

NO ドナー

丹野雅幸[#]・末吉祥子・宮田直樹

Nitric Oxide (NO) Donor

Masayuki TANNO[#], Shoko SUEYOSHI and Naoki MIYATA

Nitric oxide (NO), which is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) in mammals, acts as a signal molecule for vasorelaxation, cytotoxicity and neurotransmission. The difficulty in handling of a gaseous and labile NO causes problems with the effective and precise studies using NO. The increasing interest in the biological roles of NO requires the use of NO donors which releases NO under the various desirable conditions. We systematized the most commonly used NO donors in this article to support the biological investigation. NO donors were classified according to the functional groups based on NO-donating characteristics. The preparation, chemical properties and NO-donating ability of these NO donors are summarized. It is particularly described in some detail on the stability both as a solid and in solution and the handling of the compounds.

Keywords : nitric oxide, NO donor

1. はじめに

内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) の存在は約20年前から知られ、それが一酸化窒素 (NO) 自身であると明らかにされるまでさらに約10年の時を要したが、これらの研究を行った Furchgott, Ignarro, Murad の3人のNO研究者が1998年のノーベル医学・生理学賞を受賞した¹⁾。NOは大気中存在し、環境汚染物質、NO_xとして古くから知られていた低分子量の気体分子であり、これが実は生体内で産生され利用されていたことは驚きである。NOはNO合成酵素 (NOS) によりL-アルギニンがL-シトルリンへ代謝される際に生成する。NOはさらに、情報伝達物質としてその生理機能に関与していることもわかってきた。最近では、NO合成酵素 (NOS) の同定、3種のアイソフォーム (cNOS, iNOS, nNOS) の精製とそのクローニング、ノックアウトマウスの作製等による解析も行われおり、特に、cNOS, iNOSの各々あるいは両者が関与する病態も明らかにされている²⁾。例えばcNOSの場合、動脈硬化、高血圧、アルコール性肝障害、インポテンスに、また、iNOSでは肺血症、感染症、リウマチ、臓器移植、肝硬変に関与し、両者が関与する場合は虚血・再灌流 (脳、心、腎、胃)、そして糖尿病である。これらNOの代謝病態の研究が現在も盛んに進められている。

NOの有効性や有害性等の作用を解析するためには、NOを直接あるいは間接的に生体に与える必要がある。しかし、

NOは分子内に孤立電子対を有するフリーラジカルであり、常温常圧下で気体である。また、大気中の酸素で酸化されやすいため、少量を定量的に扱うことは難しい。一般の化学実験ではボンベに貯蔵されたNOまたは不活性ガスで希釈したNOガスを利用する。実験室で簡便にNOを発生させるには、亜硝酸ナトリウムの粉末に濃硫酸を滴下させる³⁾。しかし、生物実験系では微量のNOを制御して使用する事が多いのでこれらの方法を用いることは稀である。生体内でNOを用いる実験では、NOの代替品として、秤量や希釈がしやすく、目的に応じた安定性を持ち、必要量のNOを発生する化合物、NOドナー (NO供与剤) が使われるようになってきた。NOの生物作用に関する研究が飛躍的に進んだのはNOドナーの貢献が大きい。

NOの研究を生理医学系に限定すれば、もともと血管系に始まり、NOの機能もはっきりしてきたが、神経系や免疫系等その他の分野では未だにはっきりしていない部分が多い。NOは、神経伝達や可塑性にどうかかわっているのか、そこにNOによって上昇したcGMPはどのようにNOの作用を仲介しているのか、細胞の癌化やアポトーシスにはどうかかわっているのか、タンパク質のニトロ化はどのように調節されているのか、なぜ過剰のNOを産生する細胞自身はNOの毒性を受けにくいのか⁴⁾、生化学や分子生物学の手法だけでは追いきれないこうした疑問に答えるためにもNOドナーを利用した実験は有効な手助けになる。筆者らも有機化学的立場からNOドナーの重要性を説き、種々のNOドナー候補化合物を合成してきた⁵⁾。さらに合成したNOドナーや既知のNOドナーのNO発生速度 (NO発生能) を測定できる簡単な装置も考案した⁶⁾。

現在、種々のNOドナーが市販されているが化学的性質

[#] To whom correspondence should be addressed: Masayuki Tanno; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158, Japan; Tel:+81-3-3700-1141 ext. 224; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: tanno@nihs.go.jp

も様々である。そのため、NOドナーの化学的性質を理解した上で研究の目的に適したNOドナーを選択することが重要となる。特に、NOの発生量が制御でき、持続性があり、NO代謝系の影響を受けないようなNOドナーが要求されている。しかしながら、NOドナーを使用する場合の注意やNOドナーの化学的性質や保存方法などを体系的に紹介した文献はほとんどない。各メーカーからの情報では、自社が扱っている製品に関しては詳細に記載されているがNOドナー全般を知ろうとすると離散的である。筆者らも数年前からNOドナーに関する性質の体系化を試みてきたが^{7,8)}、最近、生物化学者のためのNOドナーの扱い方を紹介したレビューがでた⁹⁾。また、このレビュー以外にもNOドナーに関する研究成果がいくつか報告されている。著者らも「NO-化学と生物」(学会出版編1996)および「生体内一酸化窒素(NO)実験プロトコル」(共立出版2000)でNOドナーについて述べた。本総説は、それらに記載したデータに最新の情報を加筆したものである。現在市販されているNOドナーを中心に官能基別に分類し、製法、溶解性、固体状態および水溶液中での安定性、保存方法、NO発生機序などをまとめた。また、市販されていないNOドナーについても記載した。

2. NOドナーの分類

筆者らは以前、NOドナーの性質をNOの発生方法に従って次のように四つに分類した⁷⁾。(1)熱や光により物理化学的にNOを発生する自発発生型化合物 (2)溶液中で酸・アルカリ等により分解しNOを発生する化学反応依存型化合物 (3)代謝酵素により分解しNOを発生する代謝活性型化合物 (4)NOSが関与するNO産生系に作用して、内因性NO発生を高めるNO産生系活性型化合物である。しかし、NOが発生するまでの過程が研究途上の場合が多く、直接的か間接的か、あるいは非酵素的か酵素的かによって上記の分類は一部重複するところもあり、それぞれ厳密に区分することは難しい。そこで、今回は構造による分類、すなわちNOの発生に深く関与すると考えられる

官能基毎に分類した。

現在市販されているNOドナーについてはTullettおよびRees⁹⁾らの文献をもとに、最新のデータ⁸⁾と共にTableにまとめ、化学的性質や作用機序などのほか発売元も載せた。また、NOドナーの構造を各章毎に図示した。

NOドナーは、便宜的に治療薬と研究試薬に分けることができる⁸⁾。治療薬よりも研究試薬の方が種類は多いが本論の各章の中やTable中で治療薬である場合は説明を加えた。

3. 官能基別NOドナーの性状と合成法

一般にNOドナーが分解しNOを発生する場合、物理化学的環境下(光、熱、pHによる反応)でも生物化学的環境下(酵素による生体内化学物質存在下での反応)でもNOを放出する場合が多いので本論では使用環境下でのNO発生(遊離)機構に関する説明を加えた。

3.1 硝酸エステル(ONO₂)および亜硝酸エステル(ONO)

ニトログリセリン(NTGまたはGTN)、ジ亜硝酸イソソルビド(ISDN)、モノ亜硝酸イソソルビド(IS-5-MN)の硝酸エステル類と亜硝酸イソアミル等の亜硝酸アルキルエステルに分類される。いずれも冠動脈拡張剤であり、狭心症治療に用いられる。亜硝酸イソアミルやNTGは日本薬局方収載医薬品である。ニコランジルとKRN-2391も硝酸エステル誘導体であるが、これらはNOドナーというよりもむしろKチャネルオープナーと称されることが多い¹⁰⁾。合成法としてアルキルアルコール類を硝酸や亜硝酸でニトロ化またはニトロソ化する方法が知られているが、反応条件も種々で副生成物も生じやすい¹¹⁾。これらのNOドナーは治療薬として医薬品メーカーから入手可能なので合成例は省略した。ISDNやIS-5-MNの合成原料であるイソソルビドも医薬品として用いられている。これら硝酸エステル類が生体内のシトクロームP-450やチオール分子で代謝され、NOを生成して血圧を下げると考えられるようになっ

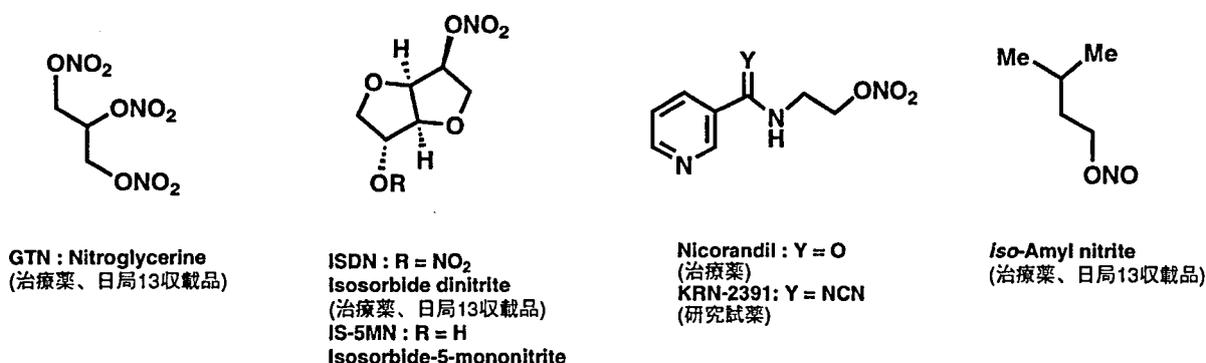


Fig. 1 Nitrates and Nitrites

Table NOドナーの性質(J. M. Tullettのデータの新知見を加えて一部改変⁹⁾)

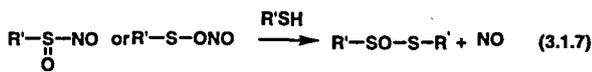
分類	名称または記号	性状、安定性、貯蔵方法	備考	国内発元 ^注
有機硝酸エステル類	GTN (NTG)	液状。EtOH又はDMSOで調製した溶液は安定。遮光保存	酵素のおよび非酵素的経路で代謝を受ける。チオ硝酸エステル (RSNO ₂) 中間体を経てRSNOからNO遊離する。弱い血小板凝固因子。冠動脈拡張剤。治療薬。JP 収載	A
	ISDN	上記と同じ	上記と同じ。治療薬。JP 収載	A
	Nicorandil	EtOH可溶。水に難溶。2-10°Cで暗所、乾燥貯蔵	狭心症治療剤。冠血管拡張作用。治療薬	A
有機亜硝酸エステル類	iso-Amyl nitrite	液状。4°Cで封かんしたガラス容器に貯蔵	NOの発生にはSH基の存在が必要。RONOが活性中間体。NOの発生速度はRSNOの生成速度の関数になる。RONOの代謝を伴う。治療薬。JP 収載	A, K
金属ニトロシル類	SNP	室温、暗所、乾燥貯蔵。光を避け、水溶液を用時調製	酵素のおよび光化学的にNOを遊離するが、発生機構は一部不明。シアン化物を同時に生成。生物学的半減期はヒトで約2分。降圧剤。治療薬。	F, I, K, W
	NPS	水に可溶。2-10°Cで暗所、乾燥貯蔵	Caged化合物であり、光照射によりNOを放出。SNPと異なり、シアンによる毒性は無い。研究用試薬	I, K, W
	DNIC (1:20)	-70°Cで1ヶ月以上安定。希釈水溶液中で分解。	L-システインの過剰量で調製した(L-Cysteine) ₂ Fe(NO) ₂ 錯体の冷水溶液。研究用試薬	K
シドノニン類	Molsidomine	固体は安定。光を避け室温で貯蔵。DMSOに溶かして調製	<i>In vitro</i> で不活性。肝臓のエステラーゼによって活性代謝体SIN-1へ変換され、NOを発生。狭心症治療剤。治療薬。	F, I, K
	SIN-1	固体の塩酸塩は安定。光を避け-20°Cで乾燥貯蔵。DMSO、エタノールに可溶。水及びpH 5.0酸性溶液で安定。	加水分解により開環体、SIN-1Aを生成し、ラジカル過程を経てNOを発生。酸素存在下でスーパーオキシドも生成。NOの発生はSODにより増大。ペルオキシ亜硝酸(ONOO)とOHラジカルが生成する可能性あり。研究用試薬	F, I, K, W

分類	名称または記号	性状、安定性、貯蔵方法	備考	国内発売先*
S-ニトロソチオール類	GEA 3162	水に可溶。固体の塩酸塩は安定。光を避け-20°Cで乾燥貯蔵	熱的に比較的安定なNOドナー。 研究用試薬	I, K
	GEA 5024	上記と同じ	上記と同じ	I, K
	GEA 5583	上記と同じ	上記と同じ	K
	GSNO	光を避け-20°Cで乾燥貯蔵。使用時にクエン酸/塩酸緩衝液(pH 2.0)または0.5-1M塩酸に溶かす。溶液は光を避け4°Cで貯蔵	速い分解によりNOとジスルフィド生成。チオールラジカルが生成する。この分解は熱や光によって加速され、痕跡量のCu ²⁺ が触媒する。研究用試薬	F, I, K, W
	CysSNO	上記と同じ	上記と同じ	W
	SNAP	光を避け室温で乾燥貯蔵。使用時に調製。溶液は光を避け4°Cで貯蔵	上記と同じ	F, I, K, W
NONOate類	ANGELI'S SALT	-20°Cで貯蔵。水またはメタノールに可溶	自発的にNOを発生。アルカリ性で安定。酸性では速い分解。pHでNO発生を制御。研究用試薬	F, I
	Diethylamine/NO	-80°Cでアルゴンまたは窒素下で貯蔵。水に可溶。使用時に希NaOHで調製。溶液はアルゴン下で冷却貯蔵	自発的にNOを発生。チオール濃度が高いとNOの発生が低下。アルカリ性で安定で、pHの低下に従ってNOの発生速度が増大。pH 5.0では速い分解。pHでNO発生を制御可能。研究用試薬	F
	Spermine/NO	上記と同じ	生物活性を持つスベルミンを生成。研究用試薬	F, I, K
	NOC	上記と同じ	0.1 M リン酸 buffer 中 37°C, pH 7.4 で NO を発生する NOC 類の半減期(分), (吸収スペクトル法): NOC 5 (25.0), NOC 7 (5.0), NOC 12 (100), NOC 18 (21h)。研究用試薬	F, I, K, W

分類	名称または記号	性状、安定性、貯蔵方法	備考	国内発売先*
ヒドロキシイミン類	NOR	冷凍庫で乾燥貯蔵。DMSOに可溶。pHアルカリ側で分解が速い。	NO発生の機構は不明な部分がある。0.1 M リン酸 buffer 中, 37°C, pH 7.4 の水溶液中で NO を発生する NOR 類の半減期 (分), (ESR 法): NOR 1 (1.8), NOR 2 (28), NOR 3 (30), NOR 4 (60)。NOR 3 は FK409 とも称される。研究用試薬	F, I, K, W
オキソトリアゼン類	CNO-4	2-10°C 保存。脂溶性で水に難溶	光照射により NO を発生する Caged 化合物。生理的 pH 下で膜透過性が低く細胞内外どちらかで選択的に閉じこめられ、光分解的に NO を生成。NO 放出の場所、時間および濃度の制御が可能。研究用試薬	K, W
	CNO-5	上記と同じ	光照射により NO を発生する Caged 化合物。CNO-4 と異なり膜透過性が高い。細胞内でエステラーゼにより加水分解され、細胞内に局在。NO 放出の場所、時間および濃度の制御が可能。CNO-4、CNO-5 の量子収率は 0.02-0.05。研究用試薬	K, W
芳香族 N-ニトロソアミン類	BNN 3	光を避け冷凍庫で貯蔵。脂溶性。DMSO に可溶	光照射により NO を発生する Caged 化合物。オキソトリアゼン類と比べ量子収率は 2 と高い。研究用試薬	W
	BNN 5 Na	光を避け冷凍庫で貯蔵。水溶性 (5mM 以上溶解)	細胞内に局在化可能。研究用試薬	W
	BNN 5 Methyl ester	光を避け冷凍庫で貯蔵。水に不溶。EtOH に難溶。DMSO 可溶。	細胞膜通過型。研究用試薬	W
フロキサソニル類	4-Phenyl-3-furoxan-carbonitrile	4°C、暗所保存で 3 年間安定。水、DMSO に可溶。溶液は不安定。リン酸緩衝液中では安定 -20°C で貯蔵	血管拡張作用や血小板凝固阻止活性を示す。研究用試薬	F, I
脂肪族 N-ニトロソ尿素類	STZ	冷凍庫で貯蔵。水に可溶。溶液は不安定	光照射により NO を発生する。研究用試薬	F, I

* 発売元略記号：A: 製薬各社 (医療薬 日本医薬品集 1998-99 (第 22 版) 日本医薬情報センター編 薬業時報社), F: フナコシ薬品, I: 岩井化学, K: 国産化学, W: 和光純薬

たのは最近のことである。すなわち、生体内でグルタチオンのようなチオールとの代謝によりニトロソチオールに変換されてNOを遊離すると言われているが^{12a)}、亜硝酸エステルのNO遊離式は(式3.1)、(式3.1.2)であり、ニトログリセリンのような硝酸エステルの場合は(式3.1.3)と(式3.1.4)や(式3.1.5)から(式3.1.7)で亜硝酸エステルとNO発生機構は異なる。硝酸エステルでは他の機構としてP-450を経由する代謝も考えられている^{12b)}。

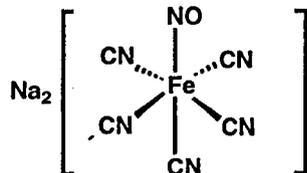


3.2 金属ニトロシル類

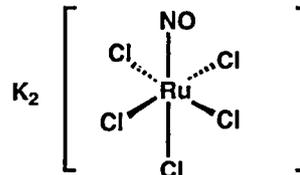
3.2.1 ニトロプルシドナトリウムおよびニトロシルペンタクロロルテナトカリウム

ニトロプルシドナトリウム (SNP) とニトロシルペンタクロロルテナトカリウム (PNP) が市販されている。SNPの方は降圧剤として使用されている。これらのNOドナーは照射でNOを放出する。多くのNOドナー類は使用時に溶液にすると、直ちにNO放出の分解が始まる。しかし、このグループの化合物は、pHによっては安定で、照射時だけNOを発生するので目的部位で利用するのに良いとされている¹³⁾。ただし、筆者らの実験では光を遮りpH7.4、37°Cでの熱分解でもNOを放出することが判明した。従って、照射下での温度制御に注意が必要と思われる。SNPは $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ を温水に溶かし、濃硝酸を加えて反応させたのち炭酸ナトリウムで中和して得られる(式3.2.1)¹⁴⁾。PNPの場合は $RuCl_3 \cdot H_2O$ の温水溶液に発泡しなくなるまで KNO_2 を加えて製する(式3.2.1.2)¹⁵⁾。

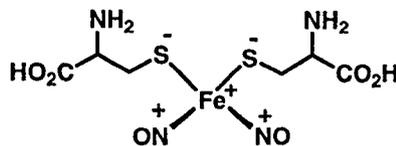
SNPはNO以外の生理活性も示し、CN基を持つためその毒性がNOによる活性を評価する際に複雑にする可能性もあるので問題となっている。これに対して、PNPはCN基を持たないので、使用の際、選択する目安となる。ただし、SNPはこれまで広く利用されてきただけにデータも豊富であるから、自分達のデータと比較検討する場合など、SNPの使用はまだ多いと思われる。



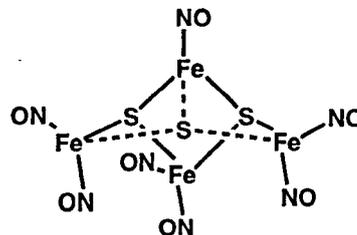
SNP : Sodium pentacyanonitrosylferrate
(治療薬)



NPS : Nitrosylpentachlororuthenate
potassium salt (研究試薬)

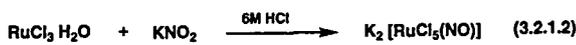
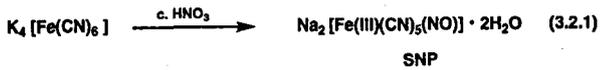


DNIC (1:20) : Dinitrosyl-iron-di-L-cysteine
prepared with an excess of L-cysteine
(研究試薬)



Roussin's Black Salt :
Heptanitrosyl-tri-μ3-thioxotetraferate (1-)
(研究試薬)

Fig. 2 Metal Nitrosils



3.2.2 DNIC

最近、新しいNOドナーとしてDNIC、が市販されている。DNIC (1:20) は鉄ニトロシルとL-システインから形成した錯体 (L-Cys)₂Fe(II)(NO)₂の1当量に20当量のL-システインを加えたものである¹⁶⁾。EDRFの本体がL-システインのような低分子のチオールを配位子とする鉄ニトロシル錯体であるとの考えからDNICがNOドナーとして開発された。

3.2.3 黒色ルッサン塩

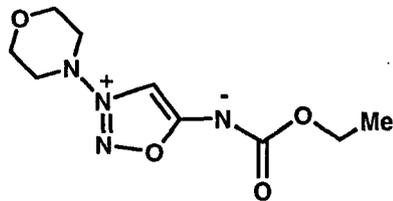
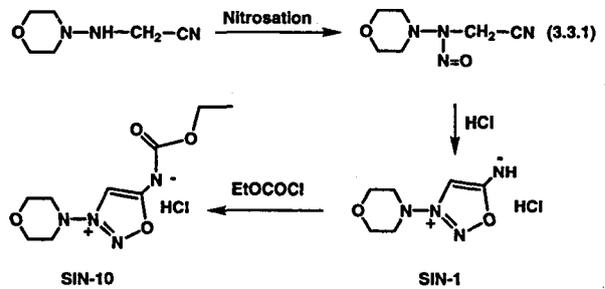
クラスター構造を持つ鉄ニトロシル化合物として赤色ルッサン塩 (M₂[Fe₂(NO)₄S₂]; M=K, Na) と黒色ルッサン塩 (M[Fe₄(NO)₇S₃]; M=H, K, Na, Cs) が古くから知られている。両金属塩のうち、黒色ルッサン塩 (Roussin's black salt)¹⁷⁾ は熱的分解だけでなく光分解でもNOを発生することが最近報告された。ただし、黒色ルッサン塩は市販されていないので必要に応じて合成する必要がある。製法¹⁸⁾ : 1) 亜硝酸アルカリと硫化アルカリの混合水溶液に硫酸鉄(II)水溶液を熱時反応させる。2) 水酸化鉄(II)と二硫化炭素

との混合物にアンモニアを飽和させてNOを通ずる。3) 新しく沈殿させた硫化鉄(II)を水に懸濁させ、NOを通ずる。黒色ルッサン塩は一般に光沢ある黒赤色の結晶で、熱すると分解しやすい。水、エタノール、エーテルなどに可溶。緩衝液に溶かすと、速やかに分解が始まる。空气中、散光下では安定であるが太陽光では分解する。アルゴン雰囲気下、-20℃で保存する。

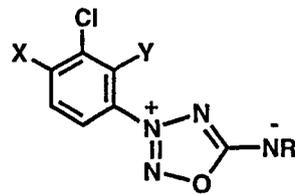
3.3 シドノニミン類

3.3.1 モルシドミン (SIN-10)

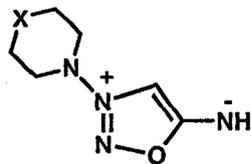
市販されている血管拡張薬である。代謝されてSIN-1へ変換されてNOを遊離する¹⁹⁾。N-ニトロソアルキルアミノアセトニトリルを原料にして合成する (式3.3.1)²⁰⁾。



SIN-10 : Molsidomine
N-(Ethoxycarbonyl)-3-(4-morpholinyl)sydnonimine
(治療薬)



GEA 3162 : R = H, X = Cl, Y = H
5-Amino-3-(3,4-dichlorophenyl)-
1,2,3,4-oxatriazolium
GEA 5024 : R = H, X = H, Y = Me
5-Amino-3-(3-chloro-2-methylphenyl)-
1,2,3,4-oxatriazolium
GEA 5583 : R = CONHCH₂CN, X = H, Y = Me
3-(3-Chloro-2-methylphenyl)-5-(cyanomethylamino)-
carbonylamino-
1,2,3,4-oxatriazolium
(研究試薬)

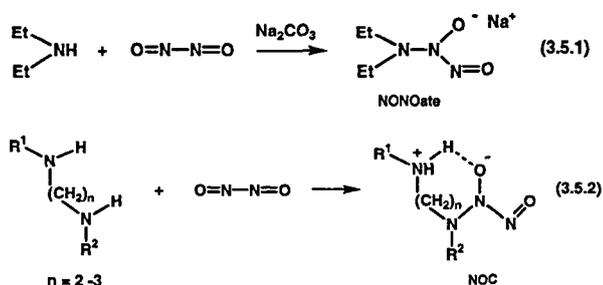


SIN-1 : X = O
3-Morpholinisydnonimine
C78-0698 : X = SO₂
(研究試薬)

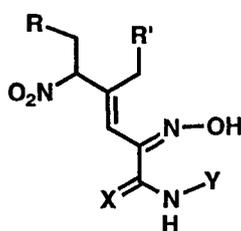
Fig. 3 Sydnonimine Derivatives

た。各種の化合物が市販されている。

NOCは若干吸湿性であるが、比較的安定な固体で水によく溶ける。しかも、NOC5, NOC7, NOC12, NOC18の半減期は、37°C, pH7.4, 0.1MPBS中で、それぞれ、7.0, 1.7, 13, 78分である。水中でのNO発生反応は酸素へのプロトン付加が引金になるとされている³³⁾。このため、アルカリ側では比較的安定であるが、0.1M水酸化ナトリウムに10mM濃度で溶かした場合、冷所でも、5-6%/1日程度でNOを放出して分解する。NONOate類はコファクターを必要としないNOドナーに分類される。NONOate類を用いて、DNA合成阻害作用をNO発生速度と関係づけた興味深い報告がある³⁴⁾。また、NOC7, NOC12を用いて、インスリン分泌に適切なNO発生速度が必要であるとの報告や³⁵⁾、グルタマート毒性とNOとの関係も報告されている³⁶⁾。



3.6 ヒドロキシイミン類



FK409 誘導体

NOR 1 : R = OMe, R' = H, X = O, Y = H

NOR 2 : R = H, R' = H, X = O, Y = H

NOR 3 (FK409) : R = H, R' = Me, X = O, Y = H

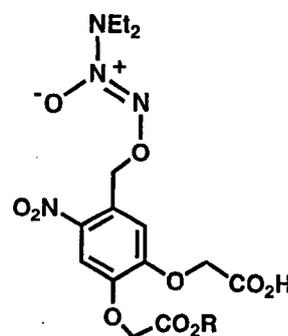
NOR 4 : R = H, R' = Me, X = H₂, Y = CO-3-pyridyl
(研究試薬)

Fig. 6 Hydroxyimino Compounds

NOR 誘導体は *Streptomyces gneosporeus* の醗酵生成物中より単離された NOR3 に基づいて開発された³⁷⁾。現在までに4種類が市販されている。コファクターを必要としないNOドナーとして知られている^{26a)}。特に、喜多ら³⁸⁾により NOR3 は KF-409 と呼ばれ、NOを放出することや血管弛緩

作用を示すことが見出された。pHが6を越えるとNO放出の分解が速くなることからOH⁻によって触媒されると考えられているがNOの発生機構は明らかにされていない^{39, 40)}。水に難溶で、少量のDMSOに溶解し、bufferで希釈して使用する。半減期はNOR1からNOR4の順で、それぞれ、1.8, 28, 30, 60分である³⁷⁾。我々は後述するように、いくつかのNOドナーのNO発生量を調べたが、用いた化合物の中ではNOR4のNO放出速度は、かなりゆっくりであった。生理活性にNOの放出速度が重要である場合があり、目的によってはこのタイプの化合物は今後重宝されるだろう。

3.7 オキソトリアゼン類 (Caged 化合物)



CNO-4 : R = K

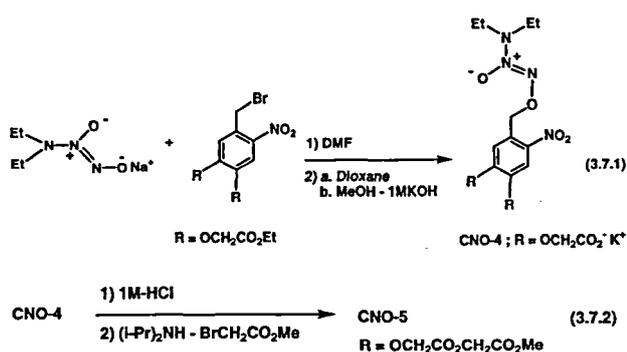
1-[4',5'-Bis(carboxymethoxy-2'-nitrophenyl)methoxy]-2-oxo-3,3-diethyl-1-triazene Dipotassium Salt

CNO-5 : R = CH₂CO₂Me

1-[4',5'-Bis(carboxymethoxy-2'-nitrophenyl)methoxy]-2-oxo-3,3-diethyl-1-triazene Diacetoxymethyl Ester
(研究試薬)

Fig. 7 Oxotriazines

CNO類はすでに述べたSNPやルテニウムのニトロシル錯体と同様に可視光照射によりNOを放出する。照射している間のみNOが発生するのでNOの発生量をコントロールしやすい。また、これらの化合物をUV照射した場合でもNOを放出していることはトロンピンで刺激した血小板凝集阻止作用によって証明されている。NONOateからCNO-4 (mp.300-305°C (dec.))を得た後(式3.7.1)、CNO-4を経てCNO-5 (Oil)を合成する(式3.7.2)⁴¹⁾。CNO-4とCNO-5はすでに市販されている⁴²⁾。



3.8 N-ニトロソ化合物

各種のN-ニトロソアミン、N-ニトロソアミド、N-ニトロソ尿素等 (Fig.8) があるがNOドナーとして市販されているのは、現在のところ下記に記載するN-ニトロソアミンのBNN類だけである。またNOドナーとしての性質が最近明らかにされたクペロンは分析試薬として以前から販売されており、NOドナーとして供給されていない。おそらく、一般にこれらの化合物群は水溶性に乏しい性質持つものが

多いためであろう。また、N-ニトロソアミン類は熱的に安定であり、効率良くNOを発生させるためには高温処理や光分解させる必要がある。一方、逆にN-ニトロソアミドやN-ニトロソ尿素類は室温で不安定な化合物であり、-20°Cでの保存を要するものが多いため、NOドナーとして扱いにくいことも原因と思われる。これらの化合物群は筆者らが研究の対象にしてきたので、特にNOドナーとしての芳香族N-ニトロソアミドおよび芳香族N-ニトロソ尿素類については国立衛研報(1997年)⁶⁾に詳述したのでここでは簡単にふれるにとどめる。

3.8.1 芳香族N-ニトロソアミン類

N-ニトロソアミン類を有機溶媒中で熱分解すると相当するニトロ体が生成することは古くから知られ、分解の際、NOの発生を伴ってニトロ体が生成すると考えられていた。例えば、ジフェニルアミンとカルバゾールのN-ニトロソ体は、トルエン中80-100°C付近で分解して相当するニトロ体を生成すること^{43a)}、また、N-ニトロソ-N-メチルアニリンも有機溶媒中、53°Cで分解生成物としてニトロ体を生成することからいずれの反応でもNOを発生していると推定さ

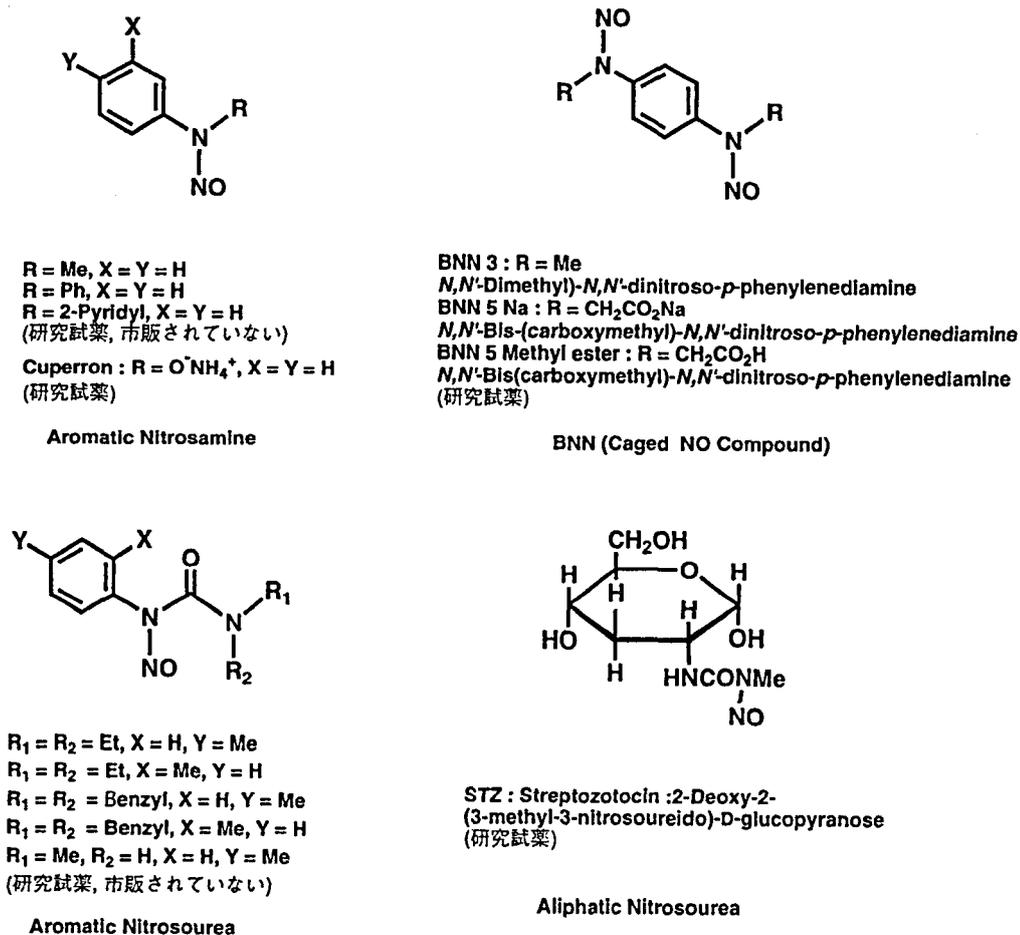


Fig. 8 N-Nitroso Compounds

れていたが^{43b)}、最近、筆者らは室温でもこれらの化合物がNOを発生することを明らかにした⁴⁴⁾。

N-ニトロソアミン類は熱的に安定であるため通常のNOドナーと比べNOを遊離しにくい。筆者らは逆にこの性質を利用して通常のNOドナーのNO発生速度 (NO発生能) の数10分の1程度のNO発生能を持つ*N*-ニトロソアミン類の開発を行ってきた。*N*-*t*-ブチル基、*N*-メチル基および*N*-フェニル基をもつ*N*-ニトロソアニリン類 (RN(NO)Ph, R=Bu, Me, Ph) のNO発生能を調べると、置換基 *t*-Bu < Me < Ph の順にNO発生能は増大する。これはN-NOのπ結合が芳香環 (Ph) のπ系と共役しやすい性質を与える置換基ほどN-NO結合はラジカル解裂を生じやすいことを示している。そこでフェニル基よりも電子吸引性基であるピリジル基を導入したニトロソ体 (PyN(NO)Ph) を各種合成した (Fig.8)。NO発生能はPhN(NO)Phよりも10-100倍に向上した⁴⁴⁾。この熱分解反応生成物も明らかにした (式3.8.1)。

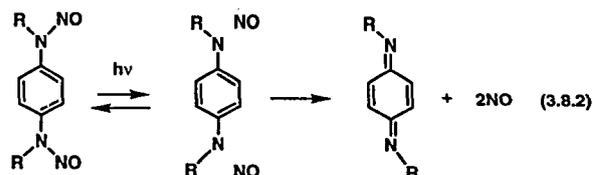
NOが作用部位と効率的に反応することが重要であると指摘されているが、筆者らの実験でも同様の結果を得ている。すなわち、培養した腫瘍細胞であるL-5178Y細胞の生育阻害効果を*N*-ニトロソアミン、*N*-ニトロソアミド、*N*-ニトロソ尿素を用いて調べた結果は、多くの化合物のNO発生能と細胞増殖阻害作用とが直線性を示す。しかし、NO発生能が特に高い化合物ではNO発生能と阻害作用が直線関係になかった。従って、生物に対する作用を調べるとき、徐放性や持続性があるNOドナーが、分野で要求される^{26a)}。特に細胞の代謝速度よりもNOドナーからのNO発生速度が大きいと、実験結果が正しく評価されない場合があり、徐放性や持続性は重要なファクターになる^{26a)}。この点で熱的に分解し徐放的にNOを放出する*N*-ニトロソアミン類も利用価値がある。



3.8.2 BNN類 (Caged NO化合物)

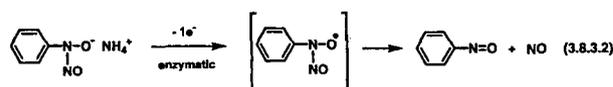
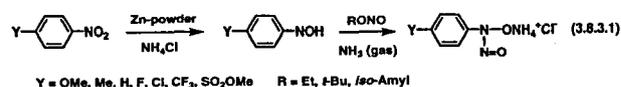
N-ニトロソ構造を有するCagedNO化合物、BNN (BNN 3, BNN 5 Na, BNA 5 Methylster など)⁴⁵⁾が最近報告された。これらの化合物は光を照射した時のみNOを発生する (式3.8.2)。光照射を利用するNOドナーの長所は、照射している間のみNOが発生するのでNOの発生量と条件をコントロールしやすい点である。特に、neurobiologyの分野では量子収率の高い化合物を用いてミリ秒でNOを高速発生させ、しかも、その発生量が制御できることが要求されるが、BNN類はその点で注目される。BNN 5 Naは水溶性である。また、脂溶性のBNN 3やBNN 5 Methylsterは細胞内に局在化し、後者は細胞内でエステラーゼで加水分

解され水溶性のBNN 5になる。



3.8.3 クペロン

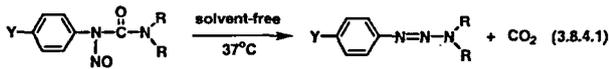
つい最近、古くから金属イオンの分析試薬として知られているクペロン (cupferron, *N*-ニトロソフェニルヒドロキシルアミンアンモニウム、別名パウディッシュ試薬) はNOを放出する性質を有することが報告された⁴⁶⁾。クペロンは*N*-ニトロソアミン構造にヒドロキシアミン構造もあわせ持つ化合物である。芳香族*N*-ニトロソアミン類としては数少ない水溶性化合物である。単純な構造の*N*-ニトロソフェニルヒドロキシルアミンアンモニウムは以前から市販されている。一般的な製法は、フェニルヒドロキシルアミン類に塩酸と亜硝酸ナトリウムを0°Cで反応させ、ろ過後、エーテル抽出液にアンモニアを加えるか、冷時、フェニルヒドロキシアミン誘導体を亜硝酸アミルとアンモニアで処理する⁴⁷⁾。種々のフェニルヒドロキシルアミン類の合成法とNO発生機構を含めると下記のようになる (式3.8.3.1; 式3.8.3.2)⁴⁶⁾。



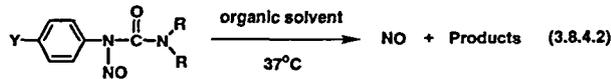
3.8.4 *N*-ニトロソ尿素誘導体

一般に芳香族*N*-ニトロソアミド、尿素類は熱的に不安定であり、NOドナーとしてよりもアリアルジアゾニウムを生成する化合物として研究されてきた。しかし、筆者らはジ置換およびトリ置換の*N*-ニトロソ尿素誘導体の分解反応を詳細に検討して、室温下でアリアルジアゾニウムを生成するよりもNOを放出する反応が優先する化合物を見出した (式3.8.4.1)。高温処理や光照射しなくても、N-NO bondはラジカル解裂しNOを遊離する。さらに、置換基の位置や種類を選択することによりジアゾニウムとNOを生成する反応を制御できる。さらに、溶媒を使用せずに室温放置するとNOでなく、CO₂を放出することができる (式3.8.4.2)⁴⁸⁾。

芳香族*N*-ニトロソ尿素のNO発生速度は芳香族*N*-ニトロソアミン類に比べ、10から100倍以上も大きい⁴⁴⁾。



R = Et, CH₂Ph, Y = H, Me



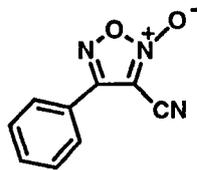
R = Et, CH₂Ph, Y = H, Me ; organic solvent = DMSO, EtOH, CHCl₃

3.8.5 脂肪族N-ニトロソ化合物

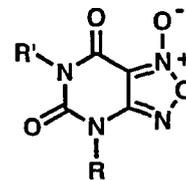
脂肪族N-ニトロソアミン、N-ニトロソアミドおよび脂肪族N-ニトロソ尿素が室温でNOを発生するという報告は現在のところない。筆者らの実験でもNO発生は認められていない⁴⁴⁾。しかし、光照射するとNOを発生する脂肪族N-ニトロソ尿素誘導体としてN-メチル-N-ニトロソ尿素構造を持つ抗生物質、ストレプトゾトシン (STZ) がNOドナーとして市販されている⁴⁹⁾。STZはDNAに対し強力なアルキル化剤として作用するが、一方リン酸緩衝液中で光を照射するとNOを遊離すると報告されている⁴⁹⁾。

3.9 N-オキシド類

N-オキシド構造に分類できるNOドナーとして、フロキサン類と1,2-ジアゼチジンN-オキシド類 (DD) がある。

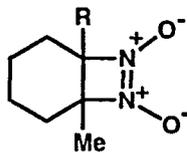


4-Phenyl-3-furoxan carbonitrile
(研究試薬)

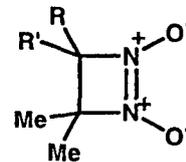


a : R = R' = Me b : R = Me, R' = H
c : R = H, R' = Me d : R = R' = H
(研究試薬, 市販されていない)

Furoxan



DD 1 : R = H : 4-Methyl-3,4-tetramethylene-
1,2-diazetidene di-N-oxide
DD 4 : R = Br : 3-Bromo-4-methyl-3,4-tetramethylene-
1,2-diazetidene di-N-oxide
(研究試薬, 市販されていない)



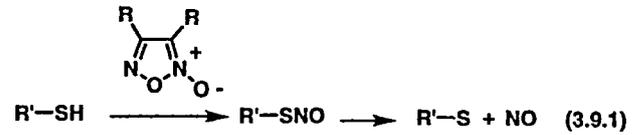
DD 2 : R = H, R' = Ph : 3,3-Dimethyl-4-phenyl-
1,2-diazetidene di-N-oxide
DD 5 : R = Br, R' = Me : 3-Bromo-3,4,4-trimethyl-
1,2-diazetidene di-N-oxide
(研究試薬, 市販されていない)

3,4-Dihydro-1,2-diazete 1,2-dioxide

Fig. 9 N-Oxide Derivatives

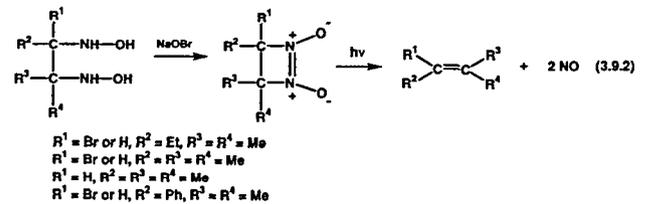
3.9.1 フロキサン類

フロキサンは血管拡張作用を示し、ニトロソチオール経路によりNOを放出する(式3.9.1)⁵⁰⁾。また、チオール無しでもNOを放出するフロキサン誘導体も合成されている。



3.9.2 1,2-ジアゼチジン-1,2-ジオキシド類

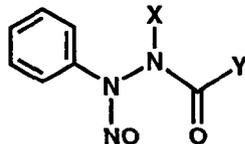
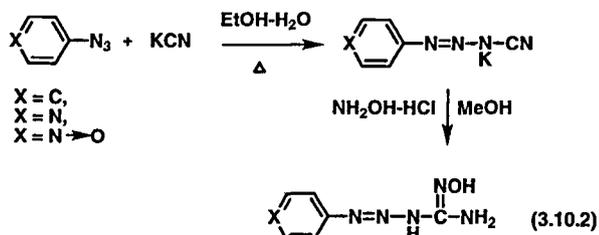
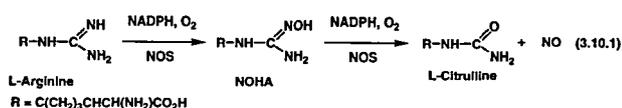
1,2-ジアゼチジン-1,2-ジオキシド類 (DD1, DD2, DD4, DD5) は、 α -ヒドロキシルアミンまたは1,2-ビスヒドロキシルアミンをNaOBrで酸化すると得られる(式3.9.2)。熱でや光でオレフィンと2分子のNOへ分解し、条件により発生速度が変化する⁵¹⁾。この化合物は血管拡張作用や血小板凝固阻止活性を示す⁵¹⁾。



3.10 グアニジン類 (RNHC(=NH)NH₂)

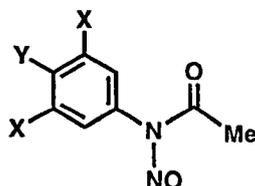
L-アルギニン⁵²は生体内にも存在し、NOS系により次に挙げるN^G-ヒドロキシ-L-アルギニン (NOHA) へ代謝を受け、さらに、L-シトルリンへ変換される過程でNOが生成する(式3.10.1)^{52, 53}。NOの生合成過程として有名である。市販されている。

NOHAが代謝によりNOを放出したことから、ヒドロキシグアニジノ基を持つ化合物(アミドキシム化合物)が注目された⁵⁴。NOHAは酢酸塩⁵⁵として、またヒドロキシグアニジンは硫酸塩⁵⁶として市販されている。水に良く溶ける。アミドキシム化合物は、ニトリルまたはシアナミドにヒドロキシルアミンを作用させて合成する。これらの化合物は自発的にNOを遊離しないが、NOHAがNOS系の助けで酸化的にNOを放出すると同じように、酸化剤が共存するとNOを出す⁵⁴。筆者らは、シアノトリアゼン類から同様にしてシアノトリアゼノアミドキシム誘導体を合成した(Fig.11: GroupIII, 式3.10.2)⁵⁷。これら誘導体は、一電子酸化剤によりNOHAの約3倍のNOを発生し(式3.10.2.3)、またラットの動脈平滑筋を弛緩することを確認した⁵⁸。これらの化合物は生体内でNOSやP-450系で酸化的代謝を受けてNOを放出することが期待できる。



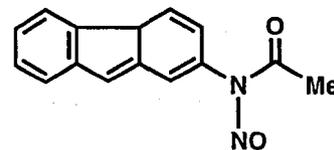
Nitroso-6a : X = Na, Y = Ph
Nitroso-10 : X = H, Y = N(Ph)₂
Nitroso-11 : X = H, Y = SO₃K
(研究試薬, 市販されていない)

N-Nitrosohydrazine

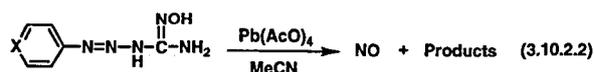


N-NO-DNAAP : X = NO₂, Y = OH
N-Nitroso-3,5-dinitro-acetaminophen
NAPT : X = H, Y = Me
N-Nitroso-aceto-p-toluidide
(研究試薬, 市販されていない)

Nitrosamide



N-NO-2-FAA :
N-Nitroso-2-fluorenylacetamide
(研究試薬, 市販されていない)



3.11 その他

研究途上のNOドナーとして、N-ニトロソヒドラジン類 (Nitroso-6a, -10, -11)^{59, 60}、N-ニトロソアミド類 (N-NO-DNAAP, NAPT, H-NO-2-FAA)⁶¹、最近開発されたNONOate構造を持つピペリジンジアゼニウムジオレート (R-N(CH₂)₂(CH₂)₂N-N(NO)=N-ONa, N(CH₂)₂(CH₂)₂N=ピペリジン環, R=カルボン酸エステル, 芳香環) などがある(Fig.11)⁶²。

4. まとめ

現在知られているNOドナーをNO発生に関与する官能基に基づいて分類し、それらの化学的性質やNO生成機構および市販の有無や製法などについてまとめた。良いNOドナーの条件としては、(a) 合成が容易であること、(b) 安定で純度の良い固体であること、(c) 生理的条件下で分解し、適当な速度でNOを定量的に放出すること、(d) 副生成物は毒性が低いことが挙げられる。最近では種々のNOドナーが提供されているが、それぞれ構造が異なり、水溶性や安定性等の性質も異なる。実験の目的に応じて使用するNOドナーを選ぶことはNOによる生物活性をより正しく評価することに対応するので重要である。

5. おわりに

これまで当研究所、有機化学部で合成し、研究中のNOドナー候補化合物(Fig.11)を図示した。

グループは三つに分けられる。室温下熱分解によりNOを遊離する各種芳香族N-ニトロソ化合物についてはグループIに示した化合物で水溶化と徐放化を意識し、水溶性官能基を導入したN-ニトロソ尿素類とピリジル基を持つN-

Fig. 10 Other N-Nitroso Compounds

ニトロソアミン類の合成を行った。さらにまたグループIIに示したようにスーパーオキシド (O_2^-) とNOを遊離するかさらにこれら活性種が反応し、ペルオキシ亜硝酸イオン ($ONOO^-$) を与える化合物も合成している。ONOO⁻はアポトシースとの関連で研究が盛んであるが、この不安定活性種を与える化合物としてシドノイミン類以外には知られていない。

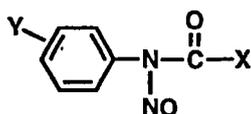
一方、NOHAは生体内でNOSによりL-アルギニンがL-シトルリンへ酸化されるときに生成する中間化合物であるが(式3.10.1)、この化合物はNOSの二段階関与によりNOを遊離し、L-シトルリンへ代謝される。これら一連の代謝経路に基づいて考えられたのがNOHAの部分構造を持つトリアゼノアミドキシム誘導体であり、NOSの代わりに適当な酸化剤により分解してNOを発生する(グループIII)。これらは酸化酵素により活性化されNOを発生する、いわゆ

る誘導活性化を狙った化合物である。筆者らは代謝活性化モデル化合物と呼んでいる。さらに、当部の福原らはニトロ基からのNOの生成を明らかにし、照射下でNOを発生する芳香族ニトロ化合物を見出している⁶³⁾。このような化合物の長所はBNN類の項でも述べたように照射の間だけNOを発生するのでNOの量や反応条件を制御できる点にある。今後、このタイプの化合物の研究の発展が望まれる。また、NOドナーから発生するNOを定量する測定法にはふれなかったが重要なので最後に最近の報告をあげた^{64, 65)}。

文 献

- 1) 大柳善彦：NOの生体内でのさまざまな役割，化学，化学同人，54，46-50 (1999)
- 2) 南山幸子，井上正康，NOの代謝動態-その様相と病態：

Group I

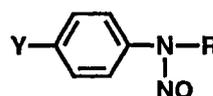
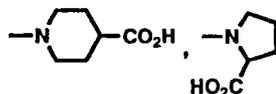


N-Nitrosamide, *N*-Nitrosourea

Y = Me, H, Cl

X = Me, NHR, NR¹R²,

R = Me, Et, Bn, Ph

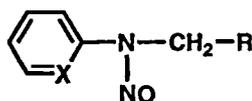


N-Nitrosamine

Y = Me, H, Cl

R = Me, Ph, 2-Pyridyl, 4-Pyridyl

Group II

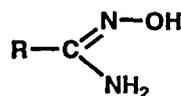


N-Nitrosamine

X = CH, N

R = CO₂Me, CO₂H, CN

Group III



Hydroxyguanidine

R = 2-Pyridyl, 4-Pyridyl, NMe₂, NPhMe,

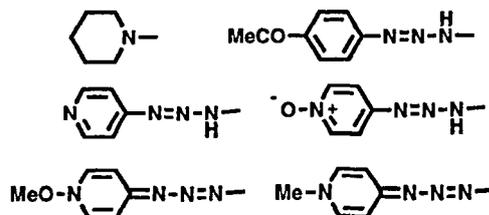


Fig. 11 NO Donors Prepared in Our Laboratory

- NO-化学と生物 (季刊化学総説 30), (日本化学会編), pp.143-150, 学会出版 (1996)
- 3) 伊藤幸夫: 新実験化学講座 8 無機化合物の合成 (I), (日本化学会編) 丸善, pp.224-225 (1991)
- 4) 中根正樹 特殊: NO 研究の最前線, NO 研究の新しい展開, 実験医学, 羊土社, 17, 914-917 (1999)
- 5) M. Tanno, S. Sueyoshi, N. Miyata and S. Nakagawa, *Chem Pharm. Bull.*, 44, 1849-1852 (1996)
- 6) S. Sueyoshi, M. Tanno and N. Miyata, *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, 115, 40-48 (1997)
- 7) a) 丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹: NO 産生化合物: NO-化学と生物 (季刊化学総説 30), (日本化学会編), pp.53-62, 学会出版 (1996); b) 丹野雅幸, 宮田直樹: 生体内で NO を発生する化合物, 現代化学, 東京化学同人出版 (4月号) pp.36-41 (1994)
- 8) 宮田直樹, 丹野雅幸: 生体内一酸化窒素 (NO) 実験プロトコール: NO ドナー, 共立出版 (2000)
- 9) Tullett, J. M. and Rees, D. D., *Molecular Biotechnology*, 11, 93-100 (1999)
- 10) 中沢久, 松下敏: 高血圧とカリウムチャンネルオープナー, *BIOmedica*, 8, 39-42 (1993)
- 11) a) 尾形強, 新実験化学講座 14, 有機化合物の合成と反応 (III), pp.1286 (1978) 丸善; b) 長哲郎, 佐藤伸, 幸田清一郎, 吉田忠雄, 高橋甫, 富永博夫: 共立化学ライブラリー 15: "NOx の化学" pp.97-105 (1978) 共立出版
- 12) M. Feelisch, *J. Cardiovascler Pharmacol.* 17 (suppl. 3), S25 (1991)
- 13) a) N. Bettache, J. E. T. Corrie, T. Carter, J. Williams and D. Ogden, *Biophys J* 64, A190 (1993); b) "NO research", Wako Pure Chemical Industries Ltd., Tokyo Japan, pp.10 (1994)
- 14) 後藤正文, 第 4 版 実験化学講座 17 無機錯体・キレート錯体, pp. 90-91 (1991) 丸善
- 15) 中原勝儼, 第 4 版 実験化学講座 17 無機錯体・キレート錯体, pp. 140 (1991) 丸善
- 16) a) A. F. Vanin, *FEBS Lett.* 289, 1 (1991); b) A. F. Vanin, I. V. Mlenkova, P. I. Mordvintcev and A. Mulsch, *Biokhymia (transl.)* 58, 1094 (1993); c) A. Mulsch, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin and R. Busse, *BBRC* 196, 1303 (1993); d) M. Feelisch, M. te Poel, R. Zamora, A. Deussen and S. Moncada, *Nature* 368, 62 (1994); e) A. L. Kleschyov, K. R. Sedov, P. I. Mordvintcev and A. F. Vanin, *BBRC* 202, 168 (1994)
- 17) a) Flitney, F. W., Megson, I. L., Flitney, D. E. and Butler, A. R.: *Br. J. Pharmacol.*, 107, 842-848 (1992); b) Matthews, E. K. Setaton, E. D., Forsyth, M. J. and Humphrey, P. P. A.: *Br. J. Pharmacol.*, 113, 87-94 (1994)
- 18) "ENCYCLOPEDIA CHIMICA 9", Kyoritsu Press, Tokyo, pp.840 (1964)
- 19) R.-E. Nitz and V. B. Fiedler, *Pharmacotherapy*, 7, 28 (1987)
- 20) H. U. Daeniker and J. Druey, *Helv. Chim. Acta.*, 45, 2462-2465 (1962)
- 21) a) N. Hogg, V. M. Darley-vsmer, M. T. Wilson and S. Moncada, *Biochem. J.*, 281, 419-424 (1992); b) H. Bohn and K. Schonafinger, *J. Cardiorac. Pharmacol.*, 14 (suppl.11) S6 (1989); c) D. T. Hess, S. I. Patterson, D. S. Smith and J. H. Skene, *Nature*, 366, 562-565 (1993)
- 22) a) 大柳善彦 (編): NO ラジカルの医学, 羊土社, pp.52-54 (1996); b) 大柳善彦 (著): NO と病気, 化学同人, pp.131-132 (1994); c) Feelisch, M., Ostrowski, J., Noak, E., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 14 (Suppl. 11), S13 (1989); d) Mato-Ranta, U., Yla-Herttuaia, S., Metsa-Ketala, T., Jaakkola, O., Moilanen, E., Vuorinen, P. and Nikkari, T.: *FEBS Lett.*, 337, 179-183 (1994); e) Vanin, A. F., *FEBS Lett.*, 289, 1-3 (1991)
- 23) 佐々木正, 新実験化学講座 14, 有機化合物の合成と反応(IV), p. 2259-2260 (1978) 丸善
- 24) L. Field, R. V. Dilts, R. Ravichandran, P. G. Lenhert and G. E. Carnahan, *J. Chem Soc. Chem. Comm.*, 1978, 249-250
- 25) T. W. Hart, *Tetrahedron Lett.*, 26, 2013-2016 (1985)
- 26) a) 片山佳樹: NO 放出薬と生物医学への応用, 最新医学, 52, 53-59 (1997); b) Singh, R. J., Hogg, N., Joseph, J. and Kalyanaraman, B., *J. Biol. Chem.*, 271, 18596-18603 (1996); c) Feelisch, M.: *J. Cardiovascler Pharmacol.*, 17 (suppl. 3), S25 (1991)
- 27) K. D. Croen, *J. Clin. Invest.*, 91, 2446 (1993)
- 28) E. A. Kowaluk and H-L Fung, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 255, 1256-1264 (1990)
- 29) S. Oae, D. Fukushima and Y. H. Kim, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1977, 407-408
- 30) B. Roy, A. M. d'Hardemare and M. Fontecave, *J. Org. Chem.*, 59, 7059-7026 (1994)
- 31) J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink and L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* 58, 1472-1476 (1993)
- 32) R. S. Drago and F. E. Paulik, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 96-98 (1960)
- 33) "NO Pathway", Dojindo laboratory, Kumamoto Japan, pp.7 (1994)
- 34) C. M. Maragos, J. M. Wang, J. A. Hrabie, J. J. Oppenheim and L. K. Keefer, *Cancer Res.* 53, 564-568 (1993)
- 35) Sakurai K., Terakawa S., Presented in part at the 71th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Takamasu, Japan, March 1994, Abstract, pp.133
- 36) Nishimura K., Okada T., Yamamura K., Koizumi S., Presented in part at the 67th Annual Meeting of the Pharmacological Society of Japan, Kyoto, Japan, March 1994, Abstract, pp.O-157
- 37) "NO Pathway", Dojindo laboratory, Kumamoto Japan, pp.10 (1994)
- 38) a) Fukuyama S., Kita Y., Hirasawa Y., Higashi T., Karatuchi N., Kouda S., Yasuda T., Sakurai H., *Xenobiotic Metabolism and Disposition*, 9 (suppl.), S239 (1994); b) Kita, Y., Ohkubo, K., Hirasawa, Y., Katayama, Y., Ohno, M., Nishino, S., Kato, M. and Yoshida, K., *Eur. J. Pharmacol.*, 275, 125-129 (1995)
- 39) 吉村哲彦 (著): NO 一酸化窒素, 共立出版, pp.113-120 (1998)
- 40) a) Hrabie, J. A., Klose, J. R., Wink, D. A., L. K. Keefer and L. K., *J. Org. Chem.*, 58, 1472-1476 (1993); b) 片山佳樹: NO 作用解明に有用な新しい自発的 NO ドナー, 別冊・医学のあゆみ, NO のすべて, 平田結喜緒編集, 医歯薬出

- 版, pp.35-40 (1996)
- 41) L. R. Makings and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **269**, 6282 (1994)
- 42) a) "NO research", Wako Pure Chemical Industries. Ltd., Tokyo Japan, Wako, pp. 9 (1994); b) "L-ARGININE-NITRIC OXIDE PATHWAY '95", Alexis corporation San Diego USA and Kokusankagaku Ltd. Tokyo Japan, 1995
- 43) a) P. Welzel, *Chem. Ber.*, **104**, 808-821 (1971); b) A. J. Buglass, B. C. Challis and M. R. Osborne, *IARC Sci. Publ.*, **9**, 94-100 (1974)
- 44) Tanno, M., Sueyoshi, S. and Miyata, N., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 595-598 (1997)
- 45) a) Namiki, S., Arai, T. and Fujimori, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3840-3841 (1997); b) Namiki, S., Kaneda, F., Ikegami, M., Arai, T., Fujimori, K., Asada, S., Hama, H., Kasuya Y. and Goto, K., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 1695-1702 (1999)
- 46) A. D. McGill, W. Zhang, J. Wittbrodt, J. Wang, H. B. Schlegel and P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 405-412 (2000)
- 47) "VORTARO DE ANALIZO KEMIO", Kyoritsu Press, Tokyo, Japan, pp.532-534 (1971)
- 48) a) Tanno M., Sueyoshi, S., Miya N., Presented in part at *International Chemical Congress of Pacific Basin Societies of Hawaii*, USA, Decemer 1995, Abstracts, Part I, pp.9 ORGN 544; b) Tanno M., Sueyoshi, S., Miya N., Presented in part at *International Symposium on Organic Reaction of Hsinchu*, Taiwan, November 1998, Abstracts, pp.283-284; c) Tanno M., Sueyoshi, S., Miya N., Presented in part at the *217th American Chemical Society National Meeting of California*, USA, May 1999, Abstracts, pp.MEDI 0033
- 49) a) Kroncke, K. D. and Fehsel, F.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **376**, 327-343 (1995); b) Kwon, N. S., Lee, S. H., Chul, C. S., Kho, T., and Lee, H. S.: *FASEB J.*, **8**, 529-533 (1994)
- 50) a) Ferioli, R., Folco, G. C., Ferretti, C., Gasco, A. M., Medana, Fruttero, R., Civelli, M. and Gasco, A.: *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 816-820 (1995); b) Sorba, G. Medana, C., Fruttero, R., Cena, C., Sttilo, A. D., Galli, U. and Gasco, A.: *J. Med. Chem.*, **37**, 463-469 (1997); c) Sako, M., Oda, S., Ohara, S., Hirota, K. and Maki, Y.: *J. Org. Chem.*, **63**, 6947-6951 (1998)
- 51) a) Severina, I. S., Belushkina, N. N. and Grigoryev, N. B.: *Biochem. Mol. Int.*, **33**, 957-967 (1994); b) Utepbergenov, D. I., Khramtsov, V. V., Vlassenko, L. P., Markel, A. L., Mazhukin, D. G., Tikhonov, A. Ya. and Volodarsky, L. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 1023-1032 (1995); c) 平田結喜緒: 治療薬としてのNO: NOと循環調節, (猿田享男, 平田結喜緒監修), 診断と治療社, pp.63-89 (1998)
- 52) H. H. H. W. Schmidt, T. D. Warner, K. Ishii, H. Sheng and F. Murad, *Science*, **255**, 721-723 (1992)
- 53) R. M. J. Palmer and S. Moncada, *BBRC*, **158**, 348-352 (1989)
- 54) J. M. Fukuto, *J. Med. Chem.*, **36**, 2666-2670 (1993).
- 55) P. Klatt, K. Schmidt, G. Uray and B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **268**, 14781-14787 (1993)
- 56) A. Zembowicz, T. A. Swierkosz, G. J. Southan, M. Hecker and J. R. Vane, *Br. J. Pharmacol.* **107**, 1001-1007 (1992)
- 57) a) M. Tanno, S. Sueyoshi, and S. Kamiya, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3125-3132 (1982); b) S. Kamiya and M. Tanno, *ibid.*, **28**, 529-534 (1980); c) M. Tanno and S. Kamiya, *ibid.*, **27**, 1824-1829 (1979)
- 58) a) Sueyoshi S., Tanno M., Hirano K., Fukuhara K., Miyata N., Presented in part at the *115th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan*, Sendai, Japan, April 1995, Abstract, pp.22; b) Sueyoshi S., Tanno M., Hirano K., Miyata N., Ono K., Satake M., *Magnetic Resonance in Medicine*, **7**, 230-232 (1996)
- 59) Rehse, K. and Koenig, P.: *Arch. Pharm.*, **328**, 137-142 (1995)
- 60) Wang, J.-M., Lin-Shiau, S.-Y. and Lin, J.-K.: *Biochem. Pharmacol.*, **45** (4) 819-825 (1993)
- 61) a) 大柳善彦 (著): NOと疾患, 医歯薬出版, pp.123-124 (1994); b) Makings, L. R. and R. Y. Tsien, R. Y.: *J. Biol. Chem.*, **269**, 6282-6285 (1994)
- 62) Saavedra, J. E., Booth, M. N., Hrabie, J. A., Davies, K. M. and Keefer, L. K.: *J. Org. Chem.*, **64**, 5124-5131 (1999)
- 63) Fukuhara K., Miyata N., Presented in part at the *28th Annual Meeting of the Environmental Mutation Society (EMS Japan)*, Gifu, Japan, 1999, Abstract, pp.118
- 64) 小島宏建, 長野哲雄: NO研究の研究最前線, NO判定法の新展開, 実験医学, 羊土社, **17**, 946-950 (1999)
- 65) 片山佳樹: NO測定法, ふんせき, **5**, 252-258 (2000)