論文

天然ミネラルベースの新規ナノ材料 IFMC は生体内に摂取されることなく血管内 一酸化窒素濃度を増加させる: COVID-19 とそれ以降への示唆

秋山知宏^{1,2,3,4,*,†},平田孝道^{1,5,*,†},藤本幸弘^{1,6},畠山進之介⁵,山﨑隆平⁵,野邑奉弘⁷

- 1東京都市大学総合研究所(〒158-8557東京都)
- 2神戸情報大学院大学(〒650-0001神戸市)
- 3京都大学大学院教育学研究科(〒606-8501京都府)
- 4上智大学大学院地球環境学研究科(〒102-8554 東京都)
- 5 東京都市大学大学院総合理工学研究科(〒158-8557 東京都)
- ⁶クリニックF(〒102-0083 東京都)
- 7大阪市立大学(〒558-8585 大阪府)
- * 責任著者:秋山知宏 (akiyamat@tcu.ac.jp),平田孝道 (thirata@tcu.ac.jp)
- †これらの著者は本稿に対して等しく貢献した.

受領日: 2020年7月24日, 受理日: 2020年8月27日, 出版日: 2020年8月29日

抄録:緊急を要するにもかかわらず、現在のところ、2019年に発生した新型コロナウイル ス感染症(COVID-19)の治療または予防に対して、有効な戦略は存在しない. COVID-19 の主な脅威として、呼吸器疾患に加え、血管合併症が急浮上している。既存の一酸化窒素 (NO)療法も血管系の改善に役立つことが示されているが、安全性、ユーザビリティおよ び利用可能性にはさまざまな限界がある.これを踏まえ,NO療法に基づいて開発した天然 ミネラルベースの新規ナノ材料 IFMC は COVID-19 の治療および予防に役立つ、という仮説 を立てた.本研究では、この新規ナノ材料が生体の血管内 NO 濃度の増大と血管拡張を誘導 し、その結果として血流量の増加と体温上昇を引き起こすかどうかを検討した.その結果、 IFMC を適用すると、ラット肝門血管内 NO 濃度が平均 35.2 秒間に 0.17nM 増加した. 超音 波ドップラー血流計では、血流速に差は認められなかったが、血流量と血管径に有意な増 加が認められた.これらはヒトの手の表面温度の測定によって裏付けられた.我々の知る 限り、天然ミネラルベースのナノ材料を生体に接触もしくは接近させることにより血管内 NO 濃度の増大と血管拡張が誘導されることを示すエビデンスは、本研究の結果が世界で初 めてである. 厳密な作用機序については今後の課題であるが, 内皮型 NO 合成酵素, ヘモグ ロビンおよび内皮由来過分極因子が血管内 NO 濃度の増大に深く関与していると考えられ る.

キーワード: SARS-CoV-2, COVID-19, 天然ミネラルベースのナノ材料, 一酸化窒素, ヘモ

グロビン,血流促進

1. はじめに

人類は、その進化という意味で大きな転換期に直面している.重症急性呼吸器症候群-コロ ナウイルス 2 (SARS-CoV-2) に起因する 2019 年に発生した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は世界的大流行となり、国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態となって いる.世界保健機関が発表した COVID-19 状況報告によると、2020 年 5 月 30 日時点で、全 世界で COVID-19 の確定症例は 580 万例を超え、死亡症例は 362,705 例が確認されている[1]. 症例数の爆発的増加によって、病院の対応能力が追い付かなくなり、医療制度が崩壊する 恐れがある.35 億人を超える人々(世界人口の約半分)を対象とした世界規模のロックダ ウンによって、前例のない経済、ビジネスおよび雇用の崩壊が発生する恐れがある.また、 多くの国々では、政府の監視メカニズムを導入することなく COVID-19 の拡大を予防する ための電子監視ツールを導入しており、これは権威主義的または全体主義的な監視・統制 体制への移行を伴う可能性がある[2].COVID-19 は医療制度の崩壊のみならず社会崩壊(経 済、政治、文化、世帯、個人レベルを含む)を招く恐れがある.

一方, COVID-19は, 完全な破滅を乗り越える, 新しい可能性を発見する機会ともなって いる. ロックダウンは必ずしも喪失を意味しない. 実際, 我々は, 在宅勤務への急速な移 行,自動化の加速,ロボットの導入,最低所得保障の導入,その他多くの革新を目の当た りにしている.また,ロックダウン政策により世界的な大気汚染と CO2 放出が削減したと いう初期の兆候もいくらか認められている[3,4]. COVID-19 は人類を新しい意識レベルに到 達させ、多くの人々に対して、なぜ世界というものがあり、我々はなぜ生きているのか、 どう生きるべきなのかという問いを突き付けている.多くの人々が死に直面しているとい う事実は,世界共通でいわゆる臨死体験をしていることを意味しており[5],これは自尊心, マインドフルネスおよび人生の目的意識を著しく高める可能性がある[6,7].しかし,優れた 国際指導力が欠如している限り、国際社会の方向性は見えてこない. これからの数か月間 で人々と政府が選ぶ選択肢が、今後数年間の世界を、あるいは数十年間の世界さえも、形 作ることになるだろう[2]. 市民社会構造の中で社会的資本を築くには,分裂と孤立に傾く ことなく、閉鎖性と開放性、統合と連携、人間の能力と社会の能力の均衡を確立する必要 がある[8]. COVID-19の世界的大流行を克服し,諸目標の目標たる世々代々の真の幸福を実 現するためには、自己の受け取り直しないしは真の自己の探究、そして優れた集団的リー ダーシップ,情報共有,対話,地域および世界レベルでの共働が必要であると我々は考え ている.

多くの社会的能力の中でもとりわけ COVID-19 の研究者は、世界規模での情報共有と協力を行うための良心と集団的リーダーシップを発揮してきた. COVID-19 感染症の治療および予防に役立つウイルス学、臨床分子疫学、診断、病因、治療法候補について考察した論文が急速に増えている[9–13]. SARS-CoV-2 は、他の RNA ウイルスと同様に、遺伝的変異性

が著しく, 組換え率が高いという特徴があるため, 世界中のヒトと動物に広がりやすい[14]. Zhao らは SARS-CoV-2 ゲノム配列で 17 種類のウイルス亜型を同定し, 亜型の地域的分布が 世界的大流行の過程の追跡にどのように利用できるかを示した[15]. 一方, van Dorp らは SARS-CoV-2 ゲノムのフィルタリング後に 198 個の反復突然変異を同定した[16]. SARS-CoV-2は、アンジオテンシン変換酵素2(ACE2)受容体から侵入し、宿主に感染する [17,18]. ACE2 受容体は、心臓(冠動脈内皮、心筋細胞、線維芽細胞、心外膜脂肪細胞)、 血管(血管内皮細胞,平滑筋細胞),腸(腸管上皮細胞),肺(気管と気管支の上皮細胞,Ⅱ 型肺胞上皮細胞、マクロファージ)、腎臓(尿細管上皮細胞の内腔表面)、精巣、および脳 に広く発現する[19-23]. 低酸素血症を呈する急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を併発した重症 COVID-19 患者のサブグループに、サイトカインストームが起きる可能性があることを示唆 する報告が相次いでいる[24,25]. 実際, COVID-19 患者の 20~30%で, 異常な血液凝固が認 められている[26]. 血栓は肺に詰まり、肺塞栓症を引き起こすことがある. また、動脈から の血栓は、脳に詰まり、脳卒中を引き起こすこともある.肺は血栓発生の中心地であるが、 そればかりでなく、血栓は脳から血管までの臓器系で形成されることもある[25]. Varga ら は、内皮細胞の SARS-CoV-2 直接感染と内皮のびまん性炎症の証拠を確認した[27]. SARS-CoV-2 は血管を標的とするため、糖尿病や高血圧症による血管損傷がある患者は、重 篤化のリスクが高い.初歩的な研究によって SARS および MERS と同様の呼吸器疾患であ ることが報告されたが[28], COVID-19の主な脅威は血管合併症であるという見方が高まっ ている.

緊急を要するにもかかわらず、現在のところ、COVID-19の治療と予防のいずれについて も有効な治療戦略は存在しない.現在,SARS-CoV-2ゲノムベースの特異的ワクチン(モデ ルナ社製メッセンジャーリボ核酸ベースのワクチン mRNA-1273, CanSino Biologics 社製ア デノウィルス 5 型ベクターワクチン Ad5-nCoV, Inovio Pharmaceuticals 社および Beijing Advaccine Biotechnology 社製の DNA ベースのワクチン INO-4800, アストラゼネカ株式会社, オックスフォード大学およびオックスフォード大学から独立した Vaccitech 社の共同開発に よるアデノウィルスベクターベースのワクチン AZD1222 または以前の開発番号 ChAdOx1 nCoV-19、深圳市免疫基因治療研究院が開発したレンチウイルスミニ遺伝子ワクチン LV-SMENP-DC およびレンチウイルスベクター修飾人工抗原提示細胞(aAPC)など)[29] と治療抗体の治験が続行中であるが、これらには安全性試験が必要であるため、これらの ソリューションは長期的なものである(例えば, mRNA-1273の研究完了予定日は 2021 年 6 月1日である).世界的大流行に対する早急な対応策として、かつて他のウイルス感染症と 病態のためにデザインされた既存薬のドラッグリポジショニングも検討されている.これ らの薬剤の大半は、すでに安全性が検証されているからである.こうした薬剤は、標的に 応じて2種類のカテゴリーに分けられる[14]. 1つは, ゲノム複製に必須のウイルス酵素の 阻害(レムデシビル、ファビピラビル、リバビリン、ソフォスブビル、ガリデシビル、テ ノフォビル等の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害薬, ロピナビル/リトナビル, アジスロ

マイシン、イベルメクチン、ネルフィナビル等のウイルスプロテアーゼ阻害薬)またはウ イルスのヒト細胞侵入の遮断 (APN01 (rhACE2)、クロロキン/ヒドロキシクロロキン、デ イコプラニン、ウミフェノビル等のウイルス細胞膜融合阻害薬) によって、コロナウイル スに直接作用するものである.しかし、ヒドロキシクロロキンとアジスロマイシンの併用 は COVID-19 患者を死に至らせる恐れがある[30].もう1つは、生得的な抗ウイルス免疫応 答を高めること(ナチュラルキラー細胞と組換え型インターフェロンを用いた免疫療法) か、または炎症抗ウイルス免疫応答の調節不全によって誘発される損傷を軽減すること(間 葉系幹細胞、静脈内免疫グロブリン、抗 C5 モノクローナル抗体 [エクリズマブ、シルツキ シマブ、TZLS-501、サリルマブ、トシリズマブなど]、抗 VEGF-A モノクローナル抗体 [ベ バシズマブ]、抗 TNF モノクローナル抗体 [アダリムマブ]、SARS-CoV-2 特異的中和抗体、 サリドマイド、メチルプレドニゾロンおよびフィンゴリモドを用いた抗炎症療法)のいず れかによって、ヒト免疫系を高めるようデザインされたものである.SARS-CoV-2 に対する 中和抗体の存在に基づいて、COVID-19 が重症化した場合には、回復期血漿を用いる受動免 疫療法が推奨されているが、輸血感染の潜在的リスクと抗体依存性亢進による潜在的リス クが懸念されている[31,32].現在このほかにも、高圧酸素、一酸化窒素 (NO)、体外膜型肺

(ECMO) などの酸素を使用する治療法,抗凝固療法,低用量コルチコステロイド療法, ACE 阻害薬や1型アンジオテンシンII 受容体拮抗薬,スタチン,抗生物質,ポリクローナ ル抗体,その他の薬剤を使用する治療法など,さまざまな治療と予防戦略が研究されてい る.漢方薬などの天然化合物[33,34],ビタミン,オメガ3脂肪酸,セレン,亜鉛,鉄などの 栄養介入[35]も,COVID-19 感染症に対する宿主免疫を高めるために採用を検討できる可能 性がある.また,SARS-CoV-2 へのドラッグリポジショニングを目的として,薬剤候補を系 統的に同定するために,ビッグデータ解析の適用も始まっている[36].薬物有害反応と薬物 間相互作用を含め,薬剤の有効性と安全性の両面に関して,さらなる臨床的裏付けが待た れる.先行研究により,対処法の候補がいくつか証明されているが,COVID-19 に対応する には,より幅広い観点からの大規模な臨床試験が必要である.

本研究では、NOを使用した COVID-19 治療および予防の新たな戦略を提案する.NOは、 血管系では、あらゆる血管を形成している内皮細胞で産生される[37].内皮由来 NO には複 数の異なる機能があり、その中の1 つは血管平滑筋の弛緩である.これによって、血管が 拡張して、血圧が低下し、局所血流が増加する[37].これらの発見に対して 1998 年にノー ベル賞が授与された[38-40]. SARS-CoV 感染症患者に対する NO 吸入治療に関する先行研 究において、NO には薬理作用と抗ウイルス作用があることが示されている[41-43].このた め、NO 吸入が COVID-19 患者にも有効である可能性が示唆される[37,44].実際、COVID-19 患者に対して、NO 吸入の臨床試験が2件実施されている[45,46].一方、バルネオセラピー (温泉療法)、サウナ療法、温熱療法(ハイパーサミア)も内皮型 NO 合成酵素(eNOS)を 増加させ、血管内皮 NO 産生を誘導することが報告されている[47-52].しかし、ハイパー サミアは心臓発作や心疾患などの健康問題を引き起こす恐れがある.例えば、日本におけ る入浴中の年間死亡数は 14,000 件であり,院外突然死の>15%を占めている[53]. 一方,こ うした療法や NO 吸入が利用できない国々もある.このような既存の課題を克服する突破口 のひとつとして,1990 年代以降進歩してきたナノ医学またはナノ科学が考えられる. 高分 子ナノ粒子またはナノカプセル,リポソーム,金属ナノ粒子,金属酸化物ナノ粒子,シリ カ系ナノ粒子,量子ドット,ペプチドまたはカーボンナノチューブ,アップコンバージョ ンナノ粒子など各種クラスのナノ材料が,制御可能な範囲で,医療用の NO の送達に使用さ れている[54]. しかし,これにはナノ材料の人体への摂取が必要であり,関連する健康上の リスクから,ナノ材料の使用については意見が分かれている[55]. 一方,2018 年以降,ナノ 材料を体内に摂取せずに NO 療法と同様の効果が期待される天然ミネラルベースの新規ナ ノ材料が利用可能である.テイコク製薬社(日本)によって日本の温泉から製造され,集 積機能性ミネラル結晶体(IFMC)と名付けられている[56]. IFMC によって血管内 NO 濃度 を十分に増加させることができれば,安価かつ容易に使用できる(身体の表面に近接させ るか溶液としてスプレーするだけでよい)ため,COVID-19 の治療および予防に役立つ可能 性がある.本稿では,天然ミネラルベースの新規ナノ材料 IFMC がどのように血管内 NO 濃 度の増大と血管拡張を誘導し,その結果として血流が増加するかを実証する.

2. 材料と方法

2.1. 研究デザインと被験者

本研究の実験対象は、テイコク製薬社製の天然ミネラルベースの新規ナノ材料 IFMC である [56]. IFMC 溶液は、ヘマタイト (Fe₂O₃)、オリバイン (Mg₂SiO₄ および Fe₂SiO₄)、ロドラ イト (MnCO₃)、亜鉛鉱石 (ZnCO₃) と、脱イオン水、エタノール、メチルパラベン、メタ 亜硫酸ナトリウムなどである.実験では、まずゼータ電位および粒子サイズの分析器と、 エネルギー分散型 X 線分光器 (EDS) を併用した走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、IFMC の物理的特性を調べた.次に、IFMC が血管内 NO を増加させるかどうか検証するため、NO センサーを使用してラット肝門における血管内 NO 濃度を連続測定した.血管内 NO 濃度を 連続で長時間測定することが困難だったため、補完的な検査として、IFMC が人体の体表温 度、血流量、速度、血管径を増加させるかどうかを測定した.

ヒトおよび動物の全実験実施計画書については、東京都市大学の医学研究倫理委員会(承認番号:413)および動物実験委員会(承認番号:956)がそれぞれ審査および承認した. 被験者全員から実験に参加する前に自由意志による書面での同意書を取得した.また、本 研究の実施前にモニタリング試験を実施した.人体に IFMC 溶液を噴霧しても、IFMC を含 浸させた衣服を着用しても、数か月間のモニタリングの結果に問題は認められなかった. IFMC を構成する天然由来の物質は温泉の成分であり、変異原性特性を持つ恐れがある化学 物質とはまったく異なる.そのため、たとえ直接摂取したとしても、小動物やヒトにとっ ての副作用はないと考えている.

2.2. ゼータ電位と粒子サイズの測定

ゼータ電位・粒径測定システム(ELS Z-2,大塚電子株式会社,大阪府)を使用して,IFMC 溶液中の粒子サイズ分布を測定した.測定には,動的光散乱法(光子相関法)と CONTIN 法を使用した.散乱角度が 165°のときの測定温度は 22.5°Cであった.測定の結果,散乱強 度は認められなかった.その可能性として,(1)粒子がない,(2)粒子が小さすぎて測定 不可能(ELS Z-2 は 0.5 nm 未満の粒子を測定できない),(3)溶液中の物質がイオンである ため微粒子としては存在しない,という理由が考えられる.しかしながら,乾燥させると 結晶が得られることから,IFMC 溶液中に鉱物成分がイオンとして存在することが考えられ る.

2.3. 電界放出型走査形電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分光法

IFMC の SEM 画像は, 超高分解能を有する電界放出形走査電子顕微鏡 FE-SEM (SU8230, 株式会社日立ハイテク, 東京都)を用いて撮影した. EDS スペクトルの取得には, エネル ギー分散型 X 線分光器 (AZtecEnergy X-Max150, Oxford Instruments 社, 英国オックスフォ ードシャー州)を用いた. IFMC をピペットで顕微鏡スライドに滴下し, ホットプレートで 乾燥させた. その後, 乾燥した沈殿物を FE-SEM カーボンテープに固定した. FE-SEM の測 定条件は, (1) 倍率: 100~5000 倍, 加速電圧: 1kV, (2) 倍率: 100,000~200,000 倍, 加 速電圧: 10kV とした. 蛍光スペクトルの収集には, シリコンドリフト検出器を用いた.

2.4. NO センサーを用いたラット肝門脈における血管内 NO 濃度の生体内測定

測定には,作業電極と基準電極が一体となった,カテーテル型 NO センサー(INC-020,株 式会社インターメディカル,愛知県)(直径:0.5 mm,感度:500 pA μm⁻¹)を用いた. NO の電気化学反応で生成された電流をヘッドアンプ(HAEC-A, B×1/×10 または×100/×1000, 株式会社インターメディカル,愛知県)にて増幅し,電気化学アンプ(IMEC-601,株式会 社インターメディカル,愛知県)を用いてボルタンメトリー法で測定した. IMEC-601/601A は,NO,酸素,ドーパミン,グルタミン酸およびビタミンCの測定に関して,生体内でも 試験管内でも現在最先端のシステムである[57-61].

メス Slc-Wistar ラット(8~10週)は、日本エスエルシー株式会社から入手した. ラット は全頭個別飼育とし、23±1℃で12時間の明暗周期を維持した.5日間の順応期間後、ラッ トを陽性群(IFMC 溶液の使用群、ラット n=2 から3標本)と陰性対照群(生理食塩水を使 用したプラセボ群:ラット n=2 から6標本)にランダムに割り付けし、飲料水は自由に飲 ませた.標本数が少ないのは、特殊な外科手技を要したからである.失敗するとラットが 大量出血で急死するため、失敗の可能性を避けるために本研究では標本数を制限した.ラ ットは全頭、酒石酸ベトルファノール(2.5 mL)、ミダゾラム(2.0 mL)、塩酸メデトミジン、 (1.875 mL)、生理食塩水(3.625 mL)のカクテルを腹腔内注射で体重 kg⁻¹あたり2 mL 投与 し、実験中は麻酔誘発性無意識状態を維持した.NO センサーは、血管が肝臓(門脈、肝動

脈), 胆管, リンパ管に出入りし, 全ての神経が通る肝門に挿入した. この部位を選んだの は, 血管内 NO 濃度の変化を直接測定でき, 動脈自体を損傷することなく動脈の血流を安定 的に測定できるためである. IFMC 溶液または生理食塩水 5 mL を浸み込ませたキムワイプ[®] で両群のラット胸部を覆い, IFMC が血管内 NO 濃度を増大させるかどうかを検証した. 統 計的有意差は, 血管内 NO 濃度に基づいて算出した.

2.5. 超音波血流計を使用したヒト上腕動脈の血流量,速度,血管径の測定

ヒト上腕動脈の血流量,速度,血管径を非侵襲的に測定するために,超音波ドップラー血 流計(QFM-21,株式会社 Hadeco,神奈川県)を使用した.測定条件は,次の通りとした: 周波数は 5.0 MHz(血流速の測定)および 7.5 MHz(血管径の測定);超音波出力について は,ピーク時平均出力は 1500 mW cm²以下,ピークパルス出力は 350 W cm²以下,最大出 力は 550W cm²以下;血流量の範囲は 0.15~377 mL/秒;血流速の範囲は 5~120 cm/秒;血 管径は 2~20 mm;深度は 4~35 mm;血流量の測定正確度は 10%であった.被験者は,21 ~25 歳の男性であった.実施した測定回数は合計 22 回であった.IFMC を噴霧した布また は IFMC 無噴霧の布(ポリエステル 100%)で各被験者の上腕を覆い,IFMC が人体の血流 量,血流速,血管径を増大させるかどうか検証した.統計的有意差の判定には,対応のあ る両側 t 検定を用いた.

2.6. サーモグラフィーを使用したヒトの手の表面温度の測定

被験者は,日頃から手足に冷え症のある 22 歳の女性であった. IFMC 溶液を被験者の手の 表面に噴霧した直後に測定を開始した.オートレンジ・サーモトレーサー(TH9100MR,日 本アビオニクス株式会社,東京都)を用いて,10 分間にわたって,1 分間隔で手の表面温 度の変化を測定した.統計学的有意差の判定は,ピクセル値に基づいて,対応のある両側 t 検定を用いて実施した.

3. 結果

3.1. IFMC の SEM 画像

図1にIFMCのSEM画像を示す. ナノサイズの結晶を含め, さまざまなサイズと形態の結 晶が観察された. 図2 に元素マッピング画像を示す. 天然ミネラルから抽出した成分とし て, 硫黄 (S), マンガン (Mn), 鉄 (Fe), 亜鉛 (Zn), ネオジム (Nd)の分布が確認され た. 各々の元素強度は降順に, O, Cl, K, Na, Fe, Zn, Mn, S, Nd であった.

3.2. IFMC およびプラセボ適用前後の血管内 NO 濃度の変化

図3に, IFMC およびプラセボ適用前後のラットの血管内 NO 濃度の変化を示す. IFMC 適用後,血管内 NO 濃度が平均 43.6 秒間(範囲: 24.6~66.6 秒)増加し始めた.平均 35.2 秒間(範囲: 17.4~47.4 秒)で平均 0.17 nM(範囲: 0.07~0.26 nM)増加し,その後,徐々に



減少した. 増加のピーク値と持続時間は、アセチルコリンを用いた他の報告と同様であっ

図 1. IFMC の FE-SEM 画像: (a) 1kV で 100 倍, (b) 1kV で 500 倍, (c) 1kV で 1000 倍, (d) 1kV で 5000 倍, (e) 10kV で 100,000 倍, (f) 10kV で 200,000 倍.

た[62-65].本研究のピーク値が低く,増加の持続時間が短かったのは,おそらくラットの サイズが小さかったためである.増加直前の小さなスパイクは,おそらく血管平滑筋が弛 緩したためである.実際に,感知器を少し動かすと,同様のスパイクが観察された.我々 の知る限り,薬理学的介入や物理的介入(鍼,マッサージ療法,バルネオセラピーなど) を用いることなく天然ミネラルベースのナノ材料を生体に接触もしくは接近させることに より血管内 NO 濃度の増大と血管拡張が誘導される根拠が得られたのは,本研究の結果が初 めてである.



図 2. 図 1a の SEM 画像に対応する EDS 元素マッピング. 元素には酸素 (O), ナトリウム (Na), 硫黄 (S), カリウム (K), 塩素 (Cl), マンガン (Mn), 鉄 (Fe), 亜鉛 (Zn), ネ オジム (Nd) が含まれる.



図 3. (a) プラセボおよび (b) IFMC 適用前後の血管内 NO 濃度の変化. 縦軸, は各測定 の原点オフセットに合わせて相対血管内 NO 濃度を示す任意の尺度. (c) は, ワイプ付着後 の最小値と最大値の差として計算した血管内 NO 濃度増加の統計学的有意差を示す. エラー バーは標準偏差を示す.

3.3. IFMC 群とプラセボ群における上腕動脈の血流量,速度,血管径の差

図 4 に、上腕動脈における血流量、血流速、血管径の変化を示す. 各パラメーターの収縮 期ピークと拡張期ピークの範囲は、他の報告の値と同様であった[66]. IFMC 群とプラセボ 群の血流量と血管径に有意な増加が観察されたが、血流速に有意差は認められなかった. プラセボ群と IFMC 群間の統計学的有意差は、血流量については 0.0188、血流速については 0.1911、血管径については 0.0387 であった. 血流量と血管径の有意な増加は、血管内 NO 濃 度の増大に由来する血管拡張によるものであった. 血流速にほとんど変化が見られなかっ た理由は、血管弾性の改善とその後の血管平滑筋の弛緩によるものである. 血流速の変化 を伴わない血管拡張による血流量の増大は、神経免疫内分泌系の改善も示唆する[67-69].



図 4. IFMC 群とプラセボ群における上腕動脈の(a)血流量,(b)速度,(c)血管径の変化. 各被験者の上腕を IFMC 噴霧布または IFMC 無噴霧布で覆った. エラーバーは標準偏差を示 す.

3.4. IFMC 適用後の手の表面温度の変化

図5に、サーモグラフィーで観察した手(背)の表面温度の変化を示す. IFMC 溶液噴霧前 は、手全体の平均表面温度が 30.5℃, 手指の表面温度が 30.5℃と、末梢循環が不良である ことが示された. 噴霧から1分後、気化により表面温度が低下した. しかし、2分後には、 比較的太い血管の数本が浮き出はじめ、3分後には太い血管のほぼ全てが目立つようになっ た. 一方、3分後に、末梢血管と血管近くの表面温度に上昇が認められた. 5分後には、手 全体の温度が上昇した. 細い血管が明らかに太くなったのは、血管拡張によるものである ことは明白である. 10分後の手全体の平均表面温度は 30.9℃, 手指の平均表面温度は 31.2℃ であった. IFMC 適用前と適用 10分後とでは、手全体と手指の表面温度に有意差が認めら れた. 手指の温度上昇(+0.9℃)は、手全体のそれ(+0.4℃)よりも大きかった. この差は、 末梢血管の血管拡張と血流量の増大である.



図 5. サーモグラフィーで観察した(a) IFMC 適用前後の手(背)表面温度の変化. 右図に, IFMC 適応前と適用 10 分後の(b)手全体と(c)手指の表面温度の変化を示す. エラーバ ーは標準偏差を示す.

4. 考察

本研究では、数十ナノメートルサイズの天然ミネラルベースの新規ナノ材料 IFMC (図 1) により、生体の血管内 NO 濃度の増大 (図 3)、血管拡張(血管径)と血流量の増加(図 4)、 手指を含む手の表面温度の増大(図 5)が誘発されることが確認された.ラットのサイズが 小さかったため、血管内 NO 濃度のピーク値が低く、増大の持続時間も短かったが(図 3)、 これは他の報告の結果とほぼ同様であった[62-65]. ヒトの手の表面温度の上昇は少なくと も 10 分間継続したため(図 5)、IFMC に有意な効果があることが示唆された.さらに、IFMC 適用から 10 分後の平均表面温度の上昇は、手指(+0.9℃)の方が手全体(+0.4℃)よりも 大きかったことから(図 5),末梢血管における血管拡張と血流量増加は内皮由来弛緩因子(EDRF)としての NO に起因することが示唆される.これは、上腕動脈の血管径拡張と血流量の増大によって支持される(図 4).我々の知る限り、薬理学的介入や物理的介入(鍼、マッサージ療法、バルネオセラピーなど)を用いることなく、天然ミネラルベースのナノ材料を生体に接触もしくは接近させることにより、血管内 NO 濃度の増大と血管拡張が誘発されるエビデンスが得られたのは、本研究が初めてである.

血管内 NO 発現の厳密な機序は未だ明らかではないが,二つの可能性が考えられる.一つ 目は、NO 合成である.血管壁における NO 産生後の eNOS 活性が,血管内皮成長因子受容 体 2 (VEGFR2),アセチルコリン (ACh),そして熱ショックタンパク質 90 (HSP90),カ ルモジュリン (CaM),カベオリン-1 (Cav-1)等のタンパク質パートナーの受容体媒介シグ ナル伝達による調節を受けることはよく知られている[70].受容体媒介性生物学的応答には, 化学的媒介因子 (メッセンジャー物質)作用と受容体反応の間のタイムラグが含まれる. 一方,IFMC の作用は1分以内に現れた (図2および5).この応答の速さは,IFMC が主に 受容体媒介作用ではなく別の機序に関与している可能性を示している.

したがって, 我々は, この現象にはヘモグロビン(Hb)が深く関与しているのではない かと考えている. 低酸素血管拡張には EDRF/NO 合成を必要としないことが知られている [71]. Hb と NO はそれぞれ独立的に多様で複雑な生理学的役割を果たす一方で、秒ごとの 局所代謝需要の変化に応答するために、微小血管灌流を共同で微調節し、低酸素血管拡張 に寄与している[72]. 候補となる分子機序のうち, 生理学的要件を直接満たすのは S-ニトロ ソヘモグロビン(SNO-Hb)のみである[72]. したがって, NO は,鳥類と哺乳類に不変の S-ニトロソチオールの高度に保存された Hb b-93 Cys 残基上で保護された形態で、赤血球に よって作用微小血管部位に輸送される[72]. 一方,血管 EDRF としての NO は,ガス状シグ ナル物質であり、血管内皮細胞ー血管平滑筋細胞間を自由に拡散するものと考えられてき た.しかし, NO は血管の内皮細胞-平滑筋細胞間を自由拡散するのではなく,同細胞間内 に存在する Hb が拡散を制御することが報告されている[70,73,74]. Hb は、グロビン蛋白質 に鉄のポルフィリン錯体(ヘム鉄)4個が結合したものであり、ヒトや動物の血液中に含ま れている赤血球の中に存在する. Hb は, 酸素分子 (O) と結合する性質を持つ. そのため Hbは、酸素(O₂)を運搬する役割を担うだけでなく、NOの伝達制御に深く関与している. Hbの鉄原子がスピン転移を起こすことにより、血液中のO,やNOの伝達が容易になること が知られている. ヘム鉄の鉄イオンは、5 配位高スピンであるが、酸素分子が配位すると6 配位低スピンになる. d 電子のスピン状態が高スピンから低スピンに変化することにより, 鉄イオンがポルフィリン環の中心に引き込まれる.この分子レベルの動きが、ヘモグロビ ン全体の構造を変化させて、他の3個のヘム鉄の酸素分子に対する親和性(吸着性)を高 める.つまり、d電子の電子構造が、酸素分子の取り込みと放出を制御している.以上の背 景から、「IFMC.を生体に接触ないし近接させることによって、Hbから NOの結合が外れや すくなる」という仮説が成り立つ.

こうした観点から、正ミュオンなどの磁気プローブを用いた磁気評価によって、IFMCの 作用機序を解明できる可能性がある.ただし、無機物と有機物との混合物の磁性評価は非 常に困難であると予想される.なぜなら、反強磁性や弱強磁性を発現する遷移金属元素化 合物を含有している無機物としての IFMC と有機物としての Hb を混合させると、複数の相 互作用が発生する可能性があるからである.そこで、IFMC の作用機序を解明する方法のひ とつとして、IFMC にミュオンを照射した場合のミュオンが感ずる内部磁場の大きさを見積 もることが考えられる.具体的には、Hb 内へム鉄の酸素分子もしくは NO 分子に対する親 和性(吸着性)の変化に関与している鉄原子のスピン転移変化と、ミュオンを用いて観測 される IFMC のスピン特性を比較することによって、IFMC の Hb への作用機序を明らかに できると考えられる.この実験を通して、原子一原子間もしくは原子一分子間のリモート な働きの作用機序を解明できる可能性がある.2) 半導体工学の中でもスピントロニク ス分野においては、単純な反強磁性絶縁体が数十マイクロメートルの距離にわたって、ス ピン情報を伝達するという研究も存在する[75].数百マイクロメートル以上のスピン情報伝 達が存在することは未だ確認されておらず、それを立証できれば世界初の研究になる可能 性がある.

一方, IFMCの潜在的な可能性は、おそらく血管内NOの誘発のみにとどまらない.血管 恒常性の維持に関与する内皮由来血管弛緩因子には 3 種類あることが知られている:プロ スタサイクリン (PGI2), NO [38-40,76], 内皮由来過分極因子 (EDHF) [77]. これらは全 て血管内皮由来であるが,産生プロセスが異なる. NO は, eNOS によってアルギニンから 産生される. EDHF は、Ca²⁺/カルモジュリン依存性の様式で、作動薬、ずり応力、アセチル コリン等,さまざまな刺激因子によって合成される[78]. プロスタサイクリンは,シクロオ キシゲナーゼとプロスタサイクリン合成酵素によって産生される[79]. NO と EDHF は相補 的な役割を果たすことが知られている. NO は比較的大きな導管動脈(大動脈,心外膜冠動 脈など)の血管弛緩を媒介する.一方,EDHF は小さな抵抗動脈(小さな腸間膜動脈と冠微 小血管など)の血管緊張度の調節に重要な役割を果たす[80].血管緊張度は,NO欠如下で は, EDHF 様の機序によって調節される[81]. 細い血管が明らかに太くなったことから(図 4), IFMC は血管内 NO の誘発だけでなく, EDHF 産生にも影響を与えることが示唆される. また、血流速の変化を伴わない血管拡張によって血流量が増大したことから(図5)、IFMC が神経免疫内分泌系の改善に作用する可能性についてもさらに研究する価値があると考え られる.このように、IFMCの厳密な機序の解明と、IFMCの他の潜在的な可能性は、今後 の有意義な研究課題である.

本研究の限られた結果からも、しかしながら、COVID-19の治療および予防についての洞 察を得ることができる.血管内 NO 濃度の増大(図3)は、薬理作用と抗ウイルス作用の両 方を期待できる.NOの薬理作用には2つがある:(1)血管および非血管平滑筋の弛緩と気 道機能調節, (2)炎症性気道疾患の病態生理[82]. また, NO には抗ウイルス作用があるこ とが示されており、それにはウイルスタンパク質や SARS-CoV 複製サイクルを含む RNA 合 成の阻害作用が含まれている [41~43].一般に,NO吸入の作用機序は,肺の血管拡張と, その結果としての肺の血液酸化状態の改善によるウイルス殺傷であると考えられている. ウイルスは高酸素環境に適さないためである. Ignarro はさらに, NO はウイルスとも直接相 互作用してウイルスを殺傷したり、ウイルスの複製を阻害したりするとして、NO 吸入は肺 循環における単なる血管拡張としてよりも、抗ウイルスとして効果的であると述べている [37]. 本稿で提示した天然ミネラルベースの新規ナノ材料は安価であり、容易に使用できる ため(身体の表面に近接させるか溶液としてスプレーするだけでよい), COVID-19 の治療 および予防に役立つ選択肢として追加できる可能性がある。こうした利点を考えると、機 器の費用や利用可能性,熟練した医療従事者などの面で,IFMC は,NO 吸入療法の限界を 克服できる可能性がある. IFMC は生体内に摂取する必要がないため, NO を放出する既存 の医療用ナノ材料による健康上のリスクを懸念する必要もない.血管内 NO 濃度の増大(図 3) は問題を引き起こすレベルではないが、人体中での増加と持続性については定量的な評 価が必要である.依然として,COVID-19の治療および予防の両面で有望な治療戦略が緊急 に必要とされている.

5. 結論

我々の学際的研究は, 天然ミネラルベースの新規ナノ材料 IFMC が生体の血管内 NO 濃度の 増大, 血管拡張, 血流量の増加および手の表面温度の上昇を引き起こすことを明らかにし た. したがって, IFMC は, COVID-19 の治療および予防の選択肢となる可能性があると言 える. 厳密な作用機序についてはさらなる研究が必要であるが, 血管内 NO の増大には eNOS, Hb, EDHF が深く関与していることが考えられる. 残る研究課題は(1) IFMC が血管内 NO 濃度を増大させ, ヒト血液循環を長期的に改善できるかどうか調べること,(2) IFMC を生 体に接触もしくは接近させることにより血管内 NO がどのように誘発されるかを明らかに すること,(3) IFMC の遠隔作用すなわち原子間または原子と分子間の作用について調べる こと,(4) IFMC のもつ他の潜在的可能性を探索すること,(5) 他の天然ミネラルベースの ナノ材料の可能性について探索すること,(6) IFMC が COVID-19 の治療および予防に有効 かどうかについての臨床研究を実施すること,(7) 幅広い観点からの大規模な治験に基づ いて, COVID-19 の治療および予防の両面における一連の有望な治療戦略を緊急かつ集団的 に探索することである.

著者の貢献度:概念化:藤本,平田,秋山,データキュレーション:秋山,平田,畠山, 山崎,分析:秋山,平田,助成金取得:平田,調査:平田,秋山,方法論:平田,プロジ ェクト運営:平田,秋山,リソース:平田,監督:野邑,妥当性確認:秋山,畠山,山崎, ビジュアライゼーション:平田,秋山,原案執筆:秋山,執筆・精査・編集:秋山,藤本,

平田, 畠山, 山崎. 著者全員が公開版の原稿を読み合意している.

資金提供:本稿に記載した作業を実施するために、公的、商業的もしくは非営利的部門からの特定の資金提供は受けていない.

謝辞: IFMC の SEM および EDS の分析は, A. Yoshida 博士, E. Shindo 氏, N. Hamamura 氏 (東京都市大学ナノ科学技術学際研究センター)が実施した. 他の測定(ラットの血管内 NO 濃度,人体の表面温度,血流量,血流速,血管径)は,森晃教授(東京都市大学医用工 学科)が実施した.

利益相反:著者らは競合する利益がないことを宣言する.

略語

本稿では以下の略語を用いた.

ACE2	アンジオテンシン変換酵素 2
ACh	アセチルコリン
aAPCs	人工抗原提示細胞
ARDS	急性呼吸窮迫症候群
CaM	カルモジュリン
Cav-1	カベオリン-1
Cl	塩素
COVID-19	2019年に発生した新型コロナウイルス感染症
EDHF	内皮由来過分極因子
EDRF	内皮由来弛緩因子
EDS	エネルギー分散型 X 線分光器
eNOS	内皮型一酸化窒素合成酵素
Fe	鉄
FE-SEM	電界放出形(型)走査型電子顕微鏡
Hb	ヘモグロビン
HSP90	熱ショックタンパク質 90
IFMC	集積機能性ミネラル結晶体
K	カリウム
Mn	マンガン
mRNA	メッセンジャーリボ核酸

Na	ナトリウム
Nd	ネオジム
NO	一酸化窒素
0	酸素
PGI2	プロスタサイクリン
S	硫黄
SARS-CoV-2	重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2
SEM	走查型電子顕微鏡
SNO-Hb S-	S-ニトロソヘモグロビン
VEGFR2	血管内皮成長因子受容体 2
Zn	亜鉛

参考文献

 World Health Organization. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Report-131. 2020. Available online:

https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200530-covid-19-sitr ep-131.pdf?sfvrsn=d31ba4b3_2 (accessed on 31 May 2020).

- Harari, Y.N. Yuval Noah Harari: The World after Coronavirus. Available online: https://www.ft.com/content/19d90308-6858-11ea-a3c9-1fe6fedcca75 (accessed on 1 April 2020).
- Venter, Z.S.; Aunan, K.; Chowdhury, S.; Lelieveld, J. COVID-19 Lockdowns Cause Global Air Pollution Declines with Implications for Public Health Risk. medRxiv 2020. Available online: http://xxx.lanl.gov/abs/https://www.medrxiv.org/content/early/2020/04/14/2020.04.10.2006067 3.full.pdf (accessed on 3 May 2020).
- Liu, Z.; Deng, Z.; Ciais, P.; Lei, R.; Davis, S.J.; Feng, S.; Zheng, B.; Cui, D.; Dou, X.; He, P.; et al. COVID-19 causes record decline in global CO2 emissions. arXiv 2020, arXiv:econ.GN/2004.13614.
- Martial, C.; Cassol, H.; Laureys, S.; Gosseries, O. Near-Death Experience as a Probe to Explore (Disconnected) Consciousness. Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.) 2020, 24, 173–183.
- van Lommel, P.; van Wees, R.; Meyers, V.; Elfferich, I. Near-death experience in survivors of cardiac arrest: A prospective study in the Netherlands. Lancet 2001, 358, 2039–2045.
- Bianco, S.; Testoni, I.; Palmieri, A.; Solomon, S.; Hart, J. The Psychological Correlates of Decreased Death Anxiety After a Near-Death Experience: The Role of Self-Esteem, Mindfulness, and Death Representations. J. Humanist. Psychol. 2019.
- Rouda, U. Prospects for democracy in Belarus. In Democratisation in the European Neighbourhood; Emerson, M., Ed.; Centre for European Policy Studies: Brussels, Belgium,

2005; pp. 71–92.

- Guo, Y.R.; Cao, Q.D.; Hong, Z.S.; Tan, Y.Y.; Chen, S.D.; Jin, H.J.; Tan, K.S.; Wang, D.Y.; Yan, Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—An update on the status. Mil. Med. Res. 2020, 7, 11.
- Lake, M.A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. Clin. Med. (Lond.) 2020, 20, 124–127.
- 11. Jin, Y.; Yang, H.; Ji, W.; Wu, W.; Chen, S.; Zhang, W.; Duan, G. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. Viruses 2020, 12, 372.
- Kakodkar, P.; Kaka, N.; Baig, M.N. A Comprehensive Literature Review on the Clinical Presentation, and Management of the Pandemic Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Cureus 2020, 12, e7560.
- Lythgoe, M.P.; Middleton, P. Ongoing Clinical Trials for the Management of the COVID-19 Pandemic. Trends Pharmacol. Sci. 2020, 41, 363–382.
- Tu, Y.F.; Chien, C.S.; Yarmishyn, A.A.; Lin, Y.Y.; Luo, Y.H.; Lin, Y.T.; Lai, W.Y.; Yang, D.M.; Chou, S.J.; Yang, Y.P.; Wang, M.L.; Chiou, S.H. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 2657.
- Zhao, Z.; Sokhansanj, B.A.; Rosen, G.L. Characterizing geographical and temporal dynamics of novel coronavirus SARS-CoV-2 using informative subtype markers. bioRxiv 2020. Available online: https://www.biorxiv.org/content/early/2020/04/20/2020.04.07.030759.full.pdf (accessed on 2 May 2020).
- van Dorp, L.; Acman, M.; Richard, D.; Shaw, L.P.; Ford, C.E.; Ormond, L.; Owen, C.J.; Pang, J.; Tan, C.C.S.; Boshier, F.A.T.; et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. Infect. Genet. Evol. 2020, 83, 104351.
- Zhou, P.; Yang, X.L.; Wang, X.G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.L.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 2020, 579, 270–273.
- Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell 2020, 181, 271–280.e8.
- 19. Kuba, K.; Imai, Y.; Penninger, J.M. Multiple functions of angiotensin-converting enzyme 2 and its relevance in cardiovascular diseases. Circ. J. 2013, 77, 301–308.
- Patel, V.B.; Zhong, J.C.; Grant, M.B.; Oudit, G.Y. Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. Circ. Res. 2016, 118, 1313–1326.
- Turner, A.J.; Hiscox, J.A.; Hooper, N.M. ACE2: from vasopeptidase to SARS virus receptor. Trends Pharmacol. Sci. 2004, 25, 291–294.

- Zhang, H.; Penninger, J.M.; Li, Y.; Zhong, N.; Slutsky, A.S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: Molecular mechanisms and potential therapeutic target. Intensive Care Med. 2020, 46, 586–590.
- Angeli, F.; Reboldi, G.; Verdecchia, P. Hypertensive urgencies and emergencies: Misconceptions and pitfalls. Eur. J. Intern. Med. 2020, 71, 15–17.
- Mehta, P.; McAuley, D.F.; Brown, M.; Sanchez, E.; Tattersall, R.S.; Manson, J.J. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. Lancet 2020, 395, 1033–1034.
- 25. Wadman, M.; Couzin-Frankel, J.; Kaiser, J.; Matacic, C. A rampage through the body. Science 2020, 368, 356–360.
- Klok, F.A.; Kruip, M.J.H.A.; van der Meer, N.J.M.; Arbous, M.S.; Gommers, D.A.M.P.J.; Kant, K.M.; Kaptein, F.H.J.; van Paassen, J.; Stals, M.A.M.; Huisman, M.V.; et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. Thromb. Res. 2020, 191, 145–147.
- Varga, Z.; Flammer, A.J.; Steiger, P.; Haberecker, M.; Andermatt, R.; Zinkernagel, A.S.; Mehra, M.R.; Schuepbach, R.A.; Ruschitzka, F.; Moch, H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. Lancet 2020, 395, 1417–1418.
- Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020, 395, 497–506.
- Calina, D.; Docea, A.O.; Petrakis, D.; Egorov, A.M.; Ishmukhametov, A.A.; Gabibov, A.G.; Shtilman, M.I.; Kostoff, R.; Carvalho, F.; Vinceti, M.; et al. Towards effective COVID-19 vaccines: Updates, perspectives and challenges (Review). Int. J. Mol. Med. 2020, 46, 3–16.
- Mohammad, F.S.; Karmakar, V.; Irfan, Z. Hydroxychloroquine and azithromycin combination could be lethal to COVID-19 patients. Farmacia 2020, 68, 384–389.
- Duan, K.; Liu, B.; Li, C.; Zhang, H.; Yu, T.; Qu, J.; Zhou, M.; Chen, L.; Meng, S.; Hu, Y.; et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2020, 117, 9490–9496.
- Arsene, A.L.; Dumitrescu, I.; Drăgoi, C.M.; Udeanu, D.I.; Lupuliasa, D.; Jinga, V.; Drăgănescu, D.; Dinu-pîrvu, C.E.; Dragomiroiu, G.T.A.B.; Blejan, I.E.; et al. A new era for the therapeutic management of the ongoing COVID-19 pandemic. Farmacia 2020, 68, 185–196.
- Zhang, D.H.; Wu, K.L.; Zhang, X.; Deng, S.Q.; Peng, B. In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. J. Integr. Med. 2020, 18, 152–158.
- Torequl Islam, M.; Nasiruddin, M.; Khan, I.N.; Mishra, S.K.; Kudrat-E-Zahan, M.; Alam Riaz, T.; Ali, E.S.;Rahman, M.S.; Mubarak, M.S.; Martorell, M.; et al. A Perspective on Emerging Therapeutic Interventions for COVID-19. Front. Public Health 2020, 8, 281.

- Zhang, L.; Liu, Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: A systematic review. J. Med. Virol. 2020, 92, 479–490.
- Zhou, Y.; Hou, Y.; Shen, J.; Huang, Y.; Martin, W.; Cheng, F. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. Cell Discov. 2020, 6, 14.
- 37. Ignarro, L.J. Inhaled NO and COVID-19. Br. J. Pharmacol. 2020, 177, 3848–3849.
- Murad, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. Biosci. Rep. 1999, 19, 133–154.
- Furchgott, R.F. Endothelium-derived relaxing factor: Discovery, early studies, and identification as nitric oxide. Biosci. Rep. 1999, 19, 235–251.
- Ignarro, L.J. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. Biosci. Rep. 1999, 19, 51–71.
- Keyaerts, E.; Vijgen, L.; Chen, L.; Maes, P.; Hedenstierna, G.; Van Ranst, M. Inhibition of SARS-coronavirus infection in vitro by S-nitroso-N-acetylpenicillamine, a nitric oxide donor compound. Int. J. Infect. Dis. 2004, 8, 223–226.
- Chen, L.; Liu, P.; Gao, H.; Sun, B.; Chao, D.; Wang, F.; Zhu, Y.; Hedenstierna, G.; Wang, C.G. Inhalation of nitric oxide in the treatment of severe acute respiratory syndrome: a rescue trial in Beijing. Clin. Infect. Dis. 2004, 39, 1531–1535.
- Akerström, S.; Mousavi-Jazi, M.; Klingström, J.; Leijon, M.; Lundkvist, A.; Mirazimi, A. Nitric oxide inhibits the replication cycle of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J. Virol. 2005, 79, 1966–1969.
- Kobayashi, J.; Murata, I. Nitric oxide inhalation as an interventional rescue therapy for COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome. Ann. Intensive Care 2020, 10, 61.
- 45. Berra, L.; Lei, C.; Su, B.; Dong, H.; Safaee Fakhr, B.; Grassi, L.G.; Di Fenza, R.; Gianni, S.; Pinciroli, R.; Vassena, E.; et al. Protocol for a randomized controlled trial testing inhaled nitric oxide therapy in spontaneously breathing patients with COVID-19. medRxiv 2020. Available online: https://www.medrxiv.org/content/early/2020/03/13/2020.03.10.20033522.full.pdf (accessed on 1 May 2020).
- 46. 46. Lei, C.; Su, B.; Dong, H.; Bellavia, A.; Di Fenza, R.; Safaee Fakhr, B.; Gianni, S.; Grassi, L.G.; Kacmarek, R.; Araujo Morais, C.C.; et al. Protocol of a randomized controlled trial testing inhaled Nitric Oxide in mechanically ventilated patients with severe acute respiratory syndrome in COVID-19 (SARS-CoV-2). medRxiv 2020. Available online: https://www.medrxiv.org/content/early/2020/03/13/2020.03.09.20033530.full.pdf (accessed on 1 May 2020).
- 47. Ikeda, Y.; Biro, S.; Kamogawa, Y.; Yoshifuku, S.; Eto, H.; Orihara, K.; Yu, B.; Kihara, T.; Miyata, M.; Hamasaki, S.; et al. Repeated sauna therapy increases arterial endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in cardiomyopathic hamsters. Circ. J.

2005, 69, 722–729.

- Ye, W.N.; Thipse, M.; Mahdi, M.B.; Azad, S.; Davies, R.; Ruel, M.; Silver, M.A.; Hakami, L.; Mesana, T.; Leenen, F.; Mussivand, T. Can heat therapy help patients with heart failure? Artif Organs 2020, 44, 680–692.
- Brunt, V.E.; Eymann, T.M.; Francisco, M.A.; Howard, M.J.; Minson, C.T. Passive heat therapy improves cutaneous microvascular function in sedentary humans via improved nitric oxide-dependent dilation. J. Appl. Physiol. 2016, 121, 716–723.
- 50. Oyama, J.i.; Kudo, Y.; Maeda, T.; Node, K.; Makino, N. Hyperthermia by bathing in a hot spring improves cardiovascular functions and reduces the production of inflammatory cytokines in patients with chronic heart failure. Heart Vessel. 2013, 28, 173–178.
- 51. Karaarslan, F.; Ozkuk, K.; Seringec Karabulut, S.; Bekpinar, S.; Karagulle, M.Z.; Erdogan, N. How does spa treatment affect cardiovascular function and vascular endothelium in patients with generalized osteoarthritis? A pilot study through plasma asymmetric di-methyl arginine (ADMA) and L-arginine/ADMA ratio. Int. J. Biometeorol. 2018, 62, 833–842.
- Sobajima, M.; Nozawa, T.; Shida, T.; Ohori, T.; Suzuki, T.; Matsuki, A.; Inoue, H. Repeated sauna therapy attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats by increasing coronary vascularity of noninfarcted myocardium. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011, 301, H548–H554.
- 53. Suzuki, M.; Hori, S. Experimental investigation in rats to identify the cause of sudden death during bathing in Japan. Acute Med. Surg. 2014, 1, 101–104.
- Pieretti, J.C.; Pelegrino, M.T.; Nascimento, M.H.M.; Tortella, G.R.; Rubilar, O.; Seabra, A.B. Small molecules for great solutions: Can nitric oxide-releasing nanomaterials overcome drug resistance in chemotherapy? Biochem. Pharmacol. 2019, 176, 113740.
- 55. Su, H.; Wang, Y.; Gu, Y.; Bowman, L.; Zhao, J.; Ding, M. Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine. J. Appl. Toxicol. 2018, 38, 3–24.
- Teikoku Pharmaceutical Co. 2018. Available online: https://IFMC.jp (accessed on 31 May 2020).
- Uozumi, Y.; Nawashiro, H.; Sato, S.; Kawauchi, S.; Shima, K.; Kikuchi, M. Targeted increase in cerebral blood flow by transcranial near-infrared laser irradiation. Lasers Surg. Med. 2010, 42, 566–576.
- Nakagawa, A.; Yokoyama, Y.; Suzuki, H.; Shoji, K.; Watanabe, Y.; Imamura, A.; Kokuryo, T.; Nagino, M. Real-time monitoring of liver damage during experimental ischaemia-reperfusion using a nitric oxide sensor. Br. J. Surg. 2012, 99, 1120–1128.
- Yang, C.C.; Hsu, S.P.; Chen, K.H.; Chien, C.T. Effect of Adenoviral Catalase Gene Transfer on Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. Chin. J. Physiol. 2015, 58, 420–430.
- 60. Hsu, C.H.; Lin, C.L.; Wang, S.E.; Sheu, S.J.; Chien, C.T.; Wu, C.H. Oral treatment with herbal

formula B401 alleviates penile toxicity in aging mice with manganism. Clin. Interv. Aging 2015, 10, 907–918.

- Tsutsui, C.; Lee, M.; Takahashi, G.; Murata, S.; Hirata, T.; Kanai, T.; Mori, A. Treatment of cardiac disease by inhalation of atmospheric pressure plasma. Jpn. J. Appl. Phys. 2014, 53, 060309.
- Imanishi, T.; Kobayashi, K.; Kuroi, A.; Mochizuki, S.; Goto, M.; Yoshida, K.; Akasaka, T. Effects of angiotensin II on NO bioavailability evaluated using a catheter-type NO sensor. Hypertension 2006, 48, 1058–1065.
- 63. Kume, T.; Kawamoto, T.; Okura, H.; Neishi, Y.; Hashimoto, K.; Hayashida, A.; Watanabe, N.; Kanda, Y.; Mochizuki, S.; Goto, M.; Yoshida, K. Evaluation of coronary endothelial function by catheter-type NO sensor in high-fat-diet-induced obese dogs. Circ. J. 2009, 73, 562–567.
- 64. Mochizuki, S.; Miyasaka, T.; Goto, M.; Ogasawara, Y.; Yada, T.; Akiyama, M.; Neishi, Y.; Toyoda, T.; Tomita, J.; Koyama, Y.; et al. Measurement of acetylcholine-induced endothelium-derived nitric oxide in aorta using a newly developed catheter-type nitric oxide sensor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003, 306, 505–508.
- 65. Neishi, Y.; Mochizuki, S.; Miyasaka, T.; Kawamoto, T.; Kume, T.; Sukmawan, R.; Tsukiji, M.; Ogasawara, Y.; Kajiya, F.; Akasaka, T.; Yoshida, K.; Goto, M. Evaluation of bioavailability of nitric oxide in coronary circulation by direct measurement of plasma nitric oxide concentration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102, 11456–11461.
- 66. Scheel, P.; Ruge, C.; Schöning, M. Flow velocity and flow volume measurements in the extracranial carotid and vertebral arteries in healthy adults: reference data and the effects of age. Ultrasound Med. Biol. 2000, 26, 1261–1266.
- 67. Turnbull, A.V.; Rivier, C.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. Physiol. Rev. 1999, 79, 1–71.
- Li, Y.; Chen, G.; Zhao, J.; Nie, X.; Wan, C.; Liu, J.; Duan, Z.; Xu, G.
 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces microglial nitric oxide production and subsequent rat primary cortical neuron apoptosis through p38/JNK MAPK pathway. Toxicology 2013, 312, 132–141.
- Roosterman, D.; Goerge, T.; Schneider, S.W.; Bunnett, N.W.; Steinhoff, M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. Physiol. Rev. 2006, 86, 1309–1379.
- Ghimire, K.; Altmann, H.M.; Straub, A.C.; Isenberg, J.S. Nitric oxide: what's new to NO? Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2017.
- 71. Vallet, B.; Curtis, S.E.; Winn, M.J.; King, C.E.; Chapler, C.K.; Cain, S.M. Hypoxic vasodilation does not require nitric oxide (EDRF/NO) synthesis. J. Appl. Physiol. 1994, 76, 1256–1261.
- Allen, B.W.; Piantadosi, C.A. How do red blood cells cause hypoxic vasodilation? The SNO-hemoglobin paradigm. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006, 291, H1507–H1512.

- 73. Straub, A.C.; Lohman, A.W.; Billaud, M.; Johnstone, S.R.; Dwyer, S.T.; Lee, M.Y.; Bortz, P.S.; Best, A.K.; Columbus, L.; Gaston, B.; Isakson, B.E. Endothelial cell expression of haemoglobin α regulates nitric oxide signalling. Nature 2012, 491, 473–477.
- Helms, C.; Kim-Shapiro, D.B. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. Free Radic. Biol. Med. 2013, 61, 464–472.
- Lebrun, R.; Ross, A.; Bender, S.A.; Qaiumzadeh, A.; Baldrati, L.; Cramer, J.; Brataas, A.; Duine, R.A.; Kläui, M. Tunable long-distance spin transport in a crystalline antiferromagnetic iron oxide. Nature 2018, 561, 222–225.
- 76. Culotta, E.; Koshland, D. NO news is good news. Science 1992, 258, 1862–1865.
- Chen, G.; Suzuki, H.; Weston, A.H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. Br. J. Pharmacol. 1988, 95, 1165–1174.
- Takamura, Y.; Shimokawa, H.; Zhao, H.; Igarashi, H.; Egashira, K.; Takeshita, A. Important role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in shear stress-induced endothelium-dependent relaxations in the rat mesenteric artery. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1999, 34, 381–387.
- Lakshminrusimha, S.; Porta, N.F.; Farrow, K.N.; Chen, B.; Gugino, S.F.; Kumar, V.H.; Russell, J.A.; Steinhorn, R.H. Milrinone enhances relaxation to prostacyclin and iloprost in pulmonary arteries isolated from lambs with persistent pulmonary hypertension of the newborn. Pediatr. Crit. Care Med. 2009, 10, 106–112.
- Takaki, A.; Morikawa, K.; Tsutsui, M.; Murayama, Y.; Tekes, E.; Yamagishi, H.; Ohashi, J.; Yada, T.; Yanagihara, N.; Shimokawa, H. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. J. Exp. Med. 2008, 205, 2053–2063.
- Ozkor, M.A.; Quyyumi, A.A. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. Cardiol. Res. Pract. 2011, 2011, 156146.
- 82. Barnes, P.J. Nitric Oxide and Airway Disease. Ann. Med. 1995, 27, 389–393.

サンプルの利用可能性: IFMC のサンプルは責任筆者から入手できる可能性があります.オ リジナル画像と CSV ファイルも、ご要望に応じて責任筆者から入手できる可能性がありま す.

©2020 筆者. ライセンス取得者: MDPI (スイス, バーゼル). この記事は, クリエイティ ブ・コモンズ表示 (CC BY) ライセンス (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) の条件 下で配布されたオープンアクセス記事です.