

## 一酸化窒素測定装置

岩元 純\*

一酸化窒素 (NO) の測定機器は化学発光方式のものが最も精度が高く、再現性や安定性に関しても優れているので、本稿では主として化学発光型の測定装置についてその原理と実用的な側面について記述する。

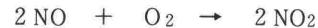
### NO の化学

NO の測定に関しては、その物理化学的性質を知っておくことが重要である。NO は分子量30.01、融点 $-163.6^{\circ}\text{C}$ 、沸点 $-151.7^{\circ}\text{C}$ 、常温常圧では、無色のガスとして存在する。参考までに、二酸化窒素 ( $\text{NO}_2$ ) は融点 $-11.2^{\circ}\text{C}$ 、沸点 $+21.2^{\circ}\text{C}$ 、高めの室温では刺激臭の強い茶色のガスであり、液相では  $\text{N}_2\text{O}_4$  との間に温度依存性の平衡を示す。NO は水にも比較的良く溶け、その溶解度は酸素よりも大きく、二酸化炭素よりも小さい。今、100%のNOを1気圧 $25.15^{\circ}\text{C}$ において水に溶かすと1.95mMの溶液になる。また、100mMのリン酸緩衝液では1.8mM、100mMの食塩水では1.62mMになると報告されている<sup>1)</sup>。この値は筆者も追試したが、正確であり、リン酸緩衝液をもちいて同一のNO溶液をつくることができた<sup>2)</sup>。ところで、NOの窒素と酸素の原子は2.5重の共有結合をしており、ローンペアの電子をもつ<sup>3)</sup>。但し、NOの軌道電子は原子核内陽子の正電荷と釣り合っており (isoelectronic)、電気的に中性である。このローンペア電子は $\pi^*$ 軌道上にあり、磁場におくとスピン共鳴 (EPR) を生じることも、古くから知られている。この信号を利用してNOの濃度測定をすることも可能である。

NOは、窒素やヘリウムなどと存在する時は、安定な物質である。但し、NOの一般的な性質であ

る遷移元素との大きな親和性によって、結合性の吸収をうける。この遷移元素との親和性に関しては、例えばNOガスの回路に銅や鉄を使えないという事実から、NOがヘモグロビンによって阻害されるという実験的事実<sup>4)</sup>に至るまで豊富な実例があり、NOがミトコンドリアの電子伝達系に何らの影響をあたえるかも知れないという推論<sup>5)</sup>の根拠にもなっている。

NOは、中程度の反応性をもつ、と教科書的にはいわれる<sup>3)</sup>。ただし、これは窒素酸化物ファミリーの $\text{NO}_2$ などとの比較においてであり、NO自体はやはり様々な物質と反応をおこす。特に高濃度のNOは酸素と瞬時のうちに反応して $\text{NO}_2$ を生じる。



ただし、臨床的に用いられている程度の濃度範囲 (ppm) では、この反応はもっと緩やかに起こるようである<sup>6-7)</sup>。また、NOが反応し結合しやすいものにハロゲンがあり、フッ素、塩素、臭素などとは nitrosyl halide (XNO) を作る。しかし、これらの物質は常温ではガス体であり、また不安定である。このなかでフッ素は比較的安定した結合をするので、最近この性質を利用して、NO吸入療法にフルオロカーボンを用いるグループもある。

NOは場合によって酸化剤にも還元剤にもなる。時折、あたかもNOが強い酸化剤のような記載に出会うことがあるが、生体内で生じたNOはむしろ酸化されて、 $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ として排泄されるわけであるから<sup>8)</sup>、自らは還元剤として働いているのかもしれない。実際、NOの $\pi^*$ 軌道の電子が結合した遷移金属に移動することも観察されている。

\*旭川医科大学生理学第一講座

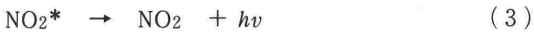
## 化学発光法の原理

化学発光の第一段階は、反応槽に導入されたNOが、オゾンと混合され、2種類の二酸化窒素（励起されない通常のNO<sub>2</sub>と励起されたNO<sub>2</sub><sup>\*</sup>）を生じるものである。



このとき、測定に必要な反応は式(1)の反応であるが、残念ながら(2)の反応よりはずっと低い割合でしか起こらない(約10%)。また、オゾンとNOの衝突をさまざまに様なる状況が存在すれば、なおさら(1)の割合は少なくなる。

第二段階では、励起されたNO<sub>2</sub><sup>\*</sup>が基底状態のNO<sub>2</sub>に変化し、この時にエネルギーが光子となって放出される。



この光は、波長が約300-6000nmにわたるもので、これを光電増倍管(PMT)によって検知する。ここで、発光を妨げる要因となるのは他分子との衝突であり、励起されたNO<sub>2</sub><sup>\*</sup>が光子を放射せずにNO<sub>2</sub>に変化してしまうことがある。この現象はクエンチング(quenching)とよばれ、せっかくの励起エネルギーが無駄に消費されてしまうものである。クエンチングをおこさせるものは数多く知られていて、その代表的なものが蒸発した水分子や二酸化炭素である。クエンチングがおこると実際の値よりも低い測定値を得ることになる。

## NOの環境基準

NOやNO<sub>2</sub>には、ちょうど放射線の曝露の限界値があるように、平均作業時間あたりの環境基準が存在する。一日8時間、一週40時間働く場合、環境の平均NO濃度(時間荷重平均限界値)は25ppm以下でなければならない。また、短時間曝露限界値は一回に15分以内、1日4回以下、及び各曝露の間隔が1時間以上という条件をみたすもので、その値は35ppmと定められている。NO<sub>2</sub>の場合は更に厳しく、各々3ppmと5ppmである。最近、肺高血圧症に対してNOを投与する治療法が試みられているが<sup>9-10)</sup>、今患者に対してこのNO基準を単純に適用すると、5日間、24時間の連続NO吸入治療に対して、約8.3ppmが使用できる平均濃度となる。実際には、治療に何日要す

るかわからないので、このような計算は勿論不可能である。

## NO測定装置

現在、わが国で商品として流通している化学発光型のNO測定器は、基本的に環境測定用機器であるから、そのほとんどが大気の連続的な濃度変化を測定することを目的としている。得られるデータはNO及びNO<sub>2</sub>の濃度である。その他、研究用に開発されたNOの実量のみを測定するものもあるが、それについては後述する。

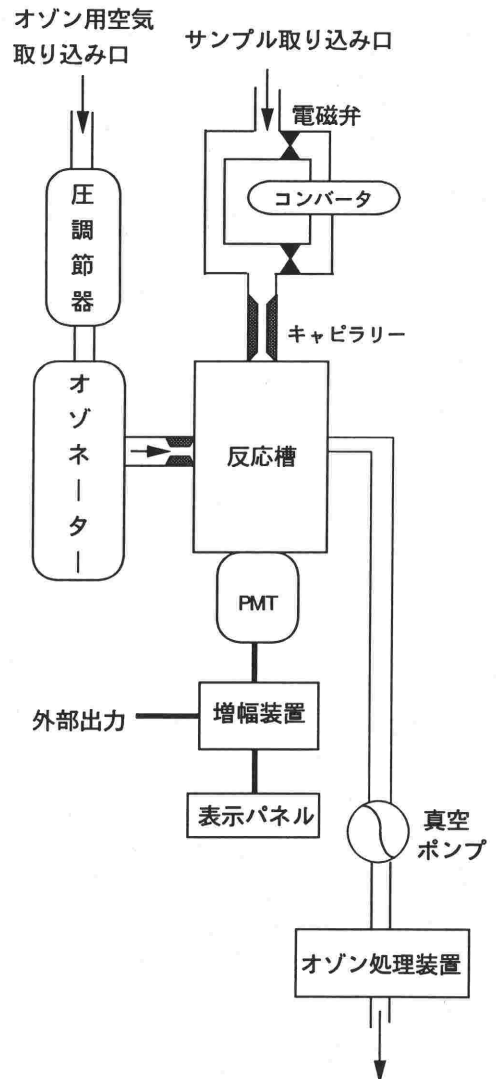


図1

NO 測定器は、図1に示すように、次の4つの部分から構成される。

- 1) サンプルの流入路
- 2) オゾン発生装置
- 3) サンプル-オゾン反応槽
- 4) 光電増倍管 (PMT)

NO 測定の最終段階は光量測定であるから、機器設計上、厳密で単純な基準が必要である。すなわち、効率のよい発光環境をつくる、感度のよい光検出システムをもつ、一次信号を直線性のよい低ノイズ信号に迅速に変換する、の3点である。この3つの基準を満足させるために機器の各部分がどのように作動しているかを、以下略述する。

A. サンプル流入路

サンプルの取り込み口から反応槽までの経路は2本の流路があり、サンプルは電磁弁により時間毎にどちらか一方の流路を流れ、最終的に反応槽に導かれる。この一方の流路にコンバータがあり、モリブデンなどの金属触媒によって、NO<sub>2</sub>をNOに還元する。機種によっては反応槽を2つ持つものもあり (Eco Physics 社, CLD7000AL), 二つの流路にサンプルを流してNOとNO<sub>2</sub>を個別に又連続的に測定する。

B. オゾネーター

オゾネーターは高電圧を用いて大気中の酸素からオゾンを生産する。



ここで問題となるのは、オゾネーターに入る大気そのものに多量のNOやNO<sub>2</sub>が含まれている場合である。この時は、出来たオゾンが反応槽にはいる前に、オゾネーター内で(1)(2)式の反応が起こり、オゾン濃度が低下する(従って測定値が低く出る)恐れがある。サンプル取り込み口から入る大気とオゾネーターに入る大気が同一ならば、減少分を理論的に計算をすることも可能である。が、できればオゾネーターへ供給される酸素は清浄なものであってほしい。機器によっては、あらかじめ純酸素のタンクを用いるように指定されているものもある。

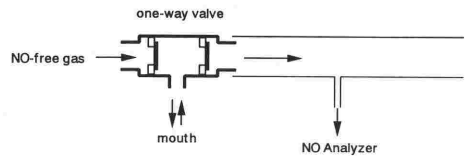
C. 反応槽とPMT

サンプルガスは、真空ポンプによって減圧されたを反応槽とサンプル流路の間の圧差が駆動力となって、反応槽の中に吸い込まれる。反応槽とサンプル流路の間にある毛細管の抵抗は、大きな圧

差を生みだすとともに、一定の流量を保障することに寄与している(図1)。この毛細管の内径と、反応槽の減圧の程度がサンプルの流入量の決定因子となる。反応槽の減圧化は、流量の安定化のみならず、クエンチング抑制、オゾン-サンプル反応の効率化といった感度の増加にも寄与するので、機器設計上、重要な要素である。

次に、PMTであるが、これはきわめて温度依存性の高い素子で、PMT信号安定化のためには低温域での恒温化が不可欠の条件である。このようなユニット別の温度管理は、機器設計を困難なものにしている。

1. 直接採気法



2. バッグ採気法

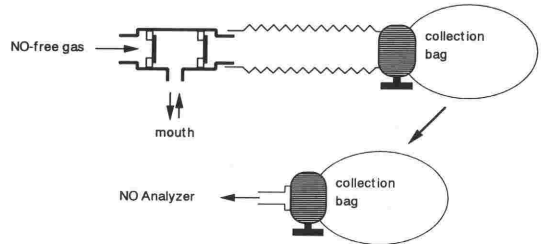


図2

NO 測定の実際と問題点

現在行われている医学分野でのNO測定は、ほとんどが呼気ガスに関するものである<sup>11-15)</sup>。一般的な方法は、被験者の呼息をチュービング内に呼出してもらい、それを側管からNO分析器の方に導くというもの(直接採気法)と、一旦バックに採気する方法がある(図2)。直接採気法(変法として、30秒ほどかけて一回呼気量全体を分析器に導くものも含む)には、実は様々な問題点がある。それらを考察することはNO分析器と呼気ガスNOの関係をより理解することになる興味深いテーマであるので、やや詳しく論ずることにする。

## A. 有限サンプル量と応答時間

サンプルガスの量が有限の場合は、最小測定可能な NO 量はメーカーのスペックで示された値とは大いに異なってくる。具体例をあげると、いま有限のサンプルガス500ml（一回呼吸量）全部が反応槽に11/minの流量で入ったとする。この量は理論的には30秒で通過してしまう量である。もしも、このサンプルガスの濃度がわずか50ppbほどなら、ほとんどの環境 NO 測定器で測定値はプラトーに達することはない（図3）。これは低濃度の NO による微弱信号（発光）のために、信号積分（加算平均）時間が延長されることが主たる原因で、その他に、低ノイズ処理のためのデータ処理プロセスによる時間消費などが挙げられる。一般的に、環境 NO の測定濃度域が100ppb以下になると精度確保のため自動的に応答時間（信号処理時間）が延長して、どんなに優れた環境機器でも分のオーダーの測定時間が必要となる。（図3、表1）。このような場合においては、バッグ採気などの方法でサンプル量を増やし、プラトー値を得ることが必要となる。また、NO 濃度のピーク値は<sup>11,12)</sup>機器の反応時間次第で変化するため、生理学的な意味を見出すことは困難である。

## B. NO 濃度測定と NO 実量測定

環境 NO 測定装置では、NO 濃度 = NO 量 / サンプルの総気体量、すなわち濃度 = 単位時間あたりの発光量 / サンプル流量で求められる。実際には、サンプル流量を一定と見なし、単純に光量の電気的信号値に定数を掛けて（割って）濃度を計算するという仕組みになっている。この内部定数は標準ガスをもちいた校正によってあらかじめ求められ、計算回路の中に組み込まれている。ただし、

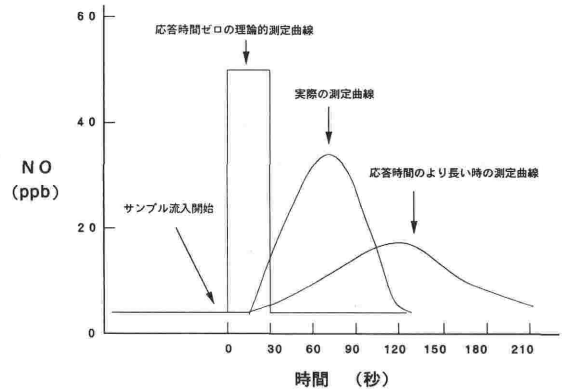


図3

表1

機種	最小検出感度	サンプル流量	応答時間
CLM-500 (島津)	5 ppb (再現性) *1	約2.5l/min (可変)	20秒以下 (T <sub>90</sub> : フルスケール500ppb時) *2
APNA-360 (堀場)	0.5 ppb	800ml/min (固定)	120秒以下 (T <sub>90</sub> : フルスケール100ppb時)
CDL700AL (Eco Physioics)	1 ppb	700ml/min (固定)	80秒以下 (T <sub>95</sub> : フルスケール100ppb時)
Model 42S (Thermo Environmental)	0.05 ppb	約11/min (固定)	5分以下 (T <sub>90</sub> : フルスケール5ppb時)
Model 2108 (Dasibi)	1 ppb	200ml/min (固定)	90秒以下 (T <sub>95</sub> : フルスケール50ppb時)
Model FES-450 (スカラテック)	2 ppb	約2l/min (可変)	5秒以下
270B-NOA (Sievers)	2 ppb (1 pmole)	175ml/min (固定)	5秒以下

注1: 実際には1ppbまで測定可能であるが、フルスケール500ppbの1%が測定再現性の保障範囲である。

注2: メーカーの発表したスペックには100ppbの測定レンジはないので、他メーカーとの比較はできない。

状況によってはサンプル流量や、PMT感度の変化が起こりうるので、外部からこの定数を修飾することが可能である（可能でない機種もある）。この二次的な定数をスパンファクターといい、濃度表示の校正を行うことができるようになってきている（Thermo Environmental社製のModel 42 seriesなど）機種によっては、ニードルバルブでサンプル流量を変えられるものもあるが（島津製作所のCLM500など）、濃度の計算は内部定数を用いているから、この場合の表示濃度はarbitrary numberと思ったほうが良い。一般的には、サンプル流量が増加すると見かけの濃度が上昇する。なぜなら、増えたサンプル流量によって単位時間あたりのシグナル（発光）が増えたにもかかわらず、内部定数を用いて濃度計算が行われるからである。同様の理由で、サンプル流量が減少すると表示濃度が低くなる。従って、校正ガスよりも低い濃度表示がでたときは、サンプル流量が減少している可能性がある。

もう一つのNO測定器のカテゴリーとして、NOの実量のみを測定表示するものがある（Sievers社製の270B-NOAや、スカラテック社のFES-450など）。これらの機器は、原則的にPMTからの一次信号を最小限に信号処理して外部に出力し、何らかの積分装置によってNOの総量を求めるようにしてある。したがって、応答時間が短く、感度の高いのが特徴である。一次信号を得られることの利点は、データを様々に解析する必要のある場合に発揮される。この種の機器で濃度を測定するには、サンプル量（換気量）を同時に測定すればよい<sup>13,14</sup>。逆に、NO濃度計を用いて、濃度と換気量からNO総量を求めることもできる<sup>15</sup>。

### NO吸入治療時の濃度モニター

肺高血圧症に対する吸入NOの濃度測定は、治療上最も重要な要件である。高濃度のNO（400-1000ppm）を40ppm程度まで希釈して行われるNO治療では、治療では、酸素との希釈の際に必ずNO<sub>2</sub>（強力な酸化剤）が産生される。NO<sub>2</sub>はメトヘモグロビン血症を引き起こすため<sup>16,17</sup>、ガスの供給側で監視する必要がある。つまり、NOとNO<sub>2</sub>（NO<sub>x</sub>）の同時監視が必要である。NO吸入治療の発祥地マサチューセッツ総合病院で

Thermo Environmental社製の化学発光式NO<sub>x</sub>分析装置を用いたために同様の製品を使う施設が次いだが、ppmの測定範囲であれば電気化学式の測定器（燃焼管用用テスター）でも充分使用可能と思われる。化学発光式機器の臨床応用上の問題としては、サンプルガスがレスピレーターの加湿加湿によって多くの水分を含んでいることである。前述したように、水は発光のクエンチングを起こすため、見かけのNO濃度が低く表示される恐れがある。また、反応槽内部やサンプル流路に水分が貯留して、機器の誤作動を誘発したり、機器を破損する恐れがある。従って、NOの連続モニターは、必要かどうか、必要であればどのように行われるべきか等を議論することが重要である。また、測定に際しては、NOや測定器の特性に習熟してから行うべきである。

### 文 献

- 1) Armor JN, Influence of pH and ionic strength upon solubility of NO in aqueous solution. *J Chem Eng Data* 19: 82-84, 1974
- 2) Iwamoto J, Morin III FC: Nitric oxide inhibition varies with hemoglobin saturation. *J Appl Physiol* 75: 2332-2336, 1993
- 3) Cotton FA, Wilkinson G: Nitrogen. In: *Advanced inorganic Chemistry*. (5th ed.), New York: John Wiley & Sons, 1988, pp304-381
- 4) Martin W, Smith JA, White DG: The mechanisms by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide, or bovine retractor penis inhibitory factor. *Br J Pharmacol* 89: 563-571, 1986
- 5) Stuehr DJ, Nathan CF: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-1555, 1989
- 6) Frostell C, Fratacci M, Wain JC, et al: Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 83: 2038-2047, 1991
- 7) Miyamoto K, Aida A, Mishimura M, et al: Effects of humidity and temperature on nitrogen dioxide formation from nitric oxide. *Lancet* 343: 1099-1100, 1994
- 8) Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, et al: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27: 8706-8711, 1988
- 9) Zayek M, Cleveland D, Morin III FC: Treatment of persistent pulmonary hypertension in the newborn lamb by inhaled nitric oxide. *J Pediatr* 122: 743-750, 1993
- 10) Roberts JD, Polaner DM, Lang P, et al: Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 340: 818-819, 1992
- 11) Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM: Increased

- amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 6 : 1368-1370, 1993
- 12) Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al : Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 181 : 852-857, 1991
  - 13) Iwamoto J, Pendergast DR, Suzuki H, et al : Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. *Respir Physiol* 97 : 333-345, 1994
  - 14) Matsumoto A, Hirata Y, Momomura S, et al : Increased nitric oxide production during exercise. *Lancet* 343 : 849-850, 1994
  - 15) Persson MG, Wilkund NP, Gustafsson LE : Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis* 148 : 1210-1214, 1993
  - 16) Iwamoto J, Krasney JA, M III FC : Methemoglobin production by nitric oxide in fresh sheep blood. *Respir Physiol* 96 : 273-283, 1994
  - 17) Kosaka H, Imaizumi K, Imai K, et al : Stoichiometry of the reaction of oxyhemoglobin with nitrite. *Biochim Biophys Acta* 581 : 184-188, 1979