総説

新規抗酸化物質の設計・合成とその活性評価

野口 範子

東京大学先端科学技術研究センター (〒153 東京都目黒区駒場 4-6-1)

Design, Synthesis and Evaluation of Novel Radical-Scavenging Antioxidant against Lipid Peroxidation

Noriko NOGUCHI

Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo
(4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 〒153)

Abstract : With increasing evidence which shows the involvement of oxygen radicals in a variety of pathological events, cancer and aging, the role of antioxidants has received much attention. In order to develop a novel potent radical-scavenging antioxidant, the ideal structure of phenolic compound was designed considering the factors that determine antioxidant potency. 2,3-Dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-*t*-butylbenzofuran (BO-653) was thus synthesized and its antioxidant activity was evaluated against lipid peroxidations *in vitro*. The electron spin resonance study showed that the phenoxyl radical derived from BO-653 was more resonance-stabilized than α -tocopheroxyl radical and BO-653 reduced α -tocopheroxyl radical rapidly. Although the chemical reactivity of BO-653 toward peroxy radical was smaller than that of α -tocopherol, its antioxidant potency against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomal membranes and low density lipoprotein (LDL) was superior to that of α -tocopherol. Ascorbic acid reduced the phenoxyl radical derived from BO-653 in the homogeneous solution, but it did not spare BO-653 in the oxidation of liposomal membranes or LDL. It was concluded that BO-653 is a potent novel radical-scavenging antioxidant.

Key words : antioxidant ; lipid peroxidation ; free radicals ; α -tocopherol ; LDL.

1 はじめに

抗酸化物質は古くから工業分野や食品分野においてゴムや油脂の酸化劣化を防止するものとして関心をもたれてきた。さらに近年では、種々の疾病や老化に活性酸素、フリーラジカルによる酸化傷害が深くかかわっていることが明らかにされ^{1)~7)}、抗酸化物によるその防止が注目されており、天然抗酸化物質、合成抗酸化物質に関する研究がさかんに行われている^{8)~10)}。生体を構成する物質は、脂質、タンパク質、糖、核酸いずれも活性酸素、フリーラジカルによって酸化され、傷害を受けることが知られている^{11),12)}。なかでも、脂質の酸化はそのメカニズムについて、最も詳しく調べられている。抗酸化物質の活性、作用機序を明らかにするためには、酸化のメカニズムを正しく理解している必要がある。本稿では、脂質酸化のメカニズムを理解したうえで、これまで行われてきた種々の抗酸化物質の酸化抑制作用に関す

る研究によって蓄積された知識、技術をもとに、理論的により優れた抗酸化物質の設計がどのように行われるかを概説し、またその抗酸化物質の抗酸化活性の評価を実例をあげながら示す。

2 脂質酸化のメカニズム

脂質の酸化においては、高度不飽和脂肪酸の二重結合に挟まれたメチレン基が酸化を受けやすい¹³⁾。脂質の酸化は非ラジカルの酸化とラジカルの酸化にわけることができる。非ラジカルの酸化はリポキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼなどの酸化酵素によるもので、これらは酵素の種類によって位置特異的に酸化される。一重項酸素による酸化も非ラジカルの酸化に含まれる。非ラジカルの酸化は一分子の脂質の酸化に始まり、一分子の脂質ヒドロペルオキシドが生成して反応は終わる。これに対して、ラジカルの酸化は Fig. 1 に示すように、一つのラジカルが一分子の脂質を攻撃して脂質ラジ

Fig. 1 Peroxidation of Lipids by a Free Radical Chain Mechanism and its Inhibition.

AAPH, AMVN, MeO-AMVN : radical initiator ; $AO_2\bullet$: peroxy radical ; $X\bullet$: radical ; LH : lipid ; $L\bullet$: lipid radical ; $LO_2\bullet$: lipid peroxyl radical ; LOOH : lipid hydroperoxide

カル($L\bullet$)が生成すると(連鎖開始反応),これが酸素分子と速やかに反応して脂質ペルオキシラジカル($LO_2\bullet$)が生成する。 $LO_2\bullet$ は別の脂質を攻撃して脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)を与えるとともに $L\bullet$ が生成するため,また酸化が始まる(連鎖成長反応)。こうして一つのラジカルから始まった酸化が連鎖反応により繰り返し起こり,何分子もの脂質が酸化され,傷害が増幅されるのがラジカル酸化の特徴である。脂質の酸化がラジカルにより連鎖的に進行することは,均一溶液,リポソーム,そしてリポタンパクにおいて実験的に確認されている^{(14),(15)}。

低比重リポタンパク(LDL)の酸化は動脈硬化発症過程の重要な因子であることがよく知られており,多くの

研究がなされている^{(16),(17)}。LDLは脂質とタンパク質の粒子状複合体で,コレステロールエステル(CE)とトリアシルグリセリン(TG)が中心部を構成し,その外側をホスファチジルコリン(PC)と遊離のコレステロール(FC)から成る膜が取り囲んでいる。そしてこの表面に一分子のアポリポタンパク質-B 100(apoB)が組み込まれた状態になっている。PCおよびCEには高度不飽和脂肪酸がエステルの形で結合しており,この部分が酸化を受け,ヒドロペルオキシド(PCOOH, CEOOH)が生成する。PCOOH自身あるいはホスホリパーゼA₂(PLA₂)の作用により生成するリゾホスファチジルコリン(lyso PC)は種々の細胞に対する生理活性をもち,接着分子の発現を促したり⁽¹⁸⁾,遊走能や増殖能を促進することが知られている^{(19),(20)}。脂質ヒドロペルオキシドが蓄積すると,2次生成物であるアルデヒド,ケトン,アルコール等が生成する⁽²¹⁾。なかでもマロンジアルデヒド(MDA)や4-ヒドロキシノネナル(4-HNE)はapoBと結合し,apoBの変性を招いてマクロファージによる取り込みを上昇させる(Fig. 2)⁽²²⁾。

3 脂質酸化抑制のメカニズム

脂質の酸化が開始反応と成長反応の2つのステップで進行することから,脂質酸化の抑制は1)開始反応の抑制と2)連鎖成長反応の抑制の2つに分けて考えることができる。酸化開始反応の抑制はラジカルの発生を抑制すること,あるいはラジカルが脂質を攻撃する前に捕捉することによって達成できる。後者に属するものとして, a) ビタミンC^{(23),(24)},尿酸⁽²⁵⁾,アルブミン,ビリル

Fig. 2 Mechanism of Oxidative Modification of LDL.

The oxidation of LDL proceeds by free radical-mediated chain mechanism giving PCOOH, CEEOH and Aldehydes. The oxidative modification of apoB also occurs. The oxidative modified LDL is taken up by macrophage. VC : vitamin C ; UA : uric acid ; VE : vitamin E ; QH₂ : ubiquinol ; PC : phosphatidylcholine ; FC : free cholesterol ; CE : cholesteryl ester ; TG : triacylglycerol.

Table 1 Factors for Designing Ideal Potent Antioxidant.

(a)	Intrinsic chemical reactivity toward radical
(b)	Location
(c)	Concentration and mobility at the micro-environment
(d)	Fate of antioxidant-derived radical
(e)	Interaction with other antioxidants
(f)	Absorption, distribution, retention, metabolism and safety <i>in vivo</i>

ビン²⁶⁾が挙げられるが、これらは水相に存在して水相のラジカルが膜やリポタンパクなどの脂質を攻撃するのを防ぐことができる。ラジカルの発生を抑制するものとしては、b) トランスフェリン、セルロプラスミン、デスフェリオキサミンのように鉄や銅などラジカルの発生にかかわる金属を捕捉するもの、c) カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ²⁷⁾、エブセレン²⁸⁾などラジカルの発生に必要なヒドロペルオキシドを還元し安定なアルコールなどに変えるもの、などに分類することができる。SOD もスーパーオキシドを消去することにより、金属捕捉タンパク質からの金属の遊離や金属の還元を抑えることから、酸化の開始抑制に働くと考えられる。キサンチンオキシダーゼを阻害するアロプリノールも結果的に同じ作用を期待されるものである²⁹⁾。これらはいわゆる予防型抗酸化物と総称されるものである。この抗酸化物がうまく機能するかどうかは酸化の開始が何であるのか、いかにえれば、活性種が何であるのかによって左右される。

2) は連鎖成長反応の担体であるペルオキシルラジカルを捕捉して連鎖成長反応を抑える、いわゆるラジカル捕捉型抗酸化物である。ラジカル酸化のメカニズムからこの抗酸化物は酸化の開始の種類には依存しないことがわかる。われわれの生体に存在するものではビタミン

E^{30),31)}やユビキノール^{32),33)}、カロテノイド^{34),35)}がこれに属する。酸化開始の種類によらず酸化傷害を抑制することができるのは、ある意味でわれわれにとって非常に有利なことであるため、これまでに数多くのラジカル捕捉型抗酸化物について研究が行われており、多くの知見を得てきた。これをもとに設計された一つの抗酸化物質を紹介したい。

4 新規抗酸化物の設計と合成

ラジカル捕捉型抗酸化物の抗酸化活性は以下に示すようないくつかの因子によって決定される³⁵⁾。a) 抗酸化物自身のラジカルに対する化学的な反応性、b) 抗酸化物の存在場、c) 局所濃度と動きやすさ、d) 抗酸化物由来のラジカルの挙動、e) 他の抗酸化物との相互作用、f) 生体における吸収、分布、保持、代謝そして毒性または安全性 (Table 1)。

これらをすべて考慮にいれて考え出された脂溶性のフェノール抗酸化物が 2,3-dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-*t*-butylbenzofuran (BO-653) (Fig. 3) である。BO-653 を設計するにあたり重要視された点を以下にまとめた。

まず、フェノール性抗酸化物は脂質酸化の連鎖担体であるペルオキシルラジカルが脂質を攻撃する前に速やかに反応しなければならない。従って、ペルオキシルラジカルに対する高い反応性を有する必要がある。これを決定するのは、フェノール基の O-H 結合の結合解離エネルギーと、生成するフェノキシルラジカルの共鳴安定性、そしてペルオキシルラジカルによるフェノール基の水素引き抜きの際の立体障害である。Burton と Ingold^{36),37)}はフェノキシルラジカルの安定性に対する化学構造の影響について様々な化合物について研究を行った結果、トコフェロール (Fig. 3) のクロマン環の 6 員環を 5 員環に変換したものが共鳴安定性において非常に優れているという結論に達した。これは 6 員環に比

Fig. 3 Chemical Structure of BO-653, α-tocopherol and PMC.

べて5員環のエーテル酸素の p 軌道ローンペア電子が不対電子を含む軌道により広く重なっているからである。向井ら³⁸⁾も同様の結果を得、トコフェロールの中でK 1-chromanolとK 1-chromenolがもっとも高い反応性を持つことを見いだしている。これらの研究結果を考慮し2,3-dihydro-5-hydroxybutylbenzofuranがキー構造として選ばれた。

次に、クロマン環の置換基について考えられた。ペルオキシラジカルは電子親和性であるため、電子供与性の高い置換基は反応性を上げ、逆に電子吸引性の高い置換基は反応性を下げることが予測される。もう一つ重要なことは、抗酸化物由来のフェノキシラジカルの反応性もしくは安定性である。つまり、抗酸化物がペルオキシラジカルと反応した結果生じる抗酸化物由来のラジカルが、基質である脂質や酸化生成物、とくにヒドロペルオキシドと反応して連鎖反応を継続しない構造が望ましいわけである。この点を考慮してフェノール基を挟む4位と6位に t -butyl基を配置することに決定した。ただし、 t -butyl基はメチル基に比べてペルオキシラジカルが近づいて水素を引き抜く際に立体障害が大きくなる。さらに、2つめのペルオキシラジカルの7aの位置への結合が容易に起こり安定な生成物ができるように7位には置換基を付けずに空けておくように設計された。7位には二酸化窒素($\text{NO}_2\cdot$)などの置換も可能となる。

次に考えられたのは側鎖である。ビタミンEの類似物

質である pentamethyl-6-chromanol (PMC) (Fig. 3) は α -トコフェロールからフィチル側鎖を取り除いた構造をしている化合物で、ペルオキシラジカルに対する化学的反応性は α -トコフェロールと同じであるが¹⁴⁾、その生物学的な活性は非常に低いことが知られている³⁹⁾。トコフェロールの長い側鎖は膜やリポタンパクへの取り込みや保持に重要であると考えられる。その一方、側鎖が長くなればなるほど、膜中、膜間の動きは制限される^{14), 40)~42)}。これらを考え、2,2-dipentyl基が選ばれた。同じ pentyl 基を二個付けることのうちの利点は、不斉炭素がないため様々な解析、応用上の煩雑さを免れることである。

以上の点を考慮して理論的に最も優れたラジカル捕捉型抗酸化物として設計、合成されたものが BO-653 である⁴³⁾。

5 新規抗酸化物質の活性評価

次に行わなければならないことは、実際にこの新規化合物がどのような抗酸化活性を示すのかを調べることである⁴⁴⁾。

5.1 ガルビノキシラジカルとの反応性

メタノール均一溶液中で安定なラジカルであるガルビノキシラジカル(Gラジカル)とBO-653を反応させた。Gラジカルは429 nmに極大吸収をもつため、抗酸化物質が存在するとき、この波長の吸光度の変化を追うことにより、抗酸化物質のラジカルに対する反応性を知

Fig. 4 Reaction of BO-653 and α -Tocopherol. Equimolar concentration ($5.0 \mu\text{M}$) of galvinoxyl and BO-653 or α -tocopherol in acetonitrile were reacted and the consumption of galvinoxyl was followed by its absorption at 429 nm.

ることができる。Fig. 4にBO-653のGラジカルとの反応性をトコフェロールと比較して示した。この結果から、BO-653はGラジカルに対してトコフェロールとほぼ同様の反応性を示すことがわかった。

5・2 リノール酸メチルの酸化に対するBO-653の抗酸化効果

BO-653の連鎖停止能をより正確に評価するために、アセトニトリル均一溶液中におけるリノール酸メチルの脂溶性ラジカル開始剤AMVNによる酸化に対するBO-653の抗酸化活性を測定した(Fig. 5)。均一溶液中のリノール酸メチルの酸化のメカニズムはよく理解されており、速度論的解析が可能である^{(14),(45)~(47)}。酸化に伴い、一定速度でリノール酸メチルのヒドロペルオキシドの生成が見られる。BO-653が存在しない場合は、誘導期はまったくみられない。BO-653は濃度依存的に酸化を抑制し、明確な誘導期を示した。誘導期の長さは式(1)から予測されるとおり、BO-653の濃度に比例している。

$$t_{inh} = n[IH]/R_i \quad (1)$$

t_{inh} = 誘導期, n = 一分子の抗酸化物が捕捉するペルオキシラジカルの数(化学量論数), $[IH]$ = 抗酸化物の濃度, R_i = 酸化開始速度

抗酸化物によるリノール酸メチルの酸化抑制速度は式(2)で表される。

$$R_{inh} = \frac{k_p[LH]R_i}{nk_{inh}[IH]} \quad (2)$$

R_{inh} = 誘導期の酸化速度, k_p , k_{inh} = 連鎖成長反応, ラジカル捕捉反応のそれぞれの反応速度定数, $[LH]$ = 脂質の濃度。

Fig. 5 Inhibition of Oxidation of Methyl Linoleate by BO-653 in Acetonitrile. Methyl linoleate (453 mM) was oxidized in acetonitrile in the presence of AMVN (0.20 mM) without or with various concentrations of BO-653 at 37°C in air.

式(1)と(2)から式(3)が得られる。実験で求められたデータを代入すると式(4)と(5)が得られ、さらに式(6)が求められる。

$$\frac{k_{inh}}{k_p} = \frac{[LH]}{T_{inh} R_{inh}} \quad (3)$$

$$t_{inh} = 1.55 \times 10^9 \times [BO-653] \quad (4)$$

$$R_{inh} = 1.30 \times 10^{-13} / [BO-653] \quad (5)$$

$$\frac{k_{inh}}{k_p} = [LH] / 2.02 \times 10^{-4} \quad (6)$$

この反応に用いられたリノール酸メチルの濃度 $[LH] = 453$ mMを導入すると, k_{inh}/k_p は 2.24×10^3 と算出される。これはBO-653とリノール酸メチルのペルオキシラジカルの反応がリノール酸メチルとリノール酸メチルのペルオキシラジカルとの反応より2000倍速いことを示している。同じ条件下で求めたトコフェロールの k_{inh}/k_p は 4.55×10^3 であることからトコフェロールの方がBO-653よりも2倍速くペルオキシラジカルと反応することがわかる。この理由として、両オルト位の *t*-butyl基による立体障害があるため、リノール酸メチルのペルオキシラジカルがBO-653のフェノール基の水素原子に近づきにくくなっていることが考えられる。

5・3 BO-653ラジカルの安定性

ベンゼン中でBO-653をGラジカルもしくはAMVNと反応させると、BO-653由来のフェノキシラジカルのESR (electron spin resonance) シグナルが検出できる(Fig. 6)。このラジカルの安定性をトコフェロキシラジカルとの比較において調べた。まず、GラジカルとBO-653を反応させBO-653ラジカルのシグナルが観察されるころへ、 α -トコフェロールを添加すると、BO-653ラジカルのシグナルはほとんど変化せず、微小なトコフェロキシラジカルのシグナルが確認されるだけであった。今度は逆に、まず、Gラジカルと α -トコフェロールを反応させトコフェロキシラジカルのシグナルが観察されるころへ、BO-653を添加すると、トコフェロキシラジカルのシグナルはほとんどすべてBO-653ラジカルのシグナルに置き換わった。この結果から、BO-653ラジカルはトコフェロキシラジカルよりもはるかに安定であることと、BO-653はトコフェロキシラジカルを還元することがわかった。

5・4 α -トコフェロールとの相互作用

リノール酸メチルのアセトニトリル均一溶液中の酸化反応において、同じ濃度の α -トコフェロールとBO-653を共存させた場合の2つの抗酸化物の減少を追跡した(Fig. 7A)。BO-653がわずかに速く減少するが、両方ほぼ同時に減少することがわかる。5・2に示したように、 α -トコフェロールはBO-653よりもリノール酸メチルのペルオキシラジカルに対する反応性が高いの

Fig. 6 Spectra of Phenoxyl Radical Derived from BO-653 and α -Tocopherol as Studied by ESR. ESR spectra was detected in benzene under vacuum at room temperature.

Fig. 7 Competitive Consumption of BO-653 and α -Tocopherol.

(A) Equimolar amounts ($2.1 \mu\text{M}$) of BO-653 and α -tocopherol were incubated in the presence of methyl linoleate (450 mM) and AMVN (0.2 mM) in acetonitrile at 37°C in air. (B) Equimolar amounts ($3.0 \mu\text{M}$) BO-653 of and α -tocopherol were incorporated into soybean PC (5.15 mM) liposomal membranes together with AMVN (1.0 mM) and incubated at 37°C in air.

で、この反応系においても BO-653 よりも速くペルオキシラジカルを捕捉して、トコフェロキシラジカルになっているはずである。BO-653 も α -トコフェロールよりも遅いがペルオキシラジカルを捕捉する一方、トコフェロキシラジカルを還元して α -トコフェロールを再生していると考えられる。 α -トコフェロールの減少が完全に抑えられないのは、BO-653 によるトコフェロキシラジカルへの還元速度がトコフェロキシラジカルとペルオキシラジカルとの反応を完全に抑えるほど速くないためであろう。

これに対してリポソーム膜の酸化における BO-653 の α -トコフェロールのスパー効果は顕著である (Fig.

7 B)。 α -トコフェロールは膜中では長い側鎖があるためにその動きが制限されることや、膜のより深部に存在するラジカルほど捕捉しにくくなることが知られている⁴⁸⁾。BO-653 は膜の表層部、深部いずれに存在するラジカルをも捕捉することが ESR を用いた実験により確認されている。これは BO-653 は脂溶性が高いため膜中に広く分布し、また側鎖も α -トコフェロールのフィチル側鎖ほど長くないので動きの制限を受けにくいと考えられる。

5.5 LDL の酸化に対する BO-653 の抑制作用

LDL をラジカル開始剤を用いて酸化すると、内因性の α -トコフェロールが減少し、その間 PC や CE のヒ

ドロペルオキシド (PCOOH, CEOOH) の生成は抑制されており、 α -トコフェロールが消費されてなくなると、これらの生成速度は大きくなることが知られている¹⁵⁾。BO-653 を投与した WHHL ウサギの血漿から分離精製した LDL をラジカル開始剤を用いて酸化すると、リポソーム膜の酸化と同様、BO-653 が α -トコフェロールよりも先に減少し、 α -トコフェロールの減少を抑え、ヒドロペルオキシドの生成も遅らせる (Fig. 8)。この現象はリポソームの酸化の場合と同様に説明することができるであろう。ある特定の酸化条件下では、 α -トコフェロールが減少する過程で速い速度でヒドロ

Fig. 8 Effect of BO-653 on Oxidation of LDL induced by AAPH.

BO-653 containing LDL was isolated from WHHL rabbit which was administered with BO-653. The oxidation of LDL was induced by 0.5 mM AAPH at 37°C in air.

ペルオキシドが生成する場合がある。これはトコフェロキシルラジカルが脂質のビスアリル水素を引き抜き、酸化を進行させるためであると説明されている^{49),50)}。BO-653 の減少過程においてこのような酸化はみられないことから、BO-653 ラジカルによる酸化は起こっていないと考えられる。ESR の研究で明らかにされたように、BO-653 ラジカルが安定なためであると考えられる。したがって、BO-653 は LDL の酸化を非常に効果的に抑制する抗酸化物であるということが出来る。

5・6 アスコルビン酸との相互作用

新規抗酸化物質の抗酸化活性を評価するときに、考えなければならないもうひとつ重要な因子は水溶性抗酸化物質との相互作用である。アスコルビン酸はラジカルが膜の深部にいくほど捕捉しにくくなることは確認されているが⁵¹⁾、膜中や LDL 中のトコフェロキシルラジカルが水相のアスコルビン酸によって還元され α -トコフェロールが再生されることはよく知られている¹⁴⁾。リノール酸メチルの均一溶液酸化反応系に BO-653, α -トコフェロール、そしてアスコルビン酸を共存させると、最初はアスコルビン酸だけが減少し、BO-653, α -トコフェロールの両方をスベアする (Fig. 9 A)。ESR の実験結果と合わせ考えると、均一溶液中では、BO-653 も α -トコフェロールもそのラジカル体はアスコルビン酸によって還元され再生されると結論づけられる。ところが、興味深いことに、リポソームや LDL では全く異なる結果が得られた。リポソーム膜や LDL 粒子の中に存在する BO-653 ラジカルは、トコフェロキシルラジカルのように水相のアスコルビン酸によって完全に

Fig. 9 Effect of Ascorbic Acid on Consumption of BO-653 and α -Tocopherol.

(A) Methyl linoleate (71.3 mM) was oxidized in methanol solution at 37°C in air in the presence of AMVN (0.20 μ M), BO-653 (2.0 μ M), α -tocopherol (2.0 μ M) and ascorbic acid (15 μ M). (B) BO-653 containing LDL was isolated from WHHL rabbit which was administered with BO-653. The oxidation of LDL was induced by 200 μ M MeO-AMVN after addition of 30 μ M ascorbic acid into LDL suspension.

還元されることはなかった (Fig. 9 B)。均一溶液における結果との違いは、まだ充分明らかにされてはいないが、おそらく α -トコフェロールが膜や LDL の表層近くに位置し、水相のアスコルビン酸と接触しやすい状態にあるのに対し、BO-653 はより深部に存在しているのではないかと考えられる。

6 おわりに

理論に基づき設計、合成された新規抗酸化物質 BO-653 は期待どおり優れた抗酸化作用を LDL を含め様々な反応系で示すことがわかった。さらに、動脈実験でも期待されたとおりのすぐれた抗酸化作用が認められており⁵²⁾、物理化学的考察、*in vitro* 実験成果が *in vivo* へも発展できることが示された例として興味深い。その挙動については、化学構造から予測できるもの、あるいは充分説明できるものも多いが、実験を行ってみて初めてわかったこともあった。また、得られた結果についてまだ説明できないこと、あるいはまだ解明できない機構が存在することなど、今後さらに研究を重ね解決していかなければならないことが数多く残されていることも事実である。優れた抗酸化物質が開発されることは実用的な意味で有用であるとともに、このような研究を通して、酸化と抗酸化のメカニズムにより深くせまることができるのではないかと期待している。

(受付: 1997 年 5 月 8 日, 受理: 1997 年 6 月 20 日)

文 献

- 1) B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Rad. in Biol. Med.* 2nd, Clarendon Press, Oxford, England (1989).
- 2) W.G. Stillwell, H.X. Xu, J.A. Adkins, J.S. Wishnock, S.R. Tannenbaum, *Chem. Res. Toxicol.*, 2, 94 (1989).
- 3) B.N. Ames, *Free Radical Res Commun.*, 7, 121 (1989).
- 4) H. Kaur, B. Halliwell, *Chem. Biol. Interac.*, 73, 235 (1990).
- 5) E.R. Stadtman, C.N. Oliver, *J. Biol. Chem.*, 266, 2005 (1991).
- 6) H. Sies, ed. "Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants", Academic Press, London and New York (1991).
- 7) B. Halliwell, M. Dizdaoglu, *Free Radical Res. Commun.* 16, 75 (1992).
- 8) B. Frei, Ed. "Natural Antioxidants in Human Health and Disease", Academic Press, San Diego (1994).
- 9) J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, Eds. "Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease", Oxford Medical Pub., Oxford (1995).
- 10) 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃 真 編, "抗酸化物質: フリーラジカルと生体防御", 学会出版センター (1994).
- 11) B. Halliwell, S.Chirico, *Am. J. Clin. Nutr.*, 57, 715S (1993).
- 12) B. Halliwell, *Free Rad. Res.*, 25, 57 (1996).
- 13) 日本化学会編, "活性酸素種の化学", 学会出版センター (1990).
- 14) E. Niki, T. Saito, A. Kawakami, Y. Kamiya, *J. Biol. Chem.*, 259, 4177 (1984).
- 15) N. Noguchi, N. Gotoh, E. Niki, *Biochim. Biophys. Acta*, 1168, 348 (1993).
- 16) D. Steinberg, S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo, J.L. Witztum, *N. Engl. J. Med.*, 320, 915 (1989).
- 17) H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jurgen, *Free Radical Biol. Med.*, 13, 341 (1992).
- 18) J.K. Kim, M.C. Terrioto, E. Wayner, T.M. Carlos, F. Parhami, C.W. Smith, M.E. Haberland, A.M. Fogelman, J.A. Berliner, *Arterioscl. Thromb.*, 14, 427 (1994).
- 19) S. Yui, T. Sasaki, A. Miyazaki, S. Horiuchi, M. Yamazaki, *Arterioscl. Thromb.*, 13, 331 (1993).
- 20) Y.C. Chai, P.H. Howe, P.E. DiCorleto, G.M. Chisolm, *J. Biol. Chem.*, 271, 17791 (1996).
- 21) H. Esterbauer, M. Rotheneder, G. Striegl *et al.*, *Fat Sci. Technol.*, 91, 316 (1989).
- 22) H. Esterbauer, M. Dieber-Rotheneder, G. Waeg *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 77 (1990).
- 23) A. Bendich, L.J. Machlin, O. Scandarra, *Free Radical Biol. Med.*, 2, 419 (1986).
- 24) E. Niki, *World Rev. Nut. Diet.*, 64, 1 (1991).
- 25) 寺尾純二, 活性酸素フリーラジカル, 2, 247 (1991).
- 26) R. Stocker, A.N. Glazer, B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 5918 (1987).
- 27) F. Ursini, M. Maiorino, C. Gregolin, *Biochim. Biophys. Acta*, 839, 62 (1985).
- 28) N. Noguchi, Y. Yoshida, H. Kaneda, Y. Yamamoto, E. Niki, *Biochem. Pharmacol.*, 44, 39 (1992).
- 29) V. Massey, H. Komai, G. Palmer, G.B. Elion, *J. Biol. Chem.*, 245, 2837 (1970).
- 30) G.W. Burton, *Annu. Rev. Nutr.*, 10, 357 (1990).
- 31) 三木正之, 二木鋭雄, 活性酸素フリーラジカル, 3, 522 (1992).
- 32) Y. Yamamoto, E. Komuro, E. Niki in "Oxidative Damage and Repair" (K.J.A. Davies, ed.) Pergamon, London (1991) p. 287.
- 33) R.E. Beyer, *Free Radical Biol. Med.*, 8, 545 (1990).
- 34) N.I. Krinsky, *Free Radical Biol. Med.*, 7, 617 (1989).
- 35) E. Niki, N. Noguchi, H. Tsuchihashi, N. Gotoh, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62 (Suppl), 1322S (1995).
- 36) T. Doba, G.W. Burton, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 6505 (1983).
- 37) G.W. Burton, K.U. Ingold, *Acc. Chem. Res.*, 19, 194 (1986).
- 38) K. Mukai, K. Okabe, H. Hosose, *J. Org. Chem.*, 54, 557 (1989).
- 39) L.J. Machlin, Ed. "Vitamin E", Marcel Dekker, New York (1980).
- 40) L. Castle, M.J. Perkins, *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 6381 (1986).
- 41) E. Niki, E. Komuro, M. Takahashi, S. Urano, E.

- Ito, K. Terao, *J. Biol. Chem.*, **263**, 19809 (1988).
- 42) M. Iwatsuki, E. Niki, S. Kato, *BioFactors*, **4**, 123 (1993).
- 43) K. Tamura, Y. Kato, M. Yoshida, O. Cynshi, Y. Ohba, *Patent Publication WO 94/08930* (1994).
- 44) N. Noguchi, Y. Iwaki, M. Takahashi, E. Komuro, Y. Kato, K. Tamura, O. Cynshi, T. Kodama, E. Niki, *Ach. Biochem. Biophys.*, **342**, 236 (1997).
- 45) G.W. Burton, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6472 (1981).
- 46) L.R.L. Barclay, *Can. J. Chem.*, **71**, 1 (1993).
- 47) J.P. Consgrrove, D.F. Church, W.A. Pryor, *Lipids*, **22**, 299 (1987).
- 48) M. Takahashi, J. Tsuchiya, E. Niki, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6350 (1989).
- 49) V.W. Bowry, K.U. Ingold, R. Stocker, *Biochem. J.*, **288**, 341 (1992).
- 50) V.W. Bowry, D. Mohr, J. Cleary, R. Stocker, *J. Biol. Chem.*, **270**, 5766 (1995).
- 51) M. Takahashi, J. Tsuchiya, E. Niki, S. Urano, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **34**, 25 (1988).
- 52) O. Cynshi, Y. Kawabe, T. Suzuki, Y. Takashima, H. Kaise, M. Nakamura, Y. Ohba, Y. Kato, K. Tamura, A. Hayasaka, A. Higashida, H. Sakaguchi, M. Takeya, K. Takahashi, N. Noguchi, E. Niki, T. Kodama, submitted.
-

〔総説〕 臨床現場からみた過酸化脂質測定の意義

川村 武^{*1}・大久 良晴^{*2}

^{*1} 宮城大学看護学部 (〒981-36 宮城県大和町学苑 1-1)

^{*2} 宮城健康保険病院 (〒982 宮城県仙台市太白区長町 2-4-18)

組織障害においてはフリーラジカルによる脂質過酸化反応が大きな役割を果たしている事が指摘されている。従って過酸化脂質を測定する事は種々の疾患における脂質過酸化反応の関与を知るうえにおいて重要である。例えばストレスによって胃粘膜局所における脂質過酸化反応が惹起されるが、そのことが胃粘膜障害発現に関与するとされる。同様のことは糖尿病や肝臓病等の疾患においても認められている。通常過酸化脂質の測定は臨床的には八木法として知られる TBA 法や MCDP 法が用いられている。我々は更に不飽和脂肪酸とその過酸化物を同時に測定できる方法として化学発光 HPLC による分析システムを確立し検討してきた。その結果ストレス負荷は脂質過酸化反応を惹起させ、障害発現にかかわるが、同時に生体の適応反応としての抗酸化能も亢進することを認めている。従って病態解明においては過酸化脂質を測定だけではなく、抗酸化能の測定も生体における酸化的ストレスへの適応能を知り、また疾患への関与を知るうえにおいても重要である。

(連絡者：川村 武) Vol. 46, No. 10, 1159 (1997)

〔総説〕 新規抗酸化物質の設計・合成とその活性評価

野 口 範 子

東京大学先端科学技術研究センター (〒153 東京都目黒区駒場 4-6-1)

種々の疾病に活性酸素、フリーラジカルが関与するという報告が増えるに従い、抗酸化物質の役割が注目されるようになってきた。優れたラジカル捕捉型の新規抗酸化物質の開発を目的とし、抗酸化活性を決定する因子をすべて考慮に入れ、理論的により優れた抗酸化物質が設計された。これにより合成されたのが、2,3-dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-*t*-butylbenzofuran (BO-653) であり、*in vitro* の系において脂質酸化に対するその抗酸化活性評価を行った。電子磁気共鳴装置を用いた実験結果から、BO-653 由来のフェノキシラジカルは α -トコフェロキシラジカルよりも安定で、BO-653 は α -トコフェロキシラジカルを速やかに還元することがわかった。BO-653 のペルオキシラジカルに対する化学的反応性は α -トコフェロールよりも小さいが、リポソーム膜や低比重リポタンパク (LDL) の酸化に対しては α -トコフェロールよりも優れていた。アスコルビン酸は均一溶液中では BO-653 由来のフェノキシラジカルを還元するが、リポソーム膜や低比重リポタンパク (LDL) の酸化においては BO-653 をスペアーしないことがわかった。BO-653 は総じて優れたラジカル捕捉型の抗酸化物であることが結論づけられた。

(連絡者：野口 範子) Vol. 46, No. 10, 1167 (1997)