

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 相澤 恭

第1章 緒論

放射線治療における長時間、低線量の被爆を想定した天然由来の放射線防護剤の開発が、近年精力的に進められている。その中で、フラボノイドは機能性や安全性が高く、優れた候補物質であるが、フラボノイド自身が難水溶性であることが使用上の大きな課題となっている。この課題に対して糖転移フラボノイドが提案されているが、糖転移することによって大幅な水溶性改善は達成できるが、反面、細胞への取り込み効率の低下が起こり、細胞内での機能性が低下するデメリットがある（図1）。

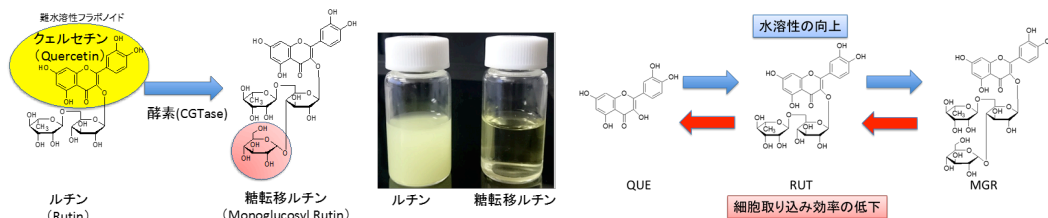


図1 糖転移フラボノイド（モノグルコシルルチン）の利点と欠点

そこで、本研究では、この糖転移フラボノイド（モノグルコシルルチン）の欠点を改善するため、難水溶性フラボノイド（ケルセチン、ヘスペレチン、ナリンゲニン）と糖転移フラボノイド（モノグルコシルルチン）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することを研究目的としている。本博士論文においては、図2に示すような手順で、本研究で提案したフラボノイド複合体の作製から、物性評価および放射線防護剤としての可能性検討について、段階的に研究を進めた。本研究を通して、糖転移フラボノイドを用いたフラボノイド複合体の有効性を検証すると共に、放射線防護剤として、より望ましいフ

フラボノイド複合体の組み合わせや製剤設計の指針について提案したい。

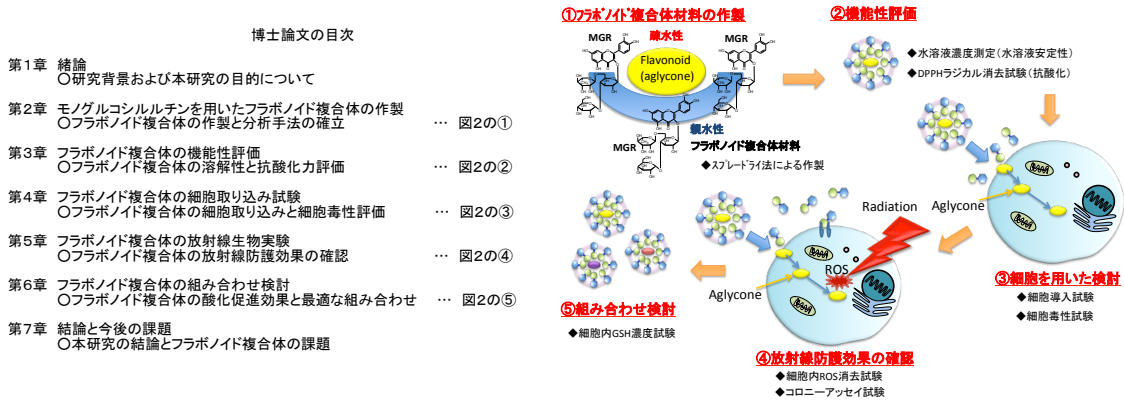
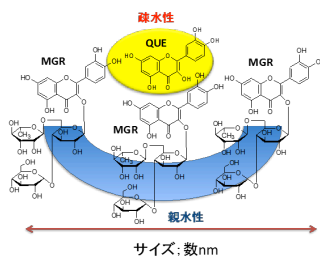


図2 博士論文における研究の進め方

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

第2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）をスプレードライヤ法により作製し、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。



	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)

図3 本研究で作製したフラボノイド複合体

第3章 フラボノイド複合体の機能性評価

第3章では、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物性評価を行った。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 (図 4)。

第 4 章 フラボノイド複合体の細胞取り込み試験

第 4 章では、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 (図 5)。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って、細胞毒性に変化があることを確認した。

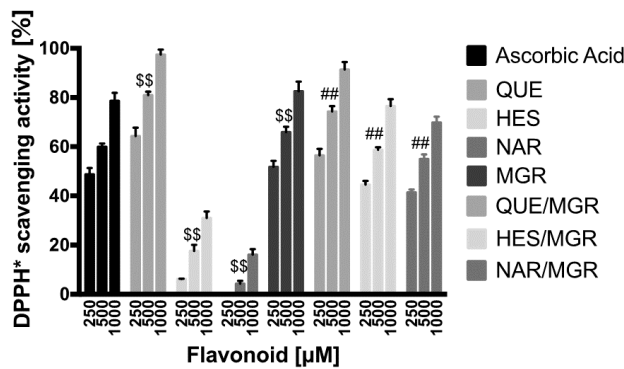


図 4 DPPH 法による抗酸化試験結果

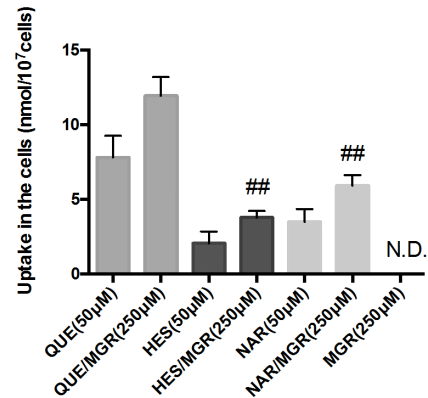


図 5 細胞取り込み試験結果

第 5 章 フラボノイド複合体の放射線生物実験

第 5 章では、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、ケルセチン/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、ケルセチン/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、ケルセチン/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 (図 6)。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。

第 6 章 フラボノイド複合体の組み合わせ検討

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、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。

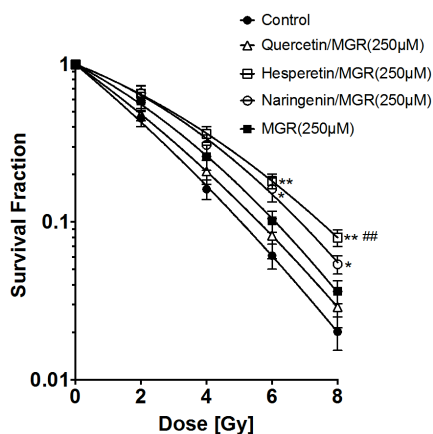


図6 放射線防護効果の比較

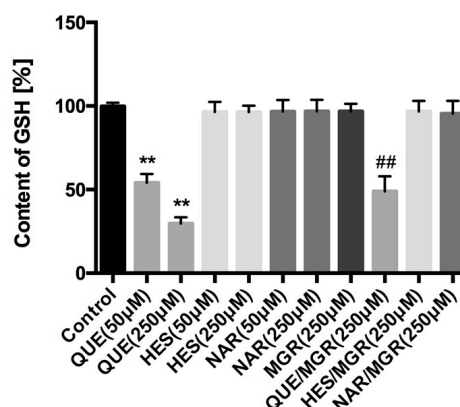


図7 フラボノイドの酸化促進効果

第7章 結論と今後の課題

本研究によって、難水溶性フラボノイドを糖転移フラボノイド（モノグルコシルルチン）によって可溶化することを目的としたフラボノイド複合体を作製し、その細胞内への取り込み効果を確認した。また、作製した3種類のフラボノイド複合体のうち、ヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体が、最も放射線防護効果が高い結果となった。さらに、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を明らかにする中で、新たな課題（難水溶性フラボノイドの酸化促進効果）も示すことが出来た。

今後の課題と展望として、モノグルコシルルチン以外の糖転移フラボノイドを用いたフラボノイド複合体の検討、または、本研究で取り扱わなかった新たな難水溶性フラボノイドやその誘導体を検討することによって、今回見出したヘスペレチン/モノグルコシルルチン複合体を越えるフラボノイド由来の安全で効果が高い放射線防護剤の開発に繋がるものと考えている。