

(様式4)

## 学 位 論 文 概 要

平成 30 年 1 月 10 日

学位申請者

飯田 沙也加 印

### 学位論文題目

生体中の一重項酸素や次亜塩素酸生成のプローブ分子としての尿酸

Uric acid as a molecular probe of singlet oxygen and hypochlorite formation *in vivo*

### 学位論文の要旨

【緒言】酸化ストレスが老化や種々の疾病の原因であると考えられている。酸化ストレスは種々の活性酸素種 (ROS) によって引き起こされるため、*in vivo*で発生している ROSを同定することは、極めて臨床的意義が大きいと考えられる。そこでROSに特異的な尿酸の反応生成物を同定し、これをマーカーとしてROSを同定することを考えた。

尿酸は優れた抗酸化物質であり、酸化生成物は反応するROSに特異的な化合物を与える。本研究では、まだ明らかになっていない一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) と次亜塩素酸イオン ( $\text{ClO}^-$ ) との特異的反応生成物を同定することを目的とした。これにより *in vivo*でのROSの同定につながると予想される。

【実験】尿酸を様々な系で発生させた $^1\text{O}_2$ と、そして次亜塩素酸ナトリウム ( $\text{NaClO}$ ) 由来の $\text{ClO}^-$ と反応させ、反応生成物を飛行時間型質量分析計 (TOFMS) で分析してMSスペクトルを測定した。そして、そのMSスペクトルから組成を推定した。

【結果と考察】尿酸を光酸化したところ、尿酸の減少と複数の不明化合物の生成を確認した。このうちの2つの化合物U1とU2に注目して分析し、U1をパラバン酸 (PA) , U2をオキサリ尿酸 (OXA) と同定した。次に光酸化、 $^1\text{O}_2$ の発生剤である3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-4-methyl-1-naphthyl)propionic acid (NEPO) の熱分解、および $\text{H}_2\text{O}_2$ の2電子酸化により発生した $^1\text{O}_2$ で尿酸を酸化し、PAとOXAを定量してそれらの収率 (尿酸の減少量に対するPAとOXAの生成量の割合) を求めたところ、光酸化およびNEPOを用いた系において100%近い収率となった。このことから、尿酸と $^1\text{O}_2$ との反応ではPAのみが生成することが示された。また $\text{H}_2\text{O}_2$ の2電子酸化反応では酸化剤として、

$\text{ClO}^-$ 以外にも $\text{ONOO}^-$ を用いたが、いずれの系でも高い収率（37～50%）でPAおよびOUAの生成が認められた。このことから、炎症時や虚血・再灌流時のように $\text{H}_2\text{O}_2$ と $\text{O}^-$ が共存することが予想される場合にも $^1\text{O}_2$ が生成すると考えられる。

一方、 $^1\text{O}_2$ 以外のROSで尿酸を酸化してもPAの生成はほぼ認められなかった。このことから、PAは $^1\text{O}_2$ に対して極めて特異性の高い反応生成物であると推察される。さらに生体試料としてヒト皮膚分泌物を分析したところ、尿酸とPAが検出され、日光曝露後に有意にレベルが上昇することが観察された。

また、尿酸と $\text{ClO}^-$ との反応では、一次生成物と思われる化合物の生成が認められ、MS分析からその組成を $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}$ と同定した。分子中にCl原子を有していることから $\text{ClO}^-$ に特異的な化合物であると推察される。PAとOUAとともに、*in vivo*でのROSの同定につながる、新規酸化ストレス・マーカーとしての応用に期待される。

(1,211文字)

東京工科大学 博士学位論文

生体中の一重項酸素や次亜塩素酸生成  
のプローブ分子としての尿酸

平成 30 年 3 月

飯田 沙也加

# 目次

## 目次

### 第 1 章 序論

- 1-1. 酸素
- 1-2. 活性酸素種
- 1-3. ラジカル種
- 1-4. 次亜塩素酸イオン
- 1-5. 一重項酸素
- 1-6. パーオキシナイトライト
- 1-7. 抗酸化反応
- 1-8. 抗酸化酵素
- 1-9. 抗酸化物質
- 1-10. 酸化ストレス・マーカー
- 1-11. 過酸化脂質
- 1-12. 核酸酸化物
- 1-13. コエンザイム **Q** のレドックス・バランス
- 1-14. 3-ニトロチロシン
- 1-15. 新規酸化ストレス・マーカーの意義
- 1-16. 尿酸
- 1-17. 本研究の目的

### 第 2 章 尿酸と一重項酸素の特異的反応生成物としてのパラバン酸とオキサール尿酸

- 2-1. 概要
- 2-2. 実験方法
  - 2-2-1. 標準溶液及び反応溶液の調製
  - 2-2-2. 尿酸の光酸化
  - 2-2-3. パラバン酸の安定性の確認
  - 2-2-4. 尿酸と **NEPO** の熱分解により発生した一重項酸素との反応
  - 2-2-5.  $\text{H}_2\text{O}_2$  の二電子酸化により発生した一重項酸素による尿酸の酸化
  - 2-2-6. 尿酸とパーオキシラジカルとの反応
  - 2-2-7. ヒト皮膚上のパラバン酸およびオキサール尿酸の検出
  - 2-2-8. 尿酸と一重項酸素の反応経路の検討
  - 2-2-9. HPLC-UV 分析
  - 2-2-10. LC/ TOFMS 分析
  - 2-2-11. LC/MS/MS 分析

## 2-3. 結果

- 2-3-1. 尿酸と一重項酸素の特異的反応生成物の同定
- 2-3-2. パラバン酸安定性の pH 依存性と加水分解によって生じるオキサール尿酸
- 2-3-3. 酸化チタン-UVA 照射による UA の光酸化
- 2-3-4. NEPO の熱分解で生成した一重項酸素による UA の酸化反応
- 2-3-5.  $\text{H}_2\text{O}_2$  の二電子酸化により生成する  $^1\text{O}_2$  と UA との反応
- 2-3-6. UA とフリーラジカルとの反応
- 2-3-7. ヒト皮膚上からの PA 及び OUA の検出
- 2-3-8. UA と  $^1\text{O}_2$  の反応経路の検討

## 2-4. 考察

# 第 3 章 尿酸と次亜塩素酸イオン( $\text{ClO}^-$ )との特異的反応生成物としての CCPD

## 3-1. 概要

## 3-2. 実験方法

- 3-2-1. 反応溶液の調製
- 3-2-2. UA と  $\text{ClO}^-$  の反応
- 3-2-3. 化合物の分離・精製
- 3-2-4. UA と  $\text{ClO}^-$  との反応における  $\text{ClO}^-$  濃度変化に対する CCPD 生成への影響の検討
- 3-2-5. U6 の安定性の検討
- 3-2-6. MPO を用いて発生させた  $\text{ClO}^-$  と UA の反応
- 3-2-7. HPLC-UV 分析
- 3-2-8. LC/ TOFMS 分析
- 3-2-9. LC/MS/MS 分析

## 3. 結果

- 3-3-1. UA と  $\text{ClO}^-$  の反応
- 3-3-2. U6 の分離・精製
- 3-3-3. UA と  $\text{ClO}^-$  との反応における  $\text{ClO}^-$  濃度変化に対する CCPD 生成への影響
- 3-3-4. U6 (CCPD) の安定性の検討

## 3-4. 考察

# 第 4 章 尿酸酸化生成物の微量分析系の確立と病態試料の分析

## 4-1. 概要

## 4-2. 実験方法

- 4-2-1. 溶液調製

4-2-2. 検量線の作成

4-2-3. ヒト血漿中における尿酸化生成物の安定性の検討

4-2-4. 健常人及び筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の血漿分析

4-2-5. LC/MS/MS 分析

4-3. 結果

4-3-1. 各酸化生成物の微量分析

4-3-2. ヒト血漿中における尿酸化生成物の安定性の検討

4-3-3. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者の血漿分析

4-4. 考察

第 5 章 結語

第 6 章 引用文献および論文目録

謝辞

## 略語一覽

|       |   |
|-------|---|
| AL    | Allantoin   |
| ALS   | Amyotrophic lateral sclerosis   |
| AU    | 6-Amino uracil  |
| CA    | Cyanuric acid   |
| CCPD  | 5- <i>N</i> -carboxyimino-6- <i>N</i> -chloroaminopyrimidine-2,4(3 <i>H</i> )-dione |
| CoQ10 | Coenzym Q10   |
| DHAL  | Dehydroallantoin  |
| 4-HAL | 4-Hydroxyallantoin  |
| NEPO  | 3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-4-methyl-1-naphthyl) propionic acid                     |
| OUA   | Oxauric acid  |
| PA    | Parabanic acid  |
| ROS   | Reactive Oxygen Species   |
| TU    | Triuret   |
| TFA   | Trifluoroacetic acid  |
| TOFMS | Time-of-flight mass spectrometry  |
| UA    | Uric acid   |
| 4CH   | 4- <i>N</i> -carboxyamino-carboxyimino-hydantoin                                    |



# 第 1 章

## 序論

## 第1章 序論

### 1-1. 酸素

酸素はヒトが生きていくために必要不可欠なものである。酸素の不足は生命活動に悪影響をもたらすが、過剰に取り込むことでも障害が生じることが報告されている。実際、大気中の酸素濃度は約 20%程度、ヒト生体内酸素濃度は約 2%程度となっており、これは、ヒトが皮膚という殻で臓器を守るよう進化した結果であると考えられる。

通常酸素は三重項酸素 ( $^3\text{O}_2$ ) として存在している。三重項酸素とは、電子スピンの量子数の和が 1 である酸素のことである。酸素の電子配置は  $(\sigma_{1s})^2$ ,  $(\sigma_{1s}^*)^2$ ,  $(\sigma_{2s})^2$ ,  $(\sigma_{2s}^*)^2$ ,  $(\sigma_{2p})^2$ ,  $(\pi_{2p})^2$ ,  $(\pi_{2p}^*)^2$  である。HOMO の電子配置はフントの規則に従い、2つの反結合性  $\pi_{2p}^*$  に同じ向きのスピンを持つ 2 個の電子が 1 個ずつ配置されている。ゆえに酸素分子は不対電子を 2 個持つ電子配置をしている。一方、電子スピンは向きに応じて  $+1/2$  または  $-1/2$  の量子数を持っているため、酸素のスピン量子数の和は  $1/2+1/2=1$  となる。ゆえに通常酸素は三重項酸素 ( $^3\text{O}_2$ ) である。不対電子をもつ物質は基本的に不安定である。酸素が 2 個の不対電子を持ったまま存在している理由は、他の物質が一重項基底状態のため、逆方向のスピンを持つ電子を同時に平衡状態で引き抜くことが不可能であるからである。

### 1-2. 活性酸素種 (ROS ; Reactive oxygen species)

活性酸素または活性酸素種 (ROS ; Reactive oxygen species) とは大気を構成する通常酸素よりも活性化された酸素およびその関連化合物のことを示す。体内に取り込まれた酸素は 4 電子還元され水となって排出されるが、その過程で ROS を産生する。その発生メカニズムは多岐に渡り、ミトコンドリア電子伝達系や小胞体電子伝達系におけるエネルギー代謝の過程、キサンチン酸化酵素などの酸化酵素が働いた場合、食細胞が異物を捕食した場合、虚血再灌流障害<sup>1)</sup>、<sup>2)</sup>、化学物質が体内に侵入した場合、紫外線や放射線を浴びた場合、喫煙、精神的ストレスや過度なスポーツによる虚血状態<sup>3)</sup>に陥った場合などが挙げられる。発生した ROS は、脂質の過酸化<sup>4)</sup> やタンパク質のカルボニル化<sup>5)</sup>、DNA へのダメージを惹起し<sup>6)</sup>、がん<sup>7)</sup> や糖尿病<sup>8)</sup>、アルツハイマー病<sup>9)</sup>、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis ; ALS)<sup>10)</sup> を惹起すると考えられている<sup>11)</sup>。このように疾患を惹起する ROS に対してヒトは ROS と鋭敏に反応し、生体へのダメージを防御する抗酸化物質や酵素を有している。

ROS は大きく分けてラジカル種と非ラジカル種に大別される。これらの ROS は酸化様式が異なる。また、フリーラジカル (Free radical) とは分子または原子の最外殻電子軌道に不対電子をもつ不安定な化合物の総称である。

### 1-3. ラジカル種

ラジカルとは不対電子を持つ酸素分子種である。ラジカル種にはスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) やヒドロキシルラジカル ( $HO\cdot$ ), NO ラジカル ( $\cdot NO$ ) などがある。

$O_2^-$  は NADPH オキシダーゼ (NOX), キサンチン-キサンチンオキシダーゼ (Xanthine oxidase; XOD) 酸化系やミトコンドリア電子伝達系で発生するラジカル種である。NOX は酸素分子を一電子還元して  $O_2^-$  を生成する酵素ファミリーである。ヒトにおいて 5 種類の NOX が存在し、いずれの場合も細胞質の NADPH から細胞外の酸素分子への電子の授受によって  $O_2^-$  を生成する。キサンチン-XOD 酸化系では XOD がヒポキサンチン及びキサンチンを水と酸素分子を用いて酸化することで尿酸に代謝している。XOD はその活性中心にモリブドプテリンを有し、基質から受け取った電子はモリブデン、2 個の鉄硫黄クラスターに渡り、最終的に過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) もしくは  $O_2^-$  が生成する (Fig. 1-1)。

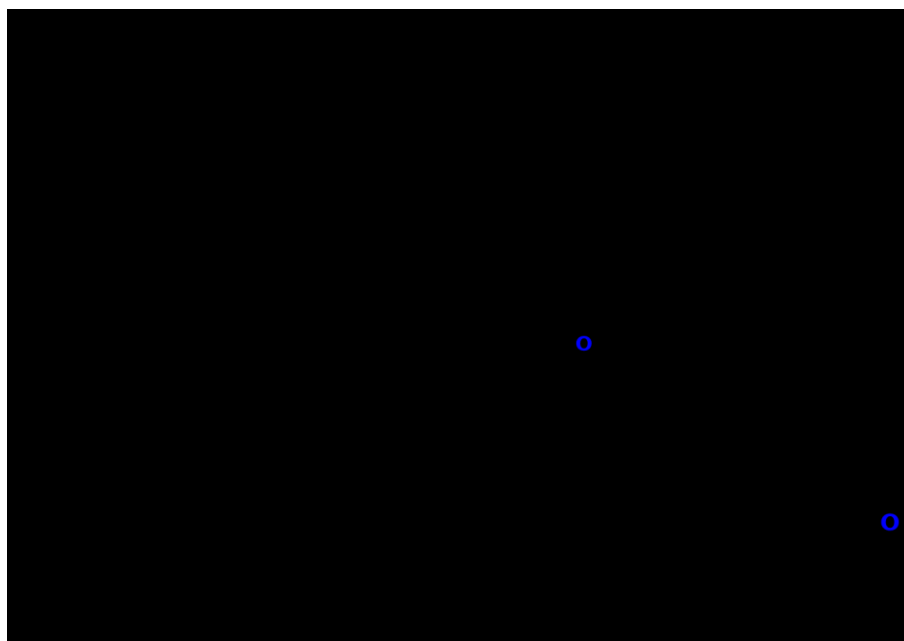
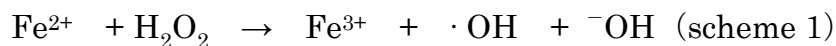


Fig. 1-1 XOD によるプリン体の代謝

ミトコンドリアは真核生物のエネルギー産生を行う。ATP 合成過程において Complex I からIVを介して酸素が水になるが、この際に  $O_2^-$  が生成する。細胞内で生成する  $O_2^-$  の大部分はミトコンドリア電子伝達系由来であるとの報告もある<sup>12)</sup>。ROS の中では反応性は低いものの、別の ROS と反応することで酸化力が高い新たな ROS を生成する原因になる。 $O_2^-$  は反応する相手がいない場合、不均化反応により過酸化水素と酸素に分解する。

$HO\cdot$  は  $Fe^{2+}$  や  $Cu^+$  などの遷移金属の存在下で過酸化水素が 1 電子還元されることで生じる活性酸素種である。この反応を Fenton 反応と言い<sup>13)</sup>、下記の式で反応する (scheme 1)。



活性酸素種の中でも反応性に富み、脂質やタンパク質などの種々の有機化合物や無機化合物から電子を引き抜いて酸化する。生じると拡散律速で近辺の物質と反応する。

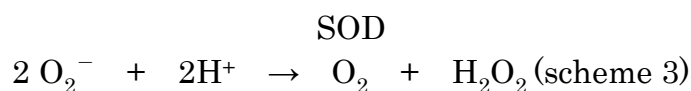
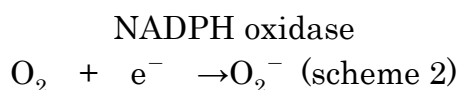
$\cdot NO$  は生体内において NO 合成酵素 (NO synthase; NOS) から生成されるラジカル種である。 $\cdot NO$  は血管内皮由来弛緩因子、神経伝達物質としての生理機能を有している<sup>14)</sup>。一方、 $\cdot NO$  は金属タンパク質や酵素の金属に対する親和性が高く、容易にニトロ化や酵素の阻害や活性化を引き起こす<sup>15, 16)</sup>。 $\cdot NO$  の大きな特徴はパーオキシナイトライト ( $ONOO^-$ ) の生成に関与することである。虚血時ではミトコンドリア電子伝達系内においてスーパーオキシドが蓄積され、同時に NOS から血管拡張作用を持つ  $\cdot NO$  の産生が促される。そして、再灌流を開始することで両者が拡散律速で反応し、 $ONOO^-$  が生成される。後述するが、 $ONOO^-$  の反応性と毒性は  $\cdot NO$  よりもはるかに高い。

過酸化水素はそれ自身はラジカルではないが、他の物質を酸化する基質になったり、複合体を生成したりすることから生体内への影響が懸念されている。また、白斑患者のカタラーゼ活性が低下していること<sup>17)</sup>、白斑部分に過酸化水素が蓄積することが報告されている<sup>18)</sup>。

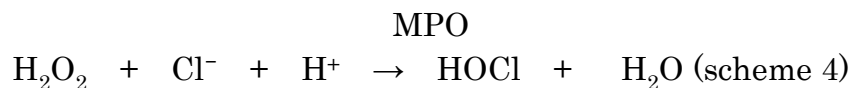
#### 1-4. 次亜塩素酸イオン ( $ClO^-$ )

次亜塩素酸イオン ( $ClO^-$ ) は生体防御機能と密接に関連している ROS である。白血球の一種である好中球は、生体内に微生物などの異物に対して活性化し、遊走性を示し、異物を貪食することで殺菌する。この際に放出されるミエ

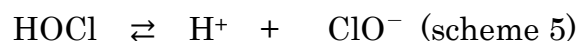
ロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase; MPO) の作用により発生する殺菌因子が  $\text{ClO}^-$  である。MPO は好中球の 1 次顆粒内に存在する酵素で、活性部位に鉄イオンを有するヘムタンパクである。MPO による  $\text{ClO}^-$  の生成は NADPH oxidase によって  $\text{O}_2^-$  が生成する呼吸バーストから開始する (scheme 2)<sup>19)</sup>。そして、生成した  $\text{O}_2^-$  は SOD によって速やかに過酸化水素へと分解される (scheme 3)。この反応は不均化反応で行われる<sup>20)</sup>。



そして、MPO の活性中心の鉄イオンが還元状態の Complex I を形成し、塩化物イオンを 2 電子還元することで HOCl を生成する (scheme 4)<sup>21)</sup>。



また、HOCl の pKa は 7.59 であるため、生体内では HOCl と  $\text{ClO}^-$  が混在している (scheme 5)<sup>22)</sup>。



#### 1-5. 一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ )

一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) は全スピン量子数が 0 の励起状態の酸素である (Fig. 1-2)。化合物の不飽和結合に対して高い反応性を有するが、ラジカルではない。三重項酸素の酸素分子に適当なエネルギーが与えられると、HOMO の 1 つの電子ス

ピンが逆向きになり，スピンの量子数は $+1/2-1/2=0$ となる．これが， ${}^1\text{O}_2$ である． ${}^1\text{O}_2$ はそのスピンの向きから2種類存在する．互いの電子スピンの向きが逆向きの場合は2つの電子が同一の軌道に入ることができ，1つの $\pi_{2p}^*$ 軌道に2個の電子が配置された場合を $\Delta^1$ 状態，一方で2つの $\pi_{2p}^*$ 軌道に電子が1個ずつ配置された場合を $\Sigma^1$ 状態という．エネルギー的には $\Sigma^1$ 状態よりも $\Delta^1$ 状態の方が安定であり，生成した $\Sigma^1$ 状態の ${}^1\text{O}_2$ も速やかに $\Delta^1$ 状態の方に遷移する．

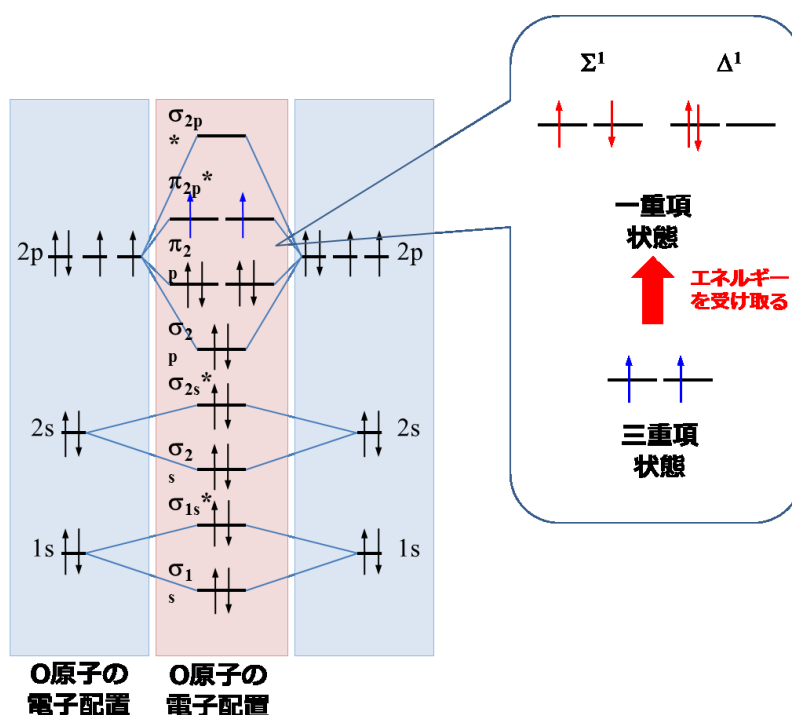


Fig. 1-2  ${}^1\text{O}_2$  の電子配置

${}^1\text{O}_2$  特有の酸化にエン反応がある．エン反応とは  ${}^1\text{O}_2$  が $\pi$ 結合そのものを攻撃して酸素分子が付加し， $\sigma$ 結合の形成とアリル水素原子の移動に伴う二重結合の移動が起こることである．生体内に存在する不飽和脂肪酸の二重結合はその間に必ずメチレン基 ( $-\text{CH}_2-$ ) を1つに挟むように導入される．オレイン酸 (18:1) やパルミトオレイン酸 (16:1) などのモノ不飽和脂肪酸 (MUFA) は分子内に二重結合を1つ有する化学構造であり，ビスアリル水素はなく，アリル水素を持っている．このアリル水素のラジカルに対する反応性はビスアリル水素の1/1000であるため，モノ不飽和脂肪酸はラジカルの攻撃に対しては比較的安定な化合物である．しかし，ラジカルに対しては安定なモノ不飽和脂肪酸も， ${}^1\text{O}_2$

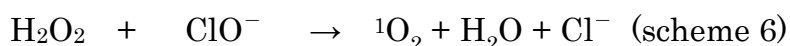
の攻撃を受けると酸化されて脂質過酸化物を生成する。例えば、オレイン酸 (18:1) は  $^1\text{O}_2$  による酸化を受け、9-OOH 体または 10-OOH 体の 2 種類の過酸化脂質を生成する。また、この場合、9-10 位間にあった二重結合はそれぞれ異性体に応じて 9-10 位 (10-OOH 体) または 12-13 位 (12-OOH 体) に移動し、両者は  $^1\text{O}_2$  に特異的な反応生成物となる。実際に、II 型糖尿病患者の血液からリノール酸の 10-OOH 体と 12-OOH 体が検出されたことが報告された<sup>23)</sup>。

一方、 $^1\text{O}_2$  は殺菌作用において重要な役割を果たす ROS でもある。中野らは  $^1\text{O}_2$  が HUVEC 細胞に対して有害ではないが、大腸菌に対して著しい殺菌作用を示すことを報告した<sup>24)</sup>。その理由として、真核細胞の呼吸鎖はミトコンドリアに内包されているのに対し、原核細胞の呼吸鎖は細胞膜付近に存在するため、細胞表面から侵入した  $^1\text{O}_2$  はミトコンドリアに達する前に無害な三重項分子酸素 ( $^3\text{O}_2$ ) に変わるためと考えられる。したがって、 $^1\text{O}_2$  は真核生物細胞に対して比較的無害な ROS と考えることができる。しかし、過剰量の  $^1\text{O}_2$  が生体に損傷を与え、脂質<sup>25)</sup>、タンパク質<sup>26)</sup>、DNA<sup>27)</sup> に酸化的損傷を引き起こし、アポトーシスも誘導することが報告されている報告がある<sup>28)</sup>。

$^1\text{O}_2$  の発生方法は大きく分けて 4 種類存在する。まず、適当な増感剤を用いて光増感反応は発生させたものがある。通常、全スピン量子数の異なる状態間の光遷移は禁制であり、また酸素分子は三重項状態と一重項状態のエネルギー差が大きいため項間交差 (熱的遷移) も起こらず、酸素分子に対する光照射のみでは  $^1\text{O}_2$  を生成することはできない。一方、ローズベンガルやメチレンブルーなどの色素が共存していると、これらの色素分子は光照射により励起された後、最低励起状態 ( $\text{S}_1$ ) から最低励起酸重項状態 ( $\text{T}_1$ ) への反応が起こり、この色素の  $\text{T}_1$  エネルギーが基底状態の酸素に移動して  $^1\text{O}_2$  が発生する。2 つ目に酸化チタンに紫外光照射し<sup>29, 30)</sup>、発生させる方法である。この方法では  $^1\text{O}_2$  の他にスーパーオキシドも生じるが、発生効率は酸化チタンの種類によって異なる。従来、酸化チタンに紫外光を照射すると主に  $\text{HO}\cdot$  が発生すると考えられていた。しかし、 $\text{HO}\cdot$  は先述したように人体に対して強い酸化ストレスを与える。一方で酸化チタンは化粧品の原料として使用されており、皮膚に塗布されて常に太陽光などの光に曝されている。このような条件下では  $\text{HO}\cdot$  が発生するため、皮膚に塗布している場合、皮膚は恒常的に  $\text{HO}\cdot$  の攻撃を受けることになる。このような状況は生体にとって極めて好ましくなく、重篤な障害が発生することが予想されるが、現在までにそのような報告はほとんどない。

このことに注目した Yamamoto らは酸化チタンに紫外光を照射して発生する活性酸素種の検討を行った。Yamamoto らはラジカル捕捉型の抗酸化物質である 2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール (BHT) および尿酸の溶液に酸化チタンを懸濁し、それに紫外光を照射して BHT 及び尿酸の経時変化を観察した。する

と BHT の濃度に経時変化が無かったに対して、尿酸は時間の経過に伴い濃度の減少が認められた。もし、この系で発生する ROS が HO $\cdot$  であれば、ラジカル捕捉能のある BHT は反応し減少すると考えられる。また、尿酸はラジカル種のみならず  $^1\text{O}_2$  とともに高い反応性を示すことが知られている。この実験結果は酸化チタンに紫外光を照射して発生する ROS は HO $\cdot$  ではなく、 $^1\text{O}_2$  であることを強く示唆している。さらに後述するが、本研究において同定した、尿酸と  $^1\text{O}_2$  との特異的反応生成物がこの系から検出されている。このことから、酸化チタン-紫外光照射の系では  $^1\text{O}_2$  が生成している。3 つ目に ClO $^-$  または ONOO $^-$  による H $_2$ O $_2$  の二電子酸化反応である。この反応では ClO $^-$  または ONOO $^-$  が 2 電子酸化剤として作用している。前者 2 つが光照射を必要としたことに対し、この反応は遮光下でも進行することから、生体内でも生じる可能性がある<sup>31, 32</sup>。例えば、前述の MPO の作用時には、基質として H $_2$ O $_2$  の存在下で ClO $^-$  が生成し、両者は近傍に存在する。そのため、その後に両者の反応により  $^1\text{O}_2$  が生成すると考えられる (scheme 6)。



4 つ目はナフタレンエンドパーオキシドの熱分解反応である。本研究では 3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid-1',4'-endperoxide (NEPO) を用いた。この NEPO とスクアレンと反応させたところ、エン反応由来の酸化物が生成したことから、 $^1\text{O}_2$  の発生が確認された<sup>33</sup>。また、この NEPO を HaCaT 細胞と HepG2 細胞に作用させたところ細胞死が誘導され、 $^1\text{O}_2$  が細胞死を惹起していると報告されている<sup>34</sup>。

#### 1-6. パーオキシナイトライト (ONOO $^-$ )

$\cdot\text{NO}$  と O $_2^-$  が拡散律速で反応して生成する (scheme 7)。強力な酸化力を有する活性酸素種の一つであり、神経毒性が強い。両者の反応速度定数は  $3.4 \sim 6.7 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であり<sup>35, 36</sup>、superoxide dismutase (SOD) が O $_2^-$  を消去する反応速度定数 ( $2 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) より速く<sup>37</sup>、 $\cdot\text{NO}$  生成が病的に増加した場合は O $_2^-$  と反応する<sup>38</sup>。また、pKa が 6.8 であり、プロトン化されると ONOOH となる。ONOOH にはシス型とトランス型があるが、大部分は NO $_3^-$  となり、ニトロ化を引き起こす (Fig. 1-3)。また、わずかに  $\cdot\text{NO}_2$  ラジカルと HO $\cdot$  も生成するとされている。



ONOOH は HO· と同様に、細胞膜の脂質を攻撃し脂質過酸化を引き起こすだけでなく、DNA のリボースの水素原子を引き抜き、DNA に障害を与える<sup>39,40)</sup>。このことから、ONOO<sup>-</sup>が関与している疾患が多数報告されている。神経疾患として、ALS<sup>41,42)</sup>、アルツハイマー病<sup>43)</sup>、ハンチントン病<sup>44)</sup>、脳塞栓症<sup>45)</sup>、循環器疾患として心筋炎<sup>46)</sup>、心臓移植<sup>47)</sup>、動脈硬化症<sup>48)</sup>、糖尿病性腎症<sup>49)</sup>、呼吸器疾患としてARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome)<sup>50)</sup>、消化器疾患として炎症性腸疾患<sup>51)</sup>、急性胃粘膜障害<sup>52)</sup>、その他に慢性関節リュウマチ<sup>53)</sup>、敗血症<sup>54)</sup>、アレルギー性鼻炎<sup>55)</sup>などに ONOO<sup>-</sup>が関与しているとされている。

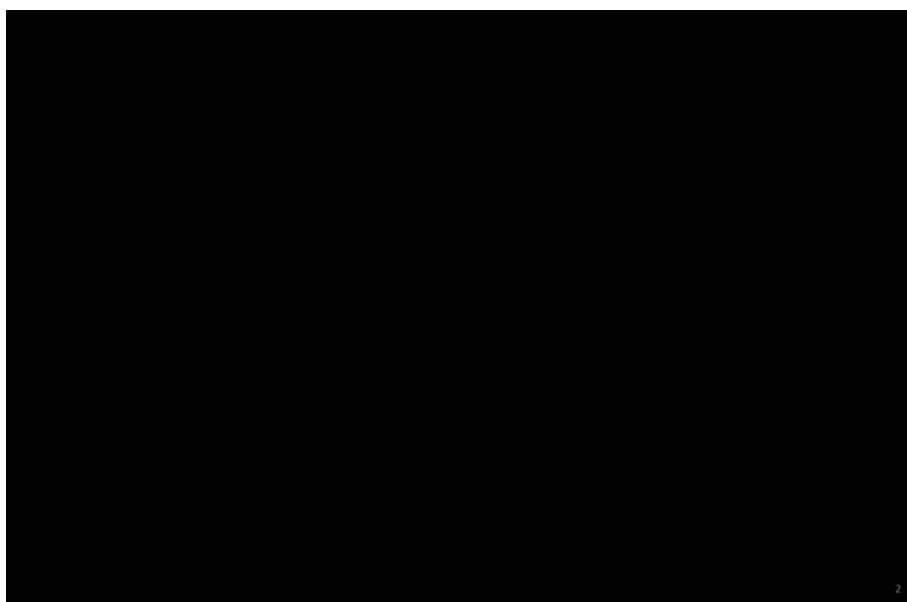
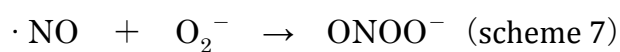


Fig. 1-3 ONOO<sup>-</sup>の化学的性質

#### 1-7. 抗酸化反応

これらの ROS からのダメージを防ぐために生体内では抗酸化反応が起こっている。抗酸化反応には、スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase; SOD) やグルタチオンペルオキシダーゼ (Glutathione peroxidase)<sup>56)</sup>、カタラーゼ (Catalase) などの抗酸化酵素やコエンザイム Q10 (Coenzyme Q10; CoQ10) やグルタチオン、ビタミン C、尿酸、ビタミン E などの抗酸化物質によるものがあげられる。

### 1-8. 抗酸化酵素

$O_2^-$  に対しての防御機構として SOD があげられる。SOD は不均化反応を触媒し、 $O_2^-$  を  $H_2O_2$  に還元する。SOD には 3 種類存在する。Cu,Zn-SOD (SOD1) は各組織の細胞質で恒常的に発現している SOD であり<sup>57, 58</sup>、特に血清中に存在する Cu,Zn-SOD は EC-SOD (extracellular-SOD, SOD3) と呼ばれる。そして、Mn-SOD (SOD2) はミトコンドリアに局在し、酸化ストレスに応じて誘導される SOD である。SOD 活性と寿命には正の相関があることが報告されている<sup>59</sup>。また、 $H_2O_2$  はカタラーゼにより分解される。カタラーゼはペルオキシソームに局在するヘムタンパク質である。また、グルタチオン存在下で過酸化脂質や  $H_2O_2$  をアルコール体への還元と水への分解をグルタチオンペルオキシダーゼ (Glutathione peroxidase; Gpx) は生体体に広く分布している。Gpx は活性中心にセレノシステインを持ち、SeH 基が過酸化物をアルコールへ還元するとともに自身は SeOH へと酸化される。SeOH はグルタチオンから電子を受け取ることで還元型の SeH に再生される。これを繰り返すことで生体内へのダメージを防いでいる。

### 1-9. 抗酸化物質

CoQ10 やビタミン E は脂溶性抗酸化物質であり、還元型グルタチオンや還元型ビタミン C であるアスコルビン酸は水溶性抗酸化物質である (Fig. 1-4)。これらはラジカルに対して抗酸化作用を発揮する。ビタミン E は天然に存在する重要な脂溶性抗酸化物質である。現在までに 10 種類の同族体が発見されているが、中でも最も生理活性が高い化合物は  $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc) である。脂溶性の  $\alpha$ -Toc は  $\alpha$ -Toc と選択的に結合する  $\alpha$ -Toc 輸送タンパク質 ( $\alpha$ -Tocopherol transfer protein;  $\alpha$ -TTP) によって生体内に取り込まれている<sup>60</sup>。この  $\alpha$ -TTP は肝臓の他に脳神経細胞、皮膚に存在し、また妊娠中に生育する胎盤 (placenta) に極めて多く発現していることが知られている。

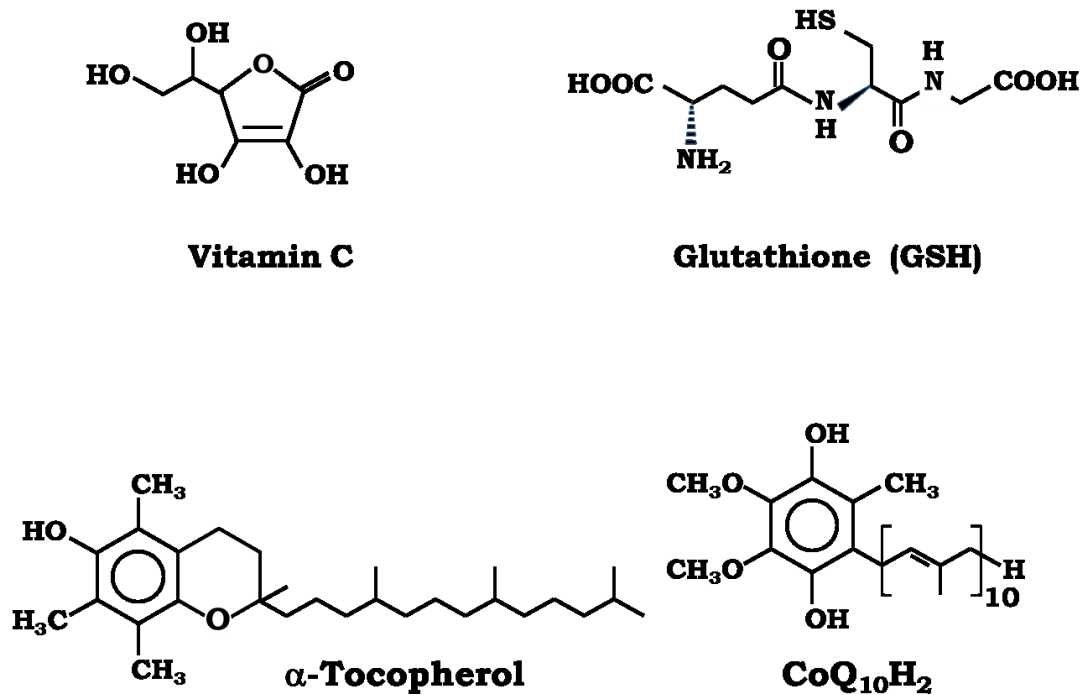


Fig. 1-4 各抗酸化物質の化学構造

ビタミン C であるアスコルビン酸は重要な水溶性の抗酸化物質である。ビタミン C の「C」は柑橘類を表す「Citrus」の頭文字で、ヒトは進化の過程で生合成経路を失った。これが欠乏すると壊血病という出血性の障害に陥る。ビタミン C の酸化電位はビタミン E よりも低いため、ビタミン E ラジカルの還元が可能であり、このことから生体中ではビタミン E による抗酸化を補助する役割もあると考えられている。

CoQ10 は生体中においてキノンに酸化された酸化型 CoQ10 とヒドロキノンに還元された還元型 CoQ10 (ユビキノール) (Fig. 1-5) として存在し、非常に重要な抗酸化物質として働いている。CoQ10 はヒト体内でエネルギー産生や抗酸化的防御に重要な役割を果たしている。還元型 CoQ10 は脂質パーオキシラジカルを補足するだけでなく、ビタミン E ラジカルを補足し、還元する (Fig. 1-6) 。これは $\alpha$ -Toc よりも酸化電位が低いことから予想される。

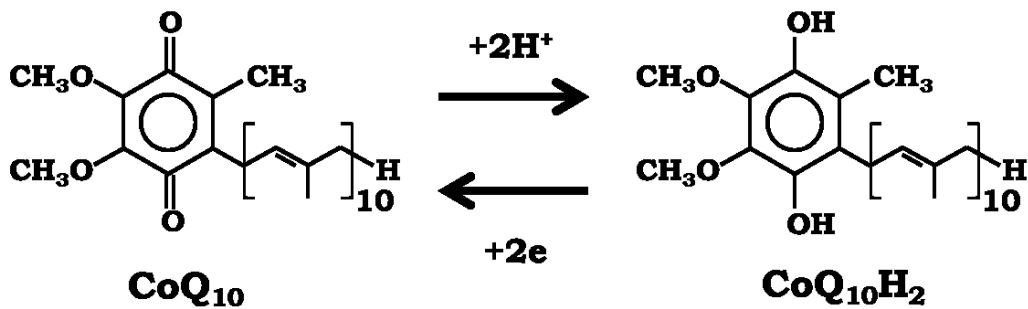


Fig. 1-5 酸化型および還元型 CoQ10 の化学構造

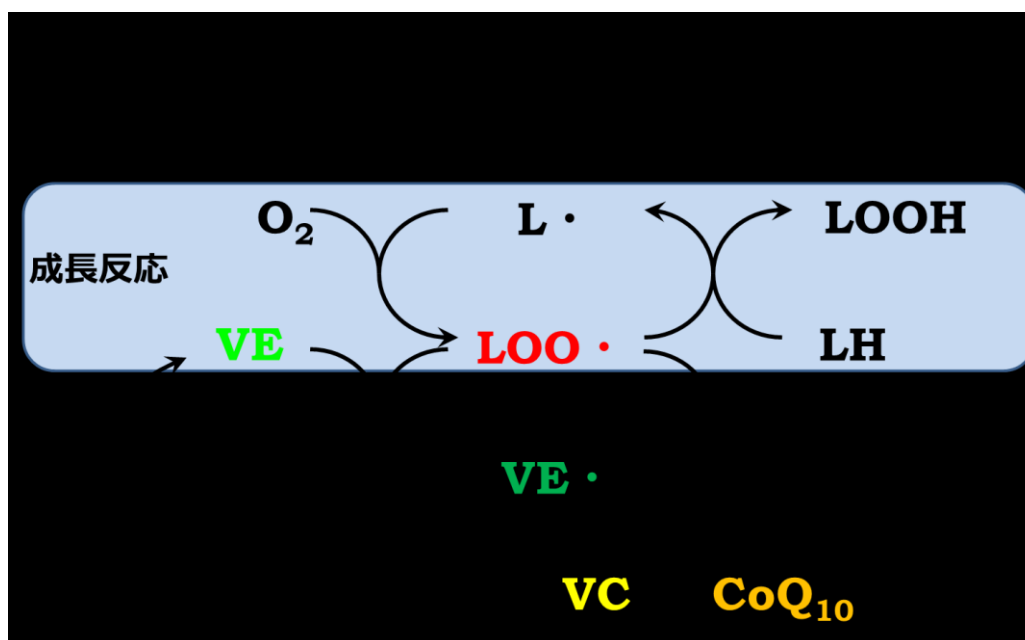
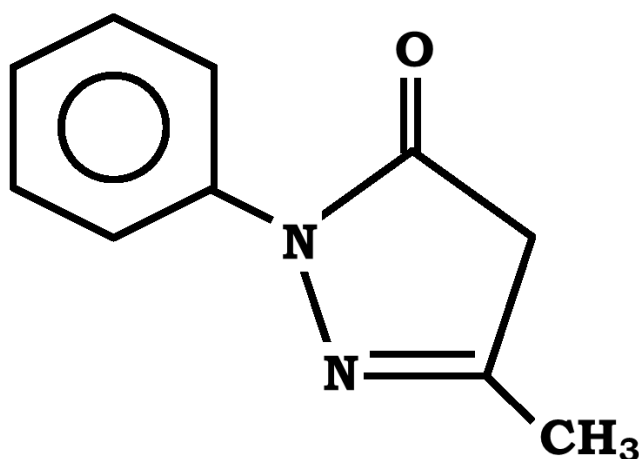


Fig. 1-6 還元型 CoQ10 のラジカル捕捉機構

グルタチオンは水溶性抗酸化物質であるが、CoQ10 などのように 1 種類の ROS だけを消去するものではない。ラジカル種以外にも ClO<sup>-</sup>や ONOO<sup>-</sup>をも消去する。その理由としてグルタチオンの構造内に存在するスルフィドやチオール基が関係している。

治療薬として合成され、使用されている抗酸化物質にエダラボンがある (Fig. 1-7) <sup>61)</sup>。エダラボン (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) は (株) 三菱ウェルファーマ (現: 田辺三菱製薬 (株)) から世界初のフリーラジカルスカベンジャー薬として、2001 年 6 月より販売されている。エダラボンはほぼ白色の結

晶である。エダラボンは互変異性によってアミン型、ケト型、エノール型の構造を持つ。pKaが7.0であるため、生体内ではエノール型とアニオン型がほぼ等量ずつ存在すると考えられる。リポソーム（生体膜モデル）中において脂溶性ラジカル、水溶性ラジカルのいずれに対しても内因性抗酸化物質よりもエダラボンの抗酸化活性が高く、さらに共存系においてはさらに抗酸化能は高くなるということが明らかになっている<sup>62)</sup>。これらの物理化学的性質により、エダラボンは細胞質のような親水性条件および細胞膜のような親油性条件の両方に分布すると考えられる。エダラボンは水溶性および脂溶性ペルオキシラジカルに加え、ONOO<sup>-</sup>とも反応する<sup>63-65)</sup>。in vivoにおけるONOO<sup>-</sup>のスカベンジャーは、第一に尿酸が挙げられる。しかし、エダラボンはONOO<sup>-</sup>に対して、尿酸よりも30倍高い反応性を有していることが明らかになっている<sup>65)</sup>。加えて、エダラボンはニューロンに保護効果を示したり<sup>66)</sup>、グリア（小膠細胞、星状細胞、希突起膠細胞）<sup>67-69)</sup> および血管内皮細胞を酸化ストレスから保護し、活性化したグリア細胞の炎症反応を抑制したりすることが報告されている。また、2016年、NagaseらによってALS患者にエダラボンを投与すると、症状の改善と、血漿中尿酸レベルが回復傾向あることが報告された<sup>70)</sup>。このことはALSにONOO<sup>-</sup>が強く関与していること、そしてエダラボンが生体中でONOO<sup>-</sup>を消去していることを示唆している。そして、2015年に日本と韓国にて、2017年にアメリカにてALSの治療薬として認可された。



**3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (Edaravone)**

Fig. 1-7 エダラボンの化学構造

#### 1-10. 酸化ストレス・マーカー

酸化ストレス (Oxidative stress) とは、生体内の酸化と還元バランスが崩れて酸化側に傾き、生体にとって好ましくない状態と定義されている<sup>71)</sup>。これが種々の疾病や老化の原因と考えられている。酸化ストレス研究は、生体における酸化のエビデンスとしての酸化物の検出から始まり、その後、酸化ストレスの評価法の開発と続いた。そして、今後は抗酸化療法の開発と応用へと進行していくと推察される。ここでは、最初に酸化物として脂質過酸化物や核酸の酸化物について議論する。そして、現在、優れた酸化ストレス・マーカーとして応用されているコエンザイム Q のレドックスバランス (%CoQ) について紹介する。

#### 1-11. 過酸化脂質

生体内にて最も酸化されやすいものは分子内に高度不飽和脂肪酸を有する脂質である。高度不飽和脂肪酸はラジカル種の攻撃を受けると、2つの二重結合に挟まれたビスアリル位のメチレンの水素が引き抜かれ、脂質ラジカルを生成する。この脂質ラジカルは酸素と反応して脂質ペルオキシラジカルとなり、さらに別の脂質と反応する連鎖反応が進行する。この過酸化連鎖反応はラジカル分子の重合もしくはラジカルの消去でのみ停止可能である。一方、脂質ペルオキシラジカルは脂質パーオキシドを生成し、イソプロスタンのようなプロスタグランジン類似物質を生成する<sup>72)</sup>。この過酸化脂質を測定することでラジカル種による酸化ストレスを評価する方法に TBA 法がある。Thiobarbituric acid (TBA) は酸性条件下で過酸化脂質と加熱すると、過酸化脂質の分解で生じたマロンジアルデヒドやアルケナール、アルカジエナールなどの TBA 反応性基質 (TBARS) と反応し、2分子の TBA と 1分子の TBARS が結合した化合物が生成する。この化合物は 532nm 付近に極大吸収を持つ赤色色素で、分光光度計を用いてこの赤色色素の生成量を測定することで TBARS を定量することが出来る。しかし、リノール酸過酸化物などの TBARS を生成しない過酸化脂質の定量には不向きであること、また、加熱時に新たに生じる過酸化脂質の影響があることから課題が多く残る手法である。

F<sub>2</sub>イソプロスタン (F<sub>2</sub>-isoprostane) はアラキドン酸 (20:4) のフリーラジカル生成物である<sup>73) 74) 75)</sup>。アラキドン酸は炭化水素部分に不飽和結合 4つ有する脂肪酸であり、極めて酸化を受けやすいことが知られている。通常、シクロオキシゲナーゼ (COX) の作用で酵素的に酸化され、プロスタグランジン類、さらにロイコトリエン類へと代謝され、これらは重要な生理活性物質となる。しかし、これらはラジカルにより自動酸化を受けることで F<sub>2</sub>イソプロスタンとな

ることが知られ、脂質過酸化のマーカーとして応用されている。

また Yamamoto らは、過酸化脂質の微量分析法として、HPLC とイソルミノールを用いた化学発光法を組み合わせた手法を開発している。この手法により健康人血漿を分析したところ、コレステロールエステルの過酸化物が約 3nM 程度存在することが明らかになっている<sup>76)</sup>。

#### 1-12. 核酸酸化物

DNA 損傷の酸化ストレス・マーカーに 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) がある<sup>77)</sup>。8-OHdG は DNA を構成する塩基の一種である deoxyguanosine (dG) の 8 位がヒドロキシ化された化合物である。dG は DNA の中で最も酸化電位が低いため、酸化されやすい。このことから dG の酸化生成物である 8-OHdG が酸化ストレスを反映していると考えられること、8-OHdG が比較的安定な物質であること、そして、代謝などを受けずに尿中に排出されることから簡便に採取可能な DNA の酸化ストレス・マーカーとして使用されている。発がんリスクの評価に用いられる。DNA 上に生成した 8-OHdG は DNA 複製時にグアニン⇒チロシン変異を惹起することから、8-OHdG の増加と発がんリスクの上昇に正の相関があると報告されている<sup>78)</sup>。また、アルツハイマーと認知症の合併症患者と認知症の両者の脳脊髄液中の 8OHdG を比較すると、認知症患者の方が優位に高かったことから、酸化ストレスによる DNA 障害が惹起されたとの報告がある<sup>79)</sup>。

#### 1-13. コエンザイム Q (CoQ) のレドックス・バランス

前述したように、F<sub>2</sub>-isoprostane や cholesteryllinoleate 酸化物などの過酸化脂質、8-OH-dG などの核酸の酸化物、そしてカルボニル化タンパク質などの酸化生成物が生体試料中から検出されたことから、生体内で好ましからざる酸化反応が起きていることが推察される。しかし、生体内にはビタミン C (VC) やビタミン E (VE)、そしてコエンザイム Q (CoQ) の還元型といった抗酸化物質が豊富に存在し、これらの共存下では過酸化脂質などは生成しない。したがって、初期の酸化ストレスを評価するためには、酸化ストレスに対して鋭敏に反応する抗酸化物質の変化を追跡することが重要である。このことに着目した山本らは、血漿中のコエンザイム Q (CoQ) のレドックス・バランスが優れた酸化ストレス・マーカーになり得ると考え、電気化学検出器付き HPLC (HPLC-ECD) と白金触媒カラムを用いた酸化型および還元型 CoQ の同時分析システムを開発した<sup>80, 81)</sup>。生体内の酸化還元物質の酸化型と還元型の比率が

酸化ストレスの度合いを反映していることに注目し、生体内の CoQ10 の酸化型（ユビキノン）と還元型（ユビキノール）の比率を用いることで新規酸化ストレスのマーカーになると報告した。健常成人の血漿中のユビキノール／ユビキノン比が 96/4 であり、かなりの還元状態である。しかし、ヒトが肝炎、肝硬変を経て肝がんに至るまでにこの比率が崩れ、ユビキノールが増加することから、かなりの酸化ストレスがかかると報告されている。また、新生児は全身の虚血/再灌流のもとに誕生すると考えられているが、血漿中のユビキノンの割合は 25%程度であり、健常成人よりも有意に大きかったとも報告されている。加えて、パーキンソン病<sup>82)</sup>、ALS<sup>83)</sup>、慢性閉塞性肺疾患<sup>84)</sup>、慢性肝障害<sup>85)</sup>、においても同様にユビキノンの割合が上昇していると報告している。これらの報告のように CoQ10 のレドックス・バランスの評価は幅広く利用されている。

#### 1-14. 3-ニトロチロシン

チロシンのニトロ化体である 3-ニトロチロシン (3-NT) はチロシンの 3 位がニトロ化された化合物であり、炎症性疾患のマーカーとして応用されている。3-NT の生成には複数の経路が存在し、ONOO<sup>-</sup><sup>86)</sup>、二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>)<sup>87, 88)</sup>、塩化ニトリル (NO<sub>2</sub>Cl)<sup>89)</sup> がチロシン残基の芳香環への攻撃によりニトロ基の修飾がなされると報告されている。いずれかの場合も NOS の存在下での報告だが、二酸化炭素と ONOO<sup>-</sup> との反応で生じる中間体としてニトロソペルオキシカルボキシレート (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) を介して最終的に CO<sub>3</sub><sup>·-</sup> と NO<sub>2</sub> によって非酵素的ニトロ化される経路も報告されている<sup>90-92)</sup>。一方、このニトロ化に MPO が関与しているとの報告がある。NO<sub>2</sub>Cl が MPO から産生された HOCl による亜硝酸イオンの酸化により生成し、チロシンをニトロ化する<sup>93)</sup>。

#### 1-15. 新規酸化ストレス・マーカーの意義

前述したように酸化ストレスは種々の活性酸素種 (ROS) によって引き起こされる。ROS はヒドロキシルラジカル (HO·) などのラジカル種と、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) やパーオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) などの非ラジカル種に大別される。さらに、非ラジカル種にはこの他にも次亜塩素酸イオン (ClO<sup>-</sup>) や一重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) などがある。これらの ROS は反応機序や生成機序が異なるため、一概に酸化ストレスとして一括りにはできない。したがって *in vivo* で発生する ROS を同定することは、臨床的にも極めて意義が大きい。しかし、これらの ROS はその反応性の高さゆえに不安定であり、直接検出することは非常に困難である。そこで ROS に対して特異的な反応生成物を同定し、これをマーカー



として生体試料から検出することができれば、間接的にはあるが *in vivo* で発生する ROS の同定が可能になる。その目的に適切な基質としての条件は、ROS に対して感受性が高いこと、そして生体内にユビキタスに、かつ高濃度に存在することが必須であると考えられる。この条件を満たす化合物に尿酸がある。

#### 1-16. 尿酸

尿酸は分子式  $C_5H_4N_4O_3$ 、分子量 168.11 の有機化合物であり、常温において無臭の白色固体である。極大吸収波長は 290nm 付近に存在し、有機溶媒や中性領域以下の水溶液では難溶である。尿酸は水溶液中において互変異性により、ケト型とエノール型の構造を持つ。pKa は 5.8 であるため、血液中では 8 位のエノール性ヒドロキシ基が解離した一塩基アニオンとして存在する (Fig. 1-8)<sup>94)</sup>。尿酸はヒト生体内ではプリン体の最終代謝物であり、ヒト血液中では 120-450  $\mu\text{M}$  と高濃度で存在している<sup>95)</sup>。腎臓の糸球体でろ過された尿酸はその 9 割が再吸収されている。

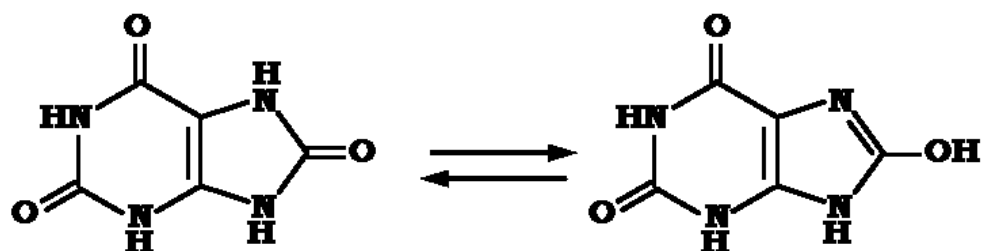


Fig. 1-8 尿酸の化学構造

尿酸は重要な水溶性抗酸化物質の一種である。ラジカル<sup>96)</sup>や  $1O_2$ 、 $ONOO^-$ <sup>97)</sup> や  $ClO^-$ <sup>98)</sup> などの様々な ROS と鋭敏に反応することが報告されている。そして、ROS の種類に応じた反応生成物を与えることも判明している。ラジカルとの反応ではアラントインが<sup>99)</sup>、 $ONOO^-$ との反応ではトリウレットが<sup>100)</sup>、 $\cdot NO$ との反応では 6-アミノウラシルが<sup>101)</sup>生成すると報告されている (Fig. 1-9)。しかし、現在までに  $1O_2$  と  $ClO^-$  との特異的反応生成物は報告されていない。

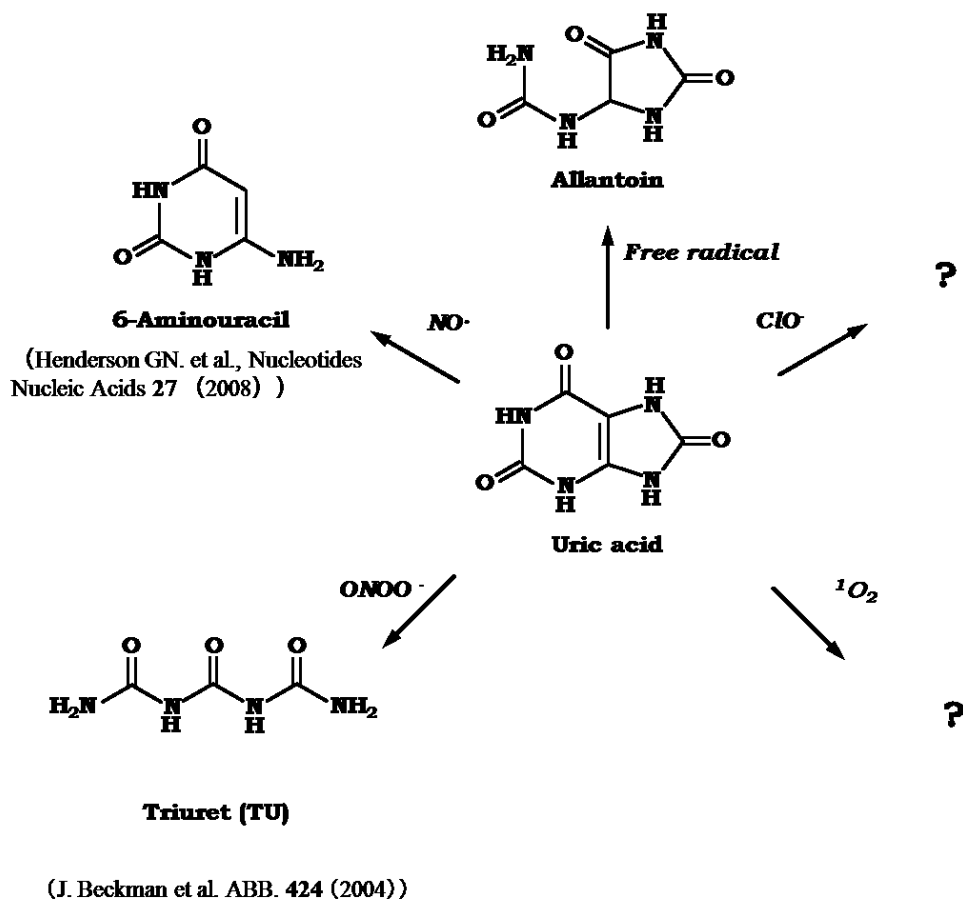


Fig.1-9 報告されている尿酸酸化生成物

酸化ストレスと神経変性疾患は密接に関係していることが示唆されている。その中でも尿酸との関連を示唆している論文が複数報告されている。痛風患者はパーキンソン病や ALS, 多発性硬化症などの神経変性疾患を発症するリスクが低いとの報告がある<sup>102)</sup>。痛風は高濃度の尿酸が体液に溶解できなくなり、関節などに尿酸が析出し定着することで炎症を生じる疾患である<sup>103)</sup>。これは過剰量の尿酸が生体中の ROS を消去し、酸化ストレスから保護していると考えられる。一方、パーキンソン病<sup>104, 105)</sup>, ALS<sup>106, 107)</sup>, アルツハイマー病<sup>108)</sup>, ハンチントン病<sup>109)</sup>, 変異型クロイツフェルト・ヤコブ病患者<sup>110)</sup>の血清中尿酸値は健常人と比べると有意に低いことが報告されている。

## 1-17. 本研究の目的

現在までに開発された酸化ストレス・マーカーの問題点は ROS の種類を評価出来ないことである。そこで、生体内に高濃度に存在し、かつ ROS と鋭敏に反応し、ROS の種類に応じた反応生成物を与える尿酸に注目した。ROS に特異的な尿酸の反応生成物を同定し、これをマーカーとして ROS を同定することを考えた。本研究では、まだ明らかになっていない  $^1\text{O}_2$  と  $\text{ClO}^-$  との特異的反応生成物を同定することを目的とした。これにより *in vivo* での ROS の同定につながると予想される。

## 第2章

尿酸と一重項酸素の特異的反応生成物  
としてのパラバン酸とオキサリ尿酸

## 第2章 尿酸と一重項酸素の特異的反応生成物としてのパラバン酸とオキサリ尿酸

### 1. 概要

尿酸 (UA) は ROS と鋭敏に反応し, ROS に応じた酸化生成物を与えることが報告されているが,  $^1\text{O}_2$  との特異的反応生成物については報告されていない. そこで UA と光増感反応で発生させた  $^1\text{O}_2$  を反応させ, 反応生成物の検索を行った. その結果, 反応生成物としてパラバン酸 (PA, Fig. 2-1A) を同定した. PA は酸性領域では非常に安定であったが, 中性および塩基性領域で加水分解を受け, オキサリ尿酸 (OUA, Fig 2-1B) となった. 一方 OUA はすべての pH 領域で安定に存在した.

次に, 酸化チタンを用いた光増感反応, ナフタレンエンドパーオキシド (NEPO) の熱分解, 過酸化水素の二電子酸化反応で生成させた  $^1\text{O}_2$  により UA を酸化させたが, いずれも PA の生成を認めたことから, PA は  $^1\text{O}_2$  由来の UA 酸化生成物であることが示された. また NEPO を用いた反応で, UA から PA への変換効率はほぼ 100% であること,  $^1\text{O}_2$  との反応効率は 1% 未満であることが分かった.

また  $^1\text{O}_2$  以外の ROS (パーオキシラジカル,  $\text{ClO}^-$  または  $\text{ONOO}^-$ ) と UA を反応させても PA の生成はほとんど認められなかったことから, PA は  $^1\text{O}_2$  特異的な UA の反応生成物であることが明らかになった.

皮膚に日光を暴露すると皮膚上の尿酸量が増加することが分かっている<sup>11)</sup>. また, ポルフィリンなどの色素増感反応により  $^1\text{O}_2$  が発生することも予想される. そこで, 日光を暴露した皮膚から PA の検出を試みたところ, 曝露後に有意にそのレベルが増加することが確かめられた.

最後に, 尿酸と  $^1\text{O}_2$  との反応経路を推定した. 尿酸の光酸化を行ったところ, PA と OUA に加えて 3 つの不明化合物 U3, U4, および U5 が検出された. それぞれを単離し, その構造を解析したところ, U3, U4 および U5 をそれぞれ, 4-*N*-carboxyaminocarbonylimino-hydantoin (4-CH), Dehydroallantoin (DHAL), および 4-Hydroxyallantoin (4-HAL) と推定した. これらのうち, 4-CH と 4-HAL は PA の直接の前駆体であることが分かった. そこで,  $^{18}\text{O}_2$  大気下および  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  溶媒中で UA の光酸化を行い, これらの生成メカニズムを推定した.

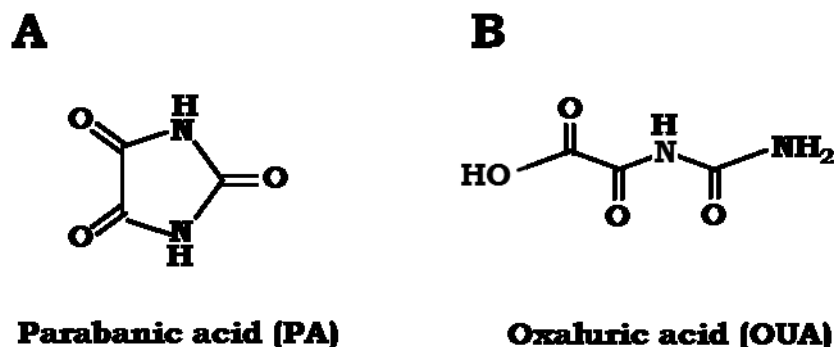


Fig.2-1 PA (A) と OUA (B) の化学構造

## 2. 実験方法

### 2-1. 標準溶液および反応溶液の調製

UA は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), パラバン酸 (PA) は MeOH に溶解し, 使用前まで 4°C に保存した. オキサール尿酸 (OUA) は PA 溶液にアンモニア水を加えて加水分解し, 全ての PA が加水分解したのちに 1M HCl で中和した. この溶液を飛行時間型質量分析計付き HPLC (LC/ time-of-flight mass spectrometry (TOFMS)) を用いて分析し, 親イオン ( $m/z = -131$ ) とそのフラグメントイオン ( $m/z = -59$ ) の推定組成から, OUA の生成を確認した.

3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-4-methyl-1-naphthyl)propionic acid (NEPO) は使用直前に MeOH に溶解し, 後述の方法でその濃度を決定した. Rose Bengal (RB) は MeOH に溶解した (10 mM). また ONOO<sup>-</sup> 発生剤である 3-(4-morpholinyl)sydnonimine hydrochloride (SIN-1) はやはり MeOH に溶解 (100 mM) して, 直前まで -25°C で保存した. ラジカル開始剤である 2',2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) はリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解して (10 mM), 使用まで 4°C で保存した.

ONOO<sup>-</sup> は Kato ら<sup>112)</sup> の方法を用いて合成した. 0.6M HCl と 0.7M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の混合溶液を調製し (10mL), 氷浴上で十分に冷却した. この溶液を冷却下で攪拌しながら 0.6M NaNO<sub>2</sub> 溶液 (10mL) と 1.5M NaOH (20 mL) を同時に加え, ONOO<sup>-</sup> を合成した. その後, MnO<sub>2</sub> を加えて攪拌し未反応の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を除去することで ONOO<sup>-</sup> の分解を防いだ. この水溶液を使用まで -25°C で保存した. 使用時には凍結により得られた黄色い層を回収して, 302nm ( $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) での吸光度から濃度を測定して (330 mM) から用いた.

酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) は三好化成の TTO-S1 および TTO-55 を用いた. <sup>18</sup>O<sub>2</sub> は太陽日酸, H<sub>2</sub><sup>18</sup>O は Sigma-Aldrich を用いた.

## 2-2. UA の光酸化反応

UA をリン酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、濃度を 50, 100, 150, 200  $\mu\text{M}$  に調製した。そこに光増感剤として Rose Bengal (10  $\mu\text{M}$ ) を加えて反応溶液とした。UVA (1.12  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) を照射し、その反応溶液を LC/TOFMS で 1 時間おきに 3 時間分析した。

その後、RB または、その代わりに酸化チタン TTO-S1 もしくは TTO-55 を加え (100  $\text{mg}/\text{mL}$ )、同様に UVA を照射し UA およびその酸化生成物の経時変化を、紫外吸光検出器付き HPLC で分析した。分析には 210 nm の吸光を追跡した。

## 2-3. PA の安定性の確認

リン酸緩衝液を 1M NaOH または 1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を用いて pH4.0-8.5 の溶液を調製した。異なった pH 溶媒で 500  $\mu\text{M}$  PA 溶液を調製し、6 時間、室温、好氣的条件下で静置し、その後 HPLC を用いて分析した。調製したサンプルは 1, 2, 4, 5, 6, 7 日後に再度分析した。

## 2-4. UA と NEPO の熱分解により発生した $^1\text{O}_2$ との反応

使用前に NEPO の純度を確認した。NEPO は熱分解により、 $^1\text{O}_2$  を生成する。熱分解後のナフタレン誘導体は 288 nm に極大吸収を有する。そこで NEPO の MeOH 溶液を熱分解させ、その前後での 288 nm の吸光度を比較し、その値から NEPO の純度を算出したところ、78% であることが分かり、以降の実験にはその値を用いた。また、35°C では、NEPO は 3 時間でほぼすべてが熱分解した。

次に UA を 50% MeOH で溶解し、50 または 100  $\mu\text{M}$  の溶液を調製した。そこに NEPO の MeOH 溶液を添加し (8.0 mM)、35°C で 3 または 12 時間加温した。1 時間おきに反応溶液を LC/MS/MS を用いて分析し、UA およびその反応生成物の経時変化を追跡した。また、この系に  $^1\text{O}_2$  のクエンチャーであるアジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ ) を加えて (1 mM)、その効果を確認した。

## 2-5. $\text{H}_2\text{O}_2$ の二電子酸化により発生した $^1\text{O}_2$ による UA の酸化

$\text{H}_2\text{O}_2$  は  $\text{ClO}^-$  などにより二電子酸化を受けると  $^1\text{O}_2$  を生成する。本実験では二電子酸化剤として、 $\text{ClO}^-$  以外に  $\text{ONOO}^-$  も検討した。その実験方法は、2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  とキレーターとして 100  $\mu\text{M}$  diethylenetriamine-*N, N, N', N'*-pentaacetic acid (DTPA) を加えた 130  $\mu\text{M}$  UA/リン酸緩衝水溶液 (pH 7.4) を調製した。そしてそこに、182 mM NaClO 水溶液を 33  $\mu\text{L}$  加えて反応させた。

NaClO 水溶液はシリンジポンプ (Harvard Apparatus, USA) を用いて一定速度 (2  $\mu\text{M}$  NaClO/ min) で注入し, 2.5 時間反応させ, その経時変化を分析した.

次に 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  と 100  $\mu\text{M}$  DTPA を加えた 150  $\mu\text{M}$  UA/ リン酸緩衝水溶液 (pH 7.4) に,  $\text{ONOO}^-$  発生剤である SIN-1 の MeOH 溶液を加えた場合 (1.0 mM) または 330 mM  $\text{ONOO}^-$  溶液を  $\text{ClO}^-$  の場合と同様にシリンジポンプで加え (2  $\mu\text{M}$  / min), 室温で 3 時間反応させ, その経時変化を分析した.

$\text{H}_2\text{O}_2$  を加えない条件でも同様な実験を行った. 経時変化は HPLC を用いて分析した.

## 2-6. UA とパーオキシラジカルとの反応

150  $\mu\text{M}$  UA/ リン酸緩衝水溶液 (pH 7.4, +100  $\mu\text{M}$  DTPA) に AAPH 溶液を加え (1.0 mM), 37°C で 3 時間加温して反応させた. その反応溶液を HPLC により経時的に分析した.

## 2-7. ヒト皮膚上の PA および OUA の検出

インフォームドコンセント後, 5 人の健常者がボランティアとしてこの研究に参加した. 日光暴露前と 2 時間暴露後に前腕皮膚表面から採取した. MeOH 1.0 mL を 5 本のガラス管に入れた. ガラス管の開放端 (20 mm) を前腕の異なる位置で皮膚に対してしっかりと押しつけ, MeOH が皮膚に 1 分間接触するように注意深くガラス管を回した. その後, 抽出液を窒素ガスで乾固し, MeOH で再溶解した後, LC/MS/MS を用いて分析した.

## 2-8. $^{18}\text{O}_2$ 大気下および $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 中での光酸化

250  $\mu\text{M}$  UA を純水に溶解し, そこに光増感剤として Rose Bengal (10  $\mu\text{M}$ ) を加えて反応溶液とした. UVA (1.12  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) を照射し, その反応溶液を LC/TOFMS で 30 分おきに 3 時間分析した.

$^{18}\text{O}_2$  由来の酸素と水由来の酸素を区別するために, 溶存酸素を  $^{18}\text{O}_2$  に置換して UA を光酸化した. UA 水溶液を調製した. 気密性を保つため, 真空コックを作製し, まず, UA 水溶液の溶存酸素を窒素するため, 窒素ガスで 3 時間バブリングして置換した. その後,  $^{18}\text{O}_2$  を加え, そこに光増感剤として Rose Bengal (10  $\mu\text{M}$ ) を加えて反応溶液とした. UVA (1.12  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) を照射し, その反応溶液を LC/TOFMS で 30 分おきに 2 時間分析した.

一方, 反応溶液の溶媒である純水を  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  に変えて UA を溶解し, そこに光増



感剤として Rose Bengal (10  $\mu$ M) を加えて反応溶液とした。UVA (1.12 mW/cm<sup>2</sup>) を照射し、その反応溶液を LC/TOFMS で 30 分おきに 2 時間分析した。

#### 2-9. HPLC-UV 分析

UA とその酸化生成物である PA, OUA および AL の定量は HPLC-UV を用いて行った。210 nm での吸収を観察した。移動相は 40 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.5), 流速は 1.0 mL/min であった。分離カラムには ODS カラム (東ソー, 5 $\mu$ m, 4.6mm $\times$ 150mm) を用いた。このカラムを使用すると, UA, PA, OUA, AL の保持時間は 7.8, 3.2, 11.0, 2.5 分であった。

#### 2-10. LC/TOFMS 分析

UA 酸化生成物の正確な質量電化比 (m/z) を測定するために, TOFMS (JMS-T100LC, JEOL) と組み合わせた HPLC を用いた。ネガティブイオン化 (ESI<sup>-</sup>) で測定し, イオン化ポテンシャルは -2000V, リングレンズ, 外部オリフィス, 内部オリフィス, そしてイオンガイドの電位はそれぞれ -5V, -10V, -5V, -500V に設定した。また, 精密質量電荷比を得るために, トリフルオロ酢酸 (TFA) を内部標準物質として使用した。

#### 2-11. LC/MS/MS 分析

pmol レベルでの微量分析を行うために LC/MS/MS (LCMS-8040, 島津) を用いた。移動相はギ酸水溶液 (pH 3.5), 分離カラムは C-30 (野村化学株式会社, 5  $\mu$ m, 250 mm $\times$ 2.0 mm), 流速は 0.2 mL/min で行った。ネガティブイオン化で測定し, エレクトロスプレープローブを用いて -3.2kV で行った。各酸化生成物の同定および定量には多重反応モニタリングで測定した。PA, OUA についての親イオン及びフラグメントイオンの最適化された組み合わせは, それぞれ -42/-113 および -59/-131 となった。また, PA および OUA の保持時間は 6.0 分と 10.5 分であった。

### 3. 結果

#### 3-1. UA と $^1\text{O}_2$ の特異的反応生成物の同定

200  $\mu\text{M}$  UA を Rose Bengal を増感剤として UVA 照射によって発生させた  $^1\text{O}_2$  と反応させたところ、経時的に UA の減少が確認された。この反応溶液をネガティブ ESI モードに設定した TOFMS を用いてフローインジェクションにより分析した。UVA 照射前には UA のイオンのみが観察されたが (Fig. 2-2A), UVA 照射 60 分後には UA に加え、3 つの不明化合物, U1, U2, U3 のイオンが観察された (Fig. 2-2B)。この時、UA 濃度は 35% に低下した。3 つの不明化合物は UA がいない条件下では生成しなかった。このことからこの 3 つの不明ピークは UA の酸化生成物であることが推察された。そこで、TFA を内部標準物質として、これらの精密質量電荷比を求め、化学組成を検討した。U1 の精密質量電荷比は  $-112.99870$  となり、化合物の組成は  $\text{C}_3\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$  と推定された。この化学式はパラバン酸 (PA) と同一のものであることから、別途、PA の標準品を分析したところ、 $-112.99868$  となった。このことから、U1 が PA であると予想した。また、反応溶液と PA の標準物質を同一の LC/MS で分析したところ、反応溶液のクロマトグラム上に PA と思われるピークを確認した。この検出時間および MS スペクトルが標準物質と一致したことから、U1 は PA であると強く考えられる。

同様に U2 の化学式は質量電荷比から  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$  となった。この化学式は PA の加水分解生成物である OUA と同一であることから、U2 は OUA であると推定した。U3 の化学式は  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_5$  であり、UA に酸素分子が 1 つ付加した化合物であると考えられる。PA にはその開裂部位から 2 種類の化合物 A と B が予想された (Fig. 2-3 中の化合物 A と B)。そこで、OUA の MS スペクトルを測定し、そのフラグメントイオンを測定したところ、 $m/z = -59$  のイオンが観察された (Fig. 2-3)。これは尿素のフラグメントイオンであり、このことから、分子内に尿素の構造を有する OUA (化合物 A) が PA の加水分解化合物であると同定した。

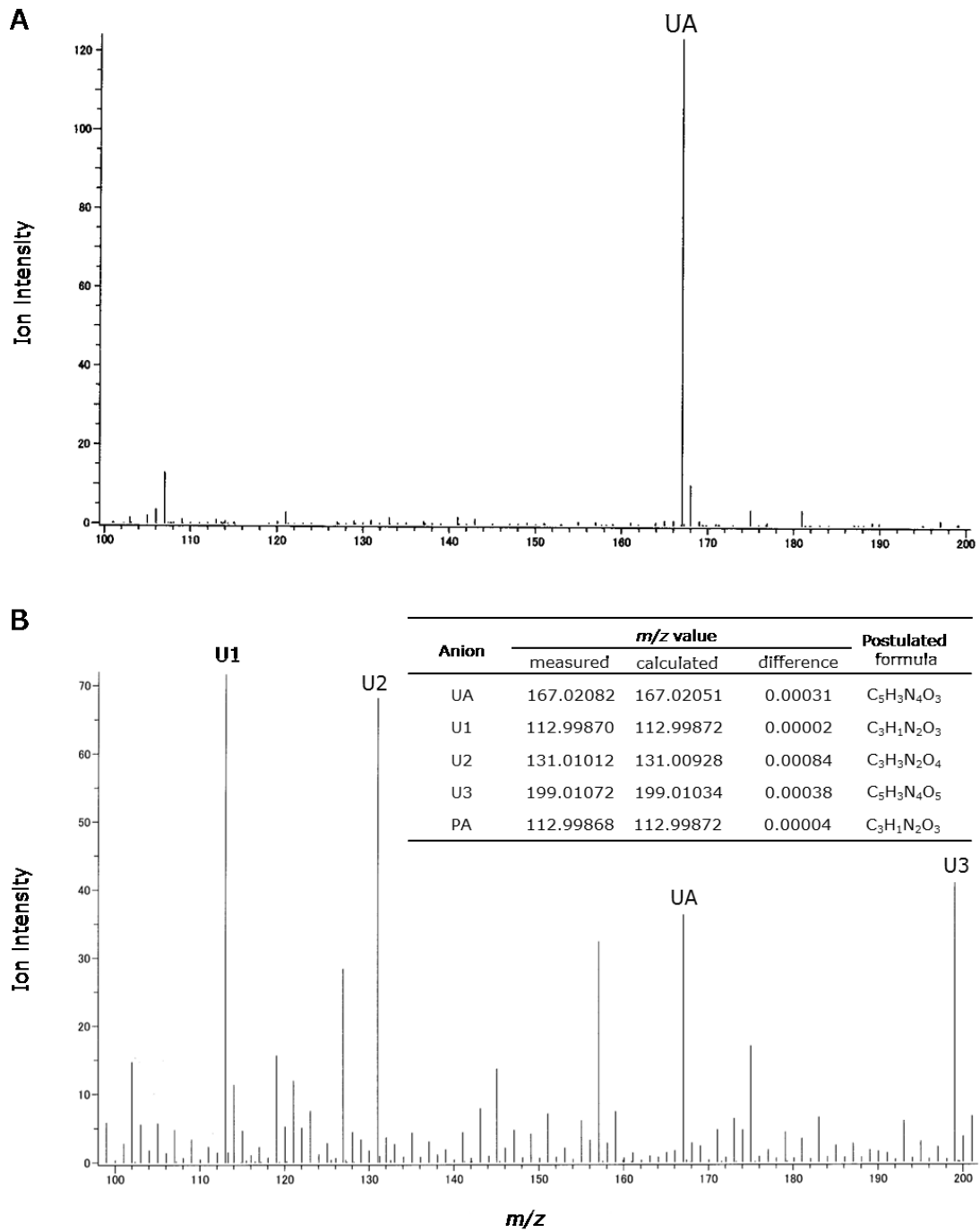


Fig. 2-2 200  $\mu$ M UA を RB-UVA 照射 ( $1.12\text{mW}/\text{cm}^2$ ) の系で発生させた  $^1\text{O}_2$  と反応させた. 反応開始 0 分 (A) と 60 分後 (B) の MS スペクトル, および, 各イオンの精密質量電荷比とそれらの推定組成 (挿入表)

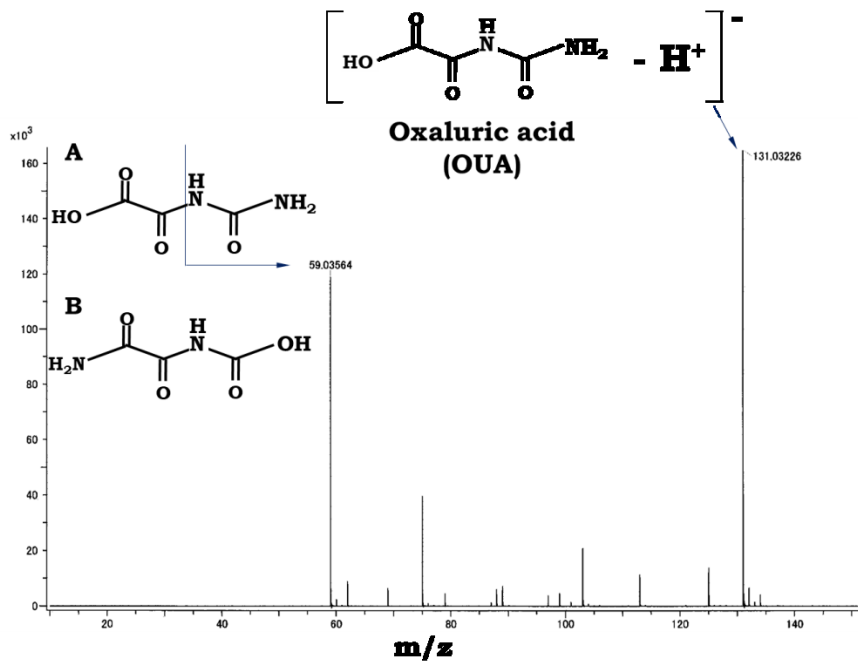


Fig. 2-3 PA の加水分解生成物である OUA の MS スペクトル

### 3-2. PA 安定性の pH 依存性と加水分解によって生じる OUA

PA の pH 安定性の検討を行った. PA は pH の上昇に伴い加水分解され, 化学量論的に OUA が生成した (Fig2-3A, B). 一方, OUA は全ての pH (4-8.5) に溶解しても少なくとも 1 週間は安定に溶液中に存在した (Fig2-3B). ここまでの結果から, UA の  $^1\text{O}_2$  酸化生成物は PA およびその加水分解生成物である OUA であると考えられる.

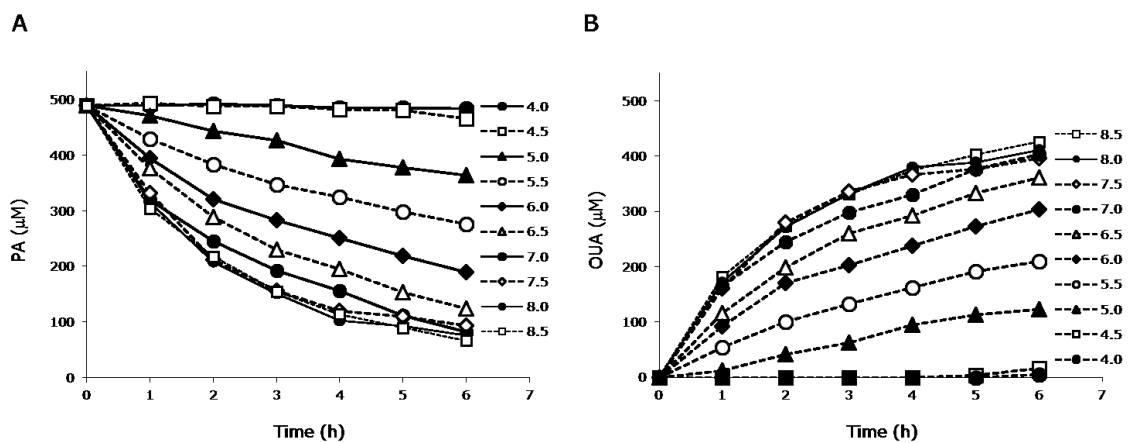


Fig. 2-3 各 pH (4.0- 8.5) における経時的な PA の加水分解 (A) とそれによって生じる OUA (B)

### 3-3. 一重項酸素による UA の酸化で生成する PA

#### 3-3-1 光酸化反応

光増感剤にローズ・ベンガルを用いて紫外光を照射したところ, UA の酸化に伴い PA の生成が観察された (Fig. 2-5). 一方, 酸化チタンに UVA 照射した場合には,  $O_2^-$ に加えて  $^1O_2$  が生成すると考えられている. そこで, RB の代わりに 2 種類の酸化チタン TTO-S1 もしくは TTO-55 を UA 溶液に懸濁し (100mg/mL), UVA を照射した. 両方の系で UA の減少と PA の生成が認められたが (Fig. 2-6), その生成率に差が生じた. 以前の検討で, 紫外光を照射時の TTO-S1 と TTO-55 における  $^1O_2$  と  $O_2^-$  の生成率 ( $^1O_2/O_2^-$ (mol/mol)) がそれぞれ 72.8 (mol/mol) と 8.9 (mol/mol) であることが分かっている. 今回, UA の減少量に対する PA の生成量の比は TTO-S1 が 61.8%であったのに対し, TTO-55 が 21.6%となった.  $^1O_2$  を多く発生させる TTO-S1 の方が PA の収率が高かったことから PA は  $^1O_2$  との反応生成物であると推察される.

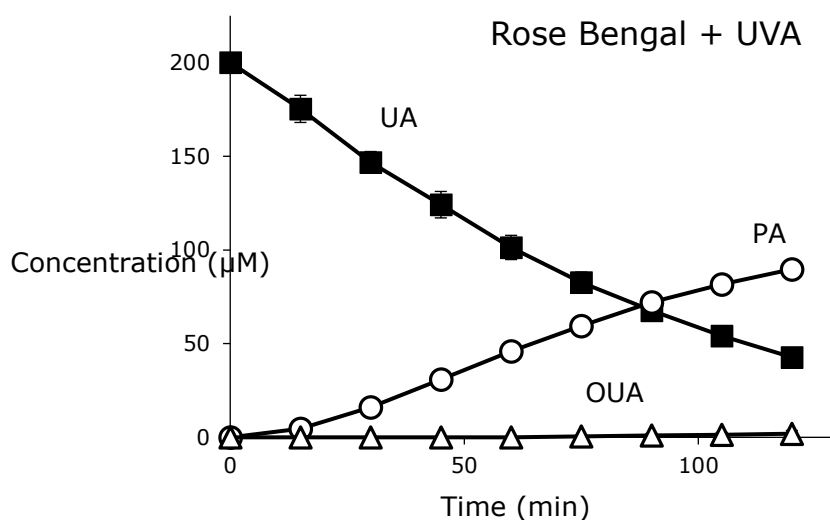


Fig. 2-5 ローズベンガルを増感剤に用いた UA の光酸化反応で減少する UA (■) と生成する PA (○).

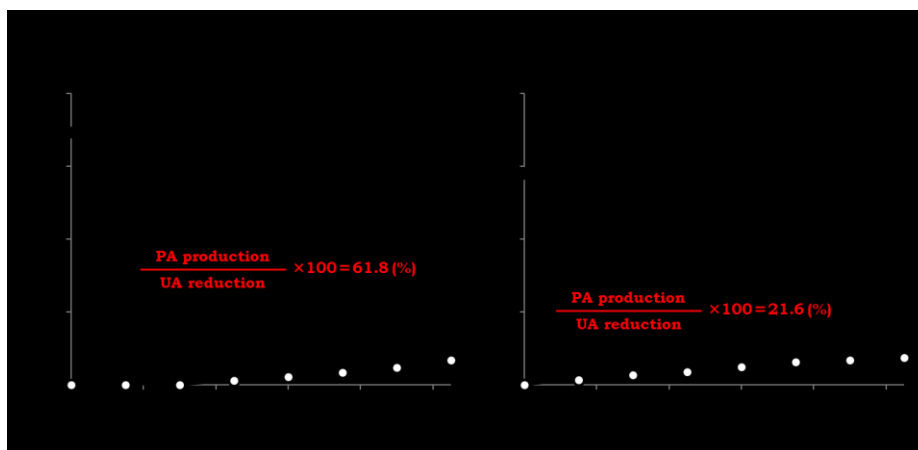


Fig. 2-6 酸化チタンを増感剤に用いた UA の光酸化反応で減少する UA (■) と生成する PA (○). 酸化チタンには TTO-S1 (A) と TTO-55 (B) を用いた.

### 3-3-2 過酸化水素の 2 電子酸化反応

$\text{H}_2\text{O}_2$  を  $\text{ClO}^-$  または  $\text{ONOO}^-$  により二電子酸化させると  $^1\text{O}_2$  とが生成することが知られている. そこでこの系で発生した  $^1\text{O}_2$  と UA との反応を検討した.  $\text{H}_2\text{O}_2$  共存下で UA と  $\text{ClO}^-$  を反応させると UA の減少と PA 及び OUA の生成を確認した.  $130 \mu\text{M}$  UA に  $2.5 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  を共存させ,  $\text{ClO}^-$  を一定速度で加えたところ, UA の減少と PA の生成を認めた (Fig. 2-7A). PA 及び OUA の収率は 56.1% となった (Table 2-1). 一方で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を共存させずに  $\text{ClO}^-$  のみと反応させると, UA 減少速度は速くなり, PA および OUA の収率は 1.3% 程度となった (Table 2-1 および Fig. 2-7B). これらの結果から,  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{ClO}^-$  の反応で  $^1\text{O}_2$  が生成し, それにより UA から PA と OUA が生成したと考えられる.

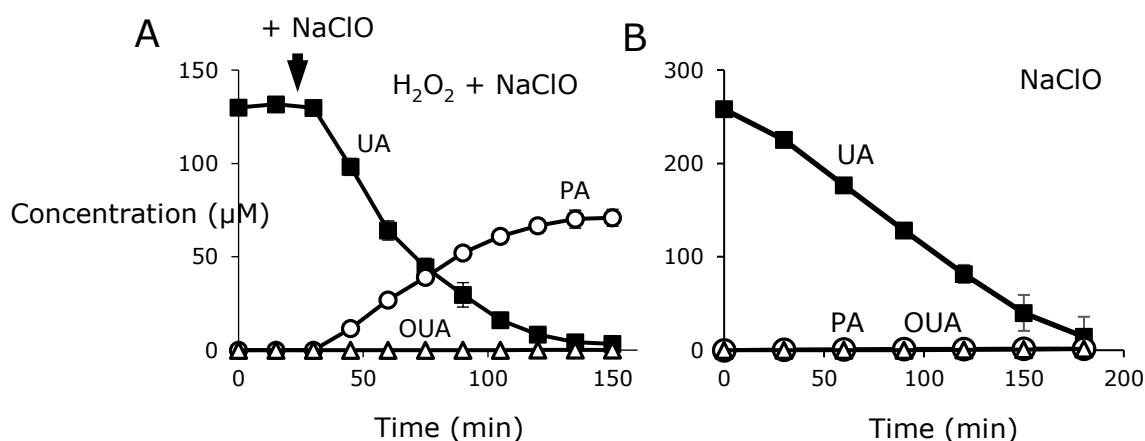


Fig. 2-7 過酸化水素と  $\text{ClO}^-$  の反応で生成した  $^1\text{O}_2$  と UA の反応における UA (■) 及び PA (○) と OUA (△) の経時変化.

また、 $\text{ClO}^-$ の代わりに  $\text{ONOO}^-$ 発生剤である SIN-1 を用いた場合にも PA および OUA の生成が認められた (Fig. 2-8A). また SIN-1 の代わりにシリンジポンプで  $\text{ONOO}^-$ を一定速度で導入した場合でも同様の結果となった. このことから  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ONOO}^-$ の系でも  $^1\text{O}_2$ が生成することを示している. また  $\text{ClO}^-$ の場合と同様に、 $\text{H}_2\text{O}_2$ が共存しない場合には PA の生成は認められなかった (Fig. 2-8B)

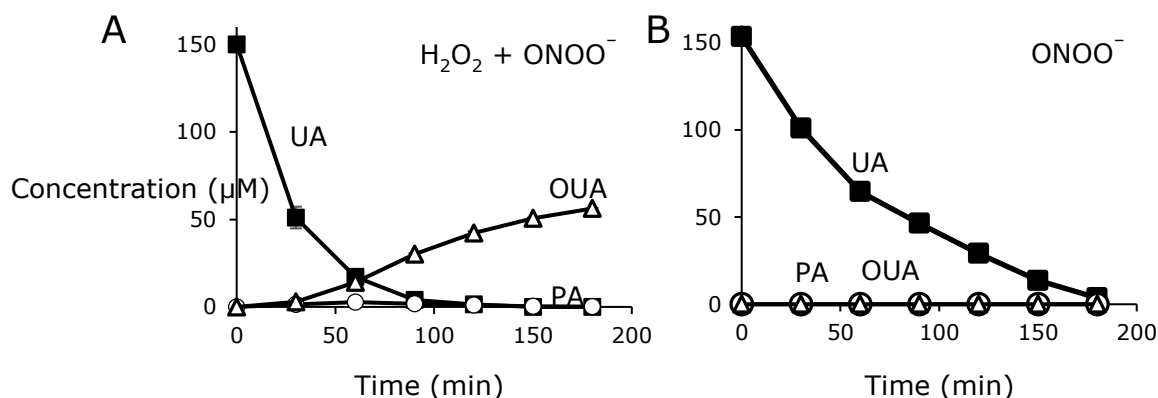


Fig. 2-8 過酸化水素と  $\text{ONOO}^-$ の反応で生成した  $^1\text{O}_2$  と UA の反応における UA (■) 及び PA (○) と OUA (△) の経時変化.

### 3-3-3. NEPO の熱分解で生成した $^1\text{O}_2$ による UA の酸化反応

3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-4-methyl-1-naphthyl)propionic acid (NEPO) は熱分解により 1 分子の NEPO から  $^1\text{O}_2$  を 1 分子放出する.  $^1\text{O}_2$  以外の活性種が出来ないことや、化学量論数が 1 であることから、動力的な解析に応用される. 50, または 100  $\mu\text{M}$  UA 水溶液に 8 mM NEPO/MeOH 溶液を 1 : 1 で混合し、35°C で 3 時間加熱して反応させた. 100  $\mu\text{M}$  UA の時の UA, PA, OUA の経時変化を示す (Fig. 2-9A). 主な酸化生成物は PA であり、微量に OUA の生成を確認した. また、UA の減少量に対する PA 及び OUA の生成量の比である収率は 66.6% となった. この系に  $^1\text{O}_2$  のクエンチャーである  $\text{NaN}_3$  を添加し、同様の実験を行うと、UA の減少と PA および OUA の生成速度が減少し、PA と OUA の収率は 13.2% となった (Fig. 2-9B). このことから、 $\text{NaN}_3$  が  $^1\text{O}_2$  をクエンチングし、PA の生成が抑制されたと推察される.

また、この場合の UA の減少に伴う PA の最終生成量は 97% 以上であり、UA と  $^1\text{O}_2$  との反応ではそのほとんどが PA に変化することが示唆された.

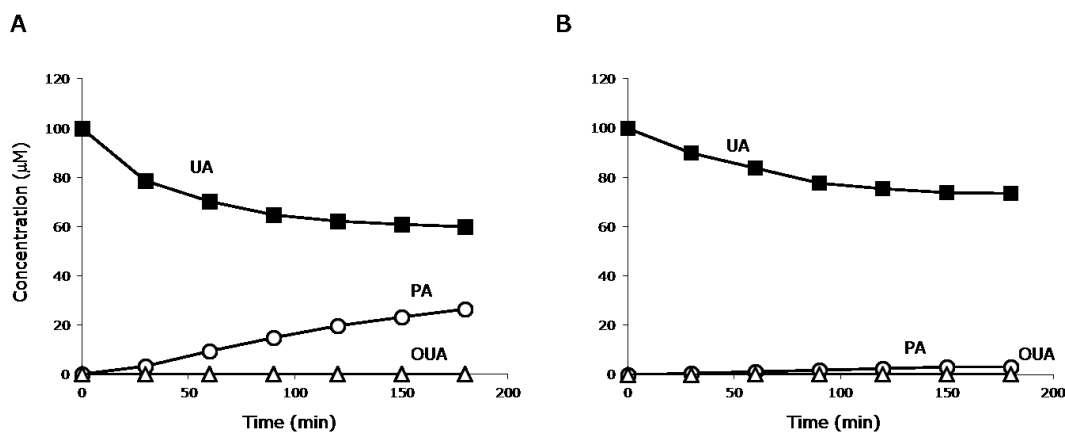
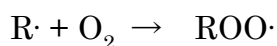
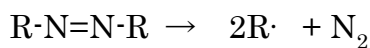


Fig. 2-9 NEPO の熱分解で生成する  $^1\text{O}_2$  による UA (■) の酸化と、それに伴う PA (○) および OUA (△) の生成 (A). および 1.0 mM  $\text{NaN}_3$  の添加効果 (B). 反応溶液は MeOH/  $\text{H}_2\text{O}$  = 50/50 (v/v), 37°C でインキュベートした.

### 3-4. UA とラジカル種との反応

AAPH 由来のアルコキシルラジカルとの反応を検討した. AAPH は熱分解により窒素が脱離し, 2つのアルキルラジカル (R) が生成する. 生成したアルキルラジカルは直ちに酸素と反応してパーオキシルラジカル ( $\text{ROO}\cdot$ ) に変換される (Scheme 2-1). UA とパーオキシルラジカルを反応させると UA が減少し, 主にアラントイン (AL) が生成することが観察された (Fig. 2-10).



Scheme 2-1

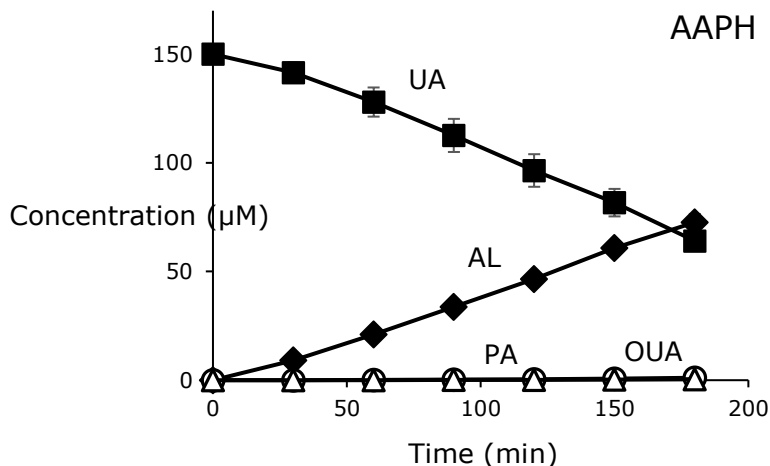
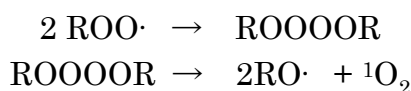


Fig. 2-10 AAPH によるパーオキシルラジカルとの反応による UA (■) の減少と PA およびアラントイン (◆) の生成.

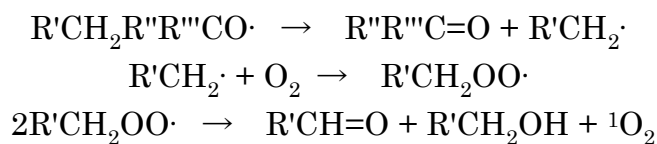


一方、この反応で PA 及び OUA もわずかに生成した。これは ROO· 同士のカップリング反応で生成した ROOOOR が分解するときにアルコキシルラジカル (RO·) と酸素分子 O<sub>2</sub> が生成するが、その一部が <sup>1</sup>O<sub>2</sub> となることが知られており (Scheme 2-1) <sup>113)</sup>、これが UA と反応して PA と OUA が生成したと推察される。



Scheme 2-2

また、この RO· はβ開裂により 1 級のアシルラジカル (R'H<sub>2</sub>C·) が生成する。これが O<sub>2</sub> と反応して 1 級のパーオキシルラジカル (R'H<sub>2</sub>COO·) になると、Russell 反応より <sup>1</sup>O<sub>2</sub> を生成する (Scheme 2-3)。これらのようにパーオキシルラジカルからも若干の <sup>1</sup>O<sub>2</sub> が生成することが予想され、この系で生成した PA はこの <sup>1</sup>O<sub>2</sub> と UA が反応して生成したと推察される。



Scheme 2-3

ここまでの結果から、UA は <sup>1</sup>O<sub>2</sub> と反応することにより、特異的及び選択的に PA が生成することが示された (Table 2-1)。

Table 2-1. Formation of PA and OUA and their yields during UA oxidation induced by different types of ROS ( $\mu\text{M}$ , mean  $\pm$  SD (n = 3))

| ROS  | [UA] <sub>0</sub> | Time (h) | $-\Delta[\text{UA}]$ | [PA]            | [OUA]            | [PA] + [OUA]    | Yield (%)      |
|--|-------------------|----------|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|
| $^1\text{O}_2$ from 8.0 mM NEPO  | 50                | 12       | 21.3 $\pm$ 1.3       | 20.4 $\pm$ 1.3  | 0.29 $\pm$ 0.07  | 20.7 $\pm$ 1.4  | 97.0 $\pm$ 2.0 |
| $^1\text{O}_2$ from 8.0 mM NEPO  | 100               | 3        | 40.0 $\pm$ 2.2       | 26.4 $\pm$ 0.9  | 0.18 $\pm$ 0.01  | 26.6 $\pm$ 0.9  | 66.6 $\pm$ 1.3 |
| $^1\text{O}_2$ from 8.0 mM NEPO + 1.0 mM $\text{NaN}_3$                              | 100               | 3        | 26.4 $\pm$ 0.4       | 3.21 $\pm$ 0.04 | 0.25 $\pm$ 0.01  | 3.5 $\pm$ 0.04  | 13.2 $\pm$ 0.2 |
| $^1\text{O}_2$ from 8.0 mM NEPO  | 100               | 12       | 44.6 $\pm$ 1.1       | 42.4 $\pm$ 0.8  | 0.57 $\pm$ 0.13  | 44.2 $\pm$ 1.2  | 99.1 $\pm$ 0.3 |
| $^1\text{O}_2$ from UVA-irradiated Rose Bengal                                       | 50                | 12       | 50                   | 7.2 $\pm$ 0.2   | 41.6 $\pm$ 0.4   | 48.8 $\pm$ 0.4  | 97.6 $\pm$ 0.8 |
| $^1\text{O}_2$ from UVA-irradiated Rose Bengal                                       | 100               | 12       | 100                  | 18.3 $\pm$ 0.4  | 78.6 $\pm$ 0.5   | 96.9 $\pm$ 0.2  | 96.9 $\pm$ 0.2 |
| $^1\text{O}_2$ from UVA-irradiated Rose Bengal                                       | 150               | 12       | 150                  | 33.1 $\pm$ 0.2  | 109.4 $\pm$ 0.1  | 142.5 $\pm$ 0.3 | 95.0 $\pm$ 0.2 |
| $^1\text{O}_2$ from UVA-irradiated Rose Bengal                                       | 200               | 2        | 157 $\pm$ 3.4        | 89.7 $\pm$ 3.6  | 1.9 $\pm$ 1.4    | 91.7 $\pm$ 5.0  | 58.4 $\pm$ 4.3 |
| $^1\text{O}_2$ from UVA-irradiated Rose Bengal                                       | 200               | 12       | 200                  | 55.7 $\pm$ 0.7  | 129.8 $\pm$ 0.1  | 185.4 $\pm$ 0.7 | 92.7 $\pm$ 0.4 |
| $^1\text{O}_2$ from 2.5 mM $\text{H}_2\text{O}_2$ + 300 $\mu\text{M}$ $\text{ClO}^-$ | 130               | 2.5      | 127 $\pm$ 0.5        | 70.9 $\pm$ 3.8  | 0.12 $\pm$ 0.003 | 71.0 $\pm$ 3.8  | 56.1 $\pm$ 3.3 |
| $^1\text{O}_2$ from 2.5 mM $\text{H}_2\text{O}_2$ + $\text{ONOO}^-$ (1.0 mM SIN-1)   | 150               | 3        | 150                  | 0.04 $\pm$ 0.01 | 56.2 $\pm$ 0.3   | 56.3 $\pm$ 0.3  | 37.0 $\pm$ 0.2 |
| Peroxyl radicals from 10 mM AAPH   | 150               | 3        | 85.9 $\pm$ 4.2       | 1.2 $\pm$ 0.1   | 0.5 $\pm$ 0.1    | 1.7 $\pm$ 0.1   | 1.9 $\pm$ 0.1  |
| $\text{ClO}^-$ (360 $\mu\text{M}$ )  | 260               | 3        | 243 $\pm$ 9.9        | 1.6 $\pm$ 0.2   | 1.5 $\pm$ 0.2    | 3.1 $\pm$ 0.2   | 1.3 $\pm$ 0.1  |
| $\text{ONOO}^-$ (1.0 mM SIN-1)   | 200               | 3        | 132 $\pm$ 15         | ND              | ND               | ND              | 0              |

ROS, reactive oxygen species; UA, uric acid; PA, parabanic acid; OUA, oxaluric acid; NEPO, 3-(1,4-dihydro-1,4-epidioxy-4-methyl-1-naphthyl)propionic acid; SIN-1, 3-(4-morpholinyl)sydnonimine, hydrochloride; ND, not detected.

### 3-5 ヒト皮膚上で生成する PA

ヒト皮膚 MeOH 抽出物を LC/MS/MS を用いて分析したところ、UA に加えて PA が観察された (Fig. 2-11). 一方で OUA は検出されなかった (Table 2-2). また、日光暴露前後で UA 及び PA レベルが増加した. これは、光酸化に対するヒト皮膚表面の保護反応であると考えられる.

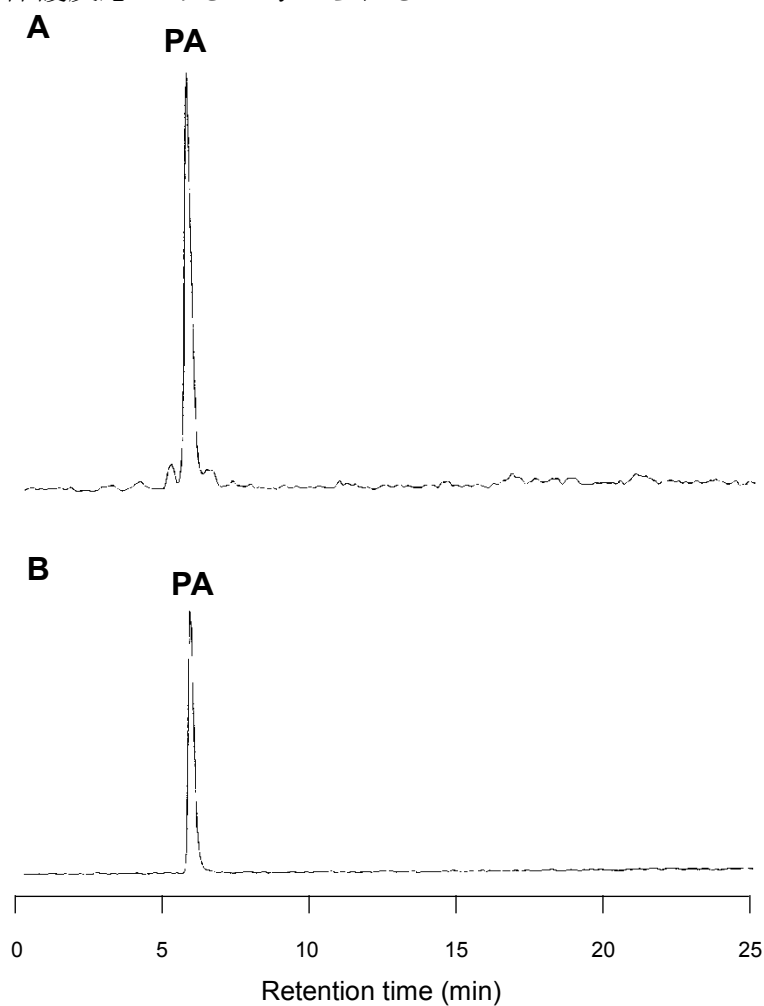


Fig. 2-11 LC/MS/MS を用いて分析したヒト皮膚のメタノール抽出液 (A) と PA の標準物質 (B).

Table 2-2. PA formation and UA secretion on human forearm skin surface exposed to sunlight for 2 h

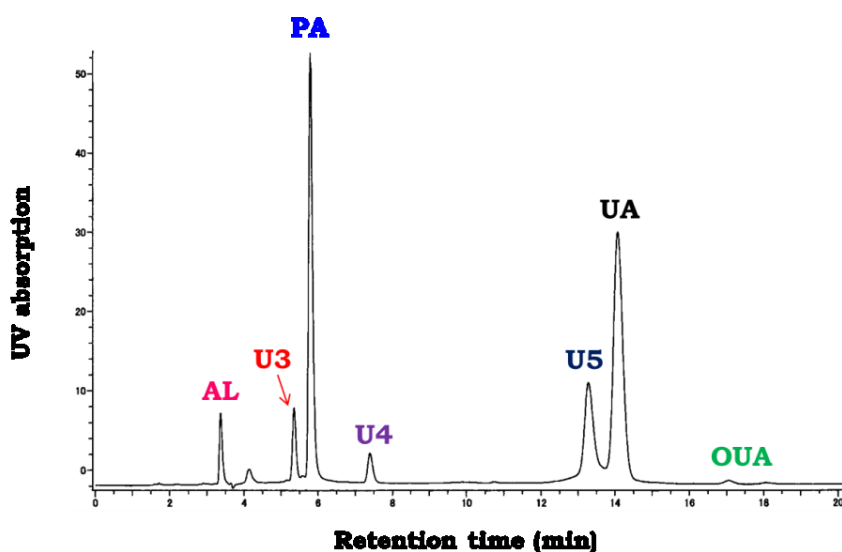
| PA (pmol/cm <sup>2</sup> ) |                 |              | UA (pmol/cm <sup>2</sup> ) |                |              |
|----------------------------|-----------------|--------------|----------------------------|----------------|--------------|
| Before exposure            | After exposure  | After/Before | Before exposure            | After exposure | After/Before |
| 0.020 ± 0.010              | 0.065 ± 0.040 * | 3.1 ± 1.2    | 13.9 ± 15.1                | 46.2 ± 30.8    | 4.8 ± 4.2    |

PA, parabanic acid; UA, uric acid; Each value represents mean ± SD (n = 5); \*  $p < 0.05$

### 3-8. UA と $^1\text{O}_2$ の反応経路の検討

250  $\mu\text{M}$  UA を Rose Bengal を増感剤として UVA 照射によって発生させた  $^1\text{O}_2$  と反応させたところ、経時的に UA の減少が確認された。この反応溶液をネガティブ ESI モードに設定した LC/TOFMS を用いて分析した。UA, PA, OUA, U3 に加えて、新たに 2 つの不明化合物である U4, U5 が観察された (Fig. 2-12 A, B)。U3 は前述したとおり、精密質量電荷比は  $-199.01072$ 、その化学式は  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_5$  であり、UA に酸素分子が 1 つ付加した化合物であると考えられる。同様に、U4 の精密質量電荷比は  $-155.01855$ 、化学式は  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$  であり、Dehydroallantoin (DHAL) であると考えられる (Fig. 2-13)。U5 の精密質量電荷比は  $-173.03023$ 、化学式は  $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_4$  であり、4-Hydroxyallantoin (4-HAL) と推定した (Fig. 2-14)。

**A**



**B**

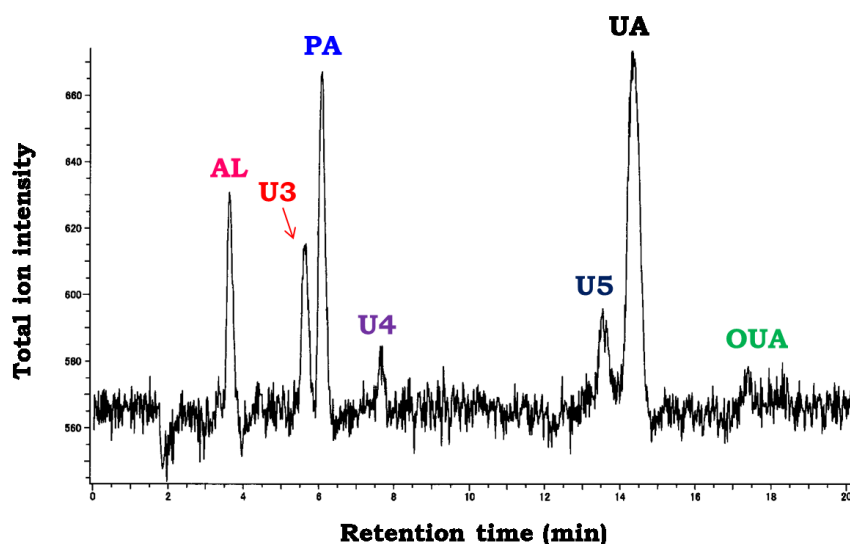


Fig. 2-12 250  $\mu\text{M}$  UA を RB-UVA 照射 ( $1.12 \text{ mW}/\text{cm}^2$ ) の系で発生させた  $^1\text{O}_2$  と反応させ、反応開始 60 分後の UV210nm のクロマトグラム (A) とトータルイオンクロマトグラム (B)

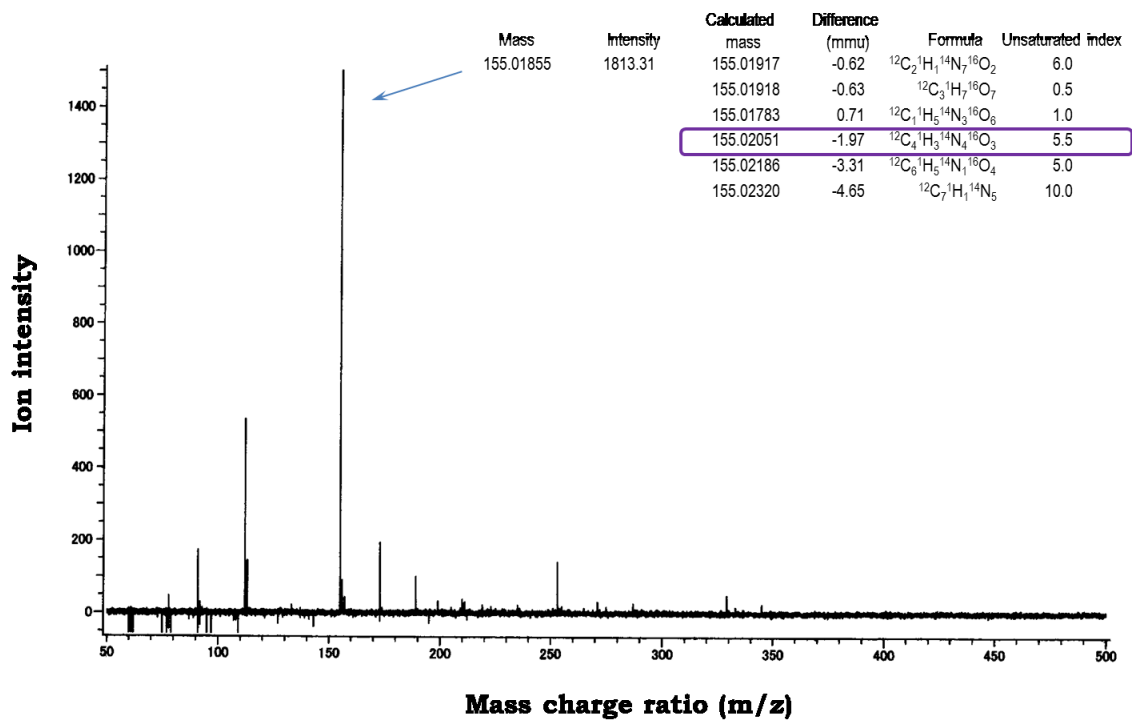


Fig. 2-13 U4 の MS スペクトル, および精密質量電荷比と推定組成 (挿入表)

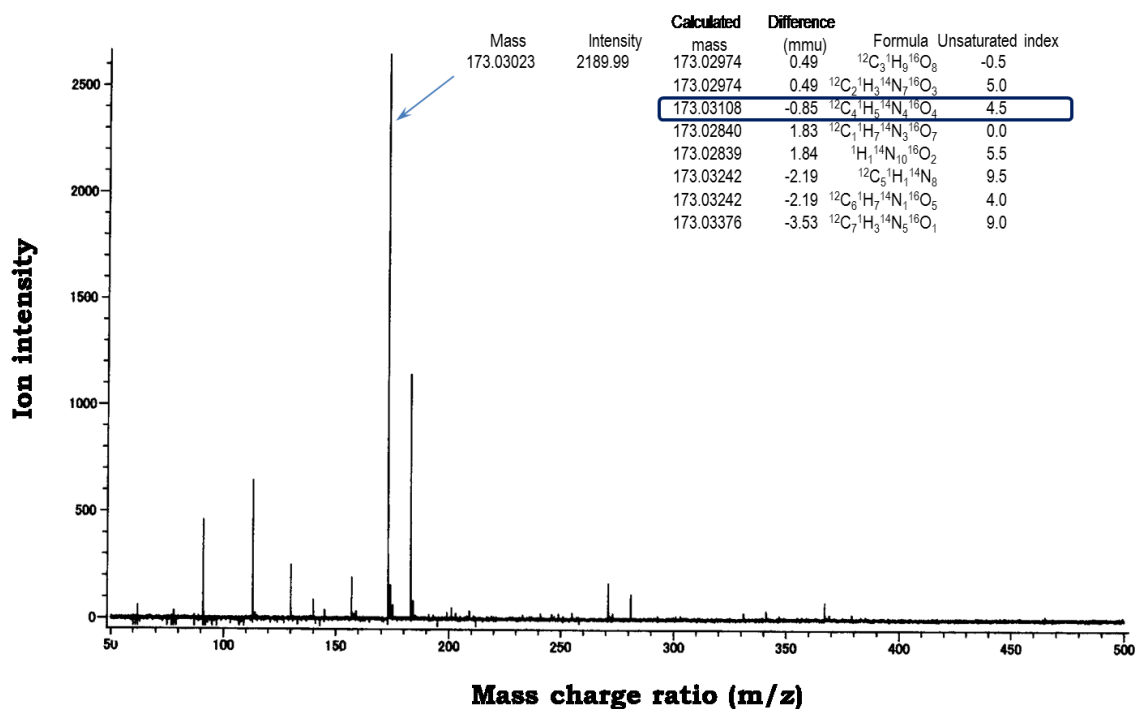


Fig. 2-14 U5 の MS スペクトル, および精密質量電荷比と推定組成 (挿入表)

次に、U3, DHAL, 4-HAL をそれぞれ単離した。その後、常温で静置または NaOH で pH を変化させた後、同様に放置し、HPLC-UV を用いて分析した。U3 は中性以上の pH 条件下では不安定であり、分解して PA 及び OUA に変化した (Fig. 2-15 A, B, Fig. 2-16A, B)。しかしながら、PA 及び OUA 以外にピークは検出されなかった。U3 を全て PA 及び OUA に変化させ、そのマス・バランスをまとめたところ、一定値をとった (Fig. 2-16 C)。このことから、U3 は PA の直接の前駆体であると推察される。次に、4-HAL を分取したところ、pH が酸性条件下では安定に存在した。しかし、NaOH を添加したところ、4-HAL は分解し、PA 及び OUA が検出された (Fig. 2-17 A, B, Fig. 2-18 A)。4-HAL を全て PA 及び OUA に変化させ、そのマス・バランスをまとめたところ、一定値をとった (Fig. 2-18 B)。このことから、4-HAL もまた、PA の直接の前駆体であると推察される。最後に、DHAL のピーク部分を単離すると、DHAL が検出されず、4-HAL と PA が検出された (Fig. 2-19)。DHAL は非常に不安定であり、分取した途端に分解していることが示唆された。

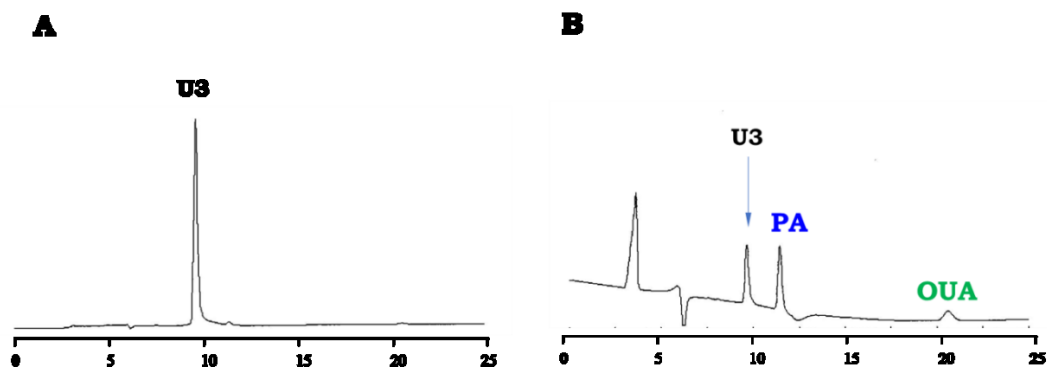


Fig. 2-15 U3 分取後 (A) と NaOH 添加後 (B) のクロマトグラム

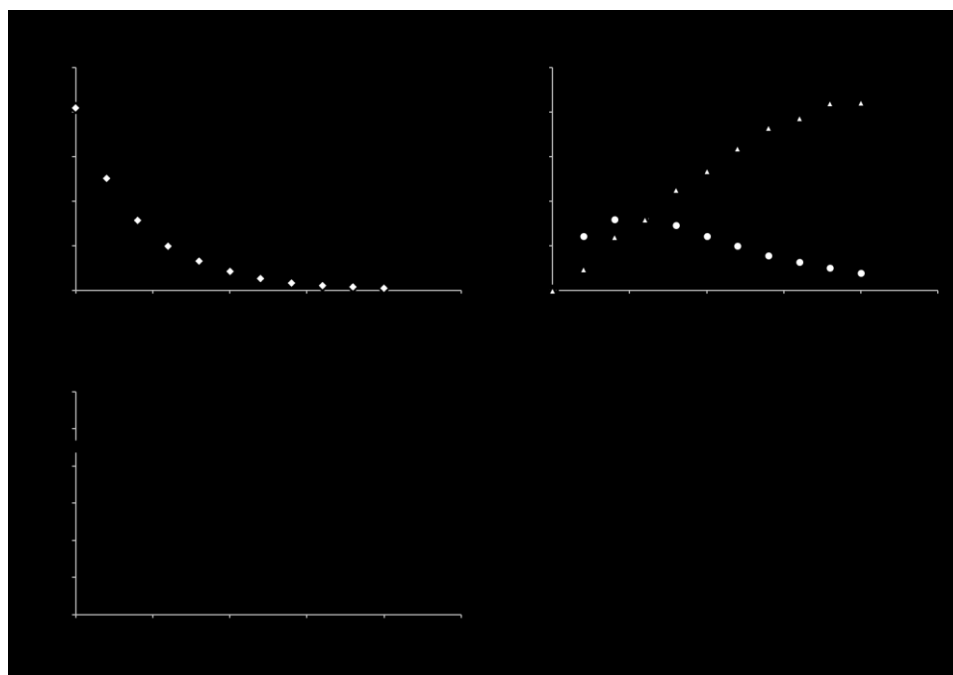


Fig. 2-16 U3 ( $\diamond$ ), PA ( $\circ$ ) 及び OUA ( $\triangle$ ) の経時変化 (A, B) と各マス・バランス (C)

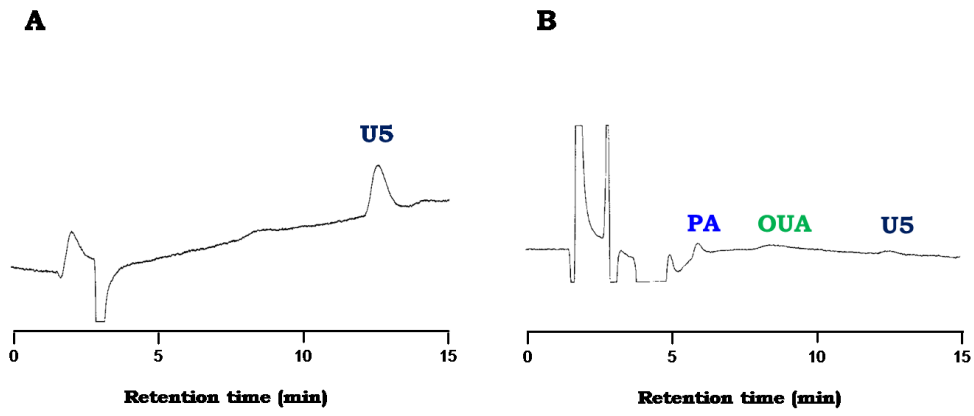


Fig. 2-17 U5 分取後 (A) と NaOH 添加後 (B) のクロマトグラム

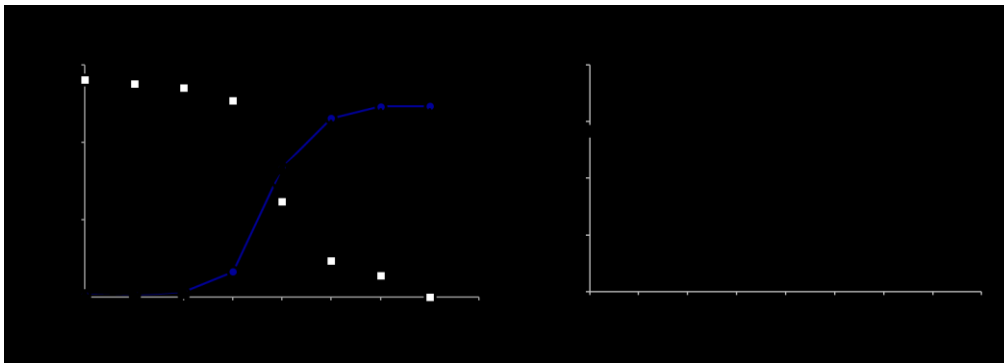


Fig. 2-18 U5 (□) と PA 及び OUA (●), 尿素 (▲) の経時変化 (A) と U5 と PA 及び OUA の MS バランス (B)

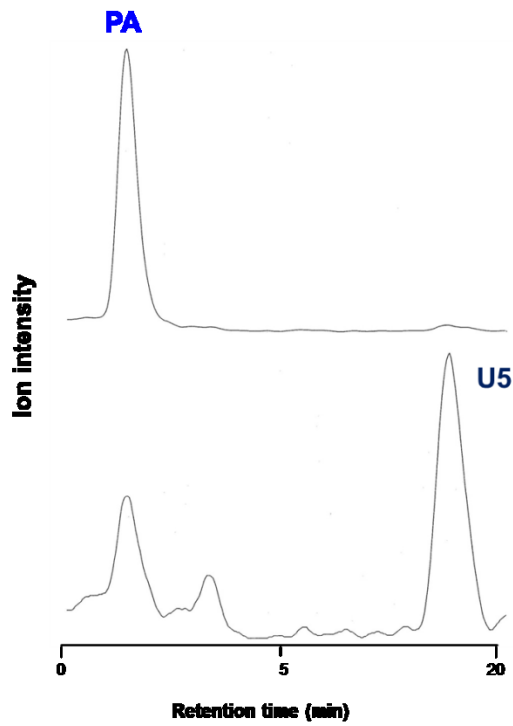


Fig. 2-19 U4 分取後のクロマトグラム

次に U3 の構造を推定するために  $^{16}\text{O}_2$  の安定同位体である  $^{18}\text{O}_2$  中での光酸化を行い、これらの反応生成物の組成を求めた。溶存酸素を  $^{18}\text{O}_2$  に完全に置換し光酸化したところ、通常酸素中での光酸化と同様に U3 と PA, DHAL, および 4-HAL の生成を認めた (Fig. 20, 21)。そして、U3 (Fig. 22A), PA (Fig. 22B), DHAL, および 4-HAL (Fig. 22C) いずれも  $^{18}\text{O}$  の一置換体のみが生成していることが明らかになった。一方で、通常の大気下で水の安定同位体  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  中で同様の光酸化を行った場合も U3 と PA, DHAL, および 4-HAL の生成を認めたが (Fig. 23, 24), PA (Fig. 25), U3 (Fig. 26), と 4-HAL (Fig. 28), は  $^{18}\text{O}$  一置換体が検出され、DHA には  $^{18}\text{O}$  が導入されなかった (Fig. 27)。これらのことから、U3 に導入された 2 つの O 原子のうち、1 つは  $^{16}\text{O}_2$  から、もう 1 つは溶媒の  $\text{H}_2\text{O}$  から導入されていることが推察された。

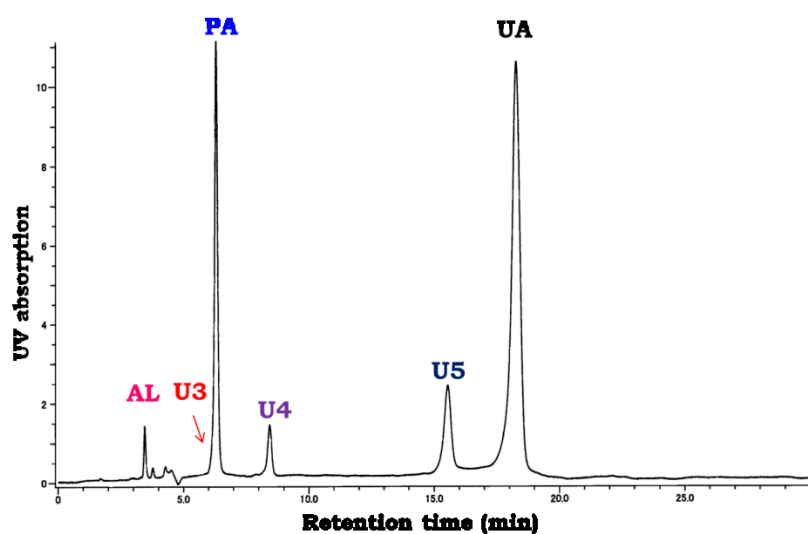


Fig. 2-20  $^{18}\text{O}_2$  条件下における UA と光酸化反応の UV クロマトグラム

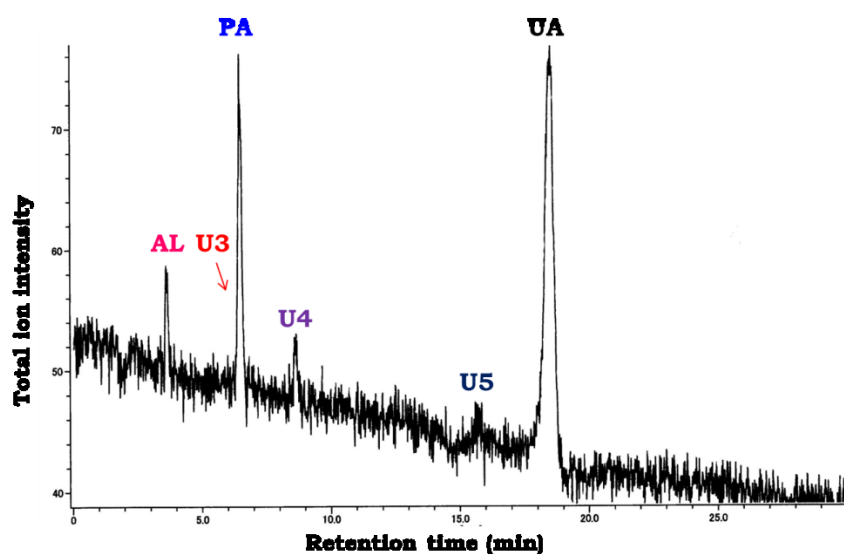


Fig. 2-21  $^{18}\text{O}_2$  条件下における UA と光酸化反応のトータルイオンクロマトグラム



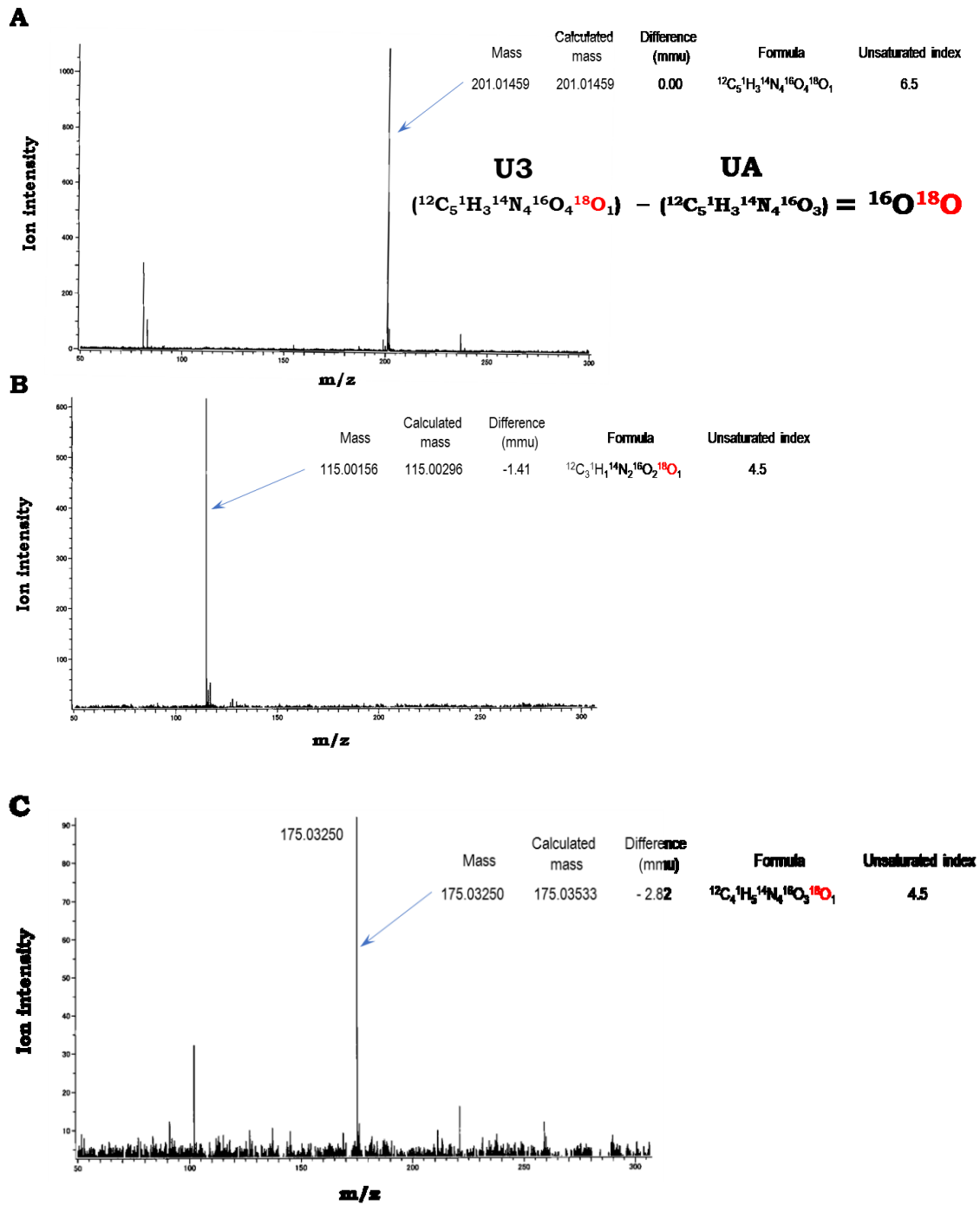


Fig. 2-22  $^{18}\text{O}_2$  条件下における UA と光酸化反応によって生成した U3 (A), PA (B), U5 (C) と推定組成 (挿入表)

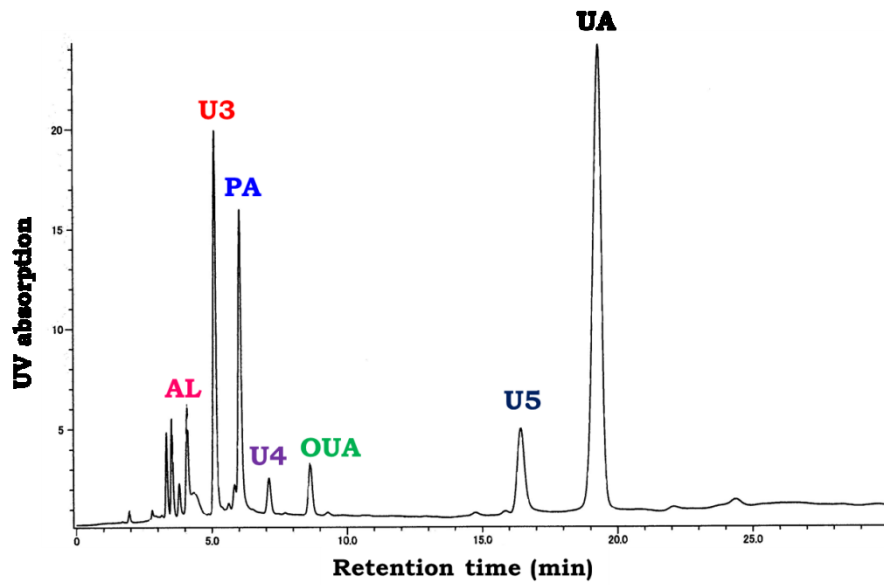


Fig. 2-23  $H_2^{18}O$  条件下における UA と光酸化反応の UV クロマトグラム

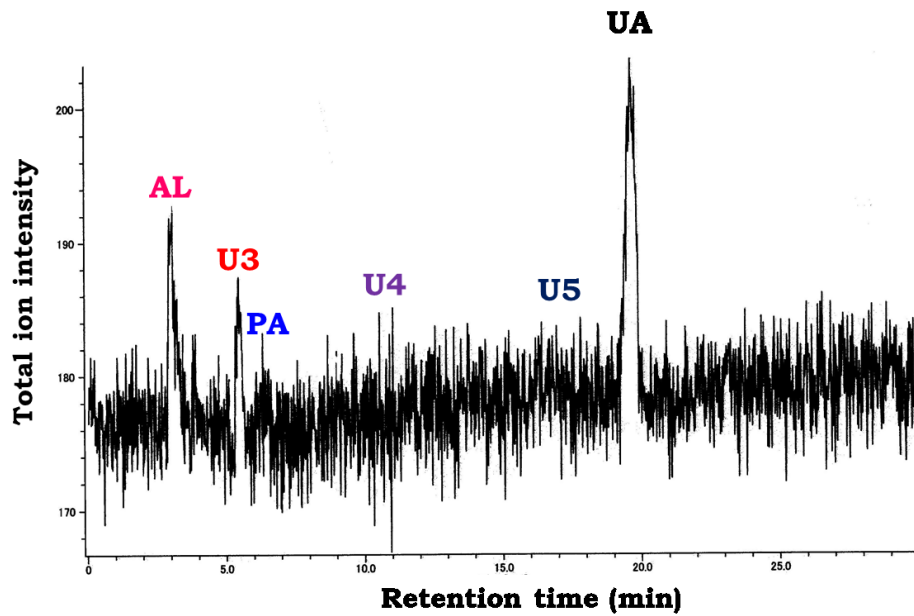


Fig. 2-24  $H_2^{18}O$  条件下における UA と光酸化反応のトータルイオンクロマトグラム

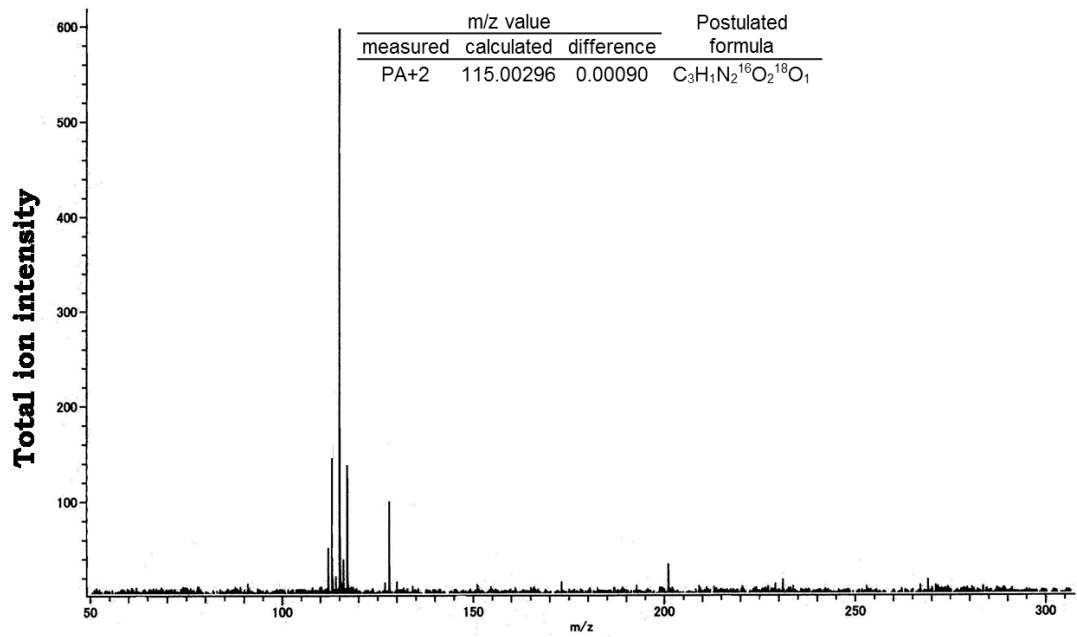


Fig. 2-25  $H_2^{18}O$  溶媒中における UA 光酸化 60 分後の PA の MS スペクトル

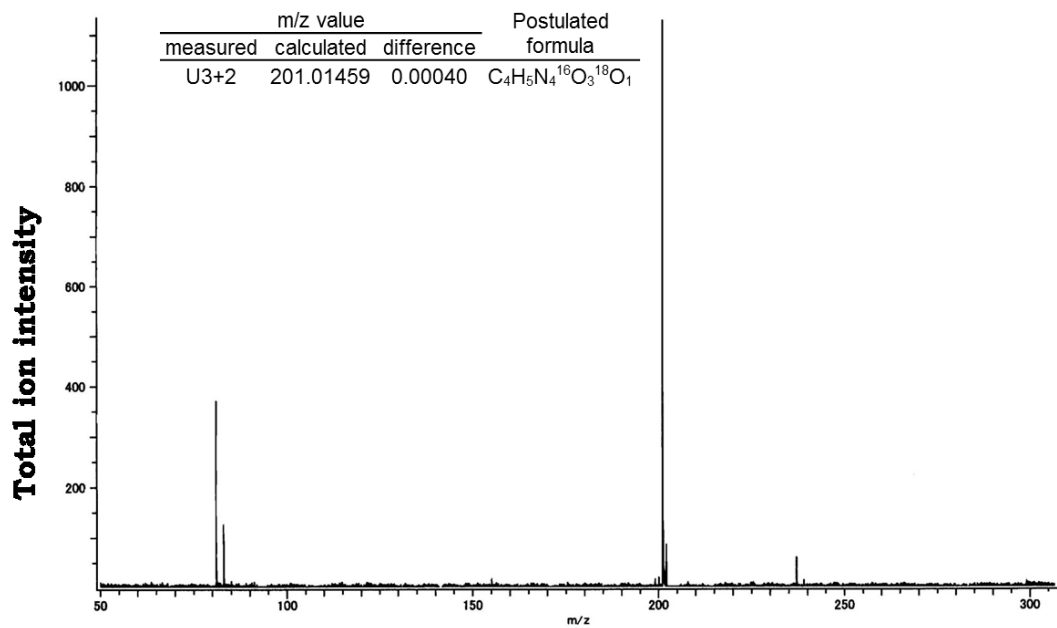


Fig. 2-26  $H_2^{18}O$  溶媒中における UA 光酸化 60 分後の U3 の MS スペクトル

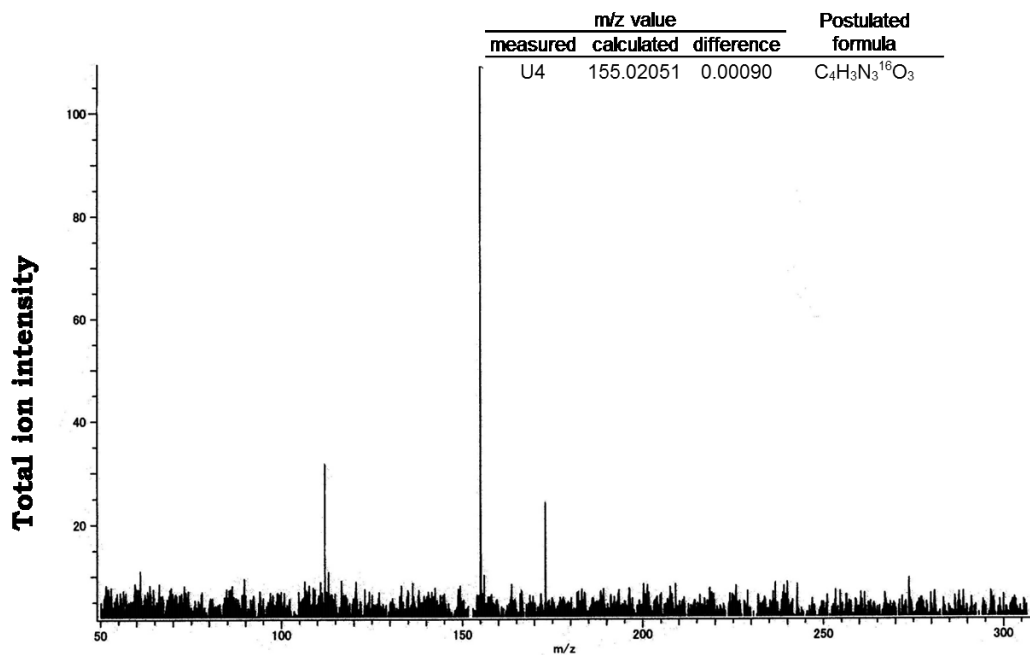


Fig. 2-27  $H_2^{18}O$  溶媒中における UA 光酸化 60 分後の DHAL の MS スペクトル

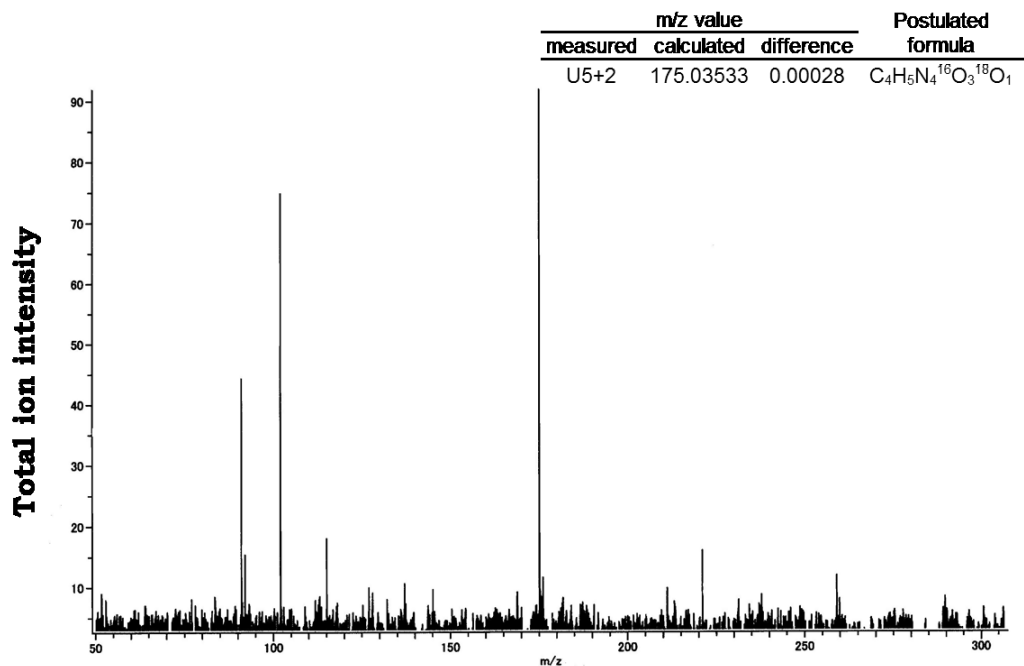


Fig. 2-28  $H_2^{18}O$  溶媒中における UA 光酸化 60 分後の 4-HAL の MS スペクトル

これらのことから、 $^1\text{O}_2$  と UA の反応メカニズムを以下のように推察した (Fig. 2-29).  $^1\text{O}_2$  は UA の C4-C5 間の二重結合を攻撃し 4,5-エンドパーオキシドを生成する. これは速やかに 5-OOH 体となり, 両者は平衡状態となる. この 5-OOH 体の 6 位のカルボニル炭素を水分子のローンペアが求核的に攻撃して結合し, 同時に C5-C6 間の開裂とヒドロパーオキシドからの脱水が起こる. これによって 4-*N*-carboxyamino-carbonylimino-hydantoin (4-CH) が生成する. これが U3 と推察される. 4-CH はその後, 水が付加すると 4-OH 体となるがこれは不安定で速やかに PA へと分解される. また, 4-CH が脱炭酸されると DHAL となり, これに水が付加すると 4-HAL となり, これもまた PA の前駆体となる.

このように  $^1\text{O}_2$  由来の O 原子はイミダゾリン環に付加して hydantoin を形成し, 一方, 水由来の O 原子はカルボキシル基を形成する.

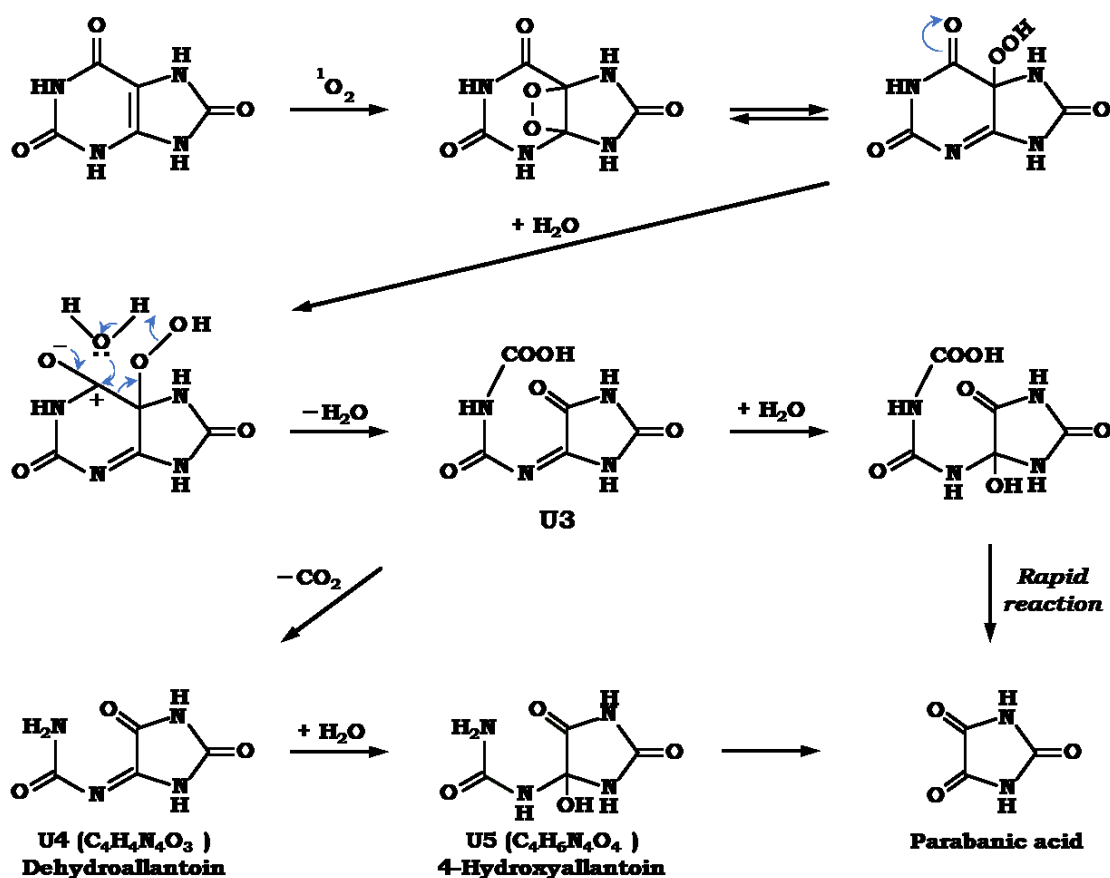


Fig. 2-29 推定される UA と  $^1\text{O}_2$  との反応による PA の生成メカニズム

そこで、この反応メカニズムを確認するために、4-CH の構造を確定すべく、U3 のフラグメントパターンを確認した。カルボキシル基を有する化合物は脱カルボキシル基のフラグメントを与えることが知られている。まず、通常の大気下で生成した 4-CH のフラグメント・パターンを確認したところ、質量電荷比  $-199$  の親イオンに加えて、 $-155$  のフラグメントイオンを観察した (Fig. 30A)。この質量差が  $-44$  と脱炭酸したフラグメントであることや、精密質量からその組成が確かに  $4\text{-CH}-\text{CO}_2$  であったことから、この 4-CH は分子内にカルボキシル基を有しており、推定した構造であることが強く推察された。

次に  $^{18}\text{O}_2$  下で光酸化を行って生成した 4-CH のフラグメント・パターンを確認した。質量電荷比  $-201$  の親イオンに加えて、 $-157$  のフラグメントイオンを観察した (Fig. 30B)。このことは反応した  $^{18}\text{O}_2$  由来の O 原子は hydantoin 環にあり、カルボキシル基にはないことを示している。また、hydantoin 環は脱イソシアン酸 (分子量: 41) のフラグメントを起こすことも知られているが、この場合、イソシアン酸に  $^{18}\text{O}$  が入っていれば質量電荷比が 43 小さいフラグメントが観察される。MS スペクトル上にこれに相当する  $-112$  のイオンを観察したことから、 $^{18}\text{O}$  は hydantoin 環にあることが強く示唆された。

また、 $\text{H}_2^{18}\text{O}$  中で光酸化を行って得られる 4-CH のフラグメント・パターンも同様に観察した (Fig. 30C)。予想通り  $-201$  の親イオンと、 $-155$  のフラグメントイオンを観察し、このことから、 $\text{H}_2^{18}\text{O}$  由来の  $^{18}\text{O}$  は 4-CH のカルボキシル基中にあることが示唆された。

以上のことから、4-CH の化学構造および、その生成メカニズムは推定したものであると強く示唆された。

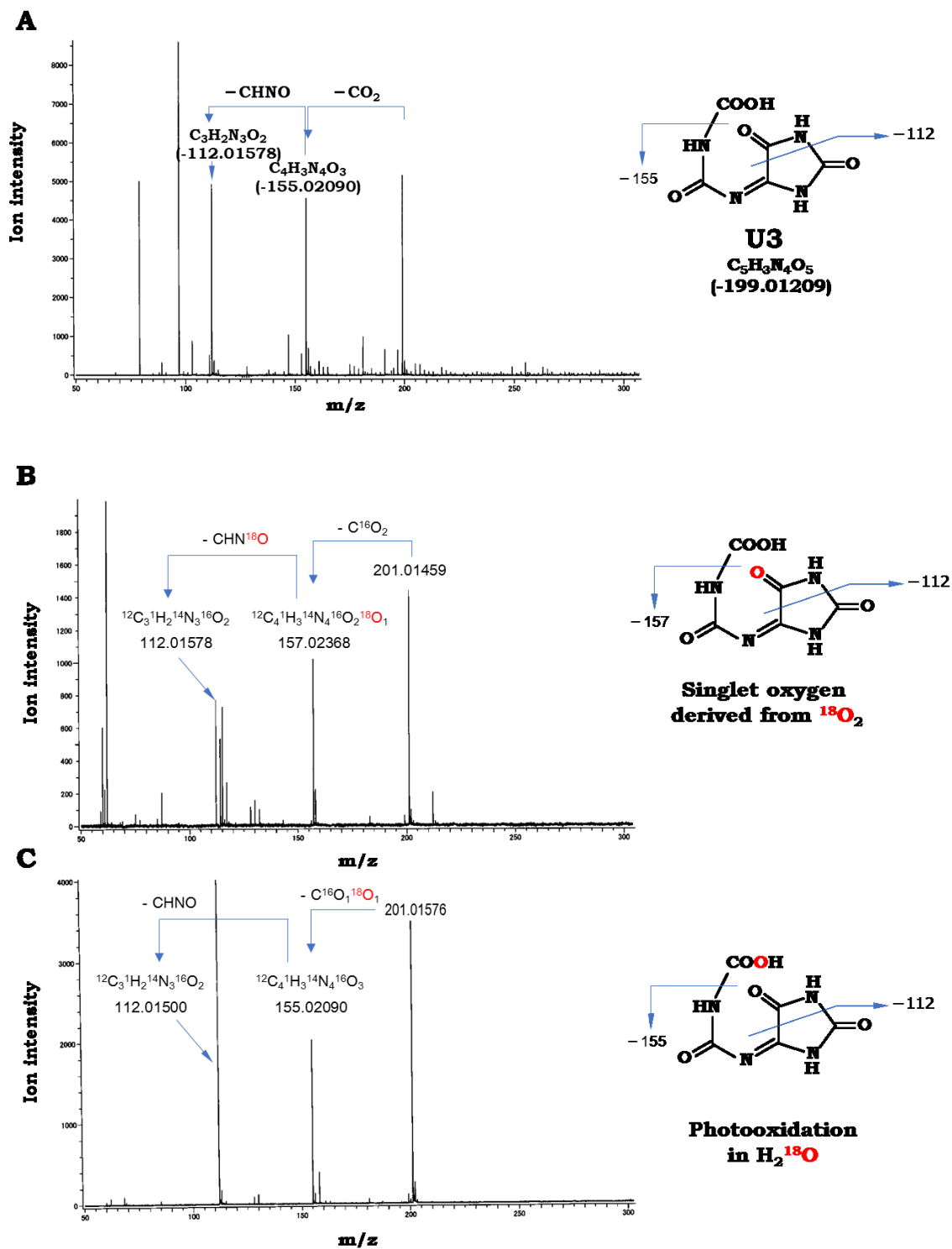


Fig. 2-30 UA の光酸化で得られた 4-CH のフラグメント・パターン. 水溶媒 (A),  $^{18}O_2$  大気下 (B),  $H_2^{18}O$  溶媒中 (C)

#### 4. 考察

尿酸(UA)と一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )との特異的反応生成物としてパラバン酸(PA)を同定した. 今回は $^1\text{O}_2$ の生成系としてRBまたは酸化チタンを増感剤として用いた光酸化, ナフタレンエンドパーオキシド(NEPO)の熱分解, そして過酸化水素 $\text{H}_2\text{O}_2$ の二電子酸化反応を用いた. いずれの系でも共通してPAの生成を認めたことから, PAはUAと $^1\text{O}_2$ の反応で生成する化合物であることが明らかになった. 一方で, AAPH由来のパーオキシラジカル,  $\text{ClO}^-$ または $\text{ONOO}^-$ 単独の系ではPAの生成はほとんど認められなかった. 以上のことから, PAは $^1\text{O}_2$ に特異的なUAの酸化生成物であることが強く示唆される.

光酸化, およびNEPOを用いた実験で, UAの減少に対するPAの生成効率を求めたところ, 12時間反応させるとほぼ100%となったことから(Table 1), UAを $^1\text{O}_2$ により酸化させるとPAのみが生成することが分かった. しかし, PAの生成は, 尿酸が消失した後も, また $^1\text{O}_2$ の生成を停止した後も停止せずに行っていたことから, 比較的安定な中間体が存在する可能性が示唆された.

UAは $^1\text{O}_2$ のスキャベンジャーであると同時に, クエンチャーでもある. NEPOを用いた実験では発生する $^1\text{O}_2$ の量はNEPOの量と同じである. 一方で $^1\text{O}_2$ と反応したUAはすべてPAに変換されるとすると, PAの生成量はUAと化学反応した $^1\text{O}_2$ 量と同じであると考えられる. このことから,  $^1\text{O}_2$ の生成量に対するUAと反応した $^1\text{O}_2$ 量の割合を算出すると, 1/180~1/370 (0.27~0.56%)程度であることが分かった. UAと $^1\text{O}_2$ との反応速度定数 $k_r$ はSueishiらにより,  $2.3 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と見積もられている<sup>114)</sup>. また, UAによるクエンチングの速度定数 $k_q$ は $3.6 \times 10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と求められており<sup>115)</sup>, 今回の結果は, これらの値と矛盾しないと考えられる.

$\text{H}_2\text{O}_2$ の二電子酸化反応は光照射を必要とせずに $^1\text{O}_2$ を生成する.  $\text{H}_2\text{O}_2$ の酸化には $\text{ClO}^-$ があるが, この反応系はミエロパーオキシダーゼ(MPO)を模倣した系とみなせる. MPOは炎症時に好中球から放出される, ヘムを有する酵素であり, 塩化物イオン( $\text{Cl}^-$ )と $\text{H}_2\text{O}_2$ から $\text{ClO}^-$ を生成する反応を触媒する. よってMPOが作用する際には基質である $\text{H}_2\text{O}_2$ と生成物である $\text{ClO}^-$ が近傍に共存しており, 二次反応として, 両者の反応が起きた場合には $^1\text{O}_2$ が生成すると考えられる. したがって, 炎症時には $^1\text{O}_2$ による酸化反応も十分に起こっていることが予想される. また, 本研究では酸化剤として $\text{ClO}^-$ に加えて $\text{ONOO}^-$ も検討した.  $\text{ONOO}^-$ は $\cdot\text{NO}$ と $\text{O}_2^-$ が拡散律速で反応して生成する活性種である.  $\text{O}_2^-$ はSODにより消去されると $\text{H}_2\text{O}_2$ が生成する. よって, 虚血・再灌流時のように,  $\cdot\text{NO}$ と $\text{O}_2^-$ が共存している場合にも $^1\text{O}_2$ が生成してもおかしくないと考えられ, 今まで考えられている以上に*in vivo*での $^1\text{O}_2$ の生成は重要かもしれない.

$^1\text{O}_2$ は不飽和脂肪酸に対してエン反応による特徴的な過酸化脂質を生成する. リノール酸(18:2)が $^1\text{O}_2$ により酸化されると, 10-(Z,E)-OOHと12-(Z,E)-OOHが生成する. これらは, ラジカル酸化生成物の9-(Z,E)-OOH, 9-(E,E)-OOH, 13-(Z,E)-OOH, そして13-(E,E)-OOHとは明らかに異なる過酸化脂質である.



Umeno らは、ヒト血漿中から 10-(Z,E)-OOH および 12-(Z,E)-OOH の還元体の 10-(Z,E)-hydroxyoctadecadienoic acid (10-(Z,E)-HODE) と 12-(Z,E)-HODE を検出し、これらの総リノール酸に対する割合が糖尿病のバイオマーカーである HbA1c や血漿中グルコース濃度、インスリン分泌量やインスリン抵抗性と正の相関があることを見出した。よって、10-(Z,E)-HODE と 12-(Z,E)-HODE が II 型糖尿病の新たなバイオマーカーになり得ることを報告している。このことから、生体内でも  $^1\text{O}_2$  由来の過酸化反応が起きていることが推察される。

1995年に Hillered らは重篤なクモ膜下出血の患者3名の脳からマイクロダイアリースを用いて灌流液を採取し分析したところ、ALにくわえてPAを検出し、そのレベルが上昇することを見出した<sup>116)</sup>。本章で示してきたように、PAは $^1\text{O}_2$ に非常に特異性の高い酸化生成物である。したがってこのクモ膜下出血の場合にも頭蓋内で $^1\text{O}_2$ が生成したことを示しており、極めて興味深い結果である。

尿酸と $^1\text{O}_2$ との反応経路を推定した。尿酸を光酸化した反応溶液を分析条件を変えて分析したところ、U3に加えて、U4、U5が検出された。同様に組成を推定したところ、U3は $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_5$ 、U4は $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ 、U5は $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_4$ であった。U3とU5を単離したところ、PAに変化した。このことから、U3とU5はPAの前駆体であると考えられた。また、U3、U5ともにPAのみ検出されたことから、別々の反応経路の存在が示唆された。一方、U4を単離し、分析したところ、U4は検出されず、PA及びU5が検出された。U4は非常に不安定であること、また、U5及びPAに変化したことは、別個の経路の分岐点である化合物であると考えられた。U4の加水分解が先行すると、PAに変化し、また、脱炭酸が先行すると、U3、U5を経て加水分解されてPAに変化すると予想された。これらの反応はpHが高いと進行が速くなると考えられる。

光酸化反応では水溶液中の溶存酸素が $^1\text{O}_2$ となる。そこで、溶存酸素を窒素ガスで除き、 $^{18}\text{O}_2$ に置換して同様の実験を行った。 $^{18}\text{O}$ が置換したU3、U5が観察された。使用した $^{18}\text{O}_2$ ボンベの中に $^{16}\text{O}_2$ は混入していないこと、また、サンプリング時の空気漏れがないことを事前に確認して実験を行ったため、交換された $^{16}\text{O}$ は水由来であると考えられる。よって、 $^1\text{O}_2$ が尿酸に付加すると水の酸素原子と交換し、その後の反応が進行していることが示唆された。しかしながら、 $^{18}\text{O}$ は尿酸の5位または6位のどちらに付加したのか不明であった。そこで、尿酸に酸素分子が付加した組成を持つU3のフラグメントイオンを測定したところ、 $^{18}\text{O}$ を含むフラグメントイオンが観察された。一方、反応液の溶媒を $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 中を用いて同様の光酸化反応を行うと、U3のフラグメントイオンに $^{18}\text{O}$ は含まれていなかった。これらの結果、及びU3のフラグメンテーションから、U3は4-N-carboxyaminocarboxyimino-hydantoin (4CH) であると推察され、PAは4CHの $\text{H}_2\text{O}$ 付加後の分解、もしくは4-CHからDHALを経て生成される4-HALから生成されると推察される。

## 第 3 章

# 尿酸と次亜塩素酸イオンとの特異的 反応生成物としての CCPD

## 第3章 尿酸と次亜塩素酸イオンとの特異的反応生成物としての CCPD

### 1. 概要

尿酸 (UA) と次亜塩素酸イオン ( $\text{ClO}^-$ ) との反応生成物については, アラントイン (AL) が主生成物であると Kaur らが報告している<sup>99)</sup>. しかし, AL はラジカルとの反応でも生成することから特異的反応生成物とは言えない. AL が生成する原因は UA と  $\text{ClO}^-$  との反応は非常に速く, また生成した一次反応物も  $\text{ClO}^-$  と反応してしまうことと予想した. そこで, 次亜塩素酸ナトリウム ( $\text{NaOCl}$ ) 溶液を良く攪拌している UA 溶液にシリンジポンプを用いて一定速度で導入し, UA と  $\text{ClO}^-$  との一次反応生成物を検索した. その結果, 不明化合物 U6 の生成を認めた. この化合物は UA の減少と同時に生成したことから, UA と  $\text{ClO}^-$  との一次反応生成物であると推察された. そこでこの U6 をネガティブ ESI モードの TOFMS を用いて MS スペクトルを測定したところ, 精密質量電荷比は  $m/z = -216.97421$ , 化合物の推定組成は  $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}$  となり, 5-*N*-carboxyimino-6-*N*-chloroaminopyrimidine-2,4(3*H*)-dione (CCPD) であると推察した. また, CCPD は中性領域では安定に存在することが判明した.

### 2. 実験方法

#### 2-1. 反応溶液の調製

UA は 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した. AL は純水で溶解した. 1.82M 次亜塩素酸ナトリウム水溶液 ( $\text{NaOCl}$  水溶液) は使用前まで 4°C に保存し, 使用時に純水を用いて 10 倍希釈または 500 倍希釈して溶液を調製した.

#### 2-2. UA と $\text{ClO}^-$ の反応

230  $\mu\text{M}$  の UA/リン酸緩衝液 (pH 7.4) に  $\text{NaOCl}$  水溶液を 42  $\mu\text{M}$  加えて反応させた.  $\text{NaOCl}$  水溶液はシリンジポンプを用いて一定速度 ( $R_i = 0.35 \mu\text{M}/\text{min}$ ) で導入し, その経時変化を HPLC を用いて分析した. また反応溶液を LC/TOFMS で分析した.

#### 2-3. 化合物の分離・精製

過剰量の UA を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解し飽和溶液を 50 mL 調製した. これに 200 mM の  $\text{NaOCl}$  水溶液をシリンジポンプで  $R_i = 0.2 \mu\text{M}$

/min の一定速度で導入した。反応溶液中に生成した U6 を、移動相に 40 mM ギ酸アンモニウム水溶液、流速が 3.0 mL/min, 分離カラムとして C-18 (20.0 mm × 250 mm, Supelco) を用いた HPLC で分取し、一次精製を行った。検出は紫外吸光検出器を用い、210 nm の吸光度で行った。

回収した U6 を含む画分を、窒素ガスの吹付で濃縮した。濃縮サンプル 100  $\mu$ L に対してギ酸を 2  $\mu$ L 加え、移動相にメタノール/水=15/85 (v/v), 流速が 1.0 mL/min, 分離カラムとして C-30 (4.6 mm × 250 mm, 野村化学) を用いた HPLC で分取し、二次精製を行った。検出は紫外吸光検出器を用い、210 nm の吸光度で行った。二次精製後の試料を窒素ガスの吹付で溶媒を除去した。単離の確認はこの試料を純水に再溶解して HPLC 分析して行った。

#### 2-4. UA と $\text{ClO}^-$ との反応における $\text{ClO}^-$ 濃度変化に対する U6 生成への影響の検討

250  $\mu$ M もしくは 1 mM の UA/リン酸緩衝液 (pH 7.4) に NaOCl 水溶液を 42  $\mu$ M, 252  $\mu$ M, 420  $\mu$ M, 2.52 mM それぞれ加えて反応させた。NaOCl 水溶液はシリンジポンプを用いて一定速度 ( $R_i = 0.175 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $1.05 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $1.75 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $10.5 \mu\text{M}/\text{min}$ ) で導入し、その経時変化を HPLC を用いて分析した。また、マイクロピペットを用いて同濃度の NaOCl 溶液を加え、同様に分析した。

#### 2-5. U6 の安定性の検討

リン酸緩衝液を 1M NaOH または 1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を用いて pH 6.0, 7.0, 7.4, 8.0 の溶液を調製した。異なった pH 溶媒で 500  $\mu$ M U6 溶液を調製し、6 時間、室温または 37°C でインキュベート、好氣的条件下で静置し、その後 HPLC を用いて分析した。室温で静置したサンプルは 1, 2, 3, 4, 5 日後に再度分析した。

また、U6 溶液に NaOCl 水溶液を加えて酸化させ、その安定性を HPLC を用いて分析した。

#### 2-6. MPO を用いて発生させた $\text{ClO}^-$ と UA の反応

300  $\mu$ M UA リン酸緩衝液 (pH 7.4) に対して 50 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  を加えて調製した。MPO をリン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解し、25 nM になるように添加した。その後、37°C で加温し、経時変化を LC/MS/MS を用いて分析した。

## 2-7. HPLC 分析

UA とその酸化生成物である U6 および AL の定量は HPLC-UV を用いて行った。210nm での吸収を観察した。移動相は 40mM ギ酸アンモニウム水溶液 (pH 4.5), 流速は 1.0mL/min であった。分離カラムには ODS カラム (東ソー, 5 $\mu$ m, 4.6mm $\times$ 150mm) を用いた。このカラムを使用すると, UA, U6, AL の保持時間は各々 7.8, 6.2, 2.5 分であった。

## 2-8. LC/ TOFMS 分析

UA 酸化生成物の正確な質量電荷比 ( $m/z$ ) を測定するために, TOFMS (JMS-T100LC, JEOL) と組み合わせた HPLC を用いた。ネガティブ ESI モードでイオン化し, イオン化ポテンシャルは -2000V とした。また, リングレンズ, 外部オリフィス, 内部オリフィスおよびイオンガイドの印加電圧はそれぞれ -10V, -30V, -10V そして -500V に設定した。さらに, 正確な  $m/z$  値を得るために, トリフルオロ酢酸 (TFA) を内部標準物質として使用した。

## 2-9. LC/MS/MS 分析

ピコモルレベルでの微量分析を行うために LC/MS/MS (LCMS-8040, 島津) を用いた。移動相はギ酸水溶液 (pH 3.5), 分離カラムは C-30 (野村化学株式会社, 5 $\mu$ m, 250mm $\times$ 2.0mm), 流速は 0.2mL/min で行った。ネガティブイオン化で測定し, エレクトロスプレープローブを用いて -3.2kV で行った。各酸化生成物の同定および定量には多重反応モニタリングで測定した。AL と U6 についての親イオン及びフラグメントイオンの最適化された組み合わせは, それぞれ -97/-157 および -110/-217 となった。このカラムを用いると AL および U6 の保持時間は 4.0 分と 35 分であった。

### 3. 結果

#### 3-1. UA と $\text{ClO}^-$ の反応

$\text{NaOCl}$  を  $230 \mu\text{M}$  の UA 溶液に  $R_i = 0.35 \mu\text{M}/\text{min}$  で導入すると、UA の減少とともに不明化合物 (U6) が確認された (Fig. 3-1A, B). そこで、ネガティブ ESI モードに設定した LC/TOFMS を用いて分析し、U6 の MS スペクトルを測定した (Fig. 3-2). TFA を用いて精密質量電荷比を求めたところ、 $m/z = -216.97421$  となり、この値からイオンの推定組成式は  $\text{C}_5\text{H}_2\text{Cl}_1\text{N}_4\text{O}_4$  であることが分かった. また、その近傍に  $m/z = -218.97160$  のイオンが観察され、その強度比から  $^{35}\text{Cl}$  の安定同位体である  $^{37}\text{Cl}$  由来のイオンであることが推察された. このイオンについても組成を推定したところ、 $\text{C}_5\text{H}_2\text{Cl}_1\text{N}_4\text{O}_4$  となり、両者は一致した. このことから U6 の分子式は  $\text{C}_5\text{H}_2\text{Cl}_1\text{N}_4\text{O}_4$  であると強く推定される. U6 の吸光スペクトルも測定したが、UA とは異なり  $290 \text{ nm}$  付近に吸収を持っていないことが分かった (Fig. 3-3).

この U6 は、 $\text{NaOCl}$  の導入による UA の減少にともない直線的に増加することが認められたが (Fig. 3-4 A, B), その後  $\text{NaOCl}$  をさらに導入し続けることで減少した. このことから U6 はさらに  $\text{ClO}^-$  によって酸化を受け、他の化合物へ変化することが示唆された.

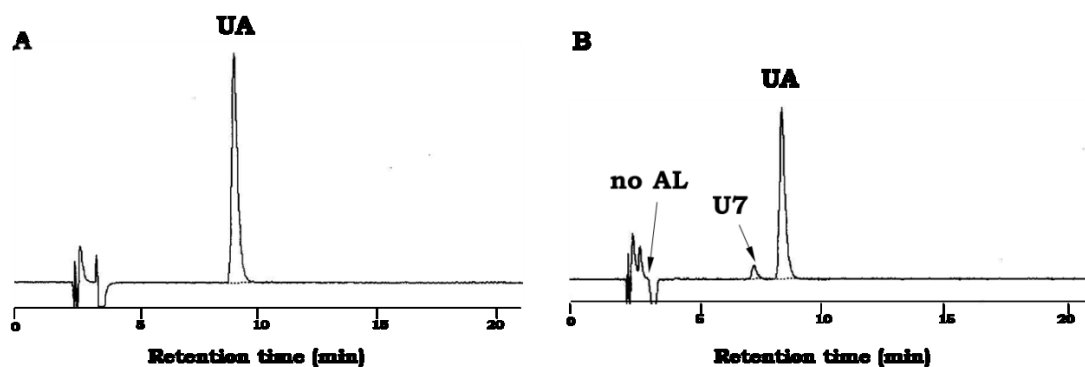


Fig. 3-1  $250 \mu\text{M}$  の UA 溶液に  $R_i = 0.35 \mu\text{M}/\text{min}$  で  $\text{NaOCl}$  を導入した場合の分析クロマトグラム (0分 (A), 20分 (B))

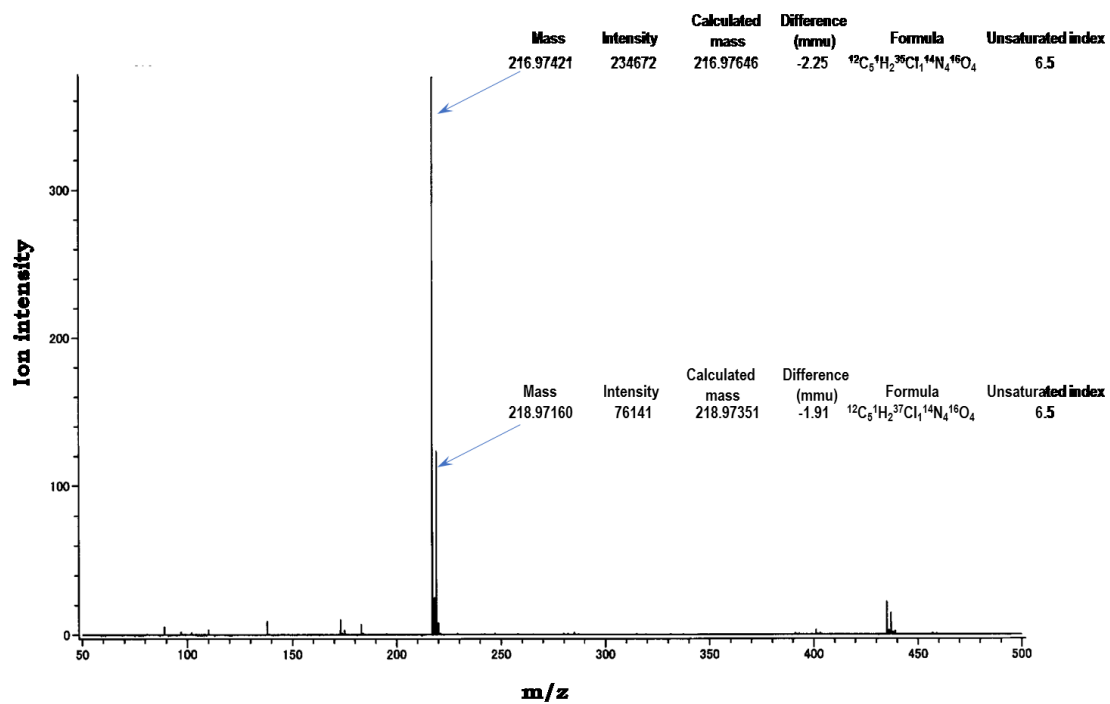


Fig. 3-2 UA と  $\text{ClO}^-$  を反応させてから 20 分後の U6 の MS スペクトルとそれらの推定組成 (挿入表)

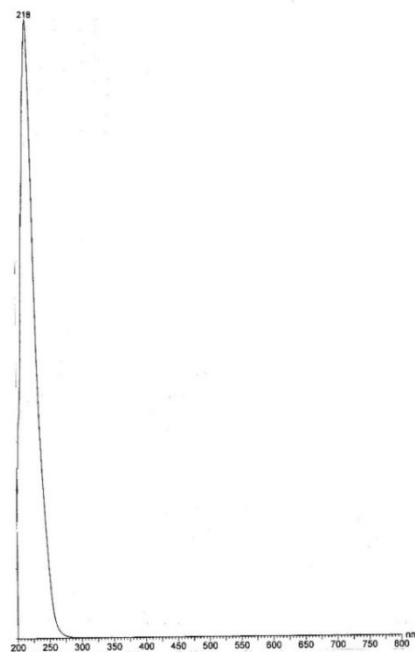


Fig. 3-3 U6 の吸光スペクトル

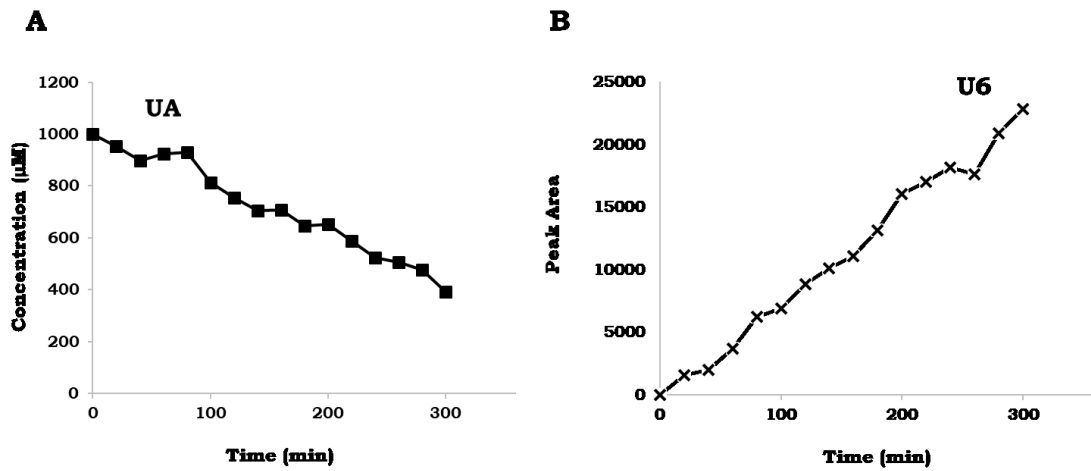


Fig. 3-4 UA と  $\text{ClO}^-$  の反応による UA の減少 (A) と U6 の生成 (B)

### 3-2. U6 の分離・精製

U6 の分離・精製を試みた. UA の飽和溶液に  $\text{NaOCl}$  溶液をシリンジポンプで導入し, 反応させた. 反応後の溶液を HPLC-UV で分取し, 一次精製を行った (Fig. 3-5 A). その後, 二次精製を行ってギ酸アンモニウムを除去した (Fig. 3-5 B). 溶媒を窒素ガスにより除いて乾固させた.

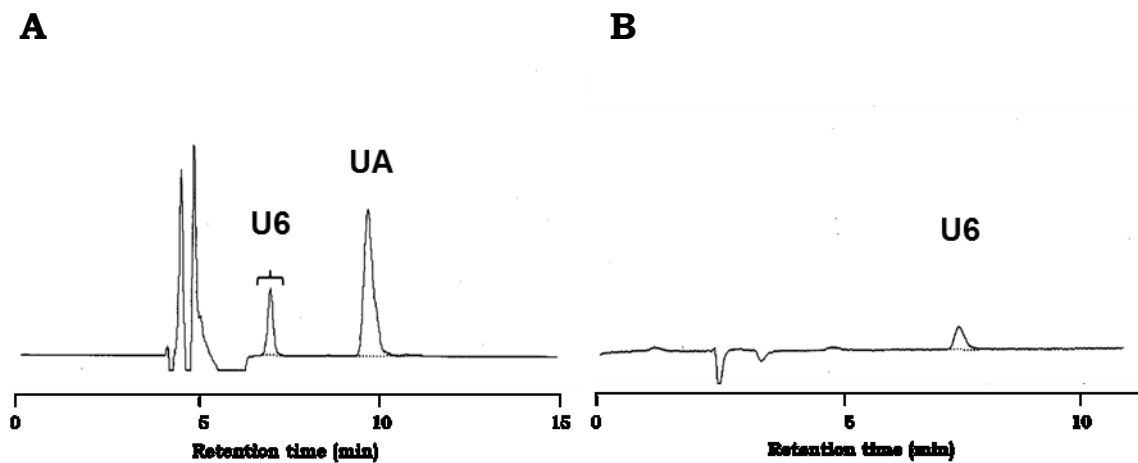


Fig. 3-5 分取時のクロマトグラム (A) と精製した U6 (B).



### 3-3. UA と $\text{ClO}^-$ との反応における $\text{ClO}^-$ 濃度変化に対する U6 の生成への影響

230  $\mu\text{M}$  もしくは 1 mM の UA/リン酸緩衝液 (pH 7.4) に NaOCl 水溶液を 42  $\mu\text{M}$ , 252  $\mu\text{M}$ , 420  $\mu\text{M}$ , 2.52 mM それぞれ加えて反応させたところ, シリンジポンプ及びマイクロピペットの両者を用いたいずれの場合でも尿酸は減少し, U6 の生成を確認した (Fig. 3-6). また, 精製した U6 を用いて U6 の定量を試みた. UA の減少量に対する U6 の生成量は NaOCl 濃度に依存せず, 40-70% となった. 加えて, AL は NaOCl を 420  $\mu\text{M}$ , 2.52 mM 添加した際に検出されたが, OU は検出されなかった. また, AL の収率は 20%以下となった. 一方, UA は加えた NaOCl 濃度の半分の濃度が減少した (Table. 3-2).

また, MS 条件を変えて U6 のフラグメントイオンを観察したところ,  $m/z = -110, -113, -138, -173$  のイオンが観察された (Fig. 3-7). また, これらのフラグメントイオンの組成は,  $\text{C}_3\text{H}_1\text{N}_3\text{O}_2, \text{C}_3\text{H}_1\text{N}_2\text{O}_3, \text{C}_4\text{H}_1\text{N}_3\text{O}_3, \text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_1\text{N}_4\text{O}_2$  となった.

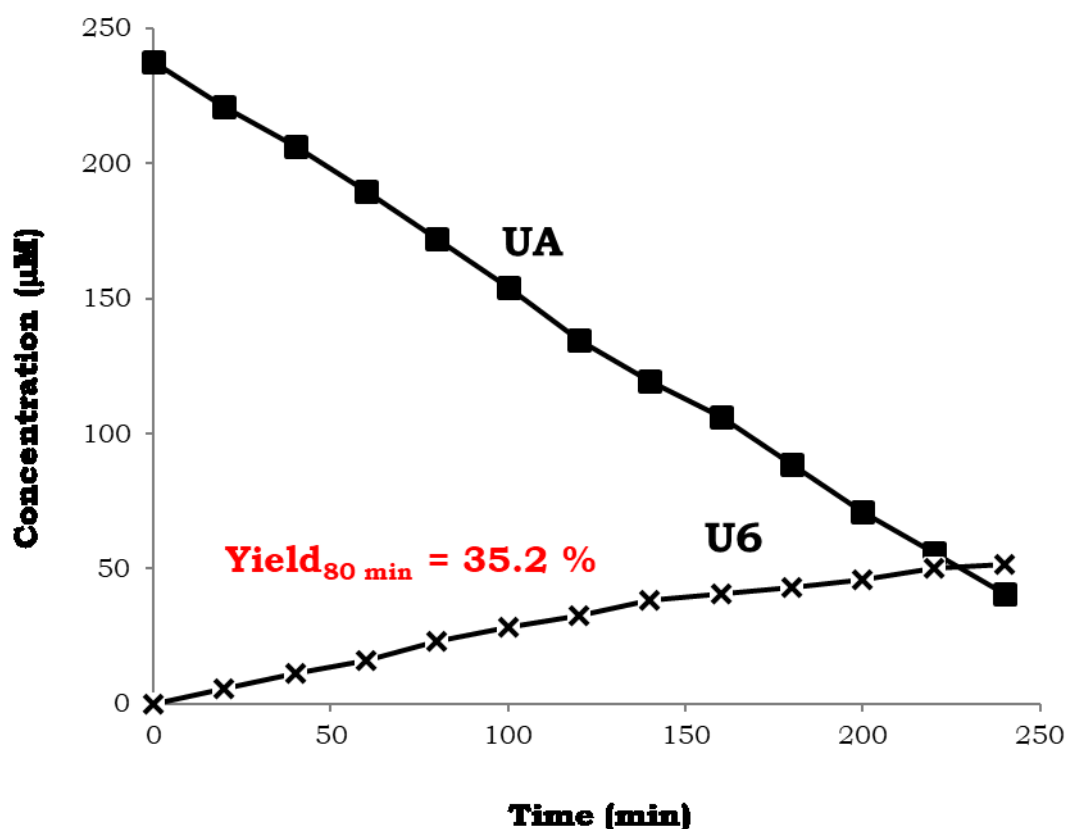


Fig. 3-6 UA と  $\text{ClO}^-$  の反応による UA (■) の減少と U6 の生成 (△)

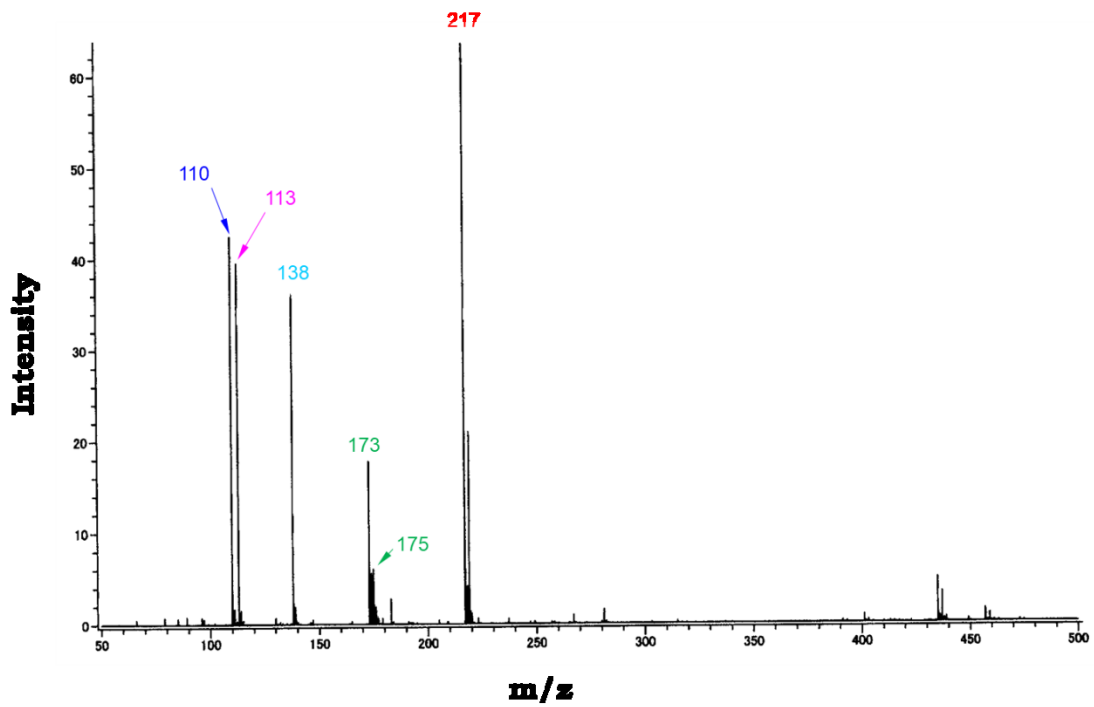


Fig. 3-7 U6 の MS スペクトル

Table. 3-1 U6 のフラグメントイオンの推定組成表

| measured | m/z value  |            | Postulated formula      |
|----------|------------|------------|-------------------------|
|          | calculated | difference |                         |
| 110      | 109.99637  | 0.00040    | $C_4N_2^{16}O_2$        |
| 113      | 112.99065  | 0.00031    | $C_3H_1N_2^{16}O_2$     |
| 138      | 137.9859   | 0.00032    | $C_4N_4^{16}O_2$        |
| 173      | 172.98346  | 0.00010    | $C_4H_2Cl_1N_4^{16}O_2$ |

Table. 3-2 UA と各 ClO<sup>-</sup>濃度との反応における CCPD, AL, OU の生成量

| Addition of NaClO    |                         | [UA] <sub>0</sub> | time (min) | -Δ[UA] | R <sub>d</sub> (μM/min) | R <sub>i</sub> /R <sub>d</sub> | [CCPD]      | CCPD Yield (%) | [AL] | AL Yield (%) |      |
|----------------------|-------------------------|-------------------|------------|--------|-------------------------|--------------------------------|-------------|----------------|------|--------------|------|
| Continuous addition  | R <sub>i</sub> (μM/min) | 0.16              | 220        | 120    | 9.8 ± 0.2               | 0.081 ± 0.001                  | 1.99 ± 0.03 | 5.32 ± 0.17    | 54.4 | ND           | 0.0  |
|                      |                         | 0.65              | 230        | 120    | 39.0 ± 1.3              | 0.33 ± 0.02                    | 1.95 ± 0.10 | 16.8 ± 0.1     | 45.3 | ND           | 0.0  |
|                      |                         | 1.35              | 230        | 120    | 79.1 ± 1.2              | 0.66 ± 0.01                    | 2.05 ± 0.03 | 28.5 ± 0.3     | 36.1 | ND           | 0.0  |
|                      |                         | 6.5               | 230        | 80     | 197 ± 5.8               | 2.47 ± 0.07                    | 2.64 ± 0.08 | 76.4 ± 4.5     | 38.8 | 3.7 ± 1.9    | 1.9  |
|                      |                         | 13.5              | 1075       | 120    | 587 ± 22                | 4.89 ± 0.18                    | 2.66 ± 0.10 | 244 ± 11       | 41.6 | 1.7 ± 0.2    | 0.3  |
| Instantaneous mixing | [NaClO] (μM)            | 110               | 250        | 120    | 36.3 ± 4.3              | -                              | 3.14 ± 0.55 | 23.4 ± 2.0     | 66.2 | 1.4 ± 0.0    | 3.9  |
|                      |                         | 240               | 240        | 120    | 81.3 ± 1.5              | -                              | 2.95 ± 0.04 | 52.0 ± 0.9     | 64   | 11.2 ± 2.1   | 13.8 |
|                      |                         | 480               | 250        | 120    | 154 ± 1.5               | -                              | 3.09 ± 0.02 | 106 ± 9.3      | 69   | 30.5 ± 1.2   | 19.8 |

### 3-4. U6 の安定性の検討

pH 6.0, 7.0, 7.4, 8.0 の溶液に U6 を溶解して調製し, その安定性を検討した. 常温で 5 日放置した場合のそれぞれの U6 残存率は, 79.9%, 77.8%, 78.7%, 79.1% となった (Fig. 3-8 A). また, 37°C でインキュベートしてから 6 時間後の U6 残存率は, 86.5%, 90.2%, 89.6%, 84.0% となった (Fig. 3-8 B). このことから, U6 の安定性は pH 及び温度に依存しないことは示唆された.

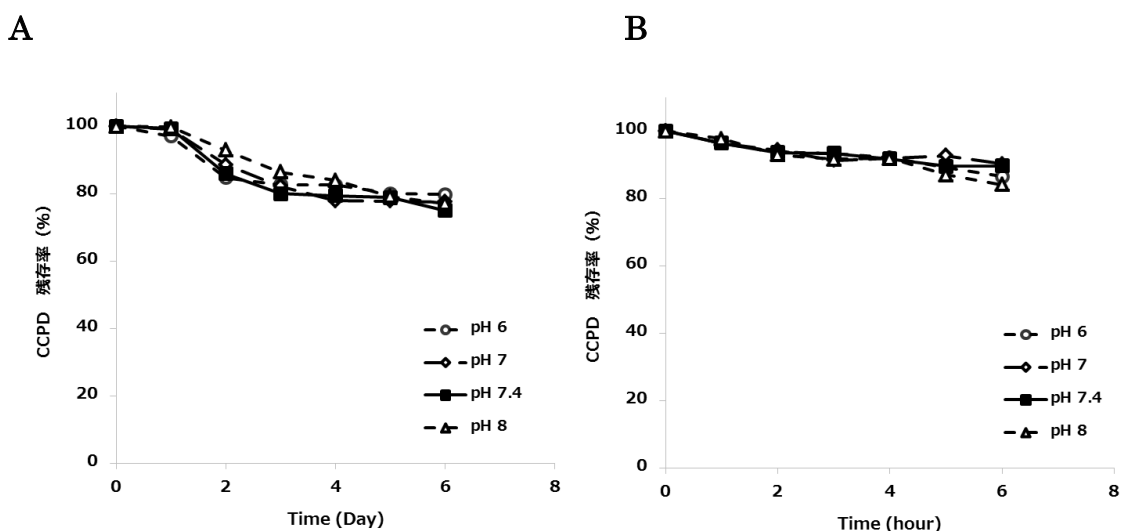


Fig. 3-8 pH 6.0 (○), 7.0 (◇), 7.4 (■), 8.0 (△) に溶解した 500 $\mu$ M CCPD の常温 (A) と 37°C (B) での経時変化

### 3-5. MPO を用いて発生させた $\text{ClO}^-$ と UA の反応

過酸化水素共存下において UA と MPO を反応させると, OUA が観察された (Fig. 3-9). 一方, UA と過酸化水素を共存させても UA は減少せず, MPO を添加した直後に UA の減少が認められたことから, OUA は生成した  $^1\text{O}_2$  と尿酸の反応によって生成したものと推測される. しかしながら, CCPD の生成は確認できなかった.

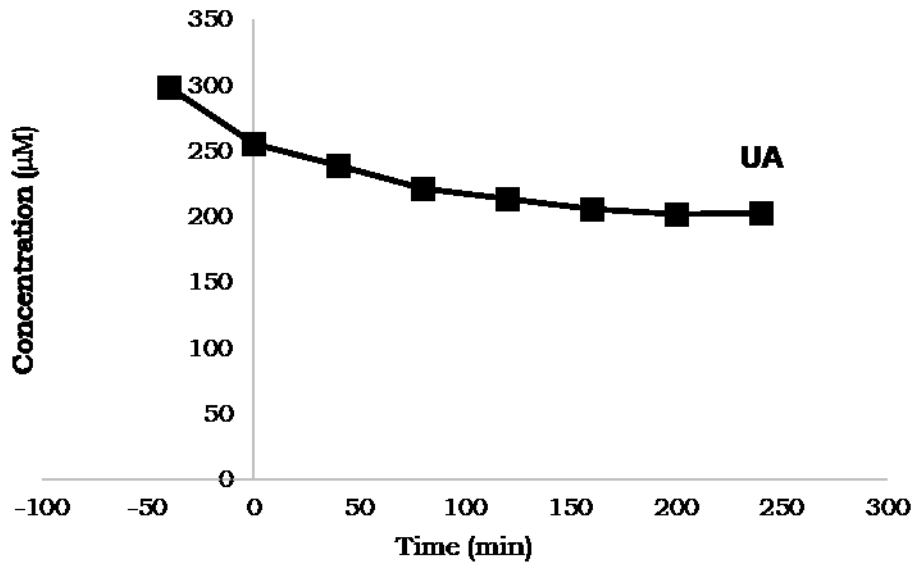
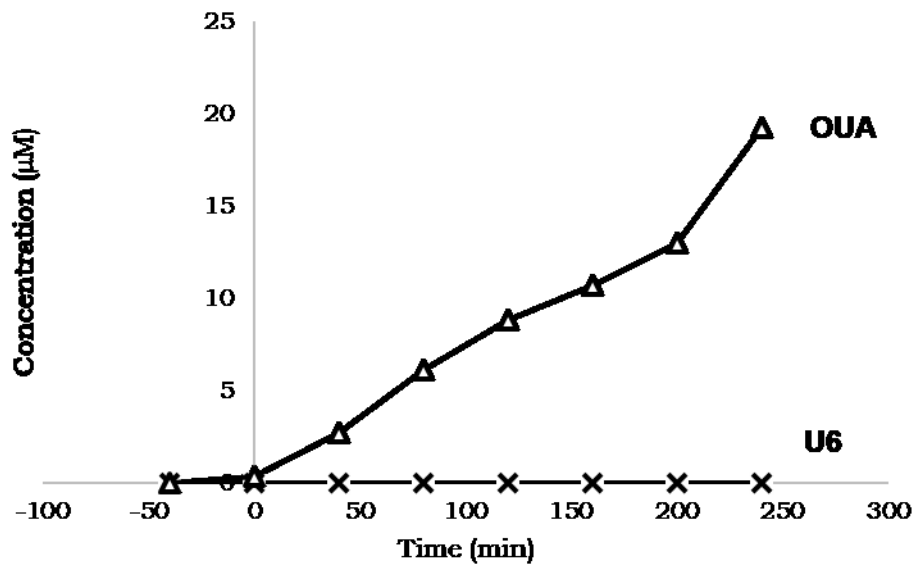
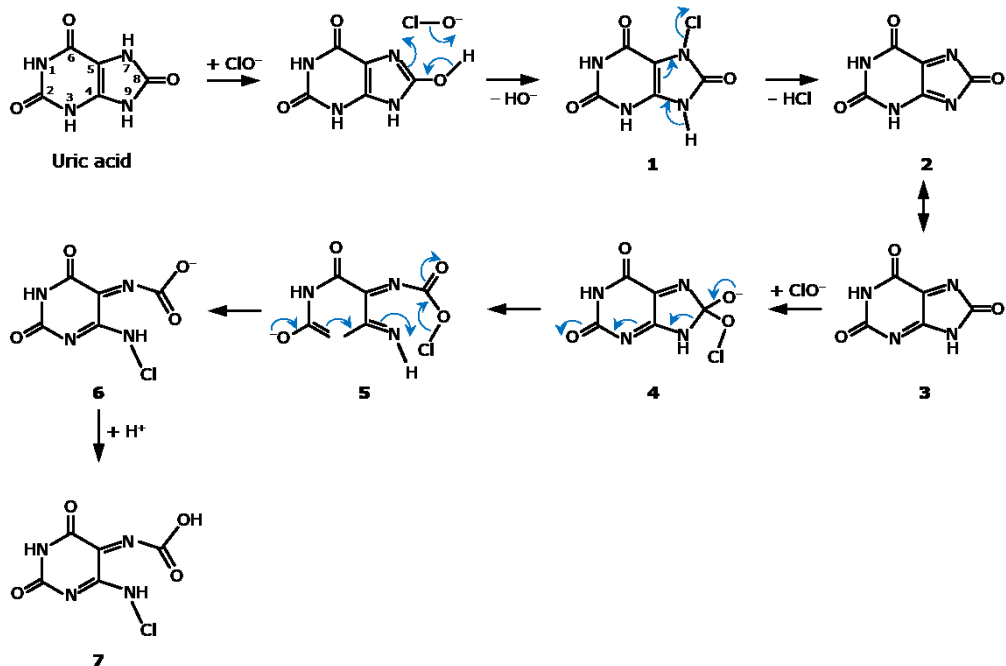
**A****B**

Fig. 3-9 過酸化水素共存下における UA と MPO の反応  
尿酸 (■, A) と OUA (○) 及び CCPD (△) (B) の経時変化



5-*N*-carboxylimino-6-*N*-chloroaminopyrimidine-2,4(3*H*)-dione (CCPD)

Fig. 3-10 CCPD の推定生成メカニズム

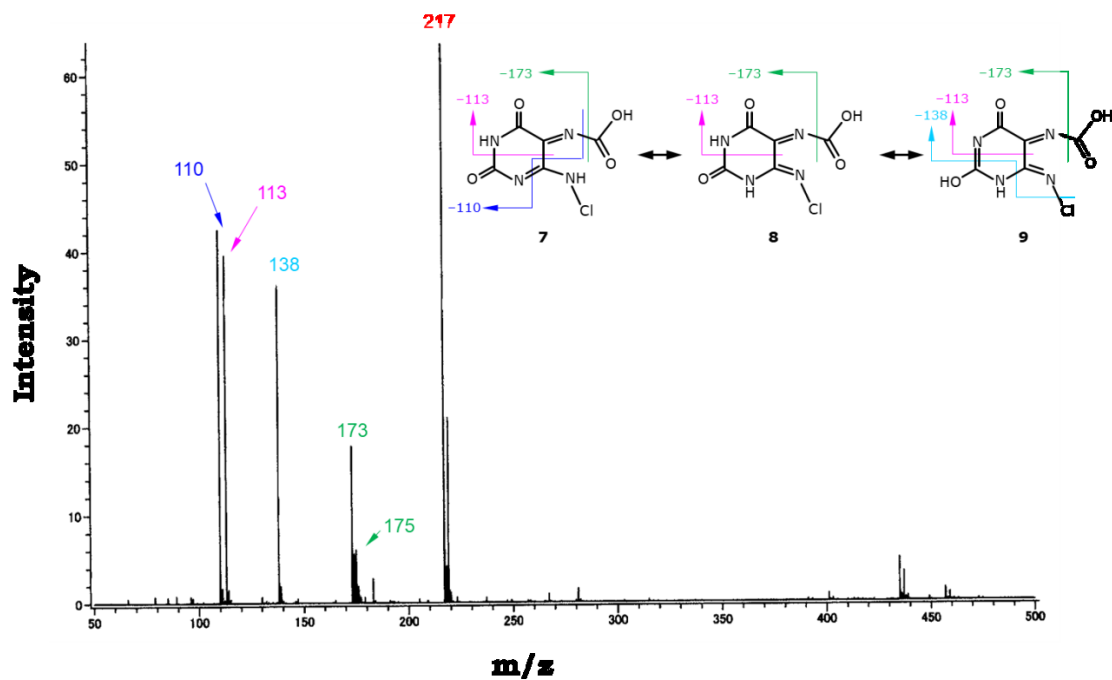


Fig. 3-11 CCPD のフラグメント・パターン

#### 4. 考察

本章では UA と  $\text{ClO}^-$  との反応生成物の検索と同定を検討した. シリンジポンプを用いて  $\text{NaOCl}$  溶液を一定速度で反応溶液に導入することで, 開始速度 ( $R_i$ ) を一定にする手法を検討した. これにより低い  $R_i$  ( $= 0.33 \mu\text{M}/\text{min}$ ) で  $\text{NaOCl}$  を導入したところ, AL の生成は 20%以下となり, 新たな不明化合物 U6 の生成が認められた. この化合物の化学組成が  $\text{C}_5\text{H}_2\text{Cl}_1\text{N}_4\text{O}_4$  と推定されたことから, UA に  $\text{ClO}$  が付加した化合物もしくはその一次代謝物であると予想された. この化合物は分子内に  $\text{Cl}$  を有しており  $\text{ClO}^-$  に特異的な化合物であること, また, UA の減少に平行に増加し, かつ化学構造も大きく分解が進行した化合物ではないと推察されたことから, プライマリーな  $\text{ClO}^-$  特異的反応生成物であると考えられた. 化学構造の推定に先立ち, 尿酸と次亜塩素酸イオンとの反応における化学量論数を求めた. シリンジポンプを用いて一定速度で導入した次亜塩素酸の導入速度を  $R_i$ , 尿酸の減少速度を  $R_d$  として両者の比を算出したところ, 導入速度が遅く, U6 以外の反応生成物が無い状態ではこの値は約 2 となり, 一方, 導入速度を上げた場合や一気に次亜塩素酸を加えた場合にはバイプロダクトとしてアラントインが生成し, その値は 2 以上になった (Table. 3-2). これらのことから, U6 が生成する反応の化学量論数は 2 であると推察され, このことは一分子の尿酸と二分子の次亜塩素酸イオンが反応して U6 が生成していることが示唆された. これを踏まえて尿酸と次亜塩素酸イオンとの反応メカニズム推察した (Fig. 3-10). まず, 尿酸の 8 位のカルボニルがエノール型となり, これに次亜塩素酸イオンが作用してご覧の電子移動が起こり, 1 番の 7-クロロイソ尿酸が生成するが, この化合物は不安定であると予想され, 速やかに 2 を経て 3 の化合物になる (Fig. 3-10). そして, 2 分子目の次亜塩素酸イオンが 8 位のカルボニルに求核攻撃をし, 4-5-6 の電子移動を経て, 7 の最終化合物へと変換されると推察した (Fig. 3-10). この 7 の化合物が U6 であり, これを 5-*N*-carboxyimino-6-*N*-chloroaminopyrimidine-2,4(3*H*)-dione (CCPD) と命名した. 次に, CCPD のフラグメントイオンからその化学構造を同定した. 217 のイオンは CCPD 由来の親イオンであり, これ以外に 173 と 175, 138, 113, そして 110 のフラグメントが観察された (Fig. 3-11). CCPD には, 互変異性の異性体 8 番と, 同じく 9 番が存在すると推定した (Fig. 3-11). そして, -173 のフラグメントは脱炭酸したものであり, 分子内に塩素原子を有していることから  $^{37}\text{Cl}$  由来の同位体-175 が観察されている. さらに, -138, -113, そして -110 のフラグメントイオンから, U6 は CCPD であると強く示唆された.

CCPD を単離し, 標準溶液を調製し, UA の減少量に対する不明化合物の生成量を検討したところ, 40-70%となった. これは  $\text{ClO}^-$  の濃度を変化させても変わらず一定値をとったこと, また, 化学量論数 ( $R_i/R_d$ ) が 2 であったことから

UA 1 分子に対して  $\text{ClO}^-$  が 2 分子反応していると推察された。このことから、UA と  $\text{ClO}^-$  の反応では  $\text{ClO}^-$  の 1 分子は求核反応を行うが、もう 1 分子は電子の受け取り手として作用していることが推察された。 $\text{ClO}^-$  の濃度が高いと化学量論数は 2-3 であった。これは、CCPD が  $\text{ClO}^-$  と反応すると推察された。しかしながら、UA と CCPD の  $\text{ClO}^-$  に対する反応性は抗酸化物質である UA の方が速いことが予想される。加えて、中性領域において CCPD は安定に存在することから、CCPD が酸化ストレス・マーカーとして応用可能であると考えられる。

一方、生体内で  $\text{ClO}^-$  の発生源であるとされる MPO との反応では CCPD が生成せず、OUA が生成したことは UA と  $\text{ClO}^-$  との反応よりも  $\text{ClO}^-$  と過酸化水素の反応が進行し、生成した  $^1\text{O}_2$  が UA と反応したことが推察される。しかしながら、今回の反応はスクリー管内という極めて狭い空間の反応であった。ゆえに、実際の生体内では血流によって  $\text{ClO}^-$  は拡散することが予想され、動物モデル等を用いて再検討する必要がある。



## 第4章

# 尿酸酸化生成物の微量分析系の確立と 病態試料の分析

## 第4章 尿酸酸化生成物の微量分析系の確立と病態試料の分析

### 1. 概要

シアヌル酸 (CA) は UA と  $\text{ONOO}^-$  との特異的反応生成物として当研究室にて見出された化合物である (Fig. 4-1). CA を加えた 7 つの UA 酸化生成物 (PA, OUA, AL, トリウレット: TU, CA, CCPD, 6-アミノウラシル: AU) を酸化ストレス・マーカーとして応用するにあたり, これらの生体中の濃度は低いことが予想される. よって, 高感度な分析系が必要である. そこで, LC/MS/MS を用いて微量分析系の確立とヒト血漿からの抽出法の検討を行った. そして, 確立した分析方法を用いて, 健常人, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び敗血症患者の血漿を分析した. 健常人からは尿酸のみが検出されたが, ALS 患者の血漿からは TU と PA が検出された. 一方, 敗血症患者の血漿からは TU と CA が検出された. これらのことから, ALS 患者では  $^1\text{O}_2$  と  $\text{ONOO}^-$  が, 敗血症患者では  $\text{ONOO}^-$  の関与が示唆された.

### 2. 実験方法

#### 2-1. 溶液調製

PA, OUA, AL, CCPD は MeOH に溶解した. TU, CA, AU は純水で溶解後に MeOH で調製し, 使用前までは  $-20^\circ\text{C}$  で保存した.

#### 2-2. 検量線の作成

調製した溶液を MeOH で希釈し, LC/MS/MS を用いて分析した.

#### 2-3. ヒト血漿中における尿酸酸化生成物の安定性の検討

採血したヒト血漿を擬似試料として用いた. インフォームドコンセント後, 2 人の健常人のヒト血漿を用いた. ヒト血漿に 4 倍量の MeOH を加えて除タンパクし, その上清を回収し, 窒素ガスで溶媒を除去した. その後, ギ酸水溶液 (pH 3.5) で溶解してサンプルを調製し, 分析した. ヒト血漿に尿酸酸化生成物が存在しないことを確認後, 各尿酸酸化生成物 (PA, OUA, AL, CCPD, TU, CA, AU) を添加した. 添加直後に血漿を分注し, MeOH を加えて除タンパクを行った. その後, 上清を回収し, 窒素ガスで溶媒を除去し, ギ酸水溶液 (pH 3.5) で溶解してサンプルを調製した. 分注したヒト血漿は  $37^\circ\text{C}$  でインキュベートし,

24 時間後に同様に除タンパクして分析した。

#### 2-4. 健常人, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び敗血症患者の血漿分析

インフォームドコンセント後, 10 人の健常人と 3 人の ALS 患者 (A, B, C) と 2 人の敗血症患者 (D, E) がボランティアとしてこの研究に参加した。ALS 患者には対処薬としてエダラボンが投与されていた。初回投与時から 1 週間後, 1 か月後, 3 か月後, および 6 か月後のタイミングで, エダラボン投与の前後で採血した。敗血症患者は発症時を 0 時間とし, 患者 D は 6, 24, 48 時間後, E は 6, 18, 24 時間後にそれぞれ採血した。これらの貴重な生体試料は, ALS 患者血漿は吉野神経内科の吉野先生より, 敗血症患者血漿は日本大学医学部木下先生よりご提供いただいた。ヒト血漿は分析前に 4 倍量の MeOH を加えて除タンパクし, その上清を回収し, 窒素ガスで溶媒を除去した。その後, ギ酸水溶液 (pH 3.5) で溶解してサンプルを調製した。

#### 2-5. LC/MS/MS の分析条件

ピコモルレベルでの微量分析を行うために LC/MS/MS (LCMS-8040, 島津) を用いた。移動相はギ酸水溶液 (pH 3.5), 分離カラムは C-30 (野村化学株式会社, 5 $\mu$ m, 250mm $\times$ 2.0mm), 流速は 0.2mL/min で行った。ネガティブイオン化で測定し, エレクトロスプレープローブ (ESI) を用いて -3.2kV で行った。各酸化生成物の同定および定量には多重反応モニタリングで測定した。各酸化生成物 (PA, OUA, AL, TU, CA, CCPD, AU) についての親イオン及びフラグメントイオンの最適化された組み合わせは, それぞれ -42/ -113, -59/ -131, -97/ -157, -42/ -145, -42/ -128, -110/ -217, -42/ -126 となった。このカラムを用いると各酸化生成物 (PA, OUA, AL, TU, CA, CCPD, AU) の保持時間は 6.0 分, 10.5 分, 4.0 分, 18.0 分, 5.5 分, 35.0 分, 8.0 分であった。

### 3. 結果

#### 3-1. 各酸化生成物の微量分析

各標準溶液を LC/MS/MS を用いて分析した (Fig. 4-1). そして, 検量線を作成した (Fig. 4-2). いずれの酸化生成物においても良好な直線性を得られた. また, それぞれの定量限界は PA が 0.025 pmol, OUA が 0.010 pmol, AL が 0.05 pmol, TU が 0.300 pmol, CA が 0.02 pmol, CCPD が 0.025 pmol, AU が 0.1 pmol となった.

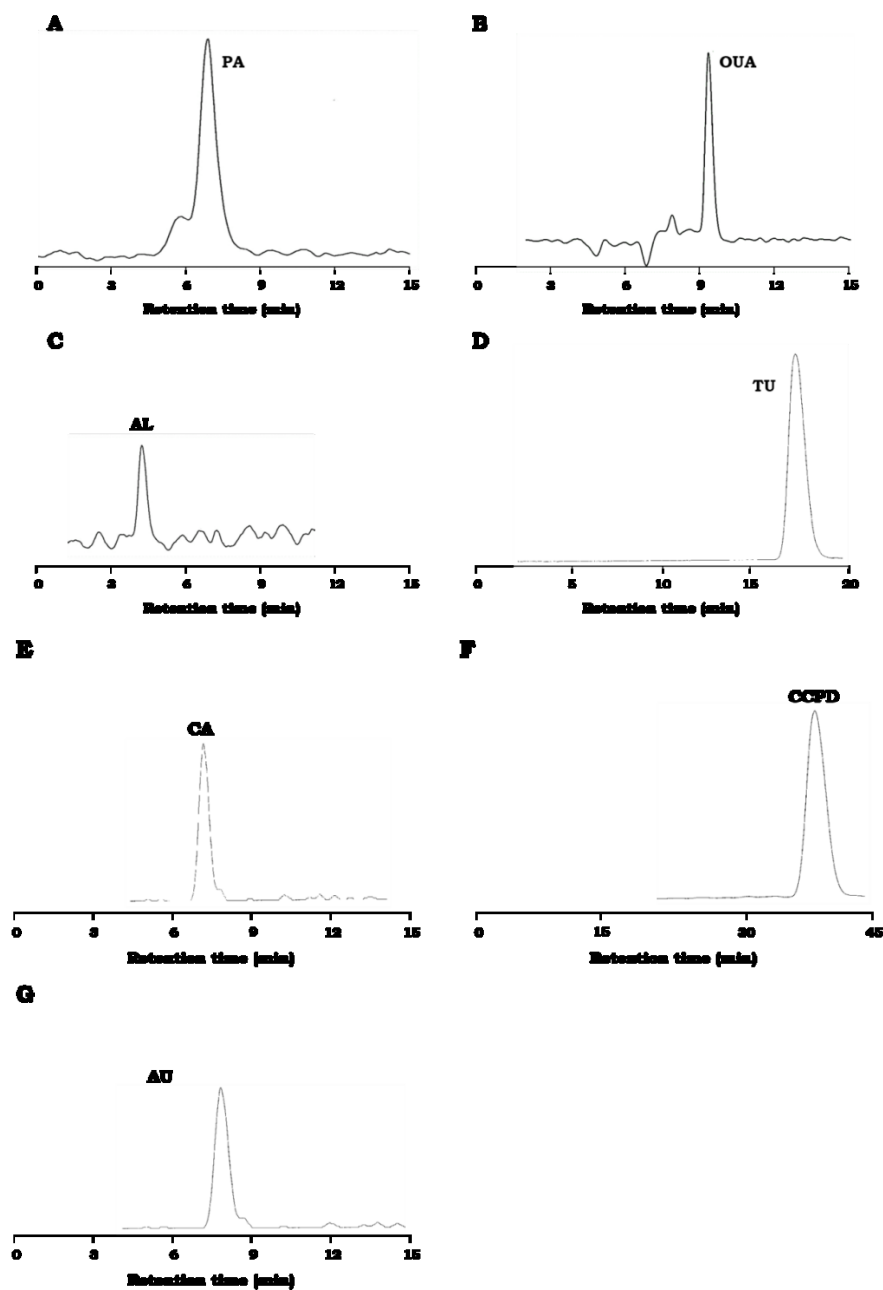


Fig. 4-1 PA (A), OUA (B), AL (C), TU (D), CA (E), CCPD (F), AU (G) の MS クロマトグラム

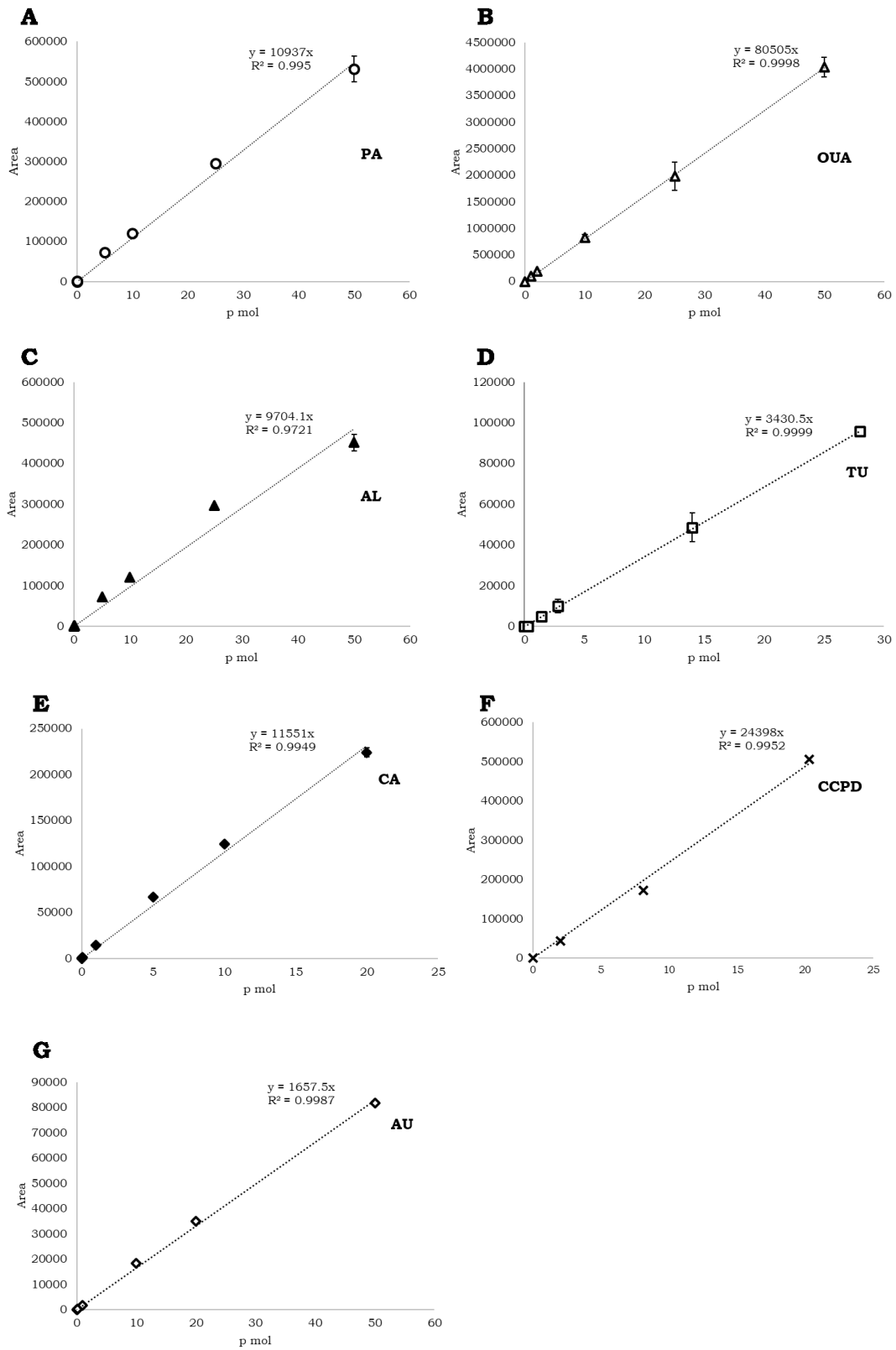


Fig. 4-2 PA (A), OUA (B), AL (C), TU (D), CA (E), CCPD (F), AU (G) の LC/MS/MS を用いて分析し、作成した検量線

### 3-2. ヒト血漿中における尿酸酸化生成物の安定性の検討

ヒト血漿に尿酸酸化生成物を添加すると、添加直後では CCPD と AU 以外は 95%以上、AU は 90%以上の回収率を得た (Table 4-1). しかしながら、CCPD は検出されなかった (Table 4-1). 24 時間後では CCPD と AU 以外は 90%以上、AU は 80%以上の回収率を得た (Table 4-1). CCPD は中性領域での pH では安定に存在することから、血漿中のタンパク質に吸着していることが予想された.

Table 4-1 健常人血漿中の各 UA 酸化生成物の回収率 (%)

| Time (hour) | UA    |        | PA    |        | OUA (PA) |       | OUA   |       |       |       |
|-------------|-------|--------|-------|--------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
|             | 0     | 24     | 0     | 24     | 0        | 24    | 0     | 24    |       |       |
| 回収率 (%)     | 98.7  | 98.2   | 0     | 0      | 98.8     | 97.0  | 103   | 94.8  |       |       |
| SD          | 0.439 | 0.485  | 0     | 0      | 0.319    | 0.113 | 0.402 | 0.443 |       |       |
| CV          | 4.74  | 3.46   | 0     | 0      | 3.37     | 4.69  | 3.92  | 2.80  |       |       |
| Time (hour) | AL    |        | TU    |        | CA       |       | CCPD  |       | AU    |       |
|             | 0     | 24     | 0     | 24     | 0        | 24    | 0     | 24    | 0     | 24    |
| 回収率 (%)     | 106   | 101    | 99.6  | 99.2   | 95.2     | 102   | ND    | ND    | 93.0  | 87.0  |
| SD          | 0.321 | 0.0711 | 0.340 | 0.0711 | 0.395    | 0.240 | ND    | ND    | 0.305 | 0.221 |
| CV          | 3.02  | 3.91   | 3.71  | 3.91   | 4.15     | 1.71  | ND    | ND    | 2.92  | 1.00  |

n = 9

### 3-3. 健常人, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び敗血症患者の血漿分析

健常人の血漿では UA のみが観察され, UA 酸化生成物は一切検出されなかった (Fig. 4-3 C, D). しかし, ALS 患者の血漿からは UA に加えて, TU と PA が検出された (Fig. 4-3 E, F). これは各標準溶液の検出時間とも一致しており, TU 及び PA であると推察された (Fig. 4-3 A, B, E, F). 加えて, いずれの患者からも TU と PA が検出された (Fig. 4-4, 4-5, 4-6).

一方, 敗血症の血漿からは TU と CA が検出された (Fig. 4-7 E, F). これは各標準溶液の検出時間とも一致しており, TU 及び CA であると推察された (Fig. 4-3). 加えて, いずれの患者からも TU と CA が検出された (Fig. 4-8, 4-9). 患者 D からは AL は検出されなかったが, 患者 E からは検出された.

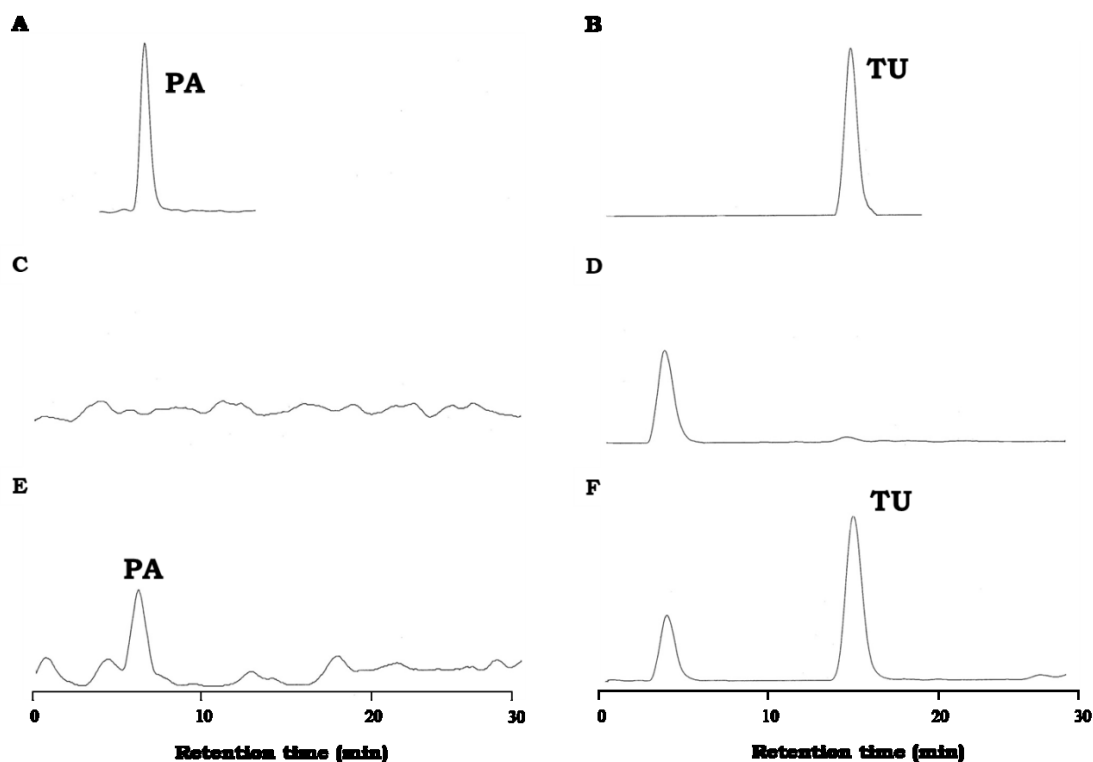


Fig. 4-3 ALS 患者血漿を分析した MS クロマトグラム  
PA 標準溶液 (A), TU 標準溶液 (B), 健常人血漿の PAMS クロマトグラム (C),  
健常人血漿の TU MS クロマトグラム (D), ALS 血漿の PA MS クロマトグラム (E),  
ALS 血漿の PA MS クロマトグラム (F)

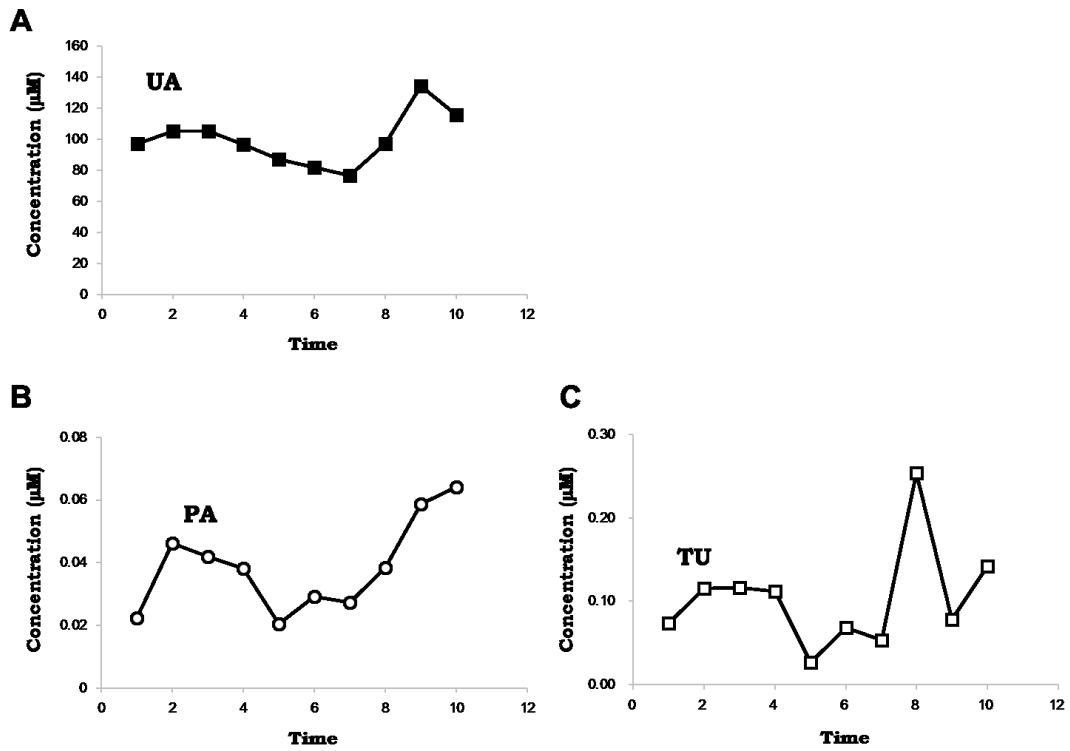


Fig. 4-4 ALS 患者 A の血漿を分析した MS クロマトグラム UA (A), PA (B), TU (C) の経時変化

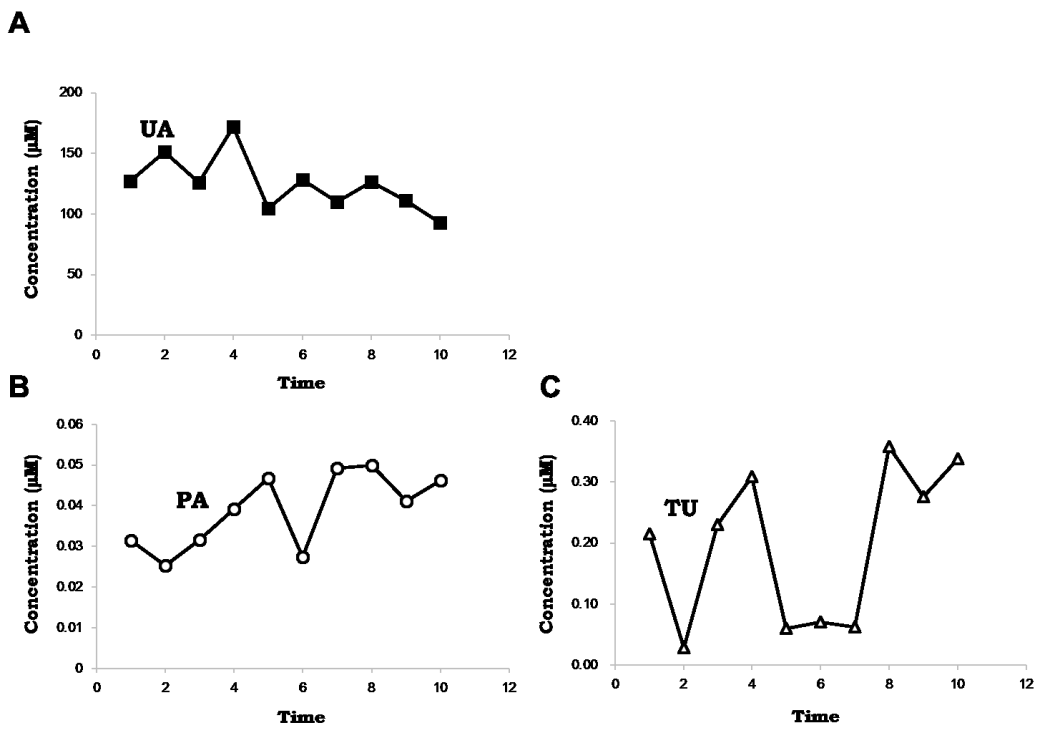


Fig. 4-5 ALS 患者 B の血漿を分析した MS クロマトグラム UA (A), PA (B), TU (C) の経時変化



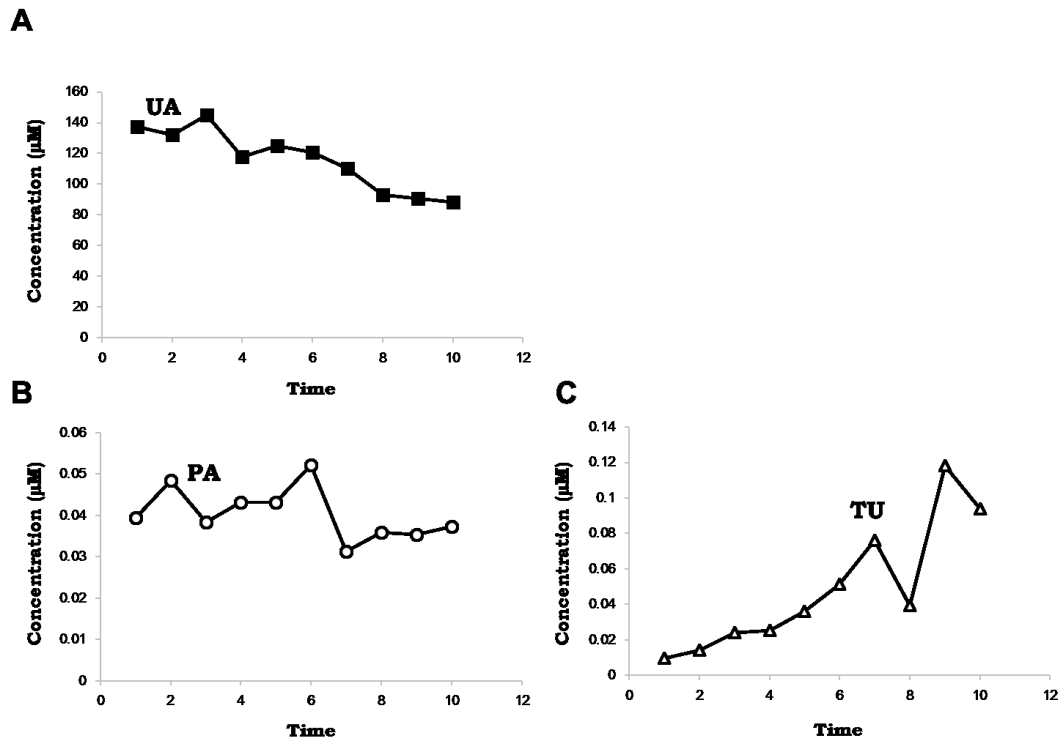


Fig. 4-6 ALS 患者 C の血漿を分析した MS クロマトグラム  
UA (A), PA (B), TU (C) の経時変化

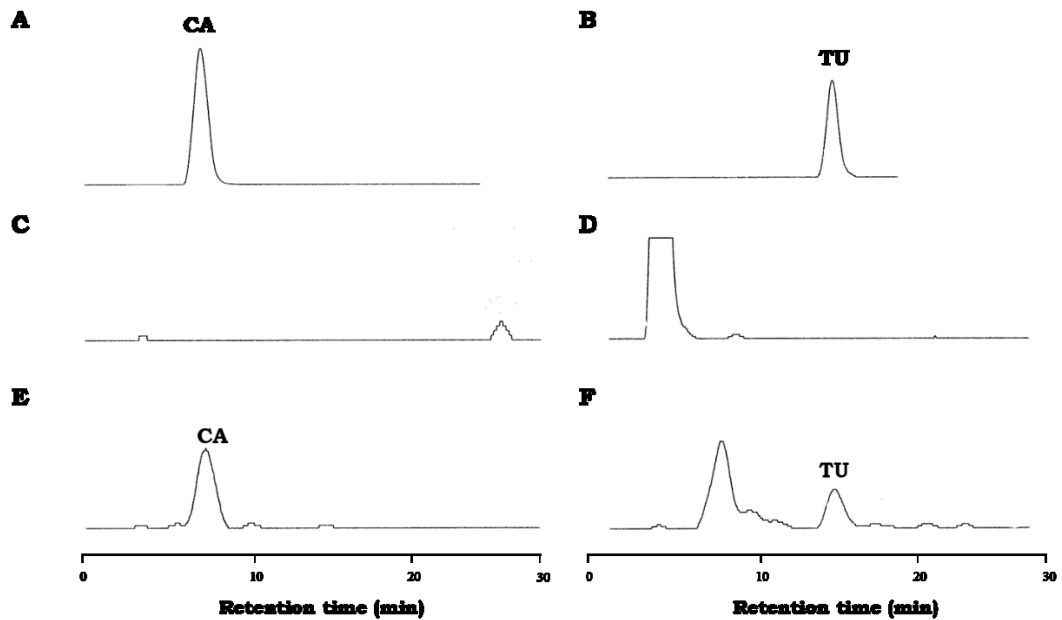


Fig. 4-7 敗血症患者血漿を分析した MS クロマトグラム  
PA 標準溶液 (A), TU 標準溶液 (B), 健常人血漿の PAMS クロマトグラム (C),  
健常人血漿の TU MS クロマトグラム (D), 敗血症血漿の PAMS クロマトグラ  
ム (E), 敗血症血漿の PA MS クロマトグラム (F)

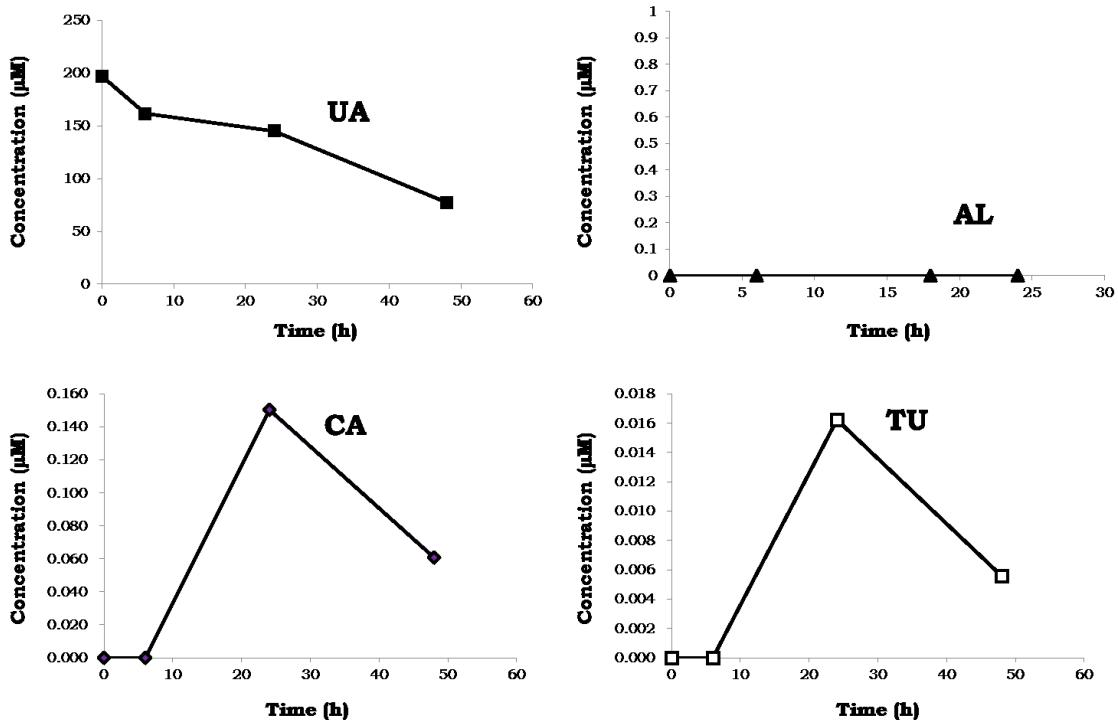


Fig. 4-8 ALS 患者 D の血漿を分析した MS クロマトグラム  
 UA (A) AL (B), CA (C), TU (D) の経時変化

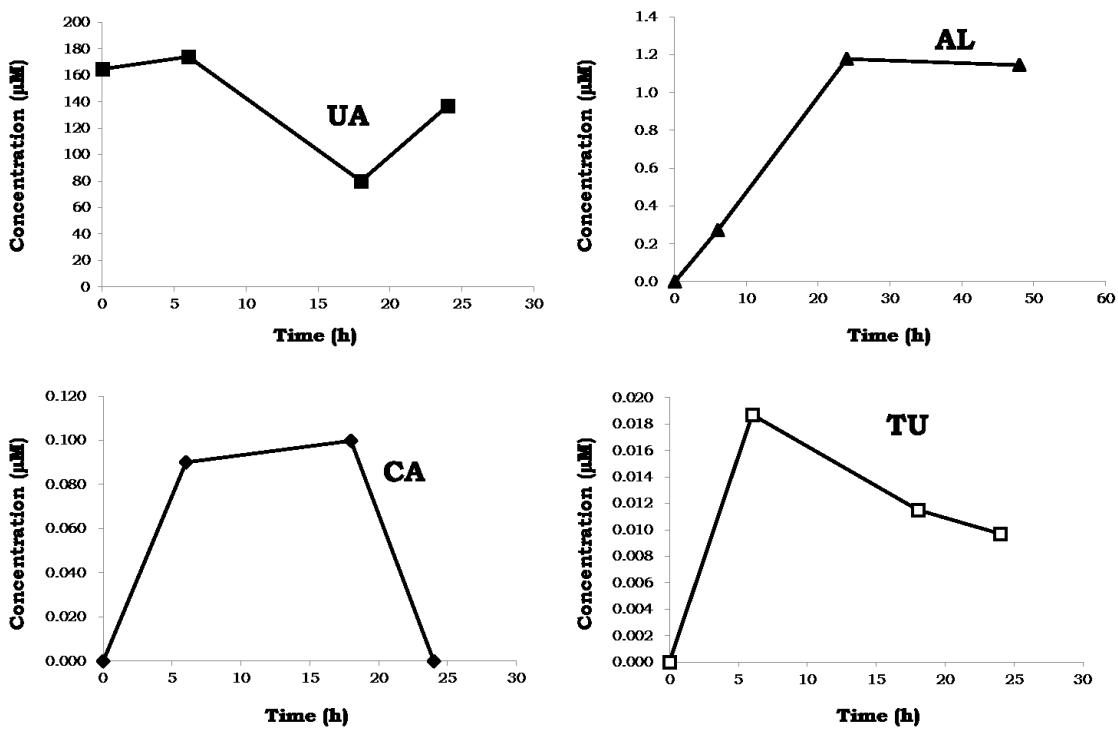


Fig. 4-9 ALS 患者 D の血漿を分析した MS クロマトグラム  
 UA (A) AL (B), CA (C), TU (D) の経時変化

#### 4. 考察

健常人の血漿中の UA 濃度は  $250\mu\text{M}$ -  $350\mu\text{M}$  程度であり, ALS 患者の UA 濃度は健常人に加えて極めて低いことが判明した. これは, ALS 患者の生体内において酸化ストレスが亢進していることを示唆している. 加えて, ALS 患者の血漿から TU と PA が検出された. TU が生体内から検出されたとの報告はあるが, 喫煙による血漿のみからの検出であった<sup>118)</sup>. このことから, 酸化ストレスの原因である ROS は少なくとも  $^1\text{O}_2$  と  $\text{ONOO}^-$  のであると推察された. ALS において  $\text{ONOO}^-$  が関与しているとの報告は 3-ニトロチロシンによって証明しているものがほとんどである<sup>43)</sup>. 3-ニトロチロシンに加えて ALS 患者の血漿から TU が検出されたことは ALS において  $\text{ONOO}^-$  が関与していることを強く示唆している. 一方, PA も検出されたことから, 生体内にて  $^1\text{O}_2$  が発生しているが示唆された. 現在までに光が当たらない生体内で  $^1\text{O}_2$  が発生していることは少数派であったが, 生体内で  $^1\text{O}_2$  が発生し, 酸化ストレスの亢進の一因になっていることが予想される. しかしながら, OUA が検出されなかったことは, OUA の検出限界以下であることが予想されるため, 更なる好感度分析手法が必要であると考えらえる.

敗血症患者の血漿中の尿酸は経時的に減少傾向であった. 敗血症患者の生体内において酸化ストレスが亢進していることを示唆している. また, 入院初期には CA と TU は認められなかったが, 時間経過とともに生成を認め, 24 時間以降には減少した. このことから, 敗血症には  $\text{ONOO}^-$  が関与していることを強く示唆している.

今後, ALS 以外の神経疾患や炎症疾患における酸化ストレス・マーカーへの応用が期待される.

# 第 5 章

## 結語

## 第 5 章 結語

尿酸を  $^1\text{O}_2$  と反応させ、反応生成物の同定を行った。光酸化にともない尿酸の減少と複数の不明化合物の生成を認めた。そのうちの 2 つの未知化合物 U1 と U2 の精密 MS スペクトルを測定してそれらの推定組成を求めたところ、U1 が  $\text{C}_3\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 、U2 が  $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$  となった。この結果から U1 をパラバン酸 (PA)、U2 をその加水分解生成物であるオキサリ尿酸 (OUA) と推定した。加えて、PA および OUA の標準物質を用い、U1 と U2 の HPLC クロマトグラム上での検出時間および LC/TOFMS を用いて MS スペクトルを各々比較したところ、検出時間および MS スペクトルが一致し、このことから両者を PA と OUA と同定した。また、NEPO の熱分解、および  $\text{H}_2\text{O}_2$  の 2 電子酸化により発生した  $^1\text{O}_2$  との反応においても同様に PA および OUA の生成を確認した。PA と OUA を定量してそれらの収率 (尿酸の減少量に対する PA と OUA の生成量の割合) を求めたところ、光酸化および NEPO を用いた系において 100% 近い収率となった。このことから、尿酸と  $^1\text{O}_2$  との反応では PA のみが生成することが示された。また興味深いことに  $\text{H}_2\text{O}_2$  の 2 電子酸化反応では酸化剤として  $\text{ClO}^-$  以外にも  $\text{ONOO}^-$  を用いたが、いずれの系でも高い収率 (37~50%) で PA および OUA の生成が認められた。このことから、炎症時や虚血・再灌流時のように  $\text{H}_2\text{O}_2$  と  $\text{ONOO}^-$  が共存することが予想される場合にも  $^1\text{O}_2$  が生成すると考えられる。

次に尿酸と  $\text{ClO}^-$  との反応を検討した。良く攪拌している尿酸溶液中に希釈した  $\text{NaClO}$  溶液を一定速度でゆっくりと導入すると、AL の生成は観察されず、HPLC クロマトグラム上に不明ピークが出現した。これは尿酸の経時的減少にともない生成したことから、プライマリーな反応生成物であると推察され、LC/TOFMS で分析したところ、その推定組成は  $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}$  となり、5-*N*-carboxyimino-6-*N*-chloroaminopyrimidine-2,4(3*H*)-dione (CCPD) であると推察した。また、UA の減少量に対する CCPD の生成量は 40~70% となり、UA と  $\text{ClO}^-$  との反応における主反応生成物であると考えられる。加えて、CCPD は中性領域では安定に存在することが判明した。

実際に健常人と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及び敗血症患者の血漿を分析したところ、健常人の血漿からは尿酸酸化生成物が一切検出されなかった。一方、ALS 患者の血漿中の尿酸濃度が健常人に比べて低いことから酸化ストレスが亢進していることが示唆された。加えて、PA 及び TU を検出したことから、生体内で  $^1\text{O}_2$  が発生していること、そして、病態に  $^1\text{O}_2$  と  $\text{ONOO}^-$  が関与していると考えられる。敗血症の血漿中からは CA と TU が検出されたことから、生体内で  $\text{ONOO}^-$  が発生し、病態に関与していると考えられる。

尿酸と  $^1\text{O}_2$  との特異的反応生成物を同定した。また、 $\text{ClO}^-$  との特異的反応生成物を見出した。現在までに報告された尿酸と ROS との反応生成物を網羅的に解析する手法を開発し、血漿からの検出が可能となった。今後、ALS 以外の神経疾患や炎症疾患などの *in vivo* で発生する ROS の同定が可能になると期待される。

## 第6章

### 引用文献および論文目録

引用文献

- 1) Hermann DM and Matter CM: Tissue plasminogen activator-induced reperfusion injury after stroke revisited. *Circulation*. 2007; **116**: 363-365.
- 2) Stephens JW, Khanolkar MP and Bain SC: The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009; **202**, 321-329.
- 3) Dekkers JC, vanDoornen LJ and Kemper HC: The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med*; 1996; **21**, 213-238.
- 4) Flynn TP, Allen DW, Johnson GJ and White JG: Oxidant damage of the lipids and proteins of the erythrocyte membranes in unstable hemoglobin disease. Evidence for the role of lipid peroxidation. *J Clin Invest*, 1983; **71**: 1215-1223.
- 5) Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M and Nyström T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; **97**: 5746-5749.
- 6) Kasai H, Okada Y, Nishimura S, Rao M.S. and Reddy J.K. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Res*. 1989; **49**: 2603-2605.
- 7) Ames BN, Gold LS and Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92**: 5258-5265.
- 8) Andrew O.Odegaard, David R. Jacobs Jr, Otto A. Sanchez, David C. Goff Jr, Alexander P. Reiner and Myron D. Gross. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and incidence of type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; **15**: 51.
- 9) Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS and Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 1997; **17**: 2653-2657.
- 10) Jaeschke H, Smith CV and Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest*. 1998; **81**: 1240-1246.



- 11) Yamamoto Y and Yamashita S. Plasma ubiquinone to ubiquinol ratio in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma, and in patients treated with percutaneous transluminal coronary reperfusion. *Biofactors*. 1999; **9**: 241-246.
- 12) Bandy B and Davison A.J. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radical Biology and Medicine*. 1990; **8**: 523-539.
- 13) H J H.Fenton. The oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Proc*. 1894; **10**: 157–158.
- 14) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; **87**: 1620-1624.
- 15) Josef S, Jorg T and Wolfgang A. Schmalix, Thomas Brill, J. Rudiger Siewert, Helmut Greim and Johannes Doehmer. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; **91**: 3559-3563.
- 16) Joseph K, Stela H and Rina G. Nitric Oxide, an Inhibitor of Lipid Oxidation by Lipoxygenase, Cyclooxygenase and Hemoglobin. *Lipid*. 1992; **27**: 46.
- 17) Schallreuter KU, Wood JM and Jurgen B. Low Catalase Levels in the Epidermis of Patients with Vitiligo. *J. Invest Dermatol*. 1991; **97**: 1081-1085.
- 18) Spencer JD, Gibbons NC, Rokos H, Peters EM, Wood JM and Schallreuter KU. Oxidative Stress Via Hydrogen Peroxide Affects Proopiomelanocortin Peptides Directly in the Epidermis of Patients with Vitiligo. *J. Invest Dermatol*. 2007; **127**: 411-420.
- 19) Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*; 1998; **92**: 3007-3017.
- 20) Weening RS, Wever R and Rose D. Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytosing human granulocytes. *J. Lab. Clin. Med*. 1975; **85**: 245-252.

- 21) Kettle AJ, Anderson RF, Hampton MB and Winterbourn CC. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochemistry*. 2007 ;**46** :4888-4897.
- 22) Ushijima Y and Nakano M. No or little production of singlet molecular oxygen in HOCl or HOCl/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: A model system for myeloperoxidase /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Cl<sup>-</sup>. *Biochem and Biophys. Res. Commun.* 1980; **93**: 1232-1237.
- 23) Umeno A, Shichiri M, Ishida N, Hashimoto Y, Abe K, Kataoka M, Yoshino K, Hagihara Y, Aki N, Funaki M, et al. Singlet oxygen induced products of linoleates, 10- and 12-(Z,E)-hydroxyoctadecadienoic acids (HODE), can be potential biomarkers for early detection of type 2 diabetes. *PLOS One*. 2013; **5**: e63542.
- .
- 24) Nakano M, Kambayashi Y, Tatsuzawa H, Komiyama T and Fujimori K. Useful <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) generator, 3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid, 1',4'-endoperoxide (NEPO), for dioxygenation of squalene (a skin surface lipid) in an organic solvent and bacterial killing in aqueous medium. *FEBS Letter*. 1998; **432**: 9-12.
- 25) Wagner JR, Motchnik PA, Stocker R, Sies H and Ames BN. The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J Biol Chem*. 1993; **268**: 18502-18506.
- 26) Morgan PE, Dean RT and Davies MJ. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. *Eur J Biochem*. 2002; **269**: 1916-1925.
- 27) Ravanat JL, Di Mascio P, Martinez GR, Medeiros MH, Cadet J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J Biol Chem*. 2001; **276**: 40601-40604.
- 28) Rosen H and Klebanoff SJ. Formation of Singlet Oxygen by the Myeloperoxidasemediated Antimicrobial System. *J Biol Chem*. 1977; **252**: 4803-4810.
- 29) Dunlap WC, Yamamoto Y, Inoue M, Kashiba-Iwatsuki M, Yamaguchi M, Tomita K. Uric acid photo-oxidation assay: in vitro comparison of sunscreens agents. *Int. J. Cosmet. Sci.* 1998; **20**(1):1-18.

- 30) Yamamoto Y, Imai N, Mashima R, Konaka R, Inoue M and Walter C. Dunlap. Singlet oxygen from irradiated titanium dioxide and zinc oxide. *Methods in Enzymology*. 2000; **319**: 29-37.
- 31) Rosen H and Klebanoff SJ. Formation of singlet oxygen by myeloperoxidase mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.*1977; **252**: 4803- 4810.
- 32) Mascio P, Etelvino J, HB Marisa, HG Medeiros, K Briviba and Sies H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Letters*. 1994; **355**: 287-289.
- 33) 大柳善彦. 活性酸素と病気, 化学同人. 1989. p. 56-57.
- 34) Otsu K, Sato K, Sato M, Ono H and Katagata Y. Impaired activation of caspase cascade during cell death induced by newly synthesized singlet oxygen generator, 1-buthylnaphthalene-4-propionate endoperoxide. *Cell Biology International*. 2008; **32**: 1380-1387.
- 35) Goldstein S and Czapski G. The reaction of NO with O<sub>2</sub> and HO<sub>2</sub> : A pulse radiolysis study. *Free Radical Biol. Med.* 1995; **19**: 505-510.
- 36) Huie RE and Padmaja S: The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun*. 1993; **18**: 195-199.
- 37) Cudd A and Fridovich I: Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1982; **257**: 11443- 11447.
- 38) Rigo A and Viglino P. Effect of ionic strength on the activity of bovine superoxide dismutase. *FEBS Letter* . 1975; **50**: 86-88.
- 39) Szabo C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxyxynitrite. *Free Radic Biol Med*. 1996; **21**: 855-869.
- 40) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ and Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*. 1993; **364**: 626-632.

- 41) Beckman JS, Carson M, Smith CD and Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*. 1993; **364**: 584.
- 42) Beal MF, Ferrante RJ, Browne SE, Matthews RT, Kowall NW, Brown RH . Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Jr. Ann Neurol*. 1997; 42(4): 644-654.
- 43) Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS and Perry G. Widespread peroxynitrite mediated damage in Alzheimer's disease. *J.Neuro sci*. 1997; **17**: 2653-2655.
- 44) Matthews RT, Yang L and Beal MF. S-Methyl thioctitrulline, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, protects against malonate and MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol*. 1997; **143**: 282-286.
- 45) Fukuyama N, Takizawa S, Ishida H, Hoshiai K, Shinohara Y and Nakazawa H. Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998; **18**: 123-129.
- 46) Ishiyama S, Hiroe M, Nishikawa T, Abe S, Shimojo T, Ito H, Ozasa S, Yamakawa K, Matsuzaki M, Mohammed MU et al. Nitric oxide contributes to the progression of myocardial damage in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circulation*. 1997; **95**: 489-496.
- 47) Szabolcs M, Michler RE, Yang X, Aji W, Roy D, Athan E, Sciacca RR, Minanov OP and Cannon PJ. Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase. *Circulation*. 1996; **94**, 1665-1673.
- 48) Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM and White CR. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1994; **375**: 81-88.
- 49) Thuraishingham RC, Nott CA, Dodd SM and Yaqoob MM. Increased nitrotyrosine staining in kidneys from patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2000; **57**: 1968–1972.

- 50) Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR and Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; **151**: 1250-1254.
- 51) Miller MJS, Thompson JH, Zhang XJ, Sadowska Krowicka H, Kakkis JL, Munshi UK, Sandoval M, Rossi JL, Eloby Childress S, Beckman JS, et al. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology.* 1995; **109**: 1475-1483.
- 52) Lamarque D and Whittle BJ. Role of oxygen derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors. *Eur J Pharmacol.* 1995; **277**: 187-194.
- 53) Kaur H and Halliwell B. Evidence for nitric oxide mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letter.* 1994; **350**: 9-12.
- 54) Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K and Nakazawa H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med.* 1997; **22**: 771-774.
- 55) Sato M, Fukuyama N, Sakai M and Nakazawa H. Increased nitric oxide in nasal lavage fluid and nitrotyrosine formation in nasal mucosa Indices for severe perennial nasal allergy. *Clin Exp Allergy.* 1998; **28** (5): 597-605,
- 56) Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 1990; **51**: 283-297.
- 57) Fridovich I. Superoxide radical and Superoxide Dismutase. *Annu Rev Biochem.* 1995; **64**: 97-112.
- 58) McCord JM and Fridovich I. Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 1969; **244**(22), 6049-6055.

- 59) Tolmasoff J.M, Ono T, Cutler RG. Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; **77**: 2777-2781.
- 60) Sato Y, Hagiwara K, Arai H and Inoue K. Purification and characterization of the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBSLetter*. 1991; **288**: 41-45.
- 61) Yamamoto Y, Yanagisawa M, Nyou Wei Tak, Watanabe K, Takahashi C, Fujisawa A, Kashiba M, and Tanaka M. Repeated edaravone treatment reduces oxidative cell damage in rat brain induced by middle cerebral artery occlusion. *Redox Report Communications in Free Radical Research*. 2009; **14** (6): 251-258.
- 62) Yamamoto Y, Kuwahara T, Watanabe K and Watanabe K. Antioxidant activity of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one. *Redox Rep*. 1996; **2**: 333–338.
- 63) Abe S, Kirima K, Tsuchiya K, Okamoto M, Hasegawa T, Houchi H, Yoshizumi M and Tamaki T. The reaction rate of edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186)) with hydroxyl radical. *Chem Pharm Bull*. 2004; **52**: 186–191.
- 64) Kamogawa E and Sueishi Y. A multiple free-radical scavenging (MULTIS) study on the antioxidant capacity of a neuroprotective drug, edaravone as compared with uric acid, glutathione and trolox. *Bioorg Med Chem Letter*. 2014; **24**: 1376–1379.
- 65) Fujisawa A, Yamamoto Y. Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxynitrite to produce predominantly 4-NO-edaravone. *Redox Rep*. 2016; **21**: 98–103.
- 66) Kraus RL, Pasieczny R, Lariosa-Willingham K, Turner MS, Jiang A and Trauger JW. Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *J Neurochem*. 2005; **94**: 819–827.
- 67) Banno M, Mizuno T, Kato H, Zhang G, Kawanokuchi J, Wang J, Kuno R, Jin S, Takeuchi H and Suzumura A. The radical scavenger edaravone prevents oxidative neurotoxicity induced by peroxynitrite and activated microglia. *Neuropharmacology*. 2005; **48**: 283-290.

- 68) Lee BJ, Egi Y, van Leyen K, Lo EH, Arai K. Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress *in vitro*. *Brain Res.* 2010; **1307**: 22-27.
- 69) Miyamoto N, Maki T, Pham LD, Hayakawa K, Seo JH, Mandeville ET, Mandeville JB, Kyu-Won Kim, Eng H.O and Arai K. Oxidative stress interferes with white matter renewal after prolonged cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke.* 2013; **44**: 3516–3521.
- 70) Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Yoshino H. Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration. *Redox Rep.* 2016; **21**(3): 104-112.
- 71) Sies H. Oxidative Stress: Introductory remarks. *Oxydative Stress.* 1985; 1-8.
- 72) Yin H, Havrilla C.M, Gao L, Morrow J.D, and Porter N.A. Mechanisms for the Formation of Isoprostane Endoperoxides from Arachidonic Acid. “DIOXETANE” INTERMEDIATE *VERSUS*  $\beta$ -FRAGMENTATION OF PEROXYL RADICALS. *J. Biol. Chem.* **2003**; *278*(19),16720-16725.
- 73) Roberts LJ and Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000; **28** (4): 505-513.
- 74) Morrow J D, KE Hill, RF Burk, TM Nammour, KF Badr, and LJ Roberts II. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; **87**: 9383-9387.
- 75) Davì G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation.* 1999; **99** (2): 224-229.
- 76) Yamamoto Y and Niki E. Presence of cholesteryl ester hydroperoxide in human blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Dec 29; **165**(3): 988-993.

- 77) Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 1991; **349** (6308): 431-434 .
- 78) Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saito H, Nishimura S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res*. 1984; **12**(4): 2127-2136.
- 79) D Gackowski, R Rozalski, A Siomek, T Dziaman, K Nicpon, M Klimarczyk, A Araszkievicz and R Olinski. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008; **266**: 57-62.
- 80) Yamashita S and Yamamoto Y. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a maker of oxidative stress. *Anal Biochem*. 1997; **250**: 66-73.
- 81) Hara K, Yamashita S, Fujisawa A, Ogawa T and Yamamoto Y. Oxidative stress in newborn infants with and without asphyxia as measured by plasma antioxidants and free fatty acids. *Biochem Biophys Commun*. 1999; **257**: 244-248.
- 82) Sohmiya M, Tanaka M, NyouWeiak, Yanagisawa M, Tanino Y, Suzuki Y, Okamoto K and Yamamoto Y. Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 2004; **223** (2): 161-166.
- 83) Sohmiya M, Tanaka M, Suzuki Y, Tanino Y, Okamoto K and Yamamoto Y. An increase of oxidized coenzyme Q-10 occurs in the plasma of sporadic ALS patients. *J Neurol Sci*. 2005; **228**(1): 49-53.
- 84) Wada H, Hagiwara S, Saitoh E, Ieki R, Okamura T, Ota T, Iguchi M, Yuasa K, Kodaka T, Koishi T et al. Increased oxidative stress in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as measured by redox status of plasma coenzyme Q10. *Pathophysiology*. 2006; **13** (1): 29-33.
- 85) Yamamoto Y and Yamashita S. Plasma ubiquinone to ubiquinol ratio in patients with hepatitis, cirrhosis, and hepatoma, and in patients treated with percutaneous transluminal coronary reperfusion. *Biofactors*. 1999; **9** (2-4): 241-246.



- 86) Crow JP and Beckman JS. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1995; **196**: 57-73.
- 87) Prutz WA, Moninger H, Butler J and Land EJ. Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1985; **234**: 125-134.
- 88) Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B and Cross CE: Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 7617-7625.
- 89) Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B and van der Vliet A. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem*. 1999; **38**: 2590-2600.
- 90) Gow A, Duran D, Thom SR and Ischiropoulos H. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys*. 1996; **333**: 42-48.
- 91) Lemercier JN, Padmaja S, Cueto R, Squadrito GL, Uppu RM and Pryor WA. Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 1997; **345**: 160-170.
- 92) Knowles ME, McWeeny DJ, Couchman L and Thorogood M. Interaction of nitrite with proteins at various pH. *Nature*. 1974; **247**: 288-289.
- 93) Byun J, Henderson JP, Mueller DM and Heinecke JW. 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes. *Biochemistry*. 1999; **38**: 2590-2600.
- 94) M. G. Simic and S. V. Jovanovic, Antioxidant mechanisms of uric acid. *J. Am. Chem. Soc*. 1989; **11**: 5778-5782.

- 95) Sautin, Y.Y and Johnson, J.R. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleos, Nucleot, Nucl. Acids*. 2008; **27** (6): 608-619.
- 96) Ames BN, Cathcart R, Schwiers E and Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; **78**: 6858-6862.
- 97) Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, JM Champion, GM Dickson, I Chaudhry and H Koprowski. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; **95**: 675-680.
- 98) Grootveld M, Halliwell B and Moorhouse CP. Action of uric acid, allopurinol and oxypurinol on the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid. *Free Radic Res Commun*. 1987; **4**: 69-76.
- 99) Kaur H, Halliwell B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem Biol Interact*. 1990; **73**: 235-247.
- 100) Robinson KM, Morré JT and Beckman JS. Triuret: a novel product of peroxynitrite-mediated oxidation of urate. *Arch Biochem Biophys*. 2004; **423**: 213-217.
- 101) Gersch C, Palii SP, Kim KM, Angerhofer A, Johnson RJ and Henderson GN. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008; **27**: 967-78.
- 102) J Pakpoor, OO Seminog, SV Ramagopalan and MJ Goldacre. Clinical associations between gout and multiple sclerosis, Parkinson's disease and motor neuron disease. *BMC Neurology*. 2015; **15**: 16.
- 103) 細山田真. 高尿酸血症と痛風, 2010, **18** (1), 1-4.
- 104) Davis JW, A Grandinetti, CJ Waslin, GW Ross, LR White and DM morens. Observations on Serum Uric Acid Levels and the Risk of Idiopathic Parkinson's Disease. *Am. J. Epidem*. 1996; **144** (5): 480-484.

- 105) Ascherio A, LeWitt PA, Xu K, Eberly S, Watts A, Matson WR, Marras K, Kieburtz A, Rudolph M, Bogdanov B, et al. Urate as a predictor of the rate of clinical decline in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2009; **66** (12), 1460-1468.
- 106) Keizman D, M Ish-Shalom, Berliner S, Maimoon N, Vered Y, Artamonov I, Tshehori J, Nefussy B and Drory VE. Low uric acid levels in serum of patients with ALS: Further evidence for oxidative stress? *J. Neurol. Sci.* 2009; **285**: 95-99.
- 107) Ikeda K, Kawabe K and Iwasaki Y. Do serum uric acid levels reflect oxidative stress in the progression of ALS? *J Neurol Sci.* 2009; **287**: 294.
- 108) Kim TS, Pae CU, Yoon SJ, Jang WY, Lee NJ, Kim JJ, et al. Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2006; **21**: 344-348.
- 109) Beal MF, Matson WR, Storey E, Milbury P, Ryan EA, Ozawa T and Bird ED. Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J Neurol Sci.* 1992; **108**: 80-87.
- 110) Lekishvili T, Sassoon J, Thompsett AR, Green A.; Ironside JW and Brown DR. BSE and vCJD cause disturbance to uric acid levels. *Exp Neurol.* 2004; **190**: 233-244.
- 111) Hayashi N, Togawa K, Yanagisawa M, Hosogi J, Mimura D, Yamamoto Y. Effect of sunlight exposure and aging on skin surface lipids and urate. *Exp Dermatol.* 2003; **12 Suppl 2**: 13-17.
- 112) Kato Y, Ogino Y, Aoki T, Uchida K, Kawakishi S, Osawa T. Phenolic antioxidants prevent peroxynitrite-derived collagen modification in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 1997; **45**: 3004–3009.
- 113) Adam W, Kazakov DV, Kazakov VP. Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions. *Chem. Rev.* 2005; **105**: 3371-3387.
- 114) Sueishi Y, Hori M, Ishikawa M, et al. Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; **54**: 67-74.

115) Niu QJ, Mendenhall GD. Yields of singlet molecular oxygen from peroxy radical termination., *J. Am. Chem. Soc.* 1992; **114**: 165-172.

116) Hillered L and Persson L. Parabanic acid for monitoring of oxygen radical activity in the injured human brain. *Neuroreport*. 1995 Sep 11; **6 (13)**: 1816-1820.

117) LK Stamp, R Turner, IS Khalilova, M Zhang, J Drake, LV Forbes and AJ Kettle. Myeloperoxidase and oxidation of uric acid in gout: implications for the clinical consequences of hyperuricaemia. *Rheumatology* . 2014; **53**: 1958- 1965.

118) KM Kim, GN Henderson, RF Frye, CD Galloway, NJ Brown, MS Segal, W Imaram, A Angerhofer and RJ Johnson. Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2009; 877 (1-2): 65-70.

学理論文を構成する論文

1. 題目 : Parabanic acid is the singlet oxygen specific oxidation product of uric acid.

印刷公表の方法及び時期

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. Volume 61,  
Number3 (November 2017), 169- 175

共著者名 : Yuki Ohkubo, Yorihiro Yamamoto, and Akio Fujisawa.

2. 題目 : 5-*N*-Carboxyimino-6-*N*-chloroaminopyrimidine-2,4(3H)-dione as a hypochlorite specific uric acid.

印刷公表の方法及び時期

Journal of Clinical Biochemistry (Accept)

共著者名 : Yorihiro Yamamoto, Chisato Susa, Kana Tsukui, and Akio Fujisawa

本論文に関連した学会発表

1. 口頭発表

- 1) 第 27 回 酸化ストレス学会関東支部会 (2012 年 12 月, 東京)
- 2) 第 66 回 酸化ストレス学会学術集会 (2013 年 6 月, 名古屋)
- 3) 第 30 回 酸化ストレス学会関東支部会 (2015 年 12 月, 東京)
- 4) 第 69 回 酸化ストレス学会学術集会 (2016 年 8 月, 仙台)
- 5) 8th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan (Hachioji, December 9th-12th, 2017)

2. ポスター発表

- 1) 6th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan (Sydney, September 12-14, 2013)
- 2) 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (Kyoto, March 23-26th, 2014)
- 3) 第 68 回 酸化ストレス学会学術集会 (2015 年 6 月, 鹿児島)
- 4) 7th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan (Christchurch, December 7th-10th, 2015)  
※Young Investigator Award 受賞
- 5) 第 70 回酸化ストレス学会学術集会 (2017 年 6 月, つくば)

## 謝辞

本論文は東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオクス専攻博士課程に在籍中の研究結果をまとめたものである。

本研究を進めるにあたり，同専攻藤澤准教授には終始あたたかいご指導と激励を賜り，心から感謝の意を表します。未熟な私を一から鍛え上げ，そして何よりも研究に対する面白さと難しさを教えてくださいました。

同専攻山本教授には研究内容に関わらず，数多の助言を頂きました。心から御礼申し上げます。同専攻杉山教授，遠藤教授，横山教授，今井教授には副査として助言を頂きましたこと，心から御礼申し上げます。

吉野神経内科の吉野先生と日本大学医学部木下先生にはサンプル提供に尽力して頂きました。提供にご協力して頂いた患者の皆様並びに先生方に心から御礼申し上げます。

東京工科大学応用生物学部岸さんには様々な実験機器を貸し出して頂きました。同専攻加柴准教授には常にあたたかく見守っていただきました。そして，今まで共に研究に取り組んできた全ての後輩たちに心から感謝の意を表します。

実験を始めたころ，経験不足を承知で任せて下さった日本工学院八王子専門学校校田中先生，本研究テーマに一から指導して頂いた大久保氏に心から御礼申し上げます。お二人がいなければここまで研究を進めようとは思いませんでした。

そして，博士課程への進学を応援し，サポートしてくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞といたします。

東京工科大学大学院  
抗酸化物質化学研究室  
飯田 沙也加