

# 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	佐藤 栄一
<h2>学位論文題目</h2> <p>The effect of the intravitreal injection of N<sup>G</sup>- nitro-L-arginine-methylester on the changes in retinal blood flow in response to hypercapnia (二酸化炭素負荷時における網膜血流変化に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤L-NAMEの硝子体注入の影響)</p> <p>共著者名      坂本 尚志   長岡 泰司                          吉田 晃敏</p> <p>未公表</p> <h2>研究目的</h2> <p>組織血流量が減少した際、組織酸素需要や代謝需要を満たすように血流量を適応させる autoregulation機構が網膜には存在している。網膜虚血時にはこの機構により網膜血流量が増加するが、虚血によって生ずる低酸素と高二酸化炭素の両者がこの血流量増加に関与している。</p> <p>これまで我々は、動物を用いた実験により、低酸素では、まずはじめに毛細血管あるいは終末細動脈が拡張し、血管抵抗が減少して、組織血流量が増加すること（代謝性調節）、続いて、この血管抵抗の減少が、上流にある小口径の細動脈の血管内圧の減少を引き起こし、血管平滑筋が弛緩して血管が拡張すること（筋原性調節）、さらに、その上流にある大口径の細動脈では下流で増大した血流により、血管壁に対するずり応力の増加を介した血管拡張を引き起こされ、さらなる血流量増加が引き起こされること（血流依存性調節）を明らかにしてきた。また、毛細血管や終末細動脈における代謝性調節および大口径の細動脈における血流依存性調節には一酸化窒素(NO)が関与することも明らかにしてきた<sup>1</sup>。</p> <p>一方、高二酸化炭素負荷時の網膜血流量増加は様々な動物種、測定方法を用いて明らかにされているが、NOの関与は明らかになっていない<sup>2</sup>。そこで、本研究では、高二酸化炭素負荷時の網膜血流量増加へのNOの関与を検討するため、NO合成酵素阻害剤であるL-NAMEを硝子体内注入し、二酸化炭素負荷における網膜循環の変化を解析した。</p>			

## 材 料 と 方 法

### 1. 実験動物

実験には成ネコを用いた。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. 二酸化炭素負荷

人工呼吸管理下で二酸化炭素の吸入負荷を10分間行った。吸入には、5%CO<sub>2</sub>, 21%O<sub>2</sub>, 74%N<sub>2</sub>の混合ガスを用いた。負荷開始前、負荷10分後、および負荷終了10分後に動脈血を採取し、血液ガス分析(pH, PaCO<sub>2</sub>, PaO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub>)により、二酸化炭素負荷の程度を評価した。測定中は呼気終末期二酸化炭素濃度を記録し、高二酸化炭素の状態が維持されていることを確認した。

### 3. NO合成酵素阻害剤の投与

NO合成酵素阻害剤であるL-NAME(N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methylester; 100mM) (L-NAME群) を30ゲージ針をつけたマイクロシリンジを用いて、角膜輪部から片眼の硝子体中に50μl 注入した。L-NAME非投与をコントロール群とした。L-NAME群においては、硝子体注入120分後から二酸化炭素吸入負荷を行った。

### 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、ずり応力の指標とした。血管抵抗は、大腿動脈からモニターした平均動脈血圧、前房内からモニターした眼圧、および算出した網膜血流量から算出した。また、大腿動脈から心拍数も同時にモニターした。

二酸化炭素吸入負荷時には、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10分後まで、1分間隔で測定し、コントロール群とL-NAME群の結果を比較、検討した。

### 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。2群間の比較にはunpaired t-testを行った。相関係数の検定はPearson's correlation coefficientを用いた。危険率5%未満を統計学的有意とした。

## 成 績

### 1. 二酸化炭素負荷時の網膜血流量増加に対するL-NAMEの効果

コントロール群では、二酸化炭素吸入負荷時、平均動脈血圧と心拍数に大きな変動を認めなかったが、網膜血流量は増加し、負荷開始後7-10分で最大の値を示した。血管径と血流速度は網膜血流量とともに増加したが、ずり速度は増加しなかった。血管抵抗は負荷開始後減少し、負荷後7分で最小となり、負荷中はその値を維持した。一方、L-NAME群では、網膜血流量の増加は有意に抑制され、血管径

および血流速度には有意な増加を認めなかった。ずり速度、血管抵抗は有意な変化をしなかった。

## 2. 二酸化炭素負荷時の血管径増大と血流速度増大に対するL-NAMEの効果

網膜血流量増加に、血管径増大および血流速度増大のいずれが関与しているか解析するために、血管径増大( $\Delta D$ )と血流速度増大( $\Delta V$ )の相関関係を検討した。

コントロール群では、 $\Delta D$ と $\Delta V$ の間には負の相関関係を認めたが、L-NAME群では、 $\Delta V$ が低下し、 $\Delta D$ と $\Delta V$ の間に相関関係を認めなかった。

コントロール群では、高二酸化炭素の負荷前血管径と $\Delta D$ の間に負の相関関係を認めたが、L-NAME群では、負荷前血管径の小さい例における $\Delta D$ が低下し、負荷前血管径と $\Delta D$ の間に相関関係を認めなかった。

コントロール群では、高二酸化炭素の負荷前血管径と $\Delta V$ の間に正の相関関係を認めたが、L-NAME群では、正の相関関係は保たれていたが、負荷前血管径によらず一様に $\Delta V$ が低下した。

## 考 案

高二酸化炭素負荷による網膜血流量増加がL-NAMEの硝子体内注入で抑制されたことから、高二酸化炭素による網膜血流量増加にNOが関与していることが示唆された。また、この網膜血流量増加の抑制は、大口径の細動脈における血管径の増大( $\Delta D$ )の抑制よりも血流速度増大( $\Delta V$ )の抑制によることがはじめて明らかとなった。

血流速度の増大は、その下流における血流増大を反映していることが推測されているが、今回の解析で、L-NAME注入により負荷前の血管径の違いによらず一様に血流速度が低下したことは、測定した大口径の細動脈より末梢での血流増加の抑制が主体となっていることを示す結果と考えられる。すなわち、毛細血管および終末細動脈における代謝性調節による血管拡張がL-NAMEによって抑制されたことを示唆している。

一方、大口径の細動脈における血管径の増大は、下流の毛細血管および終末細動脈における代謝性調節による血流量増加に伴った血流依存性調節が主体であることが知られているが、本研究では、血管径増大の抑制は顕著でなかった。この理由として、今回用いた二酸化炭素負荷で引き起こされた末梢での代謝性調節が、大口径の細動脈に血流依存性調節を引き起こすのに十分なだけの血流増大を引き起こしていなかったことが推測される。コントロール群においてずり速度が増加しなかったことは、L-NAME投与によらず血流依存性調節の関与が小さかったことを示しており、また高二酸化炭素によってもたらされる細胞外アシドーシスの血管平滑筋への直接弛緩作用と、血流依存性調節による血管拡張とが重複して起こった可能性が考えられる。

本研究により、高二酸化炭素による網膜血流量の増加には、主に代謝性調節でのNOを介する血管拡張が関与することが明らかとなった。虚血時には、低酸素と高二酸化炭素両者による網膜血流量の増加が引き起こされる。低酸素と高二酸化炭素の両者を併せての負荷実験は行っていないが、虚血時の網膜血流量増加において、高二酸化炭素は低酸素による血流増加と共通の機構を介していることが推測された。

## 結 論

1. 一酸化窒素合成酵素阻害剤の硝子体内注入により、二酸化炭素吸入負荷による網膜血流量増加は抑制された。
2. 一酸化窒素合成酵素阻害剤の硝子体内注入により、大口径の細動脈における血管径増大よりも、血流速度増大が大きく抑制された。
3. 以上の結果から、一酸化窒素が高二酸化炭素による網膜血流量増加に関与し、一酸化窒素は大口径の細動脈よりも末梢の血管を拡張させることで網膜血流量を増加させていることが推測された。

## 引用文献

1. Nagaoka T, Yoshida A, Mori F, Kagokawa H, Sato E, Sakamoto T: Effect of intravitreal injection of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methylester on retinal blood flow during hypoxia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41: S549; 2000
2. Koss MC: Functional role of nitric oxide in regulation of ocular blood flow. *European Journal of Pharmacology* 374: 161-174; 1999

## 参考文献

1. Sato E, Mori F, Igarashi S, Abiko T, Takeda M, Ishiko S, Yoshida A: Corneal advanced glycation end products increase in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 24: 479-482; 2001
2. 佐藤栄一、石子智士、今野 優、小笠原博宣、北谷智彦、柳谷典彦、長岡泰司、吉田晃敏: 網膜動脈分枝閉塞症の網膜厚と網膜感度の変化. *眼科臨床医報* 93: 1470-1473, 1999
3. 佐藤栄一、今野 優、長岡泰司、花田一臣、吉田晃敏: 眼科検診における手持ち式オートレフラクトメーターの有用性. *眼科臨床医報* 94: 862-864, 2000

## 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	佐藤 栄一
<p>審査委員長 原 淵 保 明 ㊟</p> <p>審査委員 高 井 章 ㊟</p> <p>審査委員 坂 本 尚 志 ㊟</p> <p>審査委員 吉 田 晃 敏 ㊟</p>			
<h3 style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</h3> <p style="margin: 0;">The effect of the intravitreal injection of N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methylester on the changes in retinal blood flow in response to hypercapnia</p> <p style="margin: 0;">(二酸化炭素負荷時における網膜血流変化に対する一酸化窒素合成酵素阻害剤 L-NAME の硝子体注入の影響)</p>			
<p>網膜虚血時には網膜血流量が増加するが、虚血によって生ずる低酸素と高二酸化炭素の両者がこの血流量増加に関与している。本研究では、高二酸化炭素負荷時の網膜血流量増加への NO の関与を検討するため、ネコを用いて NO 合成酵素阻害剤である L-NAME を硝子体内注入し、二酸化炭素負荷における網膜循環の変化を解析した。</p> <p>方法は網膜動脈の血管径と血流速度をレーザードップラー眼底血流計にて測定し、網膜血流量はこれらの値から算出した。二酸化炭素吸入負荷によって血管径と血流速度はいずれも増加し、その結果、網膜血流量は増加し、血管抵抗は減少した。一方、L-NAME 投与後、二酸化炭素吸入負荷を行ったところ、血管径、血流速度、網膜血流量および血管抵抗は負荷前に比較していずれも有意な変化を認めなかった。対照群、PBS 前投与群および L-NAME 前投与群における二酸化炭素吸入負荷時の血流動態の変化を比較したところ、血管径の変化は3者間に差を認めなかったが、血</p>			

流速と網膜血流量は L-NAME 前投与群では対照群および P B S 前投与群に比較して有意に低下していた。高二酸化炭素負荷前の血管径と高二酸化炭素負荷時の血流速度変化の関連性を解析したところ、L-NAME 群では対照群に比較していずれの血管径においても同じ割合で血流速度が抑制されていた。したがって、L-NAME は測定した細動脈より末梢での血流を抑制したこと、すなわち、L-NAME は高二酸化炭素負荷によって生じる毛細血管や終末細動脈の血管拡張を抑制したことが示唆された。

本研究は、高二酸化炭素下における網膜血流量の増加には NO が深く関与していることが明らかしたものである。さらに、その機序として NO は大口径の細動脈の血管拡張に直接的に働くのではなく、抹消の毛細血管を拡張し、その結果、大口径の細動脈における血流速度が増加する可能性を示唆した。本研究成果は臨床的にも今後、網膜虚血の治療として NO donor などが有効である可能性を秘めている。また、本論文提出者に行った試問審査においても、適切な解答が得られ、同氏は研究者として基本的な資質も十分であると判断した。

以上の内容から、本審査委員会は本論文を学位論文として値するものであると判断した。