

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	梶野 浩樹
<p>学 位 論 文 題 目</p>			
<p>Tissue hypoxia inhibits prostaglandin and nitric oxide production and prevents ductus arteriosus reopening.</p> <p>(動脈管組織の低酸素はプロスタグランディンと一酸化窒素の産生を阻害し、その再開通を防ぐ)</p>			
<p>共著者名</p> <p>Chen YQ, Chemtob S, Waleh N, Koch CJ, Clyman RI.</p>			
<p>掲載雑誌</p> <p>Am J Physiol, Regul Integr Comp Physiol. 2000; 279(1): R278-86.</p>			
<p>【研究目的】 血管トーンは収縮因子と弛緩因子のバランスで決定される。動脈管における収縮は酸素に依存する収縮と依存しない収縮に分けられ、弛緩は主に prostaglandin (PG)による弛緩と nitric oxide (NO)による弛緩に分けられる(ref. 1, 2)。動脈管は出生後の酸素分圧の上昇とともに収縮する一方で、血管内腔の血流の途絶により中膜が強い低酸素状態に陥る。そして、この低酸素刺激こそが血管壁のリモデリング-解剖学的閉鎖に必須である (ref. 3)。しかし、出生後の酸素分圧の上昇による動脈管の収縮が、中膜が強い低酸素状態に陥った後でも維持される機序はまだ不明である。本研究の目的は、酸素濃度の変化に伴う動脈管血管トーンの収縮と弛緩のバランスの変化を知ること、特に動脈管中膜が出生後に達成する強い低酸素状態と同様の酸素濃度で、血管トーンのバランスが収縮に傾くことを維持するか否かを知ることにある。</p>			
<p>【材料・方法】 30頭の羊胎仔(在胎125~137日、満期約145日)を帝王切開で得て、麻酔下に急速脱血によって安楽死させた後、動脈管を摘出した。さらに動脈管を幅1mmのリング状に切り分け、10mlのKrebs液を満たした38℃の浴槽の中で、その等尺性張力を測定した。Krebs液の酸素濃度は0%、2.5%、5%、15%、30%酸素ガスによって、それぞれ2%、4%、6%、16%、30%に達した。</p>			
<p>それらの条件下で動脈管リング組織の酸素濃度を測定するために、EF5という物質をKrebs液</p>			

## 学位論文の要旨

に加えた。EF5 は低酸素状態に比例して組織に結合する物質である(ref. 3)。各酸素濃度下にあった動脈管リング組織と EF5 に特異的なモノクローナル抗体を用いて、免疫蛍光法により EF5 結合率を求め、既知の酸素濃度で EF5 と結合した血管平滑筋細胞とその結合率を比較することによって動脈管リング組織の酸素濃度を決定した。

プロトコール 1 : 動脈管リングの張力を各酸素濃度下で測定した(A: net tension)。次に、indomethacin( $5.6 \times 10^{-6}$ M)を加えて発生する張力(B: indomethacin-induced tension)と、さらに L-NAME( $10^{-4}$ M)を加えて発生する張力(C: L-NAME-induced tension)を求めた。(B)で動脈管が自ら産生する PG によって弛緩していた割合を、(C)で自ら産生する NO によって弛緩している割合を知ることができる。その後、95%酸素ガスをを用いながら KCl(100mM)を添加し、それにより得られた張力を最大限の収縮とし、さらに sodium nitroprusside( $10^{-4}$ M)添加 Krebs 液で置換して得られた張力を最大限の弛緩とした。全ての張力はこの最大限の収縮と弛緩の張力の差に対する百分率で示した。

プロトコール 2 : indomethacin と L-NAME を始めから添加し、Krebs 液酸素濃度を段階的に変化させて動脈管リングの張力を測定した。これによって PG や NO という弛緩因子の影響を除去し、酸素に依存する、あるいは依存しない収縮の割合を知ることができる。

以上のプロトコールに加えて、2%、4%、6%、30%の Krebs 液酸素濃度で 30 分間動脈管を浸した Krebs 液を採取し、その  $\text{PGE}_2$  および 6-keto  $\text{PGF}_{1\alpha}$  の濃度を測定し、30%酸素での濃度との比を求めた。また、2%、6%、30%酸素濃度における動脈管の  $\text{PGE}_2$  に対する反応性を調べるために、indomethacin と L-NAME の添加後に、 $\text{PGE}_2$ ( $10^{-10} \sim 10^{-6}$ M)を加えて動脈管リングの張力を測定し、濃度張力曲線における  $\text{IC}_{50}$  を求めた。

【成績】 (1) Krebs 液の酸素濃度が 2%、4%、6%、16%、30%である時、この実験系において動脈管リング組織の酸素濃度はそれぞれ、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、1.4%であった。この 0.1%という組織酸素濃度は出生後の動脈管中膜が in vivo で達成する強い低酸素状態に匹敵する(ref. 3)。

(2) プロトコール 1 : Net tension は 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、1.4%の組織酸素濃度で、 $66 \pm 5$ ,  $21 \pm 9$ ,  $23 \pm 11$ ,  $29 \pm 9$ ,  $46 \pm 11$ (%)であった。すなわち、動脈管はこの実験で調べた中では強い低酸素状態で最も大きな収縮を示した( $p < 0.001$ )。indomethacin-induced tension は 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、1.4%の組織酸素濃度で、 $0 \pm 0$ ,  $34 \pm 11$ ,  $36 \pm 15$ ,  $31 \pm 20$ ,  $22 \pm 11$ (%)であった。すなわち、動脈管は強い低酸素状態では PG による弛緩をもたなかった( $p < 0.001$ )。L-NAME-induced tension は 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、1.4%の組織酸素濃度で、 $0 \pm 0$ ,  $17 \pm 4$ ,  $17 \pm 5$ ,  $16 \pm 8$ ,  $14 \pm 6$ (%)であった。すなわち、動脈管は強い低酸素状態で PG と同様に NO による弛緩をもたなかった( $p < 0.001$ )。

(3) プロトコール 2 : Indomethacin と L-NAME によって弛緩因子の影響を失った動脈管は 1.4%の組織酸素濃度で  $78.4 \pm 6.9\%$ という大きな収縮を示した。その後 0.4%、0.3%、0.2%、0.1%と濃度を下げると、 $74 \pm 8$ ,  $69 \pm 8$ ,  $68 \pm 10$ ,  $64 \pm 8$ (%)に張力が低下した。0.1%の組織酸素濃度

## 学位論文の要旨

を実質的な無酸素状態と考えると、64%という張力が酸素に依存しない収縮の割合と言える。

(4) 0.1%、0.2%、0.3%、1.4%の組織酸素濃度での Krebs 液中 PGE<sub>2</sub> と 6-keto PGF<sub>1α</sub> の濃度は、0.1% でのみ有意に低かった(それぞれ 27±27%、22±9%、対 1.4%における濃度、p<0.01)。また、indomethacin と L-NAME の添加後、PGE<sub>2</sub> に対する 0.1%組織酸素濃度での動脈管張力の IC<sub>50</sub> は 0.3%、1.4%でのそれと有意差がなかった(それぞれ 7±2 x10<sup>-10</sup>M vs. 5±3 x10<sup>-10</sup>M、5±1 x10<sup>-10</sup>M)。ゆえに、プロトコール 1 における 0.1%組織酸素濃度での PG による弛緩の欠如は、自らの PG 産生が停止するためであり、低酸素状態で PG に対する反応性が低下するわけではない。

【考案】 動脈管中膜が出生後に達成する強い低酸素状態と同様の酸素濃度で、動脈管血管トーンのバランスが大きく収縮に傾くことを確認できた。それは強い低酸素状態では酸素に依存する収縮がなくとも PG と NO の産生が停止し弛緩因子を失うことによって、酸素に依存しない大きな収縮力が顕在化するという機序による。強い低酸素状態で PG や NO の産生が失われる理由はそれらの産生には酸素が基質として必須であるからと推定する。

酸素は動脈管平滑筋細胞を脱分極させ細胞内カルシウム濃度を上昇させて収縮を起こす。出生後動脈管は、血管内腔の血流に接する内膜側と vasa vasorum をもつ外膜側において血中酸素分圧の上昇による収縮が生じ閉鎖する。すると内腔の血流が失われ、外膜から離れた中膜では強い低酸素状態が生じ上記の機序の収縮が発生する。この空間的にも巧妙に機能する収縮機構が出生後の動脈管の閉鎖を維持し解剖学的閉鎖にまで導くものと考えた。

【結論】 動脈管中膜が出生後に達成する強い低酸素状態と同様の組織酸素濃度においても、動脈管は PG と NO による弛緩を失うことによって大きな収縮力を維持する。

## 引用文献

- 1 Clyman RI, Waleh N, Black SM, Riemer RK, Mauray F, Chen YQ.  
Regulation of ductus arteriosus patency by nitric oxide in fetal lambs: the role of gestation, oxygen tension, and vasa vasorum.  
Pediatr Res. 1998; 43(5): 633-44.
- 2 Clyman RI, Hardy P, Waleh N, Chen YQ, Mauray F, Fouron JC, Chemtob S.  
Cyclooxygenase-2 plays a significant role in regulating the tone of the fetal lamb ductus arteriosus.  
Am J Physiol. 1999; 276(3 Pt 2): R913-21.
- 3 Clyman RI, Chan CY, Mauray F, Chen YQ, Cox W, Seidner SR, Lord EM, Weiss H, Waleh N, Evans SM, Koch CJ.  
Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: the roles of

## 学位論文の要旨

postnatal constriction, hypoxia, and gestation.

Pediatr Res. 1999; 45(1): 19-29.

### 参考論文

1 Kajino H, Chen YQ, Seidner SR, Waleh N, Mauray F, Roman C, Chemtob S, Koch CJ, Clyman RI.

Factors that increase the contractile tone of the ductus arteriosus also regulate its anatomic remodeling.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001; 281(1): R291-301.

2 Bouayad A\*, Kajino H\*, Waleh N, Fouron JC, Andelfinger G, Varma DR, Skoll A, Vazquez A, Gobeil F Jr, Clyman RI, Chemtob S. (\*Both authors have equally contributed to the submitted work.)

Characterization of PGE2 receptors in fetal and newborn lamb ductus arteriosus.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280(5): H2342-9.

3 Goldberg SH, Takahashi Y, Cruz C, Kajino H, Roman C, Liu BM, Chen YQ, Mauray F, Clyman RI.

In utero indomethacin alters O<sub>2</sub> delivery to the fetal ductus arteriosus: implications for postnatal patency.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 282(1): R184-R190.

4 Clyman RI, Seidner SR, Kajino H, Roman C, Koch CJ, Ferrara N, Waleh N, Mauray F, Chen YQ, Perkett EA, Quinn T.

VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 282(1): R199-R206.

5 Kajino H, Goldberg S, Roman C, Liu BM, Mauray F, Chen YQ, Takahashi Y, Koch CJ, Clyman RI.

Vasa vasorum hypoperfusion is responsible for medial hypoxia and anatomic remodeling in the newborn lamb ductus arteriosus

Pediatr Res 2002; 51: 228-235.

## 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	梶 野 浩 樹
<p>審査委員長 藤 枝 憲 二 ㊞</p> <p>審査委員 石 川 睦 男 ㊞</p> <p>審査委員 牛 首 文 隆 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Tissue hypoxia inhibits prostaglandin and nitric oxide production and prevents ductus arteriosus reopening.            (動脈管組織の低酸素はプロスタグランジンと一酸化窒素の産生を阻害し、その再開通を防ぐ)</p>			
<p>動脈管は出生後の酸素分圧の上昇とともに収縮する一方で、血管内腔の血流の途絶により中膜が強い低酸素状態に陥る。この低酸素刺激こそが血管壁のリモデリング、すなわち器質的閉鎖に必須であるが、酸素分圧の上昇による動脈管の収縮が、強い低酸素状態に陥った後でも維持される機序は不明であった。本論文の研究目的は、その機序を解明することにある。</p> <p>論文提出者らは、その解明のために在胎満期の羊胎仔の動脈管を摘出し、様々な酸素濃度下、及び薬物添加時の動脈管血管張力を測定する実験系を作成した。この実験系の優れた点は、EF5 という低酸素状</p>			

態に比例して組織に結合する物質を用いて、組織の酸素濃度を測定する新しい方法を開発したことと、その方法を用いることにより、出生前後の生体内における動脈管組織酸素濃度を *in vitro* で再現しえたことである。

動脈管における収縮は酸素に依存する収縮と依存しない収縮に分けられ、弛緩は prostaglandin による弛緩と nitric oxide による弛緩に分けられる。論文提出者らは、この実験系に indomethacin や L-NAME を添加し、酸素濃度を適切に変化させることによって、それらの相互関係を明らかにした。特に、強い低酸素状態で最も強い収縮力が発生することを見出し、その機序が prostaglandin や nitric oxide の産生が停止するためであることを証明した。このことにより、生体内において酸素分圧の上昇による動脈管の収縮が、強い低酸素状態に陥った後でも維持される機序が解明されたと言える。また、本論文は動脈管の収縮機構の解明を進めたばかりでなく、動脈管の管理にまつわる周産期医療に大きく貢献する優れた考察内容を備えるものと言える。

なお、論文提出者に対し、本論文及び関連分野に関する試問を行い適切な解答が得られた。従って、本論文は学位論文に値するものと判断した。