

健康に関する科学研究

H-3. (3) SOD様効果の新評価法

神奈川大学 理学部 天野 力、大石不二夫、西本右子

標記のモデルとしては、ヒドロキシルラジカル (OH) の濃度をスピントラップ試薬を用いて ESR 信号強度から求める方法が適当であろう。活性酸素種の 1 つとしてのヒドロキシルラジカルは寿命が短いため、通常の ESR 測定では信号を与えない。そこで、スピントラップ試薬との反応により寿命の長い準安定ラジカルに変換して測定する。溶液内に存在するヒドロキシルラジカルはスピントラッピング試薬に速やかに結合して、寿命の長い付加体ラジカルになり通常の ESR で測定できるようになる。そこに抗酸化物質 (SOD) が共存すると、それはスピントラップ試薬と競合してヒドロキシルラジカルと反応する。もし抗酸化物質とヒドロキシルラジカルとの反応でラジカルが生じないか、または生じたラジカルが ESR 信号を与えなければ、結果として付加体ラジカルは ESR 信号強度は減少する。この減少の割合は物質の抗酸化能の 1 つの表現である。抗酸化能が高い物質は付加体ラジカルは ESR 信号強度の大巾な減少を引き起こす。

この直感的な抗酸化能の定義を定量的に検討しよう。ヒドロキシルラジカルは過酸化水素の銅錯体触媒による分解 (Fenton 反応) や紫外線照射による分解により得られる。いずれの反応も極めて速いので、スピントラップ試薬や抗酸化物質との反応開始時 ($t=0$) に既に一定濃度で存在すると仮定する。スピントラップ試薬としては DMPO を仮定する。実験は次の 2 段階で行われる。

(1) 初めに抗酸化物質が加えられていない場合を考える。ヒドロキシルラジカルと DMPO との単純な 2 体反応を仮定する。反応式は



ここで付加体ラジカルを DMPO-OH と表した。それは ESR 信号を与え、その強度から DMPO-OH の濃度、あるいは OH の濃度が求められる。反応速度式は

$$\frac{d[\text{DMPO-OH}]}{dt} = k_1[\text{OH}][\text{DMPO}]$$

反応開始時 ($t=0$) において、 $[\text{OH}] = a \text{ mol/l}$ 、 $[\text{DMPO}] = b \text{ mol/l}$ であるとし、ある時点での $[\text{DMPO-OH}] = x \text{ mol/l}$ とすると

$$\frac{dx}{dt} = k_1(a-x)(b-x)$$

この方程式は解けて、 x が時間の関数として得られる。しかし、ここでは十分長い時間がたち、反応が完結した状態での x が知れば十分である。 $x = a$ または $x = b$ となることは自明であろう (a と b のうち、小さい方の式が成り立つ)。ヒドロキシルラジカル濃度を求めるには $a \leq b$ (実験条件 1) でなければならない。

(2) 抗酸化物質 (仮に SOD と標記) が共存する場合は、ヒドロキシルラジカルに対して競

合的に反応して、反応式は



ここで OH と SOD の反応物を仮に SOD-OH と表したが、必ずしも付加体である必要はない。

反応速度式は

$$\frac{d[\text{DMPO-OH}]}{dt} = k_1[\text{OH}][\text{DMPO}]$$

$$\frac{d[\text{SOD-OH}]}{dt} = k_2[\text{OH}][\text{SOD}]$$

(1) と同様に反応開始時 ($t=0$) において、 $[\text{OH}] = a \text{ mol/l}$ 、 $[\text{DMPO}] = b \text{ mol/l}$ 、 $[\text{SOD}] = c \text{ mol/l}$ とし、ある時刻における $[\text{DMPO-OH}] = x \text{ mol/l}$ 、 $[\text{SOD-OH}] = y \text{ mol/l}$ すると

$$\frac{dx}{dt} = k_1(a-x-y)(b-x)$$

$$\frac{dy}{dt} = k_2(a-x-y)(c-y)$$

この方程式を解かなくても、十分長い時間がたった時の x と y の関係が知ればよい。上式からこの式から速度定数の比が求められる。

$$\frac{1}{k_1(b-x)} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{k_2(c-y)} \frac{dy}{dt}$$
$$\frac{k_2}{k_1} = \frac{\ln(1-\frac{y}{c})}{\ln(1-\frac{x}{b})} = \frac{\ln(1-\frac{a-x}{c})}{\ln(1-\frac{x}{b})}$$

実験 (1) から a を (2) から b 、 c 、 x を求めれば、この式を用いて反応速度定数の比が求められる。

抗酸化能という直感的には有用な量が化学反応速度の比として表現されたわけである。もちろん比の値が大きいほど抗酸化能は高いということになる。速度定数は反応温度の関数であるので、特に生体系への応用では温度依存性を検討する必要があるだろう。 k_1 の値はヒドロキシルラジカルとエタノールの反応の速度を基準にして求められていて、 $k_1 = 2.1 \times 10^9 \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ または $3.4 \times 10^9 \text{ l}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ とされている⁽¹⁾。

参考文献

- (1) E. Finkelstein, G. N. Rosen, and E. J. Rauchman, J. Am. Chem. Soc., 102, 4994-4999 (1980).