招請論文

呼吸器系における一酸化窒素 (NO) の病態生理学的役割

塚 原 宏 一

福井医科大学医学部小児科

要 旨

一酸化窒素 (NO) はNO合成酵素の働きによりL-arginineを基質として生合成されるフリーラジカルである。呼吸器系を構成するほぼすべての細胞がNOを産生することから、NOは生理的にも様々な呼吸器疾患においても重要な役割を果たすと考えられる。

著者らは、以前より血管内皮の病態生理について臨床的および実験的研究を推進してきた。本論文では、それらの研究成果に基づいて血管内皮、NOを軸とした呼吸器系の病態生理について論じる。

肺の血管内皮は肺血流や換気血流均衡を調節することで血液の効率的な酸素化に寄与している。また、血管内皮は気道-血管関門を構築し白血球の接着浸潤を抑制することで気道のホメオスタシスを維持している。ところが、気管支喘息などの炎症性肺疾患では誘導合成されたNOは活性酸素種と相互作用し組織障害性の強い活性窒素種に変化する。このような酸化ストレスが亢進すると血管内皮機能は低下し、肺の組織障害はさらに進展する。こうしたパラダイムに基づいて、近年NOが創薬ターゲットとして注目されている。NOガス吸入療法はその代表である。

1. 一酸化窒素の (病態) 生理作用

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は分子内に不対電子を1個含むフリーラジカルである。一般的にラジカルは反応性が高く不安定で寿命も短い。NOは比較的安定で反応性も低いことが知られている。ただし、反応の対象がラジカルや遷移金属イオンの場合にはNOは高い反応性を示す^{1,2)}。NOは従来より喫煙や大気汚染の有毒ガスとして悪名高い窒素酸化物とされていたが³⁾、1980年代に入ってNOが生体内の重要な酸化還元 (“レドックス”) 制御因子、情報伝達因子として脚光を浴びるようになり、それに対する認識は一変した^{4,5)}。

生体内では、通常NOは一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase, NOS) を介して合成される^{4,5)}。NOSには神経型 (NOS1)、誘導型 (NOS2)、内皮型 (NOS3) と少なくとも3種類のアイソザイムが存在し、それぞれ多種の細胞内に存在する。一方、低酸素酸性条件下では亜硝酸 (NO_2^-) が化学的にあるいは酵素的にNOに還元される経路も存在することが知られている⁶⁾。

NOはラジカルとして生体内の多様な反応に関わる⁴⁻⁶⁾。また、NOと種々の構成成分との化学反応あるいは相互作用を通じて生成されたNO由来派生物にも生理

活性を持つ物質が多く含まれている^{1,2)}。このことが生体内NOの病態生理を複雑にし、また奥行きを深くしている要因でもある。

NOは呼吸器系を構成する多くの細胞で産生される⁷⁾。鼻腔、副鼻腔、気道、肺胞の各上皮細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などにNOS2あるいはNOS3が存在する。またNOは抑制性非アドレナリン非コリン性神経 (NOS1を有する) の伝達物質でもある。加えて、好酸球、好中球、単球マクロファージ系細胞、T細胞もNOSを有し、呼吸器系においてNOは生理的にも様々な呼吸器疾患においても重要な役割を果たす⁷⁾。

鼻腔から肺胞までのすべての上皮細胞がNOを産生し粘液相に放出するが、その一部は気化し気道内にガスとして放出される⁸⁾。実際、ヒトの呼気中にはNOが微量 (数ppbレベル) ながら存在する。数ppbレベルのNOガスは気道内では極めて安定である (半減期は約200日; 第6章を参照)。健康状態では内因性NOガスをautoinhalationすることで等濃度のNOが全気道に行き渡り、呼吸機能を協調的に調節していると思われる (“aerocrine制御”)。

肺で産生されたNOの一部は、 O_2 やそれ由来の活性酸素種 (O_2^- など) との相互作用を通じて酸化性と組織障害性を獲得した活性窒素種 (ONOO^- など) に変化する

る^{1,2,7,8)}。この“酸化ストレス”は多様な経路で肺に影響を及ぼすが、それは生体に備わった一連の抗酸化酵素または低分子抗酸化物質により捕捉制御される(“レドックス制御”)。生体内の抗酸化システムで制御しきれない過剰の酸化ストレスが生じた場合に、組織障害や細胞死が惹起される^{7,8)}。

2. 内因性NO産生と酸化ストレス

ヒト、特に小児を対象として内因性のNO産生を評価した報告は意外に少ない。この方面の研究について、著者らは中心的な役割を果たした。

生体内で合成されたNOはO₂、スーパーオキシド(O₂⁻)などのラジカルや遷移金属イオンその他と反応し、最終的に亜硝酸(NO₂)、硝酸(NO₃)まで酸化される(まとめてNO_x⁻)⁵⁾。従って、生体試料中のNO_x⁻濃度を測定することにより内因性のNO産生を評価できる^{5,9,10)}。

著者らはまず正常小児の年齢、性別の尿中NO_x⁻濃度を求めた^{11,12)}。この正常値を対照にして川崎病¹³⁾、気管支喘息¹⁴⁾(図1)の患者において内因性NO産生が増加していることを示した。後者の結果は喘息患者の呼気中に高濃度のNOが検出されるという他グループからの報告¹⁵⁾と一致する。喘息患者における過剰のNO産生は、気道の慢性炎症に伴って気道上皮細胞、免疫担当細胞、血管内皮細胞で誘導されたNOS2に主により由来するとされる⁷⁾。これらの患者の呼気中の過酸化水

図1. 気管支喘息患者の尿中NO_x⁻排泄量¹⁴⁾。

平均 (SD) で表示した。*p<0.05 vs. 正常対照。

素(H₂O₂)、一酸化炭素(CO)濃度も高いこと¹⁶⁾も考慮に入れると、喘息患者の気道では酸化ストレスが亢進していることが推測される。さらに、早産児のうち新生児呼吸窮迫症候群を呈し酸素補充を受けた患者では内因性のNO産生のみならず(図2)^{17,18)}、O₂⁻産生も増加すること(尿酸排泄の増加)¹⁹⁾、glutathione peroxidase, thioredoxin reductaseなどの抗酸化酵素系は減弱すること(セレン排泄の減少)²⁰⁾も認められた。

著者らは、細菌性髄膜炎患者の脳脊髄液中NO₂⁻、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)濃度が増加することも見出した^{21,22)}。NO産生、酸化ストレスともに中枢神経系で亢進することが細菌性髄膜炎の病態形成(脳血管関門破綻、脳細胞障害など)に関与することを示唆するデータである。

一方、アトピー性皮膚炎患者ではNO産生が低下(NO_x⁻排泄の低下)していながら、酸化ストレスが亢進していること(8-OHdG排泄の増加)も観察した(図3)²³⁾。実験的にも、NO合成を慢性的に阻害されたラットでは酸化ストレスが増加することを見出した(NO_x⁻排泄の低下、8-OHdG排泄の増加)(図4)²⁴⁾。このNO欠乏ラットは骨症²⁵⁾、腎症²⁶⁾など多彩な病像

図2. 新生児の尿中NO_x⁻排泄量¹⁷⁾。

平均 (SD) で表示した。*p<0.05 vs. 同日齢の満期産児, **p<0.05 vs. 同日齢の満期産児, #p<0.05 vs. 同日齢の呼吸障害を呈さなかった早産児。

を呈することが知られている。

以上の結果から、炎症性疾患においては、NOS2が誘導されNO産生が増加している場合には他の活性酸素種、活性窒素種の増加と相まって酸化ストレスが亢進するが、一方、炎症の遷延化に伴いNOS活性が疲弊した環境でも酸化ストレスは亢進するという仮説をわれわれは提唱している²⁴⁾。

加えて、著者らはinsulinの静脈内投与によって内因性のNO産生が短時間のうちに増加する現象も観察した²⁷⁾。これは血管内皮に存在するNOS3活性の亢進に起因する。インスリン抵抗状態ではNOS3活性が低下するが、そのことが(前述の仮説から)酸化ストレスを増加させ、血管障害ひいては組織障害を導くと考えられる。

図3. アトピー性皮膚炎患者の尿中NOx⁻, 8-OHdG排泄量²³⁾。

平均 (SD) で表示した。正常対照 : n=25 ; アトピー性皮膚炎 (AD) : n=27。*p<0.05, **p<0.005 vs. 正常対照。

3. NOによる肺微小血管内皮機能の制御

肺組織は基本的には気道と肺胞から構成される。気道は気管から終末細気管支まで空気伝導路としての役割を果たし、呼吸細気管支の移行部を経て肺胞に至りガス交換機能を荷う。この内腔面を連続性に被覆する上皮細胞の機能にほぼ対応するように、それぞれの領域に位置する血管は特にその内皮細胞において特徴的

図4. 8週齢から4週間投薬を受けた12週齢ラットの尿中NOx⁻, 8-OHdG排泄量²⁴⁾。

平均 (SD) で表示した。L-NAME: nonselective NOS inhibitor, AG (aminoguanidine): NOS2 inhibitor. (上図) *p<0.05 vs. control, **p<0.05 vs. control, L-NAME+L-arginine, ***p<0.05 vs. control, L-NAME+L-arginine, AG. (下図) *p<0.05 vs. control, L-NAME (80mg/dL), **p<0.05 vs. control, L-NAME+L-arginine, ***p<0.05 vs. control, L-NAME+L-arginine, AG.

な性質を持つことが最近わかってきた。

肺の研究については今まで主に気道上皮細胞が注目を受けていた。しかし、炎症の形成、増悪において重要な役割を果たす気道-血管関門の破綻や白血球の肺への浸潤、あるいは肺高血圧症における血管内皮機能不全の重要性を考慮すると、肺血管内皮細胞の生理と病理を探究することも極めて重要な研究テーマであると考えられる。このような観点から、著者らは肺血管内皮細胞による呼吸機能制御機構を解明するための実験的研究も推進している。

培養ヒト肺微小血管内皮細胞は主に肺泡毛細血管に

由来する。著者らはこの細胞を用いて以下の事項を明らかにした。(a) 過剰のNOは内皮細胞の細胞外基質への接着をcGMP非依存性に抑制する(図5)。これは内皮細胞の $\alpha_v\beta_3$ integrinがNOにより酸化修飾されるためと推定される。また、 α -thrombinによる肺微小血管内皮細胞の接着抑制はNOS3由来のNOに部分的に依存する(図6)。なお、これらの結果はelectrical cell-substrate impedance sensor (ECIS) を用いた実験により得られたものである²⁸⁾。(b) tumor necrosis factor- α により活性化された内皮細胞への白血球の接着は共存する過剰のNOにより低下するが、それはICAM-1、

図5. ヒト肺微小血管内皮細胞の細胞外基質 (fibronectin) 接着の計測 (ECIS法)²⁸⁾

(上図) cell attachmentの実験。右は細胞を播いた後4時間経過した時点での接着抵抗。平均 (SE) で表示した。
 * $p < 0.05$ vs. control, L-arginine, L-NAME, Br-cGMP, ** $p < 0.05$ vs. control, L-arginine, L-NAME, Br-cGMP, *** $p < 0.05$ vs. control, L-NAME, Br-cGMP. (下図) cell detachmentの実験。NO donors (SNAP, Sper-NO), L-arginineは細胞接着を制御するが、NOS inhibitor, cGMP analoguesにはそのような作用がない。

図6. α -thrombinのヒト肺微小血管内皮細胞の細胞外基質 (fibronectin) 接着に対する作用とその情報伝達 (ECIS法)²⁸⁾.

平均 (SE) で表示した。矢印: α -thrombin (1 U/ml) 添加。(上図) * $p < 0.05$ vs. thrombin alone, LY-83583 (guanylate cyclase inhibitor) + thrombin, ** $p < 0.05$ vs. thrombin alone, LY-83583 + thrombin。(下図) NOS3 knock-downの実験。* $p < 0.05$ vs. control, sense S-ODN, scrambled S-ODN.

VCAM-1などの接着分子の細胞表面での発現がNOにより抑制されるためである²⁹⁾。NOが転写因子NF- κ Bの活性化を負に制御することで、接着分子の誘導を抑えると思われる。

以上の実験結果から、肺では過剰のNOは気道-血管関門の破綻を招くが、一方では、NOは白血球の接着、浸潤を抑制する働きを持つことが推測される。NOには肺の炎症を誘発させる作用と炎症を抑制する作用が存在することになるが、それらの発現もまたレドックス制御を受けると考えられる。

4. 血管内皮におけるNO産生と情報伝達

NOの直接定量はきわめて困難とされていたが、近年NOをその場で感度よく定量することを目的とした研究が進展した。電気化学的定量法がその1つであるが、その原型はClark型の酸素電極を対NO用に改変したものである (図7)³⁰⁾。

著者らはNO電極を応用することにより培養血管内皮細胞 (主に微小血管内皮細胞) におけるNO産生の調節機構を明らかにした。その事項を以下にまとめる。

(a) 血管内皮細胞は endothelin-1 (ET-1), bradykinin, α -thrombin, insulin-like growth factor (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin などの血管作動因子に反応して10秒以内にNOを産生し細胞外に放出する(図7)³¹⁻³⁴。(b) このNO産生はprotein kinase Cの活性化により抑制されるが, protein kinase Aの影響は受けない³¹。(c) ET-1, IGF-1によるNO産生の促進はtyrosine kinaseの活性化に依存する(図8, 9)^{32, 33}。すなわち, 血管内皮細胞にはET-1 $\Rightarrow$ ET-B receptor $\Rightarrow$ tyrosine kinase $\uparrow \Rightarrow$ NOS3 $\uparrow$ および IGF-1 $\Rightarrow$ IGF-1 receptor $\Rightarrow$ tyrosine kinase $\uparrow \Rightarrow$ NOS3 $\uparrow$ の情

図7. NO電極による血管内皮細胞由来のNOの定量 (amperometry法)³⁰⁾。

(上図) NOがanodeで1電子酸化されることで電流が発生する。NO=NO⁺+e⁻。(下図) ヒト臍帯静脈内皮細胞のNO産生。矢印: 血管作動因子の添加。10pA=35nM NO。

報伝達経路が存在する。

さらに, 血管内皮細胞膜には電位依存性Na channelsが存在することをwhole-cell patch clamp法を用いて証明した(図10)³⁵。この結果から, membrane depolarization $\Rightarrow$ Na⁺ entry $\uparrow \Rightarrow$ Na⁺-Ca²⁺ exchange / Na channel gating $\uparrow \Rightarrow$ G-proteins $\uparrow \Rightarrow$ cytosolic Ca²⁺ $\uparrow \Rightarrow$ NOS3 $\uparrow$ の経路の存在も示唆される。また, NOが血管作動因子 (ET-1など) の平滑筋細胞へのシグナル伝達をcGMP非依存性に遮断することも明らかにした(図11)³⁶。

NOS3とL-arginine輸送体は血管内皮細胞膜のcaveolinと呼ばれるドメインに局在する。ここには血管作動因子受容体, G-proteins, Ca channelsなども存在することから, caveolinは情報伝達, Ca動員の制御に関わるとされる。NOS3とL-arginine輸送体がcaveolinに局在することは, 血管作動因子や予力に伴うCa動員に

図8. ET刺激によるヒト臍帯静脈内皮細胞のNO産生 (NO電極による計測)³³⁾。

最大反応 (ピーク電流) を比較した。平均 (SE) で表示した。(A) ET-1, IRL1620 (ET-B receptor agonist) とNO産生との用量反応関係。(B) 低濃度ET-1 (100pM) に対する反応はCMZ (calmidazolium), BAPTAではなく, GEN (genistein: tyrosine kinase inhibitor) で抑制される。

よるNOS3の活性化が効率的に行われるのに都合が良い。著者らは血管内皮細胞にgreen fluorescent protein (GFP)-caveolin fusion protein遺伝子を導入し、細胞膜に発現したcaveolinの分布を観察した³⁷⁾。caveolinは非刺激状態では集積して存在するが、細胞がNO供与体や血管作動因子で刺激されると分断されることを見出した(後者はNOS3依存性であった)。このようなtopologic regulationは、NOによるNOS活性の負制御や血管作動因子の情報伝達経路の遮断に関連すると考えられ興味深い(図12)。

以上のような機構を介して、血管内皮細胞は様々な刺激に活発に反応してNOを産生し、他からの情報伝達を制御しながら瞬時瞬時に血管の緊張を変化させ、血流や血圧を調節していると推定される³⁷⁾。

図9. IGF-1 (4ng/ml) 刺激による血管内皮細胞のNO産生 (NO電極による計測)³²⁾。

最大反応(ピーク電流)を比較した。平均(SE)で表示した。(A) ヒト臍帯静脈内皮細胞の実験。(B) ラット腎臓微小血管内皮細胞の実験。* $p < 0.05$ vs. IGF-1 alone, dexamethasone + IGF-1。

5. NOによる血管新生の制御

血管新生には個体発生、発育で代表される生理学的なものと同創傷治癒、虚血性疾患で代表される病理学的なものと同種類ある。新生因子の刺激を受けた血管内皮細胞は刺激の方向へと遊走を開始する。血管新生を正に制御する因子としてendothelins (ET) とVEGFは重要である。これらのペプチドは低酸素状態で転写が誘導されるという特徴を有する。

著者らはin vivo (鳥胚漿尿膜の血管新生モデル, ラットの腎虚血モデル), in vitro (Transwell chamber遊走実験, ECIS) の両系で、ETやVEGFで誘導される血管新生が各ペプチドで活性化されたNOS3由来のNOによって推進されることを示した^{34, 37)}。

細胞レベルでは、NOがfocal adhesion kinase, paxillinのtyrosine磷酸化を修飾し接着斑のturnoverを亢進させることにより遊走を準備させる現象(“podokinesis”)を観察した³⁷⁾。NO欠乏状態では細胞のpodokinesisは抑制される。一方、第3章で記したようにNO過剰状態では内皮細胞は細胞外基質から離解する。いずれの環境でも血管内皮細胞の遊走能力は低下し、正常な血管新生は営まれないと推定される。

6. NOの臨床応用

これまで述べてきたパラダイムに基づいて、呼吸器系疾患におけるNO関連物質の臨床応用について論じる。

第1, 4, 5章で示したように、NOの生理作用は多岐に渡り多くの情報伝達経路ともクロストークする。さらに、NO欠乏では酸化ストレスが亢進し多臓器障害を呈する。従って、非選択的に強力にNOの産生あるいは活性を消去することを指向した治療は極めて危険でありむしろ禁忌と言って良い。一方、第1章で述べたようにNOは有毒ガスとして扱われるラジカルであり、過剰のNOを患者に投与することもまた危険である。

第2章で示したように、炎症性疾患ではNOS2が誘導されNOを含めた活性窒素種、活性酸素種が多量に発生し、組織や細胞を酸化的に損傷することが多い。このような環境下では、第3, 4, 5章の中で記した病理により血管内皮機能不全が起こりえる。従って、炎症性肺疾患の治療として過剰発現したNOS2を選択的に

図10. ラット腎臓微小血管内皮細胞におけるTTX (tetrodotoxin) 抑制性Na channel (Whole-cell patch clamp法)³⁵⁾.

(A) 膜電位を-100mVから-70mV～+50mVまで(10mVずつ)増加させると-50mV～-40mVで内向きNa電流が発生する。右下は固定電位と内向き電流との関係図。(B) 膜電位を-100mVから-10mVまで増加させた時に発生する内向きNa電流に対するTTXの抑制効果。

抑制する療法が期待されるが、同時に血管内皮機能が保全されるよう留意する必要がある。健康肺ではNOSが広範に発現し呼吸機能を維持していることを考えると、NOS2選択的阻害剤の用量はNOS2特異性に重点を置いて設定されるべきである。また、臓器特異性を高めるためにNOS2選択的阻害剤の吸入療法の開発も望まれる。活性酸素種、活性窒素種を捕捉するための抗酸化因子、NOSの基礎活性を維持するための基質(L-arginine)や補因子の補充療法もそれらの欠乏があれば行うべきであろう。

ところで、気管支喘息の発作予防¹⁵⁾や新生児呼吸窮迫症候群の遷延予防³⁸⁾の目的に使用されるステロイド剤は、転写因子NF- κ B活性化を抑えて効力を発揮するNOS2選択的阻害剤でもある。

著明な肺高血圧が原発的あるいは続発的に発症することがある。後者については急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome, ARDS)に続発するものが有名である。ARDSに特徴的な肺血管透過性の亢進は活性酸素種や活性窒素種の過剰産生によるところが大きい。このような酸化ストレスの増大が肺血

図 11. 血管平滑筋細胞のET-1/ET-A receptor系に対するNOの作用 (仮想図)³⁶⁾.

NOはET-1/ET-A receptor結合親和性を低下させ、また、ET-1によるG-proteinsを介するCa流入を抑制する。これらの効果はcGMP非依存性である。

管内皮機能不全を導くと考えられる。現在注目されているNOガス吸入療法は、肺高血圧あるいは換気血流不均衡の改善により血液酸化を増加させることを目的とした肺血管選択性の極めて高い治療手段であり、ARDSもその適応疾患の中に入っている^{8,39)}。炎症性肺疾患では気道閉塞を合併することが多いが、気管支鏡下で閉塞部周辺にNOガスを導き閉塞を解除した後、NOS2選択的阻害剤を炎症局所に吸入させる二段階療法も今後開発されるべき領域となろう。

ところで、NOガス吸入療法を施行する際にその発生が憂慮される二酸化窒素 (NO₂) は酸化損傷性が高い窒素酸化物である。よって、NO₂発生を最小限に抑えることが臨床上重要なテーマになる^{8,39)}。そのためにはNOを含む窒素酸化物の化学反応機構を十分に理解しておかなければならない。

気相におけるNOの酸化反応： $2\text{NO} + \text{O}_2 = 2\text{NO}_2$ は3次反応であり、NO₂の発生速度 ($-\text{d}[\text{NO}]/\text{dt} = +\text{d}[\text{NO}_2]/\text{dt} = 2k[\text{NO}]^2[\text{O}_2]$) は速度定数kだけでなくNO濃度の2乗とO₂濃度に比例する²⁾。この微分方程式を解くと、 $t = 1/(2k[\text{O}_2][\text{NO}]_0) \times f/(1-f)$ (ただし、 $[\text{NO}]_0 = \text{initial}[\text{NO}]$, $f = [\text{NO}_2]/[\text{NO}]_0$) となり、NOがある割合fだけNO₂に酸化されるまでに要する時間tは速度定数k、最初のNO濃度およびO₂濃度に逆比例することが理解できる。われわれは、過去80年間の研究報告からk値が $k = 1.2 \times 10^3 e^{530/T}$ ($\text{L}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) のArrheniusの式で表されることを導いた²⁾。室温ならば $k = 7.0 \times 10^3 \text{L}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ と計

図 12. 血管内皮細胞の情報伝達におけるtopologic regulation (仮想図)³⁷⁾.

caveolinは非刺激状態では集積して存在するが、細胞がNO供与体や血管作動因子で刺激されると分断される。結果として、内皮細胞の刺激反応性は一時的に低下する。

算される。NOガス吸入療法でのO₂濃度はNO濃度の約10⁵倍であるので一定と考えてよい。従って、ある決められたO₂, NO濃度から任意濃度のNO₂が発生するまでの時間が前記の式を用いて計算できることになる (例えば、60% O₂下、80ppmのNOを吸入した場合、NO₂濃度が短期曝露限界である5ppmに達するのはわずか1分である)^{2,8)}。

加えて、著者らはNOガスが高压で保存された場合に見られるNO₂と一酸化二窒素 (笑気: N₂O) に分解される反応： $3\text{NO} = \text{NO}_2 + \text{N}_2\text{O}$ の速度式を導き、米国NHLBI workshop (1993) での合意事項の1つ (“吸入用NOは低压で保存しなければならない”) の理論的根拠を提出した⁴⁰⁾。

参考文献

- 1) Bonner FT, Stedman G. The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In *Methods in Nitric Oxide Research* (Feelisch M, Stamler JS, eds), Chichester, John Wiley & Sons, 3-18, 1996.
- 2) Tsukahara H, Ishida T, Mayumi M. Gas-phase oxidation of nitric oxide: Chemical kinetics and rate constant. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 3: 191-198, 1999.
- 3) Gong H Jr. Health effects of air pollution: A review of clinical studies. *Clin Chest Med* 13: 201-214, 1992.
- 4) Moncada S, Palmer MJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-141, 1991.
- 5) 塚原宏一, 須藤正克. 一酸化窒素の生理, 病態, 分析. *小児科学年鑑* (小児科の進歩 17) 197-202, 1997.
- 6) Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL. Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. *Arch Biochem Biophys* 357: 1-7, 1998.
- 7) Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 538-551, 1994.
- 8) 塚原宏一. NO吸入療法の基礎と臨床. 4th *New Topics of Clinical Immunology & Allergy* (アレルギーとNO) 19-27, 2000.
- 9) 塚原宏一, 堀 親秀, 畑 郁江, 土田晋也, 平岡政弘, 津村久美, 菊池 清, 眞弓光文. 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. *日本小児腎臓病学会雑誌* 11: 79-89, 1998.
- 10) 塚原宏一. 小児疾患における一酸化窒素 (NO). *腎とフリー・ラジカル* 第4集 82-88, 1998.
- 11) Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Miyanome T, Kikuchi K, Sudo M. Age-related changes of urinary nitrite/nitrate excretion in normal children. *Nephron* 76: 307-309, 1997.
- 12) Tsukahara H, Hata I, Sudo M. Urinary nitrite versus nitrate excretion in children. *J Pediatr* 130: 161, 1997.
- 13) 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.
- 14) Tsukahara H, Miyanome T, Sudo M. Urinary nitrite/nitrate levels in children with bronchial asthma. *Eur J Pediatr* 156: 667, 1997.
- 15) Baraldi E, Azzolin NM, Zancanato S, Dario C, Zacchello F. Corticosteroids decrease exhaled nitric oxide in children with acute asthma. *J Pediatr* 131: 381-385, 1997.
- 16) Uasuf CG, Jatakanon A, James A, Kharitonov SA, Wilson NM, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide in childhood asthma. *J Pediatr* 135: 569-574, 1999.
- 17) Tsukahara H, Takeuchi M, Hata I, Hiraoka M, Kotsuji F, Sudo M, Mayumi M. Assessment of endogenous nitric oxide formation in newborns: Measurement of urinary nitrite and nitrate concentrations. *Biol Neonate* 72: 322-326, 1997.
- 18) Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Tsuchida S, Hata I, Nishida K, Kikuchi K, Sudo M. Urinary nitrite/nitrate excretion in infancy: Comparison between term and preterm infants. *Early Human Dev* 47: 51-56, 1997.
- 19) Tsukahara H, Hiraoka M, Hori C, Tsuchida S, Uchida H, Fujisawa K, Konishi Y, Sudo M. Urinary uric acid excretion in term and premature infants. *J Paediatr Child Health* 32: 330-332, 1996.
- 20) Tsukahara H, Deguchi Y, Hiraoka M, Hori C, Kimura K, Kawamitsu T, Konishi Y, Kusaka Y, Sudo M. Urinary selenium excretion in infancy: Comparison between term and preterm infants. *Biol Neonate* 70: 35-40, 1996.
- 21) Tsukahara H, Haruta T, Hata I, Mayumi M. Nitric oxide in septic and aseptic meningitis in children. *Scand J Clin Lab Invest* 58: 73-80, 1998.
- 22) Tsukahara H, Haruta T, Ono N, Kobata R, Fukumoto Y, Hiraoka M, Mayumi M. Oxidative stress in childhood meningitis: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentration in cerebrospinal fluid. *Redox Rep* 5: 295-298, 2000.
- 23) Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 69: 223-228, 2001.

- 24) Tsukahara H, Hiraoka M, Kobata R, Hata I, Ohshima Y, Jiang M, Noiri E, Mayumi M. Increased oxidative stress in rats with chronic nitric oxide depletion: Measurement of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion. *Redox Rep* 5: 23-28, 2000.
- 25) 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* 270 (Endocrinol Metab 33): E840-E845, 1996.
- 26) Tsukahara H, Tsuchida S, Imura T, 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* 38: 614-618, 1996.
- 27) Tsukahara H, Kikuchi K, Tsumura 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.
- 28) Tsukahara H, Noiri E, Jiang M, Hiraoka M, Mayumi M. Role of nitric oxide in human pulmonary microvascular endothelial adhesion. *Life Sci* 67: 1-11, 2000.
- 29) 塚原宏一. 全身性炎症性疾患における一酸化窒素 (NO) の病態生理学的意義. *日本小児アレルギー学会誌* 14: 352, 2000.
- 30) 塚原宏一, 須藤正克, Michael S. Goligorsky. 血管内皮細胞より放出された一酸化窒素 (NO) の化学センサによる定量. *発達腎研究会誌* 3: 27-32, 1995.
- 31) Tsukahara H, Gordienko DV, Goligorsky MS. Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 722-729, 1993.
- 32) Tsukahara H, Gordienko DV, Tonshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS. Direct demonstration of IGF-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int* 45: 598-604, 1994.
- 33) Tsukahara H, Ende H, Magazine HI, Bahou WF, Goligorsky MS. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ET_B receptor in endothelial cells: Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 21778-21785, 1994.
- 34) Goligorsky MS, Budzikowski A, Tsukahara H, Noiri E. Cooperation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 269-271, 1999.
- 35) Gordienko DV, Tsukahara H. Tetrodotoxin-blockable depolarization-activated Na^+ currents in a cultured endothelial cell line derived from rat renal interlobar artery and human umbilical vein. *Pflügers Arch* 428: 91-93, 1994.
- 36) Goligorsky MS, Tsukahara H, Magazine H, Andersen TT, Malik AB, Bahou WF. Termination of endothelin signaling: Role of nitric oxide. *J Cell Physiol* 158: 485-494, 1994.
- 37) Goligorsky MS, Noiri E, Tsukahara H, Budzikowski AS, Li H. A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction. *Acta Physiol Scand* 68: 33-40, 2000.
- 38) Tsukahara H, Watanabe Y, Yasutomi M, Kobata R, Tamura S, Kimura K, Mayumi M. Early dexamethasone therapy for prevention of chronic lung disease in preterm infants. *Biol Neonate* 76: 283-290, 1999.
- 39) Troncy E, Francoeur M, Blaise G. Inhaled nitric oxide: Clinical applications, indications, and toxicology. *Can J Anaesth* 44: 973-988, 1997.
- 40) Tsukahara H, Ishida T, Mayumi M. Gas-phase oxidation and disproportionation of nitric oxide. *Methods in Enzymology* 2002 (in press).