

水素置換で向上するパプラーン製剤の ヒドロキシルラジカル消去反応機構

京都工芸繊維大学大学院 生体分子工学部門

田嶋 邦彦 小松るしる 櫻井 康博

大石 俊恵 金折 賢二

安田女子大学 薬学部

森本 千恵

安田女子大学 家政学部

坂本 俊治

要 旨

パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去活性の機構に関する知見を得るために、パプラーン製剤への水素置換が消去活性に及ぼす効果をフローインジェクションESR（電子スピン共鳴, FI-ESR）装置によるスピントラッピングESR法で検討した。スピントラッピングESR測定には5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を使用し、過酸化水素の紫外線分解で生成するDMPOのヒドロキシルラジカル付加体であるDMPO/OHラジカルを測定対象とした。DMPO/OHラジカルの濃度がコントロール溶液の50%に減少したパプラーン製剤の希釈率 (ID₅₀, 体積%) を、ヒドロキシルラジカルの消去活性の指標とした。パプラーン製剤を開封直後に窒素置換した試料のID₅₀値は0.41%であったが、水素置換したパプラーン製剤のID₅₀値は0.15%に低下し、ヒドロキシルラジカル消去活性が顕著に向上した。さらに、水素置換したパプラーン製剤を再び窒素置換後に同様の測定を行うと、ID₅₀値は0.35%に増加した。これらの結果はパプラーン製剤の抗酸化活性が、白金およびパラジウムコロイドの表面に吸着している水素に起因する可能性を支持している。

キーワード：パプラーン製剤, 白金, パラジウム, コロイド, 水素, ヒドロキシルラジカル
消去活性, ESR, スピントラッピング

Effect of Hydrogen Gas Bubbling on the Antioxidant Activity of Papuraru Toward Hydroxyl Radical
Kunihiko TAJIMA (Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto,
Japan) et al.

緒 言

活性酸素種 (ROS) は、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシドラジカルおよび過酸化水素等の酸素分子由来に由来する反応性の高い化学種の総称である¹⁾。ROSは生体分子を容易に酸化することから、生体系にはROSを無毒化する様々な防御系が備わっている。たとえば、スーパーオキシドラジカル消去酵素 (SOD) は、スーパーオキシドラジカルを酸素と過酸化水素に変換する²⁾。生成した過酸化水素は、カタラーゼやペルオキシダーゼによって代謝・無毒化される。他方、脂質過酸化などの自動酸化反応では、ビタミンEおよびC等がラジカル種を還元することで酸化反応を抑制している³⁾。しかし、ヒドロキシルラジカルには特定の生体防御系が存在しない。そのため、ビタミンCなどのヒドロキシルラジカル消去活性に優れた抗酸化活性物質が重要な役割を果たしている。今日、ヒドロキシルラジカル消去活性を維持あるいは改善するために、抗酸化活性を備えた医薬品あるいは食品などが注目され、それらの抗酸化活性について物理化学的な研究が継続されている^{4, 5, 6)}。

近年、ヒドロキシルラジカルと水素分子の反応が消去反応として注目を集めている⁷⁾。水素とヒドロキシルラジカルの反応は比較的遅い反応に分類され、その速度定数は $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 程度である⁸⁾。水素は生体系に無害なために血中投与あるいは吸引などによる供給が可能であり、その応用が検討されている。他方、水素原子とヒドロキシルラジカルの反応は極めて速い ($k_s \sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁹⁾ が、その寿命は極めて短いため水溶液中では容易に存在しえない化学種である。水素を水素原子に活性化する反応として、白金あるいはパラジウムなどの金属固体表面における水素分子の吸着と水素原子への活性化がある。

パプラーン製剤は白金およびパラジウムのコロイド溶液であり、パプラーン製剤の原液 (3.0mL) 中にコロイド状の白金0.6mgとパラジウム0.9mgが含まれている。白金コロイドの粒径はおおよそ50 Å、パラジウムコロイドの粒径はおおよそ100

Åである。パプラーン製剤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⁾。パプラーン製剤は、ヒドロキシルラジカルに対して優れた消去活性を有し、その重量あたりの消去活性はビタミンCに匹敵する¹¹⁾。さらに、パプラーン製剤はスーパーオキシドラジカルに対しても消去活性を有する¹²⁾。

パプラーン製剤の抗酸化活性については物理化学的な研究例が乏しく、ヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドラジカルの消去機構に関する研究例は皆無である。パプラーン製剤の化学組成から、ヒドロキシルラジカルの消去活性には、白金及びパラジウムコロイド表面における水素の活性化が関与する可能性が推測できる。そこで本研究では、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカルの消去活性に及ぼす水素の影響を、ヒドロキシルラジカルの検出に特化したフローインジェクションESR装置 (FI-ESR)⁶⁾を使用して検討した。本論文では、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去反応機構に、白金およびパラジウムコロイドの表面に吸着した水素分子が重要な役割を果たしている可能性を報告する。

実 験

1. FI-ESR測定装置

FI-ESR測定にはTE-100型電子スピン共鳴装置 (日本電子) に改良型IPRITソフトウェアと組み合わせてして使用した。FI-ESR測定システムは高速液体クロマトグラフ分析用 (TOSOH) の送液ポンプ、6方切り替えバルブ、インジェクションバルブ (Rheodyne) および扁平型石英ESRフローセル (Wilma) 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 (Fig. 1)。光照射には、石英ガラスとテフロンスペーサーで構成されるフロー型の照射セル (JEOL) を使用し、紫外線照射には光ファイバー式照射装置 (三永電機 UV-203S, 150W) を使用した。DMPO/OHラジカルの濃度は、安定ラジカルであるTEMPOL (和光純薬) 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

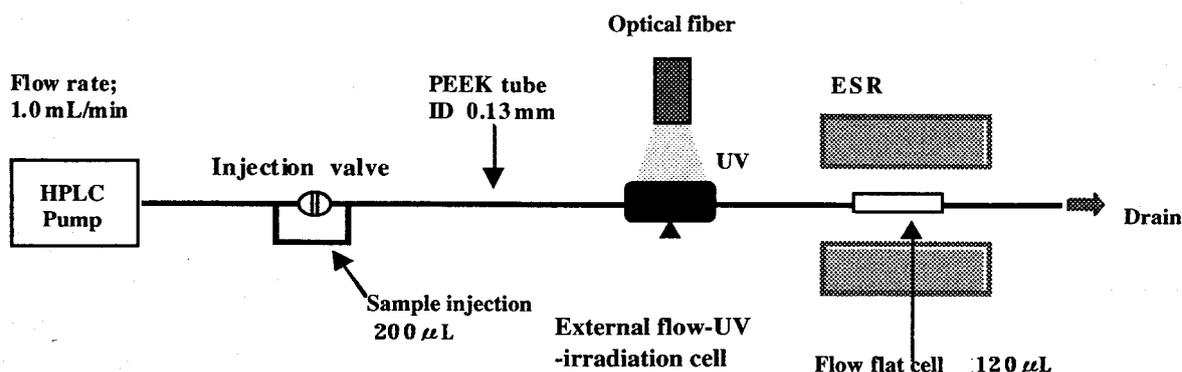


Fig. 1 Systematic illustration of the flow-injection ESR system, developed for detection of hydroxyl radical by using DMPO as a spin-trapping reagent

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、磁場強度の補正にはMn(II)イオン由来のESR信号の低磁場から3本目と4本目の分裂幅 (8.69 mT) を基準とした。なお、FI-ESR法における信号強度の実験誤差は±5%以内である。

2. 試 薬

開封直後のパプラーン製剤の原液 (3.0 ml) を窒素で十分に置換した。大気中で調製したDMPOおよび過酸化水素の超純水溶液でパプラーン原液を所定の希釈率 (0.05%から1.0%, 希釈率は体積%) に調製した。同様にして、水素で十分に飽和したパプラーン製剤の原液 (3.0 ml) から同様の希釈溶液 (0.05%から3.0%) を調製した。比較試料として、マンニトールの超純水溶液 (10.0 mM) 3.0 mlを窒素あるいは水素で十分に置換後、DMPO超純水で0.05%から3.0%に希釈した溶液を調製した。5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) は市販の試薬 (Labote) 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TEM-POL (2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine-N-oxyl, 和光純薬) をそのまま使用した。マンニトールは特級試薬を使用した。いずれの試薬及び測定溶液も測定の直前に所定の濃度に調製した。

3. FI-ESR測定の方法

過酸化水素の紫外線分解で生じるヒドロキシルラジカルのDMPOによるスピントラッピングESR測定は次の手順で実施した。コントロール溶液として、DMPO (100 μM) と過酸化水素 (500 μM) の超純水溶液を調製使用した。1.0 ml毎分の流速で送液している超純水キャリアー溶液に、インジェクションバルブから200 μlのコントロール溶液を注入した。試料溶液が紫外線照射セル内を通過すると、過酸化水素から生成したヒドロキシルラジカルとDMPOが反応してヒドロキシルラジカルアダクト (DMPO/OH) を生成する。FI-ESR測定は、DMPO/OHラジカルの信号のピーク位置にESRの外部磁場を固定し、ESR信号の強度の時間変化を記録した。次に、コントロール溶液と同一濃度のDMPO、過酸化水素および希釈率が異なるパプラーン製剤を含む試料溶液 (200 μl) を調製し、FI-ESR測定を行った。

結 果

1. パプラーン製剤およびマンニトール水溶液のFI-ESR測定

Fig. 2に示したESRスペクトルは、コントロール溶液がESRセルに到達した時点で送液を停止し、外部磁場を掃引して記録した。ESR信号は強度比1:2:2:1の4本線の微細分裂 ($a^H = a^N =$



Fig. 2 ESR spectrum of DMPO/OH radical.

The downward arrow indicates the static field for FI-ESR measurements.

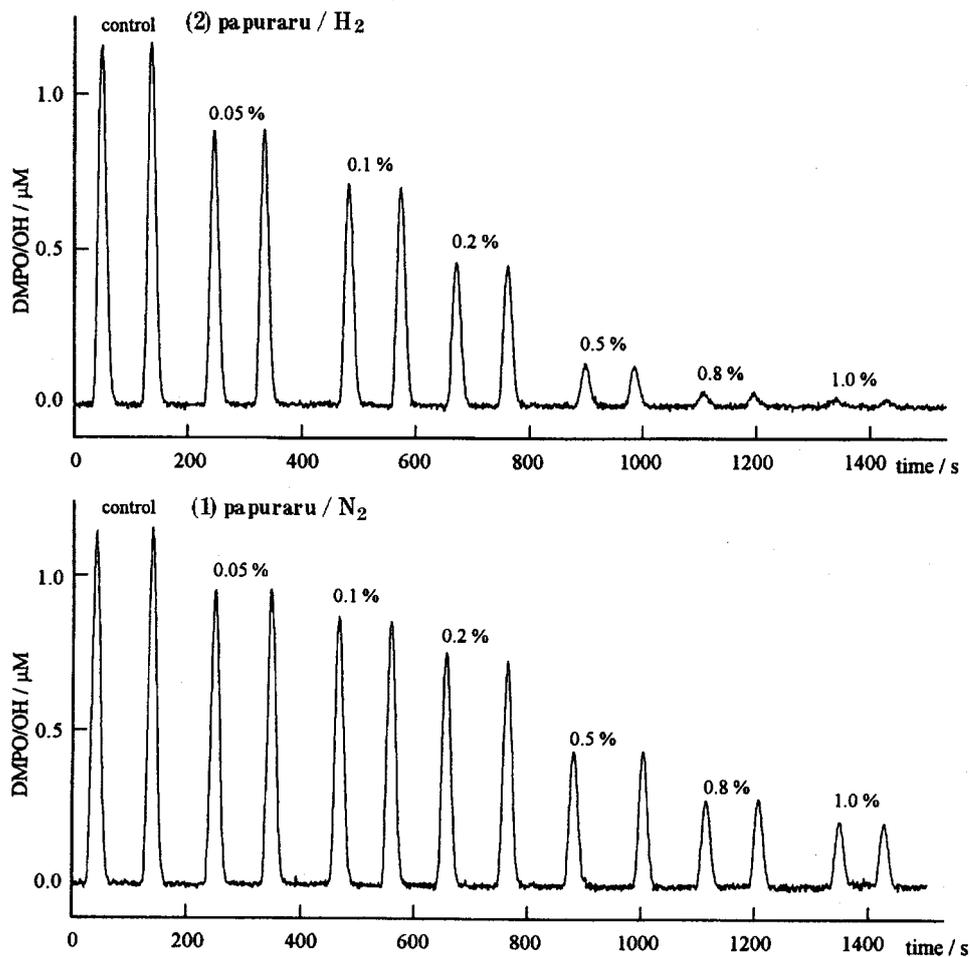


Fig. 3 FI-ESR signals of DMPO/OH radical observed for each injection of reaction mixture containing DMPO ($100 \mu\text{M}$), H_2O_2 ($500 \mu\text{M}$) and diluted (0.05% to 1.0%) papuraru solution after (1) nitrogen gas bubbling, (2) hydrogen gas bubbling.

FI-ESR measurements were conducted by following condition; microwave power 10 mW, modulation width 0.16 mT, amplitude 1000, time constants 1.0 ms, sampling interval 1.0 ms, and number of accumulation 1000.

1.49 mT) を示し、その信号の線形と微細結合定数から、本ラジカルをDMPO/OHラジカルと帰属した¹³⁾。次に、DMPO/OHラジカルのESR信号の低磁場から2本目のピーク頂点に外部磁場を固定し、HPLCポンプから超純水を毎分1.0 mlで連続的に送液しながら、インジェクションバルブからコントロール溶液を注入し、DMPO/OHラジカルの信号強度の時間変化曲線を観測した。TEMPOLラジカルのESR信号強度を基準として、コントロール溶液のDMPO/OHラジカルの濃度を1.2 μ Mと解析した。この濃度を[DMPO/OH]_cとする。

窒素で飽和したパプラーン製剤の原液を0.05から1.0%の範囲で希釈した溶液についてFI-ESR測定を行った (Fig. 3-1)。パプラーン製剤の希釈率が0.05%の試料溶液では、DMPO/OHラジカルの信号強度はコントロールの約90%に減少した。パプラーン製剤の存在量を上げると、DMPO/OHラジカルの強度は段階的に減少した。最終的にパプラーン製剤の希釈率が1.0%の溶液では、DMPO/OHラジカルの強度はコントロール溶液の約22%に減少した¹¹⁾。

次に、水素で飽和したパプラーン製剤の原液を測定対象として、同様のFI-ESR測定を行った。Fig. 3-2に示すように、パプラーン製剤の希釈率が0.05%の溶液ではDMPO/OHラジカルの信号強度がコントロール溶液の約76%に減少し、Fig. 3-1の窒素置換した試料に比べてDMPO/OHラジカル強度の減少が顕著である。パプラーン製剤の含有量が増加するにつれて、DMPO/OHラジカルの濃度は減少した。最終的にパプラーン製剤の希釈率が1.0%の試料で観測されたDMPO/OHラジカルの強度はコントロール溶液の僅か2.4%であり、窒素置換の測定結果 (22%) に比べて、著しくDMPO/OHラジカルの強度が減少した。さらに、水素置換したパプラーン製剤の原液を再び窒素で飽和し、その希釈溶液について同様のFI-ESR測定を行った。パプラーン製剤の希釈率が1.0%では、DMPO/OHラジカルの信号強度はコントロール溶液の約20%であった (data not shown)。この結果は、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去活性が水素置換によって向上するだけでなく、窒素置換によって低下することを示唆している。

同様の測定条件で、あらかじめマニトール水溶液 (10.0 mM) を窒素および水素で飽和した試料溶液を、FI-ESR測定に供した。マニトール濃度の増加につれてDMPO/OHラジカル強度は連続的に減少した。しかし、DMPO/OHラジカルの信号強度は、水素あるいは窒素置換とは無関係に、それぞれ誤差範囲内で一致した。この結果は、水素置換した試料溶液に含まれる溶存水素のヒドロキシルラジカル消去反応への関与は無視できることを支持している。

考 察

1. スピントラッピングESR法によるヒドロキシルラジカルの消去活性評価

ヒドロキシルラジカルを還元的に無毒化する物質は抗酸化活性物質と総称され、その活性の本質はヒドロキシルラジカルとの2次反応速度定数 (k_s) である。これまで、 k_s を評価するにはパルスラジオリシス法等の分光装置が必要とされていた。ヒドロキシルラジカルをESRで検出するには、スキーム1に示すようなDMPOを使用したスピントラッピング測定が必要である。谷口らは、DMPOとヒドロキシルラジカルの2次反応速度定数を、 2.8×10^9 ($M^{-1}s^{-1}$) と報告している¹⁴⁾。

適切なヒドロキシルラジカルの生成系にDMPOと抗酸化物質が共存すると (スキーム1)、ヒドロキシルラジカルに対する競争反応が進行する。すなわち、DMPO/OHラジカルの強度は、抗酸化物質の濃度と k_s 値に依存して減少する。ESR法によって抗酸化物質の k_s 値を評価するには、被検物質がヒドロキシルラジカルの生成反応に影響を与えないことが前提となる。先に報告しているようにパプラーン製剤は、過酸化水素の分解反応を触媒しないだけでなく、DMPOをDMPO/OHラジカルに変換するなどの副反応を起こさない¹¹⁾。したがって、過酸化水素をヒドロキシルラジカルの生成系とするスピントラッピングESR測定系は、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去反応機構の解析に適応できる。

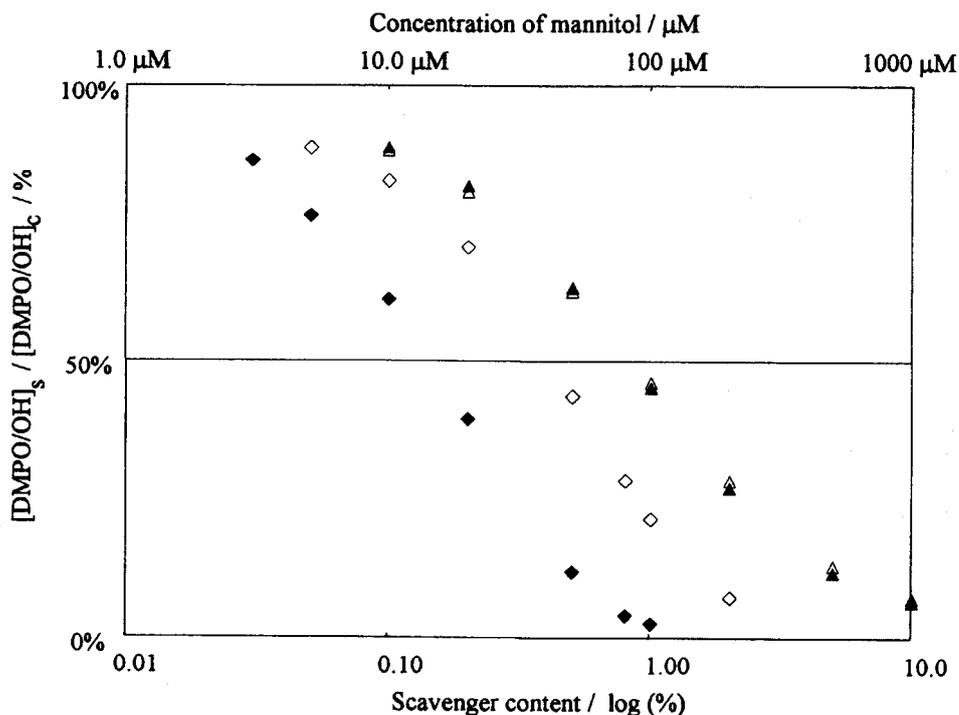
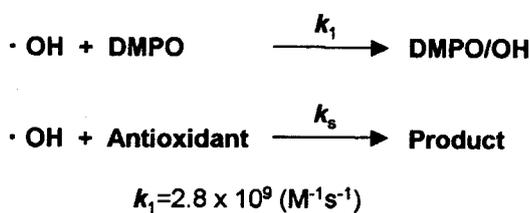


Fig. 4 Inhibitory curves of papuraru (◇) and mannitol (△) prepared after nitrogen (white) and hydrogen (black) gas bubbling.

The bottom horizontal axis corresponds to the dilution (%) of papuraru and mannitol solutions.

The top horizontal axis corresponds to the concentration of mannitol.

FI-ESR measurements were performed by same condition top the case of papuraru.



2. マニトールおよびパプラーン製剤の抗酸化曲線に及ぼす水素置換の効果

FI-ESRの測定結果から、コントロール溶液 ([DMPO/OH]_c) と抗酸化剤を加えた溶液の DMPO/OHラジカル濃度 ([DMPO/OH]_s) の比率 (%) を縦軸に、パプラーン製剤の希釈率を横軸にとって抗酸化曲線をプロットした (Fig. 4)。

抗酸化曲線の線形からヒドロキシルラジカルと抗酸化物質の反応における化学量論比およびID50値が評価できる¹⁵⁾。ここで、ID50値はDMPO/OHラジカルの信号強度比が50%に到達する抗酸化物質の濃度である。両曲線ともS字線形を示したが、水素置換パプラーンの抗酸化曲線は窒素置換した試料に比べて著しく左方向にシフトしている。窒素置換パプラーン製剤のID50値は希釈率として0.41%と解析された。他方、水素置換パプラーン製剤後者のID50値は0.15%と評価され、水素置換によってパプラーン製剤のヒドロキシルラジカルの消去活性が顕著に向上した。また、水素置換したパプラーン製剤に再び窒素置換を行うと、そのID50値は0.35%に増加した。この結果は、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去活性は水素

置換によって向上したことを意味している。

水素および窒素置換したマニトール水溶液を原液として、パプラーン製剤と同様の方法で希釈した試料溶液の抗酸化曲線を同様の方法でプロットした (Fig. 4)。水素および窒素置換マニトール溶液は極めて類似した抗酸化曲線を示し、両者のID50値はほぼ一致して希釈率が約0.9%と評価された。このID50値はマニトール濃度に換算して0.09 mMとなり、スキーム1の競争反応からマニトールの k_s 値は 3.1×10^9 ($M^{-1}s^{-1}$)と評価できる。この k_s 値はパルスラジオリシスおよびESR法から求められた k_s 値 ($1.5 \sim 1.7 \times 10^9$ ($M^{-1}s^{-1}$))^{6, 16)}に近い。試料溶液に溶存する水素とヒドロキシルラジカルの反応は、ヒドロキシルラジカルとマニトールの競争反応 (スキーム) に有意な影響を及ぼさないことが結論できた。

抗酸化曲線の線形は、競争反応におけるヒドロキシルラジカルと抗酸化物質の反応比率に関する知見を与える¹⁷⁾。水素あるいは窒素置換したパプラーン製剤の抗酸化曲線の線形は、いずれもマニトールの抗酸化曲線とよく一致している。マニトールとヒドロキシルラジカルの反応は化学量論比が1で進行することから、パプラーン製剤とヒドロキシルラジカルの反応は1:1のモル比で進行することが考えられる。さらに、DMPO/OHラジカルと抗酸化物質が反応する場合には、被検物質の濃度が増加するにつれて抗酸化曲線の線形が著しく変化する。しかし、パプラーン製剤の抗酸化曲線の線形には、このような傾向が認められず、今回の測定条件においてパプラーン製剤によるDMPO/OHラジカルの還元反応は進行していないことが支持された。

パプラーン製剤およびマニトールのヒドロキシルラジカルに対する抗酸化曲線から、パプラーン製剤の抗酸化活性は水素置換によって向上し、窒素置換によって低下することが判明した。本実験条件においてパプラーン製剤の抗酸化活性は水素および窒素置換に対してほぼ可逆的であり、パプラーン製剤の抗酸化活性が溶存水素に起因することが結論できる。

3. パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去活性の機構

白金およびパラジウムは接触水素還元反応における代表的な触媒として知られている¹⁸⁾。実際の還元反応では、白金およびパラジウムは活性炭、アルミナあるいは無機塩などの不活性担体に保持した状態で使用される。これらの不均一系触媒は反応溶媒中で被還元物質と混合され、大気下あるいは加圧下で供給される水素によって還元反応が進行する。このような接触還元は、炭素-炭素多重結合の水素添加反応に広く使用される。接触還元反応における白金あるいはパラジウムの作用機序は、不均一系の反応であるため複雑であり、定量的な解析は困難である。定性的には、触媒金属の表面上に吸着した水素分子が水素原子状に活性化され、同じく金属表面に吸着あるいは接近した被還元物質に移動する反応である。

白金およびパラジウムコロイドの混合溶液であるパプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去活性が、水素置換によって向上した観測結果は (Fig. 4)、白金およびパラジウムコロイドの表面に吸着した水素分子がヒドロキシルラジカルの消去活性に関与している可能性を示唆している。水素原子はヒドロキシルラジカルを極めて速く ($k_s \sim 7 \times 10^9$ $M^{-1}s^{-1}$)⁹⁾ 消去することを考慮すると、コロイド表面に吸着した水素分子が水素原子状に活性化され、それらがヒドロキシルラジカルを水に還元している機構が考えられる。今回の研究結果から、パプラーン製剤のヒドロキシルラジカル消去活性が、白金及びパラジウムコロイドの表面で活性化された水素に起因することが結論できる。現時点で、パプラーン製剤に吸着しうる水素の濃度および表面で活性化された水素とヒドロキシルラジカルの反応速度などに不明な点が多く残されている。今後は、パプラーン製剤の水素活性化機構とその抗酸化反応の詳細を定量的に解析する予定である。

結 語

パプラーン製剤の優れたヒドロキシルラジカル消去活性は、溶液の水素置換によって向上し、窒

素置換によって低下することをFI-ESR法によるスピントラッピングESR測定から明らかにした。パプラール製剤に含まれる白金およびパラジウムコロイドの表面に吸着して活性化された水素がヒドロキシルラジカルを素早く水に還元する機構を推定した。これは、金属触媒を使用した接触水素還元反応と類似の反応である。この反応過程には白金あるいはパラジウムの酸化還元反応は関与していないことから、パプラール製剤はコロイド表面

で活性化した水素によってヒドロキシルラジカルを消去する生体系に無毒な抗酸化活性物質として結論できる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、パプラール製剤を測定試料としてご提供を頂きました株式会社東洋厚生製薬所築地榮一社長に深謝致します。

参考文献

- 1) W. A. Pryor : "Free Radicals in Biology" Vol. 1, Academic Press, 1982
- 2) J. M. McCord & I. Fridovich : *J. Biol. Chem.*, **244** : 6049, 1971
- 3) 向井和男 : 油化学, **40** : 1063, 1991
- 4) G. W. Burton & K. U. Ingold : *Acc. Chem. Res.*, **19** : 194, 1986
- 5) W. M. Garrison : *Chem. Rev.*, **87** : 381, 1987
- 6) R. Komatsu-Watanabe, Y. Sakurai, C. Morimoto, S. Sakamoto, K. Kanaori & K. Tajima : *Chem. Lett.*, **37** : 612, 2008
- 7) I. Ohsawa, M. Ishikawa, K. Takahashi, M. Watanabe, K. Nishimaki, K. Yamagata, K. Katsura, Y. Katayama, S. Asoh & S. Ohta : *Nature Medicine*, **13** : 688, 2007
- 8) J.K. Thomas, J. Rabini, M.S. Matheson, E.J. Hart & S. Gordon : *J. Phys. Chem.*, **70** : 2409, 1966
- 9) J.K. Thomas : *Trans. Faraday Soc.*, **61** : 702, 1965.
- 10) 曲 曉非 : 薬理と臨床, **8** : 215, 1998.
- 11) 田嶋邦彦, 渡部るしる, 金折賢二 : 薬理と臨床, **14** : 247, 2004
- 12) 田嶋邦彦, 渡部るしる, 金折賢二 : 薬理と臨床, **15** : 635, 2005
- 13) E. Finkelstein, G.M. Rosen & E.J. Rauckman : *J. Am. Chem. Soc.*, **102** : 4994, 1980
- 14) K.M. Madden & H. Taniguchi : *J. Phys. Chem.*, **100** : 7511, 1996
- 15) K. Mitsuda, Y. Mizuta, M. Kohno, M. Hiramatsu & A. Mori : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63** : 187~555, 1990
- 16) T. Masuda, S. Nakano & M. Kohno : *J. Radiat. Res.*, **14** : 339, 1984
- 17) K. Mitsuda, M. Hiramatsu, H. Ohya-Nishiguchi & H. Kamada : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67** : 529, 1994
- 18) R.L. Augastin : "Catalytic Hydrogenation" Marcel Dekker, 1965