

平成11年度 厚生科学研究費補助金
生活安全 総合研究事業
研究報告書

化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究
(H11-生活-030)

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 宮田直樹

分担研究者 東京大学大学院薬学系研究科 長野哲雄
共立薬科大学 阿部芳廣

厚生科学研究費補助金（生活安全 総合研究事業）

総括研究報告書

化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究

主任研究者 宮田直樹 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨

生活環境中の化学物質は、生体内において種々の活性酸素種を発生することが知られている。活性酸素種は、老化、発ガン、自己免疫疾患、炎症など多くの疾病の原因となると考えられており、生活環境中の化学物質の毒性発現にこのような活性酸素種が関与している可能性が指摘されている。更に近年、新たな活性酸素種として、NO、ONOO⁻などの含窒素活性酸素種も見いだされ、これらの生体作用も注目されている。このような状況下、生活環境中に存在する化学物質の健康影響を活性酸素毒性の観点から解析する研究が活発に行われている。しかし、活性酸素種が極めて不安定であり、その発生量を正確に測定することが困難であるため、活性酸素毒性の定量的評価に関する報告例はほとんどない。本研究では、活性酸素の関与する毒性の定量的評価法を確立することを目的として、化学物質が、どのような条件で、どのような活性酸素種を、どれだけ発生するか、を解析するための手法を開発することに焦点を絞り研究を開始した。

平成11年度には、個々の検討課題について下記のような研究成果を得た。

1) 種々の化学物質から発生する活性酸素種の解析に関しては、活性酸素種を発生する化学物質としてC₆₀フラーレンを用いて研究を行い、その結果、電子欠損型光増感剤であるC₆₀は、生理的条件下光照射によりスーパーオキシド(O₂^{·-})およびヒドロキシルラジカル(·OH)を発生することが明らかになった。C₆₀による毒性発現にはこのような活性酸素種が関与していると考えられる。

2) 活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、一酸化窒素(NO)の検出に焦点を絞って研究を行った。一酸化窒素(NO)は生理活性種として注目されており、1998年度のノーベル医学生理学賞の受賞対象研究になった反応種である。今回、NOをバイオイメージングとして捉える生細胞蛍光プローブDAF-FM DAの開発に成功した。これはNOの特異な反応性に着目し、独自にプローブを分子設計しこれを合成し、種々検討した結果、創製されたものである。このプローブを用いて、内皮細胞あるいは脳虚血モデルから産生されるNOを画像として捉えることに成功した。本法は、生体内で発生するNOの検出に有用な手法になると考える。

3) 活性酸素種の新しい定量法の開発に関しては、活性酸素種のひとつであるヒドロキシルラジカルのHPLC法による新しい定量法を確立することを目的として研究を行った。従来のスピントラップ-EPR法の欠点を補う方法としてHPLC分離を利用した高感度な蛍光検出法について検討を行った。蛍光性を有するスピントラップ剤(TMP Amineのフルオレスカミン誘導体, TMPAF)を利用し、ヒドロキシルラジカルとジメチルスルホキ

シドとの反応により生じるメチル2次ラジカルを捕捉する方法を追試し、その結果に基づいて、①PBNによる直接トラップ法、②水溶性蛍光物質（エスクリン）を利用する方法を検討した。PBNとの反応では、PBNの減少を認めたが、ベースラインが安定せず反応成績体の確認ができなかった。今後これを解決し、さらに検出感度を向上する必要がある。エスクリンを用いた実験は、まだ反応条件の検討の段階であるが、ヒドロキシルラジカルと速やかに反応し、かなり選択性よく、反応成績体を与えることを見出した。今後これを単離し、標準試料としてヒドロキシルラジカルを定量する方法を検討する。

主任研究者

宮田直樹

国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部長

分担研究者

長野哲雄

東京大学大学院薬学系研究科
教授

分担研究者

阿部芳廣

共立薬科大学薬品分析学教室
助教授

A. 研究目的

生活環境中に存在する化学物質の健康影響について、活性酸素毒性に焦点を絞り研究を行っている。化学物質が、どのような条件でどのような活性酸素種をどれだけ発生するかを、最新の分析手法を用いて定量的に評価する手法を確立し、毒性評価のための科学的指標を得ることを目的とする。

活性酸素の健康影響は、発ガン、老化、アレルギー、痴呆など、多方面で問題となっている。また、近年、新たな活性酸素種として、NO、ONOO⁻など含窒素活性酸素種の生体作用も明らかになってきた。このような状況下、生活環境中に存在する化学物質の健康影響を活性酸素毒性の

観点から解析する研究は、すでに多くなされている。しかし、従来の研究で欠落しているのは、活性酸素毒性の定量的評価であり、この原因の一つは、活性酸素発生量の正確な測定が困難であることに起因している。たとえば、最も活性の高い活性酸素の一つであるヒドロキシルラジカルについて、化学物質からどれだけの量のヒドロキシルラジカルが発生するかについてデータが不十分であり、健康影響を正確に評価することが難しい。生活環境中に存在する化学物質について、活性酸素の生成を定量的に評価する手法を確立することは、化学物質の健康影響を科学的根拠に基づいて評価するために、厚生科学研究分野で現在最も必要とされている研究課題である。

本研究を遂行することにより、生活環境中に存在する化学物質の健康影響を活性酸素毒性の観点から評価するための科学的指標が得られる。本研究の成果は、広範に応用することが可能であり、定量的な毒性評価に基づいた健康影響評価は、国民の健康維持に貢献することが期待される。

B. 研究方法、研究結果

化学物質から発生する活性酸素種を定量的に評価する新手法を開発することを

目的として、活性酸素種の新しい定量分析法の確立、化学物質から発生する活性酸素種の解析と定量、さらに、活性酸素毒性の定量的評価のための研究を行う。

本年度は、

1) 新規蛍光標識化剤を用いたヒドロキシルラジカルの定量分析法の開発 (分担研究者: 阿部)

ヒドロキシルラジカルの分析法の一つであるスピントラップ-EPR法は定量性に問題があり、EPR法に替わりうる方法としてヒドロキシルラジカルを蛍光性誘導体に導いてHPLC法で検出する方法の検討を行った。ヒドロキシルラジカルを安定な蛍光性誘導体に導く方法として、ヒドロキシルラジカルと直接反応して蛍光性誘導体に導く方法と、ヒドロキシルラジカルの反応性を利用してヒドロキシルラジカルを安定な二次ラジカルに変換し、このラジカルと反応することにより安定な蛍光性誘導体に導く方法が考えられる。蛍光性を有するスピントラップ剤 (TMP Amine のフルオレスカミン誘導体, TMPAF) を利用し、ヒドロキシルラジカルとジメチルスルホキシドとの反応により生じるメチル2次ラジカルを捕捉する方法を追試したが、満足のいく結果は得られなかった。そこで、①PBNによる直接トラップ法、②水溶性蛍光物質 (エスクリン) を利用する方法を検討した。PBNとの反応では、PBNの減少を認めたが、反応生成体の確認、ベースラインが安定化ができなかった。今後これを解決し、さらに検出感度を向上する必要がある。エスクリンを用いた実験は、まだ反応条件の検討の段階であるが、ヒドロキシルラジカルと速やかに反応し、かなり選択性よく、反応生成体を与えることを見出した。今後これを単離し、標準試料

としてヒドロキシルラジカルを定量する方法を検討する予定である。

2) 安定スピントラップ剤を利用した活性酸素種スーパーオキシドの定量 (分担研究者: 宮田)

光照射下 C_{60} フラーレンから生成するスーパーオキシドを、スピントラップ剤を用いたEPR法により検出した。まず最初は、スピントラップ剤として5,5-ジメチル-1-ピロリン N-オキシド (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide, DMPO) を用いた。電子供与性の還元剤としては生体内還元剤の一つであるNADHを用い、照射光としては300 Wの可視光ランプを用いた。その結果、DMPOと $O_2^{\cdot-}$ のアダクト (DMPO-OOH) およびDMPOと $\cdot OH$ のアダクト (DMPO-OH) のピークが見られた。この結果より、還元剤存在下 C_{60} / PVP水溶液に可視光を照射すると、還元型の活性酸素種である $O_2^{\cdot-}$ と $\cdot OH$ の両方が生成することが明らかになった。更に、 $O_2^{\cdot-}$ のみを選択的に検出するため、DMSOを添加した系で同様の測定を行った。その結果、DMSO添加により消去された $\cdot OH$ のかわりにDMPO- CH_3 のピークが検出されるとともに、DMPOと $O_2^{\cdot-}$ のアダクト (DMPO-OOH) のピークが検出された。一方、最近開発されたスピントラップ剤である5-ジエトキシホスホリル-5-メチル-1-ピロリン N-オキシド (5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide, DEPMPO) を用いた時には、生成する $O_2^{\cdot-}$ とのアダクトの寿命が比較的長いいため、光照射時間依存的にDEPMPO-OOHのピークのみが出現し、 $O_2^{\cdot-}$ の生成を確認することができた。以上の結果は、EPR法による $O_2^{\cdot-}$ の生成確認ならびに定量にはDEPMPOをスピント

ラップ剤として用いることが簡便であることを示す。

3) 一重項酸素の特異的定量分析法の開発 (分担研究者：長野)

一重項酸素を特異的に検出し、定量することを可能にする蛍光性プローブの設計を行っている。今後、その合成を行い有用性を検討する予定である。

4) 新しい定量分析法を利用した含窒素活性酸素種の定量 (分担研究者：長野)

NO をバイオイメーキングとして捉える生細胞蛍光プローブ DAF-FM DA の開発に成功した。これは NO の特異な反応性に着目し、独自にプローブを分子設計しこれを合成し、種々検討した結果、創製されたものである。このプローブを用いて、内皮細胞あるいは脳虚血モデルから産生される NO を画像として捉えることに成功し、本法が、生体内で生成する NO の解析に有用であることを明らかにした。

5) 化学物質から発生する活性酸素種の解析と定量 (分担研究者：宮田)

活性酸素種を発生する化学物質として C₆₀ フラーレンを選び研究を行った。EPR によるスピントラッピング法により、電子欠損型光増感剤である C₆₀ は、生理的条件下光照射により、従来考えられていた一重項酸素ではなく、スーパーオキシド (O₂^{·-}) およびヒドロキシルラジカル (·OH) を発生することが明らかになった。C₆₀ による毒性発現にはこのような活性酸素種が関与していると考えられる。

D. 結論と考察

本研究では、化学物質から発生する活

性酸素種を定量的に評価する新手法を開発することを目的として、活性酸素種の新しい定量分析法の確立、化学物質から発生する活性酸素種の解析と定量、さらに、活性酸素毒性の定量的評価のための研究を行った。

新しいヒドロキシルラジカルの定量分析法の開発では、スピントラップ-EPR 法に替わりうる方法として、ヒドロキシルラジカルを蛍光性誘導体に導いて HPLC 法で検出する方法を検討した。その結果、PBN による直接トラップ法では、PBN との反応で PBN の減少を認めたが、ベースラインが安定せず反応成績体の確認ができなかった。今後これを解決し、さらに検出感度を向上する必要がある。水溶性蛍光物質 (エスクリン) を利用する方法では、ヒドロキシルラジカと速やかに反応し、かなり選択性よく、反応成績体を与えることを見出した。今後これを単離し、標準試料としてヒドロキシルラジカを定量する方法を検討する。

安定スピンとラップ剤を利用した活性酸素種スーパーオキシドの定量では、DEPMPO をスピントラップ剤として用いることにより、C₆₀ フラーレンから発生するスーパーオキシドを ESR 法により感度よく安定に検出できることを明らかにした。

一重項酸素の特異的定量分析法の開発では、一重項酸素を特異的に検出し、定量することを可能にする蛍光性プローブの設計を行った。今後は、その合成を行い有用性を検討する予定である。

新しい定量分析法を利用した含窒素活性酸素種の定量では、NO をバイオイメーキングとして捉える生細胞蛍光プローブ DAF-FM DA の開発に成功した。さらに、このプローブを用いて、内皮細胞あるい

は脳虚血モデルから産生される NO を画像として捉えることに成功し、生体内で生成する NO の解析に有用であることを明らかにした。

化学物質から発生する活性酸素種の解析と定量では、活性酸素種を発生する化学物質として C₆₀ フラーレンを選び研究を行った。EPR によるスピントラッピング法により、電子欠損型光増感剤である C₆₀ は、生理的条件下光照射により、従来考えられていた一重項酸素ではなく、スーパーオキシド (O₂^{·-}) およびヒドロキシルラジカル (·OH) を発生することが明らかにした。

本プロジェクトでは、生活環境中に存在する化学物質の健康影響を活性酸素毒性の観点から評価するための新しい方法論の開発を目指して研究を展開している。研究初年度には、科学的指標を得るための新しい手法の開発ならびに、化学物質からの発生する活性酸素種の解析を行い、期待通りの成果を得たと考える。来年度も、引き続き定量的解析を目的とした方法論の確立を主眼として研究を展開したい。

本研究の成果は、将来的に広範に応用することが可能であり、定量的な毒性評価に基づいた健康影響評価は、国民の健康維持に貢献すると期待できる。

E. 研究発表

それぞれの分担研究報告書に記載した。

厚生科学研究費補助金（生活安全 総合研究事業）
分担研究報告書

研究課題：化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究

分担研究課題：活性酸素種の解析と定量、及び、活性酸素毒性の総合評価

分担研究者：宮田直樹 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長

研究要旨

生活環境中の化学物質は、生体内において種々の活性酸素種を発生することが知られている。活性酸素種は、老化、発ガン、自己免疫疾患、炎症など多くの疾病の原因となると考えられており、生活環境中の化学物質の毒性発現にこのような活性酸素種が関与している可能性が指摘されている。更に近年、新たな活性酸素種として、NO、ONOO⁻などの含窒素活性酸素種も見いだされ、これらの生体作用も注目されている。このような状況下、生活環境中に存在する化学物質の健康影響を活性酸素毒性の観点から解析する研究が活発に行われている。しかし、活性酸素種が極めて不安定であり、その発生量を正確に測定することが困難であるため、活性酸素毒性の定量的評価に関する報告例はほとんどない。本研究では、活性酸素の関与する毒性の定量的評価法を確立することを目的として、化学物質が、どのような条件で、どのような活性酸素種を、どれだけ発生するか、を解析するための手法を開発することに焦点を絞り研究を開始した。特に、分担研究者・宮田は、種々の化学物質から発生する活性酸素種を解析することを担当している。本年度は、活性酸素種を発生する化学物質としてC₆₀ フラーレンを用いて研究を行った。その結果、電子欠損型光増感剤であるC₆₀は、生理的条件下光照射によりスーパーオキシド(O₂^{·-})およびヒドロキシルラジカル(·OH)を発生することが明らかになった。C₆₀による毒性発現にはこのような活性酸素種が関与していると考えられる。

A. 研究目的

C₆₀は、電子欠損型光増感剤であり、光照射により、分子レベルでは、DNA切断や脂質過酸化を、また、細胞レベルでは、溶血や殺菌、さらには変異原性発現作用を現わすことを、すでに我々は報告している。このような光増感酸化反応にどのような活性酸素種が関与しているのかを明らかにする目的で実験を行った。

C₆₀は、有機溶媒中光照射により一重項酸素(¹O₂)を発生する。また、ベンゾニト

リルなどの極性溶媒中還元剤存在下では、Type I光増感電子移動反応が起こり、C₆₀ラジカルアニオン(C₆₀^{·-})が生成することがすでに明らかになっている。このC₆₀^{·-}が、酸素分子に電子を渡すと、活性酸素種であるスーパーオキシド(O₂^{·-})が生成する。さらに、このO₂^{·-}からフェントン反応を経て、最も活性の高い活性酸素種の一つであるヒドロキシルラジカル(·OH)が生成する可能性もある。本研究では、生理的条件下でC₆₀からどのよう

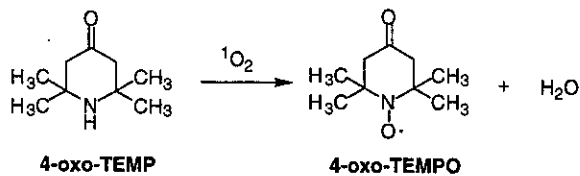
な活性酸素種が生成しているのかを明らかにする目的で研究を行った。

B. 研究方法, 研究結果

1. EPR 法による一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) の検出

生理的条件下, C_{60} フラーレンから一重項酸素が生成しているかどうかを明らかにする目的で, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (4-oxo-TEMP) を捕捉剤として用い, EPR 法により C_{60} / PVP 水溶液中での $^1\text{O}_2$ の生成の検出を試みた。

4-oxo-TEMP による $^1\text{O}_2$ の捕捉を下に示す。



Scheme. Trapping reaction of $^1\text{O}_2$ by 4-oxo-TEMP.

本法は, $^1\text{O}_2$ と 4-oxo-TEMP とを反応させることで EPR 測定可能なラジカルである 4-oxo-TEMPO を生成させることにより系内で生じた $^1\text{O}_2$ を検出する方法であり, 検出限界は 100 nM である。対照として, 代表的な光増感剤であるローズベンガル (rose bengal), メチレンブルー (methylene blue), リボフラビン (riboflavin) の三種の色素を用いて実験を行った。その結果, 光増感剤としてローズベンガルやメチレンブルーを用いたときそれらの水溶液中において, 4-oxo-TEMPO の生成が検出され, 本実験系が水溶液中での $^1\text{O}_2$ 検出に有用であることが分かった。それに対し, C_{60} / PVP 水溶液を用いた系では, 対照実験として行った PVP 水溶液のみを用いた実験と同様に $^1\text{O}_2$ 生成が検出されなかつ

た。また, Type I 反応を行う光増感剤として報告されているリボフラビンを用いた系でも同様に, $^1\text{O}_2$ は生成が検出されなかった。この結果は, C_{60} は, 水溶液中で, $^1\text{O}_2$ を生成しないことを示す。

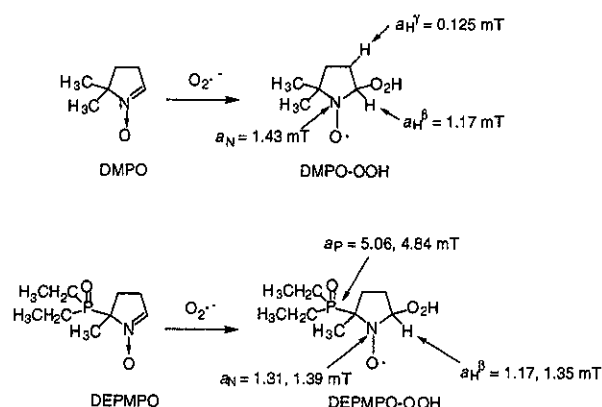
以上, EPR 法を用いた実験により, 光励起 C_{60} からは, ベンゾニトリルのような有機溶媒中では $^1\text{O}_2$ が生成するのに対し, 水溶液中では, $^1\text{O}_2$ はほとんど生成していないことが明らかになった。

2. EPR 法によるスーパーオキシドラジカルアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の検出

C_{60} からスーパーオキシドラジカルアニオンが生成しているかどうかを明らかにするために, スピントラップ剤を用いた EPR 法により $\text{O}_2^{\cdot-}$ の検出を試みた。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ はそれ自身がラジカルであるので EPR で直接検出することも可能であるが, この方法ではサンプルを凍結し分子運動を停止させた状態で測定する必要がある。それに対してスピントラップ剤を用いる方法では, スピントラップ剤で $\text{O}_2^{\cdot-}$ を捕捉することで簡便に $\text{O}_2^{\cdot-}$ の検出が行える。スピントラップ剤としては 5,5-ジメチル-1-ピロリン N-オキシド (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide, DMPO) および 5-ジエトキシホスホリル-5-メチル-1-ピロリン N-オキシド (5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide, DEPMPO) を用いた。DMPO および DEPMPO による $\text{O}_2^{\cdot-}$ のスピントラップ反応を次頁に示す。

DMPO は, $\text{O}_2^{\cdot-}$ のスピントラップ剤として最も一般的に用いられている試薬である。ただし, $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成とともにフェントン反応を経て生じる $\cdot\text{OH}$ とも高い反応性があるため, 反応系における $\cdot\text{OH}$ を消去するためにジメチルスルフォキシド (DMSO) を添加する必要がある。とくに,

$O_2^{\cdot-}$ との反応に比較し、 $\cdot OH$ とDMPOとの反応は反応性が高いばかりでなく、生じるアダクトの安定性も高いため、DMPOでスピントラップして $O_2^{\cdot-}$ の検出を行うには注意が必要である。その点で、最近開発されたDEPMPOは $\cdot OH$ との反応に比べ $O_2^{\cdot-}$ との反応に反応性の選択性がみられ、また、生じるアダクトの安定性も高いため有用である。



Scheme. Trapping reactions of superoxide radical anion by spin-trapping agents (DMPO, DEPMPO) available in EPR method.

電子供与性の還元剤としては生体内還元剤の一つであるNADHを用い、照射光としては300Wの可視光ランプを用いた。まず、還元剤存在下 C_{60} /PVP水溶液に光照射しておいて生じた酸素ラジカルをDMPOにてトラップする実験を行った。その結果、DMPOと $O_2^{\cdot-}$ のアダクト(DMPO-OOH)およびDMPOと $\cdot OH$ のアダクト(DMPO-OH)のピークが見られた。この結果より、還元剤存在下 C_{60} /PVP水溶液に可視光を照射すると、還元型の酸素ラジカル種である $O_2^{\cdot-}$ と $\cdot OH$ の両方が生じることが示された。更に、 $O_2^{\cdot-}$ のみを選択的に検出するため、DMSOを添加した系で同様の測定を行った。その結果、

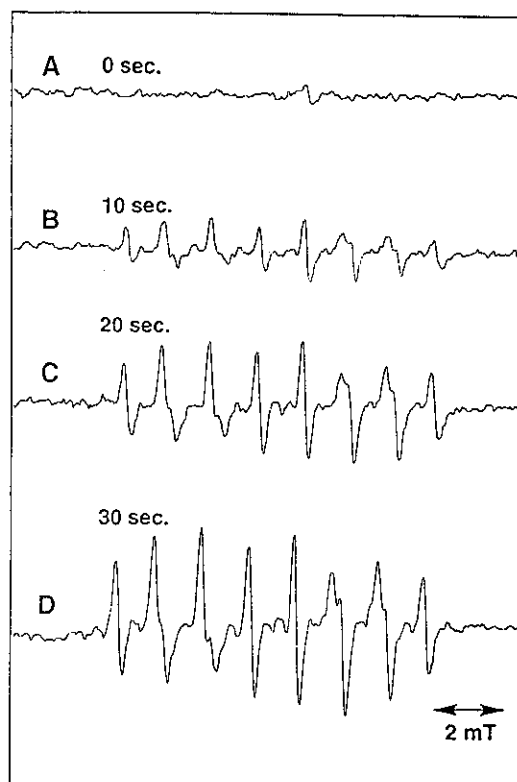


Figure. X-band EPR spectra of DEPMPO adduct with $O_2^{\cdot-}$ generated C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp. DEPMPO 50 mM, DETAPAC 1 mM, DMSO 3.1 M, in 50 mM phosphate buffer, C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM. Irradiation time A 0 sec., B 10 sec., C 20 sec., D 30 sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

光照射下、還元剤存在下でのみ C_{60} /PVP水溶液中においてDMPO-OOHのピークが見られた。また、DMSO添加により消去された $\cdot OH$ とDMPOのアダクトであるDMPO-OHのかわりにDMPO- CH_3 のピークが検出された。これは、DMSOのSに $\cdot OH$ が付加した後メチル基が一つラジカル的に脱離し生じたメチルラジカルとDMPOが反応したために生じるピークである。ハイパーファインスプリッティングは、DMPO-OOHは $a_N = 1.37$ mT, $a_{H^\beta} = 1.09$ mT, $a_{H^\alpha} = 0.10$ mT, DMPO- CH_3 は a_N

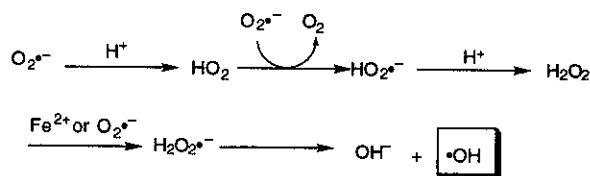
$= 1.57 \text{ mT}$, $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.23 \text{ mT}$ であり、文献値とよく一致した。光非照射下、還元剤非存在下、あるいは、 C_{60} 非存在下では、ピークは見られなかった。また、DMPO-OOH のピークの高さは、 C_{60} 濃度や添加した NADH 量に依存して増減した。また、DMPO-OOH のピークは SOD の添加 (20 units / mL) により完全に消失した。

次に、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ とのアダクトの寿命が比較的長い DEPMPO をスピントラップ剤として用いて同様の実験を行ったところ、光照射時間依存的に DEPMPO-OOH のピークが出現し $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成が認められた。

以上、EPR 法を用いて還元剤 NADH 存在下、光励起 C_{60} から $\text{O}_2^{\cdot-}$ が生成することを確認した。

3. EPR 法によるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の検出

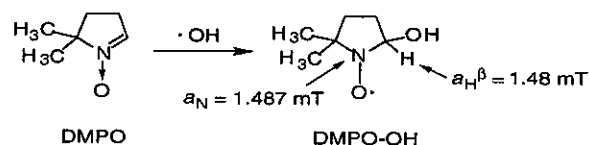
上記のように、光励起フラレン C_{60} から還元剤の存在下において $\text{O}_2^{\cdot-}$ が生成することが明らかになった。そこで次に、この $\text{O}_2^{\cdot-}$ を経由して生成する可能性のあるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成について、EPR 法を用いて検討した。フェントン反応を経由する $\text{O}_2^{\cdot-}$ から $\cdot\text{OH}$ の生成を次に示す。



Scheme. Generation of hydroxyl radical through the Fenton reaction of superoxide radical anion.

下に DMPO をスピントラップ剤として用いた、 $\cdot\text{OH}$ の捕捉の式を示す。この、DMPO は前述の $\text{O}_2^{\cdot-}$ の捕捉にも用いられる試薬であるが、 $\cdot\text{OH}$ との反応性の方が

高く、 $\cdot\text{OH}$ の検出には高感度で有用な手法である。



Scheme. Trapping reactions of hydroxyl radical by spin-trapping agents (DMPO) available in EPR method.

本法を用いて $\cdot\text{OH}$ の生成を調べた。結果を次に示す。NADH の存在下 C_{60} に光を照射すると、 $\cdot\text{OH}$ とスピントラップ剤である DMPO のアダクトのピークが認められ、アダクトのピークは経時的に増加した。この結果は、 $\cdot\text{OH}$ がこの実験系において生成していることを確認した。また、 C_{60} の非存在下や、NADH の非存在下においては $\cdot\text{OH}$ の生成量が低く抑えられた。

これらの結果より、本実験系において、光照射下、還元剤存在下で光励起フラレンは、 $\cdot\text{OH}$ を生成することが明らかになった。

C. 結論、考察

2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (4-oxo-TEMPO) は一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) と特異的に反応し、その酸素付加体である 4-oxo-TEMPO を生成する。この 4-oxo-TEMPO は比較的安定なラジカル種で電子スピン共鳴 (EPR) 法で検出可能であるため、 $^1\text{O}_2$ の検出に広く用いられている。そこで、好気性条件下、PVP により水溶化した C_{60} 溶液に 4-oxo-TEMPO を加え、光照射により、 $^1\text{O}_2$ が生成するかどうかについて EPR 法により検討した。その結果、4-oxo-TEMPO に由来する EPR シグナルは

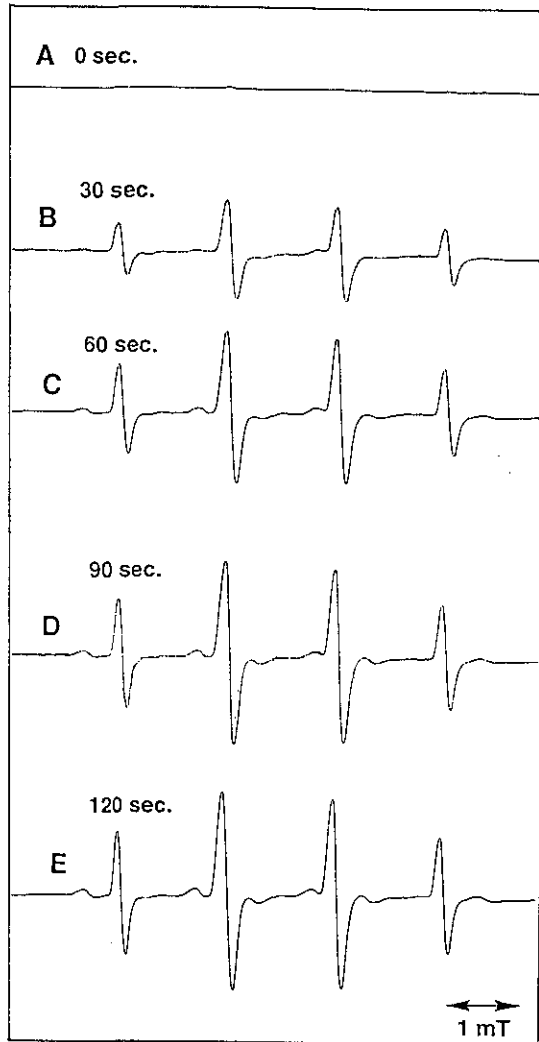


Figure. X-band EPR spectra of DMPO adduct with $\cdot\text{OH}$ generated in C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp. DMPO 0.72 M, Fe(II)-DETAPAC 0.2 mM, in 50 mM phosphate buffer, C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM. Irradiation time: Dark 0 sec., Light 10sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

観測されず、水溶液中では、 $^1\text{O}_2$ が生成していないことがわかった。そこで次に、スーパーオキシド ($\text{O}_2\cdot^-$) 捕捉剤を用い、Type I の光増感電子移動反応により $\text{O}_2\cdot^-$ が生成しているかどうかの検討を行った。これまで、 $\text{O}_2\cdot^-$ 捕捉剤としては

5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) が最も一般的に用いられてきたが、DMPO は、 $\text{O}_2\cdot^-$ からフェントン反応を経て生成する $\cdot\text{OH}$ とも高い反応性を示すため、 $\text{O}_2\cdot^-$ に対する定量性は期待できない。実際、酸素存在下、還元剤である NADH および DMPO を含む C_{60} /PVP 水溶液に光照射すると、DMPO の $\text{O}_2\cdot^-$ 付加体である DMPO-OOH の EPR シグナルに加え、 $\cdot\text{OH}$ 付加体、DMPO-OH の EPR シグナルが観測された。そこで本研究では、新規な $\text{O}_2\cdot^-$ 捕捉剤である 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (DEPMPO) を用い、 $\text{O}_2\cdot^-$ の検出を試みた。酸素存在下、NADH および DEPMPO を含む C_{60} /PVP 水溶液に光を照射し、その溶液の EPR スペクトルを測定すると、DEPMPO の $\cdot\text{OH}$ 付加体である DEPMPO-OH の ESR シグナルはほとんど観測されず、 $\text{O}_2\cdot^-$ 付加体である DEPMPO-OOH のシグナルのみが観測された。以上の結果から、DEPMPO は $\text{O}_2\cdot^-$ と選択的に反応し、 $\text{O}_2\cdot^-$ の検出と定量に非常に有用であることがわかった。さらに、還元剤存在下、 C_{60} への光照射による DNA 切断は、Type I 光増感電子移動反応を経由して進行していることが示唆された。

以上、本研究では、酸素存在下、光照射により種々の活性酸素種を発生する可能性のある C_{60} を用い、 $^1\text{O}_2$ や $\text{O}_2\cdot^-$ などの活性酸素種の検出法を検討した。特に、今回用いた DEPMPO は $\text{O}_2\cdot^-$ と選択的に反応し、 $\text{O}_2\cdot^-$ の検出および定量に非常に有用であることがわかった。今後は、新規な活性酸素種である NO や ONOO $^-$ を発生する化合物を合成し、その検出法を確立するとともに、それぞれの活性酸素種の正確な定量法の確立を目指す。さらに、それぞれの活性酸素種と高選択的に反応

するような新規な捕捉剤の開発を行う。得られた結果を生活環境中に存在する化学物質に応用し、これらの物質から発生する活性酸素種の解析および定量法の確立を目指す。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation, K. Kondo, N. Kurihara, N. Miyata, T. Suzuki, M. Toyoda, *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**(1), 79-86(1999).
- 2) Synthesis and identification of benzo[c]chrysene metabolites, D. Desai, J. Krzeminski, J-M. Lin, A. Chada, N. Miyata, H. Yagi, D.M. Jerina, and S. Amin, *Polycyclic Aromatic Compounds*, xxxx (1999).
- 3) Synergetic Effect of Naphthoquinones an the Mutagenicity of Nitroarenes, K. Omori, M. Kishi, T. Nakaoka, and N. Miyata, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**(1) 90-92 (1999).
- 4) Visible light irradiation of [60]fullerene causes killing and initiation of transformation in BALB/3T3 cells, A. Sakai, Y. Yamakoshi, and N. Miyata, *Fullerene Science and Technology*, **7**(5), 743-756 (1999).
- 5) Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in primary rat hepatocyte cultures by liquid chromatography with laser induced fluorescence detection, Y.-M. Liu, H. Jinno, M. Kurihara, N. Miyata and T. Toyo'oka, *Biomed. Chromatogr.*, **13**, 75-80 (1999).
- 6) Stereoselective Synthesis of an Erythro N-protected alpha-Amino Epoxide Derivative, Kurihara, M., Ishii, K., Kasahara, Y. and Miyata, N., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 3183-3184 (1999).
- 7) Scavenging Mechanism of (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epicatechin Gallate on Peroxyl Radicals and Formation of Superoxide during the Inhibitory Action, Kazunari Kondo, Masaaki Kurihara, Naoki Miyata, Takashi Suzuki, and Masatake Toyoda, *Free Radical Biology and Medicine*, **27**(7/8), 855-863 (1999).
- 8) Conversion of Procyanidin B-Type (Catechin Dimer) to A-Type: Evidence for Abstraction of C-2 Hydrogen in Catechin During Radical Oxidation, Kazunari Kondo, Masaaki Kurihara, Kiyoshi Fukuhara, Takashi

Tanaka, Takashi Suzuki, Naoki Miyata and Masatake Toyoda, *Tetrahedron Letteres*, **41**(4), 485-488 (2000).

9) Trans-4-hydroxy-2-nonenal, an aldehydelipid peroxidation product, lacks genotoxicity in lacI transgenic mice, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, ken-ichiro Kasahara, Shinichiro Ikezaki, Toshiaki Ito, Takayoshi Suzuki, Koji Uchida, Masaaki Kurihara, Makoto Hayashi, Naoki Miyata and Masao Hirose, *Cancer Letters*, **148**, 81-86 (2000).

2. 学会発表

- 1) DNA-cleaving activities of resveratrol and its analogues, K. Fukuhara, N. Miyata, *Oxygen Club of California 1999 World Congress*, 1999. Santa Barbara, USA.
- 2) NO-Generating Ability of N-Nitroso Compounds at Ambient Temperature, S. Sueyoshi, M. anno, K. Fukuhara, N. Miyata, *217th ACS National Meeting*, 1999, Anaheim, USA.
- 3) Reduced oxygen species (superoxide and hydroxyl radical) are responsible for the biological actions of photoexcited fullerenes, Y. Yamakoshi, S. Sueyoshi, N. Miyata, *The 195th Electrochemical Society Meeting*, 1999, Seattle, USA.
- 4) Oxyl radicals responsible for DNA cleavage by photoexcited fullerene, Y. Yamakoshi, N. Umezawa, T. Nagano, A. Ryu. K. Arakane, T. Masumizu, M. Kohno, S. Sueyoshi, N. Miyata, *Fullerene '99*, 1999, Castera-Verduzan, France
- 5) Inhibitory action of fullerene derivatives against glutathione S-transferase, N. Miyata, Y. Yamakoshi, M. Kojima, H. Inoue, K. Takahashi, L. Gan, *Fullerene '99*, 1999, Castera-Verduzan, France
- 6) Fullerene: A photosensitizer effectively generates oxyl radicals to cause DNA cleavage, N. Miyata, Y. Yamakoshi, *Oxygen '99*, 1999, New Orleanse, LA, USA

E. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

一活性酸素種の定量法の開発一

分担研究者 長野哲雄 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 一酸化窒素 (NO) は生理活性種として注目されており、1998 年度のノーベル医学生理学賞の受賞対象研究になった反応種である。今回本研究者らは NO をバイオイメージングとして捉える生細胞蛍光プローブ DAF-FM DA の開発に成功した。これは NO の特異な反応性に着目し、独自にプローブを分子設計しこれを合成し、種々検討した結果、創製されたものである。このプローブを用いて、内皮細胞あるいは脳虚血モデルから産生される NO を画像として捉えることに成功し、NO の生理機能解析に有用であることを明らかにした。

A 研究目的

本研究テーマは活性酸素種の定量法についてであり、今回は最も研究が進展した一酸化窒素の定量法について報告する。

一酸化窒素 (NO) が血管内皮細胞由来血管弛緩因子 (EDRF) であることが 1987 年に報告されて以来、NO は循環系だけでなく免疫系・神経系でも機能し、様々な疾患に関与すると報じられてきた。しかし、その真の作用機序の多くは未だ明らかではなく、特に中枢神経系においてはシナプスの可塑性や虚血傷害への関与が示唆されているものの、全く混沌とした状態にある。その原因の一つとして、生成する NO が生理的条件下で短寿命のラジカル種で、なおかつ低濃度であるために実際に機能している NO を直接測定できず、そのため確かな根拠に基づいた議論が難しいことが挙げられる。

本研究は、NO の機能解析のための汎用的な分析手法の確立を目的としており、その目標は細胞や組織中での NO の動的挙動を明らかにするために、NO のバイオイメージング法を開発し、それを応用することである。本研究者は NO を高感度に捉え、画像化できるプローブとして NO 感受性蛍光色素を数多くデザイン・合成し、それらを評価した結果、優れたプローブであるジアミノフルオレセイン (DAF) 類及びジアミノローダミン (DAR) 類の開発に成功した。その開発の経緯と薬理実験への応用について説明する。

B 方法、結果

有機合成については市販の試薬を用いて行われた。

血管内皮細胞のイメージングはウシ大動脈血管内皮細胞を用いて、これを 10%FBS と抗生物質を含む DMEM 培地で培養した。実験には 10-16 代の細胞を用いた。イメージングは DAF-FM DA の PBS(+) 溶液に細胞の培養液を取り替え、37 度で培養してプローブを負荷する。洗浄後、ポストインキュベーションを行い、ステージを 37 度に保った蛍光顕微鏡で観察した。

海馬スライスにおける虚血モデルのNOイメージングにおいてはWister ratを用いた。エーテル麻酔し、断頭する。全脳を摘出しシャーベット Ringer 液中で氷冷。左右の半球に切り分け、ピンセットとスパーテルを用いて間脳を除いてから海馬を取り出す。海馬を寒天に置き、ロータースラサーで300ミクロンの厚さに切断する。この試料にプローブを負荷し、種々の実験に用いた。

C 結果と考察

(1) NO感受性蛍光プローブのデザイン

バイオイメーキングに用いるNO感受性蛍光プローブの要件である以下の条件を満たすプローブ開発の検討を行った。

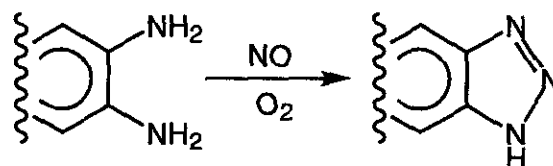
① NOを捉える反応部位の確立 (NOとプローブとの反応の精査)

- 反応が生理的条件下 (37℃、1 atm、中性のバッファー中) すなわち、加熱や加圧なしに単に混ぜるだけで進行すること
- 反応が効率良く進行し、生理的条件下でNO特異的であること
- プローブ自身、生成物が共に安定であること

② 反応部位の最適な蛍光団への導入

- 反応後にダイナミックな蛍光強度変化 (色素の退色や漏出等に起因する蛍光強度の減少と区別するため、増加する方が望ましい) や波長シフトが起きること
- 細胞自身の自家蛍光やフォトダメージを軽減するため、可視光励起であること
- 細胞へプローブを非侵襲的に負荷できる仕組みを有すること

NOの反応性を精査したところ、意外にもNOラジカル自身は反応性に乏しく、ラジカル的な酸素種や遷移金属イオン等と反応するのみである。その上、ニトロシル化された化合物は一般に蛍光を消失してしまうため、NOラジカル自身を捕捉する反応を特異的な蛍光検出に用いることは困難と判断した。ところが生理的条件下ではO₂が反応系内に存在するため、NOの反応性は変化し、芳香族隣接ジアミンと反応して対応するトリアゾール化合物を瞬時に生成することを見出した (Scheme 1)。その反応種はNOの酸化体のN₂O₃であると推定され、この反応種は生理的条件下においてはNOが存在しない限り生成しないと考えられたため、この反応は特異的なNO検出の原理となりうると推測した。市販の芳香族ジアミンには上記要件を満たすものがなかったので、新規に化合物をデザイン・合成しつつ検討した。



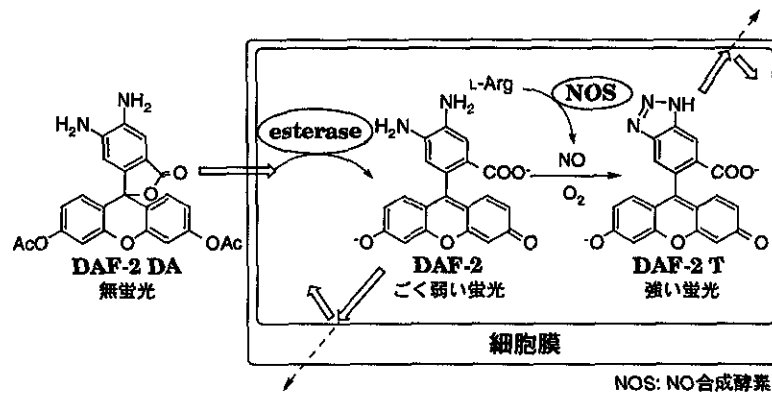
Scheme 1

(2) ジアミノフルオレセイン (DAF) の創製

可視光励起かつ高い蛍光量子収率で知られるフルオレセインの骨格にジアミンを導入

した化合物 (DAF) をデザイン・合成した。量子収率が低い DAF は酸素存在下 NO と瞬時に反応し、高い量子収率をもつトリアゾール体 (Ex. 495 nm - Em. 515 nm) を生成することを見出し、これを用いた高感度 (検出限界: 5 nM) で、特異性の高い NO 測定法の開発を行った。DAF を細胞の培養液を加えてインキュベーションすることにより、マイクロプレートリーダーを検出装置とした簡便で迅速な大量サンプルアッセイ法を確立した。さらに、DAF が細胞内に非侵襲的に局在化するようにデザインされたエステル誘導体 DAF-2 DA を合成した (Scheme 2)。

これを用い、生きているラットの脳表での *in vivo* イメージング、サイトカインとリポ多糖で刺激したラット大動脈平滑筋細胞や NMDA 刺激によりラット海馬から生成する NO のバイオイメージングに成功した。



Scheme 2

(3) DAF の pH 特性に関する改良

血管内皮細胞など構成型の NO 合成酵素 (NOS) を有する細胞においては、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると NO が生成されることが知られているが、同時に細胞内のイオン

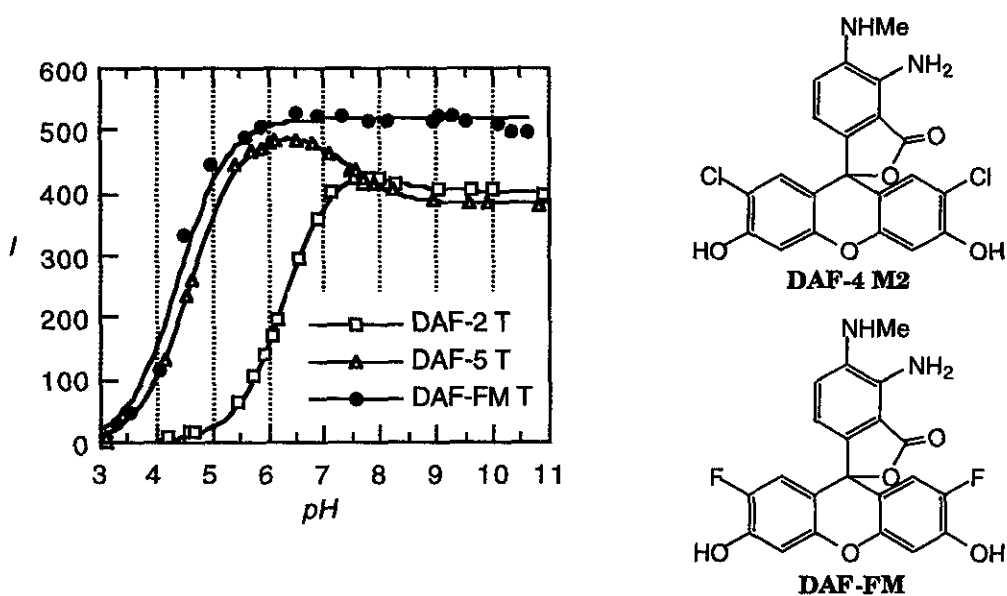


Fig. 1

組成が変わるため、細胞内 pH が変化することがある。DAF-2 トリアゾール体 (DAF-2 T) は pH 低下により蛍光強度が減少するため (Fig. 1)、DAF-2 DA はそのような細胞に適用しにくい。

そこで、DAF-2 のフェノール性水酸基の隣接位に Cl 原子を導入したが、却って pH 7 付近の蛍光強度が不安定になった (DAF-5 T, Fig. 1)。これはトリアゾール環上のプロトンの pK_a が 8 付近にあることに起因するためと考えられ、そこで Cl 原子を導入した DAF に N-メチル化を施すことにした。しかし、NO との反応性に影響する可能性もあるため、アミノ基、メチル基の置換位置が異なる 4 つの異性体をそれぞれ合成し、NO に対する感度を比較した。その結果、最も感度の良いものは DAF-4 M2 であり、メチル化していない DAF-4 よりもわずかながら高感度であった。

さらに、Cl の代わりに F を導入したものを合成した (DAF-FM)。F に置換することにより励起光による退色を軽減でき、Cl を導入したものよりも量子収率が高く、ハロゲン導入による励起波長の長波長シフトが小さいために共焦点顕微鏡で用いる Ar レーザー (488 nm) により効率良く励起できる。結局、DAF-FM が総合的に最良のプロープであり、感度も DAF-2 より約 1.4 倍高まった。

(4) 改良型プロープ (DAF-FM) の薬理実験への応用

細胞内負荷が可能な DAF-FM のジアセチル体 (DAF-FM DA) に誘導化して NO イメージングを行い、DAF-FM DA が NO の動的挙動解明に有力なツールであることを明らかにした。

① 血管内皮細胞への応用

ウシ大動脈内皮細胞に用いると細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる刺激により生成する NO を細胞内 pH 変化の影響をほとんど受けることなく測定することに成功し、細胞内の蛍光強度が NOS の存在する細胞質から上昇し始めることを観測した (Fig. 2)。

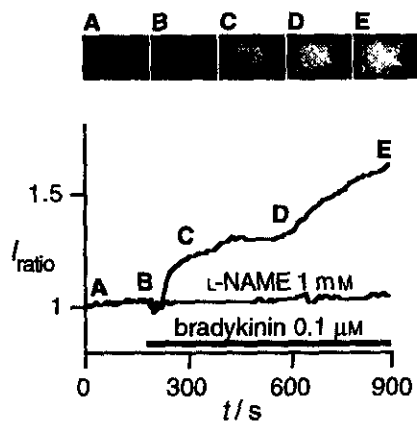


Fig. 2

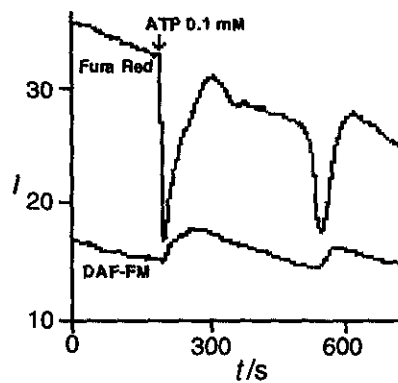


Fig. 3

また、蛍光波長の異なる Ca^{2+} 感受性蛍光色素 (Fura-Red AM) との同時負荷による NO と Ca^{2+} の同時イメージング法も開発し (Fig. 3)、NOS 活性化のための細胞内 Ca^{2+} 濃度の閾値の存在を示唆するデータを得た。

② 脳虚血モデルへの応用

脳虚血再灌流後には海馬の CA1 領域が傷害を受けやすいことが報告されている。脳虚血時には、興奮性アミノ酸が放出され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇して NO が生成するとされ、NO や活性酸素がその傷害の原因だとする仮説がある。しかし、真の分子メカニズムは未だ解明されていない。そこで、急性虚血時に NO が生成する様子を調べるために、ラット海馬スライスを用い、虚血モデル時における NO 生成の様子を可視化することを試みた。Fig. 4 は灌流液中の glucose を 2-deoxyglucose に置換したものを 10 分間灌流して虚血状態とし、再度 glucose を含む灌流液に戻してから約 8 分後の画像である (虚血前の蛍光強度との蛍光強度比を濃淡で示している)。この結果、CA1 領域の NO 生成が顕著であることが明らかとなった。また、灌流液に窒素ガス通気を行う虚血条件時には NO がほとんど生成せず、再灌流に相当する虚血条件解除直後に NO が急激に生成することも分かり、灌流液の酸素濃度の違いにより、NO 生成のパターンが異なることが明らかとなった。

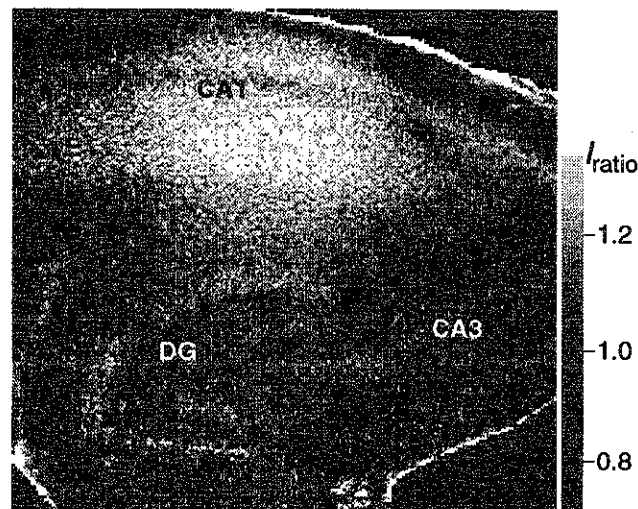


Fig. 4

以上、今回開発に成功した DAF-FM DA は真に実用的 NO 生体プローブであることが明らかになった。今後これを用いて更に NO の機能解析を行う予定である。

D. 研究発表

1. "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*, 99, 1242-1248 (1999).
2. "Role of Nitric Oxide-cGMP Pathway in Adrenomedullin-induced Vasodilation in the 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*, 33, 689-693 (1999).
3. "Effects of Vasodilatory β -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*, 33, 467-471 (1999).
4. "Dipeptides Containing L-Arginine Analogs: New Isozyme-selective Inhibitors of Nitric Oxide Synthase" Nobutaka Kobayashi, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 936-940 (1999).
5. "Synthesis and Evaluation of 1-Position-modified Inositol 1,4,5-Trisphosphate Analogs" T. Inoue, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino and T. Nagano, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 9, 1697-1702 (1999).
6. "Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen" Naoki Umezawa, Kumi Tanaka, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 38, 2899-2901 (1999).
7. "Imaging of Caspase-3 Activation in HeLa Cells Stimulated with Etoposide Using a Novel Fluorescent Probe" Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Tetsuo Mashima, Takashi Tsuruo and Tetsuo Nagano, *FEBS Lett.*, 453, 356-360 (1999).
8. "Absolute Configuration of Cathine" Kentaro Yamaguchi, Yukiko Makino, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, *Analytical Science*, 15, 1039-1040 (1999).
9. "Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production" Hirotsu Kojima, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 38, 3209-3212 (1999).

10. "Novel Iron Porphyrin-alkanethiolate Complex with Intramolecular NH \cdots S Hydrogen Bond: Synthesis, Spectroscopy and Reactivity" Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Hidehiko Uekusa, Yuji Ohashi, Takeshi Uchida, Teizoh Kitagawa and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 11571-11572 (1999).
11. "Inhibition of *E. coli* Growth by Fullerene Derivatives and Inhibition Mechanism" *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9, 2959-2962 (1999).
12. "Practical methods for Detection of Nitric Oxide" Tetsuo Nagano, *Luminescence*, 14, 283-290 (1999).
13. "Mechanism of Superoxide Dismutase Activity of Fe(II) and Fe(III) Complexes of Tetrakis-N,N,N', N' (2-pyridylmethyl)ethylenediamine" Tomohisa Hirano, Masaaki Hirobe, Kazuo Kobayashi, Akira Odani, Osamu Yamauchi, Masanori Ohsawa, Yoshinori Satow and Tetsuo Nagano, *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 223-230 (2000).
14. "Effects of Tetrahydrobiopterin on Endothelial Dysfunction in Rats with Ischemic Acute Renal Failure" Masao Kakoki, MD, Yasunobu Hirata, MD, Hiroshi Hayakawa, MD, Etsu Suzuki, MD, Daisuke Nagata, MD, Akihiro Tojo, MD, Hiroaki Nishimatsu, MD, Kazuya Kikuchi, Ph D, Tetsuo Nagano, Ph D, Masao Omata, MD, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 301-309 (2000).
15. "Fluorecent indicators for nitric oxide based on rhodamine chromophore" Hirotatsu Kojima, Miki Hirotani, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Tetrahedron Lett.*, 41, 69-72 (2000).
16. "Synthesis of Various Water-Soluble C60 Derivatives and Their Superoxide-Quenching Activity" *Fullerene Science and Tecnology*, in press.
17. "Novel zinc fluorescent probe excitable with visible light" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, in press.
18. "Fluorescent Indicators for Nitric Oxide" Hirotatsu Kojima and Tetsuo Nagano, *Advanced Materials*, in press.
19. "Synthesis and Superoxide Dismutase Activity of Novel Iron Complexes" Masakazu Tamura, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, *J. Organomet. Chem.*, in press.

20. "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*, 43, 179-186 (1999).
21. "一酸化窒素の分析法" 小島宏建, 長野哲雄, *ぶんせき*, 291, 239-245 (1999).
22. "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*, Vol. 21, No. 3, 303-307 (1999).
23. "NO 測定系とその問題点, 特集: 消化器疾患と NO" 小島宏建, 菊地和也, 長野哲雄 *臨床消化器内科*, Vol. 14, No. 6, 655-661 (1999).
24. "NO 測定法の新展開 —NO をみる—" 小島宏建, 長野哲雄, *実験医学*, Vol. 17, No. 8, 946-950 (1999).
25. "NO を測る" 長野哲雄, 小島宏建, *化学と教育*, 47, 10 月号, 665-669, 1999 年.
26. "「科学技術創造立国に向けて」大学研究室からの発信 —生細胞プローブの開発研究—" 長野哲雄, *ファルマシア*, 10 月号, 1026-1030 (1999).
27. "生細胞プローブの分子設計 —一酸化窒素 (NO) 蛍光プローブ DAF の開発—" 長野哲雄, 小島宏建, *現代化学*, 9 月号, No. 342, 23-30, (1999).