

## カテーテル型 NO センサによる血管内実時間 NO 計測の意義

望 月 精 一\*

### Intravascular Measurement of Plasma Nitric Oxide Concentration by a Catheter-Type Nitric Oxide Sensor

Seiichi MOCHIZUKI\*

#### 1. はじめに

血管の内腔側を覆っている内皮細胞からは、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) など様々な生理活性物質が産生・分泌される。内皮由来 NO は平滑筋の弛緩を引き起こして血管を拡張させる。内皮機能が正常であれば、内皮細胞膜に接着分子は発現せず、単球の接着も起こらないが、動脈硬化の危険因子があると内皮機能が低下して、血管の収縮、血栓の形成が促進される。NO は、アミノ酸の一種である L-アルギニンを基質として、内皮細胞内の NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) によって合成される (図 1)。内皮細胞内 NOS を活性化する刺激としては、血流によって内皮上に及ぼされる“ずり応力 (shear stress)”が重要で、その他、アセチルコリン (acetylcholine: ACh) などの化学的な刺激がある。

生体内で産生される NO の研究の歴史は比較的浅く、1980 年に ACh による刺激によって血管内皮から放出される因子、すなわち血管内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) の存在が報告され[1]、1987 年にこの因子が NO であることが明らかとなった[2, 3]。そして、こうした心血管系におけるシグナル分子としての NO の発見に対して、1998 年に Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad の 3 名の米国の研究者に対してノーベル生理学・医学賞が授与された。以来、NO の生理作用として、血管作用以外にも、神経系シグナル伝達 (神経細胞内 NOS 由来の NO)、免疫作用 (マクロファージ内 NOS 由来の NO) などが明らかにされてきている。現在も NO に関連した研究は医学系の様々な分野において精力的に進められており、NO 供与剤 (NO ドナー) など関連薬

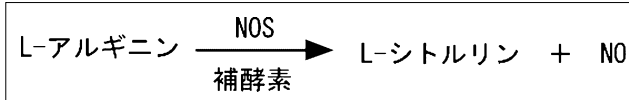
剤、遺伝子治療、再生医療などに及んでいる。

生体医工学に関連した具体的な研究・開発の例として、NO の血管弛緩作用を生かした NO ガス吸入による肺高血圧症の治療[4]、人工心肺など体外循環回路における血小板由来 NO 産生量の変動についての研究[5]、冠動脈狭窄部位の拡張に用いられるステントに NO ドナーを付着させて血管壁へ NO を徐放させて血管機能の回復を図る方法の開発、あるいは人工心肺回路や人工血管用素材などの抗血栓性向上への NO の利用などがある。

本稿では、今後、循環系における NO 研究の基盤を成すと考えられる血中での NO の直接計測の意義と、臨床レベルでの血管機能の定量的評価を目指したカテーテル型 NO センサの開発について紹介する。

#### 2. 血中 NO 計測の意義

循環器系疾患の患者によく見られる高血圧症、高脂血症、糖尿病などにおいては、以下の 2 つの因子が相まって血管内皮機能が障害されることが知られている。すなわち、(1) 血管内皮由来 NO の産生の抑制 (NOS の活性低下、NOS の発現低下) と (2) スーパーオキシド (superoxide,  $\cdot O_2^-$ ) などの活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生増加と ROS 消去系の消去能低下である。このような ROS の影響が顕在化した状態を“高酸化ストレス (high oxidative stress)”状態といい、中でも NO と  $\cdot O_2^-$  は、速やかに反応してパーオキシナイトライト ( $ONOO^-$ ) になり、これがさらに組織障害を進展させる。したがって、血管内皮機能障害 (endothelial dysfunction) では、NO の bioavailability (生理活性を有した状態の NO の



\* 川崎医療短期大学臨床工学科

Department of Medical Engineering, Kawasaki College of Allied Health Professions

図 1 一酸化窒素 (NO) の生合成

量)の低下が問題となっている[6].

しかし、血管内皮細胞から放出された NO を血管の中で直接計測することのできる汎用的な方法は、最近まで開発されておらず、臨床的には今回の特集の中でも取り上げられている FMD (flow-mediated dilation) などの間接的な方法をもとにして内皮細胞の NO 産生機能を推測してきた。FMD の詳細は、別項(「血管内皮機能測定」)の通りであるが、簡単にまとめると上腕もしくは前腕動脈のカフ圧迫による一過性の血流途絶の後、血流を再開することによって流れ(ずり応力)刺激を増加させ、EDRF の産生増加による血管弛緩反応(血管径変化)を超音波法で計測する方法である。上記のような病態で内皮機能が低下している場合、流れ(ずり応力)刺激に対する EDRF の産生増加が不十分で、FMD が低下するとされている。FMD は非観血的、比較的簡便な方法として臨床的に有用であるが、NO 産生能の評価法としては間接的な方法であり、必ずしも NO の産生のみを評価しているわけではないことに注意する必要がある。すなわち、EDRF として NO 以外にも PGI<sub>2</sub> などのプロスタグランジン類、血管内皮由来過分極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF)などがある。また、FMD は EDRF のみならず、エンドセリンなどの血管内皮由来収縮因子、血管平滑筋機能の変化などの影響も受ける現象である。さらに、内皮機能の低下が、NO の産生過程の障害によるものか酸化ストレス増加による影響なのか判別が困難で、病態を理解する上で限界があった。また、動物実験においては、NOS の阻害薬を用いた時の血管拡張反応の変化の度合い、つまり NOS を阻害した時の血管拡張率の低下に基づいて、NO の関与を定量的に評価する方法が用いられてきたが、NOS の阻害薬では、(1)生体における NO の産生を完全には阻害できないと考えられること[7]、(2)NOS に由来しないその他の NO 供給源(亜硝酸イオンからの還元、赤血球膜近傍の境界膜中 NO の放出など)からの NO の関与を区別して評価できないこと[8]、(3)NO 以外の生理活性物質の代償的な機能変化の影響を受けること[9]、などの問題点があった。

したがって、内皮細胞から放出される NO を直接計測して、NO の動態を評価することは、血管内皮障害と血管機

能異常を理解する上で重要である。さらに、最近、血管内皮機能障害の治療法として、L-アルギニン (NOS の基質)[10, 11]、テトラヒドロピオプテリン(BH<sub>4</sub>, NOS の補酵素)[12, 13]、セビアプテリン (BH<sub>4</sub> 合成の基質の一つ)[14]、などの補充、あるいは BH<sub>4</sub> 合成に関わる酵素群の一つである GTP cyclohydrolase I の遺伝子導入による発現増加[15]、ROS の消去などによる有効 NO 濃度の上昇を目指したビタミン C, E などの抗酸化物質の投与[16, 17]、スーパーオキシド消去酵素 (SOD) の遺伝子導入による発現増加[18]、そして NO ドナーの投与[19]、などが行われるようになってきており、こうした方法の効果を定量的に評価するためにも、bioactive な NO を直接計測することが一層重要になってきている。

### 3. In vivo 計測用 NO センサ

NO センサは、これまでにもいくつかのタイプが開発されてきたが、血管内皮細胞から放出された NO を血中で直接計測することができる汎用的な方法は最近まで開発されていなかった。その一因は、従来、血中に放出された NO が、反応性の高いラジカル分子であるために血中の酸化ヘモグロビンや溶存酸素などによって極めて短時間で酸化・失活し、その血中濃度を計測することが極めて困難と考えられてきたことによると思われる。しかし、最近、血液中でも、血管中を血液が流れている状態では、ピーカー実験などの結果に比較して、NO の半減期が著しく長くなることが報告されている。例えば、体外から動脈内、あるいは静脈内に投与された NO が NO のまま、あるいは血球、血漿成分にニトロソ化合物などとして捕捉されて輸送され、遠隔部位で再び放出されるなどして血管拡張 (remote vasodilation) 作用を発揮することが示され[20]、血中で直接、リアルタイムに NO 濃度を計測することの意義が認識されつつある。そこで、最近、我々は共同研究者である Ziad Taha によって開発された in vivo 計測用 NO センサの基礎特性を評価した後、in vivo 計測への応用性を評価した[21]。

図 2 に示す NO センサの基本構造と計測原理は、以下の通りである。まず、NO はガス分子であるため、センサ感知部周囲を覆ったガス透過性の高い素材でできたコーティ

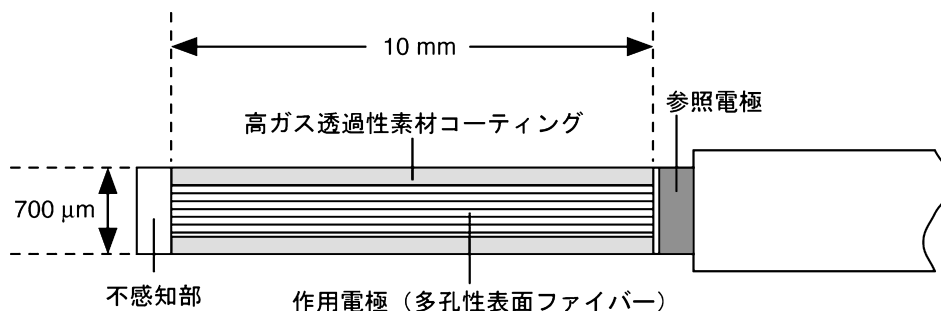


図 2 In vivo 計測用 NO センサの感知部付近の基本構造 (文献[21, 22]から引用・改変)

ング内を拡散し、作用電極に到達する。そこで NO がラジカル分子として有する不対電子を作用電極側に移動する、すなわち NO が酸化される時の酸化電流値を計測する。そして、予め NO ガス飽和水溶液を用いて、NO 濃度と計測酸化電流値との関係から作成した検量線を基に NO 濃度に換算する。このセンサは、酸化（触媒）作用の強い素材から成る多孔性表面のファイバーを作用電極とし、参照電極とともに一体化した構造をとっており、周囲の溶液の動き（血流）、振動などの影響を受けにくく、高感度で安定した計測が可能となっている [21]。

生体への応用を進めた結果、麻酔したラットの腹部大動脈内で NO ドナーであるニトログリセリン（硝酸薬）由来の NO による血中 NO 濃度の上昇を計測できた。さらに、本センサは血管内だけでなく、体外循環回路中においても血中 NO 濃度を安定して計測することができることを確認している。

#### 4. カテーテル型 NO センサ

次に、我々は上述のセンサを基にして、国内企業と共同研究を進めてカテーテル型 NO センサを開発し、血管内における血中 NO の bioavailability 評価へのカテーテル型 NO センサの応用性を検討した。

まず、上記の *in vivo* 計測用 NO センサ（図 2）を 4 Fr (1.3 mm) ナイロンエラストマー製カテーテル（長さ：120 cm）内に挿入・固定した。このカテーテル型 NO センサをガイド用の 7 Fr (2.3 mm) カテーテルを介して麻酔したイヌの大腿動脈から逆行性に挿入し、センサ感知部を胸部大動脈内に留置した。血管内皮由来 NO 産生の刺激因子である ACh (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を 2 分間持続投与したところ、血中 NO 濃度の一過性の上昇を認めた（図 3）。

前述の通り、従来、血中の NO は、正常な状態では酸化

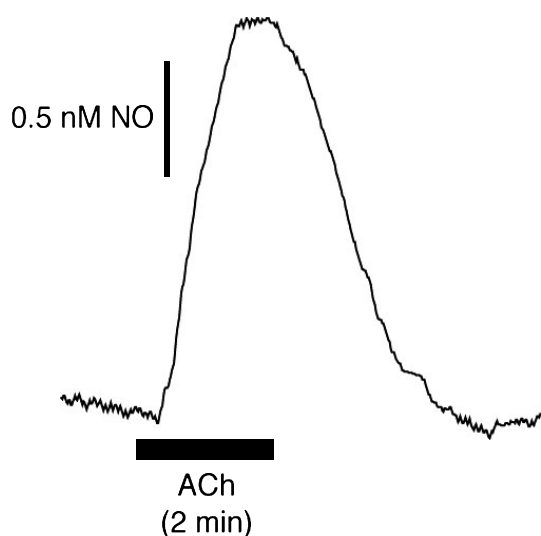


図 3 イヌ胸部大動脈内血中におけるアセチルコリン刺激による血管内皮由来 NO の計測結果（文献[22]から引用）

ヘモグロビン、溶存酸素などにより酸化され、高酸化ストレス状態ではさらにスーパーオキシドなどの ROS による酸化も加わり、瞬時に失活するものと考えられていた。しかし、我々の *in vivo* 計測の結果では、ACh による刺激に応じた血中 NO 濃度上昇が計測されることが明らかとなった。また、NOS 阻害物質投与によって、血中 NO 濃度は有意に低下することから、内皮機能障害時には NO の bioavailability が低下することも確認された。以上の結果から、我々が開発したカテーテル型 NO センサは、カテーテル検査法として臨床における血管内皮機能評価などに応用できると考えられ、高血圧症、高脂血症、糖尿病などにおける血管障害の病態解明と定量的な検査・診断に役立つものと考えられる。

現在は、上記のプロトタイプのカテーテル型 NO センサを改良して、臨床で使用可能なものを目指して開発を行っている。冠循環の検査目的で開発中のタイプでは、センサをイヌの冠状静脈洞内に留置して血中 NO 濃度をリアルタイムに計測したところ、大動脈における計測と同様に ACh の投与により NO 濃度の一過性の上昇を計測することに成功した。すなわち、静脈血中においても NO が安定して存在することが初めて確認された。

以上のように、カテーテル型 NO センサの有用性が認められたことから、本計測法が、血中 NO 動態の解明のための新しい研究手段としてのみならず、臨床レベルでの計測・診断法として確立されるように研究・開発を進める予定である。

#### 5. おわりに

本稿で紹介したカテーテル型 NO センサは、従来、循環系 NO 研究にとって隘路となっていた *in vivo* での血管内実時間 NO 計測を可能とするものである。そして、直接 bioactive な NO を計測することによって、血管内皮機能を担う中心的な分子である NO の動態を評価することができれば、臨床的にも意義があるものと考えられる。

謝辞 本稿で紹介したデータは、川崎医科大学・医用工学、循環器内科学、胸部心臓血管外科学、生理学の各教室、岡山大学大学院医歯学総合研究科システム循環生理学教室、および企業（ナカノマーカントイル、平河ヒューテック（株）、米国 Innovative Instruments 社）との共同研究の成果であり、関係各位に深謝する。また、研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金によって遂行した。

#### 文 献

1. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. **288**: 373-376, 1980.
2. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and re-

- leased from artery and vein is nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci USA*. **84**: 9265–9269, 1987.
3. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**: 524–526, 1987.
  4. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM: Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation*. **83**: 2038–2047, 1991.
  5. Borgdorff P, Fekkes D, Tangelder GJ: Hypotension caused by extracorporeal circulation: serotonin from pump-activated platelets triggers nitric oxide release. *Circulation*. **106**: 2588–2593, 2002.
  6. Alp NJ, Channon KM: Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **24**: 413–420, 2004.
  7. Broere A, Van Den Meiracker AH, Boomsma F, Derkx FH, Veld AJ, Schalekamp MA: Human renal and systemic hemodynamic, natriuretic, and neurohumoral responses to different doses of L-NAME. *Am J Physiol*. **275**: F870–F877, 1998.
  8. Schechter AN, Gladwin MT: Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med*. **348**: 1483–1485, 2003.
  9. Ishibashi Y, Duncker DJ, Zhang J, Bache RJ: ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, adenosine, and nitric oxide-mediated mechanisms account for coronary vasodilation during exercise. *Circ Res*. **82**: 346–359, 1998.
  10. Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME: Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*. **90**: 1168–1172, 1992.
  11. Lerman A, Burnett JC Jr, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR Jr: Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation*. **97**: 2123–2128, 1998.
  12. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T: Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest*. **99**: 41–46, 1997.
  13. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, M<sup>o</sup>szel T: Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers. Evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res*. **86**: 36–41, 2000.
  14. Tiefenbacher CP, Bleeke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kubler W: Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation*. **102**: 2172–2179, 2000.
  15. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, Jefferson A, Goh N, Rockett KA, Channon KM: Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest*. **112**: 725–735, 2003.
  16. Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, MacAllister RJ, Wolzt M: High doses of vitamin C reverse Escherichia coli endotoxin-induced hyporeactivity to acetylcholine in the human forearm. *Circulation*. **106**: 1460–1464, 2002.
  17. Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H: Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. *J Am Coll Cardiol*. **32**: 1672–1679, 1998.
  18. Didion SP, Kinzenbaw DA, Fegan PE, Didion LA, Faraci FM: Overexpression of CuZn-SOD prevents lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction. *Stroke*. **35**: 1963–1967, 2004.
  19. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M: Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ Res*. **91**: 470–477, 2002.
  20. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiss C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M: Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest*. **109**: 1241–1248, 2002.
  21. Mochizuki S, Himi N, Miyasaka T, Nakamoto H, Takemoto M, Hirano K, Tsujioka K, Ogasawara Y, Kajiya F: Evaluation of basic performance and applicability of a newly developed in vivo nitric oxide sensor. *Physiol Meas*. **23**: 261–268, 2002.
  22. Mochizuki S, Miyasaka T, Goto M, Ogasawara Y, Yada T, Akiyama M, Neishi Y, Toyoda T, Tomita J, Koyama Y, Tsujioka K, Kajiya F, Akasaka T, Yoshida K: Measurement of acetylcholine-induced endothelium-derived nitric oxide in aorta using a newly developed catheter-type nitric oxide sensor. *Biochem Biophys Res Commun*. **306**: 505–508, 2003.

---

望月 精一 (モチヅキ セイイチ)

1992年米国デラウェア大学化学工学科博士課程修了(フルブライト奨学生, Ph.D.)。川崎医療短期大学臨床工学科(旧称: 医用電子技術科)専任講師を経て, 1998年より川崎医療短期大学臨床工学科助教授。川崎医科大学・医用工学教室にて, 新しい計測手法を中心とした心血管系の研究(特に生体内 NO の生理作用)などに従事。所属学会: 日本エム・イー学会, 化学工学会, 日本バイオロロジー学会, 日本循環器学会, 日本 NO 学会, 他。

