

第 63 回北関東医学会総会

42. S-ニトロ化合物の化学的特性に関する研究：S-ニトロ化合物との比較検討

川島早耶香, 興石 一郎

(群馬大院・保・生体情報検査科学)

【目的】近年, S-ニトロ化合物 (R-SNO) の細胞障害性に着目した抗がん剤・抗菌剤開発がなされている。その機序は明らかにされていないが, ① S-ニトロ化合物から産生される一酸化窒素が細胞障害を誘導する, ② S-ニトロソ交換反応により細胞内エフェクター分子を S-ニトロソ化し細胞死を誘導すると言った二つの説が考えられる。しかしながら, S-ニトロソ化合物は, 生体内で一酸化窒素を産生することから, 急激な血圧の低下を引き起こすことが危惧される。我々は, S-ニトロソ体の代替物質として S-ニトロ化合物 (R-SNO₂) に着目した。S-ニトロ化合物は, 二酸化窒素ラジカルを産生するが, その細胞障害性は一酸化窒素よりも強い。また, S-ニトロ化合物は, S-ニトロソ化合物同様, S-ニトロ交換反応を起こす。これらの性質により, 血圧低下のおそれがない, 抗がん剤・抗菌剤としての可能性が期待できる。本発表では, S-ニトロ化合物の体内動態を類推するために必要な化学的性質について報告する。

【実験方法】 S-ニトログルタチオン, S-ニトロ-N-アセチルシステイン, グルタチオンおよび酸化型グルタチオンは紫外検出逆相 HPLC により定量分析した。【結果および考察】 S-ニトロソ化合物の特性に, ① S-ニトロソ交換反応, ② 紫外線照射による光分解反応, ③ アスコルビン酸による還元反応が挙げられる。そこで, S-ニトログルタチオンを用いこれらの反応について検討した。その結果, ここに示した全ての反応において, S-ニトログルタチオンは S-ニトロソグルタチオンと同等の挙動を示した。これらの結果より, S-ニトロ化合物は, 細胞内でグルタチオンとの S-ニトロ交換反応により S-ニトログルタチオンとなった後, エフェクター分子のシステイン残基のうち, pKa 値の小さいスルフヒドリル基との間で S-ニトロ交換反応を起こし安定化すると考えられた。

43. 蛍光ポストカラム誘導体化 HPLC による S-ニトロソグルタチオン, 酸化型グルタチオンおよびグルタチオンの同時定量法の開発

伊東亜里沙, 興石 一郎

(群馬大院・保・生体情報検査科学)

【目的】ヒト血漿中には S-ニトロソ化合物が存在し, 血小板凝集阻害, 血管内皮細胞の恒常性維持に機能していると考えられている。しかし, 血漿中 S-ニトロソ化合物の存在を否定する報告も少なくなく, 血漿中 S-ニトロソ化合物の存在が争点となっている。この議論の答えを得るには, 血漿中主要 S-ニトロソ化合物である S-ニトロソグルタチオン (G-SNO) の生体内挙動を明らかにしなくてはならず, 信頼できる分析法の開発が必須である。本研究では, 生体内夾雑物質の影響を受けにくい, G-SNO ならびに関連化

合物であるグルタチオン (G-SH) および酸化型グルタチオン (GSSG) の高感度簡易分析法の確立について検討した。【実験方法】 蛍光ポストカラム誘導体化 HPLC 装置は, アミノ酸分析計 (オルトフタルアルデヒド法) を改良して構築した。G-SH, GSSG および G-SNO の分離は逆相分配クロマトグラフィーにて行った。【結果および考察】 アルカリ条件下でのオルトフタルアルデヒド法により G-SH および GSSG が蛍光検出されることが知られている。しかしながら, 本反応では, G-SNO は検出されない。そこで, 亜硫酸イオンを用いた S-ニトロソ交換反応により, G-SNO を G-SH に変換する条件について検討した。しかし, 興味深いことに, G-SNO と亜硫酸イオンを pH12 のリン酸緩衝液中, 60°C, 2 分間反応させたところ, 90% を超える収率で GSSG が産生された。本反応をポストカラム誘導体化に導入した HPLC により, nM レベルの G-SH, GSSG および G-SNO を同時定量することが可能となった。応用例として, 細胞培養用培地中 GSH 存在下で G-SNO の挙動を解析したところ, 添加した G-SNO の消失と, S-ニトロソシステインの産生が認められた。培地中ではチオール化合物との S-ニトロソ交換反応がダイナミックに起きることが明らかとなった。

44. 生体内パーオキシナイトライト産生評価のためのプローブとしてのサリチル酸の可能性について

瀧川 雄太, 興石 一郎

(群馬大院・保・生体情報検査科学)

【目的】サリチル酸は, ラジカル種との反応により付加体を産生することから, ラジカル産生評価のプローブとしての有効性が報告されている。草食系の動物は, マメ科の植物などに含まれるサリチル酸誘導体の摂取により, 尿中にサリチル酸ならびにそのグリシン抱合体 (サリチル尿酸) が排泄される。同様に, 実験動物として飼育されているラットの尿中にもサリチル酸とサリチル尿酸が排泄される。すなわち, 実験動物におけるサリチル酸のラジカル付加体の尿中排泄を明らかにすることで, 生体内ラジカル産生を評価することが可能と考えられる。パーオキシナイトライト (ONOOH) は, 生理的条件下で二酸化窒素ラジカルとヒドロキシルラジカルを産生する。これらラジカルはサリチル酸と反応し付加体を産生する。本研究では, サリチル酸のラジカル付加体のラット体内における動態解析を行ったので報告する。【実験方法】 サリチル酸, サリチル酸のグリシン抱合体, ヒドロキシル化体ならびにニトロ化体は, 塩化鉄を発色試薬に用いたポストカラム誘導体化法を用いて定量した。サリチル酸誘導体の代謝分析は Wistar 系ラットを用いて行った。【結果および考察】 生理的条件下でサリチル酸と ONOOH を反応させることにより ONOOH 濃度依存的に 5-ニトロサリチル酸が産生された。5-ニトロサリチル酸をラットに皮下投与したところ, そのおよそ 90% が 18 時間以内に未変化体のまま尿中に排泄さ