

19001905

一酸化窒素の視覚化に関する研究

研究課題番号 07557185



平成7年度～平成9年度 文部省科学研究費補助金（基盤研究（A）（1））

研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 岩元 純

（旭川医科大学・医学部・生理学第一講座）

はしがき

この研究報告書は、平成7、8、9年度の3年間にわたる文部省科学研究費補助金 基盤研究(A)(1)(平成7年度においては「試験研究 B」と称し、平成8年度より現在のように改称)「一酸化窒素の視覚化に関する研究」(研究課題番号 07557185)の成果をまとめたものである。

本研究は、最近もっとも注目される呼気中の一酸化窒素(以下NOと略)のより精度の高い測定技術の向上をめざし、具体的にはNO測定の連続性と視覚化を目的としたものである。本研究は、当初、文字どおりの視覚化、すなわちNOを目でみることを目的としたために、手法として、NOを光学的に捕えることを目指した。それは、超高感度カメラによるNOの捕捉である。しかし、実際の測定法としての常圧下化学発光(オゾンによる)によるNOの視覚化は、極めて不安定であり、定量化するには適切でないことが次第に明らかになったため、むしろNOの連続的測定を定量化することを目的とした方向に転換した。もう一つの理由は、1995年にイギリスにおいて、同じようなセットアップを用いてNOの視覚化が試みられ、培養細胞系でのNO測定に成功し、一部パテント化されたことを知り、例え我々が不完全なものを実用化しても優位性を主張できないことが予測されたためである。しかし、当初の目的である視覚化という意味でのNO測定が、コンピュータ画面上にのNOの発生状況を定量的に表示することとなり、単なる視覚化以上に応用が広がったことは、喜ばしいことであった。本研究は、機器の精度や測定の応用という意味で、様々な対象からのNOの測定を試みたために、研究の過程で多くの研究協力者を得たが、中でも旭川医科大学耳鼻咽喉科学講座助手の今田正信先生、同大学内科学第一講座助手中野均先生、北海道東海大学助教授の小河幸次先生からは多大な協力を得た。また、それぞれの当該教室の教授の諸先生方が、快く共同研究に賛同して下さればこそ、このような各講座に広くまたがった研究ができたわけである。ここに、あらためて謝意を表したい。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ます。

平成10年3月

研究代表者 旭川医科大学生理学第一講座

岩元 純

文部省科学研究費補助金 (平成7、8、9年度)

基盤研究(C)(2) 一酸化窒素の視覚化に関する研究

(旧称一般研究(C))

研究課題番号 07557185

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：林 健 ((株)太陽東洋酸素・技術開発部・研究員)

研究協力者：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)

中野 均 (旭川医科大学・内科学第一・助手)

秋葉 裕二 (旭川医科大学・内科学第一・医員)

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)

小笠 寿之 (旭川医科大学・内科学第一・医員)

海野 徳二 (旭川医科大学・耳鼻咽喉科学・教授)

野中 聡 (旭川医科大学・耳鼻咽喉科学・講師)

今田 正信 (旭川医科大学・耳鼻咽喉科学・助手)

小林 吉史 (旭川医科大学・耳鼻咽喉科学・助手)

葛西眞一 (旭川医科大学・外科学第二・助教授)

柿坂明俊 (旭川医科大学・外科学第二・助手)

河野 透 (旭川医科大学・外科学第二・助手)

吉田 晃敏 (旭川医科大学・眼科学・教授)

秋葉 純 (旭川医科大学・眼科学・講師)

柳谷 典彦 (旭川医科大学・眼科学・大学院生)

坂本 尚志 (旭川医科大学・生理学第二・教授)

研究経費

平成7年度	9、200千円
平成8年度	3、100千円
平成9年度	1、100千円
計	13、400千円

I. 学会誌等

1. 岩元純. 一酸化窒素測定装置 循環制御 16 : 118-123、1995.
2. Iwamoto, J. The physiological basis for NO therapy: factors that may affect effectiveness of exogenous NO. Program & Abstracts Fourth Congress of Asia Pacific Association for Respiratory Care, Seventh Seminar for Respiratory Care, pp201-205, 1995.
3. Iwamoto, J., Imada, M., Unno, T., Nonaka, S., and A. Kuroshima. Nasal nitric oxide decreases along with nasal airway resistance after exercise. Second Joint Meeting of the Physiol Societies of Japan and U. K. and Eire, Nagoya Symposium, pp317, 1995.
4. Iwamoto, J., Saha, S.K., Ohinata, H. Kuroshima, A. Histological identification of nitric oxide synthase in brown adipose tissue of the rat . Jpn. J. Physiol. 45(suppl. 1): S261, #742, 1995.
5. Kono, T., Mito, S. K. Saha and J. Iwamoto. Hepatocytes produce inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NADPH diaphorase (NADPH-d) in patients with various liver disease. FASEB J. 9(4): A679, 1995.
6. Yamamoto, Y., Kono, T., S. K. Saha, Kamiya, K., Kakisaka, A., Ohinata, H. and J. Iwamoto. Spontaneously-occured inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the surgically-resected adenocarcinoma. FASEB J. 9(4): A679, #3939, 1995.
7. Ando, N., Kasai, S., Saito, Y., Kono, T., Kakisaka, A., Iwamoto, J., Mito, M. Spontaneously-occured inducible nitric oxide synthase (iNOS) in adenoma and adenocarcinoma in human colon. Endothelium 3 (suppl.): S56, #221, 1995.
8. Kasai, S., Kono, T., Yamamoto, Y., Kakisaka, A., Iwamoto, J., Mito, M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) like immunoreactivity in the hepatocytes from various liver diseases. Endothelium 3 (suppl.): S100, #395, 1995.
9. Kamiya, K., Ayabe, T., Kasai, S., Kono, T., Kakisaka, A., Iwamoto, J., Mito, M. Endoscopic measurements of localized gaseous nitric oxide in the inflammatory bowel disease (IBD): A clinical application. Endothelium 3 (suppl.): S118, #467, 1995.

10. Iwamoto, J. The physiological basis for NO therapy: factors that may affect effectiveness of exogenous NO. Program & Abstracts Fourth Congress of Asia Pacific Association for Respiratory Care, Seventh Seminar for Respiratory Care, pp201-205, 1995.
11. 河野透、岩元純、山本康弘、神谷和則、稲垣光裕、安藤修敏、小谷裕美、古根高、紀野修一、柿坂明俊、葛西真一、水戸迪郎. ヒト肝組織における誘導型一酸化窒素合成酵素発現の病因論的検討. 肝臓 3 6 巻 (suppl.1): 363, 1995.
12. 今田正信、小林吉文、野中聡、海野徳二、岩元純. 運動前後における鼻腔通気度と鼻腔産生NOについて. 日本鼻科学会雑誌 34 (1): 140, 1995.
13. 安藤修敏、河野透、今井政人、神谷和則、葛西真一、水戸迪郎、岩元純、野村昌史、綾部時芳、柴田好、高後裕. 大腸炎症性腸疾患における誘導型一酸化窒素合成酵素の発現と内視鏡下一酸化窒素ガス測定の意義. 日本消化器病学会雑誌 9 2 巻 (臨時増刊号) : 1512 #122, 1995.
14. 山本康弘、河野透、稲垣光裕、柿坂明俊、葛西真一、水戸迪郎、岩元純、栄浪克也、斎藤裕輔、柴田好、高後裕. 大腸腫瘍性病変における誘導型一酸化窒素合成酵素発現と内視鏡下一酸化窒素ガス測定野病因論的意義. 日本消化器病学会雑誌 9 2 (臨時増刊号): 1655, 1995.
15. Kono, T., Iwamoto, J., Yamamoto, Y., Kakisaka, A., Kasai, S. and Mito, M. Nitric oxide (NO) is released from liver into the abdominal cavity in the acute liver failure animal model. FASEB J. 10(3): A705, 1996.
16. Iwamoto, J., Ogawa, K., Suzuki, Y., Nakano, H., and Kuroshima, A. Breath-by-breath measurement of exhaled nitric oxide (NO) by chemiluminescence during exercise. FASEB J. 10(3): A330, 1996.
17. Kono, T., Iwamoto, J., Yamamoto, Y., Ando, N., Kamiya, K., Kakisaka, A., Kasai, S., and Mito, M. Intraabdominal nitric oxide production in rats: Measurements in expelled air. Gastroenterology 110(4): A1239, 1996.
18. Ogasa, T., Nakano, H., Iwamoto, J., Ide, H., Takahashi, H., Akiba, Y., and Kikuchi, K. Blood attenuates flow-dependent increase in exhaled NO in buffer-perfused rabbit lungs. Am J Resp Crit Care Med 153(4): A186, 1996.

19. Nakano, H., Ogasa, T., Iwamoto, J., Ide, H., Takahashi, H., Akiba, Y., and Kikuchi, K. Hypoxia decreases exhaled NO in isolated buffer-perfused rabbit lungs. *Am J Resp Crit Care Med* 153(4): A186, 1996.
20. Iwamoto, J., Imada, M., Nakano, H., Ogasa, T. Pulsatile excretion of human nasal nitric oxide measured by a fast real-time detection system. *Am J Resp Crit Care Med* 153(4): A851, 1996.
21. Imada M, Iwamoto J, Nonaka S, Kobayashi Y, Unno T. Measurement of nitric oxide in human nasal airway. *Eur. Respir. J.* 9: 556-559, 1996.
22. 今田正信、小林吉文、野中聡、海野徳二、岩元純. 鼻腔産生一酸化窒素 (NO) の連続測定による観察. *日本鼻科学会雑誌* 35 (1): 59, 1996.
23. Yanagiya N, Akiba J, Kado M, Yoshida A, Kono T, Iwamoto J. Nitric oxide activates water transport in the rabbit cornea. Program & Abstracts XII International Congress of Eye Research (XII ICER), Satellite Symposium Nitric Oxide and Free Radicals, pp26, 1996.
24. Iwamoto J, Nakano H, Ogawa K, Utsumi K, Ohinata H, Kuroshima A. Analysis of single breath nitric oxide (SBVNO) : A Clinical application. *Jpn J Physiol* 47 (suppl. 2): S93, 1997.
25. Ogawa K, Hattori M, Ide H, Iwamoto J, Kuroshima A. Effects of training on exhaled nitric oxide at Vo₂max in young cross-country skiers. *Jpn J Physiol* 47 (suppl. 2): S229, 1997.
26. Ogawa K, Nakano H, Ide H, Imada M, Iwamoto J. Nasal nitric oxide (NO) interferes measurement of exhaled NO during exercise. *FASEB J.* 11(3): A51, 1997.
27. Kono T, Kikuchi-Utsumi K, Ando N, Kamiya K, Suzuki Y, Yamamoto Y, Kotani H, Kasai S, and Iwamoto J. Nitric oxide production in the liver during early stage of endotoxemia. *FASEB J.* 11(3): A285, 1997.
28. Iwamoto J, Ogawa K, Nakano H, Ide H, and Kuroshima A. Analysis of single breath nitric oxide (SBVNO) in healthy subjects. *FASEB J.* 11(3): A346, 1997.

29. Ogasa T, Nakano H, Iwamoto J, Ide H, Akiba Y, Osanai S, Kikuchi K. Flow-induced production of endothelial nitric oxide in buffer-perfused rabbit lungs. *Am J Resp Crit Care Med* 155(4): A121, 1997.
30. Takahashi T, Nakano H, Iwamoto J, Ogawa K, Ide H, Akiba Y, Osanai S, Ogasa T, Kikuchi K. Reduction in nasal and exhaled NO in patients with diffuse panbronchiolitis (DPB). *Am J Resp Crit Care Med* 155(4): A823, 1997.
31. Ide H, Nakano H, Iwamoto J, Ogawa K, Akiba Y, Osanai S, Takahashi T, Ogasa T, Kikuchi K. Clinical assessment of exhaled nitric oxide (NO) in patients with asthma. *Am J Resp Crit Care Med* 155(4): A823, 1997.
32. Nakano H, Iwamoto J, Ogawa K, Ide H, Akiba Y, Osanai S, Takahashi T, Ogasa T, Kikuchi K. Analysis of exhaled NO and carbon dioxide in patients with COPD. *Am J Resp Crit Care Med* 155(4): A824, 1997.
33. Taniguchi M, Ayabe T, Ashida T, Honda M, Fujiki T, Nomura M, Einami K, Santos SB, Saito Y, Shibata Y, Kono, Kasai S, Iwamoto J, Kohgo Y. Evaluation of disease activity of ulcerative colitis by urinary nitrite. *Gastroenterology* 112(4): A1103, 1997.
34. Kono T, Ando N, Kamiya K, Suzuki Y, Yamamoto Y, Kotani H, Kasai S, Iwamoto J. Dose-independent responses of abdominal nitric oxide during LPS-endotoxemia. *Gastroenterology* 112(4): A1307, 1997.
35. Yanagiya N, Akiba J, Kado M, Yoshida A, Kono T, Iwamoto J. Transient corneal edema induced by nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide Biol. Chem. (Arch Biochem Biophys Part B)* 1(5): 397-403, 1997

II. 口頭発表

1. 岩元純、今田正信、海野徳二、野中聡、黒島晨汎： 「運動にともなう鼻腔NOの減少について」
第2回日英合同生理学シンポジウム, 名古屋、1995年 4月 1-2日.
2. 岩元純：
NO吸入療法に対する生理学的諸要素
第4回アジア太平洋呼吸療法学会総会 シンポジウム「一酸化窒素（NO）：臨床応用とその限界」、名古屋、1995年 9月 22-23日.
3. 岩元純：一酸化窒素の病態生理学
第5回日本臨床環境医学会総会 シンポジウム「物理環境と酸化的ストレス」、旭川、1996年 6月 14-15日.
4. 岩元純、中野均、小河幸次、井手宏、高橋啓、高橋政明、小笠寿之、秋葉裕二、長内忍、菊地健次郎：
リアルタイムNO測定による慢性閉塞性肺疾患患者の呼気NO分析
第53回 閉塞性肺疾患研究会、東京、1995年 7月 28日.
5. 中野均、小笠寿之、井手宏、岩元純、高橋啓、高橋政明、秋葉裕二、長内忍、菊地健次郎：気道におけるNOの産生と吸収から見た呼気NOの解析
第53回 閉塞性肺疾患研究会、東京、1995年 7月 28日.
6. Imada, M., Iwamoto, J., Nonaka, S., Kobayashi, Y., Unno, T.:
Changes of nasal nitric oxide during and after exercise.
2nd International conference: Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide
UCLA-Sunset Village, Los Angeles, U.S.A. July 13-17, 1996.
7. Nakano, H., Ogasa, T., Iwamoto, J., Ide, H., Takahashi, T., Akiba, Y., Kikuchi, K.:
Alveolar but not intravascular hypoxia decreases exhaled nitric oxide in isolated rabbit lungs.
2nd International conference: Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide
UCLA-Sunset Village, Los Angeles, U.S.A. July 13-17, 1996.
8. Kono, T., Ando, N., Yamamoto, Y., Kamiya, K., Kakisaka, A., Kasai, S., Iwamoto, J.:

Measurement of nitric oxide in the intraabdominal cavity in the liver dysfunction animal model.

2nd International conference: Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide
UCLA-Sunset Village, Los Angeles, U.S.A. July 13-17, 1996.

9. Yanagiya, N., Kado, M., Akiba, J., Yoshida, A., Kono, T., Iwamoto, J.:

Corneal nitric oxide: A direct measurement of NO from cornea and immunohistological survey of NO synthase.

Changes of nasal nitric oxide during and after exercise.

2nd International conference: Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide
UCLA-Sunset Village, Los Angeles, U.S.A. July 13-17, 1996.

10. 岩元純：生理学からみたNO吸入療法

第4回新生児NO吸入療法研究会、（第41回日本未熟児新生児学会サテライトシンポジウム）、静岡、1996年 11月 15日。

11. 岩元純：呼気NOの臨床的意義

第4回循環制御学会、サテライトシンポジウム、前橋、1997年 5月 24日。

12. 岩元純：ヒトの運動時における呼気NO動態

第11回呼吸研究会、特別講演、千里（大阪）、1997年 9月 20日。

13. J. Iwamoto, H. Nakano, M. Imada, H. Ide, and K. Kikuchi. Analysis and measurement of exhaled nitric oxide. Sapporo International Symposium "Recent Advances in Nitric Oxide Research" 札幌、1997年 9月 22日

14. Jun Iwamoto, Hitoshi Nakano, Hiroshi Ide, Masanobu Imada and Koji Ogawa : Exercise and exhaled nitric oxide: A real-time measurement of NO and a new analytical method. Nagano Symposium on Sports Science for the Winter Olympic Games '98、'98長野五輪記念国際スポーツ医科学シンポジウム 松本、1997年 10月 15-17日。

III. 出版物

1. 岩元純、NOガスのキネテイクスと作用機序. 新生児NO吸入療法研究会編「新生児NO吸入療法」pp 12 - 33 メディカ出版 1995。
2. Iwamoto J, Kono T, Kamiya K, Kakisaka A. and Kasai S. Endoscopic measurements of localized gaseous nitric oxide in the inflammatory bowel disease (IBD): A clinical application. In: The biology of nitric oxide part 5, edited by S. Moncada et al, Portland Press (London), pp326、1996.
3. Kasai S, Kono T, Mito M and Iwamoto J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) like immunoreactivity in the hepatocytes from various liver diseases. In: The biology of nitric oxide part 5, edited by S. Moncada et al, Portland Press (London), pp278、1996.
4. Kono T, Ando N, Kakisaka A, Kasai S and Iwamoto J. Spontaneously-occurred inducible nitric oxide synthase (iNOS) in adenoma and adenocarcinoma in human colon. In: The biology of nitric oxide part 5, edited by S. Moncada et al, Portland Press (London), pp154.
5. Iwamoto J, Nakano H, Ide H, Imada M, and Ogawa K. Exercise and exhaled nitric oxide: A real-time measurement of NO and a new analytical method. In: The 1997 Nagano Symposium on Sports Science, edited by Nose H, Morimoto T, and Nadel ER, Cooper Publishing Group, Carmel, IN, 1998 (in press).

研究成果

この研究と平行して行われた研究「運動における呼気ガス一酸化窒素の意義」（基盤研究（C）研究課題番号07670077）は、本研究の成果を取り込むことによって、長足の進歩を得た。昨年提出したそちらの研究報告書においては、残念ながら、こちらの研究成果を詳しく述べられなかった。本来こちらの研究成果を先に読むと分かりやすいのだが、研究年度の違いからこの報告書の方が後になった。

1. 測定装置開発までの紆余曲折

本研究の進行具合は、当初大変な困難が予想された。それは、我々とそっくり同じアイデアで、発光剤のみが異なる研究が、この研究費をいただいた直後に英国で発表されたからである。この研究は、かの高名なMoncadaらのグループがからんでいたから、勝ち目がほとんどなく、仮に我々が別の発光剤を用いたところで、製品化されてしまえば、特許で負けるのは目に見えていた。案の定、96年には、盛んにそのテクニックを喧伝する形で、システムがある会社から売りに出された。また、このころ、別のトラブルも持ち上がった。共同研究者のスカラテックの研究者が、当初のアイデアの一部を用いて、別の大学の研究者と共に、科学研究補助金の申請を行っていることが判明したのであった。幸い、そちらの研究申請は空振りに終わったために、二重になることは避けられたが、このために、次の共同研究者を探す必要に迫られた。しかし、最初の一年間で、方針を大転換することも必要だったために、このことは、かえって好都合であった。約、一年半の研究の後、ようやく試験的なシステムの開発に成功した。このシステムは、最初は、測定の時間的なアジャストができず、実験後にスプレッドシート上で時間をずらすという、大変効率の悪い方法で解析することがしばらく続いた。わずか数十秒の解析に数十分かかるというペースだから、実験の進展が誠にスローであった。しかし、この後薬5カ月ほどで、時間遅延のソフトウェアの開発に成功したため、2年目の終わり頃には、大変楽に仕事ができるようになった。業績がこれ以降増加したのは、そのためである。また、同時にデータの解析法も様々に工夫され、今の所、肺胞換気による標準化がもっとも的確にNO産生の状況をあらわすことが分かってきた。

2. 測定装置の概要

一酸化窒素（NO）は呼気ガス中に認められる。それらは、一応、喉頭より下部の気管支（気道）から来るものと、鼻から来るものに大別される。（後ろに、掲載したImadaのEur. Resp. Jに掲載された論文や、Iwamotoの著書等を参照されたい。）鼻から来るもの

は、おそらく鼻や気道の血管や粘膜上皮、あるいは神経（非アドレナリン作動性非コリン作動性神経）の終末から産生されたものが内腔に向かって拡散し、換気ガスによって体外に排出されるのであろう。その量は、鼻からは、毎分300ないし500ナノリットル（1ナノリットルは、10億分の1リットル）ほど出てくる。これが、鼻で産生されるNOの総量かどうかは分からない。また、下気道からは、その5分の1ほどの量が出てくる。これも、出てくる量が産生された総量かどうかはわからない。おそらく、この2倍の量は産生されているものと思われる。それが外に出てこないのは、息を吸った時に、気道から出てきたNOが肺胞の側に吸い込まれていき、そこで血液に捕捉されてしまうからしからしからであると推測されている（Iwamoto et al., 1994）。さて、この口や鼻を経て出てくるNOは、当然ながら肺胞気（息を吸い込んだ時、肺胞に入ったガスのこと）によって洗われて出てくるのであるから、このときの洗い具合によって出てくる量は影響されるはずである。簡単に述べると、広い範囲を洗って、また時間をかけて洗うと、その分多くのNOが回収されるはずである。このような、ことを知るためには、NOを迅速に測定し、また、同時に肺胞換気を測定する装置が必要になる。こうして、リアルタイムのNOとCO₂の測定装置の製作が試みられた。これは、NOの視覚化という意味では、化学発光という光学的な方法を用いて、かつその定量を時間軸に対してプロットするというもので、当初の予定であった二次元の表示ではないが、刻々と気道から排出されるNOが、コンピュータの画面に映し出される。また、この装置の測定精度は、大変に優れたもので、Moncadaらの装置に比しても感度ははるかに高い。次に、測定装置の各部分を列記する。

1. NOの化学発光式測定装置
2. 酸素、二酸化炭素 測定装置、
3. 気流測定装置
4. 時間遅延装置
5. 信号記録処理装置

これらの各部分が組合わさって、呼気中のNO分析を数ミリ秒台のサンプリングタイムで行うことができる。また、これらの信号は、コンピュータ上で解析されるべくストアされる。（これらの装置装置の概要と測定方法については、業績の中の著書のところに詳しく述べているので、そちらを参照されたい。）現在までのところ、このシステムは、太陽東洋酸素（株）を通して、すでに販売され始めた。また、このシステム自体には、特定の特許は設定しにくい様であるが、時間遅延装置のソフトウェアについては、太陽東洋酸素が

コピーライトをもっているので、実質的にはシステムの核の部分は海外に先駆けて国産化されたといえる。

付) 科学研究費補助金申請の研究計画調書より

資料としての立場より、平成7年度科学研究費補助金の申請時の研究計画調書を抜粋し、再録する。これらは、研究目的、意義、方法についての記載と、実際の予算の請求から構成される。この内容を再録する理由は、どのような申請内容であったから、科学研究費補助金を頂戴できたのかということ記録に残しておきたいという個人的な理由と、これを読まれる人にとってもなにがしかの参考になればという老婆心である。

研究題目：一酸化窒素の視覚化に関する研究

I. 研究目的：

背景：一酸化窒素（NO）は、生体内でアルギニンから合成される強力な平滑筋弛緩物質である。1857年、英国のバートンによって、狭心痛を和らげるためにニトログリセリンが試みられたが、この薬の作用が、NOによるものだとわかる1978年まで100年以上の月日が必要だった。話はここで終わらず、さらにNOが血管の内皮細胞から遊離されていることが発見され（Moncadaら、1987）、全身の血圧調節、主要臓器の血流調節に大きな役割を果たしていることが明らかになった。それから現在までに、血液凝固、神経系での情報伝達、感染免疫、腫瘍免疫、消化管の運動や粘膜保護などのシステムにおいても、NOが重要な意義をもつものとの報告がなされている。すなわちNOは、体内の非常に多くの細胞や組織（内皮、上皮、神経、神経膠細胞の他、心筋、マクロファージ、リンパ球など）で産生されていることがわかっている。

現行研究法の実態：NOの生理作用の研究法に関して、筆者の研究事例をあげてその問題点を述べたい。筆者らは、1990年より、脳血流、脳代謝とNOの関係の研究をはじめ、主としてNO合成酵素の阻害剤を用いた実験を行い、低酸素時の脳血流の増加がNOによるものであることなどを明らかにした。詳細は省くが、基本的にNOの生理作用の研究においてもっとも容易なのが、このような阻害実験である。しかし、これだけでは、『逆もまた真ならず』という事態に対応できない。次に、NOの直接投与実験であるが、投与すべきNOの安定な溶液をつくること自体が容易ではなく、また、その溶液のNO濃度を確定しなければならないというハードルが存在する。最近では、NOドナーと呼ばれるNOを遊離する化学物質が市販されるようになったが、それととも、遊離するNOの量を確定する作業は、依然として存在する。筆者らも、ヒツジ胎児の気管内にNO溶液を投与し肺血流量の測定をする実験をおこなったが、この際、NO溶液の濃度測定は、困難をきわめた。最後に、NOの測定実験であるが、筆者らは、化学発光式NO分析器をもちいて、培養内皮細胞からのNOの産生や、ヒトの呼気ガス中のNOを測定した。しかし、この種類の研究は、NO研究全体のなかでは、ごくわずかである。その理由は、現在広く用いられているNO分析器の測定原理のなかに潜んでいる。

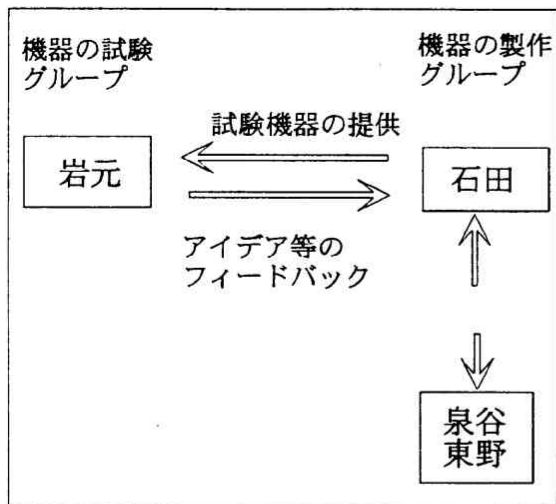
NO分析器：一般的なNOの分析器は、化学発光法を利用した装置で、元来、環境測定用に開発されたものである。その標準構成は、オゾン発生装置、反応槽、および、光電子増幅管の3つの部分よりなる。すなわち、サンプルされたNOガスは、反応槽のなかでオゾンと反応し、励起した二酸化窒素になる。これが、標準状態の二酸化窒素になる時に発光し、それを光電子増幅管（PMT）によって電気的信号に変換するのである。化学発光式NO分析器は試料の SHIPPINGの方法と得られた信号の処理法にによって大まかに2つのカテゴリーにわけられる。量を測るタイプと濃度を測るタイプである。前者は、主として医学生理学の研究に用いられ、後者は、主として環境測定用に用いられている。化学発光式NO分析器は、したがって、PMTの精度が非常に重要な要素であり、そのために温度制御が機器設計の要となる。また、極めて高価な器械であり、校正に費用と手間がかかるため、NOの測定実験は、敬遠されることが多い。

研究目的：本申請の目的は、この極めてデリケートなPMTをOCDに置き換えることをめざしたものである。そして、これによって測定するNOを量的に把握するのみならず、2次元的に表示する可能性を探究しようとするものである。

国内外の研究状況：NOの生理作用研究は、1987年以来、欧米を中心に大々的に行われている。日本でも91年頃から盛んにおこなわれているが、そのほとんどが、阻害実験かNO合成酵素に関するものである。NOのリアルタイムな測定は非常に少ない。特に日本では、化学発光式NO分析器の普及さえも、やっとはじまったばかりである。NO分析器の改良に関する研究もいまだに数が少なく、あっても、試料の発光の部分の増強を目指したものが多い。また一方で、ポーラログラフィー式のものも商品化され始めているが、精度の点では未だしの感が拭えない。このような状況にあって、NOの新しい測定原理の樹立をめざす本研究は、前例のないものである。しかしながら、この研究に用いられる個々のテクノロジーは、ある意味でそれぞれの分野ですでに確立され、また進歩しつつあるものであるから、それらを利用することを手段とする本研究は、従来のテクノロジーのアプリケーションの一種であり、それゆえに、実現の可能性が大きいのではないかと思われる。

II. 研究計画・方法

研究計画は、左図に示したように、2つの独立した研究機関によって行われる。現在、石田らの所属するス

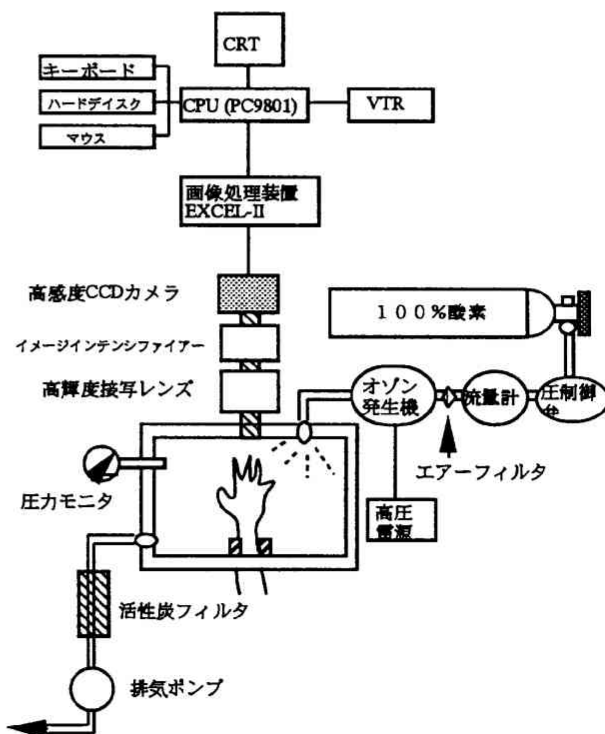


カラテック（株）は、化学発光式NO分析器の製作を行っている民間会社であり、これに関するノウハウは、十分蓄積されている。特に、効率のよいNO-オゾンの反応室、安定したオゾン発生器、PMTの温度管理等の基本的技術はすでに確立されており、したがって、機器の開発研究の第一期の中心となるのは、CCDカメラによる、化学発光の感知技術の確立である（平成7年）。もしこれが、成功した場合、続いて第二期（平成8年以降）の信号の画像化および画像解析の技術の確立へと進んで行く。次に、年度別に詳述してゆく。

平成7年度：本試験研究の目的は、新式のNO分析器であるので、まずは、実際にNOの感知が可能かどうかを確かめるプロジェクトからスタートする。化学発

光の光は、非常に微弱であるため、増強の際の信号/ノイズ比の改善が、具体的には研究の完遂目標となる。また下図に示すとおり、光学機器の性能はもとより、効率の良いオゾンとの混合、性能の良い反応チェンバーの設計等の要件も追求して行くこととなる。これらの基礎部分は石田等を中心としたグループで行われる。一方で、生体のNO信号のなかで、比較的大きなものを捜し出していくことも、機器のアプリケーション上必要である。現在知られているNO産生のなかでは、誘導型のNO合成酵素（NOS）を介してつくられたものが、比較的高濃度（内皮型NOSによるNOの1000倍程度）となることが知られている。つまり、種々の免疫細胞の培養細胞を用いたin vitro実験などから、直接NOを測定して行くことも必要となる。そのためには、従来の化学発光法による研究が確立することが、この試験研究全体の大きな支えになっていく。残念ながら、現在の日本国内において、そのような実験系を確立しているところは皆無である。勿論世界的にも非常に数が少ない。このような状況をふまえての筆者の分担部分（上図）は、新機種のテストのみならず、一般的なNO研究にとっても意義のあるものとなる。

平成8年度以降：光学的課題と生体NOの測定が解決されたならば、次には、それをどのように視覚映像化してゆくかという目標を実現するべく、研究を進めて行く。ただし、この分野は、多くの既存の画像解析に関するテクノロジーが存在するため、比較的容易に進むものと思われる。たとえば、細胞内カルシウム動態の研究などの成果は、本研究に寄与するものである。ここで肝要なことは、画像解析によるNOの量的把握が、どれほどの濃度域で、どの程度正確になされるかということを決めていくことである。そのためには、同一の検体や被験者を持ちいて、従来の測定方法による測定値との比較が必要となる。機器の改良の程度は、実際の生体を用いた試験の充実度によって決定される。現有機器との関連については、スカラテックには、自社製の化学発光式NO分析器が設置されており、それを用いることによって、比較検討が行える。また、電気回路の設計や、機器の組み立て、などは、研究所内の施設や設備を十分に活用することができる。



申請時の予算案

単位 (千円)

7	化学発光式NO分析器、Model 270B NOA (Sievers Instrument Inc.) 1x @5,900	5,900
	データアクイジション機器 MacLab/8 (ADI) 1x @980	980
	超高感度CCDカメラ及イメージインテン シファイアーV5102 (浜松フォトニクス) 1x @4,900	4,900
	オゾン発生器 (スカラテック) 1x @670	670
	高輝度レンズ 2/3*75 (池上通信機) 1x @190	190
	真空ポンプ (スカラテック) 1x @150	150
	2分割グローブボックス (スカラテック) 1x @1,250	1,250
	VTR EVO-9800A (SONY) 1x @650	650
	<hr/>	
	8	汎用画像処理システム (装置、ソフト込) (日本アビオニクス) 1x @2,500
ハードディスク ND540-BP (アイシーエム) 1x @120		120
フレームメモリーPower Movie (カノーブス) 1x @800		800
CRTディスプレイ FLEX SCAN 53T 1x @190		190
<hr/>		

消耗品		旅費		謝金		その他	
7	校正用NOガス	500	300	450	20		
	その他のガス	300	140				
	活性炭フィルタ	200					
	空気ドライア	100					
	実験動物	280					
	電気素子類	550					
	試薬	350					
	配管部品	400					
計	2680	計	440	計	450	計	20
<hr/>							
8	校正用NOガス	500	300	450	20		
	その他のガス	300	140				
	活性炭フィルタ	200					
	実験動物	280					
	試薬	350					
	電気素子類	200					
	計	1830	計	440	計	450	計
<hr/>							
9	校正用NOガス	500	300	450	20		
	活性炭フィルタ	200	140				
	実験動物	280					
	試薬	350					
	計	1330	計	440	計	450	計