4 培養細胞を用いた循環器系作用薬剤スクリーニングを 目的とした *in situ* NO センサの開発

春山 哲也*, 相澤 益男

1 緒言

「動物の権利」という概念に基づき、医学・薬学の分野で広く行なわれている動物実験は制限あるいは禁止される世界的趨勢である¹⁻⁴⁾。こうした規制は動物保護の観点から行われているが、動物実験には実験動物の個体差や実験結果の定量性などの問題点が指摘されている。これら諸背景から、可能な範囲で実験動物を用いずに同様の結果を得ることができる、動物実験代替法の開発が強く望まれるようになった。動物実験の代替法としてもっとも有力なものは、培養動物細胞を用いた実験系である。培養細胞を用いる系では、モノクローン実験系が構築できることから、動物実験に見られる固体間の特性の差異を補償することができると期待されている。

循環器系作用薬剤のスクリーニングは実験動物の血圧変化あるいは実験動物から取り出した心大動脈の張力変化などを指標として行われている (Fig. 1A)。血圧降下によって血管は弛緩するので、摘出した血管組織の張力減少から弛緩度を判定できるとされている。しかし、この方法は新鮮な心大動脈血管を必要とし、多くの実験動物を必要とするばかりでなく、動物個体間差異、実験の定量性など種々の問題点を抱えている。そこで、著者らは近年明らかとなってきた血管弛緩と血管内皮細胞が産生する一酸化窒素 (NO) との関係に着目し、培養血管内皮細胞を用いた循環器系作用薬剤のスクリーニングシステムの構築を企図した。

NO は体内では NO 合成酵素によりアルギニンから作られ、脳・神経系、免疫系、循環器系などにおいて調節物質として機能している。ニトログリセリンやイソソルビドなどの血管拡張薬は細胞内に取り込まれて NO 前駆体となり、細胞内で NO となる⁵⁾。Fig. 1B に示すように、血管内皮細胞に NO 産生を誘導する薬剤が接触すると、Ca チャネルを介する Ca イオン流入が起こり、NO 産生酵素である NO シンターゼ (NOS) が活性化し、NO が産生される。産生された NO は細胞質にあるグアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP が生成され、さらに幾つかの cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素を活性化し、タンパク質のリン酸化により血管組織の弛緩が起こる。NO は心臓血管系における血管内皮細胞由来弛緩因子 (EDRF) である。血管内皮細胞による NO 産生が血管弛緩を引き起こす誘導要因であり、NO 産生を誘導できる薬剤は血管弛緩・血圧調節を行なう循環器系医薬品となりうる。

著者らは、こうした NO 産生と血管弛緩との関係に着目し、血管内皮細胞による NO 産生を指標とする循環器系作用薬剤スクリーニングシステムの構築を企図した。システムの概要を Fig. 1C に示す。システムは細胞培養チャンバー部、試料薬剤添加部、NO センサ部、データ解析部の 4 部で構成

されている。スクリーニングを行なう試料薬剤を培養血管内皮細胞に添加後、NO センサを細胞培養チャンバーに挿入して NO 放出挙動を測定し、その結果を解析する。

このシステムのなかでもっとも重要な役割を担うのが NO 測定を行なうセンサ部である。しかし NO は気体であり、水溶液中では不安定であるため測定が困難である。現在までに幾つかの水溶液中の NO 測定法が報告されているが^{6,7)}、培養液など水溶液中 NO のその場測定を行なうには至っていない。

培養細胞が、薬剤等の作用により NO を産生する挙動を細胞培養環境下で測定するためには、水溶液 (培養液) 中で、NO を選択性良く高感度に *in situ* 測定できるセンサが必要である。電気化学的方法はその場測定に適した方法であるが、NO のみを選択的に測定するためには NO 特異性を有する「センシングマテリアル」を見出す必要がある。本報では、著者らが見出した 2 通りの NO センシングマテリアルを用いた電気化学 NO センサについて述べる。

2 熱処理シトクロム C を用いた *in situ* NO センサ

シトクロム C (CytC) の電気化学特性についてはすでに多くの研究がなされている⁸⁾。また、CytC がネイティブに NO 還元活性を有することが報告されているが、その活性は極めて低く、NO 測定などに応用することは困難であった。著者はウマ心筋由来の CytC を熱処理することにより、NO 測定などへ応用できる程度まで CytC の NO 還元活性が向上することを見出した。Fig. 2 に示す様に、ネイティブな CytC による NO 還元活性は測定限界以下であった。一方、熱変性した CytC では NO 還元活性が認められ、特に 70 °C で熱処理した場合に高い活性が得られた⁹⁾。CytC は α -ヘリックスが β 構造を介してつながった立体構造を持ち、その中心に鉄ポルフィリンがある。熱処理した CytC の構造は β -構造含有量が大きく減少していることがラマン分光法により確認された⁹⁾。このことから著者らは、熱処理によりヘム周辺の構造・環境が変化する事によって高い NO 還元活性が得られたものと考察した。以上の知見から、著者らは Fig. 3 にその原理を示す電気化学 NO 測定法を創案し、*in situ* NO センサを構築した⁹⁾。

70 °C で処理した CytC 溶液中に、4-メルカプトピリジンで修飾したディスク型金電極 (電極部径=3 mm, 外径=6 mm) を 12 時間浸漬し、熱処理 CytC を電極上に吸着させ、NO センサデバイスとした⁹⁾。このセンサデバイスに 0 mV vs. Ag / AgCl 定電位印加を行なった系で NO に対する応答電流をプロットした (Fig. 4)。その結果、熱変性 CytC を用いた NO センシングは低い印加電位で水溶液中の NO 濃

Fig. 1 Schematic illustration of NO bioassay method and novel screening system. A; Conventional NO bioassay system with blood vessel, B; Vasodilatation mechanism by internal NO, C; Novel screening system for vasodilator using cultured cells.

Fig. 2 NO reducing activity of native and heat-treated horse heart CytC. CytC was dissolved in pure water. The CytC solution was kept in a hot water bath for 15 min at various temperature.

度を直接測定できることが明らかになった (Fig. 4 実線). 0 mV vs. Ag / AgCl という低い電位領域では, 細胞培養液などに含まれる様々な夾雑物質 (多くは 250~300 mV vs. Ag / AgCl に酸化還元電位を持つ) の影響を受けないため培養液中での *in situ* NO 濃度を 1~4 μM の範囲で測定することが可能であった (Fig. 4 点線).

3 ラジカスカベンジャーを用いた *in situ* NO センサ

著者らは NO などのラジカルを特異的に補足する分子として, 様々なラジカスカベンジャーの電気化学特性についても検討を行ってきたが, そのなかで NO 特異性の高い 2-phenyl-4,4,5,5-tetra methyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) が NO を酸化し, かつ還元型 PTIO を電気化学酸化できることに着目し, PTIO を用いた電気化学 NO 測定法を創案した (Fig. 5)⁹⁾.

PTIO を疎水性の高いアルキッドレジジンTM, テフロン微粒子に混合し, ディスク型グラッシーカーボン電極 (電極部直

径 3 mm, 外径 6 mm) 電極上に PTIO を含む薄膜を形成してセンサを構築した。PTIO を固定化するマトリックスとして疎水性のアルキッドレジン™, およびテフロン微粒子を用いたことにより, センシングマトリックス内への NO の拡散透過性を高める事ができる。このセンサに 750 mV vs. Ag / AgCl 定電位を印加し, その応答電流を NO 濃度に対してプロットした結果が Fig. 6 である。このセンサでは PTIO 自体がアニオン性の物質であるため, アニオン性夾雑物質の影響を受け難く, 低濃度 NO に対する選択性・測定感度が高い。このセンサにより 0.5 μM ~ 10 μM の範囲で NO の定量が可能であることが明らかとなった。

4 培養細胞を用いた循環器系作用薬剤スクリーニング

血管内皮細胞は, 定常的に僅かな NO を産生している。誘導産生される NO 量はその誘導因子により異なるが, 10^{10} 個程度の細胞あたりに NO 誘導物質として知られるアセチルコリンを 1 μM 添加した場合, 30 分で 1~3 μM であると言われる。前章までに示した NO センサ感度から考えると下限

Fig. 3 Electrochemical sensing for nitric oxide with heat-treated CytC.

Fig. 4 Nitric oxide respond current of heat-treated CytC at 0 V vs. Ag / AgCl potential application.

近くである。このことは血管内皮細胞による NO 産生をセンサで測定するためにはセンサをより高感度化することが必要であることを示している。しかし, 測定に用いる細胞数を増やす, 計測時間を長く取るなどのスクリーニング条件を至適化することにより, ここで開発をおこなったセンサで測定が可能であると考えられる。そこで, 実際に培養細胞が産生する NO 量を熱処理 CytC を用いたシステムにより測定し, スクリーニングシステム開発のための検討を行なった。

Fig. 7 に示すのは, 血管内皮細胞 (細胞数 = 10^{12}) 培養液中に熱変性 CytC を添加し, これに血管内皮における NO 産生を誘導することで知られるアセチルコリン (ACh) を 1 μM , 10 μM および 100 μM の各濃度で加えて 50 分後の培養液の差スペクトル (Fig. 5a) と 4-メルカプトピリジン修飾電極によって得たカソード応答電流のグラフ (Fig. 7b) である。熱処理シトクロム C では, ボルフィリンの中心金属に NO が配位し, 還元反応が触媒されることから, ソーレー吸収帯の分光的解析によるセンシングも可能であることが明らか

Fig. 5 Electrochemical sensing for nitric oxide with radical scavenger PTIO.

Fig. 6 Nitric oxide respond current of PTIO deposited sensor device at 750 mV vs. Ag / AgCl potential application.

Fig. 7 Determination of acetylcholine (ACh) induced NO using heat-treated CytC in cultured human blood vessel endothelial cells.

A; Photometric analysis of heat-treated CytC, B; Electrochemical analysis of heat-treated CytC.

かとなった。電気化学的測定では、このセンサへの印加電位である 0 mV vs. Ag / AgCl では培養液に含まれる様々な夾雑物質の影響をほとんど受けない。そのため、ACh 添加により誘導された血管内皮細胞の NO 放出量を選択性良く測定することが可能である。熱変性 CytC を用いた NO センシングによる Fig. 7b の結果から、ACh 添加量に依存して培養血管内皮細胞 (25 cm² コンフルエント) から 50 分間あたりに 1.2 μM から 3.1 μM の NO 産生が行われることが示された。熱変性 CytC を用いた NO センシングにより培養細胞が産生する NO を簡便に測定でき、かつ添加した薬剤の影響を産生される NO 量から評価でき得ることが示された。

ここでは、培養液中に熱処理 CytC を添加し、一定時間後、培養液を回収して電気化学測定を行なっている。このため、アセチルコリンを添加した後、50 分間に産生された NO が熱変性 CytC に配位した状態であるためこの時間内に産生した NO の総量を測定できているものと考えられる。

同様に、熱変性 CytC を電極上に吸着したセンサデバイスを用いて薬剤により誘導・放出される NO 産生挙動を連続的に測定することも可能であることから、熱処理シトクロム C を用い

た *in situ* NO センサデバイスを用いた循環器系作用薬剤スクリーニングシステムが構築できることが強く示唆された。

5 結 言

本報に示した細胞培養液中 NO の測定が可能なセンサデバイスが開発されたことにより、血管内皮細胞が産生する NO を指標とした循環器系作用薬剤スクリーニングが新しいスクリーニング法となりうることが示唆された。

ここでは二通りの *in situ* NO センサデバイスについて示したが、それぞれに異なる特性を有しているため、現在、熱処理 CytC およびラジカルスカベンジャーを用いる NO センサデバイスのそれぞれについて血管内皮細胞培養系におけるセンサ特性の検討を行なっている。今後、スクリーニングシステムとしての評価に基づいて、それぞれの最適化を行なう予定である。

文 献

- 1) J. Turner, *Reckoning with the beast*, The Johns Hopkins University Press, Washington DC., (1980).
- 2) L. Pringle, *The Animal Controversy* (1989).
- 3) M. Barton, *Animal Right*, Aladdin Books Ltd, London (1987).
- 4) P. Singer, *Defence of Animals*, Blackwell press, London (1985).
- 5) J. Ahlner, *Pharmacol. Rev.*, **43**, 351 (1991).
- 6) P. L. Feldman, O. W. Griffith, D. J. Stuehr, *Chemical Engineering News*, **20**(12), 26 (1993).
- 7) T. Akaike, M. Yoshida, Y. Miyamoto, K. Sato, M. Kohno, K. Sasamoto, K. Miyazaki, S. Ueda, H. Maeda, *Biotechnology*, **32**, 827 (1993); L. C. Green, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, Analysis of Nitrate, Nitrite and [15 N] Nitrate biological fluids, *Analytical Biochemistry*, **126**, 131 (1982).
- 8) T. Haruyama, S. Shino, E. Kobatake, M. Aizawa *Biosensors and Bioelectronics*, **13**, 763 (1998).
- 9) I. Taniguchi, H. Toyosawa, K. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Electroanal. Chem.*, **140**, 187 (1982).

●著者プロフィール

氏名：春山 哲也 Tetsuya HARUYAMA
所属：東京工業大学大学院生命理工学研究科
(〒226-8501 横浜市緑区長津田4259)
役職：助手

氏名：相澤 益男 Masuo AIZAWA
所属：同上
役職：教授