

# 分担研究報告書（平成 12 年度）

## －活性酸素種の定量法の開発－

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** ヒドロキシルラジカルは代表的活性酸素種であり、毒性の発現を含めその生理機能が注目されている。今回本研究者らはこの活性酸素種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 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あたっ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た。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。

### ヒドロキシルラジカル蛍光プローブの開発

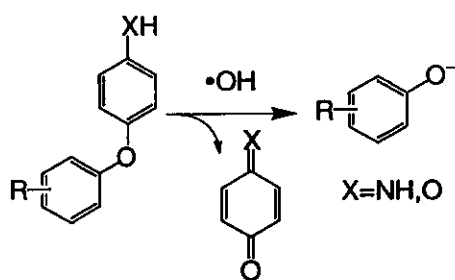
#### A 研究目的

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、生体内での 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り、このため生体における ROS の作用機序に関する議論が百出している状態にある。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 ( $\cdot\text{OH}$ ) 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。

#### B 方法、結果

##### (i) ヒドロキシルラジカル検出原理の開発

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、 $\cdot\text{OH}$  と特異的に反応し、蛍光の OFF/ON を制御する反応として、アリル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 (Scheme 1)。この反応には強い酸化力が必要であり、過酸化水素では進行せず、より強い酸化力を持った  $\cdot\text{OH}$  等でなければ進行しないことが我々によって明らかにされてきた。従って、*ipso* 置換反応を  $\cdot\text{OH}$  検出のためのスイッチとして用いることにより、 $\cdot\text{OH}$  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。

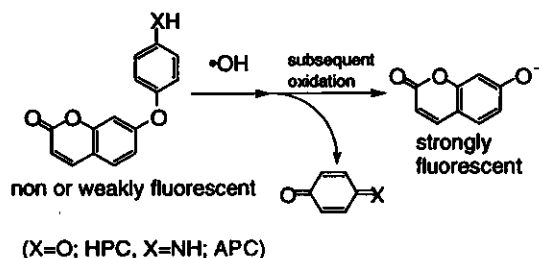


Scheme 1. *ipso*置換反応の模式図

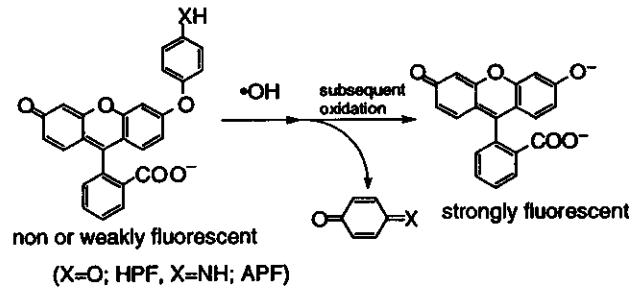
蛍光団としては、水系で大きな量子収率を持つ 7-ヒドロキシクマリン、フルオレセインを利用することを考えた。そこでまず、7-ヒドロキシクマリンの 7-位の水酸基、フルオレセインの 6'-位の水酸基に種々の置換基を有するフェニル基を導入した化合物群を合成し、その蛍光特性を調べた。その結果、電子供与性基で置換した電子密度の高いフェニル基を蛍光団の水酸基に導入することにより 7-ヒドロキシクマリン誘導体、フルオレセイン誘導体の蛍光量子収率を大幅に低下させ、OFF 状態をつくり出すことに成功した。

#### (ii) 新規ヒドロキシラジカル特異的蛍光プローブのデザイン、合成

上記の結果を踏まえて、新規ヒドロキシラジカル特異的蛍光プローブ HPC、APC、HPF、APF をデザイン、合成した (Scheme 2, 3)。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  $\cdot\text{OH}$  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  $\cdot\text{OH}$  のみを蛍光として検出可能であると考えた (Scheme 2, 3)。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。



Scheme 2. HPC、APCの $\cdot\text{OH}$ 検出原理



Scheme 3. HPF、APFの・OH検出原理

### (iii) 新規ヒドロキシラジカル特異的蛍光プローブの特性

検討の結果、予想通り HPC、APC は全く蛍光を持たず、また・OH 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、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、・OH 生成系として Fenton 反応を用いて、HPF、APF と・OH 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・OH 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 (Figure 1)。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・OH を定量的に検出できることも明らかとなった。

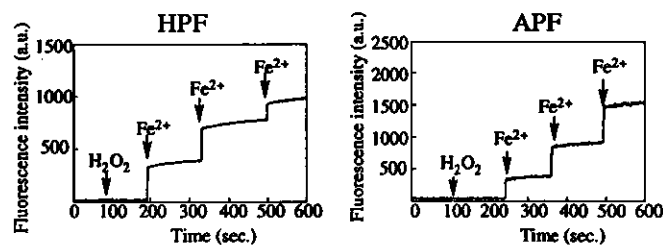


Figure 1. HPF、APFと・OHの反応の蛍光強度の経時変化

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 (Table 1)。DCFH が・OH 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、・OH 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。

Table 1. 各ROSと蛍光プローブの反応前後での蛍光増加

ROS	HPF	APF	DCFH
•OH	730	1200	7400
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	8	6	67
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	<1	190
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	5	9	26
NO	6	<1	150
ROO•	17	2	710
autoxidation	<1	<1	2000

### C 考察

以上、HPF、APFは既存のROS検出蛍光プローブが抱えていた二つの大きな問題を克服しており、極めて有用性が高い蛍光プローブであることが明らかになった。今後、HPF、APFを生体系に応用しその有用性を検討する予定である。

### D 研究発表

- "Rational Design of Fluorescein-based Fluorescence Probes. -Mechanism-based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen-" Kumi Tanaka, Tetsuo Miura, Naoki Umezawa, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, in press.
- "Selective Inhibition of Human Inducible Nitric Oxide Synthase by S-alkyl-L-isothiocitrulline-containing Dipeptides" Jung-Min Park, Tsunehiko Higuchi, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Hiroyuki Hori, Takeshi Nishino, Junken Aoki, Keizo Inoue and Tetsuo Nagano, *British Journal of Pharmacology*, in press.
- "Small Molecule-based Laser Inactivation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor" Takanari Inoue, Kazuya Kikuchi, Kenzo Hirose, Masamitsu Iino and Tetsuo Nagano, *Chemistry and Biology*, in press.
- "Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer System with Coumarin Donor Included in beta-Cyclodextrin" Hideo Takakusa, Kazuya Kikuchi, Yasuturu Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Anal. Chem.*, in press.
- "Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on Rhodamine Chromophore" Hirotatsu Kojima, Miki Hirotani, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Yasuteru

Urano, Tsunehiko Higuchi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, **Anal. Chem.**, in press.

• "Visualization of Oxygen Concentration-dependent Production of Nitric Oxide in Rat Hippocampal Slices during Aglycemia" Hirotatsu Kojima, Mihoko Hirata, Yoshihisa Kudo, Kazuya Kikuchi and Tetsuo Nagano, **J. Neurochem.**, in press.

• "Highly Zinc-Selective Fluorescent sensor Molecules Suitable for Biological Applications" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 122, 12399-12400 (2000).

• "First Synthetic NO-heme-thiolate Complex Relevant to Nitric Oxide Synthase and Cytochrome P450<sub>nor</sub>" Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Takeshi Uchida, Masahiro Mukai, Teizo Kitagawa and Tetsuo Nagano, **J. Am. Chem. Soc.**, 122, 12059-12062 (2000).

• "Fluorescence Switching by O-dearylation of 7-Aryloxycoumarines. -Development of Novel Fluorescence Probes to Detect Reactive Oxygen Species with High Selectivity-" Ken-ichi Setsukinai, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **J. Chem. Soc. Perkin Transaction 2**, (2000) 2453-2457.

• "Development of Time-resolved Fluorometric Detection System Using Diffusion-enhanced Energy Transfer" Mitsunori Koresawa, Kazuya Kikuchi, Shin Mizukami, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Anal. Chem.**, 72, 4904-4907 (2000).

• "Design and Synthesis of Intramolecular Resonance Energy Transfer Probes for Use in Aqueous Solution" Yasutomo Kawanishi, Kazuya Kikuchi, Hideo Takakusa, Shin Mizukami, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Angew. Chem., Int. Ed.**, 39, 3438-3440 (2000).

• "Novel Zinc Fluorescent Probes Excitable with Visible Light for Biological Applications" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Angew. Chem., Int. Ed.**, 39, 1052-1054 (2000).

• "A New Thioether-ligated Iron Porphyrin as a Model of a Protonated Form of P450 Active Site" Takashi Dokoh, Noriyuki Suzuki, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi and Tetsuo Nagano, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 82, 127-132 (2000).

- "Fluorescent Indicators for Nitric Oxide Based on Rhodamine Chromophore" Hirotsu Kojima, Miki Hirotsu, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Tetrahedron Lett.**, 41, 69-72 (2000).
- "Remarkable Axial Thiolate Ligand Effects on the Oxidation of Hydrocarbons by Active Intermediate of Iron Porphyrin and Cytochrome P450" Tomoe Ohno, Noriyuki Suzuki, Takashi Dokoh, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Masaaki Hirobe, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 82, 123-125 (2000).
- "Determination and Bioimaging Method for Nitric Oxide in Biological Specimens by Diaminofluorescein Fluorometry" Yoshinori Itoh, Fu Hai Ma, Hanae Hoshi, Michiko Oka, Kumiko Noda, Yojiro Ukai, Hirotsu Kojima, Tetsuo Nagano and Noboru Toda, **Anal. Biochem.**, 287, 203-209 (2000).
- "Fluorescent Indicators for Nitric Oxide" Hirotsu Kojima and Tetsuo Nagano, **Advanced Materials**, 12, 763-765(2000).
- "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.**, 611, 586-592 (2000).
- "Superoxide Dismutase Activity of Iron(II)TPEN Complex and Its Derivatives" Masakazu Tamura, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, **Chem. Pharm. Bull.**, 48, 1514-1518 (2000).
- "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).
- "Effects of Tetrahydrobiopterin on Endothelial Dysfunction in Rats with Ischemic Acute Renal Failure" Masao Kakoki, Yasunobu Hirata, Hiroshi Hayakawa, Etsu Suzuki, Daisuke Nagata, Akihiro Tojo, Hiroaki Nishimatsu, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano and Masao Omata, **J. Am. Soc. Nephrol.**, 11, 301-309 (2000).
- "Synthesis of Various Water-Soluble C60 Derivatives and Their Superoxide-Quenching Activity" Kensuke Okuda, Takashi Hirota, Masaaki Hirobe, Tetsuo Nagano, Masataka Mochizuki and Tadahiko Mashino, **Fullerene Science and Technology**, 8, 89-104 (2000).

• "Adrenomedullin and Nitric Oxide Inhibit Human Endothelial Cell Apoptosis via a Cyclic GMP-Independent Mechanism" Masataka Sata, Masao Kakoki, Daisuke Nagata, Hiroaki Nishimatsu, Etsu Suzuki, Teruhiko Aoyagi, Seiryu Sugiura, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Kenji Kangawa, Hisayuki Matsuo, Masao Omata, Ryozo Nagai and Yasunobu Hirata, **Hypertension**, 36, 83-88 (2000).

## 研究要旨

ヒドロキシルラジカル（水酸ラジカル）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った。テレフタル酸は蛍光性を有しない化合物であるが、これが水酸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水酸ラジカルのHPLCによる定量法を検討した。1) ヒドロキシル体の蛍光特性、2) HPLC分離条件の検討、3) 水酸化反応における水酸ラジカルとの反応の選択性、4) 反応のpH依存性、などについて検討し、テレフタル酸の水酸化反応を利用した水酸ラジカルのHPLC-蛍光検出法が有効であることを見出した。また、この研究の途上で、二価の鉄の水溶液とテレフタル酸の溶液を混合するだけで、ヒドロキシル体が生ずることを見出した。

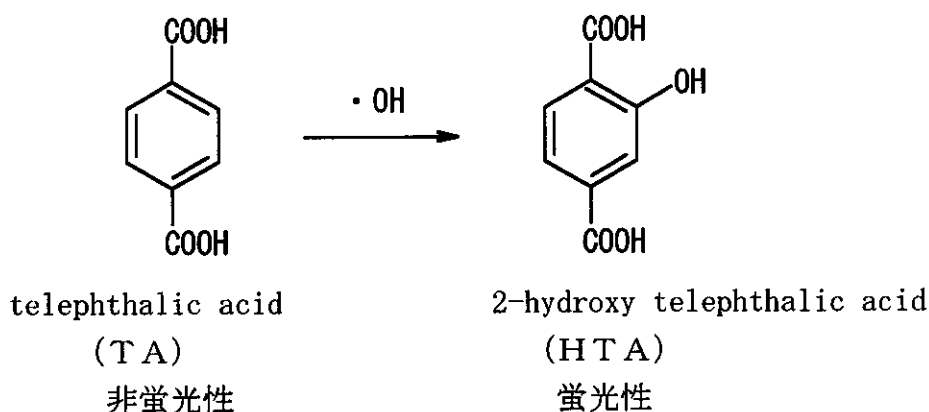


図-1 テレフタル酸による水酸ラジカルの捕捉

## A. 研究目的

HPLC法による水酸ラジカルの新しい定量法を開発する。

## B. 研究方法

1) テレフタル酸によるOHラジカルのHPLCによる定量法の検討

テレフタル酸（TA）は次のような利点をもつ。

- 1 > 対称性がよく、モノ水酸化で単一の生成物（HTA）を与える。
- 2 > TA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する成分とは考えられない。



4>従来HPLC法による水酸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。

そこで、本年度はTAを利用したHPLCによる水酸ラジカルの定量法の開発を検討した。

#### 2-ヒドロキシテレフタル酸の合成>

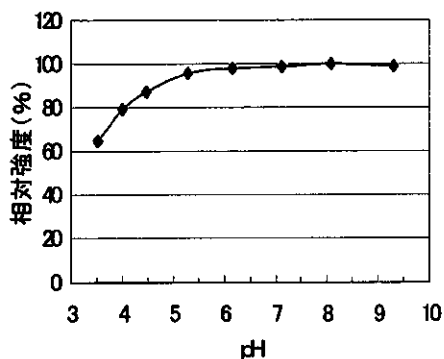
水酸化体の標品となる2-ヒドロキシテレフタル酸 (HTA) は、2-ブロモテレフタル酸から報文[1]に従い、合成した。

[1] L. Field and P.R. Engelhardt, J. Org. Chem., 35, 3647-3655 (1970).

#### HTAの蛍光特性>

合成したHTAの蛍光のpH依存性を調べたところ、pH4.5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。

図2 2-ヒドロキシテレフタル酸の蛍光強度のpH依存性



励起波長 309nm, 蛍光波長 420nm, 200mM リン酸緩衝液, 日本分光FP-750で測定。

#### HPLC条件>

カラムはODS (4.6mmφ×25cm) を使用し、溶離液として、200mMリン酸2水素カリウム-2%KCl水溶液を用い、流速1ml/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 (Ex309nm, Em420nm, 日本分光FP-1520S) とUV検出器 (285nm, 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20μlである。

#### HPLC溶離液の検討>

1) 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ことが明かとなった。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200mMのリン2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pH4.37で、蛍光強度はpH5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、感度が若干向上できるであろう。

添加する塩としてKClを用いた場合、ハロゲンイオンによる消光が懸念されたが、これは硫酸ナトリウム、あるいは硫酸アンモニウムを添加した場合と差はなく、分離度がずっとよいの

で、KClを加えるのがよい。

表1 添加する塩の影響

	HTA		TA		$\alpha$	$R_s$
	$R_t$	$k$	$R_t$	$k$		
KCl	11.13	4.56	12.98	5.49	1.20	2.18
$(NH_4)_2SO_4$	14.74	6.37	16.02	7.01	1.10	1.51
$Na_2SO_4$	10.16	4.08	10.61	4.31	1.06	1.06

試料 TA, HTA 各20 $\mu$ M

2) TAと鉄(II)によってTAの水酸化反応がおこることについて

当初、Fenton 反応により水酸ラジカルを発生させ、これをテレフタル酸で定量しようとしたが、よい定量性が得られなかった。その原因について検討したところ、テレフタル酸水溶液と鉄の溶液とを混合するだけでテレフタル酸の水酸化反応が起こることを見出した(図-3)。

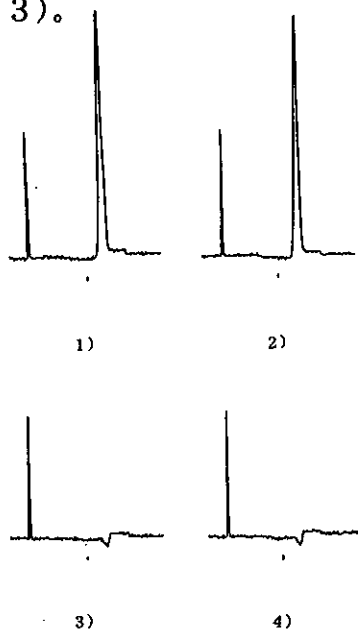


図-3 過酸化水素を添加しなくても Fe(II)とTAとでHTAの生成が見られた(右上)。

- 1) Fenton系:リン酸緩衝液(pH7.4, 10 $\mu$ l) + 10mM Fe(II)(10 $\mu$ l) + 50mMTA(170 $\mu$ l) + 10mM H2O2(10 $\mu$ l)  
 2) = 1) -H2O2, 3) = 1) -Fe, 4): TA+buffer

テレフタル酸の水酸ラジカルに対する反応の選択性>

この反応が水酸ラジカルによって引き起こされることを確認する目的で、HPLCならびにESRによる実験を行った。

1. ESRでの検討>

DMP Oをスピントラップ剤として用い、Fenton 反応において、TAがDMP Oと競合的に水酸ラジカルと反応する様子をESRで観察した結果、ならびに、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼにより生成するスーパーオキシドアニオンラジカルとの競合の結果を図-4、5に示す。

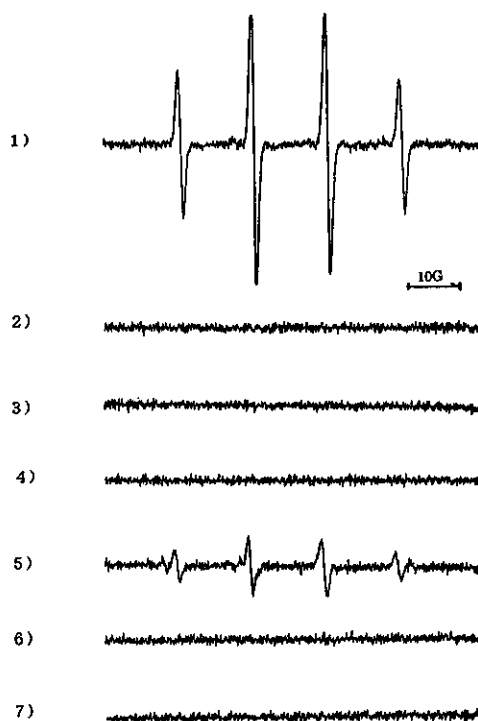


図-4 1) Fenton系:図-3と同じ 2) Fe(-) 3) H2O2(-) 4) Fe & H2O2(-) 5) ~7)は緩衝液のかわりに5mMTAを添加。5) TA存在下のFenton系 6) Fe(-) 7) H2O2(-)

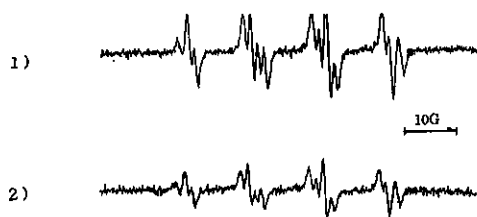


図-5 DMPO の ESR シグナル。

- 1) 4.25mM DMPO, 2mM ヒポキサンチン (50  $\mu$ l), 0.1mMEDTA 2Na (30  $\mu$ l), 緩衝液 (pH7.4, 70  $\mu$ l), 0.5U/ml キサンチンオキシダーゼ (50  $\mu$ l)  
 2) 1) containing 4.25mM TA

## 2. HPLCによる検討

HPLCによっても、スーパーオキシドアニオンラジカルとの反応性は低いことが確かめられた。

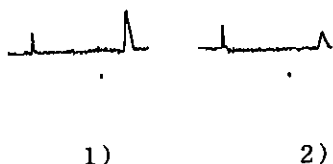
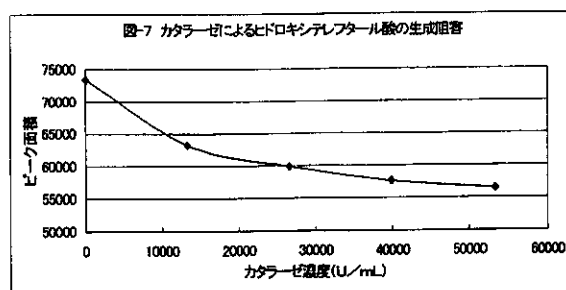


図-6 TA とスーパーオキシドとの反応

- 1) 4.25mM TA, 2mM ヒポキサンチン (50  $\mu$ l), 0.1mMEDTA 2Na (30  $\mu$ l), 緩衝液 (pH7.4, 70  $\mu$ l), 0.5U/ml キサンチンオキシダーゼ (50  $\mu$ l)  
 2) 1) in the absence of the enzyme

以上のことから、Fe (II) による TA の水酸化反応が水酸ラジカルによるものであることが推定された。その機構については、溶存酸素が Fe(II) により過酸化水素となり、Fenton 反応により水酸ラジカルを生じていると推察



し、これを証明する目的で、カタラーゼの添加により、HTA の生成が抑制されるかを HPLC により観察した。

また、DMSO を添加することにより、HTA の生成が完全に阻害されたことから、この反応は、溶存酸素と Fe (II) によって過酸化水素が生じ、それが Fenton 反応により水酸ラジカルとなったものを TA がトラップしたものと推定された。

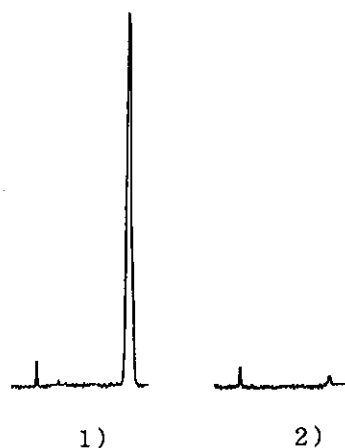


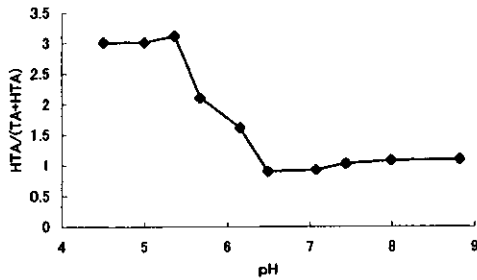
図-8 DMSO による HTA の生成阻害

- 1) TA+Fe, 2) TA+Fe+DMSO

## 反応の pH 依存性

TA の水酸ラジカルによる水酸化反応の pH 依存性を検討したところ、pH5.5 以下で速く、pH6.5 以上では遅いことが解った。

図-9 HTA生成率のpH依存性



## E. 結論

Fe (II) によって溶存酸素から過酸化水素が生じ、さらに Fenton 反応により、水酸ラジカルが発生することを見出した。

テレフタル酸の水酸化反応を利用して、蛍光検出による HPLC 定量法が確立できる見とおしが明かとなった。本法は、TA の対称性から、従来のサリチル酸を用いる HPLC 法を凌ぐ方法になると考える。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水酸ラジカルの発生を検出してゆく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

上記の研究内容は、2001年度に投稿予定である。以下に、2000年度にこれまで発表した論文を記載する。

- 1) Y. Abe, T. Shoji, K. Tahara, S. Sugata and H. Nishizawa, Practictical operation procedure for continuous dual-flow countercurrent extraction method Anal. Sci., 16, 181-182

(2000).

- 2) S. Yokoyama, Y. Abe and M. Abe, Preparation and physicochemical properties of new crystalline complexes composed of fatty acids and ethylenediamine. Materical Technology, 18, 48-52 (2000).

- 3) Y. Abe, T. shoji, M. Matsubara, M. Yoshida, S. Sugata, K. Iwata and H. Suzuki, Chiral discrimination of N-carbazole-carbonyl derivatives of  $\alpha$ -amino acids with short linear side chain by bovine serum albumin. Chirality, 12, 565-567 (2000).

- 4) S. Sugata and Y. Abe, An analogue column model for nonlinear isotherms: the diyble-glazed vessel model J. Chem. Software, 6, 127-136 (2000).

### 2. 学会発表

- 1) 阿部芳廣, 李林香, 工藤梨沙, 宮田直樹  
「Fe (II) によるテレフタル酸の水酸化反応について: 2-水酸化体の HPLC による蛍光検出  
日本薬学会第121年会 (札幌)

発表要旨集 p213、2001.3.

- 2) 北村繁幸、吉村友彦、神原幸子、  
神野敬將、阿部芳廣、太田茂  
「ラット in vivo におけるブロムワレ  
リル尿素のキラル選 択的代謝」  
日本薬物動態学会年会（福岡）  
薬物動態 15 卷 S 116-117 (2000).  
2000.10.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

2000749

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名，巻 号数，論文名）	刊行 年月 日	刊行書店名	執筆者氏名
1) <i>Environ. Mutagen Res.</i> , <b>22</b> , 155-162, Electrochemical studies of quinone and nitroarene in generation and quenching of superoxide.	2000	日本環境変 異原学会	K. Fukuhara and <u>N. Miyata</u>
2) <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> , <b>280</b> , 48-52, Oxidative DNA Damage by a Metabolite of Carcinogenic 1-Nitropyrene.	2001	Academic Press	S. Ohnishi, M. Murata, K. Fukuhara, <u>N. Miyata</u> and S. Kawanishi
3) <i>Fullerenes: Recent Advances in the Chemistry and Physics of Fullerenes and Related Materials</i> , Volume <b>8</b> , pp.242-255, Superoxide Generation in C60-Photosensitized oxidation of NADH and an Analogue by Oxygen.	2000	Pennington	I. Nakanishi, Y. Yamakoshi, K. Ohkubo, S. Fujita, M. Fujitsuka, O. Ito, S. Fukuzumi and <u>N. Miyata</u>

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名, 巻号数, 論文名)	刊行年月	刊行書店名	執筆者氏名
4) <i>Yakugaku Zasshi</i> , <b>120</b> (10) 1007-1016, Reactive Species responsible for Biological Actions of Photoexcited Fullerenes.	2000	日本薬学会	<u>N. Miyata</u> , Y. Yamakoshi, and I. Nakanishi
5) <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , <b>48</b> (10), 1532-1535, Hydroxylation of Nitrated naphthalenes with KO <sub>2</sub> /Crown Ether.	2000	日本薬学会	K. Fukuhara, Y. Hara, I. Nakanishi, and <u>N. Miyata</u>
6) <i>J. Chem. Soc. Perkin Transaction 2</i> , 2453-2457, Fluorescence Switching by O-dearylation of 7-Aryloxycoumarinés : Development of Novel Fluorescence Probes to Detect Reactive Oxygen Species with High Selectivity.	2000	The Royal Society of Chemistry	K. Setsukinai, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u>
7) <i>Advanced Materials</i> , <b>12</b> , 763-765, Fluorescent Indicators for Nitric Oxide.	2000	WILEY-VCH	H. Kojima and <u>T. Nagano</u>
8) <i>Anal. Biochem.</i> , <b>287</b> , 203-209, Determination and Bioimaging Method for Nitric Oxide in Biological Specimens by Diaminofluorescein Fluorometry.	2000	Academic Press	Y. Itoh, F.-H. Ma, H. Hoshi, M. Oka, K. Noda, Y. Ukai, H. Kojima, <u>T. Nagano</u> and N. Toda,
9) <i>Tetrahedron Lett.</i> , <b>41</b> , 69-72, Fluorescent Indicators for Nitric Oxide Based on Rhodamine Chromophore.	2000	Pergamon	H. Kojima, M. Hirotoni, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u>
10) <i>Anal. Chem.</i> , <b>72</b> , 4904-4907, Development of Time-resolved Fluorometric Detection System Using Diffusion-enhanced Energy Transfer.	2000	American Chemical Society	M. Koresawa, K. Kikuchi, S. Mizukami, H. Kojima, Y. Urano, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u>
11) <i>Angew. Chem., Int. Ed.</i> , <b>39</b> , 3438-3440, Design and Synthesis of Intramolecular Resonance Energy Transfer Probes for Use in Aqueous Solution.	2000	WILEY-VCH	Y. Kawanishi, K. Kikuchi, H. Takakusa, S. Mizukami, Y. Urano, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u>

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名, 巻号数, 論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
12) <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , <b>122</b> , 12399-12400, Highly Zinc-Selective Fluorescent sensor Molecules Suitable for Biological Applications.	2000	American Chemical Society	T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u> ,
13) <i>Chirality</i> , <b>12</b> , 565-567, Chiral discrimination of <i>N</i> -carbazole-carbonyl derivatives of $\alpha$ -amino acids with short linear side chain by bovine serum albumin.	2000	Wiley-Liss	<u>Y. Abe</u> , T. Shoji, M. Matsubara, M. Yoshida, S. Sugata, K. Iwata and H. Suzuki
14) <i>Material Technology</i> , <b>18</b> , 48-52, Preparation and physicochemical properties of new crystalline complexes composed of fatty acids and ethylenediamine.	2000	Society of Material Technology	S. Yokoyama, <u>Y. Abe</u> and M. Abe,
15) <i>J. Chem. Software</i> , <b>6</b> , 127-136, An analogue column model for nonlinear isotherms: the dyble-glazed vessel model.	2000	Society of Chemical Softwares	S. Sugata and <u>Y. Abe</u>