

氏名	濱岡 緑		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第6822号		
学位授与の日付	令和5年3月24日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	マウスマクロファージ様細胞における水素含有粘性気泡液の抗酸化作用に関する研究		
論文審査委員	高柴 正悟 教授	岡元 邦彰 教授	岡田 正弘 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

水素は新たな抗酸化物質として注目されており、強力な毒性を持つ活性酸素種（Reactive oxygen species; ROS）を選択的に消去することが知られている。当教室ではこれまでに新たな水素のデリバリー担体として水素ガスを含有した水素含有気泡液を開発し、酸化ストレスを付加したマウス培養細胞に水素含有気泡液を作用させると、細胞の生存率が高くなり、細胞内ROS産生を抑制することを報告している。本研究では気泡液の保持時間の延長と抗酸化作用の増強を目的として、気泡液に増粘剤を添加し、その物性とマウス培養細胞における抗酸化作用について検討した。

【材料と方法】

緩衝液（PBS）に界面活性剤（大豆由来レシチン）、ゲル化剤（発酵セルロース製剤）を混入し、粘性気泡液製造装置とシラス多孔質ガラス（SPG）膜を用いて気泡を発生させ、さらに増粘剤（とろみ調整用食品）を混入して水素含有粘性気泡液を作製した。気体には、コントロールガス（窒素75.1%＋酸素19.9%＋二酸化炭素5%）とそれに1.3%水素または0.5%水素を混入した水素混合ガスを用い、それぞれのガスを含有した気泡液は、コントロール気泡液、1.3%または0.5%水素含有気泡液とした。

作製した気泡液の物性の評価として、平均気泡径および気泡のボイド率（気泡の体積占有率）の変化を調べた。また気泡液からの放出水素量を、高感度可燃性ガス検知器を用いて測定し、気泡液から水相に溶解した水素濃度についても簡易ガスクロマトグラフィを用いて測定した。さらに、気泡残存率の経時的変化を測定した。これらに関して、増粘剤を添加した粘性気泡液と、添加していない気泡液で比較を行った。

酸化ストレスに対する水素含有粘性気泡液の効果については、マウス培養細胞（RAW264.7）に、酸化剤としてtert-ブチルヒドロペルオキシド（TBHP）を付加し、コントロール気泡液または水素含有気泡液を加え、細胞染色によって細胞内ROS産生を評価した。またROSによって発現が誘導され、抗酸化作用および細胞保護作用を持つHeme oxygenase-1（HO-1）遺伝子発現を定量評価した。

統計学的分析にはTwo-way analysis of variance（ANOVA）またはOne-way ANOVA、およびŠidák's multiple comparisons test またはTukey's multiple comparisons testを行い、有意水準は5%未満とした。

【結 果】

増粘剤を添加した粘性気泡液では、増粘剤を添加していない気泡液と比較して平均気泡径が大きくなり、ボイド率が低くなった。気泡液からの放出水素量については、粘性気泡液では放出ピークが低くなり、放出曲線が緩やかになった。また、気泡液から水相に溶解した水素濃度は粘性気泡液で有意に高く、気泡残存率も有意に高かった。さらに、粘性気泡液は増粘剤を添加していない気泡液より気泡残存率が高かった。

細胞染色による細胞内ROS産生の評価では、TBHP+1.3%水素含有気泡液の場合は、増粘剤の有無によらず抗酸化作用が認められた。一方、TBHP+0.5%水素含有気泡液は、増粘剤を添加した粘性気泡液は抗酸化作用が認められたが、増粘剤を添加していない気泡液では認められなかった。また水素含有粘性気泡液では濃度依存性に抗酸化作用が増強されることが示された。HO-1遺伝子発現は、TBHP群とTBHP+コントロール粘性気泡液群で増加し、TBHP+水素含有粘性気泡液群で有意に抑制されていた。

【考 察】

増粘剤を添加して作製した水素含有粘性気泡液は、増粘剤を添加していない気泡液と比較して有意に気泡の残存率が高く、気泡保持時間の延長が認められた。また水相に溶解した水素濃度においても、増粘剤を添加していない気泡液と比較して粘性気泡液の方が高かった。これは、残存した気泡が水相の表面を覆うことで、水相に溶解した水素が気相中に放出されにくくなり、水相中に留まったためであり、これにより抗酸化作用が増強されたのではないかと考えられた。

【結 語】

水素含有気泡液とそれに増粘剤を添加した水素含有粘性気泡液を作製した。水素含有粘性気泡液では気泡残存率が高く、水相に溶解する水素濃度が高くなった。1.3%水素含有ガスと、より低濃度の0.5%水素含有ガスを用いて作製した水素含有粘性気泡液は、TBHPで酸化ストレスを与えたマウス培養細胞のROS産生およびHO-1の遺伝子発現を抑制したことから、抗酸化作用を有していることが示された。さらに抗酸化作用は粘性気泡液のほうが強いことが示され、粘性気泡液であれば0.5%の低濃度であっても抗酸化作用があることが示された。水素含有粘性気泡液の原材料は食品であるため、口腔粘膜炎などの口腔粘膜疾患に対して応用することができるのではないかと示唆された。

論文審査結果の要旨

【緒言】近年、水素は新たな抗酸化物質として注目されており、特に強力な毒性を持つヒドロキシルラジカルやペルオキシナイトライトなどの活性酸素種（Reactive oxygen species; ROS）を選択的に消去することが報告されている。当教室では水素ガスを含む水素含有気泡液を開発し、酸化ストレスを付加したマウス培養細胞に水素含有気泡液を作用させると、細胞内ROS産生を抑制することを報告している。本研究では気泡液の保持時間の延長と抗酸化作用の増強を目的として、気泡液に増粘剤を添加し、その物性とマウス培養細胞における抗酸化作用について検討した。

【方法】加温した緩衝液に界面活性剤とゲル化剤を混入し、既報の粘性気泡液製造装置とシラス多孔質ガラス（SPG）膜を用いて気泡を発生させ、さらに増粘剤を混入して水素含有粘性気泡液を作製した。気体には、コントロールガスとそれに1.3%水素または0.5%水素を混入した水素混合ガスを用いた。気泡の物性は平均気泡径および体積割合であるボイド率の変化を調べ、気泡液からの放出水素濃度と水相への溶解水素濃度を測定した。さらにシャーレ面積に対する気泡の残存率を算出した。抗酸化作用は、培養細胞（マウスマクロファージ様細胞RAW264.7）に酸化剤であるtert-ブチルヒドロペルオキシド（TBHP）と気泡液を作用させ、細胞染色によって細胞内ROS産生を評価した。またROS誘導性の抗酸化酵素Heme oxygenase-1（HO-1）遺伝子の発現をRT-PCRで定量した。

【結果】増粘剤添加の粘性気泡液では、増粘剤なしの気泡液よりも平均気泡径は大きくなり、ボイド率は低下した。放出水素量は、放出ピークが低くかつ放出曲線が緩やかになり、水相への溶解水素濃度と気泡残存率も有意に上昇した。細胞染色では、1.3%水素含有気泡液では増粘剤の有無によらず抗酸化作用を示したが、0.5%では粘性気泡液群のみで示した。また、抗酸化作用は濃度依存性であった。HO-1遺伝子発現量は、TBHP群とTBHP+コントロール群で増加したが、TBHP+水素含有粘性気泡液群で有意に抑制された。

【考察】粘性気泡液では水素含気泡の残存率が高く、培養細胞での酸化ストレスに対する抗酸化作用が増強することが示唆された。残存した気泡が水相の表面を覆うことで、溶解した水素が水相中に留められて抗酸化作用を増強すると考えられた。

本研究では、開発した水素含有粘性気泡液に粘性を付与することで接触する水相へより高濃度の水素を供給することを示し、水素濃度が低濃度であっても酸化ストレス下の培養細胞で抗酸化作用があることを示した。この原材料は食品であるので生体に対して安全に使用できることから、得られた結果は、今後の臨床応用を期待させる新しい知見である。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。