

光増感反応による  
グルタチオン抱合ヒドロキノンの生成機序と  
その酸化ストレス惹起に関する研究

2006年

千葉大学大学院薬学研究科  
環境健康科学専攻 衛生化学研究室  
西澤千穂

# 目次

要旨	4
略語	5
第1章 緒言	6
参考文献(第1章)	14
第2章 一重項酸素依存的グルタチオン抱合ハイドロキノンの生成とその機序	
2-1. 目的	19
2-2. 実験方法	21
2-2-1. 試薬	
2-2-2. グルタチオン抱合ハイドロキノン(HQ-GSH抱合体)の合成	
2-2-3. 一重項酸素の発生	
2-2-4. パラベン類と一重項酸素との反応による生成物の検出	
2-2-5. サリチル酸と一重項酸素との反応による生成物の検出	
2-3. 結果	
2-3-1. GSH存在下パラベン類と $^1\text{O}_2$ との反応によるHQ-GSH抱合体の生成	26
2-3-2. パラベン類と $^1\text{O}_2$ との反応によるBQとHQの生成	29
2-3-3. BQの生成とHQ-GSH抱合体形成の関係	35
2-3-4. GSH存在下サリチル酸と $^1\text{O}_2$ との反応生成物	38
2-4. 考察	41
2-5. 参考文献(第2章)	44

第 3 章	グルタチオン抱合ハイドロキノンによる活性酸素生成	
3-1.	目的	46
3-2.	実験方法	48
	3-2-1. 試薬	
	3-2-2. 細胞培養	
	3-2-3. ACP の合成	
	3-2-4. CP-H の合成	
	3-2-5. 過酸化水素の定量	
	3-2-6. 酸素ラジカルのスピントラップ法による検出	
	3-2-7. セミキノラジカルの測定	
	3-2-8. ACP をプローブとした ESR 測定	
	3-2-9. HPX/XOD 系による $O_2^{\cdot-}$ の生成と ESR 測定	
	3-2-10. 統計解析	
3-3.	結果	
	3-3-1. HQ-GSH 抱合体水溶液における過酸化水素の生成	53
	3-3-2. HQ-GSH 抱合体の自動酸化	55
	3-3-3. HQ-GSH 抱合体水溶液における酸素ラジカルの生成	58
	3-3-4. スピンプローブ ACP を用いた $O_2^{\cdot-}$ 生成の評価	60
3-4.	考察	71
3-5.	参考文献 ( 第 3 章 )	73
第 4 章	グルタチオン抱合ハイドロキノンによる細胞毒性	
4-1.	目的	74
4-2.	実験方法	76
	4-2-1. 試薬	
	4-2-2. 細胞培養	
	4-2-3. クリスタルバイオレット染色による細胞毒性の評価	

4-2-4. $\gamma$ -GT 活性の測定	
4-2-5. DCFH-DA 蛍光法を利用した細胞内酸化的ストレスの評価	
4-2-6. 細胞内グルタチオンの定量	
4-2-7. 統計解析	
4-3. 結果	
4-3-1. HQ-GSH 抱合体による細胞毒性への $\gamma$ -GT の関与	80
4-3-2. HQ-GSH 抱合体による細胞毒性への活性酸素の関与	84
4-3-3. HQ-GSH 抱合体による細胞内酸化的ストレスの評価	88
4-3-4. HQ-GSH 抱合体による細胞内グルタチオン量の変化	93
4-4. 考察	95
4-5. 参考文献 (第4章)	97
第5章 総括	99
参考文献 (第5章)	102
主論文目録	104
謝辞	105

## 要旨

皮膚にある光増感剤は光照射により一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) を生じることから、医薬品や化粧品を皮膚に塗布した場合、それに含まれる種々のフェノール化合物がそれと化学反応を起こすと考えられる。本研究では、グルタチオン (GSH) 存在下での  $^1\text{O}_2$  とフェノール化合物との反応生成物とその毒性について酸化ストレスの観点から調べた。保存料 *p*-ヒドロキシ安息香酸類を水溶液中で GSH 存在下  $^1\text{O}_2$  と反応させると、GSH 抱合ヒドロキノン (HQ-GSH 抱合体) が生成した。GSH 量や  $^1\text{O}_2$  量を変えた実験から、抱合体は  $^1\text{O}_2$  の関与した複数の過程を経て生じることが示唆された。HQ-GSH 抱合体とヒドロキノン (HQ) のそれぞれの水溶液では過酸化水素が検出され、その量は抱合体で多かった。これらによる過酸化水素は、ESR でセミキノン型ラジカルが検出されたことなどから自動酸化によるものと考えられる。腎近位尿細管由来培養細胞への暴露実験では抱合体、HQ とともに細胞毒性が現れ、DCFH-DA をプローブとしたフローサイトメトリーにより細胞内酸化ストレスの惹起が観測された。活性酸素の阻害実験と細胞内 GSH 量の測定から、HQ-GSH 抱合体は細胞外で生成される過酸化水素が、また HQ では細胞内 GSH 枯渇が主な細胞毒性の機序であると推定される。本研究は、皮膚で起こる光増感反応がフェノール化合物の毒性を変える可能性を示唆するものである。

## 略語

- 2,5-DHBA 2,5-dihydroxy benzoic acid
- 2,5-DGHQ 2,5-(diglutathion-S-yl)hydroquinone
- 2,6-DGHQ 2,6-(diglutathion-S-yl)hydroquinone
- ACP 1-acetoxy-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine
- BQ 1,4-benzoquinone
- CP carbamoyl-PROXYL
- CP-H 1-hydroxy-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
- DCFH-DA 2',7'-dichlorofluorescin diacetate
- DMPO 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
- DPBS Dulbecco's phosphate buffered saline
- DTPA diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid
- GSH reduced glutathione
- GSSG oxidized glutathione
- HPX hypoxanthine
- HQ hydroquinone
- MGHQ 2-(glutathion-S-yl)hydroquinone
- PB sodium phosphate buffer (20mM, pH 7.4)
- RB rose bengal
- TGHQ 2,3,5-(triglutathion-S-yl)hydroquinone
- XOD xanthine oxidase

## 第1章 緒言

生体内には、ポルフィリン類やリボフラビンなどの内因性の光増感剤が存在する[1]。プロトポルフィリンなどのポルフィリン類はヘム合成過程における中間代謝物で、ヘム合成過程の酵素異常で皮膚などに蓄積する。このような疾患はポルフィリア症と呼ばれ、日光にさらされると光過敏症を引き起こす[2]。植物に含まれるクロロフィルの分解生成物であるフェオフォルバイドや、テトラサイクリン系の抗生物質[3]も皮膚に蓄積しやすく、摂取により光過敏症を引き起こすことがある。また、皮膚表面に常在するアクネ菌はコプロポルフィリンを排泄する[4]。これらの化合物は、光増感剤として作用することが知られている。光増感剤は紫外線や可視光線の照射によって励起され、その励起エネルギーが基底状態の酸素分子に移動すると一重項酸素( $^1O_2$ )が生成する(type 光増感反応)(scheme 1-1)。 $^1O_2$ は空の電子軌道を持つため反応性が高く、活性酸素の一つとされている。生体構成成分に対し強い酸化力を有し、ene 反応や1,4-付加反応によって、膜脂質の過酸化や塩基の修飾を起こすことが報告されている[5-10]。皮膚は紫外線や可視光線にさらされる機会の多い組織であること、他の組織に比べて酸素に触れやすい部位であること[11]、そして外因性や内因性の光増感剤が存在することから、最も $^1O_2$ を生成しやすい部位と言える。実際、様々な in vivo の実験によって皮膚で $^1O_2$ が生成することが示されている[4, 12-13]。ポルフィリア症やテトラサイクリン系抗生物質の摂取でみられる光過敏症には、この $^1O_2$ の生成が関与していると考えられている。

体の中では $^1O_2$ とは違った生成機序で別の活性酸素種、すなわち superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素、およびヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) が生成することがわかっている。 $O_2^{\cdot-}$ はミトコンドリア電子伝達系やシトクロム P-450 で生体にさほど影響しない程度の量が生じていると考えられているが、虚血組織の xanthin oxidase や貪食細胞の NAD(P)H-oxidase では爆発的に発生するとされている。 $O_2^{\cdot-}$ は自発的に不均化反応を起こし、過酸化水素と酸素を生

じる。superoxide dismutase (SOD) は、この反応を加速する。過酸化水素は、さらに還元鉄の働きで $\cdot\text{OH}$  と  $\text{OH}\cdot$  に分解する。これら活性酸素のなかでも $\cdot\text{OH}$  は非常に反応性に富み、強い酸化力を有している。 $^1\text{O}_2$  を含めた活性酸素は DNA、膜脂質、タンパク質などの生体構成成分と反応し、タンパクの変性および失活、脂質過酸化、核酸塩基の修飾および DNA 鎖の切断などを引き起こすことが確認されている。また近年、活性酸素がカスパーゼカスケードや MAP キナーゼカスケードといったシグナル伝達系や、NF- $\kappa$ B や AP-1 といった転写因子を活性化して、アポトーシス誘導や障害に関わる酵素の発現調節をすることが多数報告されている[1, 14-18]。これらのことから、生体内で生成する活性酸素は虚血-再灌流障害、炎症、その他動脈硬化や発がんなどのさまざまな疾患や老化と密接に関係していると考えられている[1, 19-25]。活性酸素の引き起こす生体あるいは細胞への影響は、「酸化ストレス」という言葉で表現されている。

一方で、生体内には活性酸素に対する防御系として、様々な抗酸化物質や抗酸化機構が存在している[1]。低分子抗酸化物質としてグルタチオン、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -カロテン、ビリルビンなどが、また抗酸化酵素として SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどが知られている。これらは、生成した活性酸素を化学的あるいは物理的に消去したり酵素的に分解することで、活性酸素による生体への障害を防いでいる。これらの中で還元型グルタチオン (GSH) は、活性酸素を直接消去する働きに加え、アスコルビン酸の酸化還元とリンクして活性酸素と還元型アスコルビン酸の反応で生じた酸化型アスコルビン酸を還元型に戻す働きがある[1]。また、脂質過酸化物を分解するグルタチオンペルオキシダーゼの基質として、電子の供与をおこなう[1]。このように、GSH は抗酸化に関して重要な役割を果たしている。GSH の生体内の濃度は、多くの組織で比較的高く[1]、表皮にも 1 mmol/kg の濃度で存在していると報告されている[26]。

GSH はグリシン (Gly)、システイン (Cys) そしてグルタミン酸 (Glu) が



らなるトリペプチドである。GSHは抗酸化剤として重要な役割を演じる一方で、抱合反応を起こすことが知られている。GSHは求核試薬として、容易に1,4-ベンゾキノン(BQ)などのキノン化合物とMichael付加反応を起こし、ハイドロキノン(HQ)抱合グルタチオン(HQ-GSH抱合体)を生成することが報告されている[27, 28]。Hillら[29]は、HQとGSHをラットの肝ミクロソーム中で反応させたところ、NADPH-dependent microsomal enzymeの働きによりHQ-GSH抱合体が生成することを報告した。GSH抱合体形成はシスプラチン、アセトアミノフェンおよびメナジオンなどでも起こることが知られている。

Lauら[27]は、Sprague-DawleyラットにHQ-GSH抱合体を静脈内投与したところ、血中尿素窒素濃度が上昇したことから、HQ-GSH抱合体が腎障害を引き起こす可能性を示唆した。HQ-GSH抱合体はGSHの置換数の違いにより2-(glutathion-S-yl)hydroquinone (MGHQ)、2,5-(diglutathion-S-yl)hydroquinone (2,5-DGHQ)、2,6-(diglutathion-S-yl)hydroquinone (2,6-DGHQ)、および2,3,5-(triglutathion-S-yl)hydroquinone (TGHQ)の4種が生体内で生成するとされている (Fig. 1-1 [27])。Lauら[27]の実験では、そのうちTGHQがもっとも毒性が強かった。さらに、Petersら[30]は、Fischer 344ラットにTGHQを静脈内投与したところ、腎近位尿細管S3領域においてネクローシス様の壊死を認めた。一般に、GSH抱合体の毒性機序については次のように考えられている (scheme 1-2) [31-33]。GSH抱合体は、腎近位尿細管細胞表面に存在する $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT)によりGluが加水分解され、Gly-Cys抱合体となる。さらに細胞表面に存在するaminodipeptidaseにより加水分解され、Cys抱合体となる。Cys抱合体はアミノ酸トランスポーターやNa<sup>+</sup>-coupledトランスポーターの働きで細胞内に移行し、細胞内に存在する $\beta$ -lyaseによりチオール化合物となる。チオール化合物は反応性が高いため、細胞構成成分と容易に結合し、その結果、細胞死などの細胞毒性を表わす。Lauら[27]は、HQ-GSH抱合体投与による腎毒性が $\gamma$ -GTの阻害剤acivicinの投与で緩和されたことから、HQ-GSH抱合体の腎毒性も上記機構によるものと推定した。しかし、 $\gamma$ -GTなど

の酵素により消化されて細胞内に入った後の毒性発現機構については全く調べられておらず、上記機構によるかどうかは不明である。さらに、腎障害の指標とした血中尿素窒素の上昇は、acivicin で完全に抑えられているわけではない。

HQ は水溶液中で自動酸化を受けてセミキノラジカルとなり、セミキノラジカルもまた自動酸化を受けて BQ となる。これらの自動酸化の過程では、電子は溶存酸素に渡され  $O_2^{\cdot-}$  を生じる ( scheme 1-3 )。生体内では、NADH-cytochrome  $b_5$  reductase や NADPH-cytochrome P450 reductase などの酵素の働きにより BQ はセミキノラジカルに還元されることから、ここで形成されるセミキノラジカル-BQ のレドックスサイクルも、生体内の  $O_2^{\cdot-}$  の発生源となりうる[34]。「HQ-GSH 抱合体は HQ と同様に、レドックスサイクルにより活性酸素を生成する可能性はないか?」、そして「もし生成するのであれば、HQ-GSH 抱合体の毒性に活性酸素生成の寄与はあるのか?」これらのことについては全く調べられていない。

ところで、Briviba ら[35]は、光増感剤にメチレンブルーを用いて生成させた  $^1O_2$  とフェノールとの反応で、BQ と HQ が生成することを報告した。彼らはこの生成メカニズムとして、 $^1O_2$  のフェノールへの 1,4-付加反応により endoperoxide の形成を経て生成した HQ が、さらに  $^1O_2$  による endoperoxide 形成を経由して BQ が生成したと推定した ( scheme 1-4 )。BQ は前にも述べたとおり、GSH の求核置換反応を受けると HQ-GSH 抱合体となるため、GSH 存在下でフェノールが  $^1O_2$  と反応すると HQ-GSH 抱合体を生じる可能性が考えられる。

フェノール化合物は医薬品、化粧品、食品添加物などに広く使用されている。医薬品の例として角化性皮膚疾患治療薬であるサリチル酸、局所刺激薬であるサリチル酸メチルや、交感神経興奮薬である塩酸フェニレフリンが挙げられる。化粧品には HQ や、保存料として *p*-ヒドロキシ安息香酸エステル類 (パラベン類) が比較的高濃度に含まれる。パラベン類は食品添加物としても許可され

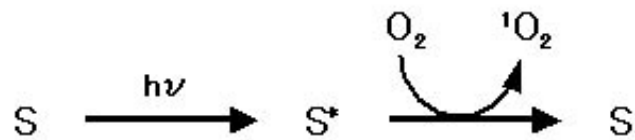
ていることから、経口的にも摂取される。フェノール性水酸基はもともと抗酸化活性を有することから、食品添加物のうち酸化防止剤としてジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、没食子酸プロピルなどが使用許可されている。さらに近年の健康ブームにより、カテキン類などのいわゆるポリフェノール類やウコンの成分であるクルクミンが、サプリメントとして積極的に摂取される機会も増えてきた。化粧品に含まれる HQ やパラベン類のみならず、サリチル酸やサリチル酸メチルも軟膏や液剤として直接皮膚に塗布される。皮膚に塗布されたこれらの化学物質は、少なからず皮膚組織に浸透するはずである。

皮膚は先に述べたように光増感反応を起こしやすい条件下にあり、最も  $^1\text{O}_2$  を生成する可能性の高い組織である。「皮膚に浸透したフェノール化合物は、 $^1\text{O}_2$  と反応して HQ や BQ そのものやその誘導体を生成する可能性はないか？」、そして、「皮膚は GSH 濃度の比較的高い組織であるため、もし BQ そのものや BQ 型の化合物を生成した場合には GSH 抱合を受け、毒性のある HQ-GSH 抱合体やその誘導体を生じる可能性があるのではないか？」これらの疑問に答えるための実験データは、これまでのフェノール化合物の毒性試験で光増感反応を全く考慮に入れていなかったため、皆無に等しいのが現状である。

以上の背景から、本研究では GSH 存在下でフェノール化合物と  $^1\text{O}_2$  との反応による生成物並びにその生成物の毒性に関する酸化的ストレスの関与について検討を行った。ここで得られた結果は、次の通りである。

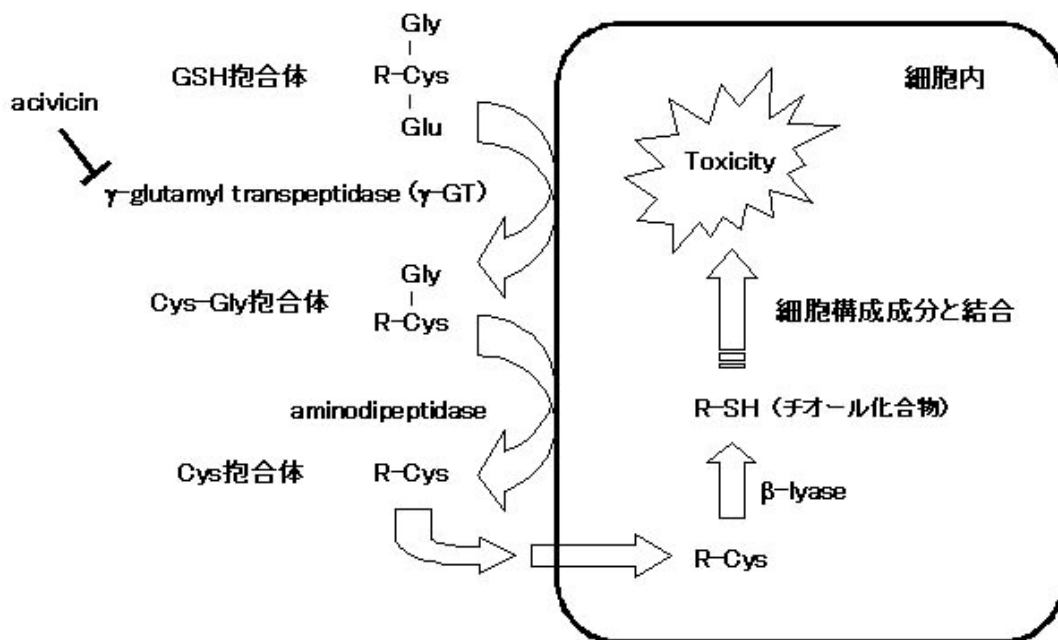
まず、フェノール化合物として最近広く使用されているパラベン類を中心に、フェノール化合物が GSH 存在下で  $^1\text{O}_2$  と反応した場合に HQ-GSH 抱合体が生じることを明らかにし、その生成メカニズムを推定した（第 2 章）。次に、HQ-GSH 抱合体でも、HQ と同様に自動酸化により活性酸素を生成することを明らかにした（第 3 章）。そして最後に、培養細胞に対して HQ-GSH 抱合体は HQ と共に酸化的ストレスの関与した細胞毒性を示したが、その毒性に寄与する

活性酸素の細胞膜を隔てた生成場所が両者で異なっていることを明らかにした  
(第4章)。

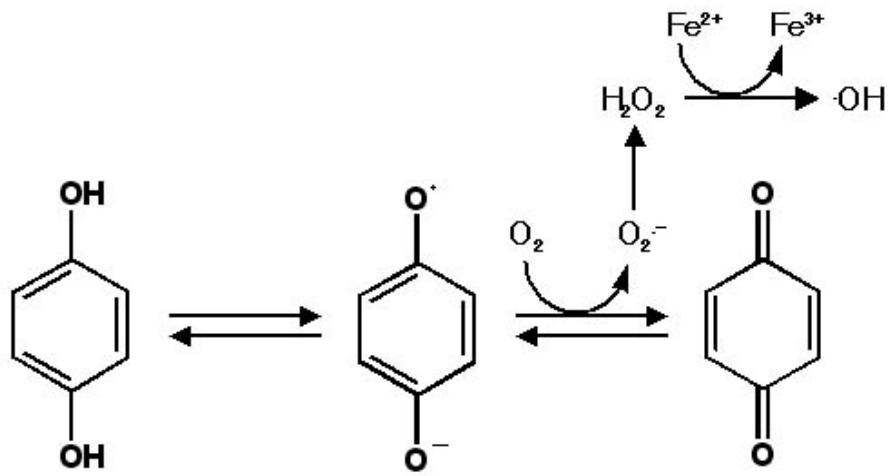


scheme 1-1 type 光増感反応で生成する  ${}^1O_2$

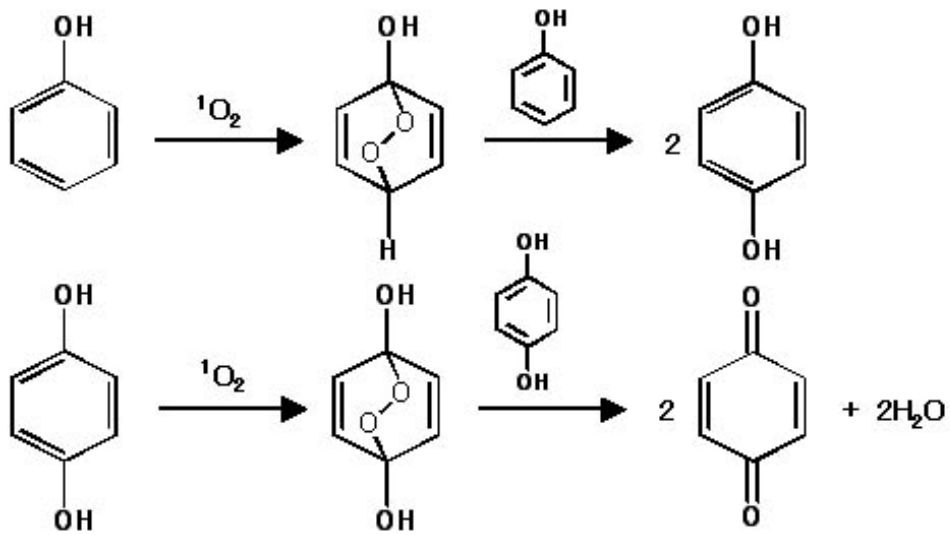
S: 光増感剤、S\*: 励起した光増感剤、h : 紫外線あるいは可視光線



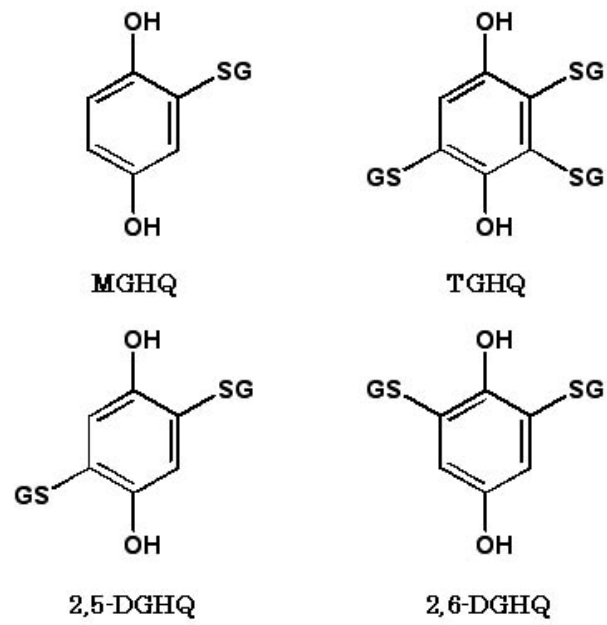
scheme 1-2 腎近位尿細管における GSH 抱合体の毒性発現として推定されている機序



scheme 1-3 HQの自動酸化により生成するセミキノンラジカルとBQとのレドックス反応で生成する活性酸素



scheme 1-4 Briviba ら[35]が推定したフェノールと $^1O_2$ との反応によるHQあるいはBQの生成



**Fig. 1-1** HQ-GSH 抱合体の構造式  
 (-SG = glutathione-S-yl-)

## 参考文献 (第 1 章)

- [1] Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, New York
- [2] Moor, E. M. R., and Mccoll, K. E (1989) Therapy of the acute porphyries. *Clin. Biochem.* **22**, 181-188
- [3] Miskoski, S., Sanchez, E., Garavano, M., Lopez, M., Soitermann, A. T., and Garcia, N. A. (1998) Singlet molecular oxygen-mediated photo-oxidation of tetracyclines: kinetics, mechanism and microbiological implications. *J. Photochem. Photobiol. B* **43**, 164-171
- [4] Arakane, K., Ryu, A., Hayashi, C., Masunaga, T., Shinmoto, K., Mashiko, S., Nagano, T., and Hirobe, M. (1996) Singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) generation from coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 578-582
- [5] Buchko, G. W., Wagner, J. R., Cadet, J., Raoul, S., and Weinfeld, M. (1995) Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 17-24
- [6] 中野稔、浅田浩二、大柳善彦 編 (1988) 活性酸素 生物での生成・消去・作用の分子機構 共立出版
- [7] Baird, M. B., Massie, H. R., and Piekieniak, M. J. (1977) Formation of lipid peroxides in isolated rat liver microsomes by singlet molecular oxygen. *Chem. Biol. Interact.* **16**, 145-153
- [8] Sugioka, K., and Nakano, M. (1976) A possible mechanism of the generation of singlet molecular oxygen in nadph-dependent microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **423**, 203-216
- [9] Dixit, R., Mukhtar, H., and Bickers, D. R. (1982) Evidence that lipid peroxidation in microsomal membranes of epidermis is associated with generation of hydrogen peroxide and singlet oxygen. *Biochem. Biophys.*

*Res. Commun.* **105**, 546-552

- [10] Cannistraro, S., and Vorst, A. V. (1977) Photosensitization by hematoporphyrin: ESR evidence for free radical induction in unsaturated fatty acids and for singlet oxygen production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **74**, 1177-1185
- [11] Stücker, M., Struk, A., Altmeyer, P., Herde, M., Baumgärtl, H., and Lübbers, D. W. (2002) The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J. Physiol.* **538 (Pt 3)**, 985-994
- [12] Takeshita, K., Takajo, T., Hirata, H., Ono, M., and Utsumi, H. (2004) In vivo oxygen radical generation in the skin of the protoporphyria model mouse with visible light exposure: an L-band ESR study. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1463-1470
- [13] Yasui, H., and Sakurai, H. (2000) Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 131-136
- [14] Weber, T. J., Huang, Q., Monks, T. J., and Lau, S. S. (2001) Differential regulation of redox responsive transcription factors by the nephrocarcinogen 2,3,5-tris(glutathione-S-yl)hydroquinone. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 814-821
- [15] Ramachandiran, S., Huang, Q., Dong, J., Lau, S. S., and Monks, T. J. (2002) Mitogen-activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1635-1642
- [16] Skulachev, V. P. (1998) Cytochrome *c* in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* **423**, 275-280
- [17] Hampton, M. B., and Orrenius, S. (1997) Dual regulation of caspase



- activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* **414**, 552-556
- [18] Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**, 1-16
- [19] Murata, M., Tsujikawa, M., and Kawanishi, S. (1999) Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 478-483
- [20] Kawanishi, S., Hiraku, Y., and Oikawa, S. (2001) Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat. Res.* **488**, 65-76
- [21] Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., and Tanooka, H. (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* **7**, 1849-1851
- [22] Floyd, R. A., Watson, J. J., Harris, J., West, M., and Wong, P. K. (1986) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in Granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 841-846
- [23] Muniz, P., Saez, P., Iradi, A., Vina, J., Oliva, M. R., and Saez, G. T. (2001) Differences between cysteine and homocysteine in the induction of deoxyribose degradation and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 354-362
- [24] Garcon, G., Garry, S., Gosset, P., Zerimech, F., Martin, A., Hannotiaux, M. H., and Shirali, P. (2001) Benzo(a)pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles-induced lung tissue injury : role of free radicals. *Cancer Lett.* **167**, 7-15

- [25] Yamamoto, H., Watanabe, T., Mizuno, H., Endo, K., Hosokawa, T., Kazusaka, A., Gooneratne, R., and Fujita, S. (2001) In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 547-554
- [26] Connor, M. J., and Wheeler, L. A. (1987) Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol.* **46**, 239-245
- [27] Lau, S. S., Hill, B. A., Highet, R. J., and Monks, T. J. (1988) Sequential oxidation and glutathione addition to 1,4-benzoquinone: Correlation of toxicity with increased glutathione substitution. *Molecular Pharmacol.* **34**, 829-836
- [28] Finley, K. T. (1974) The addition and substitution chemistry of quinines. *The chemistry of the quinonoid compounds* (S. Patai, ed), Part 2. John Wiley and Sons, New York, 877-1144
- [29] Hill, B. A., Kleiner, H. E., Ryan, E. A., Dulik, D. M., Monks, T. J., and Lau, S. S. (1993) Identification of Multi-S-substituted conjugates of hydroquinone by HPLC-coulometric electrode array analysis and mass spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 459-469
- [30] Peters, M. M. C. G., Jones, T. W., Monks, T. J., and Lau, S. S. (1997) Cytotoxicity and cell-proliferation induced by the nephrocarcinogen hydroquinone and its nephrotoxic metabolite 2,3,5-(tris-glutathion-S-yl) hydroquinone. *Carcinogenesis* **18**, 2393-2401
- [31] Monks, T. J., and Lau, S. S. (1987) Commentary : Renal transport processes and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* **15**, 437-441
- [32] Schaeffer, V. H., and Stevens, J. L. (1987) The transport of S-cysteine conjugates in LLC-PK1 cells and its role in toxicity. *Mol. Pharmacol.* **31**,

506-512

- [33] Lash, L. H., and Jones, D. P. (1984) Renal glutathione transport: Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane. *J. Biol. Chem.* **259**, 14508-14514
- [34] Brunmark, A., and Cadenas, E. (1989) Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 435-477
- [35] Briviba, K., Devasagayam, T. P. A., Sies, H., and Steenken, S. (1993) Selective para hydroxylation of phenol and aniline by singlet molecular oxygen. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 548-553

## 第2章 一重項酸素依存的グルタチオン抱合ヒドロキノンの生成とその機序

### 2-1. 目的

本章では、GSH 存在下でフェノール化合物と  $^1\text{O}_2$  との反応による生成物と、その生成機序について検討した。フェノール化合物は多くの医薬品、化粧品などに使用されており、最近では摂取する機会も非常に多い。

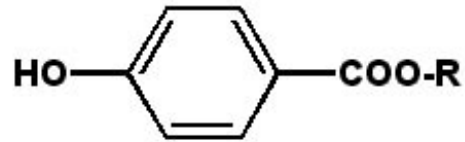
多くのフェノール化合物の中で、本実験ではパラベン類とサリチル酸を選択し、実験を行った。パラベン類は Fig. 2-1 に示すように、フェノール性 OH 基に対して para 位に電子吸引基をもつ化合物である。この化合物は抗菌性保存料として医薬品や化粧品などに広く使用されており、特に化粧品では 0.3-1% という比較的高い濃度で使用されている[1-3]。この量は、食品添加物として認可されている量に比べて 2 桁高い濃度である。また、皮膚から容易に吸収されることが報告されている。

パラベン類は生体内で *p*-ヒドロキシ安息香酸に加水分解されたあと、そのほとんどが肝臓や腎臓でグルクロン酸、グリシン、そして硫酸抱合体に代謝されて、速やかに尿中に排泄されるため体内には蓄積しない[1-3]。実験動物を用いた急性毒性試験ではパラベン類の  $\text{LD}_{50}$  は、1.5-8 g/kg と高く、また亜急性、慢性毒性試験でも毒性はほとんどないとされてきた。一方で、パラベン類を含む化粧品などを皮膚に塗布して日光に当たると皮膚炎、湿疹そしてアレルギー症状を起こすケースが報告されている。

一方、サリチル酸は角質軟化溶解作用により角質を剥離し、またフェノールに匹敵する防腐力を持つため、白癬菌や角化性の皮膚疾患治療に広く使用されている[4]。Fig. 2-2 に示すように、フェノール性 OH 基の ortho 位に置換基をもつ化合物であり、 $^1\text{O}_2$  との反応で 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-DHBA) を生成することが報告されている[5-7]。

本研究では、まず GSH 存在下でパラベン類と  $^1\text{O}_2$  とが反応した場合の生成物と、その生成メカニズムについて検討した。さらに、サリチル酸についても GSH

存在下での同様な反応による生成物を調べた。



R = -H      *p*-ヒドロキシ安息香酸  
 -CH<sub>3</sub>      メチルパラベン  
 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>      エチルパラベン

Fig. 2-1 *p*-ヒドロキシ安息香酸およびパラベンの構造式

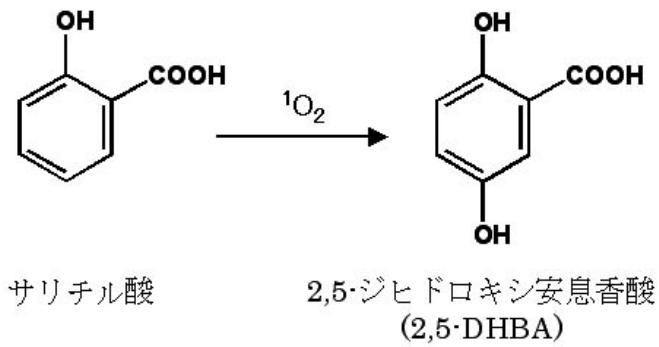


Fig. 2-2 サリチル酸と <sup>1</sup>O<sub>2</sub> との反応による 2,5-DHBA の生成

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 試薬

BQ、GSH、ローズベンガル (RB)、メチルパラベン、エチルパラベン、重水は和光純薬工業社製を用いた。*p*-ヒドロキシ安息香酸は Sigma 社製を、HQ は半井化学薬品 (株) 製を、uroporphyrin dihydrochloride (UP) はフナコシ (株) 製を使用した。その他の試薬は、すべて特級品を用いた。

試薬調製ならびに HPLC 分析には、すべて逆浸透精製水 (Millipore Milli-Q Labo により製造) を使用した。標準物質以外の試薬は、用時リン酸ナトリウム緩衝液 (PB) (特に断りのない限り 20 mM, pH 7.4) に溶解した。

### 2-2-2. グルタチオン抱合ヒドロキノン (HQ-GSH 抱合体) の合成

HQ-GSH 抱合体は、Lau らの方法を一部改良して合成した [8]。BQ 水溶液 (167 mM、2 mL) に等モル量の GSH 水溶液 (167 mM、2 mL) を滴下し、室温で 2 時間攪拌しながら反応させたのち、未反応の BQ を混在する HQ とともに酢酸エチルで抽出除去してから凍結乾燥し、HQ-GSH 抱合体粗画分とした。HQ-GSH 抱合体粗画分から HQ の 1 置換抱合体 (MGHQ)、2 置換抱合体 (2,5-DGHQ 並びに 2,6-DGHQ) および三置換抱合体 (TGHQ) の分離・精製は、HPLC (東ソー-CCP & 8020 シリーズ) を用いておこなった。カラムは Whatman magnum 9 ODS-3 逆相 semipreparative column (9.4 × 250mm) を使用し、カラム温度を 25 °C に保ちながらメタノール : 水 : 酢酸 = 5 : 94 : 1 の溶離液を 3 mL/min の速度で流した。逆浸透精製水に 30 mg/mL の濃度に溶解した HQ-GSH 抱合体粗画分を、100 μL ずつ HPLC に注入し、各抱合体の検出は紫外線検出器 (280nm) で行った。このときの HPLC クロマトグラムを Fig.2-3 に示す。ここで検出されたピークのうち、3-6 番目の画分をそれぞれ分取して凍結乾燥した。さらに 3-6 番目の画分について、同様の操作をメタノール : 水 : 酢酸 = 3 : 96 : 1 の溶離液に変えて行い、精製した。各抱合体の精製度は HPLC で確認した。カラムは Whatman PARTISIL 10 ODS-3 逆相カラム (4.6

× 250 mm) を使用し、カラム温度を 25 に保ちながらメタノール：水：酢酸 = 5 : 94 : 1 の溶離液を 1 mL/min の速度で流した。各抱合体の同定と純度は <sup>1</sup>H-NMR( JNM-AL300 FT NMR System, JEOL ) [8] を用いて行った (Fig. 2-4)。MGHQ、TGHQ、2,5-DGHQ、および 2,6-DGHQ はそれぞれ 32.3 %、14.1 %、2.7 %、および 5.3 % の収率で得られた。

### 2-2-3. 一重項酸素の発生

一重項酸素は、RB あるいは UP の光増感反応により発生させた。褐色バイアル瓶内で調製した RB あるいは UP を含む試料をボルテックスミキサーで攪拌後、ただちに石英製偏平セル ( ESR 測定用偏平セル ; Labotec ) にとり、室温でタングステンランプ ( Philips KP-12 100V, 750W ) を用いて可視光を照射 ( 0.7 W/m<sup>2</sup> ) した。特に断りのない限り、2 分間照射を行った。

### 2-2-4. パラベン類と一重項酸素との反応による生成物の検出

褐色バイアル瓶に PB で調製した RB、パラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸、そして GSH 溶液を入れ、混和後石英製偏平セルにとって可視光照射を行った。照射後、試料 50 μL を HPLC 移動相 200 μL で希釈し、syringe filter ( 0.2 μm Minisart RC4, Sartorius ) でろ過してから 50 μL を HPLC に注入した。HPLC の測定には CCP & 8020 シリーズ ( 東ソー ) を、カラムは TSK-GEL OCTYL-80Ts ( 4.6 × 250 mm ; 東ソー ) 逆相カラムを使用した。電気化学検出器 ( ECD ) は ESA 製 Coulochem を、アナリティカルセルは MODEL 5011 を用いた。分析はメタノール：酢酸：水 = 5 : 1 : 94 の移動相を、1.0 mL/min の速度で流して行った。また、このときカラム温度は 25 に保った。ECD は第一電極を -350mV、第二電極を +400mV に設定した。HQ、BQ および各 HQ-GSH 抱合体の保持時間は、測定日ごとに標準物質を用いて確認した。

#### 2-2-5. サリチル酸と一重項酸素との反応による生成物の検出

褐色バイアル瓶にPBで調製したUP、サリチル酸、およびチオール化合物溶液を入れ、混和後石英製偏平セルにとって可視光照射を行った。照射後、試料50  $\mu\text{L}$ をHPLC溶離液200  $\mu\text{L}$ で希釈し、syringe filter (0.2 $\mu\text{m}$  Minisart RC4, Sartorius)でろ過してから50  $\mu\text{L}$ をHPLCに注入した。HPLCの測定には東ソー株式会社のCCP&8020シリーズを、カラムはTSK-GEL OCTYL-80Ts (4.6  $\times$  250mm)逆相カラムを使用した。電気化学検出器(ECD)はESA製Coulochemを、アナリティカルセルはMODEL 5011を用いた。分析は30 mM クエン酸 / 30 mM 酢酸 / 20% メタノール (pH 3.2)の溶離液を1.0 mL/minの速度で流して行った。またカラム温度は43 に保った。ECDは第一電極を30 mV、第二電極を300 mVに設定した。2,5-DHBAの保持時間は、測定日ごとに標準物質を用いて確認した。



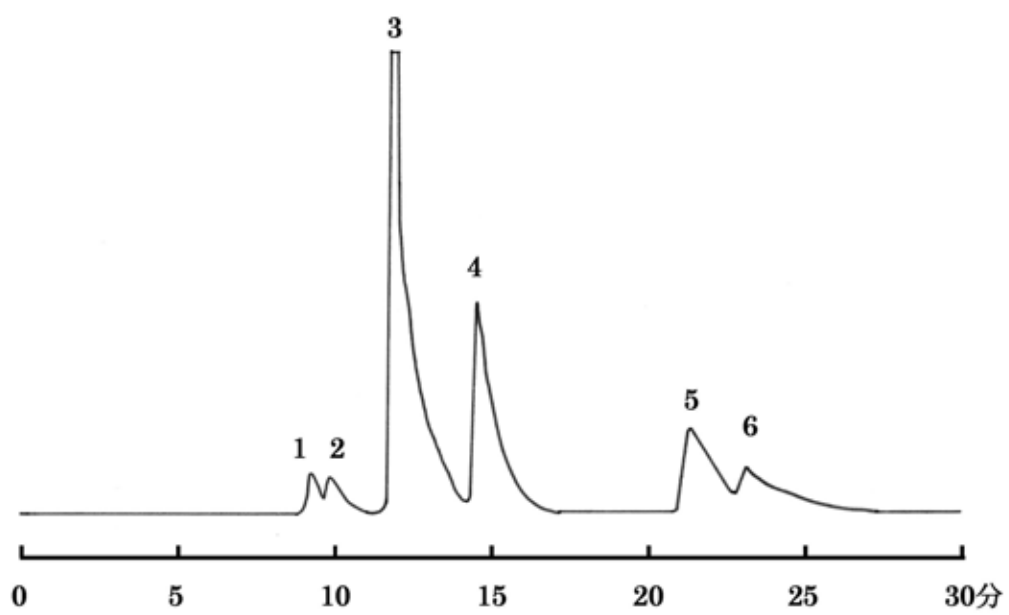


Fig. 2-3 合成した HQ-GSH 抱合体の HPLC クロマトグラム

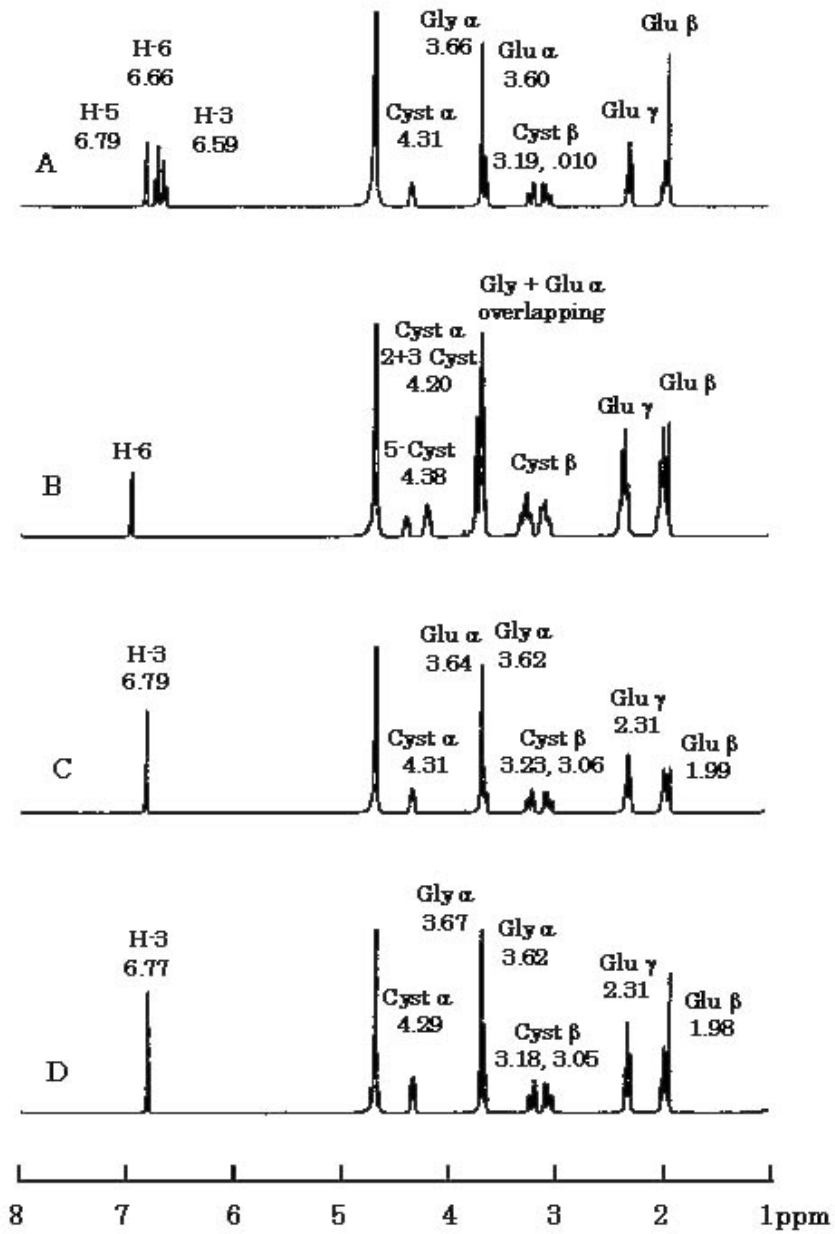


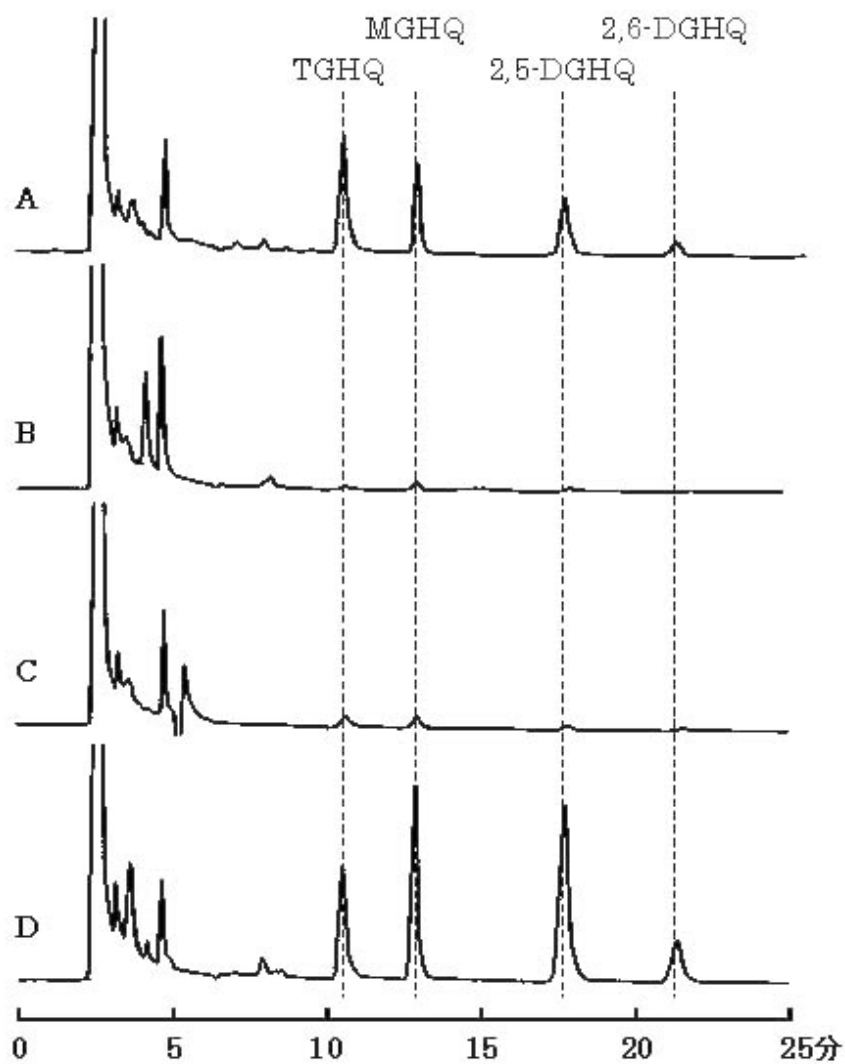
Fig. 2-4 合成した HQ-GSH 抱合体の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル  
 A : MGHQ、 B : TGHQ、 C : 2,5-DGHQ、 D : 2,6-DGHQ

## 2-3. 結果

### 2-3-1. GSH 存在下パラベン類と $^1\text{O}_2$ との反応による HQ-GSH 抱合体の生成

光増感剤 RB と共に GSH を混合したメチルパラベンの PB 溶液を 2 分間照射し、生成物を HPLC で分析したところ、クロマトグラム上に新たに 4 つのピークが現れた (Fig. 2-5A)。これらのピークの保持時間は、保持時間の短い方から順に TGHQ、MGHQ、2,5-DGHQ および 2,6-DGHQ のものと一致した。これらの HQ-GSH 抱合体のうち、GSH が 3 つ置換した TGHQ と 1 つ置換した MGHQ が主生成物であった。光照射を行わなかった場合、あるいは RB を添加せずに光照射を行った場合には、これらの HQ-GSH 抱合体は生成しなかった。

この反応に  $^1\text{O}_2$  が関与しているか否かを調べるため、試料中の溶存酸素を減らす目的でアルゴンガスによる脱気を行ってから光照射を行ったところ、HQ-GSH 抱合体の生成は見られなかった (Fig. 2-5B)。さらに  $^1\text{O}_2$  のクエンチャーであるアジ化ナトリウムの存在下でも、HQ-GSH 抱合体は生成しなかった (Fig. 2-5C)。反対に、 $^1\text{O}_2$  の寿命を延長する重水[9]を 90%含む水で調製した PB 溶液中では、HQ-GSH 抱合体の生成量が増加した (Fig. 2-5D)。これらのことから、上記反応においてメチルパラベンからの HQ-GSH 抱合体生成は  $^1\text{O}_2$  依存的に起きていることが確認された。メチルパラベンの代わりにエチルパラベンあるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸を用いた場合にも、同様に MGHQ、2,5-DGHQ、2,6-DGHQ および TGHQ の生成が観察された。主生成物であった MGHQ と TGHQ の量を定量した結果を、Table 2-1 に示す。



**Fig. 2-5** RB 存在下でメチルパラベンと GSH との反応による生成物の HPLC-ECD クロマトグラム

A: 1mM メチルパラベン、1mM GSH そして 14 $\mu$ M RB を空気飽和した PB に溶解し、2 分間可視光照射を行った。B: A の試料を光照射前に 3 分間アルゴンガスで脱気を行った。C: A の試料に 5mM アジ化ナトリウムを添加してから光照射を行った。D: A の試料を 90% D<sub>2</sub>O PB 中で行った。

**Table 2-1** GSH 存在下でパラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸と  $^1\text{O}_2$  との反応で生成する MGHQ および TGHQ

1mM パラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸と 1mM GSH、そして 14 $\mu\text{M}$  RB を空気飽和した PB に溶解し、可視光を 2 分間照射した。値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。

	MGHQ ( $\mu\text{M}$ )	TGHQ ( $\mu\text{M}$ )
メチルパラベン	47 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 0.2
エチルパラベン	47 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 0.8
<i>p</i> -ヒドロキシ安息香酸	8.1 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.0

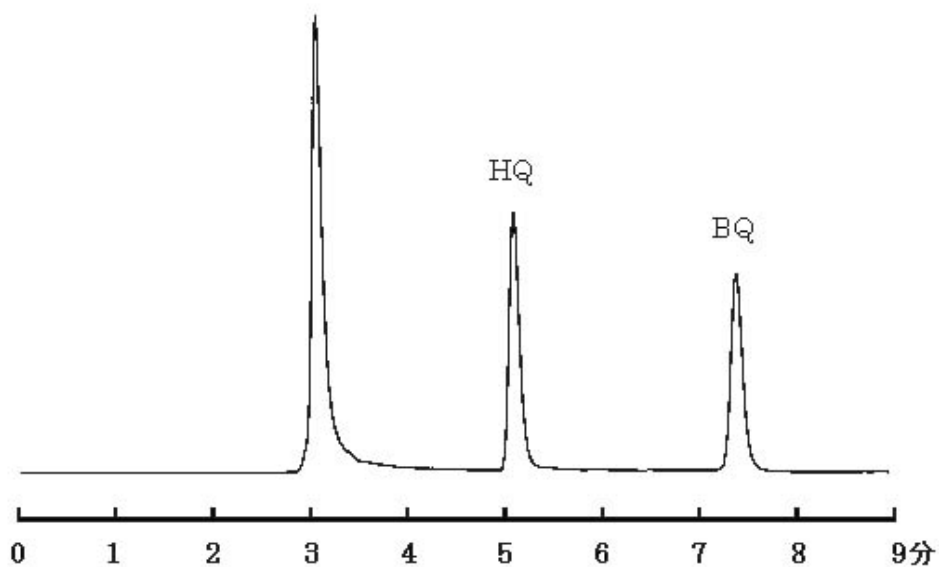
### 2-3-2. パラベン類と $^1\text{O}_2$ との反応による BQ と HQ の生成

HQ-GSH 抱合体の生成メカニズムについて調べるため、GSH を添加しない状態でメチルパラベンの PB 溶液を RB 存在下で光照射した。生成物を HPLC 分析した結果、クロマトグラム上に 2 つのピークが現れ、BQ 並びに HQ と同定された (Fig. 2-6)。同様の実験をエチルパラベンおよび *p*-ヒドロキシ安息香酸についても行い、BQ と HQ の生成量を定量した結果を Fig. 2-7A に示す。ここで用いた条件下では、いずれも HQ に比べ BQ の生成量が圧倒的に多かった。この反応に  $^1\text{O}_2$  が関与しているかどうかを調べるため、重水を 90%含有する水で調製した PB 溶液中で反応を行った。重水を含む PB では水で調製した PB の時に比べ、BQ と HQ の生成量は共に 3-4 倍に増加した (Fig. 2-7B)。このことは、パラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸からの BQ 並びに HQ の生成は、 $^1\text{O}_2$  依存的に起きる反応であることを示す。

パラベン類からの BQ および HQ の生成メカニズムを詳しく調べるために、*p*-ヒドロキシ安息香酸と  $^1\text{O}_2$  との反応について、 $^1\text{O}_2$  の濃度を変え、反応時間を追って生成物を調べた。RB の濃度を Fig. 2-7A で用いたときよりも低い 10  $\mu\text{M}$  にして照射した場合、すなわち  $^1\text{O}_2$  の生成量が比較的少ない場合では、3 分間にわたり BQ と HQ はほぼ同程度生成した (Fig. 2-8A)。RB の濃度を Fig. 2-7A の場合と同じ 14  $\mu\text{M}$  に上げたときの結果を Fig. 2-8B に示す。光照射を開始してから初期の段階では、Fig. 2-8A で見られたように BQ と HQ がほぼ同程度生成した。しかし、照射時間が長くなると、すなわち  $^1\text{O}_2$  生成量が増加すると、BQ が優位に生成し、HQ の生成量は 10 $\mu\text{M}$  RB のときよりも減少する傾向にあった (Fig. 2-8B)。このとき、さらに  $^1\text{O}_2$  の寿命を長くするため同じ反応を、90% 重水を含む水で調製した PB 溶液中で行うと、照射直後から BQ が優位に生成した (Fig. 2-8C)。

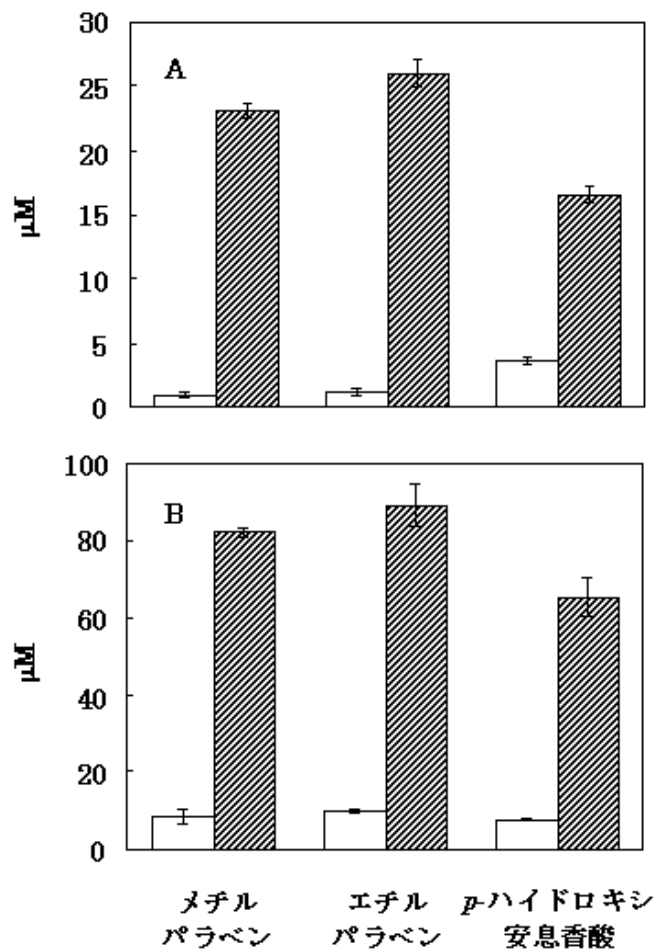
比較的低濃度の  $^1\text{O}_2$  では HQ と BQ が同濃度できたのに対し、 $^1\text{O}_2$  生成量が過剰になると BQ の生成量が顕著に多くなり、HQ 生成量はむしろ減少する傾向にあったことから、*p*-ヒドロキシ安息香酸と  $^1\text{O}_2$  との反応で生じた HQ がさら

に  $^1\text{O}_2$  と反応して BQ を生成する可能性が考えられる。このことを確かめるために RB を HQ 溶液に混合して光照射したところ、HQ 量が減少し、代わりに BQ が生成した (Fig. 2-9)。光照射しない場合には、BQ は生成せず、HQ 濃度も変化しなかった。



**Fig. 2-6** メチルパラベンと  $^1\text{O}_2$  との反応生成物の HPLC クロマトグラム  
1mM メチルパラベンと 14 $\mu\text{M}$  RB を PB に溶解し、2 分間可視光照射してから  
HPLC-ECD で解析した。

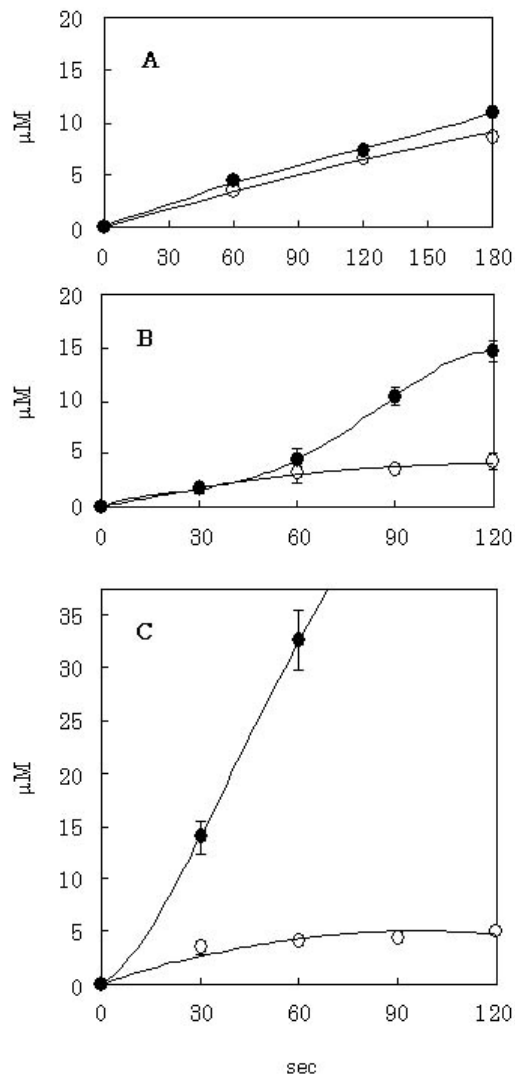




**Fig. 2-7** パラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸と  $^1\text{O}_2$  との反応で生成する HQ および BQ

1mM パラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸と 14μM RB を (A) PB、(B) 90% D<sub>2</sub>O で調製した PB に溶解し、2 分間可視光照射を行った。

□ : HQ、▨ : BQ



**Fig. 2-8** *p*-ヒドロキシ安息香酸からの HQ および BQ 生成に対する  $^1\text{O}_2$  濃度依存性

A : 1mM *p*-ヒドロキシ安息香酸と 10 $\mu\text{M}$  RB を PB に溶解。

B : 1mM *p*-ヒドロキシ安息香酸と 14 $\mu\text{M}$  RB を PB に溶解。

C : B の試料を 90% $\text{D}_2\text{O}$  で調製した PB に溶解。

● : HQ、 ○ : BQ

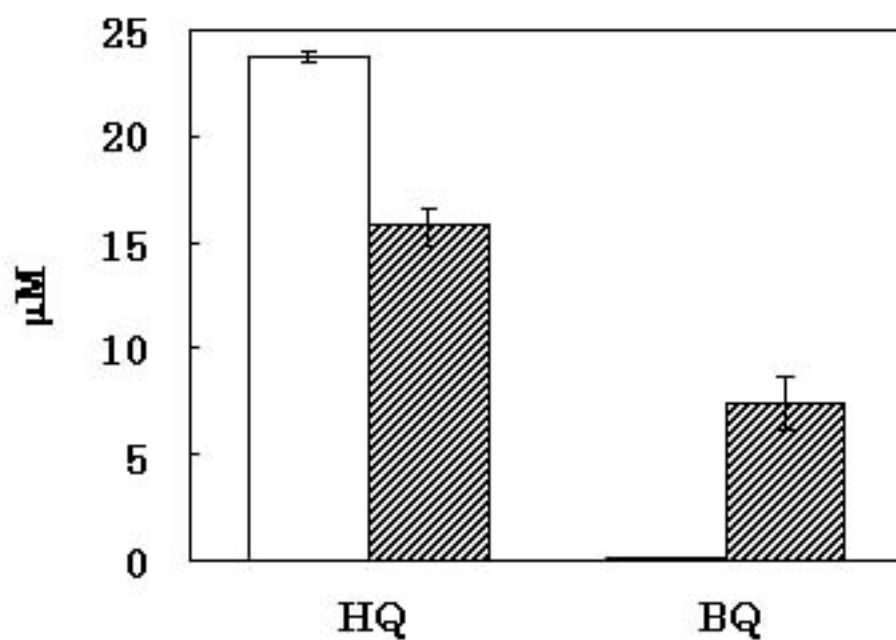


Fig. 2-9 HQ と  $^1\text{O}_2$  との反応による BQ の生成

25 $\mu\text{M}$  HQ と 14 $\mu\text{M}$  RB を PB に溶解し、2 分間可視光照射を行った。

□ : 照射なし、▨ : 2 分間照射

### 2-3-3. BQ の生成と HQ-GSH 抱合体形成の関係

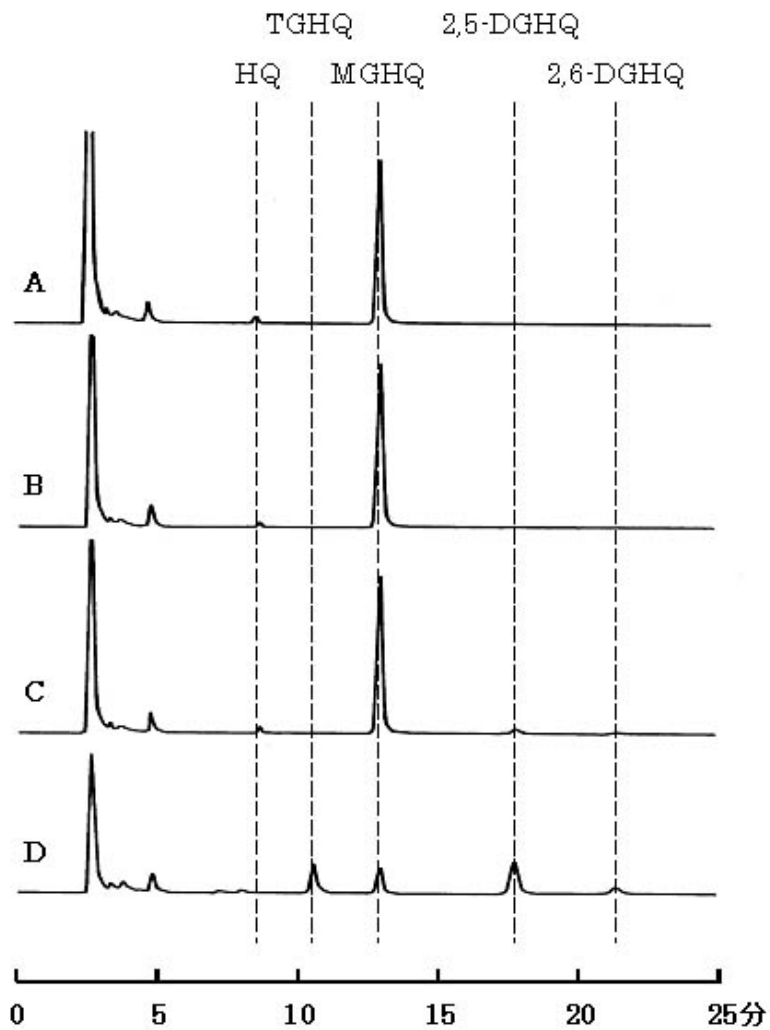
GSH 存在下、1 mM メチルパラベンと  $^1\text{O}_2$  との反応について、GSH 濃度を変えて光照射を行った結果を Table 2-2 に示す。GSH を含まない状態で反応させた時に生成した BQ は、GSH 濃度を 50  $\mu\text{M}$  まで増加させると顕著に減少し、代わって MGHQ の生成が増加した。一方、HQ の生成量は GSH 濃度によらず、ほぼ一定だった。GSH 濃度が 50  $\mu\text{M}$  以上になると MGHQ の生成濃度は減少する傾向が見られ、同時に TGHQ の生成量が GSH 濃度依存的に増加した。Table 中には示していないが、このとき同時に 2,5-DGHQ および 2,6-DGHQ の生成も見られた。

パラベン類と  $^1\text{O}_2$  との反応で BQ が生じたことと HQ-GSH 抱合体が GSH 濃度依存的に生成したことから、パラベン類と  $^1\text{O}_2$  との反応により生成した BQ に GSH が付加した可能性が考えられる。このことを確かめるために、BQ が GSH と反応して HQ-GSH 抱合体を形成するかどうかについて調べた。BQ と GSH の混合液を 2 分間放置したところ、HQ に GSH が 1 つ結合した MGHQ のみが検出された (Fig. 2-10A)。この混合液を光照射しても、また RB 存在下で BQ と GSH の混合液を放置しても結果は同じであった (Fig. 2-10B, C)。GSH が 2 つ置換した 2,5-DGHQ および 2,6-DGHQ や 3 つ置換した TGHQ の生成は、BQ と GSH の混合液を RB の共存下で光照射してはじめて確認された (Fig. 2-10D)。

**Table 2-2** GSH 存在下でのメチルパラベンと  $^1\text{O}_2$  との反応生成物に対する GSH 濃度依存性

1mM メチルパラベン、14 $\mu\text{M}$  RB そして GSH を PB に溶解し、2 分間可視光を照射した。実験は 5 回行い、同様の結果が得られた。

GSH ( $\mu\text{M}$ )	HQ ( $\mu\text{M}$ )	BQ ( $\mu\text{M}$ )	MGHQ ( $\mu\text{M}$ )	TGHQ ( $\mu\text{M}$ )
0	4.1	22.0	0	0
10.0	3.4	20.0	0.3	0
25.0	3.3	6.7	0.7	0
37.5	4.0	1.2	3.0	0.6
50.0	2.5	0	5.1	2.7
62.5	1.0	0	5.5	4.8
75.0	0.6	0	5.4	6.1
100.0	0.4	0	4.8	7.4
250.0	0	0	4.2	8.3



**Fig. 2-10** BQ と GSH との反応による HQ-GSH 抱合体の生成

A : 25 $\mu$ M BQ と 1mM GSH を PB に溶解し、2 分間放置してから測定

B : A の試料を 2 分間可視光照射してから測定

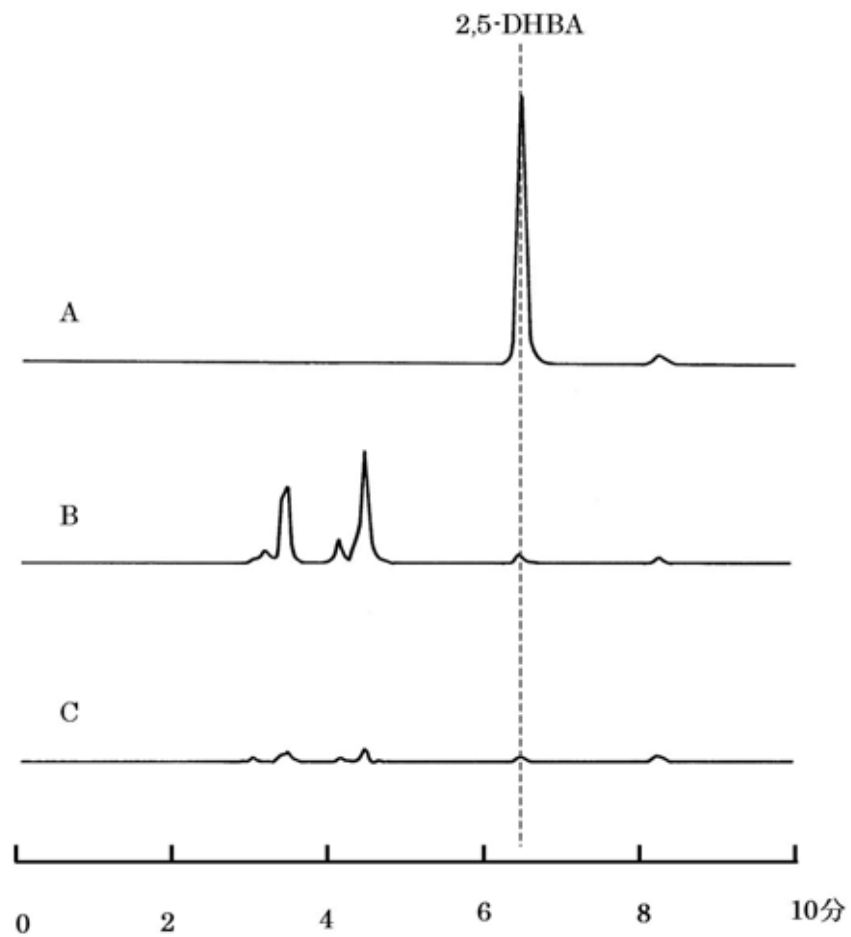
C : 25 $\mu$ M BQ と 1mM GSH、14 $\mu$ M RB を PB に溶解し、2 分間放置してから測定

D : C の試料を 2 分間可視光照射してから測定

#### 2-3-4. GSH 存在下サリチル酸と $^1\text{O}_2$ との反応生成物

パラベン類の代わりにサリチル酸を用いて、同様の反応で GSH 抱合体ができるかどうかを調べた。まず、サリチル酸と UP 光増感反応により発生させた  $^1\text{O}_2$  とを反応させると、1本のシャープなピークが HPLC クロマトグラム上に現れた (Fig. 2-11A)。このピークは標準品を用いて確認したところ、2,5-DHBA であると確認された。この反応を GSH 存在下で行ったところ、2,5-DHBA のピークはほとんど見られなくなり、代わりに未知のピークが出現した (Fig. 2-11B)。これらのピークの保持時間は 2,5-DHBA のものより短かった。この未知ピーク形成に  $^1\text{O}_2$  が関与しているかどうかを調べるため、アジ化ナトリウムを添加したところ、ピークはほとんど検出されなくなった (Fig. 2-11C)。

ここで見られたピークが、GSH がそのチオール基の求核反応により付加したものであることを推定するため、GSH 以外のチオール化合物を添加して光照射を行い、GSH の場合とは異なった保持時間に新たなピークが現れるかどうかを調べた。GSH の代わりにシステイン、ペニシラミン、アセチルシステインあるいはシステアミンを用いたところ、いずれの場合も 2,5-DHBA のピークはほとんど見られなくなり、代わりに GSH の場合とは異なった保持時間におのおの数本のピークが出現した (Fig. 2-12C-F)。新たに出現したピークの保持時間は、添加したチオール化合物により異なった。このことから、GSH 存在下で出現した新たなピークは、サリチル酸に GSH 抱合が起きた結果であると推定される。



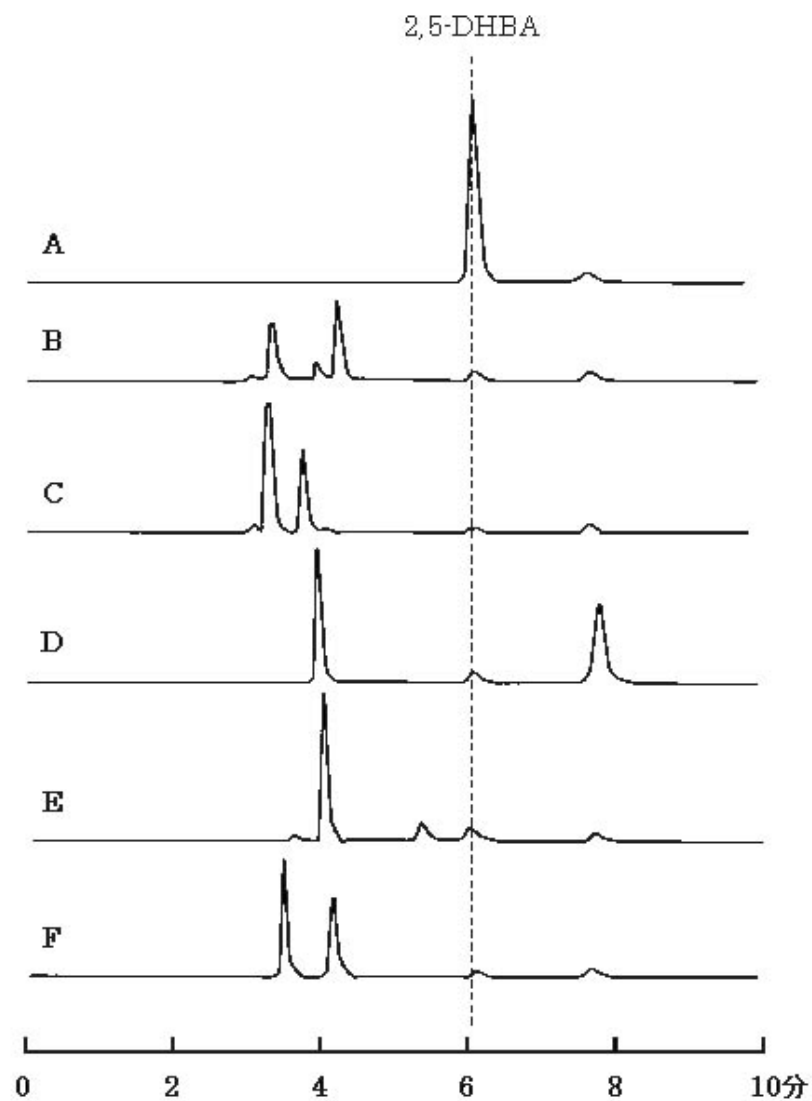
**Fig. 2-11** GSH 存在下でのサリチル酸と  $^{10}\text{O}_2$  との反応による生成物と、それにおよぼすアジ化ナトリウムの影響

A: 14 $\mu\text{M}$  UP と 32mM サリチル酸を PB に溶解し、2 分間照射

B: A + 0.17mM GSH

C: B + 5mM アジ化ナトリウム





**Fig. 2-12** チオール化合物存在下でのサリチル酸と  $^1O_2$  との反応による生成物

A : 14 $\mu$ M UP と 32mM サリチル酸を PB に溶解し、2 分間可視光照射

B : A + 0.17mM GSH、C : A + 0.17mM システイン、D : A + 0.17mM

ペニシラミン、E : A + 0.17mM アセチルシステイン、F : A + 0.17mM

システアミン

## 2-4. 考察

本章ではまず、フェノール化合物としてパラベン類を用いて、RB 光増感反応により発生させた  $^1\text{O}_2$  との反応について検討した。GSH 存在下では HQ-GSH 抱合体が形成し、試料中の溶存酸素の脱気あるいは  $^1\text{O}_2$  クエンチャーの添加により、これらの抱合体生成が抑えられたこと、そして重水中における反応では抱合体の生成量が増加したことから、GSH 存在下でのパラベン類からの HQ-GSH 抱合体生成には  $^1\text{O}_2$  が関与していることが明らかになった。

パラベン類から HQ-GSH 抱合体が形成されるメカニズムとして次のような仮説を立てた。すなわち、パラベン類と  $^1\text{O}_2$  との反応で BQ ができ、それと GSH との反応で HQ-GSH 抱合体が生成されるというメカニズムである。GSH は BQ と Michael 付加により HQ-GSH 抱合体を形成することが報告されているからである[8, 10]。GSH の非存在下での反応生成物について調べたところ、パラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸から RB 光増感反応で BQ と HQ が生成した。重水中における反応ではこれらの生成量が増加したことから、この反応も  $^1\text{O}_2$  との反応によることがわかった。 $^1\text{O}_2$  発生量を変えて反応を行ったところ、 $^1\text{O}_2$  発生量が少ない場合には BQ と HQ がほぼ同量生成したのに対し、過剰に  $^1\text{O}_2$  を発生させると BQ が優位に生成した。さらに HQ と  $^1\text{O}_2$  との反応では BQ が生成した。これらのことから、パラベン類と  $^1\text{O}_2$  から BQ と HQ がほぼ同程度生成する反応がまず起こり、 $^1\text{O}_2$  生成量が過剰になると HQ から BQ への酸化反応が起こることが推定される。HQ と  $^1\text{O}_2$  とから BQ ができる反応は Briviba ら[11]も確認し、HQ と  $^1\text{O}_2$  との反応により不安定な endoperoxide が生成され、速やかに他の HQ により 2 電子移動が起きた結果、2 分子の BQ が生成するメカニズムを推定している。

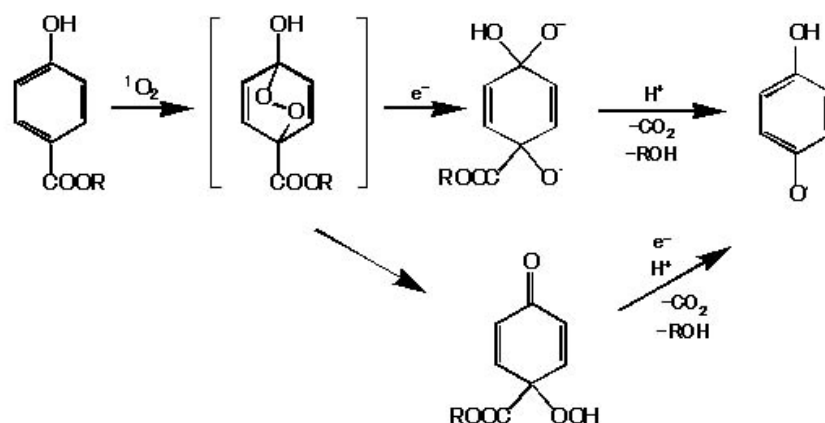
パラベン類と  $^1\text{O}_2$  との反応により BQ と HQ が生成するメカニズムは、現在のところはっきりしない。フェノールや para 位に置換基をもつフェノール化合物が  $^1\text{O}_2$  と反応すると endoperoxide が生成すると推定されている[12-14]。Briviba ら[11]はフェノール化合物の endoperoxide が、親化合物のフェノール

によって還元され HQ を生成し、この HQ はすぐに  $^1\text{O}_2$  と反応して BQ を生成することを推定した。また、endoperoxide から hydroperoxycyclohexadienone を介して BQ が生成するという機序も推定されている[14, 15]。しかし、これらのメカニズムは、今回の実験において BQ と HQ が初期の段階でほぼ同程度生成したという結果と一致しない。おそらく、endoperoxide の生成を経てできたセミキノラジカルが不均化反応を起こした結果、BQ と HQ がほぼ同程度生成したものと推定される。セミキノラジカルの生成機序として考えられるものを scheme 2-1 に示した。パラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸は  $^1\text{O}_2$  との反応で endoperoxide あるいは hydroperoxycyclohexadienone となり、親化合物であるパラベン類あるいは *p*-ヒドロキシ安息香酸がこれらに 1 電子を与え、セミキノラジカルが生成するものと推定される。また、一度 HQ が生成されれば、その HQ から電子が供給されると考えられる。

BQ と GSH との反応で多置換 HQ-GSH 抱合体ができる反応は、単純に Michael 付加によるものではないことがわかった。なぜならば、 $^1\text{O}_2$  が存在しない場合には、BQ と GSH とを今回ほとんどの実験で用いている 2 分という反応時間で反応させても、GSH の 1 置換体である MGHQ のみしか生成しなかったからである。 $^1\text{O}_2$  発生条件下では MGHQ 以外に多置換体である TGHQ や DGHQ の生成も見られたことから、多置換抱合体形成においても  $^1\text{O}_2$  が関与していることが明らかとなった。ここでは、MGHQ が過剰の  $^1\text{O}_2$  と反応すると、HQ と  $^1\text{O}_2$  との反応の場合と同様に BQ 型 MGHQ が形成され、GSH の付加反応により 2,5-DGHQ や 2,6-DGHQ のような 2 置換抱合体が形成される可能性が考えられる。さらに DGHQ が  $^1\text{O}_2$  と反応して同様に BQ 型 DGHQ が形成され、付加反応により 3 置換体である TGHQ が生成されたものと推定される。

最後に、サリチル酸について GSH 抱合体が形成されるかどうかを調べた。サリチル酸を  $^1\text{O}_2$  と反応させたところ、すでに報告されているように[5-7]、2,5-DHBA が生成した。しかし、GSH 存在下で同様に実験を行ったところ 2,5-DHBA のピークは検出されず、未知のピークが生成した。このピークは、

GSH を別のチオール化合物に換えると GSH の場合とは異なった保持時間にピークが複数見られたことから、サリチル酸に GSH が付加してできた生成物であると考えられる。サリチル酸は  $^1\text{O}_2$  と反応すると HQ 骨格をもった 2,5-DHBA を生成することから、パラベン類の場合と同様に  $^1\text{O}_2$  との反応により endoperoxide やセミキノン型ラジカルの生成を経て 2,5-DHBA が生成し、さらに  $^1\text{O}_2$  の関与によって BQ 構造となり、GSH の求核反応を受けて GSH 抱合体が形成されたものと推定される。



scheme 2-1 推定されるパラベンと  $^1\text{O}_2$  との反応による  
セミキノンラジカルの生成

## 2-5. 参考文献 (第2章)

- [1] Soni, M. G., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., and Burdock, G. A. (2002) Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1335-1373
- [2] Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L., and Greenberg, N. A. (2001) Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 513-532
- [3] Soni, M. G., Carabin, I. G., and Burdock, G. A. (2005) Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* **43**, 985-1015
- [4] 辻彰、重信弘毅、河島進、杉本功、野田浩司 編 (医療薬学研究会) (1999 年版) 薬剤師のための常用医薬品情報集 廣川書店
- [5] Kalyanaraman, B., Ramanujam, S., Singh, R. J., Joseph, J., and Feix, J. B. (1993) Formation of 2,5-dihydroxybenzoic acid during the reaction between singlet oxygen ( $^1O_2$ ) and salicylic acid: analysis by ESR oximetry and HPLC with electrochemical detection. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4007-4012
- [6] Feix, J. B., and Kalyanaraman, B. (1991) Production of singlet oxygen-derived hydroxyl radical adducts during Merocyanine-540-mediated photosensitization : Analysis by ESR-spin trapping and HPLC with electrochemical detection. *Arch. Biochem. Biophys.* **291**, 43-51
- [7] Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, New York
- [8] Lau, S. S., Hill, B.A., Hight, R. J., and Monks, T. J. (1988) Sequential oxidation and glutathione addition to 1,4-benzoquinone: Correlation of toxicity with increased glutathione substitution. *Mol. Pharmacol.* **34**, 829-836

- [9] Merkel, P. B., and Kearns, D. R. (1972) Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 7244-7253
- [10] Finley, K. T. (1974) The addition and substitution chemistry of quinines. *The chemistry of the quinonoid compounds* (S. Patai, ed), Part 2. John Wiley and Sons, New York, 877-1144
- [11] Briviba, K., Devasagayam, T. P. A., Sies, H., and Steenken, S. (1993) Selective para hydroxylation of phenol and aniline by singlet molecular oxygen. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 548-553
- [12] Saito, I., Kato, S., and Matsuura, T. (1970) Photoinduced reactions. XL Addition of singlet oxygen to monocyclic aromatic ring. *Tetrahedron Lett.* **3**, 239-242
- [13] Thomas, M. J., and Foote, C. S. (1978) Chemistry of singlet oxygen XXVI. Photooxygenation of phenols. *Photochem. Photobiol.* **27**, 683-693
- [14] Machado, A. E. H., Gomes, A. J., Campos, C. M. F., Terrones, M. G. H., Perez, D. S., Ruggiero, R., and Castellan, A. (1997) Photoreactivity of lignin model compounds in the photobleaching of chemical pulps 2. Study of the degradation of 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde and two lignin fragments induced by singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **110**, 99-106
- [15] Gerdes, R., Wöhrle, D., Spiller, W., Schneider, G., Schnurpfeil, G., and Schulz-Ekloff, G. (1997) Photo-oxidation of phenol and monochlorophenols in oxygen-saturated aqueous solutions by different photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **111**, 65-74

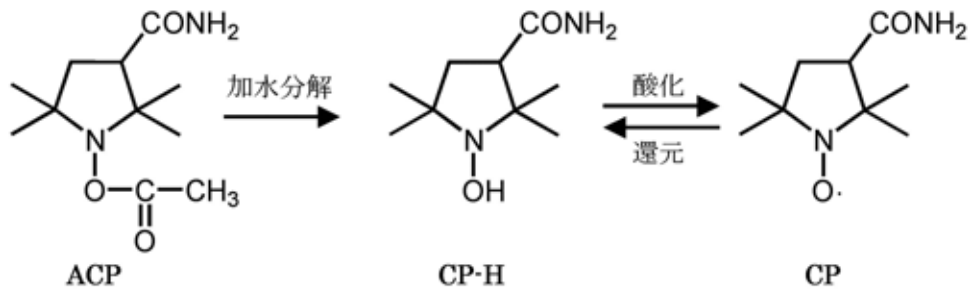
## 第3章 グルタチオン抱合ハイドロキノンによる活性酸素生成

### 3-1. 目的

HQ の自動酸化により生成するセミキノンラジカルと BQ とのレドックスサイクルにより、 $O_2^{\cdot-}$ が生じ、それが過酸化水素やOHの生成につながるということが知られている[1]。HQ-GSH 抱合体は HQ に GSH が付加した構造であるため、これらの抱合体からも上記活性酸素が生成する可能性が考えられる。活性酸素は生体構成成分と反応して、細胞死やさまざまな疾患につながっていくと考えられている。

本章ではまず、HQ-GSH 抱合体の水溶液中で生じる過酸化水素を  $Fe^{2+}$ の酸化反応を利用して定量し、HQ の場合と比較した。次にその生成メカニズムが HQ の場合と同じであるかどうかを、水溶液中でのセミキノン型ラジカルと  $O_2^{\cdot-}$ の ESR による検出により検討した。

$O_2^{\cdot-}$ の生成は今回、1-hydroxy-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine (CP-H) のヒドロキシルアミン基が酸化を受けるとニトロキシル基をもつ 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine-*N*-oxyl (CP) になり 3 本の ESR シグナルを与えることを利用して評価した。ヒドロキシルアミンは空気酸化を受けやすい。そのためアシル保護した 1-acetoxy-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine (ACP) が Yokoyama ら [2, 3]により報告された。ACP は細胞内のエステラーゼにより速やかに加水分解され、CP-H となる [3, 4]。CP-H の CP への酸化は様々な酸化物質により起こり、その中に  $O_2^{\cdot-}$ も含まれる。ACP は特異性が低いですが、酸化により生じる CP が生体系で比較的寿命が長いいため、酸化的ストレス測定用プローブとして期待されている (scheme 3-1) [2-4]。



scheme 3-1 細胞中での ACP の代謝



## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 試薬

GSH、BQ、30%過酸化水素水、hydrazine monohydrate、xylenol orange、D-sorbitol、diethylenetriamine-N, N, N', N'', N'''-pentaacetic acid (DTPA) は和光純薬工業社製を、CP (3-carbamoyl-PROXYL)、Cu,Zn-superoxide dismutase (from bovine erythrocytes) (SOD)、triethylamine、hypoxanthine (HPX)、xanthine oxidase (XOD) (from buttermilk)、Medium 199 培地は Sigma 社製を使用した。DMPO は Labotec 社製を、ウシ胎児血清は American Type Culture Collection (ATCC) 社製を、0.25% trypsin - 1mM EDTA、Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) は Gibco 社製を用いた。その他の試薬は、すべて特級品を用いた。

HQ-GSH 抱合体は、第 2 章で述べた手順で合成した。

### 3-2-2. 細胞培養

ブタ腎近位尿細管上皮細胞 (LLC-PK1) は、ATCC (Manassas, VA) から入手した。3%ウシ胎児血清を含んだ Medium 199 培地を用いて、100 mm dish で 37℃、5% CO<sub>2</sub>-95% air の条件下で LLC-PK1 細胞を培養した。継代時には 0.25% trypsin - 1mM EDTA を用いて剥離した。実験には、入手してからの継代数が 4-47 回の細胞を用いた。

### 3-2-3. ACP の合成

ACP は CP から Saito ら[4]の方法により合成した。CP (3.0 g) をメタノール (22 mL) に溶かし、その溶液に hydrazine monohydrate (2.25 mL) を加えた。室温で 48 時間攪拌した後、エバポレーターで溶媒を留去して CP-H を得た。得られた CP-H をジクロロメタン (45 mL) に懸濁し、triethylamine (450 μL) を加えた。この溶液を氷水で冷やしながらか、無水酢酸 (8.0 mL) をゆっくりと加えた。室温で 2 時間攪拌した後、水 (30 mL) を加え、エバポレーターでジクロロメタンを留去し、残った水相から生成物を

酢酸エチルで抽出した(30 mL × 3 回)。合わせた酢酸エチル相を水、3 % 塩酸水溶液、水(各 30 mL)の順で洗浄し、その後 30 mL の 5 % 炭酸水素ナトリウムで 5 回、30 mL の水で 1 回洗浄した。有機相を硫酸マグネシウム(無水)で乾燥させ、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。得られた残渣から生成物をシリカゲルカラム(Silica gel 60, 0.040-0.063 mm, ジクロロメタン:エタノール = 15:1)で精製し、ACPを得た(収率 65 %)。合成した ACP の構造は、H-NMR で確認した[3]。H-NMR の結果は以下の通りである。In DMSO:  $\delta$  0.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) 1.08 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) 1.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) 1.63 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>) 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) 2.04 (br, 1H, CH<sub>2</sub>) 2.61 (Br, 1H, CH) 6.92 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>) 7.26 (s, 1H, CONH<sub>2</sub>)。また、ACP 水溶液の X-band ESR 測定により、常磁性種の混入が 0.1 % 以下であることを確認した。

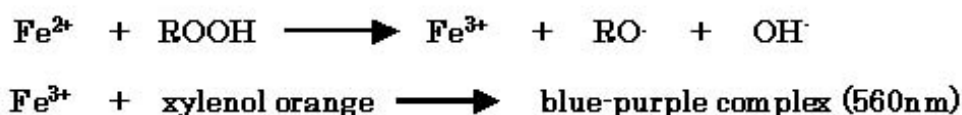
#### 3-2-4. CP-H の合成

CP-H は CP の接触還元により得た。CP (15 mg) をメタノール (5 mL) に溶かし、パラジウム活性炭素 (5 mg) を加えた。容器をアスピレーターで脱気したあと、水素ガスを満たして軽く振った。ろ過によりパラジウム活性炭素を除いた後にロータリーエバポレーターで溶媒を軽く留去し、CP-H のメタノール溶液を得た。CP-H のメタノール溶液はアルゴンガスで置換し、合成後直ちに使用した。

#### 3-2-5. 過酸化水素の定量

FOX1 assay により過酸化水素の濃度を定量した (scheme 3-2) [6]。自動酸化を防ぐために、アルゴンガスで脱気した DPBS を用いて溶解した 200  $\mu$ M HQ-GSH 抱合体、パラベン類、HQ あるいは BQ をボルテックスミキサーにより大気下でよく攪拌してから、37 °C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、試料 50  $\mu$ L を FOX1 試薬 (100  $\mu$ M xylenol orange, 250  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 100 mM D-sorbitol, および 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を含む) 950  $\mu$ L に加え、ボルテック

スしてから室温で 30 分インキュベートし、560 nm の吸光度を測定した。標品の過酸化水素の濃度は、測定日ごとに過酸化水素のモル吸光係数 (240 nm で  $\epsilon=43.5\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) で補正した。また、カタラーゼを添加することで、ここで見られた吸光度が過酸化水素によるものであることを確認した。



**scheme 3-2** FOX1 assay による過酸化水素の定量

### 3-2-6. 酸素ラジカルのスピントラップ法による検出

褐色バイアル瓶に空気で飽和した DPBS を用いて調製した 2mM TGHQ 100 $\mu$ L と 500mM DMPO 200 $\mu$ L 溶液、さらに DPBS 700 $\mu$ L を入れ、混和してから 37 °C で 30 分インキュベートした。この試料を ESR 測定用石英製偏平セルにとり、ESR 装置 (JES-RE1X X-band 分光器, 日本電子) を用いて、室温でマイクロ波 9.4 GHz、出力 4 mW、100 kHz の変調磁場は 0.079 mT で測定した。

### 3-2-7. セミキノラジカルの測定

HQ-GSH 抱合体あるいは HQ を空気で飽和した DPBS に溶解し、800  $\mu$ M 溶液を調製した。この試料溶液をマイクロピペット (Microcaps 100 $\mu$ L; Drummond Scientific Co.) に入れ、X-band ESR で測定した。ESR 装置は JES-TE 100 X-band ESR 分光器 (日本電子) を用い、室温でマイクロ波 9.4 GHz、出力 4 mW、100 kHz の変調磁場は 0.079 mT で測定を行った。スペクトルシミュレーションは JES FE シリーズ (ver. 1.01) の isotropic ESR spectrum simulation system (日本電子) により行った。

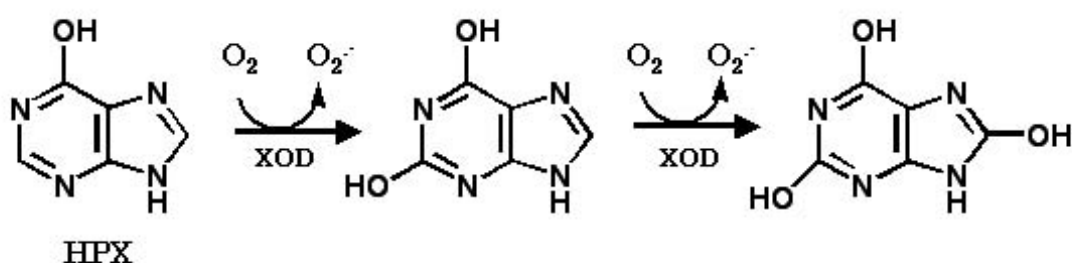
### 3-2-8. ACP をプローブとした ESR 測定

褐色バイアル瓶に DPBS で調製した  $1.2 \times 10^7$ /mL LLC-PK1 細胞浮遊液 37.5 $\mu$ L と 25mM ACP 15 $\mu$ L、そして DPBS を 67.5 $\mu$ L を加えて混和し、さらに 4mM MGHQ、TGHQ あるいは HQ 30 $\mu$ L を加え、攪拌してからマイクロピペット (Microcaps 100 $\mu$ L) に移した。混和 30 分後に X-band ESR で測定した。ESR 装置は JES-TE 100 X-band ESR 分光器 (日本電子) を用い、室温でマイクロ波 9.4 GHz、出力 4 mW、100 kHz の変調磁場は 0.079 mT で測定した。外部標準として酸化マンガンを用いた。

### 3-2-9. HPX / XOD 系による $O_2^{\cdot-}$ の生成と ESR 測定

$O_2^{\cdot-}$  は、HPX / XOD 系により生成させた (scheme 3-3)。

褐色バイアル瓶に DPBS に溶解した 1.2mM HPX 15 $\mu$ L、0.48u/mL XOD 30 $\mu$ L、1.1mM ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)15 $\mu$ L、そして DPBS 30 $\mu$ L を加えて混和した。そこに 2mM MGHQ、TGHQ あるいは HQ を 90 $\mu$ L 加え、混和してからマイクロピペット (Microcaps 100 $\mu$ L) に移した。混和 14 分後に X-band ESR で測定した。ESR 装置は JES-TE 100 X-band ESR 分光器 (日本電子) を用い、室温でマイクロ波 9.4 GHz、出力 4 mW、100 kHz の変調磁場は 0.079 mT で測定した。外部標準として酸化マンガンを用いた。



scheme 3-3 HPX / XOD 系からの  $O_2^{\cdot-}$  生成

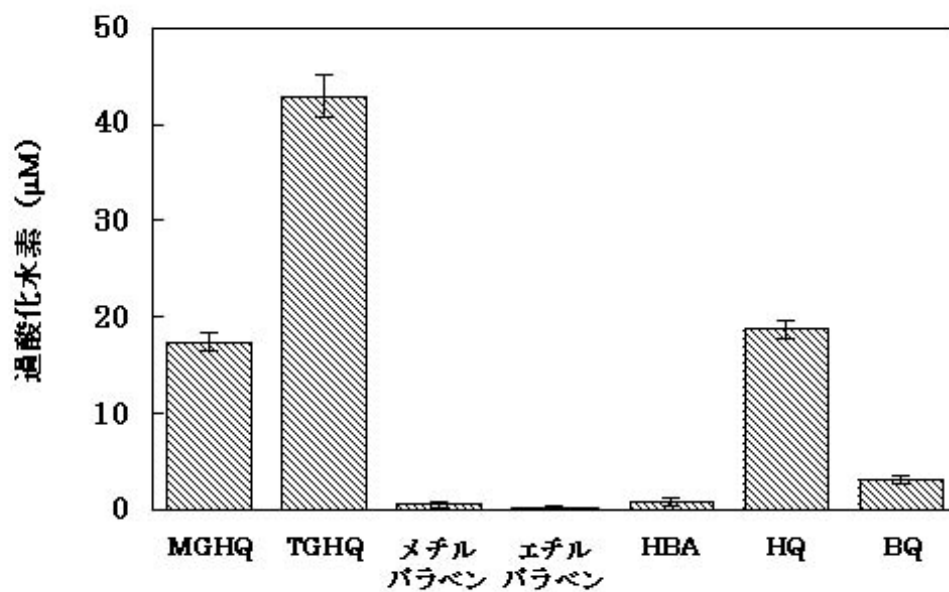
### 3-2-10. 統計解析

特に記述のない限り、測定値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差で表わした。  
Student's *t*-test を行い、 $P < 0.05$  を有意差とした。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. HQ-GSH 抱合体水溶液における過酸化水素の生成

HQ-GSH 抱合体水溶液中に、過酸化水素が生じるかどうかについて調べた。HQ-GSH 抱合体、HQ、パラベン類、*p*-ヒドロキシ安息香酸および BQ の DPBS 溶液を 37 °C で 30 分間インキュベートしたところ、HQ-GSH 抱合体である MGHQ と TGHQ 並びに HQ の水溶液で過酸化水素が生成した (Fig. 3-1)。特に 3 置換体である TGHQ による生成量が多く、その量は HQ や MGHQ の場合の 2 倍以上であった。それに対して、パラベン類や *p*-ヒドロキシ安息香酸、そして BQ の水溶液ではほとんど過酸化水素は生成しなかった。



**Fig. 3-1** HQ-GSH 抱合体、パラベン類、*p*-ヒドロキシ安息香酸(HBA)、HQ あるいは BQ の水溶液からの過酸化水素生成  
 各 200μM DPBS 溶液を 37 °C で 30 分インキュベートした。値は 3 回の実験の平均 ± 標準偏差である。

### 3-3-2. HQ-GSH 抱合体の自動酸化

HQ 自動酸化を受けて生じるセミキノラジカルは比較的寿命が長いため、ESR で直接測定が可能である[6, 7]。今回、HQ-GSH 抱合体による過酸化水素生成が HQ と同様に自動酸化を受けたためであるならば、ともにセミキノ型ラジカルの ESR シグナルが検出されるはずである。そこで、TGHQ、MGHQ、並びに HQ の水溶液について ESR を測定した。

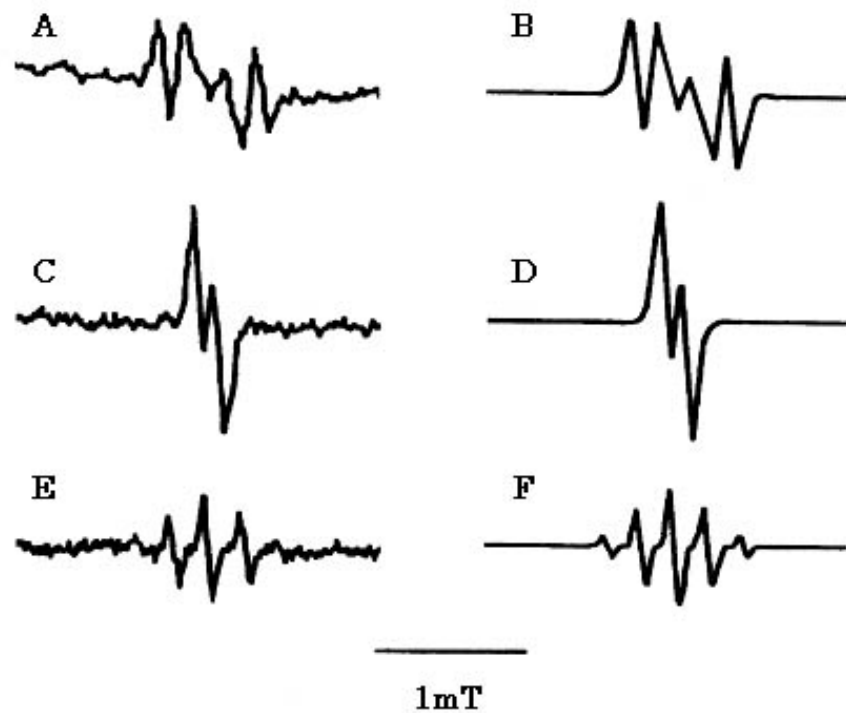
それぞれの ESR スペクトルを Fig. 3-2A-F に示す。HQ では、等間隔で強度比 1:3:6:3:1 の 5 本のシグナルが検出された (Fig. 3-2E)。これは等価な 4 つの  $I=1/2$  核スピンによるもので、セミキノラジカルの不対電子の非局在化により芳香環の 4 つの H 核の影響を受けた分裂と考えられる。Table 3-1 に掲載したパラメータを用いてコンピュータシミュレーションを行った結果を、Fig. 3-2F に示す。HQ のシミュレーションスペクトルは、実測スペクトルとよく一致した。計算に用いた超微細分裂定数は、文献値に近かった[6, 7]。

TGHQ では 2 本のシグナルが検出された (Fig. 3-2C)。HQ と同様に不対電子の非局在化によるものであるとすると、芳香環に直接結合した 1 つの H の核スピンによる分裂と考えられる。このスペクトルは Table 3-1 のパラメータを用いてシミュレーションを行った結果、よく一致したスペクトルが得られた。

MGHQ の場合は、Fig. 3-2A に示すように複雑なスペクトルが得られた。MGHQ では、芳香環に直接結合した 3 つの H は全て非等価である。複雑なスペクトルは、3 つの H がそれぞれ異なった超微細分裂定数をもつ結果と考えられる。その考えに基づき、Table 3-1 のパラメータを用いてシミュレーションした結果、実測スペクトルとよく一致するスペクトルを得ることができた (Fig. 3-2B)。

TGHQ、MGHQ、および HQ の水溶液で得られた ESR スペクトルが全てセミキノ型ラジカルを仮定したシミュレーションスペクトルと一致したことから、これらは全て水溶液中で酸化を受けていることが確認された。





**Fig. 3-2** HQ-GSH 抱合体および HQ から生成するセミキノンラジカルの ESR スペクトル

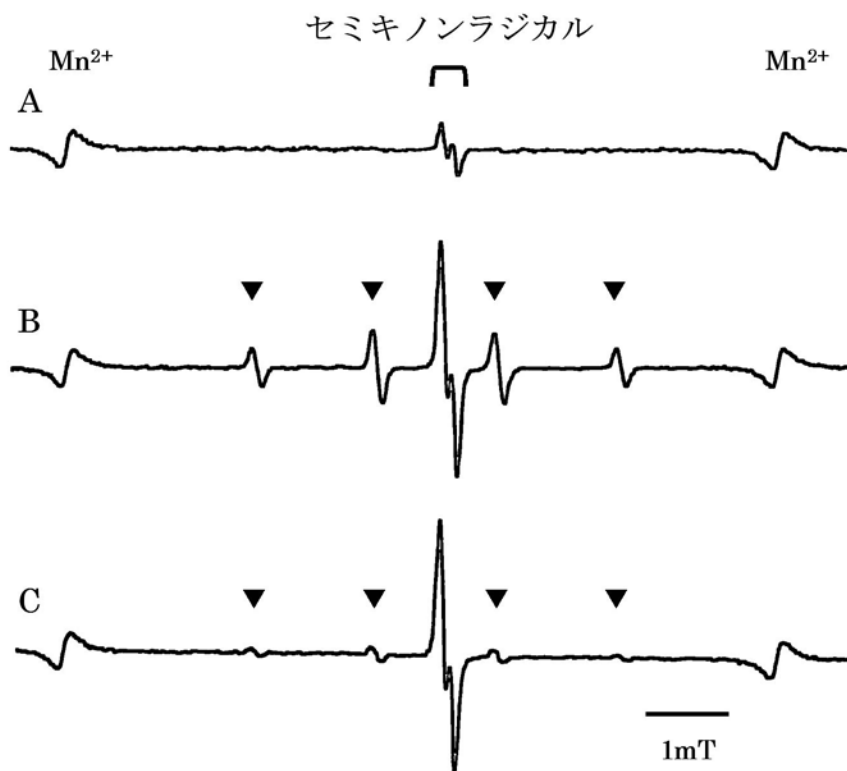
800 $\mu$ M の MGHQ (A)、TGHQ (C)あるいは HQ (E)の DPBS 溶液を X-band ESR 分光器で測定した。また、Table 3-1 に示したパラメーターを用いてコンピューターシミュレーションを行った (MGHQ (B)、TGHQ (D)あるいは HQ (F))。

**Table 3-1** HQ-GSH 抱合体および HQ の ESR スペクトル  
パラメーター

	H (2)	H (3)	H (5)	H (6)
TGHQ (シミュレーション)				0.126
MGHQ (シミュレーション)		0.139	0.274	0.212
(既報値 [6])		0.149	0.275	0.212
HQ (シミュレーション)	0.222	0.222	0.222	0.222
(既報値 [6])	0.235	0.235	0.235	0.235
(既報値 [7])	0.230	0.230	0.230	0.230

### 3-3-3. HQ-GSH 抱合体水溶液中における酸素ラジカルの生成

HQ-GSH 抱合体水溶液中で酸素ラジカルが生じるかどうかを、スピントラップ法により調べた。TGHQ 水溶液にスピントラップ剤 DMPO を添加し、放置したときに得られた ESR スペクトルを Fig. 3-3B に示す。強度比 1:2:2:1 の 4 本のシグナルが、TGHQ のセミキノン型ラジカルのシグナルに重なって検出された。この 4 本のシグナルの超微細分裂定数 ( $a^N=1.49$  mT,  $a^H=1.49$  mT) は、報告されている DMPO の OH 付加体のもの ( $a^N=1.49$  mT,  $a^H=1.49$  mT [ 8 ]) と一致した。さらに、HQ-GSH 抱合体から過酸化水素が生成することが確認されたことから (Fig. 3-1)、DMPO の OH 付加体形成と過酸化水素との関係を調べるためにカタラーゼを添加し、その影響を見た。DMPO の OH 付加体の 4 本のシグナルは、ほとんど消失した (Fig. 3-3C)。以上の結果と同様な結果は、MGHQ 水溶液でも得られた。これらのことから、HQ-GSH 抱合体水溶液中で過酸化水素を前駆体として OH が生じることがわかった。DMPO の濃度は 100 mM としたが、DMPO の  $O_2^{\cdot-}$  付加体の ESR シグナルは検出されなかった。



**Fig. 3-3** DMPO を用いた ESR-スピントラップ法による TGHQ からの $\cdot\text{OH}$  検出

A : 200 $\mu\text{M}$  TGHQ と 100mM DMPO の PB 溶液 (混和直後)

B : A を 37 °C で 30 分インキュベート

C : A + 840u/mL カタラーゼを 37 °C で 30 分インキュベート

: DMPO の $\cdot\text{OH}$  付加体、Mn<sup>2+</sup> : 外部標準

#### 3-3-4. スピンプローブ ACP を用いた $O_2^-$ 生成の評価

LLC-PK1 細胞に ACP を加えると、CP に由来する 3 本線の ESR シグナルが観測され、細胞の存在下で ACP の加水分解による CP-H の生成とその酸化が起きていることが示された (Fig. 3-4A)。この細胞に TGHQ を添加したところ、CP の ESR シグナルが増加した (Fig. 3-4B)。MGHQ や HQ の添加でも、同様にシグナル強度の増加が見られた (Fig. 3-4C, D, Fig. 3-5)。TGHQ の添加により見られた ESR シグナル強度の増加に  $O_2^-$  が関与しているかどうかを調べるために、SOD を加えて同様に実験した。その結果、CP の ESR シグナルが顕著に増加し、同時にセミキノン型ラジカルの ESR シグナル強度も増加した (Fig. 3-6)。MGHQ や HQ の場合にも同様の結果が得られた (Fig. 3-6)。

ACP は細胞系や *in vivo* 系で酸化ストレスを評価するのに都合のいいプローブであるが、特異性が低いため統一的使用法は確立されていない。今回、SOD を加えたことで ESR シグナルに変化が見られたことから、この反応には  $O_2^-$  が関与していると考えられる。そこで、CP やセミキノン型ラジカルの ESR シグナル強度が増加した機序について検討を行った。

はじめに、セミキノン型ラジカルの ESR シグナル強度が SOD を添加したことで増加した機序について検討した。この機序について、次の 2 つの可能性を考えた (scheme 3-4)。

- 1) SOD の添加により  $O_2^-$  から過酸化水素が生成し、この過酸化水素が HQ やその GSH 抱合体を酸化してセミキノン型ラジカルの生成を促進した。
- 2)  $O_2^-$  がセミキノン型ラジカルを消去したと仮定し、SOD の添加により  $O_2^-$  が消去されたため、セミキノンラジカルのシグナル強度が増加した。

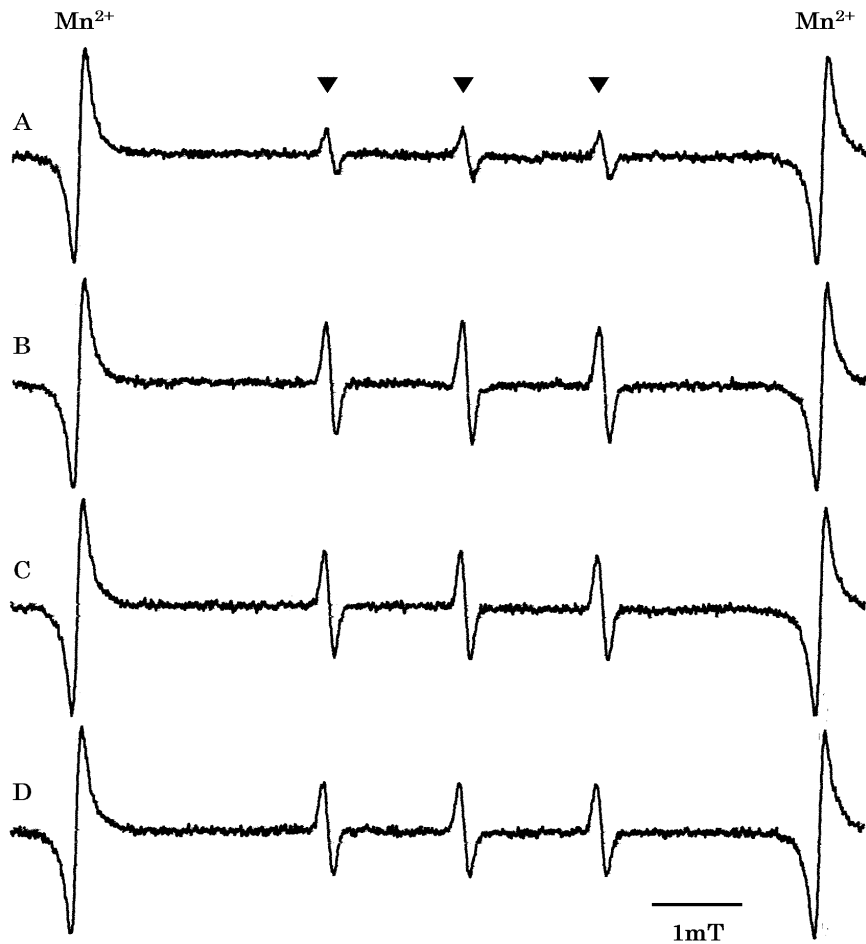
まず、1) の仮説について検証するため、過酸化水素の添加でセミキノン型ラジカルの生成が促進されるどうかを調べた。TGHQ の水溶液に過酸化水素を添加したところ、セミキノン型ラジカルのシグナル強度に変化は見られなかった

(Fig. 3-7)。MGHQ や HQ の場合でも、結果は同様であった。このことから、1) の仮説の可能性は非常に低いと考えられる。

続いて 2) の仮説について検証するため、 $O_2^{\cdot-}$  がセミキノン型ラジカルを消去するかどうかを調べた。TGHQ の水溶液中で  $O_2^{\cdot-}$  を hypoxanthine (HPX) / xanthine oxidase (XOD) 系により発生させたところ、セミキノン型ラジカルの ESR シグナルは全く検出されなくなった (Fig. 3-8)。 $O_2^{\cdot-}$  の発生に用いる HPX や XOD、あるいは DTPA を別々に TGHQ 水溶液に添加しても TGHQ のセミキノン型ラジカルのシグナル強度に変化は見られず、これらの試薬自身はセミキノン型ラジカルを消去しないことが確認された。このことから、 $O_2^{\cdot-}$  がセミキノンラジカルを消去することが確かめられ、SOD でセミキノン型ラジカルが増加したのは 2) の仮説による可能性が十分高いと考えられる。

次に、SOD の添加によりセミキノンラジカルと同時に CP のシグナルが増加した理由について検討を行った。TGHQ の自動酸化により生成したセミキノン型ラジカルが、さらに CP-H を酸化して CP を生じた可能性が予想される。この仮説を検証するために、ヒドロキシアミン体 CP-H の水溶液に TGHQ を添加したところ、CP のシグナル強度が増加した (Fig. 3-9)。セミキノン型ラジカルがより生じやすいアルカリ性条件下ではさらに CP のシグナル強度が増加した (Fig. 3-9)。このことから、CP-H はセミキノンラジカルとも反応して CP を生じることがわかった。

以上の結果から、SOD の添加で見られた CP およびセミキノン型ラジカルの ESR シグナルの増加は scheme 3-5 に示した機序により起こると考えられる。そこでこの性質を利用して、HQ-GSH 抱合体および HQ による  $O_2^{\cdot-}$  の生成を評価した。すなわち、CP シグナルの SOD 添加で増加する分が  $O_2^{\cdot-}$  の生成を意味することになる。SOD の添加により増加した CP の ESR シグナル強度は、HQ 添加時で得られたものよりも、TGHQ あるいは MGHQ を添加した場合に得られたものの方が大きかった (Fig. 3-10)。



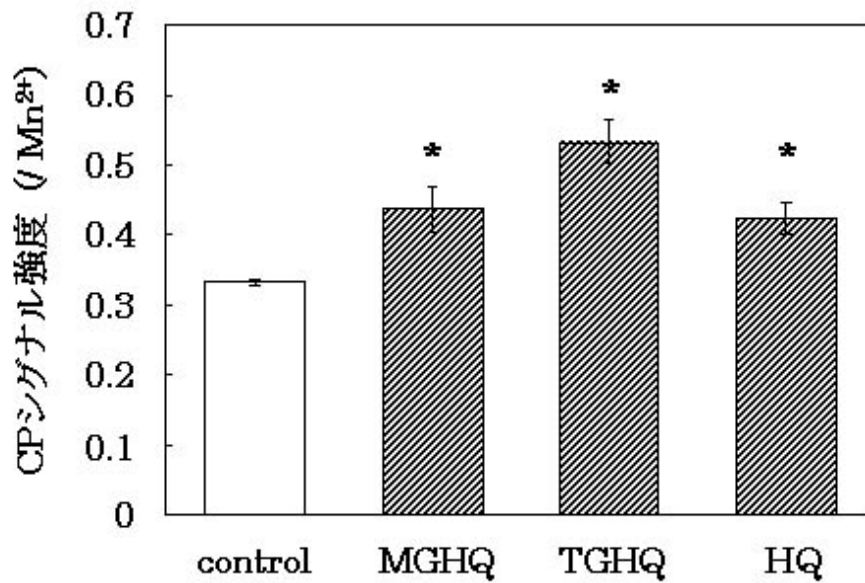
**Fig. 3-4** LLC-PK1 細胞における HQ-GSH 抱合体あるいは HQ の添加による CP シグナル強度の変化

A : LLC-PK1 細胞 ( $3.0 \times 10^6/\text{mL}$ ) と ACP (2.5mM) を混和し、

30 分後に測定、B : A + 800 $\mu\text{M}$  TGHQ、C : A + 800 $\mu\text{M}$  MGHQ

D : A + 800 $\mu\text{M}$  HQ

: CP のシグナル、 $\text{Mn}^{2+}$  : 外部標準

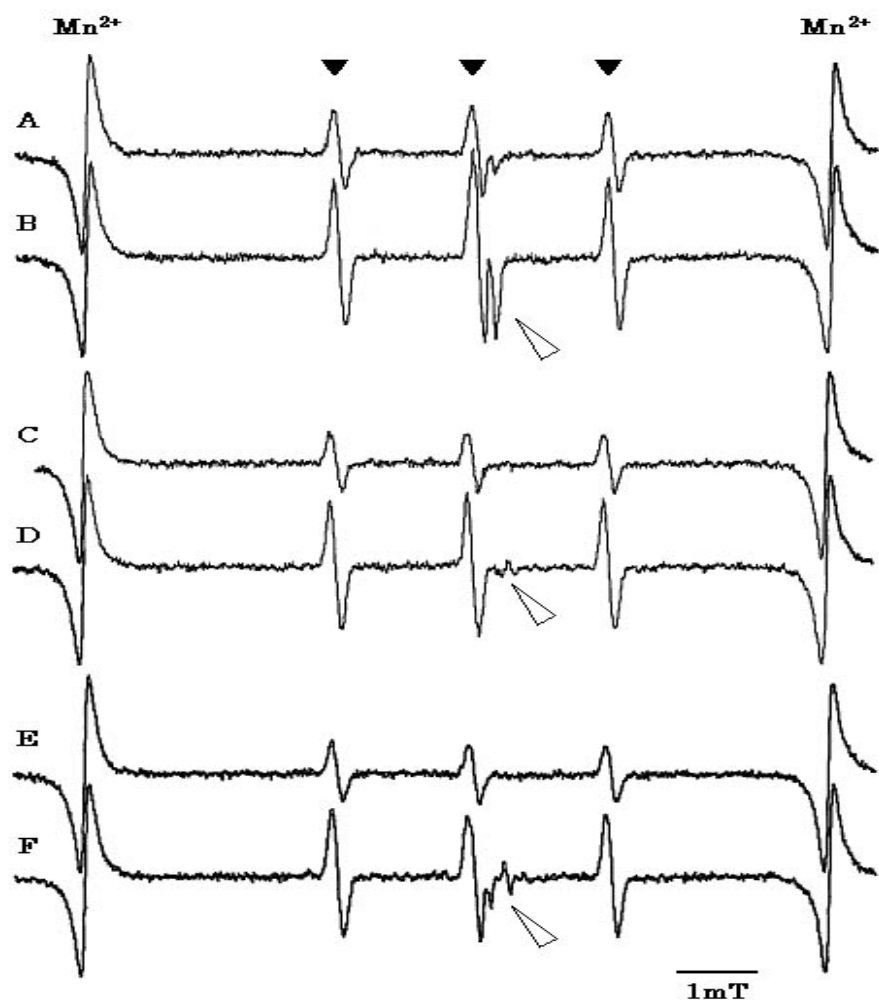


**Fig. 3-5** LLC-PK1 細胞における HQ-GSH 抱合体あるいは HQ の添加による CP シグナル強度の変化

LLC-PK1 細胞(  $3.0 \times 10^6/\text{mL}$  ) ACP( 2.5mM )そして  $800\mu\text{M}$  HQ-GSH 抱合体あるいは HQ を混和し、30 分後に ESR 測定

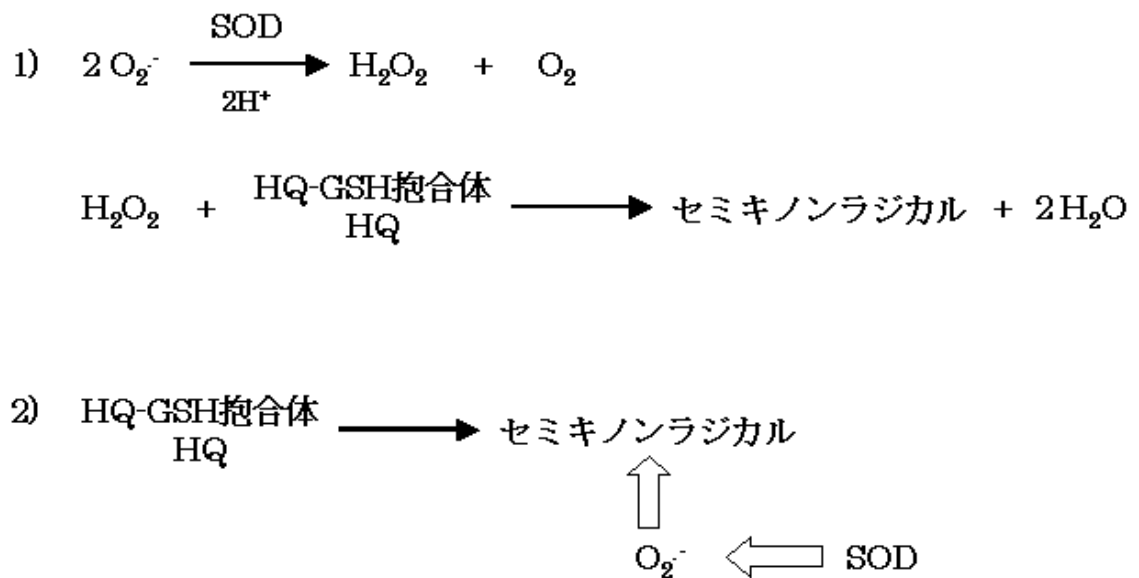
値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。\* $P < 0.01$ ( control に対して )





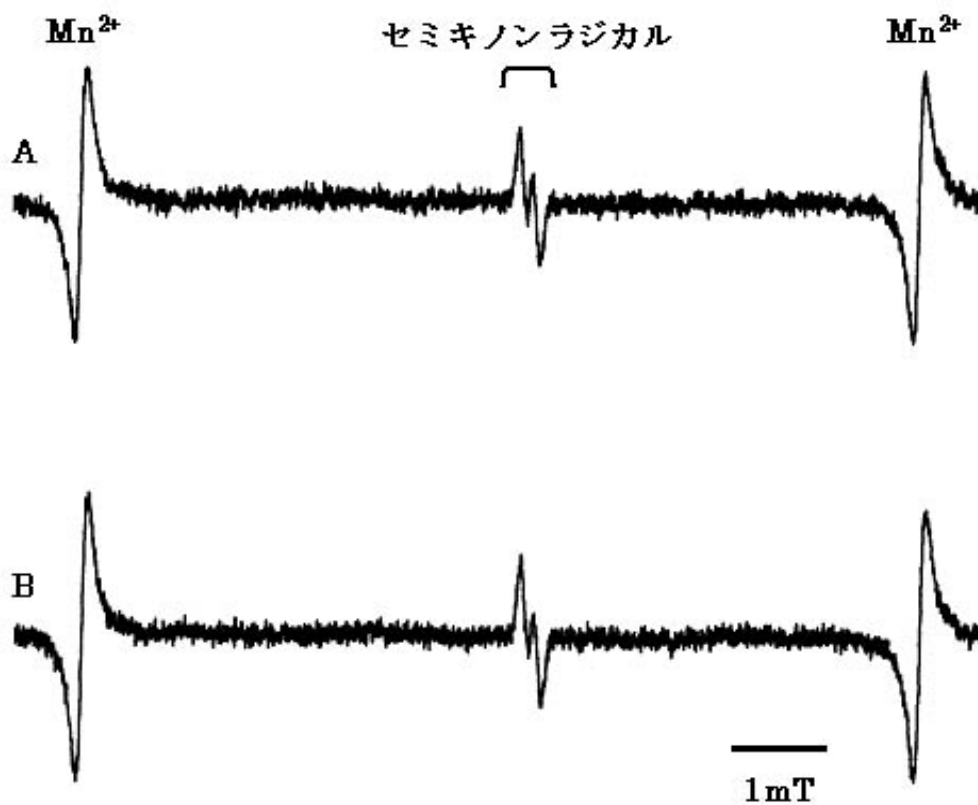
**Fig. 3-6** LLC-PK1 細胞における HQ-GSH 抱合体あるいは HQ の添加による CP シグナル強度の増加に対する SOD の効果  
 LLC-PK1 細胞 ( $3.0 \times 10^6/\text{mL}$ )、ACP (2.5mM) そして  $800\mu\text{M}$  TGHQ (A)、  
 MGHQ (C)、HQ (E) を混和し、30 分後に ESR 測定。また、それぞれに  
 SOD ( $150\text{u}/\text{mL}$ ) を添加した (B: TGHQ、D: MGHQ、F: HQ)。

△: CP シグナル、 $\text{Mn}^{2+}$ : 外部標準、▽: HQ-GSH 抱合体あるいは HQ の  
 セミキノンラジカル



**scheme 3-4** SOD の添加で見られたセミキノンラジカルシグナル強度増加の推定される機序

白抜きの矢印は、消去に働くことを表わす。

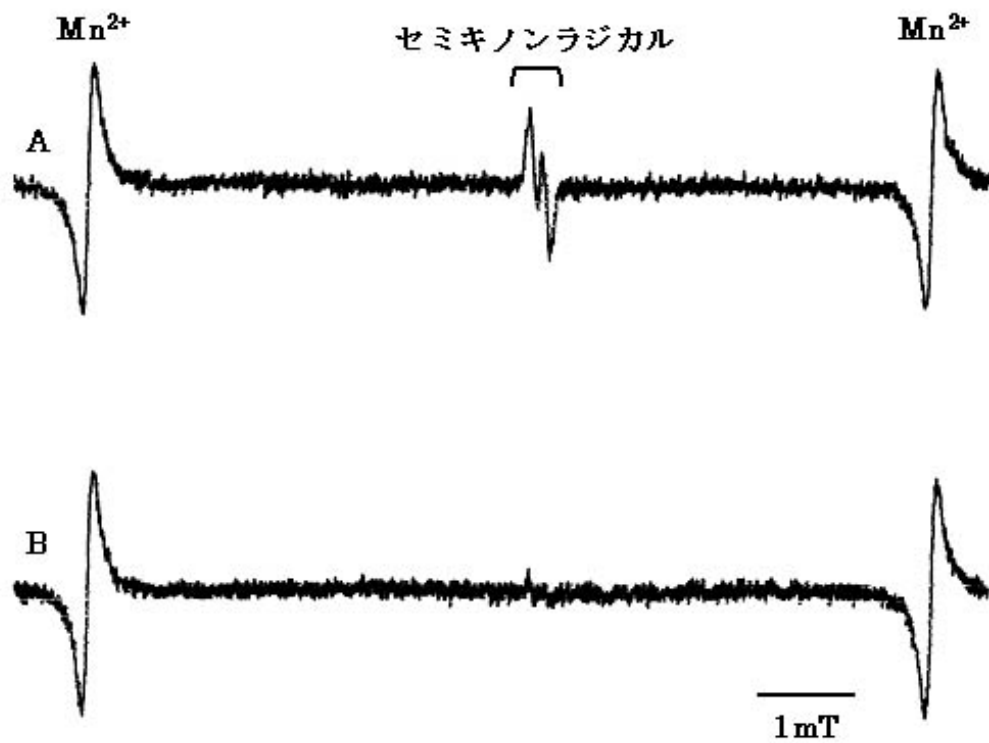


**Fig. 3-7** TGHQ セミキノンラジカルのシグナル強度増加に対する過酸化水素の効果

A: 1mM TGHQ の DPBS 溶液を混和 14 分後に ESR 測定

B: A + 1mM 過酸化水素

$Mn^{2+}$ : 外部標準

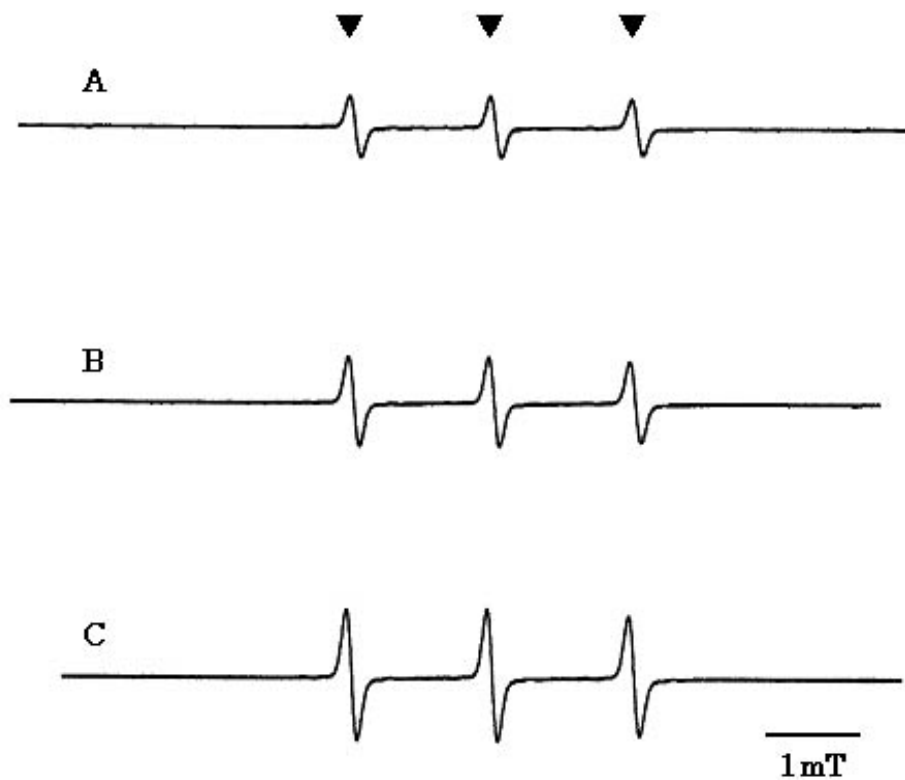


**Fig. 3-8**  $O_2^{\cdot -}$  存在下における TGHQ のセミキノンラジカル強度の変化

A: 1mM TGHQ の DPBS 溶液を、混和 14 分後に ESR 測定

B: A + HPX / XOD 系で発生させた  $O_2^{\cdot -}$  (0.1mM HPX、0.08u/mL XOD、0.09mM DTPA )

$Mn^{2+}$ : 外部標準



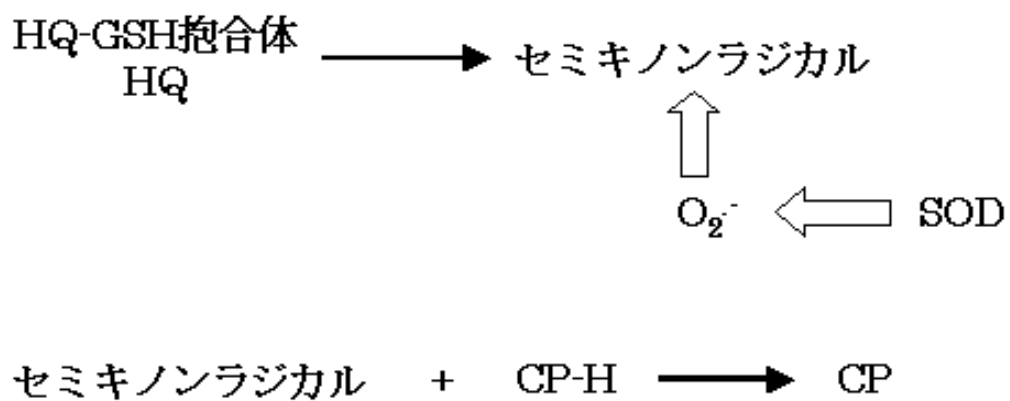
**Fig. 3-9** TGHQ のセミキノンラジカルによる CP-H の酸化

A : CP-H の DPBS 溶液を混和 30 分後に ESR 測定

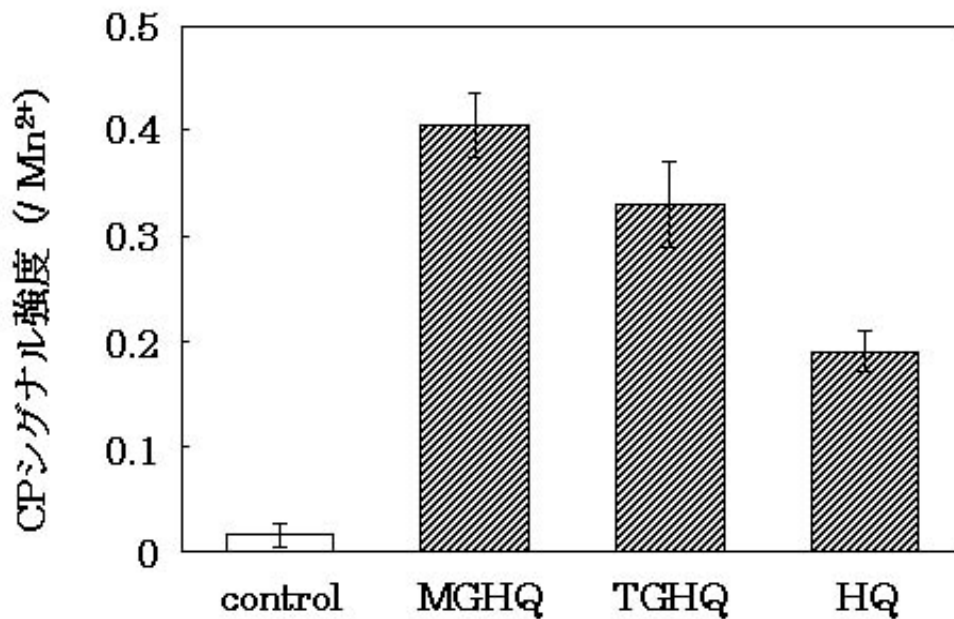
B : A + 800 $\mu$ M TGHQ

C : B + 3.2mM NaOH ( DPBS に溶解 )

: CP シグナル



**scheme 3-5** SOD の添加によるセミキノンラジカルおよび  
 CP のシグナル増加として推定される機序  
 白抜きの矢印は、消去に働くことを表わす。



**Fig. 3-10** LLC-PK1 細胞における SOD 添加による CP シグナル強度の増加を指標とした  $O_2^{\cdot-}$  生成の比較

値は、SOD の添加により得られた CP シグナル強度から、SOD 非存在下で得られた CP シグナル強度を差し引いたもの。

LLC-PK1 細胞 ( $3.0 \times 10^6/\text{mL}$ )、ACP (2.5mM)、HQ-GSH 抱合体あるいは HQ (800 $\mu\text{M}$ ) そして SOD (150u/mL) の DPBS 溶液を混和 30 分後に ESR 測定した。実験は 2 回行い、平均  $\pm$  平均と各値との差として示した。

### 3-4. 考察

MGHQ および TGHQ の水溶液中で、過酸化水素が生じることが確認された。さらにこれらの ESR 測定を行ったところ、すでに報告されている HQ の場合と同様にセミキノン型ラジカルが生成した。今回、HQ-GSH 抱合体や HQ の水溶液中での DMPO を用いたスピントラップ法では、過酸化水素生成の中間体と推定される  $O_2^{\cdot-}$  が検出されなかった。セミキノン型ラジカルの ESR シグナルが  $O_2^{\cdot-}$  の発生で検出されなくなったことから、HQ-GSH 抱合体や HQ の自動酸化で生じた  $O_2^{\cdot-}$  はこれら化合物のセミキノン型ラジカルにより消去されるのではないかと考えられる。DMPO と  $O_2^{\cdot-}$  との二次反応速度定数は  $10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [1] と非常に小さいため、DMPO はセミキノン型ラジカルと反応する前に  $O_2^{\cdot-}$  をトラップできなかったものと考えられる。また、 $O_2^{\cdot-}$  とセミキノン型ラジカルとの間の電子の授受では過酸化水素と BQ 型化合物ができる可能性がある。HQ-GSH 抱合体や HQ の水溶液中での過酸化水素の生成は、 $O_2^{\cdot-}$  同士の不均化というよりも  $O_2^{\cdot-}$  とセミキノン型ラジカルとの間の電子の授受により効率的に起きているものと推定される。

DMPO によるスピントラップで  $O_2^{\cdot-}$  が検出できなかったことから、別の方法としてスピンプローブ ACP を用いて検出を試みた。ACP を混入させた細胞浮遊液への HQ-GSH 抱合体あるいは HQ の添加により、CP の ESR シグナル強度が増加した。もしこれが  $O_2^{\cdot-}$  による CP-H の酸化によるものならば、SOD の添加で  $O_2^{\cdot-}$  を消去すれば CP の ESR シグナル強度は減少すると予想される。しかし、実際には予想に反して CP の ESR シグナル強度は増加した。SOD の添加で見られたシグナル強度の増加の機序は、いくつかの機序を想定して検討した結果、セミキノン型ラジカルによる CP-H の酸化を抑えていた  $O_2^{\cdot-}$  を SOD が消去したためであると推定された (scheme 3-5)。  $O_2^{\cdot-}$  との反応速度定数が  $10^5\text{-}10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [1] と大きな SOD の反応を利用したため、 $O_2^{\cdot-}$  の生成を見ることができたものと考えられる。SOD は細胞膜を透過できないため、ここで見ることで見られた  $O_2^{\cdot-}$  は細胞の外で生成したものであると考えられる。



セミキノン型ラジカルと  $O_2^{\cdot-}$  が生成したことから、HQ-GSH 抱合体や HQ は水溶液中で自動酸化を通して過酸化水素を生じるものと思われる。過酸化水素は、より反応性の高い  $\cdot OH$  の生成により生体に障害を与える可能性が十分考えられる。

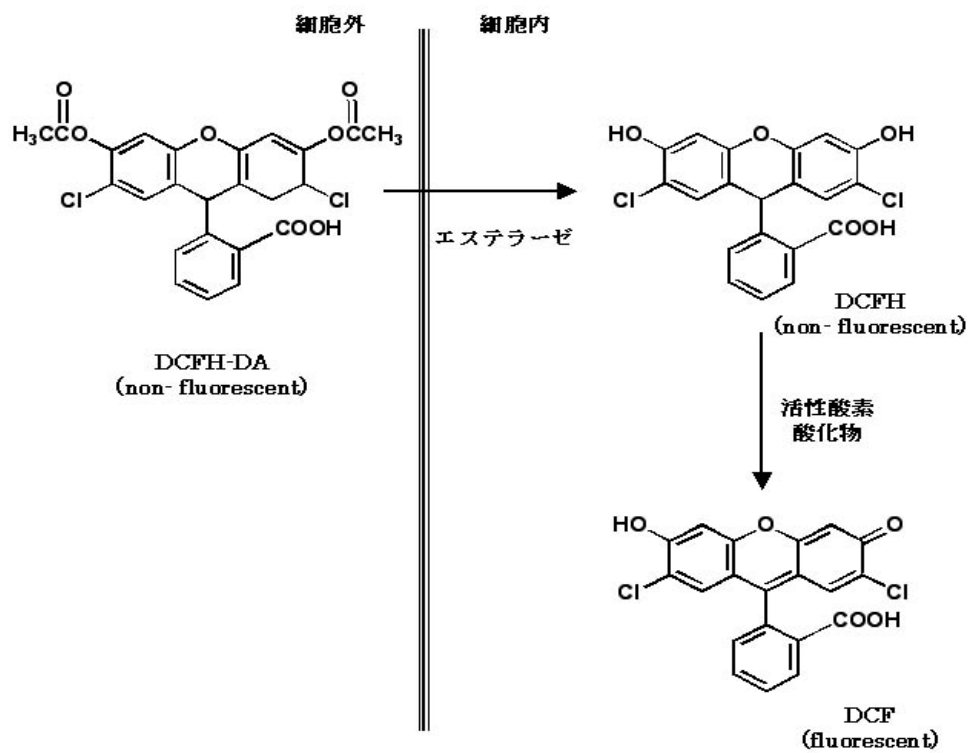
### 3-5. 参考文献 (第3章)

- [1] Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, New York
- [2] Yokoyama, H., Itoh, O., Aoyama, M., Obara, H., Ohya, H., and Kamada, H. (2000) In vivo EPR imaging by using an acyl-protected hydroxylamine to analyze intracerebral oxidative stress in rats after epileptic seizures. *Magn. Reson. Imag.* **18**, 875-879
- [3] Itoh, O., Aoyama, M., Yokoyama, H., Obara, H., Ohya, H., and Kamada, H. (2000) Sensitive ESR detection of intracellular oxidative stress by using acyl-protected hydroxylamines as new spin reagents. *Chem. Lett.* 304-305
- [4] Saito, K., Takeshita, K., Anzai, K., and Ozawa, T. (2004) Pharmacokinetic study of acyl-protected hydroxylamine probe, 1-acetoxy-3-carbamoyl-2,2,5,5,-tetramethylpyrrolidine, for in vivo measurements of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 517-525
- [5] Wolff, A. P. (1994) Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* **233**, 182-189
- [6] Rao, D. N. R., Takahashi, N., and Mason, R.P. (1988) Characterization of a glutathione conjugate of the 1,4-benzosemiquinone-free radical formed in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **263**, 17981-17986
- [7] Hiraku, Y., and Kawanishi, S. (1996) Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res.* **56**, 5172-5178
- [8] Buettner, G. R. (1987) Spin trapping : ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **3**, 259-303

## 第4章 グルタチオン抱合ハイドロキノンによる細胞毒性

### 4-1. 目的

HQ-GSH 抱合体は、ラットでの腎障害が $\gamma$ -GT 阻害剤 acivicin の投与で抑制されたことから、腎近位尿細管でグルタチオニル基が消化されて細胞内に取り込まれ、そこで生じたチオール化合物が細胞構成成分を修飾して毒性を表すと考えられている[1-3]。本研究においては、まず、このようなメカニズムにより細胞死が起こるかどうかを腎近位尿細管由来上皮細胞 (LLC-PK1) を用いて検討した。LLC-PK1 細胞は、 $\gamma$ -GT や aminodipeptidase 活性を有していることが報告されている[4]。この細胞は株化され市販されていることから、腎近位尿細管モデルとして広く使用されている。また、前章において、HQ-GSH 抱合体水溶液で HQ の場合と同様に活性酸素である  $O_2^{\cdot-}$  や過酸化水素が生成することが確認されたことから、培養細胞での酸化的ストレス惹起と細胞毒性の関係について、HQ と比較して検討を行った。細胞内の酸化的ストレスについては DCFH-DA 蛍光法により評価した。DCFH-DA は細胞内に容易に移行し、そこに存在するエステラーゼにより脱アセチル化され DCFH となる (scheme 4-1)。DCFH は細胞内の活性酸素あるいは他の酸化物と反応して DCF となり、490-510 nm 付近の励起光で 530 nm 付近の蛍光を発することが報告されている [5]。DCFH-DA は特異性がさほど高くなく、過酸化水素のほか、 $\cdot OH$ 、 $NO_2^{\cdot}$ 、 $CO_3^{\cdot-}$  などにより蛍光を発すると報告されている[6]。しかし、細胞内の酸化的ストレスをグローバルに評価する目的には好都合である。本研究では、DCF の蛍光強度をフローサイトメトリーにより解析し、酸化的ストレスの評価を行った。



scheme 4-1 DCFH-DA を用いた酸化的ストレスの評価

## 4-2. 実験方法

### 4-2-1. 試薬

BQ、GSH、Tiron、カタラーゼ、 $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide、グルタルアルデヒド、クリスタルバイオレットは和光純薬工業社から購入した。acivicin、酸化型グルタチオン ( GSSG )、bovine serum albumin ( BSA )、1,3-dimethyl-2-thiourea ( DMTU )、deferoxamine mesylate ( DFO )、GlyGly、Medium 199 培地は Sigma 社から購入した。HQ は半井化学薬品 ( 株 ) から、95% Proclin 150 はエム・シー・メディカル ( 株 ) から、2',7'-dichlorofluorescein diacetate ( DCFH-DA ) は東京化成工業 ( 株 ) から、0.25% trypsin - 1mM EDTA、Dulbecco's phosphate buffered saline ( DPBS ) は Gibco から、そしてウシ胎児血清は American Type Culture Collection ( ATCC ) から購入した。

HQ-GSH 抱合体は、第 2 章で述べた手順で合成した。

### 4-2-2. 細胞培養

ブタ腎近位尿細管上皮細胞 ( LLC-PK1 ) は、ATCC ( Manassas, VA ) から入手し、第 3 章で述べたように培養した。

### 4-2-3. クリスタルバイオレット染色による細胞毒性の評価

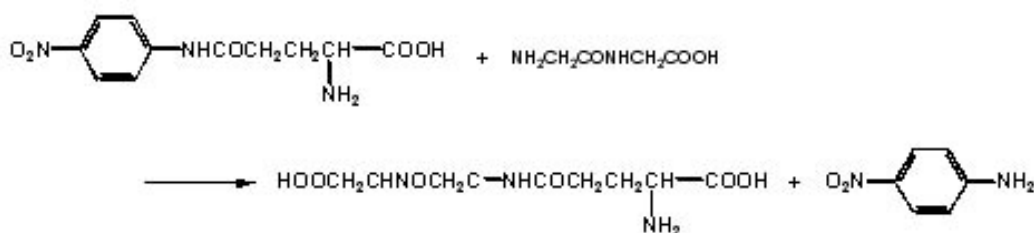
96 穴マルチプレートに LLC-PK1 細胞を  $2.5 \times 10^4$ /well ずつ播種し、3%ウシ胎児血清を含んだ Medium 199 培地で、68 時間培養した。新しい培地に交換してから、アルゴンガスで脱気した培地に溶解した阻害剤を添加し、37 °C で 10 分間インキュベートしてから、アルゴンガスで置換した DPBS に溶解した HQ-GSH 抱合体あるいは HQ を添加して、24 時間培養した。プレートから培地を除去し、DPBS で洗浄した後 25%グルタルアルデヒド溶液を加え、10 分間室温でインキュベートした。プレートを水洗いし、水をよく切ってから 4%クリスタルバイオレット-メタノール溶液を加え、30 分間室温でインキュベートした後、再びプレートを水洗いし、風乾した。595 nm のフィルターを装着した 96 穴プ

レートリーダー (Multiskan, Ascent) で吸光度を測定し、細胞生存率の指標とした。

#### 4-2-4. $\gamma$ -GT 活性の測定

5 mM  $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide 溶液および 100 mM GlyGly 溶液をあらかじめ調製した。 $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide は少量の 0.1 M HCl に溶解し、Tris 粉末を終濃度が 0.1 M になるように加え、さらに水を加えて溶解し、HCl で pH を 8.0 に調整した。GlyGly は水に溶解後、NaOH で pH を 8.0 に調整した。

60mm dish に  $4 \times 10^5$ /well で播種した細胞を、3%ウシ胎児血清を含んだ Medium 199 培地で所定時間培養した後、培地を除去し、DPBS で洗浄してから新たに DPBS を加え、LLC-PK1 細胞をセルスクレーパーで掻き取り、細胞浮遊液を 15 mL コニカルチューブに移した。細胞を遠心 (4 で 1000rpm、5 分) して集めたのち、氷冷した DPBS 1 mL を加えて氷冷下 Branson Sonifier 250 により出力ワット数 60W で、5 秒間超音波破碎+5 秒間休止のサイクルを 3 サイクル行い、細胞を破壊した。 $\gamma$ -GT 活性は Meister ら [7]の方法を参考にして調べた (scheme 4-2)。あらかじめ 200  $\mu$ L の 5 mM  $\gamma$ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide 溶液、200  $\mu$ L の 100 mM GlyGly 溶液および 500  $\mu$ L の 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) を入れて 37 に温めておいた小試験管に試料 100  $\mu$ L を加え、すばやく攪拌したのち、遊離した *p*-nitroaniline の 410 nm ( $\epsilon=8.8\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) における吸光度の時間変化を分光光度計で測定した。タンパク質を BSA を標品として、Lowry ら [8]の方法により定量した。 $\gamma$ -GT 活性は、細胞タンパク量あたりの 1 分間に遊離する *p*-nitroaniline 濃度で表わした。



scheme 4-2  $\gamma$ -GT による $\gamma$ -グルタミル基転移反応

#### 4-2-5. DCFH-DA 蛍光法を利用した細胞内酸化的ストレスの評価

35mm dish に  $2 \times 10^5$ /well ずつ播種して 3%ウシ胎児血清を含んだ Medium 199 培地で 18 時間培養した細胞に、DMSO に溶解した  $10\mu\text{M}$  DCFH-DA を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 15 分インキュベートした。培地を交換してから各活性酸素消去剤を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 10 分間インキュベートした。アルゴンガスで脱気した培地に溶解した、HQ-GSH 抱合体あるいは HQ を添加し、さらに 1 時間インキュベートを行った。細胞をトリプシンにより剥離し、遠心してから 1mL のシース液 (Becton Dickinson 社) に懸濁した。10000 個の細胞について蛍光強度をフローサイトメトリー (Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer) により検出および解析を行った。励起光として 488 nm のレーザー光を、また fluorescence 1 (FL1) 検出器 ( $530 \pm 15$  nm) を用いて検出し、BD CELLQuest Pro ソフトによりデータの取り込みおよび解析を行った。

#### 4-2-6. 細胞内グルタチオンの定量

12 穴マルチプレートに、LLC-PK1 細胞を  $4 \times 10^5$ /well ずつ播種して、3%ウシ胎児血清を含んだ Medium 199 培地で 24 時間培養した。培地交換をしてから、アルゴンガスで脱気した培地に溶解した HQ-GSH 抱合体あるいは HQ を添加し、1 時間培養した。細胞をトリプシンにより剥離し、遠心後 DPBS に懸濁した。この細胞の一部に  $0.4\text{ M HClO}_4$ - $1\text{mM EDTA}$  を加えてから 12000 rpm で 5 分間

遠心し、上清を syringe filter (0.2  $\mu$ m Minisart RC4, Sartorius) でろ過してから 50  $\mu$ L を HPLC に注入した。HPLC の測定には東ソー製 CCP&8020 シリーズを、カラムは TSK-GEL OCTYL-80Ts (4.6  $\times$  250 mm) 逆相カラムを使用した。電気化学検出器 (ECD) は ESA 製 Coulochem を、アナリティカルセルは MODEL 5010 を用いた。分析は、0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  / 0.15 mM 1-octanesulfonic acid sodium salt 水溶液 (pH 2.7) 980 mL にメタノール 20 mL と 95% Proclin 150 50 $\mu$ L を 添加して調製した溶離液を、0.6 mL/min の速度で流して行った。またカラム温度は 35 に保った。ECD は第一電極を 550 mV、第二電極を 850 mV に設定した。GSH および GSSG の保持時間は、測定日ごとに標準物質を用いて確認した。

また、剥離した細胞の一部に 0.05 % Triton-0.05mM EDTA 溶液を加えてから、凍結融解を繰り返し、細胞を破壊して、Lowry ら [8] の方法によりタンパク質を定量した (標品 BSA)。

#### 4-2-7. 統計解析

特に記述のない限り、測定値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差で表わした。Student's *t*-test を行い、有意差を求めた。P < 0.05 を有意差とした。



### 4-3. 結果

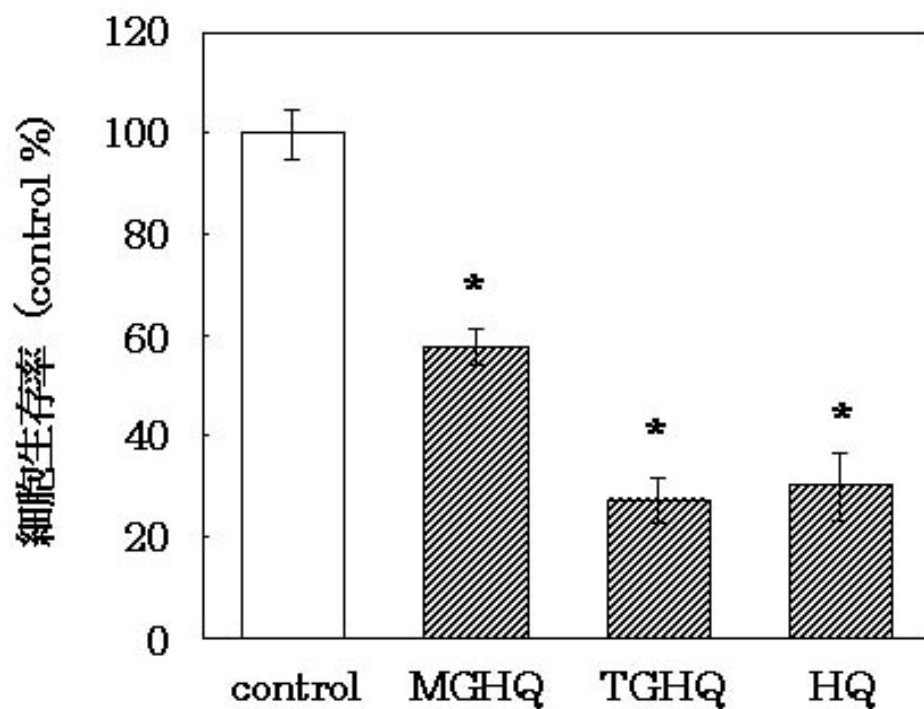
#### 4-3-1. HQ-GSH 抱合体による細胞毒性への $\gamma$ -GT の関与

LLC-PK1 細胞を用いて、HQ-GSH 抱合体が細胞毒性を起こすかどうかについて調べた。HQ-GSH 抱合体および HQ を LLC-PK1 細胞に 24 時間暴露したところ、いずれの化合物でも細胞生存率が有意に低下した (Fig. 4-1)。このとき、TGHQ と HQ ではほぼ同程度の生存率低下が見られた。

一般に、GSH 抱合体は腎近位尿細管細胞表面に存在する  $\gamma$ -GT や aminodipeptidase により加水分解され、Cys 抱合体の形で細胞内に移行してチオール化合物となり、細胞構成成分と反応することで細胞毒性を表わすことが推定されている (scheme 1-2) [1-3]。そこで、HQ-GSH 抱合体による細胞死がこのようなメカニズムによるものかどうかについて検討した。

まず、今回用いた LLC-PK1 細胞における  $\gamma$ -GT の発現を確認した。細胞を播種してから 16 時間後と 68 時間後における LLC-PK1 細胞の  $\gamma$ -GT 活性を調べたところ、時間依存的に活性が増加した (Fig. 4-2)。ここに  $\gamma$ -GT の阻害剤[9]である acivicin を添加したところ、 $\gamma$ -GT 活性は有意に抑えられ、特に播種 68 時間後の細胞では acivicin 添加後には  $\gamma$ -GT 活性はほとんど残っていなかった。

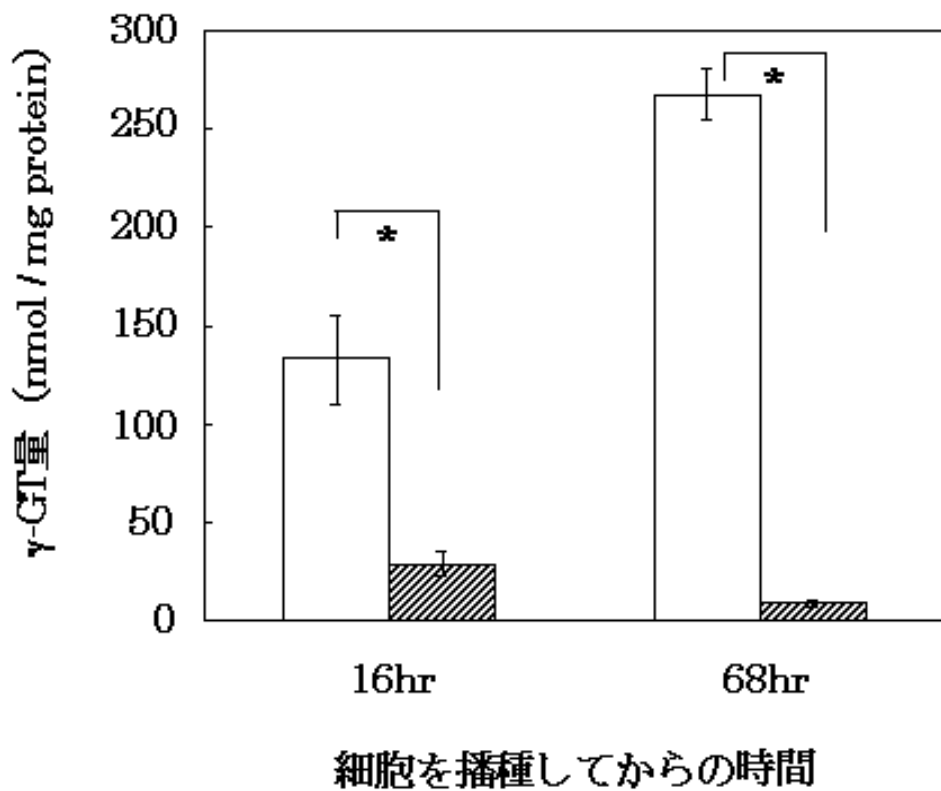
そこで TGHQ の添加により低下した細胞生存率が acivicin により回復するかどうかを調べた。播種 68 時間後の細胞に acivicin を前処理してから TGHQ を添加したところ、acivicin を添加した場合でも TGHQ の細胞毒性の程度は変わらなかった (Fig. 4-3)。このことから、少なくとも今回の実験系において観察された TGHQ による細胞毒性は、これまで報告されている  $\gamma$ -GT 関与によるメカニズムとは異なったメカニズムによるものであると考えられる。



**Fig. 4-1** LLC-PK1 細胞における HQ-GSH 抱合体あるいは HQ による細胞生存率の変化

LLC-PK1 細胞 ( $2.5 \times 10^4$ /well) に HQ-GSH 抱合体あるいは HQ ( $100\mu\text{M}$ ) を 24 時間暴露した。値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。

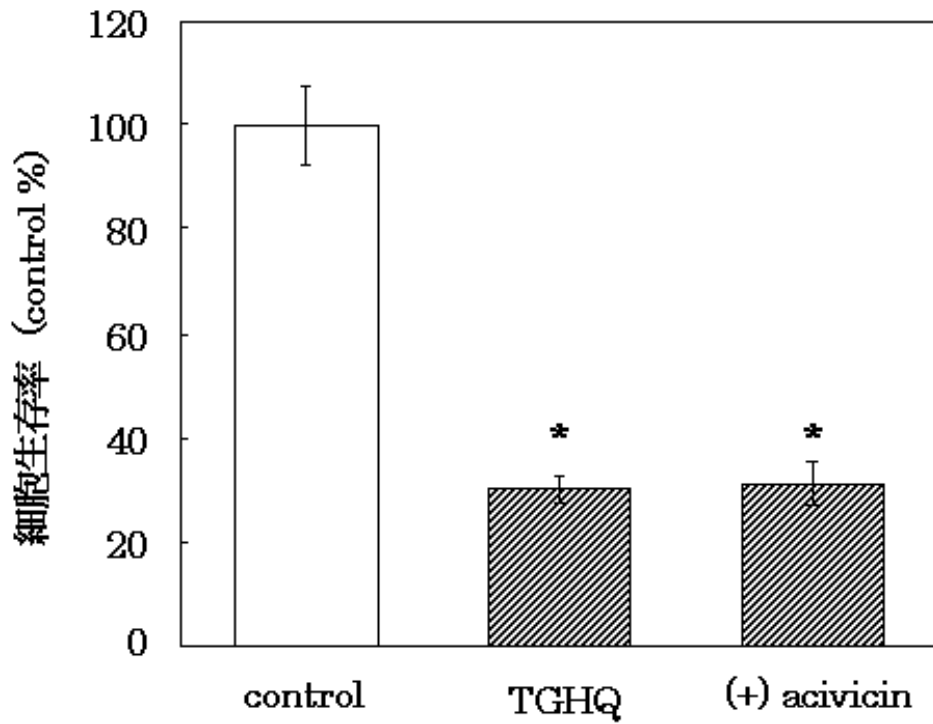
\* $P < 0.01$  (control に対して)



**Fig. 4-2** LLC-PK1 細胞における $\gamma$ -GT 活性と acivicin の効果

LLC-PK1 細胞 ( $4 \times 10^5$ /well) をそれぞれの時間培養した後、1mM acivicin を添加し、3 時間インキュベートした。値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。\*P < 0.01

□ : (-) acivicin、▨ : (+) acivicin



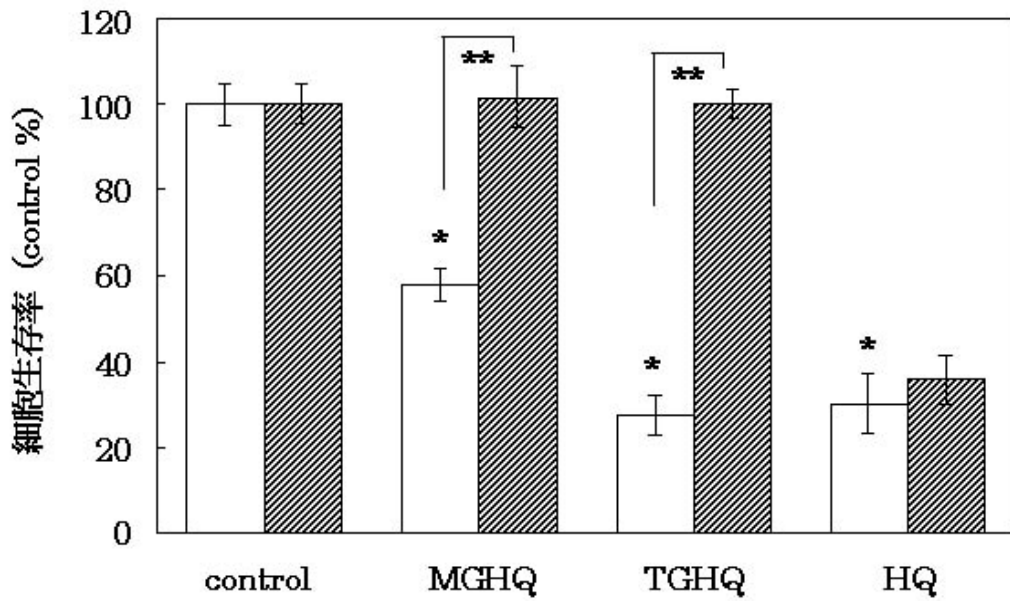
**Fig. 4-3** TGHQ 添加による細胞生存率の低下に対する acivicin の効果  
 LLC-PK1 細胞 ( $2.5 \times 10^4$ /well) に 500 $\mu$ M acivicin を添加し、10 分間インキュベ  
 ートを行ってから、100 $\mu$ M TGHQ を 24 時間暴露した。値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標  
 準偏差である。\*P < 0.01 (control に対して)

#### 4-3-2. HQ-GSH 抱合体による細胞毒性への活性酸素の関与

HQ-GSH 抱合体による細胞毒性が $\gamma$ -GT 関与によるメカニズムではないこと、そして GSH が結合していない HQ でも細胞死が確認されたことから、今回の毒性メカニズムについて検討を行った。

前章で HQ-GSH 抱合体の水溶液に活性酸素である  $O_2^{\cdot-}$  や過酸化水素が検出されたことから、HQ-GSH 抱合体の細胞毒性に活性酸素が関与していると予想される。そこで、活性酸素の関与について調べるため細胞を HQ-GSH 抱合体に暴露する前に活性酸素消去剤を添加して実験を行った。はじめに、過酸化水素分解酵素であるカタラーゼで前処理した LLC-PK1 細胞に HQ-GSH 抱合体あるいは HQ を添加し、24 時間後の細胞生存率を調べた。HQ-GSH 抱合体である MGHQ および TGHQ の場合では、それぞれによる細胞生存率の低下がカタラーゼにより、ほぼ完全に抑えられた (Fig. 4-4)。しかし HQ による生存率の低下に対するカタラーゼの防護効果は、ほとんど見られなかった。

TGHQ と HQ の添加によりほぼ同程度の細胞生存率の低下が見られたにもかかわらず、カタラーゼによる効果が両者で異なったことから (Fig. 4-4) TGHQ と HQ において他の活性酸素消去剤を用いて詳細に検討した。 $\cdot OH$  の消去剤である DMTU で前処理した細胞に TGHQ あるいは HQ を添加し、24 時間後の細胞生存率を調べたところ、TGHQ を暴露した場合は DMTU により生存率の低下が有意に抑えられた。それに対し、HQ の場合ではほとんど効果が見られなかった (Fig. 4-5)。一方、鉄キレート剤である DFO で前処理した細胞では、TGHQ、HQ とともに生存率の低下が有意に抑えられた (Fig. 4-6)。このことから、HQ-GSH 抱合体である TGHQ は HQ と細胞毒性のメカニズムが異なるものと考えられる。

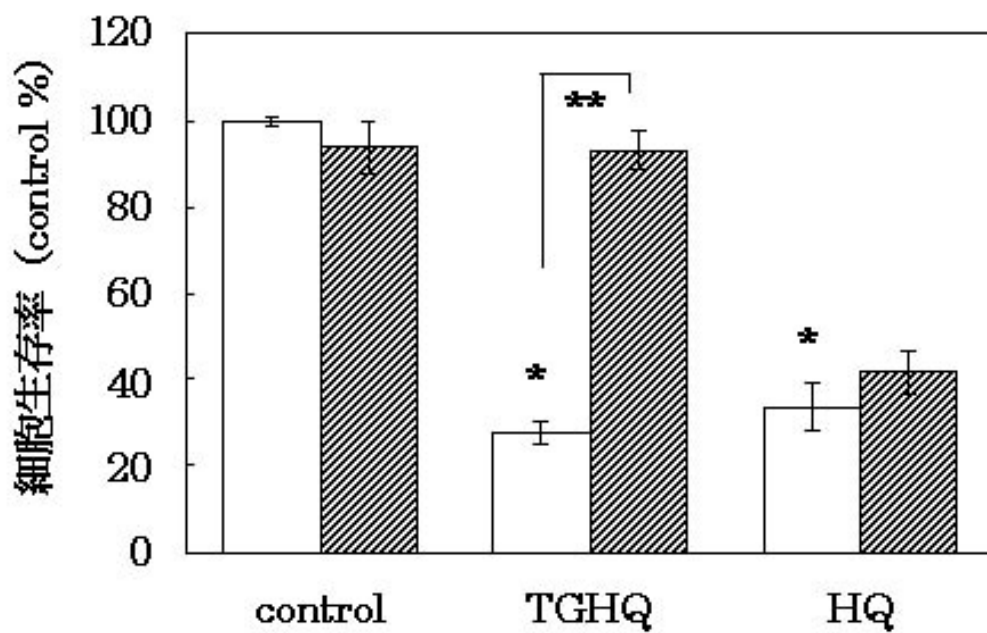


**Fig. 4-4** HQ-GSH 抱合体および HQ による細胞生存率低下におよぼすカタラーゼの影響

LLC-PK1 細胞 ( $2.5 \times 10^4$ /well) に 210u/mL カタラーゼを 10 分間プレインキュベートしてから、HQ-GSH 抱合体あるいは HQ (100 $\mu$ M) を 24 時間暴露した。

値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。□ : (-) カタラーゼ、▨ : (+) カタラーゼ

\*P < 0.01 ((-) カタラーゼの control に対して) \*\*P < 0.01

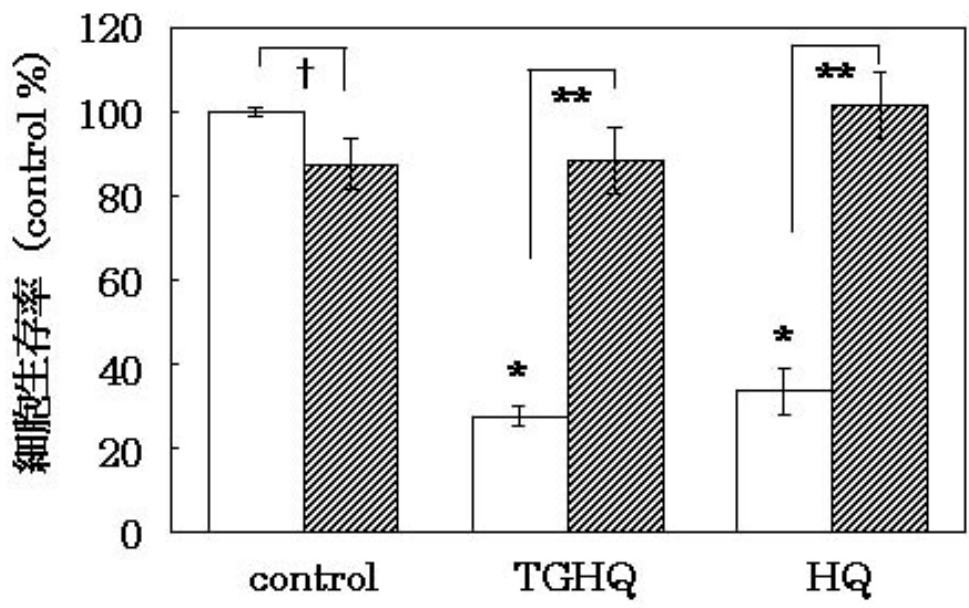


**Fig. 4-5** TGHQ および HQ による細胞生存率低下におよぼす DMTU の影響

LLC-PK1 細胞 ( $2.5 \times 10^4$ /well) に 10mM DMTU を 10 分間プレインキュベートしてから、TGHQ あるいは HQ (100 $\mu$ M) を 24 時間暴露した。

値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。□: (-) DMTU、▨: (+) DMTU

\*P < 0.01 ( (-) DMTU の control に対して) \*\*P < 0.01



**Fig. 4-6** TGHQ および HQ による細胞生存率低下におよぼす DFO の影響  
 LLC-PK1 細胞(  $2.5 \times 10^4$ /well )に 5mM DFO を 10 分間プレインキュベートしてから、  
 TGHQ あるいは HQ ( 100 $\mu$ M ) を 24 時間暴露した。

値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。□: (-) DFO、▨: (+) DFO

\*P < 0.01 ( (-) DFO の control に対して ) \*\*P < 0.01、†P < 0.05

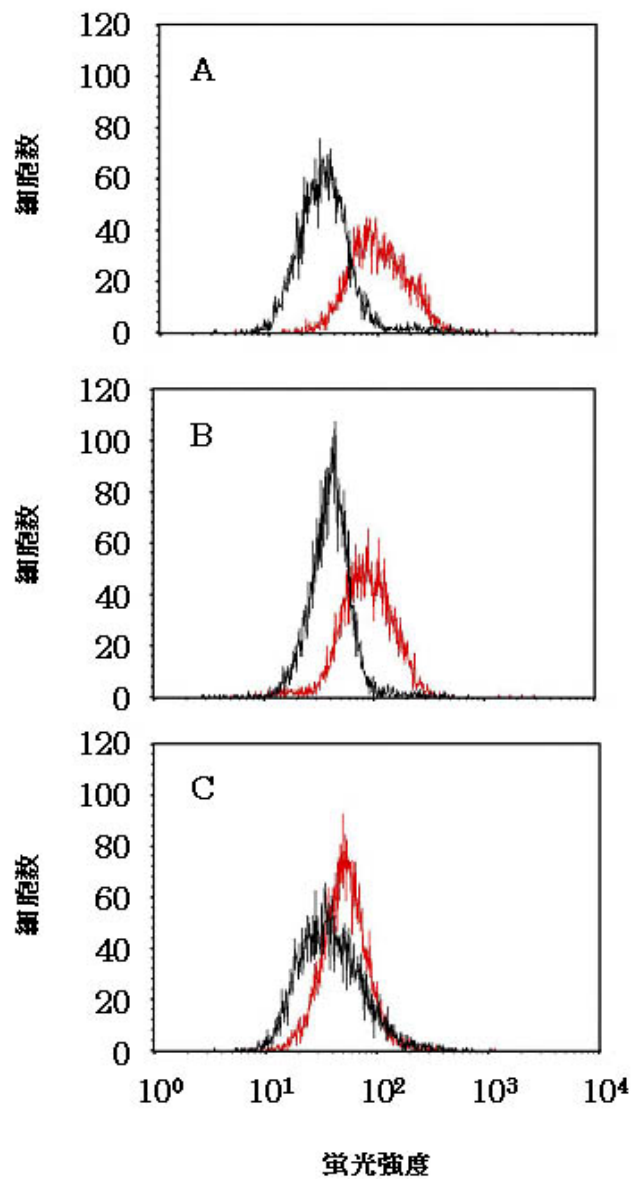


### 4-3-3. HQ-GSH 抱合体による細胞内酸化的ストレスの評価

HQ-GSH 抱合体と HQ はともに水溶液中で過酸化水素を生じるにもかかわらず、これらによる細胞毒性に対するカタラーゼの防護効果が異なっていた (Fig. 4-4)。カタラーゼは酵素であるため、細胞外に加えられた場合には細胞内に入らない。そこで、細胞内の酸化的ストレスを HQ-GSH 抱合体と HQ がどのように引き起こすかを、DCFH-DA による蛍光法を用いて調べた。

あらかじめ DCFH-DA でラベルした LLC-PK1 細胞に MGHQ、TGHQ あるいは HQ をそれぞれ 1 時間暴露したところ、すべての場合で強い蛍光を発する細胞が多くなり、酸化的ストレスが亢進することがわかった (Fig. 4-7)。この細胞内酸化的ストレスに細胞外の過酸化水素が関与しているかどうかを調べるため、カタラーゼで前処理した細胞に MGHQ、TGHQ あるいは HQ を添加した。その結果、MGHQ と TGHQ による酸化的ストレスの亢進は抑えられたのに対し、HQ の場合ではまったく抑えられなかった (Fig. 4-8)。

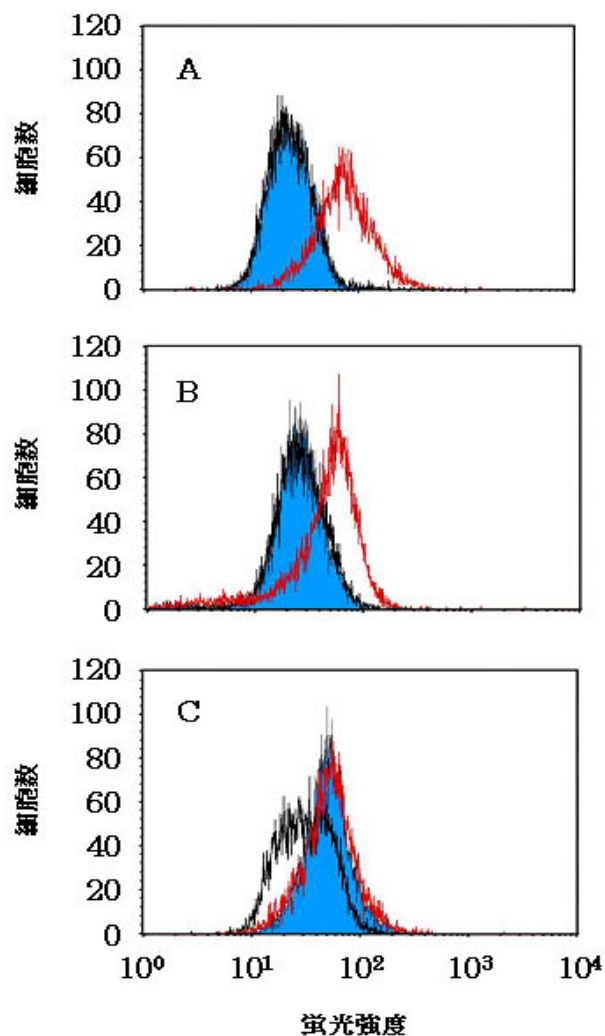
さらに TGHQ と HQ の場合について、他の活性酸素の消去剤の効果についても検討した。 $\cdot\text{OH}$  の消去剤である DMTU で前処理した細胞に TGHQ あるいは HQ を暴露したところ、TGHQ による酸化的ストレスの亢進がほとんど抑えられた。それに対し、HQ の場合ではほとんど DMTU の効果が見られなかった (Fig. 4-9)。一方、鉄キレート剤 DFO で前処理した細胞では、TGHQ、HQ とともに細胞内酸化的ストレスの亢進が大きく抑えられた (Fig. 4-10)。



**Fig. 4-7** HQ-GSH 抱合体および HQ による細胞内酸化ストレスの変化  
 LLC-PK1 細胞 ( $2 \times 10^5$ /well) に  $10 \mu\text{M}$  DCFH-DA でラベリングしてから、HQ-GSH  
 抱合体あるいは HQ ( $200 \mu\text{M}$ ) を 1 時間暴露した。

— : control、— : HQ-GSH 抱合体および HQ を暴露

A : TGHQ、B : MGHQ、C : HQ

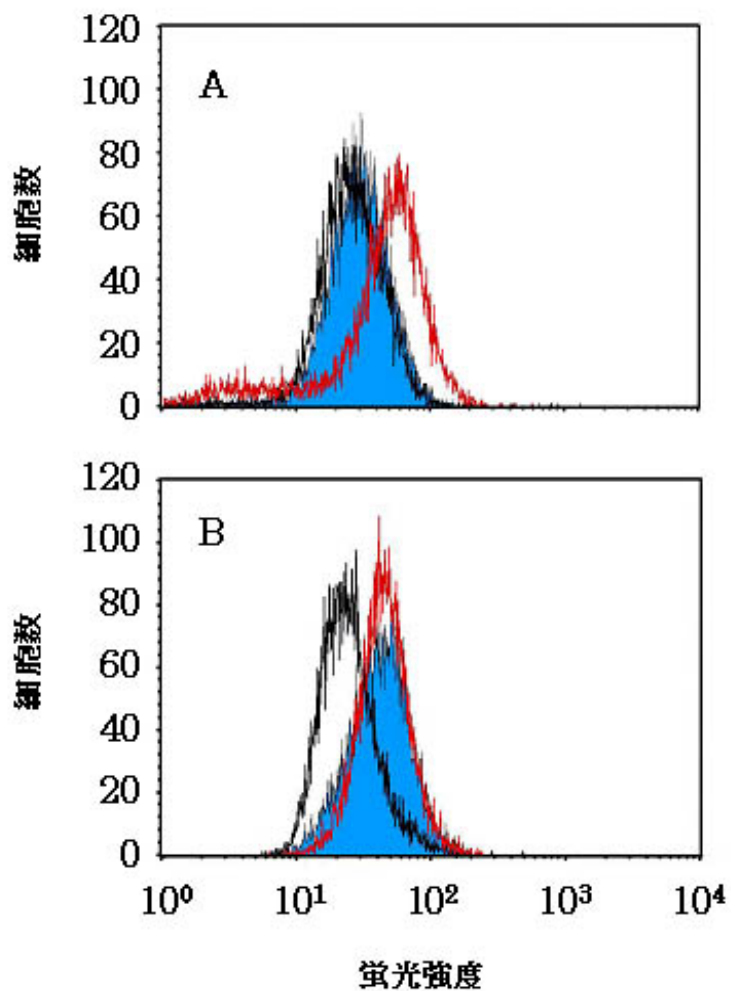


**Fig. 4-8** HQ-GSH 抱合体および HQ による細胞内酸化的ストレス亢進に対するカタラーゼの効果

LLC-PK1 細胞 ( $2 \times 10^5$ /well) に  $10 \mu\text{M}$  DCFH-DA でラベリングしてから、 $100 \text{ u/mL}$  カタラーゼを 10 分間プレインキュベートし、HQ-GSH 抱合体あるいは HQ ( $200 \mu\text{M}$ ) を 1 時間暴露した。

— : control、— : HQ-GSH 抱合体および HQ を暴露、■ : カタラーゼで前処理

A : TGHQ、B : MGHQ、C : HQ

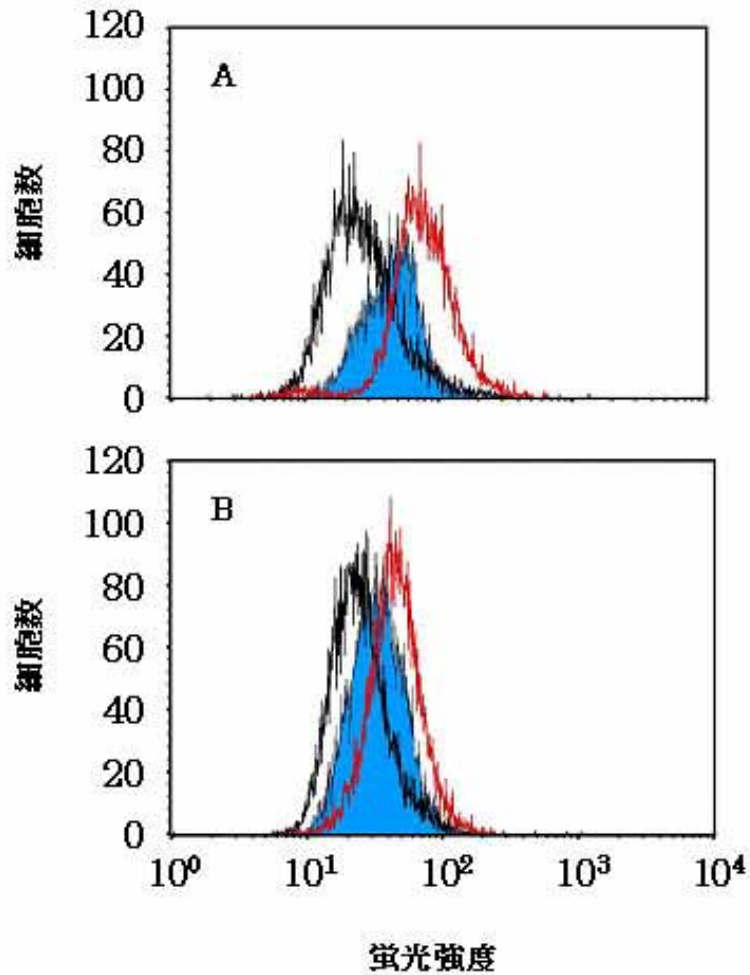


**Fig. 4-9** TGHQ および HQ による細胞内酸化ストレス亢進に対する DMTU の効果

LLC-PK1 細胞 ( $2 \times 10^5$ /well) に  $10 \mu\text{M}$  DCFH-DA でラベリングしてから、 $30 \text{mM}$  DMTU を 10 分間プレインキュベートし、TGHQ あるいは HQ ( $200 \mu\text{M}$ ) を 1 時間暴露した。

— : control、— : TGHQ および HQ を暴露、■ : DMTU で前処理

A : TGHQ、B : HQ



**Fig. 4-10** TGHQ および HQ による細胞内酸化的ストレス亢進に対する DFO の効果

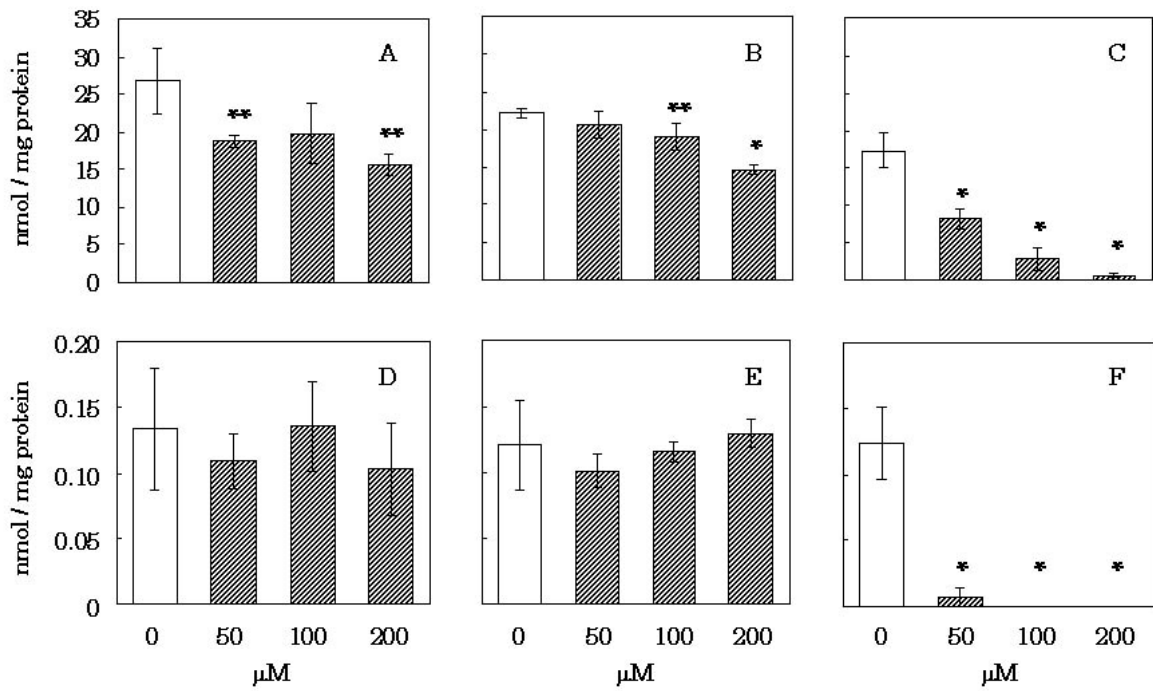
LLC-PK1 細胞 ( $2 \times 10^5/\text{well}$ ) に  $10\mu\text{M}$  DCFH-DA でラベリングしてから、 $1\text{mM}$  DFO を 10 分間プレインキュベートし、TGHQ あるいは HQ ( $200\mu\text{M}$ ) を 1 時間暴露した。

— : control, — : TGHQ および HQ を暴露、■ : DFO で前処理

A : TGHQ, B : HQ

#### 4-3-4. HQ-GSH 抱合体による細胞内グルタチオン量の変化

酸化ストレスによる細胞毒性は、酸化ストレスとそれに対する生体内の防御系とのバランスにより影響される。すなわち、酸化ストレスが防御系よりも優位である場合、細胞毒性を引き起こす。細胞内グルタチオンのうち、還元型グルタチオン (GSH) は活性酸素や他の酸化物により酸化されると酸化型グルタチオン (GSSG) となる。そこで、細胞内の GSH 量並びに GSSG 量を HQ-GSH 抱合体や HQ が変えるかどうかを調べた。LLC-PK1 細胞に TGHQ あるいは MGHQ を暴露したところ、TGHQ の濃度依存的に細胞内 GSH 量が減少した (Fig. 4-11)。このとき、GSSG 量は TGHQ でわずかな増加の傾向が見られたが、有意差は見られなかった。それに対して、HQ を暴露した細胞では HQ の濃度依存的に GSH、GSSG 量ともに顕著に減少した。



**Fig. 4-11** HQ-GSH 抱合体および HQ による細胞内グルタチオン量の変化

LLC-PK1 細胞 ( $4 \times 10^5$ /well) に HQ-GSH 抱合体あるいは HQ を 1 時間暴露した。

値は 3 回の実験の平均  $\pm$  標準偏差である。

\* $P < 0.01$  (それぞれの  $0 \mu\text{M}$  に対して) \*\* $P < 0.05$  (それぞれの  $0 \mu\text{M}$  に対して)

A : MGHQ の GSH 量、B : TGHQ の GSH 量、C : HQ の GSH 量、D : MGHQ の GSSG 量、E : TGHQ の GSSG 量、F : HQ の GSSG 量

#### 4-4. 考察

本章では、LLC-PK1 細胞における HQ-GSH 抱合体および HQ の細胞毒性について検討した。HQ-GSH 抱合体による細胞死が $\gamma$ -GT 阻害薬である acivicin を添加しても抑えられなかったことから、少なくとも本実験系における HQ-GSH 抱合体の細胞毒性は、これまでに報告されている $\gamma$ -GT の関与するメカニズムによるものではないと考えられる。前章で HQ-GSH 抱合体あるいは HQ から過酸化水素が生成することを確認したことから、本研究では活性酸素の関与という観点から実験を行った。

活性酸素阻害剤であるカタラーゼ、DMTU および DFO の添加により、TGHQ による細胞生存率の低下はほぼ完全に抑えられた。また、DCFH-DA 蛍光法を利用して細胞内の酸化ストレスについて評価を行ったところ、TGHQ の暴露で酸化ストレスが亢進され、それは活性酸素阻害剤であるカタラーゼ、DMTU および DFO の添加により抑えられた。一方、HQ による細胞生存率の低下は DFO で抑えられたもののカタラーゼおよび DMTU では効果が見られなかった。さらに HQ 暴露により、TGHQ と同様に細胞内酸化ストレスが亢進されたが、DFO での抑制効果は部分的であり、またカタラーゼおよび DMTU ではほとんど抑制効果が見られなかった。

以上の結果から、HQ-GSH 抱合体は HQ のように酸化ストレスを引き起こすものの、細胞毒性の発現機序が異なることが推定される。TGHQ による細胞毒性は過酸化水素分解酵素および $\cdot$ OH 消去剤、さらにその生成に関与する鉄のキレート剤により完全に抑えられたことから、その細胞毒性には活性酸素が関与していることは明らかと思われる。HQ-GSH 抱合体は親水性が高いため、細胞膜を通過できないと考えられる。また、カタラーゼも細胞膜を通過できない。これらのことから、HQ-GSH 抱合体の場合は、細胞の外で自動酸化により生成した $O_2^{\cdot-}$ を介した過酸化水素の生成が起こり、それが細胞内に移行して、それ自身あるいはそれと還元鉄との反応で生じる $\cdot$ OH により細胞毒性が引き起こされたものと推定される。一方、HQ は細胞膜を容易に通過できると考えられること



から、細胞の内外で自動酸化により  $O_2\cdot^-$  を介した過酸化水素の生成、さらに還元鉄の働きにより  $\cdot OH$  が生成すると考えられる。しかし、本研究において HQ の細胞毒性における  $\cdot OH$  阻害剤 DMTU と DFO の効果がまちまちであったことから、細胞毒性への  $\cdot OH$  の寄与を裏付ける統一的証拠は得られていない。もし HQ の毒性が活性酸素によるとすると HQ-GSH 抱合体との違いはその生成部位の違いによる可能性も考えられる。膜透過性の HQ はミトコンドリアなどの細胞内小器官にまで達し、そこで活性酸素を生成する可能性は十分考えられる。細胞外で生じた過酸化水素が、細胞質に移行しそこで直接的あるいは間接的に作用する場合と、細胞の生命維持に重要な器官で過酸化水素を生じ障害を与える場合では、活性酸素阻害剤が膜透過性であっても、その防護効果に違いが出ることはありうることを考えられる。

また HQ を暴露させた場合、細胞内酸化的ストレスに対する主な防御系のひとつである細胞内グルタチオンの量が還元型、酸化型ともに顕著に減少したことは、別の面から HQ の酸化的ストレスの関与した細胞毒性メカニズムを推定させる。HQ が細胞内グルタチオンの枯渇を引き起こした結果、酸化的ストレスとその防御系との間のバランスが崩れ、相対的に酸化的ストレスが惹起されたものと推定される。HQ によるグルタチオン量を減少させたことについては、HQ が細胞内で酸化されて BQ となり、それに細胞内の GSH が付加反応を起こしたためであることが可能性として考えられる。

#### 4-5. 参考文献 (第4章)

- [1] Monks, T. J., and Lau, S. S. (1987) Commentary : Renal transport processes and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* **15**, 437-441
- [2] Schaeffer, V. H., and Stevens, J. L. (1987) The transport of S-cysteine conjugates in LLC-PK1 cells and its role in toxicity. *Mol. Pharmacol.* **31**, 506-512
- [3] Lash, L. H., and Jones, D. P. (1984) Renal glutathione transport: Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane *J. Biol. Chem.* **259**, 14508-14514
- [4] Stevens, J., Hayden, P., and Taylor, G. (1986) The role of glutathione conjugate metabolism and cysteine conjugate  $\beta$ -lyase in the mechanism of S-cysteine conjugate toxicity in LLC-PK1 cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 3325-3332
- [5] Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C., and Thomas, M. (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* **130** 1910-1917
- [6] Wrona, M., Patel, K., and Wardman, P. (2005) Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 262-270
- [7] Meister, A., Tate, S. S., and Griffith, O. W. (1981)  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase *Methods Enzymol.* **77** 237-252
- [8] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** 265-275

- [9] Allen, L. M., Corrigan, M. V., and Meinking, T. (1981) Interaction of AT-125, ( $\alpha$ S,5S)-amino-3-chloro-4,5-dihydroisoxazoleacetic acid, with bovine kidney g-glutamyl transpeptodase *Chem. Biol. Interact.* **33**, 361-365

## 第5章 総括

本研究では、光増感反応による HQ-GSH 抱合体の生成と、それによる細胞毒性の機序を解明することを目的として、以下の検討を行った。

第2章では、GSH の存在下で、日常的に用いられているフェノール化合物から  $^1\text{O}_2$  との反応により HQ-GSH 抱合体が生成することを、保存料として多用されているパラベン類や、医薬品として使用されているサリチル酸を例に示した。この反応において、 $^1\text{O}_2$  はパラベン類からの HQ および BQ の生成、HQ からの BQ の生成、そして多置換 GSH 抱合体の生成など、複数の箇所に関与していることが示唆された。

第3章では、HQ-GSH 抱合体が水溶液中で過酸化水素を生成することを示した。水溶液中で同時にセミキノン型ラジカルが検出され、またスピンプローブ ACP を用いた実験で  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の生成が示唆されたことから、HQ-GSH 抱合体の過酸化水素の生成機序は HQ と同様に自動酸化による  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の生成を経て起こるものと考えられる。

第4章では、HQ-GSH 抱合体が腎近位尿細管細胞において、細胞死を引き起こすことを示した。そのメカニズムは、これまでに推定されている  $\gamma$ -GT による GSH のペプチド切断を経るものではなく、HQ-GSH 抱合体により酸化的ストレスが惹起されたためであることが明らかとなった。さらに、HQ による細胞毒性が細胞内で生成される過酸化水素の寄与が大きいのに対し、HQ-GSH 抱合体による細胞毒性は細胞外での過酸化水素生成によることが示された。

緒言で述べたとおり、皮膚には内因性および外因性の光増感剤が存在し、その存在量と光の照射条件によっては少なからず  $^1\text{O}_2$  が生じるものと考えられる。また GSH 存在量が多い。本研究の成果は、そのような条件下で特に化粧品や医薬品として皮膚に直接塗布することのあるフェノール化合物から HQ-GSH 抱

合体が形成され、それが過酸化水素などの活性酸素の生成により細胞障害を起こす可能性を示唆するものである。本来、GSHは生体内での活性酸素による障害を防御するために存在していると考えられている。また、GSH 抱合体はフェノール化合物などの化合物を生体内から排泄する目的で生じると考えられる。このような生体内で防御系としての役割を果たす GSH が、活性酸素を発生させる生成物を形成し、細胞に障害を起こしうるといふ今回の知見は、大変興味深いものである。

これまでに、HQ-GSH 抱合体の標的部位は腎近位尿細管であろうとされてきた[1-3]。今回 $\gamma$ -GT が関与しない経路で HQ-GSH 抱合体の細胞毒性が確認されたことは、HQ-GSH 抱合体がいかなる組織でも毒性を表す可能性を示唆している。特に皮膚は酸素に接する機会が最も多い組織のひとつであり、皮膚組織内の酸素分圧は大気中酸素の影響を受けているとされている[4]。従って、そこで HQ-GSH 抱合体が形成され、同時に障害を引き起こす可能性は十分考えられる。

また、腎における毒性については HQ-GSH 抱合体の毒性が acivicin で完全に抑えられなかったのは、近位尿細管の管腔内で抱合体が与える酸化ストレスの寄与があるからである可能性も考えられる。また、例え $\gamma$ -GT などの酵素の処理を受けて近位尿細管の細胞内に入ったとしても、そこで HQ のように細胞の内側から与えた酸化ストレスが障害に結びついている可能性も考えられる。この点については今後 HQ の Cys 抱合体を合成し、その細胞に与える酸化ストレスを解析することで明らかにされるものと思われる。

さらに今後の課題として、皮膚でも障害を起こすかどうかを調べるために、ケラチノサイトなど皮膚由来細胞でも毒性を確認する必要がある。また、実際にポルフィリア症モデル動物や光過敏症を起こす薬物で処理した実験動物にパラベン類などのフェノール化合物を塗布して光照射したときに、皮膚で障害が起こるかどうか、そしてこれが活性酸素生成によるものかどうかを確認する必要がある。最近では、活性酸素と反応することで自身の常磁性を失う ESR 用ス

ピンプローブを用い、その消失速度を *in vivo* で比較することで間接的ではあるが非侵襲的に生体内での活性酸素生成を評価する試みがなされている[5, 6]。この目的には、*in vivo* 測定が可能な L-band ESR (1 GHz 付近) が開発されている[7]。また、これと皮膚表面の ESR プローブの測定に適したサーフィスコイル型共振器を組み合わせて、動物の皮膚における活性酸素生成も調べられている[8, 9]。こうした方法により動物における HQ-GSH 抱合体の活性酸素生成を皮膚で解析することで、HQ-GSH 抱合体の毒性における活性酸素の関与がさらに明確になるものと考えられる。

## 参考文献(第5章)

- [1] Monks, T. J., and Lau, S. S. (1987) Commentary : Renal transport processes and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* **15**, 437-441
- [2] Schaeffer, V. H., and Stevens, J. L. (1987) The transport of S-cysteine conjugates in LLC-PK1 cells and its role in toxicity. *Mol. Pharmacol.* **31**, 506-512
- [3] Lash, L. H., and Jones, D. P. (1984) Renal glutathione transport: Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane *J. Biol. Chem.* **259**, 14508-14514
- [4] Stücker, M., Struk, A., Altmeyer, P., Herde, M., Baumgärtl, H., and Lübbers, D. W. (2002) The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J. Physiol.* **538 (Pt 3)**, 985-994
- [5] Utsumi, H. and Yamada, K. (2003) In vivo electron spin resonance-computed tomography / nitroxyl probe technique for non-invasive analysis of oxidative injuries. *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 1-8
- [6] Takeshita, K., and Ozawa, T. (2004) Recent progress in *in vivo* ESR spectroscopy. *J. Radiat. Res.* **45**, 373-384
- [7] Lukiewicz, S.J., and Lukiewicz, S.G. (1984) In vivo ESR spectroscopy of large biological objects. *Magn. Reson. Med.* **1**, 297-298
- [8] Takeshita, K., Chi. C., Hirata, H., Ono, M., and Ozawa, T. In vivo generation of free radicals in the skin of live mice under ultraviolet light, measured by L-band EPR spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.* in press
- [9] Takeshita, K., Takajo, T., Hirata, H., Ono, M., and Utsumi, H. (2004) *In vivo* oxygen radical generation in the skin of the protoporphyria model

mouse with visible light exposure: an L-band ESR study. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1463-1470



## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Nishizawa. C., Takeshita. K., Ueda. J., Mizuno. M., Suzuki. T. K., and Ozawa. T. : Hydroxyl radical generation caused by the reaction of singlet oxygen with a spin trap, DMPO, Increases significantly in the presence of biological reductants. *Free Radical Research* **38**, 385-392 (2004)
2. Nishizawa. C., Takeshita. K., Ueda. J., Nakanishi. I., Suzuki. T. K., and Ozawa. T. : Reaction of parabens with singlet oxygen in the presence of glutathione produces glutathione conjugates of hydroquinone, potent inducers of oxidative stress. *Free Radical Research* In press

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導をいただきました千葉大学大学院薬学研究科の鈴木和夫教授、崇城大学薬学部の竹下啓蔵教授、ならびに東北大学未来科学技術共同センターの小澤俊彦客員教授に深く感謝いたします。

また、多くのご助言ならびにご協力を賜りました放射線医学総合研究所レドックス制御研究グループの伊古田暢夫博士、安西和紀博士、上田順市博士、中西郁夫博士、名古屋市立大学薬学部の中川秀彦助教授に厚く御礼申し上げます。

研究を行うにあたり、様々な面でお世話になった千葉大学大学院薬学研究科衛生化学研究室の小椋康光助教授、鈴木紀行助手をはじめとするみなさま、そして放射線医学総合研究所レドックス制御研究グループのみなさまに感謝の辞を申し上げます。

本学位論文の審査は、千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	荒野 泰
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	戸井田敏彦
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	高山廣光