

図1 電子スピンのゼーマン分裂と共鳴

電子スピンは静磁場下でよりエネルギー準位の高い状態（ α スピン）とより低い状態（ β スピン）の2つに分裂する（ゼーマン分裂）。このエネルギー差に相当する電磁波を照射すると、 β スピンのエネルギーを吸収して α スピンの状態に遷移する。この現象を電子スピン共鳴（ESR）と呼ぶ。

付加体を ESR で検出し、その ESR スペクトルからフリーラジカル種の同定を行う手法である。繁用されているスピントラップ剤に、DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide) や PBN (α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron) などがある。DMPO は、図 2(A) のようにヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) との反応により DMPO-OH アダクトを形成し、その ESR スペクトルは強度比 1 : 2 : 2 : 1 の 4 本線で、超微細結合定数 $a_N = a_H = 1.47 \text{ mT}$ 、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) との反応により DMPO-OOH アダクトを形成し、その ESR スペクトルは 12 本線で超微細結合定数 $a_N = 1.399 \text{ mT}$, $a_H^\beta = 1.158 \text{ mT}$, $a_H^\gamma = 0.121 \text{ mT}$ である¹⁾。

生体系における $\cdot\text{OH}$ の生成においては、過酸化水素のレドックス分解がとくに重要であり、低原子価の遷移金属 (Fe^{2+} , Ti^{3+} ,

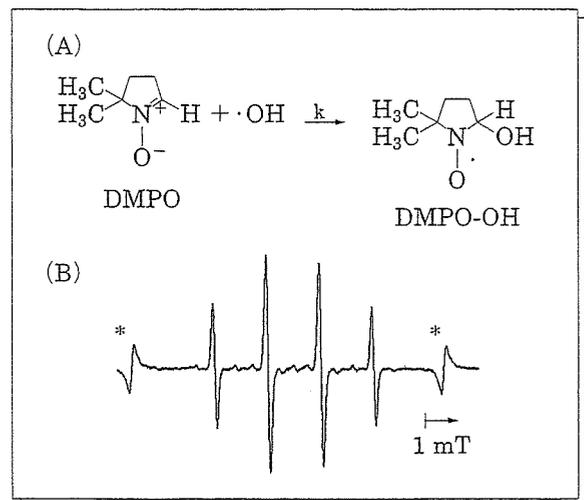


図2 スピントラップ剤 DMPO の構造式 (A) と DMPO-OH の ESR スペクトル (B) (B) に示してある*印は外標準物質 Mn^{2+} の ESR シグナルである。

Cr²⁺, Cu¹⁺) による過酸化水素の1電子還元により・OHが生成する。その中でも、Fe²⁺による反応がFenton反応としてよく知られている²⁾。実際に、Fenton反応由来の・OHがDNAや蛋白質、脂質の酸化的分解に関与し、前述したような数多くの病態の形成を引き起こしている可能性が報告されており、生体系におけるFenton反応の重要性が示唆されている^{3~5)}。実際に過酸化水素と硫酸鉄(II)を混合し、Fenton反応で生成した・OHをDMPOでトラップさせると、図2(B)のように、典型的なDMPO-OHのESRスペクトルが観察された。

筆者らは、上記のスピントラップ法をジエチルニトロソアミン誘発肝ガンモデルラットに応用し、スピントラップ剤PBNを用いて、ラット胆汁中の脂質ラジカルの検出を報告した⁶⁾。

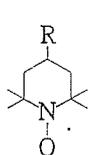
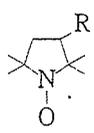
ニトロキシルプローブ法

1980年ごろから動物計測用ESR装置の開発が進められたが^{7,8)}、装置の感度が通常のESR装置の1/10~1/100と低く、生体内で

生成する活性酸素が微量で非常に短寿命であるため生体計測ESR装置で・OHやO₂・⁻などの活性酸素を直接検出することは困難である。

一方、1950年代の終わりから1960年代のはじめにかけて、多種の環状ニトロキシルラジカルが合成され⁹⁾、それらと生体内酸化還元酵素や遷移金属との反応について研究されてきた¹⁰⁾。その後、ESRスピンラベル法で膜流動性の研究に応用され、活性酸素との反応についても報告された^{11,12)}。これらの反応に着目し、筆者らはニトロキシルラジカルをプローブとし、生体内の酸化ストレスを測定する手法「生体計測ESR/ニトロキシルプローブ法」を提唱した。この手法では生体個体を生きたまま装置に挿入して計測するため、動物への侵襲を除外でき、実際に生体内で起こっているフリーラジカル反応をリアルタイムに検討できる。解析手順としては、表1に示すようなニトロキシルラジカルをニトロキシルプローブ剤として疾患モデル動物の体内に投与し、そのESRシグナル減衰速度(図3)の変動に及ぼす各種抗酸化薬、阻害

表1 生体計測ESR/ニトロキシルプローブ法に用いられる代表的なニトロキシルラジカル
構造式中のRは置換基を表す。また、略語中の-TEMPO, -PROXYLはそれぞれ2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-oxylと2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxylの略である。

基本構造	置換基(R)	略語
	-OH	hydroxy-TEMPO
	=O	oxo-TEMPO
	-COOH	carboxy-TEMPO
	-N ⁺ (CH ₃) ₃	trimethylammonium-TEMPO (CAT-1)
	-CONH ₂	carbamoyl-PROXYL
	-COOH	carboxy-PROXYL
	-COOCH ₃	MC-PROXYL
	-COOCH ₂ OCOCH ₃	AMC-PROXYL

薬処置の影響を評価することで、生体内のフリーラジカルの生成とそのメカニズムを解析する。

この生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法は生体内におけるフリーラジカルを生きのままリアルタイムで計測する方法であり¹³⁾、筆者ら^{6,14~20)}や他の研究グループ^{21~25)}において、比較的安定な酸化ストレス感受性ニトロキシルラジカルを用いて、種々の疾患モデル動物における活性酸素生成やレドックス変動の無侵襲解析が行われてきた。本法は種々の疾患モデル動物体内での活性酸素生成あるいはレドックス変動だけでなく、海外では腫瘍部位などでの酸素濃度計測にも応用されている。表2に示す報告のうち、#は上記のシグナル減衰の亢進を確認したものである。ここでは、その一例としてインドメタシン惹起胃潰瘍モデル²⁰⁾における

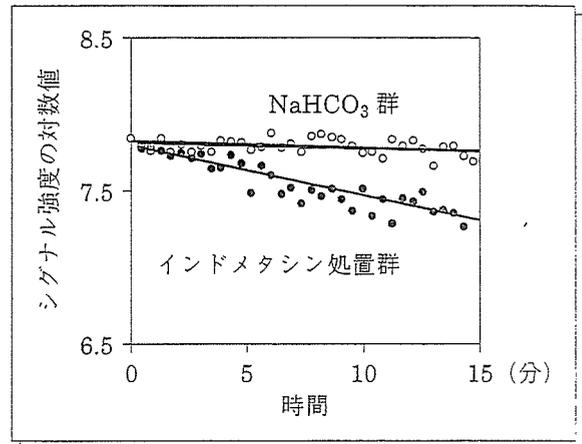


図3 インドメタシン惹起胃粘膜損傷モデルラットでの hydroxy-TEMPO の ESR シグナル減衰曲線

Sprague-Dawley ラットにインドメタシンを経口投与し、1時間後に hydroxy-TEMPO (10 mM, 1.0 ml) を経口投与した。300-MHz ESR で上腹部を経時的に測定し、3本線の ESR シグナルの中央シグナル強度を測定時間に対して片対数プロットした。○は NaHCO₃ 群、●はインドメタシン処置群を示す。

表2 生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法を用いて疾患モデルでの酸化ストレスの無侵襲解析を行った報告例

掲載年のカッコ内数字は参考文献を示す。

疾患モデル	著者	雑誌名(掲載年)	引用文献
高酸素・低酸素状態	Miura Y et al	Biochem Biophys Res Commun (1992)	—*, #
虚血-再灌流障害	Utsumi H et al	Free Radic Res Commun (1993)	—*, #
X線照射	Miura Y et al	Free Radic Biol Med (1997)	15), #
ストレプトゾトシン誘発糖尿病	Sano T et al	Diabetologia (1998)	—*, #
ガン細胞(RIF-1)移植	Kuppusamy P et al	Cancer Res (1998)	16), #
鉄過剰症	Phumala N et al	Free Radic Biol Med (1999)	7)*, #
カイニン酸誘発てんかん発作	Yokoyama H et al	Free Radic Biol Med (1999)	17)
アスベスト肺	Leonard SS et al	Mol Cell Biochem (2002)	18)
アンモニア惹起胃潰瘍	Kasazaki K et al	Free Radic Res (2003)	8)*, #
脳虚血-再灌流障害	Yamato M et al	Free Radic Biol Med (2003)	9)*, #
ストレプトゾトシン誘発糖尿病	Matsumoto S et al	Free Radic Res (2003)	10)*, #
トリニトロベンゼンスルホン酸誘発大腸炎	Togashi H et al	Gut (2003)	19)
水浸拘束惹起胃潰瘍	Yasukawa K et al	Free Radic Res (2004)	11)*, #
グリセロフルビン惹起光過敏症	Takeshita K et al	J Invest Dermatol (2004)	—*, #
インドメタシン惹起胃潰瘍	Utsumi H et al	J Pharmacol Ther Exp (2006)	12)*, #
アジュバンド惹起関節炎	Yamada K et al	Free Radic Res (2006)	13)*, #
ジエチルニトロソアミン誘発肝ガン	Yamada K et al	Free Radic Biol Med (2006)	14)*, #

*は筆者らの研究室における報告例、#はシグナル減衰の亢進が認められた報告例を示す。

活性酸素生成機序の解析例を示す。

インドメタシンは代表的な非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の1つであり、臨床で最も汎用されているNSAIDsである。主な副作用として胃粘膜傷害が知られており、従来、胃粘膜内のシクロオキシゲナーゼ阻害によるプロスタグランジン量の低下との関連が示唆されてきた。しかし、シクロオキシゲナーゼ阻害のみでは説明できないこと、および誘導型シクロオキシゲナーゼ阻害薬では胃粘膜損傷の発症を抑えられるが心血管系の副作用を誘発することから、NSAIDsにより惹起される胃粘膜傷害の発症機序の解明は急務である。

そこで、生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法をインドメタシン惹起胃粘膜損傷モデルラットに応用した。ニトロキシルプローブ剤として膜透過性の hydroxy-TEMPO を経口投与し、生体計測 300-MHz ESR で上腹部のシグナルを観測すると、その減衰速度はインドメタシン処置群で有意に亢進した (図 3)。この亢進したシグナル減衰は抗酸化薬タイロンや・OH 捕捉薬のジメチルチオウレアとニトロキシルプローブ剤との同時投与により、用量依存的に抑制された。一方、非膜透過性の trimethylammonium-TEMPO、すなわち CAT-1 では、インドメタシン処置群でシグナル減衰は変化しなかった。また、hydroxy-TEMPO の前処置で損傷形成は抑制されたのに対して、CAT-1 では抑制効果は認められなかった。

抗酸化医薬品の薬効評価への応用

最近、医薬品や機能性食品の抗酸化作用が注目され、これらの生体内抗酸化能評価法の確立が望まれている。2001年には抗酸化作用を機序とする医薬品、エダラボン (商品名: ラジカット[®]) が市販された。筆者らはその開発段階で生体計測 ESR/ニトロキシル

プローブ法を用いて脳虚血-再灌流障害モデルラットでの抗酸化作用発現を明らかにした¹⁶⁾。またアンモニア惹起胃潰瘍モデルラット¹⁵⁾であらかじめ抗潰瘍薬レバミピド (商品名: ムコスタ[®]) (30 mg/kg) を腹腔内投与すると、先に述べたシグナル減衰の亢進がほぼ消失し、胃腔内での・OH 生成を抑制することが示唆された²⁶⁾。その他、漢方の胃潰瘍治療薬など生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法は生体内での抗酸化医薬品の薬効評価法として非常に有用である。

おわりに

ここで示したように、スピントラップ法は主に生体試料中の活性酸素や活性窒素を検出するのに対し、生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法は疾患モデル動物で無侵襲かつリアルタイムに活性酸素を検出し、その生成機序を詳細に解析することが可能である。今後、種々の機能性ニトロキシルプローブ剤を開発することで、病態モデルにおけるフリーラジカルの関与を細胞レベルで解明することも可能となり、医薬品の抗酸化作用に関する詳細な知見が得られるものと期待される。

文 献

- 1) Buettner GR: Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic Biol Med* 3: 259-303, 1987
- 2) Gallard H, De Laat J: Kinetics of oxidation of chlorobenzenes and phenyl-ureas by Fe(II)/H₂O₂ and Fe(III)/H₂O₂: evidence of reduction and oxidation reactions of intermediates by Fe(II) or Fe(III). *Chemosphere* 42: 405-413, 2001
- 3) Cheeseman KH: Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 14: 191-197, 1993
- 4) Giulivi C, Boveris A, Cadenas E: Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 316: 909-916, 1995
- 5) Al-Maghrebi MA, Benov LT: Polyphosphate

- accumulation and oxidative DNA damage in superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med* 31: 1352-1359, 2001
- 6) Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H: *In vivo* detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. *Free Radic Biol Med* 40: 2040-2046, 2006
 - 7) Halpern HJ, Spencer DP, Vanpolen J et al: Imaging radio-frequency electron-spin-resonance spectrometer with high-resolution and sensitivity for *in vivo* measurements. *Review of Scientific Instruments* 60: 1040-1050, 1989
 - 8) Hardy WN, Whitehead LA: Split-ring resonator for use in magnetic-resonance from 200-2000 MHz. *Review of Scientific Instruments* 52: 213-216, 1981
 - 9) Rozantsev EG: *Synthesis of Some Stable Radicals and The Most Important Intermediates*, ed by Ulrich H, p 203-246, Plenum Press, New York, 1970
 - 10) Kocherginsky N: *Chemical reactivity of nitroxides. Nitroxide Spin Labels: Reactions in Biology and Chemistry*, ed by N Kocherginsky, CRC Press, New York, p 27-66, 1995
 - 11) Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ: Superoxide-dependent reduction of nitroxides by thiols. *Biochim Biophys Acta* 802: 90-98, 1984
 - 12) Asmus KD, Nigam S, Willson RL: Kinetics of nitroxyl radical reactions a pulse-radiolysis conductivity study. *Int J Radiat Biol* 29: 211-219, 1976
 - 13) Utsumi H, Muto E, Masuda S et al: *In vivo* ESR measurement of free radicals in whole mice. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 1342-1348, 1990
 - 14) Phumala N, Ide T, Utsumi H: Noninvasive evaluation of *in vivo* free radical reactions catalyzed by iron using *in vivo* ESR spectroscopy. *Free Radic Biol Med* 26: 1209-1217, 1999
 - 15) Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Utsumi H: Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH_4OH -induced gastric lesions of rats using a 300 MHz *in vivo* ESR technique. *Free Radic Res* 37: 757-766, 2003
 - 16) Yamato M, Egashira T, Utsumi H: Application of *in vivo* ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. *Free Radic Biol Med* 35: 1619-1631, 2003
 - 17) Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, Nawata H, Utsumi H: Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic Res* 37: 767-772, 2003
 - 18) Yasukawa K, Kasazaki K, Hyodo F, Utsumi H: Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in rats with water immersion restraint-induced gastric lesions using *in vivo* electron spin resonance spectroscopy. *Free Radic Res* 38: 147-155, 2004
 - 19) Yamada KI, Nakamura T, Utsumi H: Enhanced intraarticular free radical reactions in adjuvant arthritis rats. *Free Radic Res* 40: 455-460, 2006
 - 20) Utsumi H, Yasukawa K, Soeda T et al: Noninvasive mapping of reactive oxygen species by *in vivo* electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 228-235, 2006
 - 21) Miura Y, Anzai K, Urano S et al: *In vivo* electron paramagnetic resonance studies on oxidative stress caused by X-irradiation in whole mice. *Free Radic Biol Med* 23: 533-540, 1997
 - 22) Yokoyama H, Lin Y, Itoh O et al: EPR imaging for *in vivo* analysis of the half-life of a nitroxide radical in the hippocampus and cerebral cortex of rats after epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 27: 442-448, 1999
 - 23) Kuppusamy P, Afeworki M, Shankar R A et al: *In vivo* electron paramagnetic resonance imaging of tumor heterogeneity and oxygenation in a murine model. *Cancer Res* 58: 1562-1568, 1998
 - 24) Leonard SS, Mowrey K, Pack D et al: *In vivo* bioassays of acute asbestosis and its correlation with ESR spectroscopy and imaging in redox status. *Mol Cell Biochem* 234-235: 369-377, 2002
 - 25) Togashi H, Oikawa K, Adachi T et al: Mucosal sulfhydryl compounds evaluation by *in vivo* electron spin resonance spectroscopy in mice with experimental colitis. *Gut* 52: 1291-1296, 2003
 - 26) Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Yamada K, Utsumi H: Application of *in vivo* ESR spectroscopy to pharmaceutical sciences: evaluation of *in vivo* inhibitory mechanism of antigastric lesion drugs. *Applied Magnetic Resonance* 23: 585-595, 2003

(内海 英雄 · 安川 圭司)

16

酸化ストレスマーカーの測定
バイオマーカー測定法

はじめに

バイオマーカーとは、尿や血液中に含まれる生体由来の物質で、生体内の生物学的変化を定量的に把握するための指標（マーカー）となるものを意味する。バイオマーカーは、ある特定の疾患や状態に相関して量的に変化するため、疾病の診断、重症度の把握、効果的治療法の確立、治療効果の判定に用いることができるというものである（表1）。

これまで、酸化ストレスは、実に多種多様な疾患に関わっているため、特定の疾患における特異的な酸化ストレスバイオマーカーは、いまだみつかっていない、とあってよい。たとえば、尿中の8-OHdG（8-オキシ

グアニン）が上昇している場合に、酸化傷害の増加によるのか、修復酵素の亢進によるのか、判別はむずかしい。酸化ストレスバイオマーカーは、ストレスを特定するものではなく、全体のストレス状態を反映しているものが多い。また、多くのストレスマーカーは、酸化ストレスの結果であるが、またそれ自体が組織障害性をもつ原因ともなりうる。そのような制約を鑑みた上で、非特異的に酸化ストレス状態を評価する必要がある。

酸化ストレスのターゲットとしては、脂質、蛋白、核酸があげられるが、そのなかで実際に生体内酸化ストレスの指標として生体サンプルつまり、血液、尿からの検出を前提に心血管病において有用とされるものについて概説する。

表1 主な酸化ストレスバイオマーカー

1. 脂質
TBARS
HODE(ヒドロキシリノール酸)
アルデヒド(MDA, HNE, アクロレインなど)
イソプロスタン
コレステロール酸化物
2. 蛋白質
カルボニル化合物
アルデヒド修飾蛋白質
アミノ酸酸化物(SH酸化物, ニトロチロシン)
3. 核酸
塩基酸化物(8-オキシグアニン, 8-ニトログアニン, チミジングリコールなど)
4. 抗酸化物
抗酸化酵素(SOD, グルタチオンペルオキシダーゼ, カタラーゼなど)
酸化体/還元体比: GSSG/GSH, チオール含量

脂 質

生体を構成する脂質、なかでも二重結合をもつ高度不飽和脂肪酸とそのエステルは、最も酸化を受けやすい基質である。生体内でも最も豊富に含まれるリノール酸ならびに反応性が高いアラキドン酸の酸化が特に重要と考えられる。脂質過酸化は脂質の水素引き抜き反応により生じるものであり、あらゆる脂質が対象となるが、その反応系は多岐にわたる。

最もよく用いられる指標として、TBARS（チオバルビツール酸反応物質）が知られている。TBARSは、脂質過酸化物中の脂質ヒドロペルオキシド類およびアルデヒド誘導体などの複雑な成分からなり、酸性条件でアルデヒド類を遊離する物質群を意味する。酸化

条件下で遊離されたアルデヒド類は、チオバルビツール酸と加熱によってTBA：マロンジアルデヒド=2：1の構造をもつ赤色蛍光色素をつくるため、蛍光光度計によって鋭敏に測定が可能である。TBARS法は、マロンジアルデヒドのみならず、アルケナール、アルカジェナール類を遊離する物質から構成されるため、非特異的であるが、測定も比較的容易で、生体内の脂質過酸化状態を総合的に把握する上では、鋭敏な検出方法ともいえる。測定に際しては、TBA反応中に脂質過酸化が亢進し、人為的に生成したTBARSを測定することになるため、抗酸化剤としてBHT（ブチルヒドロキトルエン）を加えることが必須である。

8-イソプロスタンは、アラキドン酸の非酵素反応によって生じる安定なプロスタグランジンの一種である。最もよく測定されているものは、8-iso PGF_{2a}であり、実際の測定は、内部標準を加えた上で、GC/MSあるいはLC/MSによって可能となる。簡便なEIAキット（Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA）が市販されているが、生体サンプルからの抽出段階でのロスなどが明確でなく、ばらつきが大である。また、血清中の8-イソプロスタンは不安定であり、他の多くの過酸化物の検出同様に尿での測定が適している。

また、MDS, HNE, アクロレインなどは、酸化ストレスマーカーでもあると同時に、それ自身が組織傷害性を有する。動脈硬化などの免疫組織染色によってその存在が証明されていることから、それらの病態との深い関連が示唆される。

核 酸

核、およびミトコンドリア内の核酸も酸化を受ける。8-ニトログアニン、8-クロログアニンなど多くの塩基の酸化物が存在するが、

DNAの酸化損傷の1つである8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OHdG）は最もよく知られた核酸塩基の酸化物であり、尿中では代謝されず安定に測定できる。8-OH-dGは、細胞に突然変異を起こす原因ともなることから、広く研究されている。ヒトにおいては、尿、白血球DNA中の8-OH-dGの分析が行われており、大腸癌、小児癌、慢性肝炎、糖尿病、冠動脈疾患、心不全において増加が示されている。最近では、DNA修復酵素OGG1遺伝子多型の関連も含めて議論される。

蛋白質

蛋白質は、ラジカル反応ならびに脂質酸化物であるアルデヒドによってHPO（ヒドロペルオキシド）やカルボニル化合物などを与える。実際に、多様な酸化的变化を受けることから、培養細胞の実験では、最近ではプロテオミクスなどの手法により、それぞれの役割が明らかにされつつあるが、酸化ストレスの臨床的マーカーとして特定の酸化蛋白質を利用することは現時点では困難である。

抗酸化酵素の変動

酸化ストレスによって、生体内の抗酸化酵素が変動することはよく知られた事実であるが、多くの抗酸化酵素は生体内の種々の酸化ストレスに応じて、その発現および活性が制御されている。また、酸化ストレスの亢進により生体内の還元力が低下する。これらはいずれも疾患や全身状態により変化を遂げ、特異的であるとはいえないが、疾患の重症度、経時変化を観察するには、時としてよいマーカーとなりうる。

生体内に存在する抗酸化酵素は多種多様であるが、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）、カタラーゼ、チオレドキシン、な

どがよく用いられる。

還元剤としての、チオールは、低分子であればグルタチオン、高分子であれば蛋白チオールに代表される。比較的短時間で量的変化を遂げ生体内の還元力の指標として用いることができる。チオールはとくに血清中における酸化ストレスに対する即時反応を担っていると考えられ、筆者らは病態の経時的把握に有用であると考えている。

おわりに

酸化ストレスを引き起こす活性酸素種、活性窒素種、フリーラジカルは、生体内分子と直接反応して酸化を引き起こすのみならず、細胞内情報伝達などのシグナルメッセンジャーとしても作用することが知られているが、これらの生理的役割の全貌はまだ明らかになっていない。また、酸化ストレスが諸悪の根源かという点、筆者らはいくつかの解離した事実を認めざるをえない。たとえば、運

動を行うと、一過性にフリーラジカルが多く産生され、酸素消費量の増加に伴い、脂質過酸化の増加が認められる。しかし、多くの臨床研究から、運動は、心血管病のリスクを軽減し、予後を改善することが明らかである。そのほか、多くの動物実験では証明されている、抗酸化薬による心血管病の予防・治療が、前向き臨床研究では、よい結果が得られていない、など、分子メカニズムの解明と臨床への適応を明らかにすることが、今後の課題である。

また、酸化ストレスマーカーは全身性の酸化ストレス亢進を反映することはあるとしても、各臓器での酸化ストレスの増加は反映しないこともある。今後は、さらに既存のマーカーによる解析のみならず、画像診断を含めた臓器・疾患特異的な新たな酸化ストレス評価の開発が必要であると考えられる。

(井手 友美・砂川 賢二)

18

活性酸素種のバイオイメーキング MRI

はじめに

最近、糖尿病や高血圧、脳卒中などの疾患に、フリーラジカルが関与していることが明らかにされつつある。これら酸化ストレス疾患の、どの部位で、いつ、どの程度フリーラジカルが産生しているかを明らかにすることが、病態解析・薬効評価においてきわめて重要である。前述のように、生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法は、生体内で生成するフリーラジカルを無侵襲的にリアルタイムで解析する手法であり、これまでにフリーラジカルと疾患の発症・進展との関わりを明らかにしてきた（電子スピン共鳴 (ESR) 法 79 頁参照）。

プロトン核スピン共鳴画像 (magnetic resonance imaging; MRI) は臨床現場で梗塞や腫瘍など病変の画像診断や機能評価に汎用されている。最近では、筆者らのグループや欧米の研究グループで、高感度かつ短時間に画像取得できるオーバーハウザー MRI (overhauser-enhanced MRI; OMRI) を用いた生体内のレドックス動態イメージングが報告されている。

ここでは、MRI の原理について簡単に説明し、MRI を用いた活性酸素種のバイオイメーキングの応用例について紹介する。

プロトン核磁気共鳴画像 (MRI)

静磁場下で、核スピンのエネルギーは電子スピンと同様にゼーマン分裂を生じ、プロトン核スピンの場合には 2 つのエネルギー状態に分かれる。このエネルギー差に相当する

パルス状の電磁波 (ラジオ波) を照射すると、基底状態の核スピンの励起状態に遷移し、やがて基底状態と励起状態の核スピン数が同じになる。ラジオ波照射を止めると、励起状態にある核スピンはエネルギーを放出しながら基底状態に戻っていく。この現象を緩和と呼ぶ。MRI はプロトン核スピンの緩和を利用した画像化装置である。臓器や組織の種類、または同じ組織でも正常組織、病変組織間で緩和時間が異なることから、これらの相違を視覚化することが可能である。

また、MRI の造影剤はプロトンの緩和時間を短縮することによって信号強度に影響を及ぼす。ガドリニウムは孤立電子を 7 個もち電子プロトン双極子相互作用が強く、そのキレート化合物には多数の水分子プロトンと相互作用できるポケットがあるため、ガドリニウム化合物は強力な緩和時間短縮作用を有し、造影剤として汎用されている。前述したニトロキシルラジカル (電子スピン共鳴 (ESR) 法, 79 頁参照) は、水分子の出入りできるポケットをもたないため、ガドリニウム化合物ほど強力ではないものの、緩和時間短縮作用を有する。

ESRI/MRI 融像システムを用いたバイオイメーキング

活性酸素種のイメージング装置としては、ESRI が知られているが、解剖学的情報が欠落しているため、体内のどこで活性酸素が生成しているのかを決定することが困難である。そこで、筆者らは、ニトロキシルラジカ

ルを用いて、解剖学的情報の得られるMRIと融像するシステムを開発し、動物計測に応用した^{1,2)}。他のグループでも、ESRIとMRIを融像する試みがなされている³⁾。

筆者らの行ったESRI/MRI融像の一例を示す。図1(A)のように、マウスの両体側にニトロキシルラジカルを封入したマーカを設置し、Haber-Weiss 試薬とニトロキシル

ラジカルをマウスに経口投与した。その直後にESR画像を取得し、続いてMRI撮像を行った。ESR画像とMRI画像の両方に認められるマーカを重ね合わせることで、ニトロキシルラジカル溶液がマウス胃内に滞留していることが示された。また、図1(B)のように、キサンチンオキシダーゼ処置群では画像輝度の減少が認められたのに対し、対照群

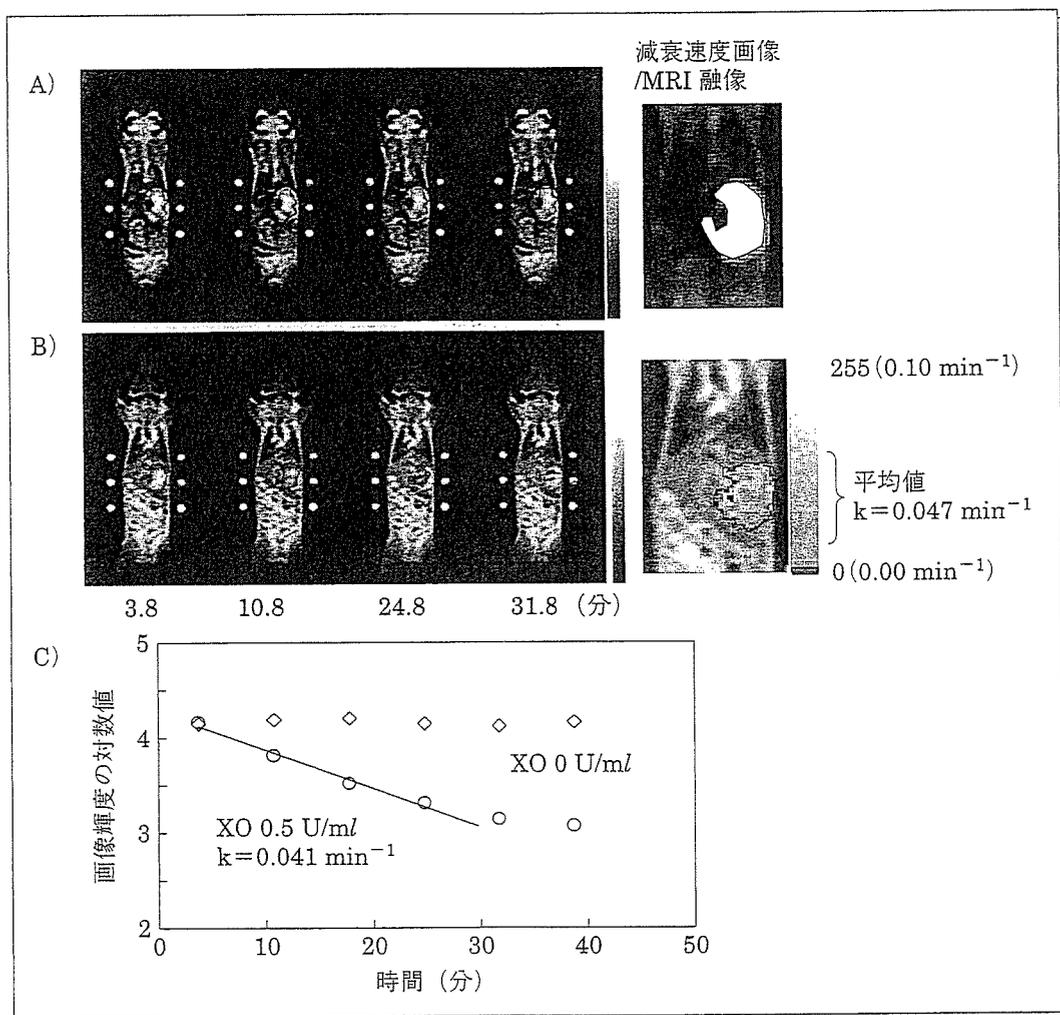


図1 ESRI/MRI融像システムを用いた、マウス胃内で生成する $\cdot\text{OH}$ のイメージング(口絵カラー参照)マウスを麻酔下、ヒポキサンチン(3.3 mM)、キサンチンオキシダーゼ(XO: 0.5 U/ml)と銅キレート剤(0.33 mM)をcarbamoyl-PROXYL(3 mM)と混合し、直後に経口投与した。投与直後にESRI測定を開始し、連続して6枚取得した。その後、0.2テスラMRI装置で、coronal面でマウスを撮像した。開始から4枚までのESR画像では、胃部での画像輝度平均値の対数プロットが直線を示したことから、それらの画像についてピクセルごとに減衰速度を算出し、減衰速度画像を作成した。

では画像輝度に変化が認められなかった。「電子スピン共鳴 (ESR) 法」で前述した方法と同様に⁴⁾、ピクセルごとに減衰速度を求めて画像表示し、MRI 画像と融像することで、マウス胃内で生成する・OH の画像が得られた。

オーバーハウザー MRI (OMRI) を用いた同時分子イメージング

近年フリーラジカルの画像化装置として新たに開発された OMRI は、高い空間分解能をもち、短時間測定が可能である⁵⁾。「オーバーハウザー効果」とは、フリーラジカルの電子スピンを ESR 遷移させ、電子スピんと核スピンの双極子相互作用により核スピンの偏極する現象である⁶⁾。OMRI とはフリーラジカルの電子スピンを励起させ、その後、水分子の水素核スピンを偏極させ、増幅したプロトン信号を MRI で画像化する方法である。熱平衡状態では、基底状態と励起状態にある核スピンの比はボルツマン分布に従い、たとえば 0.4 テスラ MRI 装置の場合、全部の核スピンの 1,000,000 個あるとすると、励

起状態の核スピンは基底状態の核スピンのよりもわずか 1.3 個多い計算になる。この通常の核スピンのボルツマン分布と比較し、最大 (理論値) で 330 倍に核スピン偏極が増強される。すなわち通常の MRI 測定に較べ、330 倍 (理論値) の高感度化を図ることができる。アメリカでは、OMRI 装置で、マウスに投与したトリアリルメチルラジカル⁷⁾、あるいはニトロキシラジカル⁸⁾ の体内動態、または腫瘍組織中の酸素濃度⁹⁾ を画像解析した報告がある。

しかし、細胞内外でフリーラジカル反応も異なるため、細胞内外を切り分け、さらにそれらを同時に画像解析できれば、より詳細に疾患の成因を解明することが可能となる。¹⁴N, ¹⁵N 標識ニトロキシラジカルは、その核スピンの違いにより ESR スペクトルの共鳴磁場が異なる (図 2)。筆者らは、ESR 励起を ¹⁴N, ¹⁵N の核種で交互に行えば、複数のプローブが同時に画像化できると考え、新たに図 3 に示す OMRI シークエンスを開発した¹⁰⁾。このシークエンスでは MRI 撮像する際に各位相エンコードごとに ¹⁴N, ¹⁵N を

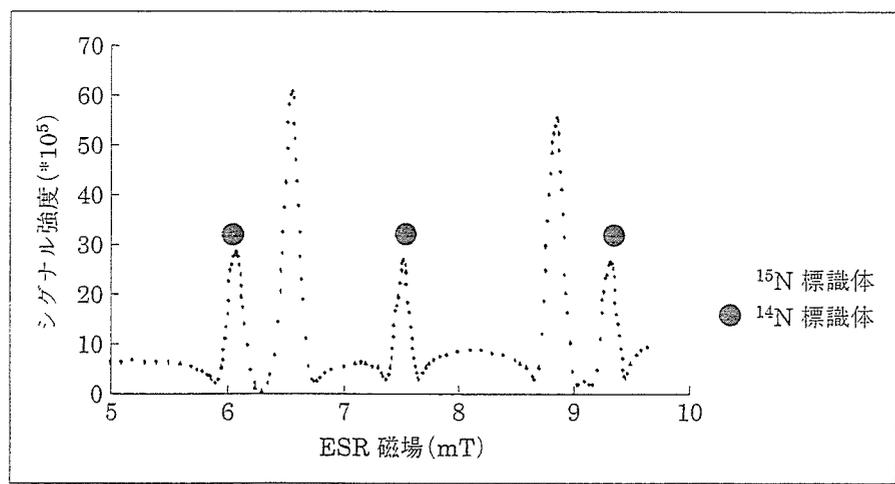


図 2 ¹⁴N, ¹⁵N 標識ニトロキシラジカルの動的核偏極スペクトル
¹⁴N-carbamoyl-PROXYL と ¹⁵N-carbamoyl-PROXYL (ともに 2 mM) 共存下で、ESR 磁場を 5 ミリテスラ (mT) から 10 mT まで変化させて動的核偏極スペクトルを取得した。

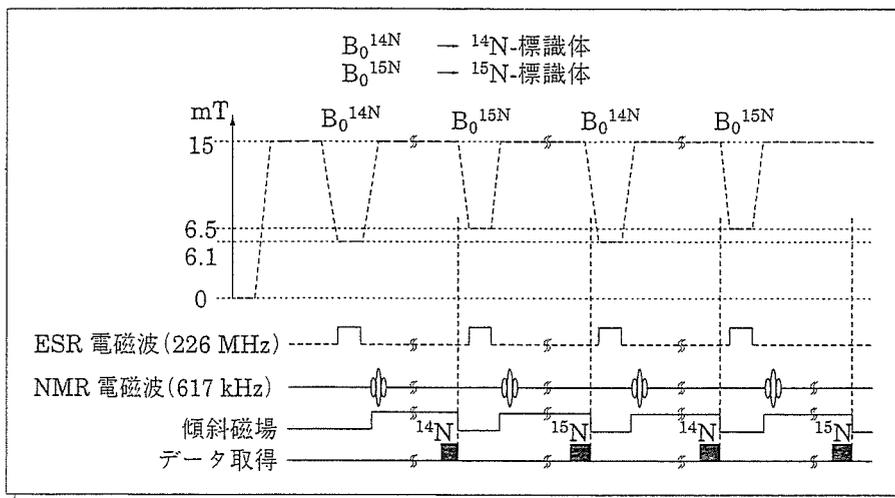


図3 同時分離画像化シーケンス

OMRI 装置で ^{14}N 標識体と ^{15}N 標識体のニトロキシルラジカルを同時に分離して画像化するために考案したシーケンスであり、 ^{14}N 標識体の ESR 共鳴磁場と ^{15}N 標識体の ESR 共鳴磁場を交互に印加し、それぞれ MRI データを取得することで、 ^{14}N 、 ^{15}N 標識体の画像を分離して同時に得ることができる。

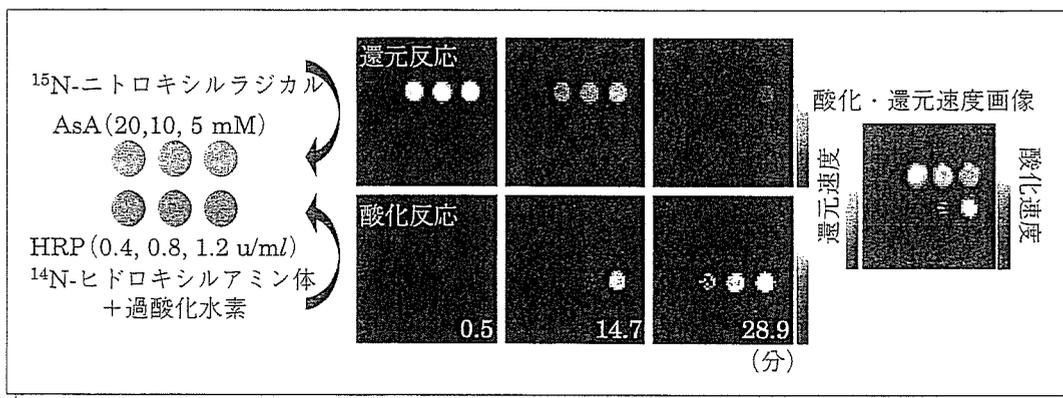


図4 酸化反応と還元反応の同時分離画像（口絵カラー参照）

左の模式図中の赤色には、左から順に 20, 10, 5 mM のアスコルビン酸 (AsA) が、青色には、左から順に 0.4, 0.8, 1.2 U/ml のペルオキシダーゼ (HRP) が含まれている。赤色のほうに 2 mM の ^{15}N 標識ニトロキシルラジカル、青色のほうに 5 mM の ^{14}N 標識ヒドロキシルアミン体と 5 mM の過酸化水素を添加し、その直後に OMRI 同時分離画像を取得した。赤で表示した画像の輝度減少の程度を還元速度とし、青で表示した画像の輝度増加の程度を酸化速度として算出した。

区別して ESR 励起することから、 ^{14}N 、 ^{15}N を同時分離した画像化が可能である。図 4 に ^{15}N 標識ニトロキシルラジカル、 ^{14}N 標識ヒドロキシルアミン体を用い、還元反応と酸化反応を分離画像した例を示す。赤色で表示したニトロキシルラジカルは、還元剤の濃度

依存的に画像強度が減少し、一方、青色で表示したヒドロキシルアミン体は酸化剤により濃度依存的に画像強度が増加する様子が明瞭に可視化されている。本手法は、レドックス (酸化と還元) の両反応を区別して同時画像解析できることから、生体内での各部位でレ

ドックス反応の詳細を可視化するまったく新たな画像化システムを提案したものである。

膜透過性の MC-PROXYL を ^{15}N で標識し、非膜透過性の carboxy-PROXYL を ^{15}N で標識したスピンプローブ剤を合成し、アスコルビン酸含有リポソームとの混合溶液での分離画像化を行った。その結果、図5に示すように、膜透過性 MC-PROXYL ではリポソーム内のアスコルビン酸との反応で顕著に輝度が減少するのに対し、非膜透過性 carboxy-PROXYL では輝度がまったく変化しない画像が得られた。この結果はプローブの物性を生かすことで、厚さ 8 nm のリポソーム膜内外をナノメートルスケールで切り分ける同時分子イメージングをはじめて示したものである¹⁰⁾。

そこで、OMRI 同時分子イメージング法を疾患モデルの病態解析に応用した。インドメタシン惹起胃粘膜損傷モデルラットに、膜透過性 ^{15}N 標識 hydroxy-TEMPO と非膜透過性 ^{14}N 標識 CAT-1 を投与し、同時分離法による OMRI 撮像を行った。その結果、同一ラットで、膜透過性のプローブでは画像輝

度が減少するのに対して、非膜透過性のプローブでは画像輝度が測定時間中保たれることが同時に示された。以上より、膜透過性プローブの分布する疎水性領域、胃粘液層や上皮細胞膜、細胞内で活性酸素が生成しているのに対し、非膜透過性プローブの分布する親水性領域では活性酸素が生成していないことが示唆された。

おわりに

ここで示したように、MRI は解剖学的情報を与えることから、ESRI と併用することで、ニトロキシルプローブの体内動態や活性酸素の生成部位の特定に用いられる。最近では腫瘍組織内のレドックス動態解析にも応用されている。さらに、オーバーハウザー効果を利用した OMRI では、疾患モデル動物で低侵襲かつリアルタイムに、細胞膜の内と外とで異なる活性酸素動態を区別し、かつ同時にイメージングすることも可能である。今後、狭線幅ニトロキシルプローブ剤を開発することで、病態モデルにおける細胞内外のレドックス変動をより高感度に検出することも

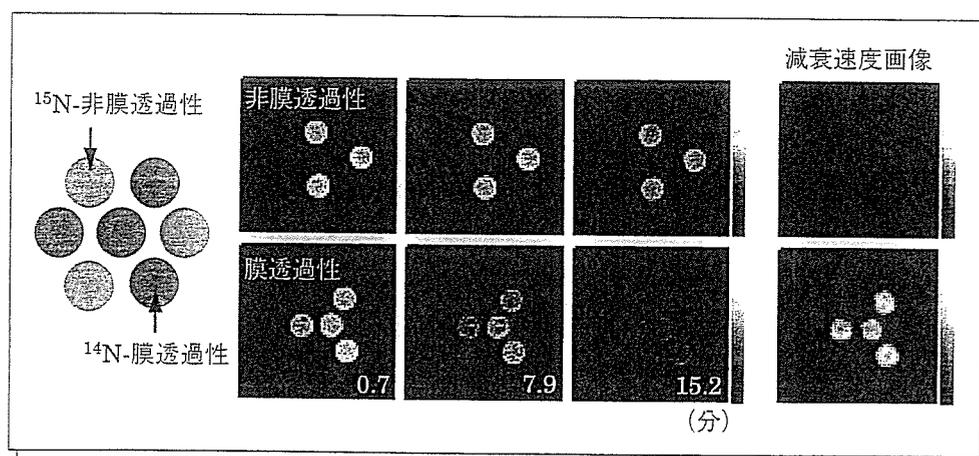


図5 リポソーム膜内と外での同時分離画像（口絵カラー参照）

左の模式図中の赤色には ^{15}N 標識の非膜透過性ニトロキシルラジカル、青色には ^{14}N 標識の膜透過性ニトロキシルラジカルが含まれている。すべての試験管に、アスコルビン酸 (100 mM) を封入したリポソーム膜を添加し、その直後に OMRI 同時分離画像を取得した。

可能となり、病態解析に有用な知見が得られるものと期待される。

文 献

- 1) Hyodo F, Yasukawa K, Yamada K, Utsumi H: Spatially resolved time-course studies of free radical reactions with an EPRI/MRI fusion technique. *Magn Reson Med* 56: 938-943, 2006
- 2) Matsumoto S, Nagai M, Yamada K et al: A composite resonator assembly suitable for EPR/NMR coregistration imaging. *Concepts in Magnetic Resonance Part B-Magnetic Resonance Engineering* 25B: 1-11, 2005
- 3) He G, Deng Y, Li H et al: EPR/NMR co-imaging for anatomic registration of free-radical images. *Magn Reson Med* 47: 571-578, 2002
- 4) Kasazaki K, Yasukawa K, Sano H, Utsumi H: Non-invasive analysis of reactive oxygen species generated in NH_4OH -induced gastric lesions of rats using a 300 MHz *in vivo* ESR technique. *Free Radic Res* 37: 757-766, 2003
- 5) Lurie DJ, Bussell DM, Bell LH et al: Proton-electron double magnetic resonance imaging of free radical solutions. *J Magn Reson* 76: 366-370, 1988
- 6) Overhauser AW: Polarization of nuclei in metals. *Phys Rev* 92: 411-412, 1953
- 7) Li H, Deng Y, He G et al: Proton electron double resonance imaging of the *in vivo* distribution and clearance of a triaryl methyl radical in mice. *Magn Reson Med* 48: 530-534, 2002
- 8) Li H, He G, Deng Y et al: *In vivo* proton electron double resonance imaging of the distribution and clearance of nitroxide radicals in mice. *Magn Reson Med* 55: 669-675, 2006
- 9) Krishna MC, English S, Yamada K et al: Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2216-2221, 2002
- 10) Utsumi H, Yamada K, Ichikawa K et al: Simultaneous molecular imaging of redox reactions monitored by overhauser-enhanced MRI with N-14- and N-15-labeled nitroxyl radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1463-1468, 2006

(内海 英雄・安川 圭司)

21

酸化ストレスと交感神経

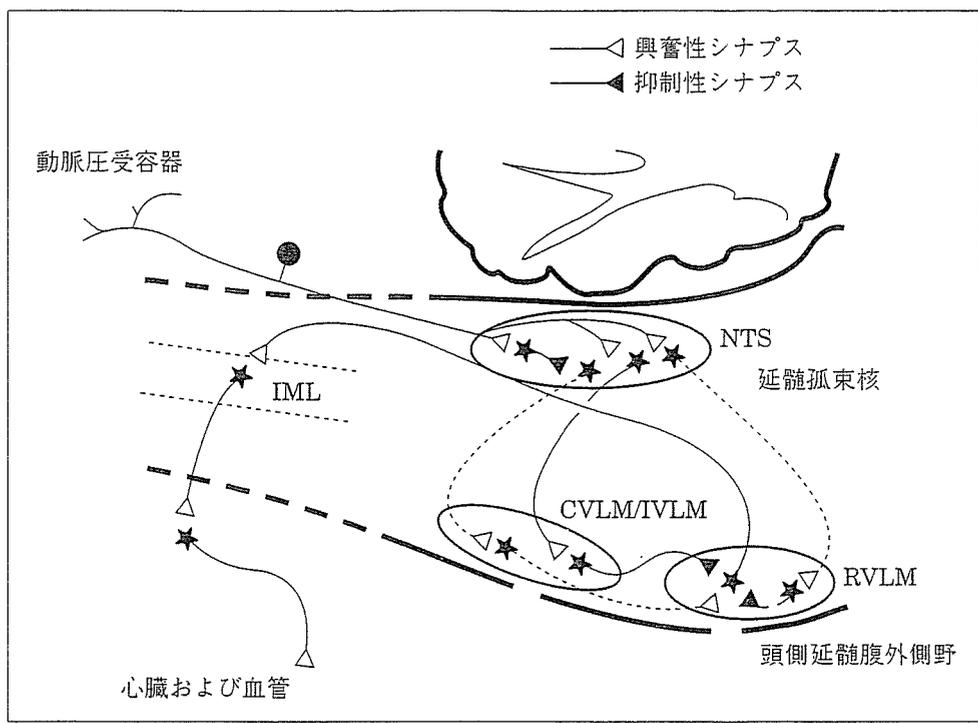
はじめに

近年、心血管病の病態に酸化ストレスが深く関与していることが注目されている。たとえば高血圧・糖尿病・高脂血症やそれらを基盤として生じる動脈硬化性疾患・心不全などである。また、最近話題のメタボリックシンドロームにおいてもその役割が示唆されている。したがって、酸化ストレス増大を抑制する治療が考えられている。その1つとしてレニン-アンジオテンシン系抑制薬の役割が示唆されている。しかし、今1つ忘れてならないのは生体の調節系として根幹をなす交感神経系の役割である。古くから、レニン-アンジオテンシン系と交感神経系の相互作用は知られている。これはアンジオテンシンⅡが血中ホルモンであるという考えが主流であったころから始まっている。すなわち、アンジオテンシンⅡは末梢交感神経からのノルエピネフリンの分泌や副腎からのアドレナリン分泌を促進するというものである。一方、ノルエピネフリンはレニン分泌を促進しレニン-アンジオテンシン系を活性化する。組織レニン-アンジオテンシン系の存在が明らかになり、アンジオテンシン受容体が同定されその拮抗薬が開発されたことによって、レニン-アンジオテンシン系の役割の重要性が再び脚光を浴び、研究の急速な進展がみられた。高血圧・心不全における治療薬としての地位も確立した^{1~4)}。最近、心血管系を制御するもう1つの重要な柱である交感神経系の研究の進展もみえ始めた。心不全におけるβ遮断薬の有用性やアンジオテンシン受容体

拮抗薬 (ARB) の交感神経抑制作用が示されてきたからである。また、残念ながらわが国では使用されていないが、新しい副作用の少ない中枢性交感神経抑制薬の登場による。交感神経活動を規定するのは脳幹部に存在する頭側延髄腹外側野 (rostral ventrolateral medulla; RVLM) である。そこへは動脈圧受容器からの最初の入力を受ける延髄孤側核 (nucleus tractus solitarius; NTS) から尾側延髄腹外側野 (caudal ventrolateral medulla; CVLM) を介して刻々の血圧値を認識して一定の血圧を維持するよう、動脈圧受容器反射を介する調節機構が存在する (図1)^{1~5)}。また、ストレス、運動、その他の刺激に対して上位中枢からの入力を受け、交感神経系を介して血圧・心拍数・臓器灌流を調節している。本稿では、主に酸化ストレスと交感神経系との関係、病態における役割に主眼をおき最近の知見を概説する。

血圧調節・高血圧における酸化ストレスと交感神経活動

高血圧におけるRVLMの活性酸素産生増加が交感神経活動亢進を介した血圧上昇機序に関与していることを示したのは、筆者らの成績が世界で最初である⁶⁾。先行研究により、筆者らは、L-NAMEラットのNTS内へARBであるカンデサルタンを微量注入すると降圧・心拍数低下・交感神経活動抑制が生じること、脳幹部アンジオテンシン変換酵素 (ACE) の mRNA 発現が増加していることを報告した⁷⁾。すなわち、L-NAMEラッ



実線は確立された主要経路，点線は仮説による追加された経路。

図1 動脈圧受容器反射を示す経路と主要神経伝達物質

[文献2)より改変引用]

トでは、末梢血管のみならず脳内レニン-アンジオテンシン系の活性化が中枢性交感神経活動亢進を介する高血圧の機序に参与している。このように脳内NOは一般的には交感神経活動を中枢性に抑制する作用があり、アンジオテンシンIIとのクロストークが考えられた。脳内には血中ホルモンとしてとは別に独立したレニン-アンジオテンシン系が存在する⁸⁾。それらの成績から、NOの作用を減弱させる活性酸素産生による酸化ストレス増加は脳内において中枢性交感神経活動を増加させる可能性を考えたのである⁶⁾。脳内とくにRVLMにおける活性酸素産生はSHRSPで顕著であり、正常血圧ラット(Wistar-Kyoto rat; WKY)ではほとんど認められなかった⁶⁾(図2)。筆者らの成績を支持する報告はその後もなされている。たとえば、最

近、中枢性のアンジオテンシンIIの昇圧作用が視床下部におけるNAD(P)Hオキシダーゼを介したスーパーオキシド産生によって生じることが示された⁹⁾。また、アンジオテンシンIIによる中枢性昇圧反応はNAD(P)Hオキシダーゼ由来のスーパーオキシド産生を生じ、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)を介しているということも示されている¹⁰⁾。

腎臓病に伴う高血圧は治療抵抗性である場合が多い。これは体液量調節の因子が大きく関わるからである。循環ホルモンの変化も大きい。Capmeseらのグループはフェノールで片側腎傷害により作成した高血圧モデルラットで交感神経系の活性化が生じていること、その機序に脳内活性酸素産生増加が関与していることを一連の研究で呈示してい

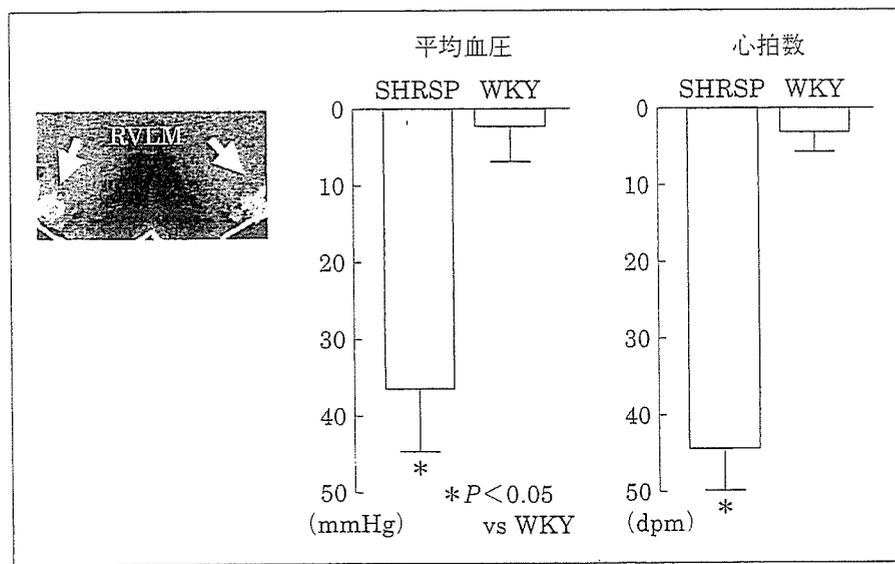


図2 脳内心血管中枢 (RVL; rostral ventrolateral medulla) に Mn-SOD 遺伝子導入を行った際の遺伝子発現 (左: 免疫組織化学染色) および血圧・心拍数の変化 (右)

[文献6)より改変引用]

る¹¹⁾。彼らの成績は腎疾患を伴う高血圧における交感神経系活性化と脳内酸化ストレス増大を結びつける点で治療の観点からも重要であると考えられる。事実、腎不全における交感神経の活性化が再び注目されてきている¹²⁾。ここにNOと酸化ストレスの関与が示唆されている。

脳内活性酸素とさまざまな局所因子との相互作用も注目される場所である。たとえば、脳内内因性アドレノメジュリンは脳内酸化ストレス低下を介して交感神経活動を抑制することが報告されている¹³⁾。

心不全における役割

心不全は交感神経系の過剰な亢進がその病態に深く関与していることは周知の事実である^{4,5)}。また、レニン-アンジオテンシン系の活性化も血液中・組織中ともに重要な役割を果たしている。最近の大規模臨床試験の結果を受けて、アンジオテンシン変換酵素阻害薬は心不全治療の基本薬となり、ARBも有用

性が確認されている。また、注目すべきは従来、禁忌と考えられてきた β 遮断薬が積極的に使用されるようになってきたことである。近年の研究により、心不全モデルで、ARBの脳内での交感神経抑制作用が注目されている¹⁴⁾。その詳細な機序はまだ明らかではないが、心不全では脳内レニン-アンジオテンシン系の活性化が生じており、その抑制によって過剰な交感神経活動の亢進が抑制される。その候補としてNO活性の低下、活性酸素産生増加が考えられている。アンジオテンシンIIによるNAD(P)Hオキシダーゼを介する活性酸素の増加がRVLやPVNなどの自律神経系を制御する諸核に作用して交感神経活動亢進を生じていることが報告された^{15~17)}。脳内AT₁受容体も心不全でアップレギュレーションしている。また、心不全で亢進している心臓交感神経反射もアンジオテンシンIIが関与しており、AT₁受容体のアンチセンス投与によってその反射は正常化する。最近の最も興味深い報告は、心

不全における脳内 AT₁ 受容体のアップレギュレーションは核内転写因子である activator protein 1 (AP1) および Jun N-terminal kinase の活性化を生じるといものである¹⁸⁾。

交感神経節レベルでの作用

交感神経系の活性化は先の動脈圧受容器反射回路図でも示したように (図 1), さまざまなレベルで調節される。その 1 つとして交感神経節がある。これは脊髄からの交感神経節前線維が交感神経節後線維へシナプスを形成する部位であり, 交感神経幹の中にある。最近, deoxycorticosterone acetate (DOCA) 食塩高血圧ラットで腹部交感神経節におけるスーパーオキシド産生が増加していることが報告された^{19,20)}。その機序としては, ETB 受容体のアップレギュレーションが生じており, エンドセリン-1 による ETB 受容体刺激によるスーパーオキシド産生増加が示唆されている^{19,21)}。

末梢交感神経での役割

通常, 運動に携わる骨格筋の交感神経による血管収縮は抑制される。これは, 局所による代謝性血管拡張作用によるがその生理活性物質の 1 つとして NO がある。活性酸素は NO を不活化することによって交感神経系による血管収縮反応を増強する可能性がある。最近, この仮説を支持する成績が慢性アンジオテンシン II 注入ラットおよび片腎動脈狭窄ラットで報告された。したがって, 少なくとも慢性的にアンジオテンシン II レベルが上昇している状態では, 活性酸素が骨格筋の交感神経による血管収縮反応を増強させることが考えられる²²⁾。この成績は, とくに血中アンジオテンシン II レベルが増加しているタイプの高血圧や心不全における運動耐容能などに関与している可能性がある。実際, 心不全

モデルラットで, 骨格筋収縮における交感神経による血管収縮反応を活性酸素が NO 活性を抑制することによって増強していることが示唆されている²³⁾。

最近の研究によると, ARB は末梢交感神経終末ではシナプス前の AT₁ 受容体に作用して交感神経を抑制するとされている。この作用はどの ARB でも認められるが, その種類によって強さは異なる。テルミサルタン, カンデサルタンが比較的強いようである^{24,25)}。

おわりに

以上述べたように, 酸化ストレスは交感神経系と密接に関連していることを支持する報告が集まりつつある。とくに, 高血圧・心不全では明らかである。その作用部位として脳・末梢神経両者への作用が考えられる。活性酸素産生源としてはアンジオテンシン II 刺激による NAD(P)H オキシダーゼの系が最もよく研究されているが, 他にもキサンチンオキシダーゼ, ミトコンドリア, uncoupled NO 合成酵素などがあり, これから解明されていかなければならない課題であろう。ARB の登場によってレニン-アンジオテンシン系の研究が飛躍的に進み, その理解が深まり臨床における適応が拡大されようとしている。一方, 交感神経系は最も重要な調節系であるにもかかわらず“脳”が関係するため循環器研究者に敬遠されがちである。しかし, 脳内レニン-アンジオテンシン系の研究が進んできていることもあり, ストレス社会の現代, メタボリックシンドロームも含め, これから交感神経系の研究が進み, 至適な調節レベルの決定など臨床への応用が期待される (図 3)。とくに, 酸化ストレスはその切り口となるであろう。

文 献

- 1) 廣岡良隆: “脳” と高血圧. 分子血管病 2: 167-

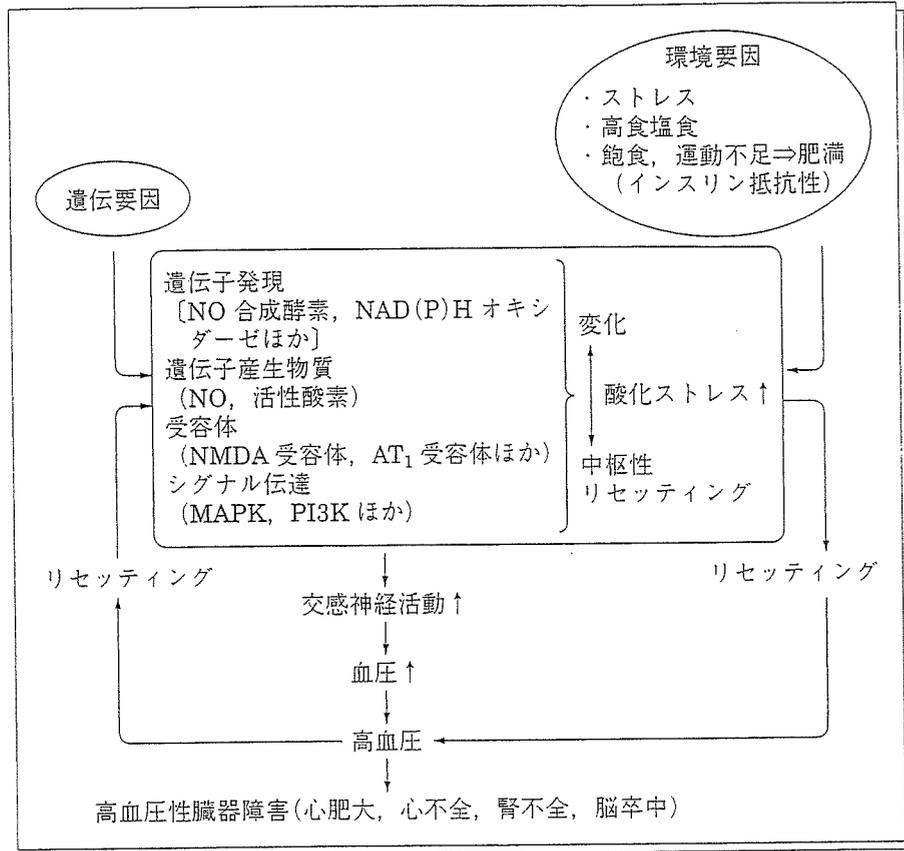


図3 高血圧および高血圧性臓器障害にいかに関与する神経系が重要か、脳が重要か、を示すシエマ

- 175, 2001
- 2) Dampney RAL, Polson JW, Potts PD, Hirooka Y, Horiuchi J: Functional organization of brain pathways subserving the baroreceptor reflex: studies in conscious animals using immediate early gene expression. *Cell Mol Neurobiol* 23: 597, 2003
- 3) 廣岡良隆: 高血圧症の標的臓器障害と交感神経活動. *血圧* 12: 668-672, 2005
- 4) 廣岡良隆: 心不全例における血圧調節機構. *呼吸と循環* 48: 333-338, 2000
- 5) 廣岡良隆, 竹下 彰: 慢性心不全と神経体液性因子. *総合臨牀* 51: 668-679, 2002
- 6) Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y et al: Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109: 2357-2362, 2004
- 7) Eshima K, Hirooka Y, Shigematsu H et al: Angiotensin in the nucleus tractus solitarii contribute to neurogenic hypertension by chronic nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension* 36: 259-263, 2000
- 8) Davisson RL: Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R498-R511, 2003
- 9) Erdös B, Broxson CS, King MA et al: Acute pressor effect of central angiotensin II is mediated by NAD(P)H-oxidase-dependent production of superoxide in the hypothalamic cardiovascular regulatory nuclei. *J Hypertens* 24: 109-116, 2006
- 10) Chan SHH, Hsu K-S, Huang C-C et al: NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res* 97: 772-780, 2005

- 11) Ye S, Zhong H, Campese VM: Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypertension. *Hypertension* 48: 309–315, 2006
- 12) Koomans HA, Blankestijn PJ, Joles JA: Sympathetic hyperactivity in chronic renal failure: a wake-up call. *J Am Soc Nephrol* 15: 524–537, 2004
- 13) Fujita M, Kuwaki T, Ando K et al: Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 45: 1165–1172, 2005
- 14) Zucker IH: Brain angiotensin II: new insights into its role in sympathetic regulation. *Circ Res* 90: 503–505, 2002
- 15) Lindley TE, Doobay MF, Sharma RV et al: Superoxide is involved in the central nervous system activation and sympathoexcitation of myocardial infarction-induced heart failure. *Circ Res* 94: 402–409, 2004
- 16) Gao L, Wang W, Li Y-L et al: Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res* 95: 937–944, 2004
- 17) Liu D, Gao L, Roy SK et al: Neuronal angiotensin II type 1 receptor upregulation in heart failure: activation of activator protein 1 and Jun N-terminal kinase. *Circ Res* 99: 1004–1011, 2006
- 18) Dai X, Galligan JJ, Watts SW: Increased $O_2^{\cdot-}$ production and upregulation of ETB receptors by sympathetic neurons in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* 43: 1048–1054, 2004
- 19) Dai X, Cao X, Kreulen DL: Superoxide anion is elevated in sympathetic neurons in DOCA-salt hypertension via activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1019–H1026, 2006
- 20) Lau YE, Galligan JJ, Kreulen DL et al: Activation of ETB receptors increases superoxide levels in sympathetic ganglia *in vivo*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R90–R95, 2006
- 21) Zhao W, Swanson SA, Ye J et al: Reactive oxygen species impair sympathetic vasoconstriction in skeletal muscle in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension* 48: 637–643, 2006
- 22) Thomas GD, Zhang W, Victor RD: Impaired modulation of sympathetic vasoconstriction in skeletal muscle of rats with chronic myocardial infarctions: role of oxidative stress. *Circ Res* 88: 816–823, 2001
- 23) Nap A, Balt JC, Mathy MJ et al: AT(1)-receptor blockade and sympathetic neurotransmission in cardiovascular disease. *Auton Autacoid Pharmacol* 23: 285–296, 2003
- 24) Wan JM, Tan J, Leenen FH: Central nervous system blockade by peripheral administration of AT₁ receptor blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 593–599, 2003
- 25) Zucker IH: Novel mechanisms of sympathetic regulation in chronic heart failure. *Hypertension* 48, 2006 (in press)

(廣岡 良隆)