

ラットへの LPS 投与による体内 NO 産生に伴う血中及び主要臓器内 NO₂/NO₃ 濃度について酒見和枝・大野泰雄・津田充寿[#]NO₂/NO₃ levels in blood and principal organs in rats treated with lipopolysaccharideKazue Sakemi, Yasuo Ohno and Mitsuhiro Tsuda[#]

It is well revealed that activation of macrophages stimulated by endotoxin resulted in induction of nitric oxide synthase which catalyze nitric oxide (NO) formation from L-arginine. Consequently, blood concentrations of NO₂/NO₃ (NO_x⁻) are shown to increase.

We studied on pharmacokinetics of NO_x⁻ in serum and principal organs in Wistar male rats after i.p. administrations of LPS and NaNO₃. The serum levels of NO_x⁻ at 1h and 6h after nitrate administration (10 mg/kg, i.p.) were 240 and 120 μM, respectively. Tissue levels of NO_x⁻ in lung, liver and kidneys were ca.1/2 of the serum level. Those levels in spleen and brain were ca.1/4 and 1/10 of the serum level, respectively. The correlation of NO_x⁻ levels in serum and these 5 organ tissues between 1h and 6h after administration of nitrate was $r = 0.992$ suggesting no specific accumulation of NO_x⁻ in these organs. The serum level of NO_x⁻ at 18h after LPS treatment (1 mg/kg, i.p.) was 430 μM. The correlation of NO_x⁻ levels in serum and 5 organ tissues between LPS and nitrate administrations was shown to be $r = 0.851$. NO_x⁻ levels of serum, lung, kidneys and brain showed good correlation but liver and spleen showed out of the correlation. The liver tissue level of NO_x⁻ after LPS treatment was low compared with the expected value from the serum level. The reason may be explained partially by the liver weight increase and the liver toxicity with increased GPT and γ-GT levels due to LPS. Contrary to this, NO_x⁻ level of spleen tissue after LPS treatment was more than 2-fold compared with the expected value from the serum level suggesting NO formation in the spleen. This was supported by the markedly high concentration (73.2 nmol/g tissue) of NO₂ in the spleen tissue. NO₂ levels in lung (34.5 nmol/g tissue) and brain (14.3) were also found to be significantly high after stimulation with LPS suggesting NO formation in these organs.

Increased formation of NO₂ in these organs by LPS stimulation suggests the formation of active nitrogen oxides such as N₂O₃ which is an effective nitrosating agent in non-acidic conditions *in vivo*.

Keywords: lipopolysaccharide (LPS), organ tissues, nitric oxide formation, nitrite/nitrate, reactive nitrogen oxides

はじめに

エンドトキシン刺激によるマクロファージの活性化に伴って、一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase, iNOS)が誘導され、アルギニンを基質として一酸化窒素(NO)が体内産生されることは良く知られている¹⁻³⁾。その結果、血中のNO₂/NO₃濃度が顕著に増加する⁴⁾。この体内NO産生は細菌感染等に対する生体防御としての免疫応答である反面、術後感染等により誘発される敗血症は、過剰のNO産生による急激な血圧低下がその原因の一つとさ

れている⁵⁾。また、産生したNOの体内酸化過程でN₂O₃のような化学的反応性に富んだ酸化窒素分子種が生成してニトロソアミン等の発がん性物質の体内生成に関与するなど体内NO産生の生体作用における両面性が論議されている^{6,7)}。このようなエンドトキシン刺激により誘導される体内NO産生には各臓器所属マクロファージの活性化に伴うiNOS誘導の関与が示されている⁵⁾。一方、各臓器でのNO産生能並びに生成したNOのNO₂及びNO₃への酸化速度は各臓器の血流速度やアスコルビン酸などの抗酸化物質の濃度により異なると考えられ^{8,17)}、臓器により異なるNO₂及びNO₃の存在状態を示すことが予想された。

本研究ではLPS刺激時における血中及び主要臓器組織内のNO₂及びNO₃濃度を調べ、臓器中のNO産生並びにその酸化状態に関する知見を得ることを目的とした。比較

[#] To whom correspondence should be addressed: Mitsuhiro Tsuda; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9762; Fax: 03-3707-6950; E-mail: mtsuda@nihs.go.jp

の為に硝酸ナトリウム投与後の血中および主要臓器内における動態の検討も合わせて行った。

実験方法

1. 使用動物

8～9週令のSPF雄性Wistarラットを日本エスエルシー(株)より購入し、1週間の馴化期間を置いて健康な個体を実験に供した。投与前日に平均体重に有意差が生じないように群分けを行ない、実験への影響をさけるために飲料水として脱イオン水を与えた。また動物は投与16時間前より実験期間中絶食した。

2. 投与と生体試料の採取

生理食塩液に溶かしたlipopolysaccharide (LPS, *E. Coli*, Serotype 0127:B8, Sigma) 1 mg/kg 又は対照群として生理食塩液を腹腔内投与 (n=4) して、18時間後にエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より採血した。採血後、直ちに頸静脈切断により放血致死させ、剖検後、肺、肝臓、腎臓、脾臓及び脳を摘出、重量を測定した。硝酸ナトリウム 10 mg/kg を同様に腹腔内投与 (4群, n=4) した。その内2群は、投与1及び6時間後に採血し、放血致死させ、剖検後、前記主要臓器を摘出、重量測定を行った。残りの2群は経時的採血 (1～2回/匹) に供した。対照群 (n=4) には生理食塩液を腹腔内投与した。尚、腹腔内投与液は全て、滅菌フィルター (孔径 0.2 μm) をろ過を施して使用した。血液は採取後血清を調製し、血清及び摘出臓器は分析時まで -20℃ で凍結保存した。

3. 血清の除蛋白および NO₂⁻/NO₃⁻ 濃度測定法

血清試料 0.1 ml に対して 0.01 N 水酸化ナトリウム溶液 0.2 ml, 420 mM 硫酸亜鉛溶液 0.2 ml, 蒸留水 0.5 ml を加えてよく攪拌し、60℃ で10分間加熱後、遠心分離 (12000 rpm, 5 min) して、除蛋白した。除蛋白した試料は、カドミウム-銅還元カラムを付した自動窒素酸化物測定装置 (TCI-NOX1000, 東京化成) を用いて、試料中の NO₃⁻ を NO₂⁻ に還元後 Griess 試薬により発色させ、生成したアゾ化合物の吸光度 540 nm を測定することにより、全 NO₂⁻/NO₃⁻ 量を定量した⁴⁾。試料中の NO₂⁻ は還元カラムを通さず直接発色させ測定した。

4. 摘出臓器のホモジェネート調製及び測定前処理法

臓器はハサミで細切し、1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて (臓器 1 g 当り 3～5 ml) アルカリ処理した後、超音波で完全に破碎してホモジェネートを得た。臓器ホモジェネートは血清試料と同様に除蛋白を行ない、NO₂⁻ 及び NO₃⁻ の濃度を測定した。

血清生化学検査は臨床生化学自動分析装置 (日立7150型, 日立製作所) により各検査項目に対する市販キットを用いて測定した。

2群間の平均値の有意差は t-検定により調べた。

結果

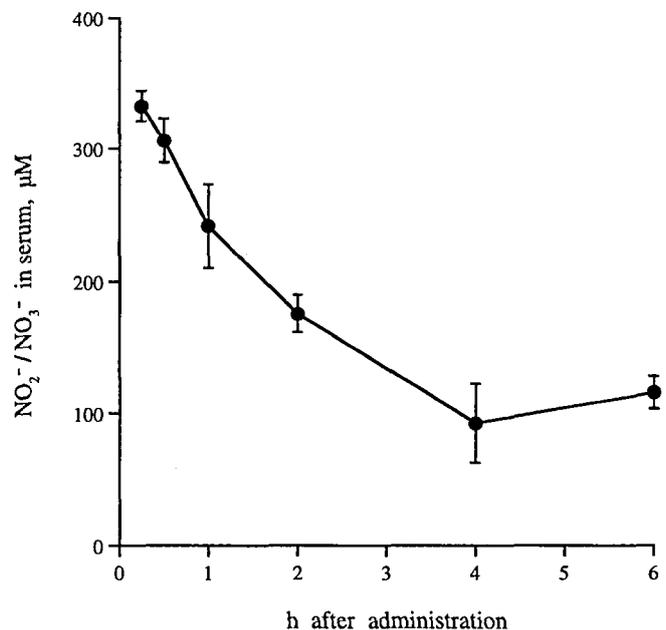
LPS 腹腔内投与 (1 mg/kg) 18時間後、硝酸ナトリウム (10 mg/kg) 腹腔内投与1及び6時間後及び生理食塩液腹腔内投与 (5 ml/kg, 対照群) 1時間後の、ラット血清中及び主要臓器組織内の NO₂⁻/NO₃⁻ 及び NO₂⁻ 濃度を Table 1 に示した。

Fig. 1 に硝酸ナトリウム腹腔内投与後のラットの血清中 NO₂⁻/NO₃⁻ 濃度推移を示した。投与後 0.25 h の NO₂⁻/NO₃⁻ 濃度は 332.2 μM で、その後はすみやかに血中より消失し、投与後 6 h で約 1/3 に低下した。

一般症状は、LPS 投与において、投与後 1 h より自発運動の低下と顕著な下痢症状が観察された。これに対して、硝酸ナトリウム投与による毒性症状は認められなかった。

Table 2 に採血直前のラット体重及び採血直後に摘出した臓器重量を示した。LPS 投与では肺、腎臓、肝臓および脾臓において臓器重量の有意な増加が見られた。

Table 3 には LPS 投与18時間後のラット血清生化学データを示した。BUN, PL, TG, TCho, ALT 並びに γ-GT が有意に増加し、Alb, AIP 並びに LAP が有意に減少した。



Each point with the vertical line represents the mean ± S.D. for 4 rats. Pharmacokinetic parameters analyzed by Gauss-Newton method (WinNonlin nonlinear estimation program) are as follows: C_{max} 341 nmol/ml, AUC^{0-∞} 1141 nmol·h/ml, t_{1/2} 2.3h.

Fig. 1. Serum concentration profile of NO₂⁻/NO₃⁻ in male rats after i.p. administration of NaNO₃ at a dose of 10 mg/kg

Table 1. NO₂/NO₃ levels of serum and various organ tissues in rats after administrations of LPS, NaNO₃ or saline

	LPS (18h)		NaNO ₃ (1h)		NaNO ₃ (6h)		Saline (1h)	
	NO ₂ /NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₂ /NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₂ /NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₂ /NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻
No. of rats	4	4	4	4	4	4	4	4
Blood (nmol/ml)	431.9 ± 120.7	15.5 ± 0.96 ^a	241.6 ± 31.5	10.8 ± 0.25 ^a	115.5 ± 12.4	10.3 ± 0.46	24.6 ± 6.03	9.97 ± 0.42
Organs (nmol / g tissue)								
Lung	239.3 ± 45.0	34.5 ± 8.84 ^b	113.7 ± 21.6	0.11 ± 0.22 ^b	58.7 ± 6.70	1.29 ± 1.56	16.1 ± 8.24	0.40 ± 0.57
Kidney	187.1 ± 60.1	19.5 ± 4.65 ^c	106.4 ± 16.3	13.8 ± 0.86 ^c	58.8 ± 11.4	14.4 ± 2.06	23.6 ± 7.11	12.4 ± 1.83
Liver	87.0 ± 28.7	21.6 ± 4.80	96.6 ± 6.34	18.1 ± 1.26	62.2 ± 3.25	17.9 ± 0.99	33.3 ± 1.55	18.2 ± 1.07
Spleen	248.7 ± 68.1	73.2 ± 30.9 ^d	60.5 ± 3.57	7.87 ± 0.65 ^d	38.0 ± 8.22	8.72 ± 5.08	20.6 ± 4.69	10.7 ± 6.83
Brain	57.8 ± 11.9	14.3 ± 2.64 ^e	17.5 ± 8.95	3.06 ± 1.66 ^e	18.3 ± 3.17	6.06 ± 2.91	5.40 ± 3.96	2.64 ± 0.46

Data are shown by mean ± S.D..

Numbers in parenthesis are h after administration.

Significantly different between a and a, b and b, d and d, e and e at p<0.01, between c and c at p<0.05.

Table 2. Body and organ weights in male rats after i.p. administrations of LPS, NaNO₃ or saline

No. of rats	Saline ¹⁾	NaNO ₃ ¹⁾	Saline ²⁾	LPS ²⁾
	4	4	4	4
Body weight (g)	225.5 ± 17.5	221.5 ± 9.8	185.8 ± 3.3	182.0 ± 7.1
Organs (g)				
Lung	0.85 ± 0.08 (0.38 ± 0.01)	0.86 ± 0.08 (0.39 ± 0.02)	0.75 ± 0.03 (0.40 ± 0.02)	0.86 ± 0.13 (0.47 ± 0.05) *
Kidney	1.61 ± 0.08 (0.71 ± 0.03)	1.54 ± 0.05 (0.70 ± 0.02)	1.32 ± 0.12 (0.71 ± 0.05)	1.40 ± 0.10 (0.77 ± 0.03) *
Liver	7.53 ± 2.21 (3.30 ± 0.69)	7.19 ± 0.40 (3.24 ± 0.05)	5.65 ± 0.69 (3.04 ± 0.33)	6.56 ± 0.51 (3.60 ± 0.22) **
Spleen	0.47 ± 0.04 (0.21 ± 0.01)	0.47 ± 0.03 (0.22 ± 0.00) **	0.42 ± 0.02 (0.22 ± 0.01)	0.54 ± 0.04 (0.29 ± 0.01) **
Brain	1.71 ± 0.04 (0.76 ± 0.06)	1.72 ± 0.08 (0.78 ± 0.05)	1.78 ± 0.07 (0.96 ± 0.05)	1.76 ± 0.07 (0.97 ± 0.02)

1) Wistar male rats (8w) were treated with NaNO₃ (10 mg/kg, i.p.) or saline (5 ml/kg, i.p.). 1h after the treatment, weighed body weight and collected blood (0.5 ml), and then autopsied to obtain the organs described.

2) Wistar male rats (9w) were treated with LPS (1 mg/kg, i.p.) or saline (5 ml/kg, i.p.). Eighteen hours after the treatment, weighed body weight and collected blood (0.5 ml), and then autopsied to obtain organs described.

Food was removed 16h before administration and during experiment.

Data are shown by mean ± S.D.. Numbers in parentheses are relative organ weight values.

* and ** show significant difference from the saline at p < 0.05 and p < 0.01, respectively.

Table 3. Clinical biochemistry findings for serum obtained from male rats 18h after treatment with LPS

Biochemical test			Treatment	
			Saline	LPS
Total protein	(TP) ^{a)}	g/dl	5.96 ± 0.18	5.61 ± 0.38
Albumin	(Alb) ^{a)}	g/dl	4.28 ± 0.20	3.88 ± 0.09 *
Albumin-globulin ratio	(A/G)		2.56 ± 0.35	2.31 ± 0.50
Blood urea nitrogen	(BUN) ^{b)}	mg/dl	13.3 ± 2.5	22.8 ± 2.2 **
Creatinine	(CRN) ^{c)}	mg/dl	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03
Glucose	(Glc) ^{c)}	mg/dl	124 ± 15	129 ± 21
Phospholipid	(PL) ^{a)}	mg/dl	97 ± 6	134 ± 9 **
Triglycerides	(TG) ^{c)}	mg/dl	61 ± 24	120 ± 28 *
Total cholesterol	(TCho) ^{c)}	mg/dl	44 ± 5	71 ± 10 **
Alkaline phosphatase	(ALP) ^{c)}	mU/ml	608 ± 45	501 ± 24 **
Alanine aminotransferase	(ALT, GPT) ^{c)}	mU/ml	49 ± 13	113 ± 22 **
Aspartate aminotransferase	(AsT, GOT) ^{c)}	mU/ml	218 ± 100	204 ± 71
γ-glutamyltransferase	(γ-GT) ^{c)}	mU/ml	0.09 ± 0.16	0.66 ± 0.40 *
Leucine aminopeptidase	(LAP) ^{c)}	mU/ml	52 ± 2	48 ± 1 *
Calcium	(Ca) ^{a)}	mg/dl	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.5

1) Wistar male rats were treated intraperitoneally with saline or LPS (1 mg/kg).

Values represent mean ± S.D. (n = 4).

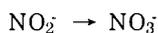
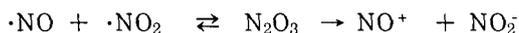
* and ** show significant difference from the control at p < 0.05 and p < 0.01, respectively.

Test kits used were obtained from a) Wako Pure Chemical Industries, b) Shinotest Laboratory,

c) Boehringer Mannheim

考 察

LPS 刺激等により体内産生した NO は、主として以下のような酸化過程を経て NO₂ 及び NO₃ に変換され⁹⁾、NO₃ の形で、主に尿中から排泄される。



NO の最終酸化産物である NO₃ の体内動態を把握するため、硝酸ナトリウム投与後の血中濃度推移及び主要臓器組織内 NO₂/NO₃ レベルを検討した。硝酸塩投与における主要臓器組織内 NO₂/NO₃ レベルは、投与後 1h 及び 6h とも、肺、腎臓、肝臓で血清レベルの約 1/2 を示し、脾臓及び脳では、それぞれ血清レベルのおよそ 1/4 及び 1/10 を示した。一般的に、血流速度の小さい脾臓等の薬物濃度は肝臓、腎臓等に比して低い場合が多い¹⁰⁾。脳は摘出臓器中最低レベルを示したが、これは硝酸イオンが水溶性であり血液-脳関門による通過抑制を受けたものと推察された¹¹⁾。このような NO₂/NO₃ の血清レベルと主要臓器組織内レベルとの濃度関係は、硝酸塩投与後 1h と 6h で良い相関 (r = 0.992, Fig. 2A) を示した。このことは、血中の NO₂/NO₃ 濃度の低下に伴って各臓器中濃度も同様に低下し、臓器特異的な蓄積が関与しないことを示唆した。更に、硝

酸塩投与後の各臓器組織内の NO₂ 濃度に対照群との差が見られなかったことから、これらの臓器組織での NO₃ の還元による NO₂ への変換の可能性は少ないと判断された。

一方、著者らの前報において、ラットへの LPS 投与により、投与 3 時間前後から血中 NO₂/NO₃ 濃度の増加がみられ、24 時間後においてもコントロールレベルの 10 倍以上であることを示した⁴⁾。また、それが NOS の阻害剤 N^G-monomethyl-L-arginine により生成抑制されることより、iNOS 誘導に伴う NO 産生によるものであることを確認してきた⁷⁾。

LPS 投与後 18 時間と硝酸塩投与後 1 時間での血清中及び各臓器組織内 NO₂/NO₃ レベルの比較において、血清レベルと肺、腎臓及び脳では硝酸塩投与の場合と良い相関を示した。一方、肝臓及び脾臓の組織内 NO₂/NO₃ レベルと血清レベルでは硝酸塩投与の場合と相関せず、肺、腎臓、脳とは異なる状況が示唆された (Fig. 2B)。肝臓が血清レベルからの予測値に比して低いレベルを示した原因としては、LPS 投与による肝臓重量の増加 (20%) がその一因と考えられた。また、血清中 ALT (GPT) 及び γ-GT が上昇していることから肝障害が示唆され、LPS の肝機能への影響もその一因と考えられたが、詳細は不明であった。脾臓においても臓器重量の増加 (30%) がみられたが、NO₂/NO₃ 濃度は逆に血清中レベルからの予測に比して、著しい増加を示しており説明が困難であった。

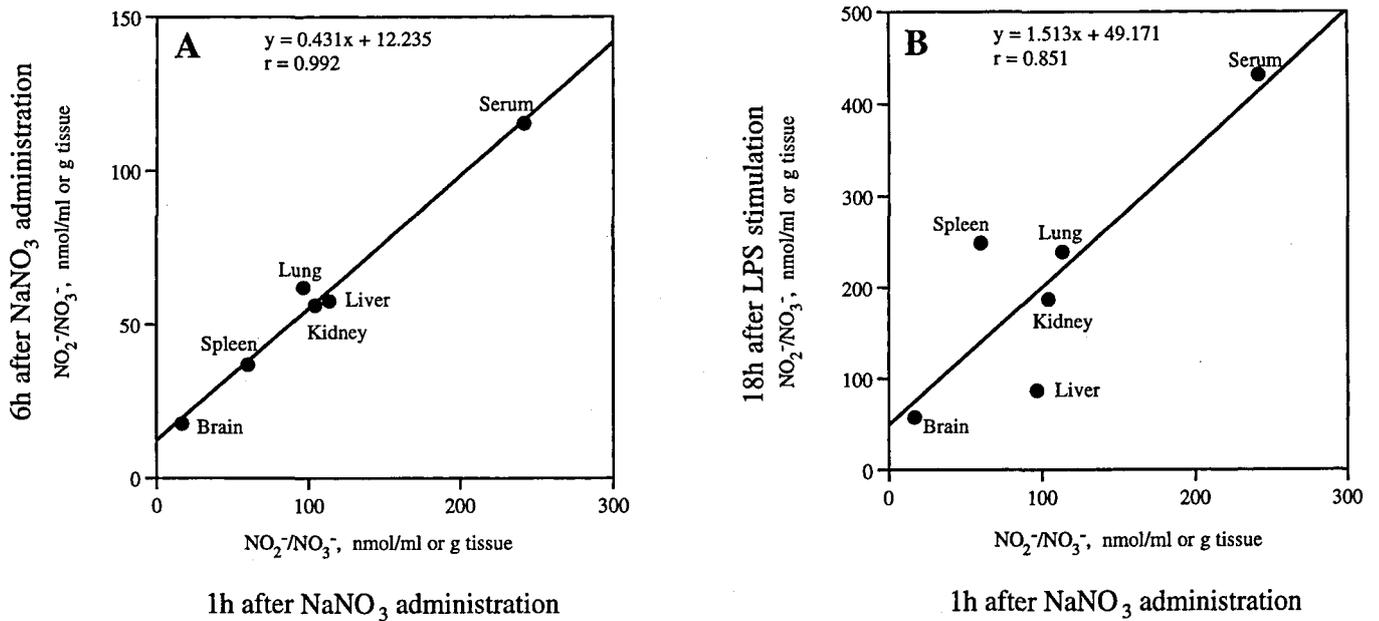


Fig. 2. Correlations of NO₂⁻/NO₃⁻ levels in serum and various organ tissues in male rats after i.p. administrations of NaNO₃ and lipopolysaccharide (LPS)

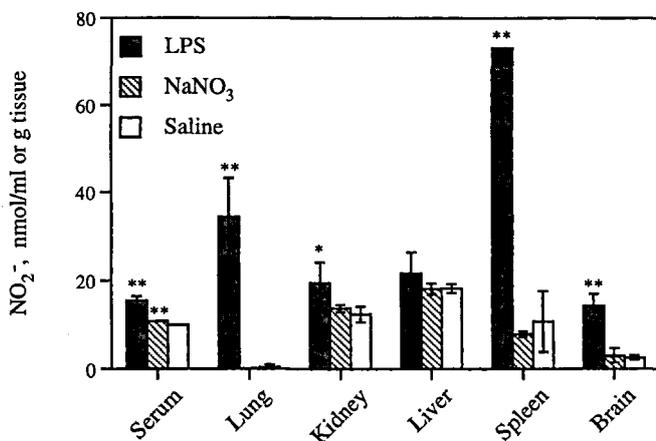
HomらはSprague-DawleyラットへのLPS投与において、今回、我々が検討した各主要臓器での、iNOSのmRNAおよび蛋白の発現を明らかにしている⁵⁾。著者らの本研究結果において、LPS投与後の各臓器組織中に検出されたNO₂濃度は、硝酸塩投与時のそれより、肝臓を除いて、有意に高い値を示し、各臓器でのNO産生の観点から注目に値した(Fig. 3, Table 1)。特に、脾臓中のNO₂濃度が他の臓器に比して著しく高いことが特徴的であった。LPS刺激により脾臓固有のマクロファージ (Splencocytes) によるiNOSの誘導の関与¹²⁾が示されている事から、脾臓におけるNO産生の結果を示すものと判断された。また、脾臓中のアスコルビン酸濃度が肝臓や腎臓に比して高濃

度¹⁷⁾であることから、NO₂が安定に存在したと推測された。

一方、対照群及び硝酸塩投与群の肺組織においてNO₂濃度が顕著に低値を示したことは、肺では酸素供給が高く、NO₂のNO₃への酸化が容易なためと推測された。また、LPS投与時の肺組織中にNO₂が高濃度で検出されたことから、肺摘出時点でのNO産生の持続が示唆された。硝酸塩投与時の脳内NO₂に比してLPS投与時のNO₂濃度が有意に増加していることから、脳内独自のNO産生の関与を示していると推察された。腎臓でのNO産生もNO₂濃度測定結果から示唆されたが、血中NO₂濃度の影響が無視出来ないと思われた。

結論として、脾臓、肺及び脳においてNO産生が示唆され、肝臓及び腎臓でのNO産生に関しては、本研究からは知見が得られなかった。今回、LPS投与による臓器組織内NO₂濃度の有意な増加が観察されたことにより、臓器組織内NO₂濃度の測定が、当該臓器でのNO産生の一指標として役立つことが示された。とりわけ、脾臓などの血流速度の小さい臓器では、血中のNO₂/NO₃濃度に比較的影響されず、臓器独自のNO産生の関与及びその酸化状態を観察出来ると考えられた。

LPSなどのエンドトキシン刺激による臓器組織内NO₂濃度の上昇は、組織内でのN₂O₃等の化学的反応性に富んだ酸化窒素分子種の増加を示している。このような活性な酸化窒素分子種は、生体の中性環境でもニトロソ化や脱アミノ化反応に関与できることから、寄生虫やバクテリアなどによる慢性感染症や炎症等による発がん促進との関連で本研究の知見は注目される¹³⁻¹⁶⁾。



*, **: Significantly different from the control (saline) at $p < 0.05$, and $p < 0.01$, respectively.

Fig. 3. NO₂⁻ levels of serum and various organ tissues in male rats after administrations of LPS, NaNO₃ or saline

文 献

- 1) Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A.: *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142(1991)
- 2) Iyengar, R., Stuehr, D. J. and Marletta, M. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6369-6373(1987)
- 3) Cunha, F. Q., Assreuy, J., Moncada, S., Liew, F. Y.: *Immunology*, **79**, 408-411(1993)
- 4) Kitajima, S., Tsuda, M., Eshita, N., Matsushima, Y., Saitoh, M., Momma, J. and Kurokawa, Y.: *Toxicol. Lett.*, **78**, 135-140(1995)
- 5) Hom, G. J., Grant, S. K., Wolge, G., Bach, T. J., Macintyre, D. E. and Hutchinson, N. I.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 452-459(1995)
- 6) Miwa, M., Stuehr, D. J., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R.: *Carcinogenesis*, **8**, 955-958(1987)
- 7) Tsuda, M., Kurashima, Y., Kosaka, H., Ohshima, H., Sugimura, T. and Esumi, H.: *ibid.*, **16**, 2653-2657(1995)
- 8) Stamler, J. S., Singel, D. J., Loscalzo, J.: *Science*, **258**, 1898-1902(1992)
- 9) 鈴木仁美：窒素酸化物(NO_x)の有機化学, *ファルマシア*, **33**, 487-491(1997)
- 10) 小泉保：医薬品の開発 第19巻 薬動学, 広川書店, 東京, pp.216-222(1990)
- 11) 加藤隆一：臨床薬物動態学, 南江堂, 東京, pp.31-34(1992)
- 12) Stein, C. S. and Strejan, G.: *Cell. Immunol.*, **150**, 281-297(1993)
- 13) Liu, R. H., Baldwin, B., Tennant, B. C. and Hotchkiss, J. H.: *Cancer Res.*, **51**, 3925-3929(1991)
- 14) Haswell-Elkins, M. R., Satarug, S., Tsuda, M., Mairiang, E., Esumi, H., Sithithaworn, P., Mairiang, P., Saitoh, M., Yongvanit, P. and Elkins, D. B.: *Mutat. Res.*, **305**, 241-252(1994)
- 15) Satarug, S., Haswell-Elkins, M. R., Tsuda, M., Mairiang, P., Sithithaworn, P., Esumi, H., Sukprasert, S., Yongvanit, P. and Elkins, D. B.: *Carcinogenesis*, **17**, 1075-1081(1996)
- 16) Satarug, S., Haswell-Elkins, M. R., Sithithaworn, P., Bartsch, H., Ohshima, H., Tsuda, M., Mairiang, P., Mairiang, E., Yongvanit, P., Esumi, H. and Elkins, D. B.: *ibid.*, **19**, 485-491(1998)
- 17) Kosaka, H., Tsuda, M., Kurashima, Y., Esumi, H., Terada, N., Ito, Y. and Uozumi, M.: *ibid.*, **11**, 1887-1889(1990)