—Regular Articles—

アロキサンとアスコルビン酸の反応系におけるアロキサンラジカル誘導活性酸素生成

加藤三佳,* 桜井光一, 藤本幸男

Alloxan Radical-Induced Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction System of Alloxan with Ascorbate

Mika KATOH,* Koichi SAKURAI, and Yukio FUJIMOTO
Department of Biochemistry, Hokkaido College of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, Hokkaido 047-0264, Japan

(Received March 8, 2002; Accepted July 11, 2002)

The diabetogenic action of alloxan is thought to be initiated by generation of reactive oxygen species (ROS). Ascorbate can be an antioxidant in a predominantly aqueous environment, such as plasma and extracellular fluids. We have investigated the generation of ROS in the interaction of alloxan with ascorbate. Rapid oxygen consumption was observed in the reaction system of alloxan with ascorbate. The oxygen consumption was suppressed by superoxide dismutase and catalase, suggesting that superoxide and hydrogen peroxide could be generated in the reaction system. In addition, the generation of alloxan radical, an electron reductance of alloxan, and ascorbate free radical (AFR), an electron oxidant of ascorbate, was observed using electron spin resonance (ESR). Under anaerobic conditions, the ESR signal intensity of alloxan radical was significantly increased in comparison with that under aerobic conditions, whereas the intensity of AFR was significantly decreased. These results suggest that alloxan radical and AFR were generated in the reaction system of alloxan with ascorbate, and that the alloxan radical but not AFR reacted with molecular oxygen, resulting in the generation of ROS.

Key words——alloxan; alloxan radical; ascorbate; reactive oxygen species; ESR

緒　論

近年，糖尿病や自己免疫疾患など多くの疾病や老化現象の原因に活性酸素の関与が示唆されている.[1—4] 反応性の高い活性酸素は，生体成分である脂質，タンパク質，核酸などに非特異的に作用し，生体に障害を与える.[5] 膵臓ランゲルハンス氏（ラ氏）島細胞は，スーパーオキサイドジスムターゼ（SOD）やカタラーゼなど抗酸化酵素の活性が他の細胞に比べて低いことから,[6,7] 糖尿病発症において，この活性酸素に対する高い感受性が関与する可能性が推察される.

アロキサンは，活性酸素生成を介して，膵臓ラ氏島 β 細胞を選択的に障害し，糖尿病を誘発する.[8—10] アロキサンは穏やかな酸化剤であり，還元型グルタチオン（GSH）やチオレドキシンなどの生体内還元物質により容易に還元され，アロキサンラジカルやジアルル酸となる.[11,12] 著者らは先に，GSH の存在下，アロキサンがアロキサンラジカルに還元され，このアロキサンラジカルの自動酸化に伴って分子状酸素（O_2）が一電子還元され，スーパーオキサイドラジカル（$O_2^{\cdot -}$）が生成することを報告した.[13] 生体内におけるアロキサンの還元に，チオレドキシン—チオレドキシンリダクターゼ系やチトクローム P-450 リダクターゼ系などが関与することが示唆されているが,[14,15] 還元機構の詳細は明らかではない.

アスコルビン酸は $O_2^{\cdot -}$，過酸化水素（H_2O_2），ヒドロキシルラジカル，一重項酸素のようなフリーラジカルと反応し，アスコルビン酸ラジカル（ascorbate free radical: AFR）になる.[16—18] AFR は他の物質との反応性が比較的低く，AFR 自身又はフリーラジカルと反応し，フリーラジカルのプロパゲーション反応を終結させる.[18] また，アスコルビン酸は，α—トコフェロールのフェノキシルラジカルと反応

北海道薬科大学生化学研究室
e-mail: katomika@hokuyakudai.ac.jp

し，α—トコフェロールを再生することにより，生体のアンチオキシダント効果を増強させることが示されている.[19—21] これらの反応によって，アスコルビン酸は活性酸素による障害から生体を防御している．一方，Fe^{3+} 又は Cu^{2+} の存在下，アスコルビン酸はプロオキシダント作用を示す.[22—25] これらの知見から，アスコルビン酸が活性酸素が関与する生体障害に対して，2 つの対照的な特徴を有することが示唆される.

アスコルビン酸の二電子酸化物であるデヒドロアスコルビン酸（DHA）の多量投与は，ラットに糖尿病を誘発する.[26,27] この DHA はアロキサンと類似のトリケトン構造を持つ.[28] O_2^- 生成に関与するアロキサンラジカルは，アロキサンの連続する 3 個のケトン基の中央のケトン基の一電子還元により生成する．DHA も同様に，ケトン基の一電子還元により AFR を生成することから，生体内におけるアスコルビン酸の酸化還元反応が糖尿病の誘発に関与している可能性が考えられる.

酸化剤アロキサンと還元剤アスコルビン酸の反応により，アロキサンラジカルが生成する.[29] すなわち，アロキサンとアスコルビン酸が共存した（アロキサン—アスコルビン酸反応系）場合，以下に示す 4 つの反応が惹起される可能性がある．(1)生成するアロキサンラジカルにより O_2^- 生成が惹起される．(2)アスコルビン酸が，反応系で生成した O_2^- を直接消去する．(3)アスコルビン酸がアロキサンラジカルと反応し，アロキサンラジカルの自動酸化を阻害することによって O_2^- の生成を阻害する．(4)アスコルビン酸，AFR そして DHA の酸化還元反応により，O_2^- 生成が促進する．本研究で著者らは，アロキサン—アスコルビン酸反応系における活性酸素の生成，及びアロキサンラジカルと AFR の生成について検討した．その結果，反応系において迅速な酸素消費が惹起されること，アロキサンラジカルと AFR が共存すること，生成するアロキサンラジカルが活性酸素生成に関与することを明らかにした．以上のことから，アスコルビン酸はアロキサンによる活性酸素生成を間接的に促進することが示唆された.

実 験 の 部

1. 試薬 アロキサンは東京化成工業株式会社（東京）より，アスコルビン酸はキシダ化学株式会社（大阪）より，GSH は和光純薬工業株式会社（大阪）より，エチレンジアミン四酢酸ナトリウム—第二鉄（EDTA–Fe^{3+}）は関東化学株式会社（東京）より，Cu/Zn–SOD（from Erythrocytes）とカタラーゼ（from Bovine Liver）は Sigma Chemical Co.（St. Louis, MO, USA）より購入した．その他の試薬は，市販特級品を使用した.

2. 実験手順

2-1. アロキサン—アスコルビン酸反応系 アロキサン及びアスコルビン酸を，あらかじめアルゴンガスで置換した 0.15 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液（pH7.4）(PBS）に溶解した．さらに約 5 分間アルゴンガスで置換し，実験に用いるまで氷冷保存した．すべての実験に用いた PBS 溶液の調製には，ミリ–Q 純水装置 academic A10（日本ミリポア・リミテッド）によって精製した超純水を用いた.

2-2. 酸素消費の測定 アロキサン—アスコルビン酸反応系における酸素消費は，アスコルビン酸を PBS 溶液（最終容量 3 ml）に添加し，37℃ で平衡化した後，アロキサンを添加して惹起した．溶液中の溶存酸素量は，Clark 型酸素電極を装備したポーラログラフィー（Yellow Springs Instrument Co., Inc., model 5300, USA）を用いて測定し，アロキサン添加後 1 分間に消費された溶存酸素量を酸素消費の初速度(μM O_2/min）とした．酸素消費に対する抗酸化酵素添加の影響を調べるため，あらかじめ SOD（1000 U/ml)，カタラーゼ（2000 U/ml)，又は両方を添加し平衡化した後，実験を行った．実験におけるアロキサンとアスコルビン酸の濃度は，表の脚注に示した.

2-3. 電子スピン共鳴装置（ESR）によるラジカルの測定 アロキサンとアスコルビン酸，アロキサンと GSH 又はアスコルビン酸と EDTA–Fe^{3+} を PBS 溶液に添加し，37℃ で 1 分間インキュベーションした後，反応系で生成するラジカルを，偏平石英セルを用い，JES–RE1X 電子スピン共鳴装置（日本電子，東京）で測定した．ESR 測定条件は以下のとおりである：magnetic field 336.7 mT, microwave power 1 mW, microwave frequency 9.450 GHz, time constant 0.3 sec, gain 2000 及び sweep time 0.5 mT/min．アロキサン—アスコルビン酸反応系において，アロキサンラジカルを測定するため，field

modulation width を 0.025 mT, AFR を測定するため，0.063 mT に設定した．アロキサンラジカルと AFR の同時測定は，sweep time 1 mT/min, field modulation width 0.025 mT に設定した．GSH によるアロキサンの還元により生成するアロキサンラジカルは，gain 1000, field modulation width 0.032 mT に設定して測定した．アスコルビン酸と EDTA-Fe^{3+} の反応により生成する AFR は，gain 1000, field modulation width 0.040 mT に設定して測定した．嫌気的実験は，あらかじめ約 30 分間アルゴンガスで置換した PBS 溶液を用いて行った．実験における各々の試薬の濃度は，図の脚注に示した．アロキサンラジカル及び AFR の測定において，g 値は酸化マンガンマーカーを内部標準として用いて求めた．また，ESR シグナル強度は，測定したいずれのラジカルも顕著な誘電損失が認められないため補正を行わなかった．

結　果

1. アロキサン—アスコルビン酸反応系における酸素消費　アロキサンによる酸素消費に対するアスコルビン酸の影響について検討した．Figure 1 に示すように，アスコルビン酸存在下，アロキサンを添加すると直ちに酸素消費が惹起された（line c）．しかしながら，アロキサン又はアスコルビン酸のいずれかを添加した場合，酸素消費はほとんど観察されなかった（lines a and b）.

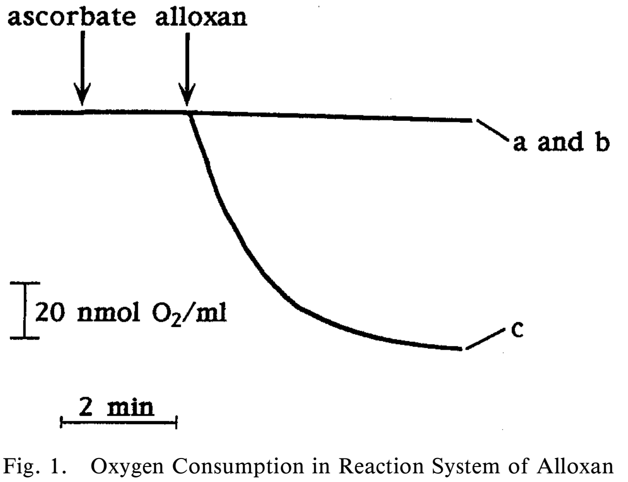

Fig. 1. Oxygen Consumption in Reaction System of Alloxan with Ascorbate

Experiments were carried out as described in "Experimental Procedure". The concentrations of alloxan and ascorbate were 0.5 mM. Alloxan and ascorbate were added at times as indicated arrows. Line a, alloxan alone; line b, ascorbate alone; line c, alloxan and ascorbate. Typical results on an experiment are shown, and similar results were obtained in above 12 experiments.

Figure 2 には，反応系において誘導される酸素消費に対するアロキサン及びアスコルビン酸濃度の影響を示した．一定量のアスコルビン酸（0.5 mM）存在下，種々濃度のアロキサンを添加すると，アロキサン濃度に依存して酸素消費の初速度の増加が引き起こされた（Fig. 2A）．種々濃度のアスコルビン酸存在下，一定量のアロキサン（0.5 mM）を添加した場合もまた，アスコルビン酸濃度に依存して酸素消費の初速度の増加が引き起こされた（Fig. 2B）．これらの結果から，アロキサン—アスコルビン酸反応系における酸素消費は，両化合物の相互作用により惹起されることが示唆された．

Table 1 には反応系において誘導される酸素消費に対する抗酸化酵素の影響を示した．SOD 又はカタラーゼの添加は，酸素消費の初速度を有意に低下させた．SOD とカタラーゼを同時に添加した場

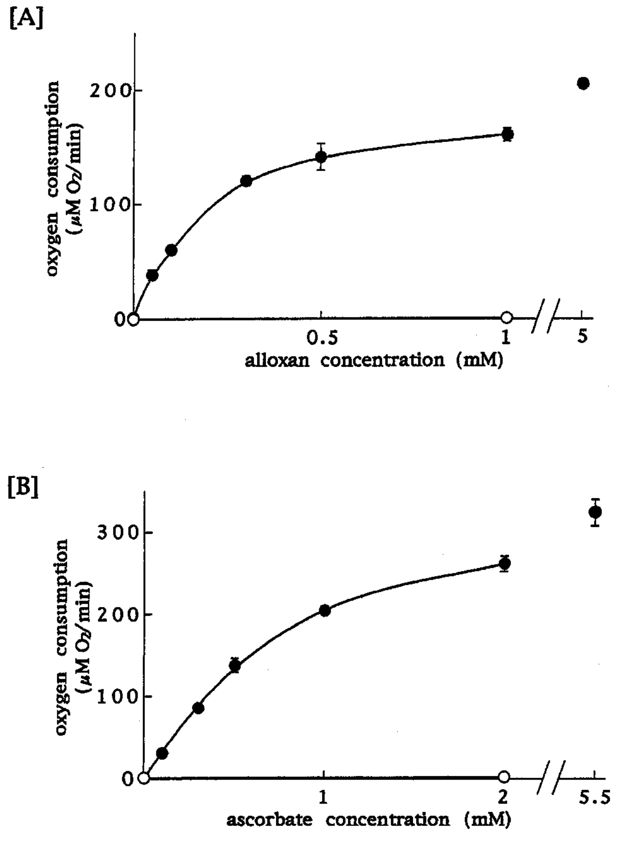

Fig. 2. Dependence of Oxygen Consumption on Alloxan and Ascorbate Concentrations

Experiments were carried out as described in "Experimental Procedure". A: Various concentrations of alloxan were incubated without (○) or with (●) 0.5 mM ascorbate. B: Various concentrations of ascorbate were incubated without (○) or with (●) 0.5 mM alloxan. Each datum is the mean ±S.E. of three experiments.

Table 1. Effect of SOD and/or Catalase on Oxygen Consumption in Reaction System of Alloxan with Ascorbate

Additions	Percentage of control
Control	100±3.9
＋SOD (1000 U/ml)	87.7±1.6*
＋catalase (2000 U/ml)	73.3±1.2*
＋SOD (1000 U/ml) and catalase (2000 U/ml)	53.4±1.3*
＋heat-denatured SOD	106.4±3.1
＋heat-denatured catalase	100.0±6.6
＋heat-denatured SOD and heat-denatured catalase	106.4±4.2

The reaction system consisted of 0.5 mM alloxan and 0.5 mM ascorbate. SOD and/or catalase were included from the beginning of the incubation. Other conditions were the same as described in "Experimental Procedure." Each datum is the mean±S.E. of 3 to 7 experiments. * $p<0.01$ compared with control.

合，酸素消費の初速度は著しく抑制され，熱変性させた酵素を用いた場合，酸素消費の初速度に対する影響は観測されなかった．これらの結果から反応系において $O_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 が生成する可能性が示唆された．

2. アロキサンラジカルと AFR の生成 アロキサンとアスコルビン酸は，それぞれ酸化還元反応の過程でアロキサンラジカルと AFR になる．本研究では，アロキサン―アスコルビン酸反応系におけるアロキサンラジカル及び AFR の生成について ESR を用いて検討した．Figure 3A-1 及び 2 に示すように，好気的及び嫌気的条件下，アロキサンと GSH の反応により相対強度比 1：4：8：10：8：4：1 の 7 本のピークからなる ESR シグナルが観測され，その g 値は 2.0052 を示した．このシグナルは，カップリング定数 $a^N = a^H = 0.045$ mT の A-3 に示したアロキサンラジカルのシミュレーションと一致した．[13] なお，嫌気的条件下，生成したアロキサンラジカルのシグナル強度は好気的条件下と比較して有意に大きかった．Figure 3B-1 及び 2 には，好気的及び嫌気的条件下，アスコルビン酸と EDTA-Fe^{3+} の反応によって得られた ESR シグナルを示した．このシグナルはほぼ同じ強度を示す 2 本のピークからなり，その g 値は 2.0054 を示した．このシグナルはカップリング定数 $a^H = 0.186$ mT の B-3 に示した AFR のシミュレーションと一致した．[30,31] 嫌気的条件下，生成した AFR のシグナルの強度は好気的条件下と比較して有意に小さかった．Figure 3C-1 に示すように，嫌気的条件下，アロキサン―アスコルビン酸反応系においてアロキサンラジカルとは異なる不規則な 7 本のピークからなる ESR シグナルが観測された．C-2 に示すように，好気的条件下，嫌気的条件において観測された ESR シグナルと異なる AFR に類似した 2 本のピークからなる ESR シグナルが観測された．C-3 に示すアロキサンラジカルと AFR の合成シミュレーションは，C-1 に示した ESR シグナルと一致し，嫌気的条件下，反応系においてアロキサンラジカルと AFR の 2 つのラジカルが共存することが示された．しかしながら，好気的条件下，観測されたラジカル（C-2）は，シュミレーション（C-3）と一致しなかったことから，反応系中に存在する O_2 が，反応系で生成するアロキサンラジカル又は AFR と反応することが示唆された．なお，アロキサンラジカルの左から 3 番目の ESR シグナルピーク（Fig. 3A, closed arrow）は，AFR シグナルとオーバーラップしないことから，このピークの高さを反応系で生成するアロキサンラジカルの指標とした．また，アロキサンラジカルの ESR シグナルとオーバーラップしない AFR の左側の ESR シグナルピークの変曲点まで (Fig. 3B, open arrow) を AFR 生成の指標とした．

Figure 4 には，アロキサン―アスコルビン酸反応系におけるアロキサンラジカル生成に対するアロキサン及びアスコルビン酸濃度の影響を示した．好気的及び嫌気的条件下，一定量のアスコルビン酸（0.5 mM）に種々濃度のアロキサンを添加すると，アロキサン濃度に依存してアロキサンラジカルのシグナル強度が増加した．嫌気的条件下に観測されたアロキサンラジカルのシグナル強度は，いずれのアロキサン濃度においても好気的条件下と比較して有意に大きかった（Fig. 4A）．種々濃度のアスコルビン酸存在下，一定量のアロキサン（0.5 mM）を添加するとアスコルビン酸濃度に依存してアロキサンラジカルのシグナル強度が増加した（Fig. 4B）．しかしながら，添加したアスコルビン酸濃度が 4.5 mM 以上の場合，アロキサンラジカルのシグナル強度は有意に減少した．嫌気的条件下も類似した結果が得られ，3 mM 以上のアスコルビン酸を添加した場合，アロキサンラジカルのシグナル強度は減少した．これらの結果から，過剰に存在するアスコルビン酸がアロキサンラジカルと反応する可能性が示唆

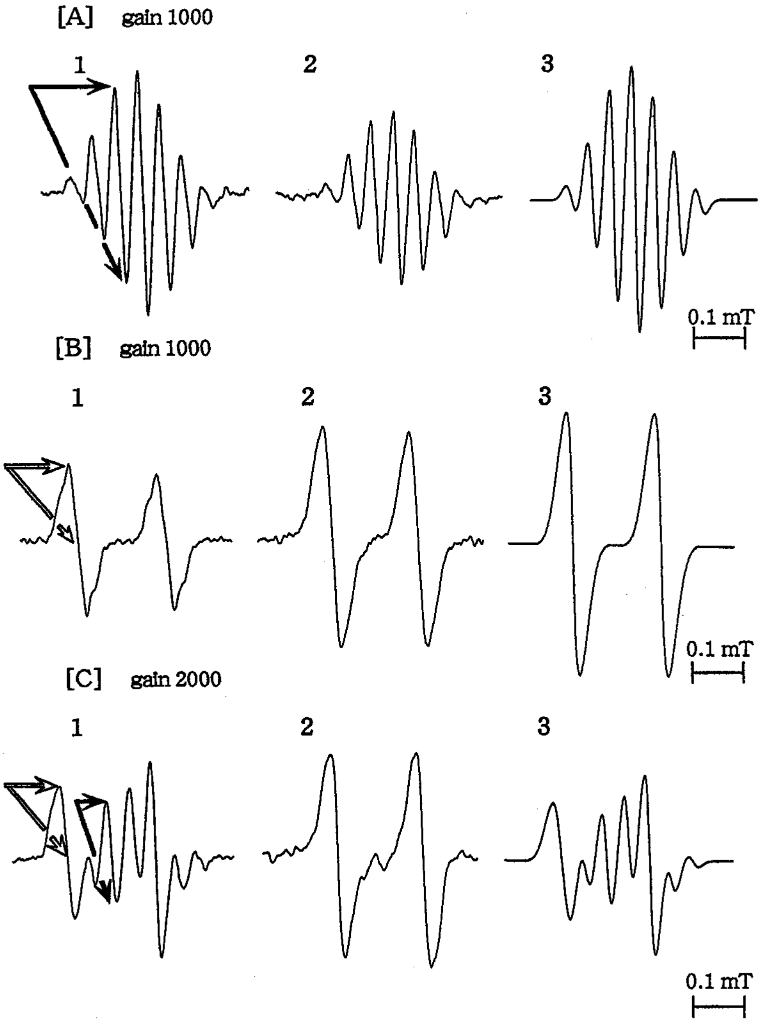

Fig. 3. ESR Spectra of Alloxan Radical and/or AFR

A: ESR spectra were observed when alloxan (1 mM) was incubated with GSH (0.5 mM) under anaerobic (1) or aerobic (2) conditions. The g-value was estimated to be 2.0052. Simulated ESR spectrum (3) was best matched the experimental results using following parameters; hyperfine coupling constant of $a^H=a^N=$ 0.045 mT. B: ESR spectra were observed when ascorbate (1 mM) was incubated with EDTA–Fe^{3+} (0.05 mM) under anaerobic (1) or aerobic (2) conditions. The g-value was estimated to be 2.0054. Simulated ESR spectrum (3) was best matched the experimental results using following parameters; hyperfine coupling constant of $a^H=0.186$ mT. C: ESR spectra were observed in reaction system of alloxan (0.5 mM) with ascorbate (0.5 mM) under anaerobic (1) or aerobic (2) conditions. Simulated ESR spectrum (3) was obtained when the spectrum A–3 put together the spectrum B–3. Other conditions were the same as described in ''Experimental Procedure''. Typical results on an experiment are shown, and similar results were obtained in above 12 experiments. The closed arrows were indicated the determination site for the intensity of alloxan radical, and the open arrows were indicated that of AFR.

された．また，嫌気的条件下に観測されたアロキサンラジカルのシグナル強度は，好気的条件下と比較して有意に大きかった．この結果から，アロキサン―アスコルビン酸反応系で生成するアロキサンラジカルは，好気的条件下，反応液中の O_2 と反応する可能性が示唆された．

Figure 5 には，反応系における AFR の生成に対するアロキサン及びアスコルビン酸濃度の影響を示した．一定量のアスコルビン酸（0.5 mM）に種々濃度のアロキサンを添加すると，アロキサン濃度 0.1 mM まで濃度に依存して AFR のシグナル強度が増加した（Fig. 5A）．嫌気的条件においてもほぼ同様な結果が得られ，過剰に存在するアロキサンは AFR の ESR シグナルに影響を及ぼさなかった．嫌気的条件下，観測された AFR のシグナル強度は，0.015 mM 以上のアロキサン濃度において好気的条件下と比較して有意に小さかった．また，種々濃度のアスコルビン酸に一定量のアロキサン（0.5 mM）を添加すると，アスコルビン酸濃度に依存して AFR のシグナル強度が増加した（Fig. 5B）．嫌気的条件下，観測された AFR のシグナル強度は，いずれのアスコルビン酸濃度においても好気的条件下

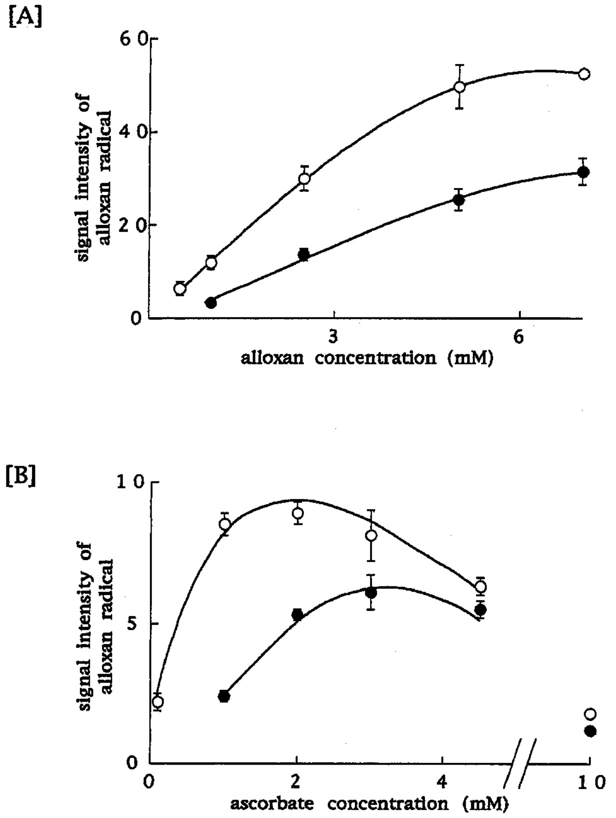

Fig. 4. Dependence of Generation of Alloxan Radical on Alloxan and Ascorbate Concentrations

The experimental conditions were as described in "Experimental Procedure". The reaction was performed under aerobic (●) or anaerobic (○) conditions. A: The reaction system was consisted of various concentrations of alloxan and 0.5 mM ascorbate. B: The reaction system was consisted of 0.5 mM alloxan and various concentrations of ascorbate. Each datum is the mean ±S.E. of three experiments.

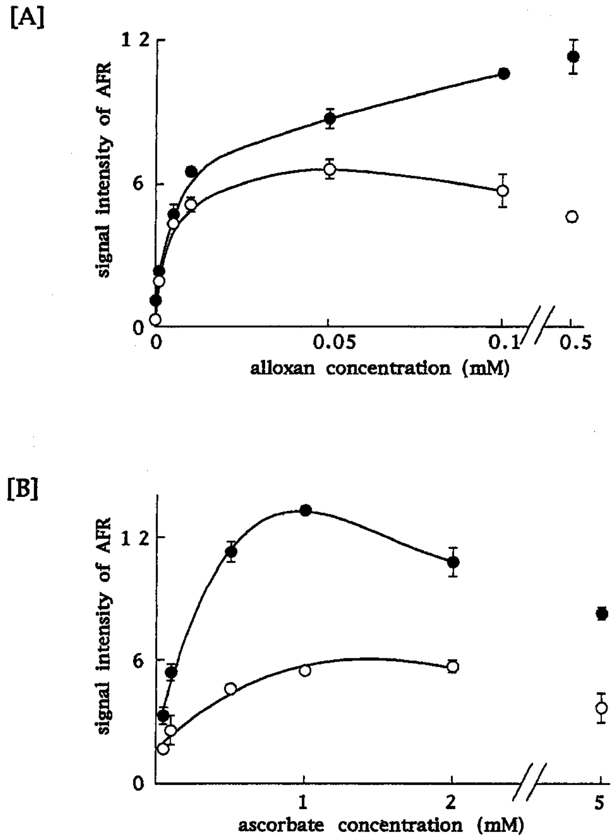

Fig. 5. Dependence of Generation of AFR on Alloxan and Ascorbate Concentrations

The experimental conditions were as described in "Experimental Procedure". The reaction was performed under aerobic (●) or anaerobic (○) conditions. A: The reaction system consisted of 0.5 mM ascorbate and various concentrations of alloxan. B: The reaction system was consisted of various concentrations of ascorbate and 0.5 mM alloxan. Each datum is the mean ±S.E. of three experiments.

と比較して有意に小さかった．また，データには示さないが鉄キレート剤の EDTA，ジエチレントリアミン五酢酸及びメシル酸デフェロキサミンの反応系への添加は，酸素消費及びアロキサンラジカルと AFR 生成に有意な影響を及ぼさないことから，この反応系に存在する微量な鉄はアロキサンとアスコルビン酸の反応及び反応生成物に影響を及ぼさないものと推察した．

考　　察

本研究で，アロキサン—アスコルビン酸反応系において，アロキサンラジカルと AFR 及び酸素消費が惹起されることを示した．アロキサンとアスコルビン酸の共存下，以下に示す反応が進行することが考えられる．

alloxan＋ascorbate ⟶ alloxan radical＋AFR　(1)

alloxan radical＋ascorbate
⟶ dialuric acid＋AFR　(2)

alloxan＋AFR
⟶ alloxan radical＋dehydroascorbate　(3)

反応系においてアロキサンは一電子還元，アスコルビン酸は一電子酸化され，アロキサンラジカルと AFR が生成する（反応式(1)，Fig. 3）．反応系において，アロキサンに比べて高いモル濃度比のアスコルビン酸が存在した場合，アロキサンラジカルのシグナル強度が減少した（Fig. 4）．反応式(2)に示すように，アロキサンラジカル濃度が減少しジアルル酸が生成するためには，過剰量のアスコルビン酸が必要であったことから，アスコルビン酸はアロキサンラジカルよりアロキサンと優先的に反応することが推察された．アスコルビン酸に比べて高いモル濃度比のアロキサンが存在した場合，AFR のシグナ

ル強度の変化は観測されなかったことから（Fig. 5），アロキサンと AFR の反応（反応式(3)）はほとんど進行しないことが推察される．以上のことから，アロキサン—アスコルビン酸反応系において，アロキサンとアスコルビン酸が反応しアロキサンラジカルと AFR が生成することが示唆され，ESR を用いたラジカルの測定結果（Figs. 3, 4 and 5）と一致した．

好気的条件下，アロキサン—アスコルビン酸反応系に SOD を添加すると，酸素消費の初速度は有意に低下した（Table 1）. SOD は $O_2^{\cdot-}$ の不均化反応を触媒し，H_2O_2 と O_2 を生成させる（反応式(4)）．通常，$O_2^{\cdot-}$ の自発的不均化反応の速度定数は，$5\times10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$ 以下であるが，SOD の添加によってその速度定数は $2\times10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$ となる.[32,33] このことから，反応系において SOD の添加により，反応式(4)が促進され，反応液中の O_2 濃度がわずかに増加し，酸素消費の初速度の低下が惹起された可能性が考えられる．

$$O_2^{\cdot-}+O_2^{\cdot-}+2H^+ \longrightarrow H_2O_2+O_2 \qquad (4)$$

カタラーゼは H_2O_2 を分解し，H_2O と O_2 の生成反応を触媒する（反応式(5)）．

$$H_2O_2 \longrightarrow H_2O+1/2O_2 \qquad (5)$$

カタラーゼを反応系に添加すると，酸素消費の初速度は有意に低下し (Table 1)，反応系において H_2O_2 が生成する可能性が示唆された．SOD とカタラーゼを同時に添加した場合，SOD 又はカタラーゼのいずれかを添加した場合と比較して酸素消費の初速度は著しく低下した（Table 1）. SOD とカタラーゼが共存した場合，反応式(4)と(5)による O_2 の生成が促進し，結果として酸素消費が阻害されると推察される．しかしながら，反応系で生成する活性酸素種の同定及びその量について，さらに詳細に検討する必要がある．

著者らはアロキサンラジカルの自動酸化に伴い O_2 が一電子還元され，$O_2^{\cdot-}$ が生成することを先に報告した.[13] このことから，アロキサン—アスコルビン酸反応系において生成したアロキサンラジカルもまた，$O_2^{\cdot-}$ を生成することが考えられる．さらに，本研究における SOD とカタラーゼ添加実験の結果から，アロキサン—アスコルビン酸反応系において $O_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 が関与する可能性が示された．そこで，アロキサン—アスコルビン酸反応系における $O_2^{\cdot-}$ 生成の機構について以下に考察した．

$$\text{alloxan radical}+O_2 \rightleftarrows \text{alloxan}+O_2^{\cdot-} \qquad (6)$$

$$\text{dialuric acid}+O_2 \rightleftarrows \text{alloxan radical}+O_2^{\cdot-} \qquad (7)$$

$$\text{AFR}+O_2 \rightleftarrows \text{dehydroascorbate}+O_2^{\cdot-} \qquad (8)$$

好気的条件下，アロキサンラジカルのシグナル強度は，嫌気的条件下と比較して著しく減少し（Fig. 4），アロキサンラジカルが O_2 と反応し，$O_2^{\cdot-}$ を生成させる可能性が示唆された（反応式(6)）．アロキサンの二電子還元物質ジアルル酸もまた O_2 を一電子還元し，$O_2^{\cdot-}$ を産生させることから,[34,35] アロキサン—アスコルビン酸反応系における酸素消費にジアルル酸の関与が考えられる（反応式(7)）．嫌気的条件下，過剰量のアスコルビン酸が存在した場合（アロキサンとアスコルビン酸の濃度比が 1 対 6 以上），アロキサンラジカルのシグナル強度は減少し（Fig. 4），ジアルル酸の生成が進行したことが推察される．好気的条件下，反応系で生成したアロキサンラジカルは O_2 と反応しアロキサンに戻るため（反応式(6)），ジアルル酸まで還元するには，より過剰量のアスコルビン酸が必要となる．実際に好気的条件下，アロキサンラジカルのシグナル強度はアロキサンとアスコルビン酸の濃度比 1 対 9 以上で減少した．一方，酸素消費の初速度は，濃度比 1 対 9 以上においても増加した（Fig. 2）．以上の結果より，反応系における酸素消費は主にアロキサンラジカル濃度に依存し，過剰量のアスコルビン酸が存在した場合，アロキサンラジカルとジアルル酸両方の濃度に依存する可能性が示唆された．一方，SOD とカタラーゼは，キサンチンオキシダーゼ—ヒポキサンチン系を用いた活性酸素生成系に添加した場合と比べて，アロキサン存在下における酸素消費を阻害するために多量の酵素が必要であることが報告されている.[36] データには示していないが，著者らは SOD 又はカタラーゼのいずれかを添加した場合と比較して，SOD とカタラーゼの共存下，アロキサンラジカルのシグナル強度が著しく減少したことを観測した．このことから，アロキサンなどのキノン化合物による酸素消費の阻害には，SOD とカタラーゼの同時添加が有効である可能性が示唆される．

アロキサンとアスコルビン酸の構造が類似していることから,[28] アロキサンラジカルと同様 AFR の自動酸化反応も $O_2^{\cdot-}$ 生成に関与する可能性が考えられる．しかし，酸化還元電位が O_2 と $O_2^{\cdot-}$ は 300

mV 以下であるのに対し，AFR とアスコルビン酸は 300 mV 以上である.[37,38] それゆえ，反応系において AFR による O_2 還元よりむしろ $O_2^{\cdot-}$ が AFR をアスコルビン酸に一電子還元することが強く示唆され，反応式(8)はほとんど進行しないものと考えた．以上のことをまとめると，アロキサン—アスコルビン酸反応系における活性酸素生成のメカニズムは，次のように 2 段階の反応で説明できる．(1)アスコルビン酸によりアロキサンはアロキサンラジカルに還元される．(2)アロキサンラジカルは O_2 を一電子還元し $O_2^{\cdot-}$ を生成させる．しかしながら，アロキサン—アスコルビン酸反応系において生成した活性酸素種の同定にはさらなる検討が必要であるだろう．

アスコルビン酸は，通常ヒト血漿中に 0.05±0.02 mM，ラット膵臓ラ氏島細胞中には 3.53±0.1 mM 含まれ，特にミトコンドリアと分泌顆粒画分に局在化している.[39,40] 好気的条件下，アロキサン濃度に対して，多量のアスコルビン酸が存在した場合でも酸素消費が惹起されたこと（Fig. 2），生体内の酸素濃度は比較的低いがアロキサンラジカルは分子状酸素と迅速に反応することから，生体内においてもアロキサンがアスコルビン酸により還元され，活性酸素生成を誘導し細胞障害を引き起こす可能性，さらにミトコンドリア内でこの反応が促進される可能性が考えられる．著者らはアロキサンがラット肝ミトコンドリアの内膜透過性変化を誘導すること,[41] アロキサンによる培養膵臓 β 細胞株 INS-1 のミトコンドリア障害がアポトーシスの誘導に関与することを報告した.[42] 今後，アロキサンによる膵臓ラ氏島 β 細胞障害のメカニズム，特に細胞内アスコルビン酸の関与について詳細に検討する必要がある．

REFERENCES

1) Corbett J. A., Lancaster J. R. Jr., Sweetland M. A., McDaniel M. L., *J. Biol. Chem.*, **266**, 21351–21354 (1991).
2) Kneepkens C. M. F., Lepage G., Roy C. C., *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 127–160 (1994).
3) Lee M.-S., Wogensen L., Shizuru J., Oldstone M. B. A., Sarvetnick N., *J. Clin. Invest.*, **93**, 1332–1338 (1994).
4) Tanaka Y., Gleason C. E., Tran P. O. T., Harmon J. S., Robertson R. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 10857–10862 (1999).
5) Aruoma O. I., Kaur H., Halliwell B., *J. R. Soc. Health.*, **111**, 172–177 (1991).
6) Grankvist K., Marklund S. L., Täljedal I.-B., *Biochem. J.*, **199**, 393–398 (1981).
7) Malaisse W. J., Malaisse–Lagae F., Sener A., Pipeleers D. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 927–930 (1982).
8) Heikkila R. E., Cabbat F. S., *Eur. J. Pharmacol.*, **52**, 57–60 (1978).
9) Grankvist K., Marklund S., Täljedal I.-B., *Nature*, **294**, 158–160 (1981).
10) Jörns A., Tiedge M., Lenzen S., Munday R., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1300–1304 (1999).
11) Nukatsuka M., Sakurai H., Kawada J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 278–283 (1989).
12) Winterbourn C. C., Munday R., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 271–277 (1989).
13) Sakurai K., Miura T., Ogiso T., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 993–997 (1990).
14) Holmgren A., Lyckeborg C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 5149–5152 (1980).
15) Sakurai K., Ogiso T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1451–1455 (1994).
16) Chou P.-T., Khan A. U., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 932–937 (1983).
17) Rose R. C., Bode A. M., *FASEB J.*, **7**, 1135–1142 (1993).
18) Buettner G. R., Jurkiewicz B. A., ''New Developments in ESR and Spin–Trapping, Analysis Free Radical Biological Systems,'' ed. by Favier A. E., Cadet J., Kalyanaraman B., Fontecave M., Pierre J.-L., Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, 1995, pp. 145–164.
19) Niki E., Saito T., Kawakami A., Kamiya Y., *J. Biol. Chem.*, **259**, 4177–4182 (1984).
20) Scarpa M., Rigo A., Maiorino M., Ursini F., Gregolin C., *Biochim. Biophys. Acta*, **801**, 215–219 (1984).
21) Buettner G. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 535–543 (1993).
22) Udenfriend S., Clark C. T., Axelrod J., Brodie B. B., *J. Biol. Chem.*, **208**, 731–739 (1954).
23) Breslow R., Lukens L. N., *J. Biol. Chem.*, **235**, 292–296 (1960).
24) Gao D., Sakurai K., Katoh M., Chen J., Ogiso

T., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **39**, 215–225 (1996).

25) Andorn A. C., Britton R. S., Bacon B. R., *J. Neurochem.*, **67**, 717–722 (1996).

26) Patterson J. W., *J. Biol. Chem.*, **183**, 81–88 (1950).

27) Pillsbury S., Watkins D., Cooperstein S. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **185**, 713–718 (1973).

28) Davis J. L. Jr., Mendiratta S., May J. M., *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1301–1307 (1998).

29) Lagercrantz C., Yhland M., *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1677–1682 (1963).

30) Pietri S., Séguin J. R., Arbigny P. D., Culcasi M., *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 523–528 (1994).

31) Benderitter M., Maupoil V., Vergely C., Dalloz F., Briot F., Rochette L., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **12**, 510–516 (1998).

32) Nakano M., "Kasseisanso no syoukyo, Kasseisanso," ed. by Niki E., Shimazaki H., Ishiyaku Shuppan Co., Ltd., 1987, pp. 64–85.

33) Forman H. J., Fridovich I., *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 396–400 (1973).

34) Cohen G., Heikkila R. E., *J. Biol. Chem.*, **249**, 2447–2452 (1974).

35) Munday R., *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 409–413 (1988).

36) Winterbourn C. C., *Biochem. J.*, **207**, 609–612 (1982).

37) Njus D., Wigle M., Kelley P. M., Kipp B. H., Schlegel H. B., *Biochemistry*, **40**, 11905–11911 (2001).

38) Kim H., Rosenthal I., Kirschenbaum L. J., Riesz P., *Free Radic. Biol. Med.*, **13**, 231–238 (1992).

39) Zhou A., Nielsen J. H., Farver O., Thorn N. A., *Biochem. J.*, **274**, 739–744 (1991).

40) Tsuji A., Sakurai H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 11–16 (1998).

41) Sakurai K., Katoh M., Fujimoto Y., *J. Biol. Chem.*, **276**, 26942–26946 (2001).

42) Sakurai K., Katoh M., Someno K., Fujimoto Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 876–882 (2001).