

研究課題番号

07457019

研究課題名

心筋の虚血再灌流障害における NOの役割に関する研究

平成7年度—平成8年度科学研究費補助金
(基盤研究B)(2) 研究成果報告書



平成10年2月

研究代表者 安孫子 保
(旭川医科大学医学部薬理学講座)

研究課題名

心筋の虚血再灌流障害におけるNOの役割に関する
研究

研究課題番号
07457019

平成7年度－平成8年度科学研究費補助金
(基盤研究B)(2) 研究成果報告書

平成10年2月

研究代表者 安孫子 保
(旭川医科大学医学部薬理学講座)

はしがき

心筋における虚血・再灌流障害の重要な原因は、酸素の心筋への供給の低下であるが、我々は虚血・再灌流障害の原因は心筋への酸素供給の低下ばかりではなく、虚血・再灌流中に心筋組織に蓄積する虚血毒(活性酸素, リゾホスファチジルコリン(LPC)、長鎖アシルカルニチンなど)が心筋細胞にさらなる障害を与えることが重要な原因であるという仮説を立てている。

この仮説の真偽を確かめるのが本実験の第1の目的で、第2の目的は虚血・再灌流障害に一酸化窒素(NO)がどのように関与しているのかを知ることである。この理由は、近年、LPCは一酸化窒素(NO)の合成を促進すること、ならびに内因性のNOが活性酸素による組織障害を抑制することが報告されているからである。

まず、虚血毒と思われる過酸化水素(H_2O_2)、LPC、または palmitoyl-L-carnitine (PALCAR) をラット灌流心臓に投与すると、心機能やエネルギー代謝に著しい障害(虚血・再灌流障害に似た障害)がおこることを確かめた。これら虚血毒による心筋障害が、虚血・再灌流障害を抑制する作用をもっていることが確かめられている dilazep や K-7259 などによって軽減することを認めた。この事実は、我々の仮説が正しいことを示唆する。

しかし、これらの薬物がどのような作用機序で、 H_2O_2 による心筋障害を抑制するかは明らかでない。そこで、dilazepやK-7259が灌流心臓においてNO産生を促進するか否かを検討した。しかし、dilazepまたはK-7259を投与しても、冠流出液中の NO_2 , NO_3 遊離量(高感度のオゾン化学発光法を用いて測定)に有意な経時的変化が認められなかった。

従って、dilazep や K-7259は冠流出液中の $NO_2 + NO_3$ 遊離量に影響を及ぼさないこと、すなわちNO産生を促進しないことを示した。したがって、過酸化水素に対するdilazepやK-7259の心筋保護作用の機序に、NOが関与する可能性は少ないものと思われる。

研究組織

研究代表者	安孫子 保 (旭川医科大学教授)
研究分担者	橋爪 裕子 (旭川医科大学助教授)
研究分担者	原 明義 (旭川医科大学助手)

研究経費

平成7年度	6,400	千円
平成8年度	1,300	千円
計	7,700	千円

研究発表

I 学会誌等 (原著論文)

- 1) Hoque, N., Hoque, A.N.E., Hashizume, H., Ichihara, K. & Abiko, Y.: K-7259, a novel dilazep derivative, and *d*-propranolol attenuate H₂O₂-induced cell damage. J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 207-211 (1996)
- 2) Magishi, K., Kimura, J., Kubo, Y. & Abiko, Y.: Exogenous lysophosphatidylcholine increases non-selective cation current in guinea-pig ventricular myocytes. Pflügers Arch.- Eur. J. Physiol. 432: 345-350 (1996)
- 3) Hara, A. & Abiko, Y.: Protective effects of dilazep and its novel derivative, K-7259, on mechanical and metabolic derangements induced by hydrogen peroxide in the isolated perfused rat heart. J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 565-571 (1996)
- 4) Kokita, N. & Hara, A.: Propofol attenuates hydrogen peroxide-induced mechanical and metabolic derangements in the isolated rat heart. Anesthesiology 84: 117-127 (1996)
- 5) Chen, M., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Effects of β -adrenoceptor antagonists

- on Ca²⁺-overload induced by lysophosphatidylcholine in rat isolated cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* 118: 865-870 (1996)
- 6) Hara, A., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Dilazep and its derivative, K-7259, attenuate mechanical derangement induced by palmitoyl-L-carnitine in the isolated, perfused rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 32-38 (1996)
 - 7) Hashizume, H. & Abiko, Y.: Dilazep and *d*-propranolol attenuate calcium overload induced by lysophosphatidylcholine in cardiac myocytes. *Exp. Clin. Cardiol.* 1: 45-48 (1996)
 - 8) Chen, M., Hashizume, H., Xiao, C.-Y., Hara, A. & Abiko, Y.: Lysophosphatidylcholine induces Ca²⁺-independent cellular injury attenuated by *d*-propranolol in rat cardiomyocytes. *Life Sci.* 60: 57-62 (1997)
 - 9) Hoque, A.N., Hoque, N., Hara, A., Hashizume, H., Ichihara, K. & Abiko, Y.: Cardioprotective effect of K-7259, a novel dilazep derivative, against ischemia-reperfusion damage in isolated, working rat hearts. *Jpn. J. Pharmacol.* 73: 365-369 (1997)
 - 10) Hara, A., Arakawa, J., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Beneficial effects of dilazep on the palmitoyl-L-carnitine-induced derangements in isolated, perfused rat heart: comparison with tetrodotoxin. *Jpn. J. Pharmacol.* 74: 147-153 (1997)
 - 11) Akahira, M., Hara A. & Abiko, Y.: Effect of MET-88, a γ -butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on myocardial derangements induced by hydrogen peroxide in the isolated perfused rat heart. *Fund. Clin. Pharmacol.* 11: 356-364 (1997)
 - 12) Xiao, C.-Y., Chen, M., Hara, A., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Palmitoyl-L-carnitine modifies the myocardial levels of high-energy phosphates and free fatty acids. *Basic Res. Cardiol.* 92: 320-330 (1997)
 - 13) Arakawa, J., Hara, A. & Kokita, N.: Lidocaine attenuates mechanical and metabolic derangements induced by palmitoyl-L-carnitine in the isolated perfused rat heart. *Pharmacology* 55: 259-268 (1997)
 - 14) Nasa, Y., Hoque, A.N.E., Ichihara, K., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Protective effect of amiloride against reperfusion damage as evidenced by inhibition of accumulation of free fatty acids in working rat heart. *Jpn. Circ. J.* 61: 1021-1029 (1997)
 - 15) Hara, A., Hayase, N., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Protective effects of dilazep

and its derivative K-7259 on the haemolysis induced by amphiphiles in rat erythrocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 806-811 (1997)

- 16) Chen, M., Xiao C.-Y., Hashizume, H. & Abiko, Y.: Differential effects of Ca^{2+} channel blockers on Ca^{2+} overload induced by lysophosphatidylcholine in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 333: 261-268 (1997)

II 総説

- 1) Hara, A. & Abiko, Y.: Role of the sympathetic nervous system in the ischemic and reperfused heart. *In Myocardial Ischemia: Mechanisms, Reperfusion, Protection*, ed. by M. Karmazyn, Birkhäuser Verlag Basel, pp. 285-297 (1996)
- 2) 橋爪裕子、陳 敏、原 明義、安孫子 保: 心筋虚血とカルシウムー虚血心筋カルシウムオーバーロードにおける虚血代謝毒としての H^+ とリゾリン脂質の役割 *Clinical Calcium* 6: 35-40 (1996)
- 3) 安孫子 保、橋爪 裕子、原 明義: 心臓の虚血・再灌流障害と抗虚血薬の作用メカニズムに関する新しい考え方 *日薬理誌* 108: 195-202 (1996)
- 4) Hashizume, H., Hoque, A.N.E., Magishi, K., Hara, A. & Abiko, Y.: A new approach to the development of anti-ischemic drugs: substances that counteract the deleterious effect of lysophosphatidylcholine on the heart. *Jpn. Heart J.* 38: 11-25 (1997)

III 図書

- 1) Abiko, Y. & Karmazyn, M. (Eds.): *Protection against Ischemia and Reperfusion Damage in the Heart*. Springer Verlag, Tokyo Berlin Heidelberg New York (in press)

IV 研究発表

- 1) 橋爪 裕子、原 明義、Nina Hoque、安孫子 保: シンポジウム「各種臓器疾患でのフリーラジカルと消去物質」活性酸素による心筋障害におよぼす薬

物の作用：代謝障害を中心に (1996年. 3月 第69回日本薬理学会年会
長崎)

- 2) 原 明義、安孫子 保: 長鎖アシルカルニチンによる心筋障害におよぼす
dilazepとその誘導体K-7259の保護作用 (1996年. 3月 第69回日本薬理
学会年会 長崎)
- 3) 陳 敏、橋爪 裕子、安孫子 保: ラット心室筋細胞におけるリゾホスファ
チジルコリンによるCa²⁺非依存性細胞障害におよぼすd-propranololの保護作
用 (1996年 3月 第69回日本薬理学会年会 長崎)
- 4) 荒川 穰二、原 明義、安孫子 保: 長鎖アシルカルニチンによるラット心
機能障害およびエネルギー代謝障害におよぼすリドカインの影響 (1996年 7
月 第10回北海道薬物作用談話会 北海道大学学術交流会館)
- 5) Chen, M., Hashizume, H., Xiao C.-Y., Hara A. and Abiko, M.: Evidence for
Ca²⁺-independent cellular injury induced by lysophosphatidylcholine in
cardiomyocytes and the protective effect of d-propranolol on the injury
(1996年10月 第4回日中合同薬理学会議 福岡市)
- 6) 荒川 穰二、原 明義、安孫子 保: 長鎖アシルカルニチンによるラット心
機能障害およびエネルギー代謝障害におよぼすリドカインの影響 (1996年
10月第47回日本薬理学会北部会 山形)
- 7) 原 明義、早勢 伸正、橋爪 裕子、安孫子 保: 長鎖アシルカルニチンお
よびリゾリン脂質による溶血におよぼすジラゼップとその誘導体K-7259の
作用(1996年10月 第47回日本薬理学会北部会 山形)
- 8) Chen, M., Hashizume, H., Xiao, C.-Y., Hara, A. and Abiko, Y.: Protective
effect of dimethleicosadienoic acid, a phospholipase A₂ inhibitor, on cell
damage induced by lysophosphatidylcholine in isolated cardiomyocytes
(1996年10月 第47回日本薬理学会北部会 山形)
- 9) Xiao, C.-Y., Chen, M., Hara, A., Hashizume, H. And Abiko, Y.: Effects of
palmitoyl-L-carnitine on energy and lipid metabolism in the heart (1996年11
月 第13回国際心臓研究学会日本部会 浦安)
- 10) 赤平 百絵、原 明義、安孫子 保: Hydrogen peroxideによるラット心機
能障害およびエネルギー代謝障害におよぼすPrazosinの保護作用 (1996年 1
1月 第2回北海道活性酸素・フリーラジカル研究会 札幌)
- 11) 陳 敏、肖 春陽、橋爪 裕子、原 明義、安孫子 保: ラット心筋細胞に
おいてvarapamilとflunarizineはリゾホスファチジルコリンによる細胞障害を

抑制する (1997年3月 第70回日本薬理学会年会 幕張メッセ)

- 12) 原 明義、荒川 穰二、橋爪 裕子、安孫子 保: テトロドトキシンはパルミトイル-L-カルニチンによる心機能障害およびエネルギー代謝障害を抑制する (1997年3月 第70回日本薬理学会年会 幕張メッセ)
- 13) Hashizume, H., Chen, M., Ma, H., Hara, A., Yazawa, K., Akahira, ., Xiao, C.-Y. and Abiko, Y.: Lysophosphatidylcholine: a possible modulator of ischemic injury in the heart (1997年7月 Pre-Congress Satellite Symposium on "Protection against Ischemia/Reperfusion Damage" 国際心臓研究学会第14回日本部会 旭川)
- 14) Akahira, M., Hara, A., Hashizume, H. and Abiko, Y.: Effects of prazosin myocardial derangements induced by hydrogen peroxide in the isolated rat heart (1997年7月 国際心臓研究学会第14回日本部会 旭川)
- 15) Ma, H., Hashizume, H., Hara, A., Yazawa, K. and Abiko, Y.: Protective effect of quinaprilat on Ca^{2+} -overload induced by lysophosphatidylcholine in isolated rat cardiomyocytes (1997年7月 国際心臓研究学会第14回日本部会 旭川)
- 16) Xiao, C.-Y., Chen, M., Hara, A., Hashizume, H. And Abiko, Y.: Beneficial effects of *d-cis*-diltiazem and *l-cis*-diltiazem on the myocardial derangements induced by palmitoyl-L-carnitine in the isolated, perfused rat heart (1997年8月 第11回北海道薬物作用談話会 札幌)
- 17) Hashizume, H., Chen, M., Ma, H., Hara, A., Yazawa, K. Akahira, M., Xiao, C.-Y. and Abiko, Y.: A new approach to the development of anti-ischemic drugs: protective drugs against cell injury induced by lysophosphatidylcholine (1997年9月 The 2nd International Symposium "Membrane Receptors, Signal Transduction and Drug Action" 札幌)
- 18) 馬 紅、橋爪 裕子、原 明義、矢沢 和人、安孫子 保: ラット心筋細胞におけるリゾフォスチジルコリンによる Ca^{2+} オーバーロードに及ぼす quinaprilat の保護作用(1997年10月 第48回日本薬理学会北部会 盛岡)
- 19) Xiao, C.-Y., Chen, M., Hara, A., Hashizume, H. and Abiko, Y.: Beneficial effects of *d-cis*-diltiazem and *l-cis*-diltiazem on the myocardial derangements induced by palmitoyl-L-carnitine in the isolated, perfused rat heart (1997年10月 第48回日本薬理学会北部会 盛岡)
- 20) 松村 久男、原 明義、橋爪 裕子、安孫子 保: 過酸化水素によるラット

心機能障害およびエネルギー代謝障害におよぼすラノラジンの影響 (1997年
10月 第48回日本薬理学会北部会 盛岡)

- 21) 原 明義、赤平 百絵、橋爪 裕子、安孫子 保: テトロドトキシンは過酸化水素によるラット心機能障害およびエネルギー代謝障害を抑制する (1997年10月 第48回日本薬理学会北部会 盛岡)
- 22) 荒川 穰二、原 明義、安孫子 保、並木 昭義: 長鎖アシルカルニチンによるラット心機能障害におよぼす Na^+/H^+ 交換機構阻害薬 5-(*N,N*-dimethyl)-amilorideの影響 (1997年10月 第48回日本薬理学会北部会 盛岡)
- 23) 矢沢 和人、馬 紅、橋爪 裕子、安孫子 保: 心室筋 Ca^{2+} 電流に対する K-7259 の作用 (1997年10月 第48回日本薬理学会北部会 盛岡)
- 24) 陳 敏、橋爪 裕子、安孫子 保: ラット心室筋細胞におけるリゾホスファチジルコリンによる Ca^{2+} 非依存性細胞障害 (1997年10月 第18回細胞情報伝達系北海道研究会 札幌)

1 虚血毒の心筋に対する作用

虚血・再灌流によって心筋組織に蓄積し、しかも心筋に対して虚血・再灌流障害に似た障害をおこす物質を我々は虚血毒と呼んでいる。虚血毒としては、活性酸素、リゾリン脂質、アシルカルニチンがある。本研究では、それらの代表である過酸化水素(H_2O_2)、リゾホスファチジルコリン(LPC)、ならびにパルミトイルカルニチン(PALCAR)を用いた。

- a) H_2O_2 : H_2O_2 は心筋細胞内の Ca^{2+} を上昇させ(1)、心筋の収縮能を低下させ、エネルギー代謝に障害を与えた(3, 10)。 H_2O_2 による心筋の障害は、虚血・再灌流による障害(8, 13)と非常によく似ていた。
- b) LPC: LPCは心筋細胞内の Ca^{2+} を上昇させた(4, 6, 15)。また、心筋の収縮能を低下させ、エネルギー代謝に障害を与えることは、今までに報告してきた。LPCによる心筋の障害は、虚血・再灌流による障害(8, 13)と非常によく似ていた。さらに、LPCは心筋の非特異的陽イオンチャネルを開口することを明らかにした(2)。LPCが細胞内 Ca^{2+} を上昇させる原因の一つにこの作用が考えられる。
- c) PALCAR: PALCARもLPCと同じように両親媒性の物質なので、細胞膜に取り込まれ、細胞に障害をおこすことが考えられる。事実、PALCARは H_2O_2 やLPCと同じような作用、つまり虚血・再灌流障害に似た障害を心筋細胞に与えることが明らかとなった(5, 9, 12)。

2 虚血毒による心筋障害を抑制する物質

- a) β -遮断薬: β -遮断薬は H_2O_2 やLPCによる心筋内 Ca^{2+} 濃度の上昇と心筋障害を抑制する(1, 4, 7)が、すべての β -遮断薬が抑制するわけではない。虚血毒に拮抗するのは β -遮断作用ではなく、 β -遮断薬のもつ膜安定化作用と疎水性のためであると考えられる。その証拠に*d*-propranololは*dl*-propranololと同程度に虚血毒による作用を減弱する(4)。
- b) Ca^{2+} チャネル遮断薬: Ca^{2+} チャネル遮断薬も虚血毒の作用に拮抗するが、その作用の本体は Ca^{2+} チャネル遮断作用であるとは考えられない(15)。この場合にも疎水性が関係しているようである。
- c) DilazepとK-7259: K-7259はdilazepの誘導体であるが、dilazepのようなadenosine potentiating actionは弱く、冠動脈を拡張する作用も弱い。しかし、dilazep同様に虚血・再灌流障害を抑制する(8)とともに、PALCARによる心筋障害を軽減する(5, 9)。また、K-7259による心筋保護は、K-7259 が心筋の機能に何らの影響を及ぼさない濃度で発揮するので、いわゆるenergy sparing effectのためではない。興味あることに、LPCとPALCAR は赤血球の溶血をおこすが、dilazepとK-7259 は溶血を抑制する(14)。従って、dilazepやK-7259 は細胞膜に直接作用して、虚血毒による細胞膜の破壊を守る作用があると考えられる。

3 NOの関与

活性酸素は、心筋における虚血-再灌流障害の主要な原因物質のひとつと考えられている。先に我々は、活性酸素の一種である過酸化水

素 (H_2O_2) をラット灌流心臓に投与すると、心機能やエネルギー代謝に著しい障害が発現すること、さらに H_2O_2 によるこれらの心筋障害が、*dilazep* ($1\ \mu\text{M}$) や *K-7259* ($1\ \mu\text{M}$) によって軽減されることを認めた。しかし、これらの薬物がどのような作用機序で、 H_2O_2 による心筋障害を抑制するかは明らかでない。近年、内因性の酸化窒素 (NO) が活性酸素による組織障害を抑制することが報告されている。そこで本研究では、*dilazep* や *K-7259* が灌流心臓において NO 産生を促進するか否かを検討した。

実験方法

(1) 灌流方法

雄性 Sprague-Dawley ラット (9~10 週令) から摘出した心臓を、95 % O_2 + 5 % CO_2 で平衡にした Krebs-Henseleit bicarbonate 液 (組成: NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 2.5 mM, NaHCO_3 25 mM, glucose 11 mM) を用いて Langendorff 式に灌流した。灌流は定流量灌流 (10 ml/min) とし、電気刺激により心拍数を一定 (300 beats/min) にした。約 20 分灌流し心臓を安定させた後、大動脈カニューレの側管より *dilazep* または *K-7259* (両薬物とも最終濃度として $1\ \mu\text{M}$) の注入を開始した。注入は 0.1 ml/min の割合で 18 分間行った。薬物投与前、薬物投与 5、10 および 18 分後に冠流出液を採取し、これを凍結保存した。

(2) Nitrite (NO_2)、Nitrate (NO_3) 総量の定量

灌流心臓における NO 産生の指標として、冠流出液中の NO_2 および NO_3 総量を測定した。採取した冠流出液 100 μl に、*Aspergillus* 硝酸還元酵素 (1 U/ml)、 β -NADPH (500 μM) および蒸留水 120 ml を加え、一

時間室温で放置することにより、冠流出液中の NO_3 を NO_2 に還元した。これに、2.8 N NaOH 40 mlを加え還元反応を停止させた後、得られたサンプル20 mlを、1%ヨウ化カリウムを含む酢酸 5 mlを入れた専用のチャンバー内へ注入した。そのチャンバー内でNOを、NO ガス analyzer (Sivers NO analyzer; Model 270B)を用いたオゾン化学発光法で定量した。この方法は、還元されたNOがオゾンと反応することにより產生された二酸化窒素の一部が励起され、それが基底状態に戻る際の発光(600-3000 nm)の強さ (NOの分子数に比例する) を測定するものである。この操作により得られた発光強度のピークをインテグレーター(Hewlett Packard 3396)を用いて記録した。なお、既知濃度の亜硝酸ナトリウム溶液から検量線を作成し、冠流出液中の NO_2 および NO_3 総量を算出した。

実験結果

表 1 に示したように、dilazep ($1 \mu\text{M}$) またはK-7259 ($1 \mu\text{M}$) 投与による冠流出液中 NO_2 , NO_3 遊離量に、有意な経時的変化は認められなかった(ANOVAにおいて $P > 0.05$)。

なお、PALCARによる心筋障害がNG-L-arginine (L-NAME)によって抑制されるか否かを実験したところ、L-NAMEはPALCARによる心筋障害を抑制したが、この抑制はL-arginineによって逆転することが出来なかった。この事実はL-NAMEによるPALCARの心筋障害抑制はNOとは関係ないことを示すものである。

表1 冠流出液中のNO₂, NO₃ 遊離量におよぼすDilazepとK-7259の影響

	NO ₂ + NO ₃ 遊離量 (nmol/g/min)	
	Dilazep	K-7259
薬物投与前	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.1
薬物投与		
5分後	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.3
10分後	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.2
18分後	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.3

各値は平均値 ± 標準誤差。Dilazep (1 μM) 投与群およびK-7259 (1 mM) 投与群の例数は、いずれも4である。

考察

NOは心筋や冠血管内皮において産生されることが知られている。本実験では、dilazepとK-7259が灌流心臓においてNO産生を促進するか否かを検討した。NOは通常気体として存在するために、冠流出液中のNOを正確に定量することは困難である。そこで、我々は、NOの代謝産物であるNO₂ および NO₃ 量を、高感度のオゾン化学発光法を用いて測定することによりNO産生を評価とした。本実験では、灌流心臓において過酸化水素による心筋障害を著明に抑制するdilazep (1 μM) とK-7259 (1 μM)の濃度を用いた。

本実験の結果は、dilazep (1 μM) とK-7259 (1 μM)が、冠流出液中の

NO₂ + NO₃遊離量に影響を及ぼさないこと、すなわちNO産生を促進しないことを示した。したがって、過酸化水素に対するdilazepやK-7259の心筋保護作用の機序に、NOが関与する可能性は少ないものと思われる。

さらに、PALCARによる心筋障害に対するNOの関与は少ないことが分かった。

以上のことから、虚血・再灌流障害にNOがどのように関わっているのかという結論を出すことはまだできない。我々の行った実験からは虚血・再灌流障害に対するNOの関与はむしろ否定的である。

総括

虚血・再灌流による心筋障害の原因は酸素供給の不足によるエネルギー不足によると考えられるが、心筋障害の原因はエネルギー不足ばかりではなく、虚血・再灌流によって心筋内に虚血毒が発生することが障害をさらに増悪させることが明らかとなった。虚血毒として現在考えられているのは、活性酸素、リゾリン脂質、アシルカルニチンである。また、これらの虚血毒の作用を抑制する物質があり、この物質が新しいメカニズムをもつ抗虚血薬として医学に登場する日が来ることを期待している。

虚血・再灌流障害にNOがどのように関わっているかは重大なことであり、本研究でも種々検討してみたが、結果的にははっきりせず、NOの関与はむしろ否定的であった。文献を調べても、虚血・再灌流障害にNOがどのように関わっているかについては、まだ結論が出ていない。また、NOは虚血・再灌流障害を抑制するように作用しているのか、その逆であるのかの議論にも賛否両論があり、結論が出ていないのが現状である。