

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2011年6月16日(16.06.2011)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2011/071088 A1

- (51) 国際特許分類:  
C01B 13/02 (2006.01) G01N 24/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/072050
- (22) 国際出願日: 2010年12月8日(08.12.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2009-279015 2009年12月9日(09.12.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人 札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤井 博匡 (Fuji Hiro tada) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南1条西17丁目 北海道公立大学法人 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 郡 俊志 (KOHRI Shunji) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南

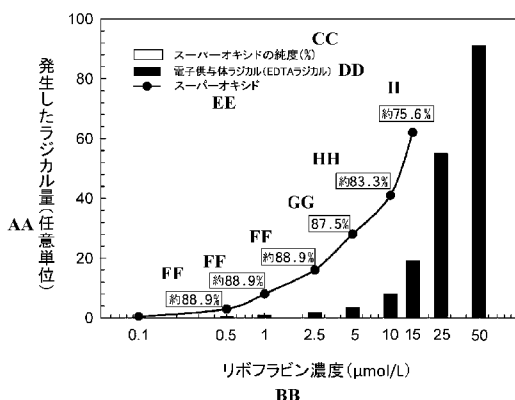
- 1条西17丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 佐川 慎悟, 外(SAGAWA Shingo et al.); 〒0600042 北海道札幌市中央区大通西5丁目1番1号 電通恒産札幌ビル3階 佐川慎悟国際特許事務所 Hokkaido (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING SUPEROXIDE, METHOD FOR EVALUATING SUPEROXIDE SCAVENGING ABILITY, DEVICE FOR PRODUCING SUPEROXIDE, AND DEVICE FOR EVALUATING SUPEROXIDE SCAVENGING ABILITY

(54) 発明の名称: スーパーオキシド製造方法、スーパーオキシド消去能評価方法、スーパーオキシド製造装置およびスーパーオキシド消去能評価装置

[図17]



- AA AMOUNT OF GENERATED RADICAL (ARBITRARY UNIT)
- BB RIBOFLAVIN CONCENTRATION (μmol/L)
- CC PURITY (%) OF SUPEROXIDE
- DD ELECTRON DONOR RADICAL (EDTA RADICAL)
- EE SUPEROXIDE
- FF APPROXIMATELY 88.9%
- GG APPROXIMATELY 87.5%
- HH APPROXIMATELY 83.3%
- II APPROXIMATELY 75.6%

(57) Abstract: Provided are a method for easily and stably producing a superoxide by selectively generating the superoxide or a radical containing the superoxide at a high purity; a method for easily evaluating the superoxide scavenging ability of a subject sample; a device for easily and stably producing a superoxide by selectively generating the superoxide or a radical containing the superoxide at a high purity; and a device for easily evaluating the superoxide scavenging ability of a subject sample. The aforesaid method for producing a superoxide comprises: a step (a) for preparing a solution for determination; a step (b) for forming a spin adduct/radical for determination; a step (c) for acquiring a spectrum for determination; a step (d) for determining similarity; a step (e) for acquiring flavin concentration; a step (f) for preparing a starting material solution; and a step (g) for generation.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2011/071088 A1



GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類: 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

---

【課題】 スーパーオキシドまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを選択的に発生させ、簡便かつ安定的に製造する方法、対象となる試料のスーパーオキシド消去能を簡便に評価する方法、スーパーオキシドまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを選択的に発生させ、簡便かつ安定的に製造する装置および対象となる試料のスーパーオキシド消去能を簡便に評価する装置を提供する。【解決手段】 本発明に係るスーパーオキシド製造方法は、(a) 判定用溶液調製工程、(b) 判定用スピンドラクトラジカル生成工程、(c) 判定用スペクトル取得工程、(d) 相似判定工程、(e) フラビン濃度取得工程、(f) 原料溶液調製工程、(g) 発生工程を有する。

## 明 細 書

### 発明の名称：

スーパーオキシド製造方法、スーパーオキシド消去能評価方法、スーパーオキシド製造装置およびスーパーオキシド消去能評価装置

### 技術分野

[0001] 本発明は、スーパーオキシド製造方法、スーパーオキシド消去能評価方法、スーパーオキシド製造装置およびスーパーオキシド消去能評価装置に関する。

### 背景技術

[0002] スーパーオキシド（スーパーオキサイド、スーパーオキシドアニオン、スーパーオキシドアニオンラジカル）は酸素分子に電子が1個付加した物質であり、 $(\cdot O_2^-)$ の化学式で表される。すなわち、スーパーオキシドは不対電子をもつ、ラジカル（フリーラジカル、遊離基）の一種である。不対電子とは、分子や原子の最外殻軌道に位置する、対になっていない電子をいい、ラジカルは一般に、この不対電子を解消しようとして他の物質を酸化ないし還元する、反応性の高い物質である。

[0003] また、スーパーオキシドは活性酸素の一種である。活性酸素とは、酸素が化学的に活性になり、一般的に非常に不安定で強い酸化力を示す、酸素の誘導体をいう。スーパーオキシドは生体内において最も多く発生する活性酸素であり、エネルギー代謝系、核酸代謝系、免疫系などにおいて、キサンチンオキシダーゼ、NAD(P)Hオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼなどの酵素により常時生成される。また、喫煙、抗癌剤、紫外線、除草剤、ストレス、排気ガスなどの刺激に曝されることにより、スーパーオキシドの生成は促進される。生成されたスーパーオキシドは、免疫系において、侵入した病原微生物に対する殺菌作用を発揮することが知られており、生体防御に重要な役割を果たしている。

[0004] 一方、生体内で過剰に生成されたスーパーオキシドは、自発的な不均化反

応により、過酸化水素やヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) といった、スーパーオキシドに比べてより強力な酸化力を有する活性酸素に変化する。その結果、スーパーオキシドは、核酸や酵素、細胞膜など、さまざまな物質の酸化変性を引き起こすことから、生体における酸化障害の出発物質のひとつとされ、疾病や老化の原因となっていると考えられている。そこで、昨今、スーパーオキシドによる生体への影響についての研究や、スーパーオキシドの活性を抑制する物質の探索などが行われており、余計なラジカルを発生させずにスーパーオキシドを発生させる技術などが求められている。

- [0005] 従来、スーパーオキシドを発生させる方法として、例えば、ヒポキサンチンにキサンチンオキシダーゼを作用させて発生させる方法（非特許文献1）、超酸化カリウム ( $\text{KO}_2$ ) を水に溶解させる方法（非特許文献2）、陽極とレドックスポリマー担持陰極との間に電流を流して発生させる方法（特許文献1）、水に浸漬したアルミニウム陽極酸化皮膜に紫外線を照射して発生させる方法（特許文献2）、混合気体を封入した放電管に高電圧をかけて発生させる方法（特許文献3）、パルスラジオリシス法を用いた方法（非特許文献3）、フラビンおよび電子供与体に光を照射する方法（非特許文献4～7）などを挙げることができる。

### 先行技術文献

#### 特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2002-273433号公報  
特許文献2：特開2003-112053号公報  
特許文献3：特開平10-152306号公報

#### 非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Finkelstein E. ら、J. Mol. Pharmacol.、第16巻、第676-685頁、1979年  
非特許文献2：Harbour J.R. ら、J. Phys. Chem.、第82巻、第1379-1399頁、1978年  
非特許文献3：Redpath J.L. ら、Int. J. Radiat. Bi

o l. R e l a t. S t u d. P h y s. C h e m. M e d. 第 3 3 卷、第 3 0 9 - 3 1 5 頁、1 9 7 8 年

非特許文献4 : M a s s e y V. ら、A n n u. R e v. B i o c h e m. 、第 3 2 卷、第 5 7 9 - 6 3 8 頁、1 9 6 3 年

非特許文献5 : M a s s e y V. ら、F E B S L e t t. 、第 8 4 卷、第 1 号、第 5 - 2 1 頁、1 9 7 7 年

非特許文献6 : C. B e a u c h a m ら、A n a l y. B i o c h e m. 、第 4 4 卷、第 2 7 6 - 2 8 7 頁、1 9 7 1 年

非特許文献7 : H. P. M i s i r a ら、A B B、第 1 8 1 卷、第 3 0 8 - 3 1 2 頁、1 9 7 7 年

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、非特許文献 1 に開示された方法では、酵素活性の低下や喪失を生ずることから、安定したスーパーオキシドの発生を担保することができず、非特許文献 2 に開示された方法では、スーパーオキシドの発生量を制御することが困難である。また、非特許文献 3 に開示された方法では、スーパーオキシドの発生と同時に、ヒドロキシラジカルや水和電子などの他の分子も同時に発生してしまうため、スーパーオキシドを選択的に発生させることができない。この点、特許文献 1 および特許文献 2 に開示された方法も、スーパーオキシドと同時に、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、あるいはオゾンなどの他の分子も同時に発生してしまうため、同様にスーパーオキシドを選択的に発生させることができない。非特許文献 4 ~ 7 に開示された方法もまた、スーパーオキシドと同時に電子供与体由来するラジカル（電子供与体ラジカル、妨害ラジカル、T H ・ラジカル）などの他の分子が発生してしまうため、やはりスーパーオキシドを選択的に発生させることができない。さらに、非特許文献 3 に開示された方法では、放射線を照射する装置を要することから、簡便な方法とはいえないが、この点、特許文献 3 に開示された方法もまた、高電圧を要するとともに放電管内部を陰圧にしなければなら

ず、同様に簡便な方法とはいえない。

[0009] 本発明は、このような問題点を解決するためになされたものであって、スーパーオキシドまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを選択的に発生させ、簡便かつ安定的に製造する方法、対象となる試料のスーパーオキシド除去能を簡便に評価する方法、スーパーオキシドまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを選択的に発生させ、簡便かつ安定的に製造する装置および対象となる試料のスーパーオキシド除去能を簡便に評価する装置を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、鋭意研究の結果、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）のスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）を生成させた後、電子スピン共鳴によりスペクトルを取得し、このスペクトルとスーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトル（スーパーオキシド標準スペクトル）とが相似するか否かの判定によりフラビンの濃度を取得して、取得した濃度のフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液に光を照射することにより、電子供与体ラジカルの発生量を抑えて、スーパーオキシドまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを選択的に発生させ、簡便かつ安定的に製造できることを見出すとともに、同様にして取得した濃度のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製して光を照射した後、電子スピン共鳴によりスペクトルを取得し、このスペクトルとスーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトルとを比較することにより、前記試料のスーパーオキシド除去能を評価できることを見出し、下記の各発明を完成した。

[0011] (1) 下記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) の工程を有するスーパーオキシド製造方法；

(a) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製工程、

(b) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体ラジカルのスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピニアダクト／ラジカル生成工程、

(c) 前記生成させたスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体ラジカルのスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

(d) スーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

(e) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得工程、

(f) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製工程、

(g) 前記原料溶液に光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生工程。

[0012] (2) フラビンがリボフラビンである場合において、前記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (f) の工程に代えて下記 (h) の工程を有する、(1) に記載のスーパーオキシド製造方法；

(h) リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製工程。

[0013] (3) フラビン濃度取得工程が、前記相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が 75.6 ~ 100% となるように取得するフラビン濃度取得工程である、(1) または (2) に記載のスーパーオキシド製造方法。

[0014] (4) 電子供与体が EDTA である、(1) から (3) のいずれかに記載のスーパーオキシド製造方法。

- [0015] (5) スピントラップ剤がCYPMPOである、(1)から(4)のいずれかに記載のスーパーオキシド製造方法。
- [0016] (6) 水系溶媒がリン酸緩衝液である、(1)から(5)のいずれかに記載のスーパーオキシド製造方法。
- [0017] (7) 試料のスーパーオキシド除去能を評価する方法であって、下記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(i)、(j)、(k)および(l)の工程を有する、前記方法；
- (a) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製工程、
  - (b) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成工程、
  - (c) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、
  - (d) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、
  - (e) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得工程、
  - (i) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製工程、
  - (j) 前記評価溶液に光を照射してスピンアダクトを生成させる評価用スピンアダクト生成工程、
  - (k) 前記評価用スピンアダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する評価用スペクトル取得工程、
  - (l) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記評価用スペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価する比較評価工程。



- [0018] (8) フラビンがリボフラビンである場合において、前記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (i) の工程に代えて下記 (m) の工程を有する、(7) に記載の方法；
- (m) リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド消去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製工程。
- [0019] (9) フラビン濃度取得工程が、前記相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が 75.6~100% となるように取得するフラビン濃度取得工程である、(7) または (8) に記載の方法。
- [0020] (10) 電子供与体が EDTA である、(7) から (9) のいずれかに記載の方法。
- [0021] (11) スピントラップ剤が CYPMPPO である、(7) から (10) のいずれかに記載の方法。
- [0022] (12) 水系溶媒がリン酸緩衝液である、(7) から (11) のいずれかに記載の方法。
- [0023] (13) 下記 (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi) および (vii) の手段を備えるスーパーオキシド製造装置；
- (i) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製手段、
- (ii) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび/または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト/ラジカル生成手段、
- (iii) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび/または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得手段、
- (iv) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用

スペクトルとが相似するか否かを判定するための相似判定手段、

(v) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得手段、

(v i) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製手段、

(v i i) 前記原料溶液に光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生手段。

- [0024] (14) フラビンがリボフラビンである場合において、前記(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)および(v i)の手段に代えて下記(v i i i)の手段を備える、(13)に記載のスーパーオキシド製造装置；  
(v i i i) リボフラビンの濃度C ( $\mu\text{mol/L}$ )が $0.1 < C \leq 15$ となるように、リボフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製手段。
- [0025] (15) フラビン濃度取得手段が、前記相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が75.6~100%となるように取得するフラビン濃度取得手段である、(13)または(14)に記載のスーパーオキシド製造装置。
- [0026] (16) 電子供与体がEDTAである、(13)から(15)のいずれかに記載のスーパーオキシド製造装置。
- [0027] (17) スピントラップ剤がCYPMPOである、(13)から(16)のいずれかに記載のスーパーオキシド製造装置。
- [0028] (18) 水系溶媒がリン酸緩衝液である、(13)から(17)のいずれかに記載のスーパーオキシド製造装置。
- [0029] (19) 試料のスーパーオキシド消去能を評価する装置であって、下記(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)、(i x)、(x)、(x i)および(x i i)の手段を有する、前記装置；  
(i) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製手段、

( i i ) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成手段、

( i i i ) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得手段、

( i v ) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定するための相似判定手段、

( v ) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得手段、

( i x ) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製手段、

( x ) 前記評価溶液に光を照射してスピンアダクトを生成させる評価用スピンアダクト生成手段、

( x i ) 前記評価用スピンアダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する評価用スペクトル取得手段、

( x i i ) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記評価用スペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価するための比較評価用手段。

[0030] ( 2 0 ) フラビンがリボフラビンである場合において、前記 ( i ) 、 ( i i ) 、 ( i i i ) 、 ( i v ) 、 ( v ) および ( i x ) の手段に代えて下記 ( x i i i ) の手段を備える、( 1 9 ) に記載の装置；

( x i i i ) リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製手段。

[0031] ( 2 1 ) フラビン濃度取得手段が、前記相似判定により相似するフラビンの

濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が75.6～100%となるように取得するフラビン濃度取得手段である、(19)または(20)に記載の装置。

[0032] (22) 電子供与体がEDTAである、(19)から(21)のいずれかに記載の装置。

[0033] (23) スピントラップ剤がCYPMPOである、(19)から(22)のいずれかに記載の装置。

[0034] (24) 水系溶媒がリン酸緩衝液である、(19)から(23)のいずれかに記載の装置。

[0035] (25) 下記(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(F)および(G)の工程を有するスーパーオキシド*in vivo*製造方法；

(A) 任意量のフラビン、電子供与体およびスピントラップ剤を生体試料または非ヒト動物の体内に投与する原料投与工程、

(B) 前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与したフラビン、電子供与体およびスピントラップ剤が存在する箇所に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成工程、

(C) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

(D) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

(E) 前記相似判定により相似するフラビンの至適量を取得するフラビン至適量取得工程、

(F) 前記取得した至適量のフラビンおよび電子供与体を前記生体試料または非ヒト動物の体内に投与する至適原料投与工程、

(G) 前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与したフラビン

および電子供与体が存在する箇所に光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生工程。

[0036] (26) 電子供与体がEDTAである、(25)に記載のスーパーオキシド *in vivo* 製造方法。

[0037] (27) スピントラップ剤がCYPMPPOである、(25)または(26)に記載のスーパーオキシド *in vivo* 製造方法。

[0038] (28) *in vivo*において試料のスーパーオキシド消去能を評価する方法であって、下記(A)、(B)、(C)、(D)、(E)、(H)、(I)、(J)および(K)の工程を有する、スーパーオキシド *in vivo* 消去能評価方法；

(A) 任意量のフラビン、電子供与体およびスピントラップ剤を生体試料または非ヒト動物の体内に投与する原料投与工程、

(B) 前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与したフラビン、電子供与体およびスピントラップ剤が存在する箇所に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成工程、

(C) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

(D) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

(E) 前記相似判定により相似するフラビンの至適量を取得するフラビン至適量取得工程、

(H) 前記取得した至適量のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤およびスーパーオキシド消去能を評価する試料を含む評価検体を生体試料または非ヒト動物の体内に投与する評価検体投与工程、

(I) 前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与した評価検体

に光を照射してスピンドダクトを生成させる *in vivo* スピンドダクト生成工程、

(J) 前記スピンドダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する *in vivo* スペクトル取得工程、

(K) スーパーオキシドのスピンドダクトの標準スペクトルと前記取得したスペクトルとを比較してスーパーオキシド消去能を評価する *in vivo* 比較評価工程。

[0039] (29) 電子供与体が EDTA である、(28) に記載のスーパーオキシド *in vivo* 消去能評価方法。

[0040] (30) スピントラップ剤が CYPMPPO である、(28) または (29) に記載のスーパーオキシド *in vivo* 消去能評価方法。

### 発明の効果

[0041] 本発明によれば、生体外および生体内において、スーパーオキシドまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを選択的に発生させ、簡便かつ安定的に製造することができることから、疾患や老化現象などにおけるスーパーオキシドの関与についての評価や研究を正確かつ簡便に行うことが可能となり、スーパーオキシドが関与する疾患や老化現象などの治療法・予防法の探索や進行メカニズムの解明を促進することができる。また、本発明によれば、生体外および生体内において、対象となる試料のスーパーオキシド消去能を簡便に評価することができることから、生体にとって真に有効な抗酸化物質の探索や、種々の物質が有する抗酸化能の評価を正確、簡便かつ迅速に行うことができる。

### 図面の簡単な説明

[0042] [図1] 本発明に係るスーパーオキシド製造装置の一実施形態を示す図である。

[図2] 本実施形態のスーパーオキシド製造装置 1 における各構成部の機能を示す機能ブロック図である。

[図3] 本実施形態における判定用溶液調製手段 2 を示す図である。

[図4] 本実施形態における判定用スペクトル取得手段 4 を示す図である。

[図5]本実施形態における相似判定手段5を示す図である。

[図6]本実施形態における原料溶液調製手段7を示す図である。

[図7]本発明に係るスーパーオキシド除去能評価装置の一実施形態を示す図である。

[図8]本実施形態のスーパーオキシド除去能評価装置9における各構成部の機能を示す機能ブロック図である。

[図9]本実施形態における評価溶液調製手段10を示す図である。

[図10]SOD無添加水系溶液およびSOD添加水系溶液に可視光を照射した後、電子スピン共鳴(Electron Spin Resonance; ESR)による測定を行い、得られたスペクトルを示す図である。図中、スペクトルAはSOD無添加水系溶液から得られたスペクトルを示し、スペクトルBは、SOD添加水系溶液から得られたスペクトルを示す。

[図11]スーパーオキシドとCYPMPPOからなるスピンアダクトの、コンピューターシミュレーションにより得られたスペクトル(スーパーオキシド標準スペクトル)を示す図(上図)、およびEDTAラジカルの、コンピューターシミュレーションにより得られたスペクトル(EDTAラジカル標準スペクトル)を示す図(下図)である。

[図12]酸化還元反応触媒としてリポフラビンを、かつ電子供与体としてテトラメチルエチレンジアミン(TMD)を用いて調製した水系溶液に可視光を照射した後、ESRによる測定を行い、得られたスペクトルを示す図である。

[図13]酸化還元反応触媒としてリポフラビンを、かつ電子供与体としてメチオニンを用いて調製した水系溶液に可視光を照射した後、ESRによる測定を行い、得られたスペクトルを示す図である。

[図14]酸化還元反応触媒としてFMNを、かつ電子供与体としてEDTAを用いて調製した水系溶液に可視光を照射した後、ESRによる測定を行い、得られたスペクトルを示す図である。

[図15]酸化還元反応触媒としてFMNを、かつ電子供与体としてTMDを用

いて調製した水系溶液に可視光を照射した後、ESRによる測定を行い、得られたスペクトルを示す図である。

[図16]酸化還元反応触媒としてフルオレセインを、かつ電子供与体としてメチオニンを用いて調製した水系溶液に可視光を照射した後、ESRによる測定を行い、得られたスペクトルを示す図である。

[図17]リボフラビンの濃度を変えた水系溶液に可視光を照射して、発生したラジカルの特定および定量を行い、発生したラジカルにおけるスーパーオキシドの純度を算出した結果を示す図である。図中、縦軸は発生したラジカル量を、横軸はリボフラビン濃度をそれぞれ示す。

[図18]可視光の照射時間を変えた水系溶液について、ESRによる測定により得られたスペクトルのシグナル強度を示す図である。図中、縦軸はシグナル強度を、横軸は可視光照射時間ないし可視光照射停止後の時間を示す。

[図19]リボフラビンの光照射によりスーパーオキシドを発生させた場合およびキサンチンオキシダーゼによりスーパーオキシドを発生させた場合における、SODによるラジカル発生阻害率を示す図である。図中、縦軸はラジカル発生阻害率を、横軸は加えたSOD濃度を示す。

### 発明を実施するための形態

[0043] 以下、本発明に係るスーパーオキシド製造方法、スーパーオキシド消去能評価方法、スーパーオキシド製造装置およびスーパーオキシド消去能評価装置について詳細に説明する。

[0044] まず、本発明に係るスーパーオキシド製造方法は、下記（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）および（g）の工程を有する；

- （a）フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製工程、
- （b）前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成工程、
- （c）前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジ



カルのスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

(d) スーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

(e) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得工程、

(f) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製工程、

(g) 前記原料溶液に光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生工程

。

[0045] 本実施形態において「高純度でスーパーオキシドを含有するラジカル」とは、スーパーオキシドと電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル）とからなるラジカルの集合であって、その集合においてスーパーオキシドが占める割合（スーパーオキシドの純度）がスーパーオキシド以外の種類のラジカルが占める割合と比較して十分に大きいラジカルをいい、その純度は、70%以上100%未満が好ましく、75.6%以上100%未満がより好ましく、83.3%以上100%未満がさらに好ましい。

[0046] なお、スーパーオキシドを含有するラジカルにおけるスーパーオキシドの純度は、常法に従い算出することができ、例えば、まず、水系溶液においてスーパーオキシドを含有するラジカルを発生させて電子スピン共鳴による測定を行い、スーパーオキシド標準スペクトルと相似するスペクトルを得て、このスペクトルに基づいてスーパーオキシド発生量を測定する。次に、スーパーオキシド発生量を測定した場合と同様の組成の水系溶液にスーパーオキシドを特異的に消去する酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ（ $\text{SOD}$ ）を添加した上でラジカルを発生させて電子スピン共鳴による測定によりスペクトルを取得し、このスペクトルに基づいて電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル）発生量を測定する。続いて、測定したスーパーオキシド発生量と電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル）発生

量とから、次式 1 によりスーパーオキシドの純度を算出することができる。

[0047] ここで、電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance ; ESR) とは、ラジカルの同定および定量に用いられる方法の一種である。電子スピン共鳴では、サンプルを磁場の中に置き、マイクロ波を照射して前記サンプルに含まれるラジカルの不対電子を共鳴させ、共鳴したときに起こる吸収エネルギーを測定する。磁場を変化させながらこの吸収エネルギーの測定を行い、一連の吸収エネルギー変化をスペクトルとして取得する。ラジカルの種類によりスペクトルの形状が決定されるため、取得されたスペクトルの形状を観察することにより、前記サンプルに含まれるラジカルを同定することができる。

[0048] (式 1) : スーパーオキシドの純度 (%) = {スーパーオキシド発生量 / (スーパーオキシド発生量 + 電子供与体ラジカル (妨害ラジカル、TH・ラジカル) 発生量)} × 100

[0049] 本発明において、スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトル (スーパーオキシド標準スペクトル) とは、スーパーオキシドのスピンアダクト、高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルのスピンアダクトまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルのスピンアダクトとラジカルとの混合物について、電子スピン共鳴による測定を行って得られるスペクトルまたは電子スピン共鳴による測定を行った場合に得られると想定されるスペクトルをいう。スーパーオキシド標準スペクトルは、例えば、コンピューターシミュレーションにより得ることができ、既報 (MASATOK. ら、Free Radical Research、第 40 巻、第 11 号、第 1166-1172 頁、2006 年) に記載のものを用いることができる他、キサンチンオキシダーゼにより高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを発生させて電子スピン共鳴による測定を行うことにより得ることもできる。

[0050] 工程 (a) : 判定用溶液調製工程において、判定用溶液は、フラビン、電子供与体およびスピントラップ剤を水系溶媒に溶解することにより調製する

ことができ、その特徴を損なわない限りにおいて、他の物質を含んでもよい。

[0051] フラビンは、ジメチルイソアロキサジンの10位に置換基をもつ一群の誘導体である。次式2および3に示すように、フラビンは電子供与体の共存下で光を照射されると、エネルギー順位の高い状態へ励起され、電子供与体から1電子を奪い、フラビンラジカルとなる。同時に、1電子を奪われた電子供与体は不対電子を有することとなるため、電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル）となる（式2）。続いてフラビンラジカルは酸素分子に1電子を付加し、スーパーオキシドを発生させる（式3）。

[0052] （式2）：フラビン+電子供与体+光→フラビンラジカル+電子供与体ラジカル

（式3）：フラビンラジカル+酸素分子→スーパーオキシド+フラビン

[0053] 本発明によれば、上記の反応を利用してスーパーオキシドまたは高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを製造することができる。本発明において用いることができるフラビンとしては、例えば、リボフラビン、フラビンモノヌクレオチド（FMN）、イソアロキサジン、アロキサジン、ルミクロム、ルミフラビン、フラビン-アデニンジヌクレオチド（FAD）、ガラクトフラビン、D-アラボフラビン、リキソフラビンおよびそれらの任意の組み合わせなどを挙げることができるが、リボフラビン、FMN、またはこれらの混合物を好適に用いることができる。

[0054] また、本発明において用いる電子供与体は、励起されたフラビンに電子を与える、低い酸化還元電位を有する物質であればよく、酸素含有化合物、窒素含有化合物、リン含有化合物、硫黄含有化合物を挙げることができ、窒素含有化合物が好ましい。そのような窒素含有化合物としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、メチオニン、テトラメチルエチレンジアミン（TMD, TMED）などを挙げることができるが、EDTAを好適に用いることができる。

[0055] スピントラップ剤は、短時間で他の物質に変化する不安定なラジカルと共

有結合（アダクト）して、安定なスピニアダクトを生成する試薬である。スーパーオキシドも不安定なラジカルであるため、直接、電子スピン共鳴により検出することは困難であるが、スピニアダクトを生成させることにより検出が可能となる。本発明において用いるスピントラップ剤は、少なくともスーパーオキシドとスピニアダクトを生成するものであればよく、例えば、2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2λ5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide (CYPMPO)、5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPPO)、5-Diethoxyphosphoryl 5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO)、2,5,5-triethyl-1-pyrroline N-Oxide (M<sub>3</sub>PO)、3,3,5,5-Tetramethyl-1-pyrroline N-Oxide (TMPO)などを挙げるができるが、CYPMPOを好適に用いることができる。

[0056] また、本発明において用いる水系溶媒は、水系溶媒を含む溶液のpHを一定に保つ機能を有する限り特に限定されず、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液などを挙げるができるが、リン酸緩衝液を好適に用いることができる。

[0057] 工程（b）：判定用スピニアダクト／ラジカル生成工程において、判定用溶液への光の照射は、適当な光源を用いて行うことができる。本発明において用いることができる光源としては、例えば、キセノンランプ、蛍光ランプ、ハロゲンランプ、クリプトンランプ、ナトリウムランプ、水銀ランプ、メタルハライドランプなどを挙げるができる。なお、本発明において用いる光の種類（波長）、光の強さ、照射時間は特に限定されず、光源の種類、光源と照射する対象との位置関係、照射する対象の量、照射する対象の濃度、照射した結果発生するスーパーオキシドの必要量などの条件に応じて、適宜設定することができる。

- [0058] また、工程（b）：判定用スピンドクト／ラジカル生成工程において、判定用溶液に光を照射すると、上記（式2）に示す反応により電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）が、上記（式3）に示す反応によりスーパーオキシドがそれぞれ生成する。生成したスーパーオキシドは、判定用溶液中のスピントラップ剤と共有結合することから、スーパーオキシドのスピンドクトを生成させることができる。また、判定用溶液中のスピントラップ剤が電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）とスピンドクトを形成するものである場合は、電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）のスピンドクトが生成する。
- [0059] 工程（c）：判定用スペクトル取得工程において、スーパーオキシドのスピンドクト、電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）のスピンドクトおよび／または電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）の電子スピン共鳴による検出およびスペクトル（判定用スペクトル）の取得は、常法に従い行うことができ、例えば、JES-RE1X（日本電子社）などの市販のESR測定装置を用いて行うことができる。なお、電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）は、一般に比較的安定で寿命が長いため、スピンドクトを形成した場合のみならず、スピンドクトを形成していない場合も電子スピン共鳴により検出することができる。
- [0060] 工程（d）：相似判定工程において、スーパーオキシド標準スペクトルと判定用スペクトルとが相似するか否かの判定は、例えば、スーパーオキシド標準スペクトルと判定用スペクトルとを並べて、または重ねて表示したうえで目視することにより行うことができる他、形状比較プログラムなどを用いてコンピューター処理をすることにより行うこともできる。
- [0061] ここで、本発明において、複数のスペクトルが「相似する」または「相似関係にある」という場合は、複数のスペクトルが互いに縮小または拡大の関係にある場合のみならず、複数のスペクトルの形状について相同性が高い場合が含まれる。ここにいう、「高い相同性」とは、少なくとも70%以上相同性をいい、好ましくは80%以上相同性、より好ましくは85%相同性、

さらに好ましくは90%以上相同性、よりさらに好ましくは95%以上相同性をいう。

[0062] 工程(e) : フラビン濃度取得工程において、フラビンの濃度は、工程(d)によりスーパーオキシド標準スペクトルと相似すると判定される判定用スペクトルが得られた場合に、その判定用溶液に係るフラビンの濃度を取得することができる構成や機能を有していればよい。すなわち、工程(e)によれば、工程(d)においてスーパーオキシド標準スペクトルと判定用スペクトルとが相似しないと判定された場合には、再度、工程(a)においてフラビンの濃度を変えた判定用溶液が調製され、以下、工程(b) → (c) → (d)を行うというように、必要に応じて工程(a) ~ (d)による判定処理をスーパーオキシド標準スペクトルに相似する判定用スペクトルが得られるまで繰り返されるため、最終的に所望のフラビンの濃度を取得することができる。

[0063] なお、工程(e) : フラビン濃度取得工程では、相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が75.6 ~ 100%の範囲となるように取得することができる。

[0064] 工程(f) : 原料溶液調製工程において、原料溶液は、フラビンおよび電子供与体を水系溶媒に溶解することにより調製することができる。原料溶液におけるフラビンの濃度は、工程(e)において取得した濃度となるように調製する。なお、本発明において、原料溶液には、その特徴を損なわない限りにおいて、他の物質を含んでもよい。

[0065] 工程(g) : 発生工程において、原料溶液への光の照射は、上述した工程(b)における判定用溶液への光の照射と同様の方法により行うことができる。

[0066] なお、本発明に係るスーパーオキシド製造方法において、フラビンがリポフラビンである場合は、上述の工程(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)に代えて、工程(h) : 「リポフラビンの濃度C ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリポフラビン、電子供与体および水

系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製工程」を有することができる。後述の実施例に示すように、リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液に光を照射してラジカルを生成した場合は、生成したラジカルにおいて、スーパーオキシドの純度が  $75.6\% \sim 100\%$  となるように製造することができる。さらに、リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 10$  となるようにリボフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液に光を照射してラジカルを生成した場合は、生成したラジカルにおいて、スーパーオキシドの純度が  $83.3\% \sim 100\%$  となるように製造することができる。

[0067] 次に、本発明に係るスーパーオキシド除去能評価方法は、試料のスーパーオキシド除去能を評価する方法であって、下記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(i)、(j)、(k) および (l) の工程を有する；

(a) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製工程、

(b) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成工程、

(c) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

(d) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

(e) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得工程、

(i) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製工程、

(j) 前記評価溶液に光を照射してスピナダクトを生成させる評価用スピナダクト生成工程、

(k) 前記評価用スピナダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する評価用スペクトル取得工程、

(l) スーパーオキシドのスピナダクトの標準スペクトルと前記評価用スペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価する比較評価工程。

[0068] なお、工程 (a)、(b)、(c)、(d) および (e) については、本発明に係るスーパーオキシド製造方法と同様である。

[0069] 工程 (i) : 評価溶液調製工程において、評価溶液は、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤およびスーパーオキシド除去能を評価する試料を水系溶媒に溶解することにより調製することができる。評価溶液におけるフラビンの濃度は、工程 (e) において取得した濃度となるように調製する。なお、本発明において、評価溶液には、その特徴を損なわない限りにおいて、他の物質を含んでもよい。

[0070] 本発明におけるスーパーオキシド除去能を評価する試料としては、例えば、食品や植物抽出物、化粧品組成物、医薬組成物などの化合物を挙げることができる。この評価の対象となる試料は、スーパーオキシドがスピナダクトに変化する前にスーパーオキシドを消去することにより、「除去能を有する」との評価がなされる。

[0071] 工程 (j) : 評価用スピナダクト生成工程において、評価溶液への光の照射は、上述した工程 (b) や (g) における判定用溶液への光の照射と同様の方法により行うことができる。

[0072] 工程 (k) : 評価用スペクトル取得工程において、評価用スピナダクトの電子スピン共鳴による検出およびスペクトル (評価用スペクトル) の取得は、上述した工程 (c) における方法と同様の方法により行うことができる。

[0073] 工程 (l) : 比較評価工程において、スーパーオキシド標準スペクトルと評価用スペクトルとの比較は、例えば、上述した工程 (d) における方法と



同様の方法により行うことができる。また、試料のスーパーオキシド消去能の評価は、評価用スペクトルのシグナル強度が、スーパーオキシド標準スペクトルのシグナル強度と比較して小さくなる場合は、スーパーオキシドが消去されたとして、その試料は「スーパーオキシド消去能を有する」と評価される。一方、評価用スペクトルのシグナル強度がスーパーオキシド標準スペクトルのシグナル強度と比較してほとんど変わらない場合は、スーパーオキシドが消去されていないとして、その試料は「スーパーオキシド消去能を有さない」と評価される。すなわち、評価用スペクトルにおけるシグナル強度の減少と試料の抗酸化能とは比例関係にあり、試料が抗酸化能を有する物質である場合、評価用スペクトルのシグナル強度はスーパーオキシド標準スペクトルのシグナル強度と比較して減少し、試料が抗酸化能を有さない物質である場合、評価用スペクトルのシグナル強度はスーパーオキシド標準スペクトルのシグナル強度と比較してほとんど変わらないこととなる。

[0074] なお、本発明に係るスーパーオキシド消去能評価方法において、フラビンがリボフラビンである場合は、上述の工程 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (i) に代えて、工程 (m) : 「リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド消去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製工程」を有することができる。

[0075] 次に、本発明は、スーパーオキシド製造装置を提供する。本発明に係るスーパーオキシド製造装置は、下記 (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi) および (vii) の手段を備える；

(i) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製手段、

(ii) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体ラジカルのスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピニアダクト／ラジカル生成手段、

(iii) 前記生成させたスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体

ラジカルのスピンドクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得手段、

(i v) スーパーオキシドのスピンドクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定するための相似判定手段、

(v) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得手段、

(v i) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製手段、

(v i i) 前記原料溶液に光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生手段。

[0076] 本発明に係るスーパーオキシド製造装置の一実施形態について、図面を用いて説明する。図1は、本実施形態のスーパーオキシド製造装置1の基本構成を説明する概念図である。図1に示すように、スーパーオキシド製造装置1は、主として、判定用溶液調製手段2と、判定用スピンドクト／ラジカル生成手段3と、判定用スペクトル取得手段4と、相似判定手段5と、フラビン濃度取得手段6と、原料溶液調製手段7と、発生手段8とから構成されている。

[0077] 判定用溶液調製手段2は、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を適切に調製することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、図3に示すように、判定用溶液収容部23に挿通する判定用注入管22が形成され、注入する物質の数に応じて注入量調節機能を備えた判定用容器21を複数備える構成などを挙げることができる。このような構成の場合、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒がそれぞれ収容された、注入量調節機能を備えた判定用容器21の各判定用注入管22から、適切な量のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を判定用溶液収容部23に注入することができる、その結果、判定用溶液を調製することができる。

[0078] なお、判定用溶液調製手段2は、後述する制御信号出力部62から出力さ

れる制御信号によって制御可能に構成されている。また、判定用溶液収容部 23 の構成としては、例えば、液体を保持する形体を有する容器からなる構成を挙げることができる。本発明において、容器を構成する素材としては、透明性、耐水性、耐食性、耐薬品性が高いものが好ましく、そのような素材としては、例えば、ガラス、プラスチックなどを挙げることができる。

[0079] 次に、判定用スピニアダクト／ラジカル生成手段 3 は、判定用溶液に対して適切に光を照射することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、光源からなる構成を挙げることができ、例えば、上述したスーパーオキシド製造方法の (b) の工程において例示したキセノンランプ、蛍光ランプ、ハロゲンランプ、クリプトンランプ、ナトリウムランプ、水銀ランプ、メタルハライドランプなどがある。

[0080] 次に、判定用スペクトル取得手段 4 は、判定用溶液に光を照射して得られるスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル）のスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル）を電子スピン共鳴により検出してそのスペクトルを取得することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、図 4 に示すように、電磁石 41、マイクロ波発振器 42、クリスタルダイオード検出器 43、増幅器 44 および記録計 45 などを挙げることができる。この構成の場合、電磁石 41 により形成した磁場の中に判定用溶液収容部 23 を置き、マイクロ波発振器 42 によりマイクロ波を照射して判定用溶液に含まれるスピニアダクトの対電子を共鳴させ、生じた吸収エネルギーをクリスタルダイオード検出器 43 で検出し、検出した信号を増幅器 44 で増幅した後、記録計 45 で記録することにより判定用スペクトルを取得することができる。また、例えば JES-RE1X（日本電子社）などの市販の ESR 測定装置に準拠した構成としてもよい。

[0081] 次に、相似判定手段 5 は、前記取得した判定用スペクトルがスーパーオキシド標準スペクトルに相似するか否かを判定することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、図 5 に示すように、

スペクトルのデータを入力する入力部 5 1 と入力したスペクトルを表示する表示部 5 2 とからなる構成を挙げることができる。この構成の場合、スーパーオキシド標準スペクトルおよび判定用スペクトルのデータを入力部 5 1 に入力し、これらのスペクトルを表示部 5 2 に表示して、その形状を比較することにより相似するか否かを判定することができる。

[0082] 次に、フラビン濃度取得手段 6 は、相似判定手段 5 によりスーパーオキシド標準スペクトルと相似すると判定される判定用スペクトルが得られた場合に、当該判定用溶液に係るフラビンの濃度を取得することができる構成や機能を有していればよい。すなわち、フラビン濃度取得手段 6 によれば、相似判定手段 5 においてスーパーオキシド標準スペクトルと判定用スペクトルとが相似しないと判断された場合には、再度、判定用溶液調製手段 2 においてフラビンの濃度を変えた判定用溶液が調製され、以下、判定用スピンドクト／ラジカル生成手段 3 → 判定用スペクトル取得手段 4 → 相似判定手段 5 による判定処理をスーパーオキシド標準スペクトルに相似する判定用スペクトルが得られるまで繰り返されるため、最終的に所望のフラビンの濃度を取得することができる。

[0083] なお、フラビン濃度取得手段 6 は、相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が 75.6 ~ 100% の範囲となるように取得することができる。

[0084] 上述した相似判定手段 5 およびフラビン濃度取得手段 6 は、例えば、パーソナルコンピューターなどによって構成してもよい。具体的には、図 2 に示すように、上述した相似判定処理およびフラビン濃度取得処理を実行する相似判定プログラムや相似判定に必要な各種のデータ等を記憶する記憶手段 R と、この記憶手段 R や判定用スペクトル取得手段 4 から各種のデータを取得して演算処理する演算処理手段 C とから構成されている。以下、各構成手段について説明する。

[0085] 記憶手段 R は、ROM (Read Only Memory)、RAM (Random Access Memory)、HDD (Hard Disk D

r i v e)、フラッシュメモリなどによって構成されており、各種のデータを記憶するとともに、演算処理手段Cが演算処理を行う際のワーキングエリアとして機能するものである。

[0086] 本実施形態では、図2に示すように、記憶手段Rには、相似判定プログラムがインストールされている。そして、演算処理手段Cが、相似判定プログラムを実行することにより、コンピューターを後述する各構成部として機能させるようになっている。なお、相似判定プログラムの利用形態は、上記構成に限られるものではなく、CD-ROM等の記録媒体に記憶させておき、この記録媒体から直接起動して実行してもよい。

[0087] また、記憶手段Rには、相似判定する際の基準となる標準スペクトルのデータが記憶されている。この標準スペクトルデータは、上述したように、例えば、コンピューターシミュレーションや既報によって得られたものをデータベース化したものである。

[0088] 次に、演算処理手段Cは、CPU (Central Processing Unit) などから構成されており、記憶手段Rにインストールされた相似判定プログラムを実行することにより、図2に示すように、判定用スペクトルデータ取得部53と、標準スペクトルデータ取得部54と、スペクトル比較判定部55と、フラビン濃度取得部61と、制御信号出力部62として機能するようになっている。以下、これら各構成部についてより詳細に説明する。

[0089] 判定用スペクトルデータ取得部53は、判定用スペクトル取得手段4によって取得された判定用スペクトルをデータとして取得するものである。例えば、記録計45に記録された判定用スペクトルをデジタルデータに変換し、所定のインターフェースからなる入力部51から入力するようにしてもよい。

[0090] 標準スペクトルデータ取得部54は、記憶手段Rに記憶されている標準スペクトルのデータを読み出して取得するものである。

[0091] スペクトル比較判定部55は、判定用スペクトルと標準スペクトルとを比

較して相似するか否かを判定するものである。具体的には、スペクトル比較判定部 55 は、判定用スペクトルデータ取得部 53 が取得した判定用スペクトルデータと、標準スペクトルデータ取得部 54 が取得した標準スペクトルデータとを取得し、両者を比較し、所定の相似条件に基づいて両者が相似するか否かを判定する。そして、当該判定結果を制御信号出力部 62 へ出力するようになっている。

[0092] フラビン濃度取得部 61 は、判定用溶液調製手段 2 によって調製された判定用溶液のフラビン濃度を取得するものである。本実施形態では、フラビン濃度取得部 61 は、スペクトル比較判定部 55 によって、相似していると判定された場合、所定の濃度測定器によって測定した判定用溶液のフラビン濃度をデータとして取得する。

[0093] 制御信号出力部 62 は、判定用溶液調製手段 2 や原料溶液調製手段 7 に制御信号を出力するものである。本実施形態における制御信号出力部 62 は、スペクトル比較判定部 55 から相似していないとの判定結果を受けた場合、判定用溶液調製手段 2 に対して、フラビン濃度を変更して再調整する旨の制御信号を送信する。一方、相似するとの判定結果を受けた場合、フラビン濃度取得部 61 が取得したフラビン濃度によって原料溶液を調製する旨の制御信号を原料溶液調製手段 7 に対して送信する。

[0094] 次に、原料溶液調製手段 7 は、フラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を適切に調製することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、図 6 に示すように、原料溶液収容部 73 に挿通可能な原料用注入管 72 を備え、注入する物質の数に応じて注入量調節機能を備えた原料用容器 71 を複数備える構成などを挙げることができる。この構成の場合、フラビン、電子供与体および水系溶媒がそれぞれ収容された、注入量調節機能を備えた原料用容器 71 の各原料用注入管 72 から、適切な量のフラビン、電子供与体および水系溶媒が原料溶液収容部 73 に注入され、原料溶液が調製される。原料溶液収容部 73 の構成としては、例えば、上述した判定用溶液収容部 23 と同様の構成を挙げることができる。

- [0095] なお、原料溶液調製手段7は、上述した制御信号出力部62から出力された制御信号によって制御可能に構成されている。
- [0096] 次に、発生手段8は、原料溶液に対して適切に光を照射することができる構成や機能を有していればよく、そのような構成としては、例えば、上述した判定用スピンドアダクト／ラジカル生成手段3と同様の構成を挙げることができる。
- [0097] なお、本実施形態のスーパーオキシド製造装置1において、フラビンがリボフラビンである場合は、手段(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)および(vi)に代えて、手段(vii)：「リボフラビンの濃度C ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるように、リボフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製手段7」を備える構成とすることができる。
- [0098] なお、本実施形態のスーパーオキシド製造装置1において、判定用溶液調製手段2は原料溶液調製手段7を兼ねる構成とし、判定用スピンドアダクト／ラジカル生成手段3は発生手段8を兼ねる構成としてもよく、別個の構成としてもよい。
- [0099] また、本発明は、スーパーオキシド消去能評価装置を提供する。本発明に係るスーパーオキシド消去能評価装置は試料のスーパーオキシド消去能を評価する装置であって、下記(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(ix)、(x)、(xi)および(xii)の手段を有する；
- (i) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製手段、
  - (ii) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンドアダクト、電子供与体ラジカルのスピンドアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンドアダクト／ラジカル生成手段、
  - (iii) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンドアダクト、電子供与体ラジカルのスピンドアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得手段、

(i v) スーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定するための相似判定手段、

(v) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得手段、

(i x) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製手段、

(x) 前記評価溶液に光を照射してスピニアダクトを生成させる評価用スピニアダクト生成手段、

(x i) 前記評価用スピニアダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する評価用スペクトル取得手段、

(x i i) スーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトルと前記評価用スペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価するための比較評価用手段。

[0100] なお、工程 (i)、(i i)、(i i i)、(i v) および (v) については、本発明に係るスーパーオキシド製造装置と同様である。

[0101] 本発明に係るスーパーオキシド除去能評価装置の一実施形態について、図面を用いて説明する。図7は、本実施形態のスーパーオキシド除去能評価装置9の基本構成を説明する概念図である。図7に示すように、スーパーオキシド除去能評価装置9は、主として、判定用溶液調製手段2と、判定用スピニアダクト／ラジカル生成手段3と、判定用スペクトル取得手段4と、相似判定手段5と、フラビン濃度取得手段6と、評価溶液調製手段10と、評価用スピニアダクト生成手段11と、評価用スペクトル取得手段12と、比較評価用手段13とから構成されている。なお、スーパーオキシド除去能評価装置9の構成のうち、上述したスーパーオキシド製造装置1の構成と同等または相当する構成については同一の符号を付し、再度の説明を省略する。

[0102] 評価溶液調製手段10は、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を適切



に調製することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、図9に示すように、評価溶液収容部103に挿通する評価用注入管102を備え、注入する物質の数に応じて注入量調節機能を備えた評価用容器101を複数備える構成などを挙げることができる。この構成の場合、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒がそれぞれ収容された、注入量調節機能を備えた評価用容器101の各評価用注入管102から、適切な量のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒が評価溶液収容部103に注入され、評価溶液が調製される。評価溶液収容部103の構成としては、例えば、上述した判定用溶液収容部23と同様の構成を挙げることができる。なお、評価溶液調製手段10は、制御信号出力部62から出力される制御信号によって制御可能に構成されている。

[0103] 次に、評価用スピニアダクト生成手段11は、評価溶液に対して適切に光を照射することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、上述した判定用スピニアダクト／ラジカル生成手段3と同様の構成を挙げることができる。

[0104] 次に、評価用スペクトル取得手段12は、評価溶液に光を照射して得られるスピニアダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、上述した判定用スペクトル取得手段4と同様の構成を挙げることができる。

[0105] 次に、比較評価用手段13は、スーパーオキシド標準スペクトルと評価用スペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価することができる構成や機能を有していればよい。そのような構成としては、例えば、上述した相似判定手段5と同様の構成を挙げることができる。この構成の場合、表示部52に表示されたスーパーオキシド標準スペクトルの形状と、評価用スペクトルの形状とを比較することにより、スーパーオキシド除去能を評価する

ことができる。

- [0106] なお、本実施形態のスーパーオキシド除去能評価装置 9 においては、相似判定手段 5 およびフラビン濃度取得手段 6 の他に、比較評価用手段 13 をパーソナルコンピュータなどによって構成することができる。
- [0107] 具体的には、図 8 に示すように、記憶手段 R には、別途、比較評価処理を実行するための比較評価プログラムが格納されている。一方、演算処理手段 C は、上述したスーパーオキシド製造装置 1 における演算処理手段 C の各構成部の他に別途、評価用スペクトルデータ取得部 131 と、スペクトル比較評価部 132 を有し、機能するようになっている。
- [0108] ただし、本実施形態においては、スペクトル比較判定部 55 が相似すると判定した場合、制御信号出力部 62 は、フラビン濃度取得部 61 が取得したフラビン濃度によって評価溶液を調製する旨の制御信号を評価溶液調製手段 10 に送信するようになっている。
- [0109] また、評価用スペクトルデータ取得部 131 は、評価用スペクトル取得手段 12 によって取得された評価用スペクトルをデータとして取得するものである。
- [0110] スペクトル比較評価部 132 は、評価用スペクトルと標準スペクトルとを比較して、スーパーオキシド除去能を評価するものである。具体的には、スペクトル比較評価部 132 は、評価用スペクトルデータ取得部 131 が取得した評価用スペクトルデータと、標準スペクトルデータ取得部 54 が取得した標準スペクトルデータとを取得し、両者を比較して所定の評価基準に従ってスーパーオキシド除去能を評価するようになっている。
- [0111] なお、本実施形態のスーパーオキシド除去能評価装置 9 において、フラビンがリボフラビンである場合は、上述の (i)、(ii)、(iii)、(iv) および (viii) の手段に代えて、手段 (xii) : 「リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製手段 10」を備える

構成とすることができる。

[0112] 本実施形態のスーパーオキシド除去能評価装置 9 において、判定用溶液調製手段 2 は評価溶液調製手段 10 を兼ねる構成とし、判定用スピンドクト／ラジカル生成手段 3 は評価用スピンドクト生成手段 11 を兼ねる構成とし、判定用スペクトル取得手段 4 は評価用スペクトル取得手段 12 を兼ねる構成とし、相似判定手段 5 は比較評価用手段 13 を兼ねる構成としてもよく、別個の構成としてもよい。また、本実施形態のスーパーオキシド除去能評価装置 9 はスーパーオキシド製造装置 1 を兼ねる構成としてもよい。

[0113] 次に、本発明に係るスーパーオキシド *in vivo* 製造方法は、生体試料または非ヒト動物の体内において本発明に係るスーパーオキシド製造方法を適用した方法であり、生体試料または非ヒト動物の体液を水系溶媒として利用している点、フラビンの濃度を取得する代わりにフラビンの量（至適量）を取得する点、および投与したフラビンおよび電子供与体が存在する箇所に光を照射してスーパーオキシドを発生させる点で本発明に係るスーパーオキシド製造方法と異なっている。具体的には、下記（A）、（B）、（C）、（D）、（E）、（F）および（G）の工程を有する；

（A）任意量のフラビン、電子供与体およびスピントラップ剤を生体試料または非ヒト動物の体内に投与する原料投与工程、

（B）前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与したフラビンおよび電子供与体が存在する箇所に光を照射してスーパーオキシドのスピンドクト、電子供与体ラジカルのスピンドクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンドクト／ラジカル生成工程、

（C）前記生成させたスーパーオキシドのスピンドクト、電子供与体ラジカルのスピンドクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

（D）スーパーオキシドのスピンドクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

（E）前記相似判定により相似するフラビンの至適量を取得するフラビン至

適量取得工程、

(F) 前記取得した至適量のフラビンおよび電子供与体を前記生体試料または非ヒト動物の体内に投与する至適原料投与工程、

(G) 前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与したフラビンおよび電子供与体が存在する箇所を光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生工程。

[0114] 本発明における生体試料としては、ヒトを含む動物、特に哺乳類から分離・採取された生体試料を用いることができ、例えば、罹患した哺乳類や老齢の哺乳類、実験動物などから分離・採取した生体試料を用いることができる。その形態としては、例えば、組織切片、細胞などの固形試料が望ましい。また、本発明において非ヒト動物としては、ヒト以外の動物を挙げることができ、例えば、ウシ、サル（サル目からヒトを除いたもの）、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ハムスター、ラット、マウスなどの哺乳類、ニワトリや七面鳥などの家禽、は虫類、両生類、魚類などを挙げることができる。

[0115] 本発明において、フラビンおよび電子供与体などの物質を生体試料または非ヒト動物の体内に投与する方法は、常法に従い行うことができ、例えば、生体試料に投与する方法としては、フラビンおよび電子供与体を封入したリポソームを膜融合させる方法やマイクロインジェクション法などを、非ヒト動物に投与する方法としては、経口投与方法や皮下注射法などを挙げることができる。

[0116] また、体液としては、細胞外液のみならず細胞内液が含まれ、細胞外液としては血液やリンパ液の他、組織間液、細胞間液、間質液などの組織液、漿膜腔液、脳脊髄液、関節液、眼房水などの体腔液、消化液、尿、精液、膿液、羊水、乳汁などが含まれる。

[0117] 次に、本発明に係るスーパーオキシド *in vivo* 消去能評価方法は、生体試料または非ヒト動物の体内において本発明に係るスーパーオキシド消去能評価方法を適用した方法であり、生体試料または非ヒト動物の体液を水系

溶媒として利用している点、フラビンの濃度を取得する代わりにフラビンの量（至適量）を取得する点、および投与したフラビンおよび電子供与体、もしくは投与したフラビン、電子供与体、スピントラップ剤およびスーパーオキシド消去能を評価する試料を含む評価検体に光を照射して、スーパーオキシドを発生させる、またはスピンアダクトを生成させるという点で本発明に係るスーパーオキシド製造方法と異なっている。具体的には、下記（A）、

（B）、（C）、（D）、（E）、（F）および（G）の工程を有する；

（A）任意量のフラビン、電子供与体およびスピントラップ剤を生体試料または非ヒト動物の体内に投与する原料投与工程、

（B）前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与したフラビンおよび電子供与体が存在する箇所を光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成工程、

（C）前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

（D）スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

（E）前記相似判定により相似するフラビンの至適量を取得するフラビン至適量取得工程、

（H）前記取得した至適量のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤およびスーパーオキシド消去能を評価する試料を含む評価検体を生体試料または非ヒト動物の体内に投与する評価検体投与工程、

（I）前記生体試料または非ヒト動物の体内において前記投与した評価検体に光を照射してスピンアダクトを生成させる *in vivo* スピンアダクト生成工程、

（J）前記スピンアダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する *in vivo* スペクトル取得工程、

(K) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記取得したスペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価する *in vivo* 比較評価工程。

[0118] 工程 (H) : 評価検体投与工程において、評価検体を投与する際、投与する前に、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤およびスーパーオキシド除去能を評価する試料から評価検体を調製してもよく、また、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤およびスーパーオキシド除去能を評価する試料を、それぞれ直接生体試料または非ヒト動物の体内に投与し、生体試料内または非ヒト動物の体内において評価検体を調製してもよい。

[0119] また、評価検体には、その特徴を損なわない限りにおいて、フラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料に加え、緩衝液や溶媒、賦形剤などの他の物質を含んでもよい。

[0120] 以下、本発明に係るスーパーオキシド製造方法、スーパーオキシド除去能評価方法、スーパーオキシド製造装置およびスーパーオキシド除去能評価装置について、実施例に基づいて説明する。なお、本発明の技術的範囲は、これらの実施例によって示される特徴に限定されない。

## 実施例

[0121] <実施例 1> リボフラビン、EDTA、CYPMPPO を含む水系溶液に光を照射して発生させたラジカルの電子スピン共鳴による測定

酸化還元反応触媒としてリボフラビン、電子供与体として EDTA、スピントラップ剤として CYPMPPO を含む水系溶液を調製し、これに光を照射してラジカルを発生させ、発生したラジカルを、電子スピン共鳴 (Electron Spin Resonance; ESR) により同定および定量した。

[0122] (1) 水系溶液の調製

50 mmol/L、pH 7.4 のリン酸緩衝液にリボフラビン、EDTA、CYPMPPO (ラジカルリサーチ社) をそれぞれ 1 μmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L となるように加え、水系溶液 (SOD 無添加水

系溶液)を調製した。調製した水系溶液に、スーパーオキシドを特異的に消去する酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)(Sigma社)を10U/mLとなるように加え、SOD添加水系溶液を別途調製した。

[0123] (2) ESRによる測定

本実施例(1)で調製した水系溶液(SOD無添加水溶液およびSOD添加水溶液)を電子スピン共鳴装置JES-RE1X(日本電子社)の試料管にそれぞれ導入した。この試料管にキセノンランプを用いて1500ルクスの可視光を30秒間照射した後、以下に示す測定条件でESRによる測定を行ってスペクトルを得た。SOD無添加水系溶液のスペクトルをスペクトルAとし、SOD添加水系溶液のスペクトルをスペクトルBとした。その結果を図10に示す。なお、スーパーオキシドとCYPMPPOからなるスピニアダクトの、コンピューターシミュレーションにより得られたスペクトル(スーパーオキシド標準スペクトル; M. Kamibayashiら、Free Radical Research、第40巻、第11号、第1166-1172頁、2006年)およびラジカル化したEDTA(EDTAラジカル)の、コンピューターシミュレーションにより得られたスペクトル(EDTAラジカル標準スペクトル)を図11に示す。

[0124] ESRによる測定の条件

出力: 6mW

磁場掃引幅:  $\pm 7.5$  mT

測定時間: 2分間

変調幅: 0.1 mT

時定数: 0.1秒

[0125] 図10および図11に示すように、図10のスペクトルAの形状と図11上図のスーパーオキシド標準スペクトルの形状とはほとんど同じであること、およびスペクトルAのシグナル強度と比較して、スーパーオキシド標準スペクトルのシグナル強度はほとんど変わらないことが確認された。また、図10のスペクトルBの形状と図11下図のEDTAラジカル標準スペクトル

の形状とはほとんど同じであることが確認された。また、図10に示すように、スペクトルAのシグナル強度と比較してスペクトルBのシグナル強度は小さく、スペクトルAで見られるピークがスペクトルBではみられないことが確認された。

[0126] このことから、スペクトルAで見られるピークはスーパーオキシドのスピニングダクトに由来することが示され、SOD無添加水系溶液において、スーパーオキシドが多量に発生したことが示された。また、スペクトルBで見られるピークはEDTAラジカルに由来することが示され、スペクトルAで見られたピークがスペクトルBではみられないことから、SOD添加水系溶液において少量のEDTAラジカルが発生し、スーパーオキシドが発生しなかったことが示された。

[0127] 以上のことから、本実施例に係る水系溶液により、スーパーオキシドおよび電子供与体ラジカル（妨害ラジカル、TH・ラジカル）の2種類のラジカルを発生させて、そのうちのスーパーオキシドを選択的に発生させることができることが明らかとなり、この水系溶液にスーパーオキシド除去能を有する物質を加えることにより、スーパーオキシドの発生を抑制することが明らかとなった。

[0128] <実施例2>酸化還元反応触媒および電子供与体の検討

酸化還元反応触媒あるいは電子供与体を変えて、光照射によりラジカルを発生させ、ESRにより発生したラジカルの同定および定量を行い、スーパーオキシド発生に好適な酸化還元反応触媒および電子供与体を検討した。

[0129] (1) 電子供与体としてテトラメチルエチレンジアミン（TMD）を用いた場合のスーパーオキシド発生

実施例1で用いたEDTAの代わりにテトラメチルエチレンジアミン（TMD）を電子供与体として水系溶液を調製し、光を照射することによりラジカルを発生させ、ESRにより発生したラジカルの同定および定量を行った。

[0130] 50mmol/L、pH7.4のリン酸緩衝液にリボフラビン、TMD、



CYPMPPO（ラジカルリサーチ社）をそれぞれ $10\mu\text{mol/L}$ 、 $10\text{mmol/L}$ 、 $10\text{mmol/L}$ となるように加え、水系溶液を調製した。

[0131] この水系溶液について実施例1（2）と同様の操作によりESRによる測定を行い、スペクトルを得た。得られたスペクトルを図12に示す。

[0132] 図11上図および図12に示すように、図11上図のスーパーオキシド標準スペクトルの形状と図12のスペクトルの形状とは異なることが確認された。

[0133] （2）電子供与体としてメチオニンを用いた場合のスーパーオキシド発生  
実施例1で用いたEDTAの代わりに、メチオニンを電子供与体として用いて水系溶液を調製し、光を照射することによりラジカルを発生させ、ESRにより発生したラジカルの同定および定量を行った。

[0134] TMDをメチオニンに換えて本実施例（1）と同様の操作により水系溶液を調製し、ESRによる測定を行い、スペクトルを得た。得られたスペクトルを図13に示す。

[0135] 図11上図および図13に示すように、図11上図のスーパーオキシド標準スペクトルの形状と図13のスペクトルの形状とは異なることが確認された。

[0136] （3）酸化還元反応触媒としてフラビンモノヌクレオチド（FMN）を用いた場合のスーパーオキシド発生

実施例1で用いたリボフラビンの代わりにフラビンモノヌクレオチド（FMN）を酸化還元反応触媒として水系溶液を調製し、光を照射することによりラジカルを発生させ、ESRにより発生したラジカルの同定および定量を行った。

[0137]  $50\text{mmol/L}$ 、 $\text{pH}7.4$ のリン酸緩衝液にFMN、EDTA、CYPMPPO（ラジカルリサーチ社）をそれぞれ $5\mu\text{mol/L}$ 、 $5\text{mmol/L}$ 、 $10\text{mmol/L}$ となるように加え、水系溶液を調製した。

[0138] この水系溶液について実施例1（2）と同様の操作によりESRによる測定を行い、スペクトルを得た。得られたスペクトルを図14に示す。

[0139] 図 1 1 および図 1 4 に示すように、図 1 1 上図のスーパーオキシド標準スペクトルの形状と図 1 4 のスペクトルの形状とが相似関係にある一方で、図 1 1 下図の EDTA ラジカル標準スペクトルの形状と図 1 4 のスペクトルの形状とは異なることが確認された。

[0140] (4) 酸化還元反応触媒としてフラビンモノヌクレオチド (FMN) を用い、かつ電子供与体としてテトラエチレンジアミン (TMD) を用いた場合のスーパーオキシド発生

実施例 1 で用いたリボフラビンの代わりにフラビンモノヌクレオチド (FMN) を酸化還元反応触媒として、また EDTA の代わりにテトラエチレンジアミン (TMD) を電子供与体として、それぞれを用いて水系溶液を調製し、光を照射することによりラジカルを発生させ、ESR により発生したラジカルの同定および定量を行った。

[0141] リボフラビンを FMN に換えて本実施例 (1) と同様の操作により水系溶液を調製し、ESR による測定を行い、スペクトルを得た。得られたスペクトルを図 1 5 に示す。

[0142] 図 1 1 上図および図 1 5 に示すように、図 1 1 上図のスーパーオキシド標準スペクトルの形状と図 1 5 のスペクトルの形状とは異なることが確認された。

[0143] (5) 酸化還元反応触媒としてフルオレセインを用い、かつ電子供与体としてメチオニンを用いた場合のスーパーオキシド発生

実施例 1 で用いたリボフラビンの代わりにフルオレセインを酸化還元反応触媒として、また EDTA の代わりにメチオニンを電子供与体として、それぞれを用いて水系溶液を調製し、光を照射することによりラジカルを発生させ、ESR により発生したラジカルの同定および定量を行った。

[0144] リボフラビンをフルオレセインに、TMD をメチオニンにそれぞれ換えて、本実施例 (1) と同様の操作により水系溶液を調製し、ESR による測定を行い、スペクトルを得た。得られたスペクトルを図 1 6 に示す。

[0145] 図 1 1 上図および図 1 6 に示すように、図 1 1 上図のスーパーオキシド標

準スペクトルの形状と図16のスペクトルの形状とは異なることが確認された。

[0146] 以上、本実施例(1)から(5)の結果より、酸化還元反応触媒としてリボフラビンを用い、かつ電子供与体としてTMDを用いた場合、酸化還元反応触媒としてリボフラビンを用い、かつ電子供与体としてメチオニンを用いた場合、酸化還元反応触媒としてFMNを用い、かつ電子供与体としてTMDを用いた場合および酸化還元反応触媒としてフルオレセインを用い、かつ電子供与体としてメチオニンを用いた場合のいずれと比較しても、酸化還元反応触媒としてリボフラビンあるいはFMNを用い、かつ電子供与体としてEDTAを用いた場合の方が、電子供与体ラジカル(妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル)の発生を抑えて、高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルを得ることができることが明らかとなった。

[0147] <実施例3>リボフラビン濃度とスーパーオキシド発生量およびスーパーオキシドの純度との関係の検討

水系溶液におけるリボフラビンの濃度を変えることにより、スーパーオキシドおよび電子供与体ラジカル(妨害ラジカル、 $\text{TH}\cdot$ ラジカル)の発生量の変化を確認した。

[0148] 実施例1(1)で調製した水系溶液(SOD添加水系溶液およびSOD無添加水系溶液)において、リボフラビン濃度が、それぞれ $0.1\mu\text{mol/L}$ 、 $0.5\mu\text{mol/L}$ 、 $1\mu\text{mol/L}$ 、 $2.5\mu\text{mol/L}$ 、 $5\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $15\mu\text{mol/L}$ 、 $25\mu\text{mol/L}$ 、 $50\mu\text{mol/L}$ となるように水系溶液を調製した。

[0149] これらの水系溶液それぞれについて実施例1(2)と同様の操作によりESRによる測定を行い、スペクトルを得た。

[0150] これらのスペクトルに基づき、それぞれの水系溶液において発生したラジカルの同定ないし発生したラジカル量の数値化を行った。すなわち、SOD添加水系溶液のスペクトルに基づいて、発生したEDTAラジカル(妨害ラジカル)量の数値化を行い、SOD無添加水系溶液のスペクトルに基づいて

、発生したスーパーオキシド量の数値化を行った。なお、スーパーオキシド量の数値化は、スーパーオキシド標準スペクトル（図11上図）の形状に基づいて、スーパーオキシド固有のスペクトル形状を有しているとの判断をした場合に行った。また、数値化した結果に基づき、次式4により、各リボフラビン濃度の水系溶液において発生したラジカルにおけるスーパーオキシドの純度を算出した。その結果を図17に示す。

[0151] (式4) : スーパーオキシドの純度 (%) = [発生したスーパーオキシド量 / {発生したスーパーオキシド量 + 発生したEDTAラジカル (妨害ラジカル量)}] × 100

[0152] 図17に示すように、リボフラビン濃度が0.1 μmol/Lの水系溶液では、スーパーオキシドおよびEDTAラジカル (妨害ラジカル) のいずれも発生しないことが確認され、リボフラビン濃度が0.5 μmol/L、1 μmol/Lおよび2.5 μmol/Lの水系溶液では、スーパーオキシドが発生するのに比較して、EDTAラジカル (妨害ラジカル) はほとんど発生せず、スーパーオキシドの純度は約88.9%であることが確認された。また、リボフラビン濃度が5 μmol/L、10 μmol/Lおよび15 μmol/Lの水系溶液では、スーパーオキシドが多量に発生するのに比較して、EDTAラジカル (妨害ラジカル) はほとんど発生せず、スーパーオキシドの純度はそれぞれ87.5%、約83.3%および約76.5%であることが確認された。なお、リボフラビン濃度が25 μmol/Lおよび50 μmol/Lの水系溶液ではEDTAラジカル (妨害ラジカル) に由来するシグナルが強くなるため、発生したスーパーオキシド量の数値化およびスーパーオキシドの純度の算出は行わなかった。

[0153] 以上の結果より、リボフラビン濃度C (μmol/L) が0.1 < C < 2.5である水系溶液、特にリボフラビン濃度C (μmol/L) が0.5 ≤ C ≤ 1.5である水系溶液では、電子供与体ラジカル (妨害ラジカル、TH・ラジカル) はほとんど発生せず、スーパーオキシドが多量に発生することが明らかとなった。

[0154] <実施例 4> 光照射時間とスーパーオキシド発生量との関係の確認

光照射開始からスーパーオキシド発生までの時間、光照射停止からスーパーオキシド発生停止までの時間および光照射時間とスーパーオキシド発生量との関係を確認した。

[0155] (1) 水系溶液の調製

50 mmol/L、pH 7.4 のリン酸緩衝液にリボフラビン、EDTA、CYPMPPO (ラジカルリサーチ社) をそれぞれ 1 μmol/L、3 mmol/L、10 mmol/L となるように加え、水系溶液を調製した。調製した水系溶液を 16 サンプルに分け、それぞれ試料 1 ~ 試料 16 とした。

[0156] (2) ESR による測定

本実施例 (1) で調製した水系溶液を電子スピン共鳴装置 JES-RE1X (日本電子社) の試料管に順次導入し、照射時間を変えて可視光を照射した後、ESR による測定を行うことによりスペクトルを得た。各試料における可視光の照射時間を以下に示す。ESR の観測磁場は 335.7 mT (実施例 1 においてスーパーオキシド由来のピークが確認された磁場と同じ磁場) に固定して、ESR による測定を行った。その他の光照射条件および ESR による測定の条件は実施例 1 (2) と同様にした。

[0157] 可視光照射時間

試料 1 : 照射開始前 30 秒 (-30)

試料 2 : 照射開始前 15 秒 (-15)

試料 3 : 照射開始前 0 秒 (0)

試料 4 : 照射時間 5 秒 (5)

試料 5 : 照射時間 10 秒 (10)

試料 6 : 照射時間 15 秒 (15)

試料 7 : 照射時間 20 秒 (20)

試料 8 : 照射時間 30 秒 (30)

試料 9 : 照射時間 45 秒 (45)

試料 10 : 照射時間 60 秒 (60)

試料 1 1 : 6 0 秒照射し、照射停止後 5 秒 (+ 5)

試料 1 2 : 6 0 秒照射し、照射停止後 1 0 秒 (+ 1 0)

試料 1 3 : 6 0 秒照射し、照射停止後 2 0 秒 (+ 2 0)

試料 1 4 : 6 0 秒照射し、照射停止後 3 0 秒 (+ 3 0)

試料 1 5 : 6 0 秒照射し、照射停止後 6 0 秒 (+ 6 0)

試料 1 6 : 6 0 秒照射し、照射停止後 1 2 0 秒 (+ 1 2 0)

[0158] 得られたスペクトルのシグナル強度を縦軸に、可視光照射時間を横軸に表してグラフ化した。その結果を図 1 8 に示す。

[0159] 図 1 8 に示すように、光照射開始後すぐにシグナルが確認され、シグナル強度は可視光照射時間に比例して大きくなることが確認された。換言すれば、発生されたスーパーオキシドのスピニアダクトの量が光照射時間に比例して増加することを示している。また、光照射の停止とともに、シグナル強度が時間に比例して緩やかに小さくなることが確認された。すなわち、発生されたスーパーオキシドのスピニアダクトの量が時間に比例して徐々に減少することを示している。

[0160] 以上の結果より、光照射の開始とともにスーパーオキシドが発生し、光照射の停止とともにスーパーオキシドの発生も停止することが明らかとなった。また、光を照射している間は、継続的、安定的にスーパーオキシドが発生することが確認された。

[0161] <比較例 1> リボフラビンの光照射により発生させたラジカルにおけるスーパーオキシドの純度とキサントンオキシダーゼにより発生させたラジカルにおけるスーパーオキシドの純度との比較

リボフラビンの光照射によりスーパーオキシドを発生させた場合と、キサントンオキシダーゼによりスーパーオキシドを発生させた場合とで、SOD によるラジカルの発生阻害の程度を比較することにより、リボフラビンの光照射により発生させたラジカルにおけるスーパーオキシドの純度について検討した。

[0162] (1) リボフラビンの光照射によるラジカル発生量の定量

実施例 1 (1) における SOD 添加水系溶液の SOD 濃度がそれぞれ 0.5 U/mL、1 U/mL、1.5 U/mL となるように SOD 添加水系溶液と SOD 無添加水系溶液とを調製した。

[0163] 調製したそれぞれの水系溶液について、実施例 1 (2) と同様の操作により ESR による測定を行い、スペクトルを得た。この得られたスペクトルに基づいて、ラジカルの発生量を定量した。

[0164] (2) キサンチンオキシダーゼによるラジカル発生量の定量

50 mmol/L、pH 7.4 のリン酸緩衝液にヒポキサンチン、CYPMPPO (ラジカルリサーチ社) およびジエチレントリアミノ五酢酸 (DETAPAC) を、それぞれ 0.39 mmol/L、10 mmol/L、0.1 mmol/L となるように加えて水系溶液 (SOD 無添加水系溶液) を調製した。さらに、この水系溶液に SOD (Sigma 社) をそれぞれ 0.5 U/mL、1 U/mL、1.5 U/mL となるように加えることにより、SOD 添加水系溶液を別途調製した。

[0165] 調製した SOD 無添加水系溶液および SOD 添加水系溶液に、それぞれキサンチンオキシダーゼを 0.2 U/mL となるように加えた後、実施例 1 (2) と同様の操作により ESR による測定を行い、スペクトルを得た。続いて、得られたスペクトルに基づいてラジカルの発生量を定量した。ESR による測定は、キサンチンオキシダーゼを加えた後、60 秒経過後に行った。

[0166] 本実施例 (1) および (2) のラジカル発生量の定量結果に基づいて、SOD によるラジカル発生阻害率を、次式 5 により算出した。その結果を図 19 に示す。

$$(式 5) : SOD \text{ によるラジカル発生阻害率} = (S_0 - S) / S$$

$S_0$  : SOD を加えない場合のラジカル発生量

$S$  : SOD を加えた場合のラジカル発生量

[0167] なお、SOD は電子供与体ラジカル (妨害ラジカル、TH・ラジカル) には作用せず、スーパーオキシドのみを分解することから、SOD によるラジカル発生阻害率は、スーパーオキシドの純度を表している。すなわち、発生

したラジカルにおいて、スーパーオキシドの純度が高いほどSODによるラジカル発生阻害率は高くなる。

[0168] 図19に示すように、リボフラビンの光照射によりスーパーオキシドを発生させた場合と、キサンチンオキシダーゼによりスーパーオキシドを発生させた場合とを比較した場合、加えたSOD濃度にかかわらず、ラジカル発生阻害率はほぼ同値を示すことが確認された。

[0169] キサンチンオキシダーゼにより発生させたラジカルにおけるスーパーオキシドの純度は高いことが知られていることから、以上の結果より、本実施例における反応条件でリボフラビンの光照射によりラジカルを発生させた場合、高純度でスーパーオキシドを含有するラジカルが得られることが明らかとなった。

### 符号の説明

- [0170]
- 1 スーパーオキシド製造装置
  - 2 判定用溶液調製手段
  - 3 判定用スピンドアダクト／ラジカル生成手段
  - 4 判定用スペクトル取得手段
  - 5 相似判定手段
  - 6 フラビン濃度取得手段
  - 7 原料溶液調製手段
  - 8 発生手段
  - 9 スーパーオキシド消去能評価装置
  - 10 評価溶液調製手段
  - 11 評価用スピンドアダクト生成手段
  - 12 評価用スペクトル取得手段
  - 13 比較評価用手段
  - 21 注入量調節機能を備えた判定用容器
  - 22 判定用注入管
  - 23 判定用溶液収容部



- 4 1 電磁石
- 4 2 マイクロ波発振器
- 4 3 クリスタルダイオード検出器
- 4 4 増幅器
- 4 5 記録計
- 5 1 入力部
- 5 2 表示部
- 5 3 判定用スペクトルデータ取得部
- 5 4 標準スペクトルデータ取得部
- 5 5 スペクトル比較判定部
- 6 1 フラビン濃度取得部
- 6 2 制御信号出力部
- 7 1 注入量調節機能を備えた原料用容器
- 7 2 原料用注入管
- 7 3 原料溶液収容部
- 1 0 1 注入量調節機能を備えた評価用容器
- 1 0 2 評価用注入管
- 1 0 3 評価溶液収容部
- 1 3 1 評価用スペクトルデータ取得部
- 1 3 2 スペクトル比較評価部
- C 演算処理手段
- R 記憶手段

## 請求の範囲

- [請求項1] 下記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) の工程を有するスーパーオキシド製造方法；
- (a) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製工程、
  - (b) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体ラジカルのスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピニアダクト／ラジカル生成工程、
  - (c) 前記生成させたスーパーオキシドのスピニアダクト、電子供与体ラジカルのスピニアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、
  - (d) スーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、
  - (e) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得工程、
  - (f) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製工程、
  - (g) 前記原料溶液に光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生工程。
- [請求項2] フラビンがリボフラビンである場合において、前記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) および (f) の工程に代えて下記 (h) の工程を有する、請求項1に記載のスーパーオキシド製造方法；
- (h) リボフラビンの濃度  $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製工程。
- [請求項3] フラビン濃度取得工程が、前記相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が75.

6～100%となるように取得するフラビン濃度取得工程である、請求項1または請求項2に記載のスーパーオキシド製造方法。

[請求項4] 電子供与体がEDTAである、請求項1から請求項3のいずれかに記載のスーパーオキシド製造方法。

[請求項5] スピントラップ剤がCYPMPOである、請求項1から請求項4のいずれかに記載のスーパーオキシド製造方法。

[請求項6] 水系溶媒がリン酸緩衝液である、請求項1から請求項5のいずれかに記載のスーパーオキシド製造方法。

[請求項7] 試料のスーパーオキシド消去能を評価する方法であって、下記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(i)、(j)、(k)および(l)の工程を有する、前記方法；

(a) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製工程、

(b) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成工程、

(c) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得工程、

(d) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定する相似判定工程、

(e) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得工程、

(i) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド消去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製工程、

(j) 前記評価溶液に光を照射してスピンアダクトを生成させる評価

用スピニアダクト生成工程、

(k) 前記評価用スピニアダクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する評価用スペクトル取得工程、

(l) スーパーオキシドのスピニアダクトの標準スペクトルと前記評価用スペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価する比較評価工程。

[請求項8] フラビンがリボフラビンである場合において、前記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(i)の工程に代えて下記(m)の工程を有する、請求項7に記載の方法；

(m) リボフラビンの濃度C ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるようにリボフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製工程。

[請求項9] フラビン濃度取得工程が、前記相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が75.6~100%となるように取得するフラビン濃度取得工程である、請求項7または請求項8に記載の方法。

[請求項10] 電子供与体がEDTAである、請求項7から請求項9のいずれかに記載の方法。

[請求項11] スピントラップ剤がCYPMPOである、請求項7から請求項10のいずれかに記載の方法。

[請求項12] 水系溶媒がリン酸緩衝液である、請求項7から請求項11のいずれかに記載の方法。

[請求項13] 下記(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)および(vii)の手段を備えるスーパーオキシド製造装置；

(i) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製手段、

(ii) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピニア

ダクト、電子供与体ラジカルのスピンドクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンドクト／ラジカル生成手段、

(iii) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンドクト、電子供与体ラジカルのスピンドクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得手段、

(iv) スーパーオキシドのスピンドクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定するための相似判定手段、

(v) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得手段、

(vi) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製手段、

(vii) 前記原料溶液に光を照射してスーパーオキシドを発生させる発生手段。

[請求項14]

フラビンがリボフラビンである場合において、前記(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)および(vi)の手段に代えて下記(viii)の手段を備える、請求項13に記載のスーパーオキシド製造装置；

(viii) リボフラビンの濃度 $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ ) が  $0.1 < C \leq 15$  となるように、リボフラビン、電子供与体および水系溶媒を含む原料溶液を調製する原料溶液調製手段。

[請求項15]

フラビン濃度取得手段が、前記相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が75.6～100%となるように取得するフラビン濃度取得手段である、請求項13または請求項14に記載のスーパーオキシド製造装置。

[請求項16]

電子供与体がEDTAである、請求項13から請求項15のいずれ

かに記載のスーパーオキシド製造装置。

[請求項17] スピントラップ剤がCYPMPPOである、請求項13から請求項16のいずれかに記載のスーパーオキシド製造装置。

[請求項18] 水系溶媒がリン酸緩衝液である、請求項13から請求項17のいずれかに記載のスーパーオキシド製造装置。

[請求項19] 試料のスーパーオキシド消去能を評価する装置であって、下記(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(ix)、(x)、(xi)および(xii)の手段を有する、前記装置；

(i) フラビン、電子供与体、スピントラップ剤および水系溶媒を含む判定用溶液を調製する判定用溶液調製手段、

(ii) 前記判定用溶液に光を照射してスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを生成させる判定用スピンアダクト／ラジカル生成手段、

(iii) 前記生成させたスーパーオキシドのスピンアダクト、電子供与体ラジカルのスピンアダクトおよび／または電子供与体ラジカルを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する判定用スペクトル取得手段、

(iv) スーパーオキシドのスピンアダクトの標準スペクトルと前記判定用スペクトルとが相似するか否かを判定するための相似判定手段、

(v) 前記相似判定により相似するフラビンの濃度を取得するフラビン濃度取得手段、

(ix) 前記取得した濃度のフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド消去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製手段、

(x) 前記評価溶液に光を照射してスピンアダクトを生成させる評価用スピンアダクト生成手段、

(x i) 前記評価用スピンドクタクトを電子スピン共鳴により検出してスペクトルを取得する評価用スペクトル取得手段、

(x i i) スーパーオキシドのスピンドクタクトの標準スペクトルと前記評価用スペクトルとを比較してスーパーオキシド除去能を評価するための比較評価用手段。

[請求項20] フラビンがリボフラビンである場合において、前記(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v)および(i x)の手段に代えて下記(x i i i)の手段を備える、請求項19に記載の装置；

(x i i i) リボフラビンの濃度 $C$  ( $\mu\text{mol/L}$ )が $0.1 < C \leq 15$ となるようにリボフラビン、電子供与体、スピントラップ剤、スーパーオキシド除去能を評価する試料および水系溶媒を含む評価溶液を調製する評価溶液調製手段。

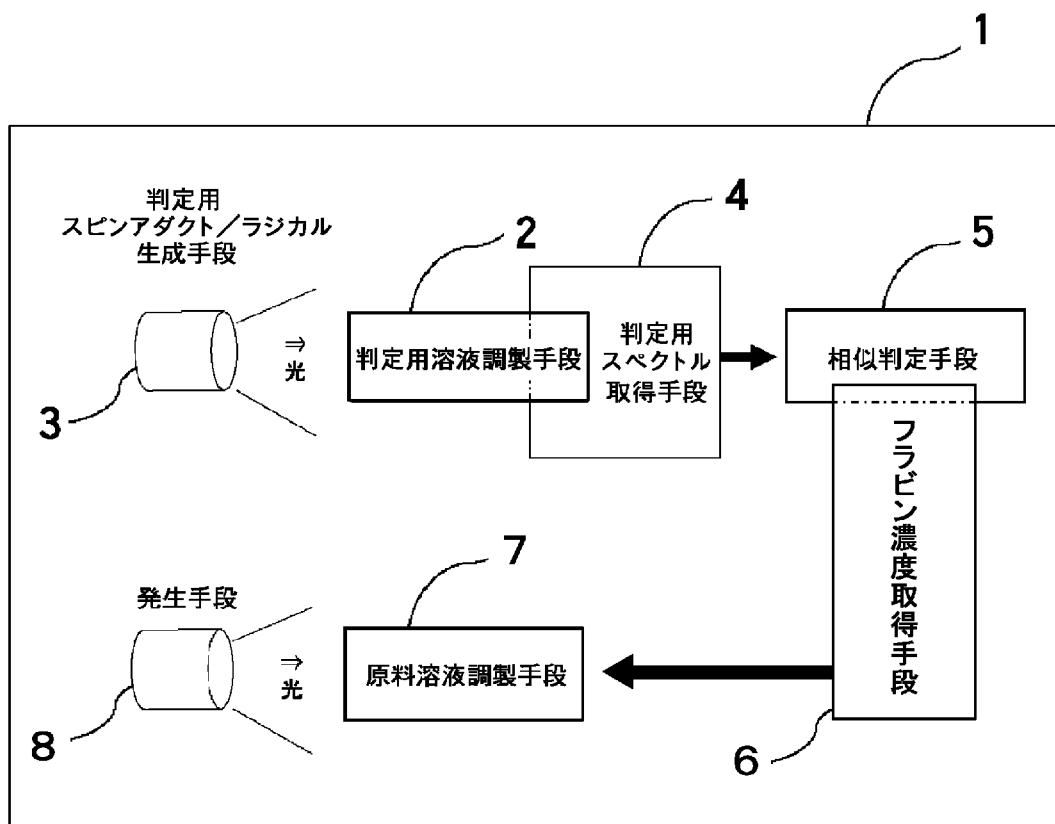
[請求項21] フラビン濃度取得手段が、前記相似判定により相似するフラビンの濃度を、生成するラジカルにおいてスーパーオキシドの純度が75.6~100%となるように取得するフラビン濃度取得手段である、請求項19または請求項20に記載の装置。

[請求項22] 電子供与体がEDTAである、請求項19から請求項21のいずれかに記載の装置。

[請求項23] スピントラップ剤がCYPMPOである、請求項19から請求項22のいずれかに記載の装置。

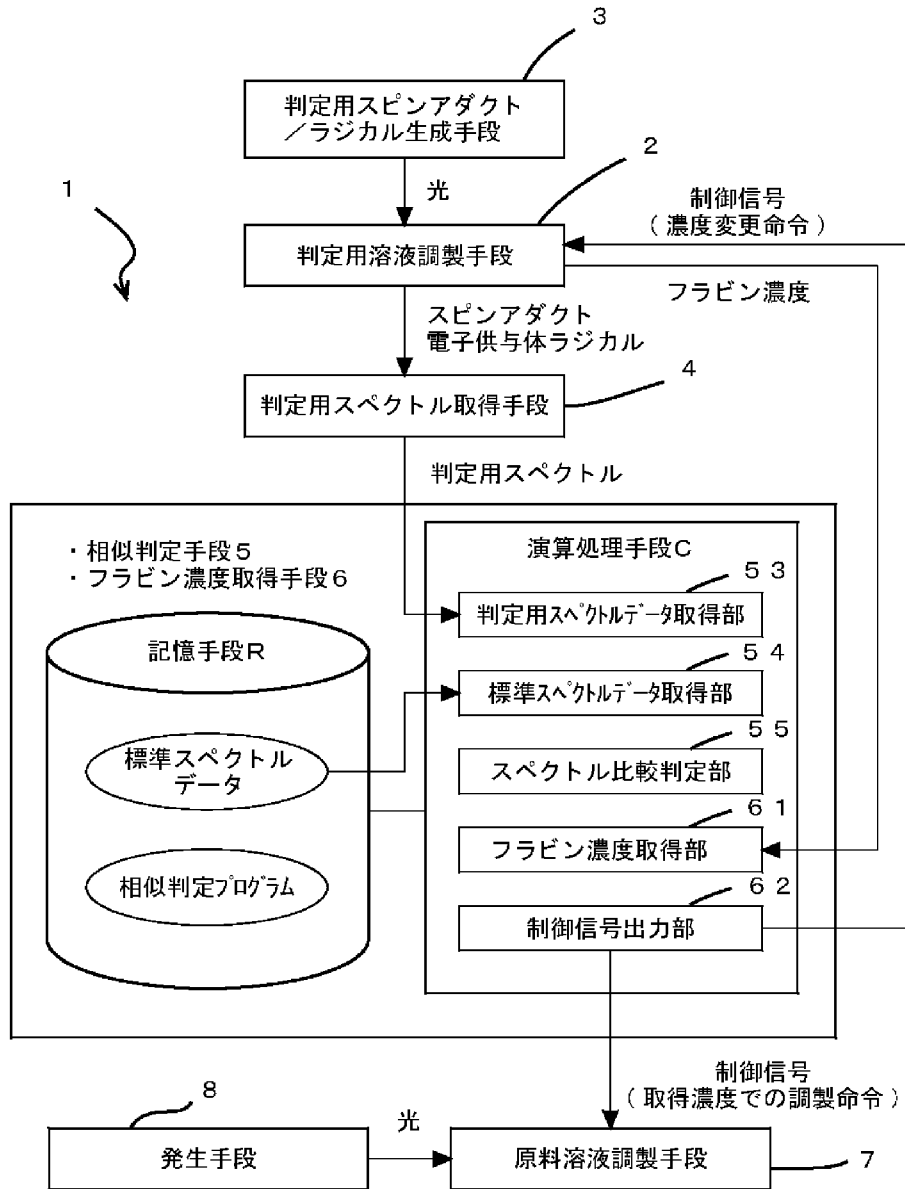
[請求項24] 水系溶媒がリン酸緩衝液である、請求項19から請求項23のいずれかに記載の装置。

[図1]

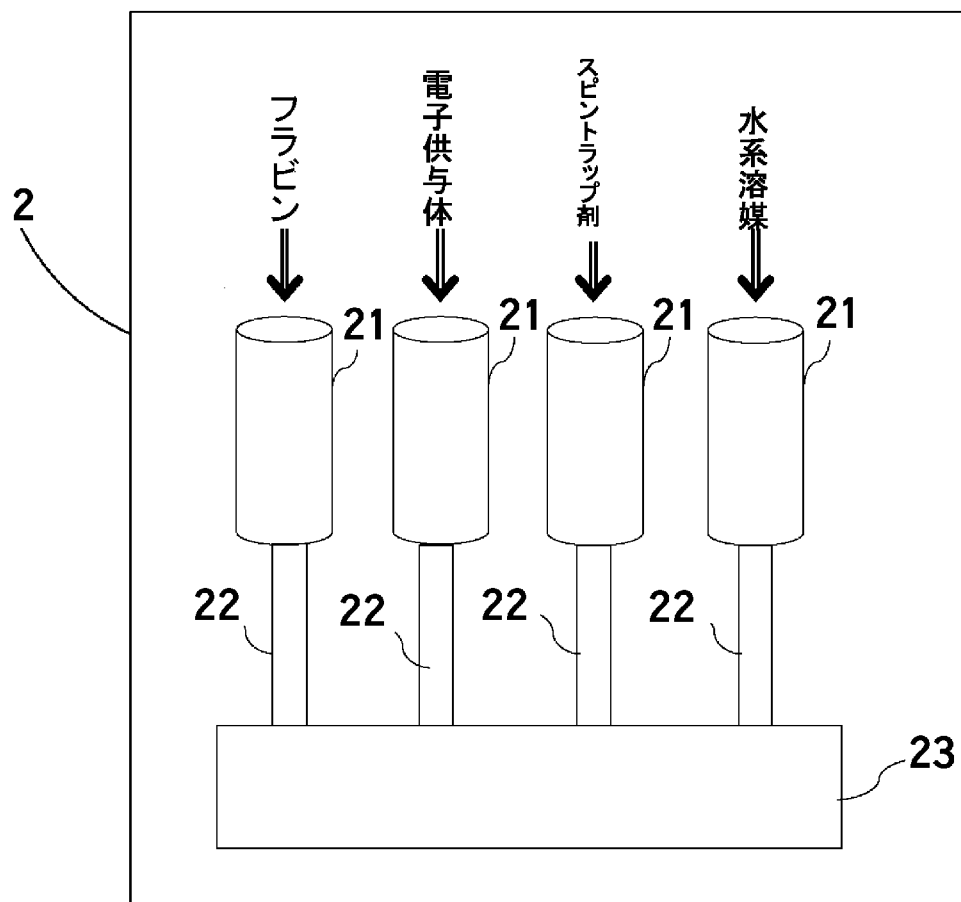




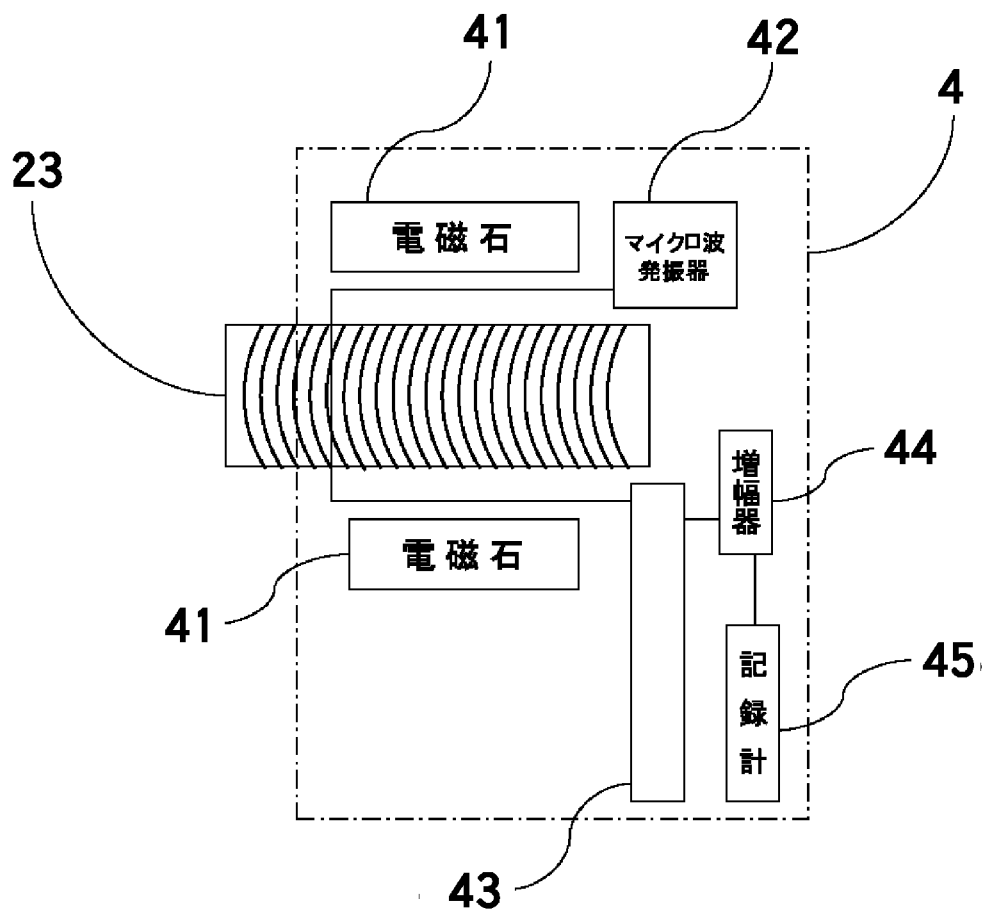
[図2]



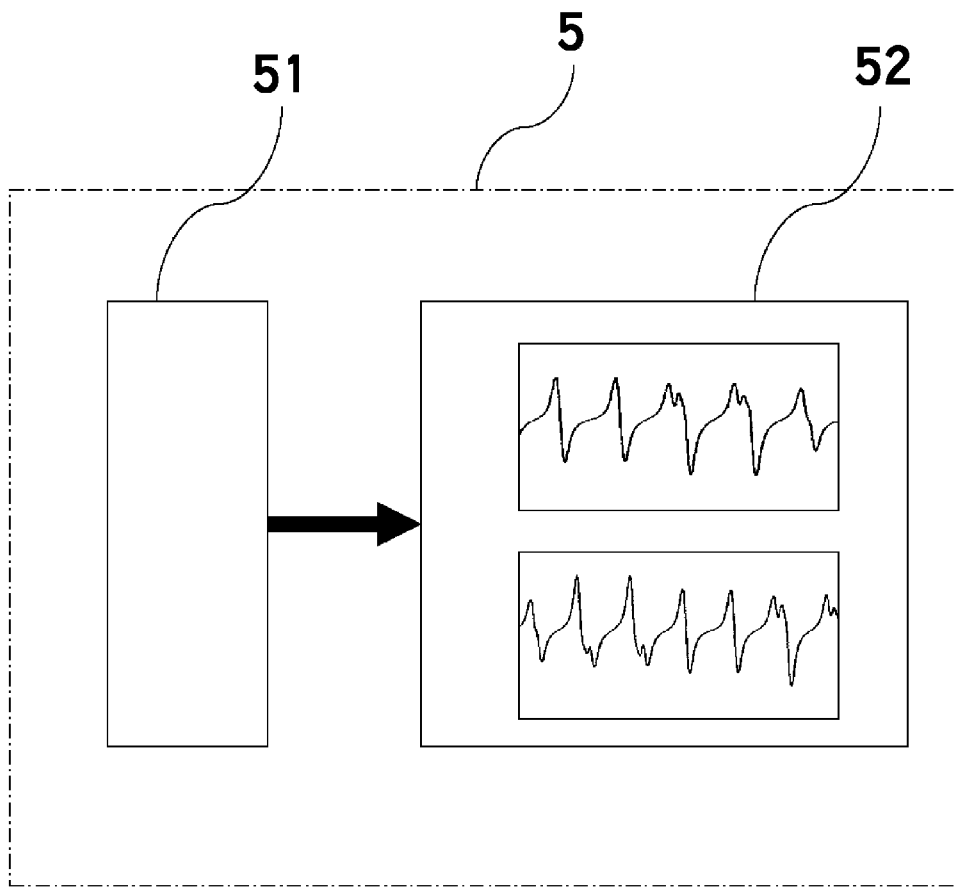
[図3]



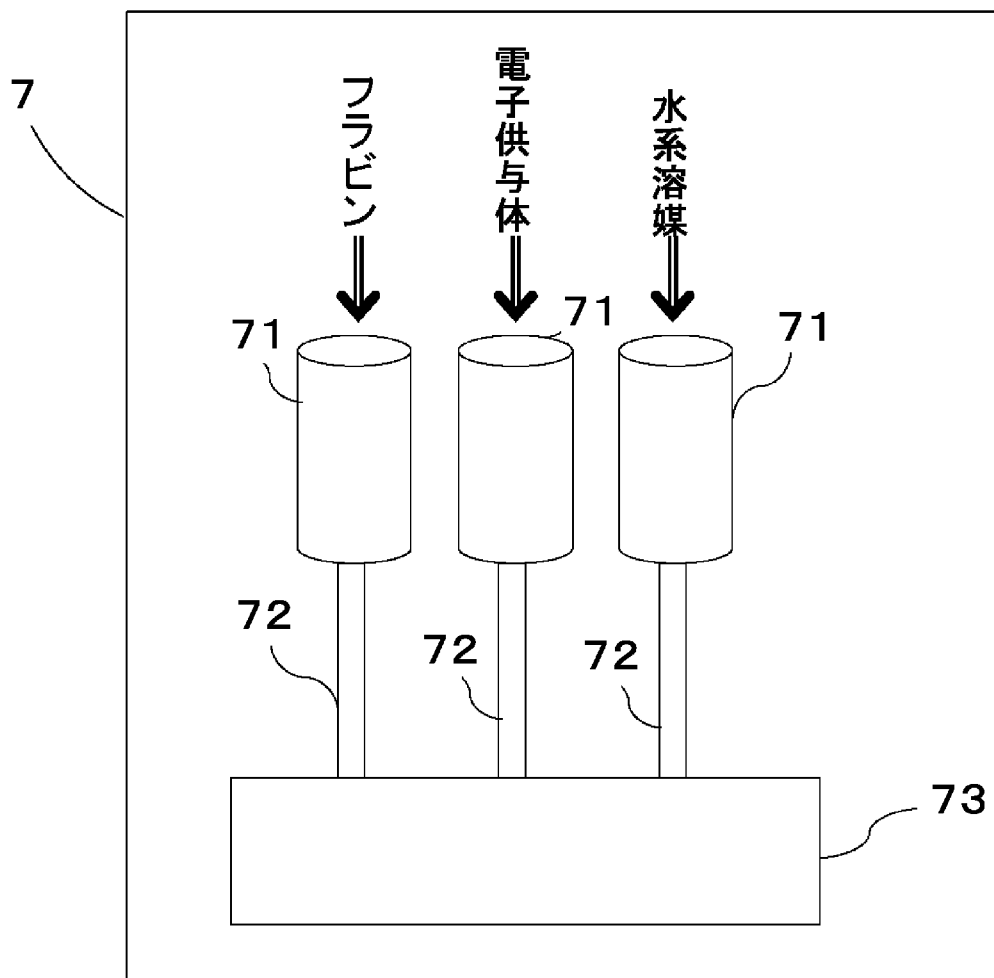
[図4]



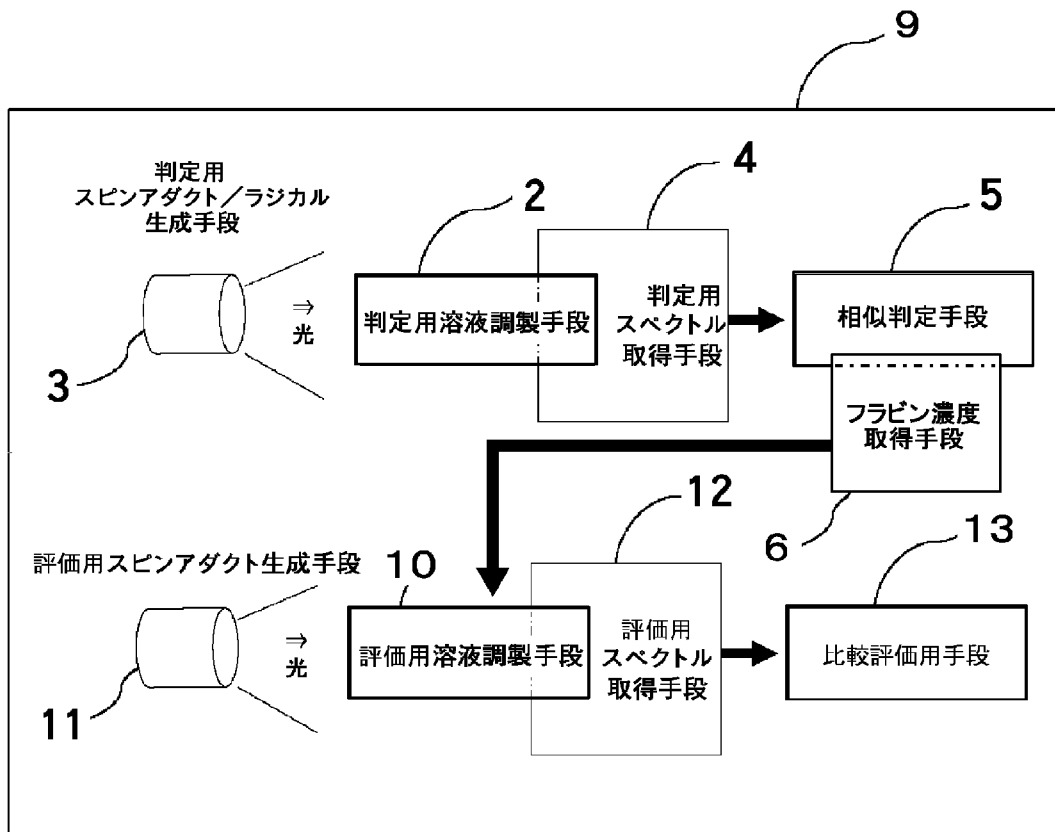
[図5]



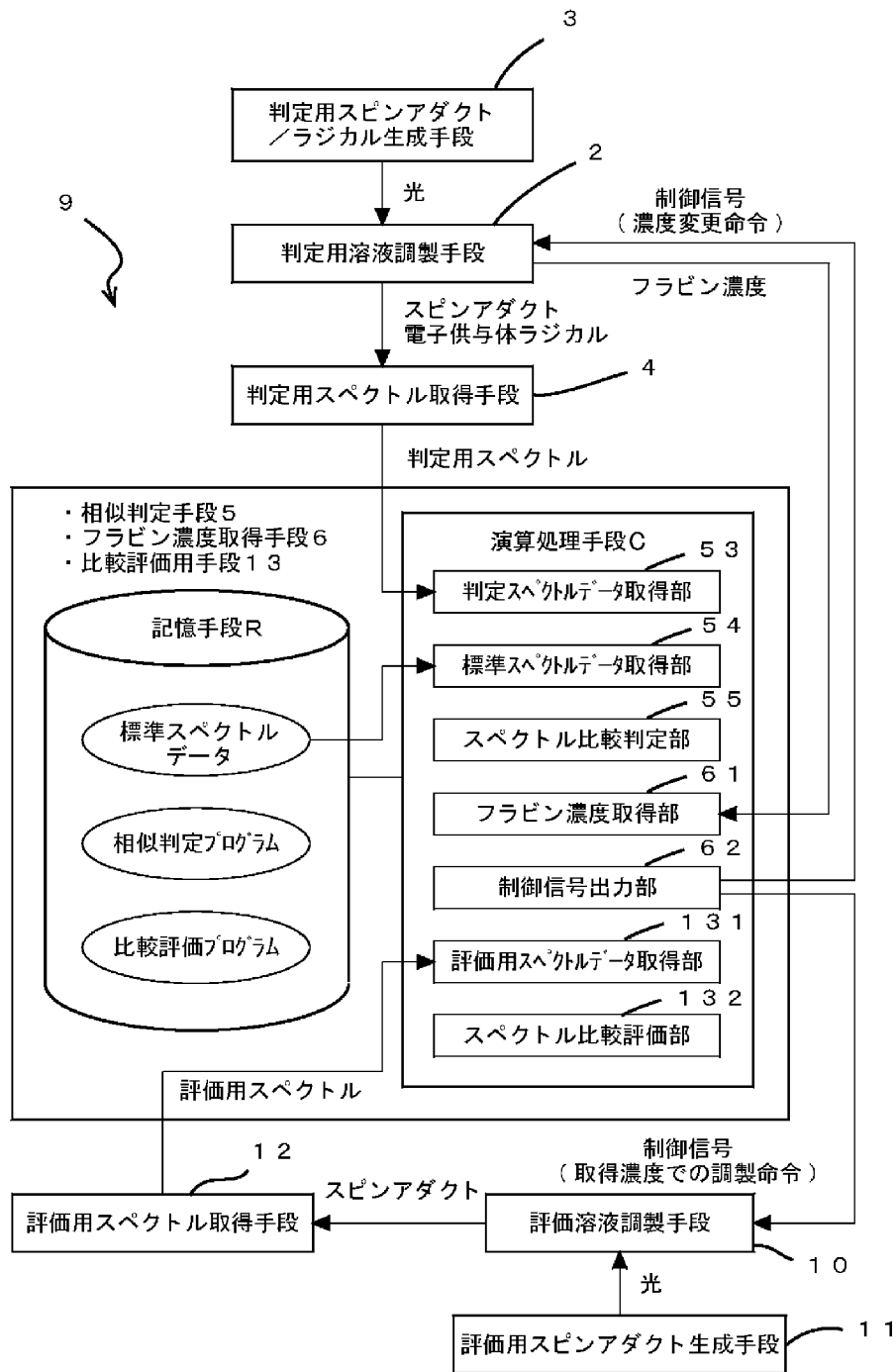
[図6]



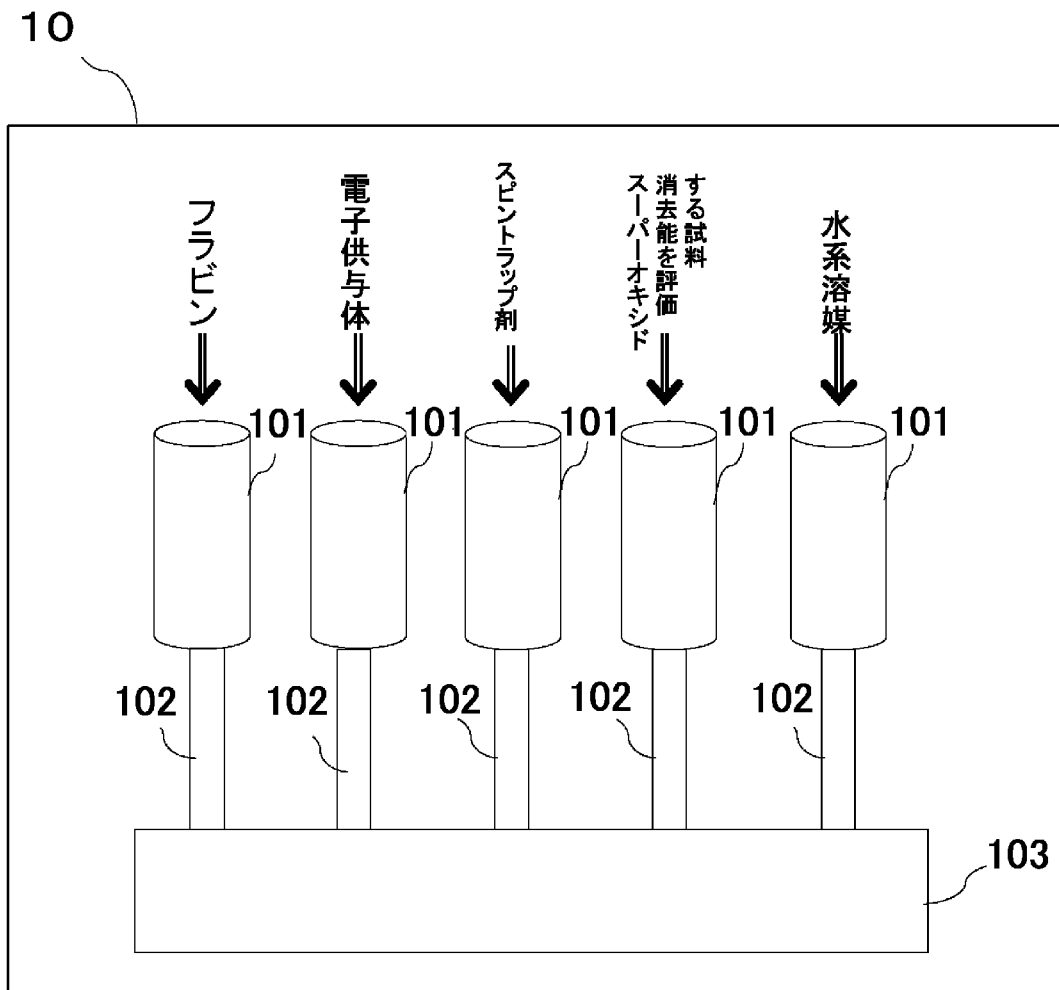
[図7]



[図8]

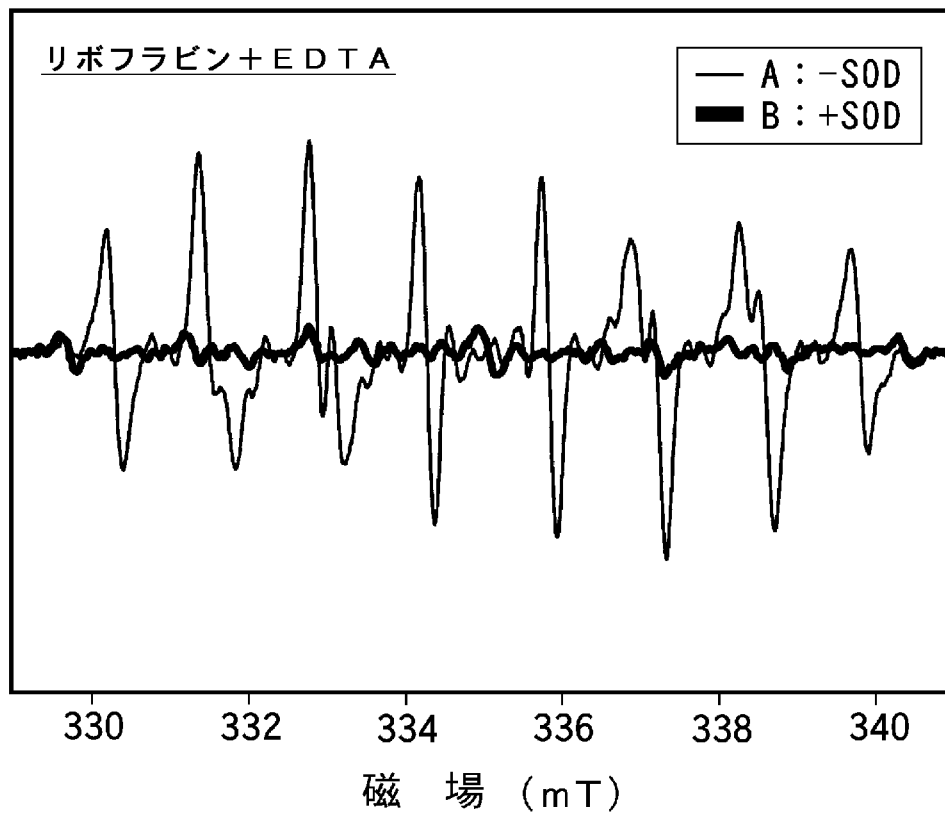


[図9]

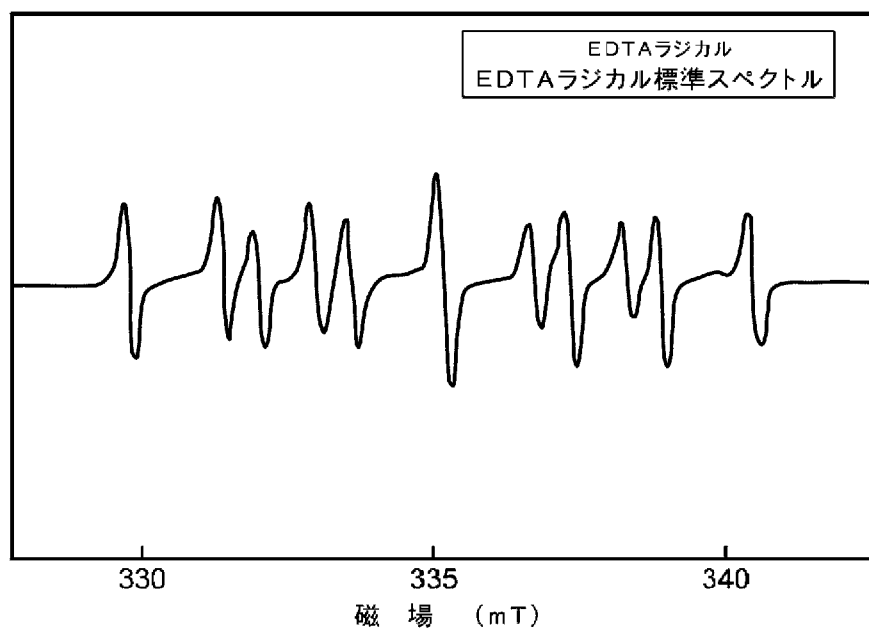
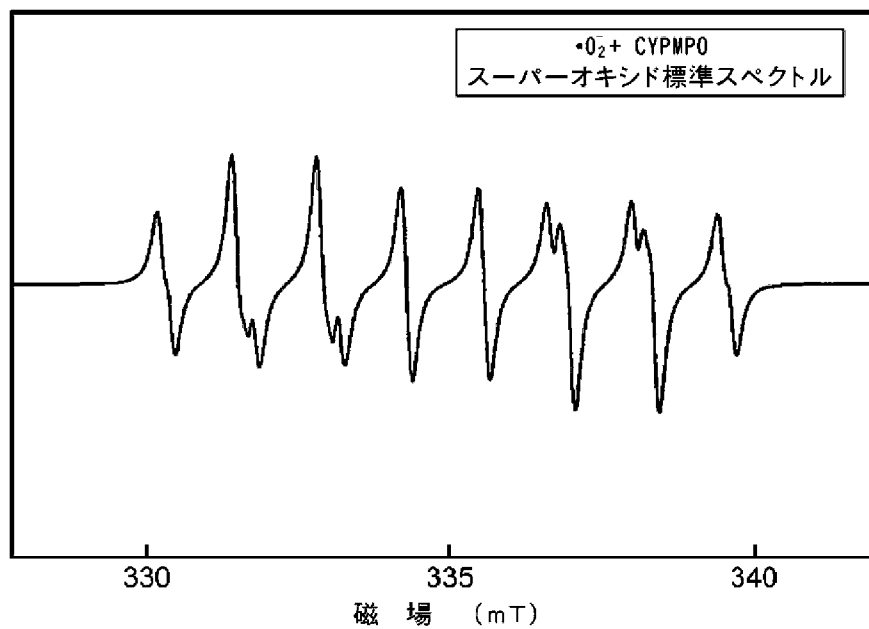




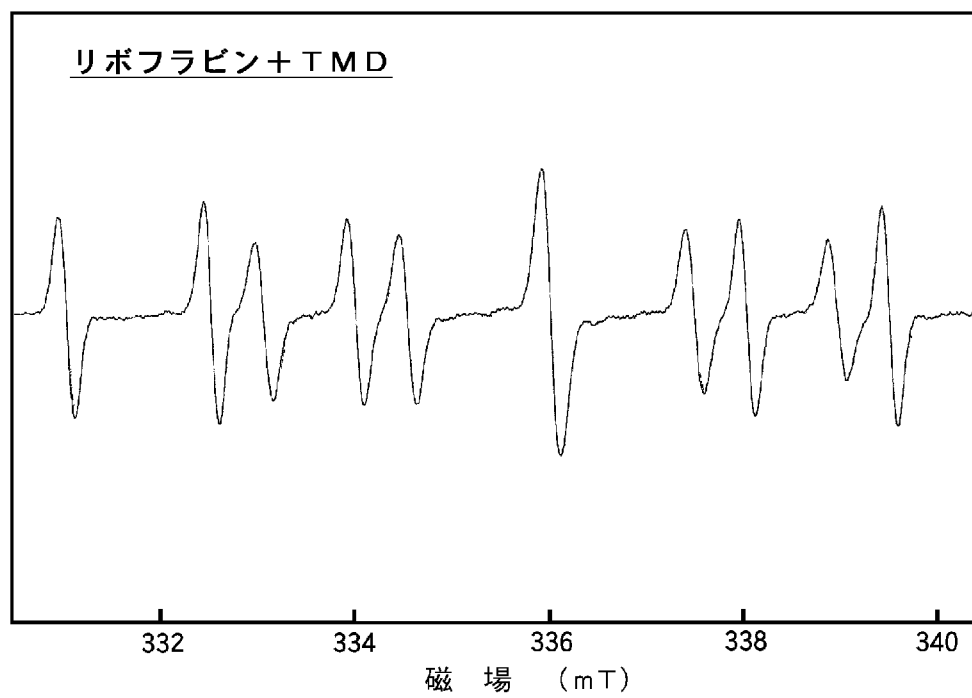
[図10]



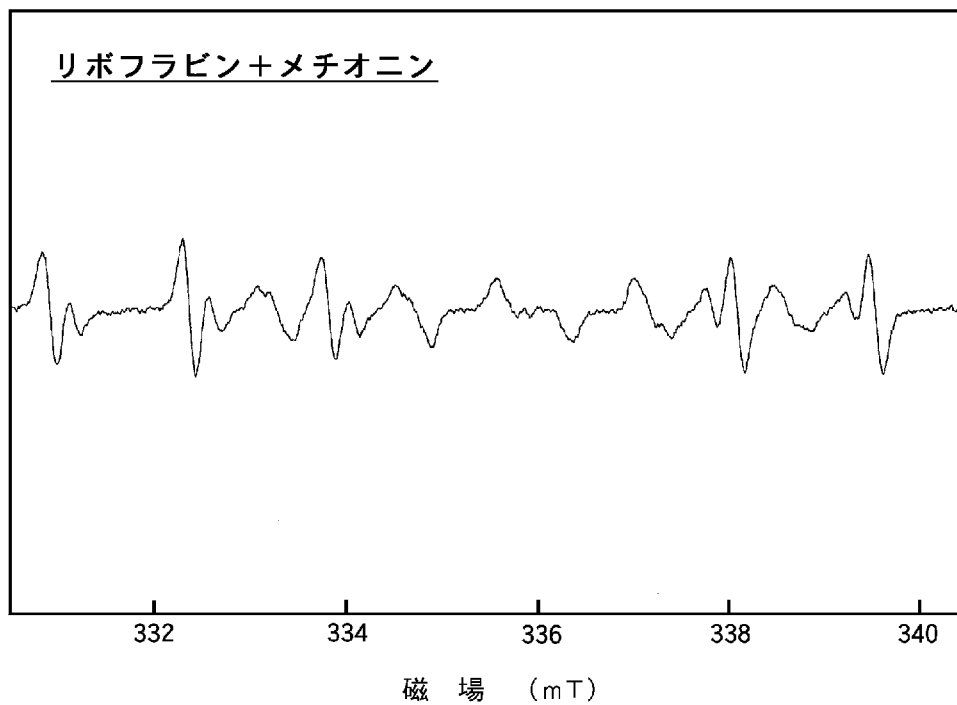
[図11]



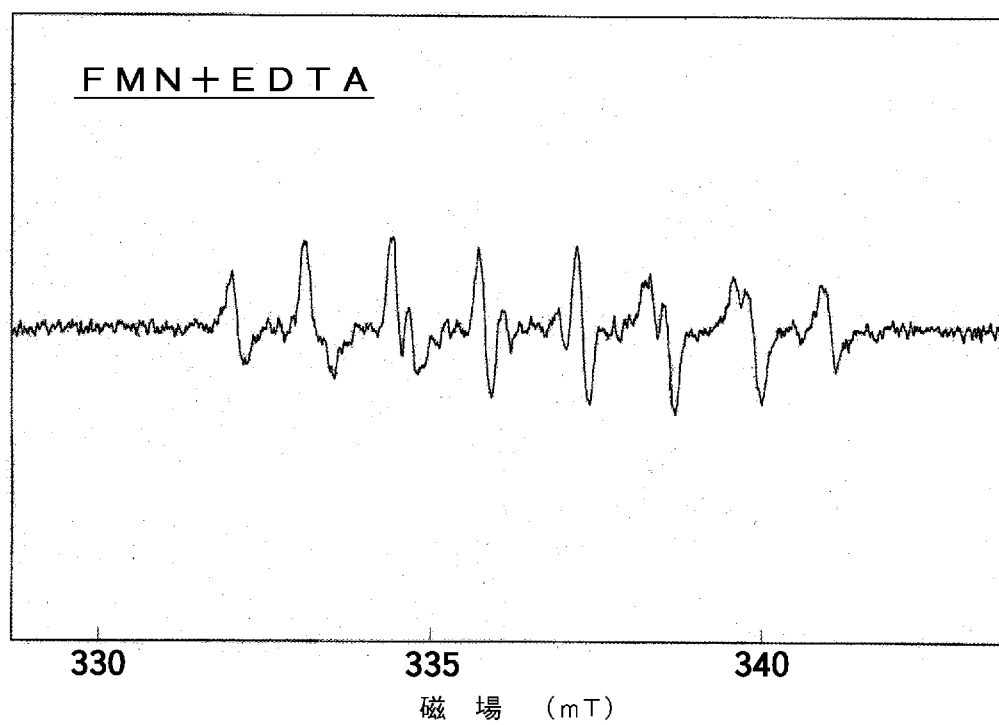
[図12]



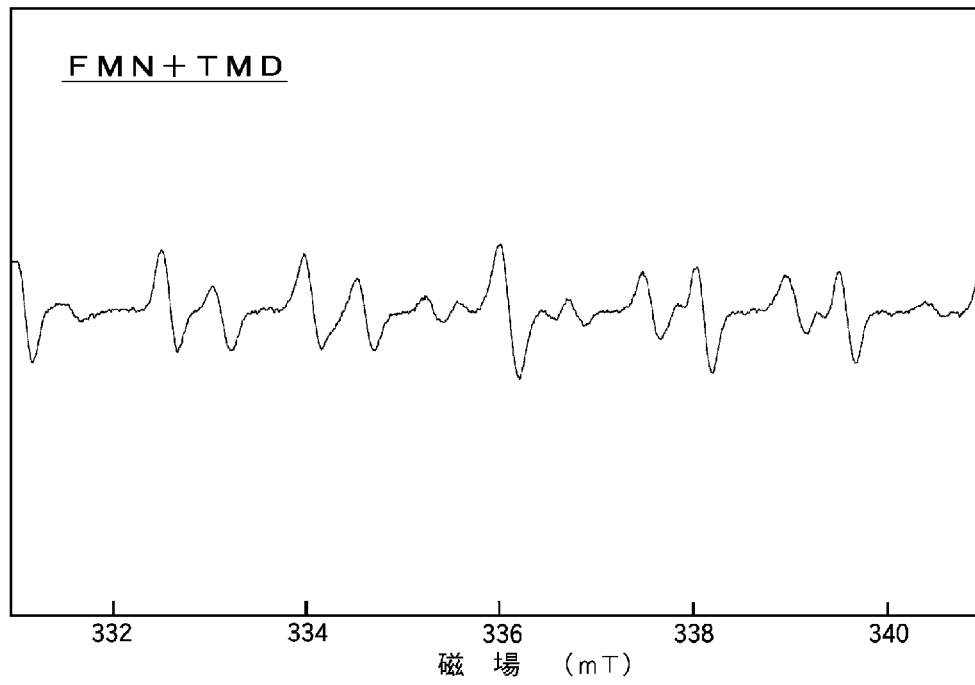
[図13]



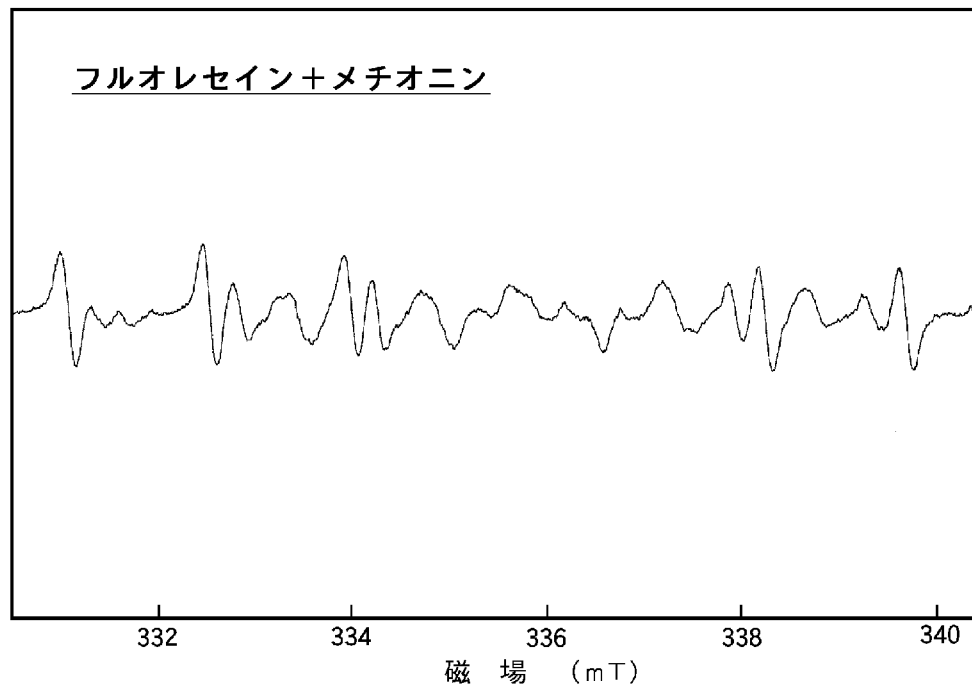
[図14]



[図15]

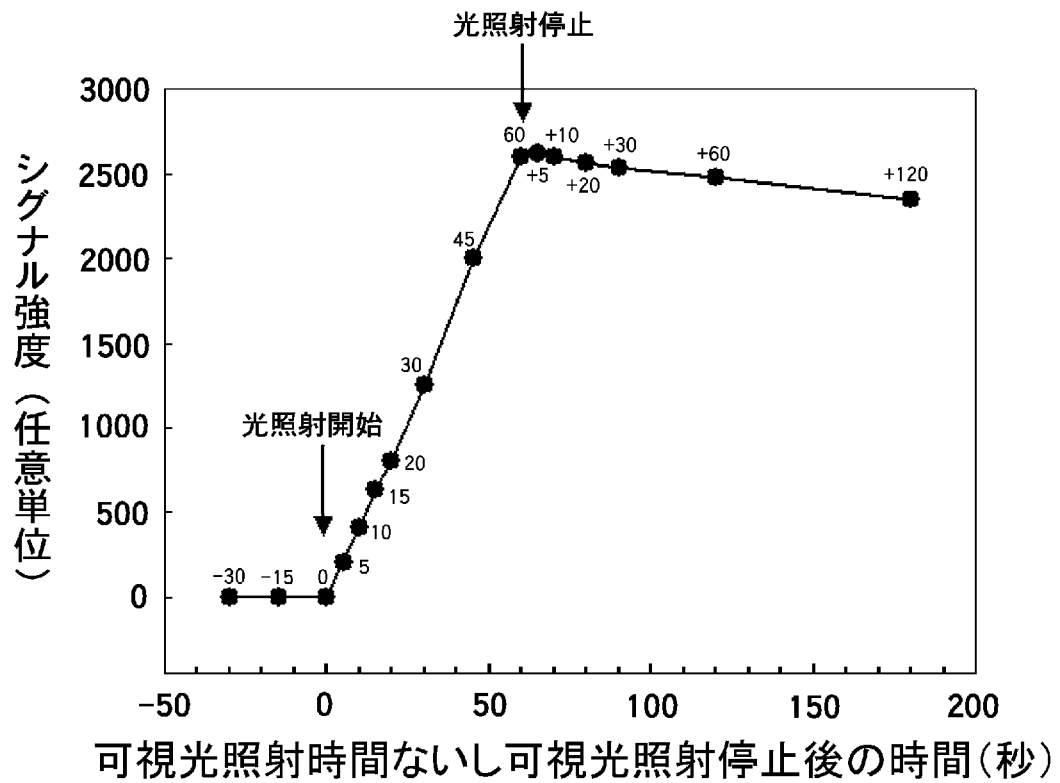


[図16]



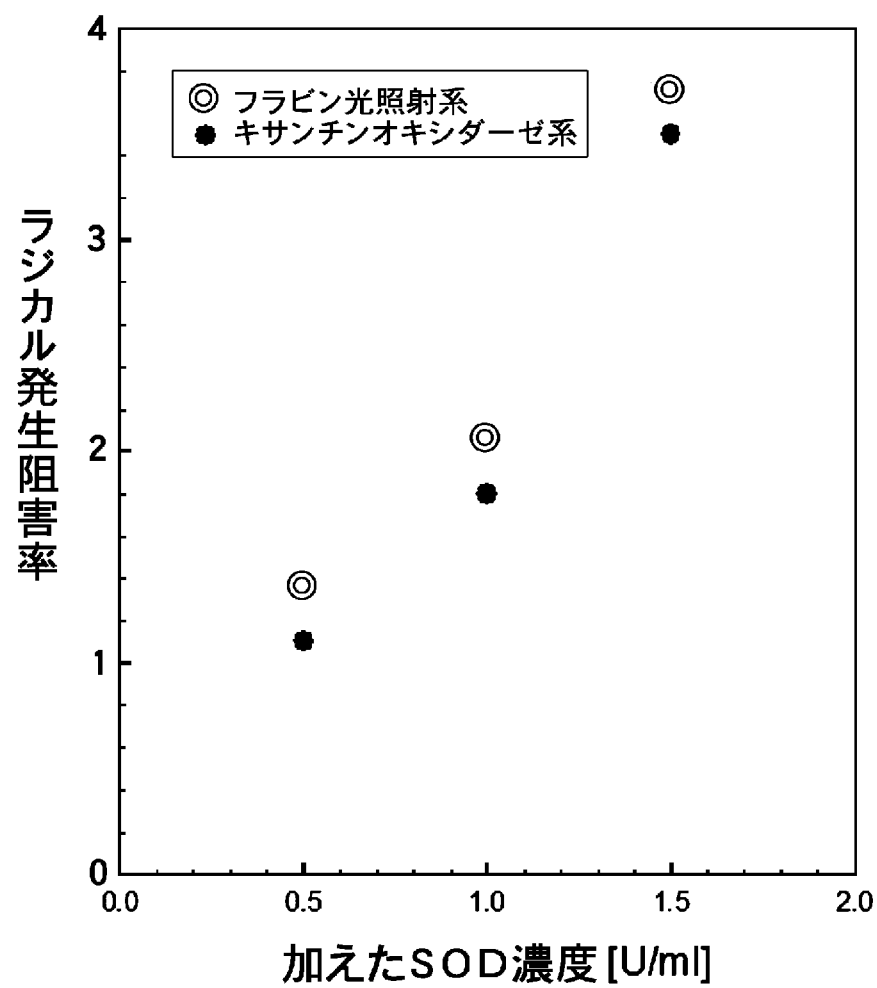


[図18]





[図19]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/072050

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C01B13/02(2006.01) i, G01N24/10(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C01B13/02, G01N24/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	YAMASAKI, H. et al., Bleaching of the Red Anthocyanin Induced by Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 1996, Vol. 332, No. 1, p.183-186, FIG. 1, FIG. 3	1-6,13-18 7-12,19-24
X Y	TAKAHAMA, U., O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -dependent and -independent photooxidation of quercetin in the presence and absence of riboflavin and effects of ascorbate on the photooxidation, Photochem. Photobiol., 1985, Vol. 42, No. 1, p. 89-91, Figure 2	1-6,13-18 7-12,19-24
X Y	TIWARI, O. P. et al., Antioxidant properties of different fractions of <i>Vitex negundo</i> Linn, Food Chem., 2007, Vol. 100, No. 3, p. 1170-1176, 2.5. Superoxide radical scavenging property	1-6,13-18 7-12,19-24

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 March, 2011 (04.03.11)Date of mailing of the international search report  
15 March, 2011 (15.03.11)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/072050

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-195672 A (Okayama University), 28 August 2008 (28.08.2008), paragraphs [0049] to [0052] (Family: none)	7-12, 19-24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/072050

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: YAMASAKI, H. et al., Bleaching of the Red Anthocyanin Induced by Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 1996, Vol. 332, No. 1, p. 183-186

Document 2: TAKAHAMA, U., O<sub>2</sub><sup>-</sup>-dependent and -independent photooxidation of quercetin in the presence and absence of riboflavin and effects of ascorbate on the photooxidation, Photochem. Photobiol., 1985, Vol. 42, No. 1, p. 89-91

Document 3: TIWARI, O. P. et al., Antioxidant properties of different fractions of *Vitex negundo* Linn, Food Chem., 2007, Vol. 100, No. 3, p. 1170-1176

(continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2010/072050

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The invention in claim 1 cannot be considered to be novel in the light of the documents 1 - 3, and does not have a special technical feature. Therefore, the inventions in claims 1 - 24 do not comply with the requirement of unity of invention. Meanwhile, the inventions in claims 1 - 6 are relevant to main invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C01B13/02(2006.01)i, G01N24/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C01B13/02, G01N24/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	YAMASAKI, H. et al., Bleaching of the Red Anthocyanin Induced by Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 1996, Vol. 332, No. 1, p. 183-186, FIG. 1, FIG. 3	1-6, 13-18 7-12, 19-24
X Y	TAKAHAMA, U., O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -dependent and -independent photooxidation of quercetin in the presence and absence of riboflavin and effects of ascorbate on the photooxidation, Photochem. Photobiol., 1985, Vol. 42, No. 1, p. 89-91, Figure 2	1-6, 13-18 7-12, 19-24

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.03.2011

国際調査報告の発送日

15.03.2011

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

西山 義之

電話番号 03-3581-1101 内線 3416

4G

3129

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	TIWARI, O. P. et al., Antioxidant properties of different fractions of <i>Vitex negundo</i> Linn, Food Chem., 2007, Vol. 100, No. 3, p. 1170-1176, 2.5. Superoxide radical scavenging property	1-6, 13-18 7-12, 19-24
Y	JP 2008-195672 A (国立大学法人 岡山大学) 2008.08.28, 【0049】- 【0052】 (ファミリーなし)	7-12, 19-24

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1: YAMASAKI, H. et al., Bleaching of the Red Anthocyanin Induced by Superoxide Radical, Arch. Biochem. Biophys., 1996, Vol. 332, No. 1, p. 183-186

文献2: TAKAHAMA, U., O<sub>2</sub><sup>-</sup>-dependent and -independent photooxidation of quercetin in the presence and absence of riboflavin and effects of ascorbate on the photooxidation, Photochem. Photobiol., 1985, Vol. 42, No. 1, p. 89-91

文献3: TIWARI, O. P. et al., Antioxidant properties of different fractions of *Vitex negundo* Linn, Food Chem., 2007, Vol. 100, No. 3, p. 1170-1176

請求項1に係る発明は文献1-3より新規性が認められず、特別な技術的特徴を有さない。したがって、請求項1-24に係る発明は、発明の単一性の要件を満たしていない。なお、請求項1-6に係る発明が主発明である。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。