

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	泉 直 宏
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Role of Nitric Oxide in Regulation of Retinal Blood Flow in Response to Hyperoxia in Cats</p> <p>(高酸素負荷後のネコ網膜血流量調節における一酸化窒素の役割)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>長岡 泰司、佐藤 栄一、十川 健司、籠川 浩幸、 高橋 淳士、河原 温、吉田 晃敏</p> <p>未 発 表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>血管内皮は、血管拡張物質である一酸化窒素 (NO) や収縮物質を有するエンドセリン (ET) などの血管作動物質を放出することにより、血液循環調節に重要な役割を果たしている。近年、糖尿病や動脈硬化では早期から血管内皮機能が障害され、それが病態の進展に関与することが明らかとなってきた。成人中途失明の原因第一位を占める糖尿病網膜症の発症・進展にも網膜血管内皮機能障害が関与する可能性が動物実験から示唆されているが、臨床的に網膜血管内皮機能を評価する方法は確立されておらず、従ってその臨床的意義は明らかではない。</p> <p>これまで我々は、ネコを用いた基礎実験で、生理的刺激に対する網膜循環動態の研究を行い、低酸素負荷における網膜血流増加には血流依存性調節を介した NO が関与していること(論文1)、さらに高二酸化炭素負荷による網膜血流増加には神経型 NO 合成酵素 (NOS) を介した NO が関与していることを明らかにしてきた(論文2)。一方、高酸素負荷は網膜血流を減少させる生理的刺激であるが、その血流減少反応が糖尿病患者では減弱することが知られており、血管反応性の指標として用いられている。さらにその血流減少反応には、主に血管平滑筋に存在する ET_A 受容体を介した ET-1 が関与することが報告されている(論文3)。ET は、血管平滑筋に存在する ET_A 受容体を介して血管を収縮させる一方、主に血管内皮に存在する ET_B 受容体を介して血管内皮から NO を放出させることにより、血管を拡張させることが知られている。これより、高酸素負荷により網膜で増加する ET-1 が、ET_A 受容体に加えて ET_B 受容体を介して血管内皮細胞から NO を産生させ、これが何らかの形で高酸素負荷に対する網膜血流の変化に関与している可能性が考えられる。血管内皮からの NO 産生能は血管内皮機能の指標とされており、この仮説が正しければ、高酸素負荷刺激時の網膜血流測定は、新しい網膜血管の内皮機能評価法となりうると考えられる。</p> <p>そこで本研究では、高酸素負荷時の網膜血流変化における血管内皮由来の NO の働きと ET 受容体との関連に着目し、非選択的 NOS 阻害剤である NG-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME)、ET_A 受容体阻害剤である BQ-123、ET_B 受容体阻害剤である BQ-788 を硝子体注入、神経型 NOS 阻害剤である 7-nitroindazole (7-NI) を腹腔内投与し、高酸素負荷に対する網膜血流の変化を解析した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 実験動物

実験には成ネコ40匹(体重1.9-4.0kg)を用いた。エンフルレンで全身麻酔し、臭化パンクロニウムにて非動化し、人工呼吸下にて実験を行った。

2. 高酸素負荷

酸素負荷は、100%O₂を用い、10分間行った。負荷開始前と負荷10分後(終了直前)に動脈血を採取し、血液ガス分析(PaO₂, PaCO₂, pH)により、高酸素負荷の程度を評価した。

3. NO合成酵素阻害剤及びET受容体阻害剤の投与

非選択的NOS阻害剤L-NAME(100mM, n=6)、その光学異性体であるNG-nitro-D-arginine-methylester(D-NAME; 100mM, n=7)、ET_A受容体阻害剤BQ-123(1mM, n=7)、ET_B受容体阻害剤BQ-788(1mM, n=8)を片眼の硝子体中に50μl注入した。基剤であるPhosphate-buffered saline(PBS)のみを投与したものを対照群(n=7)とした。L-NAME群においては硝子体注入120分後から、BQ-123群及びBQ-788群においては硝子体注入60分後から高酸素負荷を行った。

さらに構成型NOSの関与を詳しく検討するため、特異的神経型NOS(nNOS)阻害剤7-NIを基剤であるピーナツオイル10mlに溶解し腹腔内に投与した(50mg/kg, n=7)。基剤のみ投与したものを対照群とした。腹腔内投与90分後から同様の条件で高酸素負荷を行った。

4. 網膜循環の評価

以下の測定値を用いて網膜循環を評価した。網膜血流量は、レーザードップラー眼底血流計を用い、網膜動脈の血管径と血流速度を同時に測定して算出した。ずり速度は、血管径と血流速度から算出し、ずり応力(シェアストレス)の指標とした。また、大腿動脈から平均動脈血圧、心拍数を同時にモニターした。

高酸素負荷時には、負荷開始前10分間、2分間隔で測定し、各々の測定値の平均値を100%とした。負荷中および負荷終了後20分まで、2分間隔で測定した。

5. 統計学的処理

同一群におけるデータの解析には反復分散分析(ANOVA for repeated measurements)後、Dunnnett multiple range testを行った。同時点における対照群との比較解析には一元配置分散分析(one-way ANOVA)後、Dunnnett multiple range testを行った。2群間の比較解析にはStudent's paired t-testを行った。危険率5%未満を統計学的有意とした。

成 績

1. 高酸素負荷時の全身状態の変化

いずれの群においても、高酸素負荷時動脈血PaO₂は著明に増加したが、動脈血pH、動脈血PaCO₂、平均動脈血圧、心拍数には有意な変化を認めなかった。各群間で全身状態の変化に有意差はなかった。

2. 網膜血流量の変化

PBS投与群では、高酸素負荷開始後まず血流速度が低下し、遅れて血管径が収縮して、血流量はさらに減少し、8-10分で最小の値を示した。ずり速度は負荷中有意な変化をしなかった。負荷終了後、網膜血流量は10分程度で元のベースラインにまで回復し、その後測定終了時まで明らかな変化は認めなかった。

3. 高酸素負荷後の網膜血流量の変化に対するL-NAMEの関与

L-NAME 投与群では、高酸素負荷中の網膜血流量の減少は対照群に比べ変化を認めなかったが、負荷終了後の網膜血流量の回復は対照群に比べ有意に抑制され、負荷終了 20 分でもベースラインには回復していなかった。D-NAME 投与群では、高酸素負荷中および負荷終了後における網膜血流量の変化は対照群と同じ傾向を示した。

4. 高酸素負荷後の網膜血流量の変化に対する ET 受容体阻害剤の関与

BQ-123 投与群では、高酸素負荷中の網膜血流量の減少は対照群に比べ有意に抑制されたが、負荷終了後の網膜血流量の回復は対照群に比べ有意差はなかった。一方、BQ-788 投与群では、高酸素負荷中の網膜血流量の減少は対照群に比べ有意差を認めなかったが、負荷終了後の網膜血流量の回復は L-NAME 投与群と同様に対照群に比べ有意に抑制された。

5. 高酸素負荷後の網膜血流量の変化に対する 7-NI の関与

7-NI 投与群では、高酸素負荷中の網膜血流量の減少は対照群に比べ変化を認めず、負荷終了後の網膜血流量の回復は対照群に比べ有意差は認められなかった。

考 案

高酸素負荷による網膜血流低下では、網膜血流速度がまず低下し、それに続いて網膜細動脈血管径が収縮することにより、シェアストレスの指標であるずり速度は結果的に一定に保たれていた。このことから、酸素分圧の変化に応じて、測定部位よりも末梢での代謝性調節により末梢血管が収縮し血流速度がまず低下し、それに伴って引き起こされるずり速度の低下を代償するように、血管径が血流依存性機構により収縮したと推測された。血流減少時の血流依存性機構による血管収縮反応はこれまで網膜循環では報告されておらず、今回我々がその存在を初めて明らかにした。

さらに、高酸素負荷に引き続いておこる負荷終了後の網膜血流の回復反応が L-NAME 硝子体注入により抑制されたことから、この反応に NO が関与していることが初めて示唆された。

高酸素負荷による網膜血流量の減少には ET が関与していることが報告されている。二種類ある ET 受容体のうち ET_A 受容体は主に血管平滑筋に存在し、ET-1 との強い親和性により血管を収縮させる作用をもつ一方、ET_B 受容体は主に血管内皮に存在し、NO を放出させることにより血管を拡張させる作用をもつことが知られている。本研究では、高酸素負荷後にみられる網膜血流量の回復は ET_A 受容体阻害剤 BQ-123 により抑制されず、ET_B 受容体阻害剤 BQ-788 により抑制されたことから、この反応に ET_B 受容体を介した NO 産生が関与していることが示唆された。

眼内に存在する NOS には、細胞内に常に存在する構成型 NOS である nNOS と血管内皮型 NOS (eNOS) に加え、サイトカインなどの刺激で細胞が活性化されてはじめて発現する誘導型 NOS (iNOS) の 3 種類のアイソフォームが存在することが知られている。本研究では、高酸素負荷後にみられる網膜血流量の回復は非選択的 NOS 阻害剤 L-NAME により抑制され、特異的 nNOS 阻害剤 7-NI により抑制されなかったことから、この反応には主にもう一つの構成型 NOS である eNOS が関与するものと推測された。

本研究により、高酸素負荷後にみられる網膜血流量の回復に、ET_B 受容体を介した血管内皮からの NO による血管拡張が関与することが明らかとなった。血管内皮からの NO 産生は血管内皮機能の指標とされており、高酸素負荷後の網膜循環動態を評価することで、臨床的に有用な新しい網膜内皮機能評価の指標となる可能性がある。

結 論

1. 高酸素負荷により、まず網膜細動脈の血流速度が低下し、それに続いて血管径が低下して、網膜血流量は減少したが、ずり速度は一定に保たれていた。酸素分圧の上昇に対する末梢組織での血管収縮(代謝性調節)にともなう血流速度およびずり速度の低下がおり、それを代償するため(血流依存性調節)に網膜細動脈は収縮すると考えられた。
2. 非選択的 NOS 阻害剤の硝子体注入により、高酸素負荷後の網膜血流量の回復は抑制された。

3. ET_A 受容体阻害剤の硝子体注入により、高酸素負荷中の網膜血流量の減少は抑制されたが、高酸素負荷後の網膜血流量の回復は抑制されなかった。ET_B 受容体阻害剤の硝子体注入により、高酸素負荷後の網膜血流量の回復は抑制された。
4. nNOS 阻害剤の腹腔内投与により、高酸素負荷後の網膜血流量の回復は抑制されなかった。
5. 以上の結果から、高酸素負荷後の網膜血流量の回復に、ET_B 受容体を介した血管内皮からの NO が関与していることが推測された。

引用文献

1. Nagaoka T, Sakamoto T, Mori F, Sato E, Yoshida A. The effect of nitric oxide on retinal blood flow during hypoxia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3037-3044.
2. Sato E, Sakamoto T, Nagaoka T, Mori F, Takakusaki K, Yoshida A. Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow during hypercapnia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:4947-4953.
3. Takagi C, King GL, Takagi H, Lin YW, Clermont AC, Bursell SE. Endothelin-1 action via endothelin receptors is a primary mechanism modulating retinal circulatory response to hyperoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2099-2109.

参考論文

1. Izumi N, Nagaoka T, Mori F, Sato E, Takahashi A, Yoshida A. Relation between plasma nitric oxide levels and diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol.* 2006;50:465-468.
2. Nagaoka T, Takahashi A, Sato E, Izumi N, Hein TW, Kuo L, Yoshida A. Effect of systemic administration of simvastatin on retinal circulation. *Arch Ophthalmol.* 2006;124:665-670.
3. Yokota H, Mori F, Kai K, Nagaoka T, Izumi N, Takahashi A, Hikichi T, Yoshida A, Suzuki F, Ishida Y. Serum prorenin levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes: new method to measure serum level of prorenin using antibody activating direct kinetic assay. *Br J Ophthalmol.* 2005;89:871-873.
4. Shimamoto E, Mori F, Ishiko S, Takahashi A, Izumi N, Yoshida A. Use of scanning laser ophthalmoscopy in visual conversion reaction. *Br J Ophthalmol.* 2005;89:391-392.
5. Izumi N, Mori F, Ishiko S, Kitaya N, Hikichi T, Mizumoto H, Yoshida A. Spontaneous bilateral giant tears of the retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:1476-1478.

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	泉 直 宏
審査委員長 高 井 章 ㊟ 審査委員 柏 柳 誠 ㊟ 審査委員 吉 田 晃 敏 ㊟			
<h3 style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</h3> <p style="margin: 10px 0 0 0;"> Roles of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats </p> <p style="margin: 10px 0 0 40px;"> 「高酸素負荷に対するネコ網膜血流調節における一酸化窒素の役割」 </p>			
<p> ・【背景・目的】高酸素(hyperoxia)負荷は、網膜血流を減少させることが動物ならびにヒトにおける研究で知られており、網膜血管の反応性を調べる目的でしばしば用いられる方法の一つとなっている。本論文は、この高酸素負荷によっておこる網膜血流変化と負荷除去後の回復過程とにおける、内皮細胞由来の一酸化窒素ならびにエンドセリンの関与を検討したものである。 </p> <p> 【方法】実験は、両性成猫(1.9-4 kg)を enflurane 麻酔、pancuronium bromide (0.1 mg/kg/hr)を持続的に注入して不動化し、人工呼吸下で実施した。実験中は動脈血の pH、二酸化炭素分圧 PaCO₂、酸素分圧 PaO₂を継続的に計測した。また大腿動脈に刺入したカニューレを介して体循環血圧と心拍数も持続的にモニターした。直腸温は 37-38℃に保たれるよう保温を施した。なお、麻酔導入後、atropine (0.04 mg/kg)で前処理した。動物は腹臥位に置き、頭部は stereotactic 固定器で保持した。瞳孔は 0.5% の tropicamide で散大し、角膜外面に 0 diopter のレンズを装着して、そこから眼底を観察した。 </p> <p> 網脈血管内の血流速度(V;赤血球の移動速度)は Doppler 記録システムを用いて記録した。それと同時に、血管イメージから自動的に血管径 R を計測・記録した。これらの記録は、片眼の側頭部網膜動脈の二次分枝の比較的直線的な部分を選んで行い、それぞれ 2 分間の平均値を算出して時間に対してプロットした。血流量 RBF は($\pi R^2/4$)$\times V$として計算した。また、壁剪断応力率(wall shear rate; WSR)は、$8 \times V/R$として算出した。 </p> <p> 各種薬剤は磷酸緩衝食塩水(PBS)中に溶解して投与した。それら(通例各 50 μL)は、limbus(前眼縁)の後方 7 mm の位置に刺入した 30 ゲージ針を介し 100 μL Hamilton syringe を用いて、視神経乳頭部直前に注入した。 (次ページに続く) </p>			

得られた結果の概要は次の4点に要約できる。

1. まず、対照として(PBS)を注入した状態で10分間の高酸素負荷を加えると、負荷開始から2分以内にVの約20%の有意な減少が見られ、それに伴ってRBFも約50%減少した。Rの有意な変動はこれより遅れ4秒以降に観察された。WSRは、最初の2分でわずかながらも有意に低下し、4分以降はほとんど負荷前のレベルに復した。負荷終了後は、Vが最も早く2-4分で復元し、少し遅れてRとRBFも4-5分で回復した。
2. 非特異的なNO Synthase (NOS)阻害剤であるL-N^G-nitro-D-arginine methylester (L-NAME)の眼球内投与は、高酸素負荷前および負荷中のV、R、RBFには影響しなかったが、負荷終了後にこれらが復元する時間経過を著しく遅延させた。その結果、負荷終了後30分の時点でも、回復は約50%に止まった。なお、L-NAMEの代わりに同濃度のD-NAMEを投与しても、全く効果はみられなかった。
3. Endothelin-1 (ET-1)のA型受容体(ETA)は、一般に血管平滑筋細胞膜に多く分布するとされる。その選択的抑制剤であるBQ-123は、高酸素負荷前のV、R、RBFには影響しなかったが、1で述べた高酸素負荷中のそれらの変化の度合を1/2~1/3に弱めた。ただし、負荷終了後の復帰の時間経過には影響しなかった。これらは、高酸素負荷に伴う網膜血流減少の少なくとも一部が、ETA受容体を介する血管平滑筋収縮に伴うものであることを示唆する知見といえる。なお、WSRは、上記のようにPBS投与時には高酸素負荷開始直後にやや下がるかに見えたが、BQ-123投与時には、WSRの低下傾向は全く見られず、負荷開始後10分以降むしろ上昇する傾向を見せた。これは網膜血管局所においてETAを介する微妙な血流の自動調節が行われている可能性を示唆するものである。
4. ET-1のB型受容体(ETB)は内皮細胞細胞膜に多く発現しており、その刺激は内皮細胞からのNO産生を促すとされる。今回の実験でETBの選択的抑制剤であるBQ-788は、高酸素負荷前のV、R、RBFにはBQ-123と同様に影響しなかった。一方、これらのパラメータの高酸素負荷に伴う変化に関しては、BQ123とは逆に、高酸素負荷中の変化には影響せず、負荷除去後の回復過程を遅くした。このように、BQ-788は、上記2におけるL-NAMEと似た作用を示した。なお、神経タイプのNOS (nNOS)の阻害剤である7-nitroindazoleは、高酸素負荷に対する反応に何ら影響を与えなかった。

これらの結果のうち、特に2と4とは、高酸素負荷に伴う血流減少が、負荷終了後に回復する過程に、網膜血管内皮由来のNOが重要な役割を演ずることを実験的に明確に示した初めての知見である。また、3に関しては、ごく最近、他のグループによりやや類似したデータの報告があるが、今回の実験では、V、R、RBFおよびWSRの同時実時間記録により、それを遙かに明瞭に示している。

本論文では、このように適切な方法を用いて行った実験により、オリジナリティのある結果を導いていることが高く評価できる。また、糖尿病性の網膜血流の異常などを評価する新しい方法を示唆するものといえ、臨床方面からも注目されるだろう。

論文提出者は、3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。