

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山本泰司
学位論文題目			
Role of airway nitric oxide on the regulation of pulmonary circulation by carbon dioxide			
(二酸化炭素による肺循環調節における気道内一酸化窒素の役割)			
共著者 中野 均, 井手 宏, 小笠寿之, 高橋 啓, 長内 忍, 菊池健次郎, 岩元 純			
発表誌 ; <i>Journal of Applied Physiology</i> : 2001 (In press)			
研究目的			
<p>肺の最も重要な機能はガス交換であり、換気 (\dot{V}) と血流 (\dot{Q}) の比がより至適な条件となった時、動脈血は最も酸素化される。この \dot{V} / \dot{Q} 比を維持するために、肺においては、低酸素によって血管が収縮するという体循環では見られない血流調節機構 (低酸素性肺血管収縮 ; HPV) が存在する。一方、低酸素のみならず、高炭酸ガス (CO_2) も肺循環調節に重要な役割を担っている。すなわち、CO_2 は局所肺の pH の変化を介して HPV を修飾し、2 次的に動脈血の酸素化を調節している。しかし、その詳細なメカニズムは明らかではない。一酸化窒素 (NO) は強力な血管拡張物質であり、気道上皮や肺血管内皮での産生が確認されている。近年我々は、気道上皮由来 NO が肺胞低酸素の程度に応じて肺血流を調節していることを見出した¹⁾。そこで本研究では、肺胞気 CO_2 もまた気道上皮由来 NO を介して、肺循環調節を行っているという仮説を検証する目的で、ウサギ摘出灌流肺を用いて、異なる濃度の肺胞気 CO_2 または血管内 CO_2 負荷が HPV を含めた肺循環動態をどのように修飾するかを、呼気 NO と肺血管 NO 代謝産物の面から検討した。</p>			

材料・方法

1) 摘出灌流肺の作成

日本白色家兎(3.0~3.5 kg)を用い摘出灌流肺を作成した。灌流液には Klebs-Henseleit 液を使用し、灌流液中の血液がほぼ消失するまで肺内を十分に洗浄した後に閉鎖回路とした緩衝液灌流肺、または自家血を混合した血液灌流肺を作成した。灌流回路の肺動脈流入部位に膜型人工肺 (ECMO) を設置し、供給する CO_2 濃度を变化させ混合静脈血 CO_2 分圧を任意に調節した。肺循環動態の観察のため肺動脈圧 (Ppa)、肺静脈圧 (Ppv)、気道内圧 (Paw) を測定した。

2) 呼気中の酸素、二酸化炭素濃度および NO 濃度の測定

O_2 - CO_2 分析器(Respina IH26, San-ei 社製)と化学発光法による NO 分析装置(NO A270B, Sievers 社製)を使用し呼気の O_2 , CO_2 および NO 濃度を連続的に測定した。

3) 灌流液中の NO 代謝産物(NO_x)の測定法

灌流液中 NO_3^- はアスペルギルス還元酵素を用い NO_2^- に還元し、さらに NO_2^- をヨウ化カリウムと氷酢酸を用いて NO に還元し、発生したガスを NO 分析装置で測定し、灌流液の NO_x 濃度を求めた。

4) 実験プロトコール

プロトコール IA : 血液灌流肺における肺胞気 CO_2 負荷 (n = 5)

標準状態 (標準ガス [O_2 20%, CO_2 6%, N_2 balance]) で換気し、灌流液 O_2 分圧を 150mmHg, PvCO_2 を 40mmHg に調節した) の後、吸入気 CO_2 濃度 (FICO_2) を 0%, 3%, 6%, 9%, 12% と段階的に増加させ、それぞれ 15 分間換気した。ECMO には標準ガスを持続的に送気した。

プロトコール IB : 血液灌流肺における血管内 CO_2 負荷 (n = 5)

肺胞気を標準ガスで換気しながら、ECMO に供給する CO_2 濃度を 0%, 6%, 12% と増加させそれぞれ 15 分間送気した。

プロトコールⅡA：緩衝液灌流肺における肺胞気 CO₂ 負荷 (n = 6)

緩衝液肺でプロトコール I A と同様の負荷を行った。それぞれの条件で 5 分おきに灌流液をサンプルし、NO_x 産生量を計算した。

プロトコールⅡB：緩衝液灌流肺における血管内 CO₂ 負荷 (n = 6)

緩衝液肺でプロトコール I B と同様の負荷を行い、灌流液 NO_x 産生量を計算した。

プロトコールⅢ：緩衝液灌流肺における低酸素負荷時の吸入気 CO₂ 濃度の影響 (n = 5)

コントロールとして換気用標準ガスに CO₂ 6%, N₂ 94%の混合ガスを混入し、吸入気酸素濃度 (FIO₂) を 20%から 0%まで 20 分間かけて徐々に低下させた。次いで、高 CO₂ 条件として混合ガス (20% O₂, 12% CO₂) で換気した後、CO₂ 12%, N₂ 94%の混合ガスを混入し同様に FIO₂ を徐々に低下させた。

6) 解析および統計処理

プロトコール I, II における \dot{V}_{NO} , NO_x, Ppa の平均値の差の検定は反復測定分散分析を用いた。Ppa, CO₂ 濃度, NO_x の相互関係は回帰分析により検討した。プロトコールⅢでの \dot{V}_{NO} と O₂ の逆数プロット (Lineweaver-Burk Plot) は回帰分析にて求めた。全てのデータは平均値 ± 標準誤差で表し、 $P < 0.05$ をもって有意と判定した。

成績

①血液灌流肺

FICO₂ の増加 (6%から 12%) は \dot{V}_{NO} を低下させ (20.9 から 14.2 nl/min, $P < 0.05$), Ppa を上昇させた (17.8 から 23.5 mmHg, $P < 0.05$)。一方、灌流液中 CO₂ の増加 (6%から 12%) は Ppa を上昇させた (17.0 から 18.5 mmHg, $P < 0.05$) が、 \dot{V}_{NO} を変化させなかった。

②緩衝液灌流肺

FICO₂の増加(0%から12%)は \dot{V}_{NO} を低下させ(93.8から61.7 nl/min, $P < 0.01$), 灌流液中のNOx 産生量も有意に低下させた(4.8から1.8 nmol/min, $P < 0.01$). またPpaは軽度上昇した. 一方, 灌流液中CO₂の増加(6%から12%)は \dot{V}_{NO} , Ppaのいずれをも変化させなかったが, 灌流液NOx 産生量は軽度低下する傾向を示した(3.2から2.3 nmol/min, N.S.). 呼気終末CO₂濃度は, いずれも有意に \dot{V}_{NO} とは負に($r = -0.827, P < 0.01$), Ppaの変化とは正に($r = 0.650, P < 0.01$) 相関した.

③高炭酸ガス時の低酸素の影響

コントロールではFIO₂を20%から0%に徐々に低下させると, それに対応して \dot{V}_{NO} は低下し(95から26 nl/min), Ppaは28%上昇した. 一方, 高CO₂負荷下では \dot{V}_{NO} はさらに低下し(67から19 nl/min), Ppaは50%上昇した. CO₂負荷はFIO₂- \dot{V}_{NO} 曲線を下方へ偏位させた. FIO₂と \dot{V}_{NO} の逆数プロット解析から, CO₂はMichaelis定数(K_m)には影響を与えなかったが, 最大反応速度(V_{max})を66.7 nL/minから55.6 nL/minに減少させた.

考案

呼気NOは主に気道肺胞上皮由来, 灌流液NOxは主に肺血管内皮由来と考えられている²⁾. 本研究において肺胞気CO₂負荷は, 濃度依存性に呼気NOを減少させるとともに, 灌流液NOxを有意に低下させた. しかし, 灌流液CO₂負荷は呼気NOに影響を与えず, 灌流液NOxの減少は肺胞気CO₂負荷と比べ軽微であった. 以上の成績より, CO₂は気道上皮および肺血管内皮におけるNO産生のいずれをも抑制するが, 特に肺胞気CO₂が肺内NO産生の調節に深く関与している可能性が強く示唆された.

近年, 我々は気道上皮に存在するNO合成酵素(NOS)が吸入気中の酸素を基質としてNOを合成することを報告した¹⁾. そこで, 肺胞気CO₂が酵素基質反応に及ぼす影響を逆数プロットを用いて検討したところ, CO₂は K_m を変化させずに V_{max} を減少させた. このことはCO₂が非競合的にNO産生を阻害す

ることを意味する。従来、NOS 活性は細胞内アシドーシスにより低下することが報告されている³⁾。また気道内の CO₂ は容易に気道肺胞上皮細胞膜を通過し、細胞内 pH を低下させる。したがって、CO₂ による呼気 NO の減少は、瞬間的な細胞内 pH の低下による NOS 活性の低下に起因するものと推察された。

一方、本研究において、肺胞気 CO₂ 負荷は呼気 NO を減少させるとともに、灌流液 CO₂ 負荷に比べ、より強い肺動脈の昇圧反応を惹起した。また、肺胞気 CO₂ 濃度の上昇は、HPV をさらに増強させた。これらの結果から、低換気領域の肺胞（低酸素と高炭酸ガスが共存）においては気道肺胞上皮由来の NO 産生は極度に減少し、その領域の肺血管は強力に収縮し、血流が高換気領域にシフトすることで \dot{V} / \dot{Q} 比が至適に保たれると考えられる。

結論

ウサギ摘出灌流肺において

- 1) 肺胞気 CO₂ 濃度の変化は、気道上皮由来 NO を介して肺循環動態を調節する。
- 2) 肺胞気 CO₂ 濃度の上昇は低酸素性肺血管収縮 (HPV) を増強する。

以上より、換気血流調節機構のメカニズムの一つとして、肺胞気ガス組成に対応した気道由来 NO の変化を介した肺血流調節機構が存在するという新しい知見を得た。

引用文献

1. Ide H, Nakano H, Ogasa T, Osanai S, Kikuchi K, and Iwamoto J. Regulation of pulmonary circulation by alveolar oxygen tension via airway nitric oxide. *J Appl Physiol* 87: 1629-1636, 1999.
2. Ogasa T, Nakano H, Ide H, Yamamoto Y, Sasaki N, Osanai S, Akiba Y, Kikuchi K, and Iwamoto J. Flow-mediated release of nitric oxide in isolated perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 91: 363-370, 2001.
3. Fleming I, Hecker M, and Busse R. Intracellular alkalinization induced by bradykinin sustains activation of the constitutive nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circ Res* 74: 1220-1226, 1994.

参考文献

1. Ogasa T, Nakano H, Ide H, Yamamoto Y, Sasaki N, Osanai S, Akiba Y, Kikuchi K, and Iwamoto J. Flow-mediated release of nitric oxide in isolated perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 91: 363-370, 2001.
2. 長内忍, 井手宏, 山本泰司, 中野均, 菊池健次郎. 睡眠時無呼吸症候群の診断の進歩 呼気一酸化窒素.
日本臨床 58(8): 1665-1670, 2000.
3. 山本泰司, 秋葉裕二, 高橋啓, 井手 宏, 西垣 豊, 藤内 智, 中野 均, 大崎能伸, 菊池健次郎. 抗リン脂質抗体陽性を呈した肺塞栓症の検討. *Therapeutic Research* 17(5): 1513-1515, 1996.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	山本泰司
審査委員長 坂本尚志 ㊞			
審査委員 鈴木裕 ㊞			
審査委員 菊池健次郎 ㊞			
学位論文題目			
Role of airway nitric oxide on the regulation of pulmonary circulation by carbon dioxide (二酸化炭素による肺循環調節における気道内一酸化窒素の役割)			
<p>本論文は、肺の換気血流調節機構における肺胞気ガス組成、特に二酸化炭素(CO₂)の関与を明らかにしようと試みた論文である。論文提出者らは、これまで肺胞気低酸素による低酸素性肺血管収縮に気道上皮由来の一酸化窒素(NO)が関与していることを明らかにしてきたが、本研究では、二酸化炭素が同様の機構を介して関与しているか明らかにしようと試みている。</p> <p>実験には、家兎摘出灌流肺を用いて、肺胞気由来のCO₂が肺血管内皮由来ではなく気道上皮由来のNOを介しているか解析するために、異なる濃度のCO₂を肺胞気および血管内から負荷し、両者の結果を比較している。また、生体における低換気領域における低酸素</p>			

と高 CO₂ 状態における両者の関与を解析するために、肺胞気低酸素下に肺胞気高 CO₂ 負荷を行い、解析を加えている。

得られた結果は明らかで、肺胞気 CO₂ の増加は優位に呼気 NO を低下させ、肺動脈圧を上昇させたが、血管内 CO₂ の上昇は肺動脈圧をわずかに上昇させたのみで、呼気 NO を変化させなかった。また、肺胞気低酸素下肺胞気高 CO₂ 負荷は、低酸素により減少した呼気 NO をさらに減少させ、肺血管収縮による肺動脈圧の上昇を増幅させた。

このことは、低換気領域の肺胞においては、低酸素のみならず高 CO₂ により、気道上皮由来の NO 産生が極度に低下し、その領域の肺血管を強く収縮させ、血流を高換気領域にシフトし、至適換気血流比が保たれることを極めて明解に示している。

論文は既に臨床生理学の一流誌である J. Appl. Physiol. に掲載予定で、今後肺における換気・血流調節の研究、臨床における病態解析、治療に貢献するところ大と考えられる。

なお、論文提出者に対する本論文の内容、関連領域に関する試問に対し、適切な回答が得られ、学力も十分と考えられた。以上より、本論文は博士の学位論文に値すると判定された。