論文特集「化学における活性化の新展開」——ノート——

(日本化学会誌, 1984, (11), p.1739~1743)
© 1984 The Chemical Society of Japan

超音波によりチミン水溶液に生じる化学反応

(1984年3月14日受理)

牧野圭祐**・和田啓男**・武内民男**・波多野博行*

1 緒 言

超音波は現在医学において診断ならびに治療に広く用いられており^{1)~8)}, 将来もさらに広範囲に用いられることが予想されるが, その生体におよぼす影響についてはいまだ不明確な部分が多い。American Institute of Ultrasound in Medicine の The Biological Effects Committee は超音波の生物学的影響についての論文などを総括しつつのような発表を行なっている¹⁾。

「周波数が低 MHz (0.5~10 MHz) 域の 100 W/cm² 以下の強度の超音波の場合, 照射を受けた哺乳類の組織について重大なる生物学的影響が確認されたことはない」。しかしながら一方では市販の治療用超音波照射装置 (0.75 MHz) を用い, ギニーピッグ脚部に *in vivo* での照射を行なった結果, 80 W/cm² の強度の超音波でも脚部組織にキャビテーションの生成が認められた⁴⁾。

このようにきわめて複雑な超音波と生体の相互作用に関する基礎的情報を得ることを目的として, 生体関連化合物を含む水溶液への超音波照射で誘起される化学反応に関する研究が過去 50 年にわたって行なわれてきた^{5)~10)}。水溶液への超音波照射に関する一連の研究によって示唆されてきたことは, 超音波照射によっても γ 線照射の場合と同様にきわめて反応性の高いヒドロキシルラジカル (以下 $\cdot\text{OH}$ と略記する), 水と電子 (以下 e_{aq}^- と略記す

る) および水素原子 (以下 $\cdot\text{H}$ と略記する) などの水分子由来の初期活性種の生成があるのではないかということであり, これらが超音波の生体におよぼす影響に直接関与しているのではないかということであった。最近, 牧野らは 3 種類のニトロ化合物を, スピントラップ剤としたスピントラッピング法を用いることによって, Bransonic 12 型超音波洗浄浴 (50 kHz) 中で照射を行なうことにより $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{H}$ がキャビテーション中での水分子の直接的分解反応により生成することの可能性のきわめて高いことを示し¹¹⁾¹²⁾, さらに歯科医で歯垢の除去に使用されている超音波洗浄器 (Dentsply/Cavitron, Model 1010, 25 kHz) を用いた場合にも同様の活性種のスピニングダクトがわずかな数分間の照射で生成することを示した¹³⁾。また彼らの報告によれば, e_{aq}^- の生成の可能性は低いとされている。

$\cdot\text{OH}$ は γ 線照射に関する研究の中で γ 線の生体への間接効果の 7 割程度に関与すると報告されており¹⁴⁾, このような活性種の生成は超音波と生体の相互作用を解析するうえできわめて重要な意味をもつ。以上のような歴史的背景をふまえ, 本研究においては e_{aq}^- の生成をとまわらない $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{H}$ らの生成, ならびに $\cdot\text{OH}$ および $\cdot\text{H}$ の生体中での反応性を検討することを目的とし, 核酸の構成成分であり放射線に感受性の高いチミンをモデル化合物として選択し, この水溶液に超音波照射を行ない, 最終生成物を分析し, 得られた結果を同試料の γ 線照射によって得られた結果と比較検討した。

2 実 験

用いたチミン水溶液の濃度はすべて 1 mmol $\cdot$ dm⁻³ であり, 試料は試験管に入れ, Branson 52 H 型超音波洗浄浴 (45 kHz) 中で一定の場所に固定し, 試料水面と洗浄浴水面とが同一高になるようにしてアルゴンを通気しながら照射した。なお液温は, 適宜氷塊を洗浄浴中に加えることによって約 25°C にたもった。照射後の試料溶液は高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。使用した装置は UV モニターならびにグラジエント装置を具備した東洋曹達工業(株)製 HLC-803 D 型高速液体クロマトグラフである。またその測定条件は以下のものである。

京都大学理学部化学科, 606 京都市左京区北白川
** 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科, 606 京都市左京区松ヶ崎

- 1) F. W. Kremkau, "Diagnostic Ultrasound, Physical Principles and Exercises", Grune & Statton, New York (1980)
- 2) J. I. Distasio, "Ultrasonics as a Medical Diagnostic Tool", Noyes Data Corporation, Park Ridge, N. J., USA, (1980).
- 3) F. W. Kremkau, *J. Clin. Ultrasound*, **7**, 287 (1979).
- 4) G. R. ter Haar, S. Daniels, *Phys. Med. Biol.*, **26**, 1145 (1981).
- 5) I. E. Elpiner, "Ultrasound, Physical Chemistry and Biological Effects", Consultants Bureau, New York (1964).
- 6) A. Weissler, *Nature*, **193**, 1070 (1962).
- 7) M. Anbar, I. Pecht, *J. Phys. Chem.*, **71**, 1246 (1967).
- 8) S. B. Reifsnider, L. A. Spurlock, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 299 (1973).
- 9) E. L. Mead, R. G. Sutherland, R. E. Verrall, *Can. J. Chem.*, **53**, 2394 (1975).
- 10) J. R. McKee, C. L. Christman, W. D. O'Brien, Jr., S. Y. Wang, *Biochemistry*, **16**, 4651 (1977).

- 11) K. Makino, M. M. Mossoba, P. Riesz, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3537 (1982).
- 12) K. Makino, M. M. Mossoba, P. Riesz, *J. Phys. Chem.*, **87**, 1369 (1983).
- 13) K. Makino, M. M. Mossoba, P. Riesz, *Radiat. Res.*, **96**, 416 (1983).
- 14) E. J. Hall, "Radiobiology for the Radiologist", 2nd Ed., Harper and Row, New York (1978).

カラム, 東洋曹達工業(株)製 ODS-120 T; 流速, $0.5 \text{ cm}^3/\text{min}$, 試料注入量, $2 \times 10^{-5} \text{ dm}^3$; 検出器波長, 210 nm; 測定温度, 室温。溶離液は水-メタノール混合系をつぎのように直線グラジエントして用いた。メタノール濃度; 0~15% (20 分間), 15~50% (5 分間)。なお, 他の溶離液については, たとえばリン酸緩衝液-メタノール系など種々試みたが, 超音波分解生成物による ODS カラムの劣化が生じ, 結果に再現性がなく, 水-メタノール系が最適であった。

3 結果・考察

図 1 に, 超音波照射を 60 分間行なったチミン水溶液から得られたクロマトグラムを示した。図中に示したように, 超音波照射によっても γ 線照射の場合にチミンと $\cdot\text{OH}$ の反応によって生成することが知られている 5,6-ジヒドロキシ-5,6-ジヒドロチミン (別名チミングリコール, 以下 TG と略記する) ならびに 5-(ヒドロキシメチル)ウラシル (以下 HMU と略記する) の生成が確認された。この結果は過去に薄層クロマトグラフィーを用いて得られた結果とも一致した⁹⁾。しかしながら γ 線照射によって生成すると考えられる他の特徴的化合物は超音波照射の場合には検出されなかった。ジヒドロチミン (以下 DHT と略記する) が生成しないことを明確にするために, DHT 水溶液に超音波照射を行ない, この化合物が 60 分間の照射ではほとんど分解されないことを確認した。

一方, 図 2(a) に示したように, 空気存在下での 700 Gy の総線量を与える γ 線照射を行なったチミン水溶液から得られたクロマトグラム中には, TG および HMU の生成に加えて, 6-ヒ

Fig. 1 High performance liquid chromatographic separation of the sonicated aqueous thymine solution

Chromatographic conditions: Column, TSK-ODS-120 T; Sample injection, $2 \times 10^{-2} \text{ cm}^3$; Flow rate, $0.5 \text{ cm}^3/\text{min}$; Low strength eluent, Water; High strength eluent, 100% methanol; Gradient, from 0 to 15% methanol in 20 min and from 15 to 50% in 5 min; Detection, 210 nm; Temperature, ambient.

ドロキシ-5,6-ジヒドロチミン (以下 HDT と略記する) の生成が確認された。また同様の γ 線照射を, アルゴンを十分に通気することで脱気したチミン水溶液に対して行なった場合には図 2(b) に示したように, TG, HMU および HDT に加えて DHT の生成が認められた。

以下得られた結果から超音波照射によって誘起される活性種についての議論を行なう。

空気共存下および非共存下での γ 線照射で得られた結果に対するメカニズムは, 過去の論文などに発表された結果と照らし合わ

Fig. 2(a) High performance liquid chromatographic separation of the aerated aqueous thymine solution which was γ -irradiated

Chromatographic conditions as in Fig. 1

Fig. 2(b) High performance liquid chromatographic separation of the deaerated aqueous thymine solution which was γ -irradiated

Chromatographic conditions as in Fig. 1

Scheme 1 Proposed scheme for the degradation of thymine(I)

Scheme 2 Proposed scheme for the degradation of thymine(II)

せてつぎの2種類が存在するものと考えられる(図式1, 2)^{15)~17)}。空気共存下での γ 線照射の場合, 生成物は図式1で主として生成すると考えられるが, 図式2の共存をまったく否定するものではない。またこの場合, e_{aq}^- および $\cdot H$ の一部は系中に存在する酸素(約 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)と反応するが, チミンとも競争的に反応する。一方, 空気非共存系では図式2が進行するものと考えられるが, 初期活性種の攻撃によって生成する短寿命フリーラジカルは引きつづき生じる種々の反応により最終生成物へ変化すると考えられている。また水溶液への γ 線照射によっては, 一重項酸素分子¹⁷⁾ならびに三重項酸素原子¹⁸⁾などが生成するという報告もあり, これらが図式1および2で重要な役割を果たすことも考えう

る。以上のような経路で生成すると考えた γ 線照射による最終生成物に関する考察から, 無酸素状態での超音波照射系で得られた最終生成物の分析結果はつぎの結論を与えた。

TG および HMU の生成は, $\cdot OH$ がチミンの C5, C6 間の二重結合に付加反応したことおよび C5-位のメチル基から水素引き抜き反応を行なったことを意味しており, 超音波照射によって水分子が開裂したことを示している。また超音波照射系では DHT の生成が認められなかったが, これは超音波による水分子の開裂が e_{aq}^- の生成をともしないものであり, ホモリティックな開裂であることを示すものである。 e_{aq}^- が生成するかいなかという点は今日なお不明瞭な点として残されており, たとえば Verrallらの薄層クロマトグラフィーを用いた研究では e_{aq}^- 生成についての議論はまったくなされていない⁹⁾。

本研究で得られた結果は, e_{aq}^- が生成しないということを示す数少ない証拠である。またこの結果は, γ 線照射系での DHT の生成が $\cdot H$ の攻撃によるよりも, e_{aq}^- の攻撃によるものであるということも示唆している。すなわち図式1において反応(1)の方が(2)よりも, 図式2において(4)の方が(5)よりも可能

- 15) J. Hüttermann, W. Köhnlein, R. Téoule, A. J. Bertinchamps, "Effects of Ionizing Radiation on DNA", Springer Verlag, Berlin (1978).
- 16) J. Cadet, M. Berger, R. Téoule, *Sov. J. Quantum Electron*, 11(12), 1576(1981).
- 17) 山本 修編, "放射線障害の機構", 学会出版センター(1982).
- 18) W. G. Brown, E. J. Hart, *J. Phys. Chem.*, 82, 2539 (1978).

Fig. 3 Sonolytic degradation of aqueous thymine solutions

● : Thymine, ○ : 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymine,
⊙ : 5-(Hydroxymethyl)uracil

性の高いことを示している。なぜならば、前にも示したように DHT は超音波照射では分解しにくく、また水への超音波照射では $\cdot\text{OH}$ の生成とともに等量の $\cdot\text{H}$ が生成することが強く示唆されているにもかかわらず DHT は検出されなかったからである。さらに、超音波照射の場合には HDT が検出されなかったが、この事実は、 γ 線照射で HDT が生成する場合、 $\cdot\text{OH}$ あるいは $\cdot\text{H}$ の攻撃による短寿命フリーラジカルを出発物質とするよりも e_{aq}^- の攻撃およびプロトン付加によって生成するラジカルを経由して生成する可能性の高いことを示唆するものである。このことは、図式 2 中の番号 (3) で示した電子移動などの反応が超音波照射系ではおきにくいことを示すものである。

図 3 には超音波照射による最終生成物の照射時間依存を、図 4 (a) および (b) にはおのおの空気共存下ならびに非共存下での γ 線照射の最終生成物の総線量依存を示した。これらの図から、たとえば超音波照射の場合、30 分間の照射ですでに総線量 800 Gy の γ 線照射の場合と匹敵する量の TG ならびに HMU の生成が得られることがわかる。これは $\cdot\text{OH}$ の生体に対する影響を考慮した場合、非常に重要な意味をもつと考える。

以上、市販の超音波洗浄浴を用いた実験の結果、チミン水溶液中には $\cdot\text{OH}$ との反応生成物が多量に検出され、過去の報告同様に $\cdot\text{OH}$ の生成が示唆された。また e_{aq}^- の生成は認められず、

Fig. 4(a) Radiolytic degradation of aerated aqueous thymine solutions

● : Thymine, ○ : 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymine,
◐ : 6-Hydroxy-5,6-dihydrothymine, ⊙ : 5-(Hydroxymethyl)uracil

Fig. 4(b) Radiolytic degradation of deaerated aqueous thymine solutions

● : Thymine, ○ : 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymine,
◐ : Dihydrothymine, ◑ : 6-Hydroxy-5,6-dihydrothymine,
⊙ : 5-(Hydroxymethyl)uracil

$\cdot\text{OH}$ は水分子のホモリティックな分解により生成されることが示唆された。

Special Articles on
the Progress of Generating Active Species in Chemistry—Note—

Studies on Ultrasound-induced Reactions in Aqueous Thymine Solutions

Keisuke MAKINO**, Hiroo WADA**, Tamio TAKEUCHI** and Hiroyuki HATANO*

*Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University; Kitashirakawa,
Sakyo-ku, Kyoto-shi 606 Japan*

*** Department of Polymer Science and Engineering, Faculty of Textile Science,
Kyoto Institute of Technology; Matsugasaki, Sakyo-ku,
Kyoto-shi 606 Japan*

Aqueous thymine solutions were sonicated in an ultrasonic cleaning bath with argon bubbling and the final degradation products were analyzed by high performance liquid chromatography. By comparison of the obtained data with those from γ -radiolyses of aerated and deaerated thymine solutions, it was found that hydroxyl radicals were produced through the scission of water molecules and this cleavage did not involve the degradation of hydrated electrons, implying the homolytic scission. It was also found that the yield of the hydroxyl radical obtained from 30 min sonication was equivalent to that from radiolytic degradation for the total dose of 800 Gy.