
低酸素性肺血管収縮と換気・血流再分配における
内因性NOの役割

研究課題番号 08670643



平成8年度～平成9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10年3月

研究代表者 中野 均
(旭川医科大学・医学部・助手)

はしがき

この研究報告書は、平成8～9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)『低酸素性肺血管収縮と換気・血流再分配における内因性NOの役割』(研究課題番号08670643)の成果をまとめたものである。

本研究は、当初、肺循環制御や血液ガス交換に果たす内因性一酸化窒素(以下NOと略)の役割を、低酸素性肺血管収縮と換気・血流再分配からみるという意味において、純粋な肺循環動態の実験的研究を志した。しかし、研究分担者である岩元純(生理学第一講座・助教授)らの開発したリアルタイムで呼気NOを測定するという新たな手法を取り入れることにより、肺循環系よりもむしろ気道系におけるNOの重要性へとその方向性が大きく転換した。すなわち、吸入気を低酸素にすると低酸素性肺血管収縮が起こるということは半世紀前からの事実であったが、低酸素ガスを吸入した時、肺血管収縮に先立って呼気NOが瞬時に低下する。また、酸素濃度依存性にミカエリス・メンテンの酵素・基質反応速度論に則った呼気NOの低下が観察された。これらの結果はリアルタイムで呼気NOを測定しなければ到底得られなかった実験事実である。この実験事実は、『呼気NOは、大気中の酸素を基質として気道上皮で産生される』という新しい仮説を産みだした。次にこの作業仮説を実証するために、今田正信(耳鼻咽喉科学・助手)らの協力のもと、実際の生体において鼻腔由来NOの低酸素による変化に関して研究が始められた。これらの研究は現在進行中であるが、一連の研究は、『両性類の皮膚呼吸と同じように、鼻腔や気道上皮は大気中の酸素を消費してエネルギー代謝やNOの産生を行っており、気道上皮で産生されるNOは呼吸循環系制御に究めて重要な役割を担っている可能性がある。』という新たな仮説に発展している。この新しい仮説は平成10、11年度の文部省科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))に『気道上皮内一酸化窒素合成酵素(NOS)のO₂センサーとしての作用に関する研究』という課題で申請中である。

医学部助手として、臨床・教育・研究の3本立てを同時に遂行することは時間的にかなり大変であるが、研究の過程で多くの研究協力者と出会い、議論できたことは研究者として大きな財産となった。最後に次ページに掲げた研究協力者に謝意を表わすとともに、本研究の財政的支援をして下さった文部省に心からお礼を述べる。

平成10年3月

研究代表者 旭川医科大学・内科学第一講座・助手
中野均

文部省科学研究費補助金（平成8～9年度）

基盤研究(C)(2) 低酸素性肺血管収縮と換気・血流再分配における内因性NOの役割

研究課題番号 08670643

研究組織

研究代表者：中野 均 (旭川医科大学・内科学第一講座・助手)

研究分担者：岩元 純 (旭川医科大学・生理学第一講座・助教授)
長谷部 直幸 (旭川医科大学・内科学第一講座・講師)

研究協力者：菊池 健次郎 (旭川医科大学・内科学第一講座・教授)
長内 忍 (旭川医科大学・内科学第一講座・助手)
秋葉 裕二 (旭川医科大学・内科学第一講座・助手)
井手 宏 (旭川医科大学・内科学第一講座・医員)
小笠 寿之 (旭川医科大学・内科学第一講座・研究生)
高橋 啓 (旭川医科大学・内科学第一講座・研究生)
小河 幸次 (北海道東海大学・教育開発センター・教授)
今田 正信 (旭川医科大学・耳鼻咽喉科学・助手)

研究経費

平成8年度	900千円
平成9年度	1,200千円
計	2,100千円

研究発表

I. 学会誌等

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 井手宏, 小笠寿之, 中野均, 岩元純, 秋葉裕二, 高橋啓, 山本泰司, 菊池健次郎: 家兎摘出灌流肺において低酸素は呼気NO濃度を低下させる. *日本胸部疾患学会雑誌* 34:105,1996.
6. 小笠寿之, 中野均, 岩元純, 井手宏, 秋葉裕二, 高橋啓, 山本泰司, 菊池健次郎: in vivo と摘出灌流肺における家兎呼気NOの差異について. *日本胸部疾患学会雑誌* 34:105,1996.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 中野均, 井手宏, 岩元純, 小河幸次, 小笠寿之, 秋葉裕二, 長内忍, 高橋政明, 大崎能伸, 菊池健次郎: 健常人とCOPD患者における呼気NO及びCO₂の解析. *日本胸部疾患学会雑誌* 35:168, 1997.
15. 小笠寿之, 中野均, 井手宏, 秋葉裕二, 長内忍, 菊池健次郎, 岩元純: 無血摘出灌流肺では血管内皮での流量依存性NO産生は呼気に反映される. *日本胸部疾患学会雑誌* 35:421, 1997.
16. 井手宏, 中野均, 岩元純, 小河幸次, 秋葉裕二, 長内忍, 小笠寿之, 高橋政明, 菊池健次郎: 気管支喘息患者における呼気NOの測定—NO産生量からみた評価—. *日本胸部疾患学会雑誌* 35:277, 1997.

II. 口頭発表

1. 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, 菊池健次郎: 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, 1996年7月28日.
2. 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, 菊池健次郎: 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, 1996年7月28日.

3. 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.
4. 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
5. 高橋啓, 中野均, 井手宏, 長内忍, 菊地健次郎, 今田正信, 岩元純:びまん性汎
細気管支炎(DPB)患者における鼻腔NOの低下. 第55回閉塞性肺疾患研究会, 東京,
1997年8月3日.
6. 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.
7. 中野均, 井手宏, 小笠寿之, 長内忍, 菊池健次郎, 岩元純, 小河幸次:肺におけ
るNOの産生と呼気NOの呼吸生理学的意義. 第3回北海道活性酸素・フリーラジカ
ル研究会, 札幌, 1997年11月22日

III. 出版物

1. 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

本研究は、肺循環制御の上で最も重量な低酸素性肺血管収縮と換気・血流の再分配調節において内因性NOがどのように関わっているかを、血液の存在しない摘出灌流肺を用い、肺循環動態と呼気NO濃度と灌流液NO代謝産物濃度の関係において検討するのが申請時の目的であった。そこで、1) 呼気NOに与える血液ヘモグロビンの影響、2) 呼気NOと肺循環NO代謝産物に与える肺血管内皮の薬理学的および物理学刺激の影響、3) 低酸素換気と低酸素血症が呼気NOおよび肺循環NO代謝産物におよぼす影響。に関して研究を進めた。

1. 呼気NOに与える血液ヘモグロビンの影響

呼気NOは、その発見当初は、肺血管内皮由来であると考えられていたが、健常人や実験動物において気管切開がなされた例で呼気中にNOが検出されることや、気道上皮にNOSの発現が認められることから、最近になって下気道が呼気NOの発生源の一つであると考えられている。しかし、NOはヘモグロビンに対する親和性が非常に高いため、換気に伴い容易に肺循環系から吸収され得る。したがって、その産生と吸収の関係については明らかでないばかりか、臨床的に測定された呼気NO濃度が実際に何を反映しているのかについても明らかではない。そこで、生体の場合および実験的に家兎摘出灌流肺を作成、灌流液のヘモグロビン濃度を変化させて呼気NOを測定し、呼気NOと血液ヘモグロビン濃度の関係について検討した。結果として、血液のない灌流液のみの時は、呼気NOは血液灌流肺の約3～4倍に増加した。またヘモグロビン濃度に依存して呼気NOは低下した。生体と血液灌流肺で呼気NOに有意な差を認めなかった。以上から、NOの産生は気道・肺胞系と肺血管内皮系の2つが考えられるが、気道由来NOの大部分は肺胞を介して肺循環系のヘモグロビンで吸着される。肺血管内皮由来のものは血液中のヘモグロビンに全て吸着される。したがって、生体においても、実際はかなり多くのNOが末梢気道で産生されているが、その大部分は肺胞から吸収されていることが予

想される。これらの結果は1996年の米国胸部疾患学会や日本胸部疾患学会で発表された。また、H. Nakano et al. : Decrease in exhaled nitric oxide by pulmonary blood のタイトルで Am J Resp Crit Care Med に現在投稿中である。

2. 呼気NOと肺循環NO代謝産物に与える肺血管内皮の薬理的および物理学刺激の影響

血管内皮由来弛緩因子 (EDRF/NO) は古くから、アセチルコリンや‘ずり応力’の刺激で産生されることが報告されている。しかし、肺血管でこれらの事実は証明されていない。前述の通り血液の存在下では、血管内皮由来NOを検出することが出来ないため、血液のない灌流液で家兎摘出灌流肺を作成し、薬理的刺激としてアセチルコリン、物理学刺激として流量の変化(ずり応力)の影響について検討した。その結果、肺血管内にアセチルコリンを投与すると呼気NOは一過性に上昇したが、灌流液中NO代謝産物は変化しなかった。灌流量を25, 50, 100, 150 ml/minと変化させると、呼気NOは流量依存性に増加した。しかし、灌流液中のNO代謝産物は変化しなかった。肺は唯一液相と気相が交錯する臓器であり、NOは揮発性のガスであることから、無血状態の摘出灌流肺では肺血管内皮由来NOは容易に肺胞・気道へ拡散し、刺激の程度に応じて呼気NOは増減することがわかった。また、同時に行ったNO合成酵素阻害薬投与の実験から、流量依存性の呼気NOの増加は、肺血管床のリクルートメント現象に重要であることが推測された。これらの結果は1997年の米国胸部疾患学会や日本胸部疾患学会で発表された。また、T. Ogasa et al. : Flow-dependent increase of exhaled nitric oxide in isolated perfused rabbit lungsのタイトルで Am. J. Physiol. に現在投稿中である。

3. 低酸素換気と低酸素血症が呼気NOおよび肺循環NO代謝産物におよぼす影響

低酸素は肺血管を収縮(低酸素性肺血管収縮)させ、同時に内因性NOも変化させることが知られている。しかし、どの部位の低酸素あるいはどの程度の低酸素がこの現象

を引き起こしているのかは不明である。そこで、段階的な低酸素換気と低酸素血症が呼気NO [NO] ,肺循環NO代謝産物 [NOx] と肺循環動態に与える影響について無血家兎摘出灌流肺を用いて検討した。結果として、 $FiO_2=0.04$ 以下の低酸素換気により、肺動脈圧の上昇に先立ち [NO] は数秒で急速に低下したが、[NOx] は変化しなかった。灌流液 PO_2 の変化は [NO] , [NOx] に影響を与えなかった。以上から、低酸素換気により低下する [NO] は気道上皮由来成分と考えられた。また、この [NO] の低下は完全に吸入酸素濃度依存性であり、ミカエリス・メンテンの酵素・基質反応速度論に合致する。したがって、気道上皮は大気中の酸素を受動的な拡散で吸収し、これを基質としてNOを合成している可能性が示唆された。このことは気道由来NOの産生系それ自身がいわゆる O_2 sensorとしての作用を発揮しているものと考えられる。従来からいわれている低酸素性の肺血管収縮や換気・血流の再分配調節において、低酸素刺激を先ず気道上皮が感知し、次に気道上皮由来NOが減少することで、肺血流の調節がなされているという結論に至った。これらの結果は1998年の米国胸部疾患学会、米国実験生物学会(Experimental Biology '98)や日本胸部疾患学会で発表される予定である。また、H. Ide et al. : Oxygen tension regulates pulmonary circulation via nitric oxide produced in the lower respiratory tracts のタイトルで現在投稿予定である。

以上2年間の実験成果は、『呼気NOは、大気中の酸素を基質として気道上皮で産生される』『両性類の皮膚呼吸と同じように、気道上皮は大気中の酸素を消費してエネルギー代謝やNOの産生を行っている。』という新たな作業仮説を産みだした。次にこの作業仮説を実証するために、現在、実際の生体において鼻腔由来NOを用いて低酸素による影響についての研究を行っている。この新しい仮説は平成10～11年度の文部省科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））に『気道上皮内一酸化窒素合成酵素(NOS)の O_2 センサーとしての作用に関する研究』という課題で申請中である。