

# 学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	高橋 啓
<p>学位論文題目</p> <p>Doxapram stimulates the carotid body via a different mechanism than hypoxic chemotransduction (末梢化学受容器におけるドキサプラムの効果と低酸素刺激の差異に関する検討)</p> <p>共著者名 長内 忍, 中野 均, 大崎能伸, 菊池健次郎</p> <p>Respiratory physiology &amp; neurobiology (2005 in press)</p> <p>(1) 研究目的</p> <p>ほ乳類においては, 酸素分圧 (<math>PO_2</math>) および二酸化炭素分圧 (<math>PCO_2</math>) の変動は頸動脈体などの末梢化学受容器で感知され, その情報が中枢へ伝達されることにより呼吸が調整されている. しかし, 末梢化学受容器における低酸素および高二酸化炭素感受機構 (化学感受機構) は, 未だ充分には解明されていない.</p> <p>近年, 頸動脈体で化学受容の主役とされる I 型細胞の細胞膜上に <math>PO_2</math> 依存性 <math>K^+</math>チャネル (<math>KO_2</math>) が発見され, 広義の「酸素センサー」であるとの仮説が提唱されている. この仮説では低酸素感受機構を, 1) <math>PO_2</math> の低下により <math>KO_2</math> が閉鎖し, 膜電位が上昇して細胞膜の脱分極が起き, 2) 細胞膜上の電位依存性 <math>Ca^{2+}</math> チャネルが開閉し, 3) 引き続き細胞外から細胞内へ <math>Ca^{2+}</math> が流入することによって, 細胞質内から神経伝達物質が分泌され, 4) 頸動脈洞神経のシナプス様神経終末が刺激され興奮を呼吸中枢へ伝える, と説明されている. しかし, 1) のメカニズムを支持しない実験結果も報告されている.</p> <p>一方, 末梢化学受容器を介した呼吸刺激作用を有するドキサプラムは, 近年, 頸動脈体 I 型細胞の細胞膜 <math>K^+</math> チャネルを抑制することが報告され, 注目されている. しかし, ドキサプラムの作用が先に述べた低酸素感受機構の仮説と同様のメカニズムであるか否かでは明らかではない.</p> <p>そこで本研究では, 前述した低酸素に対する頸動脈体の生理反応特性が, ドキサプラムでも認められるか否かについて, 1) 低酸素感受機構の <math>[Ca^{2+}]</math> 依存性と, 2) 低酸素と高二酸化炭素に対する化学感受性の相乗作用の有無, 3) 各種の <math>K^+</math> チャネル開口薬 (ATP 依存性 <math>K^+</math>チャネル開口薬: ピナシジルおよびレボクロマカリム, <math>Ca^{2+}</math>依存性 <math>K^+</math> チャネル開口薬: NS-1619, TASK 様 <math>K^+</math> チャネル開口薬: ハロセン) 使用下における低酸素とドキサプラムの頸動脈体に対する効果の差異の面から検討した.</p> <p>(2) 方法</p> <p>実験動物には日本白色系雄性ウサギ (<math>n=21</math>, 体重 3.0~3.5 kg) を用いた.</p> <p>摘出灌流頸動脈体標本の作製. 麻酔下に, 内頸動脈および外頸動脈分岐部を露出し総頸動脈にカニユーレを挿入した. 内頸動脈および外頸動脈を結紮し, 頸動脈洞神経を舌咽神経より切離した. 頸動脈分岐部とともに摘出した頸動脈体を恒温槽内に固定して流動パラフィンで被覆し, カニユーレよりタイロード液を灌流した. 頸動脈洞神経の神経線維を露出させ, 活動電位を記録した. 神経発射数 (Hz) をもって頸動脈体の化学感受機構の指標 (CSN activity) とした.</p> <p>灌流液はタイロード液 (112 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.2 mM <math>CaCl_2</math>, 1.1 mM <math>MgCl_2</math>, 21.4 mM <math>NaHCO_3</math>,</p>			

5.0 mM HEPES, 5.0 mM glucose, 22.0 mM sodium glutamate, and 4 mg/mL dextran) および,  $\text{CaCl}_2$  を同当量の  $\text{MgCl}_2$  で置換した  $\text{Ca}^{2+}$ -除去タイロド液を用いた.

下記の混合ガスで灌流液を飽和し,  $\text{PO}_2$  と  $\text{PCO}_2$  を調整した.

コントロールガス:  $\text{O}_2$  21%,  $\text{CO}_2$  5%,  $\text{N}_2$  バランス.

低酸素ガス:  $\text{O}_2$  3%,  $\text{CO}_2$  5%,  $\text{N}_2$  バランス.

高二酸化炭素ガス:  $\text{O}_2$  21%,  $\text{CO}_2$  (5, 7, 9%),  $\text{N}_2$  バランス.

低酸素高二酸化炭素ガス:  $\text{O}_2$  7%,  $\text{CO}_2$  (5, 7, 9%),  $\text{N}_2$  バランス.

ドキサプラムは灌流液に溶解し設定した濃度に調整した. ピナシジル, レボクロマカリム, NS-1619 は dimethyl sulfoxide に溶解し, 投与濃度がそれぞれ 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  になるように調整した. ハロセンはエタノールに溶解後, 灌流液に溶解し投与濃度が 100  $\mu\text{M}$  になるように調整した.

#### プロトコール

##### 1. ドキサプラムの至適投与量の決定

灌流液中に濃度が 1, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$  になるようにドキサプラムを投与し, 用量反応曲線を作成する.

##### 2. 高二酸化炭素-低酸素相互作用.

三段階の  $\text{PCO}_2$  の灌流液を用い,  $\text{PCO}_2$ -CSN activity 反応を測定する. さらに低酸素刺激およびドキサプラム投与下において  $\text{PCO}_2$ -CSN activity 反応を測定し, 低酸素刺激およびドキサプラム投与が高二酸化炭素応答に与える作用について検討する.

##### 3. 灌流液中の $\text{Ca}^{2+}$ の効果

低酸素刺激およびドキサプラム投与を  $\text{Ca}^{2+}$ -除去灌流液で行い, それらの CSN activity を比較する.

##### 4. 既述した $\text{K}^+$ チャネル開口薬投与の低酸素刺激とドキサプラム投与への影響について比較する.

#### (3) 成績

1. ドキサプラム濃度は 10  $\mu\text{M}$  で最大の反応が得られた. よって以下のプロトコールではドキサプラムは 10  $\mu\text{M}$  で検討を行った.

2. 灌流液中の  $\text{PCO}_2$  を 35, 45, 55 mmHg へと変化させると, CSN activity は直線的に増加した. その傾きは  $2.7 \pm 0.3$  Hz/mmHg であった. 低酸素条件 ( $\text{PO}_2$  55 mmHg) では, 傾きは  $7.2 \pm 0.4$  Hz/mmHg に増加し, その増加は有意であった. 一方, ドキサプラム投与では, その傾きは  $3.1 \pm 0.4$  Hz/mmHg であり, 有意な増加は認められなかった. 低酸素刺激は高二酸化炭素応答に対し相乗的に作用したが, ドキサプラム投与は相加的に作用した.

3.  $\text{Ca}^{2+}$  を除いた灌流液では, CSN activity は低酸素刺激およびドキサプラム投与のいずれにおいても,  $218.1 \pm 42.5$  から  $41.2 \pm 17.8$  Hz,  $43.5 \pm 7.2$  から  $21.1 \pm 6.5$  Hz と有意に抑制された.

4. ピナシジルおよびレボクロマカリムは, 低酸素刺激およびドキサプラム投与による CSN activity の増加に影響を及ぼさなかった. NS1619 は低酸素刺激には影響を及ぼさなかった ( $123.0 \pm 19.2$  Hz から  $115.7 \pm 17.9$  Hz) が, ドキサプラムの作用を抑制した ( $35.3 \pm 8.8$  Hz から  $10.2 \pm 7.6$  Hz). ハロセンは低酸素刺激 ( $123.8 \pm 25.8$  Hz から  $109.5 \pm 16.5$  Hz) とドキサプラムの作用 ( $27.2 \pm 10.1$  Hz から  $14.3 \pm 8.6$  Hz) のいずれも抑制した.

#### (4) 考案

ドキサプラムの頸動脈体刺激反応は低酸素刺激と同様に、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  に依存していた。一方、ドキサプラムは低酸素刺激と異なり、頸動脈体の二酸化炭素感受性に対し相乗効果を示さなかった。ATP 依存性  $\text{K}^+$  チャネル開口薬は低酸素刺激およびドキサプラムの作用に影響を与えなかった。 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネル開口薬は低酸素刺激に対し影響を与えなかったが、ドキサプラムの作用を抑制した。TASK 様  $\text{K}^+$  チャネル開口薬はいずれの作用も抑制した。

ドキサプラムは I 型細胞の脱分極をもたらし、神経伝達物質を放出させると報告されている。これらの報告と今回の結果から、ドキサプラムの頸動脈体刺激作用は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネルを閉鎖させることで I 型細胞の膜電位を変化させ、それに伴い電位依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが刺激され、 $\text{Ca}^{2+}$  流入がもたらされ、神経伝達物質が放出されていると推測される。これまで、ドキサプラムの頸動脈体刺激作用については、拮抗薬に関する報告が無く、今回初めて器官レベルで、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネルが作用点であることが確認された。

$\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネル開口薬が頸動脈体の低酸素感受性を変化させなかったこと、またドキサプラムが高二酸化炭素感受性に対し相乗効果を示さないことは、「酸素センサー」がイオンチャネルではない可能性も推察させる。

一方、ハロセンは麻酔薬として使用されていたが、臨床的な検討から、化学感受性を低下させることが知られている。本研究では頸動脈体におけるドキサプラムと低酸素化学感受性の両者の反応がハロセンによって抑制されることが初めて示された。このことは TASK 様  $\text{K}^+$  チャネルの低酸素化学感受性において何らかの関与を強く示唆し、今後さらに細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化や神経伝達物質放出などの細胞レベルでの検討が必要と考えられた。

#### (5) 結論

ドキサプラムは頸動脈体の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{K}^+$  チャネルを抑制することで化学感受機構を刺激していることが強く示唆された。しかし、このメカニズムは生理的な低酸素化学感受機構とは異なると考えられた。

#### 引用文献

1. Buckler, K.J., Williams, B.A., Horore, E.. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J. Physiol.* (Lond.) 525: 135-142, 2000.
2. Lahiri, S., Rozanov, C., Roy, A., Storey, B., Buerk, D.G.. Regulation of oxygen sensing in peripheral arterial chemoreceptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 755-774, 2001.
3. Peers, C.. Effects of doxapram on ionic currents recorded in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *Brain Res.* 568: 116-122, 1991.

#### 参考論文

1. 松本博之ほか5名と共著. ステロイド吸入療法により肺野のガリウム-67シンチグラフィの取り込みが著明に改善したサルコイドーシスの1例. *日本胸部臨床* 57: 393-398, 1998.
2. 中野均ほか5名と共著. Reduced nasal nitric oxide in diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: 2218-2220, 2000.
3. 長内忍ほか8名と共著. Hypoxic ventilatory depression in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Respirology* 6: 163-166, 2001.
4. 長内忍ほか4名と共著. 寒冷地に居住する気管支喘息患者の冬期の症状に関する検討. *アレルギー* 53 (5): 508-514, 2004.
5. 長内忍ほか2名と共著. Doxapram inhibits carotid sinus baroreceptors in rabbits. *Autonomic & Autacoid Pharmacology* 25: 79-84, 2005.

## 学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第                      号		
学位の種類	博士（医学）	氏            名	高        橋            啓
<div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-bottom: 5px;"> <span>審査委員長</span> <span>高 井   章   ㊞</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-bottom: 5px;"> <span>審査委員</span> <span>岩 崎   寛   ㊞</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-bottom: 5px;"> <span>審査委員</span> <span>柏 柳   誠   ㊞</span> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>審査委員</span> <span>菊 池 健次郎 ㊞</span> </div>			
<div style="margin-bottom: 10px;">学   位   論   文   題   目</div> <div style="text-align: center;"> <p style="font-size: 1.2em; margin: 0;">Doxapram stimulates the carotid body via a different mechanism than hypoxic chemotransduction</p> <p style="font-size: 0.9em; margin-top: 10px;">「末梢化学受容器におけるドキサプラムの効果と低酸素刺激の差異に関する検討」</p> </div>			
<p>【目的】本研究は、頸動脈小体からの上行性信号発射頻度に対する呼吸刺激剤doxapramの促進性作用の発現メカニズムを、特にその細胞膜K<sup>+</sup>イオンチャネルを介する効果を中心に検討したものである。</p> <p>【方法】計 21 羽の白色ウサギからpentobarbital/urethane麻酔下に頸動脈小体を頸動脈洞部（総頸動脈から内外頸動脈への分枝部）の血管ならびに頸動脈洞神経(CNS)がついたままの状態 で分離摘出した頸動脈小体標本を用いた。実験は、内外頸動脈側の断端を結紮し総頸動脈側から挿入したカテーテルより一定圧（65 mmHg）でTyrode液（37℃）を注入し頸動脈小体を持続的に灌流した状態で実施、doxapramの灌流液投与のCNS発火頻度への影響を正常および低酸素分圧下で調べた。また、これらdoxapramの効果に対して各種K<sup>+</sup>チャネル活性化剤の影響を検討した。この目的に使用した薬剤は、ATP-感受性K<sup>+</sup>チャネル開口剤であるlevocromakalimとpinacidil、Ca<sup>2+</sup>依存性BK型K<sup>+</sup>チャネル(BK)開口剤であるNS-1619、およびTASK型K<sup>+</sup>チャネル開口作用を持つhalothaneの計 4 種である。</p>			

### 【主要結果概説】

1. Doxapram (0-20  $\mu\text{M}$ )は、濃度依存性に CSN 発火頻度を上昇させた。 $\text{ED}_{50}$  はおよそ 1  $\mu\text{M}$  であり、最大反応は 10  $\mu\text{M}$  以上で得られた。
2.  $\text{CO}_2$  分圧( $P_{\text{CO}_2}$ )を 33-55 mmHg の範囲で高めると、 $P_{\text{CO}_2}$  値に対してほぼ直線的に CSN 発火頻度が増加した。低酸素状態（正常の 1/3）では、 $P_{\text{CO}_2}$  と発火頻度との関係が上方に移動するとともに急峻化した。これに対し doxapram (10  $\mu\text{M}$ )は、平行に上方移動させるのみであった。
3. 灌流液中の  $\text{Ca}^{2+}$ 除去は、低酸素または doxapram の CSN 刺激効果を強く抑制した。この抑制効果は特に doxapram に対して著明であった。
4. 4 種の  $\text{K}^+$ チャネル活性化剤のうち、halothane (100  $\mu\text{M}$ )は低酸素による CSN 活性化に対し有意な抑制作用を示したが、levocromakalim (50  $\mu\text{M}$ )、pinacidil (100  $\mu\text{M}$ )および NS-1619 (30  $\mu\text{M}$ )はいずれも無効であった。
5. Doxapram (10  $\mu\text{M}$ )による CSN 活性化に対し、NS-1619 (30  $\mu\text{M}$ )はその約 50 %を抑制する効果を示したが、他の 3 種の  $\text{K}^+$ チャネル活性化剤はいずれも無効であった。

これらの結果は、doxapram が、低酸素刺激とは異なり  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $\text{K}^+$ チャネル(たぶん BK タイプ)を抑制し、それに伴う細胞膜の脱分極を介して低酸素感受性細胞からの伝達物質（おそらく dopamine）の放出を誘起する結果、CSN 発火頻度を増すというメカニズムを示唆する。

【審査結果】本論文は、適切な方法を用いて行った実験の結果に基づいて注意深い議論を展開しており、未だ不明の点が多い頸動脈小体における  $\text{O}_2$  濃度の検知機構について、基礎的にも興味ある新知見を提供したものと評価できる。

論文提出者は、4 名の審査員による個別の口頭試問において、本論文の内容とその重要性について明確に説明し、また、関連領域についての試問でも適切な回答を与えた。それにより、当人がこの領域において十分な知識と経験を有することを確認できた。

以上より、本審査委員会は、本論文が学位授与に値するものと判定した。