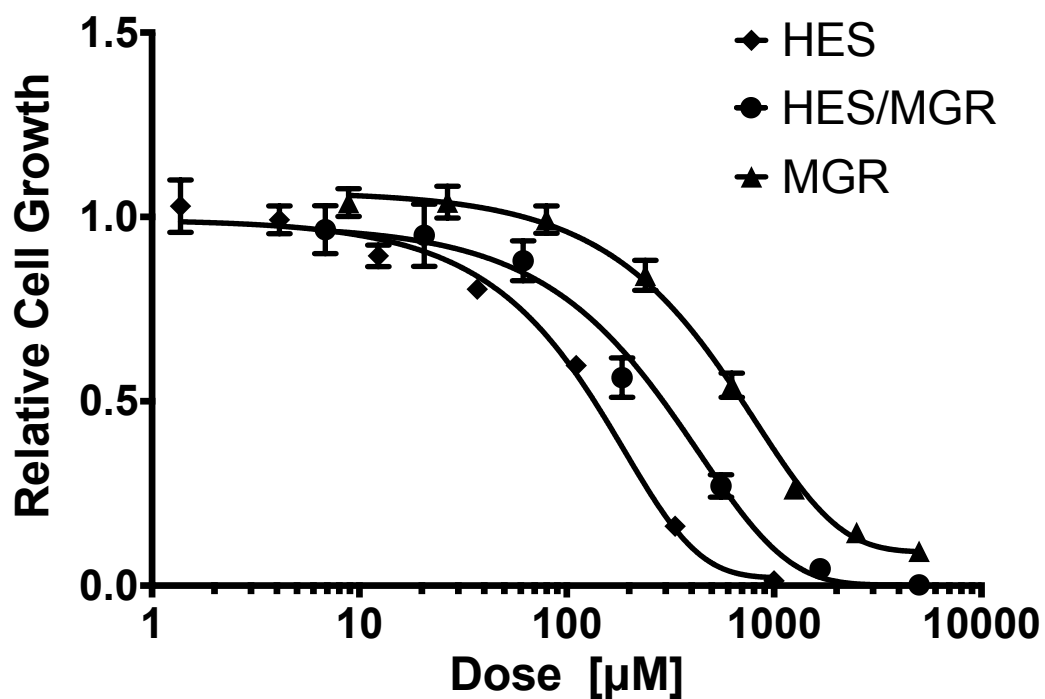


図4-6 ヘスペレチンとヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体比較

④ ナリンゲニンとナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体

ジメチルスルホキシド (DMSO) 0.2%によって可溶化したナリンゲニンとナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体の比較試験結果を図4-7に示す。それぞれの50%阻害濃度 (IC₅₀) を比較すると、ナリンゲニン (IC₅₀= 138 μM) に対して、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 (含有するナリンゲニンに対して、IC₅₀= 61 μM) となり、ジメチルスルホキシドによって可溶化したナリンゲニンと、モノグルコシルルチンによって可溶化したナリンゲニンでは、ヘスペレチンと同様に、モノグルコシルルチンで可溶化したナリンゲニンの方が、IC₅₀が低下する結果となった。

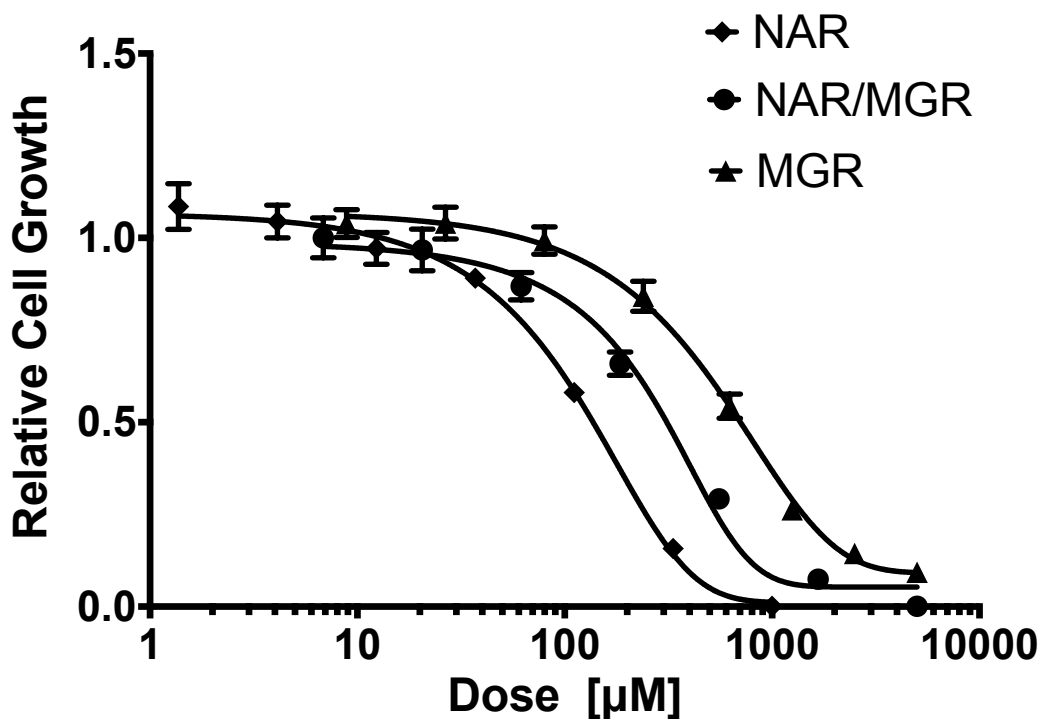


図4-7 ナリンゲニンとナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体比較

4-5 考察

本章では、本研究の目的の一つである 3 種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）による難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）の細胞取り込み効果とその細胞毒性について細胞試験を用いて確認することを実施した。

まず、CHO-K1 細胞への短時間処理（添加 30 分後）でのフラボノイド複合体の細胞取り込み効果を、フラボノイドを取り込んだ細胞を破碎し、メタノールで抽出したものを HPLC 装置で分析を行い確認した。その結果、フラボノイド複合体による難水溶性フラボノイドの細胞取り込み効果と、ジメチルスルホキシド（DMSO）1%で可溶化し単独添加した難水溶性フラボノイドの細胞取り込み効果が、同様程度の効果を有していることが確認された。この試験結果から、3つの知見を得ることが出来た。一つは、フラボノイド複合体によって、可溶化された難水溶性フラボノイドの細胞内への取り込みが確認されたこと、二つに、フラボノイド複合体に含まれるモノグルコシルルチンと有機溶剤であるジメチルスルホキシド（DMSO）の両者の可溶化および細胞膜透過のメカニズムが異なるにも関わらず、同程度の効率で細胞取り込み効果が得られていること、三つにモノグルコシルルチンが、本実験の様な短時間（添加 30 分間）では、細胞内に取り込まれないという知見である。特に、細胞膜透過において、ジメチルスルホキシド（DMSO）の場合は、ジメチルスルホキシド（DMSO）が細胞膜に細孔を形成することで難水溶性物質を細胞内に取り込み易くすると考えられているが、モノグルコシルルチンの場合は、今回の実験結果からも細胞内へ透過しておらず、その分子量の大きさや配糖化による水溶性向上による細胞膜への直接的な結合は考えにくく、ジメチルスルホキシド（DMSO）の透過メカニズムとは異なる別の透過メカニズムを有していることが推測される。このモノグルコシルルチンと細胞膜の相互作用については、本研究の目的である難水溶性フラボノイドの取り込み効果についてだけではなく、モノグルコシルルチン自身の細胞への機能性に関わる課題であり、その詳細な検討が望まれる。

次に、細胞への短時間処理（添加 30 分間）による細胞毒性試験の結果から、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体においては、1.25mM から既に細胞増殖率が低下しており、他のヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体とナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体の 5.0mM と比較しても、明らかにクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体即ち、細胞内に取り込まれたクエルセチンの細胞毒性が高いことが分かる。また、モノグルコシルルチン単独添加では、5.0mM においても細胞毒性を示さなかったことは、上記の細胞取り込み試験でモノグルコシルルチンが細胞内に検出されなかった

結果と相関が取れている。

次に、細胞への長時間処理（添加 3 日間）による細胞毒性試験の結果から、細胞毒性が高いクエルセチンを含有したクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体においては、ジメチルスルホキシド（DMSO）1%で可溶化したクエルセチン単独添加と含有するクエルセチンで比較するとほぼ同じ IC₅₀ を示したが、細胞毒性の低いヘスペレチンやナリングениンを含有したヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体とナリングениン/モノグルコシルルチン複合体に関しては、それぞれヘスペレチンおよびナリングениンを単独添加の場合に比べて、少ないアグリコン量で、細胞毒性が確認された。このことは、フラボノイド複合体に含有するモノグルコシルルチンの細胞への影響が関与していると考えられる。短時間処理での細胞取り込み効果試験においては、難水溶性フラボノイド何れにおいても、ジメチルスルホキシド（DMSO）およびモノグルコシルルチンによる細胞取り込み効果に大きな差が見られなかったことから、モノグルコシルルチンによって、ヘスペレチンおよびナリングениンの細胞取り込み効率が向上したというよりは、ヘスペレチンおよびナリングениンとモノグルコシルルチンとの組み合わせによる相乗効果による影響であると考えている。このことは、フラボノイド複合体の設計において、モノグルコシルルチンを単なる可溶化剤として考えるのではなく、難水溶性フラボノイドとの組み合わせも考慮することが重要となり、その組み合わせによっては、それぞれ単独添加とは異なる生物活性をフラボノイド複合体で作り出すことが可能となることを示している。このことは、既に報告されているマウス経口摂取試験におけるモノグルコシルルチンによる難水溶性物質の生体吸収効率の改善効果[28, 31]と合わせて、モノグルコシルルチンなどの糖転移フラボノイドをドラッグデリバリーシステム（DDS）の様な役割として利用することが期待できることを示している。

第5章 フラボノイド複合体の放射線生物実験

5-1 背景

本章では、細胞試験を実施して、放射線防護剤としてフラボノイド複合体を活用する可能性を検討した。放射線生物学におけるフラボノイド利用の検討は、近年、放射線治療発展と共に、より安全で長期摂取に適した薬剤としての期待から積極的に進められている。

まず、放射線の細胞への影響についてであるが、大きく分けて直接作用と間接作用の2種類が存在する[54]。直接作用は、放射線が直接細胞核やミトコンドリア内のDNAが一本鎖切断(single strand break; SSB)もしくは、二本鎖切断(double strand break; DSB)し、細胞傷害が起こる。間接作用は、細胞内外の酸素や水分子が放射線によって活性酸素種(Reactive Oxygen Spices; ROS)が発生し、この活性酸素種(ROS)が引き金となり、細胞傷害を引き起こす(図5-1)[55]。特に低LETや低線量の放射線照射による細胞傷害については、およそ70%が、この間接作用により誘発された活性酸素種(ROS)の影響だとされている[56]。

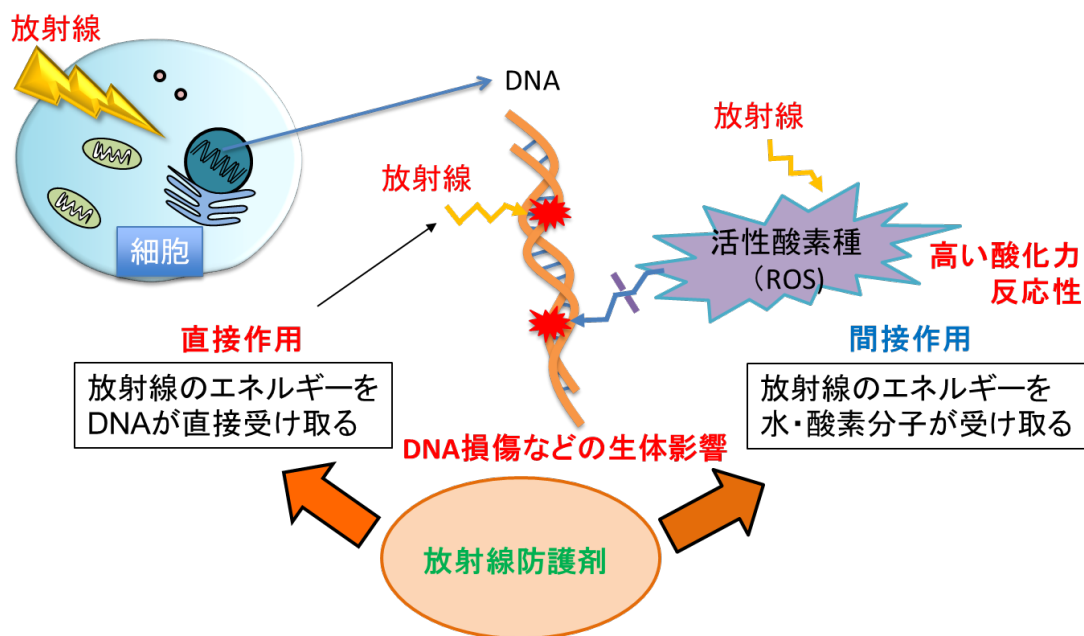


図5-1 放射線による直接作用および間接作用

次に、放射線による細胞への間接作用に重要な役割を果たす活性酸素種（ROS）の発生メカニズムを図5-2に示す[57]。活性酸素種（ROS）と呼ばれるものは、一重項酸素（ $^1\text{O}_2$ ）、スーパーオキシドアニオンラジカル（ $\cdot\text{O}_2^-$ ）、過酸化水素（ H_2O_2 ）、ヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）の4種類が存在する[58]。特にヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）は反応性が高く、活性酸素種（ROS）の中でも最も危険なラジカルと言われており、多くの放射線防護剤は、このヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）の消去活性が高いものがより望まれる[59, 60]。

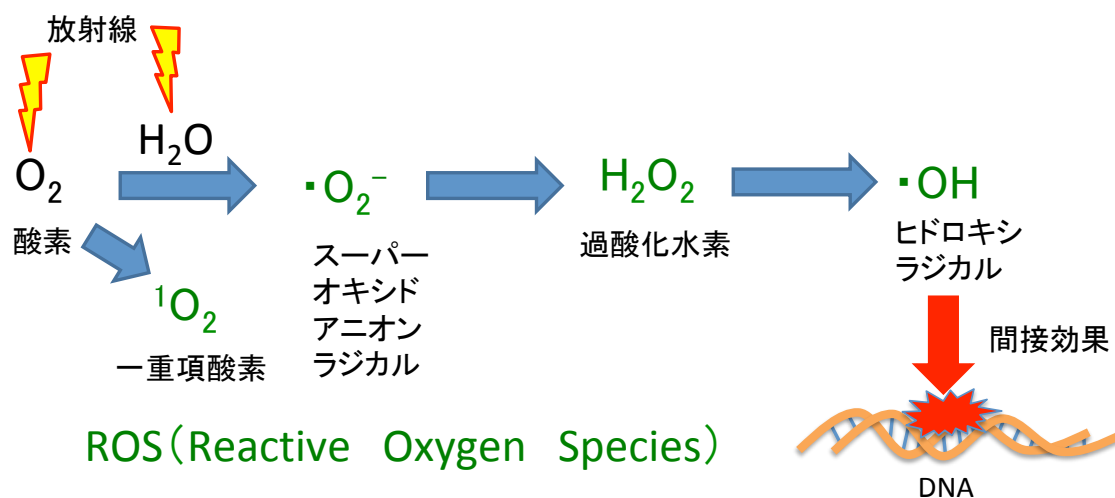


図5-2 放射線による活性酸素種（ROS）の発生メカニズム

また、活性酸素種（ROS）は細胞内シグナル分子としての機能も有しており、細胞が外的要因（例えば、放射線）によって大きく影響を及ぼす状態が生じた場合に、その状態を細胞内器官に伝える働きがある。活性酸素種（ROS）がシグナル分子として働く場合として、細胞の増殖抑制や、アポトーシスの誘導などが挙げられる[61-63]。

また、細胞内 ROS のレベルが上昇した場合、その上昇を緩和するように働く物質が細胞内に複数存在し、活性酸素種（ROS）による酸化作用と細胞内の抗酸化物質による抗酸化作用で細胞内レドックスのバランスをとっている[64-66]。

この細胞内 ROS の制御のために細胞内に存在する抗酸化物質は、主にタンパク質や酵素で構成されている。グルタチオン (Glutathione-SH; GSH) は、細胞内に含まれ、抗酸化作用を示すトリペプチドで、過酸化水素（ H_2O_2 ）を H_2O へ変換することで無害化する働きをもつ。また、カタラーゼやチオレドキシニンも、グルタチオン同様、過酸化水素（ H_2O_2 ）を H_2O へ変換することで無害化する働きをもつ抗酸化作用を示す酵素や補酵素である[67, 68]。さらに、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase ; SOD) は、スーパーオキシドアニオンラジカル（ $\cdot\text{O}_2^-$ ）と反応して H_2O_2

を生成する働きをもつ酸化還元酵素であり、活性中心に金属イオンを持っている。銅イオンが結合した CuSOD や亜鉛イオンが結合した ZnSOD は細胞質内に、また、マンガンイオンと結合した MnSOD はミトコンドリア内に多く局在している[69]。通常は、これら細胞内の抗酸化物質によって、外部要因によって、生じた活性酸素種 (ROS) に上昇も、正常な状態となり、細胞内レドックスのバランスは保たれている。

しかしながら、先に述べた外部からの要因によって、過度な活性酸素種 (ROS) が細胞内に発生すると細胞内レドックスのバランスが崩れ、DNA 損傷、タンパク質の酸化や、DNA タンパク質クロスリンク損傷などが生じ、細胞傷害を引き起こす。放射線照射においては、DNA 損傷が主な細胞傷害として挙げられるが、それ以外に、細胞内レドックスを調整するタンパク質や酵素が、活性酸素種 (ROS) によって酸化やカルボニル化され不活化することで、細胞内レドックスが調整できない状態になることも、放射線による細胞損傷の重要な点として挙げられる。このことは、それらを緩和する放射線防護剤や促進する増感剤の開発においても重要な課題と言える。

また、放射線照射による細胞内 ROS の上昇は、二段階の局面が存在する。第一段階で、放射線照射直後に、細胞内の水分子や酸素が照射されたことによって生じる活性酸素種 (ROS) によって、細胞内 ROS レベルが上昇する。第二段階は、細胞内のミトコンドリアが放射線によって障害を受け発生する活性酸素種 (ROS) による上昇である[70, 71]。ミトコンドリアは、細胞が生命活動するためのエネルギーである ATP を生み出す、重要な器官であるが、一方で、呼吸による活性酸素種 (ROS) の発生源でもある。そのミトコンドリアが、放射線によって損傷を受けると、ミトコンドリアがさらに過度の活性酸素種 (ROS) を発生させ、結果として、アポトーシスによる細胞死を引き起こすことが報告されている。このミトコンドリア異常によるアポトーシスのシグナリング機構として、まず、抗酸化タンパクであり、p53 と結合して転写活性を調整する核内レセプターと DNA との結合やアポトーシスを制御するチオレドキシシン 1 (TRX1) とよばれるタンパク質が酸化される。次に、チオレドキシシン 1 の酸化を受けて、アポトーシス誘導の初期マーカーとして機能するアポトーシスシグナル調節キナーゼ (ASK1) とチオレドキシシン 1 との結合が妨げられる。この分離によって、ASK1 が自己リン酸化されることで活性化されアポトーシスが誘導される (図 5-3)。こういったアポトーシスが起こる一連の経路を c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) 経路と呼ぶが、この経路において、損傷を受けたミトコンドリアから発生するスーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot O_2^-$) によってチオレドキシシン 1 が酸化されることでアポトーシスが起こる[72, 73]。このような損傷を受けたミトコンドリアに由来する活性酸素種 (ROS) の増加は、細胞の種類によって異なるが、損傷を受けて数日後に見られることが多い[74]。

この様に、細胞における放射線の影響を確認する上で、細胞内 ROS の変化を観測することは、非常に有効な手段であることが分かる。

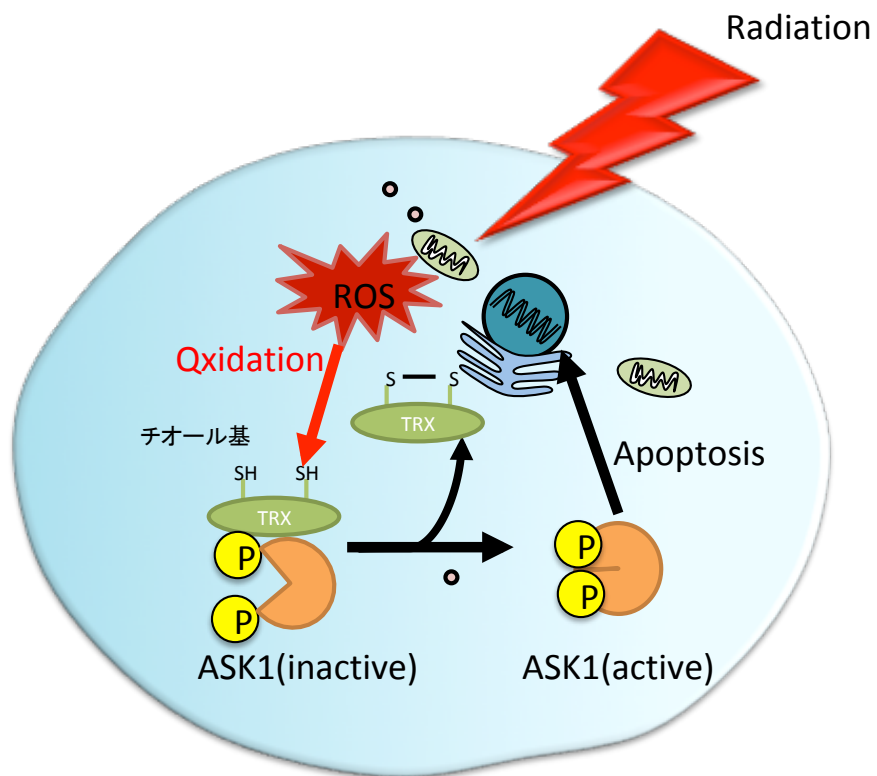


図 5-3 TRX1 による ASK 1 の活性制御[73]

5-2 実験概要

フラボノイド複合体の放射線照射細胞への影響を三つの実験を行うことで確認を行った。一つ目の実験は、フラボノイド複合体による細胞内 ROS 消去試験である。この実験で、使用した活性酸素種 (ROS) 測定用試薬 (H_2DCFDA) は、細胞内 ROS を測定するために開発された蛍光プローブである。これら蛍光プローブは、細胞内に蛍光プローブを効率良く取り込ませる工夫として、親水性の蛍光プローブに親油性を向上させる置換基を導入することで細胞膜透過性を高め、その後、細胞内で置換基部分を除去することで細胞内にとどまるように工夫されている。具体的には、蛍光プローブの親水性を示すカルボキシル基やヒドロキシル基に対して、アセチル基やアセトキシメチル基を導入する。これら置換基を導入することで蛍光プローブの親油性を高め、細胞内へ効率的に蛍光プローブを導入することができる。その後、細胞内に導入された蛍光プローブは、親油性を向上させるために導入した置換基が、細胞内のエステラーゼによって切断され、元の親水性蛍光プローブに戻り、細胞内に留まり易い構造に変化する。この状態で、細胞内に存在する活性酸素種 (ROS) と反応することによって蛍光プローブ (H_2DCF) が酸化されて蛍光性を持つ DCF へ変換される (図 5-4)。この状態で、DCF の励起光を照射すると、DCF が存在する細胞は、励起状態に遷移し、再び基底状態に戻る際に蛍光を発する。この蛍光強度を測定することによって、細胞内 ROS レベルを観測することができる [75, 76]。

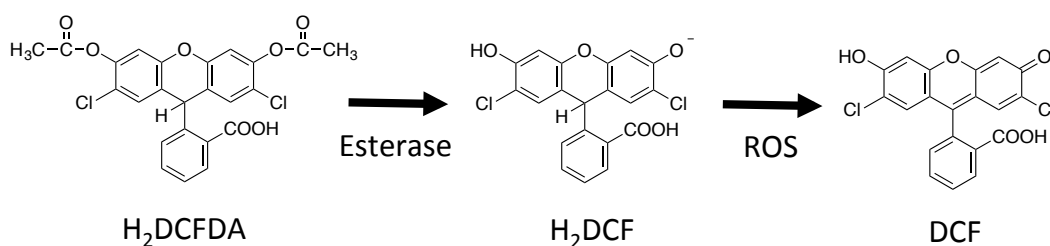


図 5-4 H_2DCFDA の蛍光発生メカニズム

二つ目の実験は、前章で使用したコールターカウンタを用いた放射線照射後の細胞増殖率についての評価、最後に、コロニーアッセイ法を用いた放射線照射後の細胞生存率についての評価を行うことによって、フラボノイド複合体の放射線感受性を評価した。このコロニーアッセイ法は、細胞に対する放射線の影響を生存率の観点で評価するときの最も代表的な手法である。1956年に Puck と Marcus によって、哺乳動物単細胞がコロニー形成能力を示したと報告されて以来、様々な培養細胞によってこの実験手法が確立され、正常細胞、がん細胞などにおける薬剤の効能や放射線感受性などの評価に利用

されている[77, 78]。本研究においても、この手法を用いて、フラボノイド複合体の放射線防護を評価した。

5-3 実験方法

5-3-1 細胞培養および放射線照射の照射条件

細胞は、前章と同様にチャイニーズハムスターの卵巣由来細胞である CHO-K1 を、RIKEN BRC (理化学研究所) より入手し使用した。培地は、MEM α (alpha minimum essential medium;和光純薬)に 10% fetal bovine serum (FBS ; コーニング)と 1% antibiotics and antimycotics (Gibco)を加えた培地を用い、100mm 培養皿に 10ml の上記 MEM α 培地と CHO-K1 細胞を入れ、37°C、5% CO₂ 存在下のインキュベータ内で培養した。継代は、セミコンフルエントになった CHO-K1 細胞を、PBS (-) (和光純薬)を用いて洗浄後、Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Gibco)を用いて処理を行い、細胞回収したものを再び上記培地に適当数入れて継代した。また、全ての実験は、指数増殖期の細胞を使用した。また、放射線照射は、X 線照射装置 TITAN 320(200 kV, 20 mA, 島津製作所)を室温中で使用した。また、照射線量率は、1Gy/min であった。

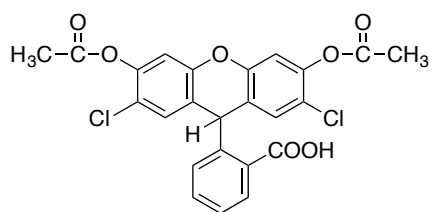
5-3-2 細胞内 ROS (過酸化水素) のフラボノイド複合体による消去試験

100mm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁したものを準備した。24 ウェルプレートに、MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁した CHO-K1 細胞を 80,000 個/ウェルになるように入れ、1 日間培養する。培養後は、培地をアスピレータで除去し、MEM α 培地 (10%FCS) で溶解した薬剤 (フラボノイド) を各 well に 200 μ l 添加する。その際に、難水溶性フラボノイド (クエルセチン、ヘスペレチン、ナリングニン) の添加については、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させ、ジメチルスルホキシドの最終濃度が、0.5% (vol/vol) になる様に希釈して添加し、また、モノグルコシルルチンおよびフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体) については、PBS(-)に溶解したものを希釈して培地に添加した。30 分間インキュベータ内で保管した後、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)に溶解した活性酸素種 (ROS) 測定用試薬 (H₂DCFDA、10 μ M) を各 well に 200 μ l 添添加する。10 分間インキュベータ内で保管した後、再び PBS(-)をアスピレータで除去し、MEM α 培地で希釈した過酸化水素 (H₂O₂、25mM) を各 well に 200 μ l 添加する。暗所で 15 分間保管した後、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M5、Molecular Devices、CA、USA) を利用し

て、細胞内の DCF 蛍光強度（励起波長 485nm、蛍光波長 538 nm）を測定した。得られた DCF 蛍光強度は、放射線未照射の細胞における DCF 蛍光強度で規格化を行い、ROS 活性能として計算をした（式 5-1）。

$$\text{相対 ROS 活性 (Relative ROS activity)} = \frac{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 処理細胞の蛍光強度 (RFU)}}{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ 未処理細胞の蛍光強度 (RFU)}} \quad (\text{式 5-1})$$

また、活性酸素種 (ROS) 測定用試薬 (H₂DCFDA ; 分子量 486.03) は、Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.)より購入した。



H₂DCFDA

図 5-5 H₂DCFDA の分子構造式

5-3-3 細胞内 ROS (放射線) のフラボノイド複合体による消去試験

100mm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁したものを準備した。24-well プレートに、懸濁した CHO-K1 細胞を 40,000 個/well になるように入れ、インキュベータ内で 1 日間培養する。培養後は、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)で細胞を洗浄後、照射直後に測定するサンプルについては、PBS(-)に溶解した薬剤 (250 μ M) と活性酸素種 (ROS) 測定用試薬 (H₂DCFDA、10 μ M) を同時に加えたものを各 well に 200 μ l 添加する。また、照射当日以降の測定サンプルについては、照射時に、PBS(-)中に薬剤 (250 μ M) のみとして、ROS 測定用試薬 (H₂DCFDA、10 μ M) を抜いたものを well に添加する。インキュベータ内で 30 分間保管した後、X 線照射装置にて 4Gy の X 線を照射した。照射直後に測定するサンプルについては、照射 30 分後、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M5、Molecular Devices、CA、USA) を利用して、細胞内の DCF 蛍光強度（励起波長 485nm、蛍光波長 538 nm）を測定した。得られた DCF 蛍光強度は、放射線未照射の細胞における DCF 蛍光強度で規格化を行い、活性酸素種 (ROS)

活性能として計算をした（式 5-2）。

$$\text{相対 ROS 活性 (Relative ROS activity)} = \frac{\text{放射線照射細胞の蛍光強度 (RFU)}}{\text{放射線未照射細胞の蛍光強度 (RFU)}} \quad (\text{式 5-2})$$

5-3-4 放射線照射における細胞増殖率試験

100mm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地（10%FCS）に懸濁したものを準備した。24-well プレートに、懸濁した CHO-K1 細胞を 40,000 個/well になるように入れ、インキュベータ内で 1 日間培養する。培養後は、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)で細胞を洗浄後、PBS(-)溶解に溶解した薬剤（250 μ M）を各 well に 200 μ l 添加する。インキュベータ内に 30 分間置いた後、X 線照射装置にて、4Gy の X 線照射を照射した。照射後は、PBS(-)をアスピレータで除去し、PBS(-)で洗浄後、細胞をトリプシン処理で剥離し、MEM α 培地（10%FCS）培地に懸濁した細胞をコールターカウンタ Z1 で、細胞数を計測する。細胞懸濁液を 24-well プレートに、20,000 個/well 入れる。3 日間、培養した後、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)で洗浄した細胞をトリプシン/EDTA(0.25w/v%)処理（100 μ l で 5 分間）処理で剥離し、再び PBS(-)に懸濁した細胞をコールターカウンタ Z1 で、細胞数を計測した。得られた細胞数から、薬剤未処理の細胞数で規格化を行い、細胞増殖率を計算した。（式 5-3）

$$\text{相対細胞増殖率 (Relative Cell Growth)} = \frac{\text{放射線照射細胞の総数 (個)}}{\text{放射線未照射細胞の総数 (個)}} \quad (\text{式 5-3})$$

5-3-5 コロニーアッセイ法による細胞生存率試験

10cm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地（10%FCS）に懸濁したものを準備した。24-well プレートに、懸濁した CHO-K1 細胞を 40,000 個/well になるように入れ、インキュベータ内で 1 日間培養する。培養後は、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)で細胞を洗浄後、PBS(-)溶解に溶解した薬剤（250 μ M）を各 well に 200 μ l 添加する。薬剤（250 μ M）処理した CHO 細胞に X 線照射装置を使用して、0、2、4、6、8Gy の X 線を照射した。照射後、薬剤入りの PBS(-)をアスピレータで除去し、PBS(-)で洗浄後、細胞をトリプシン/EDTA(0.25w/v%)処理（100 μ l で 5min）で剥離し、MEM α 培地（10%FCS）に懸濁した細胞についてコールターカウンタ Z1 で、細胞数を計測する。細胞懸濁液を

10cm ディッシュに、200 個/well (0Gy) , 500 個/well (2Gy) , 1000 個/well (4Gy) , 2000 個/well (6Gy)、4000 個/well (8Gy) になる様に入れる (ディッシュ当たりの培地量は、7ml)。10 日間培養した後、培地をアスピレータで除去し、PBS(-)で洗浄し、エタノール (100%) で、細胞を固定する。その後、クリスタルバイオレット染色液にて細胞染色後、水洗し、乾燥させる。乾燥後の培養皿上のコロニー数 (コロニー当たり 50 個以上) を目視で計測した後、放射線未照射 (0Gy) のコロニー数で規格化を行い、細胞生存率 (Survival Fraction) を計算する (式 5-4)。

$$\text{細胞生存率 (Survival Fraction)} = \frac{\text{放射線照射細胞のコロニー総数(個)}}{\text{放射線未照射細胞のコロニー総数 (個)}} \quad (\text{式 5-4})$$

5-3-6 統計処理

全ての実験は、3 回以上繰り返し行い、統計的有意性は、Prism 6 software (GraphPad Software, Inc.)を用いて、スチューデントの t 検定もしくは、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差検定にて確認した。また、すべてのデータにおいて、 $p < 0.05$ (*、#で表示) または、 $p < 0.01$ (**、##で表示) で統計的優位性を示し、エラーバーは、標準誤差を表す。

5-4 実験結果

5-4-1 細胞内 ROS (過酸化水素) のフラボノイド複合体による消去試験結果

(A) クエルセチンとクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体の比較

クエルセチンとクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体の比較試験結果を図 5-6 に示す。過酸化水素 (H_2O_2) 未処理の細胞内 ROS をコントロールとして、過酸化水素処理した細胞は、細胞内 ROS が 3.51 倍上昇した。さらに、過酸化水素 (H_2O_2) 処理した細胞において、薬剤未添加の細胞 (コントロール) に対して、クエルセチンおよびモノグルコシルルチンを添加した細胞は、t 検定による有意差 (**、*) が見られる細胞内 ROS の低減効果を示した。また、ジメチルスルホキシド (DMSO) で可溶化し単独添加したクエルセチンとクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体との結果を比較すると、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体の方が、同じクエルセチン濃度において細胞内 ROS の低減効果が高かった。さらに、モノグルコシルルチン ($200 \mu\text{M}$) とクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体 ($250 \mu\text{M}$) における結果について t 検定による比較をすると、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体の方が有意 (#) に細胞内 ROS の低減効果があった。

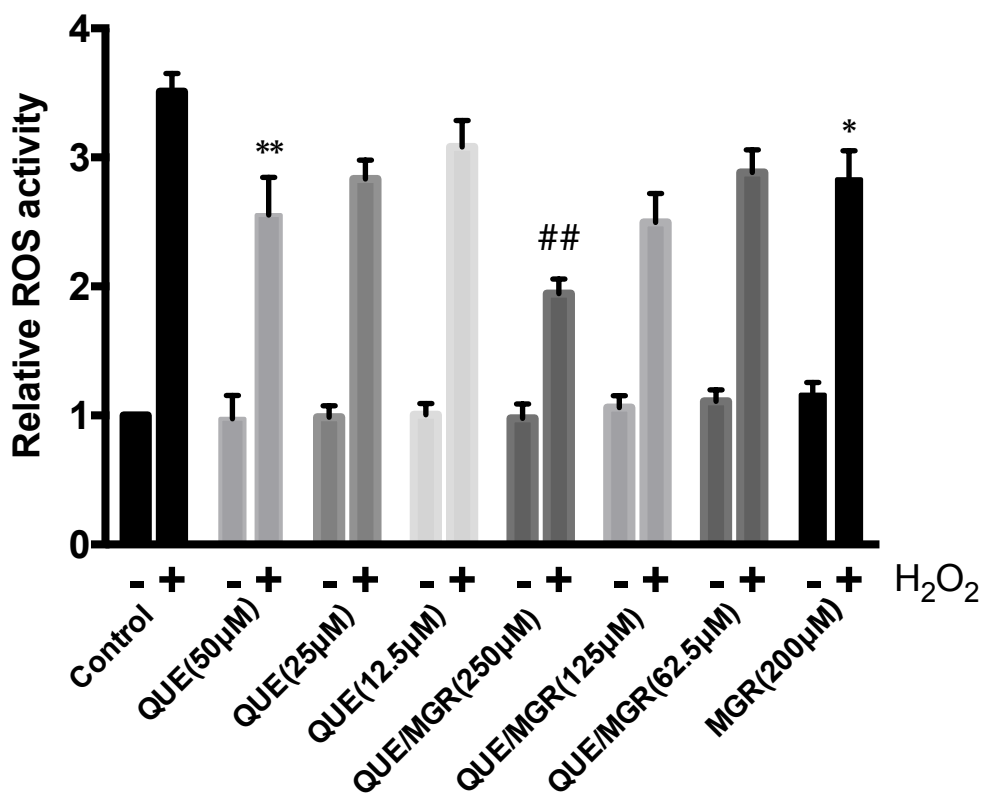


図 5-6 クエルセチンとクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体の比較

(B) ヘスペレチンとヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体における比較

ヘスペレチンとヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体の比較試験結果を図5-7に示す。過酸化水素 (H_2O_2) 未処理の細胞内 ROS をコントロールとして、過酸化水素 (H_2O_2) 処理した細胞は、細胞内 ROS が 3.51 倍上昇した。さらに、過酸化水素 (H_2O_2) 処理した細胞において、薬剤未添加の細胞 (コントロール) に対して、モノグルコシルルチンを添加した細胞については、t 検定による有意差 (*) が見られる細胞内 ROS の低減効果は見られたが、ジメチルスルホキシド (DMSO) で可溶化し単独添加したヘスペレチン ($50 \mu M$) については、t 検定による有意差が見られる細胞内 ROS の低減効果は見られなかった。一方、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体を添加した細胞は、細胞内 ROS の低減効果は見られ、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体 ($250 \mu M$) において、薬剤未添加の細胞 (コントロール) およびモノグルコシルルチン ($200 \mu M$) に対して、何れも t 検定による有意差 (**、#) が見られる細胞内 ROS の低減効果を示した。

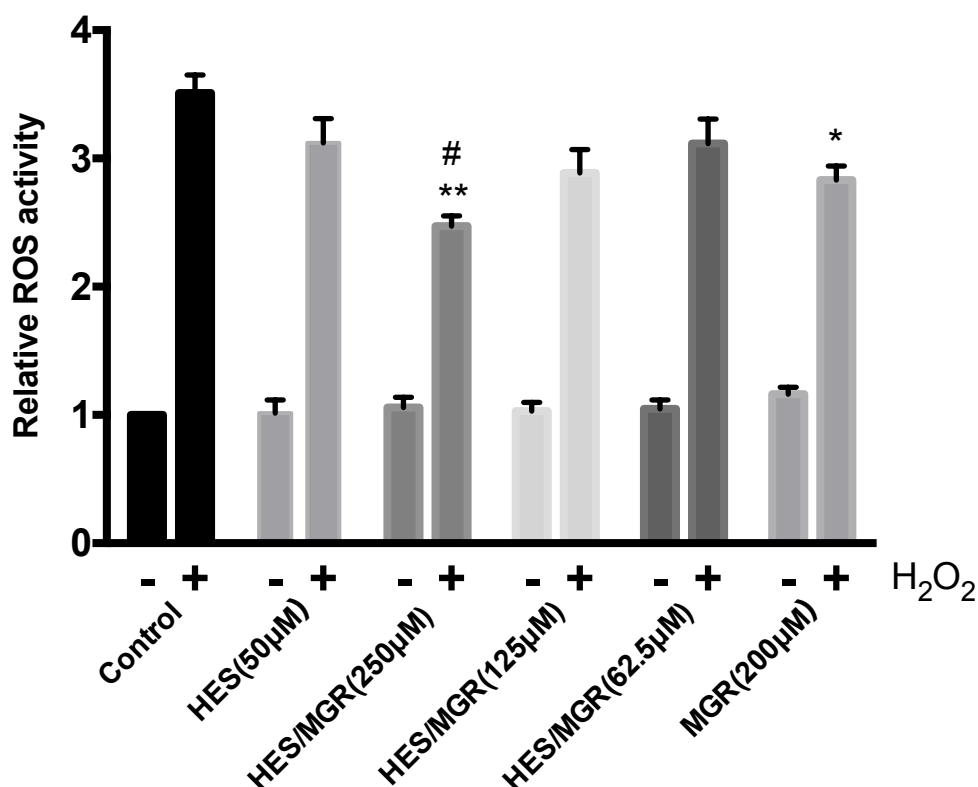


図5-7 ヘスペレチンとヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体における比較

(C) ナリンゲニンとナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体における比較

ナリンゲニンとナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体の比較試験結果を図5-8に示す。過酸化水素 (H_2O_2) 未処理の細胞内 ROS をコントロールとして、過酸化水素 (H_2O_2) 処理した細胞は、細胞内 ROS が 3.51 倍上昇した。さらに、過酸化水素 (H_2O_2) 処理した細胞において、薬剤未添加の細胞 (コントロール) に対して、モノグルコシルルチンを添加した細胞については、t 検定による有意差 (*) が見られる細胞内 ROS の低減効果は見られたが、ジメチルスルホキシド (DMSO) で可溶化し単独添加したナリンゲニン ($50 \mu M$) では、細胞内 ROS 低減効果は見られなかった (有意差なし) が、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体を添加した細胞では、細胞内 ROS の低減効果を示し、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体 ($250 \mu M$) においては、薬剤未添加の細胞 (コントロール) およびモノグルコシルルチン ($200 \mu M$) に対して、t 検定による有意差 (**、##) が見られた。

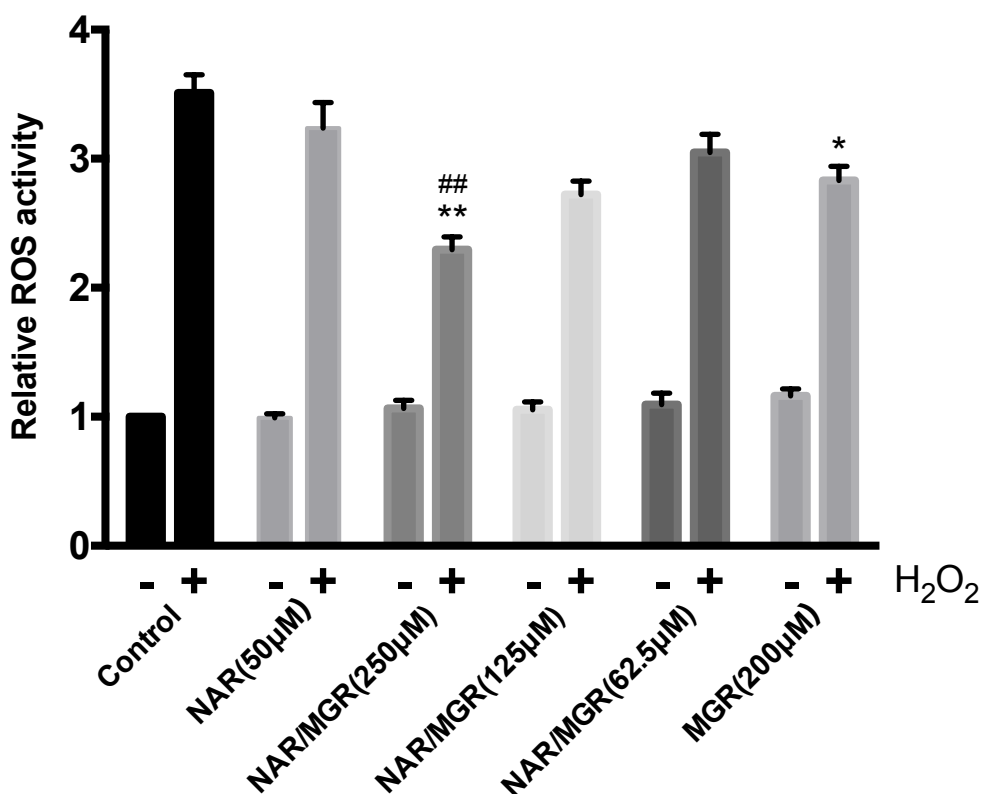


図5-8 ナリンゲニンとナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体における比較

5-4-2 細胞内 ROS (放射線) のフラボノイド複合体による消去試験結果

まず、モノグルコシルルチン単独添加による細胞内 ROS 消去活性を放射線照射コントロール (薬剤未添加) と比較を行った。その結果、僅かに細胞内 ROS 消去効果は見られるが有意差は得られなかった。また、3 種類のフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体) の比較を行った所、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体が最も細胞内 ROS 消去効果が高く、次に、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体であった。これらフラボノイド複合体について、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体については、放射線照射コントロールおよびモノグルコシルルチン単独添加に対して共に一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差 (**、##) が見られた。ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体については、放射線照射コントロールおよびモノグルコシルルチン単独添加に対して共に一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差 (**、#) が見られた。また、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体とアスコルビン酸は、細胞内 ROS 低減効果は見られるが、何れも放射線照射コントロールに対して有意差がある低減効果ではなかった。

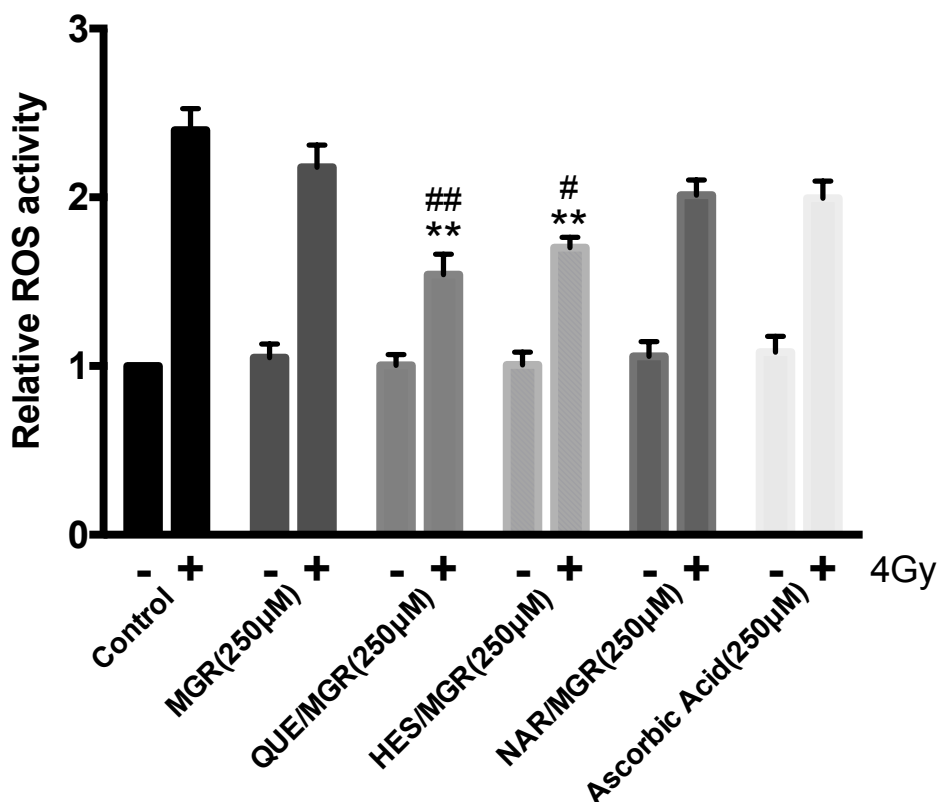


図 5-9 放射線照射 (4Gy) による細胞内 ROS の消去試験

5-4-3 細胞増殖率におけるフラボノイド複合体の放射線防護効果試験

モノグルコシルルチンおよびアスコルビン酸単独添加については、共に放射線照射コントロール（薬剤未添加）と同程度の細胞増殖率であり、薬剤添加による影響は見られなかった。また、3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）の比較を行った所、放射線照射コントロールに対して、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体については、細胞増殖率に変化が見られなかったが、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体およびナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体については、共にt検定における有意差(*)が見られる細胞増殖率の上昇を示しており、特にヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体が、その上昇率が最も高かった。

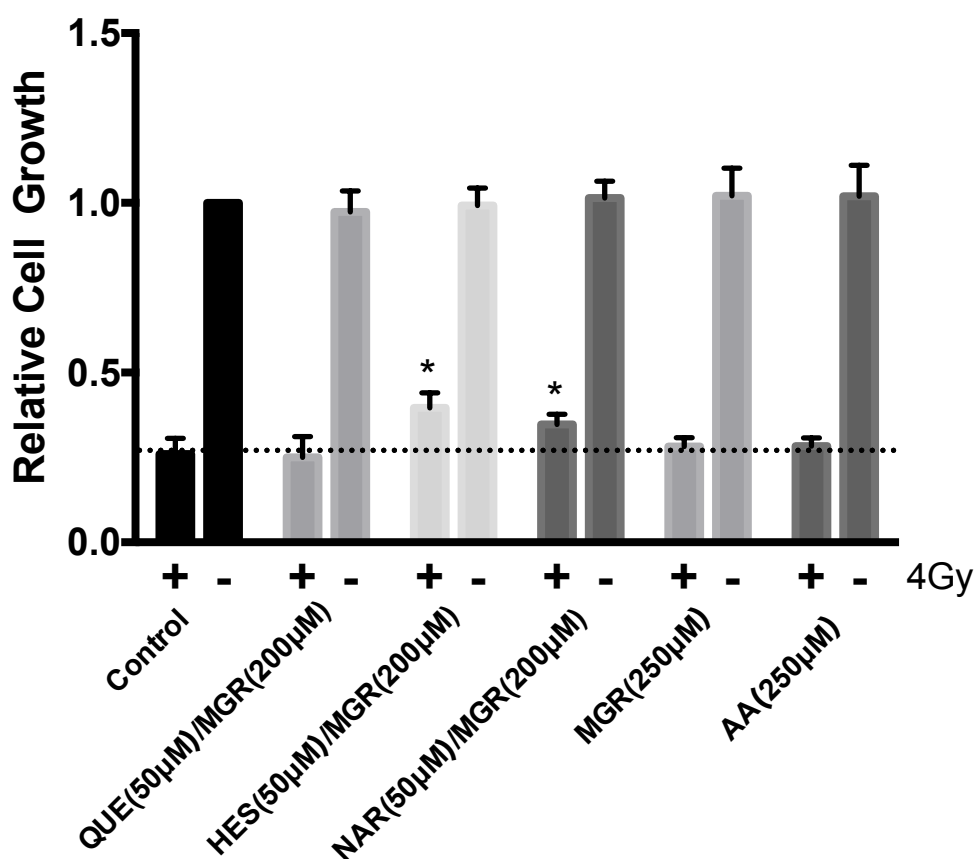


図 5-10 放射線照射（4Gy）3日後の細胞増殖率の比較

5-4-4 コロニーアッセイ法による細胞生存率試験結果

まず、モノグルコシルルチンおよびアスコルビン酸単独添加の細胞における細胞生存率の比較試験を行ったが、モノグルコシルルチンおよびアスコルビン酸共に、2、4、6、8Gyすべての照射強度において、薬剤未添加コントロール細胞と比較して同程度の細胞生存率の上昇が見られたが、一元配置分散分析（One-Way ANOVA）による有意差検定において有意差は得られなかった。また、モノグルコシルルチンとアスコルビン酸、両薬剤間の有意差も同様に見られなかった。

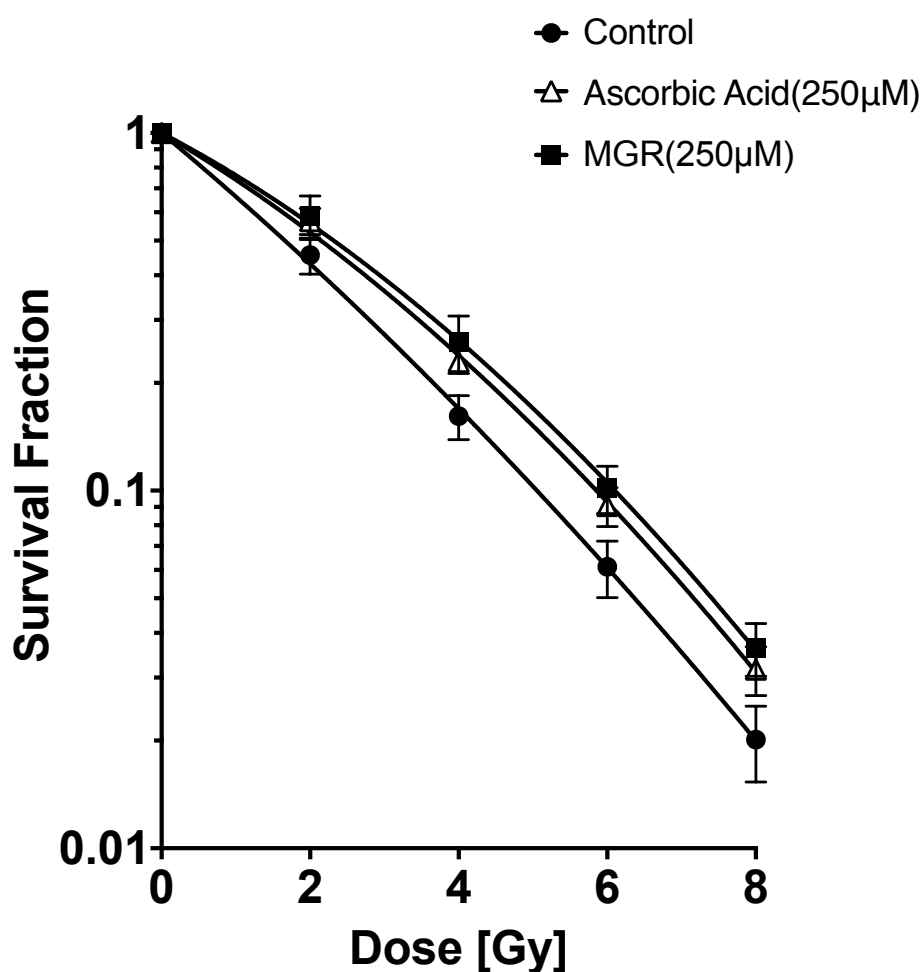


図5-11 MGR および AA における細胞生存率の比較

次に、3種類のフラボノイド複合体（ケルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）についての比較試験を行った。最も細胞生存率の高かったのは、ヘスペレチン/モノグ

ルコシルルチン複合体で、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差検定において、6Gy、8Gy において薬剤未添加コントロールとの間で有意差 (**)、8Gy においてモノグルコシルルチンとの間で有意差 (##) が得られた。次に、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体が高く、6Gy、8Gy において薬剤未添加コントロールとの間で有意差 (*) が得られた。一方、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体は、すべての照射強度について、細胞生存率の上昇は見られるものの、有意差が見られなかった。

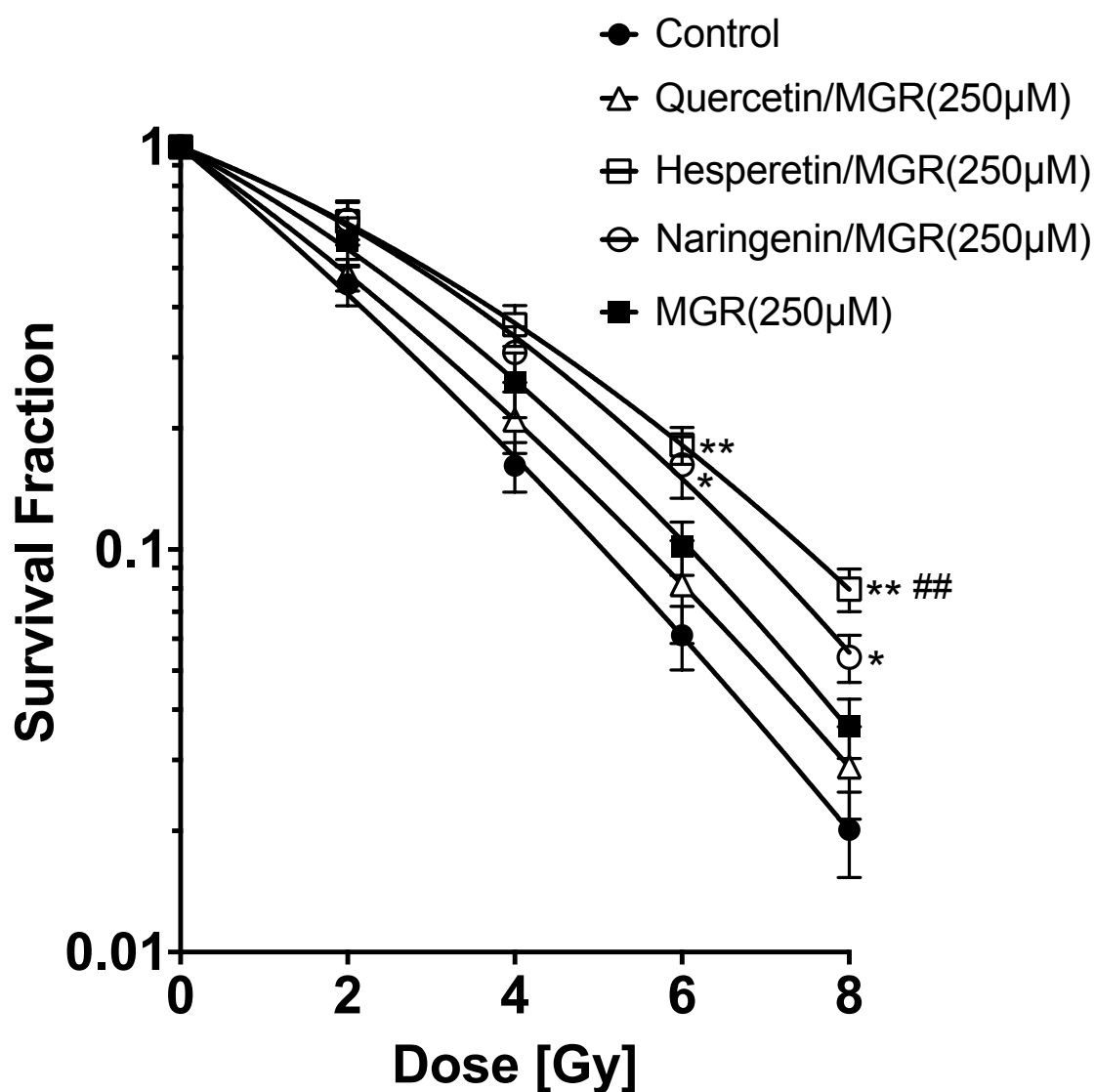


図 5-1 2 フラボノイド複合体における細胞生存率の比較

5-5 考察

本章では、CHO-K1 細胞を用いたフラボノイド複合体の放射線生物実験を行った。最初に、フラボノイド複合体による細胞内 ROS 消去試験を実施した。まず、予備検討として放射線照射による活性酸素種 (ROS) の発生を利用する代わりに、過酸化水素 (H_2O_2) を直接細胞培地に添加することによって、細胞内 ROS を上昇させ、薬剤添加による消去効果を確認した。その結果、難水溶性フラボノイド (クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン) およびモノグルコシルルチンにおいては、クエルセチンおよびモノグルコシルルチンにおいて、過酸化水素 (H_2O_2) 処理のみの細胞 (コントロール) に対して、t 検定による有意な差が得られた。また、ヘスペレチンおよびナリンゲニンについては、細胞内 ROS の減少傾向は見られるが、コントロールに対して有意差は見られなかった。一方、3 種類のフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体; 各 $250 \mu\text{M}$) については、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した同濃度の難水溶性フラボノイド (クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン; 各濃度 $50 \mu\text{M}$) と比較した場合、3 種類すべてのフラボノイド複合体において、コントロールに対し、有意差のある減少を示しただけではなく、モノグルコシルルチンと比較しても、有意に細胞内 ROS の減少効果を示した。これらの結果は、前章で示されたフラボノイド複合体の細胞取り込み試験において、細胞内にはモノグルコシルルチンが検出できなかった実験結果からも、細胞外に存在する過酸化水素 (H_2O_2) が、まず、細胞膜表面のモノグルコシルルチンにより消去され、残りの過酸化水素 (H_2O_2) が、細胞内の難水溶性フラボノイドで再び消去される 2 段階の ROS 消去メカニズムが存在すると推測される。

一方、放射線照射による細胞内 ROS 発生においては、薬剤未添加の放射線照射細胞 (コントロール) に対して、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体およびヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体については、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差検定を行った所、有意に細胞内 ROS 消去活性能力を確認した。しかしながら、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体やモノグルコシルモノグルコシルについては、有意差が無く、放射線照射による細胞内 ROS 発生においては、先に行った過酸化水素 (H_2O_2) を用いた実験と相違が見られる。この理由として、放射線によって発生した活性酸素種 (ROS) は、主に細胞内で発生するため、過酸化水素 (H_2O_2) の様に細胞外から細胞内に透過した状況と異なっており、そのため、細胞内に取り込まれないモノグルコシルルチンの影響は、放射線照射による細胞内 ROS 発生においては、少ないと考えられる。したがって、放射線照射による細胞内 ROS へのフラボノイド複

合体の効果は、その含有する難水溶性フラボノイドの抗酸化力の強さによる消去能の差に反映する。特に、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体は、含有するクエルセチンの抗酸化活性が高いため、他のフラボノイド複合体に比べ、高い細胞内 ROS 消去能を示した。この結果は、前章で確認したフラボノイド複合体から細胞内へ難水溶性フラボノイドの取り込みが起こっているという現象を改めて確認しただけでなく、フラボノイド複合体による難水溶性フラボノイドの組み合わせによって、放射線による初期の細胞内 ROS 上昇を制御することが可能であることを意味している。

次に、放射線照射から 3 日後の細胞増殖率に与えるフラボノイド複合体の影響を確認した。その結果、放射線照射から 3 日後の薬剤未添加の細胞（コントロール）に対して、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体およびナリングニン/モノグルコシルルチン複合体を添加した細胞の細胞増殖率について t 検定による有意差がある減少抑制が見られた。一方、先のフラボノイド複合体による細胞内 ROS 消去試験の結果に反して、活性酸素種（ROS）消去効果が最も高かったクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体で処理した細胞が、薬剤未添加の放射線照射細胞（コントロール）に対して、細胞増殖率の低減抑制効果が見られなかった。この結果から、細胞内に取り込まれる難水溶性フラボノイドについては、細胞内 ROS の捕捉剤としての効果だけでなく、別の効果が細胞増殖率へ影響していることが考えられる。

最後に、フラボノイド複合体の放射線防護剤としての可能性検討のために放射線照射後の CHO-K1 細胞における生存率にフラボノイド複合体が及ぼす影響の確認試験を行ったが、先の細胞増殖率試験と同様に、モノグルコシルルチンと組み合わせた難水溶性フラボノイドの種類によって、放射線防護効果に差が見られた。最も放射線防護効果が高かったのは、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体であり、その次に、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体であり、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体については、細胞増殖率試験と同様に、放射線防護効果は、殆ど見られなかった。

これら試験結果は、モノグルコシルルチンと組み合わせる難水溶性フラボノイドとして、放射線照射直後の細胞内 ROS 消去効果が高い即ち抗酸化力の高いものがすべて優れた放射線防護効果を持つ訳ではないこと、また、その後の細胞応答におけるフラボノイドの影響や、直接作用における放射線照射後の DNA 損傷における修復に関する影響など、より総合的な視点に立ち、放射線防護メカニズムの解明および検討が必要であることを示している。今回放射線防護効果が確認された難水溶性フラボノイドのヘスペレチンやナリングニンに関して、ヘスペレチンについては、マウスの脾細胞を用いた試験において、放射線照射によるマウス脾細胞の DNA 損傷を抑制する放射線防護効果が報告[79]され、また、ナリングニンについては、マウスへの経口投与試験において放射線

誘導型のアポトーシスをナリングニンが抑制する作用メカニズムによって、放射線防護効果を発揮していることが報告されている[80]。本研究で使用したヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体やナリングニン/モノグルコシルルチン複合体においても、同様の作用メカニズムで放射線防護効果が得られていると考えられる。一方で、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体について、顕著な放射線防護効果が見られなかった原因については、次章にて詳細に検討を進めたい。

第6章 フラボノイド複合体の組み合わせ検討

6-1 背景

前章におけるフラボノイド複合体の放射線生物実験によって、フラボノイド複合体に含まれる難水溶性フラボノイドの種類によって、放射線防護効果に差があることが確認された。特に、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体は、DPPH ラジカル消去試験によって示されたクエルセチンの抗酸化効果の強さに加え、細胞内 ROS 低減効果も確認され、放射線防護効果も期待されたが、コロニーアッセイ法による放射線防護効果の確認試験では、予測とは反対に放射線防護効果を見出すことは出来なかった。そこで、本章では、この結果の原因を確かめるための追加試験を行うと共に、本研究で作製した3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）について、放射線防護剤として、適切な難水溶性フラボノイドの組み合わせ検討について行うことにする。

本研究では、放射線防護剤として、一貫してフラボノイド複合体の抗酸化力に着目して検討を進めてきた。このアプローチは、過去の放射線防護剤の開発経緯から考えても正しいと言える[17, 81, 82]。しかしながら、強い抗酸化剤については、酸化を促進する効果、所謂、酸化促進効果（プロオキシダント効果）と言われる負の効果も指摘されている。フラボノイドの研究においては、この抗酸化と酸化促進の両面の影響を明らかにすることが、研究対象の一つとして精力的に研究が進められているテーマであり、先行研究によっても、様々な面から検討されている[83-85]。本研究と同様のクエルセチンを用いた細胞試験においても、その添加条件によって、クエルセチンの抗酸化と酸化促進の両面の効果が確認されている[86, 87]。本研究においても、フラボノイド複合体で細胞内に導入された難水溶性フラボノイドの酸化促進効果に着目して、実験を進めることにした。

フラボノイドの酸化促進効果については、酸化したフラボノイドが自ら他の物質の酸化剤として作用することより引き起こされる。特に、細胞内に含まれる還元型グルタチオンは、SH 基を持つことにより細胞内還元状態を維持しており、放射線などにより発生した細胞内 ROS を消去する生体内抗酸化物質の役割を担っている[67, 88]。細胞外から導入される放射線防護剤に関しても、薬剤自身が抗酸化剤として作用する以上に、細胞が本来有している細胞内酸化還元電位（レドックス）の調整因子への影響をなるべく少なくしなければ、結果的に細胞への悪影響が増加することになる。さらに、細胞内に含まれる各種調整因子として働くタンパク質の多くは、SH 基を介したジスルフィド結

合によって、その活性を制御している[89-91]。例えば、本研究のテーマである放射線障害によって、細胞内の DNA が損傷を受けた場合に、DNA 修復に重要な役割を果たすタンパク質である PARP(Poly (ADP-ribose) polymerase)に関しても、分子内 SH 基の酸化/還元により、その活性が制御されている[92]。

この様に、細胞内の SH 基の制御は、細胞における様々な外的要因（主に酸化によるストレスや障害）に対して極めて重要な役割を果たしていることが分かる。そこで、本研究の最終目標である安全で効果が高い放射線防護剤の開発において、フラボノイド複合体に組み合わせる適切な難水溶性フラボノイドの選択をするために、今回検討したクエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニンの3種類の中でより望ましいフラボノイドは何かについて、細胞内 SH 基への影響について確かめることにする。

6-2 実験概要

本章では、本研究で作製した 3 種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体）において、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体において組み合わせに用いた難水溶性フラボノイドによる SH 基への影響を確認するために、2つの実験を実施することにした。

まず、CHO-K1 細胞を用いたフラボノイド複合体処理による細胞内 GSH 濃度の変化を確認する試験を行った。この実験は、フラボノイド複合体を培養細胞に短時間処理(30分)した後に、細胞内に存在する還元型グルタチオン (GSH) の濃度が、細胞に導入された難水溶性フラボノイドにより、どの様に変化するか確認する実験である。また、細胞内 GSH の濃度測定には、細胞内 GSH 濃度を計測する試薬 Monochlorobimane (mBCl) を使用した。mBCl は、SH 基の検出試薬として実績がある試薬であり、mBCl 単独では蛍光を発生しないが、SH 基と結合することによって、蛍光を発生し、この蛍光を検出することによって、SH 基の定量を行うことが出来る[93]。また、mBCl は細胞への取り込みも可能であることから、細胞内の SH 基検出にも使用可能で、細胞内 SH 基の大部分は、還元型グルタチオン (GSH) が有する SH 基であるため、mBCl は、細胞内 GSH 濃度の計測に用いられる[93-95]。

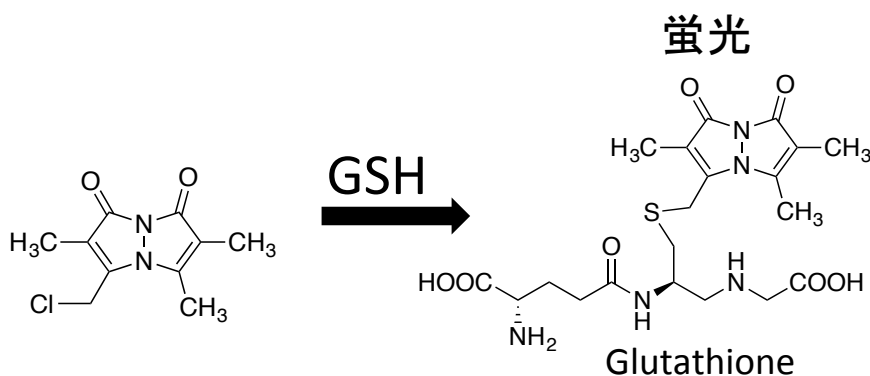


図 6-1 Monochlorobimane (mBCl) の蛍光発生メカニズム

6-3 実験方法

6-3-1 試薬の入手法

細胞内 GSH 測定用試薬 Monochlorobimane (mBCl; 分子量 226.66) は、Life Technologies (Thermo Fisher Scientific Inc.) より購入した。

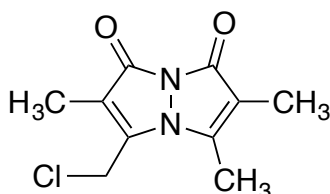


図 6-2 Monochlorobimane(mBCl)の分子構造式

6-3-2 細胞培養法および継代

細胞は、チャイニーズハムスターの卵巣由来細胞である CHO-K1 を、RIKEN BRC (理化学研究所) より入手し使用した。培地は、MEM α (alpha minimum essential medium;和光純薬)に 10% fetal bovine serum (FBS ; コーニング)と 1% antibiotics and antimycotics (Gibco)を加えた培地を用い、100mm 培養皿に 10ml の上記 MEM α 培地と CHO-K1 細胞を入れ、37°C、5% CO₂ 存在下のインキュベータ内で培養した。継代は、セミコンフルエントになった CHO-K1 細胞を、PBS (-) (和光純薬)を用いて洗浄後、Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Gibco) を用いて処理を行い細胞回収したものをコールターカウンタ Z1 (Beckman Coulter Inc.) で細胞数を測定し、再び、MEM 培地 (10%FCS) に適当数入れて継代した。また、全ての実験は、指数増殖期の細胞を使用した。

6-3-3 細胞内 GSH 濃度測定試験

100mm 培養皿で予めセミコンフルエントに培養した CHO-K1 細胞をトリプシン処理し、剥離した細胞を MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁したものを準備した。96 ウェルプレートに、MEM α 培地 (10%FCS) に懸濁した CHO-K1 細胞を 40,000 個/ウェルになるように入れ、1 日間培養する。培養後は、培地をアスピレータで除去し、PBS(-) で 2 回洗浄した後、PBS(-)に溶解した薬剤 (フラボノイド) を各 well に 50 μ l 添加する。その際に、難水溶性フラボノイド (クエルセチン、ヘスペレチン、ナリングニン) の添加については、ジメチルスルホキシドに溶解させ、ジメチルスルホキシド (DMSO)

の最終濃度が、0.5% (vol/vol) になる様に希釈して添加し、また、モノグルコシルルチンおよびフラボノイド複合体 (クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体) については、PBS(-)に溶解したものを希釈して培地に添加した。30 分間インキュベータ内で保管した後、PBS(-)をアスピレータで除去し、PBS(-)に溶解した SH 基検出試薬 (mBCI, 50 μ M) を各 well に 100 μ l 添加する。30 分間インキュベータ内で保管した後、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M5、Molecular Devices、CA、USA) を利用して、細胞内の mBCI-GSH 複合体の蛍光強度 (励起波長 430nm、蛍光波長 485 nm) を測定した。得られた mBCI-GSH 複合体の蛍光強度は、フラボノイド未添加の細胞における mBCI-GSH 複合体の蛍光強度で規格化を行い、細胞内 GSH 濃度相対比として計算をした。

$$\text{細胞内 GSH 濃度相対比} = \frac{\text{フラボノイド処理細胞の蛍光強度 (RFU)}}{\text{フラボノイド未処理細胞の蛍光強度 (RFU)}} \quad (\text{式 6-1})$$

6-3-4 統計処理

全ての実験は、3 回以上繰り返し行い、統計的有意性は、Prism 6 software (GraphPad Software, Inc.)を用いて、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) による有意差検定にて確認した。また、すべてのデータにおいて、 $p < 0.05$ (*、#で表示) または、 $p < 0.01$ (**、##で表示) で統計的優位性を示し、エラーバーは、標準誤差を表す。

6-4 実験結果

6-4-1 細胞内 GSH 濃度測定試験結果

まずは、ジメチルスルホキシドで可溶化し単独添加した 3 種類の難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリングニン）について、2 種類の濃度（50 μ M、250 μ M）で添加した場合の細胞内 GSH 濃度を確認した。その結果、クエルセチンのみが、薬剤未添加の細胞（コントロール）に対して、50 μ M の時に 54%、250 μ M の時に 30%と何れも有意差（**）のある細胞内 GSH 濃度の減少が見られた。逆に、ヘスペレチン、ナリングニンについては、難水溶性フラボノイド添加による細胞内 GSH 濃度の変化は見られなかった。

また、同様に 3 種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリングニン/モノグルコシルルチン複合体）およびモノグルコシルルチンについても同様の試験を行った。モノグルコシルルチンは、細胞内 GSH の濃度変化が見られなかった。また、フラボノイド複合体においては、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体について、モノグルコシルルチン添加の細胞に対して 49%と有意差（##）のある細胞内 GSH 濃度の減少が見られた。また、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体およびナリングニン/モノグルコシルルチン複合体については、細胞内 GSH 濃度の変化は見られなかった。

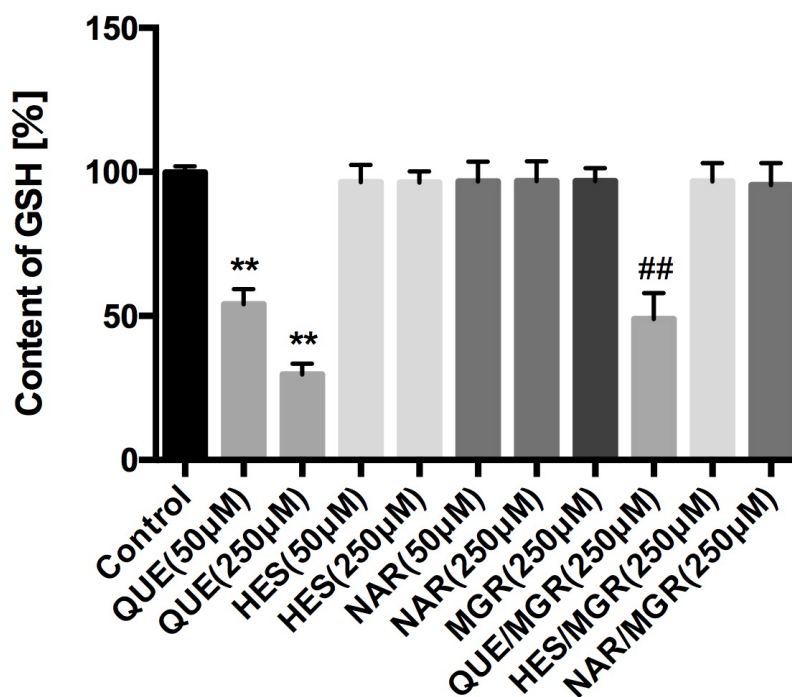


図 6-3 細胞内 GSH 濃度変化試験結果

6-5 考察

本章では、3種類のフラボノイド複合体における放射線防護効果が、モノグルコシルルチンと組み合わせた難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）の種類の違いによって差が見られたこと、また、特に抗酸化効果が高く、細胞内 ROS 除去効果も高い効果を示したクエルセチンが、放射線防護効果を顕著に示さなかった原因について、各難水溶性フラボノイドの酸化促進効果に着目して検討を行った。

難水溶性フラボノイドおよびフラボノイド複合体の CHO-K1 細胞への短時間処理（添加 30 分後）によって、細胞内に取り込まれた 3 種類の難水溶性フラボノイドの細胞内 GSH 濃度における影響を確認した。その結果、クエルセチンおよびクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体に関しては、細胞内 GSH を減少させる効果が見られ、先行研究において、クエルセチン単独投与による試験結果と同様の結果であった[96, 97]。このことは、細胞内に取り込まれたクエルセチンが酸化を受け、酸化クエルセチンとなり、さらに細胞内に含まれる還元型グルタチオン（GSH）に結合し、その濃度を低下させていると推測される。実際に、先行研究においてもこの酸化クエルセチンの還元型グルタチオン（GSH）への結合やその結合部位についても詳細に検討され報告されている[98, 99]。一方ヘスペレチン、ナリンゲニンは、細胞内 GSH への低下を引き起こさなかったことから、細胞内で酸化を受けたこれらのフラボノイドは、クエルセチンとは異なり還元型グルタチオン（GSH）への結合しないことを示している。すなわち、フラボノイド複合体もしくは、ジメチルスルホキシド（DMSO）により細胞内に導入された難水溶性フラボノイドが、放射線防護のため、抗酸化物質として機能することは、重要であるが、その一方で、酸化された難水溶性フラボノイドが、細胞内の還元型グルタチオン（GSH）に結合することにより、細胞内レドックスの制御を阻害する状態に成らない様な難水溶性フラボノイドの選択が必要となることが明らかになった。

一方で、クエルセチンによる細胞内 GSH の減少は、還元型グルタチオン（GSH）の主な機能の 1 つであるグルタチオン抱合を利用した細胞内有害物質を除去する機能の低下も引き起こす[88, 100]。即ち、細胞自身が持つ生存または回復機能の低下を意味し、放射線による細胞障害を加速させてしまう。

また、SH 基へのクエルセチンの結合は、細胞内に存在する還元型グルタチオン（GSH）以外の SH 基によって制御されている様々なタンパク質調整因子の別の障害を引き起こす。例えば、DNA 修復を制御する PARP は、先に述べたチオレドキシシン 1（TRX1）と同様に SH 基によって活性が制御されている。筆者らの先行研究により、本研究で検討した 3 種類の難水溶性フラボノイドについて、PARP 阻害試験を行ったが、この試験結果も予測通り、クエルセチンの PARP 阻害効果が最も高く、ヘスペレチンやナリン

ゲニンの阻害効果はクエルセチンに比べ低いものであった[101]。このことは、PARPの活性制御を行うSH基に酸化されたクエルセチンが結合する事による活性阻害の増強もその要因となっていると予測される。さらに、先行研究においても、クエルセチンおよびその配糖体について、同様のPARP阻害活性試験が行われており、配糖化によるクエルセチンの構造変化により、PARP阻害効果が異なっていることが明らかになっている[28, 52, 102]。これらの結果からもPARP阻害効果は、フラボノイドの抗酸化力の強さによる影響だけでは無く、フラボノイドの構造、特に酸化したフラボノイドのSH基への結合のし易さによって、変化すると考えられる。

以上、本章で実施した実験結果から、3種類の難水溶性フラボノイド(クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン)のうち、クエルセチンが細胞内GSHの低下すなわち細胞内のSH基への結合を示しており、このことは、酸化を受けた酸化クエルセチンのSH基へ結合によって、引き起こされたと考えられる。この実験結果は、フラボノイド複合体によって細胞内に導入された難水溶性フラボノイドの選択に対して大きな知見を与えている。即ち、放射線防護剤として適した難水溶性フラボノイドは、抗酸化力が高く細胞内ROSを低減する効果が強いものほど好ましいと考えていたが、実際には、本研究で明らかになった様に、細胞内で酸化を受けた酸化フラボノイドの細胞内での影響も重要であることが分かった。特に、SH基への結合性に関する影響は、その中でも特に重要視すべき課題であり、これら、フラボノイドの抗酸化と酸化促進の両効果のバランスを考慮することが、放射線防護剤に適した難水溶性フラボノイドを選択する上で重要であることが明らかとなった。この結果は、過去の古典的なチオール系放射防護剤における開発状況と同様の結果となっている。即ち、還元状態のSH基のままでは、細胞内でのSH基を有する調整因子への影響が大きく、毒性や副作用が強く発生してしまう。そのため、アミフォスチンの様に、SH基をリン酸化することによって還元性を下げ、細胞内のSH基への影響を下げることによって、細胞への毒性を下げつつも、結果的に放射線防護剤効果を高めている。所謂、プロドラッグ化と言われる誘導化を施した薬剤となっている。この様なプロドラッグ化することによって、抗酸化と酸化促進効果のバランスを取ることが出来、その結果として細胞毒性を最小限としながら、放射線防護効果を得ることが可能となっている。この様なプロドラッグ化の考え方によって、今回検討した難水溶性フラボノイド3種類(クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン)を見るとクエルセチンは、抗酸化の中心的な役割を果たすB環のカテコール構造におけるOH基が全て残っており、それ故に高い抗酸化力を有している。一方、ヘスペレチンに関しては、B環のカテコールのOH基の一つがメチル化されていることによって、抗酸化力が弱まるが、B環にカテコール構造を持たないナリンゲニンよりは高く、また、

細胞毒性に関しては、この 2 つのフラボノイド共に同程度であることを考えると、ヘスペレチンが、抗酸化と細胞毒性のバランスが取れた難水溶性フラボノイドと言える。

第7章 結論と今後の課題

7-1 結論

本研究では、糖転移フラボノイドであるモノグルコシルルチンと難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）を組み合わせた新しいフラボノイド複合体を提案し、放射線防護剤としてより安全で効果のあるフラボノイド製剤の開発を最終目標として進めてきた。

まずは、第2章において、3種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）をスプレードライ法により作製し、電子顕微鏡による粉体形状の観察や、HPLCによる分析手法の確立をした。

次の第3章で、第2章で作製した3種類のフラボノイド複合体について、水溶液濃度の時間変化測定や DPPH ラジカル消去試験による抗酸化活性の測定などの機能性評価を行った。その結果、モノグルコシルルチンは、代表的な可溶化剤であるジメチルスルホキシド (DMSO) に比べ、クエルセチンの可溶化効果が高く、また、ヘスペレチン、ナリンゲニンについても、同様に可溶化効果を示した。また、DPPH ラジカル消去試験において、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複体の順番で、高い抗酸化力を示した。

次の第4章において、CHO-K1細胞を用いたフラボノイド複合体の細胞取り込み試験を実施し、フラボノイド複合体を用いた難水溶性フラボノイドの細胞内取り込みを確認した。一方、モノグルコシルルチンについては、細胞内で検出できず、細胞への取り込みは確認できなかった。さらに、フラボノイド複合体の細胞毒性効果試験によって、細胞内に取り込まれた難水溶性フラボノイドの種類により細胞毒性に変化があることを確認した。

次の第5章において、放射線誘起による細胞内 ROS のフラボノイド複合体による低減効果の確認試験を行った。その結果、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体およびヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体について、細胞内 ROS 低減効果が確認された。特に、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体の細胞内 ROS 低減効果が高いことが分かった。しかしながら、コロニーアッセイ法にてフラボノイド複合体の放射線防護効果を確認した所、クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体は、放射線防護効果を示さず、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体については、共に放射線防護効果を示した。特に、ヘスペレチン/モ

ノグルコシルルチン複合体は、本研究で作製した3種類のフラボノイド複合体のうち、最も放射線防護効果が高かった。これらの結果は、モノグルコシルルチンと組み合わせる難水溶性フラボノイドとして、放射線誘起による細胞内 ROS 消去効果が高い、即ち抗酸化力の高いものが優れた放射線防護効果を持つ訳ではないことを示している。

次の第6章では、フラボノイド複合体にて細胞内に取り込まれた難水溶性フラボノイドの抗酸化効果ではなく、酸化促進効果に着目して、フラボノイド複合体による細胞内 GSH 濃度への影響を確認した。その結果、クエルセチンおよびクエルセチン/モノグルコシルルチン複合体を添加した細胞のみに細胞内 GSH 濃度の低減が見られた。これは、クエルセチンが細胞内で容易に酸化され、還元型グルタチオン (GSH) を含む SH 基への結合することによって、引き起こされている。すなわち、クエルセチンは、極めて高い抗酸化物質であるが、その反面、自らが酸化を受け、細胞内の様々な SH 基を持つ調整物質に結合し、その機能を抑制する (酸化促進効果)。一方、ヘスペレチンは、クエルセチン程の高い抗酸化力は有していないが、酸化促進効果が低いため、細胞毒性が低く、放射線防護剤として、より好ましい物質と言える。この様に、フラボノイド複合体に組み合わせる難水溶性フラボノイドの選択は、抗酸化 (放射線防護) と酸化促進 (細胞毒性) の両面を考慮した検討が必要であると考えられる。

最後に、図7-1に本研究で検討したフラボノイド複合体を用いた放射線防護剤の検討結果をまとめたものを示す。この図の中で、第一章で仮定したフラボノイド複合体の放射線防護剤としての作用メカニズムが本研究の中で確認された事実と共に、新たな課題 (難水溶性フラボノイドの酸化促進効果) も示されている。今後の課題については、次節において詳細を記載するとし、結言となるが、フラボノイドは、身近な植物由来の食品や薬用植物に含まれる有効成分として古くから利用されて来たが、その二面性 (抗酸化と酸化促進) 故に、摂取量を間違えると逆に有毒成分となり得る。一般的な言い方であるが、「フラボノイドは適量が大事」という言葉は正しいと思われる。本研究で検討した糖転移フラボノイドを利用したフラボノイド複合体は、この様なフラボノイドの特性を考慮した上で、有機溶剤を用いず、難水溶性フラボノイドを可溶化し、細胞取り込み効果を上げることが出来る安全で有効な手段であるばかりでなく、難水溶性フラボノイドを過剰に摂取することによる有毒性を回避し、フラボノイド本来が持つ機能性を上手く使い分け摂取することを可能にする新しいフラボノイド製剤であると考えている。この様な素晴らしい機能性を有する糖転移フラボノイドの新しい可能性が、本研究を通して更に発展することを期待する。

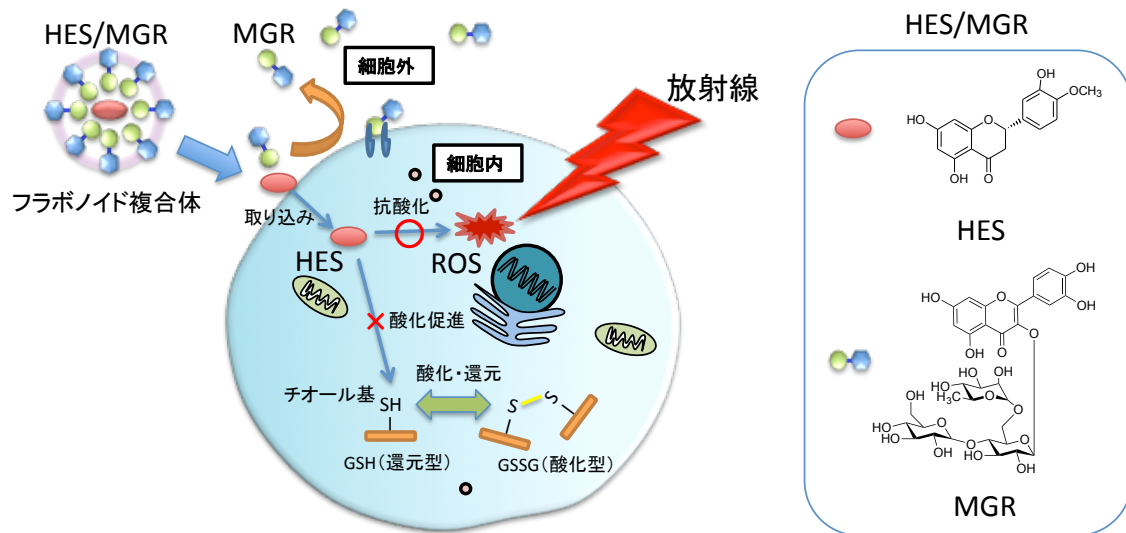


図 7-1 本研究で進めたフラボノイド複合体を用いた放射線防護剤の検討結果まとめ

7-2 今後の課題

本研究では、安全で効果的な放射線防護剤の開発を目指し、モノグルコシルルチンを利用したフラボノイド複合体を提案した。このフラボノイド複合体によって、モノグルコシルルチンの課題である細胞透過性の問題を解決することが出来た。実際に検討した3種類の難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）は何れも、モノグルコシルルチンによって可溶化することが出来、細胞内への取り込み効果が確認出来た。また、三種類のフラボノイド複合体（クエルセチン/モノグルコシルルチン複合体、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体、ナリンゲニン/モノグルコシルルチン複合体）の内、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体の放射線防護効果が一番高い結果となった。

これら、本研究で得られた知見を元に、今後の課題として、以下の二つを考えている（図7-2）。

【課題① 糖転移フラボノイドの選択検討】

まず、フラボノイド複合体に糖転移フラボノイドとしてモノグルコシルルチンの利用を前提としたが、他の糖転移フラボノイド（モノグルコシルヘスペリジン、モノグルコシルナリンジン）については、今回詳細に検討することは出来なかった。これら糖転移フラボノイドもモノグルコシルルチンと同様に可溶化効果を持つことが知られており、新たなフラボノイド複合体としての可能性を有していると考えている。特に、本研究でその放射線防護効果が確認されたヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体は、難水溶性フラボノイドとしてヘスペレチンが有効であったことを考えると、その組み合わせに最適な糖転移フラボノイドとして、同じアグリコン構造を持つモノグルコシルヘスペリジンを使用することがより、溶解性や細胞への取り込み効率に好ましい結果をもたらすことが期待される。本研究と同様のスプレードライ法により、ヘスペレチン/モノグルコシルヘスペリジン複合体の作製は可能であることは確認しており、本研究で作製したヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体とこのヘスペレチン/モノグルコシルヘスペリジン複合体の比較試験をすることは、大変興味深い。

また、本研究で取り上げたモノグルコシルルチンは、抗酸化力に優れた糖転移フラボノイドであることが、放射線防護剤として期待された。しかしながら、モノグルコシルルチンは、本研究においても細胞内への取り込み効果は殆ど見られず、細胞外もしくは細胞膜上に存在していることが予測される。そのため、放射線防護剤としてのモノグル

コシルルチンは、細胞外から細胞膜を通過して進入して来る放射線誘発の活性酸素種（ROS）への防護効果は期待出来るかもしれないが、放射線照射時に細胞内に直接発生する細胞内 ROS への関与は期待できない。このことは、フラボノイド複合体に使用する糖転移フラボノイドとして、モノグルコシルルチンの様な高い抗酸化力を持つ糖転移フラボノイドが適切であるかについて再考する必要があると考えている。

【課題② 難水溶性フラボノイドの誘導化検討】

次に、フラボノイド複合体として組み合わせる難水溶性フラボノイドの選択についてである。本研究においては、3種類の難水溶性フラボノイド（クエルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）の内、ヘスペレチンが最も好ましい結果となったが、これは、クエルセチンの酸化促進効果が強すぎたため、フラボノイド複合体によって、細胞内に取り込まれたクエルセチンが、結果として抗酸化効果が強い割には、放射線防護剤として期待される程の効果が得られない結論となった。この問題は、先に述べたが、古典的な放射線防護剤（チオール系化合物）においても、同様の展開となっており、放射線防護剤開発の歴史の中で、最も解決が難しい課題である。本研究では、ヘスペレチンの様なプロドラッグ化された難水溶性フラボノイドが、上記の課題解決に有効であることが示されたが、この考え方を更に発展させるアイデアは、面白いと思われる。例えば、クエルセチンの場合、誘導化されたイソラムネチン（メチル化）やイソクエルシトリン（配糖化）などが、すでに天然フラボノイドとして存在しており、この様な未検討の天然フラボノイドの中から、ヘスペレチンの様な新たなプロドラッグ化された物質を探索し、検討を進めることは大変興味深い。さらに、天然フラボノイドではなく、化学合成法を用いて人工的に難水溶性フラボノイドをプロドラッグ化する手法は、薬剤設計の自由度が増し、可能性が広がる点からも是非試みたい研究課題である。

さらに、この様なフラボノイド誘導体が、プロドラッグ化により抗酸化力が低下する一方、放射線による細胞障害や回復に関与する細胞内調整因子に対する増強剤として機能すれば、今までに無い、より効果的な放射線防護剤としての可能性があると思われる。

この様に、本研究で目指した安全で効果がある新しい放射線防護剤として、フラボノイドは、食経験が長く、安全性や機能性に関するエビデンスも多いことから、誘導体材料としても適した物質と言える。

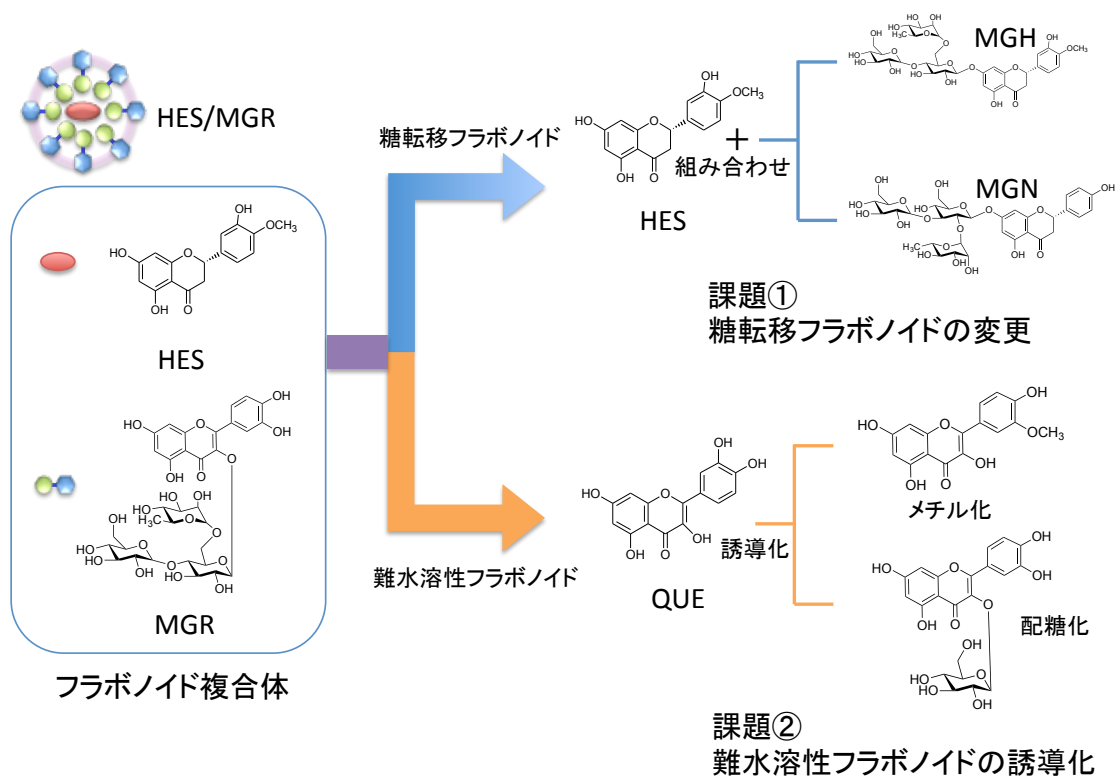


図 7-2 本研究で検討したフラボノイド複合体の今後の課題

謝辞

本論文は筆者が東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同研究科原子力国際専攻教授 上坂充先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きましたこと、ここに深く感謝の意を表します。また、同研究科バイオエンジニアリング専攻教授 津本先生、同研究科化学工学専攻教授 北森先生、同研究科原子力国際専攻教授 高橋先生、同大学院医学系研究科疾患生命工学センター講師 細谷先生、並びに、放射線医学総合研究所放射線障害治療研究部チームリーダー 藤森先生には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴き、ここに感謝の意を表します。

また、コロラド州立大学環境放射線保健科学学部准教授 加藤先生には、研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴き、ここに感謝の意を表します。

最後に、カーリットホールディングス株式会社には、研究全般に渡りご協力戴きました。また、東洋精糖株式会社からは、本研究に欠くことのできない糖転移フラボノイドの試験サンプルを提供して戴きました。改めて、両社共に感謝の意を表します。

参考文献

- [1] P.G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *Journal of natural products*, 63 (2000) 1035-1042.
- [2] D. Nikolic, R.B. van Breemen, New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 32 (2004) 387-397.
- [3] M. Alia, R. Mateos, S. Ramos, E. Lecumberri, L. Bravo, L. Goya, Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2), *European journal of nutrition*, 45 (2006) 19-28.
- [4] L. Gao, G. Liu, X. Wang, F. Liu, Y. Xu, J. Ma, Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology, *International journal of pharmaceutics*, 404 (2011) 231-237.
- [5] C.F. Krewson, J. Naghski, Some physical properties of rutin, *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association*, 41 (1952) 582-587.
- [6] K. Srinivas, J.W. King, L.R. Howard, J.K. Monrad, Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water, *Journal of Food Engineering*, 100 (2010) 208-218.
- [7] R. Mauludin, R.H. Muller, C.M. Keck, Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 36 (2009) 502-510.
- [8] M. Ikemura, Y. Sasaki, J.C. Giddings, J. Yamamoto, Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Phytotherapy research : PTR*, 26 (2012) 1272-1277.
- [9] M. Yamamoto, H. Jokura, A. Suzuki, T. Hase, A. Shimotoyodome, Effects of Continuous Ingestion of Hesperidin and Glucosyl Hesperidin on Vascular Gene Expression in Spontaneously Hypertensive Rats, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 59 (2013) 470-473.
- [10] Y. Suzuki, K. Suzuki, Enzymatic formation of 4G-alpha-D-glucopyranosyl-rutin, *Agric Biol Chem*, 55 (1991) 181-187.
- [11] C. Aoki, Y. Takeuchi, K. Higashi, Y. Okamoto, A. Nakanishi, M. Tandia, J.

- Uzawa, K. Ueda, K. Moribe, Structural elucidation of a novel transglycosylated compound alpha-glucosyl rhoifolin and of alpha-glucosyl rutin by NMR spectroscopy, *Carbohydr Res*, 443-444 (2017) 37-41.
- [12] T. Makino, R. Shimizu, M. Kanemaru, Y. Suzuki, M. Moriwaki, H. Mizukami, Enzymatically modified isoquercitrin, alpha-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside, is absorbed more easily than other quercetin glycosides or aglycone after oral administration in rats, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 32 (2009) 2034-2040.
- [13] K. Murota, N. Matsuda, Y. Kashino, Y. Fujikura, T. Nakamura, Y. Kato, R. Shimizu, S. Okuyama, H. Tanaka, T. Koda, K. Sekido, J. Terao, alpha-Oligoglucosylation of a sugar moiety enhances the bioavailability of quercetin glucosides in humans, *Archives of biochemistry and biophysics*, 501 (2010) 91-97.
- [14] Y. Tozuka, J. Kishi, H. Takeuchi, Anomalous dissolution property enhancement of naringenin from spray-dried particles with α -glucosylhesperidin, *Advanced Powder Technology*, 21 (2010) 305-309.
- [15] K. Kadota, K. Semba, R. Shakudo, H. Sato, Y. Deki, Y. Shirakawa, Y. Tozuka, Inhibition of Photodegradation of Highly Dispersed Folic Acid Nanoparticles by the Antioxidant Effect of Transglycosylated Rutin, *J Agric Food Chem*, 64 (2016) 3062-3069.
- [16] E.M. Rosen, R. Day, V.K. Singh, New approaches to radiation protection, *Front Oncol*, 4 (2014) 381.
- [17] J.F. Weiss, M.R. Landauer, Radioprotection by antioxidants, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899 (2000) 44-60.
- [18] N. Sasano, A. Enomoto, Y. Hosoi, Y. Katsumura, Y. Matsumoto, A. Morita, K. Shiraishi, K. Miyagawa, H. Igaki, K. Nakagawa, Edaravone, a known free radical scavenger, enhances X-ray-induced apoptosis at low concentrations, *Cancer Lett*, 293 (2010) 52-57.
- [19] 仲. 笹野, 敦. 榎本, 義. 細井, 清. 宮川, 恵. 中川, エダラボンによる放射線感受性の修飾, *放射線生物研究*, 44 (2009) 106-113.
- [20] M.H. Green, J.E. Lowe, A.P. Waugh, K.E. Aldridge, J. Cole, C.F. Arlett, Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells, *Mutation research*, 316 (1994) 91-102.
- [21] Y. Ito, M. Kinoshita, T. Yamamoto, T. Sato, T. Obara, D. Saitoh, S. Seki, Y. Takahashi, A combination of pre- and post-exposure ascorbic acid rescues mice from

radiation-induced lethal gastrointestinal damage, *Int J Mol Sci*, 14 (2013) 19618-19635.

[22] N. Devipriya, A.R. Sudheer, M. Srinivasan, V.P. Menon, Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes, *Mutation research*, 654 (2008) 1-7.

[23] S. Sunada, H. Fujisawa, I.M. Cartwright, J. Maeda, C.A. Brents, K. Mizuno, Y. Aizawa, T.A. Kato, M. Uesaka, Monoglucosyl-rutin as a potential radioprotector in mammalian cells, *Molecular medicine reports*, 10 (2014) 10-14.

[24] J. Overgaard, H.S. Hansen, M. Overgaard, L. Bastholt, A. Berthelsen, L. Specht, B. Lindelov, K. Jorgensen, A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85, *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 46 (1998) 135-146.

[25] N.N. Nusser, D. Bartkowiak, E.M. Rottinger, The influence of bromodeoxyuridine on the induction and repair of DNA double-strand breaks in glioblastoma cells, *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]*, 178 (2002) 504-509.

[26] H.S. Greenberg, W.F. Chandler, W.D. Ensminger, L. Junck, A. Thornton, H. Sandler, M.A. Page, P. McKeever, S. Gebarski, B. Liang, R. Tankanow, Radiosensitization with Carotid Arterial Infusion of Bromodeoxyuridine (BUdR) ± 5 Fluorouracil (5FU) Biomodulation with Focal External Beam Radiation (FEbT) for Malignant Gliomas, in: P. Paoletti, K. Takakura, M.D. Walker, G. Butti, S. Pezzotta (Eds.) *Neuro-Oncology*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1991, pp. 217-219.

[27] T. Lagerweij, L. Hiddingh, D. Biesmans, M.H. Crommentuijn, J. Cloos, X.N. Li, M. Kogiso, B.A. Tannous, W.P. Vandertop, D.P. Noske, G.J. Kaspers, T. Wurdinger, E. Hulleman, A chemical screen for medulloblastoma identifies quercetin as a putative radiosensitizer, *Oncotarget*, 7 (2016).

[28] M. Fujimori, K. Kadota, K. Kato, Y. Seto, S. Onoue, H. Sato, H. Ueda, Y. Tozuka, Low hygroscopic spray-dried powders with trans-glycosylated food additives enhance the solubility and oral bioavailability of ipriflavone, *Food Chem*, 190 (2016) 1050-1055.

[29] M. Fujimori, K. Kadota, K. Shimono, Y. Shirakawa, H. Sato, Y. Tozuka,

- Enhanced solubility of quercetin by forming composite particles with transglycosylated materials, *Journal of Food Engineering*, 149 (2015) 248-254.
- [30] H. Sato, M. Fujimori, H. Suzuki, K. Kadota, Y. Shirakawa, S. Onoue, Y. Tozuka, Absorption improvement of tranilast by forming highly soluble nano-size composite structures associated with alpha-glucosyl rutin via spray drying, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 92 (2015) 49-55.
- [31] Y. Tozuka, K. Higashi, T. Morita, M. Nishikawa, H. Uchiyama, J. Zhang, K. Moribe, K. Nishikawa, H. Takeuchi, K. Yamamoto, Transglycosylated rutin-specific non-surface-active nanostructure affects absorption enhancement of flurbiprofen, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 82 (2012) 120-126.
- [32] 濱田賢良, 噴霧乾燥装置の特徴と設計の実際, *技術革新と産業改革*, 6 卷 (2013) 32-37.
- [33] A. Paudel, Z.A. Worku, J. Meeus, S. Guns, G. Van den Mooter, Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: formulation and process considerations, *International journal of pharmaceuticals*, 453 (2013) 253-284.
- [34] H. Uchiyama, Y. Tozuka, F. Asamoto, H. Takeuchi, Fluorescence investigation of a specific structure formed by aggregation of transglycosylated stevias: solubilizing effect of poorly water-soluble drugs, *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 43 (2011) 71-77.
- [35] H. Uchiyama, Y. Tozuka, F. Asamoto, H. Takeuchi, alpha-Glucosyl hesperidin induced an improvement in the bioavailability of pranlukast hemihydrate using high-pressure homogenization, *International journal of pharmaceuticals*, 410 (2011) 114-117.
- [36] J. Zhang, Y. Tozuka, H. Uchiyama, K. Higashi, K. Moribe, H. Takeuchi, K. Yamamoto, NMR investigation of a novel excipient, alpha-glucosylhesperidin, as a suitable solubilizing agent for poorly water-soluble drugs, *Journal of pharmaceutical sciences*, (2011).
- [37] H. Uchiyama, Y. Tozuka, M. Imono, H. Takeuchi, Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: dramatic improvement in drug dissolution

and bioavailability, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* : official journal of *Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 76 (2010) 238-244.

[38] H. Uchiyama, Y. Tozuka, M. Imono, H. Takeuchi, Improvement of dissolution and absorption properties of poorly water-soluble drug by preparing spray-dried powders with alpha-glucosyl hesperidin, *International journal of pharmaceutics*, 392 (2010) 101-106.

[39] C.A. Rice-evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley, J.B. Pridham, The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids, *Free Radical Research*, 22 (1995) 375-383.

[40] W. Bors, W. Heller, C. Michel, M. Saran, [36] Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods in Enzymology*, Academic Press 1990, pp. 343-355.

[41] C. Jullian, L. Moyano, C. Yanez, C. Olea-Azar, Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 67 (2007) 230-234.

[42] S. Gunji, J. Santoso, Y. Yoshie-Stark, T. Suzuki, Effects of Extracts from Tropical Seaweeds on DPPH Radicals and Caco-2 Cells Treated with Hydrogen Peroxide, *Food Science and Technology Research*, 13 (2007) 275-279.

[43] Y. Takahata, M. Ohnishi-Kameyama, S. Furuta, M. Takahashi, I. Suda, Highly Polymerized Procyanidins in Brown Soybean Seed Coat with a High Radical-Scavenging Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2001) 5843-5847.

[44] M. Okawa, J. Kinjo, T. Nohara, M. Ono, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 24 (2001) 1202-1205.

[45] A. Karioti, D. Hadjipavlou-Litina, M.L. Mensah, T.C. Fleischer, H. Skaltsa, Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiya aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana, *J Agric Food Chem*, 52 (2004) 8094-8098.

[46] R. Notman, M. Noro, B. O'Malley, J. Anwar, Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 13982-13983.

- [47] A.M. Smondyrev, M.L. Berkowitz, Molecular dynamics simulation of DPPC bilayer in DMSO, *Biophysical journal*, 76 (1999) 2472-2478.
- [48] R. Notman, W.K. den Otter, M.G. Noro, W.J. Briels, J. Anwar, The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide bilayers simulated by molecular dynamics, *Biophysical journal*, 93 (2007) 2056-2068.
- [49] K. Kanazawa, M. Uehara, H. Yanagitani, T. Hashimoto, Bioavailable flavonoids to suppress the formation of 8-OHdG in HepG2 cells, *Archives of biochemistry and biophysics*, 455 (2006) 197-203.
- [50] A. Ikeno, K. Hashimoto, M. Shimizu, J. Terao, S. Kumazawa, T. Nakayama, Absorption and Metabolism of Quercetin in Caco-2 Cells, *Food Science and Technology Research*, 5 (1999) 90-92.
- [51] M. Shirai, R. Yamanishi, J.H. Moon, K. Murota, J. Terao, Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts, *Biosci Biotechnol Biochem*, 66 (2002) 1015-1021.
- [52] A. Engen, J. Maeda, D.E. Wozniak, C.A. Brents, J.J. Bell, M. Uesaka, Y. Aizawa, T.A. Kato, Induction of cytotoxic and genotoxic responses by natural and novel quercetin glycosides, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 784-785 (2015) 15-22.
- [53] W.H. Coulter, Means for counting particles suspended in a fluid, United States Patent Office, 1953.
- [54] 嘉. 籾野, Y. Katsumura, A. Mozumder, Charged particle and photon interactions with matter : recent advances, applications, and interfaces, CRC Press 2011.
- [55] E.J. Hall, A.J. Giaccia, *Radiobiology for the radiologist*, 7th ed ed., Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins 2012.
- [56] C.v. Sonntag, *The chemical basis of radiation biology*, Taylor & Francis, London; New York, 1987.
- [57] 小沢俊彦, 活性酸素の環境因子による生成, *蛋白質核酸酵素*, 33 (1988) 2811-2817.
- [58] P.A. Riley, Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation, *International journal of radiation biology*, 65 (1994) 27-33.
- [59] 藤田直, 活性酸素, 過酸化脂質, フリーラジカルの生成と消去機構並びにそれらの

生物学的作用, *Yakugaku Zasshi*, 122 (2002) 203-218.

[60] M. Dizdaroglu, Chemical determination of free radical-induced damage to DNA, *Free radical biology & medicine*, 10 (1991) 225-242.

[61] R.I. Salganik, The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population, *Journal of the American College of Nutrition*, 20 (2001) 464S-472S; discussion 473S-475S.

[62] R.E. Shackelford, W.K. Kaufmann, R.S. Paules, Oxidative stress and cell cycle checkpoint function, *Free radical biology & medicine*, 28 (2000) 1387-1404.

[63] A. Galan, L. Garcia-Bermejo, A. Troyano, N.E. Vilaboa, C. Fernandez, E. de Blas, P. Aller, The role of intracellular oxidation in death induction (apoptosis and necrosis) in human promonocytic cells treated with stress inducers (cadmium, heat, X-rays), *European journal of cell biology*, 80 (2001) 312-320.

[64] A. Tulard, F. Hoffschir, F.H. de Boisferon, C. Luccioni, A. Bravard, Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity, *Free radical biology & medicine*, 35 (2003) 68-77.

[65] M.L. Circu, T.Y. Aw, Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis, *Free radical biology & medicine*, 48 (2010) 749-762.

[66] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free radical biology & medicine*, 30 (2001) 1191-1212.

[67] D.A. Dickinson, H.J. Forman, Cellular glutathione and thiols metabolism, *Biochem Pharmacol*, 64 (2002) 1019-1026.

[68] E.S.J. Arnér, A. Holmgren, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *European Journal of Biochemistry*, 267 (2000) 6102-6109.

[69] X.J. Huang, C.X. Song, C.Q. Zhong, F.S. Wang, Research progress in the radioprotective effect of superoxide dismutase, *Drug discoveries & therapeutics*, 6 (2012) 169-177.

[70] S. Kobashigawa, G. Kashino, H. Mori, M. Watanabe, Relief of delayed oxidative stress by ascorbic acid can suppress radiation-induced cellular senescence in mammalian fibroblast cells, *Mech Ageing Dev*, 146-148 (2015) 65-71.

[71] S. Kobashigawa, G. Kashino, K. Suzuki, S. Yamashita, H. Mori, Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive

oxygen species in normal human fibroblast cells, *Radiation research*, 183 (2015) 455-464.

[72] P.J. Nadeau, S.J. Charette, M.B. Toledano, J. Landry, Disulfide Bond-mediated multimerization of Ask1 and its reduction by thioredoxin-1 regulate H₂O₂-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation and apoptosis, *Molecular biology of the cell*, 18 (2007) 3903-3913.

[73] 裕. 榮長, 栄. 吉原, 禎. 松尾, 酸化ストレスとレドックス制御 : タンパク質の酸化的修飾と活性調整 (特集 酸化ストレス), *生物試料分析 = Journal of analytical bio-science*, 32 (2009) 265-272.

[74] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *Eur J Med Chem*, 97 (2015) 55-74.

[75] O. Myhre, J.M. Andersen, H. Aarnes, F. Fonnum, Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation, *Biochem Pharmacol*, 65 (2003) 1575-1582.

[76] J.A. Royall, H. Ischiropoulos, Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells, *Archives of biochemistry and biophysics*, 302 (1993) 348-355.

[77] T.T. Puck, P.I. Marcus, Action of x-rays on mammalian cells, *The Journal of experimental medicine*, 103 (1956) 653-666.

[78] N.A. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat Protoc*, 1 (2006) 2315-2319.

[79] J.A. Kang, S.H. Yoon, J.K. Rho, B.-s. Jang, D.S. Choi, D.-E. Lee, E.-B. Byun, J. Jeon, S.H. Park, Radioprotective effect of hesperetin against γ -irradiation-induced DNA damage and immune dysfunction in murine splenocytes, *Food Science and Biotechnology*, 25 (2016) 163-168.

[80] S. Kumar, A.B. Tiku, Biochemical and Molecular Mechanisms of Radioprotective Effects of Naringenin, a Phytochemical from Citrus Fruits, *J Agric Food Chem*, 64 (2016) 1676-1685.

[81] K. Shimoi, S. Masuda, B. Shen, M. Furugori, N. Kinae, Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 350 (1996) 153-161.

[82] J.F. Weiss, M.R. Landauer, Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals, *Toxicology*, 189 (2003) 1-20.

- [83] G. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships, *Free Radical Biology and Medicine*, 22 (1997) 749-760.
- [84] M. Kessler, G. Ubeaud, L. Jung, Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives, *J Pharm Pharmacol*, 55 (2003) 131-142.
- [85] G.C. Yen, P.D. Duh, H.L. Tsai, S.L. Huang, Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes, *Biosci Biotechnol Biochem*, 67 (2003) 1215-1222.
- [86] E.V. Schmalhausen, E.B. Zhlobek, I.N. Shalova, O. Firuzi, L. Saso, V.I. Muronetz, Antioxidant and prooxidant effects of quercetin on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Food and Chemical Toxicology*, 45 (2007) 1988-1993.
- [87] A. Robaszekiewicz, A. Balcerczyk, G. Bartosz, Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells, *Cell Biol Int*, 31 (2007) 1245-1250.
- [88] A. Meister, M.E. Anderson, Glutathione, *Annual Review of Biochemistry*, 52 (1983) 711-760.
- [89] C. Jacob, G.I. Giles, N.M. Giles, H. Sies, Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 42 (2003) 4742-4758.
- [90] H.J. Forman, J.M. Fukuto, M. Torres, Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers, *American journal of physiology. Cell physiology*, 287 (2004) C246-256.
- [91] N. Le Moan, G. Clement, S. Le Maout, F. Tacnet, M.B. Toledano, The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways, *J Biol Chem*, 281 (2006) 10420-10430.
- [92] A.F. Banne, A. Amiri, R.W. Pero, Reduced level of serum thiols in patients with a diagnosis of active disease, *Journal of anti-aging medicine*, 6 (2003) 327-334.
- [93] J.C. Fernandez-Checa, N. Kaplowitz, The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis, *Analytical biochemistry*, 190 (1990) 212-219.
- [94] J.A. Cook, H.I. Pass, S.N. Iype, N. Friedman, W. DeGraff, A. Russo, J.B. Mitchell, Cellular glutathione and thiol measurements from surgically resected human lung tumor and normal lung tissue, *Cancer research*, 51 (1991) 4287-4294.

- [95] H. Kamencic, A. Lyon, P.G. Paterson, B.H. Juurlink, Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione, *Analytical biochemistry*, 286 (2000) 35-37.
- [96] G.N. Kim, H.D. Jang, Protective mechanism of quercetin and rutin using glutathione metabolism on HO-induced oxidative stress in HepG2 cells, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171 (2009) 530-537.
- [97] R. Ferraresi, L. Troiano, E. Roat, E. Lugli, E. Nemes, M. Nasi, M. Pinti, M.I. Fernandez, E.L. Cooper, A. Cossarizza, Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin, *Free Radic Res*, 39 (2005) 1249-1258.
- [98] S. Ito, T. Kato, K. Fujita, Covalent binding of catechols to proteins through the sulphhydryl group, *Biochem Pharmacol*, 37 (1988) 1707-1710.
- [99] A.W. Boots, N. Kubben, G.R.M.M. Haenen, A. Bast, Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308 (2003) 560-565.
- [100] T.J. Monks, M.W. Anders, W. Dekant, J.L. Stevens, S.S. Lau, P.J. van Bladeren, Glutathione conjugate mediated toxicities, *Toxicology and applied pharmacology*, 106 (1990) 1-19.
- [101] C. Su, A.H. Haskins, C. Omata, Y. Aizawa, T.A. Kato, PARP Inhibition by Flavonoids Induced Selective Cell Killing to BRCA2-Deficient Cells, *Pharmaceuticals (Basel)*, 10 (2017).
- [102] J. Maeda, E.J. Roybal, C.A. Brents, M. Uesaka, Y. Aizawa, T.A. Kato, Natural and glucosyl flavonoids inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity and induce synthetic lethality in BRCA mutant cells, *Oncology reports*, 31 (2014) 551-556.