

磁気共鳴と医学

VOL. **13** 2002

MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE

編集 大 和 田 滋

吉 川 敏 一

執筆者名

表 題

日 本 医 学 館

carbamoyl-PROXYLの半減期に及ぼすpH変動の影響について

植田 勇人¹、林 要人¹、横山 秀克³、中島 暉²、
土井 拓¹、大矢 博昭³、鎌田 仁³、三山 吉夫¹

¹ 宮崎医科大学精神医学講座, ² 宮崎医科大学化学, ³ 生物ラジカル研究所

The pH sensitive nitroxide radical elimination by α -tocopherol and ascorbic acid

Yuto Ueda¹), Yoshihito Hayashi¹), Hidekatsu Yokoyama³), Akira Nakajima²),
Taku Doi¹) Hiroaki Ohya-Nishiguchi³), Hitoshi Kamada³) and Yoshio Mitsuyama¹)

¹) Dept. of Psychiatry, ²) Dept. of Chemistry, Miyazaki Med. College, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan; ³) Div. of ESR tech., Inst. for Life Support Tech., 2-2-1 Matsuei, Yamagata 990-2473, Japan

RATIONALE: NMDA-mediated excitatory neurotransmission and GABA-mediated inhibitory neurotransmission in the central nervous system (CNS) is affected by extracellular pH, that changes easily when oxidative stress occurred. CNS is protected by antioxidant ability from the oxidative stress. Synergistical scavenging works of α -tocopherol (Vit E) and ascorbic acid (Vit C) are most potent antioxidant ability in CNS. However, there are very few reports investigated interaction between the pH changes and the antioxidant ability. The aim in this study is to clarify *in vitro* and *in vivo* effect of pH changes in the hippocampal extracellular space on antioxidant ability using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy.

Materials and Methods: *In vitro* reactant was constructed from 0.1M Vit E, 10mM Vit C, 1mM carbamoyl-PROXYL in 70% ethanol. The pH was adjusted at 5, 6, 7, 8 and 9 using 1N NaOH. *In vivo* investigation was carried out using *in vivo* microdialysis combined with EPR spectroscopy. Following 60min perfusion of 6mM carbamoyl-PROXYL aCSF of pH 5 in the unilateral hippocampus, normal aCSF perfusion adjusted at pH 5 was started and the recovered hippocampal dialysate in sample tube was subjected in EPR spectroscopy. The amplitude of $M_I = +1$ of carbamoyl-PROXYL in the recovered dialysate was monitored. Half-life (min) was calculated from the elimination curve of nitroxide radical, that was exponentially decayed. The same experiment was performed using aCSF adjusted at 6, 7, 8 and 9.

Results and Discussion: Characteristic result being mostly common both in an *in vitro* and *in vivo* study about interaction between pH changes and antioxidant ability of Vit E-Vit C was that acidosis changes from pH 7 to 6 made half-life of carbamoyl-PROXYL decrease remarkably. Increased reducing ability of Vit E-Vit C in acidosis might play as compensatory role when CNS would be exposed to oxidative stress, such as brain ischemia acidosis.

KEY WORDS

nitroxide radical, pH, reducing ability, α -tocopherol, ascorbic acid

【緒言】

昨今、carbamoyl-PROXYL などニトロオキシドの生体内における半減期を指標にした抗酸化能力の評価実験が散見されるようになった。脳虚血、てんかん性けいれん重積時、低酸素状態など様々な病態で変動する脳実質内 pH はその後の病態進行に影響を及ぼすとともに、グルタミン酸並びに GABA 作動性神経伝達を修飾する重要なシナプス環境要因である[5,6]。しかしながら、pH 変動が抗酸化能に及ぼす影響を考察した実験は少ない。

【方法】

1. in vitro 実験

100mM L(+)-ascorbic acid (vitamin C, VitC; 生食溶液)を 100ul, 1M DL- α -tocopherol (vitamin E, VitE; 100%エタノール溶液)を 100ul, 10mM 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl(carbamoyl-PROXYL) 100ul をそれぞれ加えた carbamoyl-PROXYL 消去系全体を 100%エタノールを用いて全容量を 1ml にし、NaOH を用いて、pH5,6,7,8,9 を作成し carbamoyl-PROXYL の信号強度の減衰を観察、各 5 サンプルを設け平均値を算出した。ESR 測定条件：静磁場強度, 335mT; 共振周波数, 9.42GHz; マイクロ波電力, 4mW; 磁場掃引幅, 10mT; 磁場掃引時間, 120 秒; 時定数, 0.1 秒; 磁場変調幅, 0.1mT。

2. in vivo 実験

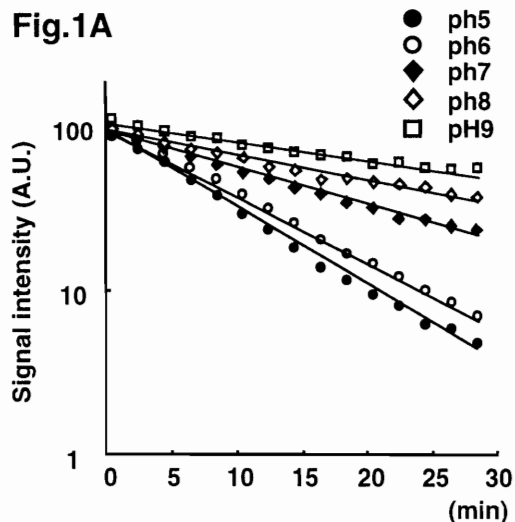
昨年本学会で発表したマイクロダイアリシス法(MD)を用いた脳内抗酸化能力のオンラ

イン計測において、pH5 の 6mM

carbamoyl-PROXYL リンゲル溶液を 1 時間海馬腹側部に灌流、その後 pH5 のリンゲル液灌流へ切り替え、carbamoyl-PROXYL の信号強度の減衰をそれぞれ観察した[4]。同様な方法を用いて pH6, 7, 8, 9 の各 carbamoyl-PROXYL の半減期が測定された。ESR 測定条件：静磁場強度, 335mT; 共振周波数, 9.42GHz; マイクロ波電力, 4mW; 磁場掃引幅, 10mT; 磁場掃引時間, 120 秒; 時定数, 0.1 秒; 磁場変調幅, 0.1mT。

【結果】

1. in vitro 実験における pH 変動に伴う carbamoyl-PROXYL の半減期



代表的な carbamoyl-PROXYL の EPR 信号の減衰を図 1A に示した。EPR のシグナルが指数関数的減衰を示したことから、pH 依存性の VitE-VitC 系における carbamoyl-PROXYL 還元効率を図 1A から算出した半減期を用いて評価し、pH 変動に伴う VitE-VitC

系抗酸化能力に対する影響を図 1B に示した。表 1. は半減期の平均を表にしたものである。図 1B から分かるように、7 から 6 への pH 変動において急激に VitE-VitC 系における carbamoyl-PROXYL 還元効率が著しい増加を示していた。

Fig.1B

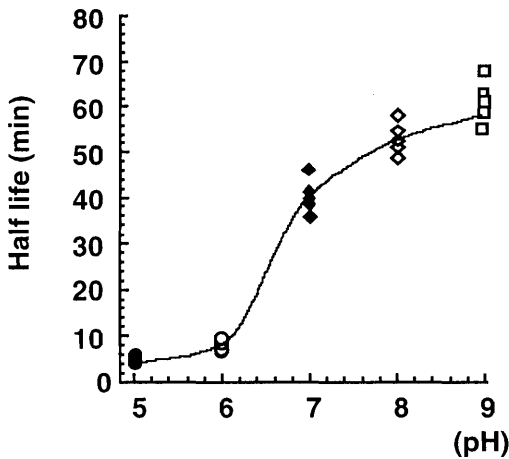


表 1. 各pHにおける carbamoyl-PROXYL 半減期
- in vitro - (min; mean \pm SE)

pH 5	4.195 \pm 0.331
pH 6	7.790 \pm 0.206
pH 7	43.210 \pm 2.398
pH 8	55.799 \pm 1.485
pH 9	61.667 \pm 4.029

2. *in vivo* 実験における pH 変動に伴う carbamoyl-PROXYL の半減期

in vivo 条件で行ったラット海馬においても灌流領域の pH が 7 から 6 への pH 変動において急激に carbamoyl-PROXYL 還元効率、即ち海馬細胞外液における抗酸化能力が著しい増加を示していた。

【考察】

pH 低下 (特に pH7 近傍から pH6 近傍に移行する過程) において carbamoyl-PROXYL

自身の還元速度が上昇した可能性も否めないが、pH7 近傍から pH6 近傍に移行する過程での pH 低下が VitE-VitC 系のもつ carbamoyl-PROXYL 還元効率が增大している可能性も否めない。今回の *in vitro* データ

Fig.2A

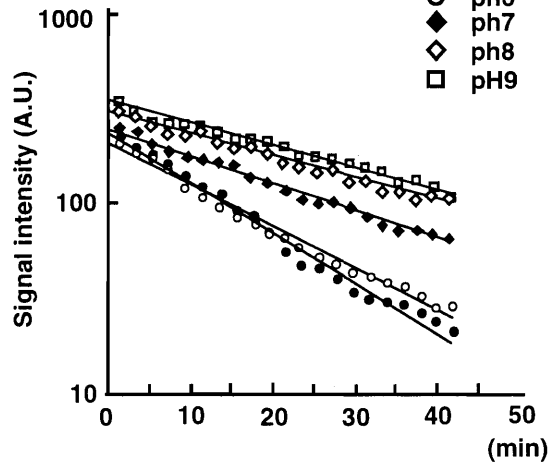
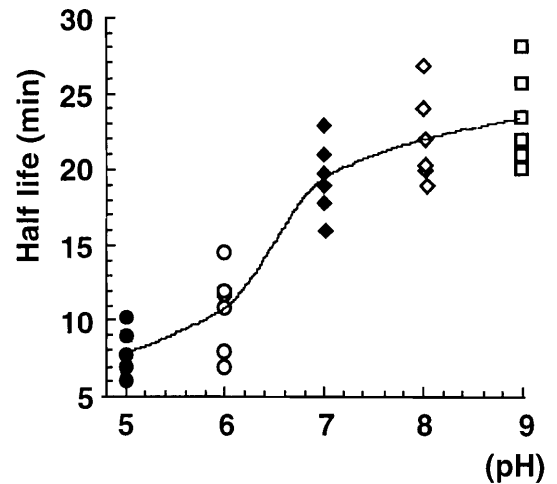


Fig.2B



各pHにおけるcarbamoyl-PROXYL半減期

	- in vivo -	(min; mean±SE)
pH 5	7.743	+/- 0.752
pH 6	10.706	+/-1.397
pH 7	19.601	+/-1.166
pH 8	22.561	+/-1.517
pH 9	23.353	+/-1.517

から vitC の carbamoyl-PROXYL 還元作用に対する VitE 添加の増強作用は pH 依存性であり、pH5 近傍で最も効率良く還元されること、また pH7 近傍から pH6 近傍に移行する過程において VitE-VitC 系における carbamoyl-PROXYL 還元効率は最も大きく増大される。そしてこれら in vitro 実験結果は自由行動条件下におけるラット脳内の carbamoyl-PROXYL 半減期に及ぼす pH 変動の影響をよく反映するものであった。pH7 付近における脳内 pH のアシドーシスへの変動は、NMDA 作動性興奮系を抑制し GABA 作動性抑制系を増強、逆にアルカローシスへの変動では、NMDA 作動性興奮系増強と GABA 作動性抑制系の脱抑制が誘発される [3][5,6]。pH 依存性に生体内における主要な抗酸化系である VitE-VitC 系が pH7 を境にした低下とともにその抗酸化能力が増強される機構は、脳虚血時のアシドーシス変化に対する [1] [2][7] 脳実質がもつもう一つの代償性機構ではないかと推測された。

【参考文献】

- [1] Charbel, F.T., Du, X., Hoffman, W.E. and Ausman, J.I. (2000) Surg Neurol 54, 432-437; discussion 438.
- [2] Pettigrew, L.C., Hazle, J.D., Gutierrez, G., Smith, C.D. and Ogletree, M.L. (1992) Neurol Res 14, 335-339.
- [3] Schweitzer, J.S., Wang, H., Xiong, Z.Q. and Stringer, J.L. (2000) J Neurophysiol 84, 927-933.
- [4] Ueda, Y., 植田 勇人, 徳丸 潤, 中島 暉, 横山 秀克, 大矢 博昭, 鎌田 仁 and 三山 吉夫. (2001) 磁気共鳴と医学 12, 171-174.
- [5] Velisek, L., Dreier, J.P., Stanton, P.K., Heinemann, U. and Moshe, S.L. (1994) Exp Brain Res 101, 44-52.
- [6] Velisek, L., Veliskova, J. and Moshe, S.L. (1998) Brain Res 782, 310-313.
- [7] Widmer, H., Abiko, H., Faden, A.I., James, T.L. and Weinstein, P.R. (1992) J Cereb Blood Flow Metab 12, 456-468.