

NIRS-M-114

放医研 図書室



8 0 1 9 9 6 0 1 2

放医研シンポジウムシリーズ No. 27

活性酸素・フリーラジカル
研究の新展開
— 基礎から臨床まで —

小澤 俊彦・湯川 修身 編

放射線医学総合研究所

放医研シンポジウムシリーズ No. 27

活性酸素・フリーラジカル
研究の新展開
— 基礎から臨床まで —

小澤 俊彦・湯川 修身 編

New Development for Active Oxygens
and Free Radical Research
— From Basic Science to Clinical Applications —

Proceedings of the 27th NIRS Symposium
held at Chiba, December 7 - 8, 1995

Edited by
Toshihiko Ozawa,
Osami Yukawa

1996
National Institute of Radiological Sciences
Chiba, Japan

開会の挨拶

皆様お早うございます。佐藤と申します。本日は、朝早くから本シンポジウムにおいで頂きありがとうございます。

このシンポジウムは、「活性酸素・フリーラジカル研究の新展開－基礎から臨床まで－」と題しまして、小澤委員長の委員会において企画・立案・検討されまして本日開催のはこびとなりました。

活性酸素というものは、生物が酸素を利用するようになってから長い歴史がございまして、その中で、活性酸素あるいは酸素の害をすでに受けたあるいはその益を引き出した生物が今日繁栄していると言えると思います。

その益と言うものは、非常に効率的なエネルギー産生であり、さらには、体内異物を殺す殺菌作用であり、あるいは、生体内の各種の調節機構である訳ですが、害というのは、色々な疾患があります。炎症であり、虚血再灌流障害であり、或いは、老化、発がん、自己免疫疾患など色々なことが、ほとんどあらゆる臓器に活性酸素の害が起こっているということが言えます。

これらの研究が、本日それぞれのこの分野の第一線でご活躍中の先生方によってご紹介されまして、それに対しまして、ご参加の皆様方のご討論によりましてさらに今後の発展が期待されますものと思っております。さらに明日は、最近話題になっております一酸化窒素（NO）につきまして特集が組まれておりまして、また、その中でパネルディスカッションも計画しております。この放医研シンポジウムにおきまして、こういうパネルディスカッションを採用したのは今回が初めてでございまして、それにつきましては皆様の活発なご討論を期待しております。

それでは、本日並びに明日につきましては、皆様方のご協力をよろしくお願い致しまして私のご挨拶と致します。

放射線医学総合研究所

科学研究官 佐藤 弘毅

目 次

開会の挨拶	佐藤 弘毅	v
座長一覧		viii
執筆者一覧		ix
I. 活性酸素・フリーラジカルの生成、反応性及び測定		
1. 放射線	山口 寛	1
2. 環境ストレスと活性酸素	嵯峨井 勝	11
3. 活性酸素、フリーラジカルの化学的な生成と検出	河野 雅弘	21
4. <i>in vivo</i> ESR による生体内フリーラジカル反応の解析	内海 英雄	33
II. 特別講演		
脳と活性酸素・フリーラジカル	森 昭胤	43
III. 活性酸素・フリーラジカルの生物学		
1. 活性酸素感受性変異株	浜・稲葉浩子	54
2. 酸化的 DNA 損傷の生成、修復および突然変異誘発	葛西 宏	64
3. 膜	安西 和紀	71
4. 細胞情報伝達系	中島 徹夫	83
5. 活性酸素代謝とアポトーシス	井上 正康	90
IV. 活性酸素・フリーラジカルの防御		
1. 防御薬剤の臨床応用	吉川 敏一	91
2. 生体防御機構	山岡 聖典	97
3. 合成抗酸化物	伊古田暢夫	113
4. 食品からの抗酸化物質	尾形 健明	123
V. がん・老化と活性酸素・フリーラジカル		
1. 突然変異の原因となる放射線誘導ラジカル	渡邊 正己	132
2. LEC ラットにおける銅代謝異常および毒性発現へのメタロチオネインの関与	鈴木 和夫	141
3. 制がん活性酸素・フリーラジカル	古澤 佳也	151
4. 老化と活性酸素・フリーラジカル	浦野 四郎	159
VI. 活性酸素・フリーラジカルによる疾患と防御		
1. 胃粘膜障害	内藤 裕二	166
2. 活性酸素・フリーラジカルの心筋機能障害様式	岡部栄逸朗	171

3. 皮膚障害	荒金 久美	184
---------------	-------	-----

VII. NO 現状と将来

1. NO の基礎：NO 発生化合物	宮田 直樹	192
2. NO と病態	谷口 直之	201
3. 一酸化窒素の臨床応用	平田 恭信	203
4. NO 測定法 NO の高感度分析について		
i) ジチオカルバメート鉄錯体による NO のトラップ	吉村 哲彦	211
ii) 生体内でのヘモグロビンによる NO のトラップ	小坂 博昭	222
iii) Nitronyl nitroxides による NO の定量的検出	赤池 孝章	230
iv) 蛍光法による NO 検出	長野 哲雄	236
v) 電極法による NO 測定	一守 康史	244

閉会の挨拶	平尾 泰男	250
-------------	-------	-----

第27回放医研シンポジウム

「活性酸素・フリーラジカル研究の新展開－基礎から臨床まで－」プログラム	251
---	-----

第27回放医研シンポジウム実行委員会委員一覧	252
------------------------------	-----

座長一覧 (担当セッション順、敬称略)

(所属は平成7年12月現在)

I. 活性酸素・フリーラジカルの生成・反応性及び測定

藤高 和信 放射線医学総合研究所

上田 順市 放射線医学総合研究所

II. 特別講演

小澤 俊彦 放射線医学総合研究所

III. 活性酸素・フリーラジカルの生物学

湯川 修身 放射線医学総合研究所

大山ハルミ 放射線医学総合研究所

IV. 活性酸素・フリーラジカルの防御

長野 哲雄 東京大学

桑原 幹典 北海道大学

V. がん・老化と活性酸素・フリーラジカル

小木曾洋一 放射線医学総合研究所

巽 紘一 放射線医学総合研究所

VI. 活性酸素・フリーラジカルによる疾患と防御

加藤 博敏 放射線医学総合研究所

VII. NO 現状と将来

湯川 修身 放射線医学総合研究所

内海 英雄 九州大学

執筆者一覧 (発表順、敬称略)

(所属は平成7年12月現在)

山口 寛 放射線医学総合研究所
嵯峨井 勝 国立環境研究所
河野 雅弘 日本電子株式会社
内海 英雄 九州大学
森 昭胤 カリフォルニア大学
浜・稲葉浩子 放射線医学総合研究所
葛西 宏 産業医科大学
安西 和紀 放射線医学総合研究所
中島 徹夫 放射線医学総合研究所
井上 正康 大阪市立大学
吉川 敏一 京都府立医科大学
山岡 聖典 電力中央研究所
伊古田暢夫 放射線医学総合研究所
尾形 健明 山形大学

渡邊 正己 長崎大学
鈴木 和夫 千葉大学
古澤 佳也 放射線医学総合研究所
浦野 四郎 東京都老人総合研究所
内藤 裕二 彦根中央病院
岡部栄逸朗 神奈川歯科大学
荒金 久美 (株)コーセー基礎研究所
宮田 直樹 国立衛生試験所
谷口 直之 大阪大学
平田 恭信 東京大学
吉村 哲彦 (財)生物ラジカル研究所
小坂 博昭 大阪大学
赤池 孝章 熊本大学
長野 哲雄 東京大学
一守 康史 東海大学

の研究の深化が行われている。さらに第一近似として、生体での間接作用は DNA 分子と OH ラジカルとの相互作用がその大半を占めると、考えられている。OH ラジカルは DNA 分子をとりまく水分子の放射線分解により生成されたものである。OH ラジカルは従って放射線科学では長らく意識されてきた活性種である。そして近年注目を集めている活性酸素の一種でもある。放射線により生成される OH ラジカルの量と、効果（障害）のうちの間接作用の占める割合、この2つが推定できれば、OH ラジカルと効果との定量的関係が推定できるはずである。ここに、活性酸素の問題を考える上で、放射線研究が関わる意義の一つがある。

さて、この問題意識、OH ラジカルに対する線量効果関係は得られるか、に答えるためには、さらに以下の間に答えなければならない。(1) 生体中の放射線による OH の収量は判っているか。(2) 水中での放射線による OH 収量はどれほど判っているか。(3) それら OH 収量と放射線飛跡構造との関係は如何に。(4) 水中の OH 収量および拡散過程は効果の間接作用を説明できるか。(5) 効果の間接作用の割合の推定の現状どうか。この論文では、これらの間に答えることを目指して考察を進める。

II. 水の放射線分解生成物の収量

放射線と物質集合体との相互作用は空間的に離散的で、小さな塊、クラスター状の形態として生じる。気相でのこの形態をイオンクラスターと呼び、液相での形態をスパーク、ブロップ、ショートトラックなどと呼んでいる。イオンクラスターはウイルソンの霧箱の観測から出てきた概念であり、スパーク、ブロップ、ショートトラックは理論的考察から出てきた概念である。いずれにせよ、これら形態の空間分布を飛跡構造と呼ぶ。原子核（写真）乾板などの固相に生じるパターンはこの飛跡構造の典型的な例である。飛跡構造は同じ物質でも相が変われば変わる、同じ相でも物質を構成する原子や分子の種類が異なれば異なる。後者の場合生成される化学種の空間分布のみならず化学種そのもの、引き続いて起こる化学反応も異なる。(1)の問は生体を構成する水の放射線分解のみに注目して OH ラジカルの収量の推定は可能か、と問う。答えは否である。我々は生体分子と水の複合系での OH ラジカルを *in vivo* で測定または理論的推定のできる現状にはない。これは物理的放射線線量も似たような事情にある。線量効果関係の線量は生体の *in vivo* の線量ではなく、組織等価物質（又は水）の線量で代用されている。この測定及理論的推定の限界から、OH ラジカルもバルクな水媒質内に生成される収量で代用せざるを得ない。

バルクな水媒質内でもさらに複雑なことがある。すなわち、放射線ごとに水中の飛跡構造は異なる。飛跡構造が異なれば OH ラジカルの収量も異なる。放射線の作用機序の解明のために、この飛跡構造の特異性を加味した OH ラジカルの推定が求められる。水中での水の放射線分解生成物 species の収量、G 値（100eV あたりの数）及其時間変化と化学平衡時の値が放射線生物学に必要なデータである。Species の G 値のいくつかの経時変化はパルスラジオリシスで測定されている¹⁾。飛跡構造を精密に加味した G 値推定は電子線トラックの計算機シミュレーションによる方法と、拡散反応化学方程式を解く方法とがある。前者はトラックシミュレーションに加え OH ラジカルの空間分布を与え、拡散過程をシミュレートすることにより経時変化をも与えるようになっている²⁾。しかし、拡散過程の化学反応をシミュレートできるまでにはなっていない。

後者の拡散反応微分方程式を解く方法は、この化学反応過程を直接扱うことができる利点を持つ。飛跡を構成する塊として、生じる相互作用領域を電子のエネルギーにより、前述のように、ショートトラック、ブロップ、スパークと定義する³⁾。この区分に従い拡散反応微分方程式を解く方法⁴⁻⁷⁾と、スパークについて解

き放射線場ごとにスパーサイズ分布を考える方法⁸⁾がある。前者はショートトラック、ブロップの3次元空間での定義の仕方に任意性があり、後者は放射線場全体を平均 LET とスパーサイズ分布のみで表現する点に近似の不十分さがある。Yamaguchi は後者の近似を高める方法を開発した⁹⁾。そこでは単一のスパーサイズを仮定し、飛跡は多くの電子の path からできており、path は電子のエネルギーで特徴付けられ、したがって、path 上のスパー間の平均距離はその path のエネルギー（付与過程）で一義的に決まる。その path 毎に拡散反応微分方程式を予め解く（微分 G 値）。放射線場のなかの電子の path の分布は電子線のエネルギーの関数として、degradation spectrum として求められる。そこで各 path の微分 G 値を degradation spectrum で重み付けして積分すれば、放射線場ごとの G 値（積分 G 値）が求められる、というものである。この方法は、飛跡構造をいかに微分 G 値の計算の中に取り込めるか、に若干の試行錯誤が必要である。しかしこの難点を克服できれば、その方法は比較的容易に積分 G 値を求めることが出来る。次節以降この克服した方法の概要を述べる。

III. A prescribed Diffusion Model

水の放射線分解により生じたスパー内では、およそ 10^{-12} 秒から反応成生物 species 間の反応が進行する。次式(1)-(12)は溶存酸素下の中性水での反応と反応定数を示す。式(13)-(14)は例えば、Fricke 線量計内で付加的に起こる反応とその反応定数である。

	$\times 10^{10} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
(1) $e^-_{\text{aq}} + e^-_{\text{aq}} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$	0.55
(2) $e^-_{\text{aq}} + \text{H} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{OH}^-$	2.5
(3) $e^-_{\text{aq}} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}$	1.7
(4) $e^-_{\text{aq}} + \text{OH} \rightarrow \text{OH}^-$	2.5
(5) $e^-_{\text{aq}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}$	1.3
(6) $\text{H} + \text{H} \rightarrow \text{H}_2$	1.0
(7) $\text{H} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	2
(8) $\text{H} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OH}$	0.01
(9) $\text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	10
(10) $\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0.6
(11) $e^-_{\text{aq}} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^-$	1.9
(12) $\text{H} + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2$	2.1
(13) $\text{OH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$	0.05
(14) $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{OH}^-$	0.05
(15) $\text{HO}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$	0.12

微分方程式を解く便宜上 species に以下の番号をあてがう。 $e^-_{\text{aq}}=1$ 、 $\text{H}=2$ 、 $\text{H}^+=3$ 、 $\text{OH}=4$ 、 $\text{OH}^-=5$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2=6$ 、 $\text{H}_2=7$ 、 $\text{O}_2^-=8$ 、 $\text{HO}_2=9$ 、 $\text{Fe}^{2+}=10$ 、 $\text{Fe}^{3+}=11$ 。スパーを構成する species は 1 から 7 までで、これらが拡散律動し溶質である O_2 や Fe^{2+} と反応する。Species のダイナミクスは次の拡散反応微分方程式に従う。

$$(16) \quad dC_i/dt = D_i \nabla^2 C_i - \sum_j k_{ij} C_i C_j + \sum_{j, k+i} k_{jk} C_j C_k - k_s C_i C_s$$

ここで C_i は species i の濃度、 D_i は拡散係数、 k_{ij} は species i と j の間の rate constant であり、 C_s は溶質の濃度、 $k_s C_i C_s$ は species i と溶質 s との反応率を示す。

スパー内の species の空間分布はガウス分布型であると仮定し (prescribed)、そのスパーがビーズ状に path に沿って連なっていると仮定して (Fig. 1)、(16) 式を全空間で積分すると、スパー内の species の数 N_i に対する連立微分方程式に帰着する。

$$(17) \quad dN_i/dt = -\sum_j k_{ij} N_i f_{ij} + \sum_{j, k+i} k_{jk} N_j N_k f_{jk} - k_s N_i C_s$$

$$(18) \quad f_{ij} = [1 + \{\pi (b_i^2 + b_j^2)\}^{(1/2)} / Z_1] / \{\pi (b_i^2 + b_j^2)\}^{(3/2)}$$

ここで、 Z_1 は電子 path ごとの平均スパー間距離であり、 b_i^2 はスパーの広がりを表わすパラメーターである。平均スパー間距離は Fig. 1 に示すように電子の path (エネルギー) ごとに定義する。すなわち、

$$(19) \quad Z_1 = E_s / L_{1, E_s}$$

ここで E_s はスパー 1 つを作るのに必要なエネルギー、 L_{1, E_s} は電子の一回の相互作用により E_s 以上のエネルギーの電子を放出する際の線エネルギー付与で、

$$(20) \quad L_{1, E_s} = \int_0^{E_s} N_i(E, Q) (Q+B) dQ + BeNe(E)$$

で求められる。ここで、 $N_i(E, Q)$ はエネルギー E の電子の $1\mu\text{m}$ あたり放出されるエネルギー Q の電子の数であり、 $B (=12.6\text{eV})$ は電離ポテンシャル、 $Be (=13\text{eV})$ は平均励起ポテンシャル、 $Ne(E)$ は $1\mu\text{m}$ あたり生起する励起の数である。 $N_i(E, Q)$ や $Ne(E)$ は既知の相互作用断面積のデータから求めることができる。

Species の数に対する連立微分方程式 (17) 式を式 (1) - (15) に従い書き下すと次式になる。

$$(20) \quad dN_1/dt = -2k_1 f_{11} N_1^2 - k_2 f_{12} N_1 N_2 - k_3 f_{13} N_1 N_2 - k_3 f_{13} N_1 N_3 - k_4 f_{14} N_1 N_4 - k_5 f_{16} N_1 N_6 (-k_{11} N_1 N_8)$$

$$(21) \quad dN_2/dt = k_3 f_{13} N_1 N_3 - k_2 f_{12} N_1 N_2 - 2k_6 f_{22} N_2^2 - k_7 f_{24} N_2 N_4 - k_8 f_{26} N_2 N_6$$

$$(22) \quad dN_3/dt = -k_3 f_{13} N_1 N_3 - k_9 f_{35} N_3 N_5$$

$$(23) \quad dN_4/dt = k_5 f_{16} N_1 N_6 + k_8 f_{26} N_2 N_6 - k_4 f_{14} N_1 N_4 - k_7 f_{24} N_2 N_4 - 2k_{10} f_{44} N_4^2 + k_{14} N_6 N_{10} - k_{13} N_4 N_{10}$$

$$(24) \quad dN_5/dt = 2k_1 f_{11} N_1^2 + k_2 f_{12} N_1 N_2 + k_4 f_{14} N_1 N_4 + k_5 f_{16} N_1 N_6 - k_9 f_{35} N_3 N_5 + k_{13} N_4 N_{10} + k_{14} N_6 N_{10} + k_{15} N_9 N_{10} - k_{14} N_6 N_{10}$$

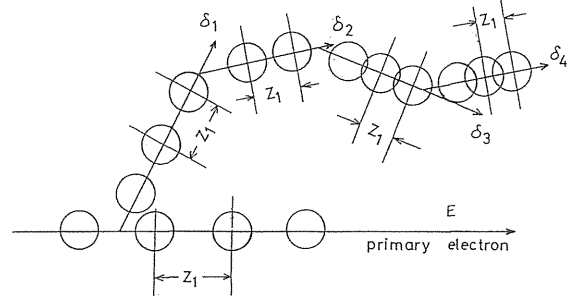


Fig. 1 Schematic picture of electron track. The primary electron produces δ rays down to the fourth generation. Spheres indicate spurs which are constant size in an equidistance Z_1 being characterized by the average energy of each electron path.

$$(25) \quad dN_6/dt = k_{10}f_{44}N_4^2 - k_{5}f_{16}N_1N_6 - k_{8}f_{26}N_2N_6$$

$$(26) \quad dN_7/dt = k_{1}f_{11}N_1^2 + k_{2}f_{12}N_1N_2 + k_{6}f_{22}N_2^2$$

$$(27) \quad dN_8/dt = (-k_{11}N_1N_8) - k_{12}N_2N_8$$

$$(28) \quad dN_9/dt = k_{12}N_2N_8 - k_{15}N_9N_{10}$$

$$(29) \quad dN_{10}/dt = -k_{13}N_4N_{10} - k_{14}N_6N_{10} - k_{15}N_9N_{10}$$

$$(30) \quad dN_{11}/dt = k_{13}N_4N_{10} + k_{14}N_6N_{10} + k_{15}N_9N_{10}$$

これらの微分方程式を Table 1 に示す初期値で解く⁹⁾。スパー内の species の初期値、及 Es の値はフリッケ線量計の G 値の実験値での最適化をして求められたものである¹⁰⁾。特に Es を変化させて G(Fe³⁺) の計算値を最適化する。試行錯誤の結果得られた値は Es=50.7eV である。微分方程式をある時間間隔で解くことになるが、以下 3 つの場合について計算で具体的に述べる。

Table 1 Diffusion constants, initial radii and yields of species in a spur

Species	Dx10 ⁵ (cm ² s ⁻¹)	r ₀ (Å)	G ₀ (100eV ⁻¹)
1. e ⁻ aq	4.5	24.58	5.834
2. H	7	11.45	0.65
3. H ⁺	9	11.45	5.834
4. OH	2.8	11.45	6.8
5. OH ⁻	5	11.45	0
6. H ₂ O ₂	2.2	11.45	0
7. H ₂	8	11.45	0.158

(Ⅲ-a) 中性の水、

中性の水の場合は式(1)-(10)に相当する微分方程式を 10⁻¹²-3x10⁻⁷ 秒間で解く⁹⁾。Fig. 2 に OH と e⁻aq の微分 G 値の経時変化を実験値との比較で示す。ピコラジオリシスの実験値とよい一致を示している。Fig. 3 に微分 G 値を degradation spectra を使って得られた species の積分 G 値を示す。フリッケ G 値は、

$$(31) \quad G(\text{Fe}^{+3}) = 3G(\text{e}^{-}\text{aq}) + 3G(\text{H}) + G(\text{OH}) + 2G(\text{H}_2\text{O}_2)$$

で計算でき、Fig. 3 の G 値から求められるフリッケ G 値は現存する実験値をほぼ再現できる。またこの積分 G 値から光子に対するフリッケ G 値を求めることができ、それらも実験値との一致はよい (Fig. 4)¹⁰⁾。

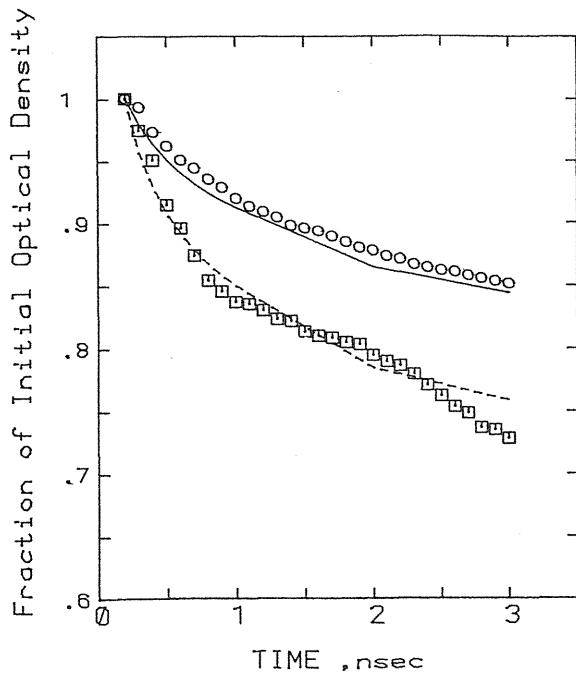


Fig. 2 Comparison of the calculations with experiments for the decay of e^-aq (○) and OH (□) as measured by pico-second pulse radiolysis (Jonah et al., 1976). The solid and dashed curves show the results from the present model for e^-aq and OH respectively.

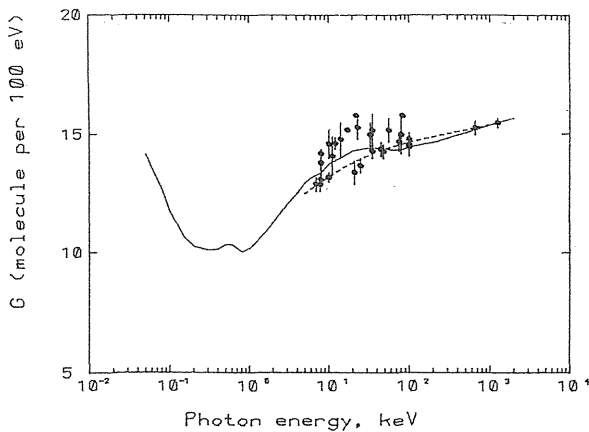


Fig. 4 The integral G-value (solid curve) of the Fricke dosimeter as a function of initial photon calculated by the present method. The dashed dashed curve shows the recommended values by ICRP report 17 (1970). The closed points show all experimental values which are cited in the same JCRU report.

(III-b) スーパーオキシドの収量

species の反応式(1)-(11)を解くことにより、スーパーオキシドのG値 $G(O_2^-)$ を求めることが出来る。aerobic の水中の溶存酸素の濃度は Ostwald 溶解度係数から計算し、 $1.48 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ とした。式(16)の C_s にこの値を代入した。スーパー内に存在する溶存酸素はスーパーが拡散で広がるに従い、反応に関与する数が

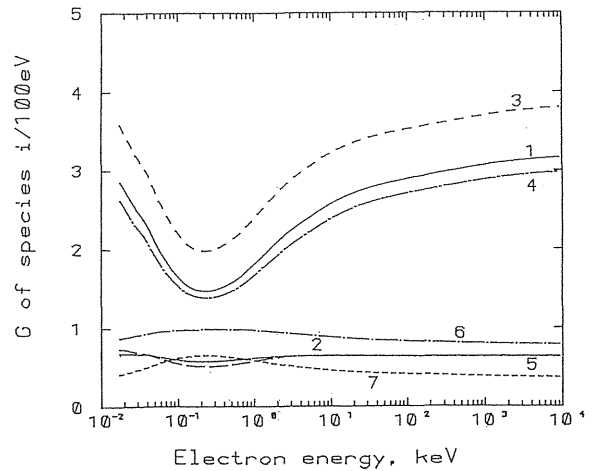


Fig. 3 The integral G-values of species in water irradiated by electrons. Numbers indicate that 1 = e^-aq , 2 = H, 3 = H^+ , 4 = OH, 5 = OH^- , 6 = H_2O_2 and 7 = H_2 .

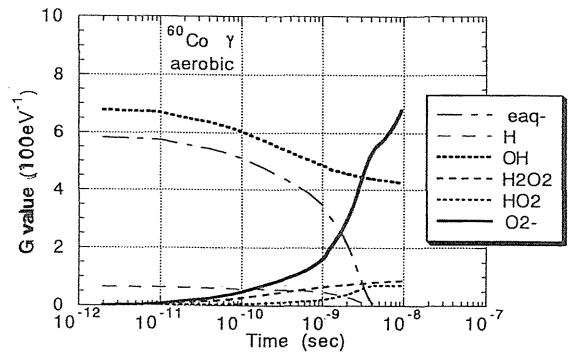


Fig. 5 The integral G-value of O_2^- (solid curve) in aerobic water after irradiated by ^{60}Co γ rays, calculated by the present method.

増していく。Fig. 5 に ^{60}Co γ 線による収量を示す $G(\text{O}_2^-)$ は水和電子がなくなるまで続き、この場合 10^{-7} 秒で $G(\text{O}_2^-) = 6.6$ 程度となった (注、計算時間を短縮させるために拡散係数と rate constant を10倍にして計算は行われたので、Fig. 5 では過程全体が10倍ほど短縮して示されている)。この時間 10^{-7} 秒以降は e^-_{aq} 以外の species が関与してゆっくりと増加する様相を示している。照射後 4×10^{-8} 秒あたりまでの初期 $G(\text{O}_2^-)$ を問題とするときには、 e^-_{aq} の初期収量 $G_0(e^-_{\text{aq}}) = 5.834$ がその推定値の目安となる。またこの時間領域で、 $G(\text{O}_2^-)$ と $G(\text{OH})$ の経時変化に対して逆相関になっている。即ち、生体への agent の種類は時間とともに変化している。

(III-c) フリック線量計

Species の反応式 (1)-(15) を全て含んで解けばフリッケ G 値が (31) 式を介することなく求められる。第一酸化鉄の濃度 C_s を 10^{-3} mol/l とした。aerobic では酸素濃度を (III-b) と同じとした。Fig. 6 に ^{60}Co γ 線による $G(\text{Fe}^{3+})$ を示す。溶存酸素濃度を1/100とした hypoxic の $G(\text{Fe}^{3+})$ を Fig. 7 に示す。これら最終の $G(\text{Fe}^{3+})$ は実験値とよく一致する。また aerobic 条件で第一酸化鉄の濃度 C_s を通常の100倍の高濃度溶液での $G(\text{Fe}^{3+})$ を Fig. 8 に示す。溶質の濃度が100倍になっても、平衡時の収量が増えるわけではなく、

平衡に到る速さが増すだけである。希薄溶液の場合 $G_0(\text{OH})$ が半分になる時間は 6×10^{-8} 秒であるのに対して高濃度溶液では 4×10^{-10} 秒である (時間に関しては上述の注と同じ読み換えを行う)。

以上水中で生成する水ラジカルの収量は低 LET 放射線に関する限り、かなりの精度で時間変化も含め推定できる。これが上記問 (2) と (3) に対する解答である。さて、問 (4) 水中の OH 収量および拡散過程は効果の間接作用を説明できるか、であるが、Tomita ら¹¹⁾ は電子トラックシミュレーションを行いこの点を解析した。その結果、答えは否である。

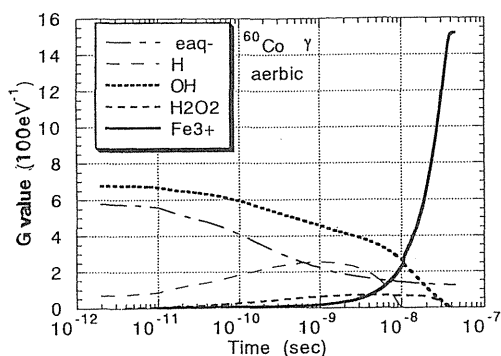


Fig. 6 The yield of $G(\text{Fe}^{3+})$ as a function of time, for aerobic Fricke solution irradiated by ^{60}Co γ rays, which is calculated by the present method.

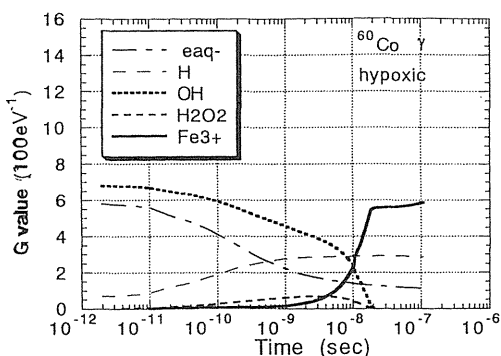


Fig. 7 The yield of $G(\text{Fe}^{3+})$ as a function of time, for hypoxic Fricke solution irradiated by ^{60}Co γ rays, which is calculated by the present method. The concentration of dissolved O_2 was assumed as 1/100 of that of aerobic.

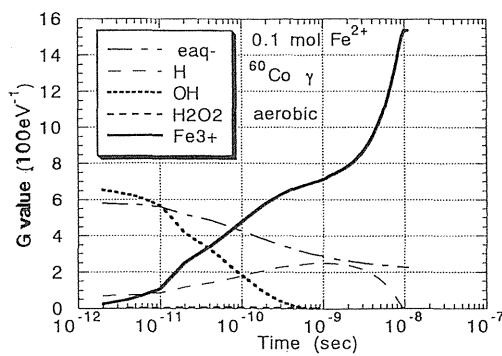


Fig. 8 The yield of $G(\text{Fe}^{3+})$ as a function of time, for aerobic Fricke solution irradiated by ^{60}Co γ rays, which is calculated by the present method. The concentration of Fe^{2+} was assumed 100 times higher than that of usual Fricke dosimeter.

すなわち拡散過程の拡散パラメータを細胞内のものと推定されている値を使うと DNA 分子の一重鎖切断の実験値を説明でき、水の値を使うとかなりの過大評価になることを報告している¹¹⁾。OH の細胞核中の拡散課程は OH の平均寿命が 3.7×10^{-9} 秒であるとしてシミュレートされている。細胞または細胞核の化学的状況を完全に考慮した OH の dynamics を取り扱うことは近い将来できそうにない。従って、ここで示したように Fricke の系の濃度を変えることで OH の平均寿命は変わることを利用して、細胞核での OH の拡散問題をこの系に翻訳して、議論できるかもしれないと考えている。

IV. 間接作用の比率に対する考察

細胞核の DNA 分子が放射線損傷の重要な一標的であることを示す実験はいくつかある¹²⁻¹⁶⁾。DNA 分子へ直接作用する成分と、周りに生成した水ラジカルによる間接作用の成分とから DNA 損傷は成り立っている。損傷へのこの成分比率を推定した歴史的仕事がある^{17,18)}。水ラジカルのうち OH ラジカルに注目し、OH を scavenge する各種アルコールを使い、観測する生物損傷が、アルコールの濃度に依存してどれだけ減少するかを調べたものである。生物損傷として、DNA 一重鎖切断と *in vitro* 細胞増殖死をみている。低 LET 放射線に対して、どちらの生物指標についても、直接作用成分はほぼ30%、間接作用成分70%と報告している。また生物指標の修飾される度合のアルコールの濃度依存性から、細胞内の OH ラジカルの寿命は 3.7×10^{-9} 秒、拡散距離は約60 Å と推定している。前節で述べたように低 LET 放射線について OH ラジカルの収量は推定できるので、これら生物指標に対する線量効果関係から OH ラジカルに対する線量効果関係を推定することができる。通常放射線・線量効果関係で観測されている OH の量は、低 LET 放射線で $30.3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} / 100\text{Gy}$ と換算されることが G(OH) から得られる。放射線で観測される線量効果関係は OH ラジカルの $\mu\text{mol/l}$ のオーダーのものであること、DNA 一重鎖切断や細胞増殖死への OH ラジカルの関与はナノ秒のオーダーであることが示唆された。このことは、水ラジカルとの反応で生じた有機ラジカルが十数時間のオーダーで生物指標、突然変異に関与することと対比させられる¹⁹⁾。

さて間接作用比率が70%というのは如何なる意味を持つのであろうか。残念ながらこの意味は今まであまり議論されてこなかった。ここでは手始めに一番原始的な考察として、直接作用、間接作用に関与する原子の数を数えてみる。モデル系として塩基対10段のデカマー DNA 分子を取りあげ、それが水分子に取り囲まれている系を考える (Fig. 9)。DNA を構成する原子の総数は630である。これらのどの原子に放射線相互作用が生じても、それは直接作用である。次に水分子であるが、水分子は、DNA の軸を中心にした円筒形 (長さが34Å) の中に、DNA を排除するように存在するとする (Fig. 9)。DNA の占める体積は半径 $R_d (=7.5\text{Å})$ の円筒形と見積もられる。間接作用に関与する水分子は、上記の細胞内の有効 OH 拡散距離内にある水分子の総数とすると、すなわち、円筒形の半径 r が $R_d < r < R_c (=60\text{Å})$ の部分の体積内に存在する水分子の総数とな

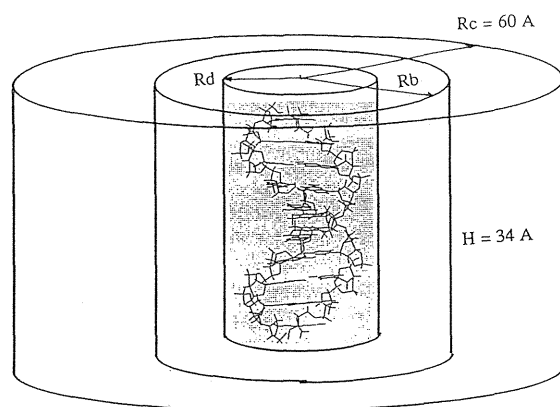


Fig. 9 Schematic picture of DNA (decamer), hydrated water and bulk water. The followings were assumed: $R_d = 7.5\text{Å}$, $R_b = 17.5\text{Å}$ and $R_c = 60\text{Å}$, they are radii of DNA, hydrated water and bulk water within the diffusion distance OH radical, respectively. And $\rho_b = 0.16\text{Å}^{-3}$ and $\rho_c = 0.03\text{Å}^{-3}$ were assumed to estimate the fraction of fraction of indirect action.

る。バルクな水の数密度は 0.03A^{-3} であるから水の総数は12491個となる。従って、間接作用の比率は $0.95(=12491/[630+12491])$ となる。これでは比率70%を説明できない。DNAのすぐ近傍の水をバルク水と同じとすることは正しくないらしい。いわゆる結合水の存在は別途考えなければならないらしい。そこで結合水の存在する部分を半径 r が $R_d < r < R_b$ とする。そして、結合水の数密度として我々は 0.05A^{-3} を得ているので、ちなみに、この結合水を間接作用の標的の数に組み込むと間接作用比率は95%よりさらに大きくなる。従って、結合水の水分子は直接作用の標的ではないかとの示唆が得られる。すなわち、間接作用比率70%を可能にする結合水の数未知数にして R_b を求めてみると $R_b=17.5\text{A}$ となる。この値は、現在我々が進めている DNA 分子に対する分子動力学との知見と矛盾しない。すなわち、DNA の原子から 10A 以内の距離に存在する結合水に生じた放射線事象は直接作用である可能性が高い。

V. まとめ

OH ラジカルに対する線量効果関係は得られるか、との問題意識で述べてきた。低 LET 放射線に対する水ラジカルの収量はある程度推定出来る。それら水ラジカルの一つ一つに特異的な scavenger を使った細胞に対する修飾実験が得られれば、それらからラジカルに対する線量効果関係は推定できる。ここでは、特に OH ラジカルについて見てきたが、低 LET 放射線で線量効果関係として観測されているのは OH の量に翻訳すると、 $30.3\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}/100\text{Gy}$ になる。OH ラジカルが $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ の濃度のオーダーで放射線の様に瞬時に与えられたとすると、放射線でみられる程度の影響を引き起こすことになる。これは放射線影響研究から活性酸素研究へのメッセージの1つである。

低 LET 放射線での間接作用比率が 70 %であることを、断面積の概念で分析すると、DNA の結合水は直接作用を起こす分子に含ませるべきではないかとの示唆が得られた。これはこれまで全く問題にされなかった点であり、放射線影響研究にとっても活性酸素影響研究にとっても興味ある新たな問題提起であると思う。

VI. 参考文献

- 1) Jonah, C. D., Matheson, M.S., Miller J. R., (1976): Yields and Decay of the hydrated electron from 100 ps to 3 ns, *J. Phys. Chem.* **80**, 1267-1270,
Jonah, C. D. and Lewis, M. A. (1985): Picosecond-pulse radiolysis to understand the primary processes in radiolysis, *Radiat. Phys. Chem.*, **26**, 485-489.
- 2) Turner, J. E., Magee, J. L., Wright, H. A., Chatterjee, A., Hamm, R. N. and Ritche, R. H. (1983): Physical and chemical development of electron tracks in liquid water. *Radiat. Res.*, **96**, 437-449.
- 3) Mozumder, A. and Magee, J.L., (1966): Model of tracks of ionizing radiations for radical reaction mechanisms, *Radiat. Res.*, **28**, 203-214.
- 4) Mozumder, A. and Magee, J. L. (1966): Theory of radiation chemistry, VII. Structure and reactions in low LET tracks, *J. Chem. Phys.*, **45**, 3332-3341.
- 5) Magee, J. L. and Chatterjee, A., (1967): Theory of the chemical effects of high-energy electrons *J. Phys. Chem.*, **82**, 2219-2226.
- 6) Magee J. L. and Chatterjee A, (1980): Radiation chemistry of heavy-particle tracks I. General consideration, *J. Phys. Chem.* **84**, 3529-3536.

- 7) Chatterjee, A. and Magee, J. L., (1980): Radiation chemistry of heavy-particle tracks. 2. Fricke dosimeter system, *J. Phys. Chem.* **84**, 3537-3543
- 8) Schwarz, H. A. (1969): Application of the spur diffusion model to the radiation chemistry of aqueous solution, *I. Phys. Chem.* **73**, 1928-1937.
- 9) Yamaguchi, H., (1987) A prescribed diffusion model of many-radical system considering electron track structure in water, *Radiat. Phys. Chem.*, **30**, 279-284.
- 10) Yamaguchi, H., (1989) A spur diffusion model applied to estimate yields of species in water irradiated by monoenergetic photons of 50 eV - 2 MeV, *Radiat. Phys. Chem.*, **34**, 801-807.
- 11) Tomita, H., Kai, M., Kusama, T., Aoki, Y., and Ito, A. (1994) Monte Carlo simulation of DNA strand breaks induced by monoenergetic electrons using higher-order structure models of DNA, *Int. J. Radiat. Biol.*, **66**, 669-682.
- 12) Cole A. (1965) The study of radiosensitive structures with low voltage electron beams, In *Cellular Radiation Biology*, Baltimore, Williams and Wilkins, pp. 267-271.
- 13) Munro, T. R. (1970) The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.*, **44**, 451-470.
- 14) Datta, R., Cole, A and Robinson, S. (1976) Use of track-end alpha particles from ²⁴¹Am to study radiosensitive sites in CHO cells, *Radiat. Res.*, **65**, 139-151.
- 15) Okada, S. (1970) DNA as target molecule responsible for cell killing, In *Radiation Biochemistry*, edited by K. I. Altman, G. B. Gerber and S. Okada, Vol. 1, New York; Academic Press, pp. 103-147.
- 16) Waters, R. L., and Hofer, K. G. (1977) Radionucleotide toxicity in cultured mammalian cells, Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay, *Radiat. Res.*, **69**, 348-358.
- 17) Roots, R. and Okada, S. (1972) Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds, *Int. J. Radiat. Biol.*, **21**, 329-342.
- 18) Roots, R. and Okada, S. (1975) Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells, *Radiat. Res.*, **64**, 306-320.
- 19) Watanabe M., Suzuki M., Suzuki K., Hayakawa Y. and Miyazaki T. (1990): Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to γ rays at 77 K, *Radiat. Res.*, **124**, 73-78.

一方、我々が生存する地球もまたこれらと全く同じ活性酸素やフリーラジカルによって深刻な病気にかかっている。本項では、地球の病気、いわゆるオゾン層破壊、地球温暖化および酸性雨という地球規模の環境破壊現象⁶⁻⁸⁾について活性酸素、フリーラジカルとの関わりを述べたい。

ノーベル賞は科学者にとって極めて関心の高い対象である。1995年度のノーベル化学賞は窒素酸化物(NOx)によるオゾン層破壊のメカニズムを解明したオランダのP. J. Crutzen博士⁹⁾とフロンによるオゾン層破壊のメカニズムをを明らかにしたアメリカのF. S. Rowland博士とM. J. Molina博士¹⁰⁾に授与された。この事実は、ノーベル賞はこれまでの純粋に基礎的な研究業績だけでなく、社会的な問題への貢献も重視することを示したと共に、地球規模の環境破壊が、今日非常に重大な問題であることを世界の人々にアピールしたものとしても重要な意味を持っていると思われる。

2. 成層圏オゾン層の誕生とその分解におけるラジカルの役割

2. 1. 成層圏におけるオゾン層の誕生と分解：

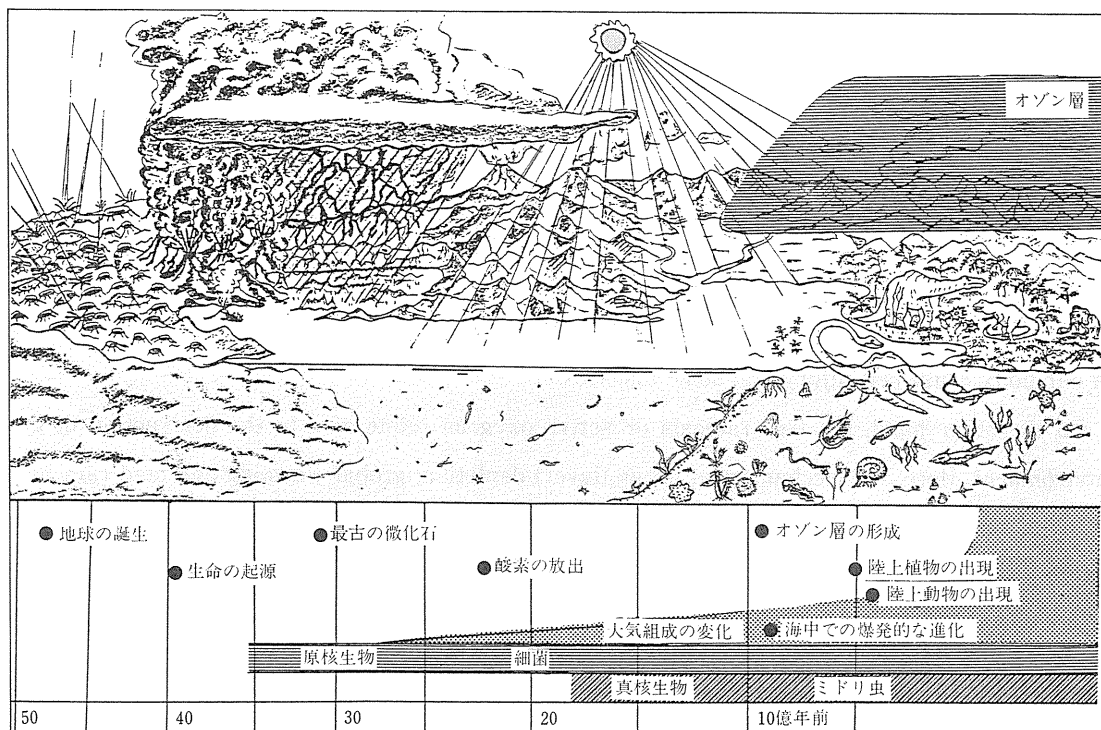
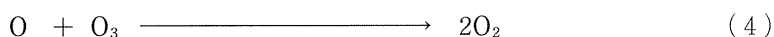
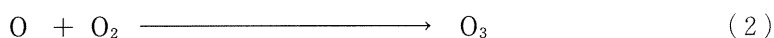


Fig. 1 The history of the birth of the earth and the appearance of land-biology.

Fig. 1 に示すように、地球は今から約46億年程前に誕生し、その後約27～28億年前から原生生物が誕生した。この頃の地球上には太陽からの紫外線が強く降りそそぎ、陸上に生物は生存できず、限られた水生生物が生存しえた程度であった。その後、これら生物が進化し、約20億年ほど前から光合成生物が誕生し、この生物によって作られた酸素が、太陽系からの紫外線的作用を受けて下の(1)式と(2)式に示す反応によってオゾンに変化し、約8億年ほど前から成層圏にオゾン層が形成されてきたと考えられている。これが成層圏のオゾン層生成に関する Champmann 理論¹¹⁾といわれているものである。この成層圏オゾン層の形成によって太陽からの紫外線が防がれ、約4～5億年前に初めて陸上に動植物が出現し、前記のような進化をとげてきた。



上記(1)と(2)式によって生成した O_3 は、上の(3)式に示すように、紫外線によって O と O_2 に分解する。しかし、これは再び(2)式により素早くオゾンに戻るので実質的なオゾン消滅過程とはならない。したがって、Chapman 理論でのオゾンの消滅過程は(4)式のみとなる¹²⁾。

オゾンの濃度は(1)～(4)式の生成と分解のバランスによって決まり、しかも最近までこのバランスは極めて良く保たれていた。ところが、1974年に Rowland ら¹⁰⁾はフロンガスに由来する塩素ラジカルがオゾン分解の(4)式を著しく促進するという、いわゆるオゾン層の破壊と言う重大な事実を報告した。しかし、Rowland ら¹⁰⁾はこのフロンガスの全地球規模での環境影響は、数十年にわたって数%といった緩慢な変化として出現すると予測していたことと、そのころはオゾン濃度に特別な変化の兆候が見られなかった事などから、必ずしも広く社会一般の注目するところではなかった。ところが、その後十年も経たない1982年に南極の昭和基地上空で成層圏オゾン層の温度が春先に急激に低下する、いわゆるオゾンホールが日本人の忠鉢氏¹³⁾によって見いだされ、彼が過去にさかのぼってデータを調べなおしたところ、年々その低下の度合いが大きくなっていることがわかり、世界中が大騒ぎする今日の事態にいたった。

2. 2. オゾン層破壊を引き起こすフリーラジカル3兄弟：

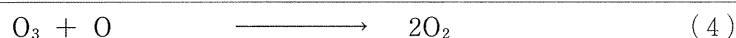
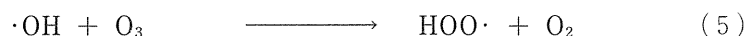
オゾンの分解を促進する物質としてはフロンに由来する一酸化塩素ラジカル ($\cdot\text{ClO}$) を含む次の三つのラジカル種が極めて重要である。



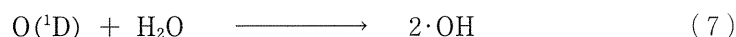
なお、ここで x は 0、1 あるいは 2 のいずれかの整数である。これら三兄弟は、いずれも人間の生体内でも生成し、組織や細胞を傷害したり殺菌などの強力な作用を持つことが知られている。

(1) $\text{HOx}\cdot$ サイクルによるオゾンの分解反応

$\text{HOx}\cdot$ サイクルによるオゾンの分解は(5)(6)式による。この両式をまとめると前記(4)式になる。

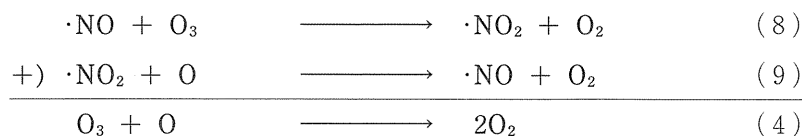


なお、(5)式に示す $\cdot\text{OH}$ は O_3 の分解によって生じた原子状酸素の $\text{O}({}^1\text{D})$ と成層圏の水分 (H_2O) との反応で生成する (下に示す7式)。この反応は生体内では知られていないが、大気中では非常に広範に起こる重要な $\cdot\text{OH}$ (ヒドロキシラジカル)生成反応である。

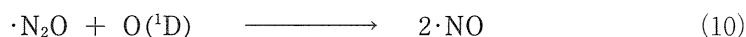


(2) NOx サイクルによるオゾンの分解反応⁹⁾：

$\cdot\text{NOx}$ は言うまでのなくフリーラジカルであり、これによるオゾンの分解は次式によって起こる⁹⁾。

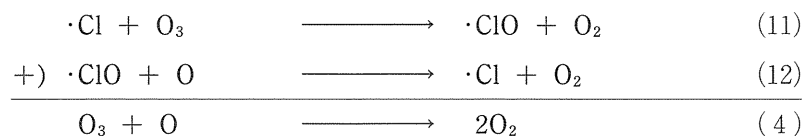


このサイクルに関与する $\cdot\text{NO}$ は窒素肥料などが土壤中で細菌による還元で生じる亜酸化窒素 (N_2O) から次の(10)式によって生じた¹⁴⁾ものと(9)式の NO_2 と同様に化石燃料の燃焼で生じた人間活動に由来するものからなる。

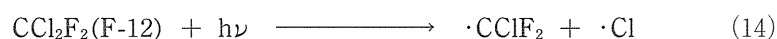
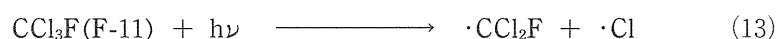


(3) $\cdot\text{ClO}_x$ サイクルによるオゾンの分解反応¹⁰⁾ :

$\cdot\text{ClO}_x$ サイクルによるオゾンの分解は次式による。なお、(11)式に示す主な $\cdot\text{Cl}$ 源は海塩粒子や火山の爆発による HCl や海洋からの CH_3Cl 等自然由来のものもあるが、1980年代前半までの成層圏への塩素供給量の70%以上はフロンガスであったと推定されている。この反応に関与する $\cdot\text{ClO}$ の成層圏での平均滞留時間は約2年間と云われ、その間に1個の $\cdot\text{ClO}$ 分子が1万~10万個ものオゾンを分解すると推定されている。



このように、フロンの関与するオゾン破壊力は $\cdot\text{OH}$ や NO_x のようなラジカルよりはるかに高く、それらの6倍以上と考えられている。なお、このように強力なオゾン破壊作用を有する塩素ラジカル ($\cdot\text{Cl}$) は次の(13、14)式のフロンの光分解によって生成し、その後(11)式に示す反応でオゾンの分解を引き起こす。



2. 3. オゾン層破壊のヒト及び生態系への影響

このようなフリーラジカル反応によってオゾン層が破壊されると、地球上の生態系、あるいはその生態系の中に生きている人間にどのような影響が表れるであろうか？ 私たちの頭に第一に浮かぶのは、紫外線の増加による皮膚癌の増加であろう。国連環境計画 (UNEP) は1991年末に、成層圏のオゾン層の破壊がこのまま進めば、西暦2000年までにオゾン層が10%減少し、そのため世界の皮膚がん発生率は26%増加すると予測した。また、紫外線はヒトの免疫能力を低下させることも知られている。これにより、ヘルペス、マラリヤや結核などの病原菌感染に対する抵抗力が低下したり、皮膚がん以外のがんの発生率も上昇する可能性が心配されている。紫外線の増加は潜伏状態にあるエイズウイルスを活性化することも知られている¹⁵⁾。また、エイズウイルスの活性調節には活性酸素や抗酸化物質が関与していることも報告されている¹⁶⁾。さらに、紫外線の増加は目の白内障を増加させるとされている。

オゾン層の破壊が重大である第二の問題は紫外線に弱いプランクトンの減少に始まる水中食物連鎖の切断とその生態系の破壊であろう。この生態系の破壊と云う中には2つの意味がある。1つは食物連鎖の切

断による生物種の減少を意味し、もう一つはこれら魚類の減少に伴う人間の食料不足の問題である。また、オゾン層破壊の第3の問題点は、プランクトンが紫外線に極めて敏感で、特に海洋表面で生きていて光合成作用を有する植物性プランクトンが激減し、地球上の炭酸ガス吸収能が著しく低下すると云う可能性であろう。この点はまだ議論の多い所であるが、マクロに見ると、この植物性プランクトンのCO₂吸収能の低下が生態系にとって最も重大な問題であると思われる。なぜなら、この植物性プランクトンの死滅によるCO₂吸収能の低下が大気中CO₂濃度の上昇を引き起こし、これがひいては地球温暖化現象に直接的に結び付く可能性が高いからである。

3. 地球温暖化とフリーラジカル：

3. 1. 地球温暖化の原因とフリーラジカル

今日、世界的規模でエネルギー需要が増大し、Fig. 2 に示すように、主に先進国での化石燃料消費の増大に伴う大気中CO₂の増大と、開発途上国での人口爆発あるいは国境戦争などによる難民流出により膨大な森林が破壊され、CO₂吸収能力が減退することなどによって、大気中CO₂濃度が上昇し、これが温室効果を増幅し、地球の気温上昇、海洋温度の上昇をもたらしたり、氷河、氷原の融解を起こし、大気の大循環の攪乱をもたらし、異常気象を引き起こすと考えられている。

地球の温暖化は、このような人間生活あるいは産業活動等に由来するCO₂のみならず、Fig. 3 に示すごとく非メタン炭化水素、CO、フロンガスやIC産業等で多用されているトリクロロエチレン、テトラクロロエチレンあるいは海水由来のクロロメタンのようなハロカーボン類、あるいは森林由来のテルペン類、さらには水田や嫌気化した湖沼に由来するメタン、焼き畑や森林火災に由来するCO、NO_x、黒色炭素などの微量成分も温暖化に寄与し、これら微量成分の濃度が大気中で現実に著しく増加し続けており、過去10年間のこれらの総計はCO₂と同等程度に温暖化に寄与している。また、これら微量成分も、Fig. 3 の上部に示すように、NO_xやO₃の関与するラジカル反応を介して、ペルオキシド、アルデヒド、ケトンなどの中間物を経てCO₂に変化する。Fig. 4 には大気中・OHによる大気酸化反応を示した。

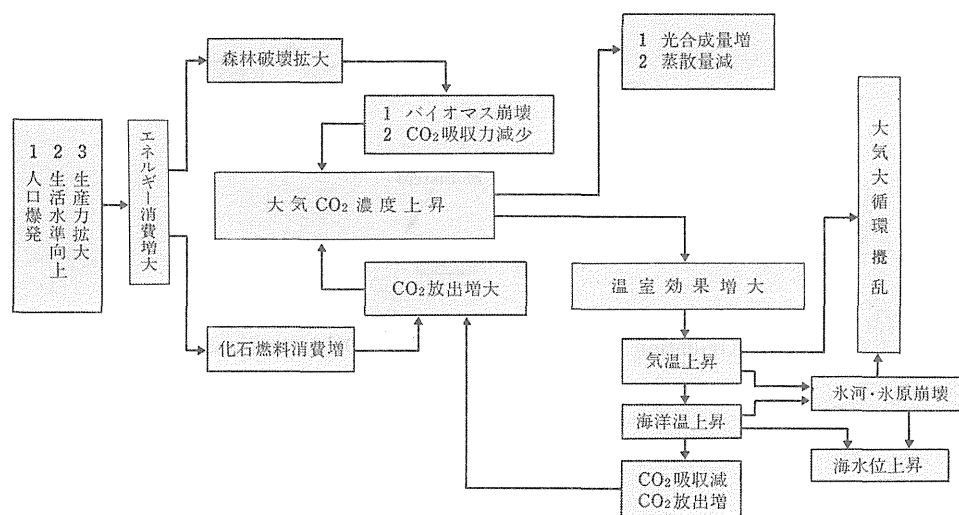


Fig. 2 The causes of earth-warming and the effect on the climate change.

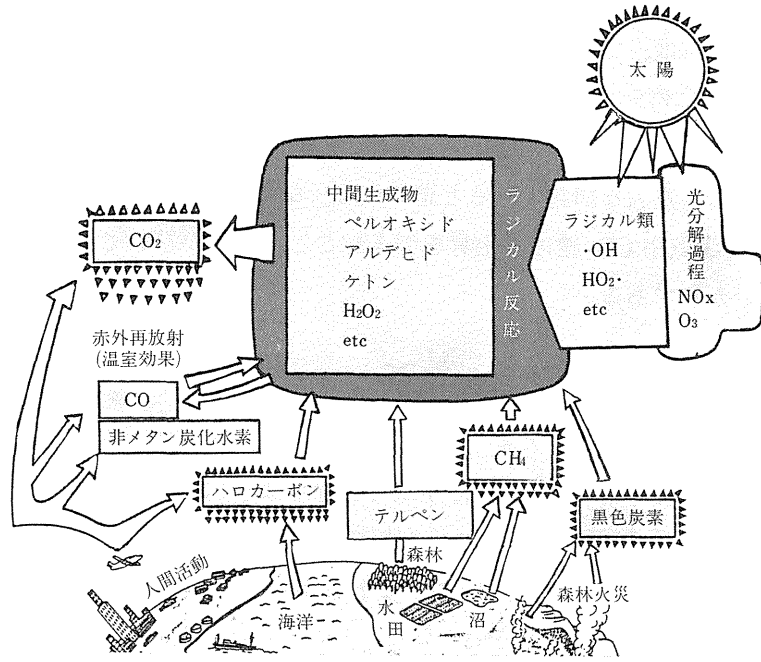


Fig. 3 Natural generation of various green house gases and their appearance by photo-chemical reaction originated by radical reactions.

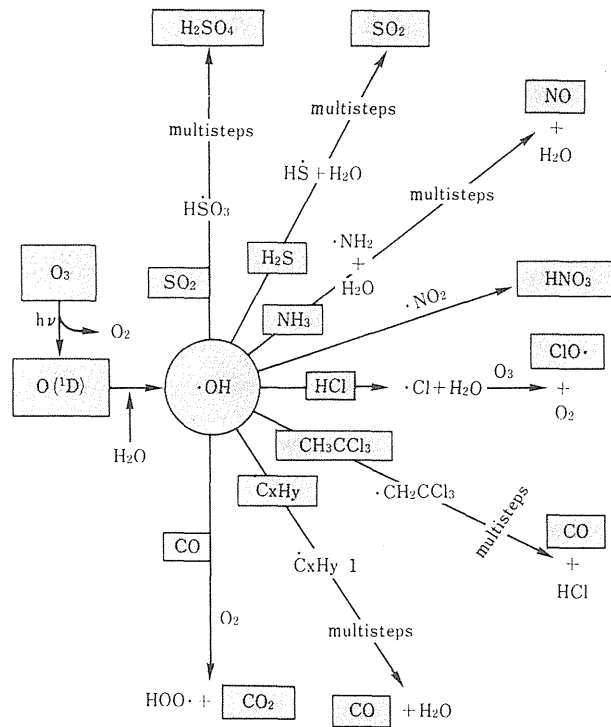


Fig. 4 Oxidation reaction of methane by $\cdot\text{OH}$ in atmosphere.

3. 2. 地球温暖化のヒト及び生態系への影響

地球温暖化が進行すると、紫外線の増加の場合と同様に、まず伝染病が広がる危険性が指摘されている。たとえば、アジア地域では、マラリヤやテング熱など熱帯性の伝染病流行地が大巾に広がり、病気の種類によっては日本も含まれる可能性があるとして予測されている。また、地球の温暖化は局地的な高温や熱波の発生を増し、高齢者や心臓血管系、脳血管系あるいは呼吸器系臓器等の弱い人の死亡や症状の増悪をもたらす。

また、温暖化すれば、ヒトの病気ばかりでなく、病虫害の大量発生により農作物の生産にも大きな影響がでると同時に、大量の農薬使用を余儀なくされ、農薬によるヒトの健康被害も増加することが予測される。また、農薬や様々な化学物質の毒性は低温地帯よりも温暖地帯で強く表れるという事実も温暖化の健康影響を深刻にしている。また、温暖化に伴う異常気象の発生は干ばつや砂漠化あるいは豊かな穀倉地帯の乾燥化や害虫の異常発生などを起こし、人間の食糧生産の著しい低下を招くことも危惧されている。

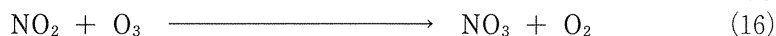
4. 酸性雨とフリーラジカル

最近、日本各地で酸性雨や酸性の霧が観測されている。たとえば、夏の避暑地として名高い軽井沢には東京の自動車排気ガス由来の NO_2 や SO_2 が硝酸や硫酸の霧となって東京湾から吹いてくる夕風に乗って大量に運ばれている。もしかすると、いや多分、私達はその酸性の霧をすがすがしい高原の空気と思い感激して吸っているのである。また、最近では中国や韓国等の近隣諸国のめざましい工業化の結果、大量の硫酸酸性雨（霧）が日本にまで飛来している。なお、硝酸ではなく硫酸が飛来するのは、 SO_2 が H_2SO_4 になる反応は比較的遅いので SO_2 の長距離輸送が起こるのである。一方、 NO_2 が硝酸に変わる反応は比較的早いので長距離輸送される前に近傍地域に降下してしまう。

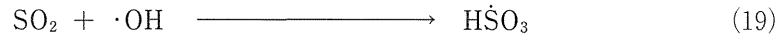
4. 1. フリーラジカル反応による酸性雨の生成：

酸性雨や酸性の霧は活性酸素やフリーラジカル反応なしでは生成しない。そのフリーラジカルの中でも最も重要な役割を果たしているのは $\cdot\text{OH}$ である。 $\cdot\text{OH}$ は2.2項に示したように、大気中では(7)式で生成している。すなわち、紫外線によるオゾンあるいは酸素の分解反応で生じた原子状酸素(O)と大気中の水分 (H_2O) とが反応して、直接2分子の $\cdot\text{OH}$ が生じる。この反応は大気中では非常に重要な反応である。

こうして生成した $\cdot\text{OH}$ は大気中の NO_2 と反応する。 NO_2 の約半分は(15)式によって HNO_3 になり、あとの半分は(16~18)式に示すオゾンとの反応で HNO_3 になる。なお、 NO_2 は水に極めて溶けずらいので、これらの反応はすべて気層反応である。



SO_2 が硫酸になる反応は気層と液層で半々ずつ起こる。気層での反応は(19~21)に示すように、その100%が $\cdot\text{OH}$ との反応で起こる。



一方、SO₂は非常に水に溶けやすいので、液層での反応も重要で(22)と(23)式の反応で生じる。この時は、·OHとの反応ではなく、2分子の·OHから生じるH₂O₂という活性酸素との反応で起こる。



このように、気層であれ液層であれ、硫酸の酸性雨や霧が生じるときには·OHやH₂O₂のようなフリーラジカルや活性酸素が関与する。Fig. 5には·OHによるSO₂やNO₂の酸化反応ばかりでなく、メタンやテルペンその他の様々な大気中微量ガスも·OHによって酸化され、最終的にはCO、CO₂、NO、NO₂、·ClO等温暖化やオゾン層破壊につながる成分に変化する。

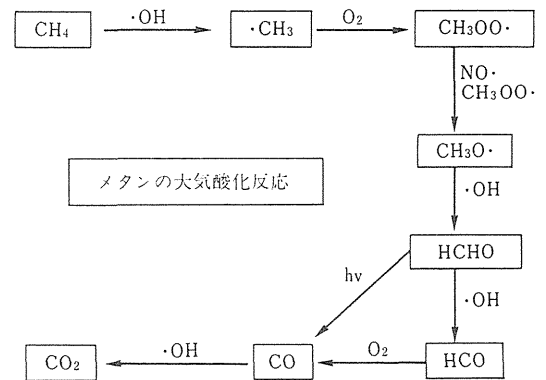


Fig. 5 Atmospheric oxidation reactions by ·OH and generation of environmental destruction gases at the global level.

4. 2. 酸性雨（霧）のヒト及び生態系への影響：

酸性雨の生態系に及ぼす最も大きな影響は土壤や湖沼の酸性化による生態系の攪乱であろう。土壤が酸性化すると、それまで安定な化合物として存在していた土壤中のアルミニウム、水銀、カドミウム、鉛などの有害金属が溶けだしてくる。土壤から溶けだした重金属は樹木の根毛を傷める。また、土壤を耕す働きをしているミミズは特に酸性に弱い。このため、酸性雨によってミミズは死に絶え、土壤はどんどん固くなって木の根の成長も悪くなり、次第に弱り、ついには枯れて、森林が禿山になる例が多い。

また、甲殻類や昆虫類も酸性環境には非常に弱い。酸性雨による湖沼の酸性化により、甲殻類や昆虫類が死に絶え、それを餌にしている魚類も湖から姿を消し生物の住めない死の湖と化する。このような被害は北歐ではあちこちに見られる。さらに酸性雨によって土壤が酸性化すると、農作物は減収し人間の食糧不足問題にもなりかねない。

酸性雨のヒトに及ぼす影響も重大である。スウェーデンでは水道水の酸性化により、水道管から銅が溶出して、金髪女性の頭髪が緑色に変色したという事件がいくつも知られている。スウェーデンの水道管は7割近くが銅製であったので特に影響が大きかったのである。一方、イギリスの水道管は鉛管が多い。鉛もまたヒトの神経系に影響を及ぼす金属である。

極端な例を除くと、このような重金属の溶出や生体内蓄積は極めて微量で、慢性的なものであろう。しかし微量とは云え、感受性の高い乳幼児期から生涯暴露されるとなるとヒトの健康への影響は益々心配にならざるをえない。このような例としてたとえば、乳幼児に慢延していた原因不明の下痢が酸性雨による地下水汚染が原因であったことが知られている。また、酸性雨により土壤中のアルミニウムが溶出し、やがて私たちの飲料水を汚染しそれを飲み続けるとアルミニウムが脳に蓄積して脳傷害を起こす可能性も指摘されている。事実、アルツハイマー型痴呆症患者の脳内でアルミニウムが神経繊維を破壊していると言

う報告も出されている。このように地球規模の環境破壊は様々な形で私たち人間の健康にも大きな影響を及ぼしている。

5. おわりに

以上述べたように、地球規模の環境破壊現象のオゾン層破壊、地球温暖化及び酸性雨などはいずれもその成因の中心にフリーラジカルが関与していることを強調しておきたい。さらに、これらの現象はなんと云っても相互に関連し合った現象であると同時に、これらによって起こる影響も相互にからみあっており、かつ互いに相対立関係にあることである (Fig. 6 参)。例えば、今後増加が

予想される世界の人口を養うために有機肥料を投下して食糧増産に励むこと自体が N_2O や NO を増やしてオゾン層を破壊したり、水田由来のメタンを増やして温暖化を招き、この温暖化が気象異常を起こして穀倉地帯の乾燥化や干ばつを招来して、結局食糧生産の減少に帰する可能性があるということである。また、健康で文化的な生活に加えて、便利な生活を目指した人間活動、生産活動が今や逆に人間の健康を損ない、生態系をも破壊しようとしている。

参考文献：

- 1) Burton, R. B.: Free radicals and cellular responses to environmental stress. Soc. Free Radical Res. News Letter, 18, 9-17 (1988).
- 2) 松尾光芳、嵯峨井勝、吉川敏一訳：「フリーラジカルと生体」、学会出版センター (1988).
- 3) 大柳善彦著：「活性酸素と病気」、化学同人 (1989).
- 4) 井上正康 編著：活性酸素と病態、疾患モデルからベッドサイドへ、学会出版センター刊 (1992).
- 5) Sees, H. (ed): Oxidative stress, Academic Press, (1985).
- 6) 科学 (岩波書店)；特集：変容する地球大気：第59巻9号 (1989).
- 7) 科学 (岩波書店)；特集：気象変動のメカニズム；第61巻10号 (1991).
- 8) 別冊サイエンス (日経サイエンス社)：破壊される地球環境；別冊93号 (1989).
- 9) Crutzen, P. J.: The influence of nitrogen oxides on the atmospheric ozone content. Q. J. R. Meteorol. Soc. 96, 320-325 (1970).
- 10) Molina, M. J. and Rowland, F. S.: Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: Chlorine atom-catalysed destruction of ozone. Nature, 249, 810~812 (1974).
- 11) Champmann, S.: A theory of upper atmospheric ozone. Mem. Roy. Meteorol. Soc., 3, 103-125 (1930).
- 12) Nicolet, M.: Stratospheric ozone: An introduction to its study. Rev. Geophys. Space Phys. 13, 593~636 (1975).
- 13) Chubachi, S.: Preliminary result of ozone observations at Syowa Station from February 1982 to January 1983.

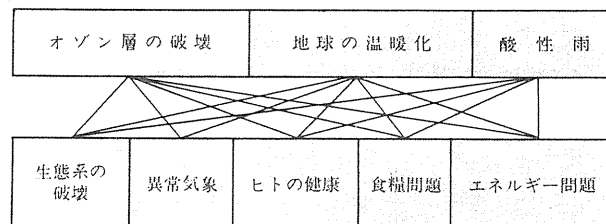


Fig. 6 The three phenomena on global environmental destruction and their effect on various phenomena.

In, Proceedings of the Sixth Symposium on Polar Meteorology and Glaciology. pp. 13~19, National Institute of Polar Research, Tokyo, 1984.

- 14) 日本微生物生態学会編、微生物のガス代謝と地球環境、学会出版センター (1995).
- 15) Wallace, B. M. & Lasker, J. S.: Awakenings --- UV light and HIV gene activation. *Science*, **257**, 1211-1212 (1992).
- 16) Greenspan, H. C.; The role of reactive oxygen species, antioxidants and phytopharmaceuticals in human immunodeficiency virus activity. *Medical Hypothesis*, **40**, 85-92 (1993).

3. 活性酸素、フリーラジカルの 化学的な生成と検出

河野 雅 弘

Chemical generation and detection methods of active oxygen and free radicals

Masahiro Kohno

Application and Research Center, Japan Electron Optics Laboratory

3-1-2, Musashino, Akishima-shi Tokyo 196, Japan

Abstract:

Free radicals such as superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$) and hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) in living system contribute to the defense mechanisms needed for killing bacteria and viruses and immunity. On the other hand, active oxygen radicals may also be trigger for some kinds of acute diseases and contribute to the degenerative disease of aging and cancer. Therefore, it is important to establish the method for detecting free radicals. This report describe detection methods of $\cdot\text{O}_2^-$ and $\cdot\text{OH}$ by using the ESR-spin trapping method, and generation mechanisms from some chemical compounds. The importance with research of free radical related to active oxygen introduce using information in the living system.

1) 緒 言

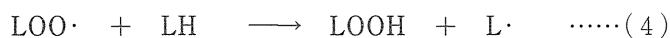
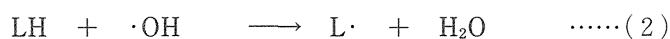
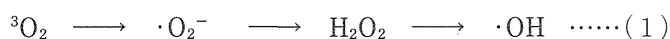
最近、活性酸素種やフリーラジカル物質の生体内挙動に関心が集まっている。特に、活性酸素種に分類されるスーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) とヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) が各種の疾患、癌、老化などの成因となると報じられている。^{1,2)} 他にも、生命の維持に不可欠な酸素分子 ($^3\text{O}_2$)、血管内皮由来の弛緩因子として特定された一酸化窒素 ($\cdot\text{NO}$) や、公害の成因であるとされる二酸化窒素 ($\cdot\text{NO}_2$) などもフリーラジカルである。フリーラジカルは、“不対電子を一つあるいはそれ以上持つ原子や分子”の総称である。数の限られる活性酸素とは違い、先に述べた低分子化合物の他にも、金属イオン (遷移金属化合物) に分類される Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 V^{2+} 、 V^{4+} 、 Cr^{3+} 、 Cr^{5+} 、 Mo^{2+} 、 Ti^{3+} 、等も、フリーラジカルの定義を満足している。金属イオンは酵素や蛋白の活性中心に存在し機能発現の役割を担ってい

る。³⁾ 例えば、 $\cdot\text{O}_2^-$ の処理過程（不均化反応）に必須の酵素として生理的な役割を担っているスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）にも、Cu、Mn、Fe の 3 種類がある。また、過酸化水素（ H_2O_2 ）の処理を行っているカタラーゼ、さらには、 $^3\text{O}_2$ の体内運搬と貯蔵を行うヘモグロビンとミオグロビン、酸素を利用して生体エネルギーを生み出すシトクロム b、 C_1 、C、酸素を利用して生体防御を行うシトクロム b_{558} 、 H_2O_2 を利用するペルオキシダーゼ類、酸素利用酵素シトクロム p450 など活性中心は Fe である。先に述べたように広義のフリーラジカル物質が、生命の活動に深く関わっていることが理解される。^{4,5)}

地球上棲息する好気性生物は、金属酵素や蛋白の助けをかりて、大気中の $^3\text{O}_2$ の有効活用を計っている。特に、人類は、体内に $^3\text{O}_2$ を効率よく利用する機構を備えていると同時に、火を利用する（ $^3\text{O}_2$ の活用）のために知的な進化を遂げた唯一生命体と言える。しかし、好気性生物は、“酸素毒”と呼ばれる生体にとって、“退化”の歴史を背負うこととなった。 $^3\text{O}_2$ は、薬にも毒にもなる“両刃の剣”と言える。

酸素毒は、酸化劣化、自動酸化、過酸化生成などと同義語で、長い間議論されている。酸素毒の一つとして活性酸素種が注目されたのは、1969 年、マッコードとフリードピッチによる SOD の発見と $\cdot\text{O}_2^-$ の係りからである。あとで SOD が $\cdot\text{O}_2^-$ を処理する機能を有する酵素（ $\cdot\text{O}_2^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ ）で、各臓器に存在し、様々な動物の潜在寿命と相関することが報告され、生命に不可欠な酵素と認識された。この報告に端を発して、SOD 研究が活発化し、生化学的な性質が次々と明らかにされた。しかし、生理的な役割は今日でも未解決な課題と言える。⁶⁾ 一方、 $\cdot\text{O}_2^-$ の計測法（シトクロム c 法）が確立したことで、 $^3\text{O}_2$ を $\cdot\text{O}_2^-$ に変化させるキサンオキシダーゼ、シトクロム b_{558} などの酵素の研究が進み、生体内では、 $\cdot\text{O}_2^-$ の産成が生体防御、特に抗菌作用に必要で有ることが分かってきた。SOD の発見から 20 年を経て、SOD と共に、 $\cdot\text{O}_2^-$ が、酸素と同様、生命活動に必須の物質であることが深く理解されている。

$\cdot\text{O}_2^-$ は生理的な条件下で、自己の不均化反応により H_2O_2 となることが確認されている。 H_2O_2 はさらに分解して $\cdot\text{OH}$ を生じ、生体の障害を惹起する正体であることが論じられている。酸素毒は、式-(1)に示す活性酸素発生系を経由して生成した $\cdot\text{OH}$ が、脂質 (LH) 作用して、式-(2)の脂質ラジカルを生成し惹起する。脂質ラジカルに $^3\text{O}_2$ が反応し、過酸化ラジカル ($\text{LOO}\cdot$) を経て、過酸化物 (LOOH) となる、式-(2)~式-(4)の連鎖的作用（自動酸化）で説明されている。



式-(1)の中で、 H_2O_2 から $\cdot\text{OH}$ を生成する機構には、フェントンあるいはハーバーワイスと呼ばれる 2 つの反応系が提唱されている。金属イオン (Fe^{2+}) と H_2O_2 による生成機構がフェントン反応と呼ばれている。一方、 $\cdot\text{O}_2^-$ の反応による生成機構がハーバーワイス反応と呼ばれている。二つの生成機構に関する議論は、 $\cdot\text{OH}$ の測定法が確立していない時代に研究されたことも原因して、ハーバーワイス型フェントン反応などと理由の分からない説明もある。もし、 $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ の選択的な検出法が確立されれば、このような問題も解消されるであろう。

化学物質による生体障害の過程にも $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ の関与が考えられる。化学反応とは、分子を構成している原子間の結合が切れて新しい結合を形成すると言う原子間の編成替えのことである。活性酸素種の生成系には、ヒポキサンチン (HPX) とキサンチン酸化酵素 (XOD) の反応やニコチンアミドアデニン

ヌクレオチド (NADPH) と NADPH 酸化酵素など酵素を用いた生成反応がよく知られている。紫外線、放射線、超音波、化学物質の酸化反応、金属イオンなどでもある。

化学物質によるフリーラジカル生成は、パラコート(メチルビオローゲン)、6-ヒドロキシドーパミン、フェナジンメタサルフェート、ルシゲニンやオゾン、塩素などで誘起される。化学物質による $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ の生成機構の研究は、薬物毒性の基礎研究とも関連しており、作用機構の解明は生体障害を解明する上で重要である。⁷⁾

生体の恒常性は、活性酸素種の生成系とこれを抑制する防御系の平衡の上に保たれている。特に、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 と $\cdot\text{OH}$ の制御をする事のできるSOD、Catalaseとグルタチオン制御系(還元型グルタチオン、酸化型グルタチオン、グルタチオン酸化酵素、グルタチオン還元酵素)など生体成分が重要である。他にも、補酵素のビタミン類、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンK、ビタミンAなども重要な役割を担っている。⁷⁾

本報告では、1) 活性酸素種とフリーラジカル物質の検出法を確立、2) $\cdot\text{O}_2^-$ 、 H_2O_2 と $\cdot\text{OH}$ の化学物質による連鎖的な生成機構の解明 3) 生体の恒常性とフリーラジカルの関連性、について述べる。さらに活性酸素種やフリーラジカルの生体内挙動は解明が、生命支援の科学研究として人類の発展に貢献することを紹介する。

2) 実験方法と問題点

1) 発生系、 $\cdot\text{O}_2^-$ の生成系として、ヒポキサンチン (HPX) とキサンチン酸化酵素 (XOD) の反応、フェナジンメタサルフェイト (PMS) とニコチンアミドアデニンヌクレオチド (NADPH) の反応を用いた。また、 $\cdot\text{OH}$ の生成系は、硫酸第1鉄 (FeSO_4) と H_2O_2 との反応を用いた。

2) 検出法、フリーラジカルの測定はESR分光装置を用いておこなった。^{8),9)} ESRによるフリーラジカル検出には直接と間接の二つの方法があり、直接法は反応液を低温(77K)に固め、フリーラジカルを安定化し測定している。この方法では、反応液中に測定限界以上の濃度(10^{-8}M)のフリーラジカルが存在すれば信号として検出される。一方、間接測定法は、スピントラップ法と呼ばれ、フリーラジカルの捕捉剤を用いて短寿命のフリーラジカルを捉え、スピニアダクトと呼ばれる安定なニトロオキシドに変換して測定する手法である。スピントラップ剤として用いられる代表的な化合物が、DMPO (5, 5, -dimethyl-1-pyrroline-1-oxide) とPBN (α -Phenyl-N-tert-butyl nitron) である。 $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{OH}$ の測定には、DMPOがよく使われている。この方法の特長は、スピニアダクトが安定化する条件下で、フリーラジカルの生成量に比例して信号強度が増加することで、反応系中の定常濃度が 10^{-8}M 以下であっても検出できる。スピントラップ法は発展途上の技術であるため、当初はスピニアダクトのDMPO-OOHやDMPO-OHの寿命が短く、安定性に欠ける、DMPO-OOHからDMPO-OHが生成する、などの報告がある。しかし、最近の研究によりDMPO-OOHの半減期は40分以上、DMPO-OHの半減期も数時間であることが確認されており、先の報告がいずれも間違いであることが確認されている。そして、アダクトの定量により $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{OH}$ の定量が可能となることが確認されている。¹⁰⁾ スピニアダクトの定量は、コンピュータを接続し、信号の2回積分による面積比較法で行なわれ、標準試料として、既知濃度の安定フリーラジカルのTEMPOL (2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine-1-oxyl) の水溶液が使われている。

3) 結果と考察

(1) 酸素分子 ($^3\text{O}_2$) の測定例

大気中には、150 mmHgの圧力を示すの酸素ガスが存在する。これは、三重項酸素と呼ばれ $^3\text{O}_2$ と表さ

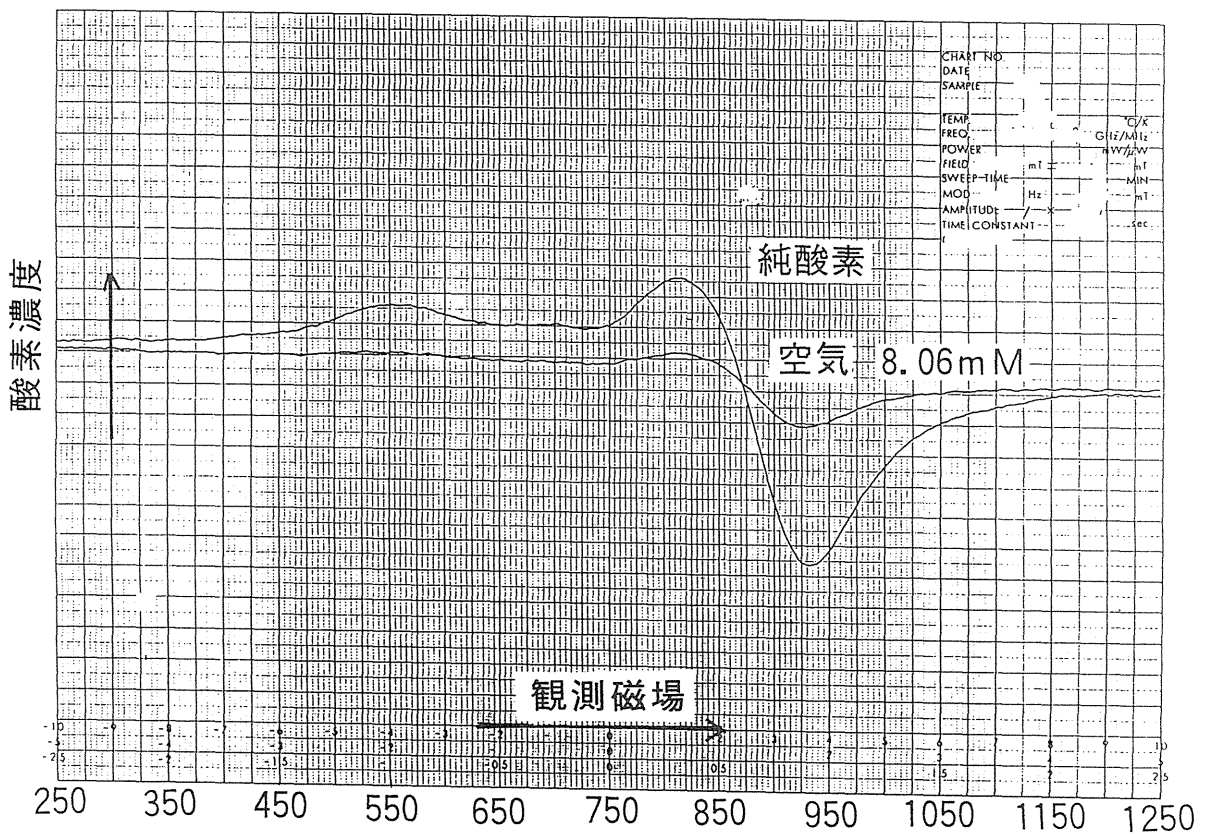


Fig. 1 常圧で観測される酸素分子の ESR スペクトル (室温)
 a) 100%の酸素ガス、b) 空気

れる代表的なフリーラジカル物質である。大気中の $^3\text{O}_2$ を直接測定する手段の一つに、 $^3\text{O}_2$ のフリーラジカルとしての性質を利用した ESR の直接測定法がある。Fig. 1 は、常圧で測定した100%の酸素ガスと空気の ESR スペクトルである。ガス状の酸素のスペクトルは、分子の回転運動に由来する多彩な信号成分の重なりと、分子同士の衝突による信号の広幅化により、広い磁場領域 (0 ~ 140 mT) に観測される。両スペクトルからの対比により空気中の $^3\text{O}_2$ 濃度が直接求められる。信号強度から大気中の $^3\text{O}_2$ が21%であることも確認できる。同様の方法で、減圧状態の酸素濃度も ESR スペクトルから求められることが報告されている。¹¹⁾ 常圧の $^3\text{O}_2$ 濃度 (8 mM) は、通常、活性酸素の発生系である溶存酸素濃度、0.25mM に比べると高濃度である。生体系の研究には、溶存酸素の情報が必要となる。残念なことに水に溶解している $^3\text{O}_2$ は ESR 装置で観測されない。水中の溶存酸素濃度は ESR で、充分検出可能濃度であるため、検出されない原因は不明であるが $^3\text{O}_2$ の存在状態や、分子同士の衝突による信号の広幅化などが考えられる。

$^3\text{O}_2$ 分子の特徴は、1つの分子中に2つの不対電子を持つフリーラジカル分子である。通常、フリーラジカル分子の中の不対電子は対 (結合する) を形成しようとする性質のため、電子の授受が容易で酸化還元反応を受け易くなる。ガス状酸素の挙動を調べれば自動酸化の反応なども明らかにされる。 $^3\text{O}_2$ は、自らが酸化を惹起する現象は観測されておらず、外的な要因 (紫外線、放射線、熱、金属イオン) などで、最初のフリーラジカル ($\text{L}\cdot$) が生成すると、連鎖的な酸化反応を進めることになる。生体系でも溶存酸素無しでは傷害は拡大せず、酸素毒の本体は $^3\text{O}_2$ とであるとも言える。虚血再還流傷害などでは、高濃度の $^3\text{O}_2$ を供給する機構を考えねば説明されないであろう。

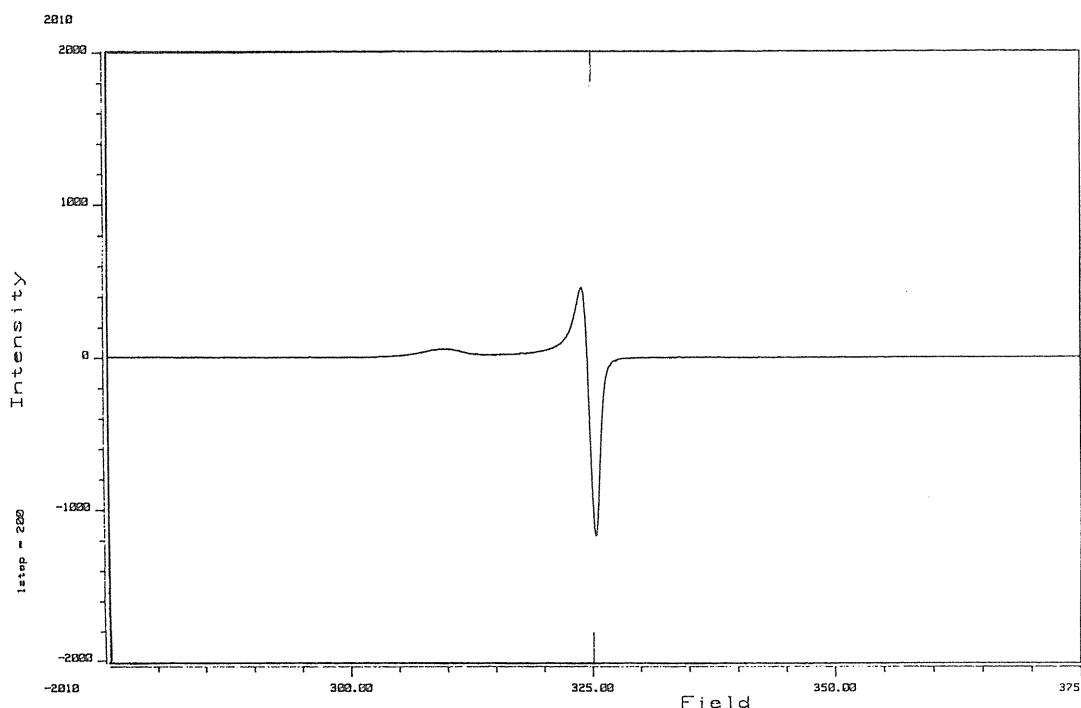


Fig. 2 強アルカリの条件で溶存酸素から生成した $\cdot\text{O}_2^-$ のESRスペクトル (77K)

(2) $^3\text{O}_2$ と $\cdot\text{OH}$ の測定と生成機構の研究

$^3\text{O}_2$ の2つの不対電子の一方に、外部から水素原子のような不対電子を取り込んだのが $\cdot\text{O}_2^-\text{H}^+$ である。さらに、もう一方に、水素原子を取り込むと H_2O_2 となる。Fig. 2は、強アルカリ条件下で、溶存酸素が還元されて生成した $\cdot\text{O}_2^-$ のESRスペクトルである。同様のスペクトルは、過酸化水素を強アルカリ条件で一電子酸化することでも観測される。また、HPXとXODにより生成する $\cdot\text{O}_2^-$ も、反応溶液をpH10以上にすることで観測されることが報告されている。¹²⁾ 図のスペクトルは、77Kでのみ信号が観測される(室温では測定されない)ことから、 $\cdot\text{O}_2^-$ は、室温、溶液状態では何らかの制約を受けていることになる。信号が観測されない原因に、フリーラジカル同士が交換相互作用での信号を広幅化か、不均化反応により、ほとんどが、 H_2O_2 として存在することも予測される。

$\cdot\text{O}_2^-$ の特徴の一つに、生理的なpHでは不均化反応により過酸化水素となるが、強アルカリ条件では不均化反応が遅くなり、安定な $\cdot\text{O}_2^-$ として存在することがあげられる。

$^3\text{O}_2$ を還元しても、過酸化水素を酸化しても $\cdot\text{O}_2^-$ は生成することから、電気化学的な還元により溶存酸素から安定な $\cdot\text{O}_2^-$ を生成させることができる。ESR分光装置による直接法の欠点は、不均化反応の平衡状態で測定しているため、検出が可能な濃度以上の $\cdot\text{O}_2^-$ が存在することが条件が必要となるため、測定感度が低いことである。また、平衡状態を測定するため絶対量を求めるのに難がある。

低感度である欠点を補い、直接法に優る定量性と高感度を誇るのがスピントラッピング法である。スピントラッピング法は1972年、E. G. Janzenにより開発され、Fig. 3に示すようなフリーラジカル(スピンと呼ばれることもある)の捕捉剤(スピントラップ)を用いて不安定なフリーラジカルを捕捉し安定なニトロオキシイドラジカル(スピニアダクトと呼ばれる)に変換し測定している。スピントラップ剤には、ニトロソ系とニトロン系があり、フリーラジカルに対する選択性を持ち、旨く使いこなせば、水素原子($\text{H}\cdot$)、アルコキシラジカル($\text{LO}\cdot$)、パーオキシラジカル($\text{LOO}\cdot$)、炭素中心ラジカル($\cdot\text{C}-$)、イオウラジカ

ル ($\cdot S-$) なども測定できる。スピニアダクトの ESR スペクトルから、 g 値と超繊細結合定数 ($hfcc$, $a=mT$ で示す) と呼ばれるスペクトル情報 (ESR パラメータと呼ぶ) と、吸収強度 (面積値) が入手される。¹³⁾ g 値と $hfcc$ から、フリーラジカル種の同定ができ、吸収量から定量できる。この方法が、 $\cdot O_2^-$ や $\cdot OH$ の測定に利用されたのが 1979 年のことである。¹⁴⁾ 残念なことに、初期の頃には、試薬の純度の問題や、理論体系が確立していなかったことが原因して誤った結果が導かれている。

生理的な pH 条件下で生成する $\cdot O_2^-$ は、反応性が高く不安定であるため直接測定することが難しいため、主にスピントラップ法が用いられている。

Fig. 4 は、HPX と XOD より発生する $\cdot O_2^-$ をスピントラップ剤である DMPO で補足し、 $\cdot O_2^-$ のスピニアダクト (DMPO-OOH) の ESR スペクトルである。このスペクトルの $hfcc$ 、窒素の $a_N = 1.43mT$ 、 β の水素の分裂 $a_H = 1.15mT$ 、

γ の水素の分裂、 $a_H = 0.13mT$ で、既報の結果との対比で DMPO-OOH に帰属される。 β の水素の分裂を DMPO-OOH の H に帰属している論文もあるがこれは間違いである。

$\cdot OH$ の場合は $\cdot O_2^-$ より反応性が高く、pH を変化させても計測感度以上の濃度を存在させることができず直接測定は不可能である。唯一の方法は、過酸化水素を、あらかじめ低温条件 (77K) にして紫外線照射で分解し生成させる方法で直接測定が可能との報告がある。 $\cdot OH$ は、ジメチルスルホキサイド (DMSO) と、77K で反応するとの報告もある。¹⁰⁾

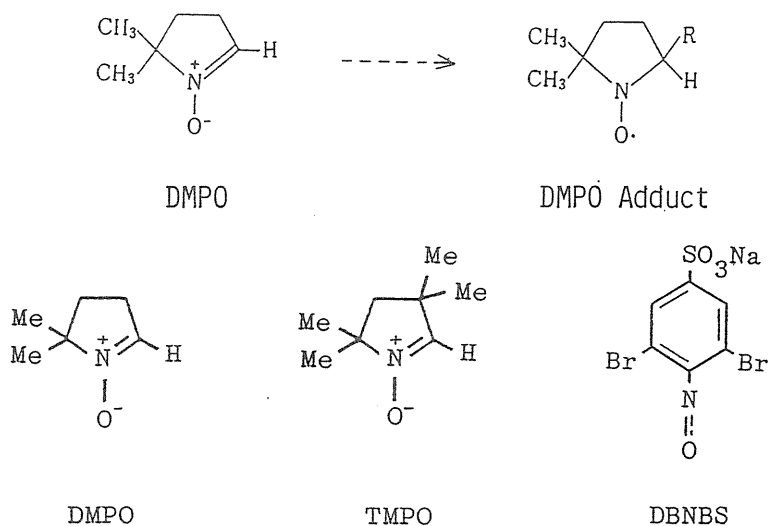
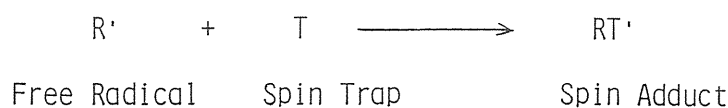
$\cdot OH$ 発生系の一つにフェントン反応と呼ばれる $FeSO_4$ と過酸化水素の反応系がある。この反応で生成させた $\cdot OH$ を、DMPO で補足したスピニアダクトの ESR スペクトルが、Fig. 5 である。この信号の $hfcc$ は、 $a_N = 1.49mT$ 、 β の水素の分裂 $a_H = 1.49mT$ で、DMPO-OH に帰属される。

スピントラップ法を応用すれば、酵素反応、フェントン反応、化学物質の酸化機構で生成 $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ の定性と定量ができ、生成機構や反応速度定数などの情報が求められる。¹⁵⁻¹⁹⁾

(3) $\cdot O_2^-$ の特性と測定方法

$\cdot O_2^-$ はアルカリ金属やアルカリ土類金属を燃焼させると、酸化的に生成させることができる。一方、NaOH で強アルカリ水溶液にすると、溶存酸素は還元されて $\cdot O_2^-$ を生成する。 $\cdot O_2^-$ 生成系は先に述べた

Spin Trapping



5,5-dimethyl pyrroline-1-oxide (DMPO)
3,3,5,5,-tetramethyl pyrroline-1-oxide(TMPO)
3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonate(DBNBS)

Fig. 3 スピントラッピング法の原理と代表的な捕捉剤

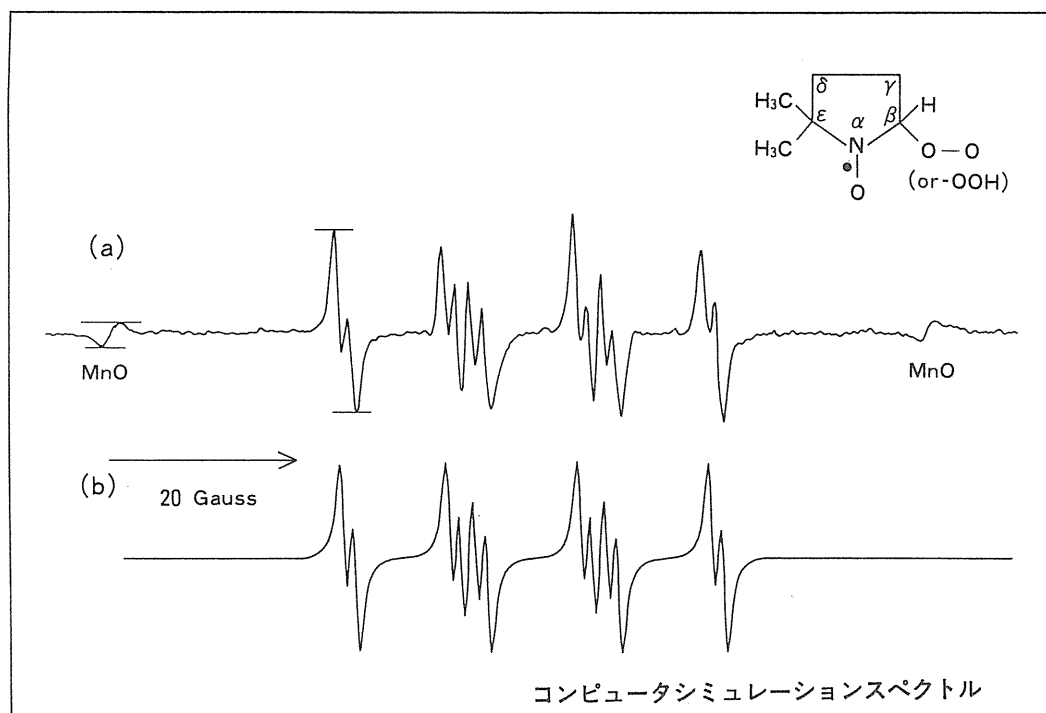


Fig. 4 HPX と XOD より発生する $\cdot\text{O}_2^-$ を DMPO で補足したスピナダクト (DMPO-OOH) の ESR スペクトル

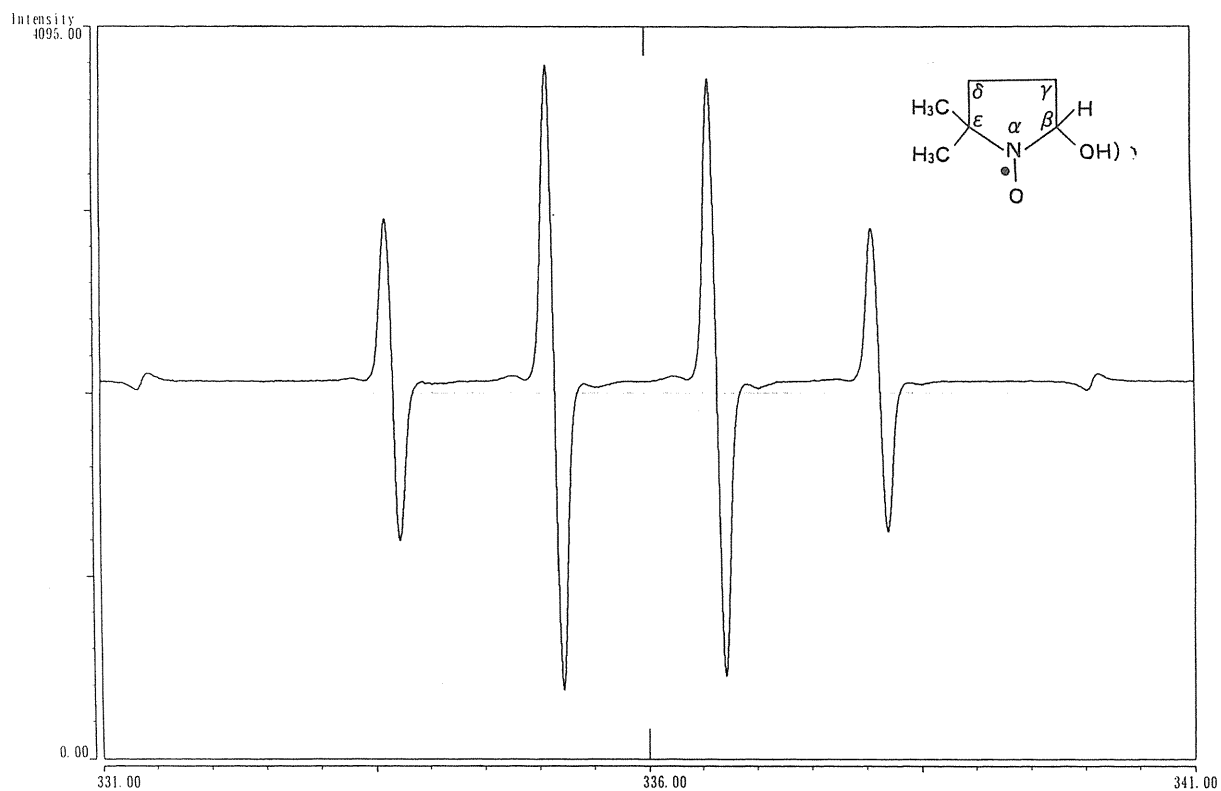
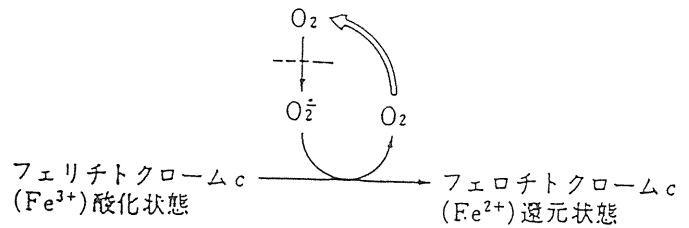


Fig. 5 Fe^{2+} と H_2O_2 の反応で生成した DMPO-OH の ESR スペクトル

電気的な酸化還元反応の他に、放射線分解、紫外線分解、還元型フラビン酵素による還元反応、XOD による HPX などを経た還元反応で生成する。マッコウドとフリードビッチは、1969 年電気化学的に生成させた $\cdot\text{O}_2^-$ が、シトクローム c を還元することを見だし、この系に SOD を添加すると、反応を阻害することを見つけ、この方法を用いて間接的に $\cdot\text{O}_2^-$ の生じることを証明し報告した。¹⁵⁾ この方法は SOD の測定法として認知されているが、実際は $\cdot\text{O}_2^-$ の消去活性 (SOSA) を測定する方法であって、SOD の測定法では無いことを理解する必要がある。

$\cdot\text{O}_2^-$ は水と強く溶媒和する性質を持つ。 $^3\text{O}_2$ から $\cdot\text{O}_2^-$ への還元電位は、0.16V であるので、この電位を与える物資が存在すれば、 $\cdot\text{O}_2^-$ が還元的に生成する。 $\cdot\text{O}_2^-$ の測定法には、Fig. 6 に示す間接的な測定法として呈色反応を利用した比色定量法がある。最も知られているのが先に紹介したシトクローム c 法で、酸化型チトクローム c が、 $\cdot\text{O}_2^-$ で還元されて生じる還元型シトクローム c の示す 550 nm の吸光度変化を観測する方法である。同様の比色測定法に、ニトロブルーテトラドリウム (NBT) やエピネフリン (アドレナリン) の酸化反応を利用した方法もある。クラーク型オキシノゲノメータを用いた溶存酸素の減少量を求める方法も信頼性が高い方法と言える。しかしこれらの方法の欠点としては、 $\cdot\text{O}_2^-$ の定性的な測定法とは言えず、SOD の添加と無添加の反応を比較して、 $\cdot\text{O}_2^-$ の存在の有無を判定する必要がある。²⁰⁾

チトクローム c 法



N B T 法

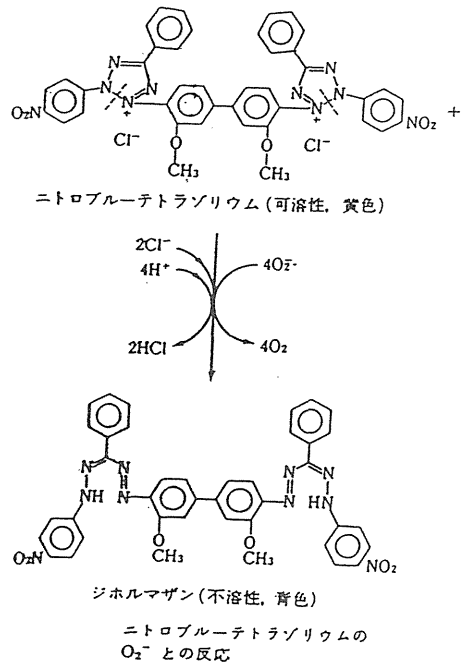


Fig. 6 呈色反応を利用した比色定量法による $\cdot\text{O}_2^-$ の分光学的な測定

(4) PMS と NADPH の反応で生成する $\cdot\text{O}_2^-$ の定量

$\cdot\text{O}_2^-$ とヒドロパーオキシドラジカル ($\cdot\text{OOH}$) は平衡状態にあり、 $\text{pK}=4.8$ である。反応性は pH に依存しており、酸性で高くなりアルカリで低くなる。これは、 $\cdot\text{O}_2^-$ の存在状態と関係し、不均化反応の速度と安定性は比例する関係にある。報告によれば、酵素反応過程で生じる $\cdot\text{O}_2^-$ の不均化反応の速度は、約 $10^7/\text{M}/\text{sec}$ であること、 $\cdot\text{O}_2^-$ と $\cdot\text{OH}$ が共存すると互いに反応することなどが明らかにされている。PMS と NADPH の反応で観測される $\cdot\text{O}_2^-$ のスピンアダクト (DMPO-OOH) の信号を Fig. 7 に示す。図中には HPX-XOD の結果も示している。

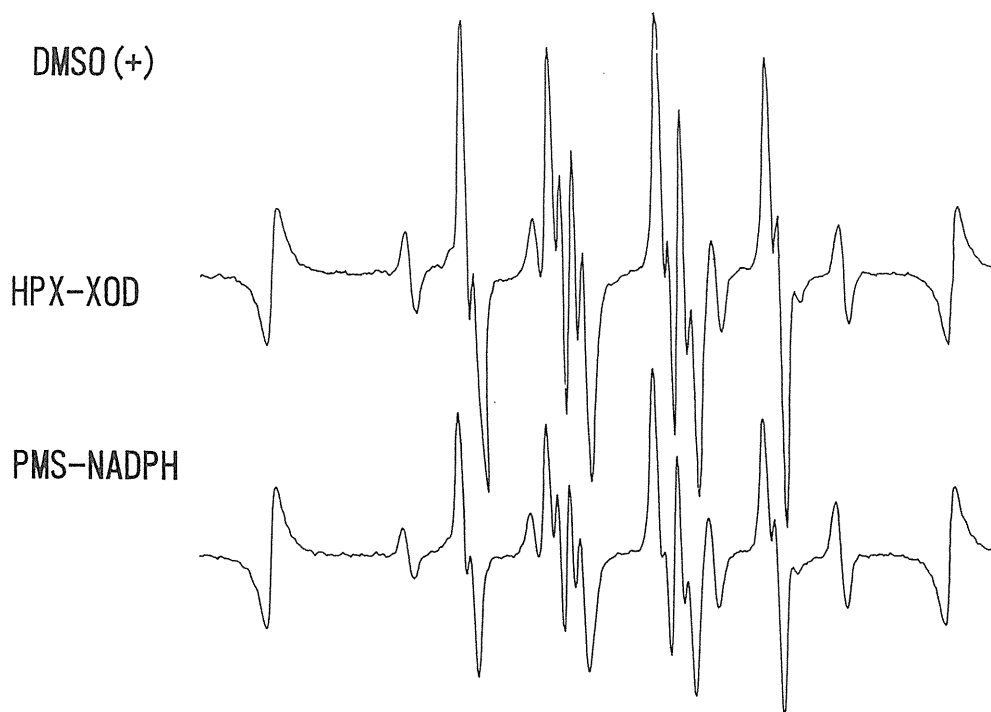
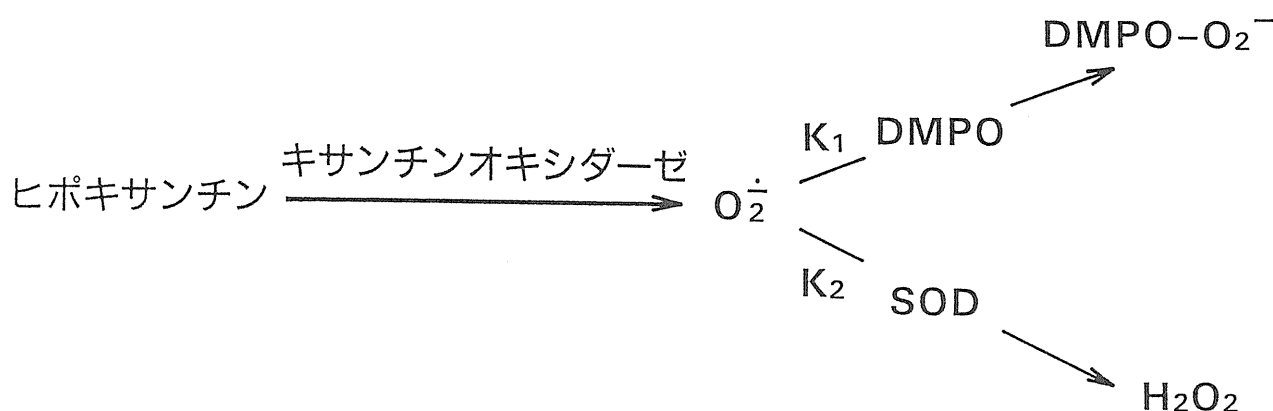
Fig. 7 PMS と NADPH の反応で観測される $\cdot\text{O}_2^-$ のスピニアダクト

Fig. 8 スピントラップ剤と薬剤との競争反応を利用した消去活性の測定原理

ESR-スピントラップ法を用いた $\cdot\text{O}_2^-$ の定量には、速度論的な検討が必要となる。そこで、先の条件でおこなった DMPO を用いた $\cdot\text{O}_2^-$ の定量について紹介する。スピニアダクト (DMPO-OOH) から $\cdot\text{O}_2^-$ の定量を行う式を、式-(5)に示す。

$$d[\text{DMPO-OOH}]/dt = k[\text{DMPO}] * [\cdot\text{O}_2^-] \quad \dots\dots(5)$$

式の $[\text{DMPO-OOH}]$ は、観測される ESR スペクトルより求められた濃度である。 $[\text{DMPO}]$ は測定に用いた DMPO 試薬の濃度、 k は $\cdot\text{O}_2^-$ と DMPO の 2 次反応速度定数は、約 18M/s である。¹⁰⁾ 一定時間後に生成した DMPO-OOH を定量すれば、式-(5)から酵素や好中球細胞などから生成している $\cdot\text{O}_2^-$ の濃度が求められる。

HPX と XOD の反応で産生した $\cdot O_2^-$ スピンアダクトの濃度とシトクローム c 法の還元量を求めた結果を Fig. 8 に示す。両者は一致しており、2つの測定法の信頼性の高さを示している。DMPO の $\cdot OH$ に対する反応速度定数、 k 、は、 $2.6 \times 10^9 M/s$ を使えば、 $\cdot O_2^-$ と同様に、 $\cdot OH$ の定量にも適用できる。¹⁹⁾

(4) $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ に対する消去機能物質の評価法

ESR-スピントラップ法を用いて各種の薬剤の示す $\cdot O_2^-$ や $\cdot OH$ に対する消去能を表したのが、Table. 1 である。この測定法の原理は、Fig. 9 示した様に、シトクローム c 法と同様に、スピントラップ剤と薬剤との競争反応を利用する方法である。この方法を応用して、 $\cdot O_2^-$ の測定試薬であるシトクローム c、NBT、エピネフリンなどは、消去機能物質の反応速度が求まる。ESR と生化学的な方法で求めた 2 次反応速度定数を、Table. 2 と Table. 3 に示した。この表から、生体成分の $\cdot O_2^-$ の消去機能物質の特性として、活性中心に金属イオンを持つ物質は反応性は比較的高いことが理解される。

(5) $\cdot O_2^-$ の示す生体作用の検証

$\cdot O_2^-$ の生体作用を議論する過程で、フェントン反応か、ハーバーワイス反応かが大きなカギとなる。 $\cdot O_2^-$ の発生機構には必ず不均化反応が伴っており、その結果として H_2O_2 を生成する。ここからが二つの反応性の問題で、 $\cdot O_2^-$ と H_2O_2 が共存すれば、ハーバーワイス反応で $\cdot OH$ は生成する。PMS と NADPH

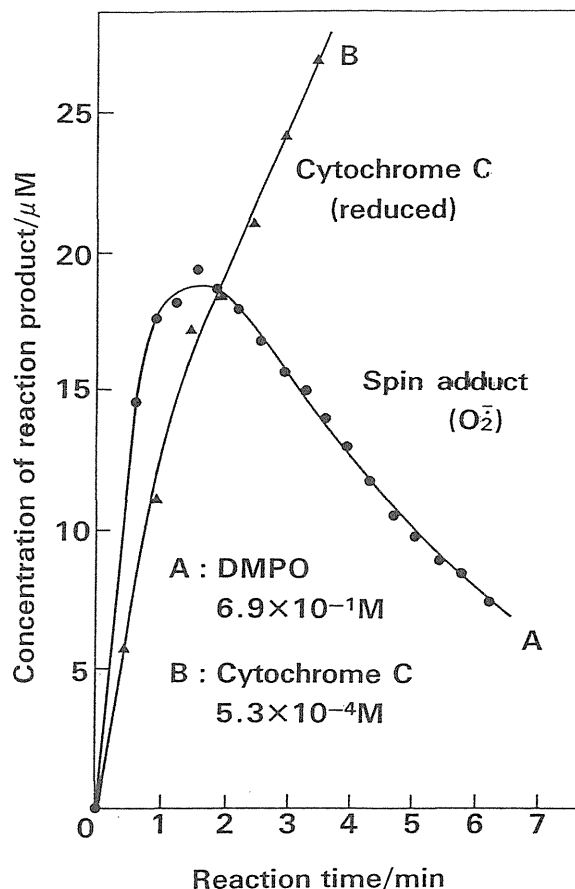


Fig. 9 ESR 法で求めた $\cdot O_2^-$ スピンアダクト濃度と、同一条件で還元されたシトクローム c 濃度の相関

Table. 1 $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ に対する水溶性抗酸化剤の消去能²¹⁾

Compound	$O_2^{\cdot -a)}$	$\cdot OH^b)$	$ROO\cdot^c)$	$RO\cdot^d)$
L-Ascorbic acid	93.3	70.3	0	0
D-Isoascorbic acid	100.0	100.0	0	0
Sorbic acid	0	0	0	5.8
Protocatechuic acid	63.3	0	10.3	3.0
Gallic acid	96.5	0	0	28.5

Measurement conditions for generating $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$, $RO\cdot$, $ROO\cdot$ are shown as follows. a) $O_2^{\cdot -}$, 2 mM HPX + 5.5 mM DETAPAC + 0.4 U/ml + 0.7 M DMPO. b) $\cdot OH$, 0.1 mM iron (II)-DETAPAC + 1 mM H_2O_2 + 0.92 M DMPO. c) $ROO\cdot$, 1.0 mM iron (II)-DETAPAC + 5 mM $ROOH$ + 0.07 M DMPO. d) $RO\cdot$, 1.0 mM iron (II)-DETAPAC + 5 mM $ROOH$ + 0.07 M DMPO.

Table 2 $\cdot\text{O}_2^-$ に対する 2 次反応速度定数 (ESR 法)¹⁷⁾ ID₅₀ 値と二次反応速度定数

生体関連物質	ID ₅₀ 値		二次反応速度定数 (M ⁻¹ ·s ⁻¹)		pH _{ref}
	(M)	(mg/ml)	<i>k</i> _{スカベンジャー}	<i>k</i> _{ref}	
Cu, Zn-SOD*	7.5×10 ⁻⁹	0.00024	1.6×10 ⁹	~2×10 ⁹	5~9.5
Mn-SOD*	6.5×10 ⁻⁹	0.00026	1.9×10 ⁹	1.8×10 ⁹	7.8
Fe-SOD*	5.1×10 ⁻⁹	0.00020	2.4×10 ⁹	1.6×10 ⁹	7.8
セルロプラスミン*	1.5×10 ⁻⁵	2.0	8.1×10 ⁵	3.04×10 ⁹	7.8
アスコルビン酸オキシダーゼ*	2.5×10 ⁻⁶	0.35	4.8×10 ⁶	—	—
チトクロム <i>c</i> *	2.7×10 ⁻⁵	0.33	4.5×10 ⁵	6.2×10 ⁵	7.8
ペルオキシダーゼ*	5.0×10 ⁻⁷	0.020	2.4×10 ⁷	1.6×10 ^{6***}	7~8.8
カタラーゼ*	1.3×10 ⁻⁵	3.0	9.6×10 ⁵	2.7×10 ⁵	7.4
L-アスコルビン酸	3.4×10 ⁻⁵	0.0060	3.5×10 ⁵	2.7×10 ⁵	7.4
DEPO	—	—	—	1.8×10 ⁴	7.8

*つぎのような分子量を用いた：Cu, Zn-SOD (32,000)、Mn-SOD (40,000)、Fe-SOD (39,000)、セルロプラスミン (134,000)、アスコルビン酸オキシダーゼ (140,000)、チトクロム *c* (12,400)、ペルオキシダーゼ (40,000)、カタラーゼ (240,000)

**ペルオキシダーゼ compound I と O₂⁻ との二次反応速度定数である。

Table 3 $\cdot\text{O}_2^-$ に対する 2 次反応速度定数 (化学-生化学的な測定方法)²⁰⁾

測定法の原理	反応物質の濃度 (M)	2 次反応速度 (M ⁻¹ s ⁻¹)	pH	測定法
a. チトクロム <i>c</i> の還元	2-5×10 ⁻⁵	1.4×10 ⁶ 3.0×10 ⁵ 1.1×10 ⁵	<7.45 7.45~9.2 8.5	A ₅₅₀ ↑
b. NTB の還元	2.5-5.6×10 ⁻⁵	—	7.8	A ₅₆₀ ↑
c. TNM の還元	4-10×10 ⁻⁶	1.9×10 ⁹	6.0	A ₃₅₀ ↑
d. エピネフリンの酸化 (連鎖反応)	1.5×10 ⁻⁴	4×10 ⁴	7.8	A ₄₈₀ ↑
e. 亜硫酸の酸化 (連鎖反応)	2-4×10 ⁻²	—	7.4	O ₂ uptake
f. 乳酸脱水酵素-NADH の酸化 (連鎖反応)	4.7×10 ⁻⁶ (LDH)	3.6×10 ⁴ (O ₂ ⁻)	5~7	
	1.6×10 ⁻⁴ (NADH)	1.2×10 ⁶ (HO ₂ [·])		
g. ラクトペルオキシダーゼ-O ₂ ⁻ 複合体生成	1×10 ⁻⁵	—	6.2~7.4	A ₅₄₆ ↑ または A ₅₈₈ ↑

の反応系で明らかなように、金属イオンが存在しなくても、 $\cdot\text{OH}$ が大量に生成することが認められている。この場合の $\cdot\text{OH}$ 生成はハーバーワイス反応と特定しても良いであろう。また、反応する金属イオンが高濃度存在すると、H₂O₂ を分解すると、フェントン反応による $\cdot\text{OH}$ の生成となる。鉄や銅イオンに想定されるフリーの金属イオンが大量に存在する条件は、虚血再還流、内出血などの場合に限定されている。速度論的な検証によれば、急性傷害はハーバーワイス、慢性傷害はフェントン反応で惹起されると考えるとよく説明される。

4) 結 論

様々な環境下で化学的に生成するフリーラジカル物質、 $\cdot O_2^-$ や $\cdot OH$ 、を研究するには、計測法の確立が不可欠である。フリーラジカル物質を試料の形状に影響されることなく、非破壊で、選択的に測定できる、などの特徴を持つ分光装置が ESR である。この装置の活用が研究の進展には必要であるが万能とは言えず、比色定量法や蛍光測定法も活用する必要がある。今後のフリーラジカルや活性酸素の研究の発展には、ESR/紫外可視発光、ESR/化学発光、ESR/電気検出など複合計測法の開発が望まれる。

また、フリーラジカル測定の実史は浅く、特に活性酸素種の研究は試行錯誤を繰り返し進歩してきたと言える。そのため、今日の計測技術で判断すると誤った報告も多く混乱を招く原因となっている。今後は、より基礎的な研究の積み重ねと正しい知識の整理により生体のフリーラジカル挙動の解明が実現するであろう。

文 献

- 1) 松尾光芳、嵯峨井 勝、吉川敏一訳、B. Halliweel, B. Butterige 著、フリーラジカルと生体、学術出版 (1989)
- 2) 大柳善彦：活性酸素と病気 (1989)
- 3) 桜井弘著、田中英彦編、生体微量元素、広川書店、(1994)
- 4) 吉川敬一、近藤元治、モダンメディア 33: 135-141 (1987)
- 5) 八木国夫、中野稔：活性酸素、医歯薬出版、(1987)
- 6) J. M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6049-6055 (1969)
- 7) 菊川清見、桜井弘編：フリーラジカルとくすり、廣川書店 (1991)
- 8) E. Zavoisky. J. Phys. USSR. 9, 211, 245, (1945)
- 9) 桜井弘著、ESR スペクトルの実際、廣川書店、(1989)
- 10) M. Kohno, T. T. Masuizu, M. Kusai, Y. Mizuta, and K. Makino, Bull. Chem. Soc. Jpan., 67, 1085 (1994)
- 11) 藤田英夫：化学と工業、42, 1266 (1989)
- 12) H. Fujii and K. Kakinuma, J. Biochem. 108, 983 (1990)
- 13) E. G. Janzen., Acc. Chem. Res., 4, 31 (1971)
- 14) E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, and J. Paxton, Mol. Pharmacol., 16, 676 (1979)
- 15) I. Ueno, M. Kohno, K. Yoshihira, and I. Hirano, J. Pharm. Dyn., 7, 563-569 (1984)
- 16) M. Hiramatsu, and M. Kohno, JEOL. News. 23A, 7-9 (1987)
- 17) M. Mitsuta, Y. Mizuta, M. Kohno, M. Hiramatsu, and A. Mori, Bull. Chem. Soc. Jpan., 63, 187 (1989)
- 18) H. Miyagawa, T. Yoshikawa, T. Tanigawa, N. Yoshida, S. Sugino, M. Kond, H. Nishikawa, and M., Kohno, J. Clin. Biochem., Nutr. 5, 1-7, (1988)
- 19) T. Tanigawa, T. Yoshikawa, H. Oyamada, T. Takemura, Y. Morita, K. Tainaka, H. Miyagawa, N. Yoshida, S. Sugino, and M. Kondo.
- 20) 谷口 直之監：活性酸素実験プロトコール (1994) 秀潤社 Elsevier Science Publishers, BV., 37-42 (1988)
- 21) M. Kohno, M. Yamada, K. Mitsuta, Y. Mizuta, and T. Yoshikawa, Bull. Chem. Soc. Jpan., 64, 1447 (1991)

来の抗酸化剤の影響を受けたり、生体物質と種々の反応を行うことにより様々な生体作用を発現する。従来、生体内のフリーラジカル反応は試験管内反応からの類推で議論されてきた。しかし、非常に単純化された試験管内反応の結果を複雑な生体内フリーラジカル反応に演繹することは自ら限界がある。生体内で起こっているフリーラジカル反応を理解するためには生体丸ごとを生きた状態でラジカル反応を測定することが不可欠である。

ESR は electron spin resonance (電子スピン共鳴) の略称で EPR (electron paramagnetic resonance) とも呼ばれる磁気共鳴法の一つで、不対電子のスピンを測定対象としている。不対電子を持つ代表的物質には活性酸素や最近注目を集めている一酸化窒素 (NO; nitric oxide) などのフリーラジカル、遷移金属がある。不対電子は常磁性を有し、棒磁石としての性質があるために、静磁場中におかれるとゼーマン分裂によりそのエネルギー状態は安定状態と不安定状態に分裂する。ここに外から両状態間のエネルギー差に相当する電磁波を照射すると電子スピンはそのエネルギーを吸収して安定状態から不安定状態に遷移する。ESR はこの電磁波の吸収を観測する分光器である。このときのエネルギー差は400mT の静磁場で10GHz (10^{10} Hz) 程度の、また40mT の静磁場では1 GHz 程度のマイクロ波に相当し、NMR でのプロトンのゼーマン分裂に比べて数百倍大きい。最も広く用いられている X-バンド ESR 分光器では9.4GHz の高周波マイクロ波を用いている。これはこの周波数帯が感度上および装置の製作上最も好都合であることによる。しかし、このような高周波のマイクロ波は水のような誘電率の大きい溶媒によって吸収され易い。生物試料を考えた場合、水などの生体成分によるマイクロ波の吸収が起こるために、生体内へのマイクロ波の浸透性が低下した発熱を起こす。その結果、0.1ml 以下という少量の試料しか測定できない。そこで、水分によるマイクロ波の吸収が比較的少ない低周波のマイクロ波を用いた生体計測用 ESR が開発された。

本稿では、この生体計測用 ESR を用いて我々が行ってきた研究を中心に概説する。

II. 生体計測用 ESR

生体内のラジカルを初めて *in vivo* 測定したのは1975年、Piette のグループである¹⁾。彼らはスピンラベル法を用いて早くから生体関連物質の ESR 測定を行っていたが、ラット肝臓中にヘリックスコイルを埋挿し、腹腔内投与したニトロキシドラジカルの消失を X-バンド ESR で測定した。この方法は非共鳴型であるため X-バンドでも測定可能であった。しかし、コイルを外科的に測定部位に挿入する侵襲的方法で感度もよくなく、あまり注目されなかった。

生体そのものを *in vivo* ESR 測定するためには水によるマイクロ波の吸収を抑えなければならない。マイクロ波の磁界と電界成分のうち、ESR 測定には磁界成分が必要で、電界成分と水が接触するとマイクロ波の誘電損失をもたらす。現在の ESR 装置では感度を高めるために試料測定部に空洞型共振器を用いているが、この空洞型共振器では試料と電界成分が接触し易いので、大容量試料には適さない。生体計測用 ESR にはマイクロ波の磁場成分だけ存在する広い空間が必要であり、スプリット・リング共振器やループ・ギャップ共振器、リ・エントラント共振器などが考案されている。又、共振器を用いないものとして、ヘリックスコイルやサーフェスコイルがある。

一方、水の誘電分散特性によると誘電損失の起り易さはマイクロ波の周波数に強く依存し、低い周波数帯域、例えば、1 GHz のマイクロ波を用いると誘電損失は著しく低減される。この周波数帯域は L-バンドと呼ばれ、その ESR 装置を L-バンド ESR と総称している。また、最近では更に低周波数の ESR、例え

ば300MHzのESRも開発されている。現在市販されている生体計測用ESR装置ではL-バンドのマイクロ波を用い磁場成分だけを動物に照射するためのループギャップレゾネーター方式が採用されている²⁾。この装置を使うと、生体中のラジカルやスピン標識薬物の挙動を無侵襲測定でき、更にCT化によりラジカルの体内分布も0.1mm程度の分解能で画像化できる。

III. 生体計測用 ESR の測定対象

多くの活性酸素、突然変異の原因となるラジカル反応中間体、金属錯体や生命化学の分野で最近話題となっている一酸化窒素などは全て常磁性種である。原則的にはこれらの不対電子を有する常磁性種は全て測定の対象となりうる。しかし、安定性や量的問題、緩和時間の関係で必ずしも全てが室温で測定できるわけではない。

現在の生体計測用ESRの感度は通常のXバンド装置の数十分の一で、動物存在下ではさらに悪くなる³⁾。そのために生体内で発生した活性酸素や金属酵素などの微量常磁性物質を直接測定するのは困難である。生体内で産生した一酸化窒素については後述するように、鉄錯体に捕捉することで測定できるようになったが^{4,5)}、不安定な活性酸素はスピントラップ法によっても未だ観測できていない。そこで、安定なニトロキシドラジカルを投与し、そのシグナル変化から間接的にラジカル反応を計測する方法が採られている^{6,7)}。

ニトロキシドラジカルは種々の生体内酸化還元酵素や活性酸素、抗酸化剤などと反応し、その常磁性を消失したり獲得したりする⁸⁾。この活性酸素との反応性のために、脂溶性や水溶性のニトロキシドラジカルは脂質過酸化を抑制する性質がある。一方、還元されたヒドロキシルアミンは酸化酵素の作用を受け高酸素状態で再びニトロキシドラジカルに酸化され、常磁性を獲得する。

我々は、このニトロキシドラジカルの性質に注目し、安定なニトロキシドラジカルを生体内に投与し、そのシグナル変化から間接的に生体内フリーラジカル反応を評価した。Table 1に我々がスピンプローブとして用いているニトロキシドラジカルの一覧を示す。薬物受容体結合能を持つプローブを用いた場合には特定部位でのフリーラジカル反応を評価できる。また、両親媒性のプローブを利用すると、細胞やリポ蛋白、薬物輸送担体などの体内挙動を解析できる⁹⁾。

IV. ニトロキシドプローブを用いた生体内フリーラジカル反応の解析

Fig. 1にddYマウスにニトロキシドラジカルの一つであるCarbamoyl-PROXYLの水溶液を尾静脈内投与し、肝臓部位を中心に測定したときのESRスペクトルを示す⁶⁾。ニトロキシドラジカルでは窒素の核スピンのためゼーマン分裂は更に核スピン状態が-1、0、1の3つの状態に分裂し、その結果3本の超微細分裂吸収が見られる。ここで規則的に現われるノイズはマウスの呼吸によるもので、測定中にマウスが死んだ場合にはこのノイズも消える。このESRスペクトルでは3本の吸収線が等強度であることから、ニトロキシドラジカルは遊

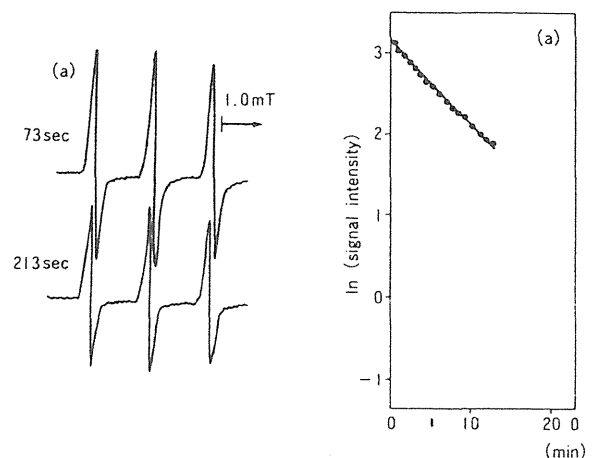
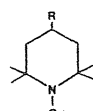
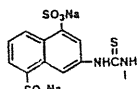
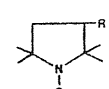
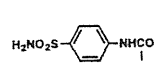
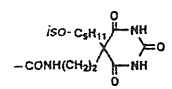

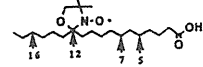
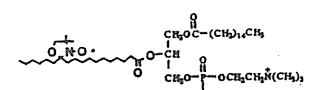
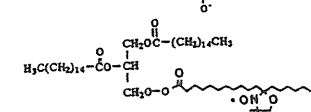
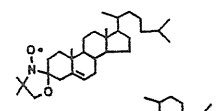
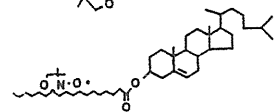


Fig. 1. *In Vivo* ESR Spectra of Carbamoyl-PROXYL at Abdomen of Mouse after i. v. Administration and Its Signal Decay-Curve⁶⁾

Table 1. Abbreviation and Chemical Structure of Spin-Probes for *In Vivo* ESR Measurement

Acronym	Chemical name	R	Basic structure
1. TEMPO derivatives			
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-H	
Hydroxy-TEMPO	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-OH	
Amino-TEMPO	4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-NH ₂	
Carboxy-TEMPO	4-carboxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-COOH	
Oxo-TEMPO	4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	=O	
CAT-1	4-trimethylammonium-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxylidide	-N ⁺ (CH ₃) ₃ I ⁻	
Phosphonoxy-TEMPO	4-phosphonoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl	-OPO ₃ H ₂	
Glutaramide-TEMPO		-NHCO(CH ₂) ₃ COOCH ₃	
Methylglutaramide-TEMPO		-NHCO(CH ₂) ₃ COOCH ₃	
TEMPO-T	4-N'-[N-3-(1,5-disodiumsulfonaphthyl)]-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl		
Hexamethonium-TEMPO		(CH ₃) ₂ N ⁺ -(CH ₂) ₆ -N ⁺ (CH ₃) ₂	
2. PROXYL derivatives			
Carboxy-PROXYL	3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl	-COOH	
Carbamoyl-PROXYL	3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl	-CONH ₂	
Aminomethyl-PROXYL	3-aminomethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl	-CH ₂ NH ₂	
Sulfonamide-PROXYL			
Barbiturate-PROXYL			
3. Oxazolidine derivatives			
OXANO	2-ethyl-2,4,4-trimethyloxazolidine-3-oxyl		
nSLS	<i>n</i> -(<i>N</i> -oxyl-4'4'-dimethyloxazolidine)-stearic acid		
nSL-PC	1-palmitoyl-2-(<i>n</i> -SLS)-phosphatidylcholine		
nSL-TG	1,2-dipalmitoyl-3-(<i>n</i> -SLS)-glycerol		
SL-Cholestane			
nSLS-Cholesterol			

離状態で存在していると思われる。もし、ラジカルが血清アルブミンやリポ蛋白などと結合した場合や粘性の高い媒体に取り込まれると分子運動が遅くなるために、両端のシグナルは小さくなる。Fig. 1 に示すように、ESR シグナル強度の経時変化を片対数プロットすると初期には直線的に減衰する。従って、静脈内投与されたニトロキシドラジカルは投与直後、生体内で一次反応で消失すると見做される。

このシグナル消失速度はスピンプローブの種類や測定部位により大きく異なる (Table 2)。一般に、荷電を持たないプローブの方が消失速度は大きい。また、同じ置換基同士で比較すると、TEMPO 系の方が PROXYL 系のそれよりも約10倍程度大きい。また、測定部位間では膀胱部位と肝臓部位では有意差はないが、頭部では遅い化合物もある。我々は当初酸化還元電位がスピנקリアランスの速度に関係するものと考えたが、今のところ、必ずしもニトロキシドラジカルの酸化還元電位だけでは説明できない。

Table 2. Reduction Rate of Nitroxyl Spin-Probes at Mice Abdomen after Intravenous Injection (min^{-1} ; mean \pm S. D.)⁷⁾

	Breast	Head
Hydroxy-TEMPO	0.97 ± 0.33 (5)	0.55 ± 0.13 (5)
Amino-TEMPO	1.53 ± 0.54 (8)	0.92 ± 0.14 (5)
CAT-1	0.21 ± 0.08 (6)	0.07 ± 0.05 (5)
TEMPO-T	0.27 ± 0.10 (6)	0.12 ± 0.04 (6)
Carboxy-TEMPO	0.46 ± 0.10 (5)	0.25 ± 0.02 (5)
Hexamethonium-TEMPO	0.06 ± 0.04 (4)	0.02 ± 0.01 (2)
Carbamoyl-PROXYL	0.10 ± 0.05 (6)	0.05 ± 0.01 (5)
Carboxy-PROXYL	0.04 ± 0.01 (5)	0.04 ± 0.02 (5)
Barbiturate-PROXYL	0.06 ± 0.03 (4)	0.04 ± 0.02 (2)
Sulfonamide-PROXYL	0.20 ± 0.08 (5)	0.12 ± 0.02 (2)

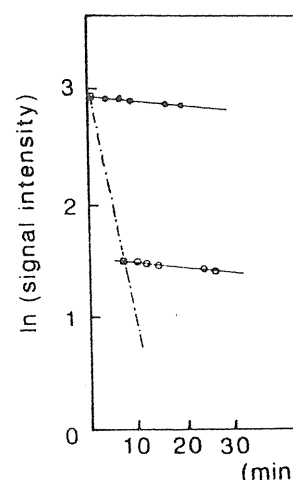


Fig. 2. ESR Signal Decay-Curve of Carbamoyl-PROXYL in the Collected Blood after i. v. Injection⁶⁾

このシグナルの減衰、即ち、スピנקリアランスの機構を明らかにするために、予めニトロキシドラジカルをマウス尾静脈に投与し、間隔をおいて2回採血し、血液中でのニトロキシドラジカルの減衰を調べた (Fig. 2)⁶⁾。採血後の血液中ではいずれのラジカルでもその減衰速度は生体内のほぼ十分の一で、外挿法で得た生体内消去速度定数は *in vivo* での結果と一致した。このように、採血後の血液中でのスピנקリアランスが著しく遅いことから血液成分自身が単独でニトロキシドラジカルを消去しているのではなく、血管壁や組織との反応ないしは不安定な補酵素を必要とする反応がスピנקリアランスに関与している可能性が示唆された。

また、血漿をフェリシアン化カリウムで酸化すると ESR シグナルは増大し、遅れて採血した血漿中のシグナルも再酸化すると初めに採血した血漿の再酸化シグナルの7~10割程度のシグナル強度を与える¹⁰⁾。フェリシアン化カリウムはニトロキシドラジカルの一電子還元体であるヒドロキシルアミンを元のニトロキシドラジカルに再酸化することが知られている。従って、ここでのスピנקリアランスは血液中でニトロキシドラジカルが還元されヒドロキシルアミンになることが主要因であると判断される。

このほかに、時間が経つと尿からも ESR シグナルが検出されることから腎クリアランスも当然関与する。また、単離した肝や他の臓器中にも見い出されることから多組織への分布も関係する (佐野ら, 1994)。しかし、投与後短時間では一電子還元体が化学量論的に回収されることから、初期におけるスピנקリアランスはニトロキシドラジカルからヒドロキシルアミンへの変化、即ち一電子還元による常磁性消失が主

要因であると見做される。従って、その減衰速度は生体内の「総合還元力」即ち“Reducing Capability”を示しており、生体自身の総合抗酸化力（Antioxidant Capacity）とも密接に関係している。

V. 総合還元力の生理的意味

ニトロキシドプローブの減衰から評価される総合還元力は生理的にどのような意味を持つのであろうか。我々は種々の生理状態でのマウスを用いてこの ESR シグナルの減衰を調べた。

Table 3. Influence of Aging and Feeding on ESR Signal Decay of Nitroxide Radical at Head of BDFI Mice (min^{-1} ; mean \pm S. D.)¹⁰⁾

Age (mo.)	Number of mice	Feeding	Spin clearance rate (min^{-1}) mean \pm SD
6	10	<i>ad libitum</i>	0.038 \pm 0.006 [§]
30	4	<i>ad libitum</i>	0.026 \pm 0.004 ^{§†}
39	4	<i>restricted</i>	0.035 \pm 0.004 [†]

^{§†} Means are significantly different from each other at the $p < 0.05$ level as analyzed by Student's *t*-test.

低下し、放射線障害が生体抗酸化システムにも及んでいることや、種々の抗酸化剤、例えばビタミン C や E をマウスに投与すると生体の総合還元力が有意に大きくなることが示されている。

Table 4. Influence of Oxygen Concentration in Inspired Gas on ESR Signal Decay of Nitroxide Radical in Living Mice (min^{-1} ; mean \pm S. D.)¹¹⁾

	Hydroxy-TEMPO		Carbamoyl-PROXYL	
	abdomen	head	abdomen	head
12% O ₂	0.95 \pm 0.03	0.69 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
20% O ₂	0.85 \pm 0.01	0.71 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01
80% O ₂	0.84 \pm 0.02	0.71 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01

Clearance constants are presented as mean \pm S. E. over 5 or 6 experiments.

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

一方、酸化ストレスに曝した場合にもこのシグナル減衰は変化する。Table 4 に種々の酸素濃度にマウスを暴露した状態で頭部、腹部での ESR シグナルの減衰速度を示す。酸素濃度、測定部位に依存してシグナルの消失速度は異なり、低酸素状態では頭部、腹部ともに ESR シグナルの減衰が亢進される¹¹⁾。 *in vitro* の実験結果からはニトロキシドラジカルは酸素濃度が低いほど電子還元され易いことが知られており⁸⁾、この意味では低酸素状態で消失速度が速くなることは妥当である。

興味深いことに腹部では高酸素状態でもシグナル消失速度が著しく増大する。ニトロキシドラジカルはヒドロキシラジカルなどの活性酸素の作用によってもその ESR シグナルを消失する。Fig. 3 に示すように、ここでの消失速度の増大は Trolox やグルタチオン、尿酸などの抗酸化剤の前処理により抑えられることから、酸化ストレスによるシグナルの消失と判断される¹²⁾。もし、高酸素状態で腹部のいずれかの臓器内で活性酸素が産生しているとする、この活性酸素が直接あるいは間接的にニトロキシドラジカル

マウスの 6 月齢、30 月齢、および食餌を 60% に制限した 39 月齢マウスにスピンプローブとして Carbamoyl-PROXYL を腹腔内投与し、頭部での ESR シグナルの減衰を調べると、老化群で明らかに減衰速度の低下が認められる (Table 3)¹⁰⁾。しかし、興味深いことに食餌を制限した群では幼若群に匹敵する減衰速度を示した。従って、マウスの総合還元力は老化により低下することおよび食餌の摂取量が関係することが示唆される。

更に、 γ -線全身照射によっても総合還元力は

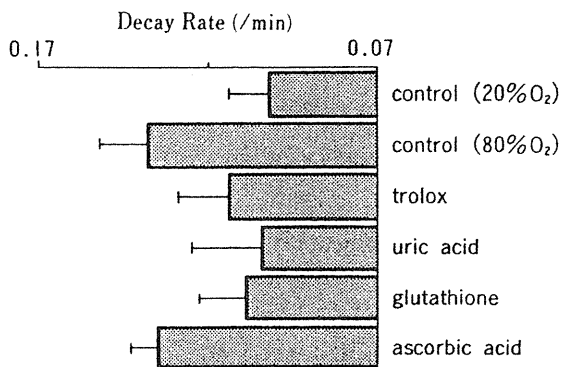


Fig. 3. Influence of Antioxidants on ESR Signal Decay of Nitroxide Radical at Abdomen of Mice under Hyperoxia (min^{-1} ; $\text{mean} \pm \text{S. D.}$)¹²⁾

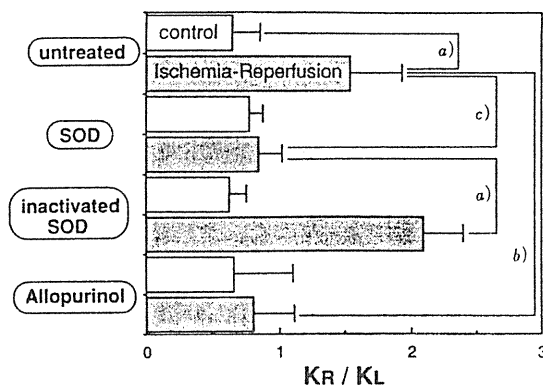


Fig. 4. Influence of Ischemia-Reperfusion Injury and Antioxidants on ESR Signal Decay of Nitroxide Radical at Thigh of Mice¹³⁾

と反応し、その ESR シグナルを減衰させ、その結果として減衰速度を亢進させたのであろう。

一方、マウス大腿部で大柳等の方法を改良して虚血再灌流を起こすとその部位でのシグナル消失速度は有意に増大する¹³⁾。Fig. 4 は、マウスの左右大腿部にスピンプローブを投与し、両者のシグナル減衰速度の比を採ったものである。何も処置しないマウス群に較べ右大腿部に虚血再灌流を起こした群で有意に減衰速度比は増加している。ここに SOD やキサンチンオキシダーゼの阻害剤である Allopurinol を添加するとその増大は抑制され、虚血再灌流による消失速度の増大にスーパーオキシドの産生が関与していることが示される。

以上に示した酸化ストレス状態でのシグナル消失速度の増大はいづれも活性酸素の生成が関与しており、抗酸化剤の生体内での総合抗酸化力を評価するのに本分法が非常に有用であることを示している。

VI. 肺における抗酸化システム

肺は直接空気に晒されており、最も酸化ストレスを受けやすい臓器である。従って、肺には酸素障害に対する防御機構が存在するものと考えられ種々の検討がなされている。しかし、その多くは *in vitro* での結果を基にしており、実際に *in vivo* で解析したものはあまりない。我々は、ニトロキシドラジカルの水溶液をマウスの肺内に注入し、ニトロキシドラジカルのスピンの減衰から肺におけるラジカル還元機構を探った^{14,15)}。後に示すとうり、ESR-CT での画像診断では投与したニトロキシドラジカルは肺全体で一様に分布しており、肺胞内に達していることが示された (Fig. 5)。この肺胞内へ投与したニトロキシドラジカルの ESR シグナルは一次反応で減衰し、薄層クロマトグラフィーの結果からニトロキシドラジカルがヒドロキシルアミンに還元されるこ

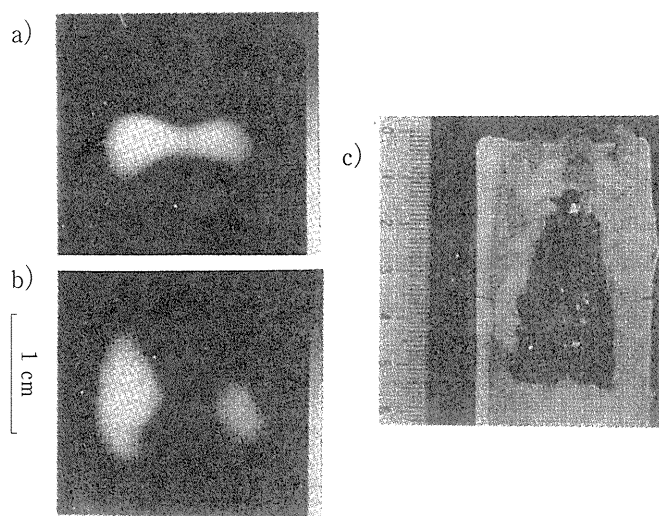


Fig. 5. ESR-CT Imaging at Mouse Chest after Intra-tracheal Injection of Carboxy-PROXYL¹⁴⁾
 a) and b) indicate the section images observed from tail to head and from front to back, respectively. c) is anatomical picture of mouse chest used for the ESR-CT.

とに由来することが示された。また、減衰の程度は従来より言われているグルタチオンやアスコルビン酸量では説明できなかった。このニトロキシド還元力は肺洗浄液中や肺ホモジネートには認められず、細胞膜を修飾すると減少することから、実質細胞の膜酵素が関与している可能性が強く示唆された。この系では脂溶性 SH 修飾化合物は調節的に作用するが、グルタチオン等の水溶性抗酸化物質は関与しない (Fig. 5)¹⁵⁾。従って、ここで見出した還元系はこれまで報告されている肺における酸化障害防御系とは性質が異なる可能性が強い。

VII. 一酸化窒素の *in vivo* 測定

最近、フリーラジカルの一種である一酸化窒素がその多様な生理作用と共に非常に注目を集めている。この一酸化窒素の ESR 測定に関し、最近、生理的温度で *in vivo* 測定する可能性が開かれた。例えば、マウス体内で産生した一酸化窒素を鉄錯体にトラップさせ、形成したニトロシル鉄錯体の *in vivo* 測定に成功したことが報告された⁴⁾。我々も水溶性鉄錯体やリポソーム封入鉄錯体を用いてマウス体内の一酸化窒素産生を測定すると、5 配位型のニトロシル鉄錯体特有の 3 本の ESR シグナルが観測された⁵⁾。生体計測用 ESR に動物移動装置を付けると 5 mm 間隔で正確に ESR スペクトルを測定することができる。この方法で一酸化窒素の分布を見ると上腹部で有意に多く存在することが示された。今後画像化の手法を組み合わせるなどにより、一酸化窒素の産生臓器を特定したり活性酸素と一酸化窒素との反応部位などを直接測定することも不可能でなくなるものと期待される。

VIII. 生体内ラジカルの画像化 (ESR-CT)

生体計測用 ESR は電子スピンのみを選択的に測定するものであり、もし画像化手法が導入されればこれまでの画像診断とは質的に異なる情報が期待できる。ESR-CT の可能性は1979年 Hoch と Day により初めて報告された¹⁶⁾。原理は X-線 CT で用いられている手法と全く同様に、位置情報を持つスペクトルから二次元ないし三次元画像を逆投影法で作成する。

これまでの報告として Berliner ら¹⁷⁾によるラットの尾部肉腫中でのニトロキシドラジカルの分布画像、

Table 5. Influence of SH Modifying Reagents on ESR Signal Decay of Nitroxide Radical at Lung of Mice (min^{-1} ; mean \pm S. D.)¹⁵⁾

Sulfhydryl-blockers	Distance ^a (Å)	k^b (min^{-1})	%
None		0.111 ± 0.013 (7)	100
Membrane-permeable NEM		0.037 ± 0.001 (3)	33
Floating in membrane			
MCA	10.8	0.040 ± 0.002 (3)	36
MBA	8.3	0.076 ± 0.015 (4)	68
MPA	7.1	0.120 ± 0.011 (4)	108
Membrane-impermeable CMBS		0.105 ± 0.023 (4)	95

^a The distance is that from the reactive maleimide moiety to the carbon atom of the carboxyl group.

^b Each value represents the mean \pm SD. The numbers in parentheses are numbers of animals.

Ishida ら¹⁸⁾のラット尾静脈投与ニトロキシドラジカルの頭部での CT 画像、Sotgui ら¹⁹⁾による尾静脈の 3 次元画像、あるいは我々のマウス腹部²⁰⁾や胸部¹⁴⁾でのニトロキシドラジカルの分布画像 (Fig. 5) などがある。この画像化の手法を発展させれば酸化還元という代謝能そのものの画像化も夢ではなく、今後の展開が望まれる。

その他に、リポソームにスピン標識薬物を封入すると、薬物輸送担体の体内挙動や担体からの薬物の放出過程についても一匹毎にリアルタイム無侵襲評価が可能であり、更に ESR-CT による体内分布の画像も得られる。

IX. 生体計測用 ESR の今後の展望

以上のように、生体計測用 ESR は医学、薬学、生物学など生命化学研究者にとって非常に有望な測定手段となるものと期待される。現在、放射線や紫外線の照射、あるいは変異原性物質の作用で生体内にラジカル中間体が生成し、これが突然変異に関係することが示されつつある。しかし、生体内でのラジカル反応は非常に多様性に富んでおり、抗酸化剤の生体内作用一つをとっても試験管内実験での結果と相反する結果が *in vivo* では認められている。一方、広く病態や毒性の解析に関しても、活性酸素や一酸化窒素などラジカルが関与する化学反応を詳細に解析することが不可欠となってきた。本稿で示したように、生体計測用 ESR はこの分野の研究にも威力を発揮する。例えば、虚血・再灌流障害や老化、薬物による肝障害²¹⁾などの研究にも有効で、我々もいくつかの系で興味ある結果を得ている。このことは、これら障害に対する薬物の評価にも我々の用いている測定系が利用できることを示唆しており、今後、生体計測用 ESR の応用がますます期待される。

参考文献

- 1) Feldman, A., Wildman, E., Bartolinini, G., Piette, L. H.: *In vivo* electron spin resonance in rats, *Phys. Med. Biol.*, **20**, 602-612 (1975)
- 2) 内海英雄、濱田 昭、河野雅弘: 電子スピン共鳴スペクトル装置、*Pharm. Tech. Japan*, **6**, 1329-1335 (1990)
- 3) Utsumi, H., Masuda, S., Muto, E., Hamada, A.: *In vivo* ESR studies on pharmacokinetics of nitroxide radicals in whole mice. *Oxidative Damage & Repair: Clinical, Biological and Medical Aspects.* (ed. K. J. A. Davies), Pergamon Press, New York, pp. 165-170 (1991)
- 4) Lai, C-S., Komarov, A. M.: Spin Trapping of Nitric Oxide Produced *in vivo* in Septic-Shock Mice, *FEBS Letters*, **345**, 120-124 (1994)
- 5) Quaresima, V., Takehara, H., Tsushima, K., Ferrari, M., Utsumi, H.: *In vivo* Detection Mouse Liver Nitric Oxide Generation by Spin Trapping Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 729-734 (1996)
- 6) Utsumi, H., Muto, E., Masuda, S., Hamada, A.: *In vivo* ESR Measurement of Free Radicals in Whole Mice. *Biochem. Biophys. Commun.*, **172**, 1342-1348 (1990)
- 7) Utsumi, H., Takeshita, K.: *In vivo* ESR measurement of free radical reactions in living animals using nitroxyl probes in "Bioradicals detected by ESR spectroscopy", Ed. by H. Ohya-Nishikawa & L. Packer, Birkhaeuser Verlag, Basel, pp. 321-334 (1995)
- 8) Miura, Y., Utsumi, H., Hamada, A.: Antioxidant Activity of Nitroxide Radicals in Lipid Peroxidation of Rat Liv-

- er Microsomes. Arch. Biochem. Biophys., **300**, 148-156 (1993)
- 9) Yamaguchi, T., Itai, S., Hayashi, H., Soda, S., Hamada, A., Utsumi, H.: *In vivo* ESR studies on pharmacokinetics and metabolism of parenteral lipid emulsion in living mice, Pharm. Res., **13**(5) 729-733 (1996)
 - 10) Gomi, F., Utsumi, H., Hamada, A., Matsuo, M.: Aging Retards Spin Clearance from Mouse Brain and Food Restriction Prevents its Age-Dependent Retardation. Life Science, **52**(25) 2027-2033 (1993)
 - 11) Miura, Y., Utsumi, H., Hamada, A.: Effect of Inspired Oxygen Concentration on *in vivo* Redox Reaction of Nitroxide Radicals in Whole Mice. Biochem. Biophys. Res. Commun., **182**, 1108-1114 (1992)
 - 12) Miura, Y., Hamada, A., Utsumi, H.: *In vivo* ESR Studies of Antioxidant Activity on Free Radical Reaction in Living Mice Under Oxidative Stress. Free Rad. Res., **22**, 209-214 (1995)
 - 13) Utsumi, H., Takeshita, K., Miura, Y., Masuda, S., Hamada, A.: *In vivo* EPR measurement of Radical reaction in whole mice, Free Radical Res. Comms. **19**, ss219-225 (1993)
 - 14) Takeshita, K., Utsumi, H., Hamada, A.: ESR Measurement of Radical Clearance in Lung of Whole Mouse. Biochem. Biophys. Res. Commun., **177**, 874-880 (1992)
 - 15) Takeshita, K., Utsumi, H., Hamada, A.: Whole Mouse Measurement of Paramagnetism-Loss of Nitroxide Free Radical in Lung with L-Band ESR Spectrometer. Biochem. Mol. Biol. Int., **29**, 17-24 (1993)
 - 16) Hoch, M. J. R., Day, A. R.: Imaging of Paramagnetic Centres in Diamond. Solid State Commun. **30**, 211-213 (1979)
 - 17) Berliner, L. J., Fujii, H.: Magnetic Resonance Imaging of Biological Specimens by Electron Paramagnetic Resonance of Nitroxide Spin Labels. Science **227**, 517-519 (1985)
 - 18) Ishida, S., Matsumoto, S., Yokoyama, H., Mori, N., Kumashiro, H., Tsuchihashi, N., Ogata, T., Yamada, M., Ono, M., Kitajima, T., Kamada, H., Yoshida, E.: An ESR-CT imaging of the head of a living rat receiving an administration of a nitroxide radical. Magn. Reson. Imaging, **10**, 109-114 (1992)
 - 19) Alecci, M., Colacicchi, S., Indovina, P. L., Momo, F., Pavone, P., Sotgiu, A.: Three-dimensional *in vivo* ESR imaging in rats. Magn. Reson. Imaging, **8**, 59-63 (1990)
 - 20) 増水章季、建部卓司、増田貞夫、武藤江美子、内海英雄、濱田 昭：ESR-CT装置の試作、磁気共鳴と医学、**2**, 63-68(1991)
 - 21) Utsumi, H., Ichikawa, K., Takeshita, K.: *In vivo* ESR measurements of free radical reactions in living mice, Toxicology Letters, **82/83**, 561-565 (1995)

脳と活性酸素・フリーラジカル

森 昭 胤

Reactive Oxygen Species and Central Nervous System

Akitane Mori

Department of Molecular and Cell Biology, University of California at Berkeley,
251 Life Science Addition, Berkeley, CA 94720-3200, U. S. A.

Abstract

The brain and nervous system are especially prone to free radical damage since the membrane lipids are very rich in polyunsaturated fatty acid side chains, and areas of the human brain are rich in iron which plays an essential role in generating reactive oxygen species. In addition, the brain reportedly utilizes about one-fifth of the oxygen taken in the body each day. Therefore, neurons are especially vulnerable to free radical attack.

On the other hand, brain contains both enzymatic and non-enzymatic antioxidants against free radical damage. The enzymatic antioxidants include catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Known non-enzymatic antioxidants include α -tocopherol, β -carotene, estrogen, ascorbic acid, glutathione, uric acid, α -lipoic acid and monoamines and their metabolites. They are the prevent defense system against free radical attack in the healthy condition. However, impaired defenses or exposure to excess free radicals can lead to neuronal damage. Such neuronal damage may be involved in the degeneration of neurons seen in epilepsy, schizophrenia, tardive dyskinesia, normal aging, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and emotional stress.

In this paper, roles of superoxide anion, hydroxyl radical, transition metals, nitric oxide and also guanidino compounds in the neuronal cell damage are reviewed and discussed, especially regarding to neurological and psychiatric disorders.

- er's disease. *Ann. Neurol.* **36**: 747-751, 1994.
- 54) Sinet, P. M.: Metabolism of oxygen derivatives in Down's syndrom. *Ann. NY Acad. Sci.* **386**: 82-94, 1982.
- 55) Subbarao, K. V., Richardson, J. S. and Ang, L. C.: Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vivo. *J. Neurochem.* **55**: 342-345, 1988.
- 56) Birchall, J. D, and Chappel, J. S.: Aluminum, chemical physiology and Alzheimer's disease. *Lancet* **11**: 1008-1010, 1988.
- 57) Gutteridge, J. M. C., Quinlan, G. J. and Clark, I.A. et al.: Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochem. Biophys. Acta* **835**: 441-447, 1985.
- 58) Behl, C., Davis, J. B. and Lesley, R. et al.: Hydrogen peroxide mediates amyloid- β -protein toxicity. *Cell* **77**: 817-827, 1994.
- 59) Hensley, K., Carney, J. M. and Mattson, M. P. et al.: A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide; Relevance to Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 3270-3274, 1994.
- 60) Games, D., Adams, D. and Alessandrim, R. et al.: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717FB-amyloid precursor protein. *Nature* **373**: 523-527, 1995.
- 61) Sosnovskii, A. S. and Kozlov, A. V.: Increased lipid peroxidation in the rat hypothalamus after short-term emotional stress. *Biull. Eksp. Biol. Med.* **1113**: 486-488, 1992.
- 62) Nilovas, N. S. and Polezhaeva, L. N.: Lipid peroxidation in slices of rat olfactory cortex under longterm potentiation. *Fizion. Zh. Im. I. M. Sechenova* **80 (8)**: 43-47, 1994.
- 63) Taranova, N. P., Nilova, N. S. and Polezhaeva, L. V. et al.: Lipid peroxidation in the rat brain under neurotization conditions. *Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova* **80 (3)**: 43-49, 1994.
- 64) Liu, J., Wang, X., and Shigenaga, M. K. et al.: Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein and DNA in the brain of rats. *FASEB J.* (in press) 1996.
- 65) Liu, J., Shigenaga, K. and Mori, A. et al.: Free radicals and neurodegenerative diseases: Stress and oxidative damage. M. Hiramatsu, T. Yoshikawa. and L. Packer (eds.) Academic Press. New York. Free Radicals in Brain Physiology and Disorders. (inpress) 1996.
- 66) Mori, A., Mizukawa, K. and Kabuto, H. et al.: Nitroglycerin relieves emotional stress-induced stomach ulcers in rats. *Int. J. Stress Manag.* **1**: 299-307 1994.

I. はじめに

脳はそのエネルギー生成をほとんどグルコースの酸化的代謝に依存している。また、脳のエネルギー代謝は極めて活発であり、重量比では全体量の約2.5%しかない脳の酸素 (O_2) 消費量は全体の20%にのぼる。そのような活発な酸素代謝に対して、正常な中枢神経系においては酵素系および非酵素系を含む極めて強力な防御機構が備わっており、潤滑な脳の機能活動が保証されている¹⁾。他面、脳は化学的構成成分として、細胞膜成分の不飽和脂質や神経伝達物質であるカテコールアミンなどの容易に酸化されやすい物質を豊富に含んでおり、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が異常発生し、それに対する抗酸化機構との平衡が破綻をきたした、いわゆる“酸素ストレス”の状況下では、極めて傷害を受けやすい組織である。

近年、中枢神経系における ROS の役割が、多くの疾患と関連して研究がすすめられ、多くの情報が集積されてきた²⁻⁶⁾。ここでは中枢神経系における ROS の特徴と、それによってもたらされる分子細胞傷害および、ROS の病因への関与様式が解明されつつある脳虚血と浮腫、脳血管攣縮、外傷性てんかん、パーキンソン病、アルツハイマー病、情動ストレスなどについて概説する。

II. 中枢神経系の活性酸素種

生体内に摂取された酸素 (3O_2) は諸組織に供給され、その90%以上は細胞内においてミトコンドリア電子伝達系：チトクロームオキシダーゼにより順次4電子還元されて水 (H_2O) になるが、その過程は常に酵素に結合したまま反応が進み、その課程 (コンプレックス I および III) で生ずるスーパーオキシド (O_2^-) 漏出は極めて少量で、健常状態では、 O_2^- 消去酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) のほか、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオンレダクターゼなどの抗酸化酵素、及び α -トコフェロール、 β -カロチン、アスコルビン酸、グルタチオン、尿酸、 α -リポ酸あるいはモノアミンなどの低分子抗酸化物質によって直ちに消去される。しかし、過剰の酸素が負荷される場合はこれらの防御機構が破壊をきたすことも知られている。例えば、自然環境の地表面の空気の O_2 含有量は21%であるが、高濃度酸素吸入や高圧酸素療法などにより、体内への O_2 の摂取量が異常に増加するような場合には、ミトコンドリア電子伝達系の破綻が起これ、 O_2^- が漏出するので、中枢神経においても、種々の形の神経傷害を引き起こすことになる。ダイビングや高圧酸素療法でしばしば認められるけいれん発作などは酸素ストレスの症状の1つといえよう。

中枢神経系における O_2^- の発生は上述のミトコンドリア電子伝達系のほかにアラキドン酸カスケードによる酵素的酸化過程で常時行われている。また、炎症や虚血時にはキサンチンデヒドロゲナーゼが O_2^- 発生を伴うキサンチンオキシダーゼに変換することによっても起こる⁷⁾。また脳のミクログリアはマクロファージと同様に感染微生物に対する防御のために O_2^- を分泌することが知られている⁸⁾

中枢神経系で問題になる ROS には O_2^- の他、過酸化水素 (H_2O_2) とヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) がある。 H_2O_2 はフリーラジカルではないが共有結合分子で、ROS の仲間といえる。これらのうち、 O_2^- や H_2O_2 の反応性あるいは細胞傷害性は $\cdot OH$ に比べるとはるかに弱いが、生体内では鉄や銅などの遷移金属が共存すると、Fenton 反応あるいは鉄イオン媒介 Harber-Weiss 反応により反応性の強い細胞毒性の $\cdot OH$ に変換する。

パーキンソン病患者黒質の高濃度の鉄 (Fe^{2+} /メラニン複合体)⁹⁾、脳内出血・溢血に伴ない赤血球から遊離するヘモグロビン (Hb)^{10,11)} のほか Wilson 病の脳や肝に沈着する銅¹²⁾ はいずれも O_2^- や H_2O_2 から細

胞毒性の強い $\cdot\text{OH}$ への変換を促進すると考えられる。哺乳動物の体内で問題となる遷移金属は主として鉄であるが、鉄は、細胞内では種々のフェリチンとして貯えられていて、これらの蛋白結合鉄は H_2O_2 と反応して $\cdot\text{OH}$ を生成することはないとされていたが、最近、一酸化窒素 (NO) がフェリチンから鉄を遊離させ、後述する鉄イオン媒介脂質過酸化反応を促進すること¹³⁾が明らかとなった。なおHbやミオグロビンは過剰の H_2O_2 により鉄イオンを遊離することや、Hbは H_2O_2 と反応して $\cdot\text{OH}$ を発生させ、脂質を過酸化することが知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。

NOは血管平滑筋由来の弛緩因子 (EDRF) として、あるいは免疫性刺激すなわちマクロファージの腫瘍細胞などに対する毒性作用に関して知られているのみならず、中枢神経系においては神経伝達系のセカンド・メッセンジャーとしての小脳の長期抑圧¹⁷⁾および海馬¹⁸⁾長期増強など学習のメカニズムであるシナプス可塑性に関与しているほか、興奮性アミノ酸による神経細胞死¹⁹⁾にも関与しているといわれている。脳では一酸化窒素合成酵素 (NOS) はNADPHとCa/カルモジュリン依存性にアルギニンからNOとシトルリンを合成するが、アルギニン濃度が低い場合には、併せてCa/カルモジュリン依存性に O_2^- を発生すること、またある条件下では H_2O_2 を生成することが明らかにされている^{20,21)}。小脳顆粒細胞 (培養) の興奮性アミノ酸NMDAレセプターを刺激すると O_2^- が発生することが最近報告されている²²⁾が、この O_2^- の発生はNOSの活性と関係があるかもしれない。なお、NOのラジカルの不対電子は窒素原子 (N) と酸素原子 (O) との間で共鳴安定構造をもつので、対応により $\cdot\text{NO}$ あるいは $\text{NO}\cdot$ と示すことができ、 $\text{NO}\cdot$ は活性酸素の仲間といえることができる。

NOは O_2^- と反応するとperoxinitrite、 $^-\text{OONO}$ になるが、酸性条件下 ($\text{pK}_a=6.8$) ではperoxynitrous acid, ONOOH となり、分解すると $\cdot\text{OH}$ と NO_2 になり、 $\cdot\text{OH}$ の細胞毒性を発揮する。一方、NOは鉄複合体、 H_2O_2 及び $\cdot\text{OH}$ の細胞毒性を防御することも知られており、脳においてはROSスカベンジャーとして作用している可能性も示唆されている²³⁾。

III. 活性酸素種による細胞傷害

なんらかの理由で組織の局所に異常高濃度の鉄や銅イオンと H_2O_2 が共存するような状況下では $\cdot\text{OH}$ が発生して、DNA鎖、蛋白質やアミノ酸の $\cdot\text{SH}$ 基、細胞膜の不飽和脂質などと強く反応し、細胞傷害をきたす。特にDNA損傷はほとんどDNAに結合したり、その付近に存在する鉄あるいは銅イオンにより媒介されて H_2O_2 と反応して生ずる $\cdot\text{OH}$ によると考えられており、 $\cdot\text{OH}$ は直接DNA塩基を修飾したり、DNA鎖やデオキシリボースを破砕して細胞死に至らせる²⁴⁾。

次にROSが不飽和脂質の過酸化反応を引き起こすことはよく知られているが、特に $\cdot\text{OH}$ の作用は強く、不飽和脂質を豊富に含有している脳細胞は特に攻撃されやすい。 $\cdot\text{OH}$ は細胞膜を構成している二重層の不飽和脂質 (Lipid-H) の水素原子 (H) を引き抜き、アルキルラジカル (Lipid \cdot) を生成するが、好氣的条件下ではLipid \cdot は O_2 と反応してペルオキシラジカル (Lipid- $\text{O}_2\cdot$) となる。そしてLipid- $\text{O}_2\cdot$ は新たに他分子の脂質 (Lipid-H) のHを引き抜きLipid \cdot とするとともに自らは非ラジカルの脂質ヒドロペルオキシド (Lipid- O_2H) となる。これらの脂質過酸化反応 (Lipid peroxidation) は連鎖反応として次々と隣接する不飽和脂質を攻撃し、細胞膜に重篤な傷害を与えることになる。特に神経細胞においては、膜の流動性の低下、イオンチャンネルの変化がおこるが、 Ca^{2+} の流入は神経組織の脂質過酸化を顕著に促進させる²⁵⁾ばかりでなく、 Ca^{2+} 依存性の酵素であるホスホリパーゼ A_2 の賦活によってアラキドン酸カスケードからのROSの発生を促進したり、エンドヌクレアーゼの賦活によってDNAを破砕するなど多くの酵素

系を介して細胞傷害の原因となる可能性がある。また神経細胞膜イオンチャンネル機構である Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性の抑制は神経細胞機能障害を引き起こし、脳浮腫の直接的原因となる²⁶⁾。

また、ROS によって生成された脂質ペルオキシラジカルやヒドロペルオキシドはさらに過酸化されて、マロンジアルデヒドや4-ヒドロキシノネナールなどのごとき細胞毒性の強いアルデヒド類を生成する²⁷⁾。また、脂質の過酸化によりセロトニンやドーパミンレセプターの機能が低下すること^{28,29)}が報告されている。

また、ROS の中枢神経系における作用の1つとして、海馬における興奮性アミノ酸の放出を促進することが知られている³⁰⁾。一方、ROS はある種の酵素を失活させることが知られているが、特に脳に関しては、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸を無害なグルタミンに変換するグルタミン合成酵素を O_2^- が失活させることが明らかにされている³¹⁾。したがって、そのような状況下ではグルタミン酸が過剰蓄積することになり、これが虚血後などの興奮性アミノ酸 NMDA レセプターの過剰刺激に基づく神経細胞死（アポトーシス）の重要な因子の1つになると想定されている。また、グルタミン酸レセプターアゴニスト（NMDA、カイニン酸、AMPA）は ROS の発生を促進することが最近報告され³²⁾ ROS と興奮性アミノ酸レセプターとの相互作用がより明確化されてきた。

その他の ROS の中枢神経系における反応として、神経毒性のメチルグアニジンやグアニジノ酢酸などのグアニジノ化合物生成反応がある。これらのグアニジノ化合物のうちメチルグアニジンはクレアチニンの O_2^- あるいは $\cdot\text{OH}$ による分解反応を介して生成される³³⁾が、一般に腎不全の毒性物質であることは広く知られており、中枢神経系においては内因性のけいれん物質であることが明らかにされている³⁴⁾。さらに、最近われわれによってグアニジノ化合物は自動酸化により ROS を発生することが観察され³⁵⁾、後述のごとく頭部外傷後遺症、特に外傷性てんかんの成因として重要な役割をはたしていることが明らかにされている（Fig. 1）。

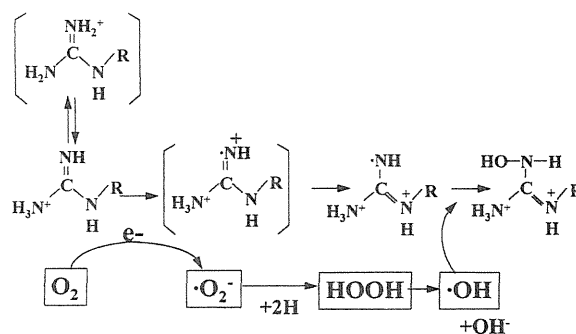


Fig. 1 Possible mechanism for reactive oxygen species generation by oxidation of guanidino compound

IV. 活性酸素種と中枢神経疾患

1. 脳虚血と浮腫

脳虚血時には過剰の ROS が発生し、脳浮腫などの損傷の原因となることが知られている。脳虚血あるいは頭部外傷の際の ROS の発生源は大別して、アラキドン酸カスケードを介するものと、溢血・溶血により遊離したヘモグロビン (Hb) あるいは鉄イオンを介する反応とにわけられる。

実験的研究によると、頭部外傷時には脳酸素消費量が低下し、ATP 産生が減少し、 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性が低下する。そのため、細胞膜を介しての K^+ 流失と Na^+ 流入、すなわち脱分極が起こり、細胞膜電位依存性の Ca チャンネルのゲートが開き Ca^{2+} が流入する。この Ca^{2+} 濃度の上昇によりホスホリパーゼ A_2 活性が亢進し、細胞膜内のリン脂質からその構成成分であるアラキドン酸 (AA) が過剰に切り出されてくる。この AA の遊離が ROS の発生とそれに続く脳浮腫などの脳傷害の原因となる。

AA カスケードのうち、プロスタグランジン (PG) G_2 から PGH_2 への変換のさいに産生されるフリーラ

ジカル ($\cdot R$) は脳微細血管の傷害を引き起こすとされており、実際に AA や PGG₂ を脳表に投与すると脳微細動脈傷害が発生する³⁶⁾。他方、AA を脳内に注入すると脳浮腫が発生するが、ロイコトリエン A₄ の脳内注入によっても脳浮腫が発生するので、5-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (5-HPETE) 由来の O₂⁻ が細胞膜傷害に関与している以外に、産生されたロイコトリエンもまた脳浮腫に関与していると想定されている³⁷⁾。その他、15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (15-HPETE) は脳微細血管壁の Na⁺、K⁺-ATPase のみを特異的に活性化して、Na⁺ を血管内から脳実質内へ輸送し、水分を蓄積させて脳浮腫を発生させることも知られている³⁸⁾。

2. 脳血管攣縮

イヌの脳室内に 5-HPETE を投与すると、直後より数時間にわたって脳底動脈が収縮し、さらに3日目後からは二次性の収縮がおこること³⁹⁾や、ROS が脳血管内膜細胞の培養に悪影響を与えること⁴⁰⁾などから、脳血管攣縮とそれに伴う循環血液量の低下に ROS が関係することが示唆されている。

さらに、くも膜下出血のさい、凝血塊からオキシヘモグロビンが遊離し、ヘモグロビンあるいは鉄イオン由来の $\cdot OH$ や O₂⁻ が産生され、血管内皮の脂質の過酸化が引き起こされ、ついで、血管内皮が傷害された結果、内因性の血管拡張因子であるプロスタサイクリンの産生が低下し、上述の PGH₂ 由来のトロンボキサン A₂ やプロスタグランジン F_{2 α} などによる血管収縮効果に対応できなくなり、血管が攣縮を起こすことが想定されている³⁹⁾。一方、ROS が血管内皮由来弛緩因子 (EDRF: NO) を不活性するため血管の攣縮が起こることも想定されている。すなわち、EDRF の効果を SOD が延長し、Fe²⁺ が短縮すること⁴¹⁾などから、くも膜下出血後の血管攣縮機構として EDRF 系を介するフリーラジカル傷害説が提唱されている。

3. 外傷性てんかん

頭部外傷性てんかんの場合には脳内に出血した赤血球から遊離した鉄成分を介しての ROS 発生が重視されている。鉄イオン (Fe²⁺ あるいは Fe³⁺) あるいは Hb を大脳皮質感覚運動領野に注入すると、発作波 (脳波記録) が出現し、ついで慢性てんかん焦点が形成される⁴²⁻⁴⁴⁾。

われわれ^{11,44)}は鉄イオンあるいは Hb をラット脳内組織に負荷すると $\cdot OH$ などの ROS が異常に発生し、細胞膜脂質の過酸化の亢進がおこり、神経細胞の電気生理的活動を保つために必要な Na⁺、K⁺-ATPase の障害をもたらすことを見だし、これらが特に受傷1週間以内に発生するいわゆる「早期けいれん」の原因となると想定している。一方、われわれは内因性のけいれん物質⁴⁴⁾であるメチルグアニジンやグアニジノ酢酸などが鉄誘導てんかん焦点組織内に慢性的に異常発生していることを明らかにしている¹¹⁾が、これらのグアニジノ化合物は側頭葉てんかんのモデル動物であるキンドリングてんかんラットにおいても慢性的に異常増加していることが見いだされ^{45,46)}慢性てんかん発作の成因に密接に関係していることが示唆されている。このさい、前述のごとく、これらのグアニジノ化合物は、酸素の存在下では自動酸化され、ROS (O₂⁻、H₂O₂、 $\cdot OH$) の発生源となり³⁵⁾、H₂O₂ は鉄イオンあるいは Hb と反応して $\cdot OH$ を生成し、また O₂⁻ 及び $\cdot OH$ は細胞膜脂質の過酸化反応へと利用されるといふ vicious circle を形成するものと考えられる。なお、このような ROS によって開始された神経細胞内傷害は最終的にはグルタミン酸やアスパラギン酸などの興奮性神経伝達物質および γ -アミノ酪酸などの抑制性神経伝達物質及び調節物質の異常をきたすところとなり、大脳内にてんかん発作焦点を形成すると想定される⁴⁷⁾ (Fig. 2)。

4. パーキンソン病

パーキンソン病 (PD) の主病変は黒質線状体のドーパミン (DA) 作動性神経の脱落であるが、この過程にも ROS の関与が想定されている。すなわち、PD 患者にはミトコンドリアのコンプレックス I の機能欠損⁴⁸⁾が認められているほか、従来知られていたように黒質における鉄 (Fe^{3+} /メラニン複合体) 含有量の増加、脂質酸化の亢進、ペルオキシダーゼ活性とカタラーゼ活性の低下、SOD 活性の亢進およびグルタチオン含有量の低下が認められる⁴⁹⁾。

DA は神経終末の小胞内に蓄えられているが、一部は細胞質内にも存在しており、細胞質内の DA はモノアミン酸化酵素 (MAO_B) により酸化的脱アミノ化され、その際 H_2O_2 が発生する。その H_2O_2 がカタラーゼ活性の低下などの何らかの原因で蓄積すると鉄イオンとの反応により $\cdot\text{OH}$ が発生し、続いて細胞膜脂質過酸化反応がはじまる。また、PD で黒質内に増加しているフェリチン自体も直接脂質酸化反応を開始する。PD 患者の黒質には SOD 活性が亢進しているが、SOD によって過剰に生成される H_2O_2 は PD の脳内病的反応にさらに拍車をかけることになる。最近、われわれは PD の治療薬である L-DOPA を大量投与した場合には L-DOPA 自身のラジカル化を介して、PD 脳内の ROS による脂質過酸化反応を増強し、PD における神経細胞変性を促進する場合のあることを明らかにしている⁵⁰⁾。

1-メチル-4-フェニルピペリジン (MPTP) は動物に PD の症状を惹起するので PD の実験モデル動物作成に使用されているが、最近 MPTP をマウスに投与すると NO による蛋白傷害の指標とされる 3-ニトロチロジンが増加すること、およびこの増加は NOS 阻害剤 (7-ニトロインダゾール) によって抑制されることが明らかになり、少なくとも MPTP による PD の病態には NO の関与していることが示唆された⁵¹⁾。

5. アルツハイマー病

アルツハイマー病 (AD) に関しても、その病態と ROS との関係を示唆する多くの報告がある。まず、AD の脳機能不全は脳の DNA 損傷によるとされているが^{52,53)}、その損傷は ROS によることが想定されている^{5,6)}。最近の AD 患者脳の前頭葉の核 DNA の oxo8dG (DNA 酸化損傷の指標) 量は同年齢対照人に比しわずかしか増加していなかったが、ミトコンドリア DNA のものは3倍に増加しておりミトコンドリア DNA の損傷が AD の病態に深く関与していることがわかった⁵³⁾。

早期発症の家族性 AD にはしばしばダウン症候群の患者にみられる染色体異常、すなわち第21染色体が3本ある奇形 (トリソミー-21) が認められるが、 O_2^- 消去酵素 Cu、Zn-SOD は第21染色体上に存在しており、したがってトリソミー-21の患者の Cu、Zn-SOD 活性は正常人の50%増加している^{8,54)}。Cu、Zn-SOD とその mRNA は特に海馬錐体細胞に多い。したがってそのような場合には細胞内の SOD により生成される H_2O_2 が過剰となり、先述の諸疾患にみられたと同様の機序で細胞傷害をきたすことになる。また AD の DNA 損傷は細胞内の鉄を恒常的に処理している蛋白の生成にも関係しており、AD 脳の鉄処理不全とそれに帰因する脂質過酸化を示す剖検例が報告されている⁵⁵⁾。

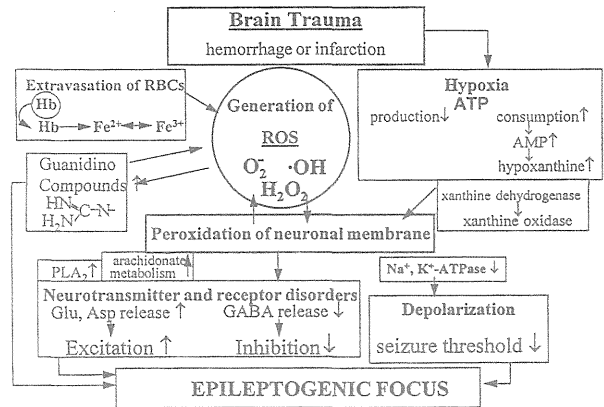


Fig. 2 Involvement of reactive oxygen species in pathogenesis of posttraumatic epilepsy

また、アルツハイマー病の病理的变化はアルツハイマー神経原線維変化と老人斑を特徴とするが、これらの生成についても同様な ROS の関与様式を想定することができる。例えば、AD の病因にアルミニウムの関与が想定されているが、アルミニウムは神経線維異常を来たした神経細胞中に見いだされており、老人斑の中心のコアにも非結晶のケイ酸アルミニウムが検出される⁵⁶⁾。アルミニウムそれ自体には脂質酸化促進作用はないが、鉄輸送蛋白であるトランスフェリンとの親和性が高く、またアルミニウムは鉄イオン媒介性の過酸化を促進する⁵⁷⁾ので、老人斑内あるいは付近に鉄が蓄積すると、ROS 発生とそれに続く過酸化反応を引き起こす可能性がある。

最近老人斑の主構成要素である β -アミロイド蛋白 (β /A4) が注目されているが、 β /A4 の神経細胞に対する毒性は H_2O_2 によって媒介されていることが想定されている⁵⁸⁾。また、AD の神経細胞損傷には β -アミロイドペプチドの分解の際発生する ROS が関与している可能性が示されている⁵⁹⁾。他方、従来 AD の病理解明のための適当な実験モデル動物がなかったが、最近、AD のトランスジェニックマウスが開発された⁶⁰⁾ので、ROS の関係様式も含めて AD の実験病理学的解明が促進されることが期待されている。

6. 情動ストレス

情動ストレスが生体に酸化的損傷を与えることが明確化されつつある。われわれは情動ストレスの実験モデルとして、ラットの腹部を上位にして数時間固定する拘束ストレス実験の結果から、そのようなストレスによって脳の脂質過酸化反応が促進し⁶¹⁾、またグルタチオンペルオキシダーゼが活性化され、それによってもなると SOD やグルタチオントランスフェラーゼ活性が低下すること^{62,63)}、などを明らかにしてきた。われわれはさら拘束ストレスにより、大脳の脂質過酸化が促進し、細胞膜流動性が変化し、さらに Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性が低下し、またドーパミン及びセロトニンニューロンが活性化することを見いだした^{64,65)}。なお、そのさいラットは胃出血・潰瘍をともなうが、拘束時にグルタチオンを投与しておく、これらの症状は現われず、また上記の酸化的損傷も軽減していた。また、拘束実験時にトリニトログリセリンを投与することによっても胃出血・潰瘍が軽減されるので、拘束ストレスによる ROS の発生が示唆されると同時に、それに対する NO の予防 (O_2^- 消去) 効果が示唆される⁶⁶⁾。

さらに、蛋白酸化の指標として蛋白カーボニル、及び DNA の酸化損傷の指標として oxo8dG を測定すると、いずれも脳の特定位で増量しており、情動ストレスが脳蛋白および核酸にまで変化を及ぼすという深刻な知見が得られた⁶⁴⁾。なお、情動ストレスによる過酸化反応のメカニズムとして、ストレスによって副腎より分泌されるグルココルチコイドやカテコールアミンの異常代謝、およびストレスによる脳循環系の不全を介しての神経系の損傷などが想定される⁶⁵⁾、さらに今後の実験的検討が待たれる。

V. むすび

フリーラジカル反応は正常な生体反応の一部であるが、過剰の ROS の発生 (酸素ストレス) は細胞・組織の傷害を引き起こす。中枢神経系は酸素ストレスによる傷害を受けやすい素地をもっているが、その傷害は神経伝達など中枢神経系特有の機能不全に結びつき、種々の神経系疾患の原因や病態と関わり合うことになる。ここでは脳における ROS の一般的な問題について概説し、それらの関与するいくつかの疾患、すなわち脳虚血、外傷性てんかん、パーキンソン病、アルツハイマー病、情動ストレスなどについての研究の現況を述べた。その他、中枢神経系に関連あるものとして分裂病、遅発性ジスキネジア、アルコール症、網膜損傷、脊髄損傷、多発性硬化症、早老などが ROS と関係あるとされており、また老化、腫瘍、

炎症、ショック、AIDSなどは他臓器と共通のメカニズムでROSとの関わり合いが論じられている。しかしこれらの多くの疾患や病態については必ずしも十分な病因論的メカニズムが解明されているわけではなく、近い将来、諸疾患の原因や病態へのROSの関与様式に関する情報がさらに蓄積されることが期待されている。

参考文献

- 1) Mori, A., Liu, J., Wang, X. and Kawai, M.: Free radical scavenging by brain homogenate: Implication to free radical damage and antioxidant defense in brain. *Neurochem. Int.* **24**: 201-207, 1994.
- 2) Hall, E. D.: Free radical and NOS injury. *Critical Care Clinics* **5**: 793-805, 1989.
- 3) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Method Enzymol.* **186**: 1-85, 1990.
- 4) Jesberger, J. A. and Richardson, J. S.: Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Interl. J. Neuroscience* **57**: 1-17, 1991.
- 5) Packer, L., Prillipko, L., and Christen, Y.: *Free Radicals in the Brain: Aging, neurological and mental disorders.* Springer-Verlag, Berlin 1992.
- 6) Bandy, S. C. and Label, C. P.: The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Rad. Biol. Med.* **14**: 633-642, 1993.
- 7) McCord, J. M.: Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Feder. Proc.* **46**: 2402-2406, 1987.
- 8) Colton, C. A. and Gilbert, D. L.: Production of superoxide anion by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Letter* **223**: 284-288, 1987.
- 9) Youdim, M. B. H. and Ben-Shacher, D.: Iron-melanin interaction in substantia nigra as the neurotoxic component of Parkinson's disease.. II International conference on basic and therapeutic strategies for Alzheimer's and Parkinson's Disease., Kyoto, **55**, 1989.
- 10) Mori, A., Hiramatsu, M. and Edamatsu, R., et al.: Possible involvement of oxygen free radical in the pathogenesis of post-traumatic epilepsy. O. Hayaishi et al. (eds.) Elsevier, Amsterdam, *Medical Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals.* 1249-1252, 1989.
- 11) Mori, A., Hiramatsu, M. and Yokoi, I.: Posttraumatic epilepsy, free radicals and antioxidant therapy. L. Packer, L. Prillipko and Y. Christen (eds.), Springer Verlag, Berlin, *Free Radicals in the Brain*, 109-122. 1992.
- 12) Scheinbar, I. H. and Strenlieb, I.: *Wilson's Disease.* Saunders, Philadelphia, 1984.
- 13) Reif, D. W. and Simons, R. O.: Nitric oxide mediates iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**: 537-541, 1990.
- 14) Sadradeh, S. M. H., Panter, S. S. and Hallaway, P. E. et al.: Hemoglobin-Abiological Fenton reagent. *J. Biol. Chem.* **259**: 14354-14356, 1984.
- 15) Kanner, J., German, J. B. and Kinsella, J. E.: Initiation of lipid peroxidation in biological system. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **25**: 317-374, 1987.
- 16) Puppo, A. and Halliwell, B.: Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton catalyst? *Biochem. J.* **249**: 185-190, 1988.

- 17) Shibuki, K. and Okada, D.: Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* **349**: 326-328, 1991.
- 18) Bohme, G. A., Bon, C. and Stutzmann, J. M., et al.: Possible involvement of nitric oxide in longterm potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* **199**: 379-381, 1991.
- 19) Dawson, V. L., Dawson, T. M. and London, E. D. et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6368-6371, 1991.
- 20) Heinzl, B., John, M. and Klatt, P. et al.: Ca^{2+} /Calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.* **281**: 627-630, 1992.
- 21) Pou, S., Pou, W. S., Bredt, D. S. et al.: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 24173-24176, 1992..
- 22) Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcaes, M. et al.: NMDA-dependant superoxide production and neurotoxicity. *Nature* **364**: 535-537, 1993.
- 23) Chiueh, C. C.: Neurobiology of $\text{NO}\cdot$ and $\cdot\text{OH}$: Basic Research and Clinical Relevance. The Neurobiology of $\text{NO}\cdot$ and $\cdot\text{OH}$. *Ann. NY Acad. Sci.* **739**: 279-281, 1994.
- 24) Halliwell, B. and Aruoma, O. I.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurment in mammalian system. *FEBS Letter* **281**: 9-19, 1991.
- 25) Braugher, J. M. and Hall, E. D.: Central nervous system trauma and stroke: I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* **6**: 289-301, 1989.
- 26) Mori, A., Watanabe, Y. and Yokoi, I.: Effect of ferric ion on activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in rat brain. *IRCS Med. Sci.* **14**: 707-708. 1986.
- 27) Esterbauer, H., Koller, E. and Heckenast, P. et al.: Cytotoxic lipid peroxidation products. *Prog. Clin Biol. Res.* **236A**: 245-252, 1987.
- 28) Mucke, S. F., Andersen, J. W. and Shih, J. C. et al.: Decreased [^3H] serotonin and [^3H] spiperon binding consequent to lipid peroxidation in rat cortical membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**: 1003-1010, 1982.
- 29) Andorn, A. C., Bacon, B. R. and Nguyen-Hunh, A. T. et al.: Guanyl nucleotide interactions with dopaminergic binding sites labeled by [^3H] spiroperidol in human caudate and putamen: Guanyl nucleotides enhance ascorbate-induced lipid peroxidation and cause an apparent loss of high affinity binding sites. *Mol. Pharmacol.* **33**: 155-162, 1988.
- 30) Pellegrini-Glamapietro, D. E., Cherichi, G., Alesiani, M. et al.: Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.* **51**: 1960-1963, 1988..
- 31) Schor, N. F.: Inactivation of mammalian brain glutamine synthetase by oxygen radicals. *Brain Res.* **456**: 17-21, 1988.
- 32) Bondy, S. C. and Lee, D. K.: Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* **610**: 229-233, 1993.
- 33) Nagase, S., Aoyagi, K. and Narita, M. et al.: Active oxygen in methylguanidine synthesis, *Neuron* **4**: 299-306. 1986.
- 34) Mori, A.: Biochemistry and neurotoxicology of guanidino compounds. History and recent advances. *Pavlov. J.*

Biol. Sci., 22: 85-94, 1987.

- 35) Mori, A., Kohno, M., Masumizu, T. and Packer, L.: α -Guanidinoglutamic acid as a free radical generator. *Biochem. Molecul. Biol. Int.* 37: 371-3741 1995.
- 36) Kontons, H. A., Wei, E. P., Povlishock, J. T. et al.: Cerebral arteriar damages by arachidonic acid and prostaglandin G₂. *Science* 209, 1242-1245, 1980.
- 37) Black, K. Land Hoff, J. T.: Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rat. *Am. Neurol.* 18: 349-351 , 1985.
- 38) Koide, T., Asano, T. and Matsushita, H. et al.: Enhancement of ATPase activity by a lipid peroxide of arachidonic acid in rat brain microvessels. *J. Neurochem.* 46: 235-242, 1986.
- 39) Sano, K., Asano, T. and Tanishima, T. et al: Lipid peroxidation as a cause of cerebral vasospasm. *Neurol. Res.* 2: 253-272, 1980.
- 40) Lo, W. D. and Betz, A. L.: Oxygen free radical reduction of brain capillary rubidium uptake.. *J. Neurochem.* 46: 394-398 1986.
- 41) Gryglecoski, P. J., Palmer, R. M. J. and Moncada, S.: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelilum-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-456, 1986.
- 42) Willmore, L. J., Hiramatsu, M., Kochi, H. and Mori, A.: Formation of superoxide radicals after injection of iron into rat isocortex. *Brain Res.* 277: 293-296, 1983.
- 43) Willmore, L. J., Sybert, G. W. and Musson, J. B.: Chronic focal epileptiform discharges induced by injection of iron into rat and cat cortex. *Science* 200: 150-153, 1978.
- 44) Mori, A., Hiramatsu, M. and Yokoi. I. et al.: Biochemical pathogenesis of post-traumatic epilepsy. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 25: 54-62l 1990.
- 45) Hirayasu, Y., Morimoto, K. and Otsuki. S.: Increase of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the brain of amygdala-kindled rats. *Epilepsia* 32: 761-76, 1991.
- 46) Simizu. Y., Morimoto, K., Kuroda, S. and Mori, A.: Sustained increase of methylguanidine in rats after amyddala or hippocampal kindling. *Epilepsy Res.* 21: 11-17, 1995.
- 47) Mori, A., Yokoi, I., Liu, J. and Mizukawa, K.: Oxidative stress and brain damage as the pahtogenesis of epilepsy. R. G. Cutler, L. Packer and A. Mori (eds), Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland, pp. 309-317. 1995.
- 48) Shapira, A. H. V., Cooper, J. M. and Dexter, D. et al.: Mitochondrial complex 1 deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54: 823-827, 1990.
- 49) Adams, J. D. Jr. and Orunze, I. N.: Oxygen free radical and Parkinson's disease. *Free Radical Biol. Med.* 10: 161-169, 1991.
- 50) Ogawa, N., Edamatsu, R. and Mizukawa, K. et al.: Degradation of dopaminergic neurons and free radicals. Possible participation of levodopa. *Adv. Neurol.* 60: 242-250, 1993.
- 51) Schulz. J. B., Matthews, R. T. and Muquit, M. et al.: Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem.* 64: 936-939, 1993.
- 52) Goldgaber, D., Lerman, M. I. and McBride, O. W. et al.; Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amiloid of Alzheimer's Disease, *Science* 235: 877-880. 1987.
- 53) Mecocci, P., MacGarrey, U. and Beal. M. F.: Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheim-

いる。全ての呼吸する生物はこのような酸素の毒性から身を守るために種々の防御機構を発達させてきた。それらには SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシターゼなどの酵素やビタミン E やグルタチオンなどの低分子量の抗酸化物がある。これらの消去機構に加えて、損傷を受けた高分子、特に損傷 DNA の修復機構が活性酸素に対する防御に関係があることが、大腸菌修復欠損、*polArecB* の 2 重変異体を用いた実験によって示されている¹⁾。また、大腸菌では種々のストレスによって活性酸素のフラックスを増加させると、活性酸素に対する防御や除去、また修復に重要な役割を持つ蛋白質が誘導合成されることが知られている²⁾。 O_2^- 生産剤^{3),4)}、methyl viologen (MV、パラコート) や plumbagin (PG) による SOD 誘導合成はよく知られている。適応応答もまた防御機構では重要な位置を占めていると考えられる。

哺乳類細胞での活性酸素に対する防御機構を組織的に明らかにするためには、遺伝学的立場に立つことも一つの方法である。即ち、細胞レベルで防御機構を考える時、活性酸素感受性変異株やヒト遺伝病細胞の持つ役割は重要であると思われる。分離されている電離放射線感受性変異株の多くは H_2O_2 やプレオマイシンなどにも感受性であり $OH\cdot$ に感受性が高いと考えられる。チャイニーズハムスター由来細胞を用いた変異株を相補するおよそ 10 個のヒト遺伝子がすでに染色体上にマッピングされ、また、いくつかの遺伝子が同定されている。電離放射線感受性変異株の研究は、 $OH\cdot$ による DNA 損傷とその修復機構の研究の側面ばかりでなく、細胞周期の制御、シグナル伝達系といった観点からも今後いっそう多くの分野と係わりながら発展することと思われる。これについては最近の総説⁵⁾を見られたい。

一方最近原因不明であった家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子が O_2^- の消去に関する Cu/Z-SOD 遺伝子であることが報告されて注目をあびた⁶⁾。しかし、SOD 遺伝子の変異がどのように疾病に関わっているかはまだ充分明らかではない。SOD 活性の低下は種々の疾患、老化などで見られる現象であるが、活性酸素ストレスによる SOD の誘導合成などを含めて、まだ未知の点が多い。我々は哺乳類細胞における O_2^- に関する防御適応機構の遺伝的な解明を目指して、CHO-K1 細胞よりプランバギン (PG) 感受性変異株を多数分離し、その解析を進めてきた。分離された変異株は、PG と同様に生体内で O_2^- を生成する MV にも交差感受性を示すことから、活性酸素に関する何らかの遺伝子に変異をもつと考えられる。この稿ではこれらの変異株の、種々の活性酸素生成薬剤に対する感受性と遺伝的解析について述べる。本論文の一部は既に発表してある^{7),8)}。

II. 実験方法

1. 細胞、培養、試薬

この研究で用いた野生株である CHO-K1 細胞は大日本製薬 (P133) から入手した。Ham's F12 培地に 5% の牛胎児血清を加えた培地を用い高湿度 CO_2 (5%) インキュベータ (37°C) で培養した。

用いた試薬は次の通りである。Plumbagin (PG)、ethyl methanesulfonate (EMS) : Aldrich Chemical (Milwaukee)。Methyl viologen (paraquat, MV, mitomycin C (MMC)、*cis*-diamine dichloride-platinum (II) (*cis*DDP)、adriamycin (ADM) : Sigma Chemical (ST. Louis)。PEG 1500 (50% (w/v)) : Boehringer Mannheim GmbH (Germany)。Menadione (Vitamin K3) (MD)、他の試薬は Nakarai Tesque (東京)。

2. 変異株の単離

対数増殖期にある細胞 (2×10^6 個) に 10 ml の新鮮な培地を加え、9 cm の培養皿の上にかき、3-4 時間静置後、これらに 400 $\mu\text{g/ml}$ (a) または 500 $\mu\text{g/ml}$ (b) の EMS を加え 16 時間培養した。生存率はそれぞれ

約10% (a)と3% (b)であった。変異原処理細胞をPBS(-)で洗浄し、トリプシン処理により浮遊状態とし、適当量を直ちに寒天培地 (0.4%寒天、6%牛胎児血清を含む) 上にまいた。10-14日後、寒天上に増殖したコロニー (1実験区で約1000個づつ) をそれぞれ2枚の寒天プレート (その1枚には5 μ g/mlのPGを含む) に爪楊枝を用い移した (レプリカプレート法)。数日後、PG含有プレートでは生育できないコロニーを対象プレートよりピックアップし、再びレプリカプレート法でテストした。候補コロニーは再びレプリカプレート法でテストした後、安定な変異株を液体培地で培養した。

3. 生存率検定

化学物質に対する生存曲線を作成するために、対数増殖期にある細胞 (10^2-10^5) を6 mlの軟寒天培地 (0.29-0.30%寒天と6%の牛胎児血清、さまざまな濃度の薬物 (PG, MV, MD, MMC, *cis*DDP and ADM) を含む) とともにそれぞれ6 cmの培養皿にまいた。2-3週間5% CO_2 存在下で37°Cで培養後、生成したコロニーを数えた。

4. 遺伝的相補性グループの解析

PG-感受性変異株より自然誘発6-thioguanine (6-TG)-耐性変異株を5 μ g/ml 6-TG含有プレートより選択した。G418またはBrastcitidine耐性株を得るためにそれぞれの変異株細胞にpSV2neoまたはpSV2bsrをエレクトロポレーション法により導入し、耐性株をそれぞれの薬剤含有プレートより選択した。細胞種間のハイブリッドはPEG1500を用い細胞融合を行い、2薬剤含有 (3種の試薬; (HAT, G418-sulfate (400 μ g/ml) またはBrastcitidine S (1 μ g/ml) の内2種) 寒天培地で選択した。各ハイブリッド共5株以上について薬剤に対する生存率検定を行った。

III. 結 果

1. PG-感受性変異株の単離

PGに対する感受性の高い9個の変異株が単離された。400 μ g/ml-EMS処理で8個 (Pa series) と500 μ g/ml-EMS処理で1個、変異株の頻度はそれぞれ約 2×10^{-3} と 1×10^{-3} であった。これらの変異株のPG感受性は連続培養や-80°Cでの保存に対して安定であった。

2. PGとMVに対する感受性

Fig. 1に示すように、9個の変異株のうち、6個の変異株 (Pa2, Pa8, Pa13, Pa14, Pa15 and Pb4) はPGに対して類似した中程度の感受性を示した。3個の変異株 (Pa20, Pa21 and Pa25) は同程度の弱い感受性を示した (Pa21とPa25のデータは示していない)。PG感受性変異株はまたMVに対しても感受性であり、その感受性はFig. 2に示すように3つのグループに分類された。Pa14とPa15は高感受性、Pa13, Pa20, Pb4は中程度感受性、Pa2, Pa8, Pa21, Pa25は低感受性であった (最後の2つの株についてはデータは示していない)。

結果として、9種の変異株は異なる2種のsuperoxide発生剤、PG, MVに対する感受性によって5つの感受性グループ (A-E) に分類された (Table 1参照)。すなわち、グループB (Pa13とPb4) 2種の薬剤に対して感受性、グループC (Pa14とPa15) はPGに対して中程度の感受性でMVに対して高い感受性であった。グループA (Pa2とPa8) はPGに対して感受性であるのに対して、グループD (Pa20) は

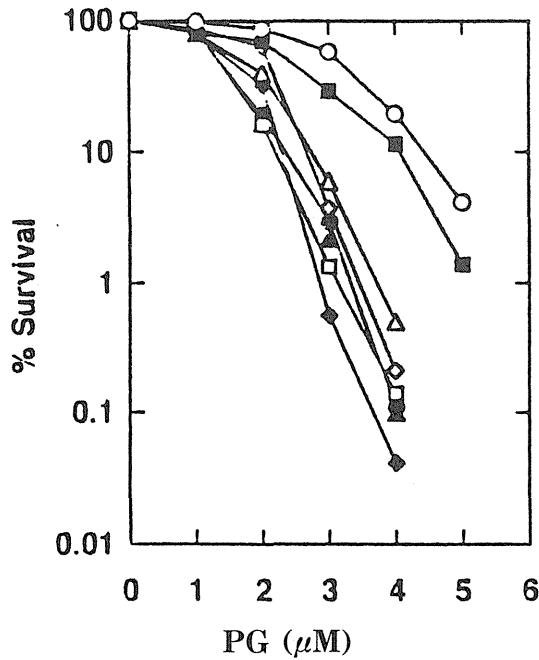


Fig. 1 Plumbagin (PG)-survival curves of the mutants. (○) CHO·K1, (●) Pa13, (△) Pa14, (▲) Pa15, (□) Pb4, (◆) Pa2, (■) Pa8, (■) Pa20

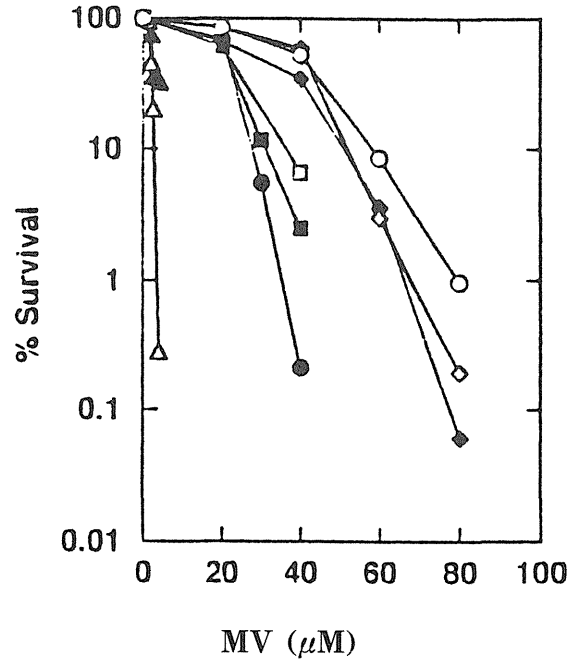


Fig. 2 Methyl viologen (MV)-survival curves of the mutants. Symbols for strains are the same as in Fig. 1.

MV に対して感受性であった。グループ E (Pa 21 と Pa 25) は 2 種の薬剤に対して低い感受性であった。

3. X-線、UV、H₂O₂、と MD に対する感受性

X-線、UV、と MD に対する感受性を Table 1 にまとめた。調べた全ての変異株は X-線に対してやや感受性であった。10% 生存率を与える線量から判断すると Pa13 は感受性がやや高い。全ての変異株は H₂O₂ に対しては野生株とほぼ同様の感受性を示した。Pb4 は UV にたいしては他の変異株や野生株より感受性が高かった。Pa2 と Pa13 以外の変異株に対しては Menadione (MD, Vitamin K₃) は PG より弱い致死効果を示した。

4. 抗腫瘍薬剤にたいする感受性

PG 感受性変異株は放射線に対しては高い感受性を示さなかった。そこで他の DNA 損傷薬剤の細胞致死効果を調べた。MMC と cisDDP は細胞内酵素による代謝過程で活性酸素を生成する 2 価性の抗腫瘍剤である^{9),10)}。Fig. 3 に示すように全ての変異株は MMC に対して程度の異なる感受性を示した。Pb4 は高感受性、Pa13, Pa2, Pa8, Pa20 は中程度感受性、Pa14 と Pa15 は低い感受性であった (Pa21 と Pa25 のデータは示していない)。Fig. 4 は cisDDP に対する生存率である。多くの変異株は野生株に比べて高い感受性を示した。Pb4 は高感受性、Pa13, Pa14, Pa15 は中程度感受性、Pa20 は低感受性、Pa2 と Pa8 は感受性を示さなかった (データは示していない)。また、全ての変異株は Adriamycin (ADM) に対しては Table 2 に示すようにほぼ野生株とほぼ同様の感受性を示した。ADM はキノン構造を持つ抗腫瘍剤で細胞中では活性酸素を生成する⁹⁾が MMC のように 2 価性に作用しない。

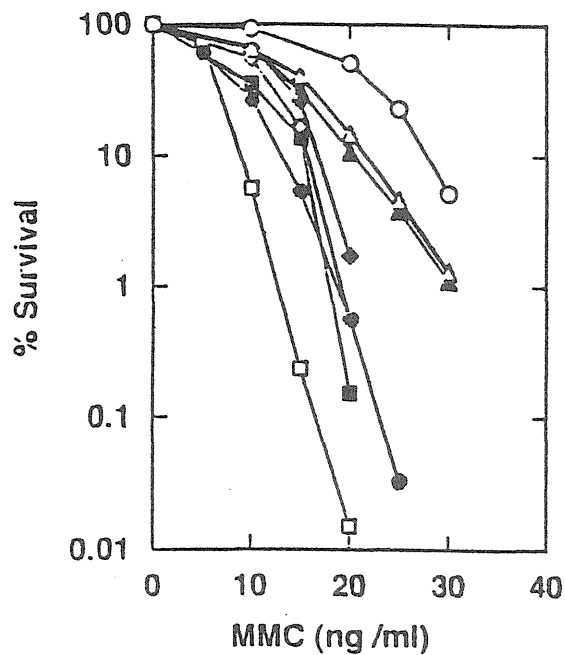


Fig. 3 Mitomycin C (MMC)-survival curves of the mutants. Symbols for strains are the same as in Fig. 1.

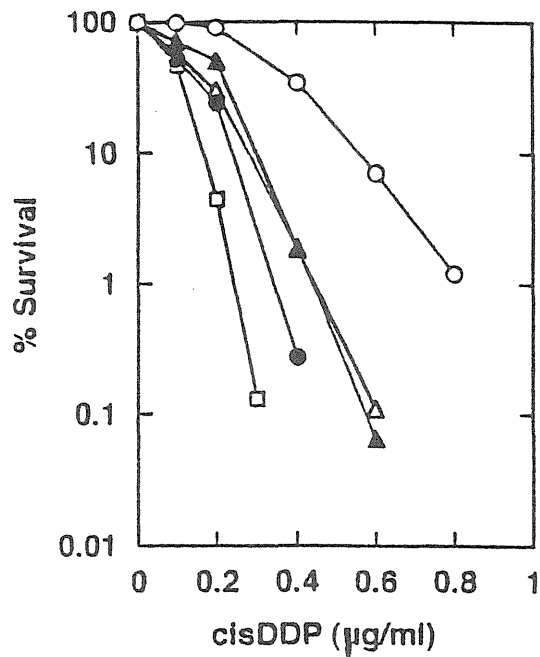


Fig. 4 cisDDP-survival curves of the mutants. Symbols for strains are the same as in Fig. 1.

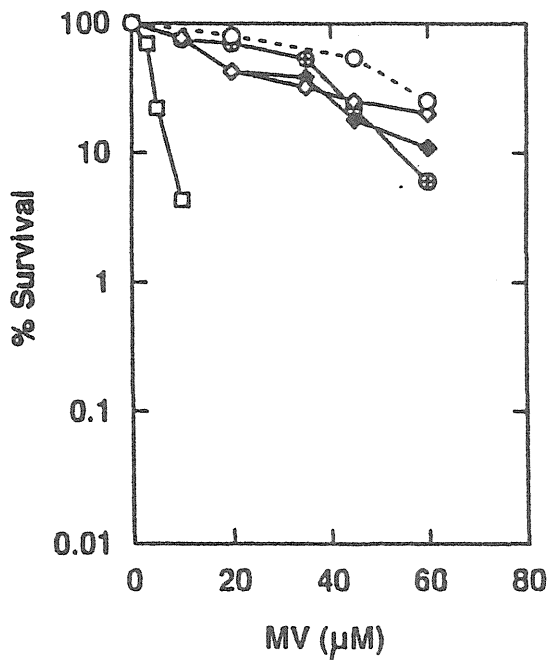


Fig. 5 Methyl viologen (MV)-survival curves of the heterohybrids between mutants. (----○----) (117) CHO·K1neol x CHO·K1bsr1, (—◇—) (855) Pa13neo1TG² x Pa15, (—◆—) (733) Pa13neo1 x Pb4bsr2, (—○—) (742) Pa15neo3 x Pb4bsr2, (—□—) (933) Pa14 x Pa15neo3TG¹

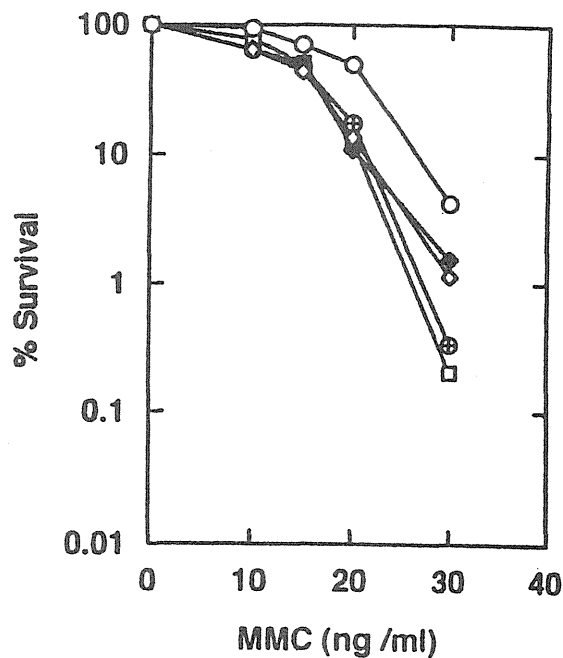


Fig. 6 Mitomycin C (MMC)-survival curves of the hybrids. Symbols for hybrids are the same as in Fig. 5 except (—○—) CHO·K1.

5. 感受性グループ B と C に対する 4 種の変異株の相補性の解析

PG と MV 対して高感受性を示すグループ B と C の 4 種の変異株の遺伝的相補性の解析を行った。野生株と変異株のハイブリッドを作り PG と MV に対する感受性を調べると、野生型遺伝子は PG 感受性に対して不完全優性であった（データは示していない）。そこで野生型が優性である MV と MMC に対する感受性を指標として相補性解析を行った。

変異株のホモハイブリッドは元の変異株と同様の感受性を示した。Pa13, Pa14, Pa15, Pb4 に対しては野生型は変異遺伝子に対しては優性であった。Fig. 5 は 4 つの変異株間のヘテロハイブリッドに対する生存曲線である。Pa14 は Pa15 を相補せず、これらは同じ相補群に属する（Table 2 を参照、グループ III）。Pa15（また Pa14）は Pa13 と Pb4 を相補（データは示していない）、Pa13 は Pb4 を相補した。従って、これらの 3 つの変異株は異なる相補群に属する。結果として、感受性グループ B は 2 種の相補群に I と II に分類された。

変異株の MMC-感受性が MV-感受性と同じ遺伝子によって制御されているかどうかを検討するために、ハイブリッドの MMC に対する生存率を調べた。Fig. 6 はヘテロハイブリッドの MMC 生存曲線である。Pa13 は Pb4 を相補し、また Pa15 は Pa13 と Pb4 を同程度相補した。このことは Pa15 が Pa13 や Pb4 とは異なる相補群に属することを示唆している。Pa14 と Pa15 のハイブリッドは Pa14 または Pa15 のホモのハイブリッドと同程度の感受性を示したので、Pa14 は Pa15 と同じ相補群に属する。

これらの結果から、変異株、Pa13, Pb4, Pa15（Pa14）、の MMC 感受性は 3 種の異なる遺伝子によって制御されていること、またそれらはそれぞれの MV 感受性遺伝子に対応していることが示された。

6. 他の変異株の相補性解析

3 種の変異株、Pa2, Pa8, Pa20 もまた MMC に対して感受性であった。しかしながら、これらの 3 種の変異株は上述の 4 種の変異株と違って *cis*DDP に対して感受性を示さなかった。Pa2 と Pa8 の MMC 感受性は部分的に野生型遺伝子によって相補されたが Pa20 は相補されなかった。Pa2 は Pa8 は相補せず同じ相補群に属する。Pa13, Pa15（Pa14）、Pb4 は野生株同様 Pa2 または Pa8 と部分的に相補性であった。結果として、Pa2（または Pa8）は第 IV 相補群に属する。Pa20 の MMC 感受性は野生型遺伝子に対して優性であり、他の変異株と異なる。この事実は Pa20 が MMC 感受性に対して第 V グループに属することを示している。

Tables 1 と 2 にはこれらの PG 感受性変異株の種々の薬物に対する感受性、分類、特徴を示した。

IV. 考 察

我々は CHO・K1 細胞から 9 株の PG 感受性変異株を単離し解析した。そのうち 6 株は PG に対して中程度に感受性であり、3 株は弱い感受性であった。EMS による PG 感受性変異誘発率は $1-2 \times 10^{-3}$ であった。これらの変異株は PG と同様に強力な superoxide 生産剤である MV にたいして程度の異なる感受性を示し、高感受性、中程度感受性、弱感受性の 3 種に分類された。

その結果、9 種の変異株は PG と MV 両薬剤に対する感受性によって Table 1 に示したように 5 種の感受性グループ、A ~ E、に分類された。中でも、グループ B と C は両試薬に対して高感受性であり興味深い。PG と MV は全く構造が異なり、機能グループとして、PG はキノンを、MV は 3 級アミンを持って

Table 1 Mutant classifications based on agent sensitivity (I)

Sensitivity group	Cell Strain	PG	MV	MD	X-rays	UV
wild type	CHO-KI	-	-	-	-	-
A	Pa2	++	+/-	++	+	nt
A	Pa8	++	+/-	+	+	nt
B	Pa13	++	++	++	++	-
B	Pb4	++	++	+	+/-	++
C	Pa14	++	+++++	+	+/-	nt
C	Pa15	++	+++++	+	+/-	-
D	Pa20	+/-	++	-	+	nt
E	Pa21	+/-	+/-	nt	nt	nt
E	Pa25	+/-	+/-	nt	nt	nt

Susceptibility in the table is shown according to the following definition: -, wild type; +/-, $1.1 < x < 1.2$; +, $1.2 < x < 1.5$; ++, $1.5 < x < 2.5$; +++, $2.5 < x < 3.5$; +++++, $3.5 < x < 5$; ++++++, $5 < x$; nt, not tested; $x = LD_{10}$ of wild/ LD_{10} of a mutant; $LD_{10} = 10\%$ survival dose.

Table 2 Mutant classifications based on agent sensitivity (II)

Sensitivity group	Genetic complementation group		Strain	Susceptibility			Characteristic sensitivity				
	MV	MMC		MMC	cisDDP	ADM	++	+++	-	++++	
wild	(W)		CHO-KI	-	-	-					
B	I	I	Pa13	++	++	+/-	PG, MV, MD, X-ray, MMC, cisDDP				
		II	Pb4	+++	+++	-	PG, MV, UV			MMC, cisDDP	
C	III	III	Pa14	+	++	+/-	PG, cisDDP				MV
			Pa15	+	++	+/-	PG, cisDDP				
A	nd	IV	Pa2	++	-	-	PG, MD, MMC				
			Pa8	++	+/-	-	PG, MMC				
D	nd		Pa20	++	+	+/-	MV, MMC				
E	nd		Pa21	+/-	nt	nt					
			Pa25	+	nt	nt					

Definition of susceptibility is the same as that of table 1.
nd, not determined.

いる。また、水と有機溶媒に対する溶解度も異なる。MVは水溶性であるがPGは水に溶けない。これら2種の試薬は細胞への取り込まれ方や代謝も異なると思われる。しかし、これらは共に細胞中でラジカルになって superoxide を生成する。従って、両試薬にたいして感受性を持つ変異株は活性酸素による傷害を防止または修復する防御機構に欠陥がある可能性がある。この可能性にたいする直接的証拠は未だ得られていない。PG感受性変異株はいずれもX-線やUVに対しては特に感受性ではなかった。Pb4とPa13が他の変異株に比べてそれぞれUVとX-線に対してやや感受性であった。

生体において活性酸素を発生する多くの試薬について変異株の生存率を調べた。MD, H₂O₂, Mn²⁺, ferric nitrilotriacetate (Fe³⁺-NTA) に対して一部の變異株は低、中程度の感受性を示した。全てのPG感受性変異株が様々な程度にMMCに対し致死感受性を示したことは興味深い。MMCに対してPb4は高感受性、Pa13, Pa2, Pa8, Pa20は中程度感受性、Pa14, Pa15, Pa21, Pa25は弱感受性を示した。よく知られているように、MMCはDNAを架橋する2価性のDNA障害剤である。そこで、他のDNA架橋剤 cisDDP についても調べた。Pa13, Pa14, Pa15, Pb4は交差感受性を示したが、他の變異株 (Pa2, Pa8, Pa20) は感受性を示さなかった。両薬物に対して感受性を示した變異株、特にPa13とPb4は活性酸素により生じた架橋DNAの修復過程に欠陥があるかもしれない。

遺伝的相補性の解析は細胞融合法によって調べた。Fig. 5に示した生存曲線をもとにして、MVとPGに感受性の4種の変異株(グループBとC)は3種の相補性グループ、I-IIIに分類されることが示された。MMC感受性に関してもこれらの4種の変異株はI-IIIの3種のグループに分類された。この相補性の一致は同一遺伝子がそれぞれのグループのMVとMMCに感受性に関与していることを示唆している。これを確認するためには、それぞれの感受性に関与した遺伝子の同定が必要である。グループAのMMC感受性変異株(Pa2, Pa8)は同じ相補性グループIV属する。これらの變異株はI-IIIの相補性グループとは異なり cisDDP に感受性ではなかった。グループDに属する變異株 Pa20 は野生型に対し優性であり興味深い。感受性グループEの変異株は2種以上の薬剤に対してやや感受性であった。

我々は以前マウスリンパ種細胞株 L5178Y から Mitomycin 感受性變異株を単離した^{11), 12)}。これらの變異株もまた cisDDP に対して感受性であり、2つの相補性グループに分類されている。これらの變異株はPGやMVに対しては感受性でなく、CHO-K1細胞のMMC感受性グループIとIIとその性質が異なっている。CHO細胞とマウスの細胞のMMC感受性變異株の間の相補性のテストは問題点が多く、相補性に関する最終的結論はまだ得られていない。また、DNA架橋剤高感受性を特徴とする Fanconi's 貧血症^{13), 14)} 原因遺伝子 (FACC) のこれらの變異株への導入実験は現在計画中である。現在 FACC 及び FA, A, B, D 群遺伝子の乗っているヒト9番染色体の移入により變異株のMMC感受性が修復されるかどうか調べている。

ADMはアントラキノン型の抗腫瘍薬剤で、細胞中でセミキノラジカルとなり、OH⁻を発生し、DNAに作用し2重鎖を切断すると考えられている。MMCはベンゾキノロン型の抗腫瘍薬剤で活性化後DNAに結合し、DNAの複製を阻害するか、O₂⁻とOH[·]を発生し鎖を切断する。PG感受性變異株、特にPa13とPb4はMMCとcisDDPに対して交差性を示したがADMに対しては感受性ではなかった。これらはDNA架橋の修復に何らかの欠陥があると思われる。Pa15 (Pa14)はMMCに対して弱い感受性を示したが、cisDDPに対しては中程度、MVに対しては高い感受性を示した。Pa15の細胞質を分析したところ、DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl、安定なフリーラジカル) 補足活性が野生型に比べて低いことが示された⁹⁾。これらのことから、この變異株はラジカル消去能が減少している可能性がある。

E. coli においては活性酸素に対する防御機構が構成的か誘導的である。過酸化水素と superoxide によってそれぞれ OxyR と SoxRS を経由する異なる経路の酵素が誘導されることが分かっている¹⁵⁾。MV 感受性変異株が E. coli K-12 から単離され、新しい遺伝子 mvrA、mvrB、mvrC が単離され解析された^{16)、17)}。mvrA は ferredoxin NADP⁺ reductase であることが示され¹⁸⁾、mvrC は膜に発現している emr 遺伝子 (種々の抗生物質に対して耐性を示す) の 1 種である (EmrA タンパク)¹⁹⁾。

これらの結果を考慮すると、我々の分離した変異株は、ラジカル消去、化学物質の排除、損傷 DNA の修復のような薬剤や活性酸素に対する防御機構の欠損であると考えられる。変異遺伝子の機能を明らかにするための研究は、DNA 架橋修復、SOD 活性とその誘導、ラジカル消去能の解析など、現在進行中である。ヒト遺伝病細胞との相関、あるいは分離されている活性酸素に対する防御遺伝子、DNA 架橋修復に係わる既知遺伝子による感受性の補償などを含めて、多面的な研究が必要であり、遺伝子の同定をめざして研究を進めている。

参考文献

- 1) M. Morimyo: Isolation and characterization of methyl viologen sensitive mutants of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **170**: 2136-2142, 1988.
- 2) S. B. Farr and T. Kogoma: Oxidative stress responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Microbiol. Rev.* **55**: 561-585, 1991.
- 3) J. A. Ferrington, M. Ehert, E. J. Land, and K. Fletcher: Bipyridilium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies on the reaction of paraquat radical with oxygen. Implication for the mode of action of bipyridilium herbicides. *Biochim. Biophys. Acta* **34**: 372-381, 1973.
- 4) H. M. Hanson, and I. Fridovich: Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **253**: 8143-8148, 1978.
- 5) 村上政弘: 電離放射線高感受性細胞の相補群. *放射線科学* **38**: 201-203, 1995.
- 6) D.R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D.a. Figlewicz, *et al*: Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**: 59-62, 1993.
- 7) H. Hama-Inaba, Y. Shimazu, M. Takusagawa, K. Sato, and M. Morimyo: CHO·K1 cell mutants sensitive to active oxygen-generating agents. I. Isolation and genetic studies. *Mutation Res.* **311**: 95-102, 1994.
- 8) H. Hama-Inaba, Y. Shimazu, M. Takusagawa, T. Nakajima, J. Ueda, T. Ozawa, O. Yukawa, and M. Morimyo: Characterization of CHO cell mutants sensitive to active oxygen propagators. K. Asada and T. Yoshikawa (eds.) Elsevier Science B. V. "FRONTIERS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BIOLOGY AND MEDICINE" 299-300, 1994.
- 9) N. R. Bachur, S. L. Gordon, M. V. Gee, and H. Kon: NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 954-957, 1979.
- 10) N. P. Johnson, P. Lapetoule, H. Razaka, and G. Villani: Biological and biochemical effects of DNA damage caused by platinum compounds. D. C. H. McBrien and T. F. Slater (Eds.) IRL Press. Oxford "BIOCHEMICAL MECHANISMS OF PLATINUM ANTITUMOUR DRUGS" 1-28. 1986.
- 11) H. Hama-Inaba, N. Hieda-Shiomi, T. Shiomi, and K. Sato: Isolation and characterization of mitomycin-C sensitive mouse lymphoma cell mutants. *Mutation Res.* **108**: 405-416, 1985.

- 12) H. Hama-Inaba, K. Sato, and E. Moustacchi: Survival and mutagenic responses of mitomycin-C sensitive mouse lymphoma cell mutants to other DNA cross-linking agents. *Mutation Res.* **194**: 121-129, 1988.
- 13) G. Fanconi: Familia"re infantile perniciosaatige Anamie (Permizio" ses Blutbild und Konstitution). *Jb. Kinderheilk.* **117**: 257-280, 1927.
- 14) C. A. Strathdee, H. Gavish, W. R. Shannon, and M. Buchwald: Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* **356**: 763-767, 1992.
- 15) B. Demple: Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Ann. Rev. Genet.* **25**: 315-337, 1991.
- 16) M. Morimyo: Anaerobic incubation enhances the colony formation of a polyA recB strain of Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* **152**: 203-214, 1982.
- 17) M. Morimyo, E. Hongo, H. Hama-Inaba, and I. Machida: Cloning and characterization of the mvrC gene of Escherichia coli K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acid Res* **20**: 3159-3165, 1992.
- 18) V. Bianchi, P. Reichard, R. Eliasson, E. Pontis, M. Krook, H. Jo"rnvall, and E. Haggard-Ljungquist: Escherichia coli ferredoxin NADP⁺ reductase: Activation of E. coli anaerobic ribonucleotide reduction, cloning of the gene (fpr), and overexpression of the protein. *J. Bacteriol.* **175**: 1590-1595, 1993.
- 19) O. Lomovskaya and K. Lewis: emr, an Escherichia coli locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8938-8942. 1992.

produced from DNA will easily react with the neighboring DNA molecules. Therefore, this endogenously formed mutagen may be a more efficient and stronger mutagen than other, general mutagens. Thus, it is possible that the formation of glyoxal is an important mechanism of cellular mutations by oxygen radicals.

We also found that hydroxylation occurs at the C-2 position of adenine by oxygen radical treatment (Fe^{2+} -EDTA- O_2) of dA, dATP, and single- and double-stranded DNA. This oxidatively damaged base, 2-hydroxyadenine (2-OH-Ade), in template DNA induced mispairing with A and C by *in vitro* DNA synthesis. On the other hand, 2-OH-dATP was incorporated opposite T and C in the DNA template. These results suggest that formation of 2-OH-Ade in DNA and nucleotide pool will induce AT→GC and CG→TA mutations in cells.

活性酸素（酸素ラジカル）による DNA 損傷の研究は放射線生物学と密接に関係した研究テーマであるが、近年に至り、活性酸素は放射線以外の様々な環境因子によっても生じること、また生体内では酸素の代謝によっても生じることが明らかとなり、特に発癌や老化の原因として注目されつつある。酸化的 DNA 損傷の構造はこれまでに20-30程報告されているが、突然変異との関係については、アルキル化剤による O-6-アルキルグアニンや O-4-アルキルチミン等の生成、あるいは紫外線によるピリミジン二量体生成の役割ほど明確には解明されていない。また酸化的 DNA 損傷の修復酵素はどの塩基についても哺乳動物細胞からの完全精製は報告されていない。

8-ヒドロキシグアニン (8-OH-Gua) は主要な酸化的 DNA 損傷の一つで、最初、焦がした糖と DNA の反応により見いだされた (葛西、西村ほか、1984)。その後、HPLC-ECD による高感度分析、発癌標的臓器 DNA 中の生成、GC→TA 変異の誘導、修復酵素の精製、ヌクレオチドプールにおける 8-OH-dGTP の生成、AT→CG 変異誘導およびその浄化機構、などの研究によりその生物学的意義が次第にわかってきた。

われわれは最近、細胞の酸化ストレスにより 8-OH-Gua 修復酵素活性が高まることを見出した。例えば、ラットに腎発癌物質 Fe-NTA を投与した場合、標的臓器、腎において DNA 中の 8-OH-Gua が増加するだけでなくその修復活性が高まることがわかった。肝では修復活性の増加は少なかった。この方法は活性酸素を発生する化学物質の発癌性を評価する方法として有用であろう。次にヒト白血球の酸化ストレスについて研究した。喫煙者、非喫煙者、および禁煙者、計30名について末梢血好中球中の 8-OH-Gua およびその修復酵素活性を測定したところ明らかに喫煙本数の多い人ほど 8-OH-Gua とその修復活性が共に高く喫煙は酸化ストレスを高める作用があることがわかった。また活性の強さには6-8倍の個人差が認められた。運動により大腸癌、肺癌、乳癌のリスクが減るという疫学的研究結果が報告されているが、一方、運動により酸素消費量が高まり生体内で活性酸素が発生することも知られている。30名の健康な人に自転車エルゴメーターにて、最大酸素摂取量100%の運動(約30分)を負荷し、その運動の前後で、8-OH-Gua 修復酵素活性を測定したところ殆どの人で運動後に活性が高まることが判明した。また DNA 中の 8-OH-Gua 量は運動後に低下する傾向がみられた。これらの測定値にも10倍程度の個人差が見られ日頃運動している人は低い 8-OH-Gua 値を示した。今後は、好中球中の 8-OH-Gua レベルおよびその修復活性の測定により、個人個人の発癌危険度の予測が可能かどうかを検討する予定である。

更に活性酸素による新しい DNA 損傷や突然変異の機構を調べることも重要であろう。最近われわれは活性酸素により生成するグリオキサールおよび 2-ヒドロキシアデニンによる新しい突然変異のメカニズ

ムを見出した。DNA を試験管内で活性酸素発生系 Fe^{2+} -EDTA- O_2 で処理すると、8-OH-Gua の17倍量ものグリオキサルが生じた。DNA から生じる直接変異原、グリオキサルはまわりの DNA と反応しやすく、これが活性酸素による突然変異の一要因と考えられる。また、 Fe^{2+} -EDTA- O_2 による処理を dATP 及び DNA に対し行ったところ、2-ヒドロキシアデニンの生成が認められた。DNA 中の 2-OH-Ade は in vitro の DNA 合成により A や C とミスペアを起こし、また 2-OH-dATP はテンプレート DNA の T または C と塩基対を形成して DNA 中に取り込まれた。現在、大腸菌や動物細胞を用いて 2-OH-Ade による変異を調べている。

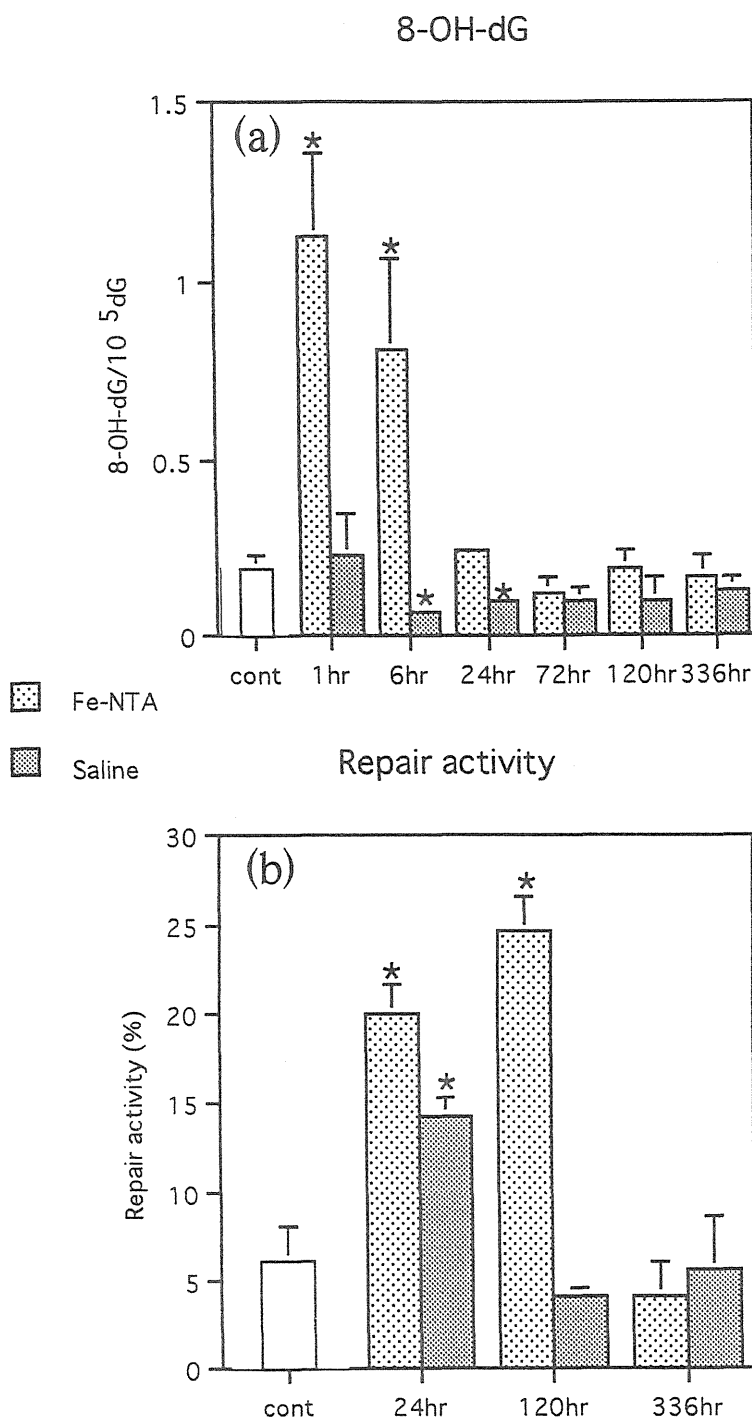


図1 Fe-NTA 投与後のラット腎における 8-OH-dG (a) およびその修復活性 (b) (* : $p < 0.01$)

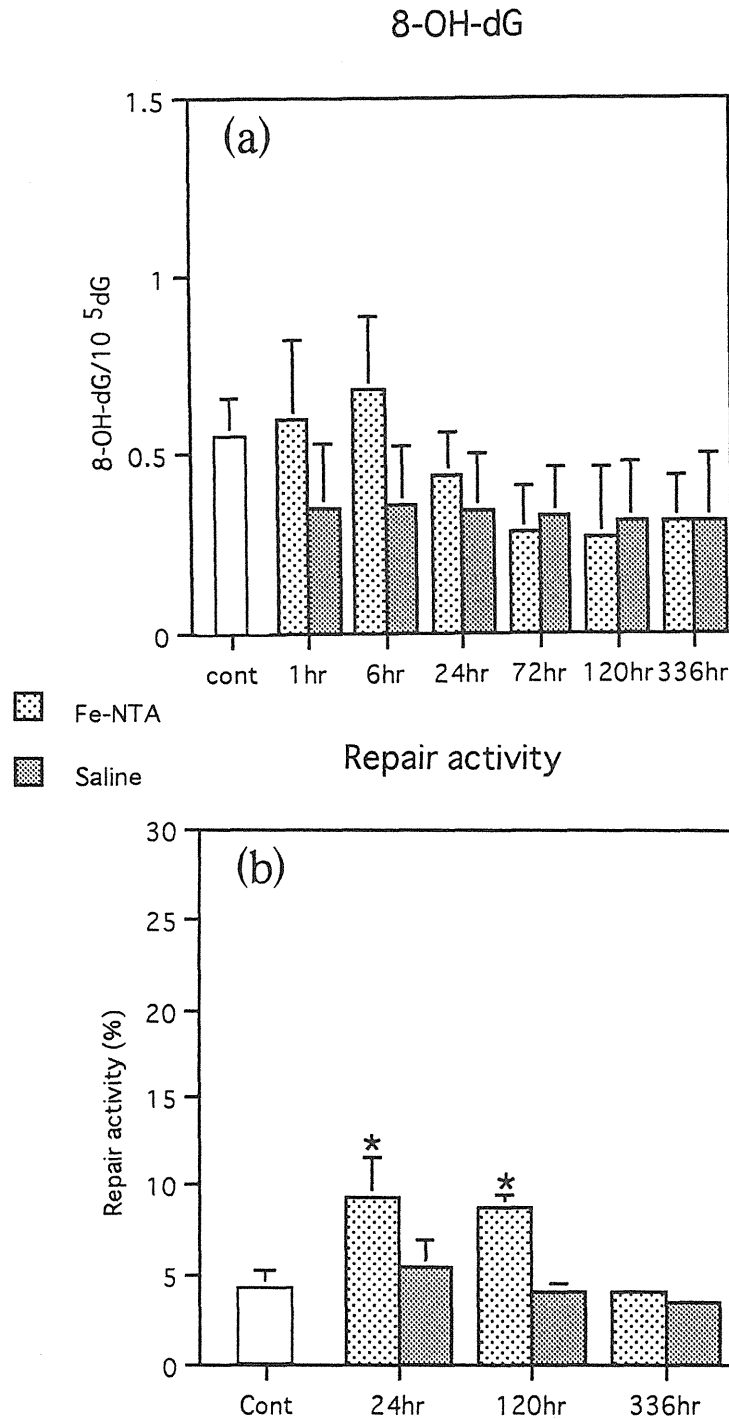


図2 Fe-NTA 投与後のラット肝における 8-OH-dG (a) およびその修復活性 (b) の変動 (* : p<0.01)

Fe-NTA によるラット腎 8-OH-Gua 修復酵素の上昇

8-OH-Gua は、その測定の過程で、酸素との接触、光の作用、微量元素の作用などにより生じる可能性があり、どこまでその測定値が生体内の量を反映しているかは不明である。今回、その修復活性を、8-OH-Gua と同時に測定した。これは、生体内で 8-OH-Gua の修復酵素活性が高まっていれば、とりも直さずそれは修復されるべき 8-OH-Gua が生体内に高まっていることを示すことになり、8-OH-Gua 測定の信頼性を、評価することができると思ったからである。

実験は、腎発癌物質である Fe-NTA 15mg/kg と生食をそれぞれ 6 週齢の雄の Wistar ラットに単回腹腔

内投与し、経時的に屠殺、その標的臓器である腎臓および非標的臓器である肝臓組織中の 8-OH-Gua およびその修復酵素活性を測定した。結果は、標的臓器である腎臓で 8-OH-Gua については、Fe-NTA 投与群において 1、6 時間をピークとする明らかな上昇を認めた (図 1 a)。生食投与群では、上昇は見られなかった。修復酵素活性については Fe-NTA 投与群で 24、120 時間と明らかな上昇を認め、120 時間においては、生食投与群より明らかに高い活性を維持していた (図 1 b)。それに対して非標的臓器である肝臓で 8-OH-Gua については、Fe-NTA 投与群、生食投与群両方とも有意な変化はなかった (図 2 a)。修復酵素活性については Fe-NTA 投与群で 24、120 時間と若干の上昇を認めたが、標的臓器である腎臓よりは、はるかに少なかった (図 2 b)。

以上より、化学発癌物質により標的臓器の細胞に酸化ストレスを与えると、その DNA 中の 8-OH-Gua だけでなくその修復酵素活性も高まることが示された。このことは、この方法が活性酸素を発生する化学物質の発癌性を評価するのに、より信頼性の高いものであることを示しており、今後ますます試みられてよい方法であると考えられる。

喫煙と 8-OH-Gua

喫煙者、非喫煙者、禁煙者各々 10 名より静脈血採血を行い、それぞれの好中球中 8-OH-Gua 生成及びその修復酵素活性を測定した。喫煙者での 8-OH-Gua 生成は非喫煙者と比べて平均で約 1.9 倍 (図 3)、修復酵素活性は平均で約 1.6 倍高く (図 4)、喫煙により酸化的ストレスが高まることが示された。一日の喫煙本数と 8-OH-Gua 生成及び修復酵素活性の関係も各々正の相関関係を示した。また、8-OH-Gua 修復酵素活性は、喫煙者で約 7.5 倍、非喫煙者で約 5.5 倍の個人差が認められた。以上より、喫煙は生体に酸化的 DNA 損傷を与えるが、それ自体は要因の一つに過ぎず生活習慣、環境、遺伝的素因などを含めた幅広い今後の詳細な検討が必要であると思われた。

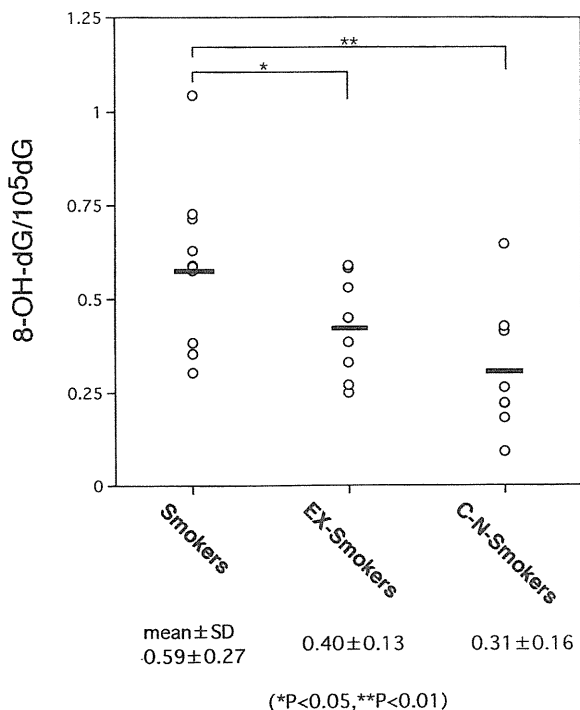


図 3 喫煙による好中球 DNA 中 8-OH-Gua 生成への影響

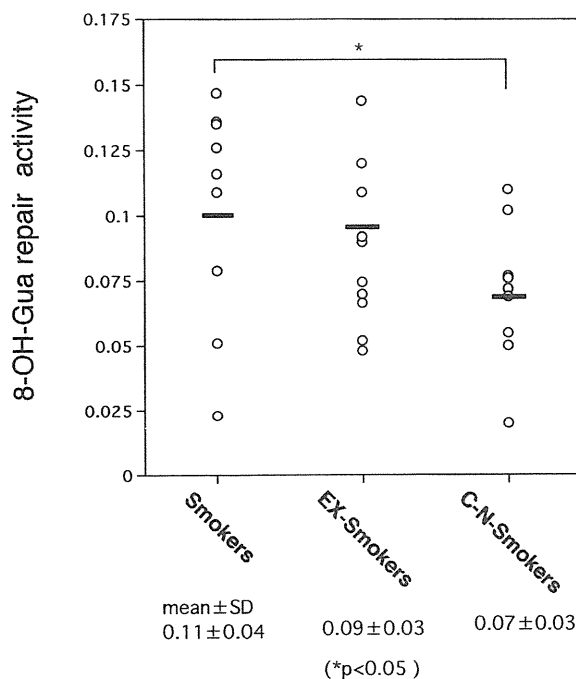


図 4 喫煙による好中球 8-OH-Gua 修復酵素活性への影響

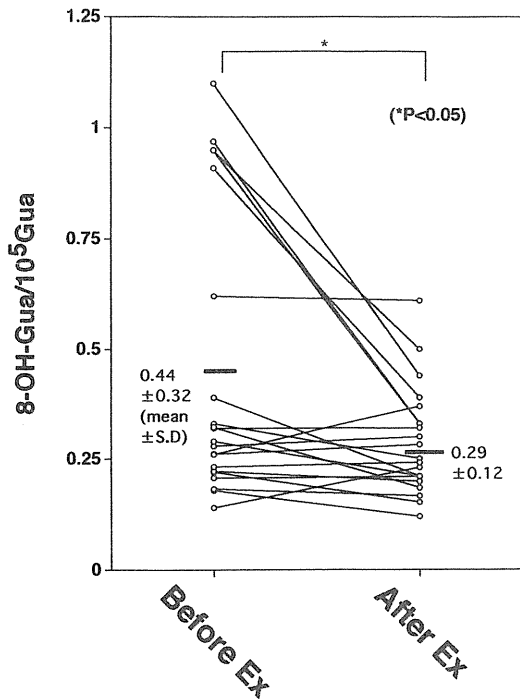


図5 運動と好中球 DNA 中の 8-OH-Gua 生成の関係

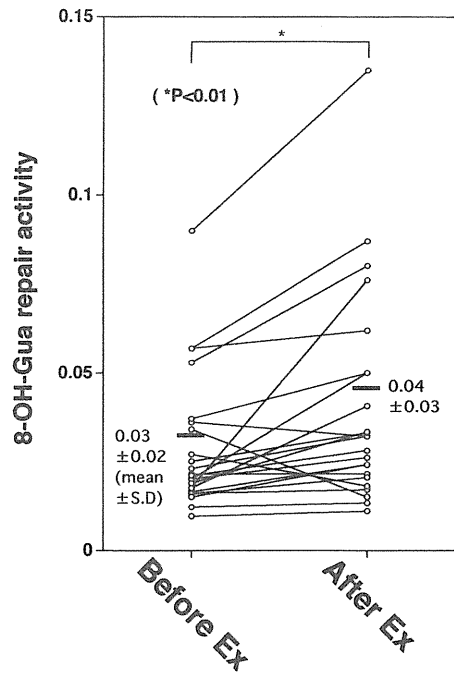


図6 運動と好中球中の 8-OH-Gua 修復酵素活性の関係

運動と 8-OH-Gua

学生運動部員10名を含む健康な成人男性（非喫煙者のみ）に自転車エルゴメーターを用いて最大酸素摂取量100%の運動を負荷し、その運動前、運動後、計2回静脈血採血を行い、好中球中の 8-OH-Gua 生成及びその修復酵素活性を調べた。運動により 8-OH-Gua 生成は有意に減少し（図5）、逆に 8-OH-Gua 修復酵素活性は有意に上昇した（図6）。また、有酸素能力の高い運動部員は運動による 8-OH-Gua 生成及び修復酵素活性の変動が他の被検者に比べ著しく小さくかつ運動前値も低い傾向を認めた。これはトレーニングにより抗酸化酵素が活性化され、活性酸素が DNA 損傷をもたらす前段階で消去されているためと思われる。これらの結果から、運動により酸化的ストレスが生体に加わるが、同時に運動は修復酵素活性も高め活性酸素による DNA の傷を運動前より減らし生体に良い効果を与える可能性があると思われる。

2-ヒドロキシアデニンによる変異誘発

デオキシアデノシン誘導体（dA、dATP）及び DNA（一本鎖、二本鎖）を $\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA}\cdot\text{O}_2$ で処理したところ、水酸化がアデニン塩基の 2 位の位置に生じていた。この損傷塩基、2-ヒドロキシアデニン（2-OH-Ade）の生成量を同条件下における 8-OH-Gua の生成量と比較すると、DNA の場合には 8-OH-Gua の約数十分の一であったが、モノマーの場合には 8-OH-Gua と同程度であった。従って、2-OH-Ade が DNA 中に生成する主なルートとしては、dATP またはその前駆体の酸化によって生じた 2-OH-dATP（2-ヒドロキシデオキシアデノシン三リン酸）が DNA ポリメラーゼによって、伸長している DNA 鎖に取り込まれてゆくルートが考えられる。

次に我々は、2-OH-dATP が DNA ポリメラーゼの基質となるかを検討した。哺乳動物の DNA ポリメラーゼ α を用いて取り込みを観察したところ、鋳型 DNA 中の T 及び C に対して 2-OH-dATP が取り込まれた。

また、取り込みの kinetics を測定した結果、(1) 2-OH-dATP は 8-OHdGTP と同程度に取り込まれることと、(2) C に対する 2-OH-dATP の取り込みは、T に対する取り込みの約十分の一程度で生ずることが明らかとなった。これにより、2-OH-dATP の取り込みにより、DNA 中に 2-OH-Ade が生じミスペアを起こすこと、また 2-OH-dATP の取り込みの段階でも誤りを誘発することが明らかとなった。

一方、2-OH-Ade を含む合成オリゴヌクレオチドを鋳型として用いた、試験管内の DNA ポリメラーゼ反応では、DNA ポリメラーゼ α 及び β が dTTP と dCTP を、クレノー断片が dTTP と dGMP を、2-OH-Ade に対して取り込んだ。すなわち、2-OH-Ade が誤った塩基対形成を誘発することが示された。また、隣接部位の配列によっては、dATP が取り込まれることも見出された。

さらに、2-OH-Ade を含むオリゴヌクレオチドを合成し、プラスミド DNA に組み込み、この損傷塩基の大腸菌及び哺乳動物細胞における変異誘発能を測定した。その結果、(1) 2-OH-Ade は DNA 複製を著しくはブロックしないこと、(2) 2-OH-Ade は 8-OH-Gua と同程度に変異を誘発することが明らかになった。

以上の結果をまとめたのが (図 7) である。2-OH-Ade の生成は様々な変異を誘発すると思われるが、主として生ずる変異は A·T → G·C と C·G → T·A であると推定している。

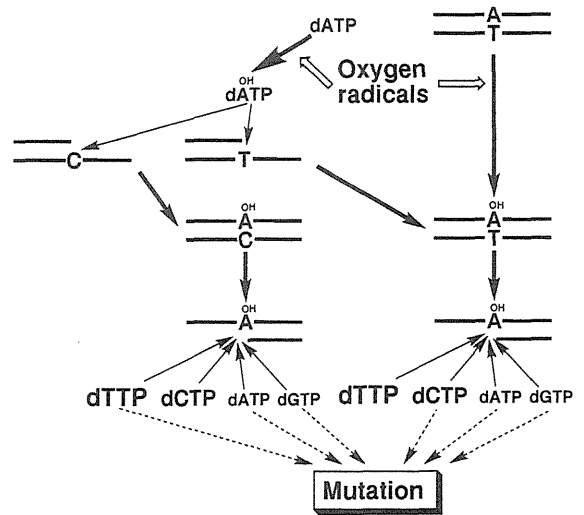


図 7 2-OH-Ade による突然変異の機構

参考文献

- 1) H. Kasai and S. Nishimura (1984) Nucl. Acids Res. 12, 2137-2145
- 2) M. H. Chung, et al. (1991) Mutat. Res., 254, 1-12
- 3) F. Yamamoto, et al. (1992) Jpn. J. Cancer Res., 83, 351-357
- 4) R. Bases, et al., Int. J. Radiat. Biol., 62, 427-441 (1992)
- 5) N. Murata-Kamiya, et. al., Carcinogenesis, in press (1995)
- 6) H. Kamiya, et. al., Nucleic Acids Res. 23, 761-766 (1995)
- 7) H. Kamiya and H. Kasai, J. Biol. Chem., in press (1995)

3. 膜

安西和紀

Membrane

Kazunori Anzai

National Institute of Radiological Sciences

4-9-1, Anagawa, Inage-ku, Chiba 263, Japan

ABSTRACT

Biomembranes have a function to separate two environments (*e.g.* cytoplasm and outside of cells). The biomembrane is one of the important targets of the attack by reactive oxygen species (ROS). Therefore, it is a basic question how the attack by ROS affects the ion-permeability of biomembranes. Ryanodine receptor (RyR), a Ca^{2+} -release channel, is involved in physiological Ca^{2+} -release from sarcoplasmic reticulum (SR) in skeletal and cardiac muscles. Various oxidative stress have been shown to influence the Ca^{2+} permeability of the SR membranes. Reconstitution studies of the SR vesicles to BLM have revealed that ion transport through RyR channel is modified by the oxidative stress [Stoyanovsky et al. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 214-221; Boraso and Williams (1994) *Am. J. Physiol.*, **267**, H1010-H1016]. In those experiments, however, it is not clear whether the oxidative stress affects directly to the RyR molecule or indirectly through modification of lipids or accessory proteins which affect the RyR. In the present study, we have purified the cardiac RyR from pig, incorporated the purified RyR to BLM, and measured the effects of hydroxyl radicals generated chemically by the reaction of H_2O_2 and $\text{Cu}(\text{en})_2$ on the ion permeability of the membrane. In addition, the effects of the hydroxyl radicals on the permeability of BLM without incorporation of the purified RyR was measured. The channel activity was increased by the generation of the hydroxyl radicals at relatively low concentration where no permeability change occurred in the pure BLM. The results indicate that the hydroxyl radicals directly modify the cardiac RyR channel protein and increase the Ca^{2+} -release through it.

I. 序

放射線照射による生体障害の発生においては、その初期過程で生体中の水から生じる活性酸素・フリーラジカルが反応の第1歩であると考えられている。また、発癌物質や毒物の摂取、虚血-再灌流等により、生体内では活性酸素・フリーラジカルが生じて生体に障害を与えると考えられている。活性酸素・フリーラジカルの生体障害機構を考える上で、その標的が何でどのような変化を与えているかを調べることは重要である。

生体を構成する細胞は、細胞内外を分離する形質膜と、細胞内にあって核やミトコンドリアや小胞体などの細胞内小器官を形成する細胞内膜のこの大きな膜系から成っており、これらの膜系は、活性酸素・フリーラジカルの重要な標的の一つである (Fig. 1)。このような生体膜は、脂質二重層膜を基本として、その中へ機能性膜蛋白質が組み込まれたいわゆる流動モザイクモデル構造をとる。したがって、活性酸素・フリーラジカルの標的として生体膜を考えた場合、活性酸素・フリーラジカルが脂質二重層へ作用するのか、膜蛋白質に作用するのか、あるいは、両方へ作用するのかを区別する必要がある。また、膜脂質の変化により二次的に膜蛋白質の機能が影響を受けるという可能性も考慮する必要がある。

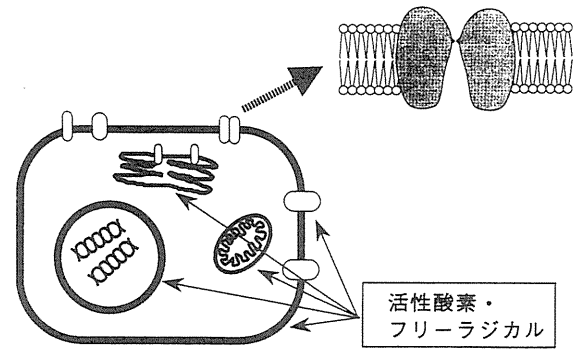


Fig. 1 Biomembranes as target of reactive oxygen species.

生体膜の果たす機能は大きく分けて2つある。1つは、膜蛋白質の機能発現のための反応場としての働きであり、これには両親媒性の膜リン脂質の極性部分を作る膜の表面電荷や界面の構造が重要な役割を果たしている。もう1つは、イオンや各種物質に対するバリアーとしての機能であり、この機能によって形質膜は細胞の内側と外側を区別でき、核、ミトコンドリア、小胞体のような細胞内小器官の細胞内膜は内側（内腔側）と外側（細胞質側）とを区別できる。脂質二重層は基本的にはイオン非透過性で、膜の内外のイオン濃度勾配を維持できる。これには膜リン脂質の疎水性炭化水素鎖が作る疎水性コアがバリアーとして働いている。一方、細胞はその機能を維持していくためには、自らのイオン環境を能動的にコントロールする必要がある。細胞内のイオン濃度を能動的に制御するためにはイオンポンプ、イオン交換輸送体、イオンチャネルのような特異的な機能性膜蛋白質が働いている (Fig. 1)。イオン濃度勾配の形成にはATPの化学エネルギーを用いるイオンポンプや別のイオンの濃度勾配を利用するイオン交換体が、また、イオン濃度勾配に従ってイオンを透過させるためにはイオンチャネルが重要な役割を果たしている。

ここでは、生体膜の果たすこれら2つの主要機能のうち、後者に焦点を絞り、活性酸素・フリーラジカルが生体膜透過性に与える影響について、活性酸素・フリーラジカルによる膜リン脂質の過酸化が脂質二重層のイオン透過性に与える影響、および、活性酸素・フリーラジカルによる心筋小胞体のカルシウム遊離チャネルの活性変化を、脂質平面膜法を用いて調べた結果について報告する。

II. 活性酸素・フリーラジカルによる膜リン脂質の過酸化が脂質二重層のイオン透過性に与える影響

II-1. はじめに

活性酸素・フリーラジカルにより膜脂質は酸化され、過酸化脂質が生じる。脂質過酸化反応が進行する

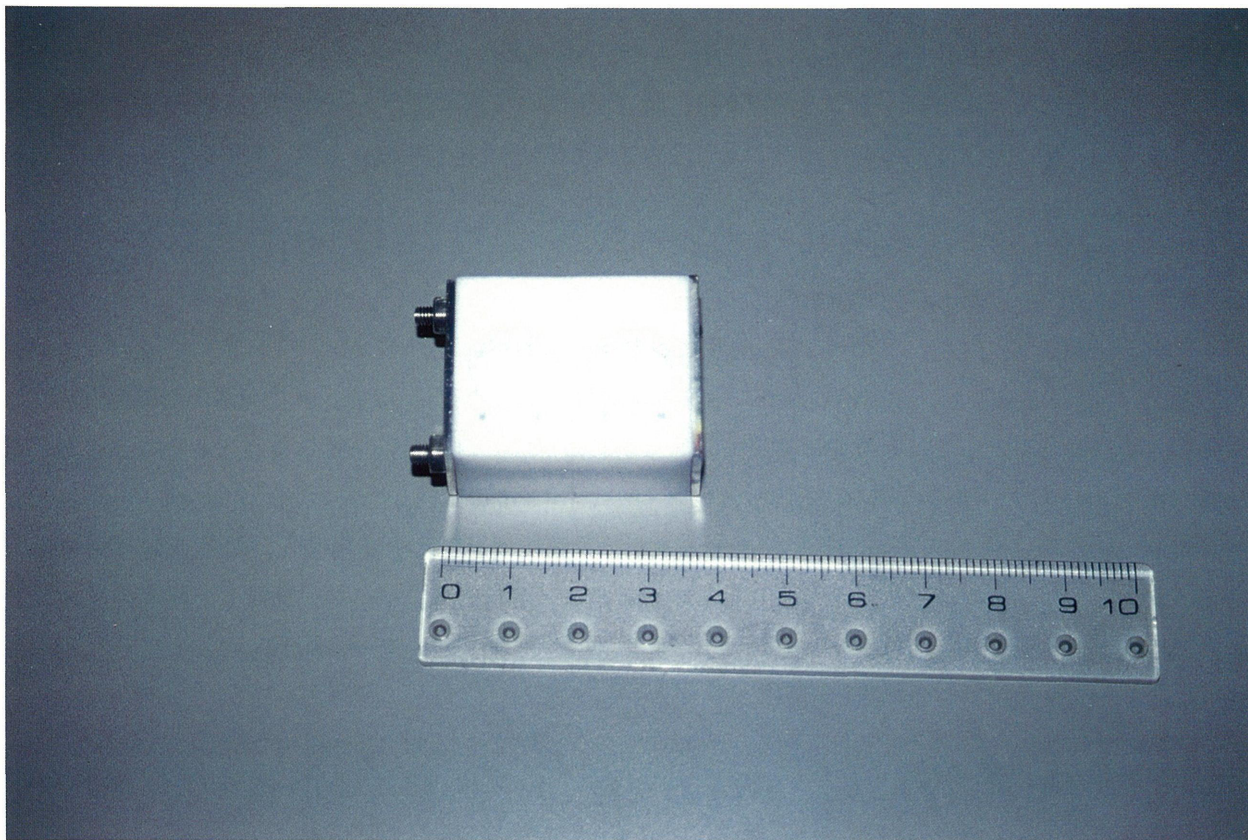


Fig. 2 A Teflon chamber for the formation of BLM.

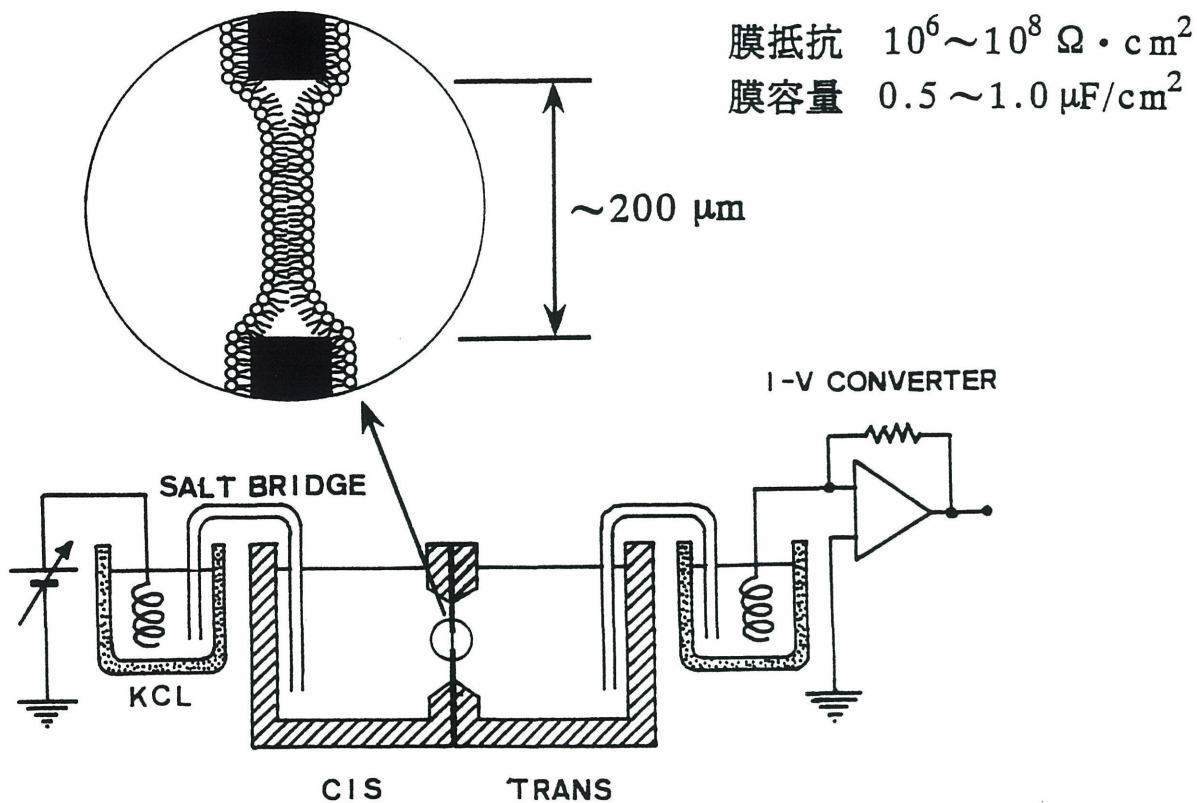


Fig. 3 Electrical set up for measuring a current through BLM.

と、一般的に生体膜のイオン透過性が亢進すると言われているが、過酸化脂質の増加が直接、リン脂質二重層のイオン透過性を上昇させているのか、あるいは、他の機構を通じてイオン透過性が上昇しているのかを明確に示した報告はない。そこで、我々は、脂質平面膜法を用いて、リン脂質二重層のイオン透過性が活性酸素・フリーラジカルによりどのように変化するかを、脂質平面膜法を用いて直接的に調べた。

II-2. 方法

1) 脂質平面膜の形成および膜電流の測定¹⁾

リン脂質平面膜は、Fig. 2 に示すようなテフロン製チャンバーの2つのコンパートメント (*cis* と *trans*、各 1.5ml) の間に形成した。2つのコンパートメントの間には、直径約 200 μ m の孔をあけた厚さ 25 μ m のテフロン膜がはさんであり、その孔の部分に、あらかじめ形成した単層膜を張り合わせる形で二重層膜を形成した (Fig. 3)。平面膜形成リン脂質としては Avanti Polar Lipid 社製の phosphatidylethanolamine (PE: from egg)、Phosphatidylcholine (PC: from egg) を 7 : 3 に混合した物を用いた。膜にかける電位は、*trans* を基準にした *cis* の電位であらわし、膜を横切る電流は、I/V コンバーターを通して電圧に変換し、オシロスコープで観察しながらチャートレコーダーおよびデータレコーダーに記録した。

2) ヒドロキシルラジカルの発生と検出

ヒドロキシルラジカルは、小沢らが開発した銅エチレンジアミン錯体 (Cu(en)_2) と過酸化水素 (H_2O_2) との反応で発生させた²⁾。ヒドロキシルラジカルの発生は、DMPO を用いる ESR スピントラッピング法で確認した。

3) 過酸化脂質の定量

平面膜を形成するのに用いたものと同じ組成 (PE/PC=7/3) のリン脂質を用い、バス型ソニケーターを用いて一重膜リポソームを形成した³⁾。

リポソームと 1mM Cu(en)_2 /100mM H_2O_2 で発生させたヒドロキシルラジカルとを反応させ、一定時間ごとに反応液を抜き取り、ジエチレントリアミン 5 酢酸 (DTPA) を添加して反応を停止させた。クロロホルム/メタノール (2 : 1) で脂質を抽出し、過酸化の進行度を定量した。脂質の過酸化の定量は、共役ジエン法、ヨードメトリー法、およびチオバルビツール酸法 (TBA 法) で行なった。

○共役ジエン法⁴⁾

原理：脂質の過酸化の進行により共役ジエンができてくる。これを共役ジエンに特異的な UV 吸収から定量する。

方法：クロロホルム/メタノールをエバポレーションで除去した。残った脂質をシクロヘキサンに溶解し、233nm の吸光度を測定した。モル吸光係数 2.52×10^4 を用いて、共役ジエンの絶対量を計算した。

○ヨードメトリー法⁴⁾

原理：過酸化脂質 (LOOH) は、LOOH により生じる I_2 が過剰の I^- の存在下に I_3^- になる反応を利用し、生じた I_3^- を吸光度測定から定量する。

方法：クロロホルム/メタノールをエバポレーションで除去し、残った脂質にクロロホルム/酢酸 (3 : 2) とヨウ化カリウム溶液を加え、さらに酢酸カドミウム溶液を添加した。2相に分離した上層を抜き取り、353nm の吸光度を測定した。モル吸光係数 1.73×10^4 を用いて絶対量を計算した。

○TBA 法⁴⁾

原理：過酸化脂質の分解で生じたマロンジアルデヒド (MDA) と 2 分子のチオバルビツール酸 (TBA)

が反応して赤色物質が生成することを利用する。最近、赤色物質はMDA以外のアルデヒドの反応からも生じることが報告されており、この反応産物量をMDA量とするのは正しくないと考えられている。したがって、赤色物質量をTBA反応産物(TBARS)とあらわす。

方法：反応液1.0mlに対して0.4mM DTPAを0.2ml加え反応を停止した。そこへTBA溶液(トリクロロ酢酸7.5g、チオバルビツール酸0.1875g、1N塩酸12.5ml、20mg/mlのブチルヒドロキシルエンを1ml、を全量50mlの水に溶解したもの)2mlを加え、100℃で15分間呈色反応を行った。流水で直ちに冷却後、2000rpmで10分間遠心し、上清の吸光度を波長535nmで測定した。モル吸光係数 1.56×10^5 を用いて絶対量を計算した。

II-3. 結果と考察

1mMのCu(en)₂と100mMのH₂O₂の反応で生じたヒドロキシルラジカルをDMPOを用いてスピントラッピングするとFig. 4のような1:2:2:1の強度の4本線からなるDMPOのOH付加体に特有のESRスペクトルが観察された。このスペクトルの強度は時間と共に減少し、60分後にはほとんど観察されなかった。Fig. 5にスペクトル強度の経時変化を示す。このグラフからわかるように、1mMのCu(en)₂と100mMのH₂O₂によるヒドロキシルラジカル発生系では、ラジカルの発生の半減期は約15分であり、30分以降も発生が続いていることがわかる。

PE/PC=7:3の脂質平面膜のcis側から1mMのCu(en)₂と100mMのH₂O₂を作用させると、Fig. 6のような膜電流変化が観察された。2例とも最初の6-7分は膜電流変化は観察されず、イオン透過性の変化は起こっていない。その後、電流増加がしだいに起こり、10分過ぎから顕著になった。16-17分で膜は破壊された。データは示さないが、ラジカル発生系の濃度を低くして、0.5mMのCu(en)₂と50mMのH₂O₂あるいは0.1mMのCu(en)₂と10mMのH₂O₂を用いた場合は、60分後でも電流の増加は観察されなかった。

PE/PC=7:3のリン脂質からなる一重膜リポソームに1mMのCu(en)₂と100mMのH₂O₂を作用させたときの脂質過酸化の経時変化をFig. 7に示す。共役ジエン法およびヨードメトリー法のいずれにおいても、急激な脂質過酸化の進行と、一定時

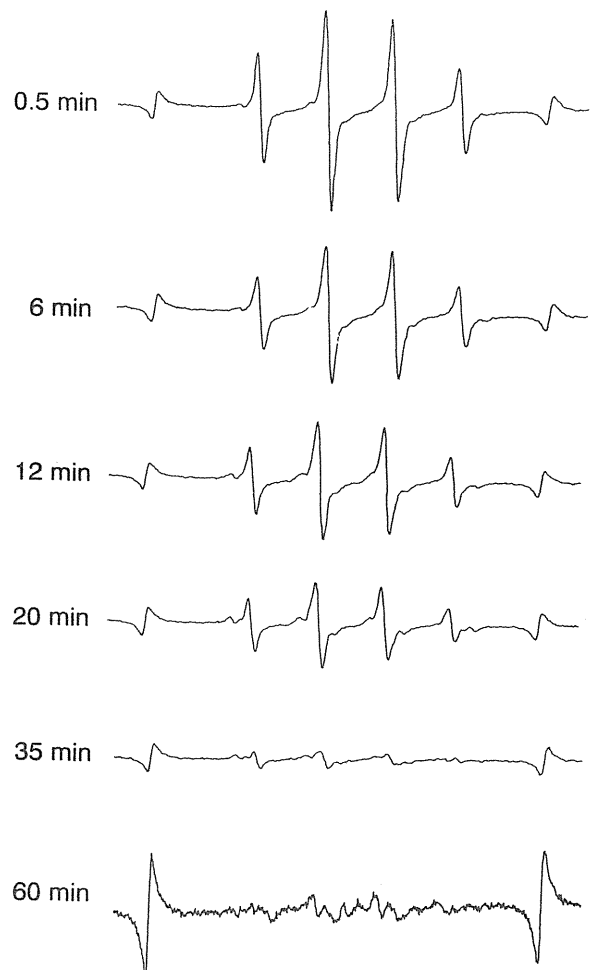


Fig. 4 ESR spin trapping of hydroxyl radicals by DMPO. The hydroxyl radicals were generated by the reaction of 100 mM H₂O₂ and 1mM Cu(en)₂ in 150 mM KCl and 10 mM Tris-Hepes (pH 7.4). An aliquot of the solution was mixed with the same volume of 100 mM DMPO at indicated time after the initiation of the reaction and the ESR spectra were obtained 1 min after the mixing.

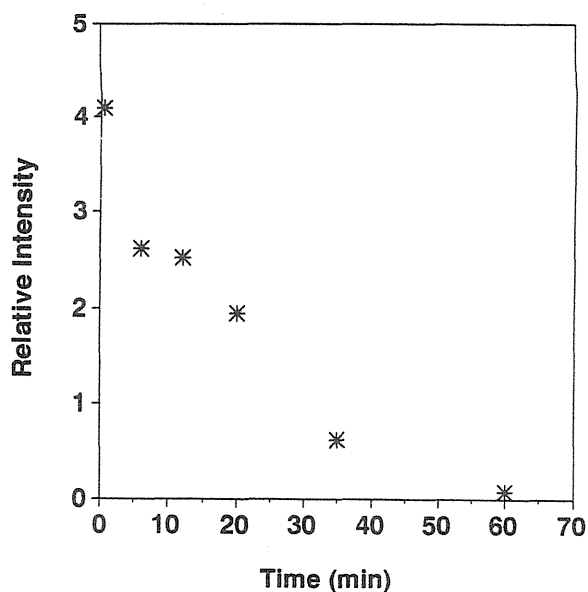


Fig. 5 Time-course of the generation of the hydroxyl radicals as shown in Fig. 4.

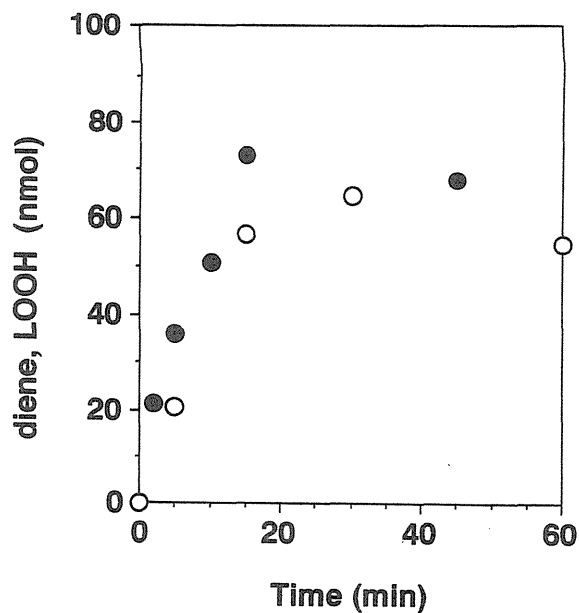


Fig. 7 Time-course of the formation of diene (○) and LOOH (●) as indices of lipid peroxidation of liposomes made of PE/PC=7:3.

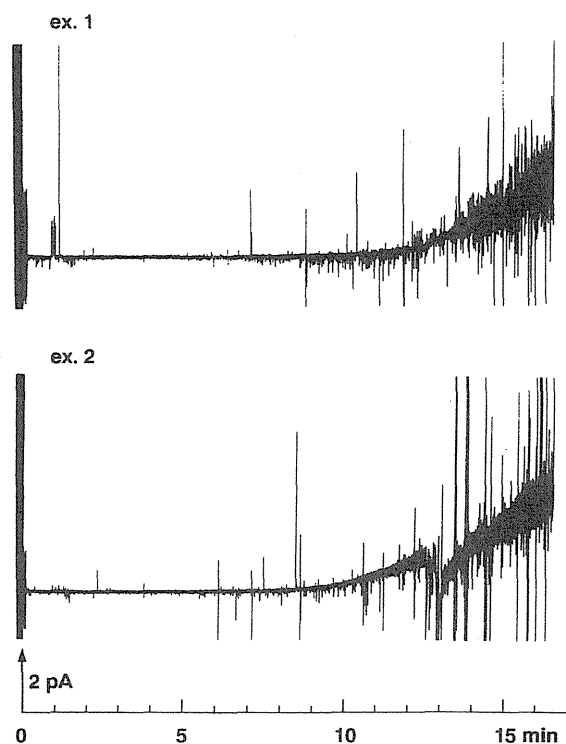


Fig. 6 Effect of hydroxyl radicals generated by the reaction of 100 mM H_2O_2 and 1 mM $Cu(en)_2$ on the permeability of BLM formed with PE/PC=7:3 in 150 mM KCl and 10 mM Tris-Hepes (pH 7.4). The membrane current was measured at the membrane potential of 40 mV. Typical two traces (ex. 1 and ex. 2) are shown.

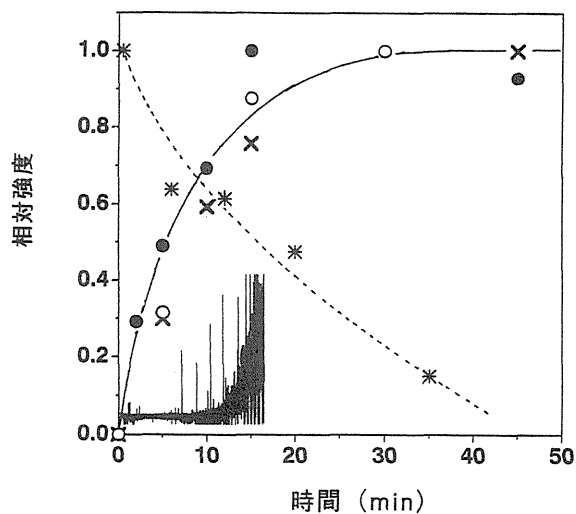


Fig. 8 Relationship among hydroxyl radical formation (*), lipid peroxidation (diene, ○; LOOH, ●; TBARS, ×), and membrane current (inserted trace).

間後の過酸化の停止が観察された。一定時間後に過酸化が停止するのはヒドロキシルラジカルの発生速度が低下するためであると考えられる。データは示さないが、0.5mM の Cu(en)_2 と 50mM の H_2O_2 を用いた場合は、Fig. 5 のようなラジカル発生の減衰は 1 時間までは観察されず、ほぼ一定の発生速度が維持された。それに対応して、脂質過酸化は 1 時間過ぎまで上昇しつづけたことから脂質過酸化とラジカル発生が対応していることがわかる。Fig. 5 において 30 分以後に脂質過酸化が一定値になるのは、発生系からのラジカル発生速度が大きく低下するためと考えられる。また、ここで観察された脂質過酸化は連鎖反応ではなく発生したヒドロキシルラジカルとの反応の結果であると言える。

ヒドロキシルラジカル発生速度、脂質過酸化、および膜電流変化の経時変化を一つの図にまとめた (Fig. 8)。ここでは、脂質過酸化の指標として、共役ジエン法およびヨードメトリー法に加えて TBA 法の結果も示してある。この図より、脂質の過酸化と膜電流変化は対応しておらず、脂質過酸化による脂質二重層の透過性上昇の寄与は小さいと考えられる。従って、活性酸素・フリーラジカルによる膜のイオン透過性の亢進の機構としては、脂質二重層膜のイオン透過性の亢進ではなく、イオン透過に参与する膜蛋白質への作用を考える必要があることが示唆された。

III. 活性酸素・フリーラジカルによる筋小胞体カルシウム遊離チャネルの活性変化

III-1. はじめに

虚血・再灌流障害の発生において、細胞内カルシウム濃度の上昇が関与しているといわれている。したがって、虚血・再灌流で発生すると言われる活性酸素・フリーラジカルがいかにか細胞内カルシウム濃度の上昇に関与しているかを明らかにすることは重要な課題である。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇には細胞内カルシウム貯蔵部位あるいは細胞の外側からのカルシウムの流入の増大と細胞内カルシウム貯蔵部位あるいは細胞の外側へのカルシウムのくみ出しの減少の二つの要因が想定できる。

骨格筋あるいは心筋においては、筋小胞体からのカルシウムの遊離および筋小胞体へのカルシウムの取り込みが細胞内カルシウム濃度を制御する上で最も重要である。活性酸素・フリーラジカルは筋小胞体のカルシウム取り込み反応を司っているカルシウムポンプ (Ca^{2+} -ATPase) の活性を阻害することが報告されている⁵⁾。一方、活性酸素・フリーラジカルによる筋小胞体からのカルシウム遊離の活性化に関して、筋小胞体膜小胞を脂質平面膜に組み込んだ実験から、カルシウム遊離チャネル (リアノジン受容体) が活性化されていることが示されているが⁶⁻⁸⁾、ここで働いている活性酸素種は何か、また、その活性酸素種はカルシウム遊離チャネルに直接作用するのか、それとも間接的にチャネルの修飾因子に作用するのか、といった問題の解答は明らかではない。そこで、脂質平面膜法を用い、精製カルシウム遊離チャネルの活性へのヒドロキシルラジカルの作用を調べることにより、上記の問題の解答の一つを得ようと考えた。

III-2. 方法

1) カルシウム遊離チャネル (リアノジン受容体) の精製

ブタ心筋から調製した筋小胞体の重い画分を界面活性剤の 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid (CHAPS) で可溶化し、しよ糖蜜度勾配遠心法およびヘパリン・アガロースカラムクロマトグラフィーによりリアノジン受容体 (RyR) を精製した。大豆リン脂質であるアズレクチンと脂質/蛋白質=50 になるように混合し、透析により CHAPS を除去することにより精製 RyR を含むプロテオリソームを調製した。

2) 脂質平面膜法

上記、II章に示した要領で脂質平面膜を形成した。平面膜形成脂質としては Avanti Polar Lipid 社製の、Phosphatidylethanolamine (PE: from egg) を用いた。平面膜形成の溶液組成としては、150mM あるいは 200mM KCl、10mM Tris-Hepes (pH7.4) を用いた。

平面膜形成後、*cis* 側の溶液を一部抜き取って等量の 3M KCl、10mM Tris-Hepes (pH7.4) と交換することにより、*cis* 側を高張にした。精製カルシウム遊離チャンネルを含むプロテオリポソームを平面膜に融合させることによりチャンネルを平面膜に組み込んだ。

III-3. 結果と考察

ブタ心筋からの精製ステップにより、分子量約 400kDa のリアノジン受容体が SDS ゲル電気泳動では単一バンドとして見えるまで精製された。この精製サンプルのリアノジン結合活性は、約 120pmol/mg protein であった。

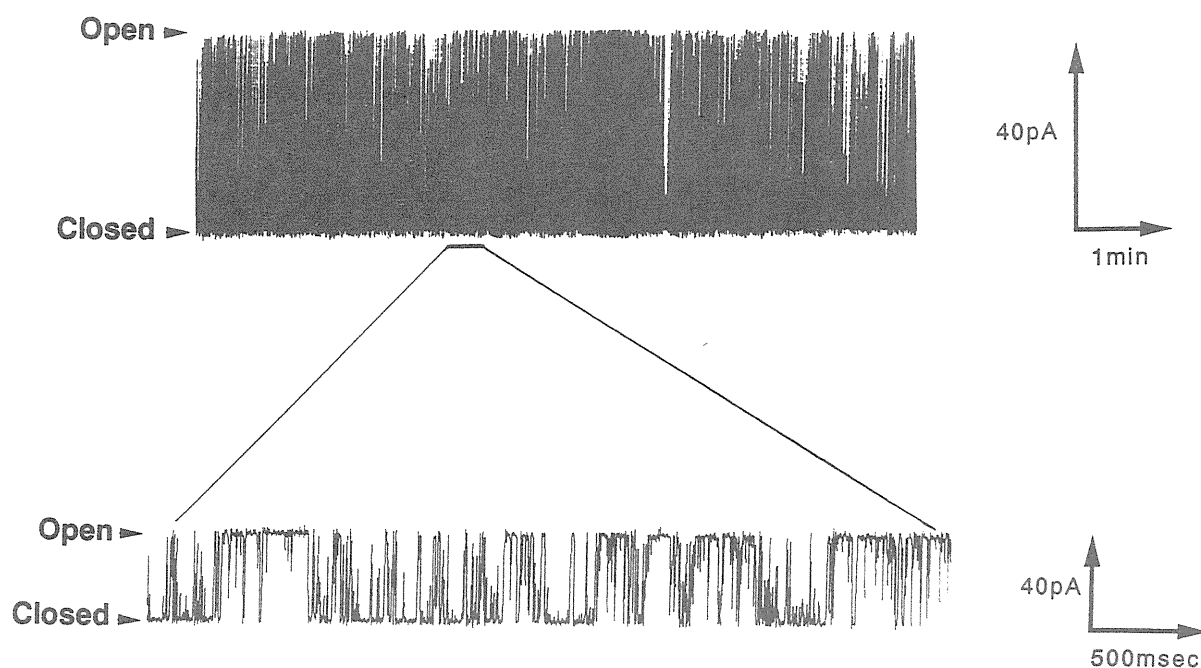


Fig. 9 Ion channel activity of purified RyR incorporated into the BLM of PE. The solution at *cis* compartment was 900 mM KCl, 10 mM Tris-Hepes (pH 7.4) and *trans* was 200 mM KCl, 10 mM Tris-Hepes (pH 7.4). The membrane potential was +20 mV. The lower trace is the expansion of the time axis and reduction of the current axis.

精製リアノジン受容体を脂質平面膜に組み込むと、Fig. 9 のような速い開閉挙動を示す単一イオンチャンネル活性が観察された。このチャンネルは、ATP の添加により開口確率が上昇し (Fig. 10A)、リアノジンの添加によって半開口状態に固定された (Fig. 10B)。溶液条件として *cis* が 900mM KCl、*trans* が 200mM KCl における I-V プロットは Fig. 11 のようになり、傾きからコンダクタンスが 731pS となった。逆転電位 -34.9mV から Goldman-Hodgkin-Katz の式を用いて計算されたイオン透過件比は、 $P_{\text{Cl}} : P_{\text{K}} = 0.03$ となり、カチオン選択性が示された。これらの結果は、既に報告されているカルシウム遊離チャンネルの性質と一致しており、精製したリアノジン受容体が自然な性質を保持していることを示している。

精製リアノジン受容体の単一チャンネルの開閉が観察されている時に、*cis* 側から 10mM の H_2O_2 を添加

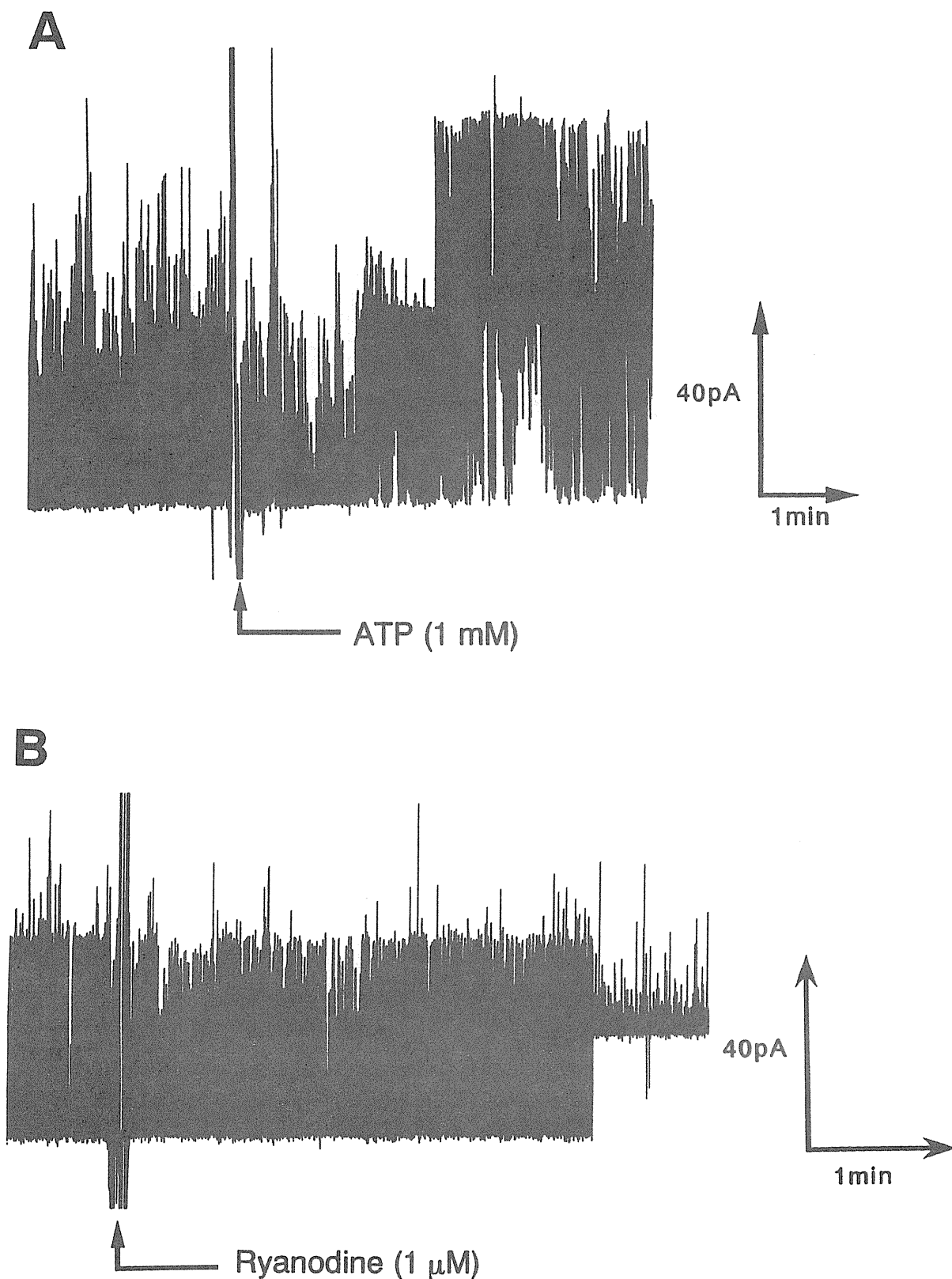


Fig. 10 A) Effect of 1 mM ATP (*cis*) on the ion channel activity of RyR. The experimental conditions were similar with those in Fig. 9. B) Effect of 1 μM ryanodine (*cis*) on the ion channel activity of RyR.

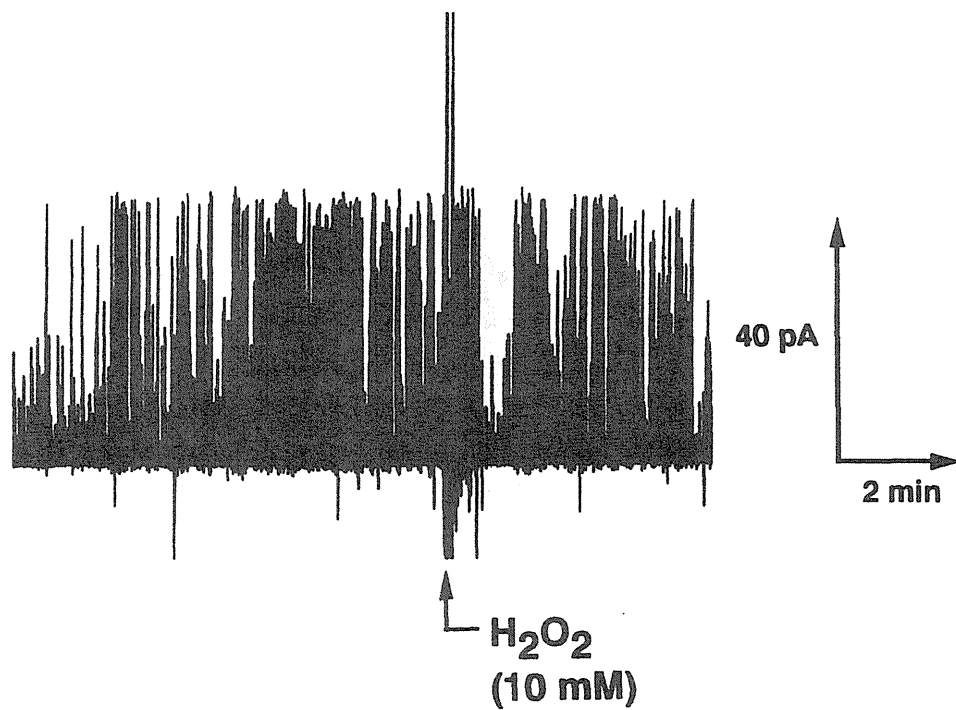
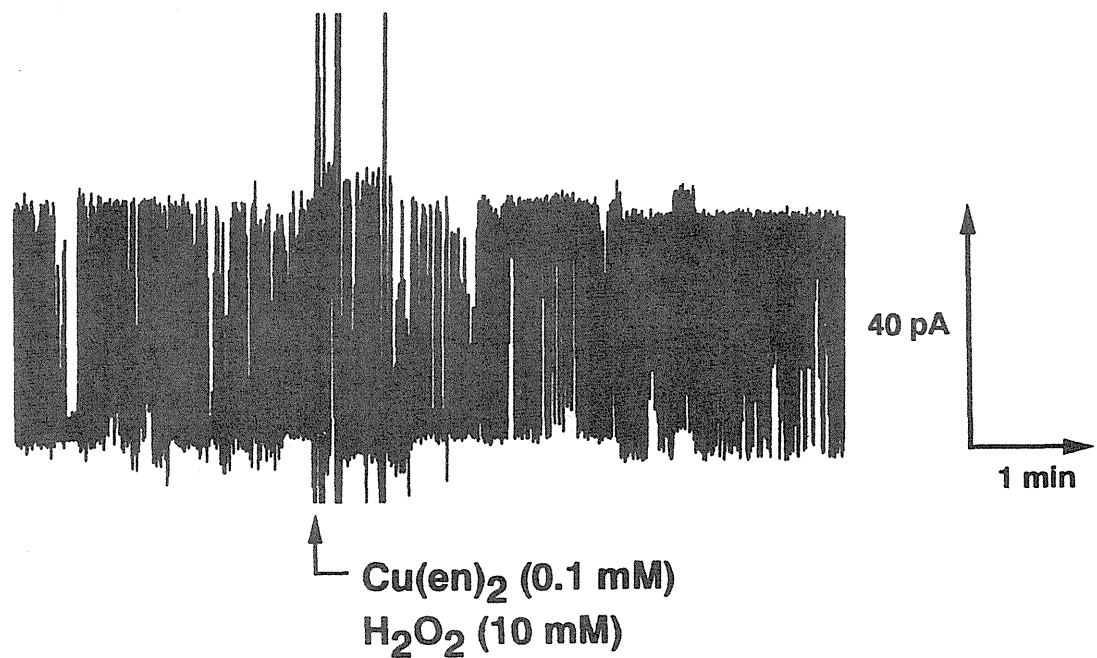
A**B**

Fig. 12 A) Effect of 10 mM H₂O₂ (*cis*) on the ion channel activity of RyR. The experimental conditions were similar with those in Fig. 9. B) Effect of hydroxyl radicals generated with 10 mM H₂O₂ and 0.1 mM Cu(en)₂ (*cis*) on the ion channel activity of RyR.

したが、コンダクタンスおよび開口確率のいずれも顕著な変化は観察されなかった (Fig. 12A)。一方、10mM の H_2O_2 と 0.1mM $\text{Cu}(\text{en})_2$ を同時に添加してヒドロキシルラジカルを発生させると、Fig. 12B のように添加後 1-2 分してから開口確率の上昇が観察された。データは示さないが、 $\text{Cu}(\text{en})_2$ だけを作用させたときには何の変化も観察されなかった。以上の結果は、ヒドロキシルラジカルはリアノジン受容体蛋白そのものに作用して、チャンネルの開口確率を上昇させることを示している。

IV. まとめ

活性酸素・フリーラジカルによる膜のイオン透過性変化の発生機構について、脂質平面膜法を用いて調べた。活性酸素種としては、過酸化水素/銅エチレンジアミン錯体の化学的発生系で生じるヒドロキシルラジカルを用いた。このようにして発生させたヒドロキシルラジカルは、直接反応によってリン脂質脂肪酸の過酸化を引き起こしたが、イオン透過性の上昇は、脂質過酸化とは密接に対応していなかった。一方、膜のイオン透過性変化に関与する膜蛋白質として、ブタ心筋小胞体のカルシウム遊離チャンネルを選び、それへのヒドロキシルラジカルを同様に調べた。可溶化・精製したカルシウム遊離チャンネルを脂質平面膜に組み込むと、自然なものと同様なイオンチャンネル活性が観察された。そこへヒドロキシルラジカルを作用させると、コンダクタンスは変わらなかったが、チャンネルの開口確率が上昇した。すなわち、心臓においては細胞内カルシウム貯蔵庫である心筋小胞体の膜透過性が、カルシウム遊離チャンネルであるリアノジン受容体へのヒドロキシルラジカル的直接作用によって上昇することが明らかになった。すなわち、心臓においては、虚血・再灌流障害の発生において、活性酸素のうちのヒドロキシルラジカルによる心筋小胞体のカルシウム遊離チャンネル活性の上昇が、細胞内カルシウム濃度上昇を通じた細胞障害の原因の一つとなることを示唆している。

謝 辞

本研究は、熊本大学薬学部および神奈川大学理学部との共同研究である。リアノジン受容体の単離精製に御尽力いただいた熊本大学薬学部の國安明彦博士と中山仁教授、チャンネル電流測定に協力していただいた神奈川大学理学部の小川国孝氏と山本晴彦教授、また、ESR スピントラッピング法を指導していただいた上田順市博士と小沢俊彦博士に感謝する。

V. 引用文献

- 1) Anzai, K., Kadono, H., Hamasuna, M, Lee, S., Aoyagi, H., and Kirino, Y. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1064, 256-266.

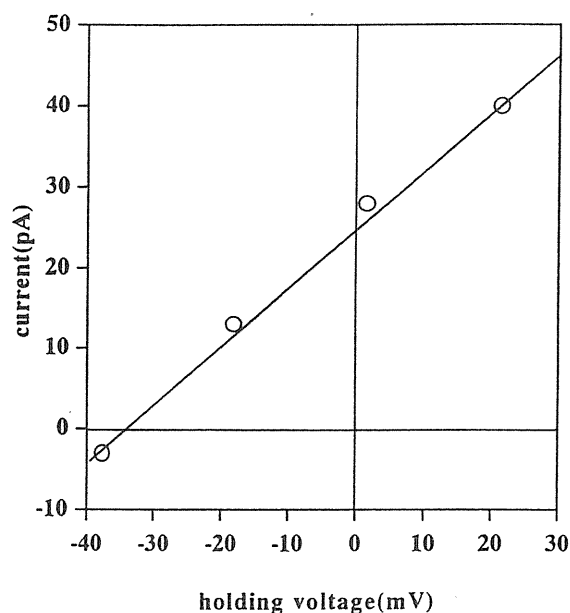


Fig. 11 I-V plot of the single ion channel activity of RyR incorporated in the BLM of PE in 900 mM KCl, 10 mM Tris-Hepes (pH 7.4) (*cis*) and 200 mM KCl, 10 mM Tris-Hepes (pH 7.4) (*trans*).

- 2) Ozawa, T. and Hanaki A. (1991) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 330-332.
- 3) Anzai, K., Yoshida, M., and Kirino, Y. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1021**, 21-26.
- 4) Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) *Methods. Enzymol.*, **52**, 302-310.
- 5) Kukreja, R. C., Okabe, E., Schrier, G., Hess, M. L., and Ito, H. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**, 447-475.
- 6) Stoyanovsky, D. A., Salama, G., Kagan, V. E. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 214-221.
- 7) Boraso, A. and Williams, A. J. (1994) *Am. J. Physiol.*, **267**, H1010-H1016.
- 8) Favero, T. G., Zable, A. C., and Abramson, J. J. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 25557-25563.

in the PdBu binding content in the membrane fraction. From these results, we concluded that radiation-induced activation of PKC is due to the translocation of PKC from cytosol to membrane as a result of membrane lipid peroxidation through ROS produced by radiation.

I. 緒 言

多くの疾病の要因が活性酸素・フリーラジカルに起因していることが次々と明らかにされ、生体に影響を及ぼす活性酸素種の同定や作用機序の解析が進められている。生体は無数の細胞が互いに結び付き精巧な生物体を作り上げている。各々の細胞は細胞内外の連絡のやりとりにより生体内における細胞社会での立場を決めているのである。それらの連絡網が細胞情報伝達系であり、生物の恒常性の保持、細胞の増殖、分化、機能発現に関わるものとして生物学の主要な研究対象となっている。活性酸素・フリーラジカルが生物に対する刺激となり、刺激応答や障害を引き起こすときには細胞情報伝達系の変動を介していることが解明されつつある。放射線は活性酸素・フリーラジカルを生じさせるもののひとつであり、放射線照射により生ずる活性酸素・フリーラジカルが生体内で種々の構成成分（核酸、タンパク質、脂質）に作用し、放射線障害を引き起こすことが明らかにされている¹⁾。我々はこれまでに生体内構成成分のなかでも活性酸素・フリーラジカルによって酸化され易い生体膜への影響を解析してきた。ラット小胞体膜において、放射線照射により生ずる生体膜脂質の脂質過酸化反応により小胞体膜における薬物代謝酵素系が失活されることなどを報告してきた²⁾。生体膜は非常に重要な細胞情報伝達系の主要な場であり、放射線による生体膜への影響が細胞情報伝達系にまで及んでいれば、それは各々の細胞レベルへの影響にとどまらず広く細胞社会・組織・個体にまで影響がおよぶことが考えられる。今回、我々は細胞情報伝達系の中でも特に生体膜との関連が深い Ca^{2+} シグナリング系と C キナーゼ系を中心に、ラット肝、ラット初代培養肝細胞を用いて放射線影響を解析した結果について述べる。

II. 結果及び考察

1. ラット肝小胞体膜における Ca^{2+} シグナリング系の変動

肝臓のような非興奮性細胞においては細胞内の Ca^{2+} は細胞膜で作りだされるイノシトール 3 リン酸 (IP3) が調節因子として働き、 Ca^{2+} を調節している³⁾。

小胞体膜は細胞内における Ca^{2+} の貯蔵庫であり、小胞体膜に存在する IP3 レセプターや Ca^{2+} -ATPase の働きにより細胞内 Ca^{2+} 濃度を制御している。このような膜におけるシステムは放射線等の酸化ストレスによって障害が起こることが推測される。ラット肝小胞体膜画分を ATP 存在下で $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を含む緩衝液中で 1 時間処理して Ca^{2+} を貯蔵させ、50Gy の X 線照射した後 Ca^{2+} イオノフォアである A23187 を用いて小胞体膜中に貯蔵されている Ca^{2+} 量を測定した。その結果、放射線照射後も Ca^{2+} の貯蔵量が変化しなかったことから、放射線照射により Ca^{2+} の貯蔵能が阻害されたり、貯蔵された Ca^{2+} が漏れ出たりすることはないものと考えられた (Fig. 1.)

次に小胞体膜における IP3 依存性の Ca^{2+} 放出への放射線影響をみた。上記のように処理して Ca^{2+} を貯蔵させた小胞体膜に IP3 を作用させて放出される Ca^{2+} 量を測定した。放射線照射によりラット小胞体膜の Ca^{2+} の放出量は半分以下になり、かなりの阻害が起きていることがわかる (Fig. 2.)。IP3 は細胞外からの情報を内部に伝え細胞内の Ca^{2+} の濃度調節を行うセカンドメッセンジャーである。このようなセカンドメッセンジャーの作用機構が阻害されてしまうことは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節に多大な影響を与

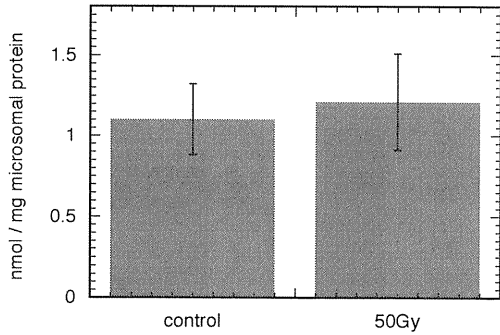


Fig. 1 Radiation effect on Ca²⁺ loading capacity in rat liver microsomes

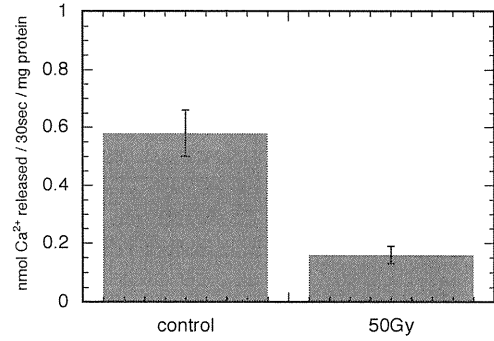


Fig. 2 Radiation effect on IP3-induced Ca²⁺ release in rat liver microsomes

えると考えられる。

2. ラット培養肝細胞における Ca²⁺ シグナリング系の変動

ラット肝小胞体膜における結果からラット肝の Ca²⁺ シグナリング系は放射線照射により大きく障害を受けていると考えられる。このような障害を細胞レベルで検討するために培養肝細胞を用いて Ca²⁺ シグナリング系の変化をみた。培養肝細胞を γ 線照射したのち、肝細胞の Ca²⁺ シグナリング系を修飾する刺激剤を加え、その効果に対する放射線影響を調べた。細胞外液を ⁴⁵Ca²⁺ を含んだ緩衝液に置き換えて、そこに各種刺激剤を加えて細胞内に取り込まれた ⁴⁵Ca²⁺ の量を測定したところ、刺激剤を加えない状態やフェニルエフリンでは影響は現われないが、グルカゴンや ATP を加えた時には取り込み量が減少傾向を示し、さらに両試薬存在下ではその減少が顕著にあらわれた (Fig. 3)。これらの試薬は細胞膜における IP3 の合成に関与することから、これらの変化は細胞膜における IP3 の生成量の変化によるものと考えられる。そこで IP3 生成量を測定してみるとクルカゴン、ATP がそれぞれ単独では変化がみられなかったが、両試薬共存下で誘起される IP3 の合成が強く阻害されていた (Fig. 4)。これらの結果は、放射線照射により、ラット肝における Ca²⁺ シグナリング系がかなり混沌とした状態になっていることを示唆している。これらの変化が実際にその後のどのような生理的变化につながるのかは未だ明らかではないが、ラット肝は放射線に非常に耐性のある臓器であることから、このような変化は後の細胞情報伝達系へとつ

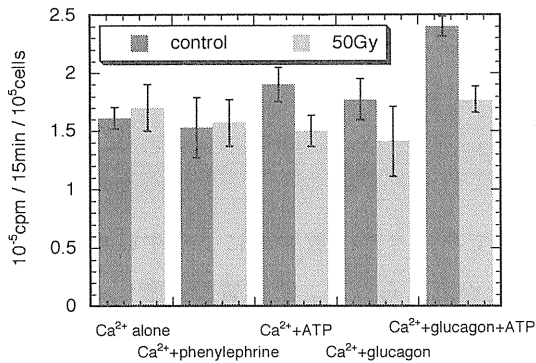


Fig. 3 Radiation effect on Ca²⁺ flux in rat hepatocytes

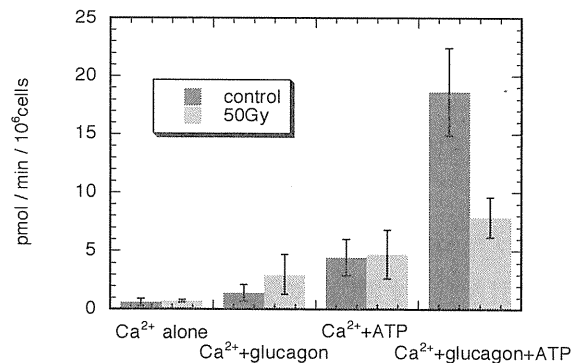


Fig. 4 Radiation effect on IP3 productivity in cultured rat hepatocytes

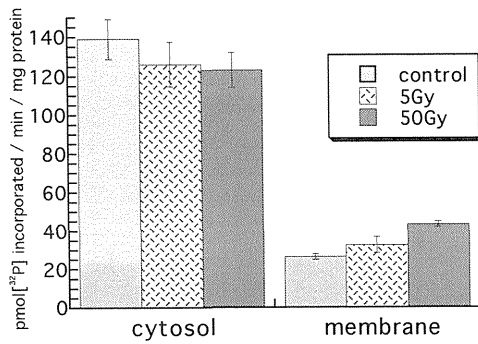


Fig. 5 Radiation effect on protein kinase C activity in cultured rat hepatocytes

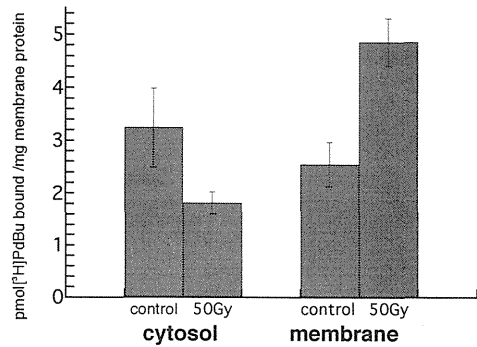


Fig. 6 Radiation effect on distribution of PdBu bound to the fractions of rat hepatocytes

ながら、なんらかの生体防御システムに関与することが予想される^{4),5)}。細胞内には Ca^{2+} によって調節される多くの生理機能がある。そこで Ca^{2+} 依存性の細胞内システムの変化を見ることにした。C-キナーゼ系は Ca^{2+} 依存性であり、しかも、脂質依存性の酵素群からなることから放射線によりその活性の変動が起こることが予想されるので、この系に対する放射線の作用機構を解析した。

3. ラット肝細胞における C-キナーゼ系の変動 (C-キナーゼの膜画分への移行)

細胞内にはタンパク質のリン酸化反応を介して作動する情報伝達系があり、多くのリン酸化酵素(キナーゼ)が知られている。C-キナーゼは Ca^{2+} /リン脂質依存性の酵素であり、様々な増殖因子などへの応答反応に関わる酵素であり⁶⁾、近年、放射線応答や感受性に関わる反応に関係していることが示唆されているがその機構は明らかではない^{7),8),9)}。ラット肝細胞における、放射線照射後の C-キナーゼ活性を C-キナーゼに特異的にリン酸化されるペプチドのリン酸化を指標にして測定した。5Gy および 50Gy の γ 線照射後 30 分の肝細胞を細胞質、膜画分に分けて、各々で活性をみると、細胞質画分では線量に応じて活性が減少し、膜画分では逆に増加していた (Fig. 5)。このような C-キナーゼの活性変動はその原因が各画分での C-キナーゼの量的変化によるものである可能性を強く示唆している。そこで、細胞質画分および膜画分における放射線照射後の C-キナーゼ分子の量の変化について解析を行った。ホルボールエステルは C-キナーゼに結合部位をもつ化合物である。このホルボールエステル的一种であるホルボールジブチレートに ^3H ラベルしたものをを用いて、照射後の肝細胞の膜・細胞質画分でのそれぞれの C-キナーゼの分子の量を測ることができる。(Fig. 6.) に示すように、細胞質画分では、照射後に C-キナーゼの分子数が減少し、膜画分では増加していた。これらの結果から、放射線は C-キナーゼ分子の膜への移行を誘起し、結果として C-キナーゼの活性化に結び付くことが明らかになった。

4. C-キナーゼ活性化と膜脂質過酸化

C-キナーゼの膜への移行はどのような仕組みで生じているのであろうか。放射線により生成する活性酸素種が引き起こす膜脂質の過酸化がその起点となっていることが考えられる。膜脂質の過酸化は肝細胞において線量依存的に増加するものでもある。この脂質過酸化はラジカル消去剤である Trolox を用いて抑えられることから、この Trolox を用いて、C-キナーゼの膜への移行現象への効果を調べた。(Fig. 7.) のように、照射された肝細胞における膜画分への C-キナーゼ移行は Trolox によりコントロール群レベルに

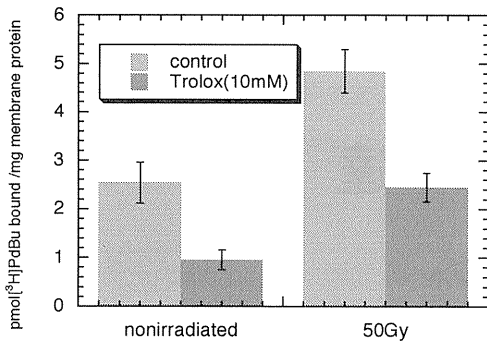


Fig. 7 Effect of Trolox on PdBu bound to the membrane fraction in irradiated rat hepatocytes

30分で最大に達する。この15分間に活性化のシステムが働くのであろう¹⁰⁾。前述の Ca^{2+} の濃度変化が関わっている可能性もある。現在蛍光色素を用いて細胞内 Ca^{2+} の分布を解析することを検討中である。リン脂質による修飾も大きな要因である。放射線照射で各種リパーゼ系の活性化が誘導されることも示唆されている¹¹⁾。

我々はC-キナーゼがリン脂質依存性の酵素でもあることから、肝細胞を放射線照射した後の、膜のリン脂質の組成分析をHPLCを用いて行ったところ、他のリン脂質と比較してホスファチジルコリン(PC)が顕著に減少していた¹²⁾。このことは放射線によりPCから何らかの生成物が生じていることを示唆している。リパーゼによるPCからの生成物がC-キナーゼの活性に関与している可能性は高い。

6. C-キナーゼファミリーからのC-キナーゼ活性化機構の推測

C-キナーゼの活性化は以上のように様々な調節因子を介しておこることが考えられる。C-キナーゼは数種のファミリー(cPKC, nPKC, aPKC)を形成しており、その活性化機構はそのファミリーのタイプによって異なっている。我々はC-キナーゼの活性化を Ca^{2+} 、ホルボールエステル存在下で測定し、またC-キナーゼの量をホルボールエステルとの結合量で測定したことから、放射線により活性化されるC-キナーゼはcPKC (Ca^{2+} 、ホルボールエステル依存性)、nPKC (ホルボールエステル依存性)のいずれかであろうと推測している。ラット肝細胞ではnPKCの一種 δ -PKCが顕著に発現していることがわかっている¹³⁾。近年、nPKCはPI3-キナーゼ生成物により活性化されることが示唆されている¹⁴⁾。 δ -PKCが放射線により活性化されるPKC種であるならば、 Ca^{2+} やリパーゼ系だけでなくPI3-キナーゼが関与するシグナリング系もC-キナーゼを活性化している可能性がある。PI3-キナーゼは、放射線感受性疾患との関連が強く示唆されている酵素であり、この系が働いている可能性は十分に考えられる¹⁵⁾。

III. まとめ

放射線を一種の酸化ストレスとして始まる一連の情報伝達系の誘導は、単なる障害ではなく様々な生理的機能の拡がりを見せる現象である。今回は膜系で生じていると思われる系を中心に解析した結果を述べたが、これらの変動は、おそらく、細胞核で生じている修復・組み換え等に関わるシステムとクロストークすることによって、その後の細胞、ひいては生体の運命を左右するのであろう(図1)。これらの系の経路を一つずつ明らかにしていくことが放射線等による酸化ストレスから生じる疾患のメカニズム、そし

まで抑制された。したがって、C-キナーゼの膜移行現象は膜脂質の酸化がその起点となっていると考えられる。Troloxを加えたのみの群でC-キナーゼの分子数が膜画分で減少していることは、生体内の何らかの酸化物がC-キナーゼ活性に影響を与えていることを示すものであり興味深い。

5. 脂質過酸化からC-キナーゼ活性化までの経路

脂質の過酸化からC-キナーゼの活性化までは種々の経路が考えられる。C-キナーゼの膜での分子数の増加は、時系列変化を調べてみると、15分後位から始まり、

図1 放射線と細胞情報伝達

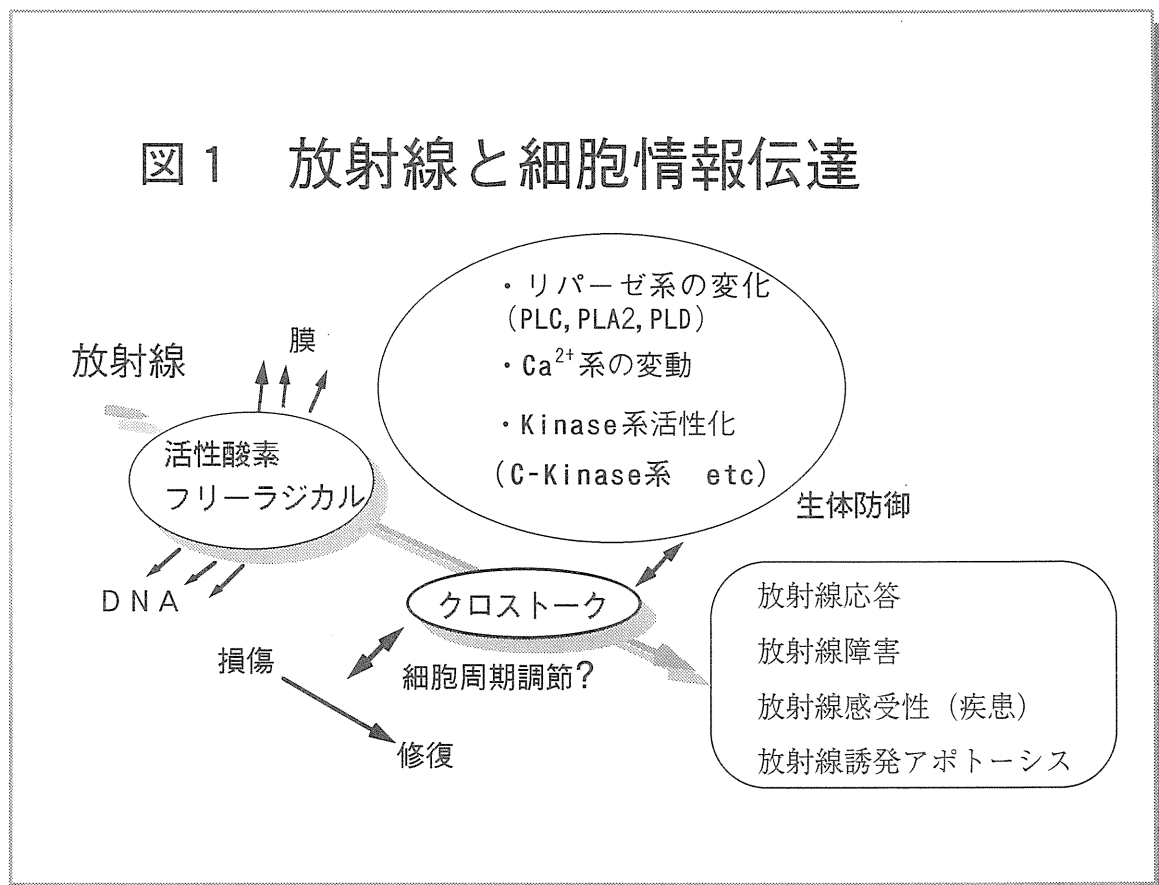


図1 放射線と細胞情報伝達

てアポトーシスなどの生体防御システムの理解につながるであろう。

参考文献

- 1) Leyko, W. and Bartoz, G.: Membrane effects of ionizing radiation and hyperthermia. *Int.J. Radiat. Biol.* 49: 743-770, 1986.
- 2) Yukawa, O., Nagatsuka, S. and Nakazawa, T.: Reconstitution studies on the involvement of radiation-induced lipid peroxidation in damage to membrane enzymes. *Int. J. Radiat. Biol.* 43: 391-398, 1983.
- 3) Clapham, D. E.: Calcium Signaling. *Cell* 80: 259-268, 1995.
- 4) Hallahan, D. E., Bleakman, D., Virudachalam, S., Lee, D., Grdina, D., Kufe, D. W. and Weichselbaum, R. R.: The Role of Intracellular Calcium in the Cellular Response to Ionizing Radiation. *Radiation Research* 138: 392-400, 1994.
- 5) Nakajima, T. and Yukawa, O.: Radiation effect on signaling transduction in rat hepatocytes. *Environ. Mut. Res. Commun.* 16: 403-408, 1995.
- 6) Nishizuka, Y.: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312, 1986.
- 7) Kim, C. Y., Giaccia, A. J., Strulovici, B. and Brown, J. M.: Differential expression of protein kinase C ϵ Protein in lung cancer cell lines by ionizing radiation. *Br. J. Cancer* 66: 844-849, 1992.
- 8) Woloschak, G. E., Chang-Liu, C.-M. and Shearin-Jones, P.: Regulation of Protein Kinase C by Ionizing Radiation.

Cancer Research **50**: 3963-3967, 1990.

- 9) Hallahan, D. E., Sukhatme, V. P., Sherman, M. L., Virudachalam, S., Kufe, D. and Weichselbaum, R. R.: Protein kinase C mediates X-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2156-2160, 1991.
- 10) Nakajima, T. and Yukawa, O. 未発表
- 11) Avila, M. A., Otero, G., Cansado, J. and Dritschilo, A.: Activation of Phospholipase D Participates in Signal Transduction Pathways Responsive to γ -Radiation. *Cancer Research* **53**: 4474-4476 1993.
- 12) Nakajima, T. and Yukawa, O. 未発表
- 13) Nakajima, T. and Yukawa, O. 未発表
- 14) 守屋繁春、秋本和憲、大野茂男：PI3-キナーゼを介した PKC の活性化。実験医学、**13**, 50-54, 1995.
- 15) Kinneret Savitsky et al.: A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to PI-3 Kinase. *Science* **268**: 1749-1753, 1995.

Table 1 *Helicobacter pylori*-related diseases of the stomach

消化性潰瘍
胃潰瘍
十二指腸潰瘍
慢性表層性胃炎
慢性萎縮性胃炎
リンパ増殖性疾患
MALToma
胃癌

以後プラトーに達する) ゆえ、安易な抗生物質の投与も躊躇せざるをえない。加えて、現時点では *H. p.* 感染による胃粘膜傷害の機序も明らかでなく、その詳細を解明し、新たな対策を講じることは急務の課題であり、新たな治療ストラテジーの確立となる可能性もある。本シンポジウムではこれまでに解明されてきた *H. p.* 感染の組織、細胞傷害機序を紹介し、活性酸素・フリーラジカルの面からみた治療、対策について述べたい。

(2) *H. p.* 感染と好中球浸潤

Fig. 1 は *H. p.* 感染胃粘膜の組織像であるが、著明な炎症細胞浸潤、好中球浸潤がみられ、好中球は一部胃粘膜上皮内にまで浸潤する像が観察される。このような組織像は程度の差はあるものの *H. p.* 感染胃粘膜の特徴である。*H. p.* 菌体は主に胃粘液層、胃粘膜表層に感染、発育するが、組織への浸潤傾向は少ない。しかし、多形核白血球浸潤は長期にわたり持続し、胃粘膜上皮内へも浸潤し、次第に胃粘膜は変性、脱落、萎縮していく。こういった慢性萎縮性胃炎と呼ばれる変化は従来加齢による不可逆的変

化と考えられてきたが、*H. p.* 感染の見られない胃粘膜には萎縮像はなく、慢性胃炎の原因は特殊なものを除いて *H. p.* 感染が原因と考えられるようになった。しかし、その胃粘膜細胞傷害機序については不明な点も多い。白血球を組織に呼び寄せる因子としては、胃粘膜上皮や炎症細胞から産生されるインターロイキン 8 (IL-8) や *H. p.* 培養抽出液による検討から neutrophil activating protein (NAP) などが知られている。実際に、*H. p.* 培養抽出液 (water extract) の添加により白血球-血管内皮間相互反応が亢進する現象が *in vivo* ならびに *in vitro* で観察される³⁾。この抽出中の接着分子惹起物質は、酸、ペプシンに耐性であり、好中球表面上に存在する接着分子 CD11b/CD18 の発現を亢進させ、血管内皮細胞表面の接着分子 ICAM-1 との間で細胞接着および好中球の血管外遊走を引き起こした。Fig. 2 はこの *H. p.* 抽出液による好中球接着に及ぼす各種接着分子抗体投与の影響をみたものであるが、CD18 あるいは CD11b に対する抗体により有意に接着が抑制されている。これらの結果は、*H. p.* 感染により胃粘膜に炎症反応が引き起こされ、その持続が粘膜障害に進展する可能性を示している。

の因果関係も疫学的に確認されるところとなっている。また、胃潰瘍、十二指腸潰瘍といった再発を繰り返すとされてきた疾患も、*H. p.* の除菌により再発を防止できることが明らかとなり、消化性潰瘍に対して抗生物質による治療も試みられている。しかし、*H. p.* 感染は他の感染症と異なり抗生物質による除菌治療が容易ではなく、また、本邦における極めて高い感染率 (浅香ら²⁾ によると、*H. p.* 抗体の陽性率は30歳までは1年に約1%の割合で上昇し、40歳代より75%前後に急激に上昇し、

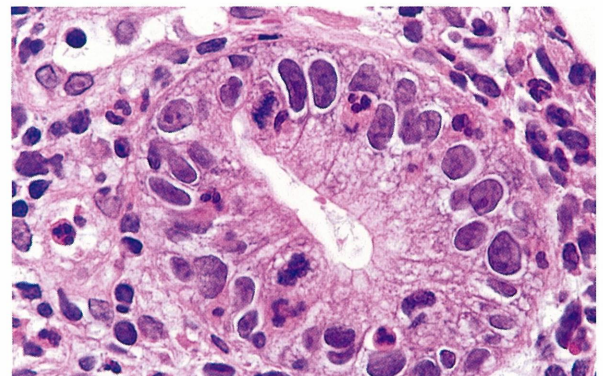


Fig. 1 Histology of HE-stained antral biopsy from a patient with *Helicobacter pylori*.

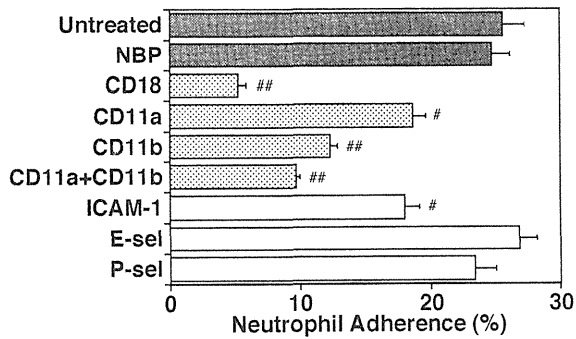


Fig. 2 Effects of monoclonal antibodies to adhesion molecules or mouse IgG nonbinding protein (NBP) on PMN adherence to HUVEC induced by the *H.pylori* extract.

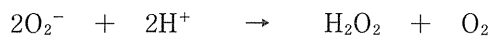
Each value represents mean + SE of 3 experiments in triplicate.

#p < 0.01 and ##p < 0.001 as compared with untreated group.

(adapted from ref.3)

て粘膜に浸潤した好中球より産生される O_2^- あるいはそれに派生する種々の活性種が粘膜傷害を引き起こすというものである (Fig. 3)。好中球は活性化されるとスーパーオキシド (O_2^-) を産生する。スーパーオキシドは自発的不均化反応ならびに superoxide dismutase (SOD) の存在下に過酸化水素へと還元される。

SOD

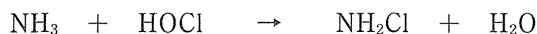


さらに、過酸化水素は好中球内のアズール顆粒の放出によりもたらされた myeloperoxidase (MPO) と塩素イオン (Cl^-) の存在下でより活性の強い hypochlorous acid (HOCl) が生じる。HOCl は過酸化水素に比較して約100倍の活性を有するとされており、多くの生体内分子種と反応し障害をもたらすと考えられている。

MPO



さらに、HOCl はアンモニアの存在下では monochloramine (NH_2Cl) というさらに細胞障害性の強い物質を生成する。アンモニアは *H. p.* より放出されるウレアーゼにより産生される。



NH_2Cl は脂溶性であり、細胞膜を容易に通過することより、極めて毒性が強いとされており、赤血球のヘモグロビンやグルタチオンを酸化することなどが報告されている^{4),5)}。実際に、胃粘膜培養細胞を用いた検討では、*H. p.* による活性化された好中球は胃粘膜細胞傷害を引き起こし、その傷害はカタラーゼ、タウリン (HOCl 消去剤)、メチオニン (NH_2Cl 消去剤) により有意に抑制される⁶⁾。なかでも、メチオニンが著明な抑制効果を示すことより、 NH_2Cl が *H. p.* による細胞障害機序のなかで最も重要な役割を果たしているとしていると考えられる。また、実際に過酸化水素、HOCl、 NH_2Cl によって濃度依存性に胃粘

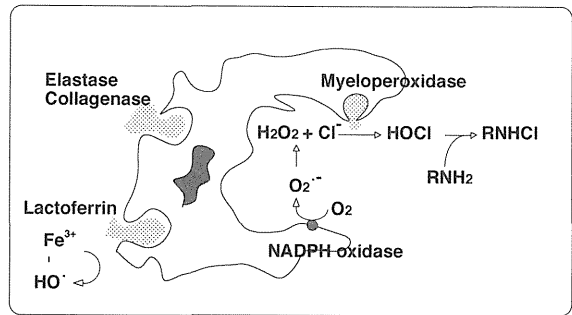


Fig. 3 Reactive oxygen species produced from activated polymorphonuclear leukocytes

(3) 胃粘膜障害メカニズム

活性化された好中球が *H. p.* による胃粘膜傷害にどのように関与しているかについては以下のような仮説が提唱されている。つまり、*H. p.* によ

膜培養細胞に傷害が引き起こされることも確認している。これらの結果は、活性化好中球により産生される $O_2^- \rightarrow H_2O_2 \rightarrow HOCl \rightarrow NH_2Cl$ が粘膜傷害に重要であることを示すものである。また、ヒトにおける検討でも *H. p.* 感染胃粘膜では好中球の組織浸潤の指標である MPO 活性が有意に上昇し、粘膜内 thiobarbituric acid (TBA) 反応物質も高値をとることを確認している。

(4) 抗酸化作用を有する胃粘膜防御系薬剤

H. p. に殺菌効果のある抗生物質による除菌療法が最も有効な治療法であることは当然であるが、*H. p.* の薬剤耐性の獲得、*H. p.* の再感染、抗生物質による副作用、極めて多い治療対象者、本邦においては健康保険治療が認められていないなどいくつかの問題点がある。現在までに明らかとなった *H. p.* 感染による胃粘膜障害機序をまとめると Fig. 4 のようになる。このような点からすれば、本感染症に対する対策もいくつかが考慮に入れられる。たとえば、好中球の活性化の抑制、活性酸素の消去などである。実際、いくつかの臨床応用されている抗潰瘍薬にはこのような活性酸素消去作用、抗炎症作用を有するものが報告されている⁷⁾。

抗酸化作用を期待して開発されたものに亜鉛-カルノシン化合物 (polaprezinc: N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc) がある。亜鉛には以前より抗酸化作用が報告されており、そのメカニズムとして多くの酵素活性に必要な SH 基の酸化を亜鉛が防御することや、亜鉛が膜結合部位にある鉄や銅と置換されることによりそれらの遷移金属依存性のラジカル反応を阻害することなどが示唆されている⁸⁾。また、カルノシンは骨格筋などに比較的高濃度に存在するジペプチドであるが、カルノシンについてもペルオキシラジカル消去作用をはじめとして多くの抗酸化作用が近年数多く報告されている^{9), 10)}。polaprezinc はともに抗酸化作用が示されている亜鉛とカルノシンをキレート結合させた新規化合物であり、各種実験の胃粘膜障害に対する有効性が示され、胃粘膜内過酸化脂質の増加を抑制する (Fig. 5)^{11), 12)}。加えて、ヒト胃潰瘍に対する臨床試験においても有効性も認められている。本化合物は、in vitro において、低濃度では一重項酸素消去活性やオプソニン化ザイモザン刺激による好中球スーパーオキシド産生抑制作用、比較的高濃度では脂質過酸化抑制作用やスーパーオキシド消去活性などが報告されている^{13), 14)}。また、最近では *H. p.* に対する直接的な抗菌作用やウレアーゼ阻害作用なども見いだされており、実際に抗生物質との併用により極めて高率に *H. p.* 感染を治癒せしめることが報告されている。

また、最近胃潰瘍に対して臨床応用されている rebamipide にもいくつかの抗酸化作用が見出されてい

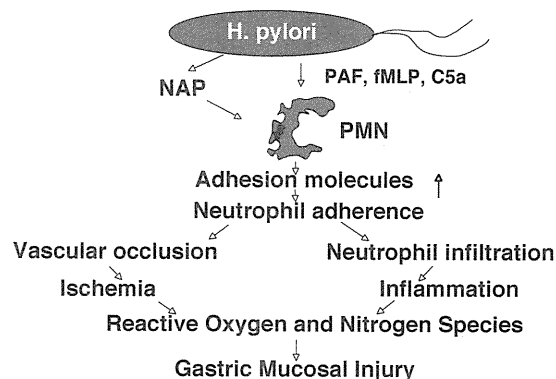


Fig. 4 Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-induced gastric mucosal injury

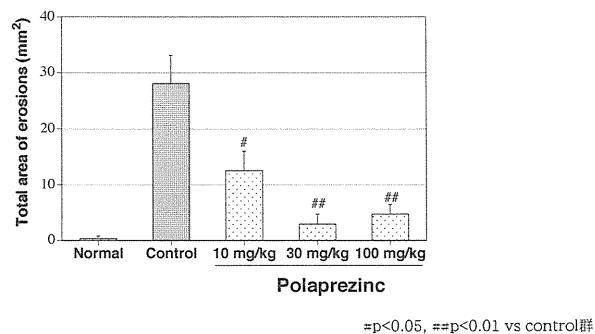


Fig. 5 Effect of polaprezinc on the total area of gastric erosions induced by ischemia-reperfusion in rats

(adapted from ref. 11)

る¹⁵⁾。rebamipide は CuZnSOD 阻害剤である DDC (diethyldithiocarbamate) によるラット前庭部潰瘍を有意に抑制し¹⁶⁾、また、虚血再灌流性胃粘膜障害やインドメタシンによる胃粘膜障害の発生を抑制することが報告されている。in vitro における検討でも rebamipide がヒト末梢多形核白血球の O_2^- の産生を抑制したり、ヒドロキシルラジカルを効率よく消去することが明らかとなっており^{15), 17)}、また、*H. p.* により活性化を受けた好中球による胃粘膜培養細胞障害を有意に抑制する (Fig. 6)¹⁸⁾。これらの抗酸化作用が抗潰瘍作用につながっているものと考えられる。このようなヒドロキシルラジカル消去作用を有する rebamipide が、

ラット酢酸潰瘍の再発を抑制することも示されており¹⁹⁾、今後潰瘍再発とフリーラジカル反応との関与がより一層明らかになるにつれ、rebamipide の消化性潰瘍に対する有用性が示されるものと考えられる。

以前より臨床応用されている抗潰瘍薬のなかにも抗酸化作用を有するものも少なからずある。また、漢方薬の薬理作用としても抗酸化作用は注目されており、なかでも四逆散には著明な O_2^- 消去作用、ヒドロキシルラジカル消去作用があり、ラット虚血再灌流性胃粘膜障害に対する有効性も見いだされている²⁰⁾。また、漢方薬ではないが、薬草の有効成分より発見、開発された抗潰瘍薬のなかにも活性酸素の消去作用を有するものが見出されている。

(5) おわりに

H. p. 感染による胃粘膜障害の機序について、活性酸素・フリーラジカルの面から考察を加え、また、現在臨床応用されている薬剤の抗酸化作用についても紹介した。

文 献

- 1) Warren JR and Marshall B: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, i: 1273-1275, 1983
- 2) Asaka M, Kimura T, Kudo M, et al.: Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology*, 102: 760-766, 1992
- 3) Yoshida N, Granger DN, Evans Jr DJ, et al.: Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology*, 105: 1431-1440, 1993
- 4) Grisham MB, Jefferson MM and Thomas EL: Role of monochloramine in the oxidation of erythrocyte hemoglobin by stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 259: 6766-6772, 1984
- 5) Grisham MB, Jefferson MM and Melton DF: Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 259: 10404-10413, 1984
- 6) Suzuki M, Miura S, Suematsu M, et al.: *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am. J. Physiol.*, 263: G719-G725, 1992
- 7) 内藤裕二、吉川敏一、近藤元治: 抗酸化剤による消化管疾患治療. *G.I. Research*, 3: 271-278, 1995

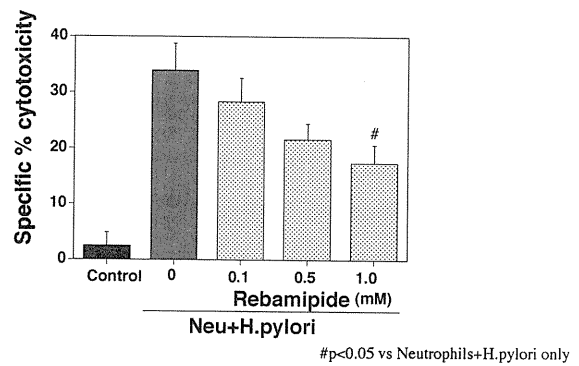


Fig. 6 gastric mucosal cell damage induced by *H.pylori*-activated neutrophils and the effect of rebamipide.

(adapted from ref. 18)

- 8) Bray TMand, and Bettger WJ: The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, **8**: 281-291, 1990
- 9) Salim-Hanna M, Lissi Eand, and Videla LA: Free radical scavenging activity of carnosine. *Free Rad. Res. Comms.*, **14**: 263-270, 1991
- 10) Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, et al.: Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 3175-3179, 1988
- 11) Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, et al.: Effect of zinc-carnosine chelate compound (Z-103), a novel antioxidant, on acute gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Free Radic. Res. Commun.*, **14**: 289-296, 1991
- 12) Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, et al.: Effect of zinc-carnosine chelate compound (Z103) on burn-induced gastric mucosal injury in rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **7**: 107-113, 1989
- 13) 米田智幸、吉川敏一、内藤裕二 他：亜鉛-カルノシン化合物 (Z103) の一重項酸素消去作用. *医学のあゆみ*, **154**: 501-502, 1990
- 14) Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, et al.: The antioxidant properties of a novel zinc-carnosine chelate compound, N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1115**: 15-22, 1991
- 15) Yoshikawa T, Naito Y, TanigawaT, pt al.: Free radical scavenging activity of the novel anti-ulcer agent rebamipide studied by electron spin resonance. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, **43**: 363-366, 1993
- 16) Yamasaki K, Ishiyama H, Imaizumi T, et al.: Effect of OPC-12759, a novel antiulcer agent, on chronic and acute experimental gastric ulcer, and gastric secretion in rats. *Japan. J. Pharmacol.*, **49**: 441-448, 1989
- 17) Naito Y, Yoshikawa T, Tanigawa T, et al.: Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: Electron paramagnetic resonance study. *Free Rad. Biol. Med.*, **18**: 117-123, 1995
- 18) Suzuki M, Miura S, Mori M, et al. Rebamipide, a novel antiulcer agent, attenuates Helicobacter pylori induced gastric mucosal cel injury associated with neutrophil derived oxidants. *Gut* **35**: 1375-1378, 1994.
- 19) 白木正裕、山崎勝也、石山広信 他：酢酸潰瘍の再発・再燃に及ぼす防御因子増強薬物 proamide の効果. *目薬理誌*, **92**: 389-395, 1988
- 20) Yoshikawa T, Takahashi S, Ichikawa H, et al.: Effects of TJ-35 (Sugyaku-san) on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion and its oxygen-derived free radical-scavenging activities. *J. Clin. Biochem Nutr.*, **10**: 189-196, 1991

性について、筆者らが得た実験結果を踏まえ検討する。これにより、標記課題に代えたい。

I. 時間軸から見た生体防御機構

進化のどの段階にある動物でもホメオスタシスを維持するために、外界から侵入しようとする多くの微生物や有害化学物質などの侵入を体表層で阻止し、あるいは侵入後に対処する。野本らは多くの書で、この生体防御機構のプロセスを時間軸の観点から、次のような初期防御系とその後の免疫系に大別できることを紹介している。

1. 初期防御系と免疫系とは

初期防御系はマクロファージまでの段階であり、免疫系が関与せずに作動して異物の侵入後2～3日までの防御を担当し、ホルモン系や神経系とともに日常の健康維持を図る。免疫系は、異物侵入後の4～6日後まで担当する系（IgM抗体と未発達型のT細胞応答）と7日以後に担当する系（クローン増殖後に機能するIgG抗体、キラーT細胞、リンホカイン型感作リンパ球）とがある。

高等な哺乳類では初期防御系に免疫系が積み重ねられているので、初期防御系との役割分担が可能である。即ち、異物が生体内部へと侵入すると、生体側は初期防御系から免疫系へと展開する連続的バリアに対応する。この連続的バリアは相手によって変化するが、基本骨格は共通している。例えば、細菌が侵入した場合、生体内部では補体活性化→好中球→マクロファージ→免疫防御へと展開する。

初期防御系は免疫系以外の要素であり、即応能力に富む。また、増幅能力は低いが、病原性の低い微生物群、老廃した自己細胞、過剰な自己産物などの処理はできる。他方、免疫系は、5～7日の間の分裂・増殖のための期間が必要なため、即応能力には欠けるが、増幅能力には富む。従って、初期防御系の壁が破られた場合、免疫系による集中攻撃が行われる。

初期防御系に関与する体液性因子には、凝集素群、殺微生物因子群、補体など多くのものが含まれる。また、細胞性因子には、異物粒子を取り込み消化する好中球やマクロファージなどの食細胞、化学活性物質を分泌して作用を発揮する好酸球や好塩基球、ガン細胞やウイルス感染細胞に結合して直接的に細胞傷害作用を発揮するnatural killer (NK)細胞が含まれる。同様に、免疫系に関与する液体性因子には抗体があり、細胞性因子には数種類のリンパ球がある。

2. 初期防御系と免疫系の段階的变化

(1) 初期防御系（化学的生体防御機構）の段階的变化

ストレスなどの原因により生体内に生じた過剰な活性酸素は毒性を有し、これが生体内酸化傷害の蓄積プロセスを経て、細胞や組織障害につながり、老化や発癌など種々の病的状態を生み出している。これに対し、生体には活性酸素を消去したり、損傷を起こした分子を修復したりして結果的に生ずる傷害を防御する化学的生体防御機構がある。この化学的生体防御機構は主に初期的防御であり、二木らは次のような段階的变化をすることを紹介している（図1）¹⁾。

化学的生体防御機構は、ストレスにより生体内に生じる活性酸素に対して幾重にもなった防御機構である。1番目は予防的抗酸化物であり、活性酸素・フリーラジカルの産生を抑える。2番目は活性酸素捕捉抗酸化物であり、それでも生成してくる活性酸素・フリーラジカルを捕捉して安定化する。3番目は生じた傷を修復しまた再生するものである。さらに、酸化的ストレスの負荷の増強がシグナルとなって抗酸化

系酵素の合成が誘導されるという適応機能も生体は有している。このようにして生体は精緻でかつ巧妙な化学的防御機構により自らを護っている。

(2) 免疫系の段階的变化

生体防御を構成する多くの因子の中で、最も進化したものが免疫系であり、脊椎動物の出現とほぼ同時に出現した。それだけに動物の進化の立場からは新しくその仕組みは精巧である。また、ヒトやマウスには、生物の進化の各段階において獲得した全ての防御因子が積み重ねられている。野本らは、次のような免疫系の段階的变化を紹介している (図2)。即ち、免疫系は、骨髄におけるリンパ球前駆細胞の産生、成熟中枢におけるリンパ球の産生、免疫成立または免疫応答、そして最終的な応答の発現へと段階的に変化して防御の一端を担っている。

3. 生体防御機構と適度なストレス

適度でかつ断続的なストレスは生体防御機構にとって適度の刺激となり、生体防御の活動準備状態を作る。しかし、過度のストレスが持続すると生体防御は徐々に機能を低下させ、やがて破壊状態へと進む。これは副腎皮質ホルモン (抗炎症作用) の過度な持続的産生による生体防御系の機能低下が主因である。他方、ストレスの全くない状態では生体防御系も休眠状態となり、病原性のある微生物などの侵入に即応できない。ホメオスタシスを維持するためには、適度の強さで断続的なストレスを運動その他を介して活用することで、適切な生体防御機構を保持することが重要と言える。

II. 少量活性酸素による化学的生体防御機構の活性化と生体内酸化傷害の緩和

酸素呼吸にともない、取り込まれた酸素は酸化によるエネルギーを付加するが、一方では活性酸素やラジカルを生じる。これらの周辺に存在する生体膜・DNA・酵素など、さまざま

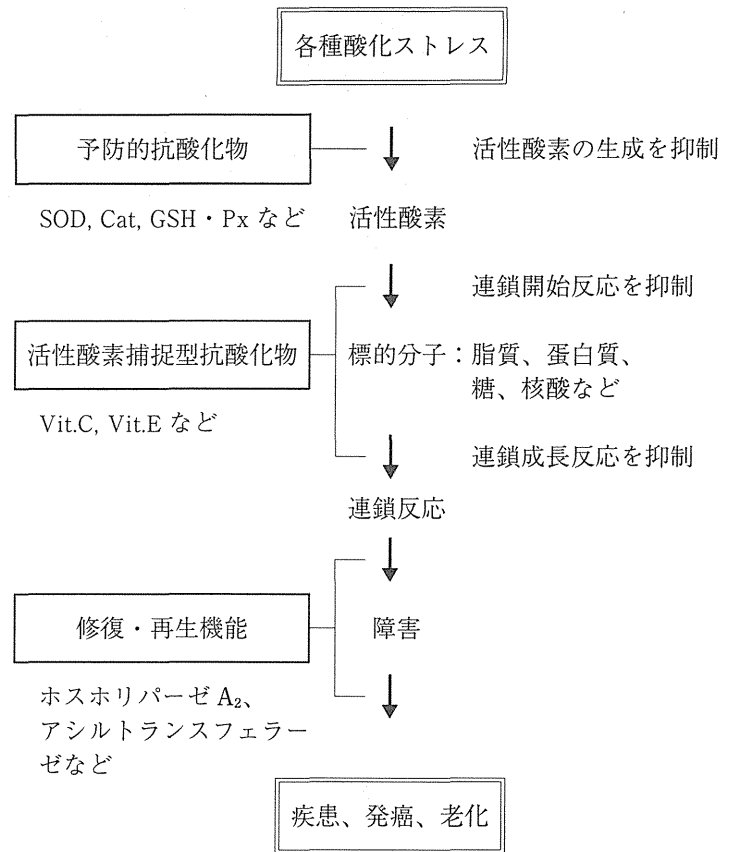


図1 化学的生体防御機構の段階的变化 (二木鋭雄の図を改編)

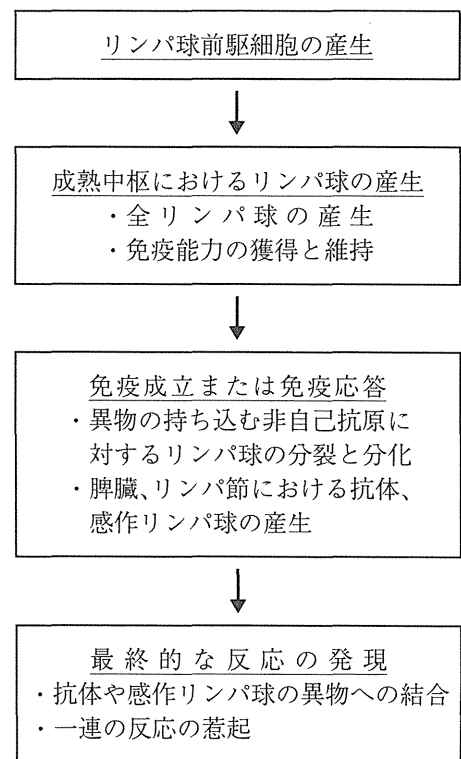


図2 免疫系の段階的变化 (野本亀久雄の図を改編)

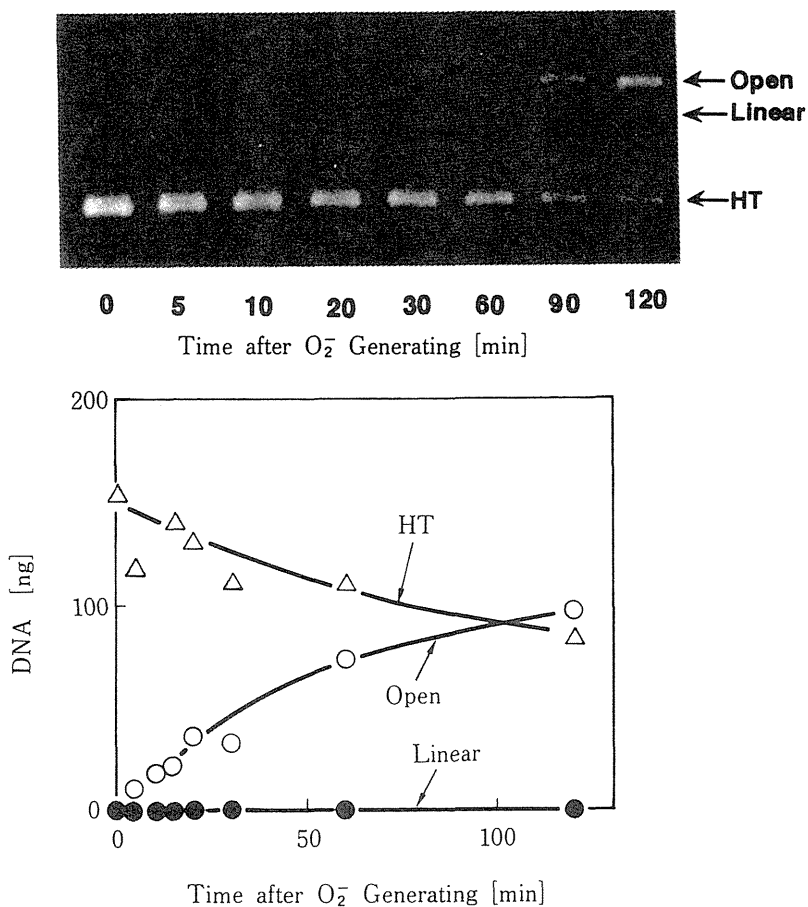


Fig. 3 Time Dependent Enhancement of DNA Damage by Superoxide Generating System. Used XOD was 100 munit/ml. Upper panel shows the pattern of damaged DNA distribution in agarose gel electrophoresis. HT, highly twisted DNA; Open, open circle DNA; Linear, linear DNA.

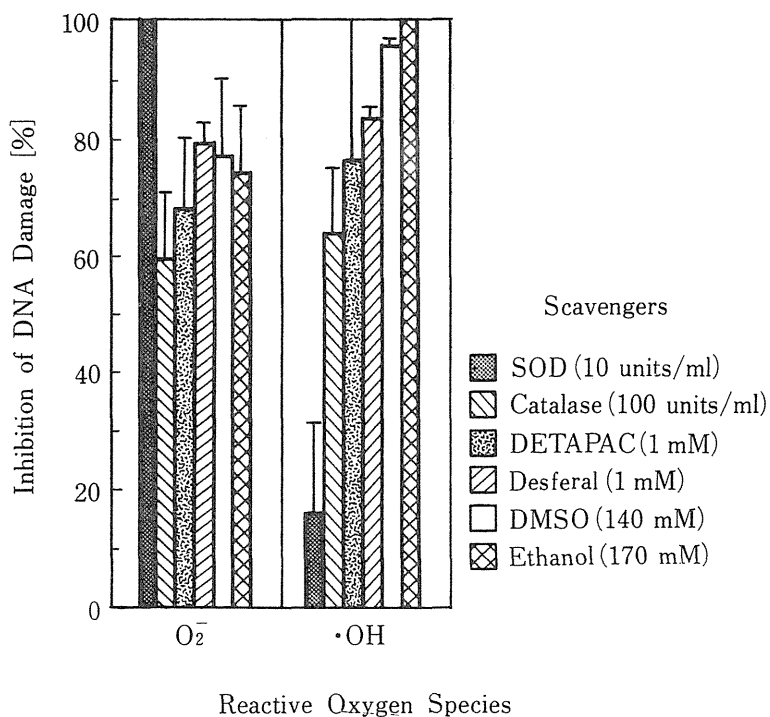


Fig. 4 Effect of Various Scavengers on DNA Damage Induced by Active Oxygens and Radicals. Damaged DNA was quantitated at 30 min and 5 min for X-XOD and $\cdot OH$, respectively. Concentrations of various scavengers were described in figures.

まな生体高分子を酸化して、その機能に障害を与えるため、老化や癌の遠因となる。しかし、元来、生体にはさまざまなストレスに対抗して内部環境の恒常性を維持する自己防御機構が備わっており、例えば、活性酸素種の一つである O_2^- に対しては、これを過酸化水素に変え、さらに過酸化水素を水と酸素に分解する SOD・カタラーゼの抗酸化系が作用することが知られている。

われわれは低線量 X 線照射によりラットにおいて、ラドン泉吸入によりウサギにおいて諸臓器・組織中の SOD 活性が亢進することを明らかにした^{2),3)}。SOD 活性が亢進するなら、一般には、抗酸化系の機能が亢進し、活性酸素の傷害作用を抑制すると考えられる。

即ち、前述の通り、日常の健康維持をホルモン系や神経系と共に担う化学的生体防御機構は、適度な酸化ストレス、即ち少量の活性酸素を生体内に発生させる環境下では活性化する可能性があり、また、これに伴い生体内酸化傷害は緩和する可能性がある。

1. 活性酸素の作用

(1) 活性酸素による DNA 損傷の生成とその防護

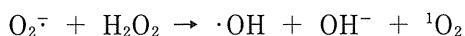
1~1.5Gy の X 線で細胞を照射すると、DNA の 1 本鎖切断が1,000、2 本鎖切断が50~100生じるとされている。放射線照射によって細胞内に生じた活性酸素のどれが主に DNA 鎖の切断に寄与しているかを調べるために、 O_2^- 、 $\cdot OH$ の活性酸素を plasmid DNA に作用させ、生じた DNA 鎖切断を電気泳動の泳動パターンの変化から調べた⁴⁾。

Xanthine-Xanthine oxidase (X-XOD) 反応により約 $10\mu M$ /分の O_2^- を発生させ、pUC19 の DNA に作用させた場合、正常型を表すねじれ型 DNA (HT DNA) が時間とともに減少したのに対して、1 本鎖切断を表す開環型 DNA (Open circle DNA) は増加し、120分の培養後には正常型をやや上回った。一方、培養120分後まで 2 本鎖切断を表す直線型 DNA (Linear DNA) は観察されなかった (Fig. 3)。

同様に、DNA 損傷生成への寄与が問題とならない濃度の Fe イオンの存在下で Fenton 反応により $\cdot OH$ を発生させ、pUC19 の DNA に作用させると、反応直後に HT DNA 量が減少し、Open circle DNA 量は増加したが、両者ともその後は大きな変化を示さなかった。また、この場合も、Linear DNA の生成は認められなかった。従って、この反応条件下では、DNA 損傷の程度は強く現れないと考えられる。

次に Superoxide dismutase (SOD)、catalase (Cat)、Fe イオンのキレート剤である diethylenetriamine pentaacetic acid (DETAPAC)・desferrioxamine (Desferal)、 $\cdot OH$ 消去剤である dimethyl sulfoxide (DMSO)・ethanol (EtOH) の存在下で、 O_2^- 、 $\cdot OH$ を発生させると、DNA 損傷が抑制された (Fig. 4)⁴⁾。X-XOD 反応で生成された O_2^- による DNA 損傷は、発生した O_2^- を SOD で消去することにより、ほぼ完全に抑制された。しかし、Cat、DETAPAC・Desferal、DMSO・EtOH も損傷の60~80%を抑制しているので、 O_2^- そのものの作用よりも、これから生じた H_2O_2 、 $\cdot OH$ が DNA 損傷の生成に寄与していることが分かった。

Fenton 反応で発生させた $\cdot OH$ による DNA 損傷は、SOD を作用させた場合には約20%の抑制にとどまったが、Catを作用させた場合には約60%抑制された。キレート剤で Fe イオンを除くと、約80%抑制された。また、 $\cdot OH$ 消去剤の DMSO・EtOH は、ほとんど完全に損傷を抑制した。これらの結果は、



で生成する $\cdot OH$ が DNA 鎖切断の原因であることを示唆する。

(2) 活性酸素による細胞膜の脂質過酸化とその防護

ラットの赤血球ゴーストに X-XOD 反応により発生させた $O_2^{\cdot-}$ 、またはこれと Fe^{3+} の反応で発生させた $\cdot OH$ を 37°C で 60 分間作用させると、脂質の過酸化反応が促進された。このとき、SOD を加えると、脂質過酸化がそれぞれ約 90%、約 80% 阻害された (Fig. 5)⁹⁾。また、肝細胞のミトコンドリア膜に X-XOD、および Fe^{3+} の反応による $\cdot OH$ を作用させた場合は、SOD によって脂質過酸化が約 65% 抑制された。この現象は、Vitamin E を欠いた状態で一層顕著であった⁵⁾。

活性酸素代謝の初期段階で発生する $O_2^{\cdot-}$ は、反応性が低く、 $O_2^{\cdot-}$ と反応しやすい標的分子は見つかっていない。従って、 $O_2^{\cdot-}$ と生体分子との反応は、SOD によりほとんど抑制されることが示唆され、本結果はこの実証例と言える。

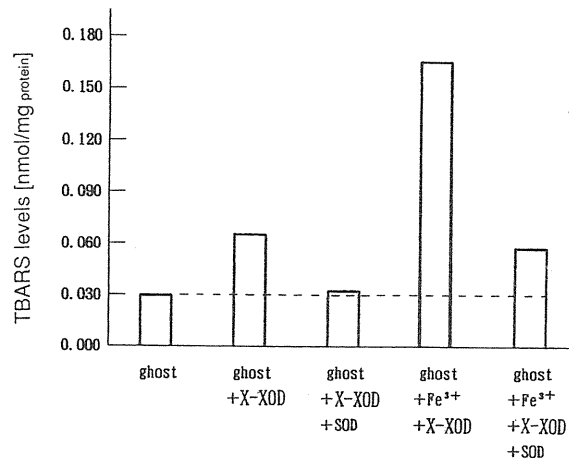


Fig. 5 Effects of SOD on Lipid Peroxidation of RBC Ghost

2. 低線量照射による細胞膜の構造と機能の変化

細胞膜は脂質の二重層によってできており、親水性の極性基が表面と内表面に、疎水性の脂肪酸側鎖よりなる非極性基が中心部に位置している。またさまざまな機能をもつ膜蛋白が、脂質層の表面に付着、または二重層の間に内在している。照射された細胞では、細胞表面の荷電状態の変化にともなう電気泳動度の減少^{6),7)}、細胞膜表面に結合する細胞凝集素の量の変化⁸⁾など、細胞膜の構造変化が起きたことを示す現象が観察されている。

蛍光ラベル法で、照射によってもたらされた細胞膜の構造変化を調べた米井らは、X線照射した赤血球膜に ANS を添加すると、蛍光強度が非照射に比べて明らかに減少すると報告している⁹⁾。この蛍光強度の減少は、ANS の膜への結合量の減少と、結合した ANS の蛍光量子収量の低下によってもたらされたものであるが、後者の寄与が大きいという。ANS の蛍光は、その周囲の溶媒の極性と局所粘度に強く依存している。しかし、ANS 結合部位周囲の極性変化にともなって蛍光強度が減少したことを示す蛍光スペクトルの変化は観察されていない。一方、照射された膜では、蛍光偏光度も低下することが分かった⁹⁾。蛍光偏光度の低下は、膜内で蛍光分子の動き易さが増大するような変化が合ったことを意味する。局所粘度の変化をよりよく表す DPH を用いた場合も蛍光偏光度の減少が観察された。DPH は脂質層に局在するので、蛍光偏光度の減少は、膜脂質層の流動性が上昇したことを示唆している。しかし、赤血球膜から抽出した脂質で作ったリポソームに X 線を照射しても、それに結合した DPH の蛍光偏光度は、10kR までほとんど変化を示さなかったという。

米井らは、X線照射による膜蛋白の構造変化に由来する膜固有蛍光の変化を観察し、その線量効果関係が X線照射による DPH の蛍光偏光度の変化に類似していること、蛋白の SH 基酸化剤が膜の固有蛍光と脂質層の動的構造に X線照射の場合と類似した変化をもたらすことを明らかにした¹⁰⁾。これらを考慮すると、照射による蛋白の構造変化の影響をうけて、膜内での脂質・蛋白間の相互作用が変化した結果、脂質分子の動きに異常が現われたと考えられる。

われわれは、ラットを25~50cGyのX線で照射し、大脳皮質について細胞膜の流動性の変化を観察した。脂質の極性基、および非極性基の動きには変化がなかったが、膜蛋白の動きを表すMSLは増加の傾向を示し、照射によって膜の流動性が上がること¹¹⁾、またそれが米井らの指摘したように、膜蛋白の動きに由来するものであることが示された。

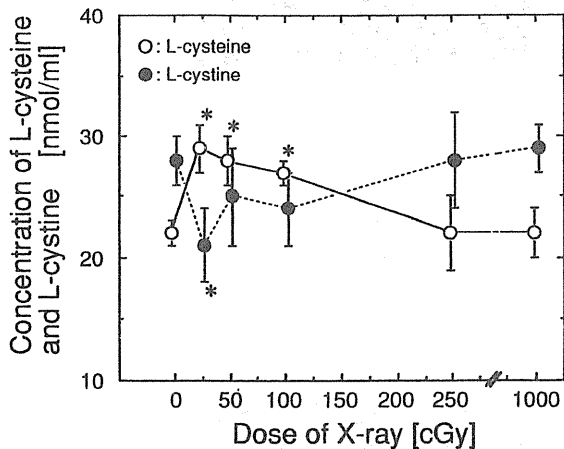


Fig. 6 Dose Dependent Changes in Cys and Cys-Cys of Rat's Brain Cortex by X-Irradiation. In figure, each value represents the mean \pm S.E.M.. *P < 0.05 by t test. N=10~15.

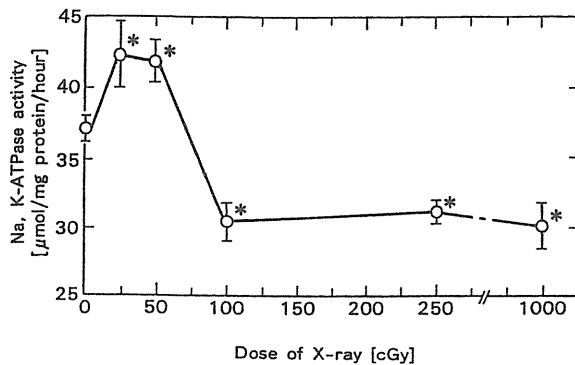


Fig. 7 Dose-dependent Changes in Na⁺, K⁺ ATPase Activity of Rat's Brain Cortex by X-Irradiation. In figure, each value indicates the mean \pm S.E.M.. The number of rats per experimental point is 10~15. *P < 0.05 vs sham-irradiated control (t test).

照射によりDNA損傷を生じると、照射3~4時間後に蛋白合成が誘導され、その中にPLD修復に関与するものが含まれることを明らかにした¹⁴⁾。このように、放射線を照射すると、生じた損傷を補償しようとする反応が誘導される。

Woloschakは、75cGyのX線、または90cGyの γ 線の照射によって、照射後3時間以内に蛋白キナーゼC (PKC) など、特定の遺伝子が発現することを報告している¹⁵⁾。また、96cGyの γ 線を照射したシリアハムスター胎児由来の培養細胞でSOD遺伝子が発現すると報告している¹⁶⁾。

われわれは、25cGyで成熟ラットを照射し、脾臓中に含まれるSOD mRNA量の変化を経時的に north-

SH基は、一般に放射線感受性が高く、とくに膜では蛋白SH基が損傷を受けやすいことが知られている。われわれは、ラットを25~100cGyのX線で照射し、その4時間後に大脳皮質の膜蛋白のアミノ酸組成を調べたところ、非照射の対照に比べてSH基をもつシステインが増加し、SS結合をもつシスチンが減少することを認めた¹²⁾。膜損傷の標的となるSH基をもつシステインは、照射によって生じた活性酸素などの攻撃を受けて酸化されるため、その2分子がSS結合で結び付いてシスチンに変化するが、照射4時間後には、SS結合が開裂し、システインに戻る傾向を示したと思われる (Fig. 6)。

同様に、細胞膜に内在するNa⁺, K⁺-ATPaseの活性を調べると、100cGy以上の線量では依然として活性の抑制が見られるものの、25cGyおよび50cGyでは活性が亢進した (Fig. 7)¹²⁾。このことは、低線量で照射された膜では、流動性が変化するが、それも比較的早期に正常な状態に戻ることを意味しよう。

3. 低線量照射によって誘導された分子レベルの応答

(1) 低線量照射によるSOD mRNAの誘導

放射線適応応答で染色体異常が抑制される反応では、低線量照射後に多くの蛋白が発現するが、これらの蛋白の合成を阻害すると、適応応答も誘導されなくなることが示された¹³⁾。Boothmanらは、X線

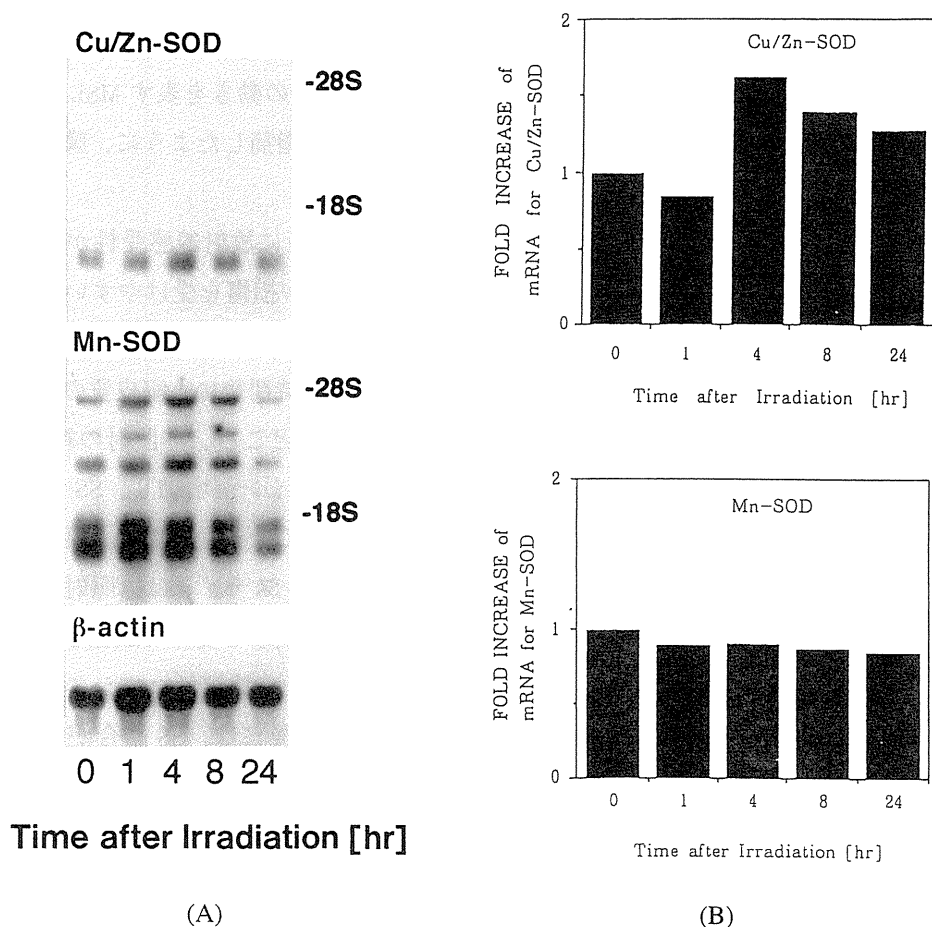


Fig. 8 Temporal Changes in the Concentration of the mRNA for Two Species of SOD in Spleens of Mature rats after X-irradiation. mRNA from the spleens of mature rats were isolated after exposure to 0.25 Gy. Poly (A)⁺ RNA (5 μ g) was electrophoresed in denaturing 1.2% agarose gels and bridized to Cu/Zn-SOD or Mn-SOD cDNA probes. Total mRNA amounts were quantitated using a densitometer and normalized to β -actin levels. mRNA expression levels for the two species of SOD were shown by autoradiography analysis (A) and were quantitated via densitometry (B). The mRNA for Mn-SOD showed the 4.1 kb, 3.0 kb, 2.1 kb, 1.08 kb and 0.85 kb bands. The mRNA for Cu/Zn-SOD showed a 0.72 kb band.

ern blotting 法により調べた。Mn-SOD の mRNA 量は変化しなかったが、Cu/Zn-SOD mRNA は、照射 4 時間後に顕著に増加した。照射 1 時間後の mRNA 量は対照群とほぼ同程度であったのに対し、8 時間後の mRNA 量は対照群より多かったこと (Fig. 8)¹⁷⁾を考慮すると、低線量照射により Cu/Zn-SOD の活性が増加するにつれて SOD が減少し、これを補うために SOD 遺伝子の発現が誘導されたと考えられる。

(2) ストレスによるストレス蛋白の誘導

1980年代に入って、種々のサイトカインの化学構造・受容体が明らかとなり、免疫系と神経・内分泌系との間の相互作用が示唆されるようになった。しかし、個体がストレスに曝された時に、全身レベルで起こる神経・内分泌系を介した情報伝達と、細胞レベルで起こるストレス蛋白の誘導との関係は、必ずしも明らかではなかった。

最近、拘束ストレスを与えると、脳下垂体から副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が放出され、その後、短時間で副腎皮質に HSP70 などのストレス蛋白が誘導されることが報告された。このストレス蛋白の誘導は、血中に ACTH を投与しただけでも見られると云う。また、開腹手術を施しただけでも、副腎・動

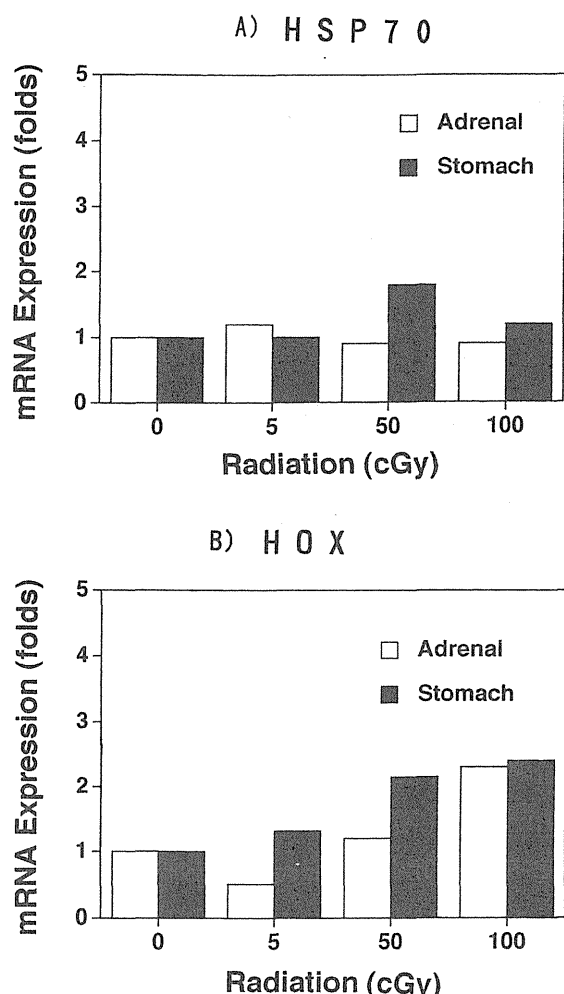


Fig. 9 Effect of Low Dose X-Irradiation on mRNA Expression. Wistar male rats were irradiated by various dose of X-ray. Adrenal and stomach were collected at indicated time and eluted total RNA by AGPC method. The expression of mRNA for HSP70 and HOX was determined by RT-PCR method.

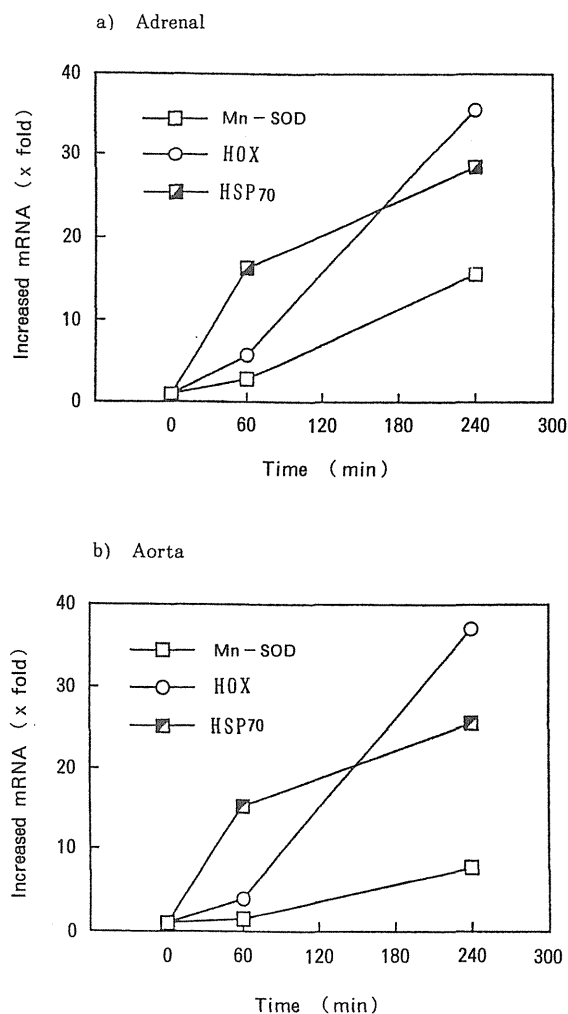


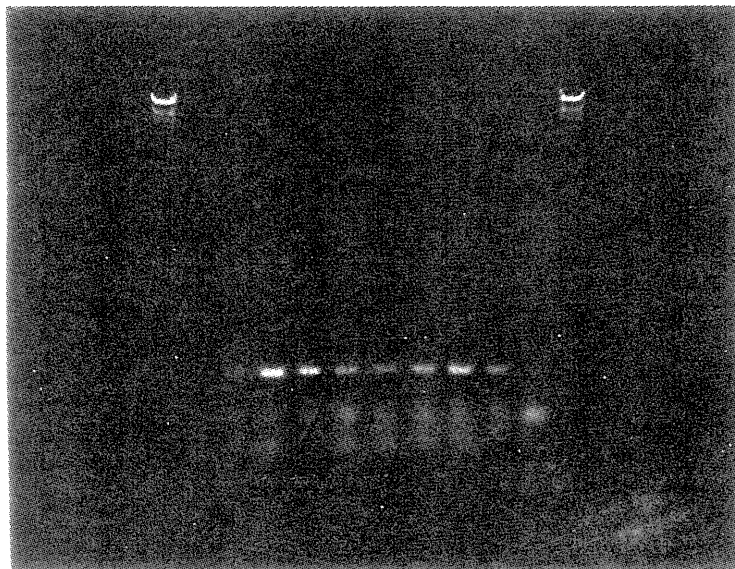
Fig. 10 Time Dependent Changes in mRNA Levels for Mn-SOD, HSP70 and HOX in Adrenal and Aorta of Rat after Paraquat Administration

静脈で HSP70 の発現が増加することが明らかにされた。

そこで、われわれは、ラットに水浸拘束・パラコートの腹腔内投与を施したときに、神経・内分泌系の情報伝達経路にある副腎と、加えられたストレスのターゲットとなる胃において HSP70、Hemeoxygenase (HOX/p32) などの mRNA の発現を調べた。

5、50、100cGy の X 線で照射しても、副腎における HSP70 の mRNA の発現量は変化しなかった。しかし、HOX は 100cGy で照射したときに mRNA の発現量が増加した。一方、胃では、50cGy で照射したときに HSP70 mRNA の発現量が、50cGy および 100cGy で照射したときに HOX mRNA の発現量が、それぞれ増加した (Fig. 9)^{18),19)}。

パラコートを腹腔内に投与 (50mg/kg 体重) すると、1 時間後から副腎の HSP70 mRNA の発現量が顕著に増加する。これに対して、HOX および Mn SOD の mRNA は、4 時間後に発現量の増加が見られた (Fig. 10)¹⁹⁾。他方、水浸拘束 (水温 22℃、6 時間) 下では、1 時間後から HSP70 mRNA、HOX mRNA の発現がみられ、2~4 時間でピークになり、その後漸減した。胃でも、同様な変化が見られた (Photo 1)¹⁹⁾。



Control 0 1 2 4 8 12 24 48 72 [hr]

Photo 1 Time Dependent Changes in HSP70mRNA in Stomach of Rat after Water Immersion and Restraint.

ラットを5、50、100cGyのX線で照射した後、水浸拘束を施した場合、副腎では、HSP70 mRNA、HOX mRNAの発現がいずれも約30%減少した。胃でも、HSP70 mRNAの発現量は約60%減少したが、HOX mRNAは、逆に10%、発現量が増えた。しかし、胃潰瘍は、水浸拘束直後から6時間後まで、拘束時間にほぼ比例して大きくなり、事前照射による胃潰瘍の緩和は認められなかった¹⁸⁾。これより、各時点での生体におけるストレスの蓄積量や化学的生体防御機構の活性化状態によって、生体内酸化傷害の緩和に違いが生じることが示唆できた。

4. ラドンの効果およびその作用機構

古くから温泉に湯治に行き、健康の回復をはかり、病気を直そうとする試みがなされてきた。近年の測定技術の進歩によって、傷病の治癒に効果があると云われている温泉には、温泉水中のラドン濃度が高いものがあることが明らかになった。その一つ、三朝温泉は適応症として高血圧症・糖尿病・疼痛などをあげている。また、「放射線ホルミシス効果」の提唱者である Luckey も、ラドン温泉での湯治によって、1) 副腎皮質ホルモン分泌の促進、2) 外傷を受けた組織の再生、3) 免疫反応の活性化、4) 抗炎症性効果、5) 鎮痛効果などの効果が上がると述べている²⁰⁾。

ラドンは不活性ガスのため、化学的には無反応性であるが、水に易溶で、脂質にも比較的良好に溶解する。主に肺から吸入され、血液に入って全身に送られ、脂肪の多い内分泌腺・神経鞘などに取り込まれるとされている。物理学的半減期は3.82日であるが、生物学的半減期は30分で、3～4時間で全量が排出される。では、上に述べたような効

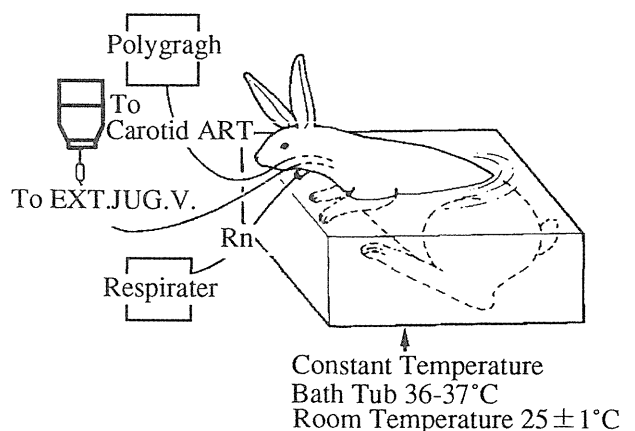


Fig. 11 Experiment Schema of Radon Inhalation using Rabbits.

果はどのようにして生じるのであろうか？

われわれは、ラドンの作用機序を知るために、室内空気、7～10kBq/l および14～18kBq/l のラドン水をネブライザーで噴霧したものをウサギに90分間吸入させ、血液中の脈管作動物質などの濃度変化を調べた²¹⁾。ウサギは、水温を36～37℃に維持した恒温槽に収容し、ペントバルビタール麻酔下で気管を切開して管を挿入し、空気およびラドンを直接肺に吸入させた (Fig. 11)³⁾。

(1) 脈管作動物質の変化

血管拡張作用を示す histamine・ α ANP (心房性ナトリウム利尿ペプチド) の血中濃度は、ラドン吸入によって有意に上昇したが、prostaglandin E₂ はほとんど変化しなかった。他方、毛細血管・細動脈を収縮させ血圧上昇作用を示す vasopressin の血中濃度は有意に減少し、ANP と拮抗する angiotensin II の濃度は変化しなかった (Table 1)²¹⁾。これより、ラドン吸入により血圧降下が起こり得ることが推定された。

Table 1 Dynamic Changes in Vasoactive Substances of Rabbit Blood by Radon Inhalation

radon [kBq/l]	control	7-10	14-18
histamine [μ g/dl]	67 \pm 12	146 \pm 31**	152 \pm 62**
α atrial natriuretic polypeptide [pg/ml]	1660 \pm 240	2170 \pm 170*	3330 \pm 520**
vasopression [pg/ml]	13.2 \pm 3.6	3.2 \pm 0.6**	5.4 \pm 0.8**
angiotensin II [pg/ml]	26 \pm 1	33 \pm 1	32 \pm 1
prostaglandin E ₂ [pg/ml]	26 \pm 4	33 \pm 10	18 \pm 5

Each value represents mean \pm S.E.M.. The number of rabbits per experiment was ten at control, eight at 7-10 kBq/l and nine at 14-18 kBq/l. Significance: *, P<0.05, **, P<0.01 vs. control.

(2) 糖尿病関連物質の変化

グルコース分解経路の酵素である glucose-6-phosphate dehydrogenase の血中濃度は、ラドン吸入によって有意に上昇した。膵島の β 細胞から分泌され、血糖量を減少させる insulin も高濃度のラドンを吸入させたときには上昇した。しかし、insulin の分泌にともなって α 細胞から分泌され、血糖量を増加させる glucagon もラドン吸入によって有意に増加したため、血糖量は変化を示さなかった (Table 2)²¹⁾。

Table 2 Dynamic Changes in Diabets-associated Substances of Rabbit Blood by Radon Inhalation

radon [kBq/l]	control	7-10	14-18
insulin [U/ml]	4.3 \pm 0.4	4.3 \pm 0.6	8.5 \pm 1.8**
glucose-6-phosphate dehydrogenase [IU/37°C]	1.9 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2**	2.6 \pm 0.3**
pancreatic glucagon [$10^4 \times$ pg/ml]	1.6 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1*	2.4 \pm 0.3**
blood glucose [mg/dl]	218 \pm 21	195 \pm 22	191 \pm 19

Each value represents mean \pm S.E.M.. The number of rabbits per experiment was ten at control, eight at 7-10 kBq/l and nine at 14-18 kBq/l. Significance: *, P<0.05, **, P<0.01 vs. control.

(3) 疼痛関連物質の変化

β endorphin・M-enkephalin は、モルヒネ受容体と特異的に結合し、モルヒネ様作用を発現する内因性ペプチドであり、神経末端から分泌され、痛覚の制御に関与する。いずれも高濃度のラドンを吸入させたときのみ、血中濃度が上昇した (Table 3)²¹⁾。筋肉痛の場合、組織に酸素が供給されて筋拘縮が解け、代謝が改善されると、痛みの原因物質の分解・除去が進む。従って、温泉に入ることによって末梢の血液循環がよくなれば、痛みの寛解が起こると考えられている。ラドン泉では、これにラドン吸入により分泌されるモルヒネ様ペプチドの鏡痛効果も加わっているのではないかと考えられる²²⁾。

Table 3 Dynamic Changes in Pain-associated Substances of Rabbit Blood by Radon Inhalation

radon [kBq/l]	control	7-10	14-18
β endorphin [ng/wet-g]	16.2±2.5	19.9±1.9	22.4±3.5*
M-enkephalin [ng/wet-g]	6.1±1.0	6.5±1.1	11.8±1.9**

Each value represents mean \pm S.E.M.. The number of rabbits per experiment was ten at control, eight at 7-10 kBq/l and nine at 14-18 kBq/l. Significance: *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ vs. control.

β endorphin などの内因性ペプチドは、ACTH などと共通の前駆物質から作られると考えられている。ラドンの作用機序は不明であるが、吸入されたラドンが脳下垂体を刺激して ACTH を分泌させている可能性がある。ACTH には、副腎皮質ホルモンの一つで、抗炎症作用・脱感作作用などを示す糖質コルチコイドの産生を上げる作用があり、これらが相俟って、Luckey の指摘したような効果が生じるものと思われる。

5. 低線量 γ 線によるアロキサン糖尿病症状の抑制

マウスにアロキサンを投与すると、膵島 β 細胞が選択的に破壊されてインシュリンの分泌が抑制され、インシュリンの分泌低下を特徴とするインシュリン依存型糖尿病状態が誘発される。これは、膵島 β 細胞のアロキサンに対する反応性が肝細胞や赤血球に比べて高い²³⁾にもかかわらず、SOD、グルタチオンパーオキシダーゼ、カタラーゼなどの濃度が低く^{24), 25)}、アロキサンから産生される活性酸素の障害を受けやすいためと考えられている。これは、SOD や抗酸化剤を事前に投与すると、アロキサンによって誘発される糖尿病状観や減弱されることから推測される²⁶⁾。

(1) 血糖値などの変化

われわれは低線量変化によって、脾臓・胸腺などの場合と同様に、膵臓の細胞の SOD 活性が亢進すれば、アロキサン投与により誘導される糖尿病症状の抑制される可能性があるかも知れないと考え、アロキサン投与の 2~3 週間前にラットを 25~200cGy の ⁶⁰Co γ 線で照射した。照射後にアロキサンを投与し、その後膵臓の SOD 活性、血糖値などの変化を測定した。

アロキサン非投与ラットの膵臓の SOD 活性は、100cGy までは、照射により増加する傾向を示した。しかし、アロキサンを投与すると、すべての群で SOD 活性が抑制された。一方、膵臓中の過酸化脂質量は、アロキサン非投与のラットでは、照射によって微増する傾向を示したが、相互の間で有意差は認められなかった。アロキサンを投与すると、0、25、および 200cGy 照射群では、アロキサン非投与の場合に比べ

て過酸化脂質量が増加した。これに対して、50、および100cGy照射群では、アロキサン非投与の場合と同程度であった。

アロキサン非投与のラットの血糖値は、全ての群において血漿100mlあたり150mgであり、0～200cGyの線量範囲では γ 線照射の影響を受けなかった。これに対してアロキサン投与群では、50cGy照射群の血糖値が約300mgにとどまったのを除き、約500mgに上昇した (Fig. 12)²⁷⁾。

(2) 膵臓の病理学的変化

インシュリン依存型糖尿病では、膵島の大きさ・数の減少、 β 細胞の分泌顆粒の脱落などが生じる。非照射でアロキサン非投与のラットの膵島には、アルデヒドフクシンで濃染される分泌顆粒で満たされた β 細胞が認められる (Photo 2.A)。アロキサンを投与すると、多くの β 細胞が壊死し、細胞核が濃縮した。残存する β 細胞でも、分泌顆粒が減少した (Photo 2.B)。これに対して、50cGy照射群では、 β 細胞の壊死にともなう核の濃縮は見られたが、細胞数・顆粒の減少は、中程度の抑制にとどまった (Photo 2.C)²⁷⁾。

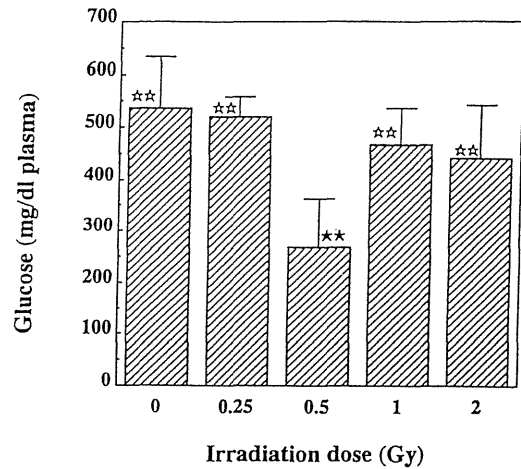
以上の観察結果は、50cGyの事前照射により、アロキサンの産生する活性酸素がもたらす β 細胞の障害がある程度緩和されたことを裏付けるものである。

なお、低線量X線照射により免疫機能が活性化すると知見は多く報告されており、筆者らにおいても同様の研究成果を得ている²⁸⁾が、本稿では割愛した。また、生体防御機構については、湯川²⁹⁾や松原³⁰⁾らが良書としてまとめられているので参照されたい。

結言と今後の課題

以上の知見と筆者らが既に明らかにしている上記以外の知見^{2), 3), 11), 22), 31)}より、一定条件下において少量活性酸素により化学的生体防御機構が活性化すること、これにより生体内酸化傷害が緩和する可能性のあることが示唆できた。しかしながら、本件に関して解明すべき課題は多く残されており、今後の解明が待たれている。例えば、低線量放射線が生体膜の構造および機能に及ぼす作用に関しては、幾つかのアプローチの方法があると考えられる。その一環として筆者らは、プリン・ピリミジン代謝系³²⁾やアラキドン酸代謝系³³⁾などの変化に着目している。

A. alloxan (i. v. , 40mg/kg)



B. control

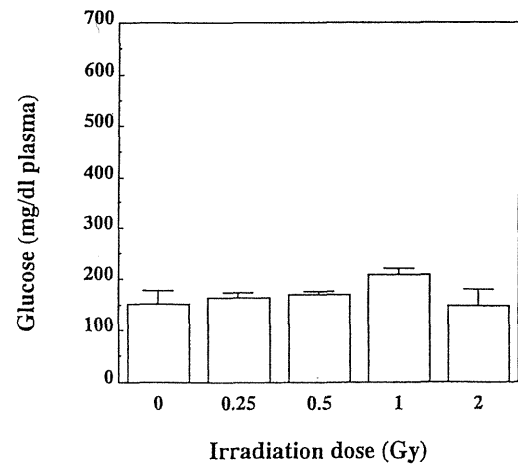
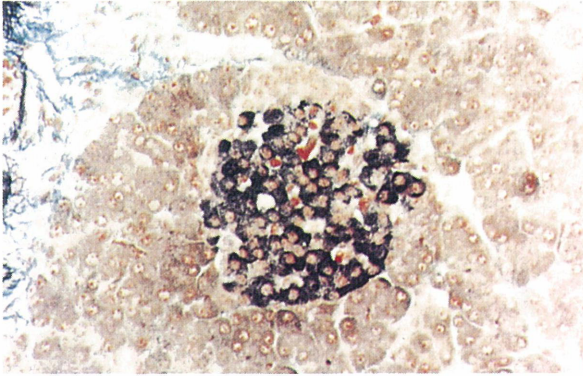
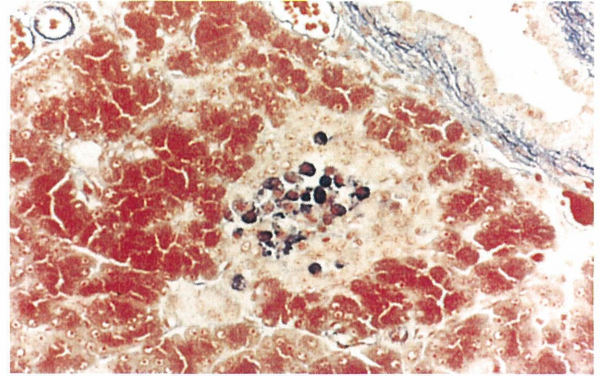


Fig. 12 Effects of γ -ray on Blood Glucose of Alloxan Treated Rats. ** $p < 0.01$ vs sham irradiated no-alloxan control group. ** $p < 0.01$ vs sham irradiated alloxan group.

A : 0 Gy and no-alloxan control group.



B : 0 Gy and alloxan (i. v., 40mg/kg) group.



C : 0.5 Gy and alloxan (i. v., 40mg/kg) group.

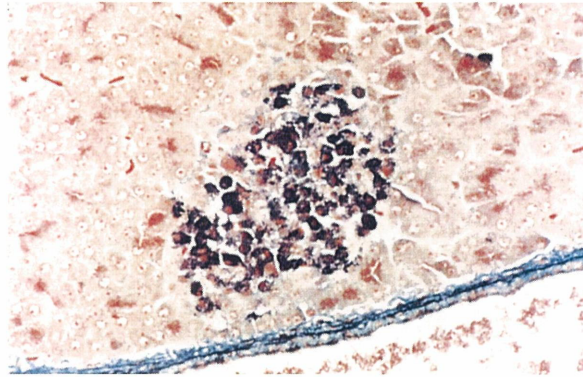


Photo 2 Cell Injury by Alloxan and Effects of Low Dose γ -irradiation evaluated by Staining of Pancreas

謝 辞

本研究の多くは、University of California, Berkeley の森 昭胤教授、倉敷成人病センター医科学研究所の内海耕慥所長、国家公務員等共済会高松病院の古元嘉昭院長、並びに大阪市立大学医学部の井上正康教授をはじめ、関係各位のご協力により、なし得た成果である。ここに深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 二木鋭雄, 生体の酸化的傷害とそれに対する防御システム “抗酸化物質 フリーラジカルと生体防御”, 二木鋭雄他編, 学会出版センター, 3-15, 1994.
- 2) K. Yamaoka, R. Edamatsu and A. Mori, Increased SOD Activities and Decreased Lipid Peroxides Levels in Rat Organs Induced by Low Dose X-Irradiation, *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 299-306, 1991.
- 3) K. Yamaoka, Y. Komoto, I. Suzuka, R. Edamatsu and A. Mori, Effects of Radon Inhalation on Biological Function-Lipid Peroxide, SOD Activity and Membrane Fluidity-, *Arch. Biochem Biophys.* **302**, 37-41, 1993.
- 4) Y. Takehara, K. Yamaoka, E. F. Sato, T. Yoshioka and K. Utsumi, DNA Damage by Various Forms of Active Oxygens and its Inhibition by Different Scavengers using Plasmid DNA, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* **26**, 38-50, 1994.
- 5) 山岡聖典, 岡添陽子, 秋丸国広, 佐藤英介, 内海耕慥, 電中研報告 T90060, 1991.
- 6) C. Sato and K. Kojima, Irreversible Loss of Negative Surface Charge and Loss of Colony-forming Ability in Burkitt Lymphoma Cells after X-irradiation, *Exptl. Cell Res.* **69**, 435-439, 1971.

- 7) C. Sato, K. Kojima, M. Onozawa and T. Matsuzawa, Relationship between Recovery of Cell Surface Charge and Colony-forming Ability Following Radiation Damage in Three Cell-lines, *Int. J. Radiat. Biol.* **22**, 479-488, 1972.
- 8) M. J. Esteves, C. A. Elias, J. Angluster and W. Souza, Effect of U. V.-radiation on the Cell Membrane of *Herpetomonas Samuelpessonai*, *Int. J. Radiat. Biol.* **33**, 191-194, 1978.
- 9) S. Yonei and M. Kato, X-ray-induced Structural Changes in Erythrocyte Membranes Studied by Use of Fluorescent Probes, *Radiat. Res.* **75**, 31-45, 1978.
- 10) S. Yonei, T. Todo and M. Kato, Radiation Effects on Erythrocyte Membrane Structure Studied by the Intrinsic Fluorescence. *Int. J. Radiat. Biol.* **35**, 161-170, 1979.
- 11) K. Yamaoka, R. Edamatsu, T. Ito and A. Mori, Effects of Low Dose X-ray Irradiation on Biomembrane in Brain Cortex of Aged Rats, *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 529-534, 1994.
- 12) K. Yamaoka, K. Ishii, R. Edamatsu, T. Ito and A. Mori, Changes in Specific Amino Acid Residues and Na⁺, K⁺-ATPase Activity in Cell Membrane of Rat Cerebral Cortex by Low Dose X-irradiation, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* **26**, 323-328, 1994.
- 13) J. H. Youngblom, I. K. Wiencke and S. Wolff, Inhibition of the Adaptive Response of Human Lymphocytes to Very Low Doses of Ionizing Radiation by the Protein Synthesis Inhibitor Cycloheximide, *Mutat. Res.* **227**, 257-261, 1989.
- 14) M. Meyers, R. A. Schea, A. E. Petrowski, H. Seabury, P. W. McLaughlin, I. Lee, S. W. Lee and D. A. Boothman, Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms, Elsevier Science, ICLB 233-236, 1992.
- 15) G. E. Woloschak and C. M. C. Liu, Differential Modulation of Specific Gene Expression Following High-and Low-LET radiations, *Radiat. Res.* **124**, 183-187, 1990.
- 16) G. E. Woloschak and C. M. C. Liu, Effects of Low-dose Radiation on Gene Expression in Syrian Hamster Embryo Cells: Comparison of JANUS Neutrons and Gamma Rays, Elsevier Science, ICLB 239-242, 1992.
- 17) K. Yamaoka, E. F. Sato and K. Utsumi, Induction of Two Species of Superoxide Dismutase in Some Organs of Rats by Dose X-irradiation, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* **26**, 205-214, 1994.
- 18) E. F. Sato, K. Yamaoka, S. Morishita and M. Inoue, Low dose X-irradiation Induced Stress Proteins but did not Prevent the Gastric Mucosal Lesion by WIR, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* (in press).
- 19) 山岡聖典, 佐藤英介, 井上正康, 電中研報告 T93055, 1994.
- 20) T. D. Luckey, 放射線ホルミシスⅡーヒトおよび動物データを中心にー (松平寛通監訳), ソフトサイエンス社, 東京 pp138-141, 1993.
- 21) K. Yamaoka and Y. Komoto, Experimental Study of Alleviation of Hypertation, Diabetes and Pain by Radon Inhalation, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* (in press).
- 22) K. Yamaoka, K. Ishii, T. Ito, Y. Komoto, I. Suzuka, R. Edamatsu and A. Mori, Changes in Biogenic Amine Neurotransmitters in Rabbits Brain by Inhalation of Radon Spring, *Neurosciences* **20**, 17-22, 1994.
- 23) K. Asayama, F. Nyfeler, D. English, S. J. Pilgis and I. M. Burr, *Diabetes*, **33**, 1008-1010, 1984.
- 24) W. J. Malaisse, F. M. Lagae and A. Senar, Determinants of the Selective Toxicity of Alloxan to Pancreatic B cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 927-930, 1982.
- 25) K. Asayama, N. W. Kooy and I. M. Burr, Effect of Vitamin E deficiency and Selenium Deficiency in Insulin Secretory Reserve and Free Radical Scavenging Systems in Islets, *J. Clin. Lab. Med.* **107**, 459-464, 1986.

- 26) L. J. Fischer and S. A. Hamburger, Inhibition of Alloxan Action on Isolated Pancreatic Islets by Superoxide Dismutase, Catalase and Metal Chelator, *Diabetes* **29**, 213-216, 1980.
- 27) Y. Takehara, K. Yamaoka, Y. Hiraki, T. Yoshioka and K. Utsumi, Protection against Alloxan Diabetes by Low Dose ^{60}Co γ Irradiation before Alloxan Administration, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* **27**, 149-159, 1995.
- 28) K. Ishii, K. Yamaoka, Y. Hosoi, T. Ono and K. Sakamoto, Enhanced Mitogen-induced Proliferation of Rat Splenocytes by Low-dose Whole-body X-irradiation, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR* **27**, 17-23, 1995.
- 29) 湯川修身, 放射線抵抗性の誘導—放射線障害の生物学的・化学的防護—「活性酸素とその防御」, 放医研シンポジウムシリーズ **23**, 5-13, 1992.
- 30) 松原純子, 放射線抵抗性の誘導—放射線障害の生物学的・化学的防護—「メタロチオネインと生体防御機構」, 放医研シンポジウムシリーズ **23**, 23-31, 1992.
- 31) 山岡聖典, 総説 生理機能に及ぼす低線量放射線の作用に関する研究, *環境変異原研究* **16**, 333-344, 1995.
- 32) K. Yamaoka, K. Iriyama, E. Niki and M. Takahashi (submit).
- 33) K. Yamaoka, T. Obata and K. Tomaru (submit).

によって、より活性の強いヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) を生成する。またヒドロキシルラジカルは水への放射線の照射や、過酸化水素の UV 照射によっても発生する。そしてこのヒドロキシルラジカルならびにそれから生成するフリーラジカルが生体に障害を与えることが明らかになってきた。活性酸素による生体組織や細胞内での障害は、DNA に対してはリボースーリン酸結合の開裂と塩基の酸化的修飾であり、機能的蛋白質に対しては酸化による不活性化であり、細胞膜においては不飽和脂質の過酸化と膜の破壊である。これらの障害から生体を防御するには 1) SOD やカタラーゼのようにヒドロキシルラジカル発生源を消去する、2) 鉄や銅などの金属をトラップしてヒドロキシルラジカルの発生を阻止する、3) 発生したヒドロキシルラジカルをトラップして生体構成成分への障害を防ぐ、ことがあげられる。本研究ではこのような観点から新しい合成活性酸素防御物質の開発、主としてヒスチジン含有ペプチドの合成とそれらのスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルの発生と消去に関する検討を行うものである。

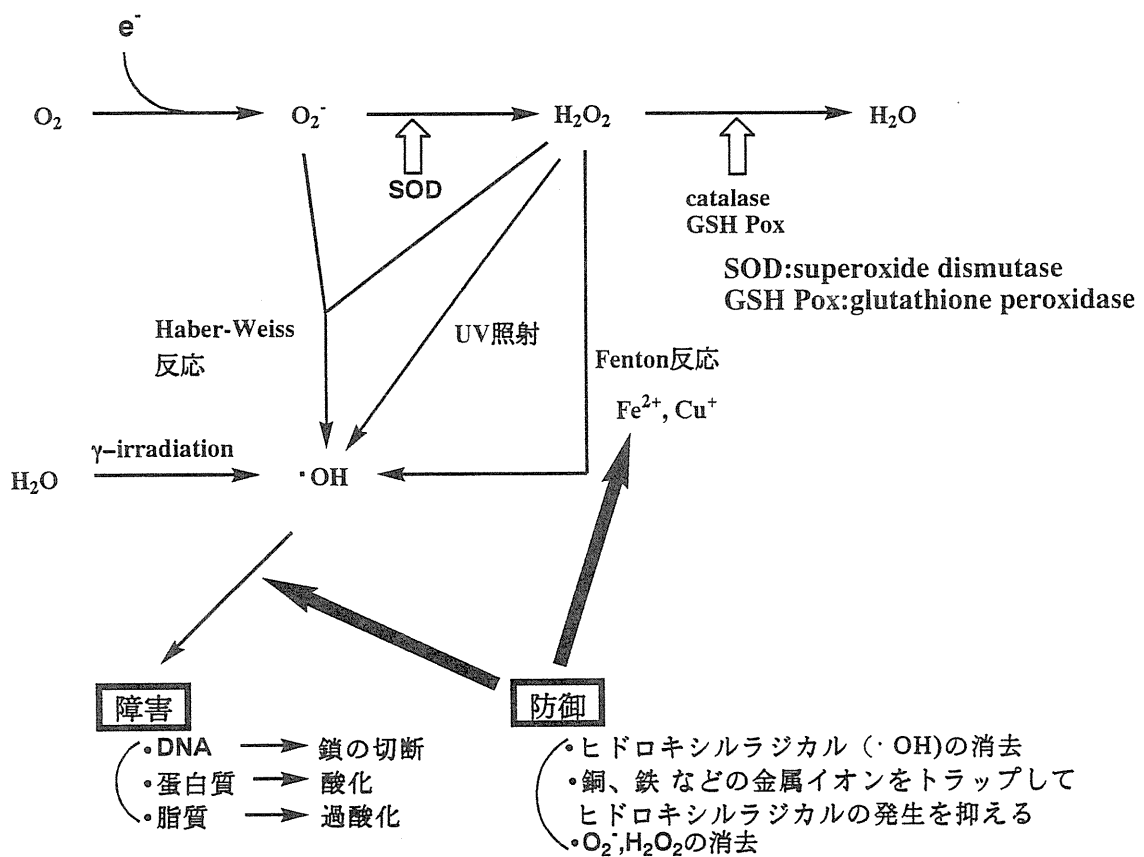


Fig. 1 Generation and Elimination of Active Oxygen Species ($\cdot\text{OH}$, O_2^- and H_2O_2)

II. 活性酸素防御物質の合成

1. ヒスチジン含有ペプチドの合成

ヒスチジン含有ペプチドとして His-Gly(1)、His-Gly-Gly(2)、His-Gly-Gly-Gly(3)、Gly-His-Gly(4)、Gly-Gly-His-Gly(5)、Ac-D-Pen-Gly-His-Gly(6)、Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met(7, PHCKRM)、Met-Gln-Phe-His-Thr(8, MQFHT)などを合成した。ペプチド1-6は α -アミノ基の保護に3級ブトキシカルボニル (Boc) 基を、またイミダゾール基の保護に4-methoxybenzenesulfonyl (MBS) 基を用い、Boc基切断にトリフルオロ酢酸あるいはHCl/AcOEtを使用する液相法にて行った。グリシンベンジルエステルパラトルエンスルホン酸

His-Gly (1) His-Gly-Gly (2) His-Gly-Gly-Gly (3)

Gly-His-Gly (4) Gly-Gly-His-Gly (5)

Ac-D-Pen-Gly-His-Gly (6, Ac-D-Pen-GHG)

Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met (7, PHCKRM)

Met-Gln-Phe-His-Thr (8, MEFHT)

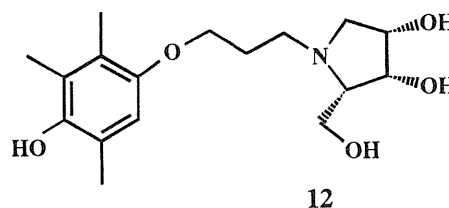
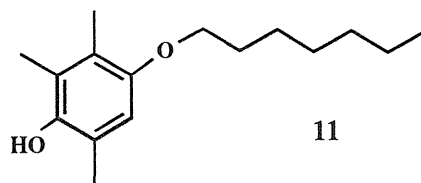
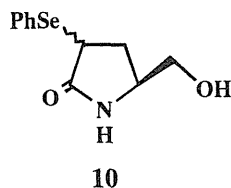
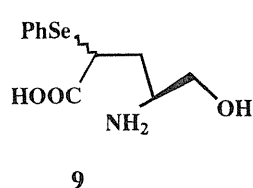


Fig. 2 Synthetic Compounds

塩から step wise elongation 法にて、順次保護した α -アミノ酸を縮合試薬としてジエチルホスホリアニデート (DEPC)¹⁾を用いて縮合し保護されたペプチドを得る。各段階での保護ペプチドの精製はシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーにて行った。最後にアニソール存在下、無水フッ化水素処理ならびにイオン交換樹脂処理 (Dowex 1-X 4 (acetate form)) することにより、ペプチド1-6を効率良く得た。なお図3に Ac-D-Pen-GHG の合成チャートを示す。

ペプチド7ならびに8は、 α -アミノ保護基にフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基を用い、Fmoc 基の除去にはピペリジンを使用する固相法にて合成した。7の合成は Fmoc-メチオニン樹脂に結合させた後 (Fmoc-Met-p-アルコキシベンジルアルコール樹脂 (0.36mmol/g))、Fmoc-4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニルアルギニン、Fmoc-tert-ブトキシカルボニルリジン、

Fmoc-トリチルシステイン、Fmoc-tert-ブトキシカルボニルヒスチジン、ならびに Fmoc-プロリンを、それぞれ5当量用い、縮合剤に HOBt (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)、DIPCI (ジイソプロピルカルボジイミド) を使用して順次縮合させた。保護ペプチド樹脂はトリフルオロ酢酸処理し、樹脂からの脱離ならびに全保護基の除去を行った。粗生成物を μ -ボンダスフェア 5C₁₈-100 Å カラムを用いて精製することにより、ペプチド7が得られた (収率24%)。ペプチド8は7に準じて合成した。

2. セレン化合物の合成

セレン含有化合物9および10は、(S)-ピログルタミノール誘導体を -78°C、THF 中 LDA (lithium diisopropylamide) にて処理し、PhSeBr を反応させてセレン化²⁾を行い、酸加水分解 (9は10% HCl/MeOH、室温処理; 10は70°C処理) にて合成した。

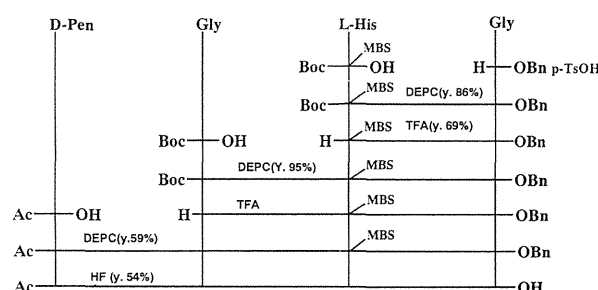


Fig. 3 Synthesis of Ac-D-Pen-GHG

3. ハイドロキノン誘導体の合成

化合物11はハイドロキノンと1-ヘキサノールをリンモリブデン酸存在下反応させて合成した。³⁾ また12は、4-ブチルジメチルシリルオキシ-2,3,5-トリメチルフェノキシプロピルブロマイドと、保護されたヒドロキシピロリジン誘導体をアセトン中、 K_2CO_2 存在下反応させ、酸処理にて保護基を除去して合成した。

III. 活性酸素消去能について

1. 活性酸素 (O_2^- , $\cdot OH$) 消去能の測定方法

(1) 試薬 グルタチオン、ヒポキサンチン (HPX)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、キサンチンオキシダーゼ (XOD) は Sigma 社製を使用した。スピントラップ剤として 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) を用いた。他の試薬はいずれも市販特級品を用いた。 $Cu(en)_2$ は硫酸銅に大過剰のエチレンジミン (en) を反応させて合成した。

(2) H_2O_2 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ の調製 H_2O_2 の濃度は $KMnO_4$ を用いて定量した。 O_2^- は HPX(2mM)/XOD (0.4U/ml) 系⁴⁾により発生させた。 $\cdot OH$ は H_2O_2 (100mM)/ $Cu(en)_2$ (1mM) 系⁵⁾により発生させた。反応溶液はほとんどの場合 pH7.4 のリン酸緩衝液を用いた。水は脱イオン水を3回蒸留したものを用いた。

(3) ESR-スピントラッピング法 ESR-スピントラッピング法は、短寿命のスーパーオキシドならびにヒドロキシルラジカルを DMPO のようなスピントラップ試薬と反応させてより安定な $DMPO-O_2^-$ 体ならびに $DMPO-OH$ 体とし、これを ESR にて測定するものである。

① O_2^- の場合；試料管に 1mM の銅錯体 (0.1ml)、2mM HPX (0.1ml)、0.5M DMPO (0.1ml)、最後に 0.4unit/ml XOD (0.1ml) を加える。この混合液を直ちに振り混ぜ、適量を ESR 測定用石英製フラットセルにとり、室温で ESR の測定 (日本電子製 JES-RE-1X ESR 分光器 (X-band)) を行った。

② $\cdot OH$ の場合；試料管に 1mM の銅錯体 (0.1ml)、リン酸緩衝液 (0.1ml)、100mM スピントラップ剤 (0.1ml)、最後に 100mM H_2O_2 (0.1ml) を加える。ESR の測定は H_2O_2 を加えてから 1 分後に行った。図 4 に、HPX/XOD 系から発生した O_2^- が DMPO にトラップされて生成した $DMPO-O_2^-$ 体の ESR スペクトル ($a^N(1)=1.43$ mT, $a^H(1)=1.15$ mT, $a^H(1)=0.13$ mT)、ならびに $Cu(en)_2-H_2O_2$ 系から発生した $\cdot OH$ が DMPO にトラップされて生成した $DMPO-OH$ 体によるシグナル [$a^N(1)=a^H(1)=1.49$ mT] を示す。 $\cdot OH$ の生成は基質としてエタノール (EtOH) を加えた時、 $\cdot OH$ が EtOH からプロトンを引き抜いて生成する $\cdot(CH)CH_3OH$ ラジカルの DMPO 付加体が出現することにより確認した。オリゴペプチド存在下での $DMPO-O_2^-$ 体ならびに $DMPO-OH$ 体の ESR シグナル強度の減少度により、オリゴペプチドの O_2^- ならびに $\cdot OH$ に対する消去能力として評価した。

(4) 円偏光二色性 (CD) スペクトル

CD スペクトルは日本分光製 J-20 自記旋光形 (光路長 50mm 石英セル) を用いて室温で測定した。

(5) DNA の切断実験 0.5 μ g の plasmid pBR322、銅 (II) 錯体、ペプチド類、 H_2O_2 (最終濃度、25mM) を 10 μ l の 10mM リン酸バッファー (pH 7.4) 中室温にて 1 分間反応させ、0.7% アガロースゲルにて電気泳動させ (85V, 3h)、BIOPROFIL VILBER LOURMAT にて解析した。⁶⁾

2. ペプチド(1-5)-銅錯体の O_2^- 消去能^{7),8)}

ペプチド(1-5)-銅錯体の O_2^- 消去能を ESR-スピントラッピング法により調べた。表 1 に示すように、どの銅錯体も Cu, Zn-SOD には及ばないものの O_2^- 消去能を示した。なお Cyhis は表中に示した化合物で

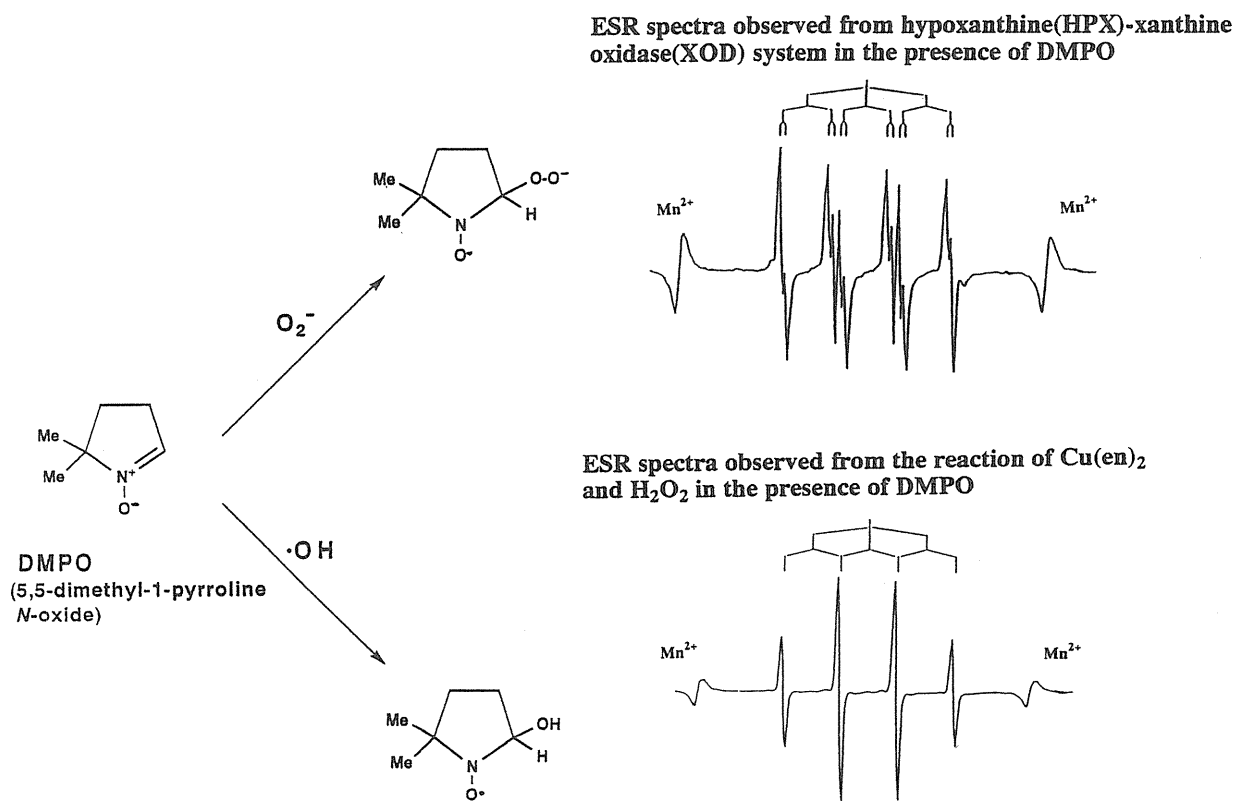
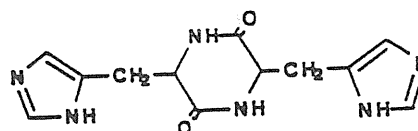


Fig. 4 ESR-Spin Trapping Method

Table 1 Abilities of Cu(II)-Peptide Complexes on Dismutation of Superoxide

copper complexes	IC ₅₀
Cu, Zn-SOD	0.008 μ M
Cu(Cyhis) ₂	1.1
Cu(II)-HisGly	1.3
Cu(II)-HisGlyGly	0.8
Cu(II)-HisGlyGlyGly	1.1
Cu(II)-GlyHisGly	7.5
Cu(II)-GlyGlyHisGly	19.0

Cyhis:cyclo(histidylhistidine)

ありその銅錯体も強いSOD活性を示すが、この実験で銅錯体の濃度変化を検討した。図5に示すように、Cu(Cyhis)₂の濃度を増加させるに従ってDMPO-O₂⁻体は減少するが、DMPO-OH体は逆に増加する。これは、O₂⁻がCu(Cyhis)₂のSOD活性によりH₂O₂になり、生成したH₂O₂と銅錯体から・OHが生成したものと考えられる。

そこでペプチド(1-5)-銅錯体ならびにCu(en)₂とH₂O₂との反応をスピントラップ法にて検討した。表2に示すようにCu(en)₂とH₂O₂から生成するDMPO-OH体の強度を100とした相対強度で示すと、HisがN端に位置するペプチド-銅錯体の・OH生成能は高く、2および3番目にあるペプチド-銅錯体の・OH生成能は低かった。このことはpBR322 DNAを用いる切断実験でも確かめられた。図6に示すようにH₂O₂とCu(en)₂やCu(II)-HG, HGG, HGGGの系では・OHによってSCが切断されてOCやLINになる

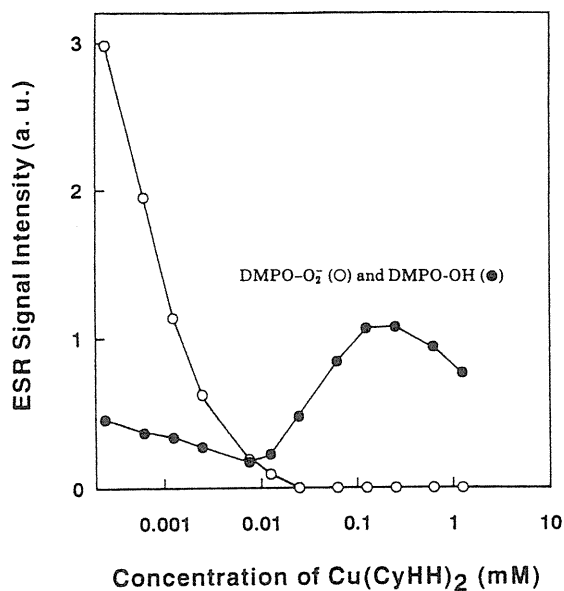


Table 2 Formation of DMPO-OH from the Reaction of $\text{Cu}(\text{en})_2$ and $\text{Cu}(\text{II})$ -Histidine Oligopeptide Complexes with H_2O_2

copper(II) Complexes	DMPO-OH (relative intensity)
$\text{Cu}(\text{en})_2$	100
$\text{Cu}(\text{II})$ -HisGly	115
$\text{Cu}(\text{II})$ -HisGlyGly	118
$\text{Cu}(\text{II})$ -HisGlyGlyGly	150
$\text{Cu}(\text{II})$ -GlyHisGly	5
$\text{Cu}(\text{II})$ -GlyGlyHisGly	27

Fig. 5 Effect of Concentration of $\text{Cu}(\text{Cyhis})_2$ on Superoxide Dimutation

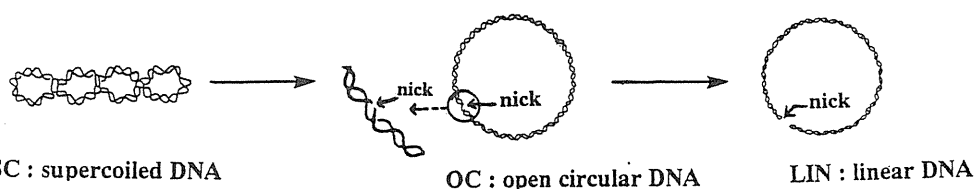
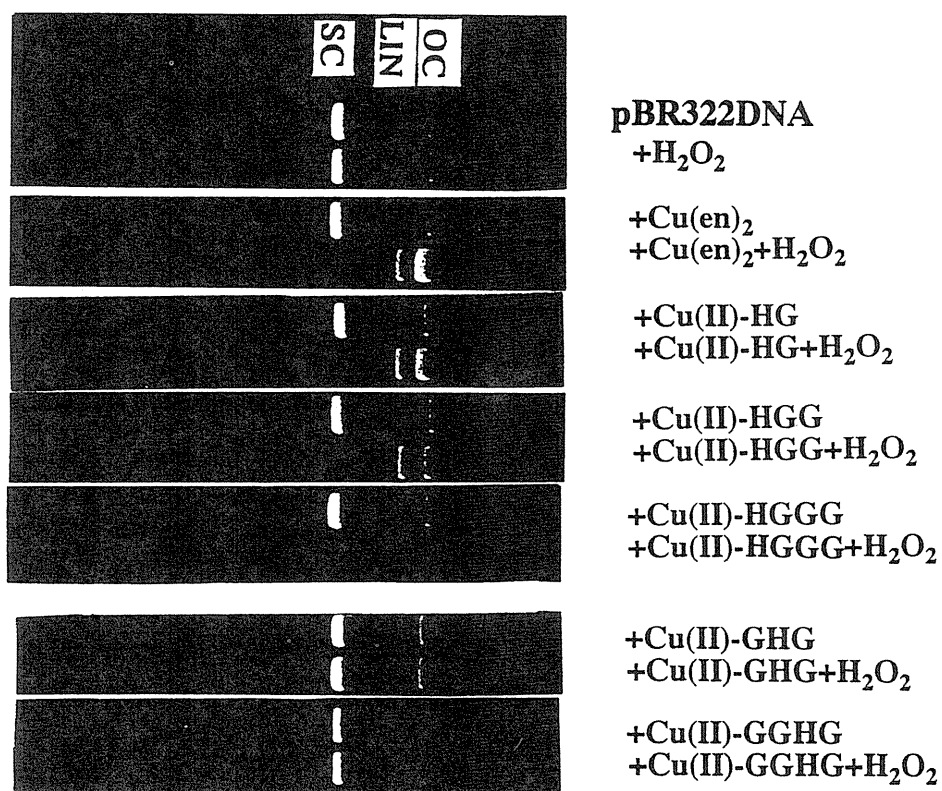


Fig. 6 Reaction of Supercoiled DNA by $\text{Cu}(\text{en})_2$ and $\text{Cu}(\text{II})$ -Oligopeptide Complexes in the Presence of H_2O_2

のに対し、 H_2O_2 と $Cu(II)$ -GHG, GGHG の系では pBR322 は切断されにくい。

3. オリゴペプチド 6、7、8 によるスーパーオキシドおよびヒドロキシルラジカル消去能について⁹⁾

Table 3 Scavenging Abilities of Oligopeptides against O_2^-

Compounds	% inhibition of O_2^- formation
None	0
Cu, Zn-SOD	100
Glutathione	31
Ac-D-Pen-Gly-His-Gly	0
Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met	25
Met-Gln-Phe-His-Thr	2

[Cu, Zn-SO]=0.25mg/ml.

[Glutathione] = [Ac-D-Pen-Gly-His-Gly] = [Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met] = [Met-Gln-Phe-His-Thr] = $0.25 \times 10^{-3}M$.

Table 4 Scavenging Abilities of Oligopeptides against $\cdot OH$

Compounds	% inhibition of $\cdot OH$ formation
None	0
Glutathione	64
Ac-D-Pen-Gly-His-Gly	85
Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met	96
Met-Gln-Phe-His-Thr	0

[Glutathione] = [Ac-D-Pen-Gly-His-Gly] =

[Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met] =

[Met-Gln-Phe-His-Thr] = $0.25 \times 10^{-3}M$.

表 3 に示すようにペプチド 6、7、8 とともにスーパーオキシド消去能は低かった。 $Cu(en)_2-H_2O_2$ 系により生成させた $\cdot OH$ に対する消去能を表 4 に示すが、Met-Gln-Phe-His-Thr(8) を除き Ac-D-Pen-Gly-His-Gly(6) と Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met(7) はともにグルタチオンに比べて DMPO-OH 体の生成を抑えることが明らかになった。

4. セレン化合物の O_2^- 消去能

Table 5 Abilities of Seleno-containing Compounds on Dismutation of Superoxide

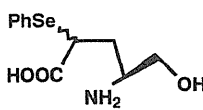
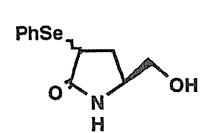
seleno compound	ESR Signal Intensity	
	concentration	% inhibition of DMPO- O_2^- formation
none		0
	0.125 mM	3
	2.5 mM	25
	2.5 mM	13

表 5 にセレン化合物 9、10 のスピントラップ法による O_2^- 消去能の結果を示すが、かなりの高濃度でもその O_2^- 消去能は低かった。

5. ハイドロキノン誘導体 (11, 12) のヒドロキシルラジカル消去能

ハイドロキノン11は水に不溶なので、スピントラップ法では50% EtOH 溶液で行った。従って、スピニアダクトは DMPO-CH(OH)CH₃ である。11と12ではヒドロキシルラジカルに対する消去能は IC₅₀ でみると2倍程度12のほうが強かった (図7)。

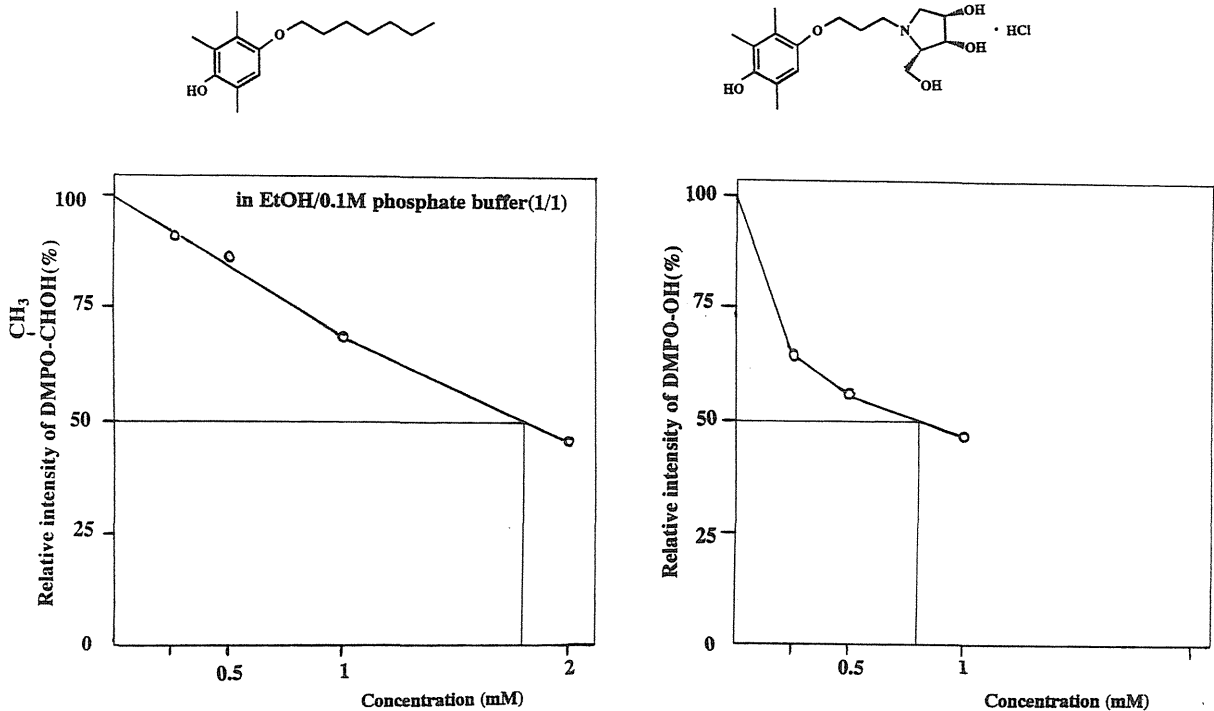


Fig. 7 Scavenging Abilities of Hydroquinone Derivatives against ·OH

IV. ペプチド6ならびに7の DMPO-OH 体生成阻止メカニズムについて

·OH の消去としては2つの理由が考えられている。1つは、生成した ·OH を直接トラップしてこれを消去する場合、他は ·OH の生成系を抑える場合である。後者では、抗酸化剤が金属イオンと結合して金属-抗酸化剤錯体を生成させることで、金属イオンと H₂O₂ の反応を阻止して ·OH の生成を抑制するものである。ここで用いた抗酸化剤がどのタイプであるのかを知るために、Cu(en)₂ と3つの合成オリゴペプチドの反応混合物の円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定した。円偏光二色性スペクトルは試料の左右の円偏光成分の吸光度の差の結果として観測されるもので、スペクトルが観測されれば、その試料がキラルであることを示す。エチレンジアミン (en) はキラルな分子ではないので Cu(en)₂ の CD スペクトルは観測されない。光学活性アミノ酸を用いた合成ペプチドはいずれもキラルであり、CD スペクトルが観測されれば、ペプチドが Cu(II) に配位していることになる。Cu(en)₂ とペプチド6、7、8の反応混合物は CD スペクトルを示した (Cu(en)₂ とペプチド7の CD スペクトルを図8に示す)。この結果は、これらのオリゴペプチドがエチレンジアミンと配位子交換し、Cu(II) イオンに配位したことを示している。Cu(en)₂ と Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met の反応混合物は N 末から2番目にヒスチジン残基を有するオリゴペプチドの Cu(II) 錯体に特徴的な CD スペクトル (590nm に正の CD バンド、484nm に負の CD バンド) を示した。この CD スペクトルの結果から、Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met がプロリンのアミノ基の N、ヒスチジンの脱プロトン化したペプチド結合の N、およびイミダゾール基の N により Cu(II) イオンに配位してい

る錯体構造が推定される。既にⅢ-2. において、N末にHis残基を持つペプチドの銅錯体は、2、3番目にHis残基をもつペプチドの銅錯体よりも H_2O_2 に対して高い反応活性を持ち $\cdot\text{OH}$ を生成すること、またHis残基を2、3番目に持つペプチド-銅錯体の H_2O_2 活性化能の欠如は、これらペプチドがCu(II)イオンと錯体を形成することによりCu(II)イオンの酸化還元電位を変化させ、その結果 H_2O_2 と反応せずヒドロキシルラジカルを生成させないことを述べた。これらのことから、2番目にヒスチジンを有するPro-His-Cys-Lys-Arg-MetのDMPO-OH体生成阻止作用は直接 $\cdot\text{OH}$ を捕捉するのではなく、Cu(II)イオンと錯体を形成して $\cdot\text{OH}$ の生成を抑えるものと推測される。

V. 結 論

ヒスチジン含有ペプチド(I-V)-銅錯体はSOD活性を有し、HisがN末に位置するペプチドの銅錯体は H_2O_2 との反応で $\cdot\text{OH}$ を発生させ、2、3番目に位置するそれは、 $\cdot\text{OH}$ の発生を阻止する。オリゴペプチド6、7は $\text{Cu}(\text{en})_2\text{-H}_2\text{O}_2$ 系からの $\cdot\text{OH}$ 生成を抑えるが、これはペプチドがCu(II)イオンと容易に結合し H_2O_2 との反応を阻害するためである。セレン含有化合物9、10のスーパーオキシド捕捉能は低かったが、ヒドロキノン誘導体11、12は $\cdot\text{OH}$ をトラップした。

謝 辞

ヒドロキノン誘導体の抗酸化能に関する研究は徳島文理大学薬学部佐藤利夫教授との共同研究であり、佐藤教授に深謝します。

参考文献

- 1) Yamada, S., Ikota, N., Shioiri, T. and Tachibana, S.: DPPA and DEPC. Two New Reagents for Solid-phase Peptide Synthesis and Their Application to the Synthesis of Porcine Motilin. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7174-7175, 1975.
- 2) Ikota, N. and Hanaki, A.: Synthesis of (-)-Swainsonine and (-)-8-epi-Swainsonine from (S)- and (R)-Glutamic Acid Derivative. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2712-2718, 1990.
- 3) Nihro, Y., Fukukawa, H., Sato, T. et al.: Synthesis and Anti Lipid-Peroxidation Activity of Hydroquinone Monoalkyl Ethers. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 576-579, 1994.
- 4) Fridovich, I.: Quantitative Aspects of the Production of Super oxide Anion Radical by Milk Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4053-4057, 1970.
- 5) Ozawa, T. and Hanaki, A.: The First Spin-trapping Evidence for the formation of Hydroxy Radical from the Reaction of Cu(II) Complexes with Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 330-332, 1991.
- 6) Ueda, J., Shimazu, Y. and Ozawa, T.: Oxidative Damage Induced by Cu(II)-oligo-peptide Complexes and Hyd-

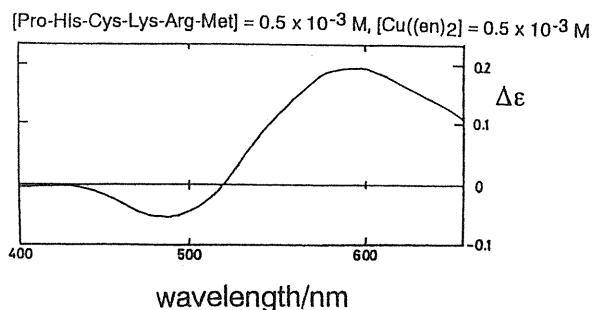


Fig. 8 CD Spectra of Pro-His-Cys-Lys-Arg-Met in the Presence of $\text{Cu}(\text{en})_2$

- rogen peroxide. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**, 801-808, 1994.
- 7) Ueda, J., Ozawa, T., Miyazaki, M. and Fujiwara, Y.: Activation of Hydrogen Peroxide by Cu(II) Complexes with Some Histidine-containing Peptides and Their SOD-Like activities. *J. Inorg. Biochem.*, **55**, 123-130, 1994.
 - 8) Ueda, J., Sudo, A., Mori, A. and Ozawa, T.: Generation of Hydroxyl Radicals during Dismutation of Superoxide by SOD Model Compounds. *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 185-189, 1994.
 - 9) Ueda, J., Ikota, N., Hanaki, A. and Ozawa, T.: Synthesis of New Oligopeptides and Their Scavenging Abilities Against Active Oxygen Species. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **33**, 1041-1048, 1994.

を定量する方法には、スーパーオキシドを例にあげると、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 法やシトクローム c 還元法などの化学的方法¹⁾が知られているが、食品などのように多種多量の試料を分析するための簡便かつ迅速な方法としては 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) などを用いるスピントラップ電子スピン共鳴 (ESR) 法²⁾が有望であると考えられる。しかし、食品は多成分・複合系であるため、スピントラップ ESR 法を適用する場合、多くの問題が生ずる可能性がある。例えば、スピントラップ ESR 法では、活性酸素の標準発生系を用い、そこから発生する活性酸素に対してスピントラップ剤と試料中の抗酸化剤との競争反応を利用して、スピニアダクトの ESR 信号強度から抗酸化剤の活性酸素消去能を評価する。しかし、食品のある種の成分が活性酸素発生系を阻害したり、また、スピニアダクトを還元するような場合では、あたかも活性酸素を消去したかのような誤った判断が下されてしまう。このような誤った判断を防ぐための方法を考え出さなければならない。

本研究では、スピントラップ ESR 法を用いたときの同時再現性、分析間再現性、緩衝剤の種類、測定温度の影響、pH の影響、キレート剤の必要性、発生系阻害、スピニアダクトの還元などについて、主としてスーパーオキシドを例にとって基礎的な検討を行い、本法を用いて種々の食品の活性酸素消去能の評価を行った。

II 実 験

1. 試薬および調製方法

試薬として、以下のものを使用した。ヒポキサンチン (HPX, Sigma Chemical)、キサンチンオキシダーゼ (XOD, from cow milk, Boeringer Mannheim GmbH Germany)、diethylenetriamine-N, N, N', N'', N'''-pentaacetic acid (DTPA, 和光純薬)、リン酸緩衝剤粉末 (PBS, 和光純薬、生化学用)、3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS, 同仁化学)、N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonic acid (HEPES, 同仁化学)、5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO, ラボテック及び OMRF SPIN TRAP SOURCE)、2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-piperidone monohydrate (TMPD, Aldorich Chemical)。なお、他の試薬は和光純薬製試薬特級である。

次の溶液を調製した。(1)リン酸緩衝剤粉末 1 包を 667ml の蒸留水に溶解し、0.1M リン酸塩緩衝溶液 (PBS, pH7.4) とした。MOPS と HEPES は、0.1M、pH7.4 に調製した。(2)HPX13.6mg を 50ml の PBS に溶解し、加温しながらスターラーを用いて十分に攪拌し、2 mM とし冷蔵保存した。(3)DTPA 21.6mg を 10ml の PBS に溶解し 5.5mM とし冷蔵保存した。(4)XOD 原液 (20unit/ml、冷蔵保存) 20 μ l を使用直前に 980 μ l の PBS に溶解し、0.4unit/ml とする。(5)硫酸鉄(II)七水和物 27.8mg と DTPA39.3mg を 0.01M 硫酸 50ml に溶解させ冷蔵保存する。これを使用直前に 0.01M 硫酸にて 10 倍に希釈して 0.2mM 溶液とする。これは、鉄(II)イオンの加水分解を防ぐためである。(6)DMPO 原液を使用直前に PBS にて 10 分の 1 に希釈する。(7)過酸化水素水原液 (9.79M) 1 ml に PBS 8.79ml を添加して 1 M 溶液を調製する。これを使用直前に PBS にて 100 倍に希釈して 10mM 溶液とした。(8)TMPD 3.4652g を 100ml の PBS に溶かして、200mM 溶液とし、冷蔵保存する。(9)リボフラビン 37.6mg を 100ml の PBS に溶かす。この溶液を PBS にて 20 倍に希釈して 50 μ M 溶液を調製し、冷蔵保存した。(10)試料が固体の場合は PBS にて室温でホモジナイズして上澄み液を試料溶液とした。また、液体の場合はそのまま使用した。

2. 測定装置

溶存酸素の測定には、セントラル科学株式会社製生化学用溶存酸素計オキシグラフ 8 型を用いた。ESR スペクトルの測定には、日本電子製 JES-FR30 ESR スペクトロメーターを用いた。また、試料のホモジナイズは、日本精機製作所製バイオミキサー（ABM 型）で行った。

3. 測定方法

(1) スーパーオキシド系では、HPX-XOD 系を発生系に選んだ。HPX (2 mM) 50 μ l、DTPA (5.5mM) 35 μ l、試料溶液50 μ l、DMPO 原液 (9 M) 15 μ l、XOD (0.4unit/ml) 50 μ l の順でマイクロテストチューブにとり、XOD を入れると同時に、計時を開始しよく攪はんした、ヘマトクリット管（テルモ製、プレインガラス）に吸い取り60秒後に磁場掃引を開始した。

(2) ヒドロキシルラジカル系では、フェントン反応を発生系に用いた。硫酸鉄(II) と DTPA 混合溶液 75 μ l (いずれも 0.2mM)、試料溶液50 μ l、DMPO (1/10希釈) 20 μ l、過酸化水素水 (10mM) 75 μ l の順で試薬をガラス製試験管にとり、過酸化水素水を入れたときに計時を開始しよく攪はんした後、ヘマトクリット管に吸い取り60秒後に磁場掃引を開始した。

(3) 一重項酸素系では、光励起リボフラビンを発生系とした。TMPD 溶液 (0.2M) 50 μ l、リボフラビン溶液 (50 μ M) 50 μ l、PBS (0.1M、pH7.4) 250 μ l、試料溶液50 μ l の順にマイクロテストチューブにとった。計時を開始し、この容器にキセノンランプ光を正確に15秒間照射した。次いでこの溶液をヘマトクリット管にとり、ESR 装置にセットし、60秒後に磁場掃引を開始した。

(4) 溶存酸素の測定では、HPX (2 mM) 250 μ l、PBS (0.1M) 250 μ l、試料溶液または PBS 250 μ l、XOD (0.4unit/ml) 250 μ l を酸素メーター専用セルにとった。

4. 消去活性値の求め方

活性酸素消去活性測定法を模式的に Fig. 1 に示す。活性酸素を基準となる系で発生させ、食品試料が存在しない場合トラップ剤によって捕捉された量（スピニアダクト量）を標準発生系からの活性酸素量とする。この系に食品を添加し抗酸化剤が存在すると、トラップ剤と競争反応が起こり、抗酸化剤の効果に応じてスピニアダクト量が減少する。これを ESR 信号強度から求め消去能力を評価することができる。具体的には、消去活性値は次のようにして求められた。スーパーオキシドとヒドロキシルラジカルは DMPO アダクトの最も低磁場の ESR 信号強度を、また、一重項酸素の場合は TMPD との反応で生成する

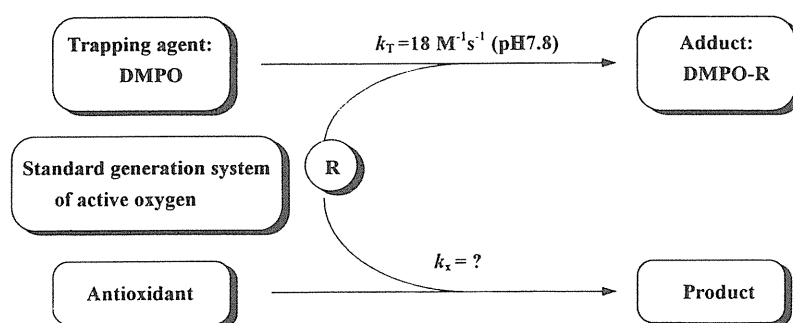


Fig. 1 Schematic diagram of method estimating free radical scavenging activity of antioxidants.

2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-piperidone-1-oxyl (TEMPONE)³⁾の ESR 信号強度を活性酸素量とした。食品試料を含まない系 (コントロール系) の値を I_0 、試料を含む場合を I として、 $100 * (1 - I/I_0)$ を消去率 (%) とした。また、活性酸素に対する抗酸化剤と DMPO の 2 次反応速度定数を、 k_x 、 k_T 、抗酸化剤と DMPO の初期濃度を $[X]$ 、 $[T]$ とすると、次の関係式が成り立つ。⁴⁾

$$I_0/I - 1 = (k_x/k_T) ([X]/[T]) \quad (1)$$

抗酸化剤が単一物質の場合は式(1)より 2 次反応速度定数 k_x を求めることができる。ところが食品のような複合系では、抗酸化剤の種類や濃度が不明であるため、速度定数を求めることができない。そこで、 $I_0/I - 1$ と試料濃度の直線関係から $I = I_0/2$ すなわち $I_0/I - 1 = 1$ のときの試料濃度を ID_{50} (スピニアダクトの ESR 信号を 50% 減少させる試料の濃度) として消去能とした。本研究では、消去活性を表すのに、消去率と ID_{50} の 2 つを用いる。消去率が大きな値ほど、また ID_{50} 値が小さいほど消去活性が高いことになる。

III 結果と考察

1. スピニアダクト信号強度の再現性

スーパーオキシド系のコントロールでは、10回のくり返し測定で相対標準偏差 (rsd) は $\pm 3.25\%$ 、実試料としてクミンとキャラウェイ (いずれも香辛料) を用いるとそれぞれ、 $\pm 3.3\%$ 、 $\pm 6.7\%$ となった。試料を調製後 10 日間の分析では、コントロール系で $\pm 4.0\%$ であり、香辛料 (クミン) をそのつど調製し直して 5 回の rsd は $\pm 7.9\%$ となった。

2. 緩衝溶液の種類

香辛料であるクローブを用いて、金属イオンの影響の少ない Good の緩衝溶液 (HEPES, MOPS) および PBS と ID_{50} 値を比較したところ、スーパーオキシドに対してそれぞれ 0.15 、 0.23 、 $0.19 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。これらの差については現在検討中である。

3. キレート剤の必要性

Fig. 2 に示すように、DTPA を含む系と含まない系において、実試料としてクローブを用いた場合、その消去率には影響を及ぼさないが、食品に多く含まれている Fe (III) や Mn (II) を加えた場合、DTPA を含まない方が消去率が大きくなった。従って、このような金属イオンもスーパーオキシド消去に関与していることになり、キレート剤は用いないほうがよいかもしれない。

4. 測定温度

本法では速度論的な扱いがなされるため、測定中の温度が重要な因子になると考えられる。しかし、Fig. 3 に示すように香辛料 (クローブ) のスーパーオキシド消去率にはあまり影響を与えないことが分かった。

5. pH の影響

反応系の pH を変化させた場合、Fig. 4 のような結果が得られた。コントロール系では pH が大きくなるにつれて DMPO アダクトの信号強度が大きくなった。これは、 $\cdot\text{OOH}$ と O_2^- の平衡¹⁾を考えれば説明で

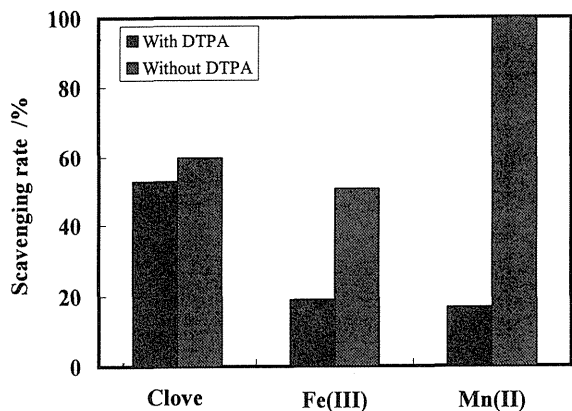


Fig. 2 Superoxide scavenging rate of spice (clove, $0.075\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), iron (III) ion (0.25mM) and manganese (II) ion (0.25mM) in the presence and the absence of DTPA.

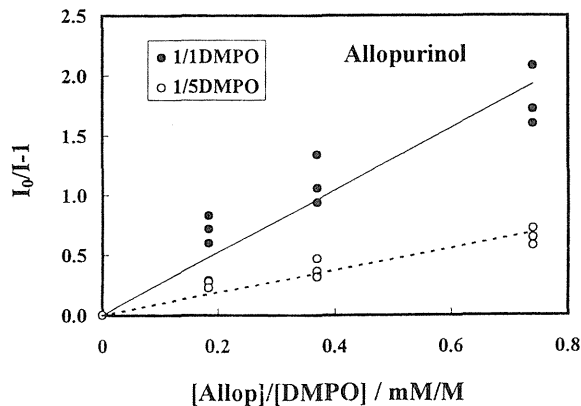
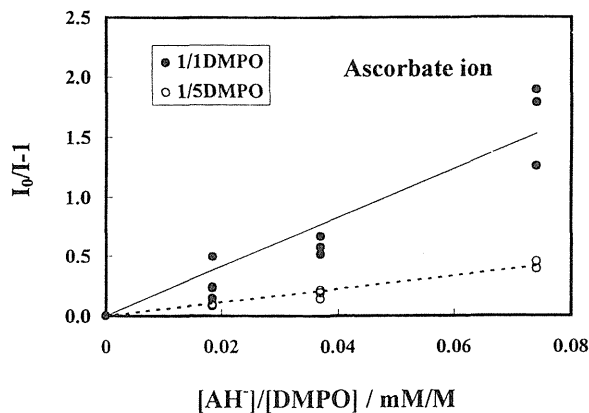
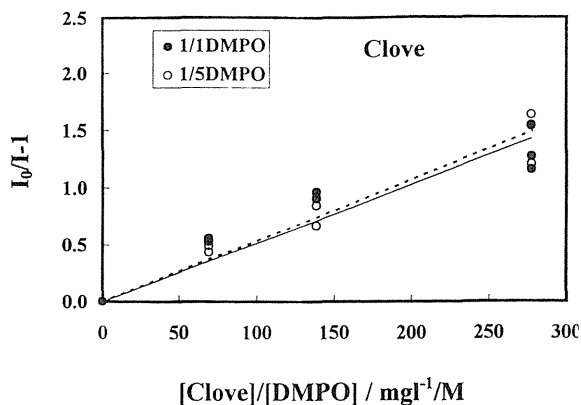


Fig. 5 Analysis of competitive reaction of superoxide with DMPO and scavenger.

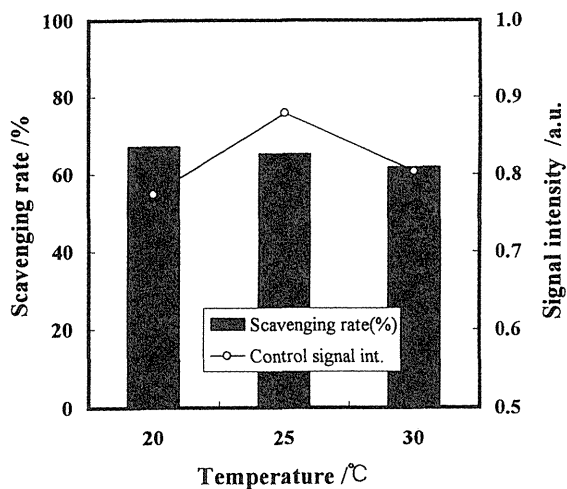


Fig. 3 Superoxide scavenging rate of spice (clove, $0.075\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) at various temperature.

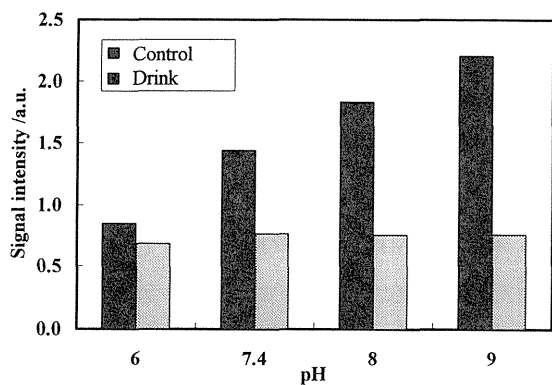


Fig. 4 pH change of DMPO-OOH signal intensity for control and drink (cola).

きるかもしれない。一方、試料にコーラを用いた場合には Fig. 4 のように一定の DMPO アダクトの信号強度を示した。従って消去率が pH によって変化することになる。これは、コーラ自身に含まれる消去剤の成分が pH によって変動しているためと考えられる。

6. 発生系阻害

スーパーオキシドに対するトラップ剤と抗酸化剤(活性酸素消去剤)の競争反応を用いて、以下のような取り扱いを行った。すでに報告されているように⁴⁾⁻⁶⁾、式(1)より2つの異なる濃度の DMPO を用いて試料濃度を变化させた場合、 $[試料]/[DMPO]$ と $I_0/I-1$ の関係の直線が同じ傾きを与えれば、発生系に影響がないと判定できる。スーパーオキシド系の場合、試料として香辛料(クローブ)、アロプリノール、アスコルビン酸ナトリウムで比較したところ、XOD 阻害が知られているアロプリノール⁷⁾は、同一直線を与えなかった。また、アスコルビン酸ナトリウムも同様であり、発生系阻害の可能性を示した。その結果を Fig. 5 に示す。しかし、溶存酸素消費量を測定したところ、Fig. 6 に示すようにアスコルビン酸ナトリウムでは異常が認められなかった。従って、上述の結果は別の理由例えば DMPO スピンアダクトのアスコルビン酸イオンによる還元を意味していると考えられる。

7. DMPO スピンアダクトの還元

スーパーオキシド系では、DMPO-OOH の分解反応による信号強度の減少を考慮しなければならないので、ここではヒドロキシルラジカルについて検討した。まず、前述と同様に2種の濃度の DMPO を用いて得られた、アスコルビン酸イオンの結果を Fig. 7(a) に示す。2直線は一致しなかった。Fig. 8(a) のように、ビールの場合の DMPO-OH の時間変化はコントロールと同様にゆっくりと減少したが、Fig. 8(b) に示すように、アスコルビン酸イオンの場合、時間に伴って一次反応速度式に従って減少した。この減少はニトロキシドラジカルとアスコルビン酸イオンによくみられる⁸⁾。そこでその速度式より時間ゼロに相当する信号強度を求めれば、還元を受けないときの真の値を知ることができる。このような方法で補正したものを Fig. 7(b) に示す。しかし、このような補正を行っても異なる DMPO 濃度で同一直線を与えなかった。従って、アスコルビン酸イオンは DMPO アダクトの還元だけではなく、ヒドロキシルラジカル発生系も阻害している可能性があるが、現時点でそのことを確かめる方法がない。アスコルビン酸を多量に含むと考えられる食品の場合、少なくとも以上のような2直線の一致性を確認しなければならない。

8. 食品の活性酸素消去能

現時点で最良と考える方法で求めた食品のスーパーオキシド消去能を Table 1 に示す。Fig. 9 には香辛

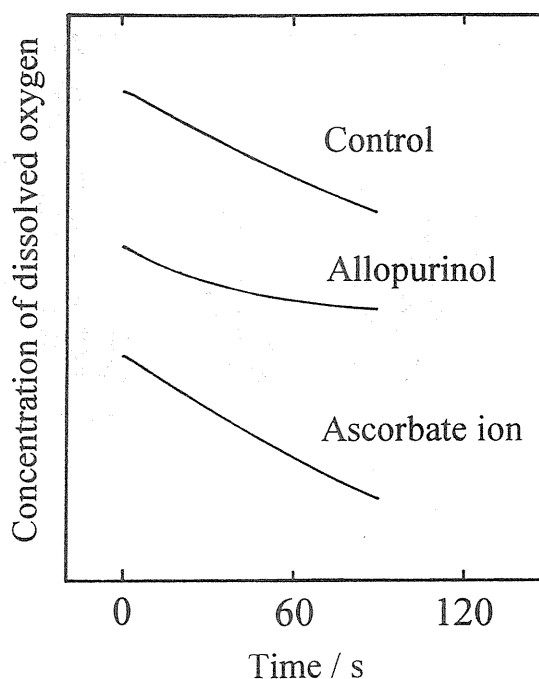
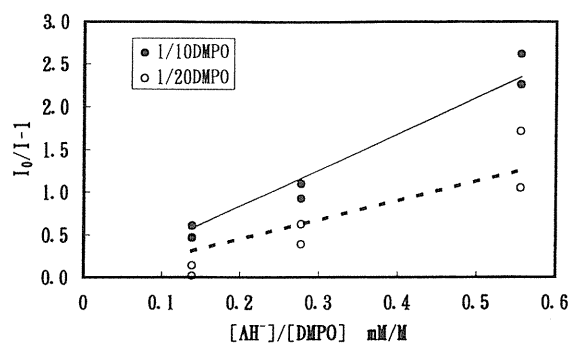
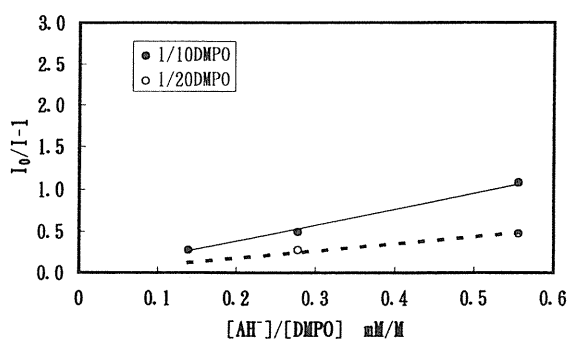


Fig. 6 The change of dissolved oxygen concentration in various systems.



(a) Before correction



(b) After correction

Fig. 7 Analysis of competitive reaction of hydroxyl radical with DMPO and ascorbate ion before (a) and after (b) the correction of DMPO-OH reduction.

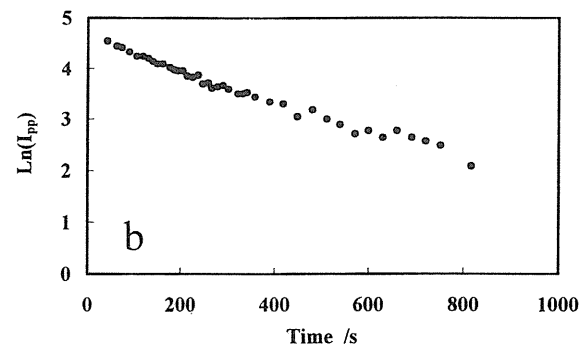
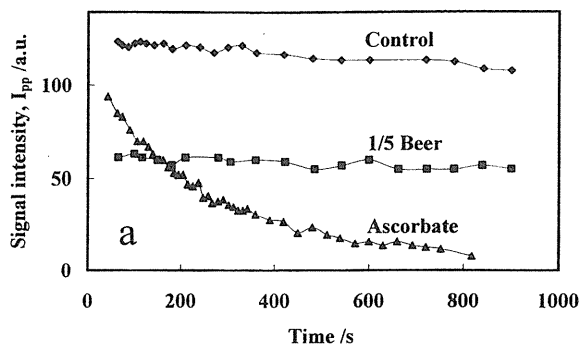


Fig. 8 Time course of DMPO-OH signal intensity (a) and the reduction of DMPO-OH by ascorbate ion (b).

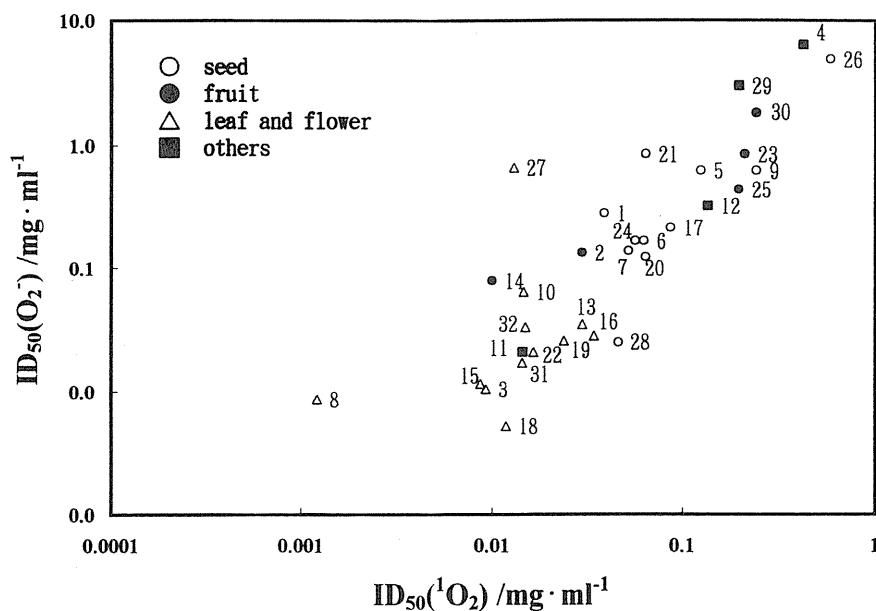


Fig. 9 The relation of ID_{50} between DMPO-OOH (O_2^-) and TEMPONE (1O_2).

- | | | | | | |
|-------------|---------------------|-----------------|--------------|------------------|--------------|
| 1. anise | 7. cumin | 13. sweet basil | 19. tarragon | 25. black pepper | 31. rosemary |
| 2. allspice | 8. clove | 14. star anise | 20. dill | 26. white pepper | 32. laurel |
| 3. oregano | 9. coriander | 15. savory | 21. nutmeg | 27. marjoram | |
| 4. garlic | 10. Japanese pepper | 16. sage | 22. basil | 28. mustard | |
| 5. cardamon | 11. cinnamon | 17. celery | 23. paprika | 29. mace | |
| 6. caraway | 12. ginger | 18. thyme | 24. fennel | 30. red pepper | |

Table. 1 Superoxide scavenging ability of various foods.

	Fresh		Microwave heating (2 min)	
	Scavenging rate %	ID ₅₀ mg·ml ⁻¹	Scavenging rate %	ID ₅₀ mg·ml ⁻¹
Sweet potato	69	5	54	12
Rice	51	18	0	
Potato	38		6	
Green pepper	100	2	67	7
Perilla	100	2		
Ukogi	100	1	100	1
Leek	74	7	51	13
Radish leaf	69	6	65	9
Parseley	69	5	83	2
Spinach	45	15	10	
Tomato	44	27	24	
Carrot	44		9	
Lemon	100	10*	93	10*
Lettuce	85	2	62	
Cabbage	82	6		
Burdock root	80	3	76	3
Ginger	63	9	34	
Garlic	47	14	68	6
Cucumber	33			
Radish	32		35	
Onion	25		29	
Welsh onion	17		27	
Soybean	90	1	23	
Beer (heated)	100	44*		
Beer (draft)	100	65*		
Whisky	100	52*		
Black tea	100	9*		
Green tea	100	2*		
Oolong tea	100	3*		
Soy sauce	90	5*		
Coke	40			
Sake	8			
Sake (heat ed)	5			

* $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$

料の一重項酸素とスーパーオキシドの ID₅₀ 値の関係を示した。香辛料は15mg を 1 ml のリン酸塩緩衝溶液に加え、攪拌後の上澄み液を試料原液とした。Table 1 の固形食品は 2 g を 40ml のリン酸塩緩衝溶液に加えホモジナイズし、遠心分離後の上澄み液を試料原液とした。飲料などはそのまま試料原液とした。消去率は試料原液の場合のスピンアダクトの信号強度から得られた値であり、ID₅₀ 値はスピンアダクトの信号が半分になる時の試料溶液の濃度である。

一般には、緑黄色野菜に活性が高いものが見出された。電子レンジ加熱（2分間）の結果もあわせて示した。この場合、活性低下が一般的であるが、中には活性が増加するものも見出された。香辛料の場合は、スーパーオキシドと一重項酸素の活性はほぼ関連しており、これは、両者を消去する成分が同一であることを示している。また、葉や花を利用部分とする香辛料に高い消去活性があった。植物におけるこの部分

は光などの外的環境のストレスを強く受けるため、植物は抗酸化機能を発揮するために抗酸化成分を多く含んでいるものと考えられる。

9. おわりに

以上のように様々な問題を抱えているものの、スピントラップ ESR 法はその簡便性と迅速性から、多量の試料の分析には最も適した方法であると考えられる。従って、少なくとも本報告で述べたような確認、すなわち、2つの異なる濃度のトラップ剤を用いたときの2直線の傾きの一致性を調べることによって、正しい評価を下すことが大切である。しかし、発生系阻害やスピニアダクトを還元すると判断された試料について、その影響を差し引いた真の活性値を求めるにはどうすればよいのだろうか。現在、我々は標準添加法がその解決策の一つになるものとして検討中であるが、今後このような問題を解決して、真の消去能を求める評価法が考案されることを切望してやまない。

本研究は、山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所および日本電子株式会社河野雅弘博士との共同研究として行われたものである。

文 献

- 1) 中野 稔：活性酸素の測定、活性酸素、蛋白質核酸酵素 33: 2684-2692, 1988.
- 2) 河野雅弘、水田幸男、増水草季：ESR による活性酸素測定と応用。日本電子株式会社（編）“ESR セミナーテキスト” 1995.
- 3) この方法は厳密にはスピントラップ法とは言えないが、一重項酸素をニトロキシドラジカルに変換して測定するという点から、スピントラップ ESR 法として取り扱った。L. J. Berliner, D. G. Bradley, D. Meinholtz, D. B. Min, T. Ogata: The detection of riboflavin photosensitized singlet oxygen formation in milk by electron spin resonance, G. Pifat(ed.) Balaban Publishers “Supramolecular Structure and Function” 67-77, 1994.
- 4) 光田慶一：スピントラッピングの速度論的応用、桜井 弘（編）廣川書店 “バイオサイエンス ESR” 74-88, 1996.
- 5) 一守康史、V. Gadzheva、中沢博江、Z. Raikov：スピンラベルされたニトロウレア系およびトリアゼン系抗癌剤におけるスーパーオキシド消去活性とその反応機構。磁気共鳴と医学 4: 53-57, 1994.
- 6) L. Prónai, Y. Ichikawa, K. Ichimori, H. Nakazawa, S. Arimori: Hydroxyl radical-scavenging activity of slow-acting anti-rheumatic drugs. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 9: 17-23, 1990.
- 7) V. Massey, H. Komai, G. Palmer: On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines. *J. Biol. Chem.* 245: 2837-2844, 1970.
- 8) Y. Liu, Z. Liu, Z. Ham: Radical intermediates and antioxidant activity of ascorbic acid. *Rev. Chem. Intermed.* 10: 269-289, 1988.

物質に捕捉させ、その結果起こった化学反応の反応常数をもとにされたものであり、生体内における実際の姿を反映しているかは疑問である。そこで、我々は、放射線照射された細胞内で実際に起きているラジカル反応を直接捕え、突然変異や発がんなど生物学的影響の原因となるラジカルを特定する目的で、細胞内ラジカルを電子スピン共鳴法 (ESR 法) を用いて測定することを試み成功した¹⁾。本稿では、その後の我々の研究結果から、放射線による遺伝的影響の原因となるラジカルが、常温で安定な高分子有機ラジカルである可能性を紹介する。

2. X線照射された細胞内には常温で安定な有機物ラジカルができる

まず、細胞を通常の活性化エネルギーを介したラジカル反応がほとんど起こらない液体ヘリウム温度 (4.2K) に凍結し、X照射によって生ずるラジカルを測定した。その結果、4.2Kで照射された細胞には、OHやHラジカルとともに特徴的な非対称スペクトラム構造を持つ高分子有機ラジカルが生ずることがわかった¹⁾。4.2Kにおける照射により SHE 細胞内に直接生成した水素原子、OHラジカルおよび有機物ラジカルの割合は、12%、72%そして16%であった¹⁾。この細胞を、液体窒素温度 (77K)、液体メタン温度 (111K) へ順次昇温するにつれて、OHやHラジカルのような低分子ラジカルは、自己消滅や周辺の物質との作用によって急激に消滅するが、常温 (295K) にまで昇温しても、安定して存在し続ける高分子有機ラジカルが存在することが判った。細胞を常温で照射しても同様に高分子有機ラジカルが生ずる (図 1 b)。常温および 77K のいずれの温度においてもこの有機物ラジカルの生成に係わる G 値は 2.005 であり、どちら

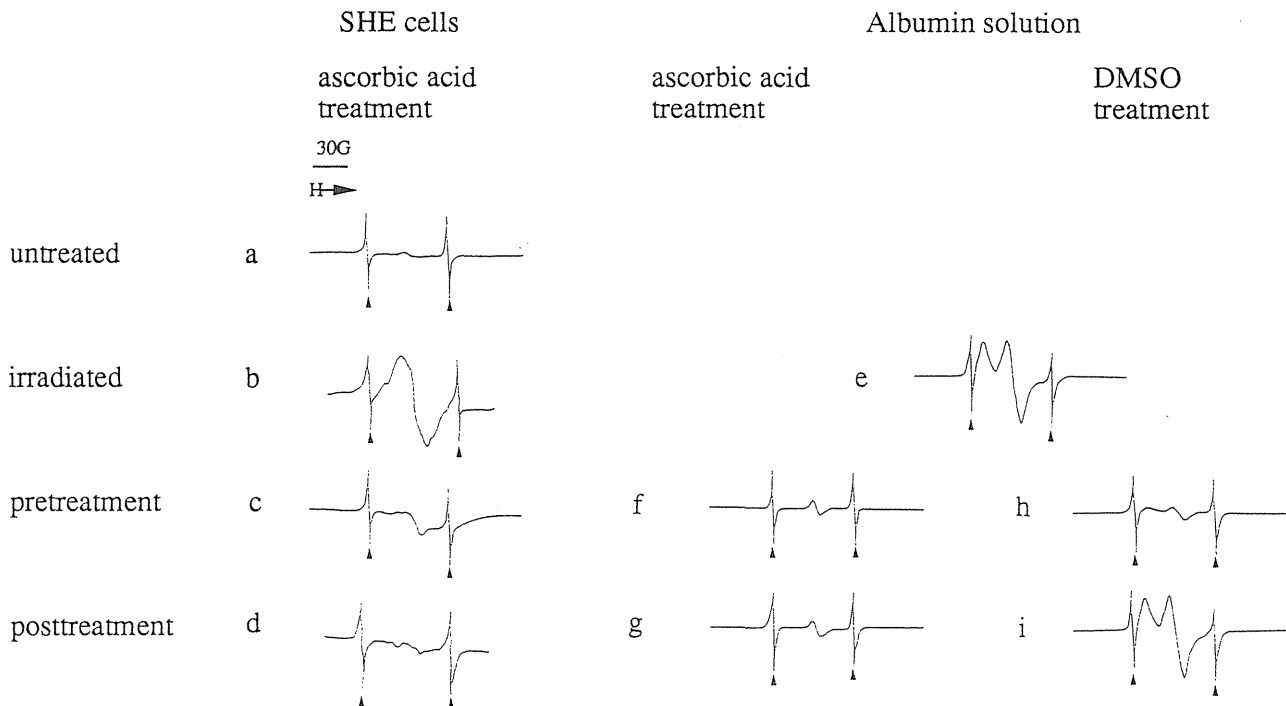


Figure 1. ESR spectra after γ -irradiation of SHE cells and albumin solution that were γ -irradiated at 295K at 5 kGy and then measured at 77 K; ▲ Spectra of Mn^{2+} ; a, SHE cells (untreated); b, SHE cells (irradiated), c, SHE cells pretreated with 8.5mM of AsA; d, SHE cells posttreated with 8.5mM of AsA; e, 9wt% albumin solution (irradiated); f, 9wt% albumin solution pretreated with 280mM AsA; g, 9wt% albumin solution posttreatment with 280mM AsA; h, 9wt% albumin solution pretreatment with 1M DMSO; i, 9wt% albumin solution posttreatment with 1M DMSO.

の温度においても同じラジカルが生じていると思われる。常温における生成量は、77K のおよそ1/100であった¹⁾。この有機物ラジカルは、常温でも極めて安定に存在し、半減期はおよそ20時間であることがわかった(図2)²⁾。この半減期は、OH ラジカルや水素原子の常温における半減期、70ナノ秒から200マイクロ秒と比較してはるかに長い。従来、DNA やタンパクなど生体高分子に生ずるラジカルは、OH ラジカルや水和ラジカルなど反応性の高い低分子ラジカルを介して間接的に生ずると考えられていた。しかし、我々の結果では、4.2K という極低温においても総ラジカルの16%にも及ぶ高分子有機ラジカルが生じていることになる。こうした温度では、如何に反応性の高いOH ラジカルといえども通常の化学反応を起こさないので、4.2K で生ずる有機物ラジカルの生成にOH ラジカルは寄与していないと考えられる。この細胞を、昇温して111K にするとOH ラジカルは、半減期5分程度で減衰するが、その減少に見合った有機物ラジカルの増加は見られない³⁾。この結果も、OH ラジカルが高分子有機物ラジカル生成の原因ではないことを支持する。従って、高分子有機ラジカルは、放射線照射により直接生じたとするか、あるいは、なにか他の活性ラジカルの関与で生じていると考えねばならない。現時点まで、我々は、高分子有機ラジカルが放射線による一次生成ラジカルか二次生成ラジカルであるか特定できていない。しかし、有力な原因候補は水素原子の関与であろう。水素原子は、原子量が極めて小さく粒子性ととも波動性を持っている。そのため、トンネル効果によって活性化エネルギーの障壁を越えずにラジカル反応ができることはよく知られている¹⁾。

これまで歴史的には、OH ラジカルが放射線の生物影響の最初の原因ラジカルと考えられてきた。これは、生体の80%以上は水分であるという事実と生体高分子は細胞内に均質に分布しているという仮定に基づいて作られた概念である。この概念に添って水溶液反応系でおこなったラジカルとラジカルスクランジャーの反応からOH ラジカルの反応速度定数はおよそ $10^9 \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ である³⁾。有機物ラジカルのそれと比べてけた違いに大きい。生体内において生体高分子は、細胞内に均質の水溶液として存在しているのだろうか? 答えは、ノウである。最近の研究結果は、核や膜などは、かなり疎水性であることが指摘されているし、水の存在形態も結晶水などの型で存在する可能性も高いと予想されている。こうした事実を考慮すれば、核内遺伝物質や細胞膜に対する放射線の影響を考えるうえで、OH ラジカルのような水由来の活性ラジカルが重要な役割を演じているかは大いに疑問である。事実、我々の結果は、高濃度アルブミン溶液内におけるラジカル反応は、そのG値から、疎水系における反応を考慮せずには解決できないことを示唆している³⁾。また、DMSO 溶液内におけるOH ラジカルの消長をESR法で観察すると、111K で生じたOH ラジカルは5分程度の半減期で減衰するにも関わらず、OH ラジカル消失に見合ったDMSO ラジカ

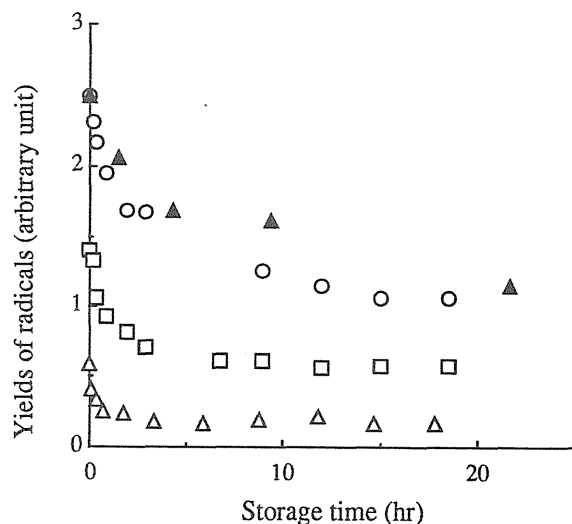


Figure 2. Decay of radicals produced at 295 K by γ -irradiation when the irradiated samples are stored at 295 K. \triangle , albumin radicals in aqueous albumin ($0.1 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$) solution at irradiation dose of 0.6 kGy; \square , albumin radicals in aqueous albumin ($0.1 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$) solution at irradiation dose of 1.4 kGy; \circ , albumin radicals in aqueous albumin ($0.1 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$) solution at irradiation dose of 4.3 kGy; \blacktriangle , organic radicals in SHE cells at irradiation dose of 5 kGy (quoted from Yoshimura et al., 1993).

ルや高分子有機ラジカルの増加は見られない¹⁾。ところが、 γ 線照射した SHE 細胞の致死感受性は、DMSO の存在によって低下する⁴⁾。DMSO は、水溶液系で OH ラジカルを効率良くスカベンジできることはよく知られており、このことも、OH ラジカルが細胞死の原因でないことを間接的に示唆するものであろう¹⁾。放射線分解で生じた OH ラジカルは、その拡散距離が常温でおよそ 20nm と考えられているので⁶⁾、細胞の直径が 10-30 μ m (核 3-10 μ m) であることを考えると、OH ラジカルの多くが産生される水分に富んだ部位に生じた、OH ラジカルは、致死の原因となる細胞内標的 (DNA) と出会うより前に、発生した場所近傍で自己再結合反応により消失すると考えるのが自然である。この再結合反応の反応速度定数は、均質の希薄水溶液中では $5.3 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ であった⁵⁾。このように、我々の研究で得られた結果は、ことごとく OH ラジカルが放射線の生物影響の主因であるとする仮説に矛盾する。

3. 高分子ラジカルは、ビタミン C で効率良くスカベンジされる

それではどのようなラジカルが放射線の生物効果の原因であろうか? 残念ながら、この疑問に答える事は出来ない。しかし、我々は、これまでに得た結果から一つの候補として高分子有機物ラジカルを考えている。活性が高く反応しやすいラジカルよりも、活性が低いが細胞内でいつまでも存在し続けるラジカルは、細胞死への寄与は少ないが、遺伝的影響の原因となる可能性が高いのではないだろうか? 我々が注目している高分子有機ラジカルは、ビタミン C 処理で効率良く消失することがわかった⁷⁾。X 線照射前から照射終了時までの間、アスコルビン酸 (5 mM) が存在すると細胞内における高分子有機ラジカルの生成は顕著に抑えられる (図1-c)。さらに驚くことに、 γ 線照射20分後からアスコルビン酸処理を開始しても細胞内に生ずる有機物ラジカルの量は激減する (図1-d)。もちろん、照射アルブミン溶液に生成するアルブミンラジカルについても同様の現象が観察された (図1-f、1-g)。こうしたことは、これまで一般に考えられているラジカルスカベンジャーの常識では予想されない。一方、DMSO 存在下で γ 線照射された場合には、アスコルビン酸の場合と同様にアルブミンラジカルの生成が抑えられるが (図1-h)、照射後に処理を開始するとラジカルスカベンジ効果は全く見られなかった (図1-i)。アルブミンラジカルの生成量は、ラジカルスカベンジャーの濃度に依存して減少する。アスコルビン酸は、DMSO のおよそ 1/100 の濃度で有効であった¹⁾。

4. 高分子有機物ラジカルは、突然変異の原因ラジカルである

我々は、細胞内に生じた高分子ラジカルとビタミン C の反応速度定数 ($0.014 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) は、この反応が水溶液中で起きていると仮定した場合に予想される反応速度定数 ($10^6 - 10^{10} \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$) に比べ極端に小さい⁸⁾ので、このラジカルは、DNA、タンパクなど高分子成分に富んだ比較的、疎水性細胞成分内に生じていると予想している。この予想が妥当であれば、我々が注目している高分子有機ラジカルは DNA など生体重要高分子に存在し放射線の遺伝的影響に関与している可能性は高いであろう。こうした観点から、我々は高分子有機ラジカルの生物効果を知るために、ヒト初代培養細胞を用いて、放射線照射に伴って誘導されたラジカル量のビタミン C 処理による消長と細胞致死、染色体異常、および突然変異誘発など放射線生物効果の動態の相関を調べた。

ESR で観察される高分子有機ラジカルの生成を 85% 抑える濃度 (5 mM)⁷⁾ のビタミン C で照射前から照射終了時まで 2 時間処理された細胞の生存率と染色体異常誘発頻度は、未処理群のそれと変わらず、致死および染色体異常の原因を起こすラジカルに対する防護効果は認められなかったが、ハイポキサンチン・

グアニン・フォスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座における突然変異頻度を著しく減少させた (図 3)。さらに驚くべきことは、ビタミン C 処理を照射後 20 分あるいは照射後 20 時間を経てか

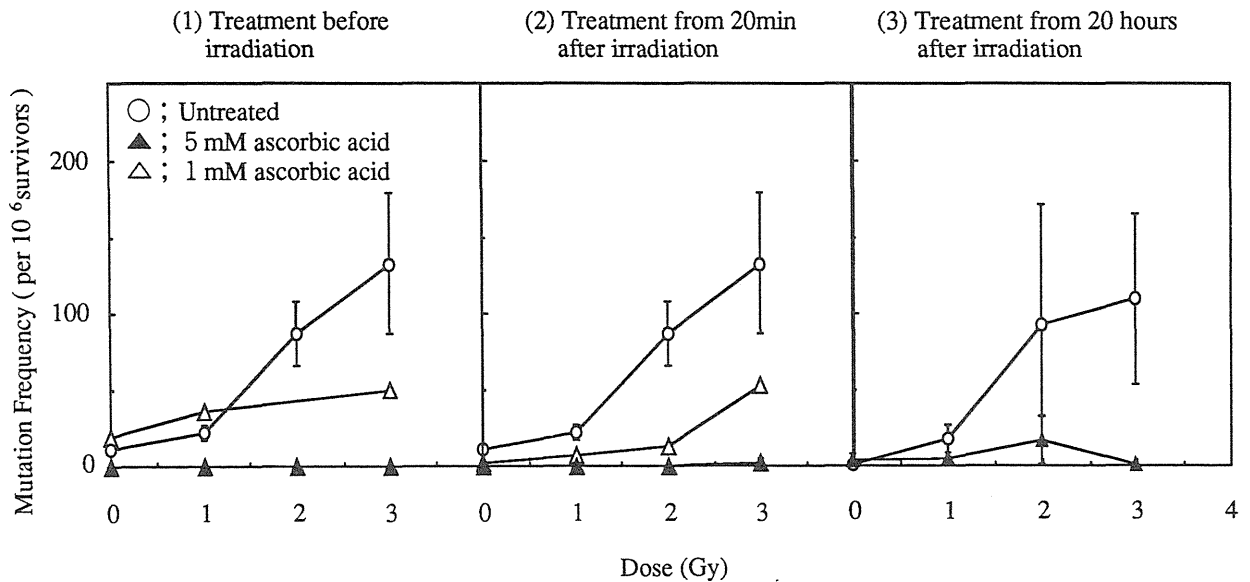


Figure 3. Effect of ascorbic acid (vitamin C) to mutation frequency of human cell irradiated with X-rays.

ら開始しても顕著な突然変異頻度抑制効果が観察されたことである (図 3)。同様の実験を DMSO で行なうと、ビタミン C の場合と同様に、照射前から照射終了時までの処理では、生存率、染色体異常および突然変異のすべての効果を軽減させるものの、後処理では全く効果が見られないことが判った (図 4)。

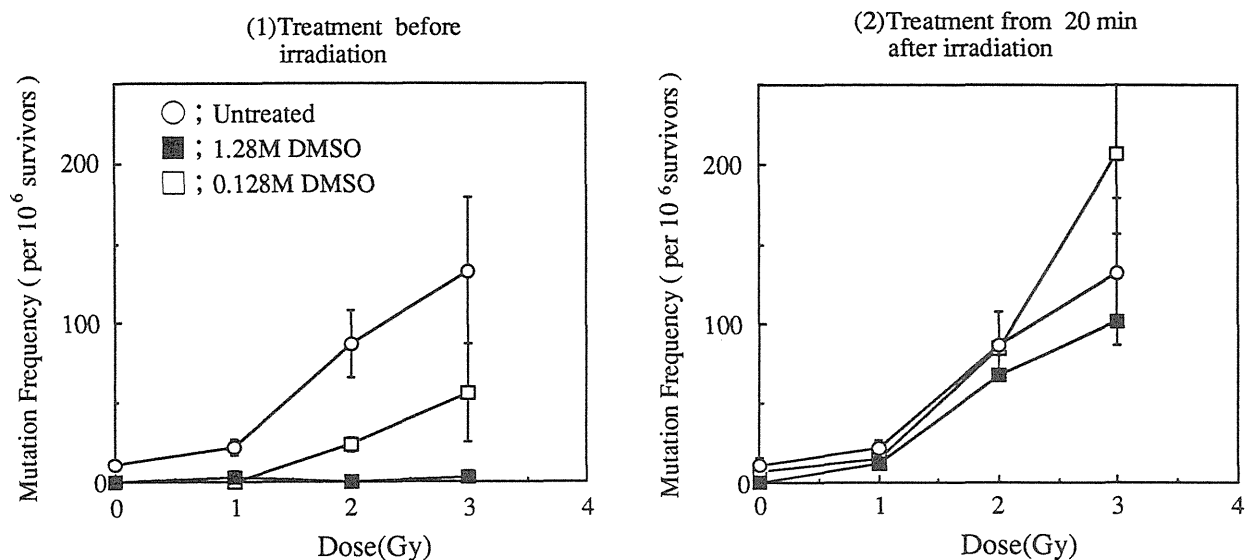


Figure 4. Effect of DMSO to mutation frequency of human cell irradiated with X-rays.

これらの結果は、ビタミン C で特異的にスキヤベンジされる高分子有機ラジカルは、細胞の生死に関与しないが、照射後長期間に渡って存在し突然変異発生の原因となることを意味している。ビタミン C は、この高分子有機ラジカルを効率良くスキヤベンジする。

これまでの ESR のシグナルを解析すると、本研究で注目するラジカルは、非対称の型などの特徴からその生成に酸素が関与する過酸化ラジカルと予想できる。このことは、細胞膜で発生した活性酸素ラジカ

ルが放射線応答現象に関連する遺伝子発現のシグナルとなるという報告とともに、突然変異の原因となる細胞損傷が活性酸素を介して生ずる可能性を示唆する。そこで、有機ラジカルの生成と突然変異頻度が酸素の存在の有無によって影響されるか否かを検討した。その結果、放射線で誘導される突然変異頻度は、窒素置換するだけで半減することがわかった。窒素置換したうえで X 線照射し、かつビタミン C 処理を行なうと放射線で誘導される突然変異頻度は、ほぼ完全に抑制された。細胞生存率や染色体異常頻度は、窒素置換によって減少したが、ラジカルスカベンジャー処理の影響はみられなかった。

これらの結果を総合すると、放射線による突然変異の主因となるラジカルは、これまで考えられていたように反応性の高い(短半減期の) OH や H ラジカルではなく、今回、我々が注目している高分子有機ラジカルであると予想できる^{3,4)}。この高分子有機ラジカルの生成には、酸素が関与しているだろう。低温度のビタミン C 長期処理によって Balb/c3T3 細胞の細胞がん化が抑えられるという報告等を考慮すると、細胞癌化にもこの高分子ラジカルが関与する可能性がある。これらの結果を踏まえて、我々は、“長寿命有機ラジカルは、致死の原因とならないため生体内に安定に存在し続け突然変異や発がんの主因となる”と予想している。

5. 考 察

近年、放射線発癌、ウイルス発癌、化学発癌の発癌機構が遺伝子レベルで理解されるようになって、フリーラジカルが遺伝子に突然変異を起こすことが発癌の主因であると考えられるようになった。もし、本稿で指摘する高分子有機物ラジカルが突然変異の主因であるとすれば、それは致死的でないのでかえって発癌を助長する可能性が高い。これらの仮定が正しいとすれば、ビタミン C は高分子有機ラジカルの発生を抑えるばかりか細胞内に安定して存在するこのラジカルも効率的にスクャベンジできるので、発癌抑制において重要な役割を演じている可能性も高い。事実、放射線発癌に対するビタミン C の投与は、細胞癌化実験でも動物発癌実験でも発癌のプロモーション過程を抑えることによって発癌抑制効果を現すと予想されている¹⁰⁻¹³⁾。ビタミン C は X 線ばかりでなく 3-メチルコラントレンなど化学物質による発癌も抑制する¹⁴⁾。また、紫外線によるマウス皮膚腫瘍の発生率を抑制する^{15,16)}。しかし、一方では、ビタミン C は必ずしも癌や突然変異に対して抑制的、または生体防御的に働くわけではないことも指摘されている。例えば、ヒトと違って生体内でのアスコルビン酸の生合成が可能なラットに多量のビタミン C を投与するとかえって過酸化脂質生成の亢進が見られる。さらに、90%酸素濃度に曝されたハムスター細胞では、通常酸素濃度(20%)より染色体異常頻度が増加し、細胞生存率が低下するが、その原因は、高い酸素濃度のために起きる酸化ダメージの増加がその原因と考えられている。この仮定が正しいければ、抗酸化剤であるビタミン C の処理によって染色体異常頻度の低下と生存率の改善が期待されるが、かえって染色体異常の増加、致死効果の増強が見られたという^{17,18)}。このように、ビタミン C は、生体内において抗酸化作用を持つと同時に酸化促進作用を持つなど、合い反する作用をもっている¹⁹⁾。我々も、マウス m5s 細胞を用いた細胞癌化実験系を用いた実験で、低温度(0.05mM 程度の長時間処理)のビタミン C 処理は細胞癌化頻度を低下させるが、高濃度(5 mM 程度の短時間処理)処理はかえって細胞癌化を促進するというビタミン C の作用の二面性を観察している。発癌機構の全容が不明であり、またビタミン C の生体内での作用は多岐に渡っていると思われるので、実際にどのようなメカニズムで放射線発癌の抑制が行なわれているかは分からないが早急に解明したい疑問である。

少なくとも、ビタミン C のラジカルスクャベンジ機構は、DMSO と全く異なる。ビタミン C がスクャ

ベンジできるラジカルが有機ラジカルだけであって、ビタミンCが影響を及ぼす（軽減できる）ことができる生物効果は、どのような処理条件においても突然変異だけであること、それも、放射線照射して20時間以上経てからでも効果があるという事実は、興味深い。もちろん、DMSOは、X線照射に先だって処理すれば、染色体異常、致死効果および突然変異のいずれも抑制することが出来るが、照射後処理では全く影響を及ぼさなかった。被曝事故や放射線治療後の遺伝的障害を軽減するために、ビタミンCの投与が役立つのではないだろうか。

有機物ラジカルが細胞死の原因となることはありそうもない。加えて、前述したように、細胞死を引き起こすラジカルがOHラジカルである可能性も低い。従って、細胞死に関与するラジカルは何かという疑問は依然として残ったままであるが、X線照射20分後からDMSO処理しても生存率は上昇しないので、少なくとも常温で照射後20分以内（ラジカルスカベンジャーの後処理の開始までにかけた時間内）に消失する活性の高い水素原子、ホールあるいは電子などが候補としてあげられる¹⁾。窒素雰囲気下において、スカベンジャー未処理細胞の生存率が有意に上昇するので²⁰⁻²³⁾、細胞死に活性酸素種（ROS）が関与していることはほぼ間違いない。DMSOは、これら反応性の高いラジカルを効果的に捕捉することによって染色体異常やそれに伴う細胞死を抑制しているに違いない。しかし、ビタミンCは、反応性の高いラジカルをスカベンジできず致死性損傷の生成を抑えられない。反応性の高いラジカルの多くは、致死性の損傷を起こすが、その損傷が生じた細胞は死んでしまうので遺伝的影響という意味ではあまり重要ではないだろう。DMSO前処理による突然変異誘発の抑制は、高反応性ラジカルを素早くスカベンジすることによって突然変異の原因となる高分子有機ラジカルの生成を抑制することができるためであろう。反応性の高いラジカルの一部は、細胞内の高分子有機物と反応して活性が低い有機ラジカルを生成する。この有機ラジカルは、反応性が低く細胞を致死に導くことはない。しかし、その損傷は、細胞の生化学的反応に異常を来し重篤な遺伝的変化につながってゆくのではないか。

いずれにせよ、我々の結果では、細胞の致死と染色体異常を起こす損傷と突然変異を起こす損傷は全く異なると結論せざるを得ない。細胞死や染色体異常のように重篤な損傷と、突然変異のような細胞の生死

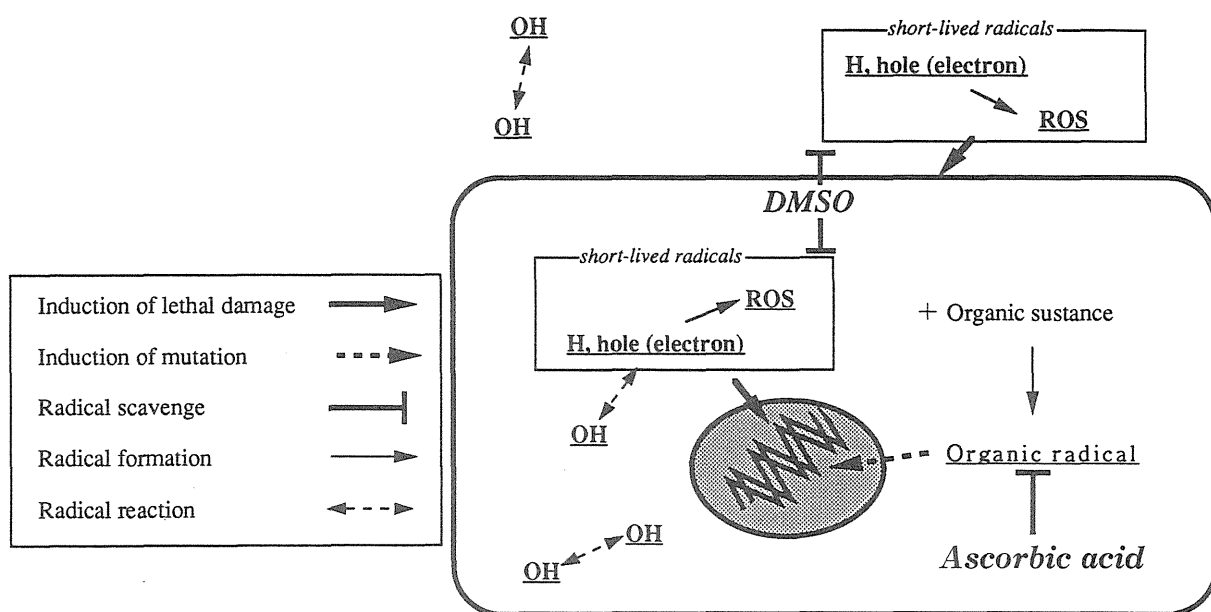


Figure 5. Mechanism of radical scavenging by ascorbic acid (vitamin C)

に大きく影響しないような損傷を想定せねばならない。前者の生成には、高反応性のラジカルが関与し、後者の生成には、長寿命の有機物ラジカルが関与する。

本研究で得られた結果から、我々は、図5に示すような仮説を提案する。細胞に致死的な障害を与えるラジカル（活性が高い短寿命のラジカル）と突然変異を引き起こすラジカル（活性が低い長寿命の有機物ラジカル）が存在する。前者は、DNAに多くの切断を起こす。巧く修復できなかつたDNA切断は染色体異常を招き、さらには細胞死を迎える。後者は、DNAに致死的ではない比較的小規模の傷（全くの仮定）を起こす。それらの傷は、巧く修復されなくても染色体異常を起こし細胞死を招くような異常を生じない。恐らく、DNA複製異常を介して突然変異頻度を増加させる。ビタミンCは、有機物ラジカルを特異的に捕捉するので突然変異の頻度を減少させる。これら一連の仮説が正しければ、ビタミンC処理後に生き残る突然変異細胞のDNAに残る変化は大規模な欠失型が多いことが予想される。現在、ビタミンC投与により抑制される突然変異のDNAレベルに残る変化に特異性があるのか、またどのようなタイプの突然変異が癌などの疾病を引き起こすのかを検討中である。

6. 参考文献

- 1) T. Miyazaki, Y. Hayakawa, K. Suzuki and M. Watanabe, Radioprotective effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to γ rays at 77K I. Radical formation as studied by electron spin resonance. *Radiat. Res.* **124**, 66-72 (1990).
- 2) T. Miyazaki, T. Yoshimura, K. Mita, K. Suzuki, and M. Watanabe, Rate constant for reaction of vitamin C with protein radicals in γ -irradiated aqueous albumin solution at 295K. *Radiat. Phys. Chem.*, **45**, 199-202 (1995).
- 3) T. Yohimura, T. Miyazaki, S. Mochizuki, K. Suzuki and M. Watanabe, Do OH radicals react with organic substances in gamma-irradiated frozen cells of golden hamster embryo?. *Radiat. Phys. Chem.*, **40**, 45-48 (1992).
- 4) M. Watanabe, M. Suzuki, K. Suzuki, Y. Hayakawa and T. Miyazaki, Radioprotective Effects of dimethyl sulfoxide in golden hamster embryo cells exposed to γ rays at 77K II. Protection from lethal, chromosomal, and DNA damage. *Radiat. Res.* **124**, 73-78 (1990).
- 5) L. E. Gerweck, B. Richards and M. Jennings, The influence of variable oxygen concentration on the response of cells to heat or X irradiation. *Radiat. Res.* **85**, 314-320 (1981).
- 6) 二木鋭雄、島崎弘幸、美濃真 抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御—学会出版センター (1994)
- 7) T. Yoshimura, K. Matsuno, T. Miyazaki, K. Suzuki and M. Watanabe, Electron spin resonance study of free radicals in gamma-irradiated golden hamster embryo cells: Radical formation at 77 and 295 K, and radioprotective effects of vitamin C at 295 K. *Radiat. Res.* **136**, 361-365 (1993).
- 8) T. Miyazaki, S. Nagasaka, I. Maeda, T. Matsumoto, S. Koyama, S. Kodama, and M. Watanabe, Radiation-induced emission from golden hamster embryo cells. *Radiat. Phys. Chem.*, in press (1995).
- 9) T. Miyazaki, T. Yoshimura, K. Suzuki, and M. Watanabe. Free radicals with long lifetime in gamma-irradiated golden hamster embryo cells and their model system at 295 K. Radical decay and reaction with vitamin C. *Magnetic Resonance in Med.*, **6**, 346-348 (1994).
- 10) M. Yasukawa, T. Terasima and M. Seki, Radiation-induced neoplastic transformation of C3H10T1/2 cells is suppressed by ascorbic acid. *Radiat. Res.* **120**, 456-467 (1989).
- 11) H. Tauchi and S. Sawada, Suppression of gamma- and neutron-induced neoplastic transformation by ascorbic

- acid in Balb/c 3T3 cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **63**, 369-374 (1993).
- 12) J. F. Dorgan and A. Schatzkin, Antioxidant micronutrients in cancer prevention. *Nutrition & Cancer*, **5**, 43-68 (1991).
 - 13) Howerde E. Sauberlich, Pharmacology of vitamin C. *Annu. Rev. Nutr.* **14**, 371-391 (1994).
 - 14) W. F. Benedict, W. L. Wheatley and P. A. Jones, Inhibition of chemically induced morphological transformation and reversion of the transformed phenotype by ascorbic acid in C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res.*, **40**, 2796-2801 (1980).
 - 15) W. B. Dunham, E. Zuckerkandl, R. Reynolds, R. Willoughby, R. Marcuson, R. Barth and L. Pauling, Effects of intake of L-ascorbic acid on the incidence of dermal neoplasms induced in mice by ultraviolet light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7532-7536 (1982).
 - 16) L. Pauling, R. Willoughby, R. Reynolds, B. E. Blaisdell and S. Lawson, Incidence of squamous cell carcinoma in hairless mice irradiated with ultraviolet light in relation to intake of ascorbic acid (vitamin C) and of D, L-alpha-tocopheryl acetate (vitamin E). *Int. J. Vit. Nutr. Res.-Supplement*, **23**, 53-82 (1982).
 - 17) S. A. Weitzman and T. P. Stossel, Effects of oxygen radical scavengers and antioxidants on phagocyte-induced mutagenesis. *J. Immunol.*, **128**, 2770-72 (1982).
 - A. Lupulescu, The role of vitamin A, β -carotene, E and C in cancer cell biology. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **63**, 3-14 (1993).
 - 18) B. Frei, L. England and B. N. Ames, Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6377-6381 (1989).
 - 19) T. Lialiaris, D. Mourelatos and J. Dozi-Vassiliades, Enhancement and attenuation of cytogenetic damage by vitamin C in cultured human lymphocytes exposed to Thiotepea or L-ethionine. *Cytogenet. Cell Genet.*, **44**, 209-214 (1987).
 - 20) H. B. Michaels, E. C. Peterson and E. D. Epp, Effects of modifiers of the hydroxyl radicals on the radiosensitivity of mammalian cells at ultrahigh dose rates. *Radiat. Res.*, **95**, 620-636 (1983).
 - 21) C. M. L. West and R. M. Sutherland, The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiat. Res.*, **112**, 105-115 (1987).
 - 22) D. J. Grdina, B. Nagy, C. K. Hill and C. P. Sigdestad, Protection against radiation-induced mutagenesis in V79 cells by 2-[(aminopropyl) amino] thanethiol under conditions of acute hypoxia. *Radiat. Res.*, **117**, 251-58 (1989).
 - 23) D. Ewing and H. L. Walton, Radiation Protection of *in vitro* mammalian cells: Effects of hydroxyl radical scavengers on the slopes and shoulders of survival curves. *Radiat. Res.*, **126**, 187-197 (1991).

Key words: metallothionein, copper, hydroxyl radicals, ceruloplasmin, superoxide dismutase, zinc, LEC rats, Wilson Disease, Menkes Disease, copper-binding ATPase

1. はじめに

正常な状態における恒常性がどのような機構で維持されているか、あるいは健康を維持する生理的な機構がどのように機能しているか、などの基本的に重要な情報や知見が、病気あるいは先天的な疾患などによってはじめて明らかになったり、疾病の原因究明によって正常な機能が明らかになることがある。生体による銅の制御機構については多くの研究がなされてきたにもかかわらず、必ずしも明らかになっていなかったが、ウィルソン病とメンケス病という先天的銅代謝異常症¹⁻⁵⁾の研究によって著しい進展がみられるようになった。

ウィルソン病は銅の異常蓄積による中毒症を示すのに対して、メンケス病は銅の吸収不全による全身性の欠乏症という全く正反対の症状を示すとされている。これらの先天的疾患の病因については、それらの治療法も含めて多くの研究がなされてきたが、1993年にこれら2つの疾病の原因となる遺伝子上の欠陥が始めて明らかにされたことによって、銅の代謝機構の解明に関する研究も急に進展しはじめた。いずれの疾患も細胞内の銅を細胞外に排出する役割を想定されている銅結合性 ATPase 遺伝子が正常に発現していないことによることが指摘された^{6-8), 9-11)}。

生体による制御機構を解明するうえで、各種疾患のモデル動物は実験動物として非常に有用である。また、そのようなモデル動物は治療法を開発するためにも極めて有用な実験動物となる。日本で発見された LEC ラットは急性肝炎、激症肝炎そして肝がんを自然発症する実験動物であり¹²⁻¹⁵⁾、その原因が肝臓への銅の異常蓄積によること¹⁶⁻²²⁾、さらに1994年になり、ウィルソン病と同じく常染色体上に存在する銅結合性 ATPase 蛋白が正常に発現していないことがその原因となっていることが明らかにされた先天性銅代謝異常ラットである²³⁻²⁵⁾。これまでも、LEC ラットの肝臓への銅の蓄積と、蓄積した銅による疾患との関係に関する研究は多方面から研究されてきたが、遺伝子レベルで LEC ラットがウィルソン病のモデル動物であることが確認されたことにより、その治療法に至るまで、より広範に利用されるようになった⁵⁾。

生体による銅の制御機構、あるいは銅の毒性発現機構にメタロチオネイン (MT) がどのようなかわりをもっているか実験的に明らかにしようとする試みについても、ウィルソン病の発症機構から治療法との関連を含めて、多くの研究者が取り組んできた。本論文は著者の研究室で LEC ラットを用いて行っている銅の代謝機構に関する研究のうち、メタロチオネインの役割に注目して実施した研究をまとめたものである⁹⁾。銅の取り込み、吸収、蓄積、毒性発現など、どの段階にもメタロチオネインが関与していること、さらに Cu-MT が pro-oxidant としてヒドロキシルラジカルを発生させることが毒性発現の直接の原因となるなど、メタロチオネインの予期せぬ役割をはたしていることがわかった。

2. メンケス病とウィルソン病

細胞内に流入 (influx) した銅を細胞外に流出 (efflux) する銅結合性 ATPase は図 1 に示すような構造をしており、膜を貫通して存在することにより膜を通した銅の移動を行っていると言われている。メンケス病とウィルソン病ではこの遺伝子の発現に欠陥があることが指摘されているが、哺乳動物においては遺伝子レベルでその存在が推定されるに至っただけで、まだ蛋白質としての ATPase は同定されていない。メンケス病とウィルソン病の ATPase 遺伝子はそれぞれメンケス遺伝子、ウィルソン遺伝子と呼ばれ、前者

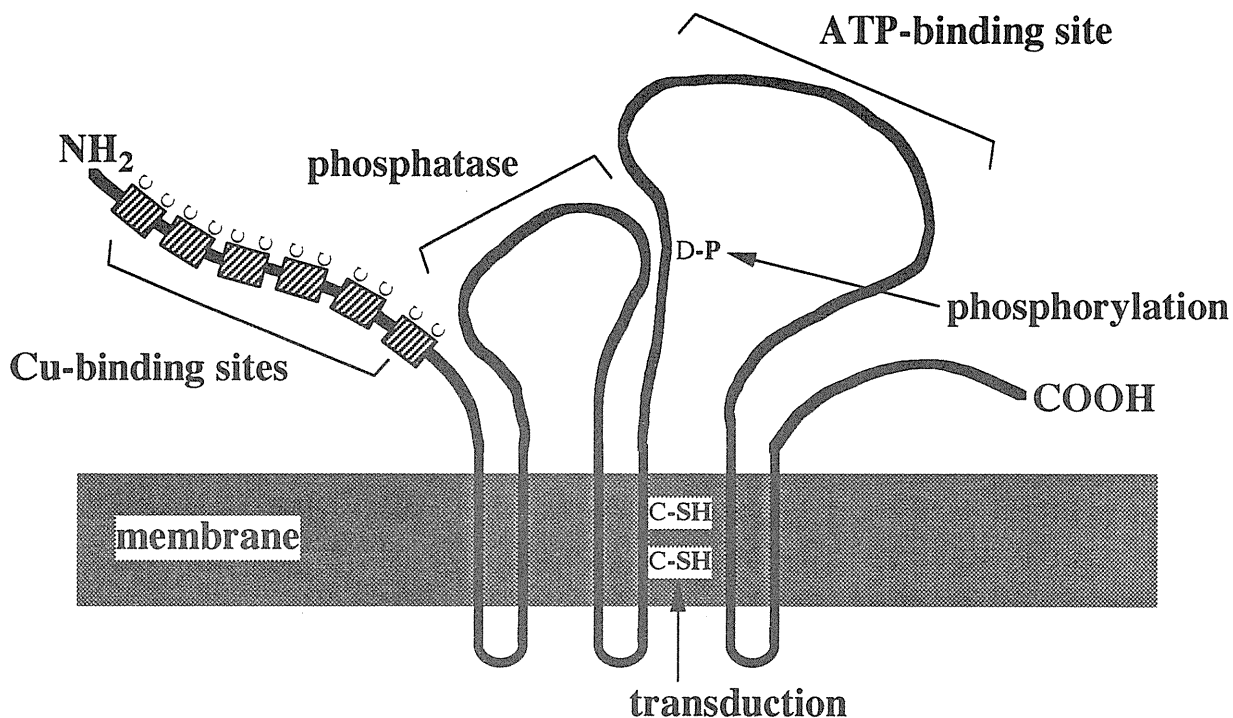


図1. 銅結合性 ATPase の模式図

Figure 1. Schematic Structure of Copper-binding ATPase for Efflux of Copper

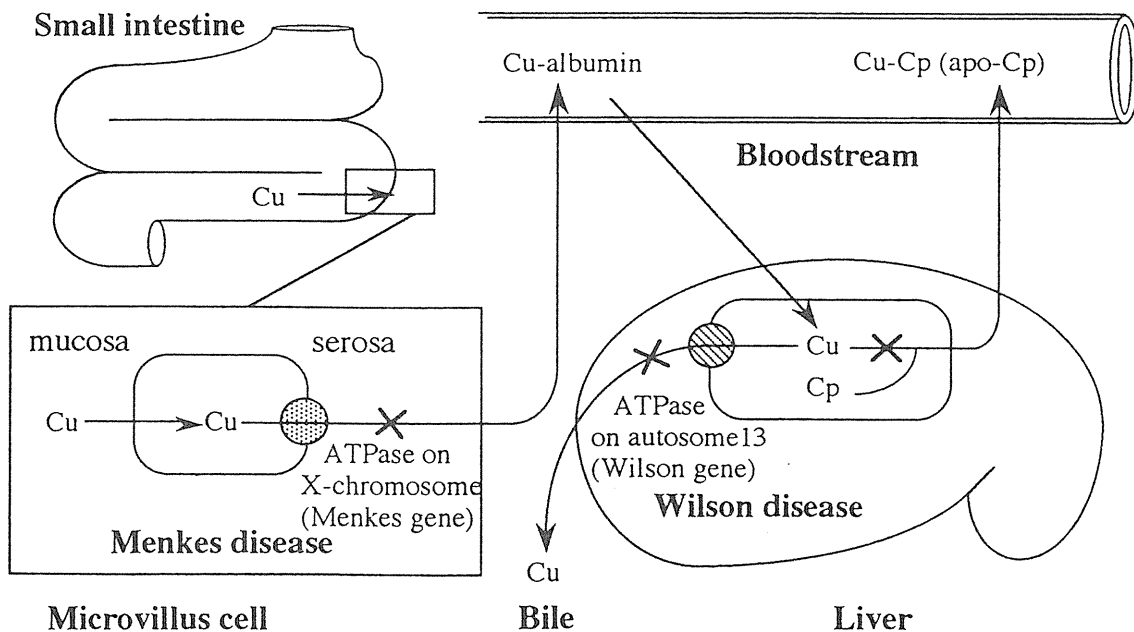


図2. メンケス病とウィルソン病における銅結合性 ATPase 遺伝子の組織特異的発現とその欠損による発症機構に対する仮説⁵⁾

Figure 2. Proposed Mechanisms for the Organ-specific Expression of Copper-binding ATPase for Efflux of Copper and Its Defective Expression in Wilson and Menkes Diseases⁵⁾

は X 性染色体上に、後者はヒトでは第13常染色体、ラットでは第16常染色体上に存在する。しかし、それらはどの臓器でも発現しているわけではなく、臓器特異に発現していることがこれまでの文献から推定され、そのためにウィルソン病とメンケス病では全く異なった症状が現れると推定される。これらの関係をまとめて図2のような機構を推定した⁵⁾。

メンケス病では消化管における銅の吸収ができないために全身性の銅欠乏症を示すが、その機構を以下のように説明した⁵⁾。腸管の微絨毛細胞においては常染色体と X 性染色体上の銅結合性 ATPase 遺伝子のうち、正常なヒトでも X 性染色体上の遺伝子しか発現していないが、メンケス病患者ではこの X 性染色体上の遺伝子も発現していない（メンケス遺伝子が発現していない）。そのため、消化管腔から微絨毛細胞に取り込まれた (influx した) 銅は血管側に汲み出されず (efflux されず)、微絨毛細胞内に蓄積する。過剰の銅は細胞にとって極めて有毒であり、細胞はそれに対する防御機構としてメタロチオネインの合成を誘導し、銅を捕捉する。細胞にはメタロチオネインを分泌したり、排出する機構が存在しないこと、さらに微絨毛細胞は短寿命の細胞で剥落するために、微絨毛細胞から血管への銅の吸収は全く起こらなくなる。吸収段階において推定されるメタロチオネインの関与である。

ウィルソン病では銅が肝臓に異常蓄積することが知られているが、その機構を以下のように説明した⁵⁾。血流から肝臓に流入 (influx) した銅は、セルロプラスミン (ceruloplasmin, Cp) に結合して血流中に分泌され、他の臓器に運搬される一方で、肝臓中では銅、亜鉛結合性のスーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) (Cu,Zn-SOD) などの銅酵素に結合し利用された後、過剰の銅は胆汁中に排泄される。胆汁中に排泄される銅は銅結合性 ATPase によって efflux されるが、肝臓の ATPase は常染色体上にあるウィルソン遺伝子にのみ由来しており、メンケス遺伝子は発現していない。さらに、ウィルソン病ではウィルソン遺伝子にも欠陥があるため、肝臓では正常に機能する ATPase が全く発現していない。その結果、銅は胆汁中に efflux されず、肝臓中に蓄積する。この蓄積した銅の毒性から生体を防御するためにメタロチオネインの生合成が誘導され、銅を Cu-MT として蓄積し、ウィルソン病や LEC ラットの肝臓中には銅は Cu-MT として蓄積することになる。メタロチオネインの生合成が過剰に誘導されると、細胞内の銅は全て Cu-MT として捕捉されてしまい、セルロプラスミンにも受け渡されなくなってしまうため、ウィルソン病患者の血液中のセルロプラスミン活性は低下する。ウィルソン病における肝臓への銅の異常蓄積にメタロチオネインが関与する機構として推定したメカニズムである。

3. 銅の毒性発現と銅の蓄積限界およびメタロチオネインの生合成容量

ウィルソン病患者の肝臓および LEC ラットの肝臓では、ウィルソン遺伝子に欠陥があるため銅結合性 ATPase が発現せず⁹⁻¹¹⁾、銅の排出ができないため銅の蓄積、そしてメタロチオネインの生合成の誘導が起こり、銅がメタロチオネインに結合して蓄積する¹⁶⁻²²⁾。メタロチオネインに結合している銅は毒性を示さないにもかかわらず、ウィルソン病患者や LEC ラットで銅中毒や肝炎をおこすのはどのような機構によるのであろうか。

メタロチオネインも通常の蛋白質と同じように代謝回転をしており、蛋白質部分 (アポ蛋白質) は常に分解されてメタロチオネインに結合している銅は絶えず新しく生合成されるアポ蛋白質に受け渡され、定常状態では常にメタロチオネインに結合して存在する。しかし、蛋白質の生合成容量には限界があるため、銅の蓄積にも限界がある。メタロチオネインの生合成容量が限界に近づくと、まず最初にメタロチオネインに Cu,Zn-MT として結合している亜鉛の比率が下がってくる (Cu/Zn 比が大きくなる)。続いてメタロ

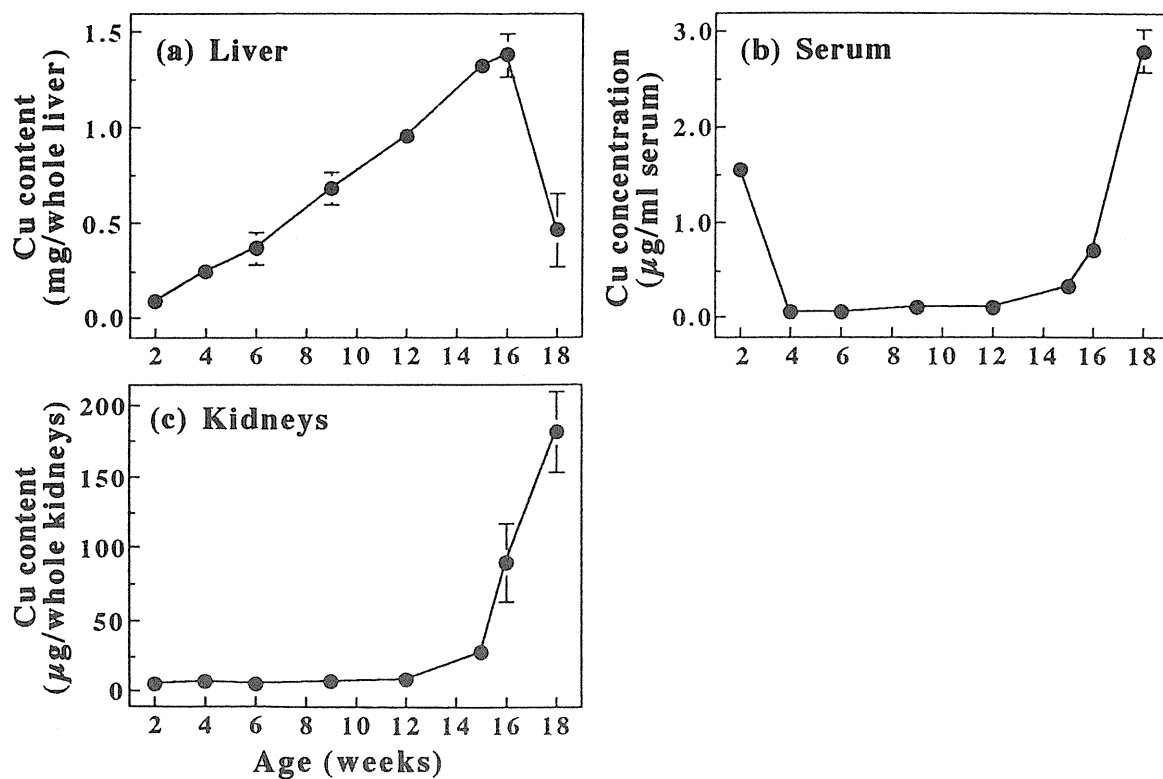


図3. LEC ラットにおける肝臓 (a)、血清 (b) および腎臓 (c) への銅の蓄積²²⁾

Figure 3. Changes in Concentrations of Copper in the Liver (a), Blood Serum (b) and Kidneys (c) of LEC Rats with Age²²⁾

チオネインに結合していない銅が肝臓中に見いだされるようになる。この銅は肝臓の可溶性蛋白質に非特異的に結合している²⁰⁻²²⁾。

図3に、週令に従ってLECラットに銅がどのように蓄積するか観察した結果を肝臓、血流および腎臓中の濃度の変化として示した²²⁾。また、図4にはこれら臓器の可溶性画分や血清中で銅がどのような状態で存在するか示した²⁰⁻²¹⁾。図3aからわかるように、銅の蓄積はまず肝臓に起こり、16週付近で蓄積限界まで達した後に急に下がる。この濃度の変化は銅の劇的な存在形態の変化としても観察される(図4a)。正常なヒトや動物の血清中の銅濃度は約 $1\mu\text{g/ml}$ でその95%以上がセルロプラスミンに結合しているが、Wilson病患者やLECラットの血漿中のセルロプラスミンには銅が結合していないため、銅濃度は正常な濃度の1/10またはそれ以下になっている。しかし、肝臓中への銅の蓄積が限界に近づくと、血流中の銅濃度が増加し始める(図3b)。また、血清中ではまずセルロプラスミンに結合している銅が増加すること、次いでセルロプラスミン以外の蛋白質に結合している銅が増加することが図4bのAからBへの変化で分かる。さらに、血流中の銅の濃度の増加に続いて、腎臓中の銅の濃度が増加しはじめる(図3c)。腎臓中に蓄積する銅は最初はメタロチオネインに結合している比率が高いが、蓄積濃度が高くなるとメタロチオネインに結合していない銅の比率が高くなっていく(図4c)。肝臓の傷害によって肝臓から逸脱してきたCu-MTは速やかに腎臓の糸球体で濾過され、尿細管で再吸収された後に分解される。肝臓から逸脱してくるCu-MTの量が多すぎると、腎臓で分解されたCu-MTから遊離してくる銅を捕捉するためのメタロチオネインの生合成が間に合わなくなり、メタロチオネインに捕捉されずに蓄積する銅が増加するためである。

各臓器におけるメタロチオネインの生合成容量が銅の生体内における存在形態を支配していることが分

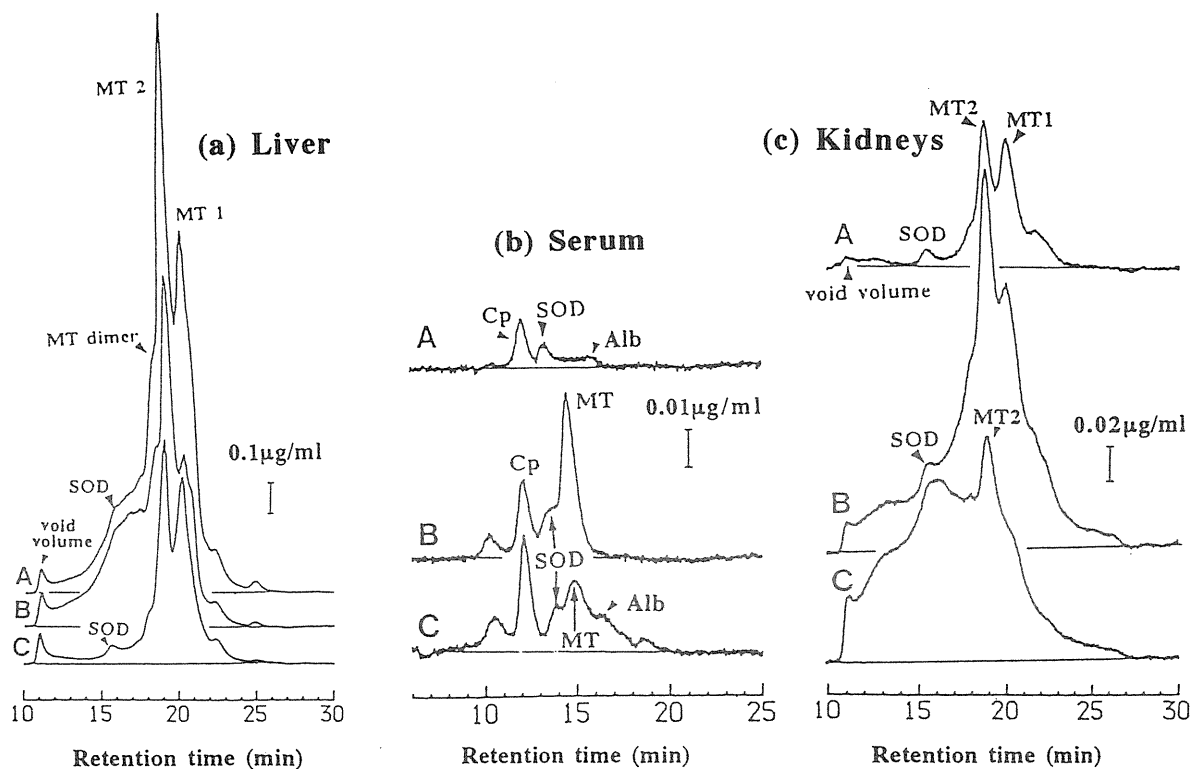


図4. HPLC/ICP-AES法によるLECラットにおける肝臓 (a)、血清 (b) および腎臓 (c) 中の銅の存在形態の解析^{20,21)}
 Figure 4. Changes in Chemical Forms of Copper in the Liver (a), Blood Plasma (b) and Kidneys (c) of LEC Rats with Age as Determined by HPLC/ICP-AES^{20,21)}

かる。

4. 銅の毒性発現機構と活性酸素の関与

銅の蓄積限界がメタロチオネインの生合成容量と関係しており、メタロチオネインに結合していない銅が毒性発現の本体であると考えられているが、どのような機構によって毒性を発現するのであろうか。メタロチオネインに結合していない銅は「遊離銅 (free copper) (ionic copper)」あるいは「毒性銅 (toxic form)」や「活性銅 (active form)」と呼ばれている¹²⁾。toxic form の銅が直接毒性を発現する機構と、間接的に活性酸素を介して毒性を発現する機構の2つが考えられている。

活性酸素を介する機構を支持するデータとしては、過酸化水素の存在下でLECラット肝臓がヒドロキシルラジカルを発生させたり²⁶⁾、同じく過酸化水素の存在下で銅含有メタロチオネインがヒドロキシルラジカルを発生させることが報告されている²⁷⁾。我々も *in vitro* の実験で、銅含有メタロチオネインがどのようにヒドロキシルラジカルを発生させるか検討し、銅含有メタロチオネインに亜鉛が結合しているときは、遊離の銅を捕捉するアンチオキシダント (anti-oxidant) として働くが、亜鉛が結合していないときは1価の銅を放出するプロオキシダント (pro-oxidant) として働くことを示し、活性酸素を介する銅の毒性発現機構を支持した。

銅含有メタロチオネインが pro-oxidant として働くことが銅の毒性発現機構であることを示し、メタロチオネインが毒性発現にも主要な働きをしているという予期せぬ役割を明らかにした。

5. ウィルソン病および LEC ラットにおける銅酵素への銅の選択的供給機構とメタロチオネインの関与

メンケス病は銅の欠乏症であり、全身性の銅欠乏のため、どの臓器における銅酵素も銅を含んでおらず、酵素活性も示さない。一方、ウィルソン病は銅過剰症であり、どの銅酵素にも銅が供給されている考えられるが、ウィルソン病患者でも LEC ラットでも血清中の銅濃度は正常なヒトや動物の1/10以下であり、その原因として血漿中の銅の95%以上を占めているセルロプラスミンに銅が結合していないことが明らかにされている¹⁻⁵⁾。このことから分かるようにウィルソン病患者や LEC ラットでも銅が供給されていない酵素が存在する。この機構を解く鍵として LEC ラットで興味深い現象が観察されている。

LEC ラットの血漿中のセルロプラスミンに銅が結合していないのは、セルロプラスミン蛋白質が正常に生合成されていないためではなく、正常に生合成されているアポ蛋白質に銅が供給されていないためである。ところが、肝臓中に銅が蓄積して toxic form の銅が観察されるようになると、図 4c に見られるようにセルロプラスミンにも銅が結合して血流中に分泌されていることが分かる²⁰⁻²²⁾。さらに、図 4a を詳細に検討すると、セルロプラスミンと同じく肝臓で生合成される Cu,Zn-SOD にはどの時期にも銅が供給されていることが分かる。このように、時期的にセルロプラスミンに銅が供給されているときとされていないときがある一方で、同じときに同じ肝臓で生合成されている銅酵素であっても銅が供給されている酵素とされていない酵素がある。このような選択的な銅酵素への銅の供給はどのような機構によるのだろうか。

図 5 はこの選択的な銅酵素への銅の供給機構について検討した結果から導きだした仮説である^{5,28,29)}。時期的にセルロプラスミン (Cp) に銅が供給されているとき (holo-Cp を分泌) と、されていないとき (apo-Cp を分泌) があるが、蛋白質としてのセルロプラスミンの生合成は常に正常であり、holo-Cp を分泌しているときと apo-Cp を分泌しているときとの違い、すなわち free copper が存在するかどうかに注目した。一方、同一時期に apo-Cp と holo-SOD (Cu,Zn-SOD) が生合成されており、銅が供給される酵素とされない酵素が共存する理由については、2つの酵素の生合成過程に関する以下の違いに注目した。SOD は primary translation product が apo-SOD であり、細胞質中で銅と亜鉛の供給を受けて holo-SOD となるが、Cp は primary translation product である Cp1059 から小胞体 (ER) でペプチドを除き Cp1040 とし、さらにゴルジ体で糖鎖が付加されて apo-Cp となった後、血流中に分泌される。Cp のプロセシングのどの過程で銅が供給されるかという点に関してはいくつかの仮説があり、まだ確定していない。我々は ER からゴルジ体への移動の過程で、細胞質中で Cp1040 に受け渡されると推定した。上記の仮説を支持するデータとして、apo-SOD にはメタロチオネインから直接銅が供給されることを示した。^{28,29)}

銅酵素への銅の選択的供給も、生合成過程でメタロチオネインから直接銅を受け取れるかどうかによることが示唆されたことになり、ここでもメタロチオネインが重要な役割をしていることが明らかとなった。

6. おわりに

ウィルソン病の治療法は、銅の摂取量を下げるか、メタロチオネインに結合して蓄積している銅を除去するか、いずれかの方法による。我々は黄疸を示している LEC ラット肝臓中でメタロチオネインに結合している銅を tetrathiomolybdate (TTM) を用いて選択的に除去することに成功した^{5,30-36)}。これも、銅がメタロチオネインに結合しているという特殊な事情を利用した方法である。

以上のように、ウィルソン病患者と LEC ラットにおける銅の代謝および毒性発現にはメタロチオネイ

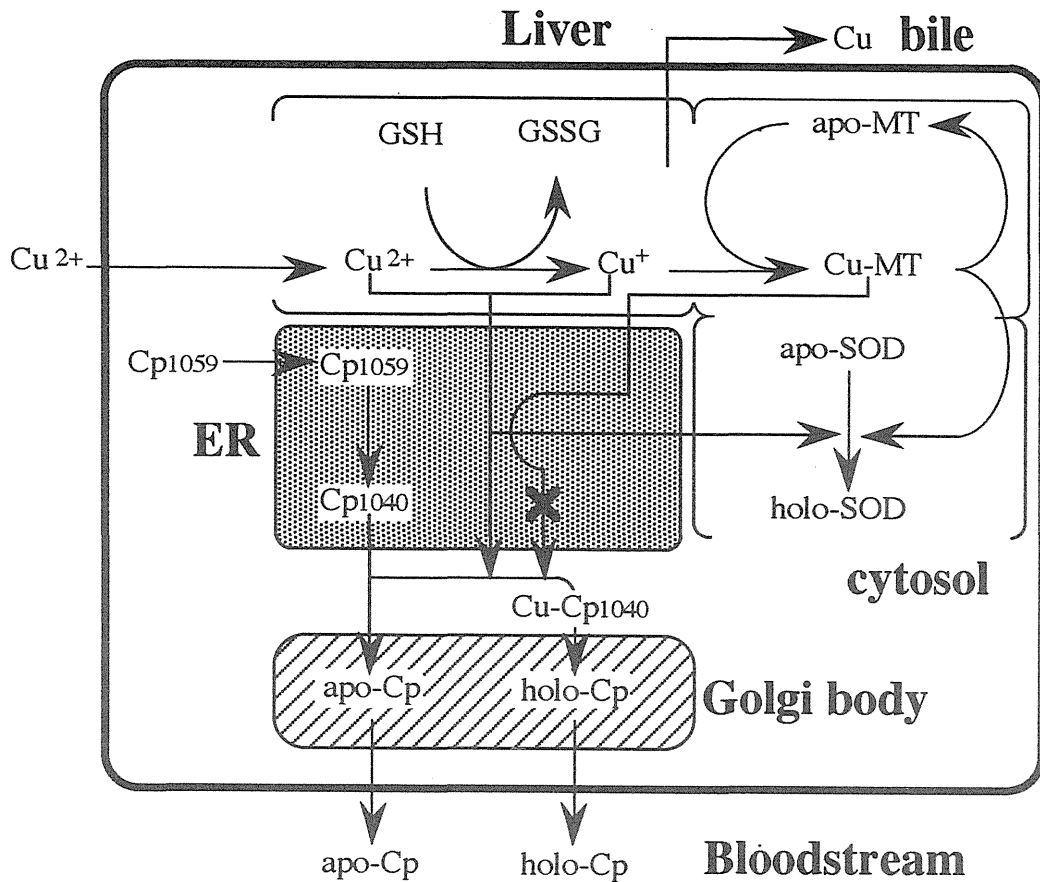


図5. 肝臓中における銅酵素（セルロプラスミンと Cu,Zn-SOD）への銅の選択的供給機構に対する仮説^{5,28,29)}
 Figure 5. Proposed Mechanisms for the Selective Supply of Copper to Copper-enzymes (Ceruloplasmin and Cu,Zn-SOD) in the Liver of LEC Rats^{5,28,29)}

ンが深く関与していることがわかった。正常な銅の代謝にも同じくメタロチオネインが重要な働きをしているが、その働きが時として毒性発現などにも関与することがあるという例にもなった。

参考文献

- 1) Danks, D. M. (1989) Disorders of copper transport. In Scriver, C. R., Beaudet, A. I., Sly, W. S. and Walle, D. eds., "The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th Edn.", McGraw-Hill, New York, pp. 1411-1431.
- 2) Danks, D. M., Campbell, P. E., Stevens, B. J., Mayne, V. and Cartwright, E. (1972) Menkes kinky hair syndrome: an inherited defect in copper absorption with widespread effects. *Pediatrics*, **50**, 188-200.
- 3) Kodama, H. (1993) Recent developments in Menkes disease. *J. Inher. Metab.*, **16**, 791-799.
- 4) Harris, E. D. (1993) Menkes'disease: perspective and update on a fatal copper disorder. *Nutr. Rev.*, **51**, 235-245.
- 5) K. T. Suzuki (1995) Disordered copper metabolism in LEC rats, an animal model of Wilson disease: roles of metallothionein. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **89**, 221-240.
- 6) Chelly, J., Tumer, Z., Tonnesen, T., Petterson, A., Ishikawa-Brush, Y., Tommerup, N., Horn, N., and Monaco, A. P. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature Genet.*, **3**, 14-19.
- 7) Mercer, J. F. B., Livingston, J., Hall, B., Paynter, J. A., Begy, C., Chandrasekharappa, S., Lockhart, P., Grimes, A.,

- Bhave, M., Siemieniak, D., and Glover, T. W. (1993) Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nature Genet.*, **3**, 20-25.
- 8) Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., and Gitschier, J. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet.*, **3**, 7-14.
- 9) Bull, P. C., Thomas, G. R., Rommens, J. M., Forbes, J. R., and Cox, D. W. (1993). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet.*, **5**, 327-337.
- 10) Petrukhin, K., Fischer, S. G., Pirastu, M., Tanzi, R. E., Chernov, I., Devoto, M., Brzustowicz, L. M., Cayanis, E., Vitale, E., Russo, J. J., Matseoane, D., Boukhgalter, B., Wasco, W., Figus, A. L., Londianos, J., Cao, A., Sternlieb, I., Evgrafov, O., Parano, E., Pavone, L., Warburton, D., Ott, J., Penchaszadeh, G. K., Scheinberg, I. H., and Gilliam, T. C. (1993). Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nature Genet.*, **5**, 338-343.
- 11) Tanzi, R. E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, I. L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D. M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L. M., Devoto, M., Peppercorn, J., Bush, A. I., Sternlieb, I., Pirastu, M., Gusella, J. F., Evgrafov, O., Penchaszadeh, G. K., Honing, B., Edelman, I. S., Soares, M. B., Scheinberg, I. H., and Gilliam, T. C. (1993) The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet.*, **5**, 344-350.
- 12) Takeichi, N. (1991) LEC rats. *CRJ Letters*, **4**, 1-8.
- 13) Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J-H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y. and Uchino, J. (1991) Spontaneous hepatic copper accumulation in LEC rats with hereditary hepatitis: A model of Wilson's disease. *J. Clin. Invest.*, **87**, 1858-1861.
- 14) Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J-H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y. and Uchino, J. (1991) Abnormal copper accumulation in non-cancerous and cancerous liver tissues of LEC rats developing hereditary hepatitis and spontaneous hepatoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 490-492.
- 15) Okayasu, T., Tochimaru, H., Hyuga, T., Takahashi, T., Takekoshi, Y., Li, Y., Togashi, Y., Takeichi, N., Kasai, N. and Arashima, S. (1992) Inherited copper toxicity in Long-Evans cinnamon rats exhibiting spontaneous hepatitis: a model of Wilson's disease. *Pediatr. Res.*, **31**, 253-257.
- 16) Sakurai, H., Fukudome, A., Tawa, R., Kito, M., Takeshima, S., Kimura, M., Otaki, N., Nakajima, K., Hagino, T., Kawano, K., Hirai, S., and Suzuki, S. (1992) Unusual accumulation of copper related to induction of metallothionein in the liver of LEC rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1393-1397.
- 17) Sakurai, H., Kamada, H., Fukudome, A., Kito, M., Takeshima, S., Kimura, M., Otaki, N., Nakajima, K., Kawano, K., and Hagino, T. (1992) Copper-metallothionein induction in the liver of LEC rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **185**, 548-552.
- 18) Sugawara, N. and Sugawara, C. (1994) A copper deficient diet prevents hepatic copper accumulation and dysfunction in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with an abnormal copper metabolism and hereditary hepatitis. *Arch. Toxicol.*, **69**, 137-140.
- 19) Sugawara, N., Sugawara, C., Sato, M., Katakura, M., Takahashi, H., and Mori, M. (1991) Copper metabolism in LEC rats aged 30 and 80 days old: Induction of Cu-metallothionein and status of zinc and iron. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **72**, 353-362.

- 20) Suzuki, K. T., Kanno, S., Misawa, S. and Sumi, Y. (1993) Changes of hepatic copper distributions leading to hepatitis in LEC rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **82**, 217-224.
- 21) Suzuki, K. T., Kanno, S., Misawa, S. and Sumi, Y. (1993) Changes of copper distributions in the plasma and kidneys of LEC rats following acute hepatitis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **82**, 225-232.
- 22) Suzuki, K. T., Kanno, S., Misawa, S. and Aoki, Y. (1995) Copper metabolism leading to and following acute hepatitis in LEC rats. *Toxicology*, **97**, 81-92.
- 23) Sasaki, N., Hayashizaki, Y., Muramatsu, M., Matsuda, Y., Ando, Y., Kuramoto, T., Serikawa, T., Azuma, T., Naito, A., Agui, T., Yamashita, T., Miyoshi, I., Takeichi, N. and Kasai, N. (1994) The gene responsible for LEC hepatitis, located on rat chromosome 16, is the homolog to the human Wilson disease gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 512-518.
- 24) Wu, J., Forbes, J. R., Chen, H. S. and Cox, D. W. (1994) The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genet.*, **7**, 541-545.
- 25) Yamaguchi, Y., Heiny, M. E., Shimizu, N., Aoki, T. and Gitlin, J. D. (1994) Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans cinnamon rats. *Biochem. J.*, **301**, 1-4.
- 26) Sakurai, H., Satoh, H., Hatanaka, A., Sawada, T., Kawano, K., Nagino, T. and Nakajima, K. (1994) Unusual generation of hydroxyl radicals in hepatic copper-metallothionein of LEC (Long-Evans Cinnamon) rats in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 313-318.
- 27) Oikawa, S., Kurasaki, M., Kojima, Y. and Kawanishi, S. (1995) Oxidative and non-oxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry*, **34**, 8763-8770.
- 28) Suzuki, K. T. and Kuroda, T. (1994) Direct transfer of copper from metallothionein to superoxide dismutase: A possible mechanism for differential supply of Cu to SOD and ceruloplasmin in LEC rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **86**, 15-23.
- 29) Suzuki, K. T. and Kuroda, T. (1995) Transfer of copper and zinc from ionic and metallothionein-bound forms to Cu,Zn-superoxide dismutase. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **87**, 287-296.
- 30) Suzuki, K. T., Yamamoto, K., Kanno, S., Aoki, Y. and Takeichi, N. (1993) Selective removal of copper bound to metallothionein in the liver of LEC rats by tetrathiomolybdate. *Toxicology*, **83**, 149-158.
- 31) Suzuki, K. T., Yamamoto, K., Ogra, Y., Kanno, S. and Aoki, Y. (1994) Mechanisms for removal of copper from metallothionein by tetrathiomolybdate. *J. Inorg. Biochem.*, **54**, 157-165.
- 32) Suzuki, K. T. and Ogra, Y. (1995) Formation of copper-metallothionein/tetrathiomolybdate complex is the first step in removal of Cu from LEC rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **88**, 187-195.
- 33) Ogra, Y. and Suzuki, K. T. (1995) Removal and efflux of copper from Cu-metallothionein as Cu/tetrathiomolybdate complex in LEC rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **88**, 196-204.
- 34) Ogra, Y., Ohmichi, M. and Suzuki, K. T. (1995) Mechanisms of selective copper removal by tetrathiomolybdate from metallothionein in LEC rats. *Toxicology*, **106**, 75-83.
- 35) Ogra, Y., Ohmichi, M. and Suzuki, K. T. (1995) Systemic dispositions of molybdenum and copper after tetrathiomolybdate injection in LEC rats. *J. Trace Elements Med. Biol.*, **9**, 165-169.
- 36) Suzuki, K. T., Ogra, Y. and Ohmichi, M. (1995) Molybdenum and copper kinetics after tetrathiomolybdate injection in LEC rats: specific role of serum albumin. *J. Trace Elements Med. Biol.*, **9**, 170-175.

生させる必要がある。しかも、できるだけ正常細胞には損傷を与えない事が必要となる。幸い、腫瘍細胞は盛んな分裂増殖のために大量の酸素を必要とすることや、多くの場合正常細胞よりも SOD 活性が低いこと等から、生じたラジカルは腫瘍細胞内で働きやすい状況にあるとされている。外科的切除や代謝拮抗剤による化学療法などを別にして制癌に用いられる多くの療法では、その作用機序に必ずといって良いほどラジカルが関与しているらしい。これらのラジカルの働きについて、化学的な単純な系では多くの研究¹⁾がありその作用について詳しい情報が得られている。しかし、酸素濃度の分布や、ラジカルスカベンジャーの存在、酵素系による代謝のプロセスなど、複雑な仕組みを有する生体内でのラジカルの働きについての研究²⁾は精力的に試みられているが、制癌作用の解明に必要な情報は得られていない場合が多い。

化学的な反応系では当然、活性種の働きは重要な作用機序として関わっている。しかし多くの癌治療法では活性酸素やフリーラジカルそのものを積極的に利用しようとする考えに基づくことと云うより、むしろ反応系に必然的にこれらの活性種が関わっていた、と言うような消極的な考え方であるように思える。最も積極的な意味での活性種の制がんへの利用という点では、放射線療法と光化学療法であろう。

化学療法におけるラジカルの関与

化学療法：天然産物から得られた多くの化学療法剤の作用機序はフリーラジカルによる DNA 傷害であると考えられている。一般に腫瘍細胞では SOD 活性が低い事も作用して、化学療法剤が有効に働く。キノン系のマイトマイシン C³⁾、アドリアマイシン⁴⁾等の抗癌剤は NADH 脱水素酵素によりセミキノンラジカルを生じ、酸化還元サイクルで O₂ に電子を移し O₂⁻ と・OH を生成する。非キノン系のプレオマイシン⁵⁾は Fe²⁺ と複合体を形成し、O₂⁻ や・OH を生成して DNA 切断を起こすと考えられている。ネオカルチノスタチンは DNA と結合してラジカル化し、主鎖を糖部分で破壊する。さらに O₂ が存在するとペルオキシラジカル ROO[·] を生成し、細胞毒性を発揮する。一方、代謝拮抗薬のメトトレキセート⁶⁾や 5-フルオロウラシル⁶⁾等は DNA の前駆体等と拮抗して DNA 合成阻害を起こし、シスプラチン⁷⁾や種々のアルキル化剤は DNA の二本鎖間に架橋を形成したりアルキル化によって DNA 合成阻害を起こして抗癌作用を発揮する。

これらの化学薬剤による療法では、薬理作用と共に体内での薬物動態がその効果に重要な意味を持つ。経口投与され吸収された薬物は門脈系から肝臓にはいり代謝を受ける。薬物によってこの代謝を通して活性化され、あるいは不活性化される。これが全身に送られ、血流の分布、血漿や組織での結合、脂質溶解性、組織内での拡散の違いなどから、標的である癌組織への分布が決まる。さらに体外への排泄系での透過性で癌組織内の濃度維持時間が決定されている。

免疫療法：免疫療法の古いアプローチとしては能動免疫療法と受動免疫療法が上げられる。前者は薬物や放射線で不活性化させた腫瘍細胞を用いて免疫すると、同じタイプの腫瘍の増殖を特異的に抑える事ができるとするものであり、あるいは BCG⁸⁾やレバミゾール⁹⁾を用いた非特異的な免疫刺激薬による方法もある。新しいアプローチとしては、生物学的応答調節薬（インターフェロンやインターロイキン-2 ほか）を用いる方法で BRM (biological response modifiers)¹⁰⁾と呼ばれている。この BRM に分類される薬剤の多くは、マクロファージ等を含む食細胞から O₂⁻ や H₂O₂ の産生を促す。腫瘍細胞の中でラジカルを発生させるわけではないので、腫瘍細胞を不活化させるかどうかについては疑問であるが、培養細胞による実験

では O_2^- や H_2O_2 等の投与で障害を起こすことから腫瘍細胞破壊の可能性は秘めている。

温熱療法：非常に古くから行われていた方法で、最近になってにラジカルが関与しているらしいことが報告され始めたようであるが、その詳細はわかっていない。治療では放射線療法などとの組み合わせが行われている。好中球による活性酸素の誘導は、37℃よりも温熱療法で用いられる42℃の方が盛んである。腫瘍組織内への好中球の誘導が巧くできれば、温熱療法に BRM を組み合わせた新しい癌治療が可能かもしれない。

放射線療法と光化学療法におけるラジカルの関与

光化学療法：1975年に Dougherty により実験動物の腫瘍の治療¹¹⁾がヘマトポルフィリン誘導体を用いて行われた。この療法は特定の波長の光に吸収を持つ化学物質（増感物質）を腫瘍に取り込ませ、レーザー等の強力な光源を用いて腫瘍に照射すると、励起状態になった増感物質からエネルギーの移動などによって生体分子の過酸化が起こる過程で 1O_2 、 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ などが生じる。この活性酸素種を利用して癌抑制¹²⁾を図ろうとする方法である。ヘマトポルフィリン誘導体等は、光動力学的反応により Type I、II の二つの経路を経てラジカルを生成する。酸素の存在下では光励起されて多量の活性酸である一重項酸素 (1O_2) を発生する。この 1O_2 は酸化的に働き、ラジカル産生に寄与し細胞を傷害する (Type II)。あるいは、光励起された増感物質が生体内の基質と反応して酸化あるいは還元が起こった後、ラジカルとなった基質に酸素が付加して過酸化物が生じるか、ラジカルから酸素へ電子移動が起こり、 O_2^- が生じる場合である (Type I)。このようにして生じた 1O_2 、 O_2^- から H_2O_2 を経て $\cdot OH$ が生成される。腔内表在性の腫瘍にヘマトポルフィリン誘導体を投与し、高出力レーザービームで腫瘍を直接的に破壊すると共に、活性酸素の誘導によるフォトダイナミック作用によって腫瘍細胞を傷害することができる。

放射線療法：放射線による細胞障害の機序には、放射線のエネルギーが直接、DNA や蛋白質などの生体高分子に吸収され、その分子を励起したりイオン化する「直接作用」と、エネルギーを吸収した細胞中の水が $\cdot OH$ や $H\cdot$ 及び e_{aq}^- に分解し (図 1)、これが DNA などに作用する「間接作用」がある。直接作用は放射線の一次的物理作用が DNA 等の生体の重要分子に作用して効果を及ぼすため、化学的な修飾を受けにくい。間接作用は放射線誘発ラジカルによる作用で、放射線による細胞障害作用の大半を占め、特に $\cdot OH$ や e_{aq}^- などは水の放射線分解による収率が高く間接作用の中心を担っていると考えられている。これは主に細胞中に含まれる水の電離によるもので、化学的反応系を介して最終的に DNA 損傷などを誘発するので、細胞中に存在するスカベンジャーや温度、反応分子の濃度など種々の要因によって放射線の効果の修飾の程度が左右される。修飾因子には、放射線の効果を減弱させるものと増強させるものがある。

放射線の効果を減弱させる物質は「放射線防護剤」などと呼ばれ、代表的な防護剤にジメチルスルフォキシド (DMSO) やグリセロール、アルコール類がある。これらはヒドロキシラジカルと反応性が高く、放射線防護剤としてよく機能する。システインやシステアミン等の OH 補足剤で「SH 化合物」と呼ばれる一連の SH 基を持った化合物も防護剤として有効である。さらに細胞中にはグルタチオン (GSH) 等の

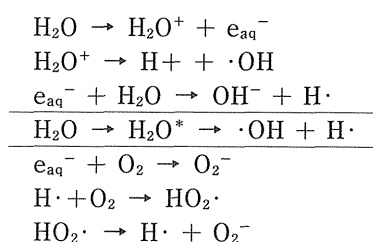


図 1 放射線による活性酸素種の生成

放射線防護剤が含まれていて、これが遺伝的に欠損した細胞では有意に放射線感受性が高い¹³⁾。逆に、放射線の作用を増強する増感剤も存在し、この放射線の効果を増強する修飾因子として最も強力なものは酸素である。しかし酸素効果は放射線化学的機構であると考えられるが、この詳しい機構ははっきりしていない。細胞の致死を指標にすると、通常のX線やγ線などでは酸素の有無によって3倍ほど放射線の効果が異なり、特に「酸素効果」と呼ばれている^{14), 15)}。酸素効果は同じ放射線の効果を得るために必要な、無酸素下での線量と酸素存在かでの線量の比として表され(図2)、溶存酸素濃度が20 μM(約15mmHg)以下から急激に小さくなる。多くの正常組織中の酸素濃度は約40mmHgであることから、細胞中ではさらに低い酸素濃度であり、特に血管の豊富でない腫瘍では酸素効果が問題となる低酸素状態¹⁶⁾にある。この酸素効果は腫瘍の放射線治療に重要な影響を及ぼすと考えられていて、多くの癌組織では無酸素或いは低酸素分画が存在するため、この部分が癌組織を放射線治療に対して抵抗性にし、或いはこの部分にあった癌細胞から再発が起こるとするものである。

このため低酸素状態にある腫瘍の放射線治療の感受性を高めるための物質として低酸素増感剤^{17), 18)}の研究が行われている。増感の効果が認められた代表的な化合物にニトロフラン誘導体や、ニトロイミダゾール誘導体がある。これらの化合物は、電子親和性の高い共軛二重結合を有し、また腫瘍組織の中心部まで浸透する。特に効果が認められたミソニダゾールは、培養細胞で1.6倍の、実験腫瘍で1.3倍の増感比が得られた。放射線などで還元されたミソニダゾールは、活性化されてニトロラジカルアニオンを生じ、低酸素細胞の放射線障害を増強するが、通常の酸素濃度では放射線効果の増強作用はない。

重粒子線治療：放射線の中でも粒子線は、放射線の線質をあらわす線エネルギー付与(LET)が高く、高LET放射線と呼ばれる。陽子線や重粒子線などの粒子線は、X線やガンマ線或いは中性子線と異なり、物質中を通過する内に速度を減じブラッグピークの位置で停止してその位置に局所的に大量のエネルギーを与える(図3)、また粒子の速度の減少と共にLETが増加してゆく等の物理的特性を持っている。この局所的にエネルギーを与える重粒子線の特性は、正常組織に与える線量を最小にして癌組織のみをねらい打ちにできる可能性を示している。また通常の数百 keV/μm 以下のLETでは、重粒子線のLETの増加と共に生物学的効果比(RBE; X線と比較し、同じ効果を与えるのに必要な線量の比)が増加する特性(図4)と、さらに酸素効果の影響を受けにくくなる特性(図5)をあわせ持ち、低酸素細胞に対しても酸素が存

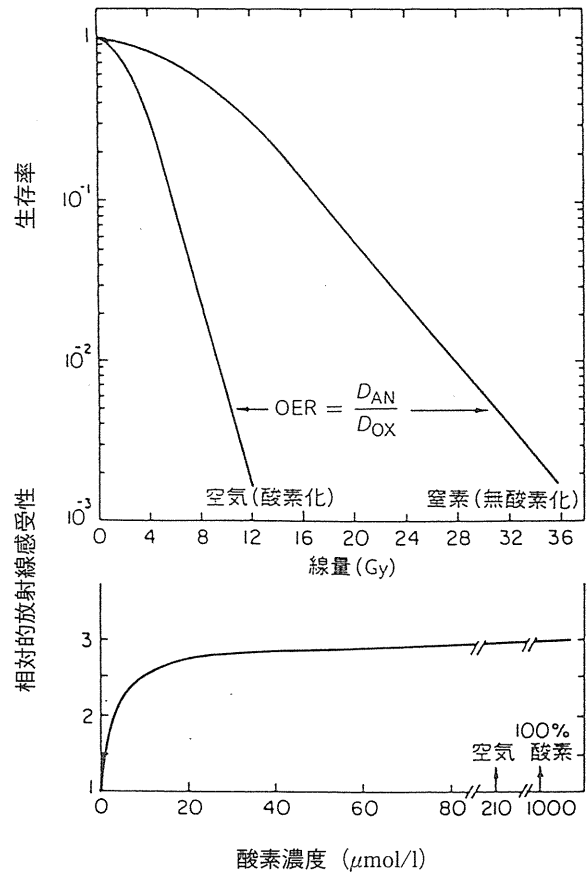


図2 細胞の放射線に対する感受性の酸素効果 (〔Chapman et al. 1974〕¹⁵⁾より引用)
 上は、生存率曲線の違いで見た酸素効果で、曲線の形は相似的で同じ効果を得るための必要線量に変化した事を示し、定義からはどの生存率レベルで比較しても同じOERが得られる。下は酸素効果の酸素濃度依存性。

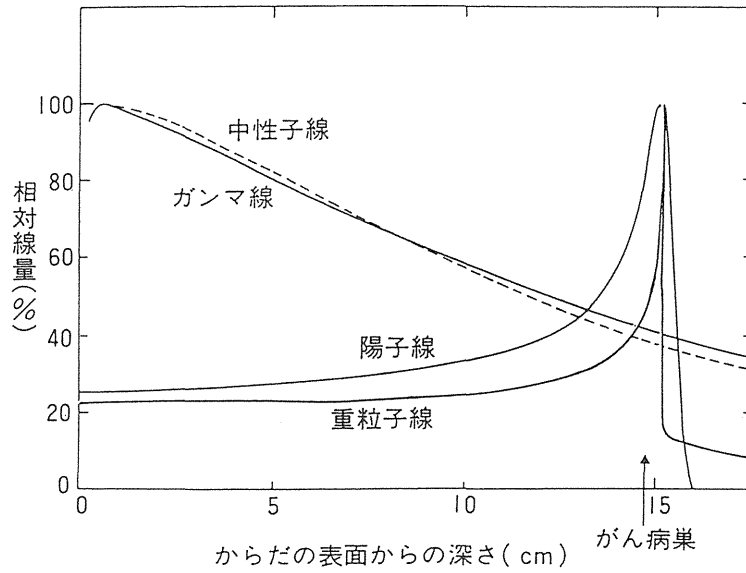


図3 各種放射線の生体内における線量分布

重粒子線は HIMAC で治療に用いられている炭素線 290MeV/u の線量分布。中性子線、ガンマ線は体表面で線量が多く、粒子線は深部で独特の線量分布のピークを形成し、ブラッグピークと呼ばれている。

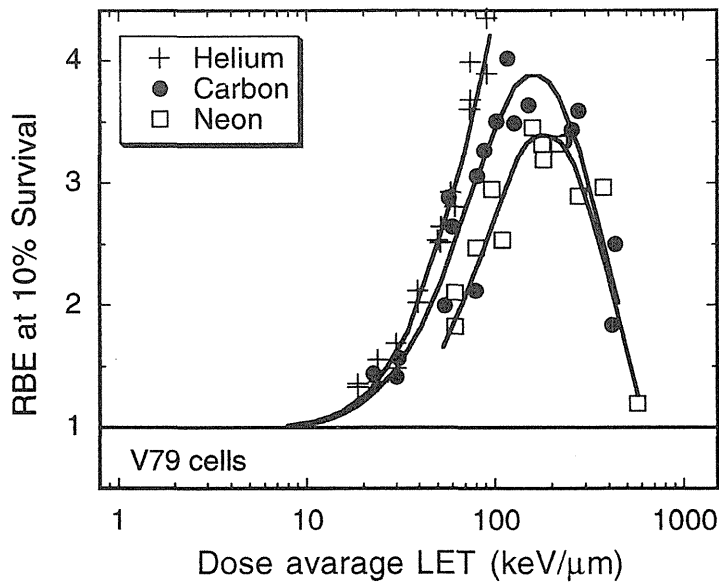


図4 重粒子線の LET と生物学的効果比 (RBE)

重粒子線で照射されたチャイニーズハムスター V79細胞の生存率を 10%にする様な線量で LET 依存性を比較した。重粒子線の種類で多少異なるが、LET が概ね数十 keV/μm から RBE が上昇し始め 100-200keV/μm で最大となった後は再び減少する。

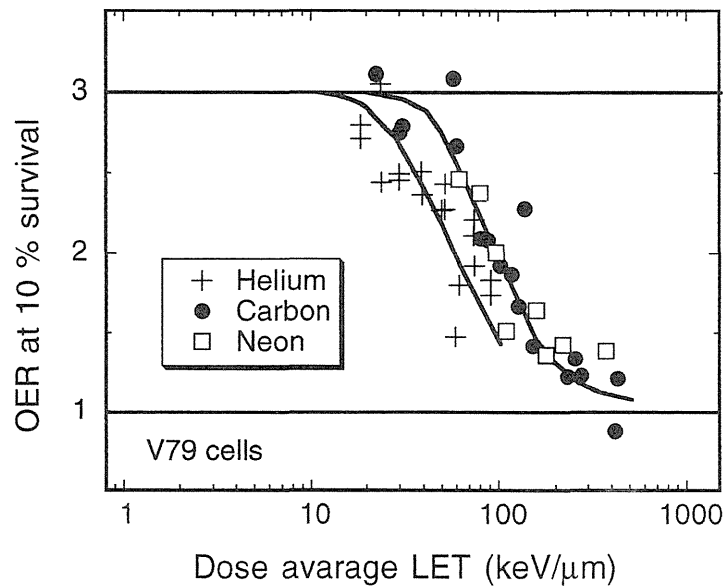


図5 重粒子線の LET と酸素効果

重粒子線で照射されたチャイニーズハムスター V79細胞の生存率を10%にする様な線量で酸素効果を比較した。重粒子線の粒子種によって異なるが、LET が数十 keV/μm 以上の領域から酸素効果が減少し始め、数100keV/μm を越える領域ではほぼ1で、酸素が存在しない事による放射線の効果の減少は見られなくなる。

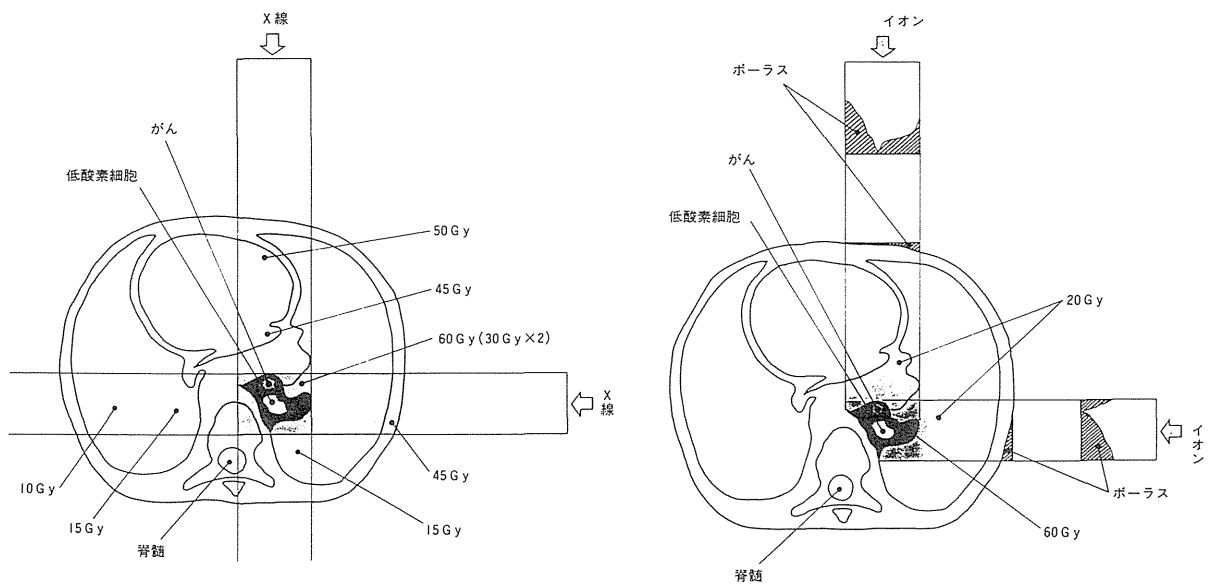


図6 X線（左）と重粒子線（右）による水平垂直2門照射

ボラスは重粒子線の最終到達位置を癌組織の後端に一致させる為の補償材、重要臓器である脊髄には重粒子線は到達しない。数字 (Gy) は体内のそれぞれの位置における線量分布例で重粒子線では癌組織に集中し周辺臓器の被曝は少ない。重粒子線では低酸素細胞（癌組織中心部の細胞）に対しても放射線効果の減弱が少ない。

在する場合と同等の効果がある。言い換えると、重粒子線の進入する皮膚やその他の正常組織部分に比べて、腫瘍部分で LET が高くなることと酸素効果が無くなる事で放射線の効果が高くできること、さらにブラッグピークより後ろの組織には放射線が及ばず、照射体積を制限できることや照射部位より後ろの重要臓器に放射線を暴露させずに照射できる等の特性と等が相まって高い治療成績が得られることが期待されている (図 6)。こういった背景より、1976年から1992年にかけてアメリカのローレンスバクレイ研究所において重粒子線を用いた治療が行われ、放医研でも昨年より治療が開始され、その成果が期待されている。

参考文献

- 1) Helmut Sies ed: Oxidative Stress. Academic Press, London, 1985 (井上正康監訳、活性酸素と疾患、学会出版センター、1987)
- 2) 近藤元治 監修：フリーラジカルの臨床 vol. 9、日本医学館、東京、1995.
- 3) Carter S.K., and Crooke S.T.: Mitomycin C: Current Status and New Developments. Academic Press, New York, 1979.
- 4) Bachur N.R., Gordon S.L., Gee M.V.: Anthracycline antibiotic augmentation of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol. Pharmacol.*, **13**, 901-910, 1977.
- 5) Chabner B.A., and Collins J.A.: Cancer Chemotherapy. In "Principles and Practice". B. J. Lippincott, Philadelphia, 1990.
- 6) Pinedo H.M., Peters G.F.J.: Fluorourasil: Biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.* **6**, 1653-1664, 1988.
- 7) Roberts J.J., Know R.J., Rera M.F., et al.: The role of platinum-DNA interactions in the cellular toxicity and the antitumor effect of platinum coordinated compounds. *Dev. Oncol.*, **54**, 16-31, 1988.
- 8) Herr H.W., Laudone V.P., Badalament R.A., et al.: Bacillus Calmette Guerin therapy alters the progression of superficial bladder cancer. *J. Clin. Oncol.*, **6**, 1450-1455, 1988.
- 9) Quirt I.C., Shelly W., Pater J., et al.: Improved survival in patients with poor prognosis malignant melanoma treated with adjuvant levamisole: a phase III study by the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.*, **9**, 729-735, 1991.
- 10) Foon K.A.: Biological response modifiers: the new immunotherapy. *Cancer Research*, **49**, 1621-1639, 1989.
- 11) Dougherty T.J., Grindery G.B., Weishaupt K.J.: Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hemoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 115-121, 1975.
- 12) Henderson B.W., and Dougherty T.J.: How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.*, **55**, 145-157, 1992.
- 13) Midander J., Deschavanne P.J., Debieu D., et al.: Reduced repair of potentially lethal radiation damage in glutathione synthetase deficient human fibroblasts after X irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **49**, 403-413, 1986.
- 14) Hall E.J.: The oxygen effect and reoxygenation, In "Radiobiology for the Radiologist" B. J. Lippincott, Philadelphia, pp.137-160, 1988.
- 15) Chapman D.J., Dugle D.L., Reuvers A.P., et al.: Studies on the radiosensitization effect of oxygen in Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **26**, 383-389, 1974.
- 16) Thomlinson R.H., Gray L.H.: The histological structure of some human lung cancer and the possible implications

for radiotherapy. *Br. J. Cancer*, **9**, 539-549, 1955.

17) Dische S.: Hypoxic cell sensitizers: Clinical development. *Int. J. Radiat. Biol.*, **56**, 1057-1060, 1989.

18) Overgaard J.: Sensitization of hypoxic tumor cells-Clinical experience. *Int. J. Radiat. Biol.*, **56**, 801-811, 1989.

発現し、速度は速いが治療により停止が可能である。今までにこうした老化の要因を説明する考え方が数多く提唱されており、大別して二種の仮説に分けられる(表1)。一つは、ヒトの寿命が遺伝子レベルで規定され、プログラムにしたがって進行し、生物時計の時間経過に対応して種々の反応を引き起こすとの説である。したがって、これに対抗する手段は見当たらない。もう一つは、生体機能の減退、生体分子の変性により傷害が発生し、老化が開始されるとする説である。この説によれば変性物質のクリアランスの賦活、防御因子の投与により老化の対抗予防が可能となる。どちらの説にしても現在のところ概念的なところが多く、これを明らかにする努力が多方面で行われている。本稿では後者の内、活性酸素・フリーラジカルに起因する老化とその防御について、著者等の行った脳神経系での検討を中心にして述べる。

表1 代表的な老化学説

老化の原因	プログラム	機能減退・生体物質変性
老化学説	プログラム説 生物時計説 代謝率説	内分泌説 神経伝達物質説 免疫説 ストレス説 老廃物説 体細胞変異説 架橋結合説 酵素エラー説 活性酸素・フリーラジカル説
対抗処置		薬剤、ホルモン投与 クリアランスの賦活 抗酸化防御系の賦活

1. 活性酸素・フリーラジカルと寿命

生体で生じたラジカルが有害な反応を引き起こし、老化を誘引するとの説が1956年、D. Harmanにより提唱された¹⁾。当時はあまり注目されなかったが、1969年、McCordとFridovichが、酸素の一電子還元により生成するスーパーオキシドを消去して、酸素毒性から生体を防御する、スーパーオキシドデイズムターゼ(SOD)を発見してから²⁾、フリーラジカルによる老化誘因説がにわかに真実味をおびてきた。今や生体中にフリーラジカルが存在することは常識であるが、どのようなラジカルが、どのようなメカニズムで生体に傷害を与えているかについてはほとんど分かっていない、したがってフリーラジカルが老化と関連しているという確証はない。

こうした点を解決しようとする多くの努力が古くからなされてた。その一つは酸素消費と寿命の関係で

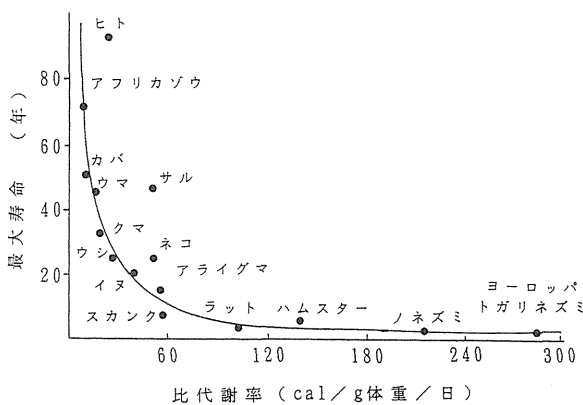


Figure 1. Correlation of specific metabolic rate and life span of mammalian species.⁴⁾

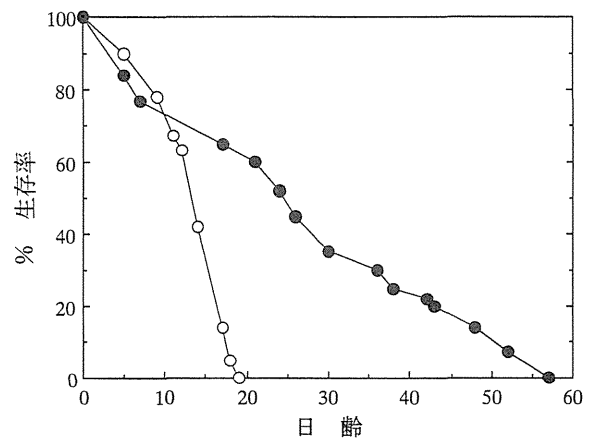


Figure 2. Survival curves of male houseflies maintained under different regimes.⁵⁾
○, 50 flies in one cubic foot cage; ●, one fly in a small bottle.

あろう。酸素が生体に摂取された場合、それが活性酸素に変わり、傷害を与えるかについては多くの議論がある。しかし、高濃度酸素の暴露により、マウス赤血球、ハト心筋などで過酸化水素が発生するし、ブタ肺では暴露した酸素濃度と過酸化水素、スーパーオキシドの生成が比例する³⁾。また、酸素暴露による脂質の過酸化、抗酸化物質の変動も数多く報告されている。こうした事実は酸素の多量消費が寿命に大きく影響する事を推定させる。Cutlerによれば、酸素消費量と生物の最高寿命には相関があって、消費量の多い動物ほど短命である(図1)⁴⁾。例えば、ゾウの最高寿命は約70年であり、ハツカネズミのそれは3.5年である。酸素消費は、ゾウが0.1ml/g体重/時間であるのに対し、ハツカネズミは1.6ml/g体重/時間であるという。また、同じ個体で比較しても、100%酸素濃度環境下で飼育したラットの寿命はわずか72時間だし、広い空間を飛ぶことの出来るイエバエは、小さな狭い瓶の中で飼育した、自由に飛べないハエよりも短命である(図2)⁵⁾。こうした事実は、活性酸素が老化に関与していることを示唆するものとして注目される。

2. 活性酸素・フリーラジカルによる傷害と老化

活性酸素の一義的な標的が不飽和脂質であることはよく知られている。生体膜の主要な構成成分である不飽和脂質の過酸化により、膜の構造と機能を変性させる。ラットは老化すると、脳ミトコンドリアで、スーパーオキシドの生成速度が上昇し、脳内の過酸化脂質(TBARS)が比例して増大するし、老化色素(リボフチン)が沈着する⁶⁾。また、ヒトの場合60歳を過ぎるとミエリン中の共役ジエンとTBARSが急激に増加し、それに伴ってミエリンの膜流動性が上昇する⁷⁾。脳における過酸化傷害は部位によりその程度が異なる。TBARSを指標とした場合、皮質、黒質、海馬領など比較的老年変化を受けやすい部位で過酸化障害が大きい⁸⁾。著者等の実験では、高濃度酸素暴露されたラットの神経細胞は、核の異常な変形、ミトコンドリアの膨潤、神経末端にシナプス顆粒の多量の蓄積を認めた(図3)⁹⁾。これらの形態変化は、正常ラットの老化に伴う変化でも認められることから、活性酸素と老化の関連を考える上で大変興味を持たれる。

このような脳神経系の傷害は、活性酸素による神経伝達機能障害を推定させる。事実、神経末端からのアセチルコリンの遊離は、酸化的ストレスにより低下した。この要因を明らかにするため、種々検討を行った。脂質の過酸化による傷害を推定し、シナプス膜の変化を調べた。酸化的ストレスにより膜のグルコースに対する透過性は著しく亢進する。また、ストレスにさらされないラットでも、老化に伴って透過性の上昇が認められる(図4)。さらに膜表面

の流動性は著しく上昇し、この場合も、通常ラットの老化に伴う変化とよく一致した。したがって、膜物性をコントロールする構成脂質の、過酸化による膜の変性が示唆される。膜中のTBARSは老化によっても、酸化的ストレスによっても増加し(図5)、膜安定化の指標であるコレステロール/リン脂質(C/P比)は顕著に大きくなる。また膜構成脂質の脂肪酸残基は、老化に伴いドコサヘキサエン酸(DHA)含量が有意に低下するし、酸素暴露ラットにおいても、同様である。

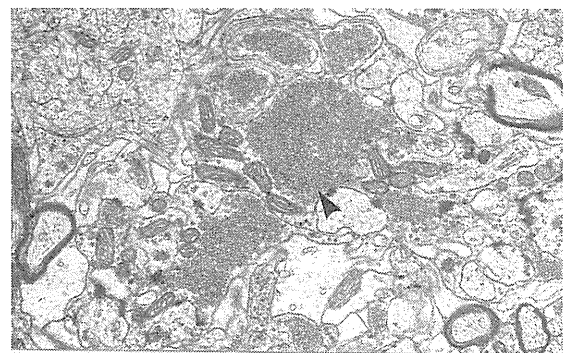


Figure 3. Transmission electron micrograph of abnormally accumulated synaptic vesicles nerve terminals (arrowhead, Magnification: x 14,000)

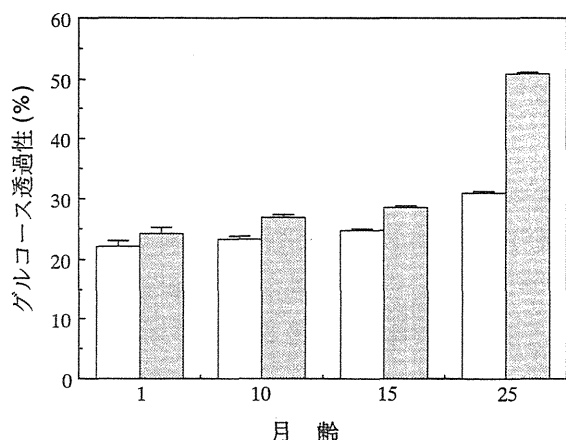


Figure 4. Changes in permeability of synaptosomes to glucose caused by aging and hyperoxia. Open bars, control; dotted bars, synaptosomes from rats exposed to 100% oxygen for 48 hours.

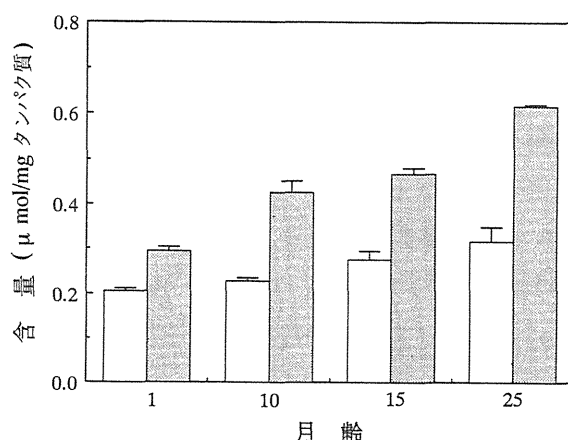


Figure 5. Effect of hyperoxia on TBARS of rat synaptic membranes with age. Rats were maintained under air (open bars) or exposed to 100% oxygen for 48 hours (dotted bars).

活性酸素による損傷は、以上述べたような脂質の過酸化のみならず、多くの生体物質にもおよぶ。タンパクが酸化変性すると、タンパク分子内にカルボニル基が増加する。カルボニル基が形成されるアミノ酸残基はヒスチジン、アルギニン、リジン、プロリンなどであるといわれている。したがって、老化の指標でもあるコラーゲンの架橋結合が増加することとなる。こうしたカルボニル基の増加は老化に伴って観察される。ヒトの皮膚線維芽細胞の場合、60歳を越えると急激に増加し、80歳では約2倍(4.7nmol/mg タンパク質)に達する。また若年の早老症患者の線維芽細胞でのカルボニル基含量は、健常人の70歳の値と同じであるという¹⁰⁾。一方、酸素暴露や虚血一再灌流したラット脳でも増加が確認されており、活性酸素の関与が示唆される。このことは、N-tert-ブチル-フェニルニトロソ(ラジカル捕捉剤)によりカルボニル基含量の増加を抑制する事実から支持される¹¹⁾。

DNAもまた活性酸素の標的である。ヒドロキシルラジカルは、核酸塩基を酸化し、非常に多くの酸化物を与える。一般にチミンとグアニンが最も酸化されやすい塩基であるといわれており、酸化物である8-ヒドロキシグアニンや8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシンの含量の検討が数多くなされている¹²⁾。こうして酸化された塩基は老齢ラットで増加するし、酸化的ストレスによっても増加する。

また活性酸素によりATP含量が低下するし、細胞内遊離カルシウム濃度の上昇も認められる。カルシウム濃度の増加はCa²⁺依存性プロテアーゼを活性化して傷害を誘起する。細胞膜損傷によりカルシウムの透過性が亢進し、更に濃度が上昇する。この場合、カルシウム拮抗剤ではこれを抑制できず、むしろ抗酸化剤で阻害されることから¹³⁾、活性酸素による細胞内カルシウム濃度増加を説明できる。一方、カルシウム濃度の上昇によりホスホリパーゼが活性化されて、アラキドン酸が多量に遊離する。アラキドン酸の多量の遊離は活性酸素を発生させることとなる。この機構は、アラキドン酸により誘発される脳浮腫が抗酸化剤で抑制されることから裏付けられる¹⁴⁾。ここで述べたような現象が老化に直接関連しているかについては、現在までのところ明確な解答がでていない。

3. 老化と抗酸化防御系の変動

ラットやマウスを用いた抗酸化防御系の老年変化については多くの研究がある。ところが得られた結果

は相反することが多い。用いた実験条件や、実験環境などいろいろな条件の違いによるものと考えられる。また、生体中の防御因子は、単独で機能することは少なく、むしろ相補的、相乗的に働くものと考えられる。したがって、一つの現象を捉えて考察することは短絡的であり、こうした現状が、真の抗酸化防御機構の解明を遅らせている原因でもある。今後は詳細でしかもグローバルな見直しが必要であろう。

スーパーオキシドデismターゼ (SOD) 活性は、Fischer344 ラット脳では、SOD 活性と m-RNA 水準は老化すると低下するとの報告があるが、一方では老化に伴う変化がないとの報告もある¹⁵⁾。また老化変化を受けやすい大脳皮質、黒質、尾状殻一被殻などは、老化に伴い SOD 活性が低下する。グルタチオンペルオキシダーゼ (GSHPx) 活性も老化に伴って増減の2方向が報告されている。老齢ラットは全脳で GSHPx 活性が減少し、グルタチオンリダクターゼ (GSHRe) 活性が上昇するとの報告もあれば、変化がないとの結果も報告されている¹⁶⁾。著者等の検討では、Wistar 雄ラット全脳で GSHPx 活性が、老化に伴い有意に増加した。しかも酸化ストレスを受けたラットは正常ラットよりも活性が高く、酸素暴露した1月齢ラットの値が、正常の10月齢ラットの値とほぼ同等であった (図6)⁹⁾。この点を考慮すると活性酸素と老化が関連するものと推定できる。GSHPx や GSHRe 活性は尾状殻一被殻や黒質で高く、皮質や海馬領で低い。一般的には、GSHPx 活性の高い部位では GSHRe 活性も高い。脳のカタラーゼ活性は、一般に他の臓器に比べて低いことが知られているが、ラット脳では、老化に伴って更に低下するし、m-RNA 水準も低下する¹⁵⁾。また、変化が認められないとの報告もある。

一方、低分子抗酸化物質の濃度も老化に伴って変化する。還元型グルタチオンなどチオール基を持つ化合物は、抗酸化性が強いとされている。C57BL/6J マウスの肝、心、腎などで、老化に伴う GSH の低下が認められている¹⁷⁾。Wistar ラットでは脂肪細胞表面のチオール基は加齢と共に減少し、その酸化物である GSSG 等のジスルフィド基が増加する。この場合、チオール基とジスルフィド基の総和は変化しないという¹⁸⁾。また、雄ショウジョウバエの GSH は、老化に伴ってあまり変化しないが、一生の終わり近くになって急に低下する。GSSG は老化に伴って上昇し続ける¹⁹⁾。

Fischer344 ラットでは、加齢により、肝、肺、水晶体でビタミン C が50%減少し、腎では20%増加する。尿酸もまた生体内で強い抗酸化活性を持つ。Fischer344 ラットで肝臓で減少し、心、腎、睾丸などでは増加するらしい²⁰⁾。このような老化に伴う水溶性抗酸化物質の変動は非常に複雑で、臓器依存性があるらしく、その意義はまだはっきりしない。一方、ビタミン E は Wistar や Fischer344 ラットの肝、肺、心臓などでは、加齢により増加する。しかし小脳や脳幹などではビタミン E 濃度は減少するらしい。著者等の検討でも、シナプス膜中の濃度は老化に伴い有意に低下した。酸化ストレス下におかれたラットでは、更に大きな濃度減少を不した (図7)⁹⁾。全脳のビタミン E を調べた報告では、濃度変化が無く、したがって脳ではビタミン E の代謝回転が遅いものとしている報告があるが²¹⁾、こうした結論はあまりに短絡的に過ぎると考えられる。脳の各部位でそれぞれの機能があるわけで、こうした点を考慮した、詳細な

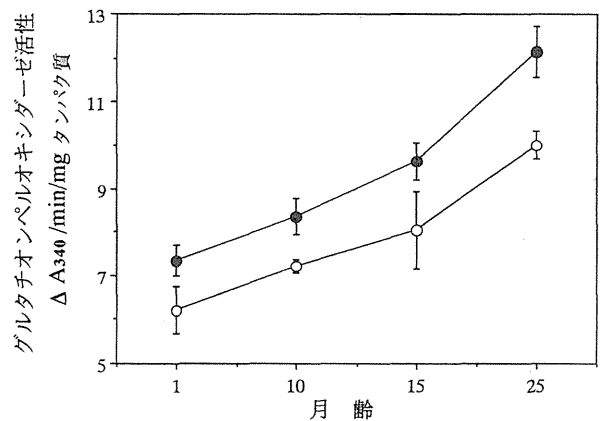


Figure 6. Changes in the activity of glutathione peroxidase in rat brain homogenates caused by oxidative stress and during aging. ○, control rat; ●, rats exposed by 100% oxygen

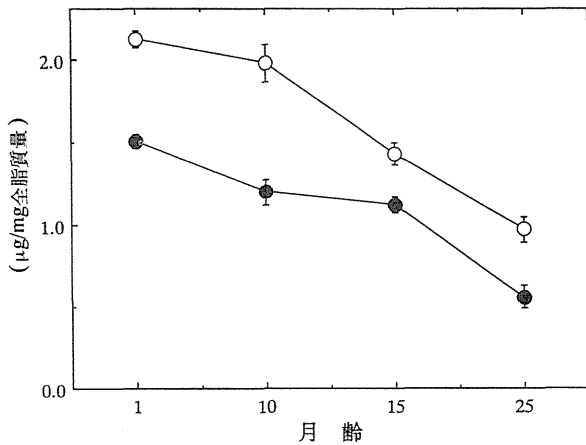


Figure 7. Changes in the vitamin E content of rat synaptic membranes caused by hyperoxia and during aging. ○, control rat; ●, rats exposed by 100% oxygen

ると、ビタミン E 含量の多い動物ほど長命である。世界一の長寿地域である沖縄での疫学的調査によれば、沖縄百歳老人の血中ビタミン E 濃度が高いのもうなずける。こうしたことは、組織中の自動酸化の速度や、その反応基質の濃度が少なく、かつ、抗酸化能が高いほど寿命が長いことを暗示する。したがって、このような抗酸化剤を投与すれば生物の寿命が延びるのであろうとの推測からいくつかの検討がなされた。

ワムシ、センチュウ、ゾウリム、ショウジョウバエなどの小動物にビタミン E を投与すると、たしかに寿命が延長される²³⁾ところがヒトを含めた多くの高等動物では、その効果が今一つはっきりしない。上述の小動物はそのほとんどが分裂終了細胞で構成されているのに対し、高等動物では分裂細胞と終了細胞の共存体である。したがって、ビタミン E は既に分裂が終了した細胞の寿命を延長しているのかもしれない。この点についてはまだ結論がでていない。ビタミン E がワムシのどの時期に働き、どのように寿命延長効果を示すかを調べた興味ある結果が報告されている (図 8)²³⁾。図に示すように、ビタミン E によりその成長期と成熟期が延長され、老衰期は延長

されない。すなわちビタミン E はワムシの成長期を遅延させ、生殖可能な時期を延長させた結果、延命されるものと結論づけられている。この効果がビタミン E の抗酸化作用によるのかどうかは明らかでない。図に見られるように抗酸化効果を示さないコルチゾンでも、ビタミン E とほとんど同じようにワムシの寿命を延長する。このことは、一概にビタミン E の抗酸化性で説明が出来ない。作用機構

はわからないまでも、成長期のエネルギー代謝回転を調節して成長を遅延させ、生殖期でのエネルギー消費を抑制したものと解釈されている。また、イエバエ体内の抗酸化酵素活性や、抗酸化物質濃度を変化させて老化を抑制しようとした試みは成功しなかったし²³⁾、逆に、SOD の阻害剤であるジエチルジチオカルバミン酸ではむしろ寿命を延長した²⁴⁾。こうした事実からビタミン E の老化抑制効果は、抗酸化性以外の効果も考えられる。ビタミン E で飼育したマウスは、胸腺由来のヘルパー T 細胞の成熟を促進すること

検討が今後求められているものといえよう。

以上のように老化に伴う抗酸化防御系の変動に関する研究は矛盾したものが多い。この違いをいかに説明するかが今後の課題である。いずれにせよ、老年変化を起こしやすい部位では防御系の活性が低下することは間違いのないものと思われる。

4. ビタミン E と老化抑制

ビタミン E は脂溶性抗酸化物質として生体中で有害なラジカル連鎖反応を終結させ、酸化傷害を防止するものと位置づけられている。活性酸素・フリーラジカルが老化の原因の一つであるならば、このような抗酸化物質が老化抑制に寄与していることは推定できる。寿命の異なる動物の血清を調べてみ

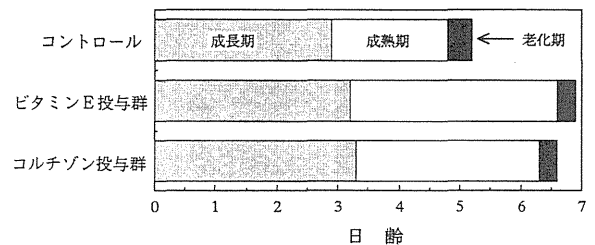


Figure 8. Effect of vitamin E and cortisone on the longevity of Rotifer.²³⁾

がわかっており、免疫賦活作用を持つことが知られている²⁵⁾。したがって、本稿の始めに述べた免疫機能衰退による老化をビタミンEが抑制しているのかもしれない。いずれにせよ、その詳細なメカニズムは明らかでなく、抗酸化性を否定する材料にも乏しい。こうした点が明らかになれば、ビタミンEを含む多くの化合物による老化抑制への応用も可能となろう。

おわりに

以上、活性酸素・フリーラジカルに由来する生体酸化傷害が、老化の要因になるであろう事、防御系の変動や防御物質の投与による効果を中心に述べた。現在までのところ、フリーラジカル傷害と老化について明確な解答が得られておらず、今後の系統だてた詳細な検討が期待される。

文 献

- 1) D. Harman: J. Gerontol., **11**, 298-300 (1956).
- 2) J. M. McCord & I. Fridovich: J. Biol. Chem., **244**, 6049-6055 (1969).
- 3) J. F. Turrens, et al.: Arch. Biochem. Biophys., **217**, 411-421 (1982).
- 4) R. G. Cutler: Free Radical in Biology (ed. by W. A. Pryer), vol. **6**, p371-428 Academic Press, New York (1978).
- 5) R. S. Sohal & P. B. Buchan: Exp. Gerontol., **16**, 157-162 (1981).
- 6) 浦野四郎：沖縄医学会雑誌、**32**, 126-131 (1994).
- 7) L.S. Chia. et al.: FEBS Lett., **157**, 155-157 (1983).
- 8) 浦野四郎：老化と環境因子（松尾光芳編）、p171-186 学会出版センター、東京 (1994).
- 9) 浦野四郎ら：ビタミンE研究の進歩、IV、85-89 (1994).
- 10) C. N. Oliver, et al.: J. Biol. Chem., **262**, 5488-5491 (1987).
- 11) C. N. Oliver, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 5144-5147 (1990).
- 12) 金子孝夫：老化と環境因子（松尾光芳編）、p203-218, 学会出版センター、東京 (1994).
- 13) J. M. Braugher, et al.: J. Neurochem., **45**, 1288-1293 (1985).
- 14) T. Asano, et al.: Mol. Chem. Neurophathol., **10**, 101-133 (1989).
- 15) I. Semsei, et al.: Mech. Agig Develop., **58**, 13-19 (1991).
- 16) J. S. Hothersall, et al.: Enzyme, **26**, 271-276 (1981).
- 17) G. A. Hazelton & C. A. Lang: Biochem. J., **188**, 25-30 (1980).
- 18) A. Hughes, et al.: J. Cell Physiol., **103**, 349-353 (1980).
- 19) R. S. Sohal, et al.: Mech. Agig Develop., **56**, 223-235 (1990).
- 20) L. E. Rikans & D. R. Moore: Biochim. Biophys. Acta, **966**, 269-275 (1988).
- 21) M. Matsuo, et al.: Mech. Agig Develop., **64**, 273-292 (1992).
- 22) 浦野四郎：臨床成人病、**22**, 25-28 (1992).
- 23) H. E. Enesco, et al.: Mech. Agig Develop., **48**, 281-289 (1989).
- 24) 松尾光芳：組織培養、**13**, 36-41 (1987).
- 25) 浦野四郎：ファルマシア、**31**, 27-31 (1995).

NSAIDs.

(1) 緒言

日常臨床の場においてさまざまな薬剤が利用されているが、これに伴い副作用も数多く報告され、なかでも、胃腸傷害はこれら副作用のうちの代表的なもののひとつである。一方、近年内視鏡の進歩に伴い、突発的な激しい腹部症状をもって発症する急性胃病変に遭遇する機会が増加し、この原因として最も多いのがストレスと薬剤によるものである。また、最近実施された日本リウマチ財団の調査では、NSAIDsを服用している約1,000例のうち、胃潰瘍、びらん性胃炎などの上部消化管病変が60%以上にみられており、NSAIDsによる胃腸障害が重要な問題点となっている¹⁾。その成因については、従来より多くの研究がなされ、Table 1に示すような機構が明らかとなっている。その主なものは、NSAIDsによるシクロオキシゲナーゼ阻害が、胃粘膜細胞保護作用を有する内因性プロスタグランジン欠乏が発生機序であると理解されてきた。また、いくつかのプロスタグランジン製剤もすでに臨床応用されている。しかし、その効果は絶対的なものではなく、依然、多くの検討課題が残されていることも事実であろう。

消化器臓器なかでも胃粘膜は外来異物や毒物に常にさらされ、微小循環障害が容易に発生しやすい。それゆえ、薬剤を含む外因的なフリーラジカルや微小循環障害を基盤とする内因的なフリーラジカルの生成により、容易に胃粘膜傷害が生じる。本稿では、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) が、フリーラジカル産生系をいかに変化させ、またフリーラジカル消去系をいかに破綻させることにより胃粘膜傷害が生じているかについて概説し^{2,3)}、その対策を探りたい。

(2) NSAIDs 惹起性胃粘膜障害と活性酸素・フリーラジカル

アスピリンやインドメタシンをラットに投与すると、NSAIDsによるヒト胃粘膜傷害類似の病変を作製できる。このため、これらのモデルをNSAIDsによる胃粘膜傷害の病態の解明のために用いることができる。インドメタシン (20mg/kg) をSD系雄性ラットに投与すると、胃粘膜びらん投与3時間後より出現し、投与6時間後には粘膜皺壁の縦軸に沿った線状、点状の出血びらんが生じる。胃粘膜PG合成阻害に十分なインドメタシン5mg/kgを投与しても出血びらんは著明でないことより、インドメタシン大量投与時の胃粘膜びらんの増悪にはPC合成阻害に加えて他の因子の関与が推定される。脂質過酸化の指標である胃粘膜内TBA (thiobarbituric acid) 反応物質も経時的に、びらんの増加と並行して増加する。加えて、これらの胃粘膜病変、胃粘膜内TBA反応物質の増加は、活性酸素消去剤であるSODやDMSO (dimethyl sulfoxide) の前処置により有意に抑制される (Fig. 1)⁴⁾。これらのことは、すでに報告している他の実験的胃粘膜障害と同様に、本胃粘膜病変の成因に活性酸素が関与し、それらが生体膜中の不飽和脂肪酸を攻撃することにより引き起こされる連鎖的脂質過酸化反応が胃粘膜障害につながる可能性を示すものである。なかでも、DMSOが著明な抑制効果を示すことよりヒドロキシルラジカルの重要性が考えられ、従来より指摘されている遷移金属 (Fe, Cu など) 触媒型のHaber-Weiss反応もヒドロキシルラジカルの

Table 1 Mechanism of NSAIDs-induced gastric mucosal injury

細胞保護作用の抑制
粘液産生の低下
重炭酸イオンの分泌低下
粘膜血流の低下
胃運動の亢進
tight junctionの破壊
胃粘膜細胞の増殖抑制
胃酸分泌亢進
フリーラジカル反応の亢進
好中球の活性化

発生系のひとつであろう。

このような活性酸素消去剤の胃粘膜保護作用のメカニズムを検討するために、胃粘膜微小循環の面からの検討を加えた⁵⁾。胃粘膜における血管透過性はEvans blue色素の漏出量より、また Monastral blue B色素によるラベリングにより血管内皮細胞障害の指標とした。Evans blue色素の胃粘膜内への漏出は、肉眼的病変のほとんど出現していないインドメタシン投与2時間後において漏出はピークとなり、血管透過性の亢進が粘膜びらんを先行して出現することが明らかとなった。SODやSODとCatalaseの併用は有意にEvans blue色素の増加を阻止した。Monastral blue B色素によるラベリングにより検討した血管内皮細胞障害についても、インドメタシン投与1、2時間後よりすでに内皮細胞障害は出現しており、同様にSODやSODとCatalaseの併用により障害は抑制された。これらの結果は、初期病変である微小循環障害、血管内皮細胞障害に活性酸素の関与を示すものであり、その後、活性酸素により引き起こされる脂質過酸化反応が粘膜びらんの進展に寄与していることを示すものであろう。アスピリン惹起性胃粘膜傷害モデルにおいても、同様に活性酸素消去剤により病変が軽減される^{6,7)}。

(3) NSAIDs 惹起性胃粘膜障害と好中球活性化

近年、実験的NSAIDs胃粘膜傷害が好中球減少ラットで抑制されることが報告され (Fig. 2)^{8,10)}、その傷害機序における好中球の役割が注目されている。家兎で作製した抗ラット好中球抗体を投与しておく、

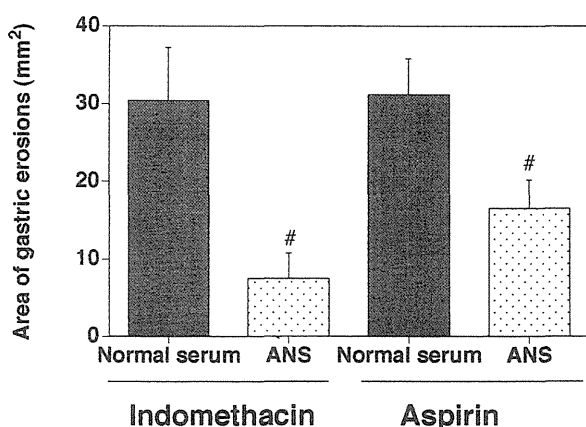


Fig. 2 Effects of anti-neutrophil serum(ANS) on indomethacin- or aspirin-induced gastric mucosal injury in rats. Control rats were treated with normal rabbit serum. #p<0.05 vs control.

(adapted from ref. 8)

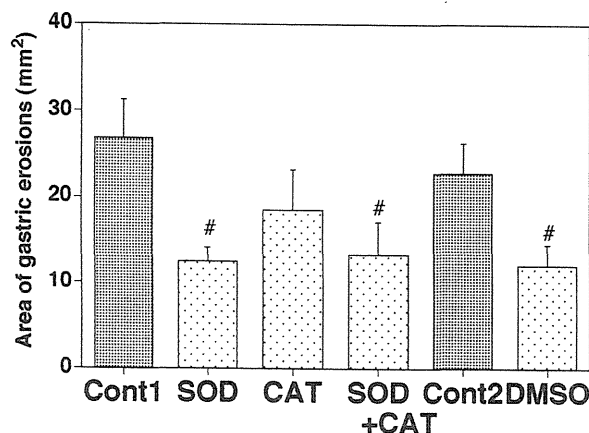


Fig. 1 Effects of SOD, catalase (CAT), SOD + catalase, or dimethyl sulfoxide (DMSO) on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats.

#p<0.05 vs control.

(adapted from ref. 4)

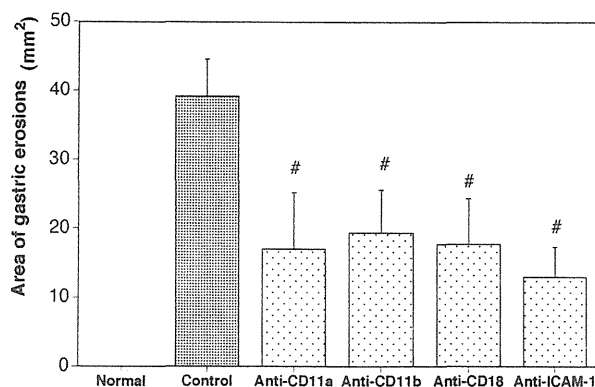


Fig. 3 Effects of monoclonal antibodies to adhesion molecules on aspirin-induced gastric mucosal injury in rats.

#p<0.05 as compared with control group.

(adapted from ref. 6)

インドメタシンやアスピリンによる胃粘膜傷害はプロスタグランジンが低下していても抑制される。また、NSAIDs 投与により微小循環系において好中球が内皮細胞に接着し血管外に遊走すること^{11,12)}や、*in vitro* の培養血管内皮細胞-好中球の系にアスピリンを添加すると、好中球が内皮細胞に接着すること¹³⁾なども解明されている。NSAIDs による好中球-血管内皮相互作用は、両者の細胞表面上に存在する接着分子を介して生じるものであり、その中心的役割を果たしているものが、好中球上の CD11a/CD18 および CD11b/CD18 と血管内皮細胞上の ICAM-1 およびほかのリガンドとの接着であった^{6,14,15)}。たとえば、アスピリン惹起性胃粘膜傷害に対して、これら接着分子に対するモノクローナル抗体を投与すると、胃粘膜びらん面積は軽減され (Fig. 3)、同時に、胃粘膜中の好中球浸潤を著明に減少する⁶⁾。前述の SOD やカタラーゼの有効性を考慮すると、活性酸素の生成源としては組織に浸潤した好中球の役割の重要性を示唆する結果である。

(4) NSAIDs 惹起性胃粘膜障害の対策

NSAIDs による胃粘膜傷害の機序を Fig. 4 のようにまとめてみたが、本稿では好中球-血管内皮相互

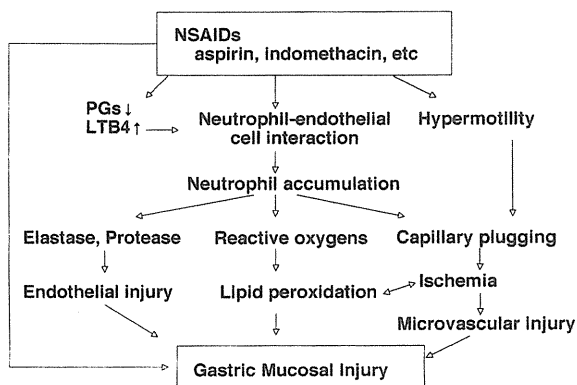


Fig. 4 Pathophysiology of NSAIDs-induced gastric mucosal injury

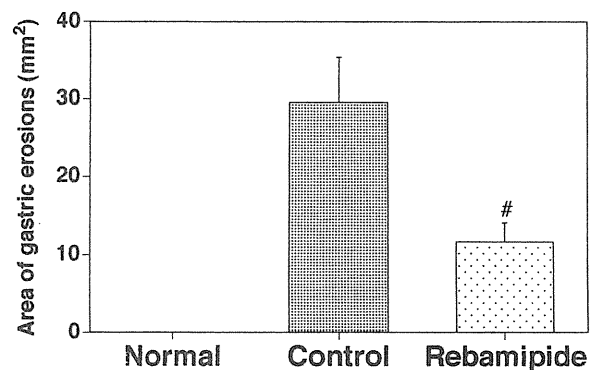


Fig. 5 Effects of rebamipide, a novel anti-ulcer agent, on indomethacin-induced gastric mucosal injury in rats.
$p < 0.05$ as compared with control group.
(adapted from ref. 16)

作用、好中球由来の活性酸素を中心に述べた。最近では、このような病態に薬理作用を求めた抗潰瘍薬 (Fig. 5) なども開発されており¹⁶⁾、今後の臨床応用に期待したい。

参考文献

- 1) 塩川優一、延永 正、斎藤輝信 他：非ステロイド系抗炎症剤による上部消化管傷害に関する疫学調査. リウマチ, 31: 96-111, 1991
- 2) 内藤裕二、吉川敏一、市川 寛 他：インドメタシン惹起性胃粘膜障害における脂質過酸化・活性酸素の関与. 過酸化脂質研究, 17: 202-204, 1993
- 3) 内藤裕二、吉川敏一：NSAIDs による AGML における活性酸素・フリーラジカルの意義. 急性胃粘膜病変—その基礎と臨床の最新情報—、並木正義編集 1994, 医学図書出版：東京, 129-134.
- 4) Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, *et al.*: Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. *Gut*, 34: 732-7, 1993

- 5) Naito Y, Yoshikawa T, Kaneko T, *et al.*: Role of oxygen radicals in indomethacin-induced gastric mucosal microvascular injury in rats. *J. Clin. Gastroenterol.*, **17**: S99-S103, 1993
- 6) Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, *et al.*: Role of neutrophilendothelial cell interactions and oxygen-derived free radicals in aspirin-induced gastric mucosal injury. *J. Clin. Gastroenterol.*, in press
- 7) Pihan G, Regillo C, and Szabo S: Free radicals and lipid peroxidation in ethanol-or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.*, **32**: 1395-1401, 1987
- 8) Yoshikawa T, Naito Y, Yoshida N, *et al.*: Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced gastric mucosal injury. in: K. Asada and K. Yoshikawa, ed. *Frontiers of reactive oxygen species in biology and medicine*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 235-238, 1994.
- 9) Wallace JL, Keenan CM, and Granger DN: Gastric ulceration induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am. J. Physiol.*, **259**: G462-G467, 1990
- 10) Lee M, Aldred K, Lee E, *et al.*: Aspirin-induced acute gastric mucosal injury is a neutrophil-dependent process in rats. *Am. J. Physiol.*, **263**: G920-G926, 1992
- 11) Asako H, Kubes P, Wallace J, *et al.*: Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am. J. Physiol.*, **262**: G903-G908, 1992
- 12) Asako H, Kubes P, Wallace J, *et al.*: Modulation of leukocyte adhesion in rat mesenteric venules by aspirin and salicylate. *Gastroenterology*, **103**: 146-152, 1992
- 13) Yoshida N, Takemura T, Granger DN, *et al.*: Molecular determinations of aspirin-induced neutrophil adherence to endothelial cells. *Gastroenterology*, **105**: 715-724, 1993
- 14) Wallace JL, Arfors KE, and McKnight GW: A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin-induced gastric damage in the rabbit. *Gastroenterology*, **100**: 878-83, 1991
- 15) Wallace JL, McKnight W, Miyasaka M, *et al.*: Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. *Am. J. Physiol.* **256**: G993-G998, 1993
- 16) Yoshikawa T, Naito Y, Nakamura S, *et al.*: Effect of rebamipide on lipid peroxidation and gastric mucosal injury induced by indometacin in rats. *Arzneim. Forsch.* **43**: 1327-1330, 1993

ated through this key intracellular specific proteins, such as the SR Ca^{2+} -release channel, thereby causing Ca^{2+} overload linked to arrhythmogenic electrophysiological changes.

Key words: Reactive oxygen species, Singlet oxygen, Ischemia-reperfusion injury, Arrhythmia, Sarcoplasmic reticulum, Ca^{2+} -release channel.

I. はじめに

多様な非生理的・反応に呼応して生成される活性酸素・フリーラジカルの病態生理論が活発に展開されている。とくに循環系疾患との関連性を血管／活性酸素・フリーラジカル相互の作用として捉えることにより、NO から hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$) に至る活性酸素ラジカル種の連携反応を基盤とした病因論的発想の触発が期待されている。たとえば、これまで最も精力的に研究されている心筋虚血—再灌流障害は、まさに活性酸素・フリーラジカルの関与する冠循環障害の一病型として、また広義には「冠血管閉塞遮断後、血流再開通に際して生ずる心筋機能障害」として理解されている。臨床的には、冠動脈痙縮 (spasm) の解除や血栓融解による血流再開通後にみられる心室性不整脈、梗塞組織内出血による心破裂などが代表例で、心臓手術時に遭遇する人工心肺離脱後の心機能回復不全やスタン心 (stunned myocardium) もこれに含まれるが、これらの病態成立に活性酸素・フリーラジカルが中心的役割を果たしていることを示唆する傍証は着実に集積されてきている。

1. 虚血—再灌流障害因子の多様性

これまで虚血—再灌流障害を成立させる因子として、心筋組織 ATP レベルの低下、 Ca^{2+} 過剰負荷 (Ca^{2+} overload)、活性酸素・フリーラジカル産生、そして冠灌流障害、などが考えられてきた。主としてこれらは、心筋細胞内でのエピソードに関連した因子であるが、冠微小循環動態変化に連携した障害因子も再灌流性心筋壊死に関与する。心筋壊死領域やその周辺に白血球・血小板が集積している組織像が実験的にも剖検心でも確認されている事実は、白血球除去フィルターを用いた再灌流で再灌流障害を阻止できるという報告と併せて、冠微小循環系破綻が再灌流障害の大きな要素であることを示唆して興味深い。

好中球が心筋虚血—再灌流過程の活性酸素・フリーラジカル産生源であると最初に指摘したのは、Romson のグループ¹⁾である。彼らは、好中球枯渇動物で再灌流障害が軽減されることを見だし、この効果が SOD や catalase を用いた場合の効果に十分匹敵しうることを報告した。補体系の活性化や微生物の貪食、あるいはホルボールエステルのような刺激物で好中球を活性化すると、superoxide (O_2^-) 産生のための急激な酸素消費が誘発される。好中球によるこのラジカル産生は、NADPH を基質として酸素分子を 1 電子還元する NADPH 酸化酵素によって達成される。産生された O_2^- は酵素的あるいは非酵素的に H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$ 、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、次亜塩素酸 (HOCl) などの活性酸素・フリーラジカルや酸化物を生ずる。

2. 再灌流不整脈

再灌流不整脈、とくに心室細動の出現頻度と持続時間は、虚血時間との間に bell-shaped curve の関係を示す²⁾。摘出ラット灌流心を用いた実験で、10~20分の虚血後に再灌流すると約90%の頻度で心室細動が出現する。この場合、再灌流直後から心室頻拍が発生し短時間で心室細動に移行、これが持続する。麻酔犬でも、冠動脈結紮時間と再灌流不整脈出現頻度との間には bell-shaped curve が認められ、とくに20

～30分虚血後の再灌流によって不整脈が高頻度に現われる^{2,3)}。臨床的にも、冠 spasm に起因する異型狭心症⁴⁾や、無症候性心筋虚血⁵⁾において心室頻拍や心室細動などの重篤な再灌流不整脈が出現する。また、病院収容以前の急性心筋梗塞発症後早期に血栓溶解薬を使用した例では、心室細動の発生する頻度が高く⁶⁾、致死的再灌流不整脈発現との関連でこれを軽視することはできない。

再灌流不整脈の発生には、 K^+ 、 Na^+ そして Ca^{2+} などイオンバランスの変化、 Na^+/Ca^{2+} 交換系や Na^+/H^+ 交換系の活性増強、adrenaline 受容体活性化にともなう細胞内 cyclic AMP の増加、またリゾリン脂質の産生など多彩な因子が関与する^{2,7,8)}。一方、再灌流時に産生される活性酸素・フリーラジカルも不整脈を誘発できる因子として認識されている⁹⁾。

3. Ca^{2+} overload

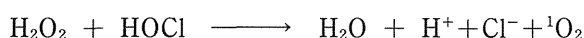
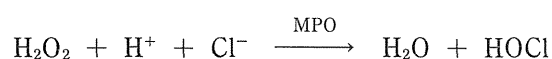
虚血時、心筋は乳酸蓄積に大きく依存してアシドーシスとなる。しかし、細胞膜に局在する Na^+/H^+ 交換系の活性増強により H^+ の汲み出しが促進されるとともに細胞内への Na^+ 流入が増加する。この細胞内 Na^+ 濃度の増加が Na^+/Ca^{2+} 交換系を介する Ca^{2+} 流入に拍車をかけることになる。細胞内 Na^+ は主として Na^+/Ca^{2+} 交換系と $Na^+/K^+-ATPase$ を介して細胞外へ汲み出されるが、前者はエネルギー非依存性であるのに対し、後者は ATP 依存性であり、虚血にともなう組織 ATP レベルの低下から考える限り、虚血心筋細胞内の Na^+ は $Na^+/K^+-ATPase$ よりむしろ Na^+/Ca^{2+} 交換系を介して汲み出されると推測する方が妥当である。しかも、 $[Na^+]_i/[Na^+]_o$ の比率が増大し、かつ膜電位が上昇するような局面をもつ虚血心筋では、 Na^+/Ca^{2+} 交換系は逆方向に作動すると考えるべきで、これが細胞内への Ca^{2+} 流入増大の引き金をひく。

活性酸素・フリーラジカルを虚血-再灌流障害の発生原因として位置づけるためには、少なくとも活性酸素・フリーラジカルが再灌流障害を擬似できるかどうか証明しなければならない。そのための実験概略とこれによって得られた結果から、さらに議論を進める。

II. 活性酸素・フリーラジカルによる心筋細胞障害のメカニズム

1. 虚血-再灌流障害と活性酸素・フリーラジカル

活性酸素・フリーラジカルのうち、さほど強い反応性をもたない O_2^- は、不均化反応を受けて H_2O_2 へ変換され、さらに遷移金属の触媒下で高い反応性をもつ $HO\cdot$ を生成する。この一連の反応が虚血-再灌流障害に関連していると考えられていた。しかし、 $HO\cdot$ は脂質過酸化反応を介して 1O_2 を生成する。したがって、 $HO\cdot$ によって直接もたらされると考えられていた組織障害が、実は 1O_2 を介する間接的な障害であると考えられることは可能である。 1O_2 は、 H_2O_2 と好中球由来ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の触媒を受けて産生される $HOCl$ との反応で以下の経路から生成される。



これらの活性酸素・フリーラジカルが、虚血-再灌流実験モデルで主要な役割を演ずることのできるメディエーターであるか否かを検討する必要がある。まず、ラジカルスカベンジャーの効果から評価することを試みた。

(1) 実験方法

プロトコールⅠ：SD ラット（雄性）より心臓を摘出、左心室内にバルーンを挿入し、等容積収縮 Langendorff 標本を作成した。Krebs-Henseleit (K-H) buffer (95% O₂-5% CO₂) による 100cm H₂O₂ の定圧灌流を行い、electrocardiogram を記録、冠流量を測定した。30分の global な虚血の後、20分間の再灌流モデルでみられる左心室圧、心拍数および冠流量の変化、そして不整脈の発現¹⁰⁾に対するラジカルスカベンジャーの効果を評価した。用いたスカベンジャーは、superoxide dismutase (SOD, 30U/ml), mannitol (5mM)、そして histidine (10, 25, 50mM) であり、それぞれ示した最終濃度になるように予め K-H buffer に溶解して実験に供した。また、これらスカベンジャーを含む K-H buffer の pH は 7.4 と安定であった。K-H buffer の浸透圧はスカベンジャーを溶解したとしても 285~323mosmol の範囲内であった。

プロトコールⅡ：プロトコールⅠと同様に SD ラット摘出心臓を用い Langendorff 標本を作成、K-H buffer で15分間の平衡灌流 (100cm H₂O) を行った。その後、global な虚血 (5、7.5、10、15、20、30分) に継続して再灌流 (10分) し、再灌流開始とともに記録した electrocardiogram から不整脈の発現に及ぼす適切な global 虚血時間を決定した。なお、平衡灌流と虚血時にはペーシング (5Hz, 3ms, 6V) を施した。この実験で、5分間の global 虚血-10分間再灌流で不整脈の発現と冠流量変化がみられなかったことから、HOCl と H₂O₂ が心筋に与える再灌流不整脈誘発感作能を検討する目的で以下の実験プロトコールを立案した。H-K buffer による5分間の平衡灌流の後に、H₂O₂ (200μM) あるいは HOCl (50, 100, 200μM) を含む buffer に切り替えて10分間の灌流を行い、その後、5分間の global 虚血に継続して H-K buffer による10分間の再灌流を行った。この10分間の再灌流で誘発される不整脈と HOCl スカベンジャー methionine (10μM, 100μM, 1mM) の効果を評価した。

HOCl は NaOCl から Elbrich et al.¹¹⁾の方法に準じて調整した。

(2) 結果

プロトコールⅠ：虚血再灌流によって左心室圧と冠流量はそれぞれ約60%と80%の減少を示した。histidine はこの減少を有意に阻止した (Fig. 1)。また SOD + catalase + mannitol は左心室圧減少のみを阻止した。不整脈 (VT, VF) は再灌流直後 (15秒以内) にすべての動物 (n=10) に確認 (平均持続時間 12.22±1.55分) され、その持続時間は histidine あるいは SOD + catalase + mannitol で有意に短縮した (Fig. 2)。虚血-再灌流による normal sinus rhythm の短縮も同様に histidine あるいは SOD + catalase + mannitol で延長した (Fig. 3)。心拍数は再灌流初期 (5~7分) では有意に減少するが、再灌流後15~17分ではほぼ元の値に復した。再灌流初期にみられた心拍数の減少も histidine または SOD + catalase + mannitol によって阻止された (データとして示さず)。測定したすべての虚血-再灌流障害のパラメーターは、SOD + catalase + mannitol よりも histidine (25mM, 50mM) によって強力に改善されるものであった。これらの結果は、少なくとも直接的に ¹O₂ をスカベンジすることで虚血-再灌流障害から心筋をほぼ完全に保護できることを示唆する。しかし、O₂⁻, H₂O₂, そして HO· を SOD + catalase + mannitol カクテルでスカベンジしてもなお完全な阻止を得ることができなかった。このカクテル成分の濃度を上げることによって完全な阻止効果を達成することは可能かも知れない。しかし、とくに高濃度の SOD は脂質過酸化連鎖反応のターミネーションの段階を妨害することが知られているので¹²⁾、ここに SOD + catalase + mannitol 効果の限界があると考えべきである。

プロトコールⅡ：¹O₂ が有力な虚血-再灌流障害のメディエーターである可能性を明確にすることがで

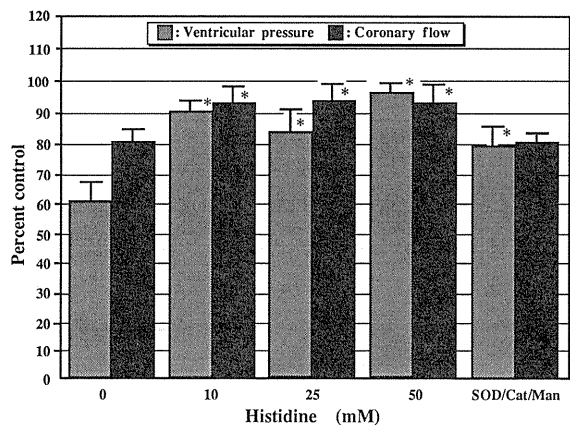


Figure 1: Protection afforded by histidine (10-50 mM) and a cocktail of SOD (30 U/ml), catalase (Cat; 60 U/ml), and mannitol (Man; 5 mM) against reduction of contractile function and coronary flow during 30 min of normothermic global ischemia and 20 min reperfusion. Results represent means \pm S.E. from 8 hearts. *Significantly ($P < 0.05$) different from corresponding value without scavengers.

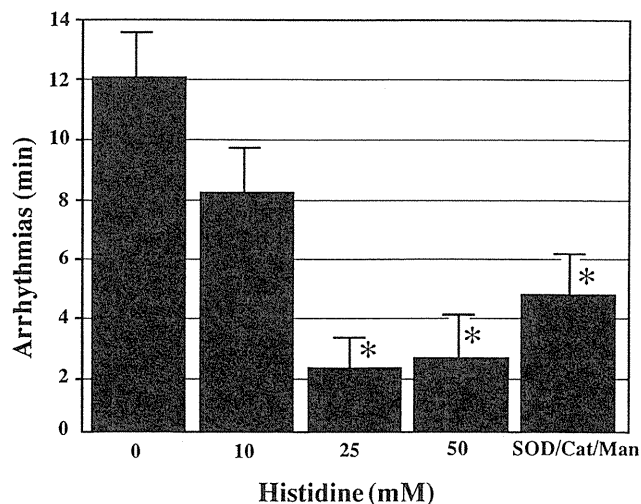


Figure 2: Protection afforded by histidine (10-50 mM) and a cocktail of SOD (30 U/ml), catalase (Cat; 60 U/ml), and mannitol (Man; 5 mM) against duration of reperfusion-induced arrhythmias (ventricular tachycardia and ventricular fibrillation). Results represent means \pm S. E. from 10 hearts. *Significantly ($P < 0.01$) different from control (without scavengers).

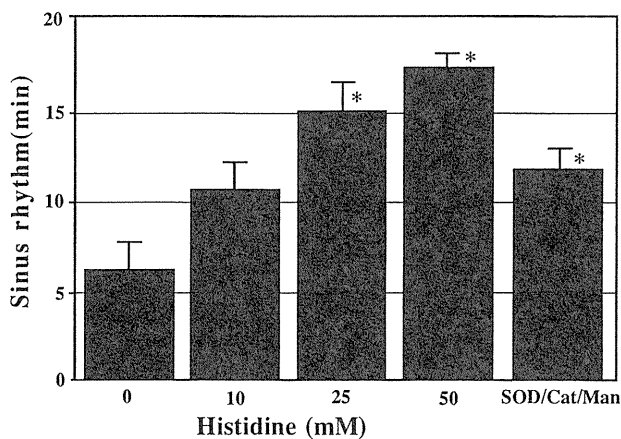


Figure 3: Dose-dependent increase in duration of normal sinus rhythm by histidine (10-50 mM) and a cocktail of SOD (30 U/ml), catalase (Cat; 60 U/ml), and mannitol (Man; 5 mM). Results represent means \pm S. E. from 10 hearts. *Significantly ($P < 0.01$) different from control (without scavengers).

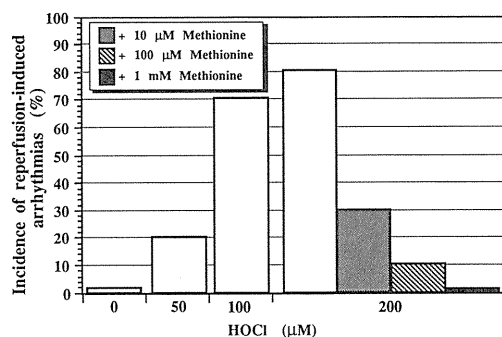


Figure 4: Effect of HOCl on incidence of reperfusion-induced arrhythmias, and protection afforded by methionine (10 μ M to 1 mM); $n = 6$ to 10/group.

きたため、さらに、 $^1\text{O}_2$ 生成に至る過程で生成される酸化物 H_2O_2 と HOCl の虚血-再灌流障害に果たす役割について検討した。この実験では、虚血-再灌流不整脈や冠流量変化を誘発しない条件のモデルを用い、虚血以前に H_2O_2 あるいは HOCl に暴露された場合に心筋そのものが虚血-再灌流に対して高い障害感受性を獲得するかどうか評価した。 HOCl に予め反応させ標本では、虚血-再灌流に反応して濃度依存性に不整脈が誘発され、methionine 処置によって誘発不整脈は濃度依存性に抑制された (Fig. 4)。 H_2O_2 も虚血-再灌流感受性を増加させた (Fig. 5A)。また、normal sinus rhythm は、 HOCl と反応させた標本

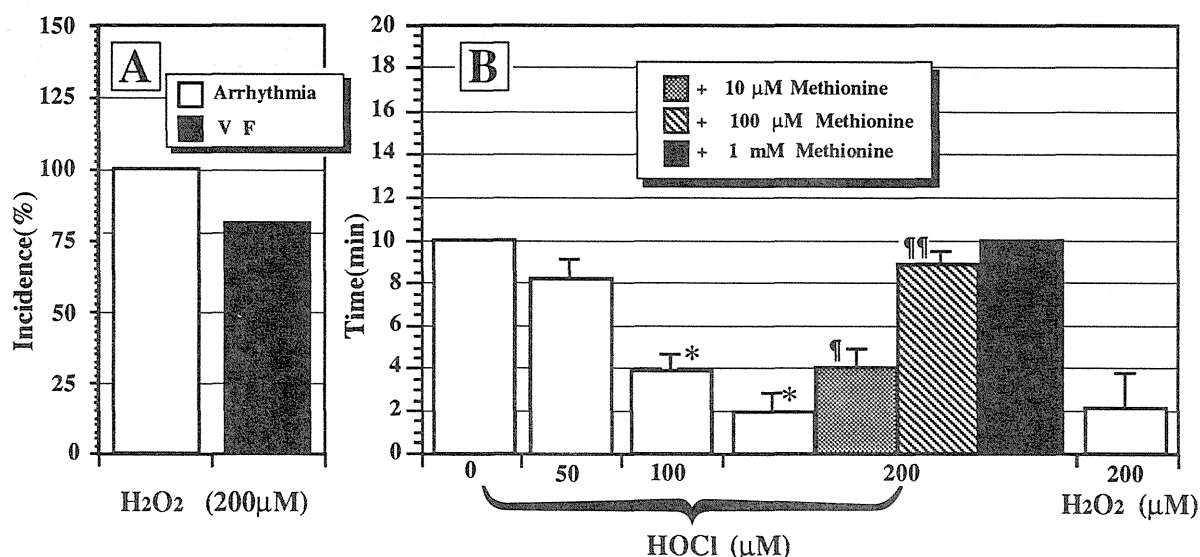


Figure 5: (A) Effect of H_2O_2 (200 μM) on incidence of reperfusion-induced arrhythmias; $n = 6$ hearts. (B) Effects of HOCl (50-200 μM) and H_2O_2 (200 μM) on duration of normal sinus rhythm during 10 min of reperfusion, and effect of methionine (10 μM to 1 mM). Results represent means \pm S. E. from 6 to 10 hearts. *Significantly ($P < 0.01$) different from the value at 50 μM HOCl ; †, †† significantly ($^{\dagger}P < 0.05$; $^{\dagger\dagger}P < 0.01$) different from corresponding value without methionine.

で持続時間の短縮として認められ、この効果も methionine で抑制された (Fig. 5B)。 H_2O_2 は HOCl と同様に normal sinus rhythm を著しく短縮させた (Fig. 5B)。

不整脈発現を指標とした場合、虚血-再灌流に対する感受性増大作用は、 HOCl と H_2O_2 とで類似したものであったが、再灌流後の冠流量変化に対しては、200 μM HOCl 前処置標本で72%の減少、200 μM H_2O_2 前処置標本では69%の増加という全く逆の作用を示した。

(3) 考 察

血球成分の関与を無視できる Langendorff 心臓標本を用い、虚血-再灌流障害が $^1\text{O}_2$ によってメディエートされている可能性を明確にした。これを支持する実験結果としては、(1)虚血-再灌流誘発性不整脈が $^1\text{O}_2$ スカベンジャー histidine によって強力に阻止されたこと、そして(2)SOD + catalase + mannitol カクテルには、histidine に匹敵する効果を認めることができなかったことである。histidine は HO とも反応するが $^1\text{O}_2$ に対する反応速度定数は $1 \times 10^8 \text{mol/s}$ であり、この点からも histidine の効果は $^1\text{O}_2$ をスカベンジした結果に依存したものであると考えるのが妥当である。そして、たとえ好中球が存在していなくとも、虚血-再灌流に際して $^1\text{O}_2$ の生成があり得ることの傍証ともなる。しかし、これまで考えられていた $^1\text{O}_2$ の生成経路から判断すれば¹³⁾、 O_2^- と H_2O_2 との Haber-Weiss 反応、 HO の H^+ 引き抜きに

よって開始される脂質過酸化反応、 H_2O_2 と HOCl との反応などが $^1\text{O}_2$ 生成と密接にリンクしていると推定しなければならない。これらの反応系は、論理的には $\text{SOD} + \text{catalase} + \text{mannitol}$ カクテルでクエンチできるはずであるが、分子サイズや反応速度の点で活性酸素ラジカル発生部位へのアクセスやラジカル消去特異性を妨げているのかもしれない¹⁴⁾。一方、 $^1\text{O}_2$ は他の分子と化学的に反応する場合と、そして他の分子にエネルギーを受け渡す場合とが知られている。histidine は $^1\text{O}_2$ と反応してエンドペルオキシドを生成するが、生成されたエンドペルオキシドは即時に不活性化される。この histidine のもつ効果は、in vitro の脂質過酸化反応 (Fe^{3+} と ADP による) を抑制する効果として確認されている¹⁵⁾。

$^1\text{O}_2$ 生成にリンクする H_2O_2 と HOCl の再灌流不整脈誘発能は共に類似したものであった。活性酸素・フリーラジカルは、一部、心筋細胞内 Ca^{2+} ストア (小胞体) からの Ca^{2+} 放出を促進する結果、細胞内 Ca^{2+} overload を引き起こすことによって細胞レベルでの自動反復放電を誘起するという前提で、これが再灌流不整脈発現の電気生理学的メカニズムであると仮定すれば、 H_2O_2 あるいは HOCl が膜系 Ca^{2+} 制御能を障害性に感作すると考えることに矛盾はない。しかし、 H_2O_2 を前処置した標本では、不整脈誘発能の感作を受けたものの、再灌流に際して減少するはずの冠流量が逆に増加した。したがって、 H_2O_2 がどのようなメカニズムでこのような冠流量増加を示すのか不明ではあるが、虚血-再灌流障害のメディエーターではないと結論づけられる。

これまでの実験結果から推論する限り、 HOCl を含む $^1\text{O}_2$ 生成の一連の反応段階が、虚血-再灌流障害を導く経路を成立させていることになり、そして、少なくとも H_2O_2 自身は、直接的障害メディエーターとしてではなく、 $^1\text{O}_2$ や HOCl 生成の仲介酸化物として位置づけられる。

2. Ca^{2+} overload と活性酸素・フリーラジカル

活性酸素・フリーラジカルが再灌流不整脈の主要メディエーターであるとはいえ、虚血-再灌流障害の発生原因であることを証明するためには再灌流に際してみられる Ca^{2+} overload を活性酸素・フリーラジカルが擬似することを確認しなければならない。再灌流によって産生される活性酸素・フリーラジカルは、直接あるいは間接的に心筋細胞を過酸化し、膜局在酵素蛋白機能を障害することができ、これによって Ca^{2+} 障壁である心筋細胞膜系機能を破綻させ、遂には細胞障害を導くと考えるのがより理論的である。したがって、興味の内容は活性酸素・フリーラジカルが心筋細胞内 Ca^{2+} 制御系としての小胞体 (SR) Ca^{2+} ハンドリングをどのように修飾するのか追究することである。この目的のために計画されたのが以下にのべる実験系である。

(1) 実験方法

SR の分離と内因性 Calmodulin (CaM) 除去および Ca^{2+} load : 雑種成犬摘出心臓の左心室筋から終末槽 SR を分離し、低張-高張 KCl 処理と 4mM EGTA 処理によって、CaM 除去 SR (EGTA-SR) を調整した^{16,17)}。この SR を用い、 Ca^{2+} loading (steady-state Ca^{2+} uptake) を得た後に Ca^{2+} ポンプを 2.5mM EGTA で停止させ、 Ca^{2+} efflux の一次反応速度を算出した¹⁸⁾。また、同様の実験条件で、SR を含む反応槽の Ca^{2+} コンパートメント (SR 外 Ca^{2+} 、SR 外結合 Ca^{2+} 、SR 内結合 Ca^{2+} 、SR 内自由 Ca^{2+}) を想定し、それぞれのパラメーターから SR 内自由 Ca^{2+} 濃度 (Ca^{2+}_i) を求めた¹⁸⁾。 Ca^{2+} -ATPase 活性は、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ からの ^{32}Pi の遊離速度として測定した。

CaM 活性 : 分離 SR の CaM 活性を CaM-stimulated phosphodiesterase 活性を指標として測定した¹⁹⁾。

Ca²⁺ 放出チャネル活性：分離 SR を人工脂質膜に融合させ、再構成された Ca²⁺ 放出チャネルの単一電流を記録した²⁰⁾。

フリーラジカルの発生：in vitro でフリーラジカルを発生させるため、xanthine を基質とした xanthine oxidase 酵素反応系を用いた。

(2) 実験結果

Fig. 6 に、用いたフリーラジカル発生系での O₂⁻ と H₂O₂ の発生速度を示す。O₂⁻ の発生速度は xanthine 濃度依存性に増加し、SOD によってほぼ完全に抑制された (Fig. 6A)。一方、H₂O₂ のそれは O₂⁻ と同様に xanthine 濃度依存性に増加したが、SOD の存在下でさらに増強された (Fig. 6B)。Catalase はほぼ完全に H₂O₂ 発生を抑制した。したがって、少なくとも xanthine-xanthine oxidase 反応を用いる限り、この反応の効果が SOD で抑制された場合には O₂⁻ の仲介によって引き出される効果であると推定できる。

xanthine-xanthine oxidase 反応が SR の Ca²⁺ ハンドリングに及ぼす効果を Fig. 7 に示す。xanthine-xanthine oxidase 反応で産生されるフリーラジカルは、Ca²⁺ ポンプ ATPase 活性に影響を与えずに (Fig. 7D) steady-state Ca²⁺ load (Fig. 7A) と Ca²⁺_i (Fig. 7B) を低下させた。Ca²⁺_i の減少は steady-state Ca²⁺ load の減少によって反映されるものであるが¹⁸⁾、特異的に Ca²⁺ 放出チャネルを閉口状態にロックする条件の ryanodine (500 μM 10分間処置)¹⁷⁾ で阻止された。ryanodine 自身は Ca²⁺ ポンプ ATPase 活性に影響を与えず (Fig. 7D)、また、フリーラジカルによって増加した Ca²⁺ leak (K/v) に対しても何ら効果を示さなかった (Fig. 7C)。この実験系に外因性 CaM を添加した場合、ryanodine 効果が擬似された。これらの結果を考慮すれば、CaM と ryanodine 受容体 (Ca²⁺ 放出チャネル) とが相互に Ca²⁺ 放出チャネルの開口を抑制しており、この制御機構をフリーラジカルが解除すると想定することが可能である。さらに、この可能性を検討した。フリーラジカルの効果は内因性 CaM の除去で完全に消失するが (Fig. 7A, 7B)、たとえ EGTA-SR を用いたとしても、外因性に CaM が補足されている場合には再現して認められた。また、SR の CaM 活性はフリーラジカルとの反応で著しく低下するものであった (Fig. 7E)。このようなフリーラジカルによって引き出される効果はすべて SOD で抑制を受けた (Fig. 7)。

フリーラジカルの標的が CaM-Ca²⁺ 放出チャネル反応段階である可能性を示唆することができたため、Ca²⁺ 放出チャネル活性に与えるフリーラジカルの直接的影響を探索した。その結果が Fig. 8 である。フリーラジカルは単一チャネル電流記録として得られるチャネル活性を増加させた (Fig. 8A)。CaM を添

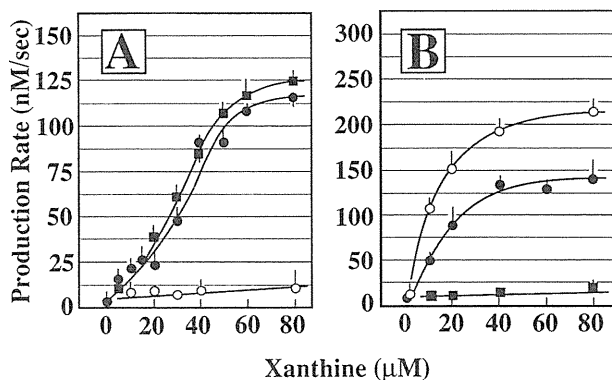


Figure 6: Rates of oxygen intermediate production by the xanthine (5-80 μM)-xanthine oxidase (0.09 U/ml) reaction in the absence (●) or presence of radical scavengers (10 μM/ml of SOD, ○; 10 μg/ml of catalase, ■). The average production rate of O₂⁻ (A) or H₂O₂ (B) during 5 min of incubation was determined by monitoring absorption during the reduction of ferricytochrome C at a wavelength of 550 nm or by monitoring the absorption at 505 nm during the oxidative coupling of H₂O₂ with 4-aminoantipyrine and phenol to yield a quinoneimine dye, respectively. Each point represents the mean ± S. E. for n = 6 determinations.

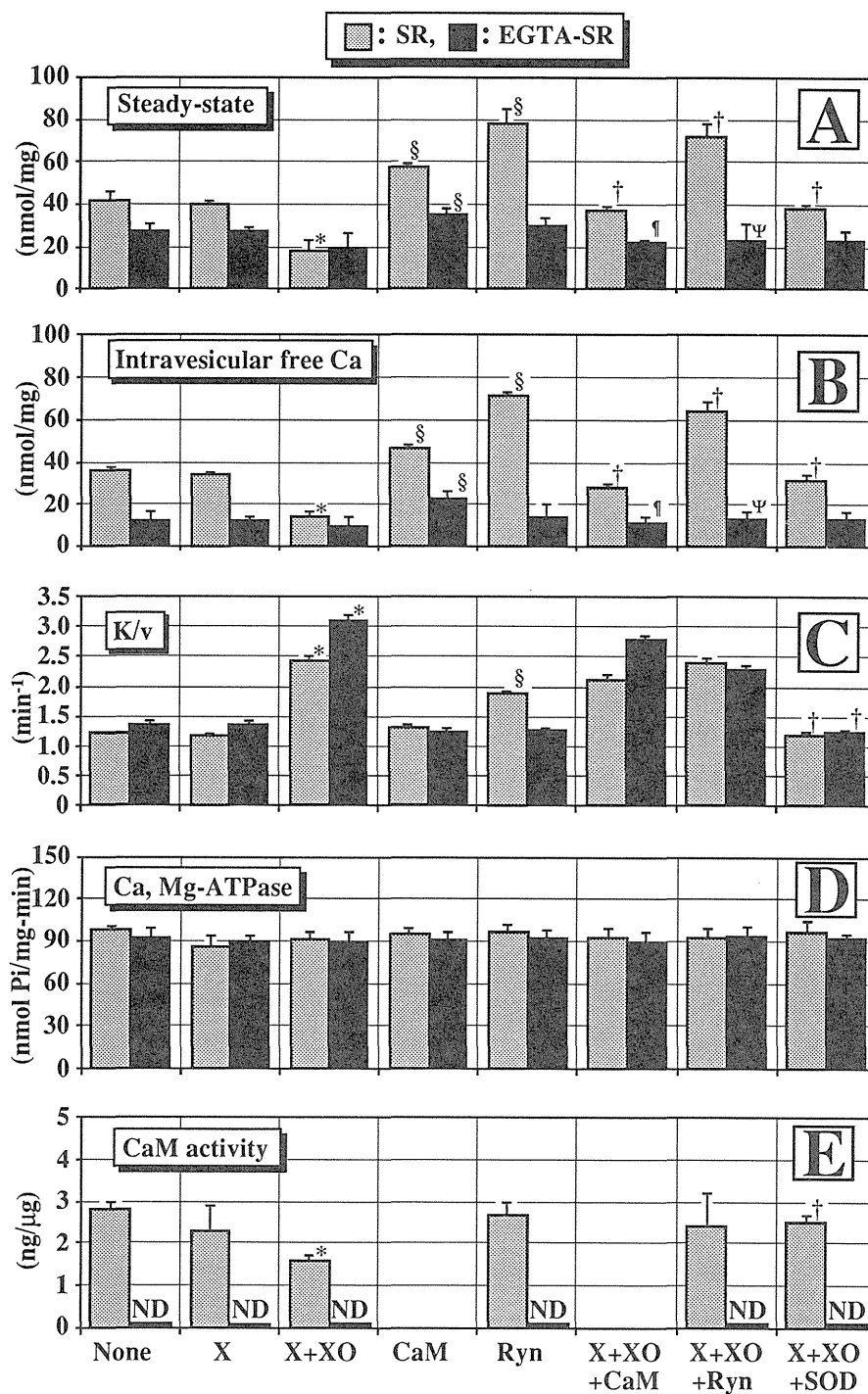


Figure 7: Effect of oxygen free radicals from the xanthine (X; 25 μ M)-xanthine oxidase (XO; 0.09 U/ml) reaction on SR Ca²⁺ flux behavior (steady-state Ca²⁺ uptake, A; intravesicular free Ca²⁺, B; passive Ca²⁺ permeability, C; and Ca²⁺-ATPase activity, D) and endogenous CaM activity (E), and effects of ryanodine (Ryn) and exogenously added CaM. The time sequence of addition was designed to ensure exposure of SR to oxygen free radicals for 1 min and SOD (10 μ g/mg) for 0.5 min before initiation of the reaction. CaM (4.0 μ g/ml) was added before the addition of SR. Ryanodine at 500 μ M was preincubated with SR for 10 min before the oxygen free radical exposure. All values are means (n = 4~8) \pm S. E. *Significantly (P < 0.01) different from X; [§]significantly (P < 0.01) different from none control; [†]significantly (P < 0.01) different from X + XO; [¶]significantly (P < 0.01) different from CaM; [§]significantly (P < 0.01) different from corresponding value for intact SR. ND indicates the CaM activity which was essentially zero.

加するとチャネル活性は抑制されるが、フリーラジカルと CaM との共存下ではほぼ対照と同程度のチャネル開口活性を示した (Fig. 8B)。一方、ryanodine (500 μ M、10分間処置) によってチャネルが閉口状態にロックされた場合には、フリーラジカルの効果がみられなくなる (Fig. 8C)。

(3) 考 察

再灌流に際して、機能的にも超微細構造的にも障害を受けやすい心筋興奮-収縮連関のコンポーネントの1つがSRである²¹⁾。SRは終末槽と縦走管の2つの部分に分かれ、この両者は形態学的そして機能的に区別される。チャネルを通過するCa²⁺放出の場が終末槽で、Ca²⁺ポンプATPaseの分布は少ない。したがって、終末槽SRのCa²⁺制御能の破綻はCa²⁺ overloadに直結する点で興味深い。

Fig. 7と8に示した実験結果から、フリーラジカルは特異的にSRのCa²⁺チャネルを通過するCa²⁺放出を増大させ、この機構にCaM制御の解除が密接にリンクしている可能性を明確にすることができた。これを支持する実験的根拠は、(1)xanthine-xanthine oxidase反応がSRのCa²⁺ポンプATPase活性に変化を及ぼすことなしにCa²⁺_iを減少させたこと、(2)xanthine-xanthine oxidase反応がSRのCaM活性を低下させたこと、(3)xanthine-xanthine oxidase反応の効果はSRがCaM活性を保持し

ている時にのみ引き出され、一方、EGTR-SRを用いた場合では、外因性にCaMを補足すると再現して認められること、(4)Ca²⁺放出チャネルの単一電流記録から、内因性CaM活性を保持するSRのチャネル活性はxanthine-xanthine oxidase反応によって増加し、さらに外因性にCaMを添加してCaM活性を補強した時にはxanthine-xanthine oxidase反応の効果が抑制されること、(5)ryanodineでチャネルを閉口状態にロックすると、xanthine-xanthine oxidaseの効果のみを見ることができなくなること、などである。Ca²⁺放出チャネルのアミノ酸一次配列で、CaM相互作用をもつ疎水結合部を乱す塩基性部の存在が知られており、CaMはこの部分でチャネル機能を制御していると考えられている²²⁾。したがって、フリーラジカルの標的をCa²⁺放出チャネル制御系に求めることの妥当性をここに見出すことができる。しかし、ここに示す結果からのみでは、CaMのCa²⁺放出チャネル制御様式やフリーラジカルとの相互の連携(単にCaMの不活性化によるのか、あるいはCa²⁺依存性リン酸化反応段階と複雑に作用しているのか)を詳細に説明することはできない。

SR膜には、Ca²⁺濃度勾配に従ったCa²⁺透過性の経路が存在している¹⁸⁾。Fig. 7Cに示すようにCa²⁺透

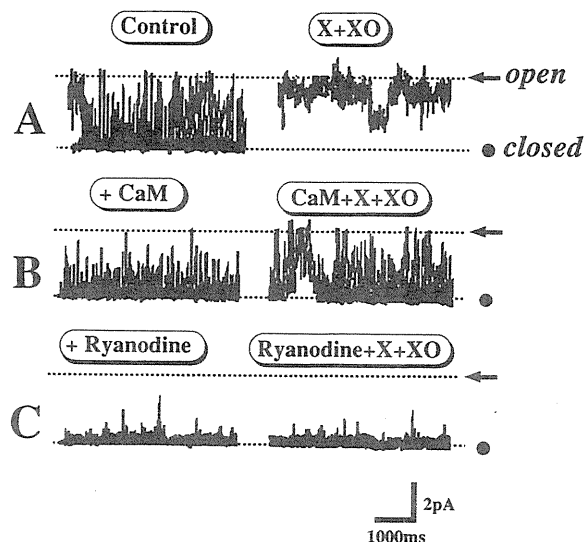


Figure 8: Effect of xanthine (X; 25 μ M)-xanthine oxidase (XO; 0.09 U/ml) reaction (A) on single-channel recordings of Ca²⁺-release channels incorporated into phospholipid bilayers, and effects of CaM (4.0 μ g/ml) (B) and ryanodine (500 μ M) (C). Representative recordings of the activity of Ca²⁺-release channels in 250 mM HEPES/125 mM TRIS with 10 μ M free Ca²⁺, pH 7.4 *cis* and 250 mM glutamic acid/10 mM HEPES with 67 mM free Ca²⁺, pH 7.4 *trans*. Upward deflections indicate channel openings. Recordings, except control studies in each experiment, were made 1 min after addition of X+XO (*cis*) with the *cis* chamber voltage-clamped at 0 mV relative to ground. CaM or ryanodine was added to *cis* chamber 1 or 10 min before the addition of X+XO, respectively.

過性の1次速度定数 K/v は、フリーラジカルと反応して増加するが、 Ca^{2+}_i とは常にパラレルに変動するとは限らず (Fig. 7B, 7C)、したがって、 Ca^{2+} 透過性は少なくとも興奮-収縮連関に与かる Ca^{2+} 流出の経路ではないと解釈するべきである。

III. まとめとその後の新しい展開

活性酸素・フリーラジカルのもつ心筋細胞障害の様式について、我々の研究室のデータを中心に議論を進めてきた。ここでのべた実験結果は、 O_2^- あるいはこれを仲介して産生されるラジカル種がSRのチャネルを通過する Ca^{2+} 放出を増大させることを明確に示しているとともに、 Ca^{2+} 放出増大に基づく Ca^{2+} overload が再灌流不整脈発現にリンクする心筋細胞レベルでの自動反復放電を導くことを強く支持している。

これまでの一連の研究から、活性酸素・フリーラジカルの標的がCaMによる Ca^{2+} 放出チャネル制御系であると推定できたが、詳細なメカニズム解明には至っていない。最近、 Ca^{2+} 放出チャネルに対する O_2^- の作用メカニズムに、ryanodine 受容体 (Ca^{2+} 放出チャネル) の内因性アゴニスト cyclic ADP-ribose (cADPR) が関与する可能性を見出した (未発表)。cADPRは β -NAD⁺ を基質としてADP-ribosyl cyclaseによって産生される。SR内の Ca^{2+} 量は外向きの Ca^{2+} ポンプ活性と Ca^{2+} 放出チャネル活性に依存して減少するので、外向きの Ca^{2+} 放出チャネルが作動しない条件で予め Ca^{2+} を負荷したSRの内腔 free Ca^{2+} 量 (Ca^{2+}_i) を決定すれば、その減少は間接的に Ca^{2+} 放出チャネル活性を反映することになる。 β -NAD⁺ は Ca^{2+}_i に影響を及ぼさなかったが、cADPRはCaM抑制性に Ca^{2+}_i を減少させた。またcADPRの効果はxanthine-xanthine oxidase反応によって増強を受け、かつcADPRアンタゴニストである8-amino-cADPRで阻止することが可能であった。したがって、Fig. 9に示すように内因性 Ca^{2+} 放出チャネルアゴニストcADPR、内因性 Ca^{2+} 放出チャネル抑制物質CaM、そして活性酸素・フリーラジカル相互の連携が Ca^{2+} overloadへの引き金をひくことになろう。これらの事実は、 O_2^- のSR Ca^{2+} 放出チャネルに対する効果に特異性があることを示唆するとともに、活性酸素・フリーラジカルを単なる細胞障害性因子として位置づけることの危険性を示唆することにもなるのである。

文 献

- 1) Romson, J. L., Hook, B. J., Kunkel, S. L., Abrams, G. D., Schork, M. A. & Lucchesi, B. R.: Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, **67**: 1016-1023, 1983.
- 2) Manning, A. S. & Hearse, D. J.: Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**: 497-518, 1984.
- 3) Balke, C. W., Kaplinsky, E., Michelson, E. L., et al.: Reperfusion ventricular tachyarrhythmias: correlation with antecedent coronary artery occlusion tachyarrhythmias and duration of myocardial ischemia. *Am. Heart J.*, **101**: 449-456, 1981.
- 4) Tzivoni, D., Keren, A., Granot, H., et al.: Ventricular fibrillation caused by myocardial reperfusion in Prinzmetal's angina. *Am. Heart J.*, **105**: 323-325, 1983.
- 5) Myerburg, R. J., Kassler, K. M., Mallon, S. M., et al.: Life-threatening ventricular arrhythmias in patients with silent myocardial ischemia due to coronary artery spasm. *N. Engl. J. Med.*, **326**: 1451-1455, 1992.
- 6) The European Myocardial Infarction Project Group: Prehospital thrombolytic therapy in patients with sus-

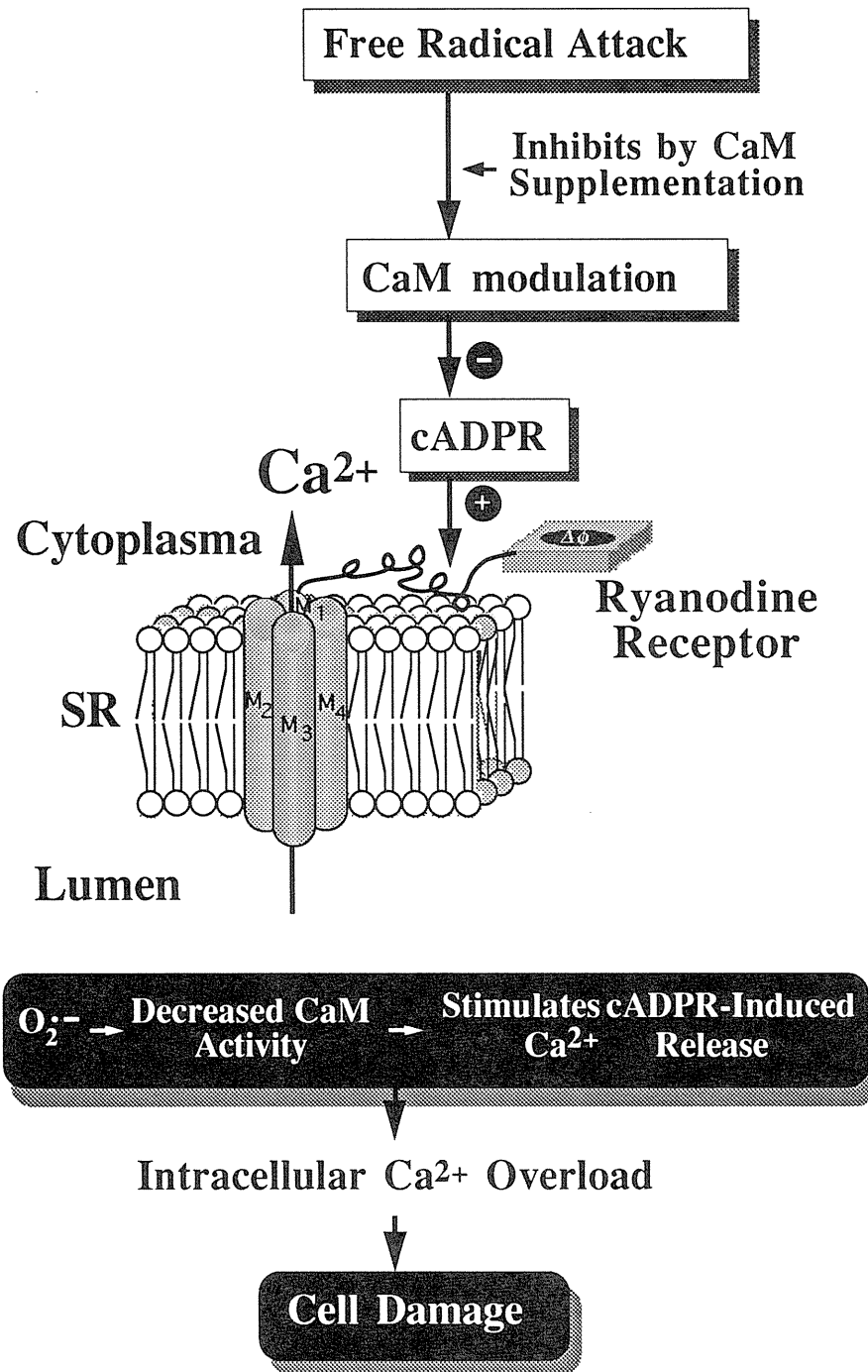


Figure 9: Modulation of the gating of the ryanodine receptor-channel complex by calmodulin (CaM) and cyclic ADP-ribose (cADPR), and effect of oxygen free radicals on the processes linked to Ca²⁺ overload.

pected acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, **329**: 383-389, 1993.

- 7) Hearse, D. J. & Bolli, R.: Reperfusion-induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc. Res.*, **26**: 101-108, 1992.
- 8) Hearse, D. J. & Tosaki, A.: Free radicals and calcium: simultaneous interacting triggers as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrhythmias in rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **20**: 213-223, 1987.
- 9) Manning, A. S.: Reperfusion-induced arrhythmias: do free radicals play a critical role? *Free Radic. Biol. Med.*, **4**:

305-316, 1988.

- 10) Walker, M. J. A., Curtis, M. J., Hearse, D. J., et al.: The lambeth conventions: guideline for the study of arrhythmias in ischemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc. Res.*, **22**: 447-455, 1988.
- 11) Elbrich, G. M., McCarthy, C. A. & Hurst, J. K.: Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**: 210-215, 1981.
- 12) Omar, B. A., Gad, N. M., Jordan, M. C., et al.: Cardioprotection by Cu, Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. *Free Radic. Biol. Med.*, **9**: 465-471, 1990.
- 13) Duran, N.: Singlet oxygen in biological processes. *In* Adam, G & Cilento, G.: *Chemical and Biological Generation of Excited States*, pp. 345: Academic Press, New York, 1982.
- 14) Kukreja, R. C., Okabe, E., Schrier, G. M. & Hess, M. L.: Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**: 447-457, 1988.
- 15) Erickson, M. C. & Hultin, H. O.: Influence of histidine on lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**: 427-432, 1992.
- 16) Okabe, E., Sugihara, M., Tanaka, K., Sasaki, H. & Ito, H.: Calmodulin and free oxygen radicals interaction with steady-state calcium accumulation and passive calcium permeability of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **250**: 286-292, 1989.
- 17) Okabe, E., Kuse, K., Sekishita, T., Suyama, N., Tanaka, K. & Ito, H.: The effect of ryanodine on oxygen free radical-induced dysfunction of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**: 868-875, 1991.
- 18) Okabe, E., Odajima, C., Taga, R., Kukreja, R. C., Hess, M. L. & Ito H.: The effect of oxygen free radicals on calcium permeability and calcium loading at steady-state in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.*, **34**: 388-394, 1988.
- 19) Filburn, C. R. & Kam, J.: An isotopic assay of cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase with aluminum oxide columns. *Anal. Biochem.*, **52**: 505-516, 1973.
- 20) Rousseau, E., Smith, J. S., Henderson, J. S. & Meissner, G.: Single channel and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophys. J.*, **50**: 1009-1014, 1986.
- 21) McCallister, L. P., Daiello, D. C. & Tyers, G. F. O.: Morphometric observations of the effects of normothermic ischemic arrest on dog myocardium ultrastructure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **10**: 67-80, 1978.
- 22) Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., et al.: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*, **339**: 439-445, 1989.

I. はじめに

活性酸素は、炎症、癌、虚血後の酸化障害などの疾患に深く関与していることが知られているが、近年では日焼け、光毒性、光アレルギーといった紫外線による皮膚障害やアトピー性皮膚炎、乾せんなどの皮膚疾患への関与も示唆されており、皮膚科領域においても活性酸素による障害が注目されてきている。

皮膚は身体の最外層にあり、常に酸素に接触し紫外線に暴露される上に皮脂や光感作物質が存在するため、紫外線により発生する活性酸素やそれにより生成した過酸化脂質を巻き込んだ酸化的損傷が起こりやすい^{1,2,3)}。

紫外線により発生する活性酸素は種々知られているが、常に紫外線を浴びている皮膚での反応を考える場合、光増感反応により容易に発生する一重項酸素は他の活性酸素に比べ、皮膚障害へ深く関与していると考えられる^{1,4)}。

一重項酸素は、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシド、過酸化水素等の活性酸素種には見られない特異的な反応性を示すため、生体で発生した場合にも他の活性酸素とは異なる作用を引き起こすと考えられる。特に光が関与する様々な反応において一重項酸素は、その高い反応性と毒性の面から光化学的ダメージの重要な活性中間体と推定される例も多く、例えばポルフィリアの光過敏症、テトラサイクリンによる光毒性、癌の光療法などの活性種として重視されている。

しかし、これまで一重項酸素は他の活性酸素に比べると、その生体での反応性については明確な研究成果がほとんど報じられていない。その大きな原因の一つは、一重項酸素の検出方法として特異性、感度を兼ね備えた信頼性の高いものが確立されていなかったことが挙げられる^{5,6)}。実際、前述のポルフィリアの光過敏症、テトラサイクリンによる光毒性等の特別な例を除いては、生体で一重項酸素が検出されたり、明確な反応活性種であることが証明された例はほとんどなかった。これは従来の一重項酸素の検出のほとんどが化学発光法や消去剤を用いた間接的な方法に基づいており、必ずしも他の活性酸素種の関与を否定できる特異性の高いものではなかったことに起因している。これらに対して、一重項酸素の ${}^1\Delta_g \rightarrow {}^3\Sigma_g^-$ 遷移に伴う1268 nmの発光を直接検出する方法は最も信頼性の高い方法である。我々は一重項酸素の高感度近赤外検出装置を製作し、種々の化合物からの一重項酸素の直接的検出を試みている。ここでは健康人皮膚表面で一重項酸素の発生源となる光増感物質について触れ、一重項酸素の関与する皮膚障害を我々が進めている研究内容を中心に紹介する。

II. 一重項酸素の測定

光増感剤溶液にレーザー光を照射すると一重項励起状態 ($S_1, {}^1\Delta_{g(0)}$) になる。その一部は系間交差により三重項励起状態 (T_1) になり、基底状態の三重項酸素 (3O_2) にエネルギーを移動させ一重項酸素を発生させる。一重項酸素はすぐに安定な基底状態に戻るが、このときに発する光を直接検出するのが我々の製作した装置の原理である (Fig. 1)。

一重項酸素の発光には種々の波長の光があるが、その中でも比較的強度が高く他の生体成分由来の発光との区別が可能な1268 nmの発光をゲルマニウムダイオードを用いた検出器で検出した。

III. ポルフィリンによる一重項酸素発生検出⁷⁾

ヒトの皮膚表面には多くの細菌が棲息し、皮膚細菌叢を形成している。その中でも常に高頻度で検出される常在菌は、皮膚に対して何らかの作用を及ぼし皮膚状態とも深く関連していることが推測される。皮

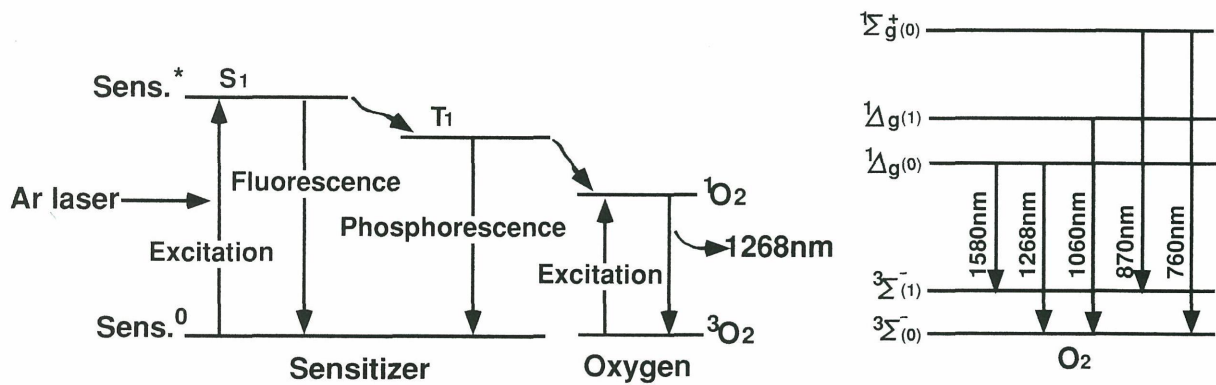


Fig. 1 Detection of Singlet Oxygen Emission at 1268 nm

Singlet oxygen was generated by photosensitized reaction and a near-infrared emission spectrum was obtained corresponding to the $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-)$ transition.



Fig. 2 Observation of Fluorescence of *P.acnes* Porphyrin on the Skin Surface by Wood's Ultraviolet Light

膚の主常在菌である *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) は、嫌気性菌で脂腺の中に棲息し、にきびの発生に深く関与しているとともに、代謝産物としてコプロポルフィリンやプロトポルフィリンのポルフィリン類を皮膚表面に排出することが知られている。これらのポルフィリンは皮脂の分泌とともに、皮膚表面へ移動するが、実際に健康人顔面に暗室下で紫外線ランプを照射するとポルフィリン由来の蛍光が観察され、その存在が確認できる (Fig. 2)。

皮膚から採取した *P.acnes* を培養して代謝産物として排出されたポルフィリンの抽出、分離を行ったところ、吸収スペクトルの λ_{max} が400 nm であり、500~600 nm にポルフィリンに特徴的な吸収ピークを有すること、最大励起波長で励起したときの蛍光スペクトルがコプロポルフィリンのそれと一致することから、得られたポルフィリンの殆ど全てがコプロポルフィリンであることがわかった (Fig. 3)。

この *P.acnes* 由来のポルフィリンの皮膚表面での蛍光は、*P.acnes* の分布状態やアクネ患者に対する抗生物質投与の効果を観察する非破壊的な手段としては皮膚科領域でも利用されていたが、活性酸素の発生源としてはこれまで捉えられていなかったようである。しかし、このコプロポルフィリン溶液を一重項酸素発生測定試料とし、この溶液に紫外部のレーザー光を照射したところ、一重項酸素由来の1268 nm における発光が検出され (Fig. 4)、その発光強度はコプロポルフィリンの濃度に依存していた (Fig. 5)。

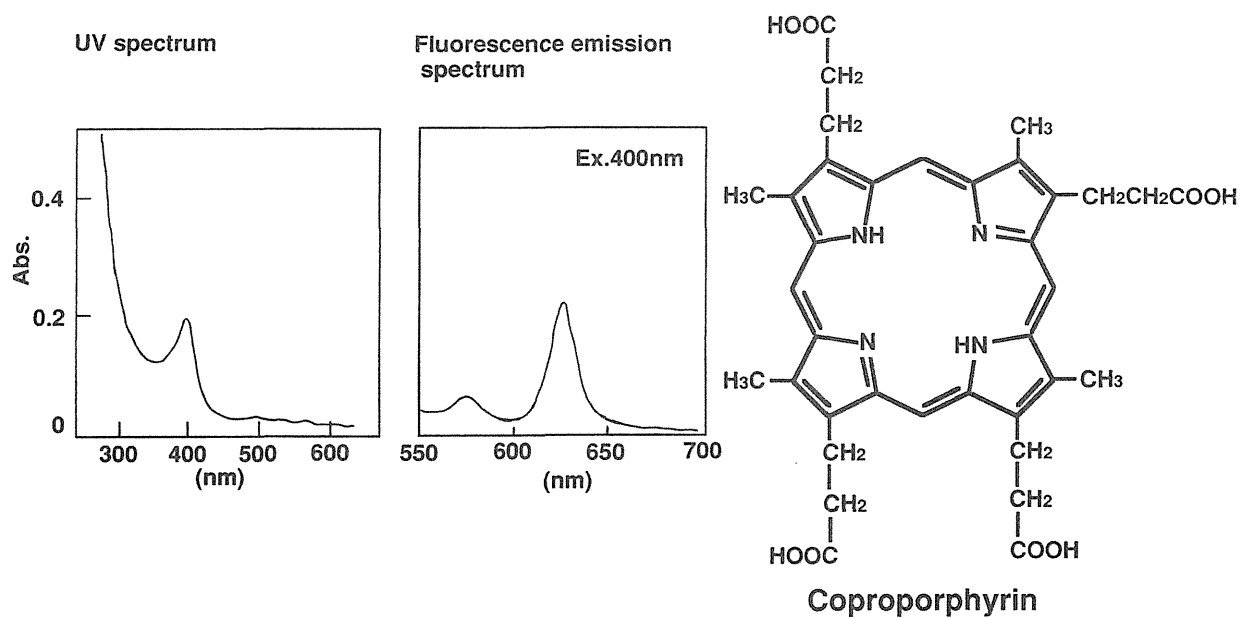


Fig. 3 UV Spectrum and Fluorescence Emission Spectrum from *P.acnes* Porphyrin
P.acnes from the skin surface was cultured under the anaerobic condition and porphyrin produced by *P.acnes* was extracted by acetone.

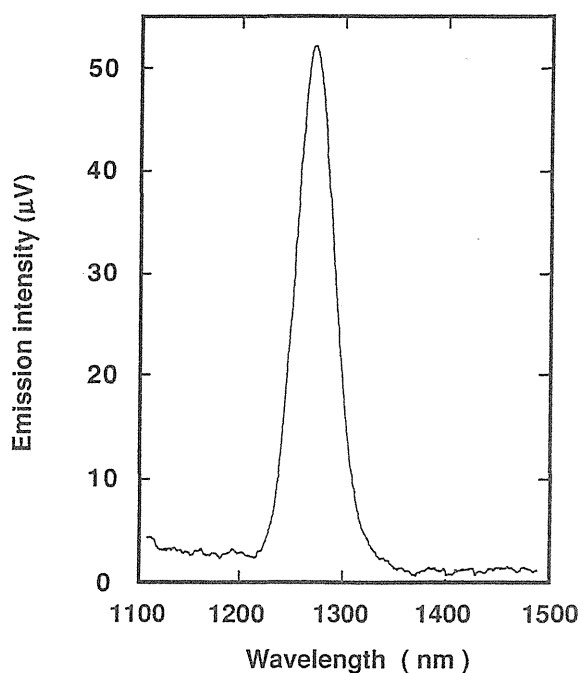


Fig. 4 Near-Infrared Singlet Oxygen Emission Spectrum in *P.acnes* Porphyrin Aceton Solution Excited by Ar Laser Light at UV-A region with 40 mW Output Power

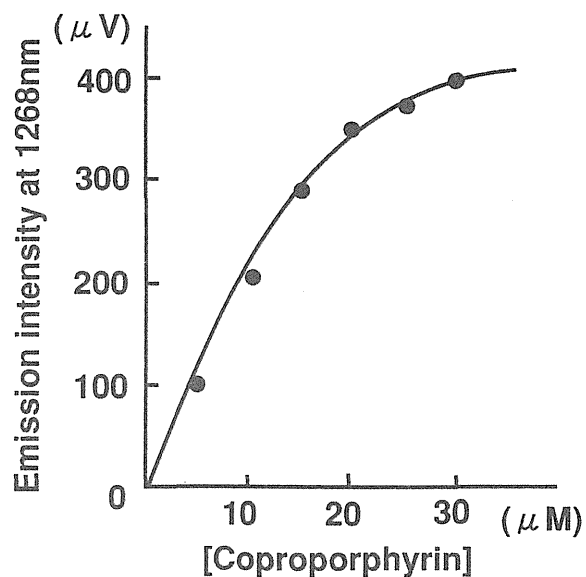


Fig. 5 Effect of Coproporphyrin Concentration on the Singlet Oxygen Emission at 1268 nm

Singlet oxygen generation in coproporphyrin methanol solution (5-30 μM) excited by Ar laser light at UV-A region with 100 mW output power was monitored by measuring the emission intensity at 1268 nm.

さらに紫外線領域におけるその発光強度は、光増感剤として良く用いられているリポフラビンやローズベンガルより極めて多く、ヘマトポルフィリンと同等量であることから、一重項酸素発生能が極めて高い光増感剤が実際に皮膚表面に存在していると言える (Fig. 6)。これまでポルフィリア症等の特殊な場合にのみ一重項酸素の関与が証明されていたが、*P.acnes* 由来のポルフィリンが紫外線照射により一重項酸素を発生するという事は、生理的条件下の健康人皮膚においても一重項酸素が発生し得ることを示唆するものであり、これまで一重項酸素とは無関係と思われてきた皮膚を反応の場とする様々な事象や疾病への一重項酸素の関与が今後明らかになっていくのではと期待される。

IV. 一重項酸素による皮表脂質の過酸化⁷⁾

IV-1 一重項酸素とスクワレンとの反応速度定数の測定

P.acnes の産生したポルフィリンは皮脂の分泌とともに皮膚表面に移動することは既に述べた。また皮脂腺は掌や足の裏を除く身体全体に分布し、特に顔面には多くその数は400-900個/cm² にもものぼると報告されている。皮表脂質のほとんどはこの皮脂腺由来の脂質であり、その構成はトリグリセライドとその分解物である脂肪酸等が60%、ワックスエステルが25%そしてスクワレンが10%となっている⁸⁾。これらの横成脂肪酸のほとんどは飽和あるいは二重結合が一つであり酸化安定性に優れているため、スクワレンが最も酸化されやすいと考えられる。そこで、まず一重項酸素とスクワレンとの反応速度定数を求め、他の皮表脂質成分のそれと比較した。コプロポルフィリン溶液に紫外線を照射すると一重項酸素が検出され、その発光強度はスクワレンの添加濃度に依存して減少した。その結果を Stern-Volmer 式に従いプロットし、得られた直線の傾きから反応速度定数を求めた結果、他の皮表脂質構成成分と比較するとスクワレンは極めて一重項酸素と反応しやすいことが確認された (Fig. 7)。

IV-2 スクワレンペルオキシドの定量

慢性障害と関係が深い過酸化脂質の生成と蓄積は、紫外線照射後や日光露光部、また老化によっても増加することが報告されている。また、皮膚表面での過酸化脂質の生成や、過酸化脂質と疾病との関連を示唆する報告は古くからなされているが、その生成メカニズムに関する報告はほとんど見られない。筆者らの実験では、過酸化脂質は紫外線照射のみでは生成せず、コプロポルフィリン存在下、発生する一重項酸素によって速やかに生成することがわかった (Fig. 8)。

紫外線による脂質の過酸化反応は一重項酸素を介する反応だけではないが、これまでに報告されている皮膚表面のスクワレンペルオキシドの量と筆者らの実験で生成したスクワレンペルオキシドの量がほぼ等

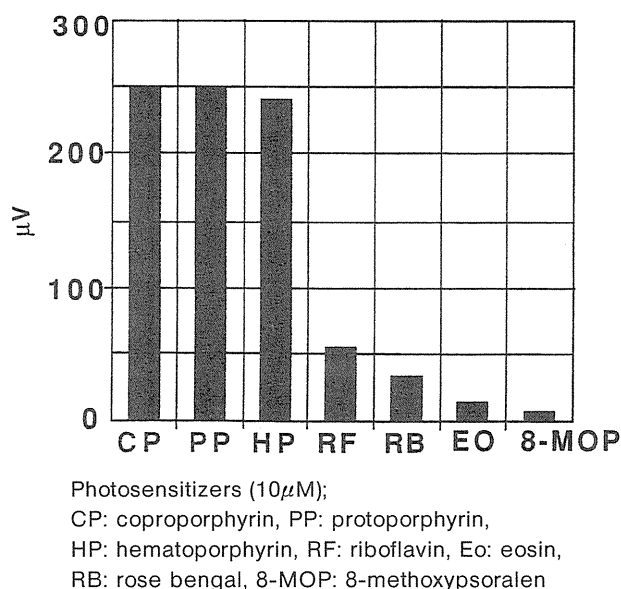


Fig. 6 Comparison of Emission Intensities of Singlet Oxygen Produced by Various Photosensitizers under UV-A

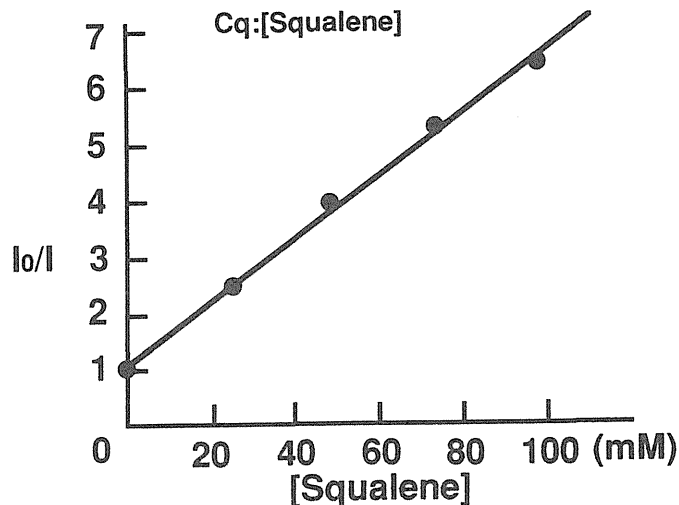
The emission intensity at 1268 nm was measured in the chloroform/methanol solution of a photosensitizer at the concentration of 10 μM, excited by Ar laser light at UV-A region with 35 mW output power.

Stern-Volmer Prot

$$I_0/I = 1 + kq \tau Cq$$

τ : life time of singlet oxygen
in CHCl₃/CH₃OH=1/1= 10~20 μ s

Cq:[Squalene]



Substrate	kq (M ⁻¹ s ⁻¹)
Squalene	2.8~5.6x10 ⁶
Oleic acid	1.3x10 ⁵
Cholesterol	1.8x10 ⁴

Fig. 7 Determination of Rate Constant of the Reaction of Singlet Oxygen with Squalene

Singlet Oxygen generation in coproporphyrin (100 μ M) chloroform/methanol solution was monitored with or without squalene (0-97 μ M) by measuring the emission at 1268 nm, excited by Ar laser light at UV-A region with 40 mW output power. The Stern-Volmer plot for the ratio of the emission intensity with (I) or without (I₀) squalene is $I_0/I = 1 + Kq\tau Cq$.

しいことや、実際皮膚表面ではスクワレンのような脂質と *P.acnes* 由来のコプロポルフィリンが共存していることを考えると、紫外線による皮表脂質の過酸化反応には一重項酸素の寄与が大きいと予想される。

V. 一重項酸素によるコラーゲンの架橋形成⁹⁾

コラーゲンは肌の弾力性や柔軟性に関与している真皮の重要な構成成分である。しかし、コラーゲンは生体内での代謝回転が遅いため、様々な化学修飾を受けやすい。そのため加齢と共に形成される架橋が老化現象の一因ではないかとも言われており、メイラード反応生成物の蓄積等と共に老化の指標として取り上げられている。その架橋の種類については

ピリノリジン等の非還元性架橋やメイラード反応生成物類似の蛍光特性を持つ物質等の存在が報告されているが、著者らの実験では一重項酸素がこれらの架橋とは異なる架橋を速やかに形成することがわかった。

すなわち、紫外線を照射しただけではコラーゲンに架橋は形成されないが、光増感剤存在下紫外線を照射すると光増感剤の濃度に依存して、つまり発生している一重項酸素の量に依存して速やかに架橋が形成されることがわかった (Fig. 9)。

また紫外線は一重項酸素以外にもスーパーオキシドなどの活性酸素を発生しうることが知られており、

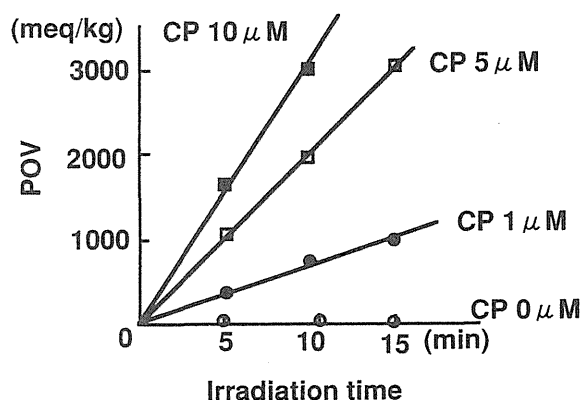


Fig. 8 Peroxidation of Squalene by Singlet Oxygen Produced by Coproporphyrin

Squalene chloroform/methanol solution (5 mM) was irradiated with UV-A (1.7 mW/cm²) by solar simulator with coproporphyrin (0-10 μ M) and POV was measured at the indicated time.

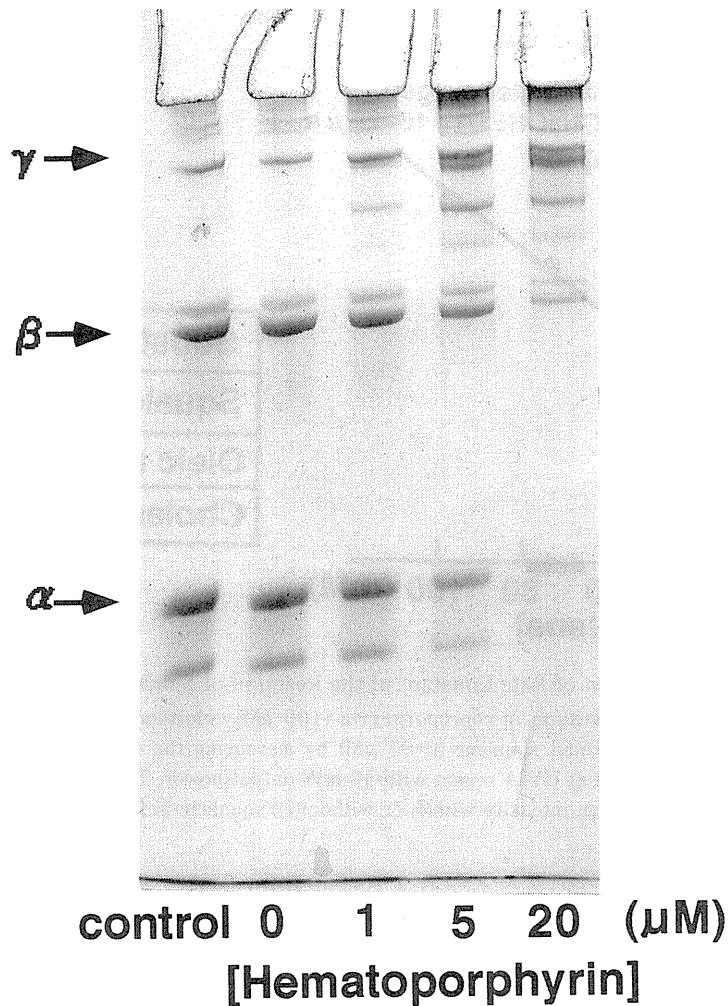


Fig. 9 Cross-linking of Collagen by Hematoporphyrin-photosensitized Singlet Oxygen

それらの活性酸素もコラーゲンの架橋形成に関与している可能性があると考えられる。そこで一重項酸素以外の活性酸素の関与について検討したところ、スーパーオキシドの消去酵素であるSODやヒドロキシラジカルの除去剤であるマンニトールを加えても架橋形成は阻害されなかった。従って、この架橋形成には一重項酸素以外の活性酸素種であるスーパーオキシドやヒドロキシラジカルは関与していないといえる (Fig. 10)。スーパーオキシドやヒドロキシラジカルはタンパクの断片化を引き起こすことがこれまでに報告されているが、一重項酸素はこれらとは異なり架橋形成を起こすという興味深い結果であった。

VI. おわりに

紫外線による皮膚障害については、紫外線のエネルギーによる直接的な障害も種々の共同作用で間接的に起こるものも一様に扱われてきたが、その障害の原因に実際は紫外線により発生する一重項酸素を中心とした活性酸素が関与している場合も多いのではないかとと思われる。今後紫外線による皮膚障害や皮膚老化の解明及びその防御についての研究を進めるにあたり、ますます活性酸素の重要性が増すと考えている。

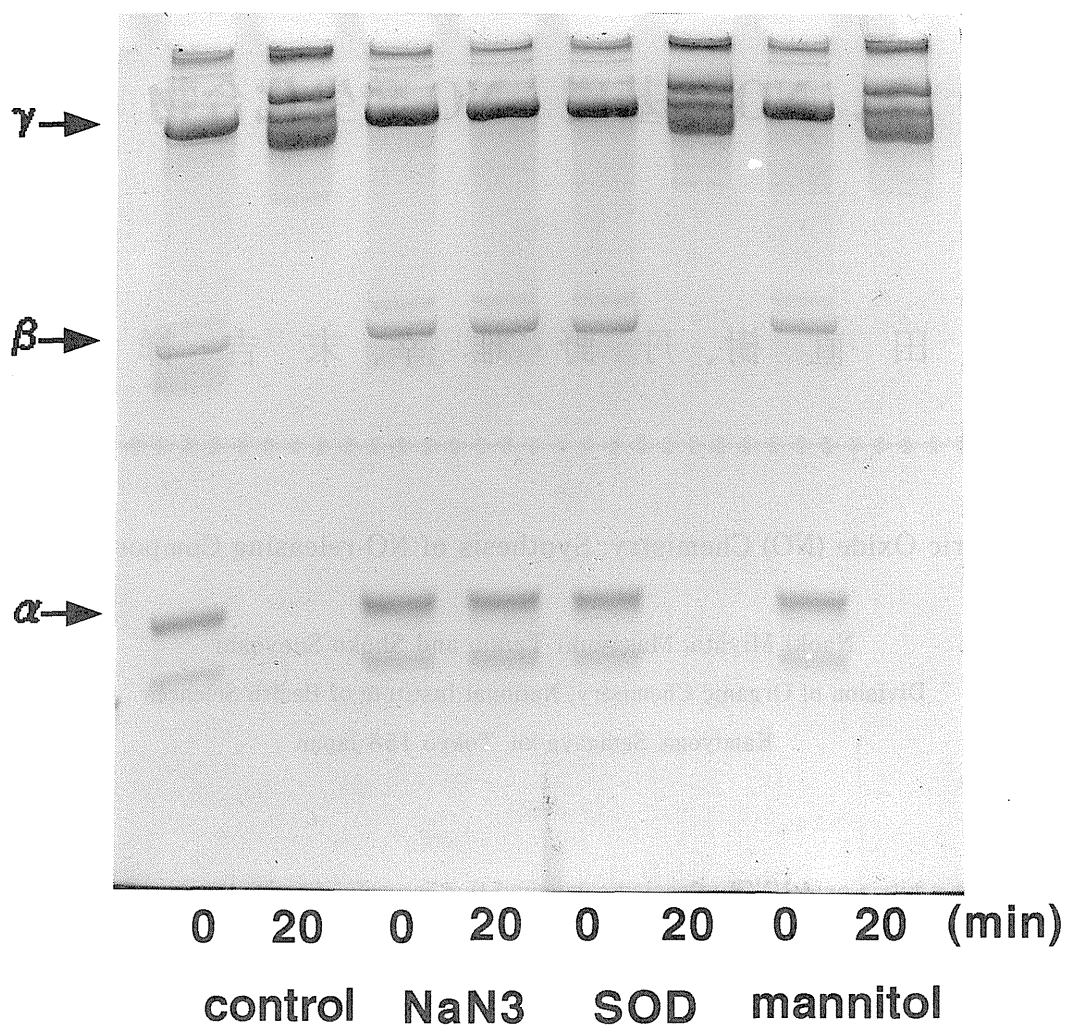


Fig. 10 Effect of Various Quenchers for Active Oxygen Species on Cross-Linking

VII. 参考文献

- 1) 伊藤 敦：紫外線による活性酸素の生成、活性酸素・フリーラジカル、4: 6-12, 1993.
- 2) 小倉良平、杵山正康：紫外線と活性酸素・フリーラジカル、活性酸素・フリーラジカル、3: 270-277, 1992.
- 3) 上田 宏：過酸化脂質と皮膚疾患、活性酸素・フリーラジカル、3: 291-297, 1992.
- 4) 松尾聿朗、大城戸宗男：皮表脂質の光増感酸化と光線過敏症、日本化粧品科学会誌、10: 138-140, 1986.
- 5) 牛島義雄：一重項酸素の測定法、活性酸素-科学・生物学・医学、医歯薬出版社、127-138, 1987.
- 6) 中野 稔：一重項酸素と発光、活性酸素と発光、日本医学館、47-54, 1990.
- 7) 笠 明美、荒金久美、林千賀子、増永卓司、新本浩一、長野哲雄、廣部雅昭、益子信郎：*Propionibacterium acnes* 由来ポルフィリンによる一重項酸素の産生と皮表脂質の過酸化、日本化粧品科学会誌、19: 1-6, 1995.
- 8) 旭 正一：皮膚の機能、皮膚科学、南山堂、26, 1990.
- 9) 笠 明美、荒金久美、増永卓司、新本浩一、長野哲雄、廣部雅昭、益子信郎：一重項酸素によるコラーゲンの重合、粧技誌、28: 163-171, 1994.



1. NO の基礎：NO 発生化合物

宮田 直樹、丹野 雅幸、末吉 祥子



Nitric Oxide (NO) Chemistry: Synthesis of NO-releasing Compounds

Naoki Miyata, Masayuki Tanno and Shoko Sueyoshi

Division of Organic Chemistry, National Institute of Health Sciences

Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158 Japan

Abstract

To develop a nitric oxide (NO)-releasing compound that is useful for the chemical and biochemical research of the action of NO, we synthesized a series of *N*-nitrosoureas and *N*-nitrosamides which liberates NO by their self-decomposition. The evidence for NO generation from these *N*-nitroso compounds comes from the formation of a nitrosyl metal complex. A comparison of the NO-releasing ability of these *N*-nitroso compounds by using the Griess-Salzmann method showed that the aromatic *N*-nitroso compounds are good candidates for an NO-donor.

We also synthesized several *N*-hydroxyamidino compounds which are analogs of *N*^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA, a key intermediate in the biosynthesis of NO from L-arginine). The generation of NO from these *N*-hydroxyamidino compounds by chemical oxidation was 1-3 fold higher compared with that from NOHA.

1. 緒言

工業の発達に伴い大気中に放出される汚染物質として、塵埃、灰、炭化水素等とともに硫黄酸化物や窒素酸化物等が増加の傾向にある。燃料に含まれる含窒素化合物の燃焼により窒素酸化物が発生するが、その時空気中の窒素も酸素と反応して窒素酸化物が生成する。近年は、屋外における工場排気ガスや自動車の排気ガスによる汚染ばかりではなく、暖房装置などの普及による屋内窒素酸化物の増大も問題になっている。

窒素酸化物は一般に NO_x と記し、一酸化窒素 (NO)、二酸化窒素 (NO₂)、一酸化二窒素 (N₂O)、三

酸化二窒素 (N_2O_2)、五酸化二窒素 (N_2O_5) 等がある。しかし、實際上問題になるのはラジカル活性種である NO と NO_2 である。 NO_2 は、吸入されると呼吸器系の障害を伴い貧血症を引き起こす。これは、 NO_2 がヘモグロビンと結合し易いためである。また、大量の窒素酸化物が肺から吸収されると硝酸イオン、亜硝酸イオンになり、重篤な炎症を起こす。ヒトは 100-150 ppm の NO_2 を 30分以上吸入すると危険であると言われている。さらに、亜硝酸塩は、生体アミンと反応して発がん性の *N*-ニトロソアミン類を作ることも知られている。

窒素酸化物の一つである NO は、燃焼や微生物活動により環境中に大量に放出されている。しかし、NO は大気中で容易に NO_2 に酸化されるので、環境汚染物質としての NO に関する研究はほとんどなく、窒素酸化物の研究は、専ら NO_2 がその主な対象となってきた。しかし、近年、

(1) NO は、 NO_2 に比べ多量に空気中に放出されていること、

(2) 大気中で観測されるような NO 濃度では、NO の NO_2 への酸化が NO の主要な分解過程とはならないこと、

(3) NO は、活性酸素種等と反応し、種々の短寿命活性物質が生成すること、等が明らかになり、NO 及び NO に由来する多様な短寿命活性物質について、ヒトへの影響を評価するための化学的及び生化学的方法を開発することが急務となっている。

一方、近年 NO が生体内で NO 合成酵素 (NOS) により産生され、血小板凝集阻止作用や血管弛緩作用など多様な生理作用に関与していることが明らかになり、NO の生理作用の解明に関する精力的な研究が展開されている。

NO の研究における最大のネックは、NO ガスの取り扱いにある。高純度の NO ガスは空気中の酸素と容易に反応し NO_2 に酸化されるため、高い酸素濃度では NO の寿命は短く、定量的な取扱いが難しい。NO 及び NO に由来する種々の短寿命活性物質が生体を与える作用の予測や評価を目的とした諸実験を遂行するためには、NO ガスに替わる簡便で効率的な NO の発生方法が必要となる。この解決法の一つとして、NO を効率よく発生する化合物、すなわち、NO 発生化合物の利用が重要となる。

NO 発生化合物は三つのグループに分けられる。第1のグループは、生体内で NO 産生系に作用し NO 産生を促進する化合物 (NO 産生促進化合物) であり、血管内皮やマクロファージに作用するアントラキノン誘導体やフラボン誘導体が知られている。第2のグループは、生体内で代謝活性化されて NO 発生化合物になり NO を発生する化合物 (代謝型 NO 発生化合物) であり、抗狭心症薬または冠血管拡張薬として古くから利用されてきたニトログリセリンや NOS の基質である L-アルギニンなどがこのグループに属する。第3のグループは、代謝活性化を受けることなく化合物自体が自己分解して NO を発生する化合物 (NO 自発発生化合物) であり、S-ニトロソチオール誘導体やアミン-NO 複合体などが知られている。

生体内の特定の部位で、あるいは特定の生理条件下で、目的に応じて必要量の NO を発生する化合物 (NO 発生化合物) が開発されれば、NO の研究が飛躍的に促進されるばかりでなく、薬としての利用も期待できる。

本報文では、NO 自発発生化合物および代謝型 NO 発生化合物の合成と作用について報告する。

2. NO 自発発生化合物の構造設計

NO ガスは不安定で、かつ少量扱うのは極めて困難なため、NO ガスの代用品となる NO 自発発生化合

物の構造設計を行った。ここでは、NO 自発発生化合物は常温で NO を放出する結晶性個体に限定した。NO 自発発生化合物の分子設計に際しては、高温で NO を遊離することが報告されている *N*-ニトロソジフェニルアミンの化学的性質に注目した。*N*-ニトロソジフェニルアミンをトルエン中で還流すると、2-および4-ニトロソジフェニルアミンが生成する。この反応では、まず最初に熱によりその N-NO 結合がラジカル的に解裂しアミニルラジカルと NO になり、ついで生成した NO が更に酸化され NO₂ となり、この NO₂ がアミニルラジカルの 2 位又は 4 位の水素を引き抜いた結果、2-及び 4-ニトロソジフェニルアミンが生成する。一方、*N*-メチル-*N*-ニトロソアニリンと第二級アミンの反応ではニトロソ基の移動反応が起こり *N*-ニトロソアミンが生成するが、この場合も中間に NO が生成していると考えられる。そこで、これら芳香族ニトロソアミン類の立体配座を ¹³C-NMR で調べた。その結果、*N*-ニトロソジフェニルアミンや *N*-メチル-*N*-ニトロソアニリンはニトロソ基と結合しているアミン窒素上の電子が芳香環と共役するような図 1 に示す構造をとることが判明した。一方、この共役効果を妨げるような配座をとる化合物として *N*-*tert*-ブチル-*N*-ニトロソアニリンがあるが、これらの *N*-ニトロソ化合物の三次元分子構造解析結果は、既に報告されている電子スペクトルの解析結果とよく一致し、前者の配座をとる場合に N-NO 結合は不安定になり、NO を遊離し易くなると予測される。

N-メチル-*N*-ニトロソアニリンや *N*-ニトロソジフェニルアミンは室温で安定な化合物であり、NO を速やかに発生する化合物とは言えない。そこで、アミンより塩基性の低いアミドや尿素のニトロソ誘導体について、先に述べた配座を考慮しながら NO を発生する化合物の構造設計を行った。その結果、室温付近で NO を発生する基本構造として、芳香族 *N*-ニトロソアミンにアミド基あるいはアシル基を導入した *N*-ニトロソ尿素構造、および *N*-ニトロソアミド誘導体構造を見出した。化学反応性解析実験、及び、核磁気共鳴装置などの構造解析機器を用いた三次元構造解析実験により、フェニル環のオルト位またはパラ位に置換基を導入したり、尿素誘導体ではウレイドの N³ 位のアシル置換基を変化させることにより、アミン窒素上の電子が芳香環と共役する構造をとり易くなり、その結果、N-NO 解裂が促進され NO が発生しやすくなると推定した。

3. NO 自発発生化合物の合成

一般に、置換ニトロソ尿素、ニトロソアセトアニリド及びニトロソアニリン等は、それぞれ相当する尿素、アセトアニリド、アニリン類をニトロソ化することにより得られる。ニトロソ化の方法はいくつか知られており、通常次の 3 種類の方法が用いられる。

A 法：相当する塩基（アミン、尿素類）を塩酸酸性条件下で亜硝酸ナトリウムの水溶液でニトロソ化する方法。

B 法：酸性下、亜硝酸エステルでニトロソ化する方法。

C 法：N₂O₄ や N₂O₃ のような窒素酸化物や NOCl のようなニトロソ化剤でニトロソ化する方法。

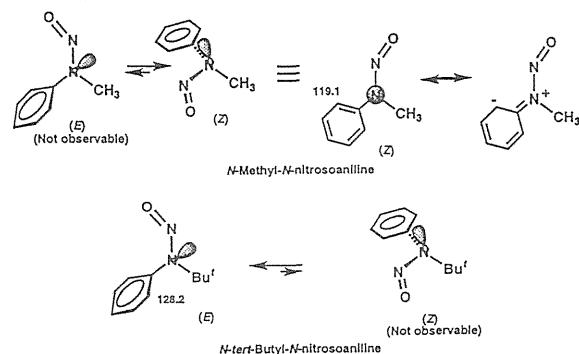


図 1 *N*-アルキル-*N*-ニトロソアニリンの立体配座とフェニル環の 2 位又は 6 位炭素の ¹³C-NMR ケミカルシフト

今回、芳香族ニトロソ尿素類の合成をA法またはB法で行ったところ、目的とするニトロソ体が生成しないか、生成してもクロマトグラフィーによる分離精製操作の段階で分解し、ニトロソ体が得られない場合が多いことがわかった。C法は試薬が気体であり、取扱いが困難である。そこで、上記、A法及びB法を改良し、次に示すD法及びE法で芳香族ニトロソ尿素類の合成を検討した。

D法：99%ギ酸中、亜硝酸ナトリウムの粉末を加えてニトロソ化し、クロロホルムで抽出する方法。

E法：非酸性条件下、クロロホルム溶液中で亜硝酸イソアミルを用いてニトロソ化する方法。

D法及びE法を用いた場合でも、生成する芳香族ニトロソ尿素類は熱的に不安定なため溶媒の濃縮は低温で行い、また、冷却管を利用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いてニトロソ尿素類を単離精製した。

分子設計に基づいて合成した芳香族ニトロソ化合物を図2に示す。

具体的な、合成法を以下に示す。ニトロソ化反応の原料である三置換アリール尿素類はアリールイソシアナート類にジアルキルアミンを反応させ定量的に得た。ただし、4-アセチルフェニル体及び2,3-ジメチルフェニル体は、アニリン類とメチルイソシアナートにより二置換体にした後、メチルニトロソ体に導き、これにジアルキルアミン類を反応させて合成した。次いで得られた尿素類は、D法によりニトロソ化し、三置換ニトロソ尿素とした。即ち、99%ギ酸に尿素類を溶解または懸濁し、5-10℃に保ちながら亜硝酸ナトリウムの粉末を少量づつ加えてニトロソ化した後、冷水を加えて冷エーテルまたは冷クロロホルムで抽出した。ニトロソ化合物の精製は、冷却シリカゲルクロマトグラフィーにより行った。特に、アリール置換ニトロソ体は不安定なので、担体や溶離液である *n*-ヘキサン-エーテル (8 : 2) 混液またはクロロホルムは予め冷やしてから用い、迅速に処理した。また、再結晶も予め水冷した少量の *n*-ヘキサン-エーテル混液に溶かし、冷蔵庫中で再び結晶化させる方法を用いた。E法でも行ったがD法の方が収率は良かった。D法で尿素類をニトロソ化する際、脱アルキル化を伴うという興味深い反応が見られた。例えば N³ 位にベンジル基を持つ尿素類をニトロソ化すると、N¹ 位がニトロソ化された化合物の他に、N³ 位に脱アルキルの起きた二置換ニトロソ尿素類が4.8%の収率で副生した。この脱アルキルのニトロソ化反応はベンジル基を持つ尿素類でのみ起きた。N³ 位のジアルキル基がジエチルやジイソプロピル基では脱アルキルのニトロソ化反応は起きなかったが、ベンジル置換体では5-10℃の低温で脱アルキルのニトロソ化が起きた。この点では高温で脱アルキルを起こすジアルキルアニリン類と異なる。さらに、N³ 位が *N*-メチル *N*-ベンジル基になると、メチル基またはベンジル基が脱アルキル化した2種類のニトロソ体を与える可能性があるが、脱メチル化した3-ベンジルニトロソ尿素のみが生じた。

二置換尿素類はアリールイソシアナート類にモノアルキルアミンを反応させ定量的に合成した。二置換尿素類のニトロソ化を三置換尿素類と同様にD法で行なうと、ニトロソ化を受ける位置が2ヶ所あるので、1-ニトロソ尿素と3-ニトロソ尿素の混合物を与えるが、両者は冷却シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離することが出来た。

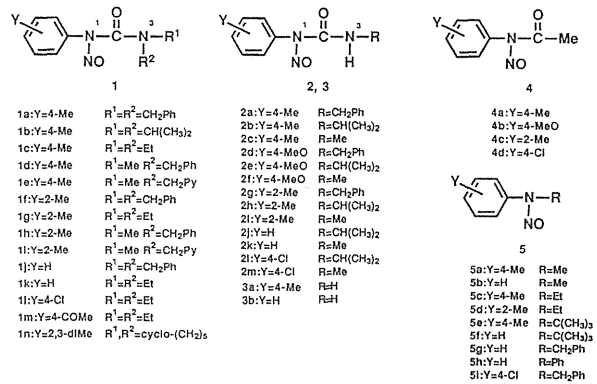


図2 NOを遊離する化合物として合成した芳香族 *N*-ニトロソ誘導体

1-(4-トリル)-3-メチル尿素をこの方法でニトロソ化するとメチル側がニトロソ化された3-メチル-3-ニトロソ尿素体のみが97%の収率で生成し、目的とする1-(4-トリル)-1-ニトロソ尿素体は得ることができなかった。すなわち、D法では尿素のメチル側窒素とアリール側窒素の塩基性の違いで3-ニトロソ尿素体が生成しやすい傾向があり、3-メチル-1-アリール-1-ニトロソ尿素体が生成しても酸により熱力学的に安定な3-ニトロソ体へ異性化したため1-ニトロソ体の収率が低下したと考えられる。アルキル基とアリール基を有する二置換尿素誘導体のニトロソ化では、酸を用いると直ちに熱力学的に安定な3-ニトロソ体へ異性化し、1-ニトロソ体を得ることが出来ないため、非酸性条件であるE法によるニトロソ化を検討した。すなわち、1-アリール-3-メチル尿素をクロロホルムに溶解させ、5-10℃で亜硝酸イソアミルと反応させると、3-メチル-3-ニトロソ尿素が95%の収率で得られるが、同時にアリール側がニトロソ化された新規化合物である1-アリール-3-メチル-1-ニトロソ尿素体も2%の収率で得られた。メチル基よりも立体的に嵩高い基を持つ3-イソプロピル-1-アリール尿素をニトロソ化するとアリール側のニトロソ体が増加した。溶媒をエタノールやアセトンにすると1-ニトロソ体は得られなかった。3-アルキル-1-アリール尿素と亜硝酸エステルとのクロロホルム中の反応は低温で1-ニトロソ尿素と3-ニトロソ尿素を与える。室温でこの反応を行うと、生成した1-ニトロソ尿素は熱力学的に安定な3-ニトロソ尿素へ異性化し、3-ニトロソ尿素だけを得ることが出来ると予測される。しかし、実際に3-イソプロピル-1-(4-クロロフェニル)尿素と亜硝酸イソアミルをクロロホルム溶液中、室温で一晩放置し反応させると、目的の3-ニトロソ尿素は得られず、4-クロロフェニルカルバミン酸イソアミルが24%と1-(4-クロロ-2-ニトロフェニル)-3-イソプロピル尿素が2%の収率で生じた。3-イソプロピル-1-(4-トリル)尿素と亜硝酸イソアミルとの反応でも相当するカルバミン酸イソアミルが37%とニトロ体が5%の収率で得られた。しかし、反応を低温で行なうことによりこれらの副反応を抑えることができた。一置換芳香族ニトロソ尿素も相当する尿素をD法により、ニトロソ化して得た。ニトロソアセトアニリド及びニトロソアニリンは相当するアセトアニリド及びアルキルアニリン類をA法またはB法によりニトロソ化して得た。芳香族ニトロソアミドの単離精製も尿素類と同様に冷却シリカゲルカラムクロマトグラフを使用すると収率が向上した。

4. NO 自発発生化合物からの NO 発生の確認と発生量の測定

N-ニトロソ化合物を有機溶媒に溶かすと、室温で徐々に分解しニトロ化合物が生成する。この結果は、NOの遊離を示唆する。NO生成は、N, N'-エチレンジアミンニ塩酸塩の溶液(0.1gを水100mlに溶かす)50mlを加え、さらに水を加えて正確に1000mlにし、褐色瓶に入れ保存する。

NO自発発生化合物からのNOの発生量は、大気中のNO_x測定法を応用し測定した。発生したNOは、アルゴン気流により系外に導出される。ついで、NOを酸化剤によりNO₂に酸化した後、吸収発色液でNO₂⁻イオンにし、Griess試薬と反応させた。反応液の546nmにおける吸光度を測定し、NOの発生量を定量した。

発色試液の調製：氷酢酸50mlを水で希釈し90mlにし、これにスルファニル酸5gを溶解する。この液にN-(1-ナフチル)エチレンジアミンニ塩酸塩の溶液(0.1gを水100mlに溶かす)50mlを加え、さらに水を加えて正確に1000mlにし、褐色瓶に入れ保存する。

標準液の調製：亜硝酸ナトリウム(純度98.5%)0.245gを水100mlに溶かす。この液10mlを水で1000mlに希釈する。ただし、水は、すべて超純水を用いた。

以下に、実験結果を示す。3,3-ジエチル-1-(4-トリル)-1-ニトロソ尿素(1c)を各種の有機溶媒に溶か

すと、脱ニトロソ体とニトロ体が生成した。非極性溶媒中ではニトロ体の生成が増加し、NOの発生を示唆している。3,3-ジベンジル-1-(4-トリル)-1-ニトロソ尿素(1a)と*N,N'*-エチレンビス(サリシリデンイミナト)鉄を四塩化炭素-クロロホルム混液中で反応させることにより、NO₃⁻錯体(黒紫色粉末、Mass m/e 338 (M⁺: C₁₄H₁₄FeN₃O₅))を単離することができた。これらの錯体は、NOガスを用いて同様の反応を行ったときに得られた錯体と一致したことにより、ニトロソ尿素類からNOが発生していることを確認した。NO発生量は、*N*-ニトロソ化合物約1mgを正確に量り、クロロホルム4mlに溶かし、37℃で2時間加温し、時間の経過とともに呈色液の546nmにおける吸光度を測定した。NO生成量を、NO発生剤として知られる*S*-ニトロソ-*N*-アセチル-DL-ペニシラミン(SNAP)と比較した結果を図3に示した。

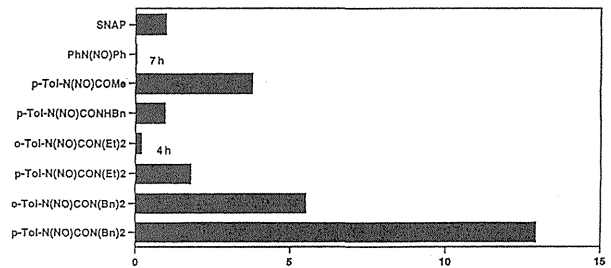


図3 *N*-ニトロソ化合物がクロロホルム中、37℃、2時間に発生するNO量の比較

化合物によりNO発生量に差が見られ、*N*-ニトロソ尿素、*N*-ニトロソアミド類は比較的良好にNOを放出するが、*N*-ニトロソアミンでは低い発生量であった。また、各化合物のパラ置換体(1a, c)とオルト置換体(1f, g)を比較したとき、パラ置換体はオルト置換体よりもNO発生量が多いことがわかった。これは、ニトロソ基に結合した窒素の塩基性が低い尿素やアミド誘導体ではN-NO結合がラジカル解裂しやすくなり、さらに、芳香環上のパラ置換基が共鳴効果によりこの反応を促進しているからであろう。また、三置換体(1a)と二置換体(2a)を比較した時は、ニトロソ基のまわりの立体障害により、1aのN-NO結合が切れやすくNO発生量も増加した。結局、三置換尿素体(1a)が最も良くNOを遊離することが判明した。

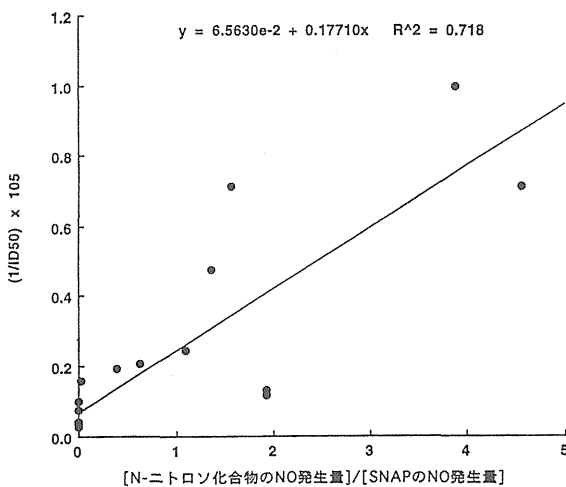


図4 殺細胞効果とNO発生量の相関

5. NO自発発生化合物の殺細胞効果

合成した*N*-ニトロソ化合物の殺細胞作用をL5178白血病細胞を用いて調べた。化合物を10% DMSO-緩衝液に溶かし、L5178白血病細胞に対する作用は37℃48時間後の成長阻止効果(ID₅₀)で求めた。NO発生量と殺細胞効果との相関を図4に示す。この図から明らかなように、*N*-ニトロソ化合物のNO発生量と殺細胞効果とは良い相関を示し、殺細胞作用がNOによることが示唆される。

6. 代謝型NO発生化合物の合成

NOは、生体内でL-アルギニンがNOSによりL-シトルリンに酸化変換される過程で発生するが、この代謝過程の中間体として*N*-ヒドロキシ-L-アルギニン(NOHA)が生成し、この中間体が更に酸化される過程でNOが発生すると言われている。従って、NOHA類似化合物は代謝型のNO発生化合物になると考えられる。そこで、NOHAの部分構造であるヒドロキシアミジノ基を有するアミドオキシム誘導体を合成し、それらが酸化的にNOを発生させる

ことができるかを検討した。

アミドオキシム誘導体は、シアノトリアゼン誘導体およびそのカリウム塩、アルキル又はアリール置換シアナミド、アルキル又はアリール置換ニトリルの各化合物にヒドロキシルアミンを反応させることにより合成した。図5にその一例を示す。4-アセチルフェニルアジドに KCN を反応させ 3-(4-アセチルフェニル) シアノトリアゼンのカリウム塩を収率 89% で合成し、次いでこのジオキサン溶液に NH_2OH を加えて加温し 3-(4-アセチルフェニル) トリアゼノアミドキシムを収率 48% で合成した。合成したトリアゼノアミドキシムの構造は、IR スペクトルにおける 2145cm^{-1} の CN の特性吸収が消失し、 ^{13}C -NMR で 127.9ppm の CN 炭素のピークが 157.9ppm にシフトしたことにより確認した。他の誘導体についても同様の操作で合成し、構造を決定した。

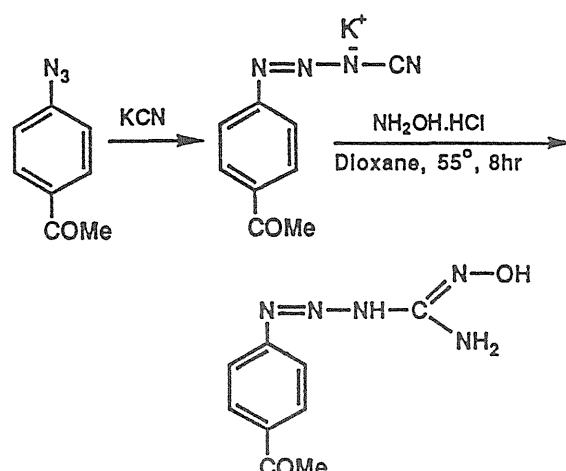


図5 アミドオキシム誘導体の合成例

7. 代謝型 NO 発生化合物の NO 発生能の測定

アリールトリアゼノ誘導体のメタノール溶液に各種の酸化剤を反応させた後、生成した NO を NO_2 に変換し、グリース試薬で呈色させ吸光度法で測定することにより NO 発生能を測定した。その結果、酸化剤の中では、四酢酸鉛や三酢酸マンガンなどの一電子酸化剤を用いたとき NO が発生し、特に、四酢酸鉛を用いたとき NO が最も良く発生することが明らかになった。酸化剤として、*m*-クロロ過安息香酸や過酸化水素を用いたときには NO が発生しなかった。また、アセトニトリル溶媒中では化合物の溶解性が低く、収率も低かった。

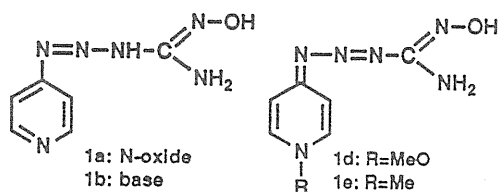
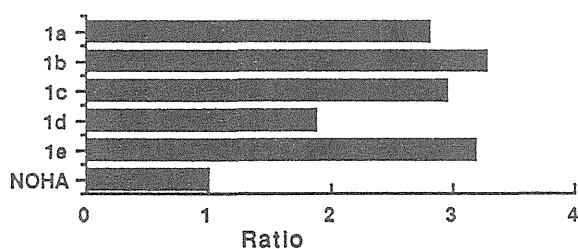


図6 アミドオキシム誘導体からの NO の発生量の比較

アミドオキシム誘導体の酸化反応を四酢酸鉛で行い、2時間反応後の NO 発生量を測定し NO 発生能を比較した。また、同条件で NOHA による NO 発生量も測定し比較した。(図6) その結果、アミドオキシム誘導体 (1a-e) は、いずれも比較的収率よく NO を発生し、本条件下では、NOHA の約 3 倍の発生量を示した。その他の誘導体についても検討したところ、NO 発生量は NOHA と同等かそれ以上であった。NO の発生量に及ぼす置換基 R の効果は比較的小さいが、トリアゼノ基を有する場合に発生量がやや高いという結果を得た。

8. 代謝型 NO 発生化合物の平滑筋弛緩作用

アミドオキシム誘導体を用いて平滑筋弛緩作用を検討した。摘出したラットの胸部大動脈リング状標本(内皮細胞附着)を修正クレプス液中で $95\% \text{O}_2$ - $5\% \text{CO}_2$ を通気して灌流し、 $10\mu\text{M}$ フェニレフェリンに

よる収縮に対する弛緩作用を調べた。対照として1 μ M アセチルコリンを用いた。0.8-1.0mM の1a-c 及び NOHA で比較したとき、1a-c の弛緩作用は NOHA より速やかであった。

9. 結果と考察

NO 自発発生化合物として、*N*-ニトロソアミン類の化学反応性、及び、三次元構造解析結果に基づいて、NO を発生する化学構造を分子設計した。この構造設計に基づき芳香族ニトロソ尿素及び芳香族ニトロソアミド類を合成した。合成した *N*-ニトロソ化合物は、室温付近で効率よく *N*-NO 結合が解裂し、NO を発生することを確認した。NO の発生は、ニトロソ化合物が分解してニトロ化合物が生成すること、及び、生成した NO が *N*, *N'*-エチレンビス (サリシリデンイミナト) 鉄錯体によって捕捉されることにより確認した。NO 遊離化合物からの NO 発生量は、吸光度測定法により比較定量した。芳香族三置換ニトロソ尿素及び芳香族ニトロソアミドは37°Cで NO を発生し、NO 遊離化合物として知られている *S*-ニトロソ-*N*-アセチル-DL-ペニシラミン (SNAP) と比較したとき、SNAP よりも効率よく NO を発生することが判明した。特に、化合物1a では10倍以上の NO 発生が見られた。L5178白血病細胞を用いて調べた殺細胞効果と NO 発生量とは良い相関を示した。これらの NO 遊離化合物は、置換基の位置や構造を修飾することにより、NO の発生の起き易さを制御することができる。また、固体であるこれらの化合物は重量として秤取できるので、常温で気体である NO に替わる簡便な NO 自発発生化合物として活用可能である。

一方、代謝型 NO 発生化合物として、NOHA と類似の部分構造を持つヒドロキシアミジノ誘導体を合成し、酸化条件下での NO 発生能を調べた。その結果、一電子酸化剤である四酢酸鉛の存在下これらのヒドロキシアミジノ誘導体が比較的収率良く NO を発生し、この条件下では NOHA と同等以上の NO 発生能を有することを明らかにした。これらの化合物が NO を発生しやすい理由のひとつとして、NOHA よりも一電子酸化を受けやすい長い共鳴系構造を有していることが考えられる。さらに、ラットの大動脈平滑筋に対する弛緩作用も NOHA よりも速やかであった。合成したヒドロキシアミジノ誘導体は、NO 自発発生型化合物に比べ安定であり、また、生体内では NOS により活性化されて NO を発生すると考えられるので生物試験への利用も容易であると考えられる。

参考文献

- 1) 丹野、末吉、宮田、「NO-化学と生物：NO 供与剤 (NO Donor)」化学総説 (日本化学会編)、印刷中。
- 2) 丹野、末吉、宮田等、「一酸化窒素 (NO) 発生剤の研究 (I)：自発発生化合物の開発と NO 検出法」磁気共鳴と医学 (日本医学館)、7: 227-229, 1996.
- 3) 末吉、丹野、宮田等、「一酸化窒素 (NO) 発生剤の研究 (II)：Biotransformation モデル化合物の合成と NO 発生及び平滑筋弛緩作用」磁気共鳴と医学 (日本医学館)、7: 230-232, 1996.
- 4) 丹野、宮田、「生体内で NO を発生する化合物」現代化学 (東京化学同人) 227: 36-41, 1994.
- 5) 宮田、末吉、丹野、「NO 遊離化合物を活用した環境汚染窒素酸化物に関する研究」環境汚染物質の影響評価に関する総合研究報告書、1995.
- 6) M. Tanno, S. Sueyoshi and N. Miyata, Transnitrosation by *N*-Aryl-*N*-nitrosoureas; NO-Carrying *O*-Nitrosoisourea, *Chem. Pharm Bull.*, 42: 1760-1767, 1994.
- 7) M. Tanno, S. Sueyoshi and N. Miyata, Transnitrosation of *N*-Nitroso Compounds under Non-acidic Conditions, *IARC Sci.*, 38, 1992.

- 8) K. Yamaguchi, M. Tanno, S. Sueyoshi and N. Miyata, Structure of *N*-Aryl-*N*-nitrosoureas, *Acta. Cryst.*, **C48**, 1051-1054, 1992.

2. NO と病態

谷 口 直 之

NO は、多くの病態とかがわっていることは周知のとおりである。ここでは、我々の研究室のデータを中心に、主として、炎症における NO の役割を論じる。

ラットで作製した大腸炎モデルでは、炎症性サイトカインの刺激により iNOS と Mn-SOD の著しい mRNA レベルでの誘導が観察される。一方、cNOS や Cu、Zn-SOD の誘導は見られない。これらのタンパク質レベルでの誘導をみると、iNOS 活性と iNOS 蛋白の誘導がともなう。驚いたことに、Mn-SOD 蛋白質や Mn-SOD 活性は著しく減少する。この際は、炎症性変化により NO の産生は iNOS の活性化により著しく増大するが、SOD 活性は減少し、微小環境における superoxide の蓄積を招く。このことは、Mn-SOD が、posttranslational に NO または他の活性酸素種により、あるいはプロテアーゼの活性化により蛋白分子が障害をうけるか、翻訳が障害されていることを示す。その結果、NO と superoxide により、ONOO⁻ の産生を助長する結果を招くことが予測される。NO はまた、活性酸素消去系の酵素のうち、グルタチオンペルオキシダーゼを特異的に不活性化し、細胞内の過酸化物を増加させることが明らかになり、細胞の毒性に大きな役割を果たしている可能性が出て来た。

一方、NO は膵臓の β 細胞にアポトーシスを起こすことがあきらかになった。インスリン依存性の糖尿病では、自己免疫性膵頭炎により、膵臓の β 細胞が破壊される。この機構には、おそらく、侵潤した活性化マクロファージから、iNOS により NO が生成し、これがアポトーシスを引き起こす。また、侵潤細胞からは IL-1 β などの炎症性サイトカインが産生され、この IL-1 β はとくに β 細胞障害性が強いいため、やはり iNOS の誘導を介して、NO によるアポトーシスを起こす。膵臓細胞では、元来抗酸化酵素活性が低い上に、糖尿病状態では、グリケーションなどにより、SOD などの抗酸化酵素活性がさらに低下し、また superoxide や過酸化水素などの増加がみられ、やはり ONOO⁻ の産生が増加を加速し、糖尿病の進展や合併症への引き金になる可能性がある。

炎症性サイトカインとくに IL-1 β や TNF による iNOS の誘導と TGF- β やグリケーションによる SOD などの活性酸素消去系酵素の不活性化が、炎症の慢性化とその後のガン化などの病態把握に重要と考えられる。

参考文献

- 1) Ookawara, T. et al., Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction: implication of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **267**, 18505-18510, 1992
- 2) Kayanoki, Y. et al. Suppression of antioxidative enzyme expression by transforming growth factor- β 1 in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 15488-15492, 1994
- 3) Asahi, M. et al. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide: implication for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **270**, 21035-21039, 1995
- 4) Kaneto, H. et al., Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic β cells. *Diabetes*, **44**, 733-738, 1995
- 5) Seo, H. G. et al. Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dimutases in experimental colitis in rats. *Archiv. Biochem. Biophys.* in Press.

生体内での役割は非常に多彩であることが明らかとなってきた。発見された順に番号が付けられていて、いずれもヘム、NADPH, FMN, Ca²⁺-カルモジュリン結合部位を有し、それぞれ約50%のホモロジーを示す。このうち、神経型（Ⅰ）NOSおよび内皮型（Ⅲ）NOSは構成的 constitutive であり NO 産生は細胞内カルシウム濃度の上昇が基本的な調節機序となっている。一方、誘導型 inducible（Ⅱ）NOSはサイトカイン等の刺激によって誘導され NO を産生する。これらの役割は最近、相次いで NOS 遺伝子のノックアウトマウスが開発されて解析された。それによると脳型では幽門狭窄と脳虚血時の抵抗性が¹⁾、誘導型ではエンドトキシンに対する抵抗性とある種の病原菌に対する感受性が高まっていた²⁾。さらに内皮型では内皮依存性血管拡張の消失と血圧上昇が認められた³⁾。

これらのことより NO は病態生理的に重要な役割を果たしていると考えられるが、臨床面への応用ははかどっていない。その大きな理由として NO の測定の困難さと作用の二面性とがある。内皮由来の NO は血管拡張、血小板凝集抑制、スーパーオキシドの消去などによって細胞保護的にも、一方、誘導型 NOS 由来の高濃度の NO はフリーラジカルとして鉄含有酵素の阻害作用などにより細胞毒としても作用するので、その存在意義は臓器、病態などによって大きく異なると考えられる。また NO は微量しか存在しない上に、本来ガス状物質で生体内での半減期は数秒以内である。従って NO を直接測定しようという試みがあるもののまだ不完全で、血管内皮機能を測定することによって NO の動態を推測する方法が依然頻用されているのが現状であろう。

NO の臨床応用として病態における診断的応用と治療的応用の可能性がある。上述の様な困難さのために NO の臨床応用は研究の端緒についたばかりとも言えるが、今後の期待を込めて現状を紹介したい。

I. 治療的応用

1. NO 遊離薬剤の開発

既に亜硝酸薬、ニトロプルシッドソーダなどが臨床に導入され、血管拡張薬としての有用性が確かめられている。これらの薬剤は動静脈を共に拡張させるので狭心症、うっ血性心不全、高血圧緊急症などに頻用される。今後、血中でも NO を遊離する薬剤が開発されると血小板凝集抑制薬としての機能も期待できる。また cGMP の増加を介する NO の細胞増殖／肥大抑制作用も心血管系に利用できるかも知れない。

2. 誘導型 NO 合成酵素阻害薬

誘導型 NO 合成酵素が発現すると高濃度の NO が血管平滑筋細胞に作用し、血圧が低下する。エンドトキシンショックや肝硬変においては本酵素の誘導によりしばしば高度の血管拡張が生じ、種々の昇圧薬に不応性の低血圧を示す。この時、L-nitroarginine methyl eater⁴⁾やメチレンブルー⁵⁾が昇圧に有用であることが示されているが、全身投与ではかえって虚血に陥る臓器もあるかも知れない。今後、誘導型 NO 合成酵素に特異的な阻害薬の開発が望まれる。

3. NO ガス吸入療法

NO の強力な血管・気管支平滑筋弛緩作用に注目して難治性の成人呼吸窮迫症候群⁶⁾や肺高血圧⁷⁾に NO ガスの吸入療法が試みられている。それによると 5～80ppm の NO ガスは濃度依存性に肺血管を拡張させ肺動脈圧の低下とともに動脈血酸素濃度を上昇させた。この一見危険性を伴う治療薬の特徴は吸入された NO が肺胞毛細血管内に吸収されると、ヘモグロビンと速やかに結合し、不活性化されるので他の血管床への影響がほとんどないことである。上記疾患の治療は肺血管の拡張を図ることであるが亜硝酸薬やプロスタサイクリンなどで十分に肺血管を拡張させる量では全身作用も現れ血圧などが低下してしまい、その

ため有効量を投与しにくい。以下に NO 吸入療法の実際を示す。約800ppm に調整した NO ガスと酸素 20%・窒素80%よりなる人工空気をブレンダーを用いて混合する。その NO 濃度はオゾン・化学発光法を用いて NO 分析機によって連続的にモニターする。これはブレンダーと吸入マスクの間に位置する三方活栓より吸引ポンプで NO 分析機まで送る。呼気は院内バキュームにより排気する。NO₂⁻ はソーダライム

により吸着することができる。図1は我々が8名の左心不全の患者に NO ガスの40ppm を投与した際の血行動態の変化である。血圧、総末梢血管抵抗などには一切影響せず肺動脈圧と肺血管抵抗のみを低下させた。肺高血圧を NO と同程度に低下させる量の亜硝酸薬を投与すると、心拍出量の増加、肺動脈楔入圧（左心房圧を反映する。左心不全とくに肺うっ血の指標となる）の低下と共に肺動脈圧ばかりでなく血圧も著明に低下させた。さらに亜硝酸薬などを静脈内投与した場合には肺血管を一様に拡張させるのに対し、吸入された NO は到達した肺胞でのみ、即ちガス交換に参加している肺胞の血管のみ拡張させるので換気/血流比が改善される。本法の問題点

としてはまずその毒性に注意する必要がある。即ち、NO は空気中の酸素と反応し、NO₂⁻ となり、またメトヘモグロビン血症も生じる。しかし40ppm 程度の NO ガスの吸入では NO₂⁻ 濃度は環境基準の 0.06ppm には達しない。またメトヘモグロビンも 1% 以内にとどまり、実害はない。いずれにせよ一般病室で手軽にという訳には現段階ではいかず、排気などに細心の注意が必要である。また NO ガス吸入により出血傾向が出現したという報告もあるが、我々は経験していないし、他の報告もほとんど無い。確かに NO には強力な血小板凝集抑制作用があるが、前述の様に血管腔に到達した NO は速やかに不活化されるのでその可能性は少ないと考えられる。以上より本療法は呼吸不全の患者には速効性があること、肺血管床にのみ有効であること、さらに換気/血流比が改善されることから重症肺高血圧に対して他に優れた治療法が少ない点もあわせて臨床応用が期待される。

II. 診断的応用

1. 内皮依存性血管拡張反応

動脈内にアセチルコリンなどの内皮依存性血管拡張薬を投与して、その際の血管拡張の程度により内皮からの NO 分泌能を評価する。この方法により多くの、特に動脈硬化性の疾患における内皮機能が評価された。その結果、前腕動脈を用いて本態性高血圧⁸⁾、二次性高血圧、高脂血症、狭心症等でアセチルコリンによる弛緩反応が減弱していた。これらはいずれも内皮非依存性血管拡張薬であるニトロプルシッドソーダでは健常対照者と差がなかった。この内の一部では L-arginine の急性投与によりアセチルコリンに対する弛緩反応が回復した。高血圧者では降圧治療によるこの反応の回復が必ずしも見られていない。そのため内皮障害が高血圧による二次的変化では無いとの考えもあるが、異論も多い。

冠動脈内へのアセチルコリンの注入でも高血圧症あるいは微小血管狭心症⁹⁾で同様の血管拡張の減弱が見られる。この方法は異型狭心症の検出に有用である。即ち、通常の労作性狭心症は冠動脈造影所見にお

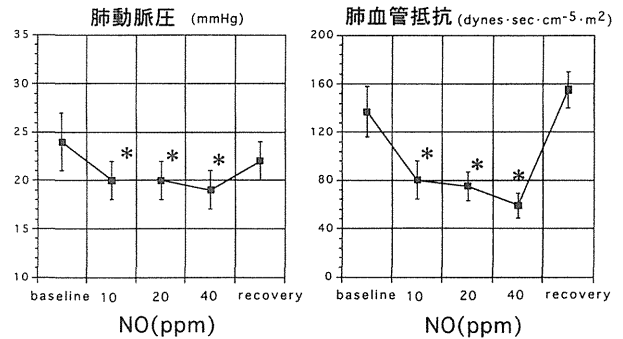


Figure 1. NO inhalation therapy in patients with congestive heart failure. Inhalation of NO gas resulted in rapid decreases in pulmonary areterial pressure and pulmonary vascular resistance without any effects on systemic hemodynamics including blood pressure.

いて比較的太い部分に狭窄が認められる。しかし、同様の胸痛を示しながら造影では明らかな狭窄を認めないことがしばしば経験される。こうした例にアセチルコリンなどを冠動脈内に注入すると、正常冠動脈では血管拡張が生じるが、異型狭心症ではむしろ冠動脈は収縮する。易攣縮性血管ではアセチルコリンの作用が障害血管内皮からの NO 遊離による血管拡張作用より血管平滑筋細胞の収縮作用が前面に出た結果と考えられる。本症は比較的日本人に多いと考えられ、労作性狭心症に頻用される β 遮断薬で胸痛発作がむしろ誘発されるので、その正確な診断は重要である。しかしながらアセチルコリンをはじめとする内皮依存性血管拡張薬は NO 以外に例えば内皮由来過分極因子などの弛緩因子と PGH_2 等の収縮因子も同時に遊離し、NO だけの作用を反映している訳では無いことに留意する必要がある。

2. NO_x

NO は酸素の存在下では速やかに亜硝酸イオン (NO_2^-) に、さらに水分の存在下で硝酸イオン (NO_3^-) にまで酸化される。これらを総称して NO_x と呼ぶ。体液中の両者を測定して NO の産生程度を推測する方法である。NO_x はグリース法などジアゾカップリングにより比較的簡便に測定できる。しかし本法は亜硝酸イオンを検出するので血清をはじめとして大半の生物サンプル内の NO は硝酸イオンにまで酸化されているため検体を何らかの方法で還元せねばならない。これにはカドミウムや細菌由来のリダクターゼを用いる。その測定感度は約 $0.1\mu\text{mol/L}$ である。正常血清には約 $5\sim 20\mu\text{mol/L}$ 含まれているのでその濃度自体を測るのは容易である。血中ではその90%は硝酸イオンとして存在する。また血中 NO_x の由来は内因性と外因性と共に50%ずつと考えられているが、細菌が産生する硝酸イオン以外に食事の影響も受け例えばセロリ等には大量の硝酸塩が含有され、消化管からの吸収により血中濃度が上昇する。一方、それが胃内で強酸により還元され NO に変換され、胃泡内には高濃度の NO が気体として存在する¹⁰⁾。しかし食後12時間を経過すれば血中 NO_x の90%は NO-arginine 経路に由来すると考えて良い¹¹⁾。

硝酸塩は細胞外スペースに一様に分布し、血中硝酸塩の半減期は約4時間で一時的な増加が完全に元に戻るまでに19時間を要する¹²⁾。逆に NO 合成阻害薬の投与によって血圧等の変化は速やかに生じるものの血中代謝物の低下には時間がかかる。血中の NO はヘモグロビンと結合し硝酸塩となり、基本的には腎臓から排泄される¹³⁾。腎臓では糸球体で濾過された後、ヘンレ上向脚で再吸収を受ける。従って血中 NO_x 濃度は NO の産生以外に腎機能の影響を受ける。尿中に排泄された NO_x は血中 NO_x と腎臓由来の NO を反映する。しかし尿路感染症の存在時には解釈に慎重を要する。逆に一般には尿中硝酸塩の検出により尿路感染を疑うのは周知であろう。

3. cGMP

NO は可溶性グアニレートシクラーゼを活性化して、cGMP を増加させる。したがって NO のセカンドメッセンジャーである cGMP の血中濃度も NO 産生の指標となり得るが一般に血中 cGMP はナトリウム利尿ペプチドの影響下にあり、これらが変化していないかあるいは両者が逆の方向に動いた場合にのみ意義付けが出来よう。

4. 電極法

マリンスキーらは白金電極にポルフィリン膜でコーティングすることにより比較的 NO に特異的な voltammetric assay を開発した。この方法は細胞培養上清液中あるいは流液中でも応用されてきた。彼らはさらに静脈内にポルフィリン電極を挿入してその先端から3-5 mm 離れた別の針先からアセチルコリンおよびブラジキニンを注入して NO 濃度を連続的に測定した¹⁴⁾。この電極の測定感度は 5 nmol/L で両薬剤共に用量依存性に NO 濃度を上昇させ、例えばアセチルコリンの 125 nmol/min の注入では血中 NO 濃

度は250nmol/Lに達した。このNO濃度の増加は200nmol/minのL-N^Gmonomethyl arginine (L-NMMA)の投与により減少し、400nmol/minのL-arginineの添加により再増加した。従ってこの電極の測定している酸化還元電位はNOの変化を反映していると考えられる。まだ病態での測定報告は発表されていない。動脈内での測定が可能か否かも興味深い。

5. 呼気中NO濃度の測定

先述の様に各種肺高血圧症等の治療にNOガスの吸入療法が導入されて、特異な有用性が報告されている。この際に当然吸入ガス中のNO濃度のモニターが必要となる。気相中のNOはオゾンを用いた化学発光法などによる検出法が確立している。しかもその感度は数ppbから測定できるのでおよそ10~30ppbの健常者の呼気中NO濃度は測定可能範囲内にある。呼気中にNOが含まれているのを最初に報告したのはGustafssonらのグループであった。彼らは家兎およびヒトの呼気中にNOが存在し、しかも家兎にL-NMMAを静注するとNO濃度が低下し、L-arginineの静注によってこれが再増加することを報告した¹⁵⁾。ヒトでも1mgのL-NMMAの吸入により呼気中NO濃度が減少する¹⁶⁾。またニトログリセリンを静注すると呼気中NO濃度は著増した。しかしニトログリセリンの静脈内投与を続けると6時間後にはその降圧作用は減弱してくる。その際、ニトログリセリンによる呼気NO濃度の増加も低下してきて本薬による耐性の検出のマーカーともなる¹⁷⁾。

我々も同様に呼気中NO濃度の測定を試みたが、NO濃度は呼吸状態によって著しく変化することに気づいた。即ち息どめをして深呼吸をする場合は高濃度に、逆に速呼吸の場合は低濃度になる。従って同時に分時換気量も測定してNO濃度との積からNO排出速度を求める方が正確と考えられた。そこで被検者に窒素80%・酸素20%の人工空気を吸入してもらい、呼気を化学発光検出器と流量計に導きNO排出速度を求めた。図2はこの方法で健常者の自転車エルゴメーターによる運動中のNO排出量を測定した結果である。運動時には呼気中NO排出速度が4倍にも増加した¹⁸⁾。運動中は換気量が増すが、安静のまま過換気状態にしてもNO産生は変化しないので、運動によるNO排泄の増加は単に換気量の増加によるのではなく産生増加の結果と考えられる。この機序として運動によって心拍出量が増加し、血流によるずり応力の増加が血管内皮のNOSを刺激したと考えられる。事実、運動訓練をした動物由来の血管は内皮依存性血管拡張反応やNOS mRNAが増加していることが示されている。従来より運動時には全身の血管拡張が生じるがその機序は必ずしも明らかでない。NOの増加も運動時血管拡張に一部関与するかも知れない。

疾患による呼気中NO濃度の変化の最初の報告は気管支喘息における上昇を示すものであった。Kharitonovら¹⁶⁾およびPerssonら¹⁹⁾はそれぞれ独立して気管支喘息患者の呼気中NO濃度の上昇を見出した。この時、前者の報告ではステロイド吸入療法を受けている患者では健常者の呼気濃度と差がなかったことよりこのNOの由来はiNOSと考えた。事実、喘息症例の気管支上皮細胞にiNOSが発現していることが

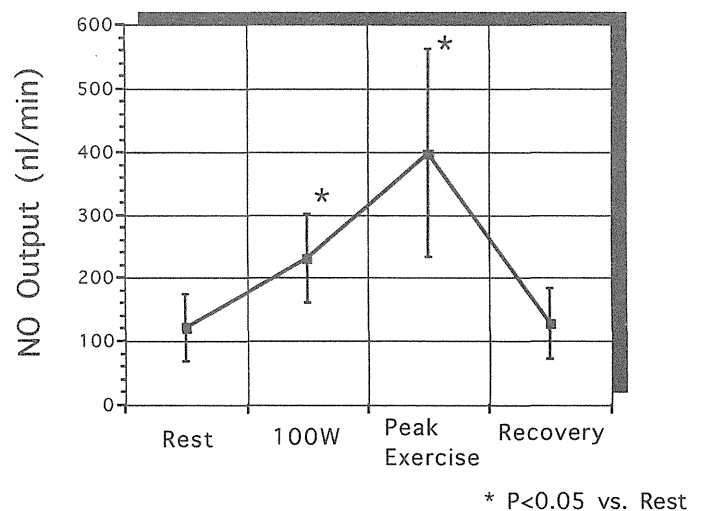


Figure 2. Exhaled nitric oxide output before, during and after exercise in healthy subjects (Ref. 18).

免疫染色によって確かめられている。一方、Persson らの報告ではステロイド投与による NO 濃度の差を認めておらず、また喘息の成因がアレルギー性であるか否かでも差がなかったという。

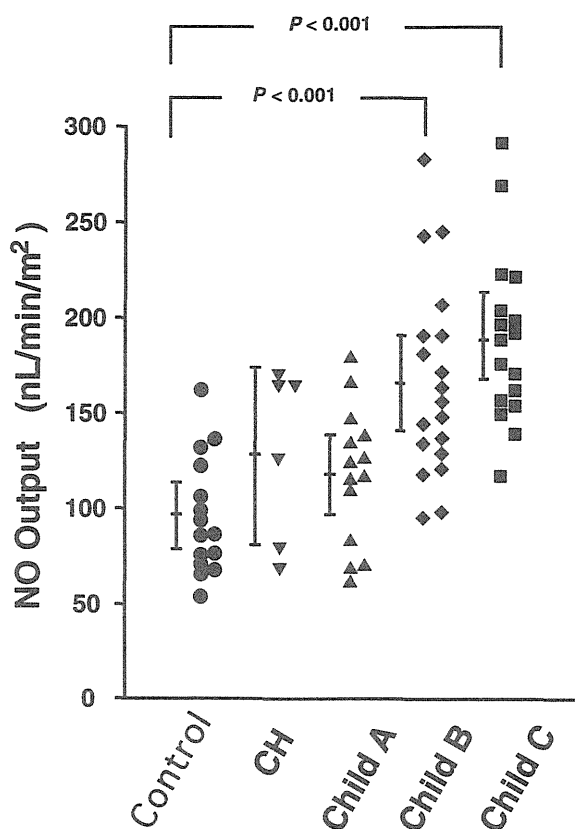


Figure 3. Exhaled nitric oxide output in patients with liver diseases (Ref. 2).

我々は肝障害例で同様の検討を行った²⁰⁾。症例は慢性肝炎および肝硬変計50例である。その呼気中 NO 排出量を15名の健常対照者と比較した。図3に示すように肝硬変を Child の重症度分類に従って分類すると NO 排出量は慢性肝炎および Child A 群では対照群と差がないが、より重症群である Child B および C 群では有意に対照群より高値を示した。従来より肝硬変では循環動態が hyperdynamic state にあると考えられている。即ち何らかの原因により血管拡張が生じ、心拍出量が増加している。このため低血圧、血管収縮物質に対する反応性の低下ひいては腹水の貯留に関与すると考えられている。この成因として以前より様々の検討がなされ、心房性ナトリウム利尿ペプチドをはじめとする血管弛緩物質の増加が提唱されていたが未だに一定の見解は無い。近年、循環調節における NO の重要性が注目されるようになり本症における NO の増加の関与も推測されていたが、実証はほとんど無い。そこで我々は呼気中 NO 排出量と心拍出量とを同時に測定した。その結果、NO 排出量の増加と心拍出量の増加

は平行することが明らかとなった。即ち血圧はいずれの群でも差が無く呼気中 NO 増加例では総末梢抵抗が減少していた。この機序として肝硬変では肝内繊維化などにより肝血管抵抗が上がり、そこへ流入する門脈内圧が上昇する。食道静脈瘤で代表される portosystemic shunt が発達して門脈血が肝臓を経由しないで直接、全身循環に入ることになる。その結果、本来、肝で処理される腸管由来のエンドトキシンが流血中を循環することになる。エンドトキシン血症によりリポポリサッカライドが直接的にあるいは間接的には IL-1 β や TNF- α 等のサイトカインの増加を介して、iNOS を誘導する。事実、肝硬変ではサイトカインの血中濃度が iNOS の誘導に十分な程度に、増加していることが知られている。肝臓の Kupffer 細胞は iNOS の発現により多量の NO を産生することが知られているが、肝臓で産生された NO は肺に達するまでにほとんど代謝されると考えられるので循環血中のサイトカインがおそらくは肺で iNOS を誘導し、一部呼気に排出された NO を測定していると考えられる。NO 産生細胞としては肺血管内皮細胞、平滑筋細胞、気管支上皮細胞、副鼻腔などの上皮細胞が考えられている^{21,22)}。呼気中 NO 濃度の測定は NO 産生細胞が特定されていないものの非侵襲的検査であるので今後の臨床応用が期待される。

おわりに

以上、現時点で臨床的に応用が可能な NO の測定法および治療薬としての投与方法について述べた。現時点では内因性 NO 産生の増減の評価しか出来ないが、将来的にはいずれの NOS 由来の NO の変化かを検

出出来る、またそれらの NOS に特異的な阻害薬あるいは刺激薬が開発されることで、多くの病態の把握あるいは治療に応用が可能になると期待される。

参考文献

- 1) Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC: Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 75: 1273-1286, 1993
- 2) MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie Q, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS: Altered responses to bacterial infection and endotoxin shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 81: 641-650, 1995
- 3) Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242, 1995
- 4) Petros A, Bennett D, Vallance P: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 338: 1557-1558, 1991
- 5) Midgley S, Grant IS, Haynes WG, Webb DJ: Nitric oxide in liver failure. *Lancet* 338: 1590, 1991
- 6) Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM: Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 328: 399-405, 1993
- 7) Perke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J: Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in pulmonary hypertension. *Lancet* 338: 1173-1174, 1991
- 8) Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE: Abnormal endothelium-derived vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27, 1990
- 9) Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Urabe Y, Takeshita A: Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilatation in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *New Engl J Med* 328: 1659-1664, 1993
- 10) Lundberg JON, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K: Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 35: 1543-1546, 1994
- 11) Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S: The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 590-596, 1995
- 12) Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, Forfia PR, Seyidi N, Shen W, Kaminski PM, Wolin MS, Hintze TH: Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation* 91: 2982-2988, 1995
- 13) Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kiels-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petterson AS, Waagstein F: Metabolism and excretion of nitric oxide in humans: an experimental study. *Circ Res* 73: 1121-1127, 1993
- 14) Vallance P, Patton S, Bhagat K, MacAllister R, Radomski M, Moncada S, Malinski T: Direct measurement of nitric oxide in human beings. *Lancet* 354: 153-154, 1995
- 15) Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S: Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 852-857, 1991
- 16) Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ: Increased nitric oxide in

- exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* **343**: 133-135, 1994
- 17) Husain M, Adrie C, Ichinose F, Kavosi M, Zapol WM: Exhaled nitric oxide as a marker for organic nitrate tolerance. *Circulation* **89**: 2489-2502, 1994
 - 18) Matsumoto A, Hirata Y, Momomura S, Fujita H, Yao A, Sata M, Serizawa T: Increased nitric oxide production during exercise. *Lancet* **343**: 849-850, 1994
 - 19) Persson MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE: Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet*. **343**: 146-147, 1994
 - 20) Matsumoto A, Ogura K, Hirata Y, Kakoki M, Watanabe F, Takenaka K, Shiratori Y, Momomura S, Omata M: Increased nitric oxide in the exhaled air of patients with decompensated liver cirrhosis. *Ann Intern Med* **123**: 110-113, 1995
 - 21) Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM: Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* **342**: 1510-1513, 1993
 - 22) Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA: Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest* **94**: 2231-2236, 1994

れ、NOは哺乳類の血管内皮細胞、神経細胞、マクロファージ等の細胞で非誘導型 (constitutive) または誘導型 (inducible) のNO合成酵素 (NOS) の働きによりL-アルギニンから産生されていることが明らかとなった。それぞれのNOSによって産生されたNOは、血液循環系では血小板凝集の阻害・血管の拡張、中枢神経系では神経伝達、免疫系では抗菌・抗腫瘍等の作用を直接的にまたは間接的に司っていることが知られている⁴⁾。生体内で産生される内因性NOの多様な生理的作用を評価するためには、細胞、組織、器官におけるNOの濃度と分布に関する知見が有用である。しかし、*in vivo*で産生されたNOの濃度は極めて低く(0.01-1 μ M)、寿命も短い(血管内皮細胞由来のNOの半減期、3-5秒²⁾；但し、生体内酸素濃度に強く依存する^{5,6)})という事実が、内因性のNOの分析を困難なものにしている。生体試料中に含まれるNO(またはその副生成物)の分析を目指した分析法が報告され、既に実試料に適用されているが、「高感度、高特異性、分析操作の容易性等」の条件を満たす分析法は報告されていない。従って、現状では、分析法の原理、長所・短所を理解して、分析の対象に応じた適当な分析法を選択する必要がある⁷⁻¹⁰⁾。

本稿では、ジチオカルバメート鉄錯体をNOトラップ試薬とする電子スピン共鳴装置を用いる生体内のNO分析法を紹介する。生体内のNO分析法の中で、本法は比較的歴史が浅く、本邦での使用例も少ない分析法である。以下では鉄錯体がNOを捕捉できる理由、電子スピン共鳴法によるNOの分析法の現状、およびジチオカルバメート鉄錯体による生体内のNO分析実施例を記述する。

II. NOと金属イオン

NOは、分子内に15個の電子を持っている。[電子配置： $(K^2K^2)(2s\sigma^b)^2(2s\sigma^*)^2(2p\pi^b)^4(2p\sigma^b)^2(2p\pi^*)^1$]から明らかのように、NOは不対電子1個を反結合性 π 軌道に持つ不安定なフリーラジカルである。それに対して、NOと同様に2原子分子であり、常温で気体のCO、 N_2 は分子内に14個の電子をもつ安定な反磁性分子である。NOの第1イオン化($NO \rightarrow NO^+ + e^-$)電位(9.26 eV)を、CO(14.01 eV)、 N_2 (15.58 eV)、 O_2 (12.07 eV)と比較すると、NOが最も酸化されやすいことが明らかである。また、NOの還元電位($E_{1/2}$)は、酸性溶液中($2NO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2N_2O_2$)では+0.71V、塩基性溶液中($2NO + 2e^- \rightarrow N_2O_2^{2-}$)では+0.18Vであり、NOは還元されやすい分子でもある¹¹⁾。(NO⁺はCO、 N_2 と、NO⁻は O_2 と等電子状態にある。)NO⁺は、求核試薬の攻撃を受けてニトロソ化合物を生成する。生体内には多種類の求核試薬が存在するが、SH含有化合物とNO⁺との反応により生成するS-ニトロソチオールが*in vivo*でのNOのreservoirの候補として注目されている¹²⁾。この様に、NOの多彩な生理作用を理解するためには、NOの生理作用のみではなく、NO⁺、NO⁻およびNO₂⁻の作用、それらから派生するS-ニトロソチオール、N-ニトロサミン等の作用、更にスーパーオキシド(O_2^-)等のフリーラジカルとの反応生成物にも注意を払わなければならない。

NOは、金属イオンに結合(配位結合)することができるが、他の配位子の場合と異なり結合挙動を画一的に表現することが難しい配位子である。結合する相手の金属の状態に応じて、酸化状態を変えることが可能であり、COのように金属に対して直線的に結合したり、 O_2 のように屈曲して結合することが可能である。また、不対電子を持っているために極性があり、結果として多様な金属との結合が可能となる。このようなNOの配位子としての「融通性」が、NO(ニトロシル)配位子を金属高親和性に行している理由である。ニトロシル金属錯体の研究の歴史は古く、膨大な数の錯体の合成が報告されている¹³⁾。ニトロシル錯体が多く研究者の関心を集めてきた理由として、次の3項目が挙げられる。(1)反応の対象、条件に応じてNO⁺、NO、NO⁻と形を変え、金属に対して多様な結合様式をとる。(2)NOが金属に結合する

のと同時にその不対電子は金属および他の配位子の電子軌道へと非局在化するために、非局在化の程度により錯体の電子状態が変化する。(3)配位ニトロシル基はフリーの NO とは異なる電子状態となるために、特異的の反応に対して活性化される場合があり、そのようなニトロシル錯体は選択的触媒として利用可能である。

O_2 , CO, NO はいずれも金属イオンに対する親和性が大きい 2 原子分子である。これらのヘモグロビン (ヒツジ) に対する親和性は、 O_2 の親和性を 1 とすると、 $(O_2:CO:NO) = (1:180:243,000)$ と報告されている¹⁴⁾。ミオグロビンに対しても同様な親和性が示されている。このように NO は、 O_2 および CO と比べて、ヘム鉄をはじめとする金属イオンに対して大きな親和性を持っていることがわかる¹⁵⁾。NO が金属に対して高い親和性を示すことから、生体内で生成された NO の近傍に金属イオン、金属蛋白質・酵素が存在すれば、NO は金属と速やかに相互作用し、結合することが予測される。NO と鉄蛋白質・酵素との相互作用は、(1)酵素活性の阻害(2)酵素の活性化(3)鉄代謝の異常に結果すると共に、NO 自身も姿を変えることが知られている⁴⁾。また、血液中では、血管内皮細胞、マクロファージ等で産生された NO の一部が、ヘモグロビン (Hb) と結合し NOHb を生成し、配位 NO は NO_2^- , NO_3^- へと酸化されることが示されており、ヘモグロビン等のヘム蛋白質が NO のスカベンジャーとして機能している可能性も指摘されている⁶⁾。

低分子・高分子の鉄錯体を生体内 NO の捕捉試薬として用いる発想は、ここに示した NO の金属に対する結合性・高親和性に基づいている。

III. 電子スピン共鳴法による NO の分析

NO はフリーラジカルであるので電子スピン共鳴 (EPR, ESR) 法でシグナルを観測できるが、気体の NO および液相中の溶存 NO のシグナルを観測するためには、特殊な条件を設定する必要があり、シグナル強度も低い。したがって、EPR を用いて生体内の NO を「直接」検出する分析法は現実的でない。

不安定で短寿命の O_2^- 、ヒドロキシルラジカル、NO 等のフリーラジカルを EPR で検出する方法として、スピントラップ試薬を用いる「スピントラップ法」がある (Fig. 1)。スピントラップ試薬は不安定なラジカルと反応して安定なラジカルを生成し、EPR での観測を容易にする試薬であり、ラジカル種に応じた試薬が開発されている¹⁶⁾。

1. NO トラップ試薬

NO のスピントラップ試薬としては、ニトロニルニトロキッド類 (PTIO が代表的化合物) 等の有機化合物¹⁷⁻¹⁹⁾ および NO に高親和性の鉄錯体が報告されている。前者の有機低分子トラップ試薬の実試料への適用例は今のところ少ないが、適用法と適用対象の検討および新規トラップ試薬の開発が期待されている。後者は、すでに多様な系に適用されており、ヘモグロビンのような高分子の鉄錯体、ジチオカルバメート誘導体を配位子とする低分子の鉄錯体が NO トラップ錯体として用いられている。

デオキシヘモグロビン (deoxyHb)²⁰⁾ またはカルボニルヘモグロビン (COHb)²¹⁾ は、NO と反応するとニトロシルヘモグロビン (NOHb) を生成し、低温で特有の EPR シグナルを示す。deoxyHb または COHb を、

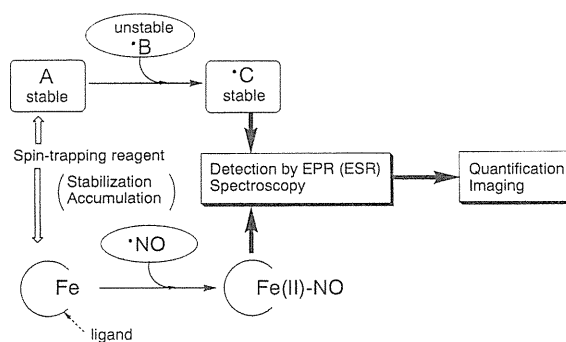


Fig. 1 EPR Spin-Trapping Method, *In Vitro*
(EPR: Electron Paramagnetic Resonance)
(ESR: Electron Spin Resonance)

組織等の試料に加え EPR を観測したり、生体内の局所に投与し回収して測定に供することによって生体内の NO を検出することができる。また、NOHb を含む試料に inositol hexaphosphate を加えて測定すると、鋭い 3 本線が観測され、より高感度の測定が可能である。ただし、deoxyHb は NO_2^- とも反応して NOHb を生成すると共に、 O_2 との結合により NO の分析に影響することが知られている。一方、COHb は、 NO_2^- および O_2 とは反応しないので、より有効な NO トラップ試薬であると報告されている²¹⁾。ヘモグロビン は生体内に内在する NO トラップ試薬であり、血液を試料として EPR スペクトルを測定し、NOHb 量の変動を追跡することにより病態の解析を行うことが可能である^{22,23)}。しかし、試料中の NOHb を検出するためには低温で凍結して測定する必要があり、*in vivo* の測定には適していない。

2. ジチオカルバメート鉄錯体

ジチオカルバメート (ジチオカルバミン酸塩、DTC) 誘導体 (*N,N*-diethyldithio carbamate [DETC]) が代表的化合物、Fig. 2) は、キレート試薬として金属イオンの溶媒抽出等の分析操作において重要な役割を果たしてきた試薬である。1991年に Vanin らは、DETC-鉄錯体を生体組織中の NO のトラップ試薬として報告した²⁴⁾。DTC-鉄錯体と NO との反応生成物である $\text{Fe(II)(DTC)}_2(\text{NO})$ は安定な化合物であり、室温では 3 本線 ($g_{\text{iso}} = 2.04$, $A_{\text{iso}} = 1.25\text{mT}$) の EPR シグナルを、また低温でも明瞭な強いシグナル ($g_{\perp} = 2.035$, $g_{\parallel} = 2.02$) を示す (Fig. 3)。このように、ジチオカルバメートの鉄錯体は NO トラップ試薬としての優れた性質をもっている。ただし、DETC は水溶性であるが、その鉄錯体および $\text{Fe(II)(DETC)}_2(\text{NO})$ は水溶性に乏しいので、鉄塩と DETC は別々に投与する必要がある。それに対して、*N*-methyl-D-glucamine dithiocarbamate [MGD]²⁵⁾ および *N*-(dithiocarboxy) sarcosine [DTCS]²⁶⁾ (Fig. 2) は、鉄錯体も NO 錯体も水溶性である (DTCS-鉄錯体は、MGD-鉄錯体よりも水溶性が高い)。鉄錯体が水溶性であることから、あらかじめ合成した鉄錯体を NO トラップ試薬として投与することができる。

DETC-鉄錯体を生体試料に適用した例は、Vanin らのグループにより既に数多く報告されている²⁷⁻³⁵⁾。以下に代表的研究を紹介する。(1) 培養細胞系：リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) で誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) を誘導したマクロファージから産生される NO^{27,30)} およびブラジキニン等で非誘導型 NO 合成酵素 (cNOS) を活性化した内皮細胞から産生される NO^{27,31)} が検出された。(2) 組織・臓器：マウスの腹腔内に LPS を投与することにより産生される NO の濃度が、肝臓、腸、肺、心臓、腎臓、膵臓で求められ、定量的評価が行われた²⁹⁾。(3) 発作との関係：ラットの脳内の NO 濃度は、カイニン酸投与により惹起された発作時に増加することが示され、痙攣発作と NO との関連が議論された³⁴⁾。(4) NO の由来：

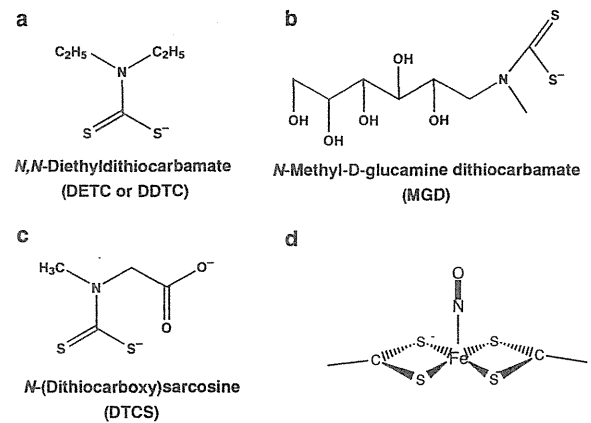


Fig. 2 (a, b, c) Derivatives of dithiocarbamate (DTC) and (d) the nitrosyl iron (II) complex.

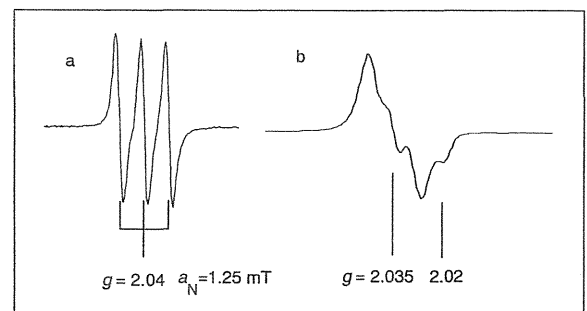


Fig. 3 EPR spectra of $\text{Fe(DTCS)}_2(\text{NO})$ in aqueous solution at X-band frequency; (a) at room temperature and (b) at 77 K.

^{14}N -アルギニンの代わりに ^{15}N -アルギニンをマウスに投与したり、培地に加えると、3本線シグナル (^{14}NO) が2本線 (^{15}NO) に変化した^{27,28,30)}。この結果は、NOがアルギニン由来であることと、NO窒素がアルギニンのグアニジノ窒素由来であることを直接的に示している。

富永らは、脳虚血時のNO産生増加と虚血再灌流時のNO濃度の時間変化と虚血法との相関を、DETCとクエン酸鉄をラットに投与することにより検討し、虚血時のNO産生は脳血流上昇に向けた生理的対応であり、再灌流時のNO産生は脳組織の障害と相関していることを示唆した³⁶⁻³⁹⁾。

この様に、DETC-鉄錯体は、多様な対象に適用されているが、「(1)DETCと鉄塩を別々に投与し、その投与方法にも注意を払う必要がある。(2)生成した鉄錯体が水にほとんど溶けないことから室温の測定に適していない。凍結温度での測定になるために *in vivo* での測定は不可能である。」という限界を持っている。

MGD および DTCS-鉄錯体は水溶性であるので、DETC-鉄錯体の限界を超えられる可能性を持っている。Laiらは、MGD-鉄錯体を使って *in vivo* で内因性のNOをトラップすることに成功した。LPSをマウスに投与してNO合成酵素を誘導し、MGD-鉄錯体を皮下注射することにより尻尾で $\text{Fe(II)(MGD)}_2(\text{NO})$ のシグナルを観測した (EPRの測定周波数は3.5 GHz-S-バンドであった)^{40,41)}。また、LPS投与マウスの尿中に検出される $\text{Fe(II)(MGD)}_2(\text{NO})$ の分析を行い、MGD-鉄錯体は、NOを過剰に生成する病態モデルの *ex vivo* での病理的・薬理的評価を可能にする試薬であることを示した⁴²⁾。Zweierらは、心虚血時のNO産生を、MGD-鉄錯体をNOトラップ試薬として低温(77K)で検討した。ラットの心臓の組織中の $\text{Fe(II)(MGD)}_2(\text{NO})$ のシグナルは虚血時間と共に増加し、NOが虚血後障害を媒介する可能性を示唆した⁴³⁾。DTCS-鉄錯体の適用例については後述する。

水溶性のNOトラップ錯体の適用例・報告は、DETC-鉄錯体に比して少なく、NOトラップ試薬としての有効性を錯体毎に比較することは、現時点では困難である。あえて著者らの経験を記すと、DETC-鉄錯体の適用が報告されている系に水溶性トラップ錯体を適用しても十分な結果が得られない場合があり、また水溶性トラップ錯体は体外への排泄がより早いようである。現在、検討を進めているところであるが、試料・対象によっては、DETC-鉄錯体の脂溶性が有利に作用する可能性があるのかもしれない。このようなNOトラップ錯体の性質、実試料に適用するに当たっての長所・短所が明らかになれば、試料・対象に応じた使い分けが可能となり、NOトラップ試薬としての有効性が拡大すると考えられる。

IV. ジチオカルボキシサルコシン鉄錯体による生体内NOの検出と画像化

本章では、ジチオカルボキシサルコシン (DTCS) 鉄錯体をNOトラップ試薬とした生体内NOの検出と画像化に関する著者らの試みを記述する。

実験動物は、Wistar系雄性ラット(200-250g)およびICR系雌性マウス(約30g)であった。これらの動物はペントバルビタール麻酔下、試料ホルダーに固定してEPR測定に供した。*in vivo*のEPRスペクトルおよび画像は、鉄芯コイル電磁石または空芯コイル電磁石を装備した周波数約700MHzの自家製装置⁴⁴⁾により室温で測定した。また、日本電子TE-200型X-バンドEPR測定装置も*in vitro*の測定に使用した。

1. NO-Fe-DTCS錯体のEPRスペクトルおよびNO-Fe-DTCS錯体を投与したラットの頭部でのEPRシグナルの検出と画像化^{26,45)}

生体内・組織中に十分な濃度のフリーラジカルが存在し、シグナルの強度が充分であれば、フリーラジカルの分布を画像化することが可能である。また、画像の分解能は、シグナルの線幅の低下と共に向上す

ることが知られている。

NO-Fe-DTCS 錯体の水溶液の室温での EPR スペクトル (Fig. 3-a) には、NO の窒素核の核スピン ($I=1$) に基づく鋭い 3 本線シグナルが観測された。しかし、NO 鉄錯体のシグナル (Fig. 3-a) の線幅 (peak-to-peak; 約 0.4mT) は、スピンラベル剤 (画像化試薬) として多用されているニトロキンド類のもの (約 0.1mT) よりも広く、画像の分解能という観点からは不利である。NO-Fe-DTCS 錯体の EPR シグナルに基づく画像化の可否を判定するために、NO-Fe-DTCS 錯体を画像化試薬としてファントムおよびラットの頭部での画像の取得を試みた。

(1) NO-Fe-DTCS 錯体を封入したガラス管をファントムとして、EPR スペクトルを測定したところ、高強度の 3 本線シグナルが得られ、鮮明な EPR-CT 画像を得ることができた。空間分解能は 3.6mm であった⁴⁵⁾。

(2) NO-Fe-DTCS 錯体水溶液 (50mM, 6 ml) をラットの腹腔内に投与して、35分後に頭部でスペクトルを測定したところ、錯体水溶液のシグナルと同様のシグナルが観測された。この結果は、血流によって錯体が頭部まで拡散していることを示している。生体内に存在するフリーラジカルが、組織または蛋白質と何らかの相互作用をしている場合には、そのフリーラジカルに起因するシグナルの線形および線幅が影響を受けることが知られている。しかし、観測されたシグナルは、NO 錯体水溶液のもの (Fig. 3-a) とほとんど同じであることから、生体内で NO 錯体は組織等と強く相互作用していないと考えられる。

画像化が可能なシグナル強度が得られたので、画像化に向けたスペクトル測定を行った。データ処理を施して得られた 2 次元投影像を Fig. 4 に示す。空間分解能は 6 mm であった²⁶⁾。Fig. 4 に於いて、腹側サイドの高強度領域は血流量の豊富な部位に相当している。また、脳部位には NO-Fe-DTCS 錯体がほとんど分布していないことを示している。したがって、本錯体は血液脳関門を通過しないと考えられる。

本実験結果から、生体内で十分な濃度の NO 錯体が生成された場合には、内因性の NO に由来するシグナルの画像化が可能であることが明らかとなった。

2. マウス腹部での内因性 NO に由来するシグナルの検出と画像化⁴⁶⁾

生体内で存在が確認されている 3 種類の NO 合成酵素 (NOS) の中で、最も多量の NO を生成するのは、生体内の多様な組織中に発現される誘導型 NOS である。従って、本研究では「内因性の NO」の画像化を目指して、誘導型 NOS をエンドトキシンで誘導し、生成した NO を NO トラップ試薬でトラップし、蓄積することを試みた。以下の実験では、エンドトキシンとして、大腸菌由来のリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) を用いた。LPS でマクロファージを活性化すると、マクロファージ中に NOS が誘導され、約 6 時間後に NO 濃度が最高値に達することが知られている⁴⁷⁾。

LPS をマウスの腹腔内に投与して 5.5 時間後に、NO トラップ試薬として Fe-DTCS 錯体を皮下に注射した。トラップ試薬の体内への拡散と、トラップ試薬による NO の捕捉と蓄積に要する時間を 3 時間と設定

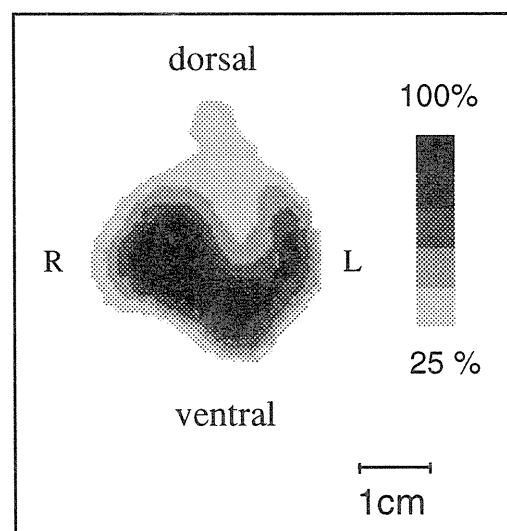


Fig. 4 Two-dimensional EPR projection of the coronal section in the head of a live rat. The rat received an intraperitoneal administration of the Fe (DTCS)₂(NO) solution as an imaging reagent.

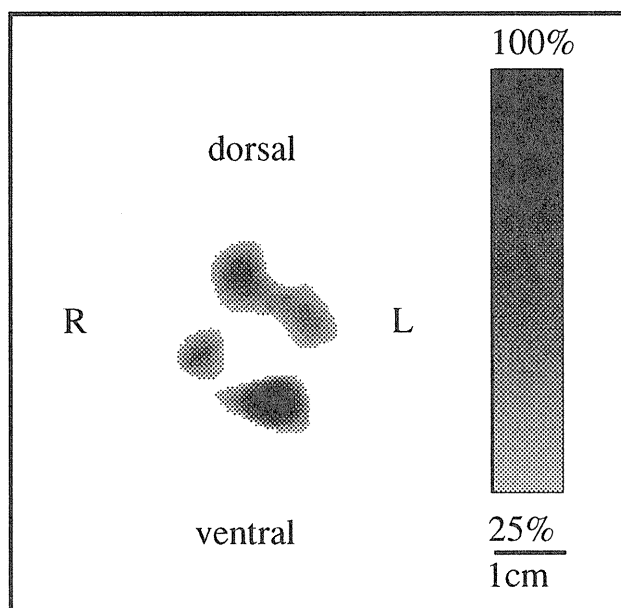


Fig. 5 Two-dimensional EPR projection of the cross section of the abdominal region of a live mouse treated by LPS. The mouse received an administration of Fe-DTCS complex solution as an NO trapping reagent.

と同様にシグナルは観測されなかった。①の実験結果は、シグナルを観測するためには LPS 投与が不可欠であることを、②の実験結果は、観測されたシグナルが誘導型 NOS から産生された NO 由来であることを示している。

Fig. 5 において、画像化された高強度部分は、解剖学的に肝臓の部位に対応している。得られた画像は、NO トラップ試薬 (Fe-DTCS 錯体) が内因性の NO を捕捉し、その結果生成された NO アダクト (NO-Fe-DTCS 錯体) が、体液による輸送によって肝臓に集積することを示している。すなわち、これらの結果は生体内に於ける NO アダクトの代謝過程を示唆している。

画像取得条件でマウスを処理して、内因性 NO の臓器分布および体内動態を、*in vitro* で調べたところ、上記の画像の解剖学的解釈が裏付けられた。生体内で産生されたフリーラジカルの画像化成功例は、本報告が最初と考えられる。

V. おわりに

高分子鉄錯体の一つであるヘモグロビンは、内在性の NO トラップ試薬と位置付けることが可能である。ヘモグロビンは云うまでもなく生体内の重要な構成成分であり、人工的薬剤と異なり、毒性や生理作用を心配しなくてもよい NO トラップ試薬である。それに対して、ジチオカルバメート (DTC) 鉄錯体は、NO を産生している局所や、培養細胞に役与したり、人工的な実験系での測定に使用することができるが、毒性や生理作用には常に注意を払う必要がある。古くから、ジチオカルバメート類は、キレート試薬として銅 (ウィルソン病)、カドミウムやニッケルの摂取に起因する疾病の解毒剤として用いられており、抗菌剤 (fungicide)、消毒剤 (disinfectant) としても有効であることが知られている⁴⁸⁾。また、ジエチルジチオカルバメートのナトリウム塩は免疫亢進剤として評価されており⁴⁹⁾、エイズの治療にも有効と報告されている⁵⁰⁾。次に、内因性 NO との関係で特に重要な二つの生理作用を紹介する。①誘導型 NO 合成酵素

して、皮下注射 3 時間後にマウスの腹部で EPR スペクトルの測定を行った。ラット頭部で得られた NO-Fe-DTCS 錯体のシグナルと同様の 3 本線シグナルを観測することができた。2 次元投影像を得るためのデータの取得 (約 5 分) を行い、画像化処理を施した。得られた 2 次元投影像を Fig. 5 に示す。空間分解能は 7.0mm であった。

次に、確認のための二つのコントロール実験を行った。①生理食塩水を投与して 5.5 時間後に、Fe-DTCS 錯体を皮下に注射した。皮下注射 3 時間後にマウスの腹部で EPR スペクトルの測定を行ったところ、シグナルは観測されなかった。② LPS を投与直後、2 時間後、4 時間後に NOS の阻害剤である *N*^ε-monomethyl-L-arginine (NMMA) を投与、5.5 時間後に、Fe-DTCS 錯体を皮下に注射した。皮下注射 3 時間後にマウスの腹部で EPR スペクトルの測定を行ったところ、①

の発現に関与している NF κ B (細胞核に普遍的に存在する転写因子の一つ) は、ジエチルジチオカルバメートやピロリジンジチオカルバメートによって阻害されると云われている⁵¹⁾。②スーパーオキシド (O₂⁻) が NO との関連において注目されているが、ジエチルジチオカルバメートは Cu, Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を阻害することが知られている⁵²⁾。DTC 投与に起因するこれらの効果は、内因性 NO の状態や濃度に影響を与える要素となる。したがって、DTC 鉄錯体を NO トラップ試薬として使用する上では、この様な DTC および DTC 鉄錯体の生理作用に関する理解が必要であるが、現状は不十分な状態にある。

NO トラップ試薬としての DTC 鉄錯体は、生体試料等への適用が先行し、NO との反応機構、NO 基含有化合物との反応性等の chemistry の解析が等閑にされており、分析試薬としての化学量論等も確立されているとは云えない。この様な種々の課題を内包しているものの、ジチオカルバメート誘導体は合成化学的に多様なデザインが可能であり、特異な性質を持つ NO トラップ試薬および生理的に穏やかな NO 消去試薬の創製の可能性を持っている。chemistry の解明と、有用な試薬の創製を追求したいと考えている。

参考文献

- 1) 吉村哲彦：一酸化窒素は生体や生体構成成分にどんな影響を与えるか。化学 40, 310-315, 1985.
- 2) R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, and S. Moncada: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526, 1987.
- 3) L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, E. B. Russel, and G. Chaudhuri: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265-9269, 1987.
- 4) P. L. Feldman, O. W. Griffith, and D. J. Stuehr: The surprising life of nitric oxide. *Chem. Eng. News* 71, 26-38, 1993.
- 5) 井上正康、佐藤栄介、山耕誠一、西川学、西泰明、内海耕造：活性酸素代謝とアポトーシス。第27回放医研シンポジウム、1995.
- 6) 吉村哲彦：NO の化学特性と生物学的ポテンシャル。「NO とスーパーオキシド：臓器特性と分子病態」(井上正康、佐藤英介、谷口直之、浅田浩二編) 日本アクセル・シュプリング出版、東京、1995, pp. 10-18.
- 7) S. Archer: Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 7, 349-360, 1993.
- 8) 吉村哲彦：生体内 NO 測定法。ファルマシア 29, 990-993, 1993.
- 9) 長野野雄：短寿命生理活性種一酸化窒素の測定法。ファルマシア 30, 879-881, 1994.
- 10) 吉村哲彦：生体内 NO の高感度分析法—現状と課題—。血管と内皮、6(増刊)、68-75, 1996.
- 11) N. N. Greenwood and A. Earnshaw: Chemistry of the Elements, 1st ed, Pergamon Pr., Oxford, 1984, pp 497-502.
- 12) J. S. Stamler: Redox signalling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78, 931-936, 1994.
- 13) G. B. Richter-Addo and P. Legzdins: Metal Nitrosyls. Oxford Univ Pr, Oxford, 1992.
- 14) Q. H. Gibson and F. J. W. Roughton: The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *J. Physiol.* 136, 507-526, 1957.
- 15) (a) T. Yoshimura: Nitric oxide, a versatile biological ligand for heme proteins. In *Bioradicals Detected by ESR Spectroscopy* (H. Ohya-Nishiguchi, L. Packer eds.), Birkhauser Verlag, 1995, pp. 217-235. (b) 吉村哲彦：NO

- とヘムおよび非ヘム鉄蛋白質との反応。磁気共鳴と医学、7, 9-13, 1996. (c) 吉村哲彦：一酸化窒素の多様な側面—金属タンパク質との相互作用を中心として。科学と工業 64: 357-364, 465-471, 1990.
- 16) (a) G. R. Buettner: Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Rad. Biol. Med.*, **3**, 259-303, 1987. (b) D. E. Wilcox and R. P. Smith: Detection and quantification of nitric oxide using electron magnetic resonance spectroscopy. *Methods*, **7**, 59-70, 1995.
- 17) T. Akaike, M. Yoshida, Y. Miyamoto, K. Sato, M. Kohno, K. Sasamoto, K. Miyazaki, S. Ueda, and H. Maeda: Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction. *Biochemistry* **32**: 827-832, 1993.
- 18) 片山佳樹、NO スカベンジャー及び NO 検出用としての Carboxy-PTIO. *Dojin News* **70**: 13-15, 1994.
- 19) H.-G. Korth, R. Sustmann, P. Lommens, T. Paul, A. Ernst, H. de Groot, L. Hughes, and K. U. Ingold: Nitric oxide cheletropic traps (NOCTs) with improved thermal stability and water solubility. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 2767-2777, 1994.
- 20) S. S. Greenberg, D. E. Wilcox, and G. M. Rubanyi: Endothelium-derived relaxing factor released from canine femoral artery by acetylcholine cannot be identified as free nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Circ. Res.* **67**, 1446-1452, 1990.
- 21) H. Kosaka, M. Watanabe, H. Yoshihara, N. Harada, and T. Shiga: Detection of nitric oxide production in lipopolysaccharide-treated rats by using carbon monoxide hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1119-1124, 1992.
- 22) H. Kosaka, Y. Sawai, H. Sakaguchi, E. Kumura, N. Harada, M. Watanabe, and T. Shiga: ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine-treated rats. *Am. J. Physiol.*, **266**, C1400-C1405, 1994.
- 23) E. Kumura, T. Yoshimine, S. Tanaka, T. Hayakawa, T. Shiga, and H. Kosaka: Nitrosyl hemoglobin production during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, **177**, 165-167, 1994.
- 24) P. Mordvintcev, A. Mülsch, R. Busse, and A. Vanin: On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* **199**, 142-146, 1991.
- 25) C.-S. Lai, and A. M. Komarov: Spin trapping of nitric oxide produced *in vivo* in septic-shock mice. *FEBS Lett.* **345**, 120-124, 1994.
- 26) T. Yoshimura, S. Fujii, H. Yokoyama, and H. Kamada: *In vivo* electron paramagnetic resonance imaging of NO-bound iron complex in a rat head. *Chem Lett.* 309-310, 1995.
- 27) A. Mülsch, A. Vanin, P. Mordvintcev, S. Hauschildt, and R. Busse: NO accounts completely for the oxygenated nitrogen species generated by enzymic L-arginine oxygenation. *Biochem. J.*, **288**, 597-603, 1992.
- 28) L. N. Kubrina, W. S. Caldwell, P. I. Mordvintcev, I. V. Malenkova, A. F. Vanin: EPR evidence for nitric oxide production from guanidino nitrogens of L-arginine in animal tissues *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 233-237, 1992.
- 29) L. N. Kubrina, V. D. Mikoyan, P. I. Mordvintcev, and A. F. Vanin: Iron potentiates bacterial lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in animal organs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1176**, 240-244, 1993.
- 30) A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, S. Hauschildt, and A. Mülsch: The relationship between L-arginine-dependent nitric oxide synthesis, nitrite release and dinitrosyl-iron complex formation by activated macrophages. *Biochim.*

Biophys. Acta, **1177**, 37-42, 1993.

- 31) A. Mülsch, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin, and R. Busse: Formation and release of dinitrosyl iron complexes by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**, 1303-1308, 1993.
- 32) A. L. Kleschyov, K. R. Sedov, P. I. Mordvintcev, and A. F. Vanin: Biotransformation of sodium nitroprusside into dinitrosyl iron complexes in tissue of ascites tumors of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 168-173, 1994.
- 33) M. Y. Obolenskaya, A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, A. Mülsch, and K. Decker: EPR evidence of nitric oxide production by regenerating rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 571-576, 1994.
- 34) A. Mülsch, R. Busse, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin, E. O. Nielsen, and J. Scheel-Krüger: Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. *NeuroReport*, **5**, 2325-2328, 1994.
- 35) V. D. Mikoyan, L. N. Kubrina, and A. F. Vanin: EPR evidence for nitric oxide formation via L-arginine-dependent way in stomach of mice *in vivo*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **32**, 1157-1160, 1994.
- 36) S. Sato, T. Tominaga, T. Ohnishi, and S. T. Ohnishi: EPR spin-trapping study of nitric oxide formation during bilateral carotid occlusion in the rat, *Biochim. Biophys. Acta*, **1181**, 195-197, 1993.
- 37) T. Tominaga, S. Sato, T. Ohnishi, and S. T. Ohnishi: Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in the rat: *in vivo* detection of the nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping. *Brain Res.*, **614**, 342-346, 1993.
- 38) S. Sato, T. Tominaga, T. Ohnishi, and S. T. Ohnishi: Electron paramagnetic resonance study on nitric oxide production during brain focal ischemia and reperfusion in the rat. *Brain Res.*, **647**, 91-96, 1994.
- 39) T. Tominaga, S. Sato, T. Ohnishi, and S. T. Ohnishi: Electron paramagnetic resonance (EPR) detection of nitric oxide produced during forebrain ischemia of the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **14**, 715-722, 1994.
- 40) A. Komarov, D. Mattson, M. M. Jones, P. K. Singh, and C.-S. Lai: *In vivo* spin trapping of nitric oxide in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 1191-1198, 1993.
- 41) C.-S. Lai and A. M. Komarov: Spin trapping of nitric oxide produced *in vivo* in septic-shock mice. *FBBS Lett.*, **345**, 120-124, 1994.
- 42) A. M. Komarov and C.-S. Lai: Detection of nitric oxide production in mice by spin-trapping electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1272**, 29-36, 1995.
- 43) J. L. Zwier, P. Wang, and P. Kuppusamy: Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, **270**, 304-307, 1995.
- 44) K. Oikawa, T. Ogata, Y. Lin, T. Sato, R. Kudo, and H. Kamada: Rapid field scan L-band electron spin resonance computed tomography system using an air-core electromagnet. *Anal. Sci.*, **11**, 885-888, 1995.
- 45) 藤井敏司、横山秀克、吉村哲彦、鎌田仁：ニトロシル鉄錯体をスピンプローブとした L-band ESR イメージング、磁気共鳴と医学、**7**, 169-172, 1995.
- 46) T. Yoshimura, H. Yokoyama, S. Fujii, F. Takayama, K. Oikawa, and H. Kamada: *In vivo* EPR detection and imaging of endogenous nitric oxide in lipopolysaccharide-treated mice. *Nature Biotechnol.*, **14**, 992-994, 1996.
- 47) (a) D. J. Stuehr and M. A. Marletta: Mammalian nitrite biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7738-7742, 1985. (b) U. Westenberger, S. Thanner, H. H. Ruf, K. Gersonde, G. Sutter, and O. Trentz: Formation of free radicals and nit-

- ric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. *Free Rad. Res. Comms.* **11**, 167-178, 1990.
- 48) (a) The Merck Index, 11th ed.: Dithiocarb sodium (3384). p. 533, 1989. (b) A. Townshend, et al. eds.: Dictionary of Analytical Reagents. Chapman & Hall, London, 1993, p. 327.
- 49) G. Renoux: Modulation of immunity by levamisole and dtc. *Int. Encycl. Pharmacol. Ther.* **115**, 393-410, 1985.
- 50) J.-M. Lang, et al.: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of dithiocarb sodium ('Imuthiol') in human immunodeficiency virus infection. *Lancet* 702-706, 1988.
- 51) (a) R. Schreck, B. Meier, D. N. Männel, W. Dröge, and P. A. Baeuerle: Dithiocarbamate as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* **175**, 1181-1194, 1992. (b) F. J. Bedoya, M. Flodström, and D. L. Eizirik: Pyrrolidine dithiocarbamate prevents IL-1-induced nitric oxide synthase mRNA, but not superoxide dismutase mRNA, in insulin producing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 816-822, 1995.
- 52) D. Cocco, L. Calabrese, A. Rigo, E. Argese, and G. Rotilio: Re-examination of the reaction of diethyldithiocarbamate with the copper of superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **256**, 8983-8986, 1981.

4. NO 測定法 NO の高感度分析について

ii) 生体内でのヘモグロビンによる NO のトラップ

小坂博昭

Hemoglobin as a physiological spin trapping agent for endogenous NO

Hiroaki Kosaka

Department of Physiology, Medical School, Osaka University,

2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

We studied the effect of interleukin 1 (IL-1), tumor necrosis factor (TNF) and interferon- γ (IFN- γ) on NO production in rats by detecting NO-hemoglobin (HbNO) in their blood using electron spin resonance (ESR) spectroscopy. Either IL-1 or TNF alone, but not IFN- γ alone stimulated NO-hemoglobin (HbNO) formation. Combined administration of IL-1 and TNF markedly enhanced HbNO generation, demonstrating synergistic character of both stimuli on NO production. Further, LPS and TNF in combination were more potent stimulator of HbNO production in rats than each alone. Addition of IFN- γ to the LPS-treated rats increased the TNF release markedly. These suggest that the increase of TNF release by IFN- γ plays a key role in LPS-treated rats with respect to NO generation. During these experiments, distinct three-line hyperfine structure of HbNO of α -NO heme species was present in venous blood but not in arterial blood. We have clarified the in vivo spectral differences. Ex vivo study using whole blood demonstrated that α -NO heme species increased and β -NO heme species decreased by the decrease of oxygen saturation of hemoglobin. Further the three-line hyperfine structure in the α -NO heme species increased by the decrease of oxygen saturation of hemoglobin, but disappeared upon reoxygenation of hemoglobin. Thus these changes in the three-line hyperfine structure between arterial and venous blood demonstrate in vivo quaternary structural transition of hemoglobin tetramer from high affinity state in arterial circulation to low affinity state in venous circulation. These results were applied to ischemic reperfusion models and to allograft rejection models to detect small amount of HbNO with distinct three-line hyperfine structure. The generation of NO from a nitrovasodilator was also proved because, when 15N-isosorbide dinitrate was injected into rats, the venous blood showed a two-line hyperfine structure of HbNO.

論文の要旨：

IL-1 と TNF の相乗効果により、ラットの末梢の組織、血管系で NO 合成酵素の誘導が起こり、生成された NO が循環している赤血球中のヘモグロビン (Hb) にトラップされて、ラット血中に全血ヘモグロビン (Hb) の 1% 弱もの HbNO が出現する。Hb は、 α 鎖、 β 鎖からなる 4 量体である。生体内では NO の α 鎖への選択的な結合がおこる。HbNO の電子スピン共鳴スペクトルは動脈血のオキシ型から末梢の組織での酸素飽和度の減少に対応して、静脈血の超微細構造を示すデオキシ型へと変化した。狭心症薬を投与した場合も動・静脈血中に同様な HbNO のスペクトル変化が観測された。他に移植拒絶反応時等や、脳虚血再灌流時にも NO が生成され HbNO が出現し、硝酸イオン濃度が上昇する。この NO の役割と意義の解明は終わっていない。

はじめに

一酸化窒素 (NO) の測定には、(i) 化学発光法、(ii) 硝酸イオンを還元してグリース試薬と反応させる分光法、(iii) ヘモグロビンに NO を結合させ測定、(iv) 金属錯体に NO をトラップさせ測定、(v) NO 電極法、(vi) ラジオアイソトープで標識したアルギニンからのシトルリンの生成を測定、(vii) サイクリック GMP (cGMP) の上昇を測定、等がある。それぞれ一長一短がある。NO はペプチド等と異なり、その化学的性質から生体中で不安定で特に活性酸素により酸化をうけやすく、またヘムに結合しやすい。ここでは筆者がよく使用している方法について解説して、他の方法については多くの成書に譲りたい。

生体内で NO をつくる酵素 (NOS) には神経型 NOS、血管内皮型 NOS、誘導型 NOS の 3 種類がみついている¹⁻⁶⁾。また肺高血圧症の改善に NO 吸入療法が効果がある。NO によって活性化をうける酵素として、以前から明らかなのはグアニル酸シクラーゼである。グアニル酸シクラーゼは、ヘムを含んでいて NO によって活性化され、cGMP を生成する。したがって、NO 合成酵素の阻害剤は cGMP 生成を遮断する。生理現象に NO が関与しているか否かについては NOS の阻害剤を投与して判断されることが多いが、阻害剤は、一般的にその特異性が問題となってくる。NO の生理作用をみるうえで現在、問題なのは 3 種類の NOS それぞれに特異的な阻害剤をみつけることであろう。最近、CO が NO と同じような生理作用をする可能性が報告されている。CO はグアニル酸シクラーゼを 4 倍活性化する (ちなみに NO はグアニル酸シクラーゼを 100-200 倍活性化する。グアニル酸シクラーゼのヘムに NO が配位することにより対側に配位していた塩基が解離し、5 配位となり活性化される)。この場合も CO を合成する heme oxygenase の阻害剤、metalloporphyrin を投与して生理現象の低下が観測されている。しかし、この metalloporphyrin はグアニル酸シクラーゼを直接、阻害することも報告されていて⁷⁾、heme oxygenase とグアニル酸シクラーゼを区別して阻害できる阻害剤をみつける必要がある。阻害剤には、これらの問題点があるので、生理現象の測定と同時に NO, CO の検出を行うことが必要になってくる。

これら、生体内での NO の生成を直接に検出するのは、NO が不安定な為、非常に難しい。また電子スピン共鳴 (ESR)、または電子常磁性共鳴 (EPR) スピントラップ法において、スピントラッピング剤として DBNBS を用いて、NO を捕捉した報告があったが、これはアーチファクトであることが窒素の安定同位体で置換した ^{15}NO ガスで明らかにされた⁸⁾。ここではヘモグロビン (Hb) と NO と結合が極めて強いこと、この結合物は NO がフリーラジカルの為、ESR で、検出・同定・定量出来ることを応用して行った例と NO の血中での最終産物、硝酸イオンの動きを追跡した結果を紹介する。赤血球中の Hb は体内循環中に NO や CO をトラップしていて、トラップ試薬を投与する必要がなく、生理的に影響をあたえる心

配がないというのが長所である。臨床的に血中の硝酸イオンの動きを追跡する場合、水や食物に含まれる硝酸塩の濃度を一定にしないと、血中の硝酸イオンのベースラインの変動が激しくなる、また点滴液中には硝酸イオンが存在しないので点滴により硝酸イオン濃度が希釈されるということを考慮に入れ、計画をたてないといけない。また、測定を妨害する薬物が存在しないか吟味する必要がある。

1. 生体内生成 HbNO の ESR スペクトル

動物にサイトカインを、特にインターロイキン1 (IL-1) と腫瘍壊死因子 (TNF) を同時に投与すると血中に1%弱のNOヘモグロビン (HbNO) が、ESRで、定量出来る。NOの生体内での寿命は短い、Hbはスピントラッピング試薬のようにNOと強く結合し、さらに動物血中HbNOのESRスペクトルは酸素飽和度も示すことを以下で紹介する。

ラットにLPSを投与して数時間後に採取した血液の低温スペクトルに3本線シグナルが観測された。この3本線を示すHbNOの分子種は、 α サブユニットのヘム鉄にNOが結合し、 β サブユニットのヘム鉄が酸化された荷電混成Hbであると報告された⁸⁾。しかし、動物の血中から得られたHbNOのESRスペクトルの形は、一定しなかった。スペクトルの形が一定しない理由をまず述べ、次にIL-1, TNFの他にインターフェロン γ (IFN- γ) も動物に投与して発現したHbNO量について検討した結果を示す。

1.1 HbNOのESRスペクトルの動・静脈差 LPSとIL-1を投与し、6時間後には誘導型NOSによるNO生成が盛んになる。この時に採血し、素早くESR用石英試料管に入れ、ただちに液体窒素中で凍結した。図1に示すように動脈血と静脈血でHbNOのESRスペクトルの形が異っている。また静脈血にはNOの窒素(14N)の核スピンによる超微細構造、3本線が顕著であるが、動脈血にはみられない。

図2には、Lから順にHbAテトラマー、単離したHb β 鎖、単離したHb α 鎖、それぞれのヘムにNOを配位したESRスペクトルを示す。NO- β 鎖の場合は高磁場側にピークが、NO- α 鎖の場合は低磁場側に肩がでてきて、両者のスペクトルを足すとHbA-NOのスペクトルとなる。図1の動脈血のESRスペクトルがNO- α 鎖の場合のESRスペクトルとよく似ている。Hbは2個の α 鎖、2個の β 鎖からなり、酸素の結合・解離に、肺では酸素を吸着しやすく、末梢では酸素を解離しやすいように四次

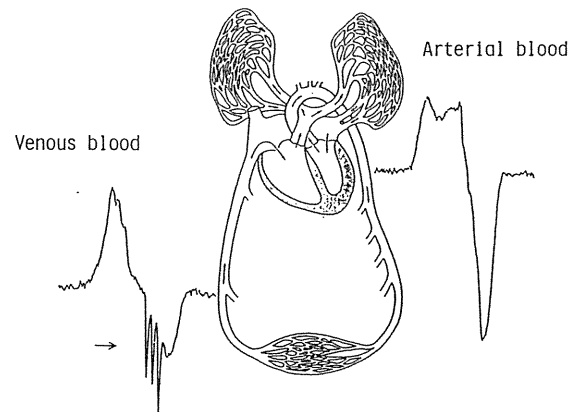


図1 LPSとIL-1を投与されたラットの血中に出現したHbNOのESRスペクトルの動・静脈血における差異：静脈血では3本線の超微細構造の出現をみた。矢印の幅は5mTに相当する。

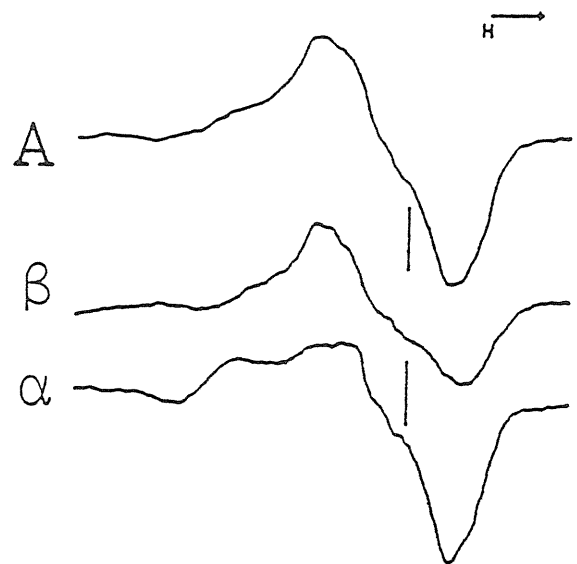


図2 HbAテトラマー(A)、単離したHb β 鎖(β)、単離したHb α 鎖(α)、それぞれのヘムにNOを配位したESRスペクトル(文献20より)。

構造を変化させている四量体である。酸素との親和性の低下した T 状態のデオキシヘモグロビンに酸素が結合しはじめると、酸素との親和性の高い R 状態へと四次構造変化をおこす (Relaxed, R state はヘムに酸素が結合しやすくなるヘモグロビンの四次構造状態、Tense, T state は酸素が結合しがたくなる四次構造状態)。リガンドが CO でも NO であっても同じ変化がおきる。

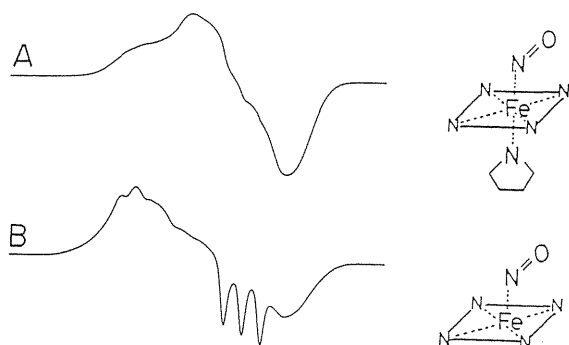


図3 R 状態 (6 配位) の HbNO の ESR スペクトル (A) と IHP を添加した場合 (B)。強い allosteric dffector であるイノシトール-6リン酸 (IHP) を添加した場合、T 状態となる為、 α 鎖が 5 配位となり、超微細構造 (3 本線) が出現してくる。右側にヘム部分の構造を示した。

Hb の全ヘムに NO が結合すると、R 状態、6 配位で、超微細構造である 3 本線はみられない (図 3)。強い allosteric effector であるイノシトール-6リン酸 (IHP) を添加した場合、T 状態となる為、 α 鎖が 5 配位となり、超微細構造が出現してくる (図 3)。そこで、HbNO の ESR スペクトルの動・静脈における差異は静脈において酸素が結合せず NO が 1 個程度結合した T 状態に傾いている Hb 分子種が出現してくるためではないかと考えた。NO のほうが酸素よりも Hb との親和性が強いのでこの Hb 分子種は可能である。

実際に、動脈から静脈への経過中におこるスペクトル変化を再現してみた。LPS をラットに投与して

から 6 時間後に採取した動脈血に、窒素ガス (5% CO₂ 含) を吹き付けていくと、NO- α 鎖がほとんどである R 状態の ESR スペクトルから T 状態のそれへと変化した。3 本線の強度は、酸素飽和度の減少とともに増加した。Hb は「末梢の組織で酸素を離しやすく、また肺胞で酸素を吸着しやすく」という矛盾した生体の要求に四次構造状態を変化させ、酸素親和性を変えて応えているという現象を、NO をスピラベルした様なヘモグロビン分子種の ESR スペクトルでみたことになる。

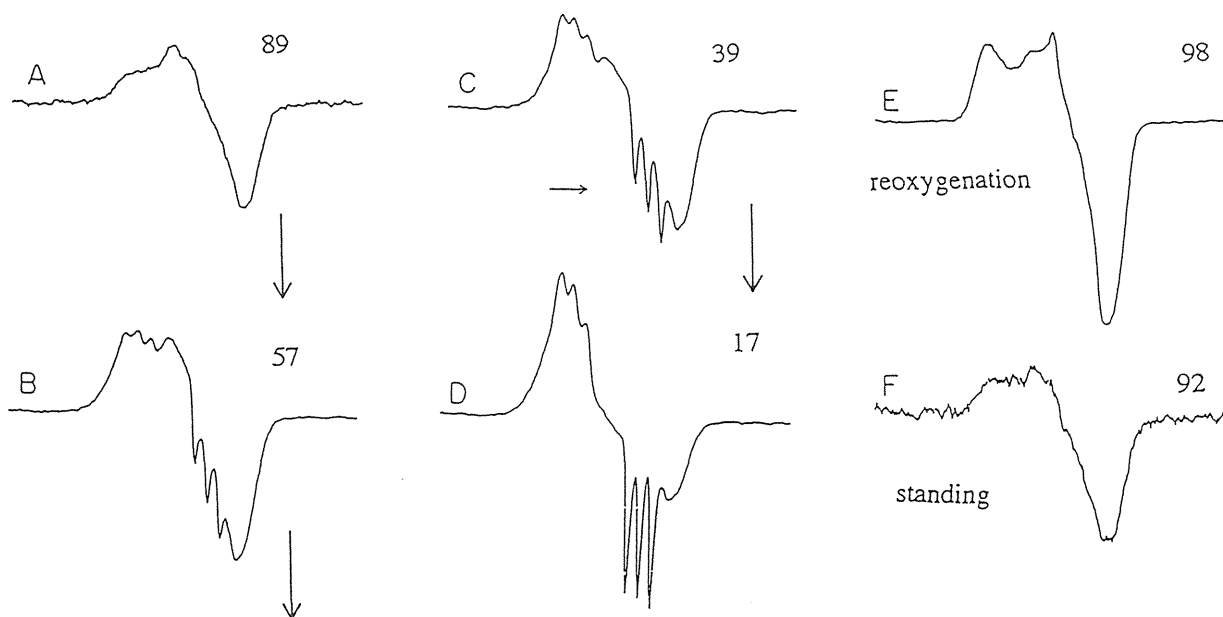


図4 酸素解離に伴う赤血球中 HbNO の ESR スペクトルの静脈血型への変化と再酸素化による動脈血型への劇的な変化: ラットの動脈から採取した血液を、溶血させずにそのまま α 鎖と β 鎖に均等に少量の NO を配位させた (A)。右肩の各数字は酸素飽和度 (%) を示す。

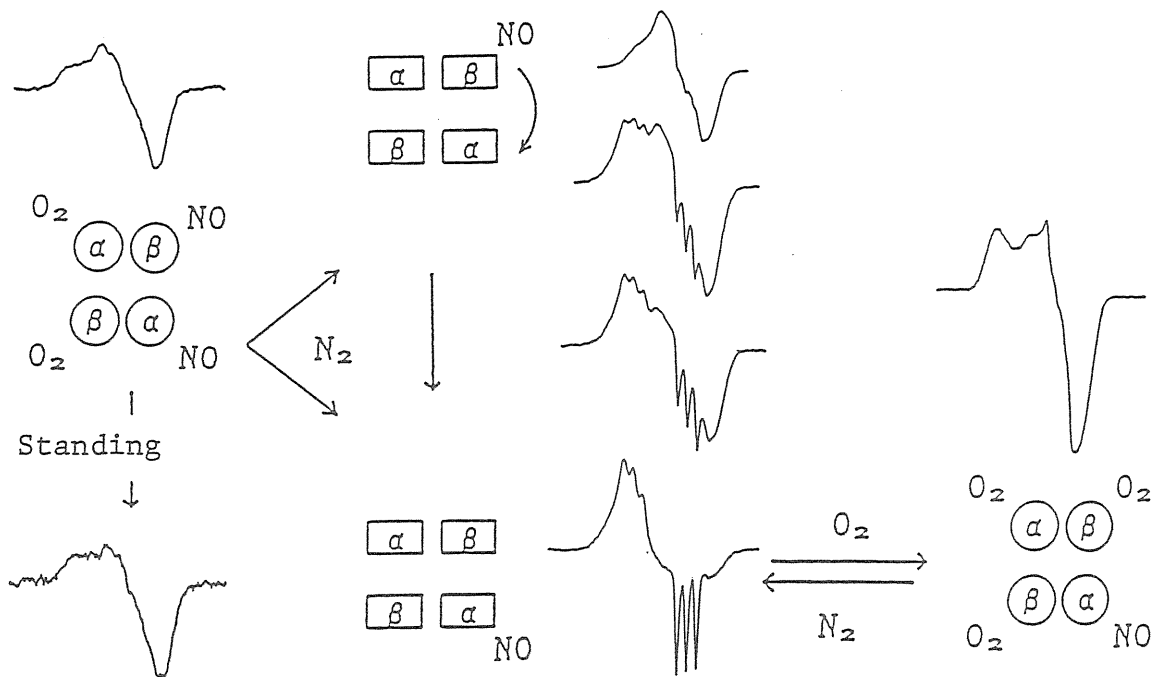


図5 HbNO のスペクトルに相当する Hb サブユニットの状態。R 状態にあるサブユニットは丸、T 状態のそれは四角で示している。

生体内では、何故 NO-β鎖がほとんどみられなくて NO-α鎖が多いのだろうか。試験管内ではこんなことはない。実際ラットの動脈から採取した血液に NO を少量発生するものを添加すると、Hb の α鎖と β鎖に均等に配位する (図 4 A)。これに窒素ガス (5% CO₂ 含) を吹き付けていくと酸素飽和度の低下とともに相対的に β鎖-NO のスペクトルの割合が減少して T 状態の超微細構造をもった α鎖-NO のスペクトルが増加していく。酸素飽和度 17% では β鎖-NO はほとんどない (図 4 D)。この Hb に酸素を十分に結合させると R 状態の 3 本線をもたない α鎖-NO のスペクトルへと変化した (図 5 E)。体内では、肺胞上での循環中にこれが起きている。窒素ガスを吹き付けない場合は最初の α鎖、β鎖に均等に NO が配位したスペクトルとほぼ同じである (図 4 F)。

以上の概要を図 5 で示す。NO は R 状態の Hb の α鎖・β鎖に均等に配位する。しかし、血液が末梢の組織を微小循環中に、酸素がヘムから解離して組織へ供給されると一部の Hb は T 状態のほうにシフトする。T 状態に傾いた Hb₄ 量体では、NO と Hb-α鎖の結合は NO と β鎖との結合より強くなる。β鎖から解離した NO は組織へ拡散していく可能性があり、またリガンドの結合していない α鎖に遭遇すれば捕捉されるだろう。次に血液は右心を経て肺胞循環中にリガンドの結合していないヘムに酸素が結合して R 状態となりスペクトルが変化する。また、末梢組織中で持続的に生成している NO が微小血管中で Hbβ鎖よりも α鎖の方につくという状態もイメージできる。これらのラットの動脈血中 HbNO 量と静脈血中 HbNO 量は、ほぼ同じであった。局所的な NO 生成量の差があっても全身を循環する間に平均化されてしまう為だろう。

以上に示したように血中の HbNO の ESR スペクトルが一定しない理由は、「採取した動物血液を液体窒素中で凍結する時の酸素飽和度の違いにより、R 型と T 型の割合が変化する為である」ことが明らかとなった⁹⁾。血中 HbNO 濃度を求めるには、ESR スペクトルの形が一定していないのでそれを二重積分して、既知濃度の標準品を同じ条件で測定して求めた二重積分値と比較して求められる。次に、各サイトカインをラットに投与して 6 時間後に採血して、検出した HbNO の濃度を求めた。

1.2 サイトカインの関与 LPSで刺激された細胞はインターロイキン1 (IL-1) や腫瘍壊死因子 (TNF) を放出する。これら IL-1, TNF によって NO 生成酵素が誘導されるのか否かについて、ラットの血液中の HbNO 量を指標に上記の方法で調べてみた。IL-1 と TNF はマクロファージ等から放出されるサイトカインであり、多彩な重複する活性を持つ。しかし IL-1 と TNF の NO 生成におよぼす顕著な相乗効果がみられた (図6)。また、TNF と LPS の同時投与でも顕著な相乗効果がみられた。IFN- γ はこれらによる HbNO の発現を増加させたが、それ自身では HbNO を発現させなかった。

LPS 投与により IL-1, TNF が一時的に放出されるが、IFN- γ は TNF の放出と NO 生成を持続的に増大させた。上記の結果とも考え合わせ、炎症の際、TNF が NO 生成量の調節を行っている可能性がある¹⁰⁾。

2 狭心症薬と NO 上述のように静脈血からの HbNO の ESR スペクトルは、超微細構造を示す。狭心症薬を人間に投与して、静脈血から微量の HbNO を検出しようとする場合、超微細構造のない ESR スペクトルは、HbNO と断定しかねる。人類はニトログリセリンを経験的に狭心症の治療に使用してきたにもかかわらず、耐性の問題とか、どの細胞のどの酵素系が代謝に関与しているのか未知の部分が多い。ニトログリセリンの中間代謝産物として、

NO₂⁻ が生成され、これが NO になると示唆されているが、確認されていない¹¹⁾。私達は、冠拡張薬の一つ、isosorbe dinitrate (ISDN) のニトロ基から、NO が生じていることを、安定同位体を用いて動物で証明した

(図7 B、窒素の安定同位体 (15N) による HbNO の 2 本線の超微細構造がみえている)。赤血球中にも冠拡張薬を代謝して、NO を生じる系が存在することを安定同位体を用いて示した。全血と ISDN を嫌氣的に混合させると、混合直後は 3 本線が見えるが、洗浄赤血球の場合だと、始めから 2 本線だけであった。赤血球内に多分ニトロソチオールがこの時の全血に存在していて洗浄中に分解してしまったのではないかと思われる。試みに、健康な 5 人から採血した全血を嫌氣的にするだけで、そのうち 3 人から HbNO を検出した。図8に示したように、溶血液中の HbNO 生成量は全血および洗浄赤血球中の場合と同様に直線的に増加した。この赤血球による ISDN の代謝系が従来ニトログリセリンで報告されているグルタチオン-S-トランスフェレーズまたはチオールによるものかを検討するために、それぞれの阻害剤として、S-ヘキシルグルタチオン、または N-エチルマレイミドを添加してみたが阻害はみられなかった¹²⁾。

3 虚血再灌流と NO 当大学脳神経外科との共同研究により、ラットを用いた脳部分虚血再灌流のモデ

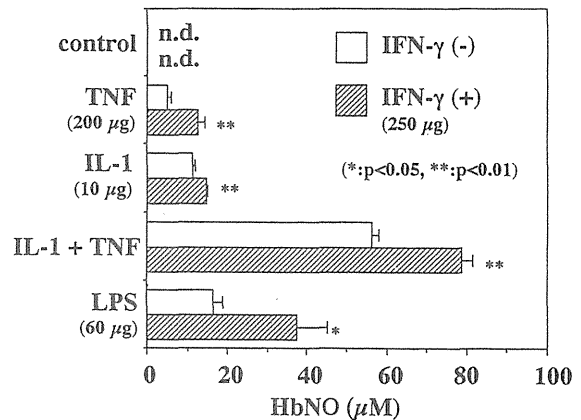


図6 サイトカインの NO 生成に及ぼす相乗効果：グラフは 6 時間後のラット血液中の HbNO 濃度を示す。

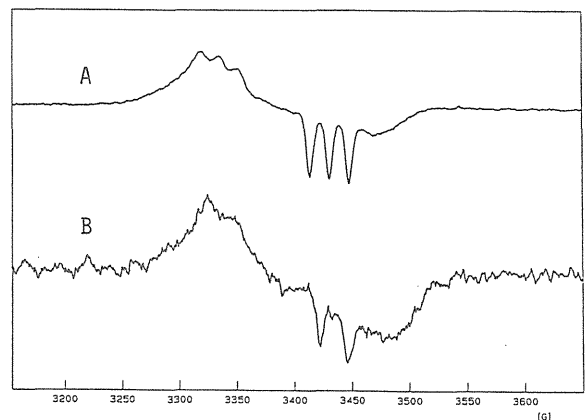


図7 A：ラットに ISDN 溶液を注射した時の静脈血中 HbNO (天然の窒素の核スピンによる 3 本線の超微細構造)。
B：ラットにニトロ基の窒素を安定同位体で置換した ISDN の溶液を注射した時の静脈血中 HbNO (2 本線の超微細構造)。

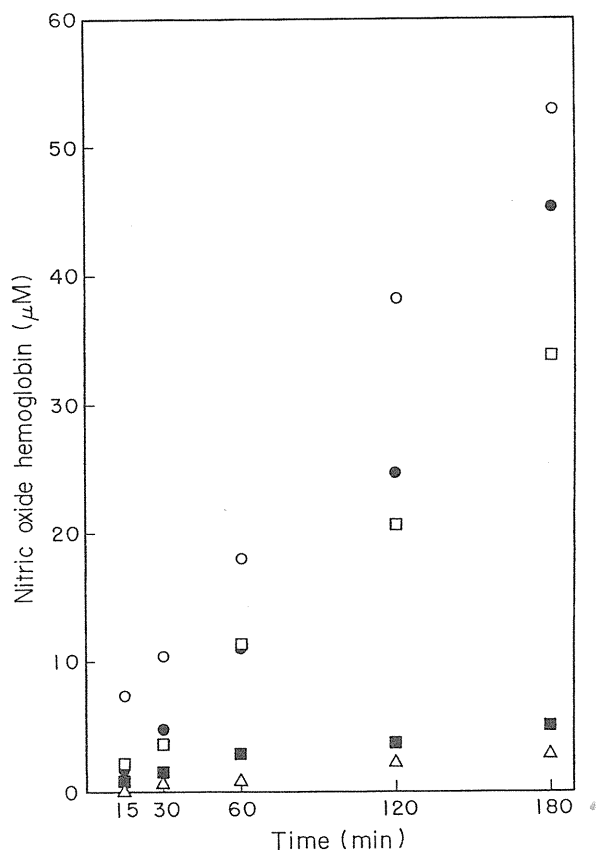


図8 嫌気状態での ISDN からの HbNO 生成量の時間経過、○、全血；●、洗浄赤血球液；□、溶血液；■、plasma；△、緩衝液・plasma と緩衝液には Hb を NO の捕捉の為に添加した。

この HbNO は、末梢の組織での酸素飽和度の減少に対応して、R 型から超微細構造を示す T 型へと変化し、NO の Hb- α 鎖への結合がおこることを ESR で示した。これは末梢の組織、血管系で NO 合成酵素の誘導が起こり、NO が Hb にトラップされた結果である。虚血再灌流により、活性酸素が生成することは以前からわかっていたが、NO も放出されることが明らかとなった。さて、脾移植はまだ成功率が低い。ラットの脾の移植拒絶反応時、拒絶により血糖が再上昇するよりも、6 日前に HbNO の著明な出現をみた¹⁹⁾。これは当大学第一外科との共同研究の結果であるが脾移植に応用できる可能性がある。肺でも検討中である。この NO の役割と意義はどうだろうか？これに関し、3 種の NOS に対応するノックアウトマウスも開発された。

文 献

- 1) Wagner, D. A. et al. Mammalian nitrate biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **80**, 4518-4521 (1983).
- 2) Hibbs, J. B. et al. Macrophage cytotoxicity: Science **235**, 473-476 (1987).
- 3) Furchgott, R. F. et al. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature **288**, 373-376 (1980).
- 4) Palmer, R. M. J. et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature **327**, 524-526 (1987).

ルにおいて、血中に NO の上昇を検出した。NO は血中では Hb の存在によって大部分硝酸イオンへと変化しているので、亜硝酸イオンに還元してグリース法で測定した。脳部分虚血 1 時間の後、30 分の再灌流時に血漿中の亜硝酸イオン+硝酸イオンは有意の増加を示した。またこの増加は、NO の合成阻害剤の投与によって抑制された。L-arginine はこの抑制を解除した。再灌流時に HbNO も電子スピン共鳴にて検出した^{13,14)}。これは脳だけに限定された現象ではなく当大学第一内科との共同研究により、心臓の虚血再灌流のモデルにおいても^{15,16)}、当大学第一外科との共同研究により、脾臓の虚血再灌流のモデルにおいても同様に NO の上昇を検出した¹⁷⁾。再灌流時に活性酸素が発生するが多いが、NO も生成されることが明らかになった。活性酸素と NO は非常に早く反応し、パーオキシナイトライトを生成し、蛋白質のチロシンのニトロ化をおこすことがわかっている¹⁸⁾。

おわりに

IL-1 と TNF の相乗効果により、ラット血中に全血ヘモグロビンの 1% 弱もの HbNO が出現する。

- 5) Bredt, D. S. et al. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714-718 (1991).
- 6) Luo, D. & Vincent, S. R. Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation. *Eur. J. Pharmacol.* **267**, 263-267 (1994).
- 7) Pou, S. et al. Can nitric oxide be spin trapped by nitron and nitroso compounds? *Biochim. Biophys. Acta* **1201**, 118-124 (1994).
- 8) U. Westenberger, et al. Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. *Free Rad Res. Comms.* **11**, 167-178, 1990.
- 9) Kosaka, H. et al. ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine-treated rats. *Am. J. Physiol.* **266**, C1400-C1405 (1994).
- 10) Kosaka, H. et al. Effect of interferon- γ on nitric oxide hemoglobin production in endotoxin-treated rats and its synergism with interleukin 1 or tumor necrosis factor. *LIFE SCIENCES*, **54**: 1523-1529 (1994).
- 11) K. E. Hill, et al. Metabolism of nitroglycerin by smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 561-566 (1992)
- 12) H. Kosaka, et al. Direct proof of nitric oxide formation from a nitrovasodilator metabolised by erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 1055-1060, (1994).
- 13) Kumura, E. et al. Elevation of plasma nitric oxide end products during rat focal cerebral ischemia and reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14**: 487-491 (1994).
- 14) Kumura, E. et al. Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am. J. Physiol.* **270**: C748-C752 (1996).
- 15) K. Node, et al. Plasma nitric oxide end products are increased in the ischemic canine heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 370-374, (1995).
- 16) K. Node, et al. Increased release of nitric oxide during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction. *Circulation* **93**: 356-364 (1996).
- 17) S. Tanaka et al. Detection of nitric oxide production and its role in pancreas ischemia/reperfusion in rats. *Am. J. Physiol.* (1996), in press.
- 18) J. S. Beckmann et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **375**, 81-88, 1994.
- 19) S. Tanaka et al. Generation of nitric oxide as a rejection marker in rat pancreas transplantation. *Transplant.* **60**: 713-717, 1995.
- 20) Shiga T et al. Electron paramagnetic resonance studies of nitric oxide hemoglobin derivatives. *Biochemistry* **8**: 378-383, 1969.

4. NO 測定法 NO の高感度分析について

iii) Nitronyl nitroxides による NO の定量的検出

赤池孝章

Quantification of NO by Using Nitronyl Nitroxides

Takaaki Akaike

Department of Microbiology, Kumamoto University

School of Medicine, Kumamoto 860, Japan

Abstract

To date much attention has been paid to diverse functions of nitric oxide (NO) in a wide range of physiological and pathological phenomena. We have reported that a series of aromatic nitronyl nitroxides react chemically with NO and thus scavenges NO effectively in biological systems. The chemistry of the reaction of nitronyl nitroxides with NO is very simple in that NO is oxidized by nitronyl nitroxide, yielding one mole each of iminonitronyl and nitrogen dioxide in a stoichiometric manner. Based on a stoichiometric reaction of nitronyl nitroxide with NO, we developed a quantitative assay for NO produced biologically by using one of the derivatives of nitronyl nitroxide which was stabilized by incorporating the nitronyl nitroxide into liposome. In this article, the unique reaction of nitronyl nitroxides with NO is reviewed briefly and subsequently a novel assay for quantitation of NO produced in biological systems is described.

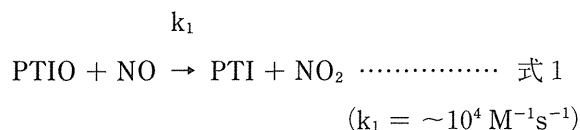
1. はじめに

近年、生体内における一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の多彩な生物活性が注目されており、NO の生成酵素である NO synthase (NOS) が、多様な細胞／組織に発現されていることが知られている¹⁾⁻⁵⁾。しかしながら、endothelium-dependent relaxing factor (EDRF) 以外の NO の生理機能については、今だに不明な点も多い。NO の機能解析を困難にしている最も大きな要因は、NO が不安定な無機ラジカルであり、その取り扱いが難しく、また、その定量的検出法が必ずしも確立されていないことなどである。我々は、これまで、有機ニトロニルニトロオキサイド化合物 (nitronyl nitroxides) を用いて、生物学的系において

生成する NO の特異的消去反応の解析と定量的検出法の開発を行ってきた⁴⁾⁻⁶⁾。そこで、本稿では、nitronyl nitroxide 化合物を用いた生体系における NO の定量的な検出法について述べる。

2. NO 消去剤 nitronyl nitroxide を用いた NO の定量的検出

生物学的系において生成する NO の生理学特性を解析するためには、水系において放出された NO を特異的に消去し、さらには、NO 生成を定量的に計測する方法が不可欠である。我々は、1991 以来、nitronyl nitroxide と呼ばれる有機ニトロオキサイド化合物のうち、2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-1-oxyl-3-oxide (PTIO) とその誘導体が、水溶液中および生体系より生成する NO と効率よくモル比 1 : 1 で反応することにより NO を消去し、かつ、その反応に伴い electron spin resonance (ESR) 上 (室温測定)、明瞭なシグナルの変化を与えることを利用し、NO 生成量が検出可能であることを示してきた (図 1)⁴⁾⁻⁵⁾。



(PTI; 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-1-oxyl)

従って、PTIO は、強い EDRF 抑制作用を発現し、ex vivo および in vivo の系において、NO 消去剤として応用することができる⁴⁾⁻⁷⁾。しかしながら、これまでの PTIO 誘導体は、その他の有機ニトロオキサイドラジカル化合物と同じ様に、アスコルビン酸やシステイン、ジチオスレイトール等の還元物質や superoxide anion radical (O_2^-) により容易に還元され、NO との反応性を失った N-hydroxy 体となってしまいうという大変深刻な欠点があった。特に、血液 (血漿) 細胞、組織中には、たくさんの還元物質、および還元酵素が存在しており、PTIO 誘導体を用いて、生体系において NO を検出する場合は、PTIO の非特異的な還元反応が大きな問題点となる。

3. PTIO 誘導体のリポソーム化による安定化

我々は、この様な PTIO 誘導体の欠点を克服するため、より安定で NO との反応において特異性の高い誘導体の開発、努力を行ってきた。その結果、最近になって、PTIO 誘導体をリポソーム膜に包埋することにより (liposome PTIO)、生体系における PTIO の安定性が劇的に改善し、かつ、NO の捕捉効率も十分保たれた formulation の作製が可能であることが明らかとなった。nitronyl nitroxide のリポソーム化による安定化についての予備的なデータについては、ロシアのグループによって 1994 年に報告されているが⁸⁾、我々はさらに、リポソーム膜組成を変化させることにより、生物学的にも安定で、より実用的なりポソームの調整に成功した。すなわち、脂質膜に含まれた PTIO は、様々な還元システムにも直接さらされることがないため、NO との反応性を長時間維持できるし、NO の lipophilicity により、NO は脂質膜を

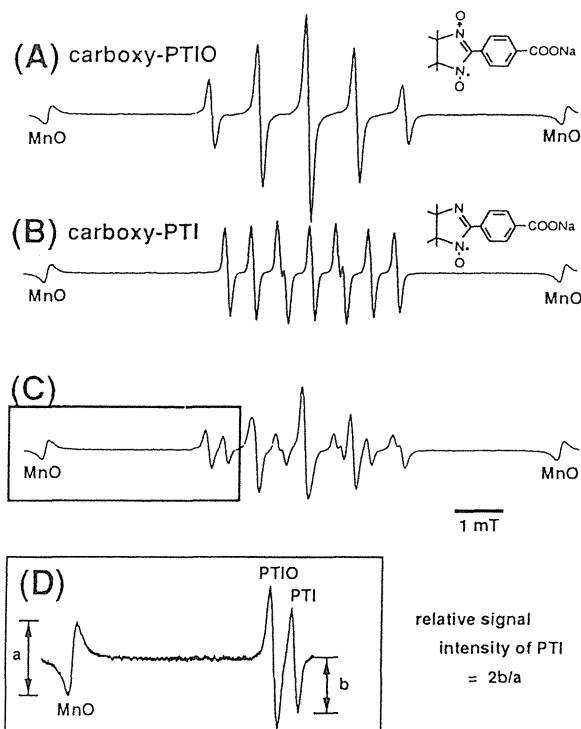


図 1. PTIO および PTI の ESR スペクトラム。

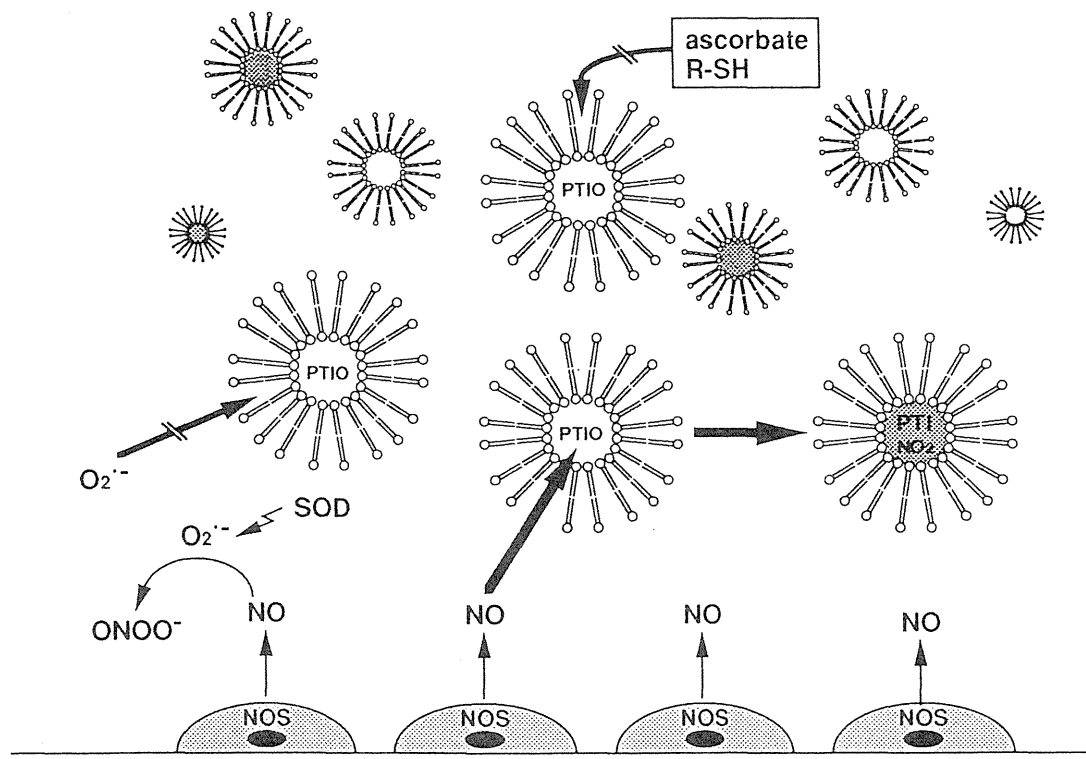
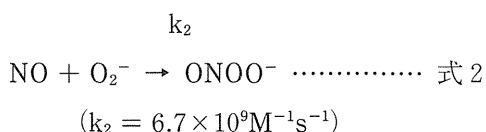


図2. liposome PTIO と NO との反応スキーム。

自由に通過し、PTIO と特異的に反応することができる (図2)⁹⁾。

このような liposome PTIO の NO との反応性を様々な NO 放出剤を用いて解析することができる。例えば、Keefer らにより合成され¹⁰⁾、既に市販品として普及している NONOate と呼ばれる polyamine/NO 化合物 (図3) により水溶液中において自発的に NO を放出させ、NO を liposome PTIO に捕捉させ、liposome PTIO の生成量を経時的に ESR により測定した場合 (NO アミン化合物は、強アルカリ溶液中では安定で、中性～酸性域で NO を遊離する)、本化合物より NO が、1 分子あたり 2 分子遊離されることが確認された (図4)。このことは、liposome PTIO を用いて NO の絶対的定量法が確立されることを示している⁹⁾。尚、liposome PTIO を用いた NO の検出限界は、ESR のコンピューターデータ処理システム (日本電子; Labotec) 等を用いることにより、0.01 μ M 程度まで改善する。

さらに、もう一つの興味ある NO 放出剤として、SIN-1 (3-morpholinosydnonimine) を挙げることができるが、本化合物は、その自発的分解過程 (中性～アルカリ性の pH 域で分解し、強酸下では安定) で O₂⁻、さらに NO を放出する¹¹⁾。この O₂⁻ と NO の放出反応 liposome PTIO を用いて定量的に検出できる (図5)。liposome PTIO により測定した 37 $^{\circ}$ C、リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中での 1 mM SIN-1 よりの NO 放出速度は 2 μ M/min 程度であるが、同時に存在する O₂⁻ による NO のすみやかな消去反応のため (式2)¹²⁾、その NO 放出は NO アミン化合物の様に単純なものではない。



一方、SIN-1 の NO 放出反応の系に、O₂⁻ の消去酵素である superoxide dismutase (SOD) を共存させ、O₂⁻ を消去させることにより (式3)¹³⁾、SOD は NO と競合し、NO の liposome PTIO による検出量は増

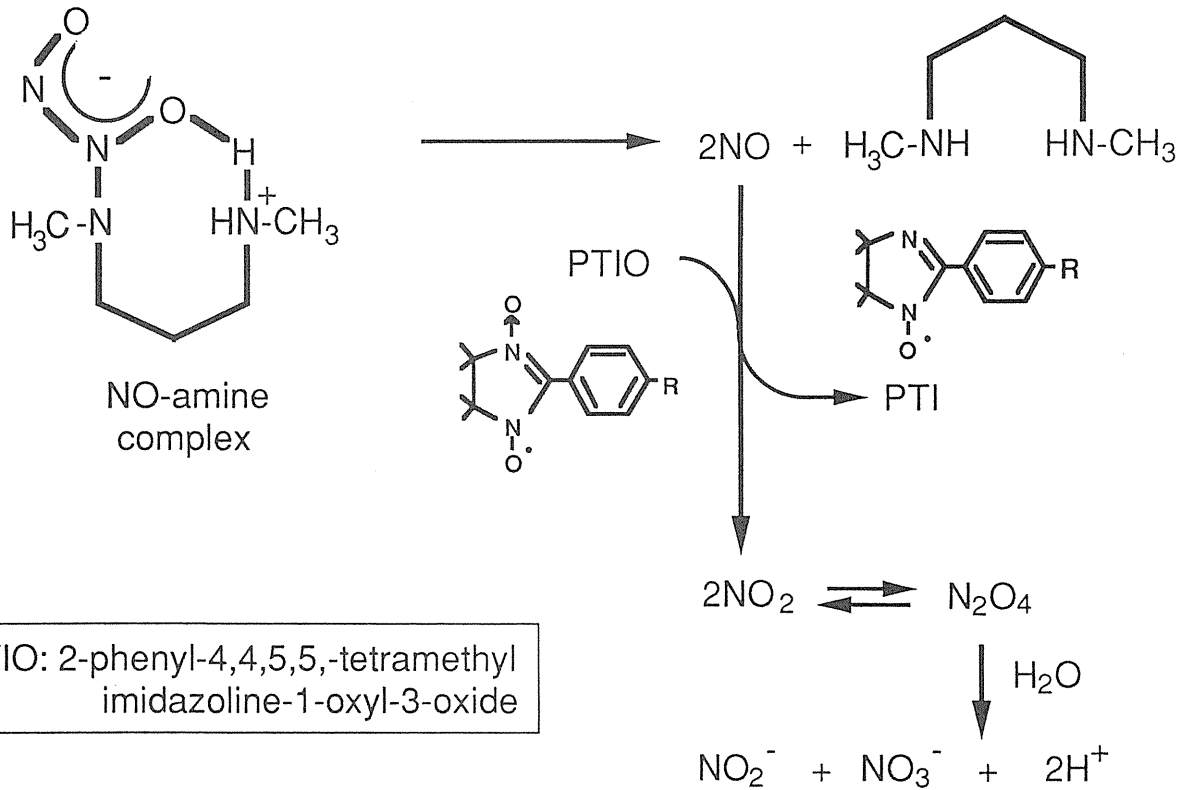


図3. NO アミン化合物 (NONOate) よりの NO の放出と PTIO との反応機構。

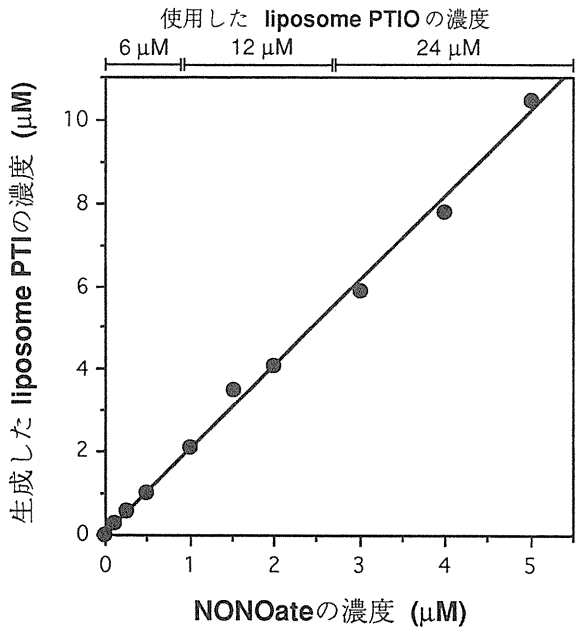


図4. NO アミン化合物 (図3参照) より放出される NO の liposome PTIO を用いた定量的測定。liposome PTIO と NO の反応生成物である liposome PTIO を ESR により定量した。各種濃度の NONOate と liposome PTIO を 37°C で 30 分反応後、ESR 測定を行った。NONOate の濃度に依存した直接的な liposome PTI の生成が認められ ($r^2 = 0.998$)。かつ、その直線の傾きがほぼ 2 であることより、liposome PTIO により、1 分子の NONOate から放出される 2 分子の NO がほぼ 100% 捕捉されていることがわかる。

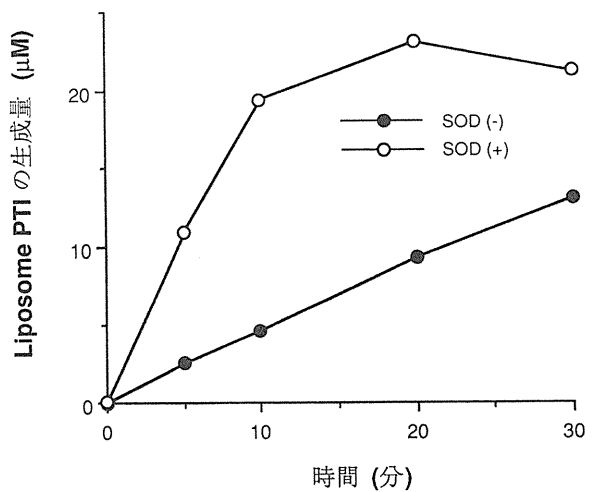
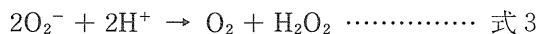


図5. SIN-1 よりの NO 放出の liposome PTIO による検出。SIN-1 (1mM) を PBS (pH7.2)、37°C にて liposome PTIO (25μM) とインキュベーションし、Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) (1mg/ml) の影響を検討した。SOD 存在下での SIN-1 (1mM; 37°C) の NO 放出速度は 2.2μM/min (初期の 5 分間) と算出される。

加する。

SOD



k_3

$$(k_3 = 1.9 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$$

このことは、 O_2^- 生成系やその他の内因性の NO 消去系 [heme および nonheme iron (Fe^{2+})] を含む生体内の NO 生成システムにおいても、liposome PTIO により、NO 生成量を定量的に検出できることを示している。

4. liposome PTIO を用いた細胞より放出される NO の定量的検出

上述の様な liposome PTIO の NO との反応特性および、その生物学的系における安定性を利用して、NOS を発現している細胞より細胞外に放出される NO を生理学的条件下 (37°C 水系) で測定することができる。

図 6 にマウスマクロファージ樹立化細胞 RAW264 あるいはヒトグリオブラストマ樹立化細胞 A172 から放出される NO を liposome PTIO を用いて検出した具体例を示す。liposome PTIO による NO の検出限界は、現在のところ、細胞を NO 生成系として用いた場合、 1×10^6 cells あたり 10 pmol 程度であろうと考えている。これらの細胞は、サイトカイン刺激により誘導型 NOS (iNOS) を発現し、NO の細胞外放出は、その発現の時間経過と完全に相関する (図 7)。

さらに、前項に述べた SIN-1 よりの NO 放出の検出の場合と同様に、マクロファージの培養系に SOD を添加することにより、liposome PTIO の生成量は有意に増加する。マクロファージ等の細胞には、その細胞膜内に O_2^- 産生酵素である NADPH oxidase が発現されていることが知られている。従って、このような SOD による NO の生成増加作用は、本細胞培養系において、NO が内因性の O_2^- により消去され、その結果 peroxynitrite (ONOO^-) が産生されていることを間接的に示唆しているものである。

5. まとめ

以上、PTIO 誘導体による NO の消去反応と NO の定量的測定法について概説した。今後、NO に対し、特異的反応性を示し、かつ生体系でも安定な liposome PTIO を用いることにより、生物学的系において生

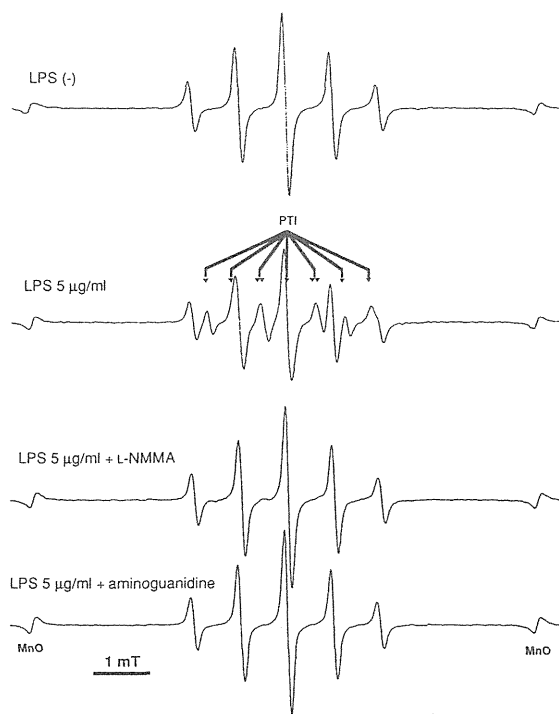


図 6. マウスのマクロファージ樹立化細胞、RAW264 から細胞外へ放出された NO の liposome PTIO を用いた測定。RAW264 (1×10^6 cells) を LPS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激、非刺激後 12 時間後の NO 放出 (1 時間あたり) を liposome PTIO で測定した。L-NMMA (1mM)、aminoguanidine (1mM) 添加により LPS 刺激に伴った liposome PTIO (図中▼) の生成は抑制される。

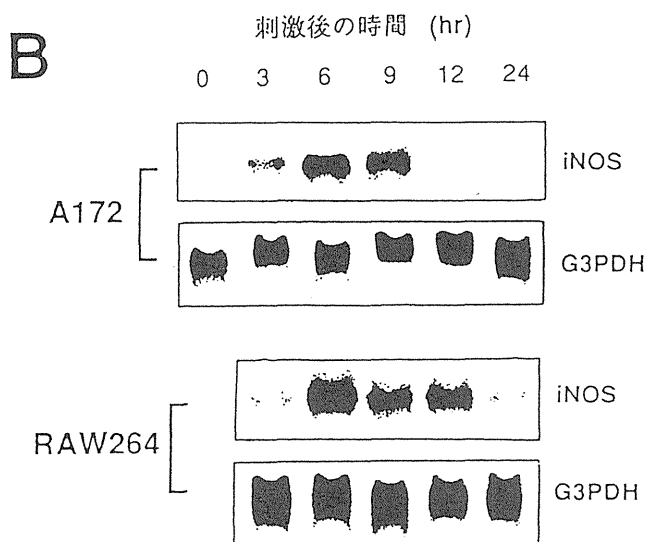
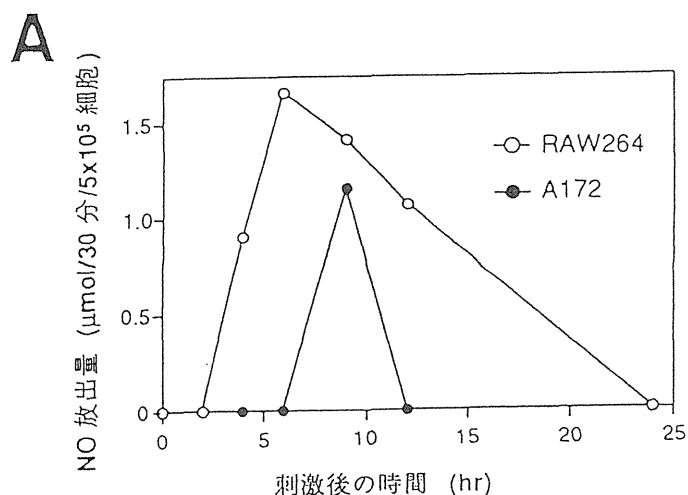


図7. liposome PTIO を用いて測定した RAW264 および A172 細胞からの NO の放出量と iNOS mRNA の発現の時間推移。RAW264 細胞は、LPS 10 μ g/ml, IFN- γ 100U/ml, A172 細胞は、LPS 10 μ g/ml, IL-1 β 100ng/ml, IFN- γ 1000U/ml, TNF- α 1000U/ml により刺激し、iNOS mRNA は Northern blot 法により解析した。

成する NO のより正確な定量法が確立するものと思われる。

文 献

- 1) Moncada, S., and Higgs, A.: *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012, 1993.
- 2) Stuehr, D.J., and Griffith, O.W.: *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology* **65**, 287-346, 1992.
- 3) Akaike, T., et al.: *J. Neuro Virology*, **1**, 118-125, 1995.
- 4) Maeda, H., et al.: *J. Leuk. Biol.* **56**, 588-592, 1994.
- 5) Akaike, T., et al.: *Biochemistry* **32**, 827-832, 1993.
- 6) Yoshida, K., et al.: *Infect. Immun.* **61**, 3552-3555, 1993.
- 7) Yoshida, M., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 923-930, 1994.
- 8) Woldman, Y.Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 195-203, 1994.
- 9) Akaike, T., and Maeda, H.: *Methods Enzymol.* **268**, 1996 (in press).
- 10) Hrabie, J. A., et al: *J. Org. Chem.* **58**, 1472-1476, 1993.
- 11) Feelisch, M., et al.: *J. Cardiovascular Pharmacol.* **14**, S13-S22, 1989.
- 12) Huie, R.E., and Padmaja, S.: *Free Radic. Res. Commun.* **266**, 195-199, 1993.

- 13) Klug-Roth, D., Fridovich, I., and Rabani, J.: *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2786-2790, 1973.

4. NO 測定法 NO の高感度分析について

iv) 蛍光法による NO 検出

長 野 哲 雄

Detection Method of Nitric Oxide
Based on Fluorescence

Tetsuo Nagano

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo,
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

Abstract

It is well established that nitric oxide (NO) plays important roles as a signal transmitter not only in the vascular endothelium but also in central and peripheral neurons and in phagocytic cells. To understand the mechanisms by which NO mediates various physiological and pathological process, it is required to monitor quantitatively the change of NO amounts produced under physiological conditions. We have developed the novel detection method of NO, based on the reaction of diamionaphthalene with NO in the presence of dioxygen to produce naphthotriazole which shows strong fluorescence at 425 nm by irradiation at 375 nm. By using the method, formation of NO in various cultured cells was quantitatively measured. The method may be useful for biological imaging of NO production from cultured cells.

I. 緒 言

短寿命の生理活性種である一酸化窒素 (NO) は免疫系・循環器系・神経系において重要な生理機能をはたしていることが報告されており^{1),2)}、この中で免疫系および循環器系における NO の作用の大筋は明らかになってきたと言える。しかしながら、神経系における NO の真の生理作用については未だ混沌としている。その原因として NO がラジカルで不安定な反応種であるため、より反応性の高い酸化活性種を生じ易く、その活性種が神経細胞に対して細胞毒として作用することが挙げられる。その一方で神経組織において NO は逆行性の情報伝達物質として機能するとの報告もあり、生理的条件下での NO の作用

は未だ確定してなく、本来の生理作用がどのようにコントロールされているのかは現在、学問的興味の焦点となっている。

この問題は刺激に応答してみられる NO の産生を刻々の時間変化で捉えることにより解明の糸口が掴めると考えられる。すなわち NO の検出・定量において NO のリアルタイムでの動的挙動と生理作用の相関を明らかにすることが現在最も求められており、そのための理想的な NO の検出・定量法としては以下のことが要求されている。

理想的 NO 検出法

- 高感度・・・不安定なラジカル種である NO の極微量の変化が追跡できること
- 特異性・・・他の窒素酸化物あるいはフリーラジカル種、過酸化物とは反応しない特異的方法であること
- 操作の簡便性・・・特殊な装置・技術を必要としないこと。すなわち容易に使える吸光度法、蛍光法、化学発光法などを測定原理とすること
- イメージング・・・培養細胞、組織切片などの試料中での NO 量のダイナミックな変化をビジュアルに観測できること

そこで演者らはまず最も感度の高い化学発光法を検出原理とする NO 検出法を開発した。そしてこの方法を単離臓器・腎臓へ適用し、灌流庄と同調して NO 量を測定できることが明らかになった³⁻¹⁷⁾。これは灌流液中の NO を測定する上から非常に有用な方法で、心臓など他の臓器への応用もできる。しかしながら、本法は発光プローブとしてルミノール+H₂O₂を用いており、適用可能な実験系に制限がある。具体的には培養細胞中などに直接このプローブを添加し、生成している NO をビジュアルに観測することはできない。

今回の第27回放医研シンポジウムでは我々が新たに開発した蛍光法を原理とする NO 検出法を紹介した。この方法は¹⁸⁾化学発光法に比べ感度においては少し劣るが、特異性においては格段に優れて、操作性も蛍光光度計を用いることから簡便であり特殊な装置・技術を必要としない。また将来展望としては Ca²⁺ の測定における Fura-2 AM のように細胞内に局在化する機能性蛍光プローブを創製することによりバイオイメージングも可能となる事が期待できる。

II. 実験結果

1. 検出法の原理

ジアミノナフタレン (DAN) は酸性条件下で亜硝酸イオンと反応して、ナフトトリアゾールを生成する (Fig. 1a)。このナフトトリアゾールは Fig. 1 b-2 に示すように蛍光性物質であるためこの反応は古くから亜硝酸イオンの検出法として用いられてきた。

筆者らはこの反応が中性条件下で NO により進行することを見出した。この反応は酸素が存在して始めて進行し、その収率もほぼ定量的である。嫌氣的条件下では反応は全く進行せず原料回収である。また 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO) を酸素の代わりに加えてもナフトトリアゾールは生成する。ナフトトリアゾールの励起波長、発光波長はそれぞれ375nm、425nm であった。

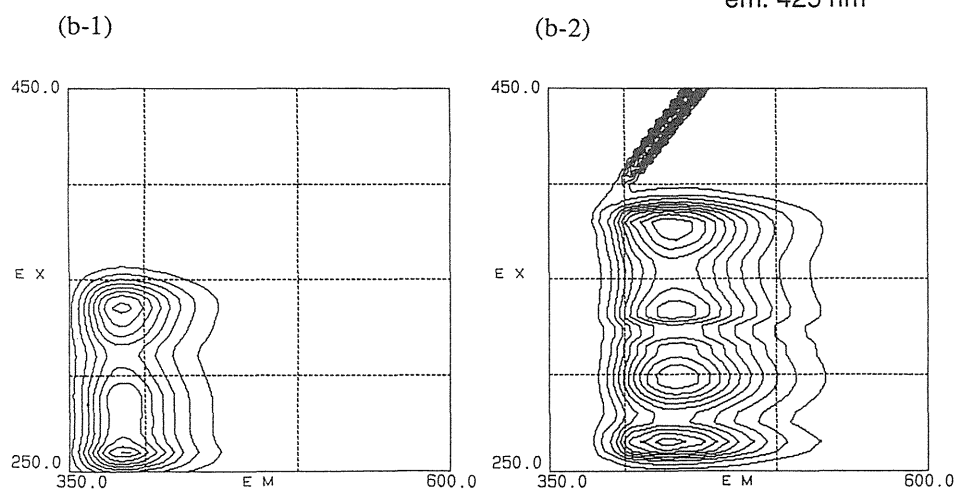
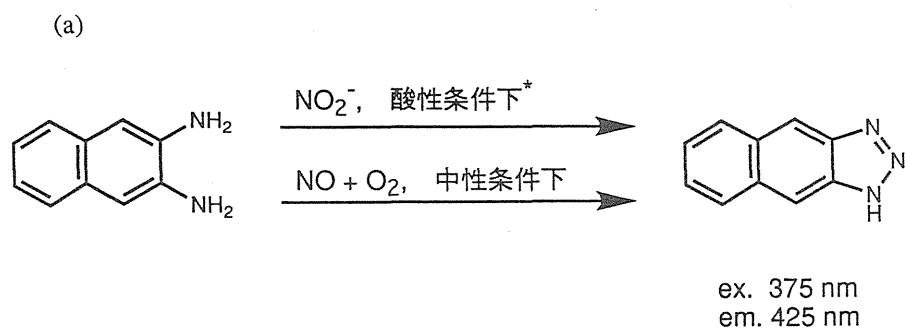


Fig. 1 (a) Reaction of diaminonaphthalene (DAN) with nitrite under acidic conditions and with nitric oxide under neutral conditions. (b) Fluorescence spectra of diaminonaphthalene (b-1) and of naphthotriazole (b-2) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4).

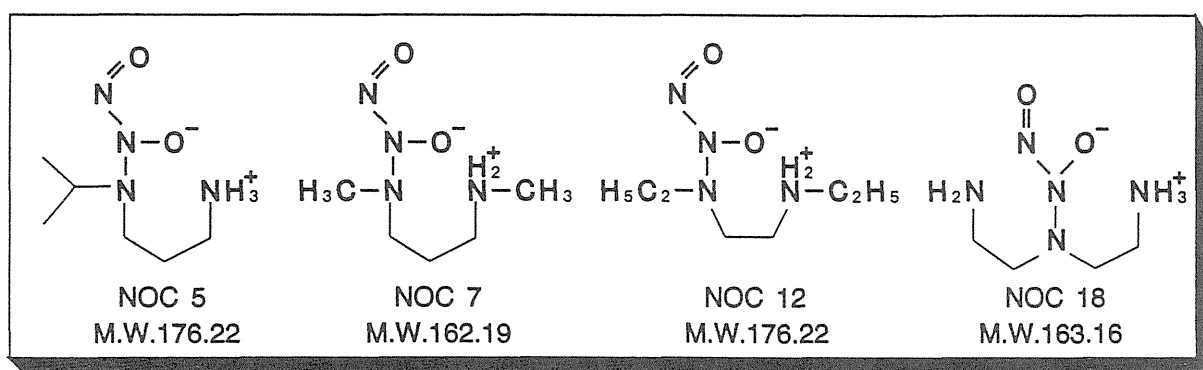


Fig. 2 NOC compounds

2. 化学反応系からのNOの検出

化学反応系によるNOの検出を試みた。NOC化合物 (Fig. 2) は溶液中で容易にNOを遊離し、その構造の違いにより半減期が異なる事が知られている。つまり単位時間当たりのNOの遊離量が異なることになる。

Figure 3にはDANを溶解したリン酸緩衝液中にNOC 7、NOC 10、NOC 12、NOC 18のいずれかを加え、ナフトトリアゾールの生成に基づく425nmの蛍光の増加を示してある。半減期はそれぞれ10.1min (NOC 7)、40min (NOC 10)、327min (NOC 12)、3,400min (NOC 18)であるが、その半減期に対応して蛍光強度の増加が示された。

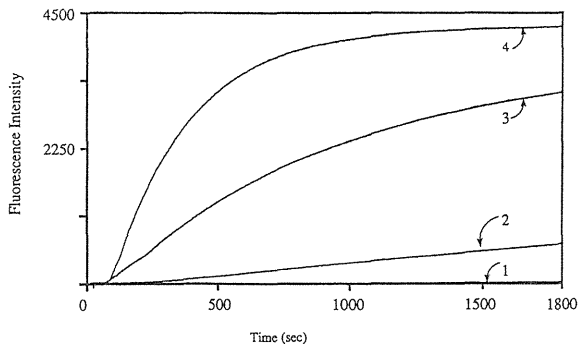


Fig. 3 Increase of fluorescence intensity based on the formation of naphthotriazole in the reaction of diaminonaphthalene with NOC compound; line 1: 0.5 μ M NOC 18, line 2: 0.5 μ M NOC 12, line 3: 0.5 μ M NOC 10, line 4: 0.5 μ M NOC 7.

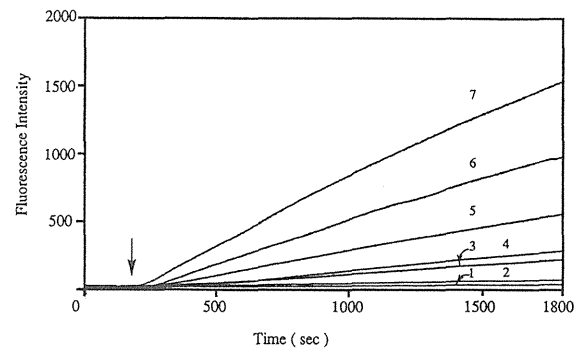


Fig. 4 Effect of NOC-12 concentration on increase of fluorescence intensity based on the formation of naphthotriazole in the reaction of diaminonaphthalene with NOC-12; line 1: 50 μ M, line 2: 100 μ M, line 3: 300 μ M, line 4: 500 μ M, line 5: 1 mM, line 6: 2 mM, line 7: 5 mM.

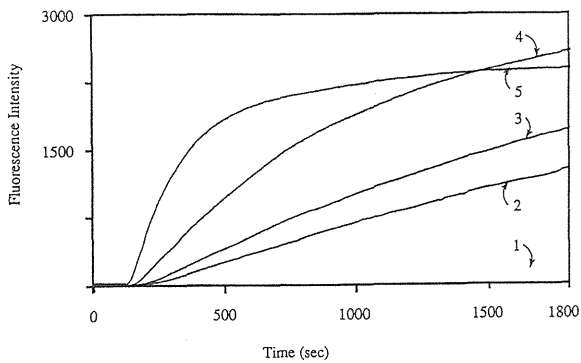


Fig. 5 Effect of temperature on increase of fluorescence intensity based on the formation of naphthotriazole in the reaction of diaminonaphthalene with NOC-12; line 1: 10 $^{\circ}$ C, line 2: 30 $^{\circ}$ C, line 3: 37 $^{\circ}$ C, line 4: 50 $^{\circ}$ C, line 5: 70 $^{\circ}$ C.

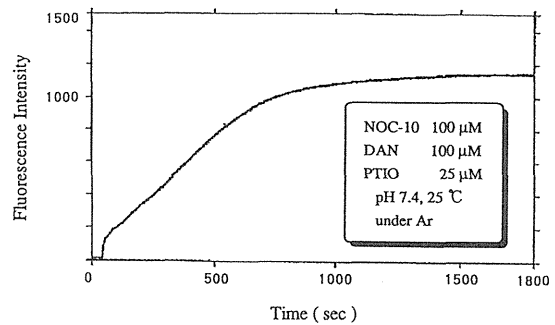
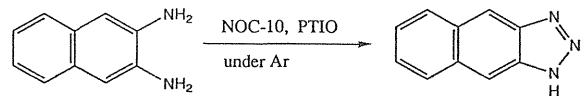


Fig. 6 Increase of fluorescence intensity based on the formation of naphthotriazole in the reaction of diaminonaphthalene with NOC-10 in the presence of PTIO anaerobically.

Figure 4 には NOC 12 の濃度を変化させた時の結果を示してあるが、濃度に対応して蛍光の伸びが見られる。更に測定温度を上げる事により単位時間当たりの NO の遊離量が増加した (Fig. 5)。この反応は酸素のない条件下では全く進行しない。

さらに酸素のない嫌氣的条件下でも酸素原子源として PTIO を添加することによりナフトトリアゾールの生成が確認された (Fig. 6)。

これらの結果は生成した NO を DAN で捉えられること示している。さらに本法による NO の検量線を作製するとともに、培養細胞系への応用を試みることにした。

3. 検量線の作製

DAN を用いた蛍光法による NO の定量に先立って、検量線を Horseradish peroxidase (HRP) を用いて

行った。この方法は、NO が CO と異なり ferrous ion および ferric ion 両者のポルフィリンと強固な錯体し、特有な Soret band, Q band の吸収スペクトルを示す事を測定原理としている。Met Hb や Met Mb を用いた場合は過剰の NO により $Fe^{3+}NO$ は $Fe^{2+}NO$ に還元されるが、HRP の $Fe^{3+}NO$ は安定である。また O_2Hb を NO により Met Hb に変換して NO 量を測定する方法 (オキシヘモグロビン法) も知られているが、この場合は O_2Hb の試料中の Met Hb 混在が問題となる。これらの点から Fe^{2+} の混在のない Fe^{3+} 状態のポルフィリンが市販品として手に入る HRP を用いることにより NO を定量する系を確立し、以下の生体中の定量に用いた。この方法は筆者らが独自に開発したものである¹⁹⁾。

4. 培養細胞系からの NO の検出

前述したように生体中で NO を生成する NOS 酵素はそれらのアミノ酸の相同性から 3 タイプに分類されている。すなわち神経型、免疫型、内皮型で現在ではそれぞれ type I, type II, type III と呼ばれている。このうち神経型と内皮型は構成型の NOS であり、免疫型は誘導型の NOS である。細胞あたりの生成 NOS 量は誘導型 NOS からの方が多いたことが予想されている。そこでまず、本測定系を誘導型 NOS を持つマクロファージ、平滑筋培養細胞に応用することにした。

(1) マクロファージからの NO

マウス由来のマクロファージ (RAW264.7) を用いた。マクロファージを 24 穴のプレートで培養しておいたものを LPS (10 μ g/ml) IFN- γ (100U/ml) で刺激し、十分に NOS の誘導を待った後 (この場合 9 時間 40 分)、DAN (10-60 μ g/ml), PTIO (0-50 μ M), L-Arg (1mM) を Krebs-Ringer Phosphate Buffer (KRP) に溶解した培養液 (200 μ l) に変え、この時を 0 時間として一定時間培養する。培養液の蛍光強度 (ex: 375nm, em: 425nm) を測定した結果を Figure 7 に示す (培養時間は 2 時間)。その結果 DAN を蛍光プローブとして用いることによりマクロファージからの NO の産生が示された。そして PTIO を添加しない場合でも溶存酸素により蛍光強度が増加すること、しかし PTIO を 20 μ M 加え DAN の濃度が高い時が最も感度良く測定できることが明らかになった。

そこで次に培養時間を変え、時間経過とともに NO の増加が見られるか否かを検討した。この場合 PTIO は上記の結果を参考にして 20 μ M に固定した。30分、1 時間、2 時間の培養時間とともに蛍光の増加が観測された (Fig. 8)。この蛍光の増加が NO に由来することを確認するために NOS の阻害剤である L-NMMA の効果を検討した。LPS, IFN- γ で刺激する際に L-NMMA (0-20mM) も添加し、8 時間 50 分培養した後、DAN (60 μ M), PTIO (20 μ M), L-Arg (1mM) を溶解した KRP 培養液に変え、蛍光強度を測定した。Figure 9 に示すように蛍光強度は完全に抑制され、この蛍光が NOS から生じた NO によることが確かめられた。

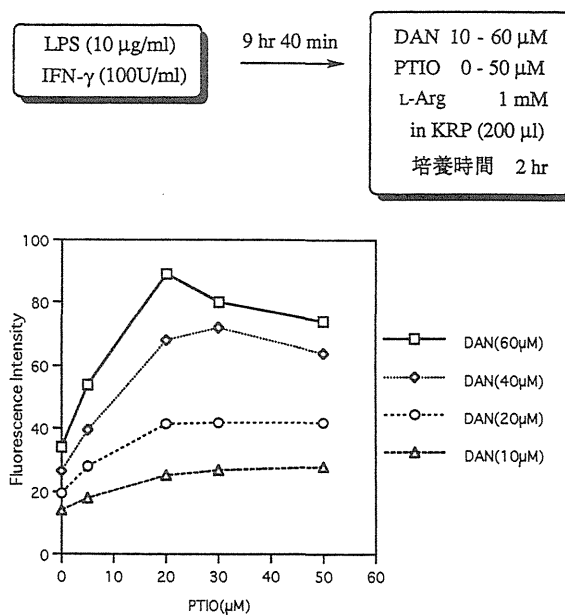


Fig. 7 Increase of fluorescence intensity based on the formation of naphthotriazole in the reaction of diaminonaphthalene with NO produced from i-NOS in macrophage (RAW 264.7) stimulated by LPS and IFN- γ .

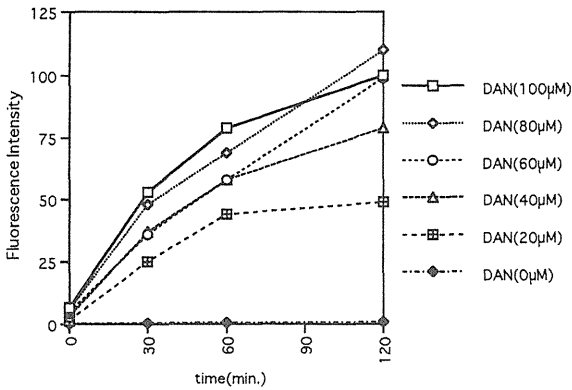
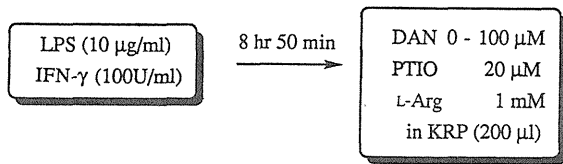


Fig. 8 Time-course of fluorescence intensity based on the formation of naphthotriazole in the reaction of diaminonaphthalene with NO produced from i-NOS in macrophage (RAW 264.7) stimulated by LPS and IFN- γ .

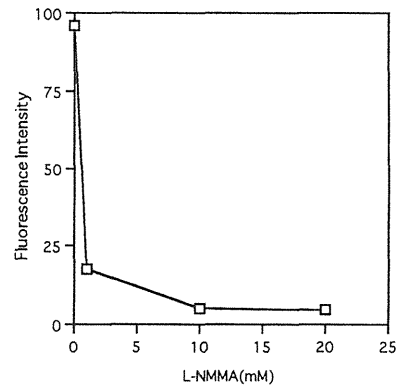
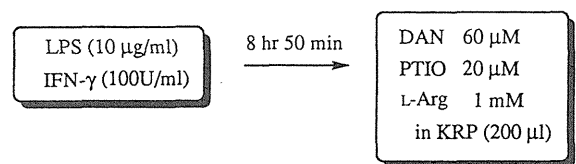


Fig. 9 Inhibitory effect of L-NMMA on the fluorescence intensity

(2) 血管平滑筋培養細胞からの NO

血管内皮細胞には構成型の NOS が存在していることが報告されているが、平滑筋細胞には誘導型の NOS があることが知られている。そこで次にラット大動脈血管平滑筋由来の培養細胞を用いてその細胞中で発現する i-NOS の測定を本方法を用いて行った。

平滑筋細胞を12穴のマイクロプレートで培養しておいたものを LPS (12.5 μ g/ml) IFN- γ (150 U/ml) IL-1 β (25 U/ml) TNF- α (30 ng/ml) で刺激し、NOS が誘導された後 (この場合13時間)、培養液を DAN: 100 μ M, PTIO: 0-30 μ M, L-Arg: 1 mM を KRP に溶解した液 (300 μ l) に変え、この時を 0 時間としてその後一定時間培養する。培養液の蛍光強度 (ex: 375 nm, em:425 nm) を測定した結果を Figure 10 に示す。培養時間30分、1 時間、2 時間でそれぞれの蛍光強度を測定した。その結果 DAN を蛍光プローブとして用いることによりマクロファージからの NO の産生が示された。そし

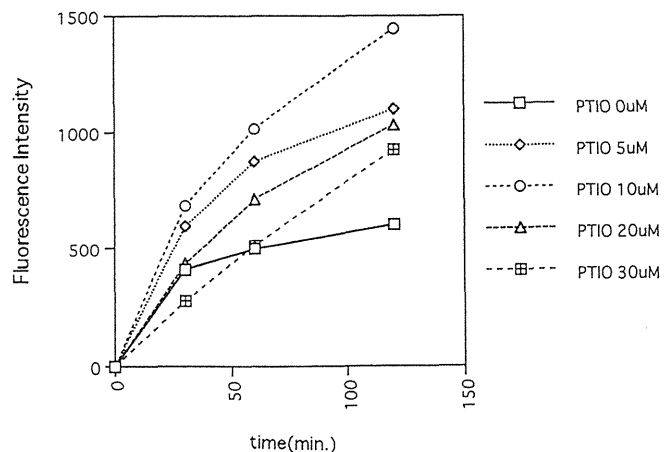
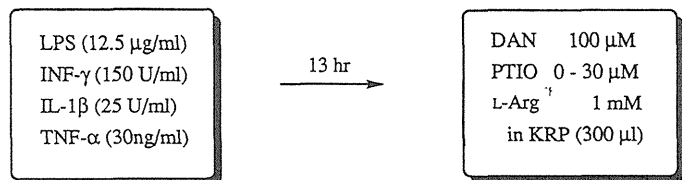


Fig. 10 Increase of fluorescence intensity based on the formation of naphthotriazole in the reaction of diaminonaphthalene with NO produced from smooth muscle cells stimulated by LPS, IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α .

て PTIO を添加しない場合でも溶存酸素により蛍光強度が増加すること、PTIO を 10 μM 加えた時が最も感度良く測定でき、PTIO が 20, 30 μM では逆に蛍光強度は減少した。NO と NO₂ から生じる N₂O₃ がトリアゾール体生成反応の反応種であると思われる。

そしてこの平滑筋培養細胞の場合も NOS 阻害剤である L-NMMA (1, 10, 20 mM) を添加する事により蛍光強度の増加は抑制され、この反応が NOS から生成する NO によるものであることが示された。

Ⅲ. 考 察

NO は生体内の様々な部位で重要な生理作用を示すことが明らかになりつつあり、その機能を解明し、動的挙動を解析することが求められている。しかし生体の組織あるいは細胞で生成する不安定な NO を直接捉えることはかなり難しく、未だ満足のいく方法はないのが現状である。

今回報告した DAN を用いた蛍光による NO の検出・定量法は細胞内での NO のイメージングの可能性を秘めた方法であり、このようなジアミンを分子内に持つ化合物を NO の蛍光プローブとしてデザイン合成することにより、高感度化、細胞内への局在化が可能となる。

当面の課題として e-NOS から生成する NO を定量することが可能か、内皮培養細胞などを用いて検討することが必要であろう。

文献

- 1) “NO の登場 —生体内での働きの発見が与えたインパクト—” 現代化学、No. 277、4月号、25-29 (1994).
- 2) “特異なラジカル種 NO の化学” 実験医学『NO 研究の最前線』、長野哲雄、10-13 (1995).
- 3) “New Method of Detecting Nitric Oxide Production” Kazuya Kikuchi, Hiroshi Hayakawa, Tetsuo Nagano, Yasunobu Hirata, Tsuneaki Sugimoto and Masaaki Hirobe, *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 2233-2235 (1992).
- 4) “Detection of Nitric Oxide Production from Perfused Organ by Luminol-H₂O₂ System” Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Hiroshi Hayakawa, Yasunobu Hirata and Masaaki Hirobe, *Anal. Chem.*, **65**, 1794-1799 (1993).
- 5) “Real-Time Measurement of Nitric Oxide Produced *Ex Vivo* by Luminol-H₂O₂ Chemiluminescence Method” Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Hiroshi Hayakawa, Yasunobu Hirata and Masaaki Hirobe, *J. Biol. Chem.*, **268**, 23106-23110 (1993).
- 6) “Mechanisms for Altered Endothelium-dependent Vasodilation in Isolated Kidneys from SHR, DOCA-salt Hypertensive Rat and Dahl Salt-sensitive Rats” Hiroshi Hayakawa, Yasunobu Hirata, Etsu Suzuki, Tokuichiro Sugimoto, Hiroaki Matsuoka, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Masaaki Hirobe and Tsuneaki Sugimoto, *American Journal of Physiology*, **264** (33) H1535-H-1541 (1993).
- 7) “新規超高感度 NO 測定法” 菊地和也、長野哲雄、廣部雅昭、活性酸素、フリーラジカル、Vol. 4, No. 5, 487-496 (1993).
- 8) “一酸化窒素ラジカルの *ex vivo* の高感度測定法” *TCSC News Letters*, **25**, 26-33 (1994).
- 9) “NO: 概論と測定方法” 菊地和也、長野哲雄、廣部雅昭、*The Lung -Perspectives* **2** (3), 7月号 237-242 (1994).
- 10) “Long-term Administration of L-Arginine Improves Nitric Oxide Release from Kidney in DOCA salt Hypertensive Rats” Hiroshi Hayakawa, Yasunobu Hirata, Etsu Suzuki, Kenjiro Kimura, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Masaaki Hirobe and Masao Omata, *Hypertension*, **23** (6) 752-756 (1994).
- 11) “Detection of Nitric Oxide Production from Rat Perfused Kidneys by a Luminol-H₂O₂ System ” K. Kikuchi, T.

- Nagano, H. Hayakawa, Y. Hirata and M. Hirobe, *The Biology of Nitric Oxide Vol. 4*, Edited by M. Feelish, R. Busse, S. Moncada and E. A. Higgs, Portland Press Ltd, pp. 205-208 (1994).
- 12) "Direct Measurement of Endothelium Derived Nitric Oxide Release by Stimulation of Endothelin Receptors in Rat Kidney and Its Alteration in Salts-induced Hypertension" Y. Hirata, H. Hayakawa, Etsu Suzuki, K. Kimura, K. Kikuchi, T. Nagano, M. Hirobe and M. Omata, *Circulation*, **96**, 1229-1235 (1995).
 - 13) "NO の測定法" メジカルビュー社編、『最新医学からのアプローチ 12: NO』、長野哲雄、42-52 (1995).
 - 14) "生体内 NO 測定法" 実業公報社編、放射線科学、長野哲雄、**38**, 94-98 (1995).
 - 15) "Endothelium-derived relaxing factors in the kidney of spontaneously hypertensive rats" Hiroshi Hayakawa, Yasunobu Hirata, Etsu Suzuki, Masao Kakoki, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Masaaki Hirobe and Masao Omata, *Life Sc.*, **56**, 401-408 (1995).
 - 16) "Determination of NO by Chemiluminescence in the Reaction with luminol and H₂O₂" Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano and Masaaki Hirobe, in *Methods in Nitric Oxide Research* ed. by M. Feelisch and J. S. Stamler, John Wiley & sons, in press.
 - 17) "NO の検出・測定法" 季刊化学総説、『NO—化学と生物—』、日本化学会編、長野哲雄、印刷中.
 - 18) この研究の原理となった反応に関する論文は以下に発表されている："Reaction of Nitric Oxide with Amines in the Presence of Dioxygen" Tetsuo Nagano, Hiromasa Takizawa and Masaaki Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, in press.
 - 19) "Novel Detection Method of Nitric Oxide Using Horseradish Peroxidase" Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano and Masaaki Hirobe. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

4. NO 測定法 NO の高感度分析について

V) 電極法による NO 測定

一 守 康 史、石 田 英 之、中 澤 博 江

Nitric oxide measurement with polarographic methods

Kohji Ichimori, Hideyuki Ishida, Hiroe Nakazawa

Department of Physiology 2, Tokai University, School of Medicine,

Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-11, Japan

Abstract

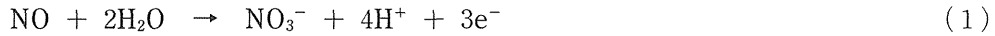
A nitric oxide (NO)-selective electrode was developed as an easily applicable tool for a real-time NO measurement. The working electrode (0.2 mm ϕ) was made from Pt/Ir alloy coated with a three-layered membrane. The counter electrode was made from carbon fiber. When a stable NO donor, *S*-nitroso-*N*-acetyl-*dl*-penicillamine, was applied, the electrode current increased dose-dependently. The current and calculated NO concentration showed a linear relationship in the range from 0.2 nM (S/N = 1) to 1 mM of NO. The response of the electrode was 1.14 ± 0.09 second. The effects of temperature, pH, and chemicals other than NO on the electrode current were also evaluated. Electrodes which were placed in the luminal side of rat aortic rings exhibited 30 pA of current on NO generation induced by the addition of 10^{-6} M of acetylcholine, and the current was eliminated in the presence of 50 μ M N^G-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of NO synthase. Thus, this NO-selective electrode is applicable to real-time NO assay in biological systems.

はじめに

これまでに数多くの NO 測定法が提唱されてきたが、①高感度、②選択的、③*in vivo* 応用可能、④時間分解能、⑤空間分解能、⑥他のパラメータとの同時測定、といった要求をすべて満たし得る測定法は見当たらない。その中で、電極法は局所で過渡的な NO 放出を高感度で測定できるため、特に、培養血管内皮細胞や輪状大動脈切片などの血管内皮の NO 生成の詳細な研究に適している。

生体から発生する NO を電極法によって検出しようとする試みは、最初に脳組織のスライスに用いら

れた¹⁾。この際用いられた電極は作用電極と対極を外径約250 μm のガラスピペット中に挿入し、その先端を合成ゴム薄膜でシールしたものをを用いている。先端のゴム薄膜は NO のような低分子ガスのみが透過でき、透過した NO が(1)式のような電極反応によって生ずる電流を検出するわけである。当然酸素ガスも薄膜を通過しうるが、作用電極への供給電圧を+0.8 V 近辺に



設定することにより NO に対する選択性が生ずる。ただし、このガラス電極はその薄膜のシーリングが非常に難しく壊れやすいことが欠点である。そのため、WPI 社はガラスを金属筒へ改良しクラーク型の酸素電極と同様の薄膜を用いた電極を開発し、市販している²⁾。また、Malinski らはニッケルポルフィリンの高分子膜をコートした電極を作成し、より選択性と感度を高め 1 個の細胞からの NO 生成が検出可能と報告し、以後各種組織への応用研究が報告されている^{3,4)}。Malinski らのポルフィリン電極は現存する電極法のなかで感度・選択性において最も優れたものであるが、自作は難しく手に入れ難い。以上を踏まえて我々は以下に述べる、より簡便な NO 選択性電極を作成した⁵⁾。

1. 電極と NO 測定系

電極による NO の検出は、前述のガラス電極と同様(1)式のような作用電極(陽極)における NO の電解酸化に基づく。作用電極に 3 層構造の NO 選択膜で覆った。0.2mm ϕ Pt/Ir 合金 (Pt90%, Ir10%) を、陰極(対極)に炭素繊維を用いた (Fig. 1)。疎水性膜の被覆により水溶性物質の電極への接触が阻止され、

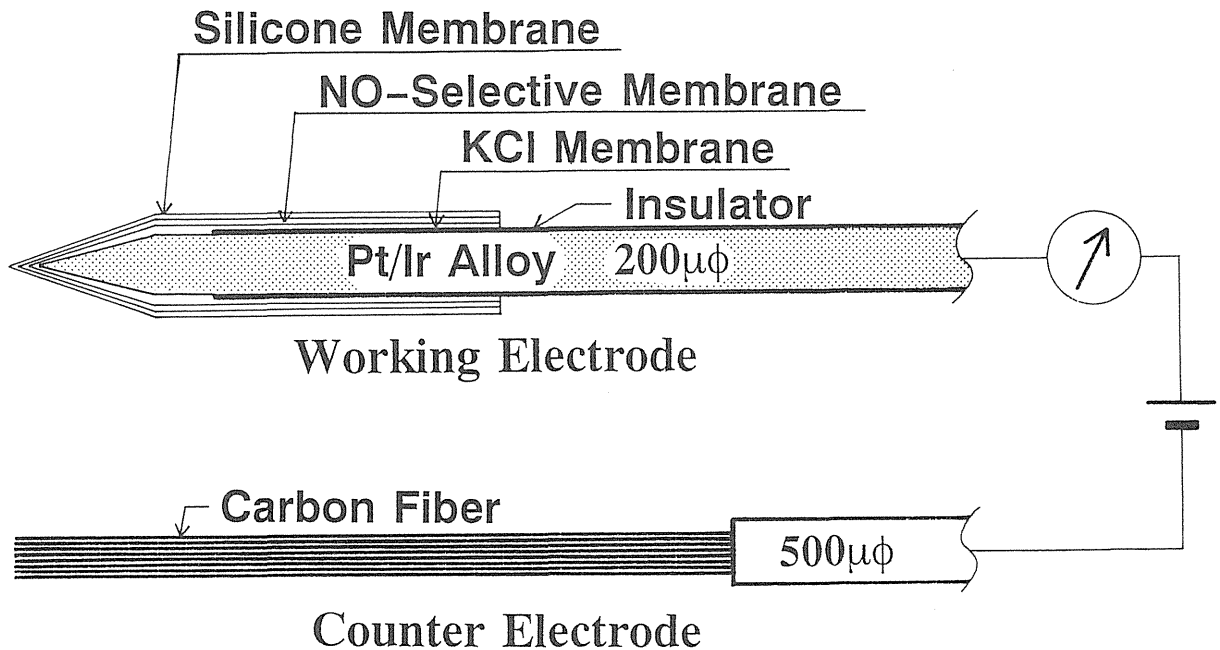


Figure. 1 Scheme of a pair of NO-selective electrodes.

ガス状小分子が選択的に陽極に到達できる。そして、作用電極に+40~+0.8 V の正の電圧を加えることにより NO は O₂ 分子などの他のガス分子と区別される。こうして得られた NO 電極電流の信号インピーダンスは非常に高いため、外来ノイズをきわめて拾いやすい。そのため、この電極対のできるだけ近傍にヘッドアンプ(電流信号を電圧信号に変換するアイソレーションアンプ、バッファアンプなどを含む)を

配置しその後の回路にもノイズ除去に細心の注意を払った。

この電極の性能試験のために用いた NO 測定装置を Fig. 2 に示す。Fig. 1 に示した電極対を小さなガ

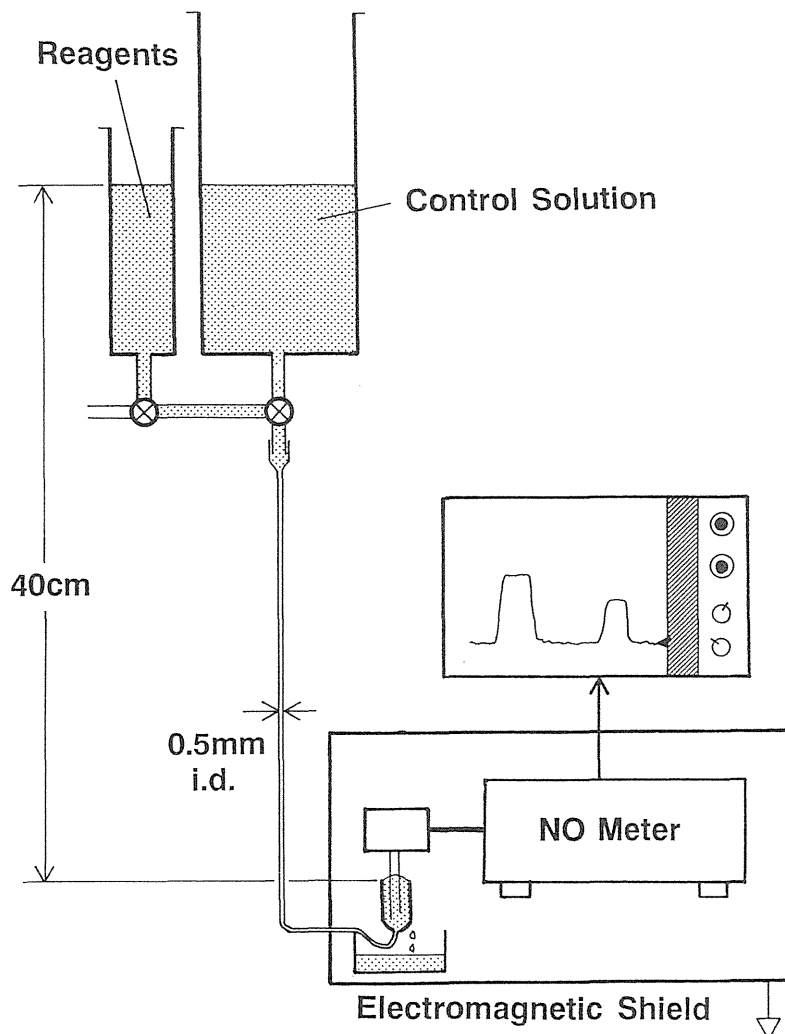


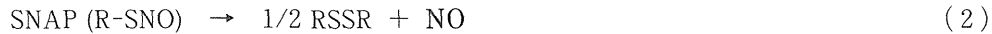
Figure. 2 *In vitro* NO-measuring system.

ラス管 (15mm X 3mm ϕ) でできたチャンバー内に挿入し、種々の薬剤を PBS (0.1M リン酸ナトリウム溶液 (pH=7.5) に 0.1M NaCl を溶かしたもの) に溶かした溶液を 1.5ml/min の速度で流した。溶液の流速の揺動はノイズとなるため、約 40cm 水柱の一定圧力で細い (内径 0.5mm) テフロンチューブを通して溶液を供給した。まず、薬剤を含まない PBS を流して電極電流が一定になるのを待ち、種々の薬剤を含む PBS に切り替えて電流変化をみる事が可能である。NO 電極、NO 電流測定器及びチャンバー全体に鉄網の電磁シールドを施した。チャンバーを superfusion 可能なディッシュに変更することにより培養細胞から発生する NO を測定することが可能であるし⁹⁾、チャンバーを少し大きくして輪状大動脈切片を挿入できるようにすればその反応を検出することができる。

2. NO 電極の感度

この電極の NO 検出感度を知るためには NO の基準溶液が必要であるが、NO の水溶液は酸素の存在下では不安定であり、NO 水溶液が接する気相との間の気液平衡の制御が難しいため一定の濃度を保った

NO 溶液でこれらの電極を検定することは非常に難しい。そこで、NO を定常的に発生する NO 供与体である *S*-nitroso-*dl*-penicillamine⁷⁾ (SNAP、市販もされている) の PBS 溶液を感度測定のための標準溶液とした。SNAP は以下の(2)式のように、微量の遷移金属イオンの存在下で熱的にゆっくりと分解し NO を放出する。NO の放出速度は 1 mM の SNAP 当たり 14 μ M/min



(37 $^{\circ}$ C) という報告がある⁸⁾が、用いた溶液中の微量の遷移金属濃度に依存するため NO 発生速度を SNAP 固有の 339nm の吸光 ($\epsilon=887\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の減少を用いてモニターすべきである。1 mM 程度以下の濃度の SNAP 溶液が大気と接触し平衡に達しているとき、発生した NO は NO に対して大過剰の O₂ (~250 μ M) に消去されるため ((3)式) 定常状態が生じ NO の濃度は一定となる。(3)



式の反応は 3 次反応であることが既に知られており⁹⁾、結局定常 NO 濃度は以下のように表される。

$$[\text{NO}] = \sqrt{\frac{k_2[\text{SNAP}]}{k_3[\text{O}_2]}} \quad (4)$$

ここで、 k_2 , k_3 はそれぞれ(2)(3)式の一次、及び三次反応速度定数であり、[SNAP] 及び [O₂] はその初期濃度である。SNAP の分解速度は遅いので、数時間のオーダーでは [SNAP] は一定と考えて差し支えない。また [O₂] は、大気との平衡が充分行われる環境であれば一定と考えられる。その結果 [NO] は数時間一定値を保ち、SNAP 溶液は空気中で安定な NO の標準溶液として使用できる。

NO 電極の高分子被膜の厚さ等の性質は手作りのために厳密には制御できない。このため、各電極 1 本 1 本について上述の SNAP 溶液を用いて較正する必要がある。代表的な電極の場合電極電流は 5 μ M~1 mM の SNAP に対し 1.5pA から 305pA と直線的に変化した (25 $^{\circ}$ C)。1 mM の SNAP は、1.3 μ M の NO に相当する。S/N 比=1 を示す SNAP 濃度は 5 μ M であった。感度のいい電極ほどノイズも大きい傾向にあった。温度を 25 $^{\circ}$ C から 33 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C と上昇させるとその感度はそれぞれ 1.84 \pm 0.01 倍、3.33 \pm 0.05 倍に上昇した。この理由は、SNAP の分解速度が上昇するのに加え、電極表面への NO の拡散速度及び電極表面における電気分解の速度が上昇するためと思われる。15 分間加熱還流して不活性化した SNAP は同量の SNAP と比較してたかだか 1/20 の電流しか示さず、また、SNAP 依存性の電流が NO の消去剤であるオキシヘモグロビン (4 μ M) や 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO, 30 μ M) によって抑制されることから、SNAP 溶液に起因する電極電流は NO そのものによることが確かめられた。

3. 電極の時定数

電極の時定数は、蛍光測定用キュベットを 1 mM の SNAP で満たして電極対を挿入し、500W の高圧水銀灯 (JEOL, ES-USHO5) で 0.2 秒間紫外線照射によって瞬時に増加する NO に対する電極の応答から算出した。時定数は 1.14 \pm 0.09 秒であった。

4. 電極の選択性

電極は空気中における NO の最終変化生成物である NO₂⁻ や NO₃⁻ には反応しなかった。NO 検出実験

によく用いられる試薬の、電極に対する非特異的反応性を検討した。その結果、0.1mM の SNAP によって観測される NO 電流を100%とした場合、L-arginine (0.1mM), N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 0.1mM)、acetylcholine (1 μ M) などほとんどの試薬は5%以下の電流しか生じないが、N-nitro-L-arginine methyl ester (0.1mM) や PTIO (30 μ M) のように20%付近の非特異的反応を示すものもあった。電極表面に付着し高分子膜の電気的特性を変化させるものは、非特異的電流を惹起するものと思われる。また、イオン強度の突然の変化は電極表面の電気二重層への充電が起こるため一過性電流を生ずる。

5. 緩衝液、O₂ 濃度及び pH の影響

SNAP 1 mM を修正 Krebs-Henseleit (KH) 緩衝液及び PBS に溶解し電極電流を測定したが誤差範囲内で一致した (KH 緩衝液の組成は以下の通り (mM): glucose 12, NaCl 124, KC 15.0, CaCl₂ 1.2, MgCl₂ 1.5, KH₂PO₄ 1.3, NaHCO₃ 26、また KH 緩衝液は75% N₂/20% O₂/5% CO₂ で平衡化した後に用いた)。また、KH 緩衝液を95% O₂/5% CO₂ 及び75% N₂/20% O₂/5% CO₂ で平衡化したもので比較したが、O₂ 濃度の高い前者の方が、後者の40%程度の電流に減少していた。また pH = 6 ~ 8.5 の範囲で SNAP 非存在下での base の電流に pH 依存性はなかった。一方、1 mM SNAP 存在下では pH が7以上ではほぼ一定であったにもかかわらず、pH を6まで下げると約1.8倍の電流が観測された。吸光度による SNAP 減衰の測定から、pH 低下による電流の増加は電極自体の性質によるものでなく、pH 低下によって SNAP 溶液の NO 放出速度が上昇するためであることがわかった。

6. 輪状大動脈切片からの NO 産生の検出

10-15過齢の雄性 wistar ラットから輪状大動脈切片を分離しガラス管内に置き、75% N₂/20% O₂/5% CO₂ で平衡化し、50 μ M の L-arginine を含む KH 緩衝液 (pH=7.4) で灌流した。電極対を大動脈内腔表面のできるだけ近傍 (接触させない) に設置した。電流が安定化した後、1 μ M の acetylcholine を含む KH 緩衝液に灌流液を変更すると、30pA の電流の上昇が観測された (Fig. 3)。これは30nM の NO 生成に対応する。L-arginine の代わりに L-NMMA を含む緩衝液に変えると、1 μ M の acetylcholine に反応しなかった。L-NMMA 溶液を洗い出し、もう一度 L-arginine 存在下で1 μ M の acetylcholine 刺激を行うと、反応が回復した。以上から、電極は大動脈片からの NO 生成を検出したものと結論される。

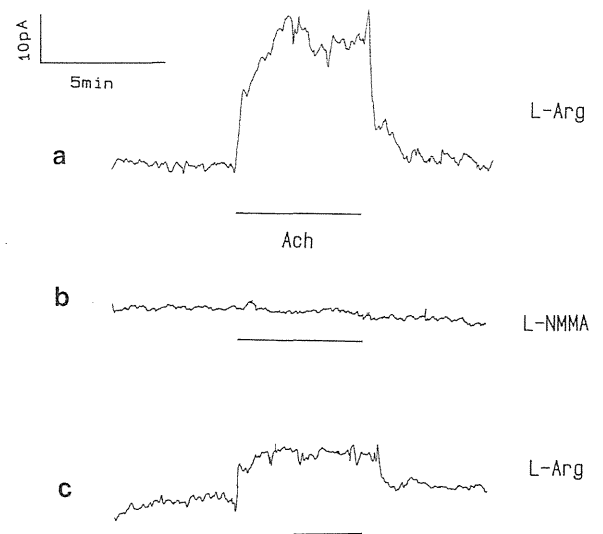


Figure. 3 The NO generation from a rat aortic segment at 37°C. The vertical and horizontal axes indicate the electrode current and time, respectively, in each trace. The scales are indicated at upper left side of the figure. a) the current response to the stimulation of acetylcholine (1 mM) in the presence of L-arginine (L-Arg, 50 μ M). b) in the presence of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, 50 μ M). c) the response in the presence of L-Arg after eliminating L-NMMA. The control solution without acetylcholine was exchanged with the solution containing acetylcholine as indicated by bar below each trace.

7. 考 察

NO 電極では nM オーダーの NO が検出可能であることが示された。また、NO 濃度として 5 nM から 1 μ M までの直線性から、SNAP 溶液を用いて各電極の較正を行えば容易に定量できることも示された。また、NO 標準溶液としての SNAP 溶液が有用であることもわかった。この電極は、ガス状小分子しか作用電極に接触し得ないことや、+0.4~+0.8V という陽性の印加電圧のために NO に対する選択性を獲得している。しかし、このように電極が高度に絶縁していたとしても電極表面と溶液の間にコンデンサを形成してしまうため、交流的には絶縁されておらず、また暗電流に対して電極表面への分子の吸着が悪影響を及ぼすものと考えられる。それが、一部の試薬に対する非特異的な電流を生ずる原因と考えられる。

生体への応用実験として、輪状大動脈切片から発生する NO を実際に検出できることを示した。従って、各試薬の NO 電極への非特異的反応の詳細な検討を加え、しかも各々の NO 発生実験において NO 合成酵素阻害剤による電流消滅が確かめられれば、充分、一過性 NO 発生を real-time でモニターできることがわかる。

参考文献

- 1) Shibuki, K. An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. *Neurosci. Res.* **9**: 69-76 (1990).
- 2) Tsukahara, H., Gordienko, D. V. and Goligorski, M. S. Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 722-729 (1993).
- 3) Malinski, T. and Taha, Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature.* **358**: 676-678 (1992).
- 4) Malinski, T. et al. Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**: 355-358 (1993).
- 5) Ichimori, K. et al. Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-selective electrode. *Rev. Sci. Instrum.* **65**: 2714-2718 (1994).
- 6) 一守 康史、NO, peroxynitrite の測定、活性酸素実験プロトコール、(谷口 直之 監修) 秀潤社、東京、pp31-35, (1994)
- 7) Field, L. et al. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D, L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-acetylamino-2-carboxy-1, 1-dimethylethyl thionitrite. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 249-250 (1978).
- 8) Feelish, M. The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilator: Appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17 (Suppl. 3)**: S25-S33 (1991).
- 9) Wink, D. A. et al. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: Determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem. Res. Toxicol.* **6**: 23-27 (1993).

閉会の挨拶

どうも二日間に渡って長い間非常に熱心に議論をされたのだと思います。だと思いと申し上げますのは、この三日間止むを得ない会がございまして大阪に行っておりまして、今日午後ようやく閉会の辞に間に合うように帰ってきた様な訳でございますので、その失礼をお許し頂きたいと思えます。

放医研は、広い意味の放射線影響とすることを研究の主題としている訳であります、その影響と言うときに欠かせないのは、その物理的に出来ました活性酸素・ラジカルと言うものが、後、化学的、薬学的にどう振る舞うか、と言うこと抜きには、放射線影響は研究できないのだという気が致します。

そのスタートが化学的であれ何であれ、活性酸素・フリーラジカルの研究、その新展開ということは、放医研にとっても極めて重要な課題であると考えております。

従いまして、影響学会、化学会、薬学会の協賛によってこのシンポジウムが活性化されたのだと思えますので、非常に有り難く思っております。

どうぞ今後ともよろしくご指導、ご鞭撻頂ければと思えます。どうも有り難うございました。

放射線医学総合研究所

所長 平尾 泰男

第27回放射線医学シンポジウムプログラム

「活性酸素・フリーラジカル研究の新展開—基礎から臨床まで—」

主催：放射線医学総合研究所

協賛：日本放射線影響学会、日本化学会、日本薬学会

開催日：平成7年12月7日（木）・8日（金）

場所：放射線医学総合研究所 講堂

時 間	セッション・講演タイトル	演 者	座 長
第1日目 9:45~9:50	—12月7日（木）— 開会の辞	佐藤 弘毅（放 医 研）	藤高 和信（放 医 研）
9:50~10:15	I. 活性酸素・フリーラジカルの生成、反応性及び測定	山口 寛（放 医 研）	
10:15~10:40	1. 放射線 2. 環境ストレスと活性酸素	嵯峨井 勝（国立環境研）	上田 順市（放 医 研）
10:40~11:05	3. フリーラジカルの化学的生成と検出	河野 雅弘（日本電子）	
11:05~11:30	4. in vivo ESR による生体内フリーラジカル反応の解析	内海 英雄（九 大）	
11:30~12:30	II. 特別講演 「脳と活性酸素・フリーラジカル」	森 昭胤（岡 山 大）	小澤 俊彦（放 医 研）
12:30~13:30	昼 食		湯川 修身（放 医 研）
13:30~13:55	III. 活性酸素・フリーラジカルの生物学	浜-稲葉浩子（放 医 研）	
13:55~14:20	1. 活性酸素感受性変異株 2. 酸化的 DNA 損傷の生成、修復および突然変異誘発	葛西 宏（産 業 医 大）	大山ハルミ（故 医 研）
14:20~14:45	3. 膜	安西 和紀（放 医 研）	
14:45~15:10	4. 細胞情報伝達系	中島 徹夫（放 医 研）	
15:10~15:35	5. 活性酸素代謝とアポトーシス	井上 正康（大 阪 市 大）	
15:35~15:50	コーヒープレイク		長野 哲雄（東 大）
15:50~16:15	IV. 活性酸素・フリーラジカルの防御	吉川敏一（京都府立医大）	
16:15~16:40	1. 防御薬剤の臨床応用 2. 生体内防御機構	山岡 聖典（電 中 研）	桑原 幹典（北 大）
16:40~17:05	3. 合成抗酸化物	伊古田暢夫（放 医 研）	
17:05~17:30	4. 食品からの抗酸化物質	尾形 健明（山 形 大）	
17:30~19:00	懇 親 会		
第2日目 9:30~9:55	—12月8日（金）— V. がん・老化と活性酸素・フリーラジカル	渡邊 正己（長 崎 大）	小木曾洋一（放 医 研）
9:55~10:20	1. 突然変異の原因となる放射線誘導ラジカル 2. LEC ラットにおける銅-メタロチオネインの関与	鈴木 和夫（千 葉 大）	巽 紘一（放 医 研）
10:20~10:45	3. 制がん活性酸素・フリーラジカル	古澤 佳也（放 医 研）	
10:45~11:10	4. 老化と活性酸素・フリーラジカル	浦野 四郎（都 老 人 研）	加藤 博敏（放 医 研）
11:10~11:35	VI. 活性酸素・フリーラジカルによる疾患と防御	内藤裕二（彦根中央病院）	
11:35~12:00	1. 胃粘膜障害 2. 活性酸素・フリーラジカルの心筋機能障害様式	岡部栄逸朗（神奈川歯大）	
12:00~12:25	3. 皮膚障害	荒金 久実（コ ー セ ー）	
12:25~13:30	昼 食		湯川 修身（放 医 研）
13:30~13:55	VII. NO 現状と将来	宮田 直樹（国立衛 試）	
13:55~14:20	1. NO の基礎：NO 合成化合物	谷口 直之（大 阪 大）	
14:20~14:45	2. NO と病態	平田 恭信（東 大）	
14:45~15:00	3. NO の臨床応用		
15:00~17:00	コーヒープレイク 4. NO 測定法 パネルディスカッション 「NO の高感度分析について」		内海 英雄（九 大）
	i) ジチオカルバメート鉄錯体による NO のトラップ	吉村哲彦（生物ラジカル研）	
	ii) 生体内でのヘモグロビンによる NO のトラップ	小坂 博昭（大 阪 大）	
	iii) Liposome PTIO を用いた NO の定量法	赤池 孝章（熊 本 大）	
	iv) 蛍光法による NO 検出	長野 哲雄（東 大）	
	v) 電極法による NO 測定	一守 康史（東 海 大）	
17:00~17:15	閉会の辞	平尾 泰男（放 医 研）	

第26回放医研シンポジウム実行委員会委員一覧

(所属は平成7年12月現在)

委員長	小澤俊彦	(第1研究グループ総合研究官)
副委員長	湯川修身	(生物影響研究部)
委員	大山ハルミ	(障害基盤研究部)
〃	笠井清美	(障害基盤研究部)
〃	小木曾洋一	(内部被ばく研究部)
〃	加藤博敏	(重粒子治療センター治療・診断部)
〃	金井達明	(重粒子治療センター医用重粒子物理・工学研究部)
〃	安西和紀	(第1研究グループ)
〃	伊古田暢夫	(第1研究グループ)
〃	上田順市	(第1研究グループ)
〃	森明充興	(第2研究グループ)
〃	藤高和信	(第3研究グループ総合研究官)
〃	山口寛	(第3研究グループ)
事務局	小川清一	(企画室)
〃	川上利彦	(企画室)

放医研シンポジウムシリーズ No. 27
活性酸素・フリーラジカル研究の新展開

平成8年9月30日 発行

編 集 小澤俊彦

編集協力 小川清一・川上利彦

放射線医学総合研究所
〒263 千葉市稲毛区穴川4-9-1
電話 043-251-2111