

## 血管内皮機能を対象にした基礎および臨床医学研究

塚原 宏一

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児医科学

キーワード：アルギニン代謝，一酸化窒素，ガス生物学，血管内皮学，酸化ストレス

## Basic and clinical research regarding vascular endothelial function

Hirokazu Tsukahara

Department of Pediatrics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

## はじめに — 血管内皮学の幕開け

米国の Furchgott (1916年～2009年) はウサギ大動脈の摘出標本にアセチルコリンを添加して張力変化を調べていたが、実験結果は一定しなかった。彼は実験助手の動作を観察し、助手が標本を丁寧に扱えば弛緩し、粗雑に扱えば弛緩しないこと、すなわち、物理的外力に弱い血管内皮が保たれば弛緩し、それが剥がれれば弛緩しないことを見つけた。その結果は1980年に雑誌 Nature に報告された<sup>1)</sup>。後から見れば単純な観察であるが、内皮が血管緊張を調節することを示す大発見であった (“Discovery consists of seeing what everybody has seen and thinking what nobody has thought”).

それより少し前, Murad (1936年～), Ignarro (1941年～) は一酸化窒素 (NO) や NO donor が cGMP を介して血管を弛緩させることを発見していた。約10年を経て1987年に血管内皮が刺激を受けて NO を産生

し、それが cGMP を介して平滑筋を弛緩させることを示した論文が Moncada (1944年～) により Nature に発表された<sup>2)</sup>。1992年12月に NO は Science により “Molecule of the Year” の称号を与えられ、多くの科学者が “NO news is good news” と熱狂するようになった<sup>3)</sup>。1997年に Ignarro を Chief Editor として専門雑誌 “Nitric Oxide: Biology & Chemistry” が創刊され、1998年には Furchgott, Murad, Ignarro の3名が Nobel Prize (生理学・医学賞) を受賞した。その後、血管生物学がこの free radical を中心として急速に発展した。その成果はとりわけ循環薬理の臨床を大幅に進歩させた<sup>4)</sup>。

## NO の化学, 生物学

NO は一酸化窒素合成酵素 (NOS) により arginine と酸素を基質にして citrulline とともに合成される。NOS には3種の isoenzyme, すなわち、1型=神経型、2型=誘導型、3型=内皮型があり、神経型、内皮型は“構成型”酵素、誘導型は文字通り“誘導型”酵素である<sup>4)</sup>。

NO の生体作用は難しいと言われる。“Is NO a good guy or a bad guy?” といった議論が続いている。NO

平成27年8月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7251 FAX：086-221-4745

E-mail：tsukah-h@cc.okayama-u.ac.jp

## ◆ プロフィール ◆



昭和60年3月 京都大学医学部医学科卒業  
 昭和60年6月 京都大学病院 小児科 研修医  
 昭和61年4月 滋賀県郡立高島病院 小児科 医師  
 昭和61年7月 福井赤十字病院 小児科 医師  
 昭和63年6月 福井医科大学医学部 小児科 助手  
 (平成4年8月～平成6年6月 米国ニューヨーク州立大学ストーニブルック校内科 (腎臓・高血圧部門) Michael S. Goligorsky 研究室へ研修渡航)  
 平成14年10月 福井医科大学医学部 小児科 講師  
 平成15年10月 福井大学医学部 (大学統合による名称変更) 小児科 講師  
 平成17年12月 福井大学医学部 未熟児診療部 副部長  
 平成22年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児医科学 准教授  
 平成26年8月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児医科学 教授  
 現在に至る

専門：(臨床医学) 新生児学，腎臓血管学，感染炎症学，(基礎医学) 血管生理学，炎症病理学，システム生物学

の作用で窒素 (N) が主体的な場合を“N反応”, 酸素 (O) が主体的な場合を“O反応”と分別すると, この変幻自在分子の働きも理解しやすい (図1). “N反応”は血管緊張調節で重要な NO-cGMP 経路だけでなく, 内因性 NOS 阻害因子 asymmetric dimethylarginine (ADMA) 経路, citrulline-arginine 経路, arginine-ornithine 経路 (後2者は肝臓では尿素サイクルに含まれる) と関連する. “O反応”は電気陰性度の高いOが他分子から電子を引き抜く特性のことで, 二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>), ペロキシナイトライト (ONOO), ペロキシナイトライト陰イオン (ONOO<sup>-</sup>) などによる生体分子の酸化修飾や傷害と関連する<sup>5)</sup>. “N反応”の極がアミノ酸・蛋白質・ヌクレオシド合成にかかわる窒素, “O反応”の極が糖・脂質代謝, ATP 合成にかかわる酸素であると考えれば, NとOからなる多くの窒素酸化物も“仲間”に見えてくる.

本稿では NO を中心とする血管内皮学に触れた後, 血管内皮機能と関連する ADMA とその分解酵素 dimethylaminohydrolase (DDAH)<sup>6)</sup>, citrulline-arginine recycling (NO 合成基質供給)<sup>7)</sup>, arginine-ornithine 経路 (arginase 作用)<sup>8-10)</sup>, 最後に NO ガスの作用を理解する上で重要な N と O の気相での反応<sup>5,11)</sup> を概説する. 筆者のこれまで (約25年間) の研究成果を中心に記述する.

### 血管生物学との出会い

筆者は1988年から2010年まで福井大学小児科に勤務していたが, 1年間 (1991年~1992年) 薬理学教室で電気生理学的研究 (パッチクランプ法) を行った. 幸運にもラット腎臓糸球体メサンギウム細胞でL型電位

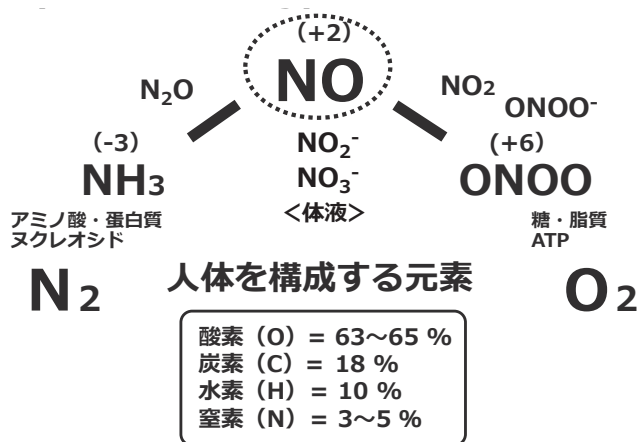


図1 Systems biology における様々な窒素酸化物 (“NxOy”)

依存性 Ca チャネルを発見し<sup>12)</sup>, この仕事が評価され, アメリカのニューヨーク州立大学 (Long Island にある Stony Brook 校) 医学部内科 (腎臓・高血圧) の Goligorsky 先生の研究室で2年間 (1992年~1994年) 血管生物学の実験研究を行うことになった.

血管内皮由来弛緩因子の代表である NO の生成機構, NO と血管内皮由来収縮因子の代表であるエンドセリン-1 (ET-1) の相互作用, NO の血管平滑筋弛緩の制御機構を探究した. 内皮型 NO 合成酵素の Ca/calmodulin を介する活性化が protein kinase C により抑制されること, 同酵素が IGF-1 や VEGF の刺激により tyrosine kinase の経路からも活性化されることを示した<sup>13-15)</sup>. ET-1 は内皮細胞の B 型受容体を介して NO 生成を促進するが, NO が cGMP 非依存性に ET-1 と平滑筋細胞の A 型受容体の結合親和性を低下させ, G-protein を介する Ca 流入を抑制して平滑筋を弛緩させる機構も示した<sup>16,17)</sup> (図2). パッチクランプ法を用いて, ヒトおよびラット血管内皮細胞で tetrodotoxin 抑制型電位依存性 Na チャネルを発見した<sup>18)</sup>.

それまで血管内皮は血管の内側に存在する単なるバリアーとしか認識されていなかったが, 以上の研究成果などより, 実際は血管機能, 生体維持の司令塔であることが明らかになった.

1994年に福井に戻ってからは, 小児の systems biology に血管内皮学を組み込むための研究を進めた. ラットを用いた一連の研究により骨代謝が血管内皮あるいは NO により制御されること, すなわち, 誘導型 NO 合成酵素阻害, ET/ET-A 型受容体阻害によりそ

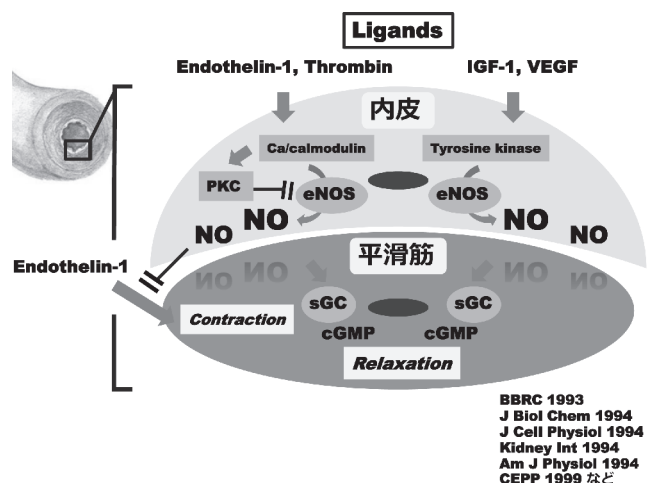


図2 血管系における NO 合成制御と NO による血管緊張調節

それぞれ骨吸収亢進型、骨形成抑制型の骨減少症が発現することを示した(図3)<sup>19,20</sup>。エリスロポエチン(Epo)の血管作用がおもに血管内皮由来のNOとET-1のバランスによることも明らかにした(図4)<sup>21,22</sup>。

“NO 欠乏” モデル (ラット)

20年前の血管生物学では“NO 過剰”の病態生理が注目されていたが、筆者は“NO 欠乏”も臨床的に意

義深いのではないかと考え、長期 NOS 阻害モデル(ラット)を作成した<sup>23,24</sup>。尿中 nitrite/nitrate (NOx) を NO 産生の指標とした。4 週間の非選択的 NOS 阻害薬 L-NAME の投与(内服)で用量依存性に血圧が上がり腎障害も進んだ。L-NAME で用量依存性に NO 産生も低下したが、それは arginine の同時大量投与で元に復した。選択的誘導型 NOS 阻害薬 aminoguanidine (AG) の投与では NO 産生は低下しなかった(図5)。尿中

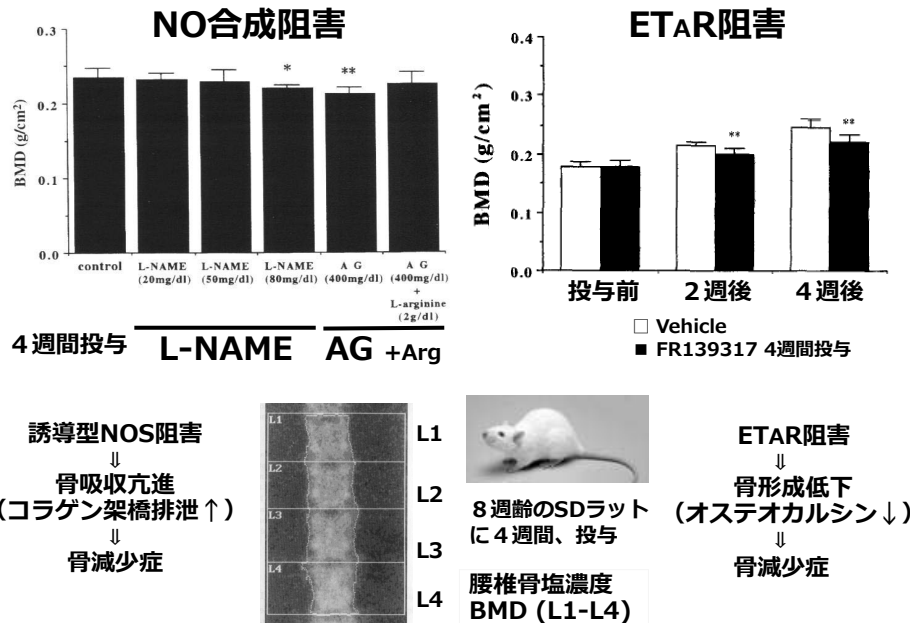


図3 誘導型 NO 合成酵素 (iNOS), エンドテリン/エンドテリンA型受容体による骨代謝制御 (ラット)<sup>19,20</sup>

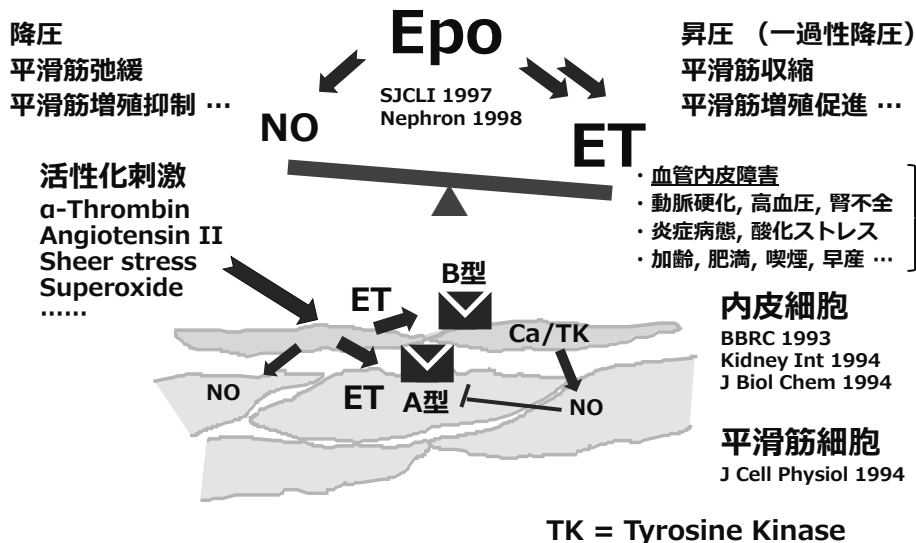
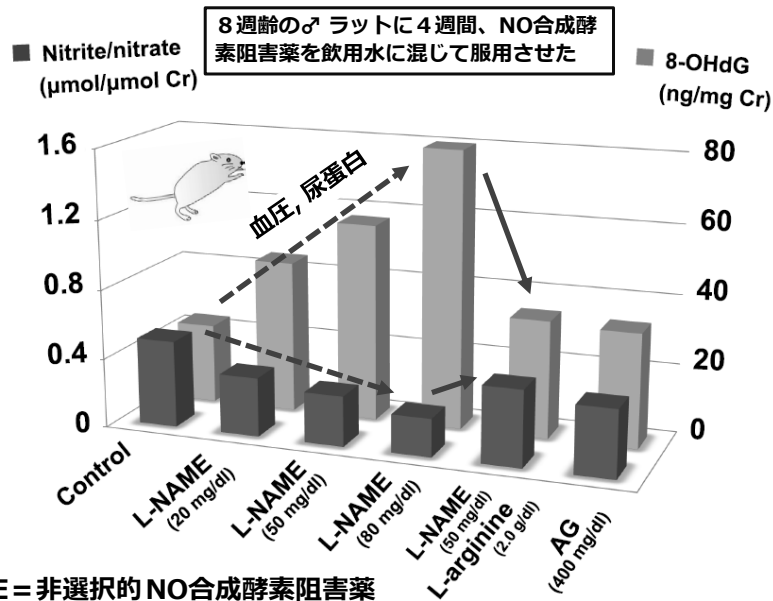


図4 エリスロポエチン (Epo) の血管内皮への作用 (ラット)<sup>21,22</sup>  
血管内皮障害では NO と ET-1のバランスは ET-1優位にシフトし, 血管障害はさらに進展する。



**L-NAME = 非選択的 NO合成酵素阻害薬**

**AG = 誘導型 NO合成酵素阻害薬**

図5 全身性 NO 合成酵素阻害の血圧, 腎機能への作用 (ラット)<sup>23,24</sup>  
L-NAME 投与 (4 週間) で8-OHdG 生成は増加する (酸化ストレスが充進する)。

8-OHdG (酸化ストレスマーカー) を同時に計測したが, それはL-NAMEで用量依存性に増加し arginineの同時投与で元に復した. AGでは8-OHdGは増加しなかった. 全ラットを対象にするとNO<sub>x</sub>と8-OHdGの間で有意な負相関が見られた.

NOSには“構成型”と“誘導型”があるが, 誘導型阻害では8-OHdGは増加しなかったことより, おもに構成型阻害が酸化ストレスを充進させると考えられた. 構成型酵素の主体は内皮型であり, この結果は血管内皮障害が酸化ストレス充進をもたらすことを示唆する. 活性酸素 (ROS) が増加する環境では誘導型 NOSが誘導され, ONOO<sup>-</sup>産生も増加して酸化ストレス (“ニトロ化ストレス”と表現してもよい) はさらに充進する. 上記の実験結果より, 内皮型酵素活性が低下すればROSが増え, 酸化ストレスが充進することが示された. 現在もL-NAMEラットは血管障害, 多臓器障害の代表的モデルである.

### Arginine-ADMA-DDAH 経路

生体は内因性に NOS を阻害する因子も産生している. それがADMAである. 蛋白質合成の過程で翻訳後ペプチド体のアルギニン残基が protein-arginine methyltransferase (PRMT) によりメチル化されるが, これが代謝回転により蛋白質から離れADMAと

して細胞外に放たれる. ADMAはDDAHの働きで citrulline と dimethylamine に分解される. DDAHは NOS とほぼ同一の組織・細胞に分布している (図6)<sup>5,6</sup>. ADMAを健常者に投与すると血管収縮, 血圧上昇が認められる. 一方, 酸化ストレス充進によりPRMT活性は増加し, DDAH活性は低下するため (抗酸化因子でもある) 血管内皮由来NOに対するADMAの比率は増加し, NO産生はさらに低下する.

ADMAは血管障害の推進因子のみならず, 心血管・腎臓疾患の予後を推定する生体マーカーとしても注目されている (表1).

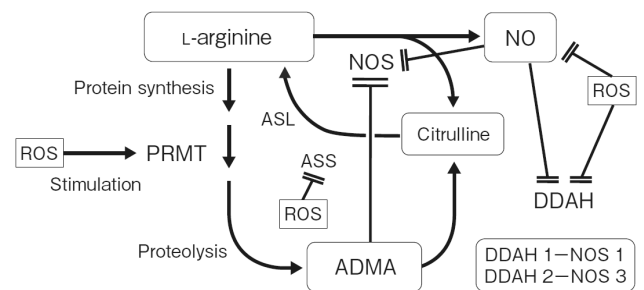


図6 Arginine-asymmetric dimethylarginine(ADMA)- dimethyl-aminohydrolase (DDAH) 経路 (医歯薬出版株式会社の許可を得て転載)<sup>5</sup>

表1 Asymmetric dimethylarginine (ADMA) 増加が発症・進展に関与するとされる疾患，病態（医歯薬出版株式会社の許可を得て転載）<sup>5)</sup>

Aging/senescence
Salt intake/high blood pressure
Hypercholesterolemia
Hypertriglyceridemia
Hyperhomocysteinemia
Insulin resistance/hyperglycemia
Essential hypertension
Pulmonary hypertension
Coronary heart disease/heart failure
Vascular disease/stroke
Hepatic disease/hepatic failure
Renal disease/renal failure
Multiorgan failure
Preeclampsia
Diabetes mellitus
Hyperthyroidism
Infection

**尿素サイクル異常症と NO, ADMA**

先天性尿素サイクル異常症では NO, ADMA を含めて arginine 代謝が障害されるが，アンモニア蓄積だけで説明できない多彩な症候を呈する<sup>5,25)</sup>。このような患者には通常 arginine が補充される（血中 arginine が増加する）が，ornithine transcarbamylase (OTC) 異常では血中 arginine は増加，citrulline は低下，NOx, ADMA はやや増加していた（結果として ADMA/NOx 比は正常域）。Argininosuccinate synthetase (ASS) 異常では血中 arginine は増加，citrulline は増加，NOx は低下，ADMA は増加していた（ADMA/NOx 比は増加）。Argininosuccinate lyase (ASL) 異常では血中 arginine は増加，citrulline は増加，NOx は正常域，ADMA はやや増加していた（ADMA/NOx 比は正常域）。ASS 異常，ASD 異常では血中 citrulline は著明に（とりわけ前者で）増加するが，血中 citrulline は NOx と有意に負相関し，ADMA と有意に正相関していた（図7）<sup>26,27)</sup>。無症候期（silent phase）にある citrin (aspartate/glutamate carrier isoform 2) 異常では血中 arginine は正常域，citrulline は増加，NOx, ADMA は正常域であったが，血中酸化 LDL, 尿中8-OHdG, acrolein-lysine などの酸化ストレスマーカーは増加していた<sup>28)</sup>。高シトルリン状態が ADMA 増加，NOx 低下を導くことで

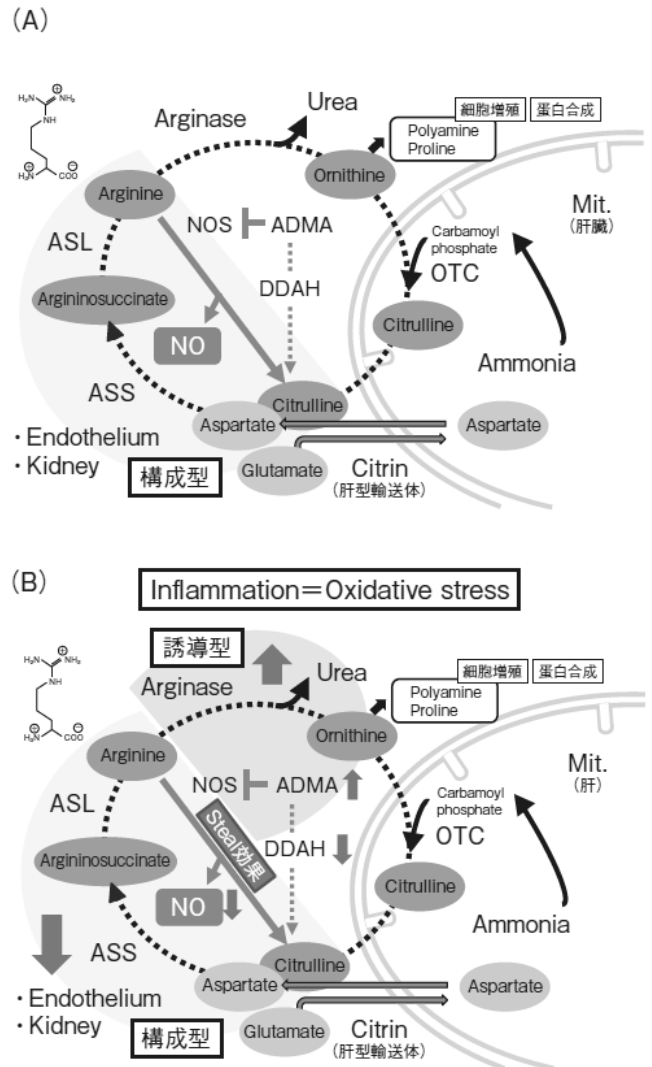


図7 Arginine を中心とする代謝ネットワーク（医歯薬出版株式会社の許可を得て転載）<sup>5)</sup>

(A) 生理的状態では血管，腎臓などでの citrulline-arginine recycling により arginine が citrulline より再生され，血管内皮細胞はこの経路を利用して NO 合成を維持できる。(B) 炎症病態（酸化ストレス亢進状態）では arginase が血管，マクロファージなど多くの細胞で誘導され，“arginine steal phenomenon” により血管内皮由来の NO 合成は低下する。

多くの合併症に関与すること，とりわけ citrin 異常での酸化ストレス亢進が特徴的な脂肪肝の発症に関与することが推察された。

Lysinuric protein intolerance では血中 arginine は低下，citrulline は正常域，NOx は増加，ADMA は正常域であった（ADMA/NOx 比は低下）。先天性門脈大循環シャントでは血中 arginine, citrulline は正常域であったが，NOx は低下，ADMA は増加していた（ADMA/NOx 比は増加し，それはシャント率と正相

関していた)。血中 endothelin-1, 血中酸化 LDL, 尿中8-OHdG, acrolein-lysine などの酸化ストレスマーカーも増加していた<sup>29)</sup>。前者でのマクロファージ活性化症候群, 後者での肺高血圧の病態生理と治療を考える上で重要な知見である。

### Citrulline-arginine 経路と arginine-ornithine 経路

Arginine を中心とする代謝ネットワークは臓器連関において重要である<sup>5)</sup>。Arginase は尿素サイクルの最後の酵素であり, arginine を加水分解して polyamine, proline を生成させる。Arginase I はおもに肝臓に存在し, arginase II はおもに (肝臓外の) ミトコンドリアに存在する。Arginase を基質として共有する NOS と arginase は互いにその機能を調節しあう。Arginase I は炎症病態などで血管内皮細胞, 平滑筋細胞, マクロファージなど多くの細胞で誘導される (“arginine steal phenomenon”) (図7)<sup>7-9)</sup>。NOS, arginase I がともに活性上昇した場合, arginine 低下のため NOS は uncoupling を起こし, NO が低下して O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup> 生成が増加する。気管支喘息などの患者で血中 arginase I の高値が報告されている。気道炎症などの動物モデルで arginase I 阻害薬 (nor-NOHA, S-(2-boronoethyl)-L-cysteine など) の効果も検討されている<sup>10)</sup>。Arginine 代謝の臨床医学的意義をより理解するために, 筆者らの最近の研究成果を以下に呈示する<sup>30,31)</sup>。

#### 1. 妊娠母体を対象にした研究

妊娠期間は first, second, third の3つの trimester に分けられる。それぞれ, 「器官形成」, 「胎盤循環」, 「胎児発育」を特徴とする。妊娠後半期の母体と胎児・

胎盤系は proliferative phase にあり, 生理的に酸化ストレスが亢進している。筆者らは妊娠28週前後の健常妊婦60名を対象に血清中 total hydroperoxides (TH), redox potential (RP), thioredoxin-1 (TRX-1), pentosidine, NOx, ADMA, arginine, citrulline, ornithine を計測した。結果は平均 ± SD あるいは範囲で示した。

妊婦の RP, TRX-1 が体重と有意に正相関, 負相関し, 妊婦の TH, RP が正期 (近く) で出生した児の体重と有意に負相関, 正相関していた (表2)。アミノ酸分画では成人基準値と比較すると, arginine は高値, citrulline は低値, ornithine は正常域であった。その後, 60名のうち3名が妊娠高血圧, 5名が胎児発育不全をきたしたが, 母体での計測のうち有意差が認められたのは妊娠高血圧発症 vs. 非発症での NOx, ADMA/NOx 比であり, 平均値の比較では 20 vs. 51 μmol/l ( $P < 0.05$ ), 0.030 vs. 0.013 ( $P < 0.001$ ) であった (arginine は 203 vs. 169 μmol/l,  $P = 0.06$ )。以下は考察である。

第1に, early third trimester の健常妊婦における酸化ストレス亢進の詳細が示された。血清中で過酸化物質が増加するにもかかわらず抗酸化系は亢進していなかった。なお, RP として計測できるのは albumin, bilirubin, uric acid, vitamin C などの総体であり, TRX-1 を含めた酵素群の活性は評価できない。第2に, このような母体の血清検体で arginine 高値, citrulline 低値が示された。平均値を用いた計算であるが, 今回の60名では arginine/citrulline 比は 10.6 (高値), ornithine/arginine 比は 0.38 (低値), (ornithine

表2 妊娠28週前後 (early trimester) の健常妊婦60名における各種生体マーカー (血清中濃度) (医歯薬出版株式会社の許可を得て転載)<sup>5)</sup>

生体マーカー	血清中濃度
total hydroperoxides (TH; U. CARR)	471 ± 105 (193~708) - 高い (基準300未満)
redox potential (RP; μmol/l)	2,142 ± 273 (1,430~2,601) - やや低い (基準2,200以上)
oxidative stress index (TH/RP 比)	0.23 ± 0.08 (0.09~0.45) - 高い (基準0.1前後)
thioredoxin (TRX)-1 (ng/ml)	90 ± 42 (11~205) - 高い (基準10~30)
pentosidine (pmol/ml)	96 ± 20 (55~149) - 正常 (基準100前後)
NOx (μmol/l)	50 ± 24 (16~118) - 正常 (基準18~107)
ADMA (μmol/l)	0.55 ± 0.17 (0.27~1.12) - 正常 (基準0.40~0.75)
ADMA/NOx 比	0.014 ± 0.007 (0.003~0.037) - 正常 (基準0.004~0.041)
arginine (μmol/l)	171 ± 30 (129~270) - 高い (基準46~122)
citrulline (μmol/l)	16 ± 3 (10~28) - 低い (基準20~45)
ornithine (μmol/l)	65 ± 15 (39~116) - 正常 (基準43~96)

+ citrulline)/arginine 比は0.47 (低値), arginine/ADMA 比は308.8 (高値)であった。妊娠後半期の母体では citrulline-arginine recycling の促進が推察されるが、その主たる部位は血管 (胎盤も含まれる), 腎臓, 肝臓と考えられる。Ornithine/arginine 比は arginase 活性, (citrulline + ornithine)/arginine 比は NOS 活性 + arginase 活性, arginine/ADMA 比は NOS 基質 / NOS 阻害因子の指標にもなる<sup>7-9</sup>。これらのパラメータは、他の領域でも arginine を中心とするアミノ酸・蛋白代謝とレドックス制御のプロファイリングに役立つと期待される。第3に、early third trimester の時点における母体の合併症発現の予測である。高血圧発症群で NO<sub>x</sub>, ADMA/NO<sub>x</sub> 比が有意に低値, (結果として) 高値であった。この結果は血清 NO<sub>x</sub> 計測が高血圧発症のリスクを知る上で有用であることを示唆する。Arginine → NO の抑制が疑われるが、それが NOS の mRNA, 蛋白, 機能のどのレベルか今後探究する予定である。

### 気体生物学 (基礎生物学) における NO

NO ガスは肺高血圧の特殊治療であるが、NO は O<sub>2</sub> と反応して有毒な二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) に酸化されるので、使用を誤れば深刻な健康被害をきたす。NO 吸入療法が開発された約20年前は NO の気体生物学的特性は明らかでなかった<sup>5,11</sup>。

筆者らは気相において任意濃度の NO と O<sub>2</sub> より NO<sub>2</sub> が任意時間で発生する一般予測式を明らかにした (図8)<sup>32</sup>。この反応は3次反応であるが、過去に報告された22編の論文より速度定数 k の一般式を導いて、それが室温では  $7 \times 10^3$  であることを示した。図中の微分方程式を解くと、NO より NO<sub>2</sub> が任意の fraction (f) だけ発生するまでの時間 (t) の予測式が得られる。NO 吸入療法ならば下線部は定数になり、f を指定すれば t が計算できる。環境での NO<sub>2</sub> の許容限界は 5 ppm であるが、この計算によると、たとえば40% O<sub>2</sub> 共存下で 5 ppm の NO<sub>2</sub> が発生するまで10ppm の NO なら177分 (約3時間) と長い、その4倍濃度の40ppm の NO では6分に短縮される。このような設定で NO, O<sub>2</sub> を混合した場合、混合気体を6分以上停留させては危険と判断できる。

また、高度真空下でのガス実験中に市販の“高純度” NO タンク内で NO の一部がすでに不純者 (他の窒素酸化物) で置き換わっていることを発見した<sup>11</sup>。NO が

高圧下で自発的に NO<sub>2</sub> と笑気 (N<sub>2</sub>O) に不均化することは現在でもあまり知られていない。筆者らは高圧タンク内で NO が NO<sub>2</sub> と N<sub>2</sub>O に不均化する危険性を警鐘し、任意圧力の NO より NO<sub>2</sub> と N<sub>2</sub>O が任意時間で発生する一般予測式を明らかにした (図9)<sup>33</sup>。この反応も3次反応である。この式を用いると、たとえば1か月で NO が不均化し NO<sub>2</sub> と N<sub>2</sub>O が発生する比率は5気圧未満ではほぼ0であるが、市販の NO タンクのレベルの50気圧の場合、全体の2.6%を占める。これを1年間保管すれば NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O それぞれが全体の16.9%まで占める。実地臨床で用いられるタンクの NO 濃度は800ppm と低いが (高圧窒素で希釈されている), NO 自体の圧力は0.1気圧であり、不純物がほとんど全く発生しないと予測できる。N<sub>2</sub>O がメチオニン-ホモシス

$$-d[\text{NO}]/dt = +d[\text{NO}_2]/dt = 2k[\text{NO}]^2[\text{O}_2]$$

where  $k (\text{L}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}) = 1.2 \times 10^3 \times 10^{230/T} = 7.0 \times 10^3$  (室温)

$$t = (1 / (2k[\text{O}_2][\text{NO}]_0)) \times f / (1-f) \text{ where } f = [\text{NO}_2] / [\text{NO}]_0$$

定数

NO<sub>2</sub>が5 ppm 発生するまでの時間 (min)

O <sub>2</sub> (%)	NO (ppm)					
	10	20	40	80	200	800
20	356	59	12.7	2.97	0.46	0.028
40	177	30	6.3	1.48	0.23	0.014
80	89	15	3.2	0.74	0.11	0.007
100	71	12	2.5	0.59	0.09	0.006

図8 気相での2NO+O<sub>2</sub>=2NO<sub>2</sub>反応 (医歯薬出版株式会社の許可を得て転載)<sup>5</sup>  
気相において、任意濃度の NO/O<sub>2</sub> より有毒な二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) が任意時間で発生する予測式が示された。

$$-d[\text{NO}]/dt = Kk'[\text{NO}]^3$$

where  $Kk' (\text{L}^2 \text{mol}^{-2} \text{h}^{-1}) = 2.6 \times 10^{-5}$  at P<sub>0</sub>=200 atm (室温)

$$z(P) = 0.998 - 0.001438 \times P - 0.000008488 \times P^2 + 0.00000003735 \times P^3$$

where  $z = [\text{NO}_{\text{ideal}}] / [\text{NO}_{\text{real}}] \quad (1/2) ((z_1/P_1)^2 - (z_0/P_0)^2) = (Kk' / (RT)^2) t$

定数                      定数

NO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>Oの発生比率 (%)

時間	NOの初圧 (atm)						
	100	50	20	10	5	2	1
1日	0.4	0.1	0	0	0	0	0
3日	1.2	0.3	0	0	0	0	0
1月	9.0	2.6	0.4	0.1	0	0	0
1年	29.8	16.9	4.5	0.2	0.3	0	0

図9 高圧タンク内での3NO=NO<sub>2</sub>+N<sub>2</sub>O反応 (医歯薬出版株式会社の許可を得て転載)<sup>5</sup>  
気相において、任意圧力の NO より有毒な二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>), 笑気 (N<sub>2</sub>O) が任意時間で発生する予測式が示された。

テイン代謝に作用し、血管障害を導くことも示唆されている<sup>34)</sup>。N<sub>2</sub>Oの作用も今後探究される必要がある。

以上の結果はNO吸入療法を安全に実施する上で、基礎的ながら重要な知見である。

## おわりに — NOの補充

血管内皮由来NOの合成と機能はsystems biologyの制御下にある。血管内皮由来NOが酸化ストレス亢進により抑制されることから、“抗酸化療法”が血管機能維持に有用であることは明らかである。Arginine代謝への介入、たとえばcitrulline補充とcitrulline-arginine recyclingの促進も効果的である。母乳にはthioredoxin-1(平均268ng/ml)だけでなくNO<sub>x</sub>(平均479μg/l)も母体血中濃度の約10倍と豊富に存在している(VEGF, HGF, EGFは10~100倍)。母乳にはADMA(平均0.12μg/lで血中濃度の約1/5)も含まれている<sup>35)</sup>。ダイズ、ソラマメ、ピーマン、ジャガイモといった野菜もNO<sub>x</sub>が豊富であるが、一定比率でADMAなどのメチルアルギニンが含まれている<sup>36)</sup>。食物のNO<sub>x</sub>(NO donor)-ADMA(NOS阻害因子)バランスは今後開拓されるべき分子栄養学の分野である。小児医療の中で特に重要な課題である。

## 文 献

- 1) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* (1980) 288, 373-376.
- 2) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (1987) 327, 524-526.
- 3) Culotta E, Koshland DE Jr: NO news is good news. *Science* (1992) 258, 1862-1865.
- 4) 塚原宏一: 窒素(N)と酸素(O)の化学・生物学. 日臨高気圧酸素潜水医学会誌(2010)7, 1-8.
- 5) 塚原宏一, 吉本順子: 一酸化窒素, アルギニン代謝と酸化ストレス. 別冊「医学のあゆみ」レドックスUPDATE ストレス制御の臨床医学・健康科学(2015), 103-111.
- 6) Cooke JP: ADMA: Its role in vascular disease. *Vasc Med* (2005) 10, S11-17.
- 7) Tsukahara H, Nagasaka H, Tokuriki S, Mayumi M: Coupling of the citrulline recycling to endothelial NO production. *Mol Genet Metab* (2010) 99, 438.
- 8) Morris CR, Gladwin MT, Kato GJ: Nitric oxide and arginine dysregulation: A novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. *Curr Mol Med* (2008) 8, 620-632.
- 9) Pernow J, Jung C: Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: Reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res* (2013) 98, 334-343.
- 10) Kubo M, Ogino K: Analytical procedures for nitrate/nitrosative stress: in *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice-Pediatric Disorders*, Tsukahara H, Kaneko K (eds), Springer, Berlin (2014) pp149-158.
- 11) Tsukahara H, Ishida T, Mayumi M: Gas-phase oxidation and disproportionation of nitric oxide. *Methods Enzymol* (2002) 359, 168-179.
- 12) Nishio M, Tsukahara H, Hiraoka M, Sudo M, Kigoshi S, Muramatsu I: Calcium channel current in cultured rat mesangial cells. *Mol Pharmacol* (1993) 43, 96-99.
- 13) Tsukahara H, Gordienko DV, Goligorsky MS: Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1993) 193, 722-729.
- 14) Tsukahara H, Gordienko DV, Tonshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS: Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int* (1994) 45, 598-604.
- 15) Goligorsky MS, Budzikowski AS, Tsukahara H, Noiri E: Co-operation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (1999) 26, 269-271.
- 16) Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS: Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ET<sub>B</sub> receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem* (1994) 269, 21778-21785.
- 17) Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF: Termination of endothelin signaling: role of nitric oxide. *J Cell Physiol* (1994) 158, 485-494.
- 18) Gordienko DV, Tsukahara H: Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na<sup>+</sup> currents in a cultured endothelial cell line derived from rat interlobar artery and human umbilical vein. *Pflugers Arch* (1994) 428, 91-93.
- 19) Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, Ishii Y, Muramatsu I, Sudo M: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol* (1996) 270, E840-845.
- 20) Tsukahara H, Hori C, Hiraoka M, Yamamoto K, Ishii Y, Mayumi M: Endothelin subtype A receptor antagonist induces osteopenia in growing rats. *Metabolism* (1988) 47, 1403-1407.
- 21) Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Hata I, Okada T, Gejyo F, Sudo M: Chronic erythropoietin treatment enhances endogenous nitric oxide production in rats. *Scand J Clin Lab Invest* (1997) 57, 487-493.
- 22) Tsukahara H, Hori C, Tsuchida S, Hiraoka M, Fujisawa K, Mayumi M: Role of endothelin in erythropoietin-



- induced hypertension in rats. *Nephron* (1998) 79, 499-500.
- 23) Tsukahara H, Imura T, Tsuchida S, Nunose M, Hori C, Hiraoka M, Gejyo F, Sudo M : Renal functional measurements in young rats with chronic inhibition of nitric oxide synthase. *Acta Paediatr Jpn* (1996) 38, 614-618.
- 24) Tsukahara H, Hiraoka M, Kobata R, Hata I, Ohshima Y, Jiang MZ, Noiri E, Mayumi M : Increased oxidative stress in rats with chronic nitric oxide depletion : Measurement of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion. *Redox Rep* (2000) 5, 23-28.
- 25) 長坂博範, 塚原宏一 : 先天性代謝疾患と一酸化窒素, 酸化ストレス. *発達腎研会誌* (2010) 18, 29-36.
- 26) Nagasaka H, Tsukahara H, Yorifuji T, Miida T, Murayama K, Tsuruoka T, Takatani T, Kanazawa M, Kobayashi K, Okano Y, Takayanagi M : Evaluation of endogenous nitric oxide synthesis in congenital urea cycle enzyme defects. *Metabolism* (2009) 58, 278-282.
- 27) Nagasaka H, Yorifuji T, Egawa H, Inui A, Fujisawa T, Komatsu H, Tsukahara H, Uemoto S, Inomata Y : Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle in non-hyperammonemic carriers of ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab* (2013) 109, 251-254.
- 28) Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, Shigematsu Y, Momoi T, Yorifuji J, Miida T, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Hirano K, Takayanagi M, et al. : Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin-deficiency even during the silent period. *Mol Genet Metab* (2009) 97, 21-26.
- 29) Nagasaka H, Okano Y, Aizawa M, Miida T, Yorifuji T, Tajima G, Sakura N, Takatani T, Sanayama Y, Sugamoto K, Mayumi M, Kobayashi K, et al. : Altered metabolisms of mediators controlling vascular function and enhanced oxidative stress in asymptomatic children with congenital portosystemic venous shunt. *Metabolism* (2010) 59, 107-113.
- 30) Nakatsukasa Y, Tsukahara H, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T : Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy : relation to maternal and neonatal characteristics. *J Clin Biochem Nutr* (2013) 52, 27-31.
- 31) 塚原宏一, 中務陽子, 山田睦子, 重安良恵, 吉本順子, 喜多村哲朗, 長坂博範, 森島恒雄 : Early third trimesterの妊婦における血清中NOx, ADMA (内因性NO合成酵素阻害因子) および酸化ストレスマーカー. *日小児高血圧研会誌* (2013) 10, 8-15.
- 32) Tsukahara H, Ishida T, Mayumi M : Gas-phase oxidation of nitric oxide : Chemical kinetics and rate constant. *Nitric Oxide* (1999) 3, 191-198.
- 33) Tsukahara H, Ishida T, Todoroki Y, Mayumi M : Gas-phase disproportionation of nitric oxide at elevated pressures. *Free Radic Res* (2003) 37, 171-177.
- 34) Tsukahara H, Todoroki Y, Hiraoka M, Mayumi M : N<sub>2</sub>O anesthesia may exacerbate hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in patients with renal impairment. *Kidney* (2004) 65, 338.
- 35) Tsukahara H : Redox modulatory factors of human breast milk ; in *Handbook of Dietary and Nutritional Aspects of Human Breast Milk*, Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (eds), Wageningen Academic Publishers, Netherlands (2013) pp599-614.
- 36) Servillo L, Giovane A, Cautela D, Castaldo D, Balestrieri ML : The methylarginines NMMA, ADMA, and SDMA are ubiquitous constituents of the main vegetables of human nutrition. *Nitric Oxide* (2013) 30, 43-48.