

200100951 A&B

(合冊)

厚生科学研究費補助金
生活安全 総合研究事業

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)

総合研究報告書
及び
平成13年度総括・分担研究報告書

主任研究者
名古屋市立大学大学院薬学研究科 宮田直樹

分担研究者
国立医薬品食品衛生研究所 福原 潔
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

平成14(2002)年3月31日

平成13年度総括・分担研究報告

厚生科学研究費補助金研究報告書

平成14年3月31日

厚生大臣 坂口 力 殿

住 所

研究者 フリガナ ミヤ タ ナオ キ
氏 名 宮 田 直 樹 
(所属施設 名古屋市立大学大学院薬学研究科)

平成13年度厚生科学研究費補助金（生活安全 総合研究事業）に係わる研究事業を完了したので次の通り報告する。

研究課題名（課題番号）： 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)

国庫補助金精算所要額： 金 13,300,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク
(別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金研究報告書目次 (別添3のとおり)
4. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添4のとおり)
5. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添5のとおり)
6. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別刷6のとおり)
(別刷は、研究報告書の最後に添付)
7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・取得状況 なし
8. 健康危機情報 なし

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=生活安全総合研究事業

研究課題名=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（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=13,300,000

研究期間（西暦）=1999-2001

研究年度（西暦）=2001

主任研究者名=宮田直樹（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

分担研究者名=福原 潔（国立医薬品食品衛生研究所）、長野哲雄（東京大学大学院薬学系研究科）、阿部芳廣（共立薬科大学）

研究目的=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。活性酸素種の健康影響は、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、一酸化窒素やナイトリックパーオキシド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種の一つであるヒドロキシルラジカルについて、化学物質からどのような条件で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。

研究方法=化学物質から発生する活性酸素種を定量的に評価することを目的として、発生する活性酸素種の解析、活性酸素種の新しい検出方法の開発、活性酸素種の新しい定量法の開発に関する研究を行った。1）化学物質から発生する活性酸素種の解析に関し

ては、フェノール構造を有する抗酸化剤カテキン類から、アルカリ性条件下で発生する活性酸素種を UV、ESR、および反応速度の測定することにより解析を試みた。同じくフェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールについては、すでに銅イオン存在下活性酸素種が発生することを明らかにしているが、染色体異常誘発試験を行い、活性酸素に由来する変異誘発が起きるかどうかを調べた。さらに、レスベラトロール誘導体を合成し構造と活性との相関を明らかにすることを試みた。環境汚染物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性についてはすでに化学的に予測し実証済みであるが、今回新たに光励起下での活性酸素種の発生について解析を行った。C₆₀ フラーレンの研究では、フルーレンからスーパーオキシドが発生することをすでに明らかにしているが、スーパーオキシドの生成速度の解析を試みた。キノン類については、NADH 存在下における活性酸素生成機構の解析を試みた。活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、本年度は、活性酸素の一つである一重項酸素に焦点をあてて研究を行い、一重項酸素を効率良く高感度で検出することができるようなプローブの設計と合成を試みた。活性酸素種の新しい定量法の開発に関しては、引き続き、ヒドロキシルラジカルの HPLC-蛍光検出法ならびに化学発光検出法による新しい定量法を確立するための研究を行った。

結果と考察=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、化学物質から発生する活性酸素種の解析に関しては、フェノール構造を有する抗酸化剤カテキン類から、活性酸素種のひとつスーパーオキシドが発生することを ESR を用いて実証するとともに生成反応速度の算出に成功した。同じくフェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールについては、今回はじめて、染色体異常誘発試験により変異誘発を確認することに成功し、さらにレスベラトロール誘導体については構造と活性との相関が明らかになった。環境汚染物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性については、今回新たに、ある種のニトロアレーン類はその構造に起因して光照射下で活性酸素種の一つ NO を発生することを明らかにした。C₆₀ フラーレンの研究では、フルーレンからの活性酸素種の生成速度と発生した活性酸素種による DNA 損傷を明らかにすることに成功した。キノン類については、NADH 存在下における活性酸素生成機構を解析し、NADH からキノンへの電子移動の結果生成するキノンラジカルアニオンと NAD ラジカルが活性酸素生成に関与していることを明らかにした。活性酸素の生成量がキノンの酸化還元特性と相関し一電子還元され易いキノンは活性酸素生成量が多く DNA 切断活性が高いことが示され、このような実験が、活性酸素毒性の定量評価に応用できることが示された。活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、一重項酸素をバイオイメーキングすることが可能なプローブ DPAX および DMAX の開発に成功した。一重項酸素は活性酸素種の一つであるが、特異な物性から他の活性酸素種とは明らかに異なる反応種である。特に生体内でこの一重項酸素が生成しているかについてはまだ議論のあるところで、この点から高感度一重項酸素検出蛍光プローブの開発が求められていたがその開発に成功した。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-蛍光検出法ならびに化学発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、テレフタル酸を利用した水酸ラジカルのHPLCによる定量法の確立に成功した。本法を用いて、Fenton 反応で生じる水酸ラジカルの定量を行ない、Fe (II) と過酸化水素とが化学量論的に 2 : 1 で反応することを確認した。また、2-ヒドロキシテレフタル酸は、化学発光検出法によっても検出可能であることがわかり、蛍光検出法よりもさらに高感度の検出ができる可能性も明らかになった。

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。

結論=化学物質から発生する活性酸素種の解析に関しては、フェノール構造を有する抗酸化剤カテキン類が、塩基性条件下スーパーオキシドを発生することを実証した。生体内でも同様な機構で抗酸化剤が活性酸素発生剤になりうることを示す。同じくフェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールについては、活性酸素種に起因する変異誘発を確認し、さらにレスベラトロール誘導体について構造と銅イオン存在下での活性との相関を明らかにした。金属イオンが活性酸素種発生に関与することは良く知られている。抗酸化剤においても金属イオンの関与により活性酸素種を発生することは、これらの化合物の活性酸素毒性を評価する際に重要な要素になる。環境汚染物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性についてはある種のニトロアレーン類がその構造に起因して光照射下でNOを発生することを明らかにした。今後は、ニトロアレーン類が活性酸素種NOを発生することによる生体作用を検討する必要がある。C₆₀ フラーレンの研究では、フルーレンが光照射によりスーパーオキシドを発生することから、その生物作用が注目される。キノン類については、還元剤 NADH 存在下における活性酸素種の発生にキノンラジカルアニオンと NAD ラジカルが関与していることが明らかになったが、NAD ラジカルが関与する活性酸素種発生は、今後より詳細に検討する必要がある。活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、一重項酸素をバイオイメーキングすることが可能な高感度一重項酸素検出蛍光プローブ DPAX および DMAX の開発に成功した。生体内で一重項酸素が生成しているかについてはまだ議論のあるところであり、この検出試薬の利用性は大きい。活性酸素種の新しい定量法の開発に関しては、今回開発した、テレフタル酸を利用するヒドロキシルラジカルのHPLC-蛍光検出法、ならびに、2-ヒドロキシテレフタル酸を利用したHPLC-化学発光検出法は、高感度で選択的な検出法であり、今後有用な分析手法になると期待できる。以上、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。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た。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。

厚生科学研究費補助金
生活安全 総合研究事業

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)

平成13年度総括・分担研究報告書

主任研究者
宮田直樹

分担研究者
福原 潔, 長野哲雄, 阿部芳廣

平成14(2002)年3月31日

目次

I. 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	宮田直樹
---------------------------	------

II. 分担研究報告書

1. 活性酸素種の解析と定量, 及び, 活性酸素毒性の総合評価	宮田直樹
2. キノン構造を有する化合物の活性酸素毒性の評価	福原 潔
3. 新規な高感度活性酸素種検出試薬の開発	長野哲雄
4. 活性酸素種の高感度定量的評価手法の開発	阿部芳廣

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授（現職）
国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長（旧職）

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行った。

平成 13 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、

①フェノール構造を有する抗酸化剤カテキン類から、活性酸素種のひとつスーパーオキシドが発生することを ESR を用いて実証するとともに生成反応速度を算出した。

②同じくフェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールについては、すでに銅イオン存在下活性酸素種が発生することを明らかにしているが、今回はじめて、染色体異常誘発試験により変異誘発を確認することに成功し、さらにレスベラトロール誘導体について構造と活性との相関を明らかにした。

③環境汚染物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性についてはすでに化学的に予測し実証していたが、今回新たに、ある種のニトロアレーン類はその構造因子に起因して光照射下で活性酸素種の一つ NO を発生することを明らかにした。

④前年度からひき続いて行っている C₆₀ フラーレンを用いた研究では、フルーレンからの活性酸素種の生成速度と発生した活性酸素種による DNA 損傷を明らかにすることに成功した。

⑤キノン類については、NADH 存在下における活性酸素生成機構を解析し、NADH

からキノンへの電子移動の結果生成するキノンラジカルアニオンと NAD ラジカルが活性酸素生成に関与していることを明らかにした。活性酸素の生成量がキノンの酸化還元特性と相関し一電子還元され易いキノンは活性酸素生成量が多く DNA 切断活性が高いことが示され、このような実験が、活性酸素毒性の定量評価に応用できる可能性が示された。

以上、担当、宮田、福原。

2) 活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、

今年度は、活性酸素の一つである一重項酸素に焦点をあてて研究を行い、一重項酸素をバイオイメーキングすることが可能なプローブ DPAX および DMAX の開発に成功した。一重項酸素は活性酸素種の一つであるが、特異な物性から他の活性酸素種とは明らかに異なる反応種である。特に生体内でこの一重項酸素が生成しているかについてはまだ議論のあるところで、この点から高感度一重項酸素検出蛍光プローブの開発が求められていたが、その開発に成功した。

以上、担当、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（水酸ラジカル）の HPLC-蛍光検出法ならびに化学発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、テレフタル酸を利用した水酸ラジカル HPLC による定量法の確立に成功した。本法を用いて、Fenton 反応で生じる水酸ラジカルの定量を行ない、Fe (II) と過酸化水素とが化学量論的に 2 : 1 で反応することを確認した。また、2-ヒドロキシテレフタル酸は、化学発光検出法によっても検出可能であることがわかり、蛍光検出法よりもさらに高感度の検出ができる可能性も明らかになった。

以上、担当、阿部。

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

名古屋市立大学大学院薬学研究科
教授

(旧職：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

共立薬科大学基礎実験薬学講座
教授

分担研究者

福原 潔

国立医薬品食品衛生研究所
有機化学部第一室長

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きた。本研究は、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に関する研究を行った。

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、福原)

①フラボノイドからの塩基性条件下での活性酸素発生の解析：

抗酸化剤として知られるカテキンをアセトニトリル中二倍モルのメトキシアニオンで処理すると、カテキンのジアニオンが生成した。このようにして生成したジアニオンは、嫌気性条件では安定であるが、酸素が存在すると速やかに酸素と反応し 430 nm に吸収極大を有する化合物に変化した。この UV 吸収の変化は、カテキンのジアニオンが酸素を還元してスーパーオキシドとカテキンのアニオンラジカルが生成した結果と考えられる。そこで、ESR によりカテキンのアニオンラジカルの観測を行い、 $g = 2.0051$ の吸収と hyperfine splitting constant の値からカテキンのアニオンラジカルが生成していることを確認した。一方、スーパーオキシドの生成については、ESR で DMPO をスーパーオキシドの補足剤として用いることにより、DMPO-OOH の生成を確認することにより証明すると共に、113K にて低温 ESR を測定することにより直接スーパー

オキシドの生成を確認することにも成功した。以上の実験により、カテキンのジアニオンから酸素分子への電子移動により活性酸素種の一つスーパーオキシドとカテキンアニオンラジカルが生成していることを化学的に証明することに成功した。さらに、酸素過剰の条件ではカテキンアニオンラジカルの生成を示す 430 nm の UV 吸収の増大が擬一次反応となり、擬一次反応速度定数 (kobs) が、酸素濃度の上昇とともに直線的に上昇した。このようにして得られた直線の傾きよりカテキンのジアニオンから酸素への電子移動速度を、 $5.8 \times 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ と算出できた。この比較的遅い反応速度は、この反応が吸熱反応であり、生成したカテキンアニオンラジカルは、早い水素移動反応によりカテキンアニオンラジカルになることを示す。

②フェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールから発生する活性酸素種の解析：

すでに我々は、銅イオン存在下レスベラトロールが活性酸素種を発生し、DNA 損傷を引き起こすことを明らかにしている。今年度はレスベラトロールおよびその誘導体を合成しそれらを用いて、染色体異常誘発試験を行った。その結果、レスベラトロール誘導体は構造依存的に変異を誘発することを確認した。また、レスベラトロールおよびその誘導体の DNA 損傷の塩基特異性を明らかにするために、DNA 損傷実験を行った。その結果もレスベラトロールのような抗酸化剤による DNA 損傷が銅イオン存在下での活性酸素種、具体的には、銅イオン-水酸化ラジカル複合体であることを示した。

③環境汚染物質であるニトロアレーン類から発生する活性酸素種の解析：

昨年度までに引き続き、ニトロアレーン類の毒性について研究を行った。今年度は特に光照射下での活性酸素種の発生に注目して実験を行い、ベンツ [a] ピレンの 6 位ニトロ体のようなニトロアレーン類が、その構造に起因して光照射下で活性酸素種の一つ NO を発生することを明らかにした。また、このようにして発生した NO により DNA が損傷を受けることも見出した。

④ C₆₀ フラーレンから発生する活性酸素種の解析：

引き続き、光励起したフラーレンから発生する活性酸素種の解析研究を行い、発生する活性種がスーパーオキシドであることの実証を行うと共に、発生反応の反応速度の解析実験を行った。その結果、励起フラーレンの還元速度、酸素への電子移動速度（スーパーオキシド生成速度）の測定に成功した。さらに、発生した活性酸素種による DNA 損傷を明らかにすることに成功した。

⑤キノンからの NADH 存在下での活性酸素種発生の解析：

キノンの NADH 存在下での DNA 損傷能を pBR322DNA を用いて調べた。その結果、ベンゾキノンのクロル体はクロル基の数が増える程、DNA 側鎖の損傷反応が進行し、テトラクロル体（クロラニル）は非常に強力に DNA を切断した。また、ナフトキノンやアントラキノンのクロル体についても同様の傾向がみられた。さらに、DNA の酸化的損傷能の指標として 8-oxodG の生成量を比較したところ、DNA 切断活性とほぼ同様の傾向がみられ、

大量に 8-oxodG を生成するキノンは強力な DNA 切断活性を示した。この結果は、キノンによる DNA 切断が、酸化的に進行していることを示しており、NADH による一電子還元反応によってラジカルアニオンが生成しやすいキノンほど DNA に対する酸化的損傷能が強いことが示唆された。また、キノン/NADH から生成する活性酸素種をスピントラップ剤として DEPMPO を用いて NADH 存在下、ESR で解析した。その結果、クロラニルのラジカルアニオン ($\text{Cl}_4\text{Q}^{\cdot-}$) のシグナルに加えて、ヒドロキシルラジカルの DEPMPO 付加体が観測された。ヒドロキシルラジカル付加体のシグナルは、スーパーオキシド消去剤 (tiron) とカタラーゼで減少することから、ヒドロキシルラジカルはスーパーオキシドを経由して生成していることがわかった。この結果より、キノン/NADH による DNA 損傷反応はスーパーオキシドを経由したヒドロキシルラジカルによって進行することが予測された。キノン/NADH によるスーパーオキシド生成機構については、嫌氣的条件下、NADH によるクロラニルの UV 吸収の変化を解析する事により行った。その結果、クロラニルに NADH を添加すると 454nm にクロラニルのラジカルアニオン由来のピークが観測された。また、クロラニルの 292nm の吸光度変化を $[\text{NADH}]/[\text{クロラニル}]$ でプロットしたところ、NADH とは 3:2 の割合で反応していることが明らかとなった。一方、クロラニルラジカルアニオンは好氣的条件下では時間の経過とともに減少し、それと同時にクロラニル由来の 292nm のピークの増加がみられた。この結果は、スーパーオキシドがクロラニルのラジカルアニオンから酸素への電子移動反応によって生成しているこ

とを示している。また、この電子移動反応は比較的遅い ($t_{1/2}=5\text{h}$) ことも明らかとなった。一方、嫌氣的条件下、NADH 添加直後のクロラニルラジカルの生成量は好氣的条件下の 2 倍であることが UV および ESR により明らかとなった。この結果は、NADH がクロラニルを還元した後、生成する NAD ラジカルは、嫌氣的条件下ではさらにクロラニルを還元するのに対して、好氣的条件下では瞬時に酸素を還元してスーパーオキシドを発生していることを示している。以上の結果より、クロラニル/NADH による活性酸素生成反応は、NADH がクロラニルを一電子還元して生成するクロラニルラジカルアニオンが酸素を一電子還元して生成するスーパーオキシドと、NADH ラジカルカチオンの脱プロトン化で成する NAD ラジカルが酸素を還元して生成するスーパーオキシドによって引き起こされることが明らかとなった。また、クロラニルラジカルアニオン由来のスーパーオキシドの生成は比較的ゆっくり進行するのに対して、NAD ラジカル由来のスーパーオキシドは NADH がクロラニルを還元後、瞬時に進行することがわかった。DEPMPO をスピントラップ剤として用いて、ベンゾキノンのクロル誘導体からの活性酸素生成量の経時変化を ESR で測定した結果、NADH 添加直後に NAD ラジカルに由来するまとまった活性酸素の生成がみられた後、時間の経過とともにキノンラジカルアニオンに由来する活性酸素量の増加が観測された。また、キノンからの活性酸素生成量はクロル基の数の増加とともに増え、クロル基の数が増えて一電子還元され易いキノンは大量の活性酸素を発生することが示された。この結果は、DNA に対する酸化的損傷能の強さと相関し、

化学的に還元され易いキノンが活性酸素毒性が強いことを示している。

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)

本年度は、活性酸素種の一つ一重項酸素を検出する方法の開発を行った。まず最初に、fluorescein 誘導体の蛍光 OFF/ON 機構の解明を目的として実験を行った。DPAX 類は fluorescein 骨格を分子内に有するがほぼ無蛍光であり、 $^1\text{O}_2$ と反応して endoperoxide 体になることで初めて強い蛍光を有する特性を持つ。しかし、これまでこの蛍光の OFF/ON 機構については不明であった。我々は DPAX 類では、diphenylanthracene 部から xanthene 部への分子内での光誘起電子移動 (PET) により消光が起こるとの仮説を立て、この考えの妥当性を分子軌道計算及び縮合芳香環を持つ fluorescein の誘導体を合成することにより検証した。PET ドナーの HOMO レベルが異なる化合物として、fluorescein の phenyl 基を anthryl 基に変換した AX, naphthyl 基に変換した NX をそれぞれ合成し、量子収率の測定をした。その結果、NX は強い蛍光をもつが、芳香環が一つ多い AX はほとんど蛍光を持たないことが明らかとなった。DPAX 類や他の fluorescein 誘導体においても HOMO レベルの計算結果と蛍光量子収率は非常によい相関を持ち、-9 eV 付近の HOMO レベルを境として蛍光の OFF/ON を説明することが可能であった。以上の結果から fluorescein 類における蛍光の OFF/ON が PET 機構に基づいていることが示された。

ついで、以上の知見に基づいて、一重項酸素検出用の蛍光プローブのデザインと合成を行った。DPAX 類より感度の向

上した蛍光プローブの開発を目指し、既述した PET 原理を応用した $^1\text{O}_2$ 検出プローブとして種々の DMAX 類をデザイン、合成した。DMAX 類は $^1\text{O}_2$ と反応するトラップ部分の構造が $^1\text{O}_2$ との反応速度定数が非常に大きい dimethylantracene (DMA) であり、感度の増加が期待できる。PM3 計算によると、DMA-2-CO₂H は anthracene-2-CO₂H よりも HOMO レベルが高く、 $^1\text{O}_2$ と反応し DMA-EP-2-CO₂H になると naphthalene-2-CO₂H 程度まで HOMO レベルが低下することから、DPAX 類と同様の蛍光の OFF/ON が可能であると考えた。合成した DMAX 類の蛍光特性を測定したところ、計算結果からの予想どおり DMAX 自身はほとんど蛍光を持たないが、 $^1\text{O}_2$ と反応して DMAX-EP となることで蛍光量子収率が約 50 倍に増加することが明らかとなった。

ついで、DMAX-1 による $^1\text{O}_2$ の検出及び DPAX-1 との感度の比較を行った。DMAX-1 の中性バフアー水溶液に、熱的に分解して $^1\text{O}_2$ を生成する化合物である EP-1 (37 °C での半減期は約 25 分) を添加すると蛍光が増大した。蛍光は EP-1 の濃度依存的に増大し、DMAX-1 は中性条件下 $^1\text{O}_2$ を定量的に検出できることが明らかとなった。蛍光増加初速度の比較により DMAX-1 の感度は DPAX-1 のその 5.3 倍に増加した。また蛍光増加初速度、EP-1、 $^1\text{O}_2$ の半減期などを用いて $^1\text{O}_2$ との反応速度定数を算出したところそれぞれ、 $7.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (DMAX-1), $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (DPAX-1) となり、DMAX-1 の反応速度定数は、DPAX-1 に比べて約 70 倍に増加することが明らかとなった。以上の結果から、DMAX 類は、非常に感度の良い優れた $^1\text{O}_2$ 検出蛍光プローブであることが示された。そこで DMAX-2 を好中球な

どの細胞系に適応し、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ 検出を行った。好中球ではPMA刺激によりMediumの蛍光強度の増加が観察され、生理的条件下での $^1\text{O}_2$ の検出に初めて成功した。

B-3) 活性酸素種の新しい定量法の開発 (分担研究者：阿部)

テレフタル酸を用いたOHラジカルのHPLCによる定量法の確立を目的として研究を行った。実験に使用した水は、超純水（ミリQ）を、減圧下に脱気し、空気をアルゴン置換したものを使用した。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-ブロモテレフタル酸から報文に従い合成した。HPLCは、カラムはODS（4.6 mm ϕ $\times$ 25 cm）を使用し、溶離液として、200 mMリン酸2水素カリウム-2% KCl水溶液を用いて、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（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20 μ lである。測定は、水酸ラジカルを発生すると思われる試料溶液2容に対し、5 mMのTAを17容、リン酸緩衝液あるいは純水1容を混合し、1分後にHPLCに注入することにより行った。OHラジカルは、Fenton反応により発生させた。検量線の作成については、TAから生じるHTAの量は極めて微量なので、用いたTAを内部標準物質として利用し、UV検出器で得られるTAの面積とHTAの面積比をとって検量線を作成した。検量線はHTAの濃度範囲20 nM $\sim$ 1 μ

Mで良好な直線性が得られた。さらに高濃度側ではHTAのピーク面積に対する検量線が利用できる。以上のような条件設定を行い、Fenton反応により生じる水酸ラジカルのテレフタル酸を用いた定量を行うこととした。Fenton反応は、様々な素反応が組み合わさった複雑な反応であると理解されている。最初の反応は、過酸化水素が二価鉄によって1電子還元を受け、水酸ラジカルと水酸イオンとを生じることにより始まるとされる。そこで、Fenton反応により生じる水酸ラジカルを定量した。まず最初に、TAは過酸化水素だけではHTAを生じなかった。従って、ここで観察されたHTAはFenton反応によって生じたOHラジカルを定量したことになる。終濃度50 μ MのFe(II)の存在下に、過酸化水素を加えて生じるHTAの量を測定すると、過酸化水素量がFe(II)の半分に等しくなるところ（加える H_2O_2 濃度で500 μ M）まで、ほぼ直線的にHTA生成量が増加しそこで止まった。従って、Fe(II)に対し、過酸化水素は、化学量論的に2:1で反応していると推定された。酢酸緩衝液を用いると、酢酸が、生成する水酸ラジカルを一部消去すると思われ、HTAの生成量は減り、過酸化水素濃度が高くなると、さらにHTA生成量の減少が認められた。

蛍光物質は、高励起状態の物質からエネルギーを受け取ることができれば、化学発光法により検出することが可能である。HTAを蛍光検出法よりもより高感度に検出できることを期待して、化学発光検出の可能性を検討した。化学発光検出器として、ShodexCL2M（昭和電工）ならびに試薬送液ポンプとして880-P（JASCO）を用いた。HPLCの

条件は上述した。ただし、この検討では、溶離液として、アセトニトリル：水（3：7）を用いた。検出試薬は、1 mM T C P O（酢酸エチル：アセトニトリル＝1：3）を流速0.5 mlで送液した。その結果、化学発光法によって検出できることが明らかとなった。ベースラインが負になる現象が認められたが、これは溶離条件を最適化することで解消できると思われる。まだ、詳細な条件の検討を行っていないが、酸性溶離条件下では、D N P OのほうがT C P Oよりもよいと思われる。シュウ酸誘導体、試薬の送液量、溶離液に添加する塩類の影響など今後の検討が必要である。

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、化学物質から発生する活性酸素種の解析と定量、活性酸素種の新しい検出法の確立、さらに、活性酸素毒性の定量的評価手法の研究を行った。

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、

①フェノール構造を有する抗酸化剤カテキン類から、活性酸素種のひとつスーパーオキシドが発生することをESRを用いて実証するとともに生成反応速度を算出した。

②同じくフェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールについては、すでに銅イオン存在下活性酸素種を発生することを明らかにしているが、今回はじめて、染色体異常誘発試験により変異誘発を確認することに成功し、さらにレスベラトロール誘導体について構造と活性と

の相関を明らかにした。

③環境汚染物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性については、すでに化学的に予測し実証していたが、今回新たに、ある種のニトロアレーン類はその構造因子に起因して光照射下で活性酸素種の一つNOを発生することを明らかにした。

④前年度からひき続いて行っているC₆₀フラレーンを用いた研究では、フラレーンからの活性酸素種の生成速度と発生した活性酸素種によるDNA損傷を明らかにすることに成功した。

⑤キノン類については、NADH存在下における活性酸素生成機構を解析し、NADHからキノンへの電子移動の結果生成するキノンラジカルアニオンとNADラジカルが活性酸素生成に関与していることを明らかにした。活性酸素の生成量がキノンの酸化還元特性と相関し一電子還元され易いキノンは活性酸素生成量が多くDNA切断活性が高いことが示され、このような実験が、活性酸素毒性の定量評価に応用できる可能性が示された。

2) 活性酸素種の新しい検出方法の開発に関しては、今年度は、活性酸素の一つである一重項酸素に焦点をあてて研究を行い、一重項酸素をバイオイメーキングすることが可能なプローブDPAXおよびDMAXの開発に成功した。一重項酸素は活性酸素種の一つであるが、特異な物性から他の活性酸素種とは明らかに異なる反応種である。特に生体内でこの一重項酸素が生成しているかについてはまだ議論のあるところで、この点から高感度一重項酸素検出蛍光プローブの開発が求められていたが、その開発に成功した。

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（水酸ラジカル）のHPLC-蛍光検出法ならびに化学発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、テレフタル酸を利用した水酸ラジカルのHPLCによる定量法の確立に成功した。本法を用いて、Fenton 反応で生じる水酸ラジカルの定量を行ない、Fe (II) と過酸化水素とが化学量論的に2 : 1で反応することを確認した。また、2-ヒドロキシテレフタル酸は、化学発光検出法によっても検出可能であることがわかり、蛍光検出法よりもさらに高感度の検出ができる可能性も明らかになった。

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。

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

名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授（現職）

国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部長（旧職）

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⁻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、化学物質が、どのような条件で、どのような活性酸素種を、どのような機構で、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た。

最終年度は、活性酸素種を発生する化学物質として、抗酸化剤としても知られるフェノール類、環境汚染物質であるニトロアレーン類、さらには、キノン類やC₆₀ フラーレンなどを用いて総合的な研究を行った。その結果、①フェノール構造を有する抗酸化剤カテキン類から、活性酸素種のひとつスーパーオキシドが発生することをESRを用いて実証するとともに生成反応速度を算出した（論文発表5，9）。②同じくフェノール構造を有する抗酸化剤レスベラトロールについては、すでに我々が銅イオン存在下活性酸素種を発生することを明らかにしているが、今回はじめて、染色体異常誘発試験により変異誘発を確認することに成功し、さらにレスベラトロール誘導体について構造と活性との相関を明らかにした（論文発表6）。③環境汚染物質であるニトロアレーン類の活性酸素毒性についてはすでに我々が化学的に予測していたが、今回新たに、ある種のニトロアレーン類はその構造因子に起因して光照射下で活性酸素種の一つNOを発生することを明らかにした（論文発表1，3，7）。④前年度からひき続いて行っているC₆₀ フラーレンを用いた研究では、フラレンからの活性酸素種の生成速度と発生した活性酸素種によるDNA損傷を明らかにすることに成功した（論文発表4，8，12）。これらのうち、カテキン類からの活性酸素の発生について以下に詳述する。キノン類についての研究成果は、福原潔の分担報告書にまとめた。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）を研究するための重要な新知見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と考える。

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きた。今年度取り上げたカテキンやケルセチン等のフラボノイドは、食品中にも多く含まれており、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルのような活性酸素種を還元的に消去し抗酸化剤としての役割を果たしていることが知られている。しかし一方で、これらの化合物が生体内で活性酸素種を発生し、DNAなどに酸化的損傷を引き起こすことも示唆されている。また、カテキンやケルセチンなどのフラボノイドが、銅イオンの存在下で活性酸素種を発生することや、フェントン反応で発生するヒドロキシルラジカルのDNA損傷を増強することも報告されている。そこで、われわれは、カテキンを例にとり活性酸素種の発生を化学的に解析することとした。

B. 研究方法, 研究結果

1. カテキンからの活性酸素種の発生の確認

抗酸化剤として知られるカテキン ($1H_2$) を、アセトニトリル中、当モルのメトキシアニオンで処理すると280 nmのUV吸収が290 nmにシフトした。カテキンの四つのフェノール性水酸基をメチル化したカテキン誘導体ではこのようなシフトは見られない。これらの結果は、カテキンの四つのフェノール性プロトンの一つが解離し、カテキンアニオン ($1H^-$) が生成したことを示す。解離は、最も pK_a が高いB環のC-3'のプロトン ($pK_a=8.97$) で起きていると考えられる (Figure 1)。

Deprotonation of Catechin by Methoxide Anion to Form Catechin Anion

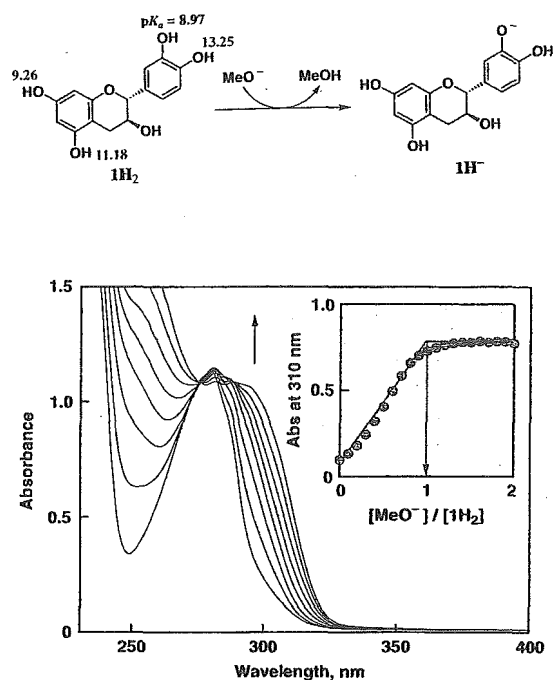
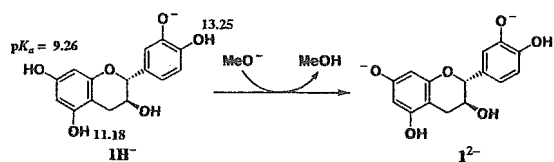


Figure 1. Spectral change upon addition of MeO^- ($0-3.3 \times 10^{-4}$ M) to a deaerated MeCN solution of $1H_2$ (3.3×10^{-4} M) at 298 K. Inset: Plot of absorbance at 310 nm vs $[MeO^-]/[1H_2]$.

ついで、さらに倍量のメトキシアニオンで処理すると、UVで290 nmの吸収が増大するとともに、新たに340 nm付近に吸収が現れた。これはカテキンのジアニオン (1^{2-}) の生成を示すと考えられる (Figure 2)。

Deprotonation of Catechin Anion by Methoxide Anion to Form Catechin Dianion



二番目のプロトン脱離はA環のC-7位水酸基 ($pK_a = 9.26$) で起きていると考えられる。このようにして生成したジアニオン (1^{2-}) は、嫌気性条件下では安定であるが、酸素存在下速やかに変化し、430 nmの吸収の増大が確認された (Figure 3)。

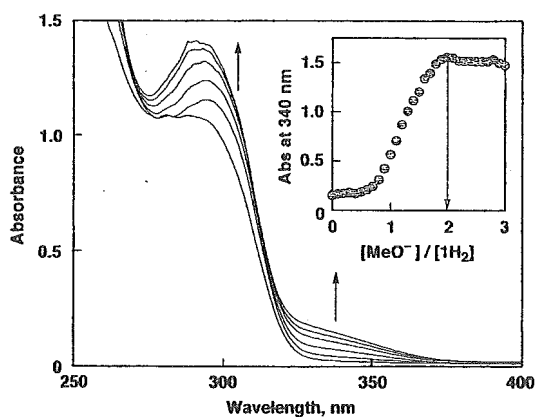


Figure 2. Spectral change upon addition of MeO^- (3.3×10^{-4} – 6.6×10^{-4} M) to a deaerated MeCN solution of 1H_2 (3.3×10^{-4} M) at 298 K. Inset: Plot of absorbance at 340 nm vs $[\text{MeO}^-]/[1\text{H}_2]$.

Reaction of Catechin Dianion with Molecular Oxygen

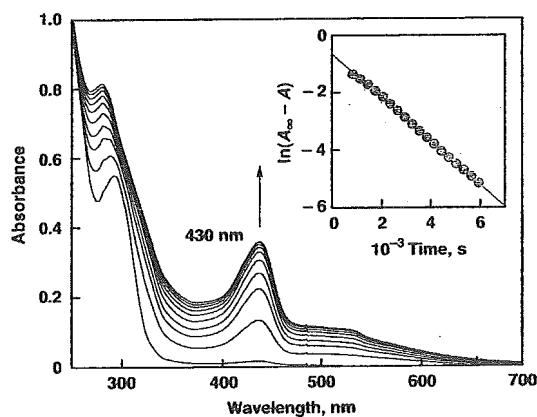
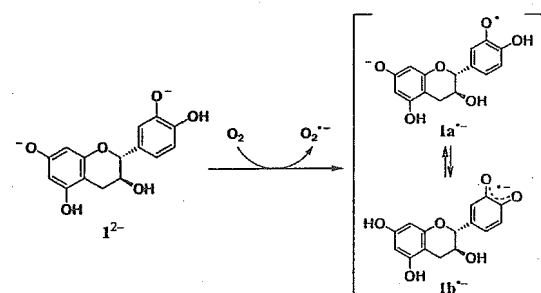


Figure 3. Spectral change observed in the reaction of 1^{2-} (1.3×10^{-4} M) with O_2 (1.3×10^{-2} M) in MeCN at 298 K (interval: 600 s). Inset: the first-order plot.

このUV吸収の変化は、カテキンのジアニオンが酸素を還元してスーパーオキシドとカテキンのアニオンラジカルが生成した結果と考えられる。実際に、ESRにより $g = 2.0051$ の吸収が観測され、 hst (hyperfine splitting constant) の値からカテキンのアニオンラジカル ($1b^{\cdot-}$) の生成を確認した (Figure 4)。スーパーオキシドの生成は、ESRで、DMPOをスーパ

オキシドの補足剤として用いることにより、DMPO-OOHの生成を確認することにより証明すると共に、113Kにて低温ESRを測定することにより直接スーパーオキシドの生成を確認することにも成功した ($g_{\parallel} = 2.175$) (Figure 5)。

これらの結果は、カテキンのジアニオンから酸素分子への電子移動により活性酸素種の一つスーパーオキシドとカテキンアニオンラジカル ($1a^{\cdot-}$) が生成し、ついで、B環水酸基からA環水酸基へのプ

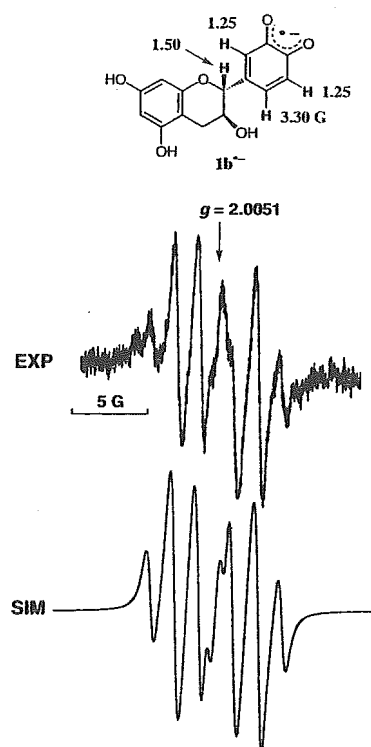


Figure 4. ESR spectrum obtained for an O_2 -saturated MeCN solution of 1H_2 (1.0×10^{-3} M) and two equivalents of MeO^- (2.0×10^{-3} M) at 298 K and the computer simulation spectrum.

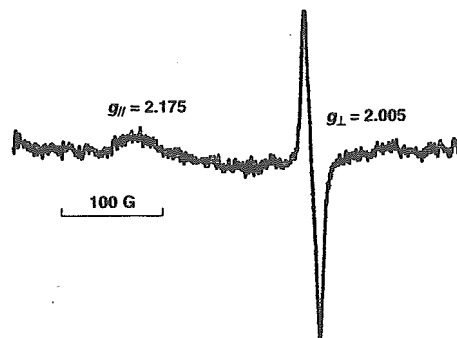


Figure 5. ESR spectrum of $\text{O}_2^{\cdot-}$ generated in the reaction of 1^{2-} (2.0×10^{-2} M) with O_2 (1.3×10^{-2} M) in MeCN at 113 K.