

ノ ー ト

チラミン投与によりラット心筋中に産生するヒドロキシルラジカルの
マイクロダイアリシス法による検出小 畑 俊 男¹

1 緒 言

人体内で酸素が使われるときに生じる「フリーラジカル (活性酸素)」という非常に反応性の高い酸素の一種が場合によって体内の細胞を構成する脂質などを酸化させて老化や病気の原因をつくるといわれている。フリーラジカルに関する研究の夢は、生きたままの動物からフリーラジカルを検出することである。心臓は虚血に陥りやすい臓器の一つであり、これより産生したフリーラジカル¹⁾²⁾が生体内の生理病理現象に広くかかわっていることが明らかになりつつある。心臓には運動、外的ストレス、心筋虚血などの代謝異常に対して迅速に対応できる循環制御メカニズムが備わっており、これがフリーラジカルの産生源となっている。例えば、心筋においてモノアミン酸化酵素 (MAO) によってノルアドレナリンが代謝されると、過酸化水素 (H_2O_2) を生じ、Fenton 反応を経てヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) が生成する可能性がある³⁾。

生理的条件下でフリーラジカルの挙動を検討するツールとしてマイクロダイアリシス法⁴⁾⁵⁾が注目されている。マイクロダイアリシス法とは、微小透析の一部に備えられた半透膜を介して単純拡散により膜内部に移行してきた物質を連続的に回収する方法である。Ungerstedt らを中心としたグループによる中枢領域での研究は画期的なものであった⁶⁾。以後、中枢におけるマイクロダイアリシス法が基礎となり、他の臓器、組織での検討へと応用範囲を広げる切っ掛けとなった。in vivo マイクロダイアリシス法は生体物質を生理的条件下で経時的に分析できるという利点から、最近 30 年間に発展してきた方法であり、連続的なサンプリングによりルーチンに稼働させることが可能である。しかし、心臓は他の臓器と異なり拍動するためマイクロダイアリシス法を心筋に適用することは困難とされていた。すなわち、マイクロダイアリシスのプローブの留置部位での損傷が大きな問題となっている。著者らはこの問題を解決するため、目的とする心筋領域にマイクロダイアリシスのプローブを装着した後、プローブを軸に固定し、

半回転運動させることでプローブと心臓の動きを連動させる工夫を施した。これにより、プローブと組織との摩擦を除去し、心筋に対する負荷を和らげることに成功するとともに、ラット心筋で生成する $\cdot OH$ の測定を可能とした⁷⁾。

内因性ノルアドレナリンを遊離する作用を有するチラミンが $\cdot OH$ ラジカルの発生源になる可能性が考えられる。そこでマイクロダイアリシス法をラット心筋に応用することによりチラミンによるラジカル産生のメカニズムについて検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

2,3- 及び 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHBA) (98% 以上)、塩酸チラミン (95% 以上)、硫酸第一鉄アンモニウム (99% 以上)、サリチル酸ナトリウム (99.5% 以上) は和光純薬製試薬特級を用いた。50% フィチン酸溶液は和光純薬製^{かん}と光化学用を用いた。灌流液の組成としては 147 mM 塩化ナトリウム (NaCl, 98.5% 以上)、2.3 mM 塩化カルシウム二水和物 ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 99~103%), 4 mM 塩化カリウム (KCl, 99.5% 以上) に調製した。これらは和光純薬製試薬特級を用いた。

2.2 実験動物

実験動物として Wistar 系雄性ラット (6 週齢, 体重 200~300 g) を室温 $25 \pm 2^\circ C$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、照明時間 16~18 時間で、水及び飼料を自由に摂取させて 1 週間予備飼育後、実験に供した。

2.3 装 置

マイクロシリンジポンプは BAS 製 CMA/100 を使用した。電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC-EC) には、Eicompak MA-5ODS カラム ($\phi 4.5 \times 150$ mm)、ECD-100 電気化学検出器 (いずれもエイコム製) 及び PU-980 高速液体クロマトグラフポンプ (日本分光製) を使用した。

2.4 実験操作

マイクロダイアリシス法は著者らが既に関した方法で

¹ 奥羽大学薬学部薬品分析化学: 963-8611 福島県郡山市富田町字三角堂 31-1

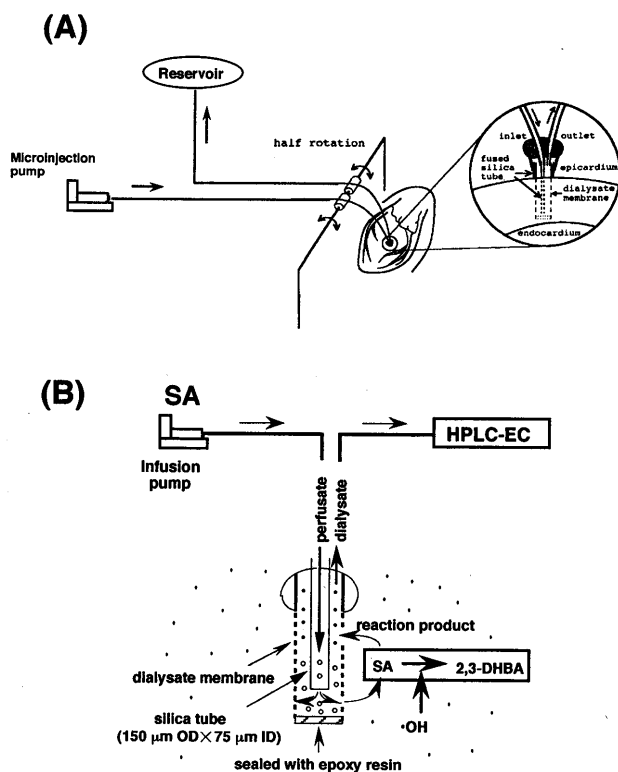


Fig. 1 Microdialysis probe-holding system in heart

(A) The microdialysis probe-holding system involves loose fixation of the tube and synchronization of movement of the heart and probe, the probe being supported by a stainless steel axis. This system increased recovery rate without an accompanying increase in tissue damage. The dialysis probe was implanted in the left ventricular myocardium. The inlet tube of microdialysis probe was connected to a microinjection pump, and outlet tube led to the dialysate reservoir. (B) Microdialysis probe was implanted from the epicardial surface into the left ventricular myocardium to the depth of 3 mm and perfused with Ringer's solution by a microinjection pump. The probe (3 mm exposure) was implanted from the epicardial surface into the left ventricular myocardium to the depth of 3 mm. The $\cdot\text{OH}$ reacts with salicylate (SA) and generates 2,3- and 2,5-DHBA, which can be measured electrochemically in picomole quantity by an HPLC-EC procedure.

行った⁷⁾. 試料中の $\cdot\text{OH}$ は、サリチル酸をトラップ剤として使用し、生成する2,3-DHBAを検出することで間接的に測定した。すなわち、400 mg/kg 抱水クロラルの静脈内投与により麻酔したラットを開胸し、Fig. 1 (A) に示すように、左心室筋層内にマイクロダイアリスのプロブを装着した。リンゲル液に溶かしたサリチル酸をマイクロシリンジポンプを用いて1 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量でプロブ中に灌流させ、氷水中にセットした0.1 N HClO_4 中に試料を回収した。15分ごとに集めた試料中の2,3-DHBAをHPLC-ECにより分析した。HPLC-ECの移動相は、1.5 g

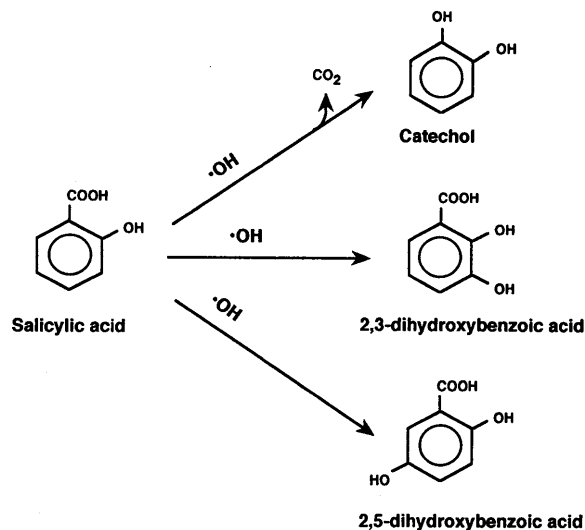


Fig. 2 Products of the attack by hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) radicals on the salicylate molecule

1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (シグマアルドリッチジャパン製, 試薬特級), 0.1 g エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (和光純薬製, 試薬特級) 及び 3 mL トリエチルアミン (和光純薬製, 試薬特級) を水に溶解した後、リン酸を用いて pH 2.8 に調整し、1 L とした。移動相流量は 0.7 mL/min とした。

ヒドロキシルラジカルの捕捉実験は次のように行った。 $\cdot\text{OH}$ のトラップ剤にはサリチル酸を用い、Fig. 2 に示すように、サリチル酸は $\cdot\text{OH}$ と反応して2,3-及び2,5-DHBAとカテコールを生成する⁸⁾。中でも2,3-DHBAは非酵素的に生成し、安定であることから、これを $\cdot\text{OH}$ の指標とした。Fig. 1 (B) に示すように、リンゲル液に溶かした0.5 mM サリチル酸をマイクロシリンジポンプ (CMA/100) を用いて1 $\mu\text{L}/\text{min}$ でプロブ中に灌流させ、氷水中にセットした0.1 N HClO_4 に試料を回収した。試料中の2,3-DHBAをHPLC-EC法により測定した²⁾⁹⁾。

3 結果と考察

心筋へのマイクロダイアリス法は1990年にVan Wylenらが初めて導入して以来¹⁰⁾, 著者らも含め幾つかの施設で実用化され、現在心筋組織間液中の物質濃度を生理的条件下で経時的かつ連続的に測定できる最も有用な方法と考えられている⁵⁾⁷⁾¹¹⁾。Fig. 1 に示すように、マイクロダイアリスのプロブを心筋に装着した後、毎分1 μL の速度でサリチル酸 (0.5 mM) を灌流した。15分ごとに灌流液を集め、HPLC-EC法で測定したところ、はじめの90分は侵襲によると思われる2,3-DHBAレベルの増減が見られたが、90分以降はFig. 3 (A) に示すように0.04 M付近で一定となった。135~150分の2,3-DHBA濃度を対照

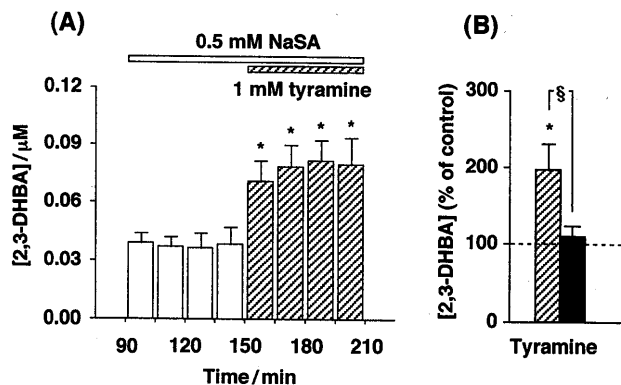


Fig. 3 Effect of tyramine on $\cdot\text{OH}$ formation in rat myocardium

(A) After a 90 min washout with Ringer's solution, the time course of in vivo trapping of highly reactive $\cdot\text{OH}$ in extracellular fluid of myocardium after tyramine (1 mM or 1 nmol $\mu\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$) was investigated by infusing sodium salicylate in Ringer's solution (0.5 mM or 0.5 nmol $\mu\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$) through a myocardial microdialysis probe placed in the epicardial surface into the left ventricular myocardium and perfused with Ringer by a microinjection pump. Dialysate samples were collected at 15 min intervals and immediately assayed for the level of 2,3-DHBA using an HPLC-EC procedure. Values are means $\pm$ S.E.M. for 6 animals; * $P < 0.05$ versus levels at 135–150 min (ANOVA and Fisher's test). (B) The level of 2,3-DHBA measured at 30–45 min after application of tyramine (1 mM, as indicated in abscissa) in the absence (diagonally shaded column) and in the presence (closed column) of prazosine (10 μM or 10 pmol $\mu\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$), and given as percentage of the value measured just before application of tyramine. Each column and vertical bar means $\pm$ S.E.M. for 6 animals; * $P < 0.05$ versus levels at 135–150 min (ANOVA and Fisher's test).

値とした。チラミンはノルアドレナリンを放出する作用を有する¹²⁾ことから、ノルアドレナリンの作用により生成する $\cdot\text{OH}$ の捕捉実験⁹⁾を行った。サリチル酸存在下で2,3-DHBAのレベルが定常状態に達した150分後からチラミン (1 mM) をプローブ中に灌流すると、有意に2,3-DHBAのレベルの上昇が認められた [Fig. 3 (A)]。Fig. 3 (B)に示すように、Na-チャンネルブロッカーであるプラゾシン (10 μM) 存在下ではチラミンによる2,3-DHBAのレベルの上昇が認められなかった。したがって、チラミンにより放出されるノルアドレナリンの作用によって産生する $\cdot\text{OH}$ はNa-チャンネルが関与している可能性がある¹³⁾。

緒言でも述べたように、ノルアドレナリンがMAOにより代謝されると H_2O_2 を生じるため、ノルアドレナリンによる $\cdot\text{OH}$ の産生には、Fenton反応が関与している可能性がある。そこで、チラミン存在下での第一鉄イオンによる $\cdot\text{OH}$ 産生レベルの増強効果に対するフィチン酸の抑制作用を検討した。第一に第一鉄イオンの作用、第二にチラ

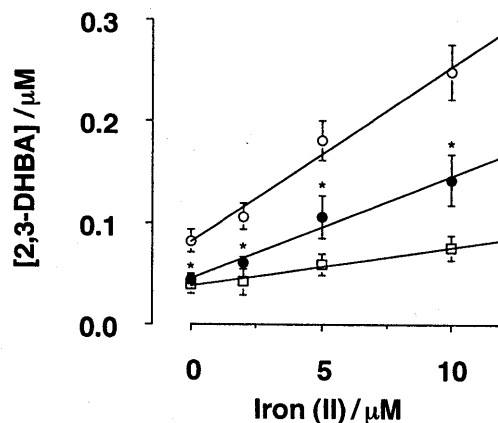


Fig. 4 Dose-response relationship between iron(II) and the formation of $\cdot\text{OH}$ products of salicylate in phytic acid

Iron(II) and sodium salicylate (0.5 mM or 0.5 nmol $\mu\text{L}^{-1} \text{min}^{-1}$) were infused through the dialysis probe. When iron(II) (0, 2, 5 and 10 μM) was administered, it was given directly through the dialysis probe. The levels of 2,3-DHBA in all three groups tyramine-only treated rat (open circle) and tyramine (1 mM) plus phytic acid (100 μM)-treated rats (closed circle) and non-treated rats (rectangle) were compared. Dialysate samples were collected and immediately assayed for 2,3-DHBA, using a HPLC-EC procedure. Values are means $\pm$ S.E.M. for six animals. * $P < 0.05$ versus the level of 2,3-DHBA by tyramine-treated rats (ANOVA and Fisher test)

ミン存在下における第一鉄イオンの作用、第三にフィチン酸及びチラミン存在下における第一鉄イオンの作用の3点について検討した。Fig. 4に示すように、灌流液中に第一鉄イオン (0, 2, 5, 10 μM) をそれぞれ混ぜると2,3-DHBAのレベルは用量依存的に上昇し、第一鉄イオンと $\cdot\text{OH}$ 産生には正の相関が得られた ($R^2 = 0.983$)。更にチラミン (1 mM) 存在下では第一鉄イオンによる2,3-DHBAのレベルは増強した。一方、100 μM フィチン酸存在下ではチラミンと第一鉄イオンによる2,3-DHBAのレベルは有意に抑制された。フィチン酸は穀類などに多く含まれ、抗酸化作用を示す¹⁴⁾ことから、 $\cdot\text{OH}$ 産生を抑制することが期待される。これらの結果から、チラミンはFenton反応による $\cdot\text{OH}$ 産生をより増強することがラット心筋を用いたマイクロダイアリス法による $\cdot\text{OH}$ の捕捉実験において証明された。

MAOによる遊離カテコールアミン (心臓では主にノルアドレナリン) の代謝に伴い生成する H_2O_2 は、還元型金属イオンによるFenton反応で細胞障害性の高い $\cdot\text{OH}$ となり³⁾、これが標的分子を容易に酸化する。細胞内では、FeとCuはフェリチン、トランスフェリン、セルロプラスミンなどの貯蔵型で存在しているため、 $\cdot\text{OH}$ 生成反応を触媒できないが、虚血によって細胞障害やこれに連動し

た金属イオンの遊離（フリーラジカル生成のための準備状態）が生じた場合、再灌流に伴う再酸化で・OH生成が増大する。心筋において、虚血により遊離した第二鉄イオンは、再酸化に伴うキサンチンオキシダーゼ反応により生成する $O_2^{\cdot-}$ と反応して、第一鉄イオンに還元される。生成した第一鉄イオンと、カテコールアミンの代謝により生じる H_2O_2 がFenton反応を引き起こすことで・OHを生成する。したがって、生体では、鉄は3価として存在するためHaber-Weiss反応を触媒して・OH生成を増大させる可能性がある¹⁵⁾。一方で、著者らは既に3価の鉄の特異的なキレーターであるデスフェリオキサミン（DES）によりHaber-Weiss反応を阻害すると、Fenton反応による・OH産生が増強することを証明した¹⁶⁾。しかし、この実験結果は先の説明と矛盾することになる。Haber-Weiss反応はFenton反応に比べて反応速度がかなり遅く¹⁷⁾¹⁸⁾、実際に生体で起きているかは更なる検討が必要である。

心臓は他の臓器と異なり拍動するため、従来、マイクロダイアリス法を心筋に適用することは困難とされていたが、マイクロダイアリスのプロープと心筋を連動させ、心筋に対する負荷を和らげるよう工夫することで、ラットの心筋に適用することを可能とした。この方法により、チラミンによるラジカル産生のメカニズムについて検討したところ、チラミン自身又はチラミンの作用により放出されたノルアドレナリンがMAOにより代謝され、生じた H_2O_2 と第一鉄イオンの反応により・OHを生成することが分かった。この・OHラジカル産生にNa-チャンネルが関与していることが、本実験により証明された。マイクロダイアリス法は神経伝達物質のみならず、様々な生体物質のモニターに利用されており、臨床応用も試みられつつある。治療に直結する更なる基礎研究の進展が必要と考えられるが、今後の研究に期待したい。

文 献

- 1) M. M. Elahi, B. M. Matata : *Arch. Biochem. Biophys.*, **450**, 78 (2006).
- 2) T. Obata : *Anal. Biochem.*, **356**, 59 (2006).
- 3) C. S. Liang, W. Mao, C. Iwai, S. Fukuoka, S. Y. Stevens : *Am. J. Physiol.*, **290**, H995 (2006).
- 4) T. W. Lameris, S. de Zeeuw, D. J. Duncker, G. Alberts, F. Boomsma, P. D. Verdouw, A.H. van den Meiracker : *Hypertension*, **40**, 491 (2002).
- 5) T. Obata : *Life Sci.*, **71**, 2083 (2002).
- 6) N. Lindefors, E. Brodin, U. Ungerstedt : *J. Pharmacol. Methods*, **17**, 305 (1987).
- 7) T. Obata, H. Hosokawa, Y. Yamanaka : *Am. J. Physiol.*, **266**, H903 (1994).
- 8) B. Halliwell, H. Kaur, M. Ingleman-Sundberg : *Free Rad. Biol. Med.*, **10**, 439 (1991).
- 9) C. C. Chiueh, R. M. Wu, K. P. Mohanakumar, L. M. Sternberger, G. Krishna, T. Obata, D. L. Murphy : *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **738**, 25 (1994).
- 10) D. G. Van Wylen, J. Willis, J. Sodhi, R. J. Weiss, R. D. Lasley, R. M. Jr. Mentzer : *Am. J. Physiol.*, **258**, H1642 (1990).
- 11) Y. Kuroko, T. Yamazaki, N. Tokunaga, T. Akiyama, H. Kitagawa, K. Ishino, S. Sano, H. Mori : *Cardiovasc. Res.*, **74**, 438 (2007).
- 12) T. Obata, H. Yonemochi, M. Arita : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **305**, 719 (2003).
- 13) T. Obata, Y. Yamanaka : *Eur. J. Pharmacol.*, **379**, 161 (1999).
- 14) T. Obata : *Brain Res.*, **978**, 241 (2003).
- 15) T. Obata : *Eur. J. Pharmacol.*, **539**, 34 (2006).
- 16) T. Obata, Y. Yamanaka : *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 1411 (1996).
- 17) J. C. Lee, Y. O. Son, K. C. Choi, Y. S. Jang : *Mol Cells*, **21** (2006).
- 18) E. Mendez-Alvarez, R. Soto-Otero, A. Hermida-Ameijeiras, M. E. Lopez-Martin, J. L. Labandeira-Garcia : *Free Radic Biol Med.*, **31**, 986 (2001).

Detection of Hydroxyl Radical Generated by Tyramine Administration in Rat Myocardium by Microdialysis Technique

Toshio OBATA¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Ohu University School of Pharmaceutical Sciences, Tomita-machi, Koriyama-shi, Fukushima 963-8611

(Received 29 May 2007, Accepted 20 February 2008)

The present study was examined the effect of tyramine-induced hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) generation. A flexibly mounted microdialysis technique was used to detect the generation of $\cdot\text{OH}$ in *in vivo* rat hearts. To measure the level of $\cdot\text{OH}$, sodium salicylate in Ringer's solution (0.5 nmol/ $\mu\text{L}/\text{min}$) was infused directly through a microdialysis probe to detect the generation of $\cdot\text{OH}$ as reflected by the nonenzymatic formation of 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA). To confirm the generation of $\cdot\text{OH}$ by the Fenton-type reaction, iron(II) was infused through a microdialysis probe. A positive linear correlation between iron(II) and the formation of 2,3-DHBA ($R^2 = 0.983$) was observed.

Keywords : hydroxyl radical ; salicylic acid ; 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) ; microdialysis.