

化学発光法に基づく生体内活性酸素産生物質の解析

岸川直哉,* 黒田直敬

Chemiluminescence Assay for the Investigation of Reactive Oxygen Species Generator

Naoya Kishikawa* and Naotaka Kuroda

Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University; 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan.

(Received August 11, 2014)

Quinones play critical roles in biological systems, but are also regarded as a class of toxins that can cause oxidative stress in living cells, and the involvement of quinone-based reactive oxygen species in oxidative stress has been reported. In biological systems, quinones are reduced to semiquinone radicals by the enzyme NADPH:quinone reductase. Next, semiquinone radicals react with dissolved oxygen to form superoxide anion, which reacts with biological molecules to cause oxidative stress. On the other hand, chemiluminescence reagents such as luminol can emit chemiluminescence after oxidation by reactive oxygen species. Therefore, chemiluminescence reagents have been used widely to investigate reactive oxygen species. We have developed a sensitive and selective assay for quantifying quinones using luminol chemiluminescence. This chemiluminescence assay is based on the generation of reactive oxygen species through the redox reaction between quinone and dithiothreitol, a reductant, followed by detection of the generated reactive oxygen by luminol. Additionally, this assay can be used to quantify the toxic herbicide, paraquat, which produces reactive oxygen species in the same manner as quinones. This review describes the development of a sensitive and selective chemiluminescence assay for investigating quinones and paraquat by utilizing their ability to generate reactive oxygen species.

Key words—chemiluminescence; reactive oxygen species; quinone; paraquat; high-performance liquid chromatography (HPLC)

1. はじめに

化学発光は、化学反応から生じるエネルギーにより分子が励起状態へと遷移し、これが基底状態へと戻る過程において受け取ったエネルギーの一部を光として外部へと放出する現象である。化学発光を利用する分析法は、簡便な測定装置で高感度測定が可能であることから、様々な生体成分や医薬品の分析に利用されている。¹⁾ これまでに、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステル誘導体やシュウ酸エステル類を試薬として用いる化学発光反応が多数報告されているが、これらの化学発光試薬の多くは活性酸素との反応により発光を生じることから活性酸素に関する研究に広く用いられている。²⁾ 活性酸素は生体防御やシグナル伝達など重要な役割を果たしている一方で、過剰に発生した活性酸素は生体へと

様々な酸化ストレスもたらし、結果として種々の疾患の原因となることが知られている。活性酸素による酸化ストレスと疾患との関連性を明らかにするための分析ツールとして化学発光分析法は有用であり、例えば好中球から産生される活性酸素の測定³⁾ や疾患に伴う生体試料の活性酸素消去能の変動解析⁴⁾ といった研究に化学発光が利用されている。一方で、キノンやパラコートといったある種の化合物はそれ自身が強い酸化力を有していないにもかかわらず、生体へと酸化ストレスをもたらしことが知られている。これらの化合物は生体内で酸化還元サイクルを形成して、溶存酸素を活性酸素へと変換する性質を有することから酸化ストレスの原因物質となる。⁵⁾ キノンやパラコートのような活性酸素産生物質の体内濃度や挙動を解析することは、これらの生体影響を評価するためにも重要であり、そのための高感度かつ選択的な分析法が必要とされている。われわれはこれまでに、キノン及びパラコートを対象としてその活性酸素産生機構を利用する化学発光分析法の開発研究を行ってきた。本稿ではこれらの研

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14)

*e-mail: kishika@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第134年会シンポジウム S29 で発表した内容を中心に記述したものである。

究の概要について紹介する。

2. キノンの活性酸素産生能を利用する化学発光分析法

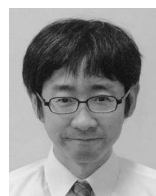
キノンは自然環境中に広範囲に見い出されている化合物であり、様々な興味深い性質を有している。⁶⁾ 多くの生物の体内での電子伝達反応にはユビキノンやピロロキノリンキノンといったキノンが関与することが知られており、植物の光合成に関与しているプラストキノンもキノン誘導体である。また、血液凝固や骨硬化に関与しているビタミンKはナフトキノン骨格を有する。これらの重要な機能を有する生体内在性キノン以外にも、産業上の用途のために製造・利用されているキノンも存在する。例えば、キノン構造を有する医薬品としてドキシソルピシンなどのアンスラサイクリン系抗腫瘍薬が臨床的に用いられているほか、⁷⁾ ある種のキノンは染料、漂白剤あるいは農薬として多方面で使用されている。しかしながら一方で、大気環境中に見い出されている9,10-フェナンスレンキノンを始めとする多環芳香族炭化水素キノンは生体へと種々の有害作用をもたらすとされており、大気汚染によって引き起こされる呼吸系疾患の原因物質の1つとして多環芳香族炭化水素キノンの関与が示唆されている。⁸⁾

2-1. キノンの酸化還元サイクルを利用するルミノール化学発光定量⁹⁾ 多環芳香族炭化水素キノンの有害作用の発現には、これらによる生体内での活性酸素の産生が関与している。生体内に取り込まれたキノンは nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) : キノンレダクターゼといった酵素の働きにより、不安定なセミキノンラジカルへと還元され、これが元のキノンへと再酸化される過程において、溶存酸素を活性酸素へと変換する (Fig. 1)。このキノンの酸化還元サイクル形成に伴う連続的な活性酸素の生成が、キノンによる酸化ストレスの原因となっている。そこでわれわれは、酸化還元サイクルにより産生される活性酸素をルミノールにより化学発光検出するという原理に基づくキノンのルミノール化学発光定量法の開発を行った。このとき、キノンの還元が安定に行えるように酵素に代えて化学的還元剤であるジチオスレイトール (dithiothreitol; DTT) を用いることにした。

9,10-フェナンスレンキノンとルミノール溶液を小試験管内で混合後に、還元剤として DTT を添加

することで長時間持続する強い発光が観察された。この発光は9,10-フェナンスレンキノンと DTT が共存するときのみ生じ (Fig. 2)、その発光強度と9,10-フェナンスレンキノン濃度との間には良好な直線関係が認められた。したがって、DTT の添加によりキノンの酸化還元サイクルが誘起されて活性酸素が生成することで発光が生じたと考えられた。大気環境中に見い出されている典型的な多環芳香族炭化水素キノンについて化学発光を測定し、その強度を比較した結果9,10-フェナンスレンキノン>1,2-ナフトキノン>1,4-ナフトキノン>9,10-アントラキノンの順に高い発光が観察された。この発光強度の大小は、報告されているキノンの活性酸素産生能の強さとよく一致しており、¹⁰⁾ したがって本法では強い活性酸素産生能を有するキノンほど強い発光を与えていると考えられた。

さらに、生体内で重要な機能を有するユビキノン、ビタミンK及びピロロキノリンキノンといったキノンも本反応により発光を示すことが確認され、これらのキノンの定量に応用可能であると考えられた。そこで、本反応を利用する製剤中ユビキノンの簡便かつ迅速な化学発光定量法の開発を行った。開発した方法は製剤をエタノールに溶解・希釈した試料溶液に、ルミノール及び DTT を添加することで生じる発光を測定する簡便な方法である。Table 1 に示すように本法による測定値は表示値及び日本薬局方収載の HPLC 法による測定値とよく一致しており、本化学発光法が十分な信頼性を有していることが確認された。本化学発光反応を利用するユビキノンの定量法は HPLC 法のように分離操作を伴わないため、試料中に活性酸素発生物質が共存している場合にその影響を受け易いという欠点を有するが、1検体あたり30秒と製剤中ユビキノンの含量を迅速に測定可能であり、HPLC法(1検体



岸川直哉

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科准教授。1976年福岡県生まれ。1998年長崎大学薬学部卒業、2000年長崎大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。2001年長崎大学薬学部助手。2006年同大学大学院医歯薬学総合研究科講師。2008年より現職。現在の研究テーマ：新たな蛍光・化学発光反応の開発とその生体・環境分析への応用。趣味は読書。

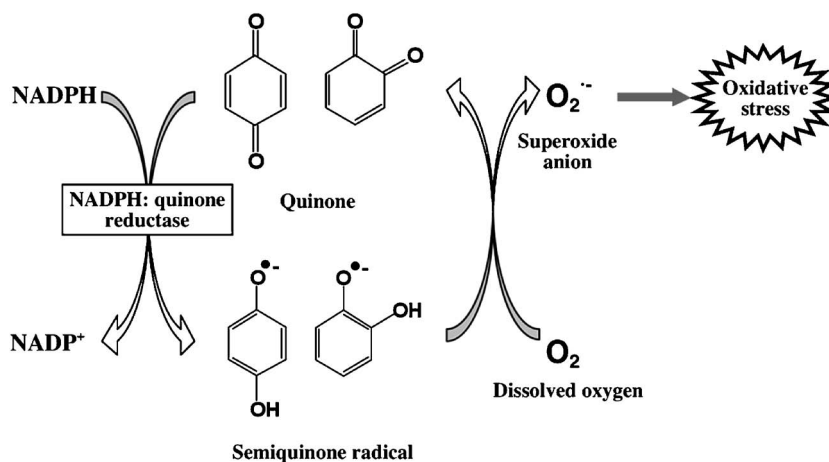


Fig. 1. Generation of Reactive Oxygen Species through the Redox Cycle of Quinone

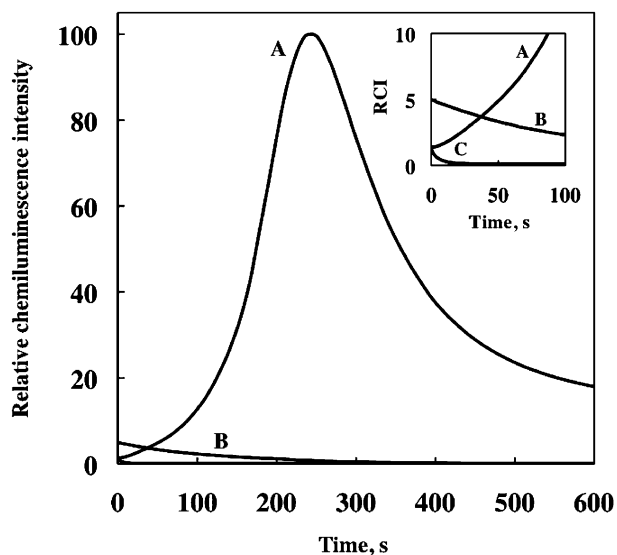


Fig. 2. Chemiluminescence Emission Obtained from a Mixture of (A) 9,10-Phenanthrenequinone, DTT and Luminol; (B) 9,10-Phenanthrenequinone and Luminol; (C) DTT and Luminol

Chemiluminescence was not observed at all in the absence of luminol. Inset: expanded view of chemiluminescence-time curves. RCI is an abbreviation of relative chemiluminescence intensity. Reprinted from Ref. 9) with permission from Springer Science+Business Media with modification.

あたり 10 分) と比較して極めて測定時間が短く、かつ有機溶媒の消費量も低減可能である。

2-2. HPLC 化学発光検出システムによる血漿中ユビキノンの定量¹¹⁾ 生体試料中に存在するキノンの高選択的定量を行うために、上記化学発光反応系を組み込んだ HPLC-化学発光検出システムを構築した。すなわち、カラムから溶出したユビキノンをルミノール及び DTT 溶液と HPLC のライン上で混合し、生じる発光を検出するシステムである

Table 1. Ubiquinone in Pharmaceutical Preparations

Formulation	Measured value, mg (mean \pm S.D., $n=5$)		Indicated value, mg
	Chemiluminescence method	HPLC-UV Method ^a	
Tablet ^b	9.9 \pm 0.6	10.0 \pm 0.3	10
Granules ^c	10.0 \pm 0.5	10.0 \pm 0.2	10

^a Japanese Pharmacopoeia XV. ^b 10 mg/tablet. ^c 10 mg/g.

(Fig. 3).

本システムをヒト血漿中のユビキノンの定量へと応用した結果、共存する生体成分の影響を受けることなく選択的にユビキノンを定量可能であった [Fig. 4(A)]. 一方で、同一の試料を HPLC-UV 検出法により測定したところ、ユビキノン以外にも多数のピークが検出され、また血漿中ユビキノンを定量するために十分な感度を有していなかった [Fig. 4(B)]. このことから、本化学発光法の優れた感度と選択性が実証された。

2-3. 化学発光法による生体内キノン付加体の解析¹²⁾ 高い反応性を有するキノンは、生体成分のアミノ基やチオール基と付加反応を起こし、結果として生体成分の機能傷害をもたらすとされている。そこで、上述の HPLC-化学発光検出システムを利用して、生体内で生成するキノンの付加体を解析する手法の開発を行った。本研究ではメナジオンをキノンのモデルとして選択し、生体内でのキノンの無毒化に関与すると考えられている *N*-アセチルシステイン (*N*-acetylcysteine; NAC) 及びグルタチオン (glutathione; GSH) のチオール基とメナジオンが

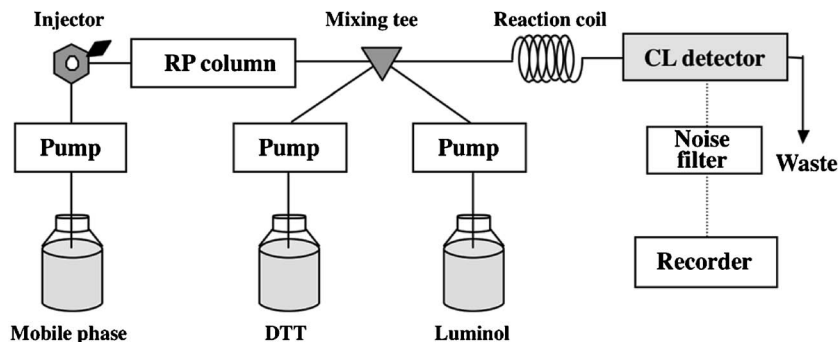


Fig. 3. Schematic Diagram of the HPLC-chemiluminescence System

Reprinted from Ref. 11) with permission from Springer Science+Business Media with modification.

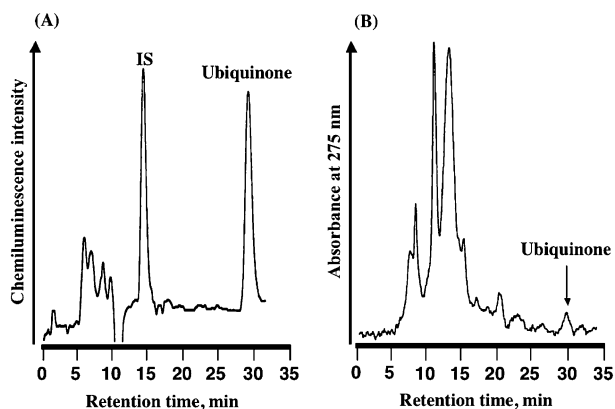


Fig. 4. Chromatograms of (A) Human Plasma Obtained with the Chemiluminescence Detection and (B) Human Plasma Obtained with UV Detection

Reprinted from Ref. 11) with permission from Springer Science+Business Media with modification.

付加反応を起こして生じる化合物 menadione-NAC 及び menadione-GSH を合成して標準物質として使用した (Fig. 5).

最初に、menadione-NAC 及び menadione-GSH について、ルミノール及び DTT と混合後の発光強度を測定した。その結果、強い発光が観察されたことから、menadione-NAC 及び menadione-GSH においても DTT によりセミキノラジカルへと還元された後で、溶存酸素を活性酸素へと変換していると考えられた。さらに、menadione-NAC 及び menadione-GSH の与える発光強度はメナジオンのそれと比較して高いという結果となり、メナジオンへの *N*-アセチルシステイン及びグルタチオンへの付加はメナジオンの活性酸素産生能を増強している可能性が示唆された。

次に、HPLC システムによりメナジオン及びその付加体の同時分析を行った。分離条件を検討した

結果、移動相にイオン対試薬として臭化テトラブチルアンモニウムを添加することでメナジオン-チオール付加体は逆相カラムへと保持され、menadione-NAC, menadione-GSH 及びメナジオンを分離定量することが可能となった。開発した HPLC 定量法を、メナジオン投与後のラット血清試料へと応用した。その結果、ラット血清より menadione-NAC 及び menadione-GSH のピークが検出され (Fig. 6)、投与されたメナジオンがラットの体内に存在する *N*-アセチルシステイン及びグルタチオンと反応することで menadione-NAC 及び menadione-GSH が生成したと考えられた。また、ラット血清より得られたクロマトグラムには menadione-NAC 及び menadione-GSH 以外にもメナジオン投与後に初めて検出されるピークの存在が見い出されており、これらが menadione-GSH 等と同様にメナジオンにより修飾された生体成分だと考えられた。本研究で開発した HPLC システムは生体内に存在するキノン付加体を選択的かつ一斉に測定することが可能であり、これら付加体の生成が生体に与える影響を調査するために有用である。

3. パラコートの活性酸素産生能を利用する化学発光分析法¹³⁾

パラコートは除草効果が高く環境残留性が低いことから、世界中で最も広く使われている農薬の 1 つである。しかしながら、他の農薬と比較しても急性毒性が強く効果的な治療薬が存在しないため、偶発的あるいは故意の服用による事故が頻発している。¹⁴⁾ パラコート中毒の効果的な治療を行うためには、服用した毒物を特定し、その服用量を推定することが重要である。パラコートの除草効果や毒性発現機構は、構造は異なるもののキノンと同様に酸化

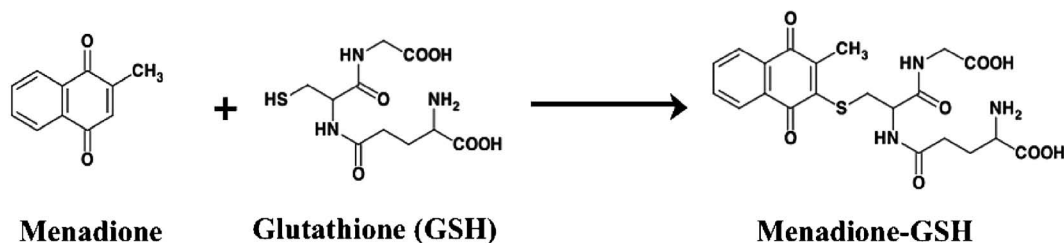


Fig. 5. Formation of Menadione Conjugate with Glutathione

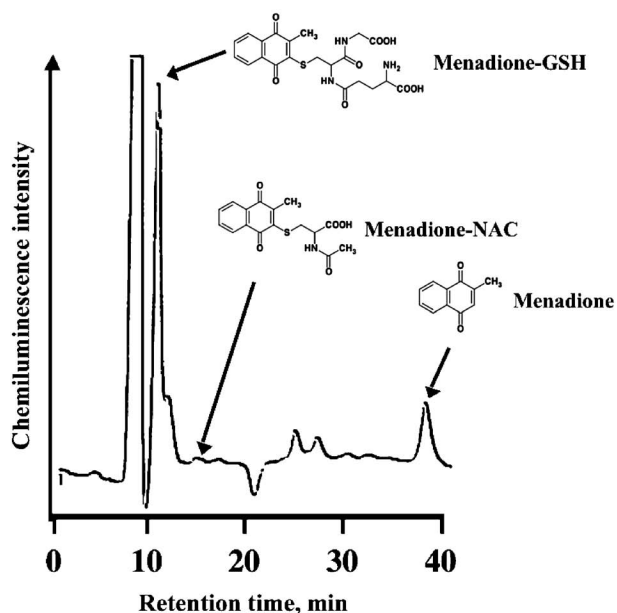


Fig. 6. Chromatogram of Rat Plasma following a Single-dose Administration of Menadione

Reprinted from Ref. 12) with permission from ACS publications with modification.

還元サイクルによる活性酸素産生に由来している。そこで、われわれは上述のキノンの測定原理をパラコートの測定へも応用できると考えた。すなわち、パラコートを DTT によりパラコートラジカルへと還元し、これがパラコートへと再酸化される過程で生じる活性酸素をルミノールにより化学発光検出する方法である (Fig. 7)。パラコートの毒性の強さと即効性を考慮すると、病院への搬送前に中毒事故現場でパラコートの測定を行うことが、治療に必要な情報を迅速に取得するために重要であると考えた。そこで、事故現場へと測定装置を持ち込んでのオンサイト分析が行えるよう携帯型ルミノメーターを用いる手法の開発を行った。

パラコートにルミノール及び DTT を添加して携帯型ルミノメーターで測定した結果、パラコートの濃度に応じて増強する発光が観察され、パラコート

の定量が可能であることが示された。また、様々な致死性の毒物について、ルミノール及び DTT 添加後の化学発光を測定することにより本法の選択性を評価した。その結果、パラコート及びその類縁化合物であるジクワット以外の毒物からは発光が観察されず (Fig. 8)、本化学発光測定法は中毒薬物の迅速な識別に有用であると考えられた。さらに、本法をコーラや果物ジュースといった飲料中のパラコートの測定に応用した。このとき、飲料に含まれる発光反応阻害成分とパラコートを分離するために陽イオン交換樹脂充填チップによるパラコートの抽出を行った。この操作により、良好な回収率で飲料中のパラコートを定量することができた。したがって、本法により事故現場での飲み残しに含まれるパラコートの定量を行うことで服用量の推定が可能となる。

4. おわりに

本研究により、キノンやパラコートといった生体内活性酸素産生物質の分析ツールとしてのルミノール化学発光の有用性を明らかにすることができた。本研究で開発した化学発光分析法は、活性酸素産生物質を高感度かつ選択的に定量できるほか、活性酸素産生能の評価にも応用可能であるという特徴を有している。したがってこれらの方法は、活性酸素産生物質の生体内動態解析や、生体や自然環境中の未知の活性酸素産生物質の探索といった広い範囲において有用な分析ツールとなり得ると考えている。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、有益な御助言と御支援を賜りました長崎国際大学薬学部中島憲一郎教授、九州保健福祉大学薬学部和田光弘教授に深く御礼申し上げます。また、本研究に御協力頂きました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科大山 要准教授及び長崎大学大学院医歯薬学総合研究科薬品分析化学研究室の皆様にご感謝申し上げます。本研究

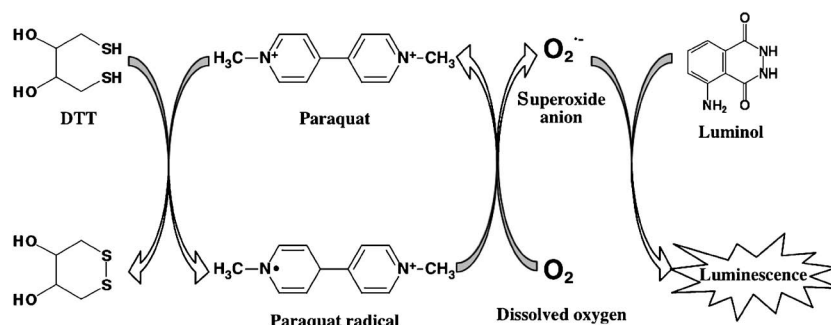


Fig. 7. Chemiluminescence Assay for Paraquat Based on Generation of Reactive Oxygen Species through the Redox Cycle of Paraquat

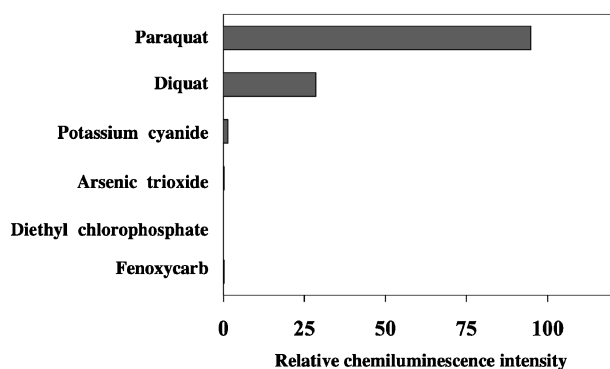


Fig. 8. Chemiluminescence Responses of Several Poisons after Mixing with Luminol and DTT

は JSPS 科研費 17790100 及び 22390116 並びに JST A-STEP FS ステージ探索タイプ AS231Z01964F の助成を受けて遂行されました。併せて感謝の意を表します。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Nakashima K., *Bunseki Kagaku*, **49**, 135–159 (2000).
- 2) Yamaguchi S., Kishikawa N., Ohyama K., Ohba Y., Kohno M., Masuda T., Takadate A., Nakashima K., Kuroda N., *Anal. Chim. Acta*, **665**, 74–78 (2010).
- 3) Mikami M., Takahashi I., Matsuzaka M., Danjo K., Yamai K., Inoue R., Iwane K., Umeda T., Nakaji S., *Luminescence*, **26**, 162–166 (2011).
- 4) Kishikawa N., Ohyama K., Yao J., Miyamoto A., Imazato T., Ueki Y., Nakashima K., Maehata E., Kuroda N., *Clin. Chim. Acta*, **411**, 1111–1115 (2010).
- 5) Motoyama Y., Bekki K., Sang W. C., Tang N., Kameda T., Toriba A., Taguchi K., Hayakawa K., *J. Health Sci.*, **55**, 845–850 (2009).
- 6) Kishikawa N., Kuroda N., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **87**, 261–270 (2014).
- 7) Ahmed S., Kishikawa N., Ohyama K., Wada M., Nakashima K., Kuroda N., *Talanta*, **78**, 94–100 (2009).
- 8) Kumagai Y., *J. Health Sci.*, **55**, 887–894 (2009).
- 9) Kishikawa N., Ohkubo N., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1337–1343 (2009).
- 10) Lemaire P., Livingstone D. R., *Comp. Biochem. Physiol.*, **117**, 131–139 (1997).
- 11) Kishikawa N., Ohkubo N., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 381–385 (2011).
- 12) Elgawish M. S., Shimomai C., Kishikawa N., Ohyama K., Wada M., Kuroda N., *Chem. Res. Toxicol.*, **26**, 1409–1417 (2013).
- 13) Kishikawa N., Higuchi S., Ohyama K., Nakashima K., Kuroda N., *Forensic Toxicol.*, **31**, 301–306 (2013).
- 14) Kudo K., Ishida T., Hikiji W., Usumoto Y., Umehara T., Nagamatsu K., Tsuji A., Ikeda N., *Forensic Toxicol.*, **28**, 25–32 (2010).