

表 1 照射部位での光刺激性指数

群	動物番号	適用後照射までの時間		
		15分	30分	45分
対照群	1	2.3	2.3	0.7
	2	1.0	1.0	0.0
	3	2.3	2.3	0.7
	平均	1.9	1.9	0.5
角化層剥離群	4	2.3	2.3	0.7
	5	2.3	2.3	0.7
	6	2.3	3.0	0.7
	平均	2.3	2.5	0.7
擦搔創群	7	1.7	2.3	0.3
	8	2.3	1.0	0.7
	9	0.7	1.0	0.3
	平均	1.6	1.4	0.4

1回適用部位は適用から照射までの時間を30分に、2回適用部位は適用から照射までの時間が20および40分になるように検体を各0.05 mLないし0.025 mL × 2回、マイクロピペットを用いて適用し、先の実験と同様の照射、判定を行った。適用検体を自然乾燥させた後、背部右側をアルミホイルで覆い遮光して(非照射対照)UV照射を開始した。光源には先の試験と同様のUV-A灯を14本用い、照射距離約50 cmで照射線量(UV-A)

が10 J/cm<sup>2</sup>となるように照射した(UV-Aの放射照度は約5.5 mW/cm<sup>2</sup>、照射時間は30分18秒であった)。

その結果、各動物の非照射部位において一次刺激性は認められなかった。また、光刺激性は下表の通りとなり、2回に分けて適用しても1回の場合と同様の成績が得られるという結果となった。

表 2 照射部位での光刺激性指数

動物番号	適用方法	
	1回	2回
1	3.0	2.3
2	3.7	4.3
3	2.3	2.3
4	2.0	3.0
5	3.0	2.3
6	1.0	3.0
平均	2.5	2.9

#### D. 考察

これまでの研究によって、モルモットにおける急性皮膚光刺激性成績では、媒体が異なる物質間での皮膚の透過性の相違、有色の被験物質への対応、限度試験とする濃度などが試験手法上の問題点であることが明らかになった。本年度は、媒体が異なる物質間での皮膚の透過性について、適用方法の検討を行い、角化層の表層を剥離してから適用した場合により安定した良好な結果が得られることが示唆された。また、適用後照射までの時間が15分という短時間でも30分の場合と同様の結果が得られることが明らかとなった。さらに、皮膚への浸透時間が異なる溶媒に対応する方法として、半量の検体を時間をずらして2度に分けて適用する方法を検討し、1度に適用した場合と比較したところ、1回の適用と変わらない結果が得られた。

これらの結果から、モルモットを用いた皮膚塗布による急性皮膚光刺激性試験では、皮膚浸透性の問題に対処するために、適用時に角化層を剥離し、検体の皮膚浸透性によっては時間をずらすて複数回に分けて塗布する方法が望ましいことが示唆された。平成11年度からは、今回設定した条件を用いて、クロルプロマジン、テトラサイクリン、ニュートラルレッド、ローズベンガル、ピロキシカム等の既知の光毒性物質について検討を行う予定である。

#### E. 結論

モルモットを用いた皮膚塗布による急性皮膚光刺激性試験の問題点について検討し、適用時の方法として、角化層を剥離し、皮膚浸透性によって適用後照射までの時間を調節するために、検体を複数回に分けて塗布する方法が望ましいことが示唆された。

#### F. 引用文献

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

## 分担研究報告書

### 7. 新規一重項酸素検出蛍光プローブの開発

分担研究者 長野 哲雄 東京大学大学院薬学研究科 教授

#### 研究要旨

一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) は活性酸素種の一つであり、化学物質の光毒性に最も関連する重要な反応種である。 $^1\text{O}_2$  は反応性が高く、特異な反応を行うことから、NO のように生体内で何らかの役割を担っていることが期待される分子であるが、他の活性酸素種とは異なり、その生理的役割はおろかその生体内での生成も明らかになっていない。その大きな理由として、 $^1\text{O}_2$  を特異的かつ簡便に検出する方法がないことが挙げられる。現在までに我々の研究グループで開発した  $^1\text{O}_2$  特異的な近赤外領域 1268 nm の発光を検出する装置を用い、種々の  $^1\text{O}_2$  産生系で検討を加えてきた<sup>1)</sup>。その結果、この装置は極めて高い特異性を有するが、感度面が劣ることが明らかとなった。現時点では、生理的条件下で効率よく  $^1\text{O}_2$  を検出できる方法は存在しないといえる。そこで本研究においては、 $^1\text{O}_2$  の生理的条件下からの検出を目的とした高感度特異的検出プローブの開発を行うこととした。最終的には  $^1\text{O}_2$  のイメージングが可能となるプローブの開発を目指している。

#### A. プローブのデザイン

$^1\text{O}_2$  検出試薬は現在までに多数開発されてきているが、特異性に問題がある試薬がほとんどであった。十分な特異性を有しているものとして、 $^1\text{O}_2$  が 1, 4 付加反応をする縮合芳香環類が挙げられるが、それらはその検出原理として吸光度法を用いている上に、 $^1\text{O}_2$  と反応することで消失する吸収を測定しているため、感度が低いという問題点があった。

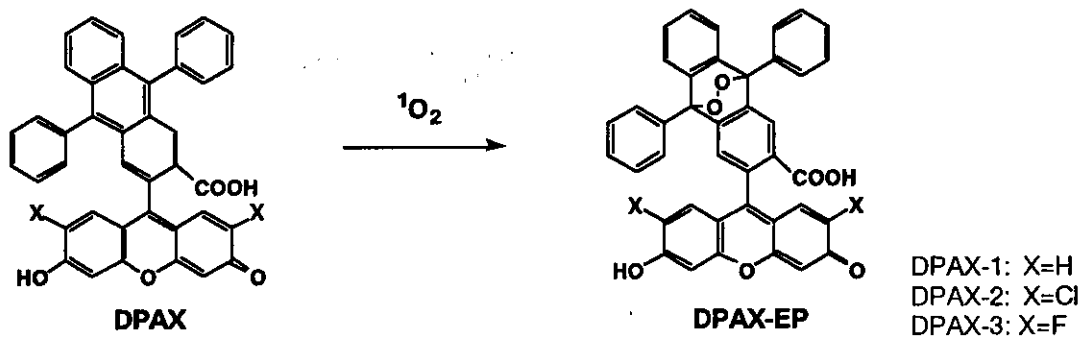
そこでこれらを踏まえ、以下の条件を満足する化合物を設計し、合成することを計画した。

- 1) 感度の高い蛍光法を検出原理とする
- 2)  $^1\text{O}_2$  と反応して、新たな蛍光波長が増大する
- 3)  $^1\text{O}_2$  に対して特異性を有している

$^1\text{O}_2$  と反応することで蛍光が変化する化合物

は感度が高いだけでなく、将来的にイメージングに適用できる可能性があり、より汎用性が高いと考えられる。

以上のようなコンセプトのもと、Scheme 1 に示すような新規化合物 DPAX 類をデザインした。これは、この化合物の Diphenylanthracene 部が  $^1\text{O}_2$  と反応して Endoperoxide 体となって、共鳴系が短くなることにより、化合物の蛍光に変化が生じることを期待したもので、9,10-Diphenylanthracene は  $^1\text{O}_2$  と  $k_r=1.3\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  で反応して、安定な Endoperoxide 体を与えることが知られている化合物である。また Fluorescein 骨格は、水中で高い蛍光量子収率をもち、長波長励起ができることから、この骨格に Diphenylanthracene を導入することにした。DPAX 類が、 $^1\text{O}_2$  と反応して DPAX-EP 体となれば、何らかの蛍光変化が期待される。



**Scheme 1 DPAX類と<sup>1</sup>O<sub>2</sub>との反応**

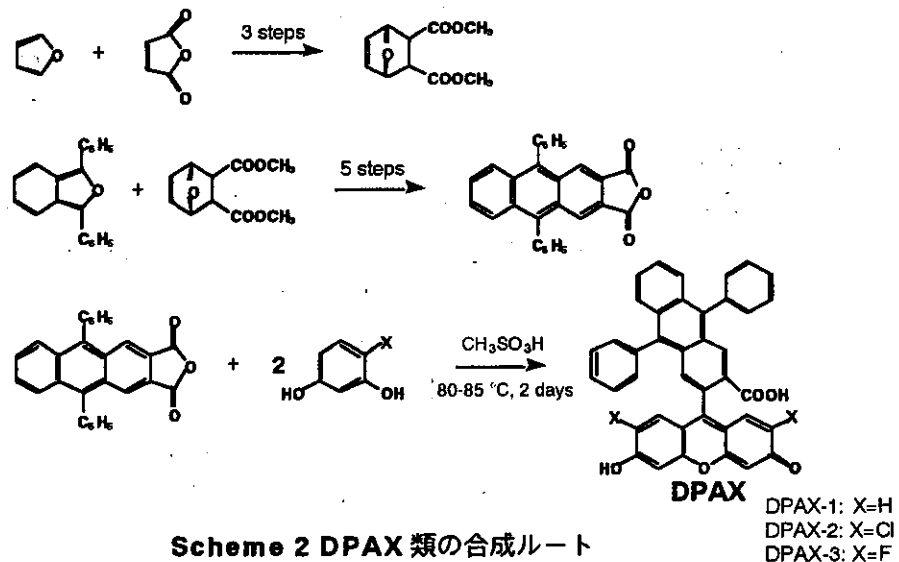
Fluorescein 類は酸性条件では顕著な蛍光の減少が見られることが知られている。そこで DPAX-2, DPAX-3 では、この化合物の pKa を下げることが目的として、Xanthene の 2,7 位に電子吸引性基である Cl, F を導入した。

### B. DPAX 類の物性

DPAX-1, DPAX-2 ともに同様の合成経路で 9 工程で合成することに成功した (Scheme 2)。また DPAX-EP 類は、DPAX 類を原料として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>系で <sup>1</sup>O<sub>2</sub> を発生させて合成した。これらの化合物の物性を Table 1 に示す。ここに示した数値は全て 0.1 M NaOH 水溶液中での値である (Cosolvent として、DMSO を最終濃度 0.1 % 用いた)。極大吸収波長、モル吸光係数、極大蛍光波長は、いずれの誘導体でも、DPAX と DPAX-EP との間に大きな違い

はなかった。だが、蛍光の相対量子収率は EP 体となることで、いずれの誘導体でも約 100 倍のなるという顕著な増大がみられた。すなわち、いずれの誘導体でも DPAX 自身はほとんど蛍光を持たないが、<sup>1</sup>O<sub>2</sub> と反応して EP 体となると強い蛍光を有するようになることが明らかとなった。

Fluorescein 類の蛍光は一般に溶媒の pH に強く依存し、酸性条件下では顕著な蛍光の減少が見られる。DPAX 類も蛍光団として類似の構造を持つため、同様の減少がみられる可能性がある。DPAX 類は生理的条件下での使用を目標としているため、中性付近で安定な蛍光強度を持つことが必要とされる。そこで DPAX-EP 類に関して、蛍光の pH 依存性を検討した (Fig. 1)。その結果、DPAX-1-EP は中性領域で蛍光強度の減少が見られたが、

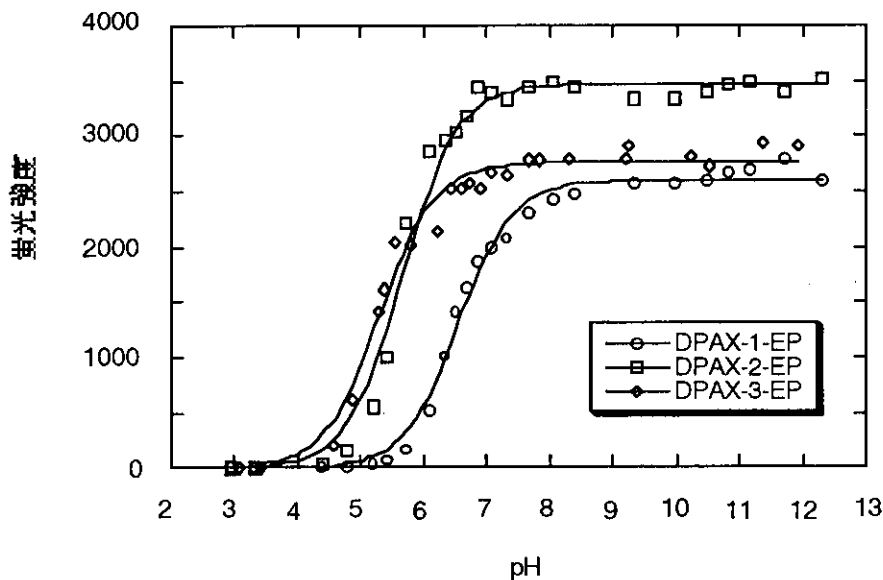


**Scheme 2 DPAX 類の合成ルート**

**Table 1 DPAX 類のスペクトルデータ**

	極大吸収波長 (nm)	モル吸光係数 ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	極大蛍光波長 (nm)	相対量子収率
DPAX-1	493	6.1	516	0.007
DPAX-1-EP	494	7.9	515	0.53
DPAX-2	507	5.7	524	0.006
DPAX-2-EP	506	8.9	527	0.66
DPAX-3	493	7.6	514	0.023
DPAX-3-EP	494	6.7	515	0.70

All data were obtained at 20 °C in 0.1 M NaOH (0.1 % DMSO).



**Fig. 1 DPAX-EP 類の蛍光の pH 依存性**

DPAX-2-EP, DPAX-3-EP では pKa のシフトが見られ, 中性領域で安定な蛍光強度を示すことが明らかとなった. DPAX-EP 類の pKa はそれぞれ 6.6 (DPAX-1-EP), 5.7 (DPAX-2-EP), 5.3 (DPAX-3-EP) となり, 当初期待したように, 電子吸引性基である Cl 及び F の効果が反映された結果が得られた. さらに DPAX-2-EP は, DPAX-EP 類の中で最も強い蛍光を示した.

以上の結果は, DPAX-2 が, DPAX 類の中

で最も優れた  $^1\text{O}_2$  検出プローブであり, 細胞系への応用が可能であることを示している. そこで, DPAX-2 を用いて実際に  $^1\text{O}_2$  を検出することができるかを検討することとした.

### C. DPAX 類による $^1\text{O}_2$ 検出

$\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ 系は, 緩和な条件で多量の  $^1\text{O}_2$  を生成することが知られている. そこでまずこの系で  $^1\text{O}_2$  が検出できるか否か検討した. この系は塩基性条件下で  $^1\text{O}_2$  を生成するため,

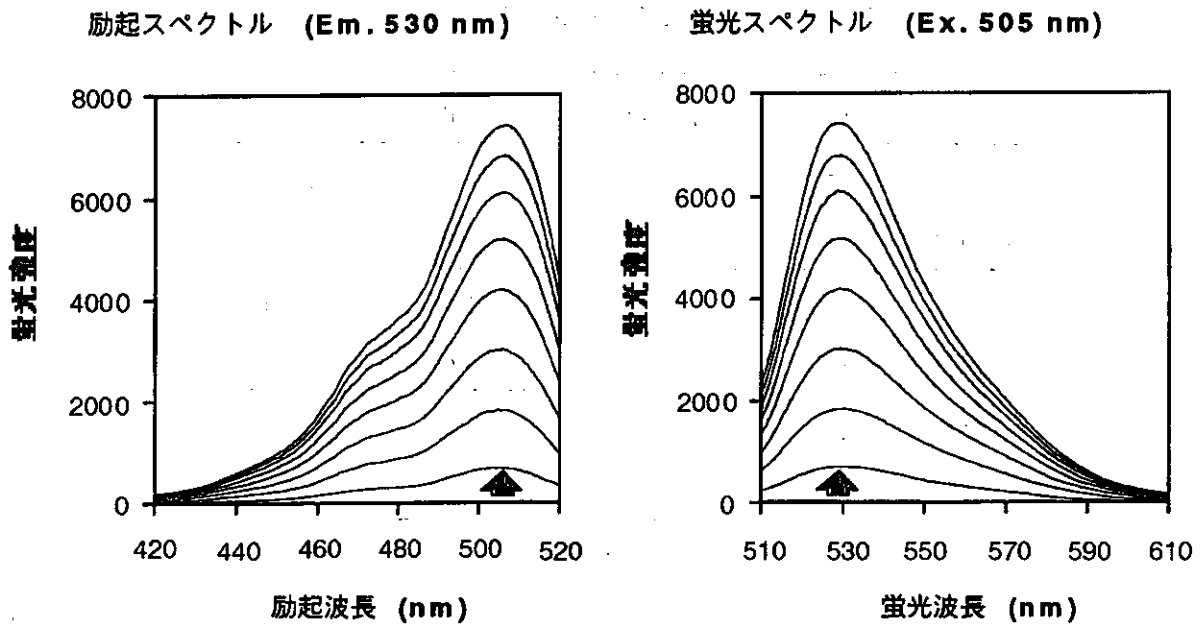
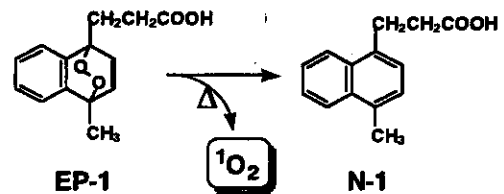


Fig. 2 DPAX-2の励起及び蛍光スペクトル変化 (---  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ 系)

測定は pH10.5 で行った。その結果を Fig. 2 に示す。 $^1\text{O}_2$ の生成に伴い、励起スペクトル、蛍光スペクトルともに顕著に増大し、DPAX-2が水溶液中で $^1\text{O}_2$ を検出することが可能であることが明らかとなった。そこで次に、DPAX-2が中性条件下でも $^1\text{O}_2$ を検出して蛍光強度が増大するかを検討した。

3-(4-Methyl-1-naphtyl)propionic Acid (N-1)のEndoperoxide体(EP-1)は、Scheme 2. に示すように熱依存的に分解して $^1\text{O}_2$ を生成する化合物である(37°Cでの半減期は約25分)。この化合物から生じる $^1\text{O}_2$ をDPAX-2で検出できるか試みた。Fig. 3の矢印に示すところで、様々な濃度のEP-1のDMSO溶液を添加した。Fig. 3中に示してある濃度は、EP-1の最終濃度である。EP-1添加直後から、EP-1濃度依存的な蛍光の増大が見られた。この結果はDPAX-2が、中性条件下でも $^1\text{O}_2$ を検出できていることを示している。

次にDPAX-2の定量性を調べる目的で、蛍光増加の初速度と、EP-1濃度との関係を検討した。Fig. 4に示すように、EP-1濃度を横軸に、各EP-1濃度での蛍光増加の初速度を縦軸にプ



Scheme 2 EP-1の反応

ロットした。その結果、両者の間に非常によい直線関係が見られ、DPAX-2が $^1\text{O}_2$ を定量的に検出していることが明らかとなった。さらに、低濃度のEP-1の添加実験から、DPAX-2の水溶液中での $^1\text{O}_2$ の検出限界は、約1 mM/minと算出できた。この値は、水中での $^1\text{O}_2$ の寿命を考えると、かなりよい数値であると思われる。

最後に、同じく活性酸素種である $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^-$ 、NOに関してDPAX-2が蛍光変化するか検討した。これらは、 $^1\text{O}_2$ が生成すると予想される系で共存すると考えられる。その結果、その両者では蛍光の増大は見られず、DPAX-2は $^1\text{O}_2$ に特異性を有していることが確認された。また、HPLCを用いてDPAX-2と $^1\text{O}_2$ の反応を追跡したところ、DPAX-2-EPがこの反応の主生成物であることが明らかとなった。

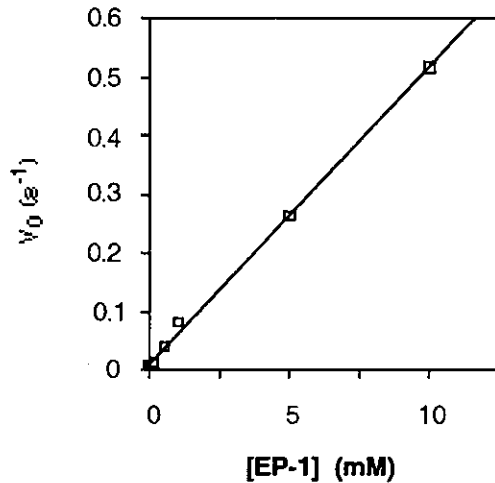


Fig. 4 EP-1 濃度と DPAX-2 の蛍光増加初速度との関係

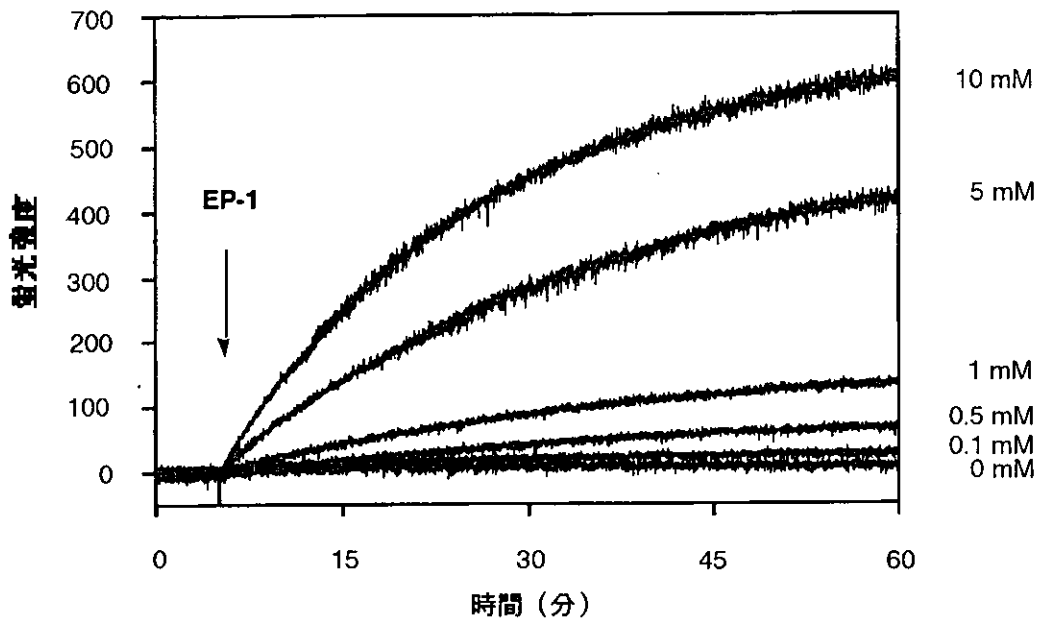


Fig. 3 DPAX-2 の蛍光 (Ex.505 nm, Em.530 nm) の経時変化

DPAX 類は、蛍光を検出原理とした長波長励起が可能な化合物である。これは、イメージングに適用しうる基本条件を満たしているといえる。

#### D. 結論

今回合成に成功した DPAX 類は、<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 特異的かつ定量的なプローブとして用いることが明らかとなった。この化合物は蛍光法を検出原理とした初めての <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 検出試薬であり、現存する <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 検出系の中で、特異性、感度ともに最も優れている方法である。

#### E. 引用文献

- 1) N. Umezawa, K. Arakane, A. Ryu, S. Mashiko, M. Hirobe and T. Nagano, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, **342**, 275-281

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. "Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore" Hirotatsu Kojima, Kuniko Sakurai, Kazuya Kikuchi, Shigenori Kawahara, Yataka Kirino, Hiroshi Nagashi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, *Biol. Pharm. Bull.*,

- 46, 373-375 (1998).
2. "Hepatoprotective Effect of Fe-TPEN on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats" Jeon-Ok Moon, Su-Kyung Park and Tetsuo Nagano, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 284-288 (1998).
  3. "Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins" Hirotatsu Kojima, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Shigenori Kawahara, Yataka Kirino, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, *Analytical Chemistry*, **70**, 2446-2453 (1998).
  4. "Detection of Nitric Oxide from Bovine Aortic Endothelial Cells with New Fluorescence Indicators: Diaminofluoresceins" Naoki Nakatsubo, Hirotatsu Kojima, Kazuya Kikuchi, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata, Daisuke Maeda, Yasuyuki Imai, Tatsuro Irimura and Tetsuo Nagano, *FEBS Lett.* **427**, 263-266 (1998).
  5. "Improvement of Nitric Oxide Detection Method Using 2,3-Diaminonaphthalene and Its Application to Evaluation of Novel Nitric Oxide Synthase Inhibitors" Naoki Nakatsubo, Hirotatsu Kojima, Kuniko Sakurai, Kazuya Kikuchi, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata, Takaaki Akaike, Hiroshi Maeda, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Biol. Pharm. Bull.*, **21** (12), 1247-1250 (1998).
  6. "Direct Evidence of Nitric Oxide Production in Rat Hippocampus Using a New Fluorescent Indicator: DAF-2DA" Hirotatsu Kojima, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Junji Tanaka, Yoshihisa Kudo and Tetsuo Nagano, *Neuroreport*, **9** (15), 3345-3348 (1998).
  7. "Selective Deoxygenation of Heteroaromatic N-oxides with Olefins Catalyzed by Ruthenium Porphyrin" Hiroshi Nakagawa, Tsunehiko Higuchi, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, *Chem. Pharm. Bull.*, **46** (10), 1656-1657 (1998).
  8. "Real Time Measurement of Nitric Oxide Release from Cultured Endothelial Cells" Hajimu Kurumatani, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Masaaki Hirobe, Jun Yamazaki and Taku Nagao, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1286-1289 (1998).
  9. "一酸化窒素のバイオイメージングを目的とした生体プローブの分子設計" 長野哲雄, 小島宏建, *日本化学会誌*, 11月号, 721-729 (1998).
  10. "一酸化窒素 (NO) のバイオイメージング" 小島宏建, 菊地和也, 長野哲雄, *バイオイメージング*, **6**, 159-160 (1998).
  11. "一酸化窒素 (NO) の測定法" 小島宏建, 長野哲雄, *呼吸*, **17** (12), 1308-1313 (1998).
  12. "神経系における機能解明を志向した NO のバイオイメージング" 小島宏建, 長野哲雄, *神経研究の進歩*, 印刷中.
  13. "一酸化窒素の分析法" 小島宏建, 長野哲雄, *ぶんせき*, 印刷中
  14. "生理活性解明へ向けた NO 測定法" 小島



宏建, 長野哲雄, *脳の科学*, 印刷中.

15. "Effects of hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia on endothelin type B receptor-mediated nitric oxide release from rat kidney" Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M, *Circulation*, in press.
16. "Role of nitric oxide-cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilation in rat" Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M, *Hypertension*, in press.
18. "Effects of vasodilatory  $\beta$ -adrenoceptor antagonists on endothelium-derived nitric oxide release in rat kidney" Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Omata M, *Hypertension*, in press.
19. "NO測定法の新展開 —NOをみる—" 小島宏建, 長野哲雄, *実験医学*, 印刷中