◆ 総 説 ◆

尿中一酸化窒素代謝物 (NO_x^-) 定量による小児の一酸化窒素 (NO) 産生の評価：基礎データとその応用

塚原 宏一^{*1}・堀 親秀^{*1}・畑 郁江^{*1}・土田 晋也^{*1}
 平岡 政弘^{*1}・津村 久美^{*2}・菊池 清^{*2}・眞弓 光文^{*1}

要 旨

一酸化窒素 (NO) は多彩な生理活性を有するガス状ラジカルであり、ここ10年の間きわめて精力的な研究が展開されてきた。われわれは、小児における NO の生理学的・病態学的意義を明らかにするために、尿中の一酸化窒素代謝物濃度を指標として以下の臨床的研究を行ったので、その成果を紹介する。①正常小児における内因性 NO 産生の評価、②川崎病、気管支喘息の患者における NO 産生の評価、③インスリン、L-アルギニンの NO 合成系への作用に関する研究がその内容である。小児の病態生理において NO がいかなる役割を果たしているのか不明のところが多く、今後の研究が期待される。

序 言

一酸化窒素 (NO) ラジカルは、L-アルギニンを基質として NO 合成酵素 (NOS) によってL-シトルリンとともに合成される。NO はさまざまな標的器官に働き、

血管トーンスの調節、血小板の凝集・白血球付着の抑制、平滑筋弛緩、免疫制御、抗菌、神経伝達など、臓器を越えた多様な作用を発揮する^{1)~3)}。

NOS は、現在少なくとも3種類のアイソフォームが存在することが明らかになっている。I型がおもに神経細胞で発現している神経型、II型がおもにマクロファージなどの組織球系細胞で発現している誘導型、III型がおもに血管内皮細胞で発現している内皮型である。I型およびIII型は構成的に発現され、 Ca^{2+} /カルモデュリンによって活性化されるのに対し、II型は Ca^{2+} 非依存性で、リポ多糖やサイトカインなどで誘導される^{1)~3)}。

NO の生理作用についての研究は、とくに分子生物学的なアプローチにより大きな進展がみられたが、ヒトとくに小児を対象として NO の病態生理学的意義を探究した研究報告は少ない^{4)~6)}。

NO レベルの測定には多種の方法 (表1) があるが、それぞれ一長一短があり、NO ラジカル ($\text{NO}\cdot$) に対して感度・特異性ともにすぐれたものは現在のところ存在しない²⁾³⁾。NO はペプチドなどと異なり、その化学的性質から生体中では不安定で、とくにスーパーオキシド (O_2^-) と反応しやすく、またヘムに結合しやすい。生体内で合成された NO の大部分は体液中では亜硝酸イオン (NO_2^-) あるいは硝酸イオン (NO_3^-) まで酸化される (まとめて NO_x^- と表される) (表2)⁷⁾。従って、生体試料中の NO_x^- 濃度を測定することによ

^{*1}福井医科大学 小児科

(〒910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月23-3)

^{*2}島根県立中央病院 小児科

Assessment of endogenous nitric oxide formation in children: Measurement of urinary excretion of nitrite/nitrate

Hirokazu Tsukahara^{*1}, Chikahide Hori^{*1}, Ikue Hata^{*1}, Shinya Tsuchida^{*1}, Masahiro Hiraoka^{*1}, Kumi Tsumura^{*2}, Kiyoshi Kikuchi^{*2}, Mitsufumi Mayumi^{*1}

^{*1}Department of Pediatrics, Fukui Medical University

^{*2}Department of Pediatrics, Shimane Prefectural Central Hospital

Key Words: 一酸化窒素
 一酸化窒素代謝物
 尿中濃度
 小児疾患
 インスリン作用

表1 NO レベルの測定法と検出限界

μ Mレベル: spin trap法, Griess法, brucine法
nMレベル: シトルリン法, PTIO法, detector cell法, 電極法, micro-dialysis法
pMレベル: オゾン化学発光法

表2 生成・放出された NO の循環血液中での変化 (酸化反応)

$\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^-$ (亜硝酸) + 酸素化Hb
$\rightarrow \text{NO}_3^-$ (硝酸) + Met-Hb

って内因性 NO 産生を評価する方法が一般に行われている²⁾³⁾。総 NOx^- 濃度は、 NO_3^- を NO_2^- まで還元したのちに (グリース法), または NO_2^- を NO_3^- まで酸化したのちに (ブルシン法) 吸光度法により定量される。生体サンプルでの測定では検出限界はそれぞれ 10^{-6} M, 10^{-5} M 程度である。ただし、これらの方法では、経口摂取された水分や食物に含まれる NOx^- を除外して定量できず、また定量された NOx^- がいかなる組織の NOS により合成された NO に由来するのか分別できない。

われわれは、小児における NO の生理学的・病態学的意義を明らかにするために、尿中 NOx^- 濃度を指標としていくらかの臨床的研究を行ったので、ここにその成果を報告する。(1) 正常小児における内因性 NO 産生の評価⁸⁾⁹⁾, (2) 小児疾患とくに川崎病, 気管支喘息における NO 産生の評価¹⁰⁾¹¹⁾, (3) インスリン, L-アルギニンの NO 合成系への作用に関する研究¹²⁾がその内容である。尿中 NOx^- 濃度の測定はブルシン法¹³⁾を用い、結果は対クレアチニン (Cr) 比で表示した。データは平均 $\pm$ SD で表し、統計学的評価は ANOVA (Scheffé) あるいは t 検定を用いて行った。

(1) 正常小児における内因性 NO 産生の評価

対象は正常小児90名 (男47/女43; 平均年齢8.5歳) であり、早朝尿中の NOx^- 濃度を定量した⁸⁾。対象を3歳ごとに、かつ性別によって区分して評価した。図1に示されるように、尿中 NOx^- 排泄は年少児が年長児よりも有意に高く、年齢が長じるにつれ低下し、12歳以降ほぼ一定になることが明らかとなった。各年齢群で男女間に差はなかった。さらに、このうち25名 (平均8.7歳) を対象として、尿中 NOx^- における $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ の相対比を求めたところ、 NO_3^- が全体の97%を占めていた (図2)⁹⁾。

図1 正常小児における早朝尿中の NOx^- 排泄量
(男) * $P < 0.05$ vs. より年長の児, ** $P < 0.05$ vs. より年長の児, *** $P < 0.05$ vs. 12~15歳の児
(女) * $P < 0.05$ vs. より年長の児, ** $P < 0.05$ vs. より年長の児, *** $P < 0.05$ vs. 12~15歳および15~18歳の児

Normal children: 4.2-12.5 (mean 8.7) years (n=25)
[Total NOx^- : 0.12-0.32 (mean 0.20) mmol/mmol Cr]

図2 正常小児の尿中 NOx^- の分画

以上の結果により、基礎レベルにおける内因性 NO 産生は、年少児の方が年長児よりも高いことが示唆され、また尿中 (および血中) の NOx^- の大部分が NO_3^- であることが示された。

(2) 川崎病, 気管支喘息における NO 産生の評価

(1) の研究で得られた尿中 NOx^- 排泄の正常値をもとにして、小児科臨床でよく経験する代表的な炎症性疾患 (川崎病および気管支喘息) 患者における内因性

図3 川崎病患児の尿中 NOx⁻ 排泄量
*P<0.05 vs. 正常対照

NO 産生を評価した。

川崎病は、冠動脈を中心とした全身の血管炎を特徴とする原因不明の急性熱性疾患であり、血管炎の発生機序としては、免疫担当細胞の活性化→種々のサイトカイン (TNF- α , IL-1, IFN- γ) 産生亢進→血管内皮細胞の障害→血管炎の発症と進展、というカスケードが想定されている。われわれは、川崎病の急性期における内因性 NO 産生を評価する目的で、8名の患者 (平均年齢2.0歳) の早朝尿中 NOx⁻ 排泄を定量し、12名の同年齢の正常対照と比較検討した¹⁰⁾。川崎病患児の病初期の尿中 NOx⁻ 排泄は正常対照と比較して有意に高値であった (図3)。さらに、4名の患者で尿中 NOx⁻ 排泄を継続的にモニターしたところ、臨床症状・検査所見の改善と一致して尿中 NOx⁻ 排泄は正常レベルまで低下した¹⁰⁾。以上の結果により、川崎病の急性期においては内因性の NO 産生が亢進していることが示唆された。

NO と気管支喘息との関係において注目されている領域の1つが呼気中 NO に関する研究である¹⁴⁾。すなわち、喘息患者で NO の呼出量が高いことが報告されている。われわれは、入院加療中の気管支喘息患者18名 (平均年齢10.9歳) の早朝尿中の NOx⁻ 濃度を定量し、35名の同年齢の正常対照のそれと比較検討した。気管支喘息患者の尿中 NOx⁻ 排泄は正常対照と比較し有意に高値であった (図4)。喘息患児における呼気中 NO または尿中 NOx⁻ は、おそらくサイトカイン刺激により気道上皮や炎症細胞で誘導された NOS (II型) によって産生される NO におもに由来していると推測でき

図4 気管支喘息患児の尿中 NOx⁻ 排泄量
*P<0.05 vs. 正常対照

る¹⁵⁾。

これらの炎症性疾患において過剰に合成される NO は、末梢循環の維持、免疫細胞の抑制などの作用により炎症を抑止する方向に働く役割を担うと考えられる。また一方、NO は炎症局所で多量に発生したスーパーオキシド (O₂⁻) との反応性が高く、その生成産物であるパーオキシナイトライト (ONOO⁻) が強い細胞毒性・組織傷害性を発揮し、炎症を増幅・遷延させる可能性もある¹⁶⁾。後者の作用が前面にでてくる疾患あるいは症例については、誘導型 NOS に対する特異的阻害剤が効果を発揮するかもしれない。

(3) インスリン、L-アルギニンの NO 合成系に対する作用

インスリンが標的組織 (骨格筋) において血管拡張性に作用すること、またインスリン抵抗状態で高血圧を合併することもよく知られている¹⁷⁾¹⁸⁾。インスリンの血管作用は多様で複雑であるが、最近になりインスリンの血管拡張作用が NO 依存性であることが示唆されている^{19)~21)}。小児科臨床では、成長障害児の成長ホルモン分泌刺激試験の1つとして対象児にインスリン、L-アルギニンを投与する機会がある。われわれは、その検査を施行中の児の尿中 NOx⁻ 濃度の変動を分析することにより、これらの薬物の in vivo における NO 合成系への作用を検討した¹²⁾。

対象は糖・脂質代謝正常の体質性小人症の患児8名である。インスリン負荷時 (n=5, 平均9.5歳), L-アルギニン負荷時 (n=5, 平均12.1歳; 2名はインスリン

図5 インスリンおよびL-アルギニン負荷試験での尿採取および血圧 (BP) 測定

試験も施行)の尿を採取した(図5)。生理食塩水のみを持続静注した4名の正常対照(平均8.5歳)からも尿を採取した。L-アルギニン負荷時の血清インスリン濃度(RIA法)の変動も調べた。

(結果)平均血圧の変動:インスリン負荷群の平均血圧は、インスリン静注15分後に有意に低下したが、対照群では血圧の有意な変動は認められなかった。L-アルギニン負荷群では、静注開始30分後に平均血圧が有意に低下した。尿中 NOx^- 排泄の変動:尿中 NOx^- 排泄量は、インスリンおよびL-アルギニンの負荷によって有意に増加した(図6)。対照群では尿中 NOx^- 濃度の有意な変動はなかった。負荷後の尿中 NOx^- 排泄量の基礎値に対する増加率はそれぞれ101%, 71%, 7%であった。アルギニン負荷時の血清インスリン値の変動:図7に示されたように、静注開始30分後に最高値を呈した。

今回の研究により、ヒトへのインスリン投与が内因性のNO合成を急激に促進させることが証明された。血管内皮細胞にはインスリン受容体が多く存在すること、かつNO反応が急速であったことから、インスリンに

図6 インスリン負荷群, L-アルギニン負荷群, 対照群における尿中 NOx^- 排泄量の変動
*および** $P < 0.05$ (対基礎値)

図7 L-アルギニン負荷試験時における血清インスリン濃度の変動
* $P < 0.05$ (対基礎値)

より産生が刺激されたNOはおそらく血管内皮に存在する構成型NOS(III型)の活性化によるものであろうと推測される¹⁹⁾。また、L-アルギニン(NO合成の基質)が対象児の尿中 NOx^- 排泄をインスリンと同程度に増加させることも明らかとなった。L-アルギニンには膵臓でのインスリン産生を亢進させる作用がある。従って、L-アルギニン負荷によるNO合成の亢進は、NO合成の基質供給だけでなく、同時に誘発された高インスリン血症にも起因している可能性がある。

結 び

われわれの身体の中には、さまざまな種類のオータコイドが細胞機能を微妙に調節するメディエータとして働いている。体液中にほんのわずかに溶けているに過ぎない気体の NO が身体の中のありとあらゆる領域でメディエータとして重要な働きをしていることが、ここ10年のうちに明らかになった。しかしながら、NO がヒトとくに小児の病態生理において果たす役割についてはほとんど解明されていない。今後、この方面の臨床的研究が活発に進められることを期待したい。

なお、本研究は、国立小児病院、腎不全研究会および横山臨床薬理財団からの研究助成を受けた。

文 献

- Moncada, S., Higgs, A. : The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329 : 2002-2012, 1993.
- Archer, S. : Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB. J.* 7 : 349-360, 1993.
- Viinikka, L. : Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56 : 577-581, 1996.
- Shi, Y., Li, H., Shen, C., Wang, J., Qin, S., Liu, R., Pan, J. : Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis. *J. Pediatr.* 123 : 435-438, 1993.
- Dollberg, S., Warner, B. W., Myatt, L. : Urinary nitrite and nitrate concentrations in patients with idiopathic persistent pulmonary hypertension of the newborn and effect of extracorporeal membrane oxygenation. *Pediatr. Res.* 37 : 31-34, 1995.
- Trachtman, H., Gauthier, B., Frank, R., Futterweit, S., Goldstein, A., Tomczak, J. : Increased urinary nitrite excretion in children with minimal change nephrotic syndrome. *J. Pediatr.* 128 : 173-176, 1996.
- Wennmalm, Å., Benthin, G., Edlund, A., Jungersten, L., Kieler-Jensen, N., Lundin, S., Westfelt, U. N., Petersson, A. S., Waagstein, F. : Metabolism and excretion of nitric oxide in humans : An experimental and clinical study. *Circ. Res.* 73 : 1121-1127, 1993.
- Tsukahara, H., Hiraoka, M., Hori, C., Miyanomae, T., Kikuchi, K., Sudo, M. : Age-related changes of urinary nitrite/nitrate excretion in normal children. *Nephron.* 76 : 307-309, 1997.
- Tsukahara, H., Hata, I., Sudo, M. : Urinary nitrite versus nitrate excretion in children. *J. Pediatr.* 129 : 161, 1997.
- Tsukahara, H., Kikuchi, K., Matsuda, M., Saito, M., Hata, I., Tsuchida, S., Sudo, M. : Endogenous nitric oxide production in Kawasaki disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 57 : 43-47, 1997.
- Tsukahara, H., Miyanomae, T., Sudo, M. : Urinary nitrite/nitrate levels in children with bronchial asthma. *Eur. J. Pediatr.* 156 : 667, 1997.
- Tsukahara, H., Kikuchi, K., Tsumara, K., Kimura, K., Hata, I., Hiraoka, M., Sudo, M. : Experimentally-induced acute hyperinsulinemia stimulates nitric oxide production in humans : Detection using the urinary $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ excretion. *Metabolism.* 46 : 406-409, 1997.
- Bank, N., Aynedjian, H. S. : Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney. Int.* 43 : 1306-1312, 1993.
- Artlich, A., Hagenah, J. U., Jonas, S., Ahrens, P., Gortner, L. : Exhaled nitric oxide levels in childhood asthma. *Eur. J. Pediatr.* 155 : 698-701, 1996.
- Barnes, P. J., Liew, F. Y. : Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol. Today.* 16 : 128-130, 1995.
- Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B. : Nitric oxide and oxygen radicals : A question of balance. *FEBS Lett.* 369 : 131-135, 1995.
- Anderson, E. A., Mark, A. L. : The vasodilator action of insulin : Implications for the insulin hypothesis of hypertension. *Hypertension.* 21 : 136-141, 1993.
- Reaven, G. M. : Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev.* 75 : 473-486, 1995.
- Baron, A. D. : Hemodynamic actions of insulin. *Am. J. Physiol.* 267 (Endocrinol Metab 30) : E187-E202, 1994.
- Scherrer, U., Randin, D., Vollenweider, P., Vollenweider, L., Nicod, P. : Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J. Clin. Invest.* 94 : 2511-2515, 1994.
- Zeng, G., Quon, M. J. : Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin : Direct measurement in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 98 : 894-898, 1996.