

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 15 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 16 (2004) 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

(ア)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 . . . 7	
福原 潔	

(イ)紫外線による老化と遺伝毒性の解析	20
川西 正祐	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
-------------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	33
---------------------------	----

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 本研究事業ではオゾンホール拡大等、地球環境の悪化によって今後さらに人への健康に重篤な被害を与えることが予測される紫外線影響を取り上げ、健康への的確な評価とその予防法について検討を行う。紫外線は生活関連物質や環境汚染物質、生体分子を活性化して活性酸素等のラジカルを発生して生体機能障害を引き起こし、癌や心臓病などの生活習慣病の発症や老化の原因となる。しかしながらその作用機構については殆ど明らかにされておらず、紫外線の人への健康影響は的確に評価されていない。そこで、光毒性に関連すると思われる生活関連化学物質についてラジカル生成機構の解析とラジカル毒性の予防目的に資する新規抗酸化剤の開発を検討した結果、平成15年度は以下の成果が得られた。1) 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成分や医薬品(芳香剤として利用されているニトロムスク、化粧品や食品添加物等に使用されている二酸化チタン、医薬品として用いられているベルベリン、色素のローダミン類)が光照射下、生体内高分子(DNA等)を酸化的に損傷して遺伝毒性を発現する機構を明らかにした。2) キサントン誘導体が太陽紫外線による発がんや光過敏症に対して有効な化学予防物質となることが予測された。3) ラジカル毒性への化学予防物質として昨年度開発した平面型カテキンをさらに改良して、細胞表面のみならず、細胞内のラジカル毒性についても強力な予防効果を発揮する化学予防物質を開発した。以上、地球環境の悪化によって紫外線照射量が増加すると生活関連化学物質が活性化されてラジカル毒性を引き起こし、人の健康に重大な影響を与えることが科学的に証明された。また、その予防的化学物质投与において優れた新規抗酸化剤が開発できたことは、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される。

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関わってくるのが予測される。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15年度は昨年度に引き

続き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、光アレル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、紫外線による健康影響の予防に有効な抗酸化物の開発を目的として昨年度合成した平面型カテキンの合成法の改良と細胞内でのラジカル消去能の向上を目的とした脂溶性平面型カテキンの合成を行った。さらに、太陽紫外線による発がんや光過敏症に対して有効な化学予防剤について天然物からの探索を行った。

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) ムスクキシレンの光毒性の解析

pBR322DNA に対するムスクキシレンの酸化的損傷能は NADH 存在下、光照射した後、アガロース電気泳動によって解析した。活性酸素の生成については DMPO をスーパーオキシドおよびヒドロキシルラジカルのスピントラップ剤、また一重項酸素のスピントラップ剤としては TEMP を用いて ESR で解析した。

1-2) 脂溶性平面型カテキン誘導体の開発

精製カテキンを真空乾燥した後、アルゴン雰囲気下、THF に溶解し、ケトンを加えた。その後、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルフォネートを加え、0°C で 12 時間攪拌した。

その後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えジエチルエーテルを用いて生成物を抽出した。ジエチルエーテル層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥、減圧下で溶媒を留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して目的物を得た。

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 の断片をサブクロー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 ^{32}P 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 ($\lambda_{\text{max}}=365 \text{ nm}$) 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ス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'-deoxyguanosine (8-oxodG) の定量は電気化学検出器付 HPLC (HPLC-ECD) を用いて行った。

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) ムスクキシレンの光毒性の解析
代表的なニトロムスク (Musk xylene, Musk ketone, Musk ambrette) について、NADH 存在下、pBR322DNA を用

いて DNA 鎖切断反応について検討した。その結果、いずれの化合物も可視光非照射下では DNA 切断反応が進行しないのに対して、可視光照射下では強力な DNA 鎖の切断がみられた。切断活性は Musk Ambrette が最も強かった。また、ESR によるスピントラップ法で活性酸素の生成を検討した。スピントラップ剤として DMPO を用いて、NADH 存在下、可視光照射すると、ヒドロキシルラジカル付加体 (DMPO-OH) が検出された。スーパーオキシド消去剤 (SOD)、過酸化水素消去剤 (Catalase) およびヒドロキシルラジカル消去剤 (Ethyl alcohol) 存在下、同様の実験を行ったところ DMPO-OH のピークが減少したことから、本反応ではスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) が生成し、それが不均化等を経てヒドロキシルラジカルを生成していることが示唆された。また、ニトロムスクは、NADH 存在下、光照射を嫌氣的条件で行うと、ニトロムスクの一電子還元体の生成が ESR で確認された。以上の結果より、ニトロムスクは光励起されると NADH により一電子還元されてラジカルアニオンが生成した後、酸素に電子を渡して $\text{O}_2^{\cdot-}$ を発生していることが明らかとなった。なお、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成量は Musk ambrette が最も多かった。

1-2) 脂溶性平面型カテキン誘導体の開発

昨年度開発した平面型カテキンの合成法を改良して汎用性の高い合成法を開発した。本反応は反応溶媒として THF、ルイス酸として TMSOTf を用いて

カテキンに様々なケトンの導入が可能である。そこでアルキル鎖の長さの異なるケトンと反応させて脂溶性を増加した新規平面型カテキン誘導体を8種類合成した。次に合成した化合物の抗酸化能をルミノール法を用いて AAPH 由来のペルオキシラジカルに対する消去能から解析した。その結果、平面型カテキンの抗酸化能はアルキル基の側鎖が長くなるにつれて(C1~C3)増強された。一方、さらに側鎖が長くなると抗酸化能の低下がみられた。

1-3) 光増感反応による DNA 損傷に対するキサントン誘導体の化学防護効果

太陽紫外線、特に UVA による皮膚がんや光過敏症に対する化学予防には、光を散乱または吸収するサンスクリーン剤やカロテノイドのような抗酸化剤の利用が考えられる。本研究では植物から抽出されるキサントン誘導体 1: Gentiacaulein, 2: Norswertianin, 3: Bellidifolin, 4: Swerchirin) に着目し、光増感反応による DNA 損傷性に対する防護効果を検討した。その結果、Gentiacaulein と Norswertianin は UVA 照射下のリボフラビンによる DNA 損傷に対して濃度依存的な抑制効果を示し、5-10 μM で、50 μM のリボフラビンによる DNA 損傷をほぼ完全に抑制した。低濃度のキサントン誘導体にはサンスクリーンの働きはなく、消光作用により DNA 損傷を抑制していると考えられた。さらに、キサントン誘導体は、リボフラビンの蛍光を消光しなかったため、リボフラビンの励起一重項状態ではなく、励起三重項状態を失活させていると考えられる。分子軌道計算で

は、Gentiacaulein および Norswertianin から励起状態リボフラビンへの分子間電子移動と逆電子移動を介した失活機構が可能であることが示された。

2) 紫外線による老化と遺伝毒性の解析

2-1) 酸化チタン光触媒による塩基特異的 DNA 損傷

ホルムアルデヒドなどシックハウス症候群の原因物質の除去目的や白色顔料、食品添加物として近年大量に利用されるようになった二酸化チタン (アナターゼ及びルチル) の光触媒作用による DNA 損傷性とその分子機構をヒトがん関連遺伝子 DNA を用いた実験で検討した。その結果、アナターゼ、ルチル共に、Cu(II) が共存すると照射下で濃度依存的に DNA を損傷した。DNA 損傷の程度はルチルよりもアナターゼの方が大きかった。DNA 損傷は、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、バソクプロイン (Cu(I) イオンのキレート剤) により抑制されたことから、過酸化水素 (H_2O_2)、スーパーオキシド (O_2^-)、Cu(I) の関与が考えられた。一方、ヒドロキシルラジカル ($^{\bullet}\text{OH}$) の消去剤 (エタノール、マンニトール、ギ酸ナトリウム) は抑制効果を示さなかった。酸化チタン、Cu(II)、バソクプロインを含むリン酸緩衝液に光照射すると Cu(I)-バソクプロイン錯体が生成したが、SOD により抑制された。また、ルチルよりもアナターゼの方が O_2^- を多く生成した。従って、光触媒作用によって生成した O_2^- により Cu(II) が Cu(I) に還元され、

DNA 損傷の活性種生成に関与することが考えられた。さらに DNA の酸化的損傷を詳細に解析した結果、グアニンの酸化による 8-oxodGuo の生成とシトシンの損傷が認められた。また、ピペリジン処理を行うとチミンの部位で高頻度の切断がみられ、GT の二塩基損傷が示唆された。以上、二酸化チタンは光触媒反応によって活性酸素 ($H_2O_2/Cu(I)$) を生成し、グアニン、シトシン、チミンを損傷することが明らかとなった。

2-2) ベルベリンの光増感反応による DNA 損傷機構

眼や皮膚の薬に使われているアルカロイドの一種で、最近光毒性が報告されたベルベリンの光増感反応による DNA 損傷機構を検討した。その結果、光照射されたベルベリンは、濃度依存的に DNA を損傷した。全てのグアニンが高い頻度で酸化され、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシンが生成したことが示唆された。窒素下の実験および一重項酸素の消去剤であるメチオナルの添加で、それぞれ DNA 損傷が抑制された。以上、ベルベリンの光増感反応による DNA 損傷は、一重項酸素生成を介した Type II の機構によると考えられた。

2-3) ローダミン類の光増感反応によるグアニン特異的 DNA 損傷

色素分子として知られているローダミンは光毒性が報告されている。そこでローダミン類の光増感反応による DNA 損傷性とその塩基配列特異性を検討した。その結果、光照射されたロ

ーダミン (RH-6G) は濃度依存的に DNA を損傷した。DNA 損傷は窒素下でも空気下と同程度に起こることから、DNA 損傷の過程に酸素は関与していないものと考えられる。ピペリジンおよび Fpg 処理を行った場合共に、全てのグアニンが高い頻度で損傷された。しかし、グアニンの酸化生成物として知られている 8-oxodGuo はほとんど検出されなかった。このことから RH-6G の光増感反応による DNA 損傷は、光増感剤の DNA 損傷機構としてよく知られている Type II (一重項酸素) 以外の機構を介して起こると考えられた。

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について検討した結果、食品成分や医薬品および生活関連化学物質の中には、紫外線照射によって遺伝傷害を伴う毒性を発現する化合物が多く存在することが明らかとなった。特にホルムアルデヒドなどシックハウス症候群の原因物質の除去目的や白色顔料、食品添加物として近年大量に利用されるようになった二酸化チタンが光毒性を示したことは、厚生行政としては早急に適正な使用方法について十分検討することが必要である。また、香料として代表的な Musk Ambrette は、1985 年、IFRA (International Fragrance Association) が神経毒性、光アレルギーの問題で、使用禁止または量規制を勧告しているが、今回の研究によって、Musk Ambrette の

光毒性がラジカルによって引き起こされている事が初めて証明された。これらの結果は、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加が人の健康に致命的な影響を与えることの科学的根拠となり、紫外線影響の的確な評価と予防について積極的な行政的取り組みが早急に必要である。本研究では紫外線によるラジカル毒性に対する予防法についても検討を行い、昨年度開発した平面型カテキンをさらに改良して、細胞内でのラジカル消去能の向上を目的とした誘導化を行った。この平面型カテキン誘導体は細胞膜透過性が高く、紫外線による細胞毒性に対する効果的な予防薬としての利用が期待される。また、植物成分であるキサントン誘導体が光毒性に対して従来のラジカル消去作用とは異なった全く新しいメカニズムで防御作用を示すことも明らかにした。この結果はキサントン誘導体が紫外線発がんや光過敏症に対する化学予防剤への応用の可能性を示すものである。なお、平面型カテキンに関する本研究は昨年度の米国科学情報誌 *Science News* (163, 141, 2003) に引き続き、今年度は日経産業新聞(先端科学技術欄 H15.5.13)にも紹介され、大きな社会的反響が得られた。

E. 結論

紫外線は生活関連物質や環境汚染物質、生体分子を活性化して活性酸素等のラジカルを発生して生体機能障害を引き起こし、癌や心臓病などの生活習慣病の発症や老化の原因と

なる。しかしながらその作用機構については殆ど明らかにされておらず、紫外線の人への健康影響は的確に評価されていない。そこで、光毒性に関連すると思われる生活関連化学物質についてラジカル生成機構の解析とラジカル毒性の予防目的に資する新規抗酸化剤の開発を検討した結果、平成15年度は以下の成果が得られた。1) 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成分や医薬品(芳香剤として利用されているニトロムスク、化粧品や食品添加物等に使用されている二酸化チタン、医薬品として用いられているベルベリン、色素のローダミン類)が光照射下、生体内高分子(DNA等)を酸化的に損傷して遺伝毒性を発現する機構を明らかにした。2) キサントン誘導体が太陽紫外線による発がんや光過敏症に対して有効な化学予防物質となることが予測された。3) ラジカル毒性への化学予防物質として昨年度開発した平面型カテキンをさらに改良して、細胞表面のみならず、細胞内のラジカル毒性についても強力な予防効果を発揮する化学予防物質を開発した。

以上、地球環境の悪化によって紫外線照射量が増加すると生活関連化学物質が活性化されてラジカル毒性を引き起こし人の健康に重大な影響を与えることが科学的に証明された。また、その予防的物質投与において優れた新規抗酸化剤が開発できたことは、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される。

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 光アレルギーが問題となっているムスク系香料について活性酸素生成能と DNA 障害について検討を行った。その結果、ムスク系香料として代表的な musuk ketone、musuk xylene、musuk ambrette は還元剤存在下、光照射するとスーパーオキシドを介してヒドロキシルラジカルが発生して、DNA 鎖を強力に切断することを明らかにした。ムスク系香料の光アレルギーの発症機構として活性酸素の関与を明らかにしたのは本研究結果が初めての報告例であり、環境化学物質、および生活関連物質として大量に存在する様々な芳香族ニトロ化合物の人への影響を適切に評価する為には、光照射による毒性発現機構を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、昨年度開発した平面型カテキンの合成法を改良して様々なケトンが導入できる汎用性の高い平面型カテキン誘導体の合成法を確立した。本方法によって合成した脂溶性平面型カテキン誘導体は細胞膜透過性が向上し、かつ強力な抗酸化力を有することから紫外線照射によって引き起こされる様々なラジカル毒性に対して優れた予防効果が期待される。

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。我々は大気中でのニトロアレーンの生成に注目し、新規に合成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¹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、我々は電気化学的手法を用いることによってニトロアレーンもキノンと同様に活性酸素を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た。

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²の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くことが予測される。そこで昨年度はニトロアレーンの毒性について光の影響を検討した結果、ディーゼル排ガス中の成分として大気中に高濃度に存在している 6-ニトロベンツピレンは光照

射によって一酸化窒素 (NO) が発生して DNA 障害を引き起こすことを明らかにした。この結果はニトロアレーンの生体影響は、従来のニトロ基の還元代謝活性化に加えて、光照射によって引き起こされる NO 毒性についても検討する必要性を示している。

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。そこで昨年度は天然抗酸化剤として代表的な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の合成し、本化合物が安全性の高い強力な抗酸化剤であることを明らかにした。

今年度は紫外線による人への影響を明らかにすることを目的として、香料として代表的なムスクキシレンの光毒性について検討を行った。また、紫外線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、昨年度開発したカテキンの立体構造の平面化反応を利用した細胞レベルで強力な抗酸化能を発揮する脂溶性平面型カテキン誘導体の開発を行った。

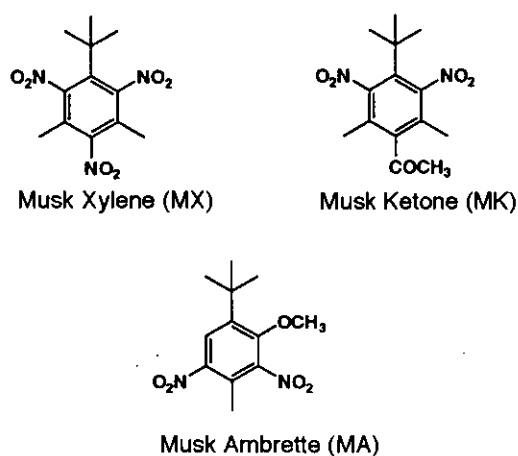


Figure 1. Chemical structures of Nitromusks

B. 研究方法

1) ムスクキシレンの光毒性の解析

1-1) DNA 切断実験

エッペンドルフチューブに 45 μ M pBR322DNA と 1mM ムスクキシレン、10mM NADH を含む 50mM リン酸緩

衝液 (pH 7.4) 溶液 20 μ L を調整した後、室温下 300W photoreflector lamp で 2 時間照射した。反応停止液 (100mM TBE buffer, pH8.3, 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue) を 5 μ L 加えた後、アガロースゲル (1%) 電気泳動を行った。ゲルは ethidium bromide (1 μ g/mL) で 30 分染色、水洗した後、UV 照射条件下、写真撮影した。

1-2) ESR による活性酸素の検出

0.1mM ムスクキシレンと 1mM NADH の 50mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4) にスーパーオキシドおよびヒドロキシルラジカルのスピントラップ剤として DMPO を添加 (250mM) 後、LABTEC LLC-04B ESR sample tube に導入し、一定時間 300W photoreflector lamp で照射した後、電子共鳴スピン ESR (JEOL JES-FA100) を測定した。一重項酸素の検出薬としては TEMP を用いて同様の方法で測定した。

2) 脂溶性平面型カテキン誘導体の開発

2-1) 脂溶性平面型カテキン誘導体の合成

実験に使用した機器

NMR スペクトル: Varian Mercury AS-400、質量スペクトル: Waters 2695 Separations Module, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters micromass ZQ (ESI Positive and Negative)

使用した試薬

Acetone (和光, 012-00343), 3-Pentanone (和光, LDM 5726), 4-Heptanone (東京化成工業, FJD01), 5-Nonanone (東京化成

工業, JG01), 6-Undecanone (東京化成工業, GH01), 7-Tridecanone (東京化成工業, AR01), 10-Nonadecanone (東京化成工業, OIJ01), Propiophenone (東京化成工業, FGF01), Tetrahydrofuran, Dehydrated (関東化学, 407F1462), Trimethylsilylmethyl trifluoromethanesulfonate (Aldrich, 64035-64-9), Diethyl Ether (関東化学, 508F1443), Methanol (関東化学, 25183-81), Toluene (関東化学, 40180-81), Ethyl Acetate (関東化学, 14029-81), Hexane (関東化学, 18041-81), 発色液は、12 モリブド (VI) リン酸 n 水和物 (和光, 164-02132) 9.6 mL を純水 400 mL に溶解し、硫酸 (和光, 192-04696) 20 mL およびリン酸 (純度 85%, 和光, 167-02166) 6 mL を加えたものを使用した。

2-1-1) カテキンの精製

市販の(+)-Catechin hydrate (SIGMA 社: C-1251) をトルエン : アセトン : メタノール = 7 : 3 : 1 でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、酢酸エチル : ヘキサンで再結晶を行い精製カテキン (1) として、以下の実験に使用した。

2-1-2) カテキン誘導体の合成

方法 A: 精製カテキン (1eq.) を真空乾燥した後、アルゴン雰囲気下、THF 50 mL に溶解し、ケトン (3eq.) を加えた。その後、トリメチルシリルトリフルオロメタン sulfonate (TMSOTf, 1eq.) を加え、0°C で 12 時間攪拌した。その後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えジエチルエーテルを用いて、生成物の抽出を

行った。水層を再度ジエチルエーテルで抽出し、ジエチルエーテル層を合一後、飽和食塩水でジエチルエーテル層を洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。

(6aS, 12aR)-6a,12a-*trans*-2,3,8,10-Tetrahydroxy-5,5-dimethyl-5,6a,7,12a-tetrahydro-[1]benzopyrano[3,2-c][2]benzopyran (PC1) の合成

方法 A に従い、化合物 1 (0.5 g, 1.72 mmol) とアセトン (379 μ L, 5.16 mmol) を使用し、目的化合物を得た。得られた化合物をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒 : トルエン / アセトン / メタノール = 7 / 3 / 1) により精製を行い、化合物 2 (0.39 g) を 68.6 % で得た。 $[\alpha]_D^{25} + 13.0^\circ$ (*c* 1.3, MeOH), MS: 331 (M+H)⁺; ¹H NMR (CD₃OD) δ 1.48 (s, 3H, -CH_{3a}), 1.53 (s, 3H, -CH_{3b}), 2.44 (dd, 1H, *J* = 10.6 Hz, *J* = 15.4 Hz, 7ax), 2.93 (dd, 1H, *J* = 5.8 Hz, *J* = 15.4 Hz, 7eq), 3.84 (m, 1H, 6a), 4.44 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, 12a), 5.93 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz, 11), 5.96 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, 9), 6.56 (s, 2H, 4), 7.02 (d, 2H, *J* = 0.8 Hz, 1); Lit.¹³⁾ ¹H NMR (acetone-*d*₆) δ 1.45 (s, 3H, 5-CH_{3a}), 1.51 (s, 3H, 5-CH_{3b}), 2.49 (dd, 1H, *J* = 11.0 Hz, *J* = 15.0 Hz, 7ax), 2.96 (dd, 1H, *J* = 6.0 Hz, *J* = 15.0 Hz, 7eq), 3.82 (m, 1H, 6a), 4.45 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 9.5 Hz, 12a), 5.97 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz, 11), 6.05 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz, 9), 6.65 (s, 2H, 4), 7.07 (d, 2H, *J* = 1.0 Hz, 1); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 28.0 (4), 28.6 and 32.1 (-CH₃), 68.0 (3), 74.5 (2), 77.0 (7'), 95.8 (6), 96.5 (8), 101.3 (10), 112.7 (2'), 112.8 (5'), 125.4 (1'), 135.4 (6'), 145.1 (3'), 146.1

(4'), 156.9 (5), 157.9(9), 157.9 (7); Lit. ¹³
¹³C NMR (acetone-*d*₆) δ 28.1, 28.5, 32.0,
67.2, 74.1, 76.1, 96.0, 96.5, 101.1, 112.3,
113.0, 125.1, 135.3, 144.5, 156.3, 157.0,
and 157.5; Lit. ¹⁴ ¹³C NMR (acetone-*d*₆) δ
27.2 (4), 28.7 and 31.4 (-CH₃), 66.6 (3),
73.5 (2), 75.5 (7'), 95.2 (6), 95.9 (8),
100.1 (10), 111.8 (2'), 112.1 (5), 124.7
(1'), 135.5 (6'), 143.9 (3'), 145.0 (4'),
156.7 (9), 156.7(7), 157.2 (5); [M+H]⁺:
331; Lit. ¹⁴ EI-MS [M]⁺: 330.

(6aS, 12aR)-6a,12a-*trans*-2,3,8,10-Tetra-
hydroxy-5,5-diethyl-5,6a,7,12a-tetra-
hydro-[1]benzopyrano[3,2-*c*][2]benzo-
pyran (PC2) の合成

方法 A に従い、化合物 1 (0.5 g, 1.72
mmol) と 3-ペンタノン(546 μL, 5.16
mmol) を使用し、目的化合物を得た。
得られた化合物をシリカゲルクロマト
グラフィー (展開溶媒: トルエン / ア
セトン / メタノール=7 / 3 / 1) によ
り精製を行い、化合物 3 (0.41 g) を
66.5 % で得た。[α]_D + 18.1° (c 1.3,
MeOH), ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.63 (dd,
3H, *J* = 7.2 Hz, -CH₂CH₃), 1.00 (dd, 3H, *J*
= 7.2 Hz, -CH₂CH₃), 1.61 (qd, 1H, *J* = 7.1
Hz, *J* = 14.4 Hz, -CH₂CH₃), 1.69 (qd, 1H,
J = 7.5 Hz, *J* = 14.8 Hz, -CH₂CH₃), 1.92
(qd, 1H, *J* = 6.9 Hz, *J* = 14.0 Hz, -
CH₂CH₃), 2.07 (qd, 1H, *J* = 7.5 Hz, *J* =
15.2 Hz, -CH₂CH₃), 2.45 (dd, 1H *J*
= 10.4 Hz, *J* = 15.2 Hz, 7ax), 2.97 (dd, 1H *J*
= 6.0 Hz, *J* = 15.6 Hz, 7eq), 3.77 (m, 1H,
6a), 4.41 (dd, 2H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 9.2 Hz,
12a), 5.94 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, 11), 5.97 (d,
2H, *J* = 2.4 Hz, 9), 6.50 (s, 2H, 4), 7.05 (d,
2H, *J* = 0.8 Hz, 1); ¹³C NMR (CD₃OD) δ

8.2 and 8.6 (-CH₃), 27.9 (4), 33.5 and 34.1
(-CH₂CH₃), 67.8 (3), 74.4 (2), 81.5 (7'),
95.8 (6), 96.5 (8), 101.3 (10), 112.5 (2'),
112.6 (5'), 127.2 (1'), 133.4 (6'), 144.9
(3'), 146.0 (4'), 156.8 (5), 157.7 (9),
157.8 (7); [M+H]⁺: 359.

(6aS, 12aR)-6a,12a-*trans*-2,3,8,10-Tetra-
hydroxy-5,5-dipropyl-5,6a,7,12a-tetra-
hydro-[1]benzopyrano[3,2-*c*][2]benzo-
pyran (PC3) の合成

方法 A に従い、化合物 1 (0.5 g, 1.72
mmol) と 4-ヘプタノン(721 μL, 5.16
mmol) を使用し、目的化合物を得た。
得られた化合物をシリカゲルクロマト
グラフィー (展開溶媒: トルエン / ア
セトン / メタノール=7 / 3 / 1) によ
り精製を行い、化合物 4 (0.43 g) を
63.2 % で得た。[α]_D + 12.6° (c 1.3,
MeOH), ¹H NMR (CD₃OD) δ 0.93 (dd,
3H, -CH₂CH₂CH₃), 1.18 (dd, 3H, -
CH₂CH₂CH₃), 1.31 (m, 1H, -CH₂CH₂CH₃),
1.47-1.70 (m, 5H, -CH₂CH₂CH₃ and
-CH₂CH₂CH₃), 1.84 (m, 1H, -CH₂CH₂
CH₃), 1.97 (m, 1H, -CH₂CH₂CH₃), 2.43
(dd, 1H, *J* = 10.4 Hz, *J* = 15.6 Hz, 7ax),
2.95 (dd, 1H, *J* = 6.0 Hz, *J* = 15.6 Hz,
7eq), 3.77 (m, 1H, 6a), 4.39 (dd, 1H, *J* =
1.2 Hz, *J* = 9.2 Hz, 12a), 5.94 (d, 2H, *J* =
2.4 Hz, 11), 5.97 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz, 9),
6.52 (s, 2H, 4), 7.04 (d, 2H, *J* = 0.8 Hz,
1); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 14.7 and 15.1 (-
CH₂CH₂CH₃), 17.8 and 18.1 (-CH₂CH₂
CH₃), 27.9 (4), 44.2 and 44.3 (-CH₂CH₂
CH₃), 67.9 (3), 74.4 (2), 81.2 (7'), 95.8
(6), 96.5 (8), 101.3 (10), 112.4 (2'), 112.6
(5'), 126.9 (1'), 135.9 (6'), 144.8 (3'),
146.0 (4'), 156.8 (5), 157.7(9), 157.8 (7);

[M-H]: 385.

(6aS, 12aR)-6a,12a-*trans*-2,3,8,10-Tetrahydroxy-5,5-dibutyl-5,6a,7,12a-tetrahydro-[1]benzopyrano[3,2-c][2]benzopyran (PC4) の合成

方法 A に従い、化合物 1 (0.5 g, 1.72 mmol) と 5-ノナン (898 μ L, 5.16 mmol) を使用し、目的化合物を得た。得られた化合物をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: トルエン / アセトン / メタノール = 7 / 3 / 1) により精製を行い、化合物 5 (0.37 g) を 51.9 % で得た。 $[\alpha]_D + 15.6^\circ$ (c 1.3, MeOH), $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 0.81 (dd, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.92 (dd, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.16-1.37 (m, 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.42-1.48 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.42-1.48 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.59-1.71 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.86 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.99 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.43 (dd, 1H, $J = 10.4$ Hz, $J = 15.6$ Hz, 7ax), 2.94 (dd, 1H, $J = 6.0$ Hz, $J = 15.2$ Hz, 7eq), 3.76 (m, 1H, 6a), 4.39 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, 12a), 5.93 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, 11), 5.96 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz, 9), 6.51 (s, 2H, 4), 7.04 (d, 2H, $J = 0.4$ Hz, 1); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ 14.5 and 14.5 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.0 and 24.3 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 26.9 and 27.2 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.0 (4), 41.6 and 41.7 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 67.9 (3), 74.5 (2), 81.2 (7'), 95.8 (6), 96.5 (8), 101.3 (10), 112.5 (2'), 112.6 (5'), 126.9 (1'), 136.0 (6'), 144.9 (3'), 146.1 (4'), 156.9 (5), 157.7 (9), 157.9 (7); [M-H]: 413.

(6aS, 12aR)-6a,12a-*trans*-2,3,8,10-Tetrahydroxy-5,5-dipentyl-5,6a,7,12a-tetrahydro-[1]benzopyrano[3,2-c][2]benzopyran (PC5) の合成

方法 A に従い、化合物 1 (0.5 g, 1.72 mmol) と 6-ウンデカノン (1.06 mL, 5.16 mmol) を使用し、目的化合物を得た。得られた化合物をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: トルエン / アセトン / メタノール = 15 / 3 / 1) により精製を行い、化合物 6 (0.32 g) を 42.0 % で得た。 $[\alpha]_D + 11.4^\circ$ (c 1.3, MeOH), $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 0.81 (dd, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.90 (dd, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.12-1.40 (m, 10H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.44-1.53 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.58-1.70 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.85 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.98 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.43 (dd, 1H, $J = 10.4$ Hz, $J = 15.6$ Hz, 7ax), 2.94 (dd, 1H, $J = 6.0$ Hz, $J = 15.2$ Hz, 7eq), 3.76 (m, 1H, 6a), 4.39 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 9.2$ Hz, 12a), 5.93 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, 11), 5.96 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, 9), 6.51 (s, 2H, 4), 7.04 (d, 2H, $J = 0.8$ Hz, 1); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ 14.4 and 14.4 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.6 and 23.7 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.3 and 24.6 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 33.3 and 33.5 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.0 (4), 41.8 and 41.9 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 68.0 (3), 74.5 (2), 81.3 (7'), 95.8 (6), 96.6 (8), 101.3 (10), 112.5 (2'), 112.6 (5'), 126.9 (1'), 134.0 (6'), 144.9 (3'), 146.2 (4'), 156.8 (5), 157.7 (9), 157.9 (7); [M-H]:

441.

(6aS, 12aR)-6a,12a-*trans*-2,3,8,10-Tetrahydroxy-5,5-dihexyl-5,6a,7,12a-tetrahydro-[1]benzopyrano[3,2-c][2]benzopyran (PC6) の合成

方法 A に従い、化合物 1 (0.5 g, 1.72mmol) と 7-トリデカノン(1.24 mL, 5.16 mmol) を使用し、目的化合物を得た。得られた化合物をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: トルエン / アセトン / メタノール = 15 / 3 / 1) により精製を行い、化合物 7 (0.28 g) を 34.6 % で得た。 $[\alpha]_D + 12.5^\circ$ (*c* 1.3, MeOH), $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 0.84 (dd, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.89 (dd, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.16-1.34 (m, 14H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.44-1.52 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.59-1.70 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.85 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.98 (m, 1H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.43 (dd, 1H, $J = 10.4$ Hz, $J = 15.2$ Hz, 7ax), 2.94 (dd, 1H, $J = 6.0$ Hz, $J = 15.6$ Hz, 7eq), 3.75 (m, 1H, 6a), 4.39 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, 12a), 5.94 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, 11), 5.97 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, 9), 6.51 (s, 2H, 4), 7.04 (d, 2H, $J = 0.8$ Hz, 1); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD) δ 14.4 and 14.4 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.7 and 23.7 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.6 and 24.9 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30.7 and 31.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 32.9 and 33.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.0 (4), 41.8 and 42.0 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$

CH_2CH_3), 68.0 (3), 74.5 (2), 81.3 (7'), 95.9 (6), 96.6 (8), 101.3 (10), 112.5 (2'), 112.6 (5'), 126.9 (1'), 134.0 (6'), 144.9 (3'), 146.1 (4'), 156.9 (5), 157.7 (9), 157.9 (7); $[\text{M}-\text{H}]^-$: 469.

(6aS, 12aR)-6a,12a-*trans*-2,3,8,10-Tetrahydroxy-5,5-dinonyl-5,6a,7,12a-tetrahydro-[1]benzopyrano[3,2-c][2]benzopyran (PC9) の合成

方法 A に従い、化合物 1 (3.0 g, 10.34mmol) と 10-ノナデカノン(8.76 g, 31.02 mmol) を使用し、目的化合物を得た。得られた化合物をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン / 酢酸エチル = 4 / 3-1 / 2) により精製を行い、化合物 8 (1.9 g) を 33.1 % で得た。 $[\alpha]_D + 19.7^\circ$ (*c* 1.3, MeOH), MS: 553 (M-H).

2-2) 化学発光法によるカテキンおよびカテキン誘導体の抗酸化能の測定
使用した試薬

2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (Wako, 017-11062)、5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazineone (Luminol, ICN, 127-02581)、ホウ酸 (Wako, 021-02195)、リン酸二水素ナトリウム・二水和物 (Wako, 192-02815)、ジメチルスルホキシド (Wako, 043-07216)、メタノール (ナカライテスク, 21923-25)

測定方法

試料溶液 200 μL を試験管に分注し、37°C の水浴で温まるまでインキュベートした。次に、氷浴中の AAPH 試薬 200 μL を試験管に加え、37°C で 2 分間インキュベートした。最後に、ルミ

ノール試薬 200 μ L を反応容器に加え、積算時間を 120 秒とし、ルミノメーター(AccuFLEX Lumi 400, ALOKA)により化学発光パターンを測定測定した。また、測定は濃度の低い方から開始し、同濃度で 5 回測定を行なった。

C. 研究結果

1) ムスクキシレンの光毒性の解析

1-1) DNA 切断反応

代表的なニトロムスク (Musk xylene, Musk ketone, Musk ambrette) について、NADH 存在下、pBR322DNA を用いて DNA 鎖切断反応について検討した。その結果、いずれの化合物も可視光非照射下では DNA 切断反応が進行しないのに対して、可視光照射下では

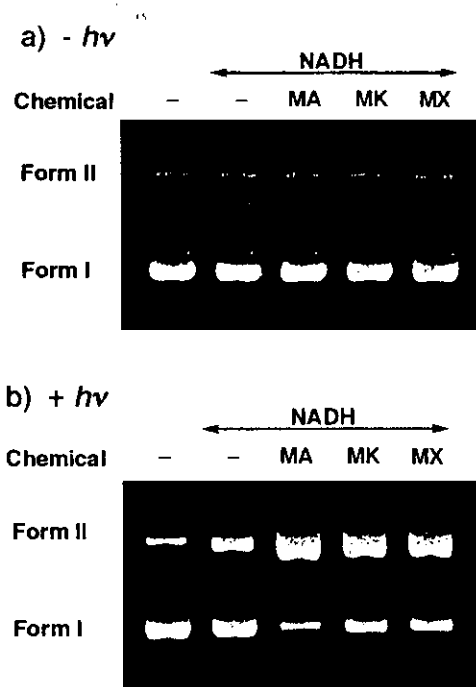


Figure 2. DNA-cleaving activities of 1 mM Musk in the presence of 10 mM NADH and O₂ in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) after visible-light irradiation or nonirradiation for 2h at 298 K.

強力な DNA 鎖の切断がみられた。切断活性は Musk Ambrette が最も強かった。

1-2) ESR による活性酸素の検出

ESR によるスピントラップ法で活性酸素の生成を検討した。スピントラップ剤として DMPO を用いて、NADH

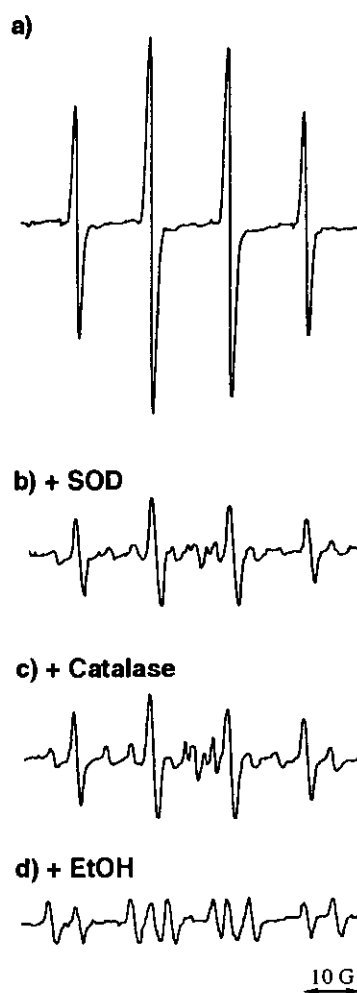


Figure 3. ESR spectra generated by visible light irradiation (1 min.) of the musk ambrette (0.1 mM) / NADH (1mM) / O₂ system in the presence of DMPO (250 mM) were recorded with or without scavenger (a; without scavenger, b; SOD 400 μ g/ml, c; catalase 1mg/ml, d; ethyl alcohol 10 %) at 298 K.

存在下、可視光照射すると、ヒドロキシラジカル付加体(DMPO-OH)が検出された。スーパーオキシド消去剤(SOD)、過酸化水素消去剤(Catalase)およびヒドロキシラジカル消去剤(Ethyl alcohol)存在下、同様の実験を行ったところ DMPO-OH のピークが減少したことから、本反応ではスーパーオキシドアニオン($O_2^{\cdot-}$)が生成し、それが不均化等を経てヒドロキシラジカルを生成していることが示唆された。また、ニトロムスクは、NADH 存在下、光照射を嫌氣的条件で行うと、ニトロムスクの一電子還元体の生成が ESR で確認された。以上の結果より、ニトロムスクは光励起されると NADH により一電子還元されてラジカルアニオンが生成した後、酸素に電子を渡して $O_2^{\cdot-}$ を発生していることが明らかとなった。なお、 $O_2^{\cdot-}$ の生成量は Musk ambrette が最も多かった。

光照射による一重項酸素の生成について、スピントラップ剤として TEMP を用いて検討したところ、ニトロムスクからの一重項酸素の生成は確認されなかった。

2) 脂溶性平面型カテキン誘導体の開発

2-1) 脂溶性平面型カテキン誘導体の合成

従来の平面型カテキン誘導体はルイス酸存在下で反応を行う事により、目的化合物の合成を行っていた。しかしながら、カテキンは1水和物を用いており、ルイス酸の失活が懸念されたので、新規カテキン誘導体の合成法開発にあたり、市販のカテキン一水和物を

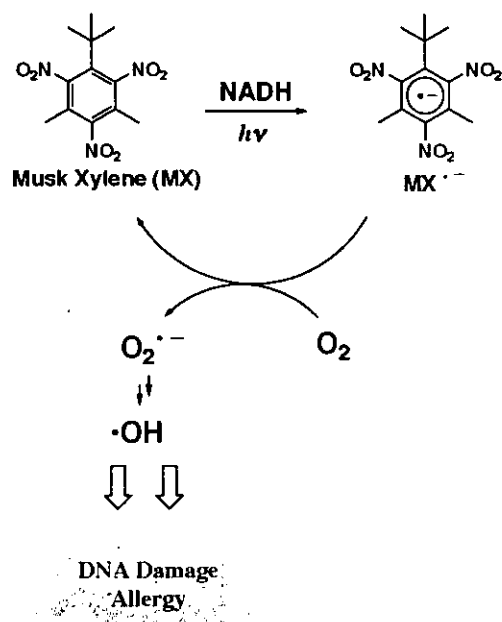


Figure 4. Possible mechanism of nitromusk to induce DNA damage and photoallergy

トルエン：アセトン：メタノール=7：3：1 でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、酢酸エチル：ヘキサンの再結晶を行い無水カテキン (I) として実験に使用した。反応溶媒については、ルイス酸を用いて反応を行う事からエーテル系溶媒について検討を行った結果、カテキンの溶解度の問題から THF を反応溶媒として用いる事とした。ルイス酸は、従来通り $BF_3 \cdot OEt_2$ を用いたとき、 $0^\circ C$ および室温において反応が進行しなかった。そこで、ルイス酸を TMSOTf に変更して反応を行った結果、反応温度 $0^\circ C$ の時、目的化合物が得られた。そこで、1 等量の無水カテキンを真空乾燥した後、アルゴン雰囲気下、乾燥 THF に溶解し、3 等量の対称ケトン (アセトン、3-ペンタノン、4-ヘプタノン、5-ノナノン、6-ウンデカノン、7-トリデカノン、10-ノナデカノン、プロピオ

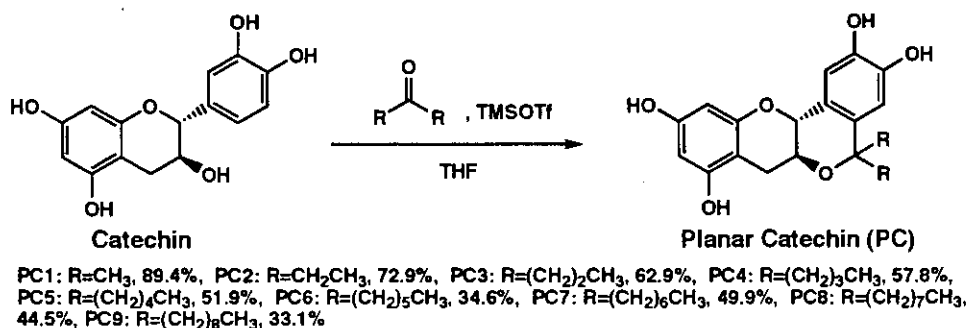


Figure 5. Synthesis of Planar Catechins

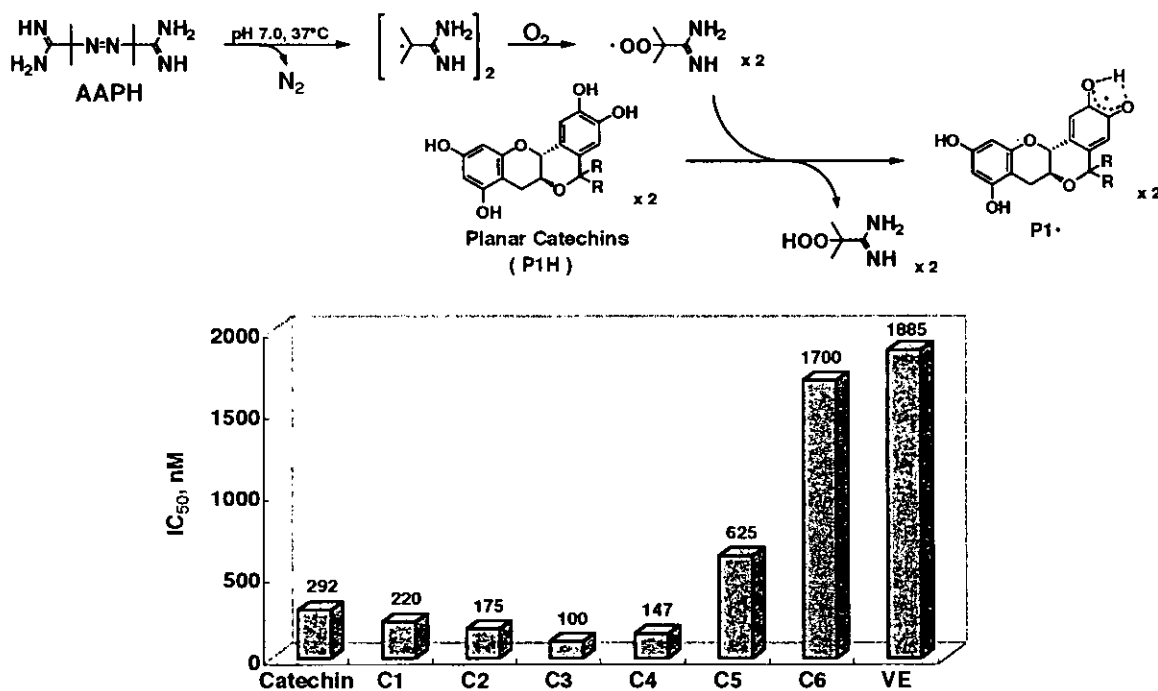


Figure 6. Antioxidative activities of planar catechin derivatives toward AAPH derived peroxy radicals.

フェノン、ジフェニルケトン) を加え、1 等量の TMSOTf を加え、0°C で 12 時間反応を行った。その結果、新規な 8 種類のカテキン誘導体が得られた。

2-2) 化学発光による脂溶性平面型カテキン誘導体の抗酸化能の評価
合成した化合物の抗酸化能を AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride) 由来のペルオキシラジカ

ルに対する消去能から解析した。AAPH がラジカル開裂した後、酸素分子が付加することによって生成するペルオキシラジカルはルミノールと反応して化学発光が生じる。そこでカテキン誘導体存在下、このルミノール反応を行い、化学発光を半分を抑える濃度 (IC₅₀, nM) から抗酸化能を比較した。その結果、カテキンの IC₅₀ が 292nM であるのに対して、PC1 は 220nM と

なり抗酸化能がカテキンよりも増強していることがわかった。さらにアルキル基が長くなるに従って抗酸化能の増加がみられ PC3 の IC₅₀ は PC2, PC3, PC4 の IC₅₀ はそれぞれ 175nM, 100nM, 147nM となった。

D. 考察

近年の地球環境の悪化で特に人への影響が問題視されているオゾンホール
の拡大は生態系のバランスを崩すのみでなく、大量の紫外線照射量の増加によって皮膚癌を高頻度に誘発することが懸念されている。さらに紫外線照射量の増加は化学物質の毒性にも影響を与えることが予測される。たとえば、芳香族化合物の中には光照射によって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たり、酸素を還元活性化してスーパーオキシドを発生することが報告されている。このようにして発生した活性酸素などのラジカルは遺伝毒性を引き起こして、がんや心臓病、脳卒中等、様々な生活習慣病の原因となる。また近年、活性酸素は不飽和脂肪酸やコレステロールを酸化して過酸化脂質を形成してアレルギー疾患、アトピー性疾患の原因となることも報告されている。このように近年の急速な環境破壊が原因となる紫外線照射量の増加はラジカルによる細胞障害を引き起こし、それが皮膚癌のみならず生活習慣病やアレルギーの発症の増加に大きく影響を与えることから、ラジカルによる人への毒性評価とその予防法の開発は急務の課題である。

Nitrobenzene 誘導体のうち麝香臭を有するものはニトロムスクと呼ばれ、香料の保留剤、または香料として用いられてきた。しかし、1985 年、IFRA(International Fragrance Association)は神経毒性、光アレルギーの問題で、代表的なニトロムスクのうち Musk ambrette の使用禁止または量規制を勧告している。我々はムスク系香料の光アレルギーに注目し、光照射による活性酸素の生成について検討した。その結果、ニトロムスクは光を照射しても一重項酸素は発生せず、また、6-ニトロベンツピレンのような一酸化窒素の発生はみられなかったが、NADH が存在するとスーパーオキシドを經由してヒドロキシルラジカルを発生して DNA 鎖切断反応を引き起こすことが明らかとなった。またニトロムスクの中では IFRA によって使用規制されている Musk ambrette が最も活性酸素の生成能が高く、強力で DNA 鎖を切断した。この結果はニトロムスクの光アレルギーが活性酸素によって惹起されることを示唆するものであり、環境汚染物質や生活関連物質に様々なニトロ化合物が存在することを考えると芳香族ニトロ化合物の人への影響評価に光による毒性を十分検討することの必要性が明らかとなった。また、昨年度明らかにした 6-ニトロベンツピレンの光毒性はムスクキシレンとは異なってニトロ基からの一酸化窒素の生成によって引き起こされるように、芳香族ニトロ化合物の光毒性は構造によって異なる機構で別のラジカルを発生する。この結果は、芳香族ニトロ化合物の人への影響は多様であることを予測するも

のであり、今後は多くの生活関連ニトロ化合物の人への影響について毒性機構に基づいた詳細な検討が必要である。

紫外線照射が原因となる健康被害の予防目的として昨年度は天然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開発した。平面型カテキンは天然カテキンと較べて強力なラジカル消去能を示し、また、カテキンの毒性として問題となっているプロオキシダント効果が弱いことから優れた抗酸化剤としての利用が期待される。しかしながら、紫外線による人への健康影響の予防目的として利用する為には細胞内で強力なラジカル消去作用を発揮することが必要であり、脂溶性が高く細胞膜透過性の向上した抗酸化剤が望まれる。そこで、今年度は天然カテキンに様々なケトンの付加が可能な汎用性の高い平面型カテキン誘導体の合成法を開発した。この方法を用いることによって、様々なケトンを経済的に付加させることにより、ラジカルが関与している疾病の種類に合わせた予防及び治療薬としての平面型カテキン誘導体の開発が可能となった。すなわち、1)天然型フラボノイドの平面構造を固定化することによるラジカル消去能の増加、また、2)平面固定化の際、アセトンの代わりにアルキル側鎖を有したケトンを導入することによる膜透過性の向上、3)ケトンに標的部位に高親和性な置換基を導入することによる分子標的剤としての誘導化が可能である。今回合成した平面型カテキン誘導体はアルキル側鎖が長いほど脂溶性が向上していることが考えられる。また、抗酸化能は、アルキル基が C1 から C3 に

増加するに従って増加した。これはアルキル基の電子供与性によってペルオキシラジカルへの水素移動反応速度が速くなっていることが考えられる。一方、さらにアルキル側鎖を長くすると抗酸化能の低下がみられることについては現在その理由を検討中である。

E. 結論

光アレルギーが問題となっているムスク系香料について活性酸素生成能と DNA 障害について検討を行った。その結果、ムスク系香料として代表的な musuk ketone、musuk xylene、musuk ambrette は還元剤存在下、光照射すると活性酸素を発生して、強力に DNA 鎖を切断した。また、活性酸素種を解析した結果、スーパーオキシドを介してヒドロキシラジカルが発生していることが明らかとなった。ムスク系香料の光アレルギーの発症機構として活性酸素の関与を明らかにしたのは本研究結果が初めての報告例であり、環境化学物質、および生活関連物質として大量に存在する様々な芳香族ニトロ化合物の人への影響を適切に評価する為には、光照射による毒性発現機構を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、昨年度開発した平面型カテキンの合成法を改良して様々なケトンが導入できる汎用性の高い平面型カテキン誘導体の合成法を確立した。本方法によって合成した脂溶性平面型カテキン誘導体は細胞膜透過性が向上し、かつ強力な抗酸化力を有することから