

ニトロ多環芳香族炭化水素の酸化と還元：毒性発現機構の解析^{#1}福原 潔^{#2}・宮田 直樹

Oxidation and Reduction of Nitroarene as Environmental Mutagens

Kiyoshi Fukuhara^{#2} and Naoki Miyata

Newly synthesized dinitrobenzo[a]pyrenes and 6-aza analogues of 1- and 3-nitrobenzo[a]pyrenes showed strong mutagenic activity in *Salmonella* assays (TA98 and TA98NR). Nitroreduction is essential for metabolic activation of nitroarene. The structure activity relationships of mono-, di- and trinitrophenanthrene were studied. Electrochemical ease of nitroreduction and dihedral angles of nitro substituents to aromatic rings is found to be important factor to determine their mutagenic potency. Nitroarene is oxidatively metabolized to form hydroxylated and nitrosubstituted derivatives and the same oxidative products were obtained by the reaction of nitroarene with chemically generated superoxide anion radical, suggesting the participation of superoxide in metabolic oxidation of nitroarene. Catalytic activity of nitroarene as a mediator in the reductive activation of molecular oxygen was also evaluated by using potential step chronocoulometry method. The potential relevance of toxicity caused by redox cycling could be solved by using this method.

Keywords: mutagenicity, nitroarene, nitrobenzo[a]pyrene, nitrophenanthrene, superoxide
(Received May 30, 1997)

1. はじめに

ニトロ多環芳香族炭化水素(以下ニトロアレーンと略す)は、有機化合物の燃焼過程で生成する多環芳香族炭化水素がNO_xによってニトロ化されることによって生成し、強力な発がん性および変異原性を有することから人への影響が注目される化合物である。歴史的には19世紀後半、1-ニトロピレン¹⁾と6-ニトロクリセン²⁾が初めて合成されて以来、多くのニトロアレーンが明らかにされてきたが、生物活性に関する研究は、1950年に2-ニトロフルオランテン³⁾の発がん性が報告されるまではほとんど行なわれていなかった。しかし、1975年、Amesらによって開発された変異原性試験によって、ニトロアレーンが酸化代謝活性化酵素を必要としない直接変異原性物質であることが明らかとなり⁴⁾、また、Pittsらによって、ニトロアレーンは大気中NO_xによって容易に生成し、環境中に高濃度に存在することが報告されて以来⁵⁾、多くの研究が展開されてきた。特に、1980年、Rosenkranzらによってコピーのトナー(carbon black)に含まれているピレンのジニトロ体が、アフラトキシンB1に匹敵する非常に強力な変異原物質であることが明らか

となり⁶⁾、現在、ニトロアレーンは人への影響が最も懸念される環境汚染化学物質として注目されている。ニトロアレーンは、酸化代謝活性化を必要としない直接変異原性物質であり、ニトロ基がヒドロキシルアミノ体に還元的に代謝活性化された後、DNAと付加体を形成することにより毒性を発現する(Fig.1)。しかし、ニトロアレーンの毒性の強さは、ニトロ基が付加している芳香環の種類、ニトロ基の数および付加位置によってかなり異なる。例えば、ピレンのジニトロ体はモノニトロ体と比べて非常に強力な変異原性を示し、その毒性はアフラトキシンB1に匹敵する⁷⁾。また、ベンツ[a]ピレンの1-および3-ニトロ体は強力な直接変異原性を示すのに対し、6-ニトロ体はほとんど変異原性を示さない^{8,9)}。構造活性相関に関する研究は、ニトロ基の還元代謝機構の解析を中心に展開されている。しかし、良い化学的な相関は得られていない。更に、最近、ニトロアレーンの生体内での毒性発現には、酸化代謝反応も関与していることが明らかにされた⁸⁾。例えば、1-ニトロピレンは、母核が水酸化代謝されると変異原性が増加することが知られている¹⁰⁾。

筆者らは、ニトロアレーンの毒性発現に影響を与える構造化学的因子を明らかにし、毒性発現機構の予測と解析を行なうことを目的として、新規ニトロアレーンおよびニトロアザアレーンを合成し、ニトロ基の還元代謝活性化に影響を与えるニトロ基の還元特性と立体効果を明らかにした。また、母核の水酸化代謝反応の酸化活性種を明らかに

^{#1} 本総説は学位論文「ニトロ多環芳香族炭化水素の酸化と還元—毒性発現機構の解析—」(東京大学大学院薬学系研究科博士号, 1995.4)の内容の一部を要約したものである。

^{#2} To whom correspondong should be addressed: Kiyoshi Fukuhara; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel: 03-3700-1141ext223; Fax: 03-3707-6950; E-mail: fukuhara@nihs.go.jp

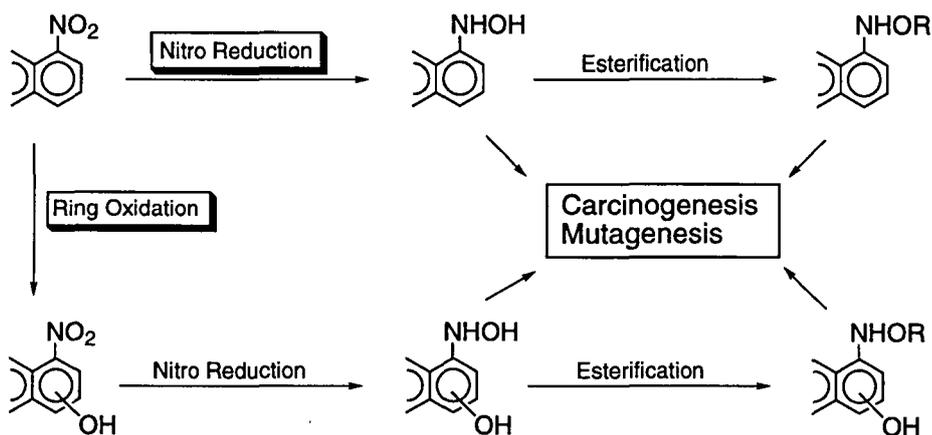


Fig. 1. Possible metabolic pathways for nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons

し、水酸化反応機構の特徴と反応機構の解析を行なった。さらに、ニトロアレンによるスーパーオキシドの生成反応を明らかにしキノンと比較した。以上の結果について、概説する。

2. ニトロ基の還元特性と変異原性¹¹⁻¹⁴⁾

ディーゼル排ガス等の汚染源によって大量に排出されている多環芳香族炭化水素は、大気中のNO_xと反応してニトロ体が生成する。ピレンは硝酸等によるニトロ化反応によりモノおよびジニトロ体が生成する。これらは大気中に存在し、ジニトロ体は最も強力な変異原性物質であることが明らかとなっている。一方、大気中高濃度に存在するベンツ[a]ピレンも、ピレンと同様にNO_xにより種々のニトロ体の生成が予測される。しかし、ベンツ[a]ピレンのニ

トロ体に関する研究報告はモノニトロ体に限られている。筆者らは、ベンツ[a]ピレンのポリニトロ化反応を試み、ジニトロ体を新規に合成した。更に、変異原性と還元特性の解析を行なった。ベンツ[a]ピレンをピレンと同様、濃硝酸によるニトロ化反応を行なったところ、1,6-及び3,6-ジニトロ体が生成した。1,6-及び3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンは有機溶媒中、非常に不安定な化合物である。この性質は、6位のニトロ基がペリ位（5位及び7位）のプロトンによる立体障害¹⁵⁾の影響で非常に不安定な状態であることに起因していることが考えられる。そこでジニトロ化反応混合物は、NaSHにより1位及び3位のニトロ基をアミノ体に変換的に還元してより安定な1-アミノ-6-ニトロ体と3-アミノ-6-ニトロ体に変換後、各異性体の単離生成を行なった。さらにアミノ基はジアゾニウム塩を経由して

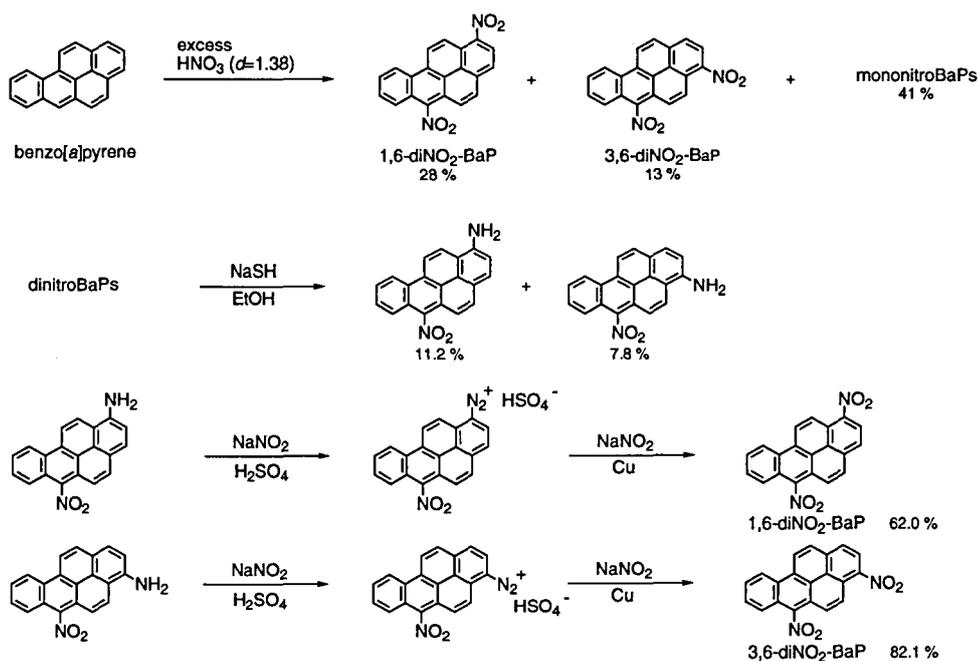


Fig. 2. Synthesis of 1,6- and 3,6-dinitrobenzo[a]pyrene

1,6-及び3,6-ジニトロ体へと変換した (Fig. 2). 1,6-及び3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンの変異原性 (*Salmonella typhimurium* TA98及びTA98NR, -S9) と電気化学的の一電子目 (E1 (1/2)) と二電子目 (E2 (1/2)) の還元のされやすさをモノニトロベンツ[a]ピレン及びジニトロピレンと比較した (Table 1). その結果, ジニトロベンツ[a]ピレンは, TA98及びTA98ニトロレダクターゼ欠損株 (TA98NR) でモノニトロベンツ[a]ピレンと比べて強力な変異原性を示し, その強さは1,6-及び1,8-ジニトロピレンに匹敵した. 化学的には二電子還元性が増加し, ニトロソ体へ容易に還元されやすいことが明らかとなった. ジニトロベンツ[a]ピレンの6位のニトロ基は, 立体障害により化学的, 生物的にも反応性が低い. 新規に合成したジニ

トロベンツ[a]ピレンのニトロ基の還元は, 1位または3位のニトロ基に選択的に進行する. そのため, ジニトロベンツ[a]ピレンの強力な変異原性は, 6位のニトロ基の置換基効果が1位又は3位のニトロ基の還元性を増加させ, 還元代謝反応を起きやすくしていることによると考えられた. 6位のニトロ基の置換基効果を明らかにする為に合成した, 1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンの6位にシアノ基を導入してニトロ基の還元性を増加させたシアノニトロベンツ[a]ピレンは, ジニトロベンツ[a]ピレンと類似した還元特性と強力な変異原性を示した (Table 1). この結果よりジニトロベンツ[a]ピレンの強力な変異原性は, 1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンと比べて1位および3位のニトロ基の化学的な還元性が増加した結果であること, 更に, ニト

Table 1. Mutagenicity and reduction potentials of nitrobenzo[a]pyrenes and nitropyrenes

compounds	mutagenicity of <i>Salmonella typhimurium</i> strains (rev/nmol/plate)		electrochemical reduction potentials (-mV vs SCE)	
	TA98	TA98NR	E1(1/2)	E2(1/2)
1-NO ₂ -BaP	653	113	915	1 420
3-NO ₂ -BaP	1370	238	921	1 459
6-NO ₂ -BaP	0	0	1 020	1 360
1,6-diNO ₂ -BaP	1 500	308	645	645
3,6-diNO ₂ -BaP	137 000	87 600	665	665
1-NO ₂ -6-CN-BaP	43 100	17 400	691	1 026
3-NO ₂ -6-CN-BaP	174 000	50 200	688	1 031
1-NO ₂ -pyrene	484	49	972	1 580
1-NO ₂ -3-CN-pyrene	39 900	1 960	758	1 352
1-NO ₂ -6-CN-pyrene	28 300	2 640	786	1 204
1-NO ₂ -8-CN-pyrene	102 000	16 900	785	1 210
1,3-diNO ₂ -pyrene	130 000	17 000	684	1 242
1,6-diNO ₂ -pyrene	60 000	63 000	707	755
1,8-diNO ₂ -pyrene	140 000	190 000	699	778

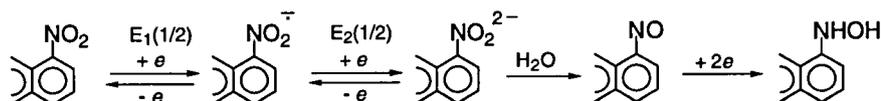
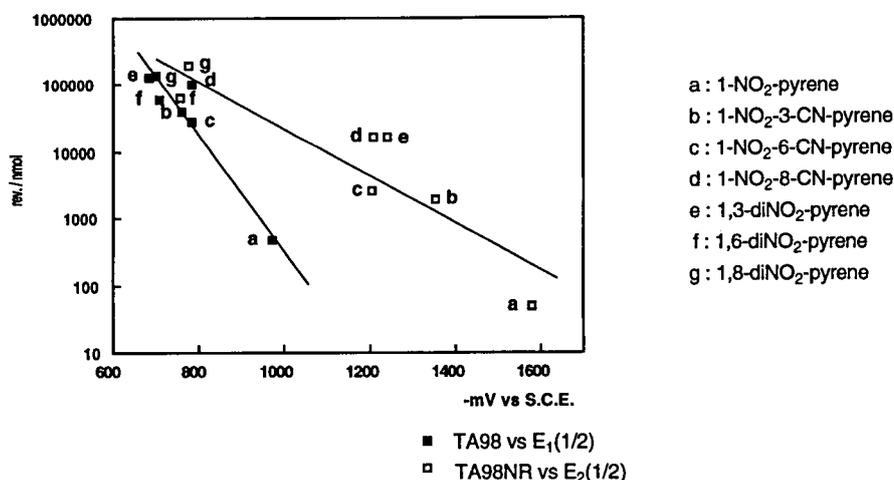


Fig. 3. Correlation between reduction potentials and mutagenicity of nitropyrenes and 1-nitrocyanopyrenes



ロ基の還元代謝活性化反応は、化学的なニトロ基の還元されやすさと相関することが明らかとなった。

ピレンの1,6-及び1,8-ジニトロ体はTA98で強力な変異原性を示し、TA98ニトロレダクターゼ欠損株 (TA98NR) でも同程度の変異原性を維持している。一方、1,3-ジニトロピレンのTA98NRでの変異原性はTA98の約10分の1程度に低下する。ピレンの1,3-ジニトロ体の化学的な一電子還元性は、1,6-及び1,8-ジニトロ体と同程度に還元されやすいが、二電子目の還元は起きにくく、この化学的還元性の違いがTA98NRでの変異原性の違いに影響していることが考えられる。そこで変異原性と還元特性との相関を化学的に解析することを目的として、1-ニトロピレンの3位、6位及び8位にシアノ基を導入した1-ニトロピレンのシアノ誘導体を合成し、1,3-,1,6-及び1,8-ジニトロピレンと一電子及び二電子還元性と変異原性を比較した。その結果、1-ニトロピレンのシアノ誘導体は、1,3-ジニトロピレンと類似した一電子及び二電子還元性とTA98及びTA98NRでの変異原性を示すことが明らかとなった。この結果は、一電子目の還元性がTA98の変異原性と相関すること、更に二電子目の還元性がTA98NRと相関することを示している (Fig.3)。

TA98によるニトロ基の還元代謝反応はクラシカルニトロレダクターゼによって進行し、その還元活性は強い。その為、ニトロアレーンの人に対する毒性の強さは、クラシカルニトロレダクターゼが欠損し、還元活性が低いTA98NR¹⁶⁾での変異原性の強さが指標となることが考えられる。一方、ニトロレダクターゼによるニトロアレーンの還元代謝反応は、好氣的条件下、阻害されることが明らかとなっている¹⁷⁾。これはニトロアレーンが一電子還元によって生成するニトロアレーンアニオンラジカルは、酸素が存在すると酸素への電子移動反応が進行して還元代謝が阻害さ

れていることを意味している。その為、ニトロ基の還元代謝活性化には一電子還元後速やかに二電子目の還元反応が進行して、ニトロソ体が生成することが必須であり、化学的な二電子還元のされやすさが毒性発現に重要であることが考えられる。化学的な二電子還元のされやすさとTA98NRでの変異原性の強さが相関したことは、ニトロアレーンの人への毒性の評価には、化学的な二電子還元性の解析が有効であることを示しており、この結果は新規に合成したジニトロベンツ[a]ピレンが1,6-及び1,8-ジニトロピレンと同様に人に対しても強い毒性を示すことを示唆している。

3. ニトロ-6-アザベンツ[a]ピレンの合成と変異原性¹⁸⁻²²⁾

環境中には、多環芳香族炭化水素の母核に窒素原子が導入された多くの含窒素多環芳香族炭化水素(アザアレーン)の存在が明らかになっている²³⁻²⁶⁾。アザアレーンがNO_xと反応してニトロ体が生成すると、母核の窒素原子の電子効果によりニトロ基の化学的還元性が増加して、強力な変異原性を示すことが予測される。大気試料中の塩基性画分はTA98で非常に強力な直接変異原性を示すことから、この画分中でのニトロアザアレーンの存在が示唆される。しかし、ニトロアザアレーンに関する研究は、4-ニトロキノリン-N-オキシド^{27,28)}を除いてはほとんど行なわれていない。そこで筆者らは、1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンの6-アザ体及びそのN-オキシド体を新規に合成し、構造と変異原性との相関を解析した。6-アザベンツ[a]ピレンはペリナフテノン为原料として3工程で合成した (Fig.4)。また、そのN-オキシド体をニトロ化することにより、1-及び3-ニトロ体を合成した (Fig.5)。合成した1-及び3-ニトロ-6-アザベンツ[a]ピレンとそのN-オキシド体の一電子及び二電子還元性は、母核がN-オキシド体>6-アザ体

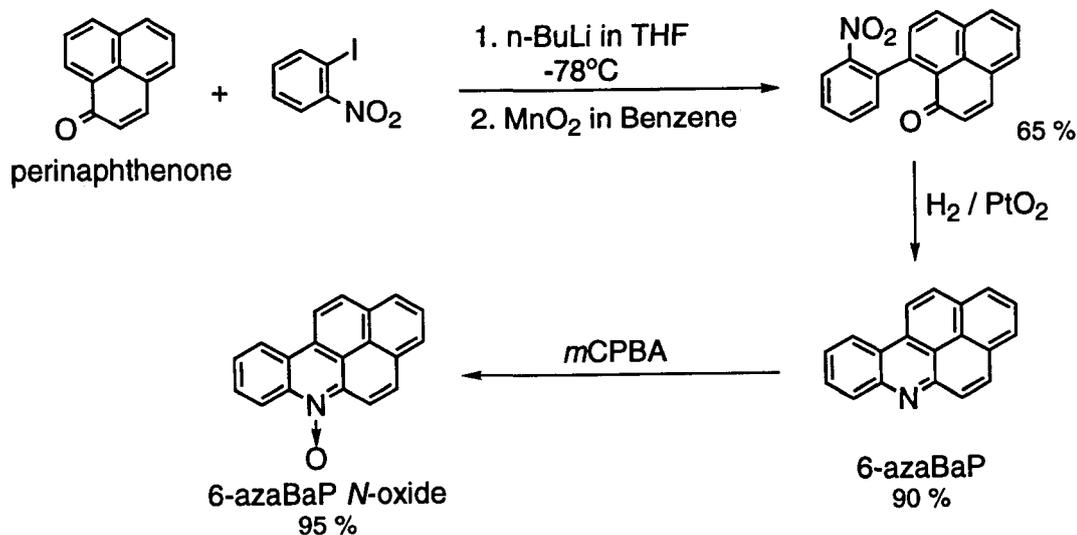


Fig. 4. Synthesis of 6-azabenz[a]pyrene and its N-oxide

Table 2. Mutagenicity and reduction potentials of nitroazabenz[a]pyrenes and their N-oxides

compounds	mutagenicity of <i>Salmonella typhimurium</i> strains (rev/nmol/plate)		electrochemical reduction potentials (-mV vs SCE)	
	TA98	TA98NR	E1 (1/2)	E2 (1/2)
1-NO ₂ -BaP	653	113	915	1 420
3-NO ₂ -BaP	1 370	238	921	1 459
6-NO ₂ -BaP	0	0	1 020	1 360
1,6-diNO ₂ -BaP	1 500	308	645	645
3,6-diNO ₂ -BaP	137 000	87 600	665	665
1-NO ₂ -6-azaBaP	105 000	105 000	756	1 101
3-NO ₂ -6-azaBaP	104 000	92 000	758	1 154
1-NO ₂ -6-azaBaP N-oxide	36 100	38 600	657	978
3-NO ₂ -6-azaBaP N-oxide	396 000	427 000	665	1 026

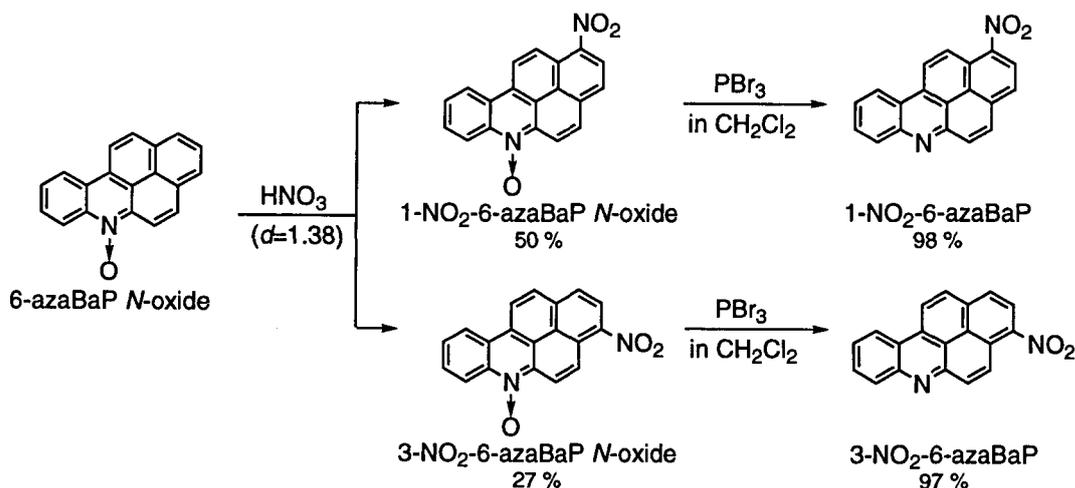


Fig. 5. Synthesis of 1- and 3-nitro-6-azabenz[a]pyrenes and their N-oxides

>ベンツ[a]ピレンの順で増加し、特にN-オキシドのニトロ体はジニトロベンツ[a]ピレンと同程度に一電子還元されやすいことが明らかとなった (Table 2)。また、変異原性試験によりこれらの化合物は、TA98で、1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンと比べ、40~170倍強い直接変異原性を示した。また、ニトロレクターゼ欠損株 (TA98NR) でも変異原性の低下は見られなかった。特に3-ニトロ-6-アザベンツ[a]ピレン N-オキシドは TA98で396,000rev/nmol, TA98NRで427,000rev/nmol という強力な変異原性を示し、3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンやジニトロピレン類よりもさらに強力な変異原物質であることが明らかとなった。今回合成した1-及び3-ニトロベンツ[a]ピレンの6-アザ体とそのN-オキシド体は、母核に導入した窒素原子の効果によりニトロ基の化学的な還元性が増加している。その結果、ニトロ基のニトロソ体への還元代謝活性化反応

が起きやすくなり、強力な変異原性を示したことが推定される。

大気試料中、ニトロアレーンはそのほとんどが中性画分に含まれている。しかし、強力な直接変異原性を示す塩基性画分に関しては、その成分は全く明らかにされていなかった。環境中濃度を検討した結果、これらの新規化合物は大気中に存在していることが明らかとなった (Table 3)。本研究でニトロアザベンツ[a]ピレンが塩基性画分に存在していること、また、環境中にはアザフェナンスレンやベンズアントラセン、アザピレン等の多くのアザアレーンの存在が明らかとなっていることを考えると、種々のニトロアザアレーンは環境中のアザアレーンがNO_xによってニトロ化されることによって生成し、ニトロアレーンよりも更に強力な変異原性や発がん性を示す環境汚染物質として大気中に存在している可能性が示唆される。

Table 3. Concentration of nitrobenzo[a]pyrenes and nitroazabenz[a]pyrenes in diesel emission and airborne particulate

compounds	concentration (ng/g of particulate) in	
	diesel emission	airborne particulate
1-NO ₂ -BaP	35.2 (31.7)	20.0 (18.0)
3-NO ₂ -BaP	52.3 (50.0)	43.0 (41.0)
1,6-diNO ₂ -BaP	ND	ND
3,6-diNO ₂ -BaP	2.8 (0.26)	1.8 (0.17)
1-NO ₂ -6-azaBaP	2.1 (0.18)	1.1 (0.09)
3-NO ₂ -6-azaBaP	2.8 (0.26)	1.2 (0.11)
1-NO ₂ -6-azaBaP <i>N</i> -oxide	1.5 (0.13)	0.8 (0.07)
3-NO ₂ -6-azaBaP <i>N</i> -oxide	1.1 (0.11)	0.3 (0.03)

() : pg/m³

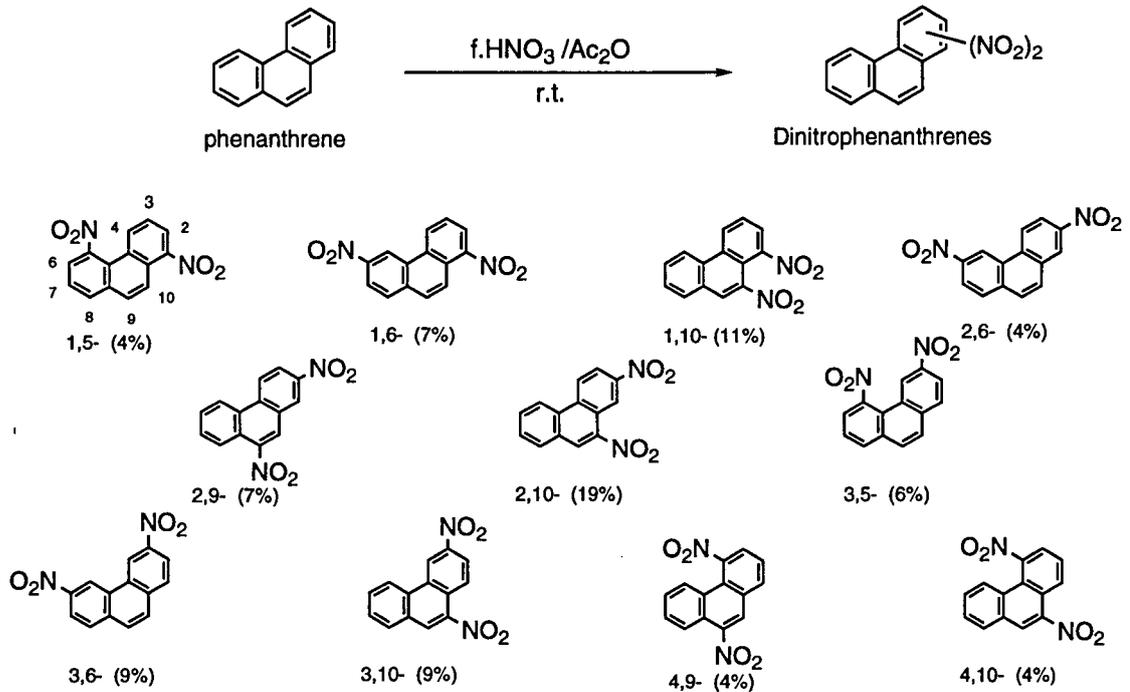


Fig. 6. Synthesis of dinitrophenanthrenes

4. ニトロ基の立体効果と変異原性^{12,13,29,30)}

ニトロアレーンの変異原性を化学的に解析することを試み、ニトロ基の一電子及び二電子還元のされやすさがTA98とTA98NRの変異原性の強さと相関することを明らかにしてきた。一方、ベンツ[a]ピレンの1-及び3-ニトロ体と6-ニトロ体は同様の電気化学的な還元特性を示すにもかかわらず、6-ニトロ体はほとんど直接変異原性を示さない。この活性の違いは、6位のニトロ基の還元代謝活性化反応が5位と7位のペリ位のプロトンによる立体障害のた

め起きにくいことで説明される。また、この結果は新規に合成した1,6-及び3,6-ジニトロベンツ[a]ピレンのニトロ基の還元代謝反応が1位および3位のニトロ基に選択的に進行することからも証明される。この様にニトロアレーンの変異原性の化学的な解析には、ニトロ基の還元特性に加えてニトロ基の立体的な構造因子との相関を明らかにすることが必要である。そこで、ニトロ基の還元特性に加えてニトロアレーンの変異原性の強さに影響を与えるもう一つの重要な化学的因子と考えられるニトロ基の立体構造の解析をフェナンスレンのモノ、ジ、およびトリニトロ体で行

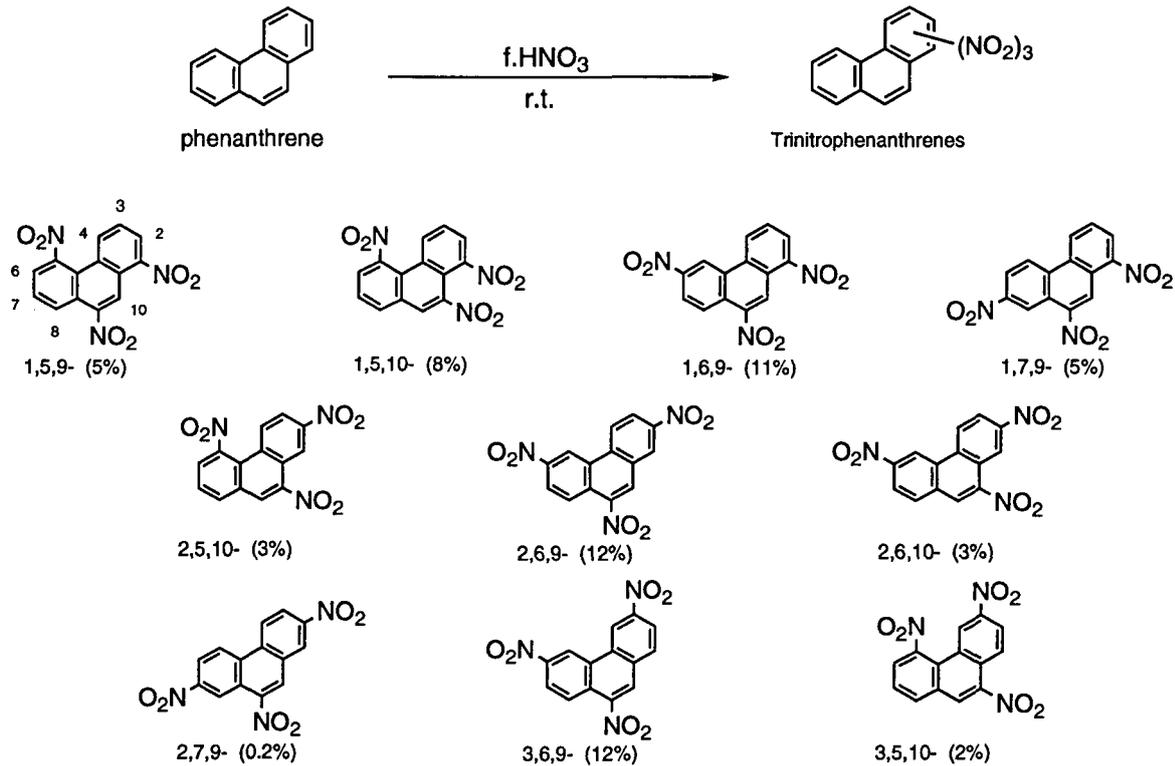


Fig. 7. Synthesis of trinitrophenanthrenes

なった。フェナンスレンのニトロ化は、ニトロ化の条件を調整することにより、ジニトロ体11種 (1,5-, 1,6-, 1,10-, 2,6-, 2,9-, 3,5-, 3,6-, 3,10-, 4,9-, 4,10-ジニトロ体) 及びトリニトロ体10種 (1,5,9-, 1,5,10-, 1,6,9-, 1,7,9-, 2,5,10-, 2,6,9-, 2,6,10-, 2,7,9-, 3,5,10-, 3,6,9-トリニトロ体) を新規に合成し (Fig. 6, 7), ニトロ基の立体構造により変異原性を解析した。

モノ、ジ、及びトリニトロフェナンスレンの変異原性を *Salmonella typhimurium* TA98及びTA100を用いてS9非存在下で行なった。また、分子軌道計算 (AM1法) によりモノ、ジ、トリニトロフェナンスレンの最低空軌道 (LUMO) 及びニトロ基とフェナンスレン骨格との二面角を求めた (Table 4)。その結果、フェナンスレンのニトロ体は、TA98に比べTA100で強力な変異原性を示すことから、塩基対置換型の変異原物質であることが明らかとなった。モノニトロ体では、特に3-ニトロ体が強い変異原性を示した (620rev/nmol)。またジニトロ体では、1,6-, 2,6-, 3,6-及び3,10-ジニトロ体 (1,200~2,100rev/nmol)、トリニトロ体では1,7,9-, 2,6,9-及び3,6,9-トリニトロ体 (1,200~1,300rev/nmol) が強力な変異原物質であることが明らかとなった。これらの強力な変異原性を有するニトロ体は二面角が小さい。一方、二面角が大きい1,5-, 1,10-, 4,9-及び4,10-ジニトロ体、1,5,9-, 1,5,10-及び3,5,10-トリニトロ体は、変異原性が低いことが明らかとなった。

次にTA100の変異原性の強さをLUMOおよび二面角で

解析した (Fig. 8)。その結果、二面角が小さく平面性がよい化合物が強い変異原性を示すことが明らかとなった。また、二面角が同程度のニトロ体のなかでは、LUMOが低く化学的に一電子還元されやすい3,6-ジニトロ体や1,7,9-トリニトロ体が特に強力な変異原性を示した。一方、二面角は小さいがLUMOが高い1-及び3-ニトロ体や、LUMOは低い二面角が大きい1,5,9-, 1,5,10-及び3,5,10-トリニトロ体は、変異原性が弱いことが明らかとなった。以上の結果より、ニトロフェナンスレンの変異原性の強さは、ニトロ基の化学的な還元されやすさに加えてニトロ基の立体的な因子が大きく影響し、二面角が小さくニトロ基がフェナンスレン骨格と平面性がよい程、強力な変異原性を示すことが明らかとなった。

立体的な因子による変異原性の低下には主に二つの理由が考えられる。第一は、ニトロ基が還元代謝される段階で二面角が大きいと、ニトロレダクターゼの接近がペリ位の水素などによる立体障害のため阻害されて、還元代謝活性化反応が起き難くなっていること、第二の理由としては、還元代謝活性化後のDNAとの付加反応の阻害が考えられる。ポリニトロ体の場合、例えば、3,5-ジニトロ体と比べて3,5-ジニトロ体の変異原性は大きく低下した。これは、還元代謝活性化を受けることが予測される立体障害が少なく平面性がよい3位のニトロ基のDNAとの付加反応を二面角が大きい5位のニトロ基が阻害していることを意味している。DNAの塩基間の幅は約3.4Å³⁰⁾であり、この大

Table 4. Mutagenicity and physical properties of mono-, di- and trinitrophenanthrenes (NPH, DNPH and TNPH)

compund	TA98	TA10	Epc1	Epc2	LUMO	Dihedral Angles					Sum of Dihedral Angles
						1(8)-	2(7)-	3(6)-	4(5)-	9(10)-	
1NPH	108	329	-1174	-1800	-1.345	16.9					16.9
3NPH	330	620	-1174	-1800	-1.367			0.3			0.3
9NPH	61	438	-1179	-1804	-1.413					11.1	11.1
2NPH					-1.300		2.5				2.5
4NPH					-1.065				85.4		85.4
1,5DNPH	4	5	-1005	-1225	-1.644	39.2			85.8		125.0
1,6DNPH	117	1244	-1077	-1207	-1.937	19.0		0.1			19.1
1,10DNPH	1	2	-965	-1551	-1.767	63.0				64.5	127.5
2,6DNPH	729	1788	-1058	-1202	-1.836		1.9	0.9			2.8
2,9DNPH	3	586	-928	-1176	-1.908		1.7			16.2	17.9
2,10DNPH	117	243	-904	-1178	-1.901		1.0			14.7	15.7
3,5DNPH	70	239	-1042	-1282	-1.735			1.3	86.0		87.3
3,6DNPH	93	2117	-997	-1117	-1.955			0.5, 0.5			1.0
3,10DNPH	107	1367	-914	-1408	-2.006			2.3		16.5	18.5
4,9DNPH	1	2	-905	-1325	-1.883				88.1	24.6	112.7
4,10DNPH	107	160	-961	-1372	-1.850				86.4	23.8	109.4
1,5,9TNPH	168	115	-737	-891	-2.345	38.0			84.0	29.6	151.6
1,5,10TNPH	14	4	-833	-1441	-2.228	53.1			82.2	56.5	191.8
1,6,9TNPH	358	720	-742	-897	-2.528	19.6		2.87		29.2	51.7
1,7,9TNPH	1034	1336	-726	-906	-2.422	20.7	9.1			28.0	57.8
2,5,10TNPH	63	370	-856	-995	-2.186		6.5		83.6	84.2	174.3
2,6,9TNPH	178	1212	-728	-1263	-2.432		0.5	1.5		33.7	35.7
3,5,10TNPH	50	44	-796	-1248	-2.394			8.0	87.9	26.2	122.1
3,6,9TNPH	531	1282	-663	-763	-2.643			0.74, 1.19		20.5	22.4

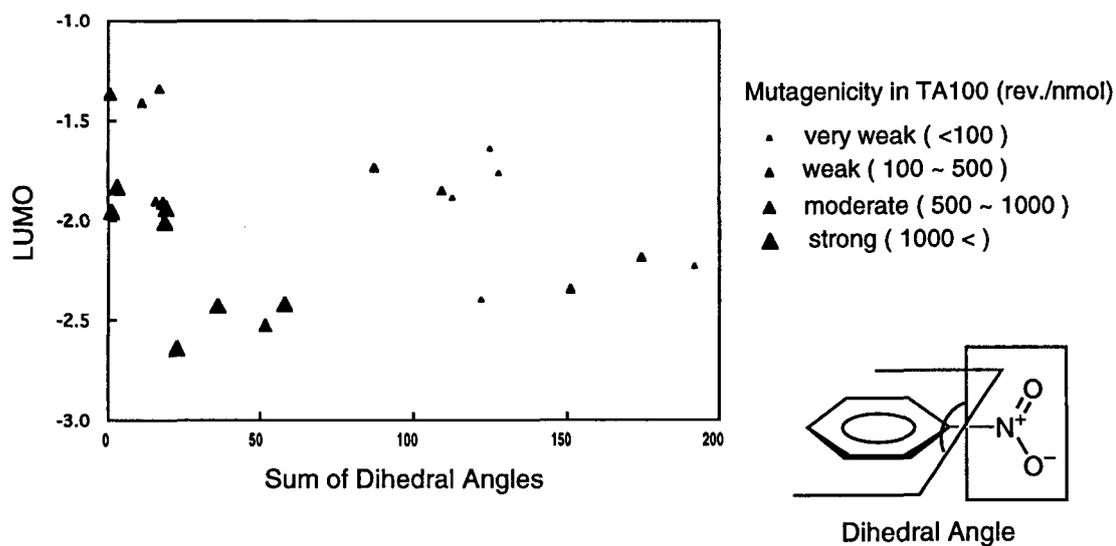
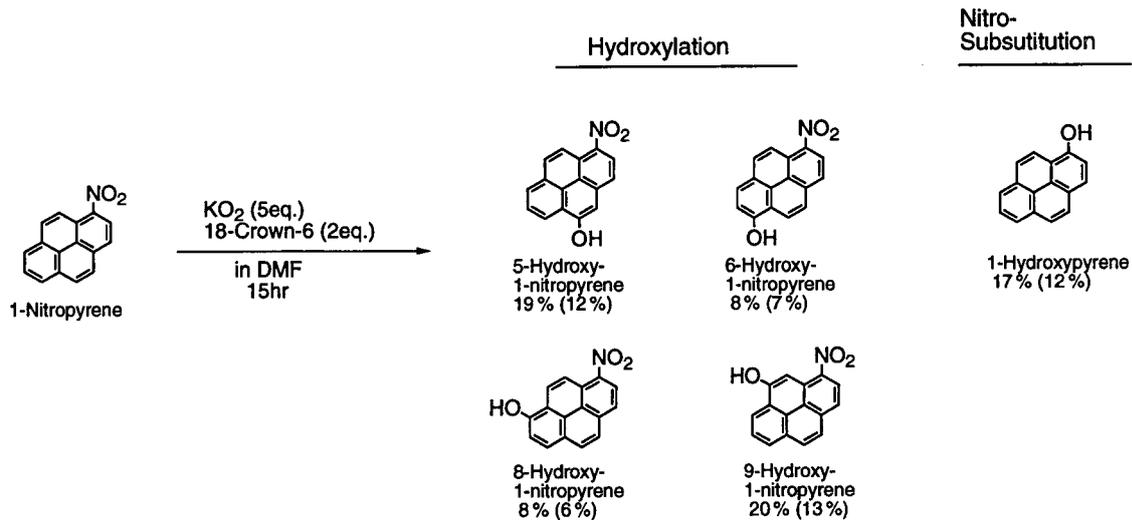


Fig. 8. Effects of LUMO energy and dihedral angles toward mutagenic potencies of mono-, di- and trinitrophenanthrenes



(): Reaction was run under anaerobic condition for 2hr.

Fig. 9. Oxidation of 1-nitropyrene with KO_2 /18-crown-6

きはニトロ基の酸素原子間の距離とはほぼ等しい。そのため、還元代謝反応が進行するニトロ基の他に二面角が大きいニトロ基が存在すると、DNA との付加反応はニトロ基が立体障害となって阻害され、変異原性が低下することが考えられる。以上、ニトロアレンの変異原性の強さは、ニトロ基の立体構造に大きく影響すること、一方、同程度の二面角を示すニトロアレンの場合、変異原性の強さはニトロ基の化学的な還元性とよい相関がみられることが明らかとなった。これらの結果より、ニトロアレンの変異原性の発現過程で、ニトロレダクターゼによる還元代謝活性化反応にはニトロ基の化学的な還元されやすさとニトロ基の母核との平面性が、また、DNA との付加反応には分子全体の平面性が変異原活性の強さに影響を与える重要な化学的因子であることが示された。

5. ニトロアレンの水酸化代謝反応の化学的解析^{32,33)}

ニトロアレンは、ニトロ基が還元代謝されて変異原性を発現するが、生体内での毒性発現にはニトロ基の還元代謝活性化反応に加え、母核の酸化代謝反応も関与していることが近年明らかとなっている。1-ニトロピレンは、ニトロ基が還元代謝活性化されて変異原性を発現する。しかし、ラット肝 S9 存在下、1-ニトロピレンは酸化代謝が進行して 3 位、6 位、8 位及び 10 位が水酸化されたヒドロキシニトロピレンとニトロ基が水酸基に置換した 1-ヒドロキシピレンが生成すること、また、この酸化代謝体の中に 1-ニトロピレンよりもさらに強力な変異原性を有する化合物が存在することが El-Bayoumy と Hecht らによって報告された¹⁰⁾。この結果は、1-ニトロピレンは生体内では水酸化代謝された後、ニトロ基が還元代謝されて毒性を発現する

ことを示唆している。また、Howard らは発癌物質 3-ニトロフルオランテンが肝ミクロソームにより母核の酸化が進行して 1 位、6 位、7 位、8 位及び 9 位の水酸化体が生成し、この水酸化代謝反応が発がん活性化に関与していることを明らかにしている³⁴⁾。このようにニトロアレンは酸化酵素によって容易に水酸化体へと代謝される。しかし、化学的にはニトロアレンはニトロ基の電子吸引効果により非常に酸化反応を受けにくい化合物である。特にニトロアレンの化学的な直接水酸化反応例はほとんどない。

多環芳香族炭化水素の水酸化反応は、直接酵素的に水酸化反応が進行する場合と、エポキシド体へと酸化代謝後、非酵素的に水酸化体へと変換される場合が考えられる。前者の場合、化学的には同様の反応はヒドロキシラジカルによって進行することが考えられる。また後者の場合、エポキシド体の生成は mCPBA 等の過酸化剤で同様の反応が進行する例が多い。1-ニトロピレンは mCPBA によって K 領域のエポキシド体が生成するが、収率は悪く反応に長時間を要する。そこで 1-ニトロピレンの酸化のモデル反応を種々の活性酸素（ヒドロキシラジカル、オキセン、スーパーオキシドなど）を化学的に発生させた系で試みた。その結果、1-ニトロピレンは KO_2 /18-クラウン-6 の系で発生させたスーパーオキシドによって水酸化反応が容易に進行することが明らかとなり、5 位、6 位、8 位、及び 9 位への直接水酸化体とニトロ基の水酸基への置換体（1-ヒドロキシピレン）が高収率で得られた (Fig. 9)。このうち 6-および 8-ヒドロキシ-1-ニトロピレンと 1-ヒドロキシピレンは、1-ニトロピレンの酸化代謝体として明らかにされており、この結果は生体内での 1-ニトロピレンの酸化代謝反応にスーパーオキシドが関与している可能性を示唆して

いる。次に1-ニトロピレンとスーパーオキシドの反応の特徴を解析した。スーパーオキシドによる水酸化反応は、塩基性非プロトン溶液中（ジメチルホルムアミド）でスーパーオキシドの求核性を高めることによって進行し、ベンゼン中では反応は全く進行しなかった。また、反応はアルゴン置換による嫌氣的条件下で容易に進行し、反応に酸素分子は関与していないことが明らかとなった。一般にスーパーオキシドによる酸化は、1) 求核的に作用して開始される酸化、2) 一電子還元後、酸素分子が付加する酸化、3) 水素引き抜き反応で開始される酸化、の3つの反応機構で進行することが考えられるが、これらの結果より1-ニトロピレンの水酸化反応は、スーパーオキシドが1-ニトロピレンに求核的に反応して進行することが明らかとなった。

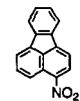
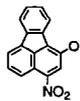
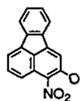
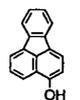
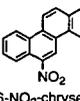
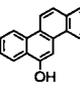
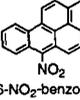
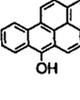
ジニトロピレンは二つのニトロ基の電子吸引効果により、1-ニトロピレンと比べて更に酸化され難い化合物であり、mCPBAやOsO₄に対しても全く反応が進行しない。一方、スーパーオキシドに対しては容易に反応が進行し、1,3-, 1,6-及び1,8-ジニトロピレンは、それぞれニトロ基の水酸基への置換反応が選択的に進行して3-, 6-及び8-ヒドロキシ-1-ニトロピレンが生成した。ジニトロピレンの二つのニトロ基は電子引き抜きを伴う一般的な酸化反応に対しては不利に働く。しかし、求核的な付加反応によって開始されるスーパーオキシドの酸化に対しては、ジニトロ体は非常に良い基質になることが明らかとなった。

他のニトロアレンとスーパーオキシドとの反応についても検討してみた（Table 5）。その結果、生体内で水酸化代謝後、毒性を発現する環境発がん物質3-ニトロフルオランテン³⁰は、母核への直接水酸化反応とニトロ基の水酸基への置換反応が進行して、1-及び2-ヒドロキシ-3-ニトロフルオランテンと3-ヒドロキシフルオランテンが生成した。一方、6-ニトロクリセンや6-ニトロベンツ[a]ピレンは、ニトロ基の水酸基への置換反応が選択的に進行して、6-ヒドロキシクリセン及び6-ヒドロキシベンツ[a]ピレンが生成した。

スーパーオキシドによる水酸化反応は、ニトロアレンに対しての特徴的な反応であり、ニトロ基の付加していないピレンやフルオランテン、ベンツ[a]ピレンはこれらのニトロ体の水酸化反応と同様の条件下、ほとんど反応が進行しなかった。このことは、ニトロ基の電子吸引効果によって電子欠損状態のニトロアレンが、スーパーオキシドによる求核的な水酸化反応の非常によい基質となることを示している。

以上、生体内での酸化反応の作用分子種と考えられる活性酸素種を化学的に発生させ、ニトロアレンの水酸化反応を検討した結果、ニトロアレンはKO₂/18-クラウン-6の系で発生させたスーパーオキシドによって母核の直接水酸化反応とニトロ基の水酸基への置換反応が進行し、生

Table 5. Oxidation of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons with KO₂/18-crown-6

entry	substrate	reaction conditions		product	yield (%)
		KO ₂ /crown (eq.)	solvent, time		
1	 3-NO ₂ -fluoranthene	8 / 2	DMF, 40min		36
					28
					22
2	 6-NO ₂ -chrysene	10 / 4	DMF, 4h		65
3	 6-NO ₂ -benzo[a]pyrene	10 / 4	DMF, 1h		70

体内での水酸化代謝体と同様の酸化体が生成することが明らかとなった。スーパーオキシドは、生体内ではキサンチンオキシダーゼによって発生し³⁵、またチトクローム P450の酸化活性種の一つであること³⁶から、スーパーオキシドによるニトロアレンの化学的な酸化反応が、生体内での水酸化代謝反応のモデル反応として有効であること、また、ほかの酸化剤では合成不可能な酸化代謝体の合成とその予測にも有効であることを示している。

6. ニトロアレンによるスーパーオキシドの生成反応の解析^{37,38}

キノン系化合物によって生じる核酸の酸化的障害は、キノン系化合物が一電子還元酵素及び酸素分子とレドックスサイクルを形成することによって発生したスーパーオキシドによって引き起こされる³⁹。すなわち一電子還元酵素によりキノン系化合物が還元されるとラジカル種（セミキノンアニオンラジカル）が生成する。セミキノンアニオンラジカルは、酸素分子と反応すると酸素が還元的に活性化されてスーパーオキシドが発生する。スーパーオキシドは、更にスーパーオキシドジスムターゼなどによる酵素的な反応や遷移金属触媒型 Haber-Weis 反応によって、過酸化水素やヒドロキシルラジカルを発生する。このようにして発生した活性酸素種が核酸に対して、核酸塩基の修飾（8-ヒドロキシグアニンやチミングリコール等の生成）、リボース部位の酸化分解、リン酸エステル鎖の切断等の損傷反応を引き起こすことが明らかとなっている。一方、ニトロ

アレーンのニトロ基の還元代謝活性化反応は好氣的条件下で阻害される⁴⁰⁾。ニトロアレーンはキノン系化合物と類似した還元特性を示すことから、この阻害反応は、還元代謝過程で生成するアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応（スーパーオキシドの生成反応）によって引き起こされることが考えられる (Fig.10)。そのため、ニトロアレーンは、キノン系化合物と同様に還元代謝過程で酸素分子とレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを発生することが示唆される。しかし、ニトロアレーンの毒性発現に活性酸素による酸素障害の関与を明らかにしている報告例はない。

キノン系化合物の酸化障害能の構造活性相関は、レドックスサイクルの第一のステップであるキノン系化合物の一電子還元反応を解析することによって明らかにされてきた⁴¹⁾。そして一電子還元されやすさ（アニオンラジカルの生成のしやすさ）がスーパーオキシド発生能と相関することが報告されている⁴²⁾。一方、レドックスサイクルの第二のステップである、セミキノンアニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応は、スーパーオキシド生成のための直接的な反応であるにもかかわらず、この電子移動反応の解析はほとんど行なわれていない。そこで筆者らは電気化

学的手法を用いて、キノンおよびニトロアレーンと酸素分子との間の一電子移動反応の解析法を確立し、スーパーオキシドの生成反応の構造化学的な解析を行なった。種々のキノンと酸素分子との間の電子移動のいきやすさを比較する為には、電子移動反応の数値化が必要である。ポテンシャルステップクロノクーロメトリー法 (PSCC 法) は、電位をある値から第2の値にステップしたときに得られる電気量 (Q) の経時変化 (クーロメトリー) を調べる方法であり、電極反応の速度論的パラメータの解析に有効な手法である^{42,43)}。そこで PSCC 法を用いて、キノンアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応によって生じるレドックスサイクルの回数 (ターンオーバー数) を数値化し、キノン化合物のスーパーオキシド生成能を明らかにした。

測定は過塩素酸テトラエチルアンモニウム (0.1M) を支持電解質とした DMF 溶液中で行なった。初期電位は 0 mV に設定し、次いで電位をそれぞれの化合物の一電子還元電位 (Epc1) に 250msec ステップした時の還元電気量の経時変化 (Q vs t) を測定した。還元電気量の対時間プロット曲線 (クロノクーログラム) は、Anson プロット (Q vs t^{1/2}) 表示法により直線プロットへと変換した後、この直線プロットの勾配 (μC/msec^{1/2}) を求めた。実験は、嫌

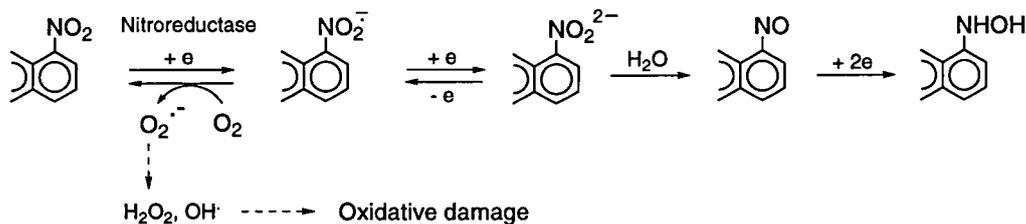


Fig.10. Superoxide generation by nitroarene anion radical with molecular oxygen

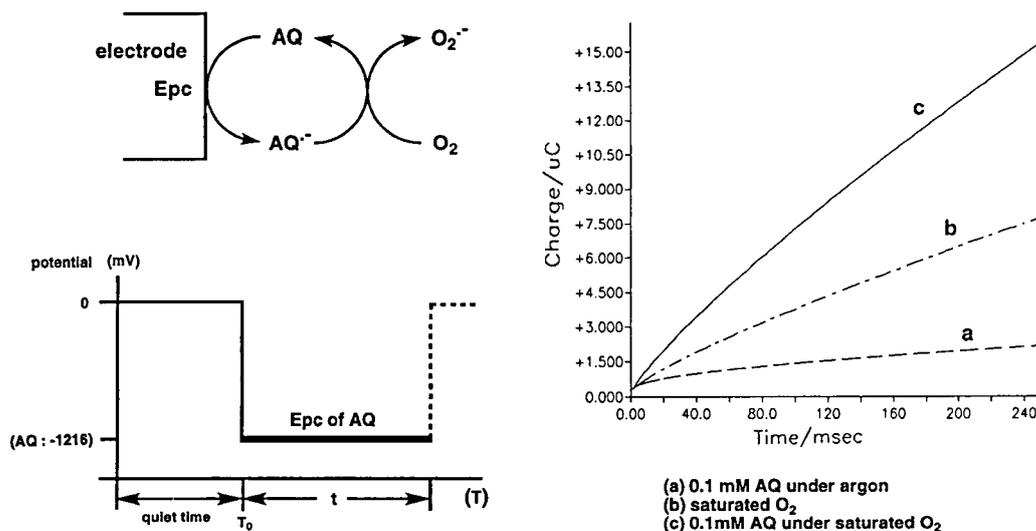


Fig.11. Catalytic activity of anthraquinone anion radical (AQ^{-•}) for superoxide generation studied by potential step chronocoulometry (PSCC) technique

Table 6. Chronocoulometric data for quinones and nitroarenes in the presence or absence of oxygen: catalytic activity of quinone and nitroarene anion radicals for superoxide generation

compounds	Epc1 ^a (mV vs. Ag/Ag ⁺)	Epa1 (mV vs. Ag/Ag ⁺)	[S] ^b ($\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$)	[S+O ₂] ^b ($\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$)	[O ₂] ^b ($\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$)	Amount of O ₂ ^{-c} (mmol dm ⁻³)	Turnover number ^d
QUINONE							
benzoquinone	-812	-731	0.022	0.027	0.006	1	0
1,4-naphthoquinone	-981	-910	0.019	0.037	0.017	3	0
1-OH-anthraquinone	-1052	-982	0.018	0.048	0.030	9	0.1
menadione	-1071	-998	0.018	0.060	0.035	46	0.5
1-Cl-anthraquinone	-1166	-1095	0.020	0.389	0.225	786	7.3
anthraquinone	-1216	-1148	0.018	0.755	0.480	1400	14.1
5,12-naphthacenequinone	-1319	-1252	0.019	1.667	1.087	3060	29.7
NITROARENE							
4-NO ₂ -quinoline <i>N</i> -oxide	-1012	-942	0.017	0.041	0.015	43	0.5
1,3-diNO ₂ -naphthalene	-1095	-1023	0.018	0.079	0.048	70	0.7
1,7-diNO ₂ -naphthalene	-1134	-1065	0.019	0.198	0.107	395	3.9
3-NO ₂ -fluoranthene	-1204	-1132	0.019	0.521	0.378	675	6.5
<i>m</i> -diNO ₂ -benzene	-1227	-1152	0.018	0.560	0.400	773	7.8
1,6-diNO ₂ -naphthalene	-1248	-1178	0.019	0.738	0.550	928	9.2
1-NO ₂ -pyrene	-1325	-1257	0.018	1.394	1.086	1580	16.2

^a Applied potential for PSCC experiment.

^b The potentials were stepped from 0mV to Epc of compounds. The integrations of current were measured for 250ms with 0.1mM substrate under argon [S], 0.1mM substrate under saturated O₂ [S+O₂] or saturated O₂ [O₂] in DMF (1mL) containing 0.1mmol dm⁻³ TEAP at a Pt electrode (diam. 1.6mm), and the diffusional slopes of a liner plot (charge vs t^{1/2}; Anson plot) were obtained. All values were subtracted by [DMF] as background. The concentration and diffusion coefficient of saturated O₂ in DMF are 4.5 mmol dm⁻³ and 4.7 × 10⁻⁵ cm²/s.

^c Amounts of generated superoxide = [S+O] - ([S]+[O]) × 5.45 × 1000.

^d Turnover numbers of redox cycling = ([S+O] - ([S]+[O])) / [S].

氣的条件下および化合物非存在下でも行い、これらの勾配値から化合物のスーパーオキシド生成量とターンオーバー数で表わした触媒能を算出した。アントラキノンの場合、一電子還元電位 (Epc 1) は -1216mV である為、この電位条件下でPSCC法を行なった (Fig. 11)。その結果、酸素飽和条件下、アントラキノン 0.1mM 溶液で測定された電気量 ([S+O₂] = 0.755 $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$) は、嫌氣的条件下 ([S] = 0.018 $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$) およびアントラキノン非存在下 ([O₂] = 0.480 $\mu\text{C}/\text{msec}^{1/2}$) での電気量をはるかに上回ることが示され、アントラキノンアニオンラジカルは酸素分子とレドックスサイクルを繰り返してスーパーオキシドの発生を触媒していることが示された。さらに Anson プロット変換で求めた電流量からスーパーオキシドの発生量は 1400mmol dm⁻³、ターンオーバー数は 14.1 であることが明らかとなった。

同様の実験をニトロアレーンについても行い、キノンと比較した (Table 6)。その結果、ニトロアレーンはキノンと同様に酸素分子への一電子移動反応が進行してスーパーオキシドの生成反応を触媒することが明らかとなった。更にこの電子移動反応は、酸化還元電位のギャップを乗り越えて進行し、酸化還元サイクルを形成することにより触媒的に活性化していること、スーパーオキシドの生成能は化合物に固有の一電子酸化電位 (Epa 1) に依存していることを明らかにした。すなわち、-1000mV ~ -1300mV に酸化電位 (Epa 1) を有するキノンやニトロアレーンは、ア

ニオンラジカルから酸素分子への電子移動反応がみられ、スーパーオキシドの発生を触媒していることが示された。特に酸素の還元電位 (Epc 1 = -1437mV) に近い Epa 1 を有する化合物 (5,12-ナフタセンキノン, 1-ニトロピレン) ほどスーパーオキシドを発生しやすいことが明らかとなった。同程度の Epa 1 を持つキノンとニトロアレーンと比較したとき、ニトロアレーンのスーパーオキシド発生量はキノンの約 60% であった (Fig. 12)。

以上、ニトロアレーンはキノンと同様に好氣的条件下ではスーパーオキシドを発生することが示された。ニトロアレーンによるスーパーオキシドの生成反応は、ニトロアレーンがキノンと同程度の一電子還元性を有していることに

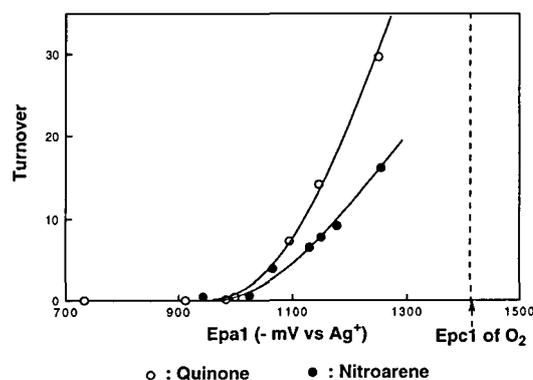


Fig.12. Correlation between catalytic activity for superoxide generation and one electron oxidation potentials (Epa 1) of quinone and nitroarene anion radicals

起因していると考えられる。また、ニトロアレンは一電子還元後、二電子目の還元が進行するとニトロソ体が不可逆的に生成する。その為、効率の良いレドックスサイクルの形成にはアニオンラジカルが生成後、二電子目の還元が起きにくいことが必須であると考えられる。このことは、一電子目の還元後、二電子目の還元が起きにくいニトロアレンは、ニトロソ体への還元代謝活性化機構を伴う毒性は弱い、好氣的条件下では酸素分子とレドックスサイクルを形成してスーパーオキシドを生成するため、酸素毒性を示すことが予測される。一方、TA98で強力な変異原性を示すニトロアレンは、化学的には一電子還元後、速やかに二電子還元反応が進行してニトロソ体を生成する為、ニトロ還元酵素による還元代謝活性化は酸素分子で阻害されにくく、好氣的条件下でも酸素毒性は低いことが予測される。

7. ま と め

ニトロ多環芳香族炭化水素 (ニトロアレン) はニトロ基の効果により無置換の多環芳香族炭化水素とはかなり異なった構造化学的特徴及び酸化還元特性を有し、この化学的特性が毒性の発現に大きく影響していることが考えられる。ニトロアレンはニトロ基が還元代謝活性化された後、DNA と付加体を形成して変異原性を発現する。ニトロ還元酵素によるニトロ基の還元反応は、化学的な一電子および二電子還元性に大きく影響し、特に二電子還元性が高くニトロソ体に還元されやすいニトロアレンがニトロレダクターゼ欠損株 (TA98NR) で強力な変異原性を示したことは、この二電子還元特性を有しているニトロアレンが人に対して強力な毒性を示す可能性が示唆される。また、ニトロ基の立体的な特徴がニトロ基の還元と DNA への付加反応に大きく影響していることが示唆された。すなわち、ニトロ基のペリ位の水素と、ニトロ基の芳香環との二面角の大きさがニトロ還元酵素の接近を阻害していることが考えられた。また、DNA の塩基間の幅は約 3.4 Å であるため、ニトロアレンの平面性が DNA との付加反応に大きく影響し、還元代謝されていないニトロ基の二面角が大きいと付加反応が阻害されることが考えられた。なお新規に合成した、3,6-ジニトロベンツ[a]ピレン、6-アザベンツ[a]ピレンの1-及び3-ニトロ体およびそのN-オキシド体は、大気中に存在する環境汚染物質であることが明らかとなった。特にアザベンツ[a]ピレンのニトロ体が非常に強力な変異原性を示したことから、大気中に大量に存在している種々のアザアレンがニトロ化されると強力な変異原性を示すことが予測され、環境汚染物質としてのニトロアザアレンの重要性が示唆された。

ニトロアレンは、ニトロ基の還元代謝に加えて、近年、生体内では母核の水酸化代謝反応が毒性発現に関係していることが明らかにされている。種々の活性酸素のうち

スーパーオキシドが唯一ニトロアレンを水酸化すること、またスーパーオキシドは、P450やキサンチンオキシダーゼの酸化活性種であることから、ニトロアレンの生体内での水酸化代謝反応にスーパーオキシドが関与している可能性が考えられた。

またニトロアレンがキノンと類似した酸化還元特性を示すことからニトロアレンの毒性としてスーパーオキシドによる酸素毒性を予測した。ニトロアレンは、嫌氣的条件下ではニトロ基はニトロ還元酵素によって、ニトロソ体、ヒドロキシルアミノ体へと還元されて、DNA と付加することによって毒性を発現する。一方、好氣的条件下では、このニトロ還元酵素によるニトロ基の還元は阻害される。しかし、この阻害反応はニトロアニオンラジカルから酸素分子への一電子移動反応によってスーパーオキシドの生成を引き起こしている可能性が示唆された。

以上、ニトロアレンについてニトロ基の還元反応と母核の酸化反応を研究し、反応および構造化学的因子の有機化学的解析が毒性評価に有効であること、化学的な活性酸素発生系が酸化代謝体の予測に有効であること、毒性発現に活性酸素が関与する可能性が予測されることなどを明らかにした。これらの結果は、ニトロアレンの毒性発現機構の解析と予測に有効な知見を与えると考えられる。

謝 辞

本研究遂行に際し、ご協力を頂いた、前福岡県保険環境研究所常磐寛博士 (現九州女子大学教授)、福岡県保険環境研究所世良暢之博士に深く感謝いたします。また、本研究総括に際し、適切にご指導、ご鞭撻を賜りました前東京大学薬学部教授廣部雅昭博士に謹んで感謝致します。

文 献

- 1) Graebe, C.: *Liebigs Ann.*, **158**, 292 (1871)
- 2) Schmidt, J.: *J. Prakt. Chem.*, **9**, 250 (1874)
- 3) Morris, H. P., Dubnik, C. S. and J. M. Johnson, J. M.: *Natl. Cancer Inst.*, **10**, 1201 (1950)
- 4) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5135~5139 (1975)
- 5) Pitts, Jr., J. N., van Cauwenberghe, K. A., Grosjean, D., Schmid, J. P., Fitz, D. R., Belser, Jr., W. J., Knudson, G. B. and Hynds, P. M.: *Science*, **202**, 515~519 (1978)
- 6) Rosenkranz, H. S., McCoy, E. C., Sanders, D. R., Butler, M., Kiriazides, D. K. and Mermelstein, R.: *Science*, **209**, 1039~1043 (1980)
- 7) Mermelstein, R., Kiriazides, D. K., Butler, M., McCoy, E. C. and Rosenkranz, H. S.: *Mutat. Res.*, **89**, 187~196 (1981)
- 8) Pitts Jr., J. N., Zielinska, B. and Harger, W. P.: *Mutat. Res.*, **140**, 81~85 (1984)
- 9) Chou, M. W., Heflich, R. H., Caciono, D. A., Miller, D. W., Freeman, J. P., Evans F. E. and Fu, P. P.: *J. Med. Chem.*, **27**, 1156~1161 (1984)
- 10) El-Bayoumy, K. and Hecht, S. S.: *Cancer Res.* **43**, 3132~3137 (1983)

- 11) Fukuhara, K., Miyata, N., Matsui, M., Matsui, K., Ishidate, Jr. M. and Kamiya, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3158~3161 (1990)
- 12) Fukuhara, K., Takei, M., Kageyama, H., Kusuma, M. and Miyata, N.: *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, P-3 (1993)
- 13) Iwata, N., Fukuhara, K., Suzuki, K., Miyata N. and Takahashi, A.: *Chem.-Biol. Interactions*, **85**, 187~197 (1992)
- 14) Drummond, L., Ohno, Y., Fukuhara, K., Miyata N. and Takahashi, A.: *Eisei Shikenjo Hokoku*, **110**, 7~14 (1992)
- 15) Miller, D. W., Evans, F. E. and Fu, P. P.: *Spectros. Int. J.*, **4**, 91 (1985)
- 16) Yamada, M., Espinosa-Aguirre, J. J., Watanabe, M., Matsui, K., Sofuni, T. and Nohmi, T.: *Mutat. Res.*, **375**, 9~17 (1997)
- 17) Djuric, Z., Potter, D. W., Heflich, R. H. and Beland, F. A.: *Chem.-Biol. Interactions*, **59**, 309 (1986)
- 18) Fukuhara, K., Hakura, A., Sera, N., Tokiwa H. and Miyata, N.: *Chem. Res. in Toxicology*, **5**, 149~153 (1992)
- 19) Fukuhara, K., Miyata N. and Kamiya, S.: *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3743~3744 (1990)
- 20) Sera, N., Fukuhara, K., Miyata, N., Horikawa K. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **280**, 81~85 (1992)
- 21) Sera, N., Kai, M., Horikawa, K., Fukuhara, K., Miyata N. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **263**, 27~32 (1991)
- 22) Sera, N., Fukuhara, K., Miyata N. and Tokiwa, H.: *Mutagenesis*, **9**, 47~52 (1994)
- 23) M. Seixas, G., Andon, B. M., Hollingshead, P. G., and Thilly, W. G.: *Mutat. Res.*, **102**, 201~212 (1982)
- 24) Kosuge, T., Zenda, H., Nukaya, H., Terada, A., Okamoto, T., Shudo, K., Yamaguchi, K., Iitaka, Y., Sugiura, T., Nagao, M., Wakabayashi, K., Kosugi, A., and Saito, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1535~1538 (1982)
- 25) Ho, C-H., Clark, B. R., Guerin, M. R., Barkenbus, B. D., Rao, T. K., and Epler, J. L.: *Mutat. Res.*, **85**, 335~345 (1981)
- 26) Shinohara, R., Kido, A., Okamoto, Y. and Takeshita, R.: *J. Chromatogr.*, **256**, 81~91 (1983)
- 27) Ochiai, E.: *Aromatic Amine Oxides*, Amsterdam: Elsevier, 1967
- 28) Tada, M., Kohda, K. H., and Kawazoe, Y.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **75**, 976~985 (1984)
- 29) Fukuhara, K., Takei, M., Kageyama H. and Miyata, N.: *Chem. Res. in Toxicology*, **8**, 47~54 (1995)
- 30) Sera, N., Fukuhara, K., Miyata, N. and Tokiwa, H.: *Mutat. Res.*, **349**, 137~144 (1995)
- 31) Drew, H. R., Wing, R. M., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K. and Dickerson, R. E.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2179~2183 (1981)
- 32) Fukuhara, K. and Miyata, N.: *Chem. Res. in Toxicology*, **8**, 27~33 (1995)
- 33) Imaida, K., Uneyama, C., Ogasawara, H., Hayashi, S., Fukuhara, K., Miyata, N. and Takahashi, M.: *Cancer Research*, **52**, 1542~1545 (1992)
- 34) Howawd, P. C., Flammang, T. J. and Beland, F. A.: *Carcinogenesis*, **6**, 243~249 (1985)
- 35) 中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編, “活性酸素-生物での生成・消去・作用の分子機構”, 共立出版 (1988)
- 36) Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 7311~7316 (1983)
- 37) Fukuhara, K. Hara Y. and Miyata, N.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 955~956 (1994)
- 38) Fukuhara, K., Hara Y. and Miyata, N.: *un Oxygen Radicals*, ed. Yagi, K., Kondo, M. Niki E. and Yoshikawa, T. Elsevier, Amsterdam, 11~14 (1992)
- 39) Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D. and Graham, D.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 2~16 (1992)
- 40) Wardman, P. and Clarke, E. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1267~1274 (1975)
- 41) O'Brin, P. J.: *Chem.-Biol. Interact.*, **80**, 1~41 (1991)
- 42) O'Dom G. W. and Murray, R. W.: *Anal. Chem.*, **39**, 51~54 (1967)
- 43) Anson, F. C.: *Anal. Chem.*, **38**, 54~57 (1966)