

厚生労働科学研究費補助金
健康科学総合研究事業

紫外線照射による健康影響とその予防に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所 福原 潔

分担研究者 三重大学医学部 川西 正祐

平成 15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 紫外線照射による健康影響とその予防に関する研究 1
福原 潔

II. 分担研究報告書

1. 紫外線によるラジカルの生成機構の解析および新規抗酸化剤の開発 . . . 8
福原 潔
2. 紫外線による老化と遺伝毒性の解析 28
川西 正祐

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 38

総括研究報告書

紫外線照射による健康影響とその予防に関する研究

主任研究者 福原 潔 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 室長

研究要旨 地球環境の悪化に伴う紫外線量の増加によって重篤な健康被害が今後懸念されるため、本研究では紫外線によって引き起こされるラジカル毒性の確かな評価、およびその予防法について検討した。その結果、光発がんや光アレルギー性疾患等に関連すると思われる食品や医薬品、ビタミン類などの生活関連物質（キサントン類、葉酸、メトトレキサート）が、紫外線照射下、生体高分子（DNA）を酸化的に損傷することが明らかとなった。また、環境汚染物質として大気中高濃度に存在するニトロアレーンの中には光照射によって一酸化窒素（NO）を発生して DNA 損傷を引き起こす化合物（6-ニトロベンツピレン）があることを明らかにした。これらの結果は、紫外線が光感受性の内因性物質および生活関連化学物質を活性化してラジカル毒性を発現することを証明するものであり、地球環境の悪化に伴う紫外線照射量の増加が人の健康に重篤な影響を与えることを示唆している。なお、光増感剤の DNA 損傷能力が分子軌道計算による HOMO エネルギーと関連したことから、光感受性化合物のラジカル毒性のリスクの予測に分子軌道計算が有効であることが示された。さらに、紫外線傷害によって引き起こされるラジカル毒性の予防法についても検討を行い、天然型カテキンの分子構造を平面に固定した平面型カテキンを新規に合成した。平面型カテキンは天然型カテキンと比べて非常に強力なラジカル消去能を示した。また、プロオキシダント効果やスーパーオキシド産生能が弱いことから、平面型カテキンは毒性の少ない優れた抗酸化剤として紫外線照射が原因となるラジカル毒性の予防および治療に有効であることが示された。

主任研究者

福原 潔

国立医薬品食品衛生研究所

有機化学部 室長

分担研究者

川西正祐

三重大学医学部

衛生学教室 教授

A. 研究目的

近年、癌や心臓病などの生活習慣病の発症および老化の促進など様々な健康影響の原因としてラジカルによる生体機能障害が大きく関係していることが話題となっている。ラジカルは生体では様々な化学物質や金属が関与して発生するが、皮膚癌発症の主な原因である紫外線は非常に強力なラジカル発生能を有しており、生活習慣病の発症や老化促進の主要原因として大きく係

わってることが予測される。すなわち、遺伝子やタンパク質などは、紫外線照射によって発生したラジカルによって傷害を受けると正常な機能が維持できなくなり様々な疾病の原因となる。また、紫外線は化学物質や生体金属からのラジカル生成能を飛躍的に増強させ、発生したラジカルは細胞に対して致命的な損傷を与える。一方、近年、問題となっているオゾン層の破壊を伴う生活環境の変化は、人への紫外線照射量を著しく増加させている。従って、今後は生活習慣病や老化の主たる原因として紫外線の影響を無視することは出来ない状況となっており、紫外線照射によるラジカルの生成と生体影響を解明し、生活環境の変化によって増加するラジカル毒性を的確に把握することは急務の課題である。また、予防医学の観点からは生活習慣病の予防と健康増進には、紫外線が引き金となって生成する活性酸素等のラジカルを消去する抗酸化剤の積極的な利用を検討することが急務の課題である。

本研究では紫外線照射が原因となるフリーラジカルの生成を有機化学的および速度論的手法によって解析する。また、分子遺伝学的手法、細胞工学的的手法および物理化学的手法を駆使することによって生活習慣病の発症におけるラジカルの影響を明らかにして、紫外線による生体機能障害が原因となる健康影響を評価する。さらに、紫外線が原因となる疾病の予防と健康増進を目的としたラジカル消去化合物の合成を行う。平成14年度は紫外線照射による生活関連物質や生体分子からのラジカル生成機構を検討して、光アレ

ギー性疾患や光発癌等に関連すると思われる環境化学物質が紫外線照射により生体高分子を酸化的に損傷することを明らかにした。また、環境汚染物質として代表的なニトロアレーンについて光照射による毒性発現機構を検討した。さらに、フラボノイド系天然抗酸化剤のラジカル消去機構を解析することにより、天然型カテキンの抗酸化能の増強を目的とした平面型カテキンの開発を行った。

B. 研究方法

1) 紫外線によるラジカルの生成機構の解析および新規抗酸化剤の開発

1-1) 光照射下における芳香族ニトロ化合物からのNOの生成

1-, 3-, および 6-ニトロベンツピレンをモデル化合物として光照射下における分解反応をESRで解析した。NOの生成についてはcarboxyPTIOおよびMGD-Fe²⁺をNO検出薬として用いてESRで解析した。6-ニトロベンツピレンの光分解物は高速液体クロマトグラフィーで単離精製後、構造をNMRで解析した。DNA切断実験は、pBR322DNA存在下、ニトロベンツピレンの光分解反応を行った後、アガロースゲル電気泳動で解析した。

1-2) 平面型カテキンの開発

平面型カテキンは天然型カテキンをアセトン中、BF₃/Et₂Oを2倍量添加して2時間攪拌して合成し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。平面型カテキンのラジカル消去能の速度論的解析は、嫌気的条件下、

galvinoxyl radical (G•) のアセトニトリル溶液中、G• の濃度に対して10倍濃度以上になるように平面型カテキンを加えて反応を行い、フォトダイオードアレー分光光度計で反応を追跡した。擬一次速度定数は KaleidaGraph を用い、最小2乗法により行った。平面型カテキンラジカルアニオンは ESR で室温下、測定後、ESR all Version 1.01 (Calleo Scientific Publisher) でシミュレーションした。スーパーオキシドの測定は 113K の凍結 ESR で行った。

2) 紫外線による老化と遺伝毒性の解析

DNA 損傷機構や損傷の塩基特異性の解析は、ヒトがん原遺伝子 *c-Ha-ras-1* 及びがん抑制遺伝子 *p53* や *p16* から変異のホットスポットを含む 100~400 bp の断片をサブクロニングすることにより行った。これらのヒトがん関連遺伝子の DNA 断片の 5'末端を ³²P で標識し、各種光増感物質とともにリン酸緩衝液 (pH 7.8) 中で UVA ($\lambda_{max}=365$ nm) を照射した後に電気泳動を行ない、DNA 損傷性を検討した。DNA 損傷の塩基配列特異性の解析には Maxam-Gilbert 法を応用し、オートラジオグラムをレーザーデンシトメーターで定量化し解析した。さらに、酸化的 DNA 損傷のひとつである 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguano-sine (8-oxodG) の定量は電気化学検出器付 HPLC (HPLC-ECD) を用いて行った。化学物質の平衡構造および HOMO エネルギーは、HF/6-31G*法による分子軌道

計算で求めた。

C. 研究結果

1) 紫外線によるラジカルの生成機構の解析および新規抗酸化剤の開発

1-1) 光照射下における芳香族ニトロ化合物からの一酸化窒素 (NO) の生成
NO 検出試薬として MGD-Fe²⁺を用いて、光照射下、1-, 3-, および 6-ニトロベンツピレンからの NO の発生を ESR により観測した。その結果、1- および 3-ニトロベンツピレンからは ESR シグナルが観測されないのに対して、6-ニトロベンツピレン存在下では、NO-Fe²⁺-MGD 由来のシグナルが観測された。また 6-ニトロベンツピレンは carboxyPTIO から carboxyPTI への ESR スペクトルの変化も確認された。これらの結果は、6-ニトロベンツピレンは光分解反応によって NO を生成することを示している。また、6-ニトロベンツピレンは NO の生成に伴ってベンツピレンの 6-オキシラジカルを生成することを ESR により確認した。次に、光照射下における pBR322DNA に対する影響を検討した。その結果、6-ニトロベンツピレンは強力に DNA を切断するのに対して、1-, および 3-ニトロベンツピレンの DNA 切断活性は非常に弱いことが明らかとなった。

1-2) 平面型カテキンの開発

天然型カテキンを化学修飾して分子全体の立体構造を平面に固定した平面型カテキンを新規に合成した。本化合物は X 線構造解析の結果、分子全体が平面に固定化されていることがわかった。平面型カテキンのラジカル消去能

を酸素ラジカル種として galvinoxyl radical を用いて解析した結果、平面型カテキンの galvinoxyl radical への水素移動反応速度は天然型カテキンと比べて飛躍的に増加し、強力なラジカル消去能を有するケルセチンよりも速いことが明らかとなった。また、天然型カテキンはアルカリ条件下、分子状酸素を一電子還元してスーパーオキシドを発生するが、同様の条件下、平面型カテキンからのスーパーオキシドの生成速度は天然型カテキンの 1/2 であることがわかった。さらに、ヒドロキシルラジカル (Fenton 反応) による酸化 DNA 切断反応に対する影響を検討した結果、天然型カテキンやケルセチンは切断能の増強が見られるのに対して (prooxidant 効果)、平面型カテキンは濃度依存的に DNA 切断を抑制した。

2) 紫外線による老化と遺伝毒性の解析

2-1) キサントン類による DNA 損傷機構

薬草などに存在するキサントン類を外因性光増感剤の一つとして用い、UVA による DNA 損傷性やその塩基配列特異性の解明を行なった。その結果、キサントンによって GG の 5'-末端側の G (5'-GG) が特異的に損傷され、この DNA 損傷は G の酸化による 8-oxodG の生成であることが示された。また、8-oxodG の生成量は、1 本鎖 DNA よりも 2 本鎖 DNA において明らかに増加した。これらの結果は、キサントンへの光誘起電子移動によって、2 本鎖

DNA の 5'-GG の下線の G がカチオンラジカルとなり、水和反応を経て 8-oxodG が生成することを示している。チオキサントン、アクリドンも同様のメカニズムで DNA を損傷したが、DNA 損傷の程度は、キサントン>チオキサントン>アクリドンの順であった。分子軌道法 HOMO エネルギーを計算した結果、DNA 損傷の程度は HOMO エネルギーの増大と相関することが明らかとなった。

2-2) 葉酸による DNA 損傷機構

ビタミン B の一種である葉酸の細胞内光増刊剤としての性質に着目し、その化学反応性と DNA 損傷性を検討した。葉酸は容易に光分解し、プテリン-6-カルボン酸 (PCA) を生成した。葉酸および PCA は UVA ($\lambda_{\max}=365$ nm) を照射すると、濃度依存的に DNA 損傷が引き起された。DNA 損傷の塩基配列特異性を解析したところ、葉酸および PCA は、それぞれ UVA 照射により、5'-GG, 5'-GGG 配列の下線部の G を選択的に損傷し、8-oxodG を生成することが明らかになった。また、8-oxodG 生成速度の解析から、光増感作用で DNA 損傷を引き起すのは、葉酸自身ではなく、光分解生成物の PCA であることが明らかになった。

2-3) メトトレキサートによる DNA 損傷機構

メトトレキサート (MTX) は、葉酸の代謝拮抗剤としてがん治療に用いられているが、投与後の太陽紫外線暴露等による皮膚の炎症等の副作用が報告されている。そこで本研究で

は、MTX の光毒性の分子機構を標的分子に DNA を用いて検討した。

その結果、葉酸と同様に、2本鎖 DNA の G の連続配列 (5'-GG および 5'-GGG) において下線部分の G が特異的に損傷されることが明らかになった。8-oxodG の生成量は、1本鎖 DNA よりも2本鎖 DNA において著しく増加した。2本鎖 DNA 中の 5'-GG および 5'-GGG において下線部分の G が電子移動により特異的に酸化されやすいことから、UVA 照射された MTX により、光誘起電子移動を介した G の酸化が考えられる。

一方、MTX は UVA を照射すると蛍光性の 2,4-ジアミノ-6-ヒドロキシメチルプテリジン (DHP) が生成した。DHP の DNA 損傷の程度は MTX よりも著しく大きいことから、MTX 自身は、DNA を損傷しないが、生成した DHP が UVA を吸収し、DNA 損傷を引き起こすことが明らかになった。

D. 考察

地球環境の悪化に伴う紫外線照射量の増加は今後重篤な人への健康影響が懸念される。本研究では紫外線照射によって引き起こされる毒性発現機構についてラジカル毒性とその予防法に焦点をあてて検討した。光増感作用を有する化学物質は生活環境中のみならず、ポルフィリンや葉酸など生体内の必須成分として多く存在する。そこで外因性光増感剤としてキサントン類、内因性光増感剤として葉酸、また紫外線暴露による副作用が報告されている抗癌剤メトトレキサートについて UVA を照射して DNA に対する影響を調べた。

その結果、DNA 損傷作用が G 選択的に進行した。また、G の酸化体である 8-oxodG が生成し、変異を誘発することが示された。本研究結果は光増感剤が DNA 損傷能力を有していることを理論的に明らかにした最初の報告であり、光増感剤が遺伝子傷害を伴う様々な毒性発現を引き起こす可能性とともに紫外線による皮膚癌の発症を促進することが示唆された。特に内因性光増感剤である葉酸が DNA 損傷を誘発したことは、オゾンホール拡大等、地球環境の悪化による紫外線照射量の増大が人の健康に致命的な影響を与えることを警告している。また、本研究で化学物質の HOMO エネルギーが DNA 損傷能と関連したことは、コンピュータを用いた太陽紫外線による毒性発現のリスクを予測できる可能性が示された。

本研究では環境汚染物質として人へのリスクが問題となっているニトロアレーンの光毒性についても検討した。その結果、NO が光照射によって発生して遺伝傷害を引き起こす可能性が示唆された。これは、ニトロアレーンは光照射されると従来の毒性発現機構とは全く異なる NO 由来の活性酸素毒性が発現することを意味している。環境汚染の悪化に伴って、生活環境中にニトロアレーンは今後さらに大量に排出され、また、オゾンホール拡大による紫外線照射量はさらに増えることが予測される。従って、今後のニトロアレーンの人への健康影響は、NO 発生が引き金となる活性酸素毒性に着目した再評価が必要であると考えられる。

以上、紫外線は人への健康に重篤な影響を与え、また、その毒性発現過

程には様々なラジカルが発生していることが示された。そこで、本研究では紫外線による健康被害の予防目的として強力なラジカル消去能と副作用の少ない新規抗酸化剤について検討を行い、平面型カテキン誘導体を合成した。本化合物のラジカル消去能は天然型カテキンと比べて飛躍的に増加し、また、抗酸化剤の毒性に係わるプロオキシダント効果は弱いことから、非常に優れた抗酸化剤として、ラジカルが関係している疾病の発病予防と治療目的への利用の可能性が示唆された。平面型カテキン誘導体は、日常的に摂取しているお茶などの主成分である天然型カテキンを化学修飾しているため、副作用が少ない。また、1ステップで大量合成できることから、今後、医療への応用が期待される。

E. 結論

紫外線による人への健康影響について検討した結果、光発がんや光アレルギー性疾患等に関連すると思われる食品や医薬品、ビタミン類などの生活関連物質（キサントン類、葉酸、メトトレキサート）が生体高分子（DNA）を酸化的に損傷することが明らかとなった。また、環境汚染物質として大気中高濃度に存在するニトロアレーンの中には光照射によってNO_xを発生してDNA損傷を引き起こす化合物（6-ニトロベンツピレン）があることが明らかとなった。これらの結果は、紫外線が光感受性の内因性物質および生活関連化学物質を活性化してラジカル毒性を発現することを証明するものであり、地球

環境の悪化に伴う紫外線照射量の増加が人の健康に重篤な影響を与えることを示唆している。なお、光増感剤のDNA損傷能力が分子軌道計算によるHOMOエネルギーと相関したことは、光感受性化合物のラジカル毒性のリスクの予測に分子軌道計算が有効であることを示すものである。

これらの結果は、紫外線傷害による健康被害の予防法の早急な確立を必要とするものであり、本研究ではその予防法の一つとして、紫外線による毒性発現の過程で発生するラジカルを強力に消去する新規抗酸化剤（平面型カテキン誘導体）の開発を行った。平面型カテキンは天然のカテキンを化学修飾して分子全体を平面に固定化しており、この平面効果によって平面型カテキンは天然型カテキンと比べて非常に強力なラジカル消去能を示した。また、プロオキシダント効果やスーパーオキシド産生能が弱いことから毒性の少ない優れた抗酸化剤として紫外線照射が原因となるラジカル毒性の予防および治療に有効であることが示唆された。

以上、地球環境の悪化が引き金となる紫外線照射量の増大が、人の健康に重篤な影響を与えることが化学的に証明された。また、その予防的薬物投与において優れた新規合成抗酸化剤が開発されたことは、本研究結果が厚生労働行政上、科学的根拠に基づいた政策の一環として国民の健康維持に貢献することが期待できる。今後は紫外線照射量の増加による人への健康影響を的確に評価することを目的として、光増感剤に加えて、紫外線照射による毒性発現に影響を与える様々な内因性

および外因性因子についても検討する。また、DNA 損傷とともにタンパク質の損傷や細胞レベルでの紫外線傷害を検討することにより、光発がんの他、様々な生活習慣病や老化に対する紫外線の影響についても明らかにする。さらに、紫外線照射によるラジカル発生機構と各種疾患の発症機構および抗酸化剤のラジカル消去機構をそれぞれ解析して、科学的根拠に基づいた効果的なラジカル毒性の予防法について検討する。

分担研究報告書

紫外線によるラジカルの生成機構の解析および新規抗酸化剤の開発

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 室長

研究要旨 環境化学物質として代表的なニトロアレーンについて光照射における分解反応の解析を行った。その結果、ベンツピレンの 6-ニトロ体は光照射によって一酸化窒素 (NO) を発生して DNA を強力に切断することが明らかとなった。環境化学物質としてのニトロアレーンからの NO の発生は本研究結果が初めての報告例であり、紫外線照射における健康影響を適切に評価するためには、今後は環境化学物質への光照射によって発生する NO を引き金とするラジカル毒性についても十分に検討する必要性が示された。本研究ではさらに紫外線照射による健康影響の予防に利用が可能な抗酸化剤の開発を目的として、天然型カテキンの分子構造を平面に固定した平面型カテキンを新規に合成した。平面型カテキンは天然型カテキンと比べて非常に強力なラジカル消去能を示した。また、プロオキシダント効果やスーパーオキシド生成能が弱いことから毒性の少ない優れた抗酸化剤であることがわかった。

A. 研究目的

環境汚染を伴う近年の急速な地球環境の変化は人および生態系に様々な影響を与え初めている。特に有機化合物の燃焼過程で生成するベンツピレン等の芳香族炭化水素は変異原性や発癌性を示すことから、これらの化学物質による環境汚染は人に重篤な健康影響を与えることが報告されている。芳香族炭化水素は生体内では酸化代謝反応によって活性化されて毒性を発現する。すなわちチトクローム C などによる代謝反応で生成したエポキシド体が DNA などの生体高分子と結合したり、キノン代謝物が活性酸素を発生して生体高分子を修飾して突然変異を引き起こす。一方、ディーゼル排ガスは発癌物質の主な排出源の一つであるが、排ガス中に含まれている窒素酸化物

(NOx) がピレンやベンツピレンなどの多芳香族炭化水素と反応して生成するニトロ多環芳香族炭化水素 (以下、ニトロアレーンと略す) はさらに強力な変異原性や発癌性を示すことから、環境中でのニトロアレーンの生成は人への影響が最も懸念される化学物質として注目されている。我々は大気中のニトロアレーンの生成に注目し、新規に発見したベンツピレンのジニトロ体がジニトロピレンと同程度の強力な変異原性を示し、肺癌発生の原因物質として大気中に高濃度存在していることを明らかにした。さらに、我々はベンツピレンの含窒素化合物として新規に合成した 6-アザベンツピレンのニトロ体がこれまで明らかにされている環境汚染物質の中で最強の変異原性を示すことを明らかにした。ニトロアレーン

は生体内ではニトロ基が還元代謝されて DNA と結合し、突然変異を誘発する。この反応機構による毒性の強さは Ames 法などの簡便な変異原性試験によって評価することが可能である。しかしながら、ニトロアレーンなどの環境化学物質の毒性発現機構には不明な点も多く Ames 法に代表される変異原性試験は、人への影響を必ずしも的確に反映していない。芳香族炭化水素の多くは生体内ではキノン体へと酸化代謝され、活性酸素を発生して毒性を発現するが、我々はニトロアレーンもキノンと同様の活性酸素の生成を予測し、電気化学的手法を用いることによってニトロアレーンから活性酸素が生成することを明らかにした。また、分担研究者の川西らはニトロピレンの還元体が金属イオン存在下、活性酸素を発生して強力に DNA を切断することを報告している。

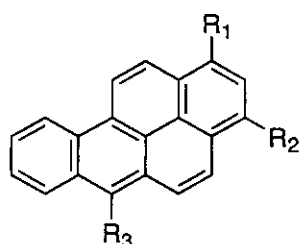
一方、紫外線はそれ自身が DNA に作用して皮膚がんを発症することが明らかとなっているが、紫外線等の光照射によって芳香族炭化水素が励起されると酸素へのエネルギー移動によって一重項酸素を発生して遺伝障害を引き起こすことも報告されている。このような光照射が原因となっている生体影響は、オゾンホール拡大に伴う紫外線量の増加と環境汚染物質の大量排出によって今後さらに問題となってゆることが予測される。

光照射を伴う毒性の発現発現の有効な予防法の一つとして、光照射によって発生するラジカル種を消去する抗酸化剤の投与が考えられる。フラボノイドなどのポリフェノールは抗酸化剤と

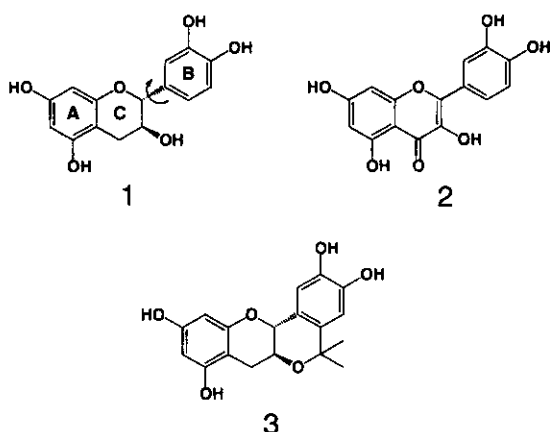
して様々なラジカルを消去することから、近年、癌や心臓病などの成人病の予防に有効であることが話題となっている。抗酸化作用を示す代表的なポリフェノールとしてはお茶の成分であるカテキンやケルセチンなどのフラボノイド、赤ワインに含まれているレスベラトロール、ゴマの主成分であるセサモール、プロポリスに含まれているアルテピリンなどがある。これらのポリフェノールは水素原子移動反応によって活性酸素を消去する。しかしながら、ポリフェノールによる成人病の予防作用は決して十分ではなく、さらに強力なラジカル消去作用と細胞内移行が容易な抗酸化剤の開発が望まれている。一方、我々はカテキン等のフラボノイドは塩基性条件下では酸素への電子移動反応が進行してスーパーオキシドを発生することを明らかにした。また、分担研究者の川西らは、ケルセチンが銅イオン存在下では活性酸素を発生して遺伝障害を引き起こすことを報告している。これらの報告は成人病の予防薬としてポリフェノールを摂取することによる副作用の発現を予測するものであり、今後は強力なラジカル消去作用とともに副作用の少ないポリフェノールを開発することが望まれる。

本研究では、地球環境の悪化によって今後人への重篤な影響が懸念されるラジカル毒性とその予防法について研究を行う。今年度は、ニトロアレーンの毒性を的確に評価することを目的として、大気中に高濃度に存在している代表的な環境汚染物質であるベンツピレンのニトロ体について光照射下における一酸化窒素 (NO) の生成を明ら

かにした。また、カテキンを化学修飾した平面型カテキンを新規に合成し、ラジカル消去能とプロオキシダント効果について検討して、光照射によるラジカル毒性の予防に有効な新規抗酸化剤の開発を行った。



1-nitroBaP: $R_1=NO_2$, $R_2=R_3=H$
 3-nitroBaP: $R_2=NO_2$, $R_1=R_3=H$
 6-nitroBaP: $R_3=NO_2$, $R_1=R_2=H$



B. 研究方法

1) 光照射下、ニトロベンツピレンからの NO 生成の解析

1-1) NO 生成の解析

carboxyPTIO 水溶液および MGD-Fe²⁺

(1 : 5) 錯体水溶液を NO 検出薬として使用した。MGD-Fe²⁺ (1 : 5) 錯体はアルゴン置換した硫酸第一鉄と MGD の水溶液を測定直前に調整した。1-, 3-, および 6-ニトロベンツピレンの DMF 溶液と NO 検出薬を pH7.6 のリン酸緩衝液に添加した後、LABTEC

LLC-04B ESR sample tube に導入し、一定時間 300W photoreflector lamp で照射した後、電子共鳴スピニング ESR (JEOL JES-FA100) を測定した。

1-2) 光分解物の解析

10mM の 6-ニトロベンツピレンのベンゼン溶液 10mL を 37°C で 2 時間照射した。反応溶液を濃縮後、高速液体クロマトグラフィーで生成物を単離精製し、NMR で構造解析した。

HPLC column ; Wakosil-II 5C18 AR

(5 μm; 10 φ × 300)

移動相 ; 0.1M NH₄HCO₃ (pH 7.0) in CH₃OH (0min; 30% → 30 min; 0%)

流速 ; 10 ml / min

検出 ; UV 254nm

1-3) DNA 切断実験

エッペンドルフチューブに 45 μM pBR322DNA と 50 μM ニトロベンツピレンを含む 50mM Na cacodylate buffer (pH 7.2) 溶液 20 μL を調整した後、氷浴中、300W photoreflector lamp で照射した。反応停止液 (100mM TBE buffer, pH8.3, 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue) を 5 μL 加えた後、アガロースゲル (1%) 電気泳動を行った。ゲルは ethidium blomide (1 μg/mL) で 30 分染色、水洗した後、UV 照射条件下、写真撮影した。

2) 平面型カテキンのラジカル消去能とスーパーオキシド生成能の解析

2-1) 分光学的および速度論的解析

石英セル (光路長 1 cm) に galvinoxyl (G[•]) (2.4 × 10⁻⁶ M) のアセトニトリル溶液 3 mL を入れ、10 分間アルゴンバブルすることにより、酸素を除去した。

一方、カテキン(1)、ケルセチン(2)、および平面型カテキン誘導体(3)の適当な濃度のアセトニトリル溶液を別途調製し、同様にアルゴンバブルにより酸素を除去した。室温(298 K)で、溶媒であるアセトニトリルによりブランクスペクトルを測定してあるHewlett-Packard 8453フォトダイオード・アレ一分光光度計のkineticモードで、攪拌子を用いて攪拌しながらG[•]溶液に、G[•]濃度に対して10倍濃度以上になるように適当量の1-3溶液をマイクロシリンジを用いて加えた。擬一次速度定数(k_{obs})はApple社のMacintoshパーソナルコンピュータ上で、KaleidaGraphを用い、最小2乗法により行った。 $\ln(A_{\infty} - A)$ vs t の擬一次プロットは $\rho > 0.999$ の係数で3半減期以上、直線フィットできた。

2-2) 塩基性条件下における酸素への電子移動反応の速度論的解析

石英セル(光路長 1 cm)に平面型カテキン(1.5×10^{-4} M)のアセトニトリル溶液 3 mL 入れ、10 分間アルゴンバブルすることにより、酸素を除去した。また、メタノールとメトキシド (*n*-tert butyl ammonium hydroxide) との反応により生成するメトキシドアニオン溶液(0.01 M)を同様にして酸素を除去した。

スペクトル変化は室温(298k)で溶媒であるアセトニトリルによりブランクスペクトルを測定してある Hewlett-Packard 8453 フォトダイオード・アレ一分光光度計(UV)の standard で測定した。平面型カテキン溶液(1H₂)に MeO⁻を等量(1.5×10^{-4} M)加えることによ

り、カテキンアニオン(1⁻)が生成した。さらに MeO⁻が 1H₂ の 2 倍当量(3.0×10^{-4} M)になるまで加える事により、平面型カテキンジアニオン (1²⁻)が生成した。

セプタムをはずし分子状酸素(2.6×10^{-3} M)を吹き込むことにより生じる平面型カテキンラジカルアニオン由来の 430 nm の急光度変化を UV の kinetic で 7200 (s)を 120 (s)間隔で測定した。同様の操作を 10 分間酸素バブルをすることにより、酸素飽和状態 (1.3×10^{-2} M) でおこなった。

2-3) 平面型カテキンラジカルアニオンの測定

1H₂(3.4×10^{-3} M)に 2 等量の MeO⁻(7.0×10^{-3} M) を加えることにより生じる、平面型カテキンジアニオンが分子状酸素と反応することにより生成する平面型カテキンラジカルアニオンを LABTEC LLC-04B ESR sample tube の中にいれ、電子共鳴スピン ESR(JEOL JES-FA100)を測定した。

得られた ESR スペクトルを、Apple 社の Macintosh パーソナルコンピュータ上で、ESR all Version 1.01(Calleo Scientific Publisher)でコンピュータシミュレーションした。

2-4) スーパーオキシドの測定

1²⁻(3.4×10^{-3} M)と分子上酸素(1.3×10^{-2} M)が反応することにより生成するスーパーオキシドアニオン(O₂^{•-})と OOH[•]を、113k の凍結 ESR で測定した。

C. 研究結果

1) 光照射下における芳香族ニトロ化合物からの NO の生成

1-1) 6-ニトロベンツ[a]ピレンからの NO の生成

ベンツ[a]ピレンのモノニトロ体(1-, 3-, 6-ニトロ体)をモデル化合物として、光照射による NO の生成を carboxyPTIO の ESR シグナルの変化から検出することを試みた。その結果、1-, 及び 3-ニトロ体は、光照射下、carboxyPTIO の ESR シグナルの変化が見られないのに対して (Fig. 1)、6-ニトロ体は carboxyPTIO の ESR シグナルは carboxyPTI への変化が見られた。carboxyPTI の生成は carboxyPTIO と NO との反応に由来することから、6-ニトロベンツ[a]ピレンは光照射によって NO が生成することが示された (Fig. 2)。

さらに 6-ニトロベンツ[a]ピレンからの NO の生成を確認する為、MGD-Fe²⁺錯体を用いて 6-ニトロベンツ[a]ピレンから生成する NO のスピントラップを試みた。その結果、1-及び 3-ニトロベンツ[a]ピレンからは MGD-Fe²⁺存在下、2分間、光を照射しても全く ESR シグナルが検出されないのに対して、6-ニトロベンツ[a]ピレンからは NO がスピントラップされることによってみられる特徴的な 3本の ESR シグナルが照射時間とともに増加することが示された。

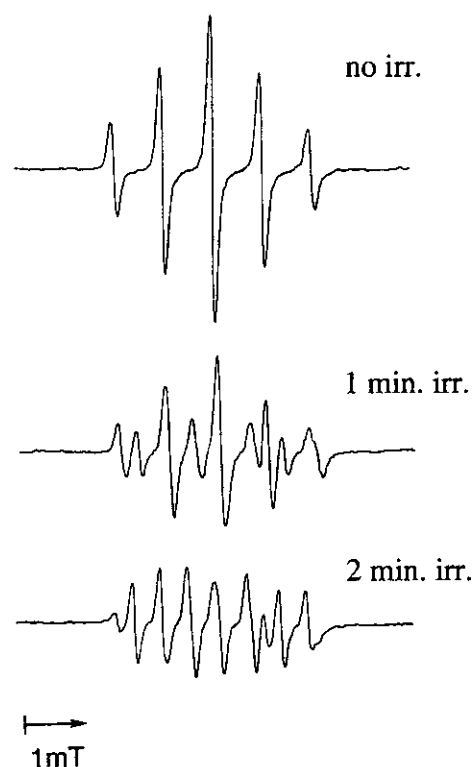


Figure 1. ESR spectra of carboxyPTIO in the presence of 6-nitroBaP. Samples contained 5 μ M carboxyPTIO and 200 μ M 6-nitroBaP in phosphate buffer pH7.6 (containing 20% DMF), and ESR spectra were recorded with a modulation amplitude of 2.0G after photo-irradiation for 0, 1, or 2 min.

一方、6-ニトロベンツ[a]ピレンを光照射下、ESR を測定するとベンツ[a]ピレンの 6-オキシラジカル由来のシグナルが観測された (Fig. 3)。

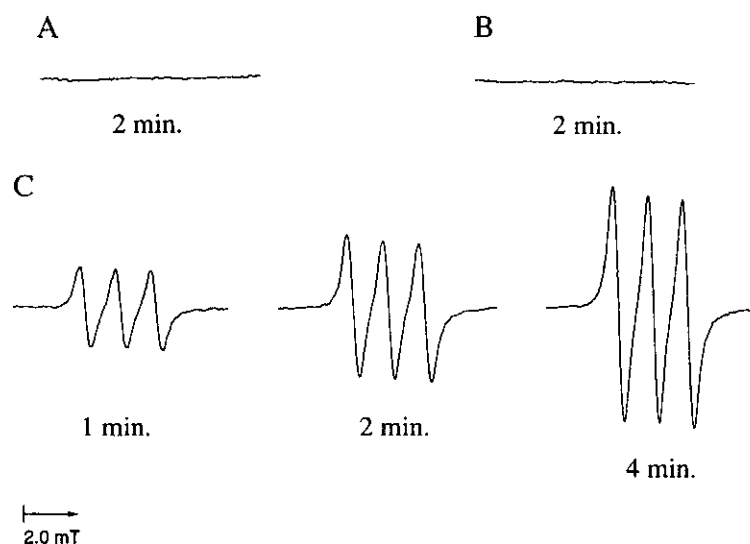


Figure 2. ESR spectra of Fe-MGD in the presence of 1-, 3-, and 6-nitroBaPs. Samples contained 200 μ M of 1-nitroBaP (A), 3-nitroBaP (B), or 6-nitroBaP (C), 75 mM of MGD and 15 mM of FeSO₄ in phosphate buffer pH 7.2 (containing 20% DMF), and ESR spectra were recorded after photoirradiation for 1, 2, and 4 min. (6-nitroBaP), or 2 min. (1- and 3-nitroBaPs), with a modulation amplitude of 2.0 G.

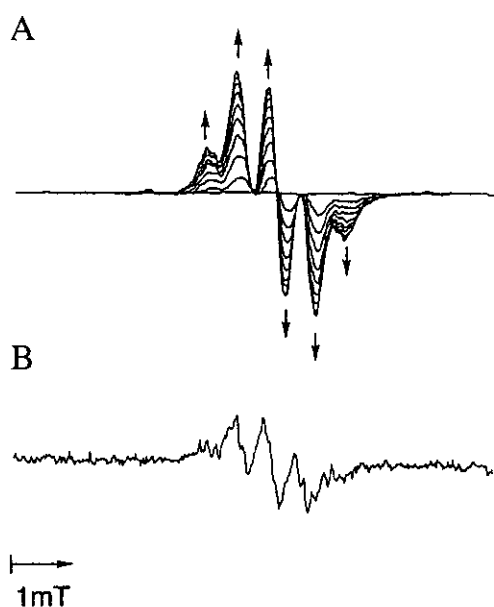


Figure 3. ESR spectra of 6-nitroBaP under photoirradiation. (A) 200 μ M of 6-nitroBaP in phosphate buffer pH7.6 (containing 20% DMF) were photoirradiated for 0, 0.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, or 16 min., and ESR spectra at a modulation amplitude of 2.0G were recorded under photoirradiated conditions. (B) ESR spectra of 6-nitroBaP photoirradiated for 5 min. recorded at a modulation amplitude of 0.2G.

以上、ベンツ[a]ピレンの 6-ニトロ体は光照射によって NO と 6-オキシ

ルベツツ[a]ピレンラジカルに分解することが明らかとなった。また、このNO生成反応は6-ニトロ体の特徴的な反応であることが示された。

1-2) 6-ニトロベンツ[a]ピレンの光分解反応

6-ニトロベンツ[a]ピレンの光照射下におけるNO生成反応機構を明らかにする目的で6-ニトロベンツ[a]ピレンを光分解して反応生成物の解析を行った。その結果、6-ニトロベンツ[a]ピレンは光分解反応によって、6-ヒドロキシベンツ[a]ピレンと3種類のベンツ[a]ピレンのキノン体(1,6-, 3,6-, 6,12-キノン)が生成した。この結果は6-ニトロベンツ[a]ピレンは光照射によってNOと6-オキシベンツ[a]ピレンラジカルに分解していることを示す。また、生成した6-オキシベンツ[a]ピレンラジカルはさらに光による酸化反応を経てキノン体へと変換されることが明らかとなった(Fig.4)。

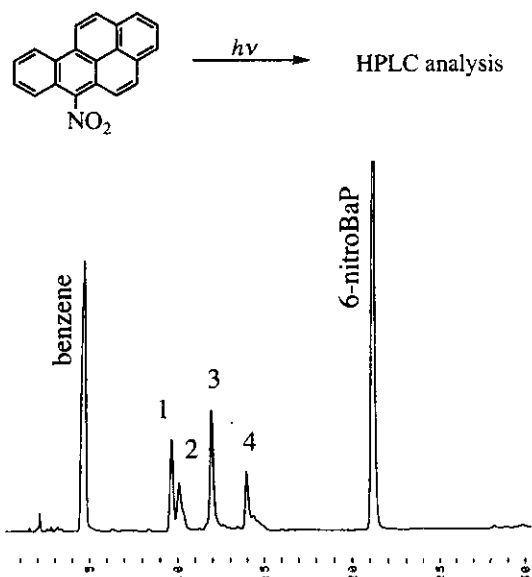
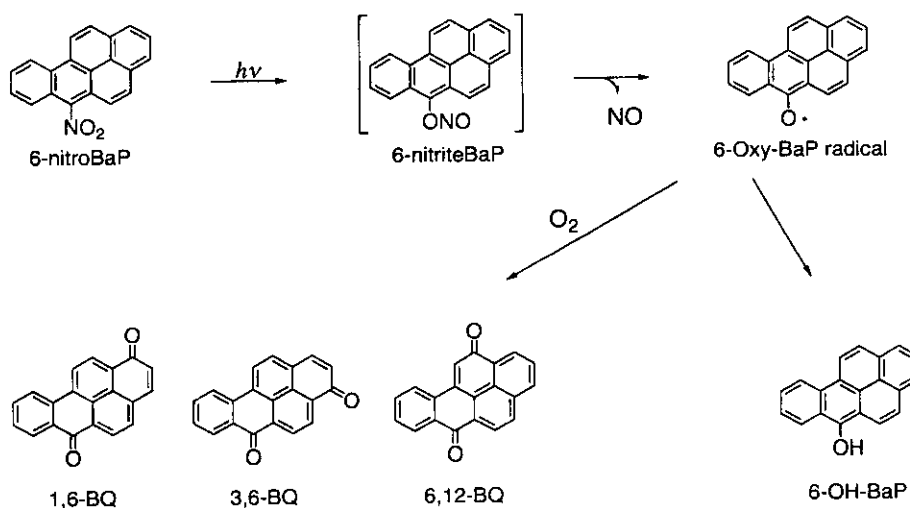


Figure 4. HPLC profile of the products formed from photoirradiated 6-nitroBaP. For analysis conditions, see the Experimental Section. The peak at 4.5 min represents benzene as the solvent. The numbers above the peaks correspond to (1) 1,6-BaPQ, (2) 3,6-BaPQ, (3) 6,12-BaPQ, and (4) 6-OH-BaP.



1-3) 光照射における DNA 切断反応

NO は生体内では多様な生理作用を示し、DNA に対しては塩基部分の修飾反応と側鎖の切断反応が進行する。そこで、ベンツ[a]ピレンの 1-, 3-, 6-ニトロ体について光照射条件下での DNA に対する作用を明らかにすることを試みた (Fig. 5)。DNA はスーパーコイル状のプラスミド pBR322DNA を用いた。その結果、1-ニトロ体と 3-ニトロ体は pBR322DNA の切断型である FormII の生成量は 2 時間光を照射しても顕著な増加はみられなかった。一方、6-ニトロベンツ[a]ピレンは 30 分間の光照射により明らかに FormII の増加がみられ、その生成量は長時間の光照射によって増加することから、6-ニトロベンツ[a]ピレンは光照射によって DNA 鎖の切断反応が進行していることが明らかとなった。さらに、6-ニトロベンツ[a]ピレンは光照射によって FormI のバンドの位置がシフトすることが明らかとなった。この現象より 6-ニトロベンツ[a]ピレンは光照射

によって生成したベンツ[a]ピレンのキノン体が DNA によってインターカレートすることによって DNA の二重らせん構造の巻き戻しが進行していることが示唆された。

2) 平面型カテキンの開発

2-1) 平面型カテキンの合成

カテキン(1)やケルセチン(2)などのフラボノイド類は、天然抗酸化剤として働くポリフェノールである。ケルセチンは、フリーラジカルを消去することにより脂質過酸化におけるラジカル連鎖反応停止させて、酸化的損傷や細胞死から生体を防御することが報告されている。一方、カテキンのラジカル消去作用はケルセチンと同様に広く研究されているが、フリーラジカルが関与する疾病の治療にカテキンを用いた報告例はあまりない。さらに、カテキ

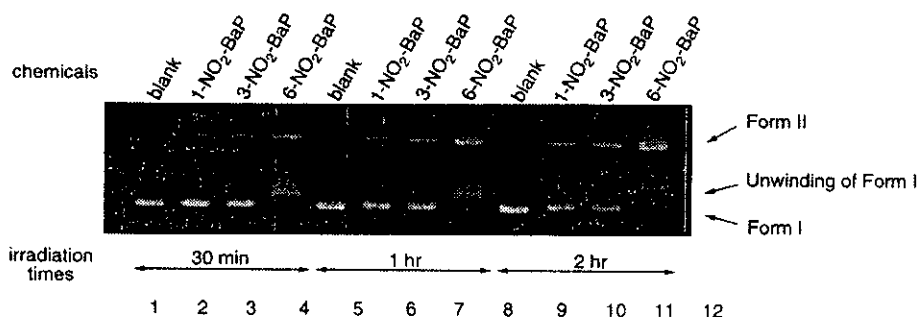


Figure 5. Cleavage of supercoiled pBR322DNA by 1-,3-, and 6-nitroBaPs upon photo-irradiation.

ンを臨床医学的に使用する前に、そのフリーラジカル消去能をさらに向上させる必要があり、細胞膜を通過させるために適度な脂溶性も必要となる。ケルセチンの優れた抗酸化作用は C2=C3 の 2 重結合により分子が平面構造を有し、生成するラジカル中間体の不対電子が分子全体に非局在化することでラジカルが安定化されるためである。一方、カテキンの B 環は A 環に対して垂直になっていることから、カテキンの分子構造を平面にすることができれば、ラジカル消去能をさらに向上できる可能性がある。そこで我々は $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ をルイス酸として用い、カテキンとアセトンとの oxa-Pictet-Spengler 反応により、平面型カテキン (**3**) を合成した。得られた **3** の構造のキャラクタリゼーションは、 ^1H および ^{13}C NMR、および UV-visible スペクトルにより行った。**3** のフェノール性 OH 基の 4 つのプロトンによる ^1H シグナルから、アセトンが B 環のカテコール部位とは反応していないことがわかった。また、**3** の平面構造は、A 環および B 環上の 4 つの OH 基を $t\text{-Bu}(\text{Me})_2\text{SiO}$ 基で置換したテトラ-O-シリル誘導体 (**4**) の単結晶 X 線構造解析により確認した (Fig. 1)。また、この X 線構造解析から、C 環上の 3-H は反応を通して酸触媒ラセミ化を起こさず、その立体化学が保持されていることが明らかとなった。

2-2) 平面型カテキンのラジカル消去能

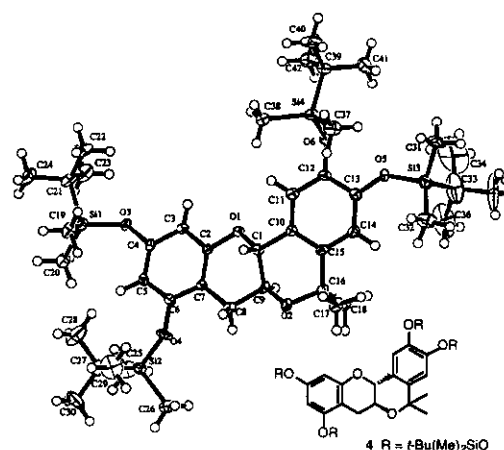


Figure 1. X-ray structure of tetra-O-silylated analogue (**4**) of **3**, showing ellipsoids at 50 % probability.

嫌気性条件下、galvinoxyl (G^{\bullet}) のアセトニトリル (MeCN) 溶液に、カテキン (**1**) を加えると、 G^{\bullet} に由来する 428 nm の吸収の減少が観測された (Fig. 2)。

Figure 2 に示す galvinoxyl (G^{\bullet}) に由来する 428 nm に吸光度の減少は、**1-3** の濃度が G^{\bullet} の濃度の 10 倍以上の条件下 ($[\mathbf{1-3}] \gg 10[\text{G}^{\bullet}]$) では、**1-3** の濃度 ($[\mathbf{1-3}]$) に対して擬一次速度式に従った (eq 2)。

$$d[\text{G}^{\bullet}]/dt = k_{\text{obs}}[\text{G}^{\bullet}] \quad (\text{eq 2})$$

ここで、 k_{obs} は擬一次速度定数である。**Eq 2** の両辺を積分すると、**eq 3** が得られる。

$$\ln([\text{G}^{\bullet}]/[\text{G}^{\bullet}]_0) = k_{\text{obs}}t \quad (\text{eq 3})$$

ここで、 $[\text{G}^{\bullet}]_0$ は $t = 0$ のときの G^{\bullet} の濃度である。

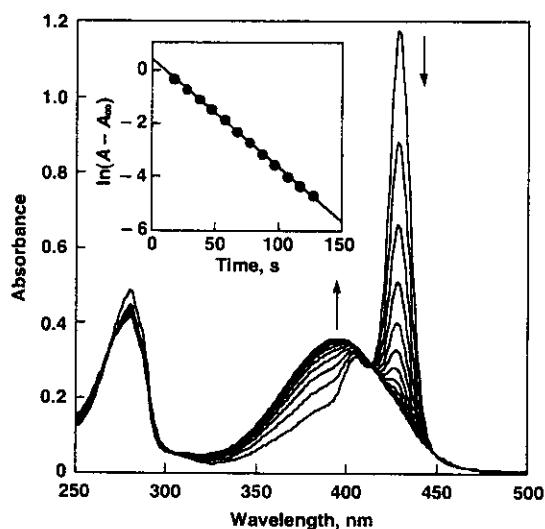


Figure 2. Spectral change in the reaction of **1** (1.5×10^{-4} M) with G^\bullet (2.4×10^{-6} M) in deaerated MeCN at 298 K. Interval: 10 s. Inset: first-order plot based on the absorption change at 428 nm.

一方、 $t=0$, t, ∞ の428 nmの吸光度をそれぞれ A_0 , A , A_∞ とすると、 G^\bullet の濃度と吸光度の間には **eq 4** の関係が成り立ち、**eq 3** と **eq 4** から、**eq 5** が得られる。

$$[G^\bullet]/[G^\bullet]_0 = (A_\infty - A)/(A_\infty - A_0) \quad (\text{eq 4})$$

$$\ln(A_\infty - A) = k_{\text{obs}}t - \ln(A_\infty - A_0) \quad (\text{eq 5})$$

Eq 5 は、 $\ln(A_\infty - A)$ を時間 t に対してプロットすると、直線が得られ、その傾きから擬一次速度定数 k_{obs} が求められることを示している。実際、 $\ln(A_\infty - A)$ を時間 t に対してプロットすると、**Figure 2** の inset に示すような直線が得られ、この傾きから k_{obs} を決定した。得られた k_{obs} は **Figure 3** に示すように **1-3**の濃度の増加に比例して増加した。

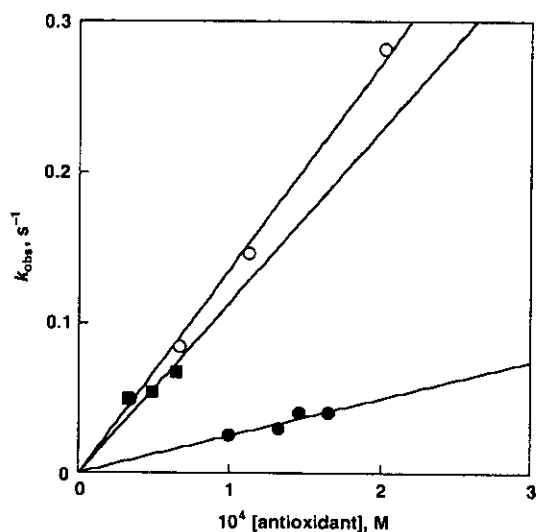


Figure 3. Plot of the pseudo-first-order rate constant (k_{obs}) vs the concentration of **1** (black circles), **2** (white circles), and **3** (black squares) for the hydrogen atom transfer from antioxidants to G^\bullet (2.4×10^{-6} M) in deaerated MeCN at 298 K.

このことから、 k_{obs} と **1-3** から G^\bullet への水素移動速度定数(k_{HT})との間には **eq 6** の関係が成り立つ。

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{HT}}[\mathbf{1-3}] \quad (\text{eq 6})$$

よって、全体の反応速度は **eq 7** で表され、 G^\bullet と **1-3** のそれぞれの濃度に対して1次反応であることがわかった。(5)

$$\text{Rate} = d[G^\bullet]/dt = k_{\text{HT}}[G^\bullet][\mathbf{1-3}] \quad (\text{eq 7})$$

このようにして求めた k_{HT} の値をまとめて **Table 1** に示す。**Table 1** に示すように、平面構造をもつ **2** や **3** の k_{HT} 値は、**1** よりも約5倍大きいことがわかった。これは、平面分子の方がラジカルの不対電子が分子全体に非局在化されるためであると考えられるが、詳細

については現在検討中である。

Table 1. Rate constant (k_{HT}) for hydrogen transfer from 1, 2, and 3 to Galvinoxyl (G•) in deaerated MeCN at 298K.

Antioxidant	$10^3 k_{HT} \cdot M^{-1} s^{-1}$
1	0.234
2	1.08
3	1.12

以上の結果から、抗酸化剤のラジカル消去能には、分子の平面性が非常に重要であることが明らかとなった。

2-3) 酸化的 DNA 切断反応に対する平面型カテキンのラジカル消去能の評価

ヒドロキシルラジカル($\bullet OH$)による DNA 切断に及ぼす 1-3 の効果についても検討した。 $\bullet OH$ は、活性酸素種の中でももっとも反応性が高く、老化やフリーラジカルが関与する酸化的損傷の原因となっている。スーパーコイ

ル型 pBR322DNA は、 Fe^{3+} 存在下、過酸化水素(H_2O_2)から発生させた $\bullet OH$ (Fenton 反応)により、極めて効率良く切断される。**Figure 4**に示すように、カテキン(1)は、高濃度条件下(1.25 and 2.50 mM)では DNA 切断を抑制するが、低濃度条件下(0.25 mM)では、抗酸化剤非存在下よりも DNA 切断を増幅し、いわゆる pro-oxidant 効果を示した。ケルセチン(2)は、0.25 および 1.25 mM においては pro-oxidant 効果のみが観測された。以前に報告された結果と同様に、観測された 1 および 2 の pro-oxidant 効果は、遷移金属存在下における抗酸化剤の自動酸化によるものと考えられる。この自動酸化により、ヒドロキシルラジカルなどのラジカル種が生成する。一方、1 および 2 の pro-oxidant 効果とは対照的に、平面型カテキン 3 は、実験を行ったあらゆる濃度範囲で Fenton 反応による DNA 切断を抑制し、カテキンを越えるヒドロキシルラジカル消去能を示した。また、3 は 1 よりもずっと脂溶性が高く、その優れたラジカル消去能は、特に細胞

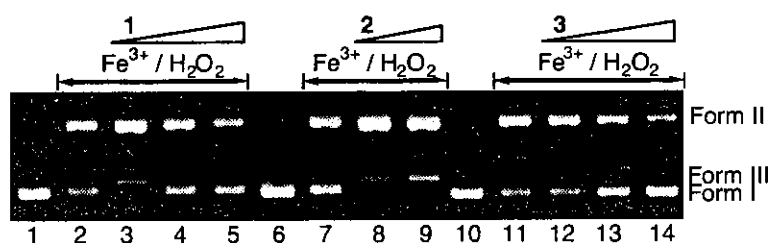


Figure 4. Effects of 1, 2, and 3 on DNA breakage induced by Fe^{3+}/H_2O_2 . Assays were performed in 50 mM sodium cacodylate buffer, pH 7.2, containing 45 μM bp of pBR322DNA, for 1h at 37°C. Lanes 1, 6, and 10; DNA alone, lanes 2, 7, and 11; 10 mM H_2O_2 and 10 μM $FeCl_3$, lanes 3-5, 8 and 9, and 12-14; 10mM H_2O_2 and 10 μM $FeCl_3$ in the presence of 0.25, 1.25, and 2.5 mM 1 (lanes 3-5), 0.25 and 1.25 mM 2, and 0.25, 1.25 and 2.5 mM 3.