

002287

気道防御メカニズムにおける 鼻腔NOの生理学的意義に関する研究

研究課題番号 10670057

平成10年度～平成11年度 文部省科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 岩 元 純

(旭川医科大学・医学部・基礎看護学講座)

はしがき

この研究報告書は、平成10、11年度の2年間にわたる文部省科学研究費補助金 基盤研究(C)(2)「気道防御メカニズムにおける鼻腔NOの生理学的意義に関する研究」(研究課題番号 10670057)の成果をまとめたものである。

本研究は、鼻腔から気管支にいたる気道を覆う上皮組織の生理機能のうち、とくに気道防御に関して、NOが果たす役割について基礎的な研究を行なったものである。気道に多量のNOが存在することは周知の事実であるが、そこでNOが何を行っているのかという問いに対して有効な答えは用意されていない。筆者らは、1994年にヒトの呼気NOが運動時に増加することを世界で初めて報告したが、当時はNOの起源が血管内皮であるという根強い思い込みがあり、したがって、NOは、運動で増加した肺血流の「流れ」が引き起こしたずり応力による血管内皮細胞への刺激によって産生されたものであり、その結果、内皮由来のNOが肺血管を弛緩させてスムーズな肺血流量の増加を可能にするという推測を行っていた。しかし、平成7年に交付された文部省科学研究費補助金(一酸化窒素の視覚化に関する研究 07557185)によって、リアルタイムの呼気NOの測定が可能となると、血管内皮由来と思われたNOが実は気道上皮由来らしいことがわかってきた。それに、同時に鼻腔のNOが桁外れに量が多く産生されている(呼気NOの5~10倍)ことも明かとなった。そこで、大量のNOを産生することで知られているマクロファージなどの免疫細胞に発現することで知られる誘導型のNO合成酵素 iNOS によって産生されたNOが、気道内において何か生理学的な役割を果たしているのであろうかと思い、今回、文部省科学研究費補助金の申請を行い、了承されて交付をうけた。実際に研究にかかってみると、とくに、呼気NOの測定のみではどうにもならず、動物実験にするモデルをどのようにするかなど問題が山積し、2年間ではほんの基礎的な測定系を整えたにすぎず、思った程の研究成果はあがらなかった。しかし、裾野の広い研究が行えたことは望外のよろこびであり、多くの先生方の助力を得ることができ、感謝に堪えない。とくに同じ教室の石川一志助教授からは多大な助力を得た。謝意を表したい。最後に、本研究の財政的支援を決定して下さった諸先生方と文部省に心からお礼を申し上げる。

平成12年3月

研究代表者 旭川医科大学医学部基礎看護学講座

岩元 純

文部省科学研究費補助金 (平成10、11年度)

基盤研究 (C) (2) 気道防御メカニズムにおける鼻腔NOの生理学的意義
に関する研究

研究課題番号 10670057

研究組織

研究代表者：岩元 純 (旭川医科大学・生理学第一・助教授)

研究分担者：今田 正信 (旭川医科大学・耳鼻咽喉科学・助手)

研究協力者：河野 透 (旭川医科大学・外科学第二・助手)

中野 均 (旭川医科大学・内科学第一・助手)

井手 宏 (旭川医科大学・内科学第一・医員)

高橋 啓 (旭川医科大学・内科学第一・医員)

野中 聡 (旭川医科大学・耳鼻咽喉科学・講師)

服部正明 (北海道東海大学・教育開発センター・助教授)

小河 幸次 (北海道東海大学・教育開発センター・教授)

菊池健次郎 (旭川医科大学・内科学第一・教授)

葛西眞一 (旭川医科大学・外科学第二・教授)

研究経費

平成10年度	2,300千円
平成11年度	1,000千
計	3,300千円

研究発表

I. 学会誌等

A. 原著論文

1. Kakuya F, Takase M, Ishii N, Kajino M, Hayashi T, Miyamoto K, Muraki S, Iwamoto J, Okuno A. Inhaled nitric oxide therapy via nasopharyngeal tube in an infant with end-stage pulmonary hypertension. *Acta Paediat. Jap.* 40 : 155-158, 1998
2. 服部正明、小河幸次、今田正信、岩元純. 鼻腔拡張テープが鼻腔横断面積と鼻腔抵抗に及ぼす影響について. *臨床スポーツ医学* 15 : 1041-1045, 1998.
3. Ando N, Kono T, Iwamoto J, Kikuchi-Utumi, Yoneda M, Karasaki H, Kasai S. Nitric oxide release from the liver surface to the intraabdominal cavity during acute endotoxemia in rats *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 2(6) : 481-488, 1998.
4. Ide H, Nakano H, Ogasa T, Osanai S, Kikuchi K, Iwamoto J. Regulation of pulmonary circulation by alveolar oxygen tension via airway nitric oxide. *J Appl Physiol* 87(5): 1629-1636, 1999.
5. 河野透、小谷裕美、安藤修敏、神谷和則、葛西眞一、岩元純、米田政志. LPS 微量前投与による実験的急性肝障害防御作用の検討薬理と治療27: S1491-1493, 1999
6. 河野透、小谷裕美、安藤修敏、神谷和則、葛西眞一、岩元純、米田政志. エンドトキシン血症時におけるNOと抗炎症性サイトカインの関連に関する研究薬理と治療. 27: S835-838, 1999.

B. 学会発表（国際学会、シンポジウム等を含む）

1. Kono T, Yoneda M, Ando N, Kamiya K, Ohara K, Karasaki H, Yamamoto Y, Kotani H, Kikuchi K, Iwamoto J, Kasai S. Hepatic cytoprotection induced by a very low amount of

- lipopolysaccharide. FASEB J.12(4): A403, 1998. 米国実験生物学会 (San Francisco)
2. Salzman A, Nakano H, Ide H, Kikuchi K, Iwamoto J. Tracheal injection of DMAEP/NONOATE decreases hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rabbit lungs. FASEB J.12(4): A493, 1998. 米国実験生物学会 (San Francisco)
3. Nakano H, Ide H, Kikuchi K, Imada M, Ogawa K, Iwamoto J. Effect of hypoxia on nasal nitric oxide in humans. FASEB J. 12(4): A493, 1998. 米国実験生物学会 (San Francisco)
4. Hattori M, Ogawa K, Imada M, Takahashi R, Iwamoto J. Effects of external nasal dilator on nasal cross sectional area and nasal resistance. FASEB J. 12(4): A855, 1998. 米国実験生物学会 (San Francisco)
5. 中西京子、井手宏、中野均、長内忍、西垣豊、大崎能伸、岩元純、菊池健次郎。COPD患者の肺高血圧症に対する一酸化窒素と酸素の併用効果 日本呼吸器学会雑誌 36巻：154頁、1998。第38回日本呼吸器学会総会，平成10年4月，熊本。
6. 井手宏、中野均、岩元純、長内忍、高橋啓、西垣豊、大崎能伸、菊池健次郎。低酸素の呼気NOと肺循環中NO代謝物に与える影響。日本呼吸器学会雑誌 36巻：201頁、1998。第38回日本呼吸器学会総会，平成10年4月，熊本。
7. Ide H, Nakano H, Takahashi T, Osanai S, Kikuchi K, Iwamoto J. Rapid reduction of exhaled nitric oxide during hypoxia in isolated rabbit lungs. Am J Respir Crit Care Med 157: A228, 1998. 国際胸部疾患学会 平成10年4月，シカゴ。
8. 岩元純、今田正信、井手宏、石川一志。ヒト鼻粘膜上皮のガス交換日本生理学会 Jpn J Physiol, 1999。第76回日本生理学会大会，長崎。
9. 山本泰司、井手宏、中野均、岩元純、高橋啓、西垣豊、長内忍、中野均、大崎能伸、菊池健次郎。家兎摘出灌流肺における吸入気CO₂濃度と呼気NO濃度の関連について。日本呼吸器学会雑誌 37巻：197頁，1999。第39回日本呼吸器学会総会，平成11年4月，横浜。

10. 井手宏、岩元純、中野均、岩元純、中西京子、山本泰司、高橋啓、西垣豊、長内忍、大崎能伸、菊池健次郎. ヒト鼻腔内でのNO産生とO₂濃度の関係について. 日本呼吸器学会雑誌 37巻:206頁, 1999. 第39回日本呼吸器学会総会, 平成11年4月, 横浜.

11. Iwamoto J, Nakano H, Ide H, Imada M. Gas exchange and nitric oxide production in human nasal mucosa. FASEB J.13(4): A498, 1999. 米国実験生物学会 (Washington D.C.)

12. Yamamoto Y, Ide H, Nakano H, Takahashi T, Osanai S, Ohsaki Y, Kikuchi K, Iwamoto J. Hypoxia decreases exhaled NO in the isolated blood-perfused rabbit lungs Am J Respir Crit Care Med 159: A573, 1999. 国際胸部疾患学会平成11年4月, サンディエゴ.

13. 今田正信、小林吉史、野中聡、海野徳二、原渕保明、岩元純. 鼻腔通気度に対するNOdonorと運動負荷の影響 日本耳鼻咽喉科学会会報 102巻4号1999頁, 1999. 平成11年5月20～21日, 仙台.

II. 口頭発表

1. Nonaka S, Katada A, Imada M, Iwamoto J, Harabuchi Y. Changes in nasal nitric oxide during several stimulations that evoke changes of nasal resistance. Program and Abstract for 5th Japan-Taiwan Conference in Otolaryngology, Head and Neck Surgery, P 29, 1999. 第5回日本・台湾耳鼻咽喉学会 10月21-22日, 札幌.

III. 著書

1. Iwamoto J, Nakano H, Ide H, Imada M, Ogawa K. Exercise and exhaled nitric oxide: A real-time measurement of NO and a New analytical method. In: The Nagano symposium on sports science, edited by H. Nose et al., Cooper Publishing Group, LLC (Carmel, IN), 1998.

2. 河野透、岩元純、安藤修敏、神谷和則、小原啓、米田政志、葛西眞一. 敗血症における肝臓の一酸化窒素の動態と意義 「エンドトキシン研究2」、日本エンドトキシン研究会編、菜根出版(紀伊国屋書店)1999年

研究成果

本研究のタイトルは、「気道防御メカニズムにおける鼻腔NOの生理学的意義に関する研究」（研究課題番号 10670057）という長いものである。NOに関する科学研究費補助金も、この研究でちょうど3つめになり、できうれば、さらなる進歩を夢見て研究を開始した。我々のグループは、生理学の範囲をいつも逸脱するのであるが、今回はオーソドックスに呼吸生理の基本に立ち返って鼻粘膜を相手に気道上皮全体を見回してみようと思い、高価な質量分析計を借用して研究を始めた。なにせ、1000万円という機械であり、貸借期間がわずか1ヶ月という。ヒトの鼻腔のNOは我々が世界ではじめて定量化し、論文として発表したものでもあり、勢い込んで始めたのであるが、初期の成果は、99年（98年度）の長崎の生理学会で、わずかに、学会発表1つという寂しさであった。被験者ももう少しのってやっておけば良かったのだが、たったの6名で、しかも男4女2というありさまであった。じつは、被験者のトライアル段階で、20名近い人が実験を行なったが、軟口蓋を意識して閉じ、口呼吸を行なうことのできる被験者が最終的にわずか6名だったという散々の結果だった。しかし、ごくささやかな成果として、鼻粘膜の酸素消費量の測定法が確立され、これ事体はかなり有望な研究方法であると思えた。しかし、今度は、共同研究者の今田が数カ月の東京出向ということが重なり、加えて細胞レベルでのNOの測定が、1年やそこらでは、とても実現する見込みがないことが分かってきた。

（小生の私事で恐縮だが、研究の困難さを物語る珍事を記しておきたい。平成10年4月、この研究のスタートの頃、に初めて看護学科という未踏の地に足を踏み込んだ。そこで、半可通の主知主義と科学的知識や科学そのものに対する軽視や侮辱を経験したことは、驚異であると同時に、ずっしりと重い心の負担となった。実験室も何も無い状態が1年続き、翌平成11年の3月に、やっとのことで、実験台や実験用の流しを新設設備費で購入したのはよかったのだが、それを設置することを、4月1日に副学長自ら電話をかけてきて止めさせようとするという事件が起こった（たちの悪いエイプリルフールのいたずらだと思った）。それも、看護学科代表野村教授の勘に触ったという理由だったらしい。（「これは、野村教授の差し金か」という問いに、副学長もなかなかの正直者で、思わず「まあ、そうだ」と口を滑らせてしまったことで分かった。）副学長が研究の足を引っ張るなどというのは言語道断を思い、意を決して副学長のもとへ怒鳴り込むという荒技をつかった。10分間ノンストップで怒鳴り散らしたら、1週間くらいして、自分が円形脱毛症になるというおまけがついてしまった。（いまでも不思議に思うのだが、なぜ副学長はいとも簡単に野村教授の言いなりになるのであろうか。それとも、だれかが裏で手を回したのであろうか。）このようないきさつで、ようやく、ガラス器具の洗い場と蒸留水置き場を確保するという体たらくであった。実験室の確保が看護科などでは、かなり絶望的であるということをよく聞くが、それなのに看護系は医学系ということで、実験講座並みの予算配分を教官たちがうけているということを初めて知った。しかし、実際は、医学系であることに異を唱える看護系教官は多い。医学を否定することで、自らのアイデンティティーの確立を図るのであろうか。誠に、人生の無情を感じるばかりである。）

気道上皮組織の生理的役割の解明

鼻粘膜上皮と気管支上皮は、それぞれNOの産生を行なっている。しかし、それらの生理学的役割は、全くと言っていいほど解明されていない。今回、われわれは、具体的に以下の2つの仮説を立て、それを検証する研究を行なった。

- 1) 鼻粘膜上皮のNOはとくに円柱絨毛上皮で産生され、NOは絨毛運動に関わる
- 2) 気管支粘膜上皮のNOは末梢の細気管支でもっともよく産生され、肺血流を調節する

実際の研究は、数年前から継続されていた2)の方が、早く決着をみた。少なくとも、呼吸NOは気管内の酸素レベルに応じて Michaelis-Menten 様の基質制限を受けるような印象があり、in vitro の研究ですでに明らかにされていたNO合成酵素NOSの性質が器官単位でも成り立つこと証明することができた。組織内のNOSがやはり、基質飽和していないことが初めて明らかになって、NOの産生そのものが、気道内の酸素のレベルで決定されるという興味深い事実が明かとなった。我々は、この結果をうけて、NOSがいわゆる酸素センサーであり、NOSによって酸素レベルに応じて合成されるNOが、酸素の肺血管拡張作用の本体ではないかとう新説を提示した。NOが換気-血流のマッチングを行なうという理論であり、かなりの反響を得た。

さて、1)は、まずヒトにおける実験からスタートしたことは前述した通りである。問題は、動物実験ができない（実験動物では鼻でのNOは測定不能である。おそらく、ほとんど産生されていない）ために、ヒトの材料を使う必要があることである。ヒトの鼻粘膜を用いて、そのNOの産生の状態を検出するために、われわれはDAF-2という蛍光色素を用いて、NOを目で見ようとして試みた。しかし、一切光ることも無く、実験はまったく暗礁に乗り上げてしまった。そこで、我々は一時的に鼻粘膜細胞から、もっとNOを多量に出しているLPSで刺激した肝細胞を用いて、方法論の確立をはかることにした。その結果、この報告集には、間に合わなかったが、ようやく日の目を見つつある。まず、肝細胞の極めて強い蛍光が検出され、これは、免疫組織学的同定を行ない、まぎれもなく iNOS由来のNOであることが確認された。一連の実験の成功は、思わぬ幸運であり、今後この方法で、多くの細胞や組織で研究が可能となる実験手法の確立を目指すことになる。また、気道上皮のサンプルを用いた研究もようやく端緒についたばかりで、これから第2の

気道上皮NOの役割研究が始まる。