

亜硝酸ナトリウムの経口補給による循環器・呼吸器疾患モデル
に対する臓器保護効果

藺田 邦博

目次

緒言	5
第 1 章 亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と NO 産生に対する主要因子の同定	9
第 1 節 はじめに	9
第 2 節 内因性 NO 不足高血圧ラットに対する亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用	11
2-1 内因性 NO 不足高血圧モデルラットの作成と検討	11
2-2 亜硝酸ナトリウムの経口および静脈内投与における血圧降下作用	12
2-3 亜硝酸ナトリウムとその他の NO 供与体の血圧降下作用の比較	16
第 3 節 亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に関する主要因子の同定	18
3-1 亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用に対する ALDH2 と XO の影響	18
3-2 亜硝酸ナトリウムの体内動態に対する ALDH2 と XO の影響	25
第 4 節 小括	30
第 2 章 亜硝酸ナトリウムの補給による循環器疾患モデルに対する臓器保護作用	32
第 1 節 はじめに	32
第 2 節 亜硝酸ナトリウムの補給による血圧への影響と体内への供給量	35
第 3 節 亜硝酸ナトリウム補給による心臓の肥大および線維化抑制効果	38
第 4 節 亜硝酸ナトリウム補給による心臓リモデリング抑制メカニズム	43
4-1 NO 不足による RAS シグナルおよび NO の作用メカニズムの考察	47
第 5 節 食事由来の硝酸塩や亜硝酸塩の代謝経路と人における摂取量	49
第 6 節 小括	51

第 3 章 亜硝酸ナトリウムの補給による呼吸器疾患モデルに対する臓器保護作用	53
第 1 節 はじめに	53
第 2 節 肺機種モデルへの亜硝酸ナトリウムの補給による体重変化と供給量	55
第 3 節 亜硝酸ナトリウムの補給による肺気腫の病変抑制効果	57
第 4 節 亜硝酸ナトリウムの補給による肺気腫病態悪化抑制メカニズム	58
第 5 節 小括	64
総括	66
実験の部 目次	70
第 1 章 実験方法	71
第 2 章 実験方法	76
第 3 章 実験方法	80
参考文献	83
謝辞	98

略語一覧(a-z 順)

ACE : Angiotensin converting enzyme

ALDH2 : Aldehyde dehydrogenase 2

ATII : Angiotensin II

AT1R : Angiotensin II receptor type 1

AUC : Area under the curve

CaM : Calmodulin

COPD : Chronic obstructive pulmonary disease

cAMP : Cyclic adenosine monophosphate

cGMP : Cyclic guanosine monophosphate

N₂O₃ : Dinitrogen trioxide

DEA / NO : Diethylamine nonoate

Deoxy-Hb : Deoxy-hemoglobin

Deoxy-Mb : Deoxy-myoglobin

EDRF : Endothelium-derived relaxing factor

eNOS : Endothelial nitric oxide synthase

ECM : Extracellular matrix

NTG : Glyceryl trinitrate

iNOS : Inducible nitric oxide synthase

MAP : Mean arterial blood pressure

nNOS : Neuronal nitric oxide synthase

NO : Nitric oxide

L-NAME : N^o-nitro-L-arginine methyl ester

NOS : Nitric oxide synthase

PDE : Phosphodiesterase

PKA : Protein kinase A

PKC : Protein kinase C

PKG : Protein kinase G

ROS : Reactive oxygen species

RAS : Renin-angiotensin system

sAC : Soluble adenylate cyclase

sGC : Soluble guanylate cyclase

TGF- β 1 : Transforming growth factor- β 1

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

XO : Xanthine oxidase

緒言

1977年にMuradらは、狭心症の治療薬であるニトログリセリン（NTG）の血管拡張作用が一酸化窒素（NO）を介した機序であることを証明した。さらに、FurchgottとIgnarroらが血管内皮細胞から分泌される内皮由来血管拡張因子（EDRF）を発見し、その正体がNOであることを明らかにして以来、NOに関する研究は盛んに行われてきた。

生体内のNOは、アミノ酸であるL-アルギニンとNO合成酵素（NOS）により産生される。NOSは、発現場所により3つのアイソザイムが知られており、血管内皮細胞に存在する内皮型NOS（eNOS）、神経細胞に存在する神経型NOS（nNOS）、炎症系細胞の活性化により誘導される誘導型NOS（iNOS）がある^{1,2}。前者の2つは、生体の恒常性の維持に不可欠な存在であり、特に血管内皮障害によるeNOSの活性低下や発現低下によるNO産生低下は、様々な疾患の発症や病態の進行に深く関ることが知られている。Tsutsuiらは、すべてのNOSを欠損させたノックアウトマウスを作り出した³。この動物では、内臓脂肪の増加、インスリン抵抗性、脂質代謝異常などメタボリックシンドロームを引き起こし、動脈硬化から急性心筋梗塞による死亡率を上げることを明らかにしており、動脈硬化や心筋梗塞発症要因の1つにアンジオテンシンII受容体1型（AT1R）を介する経路があることを示唆している⁴。このことから、NOの産生低下を防ぐことは疾患の発症や病態の進展を抑制するために重要である。

現在、NO供与体として臨床的に使用されている薬剤にはNTG、亜硝酸アミル、硝酸イソソルビドなどがある。一方、これまで食品成分については直接NOを供給できるものは発見されていなかった。Tsuchiyaらは、2000年にラットに亜硝酸塩の安定同位体を飲み水中に加え経口投与することにより、生体内で亜

硝酸塩が NO に還元されることを証明しており⁵、亜硝酸塩が新たな NO 供給源としての役割を果たす可能性を示唆している⁶。このことから、これまで生体内で産生された NO の代謝産物（酸化物）とされてきた亜硝酸塩は、近年 NO 不足におけるバックアップシステムやオンデマンドの NO 供与体としての役割が注目されるようになった。

しかしながら、亜硝酸塩は加熱した食肉中に含まれる 2 級アミンと反応することで発がん性のあるニトロソアミンを形成することから有害物質として広く認識されてきた。ところが、人が摂取している亜硝酸塩の大部分は、野菜や果物中の硝酸塩由来であり、野菜や果物に含まれる硝酸塩や亜硝酸塩に関する発がん性の報告はない⁷ことから、2008 年に FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）において、「人が飲み水や食事から摂取する量の硝酸塩における発がん性については根拠不十分である」と報告している。

Fig. 1 に示したように亜硝酸塩からの NO 産生は硝酸塩から腸-唾液循環を介して恒常的に行われている。この経路は、野菜や果実から摂取した硝酸塩が生体内に吸収された後、約 70%は尿中から、約 5%は不感蒸泄（汗、呼吸による物など）により体外に排泄される。しかし、残りの 25%は唾液中に分泌され再び口腔内の微生物により亜硝酸塩に変換される⁸。亜硝酸塩は、さらに小腸から吸収され生体内で酵素・化学的に還元され NO を産生して生理作用を示す。興味深いことに、通常のマウスに亜硝酸塩や硝酸塩を除いた食事を慢性的に与えることでメタボリックシンドロームと同様の症状を発症し、生存率が低下する（約 80%が心筋梗塞により死亡）⁹。すなわち、硝酸塩や亜硝酸塩の摂取不足が代謝異常を引き起こし、様々な疾患の発症の引き金になることを示唆している。

しかし、食事由来の亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に関する主要因子や循環器・呼吸器疾患に対する有効性などは解明されていない（Fig. 1）。

そこで、本研究では亜硝酸ナトリウムからの NO 産生機序を明らかにし、食事からの亜硝酸ナトリウムの補給による循環器疾患および呼吸器疾患に対する臓器保護効果を明らかにすることを目的に、次の (1) から (3) について検討した。

(1) 様々な疾患を起因することが知られている血管内皮障害を想定して、内因性 NO 合成阻害剤の *N*-omega-L-arginin methyl ester (L-NAME) を処置した NO 不足による高血圧モデルラットを用い亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用について検討を行った。さらに、亜硝酸ナトリウムからの NO 産生の主要因子を明らかにするため、NTG からの NO 産生に関与していることが知られているミトコンドリアアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) および虚血下において亜硝酸塩から NO を産生することが報告されているキサンチン酸化酵素 (XO) に着目して、正常な酸素環境下における亜硝酸塩からの NO 産生に対する ALDH2 と XO の影響について血圧降下作用を指標として検討を行った¹⁰。

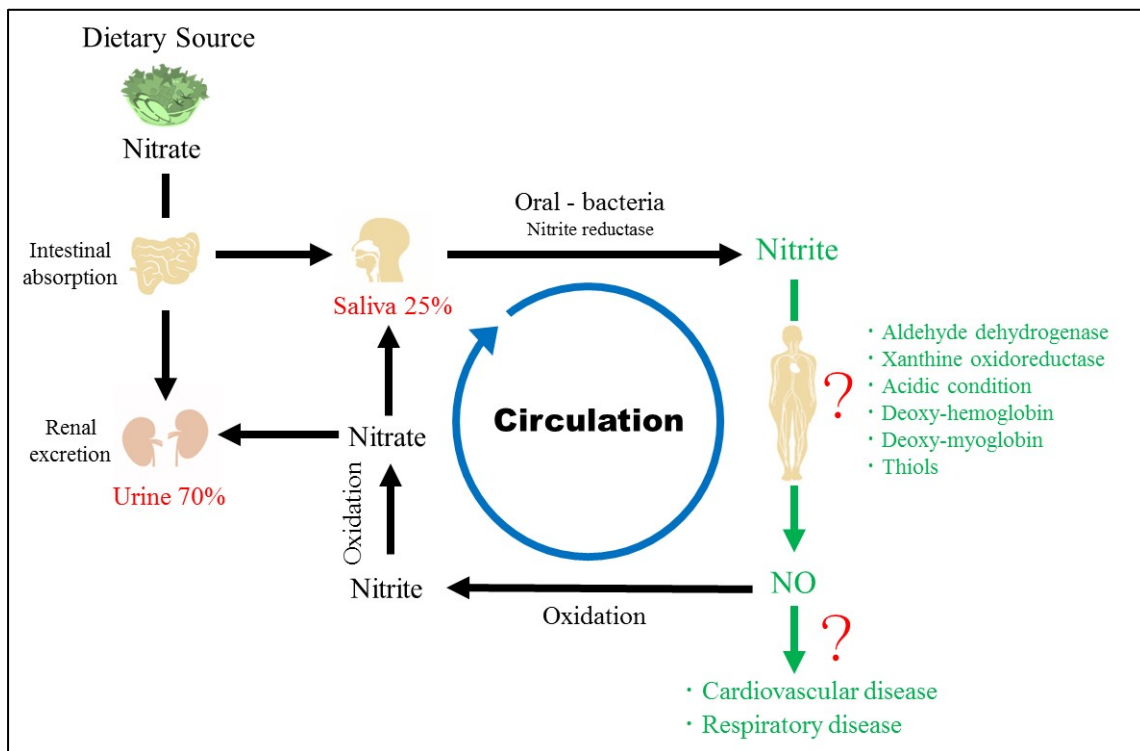
(2) 慢性的な NO の不足は、血圧の上昇とレニン-アンギオテンシン系 (RAS) の活性化を介して心臓のリモデリング (心臓肥大や心筋の線維化など) を誘発することが知られている。そこで、(1) と同様に L-NAME により内因性 NO を阻害した NO 不足高血圧モデル動物を用いて、慢性的な亜硝酸ナトリウムの経口補給による心臓リモデリング抑制効果とその抑制メカニズムについて検討を行った¹¹。

(3) 上記の (1) と (2) の研究から NO の不足が伴う高血圧や循環器疾患に対して亜硝酸ナトリウムの経口補給が血圧降下作用を示し、臓器保護的に働くことを明らかにした。しかし、NO の不足が伴わない疾患に対する亜硝酸ナトリウムの経口補給による影響については不明である。我が国の器官別の死因は新生物系疾患、循環器疾患に続き呼吸器系疾患となっている。そこで現在、食事療法が確立されておらず患者数が増加している慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に着目

した。COPD は、炎症による肺胞破壊により肺気腫が起因される疾患である。一方、亜硝酸ナトリウムは NO を介して抗炎症作用を示すことが報告されていることから COPD の主要な病態である肺気腫に対しても亜硝酸ナトリウムの経口補給が有効であると仮説を立てた。そこで、たんぱく質分解酵素であるエラスターゼ処置による肺気腫モデル動物を作成して亜硝酸ナトリウムの経口補給による有効性と肺気腫抑制メカニズムについて検討を行った¹²。

以上の (1) から (3) の研究で得られた知見は、循環器・呼吸器系疾患に対する硝酸塩や亜硝酸塩摂取の有効性 (野菜や果物の摂取の有効性) を示すことができ、臨床的に応用可能な新規食事療法の開発や硝酸塩や亜硝酸塩の基礎研究の発展に役に立つ情報を提供できると考える。

Fig. 1 The enterosalivary Nitrate-Nitrite-Nitric oxide pathway.



第1章 亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用とNO産生に対する主要因子の同定

第1節 はじめに

現在、わが国の高血圧者数は推定約4,000万人いるとされており、高血圧が原因となる心疾患や脳血管疾患は死因の上位に入っている。高血圧は、原因が明らかな二次性高血圧と原因不明の本態性高血圧の二つに分けられるが、9割が後者の本態性高血圧である。本態性高血圧の発症原因は不明なものの食塩摂取過多による体液量の増加、RASの活性化、血管内皮障害によるNOの産生低下などが関与すると考えられている。

亜硝酸塩は、生理学的な酸性環境下や低酸素条件下でNOを産生する¹³ことから病理学的な虚血状態において重要なNO供給源になると考えられている¹⁴⁻¹⁷。これは、亜硝酸塩由来のNOが虚血再灌流による心臓、肝臓、脳の臓器傷害から臓器を保護するという報告からも裏付けられている¹⁸。亜硝酸塩からの化学的・酵素的なNOまたはNOを介したシグナル伝達物質への変換経路には、次のような報告がある。まず、胃内のような酸性環境下における還元があり¹⁹、この還元は亜硝酸塩のプロトン化を介して起こり、 N_2O_3 と平衡状態にある亜硝酸を生成し、その後Homolysisを経てNOを生じる。しかし、これらの反応は胃内や皮膚表面のような酸性pHのみで起こる。さらに、還元型ヘモグロビン(Deoxy-Hb)²⁰、還元型ミオグロビン(Deoxy-Mb)¹⁴などのHeme(鉄イオンを含む)を含むグロビンたんぱく質による還元やXO²¹、ミトコンドリアのCytochrome cやCytochrome c oxidaseなどの酵素を介する酵素系による還元が報告されている²²。また、Heme、Iron-sulfur cluster、Molybdenum含有酵素などによる亜硝酸塩の還元作用は低酸素環境下で起こりやすく、さらにpHが低下した酸性環境下になると亜硝酸塩の還元がより効率的に行われる。したがって、虚血などの低酸素環境下では血管拡張および臓器保護のために複数の酵素系が亜硝酸塩からのNO産

生に関与している。しかしながら、生理的な pH および正常酸素環境下における亜硝酸塩から NO への変換に対する各種タンパク質や酵素系の影響については解明されていない。

最近、亜硝酸塩が生理的 pH や正常酸素環境下において動脈と静脈の酸素勾配を利用して NO を産生し、血管拡張作用を示すことが示唆されている^{20,25,26}。また、Chen らは、ミトコンドリアに存在するアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) が NTG を 1,2- glyceryl dinitrate (1,2-GDN) と亜硝酸塩に変換することを示した²⁵ が、その後 NTG からの NO への変換に対する ALDH2 の影響を示した報告はない。

血管内皮障害を伴う病態では、eNOS の活性や発現が低下することで NO 産生量も低下し、疾患の発症や病態を招く。一方で、亜硝酸塩は虚血性ストレスだけでなく、冠状動脈疾患や肺高血圧症を含む心血管疾患患者の血管拡張薬としての臨床試験も行われている^{26,27}。そのため、正常な酸素環境下における亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用や NO 産生メカニズムに関する基礎的な知見は非常に重要である。

これらのことから筆者は、正常酸素環境下においても生体内に普遍的に存在する ALDH2 や XO などの酵素が亜硝酸ナトリウムを還元することにより NO を産生し、NO を介した血圧降下作用を示すと仮説を立てた。そこで本研究では、正常酸素環境下における in vivo での亜硝酸ナトリウムによる血圧降下作用と亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に関わる主要因子を同定することを目的に研究を行った。

第2節 内因性 NO 不足高血圧ラットに対する亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用

2-1 内因性 NO 不足高血圧モデルラットの作成と検討

生体内では L-arginine を基質として NOS により、血管内皮細胞や神経細胞で常に NO が産生されていることから生体内で作られた内因性 NO と食事などから取り入れた亜硝酸ナトリウム由来の外因性 NO を区別することは難しい。そこで本研究では、この内因性 NO と外因性 NO を区別するとともに老化や各種疾患（心血管疾患、糖尿病、脂質代謝異常症など）で見られる血管内皮障害による NO 産生低下を想定して研究を行うため、Sprague-Dawley (SD) 系の雄性ラットに L-NAME (1 g/L) を飲み水中に加え 3 週間与え内因性の NO が不足した高血圧モデルラットを作成した。

本モデル動物が実験に適しているか確認するため、平均動脈血圧 (MAP) および血漿中の亜硝酸イオン濃度と硝酸イオン濃度を測定した。その結果、Table 1 に示したように Control ラットに比べ有意な血圧上昇が認められ、血漿中の亜硝酸イオン濃度や硝酸イオン濃度も低下していたことから、本モデル動物を以降の研究に用いることにした。

Table. 1 L-NAME-induced hypertension and plasma nitrite and nitrate concentration.

Group	MAP(mmHg)	Plasma nitrite (NO ₂)	Plasma nitrate (NO ₃)
Control rats	108.5 ± 4.2	0.33 ± 0.01	12.3 ± 0.67
L-NAME-treated rats	154.9 ± 3.0 *	0.19 ± 0.02 *	2.8 ± 0.14 *

The values are the means ± SE ($n = 9$ to 22). * $P < 0.05$ v.s. control rats.

MAP: mean arterial blood pressure

2-2 亜硝酸ナトリウムの経口および静脈内投与における血圧降下作用

亜硝酸ナトリウムを投与することで血圧降下作用を示すことは報告されていたが、内因性 NO 産生を阻害した正常酸素環境下における亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用の詳細は不明であった。そこで、L-NAME 誘発性の高血圧モデル動物に生理食塩水 (Saline) および亜硝酸ナトリウムを 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/kg の投与量で経口投与した際の血圧を測定した。血圧の測定は、直接動脈の血圧を測定できるカテーテル法により行い 60 分間の血圧を連続的に記録し、MAP を用いて解析・評価を行った。

Fig. 3 に示したように亜硝酸ナトリウムの経口投与すると投与量依存的に血圧降下作用が増強した。この血圧降下作用は、0.05 mmol/kg では、亜硝酸ナトリウム投与前の血圧よりも血圧が高くなったが、これは一過的な血圧低下にともなうリバウンド (昇圧因子の影響) が原因であると考えられた。低濃度の亜硝酸ナトリウム投与 (0.1 - 0.2 mmol/kg) においては、投与後 10 分程度で血圧が最も低下したが、時間の経過と共に初期血圧と同程度まで回復した。しかし、高濃度あゝの亜硝酸ナトリウム投与 (0.4 mmol/kg 以上) では、血圧降下作用が 1 時間以上持続した。このことから、亜硝酸ナトリウムの経口投与においても十分な血圧降下作用を示すことがわかった。しかし、亜硝酸塩からの NO 産生は前に述べたように胃内酸性環境下でも起こることが知られており、経口投与では吸収過程があるため生体内に取り込まれた亜硝酸塩による血圧降下作用であるかは明確にできていない。そこで、次の実験では、胃内酸性環境や吸収の影響を伴わない静脈内投与における亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用について検討した。

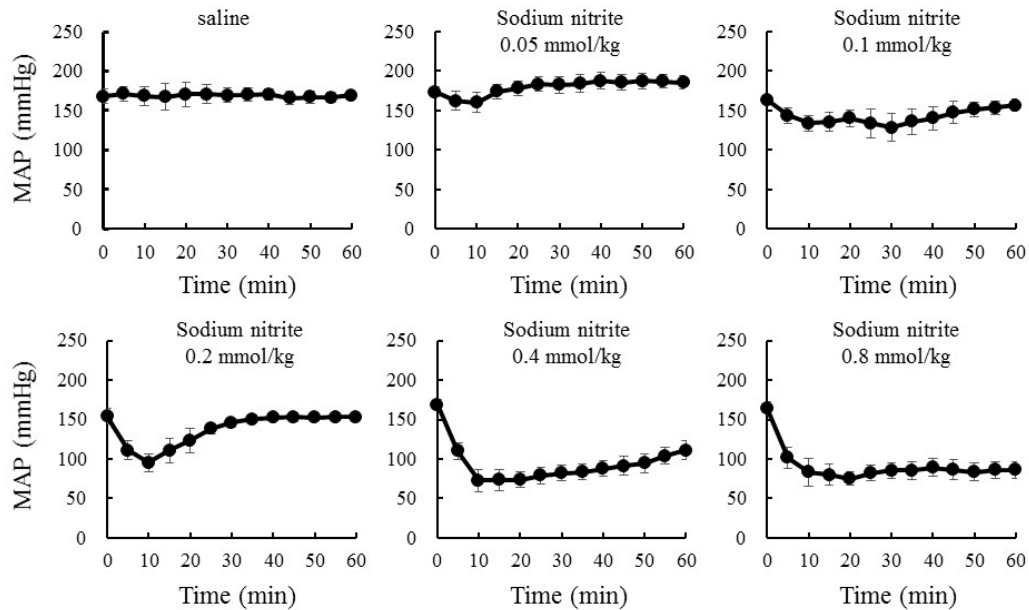


Fig. 3 Time course of the MAP in response to oral administration of sodium nitrite in L-NAME-induced hypertension rats. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6).

MAP: mean arterial blood pressure

Saline または亜硝酸ナトリウムを 17, 50, 150 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の投与量で静脈内投与し、経口投与と同様にカテーテル法で血圧を測定して解析・評価した。

Fig. 4 に示したように亜硝酸ナトリウムの静脈内投与による血圧降下作用は、経口投与と同様に投与量依存的な血圧降下作用を示し、投与後 60 分には初期血圧付近まで回復した。亜硝酸ナトリウムは、胃内酸性条件下において NO を産生することが知られているが、本研究では同じ投与量であれば経口投与 (0.05 mmol/kg = 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) に比べ静脈内投与 (50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) で強い血圧降下作用を示した。この経口投与と静脈内投与による血圧降下作用の違いは、経口投与では吸収過程があるため亜硝酸ナトリウムの体内への取り込みが緩やかであることが影響していると考えられた。しかしながら、静脈内投与において血圧降下作用を示したことから、経口的に摂取した大部分の亜硝酸ナトリウムは生体内に取り込まれたあと NO に変換され血圧降下作用を示すことが示唆された。

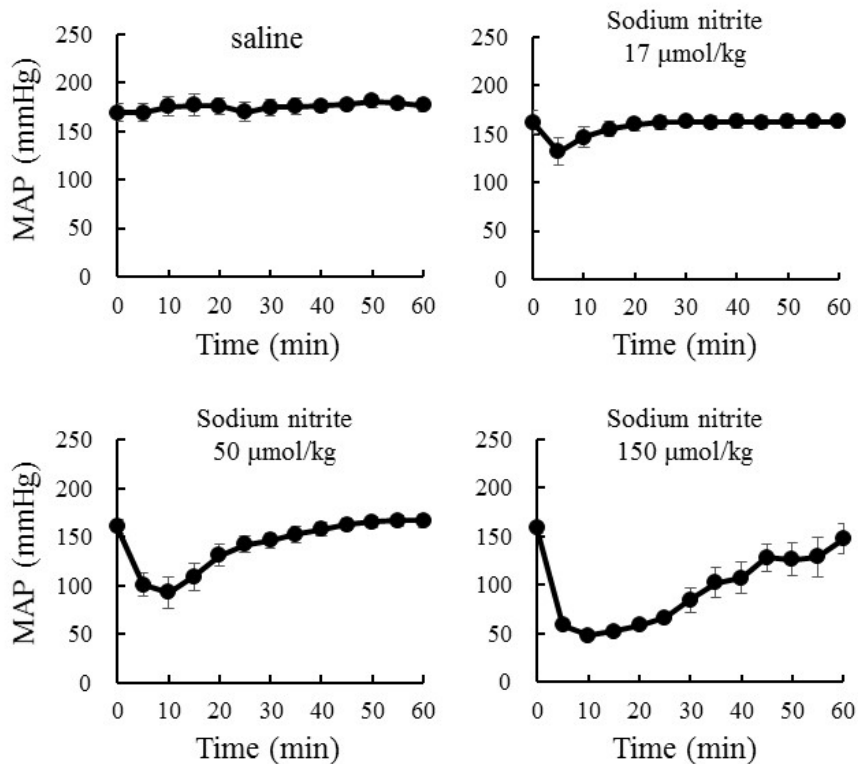


Fig. 4 Time course of the MAP in response to intravenous administration of sodium nitrite in L-NAME-induced hypertension rats. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6). MAP: mean arterial blood pressure

亜硝酸ナトリウムの経口投与と静脈内投与の血圧降下作用をさらに評価するため、初期血圧から最も血圧が低下した値を用いて最大血圧低下率（% drop of MAP）を算出した。さらに、時間概念を取り入れた血圧の圧力-時間曲線下面積（AUC of MAP）を算出した。その結果、経口投与と静脈内投与の% drop of MAP および AUC of MAP は、投与量の増加に伴い増大した（Fig. 5）。このことから亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用は、経口及び静脈内投与のどちらにおいても投与量依存的な作用を示すことがわかった。また、AUC of MAP を基に Hill plot 法で ED_{50} を算出したところ経口投与（ 0.22 mmol/kg ）であり、静脈内投与では $50 \mu\text{mol/kg}$ で経口投与と同等の血圧降下作用を示した。

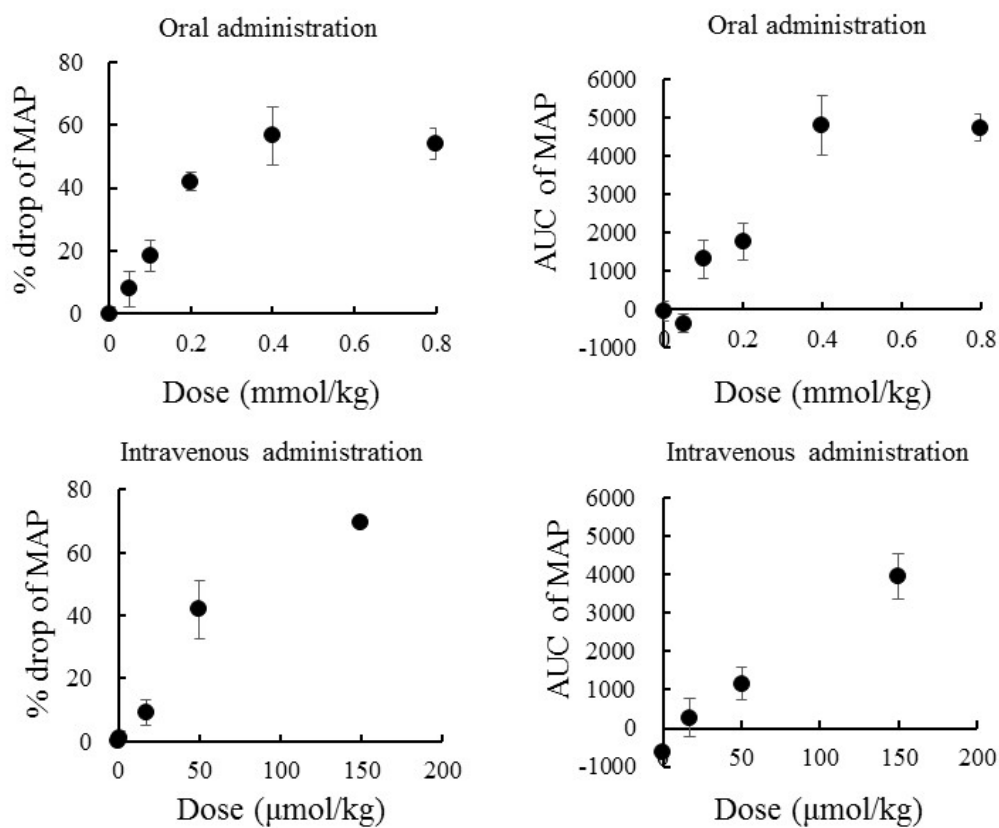


Fig. 5 Analysis of % drop of MAP and AUC of MAP to hypotensive effect of oral and intravenous administration sodium nitrite. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6). MAP: mean arterial blood pressure, AUC: area under the curve

2-3 亜硝酸ナトリウムとその他の NO 供与体との血圧降下作用の比較

亜硝酸ナトリウムと、その他の NO 供与体の血圧降下作用を比較するため狭心症治療薬として臨床的に広く用いられている NTG（生体内で還元され NO を産生する）と生体内で変換を伴わず直接 NO を放出する自発的 NO 供与体の Diethylamine nonoate (DEA/NO) を用いて検討を行った。NTG の投与量は、0.01, 0.1, 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、DEA/NO は 0.01, 1, 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ に設定した。血圧の測定は、これまでと同じカテーテル法で行い NTG または DEA/NO を静脈内投与した後、60 分間の血圧を測定して解析・評価した。Fig. 6 に示したように NO 供与体である NTG と DEA/NO の血圧降下作用は亜硝酸ナトリウムと同様の血圧降下作用を示した。さらに、NTG に関しては亜硝酸ナトリウムや DEA/NO の AUC of MAP と同等の効果を示した投与量は 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ であった。このことから、亜硝酸ナトリウムが NTG と同様の血圧降下作用を示すためには投与量を 2 から 3 オーダー多くする必要がある。

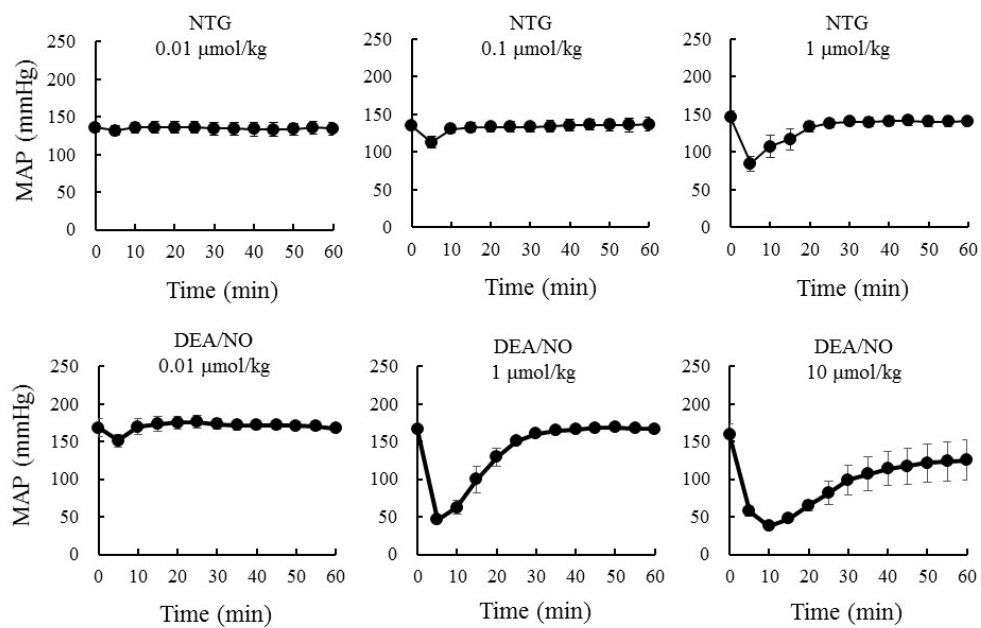


Fig. 6 Time course of the MAP in response to NO donor (NTG or DEA/NO) in L-NAME-induced hypertensive rats. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6).

MAP: mean arterial blood pressure, NTG: nitroglycerin

第3節 亜硝酸ナトリウムからのNO産生に関する主要因子の同定

3-1. 亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用に対するALDH2とXOの影響

第2節では、in vivoにおける正常酸素環境下および生理的pHにおける亜硝酸ナトリウムの経口投与および静脈内投与の血圧降下作用への影響を明らかにした。これまで、亜硝酸塩からのNOまたはNO様物質への変換に関する研究は、血圧降下作用と同様に in vitro や虚血（低酸素環境下や酸性環境下）などの病態下での研究報告が多く、in vivoによる正常酸素環境下や生理的pHにおける亜硝酸ナトリウムからのNO産生に関しては調査されていなかった。そこで本研究では、正常酸素環境下における亜硝酸ナトリウムからのNO産生に関する主要因子の明らかにすることを目的に研究を行った (Fig. 7)。

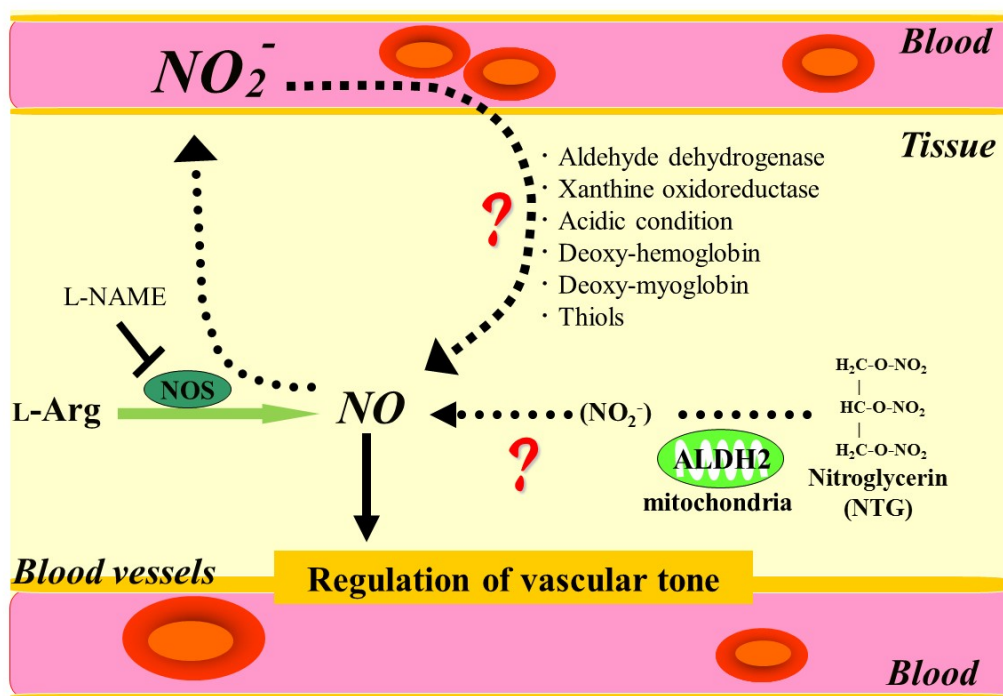


Fig. 7 Effect of ALDH and XO involved in NO production from nitrite in normoxic under the L-NAME-induced hypertension rats?

ALDH の阻害剤は数多く存在するが、本研究では ALDH2 の阻害剤として Cyanamide、XO の阻害剤として Allopurinol を用いた^{27,28}。この2つの阻害剤は、一般によく研究で使用されており²⁹⁻³⁷、Kera ら³⁸により、Cyanamide と Allopurinol は、それぞれ XO と ALDH のお互いの酵素活性に対してほとんど阻害効果を示さないことが報告されている。また、本研究においては ALDH2 阻害剤を Cyanamide だけでなく異なる作用機序で ALDH2 を阻害する Chloral hydrate を用いて検討を行った。

本実験では、Saline、ALDH2 阻害剤である Cyanamide (25 mg/kg, i.v.) または Chloral hydrate (66 mg/kg, i.v.)、XO 阻害剤である Allopurinol (100 mg/kg, i.p.) を前処置することで酵素を十分に阻害した後、亜硝酸ナトリウム、NTG、DEA/NO を静脈内に投与して 60 分間の血圧を測定した。血圧測定は、これまで同様にカテーテル法により実施した。

Cyanamide 処置により亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用は抑制されたものの亜硝酸ナトリウムの投与量を増加させると血圧降下作用に対する抑制効果は減弱した (Fig. 8-A)。XO は、嫌気性環境下における亜硝酸塩からの NO 産生に深く関与している^{28, 39}が、正常酸素環境下では XO を阻害しても 17 μ mol/ kg の亜硝酸ナトリウム投与による血圧降下作用を完全に抑制することはできなかった (Fig. 9-A)。しかし、投与量 50 μ mol/ kg と 150 μ mol/ kg では、亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用を一部阻害した (Fig. 9-A)。したがって、少なくとも 50 μ mol/ kg と 150 μ mol/ kg 用量においては正常酸素環境下での亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に XO が部分的に関与することが示唆された。

一方で、自発的な NO 供与体である DEA/NO の血圧降下作用については、ALDH2 と XO の阻害のどちらの影響も受けなかった (Fig. 8-C, 9-C)。これは、NO 供与体である DEA/NO が ALDH2 や XO などの酵素活性に関わらず直接的に

NO を産生して血圧降下作用を示したためである。さらに、ALDH2 によって変換され血圧降下作用を示すことが知られている NTG は、Cyanamide の処置により血圧降下作用がほぼ完全に抑制した (Fig. 8-B) が、Allopurinol による XO 阻害の影響は受けなかった (Fig. 9-B)。この結果は、これまでに報告された研究結果と一致しており NTG が ALDH2 により NO に変換され生理作用を示したと考えられた。

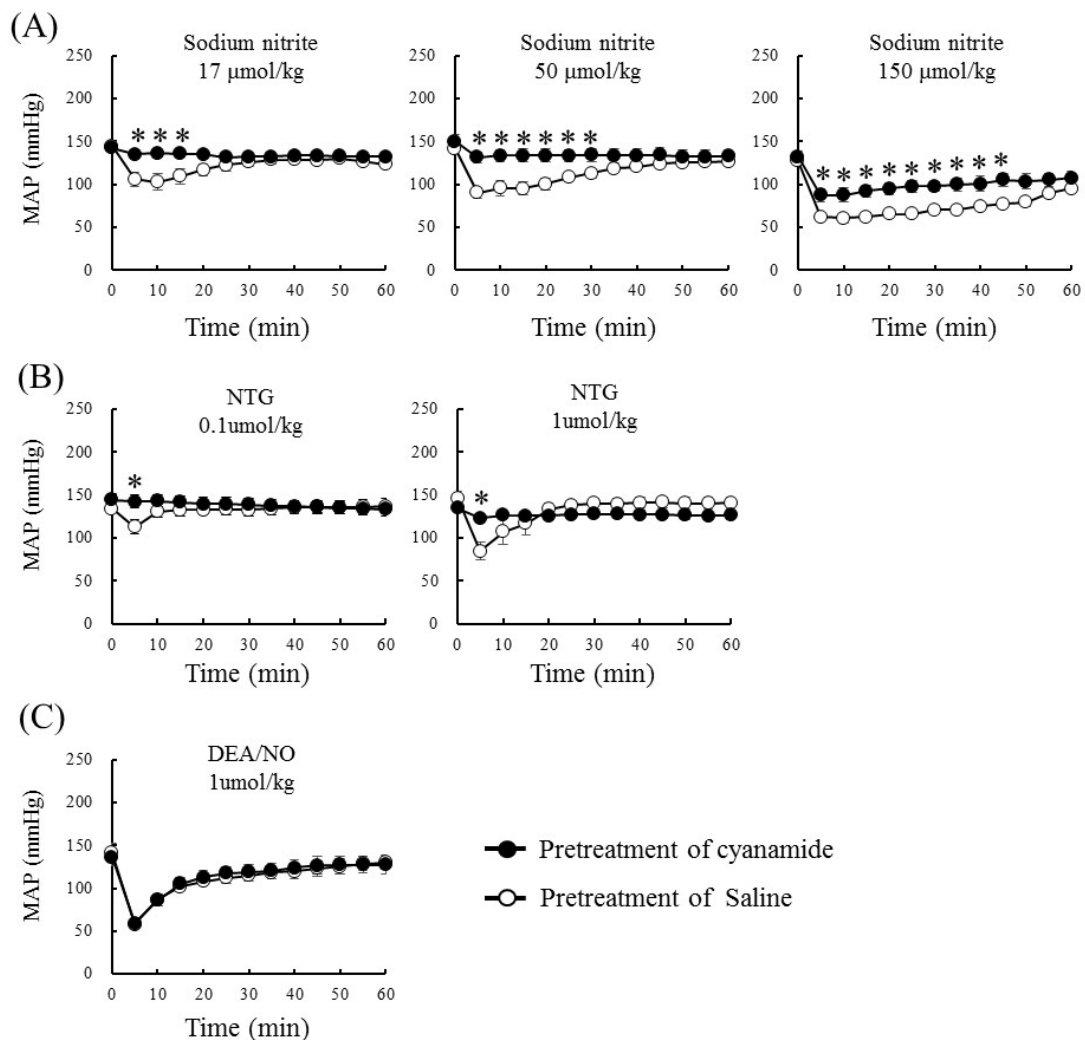


Fig. 8 Effect of MAP in sodium nitrite treatment of ALDH2 inhibition by cyanamide. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 10). $*P < 0.05$ v.s. saline.

MAP: mean arterial blood pressure, NTG: nitroglycerin

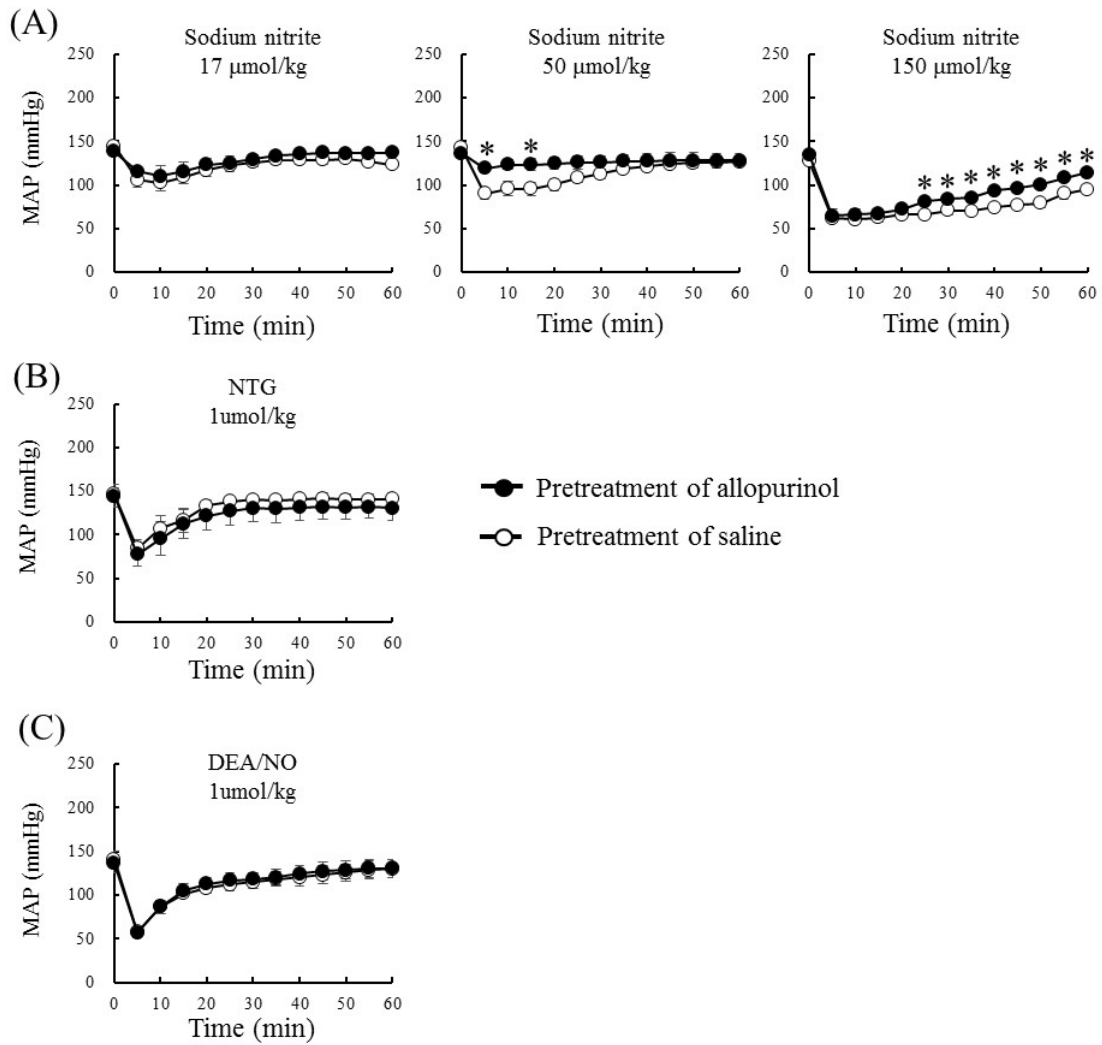


Fig. 9 Effect of MAP in sodium nitrite treatment of XO inhibition by allopurinol. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 10). $*P < 0.05$ v.s. saline. MAP: mean arterial blood pressure, NTG: nitroglycerin

Fig. 8, 9 で示した亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用に対する ALDH2 と XO 阻害の影響を、さらに評価するために% drop of MAP と AUC of MAP を算出した。Table 2 に ALDH2 阻害剤 (Cyanamide, Chloral hydrate) および XO 阻害剤 (Allopurinol) の処置の有無による亜硝酸ナトリウム、NTG、DEA / NO の投与後の% drop of MAP と AUC of MAP を示した。

Table 2 Inhibitory profiles of % drop of MAP and AUC of MAP with allopurinol, cyanamide or chloral hydrate against the hypertensive effect of NO donors.

		% drop of MAP				
NO donors (dose)	Saline	Allopurinol	Cyanamide	Chloral hydrate		
Sodium nitrite (17 μ mol/kg)	29.0 \pm 5.9	19.7 \pm 8.9	7.7 \pm 2.4 *	4.0 \pm 1.1 **		
Sodium nitrite (50 μ mol/kg)	36.5 \pm 4.4	12.6 \pm 0.8 **	12.2 \pm 1.0 **	9.4 \pm 2.8 **		
Sodium nitrite (150 μ mol/kg)	52.2 \pm 4.2	51.4 \pm 6.2	36.6 \pm 4.9 *			
NTG (0.1 μ mol/kg)	16.5 \pm 3.8		1.3 \pm 1.2 **			
NTG (1 μ mol/kg)	42.7 \pm 4.7	47.5 \pm 6.1	8.4 \pm 1.8 **			
DEA/NO (1 μ mol/kg)	59.3 \pm 1.5	57.7 \pm 2.8	56.3 \pm 2.6			
		AUC of MAP (mmHg \cdot min)				
NO donors (dose)	Saline	Allopurinol	Cyanamide	Chloral hydrate		
Sodium nitrite (17 μ mol/kg)	1370 \pm 249	609 \pm 394	516 \pm 104 *	670 \pm 129 *		
Sodium nitrite (50 μ mol/kg)	1778 \pm 335	597 \pm 110 *	903 \pm 75 *	647 \pm 271 *		
Sodium nitrite (150 μ mol/kg)	3210 \pm 289	2888 \pm 382	1982 \pm 369 *			
NTG (0.1 μ mol/kg)	281 \pm 179		391 \pm 107			
NTG (1 μ mol/kg)	1001 \pm 269	1376 \pm 320	476 \pm 37 **			
DEA/NO (1 μ mol/kg)	1792 \pm 153	1360 \pm 219	1391 \pm 278			

The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 10).

* $P < 0.05$ v.s. saline, ** $P < 0.05$ v.s. saline.

MAP: mean arterial blood pressure, NTG: nitroglycerin

L-NAME 誘発性高血圧モデル動物への亜硝酸ナトリウムの静脈内投与は、Fig. 4 と同様に投与量依存的に% drop of MAP と AUC of MAP を増加させた。ALDH2 阻害剤である Cyanamide の前処置により亜硝酸ナトリウムのすべての投与量(17 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 150 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) で、% drop of MAP と AUC of MAP の両方を有意に低下した。しかし、XO 阻害剤である Allopurinol 処置においては 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の亜硝酸ナトリウム投与のみ% drop of MAP および AUC of MAP を抑制したが、17 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ と 150 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ では XO の阻害効果を認めなかった。このことから、XO は正常な酸素環境下における亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に対する寄与率は低いことが示唆された。さらに、我々は Cyanamide とは異なる阻害メカニズムを介して ALDH2 を阻害することが知られている Chloral hydrate⁴⁰ を用い 17 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ と 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の亜硝酸ナトリウム投与による血圧降下作用への影響について検討を行った。その結果、Chloral hydrate は Cyanamide と同様に亜硝酸ナトリウムの投与量 17 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ と 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の% drop of MAP および AUC of MAP を抑制した (Table 2)。

これらの結果から、正常な酸素環境下における亜硝酸ナトリウムからの NO 産生および血圧降下作用の寄与率は XO に比べ ALDH2 で非常に高いことがわかった。しかしながら、Cyanamide と Chloral hydrate の処置の両方で血圧降下作用を完全に抑制することはできなかった。これは、Feelisch らが組織中の亜硝酸塩からの NO への変換は多因子性であり、亜硝酸塩を還元する酵素が細胞内全体に分布していることを報告している⁴¹ことから、グロビンたんぱく質や未知の酵素系による亜硝酸ナトリウムからの NO 変換システムが正常酸素環境下における亜硝酸塩からの NO 産生に関与していると考えられた。

また、Chen ら²⁵は、ALDH2 が NTG の代謝と血管拡張に関連があることを報告してから、NTG から放出された亜硝酸塩からの NO 産生に注目が集まってい

た。本研究においても NTG は亜硝酸ナトリウムと同様の血圧降下作用を示し (Fig. 4, Fig. 6)、ALDH2 が NTG と亜硝酸ナトリウムからの NO への変換に関与している可能性を血圧降下作用から示した (Fig. 8, Table 2)。このことから NTG-Nitrite-NO 経路により NTG が薬理的効果を発揮していると考えられたが、亜硝酸ナトリウムが NTG と同様の血圧降下作用 (生理作用) を示すためには、高濃度の亜硝酸ナトリウムが必要であることがわかった。これは、Complex III、Cytochrome c、Cytochrome c oxidase のような亜硝酸還元酵素が、in vitro で NO を発生するために mmol の亜硝酸塩を必要とする⁴²という結果と一致していた。さらに、Ohtake ら²⁹と他の研究者^{30, 43}は、血圧降下作用と可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 活性の点で亜硝酸塩が NTG より 2 か 3 オーダー効果が低いことを示している。したがって、仮に 1 μmol の NTG から 3 μmol の亜硝酸塩を産生したとしても、亜硝酸塩が NTG と同じ生物学的な活性を示すことは難しい。この要因として考えられるのは、NTG は疎水性であるのに対して亜硝酸塩は親水性であることから疎水性内膜内に埋もれているミトコンドリア中の亜硝酸塩還元酵素の活性部位に到達することが難しいことが原因であると考えられる。すなわち、亜硝酸塩は自由拡散によって膜を通過することが難しいため細胞内で NO を産生するためには高濃度で用いる必要がある²²。一方、最近の Mayer らによる一連の報告では、亜硝酸塩の還元とは無関係に ALDH2 による NTG から NO 生成に対する直接的な変換過程が存在することを示唆している^{31, 44, 45}。これらのことから、NTG は NTG-Nitrite-NO 経路により NO を産生し、薬理的な作用を示しているかもしれないが、本研究とは分けて考える必要があると思われた。

3-2 亜硝酸ナトリウムの体内動態に対する ALDH2 と XO の影響

これまでの研究から亜硝酸ナトリウムによる血圧降下作用に ALDH2 が深く関わっている可能性を示してきた。そこで、次に生体内に吸収された亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に対する ALDH2 や XO の影響をより明確にするため、血漿と主要臓器中の亜硝酸イオン濃度と硝酸イオン濃度を経時的に測定し、亜硝酸ナトリウムの体内動態への影響について検討した。

まず、血漿中の亜硝酸イオンと硝酸イオンへの影響について検討を行った。方法は、血圧測定実験と同様に Cyanamide または Allopurinol を前処置しておき ALDH2 または XO を阻害した状態で亜硝酸ナトリウム (50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) を静脈内投与した。その後、0、1、5、15、30、45、60 分時点で採血を行い血漿中の亜硝酸イオン濃度と硝酸イオン濃度を測定した。

その結果、Fig. 10 に示したように血漿中の亜硝酸イオン濃度は、投与直後に最大濃度に達したが、Cyanamide 処理により亜硝酸イオンの消失が遅延した。その逆に、硝酸イオン濃度は、Cyanamide 処置により血漿中での増加が遅延した。この亜硝酸イオンの消失の遅延と硝酸イオンの増加抑制は、細胞内での ALDH2 と亜硝酸イオンの反応低下が原因で起こったと考えられた。一方、XO の阻害では血漿中の亜硝酸イオン濃度および硝酸イオン濃度に影響を与えなかった (Fig. 10)。この結果は、ALDH2 と XO 阻害における亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用の結果と一致した (Table 2)。

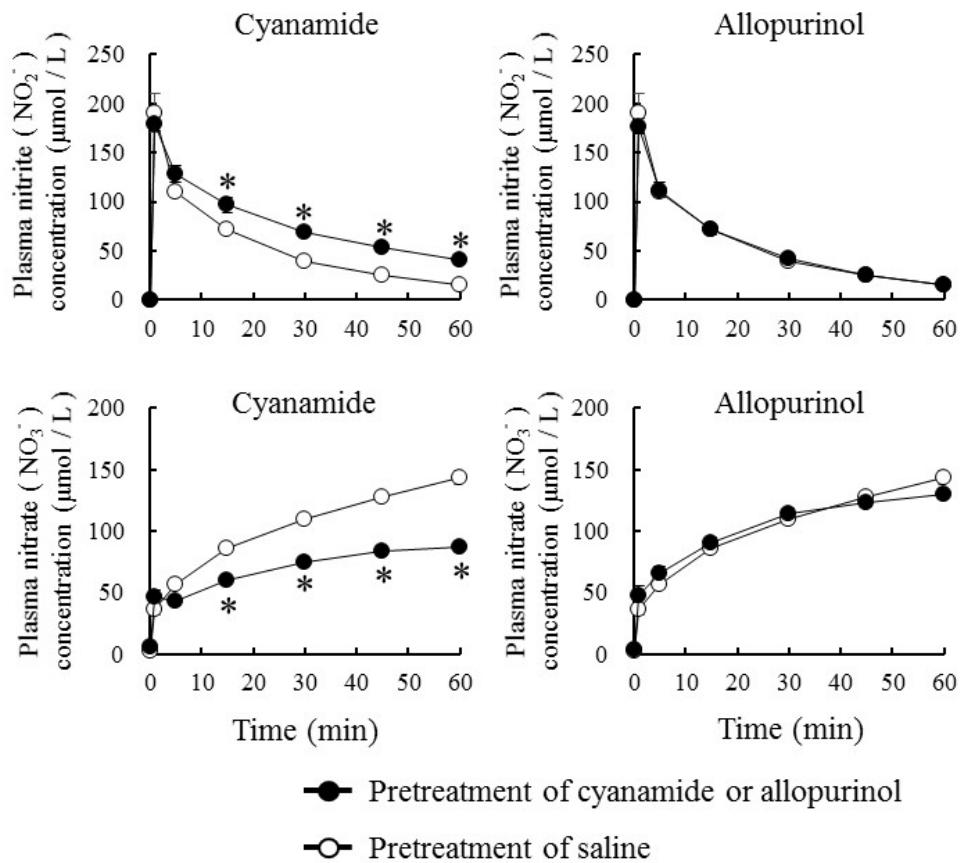


Fig.10 Time course of the plasma nitrite and nitrate levels following intravenous sodium nitrite administration with or without cyanamide or allopurinol pretreatment. The values are the means \pm SE ($n = 4$). * $P < 0.05$ v.s. saline.

次に、主要臓器中（脳、肺、動脈、肝臓、膵臓、腎臓、精巣、胃、空腸）における亜硝酸ナトリウムの体内動態について検討を行った。なお、XO に関しては正常酸素環境下では、血圧や血漿中の亜硝酸イオン濃度と硝酸イオン濃度にはほとんど影響を与えなかったことから本研究ではAllopurinolによる検討は行わず、Cyanamide を用い ALDH2 の影響のみ実施した。方法は、血圧測定実験と同様に Cyanamide を前処置しておき ALDH2 を阻害した状態で亜硝酸ナトリウム（50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ）を静脈内投与した。その後、0、5、15、30、60 分時点で各種臓器を取り出し、臓器中の亜硝酸イオン濃度を測定した（Fig. 11）。さらに、測定した組織中の亜硝酸イオン濃度の経時変化から AUC を算出して評価を行った（Table 3）。その結果、組織中の亜硝酸イオン濃度の推移は、それぞれの臓器で異なるパターンを示したが、Cyanamide 処置により主要臓器において亜硝酸イオンの消失を有意に遅延させ（Fig. 11）、AUC も増加した（Table 3）。したがって、亜硝酸ナトリウムは生体内に吸収された後、各臓器に分布し、ALDH2 によって NO に変換されて血圧降下作用を示していることが示唆された。

そこで、実際に各種臓器に ALDH2 が発現していることを確認するためウエストンブロット法により、各臓器中の ALDH2 の発現量を測定した。その結果、測定したすべての臓器で ALDH2 が発現していることが確認できた（Fig 12）。

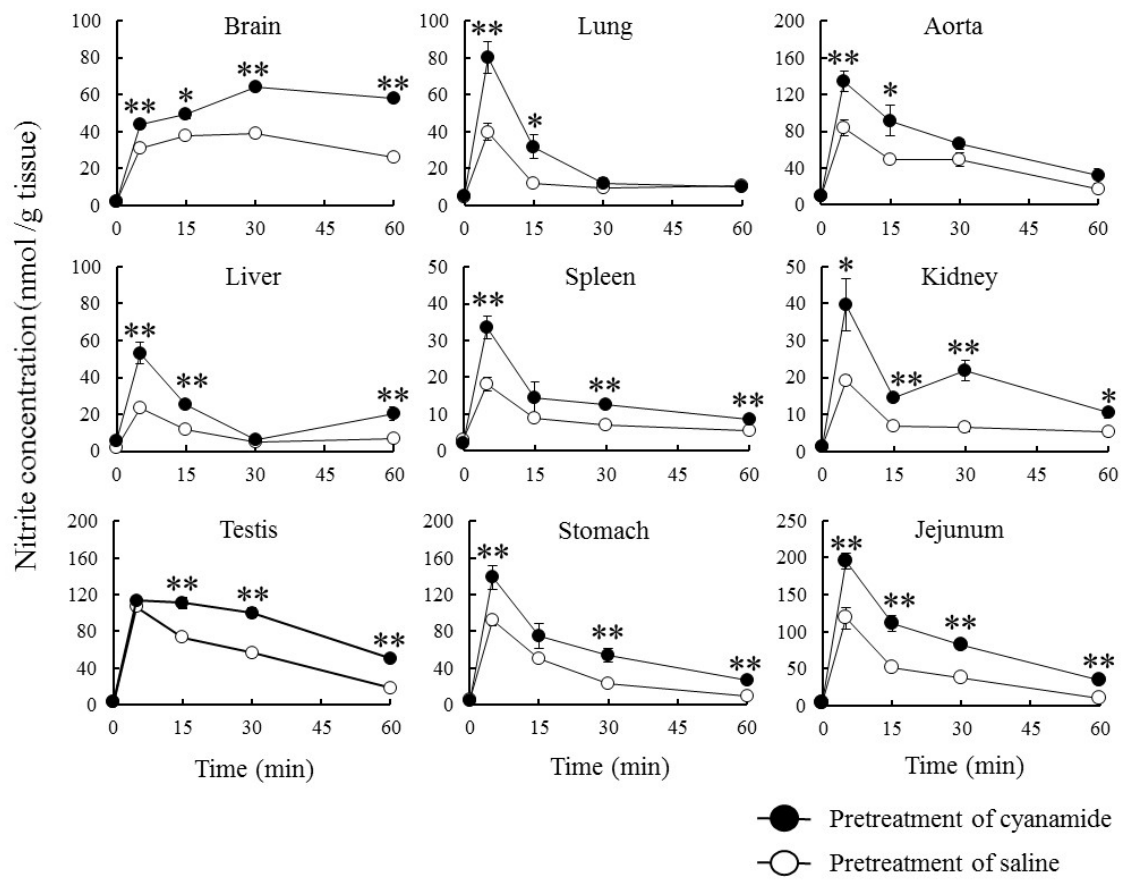


Fig. 11 Time course of the tissue nitrite levels following intravenous sodium nitrite administration with or without cyanamide. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6). * $P < 0.05$ v.s. saline, ** $P < 0.01$ v.s. saline.

Table 3 Area under the curve (min/nmol/g tissue)

AUC of nitrite in tissue (min / nmol / g tissue)			
Tissues	saline	cyanamide	
Brain	1977 ± 61	3264 ± 40	**
Lung	831 ± 93	1431 ± 201	**
Aorta	2644 ± 40	4144 ± 121	**
Liver	540 ± 50	1178 ± 76	*
Spleen	495 ± 237	846 ± 420	
Kidney	460 ± 118	1131 ± 155	*
Testis	3266 ± 44	5248 ± 89	**
Stomach	1977 ± 108	3589 ± 368	**
Jejunum	2493 ± 181	5222 ± 311	**

The data represent the means ± SE ($n = 4$ to 6).

* $P < 0.05$ v.s. saline, ** $P < 0.05$ v.s. saline.

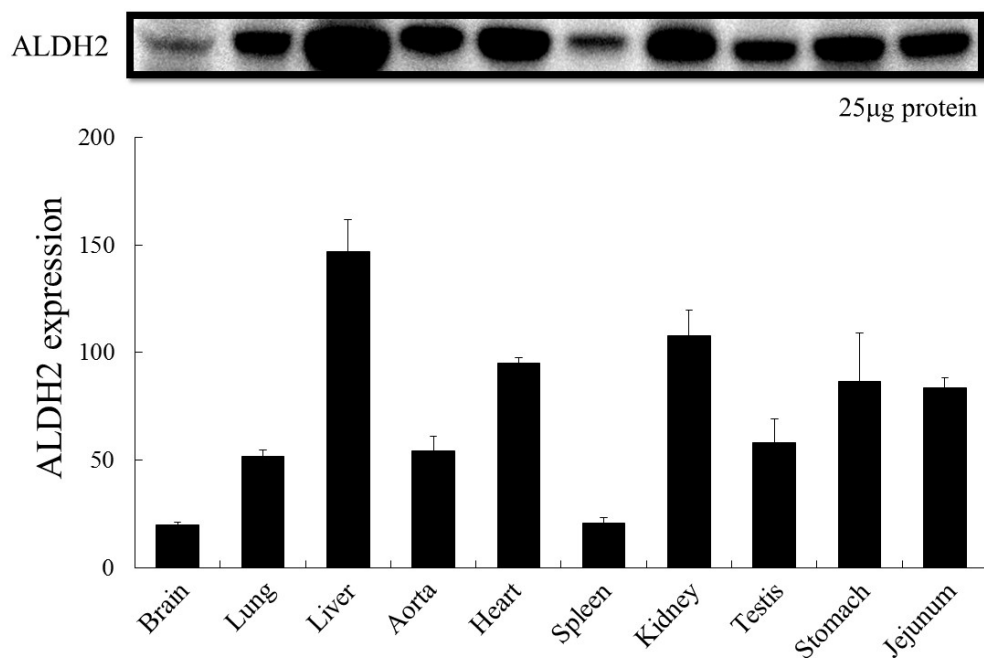


Fig. 12 Organs ALDH2 expression. The data represent the means ± SE ($n = 4$).

ALDH2: mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2

第4節 小括

本章では、正常酸素環境下における亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用および亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に関わる生体内の主要因子を同定することを目的に研究を行った。

一般に、ALDHはアルデヒドからカルボン酸への酸化を促進する酵素であり、アセトアルデヒドを酸化する酵素でもあることから、ALDH の阻害剤は多く存在する。一方で、一部の ALDH アイソザイムはそのような触媒活性とは無関係のエステラーゼ活性または機能を示すことも報告されている⁴⁶。Beretta らは、*in vitro* の研究で精製した ALDH1 および ALDH2 を用い亜硝酸塩が sGC を活性化することを報告した³¹。さらに、Ohtake ら²⁹と Kadowitz ら³⁰は、正常酸素環境下の高血圧ラットにおける亜硝酸塩からの NO への変換に ALDH2 が寄与している可能性を報告している。亜硝酸塩に対する ALDH の影響を検討した文献は限られているが、Cyanamide および Chloral hydrate を用いて ALDH2 を阻害することで亜硝酸塩を減少させている^{29-31, 35, 37}。

一方で、ALDH2 や XO のような酵素系以外にもミオグロビンやヘモグロビンなどの heme 含有タンパク質が NO または亜硝酸塩を介したシグナル伝達に関与していることが示唆されている^{14, 20, 47-54}が、これらの研究はいずれも低酸素環境下で検討したものであり、正常酸素環境下の血管拡張にどの程度寄与しているかは依然として不明であることから、さらなる証拠を示す必要がある。

最近の Kevil らによる review では、亜硝酸塩による人や動物モデルにおける多くの病態に対する影響および現在進行中の臨床的および実験的報告が示されている²⁷。本研究で用いた 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ および 150 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の亜硝酸ナトリウムの用量は、治療用量の範囲を超えている可能性があるが、17 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ の用量は多くの実験や疾患の治療に使用された用量とほぼ同じである²⁹⁻³⁷。したがって、薬

物治療として用いることが可能な亜硝酸ナトリウム量における正常酸素環境下における血圧降下作用は、主に ALDH2 に起因することが示唆された。また、Cyanamide を用い ALDH2 を阻害することで亜硝酸イオンの血漿中での消失を遅延させることを示した。さらに、ミトコンドリアに存在する ALDH2 が今回測定したすべての臓器に普遍的に発現 (Fig.12) しており、ALDH2 を阻害することでほとんどの臓器中で亜硝酸イオンの消失を遅延させることを明らかにした (Fig.11, Table 3)。

以上の結果から、亜硝酸ナトリウムはほとんどの臓器に普遍的に存在する ALDH2^{41,55} (Fig. 12) によって変換または還元され NO を介した血圧降下作用を示すことが示唆された (Fig. 13)。しかしながら、NTG に関しては Mayer ら^{31,44,45}により NTG-Nitrite-NO 経路の他に NTG から直接 NO に変換される経路も報告されていることから本研究とは分けて考える必要があり、さらなる検討が必要である。

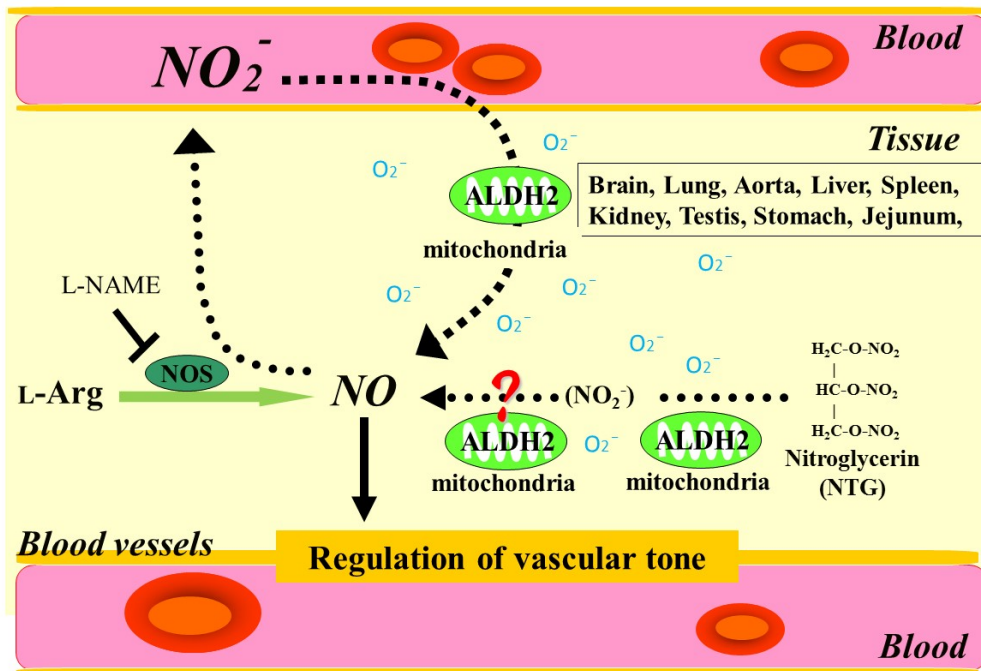


Fig. 13 Sodium nitrite-derived NO formation mechanism in normoxic condition. L-Arg: L-arginine, NOS: NO synthase, ALDH2: mitochondria aldehyde dehydrogenase 2

第2章 亜硝酸ナトリウムの補給による循環器疾患モデルに対する臓器保護作用

第1節 はじめに

高血圧による心疾患は、心不全の主要な原因であり、左心室肥大、それに続き拡張期心不全の症状（息切れなど）を示し、結果的に拡張期および収縮期心不全を引き起こす⁵⁶。このような臨床的な特徴が出現する前段階では、血管への圧力過負荷による冠動脈血管および心筋細胞肥大を引き起こし、さらに心筋細胞のアポトーシスが起これば、それをリモデリングする過程で線維物質である Collagen type1 α -1、Collagen type 3、Elastin、Fibronectin、Proteoglycan の増加などの病理学的な特徴が現れる⁵⁷。

最近の研究では、AT II と AT1R からなるレニン-アンジオテンシン系（RAS）が高血圧による心肥大発症に重要な役割を果たしていることが示されている^{57, 58}。AT II は、活性化されたマクロファージおよび筋線維芽細胞によって局所的に産生される。AT II は、強力な血管収縮作用を示すだけでなく、心筋細胞および線維芽細胞において AT1R の活性化を介して線維形成に関するサイトカインである線維芽細胞増殖因子 (TGF- β 1) の発現を増加させ心筋の線維化を誘導する^{59, 60}。

内因性の NO 合成の低下や NO の生理活性の低下は、高血圧性の心疾患の発症に関与すると考えられている^{61, 62}。Kanematsu らは、L-NAME 誘発高血圧ラットに対する食事由来の亜硝酸塩の影響を調べており、亜硝酸塩の摂取が高血圧を改善し、腎障害を軽減することを示している⁶³。さらに、Carlström らは、腎摘出術と高食塩負荷食による高血圧モデルラットに硝酸塩を処置することにより血圧を低下させ、活性酸素種 (ROS) 産生を抑制することで心臓および腎臓障害を予防することを示している⁶⁴。

これらの報告は、食事の亜硝酸塩および硝酸塩が高血圧および心臓リモデ

リングの抑制に効果があり、高血圧性の心疾患の治療に有効であることを示唆している。しかしながら、食事由来の亜硝酸塩および硝酸塩が高血圧や RAS によって起こる心臓リモデリングにどのような影響を示すのかについては明らかになっていない。筆者は、第 1 章の研究から亜硝酸ナトリウムを経口投与すると血圧降下作用を示し、亜硝酸ナトリウムが生体内に供給されると全身に分布し、臓器に普遍的に存在する ALDH2 により NO に変換されることを示唆する結果を得た。このことから、NO の不足を伴う心臓リモデリングに対しても亜硝酸ナトリウム経口的な補給によって NO が供給され、臓器保護作用を示すと仮説を立てた。また、第 1 章で用いた L-NAME は、長期間動物に与えることで NO の生物学的利用率の低下により機能的および構造的な血管機能不全から心血管疾患および腎疾患を発症することが報告されている⁶⁵。

そこで本章（第 2 章）では、L-NAME を慢性的に与え内因性 NO 不足高血圧から起因される心臓リモデリングに対して人が日常的に摂取可能な量の亜硝酸ナトリウムを慢性的に与え、心臓リモデリング（心臓や冠動脈の肥大や線維化）からの臓器保護効果と RAS の活性化への影響を明らかにすることを目的に、臨床的に使用されており臓器保護作用を示すことが報告されている ACE 阻害剤のカプトプリルをポジティブコントロールとして用い検討を行った（Fig. 14）。

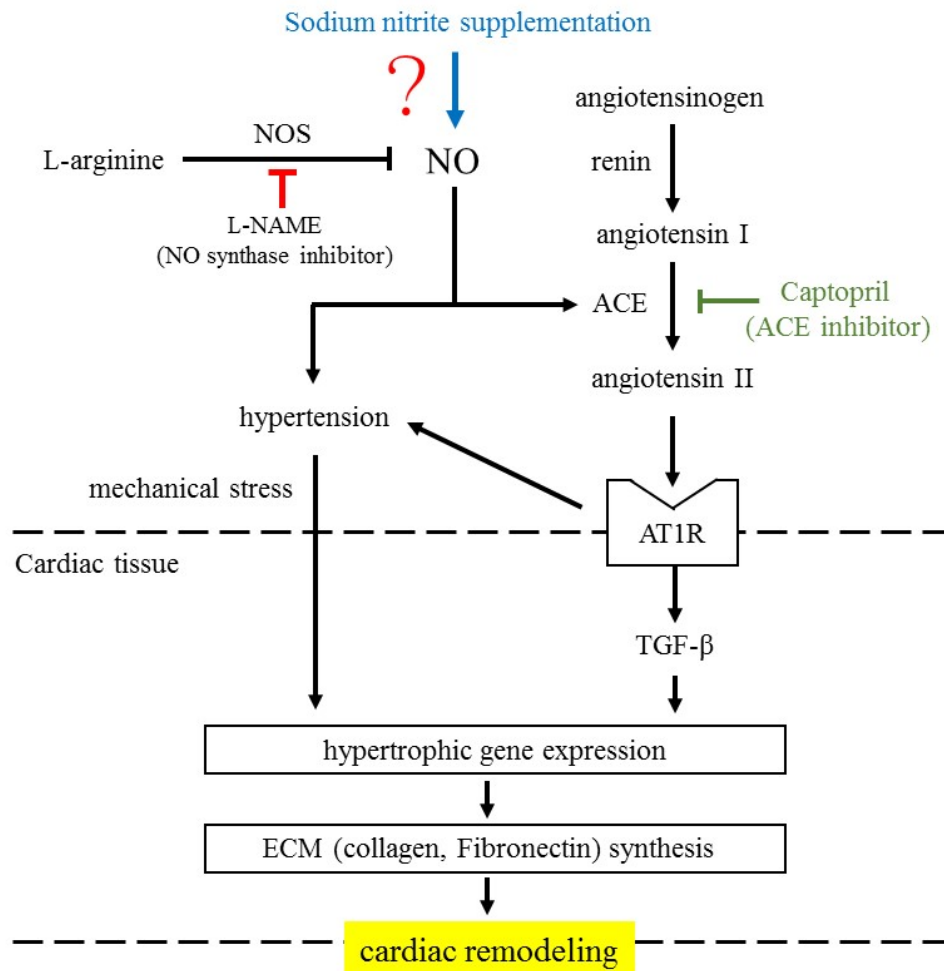


Fig. 14 Effect of nitrite supplementation to NO deficient cardiac remodeling and renin-angiotensin system. NO: nitric oxide, NOS: NO synthase, ACE: angiotensin converting enzyme, AT1R: angiotensin II type 1 receptor, TGF- β : transforming growth factor- β , ECM: extracellular matrix

第2節 亜硝酸ナトリウムの補給による血圧への影響と体内への供給量

本研究では、動物を次の5つのグループに分けた。蒸留水のみを与える Control 群、L-NAME のみを与える L-NAME 群、L-NAME を与えると同時に低用量の亜硝酸ナトリウム (10 mg/L) を与えた低亜硝酸ナトリウム群、高用量の亜硝酸ナトリウム (100 mg/L) を与えた高亜硝酸ナトリウム群、ACE 阻害剤のカプトプリル (100 mg/L) を与えたカプトプリル群とし、飲み水中に溶解して自由摂取として8週間飼育した。

L-NAME を8週間処置すると、Fig. 15 に示したように蒸留水を与えた Control 群 (MAP : 117 ± 2 mmHg) に比べて L-NAME 群 (MAP : 163 ± 5 mmHg) では有意な血圧上昇が起こり、血漿中の硝酸イオン濃度を低下させた (Fig. 16)。また、低亜硝酸ナトリウム群は L-NAME 処置による血圧上昇に対して血圧降下作用を示さなかった。一方、高亜硝酸ナトリウム群とカプトプリル群は、Control 群と同じレベルまで血圧上昇を抑制した (Fig. 15)。さらに、心臓の硝酸イオン濃度はすべての群で有意な差はなかったが、高亜硝酸ナトリウム群においては血漿の硝酸イオン濃度を Control 群と同程度まで増加させた (Fig. 16)。また、これまでの亜硝酸塩や硝酸塩の急性投与による研究では、人やげっ歯類 (マウスやラット) において血中の亜硝酸イオン濃度の著しい増加が起こることが報告されている⁶⁶⁻⁶⁸。しかし、今回の亜硝酸ナトリウムの慢性投与においては血漿および心臓の両方で亜硝酸イオン濃度に有意な差はなかった (Fig. 16)。また、カプトプリルについては、血漿および心臓の両方において、亜硝酸イオンと硝酸イオンに影響なく (Fig. 16)、L-NAME 処置による血圧上昇を抑制した (Fig. 15)。

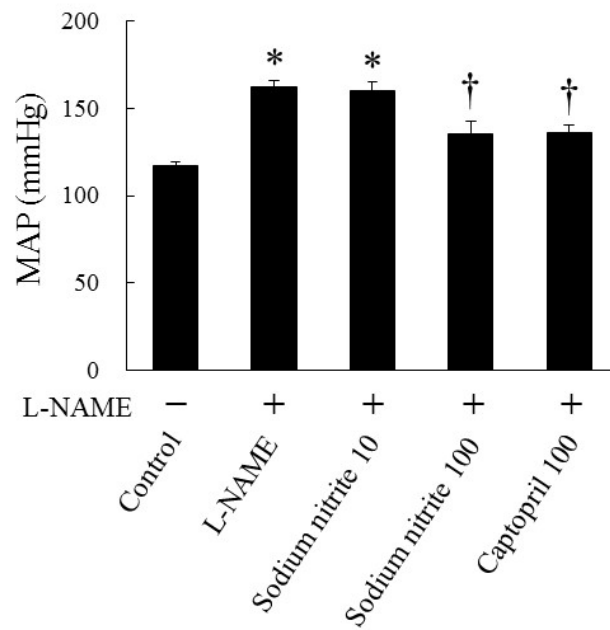


Fig. 15 Effect of dietary nitrite and captopril on blood pressure in L-NAME-induced hypertension rats. The values are the means \pm SE ($n = 10$ to 12). $*P < 0.05$ v.s. control, $^{\dagger}P < 0.05$ v.s.L-NAME. MAP: mean arterial blood pressure

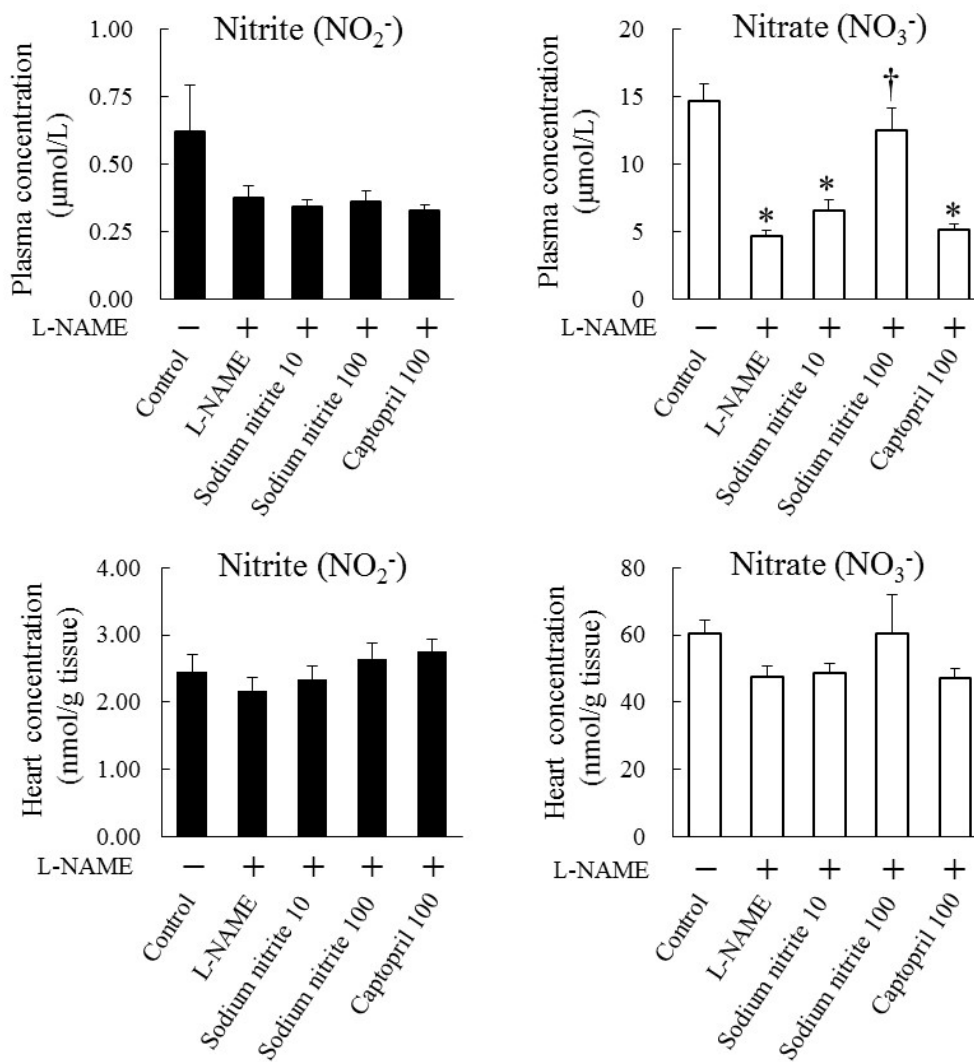


Fig. 16 Plasma and heart concentration of nitrite and nitrate.

The values are the means \pm SE ($n = 10$ to 12).

* $P < 0.05$ v.s. control, † $P < 0.05$ v.s. L-NAME.

第3節 亜硝酸ナトリウム補給による心臓の肥大および線維化抑制効果

L-NAME で処置したラットの心臓は、左心室壁（心室中隔および左心室後壁）（Fig. 17）および心臓中の冠動脈の平滑筋肥大を確認できた（Fig. 18）。これらの肥大は、亜硝酸ナトリウムの補給およびカプトプリル処置によって抑制した（Fig. 17, 18）。さらに、線維化を Masson's trichrome 染色（アニリンブルーにより線維が青く染まる）により定量的に評価した。L-NAME 処置によりコントロール群に比べ血管周囲の線維化や心筋間質の線維化が増加していることが確認できた（Fig. 17, 18）。この L-NAME 処置により誘発された線維化は、亜硝酸ナトリウムの補給およびカプトプリル処置で病理組織所見において抑制されていた（Fig. 17, 18）。さらに、組織画像を用いて心筋線維化と血管周囲の線維化部位の定量を行ったところ、L-NAME 処理に比べ亜硝酸ナトリウムの補給やカプトプリル処置では線維化の進展を抑制していた（Fig. 17, 18）。

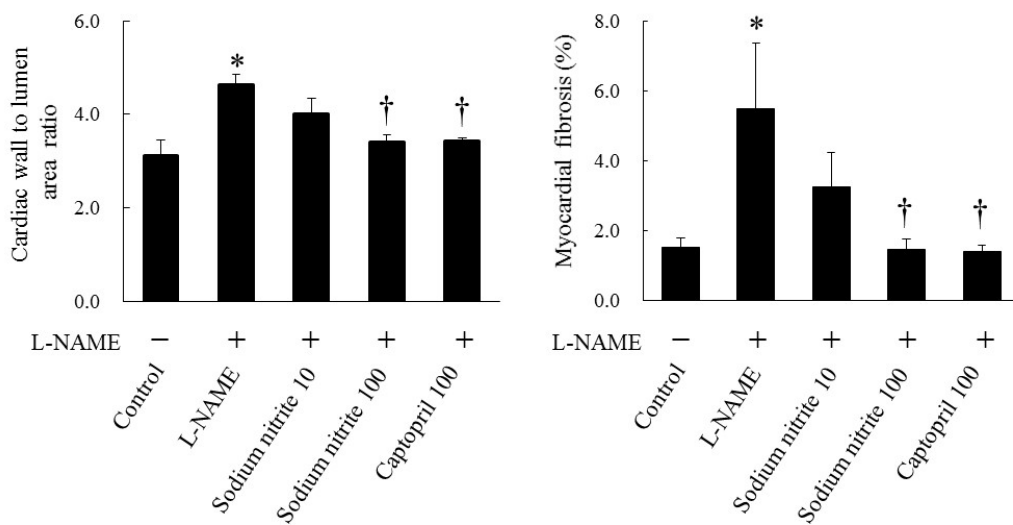
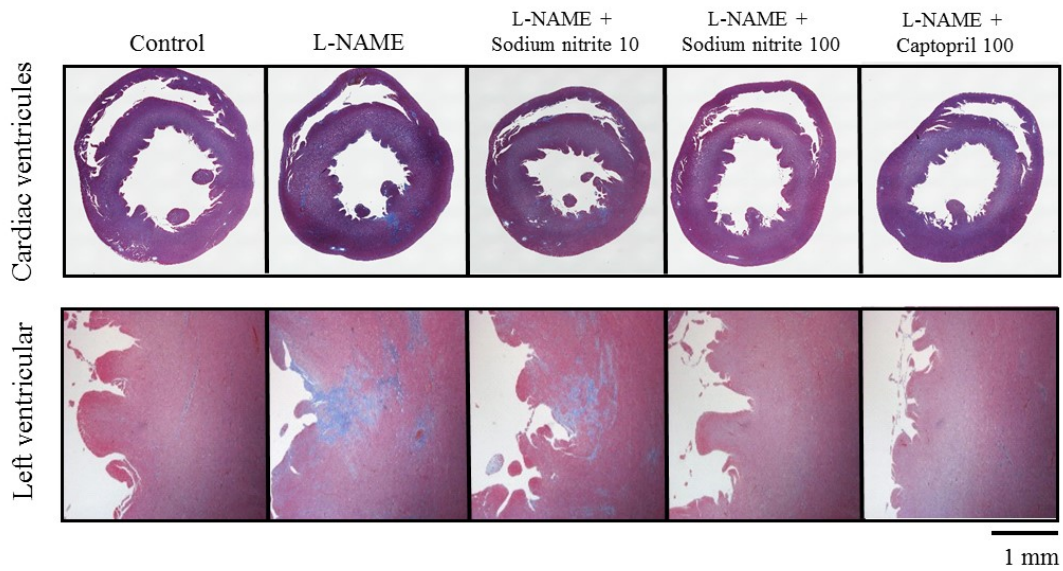


Fig. 17 Histological assessment of hypertrophy and fibrosis in the left ventricular.

The values are the means \pm SE ($n = 5$ to 6).

* $P < 0.05$ v.s. control, † $P < 0.05$ v.s. L-NAME.

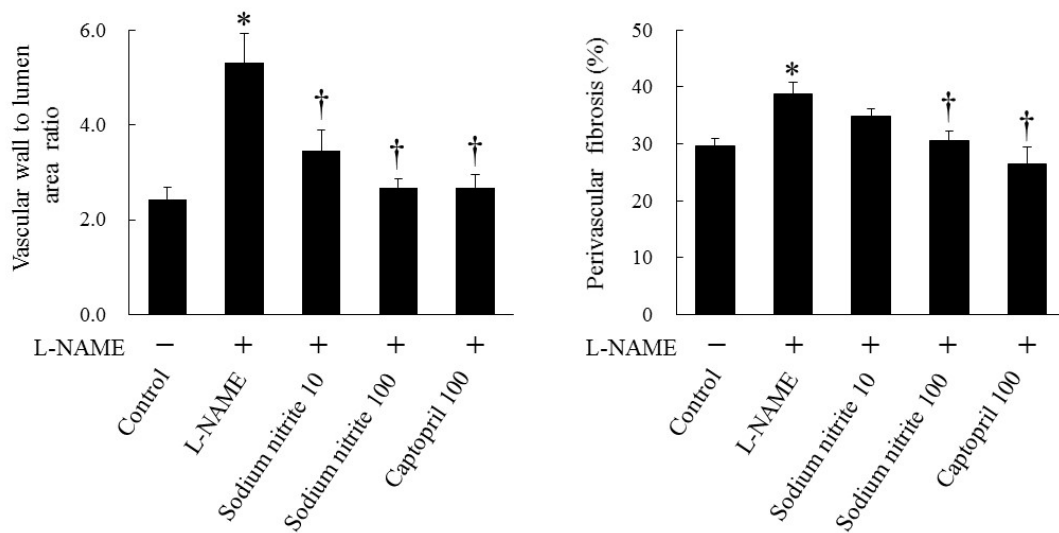
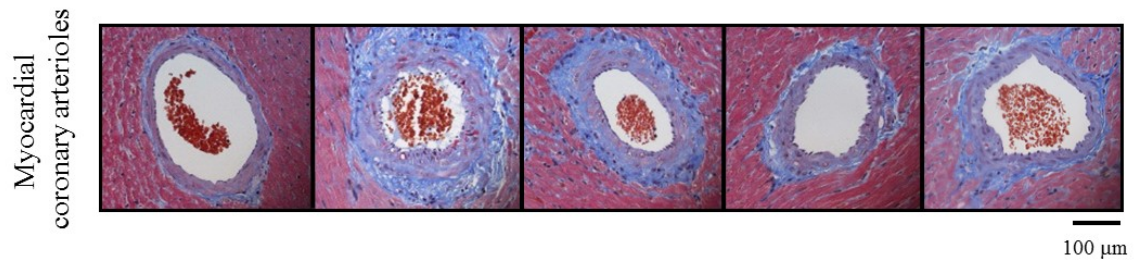


Fig. 18 Histological assessment of hypertrophy and fibrosis in the myocardial coronary arterioles. The values are the means \pm SE ($n = 5$ to 6).

* $P < 0.05$ v.s. control, † $P < 0.05$ v.s. L-NAME.

次に、心臓肥大および線維化と関連する因子である TGF- β および結合組織に含まれる Collagen type 1 α -1 と Fibronectin の心臓中の mRNA 発現レベルを調べた。L-NAME 処理は、心臓中の TGF- β の mRNA 発現量を増加させ、続いて結合組織タンパク質である Collagen type 1 α -1 と Fibronectin の mRNA 発現量を増加させた (Fig. 19)。一方で、亜硝酸ナトリウムの補給とカプトプリル処置は、心臓の組織学的所見と同様に TGF- β 、Collagen type 1 α -1、Fibronectin の mRNA 発現量を低下させた (Fig. 19)。

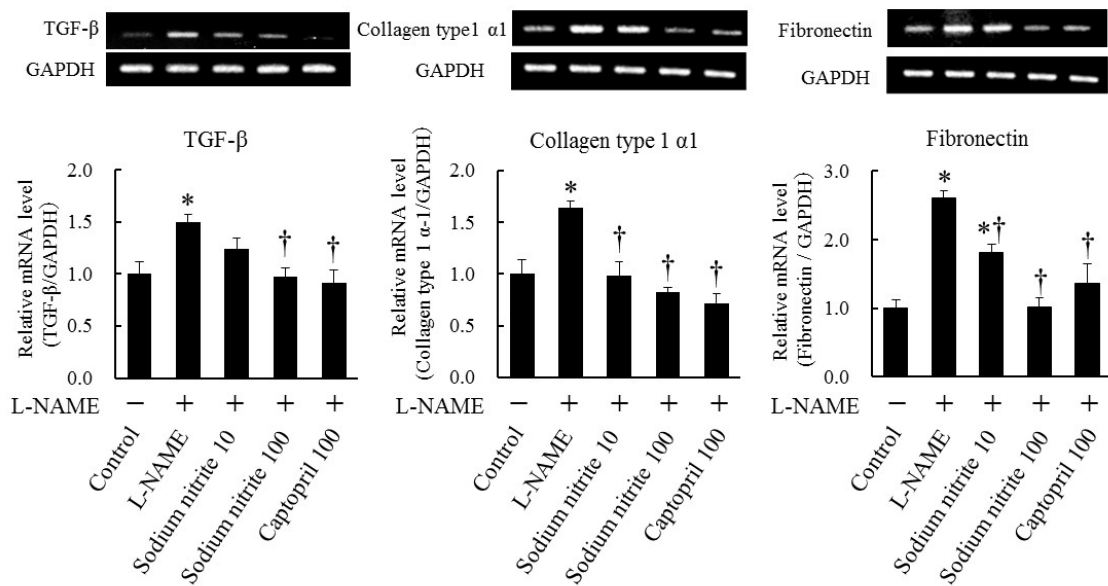


Fig. 19 Cardiac transcriptional level of TGF- β 1 and connective tissue proteins.

The values are the means \pm SE ($n = 5$ to 6). * $P < 0.05$ v.s. control, † $P < 0.05$ v.s.L-NAME. TGF- β 1: transforming growth factor- β 1

L-NAME 処理により内因性 NO 生成を阻害することで硝酸塩の血漿中濃度を有意に低下させ、血圧の上昇および心臓リモデリングを引き起こした。一方で、L-NAME と同時に亜硝酸ナトリウムを経口補給すると血圧を低下させ、心筋の肥大および心筋間質の線維化、さらに心臓の冠動脈の肥厚と冠動脈周囲の線維化を組織学的に改善することが確認できた。この結果は、内因性 NO 産生低下によって起こる血圧の上昇を伴うような心疾患の治療に亜硝酸ナトリウムの補給が有効であることを示唆する結果である。では、どのようにして亜硝酸ナトリウムの補給が心臓のリモデリングを改善したのか疑問が残る。

そこで次の研究では、この亜硝酸ナトリウムの補給による心臓の組織学的な改善効果のメカニズムを明らかにすることにした。

第4節 亜硝酸ナトリウム補給による心臓リモデリング抑制メカニズム

高血圧によって引き起こされる心臓のリモデリングは、AT II および AT 1R を介して起こる⁶⁹。この RAS の活性化は、心血管系に有害な作用を示すことは広く知られており、そのメカニズムには NADPH oxidase の発現増加や活性化による ROS 産生の増加や線維芽細胞増殖因子である TGF- β の活性化により心臓リモデリングを引き起こす^{69,70}。AT II は、肺循環中のアンギオテンシン変換酵素 (ACE) によって活性化され⁶⁹、主に血管平滑筋細胞に存在する AT1R へ結合することにより作用を示す⁷¹。本実験で用いている亜硝酸ナトリウムから産生されるとする NO は、AT I から AT II へ変換する ACE 活性阻害⁷²や NF- $\kappa\beta$ を介した AT1R の発現増加を抑制することが報告されている⁷³⁻⁷⁶。

これらのことから、亜硝酸ナトリウムの経口補給による心臓リモデリングの改善メカニズムに亜硝酸ナトリウム由来の NO を介した RAS の活性化調節が関与していると仮説を立てた。そこで、亜硝酸ナトリウムの補給による RAS への影響について検討した。L-NAME 処置 8 週目に解剖を行い血液と心臓を採取し、血漿中の AT II 濃度の測定と心臓の AT1R の mRNA とタンパク質発現レベルを PCR 法と免疫染色法により評価した。

Fig. 20 に示したように L-NAME 処置は、血漿中の AT II 濃度を上昇させたが、亜硝酸ナトリウム補給やカプトプリルの摂取は血漿中の AT II 濃度を Control 群と同程度まで抑制した。これは、亜硝酸ナトリウムがカプトプリルと同様に ACE 活性を阻害したと考えられた。これは、NO が ACE 活性を阻害 (NO が ACE の亜鉛配位活性中心と相互作用を示す) することによって RAS の活性化を阻害する⁷²という結果と一致している。

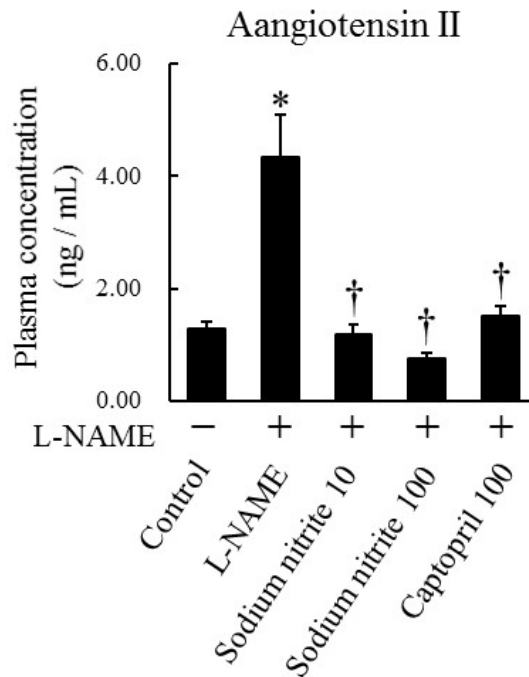


Fig. 20 Plasma AT II concentration. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6).

* $P < 0.05$ v.s. control, † $P < 0.05$ v.s. L-NAME.

さらに、L-NAME 群により心臓組織における AT1R の mRNA およびタンパク質の発現を増加させたが、亜硝酸ナトリウムの補給によって抑制した (Fig. 21, 22)。一方、カプトプリルは L-NAME 処置による心臓中の AT1R の mRNA とタンパク質発現の両方で影響を与えなかった (Fig. 21, 22)。この結果は、NO が AT1R の転写に関する NF- κ B を S-nitrosylation することで阻害するという報告がある⁷³⁻⁷⁶ことから、亜硝酸ナトリウムの補給による AT1R 発現量の抑制は、補給した亜硝酸ナトリウム由来 NO または NO 関連物質によって NF- κ B が S-nitrosylation されたことにより活性が阻害された可能性がある。しかし、本研究ではその点に関して検討を行っていないことから今後の研究課題としたい。

以上のことから、L-NAME により内因性 NO 産生が低下した状態では血圧の上昇とともに AT II-AT1R によるシグナル経路が活性化し、心臓リモデリングを

引き起こしたと考えた。一方で、L-NAME 処置ラットへの亜硝酸ナトリウムの補給については亜硝酸ナトリウム由来の NO が供給され血圧を下げるとともに AT II-AT1R の活性化を抑制することで心臓リモデリングを改善したと考えた。

また、本研究においてカプトプリルは AT1R 発現増加に対して完全な抑制効果を示さなかった。カプトプリルは、ブラジキニンを介して血管内皮細胞から内因的な NO 産生を促進させる。しかし、本研究では L-NAME により内因的な NO 産生をブロックしていたことからカプトプリルによる内因性 NO 産生も抑制されたため AT1R 発現増加を完全に抑制できなかったと推察する。したがって、血管内皮機能が正常でブラジキニンにより NO が産生できる条件下であれば、カプトプリルは AT1R の発現調節ができると考える。

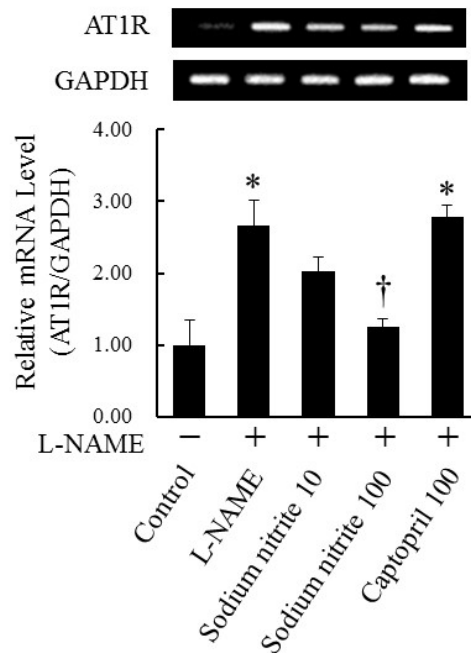


Fig. 21 Cardiac AT1R mRNA expression levels. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6). * $P < 0.05$ v.s. control, † $P < 0.05$ v.s. L-NAME. AT1R: angiotensin II type 1 receptor

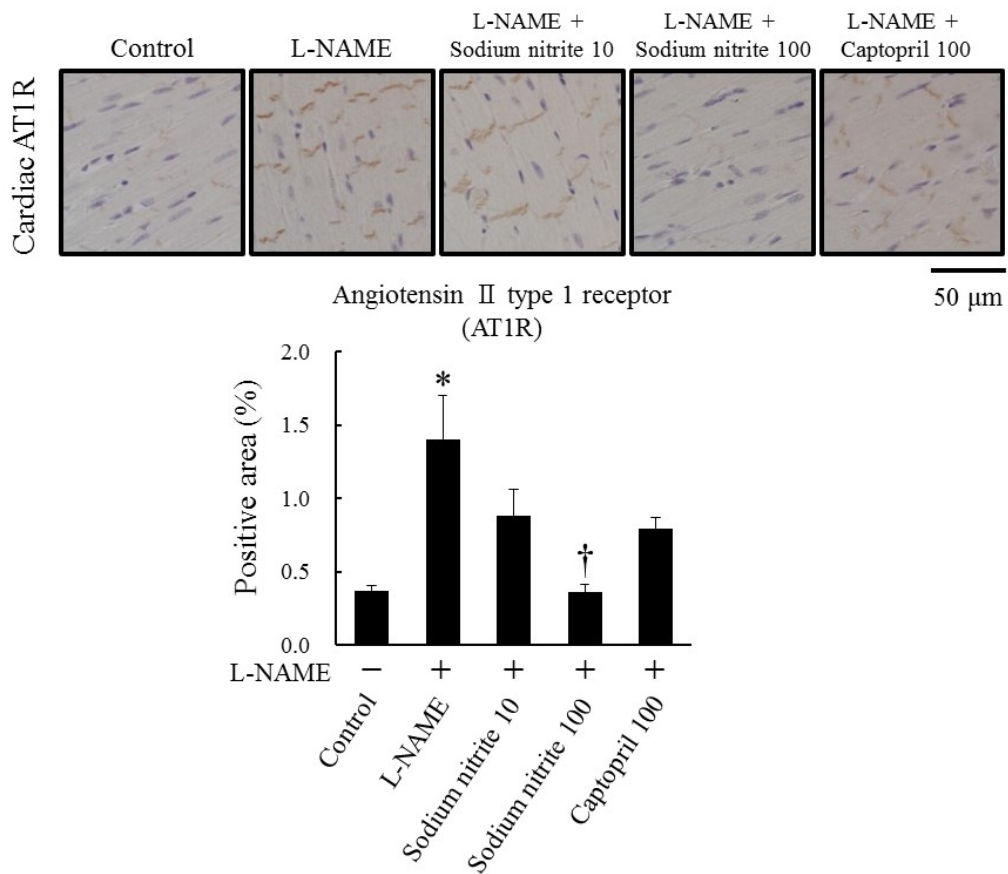


Fig. 22 Cardiac AT1R protein expression levels. The values are the means \pm SE ($n = 4$ to 6). * $P < 0.05$ v.s. control, † $P < 0.05$ v.s. L-NAME. AT1R: angiotensin II type1 receptor

4-1 NO 不足による RAS シグナルおよび NO の作用メカニズムの考察

亜硝酸塩からの NO 産生系は非常に複雑な形態をとっているが、同様に NO の作用メカニズムも非常に複雑である。そこで、本研究で調べた L-NAME によって誘導されるシグナル経路における亜硝酸ナトリウムの抑制メカニズムの他に AT II-AT1R 系の下流シグナルおよび AT II-AT1R 系から独立したシグナルに対する影響について考察した (Fig 23)。

本研究では、L-NAME 処置によって起こる AT II による NADPH oxidase 活性化や ROS 産生に関しては調査していない。しかし、多くの研究で L-NAME 誘発性高血圧の原因として AT II が血管の NADPH oxidase を活性化させ、続いて ROS 産生や炎症を起こすことが実証されている^{75,77,78}。これは、高血圧による心臓リモデリング発生メカニズムに深く関与している可能性がある。

AT II-AT1R 経路に加えて、他の重複シグナル伝達経路が心筋細胞肥大の進展に関与している。NO は、即効性の血管拡張作用により血圧調節を行うだけでなく環状アデノシン一リン酸 (cAMP) / 環状グアノシン一リン酸 (cGMP) 経路を介して高血圧に伴う心臓リモデリングを抑制する^{79,80}。cAMP は、G タンパク質共役型 β アドレナリン受容体を介して可溶性アデニル酸シクラーゼ (sAC) によって生成され、プロテインキナーゼ A (PKA) を活性化し、L 型のカルシウムチャンネルおよびリアノジン受容体の調節をもたらす。また、cAMP はグアノシン三リン酸フォスファターゼ (GTPase) の活性化を介して心筋線維芽細胞による Collagen 合成を阻害するなど PKA 非依存性経路を介して Collagen や Fibronectin などの細胞外マトリックス (ECM) 合成を抑制する⁸¹。cGMP / PKG シグナルは、TGF- β による筋線維芽細胞の形質転換および Smad 3 (TGF- β 応答の Signal transducer) のリン酸化を介して起こる ECM 合成を阻害する⁷²。心臓リモデリングにおける NO の役割についてももう少し考察すると、

ホスホジエステラーゼ (PDE) は、*in vivo* で cAMP / cGMP のレベルを調節し、心筋細胞肥大を誘導するデュアルエステラーゼとして重要な役割を果たす^{81,82}。血圧上昇による機械的ストレス刺激を受けるとセカンドメッセンジャーやリン酸化酵素により肥大に関連する遺伝子発現が増強され心臓リモデリングを誘導する。さらに、 α -アドレナリン受容体アゴニストおよび AT II によって刺激された G タンパク質によるシグナル (Ca^{2+} / CaM および PKC) は、PDE1A を活性化して cAMP および cGMP を加水分解する⁸³。L-NAME 誘発の高血圧では、心臓中の cAMP と cGMP レベルを低下させ、線維物質である Collagen や Fibronectin などの ECM 合成を増加させる。一方、本研究では亜硝酸ナトリウムの補給により NO を介して血圧および血漿 AT II レベルを低下させたことから (Fig. 15, Fig. 20)、G タンパク質によるシグナルを低下させ PDE1A 活性を抑制することにより cAMP や cGMP を増加させる可能性がある。さらに、NO による PKG 活性化は、cAMP を特異的に加水分解する PDE3 を阻害することで、心臓の cAMP レベルを上昇させる⁸¹。

これらの結果は、心臓リモデリングに対する NO の効果が予想以上に多面的であることを示している。また、これらの結果は NO 供与体および PDE 阻害剤を用いた研究から導き出されたものであり、食事由来の亜硝酸塩や硝酸塩による心臓リモデリングにおける cGMP / cAMP に対する効果については調査されていないことから、さらなる研究が必要である。

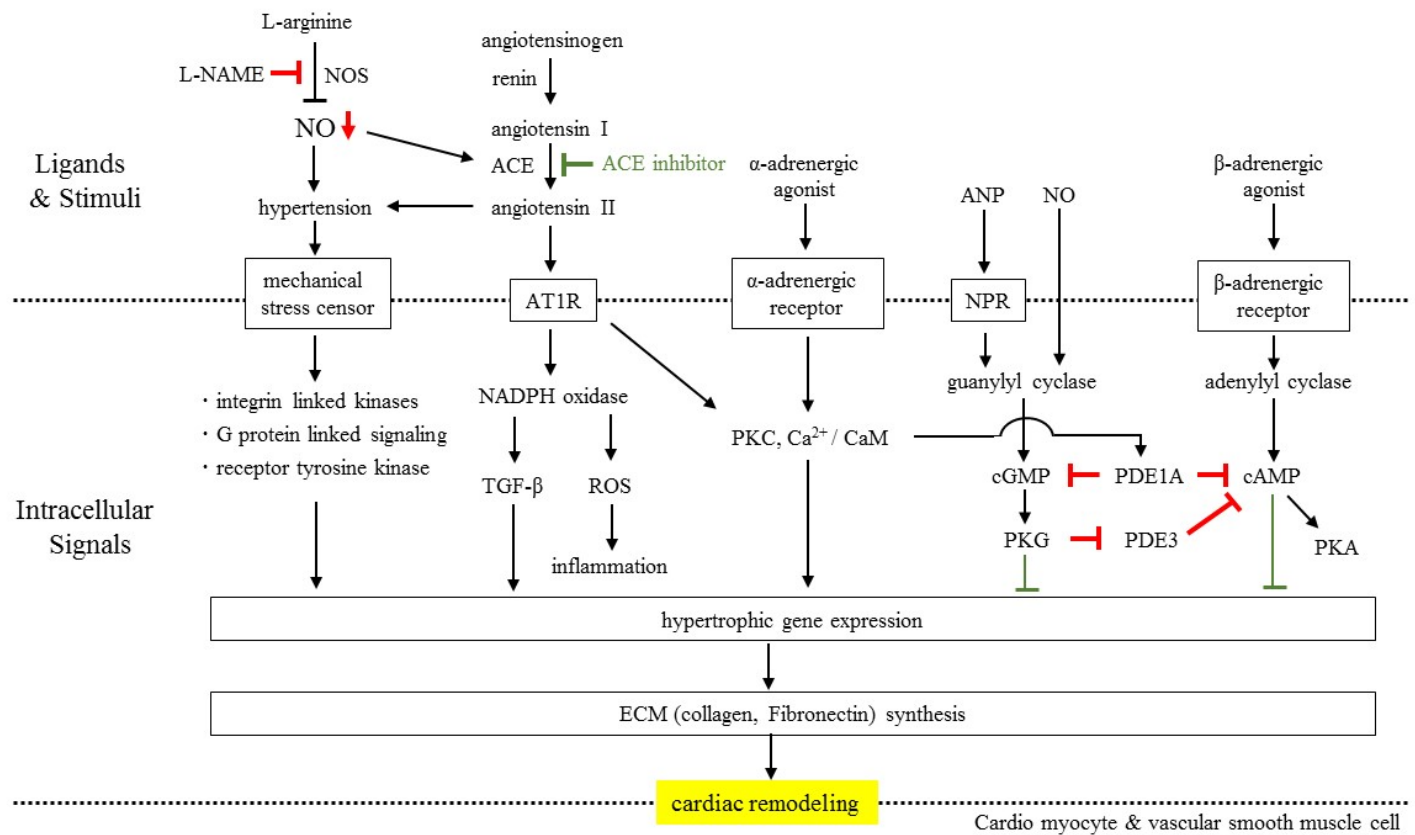


Fig. 23 A proposed schematic representation of the selected signaling related to the inhibitory actions of NO on the process of cardiac remodeling. NO: nitric oxide, NOS NO synthase, ACE: angiotensin converting enzyme, AT1R: angiotensin II type 1 receptor, TGF- β : transforming growth factor- β , ROS: reactive oxygen species, PKC: protein kinase C, CaM: calmodulin, ANP: atrial natriuretic peptide, NPR: natriuretic peptide receptor, cGMP: cyclic guanosine monophosphate, PKG: protein kinase G, PDE: phosphodiesterase, cAMP: cyclic adenosine monophosphate, PKA: pretein kinase A, ECM: extracellular matrix

第5節 食事由来の硝酸塩や亜硝酸塩の代謝経路と人における摂取量

食事から摂取した硝酸塩や内因性 NO の酸化によってできた硝酸塩の約 70% は尿中に排泄されるが、残りの硝酸塩の 25% は生体内に吸収されて腸-唾液経路を経て唾液として口腔内に分泌され、次に口腔内で口腔内細菌により亜硝酸イオンに還元される (Fig. 1)。さらに、胃内に入ると NO および S-nitrosylation タンパク質を産生する⁸⁴。胃内で産生された NO は、胃粘膜の局所で胃の保護作用を示すが、半減期が非常に短い気体分子である⁷²。逆に、より安定な NO 供与体である S-nitrosylation タンパク質および亜硝酸イオンは、上部消化管で吸収され、心臓および末梢血管を含む全身器官に輸送される⁸⁵。これらは、Transnitrosylation 剤およびオンデマンド NO 供与体として酸性条件下や虚血状態で機能する⁸⁵。一方、急性的な亜硝酸塩摂取⁶⁷とは対照的に、食事からの慢性的な亜硝酸塩の摂取は、常に亜硝酸イオンの血漿および組織濃度を上昇させるとは限らない。これは、Kumar らが食事から慢性的に亜硝酸塩を摂取させることにより、マウスの心臓や肝臓の急性虚血・再灌流傷害に対して組織保護効果を発揮することを示しており、その際、血漿や組織レベルの亜硝酸イオン濃度は上昇させなかったが、組織中の S-nitrosylation タンパク質濃度を上昇させていることを明らかにしている⁸⁵。本研究では、心臓におけるタンパク質の S-nitrosylation を測定していないが、胃内で産生される S-nitrosylation タンパク質は細胞保護を必要とする部位 (心臓など) に NO を供給するために重要な役割を果たす可能性がある。このことから、食事からの慢性的な亜硝酸塩や硝酸塩の補給においては血漿や組織中の亜硝酸イオン濃度に反映されない可能性がある⁶⁴。

また、ラットやマウスの硝酸塩摂取による腸-唾液循環は人と異なり、ラットやマウスでは硝酸塩を唾液に濃縮しないため硝酸塩の代わりに亜硝酸塩を使用している⁸⁶⁻⁸⁸。したがって、本研究においても硝酸塩ではなく亜硝酸塩を用いる

ことにより、人の腸-唾液循環を再現するように設定した。

Hord らの報告⁸⁹によれば、Dietary Approach Stop Hypertention (DASH) の食事パターン⁹⁰を用い野菜や果物の摂取量から毎日の硝酸塩摂取量を算出すると、1200 mg/日を上回る。摂取した硝酸塩は生体内に取り込まれた後、腸-唾液循環により約 25%が唾液中に分泌される⁹¹。その唾液から分泌された硝酸塩の 20%が舌上の細菌によって亜硝酸塩に変換される⁹²。したがって、1200 mg の硝酸塩を含む DASH 食では、1 日に 60 mg (硝酸塩 1200 mg の約 5%) の硝酸塩 (亜硝酸塩 46 mg に相当) が胃に入る。本研究における、ラットの亜硝酸ナトリウム摂取量は、ラット 1 匹当たり約 0.2 mg /日である (亜硝酸ナトリウムが 10 mg / L および 100 mg / L 含まれた飲料水をラットは毎日 20 ml 飲む)。硝酸塩や亜硝酸塩が豊富な食品や野菜の摂取量を増やすことにより、これらの亜硝酸塩量 (1 と 10 mg /kg 体重/日、200 g 体重/ラットを基に計算) を達成することができる⁶⁷。すなわち、人においても毎日の野菜や果物の摂取によって容易に達成できるため、臨床的に応用できる可能性を示している。

第6節 小括

本章では、L-NAME 誘導性の NO 不足高血圧モデルラットを用い、慢性的な NO 不足による心臓リモデリングに対する亜硝酸ナトリウムの経口補給による臓器保護効果と臓器保護メカニズムについて検討した。

内因性の NO 合成の低下や NO の生物学的利用率の低下は、高血圧性の心疾患の発症に関与すると考えられている^{61,62}。高血圧性の心疾患は、心不全の主要な原因である⁵⁶。心疾患発症の初期段階として心筋や冠動脈の肥大を引き起こし、さらに心筋細胞のアポトーシスが起こると、それをリモデリングするために線維物質が増加するなど病理学的な特徴が現れる⁵⁷。RAS の活性化は、高血圧に伴う心臓肥大^{57,58}だけでなく、ROS 産生の増加や TGF- β の活性化により心臓リモデリングを引き起こすことが報告されている^{69,70}。

Fig. 24 に示したように、本研究では L-NAME により内因性 NO 合成を阻害することにより、血圧の上昇 (Fig. 15) から心臓リモデリング (TGF- β を増加させ、Collagen や Fibronectin などの線維物質を増加させた) を引き起こすことを示した (Fig. 19) が、亜硝酸ナトリウムやカプトプリルを補給することにより Control 群と同程度まで改善した。そのメカニズムとして ATII の合成や産生抑制 (Fig. 20) や心臓中の AT1R の発現抑制 (Fig. 21, Fig. 22) が関わっていることが示唆された。すなわち、RAS の活性化を抑制することで心臓リモデリングを改善したと考えられた。また今回、L-NAME 誘発性の高血圧モデルラットに与えた亜硝酸ナトリウムの補給量は、人が食事から摂取可能な量で設定していた。

以上のことから、毎日の食事から積極的に硝酸塩や亜硝酸塩を摂取することで、血管内皮障害による NO 産生低下によって起因される心臓リモデリングを軽減できる可能性を示しており、循環器疾患の新たな食事療法の開発に繋がる情報を提供できると考えられた。

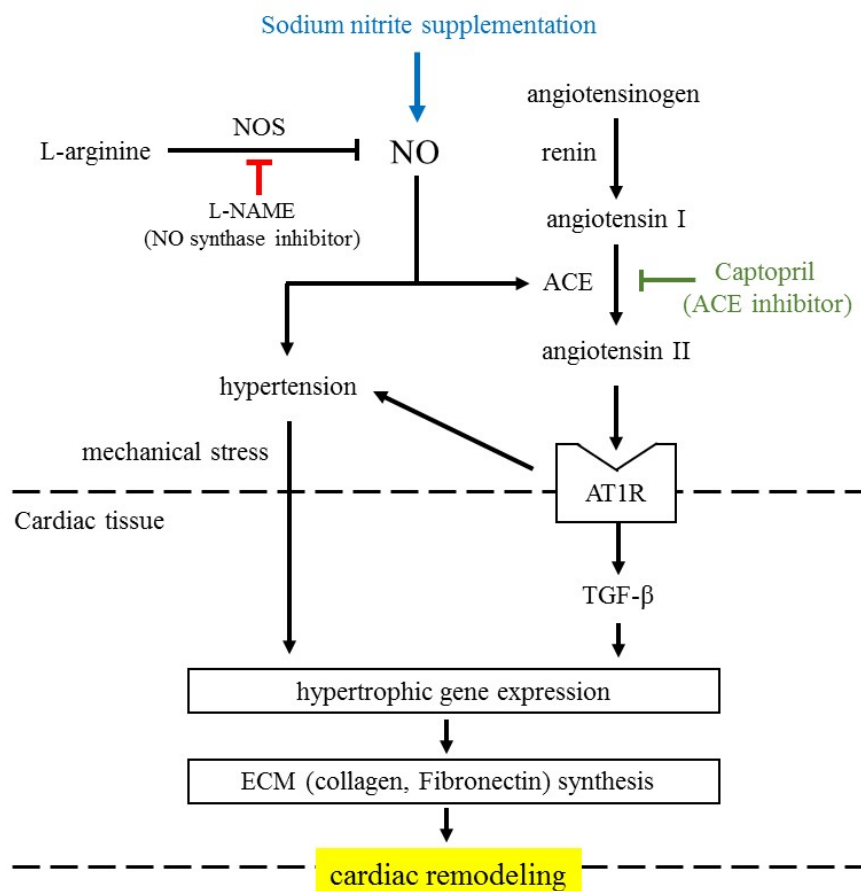


Fig. 24 Organ protective mechanism of sodium nitrite supplementation in NO-deficient cardiac remodeling. NO: nitric oxide, NOS: NO synthase, ACE: angiotensin converting enzyme, AT1R: angiotensin II type 1 receptor, TGF- β : transforming growth factor- β , ECM: extracellular matrix

また、本研究から亜硝酸ナトリウムとカプトプリルは異なる作用機序で心臓リモデリングに対して臓器保護効果を示したことから亜硝酸ナトリウムと ACE 阻害剤との組み合わせが、生活習慣病や老化による血管内皮障害で NO 減少しているような高血圧性の心疾患に対して相乗的に心臓保護効果を発揮する可能性がある。一方で、食事中の硝酸塩や亜硝酸塩量は普遍的であるため降圧剤との併用により、単独の治療に比べ予想以上に血圧を低下させる可能性があることから、高血圧治療薬を服用している患者は、硝酸塩や亜硝酸塩を豊富に含む食品との相互作用に注意する必要がある。

第3章 亜硝酸ナトリウムの補給による呼吸器疾患モデルに対する臓器保護作用

第1節 はじめに

第1章では、L-NAME 処置による内因性 NO が不足した高血圧モデル動物を用いて亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と亜硝酸ナトリウムからの NO 産生に関する主要因子が ALDH2 であることを明らかにした。さらに、第2章では L-NAME 処置による内因性 NO が不足した高血圧モデル動物に対して慢性的に亜硝酸ナトリウムを補給することで心臓リモデリングに対して臓器保護的に働くことを明らかにした。そこで本章では、NO の不足を伴っていない病態に対する亜硝酸ナトリウムの経口補給による有効性について検討を行った。

2018年（平成30年）における、我が国の器官別の死因割合は1位：新生物系疾患（28.4%）、2位：循環器疾患（25.9%）、3位：呼吸器疾患（14.0%）となっている。呼吸器疾患の中における死因としては、高齢化に伴い肺炎が上位に入っているが、それに続く呼吸器疾患に慢性閉塞性肺疾患（COPD）がある。COPDは、全身性の炎症を伴う疾患であり、主要な病態として肺気腫を認める。COPDの最も重要な危険因子は喫煙とされているが、大気汚染粒子への曝露や粉塵や煙への職業的曝露も COPD 発症の危険因子であると考えられている。この COPD の発症に関与する機序を明らかにするために様々なタイプの COPD モデル動物が使用されている^{84, 93, 94}。その COPD モデル動物中でも、エラスターゼ誘発性の肺気腫モデルが広く使用されている。ラットに植物プロテアーゼであるパパインを投与すると早期に気腫を誘発する。これらのエラスターゼ誘導性気腫における病態は、肺の肺胞構造のエラスチン骨格の破壊（気腫）であり、続いて炎症細胞の蓄積および、それに続くサイトカイン産生、他の内因性プロテアーゼに関連する慢性的な炎症が続く（慢性気管支炎）ことにより、COPD に特徴的な複雑な病理学的経過をたどる（Fig. 25）。

一方で、生体内の NO 合成酵素や野菜や果物に含まれる硝酸塩や亜硝酸塩から産生される NO は、酸素と容易に反応して毒性のある ROS を形成するため高濃度では有害であるものの生理学的な濃度では、炎症細胞から血管組織を保護することが広く認められている。硝酸塩や亜硝酸塩は、腸-唾液循環系があり血液や組織中で生理的に再利用され還元作用により NO やニトロ化合物を産生し、高血圧、虚血性心疾患、インスリン抵抗性、COPD などの生活習慣病予防に有益な効果をもたらす⁸⁴。しかしながら、亜硝酸ナトリウムの経口補給による肺気腫に対する影響については解明されていない。

そこで本研究では、ブタ膀胱エラスターゼ (PPE) 誘発性の肺気腫モデルマウスを用いて、人や動物に対して抗酸化作用や抗炎症作用を有する亜硝酸ナトリウムの補給が肺気腫に対しても有効であること明らかにすることを目的に研究を行った (Fig. 25)。

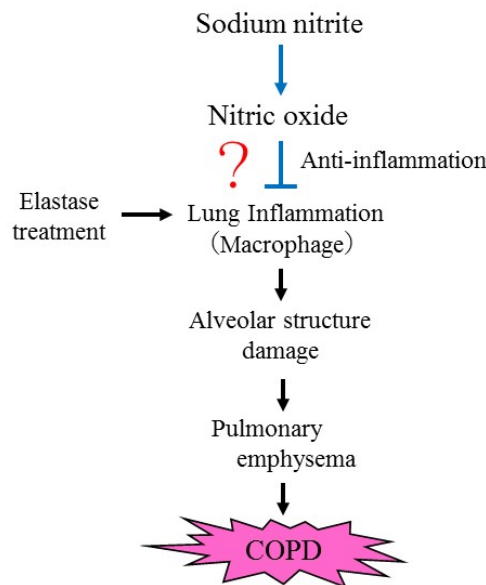


Fig. 25 Effect of sodium nitrite supplementation in elastase-induced pulmonary emphysema. COPD: chronic obstructive pulmonary disease

第 2 節 肺機種モデルへの亜硝酸ナトリウムの補給による体重変化と供給量

本研究では、豚膵臓由来のエラスターゼを肺に噴霧したエラスターゼ誘発性肺気腫モデルを作成し、エラスターゼ処置と同時に低用量の亜硝酸ナトリウム (50 mg/L) または、高用量の亜硝酸ナトリウム (150 mg/L) を飲み水中に与え 3 週間自由摂取させた。

通常、COPD では炎症や呼吸筋酸素消費量の増大に伴いエネルギー消費量が亢進するため体重減少が認められる。本研究では、Table 4 に示したように Control 群、エラスターゼ群、エラスターゼ+亜硝酸ナトリウム群 (飲料水中 50 mg / L および 150 mg / L) のそれぞれで 3 週間マウスの体重に差は現れなかった。このことから、本研究では COPD の前である肺気腫の出現段階であると考えられた。

Table 4 Effect of sodium nitrite supplementation on body weight.

	Control	Elastase	Elastase + Sodium nitrite 50	Elastase + Sodium nitrite 150
First day	17.6 ± 7.34	18.3 ± 2.12	17.7 ± 0.87	18.0 ± 0.25
1 weeks	18.4 ± 0.51	19.7 ± 0.23	18.3 ± 0.56	19.2 ± 0.23
2 weeks	18.4 ± 0.50	19.4 ± 0.24	18.6 ± 0.55	18.9 ± 0.25
3 weeks	18.7 ± 0.47	20.0 ± 0.19	18.7 ± 0.47	19.2 ± 0.27

The values are the means ± SE ($n = 6$ to 12).

次に、内因性 NO 産生と経口補給した亜硝酸ナトリウムの供給量の指標として血漿中の硝酸イオンと亜硝酸イオン濃度を測定した (Fig. 26)。本研究では、4 群間で血漿中の亜硝酸イオン濃度に差はなかった。これは、亜硝酸ナトリウムを摂取すると血中濃度が直ちに増加し、30 分後に血中濃度のピークを迎えるこ

とが報告⁹⁶されており、筆者が行った第1章の急性的な亜硝酸ナトリウム投与実験においても投与した亜硝酸イオンは生体内で直ちに硝酸イオンに変換された (Fig. 10)。このことから、摂取した亜硝酸ナトリウムは体内に吸収された後直ちに亜硝酸イオンから硝酸イオンに変換された結果、血漿中の亜硝酸イオン濃度に影響を与えなかったと考えられた。一方、硝酸イオン濃度は、Control 群と比較してエラスターゼ群で有意に増加し、低用量の亜硝酸ナトリウム補給群では増加していなかった。これは、エラスターゼ処置による炎症性の Nitrosative stress の増加を亜硝酸ナトリウム由来の NO または NO 関連物質が抗炎症作用により抑制した結果であると推察した。したがって、高用量の亜硝酸ナトリウム (飲料水中 150 mg/L) を補給したマウスの血漿中の硝酸イオンの増加は、内因性 NO の窒素酸化物よりも補給した亜硝酸ナトリウムを反映したものだと考えられた。

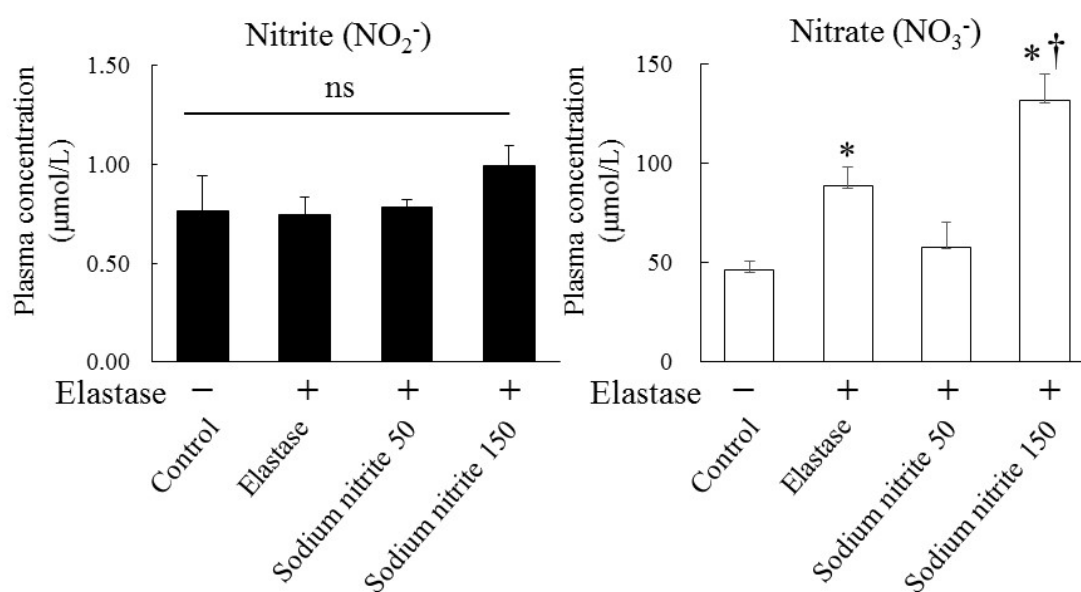


Fig. 26 Nitrite and nitrate concentrations in the plasma. The values are the means \pm SE ($n = 6$ to 12). * $P < 0.05$ v.s. control group, # $P < 0.05$ v.s. elastase group.

第3節 亜硝酸ナトリウムの補給による肺気腫病変抑制効果

エラスターゼ処置における肺気腫への病態に対する亜硝酸ナトリウムの効果を明らかにするため、本研究ではエラスターゼ処置と同時に亜硝酸ナトリウムを3週間補給した。肺組織の組織標本（HE染色）を用いて、病理学的評価を行った。Fig. 27に示したようにControl群では、正常な肺胞構造が確認できたが、エラスターゼ群では肺胞腔の著しい拡大（気腫性病変）が観察された。一方、高用量の亜硝酸ナトリウム補給においては肺胞腔の拡大などの気腫性病変を減少させた（Fig.27）。さらに、気腫性病変への影響を定量化するため組織標本を基に肺胞腔の直径を計測して、平均肺胞径を計測した。その結果においても病理標本の所見と同様にControl群に比べエラスターゼ群で平均肺胞径が増大したが、亜硝酸ナトリウム補給によりControl群と同程度まで抑制していた（Fig. 27）。

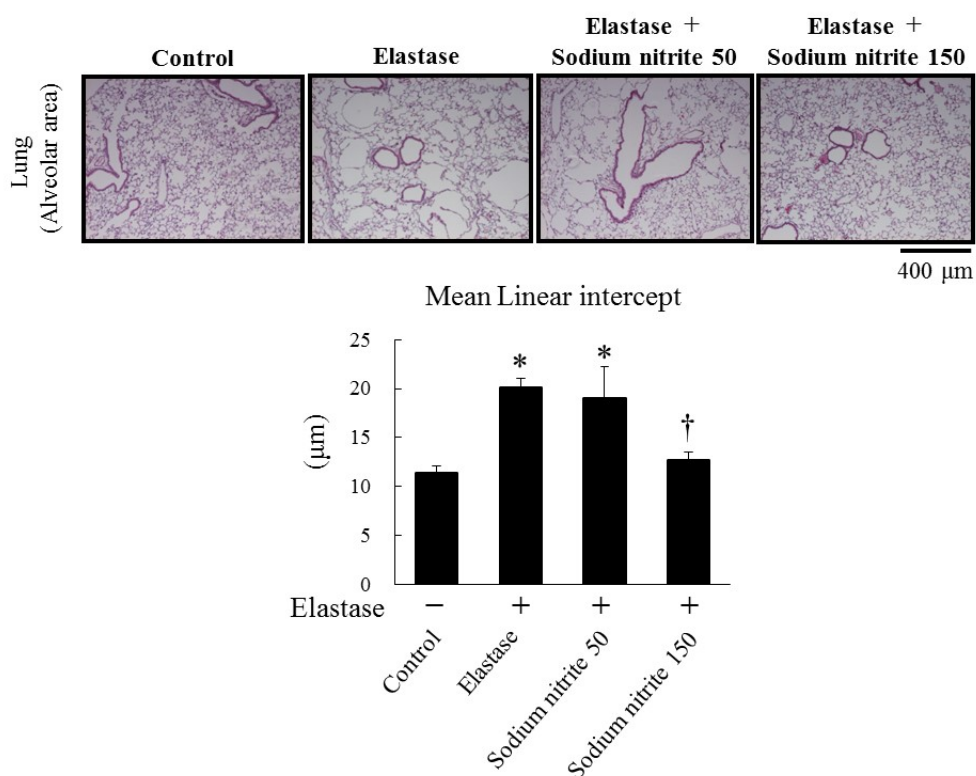


Fig. 27 Histological analysis and mean linear intercepts. The values are the means \pm SE ($n = 6$ to 12). * $P < 0.05$ v.s. control group, † $P < 0.05$ v.s. elastase group.

第4節 亜硝酸ナトリウムの補給による肺気腫の病態悪化抑制メカニズム

エラスターゼを気管内に投与すると、肺胞構造のエラスチン骨格を破壊し、細胞外マトリックスから産生されるタンパク質分解ペプチドにより炎症細胞の走化性を誘導することが報告されている⁹⁷。NOは、この初期段階で起こる肺胞上皮細胞、常在マクロファージ、好中球およびリンパ球などの常在細胞におけるTNF- α などの炎症により誘発されるサイトカイン産生を抑制することによって保護的役割を果たす^{98,99}。そこで、エラスターゼ処置によって起こる肺の炎症に対する亜硝酸ナトリウムの補給による影響について検討を行った。

肺胞の炎症は、肺胞の実質におけるF4/80陽性マクロファージを免疫染色により測定することによって評価した。病理学的な所見において、エラスターゼ処置では、Control群に比べ肺胞実質におけるF4/80陽性マクロファージの著しい増加を認めたが、亜硝酸ナトリウムにより減少していた (Fig. 28)。さらに、炎症を定量的に評価するため、総気管支数に対するF4/80陽性の気管支数の割合を算出した。その結果、亜硝酸ナトリウムの補給はエラスターゼ処置による炎症を用量依存的に改善した (Fig. 28)。

このことから、亜硝酸ナトリウムの経口補給は肺気腫の初期段階で起こる炎症に対して抗炎症作用を介して病態の悪化を抑制することが示唆された。

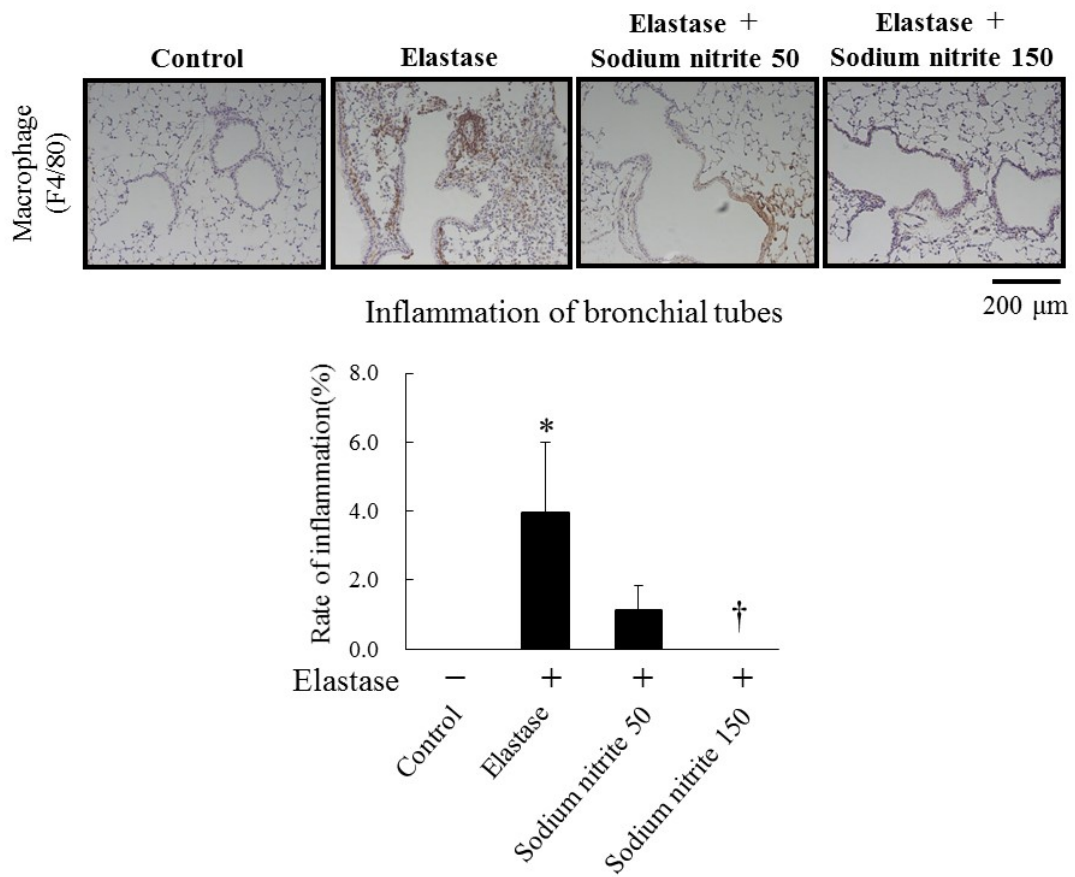


Fig. 28 Immunohistochemistry of F4/80 expression levels. The values are the means \pm SE ($n = 6$ to 12). * $P < 0.05$ v.s. control group, † $P < 0.05$ v.s. elastase group.

エラスターゼの処理により炎症細胞であるマクロファージを増加させ、肺気腫病変を誘導した。Fig. 26 で示したようにエラスターゼ処置により NO の酸化物である硝酸イオン濃度の増加が起こった。一方で、筆者の予想と異なり低用量の亜硝酸ナトリウムの補給では、エラスターゼ処置に比べ硝酸イオン濃度を低下させた。この要因として、炎症細胞により誘導され過剰な NO を産生することが知られている誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現が関係していると仮説を立てた。そこで、肺胞実質における iNOS の発現量を免疫染色により測定した (Fig. 29)。その結果、Control 群に比べエラスターゼ処置群で iNOS の発現を増加させたが、亜硝酸ナトリウムの補給により用量依存的に iNOS の発現を抑制した。この結果は、亜硝酸ナトリウムの補給がエラスターゼ処置による炎症細胞 (マクロファージ) の増加を抑制するという結果 (Fig. 28) と一致していた。このことから、亜硝酸ナトリウムの補給は初期の炎症を抑えることで炎症により誘導される iNOS の発現を抑制したものと考えられた。

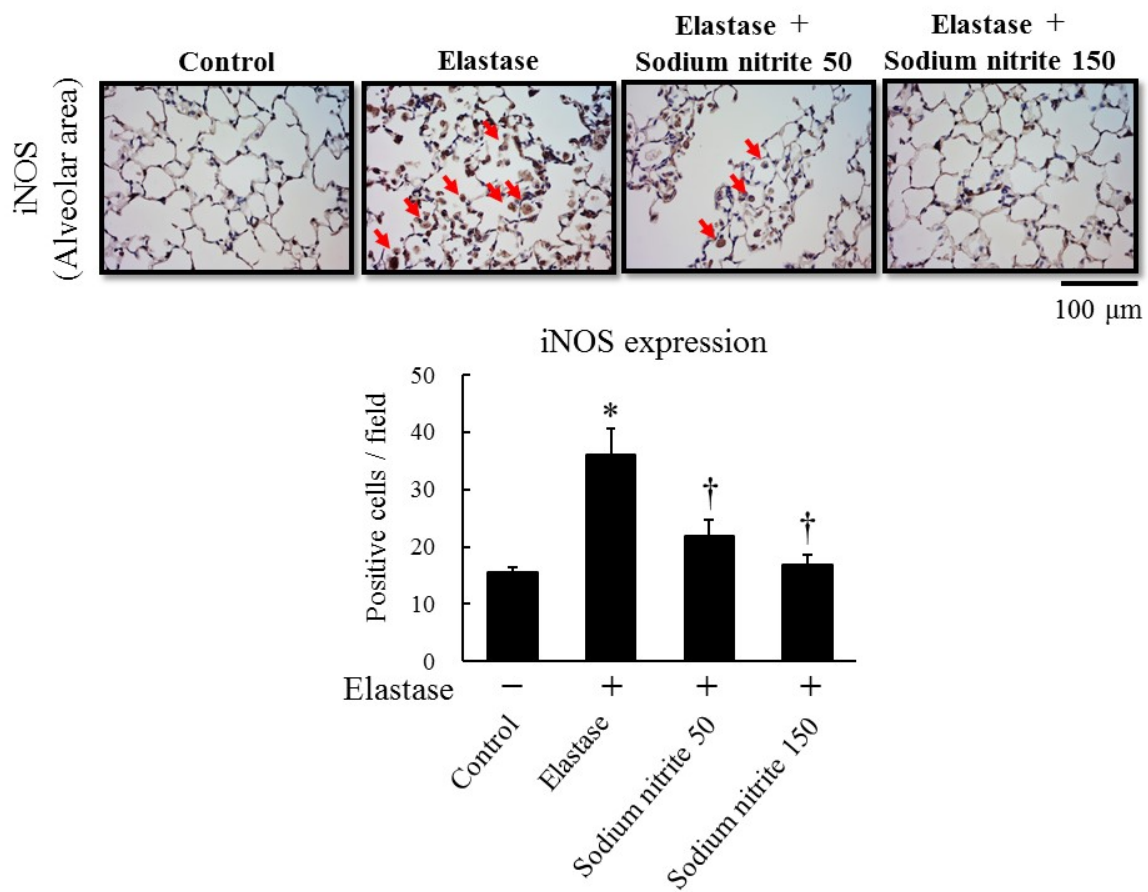


Fig. 29 Immunohistochemistry of iNOS expression levels. The values are the means \pm SE ($n = 6$ to 12). * $P < 0.05$ v.s. control group, † $P < 0.05$ v.s. elastase group.
iNOS: inducible NO syntase

最近、マウスに内因性 NO 合成阻害剤の L-NAME を処置すると eNOS を阻害することにより肺気腫を引き起こすこと¹⁰⁰、エラスターゼ誘発性ラットの肺気腫に対する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の肺胞修復と血管再生による eNOS 発現に正の相関があることが報告されている¹⁰¹。これらの知見は、動物モデルにおけるエラスターゼ誘発性肺気腫に対して NO が有益な効果を示すこと証明しており、亜硝酸ナトリウムの補給がエラスターゼ処置後に起こる肺胞実質の炎症 (マクロファージ) を用量依存的に減少させ、Control 群と同程度まで気腫性病変の進行を抑制するという本研究結果とも一致した (Fig. 27)。

NO は、肺で抗炎症作用を発揮するが、呼気中の NO は気管の炎症のマーカーとしても使用される^{102,103}。すなわち、亜硝酸ナトリウムが NO 供与体であることを考えると、本研究のように亜硝酸ナトリウムを補給することによりマクロファージ誘導される iNOS によって大量の NO がすでに生成されている肺の炎症部位に、さらに NO を供給することになる。この大量の NO 供給は、ニトロ化ストレスを産生する可能性がある。実際、呼気中の NO の増加は硝酸塩が豊富な食事を摂取した後にも検出されている¹⁰⁴、しかし、この呼気中の NO は肺の肺胞からではなく、鼻腔を含む上気道由来である^{103,105}。したがって、亜硝酸ナトリウムの補給は肺胞での NO 産生に反映されていないことを示唆している。では、どのように亜硝酸ナトリウムの補給が有益な効果に寄与しているのかという疑問が残る。

一般に果物と野菜に富む食物の硝酸塩と亜硝酸塩は、腸-唾液循環経路を介して胃に亜硝酸塩が入ると、酸性の胃内で生理学的に触媒されて赤血球中の Nitrosyl heme (Hb-NO) および S-nitrosated proteins (RS-NO) を生成する^{7,84}。胃内で産生された NO は、粘液の血流と粘液分泌を増加させることによって胃粘膜の局所的防御の役割を果たしている^{106,107}。腸管から吸収された亜硝酸および

赤血球中の Hb-NO は肺循環を介して肺に移行する。最近の報告によると、硝酸塩と亜硝酸塩の摂取後に肺組織で RS-NO と亜硝酸の増加が起こり、Transnitrosation と Nitrosylation を介して肺組織を含む哺乳動物組織で抗酸化作用や抗炎症作用を示すことが報告されている⁵⁴。また、エラスターゼ誘発性の肺気腫の初期段階に続く iNOS による病態の進展に eNOS や亜硝酸ナトリウムが治療的に関連している可能性が示唆されている⁹⁷。すなわち、摂取した亜硝酸ナトリウムは、直接肺で NO を産生するというよりも胃内や生体内で何らかの NO 輸送体 (Hb-NO や RS-NO など) を形成し、肺に運ばれ NO を介した臓器保護作用を示したと考えられた。

以上のことから、亜硝酸ナトリウム補給によるエラスターゼ誘発性の肺気腫抑制メカニズムは、炎症の抑制と炎症により誘導される iNOS の発現抑制 (過剰な NO 産生の抑制) が関与していることが示唆された。また、亜硝酸ナトリウムが直接肺胞で NO を産生するというよりは、胃内や生体内で何らかの NO 輸送体 (Hb-NO や RS-NO など) を介して肺に輸送され、肺で NO を介した抗炎症作用を示したと考えられた。

第5節 小括

本研究では、エラスターゼ誘発性の肺気腫モデルマウスを用いて経口的な亜硝酸ナトリウム補給による肺気腫に対する臓器保護効果について検討した。その結果、Fig. 30 に示したように亜硝酸ナトリウムの経口補給は、エラスターゼ処置によって引き起こされた肺気腫に対して抗炎症作用を介して臓器保護作用を示すことが示唆された。本研究では、亜硝酸ナトリウムが生体内に吸収された後、肺に分布し直接肺胞内で NO を産生して臓器保護作用を示したというよりも、胃内または生体内に吸収されたのち Hb-NO や RS-NO を形成した後、肺に移行して Transnitrosation や Nitrosylation を介して抗酸化作用や抗炎症作用^{7, 54, 84}を発揮して肺気腫病変を改善したと考えられた。また、肺気腫病変の病態悪化にはマクロファージなどの炎症系細胞で誘導される iNOS の発現増加に伴う NO の過剰産生が関与していると考えられるが、亜硝酸ナトリウムは肺気腫の初期段階で起こるマクロファージなどの増加を抑制し、同時に iNOS の発現も低下させることで肺気腫の病態悪化を抑制していることが示唆された (Fig. 30)。

本研究で用いたマウスの飲料水中に加えた亜硝酸ナトリウムの量は、低血圧やメトヘモグロビン血症を含む有害な副作用を引き起こさない量であり、人が果物や野菜を毎日積極的に摂取することで達成可能である^{108, 109}。しかし、最近では硝酸塩補給が COPD 患者の運動パフォーマンスに有益な効果を示すことが報告されているが、この COPD 患者に対する硝酸塩摂取時のメトヘモグロビン濃度は測定されていない¹¹⁰⁻¹¹³ことから、将来の臨床応用するために調査することが望まれる。

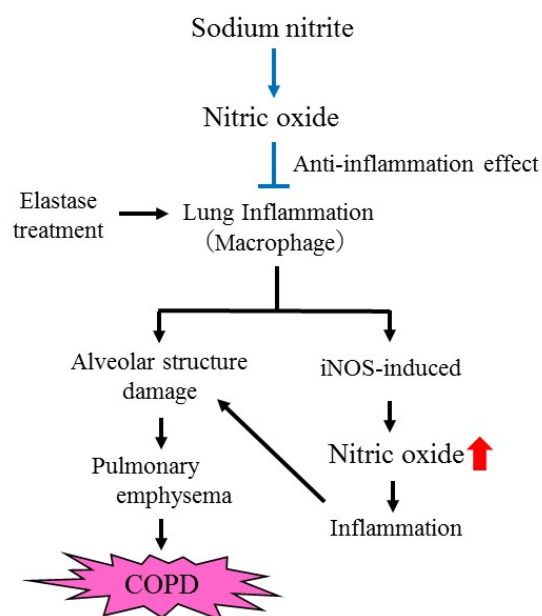


Fig. 30 Protective mechanism of oral supplementation of sodium nitrite in elastase-induced pulmonary emphysema. iNOS: inducible NO synthase, COPD: chronic obstructive pulmonary disease

以上、亜硝酸ナトリウムの経口的な補給が COPD の主要病態である肺気腫に対して抗炎症作用を介して臓器保護的に働くことを示した。この結果は、硝酸塩や亜硝酸塩を豊富に含む野菜や果物の積極的な摂取が炎症を伴う肺気腫に対して有効であることを示唆しており、肺気腫に対する新たな栄養学的な予防や治療に応用できるものと考えられる。

総括

硝酸塩や亜硝酸塩は、これまで有害物質として位置づけられてきた。しかしながら、近年の研究により、我々の摂取している大部分の硝酸塩や亜硝酸塩は野菜や果実などの食事由来であり、食事から摂取した硝酸塩や亜硝酸塩は、腸-唾液循環により生体内を巡り還元されることで NO を介した生理作用を示すことから生体保護的に機能する可能性がある。しかし、硝酸塩や亜硝酸塩からの NO 産生メカニズムや疾患に対する影響に関しては解明されていなかった。そこで本研究では、*in vivo* における亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と NO 産生に対する主要因子を同定するとともに、NO 不足により起因される心臓リモデリングと肺の炎症によって引き起こされる肺気腫に対する亜硝酸ナトリウムの経口補給の有効性について検討を行った。

第 1 章では、NO 不足による高血圧モデル動物に亜硝酸ナトリウムを経口または静脈内に投与すると投与量依存的な血圧降下作用を示し、正常酸素環境下における亜硝酸ナトリウムからの NO 産生は、NO 供与体である NTG と同様に主要臓器中に発現している ALDH2 が主要因子であることを明らかにした。このことから亜硝酸ナトリウムを補給することにより各種臓器で NO を介した生理作用を示すことが示唆された。そこで第 2 章では、L-NAME 処置による内因性 NO 不足に伴う高血圧性の心疾患モデル動物を作成して、慢性的な亜硝酸ナトリウム補給による臓器保護作用について検討を行った。L-NAME の処置は、血圧の上昇と心臓リモデリング（心臓や冠動脈の肥大や線維化など）を誘発し、そのメカニズムに血漿の ATII 濃度の上昇や心臓に発現する AT1R の発現増加が関与していることが分かった。一方で、日常的に食事から摂取可能な量の亜硝酸ナトリウムを経口補給させることで NO の不足で起こった RAS の活性化を抑制し、心臓リモデリングを改善することを明らかにした。第 1 章と第 2 章の研究では、

NO が不足した条件下における亜硝酸ナトリウム補給の有効性を明らかにできた。そこで第3章では、食事療法が確立されていない呼吸器疾患を対象に NO の不足を伴わない病態に対する亜硝酸ナトリウム補給の影響を検討した。タンパク質分解酵素のひとつであるエラスターゼを肺に噴霧した肺気腫モデル動物を作成し、そこに亜硝酸ナトリウムを経口補給すると抗炎症作用を介して肺の炎症を抑えることにより、肺気腫の病変進行を抑制することを明らかにした。

以上のことから、Fig. 31 に示したように経口的に補給した亜硝酸ナトリウムは生体内に吸収された後、全身に分布して各臓器に存在する ALDH2 により NO に変換され、内因性の NO 産生低下によって起こる血圧上昇および RAS の活性化を抑制することで心臓リモデリングを改善し、炎症を伴う肺気腫に対しては抗炎症作用を介して病態の進行を抑制することが示唆された。

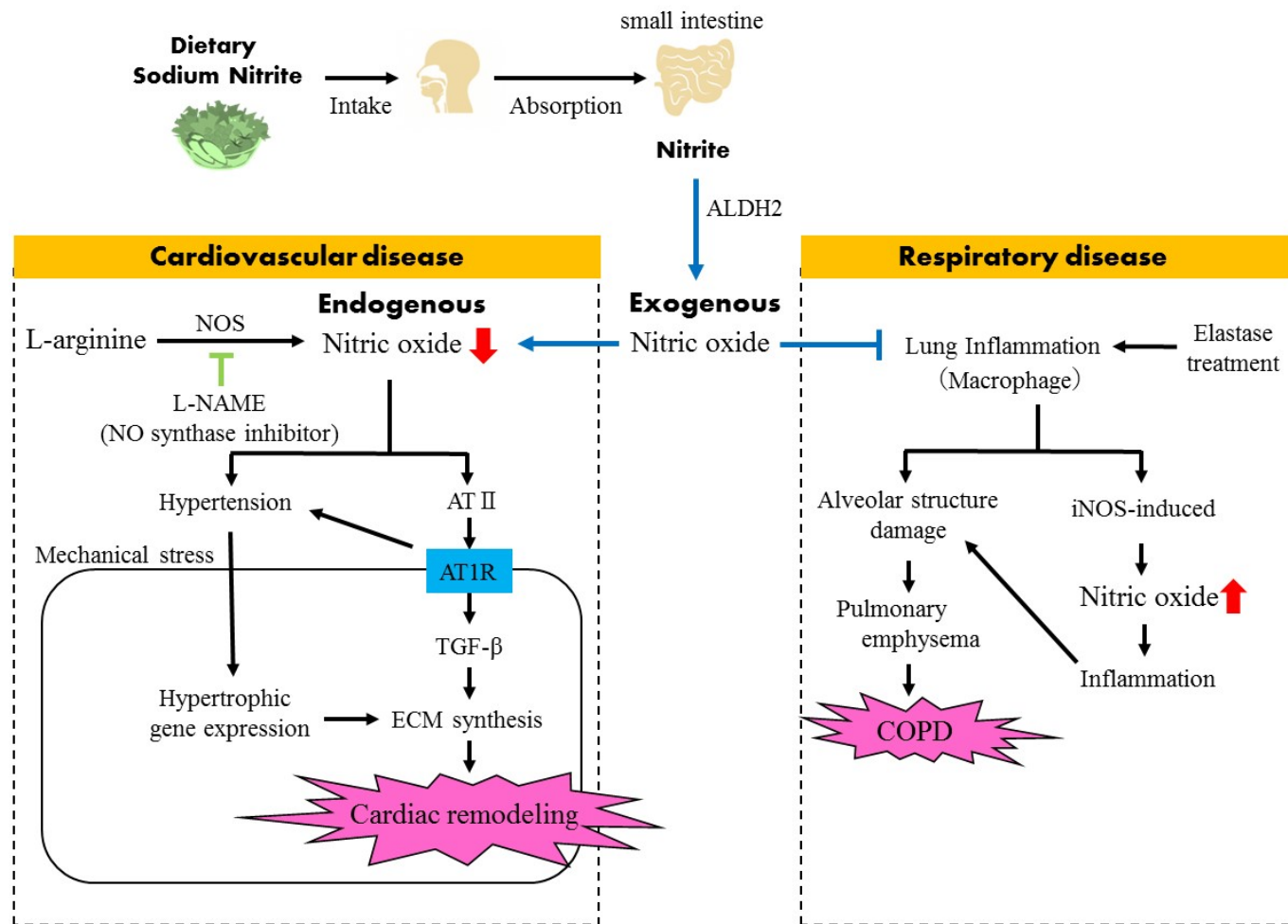


Fig. 31 Protective effect of oral supplementation of sodium nitrite in cardiovascular disease and respiratory disease.

ALDH2: mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2, NOS: NO synthase, AT II: angiotensin II, AT1R: angiotensin II type 1 receptor, TGF-β: transforming growth factor-β, ECM: extracellular matrix, iNOS: inducible NO synthase, COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

本研究で用いた亜硝酸ナトリウムの投与量は、人が積極的に野菜や果実を摂取することで達成することが可能である。また、人は、げっ歯類と異なり唾液腺に硝酸塩を濃縮できるため硝酸塩-亜硝酸塩-NOの変換経路がより効率的であると考えられる。すなわち、人においては硝酸塩や亜硝酸塩の摂取後においても腸-唾液循環系を介して常にNOを産生できることから内因性のNO産生が低下した際のバックアップシステムやオンデマンドのNO供与体としての役割を果たす可能性がある。しかし、硝酸塩や亜硝酸塩から産生されたNOの全身への輸送形態やNOによる生体調節機構については複雑であり、不明な点が多く残っていることから、今後の研究に期待したい。

以上、本研究は硝酸塩や亜硝酸塩を用いた基礎研究に役立つ基礎データを提供するとともに、硝酸塩や亜硝酸塩の積極的な摂取が心臓リモデリングや肺気腫のような循環器疾患や呼吸器疾患に対して予防または治療効果を発揮する可能性を示したことから臨床的に応用可能な新規食事療法の開発に役に立つ情報を提供できたと考えられる。

実験の部 目次

第1章 実験方法

- 1-1. 研究動物と動物倫理
- 1-2. 血圧測定方法
- 1-3. 亜硝酸ナトリウムの経口と静脈内投与実験手順と解析方法
- 1-4. ALDH2 と XO 阻害における亜硝酸ナトリウム投与実験手順と解析方法
- 1-5. 血漿・組織中の亜硝酸イオンと硝酸イオン濃度の測定
- 1-6. Western blot による ALDH2 の発現量の測定
- 1-7. 統計解析

第2章 実験方法

- 2-1. 研究動物と動物倫理
- 2-2. 血圧測定方法
- 2-3. 血漿・心臓組織中の亜硝酸イオンと硝酸イオン濃度の測定
- 2-4. 心臓の病理組織標本の作成と評価方法
- 2-5. RT-PCR による mRNA 量の測定
- 2-6. 血漿中のアンギオテンシン II 濃度の測定
- 2-7. 心臓組織の免疫染色標本の作成と評価方法
- 2-8. 統計解析

第3章 実験方法

- 3-1. 研究動物と動物倫理
- 3-2. 解剖および血液、組織サンプル採取
- 3-3. 血漿中の亜硝酸イオンと硝酸イオン濃度の測定
- 3-4. 肺の病理組織標本の作成と評価方法
- 3-5. 肺組織の免疫染色標本の作成と評価方法
- 3-6. 統計解析

第1章 実験方法

1-1. 研究動物と動物倫理

Sprague-Dawley 系雄性ラット（5 週齢，体重 200～250g）を Kiwa Laboratory Animals (Wakayama, Japan) から購入した。動物は到着後、蒸留水と標準飼料（CE-2, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan）を 7 日間自由摂取させて環境に順化させた。飼育環境は、12 時間 / 12 時間の明/暗サイクルで行った。実験終了時には高濃度のペントバルビタール（150 mg/kg; Somnopentyl®, Kyoritsu Seiyaku LTD, Tokyo, Japan）の腹腔内投与によって安楽死させた（Animal ethics 2012）¹¹⁴。実験は、Josai Life Science Center の動物実験委員会により承認（承認番号：H23014）されており、アメリカ国立衛生研究所（NIH）による実験動物のケアおよび使用のガイドラインに従って実施した。

1-2. 血圧測定方法

6 週齢のラットに内因性 NO 合成阻害剤である *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) を 1g/L で飲水に加え 3 週間摂取させ NO 不足による高血圧動物を作成した 6。その後、ラットの自律反射を低下させることなく 3～4 時間安定した麻酔効果を維持できるチオブタバルビタール（Inactin®, 80mg/kg ip, St. Louis, MO, USA）で麻酔をかけた（麻酔の深度は、呼吸数と尻尾への刺激反射によって確認した）。また、Inactin は、他の麻酔薬と比較して心血管機能（心拍数、BP、動脈 pH）にほとんど影響を及ぼさないことが報告されている¹¹⁵。動物用のウォーターベッドで体温を維持しながら左頸静脈に薬物投与用のカニューレ（INTERMEDIC™ PE-50tubing, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD）を挿入し、右頸静脈から血液試料を採取した。さらに、動

脈血圧を測定するために下肢大腿動脈にカニューレを留置し、血液の凝固を防ぐために生理食塩水で希釈したヘパリン（30 IU/mL）を注入した。その後、Transducer（MLT0670, BP transducer, ADInstruments, Oxford, UK）に接続し、PowerLab®システム（AD Instruments, Oxford, UK）によって60分間、連続的に血圧を記録し、5分おきの平均値を算出して評価を行った。

1-3. 亜硝酸ナトリウムの経口および静脈内投与における血圧測定と解析方法

L-NMAE 誘発性の NO 不足高血圧ラットに亜硝酸ナトリウム（Wako Pure Chemical Industries, LTD., Tokyo, Japan）を経口（Saline, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/kg）または、静脈内（Saline, 17, 50, 150 μ mol/kg）に投与した。本研究では、心臓血管系および血圧に及ぼすカリウムの影響を防ぐために亜硝酸カリウムの代わりに亜硝酸ナトリウムを使用した。

さらに、亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と比較するため、NTG（Vasolator®, Sanwa Kagaku Kenkyusho CO., LTD, Nagoya Japan）は 0.01, 0.1, 1 μ mol/kg、Diethylamine nonoate（DEA/NO, A.G. Scientific, Inc., San Diego, CA）は、0.01, 1, 10 μ mol/kg を同様に投与した。なお、DEA / NO は、アルカリ性溶液下で安定であるため 10mM NaOH に溶解し、使用直前まで-20°Cで保存した。投与時に保存した DEA/NO を 10 倍量の生理食塩水で希釈して用いた。

血圧降下作用を評価するため、初期血圧と各 NO 供与体を投与後の血圧が最も低下した値から最大血圧低下率（% drop of MAP）を算出し、さらに詳細に評価するために血圧の圧力-時間曲線下面積（AUC of MAP）を算出した。

1-4. ALDH2 と XO 阻害における亜硝酸ナトリウムの血圧測定と解析方法

L-NMAE 誘発性の NO 不足高血圧ラットに ALDH2 阻害剤である Cyanamide (25 mg/kg) (Wako Pure Chemical Industries, LTD., Tokyo, Japan) と Chloral hydrate (66 mg/kg) (Wako Pure Chemical Industries, LTD., Tokyo, Japan) を各 NO 供与体投与 60 分前 (腹腔内投与) と 20 分前 (静脈内投与) に処置し、さらに XO 阻害剤の Allopurinol (100 mg/kg) (Wako Pure Chemical Industries, LTD., Tokyo, Japan) は 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁した後、各 NO 供与体投与 20 分前に腹腔内投与した^{25,38,116,117}。次に、亜硝酸ナトリウム (Saline, 17, 50, 150 $\mu\text{mol/kg}$) を体重 100 g 当たり 100 μL になるように調製して静脈から急速注入した。さらに、亜硝酸ナトリウムの血圧降下作用と比較するため NTG (0.1, 1 $\mu\text{mol/kg}$) または DEA/NO (1 $\mu\text{mol/kg}$) を同様に投与した。なお、Martin らによって NTG と DEA/NO の血圧降下作用に対する Chloral hydrate の影響は報告されていた¹¹⁸ことから本研究では実施しなかった。これらの血圧降下作用を評価するため % drop of MAP と AUC of MAP を算出した。

1-5. 血漿および組織中の亜硝酸イオンと硝酸イオン濃度の測定

血液サンプルは、亜硝酸ナトリウム投与前の 0 分および投与後の 1, 5, 15, 30, 45, 60 分に頸静脈から採取した。さらに、組織サンプル (脳、肺、大動脈、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胃、空腸) は、亜硝酸ナトリウム投与後の 0, 5, 15, 30, 60 分に採取して直ちに液体窒素に浸して使用するまで -80°C で保存した。各サンプル中のタンパク質を除去するためメタノールを用いて、組織サンプル : メタノール = 1 : 2 (重量/体積)、血漿 : メタノール = 1 : 1 (体積/体積) で調製後、遠心分離 (10,000g, 5 分) した。採取した血漿と組織中の硝酸イオンと亜硝酸イオン濃度は、NO_x 測定専用の HPLC システム (ENO-20, Eicom, Kyoto, Japan) を用いて行

った^{108,119}。検出方法は、カラムにより亜硝酸イオンと硝酸イオンを分離し、さらに硝酸イオンは亜硝酸イオンに還元した後、グリース試薬で発色させ 540 nm の波長で検出した。その後、血漿と組織中の亜硝酸イオン濃度と AUC を算出し、亜硝酸ナトリウムの消失に対する Cyanamide の影響を評価した。

1-6. Western blot による ALDH2 の検出

各臓器重量の 2 倍量の RIPA buffer (25 mmol/L Tris · HCl pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L NaF, Protease inhibitor cocktail 0.1 tablet/mL) を加え 2 分間ホモジネートした後、遠心分離 (12,000 G, 4°C, 5 min) して上澄みを回収しサンプルとした。サンプル中のタンパク濃度を BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) で測定し、タンパク濃度を 10 mg/mL に調製した。その後、サンプルと等量の SDS sample buffer (0.5 mol/L Tris · HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% glycerine, 1%BPB, 6% 2-mercaptoethanol) を加え 95 ± 5°C で 5 分間ボイルした。SDS-PAGE を行うため調製したサンプルと分子量マーカーを各レーンに 5 μL ずつアプライした (25 μg/lane)。SDS-PAGE 後、タンパク質を PVDF 膜 に転写した。その後、5% スキムミルクに一次抗体 (ALDH2 goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を 1000:1 で加えブロッキングしながら一晩反応 (室温) させた。PVDF 膜を T-PBS (0.1% Tween 20 PBS) で 3 回洗浄し、二次抗体 (Anti-goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 処理を 1 時間行った。蛍光発色試薬 Super Signal™ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) を用い LAS-1000 plus (FUJIFILM Corporation, Tokyo, Japan) で蛍光強度を検出し、Gene Tools® (Synoptics LTD., Cambridge, UK) で蛍光強度を数値化した。

1-7. 統計解析

全ての値は、平均値 ± 標準誤差として示した。統計解析は、Student's *t*-test によって行い。P<0.05 をもって有意差有りとした。

第2章 実験方法

2-1. 研究動物と動物倫理

Sprague-Dawley 系雄性ラット（6 週齢、体重 200～250g）を Kiwa Laboratory Animals (Wakayama, Japan) から購入した。動物は到着後、蒸留水と標準飼料（CE-2, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan）を 7 日間自由摂取させて環境に順化させた。飼育環境は、12 時間/12 時間の明/暗サイクルで行った。7 週齢のラットを体重で無作為に次の 5 群に分け 8 週間飼育した。1) Control 群（蒸留水のみ）、2) L-NAME 群（1 g/L）、3) L-NAME + 亜硝酸ナトリウム（10 mg/L）群、4) L-NAME + 亜硝酸ナトリウム（100 mg/L）群、5) L-NAME + カプトプリル（100 mg/L）群とした。なお、ラットやマウスなどのげっ歯類は吸収され体内を循環している硝酸塩を唾液中に濃縮しないことから本研究では人間と同様の腸-唾液循環経路を再現するため硝酸塩の代わりに亜硝酸ナトリウムを用いた（腸-唾液循環経路）^{86, 88, 95}。ACE 阻害剤であるカプトプリルは、Wako Pure Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan) から購入した。実験終了時には、ペントバルビタール（150 mg/kg; Somnopentyl®; Kyoritsu Seiyaku LTD, Tokyo, Japan）を腹腔内投与して安楽死させた¹²⁰。本実験は、Josai Life Science Center の動物実験委員会により承認（承認番号：H25058）されており、NIH による実験動物のケアおよび使用のガイドラインに従って実施した。

2-2. 血圧測定方法

8 週間飼育した L-NAME 誘発性高血圧ラットにチオブタバルビタールナトリウム塩水和物（Inactin®, 80 mg/kg 腹腔内; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）で麻酔した後、体温を低下させないようにウォーターベッドで体温管理をした。血

圧の測定は、下肢の大腿動脈にポリエチレンカテーテル (INTERMEDIC™ PE-50; Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) を留置した。その後、血液の凝固を防ぐためにヘパリンを生理食塩水 (30 IU/ mL) で希釈して注入した。動脈に留置したカテーテルを圧測定用の Transducer (MLT0670, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA) に接続し、さらにデータ解析システムの PowerLab® (AD Instruments, Milford, MA, USA) に繋いで 10 分間の血圧を記録した。記録したデータを基に 10 分間の血圧の平均値を算出した。

2-3. 血漿および心臓中の亜硝酸イオンおよび硝酸イオン濃度の測定

解剖時に採取した血漿と心臓組織サンプルのタンパク質を除去するためメタノールを用いて、組織サンプル：メタノール=1：2 (重量/体積)、血漿：メタノール=1：1 (体積/体積) で調製後、遠心分離 (10,000g, 5 分) を行った。その後、血漿と心臓組織中の亜硝酸イオンと硝酸イオン濃度を NO_x 測定専用の HPLC システム (ENO-20; Eicom, Kyoto, Japan) を用いて測定した^{108,119}。検出方法は、カラムにより亜硝酸イオンと硝酸イオンを分離し、さらに硝酸イオンは亜硝酸イオンに還元した後、グリース試薬で発色させ 540 nm の波長で検出した。

2-4. 心臓の病理組織標本の作成と評価方法

心臓組織を 10%ホルムアルデヒドで固定した後、パラフィンに包埋した。包埋した心臓組織を 4 μm の切片にし、線維部位が青く染色される Masson's-trichrome 染色を行い心臓の左心室および血管の肥大と線維化について定量化した。心臓の左心室の肥大と線維化は、高解像度ビデオカメラを備えた光学顕微鏡 (BZ-X700; Keyence, Osaka, Japan) を用いて心臓切片の全領域を倍率 4 倍で撮影した。撮影した画像を用い左心室の総面積に対する左心室の内腔面積の比を算

出した。心臓の線維化は、心臓の総面積に占める線維化部位（アニリンブルーで染色された青色部分）の割合（%）を算出した。

心臓の冠動脈の肥大と血管周囲の線維化は、高解像度ビデオカメラを備えた光学顕微鏡（DP50, Olympus, Tokyo, Japan）を用いて各心臓切片から直径 50~300 μm の冠動脈を倍率 400 倍で約 20 個撮影した。撮影した画像を用い、冠動脈の肥大は血管全面積（内膜、中膜、外膜）に対する血管内腔面積の比を算出した。さらに、血管の線維化は血管全面積（内膜、中膜、外膜）に占める血管周囲の線維化面積（外膜部分）の割合（%）を算出した。画像は、Image J ソフトウェア（v.1.48, National Institutes of Health, USA）を用いて分析した。

2-5. RT-PCR

解剖時に採取した心臓組織サンプルは、採取後直ちに RNA 安定化溶液（RNA later[®]溶液; Ambion, Carlsbad, CA, USA）に浸し測定するまで-30°Cで保存した。心臓組織中からの RNA 抽出は、ISOGEN II（Nippon Gene Co., LTD, Tokyo, Japan）を用いて行った。抽出した RNA は、cDNA 合成キット（PrimeScript[®]II; Takara Bio Inc., Shiga, Japan）を用いて cDNA 化した。

RNA の増幅は、Gene RED PCR Mix（Nippon Gene, Tokyo, Japan）に 1 μl の cDNA とプライマーを加え、サーマルサイクラー（PC806, ASTEC, Fukuoka, Japan）を用いて増幅させた。なお、標的の mRNA（GAPDH, TGF- β , コラーゲン I 型, フィブロネクチン, AT1R）に対するプライマーは、STAR-OLIGO（Rikaken CO., LTD., Aichi, Japan）で合成した。サーマルサイクラーの温度設定（熱変性、アニーリング、伸展）とサイクル数は、すでに報告されている方法 121-124 に従って実施した。増幅させた mRNA サンプルは、2%アガロースゲル（TAE 緩衝液：0.04M トリス-アセテート, 0.001M EDTA）で電気泳動し、

エチジウムブロマイドで染色を行い撮影した。ゲル中のバンドの発光強度を Image J ソフトウェア (v.1.48, National Institutes of Health, USA) を用いて数値化し、標的の mRNA 発現量と GAPDH 発現量の比を算出した。

2-6. アンギオテンシン II の血漿中濃度の測定

血漿中の AT II 濃度は、ELISA キット (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて測定した。

2-7. 心臓組織の免疫染色標本の作成と評価方法

心臓組織を 10%ホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋した。次いで 4 μm 切片に切断した。切片は、キシレンで脱パラフィンし、内因性ペルオキシダーゼの活性を過酸化水素によりブロックした。次にリン酸緩衝液を用いて洗浄し、AT1R rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) で一晩反応させた後、二次抗体 MAX-PO (MULTI) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) と反応させた。ペルオキシダーゼ基質ジアミノベンジジン (ImmPACT™ DAB; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて発色させた。免疫染色の定量化は、高分解能ビデオカメラ (DP50, Olympus, Tokyo Japan) を備えた光学顕微鏡を用いて $\times 400$ の倍率で心臓組織あたり 20 視野を分析した。その後、総面積に占める陽性染色領域 (茶色) の割合 (%) を算出した。すべての画像は、Image J ソフトウェア (v.1.48, National Institutes of Health, USA.) を用いて分析した。

2-8. 統計解析

全ての値は、平均値 \pm 標準誤差として示した。データは、One-way ANOVA の Tukey-Kramer 検定により分析し、 $P < 0.05$ をもって有意差有りとした。

第3章 実験方法

3-1. 実験動物と動物倫理

7週齢の C57BL/6J マウスを SLC (Japan Inc., Tokyo, Japan) から購入し、蒸留水と標準的な飼料 (CE-2, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) を与え 12 時間自由摂取させることにより環境に順化させた。飼育環境は、12 時間 / 12 時間の明/暗サイクルで行った。本実験は、Josai Life Science Center の動物実験委員会によって承認 (承認番号 : H27077) されており、NIH による実験動物のケアおよび使用のガイドラインに従って実施した。

マウスを体重により無作為に、次の 4 群 ($n=6$ to 12) に分けた。1) Control 群 (saline 処置、 $n=6$)、2) エラスターゼのみ ($n=12$)、3) エラスターゼ+亜硝酸ナトリウム (50 mg/L、 $n=6$)、4) エラスターゼ+亜硝酸ナトリウム (150 mg/L、 $n=12$) とした。投与した亜硝酸ナトリウム (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) は、飲み水中に溶解して自由飲水させた。

エラスターゼ誘発性の肺気腫モデルマウスは、Pentobarbital (50 mg/kg) の腹腔内注射で麻酔し、次に豚膵臓由来エラスターゼ (50 μ L/匹) (Sigma, St. Louis, MO, USA) を MicroSprayer[®] (Penn-Century, Inc., Philadelphia, PA, USA) を用いて気管内投与した。その後、温度および湿度が制御された部屋に個々のケージで 3 週間飼育した。

3-2. 解剖および血液、組織サンプル採取

マウスをペントバルビタール (50 mg/kg) の腹腔内注射で麻酔後、血液サンプル (約 0.5 mL) を腹部大動脈から採取した。その後、EDTA を加えたチューブに移して遠心分離により血漿を回収して-30°Cで保存した。採血後、肺組織を採取し組織評価用のサンプルとして一部ホルマリン保存し、残りの肺組織サンプル

は使用するまで-80°Cで保存した。

3-3. 血漿中の亜硝酸イオンと硝酸イオン濃度の測定

解剖時に採取した血漿サンプルのタンパク質を除去するためメタノールを用いて、血漿：メタノール=1：1（体積/体積）で調製後、遠心分離（10,000g, 5分）を行った。その後、血漿サンプル中の亜硝酸イオンと硝酸イオン濃度をNO_x測定専用のHPLCシステム（ENO-20; Eicom, Kyoto, Japan）を用いて測定した^{108,119}。検出方法は、カラムにより亜硝酸イオンと硝酸イオンを分離し、さらに硝酸イオンは亜硝酸イオンに還元した後、グリース試薬で発色させ540 nmの波長で検出した。

3-4. 肺の病理組織標本の作成と評価方法

10%（w/v）中性緩衝ホルマリン溶液に固定した肺組織はパラフィン包埋後、厚さ5 μmの切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色した。肺気腫病変では肺胞の破壊が起こるため平均肺胞径（Mean Linear Intercept, μm）を計測した。各マウスの肺胞部分を光学顕微鏡（DP50, Olympus, Tokyo Japan）で10視野撮影し、200個の肺胞径を測定して平均値を算出した^{125,126}。

3-5. 肺組織の免疫染色標本の作成と評価方法

10%（w/v）中性緩衝ホルマリン溶液で固定した肺組織はパラフィン包埋後、4 μmの切片を作成した。キシレンで脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性を過酸化水素でブロックし、次いでリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いて洗浄した。その後、マクロファージ（F4/80）ラットモノクローナル抗体（希釈率1：200）（Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA）またはiNOSウ

サギポリクローナル抗体(希釈率 1:400) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) を添加して一晩インキュベートした。次に、二次抗体マウス MAX-PO (Rat) (Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) と共にインキュベートした。発色は、ペルオキシダーゼ基質ジアミノベンジジン (ImmPACT™ DAB; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いて行った。免疫染色の定量化は、高解像度ビデオカメラを装備した光学顕微鏡 (DP50, Olympus, Tokyo Japan) を用いて、それぞれの肺組織切片から気管支部分を 20 視野 (炎症範囲 : F4/80)、肺胞部分を 5 視野 (iNOS の発現) 撮影した。撮影した画像を基に気管支の総数に対する F4 / 80 陽性気管支数の割合 (%)、および 1 視野当たりの iNOS 陽性細胞の平均数を算出して評価を行った。すべての画像を Image J ソフトウェア (Ver.1.48, National Institutes of Health, USA) を用いて分析した。

3-6. 統計解析

全ての値は、平均値 ± 標準誤差で示した。データは、One-way ANOVA の Tukey-Kramer 検定により解析した。また、気管支の炎症範囲を定量したデータは Kruskal-Wallis および Dunn's tests の検定により解析し、 $P < 0.05$ をもって有意差有りとした。

参考文献

1. Tsutsui M, Nakata S, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N. Spontaneous myocardial infarction and nitric oxide synthase. *Trends Cardiovasc Med.* 2008; 18 (8) : 275-9.
2. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacol Ther.* 2010; 128 (3) : 499-508.
3. Morishita T, Tsutsui M, Shimokawa H, Sabanai K, Tasaki H, Suda O, Nakata S, Tanimoto A, Wang KY, Ueta Y, Sasaguri Y, Nakashima Y, Yanagihara N. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005; 26: 102 (30) : 10616-10621.
4. Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, Shibata K, Yatera Y, Sabanai K, Tanimoto A, Nagasaki M, Tasaki H, Sasaguri Y, Nakashima Y, Otsuji Y, Yanagihara N. Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation.* 2008; 29: 117 (17) : 2211-2223.
5. Tsuchiya K, Yoshizumi M, Houchi H, Mason RP. Nitric oxide-forming reaction between the iron-N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate complex and nitrite. *J Biol Chem.* 2000; 21: 275 (3) : 1551-1556.
6. Tsuchiya K, Kanematsu Y, Yoshizumi M, Ohnishi H, Kirima K, Izawa Y, Shikishima M, Ishida T, Kondo S, Kagami S, Takiguchi Y, Tamaki T. Nitrite is an alternative source of NO in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288 (5) : H2163-2170.
7. Kobayashi J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of

N-nitroso compounds: A review. *Nitric Oxide*. 2018; 28 (73) : 66-73.

8. Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, Smith L, Golden M, Benjamin N. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med*. 1995; 1 (6) : 546-551.

9. Kina-Tanada M, Sakanashi M, Tanimoto A, Kaname T, Matsuzaki T, et al. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. *Diabetologia*. 2017; 60 (6) : 1138-1151.

10. Sonoda K, Ohtake K, Kubo Y, Uchida H, Uchida M, Natsume H, Kobayashi M, Kobayashi J. Aldehyde dehydrogenase 2 partly mediates hypotensive effect of nitrite on L-NAME-induced hypertension in normoxic rat. *Clin Exp Hypertens*. 2014; 36 (6) : 410-418.

11. Sonoda K, Ohtake K, Uchida H, Ito J, Uchida M, Natsume H, Tamada H, Kobayashi J. Dietary nitrite supplementation attenuates cardiac remodeling in l-NAME-induced hypertensive rats. *Nitric Oxide*. 2017; 1 (67) : 1-9.

12. Sonoda K, Ohtake K, Tagiri M, Hirata M, Tamada H, Uchida H, Ito J, Kobayashi J. Dietary Nitrite Attenuates Elastase-Induced Pulmonary Emphysema in a Mouse Model. *Biol Pharm Bull*. 2018; 41 (12) : 1818-1823.

13. Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut*. 1994; 35: 1543-1546.

14. Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-Usmar VM, Gladwin MT. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res*. 2007; 100: 654-661.

15. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 156-67.
16. van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Nohl H, Rassaf T, Samouilov A, Slama-Schwok A, Shiva S, Vanin AF, Weitzberg E, Zweier J, Gladwin MT. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev.* 2009; 29: 683-741.
17. Zweier JL, Li H, Samouilov A, Liu X. Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall. *Nitric oxide.* 2010; 22: 83-90.
18. Dezfulian C, Raat N, Gladwin MT. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovasc Res.* 2007; 75: 327-338.
19. Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, Mckenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature.* 1994; 368: 502.
20. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DM, Schechter AN, Cannon III RO, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003; 9: 1498-1505.
21. Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 1998; 427: 225-228.
22. Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab.* 2006; 3: 277-287.
23. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood.* 2005; 106: 734-739.
24. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon III RO. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in

the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000; 97: 11482-11487.

25. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; 99: 8306–11.

26. Zuckerbraun BS, Shiva S, Ifedigbo E, Mathier MA, Mollen KP, Rao J, Bauer PM, Choi JJW, Curtis E, Choi AMK, Gladwin MT. Nitrite potently inhibits hypoxic and inflammatory pulmonary arterial hypertension and smooth muscle proliferation via xanthine oxidoreductase-dependent nitric oxide generation. *Circulation.* 2010; 121: 98-109.

27. Kevil CG, Kolluru GK, Pattillo CB, Giordano T. Inorganic nitrite therapy: historical perspective and future directions. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 576-593.

28. Li H, Cui H, Kundu TK, Alzawahra W, Zweier JL. Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in blood. Critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *J Biol Chem.* 2008; 283: 17855-17863.

29. Ohtake K, Nakanishi K, Uchida H, Kotake F, Kobayashi J. Second international meeting on the role of nitrite in physiology, pathophysiology, and therapeutics. Natcher conference center, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 2007 (Abstract) .

30. Badejo AM Jr, Hodnette C, Dhaliwal JS, Casey DB, Pankey E, Murthy SN, Nossaman BD, Hyman AL, Kadowitz P. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase mediated vasodilator responses of glyceryl trinitrate and sodium nitrite in the pulmonary vascular bed of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299: H819-H826.

31. Beretta M, Gruber K, Kollau A, Russwurm M, Koesling D, Goessler W, Keung WM, Schmidt K, Mayer B. Bioactivation of nitroglycerin by purified mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases. *J Biol Chem.* 2008; 283: 17873-17880.

32. Pluta RM, Jung CS, Harvey-White J, Whitehead A, Shilad S, Espey MG, Oldfield EH. In vitro and in vivo effects of probucol on hydrolysis of asymmetric dimethyl L-arginine and vasospasm in primates. *J Neurosurg.* 2005; 103: 731-738.

33. Dias-Junior CAC, Gladwin MT, Tanus-Santos JE. Low-dose intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41: 1764-1770.
34. Pluta RM Oldfield EH, Bakhtian KD, Fathi AR, Smith RK, DeVroom HL, Nahavandi M, Woo S, Figg WD, Lonser RR. Safety and feasibility of long-term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers. *PLoS ONE.* 2011; 6: 1-13.
35. Nossaman BD, Pankey EA, Badejo Jr AR, Casey DB, Uppu S, Murthy SN, Kadowitz PJ. Analysis of responses to glyceryl trinitrate and sodium nitrite in the intact chest rat. *Nitric Oxide.* 2012; 26: 223-228.
36. Pankey EA, Badejo Jr AR, Casey DB, Lasker GF, Riehl RA, Murthy SN, Nossaman BD, Kadowitz PJ. Effect of chronic sodium nitrite therapy on monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Nitric Oxide.* 2012; 27: 1-8.
37. Arif S, Feelisch M, Horowitz JD, Frenneaux MP, Madhani M. Aldehyde dehydrogenase plays an important role in nitrite-mediated vasorelaxation during hypoxic conditions. *Nitric Oxide.* 2013; 31: S37.
38. Kera Y, Ohbora Y, Komura S. The metabolism of acetaldehyde and not acetaldehyde itself is responsible for in vivo ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37: 3633-8.
39. Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 16939-16946.
40. Dungal P, Haindl S, Behling T, Mayer B, Redl H, Kozlov AV. Neither nitrite nor nitric oxide mediate toxic effects of nitroglycerin on mitochondria. *J Biochem Molecular Toxicology.* 2011; 25: 297-302.
41. Feelisch M, Fernandez BO, Bryan NS, Garcia-Saura MF, Bauer S, Whitlock DR, Ford PC, Janero DR, Rodriguez J, Ashrafian H. Tissue processing of nitrite in hypoxia. An intricate interplay of nitric oxide-generating and scavenging systems. *J Biol Chem.* 2008; 283: 33927-33934.

42. Shiva S. Review: Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite. *Nitric Oxide*. 2010; 22: 64-74.
43. Romanin C, Kukovetz WR. Guanylate cyclase activation by organic nitrates is not mediated via nitrite. *J Mol Cell Cardiol*. 1988; 20: 389-396.
44. Kollau A, Beretta M, Russwurm M, Koesling D, Keung WM, Schmidt K, Mayer B. Mitochondrial nitrite reduction coupled to soluble guanylate cyclase activation: Lack of evidence for a role in the bioactivation of nitroglycerin. *Nitric Oxide*. 2009; 20: 53-60.
45. Wenzl MV, Beretta M, Griesberger M, Russwurm M, Koesling D, Schmidt K, Mayer B, Gorren ACF. Site-directed mutagenesis of aldehyde dehydrogenase-2 suggests three distinct pathways of nitroglycerin biotransformation. *Mol Pharmacol*. 2011; 80: 258-266.
46. Koppaka V, Thompson DC, Chen Y, Ellermann M, Nicolaou KC, Juvonen RO, Petersen D, Deitrich RA, Hurley TD, Vasiliou V. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol Rev*. 2012; 64: 520-539.
47. Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008; 105: 10256-10261.
48. Ormerod JOM, Ashrafian H, Maher AR, Arif S, Steeples V, Born GVR, Egginton S, Feelisch M, Watkins H, Frenneaux MP. The role of vascular myoglobin in nitrite-mediated blood vessel relaxation. *Cardiovasc Res*. 2011; 89: 560-565.
49. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Berenbrink M, Klare JP, Steinhoff HJ, Semmler D, Shiva S, Williams D, Kipar A, Gladwin MT, Schrader J, Kelm M, Cossins AR, Rassaf T. Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. *Circulation*. 2012; 126: 325-334.
50. Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S, Cannon III RO, Kelm M, Wink DA, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM, Freeman BA, Lancaster

JR, Feelisch M, Lundberg JO. Meeting report: The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol.* 2005; 1: 308-314.

51. Huang KT, Keszler A, Patel N, Patel RP, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB, Hogg N. The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. *J Biol Chem.* 2005; 280: 31126-31131.

52. Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Ringwood LA, Irby CE, Huang KT, Ho C, Hogg N, Schechter AN, Gladwin MT. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. *J Clin Invest.* 2005; 115: 2099-2107.

53. Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, Schechter AN, Darley-Usmar VM, Kerby JD, Lang Jr JD, Kraus D, Ho C, Gladwin MT, Patel RP. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood.* 2006; 107: 566-574.

54. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelisch M. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* 2005; 1: 290-297.

55. Beretta M, Wolkart G, Scherthaner M, Griesberger M, Neubauer R, Schmidt K, Sacherer M, Heinzl FR, Kohlwein SD, Mayer B. Vascular bioactivation of nitroglycerin is catalyzed by cytosolic aldehyde dehydrogenase-2. *Circ Res.* 2012; 110: 385-393.

56. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC Jr, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Rodeheffer. Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *JAMA.* 2003; 289: 194–202.

57. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 568–575.

58. Rosenkranz S. TGF- β 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 2004; 63: 423–432.

59. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF) - β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011; 51: 600–606.
60. Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrügg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II increases transforming growth factor β 1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc. Res.* 2000; 46: 463–475.
61. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2007; 87: 840–844.
62. Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 915–922.
63. Kanematsu Y, Yamaguchi K, Ohnishi H, Motobayashi Y, Ishizawa K. Dietary doses of nitrite restore circulating nitric oxide level and improve renal injury in l-NAME-induced hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2008; 295: F1457–F1462.
64. Carlström M, Persson AEG, Larsson E, Hezel M, Scheffer PG, Teerlink T, Weitzberg E, Lundberg JO. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. *Cardiovasc. Res.* 2011; 89: 574–585.
65. Campbell DJ. l-NAME hypertension: trying to fit the pieces together. *J. Hypertens.* 2007; 24: 33–36.
66. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelisch M. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat. Chem. Biol.* 2005; 1: 290–297.
67. Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Ji SY, Lefer DJ. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 19144–19149.
68. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation

of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 2004; 37: 395–400.

69. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med. Sci. Monit.* 2005; 11: RA194–RA205.

70. Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 2164–2171.

71. Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME. Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clin. Sci.* 2001; 100: 481–492.

72. Ackermann A, Fernández-Alfonso MS, Sánchez de Rojas R, Ortega T, Paul M, González C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124: 291–298.

73. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 953–970.

74. Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension.* 1998; 31: 342–348.

75. Kato M, Egashira K, Usui M, Ichiki T, Tomita H, Shimokawa H, Rakugi H, Takeshita A. Cardiac angiotensin II receptors are upregulated by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circ. Res.* 1998; 83: 743–751.

76. Nishida M, Kitajima N, Saiki S, Nakaya M, Kurose H. Regulation of angiotensin II receptor signaling by cysteine modification of NF- κ B. *Nitric Oxide.* 2011; 24: 112–117.

77. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vázquez CM. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *Am. J. Hypertens.* 2008; 21: 1231–1237.

78. Toba H, Nakagawa Y, Miki S, Shimizu T, Yoshimura A, Inoue R, Asayama J, Kobara

M, Nakata T. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N (G) -nitro- L arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine. *Hypertens. Res.* 2005; 28: 689–700.

79. Pironti G, Ivarsson N, Yang J, Farinotti AB, Jonsson W, Zhang SJ, Bas D, Svensson CI, Westerblad H, Weitzberg E, Lundberg JO, Pernow J, Lanner J, Andersson DC. Dietary nitrate improves cardiac contractility via enhanced cellular Ca²⁺ signaling. *Basic Res. Cardiol.* 2016; 111 (34) : 1–13.

80. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott S. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 1999; 84 1020–1031.

81. Lee DI, Kass DA. Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle. *Physiology* 2012; 27: 248–258.

82. Miller CL, Cai Y, Oikawa M, Thomas T, Dostmann WR, Zaccolo M, Fujiwara K, Yan C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart. *Basic Res. Cardiol.* 2011; 106: 1023–1039.

83. Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, Xu H, Florio V, Rybalkin SD, Beavo JA, Chen YF, Li JD, Blaxall BC, Abe J, Yan C. Role of Ca²⁺/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 2009; 105: 956–964.

84. Kobayashi J, Ohtake K, Uchida H. NO-rich diet for lifestyle-related diseases. *Nutrients.* 2015; 7: 4911–4937.

85. Kumar D, Branch BG, Pattillo CB, Hood J, Thoma S, Simpson S, Illum S, Arora N, Chidlow JH Jr, Langston W, Teng X, Lefer DJ, Patel RP, Kevil CG. Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A. 2008; 105: 7540–7545.

86. Cockburn A, Brambilla G, Fernández ML, Arcella D, Bordajandi LR, Cottrill B, van Peteghem C, Dorne JL. Nitrite in feed: from animal health to human health. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013; 270: 209–217.

87. Djekoun-Bensoltane S1, Kammerer M, Larhantec M, Pilet N, Thorin C. Nitrate and nitrite concentrations in rabbit saliva: comparison with rat saliva. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2007; 23: 132–134.

88. Montenegro MF, Sundqvist ML, Nihlén C, Hezel M, Carlström M, Weitzberg E, Lundberg JO. Profound differences between humans and rodents in the ability to concentrate salivary nitrate: implication for translational research. *Redox Biol.* 2016; 10: 206–210.

89. Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90: 1–10.

90. Lin PH, Ginty F, Appel LJ, Aickin M, Bohannon A, Garner P, Barclay D, Svetkey LP. The DASH diet and sodium reduction improve markers of bone turnover and calcium metabolism in adults. *J. Nutr.* 2003; 133: 3130–3136.

91. Archer DL. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *J. Food Prot.* 2002; 65: 872–875.

92. Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut.* 1994; 35: 1543–1546.

93. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295: L1-L15.

94. Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, Kianmehr M. Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis.* 2017; 15: 25.

95. Djekoun-Bensoltane S, Kammerer M, Larhantec M, Pilet N, Thorin C. Nitrate and nitrite concentrations in rabbit saliva: Comparison with rat saliva. *Environ toxicol*

pharmacol. 2007; 23: 132-134.

96. Montenegro MF, Sundqvist M L, Larsen FJ, Zhuge Z, Carlström M, Weitzberg E, Lundberg JO. Blood pressure-lowering effect of orally ingested nitrite is abolished by a proton pump inhibitor. *Hypertension.* 2017; 69: 23-31.

97. Lanzetti M, da Costa CA, Nesi RT, Barroso MV, Martins V, Victoni T, Lagente V, Pires KM, e Silva PM, Resende AC, Porto LC, Benjamim CF, Valença SS. Oxidative stress and nitrosative stress are involved in different stages of proteolytic pulmonary emphysema. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53: 1993-2001.

98. Thomassen MJ, Buhrow LT, Connors MJ, Takao Kaneko F, Erzurum SC, Kavuru MS. Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 17: 279-283.

99. Raychaudhuri B, Dweik R, Connors MJ, Buhrow L, Malur A, Drazba J, Arroliga AC, Erzurum SC, Kavuru MS, Thomassen MJ. Nitric Oxide Blocks Nuclear Factor- κ B Activation in Alveolar Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21: 311-316, 1999.

100. Boe AE, Eren M, Morales-Nebreda L, Murphy SB, Budinger GR, Mutlu GM, Miyata T, Vaughan DE. Nitric oxide prevents alveolar senescence and emphysema in a mouse model. *PLOS one.* 2015; 10: e0116504.

101. Ito H, Matsushita S, Ishikawa S, Goto Y, Sakai M, Onizuka M, Sato Y, Sakakibara Y. Significant correlation between endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and alveolar repair in elastase-induced rat pulmonary emphysema. *Surg Today.* 2013; 43: 293-299.

102. Barnes PJ, Kharitonov S. Exhaled nitric oxide: a new lung functional test. *Thorax.* 1996; 51: 233-237.

103. Lundberg JON, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Nitric oxide in exhaled air. *Eur Respir J.* 1996; 9: 2671-2680.

104. Olin AC, Aldenbratt A, Ekman A, Ljungkvist G, Jungersten L, Alving K, Torén K. Increased nitric oxide in exhaled air after intake of a nitrate-rich meal. *Respir Med,* 2001;

95: 153-158.

105. Byrnes CA, Dinarevic S, Busst C, Bush A, Shinebourne EA. Is nitric oxide in exhaled air produced at airway or alveolar level? *Eur Respir J*, 1997; 10: 1021-1025.

106. Petersson J, Phillipson M, Jansson E, Patzak A, Lundberg JON, Holm L. Dietary nitrate increases mucosal blood flow and mucosal defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292: G718-G724.

107. Kobayashi J, Uchida H, Ito J. Long-term proton pump inhibitor use after *Helicobacter pylori* eradication may create a gastric environment for N-nitrosamine formation and gastric cancer development. *Gut*. 2018; 2018b

108. Ohtake K, Koga M, Uchida H, Sonoda K, Ito J, Uchida M, Natsume H, Kobayashi J. Oral nitrite ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute experimental colitis in mice. *Nitric Oxide*. 2010; 23: 65-73.

109. Ohtake K, Ehara N, Chiba H, Nakano G, Sonoda K, Ito J, Uchida H, Kobayashi J. Dietary nitrite reverses features of postmenopausal metabolic syndrome induced by high-fat diet and ovariectomy in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017; 312: E300–E308.

110. Berry MJ, Justus NW, Hauser JJ, Case AH, Helms CC, Basu S, Rogers Z, Lewis MT, Miller GD. Dietary nitrate supplementation improves exercise performance and decreases blood pressure in COPD patients. *Nitric Oxide*. 2014; 48: 22-30.

111. Curtis KJ, O'Brien KA, Tanner RJ, Polkey JJ, Minnion M, Feelisch M, Polkey MI, Edwards LM, Hopkinson NS. Acute dietary nitrate supplementation and exercise performance in COPD: A double-blind placebo-controlled, randomized controlled pilot study. *PLoS one*. 2015; 10 (12) : e0144504.

112. Kerley CP, Cahill K, Bolger K, McGowan A, Burke C, Faul J, Cormican L. Dietary nitrate supplementation in COPD: An acute, double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Nitric Oxide*. 44: 105-111, 2015.

113. Shepherd AJ, Wilkerson DP, Dobson L, Kelly J, Winyard PG, Jones AM, Benjamin

N, Shore AC, Gilchrist M. The effect of dietary nitrate supplementation on the oxygen cost of cycling, walking performance and resting blood pressure in individuals with chronic obstructive pulmonary disease: A double blind placebo controlled, randomized control trial. *Nitric Oxide*. 2015; 48: 31-37.

114. Animal ethics in cardiovascular research. *Cardiovasc Res*. 2012; 93: 1–3.

115. Buelke-Sam J, Holson JF, Bazare JJ, Young JF. Comparative stability of physiological parameters during sustained anesthesia in rats. *Lab Anim Sci*. 1978; 28: 157–62.

116. Hellstrom E, Tottmar O. Effects of aldehyde dehydrogenase inhibitors on enzymes involved in the metabolism of biogenic aldehydes in rat liver and brain. *Biochem Pharmacol*. 1982; 31: 3899–905.

117. Janero DR, Bryan NS, Saijo F, Dhawan V, Schwalb DJ, Warren MC, Feelisch M. Differential nitrosylation of blood and tissue constituents during glyceryl trinitrate biotransformation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; 101: 16958–63.

118. Martin W, Huellner, Sonja Schrepfer, Michael Weyand, Henry Weiner, Isabella Wimplinger, Thomas Eschenhagen, Thomas Rau. Inhibition of aldehyde dehydrogenase type 2 attenuates vasodilatory action of nitroglycerin in human veins. *FASEB J*. 2008; 22: 2561–2568.

119. Ohtake K, Ishiyama Y, Uchida H, Muraki E, Kobayashi J. Dietary nitrite inhibits early glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Nitric Oxide*. 2007; 17: 75-81.

120. Ruiz-Meana M, Martinson EA, Garcia-Dorado D, Piper HM. Animal ethics in cardiovascular research. *Cardiovasc. Res*. 2012; 93: 1–3.

121. Jeong IK, Oh SH, Kim BJ, Chung JH, Min YK, Lee MS, Lee MK, Kim KW. The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2001; 51: 163–171.

122. Kobayashi N, Higashi T, Hara K, Shirataki H, Matsuoka H. Effects of imidapril on NOS expression and myocardial remodelling in failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 1999; 44: 518–526.
123. Lavaud S, Poirier B, Mandet C, Bélair MF, Irinopoulou T, Heudes D, Bazin R, Bariéty J, Myara I, Chevalier J. Inflammation is probably not a prerequisite for renal interstitial fibrosis in normoglycemic obese rats. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2001; 280: F683–F694.
124. López-Sepúlveda R, Jiménez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Sánchez M, Gómez-Guzmán M, Vargas F, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Duarte, Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2008; 51: 1088–1095.
125. Thurlbeck WM. Internal surface area and other measurements in emphysema. *Thorax.* 1967; 22: 483-496.
126. Heemskerk-Gerritsen BA, Dijkman JH, Ten Have-Opbroek AA. Stereological methods: a new approach in the assessment of pulmonary emphysema. *Microvasc Res Tech.* 1996; 34: 556-562.

謝辞

本研究に際し、素晴らしい研究テーマを与えていただくとともに終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科 教授 小林 順先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行に多大なるご尽力を賜りました城西大学薬学部薬学科 准教授 大竹 一男先生、城西大学薬学部医療栄養学科 教授 内田 博之先生に深謝の意を表します。

本論文の申請にあたり、ご指導を賜りました城西大学大学院薬学研究科 教授 岡崎 真理先生、教授 真野 博先生に深く感謝の意を表します。また、本論文の審査のご指導を賜りました城西大学大学院薬学研究科 教授 和田 政裕先生、ならびに教授 小林 大介先生、教授 須永 克佳先生に深く感謝の意を表します。

最後に研究に関連して下さいました皆さまの下に本研究を遂行できましたことに感謝いたします。