

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 16 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 17 (2005) 年 4 月 1 日

別添 1

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 16 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 17 (2005) 年 4 月 1 日

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

紫外線による健康影響の解析と予防目的とした新規抗酸化剤の開発	7
福原 潔	

紫外線による遺伝毒性と老化促進機構の解明とその予防	22
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
---------------------------	----

別添 3

I. 厚生労働科学研究費補助金

総括研究報告書

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16年度は以下の成果が得られた。1) 紫外線照射により光発がんを引き起こす環境化学物質(農薬に用いられているメルカプトベンゾチアゾール)が生体内高分子(DNA等)を酸化的に損傷する機構を明らかにした。2) 紫外線によって引き起こされるラジカル毒性の予防物質として天然ポリフェノール(葡萄果皮成分のレスベラトロール)の誘導体を開発した。3) 紫外線による遺伝毒性の解析結果を基に、紫外線の有効利用の観点から光線力学療法に応用可能な光増感剤の探索を行った。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。

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

及川伸二
三重大学医学部
衛生学講座 講師

分担研究者
川西正祐
三重大学医学部
衛生学講座 教授

協力研究者

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16年度は紫外線照射により光発がんを引き起こす環境化学物質（農薬に用いられているメルカプトベンゾチアゾール）が生体内高分子（DNA等）を酸化的に損傷する機構を明らかにした。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物質として天然ポリフェノール（葡萄果皮成分のレスベラトロール）の誘導体を開発した。さらに、紫外線による遺伝毒性の解析結果を基に、紫外線の有効利用の観点から光線力学療法に応用可能な光増感剤の探索を行った。

H16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. 研究方法及び結果

1) 紫外線による健康影響の解析と予防目的とした新規抗酸化剤の開発

1-1) レスベラトロールのメチル誘導体の合成

レスベラトロール（3,5,4'-トリヒドロキシ-trans-スチルベン）はスチル

ベン誘導体であるため、スチルベン骨格のオレフィン部分で構造を A 環 (3,5-ジヒドロキシ誘導体) と B 環 (4-ヒドロキシ誘導体) の二つに分け、A 環をリン酸エステル体、B 環をアルデヒド体にそれぞれを合成した後、Wittig-Honer 反応によって縮合させてスチルベン骨格を合成した。反応生成物のスチルベン構造はオレフィンの水素のカップリング定数が大きい ($J = >14\text{Hz}$) ことからトランス異性体であることを確認した。ベンジル基の脱保護は AlCl_3 を用いて行った。本合成法を用いることによりレスベラトロールの 3'-メチル体、3'5'-ジメチル体、4-メチル体、4,3'-ジメチル体、4,3',5'-トリメチル体化合物を総収率 20 ~ 50 % で得ることができた。なお、これらは全て新規化合物である。

1-2) ラジカル消去能の速度論的解析

合成したレスベラトロールのメチル誘導体およびレスベラトロールの活性酸素に対するラジカル消去能の速度論的解析を活性酸素のモデル化合物として比較的安定な Galvinoxyl radical ($\text{G}\cdot$) を用いて紫外可視分光光度法で行った。嫌気性条件下、 $\text{G}\cdot$ のアセトニトリル溶液にレスベラトロールを加えると 428nm の吸収が減少した。この反応をレスベラトロールの濃度を $\text{G}\cdot$ の 10 倍以上で行うと、428nm の吸収は擬一次反応で減少することがわかった。そこで、レスベラトロールの濃度を変えて求めた k_{HT} から、レスベラトロールから $\text{G}\cdot$ への水素移動反応速度定数 (k_{HT}) を $4.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と決定した。次にメチル誘導体についても同様の方法で k_{HT} を求めた。その結果、レス

ベラトロールの 4' 位の水酸基のオルト位 (3' 位) にメチル基を導入した 3'-メチルレスベラトロールの k_{HT} は $5.7 \times 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、両方のオルト位 (3' および 5' 位) にメチル基を導入した 3',5'-ジメチルレスベラトロールの k_{HT} は $1.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、メチル基の導入でラジカル消去能が顕著に増強されることがわかった。また、4-メチルレスベラトロールの k_{HT} は $2.4 \times 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、であることからレスベラトロールの 3 位と 5 位の水酸基の間のメチル基も抗酸化活性を増強させることがわかった。4,3'-ジメチルレスベラトロールの k_{HT} は $1.6 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、4,3',5'-トリメチルレスベラトロールの k_{HT} は $2.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、水酸基のオルト位へのメチル基の数が増える程、抗酸化活性が増強することがわかった。

2) 紫外線による遺伝毒性と老化促進機構の解明とその予防

2-1) 紫外線照射による光増感物質を介した DNA 損傷

メルカプトベンゾチアゾールはポストハーベストとして用いられている。また、ゴムの加硫過程の促進剤としても使用されている。National Toxicology Program は、動物実験においてメルカプトベンゾチアゾールがラットやマウスに腫瘍を引き起こすことを報告している。しかし、その発がん機構は未だ不明である。本研究では、太陽紫外線に注目し、特に UVA 照射におけるメルカプトベンゾチアゾールによる塩基配列特異的 DNA 損傷とその機構を検討した。その結果、UVA 照射下

においてメルカプトベンゾチアゾールは、一本鎖 DNA において、濃度依存的に DNA を損傷した。この損傷はピペリジン処理により増強されたことから、DNA 鎖の切断とともに塩基の損傷も起こることが明らかになった。さらに、UVA 照射下メルカプトベンゾチアゾールによる損傷は Dabco などにより一部抑制されたことから活性種として一重項酸素が関わっている事が示唆された。DNA 損傷の塩基特異性は、グアニンとアデニンが損傷された。飛行時間型質量分析計 (MALDI TOF-mass) を用いて解析した結果、メルカプトベンゾチアゾールとアデニンの付加体が検出された。これらの結果から、グアニンは一重項酸素により、また、アデニンは付加体形成により損傷されることが示唆された。

2-2) 光線力学的療法 (PDT) に有用な光増感物質の探索

ポルフィリン類はその可視域での強力な吸収スペクトルと、がん細胞に蓄積しやすい性質から、PDT への応用が期待されている。UVA 照射下、がん細胞に蓄積しやすい 5, 10, 15, 20-Tetrakis (N-Methyl-4Pyridyl)-21, 23H-porphyrin Tetratosyiate (TMPyP) による DNA 損傷機構を解析した。その結果、TMPyP は UVA 照射量に依存して DNA を損傷した。DNA 損傷はピペリジン処理により増強されることから DNA 鎖切断に加えて塩基の損傷も起こることが明らかになった。4-oxo-TEMPO をスピントラップ剤として用い ESR を測定した結果、UVA 照射により TMPyP から一重項酸素が生成して

いることが明らかになった。以上の結果から、TMPyP は UVA 照射により一重項酸素を生成し酸化的に DNA を損傷することが明らかになった。

代表的なアルカロイドであるパルマチンおよびベルベリンは calf thymus DNA を添加すると蛍光の著しい増強が観測され、DNA との強い相互作用が認められた。また、光照射により濃度依存的に DNA を損傷した。光増感反応後に DNA をピペリジン処理すると、全てのグアニンの部位が特に高い頻度で切断された。さらに Fpg 処理後に電気泳動を行った場合にも同様の DNA 切断が観測された。Fpg は 8-oxodG を認識する塩基除去修復酵素であるため、光増感反応による 8-oxodG の生成が考えられる。DNA 損傷は、窒素下または一重項酸素の消去剤 (メチオナル、アジ化ナトリウム) の添加により抑制された。以上の結果から、パルマチンおよびベルベリンは DNA と強い親和性を持ち、DNA 鎖に結合した状態で光化学的な一重項酸素生成を介したメカニズムにより G を特異的に酸化損傷することが考えられる。

従って、DNA を PDT のターゲットにした場合、TMPyP やパルマチン、ベルベリンは有効な光増感剤として利用できる可能性が示された。

C. 考察

本研究によって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。特に農薬に用いられているメルカプトベンゾチアゾールは

紫外線照射によって生体高分子を酸化的に損傷することが明らかになり、今後は農薬の人への安全性の評価に紫外線影響を十分に検討することの必要性が示された。さらにメルカプトベンゾチアゾールの紫外線照射による毒性発現機構を解析した結果、従来の活性酸素生成によるラジカル毒性に加えて、光励起後、DNA と付加体を形成することによる遺伝子損傷反応機構が明らかになった。これは、紫外線を引き金とする生活関連化学物質の毒性に対する予防法としては、抗酸化物質の利用だけでは不十分であり、光励起状態の生活関連物質に対して特異的に反応したり、励起エネルギーを消去できる予防物質を開発する必要性を示している。一方、本研究では天然に豊富に存在している安全性の高い抗酸化物質を誘導化して紫外線毒性の予防に積極的な利用が可能な化合物の開発を検討し、今年度は葡萄果皮に含まれているレスベラトロールの様々な薬理作用に着目し、より安全性が高く、また、ラジカル消去能が優れた誘導體としてメチルレスベラトロールを開発した。レスベラトロールはがんの予防や細胞寿命の延長効果が報告されている一方で、我々はレスベラトロールが小胞体の形成や姉妹染色分体の誘発等の遺伝毒性を示すことを明らかにしてきた。今回開発したメチルレスベラトロールは遺伝毒性の発現に関係している水酸基の両隣のメチル基を導入することによって DNA に対する反応性を軽減させるとともに、メチル基の電子効果によって水酸基のラジカル消去能を増強させる働きがある。実際、本化合物のラジカル消去活

性は飛躍的に増加していることがわかった。今後、これらの化合物の安全性を動物レベルで明らかにできれば、紫外線毒性の予防薬としての利用が期待される。今年度はさらに、紫外線によるラジカル毒性の有効利用として、癌の治療法として近年注目されている光線力学療法 (PDT) への光増感物質の利用を検討した。PDT は静脈注射された活性酸素生成などを介した光毒性でがん細胞を死滅させる治療法である。そこで、PDT に有用な光増感物質の探索を行った結果、TMPyP、ベルベリン、パルマチンは UVA 照射時に一重項酸素を発生して DNA 障害を起こすことから PDT への応用に有効であることがわかった。

D. 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 16 年度は以下の成果が得られた。1) 紫外線照射により光発がんを引き起こす環境化学物質 (農薬に用いられているメルカプトベンゾチアゾール) が生体内高分子 (DNA 等) を酸化的に損傷する機構を明らかにした。2) 紫外線によって引き起こされ

るラジカル毒性の予防物質として天然ポリフェノール（葡萄果皮成分のレスベラトロール）の誘導体を開発した。

3) 紫外線による遺伝毒性の解析結果を基に、紫外線の有効利用の観点から光線力学療法に応用可能な光増感剤の探索を行った。

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、その予防的化學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できる。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

それぞれの分担研究報告書に記載した。

別添 4

II. 厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

分担研究報告書

分担研究課題：紫外線による健康影響の解析と予防目的とした 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 紫外線による健康影響の予防には、紫外線照射によって発生する活性酸素やフリーラジカルを消去することが必要である。今年度は葡萄果皮に含まれている抗酸化剤レスベラトロールの毒性軽減と抗酸化能の増強を目的とした誘導化を行った。誘導化法としてはビタミン E の構造を参考にして水酸基のオルト位へのメチル基の導入を検討し、Wittig-Honer 反応によってメチルレスベラトロール誘導体を新規に 5 種類合成した。抗酸化能を解析した結果、レスベラトロールの 4'位水酸基のオルト位にメチル基を導入すると抗酸化能が飛躍的に増強することがわかった。特に遺伝毒性の軽減を目的として 4'位水酸基のオルト位 (3'-および 5'-) にメチル基を導入した 4,3',5'-トリメチルレスベラトロールは非常に強力な抗酸化活性を示したことから安全性の高い紫外線による健康影響の予防物質としての利用が期待された。

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始めている。フロンガスや二酸化炭素の排出量の増加によってオゾン層が破壊されてオゾンホールが拡大されると紫外線量は急激する。オゾンの量が 1%減ると紫外線量は 1.5%増えるといわれ、紫外線の増加は白内障や角膜炎を誘発したり皮膚癌の原因になる。また、全身的には免疫系の機能障害を起こすことが報告されている。さらに、環境化学物質などに多く見られる芳香族炭化水素は紫外線等の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遺伝障害を引き起こすことも報告されている。オゾンホールの拡大による

紫外線量の増加および環境化学物質の排出は今後もさらに増加することが予測されることから、紫外線による健康被害に対する予防法の確立は厚生労働行政としては急務の課題である。

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。

レスベラトロールは葡萄果皮に含まれている天然抗酸化剤であり、近年その多彩な薬理活性（脂質過酸化の抑制、制癌作用、抗炎症作用、エストロゲン活性等）が次々と明らかになった。特にがん発症の三段階（イニシエーション、プロモーション、プログレッション）のいずれの過程にも作用することからがん予防物質として注目を集めている。また、レスベラトロールは2003年には酵母において NAD⁺依存性蛋白質脱アセチル化酵素である Sir2 を刺激することで DNA の安定性を増大させ、細胞寿命を 70%延長させる効果があることが報告された。これはレスベラトロールによって刺激された Sir2 が脂肪調節因子 PPAR- γ の働きを抑制してカロリー制限と同様の効果をあらわすことによる。一方、レスベラトロールは従来のフラボノイド系ポリフェノールやビタミン E と同様に水酸基からの水素移動反応によって活性酸素や脂質ペルオキシラジカルを消去する。生活習慣病の発症や進行の予防にはこの抗酸化機構も大きく関与していることも明らかとなっている。

既に我々は、レスベラトロールの毒性については、*in vitro* で染色体異常、小核および姉妹染色分体交換を濃度依存的に誘発することを見い出し、

側鎖水酸基に関する構造活性相関を探るうちに、4'位の水酸基がレスベラトロールの遺伝毒性に必須であることを明らかにしている。また、その分子作用機構は、すべての生物に必須で DNA の合成および修復において中心的役割を果たす酵素 ribonucleotide reductase を阻害することであることをみいだした。これは 4'位の水酸基が酵素の活性中心におけるラジカル転移を抑制することによる。このように、レスベラトロールの水酸基はラジカル消去活性の本体ではあるが、毒性の発現にも深く関与していることが推定される。

今年度は紫外線による健康影響の予防にレスベラトロールの利用を検討し、毒性の軽減とラジカル消去活性の増強を目的とした誘導体として水酸基のオルト位にメチル基が導入されたメチルレスベラトロール誘導体を合成した。すなわち、レスベラトロールにメチル基が導入されると酵素や様々なシグナル伝達に関わる生体高分子との結合がメチル基の立体障害によって阻害され、毒性が軽減されることが推定される。また、ビタミン E と類似の構造を有するレスベラトロールのメチル誘導体は、メチル基の超共役作用によってラジカル消去能が増強されることも予測される。そこで、本研究ではレスベラトロールの水酸基のオルト位にメチル基を導入したレスベラトロール誘導体5種類の合成と抗酸化作用について検討を行った。

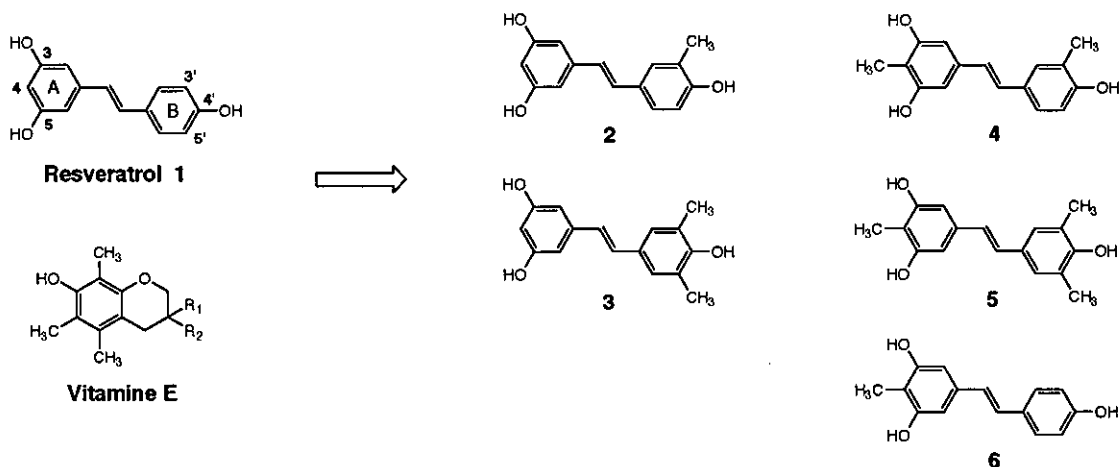


図1 レスベラトロールのメチル誘導体

B. 研究方法

(倫理面への配慮) 本研究は、in vitro および in vivo での実験を行わないため倫理面では問題ない。人および動物を用いない。また、抗酸化剤の単離精製と合成は国立医薬品食品衛生研究所における有害物質等の安全管理規定および実験室廃棄物処理要領に則るとともに、国立医薬品食品衛生研究所、有機化学部一室の有害物質等取扱安全キャビネットの中で合成実験および溶媒処理を行うことにより研究者への化学物質の汚染を最小限にとどめる。また、本実験施設は独自の排気ガス処理と廃水処理を行うことにより環境保全の観点からも十分安全である。

1. 試薬・測定機器

4-ベンジルオキシ-3,5-ジメチルベンズアルデヒドは Alfa Aesar 社より、また、4-ヒドロキシ-3-メチルベンズアルデヒドは Aldrich 社より購入した。

他の試薬はすべて、試薬一級あるいは特級を使用した。また、NMR は Varian Mercury 400-NMR を用いて測定した。

2. レスベラトロールのメチル誘導体の合成

3,5-ビスジベンジルオキシベンジルフオホニックアシッド ジエチルエステル 7 の合成

3,5-ジベンジルオキシベンジブロミド 8 を亜リン酸トリエチルに溶解後、ヨウ化テトラ-n-ブチルアンモニウムを添加して100℃で5時間、加熱攪拌した。さらに、室温で一晩攪拌した後、過剰の亜リン酸トリエチルを減圧留去して化合物 7 を得た。

3,5-ジヒドロキシ-4-メチルベンゾイックアシッド メチルエステル 9 の合成

3,5-ジヒドロキシ-4-メチル安息香酸 10 のメタノール溶液に硫酸を少量添加後、一晩室温で攪拌した。反応

混合物を氷水に移し、酢酸エチルを加えた後、炭酸水素ナトリウムを加えて中性にした。酢酸エチル層は飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒ヘキサン：酢酸エチル=1：1）により精製し、化合物 **9** を得た。

3,5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンゾイックアシッド メチルエステル **11** の合成

化合物 **9** のジメチルホルムアミド溶解に無水炭酸カリウムを加えて1時間攪拌後、ベンジルブロミドを滴下した。一晩攪拌後、反応混合物を氷水に移し、多量のジクロロメタンで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水して、溶媒を減圧留去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒ヘキサン：ジクロロメタン=1：1）により精製し、化合物 **11** を得た。

3,5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンジルアルコール **12** の合成

アルゴン気流下、無水ジエチルエーテルに水素化アルミニウムリチウムを加えた後、化合物 **11** の無水ジエチルエーテル溶液を滴下漏斗を使って少量ずつ滴下した。4時間室温で攪拌後、2-プロパノール、10%水酸化カリウム水溶液を少量ずつ加えて過剰の水素化アルミニウムリチウムを分解した。酢酸エチルで洗い込みながら吸引濾過後、反応溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧留去した。さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶

媒ジクロロメタン：メタノール=10：1）により精製して化合物 **11** を得た。

3,5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンジルブロミド **13** の合成

アルゴン気流下、化合物 **12** のジクロロメタン溶液に滴下漏斗で三臭化リンを少量ずつ滴下した。氷浴中で1時間、さらに室温で1時間攪拌した後、反応混合物を氷水に移し、ジクロロメタン抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒ヘキサン：ジクロロメタン=1：1）により精製して化合物 **13** を得た。

3,5-ビスベンジルオキシ-4-メチルベンジルフオスフォニックアシッド ジエチルエステル **14** の合成

化合物 **13** を亜リン酸トリエチルに溶解後、ヨウ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムを添加し、100℃で5時間、加熱攪拌した。さらに、室温で一晩攪拌した後、過剰の亜リン酸トリエチルを減圧留去して化合物 **14** を得た。

4-ベンジルオキシ-3-メチルベンズアルデヒド **15** の合成

4-ヒドロキシ-3-メチルベンズアルデヒド **16** のジメチルホルムアミド溶液に、無水炭酸カリウムを加えて1時間攪拌した後、ベンジルブロミドを滴下した。さらに一晩攪拌した後、反応混合物を氷水に移し、ジクロロメタン抽出した。有機層は飽和食塩水で洗

浄、無水硫酸ナトリウムで脱水、溶媒を減圧蒸留した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：酢酸エチル=2：1）により化合物 **15** を単離精製した。

1-[4-ベンジルオキシ-3-メチルフェニル]-2-[3,5-ビス(ベンジルオキシ)フェニル]エテン **17** の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 **7** を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 **15** の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 **17** を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2-(3,5-ビスベンジルオキシフェニル)エテン **18** の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 **7** を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 4-ベンジルオキシ-3,5-ジメチルベンズアルデヒド **19** の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展

開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 **18** を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシフェニル)-2-(3,5-ビスベンジルオキシ-4-メチルフェニル)エテン **20** の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 **14** を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 4-ベンジルオキシ-3,5-ベンズアルデヒド **21** の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 **20** を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシ-3-メチルフェニル)-2-(3,5-ビスベンジルオキシ-4-メチルフェニル)エテン **21** の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 **14** を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 **15** の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 **21** を単離精製した。

1-(4-ベンジルオキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2-(3,5-ビスベンジルオキシ-4-メチルフェニル)エテン **22** の合成

アルゴン気流下、水素化ナトリウムの THF 懸濁液に、氷冷下、化合物 **14** を THF に溶液を滴下した。30 分攪拌後、化合物 **19** の THF 溶液を滴下した。室温で一晩攪拌した後、氷水で過剰の水素化ナトリウムを分解した。反応溶液に塩酸を加えて弱酸性に調整した後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒 ヘキサン：ジクロロメタン=2：1）で化合物 **22** を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシフェニル)エテン **2** の合成

アルゴン気流下、化合物 **17** のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて 5 分間攪拌後、塩化アルミニウム (III) を加えて、0°C で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：メタノール=10：1）により化合物 **2** を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシフェニル)エテン **3** の合成

アルゴン気流下、化合物 **18** のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて 5 分間攪拌後、塩化アルミニウム (III) を加えて、0°C で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：メタノール=10：1）により化合物 **3** を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシ-4-メチルフェニル)エテン **6** の合成

アルゴン気流下、化合物 **20** のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて 5 分間攪拌後、塩化アルミニウム (III) を加えて、0°C で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：メタノール=10：1）により化合物 **6** を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3-メチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシ-4-メチルフェニル)エテン **4** の合成

アルゴン気流下、化合物 **17** のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて 5 分間攪拌後、塩化アルミニウム (III) を加えて、0°C で一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー（展開溶媒 ジクロロメタン：メタノール=10：1）により化合物 **4** を単離精製した。

アルゴン気流下、化合物 **21** のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて5分間攪拌後、塩化アルミニウム (III) を加えて、0°Cで一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1) により化合物 **4** を単離精製した。

1-(4-ヒドロキシ-3,5-ジメチルフェニル)-2-(3,5-ジヒドロキシ-4-メチルフェニル)エテン **5** の合成

アルゴン気流下、化合物 **22** のジクロロメタン溶液に N,N-ジメチルアニリンを加えて5分間攪拌後、塩化アルミニウム (III) を加えて、0°Cで一晩攪拌した。反応溶液に氷水を加え、さらに塩酸を少量加えて弱酸性に調整後、酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のメタノールに溶解後、分取用シリカゲル薄層クロマトグラフィー (展開溶媒 ジクロロメタン:メタノール=10:1) により化合物 **22** を単離精製した。

3. ラジカル消去反応の速度論的解析

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、レスベラトロール誘導体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・アレー分光光度計の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。 $\ln(A_0 - A)$ 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。

C. 研究結果

1) レスベラトロールのメチル誘導体の合成

合成計画:レスベラトロールはスチルベン誘導体であるため、スチルベン骨格のオレフィン部分で構造をA環(3,5-ジヒドロキシ誘導体)とB環(4-ヒドロキシ誘導体)の二つに分け、A環をリン酸エステル体、B環をアルデヒド体にそれぞれを合成した後、Wittig-Honer 反応でトランス型の二重結合を形成させる。反応の過程で水酸基はベンジル基で保護し、最後にルイス酸で脱保護を行う。

合成方法:A環としてはビスベンジルオキシベンジルリン酸エステル **7** とその4-メチル体 **14** を合成して用いた。化合物 **7** は市販のブロム体 **8** を亜リン酸トリエチルによってリン酸化

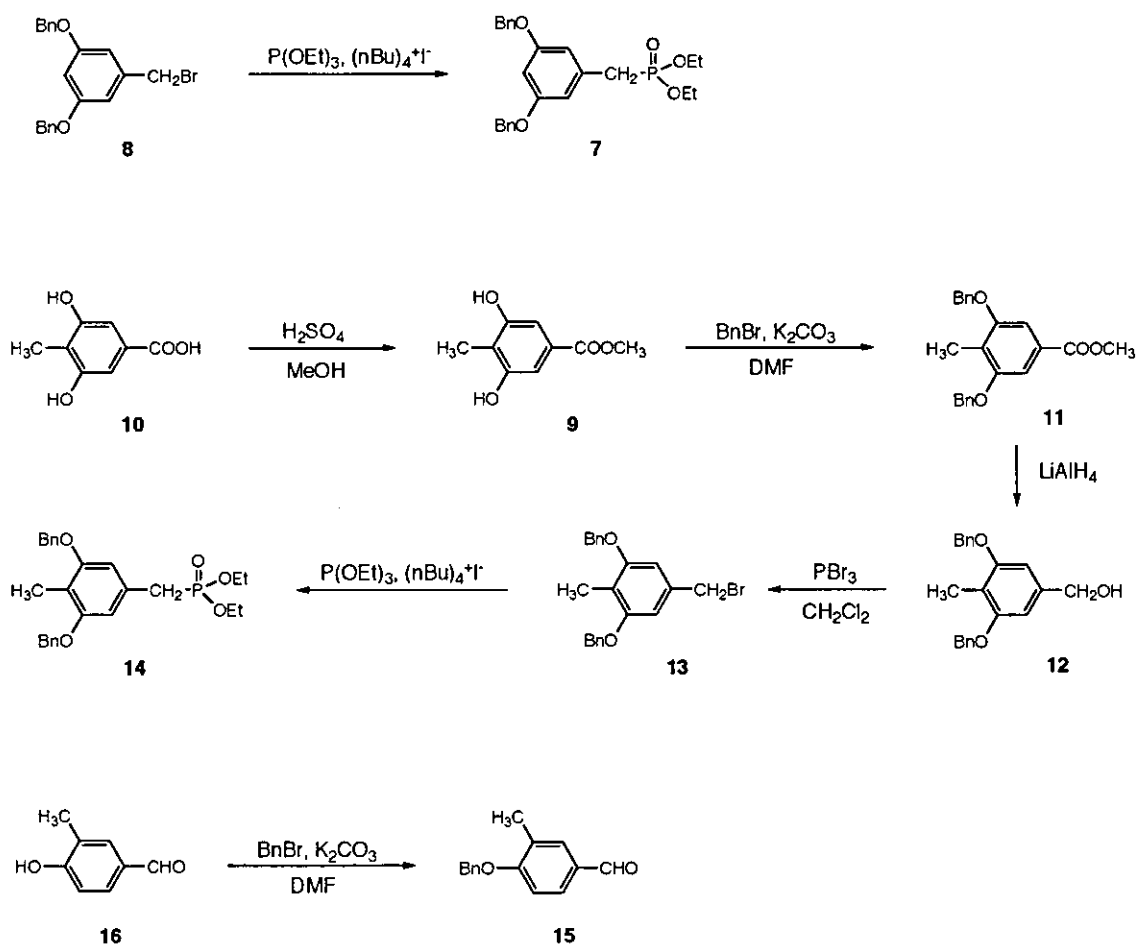


図2. メチルレスベラトロールの合成法 その1

して合成した。化合物 14 は 3,5-ジヒドロキシ-4-メチル安息香酸 10 をメチルエステル化した後、水酸基をベンジルで保護して化合物 11 とした。さらに化合物 11 は $LiAlH_4$ でエステルを還元してアルコールに変換、 PBr_3 によるブロム化後、亜リン酸トリエチルによってリン酸化して化合物 14 を合成した。B 環としては市販の 4-ベンジルオキシベンズアルデヒドとその 3,5-ジメチル体、および 4-ヒドロキシ-3-メチルベンズアルデヒドをベンジル化した化合物 15 を用いた。次

に合成した A 環および B 環を Wittig-Honer 反応によって縮合させてスチルベン骨格を合成した。反応生成物のスチルベン構造はオレフィンの水素のカップリング定数大きい ($J = >14Hz$) ことからトランス異性体であることを確認した。ベンジル基の脱保護は $AlCl_3$ を用いて行った。本合成法を用いることにより化合物 2 ~ 6 を総収率 20 ~ 50 % で得ることができた。なお、これらは全て新規化合物である。

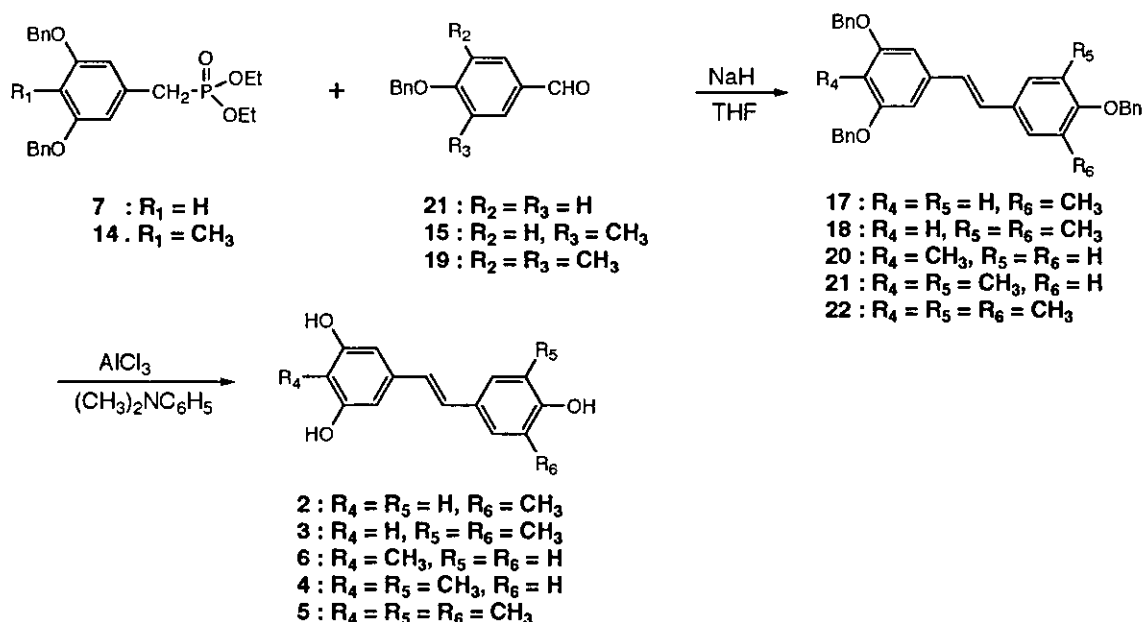


図2. メチルレスベラトロールの合成法 その2

2) ラジカル消去反応の速度論的解析

合成したレスベラトロールのメチル誘導体およびレスベラトロールの活性酸素に対するラジカル消去能の解析を行った。ヒドロキシルラジカルや脂質ペルオキシラジカルは抗酸化剤に対する反応性が非常に高いため、抗酸化剤のラジカル消去能についての速度論的解析は非常に困難である。そこで、活性酸素のモデル化合物として比較的安定な Galvinoxyl radical ($G\cdot$) を用いて化合物のラジカル消去能を解析した。嫌気性条件下、 $G\cdot$ のアセトニトリル溶液にレスベラトロール **1** を加えると 428nm の吸収が減少した。この反応を **1** の濃度を $G\cdot$ の 10 倍以上で行うと、428nm の吸収は擬一次反応で減少することがわかった。そこで、**1** の濃度を変えて求めた k_{HT} から、**1** から $G\cdot$ への水素移動反応速度定数 (k_{HT}) を $4.1 M^{-1}s^{-1}$ と決定した。次に

化合物 **2** ~ **6** についても同様の方法で k_{HT} を求めた。その結果、レスベラトロールの 4' 位の水酸基のオルト位 (3' 位) にメチル基を導入した化合物 **2** の k_{HT} は $5.7 \times 10 M^{-1}s^{-1}$ 、両方のオルト位 (3' および 4' 位) にメチル基を導入した化合物 **3** の k_{HT} は $1.5 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$ となり、メチル基の導入でラジカル消去能が顕著に増強されることがわかった。また、化合物 **6** の k_{HT} は $2.4 \times 10^1 M^{-1}s^{-1}$ 、であることからレスベラトロールの 3 位と 5 位の水酸基の間のメチル基も抗酸化活性を増強させることがわかった。さらに化合物 **6** の 3' 位がメチル化された化合物 **4** の k_{HT} は $1.6 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$ 、3' 位と 5' 位がメチル化された化合物 **5** の k_{HT} は $2.0 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$ となり、水酸基のオルト位へのメチル基の数が増える程、抗酸化活性が増強することがわかった。