

NOドナーを含む薬剤を投与したマウスにおける *in vivo*リアルタイムNO計測

川 端 千彩子, 安 井 裕 之, 桜 井 弘
(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

Real-time *in vivo* NO Monitoring in Mice Treated with NO-releasing Agents

Chisako KAWABATA, Hiroyuki YASUI, Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Inorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Summary

Nitric oxide (NO) is a free radical well recognized for its various physiological roles. Despite its importance, direct detection of NO is difficult for its high reactivity with other substances especially *in vivo*, where NO is rapidly converted to nitrosylhemoglobin and other oxidized species. In this study, we used NO-selective microelectrodes, which are capable of real-time detection of NO, to quantify NO released from NOC7 and NO-aspirin, the latter being a new type of NO-releasing drugs currently in clinical trial. NO was detected in *in vitro* experiments as well as in the liver and kidney of ddY mice given both NO-releasing compounds. We also used ESR spectroscopy to determine the formation of nitrosylhemoglobin in the blood of mice.

一酸化窒素 (NO) は多様な生理活性をもつフリーラジカルであり、様々な研究がなされてきている。特に内因性のNOは血管弛緩因子 (EDRF) の正体として1980年代に発見され以来、その血管弛緩作用をもとにした薬剤の開発が進められている¹⁾。また、NOはその他多くの生理作用に関与する物質であり、胃消化管の調節因子として亜鉛などの微量栄養素と関連性をもつことも知られている²⁾。生体内で重要な役割をもつNOは、フリーラジカルであるために半減期が短く、他のフリーラジカルや金属と素早く反応するため、その直接的な検出は非常に困難である。特に生体内ではタンパク質のSH基と結合し、ニトロソチオール化合物 (RSNO) を形成することや、血液中のヘモグロビン (Hb) と素早く反応し、ニトロシルヘモグロビン (NO-Hb) を形成することが知られている³⁾。このようなNOの代謝生成物も生理作用に大きく関与することが知られているため、NOそのものの正確な定量が重要である。しかし、NOを測定するためにはその代謝生成物を測定する間接的な方法が一般的である⁴⁾。こうした中、NOに選択的な電極を用いた電極法はNOそのものをリアルタイムで計測できる最も有効な方法であると考えられている⁵⁾。我々はこの電極法を用い、NOドナーであるNOC7の速度論的解析に基づくNOの新定量法を提案した⁶⁾。本研究では、この方法を *in vivo* に応用し、ddYマウスの肝臓ならびに腎臓中のNO濃度をリアルタイムで定量することを試みた。

近年、非ステロイド性抗炎症薬 (以下NSAIDs) にNO放出誘導基を結合したNO-NSAIDsの開発が欧米で活発に進められている。このNO-NSAIDsは既存のNSAIDsより高い有効性をもつことが報告されているが、そのNO放出メカニズムは未だ不明確な部分が多い⁷⁾。NO-NSAIDsは元のNSAIDとNO放出部位がエステル結合した形を有している。このエステル結合は体内に多く分布するエステラーゼによる加水分解を受けて、NSAIDとNO放出部位に開裂する。NSAIDはシクロオキシゲナーゼ阻害作用により薬効を発揮する一方、放出されたNOによって、シクロオキシゲナーゼ阻害により起こる胃粘膜傷害を抑制すると考えられている。NOの放出には様々なタンパクや金属が関与するとされ

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

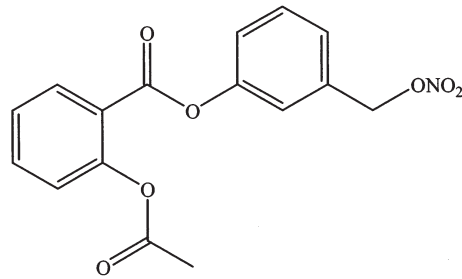


Fig. 1 Chemical structure of NO-aspirin (NO-asa).

ているが、自発的に発生するという報告もあり、詳細は未だ不明確である^{7, 8)}。本研究では、NO-NSAIDsの代表的化合物であるNO-アスピリン（以下NO-asa）(Fig. 1)を用いて、電極法により*in vitro*ならびに*in vivo*でNO放出メカニズムの解明を試みた。

装置・実験方法

1. 電極法

NOモニターには4チャンネル型のフリーラジカルアナライザーであるApollo 4000 (World Precision Instruments社製)とNO電極ISO-NOPF200 (同様にWPI社製)を用いた。電極表面で以下の反応に伴う微小電流を検知することにより、NOを選択的に測定することが可能である^{5, 9)}。



2. *In vitro*実験

NO電極をPBS (37℃)中に浸し、電流値が安定した後0.1 MのNaOHに溶解した1-hydroxy-2-oxo-3-(N-methyl-3-aminoethyl)-3-methyl-1-triazene (NOC7)を、終濃度が0.25, 0.5, 1, および2 μMとなるように加えた。NOC7はジアミンとNOが二分子結合した化学構造を有し、pHが高いほど安定した構造をとっている。pH 7.4のバッファー中に加えると、プロトンと反応して一分子のNOC7から二分子のNOが自発的に放出する¹⁰⁾。NOC7から放出したNOに由来する電流値の経時変化から、最小二乗法により放出速度定数 k_g および消失速度定数 k_d を求め、Nakashimaらによる計算式に代入し⁶⁾、最高NO濃度([NO]_{max})を求めた。[NO]_{max}と最大電流値(Current_{max})との相関性を求め、検量線を作成した。

$$[\text{NO}]_{\text{max}} = 2[\text{NOC7}]_0 \left(\frac{k_g}{k_d} \right)^{\frac{1}{1-(k_g/k_d)}} \quad (k_g \text{は NOC7 から放出される NO の放出速度定数および } k_d \text{ は NO の消失速度定数である)}$$

また、dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解したNO-asaを、終濃度が10, 40, および80 μMとなるようPBS中に加え、得られた電流値から放出されたNO濃度を定量した。なお、NO-asaを用いた実験では、0.2 U/mLのエステラーゼ(ブタ肝臓由来, Sigma社製)を予めPBS中に加えてから実験を行った。

3. *In vivo*実験

6-7週齢の雄性ddYマウスに50 mg/kgのペントバルビタールを腹腔内投与して麻酔をした後、保温パッド上で開腹した。肝臓および腎臓中にNO電極を挿入し、電流値の変化を記録した。電流値が安定化した後、50, 100, および200 μmol/kg体重のNOC7あるいは50, 100, および200 mg/kg体重のNO-asaを尾静脈内に注射し、電流値の変化を記録した後にNO濃度を換算した。

4. ESR実験

ESR測定装置はJES RE1-X (JEOL社製)を用い、以下の条件でNOと血液中のHbが結合したNO-Hbスペクトルを測定した。出力：5 mW, 変調：100 kHz, 変調幅：0.63 mT, 掃引時間：4分, 応答時間：0.03秒, 磁場：330 ± 30

mT, 温度：77 K (液体窒素温度)

*In vitro*実験：終濃度が4 mMとなるようにNOC7をddYマウスから採った新鮮血液と混合し、経時的にスペクトルを観察した。*In vivo*実験：NOC7 (200 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重) もしくはNO-asa (50 mg/kg 体重) を投与したマウスの血液を採り、経時的にスペクトルを観察した。

結果・考察

種々の濃度のNOC7から放出されたNOに由来する電流値の経時変化を観察したところ、NOC7の濃度に依存して $\text{Current}_{\text{max}}$ が大きくなった。また、計算式により得られた $[\text{NO}]_{\text{max}}$ 値と $\text{Current}_{\text{max}}$ 値をプロットしたところ、直線的な相関性が得られたため ($\text{Current}_{\text{max}} = 7.752[\text{NO}]_{\text{max}} + 0.275$)、これを検量線とし、 $[\text{NO}]_{\text{max}}$ 値を求めた。

同様の実験にNO-asaを用いてNO由来の電流値の経時変化をモニタリングしたところ、NO-asaの終濃度に依存して最大電流値が大きくなった (Fig. 2A)。それぞれの最大電流値とNO-asaの終濃度との間にもよい直線性が得られ、NO-asaの濃度に依存してNOが放出されていることを確認した (Fig. 2B)。NO-asaがNOを放出するにはエステラーゼによる加水分解が必須である。そこで、NO-asaの濃度を一定にし、酵素量を変化させて電流値の経時変化を観察した。その結果、NO-asaから放出されるNO量は、薬物濃度のみならずエステラーゼ量にも依存することが分かった。

NOC7をddYマウス尾静脈より投与し、肝臓および腎臓のNOレベルを経時的に観察した。両臓器共にNOC7投与量に依存して $[\text{NO}]_{\text{max}}$ 値が増加することが分かった (Fig. 3)。高濃度においては臓器間で有意な差がみられた。マウスの臓器における血流量は、肝臓では1.8 ml/分であるのに対し、腎臓では1.3 ml/分である¹¹⁾。臓器間でNOレベルが異なることは臓器の血流量による影響を受けるものと考えられるが、今後さらに検討する必要がある。同様にNO-asaを投与し、肝臓および腎臓のNOレベルの経時変化を観察し、それぞれの $[\text{NO}]_{\text{max}}$ 値を比較したところ、両臓器共に投与量に依存して $[\text{NO}]_{\text{max}}$ 値が増加した (Fig. 3)。しかしNO-asaの場合、NOC7とは異なり、肝臓よりも腎臓中のNOレベルが高く、特に200 mg/kg 体重のときは有意に高いことがわかった。このため、NO-asaはNOC7とは異なる代謝反応を受けていることが示唆された。NO-asaはNOを徐々に放出することが知られているため⁷⁾、この動態がNO-レベルの差に結びついたのでないかと考えられる。

次に、放出されたNOがHbと結合してできる特徴的なNO-HbのESRスペクトルが観察できるかどうかを検討した。

健常マウスの血液を心臓採血により採取後、NOC7溶液 (終濃度：4 mM) と混合し、60分間37°Cでインキュベーション

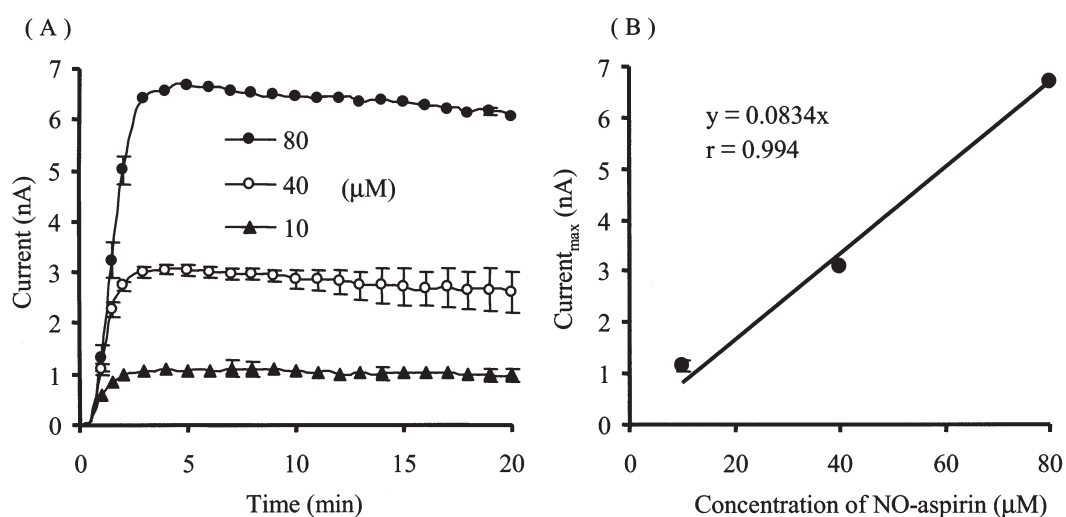


Fig. 2 (A) Time-dependent changes of currents due to NO released from 10, 40, and 80 μM of NO-asa in PBS (37°C) containing 0.2 U/ml of esterase.
(B) Relationship between the $\text{Current}_{\text{max}}$ and the final concentration of NO-asa.

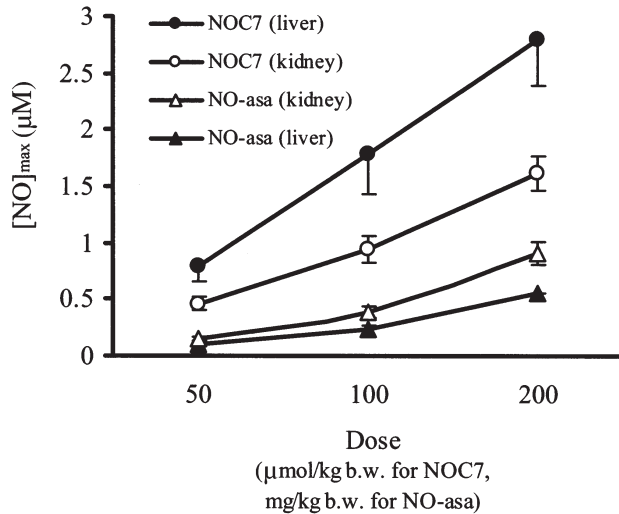


Fig. 3 Relationship between the dose of NOC7 (50, 100, and 200 $\mu\text{mol/kg}$ body weight) or NO-asa (50, 100, and 200 mg/kg b.w.) and $[\text{NO}]_{\text{max}}$ level monitored in the liver or kidney of ddY mice

(●: $[\text{NO}]_{\text{max}}$ level in the liver after administration of NOC7, ○: $[\text{NO}]_{\text{max}}$ level in the kidney after administration of NOC7, ▲: $[\text{NO}]_{\text{max}}$ level in the liver after administration of NO-asa, △: $[\text{NO}]_{\text{max}}$ level in the kidney after administration of NO-asa)

ョンした後、液体窒素温度でESRスペクトルを測定した (Fig. 4A)。 $g = 2.01$ を中心に三本に分裂した超微細分裂 (HFS) 構造を顕著に示した。この特徴的なスペクトルは5配位型のNO-Hbのスペクトルである¹²⁾。HFS構造の前後で大きなスペクトルが検出できたが、これは6配位型のNO-Hbのスペクトルであり¹²⁾、得られたサンプルは両配位型を含むNO-Hbが形成されていることがわかった。また、200 $\mu\text{mol/kg}$ 体重のNOC7をマウス尾静脈内に投与した60分後に血液を心臓採血により採取し、そのESRスペクトルを観察したところ、*in vitro*の場合と比較して5配位型に近いスペクトルが現れた (Fig. 4A)。この5配位型および6配位型は、それぞれ静脈血および動脈血で見られるスペクトルであることが報告されているが¹⁴⁾、今後検討が必要である。

続いて、電極法で用いた濃度の中で一番低い濃度である50 mg/kg 体重のNO-asaをマウス尾静脈内に投与した120分後に血液を心臓採血により採取し、ESRスペクトルを観察したところ、同様にHFS構造をもつスペクトルが観察された (Fig. 4B)。このスペクトルはNOC7の*in vitro*実験と同様に5配位型のNO-Hbのスペクトルが優位であったため、NO-

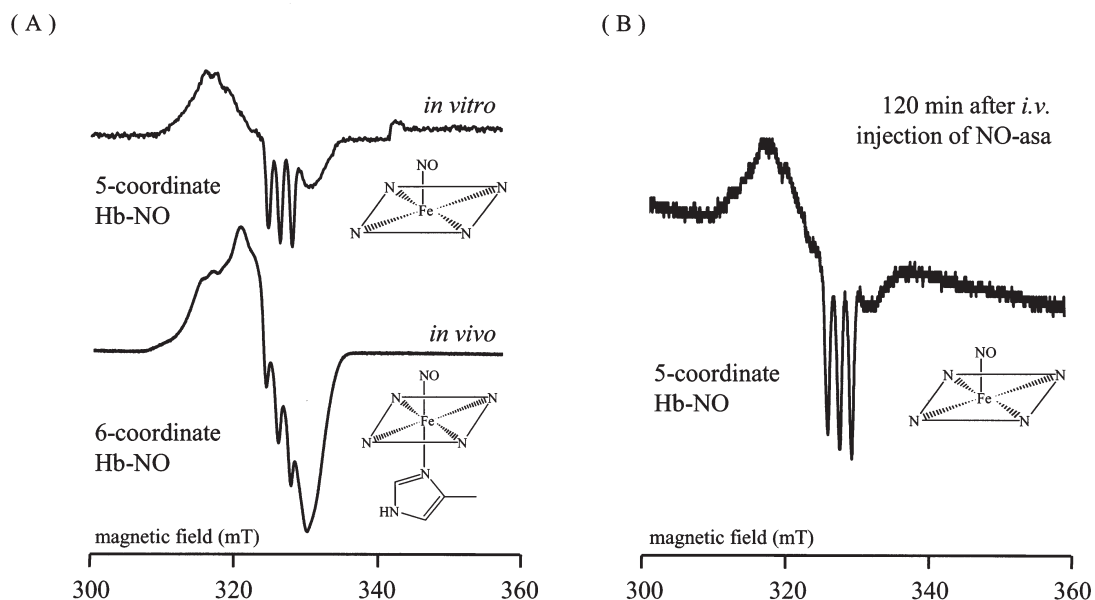


Fig. 4 (A) (*In vitro*) ESR spectra of NOC7 incubated with fresh blood of ddY mice (final concentration: 4 mM) for 60 min, (*In vitro*) ESR spectra of blood from ddY mice at 60 min. after *i.v.* injection of NOC7 (200 $\mu\text{mol/kg}$ b.w.)
(B) ESR spectra of blood of ddY mice at 120 min. after *i.v.* injection of NO-asa (50 mg/kg b.w.)

asaを投与した動物の血液中でNOが遊離し、ヘモグロビンと結合してNO-Hbを形成しているが、NOC7とは異なる状態でNOが放出されていることが示唆された。NO-Hbの配位様式の違いはNO濃度に依存していることも考えられる。今後、より詳細に検討する予定である。

参考文献

- 1) Ignarro LJ (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53: 503-14.
- 2) Janero DR (2001) Nutritional aspects of nitric oxide: human health implications and therapeutic opportunities. *Nutrition* 17: 896-903.
- 3) Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP (2004) The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Rad Biol Med* 36: 707-717.
- 4) Archer S (1993) Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 7: 349-360.
- 5) Zhang X (2004) Real time and *in vivo* monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors- from dream to reality. *Front Biosci* 9: 3434-3446.
- 6) Nakashima Y, Yasui H, Sakurai H (2002) A new determination method of nitric oxide (NO) with a NO-selective electrode demonstrated by the kinetic analysis of NO generation and decomposition. *Chem Lett* 12: 1214-1215.
- 7) Bolla M, Almirante N, Benedini F (2005) Therapeutic potential of nitrate esters of commonly used drugs. *Curr Top Med Chem* 5: 707-720.
- 8) Thatcher GRJ, Nicolescu AC, Bennett BM, Toader V (2004) Nitrates and NO release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry. *Free Rad Biol Med* 37: 1122-1143.
- 9) Ichimori K, Ishida H, Fukahori M, Nakazawa H, Murakami E (1994) Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-selective electrode. *Rev Sci Instrum* 65: 2714-2718.
- 10) Hrabie JA, Klose JR, Wink DA, Keefer LK (1993) New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem* 58: 1472-1476.
- 11) Davies B, Morris T (1993) Physiological parameters in lab animals and humans. *Pharm Res* 10: 1093-1095.
- 12) Szabo A, Perutz MF (1976) Equilibrium between six- and five- coordinated hemes in nitrosylhemoglobin: interpretation of electron spin resonance spectra. *Biochemistry* 15: 4427-4428.
- 13) Kosaka H, Shiga T (1996) Detection of nitric oxide by electron spin resonance using hemoglobin. in *Methods in nitric oxide research*, ed. by Feelisch M, Stamler JS, John Wiley & Sons: pp.373-381.
- 14) Kosaka H, Sawai Y, Sakaguchi H, Kumura E, Harada N, Watanabe M, Shiga T (1994) ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine treated rats. *Am J Physiol* 266 (Cell Physiol 35): C1400-C1405.