

スピントラッピングESR法による パプラール製剤のスーパーオキシドラジカル 消去活性の速度論的研究

京都工芸繊維大学繊維学部 応用生物学科

田嶋 邦彦 渡部るしる 金折 賢二

要 旨

パラジウムと白金の混合コロイド溶液であるパプラール製剤と活性酸素の反応機構を、電子スピン共鳴 (ESR) によるスピントラッピング測定法で検討した。今回は、キサンチンオキシダーゼ (XOD) がキサンチン (X) を酸素酸化する過程で生成するスーパーオキシドラジカルと5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) の反応で生成するDMPO-OOラジカルを測定対象として、パプラール製剤のスーパーオキシドラジカルに対する消去活性を評価した。DMPO-OOラジカルの濃度はパプラール製剤の添加量が増加するにつれて段階的に減少した。観測結果をスーパーオキシドラジカルに対するDMPOとパプラール製剤との競争反応として解析した。DMPO-OHラジカルの濃度がコントロールの50% (ID₅₀) に減少したパプラール製剤の希釈率は3.0%であった。以上の知見から、金属コロイドの表面で進行する特異な酸化還元反応とパプラール製剤の優れたヒドロキシラジカル消去活性を議論する。

キーワード：パプラール製剤, 活性酸素, スーパーオキシドラジカル, 消去活性, ESR, スピントラッピング

緒 言

活性酸素ラジカルは好気性生物が酸素の還元的代謝過程で副産する短寿命で化学反応性の高いラ

ジカル種の総称であり、スーパーオキシドラジカル、ヒドロキシルラジカル等が代表例である。生体系には活性酸素種に対する防御系としてスーパーオキシド消去酵素 (SOD) あるいはカタラーゼなどの酵素の他にビタミンEおよびC等の活性

Antioxidant Activity of Papuraru, a Colloidal Mixture of Pt and Pd metal, to Superoxide Anion Radical as Studied by Quantitative Spin Trapping ESR Measurements

Kunihiko TAJIMA (Division of Biophysical Chemistry, Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan) et al.

酸素消去系が存在している¹⁾。しかし、活性酸素ラジカルの生成と防御のバランスが崩れるとラジカル障害と呼ばれる様々な疾患、たとえば動脈硬化、心筋梗塞、ガンあるいは虚血再灌流障害などに陥ると考えられている²⁾。今日、活性酸素種が関与するラジカル障害の機構解析と平行して、抗ラジカル障害薬剤の開発が多方面で精力的に行われている³⁾。

生物ラジカルを直接的に検出する分光学的な手法は、不対電子の電子スピンを測定対象とする電子スピン共鳴法 (ESR) である⁴⁾。しかし、ESR法によっても、極めて短寿命で反応性の高い活性酸素ラジカルの直接ESR検出は困難である。そのため、活性酸素種を安定な長寿命ラジカルに変換してESR検出する方法として、スピントラッピングESR法^{5, 6)}が有用である。さらに、ESR法の定量性と見かけの感度を改善するために、フローインジェクションESR法 (FI-ESR)⁷⁾が開発された。FI-ESRとスピントラッピングを併用することで、活性酸素ラジカルと抗酸化物質の反応速度解析におけるESR法の精度が向上した。

我々はFI-ESR法を白金とパラジウムの混合コロイド溶液であるパプラール製剤と活性酸素ラジカルの反応機構解析に応用している。パプラール製剤は野口英雄博士の発案に基づいて石塚三郎博士がその製法を確立した金属コロイド懸濁液であり、白金およびパラジウムを0.2mg/mlおよび0.3mg/ml含有し、それらの平均粒子径は約300nmおよび約600nmである。金属コロイドが関与する酸化還元反応だけでなく、コロイド表面における触媒作用がパプラール製剤の重要な生理活性として注目されている。すでにパプラール製剤とヒドロキシルラジカルの消去反応速度をFI-ESR法で研究している¹⁾。パプラール製剤は過酸化水素の紫外線分解で生成するヒドロキシルラジカルに対して極めて高い消去活性を有し、原子あたりの2次反応速度定数は $2.0 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ に達し、最強のヒドロキシルラジカル消去物質であるアスコルビン酸を数桁上回る活性を有することを報告している。

パプラール製剤と活性酸素の反応様式を明らかにするために、FI-ESR法とスピントラッピング

法を併用して、キサンチンオキシダーゼ⁸⁾とキサンチンの反応で生成するスーパーオキシドラジカルとパプラール製剤反応機構を検討した。本論文では、パプラール製剤とスーパーオキシドラジカルの速度論的な反応解析について報告する。

実 験

1. 測定装置

ESR測定にはES-KIT-100型電子スピン共鳴装置 (日本電子 (株)) を使用した。フローインジェクション (FI-ESR) 測定システムは高速液体クロマトグラフ分析用 (HPLC) のポンプ、6方切り替えバルブ、インジェクションバルブおよびESRフローセルで構成され、これらを通常のHPLC用のPEEKチューブ (外径1.58mm, 内径0.13mm) で接続した。フローESRセルは水溶液扁平石英セルを使用した。DMPO/OOラジカルの濃度は、安定ラジカルであるTEMPOLのESR信号強度と濃度の検量線から評価した。また、磁場掃引形式で観測するESR信号の強度補正には外部標準試料として酸化マグネシウムに希釈したMn (II) イオンを使用した。

2. 試 薬

パプラール製剤 ((株) 東洋厚生製薬所) は3.0ml中にコロイド状の白金0.6mgとパラジウム0.9mgを含む水溶液で、その主な効能は急性胃炎および胃粘膜損傷に対する効果である¹⁰⁾。パプラール製剤の原液を超純水 (Q-II) で希釈した溶液を測定に試用し、その濃度は希釈率 (体積%) で示した。比較のために、3.0mlの超純水中に白金0.56mgおよびパラジウム0.9mgを含むコロイド溶液を測定に使用した。DMPOは市販の試薬 (ラボテック (株)) を精製せずにそのまま測定に使用した。ESR信号の強度補正にはTEMPOL (2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine-N-oxyl, 和光純薬) をそのまま使用した。Sigma社から購入しキサンチンオキシダーゼ (XOD) およびキサンチン (X) のリン酸緩衝溶液 (0.1M) pH7.4を測定に供した。その他の試薬は特級試薬を使用し、測定の直前に所定の濃度の溶液を調製した。

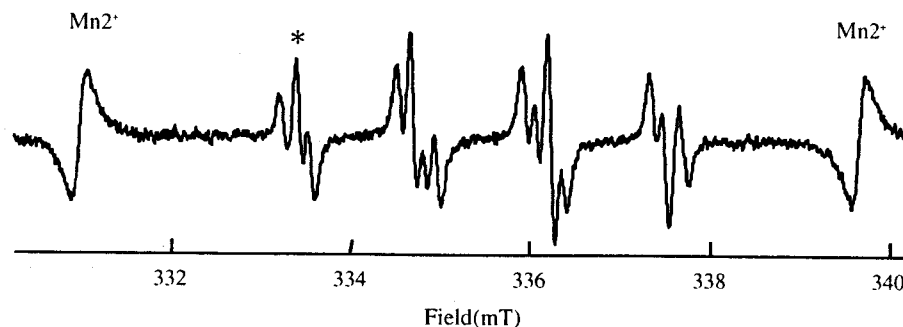


Fig. 1 ESR spectrum of DMPO/O radical recorded at room temperature for the reaction solution composed of XOD (0.06 unit/ml), X (2.0 mM), DMPO (50 mM), and DTPA (0.1 mM) in PBS buffer (0.1 M) at pH 7.4.

The asterisk shows the fixed magnetic field for FI-ESR measurements.

結 果

1. スーパーオキシドラジカルとパプラール製剤の反応解析

0.06 unit/mlのXODの水溶液 (PBS, 0.1M, pH 7.4) にDMPO水溶液 (50mM, BPS, 0.1M, pH 7.4) とX水溶液 (QIL, 2.0mM) を混合し, 室温大気下で2分放置後, ESR扁平セルに溶液を移してESR信号を記録した。Fig.1に示すように, DMPOに由来するESR微細分裂は窒素核由来のトリプレット ($a^N=1.43\text{mT}$) および2種類の水素核由来のダブルレット ($a^H=1.16$, $a^H=0.124\text{mT}$) として解析された。このhfcc値DMPOのスーパーオキシドラジカル付加体 (DMPO/OO) のhfcc値の報告値 ($a^N=1.43$, $a^H=1.17$, $a^H=0.125\text{mT}$) と一致した^{11, 12)}。つぎに, パプラール製剤を添加して同様のESR測定を試みたところ, その希釈率が0.5%から10%の範囲でDMPO/OOの信号強度はパプラール製剤の濃度増加につれて減少した。この観測結果は, パプラール製剤がDMPO/OOラジカルの生成を阻害したことを意味している。また, DMPO/OOラジカル以外のDMPO付加体のESR信号が検出されなかったことは, パプラール製剤がXODとXの反応系に影響を及ぼしていないことを支持している。同様の測定を白金コロイドおよびパラジウムコロイド水溶液について行うと, 両コロイド溶液の添加量に依存して, DMPO/OOラジカルの強度

が減少する傾向が認められた。これらの観測結果は, パプラール製剤のスーパーオキシドラジカルに対する消去活性を示唆している。

次に, スーパーオキシドラジカルとパプラール製剤の反応を定量的に解析するためにFI-ESR測定法を応用した。Fig.1のDMPO/OOラジカルの微細分裂における低磁場側の信号ピークに磁場を固定し, 先のESR測定と同様の反応溶液0.2mlをインジェクションバルブから流速1.0ml/minのフロー系に注入し, 溶液調製から2.0分後に生成するDMPO/OOラジカルのFI-ESR信号を記録した。Fig.2に示すように, コントロール溶液のESR信号強度は, パプラール製剤の添加量 (希釈率0.05%から10.0%) に依存して減少した。同様のFI-ESR測定を白金およびパラジウムコロイド溶液について行うと, DMPO-OHラジカル濃度がそれぞれのコロイド溶液の添加量に依存して減少する傾向が認められた。

考 察

1. FI-ESR法によるパプラール製剤のスーパーオキシドラジカル消去活性

FI-ESR法は水溶液中の安定ラジカルを高感度かつ定量的に検出する方法論である。我々は, FI-ESR法をスピントラッピング測定に応用し, 活性酸素ラジカルがスピントラッピング試薬に付加した安定ラジカル (スピンアダクト) の定量的な検

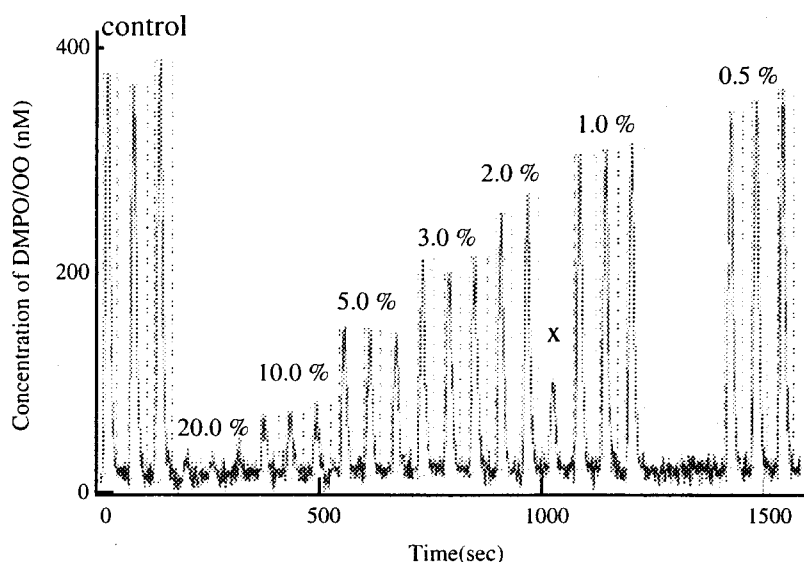


Fig. 2 The concentration of DMPO/OO radical observed by changing the content of papuraru colloidal solution, recorded by FI-ESR measurements made for the reaction solution composed of XOD (0.06 unit/ml), X (2.0 mM), DMPO (50 mM), and DTPA (0.1 mM) in PBS buffer (0.1 M) at pH 7.4. The x means an injection error.

出を達成し、活性酸素ラジカルと抗酸化物質の反応速度を評価している。先に、FI-ESR法とニトロ系スピントラッピングESR法をパプラー製剤とヒドロキシルラジカルの反応解析に応用し、本製剤はスピントラッピング試薬であるDMPOと副反応を起こさないこと等を明らかにしている。さらに、本法によって見かけの2次反応速度定数を $4.2 \times 10^{11} \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1})^{1/2}$ と評価し、パプラー製剤が最強のヒドロキシルラジカル消去物質であるビタミンCに匹敵する抗酸化活性を有することを支持している。

結果に述べたように、パプラー製剤とキサンチン酸化酵素 (XOD) から生成するスーパーオキシドラジカルの反応をスピントラッピングESR法とFI-ESR法を併用して検討した。まず、パプラー製剤がXODの酵素反応に及ぼす影響を検討した。Fig.1に示すように、XODとDMPOの反応でDMPO/OOラジカルに帰属されるESR信号が明瞭に検出できた。この反応溶液にパプラー製剤1.0%を加えると、DMPO/OOラジカルのESR線形はまったく変化せずに信号強度がコントロールの約80%に減少した。これは、パプラー製剤

がXODのスーパーオキシドラジカルの生成に影響を及ぼさないことを示唆しており、DMPO/OOラジカルの信号強度解析から、両者の反応速度が解析可能であることが支持された。Fig.2に示すように、パプラー製剤の添加量を10.0%まで増やすと、DMPO/OOラジカルの強度はコントロールの約20%に減少した。これはスーパーオキシドラジカルに対してパプラー製剤とDMPOが競争反応を起こしていることを支持している。

FI-ESR測定で観測されたDMPO/OOラジカルの信号強度をラジカル濃度に換算し、パプラー製剤の添加量に対してプロットしてスーパーオキシドラジカル消去曲線を得た (Fig.3)。パプラー製剤の添加量は原液の希釈率 (vol %) で評価した。パプラー製剤の添加につれてDMPO/OOラジカルの濃度は減少し、その線形はシグモイド型である。DMPO/OOラジカル濃度がコントロール溶液の50%に達するパプラー製剤の添加量 (ID₅₀) は3.0%であった。同様のスーパーオキシドラジカル消去曲線を白金およびパラジウムコロイドについてプロットし、それぞれのID₅₀値を10%および12%と解析した。だけでなく、希釈率

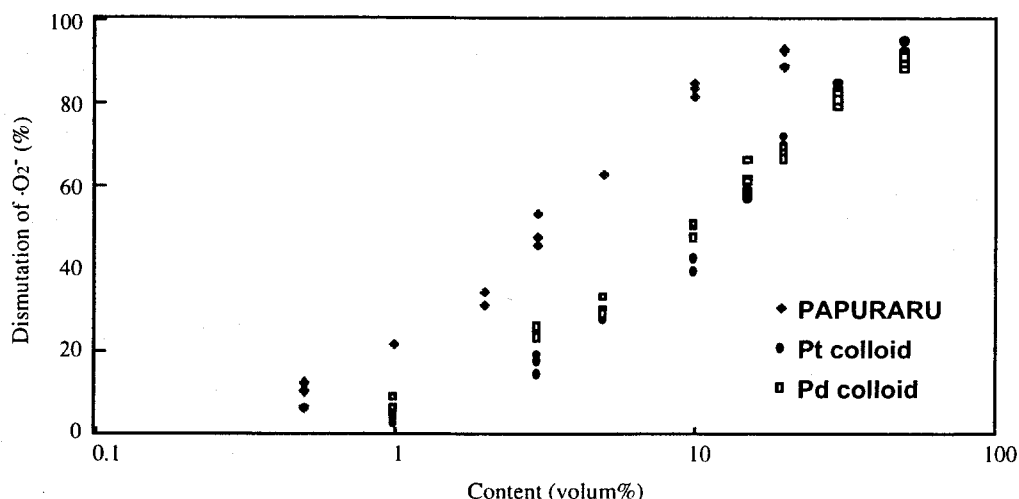


Fig. 3 Plots of superoxide radical scavenging activity (%) of papuraru, platinum, and paradium colloidal solutions.

The vertical axis is the ratio of the scavenged DMPO/OO radical (%).

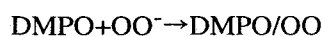
The horizontal axis is the ratio of dilution (%) made for three colloidal solutions.

Table 1 Rate constants of superoxide radical dismutation reaction of papuraru and relating compounds

Antioxidant	ID ₅₀	Concentration (μM)	k ₂ (M ⁻¹ s ⁻¹)	Ref.
Papuraru	3%	Pt 3.0, Pd 8.4	8.1×10 ⁴	*
Palladium colloid	10%	28	3.2×10 ⁴	*
Platinum colloid	12%	12	7.5×10 ⁴	*
Colloidal platinum on TiO ₂	—	—	1.2×10 ⁶	13

* : Present study

(%)と金属含有量から評価したパラジウムと白金の総モル濃度として換算している。次に、希釈率(%)と水溶液中の白金及びパラジウムの含有量からID₅₀値を金属の総モル数に換算し、解析結果と共にTable 1にまとめた。



$$k_1 = 1.8 \times 10^4 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}^{11)}$$



$$k_2 = k_1 \times [\text{DMPO}]_0 / \text{ID}_{50}$$

スキーム1: スーパーオキシドラジカルとDMPO
およびパプラールの競争反応
([DMPO]₀ DMPOの初期濃度)

スーパーオキシドラジカルと抗酸化剤の反応速度定数 (k₂) は、DMPOの初濃度と、DMPO/OOラジカル濃度がコントロール値の50%に達する抗酸化剤の濃度 (ID₅₀) およびDMPOとヒドロキシラジカルの反応速度定数 (k₁) から算出できる(スキーム1)。試みとして、白金コロイド溶液の金属白金の全てがスーパーオキシドラジカルの消去反応に関与すると仮定すると (ID₅₀ (Pt) = 12mM), k₂値は3.2×10⁴ (M⁻¹ s⁻¹) と解析できる。同様にして、パラジウムコロイド溶液のk₂値を7.2×10⁴ (M⁻¹ s⁻¹) と解析した。ここで、白金とパラジウムの反応速度定数が同程度であることから、パラジウム製剤に含まれる白金およびパラジウムの総モ

ル数 (11.4 mM) から見かけの k_2 値を 8.1×10^1 ($M^{-1} s^{-1}$) と評価した (Table 1)。金属コロイドとスーパーオキシドラジカルの反応解析に関する研究例は少ないが、Belloni 等¹³⁾ は酸化チタン結晶の表面に担持した白金とスーパーオキシドラジカルの反応を検討し、その白金コロイド粒子あたりの見かけの反応速度は 7.4×10^6 ($M^{-1} s^{-1}$) と評価している。さらに彼らは可能な反応機構として、コロイド表面におけるスーパーオキシドラジカルの不均化反応を提案している。パプラーン製剤のスーパーオキシドラジカル消去反応においても、金属コロイド表面における不均化反応の重要性が予想できる。

パプラーン製剤の白金およびパラジウムコロイドの平均粒径は電子顕微鏡撮影の結果からそれぞれ 400nm および 700nm であり、その表面には有機性の保護膜などは存在しない。白金およびパラジウムのコロイド表面でスーパーオキシドラジカルの不均化反応を触媒する機構が考えられる。パプラーン製剤のスーパーオキシドラジカルを消去反応速度は、SOD の反応速度定数 1.6×10^9 ($M^{-1} s^{-1}$) に比べて著しく低い値である。しかし、単原子あたりの反応速度として評価した k_2 値をコロイド粒子あたりの反応速度に換算すると、その数値は見かけの k_2 値を数桁上回ることが予測され、その活性は SOD に匹敵する可能性がある。コロイド粒子の表面が関与する複雑な反応機構を見かけの速度定数の比較で議論することは困難であるが、金属コロイド表面状態の検討と詳細な反応機構解析を進めることで、パプラーン製剤の抗酸化反応機構の全容を明らかにしたい。

生体内では、スーパーオキシド消去酵素 (SOD) が、不均化反応によってスーパーオキシドラジカルを酸素と過酸化水素の変換し、生成した過酸化水素はカタラーゼあるいはペルオキシダーゼによってさらに無毒化される。このように、生体内では複数の酵素が連動して活性酸素の無毒化を達成

している。ここで述べたように、パプラーン製剤は単独でスーパーオキシドラジカルおよびヒドロキシルラジカル⁴⁾ の消去反応に優れた活性を有している。これはパプラーン製剤が生体系の活性酸素消去機構を効果的に支援できる可能性を示唆している。

結 語

パプラーン製剤は白金とパラジウムの混合コロイド製剤であり、その優れた抗酸化活性が注目されている。金属コロイドが関与する化学反応には、金属の酸化を伴う還元活性だけでなく、金属コロイド表面への吸着をともなう触媒活性等が期待できる。パプラーン製剤とスーパーオキシドラジカルの反応ではコロイド表面における不均化反応が重要な働きをしていると予測される。スーパーオキシドラジカルの不均化反応で生成する過酸化水素は容易にヒドロキシルラジカルを産生するが、パプラーン製剤は本ラジカルに対して極めて高い消去活性を有するため直ちに消去する。このように、スーパーオキシドラジカルだけでなくヒドロキシルラジカルに対して優れた消去活性を有するパプラーン製剤は、生体内において普遍的に生成する活性酸素ラジカルに対する無毒化効果を発揮することが期待できる。今後は、パプラーン製剤の優れた抗酸化活性の機構を分子論的に検討する試みとして、コロイド表面における水素原子の活性化などを視野に入れた研究を展開する予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、パプラーン製剤だけでなく白金及びパラジウムコロイド溶液をご提供頂きました株式会社東洋厚生製薬所築地栄一社長に深謝致します。

文 献

- 1) McCord, J.M. & Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049, 1971
- 2) 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編: 過酸化脂質と生体, 255, 学術出版センター, 1985
- 3) 吉川敏一: フリーラジカルの科学, 65, 講談社サイエンティフィック, 1997