

新規紫外線障害防護剤の開発・評価

九州大学大学院薬学研究院

山 田 健 一

Lipid-derived radicals and peroxides are involved in the pathogenesis of oxidative stress diseases, although lipid peroxide production is a required reaction between a lipid radical and molecular oxygen, a useful lipid radical detection method has remained tentative. In this study, the focus was on nitroxide reactivity, which allows spin trapping with carbon-centered radicals via radical-radical reactions and fluorophore quenching through interactions with nitroxide's unpaired electron. Thus, the aim here was to demonstrate a useful detection method for lipid-derived radicals as well as to clarify the effects of ketoprofen induced skin damage using nitroxide. This compound reacted with lipid-derived radicals, resulting in fluorescence due to alkoxyamine formation, and lipid peroxide concentrations decreased in the reaction system. Furthermore, nitroxide inhibited lipid peroxide production and skin damage in mouse induced by ketoprofen addition and UV irradiation. These results suggested that the novel application of profluorescent nitroxide could directly and sensitively detect lipid-derived radicals and inhibited the skin damage.

1. 緒 言

紫外線は、フリーラジカルを産生し、皮膚のシミ・シワや、老化などを引き起こす原因のひとつである。オゾン層の破壊により、紫外線量の増大が進む現代、その防御は喫緊の課題である。紫外線により皮膚内で産生したフリーラジカルは、連鎖反応により、持続的な皮膚障害をもたらす。一方、ニトロキシド化合物 (>N-O 化合物) は、フリーラジカルと鋭敏に反応することから、抗酸化剤や、プラスチックの劣化防止剤として広く用いられている。この作用メカニズムは、ラジカル-ラジカル反応を介した連鎖反応の停止であり、このことは紫外線障害に対しても利用可能と考えられる。

一方、近年、蛍光法を用いた検出手法の開発が精力的に進められ、蛍光プローブは基礎研究に必要不可欠なツールとして高感度、かつリアルタイムな測定を可能としている。蛍光団は不対電子が存在すると電子移動やスピン交換により消光するために、蛍光をほとんど発しない (Fig.1A)。例えば蛍光団を分子内に持つニトロキシド化合物は、蛍光団を励起したときにニトロキシドと蛍光団との間で電子の移動が生じ、蛍光が観察されなくなる。しかしニトロキシドは、フリーラジカルとラジカル-ラジカル反応にて共有結合する。その結果、蛍光原子団が消光状態から開放され、炭素中心ラジカルの検出が可能になる。



Development and Evaluation of Protective Agent for UV Irradiation

Ken-ichi Yamada

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University

そこで本研究では、疾患の原因のひとつとされる脂質由来ラジカルの検出手法を開発した。さらに、ケトプロフェン由来ラジカル中間体の検出とその抑制による疾患の軽減効果を、光過敏症障害モデルを用いて検討した。

2. 実 験

2.1 蛍光ニトロキシドプローブおよび X-band ESR・蛍光測定

Dansyl Chloride をリード化合物として、TEMPO 系蛍光ニトロキシド化合物を合成した。ニトロキシドプローブ (100 μ M) をリノール酸 (800 μ M)、リポキシゲナーゼ (0.1 mg/ml) と混合し、経時的に ESR 測定を行った。また、蛍光光度計を用い、励起波長、蛍光波長及び蛍光強度を測定した。

2.2 LC/MS による反応生成物の解析

ニトロキシドプローブとリノール酸、リポキシゲナーゼを混合 10 分間後、2 倍量の冷アセトニトリルを加え、30 秒間ボルテックスにて混和した。10,000 g、4℃にて 5 分間遠心分離し、上清を測定した。また、加熱による変化を検討するために、反応後ヒートブロックを用いて 100℃で 5 分間加熱し、サンプルを作製した。検出器は UV (240 nm)、イオン化法は Positive 及び Negative モード、移動相は 0.05% ギ酸を含むアセトニトリル、流速は 0.2 ml/min とした。

2.3 ケトプロフェン水溶液中で生成されるフリーラジカルの検出

ケトプロフェンは 0.1 N NaOH に溶解し 0.1 M とし、0.1 M phosphate buffer (PB) containing 100 μ M DTPA を用いて希釈した。ケトプロフェンの光照射時に生成するラジカルの検出は、ケトプロフェン (3 mM)、スピント

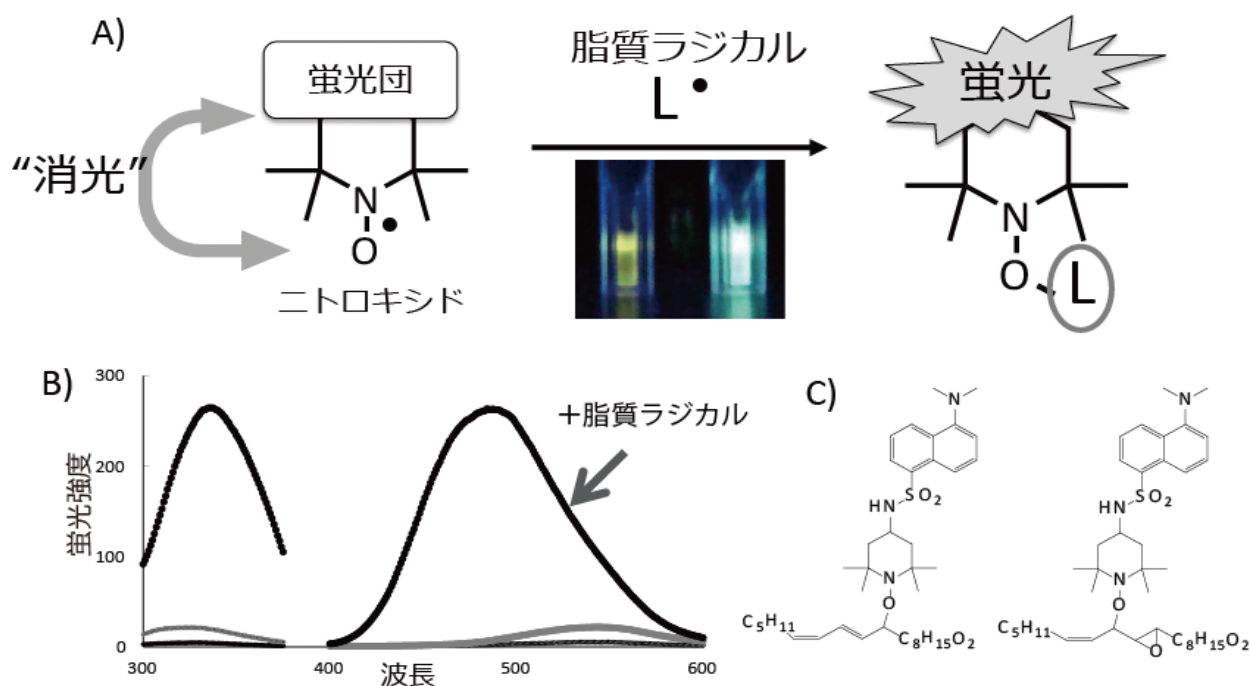


Fig. 1 蛍光ニトロキシドを用いた脂質ラジカルの検出

- A) ニトロキシドのラジカルの存在有無により蛍光の OFF-ON が制御可能。
 B) 蛍光ニトロキシドと脂質ラジカルとの反応後の蛍光強度変化。
 C) リノール酸由来ラジカルとの反応後の推定構造。

ラップ剤POBNあるいはニトロキシドを混合後、X-band ESR (JES-RE1X, JEOL) にて測定した。紫外線照射は超高圧水銀灯 (USHIO Optical Modulex, 250 W) を用いて、ESR キャビティー内を直接照射した。照射される光は、シャープカットフィルター (WG305, 駿河精機) を透過させ、305 nm 以下の短波長の光はカットした。

2.4 ケトプロフェン塗布および光照射

イソフルラン麻酔下でBALB/cマウスの背部の毛をバリカンで刈り、4% ケトプロフェン溶液を200 μ l 塗布した。ケトプロフェンを皮膚に浸透させるためにマウスを暗所で1時間放置した後に、紫外線照射を行った。紫外線照射にはブラックライト (TOSHIBA, FL15BLB, 最大波長352 nm) を三連にして使用した。ライトからの照射光は、3 mm 厚のガラスを通過させることにより、320 nm 以下の波長は除去した。紫外線照射量は約40 J/cm²とした。紫外線照射24時間後、マウスは安楽死させた後、背中皮膚を切除し液体窒素で急速凍結した後に以下の実験に使用した。

2.5 脂質過酸化物質測定 (TBARs)

過酸化脂質量の指標として、Ohkawa らの方法¹⁾ に従い TBARs 値を測定した。皮膚懸濁液0.2 ml に8.1% SDS 0.2 ml、20% acetic acid (pH3.5) 1.5 ml、0.8% 2-Thiobarbituric

acid 1.5 ml、蒸留水0.6 mlを添加し100℃の水浴中で60分間加熱した。加熱終了後、直ちに試験管を氷浴につけ反応溶液を冷却し、蒸留水1.0 ml、n-butanol/pyridine (15:1) 5.0 mlを加え攪拌後、2,000 rpmで25分間、遠心分離を行った。遠心分離後、その上清を532 nmにて吸光度を測定した。

2.6 タンパク質含量の測定

タンパク質含量はBio-Rad Protein Assay kitを用いBradford法により測定した。反応で生じた青色溶液の595 nmにおける吸光度を測定した。標準物質としてBovine Serum Albuminを用いた。

2.7 組織染色

紫外線照射24時間後にマウス背中皮膚を切除し、10%ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、H.E.染色を行った。

3. 結果、考察

3.1 炭素中心ラジカルの検出

蛍光ニトロキシドプローブと炭素中心ラジカルとの反応は、ラジカル消失および蛍光強度変化にて解析した。エマルジョン化させたリノール酸にDansyl-TEMPOを加え、リポキシゲナーゼ添加30秒後からESRならびに蛍光強度

を経時的に測定した。その結果Dansyl-TEMPOは、未反応の状態では蛍光をほとんど発しないのに対し、リポキシゲナーゼ添加後からESRシグナル強度が減衰し、蛍光強度は上昇した。未反応のプロープ、還元体ではEx325nm、Em545nmを示したのに対し、炭素中心ラジカルとの反応後Ex335nm、Em487nmへと波長がシフトした (Fig. 1B)。これは炭素中心ラジカルとの反応により蛍光原子団が疎水環境に置かれることで短波長シフトしたものと考えられる。シフト後の波長にて測定を行うことで、還元体等の影響を低減でき、より炭素中心ラジカルに特異的な解析が可能となる。さらに、LC/MS測定により炭素中心ラジカルとDansyl-TEMPOの反応産物を検出できたことから (Fig. 1C)、本手法が炭素中心ラジカルの測定に適していることがわかった。

リノール酸/リポキシゲナーゼ系では、リノール酸の11位のメチレンからプロトンが引き抜かれ、ペンタジエチルラジカルが生成する。その後、ラジカル連鎖反応により反応は進行し、最終的には13-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸 (13-HPODE) を主とするヒドロペルオキシド体を生成する。本測定では、リノール酸からプロトンが引き抜かれた炭素中心ラジカルあるいはエポキシ化されたラジカルをDansyl-TEMPOが捕捉し、付加生成物が形成されたと考えられる。一方で、炭素中心ラジカルは酸素とも反応し、13-HPODEや二量体、エポキシド体などの脂質過酸化生成物を生成する。炭素中心ラジカルが酸素と反応し、ペルオキシラジカルを生成する反応速度定数は非常に大きく、メチルラジカルでは $1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である²⁾。また、ニトロキシドと炭素中心ラジカルの反応速度定数は $7.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり³⁾、フルオレスカミン誘導体蛍光ニトロキシドでは $7.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ との報告²⁾がある。一方、ペルオキシラジカルとの反応における速度定数は $5.4 \times 10^5 \sim 5.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と上記と比較してその値は小さい³⁾。加えて、ニトロキシドはペルオキシラジカルや $\cdot\text{NO}_2$ および $\text{CO}_3\cdot$ とは安定なアダクトを形成せず、転位と脱離によりアルコキシルアミン体を生成し、捕捉したラジカルの構造を維持できない^{2,4,5)}。そのため、Dansyl-TEMPOはペルオキシラジカルとは反応しにくく、反応してもその安定性の問題から構造を特定、検出できなかったと考えられる。以上の結果より、ニトロキシドは炭素中心ラジカルを鋭敏に捕らえ安定化し、質量分析装置を用いることでその構造推定も可能であることが示された。

3.2 ケトプロフェンラジカル中間体の検出と光線過敏症に対するニトロキシドの抑制効果

ケトプロフェンはNSAIDsの一種であり、経皮製剤として関節炎や腰痛などの鎮痛、消炎に広く使用されている薬剤である。しかし、ケトプロフェン経皮製剤は効果が高い

反面、光増感剤として知られるベンゾフェノン骨格を有しており、副作用として光線過敏症が報告されている⁶⁾。これまでにケトプロフェン光分解経路には、中間体としてケトプロフェン由来のフリーラジカルが存在することが推測されている。実際に、フェニル酢酸⁷⁾や、ケトプロフェンと類似した構造を持つフェニルプロピオン酸誘導体のNSAIDsであるナプロキセン⁸⁾が光分解する過程でラジカル中間体が生成する。一方、ケトプロフェンにおいてもメタノール中でmethylviologenのような電子受容体が存在すると電子移動が起こること⁹⁾、ラジカルスカベンジャー (BHAやGSH) の添加によりケトプロフェン分解産物の生成速度が減少すること⁹⁾から、ラジカル中間体の存在が示唆されている。

そこで、ケトプロフェン光分解経路で生成する炭素中心ラジカルを検出することを目的とし、スピントラップ剤を用いてX-band ESR測定を行った。ケトプロフェン溶液にPOBNを加え1分間紫外線を照射したところ、スピニアダクトが検出され、シミュレーション解析の結果、2種類のラジカル由来のESRスペクトルであることがわかった。また、それぞれの超微細結合定数は、 $\alpha_N=15.39 \text{ G}$ 、 $\alpha_{\text{BH}}=1.957 \text{ G}$ (POBN-R₁, 72 %) および、 $\alpha_N=16.26 \text{ G}$ 、 $\alpha_{\text{BH}}=2.447 \text{ G}$ (POBN-R₂, 28 %) であった (data not shown)。

さらに、質量分析装置を用いて、ケトプロフェンラジカル中間体とニトロキシドあるいはスピントラップ剤が結合した安定化合物の構造推定を行った。その結果、2種類のケトプロフェンラジカル中間体が生成していることがわかった。さらにこの系にリノール酸を添加するとリノール酸由来脂質ラジカルが生成し、ニトロキシドと安定に結合することもわかった。一方ケトプロフェンを添加しない場合は、リノール酸由来ラジカルは検出できなかった。以上の結果より、光照射によりケトプロフェンラジカル中間体が生成し、脂質分子と反応し脂質ラジカルが生じることがわかった。

そこで、実際にケトプロフェン塗布、紫外線照射によりマウス背中皮膚で過酸化脂質量が増加するか否かについて、紫外線照射24時間後における皮膚内TBARs値を測定した。その結果、ケトプロフェン塗布・紫外線照射処置群においてのみ、皮膚内TBARs値は有意に亢進した。脂質過酸化反応は、活性酸素種やフリーラジカルが不飽和脂肪酸から水素を引き抜くことで開始され、その後連鎖的に反応が進行する。紫外線照射のみを長時間行くと、マウス皮膚内の過酸化脂質量が増加するとされているが、本条件ではTBARs値は上昇しなかった。そこで、炭素中心ラジカルと反応するニトロキシドおよびスピントラップ剤の皮膚内過酸化脂質量に与える影響について検討した。その結果、紫外線照射24時間後における皮膚内TBARs値は有意

に抑制された (Fig. 2)。一方、ヒドロキシルラジカルスカベンジャーは、亢進したTBARs値を抑制しなかった (data not shown)。

紫外線照射24時間後にマウスの背中皮膚を切除し組織染色を行った結果、ケトプロフェン塗布・紫外線照射群で、角質層の不全角化、表皮の肥厚、細胞間浮腫、液状変性、さらに表皮内でアポトーシス細胞が認められた (Fig. 3)。また、紫外線照射を行っていない群では、これらの所見は確認されなかった。紫外線照射 vehicle 塗布群において一部、軽度の不全角化や表皮肥厚が生じており、紫外線照射単独でも障害を受けている可能性がある。実際に、高い障害性を有するUVBだけではなく、UVAでも大量に照

射されると、紅斑、浮腫、サンバーン細胞の生成などを起こすことが報告されている。しかしながら、前述したように本研究の実験条件では、vehicle群に紫外線を照射しても皮膚内の脂質過酸化反応亢進、浮腫形成は起こらなかった。さらに、ニトロキシドあるいはスピントラップ剤をケトプロフェンと同時に塗布し紫外線照射すると、照射24時間後の皮膚障害は有意に抑制された。

以上の結果から、ケトプロフェン塗布マウスに紫外線を照射するとケトプロフェンの光増感作用による皮膚障害が誘発されること、この酸化障害発現は皮膚内で生成されるフリーラジカル、特にケトプロフェン由来のアルキルラジカルや脂質ラジカルが関与することが明らかとなった。さらにニトロキシドやスピントラップ剤がケトプロフェン光増感作用による皮膚障害を抑制したことから、光線過敏症を抑制あるいは軽減するのに有用であることが示唆された。

4. 総 括

本研究では、蛍光ニトロキシドプローブが炭素中心ラジカルと反応することで、蛍光のOFF/ONを制御できることを示した。同時にプローブとの反応生成物の同定を行うことで、炭素中心ラジカルなどの反応中間体の検出が可能であることを示した。一方で、ケトプロフェン紫外線照射時に、ケトプロフェンラジカル中間体が生成し、その後脂質ラジカルを産生することを見出し、またこれらラジカル体の構造推定にも成功した。さらにケトプロフェンをマウスに塗布すると、脂質過酸化、ならびに組織障害が亢進するが、これをニトロキシドの添加により有意に抑制するこ

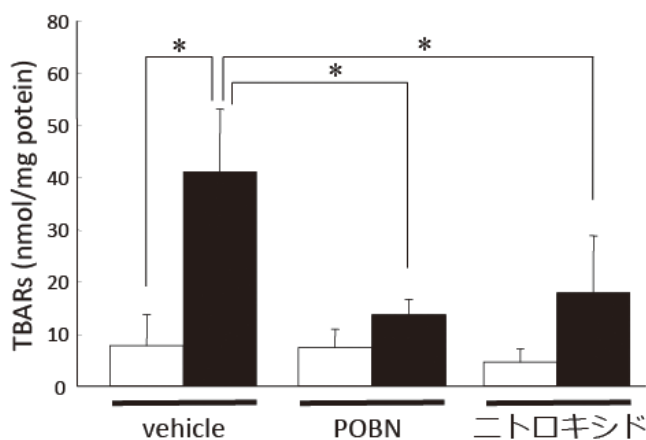


Fig. 2 ケトプロフェン塗布マウス背部での脂質過酸化測定
光照射により有意に脂質過酸化量が亢進し、POBN やニトロキシドの塗布により抑制された。

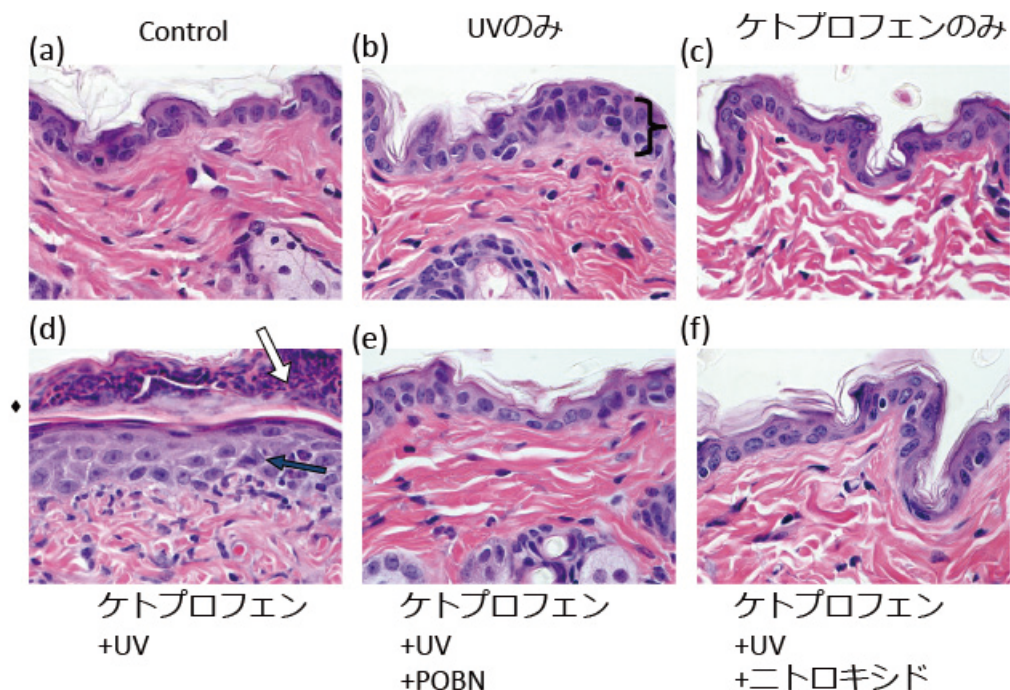


Fig. 3 ケトプロフェン塗布マウス背部での組織染色画像

とを示した。以上の結果より、ニトロキシドを用いることで皮膚疾患に関わるラジカル中間体を安定に検出でき、またラジカル中間体による連鎖反応を抑制し、その後の皮膚障害を軽減できることを見出した。今後、プローブの最適化を行うことで、皮膚疾患に関与する炭素中心ラジカルの検出およびラジカル連鎖反応抑制剤として、新たな化合物が見出せるものと期待している。

謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助頂きましたことを深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358, 1979.
- 2) Herbelin SE, Blough NV, : Intramolecular quenching of excited singlet states in a series of fluorescamine-derivatized nitroxides. *J Phys Chem B*, 102(42), 8170-8176, 1998.
- 3) Goldstein S, Samuni A, : Kinetics and mechanism of peroxy radical reactions with nitroxides. *J Phys Chem A*, 111(6), 1066-1072, 2007.
- 4) Goldstein S, et al., : Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals. *J Phys Chem A*, 110(10), 3679-3685, 2006.
- 5) Goldstein S, Samuni A, Russo A, : Reaction of cyclic nitroxides with nitrogen dioxide: the intermediacy of the oxoammonium cations. *J Am Chem Soc*, 125(27), 8364-8370, 2003.
- 6) Bosca F, Miranda MA, : Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore. *J Photochem Photobiol B*, 43(1), 1-26, 1998.
- 7) Epling GA, Lopes A, : Fragmentation Pathways in Photolysis of Phenylacetic Acid. *J Am Chem Soc*, 99(8), 2700-2704, 1977.
- 8) Moore DE, Chappuis PP, : A Comparative-Study of the Photochemistry of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, Naproxen, Benoxaprofen and Indomethacin. *Photochem Photobiol*, 47(2), 173-180, 1988.
- 9) Costanzo LL, De Guidi G, Condorelli G, Cambria A, Fama M, : Molecular mechanism of drug photosensitization-II. Photohemolysis sensitized by ketoprofen. *Photochem Photobiol*, 50(3), 359-65, 1989.