

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業研究）

分担研究報告書

化学物質の活性酸素毒性の定量評価手法に関する研究

分担研究者 阿部 芳廣 共立薬科大学 薬品分析学教室 助教授

研究要旨 活性酸素種のひとつであるヒドロキシラジカル（OH ラジカル）の HPLC 法による新しい定量法を確立することを目的として研究を行った。従来のスピントラップ-ESR 法では、定量性に問題があり、ESR 法に替わりうる HPLC 法について、特に、高感度な蛍光検出法について検討を行った。蛍光性を有するスピントラップ剤（TMP Amine のフルオレスカミン誘導体（TMPAF））を利用し、OH ラジカルとジメチルスルホキシドとの反応により生じるメチル 2 次ラジカルを捕捉する方法を追試し、その欠点を把握した。また、その結果に基づいて、1）PBN による直接トラップ法、2）水溶性蛍光物質（エスクリン）を利用する方法を検討した。PBN との反応では、PBN の減少を認めたが、反応生成体の確認、ベースラインが安定化ができなかった。今後これを解決し、さらに検出感度を向上する必要がある。エスクリンを用いた実験は、まだ反応条件の検討の段階であるが、OH ラジカルと速やかに反応し、かなり選択性よく、反応生成体を与えることを見出した。今後これを単離し、標準試料として OH ラジカルを定量する方法を検討してゆくと思われる。残念ながら、これまでのところ十分な結果を得ていないが、よりよい HPLC による OH ラジカルの定量法を確立すべく研究を続ける。

A. 研究目的

HPLC 法による OH ラジカルの新しい定量法を開発する。

B. 研究方法

- 1) TMPAmine のフルオレスカミン誘導体による OH ラジカルの HPLC による定量法の検討

TMPAF の合成>

TMPAmine とフルオレスカミンをアセトニトリル中で反応させ、蛍光性の TMPAmine 誘導体（TMPAF）を

得た。TMPAF の励起波長は 334nm、
蛍光波長は 450nm である。

OH ラジカルの発生法>

（Fenton 試薬）と TMPAF との反応： $67\mu\text{M}$ になるように TMPAF を 5% DMSO を含有する 100mM リン酸緩衝液（pH7.4）に溶解し、その 0.9ml に、 1mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ を 0.1ml および 0.3% H_2O_2 30 μl を加え、40min 後に HPLC で分析した。

HPLC 条件>

カラムは ODS（4mm ϕ ×15cm）を使用し、溶離液として、水：メタノール（35：65）を用い、流速 1 ml/min

で分析した。装置は日本分光製 HPLC システム 980 シリーズを用い、検出器には蛍光検出器（日本分光 FP-1520S）を使用した。

2) ダンシル誘導体での検討

TMPAF と同様の方法で、TMP Amine のダンシル誘導体を合成した。

3) PBN による直接トラップ法の検討

1) の実験において、0.1M TMPAF 溶液の代わりに、0.1M PBN の 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) の溶液 0.9ml を、Fenton 試薬 (0.1ml の鉄 (II) 溶液と 30 μ l の 30% H₂O₂) で発生させた OH ラジカルと反応させ、その反応生成体を ODS カラムを用い、HPLC で分析した。検出は UV (287nm, 220nm) で行った。

HPLC の溶離条件は水：アセトニトリル (100：20)，1 ml/min である。

4) エスクリンによる芳香環ヒドロキシル化による検出法の検討

等量のエスクリン 0.1mM, 0.1mM アンモニウム硫酸鉄(II)溶液, 0.1mM H₂O₂ 溶液を混合し、20 分後に HPLC で分析した。

HPLC 条件>

カラムは ODS (4mm ϕ ×15cm) を使用し、溶離液として、水：アセトニトリル (95：5) を用い、流速 1 ml/min で分析した。装置は日本分光製 HPLC システム 980 シリーズを

用い、検出器には紫外線吸光検出器（日本分光 UV-970）で行った。測定波長は 220nm である。

C. 研究結果

1) TMPAmine のフルオレスカミン誘導体(TMPAF)を利用した OH ラジカルの HPLC による定量法の検討

TMPAF のピークがほとんど消失し、メチルラジカルとの反応生成体を検出した。しかし、そのピークは小さく、感度が充分ではなかった。

2) ダンシル誘導体での検討

TMPAmine のダンシル誘導体は水溶性が極めて悪く、所期の目的を達成できないことが判明した。

3) PBNによる直接トラップ法の検討

PBN の極大吸収波長 280nm における検出では、PBN の減少を確認し、おそらく、それよりも極性の高い化学種が生成していることを確認したが、OH ラジカルの発生法として、Fenton 試薬を用いたためか、保持時間の早い部分にブロードな妨害ピークが現れ、安定したベースラインがとれないという問題に遭遇した。

4) エスクリンによる HPLC 定量法の検討

エスクリンが OH ラジカルと速やかに反応し、その反応の選択性も高いことがわかった。現在、反応の解

析と、生成物の構造の確認を急いでいる。

D. 考察

1) TMP Amine のフルオレスカミン誘導体(TMPAF)を利用した OH ラジカルの HPLC による定量法の検討

OH ラジカルが DMSO やエタノールなどと反応して、メチルラジカルやヒドロキシメチルラジカルなどの炭素ラジカルである 2 次ラジカルを生成することを利用し、これを TMPAF の蛍光性誘導体で捕捉し、HPLC で分離定量する方法が報告されている。これを追試し、その問題点を把握した。

この方法の問題点は、

1. OH ラジカルと DMSO との反応そのものが、試薬の TMPAF との反応と競合的になること。
2. DMSO との反応速度が、TMP Amine との反応速度よりもきわめて遅いため、DMSO 濃度をかなり高くする必要があること。
3. DMSO 濃度を 10% にし、蛍光法による検出を行っても、検出限界がかなり低くなること。
4. TMP Amine 誘導体の水溶性が低いこと。

であった。

2) ダンシル誘導体での検討

ダンシル基が β -シクロデキストリンにより包接されることにより、その蛍光が著しく増強されることを利

用して、TMPAF よりも検出感度を向上すること、また、水溶性の上昇も期待して、TMP Amine のダンシル誘導体を合成した。しかし、ダンシル体は期待に反し、きわめて水溶性の乏しい化合物であり、ダンシル体での検討は断念した。

3) PBN による直接トラップ-HPLC 法の検討

PBN は OH ラジカルと反応し、TEMPO などの N-オキシドラジカルよりも比較的安定な 2 次ラジカルを生じる。PBN でトラップした OH ラジカルとの反応生成物を ODS カラムで直接分離定量する方法を検討した。ここでは、蛍光検出法ではなく、UV 吸収による検出を行った。トラップしたラジカル種の検出が HPLC で可能であるかを検討したが、ベースラインが安定にとれなかった。これは、PBN 類似の蛍光性トラップ剤を開発すれば、解決しうる可能性があり、今後、この方面に研究を展開する端緒をひらくことができたが、試薬のデザインが難しいと思われる。

4) エスクリンによる HPLC 定量法の検討

これまでの方法のひとつの問題点は、試薬の水溶性が低いことにある。サリチル酸が OH ラジカルと反応し、その生成物が HPLC で分析されていることに着目し、水溶性が比較的高く、蛍光性を有し、OH ラジカルと潜在的に反応しうるクマリン骨格を有するエスクリンをとりあげ、その利

用について検討を行った。

結果は、かなり高い選択性で極性の高い反応成績体を与えること、また、その反応成績体は蛍光性を示さないことが判明した。現在、その反応の解析と、生成物の確認をしているところである。

当初期待した蛍光法による検出はできないと思われるが、UV 検出による HPLC 定量法として、サリチル酸法を凌ぐ方法になる可能性がある。

E. 結論

これまで、有効な方法を見出すことができなかったが、PBN タイプのスピントラップ剤で、蛍光性の化合物を合成すれば、かなり有効であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究の直接の成果ではないが、1999 年以降に発表した論文を記載する。

- 1) Y. Abe, F. Kotaki, S. Fukui, M. Kawaguchi, F. Furudate, T. Shoji, S. Sugata, H. Nishizawa, K. Iwata and H. Suzuki
Enantioselective binding of (\pm)-bromoisovalerylurea to serum albumin.
Anal. Sci., 15, 397-398 (1999).
- 2) H. Nishizawa, T. Shoji, K. Tahara and Y. Abe

Simulation study of the separation of binary mixtures by the continuous dual-flow countercurrent extraction method.

Anal. Sci., 15, 543-547 (1999).

- 3) H. Nishizawa, K. Tahara, S. Miyamori, Y. Motegi, T. Shoji and Y. Abe

True moving bed chromatography :solid-liquid multi-stage countercurrent extraction.

J. Chromatogr. A, 849, 61-69 (1999).

- 4) Y. Abe, S. Fukui, Y. Koshiji, M. Kobayashi, T. Shoji, S. Sugata, H. Nishizawa, H. Suzuki and K. Iwata

Enantioselective binding sites on bovine serum albumin to dansyl amino acids.

Biochim. Biophys. Acta, 1433, 188-197 (1999).

- 5) Y. Abe, T. Shoji, K. Tahara, S. Sugata and H. Nishizawa

Practical operation procedure for continuous dual-flow countercurrent extraction method.

Anal. Sci., 16, 181-182 (2000).

- 6) S. Yokoyama, Y. Abe and M. Abe
Preparation and physicochemical properties of new crystalline complexes composed of fatty acids and ethylenediamine.

Material Technology, 18,
(2000) in press.

- 7) Y. Abe, T. shoji, M. Matsubara,
M. Yoshida, S. Sugata, K. Iwata
and H. Suzuki
Chiral discrimination of
N-carbazole-carbonyl
derivatives of α -amino acids
with short linear side chain
by bovine serum albumin.
Chirality, (2000) accepted.

2. 学会発表

本研究の直接の成果ではないが、1999
年以降に発表した学会報告を記載する。

- 1) 阿部芳廣, 田原佳代子, 庄子知子,
西澤秀幸
「ムービング・ベッド クロマト
グラフの開発研究」
第3回分析化学会東京シンポジウ
ム, (幕張) 発表要旨集 p213,
1999.9月.
- 2) 阿部芳廣, 庄子知子, 松原麻実子, 吉
田みどり
「ウシ血清アルブミンのノルロイシ
ン誘導体に対する光学選択的な結
合について」
日本薬学会第120年会, (岐阜)
発表要旨集 v3, p91, 2000.3月.
- 3) 田原佳代子, 阿部芳廣, 福田真紀子
「C2 軸不斉を有する光学活性固定相
の研究」
日本薬学会第120年会, (岐阜)

発表要旨集 v3, p92, 2000.3月.

- 4) 鈴木直子, 三澤雅子, 阿部芳廣, 庄子知
子, 菅家甫子, 秋山修, 小高雅信
「死亡前喘鳴の軽減を目的とした塩酸
ピレンゼピンの投与方法と有用性の検
討」
日本薬学会第120年会, (岐阜)
発表要旨集 v4, p80, 2000.3月.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

1) 阿部芳廣

「in vivo あるいは in vitro でのヒ
ドロキシラジカルスピントラップ
法」

「ぶんせき」, 1999(8), 678-679.

一酸化窒素の特異的検出法の開発とその生体系への応用

長野 哲雄

東京大学大学院薬学系研究科教授

1. はじめに

1987年に一酸化窒素(NO)が血管内皮由来血管弛緩因子(EDRF)であると報じられて以来、生理活性物質としてのNOに関する研究は活発に行われており、L-アルギニンからNO合成酵素(NOS)により生成したNOは循環器系だけではなく、免疫系、中枢系にも関係するなど多様かつ重要な作用を有していることが報告された。そしてその生理的意義の重要性からNOは1992年のthe Molecule of the Yearに選ばれると同時に1998年のノーベル医学生理学賞がNOの循環器系における作用機序解明に対して与えられた。しかし、その詳細な生理活性に関してはいまだに議論のあるところで、特に中枢神経系においては、記憶・学習のメカニズムで提唱されているシナプスの可塑性にかかわるとされているものの、確かな証拠はなく混沌とした状態にある。その原因の一つは、NOが生理的条件下で酸素やスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)によって酸化を受け易く不安定であり、さらに低濃度で放出されるために測定が困難であることから、生理的に機能しているNOの動きを直接捕らえ、議論することができないことに起因している。NOおよびその酸化物の作用解析は、学問的に有意義であるだけでなく、解析することにより種々の疾患における未知の病因が明らかになる可能性があり、治療法の確立も期待できる。具体的には、循環器系においては、動脈硬化、脳卒中や高血圧症、免疫系では感染疾患、中枢系では痴呆症やアルツハイマー病などにNOがかかわっている可能性があるため、NOの役割を解明することには大きな意義がある。

近年、バイオイメーjing技術の発展が目覚ましく、NOについてもNOをイメーjing化できる生体プローブが開発されれば、NOの時空間的な量変化を観察することが可能となり、NOの真の役割が明らかになるものと思われる。このような観点からも、NOのバイオイメーjingに用いることが可能な蛍光プローブの開発は重要である。

本研究では、NOの新規検出・測定法となるNO生体プローブの開発を行った。その成果を学術論文に発表するとともに、その実用的価値の高さから市販することにした。この報告書では生体プローブ開発の経緯について概略を述べる。

2. 生体プローブ開発の基本戦略

2.1 生体プローブ開発の基盤となる測定法

一般に、生理活性種を生体中から捕らえる測定法を開発する場合、分析の専門家以外の研究者、特に生命科学に関係する研究者でも容易に使えることが重要である。この汎用性を考慮した場合、測定法として吸光法、蛍光法、化学発光法に基づく方法が優れているであろう。ほとんどの研究室で吸収スペクトル、蛍光スペクトルあるいは化学発光スペクトルを測定することは容易であると考えられるからである。

この中で、化学発光法は感度の点で優れており、最も望ましい測定法と考えられるが、現時点において特異性を示す化合物の設計は非常に難しい。著者らの研究室で以前に開発したルミノール+過酸化水素系測定法も NOS 阻害剤等を用いた対照実験を必ず行って確かめることが必要で、NO のみにより発光するわけではなく特異性が低い。

一方、蛍光法は特異性に優れた測定法で、感度においても吸光法に比べ、はるかに高感度であり、汎用性の観点を考え合わせると生体内機能性物質を捕らえる最も良い方法であると考えられる。事実、 Ca^{2+} をバイオイメージングするために用いられているプローブ類は蛍光の変化を原理としたものである。このような点から、蛍光法を測定原理とした NO の生体プローブを開発することにした。

2.2 生体プローブ開発の原理となる NO の反応

蛍光法により NO を測定する生体プローブを設計するに当たって、その原理となる NO に特異的な反応が必要となる。この反応に要求される条件として、次の 3 点があげられる。

- 37 °C (加熱, 加温は不可), 水溶液 (緩衝液) 中, 中性条件下 (酸, アルカリは使用できない) で反応が進行すること
- 反応は NO に特異的であること, 少なくとも生理活性種および生体構成成分などで蛍光を生じる反応が起こらないこと
- 反応は定量的に進行することが望ましい。少なくとも副生成物がほとんど生じないこと

上記の条件の下、種々検討の結果、NO とジアミン化合物の反応をプローブ創製の原理にすることにした。既に、我々の研究グループは酸素存在下、NO がアニリンと反応してジフェニルトリアゼンを生成することを報告している。一般に酸性条件下で NO_2^- とアミン化合物が反応した場合、ジアゾカップリング反応でアゾ化合物が生成する。ジフェニルトリアゼンを生成する反応は酸を加えない条件で行っており、この両者の反応の活性種はともに NO^+ と考えられるが、この NO^+ によりジアゾニウム塩が生成するステップまでは両者に違いは

ない。しかしこのジアゾニウム塩が求電子種として攻撃する部位は中性条件下と酸性条件下で異なり、中性条件下では最も電子密度の高いアミンと反応しトリアゼン体が生成する。一方、酸性条件下ではアミンがプロトン化されているため、その部位には反応せず、芳香環上の電子密度の高い部位に反応し、アゾ化合物が生成する。中性条件での $\text{NO} + \text{O}_2$ 系によるトリアゼン生成反応は高収率で進行し、酸やアルカリを使用する必要がないなど、前述した蛍光プローブの原理となる反応要件を満たしている。そこでこれ以降、この反応を基にした NO の新規プローブ試薬の開発、特に隣接位にジアミン官能基を有する化合物について検討を行うことにした。

3. ジアミン系化合物の検討

3.1 2,3-ジアミノナフタレン (DAN) による検討

具体的には、2,3-ジアミノナフタレン (DAN) を用いて検討を開始した。DAN は酸性条件下 NO_2^- と反応して、DAN と蛍光特性の異なるナフトトリアゾールを生成することが知られており、この反応が酸素存在下、中性条件でも NO により生成することを確かめた。

NO の発生システムとして気体 NO を使用するほかに、 $\text{RN}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^- (\text{CH}_2)_n \text{NH}_2^+ \text{R}'$ 化合物群 (NONOate) が市販されている。これらの化合物は水溶液中に溶解することにより徐々に NO を発生する。興味深いことに化合物のメチレン基の数などにより半減期が大きく異なる。種々の NONOate を DAN が溶解した緩衝液中に加えることにより、蛍光の増加が見られ、この蛍光増加は半減期の短い NONOate ほど大きく、経時的に発生する NO を捕らえることが可能であると判断した。そしてこの反応は特異性の点でも優れていることも明らかになった。

しかしながら、DAN からの生成物であるトリアゾール体の励起波長、蛍光波長はそれぞれ 375 nm, 425 nm であり、これらの波長の光では細胞障害が懸念され、また細胞に適用した場合、細胞からの自家蛍光と重なるため、より長い励起波長を持つ化合物を設計・合成することを計画した。また感度面においても 100 nM であり、さらに一桁以上の高感度を必要としたことも DAN を改良する理由であった。

3.2 DAN 以外のジアミノ系化合物の検討

市販されているジアミンの中で可能性のあるものについて検討したが、いずれも感度、酸化に対する安定性の点で満足すべきものはなかった。そこで、蛍光性のナフタレン骨格、ベンゾフラン骨格あるいはクマリン骨格を有するジアミノ化合物を合成した (図 1)。

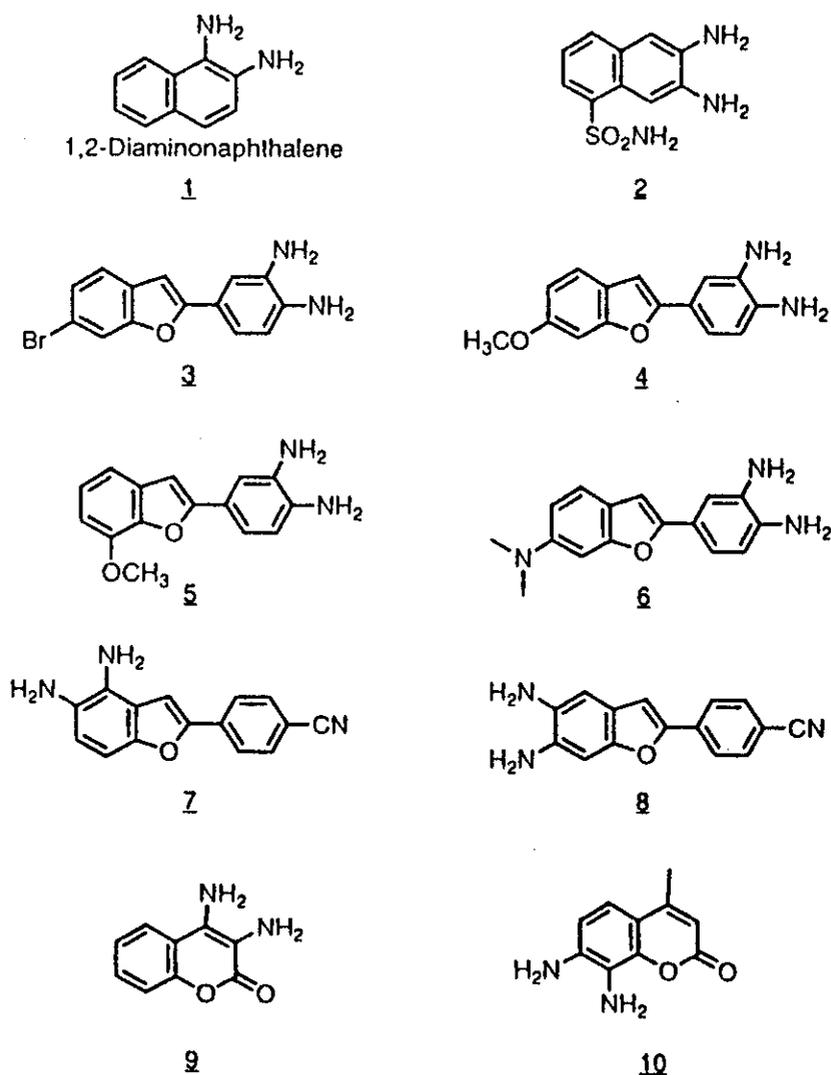


図1 合成ジアミノ系化合物

(1) ナフタレン骨格を有する化合物

1,2-ジアミノナフタレン(1)は酸化されやすく不安定で、測定には不相当であった。DANにスルホンアミドを導入した化合物(2)についてはその励起波長、蛍光波長はそれぞれ350 nm、450 nmで、そのトリアゾール体はそれぞれ370 nm、445 nmとほとんど変化せず、蛍光強度もDANを使用した場合とほぼ同等であった。

(2) ベンゾフラン骨格を有する化合物

化合物(3)はNOとの反応前後とも無蛍光であった。化合物(4)は励起波長、蛍光波長ともにトリアゾール体とほとんど変化がなかった。化合物(5)は励起波長335 nm、蛍光波長440 nmであったが、NOと反応することで蛍光量が逆に減少した。蛍光強度の減少でNOを測定することも可能であるが、特異性が得にくいことが考えられ断念した。化合物(6)には非常に強い蛍光(438 nm)があるが、化合物(5)と同様にNO添加後、蛍光強度が減少し

た。化合物 (7) はベンゾフラン環にジアミンを導入したものであるが、それ自身は無蛍光であり、NO を添加することにより 445 nm の蛍光を生じる。しかし、DAN に比べ感度が劣っていた。(8) に関しては興味ある結果が得られており、再検討が必要である。

(3) クマリン骨格を有する化合物

化合物 (9) は NO の添加により蛍光性化合物は生じなかったが、化合物 (10) は蛍光性化合物を生成し、さらに検討の余地がある。

4. ジアミノフルオレセイン (DAF) の開発

4.1 DAF 設計の考え方

可視光励起、高い量子収率で知られているフルオレセインは、それ自身およびその誘導体がさまざまな用途の試薬に応用されている。また pH 指示薬としても有用であり、水溶液中での蛍光強度もかなり高い。このような観点からフルオレセインについて検討した。

ベンゼン環の置換基からキサンテン環への電子供与があるフルオレセイン類は一般に低量子収率であることが知られている。ジアミンは電子供与性官能基であり、NO と反応後のトリアゾール体は電子供与性が弱くなることから、ジアミノフルオレセイン (DAF) は蛍光がほとんどないか弱く、一方生成物のトリアゾール体 (DAF-T) は強い蛍光強度を持つと予想される (図 2)。結果は予想通りに DAF-T は強い蛍光を有し DAF はほとんど蛍光を持たないことが明らかとなった。

図 3 に上記の考えを基にデザインし、合成した DAF-1 から DAF-6 を示した。DAF-4, 5, 6 はヒドロキシ基のオルト位に Cl を導入した化合物群で、ヒドロキシ基の pKa が小さくなるように設計された化合物である。

4.2 DAF の性質

図 4 は DAF-2 の NO 添加による励起スペクトルと蛍光スペクトル変化を示したものであ

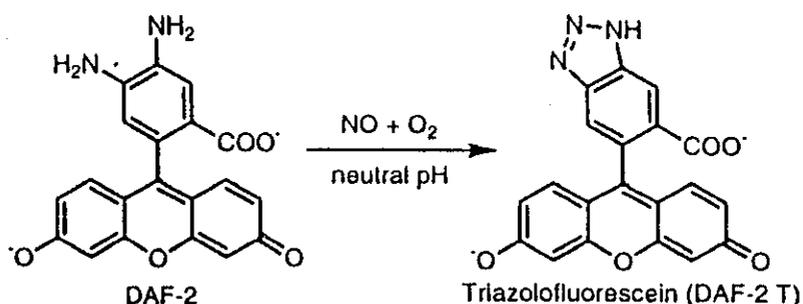


図 2 酸素存在下、NO と DAF-2 の反応

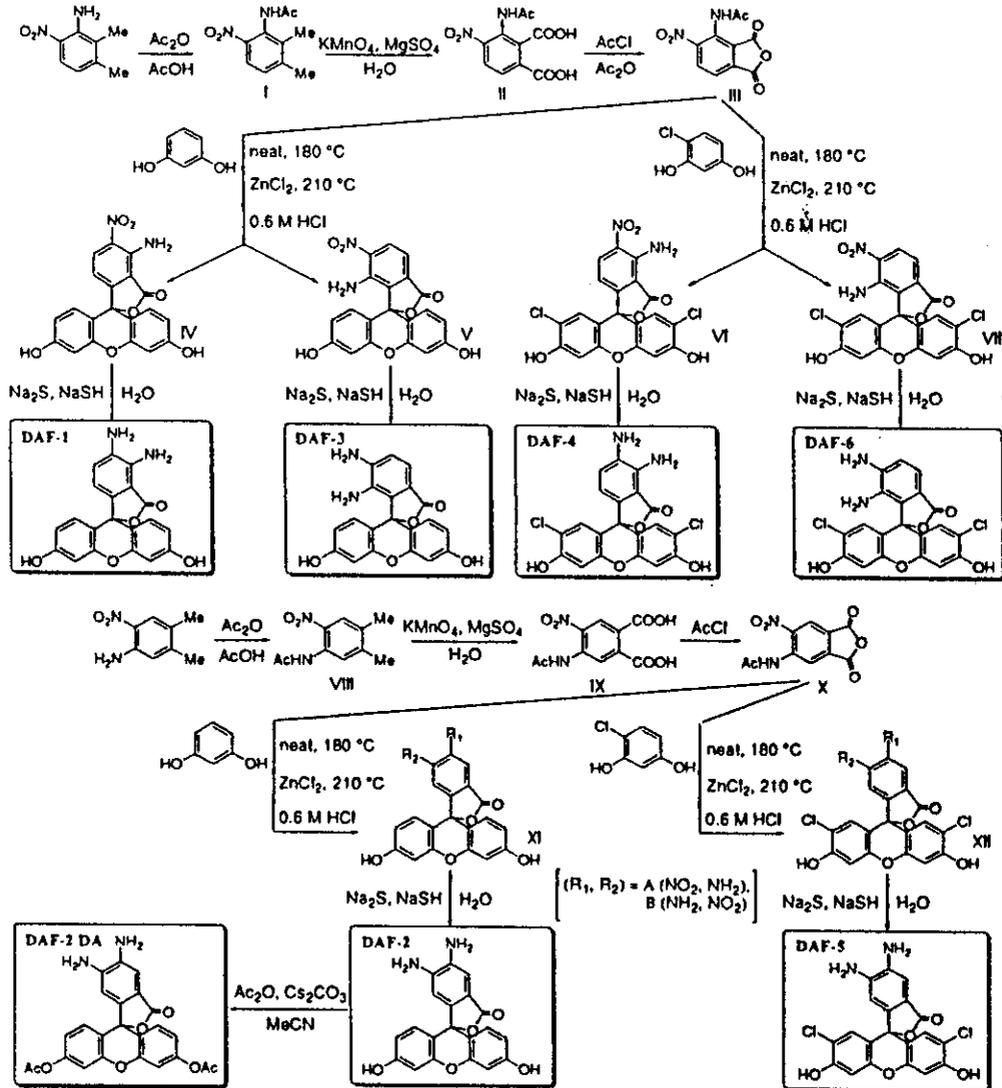


図3 DAF類とその合成法

る。NO添加により蛍光強度の著しい増加が見られる。この蛍光の増加がトリアゾール体由来であることはHPLC, $^1\text{H-NMR}$, MSにより確認した。

図5はNONOateより生成したNOによるDAF-2の蛍光量の経時変化である。NOの量に依存して蛍光量が増加することがわかる。

それぞれのDAF $10\ \mu\text{M}$ を用いてNOに対する検量線を調べ、比較した結果、どのDAFもNOと反応し蛍光強度を増加させるが、DAF-2とDAF-4がその中でも高感度であった(検出限界: 2-5 nM)。トリアゾール体の特性として大きなモル吸光係数かつ高量子収率が挙げられる。さらにCl基の導入されたDAF-4, 5, 6の励起・蛍光波長がDAF-1, 2, 3のものよりも長波長側にシフトしていることが明らかになった。DANとDAF-2それぞれのトリアゾール体(DAN-T, DAF-2T)の蛍光強度を比較した結果、DAF-2Tの方が約24倍大きいことが示された。

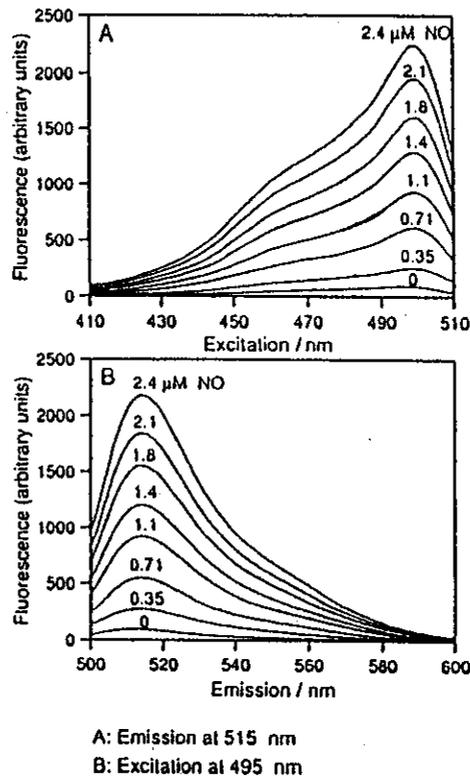


図4 DAF-2の励起スペクトル (A) と蛍光スペクトル (B)
Measurement at 37 °C in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) with NO values ranging from 0 to 2.4 μM.

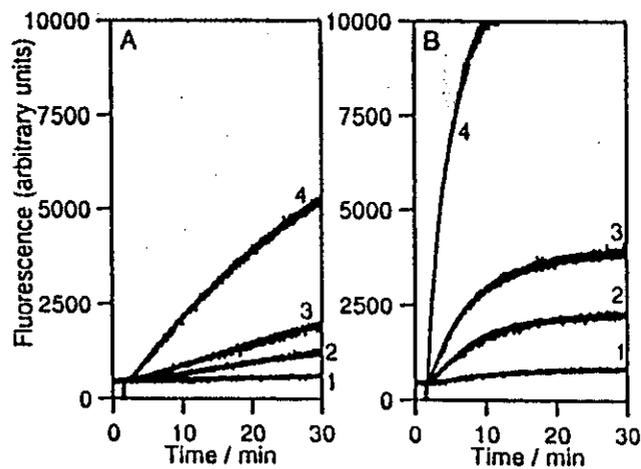


図5 NONOates から生成させた NO による DAF-2 の蛍光強度変化
Varying concentrations of two NONOates (NOC-12 and NOC-13) with different half-lives were incubated in 2 mL reaction volumes containing 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) and 10 μM DAF-2 at 37 °C. The fluorescence intensity was determined at 515 nm with excitation at 495 nm. (A) NOC 12 was added immediately after it had been dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). (B) NOC 13 was added. Final concentrations : 1 : 5, 2 : 50, 3 : 100, and 4 : 500 μM. *Half-lives of NOC-12 and NOC-13 at 22 °C.

生きた組織や細胞にプローブを用いることを考えた場合、細胞毒性などから実用的使用濃度は 10 μ M 程度であり、この濃度での高感度化という当初の目的が達成できた。

5. DAF の生体系への応用

5.1 DAF を用いた各種培養細胞系からの NO 測定

(1) マクロファージからの NO 測定

NO 測定の第一段階としてマウス由来マクロファージ (RAW 264.7) から生成する NO の検出を試みた。マクロファージは Lipopolysaccharide (LPS), Interferon- γ (IFN- γ) 等で刺激をすることにより誘導型 NO 合成酵素 (induced-NOS : i-NOS) の誘導が起き、その結果 NO 産生能を増加することが報告されている。

NO 測定に際しては NOS 阻害剤の大量検定法への応用を念頭に置いて、マイクロプレートリーダーを用いる系にした。DAN と比較すると DAF は低濃度領域における感度が上昇した。

マクロファージの i-NOS の発現量は LPS および IFN- γ の濃度に伴い増加することが知られている。i-NOS はいったん誘導されれば構成型 NO 合成酵素 (constitutive-NOS : c-NOS) とは異なり Ca^{2+} 非依存的に NO を産生し続けるので、LPS および IFN- γ の濃度依存的に NO 生成量は増加する。

図 6A に示すように 2 時間の培養時間で蛍光強度は LPS 濃度依存的に増加した。吸光度法を利用した既存の NO_2^- 測定法である Griess 法でも同様の結果であった (図 6B) が、感度が低いため 48 時間の培養時間が必要とされた。両方法の比較から DAF を用いることにより、短時間で NO 測定が可能であることがわかる。

DAF の NO に対する特異性を検討した。DAF-2 を細胞系に適用した場合、多くの生体成分があり、実際に蛍光強度の増加が DAF-2 と NO とが反応して生じた DAF-2T によるものであるかを検討する必要がある。DAF-2 存在下で培養したマクロファージ培養液の上澄みを HPLC によって分析、検討した結果、DAF-2 は細胞内においても NO との反応で DAF-2T を生じること、また他の蛍光性化合物を生じないことが明らかになった。

(2) ウシ血管内皮細胞からの NO 測定

血管内皮細胞は構成型の内皮型 NOS (endothelial-NOS : e-NOS) を有しているが、NO 生成量はマクロファージ等 i-NOS を有している細胞と比較すると極微量であると考えられている。そのためこれまで簡便な NO 測定は困難であり、血管内皮細胞からの NO 測定法が求められていた。

e-NOS は Ca^{2+} 濃度の上昇によって活性化されることが知られている。内皮細胞ではブラ

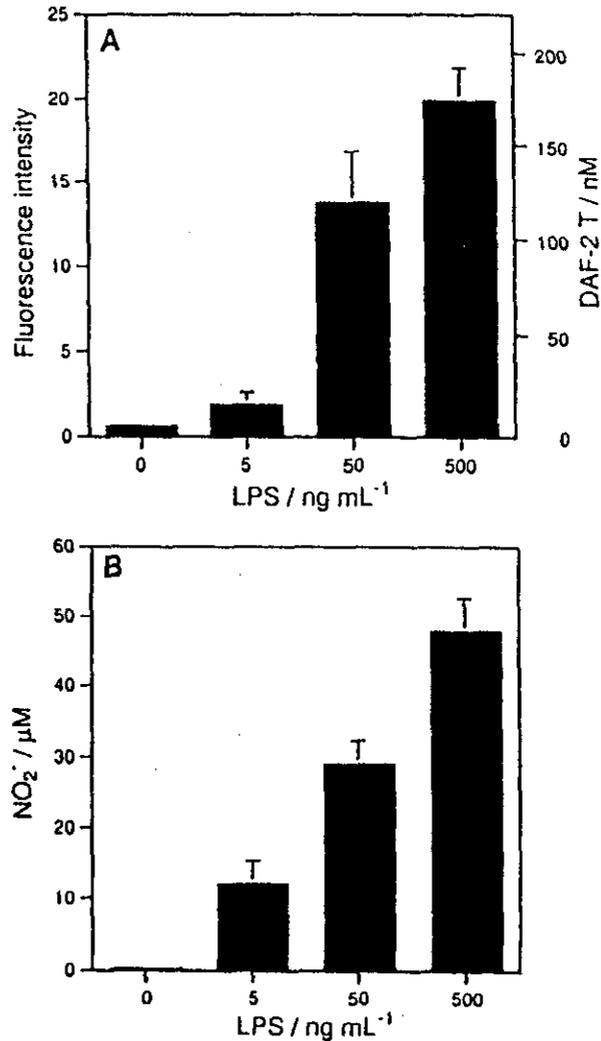


図6 LPS刺激によるマウスマクロファージ (RAW 264.7) からのNO生成
(A) DAF法による検出, (B) グリース法による検出

ジキニン (BK) によって細胞内に Ca^{2+} の流入が起こるため、e-NOS 活性が上昇する。実際に DAF をウシ血管内皮細胞培養液に添加し、BK で NOS を活性化したところ、経時的に蛍光強度の増加が見られた。NOS 阻害剤 *N*^ε-[nitroamidino]-L-2, 5-diaminopentanoic acid methyl ester (L-NAME) の添加により濃度依存的に抑制されたが、D-NAME の添加では抑制しなかった (図7)。また、BK を添加しなくても恒常的な NO の生成が観測された。以上の結果から、血管内皮細胞が恒常的に生成する極少量の NO も DAF によって捕らえることが可能であることが示された。なお、ウシ血管内皮細胞においても蛍光強度の伸びが DAF-2T に由来することを HPLC によって確認した。

(3) NOS 阻害剤の大量検定法の確立

DAF は血管内皮細胞から NO を測定できるだけの感度を有していた。本方法を用いるこ

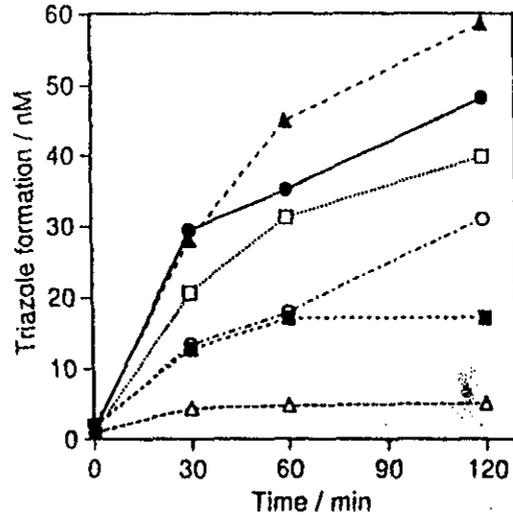


図7 アルギニンによるウシ動脈内皮細胞からのNO生成, DAF-4を用いた検出

○: basal conditions, ●: 1 μM bradykinin, □: 1 μM bradykinin + 10 μM L-NAME, ■: 1 μM bradykinin + 100 μM L-NAME, △: 1 μM bradykinin + 1000 μM L-NAME, ▲: 1 μM bradykinin + 1000 μM D-NAME.

とにより, 当初計画していた蛍光マイクロプレートリーダーを用いたNOS阻害剤大量検定法およびNOS isozyme選択性の測定法の確立に成功した。すなわちマイクロプレートリーダーのデータ解析をパソコンで自動化することにより, 大量検定が可能となった。既知のNOS阻害剤N^ω-[methylamidino]-L-ornithine (L-NMMA)をこの系で検定すると容易に50%阻害濃度が求められる。

このほかにNO産生賦活化化合物の検定にも適用できる。すなわち, i-NOSを有する細胞に対してはLPS, IFN-γ様活性を持つ化合物, e-NOSを有する細胞に対してはBK様活性を持つ化合物の検索も可能である。

5.2 DAF誘導体を用いたバイオイメーjing

バイオイメーjingを行うためにはDAFを細胞へ局在化させなければならない。そのためのプローブの誘導化を行った。

細胞膜を透過し, 細胞内のエステラーゼにより加水分解を受けると考え, DAF-2DAを設計・合成した(図3, 図8)。

DAF-2DAは非蛍光性であるため, エステルが加水分解されない限り蛍光を発しない。これを用いて実際にラット大動脈由来血管平滑筋細胞に適用した。細胞にDAF-2DAを負荷後, 細胞を観察するとDAF-2DAを負荷していない細胞よりも蛍光が強く, エステラーゼによりエステルが加水分解されていることがわかった。

刺激によりNOSを誘導した細胞は明らかにDAF-2T由来の蛍光強度の増加が見られ, この増加はNOS阻害剤により定量的に抑制された。これは細胞レベルでNOを蛍光画像とし

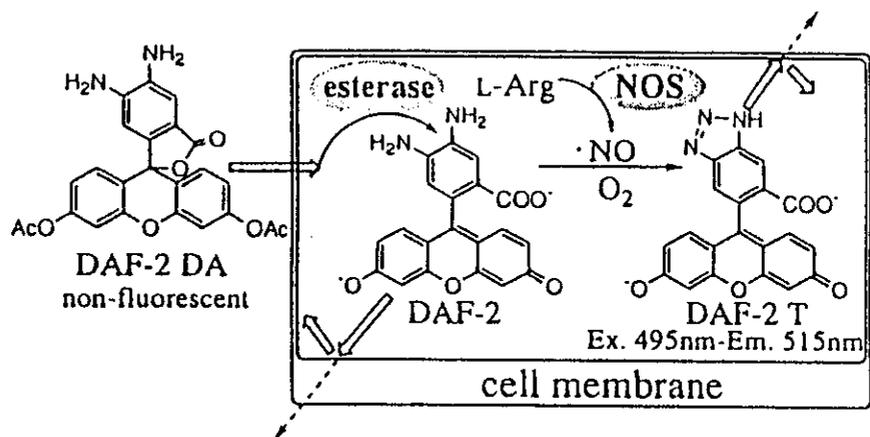


図8 DAF-2DAを用いたバイオイメーキングの模式図

て捕らえた最初の例である。

6. おわりに

今回、NOの蛍光プローブの開発に成功し、その経緯について記述した。この分子設計の考え方は単にNOのプローブ開発だけではなく、ほかの生理活性種のプローブ創製にも応用可能である。事実、著者らはNO以外に最近、一重項酸素、ヒドロキシルラジカル、亜鉛の生体プローブの開発にも成功し、特許も出願した。分子設計の考え方は本法と同じである。

今後この分子設計法をバイオイメーキングを目的とした種々の生理活性種のプローブの開発に適用したいと考えている。

謝辞

本研究は第14回三共生命科学振興財団研究助成金の援助を受けた。

発表論文

- 1) Hirata, Y., Hayakawa, H., Kakoki, M., Tojo, A., Suzuki, E., Nagata, D., Kimura, K., Goto, A., Kikuchi, K., Nagano, T., Hirobe, M. and Omata, M.: Receptor Subtype for Vasopressin-induced Release of Nitric Oxide from Rat Kidney, *Hypertension*, 29: 58-64, 1997.
- 2) Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K., Nakazawa, H. and Maeda, H.: Activation of Human Neutrophil Procollagenase by Nitrogen Dioxide and Peroxynitrite: A Novel Mechanism for Procollagenase Activation Involving Nitric Oxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, 342: 261-274, 1997.
- 3) Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Akaike, T., Maeda, H. and Nagano, T.: Development of a Fluorescent Indicator for Bioimaging of Nitric Oxide, *Biol. Pharm. Bull.*, 20: 1229-1232, 1997.
- 4) Kojima, H., Kikuchi, K., Hirobe, M. and Nagano, T.: Real-time Measurement of Nitric Oxide

- Production in Rat Brain by the Combination of Luminol-H₂O₂ Chemiluminescence and Microdialysis, *Neuroscience Letters*, 233 : 157-159, 1997.
- 5) Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagashi, H., Hirata, Y. and Nagano, T. : Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore, *Biol. Pharm. Bull.*, 46 : 373-375, 1998.
 - 6) Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. and Nagano, T. : Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators : Diaminofluoresceins, *Analytical Chemistry*, 70 : 2446-2453, 1998.
 - 7) Nakatsubo, N., Kojima, H., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Maeda, D., Imai, Y., Irimura, T. and Nagano, T. : Direct Evidence of Nitric Oxide Production from Bovine Aortic Endothelial Cells Using with New Fluorescence Indicators : Diaminofluoresceins, *FEBS Lett.*, 427 : 263-266, 1998.
 - 8) Nakatsubo, N., Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Akaike, T., Maeda, H., Urano, Y., Higuchi, T. and Nagano, T. : Improved Nitric Oxide Detection Using 2,3-Diaminonaphthalene and Its Application to the Evaluation of Novel Nitric Oxide Synthase Inhibitors, *Biol. Pharm. Bull.*, 21 : 1247-1250, 1998.
 - 9) Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Tanaka, J., Kudo, Y. and Nagano, T. : Direct Evidence of Nitric Oxide Production in Rat Hippocampus Using a New Fluorescent Indicator : DAF-2DA, *Neuroreport*, 9 : 3345-3348, 1998.
 - 10) Kurumatani, H., Kikuchi, K., Nagano, T., Hirobe, M., Yamazaki, J. and Nagao, T. : Real Time Measurement of Nitric Oxide Release from Cultured Endothelial Cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 21 : 1286-1289, 1998.
 - 11) 長野哲雄, 小島宏建 : 一酸化窒素のバイオイメージングを目的とした生体プローブの分子設計, *日本化学会誌*, 11月号 : 721-729, 1998.
 - 12) 小島宏建, 菊地和也, 長野哲雄 : 一酸化窒素 (NO) のバイオイメージング, *バイオイメージング*, 6 : 159-160, 1998.
 - 13) 小島宏建, 長野哲雄 : 一酸化窒素 (NO) の測定法, *呼吸*, 17 : 1308-1313, 1998.
 - 14) 小島宏建, 長野哲雄 : 神経系における機能解明を志向した NO のバイオイメージング, *神経研究の進歩*, 43 : 179-186, 1999.
 - 15) 小島宏建, 長野哲雄 : 一酸化窒素の分析法, *ぶんせき*, 291 : 239-245, 1999.
 - 16) 小島宏建, 長野哲雄 : 生理活性解明へ向けた NO 測定法, *脳の科学*, 21 : 303-307, 1999.
 - 17) 小島宏建 : NO 測定系とその問題点, 特集 : 消化器疾患と NO, *臨床消化器内科*, 14 : 655-661, 1999.
 - 18) Kakoki, M., Hirata, Y., Hayakawa, H., Tojo, A., Nagata, D., Suzuki, E., Kimura, K., Goto, A., Kikuchi, K., Nagano, T. and Omata, M. : Effects of Hypertension, Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia on Endothelin Type B Receptor-Mediated Nitric Oxide Release From Rat Kidney, *Circulation*, 99 : 1242-1248, 1999.
 - 19) Hayakawa, H., Hirata, Y., Kakoki, M., Suzuki, Y., Nishimatsu, H., Nagata, D., Suzuki, E., Kikuchi, K., Nagano, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Sugimoto, T. and Omata, M. : Role of Nitric Oxide-cGMP Pathway in Adrenomedullin-induced Vasodilation in the Rat, *Hypertension*, 33 : 689-693, 1999.
 - 20) Kakoki, M., Hirata, Y., Hayakawa, H., Nishimatsu, H., Suzuki, Y., Nagata, D., Suzuki, E., Kikuchi, K., Nagano, T. and Omata, M. : Effects of Vasodilatory β -Adrenoceptor Antagonists on Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Rat Kidney, *Hypertension*, 33 : 467-471, 1999.
 - 21) 小島宏建, 長野哲雄 : NO 測定法の新展開 -NO をみる-, *実験医学*, 17 : 946-950, 1999.
 - 22) Umezawa, N., Tanaka, K., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. and Nagano, T. : Novel Fluorescent

Probes for Singlet Oxygen, *Angewandte Chemie*, in press.

- 23) Mizukami, S., Kikuchi, K., Higuchi, T., Urano, Y., Mashima, T., Tsuruo, T. and Nagano, T. : Imaging of Caspase-3 Activation in HeLa Cells Stimulated with Etoposide Using a Novel Fluorescent Probe, *FEBS Lett.*, in press.
- 24) Kojima, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. and Nagano, T. : Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production, *Angewandte Chemie*, in press.

この研究には、東京大学薬学部の菊地和也助手、大学院生の小島宏建氏の協力を得た。

19990698

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

一酸化窒素のバイオイメージングを目的とした生体プローブの分子設計
長野哲雄, 小島宏建
日本化学会誌. No.11, pp721-729, 1998

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名, 巻 号数, 論文名)	刊行年 月日	刊行書店名	執筆者氏名
1) <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 362 (1), 79-86, Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation,	1999	Academic press	K. Kondo, N. Kurihara, <u>N. Miyata</u> , T. Suzuki, M. Toyoda,
2) <i>Fullerene Science and Technology</i> , 7 (5), 743-756, Visible light irradiation of [60]fullerene causes killing and initiation of transformation in BALB/3T3 cells,	1999.5	Marcel Dekker	A. Sakai, Y. Yamakoshi, and <u>N. Miyata</u> ,
3) <i>Biomed. Chromatogr.</i> , 13 , 75-80 Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in primary rat hepatocyte cultures by liquid chromatography with laser induced fluorescence detection,	1999	John Wiley and Sons	Y.-M. Liu, H. Jinno, M. Kurihara, <u>N. Miyata</u> and T. Toyo'oka,
4) <i>Free Radical Biology and Medicine</i> , 27 (7/8), 855-863, Scavenging Mechanism of (-)-Epigallocatechin Gallate and (-)-Epicatechin Gallate on Peroxyl Radicals and Formation of Superoxide during the Inhibitory Action,	1999.8	Elsevier	K. Kondo, M. Kurihara, <u>N. Miyata</u> , T. Suzuki, and M. Toyoda
5) <i>Tetrahedron Letters</i> , 41 (4), 485-488, Conversion of Procyanidin B-Type (Catechin Dimer) to A-Type: Evidence for Abstraction of C-2 Hydrogen in Catechin During Radical Oxidation,	2000.1	Pergamon	K. Kondo, M. Kurihara, K. Fukuhara, T. Tanaka, T. Suzuki, <u>N. Miyata</u> and M. Toyoda

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名，巻号数，論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
6) <i>Cancer Letters</i> , 148, 81-86, Trans-4-hydroxy-2-nonenal, an aldehydic lipid peroxidation product, lacks genotoxicity in lacI transgenic mice,	2000.1	Elsevier	A.Nishikawa,F.Furukawa, K.Kasahara, S.Ikezaki, T. Ito, T.Suzuki, K.Uchida, M.Kurihara, M.Hayashi, <u>N.Miyata</u> and M.Hirose,
7) <i>Luminescence</i> , 14, 283-290, Practical methods for Detection of Nitric Oxide,	1999	John Wiley and Sons	<u>T. Nagano</u>
8) <i>Angewandte Chemie Int. Ed.</i> , 38, 2899-2901, Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen,	1999	Wiley-VCH	N.Umezawa, K. Tanaka, Y.Urano, K. Kikuchi, T.Higuchi and <u>T.Nagano</u> ,
9) <i>Tetrahedron Lett.</i> , 41, 69-72, Fluorecent indicators for nitric oxide based on rhodamine chromophore,	2000.1	Pergamon	H.Kojima, M.Hirotani, Y.Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u> ,
10) <i>Angewandte Chemie Int. Ed.</i> , 38, 3209-3212, Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production,	1999	Wiley-VCH	H.Kojima, Y.Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi and <u>T. Nagano</u>
11) 実験医学, Vol. 17, No. 8, 946-950, NO 測定法の新展開 -NOをみる-	1999.6	羊土社	小島宏建, <u>長野哲雄</u>
12) 現代化学, 9月号, No. 342, 23-30, 生細胞プローブの分子設計 -一酸化窒素 (NO) 蛍光プローブ DAF の開発-	1999.9	東京化学同人	<u>長野哲雄</u> , 小島宏建

"Effects of Hypertension, Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia on Endothelin Type B Receptor-Mediated Nitric Oxide Release From Rat Kidney" Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M, *Circulation*, 99, 1242-1248 (1999).

"Role of Nitric Oxide-cGMP Pathway in Adrenomedullin-induced Vasodilation in the Rat" Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M, *Hypertension*, 33, 689-693 (1999).

"Effects of Vasodilatory β -Adrenoceptor Antagonists on Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Rat Kidney" Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Omata M, *Hypertension*, 33, 467-471 (1999).

"Dipeptides Containing L-Arginine Analogs: New Isozyme-selective Inhibitors of Nitric Oxide Synthase" Nobutaka Kobayashi, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Masaaki Hirobe and Tetsuo Nagano, *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 936-940 (1999).

"Synthesis and Evaluation of 1-Position-modified Inositol 1,4,5-Trisphosphate Analogs" T. Inoue, K. Kikuchi, K. Hirose, M. Iino and T. Nagano, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 9, 1697-1702 (1999).