

平成12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  
(H12-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 共立薬科大学	長野哲雄 阿部芳廣

(別添2)

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<sup>-</sup>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行っている。

平成12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) 化学物質から発生する活性酸素種の解析に関しては、環境発ガン物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性に関する研究で、1-ニトロピレンの還元代謝物である1-ニトロソピレンを用いた実験により、銅イオン存在下ヒドロキシルラジカルが関与するDNA損傷が起きることを実証した。この結果は、ニトロアレーン類の遺伝毒性に活性酸素が関与していることを示唆する。また、昨年度から引き続き行っているC<sub>60</sub>フラーレンの光毒性に関与する活性種の解析研究では、光照射下C<sub>60</sub>フラーレンがスーパーオキシドを発生することを低温EPRにて直接証明することに成功した。(担当:宮田)
- 2) 活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、代表的な活性酸素種であるヒドロキシルラジカル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の開発を行い、HPFおよびAPFの開発に成功した。これらのプローブの開発に際しては、合理的な分子設計を行うべく分子軌道計算に基づき蛍光の発光原理を精査し、その結果photoinduced electron transfer (PET) 機構に基づく発光原理を明らかにした。この原理は他の活性種の検出にも応用可能と考える。(長野)
- 3) 活性酸素種の新しい定量法の開発に関しては、ヒドロキシルラジカルのHPLC-蛍光検出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い、テレフタル酸がヒドロキシルラジカルと反応すると蛍光性を有する2-ヒドロキシ体を与えることに着目し、この反応を利用してヒドロキシルラジカルのHPLCによる定量法を検討した。ヒド

ロキシル体の蛍光特性，HPLC 分離条件，水酸化反応におけるヒドロキシルラジカルとの反応の選択性，反応の pH 依存性，などについて精査し，テレフタル酸の水酸化反応がヒドロキシルラジカルの HPLC-蛍光検出に有効であることを見出した．現在，定量性など，分析条件を検討中である．（阿部） また，電気化学測定法を活性酸素種の定量に利用する目的で実験を行い，CV 法，DPV 法，PSCC 法などを用いることにより，キノン類，ニトロアレーン類のスーパーオキシド発生能を定量的に評価し比較できることを明らかにした．（宮田）

これらの知見は，化学物質の活性酸素発生能（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）を研究するための一般的方法論を提示するものであり，広く環境中の化学物質の活性酸素毒性の評価に活用できる．

#### 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<sup>-</sup>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に関する研究を行う。

以下, 分担課題別に研究内容を報告する。

### B-1) 化学物質から発生する活性酸素種の解析 (分担研究者: 宮田)

ニトロアレーンの毒性発現には, 従来から報告されているヒドロキシルアミン経由の毒性発現機構に加えて, 活性酸素が関与する毒性発現が関与することが指摘されているが, 明確には実証されていない。たとえば, 環境汚染物質である1-ニトロピレンはヒトに対する発ガン性がIARCにより possibly carcinogenic (Group B) に分類され, 特に, 1-ニトロピレンの還元代謝物である1-ニトロソピレンは, 1-ニトロピレンよりも強力な発ガン性を有することが知られている。そこで, 不安定中間体である1-ニトロソピレンを合成し, その活性酸素毒性をDNA損傷を指標にして調べた。<sup>32</sup>PでラベルしたDNAを用いて1-ニトロソピレンによるDNA切断作用を調べた結果, 還元剤であるNADHと銅イオン存在下において, DNAの切断が観察された。次に, 活性種を明らかにするために種々の消去剤を用いてDNA切断実験を行った。水酸ラジカル消去剤であるマンニトールはDNA切断を阻害しなかった。一価の銅イオンCu(I)の補足剤であるバソクプロリンおよび過酸化水素の消去剤であるカタラーゼは, DNA切断を有意に減少させることがわかった。この結果は, DNA損傷に過酸化水素とCu(I)が関与していることを示す。

次に, 1-ニトロソピレン - NADH - Cu (I) 系におけるDNA損傷の核酸塩基選択性を調べた。その結果, 酸化傷害の指標となる8-oxodGの生成が1-ニトロソピレンの濃度に依存して増大していることがわかった。1-ニトロピレンの毒性発現に1-ニトロピレンが還元的に代謝されて生成する1-ニトロソピレンによる活性酸素種の生成が関与している可能性を示す。

1-ニトロソピレンによる活性酸素生成が関与する毒性は, 還元剤(NADH)とCu(I)の存在下1-ニトロソピレンのレドックスによってスーパーオキシドが生成し, ついで, スーパーオキシドが過酸化水素に不均化しCu(I)の関与によってDNAを損傷すると考えられる。

また, 昨年度に引き続き電子欠損型の光増感化合物C<sub>60</sub>フラーレンから発生する活性酸素種の解析を行った。昨年度は, DEPMPOをスピン補足剤として用いるEPR検出法がスーパーオキシドの検出と定量に非常に有用であることを報告した。また, それを用いてC<sub>60</sub>フラーレンから発生する活性酸素種の解析実験を行い, C<sub>60</sub>フラーレンは, 還元剤存在下の光照射でType I光増感電子移動反応によりスーパーオキシドを発生し, それがDNA切断などの活性酸素毒性を引き起こしていることを証明した。本年度は, 昨年度にDEPMPOをスピン補足剤として用いるEPR検出法で検出したスーパーオキシドを低温EPR測定により直接検出する事に成功し, スーパーオキシドの生成を実証することができた。

### B-2) 活性酸素種の新しい検出方法の開発 (分担研究者: 長野)

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) は発癌や虚血・再灌流傷害, 炎症

などの各種疾患の他に情報伝達系にも関与している事が示唆され注目を集めているが、ROSの生体内での寿命は短くまた極少量しか生成しないため、生体内のROSを検出する方法には高い感度が要求される。この要求を満たすべくこれまでも数種のROS検出蛍光プローブが開発されてきた。しかしながら、これらは、①反応種特異性に欠ける、②容易に自動酸化されるなどの問題点がある。そこで我々は、ROSの中でも最も反応性に富むヒドロキシルラジカルを特異的に検出することができればROSの生体内での役割をより明確にすることが可能になると考え、ヒドロキシルラジカル特異的蛍光プローブの開発に着手した。

ある特定の分子を検出する蛍光プローブを創製する場合、その特定の分子と特異的に反応すること、またその反応の前後で蛍光特性が大きく変化することの二点が必須となる。我々は、ヒドロキシルラジカルと特異的に反応し蛍光のOFF/ONを制御する反応として、アリオキシフェノール類のipso置換反応を利用することを考えた。我々はすでに、この反応には強い酸化力が必要であり、活性酸素種の一つ過酸化水素では進行せず、より強い酸化力を持ったヒドロキシルラジカル等でなければ進行しないことを明らかにしている。従って、ipso置換反応をヒドロキシルラジカル検出のためのスイッチとして用いることにより、ヒドロキシルラジカルに特異的でありかつ自動酸化を起こさないプローブが開発できると期待できる。

蛍光団としては、水系で大きな量子収率を持つ7-ヒドロキシクマリン、フルオレセインを利用することを考えた。そこでまず、7-ヒドロキシクマリンの7位の

水酸基、フルオレセインの6'-位の水酸基に種々の置換基を有するフェニル基を導入した化合物群を合成し、その蛍光特性を調べた。その結果、電子供与性基で置換した電子密度の高いフェニル基を蛍光団の水酸基に導入することにより7-ヒドロキシクマリン誘導体、フルオレセイン誘導体の蛍光量子収率を大幅に低下させOFF状態をつくり出すことに成功した。

次に、上記の結果を踏まえて、新規ヒドロキシルラジカル特異的蛍光プローブHPC, APC, HPF, APFをデザインし合成した。HPC, APCは7-ヒドロキシクマリンの7位の水酸基が、HPF, APFはフルオレセインの6'-位の水酸基が電子密度の高いフェニル基であるヒドロキシフェニル基、アミノフェニル基で保護されている。これらはヒドロキシルラジカルと高い選択性を持ってipso置換反応を起こすことによって脱アリル化され、7-ヒドロキシクマリン、フルオレセインを生成し、よってヒドロキシルラジカルのみを蛍光として検出可能であると考えた。HPC, HPFは4-ヨードフェノールを、APC, APFは4-ヨードアニリンを出発物質としてウールマンカップリングを含む3ステップで合成した。

合成した化合物の蛍光性を検討した結果、予想通りHPC, APCは全く蛍光を持たず、またヒドロキシルラジカルと選択的に反応し、強い蛍光を有する7-ヒドロキシクマリンを生じることがわかった。しかし、バイオイメージングに適用できるだけの感度が得られなかった。そこで、次に可視光励起可能で水中での蛍光量子収率やモル吸光係数が大きいフルオレセインを蛍光団とするHPF, APFについて検討した。

HPF, APFの蛍光量子収率はそれぞれ

0.008, 0.006であった。この値はフルオレセイン (0.85) と比べて非常に小さく、当初の分子デザイン通り HPF, APF の蛍光は非常に弱いことがわかった。

次に、ヒドロキシルラジカル生成系として Fenton 反応を用いて、HPF, APF とヒドロキシルラジカルとの反応性を検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加のみでは蛍光強度は増大しないが、Fe<sup>2+</sup>を加えてヒドロキシルラジカルが生成すると瞬時に蛍光強度が増大することがわかった。さらに、HPLC 分析により、この蛍光強度の増大がデザイン通り ipso 置換反応により脱アリル化されてフルオレセインが生成したことによること、またヒドロキシルラジカルを定量的に検出できることも明らかとなった。

続いて、現在汎用されている ROS 検出蛍光プローブ DCFH (2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセイン) と ROS との反応性を比較した。DCFH がヒドロキシルラジカル以外の他の全ての ROS と非特異的に反応するのに対して、HPF, APF はこれらとは反応せず、ヒドロキシルラジカルに対して高い特異性を有していること、また、光により自動酸化されないことが明らかになった。

### B-3) 活性酸素種の新しい定量法の開発 (分担研究者：阿部, 宮田)

分担研究者阿部は、HPLC 法によるヒドロキシルラジカルの新しい定量法を開発することを目的として研究を行った。

テレフタル酸 (TA) は、①対称性がよくヒドロキシルラジカルと反応して単一のモノ水酸化体 (HTA) を与える。②TA 自体は蛍光性を有しないが HTA は蛍光性である。③自然の状態では生体内に存在しない。④従来 HPLC 法によるヒドロキシルラジカルの検出あるいは定量に使われ

てきたサリチル酸が主に 3 種の生成物を与えるのに比べて有利である、などの特徴を有する。そこで、本年度は TA を利用して HPLC によりヒドロキシルラジカルを分離定量する方法の開発を検討した。

水酸化体の標品となる 2-ヒドロキシテレフタル酸 (HTA) は、2-プロモテレフタル酸から報文に従い合成した。合成した HTA の蛍光の pH 依存性を調べたところ、pH 4.5 付近から急激に蛍光が弱くなることがわかった。また、蛍光、励起波長ともに長波長にシフトすることが観察された。中性条件では再現性ある十分な蛍光強度が確保できると考え、次に HPLC 条件の検討を行った。カラムは ODS (4.6 mm φ×25 cm) を使用し、溶離液として 200 mM リン酸二水素カリウム-2% KCl 水溶液を用い、流速 1 ml/min で分析した。装置は日本分光製 HPLC システム 980 シリーズを用い、検出器には蛍光検出器 (Ex 309 nm, Em 420 nm, 日本分光 FP-1520S) と UV 検出器 (285 nm, 日本分光 UV-970) 記録およびピーク面積の算出にはクロマトパック C-R6A (島津) を用いた。試料注入量は 20 μL である。まず最初に、HPLC 溶離液の検討を行った。pH によって HTA の蛍光強度が変わり、しかも pH が 4.5 よりも酸性になると減弱する。しかし、TA と HTA とを逆相カラムで分離するためには、溶離液の pH を酸性にする必要があったので、上の結果から 200 mM のリン酸二水素酸カリウム水溶液を選び、これに塩類を添加することでさらに保持をよくすることを試みた。その結果、KCl を加えたときに良好な分離が得られた。溶離液は pH 4.37 で、蛍光強度は pH 5 のときに比べておよそ 85% の強度が期待できる。より分離段の大きなカラムを用いれば、溶離液の pH を

もう少し大きくすることにより感度が向上できると考える。添加する塩として KCl を用いたが、ハロゲンイオンによる消光が懸念される。しかし、硫酸ナトリウム、あるいは硫酸アンモニウムを添加した場合と差はなく、KCl を用いたときの方が分離度がよいので、KCl の使用は問題ない。今後は、TA の濃度と検出限界の関係などを明かにし、応用として様々な化合物からのヒドロキシルラジカルの発生を検出する予定である。

分担研究者宮田は、電気化学測定法を活性酸素種スーパーオキシドの定量に利用する目的で実験を行った。活性酸素種生成の重要なステップである酸素の一電子還元によるスーパーオキシドの生成反応に注目し、キノンおよびニトロアレン類によるスーパーオキシドの発生を、サイクリックボルタメトリー (CV) 法、ディファレンシャルパルスボルタメトリー (DPV) 法、ポテンシャルステップクロノクーロメトリー (PSCC) 法などの電気化学的方法で解析することを試みた。アントラキノン、シトクロム P450 などの還元酵素によって一電子還元を受けてアントラキノンアニオンラジカルになる。ついで、アントラキノンアニオンラジカルが酸素を一電子還元してスーパーオキシドが生成し、このようにして生成した還元型の酸素種が細胞障害を引き起こす。そこで、アントラキノンによる酸素分子の還元活性化反応を電気化学的に解析することを試みた。測定は、0.1 M の過塩素酸テトラエチルアンモニウムを支持電解質とした DMF 中、白金作用電極、針状白金対極、および、非水溶媒用銀参照電極を用いて行った。酸素の DMF 中の飽和濃度は約 4.5 mM である。DMF に溶存する酸素は -1,427 mV で一電子還元 (Epc 1)

されてスーパーオキシドが生成し、逆に -1,038 mV でスーパーオキシドは一電子酸化 (Epa 1) されて酸素に戻る (Fig. 2, line a)。一方、アントラキノンの 1 mM 溶液は、嫌気的条件下では、-1,216 mV で一電子還元 (Epc 1) されてアニオンラジカルが生成し、このアニオンラジカルは -1,155 mV で、一電子酸化されてアントラキノン再生する。次に、このアントラキノン溶液中に酸素を飽和濃度で溶存させて同様に酸化還元電位を測定すると酸素の還元電位 (Epc 1) は、-1,257 mV、また、スーパーオキシドの酸化電位 (Epa 1) は、-1,108 mV となり、アントラキノン非存在下と比べて酸素の還元電位はプラス側に 152 mV シフトし、また、スーパーオキシドの酸化電位はマイナス側に 70 mV シフトしていることが示された。酸素の還元電位がプラス側にシフトしたのはアントラキノンのアニオンラジカルと分子状酸素が酸化還元サイクルを形成していることを示す。すなわち、①アントラキノンが酸素より還元されやすいために電極表面上でアントラキノンが先に還元され、②生成したアニオンラジカルは、溶存酸素存在下酸素への電子移動反応をしてスーパーオキシドの発生とアントラキノンの再生が起き、③再生したアントラキノンが再度電極表面で還元される。①-③の酸化還元サイクルが繰り返されることによって酸素の還元電位はアントラキノンの還元電位の近くにシフトするとともに還元電流は増加する。以上のように、アントラキノンが触媒となってスーパーオキシドが生成することが電気化学的手法 (CV 法) で再現できた。この結果は、キノンによる活性酸素種スーパーオキシドの生成反応が電気化学的手法により解析可能であることを示す。

CV法は、酸化還元過程でバックグラウンド電流（容量性電流）が生じるために酸素の酸化還元に伴いベースラインの変化が生じる。それに対してDPV法は、電位を順次ステップアップして電流応答をサンプリングする方法であり、CV法で問題となるバックグラウンド電流の影響を受けない。そのため、DPV法で観測される電流曲線の変化はキノンによるスーパーオキシドの生成を直接反映する。そこで、つぎに、DPV法を用いて還元電位の異なる種々のキノンについて酸素の還元を解析した。その結果をFig. 3に示す。CV法で酸素への電子移動が観測されたアントラキノンの場合、DPV法でもアントラキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応に伴う酸素の還元電位のプラス側へのシフトと酸化還元サイクル形成による還元電流量の増加が見られた。また、アントラキノンの濃度が0.05 - 0.2 mMの範囲では酸素飽和条件下還元電流が濃度に比例的に増大していることから、アントラキノンはこの濃度範囲では飽和酸素と効率良く酸化還元サイクルを形成しスーパーオキシドを生成していることが示された。一方、アントラキノンよりも一電子還元されやすいベンゾキノンや一電子還元されにくい6,13-ペンタセンキノンでは還元電流量の増加がほとんど見られないことからこれらのキノンはスーパーオキシドの生成を触媒していないことが示された。以上、DPV法を用いてキノンアニオンラジカルから酸素への電子移動反応によるスーパーオキシドの生成反応を解析した結果、アントラキノンは酸化還元サイクルによってスーパーオキシドを発生するのに対して、一電子還元電位が異なるベンゾキノンや6,13-ペンタセンキノンのアニオンラジカルからは酸

素への電子移動が起こらないことが明らかになった。

種々のキノンのスーパーオキシド発生能を比較するためには、上に示した電子移動反応を数値化する必要がある。そこで、PSCC法を利用することを試みた。PSCC法は、電位変化に伴って流れる電流量の経時変化を求める方法であり、電極上で起きる反応の速度論的パラメーターを解析するのに有効である。PSCC法を用いてキノンアニオンラジカルから酸素への電子移動反応の酸化還元サイクルのターンオーバー数（触媒能）を求めた。測定条件は、CV法やDPV法と同一である。まず、初期電位を0 mVに設定し、ついで電位をキノンの一電子還元電位（Epc1）にステップし、その直後の250 m秒間の還元電流量経時変化（Q vs t）を測定した。還元電流量の対時間プロット曲線（クロノクーログラム）は、Ansonプロット表示法（Q vs  $t^{1/2}$ ）により直線プロットへと変換した後、この直線プロットの勾配（ $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ）を求めた。実験を嫌氣的条件下ならびに化合物非存在下でも行い、これらの勾配値からスーパーオキシド生成量とターンオーバー数で表した触媒能を算出した。まず最初に、アントラキノンのスーパーオキシド生成能をPSCC法で解析した。アントラキノンの一電子還元電位は-1,216 mVであり、この電位条件でPSCCを行った。その結果、酸素飽和条件下、アントラキノン0.1 mM溶液で測定された電流量（Fig. 4, line c,  $[S + O_2] = 0.755 \mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ）は、嫌氣的条件下（ $[S] = 0.018 \mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ）および、アントラキノン非存在下（ $[O_2] = 0.480 \mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ）での電流をはるかに上回ることが示され、アントラキノンアニオンラジカルは分子状酸素と酸化還元



サイクルを繰り返してスーパーオキシドを発生していることが示された。Ansonプロット変換で求めた電流量からスーパーオキシドの発生量は  $1,400 \text{ mmol dm}^{-3}$ ，ターンオーバー数は 14.1 であった。

次に、アントラキノンの濃度を変えて同様の実験を行った。その結果、0.001 mM~0.1 mM の濃度範囲ではスーパーオキシドの生成量は化合物濃度に比例し一定のターンオーバー数によってスーパーオキシドの生成を触媒していることが示され、アントラキノンによる活性酸素の生成がこの濃度範囲で計測可能であることが明らかになった。

以上のように PSCC 法でアントラキノンのスーパーオキシド生成能を数値化することが可能になった。そこで、本法を用いて種々のキノン、および、キノンと同様にスーパーオキシドが発生することが指摘されているニトロアレーンのスーパーオキシド生成能を数値化して比較することとした。その結果、-1,000 mV から -1,300 mV に酸化電位 (Epa1) を有するキノンやニトロアレーンでは、アニオンラジカルから酸素への電子移動に伴う電流量の増加 ( $[S + O_2] > [S] + [O_2]$ ) が見られ、キノンやニトロアレーンによってスーパーオキシドが触媒的に発生していることが示された。特に、Epa1 が小さい化合物ほどスーパーオキシドを発生しやすく、Epa1 が酸素分子の Epc1 (-1,437 mV) に近いとき触媒作用が最も強くなり効率良くスーパーオキシドが発生した。一方、Epa1 が -1,000 mV よりも大きい化合物では、アニオンラジカルから酸素分子への電子移動は起きない、すなわち、スーパーオキシドが発生しないことが明らかになった。キノン類の中では 5,12-ナフタセンキノンが最もよくスーパーオキ

シドを発生しターンオーバー数は 16.2 であった。また、同様の実験をニトロアレーン類についても行った結果、同程度の Epa1 を持つニトロアレーンでは、スーパーオキシド発生能はキノンの約 60% であることがわかった。

#### 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。その結果、

1) 化学物質から発生する活性酸素種の解析に関しては、環境発ガン物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性に関する研究で、1-ニトロピレンの還元代謝物である 1-ニトロソピレンを用いた実験により、銅イオン存在下ヒドロキシルラジカルが関与する DNA 損傷が起きることを実証した。この結果は、ニトロアレーン類の遺伝毒性に活性酸素が関与していることを分子レベルで強く示唆する。また、昨年度からひき続いて行っている C<sub>60</sub> フラーレンの光毒性に関与する活性種の解析研究では、光照射下 C<sub>60</sub> フラーレンがスーパーオキシドを発生することを低温 EPR にて直接証明することに成功した。

2) 活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、代表的な活性酸素種であるヒドロキシルラジカル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の開発を行い、HPF および APF の開発に成功した。これらのプローブの開発に際しては、合理的な分子設計を行うべく分子軌道計算に基づき蛍光の発光原理を精査し、その結果 photoinduced electron transfer

(PET)機構に基づく発光原理を明らかにした。この原理は、他の活性種の検出にも応用可能と考える。

3) 活性酸素種の新しい定量法の開発に関しては、ヒドロキシルラジカルのHPLC-蛍光検出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い、テレフタル酸がヒドロキシルラジカルと反応すると蛍光性を有する2-ヒドロキシ体を与えることに着目し、この反応を利用してヒドロキシルラジカルのHPLCによる定量法を検討した。ヒドロキシル体の蛍光特性、HPLC分離条件、水酸化反応における水酸ラジカルとの反応の選択性、反応のpH依存性、などについて精査し、テレフタル酸の水酸化反応がヒドロキシルラジカルのHPLC-蛍光検出に有効であることを見出した。現在、定量性など、分析条件を検討中である。また、電気化学測定法を活性酸素種の定量に利用する目的で実験を行い、CV法、DPV法、PSCC法などを用いることにより、キノン類、ニトロアレーン類のスーパーオキシド発生能を定量的に評価し比較できることを明らかにした。

これらの知見は、化学物質の活性酸素発生能（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）を研究するための一般的方法論を提示するものであり、広く環境中の化学物質の活性酸素毒性の評価に活用できる。

現在継続中の研究として、①化学物質からの活性酸素種NOの発生、②1-ニトロソピレンの場合に観察されたような活性酸素毒性における金属イオンの関与、③化学物質の存在環境（溶媒の極性やプロトン数）が活性酸素発生に及ぼす影響、がある。これらの研究についても着実に

成果をあげており、最終年度にまとめて報告する。

#### E. 研究発表

それぞれの分担研究報告書に記載した。

(別添3)

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の関与が指摘されている。更に近年、新たな活性酸素種として、NO、ONOO<sup>-</sup>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、を解析することに焦点を絞り研究を行っている。

本年度は、活性酸素種を発生する化学物質としてキノン類、ニトロアレーン類、C<sub>60</sub>フラーレンなどを用いて研究を行った。その結果、①電気化学的測定法（CV法、DPV法、PSCC法など）を用いることにより、キノン類、ニトロアレーン類のスーパーオキシド発生能を定量的に評価し比較できること、②ニトロアレーン類として1-ニトロピレンを用いた研究で、銅イオン存在下ヒドロキシルラジカルが関与するDNA損傷が起きること、③昨年度からひき続いて行っているC<sub>60</sub>フラーレンを用いた研究で、光照射下C<sub>60</sub>フラーレンがスーパーオキシドを発生することを直接的に証明することに成功した。

これらの知見は、化学物質の活性酸素発生能（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）を研究するための一般的方法論を提示するものであり、広く環境中の化学物質の活性酸素毒性の評価に活用できる。

### A. 研究目的

化学物質の毒性を科学的に評価するための研究の一環として、化学物質による活性酸素毒性について、「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」を解析することに焦点を絞り研究を行っている。

キノンやニトロアレーン類については、それらが一電子還元されて生成するキノンやニトロアレーンのアニオンラジカルが酸素分子を還元的に活性化して活性酸素種（スーパーオキシド）を発生し、毒性を発現することが知られているが、ど

のような構造や化学的性質の化合物がどれだけスーパーオキシドを発生するのかについては、定量的に比較した研究が少ない。本年度は、キノンやニトロアレーンによる活性酸素種（スーパーオキシド）の発生量を簡便に測定できる手法を見いだすとともに、それを用いて一連の化合物のスーパーオキシド発生能を比較することを目的として研究を行った。

また、ニトロアレーンの活性酸素毒性を DNA の損傷を指標にして証明することを目的として研究を行った。

さらに、昨年度から引き続いて、電子欠損型の光増感化合物  $C_{60}$  フラーレンから発生する活性酸素種の解析研究を行った。

## B. 研究方法, 研究結果

### 1. 電気化学的手法による化学物質のスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) 発生能の定量的測定

活性酸素を発生する化合物としては、キノン系の化合物として、アドリアマイシンやストリプトニグリン等のキノン系制ガン剤、ブレオマイシンやビタミンK、さらには、キノン構造を有する環境化学物質などが知られている。これらの化合物による毒性発現には、生体内に取り込まれたキノンが一電子還元されてセミキノンアニオンラジカルが生成し、それが酸素分子をスーパーオキシドに還元することが原因であることが明らかになっている。スーパーオキシドは酵素的にあるいは Haber-Weiss 反応により、より反応性の高いヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種に変換される。成人病を引き起こす原因の一つにもこれらの活性酸素種による酸化的な生体分子損傷が関与していると考えられている。一方、環境発ガン物質として知られているニトロアレーン類についても、近年、ニトロ基の代謝活

性化の過程でスーパーオキシドが生成することが報告され、好氣的条件ではこのような活性酸素種が毒性発現に関与していると予測されている。

活性酸素種生成の重要なステップである酸素の一電子還元によるスーパーオキシドの生成反応に注目し、キノンおよびニトロアレーン類によるスーパーオキシドの発生を、サイクリックボルタメトリー (CV) 法, ディファレンシャルパルスボルタメトリー (DPV) 法, ポテンシャルステップクロノクーロメトリー (PSCC) 法などの電気化学的方法で解析することを試みた。

#### 1) CV 法, DPV 法による解析

アントラキノン誘導体による細胞障害は活性酸素によって引き起こされる。すなわち、アントラキノンは、シトクロム P450 などの還元酵素によって一電子還元を受けてアントラキノンアニオンラジカルになる。ついで、アントラキノンアニオンラジカルが酸素を一電子還元してスーパーオキシドが生成し、このようにして生成した還元型の酸素種が細胞障害を引き起こす。そこで、アントラキノンによる酸素分子の還元活性化反応を電気化学的に解析することを試みた (Fig. 1)。測定は、0.1 M の過塩素酸テトラエチルアンモニウムを支持電解質とした DMF 中、白金作用電極, 針状白金対極, および、非水溶媒用銀参照電極を用いて行った (Fig. 2)。酸素の DMF 中の飽和濃度は約 4.5 mM である。DMF に溶存する酸素は -1,427 mV で一電子還元 (Epc1) されてスーパーオキシドが生成し、逆に -1,038 mV でスーパーオキシドは一電子酸化 (Epa1) されて酸素に戻る (Fig. 2, line a)。一方、アントラキノンの 1 mM 溶液は、嫌氣的条件では、-1,216 mV で一電子還元 (Epc1) さ

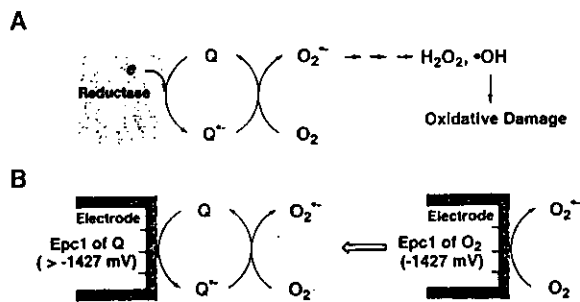


Fig. 1 Generation of superoxide catalyzed by quinone in biological (A) and electrochemical (B) systems

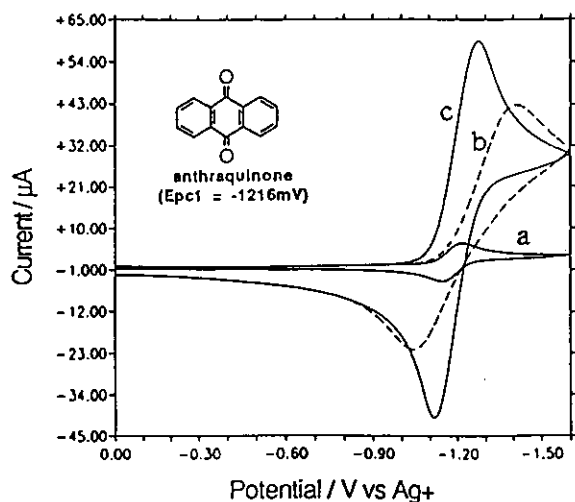


Fig. 2 CV of  $0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$  anthraquinone under argon (a), saturated  $\text{O}_2$  (b) or anthraquinone under saturated  $\text{O}_2$  (c) in DMF solutions (1 ml) containing  $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{NEt}_4\text{ClO}_4$  at a Pt electrode (diameter 1.6 mm) with a scan rate of  $100 \text{ mV s}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$ . The potentials are vs.  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$  ( $0.01 \text{ mol dm}^{-3}$ )  $\text{AgNO}_3$  in  $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{NBu}_4\text{ClO}_4$  in MeCN

れてアニオンラジカルが生成し、このアニオンラジカルは  $-1,155 \text{ mV}$  で、一電子酸化されてアントラキノン再生する (Fig. 2, line b). 次に、このアントラキノン溶液中に酸素を飽和濃度で溶存させて同様に酸化還元電位を測定すると酸素の還元電位 ( $E_{pc1}$ ) は、 $-1,257 \text{ mV}$ 、また、スーパーオキシドの酸化電位 ( $E_{pa1}$ ) は、 $-1,108 \text{ mV}$  となり、アントラキノン非存在下と比べて酸素の還元電位はプラス側に  $152 \text{ mV}$  シフトし、また、スーパーオキシドの酸化電位はマイナス側に  $70 \text{ mV}$  シフ

トしていることが示された (Fig. 2, line c). 酸素の還元電位がプラス側にシフトしたのはアントラキノンのアニオンラジカルと分子状酸素が酸化還元サイクルを形成していることを示す. すなわち、①アントラキノンは酸素より還元されやすいため電極表面上でアントラキノンが先に還元され、②生成したアニオンラジカルは、溶存酸素存在下酸素への電子移動反応をしてスーパーオキシドの発生とアントラキノンの再生が起き、③再生したアントラキノンは再度電極表面で還元される. ①-③の酸化還元サイクルが繰り返されることによって酸素の還元電位はアントラキノンの還元電位の近くにシフトするとともに還元電流は増加する. 以上のように、アントラキノンが触媒となってスーパーオキシドが生成することが電気化学的手法 (CV 法) で再現できた. この結果は、キノンによる活性酸素種スーパーオキシドの生成反応が電気化学的手法により解析可能であることを示す.

CV 法は、酸化還元過程でバックグラウンド電流 (容量性電流) が生じるために酸素の酸化還元に伴いベースラインの変化が生じる. それに対して DPV 法は、電位を順次ステップアップして電流応答をサンプリングする方法であり、CV 法で問題となるバックグラウンド電流の影響を受けない. そのため、DPV 法で観測される電流曲線の変化はキノンによるスーパーオキシドの生成を直接反映する. そこで、つぎに、DPV 法を用いて還元電位の異なる種々のキノンについて酸素の還元を解析した. その結果を Fig. 3 に示す. CV 法で酸素への電子移動が観測されたアントラキノンの場合、DPV 法でもアントラキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応に伴う酸素の還元電位のプ

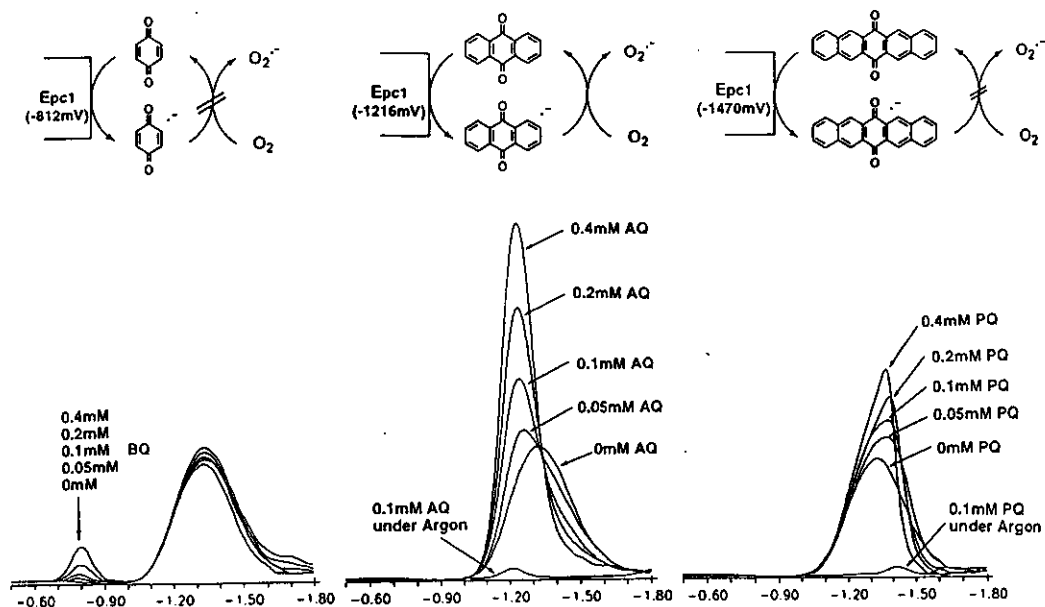


Fig. 3 DPV of p-benzoquinone (BQ), anthraquinone (AQ) or 6, 13-pentacenequinone (PQ) under saturated  $O_2$ . The conditions is as follows ; 0 mV init E, -1800 mV final E, 20 mV/s scan rate, 50 mV pulse amp, 50 ms pulse width, 200 mV pulse period, 5 s quiet T

ラス側へのシフトと酸化還元サイクル形成による還元電流量の増加が見られた (Fig. 3, 中)。また、アントラキノンの濃度が 0.05 - 0.2 mM の範囲では酸素飽和条件下還元電流が濃度に比例的に増大していることから、アントラキノンはこの濃度範囲では飽和酸素と効率良く酸化還元サイクルを形成しスーパーオキシドを生成していることが示された。一方、アントラキノンよりも一電子還元されやすいベンゾキノン (Fig. 3, 左,  $E_{pc1} = -812$  mV) や一電子還元されにくい 6,13-ペンタセンキノン (Fig. 3, 右,  $E_{pc1} = -1,415$  mV) では還元電流量の増加がほとんど見られないことからこれらのキノンはスーパーオキシドの生成を触媒していないことが示された。以上、DPV 法を用いてキノンアニオンラジカルから酸素への電子移動反応によるスーパーオキシドの生成反応を解析した結果、アントラキノンは酸化還元サイクルによってスーパーオキシドを発生するのに対して、一電子還元

電位が異なるベンゾキノンや 6,13-ペンタセンキノンのアニオンラジカルからは酸素への電子移動が起こらないことが明らかになった。

## 2) PSCC 法による解析

種々のキノンのスーパーオキシド発生能を比較するためには、上に示した電子移動反応を数値化する必要がある。そこで、PSCC 法を利用することを試みた。PSCC 法は、電位変化に伴って流れる電流量の経時変化を求める方法であり、電極上で起きる反応の速度論的パラメータを解析するのに有効である。PSCC 法を用いてキノンアニオンラジカルから酸素への電子移動反応の酸化還元サイクルのターンオーバー数 (触媒能) を求めた。測定条件は、CV 法や DPV 法と同一である。まず、初期電位を 0 mV に設定し、ついで電位をキノンの一電子還元電位 ( $E_{pc1}$ ) にステップし、その直後の 250 m 秒間の還元電気量経時変化 ( $Q$  vs  $t$ ) を測定した。還元電気量の対時間プロット曲線 (クロ

ノクーログラム)は、Anson プロット表示法 ( $Q$  vs  $t^{1/2}$ )により直線プロットへと変換した後、この直線プロットの勾配 ( $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )を求めた。実験を嫌氣的条件下ならびに化合物非存在下でも行い、これらの勾配値からスーパーオキシド生成量とターンオーバー数で表した触媒能を算出した。アントラキノンのスーパーオキシド生成能をPSCC法で解析した結果をFig. 4に示す。

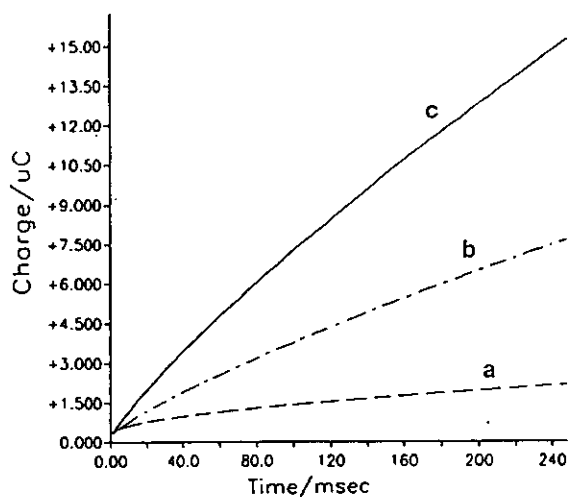


Fig. 4 PSCC of  $0.1 \text{ mmol dm}^{-3}$  anthraquinone under argon (a), saturated  $\text{O}_2$  (b) or anthraquinone under saturated  $\text{O}_2$  (c). The potentials are stepped from 0 to  $-1216 \text{ mV}$  (Epc1 of anthraquinone) for 250 ms. Other conditions are as in Fig. 1

アントラキノンの一電子還元電位は $-1,216 \text{ mV}$ であり、この電位条件でPSCCを行った。その結果、酸素飽和条件下、アントラキノン  $0.1 \text{ mM}$  溶液で測定された電気量 (Fig. 4, line c,  $[\text{S}+\text{O}_2] = 0.755 \mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )は、嫌氣的条件下 (Fig. 4, line a,  $[\text{S}] = 0.018 \mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ ) および、アントラキノン非存在下 (Fig. 4, line b,  $[\text{O}_2] = 0.480 \mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )での電流をはるかに上回ることが示され、アントラキノンアニオンラジカルは分子状酸素と酸化還元サイクルを繰り返してスーパーオキシドを発生していることが示された。Anson

プロット変換で求めた電流量からスーパーオキシドの発生量は  $1400 \text{ mmol dm}^{-3}$ 、ターンオーバー数は  $14.1$ であった。

次に、アントラキノンの濃度を変えて同様の実験を行った (Fig. 5)。

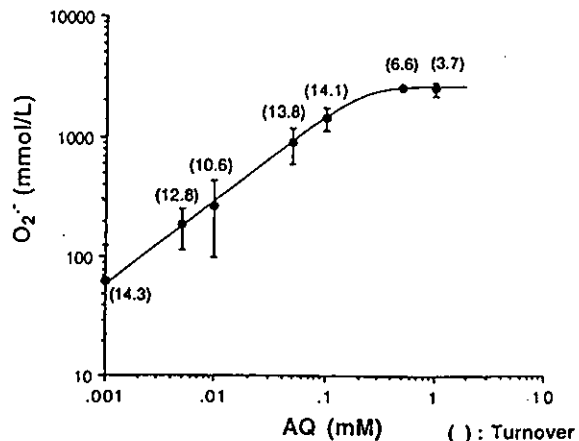


Fig. 5 Effect of anthraquinone concentration on the catalysing formation of superoxide. Each point represents the mean value of three runs, and the error bars indicate the standard deviation. Turnover numbers are given in parentheses for each concentration

その結果、 $0.001 \text{ mM} \sim 0.1 \text{ mM}$ の濃度範囲ではスーパーオキシドの生成量は化合物濃度に比例し一定のターンオーバー数によってスーパーオキシドの生成を触媒していることが示され、アントラキノンによる活性酸素の生成がこの濃度範囲で計測可能であることが明らかになった。

以上のようにPSCC法でアントラキノンのスーパーオキシド生成能を数値化することが可能になった。そこで、本法を用いて種々のキノン、および、キノンと同様にスーパーオキシドが発生することが指摘されているニトロアレーンのスーパーオキシド生成能を数値化して比較することとした。その結果をTable 1に示す。

$-1,000 \text{ mV}$  から  $-1,300 \text{ mV}$  に酸化電位 (Epa1) を有するキノンやニトロアレーンでは、アニオンラジカルから酸素への電子移動に伴う電気量の増加 ( $[\text{S}+\text{O}_2]$ )

Table 1 Chronocoulometric data for quinone and nitroarenes in the presence or absence of oxygen : Catalytic activity of quinone and nitroarene anion radical for superoxide generation

compounds	Epc1 <sup>a</sup> (mV vs. Ag/Ag <sup>+</sup> )	[S] <sup>b</sup> ( $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )	[S + O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> ( $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )	[O <sub>2</sub> ] <sup>b</sup> ( $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$ )	Amount of O <sub>2</sub> <sup>-•c</sup> (mmol dm <sup>-3</sup> )	Turnover number <sup>d</sup>
<b>QUINONE</b>						
benzoquinone	- 812	0.022	0.027	0.006	1	0
1,4-naphthoquinone	- 981	0.019	0.037	0.017	3	0
1-OH-anthraquinone	- 1052	0.018	0.048	0.030	9	0.1
menadione	- 1071	0.018	0.060	0.035	46	0.5
1-Cl-anthraquinone	- 1166	0.020	0.389	0.225	786	7.3
anthraquinone	- 1216	0.018	0.755	0.480	1400	14.1
5,12-naphthacene-quinone	- 1319	0.019	1.667	1.087	3060	29.7
<b>NITROARENE</b>						
4-NO <sub>2</sub> -quinoline <i>N</i> -oxide	- 1012	0.017	0.041	0.015	43	0.5
1,3-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	- 1095	0.018	0.079	0.048	70	0.7
1,7-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	- 1134	0.019	0.198	0.107	395	3.9
3-NO <sub>2</sub> -fluoranthene	- 1204	0.019	0.521	0.378	675	6.5
<i>m</i> -diNO <sub>2</sub> -benzene	- 1227	0.018	0.560	0.400	773	7.8
1,6-diNO <sub>2</sub> -naphthalene	- 1248	0.019	0.738	0.550	928	9.2
1-NO <sub>2</sub> -pyrene	- 1325	0.018	1.394	1.086	1580	16.2

<sup>a</sup> Applied potential for PSCC experiment.

<sup>b</sup> The potentials were stepped from 0 mV to Epc1 of compounds. The integrations of current were measured for 250 ms with 0.1 mM substrate under argon [S], 0.1 mM substrate under saturated O<sub>2</sub> [S + O<sub>2</sub>] or saturated O<sub>2</sub> [O<sub>2</sub>] in DMF (1 mL) containing 0.1 mmol dm<sup>-3</sup>

<sup>c</sup> TEAP at a Pt electrode (diam. 1.6 mm), and the diffusional slopes of a linear plot (charge vs  $t^{1/2}$ ; Anson plot) were obtained. All values were subtracted by [DMF] as background. The concentration and diffusion coefficient of saturated O<sub>2</sub> in DMF are 4.5 mmol dm<sup>-3</sup> and 4.7 × 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/s.

<sup>d</sup> Amounts of generated superoxide = [S + O] - ([S] + [O]) × 5.45 × 1000

<sup>e</sup> Turnover numbers of redox cycling = ([S + O] - ([S] + [O]))/[S]

> [S] + [O<sub>2</sub>]) が見られ、キノンやニトロアレーンによってスーパーオキシドが触媒的に発生していることが示された。特に、Epa1 が小さい化合物ほどスーパーオキシドを発生しやすく、Epa1 が酸素分子の Epc1 (-1,437 mV) に近いとき触媒作用が最も強くなり効率良くスーパーオキシドが発生した。一方、Epa1 が -1,000 mV よりも大きい化合物では、アニオンラジカルから酸素分子への電子移動は起きない、すなわち、スーパーオキシドが発生しないことが明らかになった。キノン類の中では、5,12-ナフタセンキノンが最もよくスーパーオキシドを発生しターンオーバー数は 16.2 であった。また、同様の実験をニトロアレーン類についても行った結果、同程度の Epa1 を持つニトロアレーンでは、スーパーオキシド発生能はキノンの約 60% であることがわかった。

## 2. ニトロアレーン類の活性酸素毒性の解析

前項でも触れたがニトロアレーンの毒性発現には、従来から報告されているヒドロキシルアミン経由の毒性発現機構に加えて、活性酸素が関与する毒性発現が関与することが指摘されている。環境汚染物質である 1-ニトロピレンはヒトに対する発ガン性が IARC により possibly carcinogenic (Group B) に分類されるが、実際、前項で求めた 1-ニトロピレンのスーパーオキシド発生能はアントラキノンに匹敵する。特に、1-ニトロピレンの還元代謝物である 1-ニトロソピレンは、1-ニトロピレンよりも強力な発ガン性を有する。そこで、不安定中間体である 1-ニトロソピレンを合成し、その活性酸素毒性を DNA 損傷を指標にして調べた。<sup>32</sup>P でラベルした DNA を用いて 1-ニトロソピレンに



Piperidine	+	+	+	+	+	+	+	-
Cu(II) (20 $\mu$ M)	-	+	-	+	+	+	+	+
NADH (100 $\mu$ M)	-	-	+	+	+	+	+	+
1-NOP ( $\mu$ M)	0	2	2	0	0.5	1	2	2

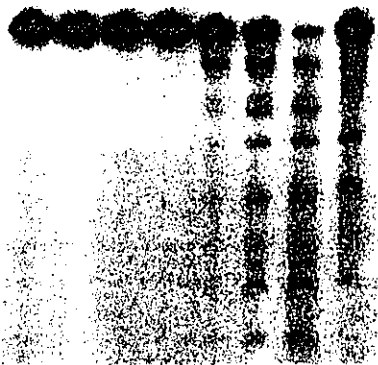


Fig. 6 Autoradiogram of  $^{32}$ P-labeled DNA fragment incubated with 1-NOP in the presence of NADH and Cu(II). The reaction mixture contained  $^{32}$ P-5'-end-labeled 211-bp DNA fragment, 50  $\mu$ M per base of calf thymus DNA, the indicated concentrations of 1-NOP, 2% (v/v) DMSO, 100  $\mu$ M NADH, and 20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> in phosphate buffer (pH 7.8). The reaction was incubated at 37°C for 1 h, followed by piperidine treatment, as described under Materials and Methods. The DNA fragments were electrophoresed on an 8% polyacrylamide/8 M urea gel and an autoradiogram was obtained by exposing an X-ray film to the gel.

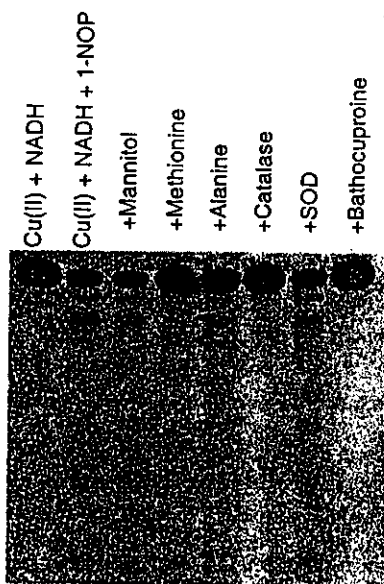


Fig. 7 Effects of scavengers and bathocuproine on DNA damage induced by 1-NOP in the presence of NADH and Cu(II). The reaction mixture contained  $^{32}$ P-5'-end-labeled 118-bp DNA fragment, 50  $\mu$ M per base of calf thymus DNA, 1.5  $\mu$ M 1-NOP, 2% (v/v) DMSO and 20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> in phosphate buffer (pH 7.8). The reaction was incubated at 37°C for 1 h, followed by a piperidine treatment. The DNA fragments were analyzed as described in the legend to Fig. 1. The concentrations of scavengers and bathocuproine were as follows: 0.1 M mannitol; 500  $\mu$ M methionine; 500  $\mu$ M alanine; 30 units of catalase; 30 units of SOD; 50  $\mu$ M bathocuproine.

よる DNA 切断作用を調べた結果を Fig.6 に示す。その結果、還元剤である NADH と銅イオン存在下において、DNA の切断が観察された。

次に、活性種を明らかにするために種々の消去剤を用いて DNA 切断実験を行った。水酸ラジカル消去剤であるマンニトールは DNA 切断を阻害しなかった。一価の銅イオン Cu (I) の補足剤であるバソクプロリンおよび過酸化水素の消去剤であるカタラーゼは、DNA 切断を有意に減少させることがわかった。これらの結果は、DNA 損傷に過酸化水素と Cu (I) が関与していることを示す (Fig.7)。

次に、1-ニトロソピレン-NADH-Cu (I) 系における DNA 損傷の核酸塩基選択性を調べた。その結果、酸化傷害の指標となる 8-oxodG の生成が 1-ニトロソピレンの濃度に依存して増大していることがわかった (Fig. 8)

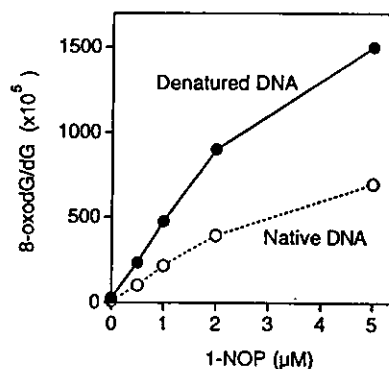


Fig. 8. Formation of 8-oxodG by 1-NOP in the presence of NADH and Cu(II). Calf thymus DNA (50  $\mu$ M per base) was incubated with the indicated concentrations of 1-NOP, 100  $\mu$ M NADH and 20  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub> for 1 h at 37°C. After ethanol precipitation, DNA was enzymatically digested to individual nucleosides, and 8-oxodG content was measured by HPLC-ECD as described under Materials and Methods. Open circles indicate native DNA, and closed circles indicate denatured DNA.

これらの結果は、1-ニトロソピレンの毒性発現に 1-ニトロソピレンが還元的に代謝されて生成する 1-ニトロソピレンによる活性酸素種の生成が関与している可能性を

示す。

1-ニトロソピレンによる活性酸素生成が関与する毒性は、還元剤 (NADH) と Cu (I) の存在下1-ニトロソピレンのレドックスによってスーパーオキシドが生成し、ついで、スーパーオキシドが過酸化水素に不均化し Cu (I) の関与によって DNA を損傷すると考えられる。

### 3. 電子欠損型の光増感化合物 C<sub>60</sub> フラーレンから発生する活性酸素種の解析

昨年度から引き続き、電子欠損型の光増感化合物 C<sub>60</sub> フラーレンから発生する活性酸素種の解析を行っている。昨年度は、DEPMPO をスピン補足剤として用いる EPR 検出法がスーパーオキシドの検出と定量に非常に有用であることを報告した。また、それを用いて C<sub>60</sub> フラーレンから発生する活性酸素種の解析実験を行い、C<sub>60</sub> フラーレンは、還元剤存在下の光照射で Type I 光増感電子移動反応によりスーパーオキシドを発生し、それが DNA 切断などの活性酸素毒性を引き起こしていること

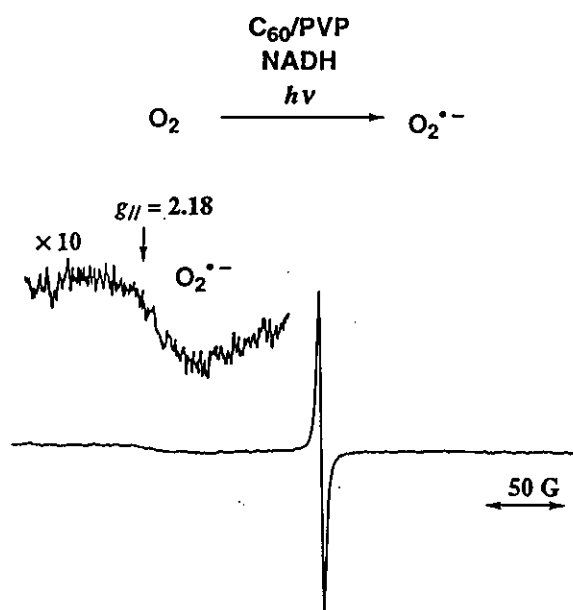


Fig. 9. X-band EPR Spectra of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> Generated by Visible Light Irradiation of an Aqueous Solution (50 mM Phosphate Buffer, pH 7.4) of C<sub>60</sub> (1.5 × 10<sup>-4</sup> M) and NADH (1.5 × 10<sup>-4</sup> M) Containing 5% PVP in the Presence of O<sub>2</sub> at 77 K

を証明した。

本年度は、昨年度に DEPMPO をスピン補足剤として用いる EPR 検出法で検出したスーパーオキシドを低温 EPR 測定により直接検出する事に成功し (Fig. 9), スーパーオキシドの生成を実証するに至った。

### C. 結論, 考察

本年度は、活性酸素種を発生する化学物質としてキノン類, ニトロアレーン類, C<sub>60</sub> フラーレンなどを用いて研究を行った。その結果, ①電気化学的測定法 (CV 法, DPV 法, PSCC 法など) を用いることにより, キノン類, ニトロアレーン類のスーパーオキシド発生能を定量的に評価し比較できること, ②ニトロアレーン類として1-ニトロピレンを用いた研究で, 銅イオン存在下ヒドロキシルラジカルが関与する DNA 損傷が起きること, ③昨年度から引き続き行っている C<sub>60</sub> フラーレンを用いた研究で, 光照射下 C<sub>60</sub> フラーレンがスーパーオキシドを発生することを直接証明した。これらの知見は, 化学物質の活性酸素発生能 (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) を研究するための一般的方法論を提示するものであり, 広く環境中の化学物質の活性酸素毒性の評価に活用できる。

現在継続中の研究として, ①化学物質からの活性酸素種 NO の発生, ②1-ニトロソピレンの場合に観察されたような活性酸素毒性における金属イオンの関与, ③化学物質の存在環境 (溶媒の極性やプロトン和) が活性酸素発生に及ぼす影響, がある。これらの研究についても着実に成果をあげており, 最終年度にまとめて報告する。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Active Oxygen Species Responsible for the Biological Action of Photoexcited Fullerenes, Naoki Miyata, Yoko Yamakoshi, Shoko Sueyoshi, Toshiki Masumizu, Masahiro Kohno, Akemi Ryu, Kumi Arakane, Naoki Umezawa, and Tetsuo Nagano, *Magnetic Resonance in Medicine*, **11**, 9-12, (2000).
- 2) 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).
- 3) Superoxide Generation in C60-Photosensitized oxidation of NADH and an Analogue by Oxygen, Ikuo Nakanishi, Yoko Yamakoshi, Kei Ohkubo, Shunsuke Fujita, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito, Shunichi Fukuzumi and Naoki Miyata, in *Fullerenes: Recent Advances in the Chemistry and Physics of Fullerenes and Related Materials*, Volume 8, eds K. M. Kadish and R. S. Ruoff, The Electrochemical Society, Pennington, pp.242-255 (2000).
- 4) Hydroxylation of Nitrated naphthalenes with KO<sub>2</sub>/Crown Ether, Kiyoshi Fukuhara, Yukie Hara, Ikuo Nakanishi, and Naoki Miyata, *Chem. Pharm. Bull.*, **48(10)**, 1532-1535 (2000).
- 5) Reactive Species responsible for Biological Actions of Photoexcited Fullerenes, (in Japanese), Naoki Miyata, Yoko Yamakoshi, and Ikuo Nakanishi, *Yakugaku Zasshi*, **120(10)** 1007-1016 (2000).
- 6) Electrochemical studies of quinone and nitroarene in generation and quenching of superoxide, Kiyoshi Fukuhara and Naoki Miyata, *Environ. mutagen Res.*, **22**, 155-162 (2000).
- 7) Nitric Oxide Donor, Masayuki Tanno, Shoko Sueyoshi and Naoki Miyata, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **118**, 21-36 (2000).
- 8) 光励起フラレーンの生物作用発現に關与する酸化活性種の解析, 宮田直樹, 山越葉子, 末吉祥子, 増水章季, 河野雅弘, 笠 明美, 荒金久美, 梅沢直樹, 長野哲雄, *磁気共鳴と医学*, **11**, 9-12 (2000).
- 9) NOドナー, 丹野雅幸, 宮田直樹, 生体内一酸化窒素 (NO) 実験プロトコール, p.26-33,

(2000).

10) Oxidative DNA Damage by a Metabolite of Carcinogenic 1-Nitropyrene, Shiho Ohnishi, Mariko Murata, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata and Shosuke Kawanishi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **280**, 48-52 (2001).

11) DNA Cleavage via Superoxide Anion Formed in Photoinduced Electron Transfer from NADH to gamma-Cyclodextrin-Bicapped C60 in an Oxygen-Saturated Aqueous Solution, Ikuo Nakanishi, Shunichi Fukuzumi, Toshifumi Konishi, Kei Ohkubo, Mamoru Fujitsuka, Osamu Ito and Naoki Miyata, *J. Am. Chem. Soc.*, submitted

### 2. 学会発表 (国際学会での発表のみを掲載した)

- 1) Photoexcited fullerene effectively generates oxy radicals in the physiological conditions to cause DNA-damages, Miyata, N., Yamakoshi, Y. *The 2nd Seminar on Science and Technology : Fullerenes*, Jan. 11-12, 2000, Okazaki, Japan.
- 2) Mechanistic Evidences for the Generation of Superoxide and Hydroxyl Radical by an Aqueous Fullerene/hv/O<sub>2</sub>/ Reductant System, Miyata, N., Yamakoshi, Y., Nakanishi, I., Fukuhara, K. *The 197th Meeting of The Electrochemical Society*, May 14-18, 2000, Toronto, Canada.
- 3) Predominant Generation of Reduced Oxygen Species in the Photochemical Reaction of C60 with Reductants in Non-Aqueous Polar Solvents, Nakanishi, I., Yamakoshi, Y., Miyata, N. *The 197th Meeting of The Electrochemical Society*, May 14-18, 2000, Toronto, Canada.
- 4) Direct observation of the ESR spectrum of superoxide anion in an aqueous C60/PVP/NADH/O<sub>2</sub> system under irradiation, Naoki Miyata, Ikuo Nakanishi, Yoko Yamakoshi, Kei Ohkubo, Shunichi Fukuzumi, *10th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International*, Oct. 16-20, 2000, Kyoto, Japan.
- 5) Nitric oxide generation from 6-nitrobenzo[a]pyrene and its DNA-cleaving activity under photoirradiation, Kiyoshi Fukuhara, Masaaki Kurihara and Naoki Miyata, *10th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International*, Oct. 16-20, 2000, Kyoto, Japan.
- 6) Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene in an aqueous media, Naoki Miyata, *Footes*

*Symposium, Pacifichem 2000, Dec. 14-19, 2000, Honolulu, USA.*

7) O<sub>2</sub> Generation in C<sub>60</sub>-photosensitized Oxidation of NADH and analogs by Oxygen, Ikuo Nakanishi, Yoko Yamakoshi, K. ohkubo, S. Fukuzumi, Naoki Miyata, *Pacifichem 2000, Dec. 14-19, 2000, Honolulu, USA.*

8) Evaluation of extended-releasing NO ability of aromatic N-nitrosoamines, Masayuki Tanno, Shoko Sueyoshi, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, *Pacifichem 2000, Dec. 14-19, 2000, Honolulu, USA.*

9) NO generation of N-hydroxy-L-arginine analogs in oxidative conditions, Shoko Sueyoshi, Masayuki Tanno, Naoki Miyata, *Pacifichem 2000, Dec. 14-19, 2000, Honolulu, USA.*

10) Electron Transfer from Photochemically Reduced C<sub>60</sub> (gamma-cyclodextrin-bicapped C<sub>60</sub>) to Molecular Oxygen. Naoki Miyata and Ikuo Nakanishi, *The 4th Taiwan-Japan Cooperative Meeting of Fullerene Science and Technology, Sec. 21-23, 2000, Miaoli, Taiwan.*

11) DNA cleavage via electron transfer from NADH to molecular Oxygen Photosensitized by gamma-cyclodextrin-bicapped C<sub>60</sub>, I. Nakanishi, T. Konishi, K. ohkubo, M. Fujitsuka, O. Ito, S. Fukuzumi, N. Miyata, *The 199th Meeting of The Electrochemical Society, March 25-30, Washington D.C., USA.*

## E. 知的所有権の取得状況

なし