

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：35309

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500534

研究課題名(和文) 生体内硝酸性窒素由来NOの産生と血管系における生理作用機序の解明

研究課題名(英文) Evaluation of generation process and physiological functional mechanism of nitrate-derived nitric oxide in the vascular system

研究代表者

望月 精一 (MOCHIZUKI, Seiichi)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：60259596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：生体内NOについて、NO合成酵素に依存しない硝酸性窒素由来NOに注目した。まず、唾液中の亜硝酸イオン(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)と飲料中の抗酸化物質との反応によるNO産生を認めた。次に抗酸化物質含有飲料についてNO<sub>2</sub>-由来NO産生は、抗酸化力に強く依存することが明らかとなった。そして、ポリフェノールを含有する飲物の抗酸化力の指標としてBAP値、OXY吸着値を用いたところ、NO産生速度との間に良好な正の相関が見られた。以上、酸性条件下におけるNO<sub>2</sub>-由来のNO産生メカニズムにおいて、抗酸化物質の果たす役割の重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have focused on nitric oxide (NO) derived from nitrite, not from NO synthase. First, we confirmed NO generation from a mixture of nitrite contained in saliva and anti-oxidant contained in drinks. Next, it was found that nitrite-derived NO generation with antioxidant-containing drinks depended on the anti-oxidative capacity of these drinks. Finally, positive linear correlations were observed between nitrite-derived NO generation and anti-oxidant capacity indexes such as BAP and OXY values. Thus, we clarified the important roles of anti-oxidants in the process of nitrite-derived NO generation under acidic conditions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：一酸化窒素(NO) 硝酸 亜硝酸 抗酸化物質 ポリフェノール カテキン 抗酸化力

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 硝酸性窒素の生体への影響

従来、硝酸性窒素は主に食物中タンパク質の代謝物(窒素代謝物)として排出されるべきものであると考えられてきており、それが体内に蓄積した場合、i) 尿毒症、ii) メトヘモグロビン血症、iii) ジメチルアミンとの反応を介した発がん性 N-ニトロジメチルアミンの生成などの有害作用のみを及ぼす物質と見なされてきた。最近では、肥料・農薬など由来の硝酸性窒素の地下水への浸透を介した飲食物中の含有物として上記のような有害作用が懸念されている。

### (2) 生体内での NO の産生・作用・代謝のメカニズム

生体組織中で生成する一酸化窒素(NO)は、血管拡張、血小板凝集抑制、抗動脈硬化作用など様々な生理作用を有することが知られ、従来、生体組織内に発現する NO 合成酵素(NOS)が生成する NO のみがこのような生理作用を及ぼすと考えられていた。そして、NO が酸化して生じた亜硝酸イオン( $\text{NO}_2^-$ )と硝酸イオン( $\text{NO}_3^-$ )すなわち硝酸性窒素は、安定した化合物であり生理活性を有さず、そのまま尿中に排泄されると理解されていた。

### (3) 硝酸・亜硝酸由来 NO の産生と作用

近年、低酸素あるいは虚血時に血中  $\text{NO}_2^-$  が還元されて NO になり、血管拡張作用を及ぼし、酸素供給を改善するのではないかと報告が出された(Nat Med 2003; Blood 2006; Nat Chem Biol 2009)。また、我々の既往研究で摂食による血中  $\text{NO}_3^-$  濃度の有意な変動を報告しているが(Heart Vessels 2000)、実際、硝酸性窒素は野菜・果物に高濃度で含有されており、最近、ビーツ・ジュース摂飲による血圧低下が報告されている(Hypertension 2008)。これは、有酸素状態においても生体内の窒素酸化物が還元され得ることを示唆した初めての報告である。さらに近年、食後低血圧症による転倒、失神が高齢者を中心に問題となっているが、こうした病態においても NO を介した硝酸性窒素の作用が関係している可能性が窺われる。また、我々の先行研究で腎不全患者において血中  $\text{NO}_3^-$  濃度が有意に高いことを見出ししているが(Blood Purif 2005)、透析患者の血中に高濃度で存在している窒素酸化物の NO 様作用に着目した研究はこれまでない。さらに、NOS ノックアウトマウスが生存できること、あるいは血管内皮機能障害における NOS 系機能低下に対する適応メカニズムとして、プロスタグランジンや血管内皮由来過分極因子などが NO の役割を代償的に補っているのではないかと考えられてきた。したがって、本研究が目指す硝酸性窒素由来の NO の役割とその貢献度の解明は、これまでの循環系、あるいは NO が関係した様々な系のこれまでの理解を大きく変える可能性がある。

### (4) 先行研究

我々はこれまでに健常者の血中  $\text{NO}_3^-$  濃度の日内変動データをモデル解析して、体内 NO 総産生速度の推算を行った(Heart Vessels 2000)。また、血液透析患者についても血中  $\text{NO}_3^-$  濃度に基づいて腎機能消失を考慮したモデル解析によって透析前と透析中との間の体内 NO 産生速度の変動評価を行い、透析中血圧低下への NO の関与の可能性を報告した(Blood Purif 2005)。これらの研究を含め従来の研究では、NOS 由来の NO とその酸化生成物のみが注目されてきた。一方、生体における  $\text{NO}_3^-$  から NO への還元反応については、唾液中での反応などに限定されており、本研究で注目している飲食物、唾液、胃液、血液、尿などに含まれる硝酸性窒素の動態と NO としての生理作用までを総合的に評価した報告はない。

## 2. 研究の目的

硝酸性窒素の代謝と新たな生理作用の可能性に注目して、これまでに開発した窒素酸化物( $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ )の計測法、NO の in vivo 計測システム、生体内 NO 動態解析のノウハウを複合的に応用した生体内硝酸性窒素動態と生理活性の評価システムを構築し、生体内動態と血管系を中心とした生理的役割を総合的に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) プロトコール

唾液  $\text{NO}_2^-$  あるいは  $\text{NaNO}_2$  からの NO 産生量の計測

NO の原料としての  $\text{NO}_2^-$  には、唾液(唾液中  $\text{NO}_3^-$  が口腔内細菌によって  $\text{NO}_2^-$  に還元)あるいは亜硝酸塩( $\text{NaNO}_2$ )を用い、 $\text{NO}_2^-$  から NO への還元反応に関わる還元剤としてヨウ化カリウム(KI)あるいは様々な抗酸化物質を含んでいると言われている野菜ジュースを用いた。そして、pH や各物質濃度を変化させて、生成する NO 量を NO センサを用いて直接計測した。

抗酸化物質を含有する飲料による  $\text{NO}_2^-$  由来 NO の産生量の計測

NO の原料としての  $\text{NO}_2^-$  には、 $\text{NaNO}_2$  あるいは飲料中に存在する  $\text{NO}_2^-$  を用い、 $\text{NO}_2^-$  から NO への還元反応に関わる抗酸化物質として様々な物質を含んでいる飲料(緑茶、野菜ジュース、コーヒー、赤ワイン)を用いた。そして、酸性条件下(pH 2)での、生成 NO 量を NO センサで直接計測した。

$\text{NO}_2^-$  由来 NO 産生速度とポリフェノール含有飲料の抗酸化力との関係の評価

抗酸化物質であるポリフェノール多く含有する飲料として、緑茶、コーヒー、赤ワインを使用した。これらの飲料を  $\text{NO}_2^-$  を含有したクエン酸緩衝溶液(pH 2、50 mL)中に添加した。その際に産生された NO を NO センサで測定した。抗酸化力の指標として、BAP 法

と OXY 吸着法を採用した。

#### (2) NO の計測方法

NO 濃度の計測には、NO センサ(amiNO-700; Innovative Instruments, Inc., USA)およびモニタ(inNO-T; Innovative Instruments, Inc., USA)を用いた。なお、本センサの基本特性については、先行研究で検討済である(Physiol Meas 2002)。

#### (3) NO<sub>x</sub> の計測方法

NO<sub>2</sub> と NO<sub>3</sub> の濃度計測には、NO<sub>x</sub> 分析器(ENO-20; エイコム)を用いた。本装置の基本原理は、HPLC 法による NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の分離と Griess 法による NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の吸光度分析である。

#### (4) 抗酸化力(還元力)の計測法

**BAP 法**: BAP (Biological anti-oxidant potential) 法では、第二鉄イオン(Fe<sup>3+</sup>)から第一鉄イオン(Fe<sup>2+</sup>)への還元反応をチオシアン酸塩による呈色を指標として測定する。

**OXY 吸着法**: OXY 吸着(OXY adsorbent)法では、次亜塩素酸(HClO)による酸化をどれだけ抑制できるかをクロモゲンによる呈色を指標として測定する。

### 4. 研究成果

#### (1) 唾液 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> あるいは NaNO<sub>2</sub> からの NO 産生

唾液からは 10~700 μM の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> が検出された。唾液もしくは野菜ジュース(抗酸化物質含有)の一方のみを pH 2 の緩衝溶液に添加すると微量の NO が生成し、両者を混合した場合、生成する NO 濃度は大きく上昇した。さらに野菜ジュースと唾液を混合した場合、NO 生成濃度は唾液中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 濃度に依存していた。

以上、酸性条件下で唾液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と食因性の抗酸化物質が混合されて生成される NO の濃度は、唾液中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 濃度と抗酸化物質濃度に依存していた。また、異なる種類の抗酸化物質による抗酸化反応を介した NO 生成能力の比較の指標として、BAP 値が有用であると示唆された。

#### (2) 抗酸化物質を含有する飲料による NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 由来 NO の産生

緑茶、野菜ジュース、コーヒー、赤ワインの BAP 値(10 倍希釈)は、それぞれ約 740 ± 140 μM、1600 ± 400 μM、1600 ± 100 μM、1800 ± 100 μM であった。そして、各飲料を 200 nM NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を含む緩衝溶液(pH 2)に添加すると、それぞれから 140 ± 30 nM、30 ± 10 nM、180 ± 20 nM、190 ± 10 nM の NO の生成が認められた。ポリフェノールを多く含む緑茶、コーヒー、赤ワインで NO 生成が多かったが、BAP 試薬は鉄イオンの還元反応を指標としており、鉄イオンとキレートを形成する溶質(ポリフェノールを含む)に用いる場合は、注意が必要であると考えられた。

次に NO 生成の多かった緑茶について、高

い抗酸化力の主要因を検討し、緑茶に保存剤として含有されているビタミン C による NO 産生はわずかで、茶葉に含まれるカテキンによることが明らかとなった。一方、赤ワインの場合は、ポリフェノールの抗酸化作用による NO 産生のみでなく、防腐剤として使用されている NO<sub>2</sub><sup>-</sup> から酸性条件下では SO<sub>2</sub> が生成し、NO 計測に影響を与える可能性も示唆された。

以上、酸性条件下で NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と飲料中の抗酸化物質との混合によって生成する NO の濃度は、飲料中に含有される抗酸化物質の抗酸化力に依存していた。

#### (3) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 由来 NO 産生速度とポリフェノール含有飲料の抗酸化力との関係の評価

いずれの飲料サンプルにおいても、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> からの NO の生成が認められた。各飲料に含有されるポリフェノール濃度の増加に伴い、NO 産生速度の増加傾向を認めた(r<sup>2</sup>=0.58、p<0.05)。すなわち、抗酸化力に依存して、NO 産生が影響されている可能性が示唆された。次に各飲料の抗酸化力を BAP 法と OXY 吸着法で測定し、その結果と NO 産生速度との関係を評価した。いずれの指標についても、その増加に伴い NO 産生速度は、増加する傾向が見られた(BAP 値、r<sup>2</sup>=0.64、p<0.05; OXY 値、r<sup>2</sup>=0.66、p<0.05)。

以上の結果から、BAP 法、OXY 吸着法ともに、抗酸化物質を含有する飲料による NO<sub>2</sub><sup>-</sup> からの NO 生成能の指標となり得る可能性が示唆された。

これらの結果の通り、酸性条件下で抗酸化物質含有飲料もしくは抗酸化物質による NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 由来 NO 産生メカニズムについて詳細な検討を行った。このようなプロセスでの NO の生成は、生体内の条件で起こり得ることであり、こうして生成した NO が、NO 合成酵素由来 NO とどのようにバランスを取りつつ、生理的作用を果たしているかについて、さらに検討が必要である。

### 5. 主な発表論文等

#### 〔雑誌論文〕(計1件)

Ogawa T, Mochizuki S: Evaluation of generation of nitric oxide by reducing nitrite with antioxidants in drinks, Nitric Oxide, 査読有 2013, 31(S1):S21.

#### 〔学会発表〕(計7件)

中塚 翔太, 中山 尚, 小谷 未来, 小川 武人, 望月 精一: 酸性条件下における亜硝酸イオンと飲料との反応による一酸化窒素の生成に関する検討, 第3回中四国臨床工学会, 2013年11月9日倉敷市芸文館(岡山県倉敷市)。

小川 武人, 望月 精一: 酸性条件下での一酸化窒素の生成速度と消失速度に

関する検討，化学工学会第 45 回秋季大会，2013 年 9 月 17 日，岡山大学津島キャンパス（岡山県岡山市）。

小川 武人，望月 精一：飲料中亜硝酸の還元による NO 産生，第 36 回日本バイオレオロジー学会，2013 年 6 月 8 日，九州大学西新プラザ（福岡県福岡市）。

Ogawa T，Mochizuki S：Evaluation of generation of nitric oxide by reducing nitrite with antioxidants in drinks，5th International Meeting on the Role of Nitrite and Nitrate in Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics, 2013 年 5 月 4 日，University of Pittsburgh (PA, USA)。

小川 武人，望月 精一：各種飲料の還元作用による一酸化窒素生成量の比較，日本医工学治療学会第 29 回学術大会，2013 年 4 月 21 日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

小川 武人，望月 精一：生体内での亜硝酸からの一酸化窒素の生成反応条件の基礎的検討，第 35 回日本バイオレオロジー学会，2012 年 6 月 1 日，朱鷺メッセ（新潟県新潟市）。

望月 精一，小川 武人，仲本 博，平松 修，小野 淳一：生体内 NO<sub>2</sub> からの NO 生成反応の基礎的検討，第 8 回医療福祉研究報告会，2012 年 2 月 28 日，川崎医療福祉大学（岡山県倉敷市）。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

望月 精一 (MOCHIZUKI, Seiichi)  
川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授  
研究者番号：6 0 2 5 9 5 9 6

### (2) 研究分担者

平松 修 (HIRAMATSU, Osamu)  
川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授  
研究者番号：5 0 2 0 8 8 4 9

小野 淳一 (ONO, Junichi)  
川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師  
研究者番号：5 0 4 3 5 3 5 1

小川 武人 (OGAWA, Takehito)  
川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師  
研究者番号：1 0 4 5 4 0 5 0