

活性酸素による生体関連物質の酸化とその抑制

後 藤 直 宏

①

## 活性酸素による生体関連物質の酸化とその抑制

本論文は、東京大学工学系研究科に博士（工学）  
の学位取得のため提出されたものである。

後藤 直宏

東京大学工学系研究科  
化学エネルギー工学専攻

1994年 3月

## 謝辞

本研究を行なうに当たり、格調と美しさを求め、終始一貫懇切なる御指導、御鞭撻賜りました二木鋭雄教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の審査に際し深い考察のもとに討議を頂きました、渡辺公綱教授、渡邊正教授、小宮山真教授、山本順寛助教授に御礼申し上げます。

私が二木研究室の院生になって以来、あらゆる面で御指導、御指摘頂きました山本順寛助教授に改めて感謝御礼申し上げます。

いつも優しく励ましてくださり、帰りの地下鉄の中までディスカッションをしてくださった野口範子助手に深く感謝します。

E S Rの実験を指導してくださった総合試験場の土屋順一助手に感謝します。

一緒によく徹夜実験をしてくださり、技術的な面でかなりお世話になった小室絵里佳研究員に感謝いたします。

あらゆる面で相談相手となってくれた吉田康一君に心から感謝いたします。

二木研究室の皆様の温かい励ましや協力に深く感謝いたします。

第5章の研究を行なうにあたり、御指導、御鞭撻賜りましたWellcome Research LaboratoriesのVictor M. Darley-Usmer博士に厚く御礼申し上げます。

1994年 3月



## 目次

### 第1章 活性酸素と動脈硬化

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 1-1 生体はいかなる反応で活性酸素を生成するか     | 1 |
| 1-2 生体内の活性酸素消去メカニズムと脂質過酸化反応  | 4 |
| 1-3 低比重リポ蛋白 (LDL) の体内合成と体内代謝 | 6 |
| 1-4 LDLの酸化と動脈硬化              | 7 |
| 1-5 本研究の目的                   | 8 |

### 第2章 スーパーオキシドの反応に関する研究

|  |    |
|--|----|
| 2-1 緒言                                   | 22 |
| 2-2 試薬                                   | 22 |
| 2-3 原理                                   | 23 |
| 二次反応速度定数 (k) の測定方法                       |    |
| CLAと $O_2^{\cdot -}$ との反応スキーム            |    |
| 化学発光検出機 (OX-7) の原理                       |    |
| NBTと $O_2^{\cdot -}$ との反応スキーム            |    |
| 2-4 実験方法                                 | 24 |
| CLAと $O_2^{\cdot -}$ との二次反応速度定数 (k) の求め方 |    |
| 化学発光を用いた $O_2^{\cdot -}$ と化合物とのkの求め方     |    |
| リボソーム中に組み込んだ化合物と $O_2^{\cdot -}$ とのkの求め方 |    |
| 2-5 結果                                   | 25 |
| CLAと $O_2^{\cdot -}$ とのk                 |    |
| 化学発光を用いた $O_2^{\cdot -}$ と化合物とのk         |    |
| リボソーム膜中に組み込んだ化合物と $O_2^{\cdot -}$ とのk    |    |
| 2-6 考察                                   | 26 |
| 2-7 まとめ                                  | 28 |

### 第3章 脂質酸化に対するプロブコールの抗酸化効果

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 3-1 緒言                           | 44 |
| 3-2 試薬                           | 45 |
| 3-3 実験方法                         | 45 |
| LDLの分離方法                         |    |
| 蛋白濃度測定方法                         |    |
| リノール酸メチル (MeLH) の均一溶液中における酸化とプロブ |    |



コールによる抑制

PCリボソームの酸化とプロブコールによる抑制

LDLの酸化方法

LDL中の過酸化物質濃度と抗酸化物質濃度の測定方法

LDLの酸化における酸素消費に対するプロブコールの影響

ESRスペクトルの測定方法

ストップフローを用いたプロブコールとガルビノキシルの反応の測定

均一系におけるペルオキシラジカルに対するプロブコールと $\alpha$ -Tocの反応性の比較

### 3-4 結果

48

プロブコールとガルビノキシルの反応とプロブコールラジカルのESRスペクトル

ストップフローを用いたプロブコールとガルビノキシルの反応の測定

プロブコールによるヘキササン中リノール酸メチルの酸化抑制

PCリボソームのプロブコールによる酸化の抑制

プロブコールを用いたLDLの酸化抑制

LDLの酸化における酸素消費に対するプロブコールの影響

均一系におけるペルオキシラジカルに対するプロブコールと $\alpha$ -Tocの反応

### 3-5 考察

50

### 3-6 まとめ

52

## 第4章 内因性 $\alpha$ -トコフェロールのLDL中における抗酸化メカニズム

### 4-1 緒言

68

### 4-2 試薬

68

### 4-3 実験方法

69

LDLの分離方法

蛋白濃度測定方法

LDLの酸化方法

LDL中の過酸化物質濃度と抗酸化物質濃度の測定方法

LDL成分の抽出方法

ユビキノンの還元方法

低濃度の酸化剤によるLDLの酸化方法

抽出したLDL成分のヘキササン均一溶液中での酸化方法

側鎖の長さが異なる $\alpha$ -Tocの誘導体によるLDLの酸化とその抑制  
LDL酸化での過酸化物生成および内因性 $\alpha$ -Tocの減少に対する  
水溶性抗酸化剤の影響

アスコルビン酸エステルによるLDL酸化の抑制

ユビキノール1によるLDL酸化の抑制

プロブコールによるLDL酸化の抑制

#### 4-4 結果 71

低濃度の酸化剤によるLDLの酸化

抽出したLDL成分のヘキサン均一溶液中での酸化

側鎖の長さが異なる $\alpha$ -Tocの誘導体によるLDLの酸化とその抑制  
LDL酸化での過酸化物生成および内因性 $\alpha$ -Tocの減少に対する水  
溶性抗酸化剤の影響

アスコルビン酸エステルによるLDL酸化の抑制

ユビキノール1によるLDL酸化の抑制

プロブコールによるLDL酸化の抑制

#### 4-5 考察 72

#### 4-6 まとめ 76

### 第5章 動脈硬化病変におけるマクロファージの役割

#### 5-1 緒言 95

#### 5-2 基本操作とその原理 96

細胞の扱い方

グルタチオン濃度の分析方法

細胞生存率の測定方法(viability測定)

#### 5-3 実験方法 97

マロンジアルデヒド (MDA) の調製方法

マクロファージに対するマロンジアルデヒド (MDA) の細胞毒性

4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) の調製方法

マクロファージに対する4-HNEの細胞毒性

実験で使用するox-LDLの調製方法

マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性

ox-LDLによって高められたグルタチオンの細胞毒性に対する影響

ex-LDLの抽出液の作り方

マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性とex-LDLの細胞毒性  
の比較

#### 5-4 結果 98

マクロファージに対するMDAの細胞毒性

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| マクロファージに対する4-HNEの細胞毒性            |     |
| マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性           |     |
| ox-LDLによって高められたグルタチオンの細胞毒性に対する影響 |     |
| マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性とox-LDL    |     |
| 抽出液の細胞毒性の比較                      |     |
| 5-5 考察                           | 99  |
| 5-6 まとめ                          | 101 |
| <br>第6章 LDLの場の固さ                 |     |
| 6-1 緒言                           | 117 |
| 6-2 試薬                           | 117 |
| 6-3 原理                           | 118 |
| スピラベル法                           |     |
| 6-4 実験方法                         | 119 |
| 低密度リポ蛋白質 (LDL) の調製               |     |
| ステアリン酸スピラベル剤のLDLへの組み込み           |     |
| コレステロールエステルスピラベル剤のLDLへの組み込み      |     |
| LDLに組み込んだスピラベル剤のアスコルビン酸による還元     |     |
| LDLに組み込んだスピラベル剤のスペクトルの測定         |     |
| 6-5 結果                           | 121 |
| LDL中に組み込んだスピラベル剤の還元              |     |
| スピラベル剤の組み込み                      |     |
| 6-6 考察                           | 121 |
| 6-7 まとめ                          | 123 |
| <br>第7章 総論                       | 133 |



## 第1章 活性酸素と動脈硬化

### 1-1 生体はいかなる反応で活性酸素を生成するか

人間は呼吸をしなくては生きていけない生物である。これは細胞内のミトコンドリア中の電子伝達系でATPを生産する際、電子の受け皿として酸素が必要なためである。しかしその一方で酸素は活性酸素というものに形を変え、種々の疾病やガン、動脈硬化、老化等の原因となる。活性酸素は生体内フリーラジカル生成の原因の一つであり、そのためこの化学種が発生すると、ラジカル反応で生体内の脂質、蛋白、核酸、糖等を酸化することが知られている。この反応は生体内で制御されているβ酸化等とは異なり、制御されていない酸化で、一度酸化が始まると生体に大きな傷害を与え、その蓄積が結果として疾病やガン、動脈硬化原因となる。活性酸素はスーパーオキシド ( $O_2^-$ )、ヒドロキシルラジカル ( $HO\cdot$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) のことを示し (図1-1) <sup>1)</sup>、このほかにも活性酸素種と呼ばれる化学種が存在する。これらは生体内の様々な箇所が発生する。特に酸素が一電子還元された際生成する  $O_2^-$  は、これら活性酸素生成の源であるため、活性酸素による反応を考慮する上では非常に大切な分子である。 $O_2^-$  は生体内で以下に示した様なところで発生することが知られている。

- 1) ほとんどあらゆる生体組織細胞の原形質膜、粗面小胞体、核膜等に存在するNADPH-チトクロムP450還元酵素による  $O_2$  の1電子還元
- 2) 肝、腎、小腸粘膜細胞の細胞液中に存在するキサンチン-キサンチンオキシダーゼによる  $O_2$  の1電子還元 (虚血-再灌流)
- 3) 多核白血球膜に局在するNADPH酸化酵素による  $O_2$  の1電子還元

しかし  $O_2^-$  自体のラジカル反応性は非常に低いことが知られており、直接ラジカル反応は起こさない (図1-1)。そのため  $O_2^-$  から二次的に生成した活性酸素種

が生体組織に傷害を与えると考えられる。 $O_2^-$ のpKaは4.8である。これは生体内pH7.4では $O_2^-$ 400分子に対しヒドロペルオキシラジカル( $HOO\cdot$ )1分子が生成することを意味している。 $HOO\cdot$ は脂質のbisアリル位水素を二次反応速度定数( $k$ )= $10^2 M^{-1} s^{-1}$ の速度で引き抜き(図1-1)、酸化を開始することができる。よってこの分子の生成は酸化傷害を起こす原因の一つであるといえる。一方生体内pH下では $O_2^-$ は不均化反応により $H_2O_2$ を生じる。この反応の二次反応速度定数は $10^5 M^{-1} s^{-1}$ であり、かなり速い反応である。おそらく生体内で $H_2O_2$ はこの反応にて生成するものと考えられる。 $H_2O_2$ は $O_2^-$ と同様にラジカル反応性が低い化学種である(図1-1)。そのため脂質過酸化や蛋白の酸化はこの化学種も起こさない。さらにこの $H_2O_2$ が一電子還元されると非常に活性の高い $HO\cdot$ へ<sup>2)</sup>と変化する。 $HO\cdot$ の脂質からのbisアリル位水素引き抜き反応及び二重結合への付加反応の $k$ の値は共に $10^9 M^{-1} s^{-1}$ である(図1-1)。これはほぼ拡散律速に近い値であるため、この化学種が生体内で発生すると激しい酸化反応を引き起こすと考えられる。 $Fe^{2+}$ もしくは $Cu^+$ は $H_2O_2$ を一電子還元し $HO\cdot$ を生成することが知られており、この反応はFenton反応<sup>3)</sup>と呼ばれている。よって生体内でこれら金属イオンと $H_2O_2$ が反応すれば $HO\cdot$ が生成する可能性はある。実際に人間の尿からDNAが $HO\cdot$ で修飾された結果生成したと考えられる、8-ヒドロキシグアニンが発見されており<sup>4) 5)</sup>、これは生体内のDNA近辺で $HO\cdot$ が生成している証拠といえる。生体内には鉄や銅が多量に存在しているため、DNA近辺でフリーな金属イオンと $H_2O_2$ が存在すれば、 $HO\cdot$ を生成する可能性は十分あると思われる。しかし普通生体内に存在する鉄や銅は決してFenton反応に参加できるようフリーな金属イオンとして存在してはいない。これらは主に酵素やヘモグロビンの活性中心として働いており、また生体内に過剰に取り込まれた鉄や銅もフェリチンやセルロプラスミン等の貯蔵蛋白に蓄えられている。仮に銅がフリーの状態で生体中に漏



れ出た場合もメタロチオネインと呼ばれるキレート蛋白がすぐに生産され銅をキレートする。血漿中には多量のアルブミンが存在し、これはフリーの金属をキレートすることも知られている。ヘモグロビン等のヘム鉄は過酸化脂質もしくは $H_2O_2$ と反応するとFenton反応とは異なった反応でアルコキシルラジカル ( $RO\cdot$ ) や $HO\cdot$ を生成することが知られている<sup>5) 6)</sup>。しかしヘモグロビンは赤血球中に存在するため、もし仮に $HO\cdot$ が生成した場合も他の組織に傷害を与えることは無いと考えられる。また溶血を起こした場合も血漿中に存在するハプトグロビンと呼ばれる蛋白が、即座にヘモグロビンと反応してその強い反応性を阻害する。そのため、生体内で金属により $HO\cdot$ が生成できるような状態は非常に特異な状態と言える。考えられる特異な状態をいくつか以下に示す。

- 1) フェリチンはその中に $Fe^{3+}$ の状態鉄を蓄えているが、 $O_2^-$ がこの鉄貯蔵蛋白と反応すると、 $Fe^{2+}$ が漏出することが知られている<sup>7)</sup>。
- 2) Wilson氏病患者は体内にセラプラスミンを持たないため、かなりの量の銅がフリーな状態で存在していると考えられる。
- 3) フェリチンがヘム蛋白に鉄を渡す瞬間、鉄イオンになる<sup>8)</sup>。
- 4) 溶血を起こし、そのときヘモグロビンがパプトグロビンが存在しない場所に位置した場合。

以上 $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、 $HO\cdot$ の生体内で発生する際の考えられる生成メカニズムを示したが、 $HO\cdot$ 生成に関しては、フリーな金属イオンもしくはヘモグロビンが存在した場合という特殊な条件での話であった。しかし近年臓器移植や心筋梗塞の際問題となっている虚血-再灌流傷害<sup>9)</sup>はどのような人の場合でも起こる。これは、血流を戻したとき $O_2^-$ が大量発生し、それが原因で組織傷害が起きる傷害であるが、このときどのような人でもフリーな状態の金属が必ず体内に存在しているとは考えにくい。

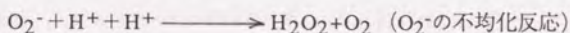


近年血管弛緩因子として生体内で一酸化窒素 (NO) が産生されていることが明かとなった<sup>10)</sup>。この分子は $O_2^-$ と $k=3.7 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ で反応し<sup>11)</sup>、亜硝酸ラジカル ( $\cdot ONOO^-$ ) を生じる。これは分解すると $HO\cdot$ を生成する。しかも虚血-再灌流時にNOと $O_2^-$ が同時に発生していることが示唆されており<sup>12)</sup>、生体内でこの反応により $HO\cdot$ が生成している可能性は十分あると思われる (図1-2)<sup>13)</sup>。

$^1O_2$ は今まで述べた3種の活性酸素とは異なるルートで発生する。この化学種は紫外線等の高エネルギーで基底状態の酸素 (三重項酸素) が励起されると発生し、非常に反応性が高いことが知られている。

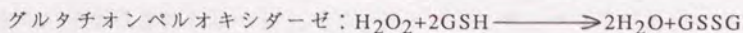
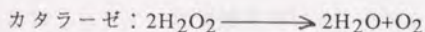
#### 1-2 生体内活性酸素消去メカニズムと脂質過酸化反応

活性酸素は生体内ラジカル反応の原因の一つであるが、生体内にはこれらを消去する機構が存在する。 $O_2^-$ の消去酵素としては、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) がある。この酵素は、 $O_2^-$ を不均化させて消去する酵素で、現在



CuZn-SOD、Mn-SOD、Fe-SODの3種が存在することが知られている。SODは以前から知られた蛋白であったが、その役割が長い間解明されなかった。しかし1968年McCordとFridovichにより初めて $O_2^-$ の不均化酵素であることが解明され<sup>14)</sup>、これが活性酸素研究の火付けになった。

$H_2O_2$ の消去酵素としては、カタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼが存在する。それぞれの反応を下に示す。



$^1O_2$ の消去には $\beta$ -カロチンが働くことが知られている。この際 $\beta$ -カロチン、ビタミンEはエネルギーの受容体として働くことにより、 $^1O_2$ を消去する<sup>16)</sup>。

HO $\cdot$ は非常にラジカル反応性の高い化学種である。そのためこれに特異的に反応する酵素もしくは化合物は知られていない。生体膜を構成しているリン脂質はHO $\cdot$ と反応すると、脂肪酸のbisアリル位水素を引き抜かれ（図1-3）、ラジカル連鎖反応が起こる。反応スキームを図1-4に示す<sup>17)</sup>。この反応は、一つのラジカルより多量の過酸化脂質を生成するため、生体に大きな傷害を与える。しかしこのラジカル連鎖反応をとめる化合物が生体膜中には存在し、抗酸化物質と呼ばれている。この物質は、自らのH $\cdot$ （場合によっては電子）を連鎖反応を起こしている脂質に渡し、連鎖反応を停止させる。生体内に存在する抗酸化物質としては、水溶性のアスコルビン酸（ビタミンC）、尿酸、脂溶性の $\alpha$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール（ビタミンE）、ユビキノール10等が有名である。特に $\alpha$ -トコフェロール（ $\alpha$ -Toc）は生体膜中に多く存在し、活性も高いためラジカルによる生体膜酸化を考えるうえで非常に重要な抗酸化物質である<sup>18)</sup>。 $\alpha$ -Tocの抗酸化メカニズムを図1-5に示す。また酸化した脂質を修復する酵素も存在し、ホスホオリパーゼA2（PLA2）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GSHPx）、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）等が知られている。PLA2はリン脂質の酸化した脂質部分を選択的に切除する酵素である<sup>19)</sup>。この酵素は、局所ホルモンであるプロスタグランジンを生成する際も働く。GSHPxとGSTは、補酵素として還元型グルタチオン（GSH）を用い、過酸化脂質をアルコールに還元する酵素である。これは、生成した過酸化脂質が分解して活性酸素種であるアルコキシルラジカル（RO $\cdot$ ）に変化するのを未然に防いでいると考えられる。しかし生体内では、これらの防御機構でも酸化を防御しきれず、脂質酸化の二次生成物を体内に蓄積してしまう。その代表的なものとしてアルデヒドがあり、マロンジアルデヒド（MDA）、1-ヘキサナール（1-HE）、4-ヒドロキシノネナール（4-HNE）などがある<sup>20)</sup>。MDAの生成機構を図1-6に示す<sup>21)</sup>。これらのアルデヒドは、蛋白と反



応し、その機能を失わせることが知られており、非常に問題の多い酸化生成物である。これらのアルデヒドを消去する酵素としては、GSTがある。

尚、蛋白、核酸、糖と活性酸素の反応については、脂質と活性酸素の反応ほど研究が進んでいない。

### 1-3 低比重リポ蛋白 (LDL) の体内合成と体内代謝<sup>22)</sup>

人間は小腸で栄養を吸収する。その際吸収されたコレステロールと脂肪酸は小腸上皮細胞内でカイロマイクロンに組み込まれる。カイロマイクロンは、非極性のトリグリセリド (TG) やコレステロールエステルを一つの組織から他の組織に搬送するために、体液中で安定した形態で分散できる様、表面をリン脂質とコレステロールからなる一層の膜で多い、それにタンパク質 (アポタンパク) が付いたものである。アポタンパクの役割は、

- 1) 脂質に対する界面活性効果
- 2) 脂質の水解又は、脂肪酸の転移に関係する酵素の活性修飾
- 3) リポタンパク質の処理に関与する細胞表面の受容体 (リポタンパク質レセプター) に対するリガンド

である。構成されたカイロマイクロンは、胸管を経て、鎖骨下静脈に放出される。その後脂肪組織や筋肉の毛細血管で、カイロマイクロン中のTGのエステル結合はリポタンパク質リパーゼ (LpL) の働きによって分解を受け、生じた脂肪酸は内皮細胞層をvericular trasportによって通過して実質細胞に取り込まれる。このような作用を受けるとカイロマイクロンの粒子は経が小さくなり、コレステロールに富んだ状態になる。この状態をカイロマイクロンレムナントと言う。これが肝臓へくると、レムナントレセプターと結合して肝細胞へ取り込まれる。このコレステロールは主として胆汁酸として小腸へ分泌されるが、一部はTGと共に非



常に低比重のリポタンパク質粒子（VLDL）に包まれて循環系へも分泌され、内因性経路へ入っていく。VLDLは血中を循環するうちに、カイロマイクロン同様にLpLの働きによって内容のTGの分解を受け、粒子サイズが小さくなってIDL（中間比重リポタンパク質）へ転換される。さらに粒子サイズが小さくなるとLDLとなる。（図1-7）このLDLは、末梢諸組織に存在するLDLレセプター（図1-8）を介して、組織にコレステロールや $\alpha$ -トコフェロールを運ぶ。このときLDLレセプターは、LDLのapo B100の表面電荷と構造を認識して取り込む（図1-9）。そして最終的には、肝臓のLDLレセプターを介して回収され、肝臓内でVLDLに再構築される。生体内におけるリポタンパクの循環経路を図1-10<sup>23) 24)</sup>に示す。LDLレセプターによるLDLの取り込みは、negative feedbackを伴って行われる。これは生体内におけるコレステロールの恒常性を維持するために重要な機構である。

#### 1-4 LDLの酸化と動脈硬化

粥状動脈硬化の病巣を顕微鏡的に観察すると、細胞質に脂肪を蓄積した泡沫細胞が観察される。この起源は、主として平滑筋細胞とマクロファージであるであると考えられているが、肉眼的にfatty streakとされるような動脈硬化の初期病変における泡沫細胞の起源は、そのかなりの部分が血中の単球由来のマクロファージであると考えている。泡沫細胞に存在する脂肪の本態は、コレステロールエステルであることが分かっており、これはマクロファージに取り込まれたLDLが原因と考えられている<sup>25)</sup>。しかしLDLとマクロファージを反応させただけではこのように脂肪を沈着させた泡沫細胞は生成しない。近年人工的に変性させたLDLをマクロファージと反応させると泡沫細胞を生成することが分かってきた。その変性としては、

1) LDLを無水酢酸で変性させたacetylLDL

2) 酸化変性させた酸化LDL (ox-LDL)

が報告されている。これらの修飾LDLはマクロファージ中のスカベンジャーレセプター (図1-11) <sup>26) 27)</sup> により取り込まれ、この際修飾LDLのマクロファージへの取り込みはnegative feedbackを受けず、過剰量の脂肪をその中に蓄積して泡沫細胞を生成する。生体内ではacetylLDLは生成しないため、この際泡沫細胞生成に関与する修飾LDLはox-LDLだと考えられる。実際動脈硬化巣の過酸化物レベルとその度合には比例関係があることが報告されている。またox-LDLに対するモノクローナル抗体を用いた研究から、動脈硬化巣にox-LDLが存在することも報告されている。

現在動脈硬化発症機構としては、以下のような機構<sup>25)</sup> が考えられている (図1-12)。

1. 酸化変性を受けたLDLが動脈壁内皮細胞下に沈着する。そしてそこに単球が侵入しマクロファージとなる。
2. マクロファージがox-LDLを取り込み泡沫細胞へと変化する。
3. 泡沫細胞が死滅し、平滑筋細胞、線維芽細胞、リンパ球等が集まり、線維化、石灰化、コレステロール沈着などが起こる。
4. ブラークと呼ばれる内膜の肥満病巣が形成され、血管の内腔が狭くなり、血栓の形成が起こると血管がつまり、脳卒中や心筋梗塞となる。

#### 1-5 本研究の目的

以上のことよりox-LDL生成は動脈硬化生成に非常に重要な役割を担っていることが分かる。そしてこのox-LDL生成には活性酸素が大きく関わっていると考えられている。しかしLDL中には酸化傷害に対する防御機構が備わっており、特

に強い抗酸化物質である $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc) が多量に存在している。しかし、実際に ox-LDL が生成することより、LDL 中でこの抗酸化活性は低下していると推察できる。現在動脈硬化の治療薬として使用されているプロブコールは抗酸化活性を持っており、そのため ox-LDL 生成を抑制することにより動脈硬化の発症を抑えんと考えられる。よって本研究では抗酸化物質による ox-LDL 生成の抑制機序の解明を目的とし、LDL 中でのプロブコールの抗酸化能についての検討、LDL 中の内因性 $\alpha$ -Tocの抗酸化機構についての反応論的な検討を行なった。さらに LDL の反応場の特殊性についてもスピンラベル剤を用い明らかにし、LDL 内の抗酸化物質の反応機構についてこのことより考察した。またマクロファージが ox-LDL を取り込む理由について、マクロファージ内の酸化ストレスの軽減機構より考察を行なった。

近年 ox-LDL の生成機構についても盛んに研究が行なわれてきており、先にも示した通り、近年活性酸素の一つである  $O_2^-$  と血管弛緩因子である NO との反応が血管壁で起こり、そのとき生成する  $HO\cdot$  が ox-LDL 生成の原因ではないかとする説が注目を浴びている。そこで生体内化合物による  $O_2^-$  との反応性の評価は非常に大切なことであり、それを生体のような不均一な場で評価できる方法が必要だと考えられる。そこで生体膜モデルであるホスファチジルコリン (PC) リポソーム膜中に組み込んだ生体関連化合物と、 $O_2^-$  との二次反応速度定数を化学発光法を用いて求める方法を開発したので合わせて報告する。

#### 1-6 参考文献

- 1) 二木鋭雄, 現代医療, 25, 13-17, 1993
- 2) Czapski, G., Method. Enzymol., 105, 209 - 214, 1984
- 3) Walling, C., Acc. Chem. Res., 8, 125 - 131, 1975



- 4) Kasai, H., Hayami, H., Yamaizumi, Z., Saito, H. and Nishimura, S., *Nucleic Acid Res.*, 12, 2127-2136, 1984
- 5) Shigeyama, M.K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9697 -, 1989
- 6) Sadrzadeh, S. M. H., Graf, E., Panter, S. S., Hallaway, P.E. and Eaton, J. W., *J. Biol. Chem.*, 259, 14354 - 14356, 1984
- 7) 中野稔, *J. Act. Oxy. Free Rad.*, 3, 658 - 665, 1992
- 8) Kaster, J.F. and Slee, R.G., *FEBS Lett.*, 199, 85 - 88, 1986
- 9) Halliwell, B. and Gutteridge, M. C., *Biochem. J.*, 219, 1- (1984)
- 10) 吉川敏一、市川寛、近藤元治, *J. Act. Oxy. Free Rad.*, 1, 258 - 262, 1990
- 11) Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A., *Pharmacol. Rev.*, 43, 109 - 142, 1991
- 12) Sara, M., Michel, C., Bors, W., *Free Rad. Res. Commun.*, 10 221 - 226, 1990
- 13) 佐久間一郎、北畠顯, *J. Act. Oxy. Free Rad.*, 4, 523-529, 1993
- 14) 一守康史、深堀正美、山下沢、中澤博江, *J. Act. Oxy. Free Rad.*, 4, 478 - 486, 1993
- 15) McCord, J. M. and Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, 244, 6049 - 6055 (1969)
- 16) Foote, C.S., Denny, R. W., *J. Amer. Chem. Soc.*, 90, 6233 - 6234, 1968
- 17) Porter, N. A. and Wujelc, D.G., *J. Amer. Chem. Soc.*, 106, 2626 - 2629, 1984
- 18) 向井和男, *J. Act. Oxy. Free Rad.*, 3, 531 - 541, 1992
- 19) Sevanian, A. and Kim, E., *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1, 263-, 1985
- 20) Esterbauer, H., Zollner, H. and Schaur, R. J., *Membrane in Oxidation I*, CRC Press, 239 - 268
- 21) Pryor, W. A., Stanley, J. P. and Blair, E., *Lipids*, 11, 370 - 379, 1976
- 22) 山本章、田嶋正二、池田康行, *生化学*, 62, 89 - 112, 1990
- 23) 北徹、現代化学、28 - 35, 1986

- 24) M. S. ブラウン、J. L. ゴールドスタイン、日経サイエンス、15, 58 - 69, 1985
- 25) Brown, M. S. and Goldstein, J. L. Annu. Rev. Biochem. 52, 223 - 261, 1983
- 26) 児玉龍彦、松本秋世、土井健史、江見充、内藤真、日経サイエンス、21, 64 - 72, 1991
- 27) Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. and Krieger, M., Nature, 343, 531 - 535, 1990

図1-1 ラジカル、活性酸素の(1)高度不飽和脂質(PUFA)からの活性水素の引き抜き反応, (2)二重結合への付加反応, および(3)ビタミンE( $\alpha$ -トコフェロール)との反応速度定数 ( $M^{-1}s^{-1}$ )

| ラジカル<br>活性酸素   | (1) PUFAからの<br>H引き抜き | (2) 二重結合付加 | (3) ビタミンE<br>による捕捉 |
|----------------|----------------------|------------|--------------------|
| $HO^{\cdot}$   | $10^9$               | $10^9$     | $10^{10}$          |
| $RS^{\cdot}$   | $10^7$               |            |                    |
| $LO^{\cdot}$   | $10^6$               | $10^6$     |                    |
| $HO_2^{\cdot}$ | $10^2$               | $10^2$     | $10^6$             |
| $LO_2^{\cdot}$ | $10^2$               | $10^2$     | $10^6$             |
| $Fe^{III}O_2$  | ?                    | ?          | ?                  |
| $^{\cdot}NO$   | 小                    | 小          |                    |
| $^{\cdot}NO_2$ | 小                    | 小          |                    |
| $O_2^{\cdot-}$ | 0                    | 0          | $10^3$             |
| $H_2O_2$       | 0                    | 0          | 0                  |
| $LOOH$         | 0                    | 0          | 0                  |
| $^1O_2$        | 0                    | $10^6$     | $10^8$             |
| $O^3$          | 小                    | $10^6$     | $10^4$             |



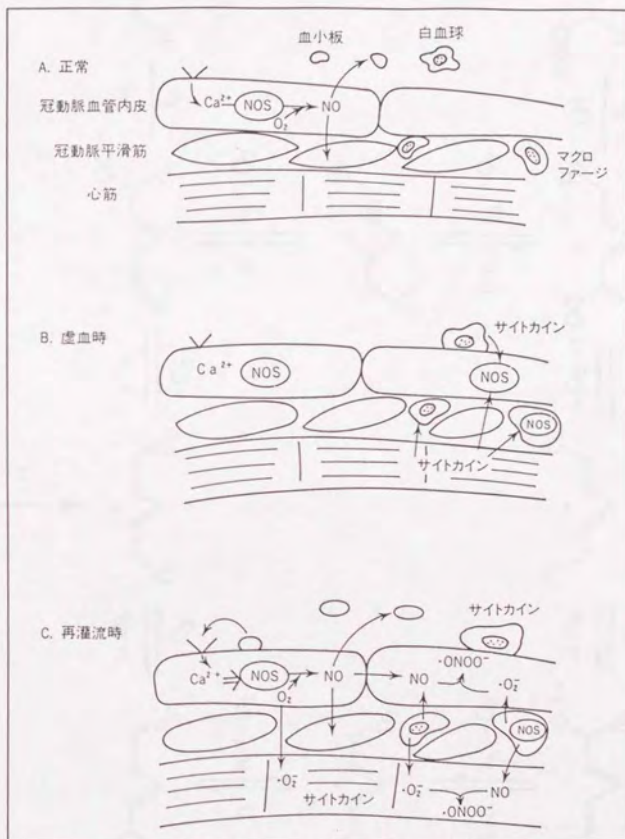


図1-2 心筋虚血-再灌流時のNOの役割  
 NOS: NO合成酵素,  $\cdot O_2^-$ : スーパーオキシドイオン  
 $\cdot ONOO^-$ : 亜硝酸ラジカル

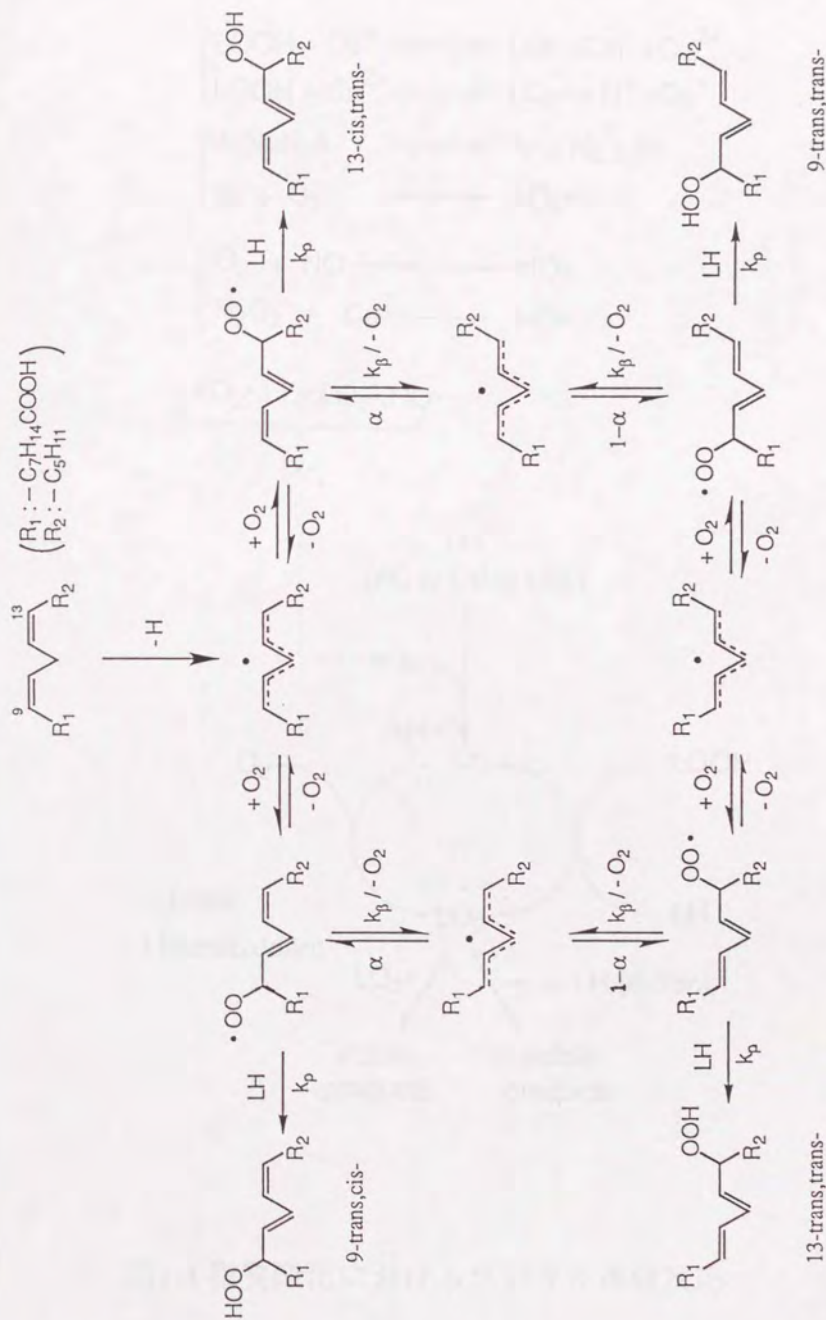
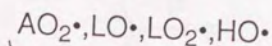
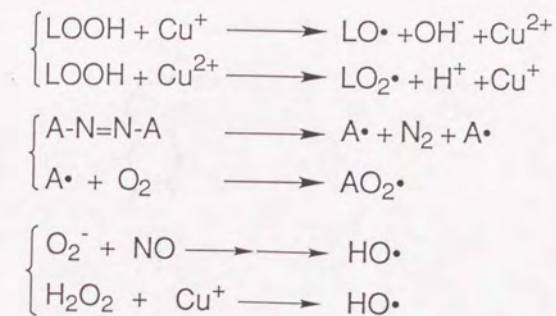


図1-3 リノール酸のラジカルによる酸化機構



(X•)

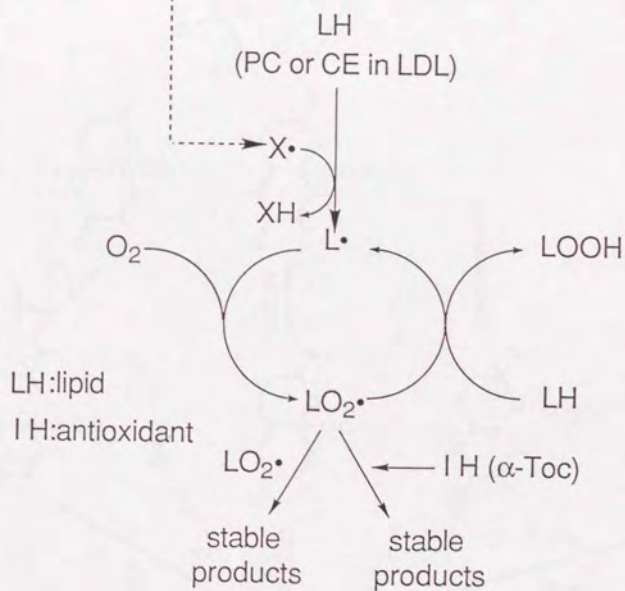


図1-4 脂質酸化におけるラジカル連鎖反応



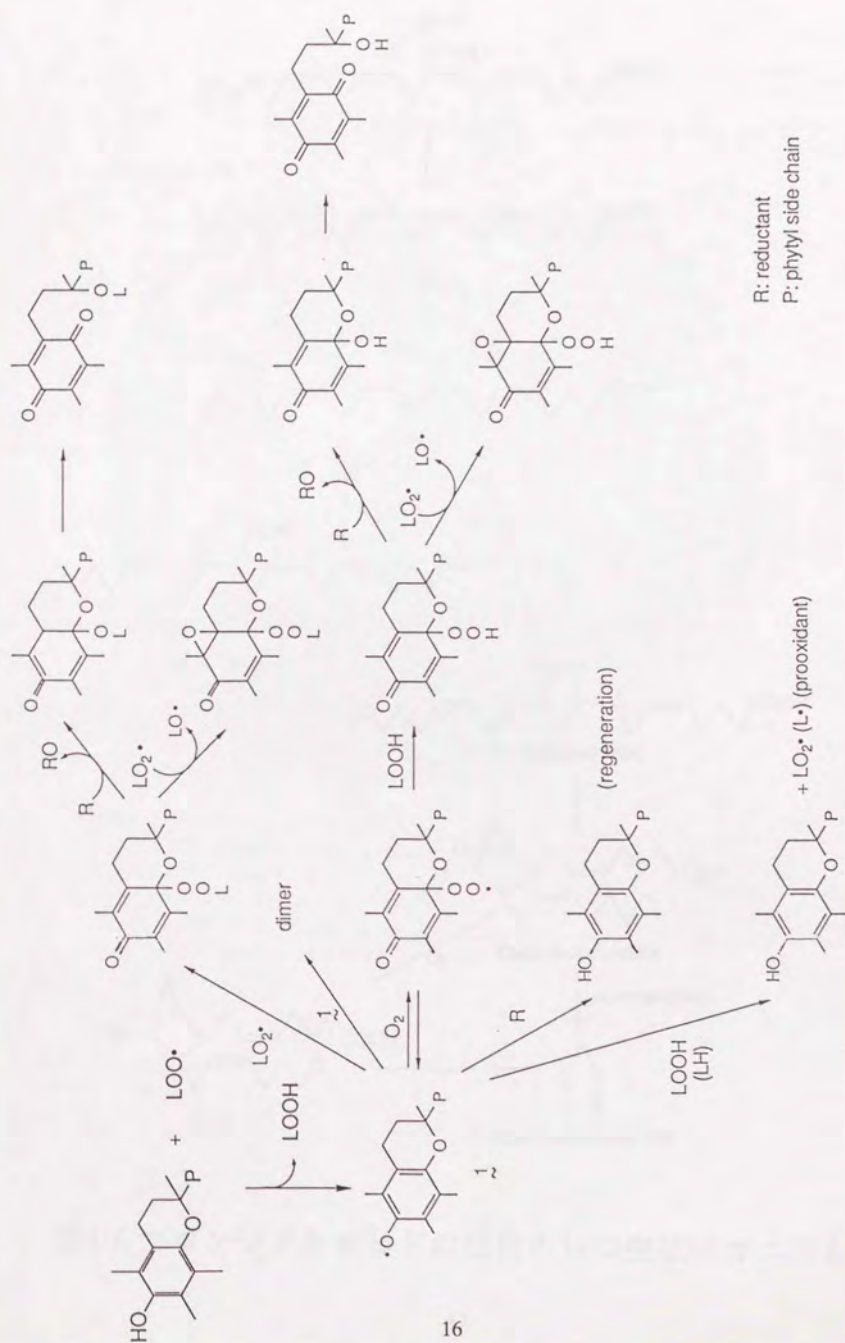


図1-5  $\alpha$ -Tocの抗酸化メカニズム

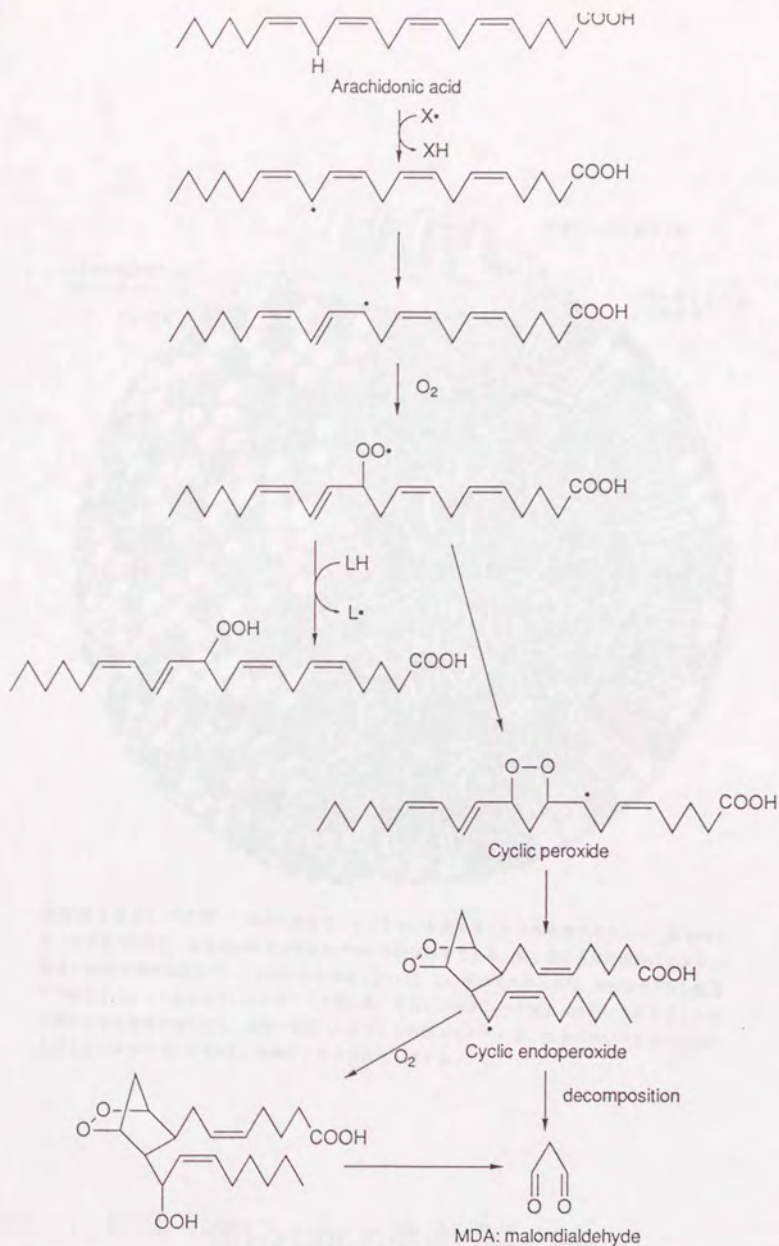
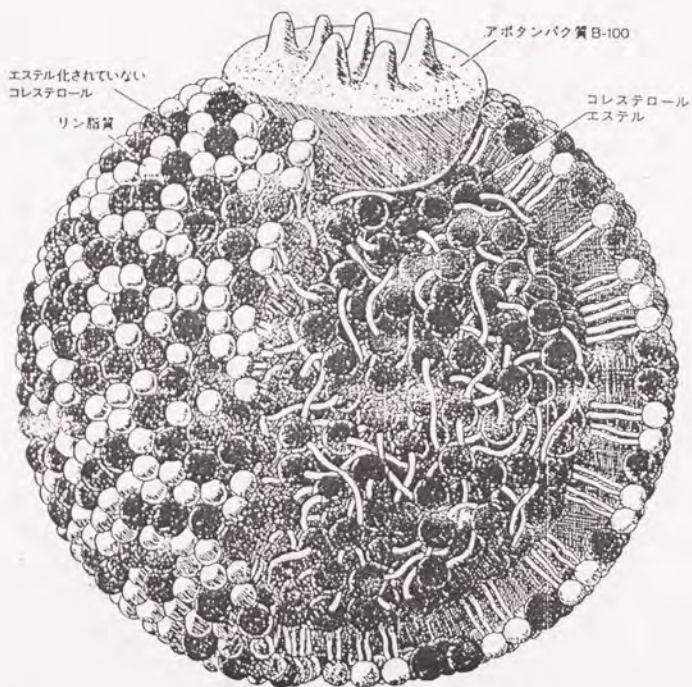


図1-6 マロンジアルデヒドの脂質からの生成メカニズム



**低密度リポタンパク質** 血中の主要なコレステロール運搬体である低密度リポタンパク質 (LDL) は、分子重約300万、直径22nm (1nmは $10^{-9}$ m) の球状粒子である。中心部は長鎖脂肪酸にエステル結合した1500分子ほどのコレステロールからなっている。この親油性の中心部は、800分子のリン脂質と500分子のエステル化していないコレステロール、それにアポタンパク質B-100という大きなタンパク質からなる被膜で覆われて、水性の血漿 (しょう) から隔てられている。血中のコレステロール値が上がると、血中のLDLが増加し、動脈硬化症の危険性も高まる。

図1-7 LDLの構造 (模式図)



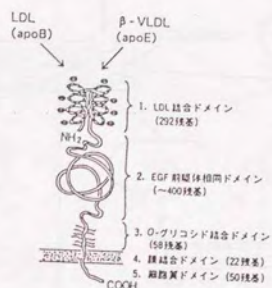


図1-8 LDLレセプターの構造

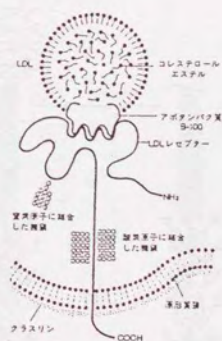


図1-9 LDLレセプターによるLDL上のアポB-100の認識

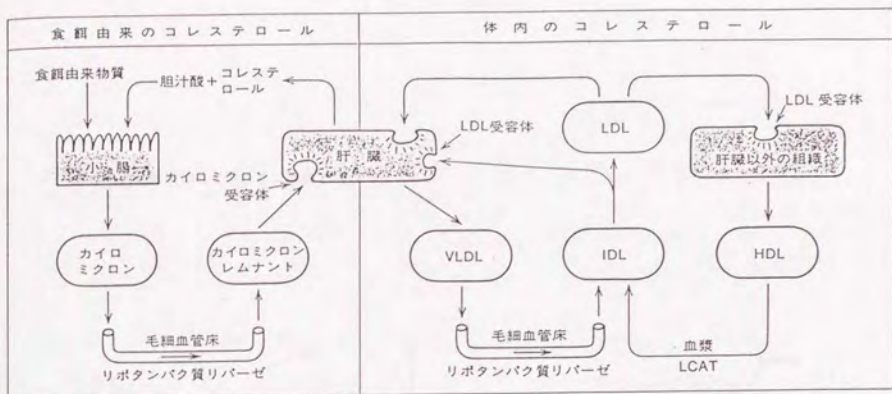


図1-10 リポ蛋白の生体内での動き

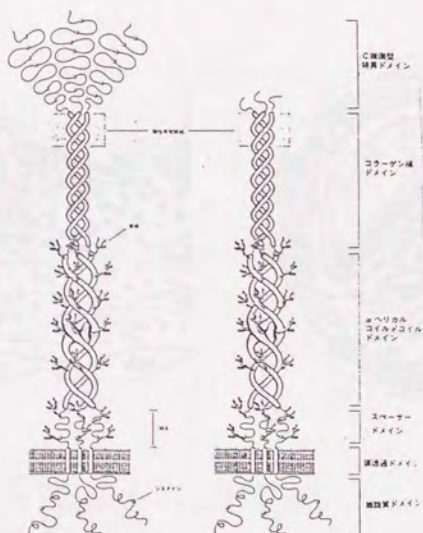
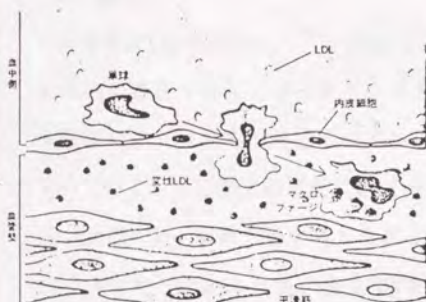


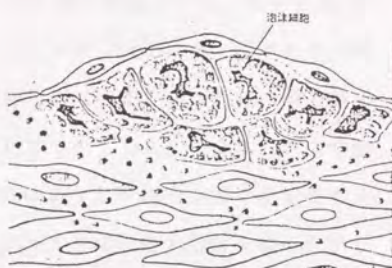
図1-11 スカベンジャーレセプターの構造

アテローム性動脈硬化はどのように進展するか

1



2



3



4



図1-12 動脈硬化の発症機構



## 第2章 スーパーオキシドの反応に関する研究

### 2-1 緒言

生体内で $O_2^-$ は生成し<sup>1) 2)</sup>、活性の高い $HO\cdot$ の生成の原因となる。しかし $O_2^-$ は生体内に存在するスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) や、種々の生体関連物質により生体内で消去されていることが知られている<sup>3)</sup>。これらの消去能の違いは $O_2^-$ との二次反応速度定数 ( $k$ ) により比較されてきた。しかしこれらの値は、実際に $O_2^-$ が働く場と考えられる生体膜中のような不均一な場で測定された値ではなかった。これは、今まで $k$ を求める方法が主に分光光度計を使った方法であったためである。

ウミホタルルシフェリン誘導体である2-methyl-6-phenyl-3-7-dihydroimidazo [1,2-a]pyrazin-3-one (Cypridina luciferin analog: CLA)<sup>4) -9)</sup>は、 $O_2^-$ もしくは $^1O_2$ と特異的に反応して強い化学発光を起こす化合物である。この場合測定するものが光の吸収でなく化学発光であるため、不均一な場における反応もその化学発光の増減を観察することにより可能だと考えられる。本研究ではCLAを用い、化学発光法により生体膜モデルであるリボソーム中に組み込んだ生体関連化合物と、 $O_2^-$ との二次反応速度定数を求める方法を開発することを目的とした。

### 2-2 試薬

ヒポキサンチン (HX), キサンチンオキシダーゼ (XOD), SODはSigma社より購入した。CLAは東京化成工業より購入した。ビタミンEである $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc) 及びその誘導体である2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol (PMC) はエーザイより提供していただいた。水溶性の $\alpha$ -Toc誘導体である6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) はFluka社

製の物を用いた。アスコルビン酸は和光純薬より購入した。大豆ホスファチジルコリン (PC) はSigma社製の物を用い、アルミナ及びシリカカラムをにて精製した。ホスファチジルコリンディミリストイル (14:0 PC) もSigma社製の物を用いた。スピントラップ剤である5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)と5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (TMPO)は三井東圧化学社製及びAldrich社製の物をそれぞれ使用した。ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) はAldrich社製の物を使用した。使用した試薬の構造と名前を図2-1に示す。

## 2-3 原理

### 二次反応速度定数 (k) の測定方法

図2-2に $O_2^-$ 発生系における競争反応スキームを示す。はじめに反応系に検出試薬 (CLAまたはNBT) しか存在しない場合を考える。このときの検出試薬 (D) と $O_2^-$ との反応速度 ( $D^\#$ の生成速度) を $V_0$  ( $V_0=kD[O_2^-][D]$ ) と仮定する。次にその反応系にある化合物 (X) を加えたとき $D^\#$ の生成速度を $V_x$ と仮定すると、 $V_x$ と $V_0$ の間には (3) 式で示す関係式が成立する。ただしこの場合DとXとの間で反応が起こればこの式は成立しない。(3) 式を展開すると (4) 式になり、実験により観察された結果を、この式に従ったプロットをすることにより、化合物Xと $O_2^-$ との二次反応速度定数 ( $k_x$ ) を求めることが可能である。

### CLAと $O_2^-$ との反応スキーム

CLAは $O_2^-$ と反応し、図2-3に示す様な<sup>6)</sup> 反応機構で化学発光を起こすことが報告されている。はじめにジオキセタンを形成する。これは分解し、 $CO_2$ と励起状態のカルボニルを持つ化合物を生じ、すぐさま380nmの光を放出し安定化合物へと変化する。このときの光の強さは $O_2^-$ との反応速度を示しているため、この光の変化を観察することによりkを求めることが可能と考えられる。



### 化学発光検出機 (OX-7) の原理<sup>10)</sup>

OX-7はフォトマルとシャッターで構成されている。フォトマルにより微弱発光を感知することが可能で、シャッターを一定時間ごとに閉じることにより、その時間間隔で発生した化学発光量を測定することが出来る。つまり記録される発光強度はCLAと $O_2^-$ との反応の反応速度を意味する。

### NBTと $O_2^-$ との反応スキーム

NBTは $O_2^-$ と反応すると図2-4<sup>11)</sup>に示したような4段階反応をすることが知られている。この4つの反応の中ではじめのNBTと $O_2^-$ との反応が律速となっている。この反応ではじめに生成するのは530nmに吸収を持つモノホルマザン (MF) で、反応の初期においては、これより先に反応は進行せず、MFだけを特異的に生成する。よっての $O_2^-$ 発生系にある化合物を加えたとき、この吸収の変化を測定すれことによりその化合物と $O_2^-$ とのkを求めることが可能である。

## 2-4 実験方法

### CLAと $O_2^-$ との二次反応速度定数 (k) の求め方

反応は、pH7.8の50mM Tris-HCl buffer中室温下でHX200 $\mu$ MとXOD2.6unit/lを混ぜ合わせることにより $O_2^-$ を発生 (図2-5)<sup>12)</sup>させ、そこで100 $\mu$ MNBTの還元反応に対するCLAの影響を、分光光度計を用い、530nm及び560nmの吸収増加速度を観察することにより求めた。またNBTとCLAを混合させ、NBTのCLAによる直接還元反応についても観察した。

### 化学発光を用いた $O_2^-$ と化合物とのkの求め方

反応は、pH7.8の50mM Tris-HCl buffer中25℃でHX50 $\mu$ MとXOD0.22unit/lを混ぜ合わせることにより $O_2^-$ を発生させ、そこで5 $\mu$ M CLAとスピントラップ剤もしくは生体関連化合物との競争反応を行なった。化学発光量の変化は、化学発光検



出機を用いて観察した。

#### リボソーム中に組み込んだ化合物と、 $O_2^-$ とのkの求め方

反応は、pH7.8の50mM Tris-HCl buffer中でHX50 $\mu$ MとXOD0.22unit/lを混ぜ合わせるにより $O_2^-$ を発生させ、そこで5 $\mu$ MのCLAと生体膜モデルであるホスファチジルコリンの多重層リボソーム<sup>13)</sup> (図2-6)<sup>14)</sup>に組み込んだ $\alpha$ -TocもしくはPMCとの競争反応を行なった。化学発光量の変化は、化学発光検出機を用いて観察した。

## 2-5 結果

#### CLAと $O_2^-$ とのk

$O_2^-$ を発生下でのNBTの還元反応に対するCLAの競争反応の結果を図2-7に示す。CLAの濃度依存的に560nmの吸収の増加速度が遅くなることがわかる。この場合NBTとCLAの直接反応が起こると競争反応が成立しなくなるため、buffer中で直接この2つの化合物を混合し、560nmの増加を観察した。結果はNBTの還元は起きなかった。このことよりCLAによるNBTの直接還元はこのbuffer中では起こらないと判断し、(4)式に従ったプロットを行ないkの値を求めた。結果を図2-8に示す。

#### 化学発光を用いた $O_2^-$ と化合物とのk

CLAとTroloxを競争反応をさせた時の化学発光変化を図2-9に示す。Troloxの濃度依存的に発光強度が落ちることが分かる。このときの変化を(4)式に従ってプロットした結果を図2-10に示す。さらにこの方法を用いてさらにスピントラップ剤であるDMPO、TMPOもしくはアスコルビン酸と $O_2^-$ とのkを求めた結果と、既に報告されている結果<sup>3)</sup>とを表2-1に示す。

#### リボソーム膜中に組み込んだ化合物と、 $O_2^-$ とのk

PCリボソーム膜中にPMCを加え、CLAの化学発光変化を観察した結果を図2-11に、また同様の方法でリボソーム中での抗酸化剤の2次反応速度定数を求めた結果の一覧を、表2-2に示す。

## 2-6 考察

この実験を行なうにあたりCLAと $O_2^-$ との $k$ が必要であったためNBTとCLAとの反応よりこの値を求めた。図2-7に示すようにCLAはNBTの $O_2^-$ による還元を濃度依存的に抑え、しかもCLAはNBTを直接還元することはなかった。そのためこの反応系において、図2-2に示した競争反応が成立すると考えた。NBTは反応の初期においてはMFだけを生成し<sup>11)</sup>、その後ディホルマザン(DF)生成へと反応は移行する。本研究ではMF生成との競争反応を観察を目的としたため、図2-8のプロットは反応開始から5分以内の傾きを用いた。反応初期においてMFの生成を観察した結果が図2-12である。反応初期において530nm付近に山を持つスペクトルが観察されていることが分かる。よってこのことより反応初期においては特異的にMFが生成しており、この反応条件で、MF生成に対する体するCLAの競争反応が観察できることが判明した。(実際の競争反応では560nmでの経時変化を測定したが、それは530nm(MF生成)にピークを持つスペクトルの肩の部分の変化であった。)また7分になるとピークトップ位置が高波長側に変化しはじめるが、これは、DFの生成が始まったことを示していると考えられる。図2-7の傾きの変化より図2-8に示した様なプロットが得られ、CLAと $O_2^-$ との $k$ を求めることが可能であるが、そのためにはNBTと $O_2^-$ との $k$ が必要である。NBTと $O_2^-$ との $k$ としては $5.88 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$  (pH7-11, 24℃) がBielskiら<sup>11)</sup>によって報告されている。しかし実はこの $k$ には誤りがある。図2-4に示したようにNBTと $O_2^-$ との反応は非常に複雑な4段階反応である。この反応で初めの反応が律速であることは



Bielskiらによって調べられており、彼らはこのことを利用しNBTと $O_2^-$ との $k$ の値を報告した。しかしこの値はモノフォルマザン (MF) の生成速度から求めた値であったため、誤りである。図2-4より、MFは(1)式から生成する化合物ではなく、(2)式から生成するものであることがわかる。NBTと $O_2^-$ の反応で生成するものはMF生成の元になるNBT<sup>+</sup>でありMFの2倍量生成する。よってこのことより本当の(1)式の $k$ は、報告されている値の半分である $2.94 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ が正確な値と考えられる。そこでこの値を用いてCLAの $k$ を図2-7より求めた。結果は、 $1.06 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ であった。よってこの値を用いて過去においてすでに $O_2^-$ との $k$ が報告されているDMPO、TMPO、Trolox、アスコルビン酸の $k$ について化学発光検出機を用いて求めた。化学発光チャートの一例を図2-9に、求めた値の一覧を表2-1に示す。表2-1より過去において報告された値と非常に良い相関を示していることが分かる。このことより、化学発光を用いたこの方法で $k$ を求めることが可能だと判断した。さらにこの方法を用いてPCリボソーム膜中もしくは14:0 PCリボソーム膜中に組み込んだ $\alpha$ -Toc誘導体の $O_2^-$ に対する $k$ を求めた結果を表2-2に示す。結果は、水溶性の誘導体であるTroloxを、Tris-buffer中、PCリボソーム中、14:0 PCリボソーム中で比較した結果、ほぼ同じ値を示した。このことより化学発光法によれば不均一な溶液中でも $k$ が測定出来ることが分かった。 $\alpha$ -Tocは、14:0 PCリボソーム膜中でもPCリボソーム膜中でもほぼ同じ値であった。このことより、この反応においてPC中に存在するbisアリル位水素は化学発光変化に影響を与えないことが判明し、この反応系で観察される化学発光量の減少は、 $\alpha$ -Tocによる純粋な競争反応によるものであることが分かった。またこの反応系に $\alpha$ -Tocの反応サイトであるフェノール性OHを、アセチル化した $\alpha$ -Tocopheryl acetateを加えた結果、 $\alpha$ -Tocの様に濃度依存的な減少は観察されなかった (data not shown)。このことより、化学発光の減少はクロマン環自体と



の反応ではないことが分かった。さらに $\alpha$ -Tocの側鎖のない誘導体であるPMCを同じようにリボソーム系に組み込み、その $O_2^-$ とのkを求めてみたところ、 $\alpha$ -Tocの4倍の値を示し、Troloxの値とほぼ同じ値であった。これらのことよりPMCは水層で発生する $O_2^-$ と非常に効率良く反応し、これは、 $\alpha$ -Tocとは異なりその側鎖が存在しないため、非常に効率良くリボソーム膜表面及び膜間を移動できたためだと考えられる<sup>15)</sup>。

## 2-7 まとめ

本研究においては不均一系中でのkを測定する方法を開発することを目的とし、CLAを使った化学発光法によりそれが可能であることが分かった。PMCは膜中で非常に効率良く反応できることが分かった。

## 2-8 参考文献

- 1) Fridorich, I., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23, 239-257., 1983
- 2) McCord, J.M., Free Rad. Biol. Med., 2, 325-345, 1986
- 3) Bielski, B.H.J., Cabelli, D.E., Arudi, R.L. and Ross, A.B., J. Phys. Chem. Ref. Data., 14, 1041-1100, 1985
- 4) Goto, T. and Takagi, T., Bull. Chem. Soc. Jpn., 53, 833-834, 1980
- 5) Sugioka, K., Nakano, M., Kurashige, S., Akuzawa, Y. and Goto, T., FEBS Lett., 197, 27-30, 1986
- 6) Nakano, M., Sugioka, K., Ushijima, Y. and Goto, T., Anal. Biochem., 159, 363-369, 1986
- 7) Kimura, H. and Nakano M., FEBS Lett., 239, 347-350, 1988
- 8) Takahashi, A., Totsune-Nakano, H., Nakano, M., Mashiko, S., Suzuki, N., Ohma, C. and Inaba, H., FEBS Lett., 246, 117-119, 1989

- 9) Takahashi, A., Nakano, K., Mashiko, S. and Inaba, H, FEBS Lett., 261, 369-372, 1990
- 10) Niki, E., J. Jpn. Petrol. Inst., 30, 369-377, 1987
- 11) Bielski, B.H.J., Shiue, G.G. and Bajuk, S., J. Phys. Chem., 84, 830-833, 1980
- 12) Hassen, H.M., Methods in Enzymology, 105, 404-412
- 13) Niki, E., Kawakami, A., Saito, M., Yamamoto, Y., Tsuchiya, J. and Kamiya, Y., J. Biol. Chem., 260, 2191-2196, 1985
- 14) 村上幸人、砂本順三、酵素・生体膜モデルの化学, 南江堂
- 15) Niki, E., Chem. Phys. Lipids, 44, 227-253, 1987

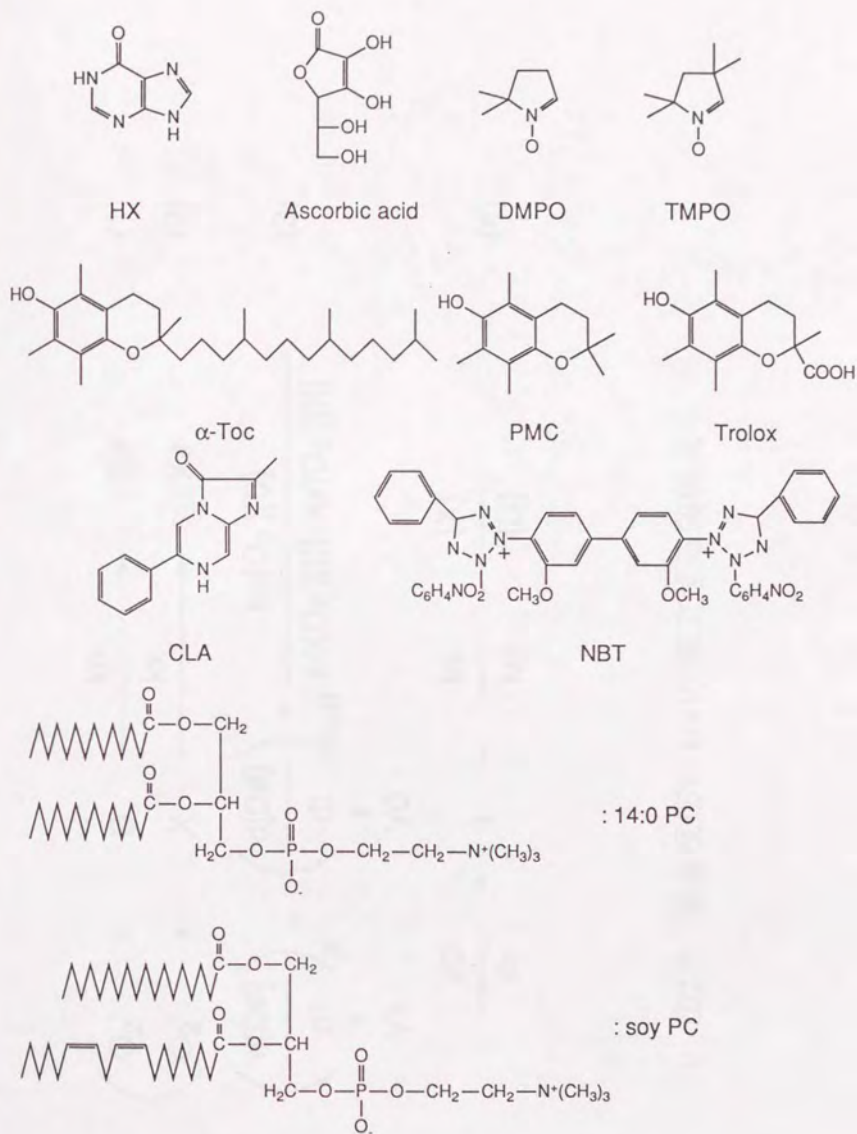
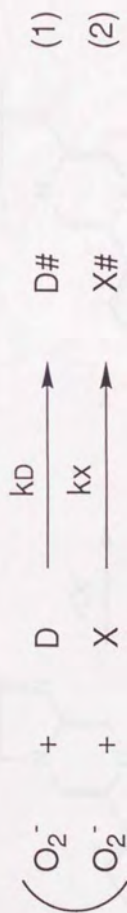


図2-1 実験で使った化合物の構造と名前





$$\left( \frac{d[\text{D}^\#]}{dt} \right)_X = \left( \frac{d[\text{D}^\#]}{dt} \right)_{X=0} \cdot \frac{k_D[\text{O}_2][\text{D}]}{k_D[\text{O}_2][\text{D}] + k_X[\text{O}_2][\text{X}]}
 \quad (3)$$

$$\frac{V_0}{V_X} = 1 + \frac{k_X}{k_D} \cdot \frac{[\text{X}]}{[\text{D}]}
 \quad (4)$$

図2-2 競争反応において成立する関係式

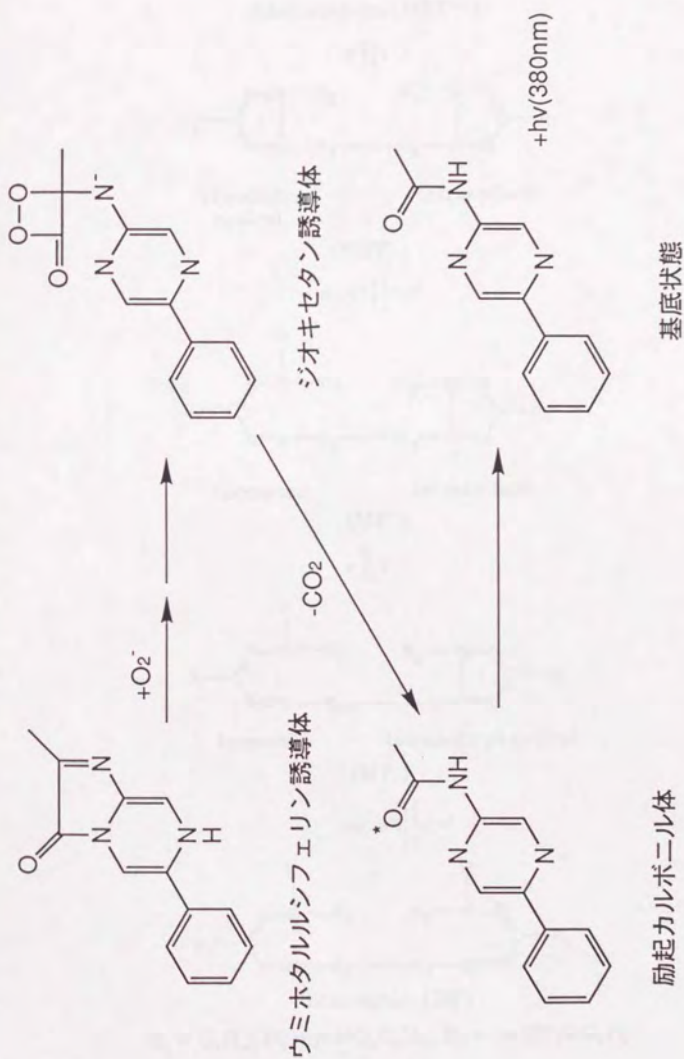


図2-3 CLAと $O_2^-$ との反応スキーム





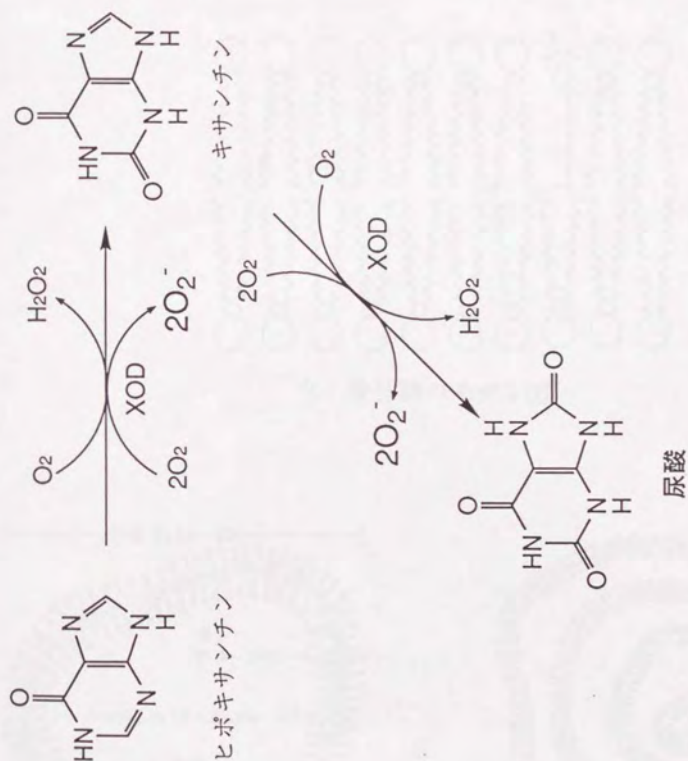
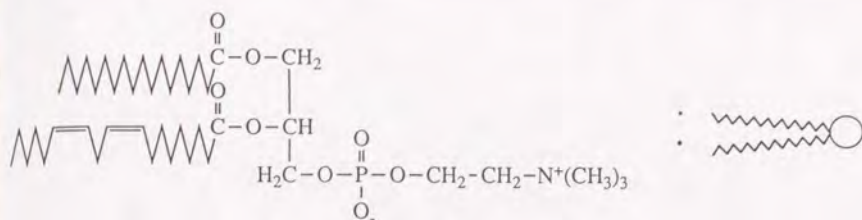
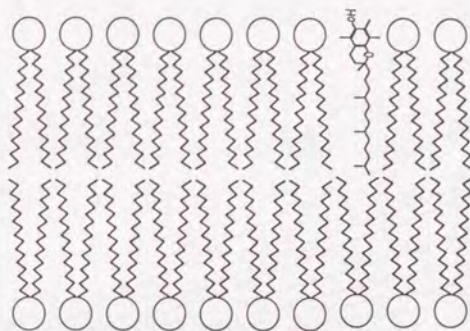


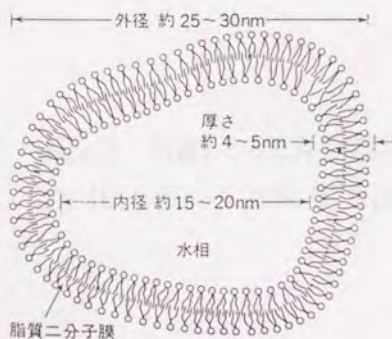
図2-5 ヒポキサンチン (HX) とキサンチンオキシダーゼに (XOD) による $O_2^-$ の発生機構



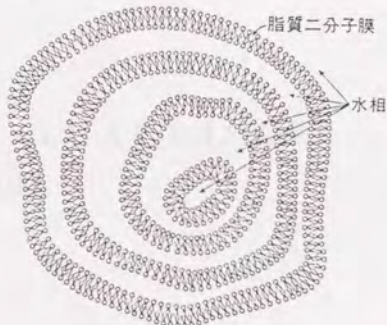
(a) ホスファチジルコリン (PC) の構造



(b) 生体膜のモデル図



(c) 一重膜リボソームの構造



(d) 多重層リボソームの構造

図2-6 生体膜モデルリボソームの構造

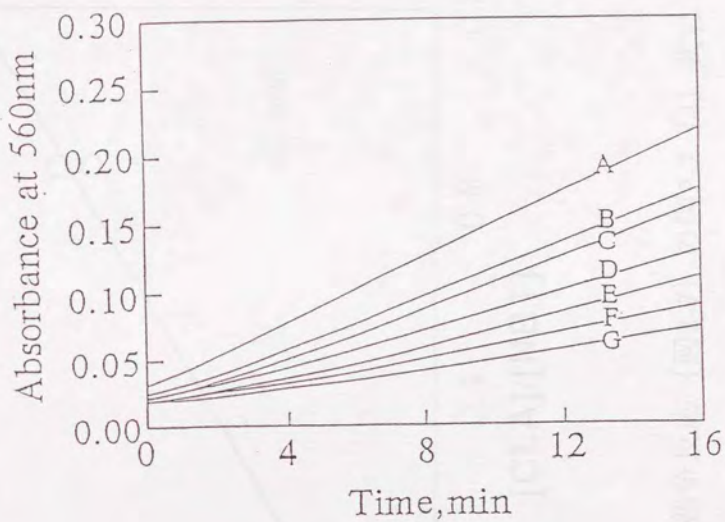


図2-7 NBTとCLAの競争反応。CLA: A:0; B:4.5; C:7.3; D: 10.1; E: 15.2; F: 27.5; G: 42.8 $\mu$ M



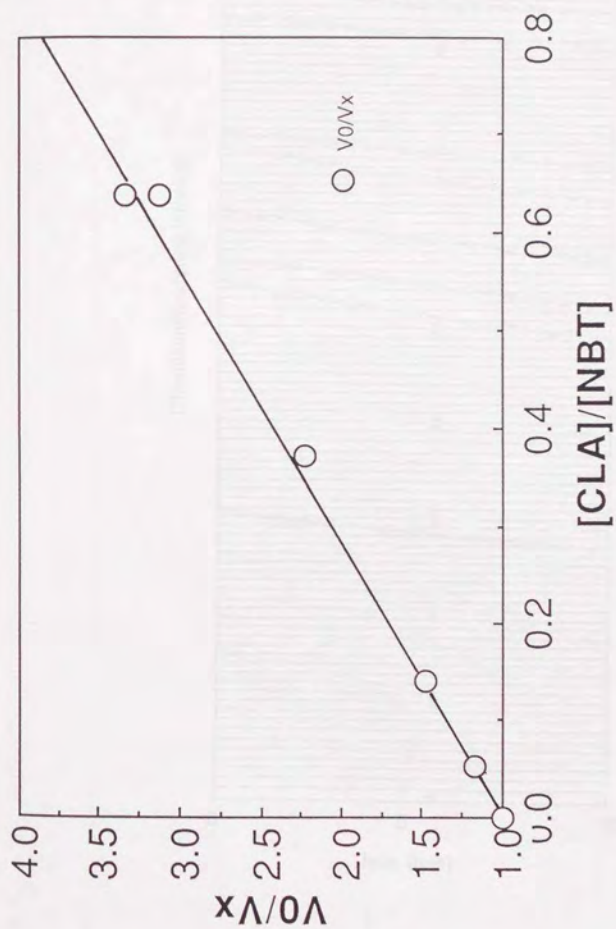


図2-8 NBTとCLAの競争反応 (図2-7) の図2-2 (4) 式に従ったプロット

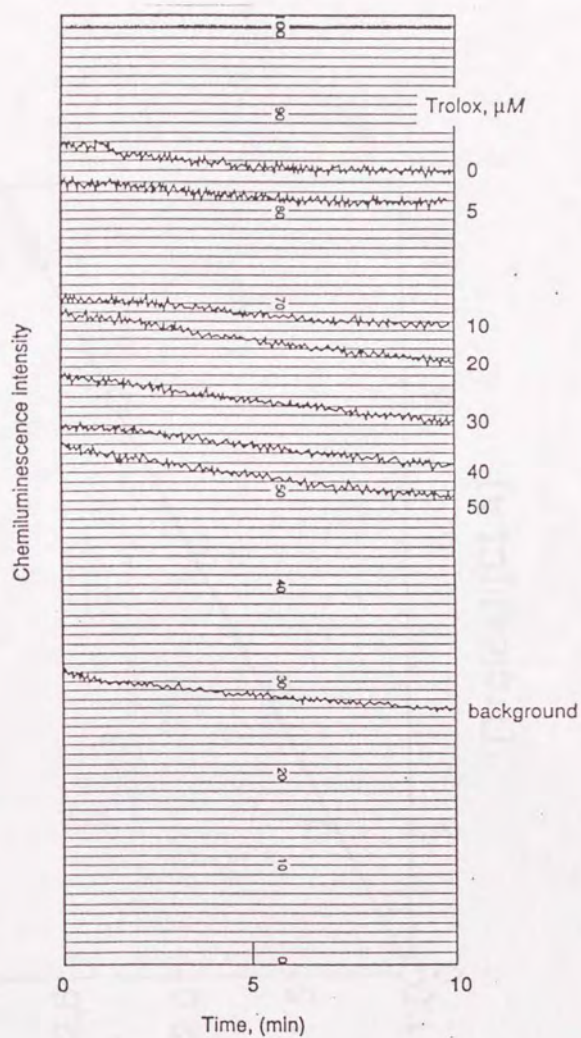


図2-9 CLAとTroloxとの競争反応

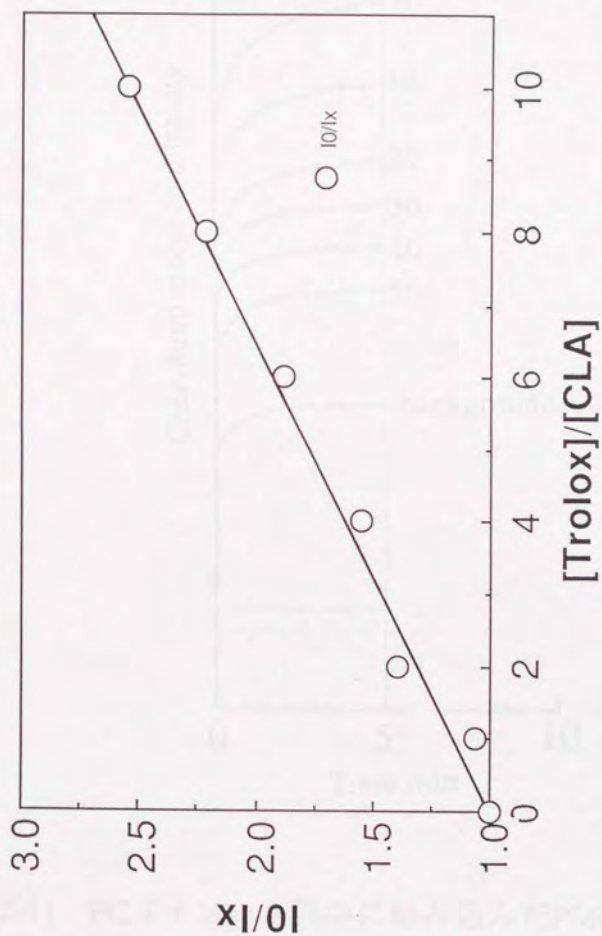


図2-10 CLAとTroloxの競争反応 (図2-9) の図2-2 (4) 式に従ったプロット



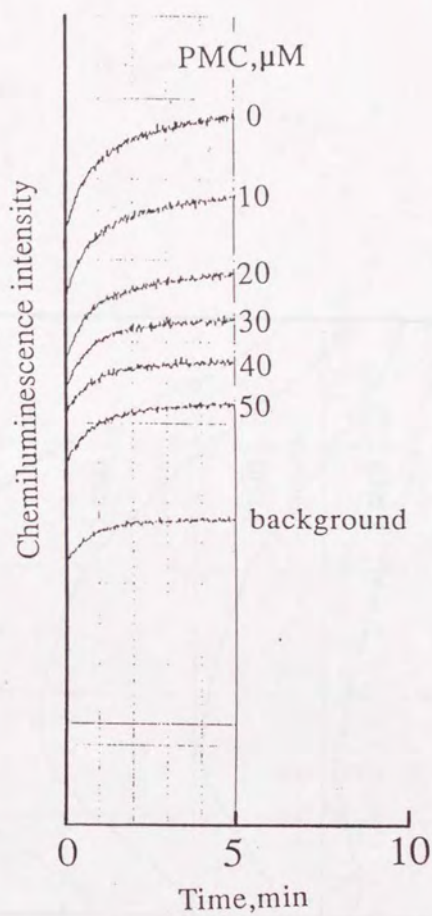


図2-11 PCリポソーム膜中に組み込んだPMCとCLAの競争反応

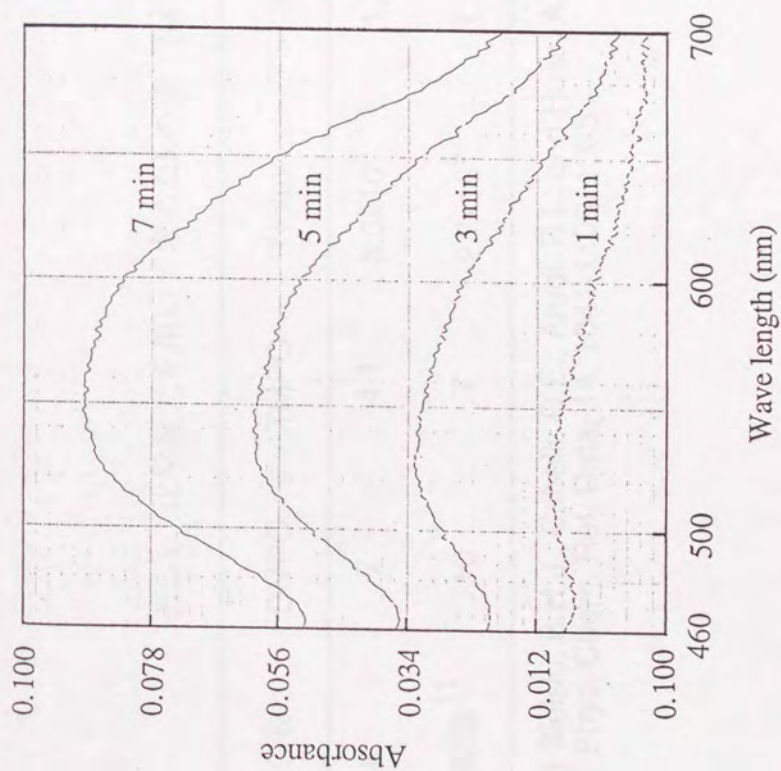


図2-12 図2-7と同条件下 (NBT+O<sub>2</sub>) におけるの反応初期でのスペクトル変化

表2-1 化学発光を用いて求めたkの値 ( $M^{-1}s^{-1}$ )


| 化合物               | DMPO | TMPO | Trolox            | アスコルビン酸           |
|-------------------|------|------|-------------------|-------------------|
| k                 | 7    | 4.1  | $3.3 \times 10^5$ | $1.7 \times 10^4$ |
| 文献値 <sup>1)</sup> | 10   | 7    | $2.7 \times 10^5$ | $1.7 \times 10^4$ |

1) Bielski, B.H.J., Cabelli, D.E., Arudi, R.L. and Ross, A.B.,  
J. Phys. Chem. Ref. Data, 14, 1041-1100, 1985

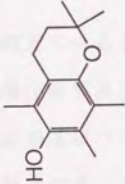


表2-2 PC多重層リポソーム中での $\alpha$ -Toc 誘導体の $O_2^-$ に対する $k$ の比較 ( $M^{-1}s^{-1}$ )

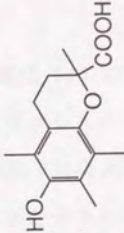
| Medium      | $\alpha$ -Tocopherol | PMC               | Trolox            |
|-------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| Water       |                      |                   | $1.7 \times 10^4$ |
| soy PC MLV  | $4.9 \times 10^3$    | $2.0 \times 10^4$ | $1.7 \times 10^4$ |
| 14:0 PC MLV | $4.5 \times 10^3$    |                   | $1.3 \times 10^4$ |



$\alpha$ -Tocopherol



PMC



Trolox

### 第3章 脂質酸化に対するプロブコールの抗酸化効果

#### 3-1 緒言

動脈硬化の発症原因の1つとして、近年低比重リポタンパクの酸化(ox-LDL)と、それに伴う泡沫細胞生成が考えられている<sup>1) 2)</sup>。これは、通常コレステロールを運ぶ役割を担っている低比重リポタンパク(LDL)が、内皮細胞下に浸出し、何かしらの作用により酸化LDLを生じ、その時内皮下に侵入してきたマクロファージに取り込まれ、泡沫細胞を形成するというメカニズムである。

しかしLDLは抗酸化物質を含んでおり、これらはox-LDL生成を抑えていると考えられるが、実際に動脈硬化が起こっている人には、これらの抗酸化物質濃度はまだ十分ではないと考えられる。現在使用されている動脈硬化治療薬にプロブコールという薬がある。これは、抗酸化物質であるBHTをS-C-S結合でカップリングさせた構造をとっている薬である。この薬は、血中のコレステロール値を最高20%程度下げため、動脈硬化治療に効果があるのではないかと考えられていたが、近年酸化LDLと動脈硬化の関係が明らかになるにつれ、LDL中でのプロブコールの抗酸化効果に注目が集まってきた。これはox-LDLの生成を抑えることで泡沫細胞生成を抑え、結果的に動脈硬化の発症を抑えるのではないかと考えられている<sup>3) -5)</sup>。そして実際にプロブコール投与を受けた患者の血中から得られるLDLは試験管内で酸化を行なうと非常に酸化されにくくなっていることや、プロブコールの酸化生成物がそのような人の血液から発見されていることが報告されている<sup>6)</sup>。

本研究では、プロブコールの抗酸化能を均一溶液中、リポソーム膜中、LDL中で $\alpha$ -Tocの抗酸化能と比較することによって評価した。またESRを用いて他の化合物との相互作用についても検討し、この結果よりLDL中でのプロブコールの抗

酸化機構についても考察した。

### 3-2 使用した試薬

リノール酸メチルは東京化成工業より購入し、シリカゲルを用いて精製し実験に使用した。ダイズホスファチジルコリン (PC) はSigma社より購入し、シリカゲルとアルミナを用いて精製した。親水性及び脂溶性のラジカル開始剤である2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) と2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN) は、和光純薬工業から購入した。プロブコールは第一製薬そして $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc)はエーザイよりそれぞれ提供していた。アスコルビルパルミテートは東京化成工業より購入した。ガルビノキシルはAldrich社より購入した。t-ブトキシルのラジカル開始剤として用いたdi-t-butylperoxalate (DBPO) は調製、精製した<sup>7)</sup>。図3-1に実験で使用した試薬の構造と名前を示す。図3-2にアゾ化合物のラジカル生成機構について示す。尚、アゾ化合物は、ラジカル発生場所を選択できることと、一定速度でペルオキシラジカルを発生させることが可能であるため使用した。

### 3-3 実験方法

#### LDLの分離方法

LDLはHavelらの方法<sup>8)</sup>に従い、超遠心機(日立社製:65P-7)を用いて健常人の血漿より $d=1.019-1.063$ の部分を取りだしLDLとした(図3-3)。分取後LDLは100 $\mu$ M EDTAを含んだ0.9%生理食塩水中で一晩透析し、その後滅菌フィルター(Millipore社製, MILLEX-GV 0.22 $\mu$ m Filter Unit)を用いて滅菌処理を行ない滅菌チューブ(Corning社製, 50ml Centrifuge Tube Sterile)中4℃で保存した。

#### 蛋白濃度測定方法



LDLの蛋白濃度は、ウシ血清アルブミン（BSA）を規準とし、Lowry法（Pierce社製,BCA試薬）により測定した。

リノール酸メチル（MeLH）の均一溶液中における酸化とプロブコールによる抑制

均一系の実験は、453mM MeLH, 0.2mM AMVN, 3 $\mu$ Mの抗酸化物質（プロブコールもしくは $\alpha$ -Toc）を混合したヘキサン溶液を37℃で酸化させることによって行なった。リノール酸メチルヒドロパーオキシド（MeLOOH）はHPLCを用いて分析した。分析条件を下に示す。

MeLOOH:

|                |   |
|----------------|---|
| column         | LC-18 25cm(Supelco社製)                                       |
| eluent         | MeOH/t-BuOH/40mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> =60/30/10 |
| detector       | UV234nm   |
| flow rate      | 1.0ml/min   |
| retention time | 5.0min  |

PCリボソームの酸化とプロブコールによる抑制

実験は、5.15mM PC, 1.0mM AMVN, 3 $\mu$ Mの抗酸化物質（プロブコールもしくは $\alpha$ -Toc）を含んだPCリボソームを37℃で酸化させることによって行なった。PCヒドロパーオキシド（PC-OOH）はHPLCを用いて分析した。分析条件を下に示す。

PC-OOH:

|           |   |
|-----------|---|
| column    | LC-Si 25cm(Supelco社製)                             |
| eluent    | MeOH/40mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> =90/10 |
| detector  | UV234nm   |
| flow rate | 1.0ml/min   |

retention time      5.0min

### LDLの酸化方法

LDLの酸化は、LDLを蛋白濃度で0.25mg/mlにpH 7.4 10mM Phosphate Buffer Saline(PBS)を用いて希釈し（アゾ化合物による酸化の場合は、最終濃度で100 $\mu$ MになるようにEDTAを加えた）、そこにEtOHに溶解させたプロブコールを反応液全量に対し1%体積のEtOHでLDLに加えLDLに組み込んだ。酸化は水溶性ラジカル開始剤であるAAPH、脂溶性ラジカル開始剤であるAMVN、またはCuCl<sub>2</sub>を最終濃度で3mM, 2mM, 10 $\mu$ Mになるように加えて37℃で行なった。サンプリングは各時間ごと300 $\mu$ lずつ1.5mlのプラスチックチューブに採ることで行なった。AAPH及びAMVNによる酸化の場合は、ドライアイスで冷やすことにより反応を止め、CuCl<sub>2</sub>による酸化の場合は、100 $\mu$ M EDTAを加えることにより反応を止めた。

### LDL中の過酸化物濃度と抗酸化物濃度の測定方法

LDL中の過酸化物濃度と抗酸化物濃度の測定は、300 $\mu$ lのLDLサンプルに対し600 $\mu$ lのCHCl<sub>3</sub>/MeOH=2/1溶液を加えてvortex処理30sec, 遠心機 12,000 rpm 3minで抽出し、50 $\mu$ lをHPLCにinjectすることによって行なった。測定は、フォスファチジルコリンハイドロパーオキシド(PC-OOH), コレステロールハイドロパーオキシド(CE-OOH), 内因性 $\alpha$ -Toc, そしてプロブコールについて行なった。分析条件を表3-1に示す。

### LDLの酸化における酸素消費に対するプロブコールの影響

酸素の取り込みの割合は酸素電極を用いて測定した。（生体酸素モニター YSI53: Yellow Springs社製）実験は、反応セルにプロブコールを組み込んだ4mlの0.25mg/ml LDLを入れ、最終濃度で5 $\mu$ MになるようにCuCl<sub>2</sub>をシリンジを使用して加え37℃で酸化を行なった。

### ESRスペクトルの測定方法

EPRスペクトルの測定は、X-Band JEOL FEIX分光計（日本電子社製）を用いて行なった。条件は以下のとおりである。

磁場：392 ± 5 mT, sweep time : 8 mT / min, マイクロ波 power : 1 mW, 周波数調節 : 100 kHz, 振幅調節 : 0.02 mT。

反応は、プロブコールとガルビノキシルをベンゼン溶液中37℃で混ぜ合わせることによって行ない、その時のスペクトル変化を観察した。さらに反応液に $\alpha$ -Tocまたはアスコルビン酸エステルを加え、プロブコールとの相互作用についても観察した。

### ストップフローを用いたプロブコールとガルビノキシルの反応の測定

プロブコールとガルビノキシルの相互作用はストップフロー分光計（Leatherhead社製：RX-100D）で調べた。プロブコールとガルビノキシルはMeOHに溶解し別々にシリンジに入れ、ストップフローを用い瞬時にこの2液を混合することにより行なった。測定は、500nm-300nmを51秒おきに分光光度系を用いて行なった。

### 均一系におけるペルオキシラジカルに対するプロブコールと $\alpha$ -Tocの反応性の比較

ヘキサン溶液中で2.5 $\mu$ Mのプロブコールと $\alpha$ -Tocを混合し、200 $\mu$ MのAMVNにより37℃で酸化を開始した。分析条件は、LDLの実験と同様である。

## 3-4 実験結果

### プロブコールとガルビノキシルの反応とプロブコールラジカルのESRスペクトル

ESRによるプロブコールとガルビノキシルの反応はベンゼン中で行なった。同



濃度の反応ではガルビノキシルのESRスペクトルは変化しなかった。しかしガルビノキシルとその100倍量のプロブコールを反応させると、ガルビノキシルのESRスペクトルが消え、新しく3連のESRスペクトルが観察された。(図3-4) ESRパラメーターは $g=2.0058$ ,  $a^H(2H)=0.14\text{mT}$ であった。プロブコールとDBPOをベンゼン溶液中で反応させた場合もガルビノキシルと同様のスペクトルが得られた。(図3-4) また、 $g$ 値と結合定数も同値であった。さらにプロブコールとガルビノキシルの混合液に $\alpha$ -Tocを加えると、プロブコールのスペクトルは消え、代わりに $\alpha$ -Tocラジカルのスペクトルが現われた。また、 $\alpha$ -Tocの代わりにアスコルビルバルミトイルを加えたところ、ESRのスペクトルは即座に消失してスペクトルは何もなくなった。(図3-4)

#### ストップフローを用いたプロブコールとガルビノキシルの反応の測定

プロブコールとガルビノキシルの反応は、ストップフロー分光光度計でも行なった。結果を図3-5に示す。ガルビノキシルとプロブコールを混ぜあわせた途端428.5nmのガルビノキシルの吸収は減少し、代わりに、プロブコールにも存在しない342nmの吸収が現われた。このピークは、 $\alpha$ -Tocまたはアスコルビルバルミテートを加えることにより消失した。

#### プロブコールによるヘキササン中リノール酸メチルの酸化抑制

プロブコールの抗酸化能測定を、ヘキササン均一溶液中リノール酸メチルの酸化速度の変化を観察することによって行なった。図3-6に結果を示す。酸化は脂溶性のアゾ化合物のAMVNを用いて行なった。リノール酸メチルを酸化すると誘導期なしで酸化が進行する。しかしプロブコールや $\alpha$ -Tocを反応系に加えると酸化速度は抑制された。 $\alpha$ -Tocは明確な誘導期を示して反応を抑制し、誘導期が終了後は抗酸化物質なしのときと同じ速度で酸化が進んだ。プロブコールはこれとは異なり濃度依存的に酸化を抑えたが、明確な誘導期は現われなかった。

#### PCリボソームのプロブコールによる酸化の抑制

PCリボソーム膜中の酸化におけるプロブコール抗酸化効果も均一系と同様に $\alpha$ -Tocと比較することにより行なった。結果を図3-7に示す。この系においては、プロブコールも $\alpha$ -Tocも誘導期を示した。

#### プロブコールを用いたLDLの酸化抑制

図3-8に $\text{CuCl}_2$ を用いてLDLを酸化したときの結果を示す。この結果より開始剤を加えることにより酸化が開始され、同時に内因性 $\alpha$ -Tocの減少が起こることが分かる。図3-9にLDLをAAPHまたはAMVNで酸化したときの結果を示す。 $\text{CuCl}_2$ の酸化でプロブコール濃度を変化させて抗酸化能を比較した結果（図3-10）、濃度が増えるに従い誘導期の長さが増加していくことが分かった。

#### LDLの酸化における酸素消費に対するプロブコールの影響

結果を図3-11に示す。図3-10の過酸化物生成と同様に濃度依存的に酸素吸収が起こった。

#### 均一系におけるペルオキシラジカルに対するプロブコールと $\alpha$ -Tocの反応

結果を図3-12に示す。ヘキサン均一系に同時に二つの抗酸化剤が存在すると、LDL中の結果（図3-8）とは異なり、はじめに $\alpha$ -Tocが減少し、 $\alpha$ -Tocの減少後、プロブコールの減少が起こった。

### 3-5 考察

ESRを用いた実験よりプロブコールは、ラジカル中間体を生成することが可能で、そのラジカルは、フェノール性OHが反応した結果生じたものであることが分かった。Aruomaら<sup>9)</sup>は、エタノール中でプロブコールと $\text{Ag}_2\text{O}$ を反応させた結果同様の3連スペクトルを得ており、これは今回観察されたものと同じスペクトルと考えられる。このスペクトルは、 $\alpha$ -Tocを加えると $\alpha$ -Tocラジカルのスペク



トルが発生し、同様にアスコルビルバルミトイルを加えるとスペクトルが消失することより、プロブコールはこれらと相互作用を持つことが分かった。またストップフローを用いた実験においても、プロブコールとガルビノキシルの反応からどちらにも存在しない342nmの吸収が生成した。これは $\alpha$ -Toc及びアスコルビン酸エステルを加えると消滅することよりおそらくプロブコールラジカルのピークと考えられる。このピーク変化を観察すると、時間経過と共にピークが消失していくことより、プロブコールラジカルは、メタノール中ではあまり安定でないことが分かる。均一溶液中でのプロブコールの抗酸化活性を $\alpha$ -Tocとの比較で調べたところ、 $\alpha$ -Tocの抗酸化活性はプロブコールよりも17.5倍反応性が高かった。この活性はそれぞれの抗酸化物質に対し誘導期の酸化速度 $R_{inh}$ と抗酸化剤なしの酸化速度 $R_0$ との比を求め比較したものである。図3-7は、 $\alpha$ -TocはプロブコールよりもPCリボソーム膜中においてもより活発に働くが、抗酸化能の違いは均一系に比べて膜の方がはるかに小さいことを示している。 $\alpha$ -Tocの抗酸化活性は有機均一溶液よりも、PC膜中における抗酸化能の方がはるかに小さいことが知られており、Barclay<sup>10)</sup>は、 $\alpha$ -Tocによるペルオキシラジカルの除去効率は、均一溶液よりもリボソーム膜におけるほうが小さいことを報告している。またPryor<sup>11)</sup>は、 $\alpha$ -Tocは、SDSミセル系でプロブコールより7.1倍も活性が高いことを報告している。図3-9を見るとLDLの酸化においてはもっと顕著に差が現われている。なぜならば、プロブコールはヒドロペルオキシドの生成を長期にわたり抑えているが内因性 $\alpha$ -Tocはすぐに消費さるからである。これらの結果は、プロブコールがラジカルに対する抗酸化能を持っており、とくに実際に治療薬として使われているLDL中で最も抗酸化能が高くなっていることを示している。これらのことより、LDL系中での抗酸化能はこのような化学的反応性だけでなく局部濃度や微環境における流動性（抗酸化剤の動き易さ）のような物理的環境が大き



く影響した結果と考えた。またプロブコールは濃度依存的にLDLの酸化を抑え、このことは、実際に人間に投与した場合LDL中に取り込まれる量が多いほど効果があがることを意味している。図3-12は $\alpha$ -Tocとプロブコール共存系のヘキサン溶液中でのAMVNによる酸化結果を示したものである。 $\alpha$ -Tocが先に消費されプロブコールは $\alpha$ -Tocがほとんど消費された後に減少をはじめる。これはおそらく $\alpha$ -Tocの方がプロブコールより均一系で速くAMVN由来のペルオキシラジカルと反応でき、しかも図3-4で示した様に $\alpha$ -Tocはプロブコールラジカルを還元するからである。しかしLDL中においては、プロブコールと $\alpha$ -Tocは独立して消費される。これはおそらくLDL中でのプロブコールの抗酸化能が上がり、しかもLDL中ではそれぞれが相互作用できない位置に存在しているからであろう。プロブコールの化学量論数 $n$ の値（一つの抗酸化物質が捕捉できるラジカルの数）を図3-12の $\alpha$ -Tocとプロブコールの減少速度の比より計算した。AMVNはヘキサン溶液中で一定速度でペルオキシラジカルを生成するので、この二つの抗酸化物質の減少速度の差より、 $n$ の値が導き出せるわけである。よって $\alpha$ -Tocとプロブコールの減少速度は、それぞれ $3.55 \times 10^{-10} \text{ M/s}$ と $1.31 \times 10^{-10} \text{ M/s}$ であるので、 $\alpha$ -Tocの $n$ の値が2であることより計算すると<sup>12) 13)</sup>、5.4という値が得られた。Pryorらは既にSDSミセル系でのプロブコールの $n$ の値として7.66という数値を報告している。二つのhinderedフェニル基をもつプロブコールの構造は化学式通りであれば $n=4$ をもっていると思われるが、既に報告されているプロブコールの反応性メカニズムの研究より考察すると $n=2$ となる。逆に $n=2$ であるPMCよりプロブコールはLDL中で酸化を長く抑えることより $n$ は2より大きいとも言える。プロブコールの $n$ の値の正確な値は未だ不明である。

### 3-6 まとめ

以上のことより、プロブコールはその化学的反応性は $\alpha$ -Tocに比べはるかに小さいが、LDL中では $\alpha$ -Tocよりも強く酸化を抑えることが出来ることがわかった。しかしLDL中でのプロブコールの反応メカニズムは未だ不明で、その解明のためにはプロブコールの正確なn値を求めることを含めた、よりいっそうの研究が必要だと思われる。

### 3-7 参考文献

- 1) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L., N. Engl. J. Med., 320, 915-924, 1989
- 2) Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Strugl, G. and Jurgens, G., Chem. Res. Toxicol. 3, 77-92, 1990
- 3) Henriksen, T., Mahoney, E. M., and Steinberg, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6499-6503, 1981
- 4) Morel, D.W., DiCorletto, P. E., and Chisolm, G. M., Atherosclerosis, 4, 357-364, 1984
- 5) Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S. Witzum, J.L., and Steinberg, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3883-3887, 1984
- 6) Mao, S.J.T., Yates, M.T., Parker, R.A., Chi, E.M. and Jackson, R.L., Arteriosclerosis and Thrombosis, 11, 1266-1275, 1991
- 7) Niki, E., and Kamiya, Y., J. Am. Chem. Soc., 96, 2129-2132, 1974
- 8) Havel, R. J., Eder, H. A., and Bragdon, J. H., J. Clin. Invest. 34, 1345-1353, 1955
- 9) Aruoma, O.I., Evans, P.J., Kaur, H., Sutcliffe, L., and Halliwell, B., Free Rad. Res. Comms., 10, 143-157, 1990
- 10) Barclay, L.R.C., Baskin, K.A., Dakin, K.A., Locke, S.J., Can. J. Chem., 68, 2258-2269, 1990

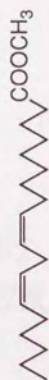
- 11) Pryor, W. A., Strickland, T., and Church, D. F., J. Am. Chem. Soc., 110, 2224-2229, 1988
- 12) Burton, G. W., and Ingold, K. U., J. Am. Chem. Soc., 103, 6472-6477, 1981
- 13) Niki, E., Saito, T., Kawakami, A., and Kamiya, Y., J. Biol. Chem., 259, 4177-4182, 1984



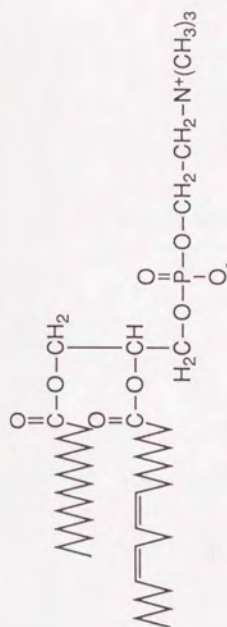
表3-1 LDL酸化実験におけるHPLCの分析条件

| compound      | column                | eluent   | detector    | retention time                   |
|---------------|-----------------------|--|-------------|----------------------------------|
| PC-OOH        | LC-Si 25cm            | MeOH/t-BuOH/40mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>=60/30/10 | UV: 234nm   | 7.5 min                          |
| CE-OOH        | LC-8 5cm + LC-8 25cm  | MeOH/t-BuOH=95/5   | UV: 234nm   | 8.5 min (20:4)<br>9.5 min (18:2) |
| $\alpha$ -Toc | LC-18 5cm + LC-8 25cm | 50mM NaClO <sub>4</sub> in MeOH/t-BuOH<br>=90/10               | ECD: 800mV  | 8.0 min                          |
| Probucol      | LC-18 5cm + LC-8 25cm | 50mM NaClO <sub>4</sub> in MeOH/H <sub>2</sub> O<br>=96/4      | ECD: 1050mV | 7.0 min                          |

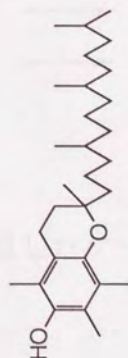
#flow rate=1.0 ml/min



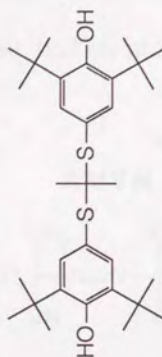
リノール酸メチル



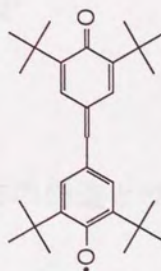
soy PC



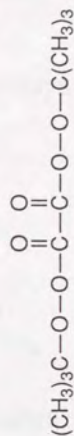
α-Toc



プロブコール



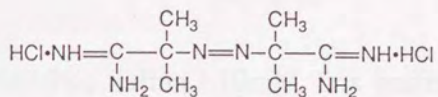
ガルビノキシル



DBPO

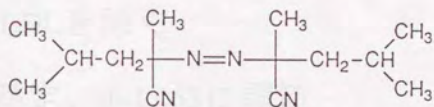
図3-1 実験で使用した試薬の構造と名前

### AAPH



water soluble, half life at 37°C = 7.0 days

### AMVN

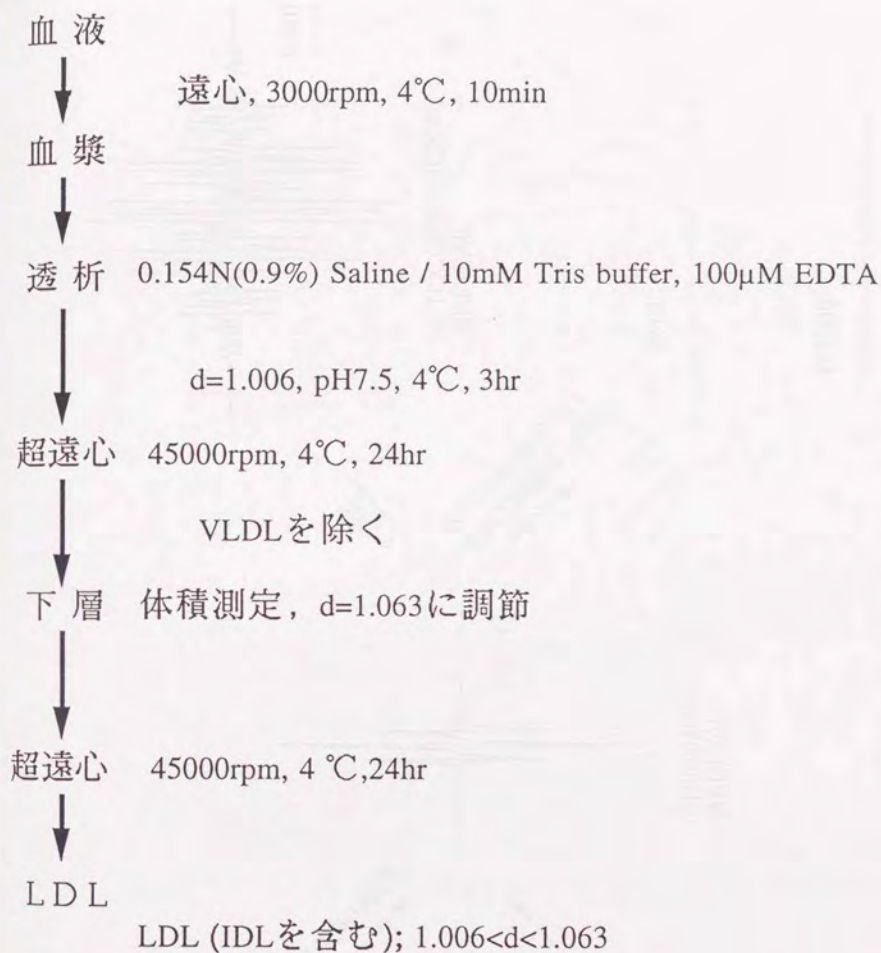


lipid soluble, half life at 37°C = 2.8 days



図3-2 実験で使したアゾ化合物の構造とラジカル生成反応





Havel, R.T., Eder, H. A. and Bragdon, J. H.  
J. Clin. Invest., 34, 1345~1353 (1955)

図3-3 LDLの分取手順

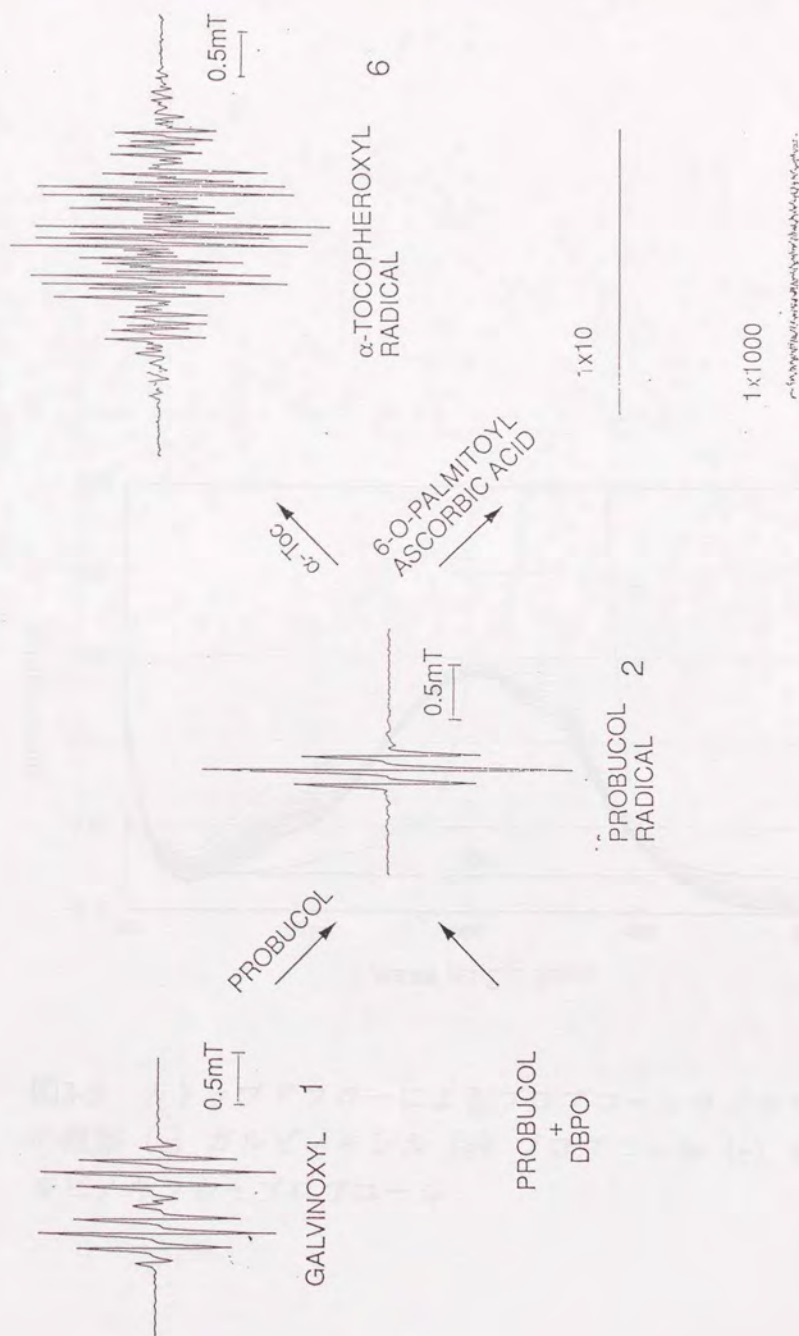


図3-4 プロブコールのESRスペクトル

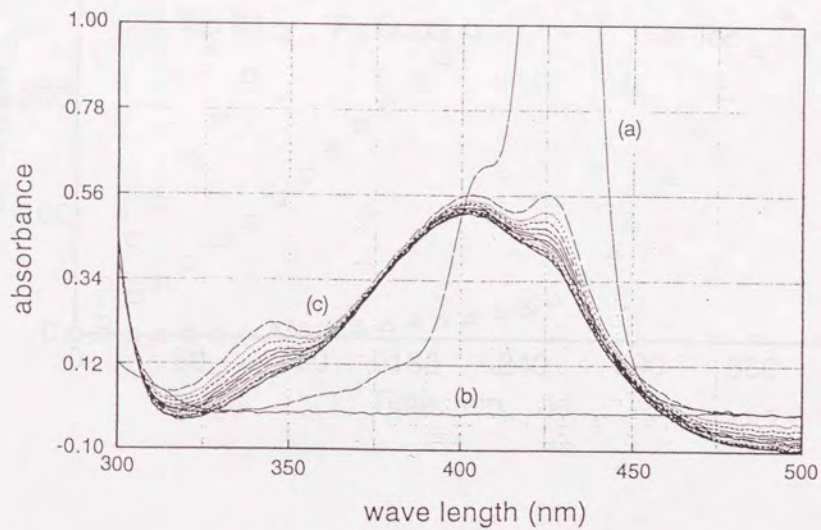


図3-5 ストップフローによるプロブコールラジカルの観察 (a) ガルビノキシル (b) プロブコール (c) ガルビノキシル+プロブコール



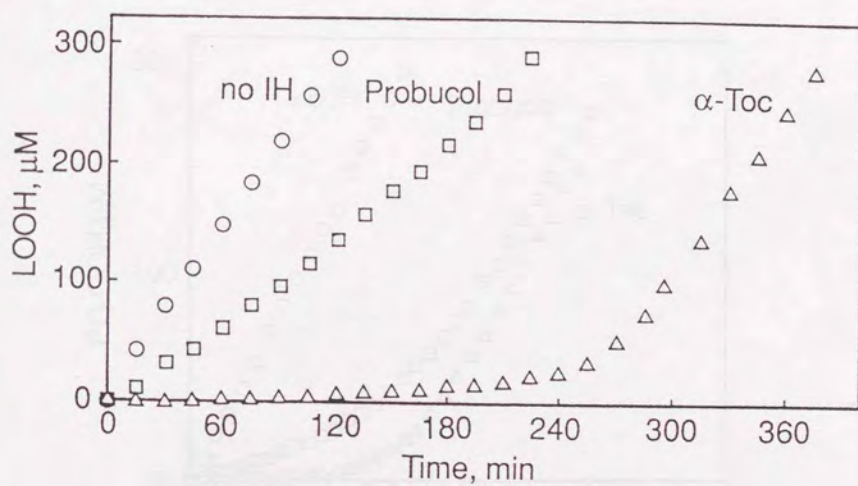


図3-6 ヘキサン均一溶液中のリノール酸メチルの酸化  
に対するプロブコールもしくは $\alpha$ -Tocの影響

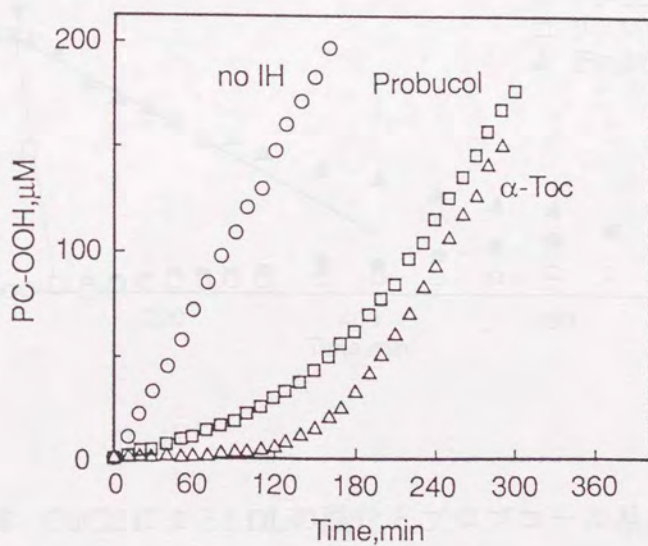


図3-7 ホスファチジルコリンリポソームの酸化に対する  
プロブコールもしくはもしくは $\alpha$ -Tocの影響

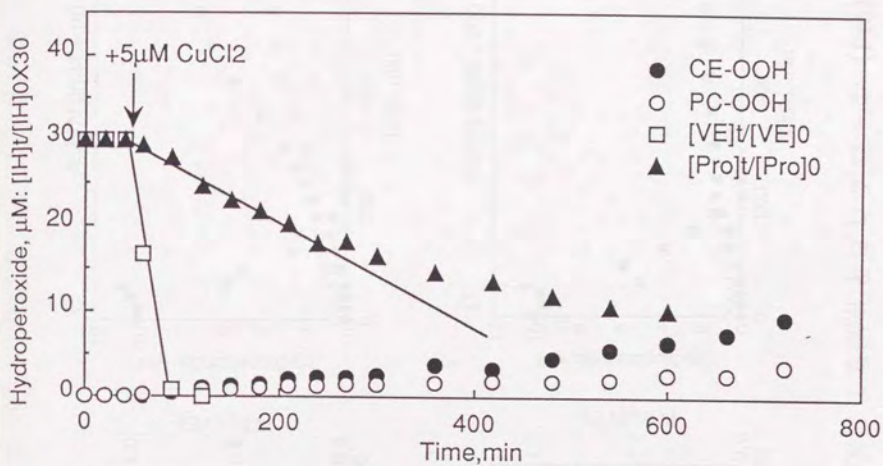


図3-8  $\text{CuCl}_2$ によるLDLの酸化とプロブコール及び内因性 $\alpha$ -Tocによる抑制



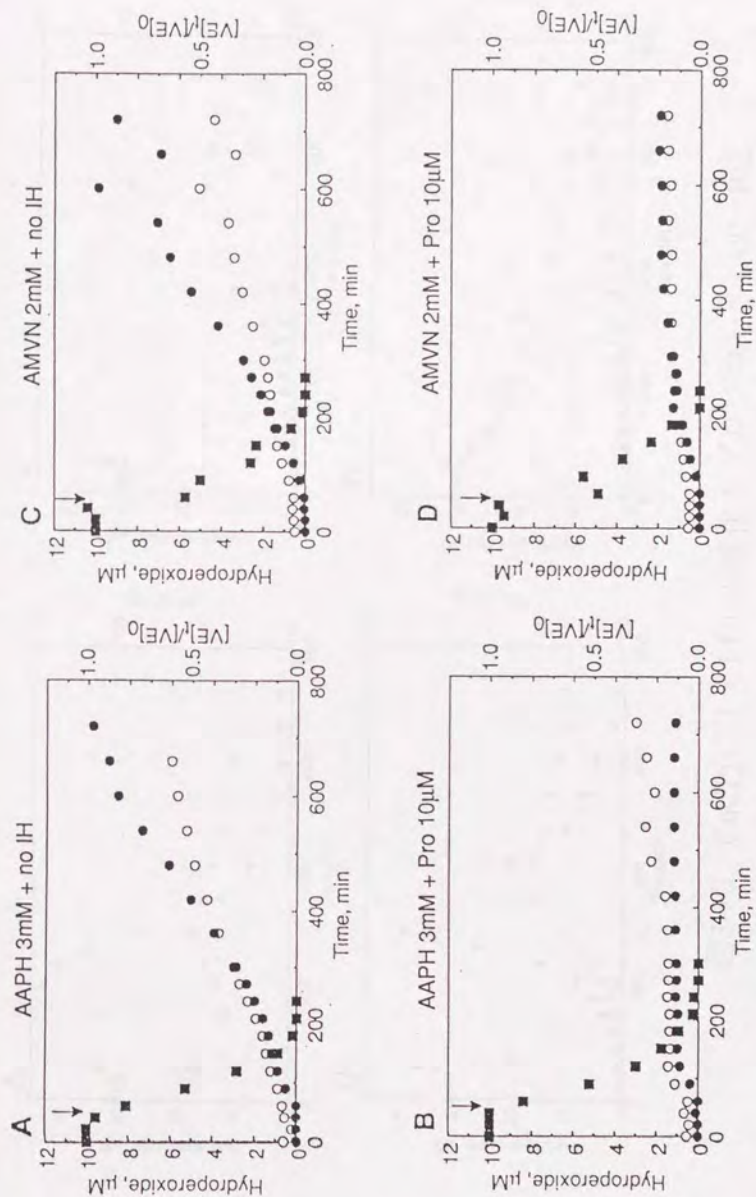


図3-9 LDLのAAPHもしくはAMVNによる酸化とプロブコール (Pro) による抑制  
 ○: PC-OOH, ●: CE-OOH, ■:  $[\text{VE}]_t/[\text{VE}]_0$

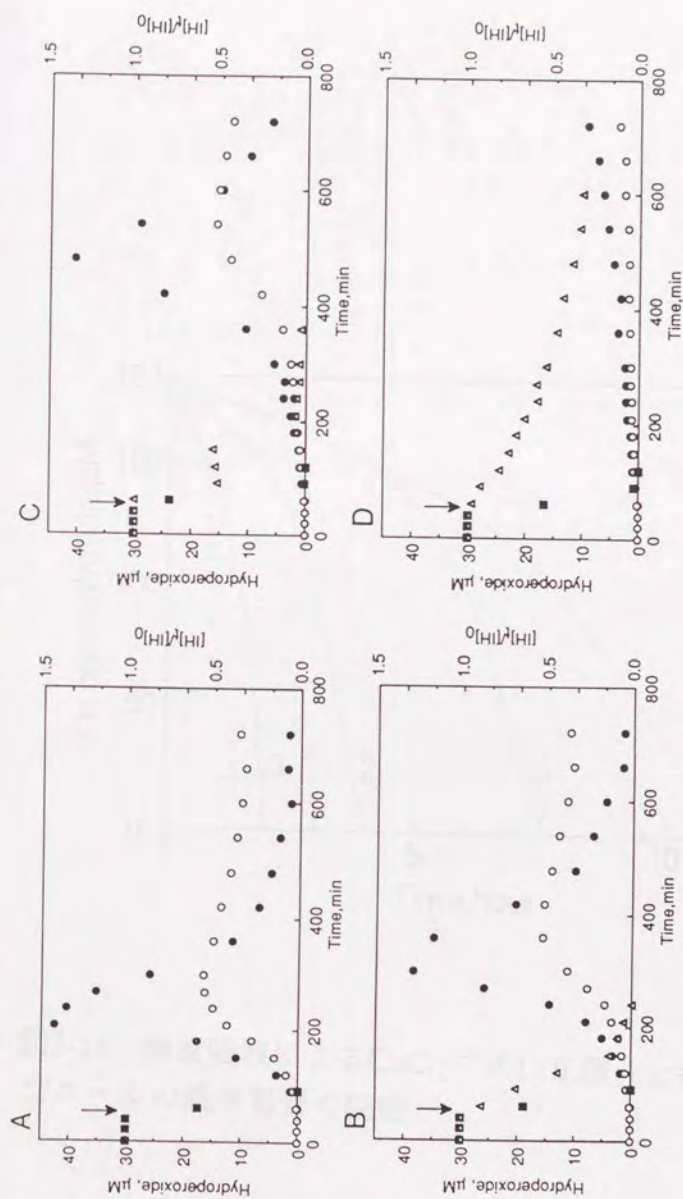


図3-10  $\text{CuCl}_2$ によるLDLの酸化とプロブコール(A:0; B:2; C:5; D:10 $\mu\text{M}$ )によるその抑制

○, PC-OOH; ●, CE-OOH; ■,  $\alpha$ -tocopherol; △, probucol.

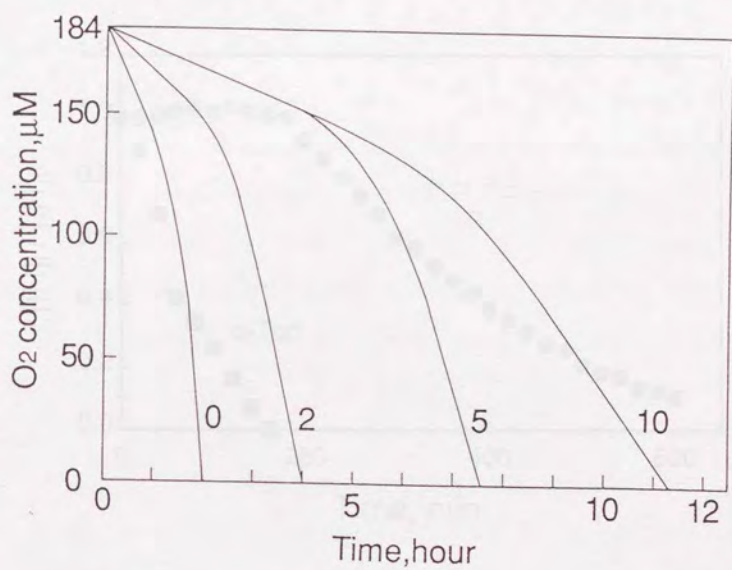


図3-11 酸素吸収によるCuCl<sub>2</sub>でのLDL酸化に対するプロブコールの濃度影響の観察



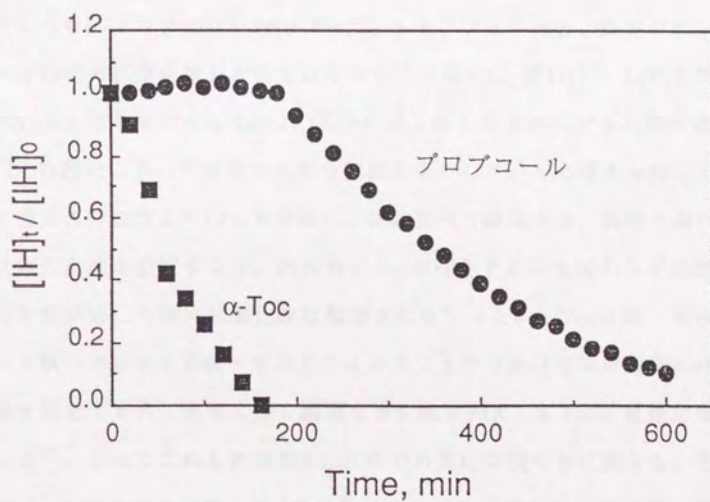


図3-12 ヘキサン中のプロブコール、 $\alpha$ -Toc共存系でのAMVNによる酸化

## 第4章 内因性 $\alpha$ -TocのLDLにおける抗酸化メカニズム

### 4-1 緒言

血管の内皮細胞下に蓄積したLDLの酸化は動脈硬化の初期病変として知られる泡沫細胞形成の原因の一つと考えられている。しかしLDL中には図4-1、表4-1に示したような $\alpha$ -トコフェロール( $\alpha$ -Toc)、 $\gamma$ -トコフェロール、 $\beta$ -カロチン、ユビキノール10等の抗酸化物質が含まれており<sup>1)</sup> (表4-1、図4-1)、LDLを酸化から守っている。その中でも $\alpha$ -TocはLDL中に最も多く含まれている抗酸化物質であり、LDLの酸化において非常に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし実際に健常人の血漿よりLDLを分離し、試験管内で酸化させ、抗酸化剤の減少と過酸化物の生成を観察すると、内因性 $\alpha$ -Tocが存在するにも関わらず急激な過酸化物の生成が起こり強い抗酸化能は観察されなかった。 $\alpha$ -Tocは均一溶液中、リポソーム膜中でリノール酸メチルまたはホスファチジルコリンの酸化に対する抗酸化能を測定すると、非常に強く過酸化物生成を抑え、 $\alpha$ -Toc消費後急激な酸化が起こる<sup>2)</sup>。よってこれらの結果とLDL中での反応は明らかに異なる。そこで本研究では、LDLにおける $\alpha$ -Tocの反応メカニズムを検討し、その低い抗酸化活性について考察した。

### 4-2 試薬

$\alpha$ -Tocの誘導体及びユビキノール1はエーザイより提供していただいた。プロブコールは、第一製薬より提供していただいた。アスコルビルバルミテート及び尿酸は東京化成工業より購入した。親水性及び脂溶性のラジカル開始剤である2,2'-azobis (2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)、2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile) (AMVN)、塩化銅(II)二水和物( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、アス

コルビン酸は、和光純薬から購入した。実験で使用した試薬の構造を図4-2に示す。

### 4-3 実験方法

#### LDLの分離方法

先に示した方法と同様に行なった。(第3章参照)

#### 蛋白濃度測定方法

先に示した方法と同様に行なった。(第3章参照)

#### LDLの酸化方法

先に示した方法と同様に行なった。(第3章参照)

#### LDL中の過酸化物濃度と抗酸化物濃度の測定方法

先に示した方法と同様に行なった。(第3章参照) 分析条件を表4-2に示す。

#### LDL成分の抽出方法

蛋白濃度で2mg/mlのLDL1mlにCHCl<sub>3</sub>/MeOH=2/1溶液を2ml加え、抽出した後、CHCl<sub>3</sub>/MeOH層を1mlのヘキサンに置換することによって行なった。

#### ユビキノンの還元方法

ユビキノール1は、脂溶性化合物であるユビキノンのヘキサン溶液(黄色)2mlに50μlのMeOH、100μM EDTA水溶液2ml、さらに50mgのNaBH<sub>4</sub>を加えてvortex mixerで攪拌することにより還元した。遠心分離後そのヘキサン層(無色)をN<sub>2</sub>下で蒸発させ、EtOHに置換することによって調製した。

#### 低濃度の酸化剤によるLDLの酸化方法

0.25mg/mlのLDLに対し最終濃度で400μM、400μM、0.5μMとなるようにAAPH、AMVN、CuCl<sub>2</sub>を加えて大気下、37℃で酸化を行ない、その時のPC-OOH、CE-OOHの生成及び内因性α-Tocの減少を観察した。



#### 抽出したLDL成分のヘキサン均一溶液中での酸化方法

抽出したLDLの成分を、ヘキサン溶液中で2mMのAMVNを用いて大気下、37℃で酸化を行なった。測定は、PC-OOHの生成及び $\alpha$ -Tocの減少について行なった。

#### 側鎖の長さが異なる $\alpha$ -Tocの誘導体によるLDLの酸化とその抑制

実験は、それぞれの $\alpha$ -Toc誘導体を最終濃度で10 $\mu$ Mになるように0.25mg/ml LDL溶液に加え、3mM AAPH、2mM AMVN、10 $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>を用いて大気下、37℃で酸化を行なった。

#### LDL酸化での過氧化物生成および内因性 $\alpha$ -Tocの減少に対する水溶性抗酸化剤の影響

水溶性抗酸化剤であるアスコルビン酸および尿酸は、最終濃度で50 $\mu$ Mになるように0.25mg/ml LDL溶液に加え、大気下、37℃で酸化を行なった。酸化は、水溶性のラジカル開始剤であるAAPH及び、脂溶性のAMVNを用い、最終濃度でそれぞれ3mM及び2mMとした。

#### アスコルビン酸エステルによるLDL酸化の抑制

脂溶性抗酸化剤であるアスコルビルパルミトイルのEtOH溶液をLDLに最終濃度で10 $\mu$ Mとなるように0.25mg/ml LDL溶液に加え、最終濃度3mM AAPHまたは2mM AMVNを用いて大気下、37℃で酸化した。

#### ユビキノール1によるLDL酸化の抑制

脂溶性抗酸化剤であるユビキノール1を0.25mg/ml LDLに最終濃度で10 $\mu$ Mとなるように加え、最終濃度3mM AAPHまたは2mM AMVNを用いて大気下、37℃で酸化した。

#### プロブコールによるLDL酸化の抑制

脂溶性抗酸化剤であるプロブコールを0.25mg/ml LDLに最終濃度で10 $\mu$ Mとな

るように加え、最終濃度3mM AAPHまたは2mM AMVNを用いて大気下、37℃で酸化した。

#### 4-4 実験結果

##### 低濃度の酸化剤によるLDLの酸化

結果を図4-3に示す。これらの結果よりどの方法で酸化を行なった場合でも、内因性 $\alpha$ -Tocが存在していても確実に過酸化物の生成が起こっていることが分かる。また、過酸化物の生成速度は、反応開始時が一番速く、 $\alpha$ -Tocが消失する付近で一番遅くなりその後再び速くなるという非常に興味あるS次カーブを描いた。

##### 抽出したLDL成分のヘキサン均一溶液中での酸化

結果を図4-4に示す。この場合LDL中での酸化と異なり $\alpha$ -Tocの減少が終わった後、過酸化物の生成が観察された。

##### 側鎖の長さが異なる $\alpha$ -Tocの誘導体によるLDLの酸化とその抑制

結果を図4-5、図4-6、図4-7に示す。またそれぞれの酸化反応開始時点での過酸化物の生成速度を表4-3に示す。 $\alpha$ -Toc誘導体の側鎖の長さが短くなるほど反応初期において過酸化物の生成速度が遅いことが分かる。E0を加えてAAPHで酸化したときは、過酸化物だけでなく内因性 $\alpha$ -Tocの減少も抑えられた。

##### LDL酸化での過酸化物生成および内因性 $\alpha$ -Tocの減少に対する水溶性抗酸化剤の影響

AAPHによる酸化結果を図4-8に、AMVNによる酸化結果を図4-9に示す。結果は、アスコルビン酸は、内因性 $\alpha$ -Tocおよび過酸化物の生成を抑え明確な誘導期を示した。しかも、過酸化物生成が全く起こらなかった。逆に、尿酸は、どちらの場合でも過酸化物生成は抑えなかった。

##### アスコルビン酸エステルによるLDL酸化の抑制

結果を図4-10に示す。どちらの酸化方法を用いても反応の初期において、内因性 $\alpha$ -Tocの減少及び過酸化物の生成を抑えた。

#### ユビキノール1によるLDL酸化の抑制

結果を図4-11に示す。どちらの酸化方法を用いても反応の初期において、内因性 $\alpha$ -Tocの減少及び過酸化物の生成を抑えた。

#### プロブコールによるLDL酸化の抑制

結果を図4-12に示す。どちらの酸化方法を用いても反応の初期において、内因性 $\alpha$ -Tocの減少及び過酸化物の生成を起こした。しかしこの過酸化物生成は $\alpha$ -Tocが消費されると止まった。

### 4-5 考察

図4-3より内因性 $\alpha$ -Tocが存在する間も確実にPC-OOH及びCE-OOHの生成が起こっていることが分かる<sup>3)</sup>。しかし通常 $\alpha$ -Tocは非常に強力な抗酸化物質であることが知られており<sup>4)</sup>、均一溶液中でリノール酸メチルの酸化に対する抗酸化能や、リボソーム膜中でホスファチジルコリン(PC)の酸化に対する抗酸化能を観察すると、 $\alpha$ -Tocが減少するまで速い酸化は観察されず、 $\alpha$ -Toc消費後酸化が始まるという現象を示す。しかしLDLの酸化においては反応開始時で酸化速度が速くその後遅くなり、 $\alpha$ -Toc消費後再び速くなるという興味あるS字カーブを描いて反応は進行した。よって、LDL中の結果は明らかに均一溶液中やリボソーム膜中のものと異なっていることが分かる。ところがLDLの成分をヘキサン均一溶液中(図4-4)で酸化すると、LDL中とは異なりホスファチジルコリンハイドロパーオキシド(PC-OOH)の生成は、 $\alpha$ -Tocが減少するまで起こらず、明確な誘導期を示して酸化は進行した。これは通常リノール酸メチルを用いた均一溶液中での酸化で観察されるのと全く同じ現象である。このことより $\alpha$ -Tocの抗酸化



能は、LDLという反応場に大きく影響されることがわかる。そこで、何が $\alpha$ -Tocのこのような抗酸化能の違いを生むかについて考察した。方法としては側鎖の長さの異なる $\alpha$ -TocをLDLに加えそのLDL中での抗酸化能を比較するという方法を使った。表4-3に示す様に、側鎖の長さが短くなるほど反応の初期において過酸化物生成を抑えた。しかもE0は均一溶液中の $\alpha$ -TocのようにLDL中でPC-OOH及びCE-OOHの生成をほぼ完璧に抑えた。これらの結果より、クロマン環自体の抗酸化能はLDL中でも十分高いこと、また側鎖の長さが長くするに従い、過酸化物生成速度が速くなる（抗酸化能が落ちる）ことから、LDL中での $\alpha$ -Tocの低い抗酸化能は、 $\alpha$ -Tocの長いフィチル側鎖に影響されていることが分かった。通常側鎖の長さが長くなるにつれ化合物のmobilityが落ちることが知られている<sup>2)</sup>。よって、LDL内でphytyl側鎖が $\alpha$ -Tocのmobilityを下げ、その結果抗酸化能が下がると考えられる。

次に、アスコルビン酸をLDL溶液に加えAMVNで酸化を行なった結果、過酸化物生成を完璧に抑えるという興味ある結果が得られた。アスコルビン酸は水溶性の抗酸化物質であるためLDL中には組み込まれず脂溶性のAMVNとは直接反応は出来ない。しかも内因性 $\alpha$ -Tocは図xよりLDLの内部からの酸化で過酸化物生成は抑えられないことが明らかである。それにもかかわらずアスコルビン酸がLDLの内部からの酸化で過酸化物生成を抑えるのは非常に不思議な現象である。そこで、一つの仮説を立ててこの現象を考察した。仮説を図4-13に示す。アスコルビン酸を加えたLDLで $\alpha$ -Tocがラジカルが生じると、その後4種類のルートでこのラジカルは消去されると考えられる。

- (a) 脂質のペルオキシラジカルと $\alpha$ -Tocラジカルとのカップリング反応
- (b) アスコルビン酸などの還元剤による $\alpha$ -Tocラジカルの還元反応
- (c)  $\alpha$ -Tocラジカル同志のカップリング反応

(d)  $\alpha$ -Tocラジカルによる脂質の水素引き抜き反応と、それによって起こる酸化反応

$\alpha$ -Tocは均一溶液中での酸化において、(a)のルートで $\alpha$ -Tocラジカルを安定化させる。しかし $\alpha$ -Tocの側鎖の長さの異なる誘導体をLDLに加えた酸化実験結果より、LDL中では $\alpha$ -Tocの動きはかなり制限されていることが判明している。しかも反応の初期においては、ほとんどのラジカルは $\alpha$ -Toc上に乗っていると予想され、ペルオキシラジカル数が $\alpha$ -Tocラジカル数に比べて少ないと考えられる。よって反応酸化反応初期のLDL中でこの反応は起こりにくい。(c)の反応は $\alpha$ -Tocラジカル同志のカップリング反応である。しかしこの反応もLDL中で $\alpha$ -Tocの動きが制限されていることや、LDL中での $\alpha$ -Tocラジカル濃度を考えると、起こりにくい反応である。 $\alpha$ -Tocは本来抗酸化物質であるため、脂質のラジカル連鎖反応の媒体とはなりえないと考えられるが、高濃度の $\alpha$ -Tocを均一溶液に加えた場合などの特殊な条件下では低濃度の $\alpha$ -Tocを加えた場合より酸化を促進することが知られている。これは、(d)のルートの $\alpha$ -Tocラジカルによる脂質からの水素引き抜き反応が起こるためである<sup>5)</sup>。この反応は $\alpha$ -Tocのプロオキシダント効果と呼ばれているが、 $k$ の値は $10^{-2}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ とあまり大きくない。しかし $\alpha$ -TocラジカルはLDL中で非常に動きにくいこと、また反応初期において脂質のbisアリル位水素濃度がペルオキシラジカルや $\alpha$ -Tocラジカル濃度に比べかなり高いことを考慮すると、この反応はLDL中では十分に起こる反応だと考えられる。当研究室の佐藤らは<sup>6)</sup>、LDLのAMVN酸化においてアスコルビン酸は内因性 $\alpha$ -Tocの減少を抑えたため、 $\alpha$ -Tocと相互作用を持つが、尿酸は抑えなかったことより相互作用を持たないことを報告している(図4-14)。このことよりアスコルビン酸存在下では $\alpha$ -Tocラジカルは(b)の反応で消去されることが分かる。これは(d)が起こりにくくなることを意味し、過酸化物生成が起こらなくなる。



逆に尿酸は過氧化物生成も $\alpha$ -Tocの減少も抑えなかったが、これは、この系においては $\alpha$ -Tocラジカルの還元が起こらず、そのため(d)の反応が起こるためと考えられる。よってこのように $\alpha$ -Tocラジカルの水素引き抜き反応を考慮することにより、水溶性抗酸化物質による不思議な現象を説明することはできた。よって次にこの還元反応によって本当に過氧化物生成が抑えられたのかを確認するために、アスコルビン酸以外の抗酸化剤で $\alpha$ -Tocラジカルの還元能を持つことが知られているアスコルビルバルミトイル<sup>7)</sup>またはユビキノール1<sup>8)</sup>をLDLに加えて同様実験を行なった。またLDL中では $\alpha$ -Tocと相互作用を持たない(持った場合でも $\alpha$ -Tocラジカルを生成する)プロブコールも同様にLDLに加え、内因性 $\alpha$ -Toc存在下での過氧化物の生成を観察した。結果を図4-10、図4-11、図4-12に示す。アスコルビルバルミテートやユビキノール1を加えた場合、アスコルビン酸を加えたときと同様内因性 $\alpha$ -Tocの減少及び過氧化物の生成を抑えた。逆にプロブコールを加えた場合内因性 $\alpha$ -Tocの減少が完了するまで過氧化物の生成が起こり、無くなった後に過氧化物の生成が止まった。この現象は、酸化反応初期の過氧化物生成は、 $\alpha$ -Tocラジカルによる脂質からの水素引き抜きによって起こることを示している<sup>9) 10)</sup>。また、プロブコールを加えた系で $\alpha$ -Toc消失後過氧化物生成が止まったことより、プロブコール単独のLDL中の抗酸化能は非常に高いことが分かる。

これらの結果は、LDLの酸化の反応の初期においては、 $\alpha$ -Tocラジカルによる脂質からの水素引き抜きが酸化の重要なステップであることを意味している。さらにこの仮説にしたがってLDLの酸化反応を考察すると、LDLを弱く酸化したときに観察される過氧化物生成のS字カーブ(図4-3)が発生する理由についても理解できる。LDLを酸化するとまずかなり速い速度の過氧化物生成が起こる。これは、 $\alpha$ -Tocラジカルが仮説における(d)のルートで反応が進むためと考えられる。



しかし反応が進んでいくと内因性 $\alpha$ -Tocの減少が起こるにつれ、過酸化物の生成速度は小さくなっていくことが分かる。これは反応時間の経過にしたがいLDL中のラジカル濃度が高まり反応が、(d)のルートから(a)のルートに片寄っていったためと考えられる。このような反応が起こりはじめると $\alpha$ -Tocラジカルによる脂質からの水素引き抜き反応が起こりにくくなり、過酸化物の生成反応は起こらなくなる。実際内因性の $\alpha$ -Tocの減少も同時に観察されていることより、(a)のルートの反応は間違いなく起こっていると思われる。内因性 $\alpha$ -TocがLDL中で消費されるとこのような反応は起こらなくなり、ラジカル連鎖反応によって酸化は進行し、再び過酸化物の生成速度は速くなると考えられる。その結果、図4-3に示されているようなS字カーブを示したと思われる。

#### 4-6 まとめ

LDL中に存在する内因性の $\alpha$ -Tocの抗酸化活性は高くなくこれは $\alpha$ -Tocの持つphytyl側鎖によりLDL中での動きが制限された結果である。このような状態では $\alpha$ -Tocラジカルは水素引き抜き反応を起こしラジカルを消去出来ない。LDLではこの反応が起きやすいために $\alpha$ -Tocの抗酸化活性が低いことが分かった。

#### 4-7 参考文献

- 1) Esterbauer, H., Dieber-Raother, M., Waeg, G., Striegl, G. and Jurgens, G., Chem. Res. Toxicol., 2, 77-92, 1990
- 2) For example: Niki, E., Yamamoto, Y. and Kamiya, Y., Life Chemistry Reports., 3, 35-40, 1985
- 3) Stocker, R., Bowry V.W. and Frei, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1646-1650, 1991
- 4) Burton, G.W. and Ingold, K.U., Acc. Chem. Rev., 19, 194-201, 1986

- 5) Takahashi, M., Yoshikawa, Y. and Niki, E., Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 1885-1890, 1989
- 6) Sato, K., Niki, E. and Shimasaki, H., Arch. Biochem. Biophys., 279, 405-409, 1990
- 7) Mukai, K., Nishimura, M., Nagano, A., Tanaka, K. and Niki, E., Biochem. Biophys. Acta., 993, 168-173, 1989
- 8) Yamamoto, Y., Komuro, E. and Niki, E., J. Nutr. Sci. Vitaminol., 36, 505-511, 1990
- 9) Bowry, V.W., Ingold, K.U. and Stocker, R., Biochem. J., 288, 341-344, 1992
- 10) Ingold, K.U., Bowry, V.W., Stocker, R. and Walling, C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 45-49, 1993

表4-1 LDL 1分子あたりに含まれている主たるLDL構成分子及び抗酸化物質の数 (approximate molecules/ LDL particle)

---

|                   |      |
|-------------------|------|
| フォスファチジルコリン       | 700  |
| コレステロール           | 600  |
| コレステロールエステル       | 1600 |
| トリグリセリド           | 100  |
| アポB-100           | 1    |
| $\alpha$ -トコフェロール | 6    |
| $\gamma$ -トコフェロール | 0.5  |
| $\beta$ -カロチン     | 0.3  |
| ユビキノール10          | 0.3  |

---



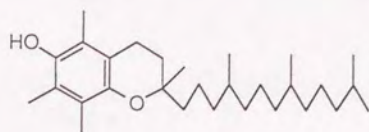
表4-2 LDLの酸化実験におけるHPLCの分析条件

| compound          | column                | eluent   | detector    | retention time                   |
|-------------------|-----------------------|--|-------------|----------------------------------|
| PC-OOH            | LC-Si 25cm            | MeOH/t-BuOH/40mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>=60/30/10 | UV: 234nm   | 7.5 min                          |
| CE-OOH            | LC-8 5cm + LC-8 25cm  | MeOH/t-BuOH=95/5   | UV: 234nm   | 8.5 min (20:4)<br>9.5 min (18:2) |
| $\alpha$ -Toc(E3) | LC-18 5cm + LC-8 25cm | 50mM NaClO <sub>4</sub> in MeOH/t-BuOH<br>=90/10               | ECD: 800mV  | 8.0 min                          |
| PMC(E0)           | LC-18 5cm + LC-8 25cm | 50mM NaClO <sub>4</sub> in MeOH/H <sub>2</sub> O<br>=94/6      | ECD: 800mV  | 5.6 min                          |
| E1                | LC-18 5cm + LC-8 25cm | 50mM NaClO <sub>4</sub> in MeOH/H <sub>2</sub> O<br>=96/4      | ECD: 800mV  | 5.6 min                          |
| E2                | LC-18 5cm + LC-8 25cm | 50mM NaClO <sub>4</sub> in MeOH/H <sub>2</sub> O<br>=96/4      | ECD: 800mV  | 11.0 min                         |
| Probucol          | LC-18 5cm + LC-8 25cm | 50mM NaClO <sub>4</sub> in MeOH/H <sub>2</sub> O<br>=96/4      | ECD: 1050mV | 7.0 min                          |

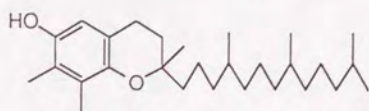
#flow rate=1.0 ml/min

表4-3 LDLの酸化における側鎖の長さが異なる $\alpha$ -Toc誘導体 (E3) の抗酸化効果 ( $10^{-10}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )

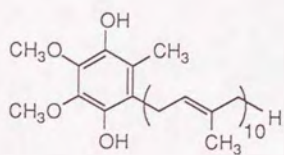
|      | AAPH   |        | AMVN   |        | CuCl <sub>2</sub> |        |
|------|--------|--------|--------|--------|-------------------|--------|
|      | PC-OOH | CE-OOH | PC-OOH | CE-OOH | PC-OOH            | CE-OOH |
| none | 4.0    | 5.5    | 1.8    | 5.6    | 3.1               | 9.6    |
| E2   | 1.5    | 3.8    | 3.9    | 5.9    | 0.36              | 1.5    |
| E1   | 0.77   | 2.7    | 0.60   | 2.8    | 0.17              | 1.5    |
| E0   | 0      | 0      | 0.67   | 3.0    | 0                 | 0      |



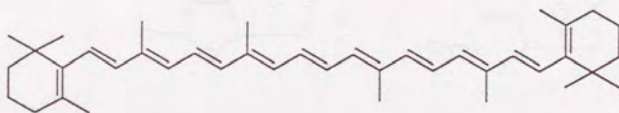
$\alpha$ -tocopherol



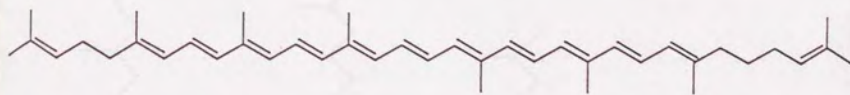
$\gamma$ -tocopherol



ubiquinol-10



$\beta$ -carotene



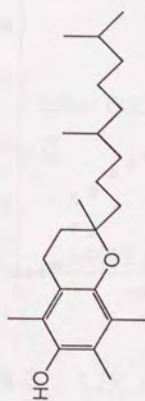
lycopene

図4-1 LDL中に含まれる抗酸化物の構造

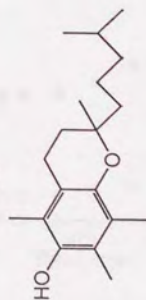




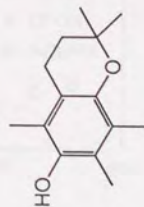
α-Toc (E3)



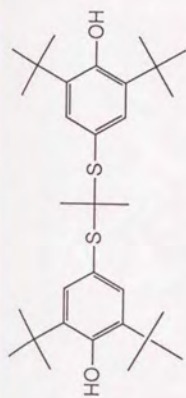
E2



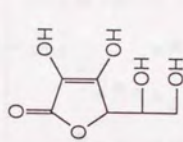
E1



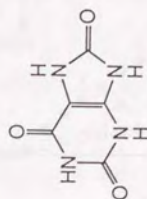
PMC(E0)



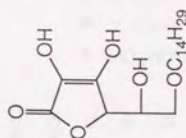
プロブコール



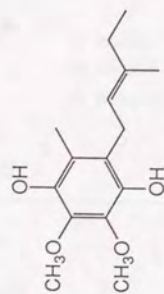
アスコルビン酸



尿酸



アスコルビルバルミテート



ユビキノール1

図4-2 実験で使用した抗酸化物質の構造と名前

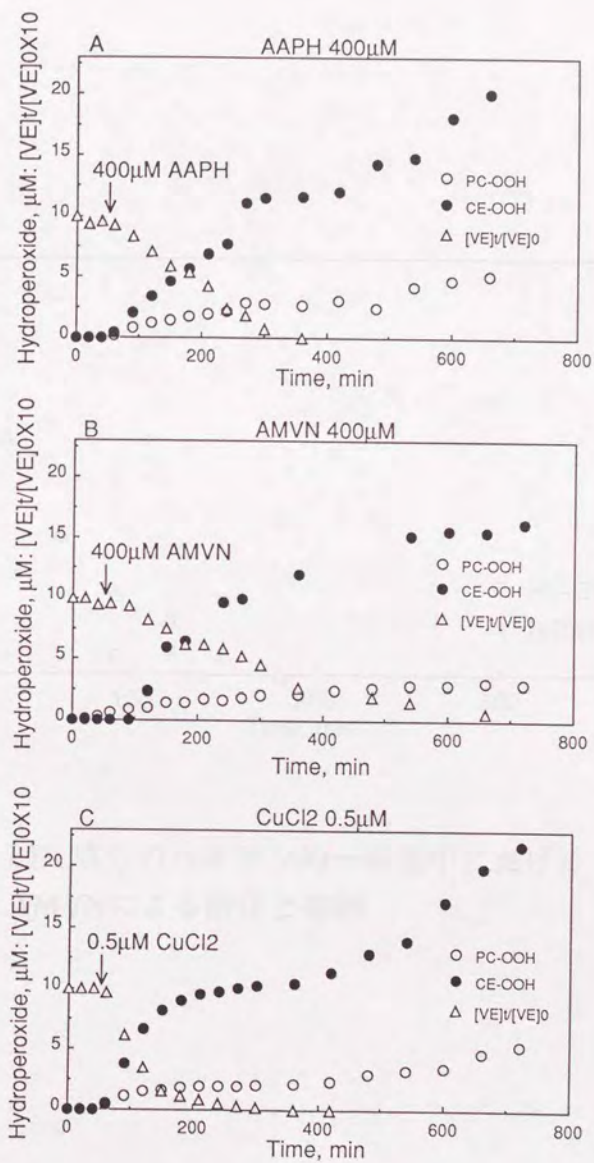


図4-3 LDLの低濃度酸化剤による酸化

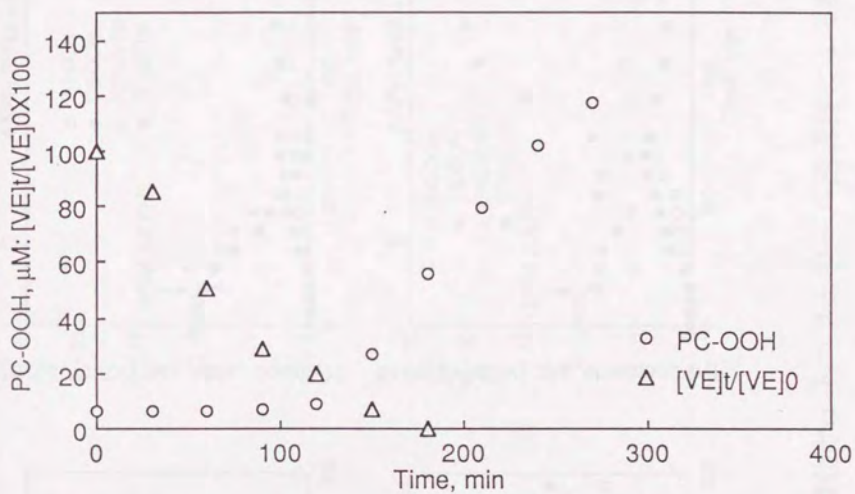


図4-4 LDL成分のヘキサン均一溶液中における  
AMVNによる酸化と抑制



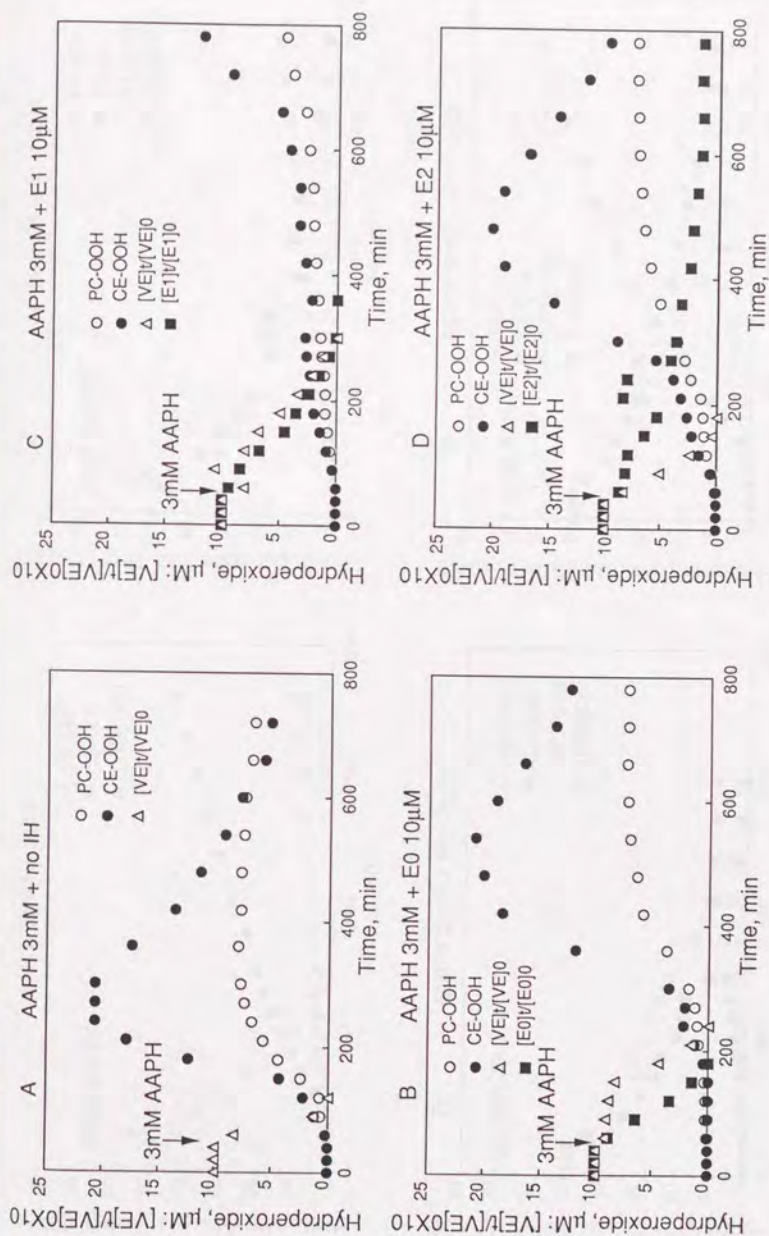


図4-5 LDLのAAPHによる酸化と $\alpha$ -トコフェロール誘導体による抑制

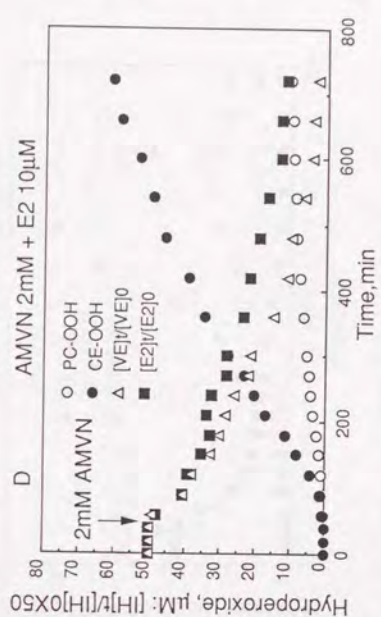
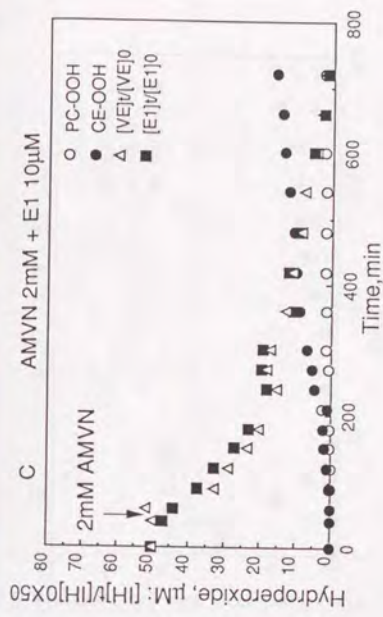
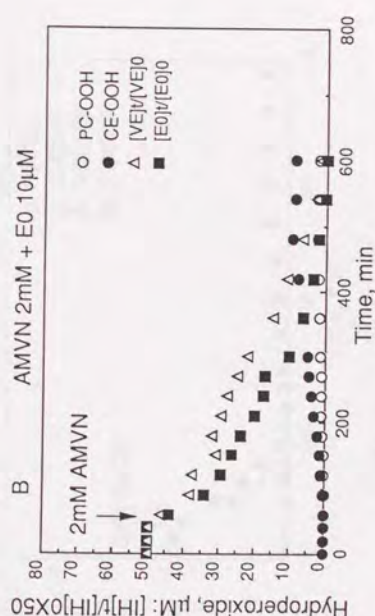
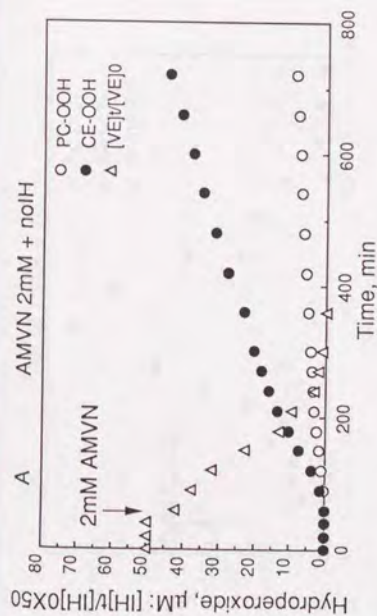


図4-6 LDLのAMVNによる酸化と $\alpha$ -トコフェロール誘導体による抑制

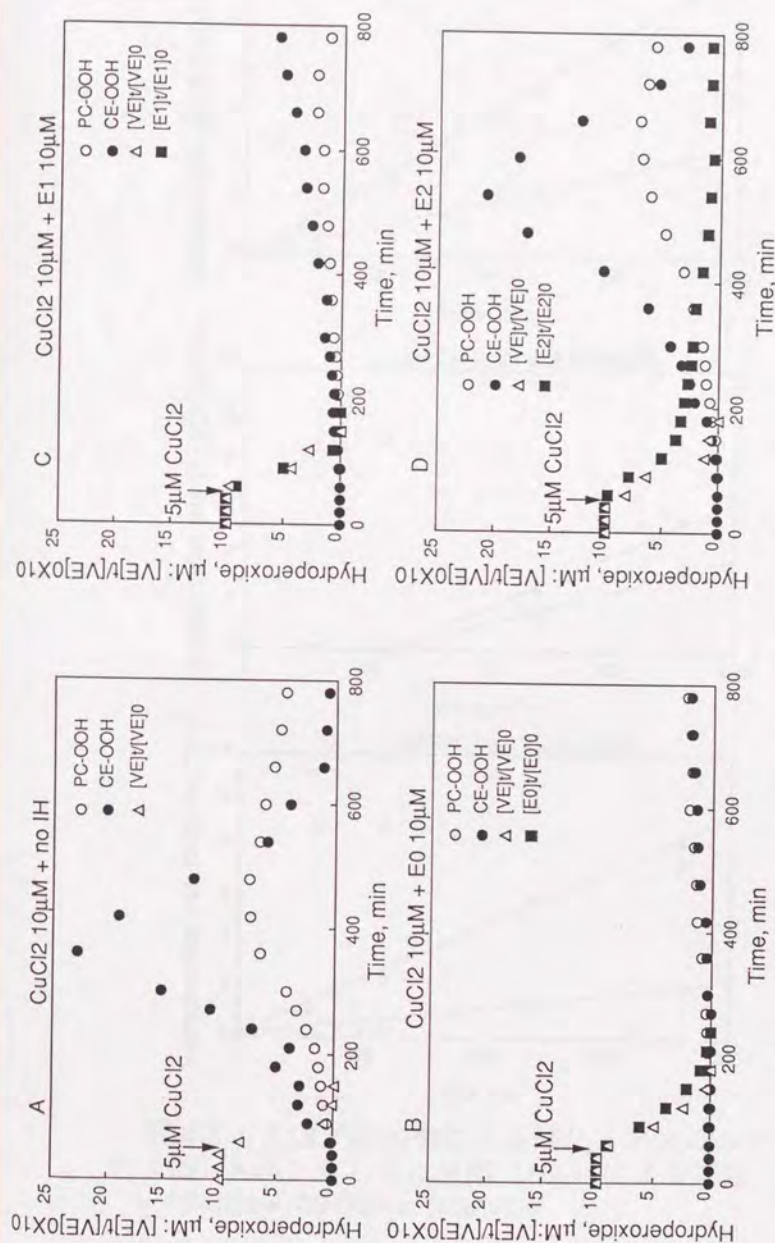


図4-7 LDLのCuCl<sub>2</sub>による酸化とα-トコフェロール誘導体による抑制



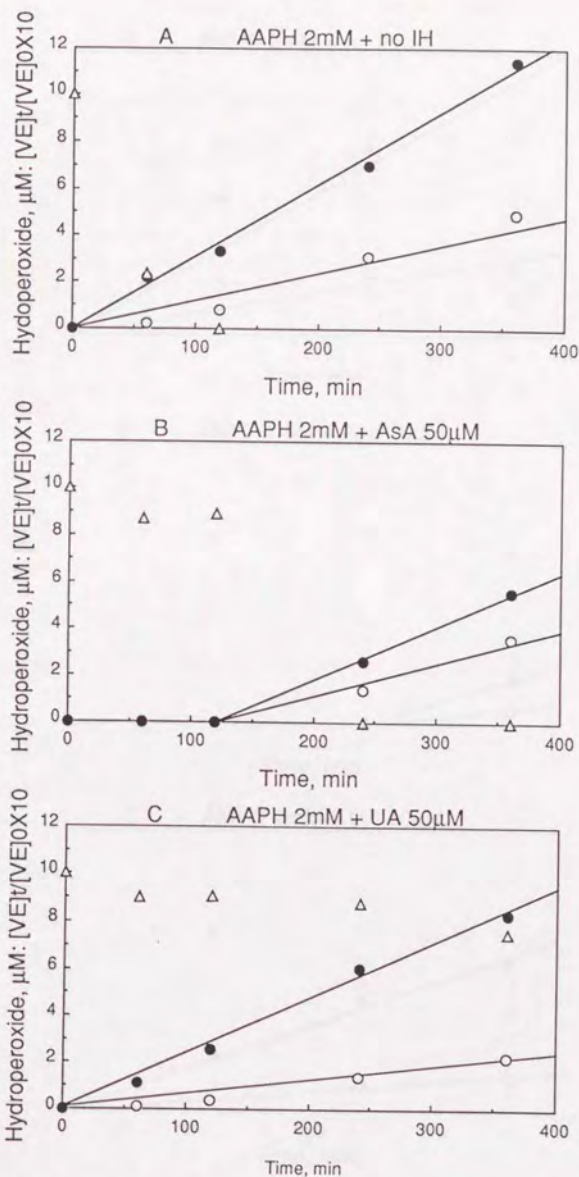


図4-8 LDLのAAPHによる酸化とアスコルビン酸 (AsA) もしくは尿酸 (UA) による抑制  
 ○: PC-OOH, ●: CE-OOH, △: [VE]<sub>t</sub>/[VE]<sub>0</sub>

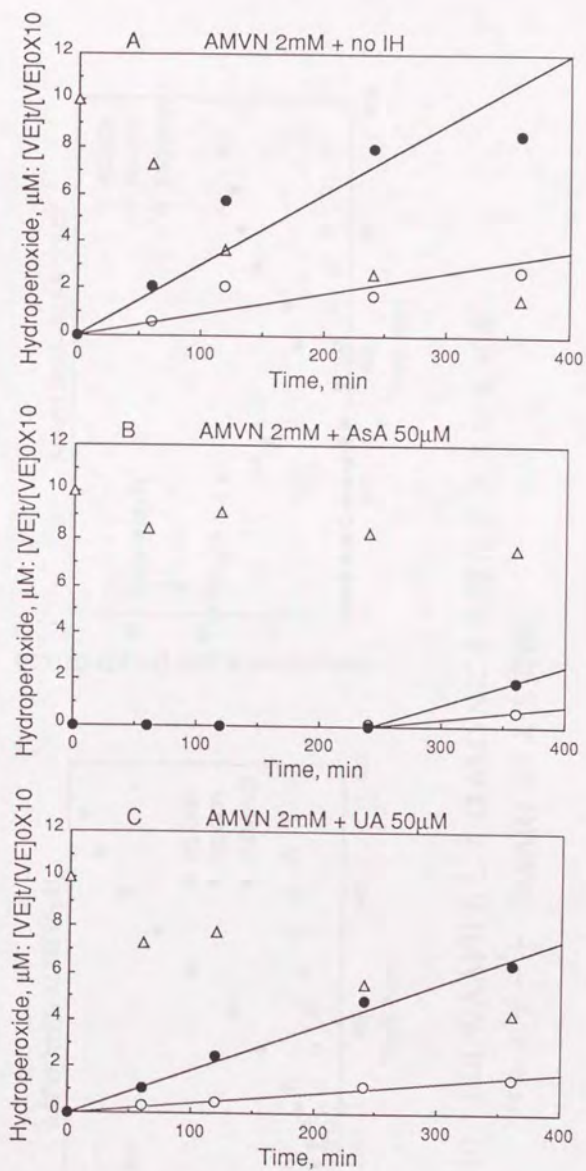


図4-9 LDLのAMVNによる酸化とアスコルビン酸 (AsA) もしくは尿酸 (UA) による抑制  
○: PC-OOH, ●: CE-OOH, Δ: [VE]t/[VE]0

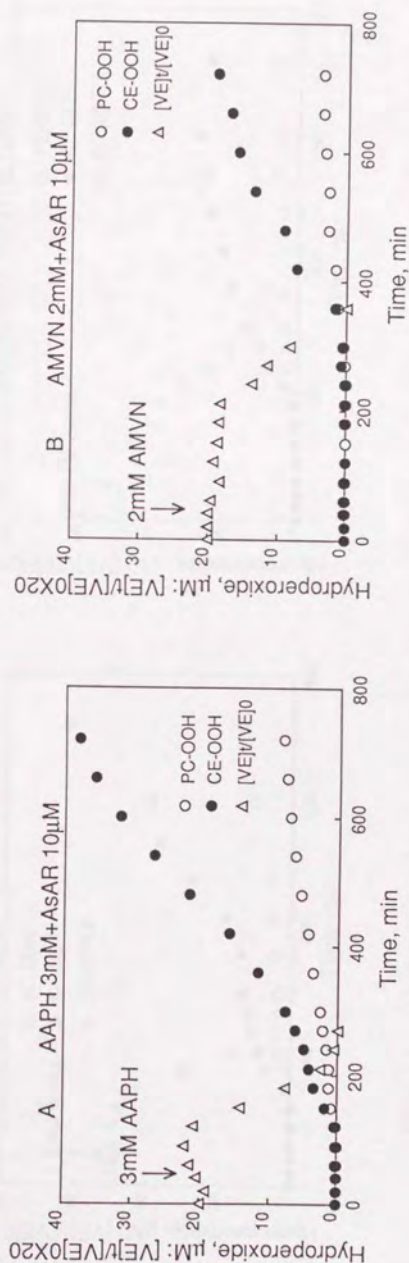


図4-10 LDLのAAPHもしくはAMVNによる酸化とアスコルビル  
パルミテート (AsAR) による抑制



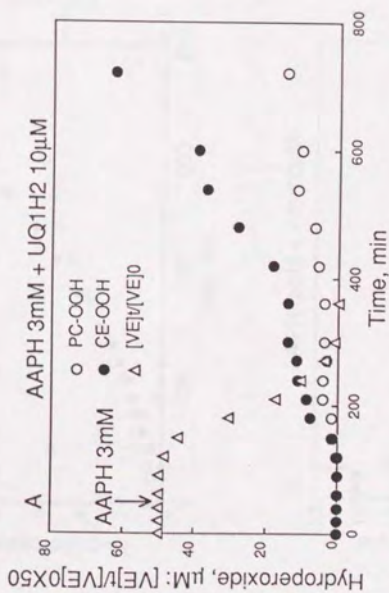
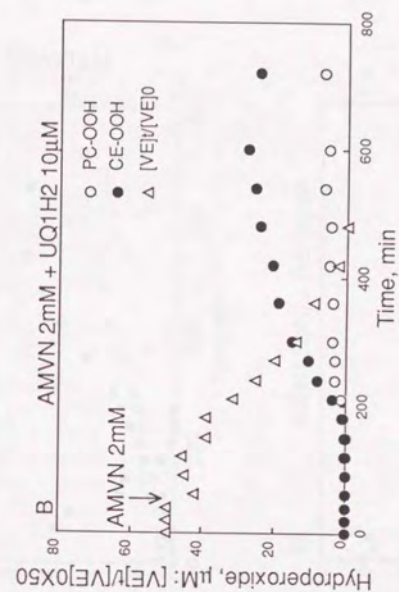


図4-11 LDLのAAPHもしくはAMVNによる酸化とユビキノール1による抑制

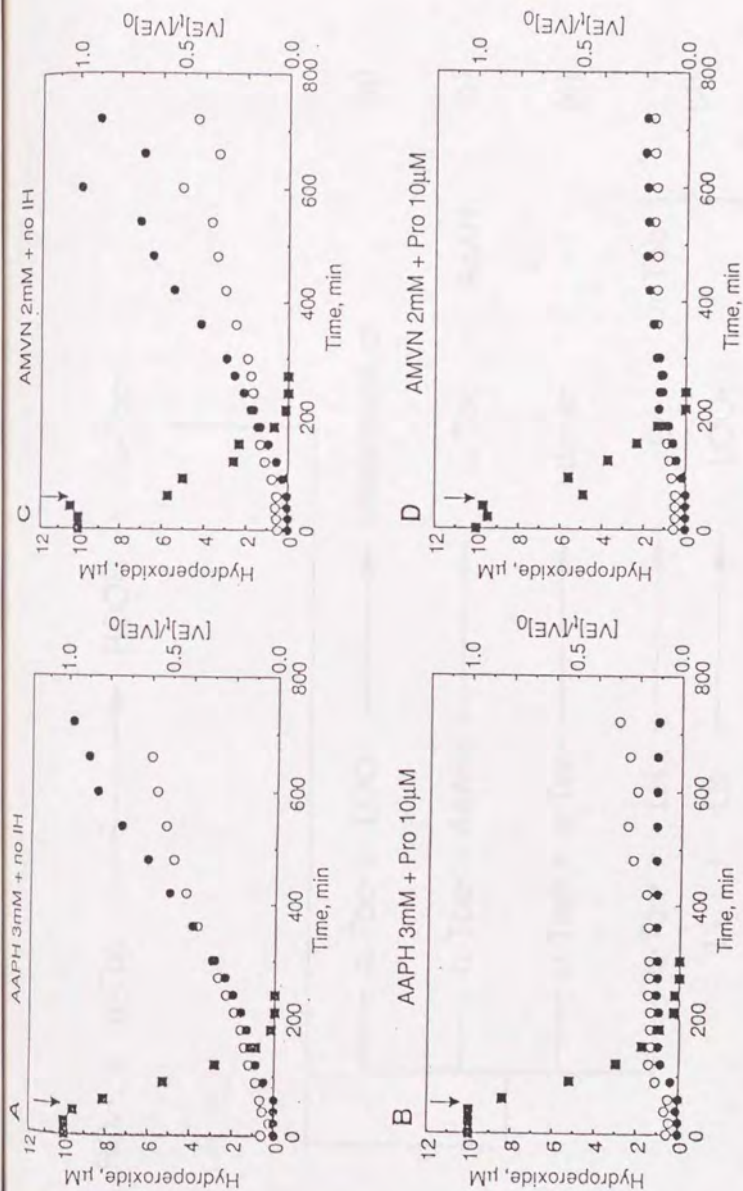
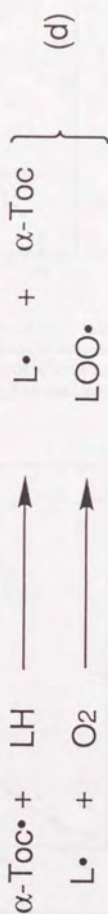
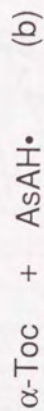
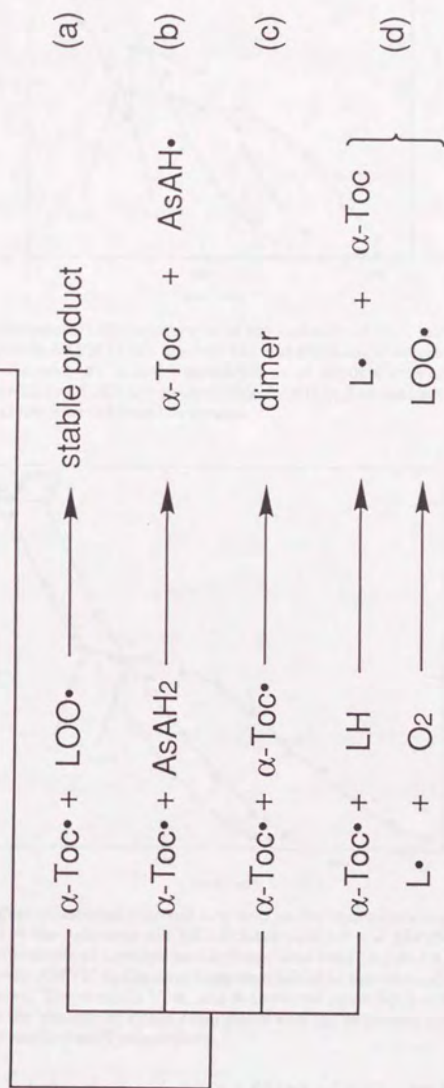
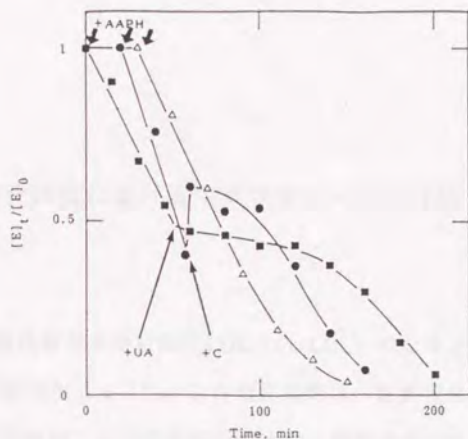


図4-12 LDLのAAPHもしくはAMVNによる酸化とプロブコール (Pro) による抑制  
 ○: PC-OOH, ●: CE-OOH, ■:  $[\text{VE}]_t/[\text{VE}]_0$

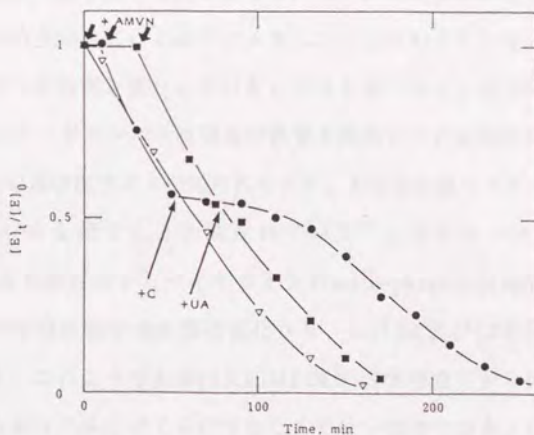


※4-13  $\alpha$ -トコフェロールラジカルの予想される反応スキーム





Consumption of  $\alpha$ -tocopherol in the oxidation of LDL initiated with 4.5 mM AAPH in the absence ( $\Delta$ ) and presence of ascorbic acid ( $\bullet$ ) or uric acid ( $\blacksquare$ ). Initial concentrations of ascorbic acid and uric acid were 13.1 and 18.1  $\mu$ M, respectively. AAPH and antioxidants were added at the time indicated by arrows.



Effect of ascorbic acid and uric acid on the consumption of  $\alpha$ -tocopherol in the oxidation of LDL initiated with 1.9 mM AMVN. Initial concentrations of ascorbic acid and uric acid were 13.2 and 9.0  $\mu$ M, respectively. AMVN and antioxidants were added at the time indicated by arrows. The symbols  $\nabla$ ,  $\bullet$ , and  $\blacksquare$  show the consumption of vitamin E in the absence of added antioxidant and in the presence of ascorbic acid and uric acid, respectively.

図4-14 LDLをAAPH (上) もしくはAMVN (下) で酸化した際の内因性 $\alpha$ -トコフェロールの減少に対する水溶性抗酸化剤アスコルビン酸 (C) もしくは尿酸 (UA) の影響

## 第5章 動脈硬化病変におけるマクロファージの役割

### 5-1 緒言

LDLは内皮下で酸化修飾を受け酸化LDL (ox-LDL) になるとマクロファージに取り込まれ泡沫細胞を生じる<sup>1) 2)</sup>。この泡沫細胞は、動脈硬化の初期病変として知られており、この後起こる平滑筋細胞の増殖、内皮細胞の破壊、血小板の凝固等の動脈硬化巣形成へのトリガーになっていると考えられている。ではなぜox-LDLをマクロファージが取り込むのか。一つの考え方として内皮下に落ち込んだLDLを能動的に取り除く役割を担っているという考え方がある。内皮細胞間隙はこれらを内皮細胞外にくみだすメカニズムは備わっていない。そのためマクロファージがこの役割を果たしているという考え方である。泡沫細胞はそれ自身でapoEを生成し<sup>3)</sup> リポタンパク様構造の物質を構成して内皮細胞間隙からコレステロールや脂質を運び出すことが知られている。また高比重リポタンパク (HDL) にコレステロールを渡すことも知られている<sup>4)</sup>。さらにマクロファージがox-LDLを取り込む際放出するサイトカインのmacrophage-derived growth factor (MDGF) は平滑筋細胞を合成型に変化させ、ox-LDL及びLDLを取り込むことも知られている。このような生体内反応はLDLを内皮細胞下から外に運び出していると考えられる。ではなぜくみだされなくてはいけないのか。LDLは内皮細胞間隙で重度の酸化を受けることが知られている。しかも細胞内ではないため酸化ストレスに対する抗酸化メカニズムが多く存在していないため、過剰の酸化が進行するとまわりの細胞に大きな傷害を与えられ<sup>5)</sup>。そのためある程度酸化が進行するとこれを消去するためにマクロファージが取り込むと思われる。ではこのときマクロファージは自分自身への酸化ストレスをどのように軽減させているのか。本実験では、マクロファージがどのような仕組みで酸化ストレスを

軽減しているかについて、細胞内グルタチオン濃度変化と細胞生存率の変化より考察した。

## 5-2 実験で使用した基礎操作とその原理

### 細胞の扱い方

細胞はヒト単球である THP-1 cell を用い Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) (GIBCO 社製) に 10% 子牛血清、4mM グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン (10 IU/ml) を加えた培地中で養い、1 週間に一度継代した。継代はすべてクリーンベンチ中で行なった。その際細胞数は、 $1 \times 10^5$  cells/ml とした。マクロファージに変化させる際には、 $1 \times 10^6$  cells/ml の THP-1 cell に、25ng/ml の phorbol myristate acetate (PMA) を加え、3 日間 37℃ の CO<sub>2</sub> インキュベーター中 (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) で放置することにより行った。

### グルタチオン濃度の分析方法<sup>6)</sup>

反応させた細胞を、0.1% の Triton X-100/Phosphate Buffer Saline (PBS) 溶液を加え破壊した後、グルタチオンリダクターゼ、NADPH、5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNP) を加え、そのとき生成する反応生成物の 412nm の吸収速度よりグルタチオン濃度を求めた。原理を図 5-1 に示す。(このとき測定しているグルタチオン濃度は、GSH+GSSG の和の濃度である) 尚グルタチオン濃度は細胞のタンパク濃度を測定し、グルタチオン/タンパクで示した。

### 細胞生存率の測定方法(viability測定)

細胞液中に存在するラクテートデヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を用いて細胞生存率を求めた。LDH 活性は、ビルビン酸、NADH に細胞液もしくは測定する細胞を養っていた培地を加え、その時の 340nm の減少速度 (NADH の減少速度) より求めた。生存率は、培地中の LDH 活性 (細胞は死ぬと本来細胞内にしかない LDH



を培地中に放出する) (A) と細胞中のLDH活性 (B) を  $B / (A+B) \times 100$  という式に代入して示めた。BのLDH活性を求める際には、グルタチオン濃度測定の時と同様に、0.1%のTriton X-100/Phosphate Buffer Saline溶液を加え破壊し、その細胞液を用いた。

### 5-3 実験方法

#### マロンジアルデヒド (MDA) の調製方法<sup>7)</sup>

MDAはtetraethoxypropane (TEP) 250 $\mu$ lに対し10mlの1% $H_2SO_4$ 溶液を加え4℃で一晩放置して調製した。正確な濃度は、 $\epsilon$  ( $\lambda$ :245nm) =xxxxを用いて分光光度計で調べた。

#### マクロファージに対するマロンジアルデヒド (MDA) の細胞毒性

MDAの濃度変化に対するTHP-1cell (マクロファージ) 中のグルタチオン濃度変化及びviabilityへの影響を調べた。実験は37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター中 (95%air, 5%CO<sub>2</sub>) で行なった。方法を図5-2に示す。

#### 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) の調製方法<sup>7)</sup>

4-HNEは100 $\mu$ lの4-hydroxynonenal-diethylacetal (CHCl<sub>3</sub>溶液) の溶媒をを窒素下で蒸発させ、これに対し1mlの1mM HCl溶液を加えて4℃で一晩放置して調製した。正確な濃度は、 $\epsilon$  ( $\lambda$ :223nm) =13750M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>を用いて調べた。

#### マクロファージに対する4-HNEの細胞毒性

4-HNEの濃度変化に対するマクロファージ中のグルタチオン濃度変化及びviabilityへの影響を調べた。実験は37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター中 (95%air, 5%CO<sub>2</sub>) で行なった。方法を図5-3に示す。

#### 実験で使用するox-LDLの調製方法

1.44mg/mlのLDL 2.45mlに対し10mM CuSO<sub>4</sub> 37 $\mu$ l, PBS 1066 $\mu$ lを加え、37℃

で一晩放置して調製した。酸化の度合いは、アガロースゲル電気泳動により普通のLDLとその移動度を比較することにより行なった。

#### マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性

ox-LDLのマクロファージへの細胞毒性及びグルタチオン濃度変化に対する影響を調べた。実験は37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター中（95%air, 5%CO<sub>2</sub>）で行なった。実験方法は、図5-4に示す。

#### ox-LDLによって高められたグルタチオンの細胞毒性に対する影響

ox-LDLのマクロファージへのグルタチオン濃度変化に対する影響及びそれがどれほどviabilityに影響を与えるかについて調べた。実験は37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター中（95%air, 5%CO<sub>2</sub>）で行なった。実験方法は、図5-5に示す。

#### ex-LDLの抽出液の作り方

1mg/mlのox-LDL 800μlに対し1.6mlのCHCl<sub>3</sub>/MeOH=2/1溶液を加え、vortex mixerで撹拌後、2500rpmにてCHCl<sub>3</sub>/MeOH層を分離し窒素下で乾燥後DMSOに溶かして使用した。

#### マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性とex-LDLの細胞毒性の比較

ex-LDLのマクロファージへの細胞毒性及びグルタチオン濃度変化に対する影響を調べた。実験は37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター中（95%air, 5%CO<sub>2</sub>）で行なった。実験方法は、図5-7に示す。

### 5-4 結果

#### マクロファージに対するMDAの細胞毒性

MDAの濃度変化に対するマクロファージ中のグルタチオン濃度変化及びviabilityへの影響を調べた。結果を表5-1に示す。

#### マクロファージに対する4-HNEの細胞毒性

4-HNEの濃度変化に対するマクロファージ中のグルタチオン濃度変化及び viabilityへの影響を調べた。結果を表5-2に示す。

#### マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性

ox-LDLのマクロファージへの細胞毒性及びグルタチオン濃度変化に対する影響を調べた。結果を表5-3に示す。

#### ox-LDLによって高められたグルタチオンの細胞毒性に対する影響

ox-LDLのマクロファージへのグルタチオン濃度変化に対する影響及びそれがどれほど viability に影響を与えるのかについて調べた。結果を図5-6に示す。

#### マクロファージに対するox-LDLの細胞毒性とex-LDLの細胞毒性の比較

ex-LDLのマクロファージへの細胞毒性及びグルタチオン濃度変化に対する影響を調べた。結果を表5-4に示す。

### 5-5 考察

これらの実験より、LDLの酸化修飾の際LDLのapo-B100の表面電荷を変化させることでしられているアルデヒド、そのなかでも比較的多く発生する4-HNE及びMDA<sup>8)</sup>のマクロファージに対する細胞毒性は同じアルデヒドでもかなりの差があることが分かった。(表5-1、表5-2) この原因の一つとしてそれぞれの極性の問題がある。MDAは親水性であるのに対し4-HNEは脂溶性が強い化合物である。そのため培地中にMDAを加えるとMDAは水層に行き、マクロファージと反応しにくくなるが、4-HNE脂溶性であるためマクロファージ中でタンパクと反応を起こすと考えられる。さらにこのときこれらアルデヒドはアミノ酸の一つのリジンとschiff塩基を形成することが知られているが、4-HNEは図5-8からも分かるように $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニルを持つため、Michael付加反応をシステインやヒスチジンと起こすことも知られている<sup>9)</sup>。よってこれらのことが4-HNEの毒性が



MDAより非常に高くなっている理由と考えられる。4-HNEは脂質を酸化した際生成する、二次酸化生成物として発生する。これがox-LDLの細胞毒性の原因になっていると思われる。しかし通常細胞内にはこれらを除去するメカニズムが備わっており、容易に細胞死は起こらない。細胞内で、生成したアルデヒドを無毒化する酵素としてはグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) が知られているが (図5-9)、これは還元型グルタチオン (GSH) を使ってアルデヒドを無毒化する酵素である<sup>10)</sup>。実際生体内からこの反応で生成したと考えられる4-HNEとGSHの付加物も検出されており、これはGSTとの反応で生成したと考えられている。そこでマクロファージとの反応でGSHレベルがどのように変化するかについて観察した。(図5-3) 結果は、MDAでも4-HNEでも濃度に比例してグルタチオン濃度が上がっており (図5-10)、マクロファージ内でGSTによるアルデヒド代謝が盛んに行なわれていることが分かる。しかし4-HNEでは40 $\mu$ Mあたりからグルタチオン濃度の減少が始まり、これはこれらの防御機構では十分でなくなったため細胞死が始まった結果 (図5-11) ではないかと思われる。つぎにマクロファージにox-LDLを加えて同じようにGSHレベルとviabilityの変化を観察した。(表5-3) やはり濃度依存的にGSHレベルは上がっていくが、過剰量加えた場合ではこれでも十分でなくviabilityが下がっている。このことより過剰量のox-LDLは毒性が高いことが分かる。次にこのGSHレベルの上昇が細胞内でox-LDLの解毒作用として働いているのかについて調べた。100 $\mu$ g/mlのox-LDLでマクロファージを処理するとGSHレベルは上がる。そこで100 $\mu$ g/mlのox-LDLで処理したマクロファージに、400 $\mu$ g/mlのox-LDLを加えて、100 $\mu$ g/ml LDLで処理しなかったマクロファージに、400 $\mu$ g/mlのox-LDLを加えた結果と比較した。図5-6よりviabilityが前処理をしてGSHレベルを上げたほうが上がることがわかる。このことより上昇したGSHレベルにより防御能が上がるということがわかる。表5-3はox-LDLの毒性

は、脂質の酸化生成物だけによるものかどうかを調べたものである。LDLは主に脂質（コレステロールエステルを含む）とタンパクとから構成されており、ox-LDL生成の際にはタンパクの酸化も起こっていることが知られている。そこで除タンパクをしたox-LDL成分と、ox-LDLのマクロファージのviabilityとGSHレベルに対する結果を比較してみた。結果を図5-13に示す。この二つの物質の毒性には大差がなく、この強い毒性は脂質の酸化生成物によるものと考えられる。

#### 5-6 まとめ

ox-LDLには4-HNEやMDAの様なアルデヒドがかなり含まれている。とくに4-HNEはその化学的及び物理的性質からかなり毒性が高く、ox-LDLの強い毒性はこの物質が原因と考えられる。ox-LDLの構造が安定している間は、これらの物質もLDL中に蓄えられており、まわりの細胞に対し強い毒性は示しにくいと思われるが、酸化が進みLDL構造が壊れるとこの中身を隣接した細胞に放出し、細胞死に至らしめると思われる<sup>11)</sup>。しかし内皮細胞下に蓄積したox-LDLはマクロファージによって除去されこのことが起こる前にox-LDLを無毒化すると考えられる（図5-14）。これが結果として泡沫細胞となり動脈硬化へと発展するわけだが、このように考えるとox-LDLのマクロファージによる取り込みは明らかに防御作用といえるであろう。

#### 5-7 参考文献

- 1) Ross, R., N. Engl. J. Med., 314, 488-500, 1986
- 2) Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L., N. Engl. J. Med., 320, 915-925, 1989
- 3) Koo, C., Innerarity, T.L. and Mahley, R.W., J. Biol. Chem., 260, 11934-11943, 1985

- 4) Slotte, J.P., Oram, J.F. and Bierman, E.L., J. Biol. Chem, 262, 12904-12907, 1987
- 5) Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L. and Steinberg, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 3883-3887, 1984
- 6) Tietze, F., Anal. Biochem., 27, 502-522, 1969
- 7) Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H., Methods in Enzymology, 186, 407-421, 1990
- 8) Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenteld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L. and Steinberg, D., J. Clin. Invest., 84, 1086-1095, 1989
- 9) Schaur, R.J., Zollner, H. and Esterbauer, H., Membrane Lipid Oxidation III, CRC Press, 141-163
- 10) Jensson, H., Guthenbera, C., Alin, P. and Mannervik, B. FEBS Lett., 203, 207-209, 1986
- 11) Kuzuya, M., Naito, M. Funaki, C., Hayashi, T., Asai, K. and Kuzuya, F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 1466-1472, 1989



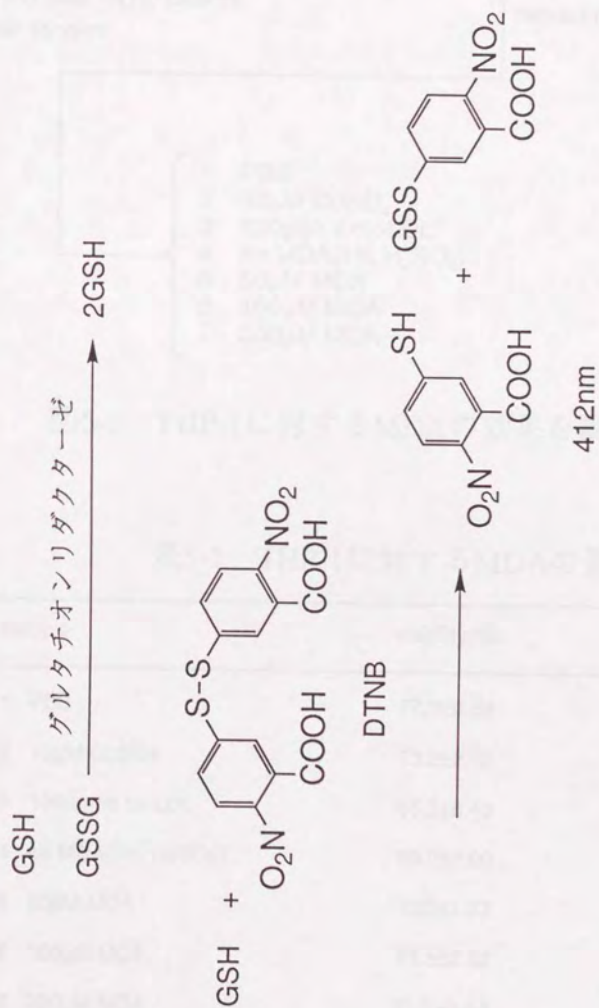


図5-1 GSH量の測定方法

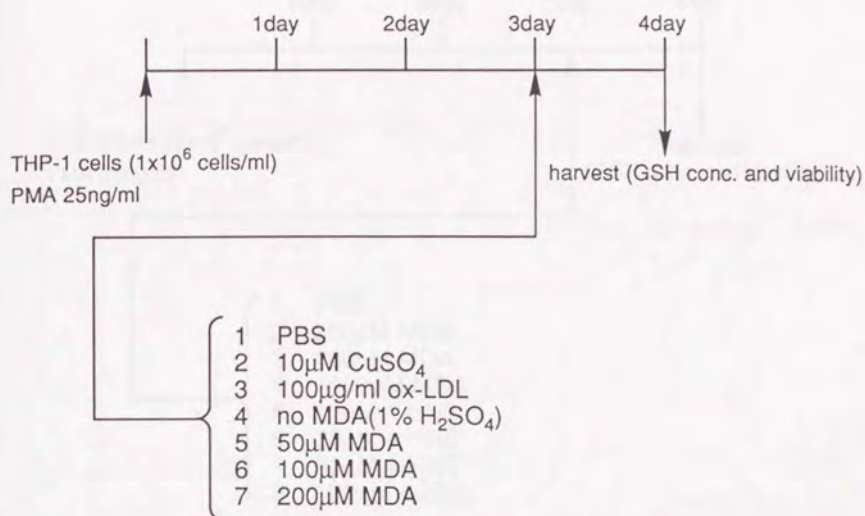


図5-2 THP-1に対するMDAの効果を調べる方法

表5-1 THP-1に対するMDAの影響

| sample                                    | viability(%)    | GSH/protein      |
|---|-----------------|------------------|
| 1 PBS                                     | $77.3 \pm 0.58$ | $112 \pm 9.17$   |
| 2 $10 \mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$        | $73.3 \pm 2.52$ | $111.7 \pm 30.6$ |
| 3 $100 \mu\text{g/ml}$ ox-LDL             | $65.3 \pm 6.43$ | $192.7 \pm 53.6$ |
| 4 no MDA( $1\%$ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) | $69.0 \pm 2.00$ | $99.7 \pm 6.11$  |
| 5 $50 \mu\text{M}$ MDA                    | $73.0 \pm 1.73$ | $115.7 \pm 32.3$ |
| 6 $100 \mu\text{M}$ MDA                   | $71.3 \pm 2.52$ | $111.7 \pm 22.2$ |
| 7 $200 \mu\text{M}$ MDA                   | $71.7 \pm 0.58$ | $105.3 \pm 18.8$ |

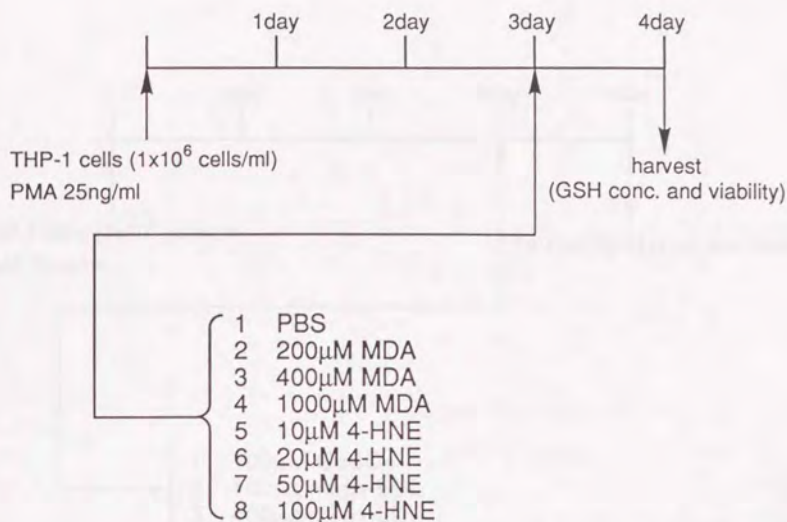


図5-3 THP-1に対する4-HNEの効果を調べる方法

表5-2 THP-1に対する4-HNEの影響

| sample              | viability(%)    | GSH/protein      |
|---------------------|-----------------|------------------|
| 1 PBS               | 66.9 $\pm$ 1.22 | 99.3 $\pm$ 4.52  |
| 2 200 $\mu$ M MDA   | 65.2 $\pm$ 1.36 | 130.9 $\pm$ 8.36 |
| 3 400 $\mu$ M MDA   | 66.3 $\pm$ 2.27 | 150.3 $\pm$ 17.5 |
| 4 1000 $\mu$ M MDA  | 64.8 $\pm$ 1.27 | 121.6 $\pm$ 15.2 |
| 5 10 $\mu$ M 4-HNE  | 59.2 $\pm$ 1.62 | 114.4 $\pm$ 1.33 |
| 6 20 $\mu$ M 4-HNE  | 47.4 $\pm$ 1.25 | 120.9 $\pm$ 11.5 |
| 7 50 $\mu$ M 4-HNE  | 13.5 $\pm$ 1.07 | 54.9 $\pm$ 37.5  |
| 8 100 $\mu$ M 4-HNE | 2.26 $\pm$ 0.28 | 0                |



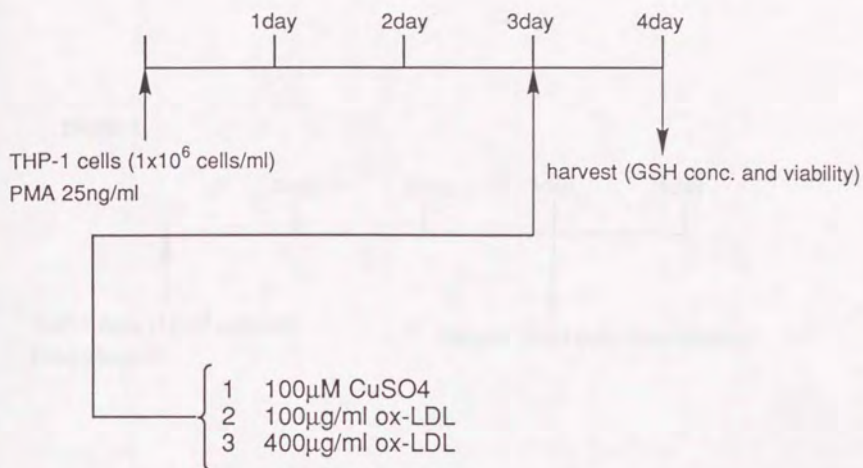
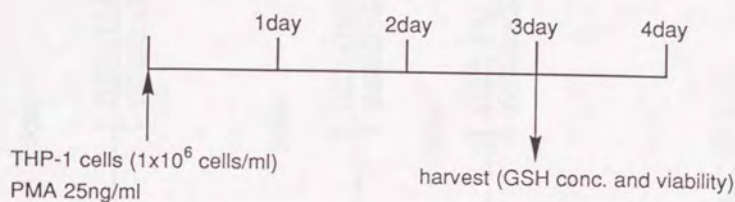


図5-4 THP-1に対するox-LDLの効果を調べる方法

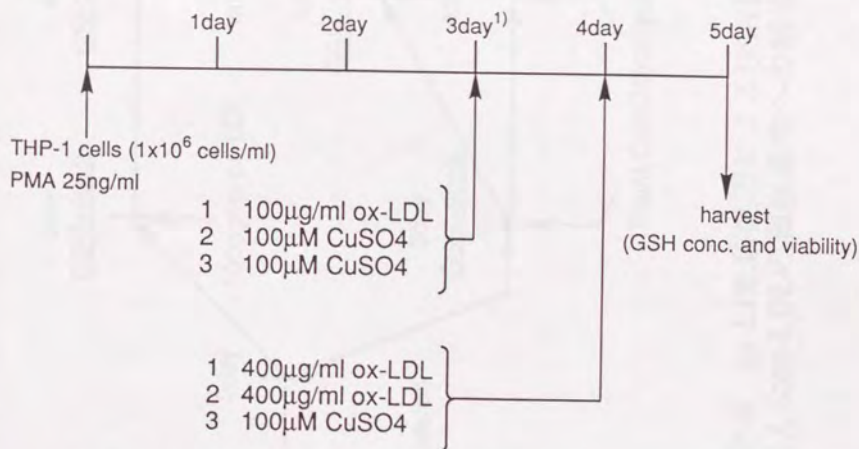
表5-3 THP-1に対するox-LDLの効果

| sample                              | viability(%) | GSH/protein |
|-------------------------------------|--------------|-------------|
| 1 100μM CuSO <sub>4</sub> (control) | 70.8±1.18    | 116.5±4.80  |
| 2 100μg/ml ox-LDL                   | 74.0±0.85    | 134.8±3.10  |
| 3 400ug/ml ox-LDL                   | 46.7±1.70    | 173.0±28.0  |

### plate 1



### plate 2



1) change to the RPMI-1640 medium which does not contain PMA

図5-5 ox-LDL前処理によるGSH量変化とそれに新たに加えたox-LDLの細胞毒性への解毒効果を調べる方法

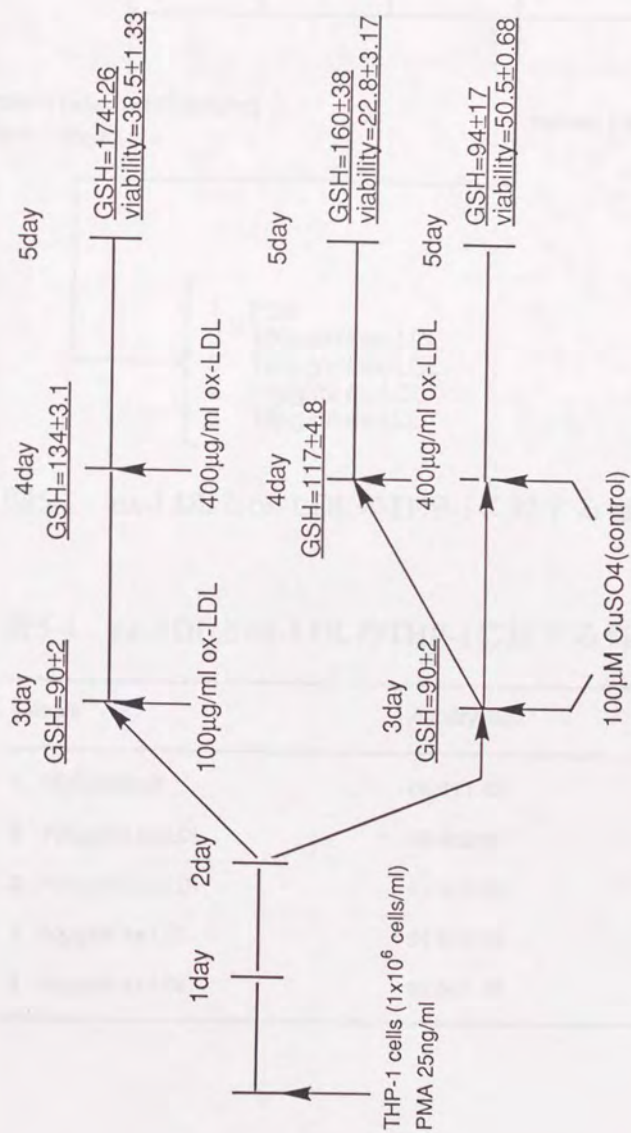


図5-6 ox-LDL前処理によるGSH量変化とそれに新たに  
加えたox-LDLの細胞毒性への解毒効果



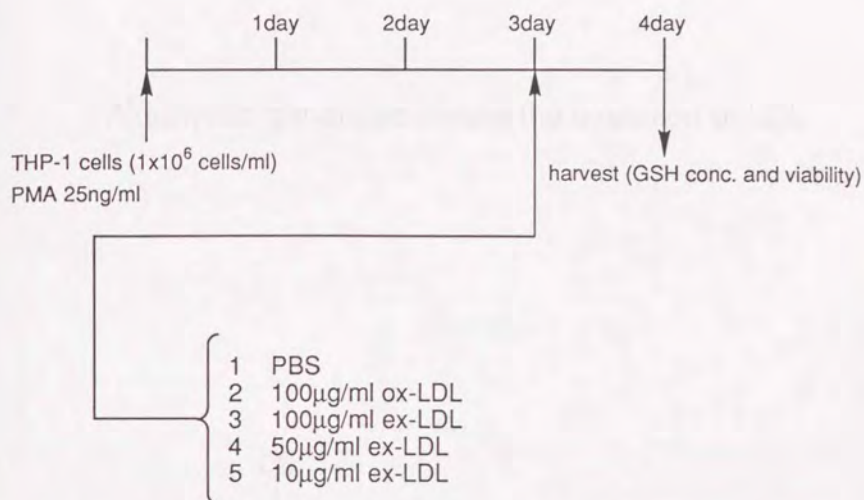


図5-7 ex-LDLとox-LDLのTHP-1に対する毒性の比較方法

表5-4 ex-LDLとox-LDLのTHP-1に対する毒性の比較結果

| sample            | viability(%) | GSH/protein |
|-------------------|--------------|-------------|
| 1 PBS(control)    | 66.1±1.48    | 70.0±4.95   |
| 2 100μg/ml ox-LDL | 60.3±3.07    | 117±10.7    |
| 3 100ug/ml ex-LDL | 61.5±1.02    | 116±4.12    |
| 4 50μg/ml ex-LDL  | 64.5±3.60    | 93.0±10.3   |
| 5 10μg/ml ex-LDL  | 61.8±1.90    | 100±11.9    |

# Aldehydes generated during the oxidation of LDL

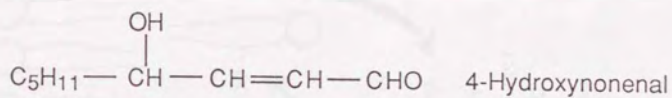
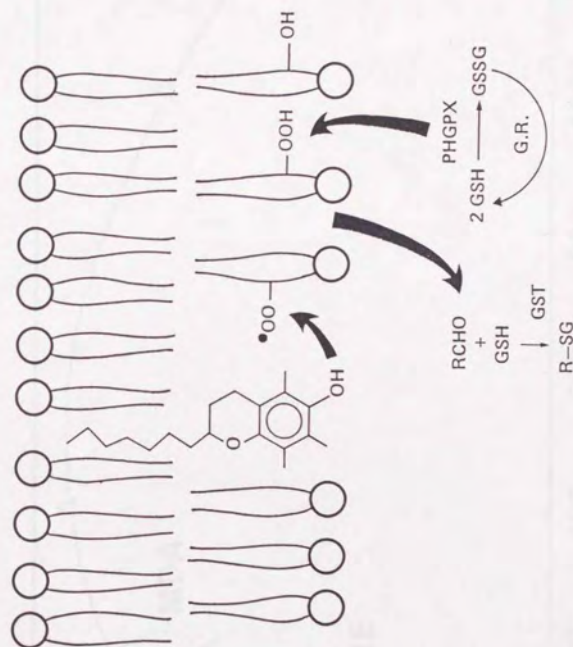


図5-8 使用したアルデヒドの構造



GSH is consumed during oxidative stress.

図5-9 脂質酸化と生体内防御機構



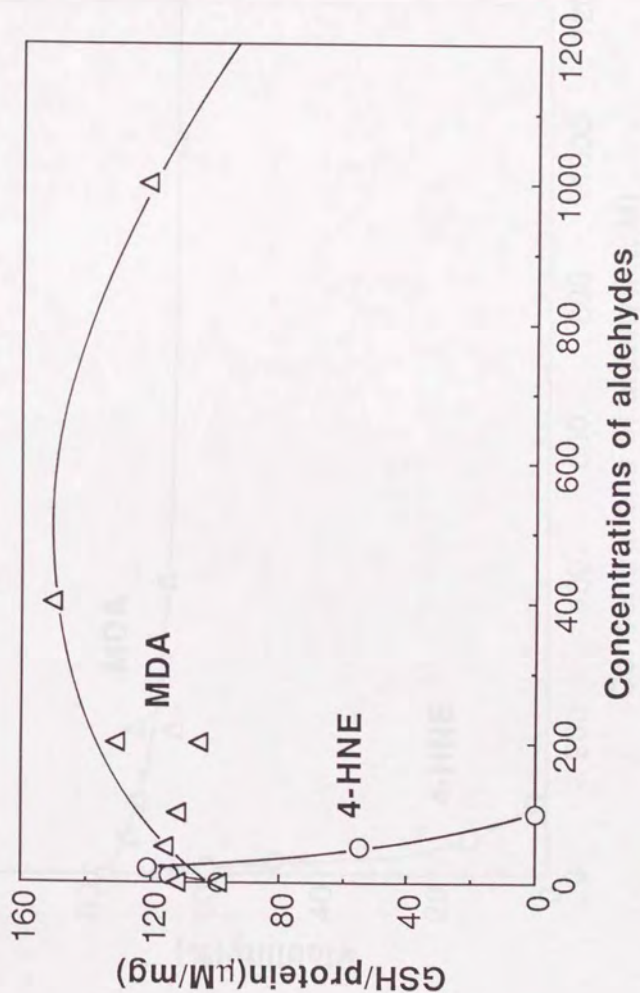


図5-10 アルデヒドの細胞内GSH濃度に対する影響

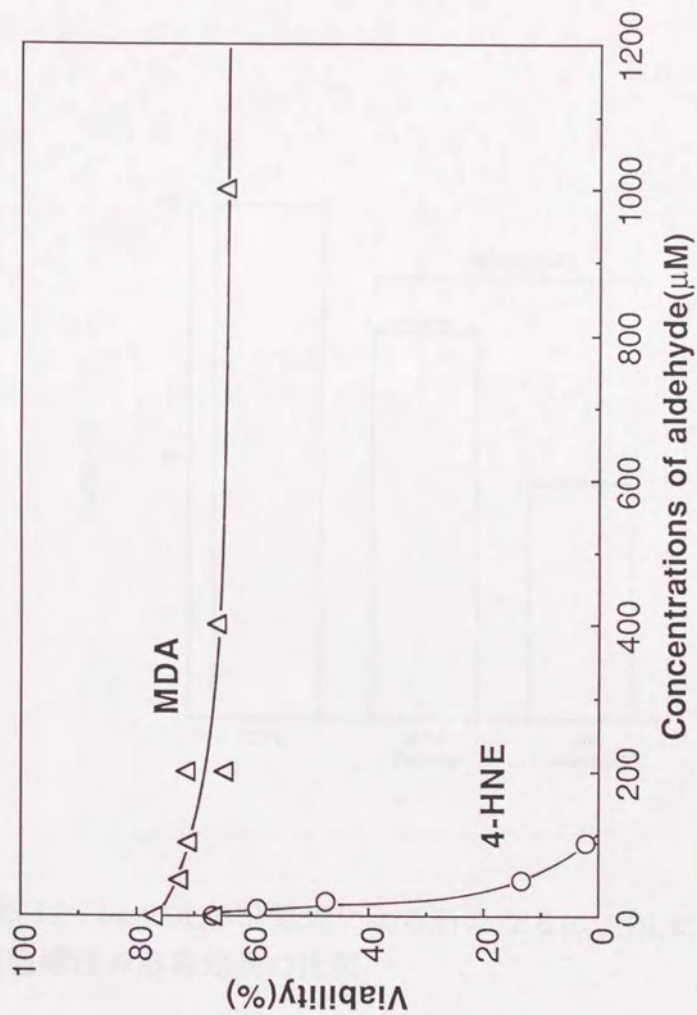


図5-11 アルデヒドの細胞生存率に対する影響

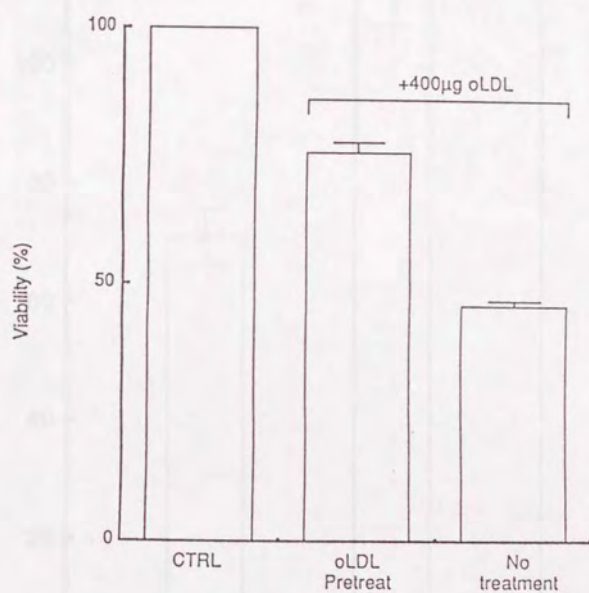


図5-12 ox-LDLの前処理による新たなox-LDLに対する細胞毒性の解毒効果の比較



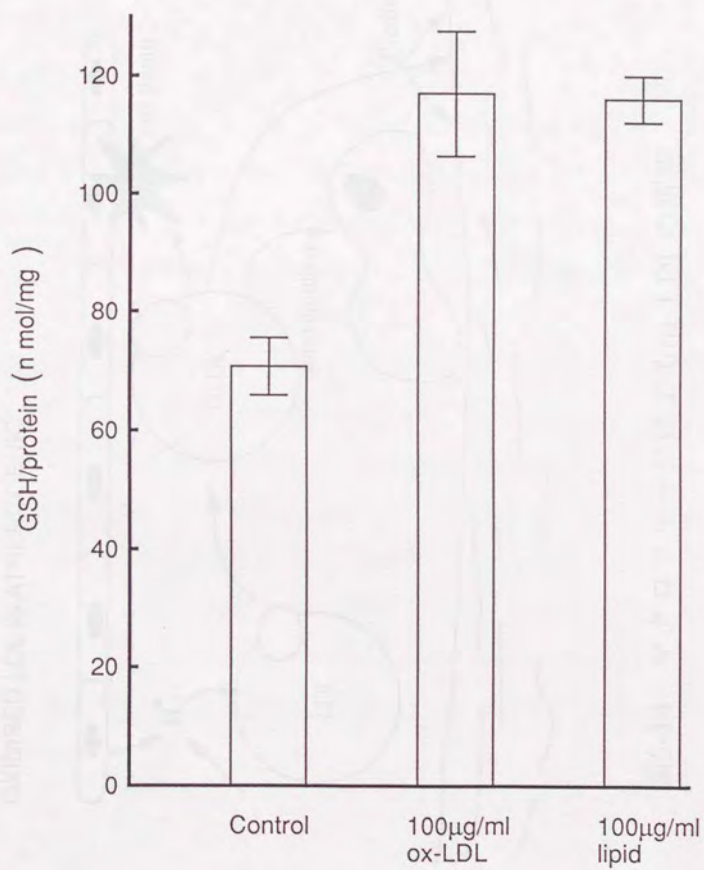


図5-13 ex-LDLとox-LDLのGSH量に対する効果

OXIDISED LDL IS ATHEROGENIC

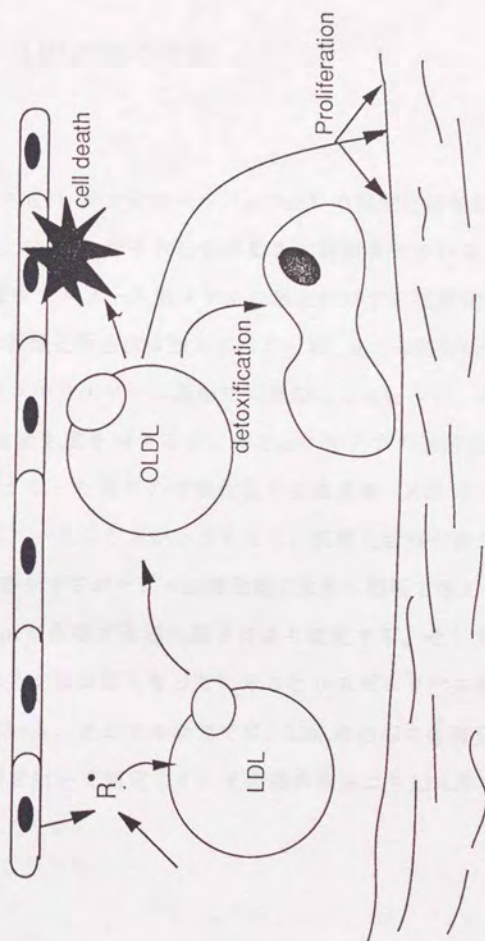


図5-14 マクロファージによるox-LDLの解毒

## 第6章 LDLの場の固さ

### 6-1 緒言

LDL中での $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc) の抗酸化活性は非常に低い。その原因の一つとしてLDL中でそれ自体の動きが制限されていることがある。通常 $\alpha$ -Tocは均一溶液中でリノール酸メチルの酸化に対する抗酸化能は非常に高く、 $\alpha$ -Toc存在下では過酸化物生成は強力に抑えられ、 $\alpha$ -Toc消失後酸化が起こる。ホスファチジルコリンのリポソーム膜中で同様のことを行くと、やはり明確な誘導期を示して過酸化物生成を抑えるが、 $\alpha$ -Toc存在下での過酸化物生成速度 ( $R_{inh}$ ) と $\alpha$ -Tocがなくなった後の過酸化物の生成速度 ( $R_0$ ) の比 ( $R_0/R_{inh}$ ) を比較すると、リポソーム系の方が小さくなり、抗酸化活性が落ちている<sup>1)</sup>。このように $\alpha$ -Tocの動きやすさがその抗酸化能に大きく影響を与えていることが分かるが、これは $\alpha$ -Tocが存在する場の固さにより変化する。そして均一溶液中よりリポソーム膜中の方が場は固くなっていることがスピラベル剤を用いた研究より明らかになっている。そこで本研究では、LDLの内部の各部分での場の固さとをスピラベル剤を用いて測定して、その場の固さよりLDL中での $\alpha$ -Tocの抗酸化活性とを考察した<sup>2)</sup>。

### 6-2 試薬

アスコルビン酸は和光純薬より購入した。N-oxyl-4,4'-dimethyloxazolidine derivatives of stearic acid (NS) はAldrich社より購入した。尚NSの前に付いている数字はスピラベルがカルボキシル基から数えて何番目の炭素と結合しているかを示す。コレステロールエステルスピラベル剤 (16-NSC) は、Morrisettらの方法<sup>3)</sup> に従い合成した。試薬の構造を図6-1に示す。



### 6-3 原理<sup>4)</sup>

#### スピンラベル法

スピンラベル法とはニトロキシドラジカル ( $=\text{N-O}\cdot$ ) の様な安定なラジカルで生体高分子や生体膜などをラベルし、そのESRスペクトルからラベル周辺的环境に関する情報を得る方法である。

スピンラベル剤として用いる有機ラジカルには一般に次の条件が要求される。

- 1) ラジカルが空气中で安定であり、化学変化を受けにくく、単離できること
- 2) 可能な限り小さな分子であり、スピンラベルすることにより、被ラベル分子や生態系の性質や機能が変わらないこと

- 3) ESRスペクトルの線形が簡単で解析が容易であり、被ラベル分子や生態系の環境や運動状態を、スペクトルが明瞭に反映できること

以上の条件を満たすものとして、ニトロキシドラジカルがある。

ニトロキシドラジカルのESRスペクトルは不対電子と窒素の角スピン ( $I=1$ ) との相互作用のため3本線からなるシグナルを示す。3本線の間隔はラジカルに対してどの方向から外部磁場をかけるかにより変わる。また  $g$  値も異方性をもって変化する。

分子の等方性回転の解析には  $\tau_c$  が用いられる。(図6-2)

$$\tau_c = 4\pi r^3 \eta / 3kT$$

$\tau_c$  は回転の相関時間と言われているもので  $h$  は溶媒の粘度、 $r$  はラジカル分子の半径である。ただし、この式は  $10^{-11}$  秒  $< \tau_c < 10^{-9}$  秒の間に成り立つものである。溶媒中と違い、膜の中では  $\eta$  の値が大きくなるので、ラジカル分子の回転運動が遅くなり、 $\tau_c$  は大きくなる。

従って、3本線の間隔は広がるが、各々のシグナルによってその程度は異なる。

つまりニトロキシラジカルの場合、高磁場側のシグナルが最も広がる、脂肪酸やステロイド等をニトロキシドラジカルでスピンラベルした化合物は、大きくて細長い構造をしており、生体膜中では分子の長軸まわりの運動が他の軸まわりのそれに比べ容易である。この分子の異方性回転を考慮し、ニトロキシラジカルの場合はオーダーパラメーター (S) と呼ばれる量が定義されている。(図6-3)

細長いスピンラベル剤の場合、アルキル鎖の運動は温度の上昇にしたがって激しくなる。Sは温度上昇につれて小さくなり、温度が低くなると大きくなり1に近づく。したがってSは、膜の流動性 (fluidity) の目安とされている。

#### 6-4 実験方法

##### 低密度リポ蛋白質 (LDL) の調製

ヒトの血漿から Stepwise法によって $d=1.019-1.063$ の画分を取り出し、これをLDLとした。タンパク濃度はLowry法を用い、ウシ血清アルブミン(BSA)の検量線より求めた。

##### ステアリン酸スピンラベル剤のLDLへの組み込み

7-NS, 16-NSの組み込みは、ラベル剤のEtOH soln.を1%体積でLDLに加えることで行なった。LDL中のスピンラベル剤の濃度は、LDLのサンプル50 $\mu$ lに対し200 $\mu$ lのMeOHを加え、12,000 rpmで抽出後MeOH層を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析することによって求めた。分析条件を下に示す。

7 or 16-NS:

column LC-18 25cm(Supelco社製)  
eluent 50mM NaClO<sub>4</sub> in MeOH/H<sub>2</sub>O=96/4  
detector ECD 800mV  
flow rate 1.1ml/min

retention time 5.5min

コレステロールエステルスピラベル剤のLDLへの組み込み<sup>5)</sup>

660  $\mu$ M 16-NSC を含む 2.5 mM PC-重膜リポソーム 1 ml を作成し、これにヒトの血漿から超遠心により超低密度リポタンパク (VLDL) を除去した血漿 4ml と 2.44 mg/ml LDL 300  $\mu$ l を加え、37°C で 24 時間インキュベートした。LDL は single-vertical 法により反応液より分離した。さらに LDL アフィニティカラム<sup>6)</sup> (カネカ製: LA01) にこの LDL 溶液を流し、十分にイオン交換水で不純物を除いた後、5% NaCl 溶液で LDL を流し落とし 16-NSC を含む LDL を得た。LDL 中のスピラベル剤濃度は、LDL のサンプル 100  $\mu$ l に対し 200  $\mu$ l の CHCl<sub>3</sub>/MeOH=2/1 溶液を加え 12,000 rpm で抽出後 CHCl<sub>3</sub>/MeOH 層を HPLC で分析することによって求めた。分析条件を下に示す。

16-NSC:

column LC-8 25cm (Supelco 社製)

eluent 50mM NaClO<sub>4</sub> in MeOH

detector ECD 1050mV

flow rate 1.2ml/min

retention time 16.0min

LDL に組み込んだスピラベル剤のアスコルビン酸による還元

各々のスピラベル剤を組み込んだ LDL 溶液に、アスコルビン酸を加え 37°C で反応を開始した。スピラベル剤の還元は、ESR シグナル強度を測定することにより行なった。分析条件を下に示す。

37°C, Power 20 mW, 中心磁場 3290 $\pm$ 100 G, Sweeptime 16 min., Mod. 100 Hz  
4 G, Amp. 4000, Response 1 sec

LDL に組み込んだスピラベル剤のスペクトルの測定



LDL中でのスピラベル剤の組み込みはESRスペクトルより観察した。測定条件を下に示す。

37°C, Power 20 mW, 中心磁場  $3290 \pm 100$  G, Sweeptime 16 min., Mod. 100 Hz  
4 G, Amp. 4000, Response 1 sec

#### 6-5 結果

##### LDL中に組み込んだスピラベル剤の還元

図6-4にLDLに組み込んだ各スピラベル剤のアスコルビン酸による還元速度を示した。この図より膜表面に近い位置にドキシル基を持つ7-NSが最も還元を受けやすく次に16-NSの順で、16-NSCは還元されにくいことが分かる。

##### スピラベル剤の組み込み

均一溶液中およびLDL膜中におけるスピラベル剤のESRスペクトルを測定した結果を図6-5、図6-6に。表6-1にそれらのスペクトルより求めた相関回転時間 $\tau_c$ を示す。均一溶液中の自由な運動よりLDL中の方が相関回転時間 $\tau_c$ およびオーダーパラメーターSの値が小さくなり、シグナルに異方性が強く現われ、膜が固くなっていることが分かる。また、LDL中においては、7-NSより16-NS、16-NSCに移行するにつれて、異方性が小さくなり、膜内部は表面より柔らかい環境になっていることが分かる。

#### 6-6 考察

スピラベル剤は、その置かれた環境下で分子の回転を制約されるとスペクトルの形が変化する。よってそのスペクトル変化よりそれぞれの場所での分子の動きやすさ（場の固さ）が測定できる。この研究は、これを応用してLDL中での場の固さを測定することを目的として行なった。しかしこのことを行うた

めにはスピンラベルをLDLの測定したい場所に組み込まなくてはならない。LDL表層から内側にかけては、NSをLDLに組み込むことにより可能であるが、LDLのコア部分の状態をこの方法では調べることは出来ない。LDLのコア部分にはトリグリセリド及びコレステロールエステルが存在している。そこで16-NSCを合成してLDLに組み込めればLDLの中心部の状態を知ることが可能だと考えた。しかし16-NSCはLDLと混合するだけではLDLに組み込まれなかった。(図6-7)そこで血漿中に含まれているコレステロールエステル輸送蛋白(CETP)を用いる方法で行なった。この方法原理は、リボソームに包んだ16-NSCを血漿とLDLと混合し、CETPのコレステロールエステル交換反応を利用してLDL中に取り込ませるというものである。この方法を利用してLDLに取り込ませた16-NSCのスペクトルを図6-6に示す。図6-7とは異なるスペクトルが得られていることがわかる。よってこれは16-NSCがLDLに組み込まれたため得られたスペクトルと考え、次に16-NSCがLDL内部のどの位置に組み込まれているかを調べた。方法としては、NSがアスコルビン酸で還元されるとそのスペクトルを失う性質を利用した。アスコルビン酸は水溶性の抗酸化剤であるためLDLには組み込まれない。そこでLDL中に組み込んだスピンラベル剤は表層近くにそのラベル部分を持つものほどスペクトルの消失速度は速い(図6-4)。7-NSが一番速くそのラベルピークを失っていき次に16-NSそして16-NSCの順であった。このことより図6-8に示してあるようにこのスピンラベル剤は配置していると考えられる。そこで次にそれぞれのラベル剤のLDL中でのスペクトルを測定してみた。結果を図6-5に示す。このスペクトルを元にして相関回転時間 $\tau_c$ およびオーダーパラメーター $S$ の値を求めた結果を表xに示す。これらの値は値が小さくなるほど動きやすい場であることを示している。よってこれらの結果よりLDLの表層が一番固く、内部に入るに従って柔らかくなって行くことが

分かる（図6-9）。LDLに含まれている内因性 $\alpha$ -TocはLDLの表層に位置していると考えられている。この結果より、 $\alpha$ -Tocは膜表面ではその場の固さによりかなり動きが制限されていると想像できる。このために $\alpha$ -TocラジカルはLDL中を動き回りペルオキシラジカルとのカップリング反応によってそのラジカルを安定化させることが出来ず、脂質からの水素引き抜き反応を起こし過酸化を進めてしまうと考えられる。また側鎖のついていないプロブコールはこのような場には固定されにくく、そのためLDL中を動き回ることが可能なため $\alpha$ -TocよりLDL中での抗酸化能が高いと考えられる。

#### 6-7 まとめ

LDLという反応場は、表層付近が一番固く（動きが制限されており）内部にいくに従って柔らかくなる場である。このため内因性 $\alpha$ -TocはLDLの表層で動きが制限されており本来の能力を発揮出来ないと考えられる。

#### 6-8 参考文献

- 1) Niki, E, Takahashi, M. and Komuro, E., Chem Lett., 1573-1576, 1986
- 2) Ohnishi, S. and McConnell, H.M., J. Am. Chem. Soc., 87, 2293-, 1965
- 3) Morrisett, J.D., Lipids, 9, 726-728, 1974
- 4) 大西俊一, 生体膜の動的構造, 東京大学出版会
- 5) Nishikawa, O., Yokoyama, S., Kurasawa, T. and Yamamoto, A., J. Biochem., 99, 295-301, 1986
- 6) Yokoyama, S., Hayashi, R., Kikkawa, T., Tani, N., Takada, S., Hatanaka, K. and Yamamoto, A., Arteriosclerosis, 4, 276-282, 1984



表6-1 スピントラベル剤の相関回転時間およびオーダーパラメーター  
に対する場の影響

| Solvent | スピントラベル剤 | 相関回転時間 $t_c$ , sec | オーダーパラメーターS |
|---------|----------|--------------------|-------------|
| Benzene | 16-NS    | 2.64e-11           | 0.184       |
|         | 16-NSC   | 2.12e-11           | 0.243       |
| Ethanol | 7-NS     | 1.01e-10           | 0.142       |
|         | 16-NS    | 3.67e-11           | 0.142       |
| LDL     | 7-NS     | 2.96e-9            | 0.510       |
|         | 16-NS    | 1.30e-9            | 0.440       |
|         | 16-NSC   | 1.01e-9            | 0.351       |

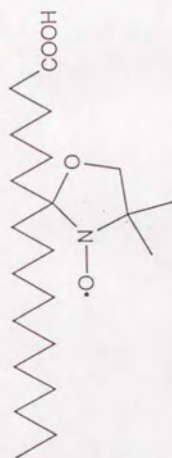
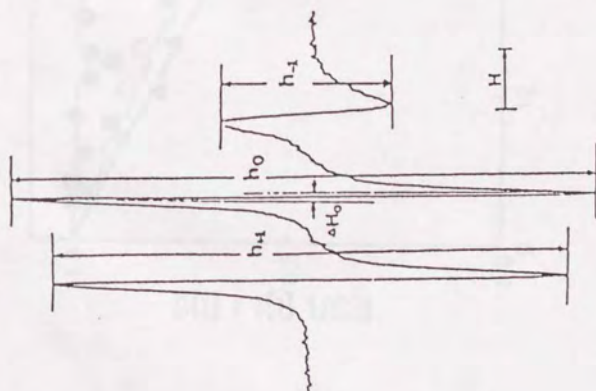
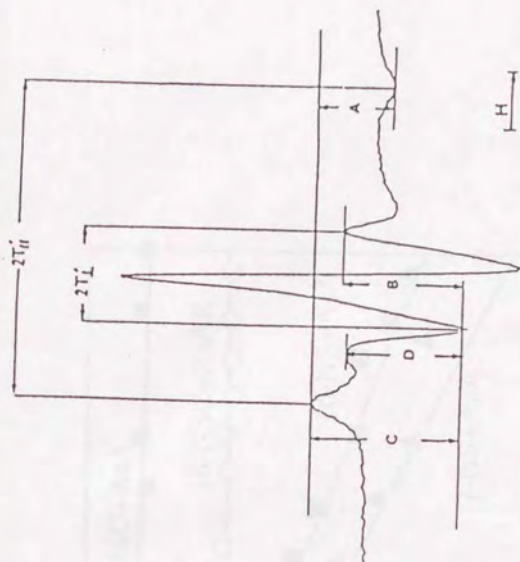


図6-1 実験で使った試薬の構造



$$\tau_c = 6 \times 10^{-10} \times \Delta H_0 \times \left( \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} \right)$$

図6-2  $\tau_c$ の求め方



$$S_3 = 1.68 \times \frac{T_{II} - T_I}{2T_I + T_{II}}$$

$$S = 1.723 \times \frac{43.7 - 3T_I}{46.1}$$

図6-3 Sの求め方



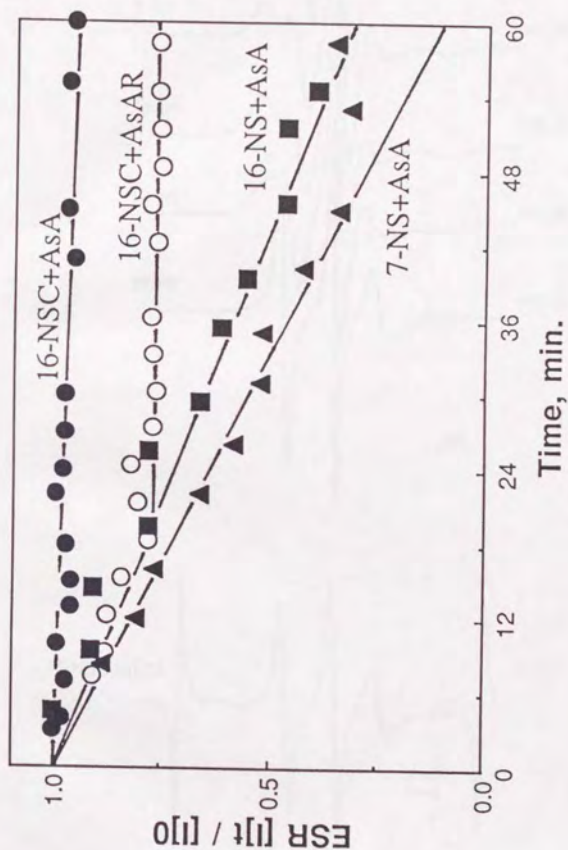


図6-4 LDL中に組み込んだ各スピラベル剤のアスコルビン酸による還元作用

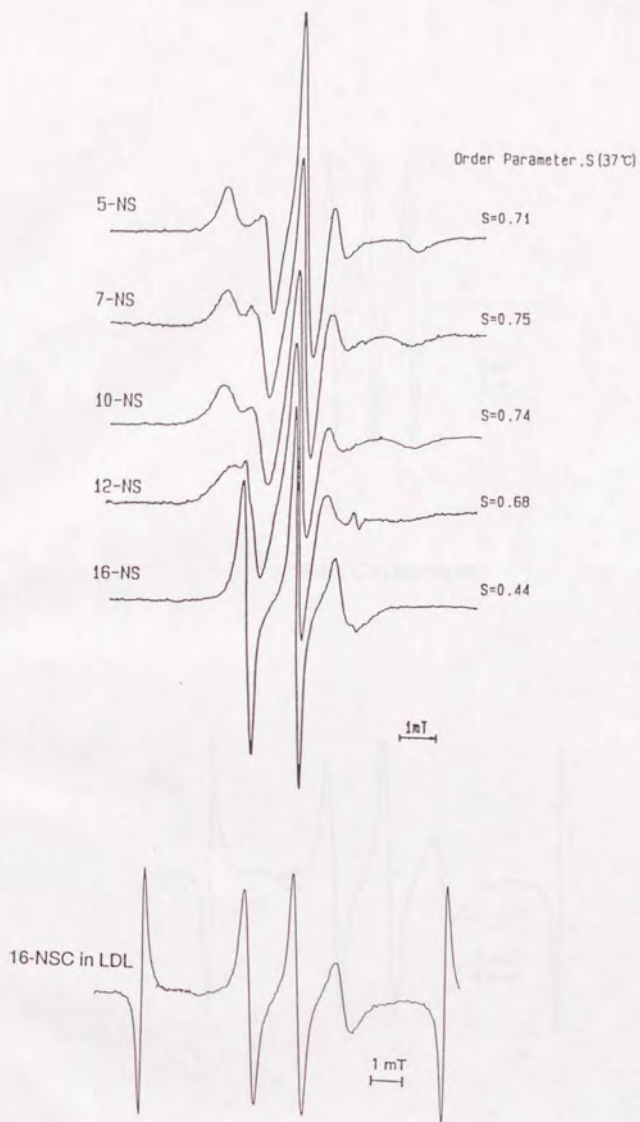
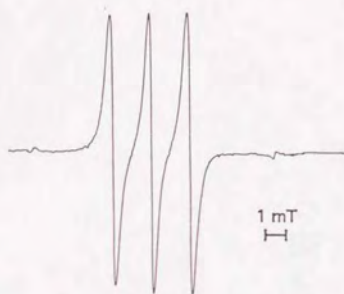


図6-5 LDL中に組み込んだNSのESRスペクトル



16-NSC in Benzene



16-NSC in LDL

図6-6 LDL中に組み込んだ16-NSCのESRスペクトル





表6-7 血漿 (CETP) なしでLDLに組み込んだ際の  
16-NSCのスペクトル

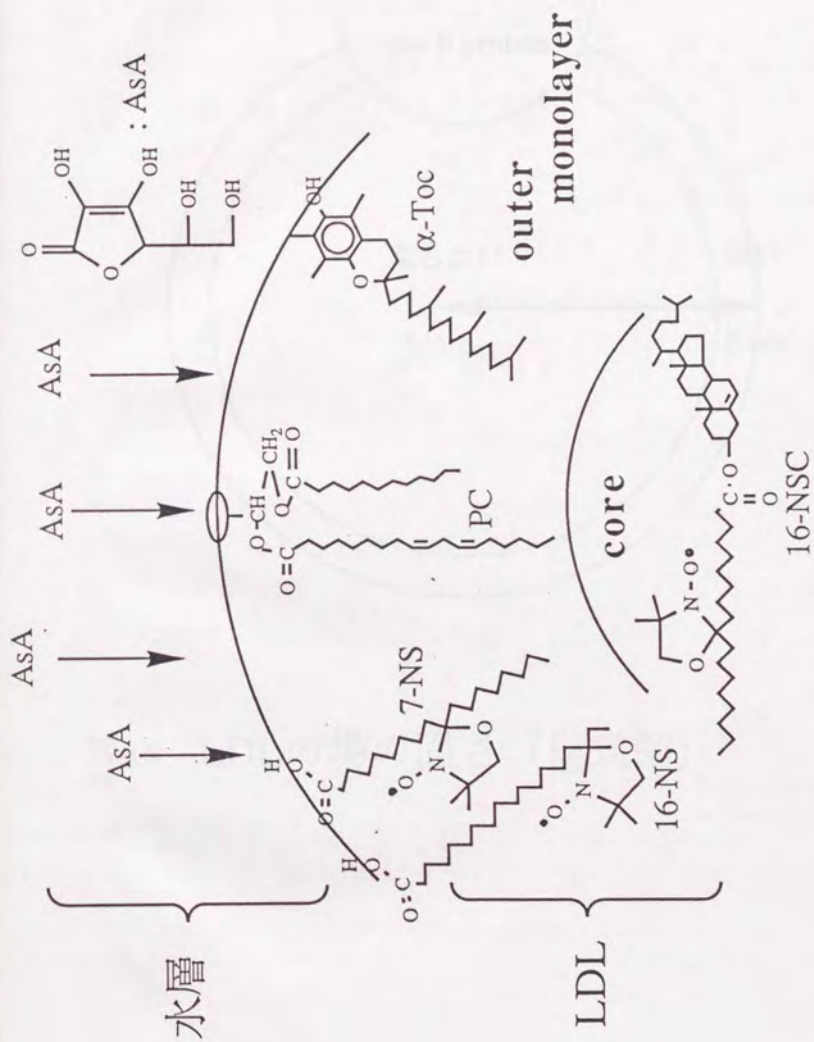


図6-8 各スピラベル剤の予想されるLDL中での配置

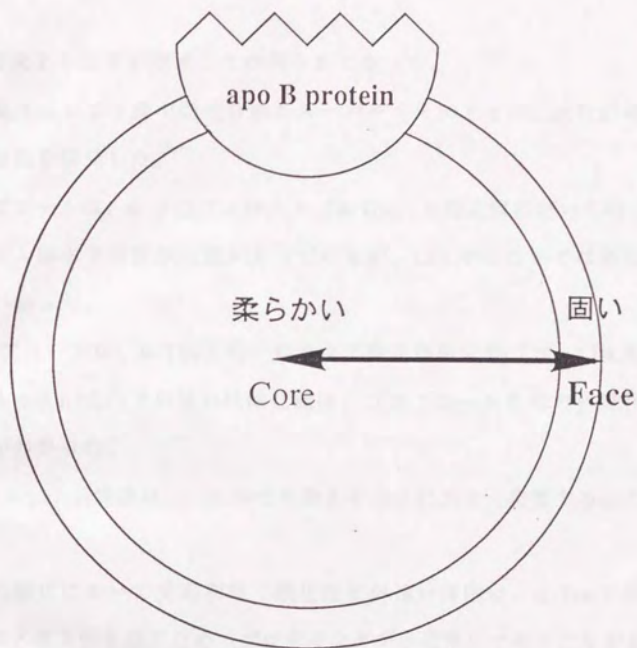


図6-9 LDLの場の固さ（模式図）



## 第7章 総論

以上の研究より以下に示すことが明らかになった。

1. 化学発光法により膜中の化合物とスーパーオキシドとの二次反応速度定数を求める方法を開発した。
2. プロブコールは、 $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc) との比較において均一溶液中、リボソーム膜中では抗酸化能が劣っているが、LDL中においては逆転していることがわかった。
3. プロブコールは、 $\alpha$ -Tocと均一溶液中で相互作用を持つが、LDL中では持たない。よってLDL内での強い抗酸化能は、プロブコール単独の抗酸化効果であることがわかった。
4.  $\alpha$ -Tocのphytyl側鎖は、LDL中での動きやすさに大きく影響することがわかった。
5. LDLの酸化において反応初期で酸化速度が速い理由は、 $\alpha$ -Tocラジカルが脂質からの水素を引き抜くため（プロオキシダント効果）であることがわかった。
6. LDLの酸化は、 $\alpha$ -Tocラジカルを還元できる化合物により抑制できることがわかった。
7. LDLは表層付近が一番固く、そして内部に進むに従い柔らかくなる。このため表層に位置している $\alpha$ -Tocは、その動きを制限され、結果としてLDL内での抗酸化能が落ちていることがわかった。
8. マクロファージは酸化LDLを取り込む際、細胞内のグルタチオン量を上げる。これは自らを酸化ストレスから防御するためである。

## 発表論文

### 原著論文

1. Gotoh, N. and Niki, E. "Rate of spin-trapping of superoxid as studied by chemiluminescence." Chem. Lett., 1475-1478, 1990
2. Gotoh, N. and Niki, E. "Rates of interactions of superoxides with viitamin E, vitamin C and relaed compounds as measured by chemiluminescence." Biochim. Biophys. Acta, 1115, 201-207, 1992
3. Gotoh, N., Shimizu, K., Komuro, E., Tsuchiya, J., Noguchi, N. and Niki, E. "Antioxidant activities of probucol against lipid peroxidations." Biochim. Biophys. Acta, 1128, 147-154, 1992
4. Noguchi, N., Gotoh, N. and Niki, E. "Dynamics of the oxidation of low density lipoprotein induced by free radicals." Biochim. Biophys. Acta, 1168, 348-357, 1993
5. Gotoh, N., Graham, A., Niki, E. and Darley-USmar, V. "Inhibition of glutathione synthesis increases the toxicity of oxidized low-density lipoprotein to human monocytes and macrophages." Biochem. J., 296, 151-154, 1993

### プロシーディング

6. Gotoh, N., Shimizu, K., Komuro, E., Tsuchiya, J. and Niki, E. "The action of probucol as antioxidant against lipid peroxidations." Oxygen Radicals, 661-664, 1992

### 成書

7. 後藤直宏, 二木鋭雄 "スーパーオキシドとビタミンEの反応速度", ビタミンEの研究の進歩II, 共立出版
8. 後藤直宏, 野口範子, 土屋順一, 二木鋭雄, 島崎弘幸 "LDLの酸化に対するビタミンEの抗酸化作用", ビタミンEの研究の進歩III, 共立出版
9. Gotoh, N. and Niki, E. "Measurement of superoxide reaction by chemiluminescence." Methods in Enzymology, in press

### 参考論文

10. Niki, E., Noguchi, N. and Gotoh, N. "Dynamics of lipid peroxidation and its inhibition by antioxidant." Biochem. Soc. Trans., 21, 313-317, 1993



