

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	河 原 温
学 位 論 文 題 目			
Adenosine agonist regulation of outward active transport of fluorescein across retinal pigment epithelium in rabbits			
(アデノシンの家兎網膜色素上皮における外方能動輸送の調節機能)			
共 著 者 名			
Taiichi Hikichi			
Norihiko Kitaya			
Junichi Takahashi			
Fumihiko Mori			
Akitoshi Yoshida			
Experimental Eye Research 80: 493-499,2005			
研 究 目 的			
<p>血液網膜関門 (BRB) の外方能動輸送の障害は、糖尿病黄斑浮腫、加齢黄斑変性、またぶどう膜炎における黄斑浮腫の原因のひとつとして考えられており、中心視力を直接脅かす要因となっている。しかし、そのメカニズムは未だ明らかではない。</p> <p>アデノシンにはA1、A2、A3受容体が存在していて、それに結合することでアデニル酸シクラーゼに作用するが、網膜色素上皮細胞ではアデニル酸シクラーゼの活性化によりBRBの能動輸送 (外方透過性) を抑制することが過去の研究で明らかになっている。<sup>1)</sup></p> <p>我々は、すでに、<b>differential vitreous fluorophtometry(DVF)</b>を用いて、<b>sodium-fluorescein</b>を静脈注射後に硝子体中の<b>fluorescein(F)</b>と<b>fluorescein monoglucuronide(FG)</b>の蛍光強度を同時に測定し、それらの濃度を算出することで得られる<b>F/FG比</b>が、BRBにおける外方透過性 (能動輸送能) の指標となることを報告した。すなわち、<b>F/FG比</b>の低下は外方透過性の亢進を示唆する。<sup>2)</sup></p> <p>そこで今回我々は、家兎に非選択的アデノシン受容体の作動薬である<b>NECA</b>を硝子体に投与し、BRBの外方透過性に対する影響を<b>DVF</b>を用いて評価した。さらに将来これらの薬剤が網膜浮腫の治療薬となるか否かも検討した。</p>			

## 材 料 ・ 方 法

本研究には体重約2.5kgの有色家兎を用いた。

1. 0.4% oxybuprocain hydrochlorideによる点眼麻酔後、硝子体への薬剤の投与を行った。
2. Sodium-fluorescien (50mg) を耳静脈から投与した。
3. Sodium-fluorescien 静注180分後にpentobarbital sodium(40mg/kg)とketamine hydrochloride(10mg/kg)の筋肉注射により麻酔し、DVFを用いて硝子体内のFとFGの蛍光強度を同時に測定し、それぞれの濃度からF/FG比を算出した。

### NECAのF/FG比に対する影響

$1 \times 10^{-5}M$ (n=6)、 $1 \times 10^{-4}M$ (n=12)、 $2.5 \times 10^{-4}M$ (n=4)、 $5 \times 10^{-4}M$ (n=6)、 $1 \times 10^{-3}M$ (n=6)、 $2 \times 10^{-3}M$ (n=8)のNECA 0.1mlを硝子体内注入した。コントロールとしてPBS(n=10)を0.1ml硝子体注射した。180分後にSodium-fluorescien(50mg)を静脈投与した。その後DVFを用いてF/FG比を求めた。

### A1、A2、A3 antagonistのF/FG比に対する影響

$1 \times 10^{-3}M$ のCPX(A1受容体antagonist)、ZM241385(A2受容体antagonist)、MRS1191(A3受容体antagonist)を0.1ml、硝子体内注入した。60分後に $1 \times 10^{-5}M$ (低用量NECA群、CPX n=7、ZM241385 n=7、MRS1191 n=4)または $1 \times 10^{-3}M$ (高用量NECA群、CPX n=12、ZM241385 n=3、MRS1191 n=4)のNECAを0.1ml、硝子体内注入した。NECA注入の180分後にSodium-fluorescien(50mg)を静脈投与した。その後DVFを施行した。

### 作製した実験的網膜剥離に対するNECAの作用

$1 \times 10^{-5}M$ (低用量)または $1 \times 10^{-3}M$ (高用量)のNECA、またはPBSを硝子体内に注入した(各群n=4)。その6時間後に実験的網膜剥離を作製した。<sup>3)</sup>そして網膜剥離の変化をHeidelberg Retina Angiographにより観察した。NECA注入の1時間前にCPX、ZM241385を硝子体内注入した群も観察した(各群n=4)。

### 統計解析

F/FG比に対する影響の比較にはMann-Whitney U-testを用いた。P値が0.05以下を統計学的に有意差ありとした。

## 成 績

### NECAのF/FG比に対する影響

1. 低用量NECA注入眼のF/FG比はコントロール(PBS)注入眼より有意に高かった。
2. 高用量NECA注入眼のF/FG比はPBS注入眼より有意に低かった。
3. NECAの最大作用が認められたのはNECA注入6時間後であった。

### A1、A2、A3 antagonistのF/FG比に対する影響

1. 低用量NECA注入によるF/FG比の増加はZM241385により有意に抑制されたが、CPX、MRS1191には影響を受けなかった。
2. 高用量NECA注入によるF/FG比の低下はCPXにより有意に抑制され、その値はPBS注入眼のF/FG比より有意に大きく、低用量NECAの値と同等であった。ZM241385、MRS1191の投与はF/FG比に影響を与えなかった。

## 作製した実験的網膜剥離に対するNECAの作用

1. 高用量NECA注入眼では網膜剥離は縮小した。
2. 低用量NECA注入眼では網膜剥離は不変であった。
3. PBS注入眼では網膜剥離は縮小傾向が認められた。PBS注入眼と高用量または低用量NECA注入眼との間に網膜剥離の大きさで有意差を認めた。
4. ZM241385は低用量NECAによる網膜下液吸収の減速を抑制する傾向を示した。
5. CPXは高用量NECAによる網膜下液吸収を有意に抑制した。

## 考 案

アデノシン受容体は網膜色素上皮にはA1、A2受容体の存在が知られており、アデノシン受容体作動薬が受容体を活性化することでアデニル酸シクラーゼ、cAMPを制御して液体の脈絡膜側への動きを調節していると考えられている。<sup>1)</sup>

今回我々は非選択的アデノシン受容体作動薬であるNECAを用いて正常家兎におけるBRBの外方透過性への効果を検討した。今回の検討では、高用量NECAはA1受容体を介してBRBの外方透過性を亢進させ、低用量NECAはA2受容体を介して透過性を抑制し、A3受容体は透過性に寄与しないことが示唆された。NECAはA1受容体よりA2受容体との親和性がより高いため、低用量NECAの硝子体注入は主にA2受容体を活性化してBRBの外方透過性を抑制するが、高用量NECAはA1とA2の両方の受容体を活性化する。しかし現象面ではA1受容体と関連しているため外方透過性を亢進させたと考えられる。このことは実験的網膜剥離眼でも明らかで、高用量NECAでは網膜剥離が減少した。高用量NECAとA1受容体antagonistを注入した眼のF/FG比は低用量NECA注入眼の値と近似していた。このことは、NECAがA2受容体との親和性が高いためにA1受容体を阻害するとA2受容体の作用が誘導されたことを示している。

アデノシン受容体作動薬の本研究における効果は、今後、中心視力の低下を直接もたらしている糖尿病黄斑症や加齢黄斑変性やぶどう膜炎に伴う黄斑浮腫などの網膜下液を早期に吸収させる治療薬として有用となることが期待される。

## 結 論

1. アデノシンはBRBにおける外方透過性機能に関与している。
2. アデノシン作動薬であるNECAを硝子体投与した結果、①高用量NECAはA1受容体を介してBRBの外方能動輸送能を亢進させた。②低用量NECAはA2受容体を介してBRBの外方能動輸送能を抑制させた。③A3受容体はBRBの外方能動輸送能に関与しなかった。
3. NECA等のアデノシン作動薬は、網膜浮腫の治療薬として有用であることが示唆された。

引用文献

1. Miller S.S., et al. Fluid transport across retinal pigment epithelium is inhibited by cyclic AMP. Proc. Natl Acad. Sci. USA 79, 2111-2115, 1982
2. Takahashi J., et al. Effect of acetazolamide on outward permeability of blood-retina barrier using differential vitreous fluorophotometry. Current Eye Research 23: 166-170, 2001
3. Negi A., et al. Quantitative estimation of metabolic transport of subretinal fluid. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 27, 1564-1568, 1986

参考論文

1. Takahashi J, et al. Effect of nucleotide P2Y2 receptor agonists on outward active transport of fluorescein across normal blood-reina barrier in rabbit. Experimental Eye Research 78: 103-108, 2004
2. Izumi N, et al. Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (in press)

## 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	河 原 温
<p>審査委員長 鈴木 裕 ㊟</p> <p>審査委員 柏 柳 誠 ㊟</p> <p>審査委員 石 子 智 士 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Adenosine agonist regulation of outward active transport of fluorescein across retinal pigment epithelium in rabbits</b></p> <p>(アデノシンの家兎網膜色素上皮における外方能動輸送の調節機能)</p>			
<p>血液網膜関門 (BRB) の外方能動輸送 (透過性) の障害は、糖尿病黄斑浮腫、加齢黄斑変性、ぶどう膜炎における黄斑浮腫などの原因のひとつとして考えられており、中心視力を直接脅かす要因となっている。網膜色素上皮細胞における外方透過性はアデニル酸シクラーゼの活性化により抑制されることが知られており、さらに、A1、A2、A3 の三種類のアデノシン受容体へのアデノシン結合によりアデニル酸シクラーゼはそれぞれ異なる制御を受け、その結果 cAMP レベルが変動するとされている。</p> <p>そこで本論文では、A1、A2、A3 受容体それぞれはどのように BRB の外方透過性と網膜浮腫・剥離に影響を与えるかを明らかにすることを目的とし、アデノシン受容体の非選択的作動薬である NECA およびそれぞれの受容体の選択的作動薬を家兎の硝子体に投与し、BRB の外方透過性の変化と網膜剥離に対する影響を検討した。実験では、外方透過性の変化を differential vitreous fluorophotometry (DVF) により評価した。すなわち、sodium-fluorescein 静脈注射後に硝子体中の fluorescein (F) と fluorescein monoglucuronide (FG) の蛍光強度を同時に測定することにより得た濃度比 (F/FG 比) を、BRB における外方透過性 (能動輸送能) の</p>			

指標とする方法であり、F/FG 比の低下は外方透過性の亢進を意味する。そして次の結果を得た。

1. 低用量 ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ) NECA 注入眼の F/FG 比はコントロール(PBS)注入眼より有意に高かった。この F/FG 比の増加は A2 受容体 antagonist ZM241385 により有意に抑制されたが、A1 受容体 antagonist CPX、A3 受容体 antagonist MRS1191 には影響を受けなかった。
2. 高用量 ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ) NECA 注入眼の F/FG 比は PBS 注入眼より有意に低かった。この F/FG 比の低下は A1 受容体 antagonist CPX により有意に抑制され、その値は PBS 注入眼の F/FG 比より有意に大きく、低用量 NECA の値と同等であった。ZM241385、MRS1191 の投与は、高用量 NECA 注入眼の F/FG 比に影響を与えなかった。なお、低用量および高用量 NECA の最大作用が認められたのは NECA 注入 6 時間後であった。
3. 高用量 NECA 注入眼では網膜剥離は縮小した。A1 受容体 antagonist CPX は高用量 NECA によるこの網膜下液吸収を有意に抑制した。
4. 低用量 NECA 注入眼では網膜剥離は不変であった。ZM241385 は低用量 NECA による網膜下液吸収の減速を抑制する傾向を示した。

これらの結果から、低用量 NECA は親和性の高い A2 受容体を介して外方透過性を抑制し、高用量 NECA は親和性の低い A1 受容体を介して全体的変化として BRB の外方透過性を亢進させること、A3 受容体は外方透過性に寄与しないことが示された。さらに高用量 NECA の作用により網膜剥離が縮小することが明らかとなった。

このように本論文は、アデノシン受容体作動薬が A1、A2、A3 受容体のそれぞれに作用することにより、網膜色素上皮細胞における外方透過性にどのような変化が現れるかを明らかにしたものである。さらに本論文は、中心視力の低下を直接もたらしめている糖尿病黄斑症、加齢黄斑変性、およびぶどう膜炎に伴う黄斑浮腫などにおける網膜下液を早期に吸収させる治療薬としてアデノシン受容体作動薬が有用であることを示唆したものである。従って網膜浮腫・網膜剥離の治療の観点からもきわめて重要な新知見を与えている。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても論文提出者から適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものと判定した。