

3) Takeuchi Y, Kosaka T, Hayashi K, Ishimine S, Ohtsuka R, Kuwahara M, Yoshida T, Takeda M, Maita K, Alterations in the developing immune system of the rat after perinatal exposure to methoxychlor. *J. Toxicol. Pathol.* 17, 165–170, 2002.

4) Casale, G.P., Cohen, S.D., DiCapua, R.A., Parathion-induced suppression of humoral immunity in inbred mice. *Toxicol. Lett.* 23, 239–247, 1984.

5) Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T. Apoptosis in immunocytes induced by several types of pesticides. *J Immunotoxicol.* 7, 39-56, 2010.

6) Sobel ES, Gianini J, Butfiloski EJ, Croker BP, Schiffenbauer J, Roberts SM. Acceleration of Autoimmunity by Organochlorine Pesticides in (NZB × NZW)F1 Mice *Environ. Health Persp.*, 113, 323-328, 2005.

7) Fukuyama, T., Nishino, R., Kosaka, T., Watanabe, Y., Kurosawa, Y., Ueda, H., and Harada, T. Effects of prior oral exposure to combinations of environmental

immunosuppressive agents on ovalbumin allergen-induced allergic airway inflammation in Balb/c mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 36(4):261-270, 2014.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 西野里沙子, 福山朋季, 渡部優子, 黒澤好, 上田英夫, 小坂忠司, 原田孝則: 免疫攪乱化学物質暴露が次世代の呼吸器アレルギーに及ぼす影響調査 第42回日本毒性学会学術年会 2015年6月

2) 西野里沙子, 福山朋季, 渡部優子, 黒澤好, 上田英夫, 小坂忠司, 原田孝則: 免疫攪乱化学物質暴露が次世代の呼吸器アレルギーに及ぼす影響 第22回日本免疫毒性学会学術年会 2015年9月

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題：異物代謝酵素誘導を指標とした食品中化学物質の複合影響  
ベンズイミダゾール類による芳香族炭化水素受容体（AhR）の活性化

研究分担者： 氏名 吉成 浩一 所属 静岡県立大学薬学部教授  
研究協力者： 氏名 出川 雅邦 所属 静岡県立大学客員教授・薬学部名誉教授  
氏名 関本 征史 所属 麻布大学生命・環境科学部・准教授  
(前：静岡県立大学薬学部・講師)

研究要旨

我々は、多環式芳香族炭化水素類（Polycyclic aromatic hydrocarbon：PAH）類の一種であり、AhR リガンドである 3-methylchroranthrene (MC) と、食品添加物である thiabendazole (TBZ) を複合曝露することで、芳香族炭化水素受容体（AhR）が相乗的に活性化されることを見出してきた。本年度の研究では、この相乗的な AhR 活性化機構の機序解明を目指した。

TBZ と同じベンズイミダゾール骨格を有する omeprazole は、CYP1A 酵素阻害作用により AhR リガンドの代謝（不活性化）を遅延させること、AhR 活性化増強作用を示すことが報告されている。そこで、HepG2 細胞を用い、TBZ の CYP1A1 酵素活性（ethoxyresorufin 脱エチル化）への影響を測定した。その結果、AhR 活性化増強作用が見られる濃度域では、TBZ による CYP1A1 酵素活性の有意な阻害は見られなかった。

次に、CYP1A 酵素発現レベルが高い HepG2 細胞と、低いヒト肺がん A549 細胞を用いて、MC による AhR 活性化（標的遺伝子（*CYP1A1*）発現および AhR 依存的レポーター活性の誘導）に対する TBZ 影響を比較解析した。その結果、いずれの細胞株でも TBZ は MC による AhR 活性化を増強した。また、AhR や CYP1 酵素の発現レベルが異なる他のヒト細胞株においても、TBZ と MC の複合処理による相乗的な *CYP1A1* 発現誘導が観察された。

リガンドと結合して活性化された AhR はユビキチン-プロテアソーム系で分解されることから、TBZ が AhR タンパク質の分解を阻害し、AhR の転写活性を増強する可能性がある。そこで HepG2 細胞に MC と TBZ を複合または単独処理し、Western blot 法にて細胞内 AhR タンパク量を測定した。その結果、TBZ 処置は、MC 処理による AhR の分解を抑制しなかった。

以上、本研究より、TBZ の AhR 活性化増強作用は、種々細胞株に共通した現象であること、また、その作用は、CYP1A 酵素活性の阻害や AhR タンパク質の分解阻害とは異なる未知の機構を介して起こることが推察された

## A. 研究目的

芳香族炭化水素受容体 (AhR) は、受容体型転写因子の一種として知られ、多環式芳香族炭化水素類による発がんや、ダイオキシン様化合物による催奇形性などの毒性発現に重要な役割を果たしている。さらに最近では脂質代謝や免疫機能の調節にも重要な役割を持つことも明らかとなってきた。

本研究において我々は、この AhR 活性化を指標として、食品中化学物質の複合曝露による毒性発現の可能性について検討してきた。その結果、食品添加物であり間接的 AhR 活性化物質の thiabendazole (TBZ) と、発がん物質であり AhR リガンドの 3-methylchroranthrene (MC) の複合処理により、相乗的な AhR 活性化作用が起こることを見いだした。さらに、TBZ をはじめとするベンゾイミダゾール (BNZ) 骨格を持つ化合物の多くが AhR 活性化増強作用を持つことが示された。BNZ 化合物は医薬品、農薬、食品添加物として広く存在していることから、本知見は食品中化学物質による複合影響を考える上で重要であると思われる。しかし、どのような化合物で複合影響が起こるかは明確にされていない。そこで本年度は、以下の 2 点から BNZ 化合物の AhR 活性化増強作用について解析した。

### 1) BNZ 類による CYP1 酵素の阻害と AhR 活性化増強との関連性の解析

AhR リガンドの多くは CYP1A1 酵素による代謝 (不活性化) を受けることや、CYP1A1 酵素の阻害はリガンドによる AhR 活性化を増強することが示されている。実際に魚類肝細胞において、BNZ 骨格を有する omeprazole (OME) が CYP1A 酵素を阻害す

ることで、結果として AhR リガンドの代謝 (不活性化) を遅延させ、AhR 活性化増強作用を示すことが報告されている。そこで、HepG2 細胞を用い、BNZ 類による CYP1A1 酵素活性 (ethoxyresorufin *O*-脱エチル化) への影響と AhR 活性化増強との関連性について解析した。

さらに、HepG2 細胞とは AhR や CYP1A1 酵素発現レベルが異なるとされるヒト細胞株を用いて、AhR 活性化 (標的遺伝子 *CYP1A1* の転写および AhR 依存的なレポーター活性) に対する MC と TBZ の複合影響を比較した。

### 2) BNZ 類による AhR タンパク質安定化の可能性

AhR の活性化は複数のフィードバック制御を受けるが、その一つとして、ユビキチン-プロテアソーム系による分解が知られている。リガンドにより活性化された AhR タンパク質は、ユビキチン化されてプロテアソームにより分解されるが、プロテアソームの阻害が AhR 活性化の持続的増強を引き起こすことが示されている。そこで、BNZ 類にも同様の作用があるか否かを、細胞内 AhR タンパク質レベルを指標として解析した。

## B. 研究方法

### 1) 試験細胞株

BNZ 類による CYP1 酵素の阻害作用の解析には、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた。遺伝子発現解析には、HepG2 細胞のほか、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞、ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞、ヒト子宮がん由来 Hela 細胞、Ishikawa 細胞を使用した。また、

AhR 活性化能の測定には、AhR レポータープラスミド (XRE-Luc) を HepG2 細胞および A549 細胞に安定導入することで作成した HepG2-XL24 および A549-XL 細胞を使用した。いずれの細胞も、10%胎児ウシ血清と硫酸カナマイシンを含んだ DMEM 培地を用い、5%炭酸ガス下、37°C で培養した。

## 2) 被検化合物

AhR リガンドとして MC を、BEZ 化合物として TBZ および OME を用いた。CYP1A 酵素阻害剤としては  $\alpha$ -naphthoflavone (ANF) を使用した。各化合物はいずれもジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、使用した。なお、実験者の健康保持のため、化学物質の取扱いは、安全キャビネット等を利用して厳重に注意して行った。

## 3) 酵素阻害試験

HepG2 細胞を  $2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> となるように播種し、48 時間培養した。さらに、MC (1  $\mu$ M) を 24 時間前処理することで CYP1A1 酵素発現を誘導した。培地を無血清培地に置換し、被検物質の存在下、CYP1A1 酵素の基質 (5  $\mu$ M ethoxyresorufin) を作用させた。30 分後、培養上清中に遊離された CYP1A1 酵素依存的代謝物 (resorufin) に由来する蛍光 (励起波長 535 nm、蛍光波長 595 nm) を測定した。また、細胞を溶解後、BCA-protein assay kit (PIERCE) を用いて蛋白質濃度を測定し、蛋白質あたりの酵素活性を算出した。さらに、CYP1A1 酵素活性に対する阻害効果を算出した。

## 4) 遺伝子発現量の測定

各細胞を  $2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> となるように播

種し、被検化合物を添加して一定時間培養後、総 RNA を Sepasol (ナカライテスク) により単離した。この総 RNA より、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。この cDNA に AhR 標的遺伝子 (CYP1A1 および CYP1B1) に特異的なプライマーと Fast SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を添加し、StepOne リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて定量的 PCR を行った。各 mRNA レベルは <sup>dd</sup>Ct 法により算出し、GAPDH 遺伝子の mRNA レベルで除することにより標準化した。

## 5) AhR 活性化能の測定

HepG2-XL24 細胞および A549-XL 細胞を  $2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> となるように 96 穴プレートに播種し、48 時間前培養した。前培養後、被検化合物を添加し、一定時間培養した。その後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞を溶解した。この細胞溶解液にルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) を添加し、生じた発光をルミネッセンサー PSN (ATTO) により測定した。また、BCA-protein assay kit を用いて細胞溶解液中のタンパク質濃度を測定し、タンパク質あたりの発光強度を算出した。

## 6) AhR タンパク質レベルの測定

HepG2 細胞を 6 穴プレートで培養し、化合物を添加して一定時間培養後、各ウェルから培地を除去し、適量の PBS (-) で洗浄した。200  $\mu$ L の 1 x sample buffer で細胞を溶解し、遠心 (4°C、12,000 xg、10 分) 後の上清をタンパク溶解液とした。総タンパ

ク質を 7.5%SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。5% スキムミルク/TBST により室温で 1 hr ブロッキングした後、ウサギ抗ヒト AhR 抗体 (Santa Cruz, sc-5579) あるいはウサギ抗ヒト $\beta$ -actin 抗体 (Cell Signaling Technology, #4967) を用いて、4°C で一晩反応させた。二次抗体としてウサギ IgG ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗体を反応させた後、ECL-plus 試薬 (PIERCE) により検出した。生じた化学発光を High performance chemiluminescence film に現像した。

#### 7) 統計解析

データ解析は、GraphPad Prism5 を使用して行った。多重比較には ANOVA 検定を、事後比較には Dunnet's 検定または Newman-Keuls 多重比較検定を用いた。

### C. 研究結果

#### 1) BNZ 類による CYP1 酵素の阻害と AhR 活性化増強との関連性の解析

CYP1A1 酵素活性 (ethoxyresorufin O-脱エチル化 (EROD) 活性) に対する TBZ および OME の阻害作用を解析した。ここでは、酵素阻害の陽性対照として ANF を使用した。ANF は 1  $\mu$ M から CYP1A1 酵素活性を 80%近く阻害した。一方、TBZ および OME は 30  $\mu$ M 以上の高濃度で CYP1A1 酵素活性を阻害したが、その阻害は最高濃度 (100  $\mu$ M) で 50%程度に過ぎなかった。さらに、TBZ および OME が AhR 活性化増強作用を示した 10  $\mu$ M では、有意な CYP1A1 酵素活性阻害は認められなかった。

TBZ に弱いながら CYP1A1 活性阻害作用が観察されたため、CYP1A1 発現が高い

HepG2 細胞由来 HepG2-XL24 細胞と、発現が低いヒト肺がん A549 細胞由来の A549-XL細胞を用い、各細胞に MC (0.1  $\mu$ M) と TBZ (10  $\mu$ M) を複合処理し、AhR 活性化における複合影響を比較検討した。その結果、HepG2-XL24 細胞では、TBZ と MC の複合処理により AhR 活性化能が大幅に増強した。また、A549-XL 細胞株においても、HepG2-XL24 細胞株に比べて増強作用は弱いものの、同様の相乗的な AhR 活性化が認められた。

さらに、HepG2 細胞や A549 細胞とは AhR や CYP1A 酵素の発現レベルが異なる複数のヒト細胞株を用いて、MC と TBZ をそれぞれ単独あるいは複合処理した場合の効果を検討した。24 時間後の AhR 標的遺伝子 (CYP1A1 および CYP1B1) の mRNA レベルを測定したところ、CYP1A1 遺伝子は Ishikawa 細胞を除いた 5 細胞において、また、CYP1B1 遺伝子は A549 細胞および Hela 細胞を除いた 4 細胞において、複合処理群でそれぞれの単独処理に比べて強い誘導が認められた。

#### 2) BNZ 類による AhR タンパク質安定化の可能性

HepG2 細胞に MC (0.1 または 1  $\mu$ M) と TBZ (10  $\mu$ M) を複合または単独処理し、3 および 6 時間後における細胞内 AhR タンパク質レベルを、Western blot 法により測定した。その結果、MC による AhR 分解作用は確認できたが、その分解作用は濃度依存적とはならなかった。また、TBZ 処理による AhR 分解抑制作用は確認できなかった。

#### D. 考察

はじめに TBZ などの BNZ 類による AhR 活性化の増強効果が CYP1A1 酵素による AhR リガンドの代謝（不活性化）阻害に起因するか否かを検討した。しかし、TBZ および OME は有意な CYP1A1 酵素阻害作用を有するものの、複合影響が見られた 10  $\mu$ M では阻害作用を示さなかった。さらに、CYP1A1 遺伝子およびその酵素発現が低いとされる A549 細胞を用いて、TBZ による複合影響の有無を解析したところ、HepG2 細胞と同様、A549 細胞でも MC と TBZ の AhR 活性化における複合影響（相乗効果）が確認された。また、AhR や CYP1A1 酵素の発現レベルが異なる細胞でも同様の傾向が見られた。これらの結果から、AhR 活性化における TBZ と MC との複合影響は、TBZ の CYP1A1 阻害作用によるものではないことが示唆された。

リガンドにより活性化された AhR タンパク質は、ユビキチン化を受けプロテアソームにより分解されるため、このプロテアソームの阻害は、AhR 活性化の増強に繋がることが考えられる。実際に、プロテアソーム阻害剤である MG132 の処理により、AhR の活性化が増強する例も示されている。そこで、細胞内 AhR タンパク質レベルに及ぼす TBZ の影響について Western blot 法を用いて解析したが、TBZ による顕著な AhR 分解抑制作用は確認できなかった。このことから、TBZ による AhR 活性化増強作用は AhR タンパク質の分解抑制に起因するものではないことが示唆された。

#### E. 結論

本実験の結果から、TBZ による AhR 活性化増強は①CYP1A1 酵素の阻害によるものではないこと、②細胞や核内の AhR の分解抑制によるものではないことが示された。今後は AhR 核内移行やクロマチン構造に及ぼす影響などについて、転写共役因子に着目し解析を行う必要があると考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 関本征史、吉成浩一、出川雅邦：化学物質の複合影響による細胞毒性発現：AhR 活性化を指標として（シンポジウム：次世代研究者セミナー：薬物の安全性評価における新たな挑戦）、第 42 回日本毒性学会学術年会（金沢）、2015 年 7 月
- 2) 田野辺潤、成瀬理紗、田崎愛佳、梅村隆志、遠藤治、出川雅邦、吉成浩一、関本征史：ベンズイミダゾール系化合物の AhR 活性化増強機構：CYP1A1 酵素阻害に着目した解析、日本薬学会第 136 年会（横浜）、2016 年 3 月

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

食品中の複数の化学物質による健康影響に関する調査研究

分担研究課題： フェノール性化合物の複合影響

研究分担者： 福原 潔 昭和大学薬学部

研究要旨

生活習慣病の予防効果が注目されているフェノール性抗酸化物質は、第Ⅰ相薬物代謝酵素によってキノン体へと酸化されると生体分子との付加や酸化ストレスを引き起こす可能性がある。しかしながら、非常に不安定なキノン酸化体の毒性を評価することは難しい。そこで、複合影響の観点からフェノール性抗酸化物質の酸化反応と、生成するキノン体由来する酸化ストレス反応をプラスミド DNA 存在下で行うことで複合影響を評価できる簡便な試験法を開発した。この試験法を利用して、代表的なフラボノイドの毒性を検討した結果、劇症肝炎が報告された緑茶抽出物の主な成分であるエピガロカテキンガレートは、エピガロカテキンへと加水分解された後、酸化ストレスによる毒性を発現することが明らかとなった。また、フェノール性抗酸化物質およびそのキノン代謝物について分子軌道計算を行い、得られた物理化学的パラメータ（HOMO、LUMO、生成熱）について毒性との相関を検討した。その結果、キノン代謝体からラジカルアニオンへの還元され易さの指標となる生成熱は強力な酸化ストレスを誘発するエピガロカテキンが最も小さいことから、分子軌道計算からの毒性予測が可能となった。以上の結果より、フェノール性抗酸化物質はキノンへの酸化代謝を経由することで酸化ストレスによる毒性を発現する可能性が示唆された。本研究で検討した試験法は第Ⅰ相薬物代謝酵素を誘導する健康食品やサプリメントとフェノール性抗酸化物質との複合影響の評価として期待される。

A. 研究目的

近年、天然のフェノール性抗酸化物質の生活習慣病に対する予防効果が明らかとなり、それに伴って健康維持の目的でこれらの成分の積極的な摂取が話題となっている。天然のフェノール性抗酸化物質は多様な生物活性を有する。例えば、カテキンやケルセチンなどは脂質や糖の吸収を阻害したり、生活習慣病の原因となる酸化ストレスに対して抑制作用を示す。また、レスベラトロールはシクロオキシゲナーゼ阻害活性やサーチュインの活性化によって寿命延伸作用

や化学発がん予防作用を示す。フェノール性抗酸化物質は比較的安全性が高く、カテキンは溶血性貧血による急性腎不全の症例が報告されたのみであった。しかしながら、最近、これらの抗酸化成分を含む緑茶抽出物の摂取と肝毒性との関連が指摘されるようになった。

2007年1月、カナダ保健省は緑茶抽出物を含む成分を体重減少目的で6カプセル（カテキン600mg相当）/dayを半年間摂取した42歳の女性が劇症肝炎になり、肝移植を受けた事例を発表した。その後、文献上

でもカテキンによる肝機能障害が 13 例報告されている。また、培養肝細胞を用いた実験では、エピガロカテキンガレート (EGCG) はミトコンドリア膜を直接破壊し、酸化ストレスを誘導することが明らかとなった。これらの報告を受け、2007 年 6 月に米国薬局方の DSI-EC (Dietary Supplements Information Expert Committee) は、緑茶成分を含むサプリメントには肝障害の危険性を示した警告文をつけるように指導している。日本では緑茶抽出物を利用した製品は多く販売されているが、現時点まで類似の報告はない。フェノール性抗酸化物質を高濃度に含む製品の消費量が年々増加していることから、今後、我が国でも同様の健康被害の発生が懸念される。

本研究では、フェノール性抗酸化物質の毒性発現機構について化学的な解析を行う。そして、毒性発現に関わる生物的、化学的因子を明らかにすることで、フェノール性抗酸化物質の薬物代謝酵素、生体環境、化学物質等との複合影響を予測し、毒性発現を事前に予測・予防するための情報提供を行う。平成 25 年度は、フェノール性抗酸化物質の毒性発現における複合影響を明らかにすることを目的として、薬物代謝酵素による酸化反応を経由するカテキンの毒性発現機構について化学的解析を行った。その結果、カテキンは塩基性条件下では酸化を還元してスーパーオキシドアニオンを発生することがわかった。金属イオンを伴うフェノール性抗酸化物質の毒性は *in vitro* 試験で既に報告されているが、塩基性条件下で活性酸素の発生を直接証明できたことから、複合影響として金属イオンを伴う毒性がヒトでも発症する可能性が強く支持された。

一方、カテキンは薬物代謝酵素によって酸化反応が進行するとカテコール部分がキノン体へと酸化されることが予想される。しかし、キノン構造は化学的には非常に不安定で単離精製することができない為、キノン酸化体を経由する毒性経路は実証されていない。そこで我々は、生体高分子のモデル化合物の存在下、カテキンの酸化反応を行い、キノン酸化体と生体高分子との付加体を得る事ができた。また、キノン構造を有する化合物は NADH 等の補酵素やアスコルビン酸等の生体内還元物質が存在すると酸素分子を還元活性化して活性酸素を発生することが考えられる。そこで、H26 年度はフェノール性抗酸化物質の酸化反応と、生成するキノンによる酸化ストレス反応の化学的なモデル系の構築を試みた。その結果、酸化代謝酵素と同様の一電子酸化反応を引き起こす DPPH によってキノン酸化体を生成させた後、この反応系に NADH と pBR322DNA を添加することで、活性酸素の生成による DNA 鎖の切断反応を引き起こすことができた。この DNA 切断量を電気泳動で解析することで、カテキンやエピガロカテキンの毒性の強さを評価することができた。

H27 年度は我々が確立した酸化代謝を伴う毒性の簡便な試験法を用いて、劇症肝炎の報告例があった緑茶抽出物の成分の解析を行い、毒性発現機構について検討を行った。また、酸化代謝を伴って毒性を発現するフェノール性抗酸化物質について分子軌道計算を行い、毒性の強さの指標となる物理化学的パラメータの解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. pBR322 を用いた DNA 切断反応

エッペンドルフチューブにフェノール性抗酸化物質のアセトン溶液と 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) の溶液それぞれ 2.5  $\mu$ l を混合後、3 分間 37°C でインキュベートした。その後、氷浴上で 50  $\mu$ M bp pBR322 の 50mM pH7.2 カコジル酸溶液を 40  $\mu$ l を添加、さらに 10mM NADH の 50mM pH7.2 のカコジル酸溶液を 40  $\mu$ l 添加した、37°C で 2 時間インキュベートした後、0.1% bromophenol blue in 30% glycerol を 5  $\mu$ L 添加し、泳動用サンプルとした。Ethydium bromide を添加した 1% アガロースゲルを作成し、各サンプル 10  $\mu$ l について電気泳動を行った (100V、5 時間) 後、ゲルを洗浄後、UV トランスイルミネーター上で撮影した。

フェノール性抗酸化物質に対する DPPH の量は、異なる比率のカテキンと DPPH (2, 4, 8, 16 倍量) の d6-アセトン溶液について NMR を測定し、スペクトルにカテキンのピークが消失し、キノン酸化体のみが生成する条件を検討して決定した。

### 2. 分子軌道計算

Spartan' 10 (Wavefunction, Inc.) を用いて分子軌道計算を行った。計算理論は密度汎関数法 (DFT: B3LYP, 6-31G\*) を用いて行い、抗酸化物質およびそのラジカルカチオンの生成熱、HOMO と、抗酸化物質のキノン酸化体およびそのラジカルアニオンの生成熱、LUMO を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究は全て化学系の実験であり、倫理面への問題はない。

## C. 研究結果

### 1. 酸化代謝を伴う毒性評価

一電子酸化剤 DPPH を用いてキノンへの酸化を行い、引き続きプラスミド DNA 共存下、還元剤 NADH によるキノンラジカルアニオンへの還元を行う、酸化代謝を伴う複合毒性の試験系を用いて、緑茶に含まれている代表的なフェノール性抗酸化物質の毒性評価を行った。反応系に添加した DPPH の濃度は抗酸化物質の 4 倍量をそれぞれ用い、NADH は全て 1mM で測定を行った (図 1)。その結果、カテキンの光学異性体であるエピカテキンはカテキンと比べて強力に DNA を切断し、エピガロカテキンはさらに強い切断活性を示した。一方、緑茶に最も多く含有されているエピガロカテキンガレートはエピカテキンとほぼ同程度の切断活性を示したが、エピガロカテキンと比べて活性が大きく低下した。

### 2. 分子軌道計算による毒性評価

フェノール性抗酸化物質とそのキノン酸化体について分子軌道計算を行い、毒性評価に有効な物理化学的パラメータの検討を行った。フェノール性抗酸化物質は酸化酵素によってキノンへと酸化された後、NADH 等の還元物質によって生成するキノンラジカルアニオンが酸素分子を還元して活性酸素を発生することが考えられる。そこで、密度汎関数法による分子軌道計算を行い、代表的なフェノール性抗酸化物質について、キノンへの酸化され易さの指標に関わる最高被占軌道 (HOMO)、および一電子酸化体 (ラジカルカチオン) の生成熱 ( $\Delta E_1$ ) を求めた。なお、 $\Delta E_1$  はフェノール性抗酸化物質と一電子酸化体の生成熱 (E) から求めた。ま

た、キノン酸化体から活性酸素発生能に関わる、キノンの最低空軌道 (LUMO)、および一電子還元体 (ラジカルアニオン) の生成熱 ( $\Delta E_2$ ) を求めた。なお、 $\Delta E_2$  はキノンと一電子還元体の生成熱 (E) から求めた (表 1)。キノンへの酸化され易さの指標となる、HOMO はエピカテキン > エピガロカテキン > エピガロカテキンガレート > カテキンの順で小さくなることから、エピカテキンが最も酸化され易いことがわかった。また、ラジカルカチオンの生成熱 ( $\Delta E_1$ ) からは、エピガロカテキン > エピカテキン > エピガロカテキンガレート > カテキンの順で小さくなることから、カテキンが最も酸化され易いことが示された。一方、キノンの還元され易さの指標となる LUMO はエピカテキン > カテキン > エピガロカテキン > エピガロカテキンガレートの順で小さくなり、エピカテキンのキノン酸化体が最も還元され易いことがわかった。また、キノンラジカルアニオンの生成熱 ( $\Delta E_2$ ) からはカテキン > エピカテキン > エピガロカテキンガレート > エピガロカテキンの順で小さくなり、エピガロカテキンのキノンが最も酸化され易いことが示された。以上の結果より、フェノール性抗酸化物質のキノンラジカルアニオンの生成熱 ( $\Delta E_2$ ) が、プラスミド DNA を用いた酸化を伴う毒性評価試験の結果と最もよく相関することがわかった。

#### D. 考察

カテキンなどのフェノール性抗酸化物質は酸化ストレスを抑制し、大量に摂取しても比較的安全性が高いことから、生活習慣病の予防目的への利用が注目されている。

しかし、海外では緑茶抽出物を摂取することで肝炎を発症した事例が報告されていることから、毒性を解析しヒトへの影響を適切に評価することが急務の課題となっている。多くのフェノール性抗酸化物質は第 II 相薬物代謝酵素によって抱合体となって排泄される。しかし、健康食品等によって第 I 相薬物代謝酵素が誘導されると、フェノール性化合物はキノン酸化体へと代謝されることが予想される。キノン代謝物は化学的には不安定で核酸や蛋白質と結合したり、活性酸素を発生して遺伝毒性を示す。近年、健康食品に含まれている第 I 相酵素を誘導する成分が、医薬品の作用に影響を与えることが問題となった。軽度の鬱状態の改善作用によって健康食品としての利用が高まっているセントジョーンズワートは第 I 相薬物代謝酵素を誘導することによって、インジナビル (抗 HIV 薬)、ジゴキシン (狭心症薬)、シクロスポリン (免疫抑制薬) の効果を減少させることから、平成 12 年 5 月、厚生労働省は医療関係社に注意喚起を行った。健康食品による第 I 相薬物代謝酵素の誘導は、フェノール性抗酸化物質においてもキノン酸化体の生成を伴う毒性の発現が懸念される。そこで、複合影響の観点からフェノール性抗酸化物質の毒性を明らかにすることを目的として、化学的な反応モデルによるカテキンからのキノンへの酸化と活性酸素発生による毒性発現系の構築を試み、酸化代謝を伴うフェノール性化合物の簡便な毒性試験法を開発した。この試験法で、緑茶に含まれるフェノール性抗酸化物質の毒性を検討したところ、エピガロカテキンがもっとも毒性が強く、エピガロカテキンガレート、エピカテキン、カテキンの

順で毒性が低くなることが明らかとなった。緑茶の主成分であるエピガロカテキンガレートは生体内では容易にエステラーゼによってエピガロカテキンに加水分解される。エピガロカテキンガレートは水溶性が高く吸収され難いが、エピガロカテキンは脂溶性が高く吸収され易い。従って、緑茶抽出物を大量摂取すると、エピガロカテキンガレートはエピガロカテキンに加水分解されて細胞に蓄積する。フェノール性抗酸化物質はその多くが抱合反応を受けて排泄されるが、第 I 相薬物代謝酵素が誘導されると、エピガロカテキンのキノンへの酸化が進行し、毒性を発現することが予測された (図 2)。

本研究で開発した簡便な毒性試験法は酸化代謝物であるキノンをプラスミド DNA を用いた切断反応の試験系で同時に生成させることで、不安定なキノンの活性酸素毒性を評価することが可能となった。しかしながら、入手困難な化合物については毒性を評価することが難しい。そこで次に、分子軌道計算を利用した化学構造による毒性予測法の開発を行った。キノンへの酸化反応とキノンのラジカルアニオンへの還元反応について物理化学的パラメータを求め、どちらが毒性発現の律速になるかを検討した結果、代表的なカテキン類の毒性はキノンのラジカルアニオンへの生成熱と相関することが明らかとなった。以上、本研究で開発した試験法は健康食品やサプリメントなどに含まれる薬物代謝酵素を誘導する化合物と、フェノール性抗酸化物質との複合影響の評価系として活用が期待される。今後は、フェノール性抗酸化物質以外の化合物についても複合影響を評価できるように本

試験法の改良を行う予定である。

## E. 結論

複合影響の観点からフェノール性抗酸化物質の酸化反応と、生成するキノン体由来する酸化ストレス反応をプラスミド DNA 存在下で行うことで複合影響を評価できる簡便な試験法を開発した。この試験法を利用して、代表的なフラボノイドの毒性を検討した結果、劇症肝炎が報告された緑茶抽出物の主な成分であるエピガロカテキンガレートは、エピガロカテキンへと加水分解された後、強力な酸化ストレスによる毒性を発現することが明らかとなった。また、フェノール性抗酸化物質およびそのキノン代謝物について分子軌道計算を行い、得られた物理化学的パラメータ (HOMO、LUMO、生成熱) について毒性との相関を検討した。その結果、キノン代謝体からラジカルアニオンへの還元され易さの指標となる生成熱は強力な酸化ストレスを誘発するエピガロカテキンが最も小さいことが明らかとなり、分子軌道計算からの毒性予測が可能であることがわかった。以上の結果より、フェノール性抗酸化物質はキノンへの酸化代謝を経由することで酸化ストレスによる毒性を発現している可能性が示唆された。本研究で検討した試験系は健康食品やサプリメントなどに含まれる薬物代謝酵素を誘導する化合物と、フェノール性抗酸化物質との複合影響を評価する試験系としての活用が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Nakanishi, I., Ohkubo, K., Imai, K., Kamibayashi, M.,

Yoshihashi, Y., Matsumoto, K., Fukuhara, K., Terada,  
K., Itoh, S., Ozawa, T., Fukuzumi, S. Solubilisation of a $\beta$ -  
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by  $\beta$ -  
cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging  
activity of antioxidants in aqueous media, Chem. Comm.,  
51, 8311-8314, 2015.  
1593-1601, 2012.

学会発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

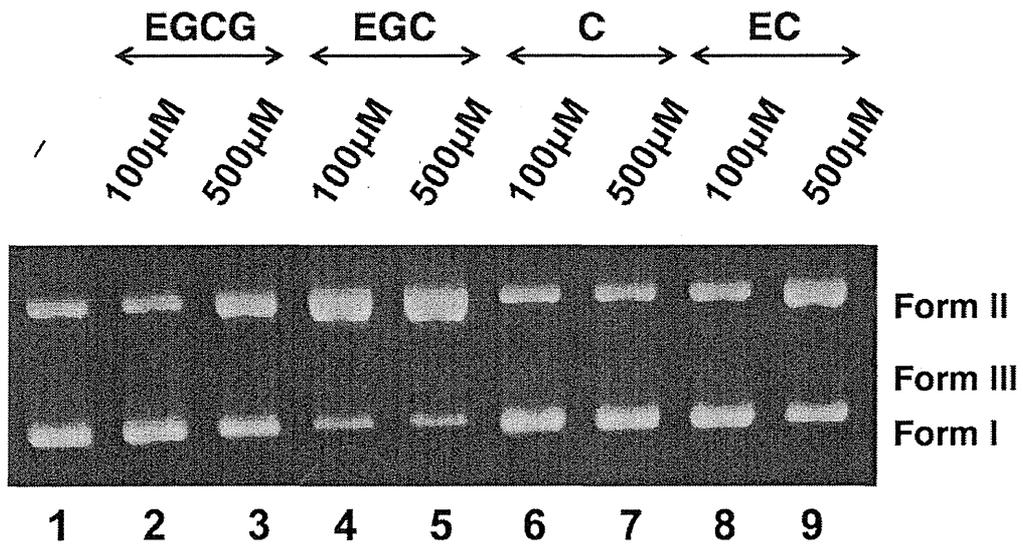


図1. カテキン類のキノンへの酸化を伴うDNA切断反応

Assays were performed in 50 mM sodium cacodylate buffer, pH7.2, containing 45μbp of pBR322DN A, 1mM NADH, DPPH (4-fold of antioxidant) for 2h at 37°C under aerobic condition. Lane 1; pBR 322 DNA alone, Lane 2 - 3; epigallocatechin gallate (EGCG), Lane 4 - 5; epigallocatechin (EGC), Lane 6 - 7; catechin (C), Lane 8 - 9; epicatechin (EC).

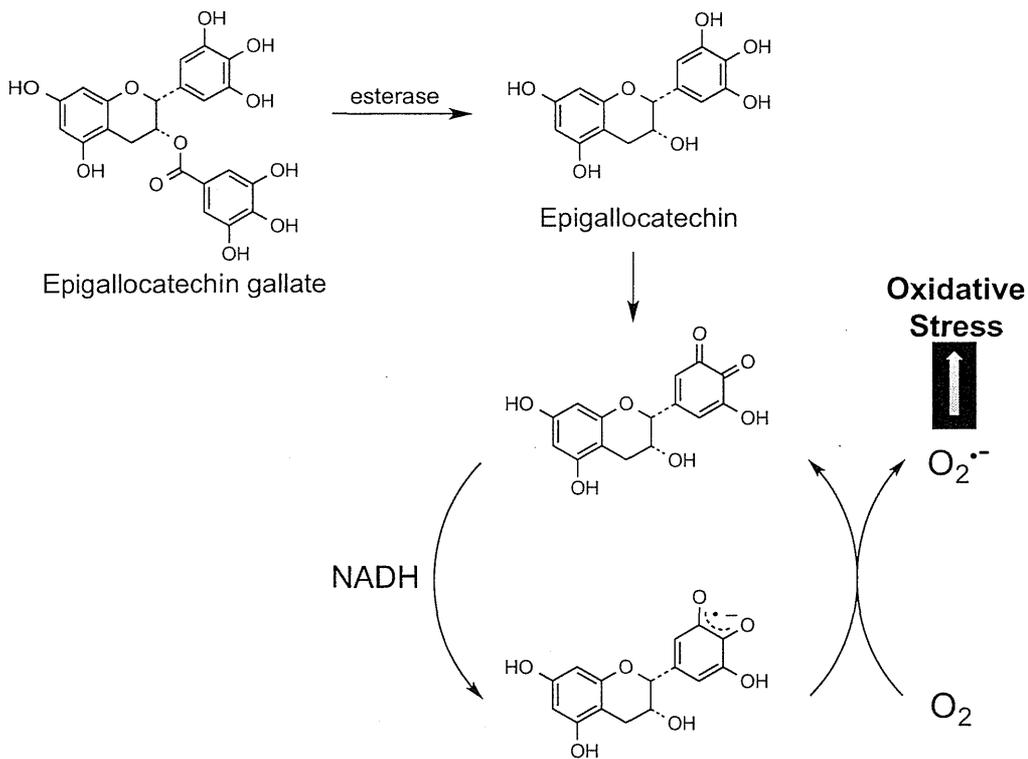


図2. エピガロカテキンガレートの酸化代謝を伴う毒性発現機構

	HOMO (eV)	Energy (au)	$\Delta E$ (au)
Catechin	- 5.59	- 1031.32087	-
Catechin $\cdot+$	-	- 1031.07574	0.24513
Epicatechin	- 5.44	- 1031.32823	-
Epicatechin $\cdot+$	-	- 1031.07614	0.25209
Epigallocatechin	- 5.48	- 1106.54887	-
Epigallocatechin $\cdot+$	-	- 1106.29283	0.25604
Epigallocatechin Gallate	- 5.51	- 1676.60754	-
Epigallocatechin Gallate $\cdot+$	-	- 1676.35781	0.24973

表1. カテキン類とそのラジカルカチオンの分子軌道計算結果

	LUMO (eV)	Energy (au)	$\Delta E$ (au)
Catechin Q	- 3.36	- 1030.09089	-
Catechin Q $\cdot-$	-	- 1030.16447	- 0.07358
Epicatechin Q	- 3.34	- 1030.08672	-
Epicatechin Q $\cdot-$	-	- 1030.14743	- 0.06071
Epigallocatechin Q	- 3.46	- 1105.31215	-
Epigallocatechin Q $\cdot-$	-	- 1105.39309	- 0.08094
Epigallocatechin Gallate Q	- 3.48	- 1118.62375	-
Epigallocatechin Gallate Q $\cdot-$	-	- 1118.70343	- 0.07968

表2. カテキン類のキノン酸化体 (Q) とそのラジカルアニオンの分子軌道計算結果

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakanishi, I., Ohkubo, K., Imai, K., Kamibayashi, M., Yoshihashi, Y., Matsumoto, K., Fukuhara, K., Terada, K., Itoh, S., Ozawa, T.,	Solubilisation of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydr azyl radical in water by $\beta$ -cyclodextrin to evaluate the radica—scavenging activity of antioxidants in aqueous media.	Chem. Comm.	51	8311-8314	2015

## 研究成果の刊行物・別刷



Cite this: *Chem. Commun.*, 2015, 51, 8311

Received 17th March 2015,  
Accepted 8th April 2015

DOI: 10.1039/c5cc02236c

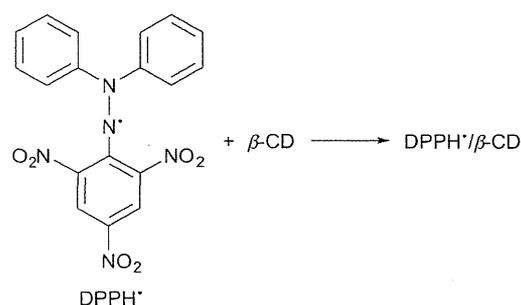
www.rsc.org/chemcomm

## Solubilisation of a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical in water by $\beta$ -cyclodextrin to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants in aqueous media†

Ikuo Nakanishi,<sup>a\*</sup> Kei Ohkubo,<sup>bc</sup> Kohei Imai,<sup>d</sup> Masato Kamibayashi,<sup>e</sup> Yasuo Yoshihashi,<sup>f</sup> Ken-ichiro Matsumoto,<sup>a</sup> Kiyoshi Fukuhara,<sup>d</sup> Katsuhide Terada,<sup>f</sup> Shinobu Itoh,<sup>b</sup> Toshihiko Ozawa<sup>g</sup> and Shunichi Fukuzumi<sup>\*bchi</sup>

A 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH<sup>\*</sup>) was successfully solubilised in water by  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). DPPH<sup>\*</sup>/ $\beta$ -CD thus obtained was demonstrated to be a powerful tool to evaluate the antioxidative activity of water-soluble antioxidants, such as ascorbate and Trolox, in aqueous buffer solutions.

A relatively stable radical, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>\*</sup>) (Scheme 1), is frequently used as a reactivity model of reactive oxygen species (ROS) to evaluate the radical-scavenging activity of antioxidants.<sup>1–6</sup> DPPH<sup>\*</sup> shows a characteristic absorption band at around 520 nm, which disappears upon addition of compounds with radical-scavenging activity. However, alcoholic cosolvents, such as methanol and ethanol, are required to use DPPH<sup>\*</sup> in aqueous systems due to its little solubility in water.<sup>7–9</sup> In such a case, concentrated buffer solutions cannot be used to control the pH of the reaction systems because buffer salts are precipitated in the alcoholic reaction media. Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides that have a hydrophobic internal cavity and a hydrophilic external surface. Thus, CDs form inclusion complexes



Scheme 1 Incorporation of DPPH<sup>\*</sup> into  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD).

with a wide range of hydrophobic molecules and solubilise them in water.<sup>10,11</sup> We report herein the solubilisation of DPPH<sup>\*</sup> in water using  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD; Scheme 1), which consists of 7 glucopyranoside units. The scavenging reaction of  $\beta$ -CD-solubilised DPPH<sup>\*</sup> (DPPH<sup>\*</sup>/ $\beta$ -CD) by water-soluble antioxidants in phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.4) demonstrated that DPPH<sup>\*</sup>/ $\beta$ -CD would be a powerful tool to evaluate the antioxidative activity in aqueous media without alcoholic cosolvents.

15 mL of boiling water (Milli-Q) or a phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.4) was added to the mixture containing DPPH<sup>\*</sup> (0.23 mmol) and  $\beta$ -CD (0.35 mmol), and the suspension was cooled to room temperature. The filtration of the suspension using a membrane filter (pore size: 0.22  $\mu$ m) gave a deep violet solution. This solution showed an absorption band at 527 nm, which is diagnostic of DPPH<sup>\*</sup> (Fig. 1). Thus, DPPH<sup>\*</sup> could be solubilised in water by  $\beta$ -CD. A significant red shift of the band due to DPPH<sup>\*</sup>/ $\beta$ -CD as compared to those of free DPPH<sup>\*</sup> in *n*-hexane (509 nm), MeOH (516 nm), EtOH (517 nm) and acetonitrile (519 nm) suggests that the >N–N<sup>\*</sup>– moiety of DPPH<sup>\*</sup> may exist outside of the  $\beta$ -CD cavity and strongly interact with water. The concentration of DPPH<sup>\*</sup> was estimated to be 5.9  $\times$  10<sup>–5</sup> M by using the  $\epsilon$  value of 11 000 M<sup>–1</sup> cm<sup>–1</sup> determined for DPPH<sup>\*</sup> in a 1 : 1 ethanol–buffer solution.<sup>9</sup> When  $\beta$ -CD was replaced by  $\alpha$ - or  $\gamma$ -CD, which consists of 6 or 8 glucopyranoside units and thus has a smaller or bigger hydrophobic cavity than  $\beta$ -CD,

<sup>a</sup> Radio-Redox-Response Research Team, Advanced Particle Radiation Biology Research Program, Research Center for Charged Particle Therapy, National Institute of Radiological Sciences (NIRS), Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan. E-mail: nakanis@nirs.go.jp; Fax: +81-43-255-6819; Tel: +81-43-206-3131

<sup>b</sup> Department of Material and Life Science, Graduate School of Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>c</sup> ALCA and SENTAN, Japan Science and Technology Agency (JST), Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>d</sup> School of Pharmacy, Showa University, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

<sup>e</sup> Pharmaceutical Manufacturing Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, Kyoto 607-8414, Japan

<sup>f</sup> Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

<sup>g</sup> Division of Oxidative Stress Research, Showa Pharmaceutical University, Machida, Tokyo 194-8543, Japan

<sup>h</sup> Department of Bioinspired Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

<sup>i</sup> Faculty of Science and Technology, Meijo University, Shiogamaguchi, Tempaku, Nagoya, Aichi 468-8502, Japan

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details and EPR spectra at room temperature (Fig. S1). See DOI: 10.1039/c5cc02236c



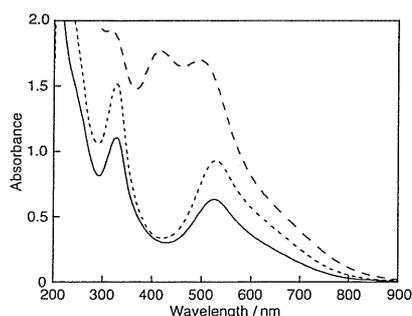


Fig. 1 UV-vis spectra of extracts of the mixture of DPPH\* (0.23 mmol) and β-CD (0.45 mmol) in 15 mL of boiling phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) (—), acetate buffer (50 mM, pH 4.4) (---) and borate buffer (14 mM, pH 9.1) (- - -).

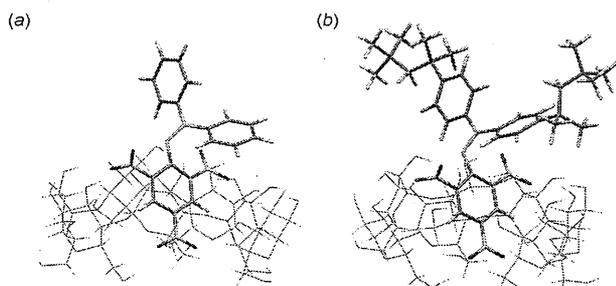


Fig. 2 Optimised structures of the inclusion complex of (a) DPPH\* with β-CD and (b) DOPPH\* with β-CD calculated by DFT (UB3LYP/3-21G:C-PCM solvation model parameterised for water).

DPPH\* was not solubilised in water. The 2,2-di(4-*tert*-octylphenyl)-1-picrylhydrazone radical (DOPPH\*) could not be solubilised in water by β-CD in the same manner, either. Fig. 2a shows an optimised structure of the inclusion complex of DPPH\* with β-CD calculated by the density functional theory (DFT) (UB3LYP/3-21G:C-PCM solvation model parameterised for water) (see the ESI†). The picryl moiety of DPPH\* is incorporated into the hydrophobic cavity of β-CD. DOPPH\* is also incorporated into β-CD as shown in Fig. 2b. The calculated association energy between DPPH\* and β-CD ( $-31 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) by DFT is significantly less negative than that between DOPPH\* and β-CD ( $-44 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). These theoretical results suggest that DOPPH\* may not be solubilised by β-CD due to the hydrophobic *tert*-octyl groups. DPPH\* solubilised by β-CD in water or the phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.4) is stable at least for several days at room temperature. When a boiling acetate buffer solution (50 mM, pH 4.4) was used instead of the phosphate buffer, DPPH\* could also be solubilised by β-CD (Fig. 1). On the other hand, a brown solution with absorption bands at 416 and 505 nm was obtained using the boiling borate buffer solution (14 mM, pH 9.1) as shown in Fig. 1. This suggests that DPPH\* is unstable under basic conditions as reported previously.<sup>9</sup> In fact, addition of 0.75 mL of a borate buffer solution (0.1 M, pH 9.1) to DPPH\*/β-CD in water (Milli-Q) (2.3 mL) resulted in a gradual decrease in the absorption band at 527 nm, accompanied by an increase in the band at 412 nm with clear isosbestic points at 252, 304, 346 and 491 nm as shown in Fig. 3. The one-electron reduced DPPH\* (DPPH<sup>-</sup>) is reported to have an

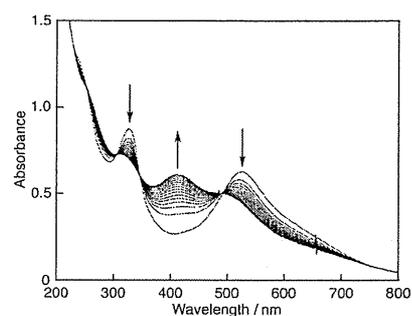


Fig. 3 Spectral change observed for DPPH\*/β-CD ( $5.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) in borate buffer (25 mM, pH 9.1) at 298 K. Interval: 20 min.

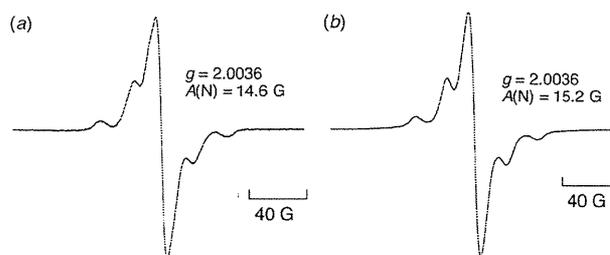
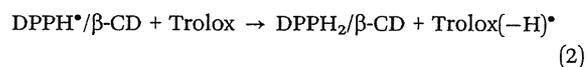


Fig. 4 EPR spectra of (a) DPPH\*/β-CD ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) in distilled water at 77 K and (b) DPPH\* ( $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) in MeOH at 77 K.

absorption band at 426 nm in a 1:1 ethanol-buffer solution,<sup>9</sup> suggesting that DPPH<sup>-</sup> may be included in the products. However, the detailed reaction mechanism of DPPH\* under basic conditions is under investigation and will be reported elsewhere.

The EPR spectrum of DPPH\*/β-CD observed in water at room temperature has the same g value (2.0036) and hyperfine coupling constant (7.8 G) as those of DPPH\* in MeOH (2.0036 and 7.9 G, respectively) (see the Fig. S1, ESI†). A slightly small hyperfine coupling constant (14.6 G) was observed in water as compared to that in MeOH (15.2 G) for the EPR spectra recorded at 77 K (Fig. 4).

When ascorbic acid (AscH<sub>2</sub>) was added to the phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.4) of DPPH\*/β-CD, the band at 527 nm disappeared immediately with clear isosbestic points at 320, 338 and 431 nm as shown in Fig. 5a. Since the pK<sub>a</sub> value of AscH<sub>2</sub> is reported to be 4.1,<sup>12</sup> AscH<sub>2</sub> undergoes deprotonation and exists in its anionic form, AscH<sup>-</sup>, in phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.4). Thus, this spectral change indicates that AscH<sup>-</sup> efficiently scavenged DPPH\* in phosphate buffer [eqn (1)]. When AscH<sup>-</sup> was replaced by Trolox, a water-soluble analogue of α-tocopherol (vitamin E), a similar spectral change was observed due to the scavenging reaction of DPPH\* by Trolox [Fig. 5b and eqn (2)].<sup>13</sup>



Spectral titrations (insets of Fig. 3a and b) show the same stoichiometry with both antioxidants, the DPPH\*/antioxidant molar ratio being 2:1.<sup>7</sup> The decay of the absorbance at 527 nm monitored by a stopped-flow technique obeyed pseudo-first-order kinetics,



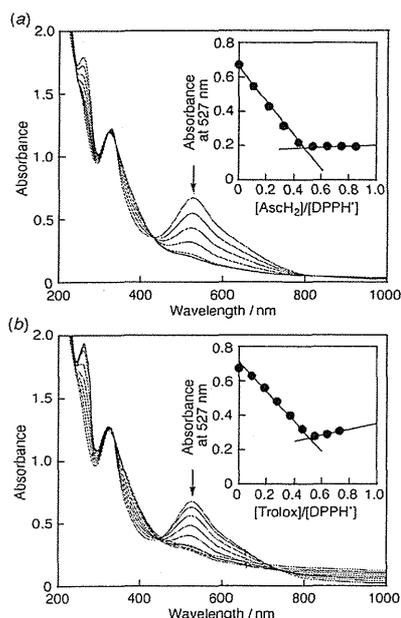


Fig. 5 Spectral changes observed upon addition of (a) AscH<sub>2</sub> (0–5.4 × 10<sup>-5</sup> M) or (b) Trolox (0–4.6 × 10<sup>-5</sup> M) to DPPH\*/β-CD (6.3 × 10<sup>-5</sup> M) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). Insets: plots of the absorbance at 527 nm vs. (a) [AscH<sub>2</sub>]/[DPPH\*] and (b) [Trolox]/[DPPH\*].

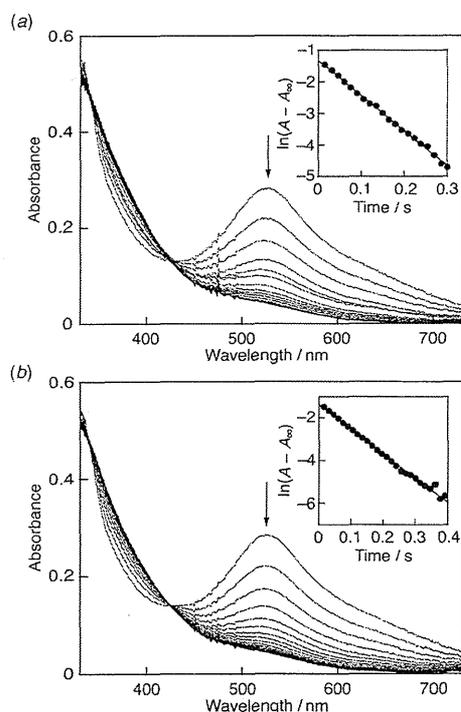


Fig. 6 Spectral changes (interval: 25 ms) observed during reactions of (a) AscH<sub>2</sub> (1.4 × 10<sup>-3</sup> M) with DPPH\*/β-CD (2.6 × 10<sup>-5</sup> M) and (b) Trolox (6.3 × 10<sup>-4</sup> M) with DPPH\*/β-CD (3.0 × 10<sup>-5</sup> M) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) at 298 K. Insets: the first-order plots of the absorbance at 527 nm.

when the concentration of AscH<sub>2</sub> ([AscH<sub>2</sub>]) was maintained at more than a 10-fold excess of DPPH\*/β-CD concentration (Fig. 6a).

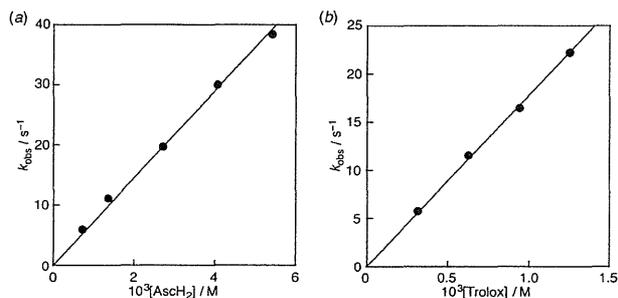


Fig. 7 Plots of  $k_{\text{obs}}$  vs. (a) [AscH<sub>2</sub>] and (b) [Trolox].

The pseudo-first-order rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ) linearly increased with increasing [AscH<sub>2</sub>] (Fig. 7a). From the slope of the linear plot the second-order rate constant ( $k$ ) for the scavenging of DPPH\*/β-CD by AscH<sub>2</sub> was determined in a phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) to be  $7.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The  $k$  value for Trolox was also determined in the same manner to be  $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 6b and 7b), which is exactly the same as that measured in a 1:1 ethanol-buffer (pH 7.4) solution.<sup>9,14</sup> Thus, β-CD does not inhibit the reaction of DPPH\* with the antioxidants, while the stability and reactivity of nitroxyl radicals were reported to be significantly changed by the complexation with cyclodextrins.<sup>15</sup>

In summary, β-CD-solubilised DPPH\* in water has been demonstrated to be a powerful tool to evaluate the antioxidative activity of antioxidants in aqueous media, especially in highly concentrated buffer solutions without precipitation of buffer salts.

This work was partially supported by Grant-in-Aid (No. 26460056 to I.N., 26620154 and 266288037 to K.O.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and ALCA and SENTAN projects from JST.

## Notes and references

- M. S. Blois, *Nature*, 1958, **181**, 1199.
- (a) K. U. Ingold and D. A. Pratt, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 9022; (b) G. Litwinienko and K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**, 222.
- (a) E. van Wenum, R. Jurczakowski and G. Litwinienko, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 9102; (b) M. Musialik, R. Kuzmicz, T. S. Pawłowski and G. Litwinienko, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 2699; (c) P. Mulder, G. Litwinienko, S. Lin, P. D. MacLean, L. R. Barclay and K. U. Ingold, *Chem. Res. Toxicol.*, 2006, **19**, 79; (d) G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 8982; (e) M. Musialik and G. Litwinienko, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 495; (f) G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 5888; (g) G. Litwinienko and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 3433.
- (a) R. Amorati, S. Menichetti, C. Viglianisi and M. C. Foti, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 11904; (b) M. C. Foti, *Int. J. Chem. Kinet.*, 2012, **44**, 524; (c) V. D. Kancheva, L. Saso, S. E. Angelova, M. C. Foti, A. Slavova-Kasakova, C. Daquino, V. Enchev, O. Firuzi and J. Nechev, *Biochimie*, 2012, **94**, 403; (d) M. C. Foti, C. Daquino, G. A. DiLabio and K. U. Ingold, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 4826; (e) M. C. Foti, R. Amorati, G. F. Pedulli, C. Daquino, D. A. Pratt and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2011, **75**, 4434; (f) M. C. Foti, C. Daquino, I. D. Mackie, G. A. DiLabio and K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 9270; (g) M. C. Foti and C. Daquino, *Chem. Commun.*, 2006, 3252; (h) M. C. Foti, C. Daquino and C. Geraci, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2309; (i) M. C. Foti, L. R. Barlay and K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 12881.
- (a) T. Waki, S. Kobayashi, K. Matsumoto, T. Ozawa, T. Kamada and I. Nakanishi, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 9842; (b) H. P. Indo, I. Nakanishi, K. Ohkubo, H. Yen, M. Nyui, S. Manda, K. Matsumoto, K. Fukuhara, K. Anzai, N. Ikota, H. Matsui, Y. Minamiyama, A. Nakajima, H. Ichikawa, S. Fukuzumi, T. Ozawa, C. Mukai and



- H. J. Majima, *RSC Adv.*, 2013, 3, 4535; (c) T. Kawashima, S. Manda, Y. Uto, K. Ohkubo, H. Hori, K. Matsumoto, K. Fukuhara, N. Ikota, S. Fukuzumi, T. Ozawa, K. Anzai and I. Nakanishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2012, 85, 877; (d) T. Waki, I. Nakanishi, K. Matsumoto, J. Kitajima, T. Chikuma and S. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, 2012, 60, 37; (e) S. Kobayashi, T. Waki, I. Nakanishi, K. Matsumoto and K. Anzai, *Chem. Pharm. Bull.*, 2010, 58, 1442; (f) I. Nakanishi, T. Kawashima, K. Ohkubo, H. Kanazawa, K. Inami, M. Mochizuki, K. Fukuhara, H. Okuda, T. Ozawa, S. Itoh, S. Fukuzumi and N. Ikota, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 626.
- 6 S. B. Kedare and R. P. Singh, *J. Food Sci. Technol.*, 2011, 48, 412 and references cited therein.
- 7 M. B. Arnao, *Trends Food Sci. Technol.*, 2000, 11, 419.
- 8 D.-W. Li, F.-F. Tian, Y.-S. Ge, X.-L. Ding, J.-H. Li, Z.-Q. Xu, M.-F. Zhang, X.-L. Han, R. Li, F.-L. Jiang and Y. Liu, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 10713.
- 9 O. Friaa and D. Brault, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, 4, 2417.
- 10 G. Crini, *Chem. Rev.*, 2014, 114, 10940 and references cited therein.
- 11 I. Nakanishi, S. Fukuzumi, T. Konishi, K. Ohkubo, M. Fujitsuka, O. Ito and N. Miyata, *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, 2372.
- 12 (a) C. Creutz, *Inorg. Chem.*, 1981, 20, 4449; (b) N. H. Williams and J. K. Yandell, *Aust. J. Chem.*, 1982, 35, 1133.
- 13 Clear isosbestic points such as those in Fig. 3a were not observed due to relatively poor solubility of Trolox in phosphate buffer as compared to  $\text{AsCH}_2$ .
- 14 For 2 : 1 and 3 : 1 ethanol-water mixtures, the  $k$  values were reported to be  $8.6 \times 10^3$  and  $7.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. See ref. 9.
- 15 (a) M. Spulber and S. Schlick, *J. Phys. Chem. A*, 2010, 114, 6217; (b) D. Bardelang, L. Charles, J.-P. Finet, L. Jicsinszky, H. Karoui, S. R. A. Marque, V. Monnier, A. Rockenbauer, R. Rosas and P. Tordo, *Chem.-Eur. J.*, 2007, 13, 9344; (c) H. Karoui and P. Tordo, *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45, 1043; (d) H. Karoui, A. Rockenbauer, S. Pietri and P. Tordo, *Chem. Commun.*, 2002, 3030; (e) C. Ebel, K. U. Ingold, J. Michon and A. Rassat, *Tetrahedron Lett.*, 1985, 26, 741.

