

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	中林 征吾
学 位 論 文 題 目			
Effect of Acute Increase in Systemic Blood Pressure on Retinal Microcirculation in Cats: Role of Nitric Oxide, Prostanoids, Endothelin, and Rho kinase			
(ネコの全身血圧の急激な上昇の網膜微小循環に対する効果: 一酸化窒素、プロスタノイド、エンドセリン、Rho キナーゼの役割)			
共 著 者 名			
長岡 泰司、十川 健司、谷 智文、吉田 晃敏			
未 発 表			
研 究 目 的			
<p>高血圧は、高血圧性網膜症などの様々な眼底変化を起こし、持続した全身血圧の上昇が網膜血管を障害すると考えられる。¹⁾ このような高血圧性の組織障害を防ぐために、網膜微小循環には、組織灌流圧の変動に対して組織血流を一定に維持する自己調節能が存在している。²⁾ 我々はこれまでに、血圧上昇時には網膜血管が収縮して、網膜血流量を一定に維持するように働くことを報告した。³⁾ 一方、急激な全身血圧上昇に対する網膜微小循環調節のメカニズムについては未解明であった。そこで本研究では、急激な全身血圧の上昇を我々の確立したネコ in vivo 実験系で作製し、網膜微小循環の反応性を検討した。</p>			
材 料 ・ 方 法			
1. 実験動物			
実験には成ネコ43匹(体重2.2-4.6kg)を用いた。セボフルランで全身麻酔し、臭化パンクロニウムにて非動化し、人工呼吸下で実験を行った。実験中は、平均血圧、心拍数、眼圧を継続的にモニターした。眼灌流圧は、平均血圧と眼圧から算出した。			
2. 網膜循環の評価			
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絶対血流速度を同時に測定して絶対血流量を算出した。ずり速度は、血管径と血流速度から算出し、ずり応力(シエアストレス)の指標とした。血管抵抗は、眼灌流圧と網膜血流量から算出した。			

3. 薬物の硝子体内微量注入

非選択的一酸化窒素(NO)合成酵素阻害剤であるL-NAME(100 mM, n=8)、シクロオキシゲナーゼ(COX)阻害剤であるインドメタシン(5 mM, n=5)、エンドセリン A(ET_A)阻害剤であるBQ-123(1mM, n=6)、Rhoキナーゼ阻害剤であるファスジル(5 mM, n=5)を片眼の硝子体に 50 μl 注入した。インドメタシンは炭酸ナトリウム溶液(n=5)に、その他の薬剤はリン酸緩衝生理食塩水(PBS, n=13)に溶解し、基材のみ投与したものを対照群とした。

4. 全身血圧上昇負荷

大腿動脈からバルーン付きダブルルーメンカテーテルを挿入、胸部下行大動脈に留置し、バルーンの膨張により全身血圧を急激に上昇させた。薬物硝子体注入 120 分後に網膜循環測定を行い、これをベースラインとした。その 10 分後に全身血圧上昇負荷を 5 分間行い、1分ごとに網膜循環を評価した。

5. 統計学的処理

2 群間の比較には、Student's paired t-test を行った。同一群の比較には反復分散分析(one-way ANOVA for repeated measurements)後、Dunnett test を行い解析した。薬物投与群における対照群との比較には、二元配置分散分析(two-way ANOVA)後、Bonferroni multiple range test を行った。危険率 5%未満を統計学的有意とした。

成 績

1. 全身血圧上昇時の網膜循環動態の変化

PBS 群ではバルーンの膨張により、全身平均血圧は負荷前の 95.6±1.8 mmHg (平均±標準誤差)から負荷後より急激に上昇し、5 分後には 151.4±2.0 mmHg に上昇した。血管径は、負荷直後は変化がなかったが徐々に収縮し、4分から有意に減少した。血流速度、血流量、ずり速度、血管抵抗は有意に増加した。

2. 全身血圧上昇後の網膜血流量の変化に対する NO 合成酵素阻害の影響

L-NAME 投与群では、全身血圧上昇後、血流速度は対照群とほぼ同様に増加したものの、負荷直後から血管径は有意に減少したため、血流量は負荷中有意な変化を認めず、対照群でみられた血流量の増加は消失した。

3. 全身血圧上昇後の網膜血流量の変化に対する COX 阻害の影響

インドメタシン投与群においても、全身血圧上昇後、血流速度は対照群と同様に増加したものの、血管径は有意に減少したため、血流量は対照群と比べて有意に減弱していた。一方、インドメタシンの溶媒である炭酸ナトリウム溶液投与群では、PBS 群とほぼ同様の変化を示した。

4. 全身血圧上昇後の網膜血流量の変化に対する ET_A 受容体阻害の影響

BQ-123 投与群では、全身血圧上昇後の血管径は対照群とほぼ同様の変化を示した。血流速度、血流量は増加し、それらの増加作用は対照群に比べて有意に増強した。

5. 全身血圧上昇後の網膜血流量の変化に対する Rho キナーゼ阻害の影響

ファスジル投与群では、全身血圧上昇負荷後の血管径は有意な変化を認めなかった。血流速度、血流量は増加し、それらの増加作用は対照群と比べて有意に増強した。血管抵抗は対照群と比べて有意に減弱し、負荷中有意な変化を認めなかった。

考 案

本研究では急激に全身血圧を上昇させると、少なくとも 5 分の時期では網膜血流量は一定に保たれていないことが明らかとなった。また、NO や血管拡張性のプロスタノイドが網膜血管を拡張させ、網膜血流の増加に関与すること、一方で ET-1 や Rho キナーゼが網膜血管を収縮させ、網膜血流増加を抑制するように働くことが示唆された。

PBS 投与群では、血管径は、血圧上昇後は変化がなく 4 分から有意に収縮したのに対し、NO 合成酵素阻害剤である L-NAME、また COX 阻害剤であるインドメタシン投与群では、血圧上昇後早期から血管径が減少し血流量増加が抑制された。このことから、NO と血管拡張性のプロスタノイドの関与によって血管拡張がおこり、血流量が増加することが明らかとなった。これらの血管拡張性物質は網膜血管内皮細胞から放出されると考えられるため、血圧上昇時の血流増加には、網膜血管内皮細胞が重要な役割を果たしていることが推測された。

一方、重要な血管収縮因子である ET-1 の受容体のうち、血管平滑筋収縮に関与する ET_A 受容体の阻害剤である BQ-123 投与群では、血圧上昇後、PBS 群と比べて血管径は変化しないのに対し、血流速度と血流量が増強したことから、ET_A 受容体を介した ET-1 の関与によって、測定部位よりも末梢の血管の収縮が示唆された。

さらに、ET_A 受容体刺激により平滑筋で活性化するとされる Rho キナーゼの阻害剤であるファスジル投与群では、PBS 群と比べて血流速度と血流量が増強したこと、血管抵抗の増加が消失したことから、急激な血圧上昇に対する筋原性調節の血管収縮反応には ET-1 による ET_A 受容体刺激を介した Rho キナーゼの関与が示唆された。

以上の結果から、急激な全身血圧の上昇時には、血流依存性調節により NO、そして血管拡張性のプロスタノイドが産生されるため、血管内圧上昇に対する筋原性調節による収縮反応が相殺され、結果として血流量が増加すると考えられた。また、この血管内圧上昇に対する血管収縮には、ET-1 による ET_A 受容体刺激作用および Rho キナーゼの関与が明らかとなった。このように、急激な血圧上昇時には網膜血管内皮細胞由来の血管作動性拡張および収縮因子が放出されていることが明らかとなり、網膜血管内皮細胞による血流調節機構が、網膜微小循環調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

結 論

1. ネコを用いて急激に全身血圧を上昇させると、その上昇直後から網膜動脈の絶対血流速度と血流量が増加し、遅れて血管径が減少した。これらは血管内圧の増加に対する筋原性調節による血管収縮よりも、血流依存性調節による血管拡張が相対的に優位に作動した結果であると考えられた。
2. NO 合成酵素阻害剤および COX 阻害剤の硝子体内微量注入により、全身血圧上昇早期より血管径は収縮して血流量は維持されたことから、NO およびプロスタノイドは血流依存性調節における拡張反応に関与していると推測された。
3. ET_A 受容体阻害剤および Rho キナーゼ阻害剤の硝子体内微量注入により、全身血圧上昇後の血流速度および血流量増加が増強されたことから、血管内圧上昇に対する収縮反応に ET-1 による ET_A 受容体および Rho キナーゼが関与していると推測された。
4. 以上の結果から、急激な全身血圧上昇時には、網膜血管内皮細胞による血流調節機構が、網膜微小循環に重要な役割を果たしていることが推測された。


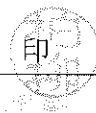

引用文献

1. Wong TY, Mitchell P. Hypertensive retinopathy. *N Engl J Med.* 2004;351:2310-2317.
2. Robinson F, Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL, Sinclair SH. Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27:722-726.
3. Nagaoka T, Mori F, Yoshida A. Retinal artery response to acute systemic blood pressure increase during cold pressor test in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1941-1945.

参考論文

1. Sogawa K, Nagaoka T, Izumi N, Nakabayashi S, Yoshida A. Acute hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in retinal arterioles in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:2648-2655.

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	中林 征吾
		審査委員長	高井 章 
		審査委員	柏柳 誠 
		審査委員	廣川 博之 
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Effect of acute increase in systemic blood pressure on retinal microcirculation in cats: role of nitric oxide, prostanoids, endothelin, and Rho kinase</p> <p style="text-align: center; font-size: 0.9em;">「ネコの全身血圧の急激な上昇の網膜微小循環に対する効果：一酸化窒素、プロスタノイド、エンドセリン、Rho キナーゼの役割」</p>			
<p>【目的】局所寒冷暴露により全身血圧上昇を誘導した際の眼底血流の変化を調べることで、より血管の圧変化に対する応答性を調べることができ、糖尿病性血管障害の程度の判定などに利用できるのではないかと期待されている。しかし、全身血圧変化に伴う眼底血行動態の変化とその調節機構については未知の点が多い。この研究では、ネコにおいて眼底微小血流を Doppler 法を用いて記録し、全身血圧を急激に上昇させたときの応答を観察するとともに、関連する調節因子の同定を目指している。</p> <p>【方法】両性成猫(計 43 頭)を用い、吸入麻酔/人工呼吸下で実施した。瞳孔を 0.5 % の tropicamide で散大し、角膜外面に 0 diopter のコンタクトレンズを装着して、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。</p> <p>大腿動脈からバルーン付ダブルルーメンカテーテルを挿入、胸部大動脈に留置し、バルーンの膨張により全身血圧を急激に上昇させた。</p> <p>各種薬剤(通例各 50 μL)は、limbus(前眼瞼縁)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。</p>			

主な結果は次の2点に要約できる。

1. 平均全身血圧を90 mmHgから135 mmHgに上昇させたあと5分間は、血管径は徐々に10%ほど縮小した。血流は1分後にかけて急速に血圧上昇前の150%まで上昇(初期相)したが、2分後には125%に戻り、ほぼその状態を維持した(持続相)。眼球内にL-NAME (NO合成酵素阻害剤)を投与した状態で同じ血圧上昇負荷をかけると、1-2分以内に6-7%の血管径短縮がみられ、初期の血流上昇をほぼ消失させるとともに、持続相も強く抑制した。Indomethacin (cyclooxygenase阻害剤)も10%の血管径短縮を起したが、その時間経過は比較的緩徐であり、初期相の血流上昇には影響せず、持続相の身を抑制した。
2. BQ-123 (endothelin-1受容体A型の阻害剤)の眼球内投与は、全身血圧上昇に伴う血流変化の初期相、持続相の変化を倍加せしめた。Fasudil (Rho kinase阻害剤)は、初期相は変化させず、持続相のみを大きく増強した。これら2種類の阻害剤の作用は血管径の変化を伴わず現れたので、モニターしている部位よりも下流で、endothelin-1を介した血管収縮が起っていることを示唆する。

血管固有の血流恒常性維持機能の範囲を超えた全身血圧を与えた時の網膜血流の変化を初めて経時的に観察した上、その様な応答の初期相・持続相にNO、プロスタノイド、エンドセリンなどの調節因子が関与していることを明らかにした点が評価できる。

全身血圧の変化に伴うrenin-angiotensin系の関与がなかったかどうかの検討など行われていればさらに申分なかつたと思われるが、学位論文としては十分の内容であると評価できる。

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。