

学 位 論 文 題 名

L-arginine-nitric oxide pathway の
心循環系における役割に関する研究

:nitric oxide 合成酵素阻害薬の長期投与による
新たな高血圧ラットモデルを用いた検討

学位論文内容の要旨

目 的

nitric oxide (NO) は、さまざまな組織で産生されており、特に血管内皮細胞で産生される endothelium-derived relaxing factor (EDRF) / NO は多くの研究者によってその作用機序が解明されつつある。NO はアルギニンを基質として NO 合成酵素 (NOS) により合成されるが、NOS の阻害により、昇圧作用が生じることが知られている。また、NO は血管内皮細胞のみならず交感神経系の制御を介して循環調節に影響を及ぼすことが報告されている。しかし血管内皮細胞以外での NO の役割についてはいまだに明確にされていないことが多い。

NOS 阻害薬の慢性投与による高血圧モデルを作製する試みは、主に NOS 阻害薬経口投与によって行われてきた。しかし従来の方法では、消化管吸収率や摂取量の変化により投与量が一定しないことがあり、安定した結果が得られるとは限らない。

本研究では長期間にわたり一定量の薬物を持続的に投与することが可能である osmotic pump を用い、ラットに NOS 阻害薬である L-N ω -nitro-arginine methyl ester (NAME) を慢性投与して安定した高血圧モデルを確立し、NO の交感神経系を含めた心循環系における役割を明らかにすることを目的とした。

方 法

Wistar 系ラットの腹腔内に生理食塩水 (コントロール群: n=8), 0.2M NAME (低NAME群: n=13), 1M NAME (高NAME群: n=12) をそれぞれ充填した osmotic pump を埋め込み、さらに脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP 群: n=9) を対照群として加えた 4 群について、4 週間の血圧・心拍数の推移を尾動脈カフ法により測定した。また、一部のラットでは、telemetry system を用いることにより、無麻酔・無拘束下での観察を行った。4 週間の観察期間終了後、ラット大腿動脈にカニューレを挿入し、これを圧トランスデューサーに接続して大動脈圧および心拍数を記録した。続いてカニューレより採血し、血漿中活性レニン濃度 (RIA 法)・血清中カテコールアミン濃度 (HPLC 法) を測定した。さらに血中 L-アルギニン濃度および L-ニトロアルギニン濃度をアミノ酸分析器を用いて測定した。

脱血後、胸部下行大動脈および心臓を摘出し、ホルマリン固定後、輪状標本を作製した。コンピュータ画像解析装置 (Kontron Cardio 500) を用いて大動脈壁の面積と内腔面積との比 (wall / lumen area ratio) および左心室壁厚を算出した。

結果

尾動脈カフ法により測定した収縮期血圧は低NAME群および高NAME群でそれぞれ 113.9 ± 3.1 から 144.0 ± 4.4 mmHg (mean $\pm$ S.E.), および 114.1 ± 7.3 から 181.4 ± 9.0 mmHg と上昇した. コントロール群とSHRSP群ではそれぞれ 116.8 ± 5.5 から 120.6 ± 1.9 mmHg, 200.3 ± 5.1 から 213.8 ± 7.4 mmHg と, 血圧に有意な変化が認められなかった. また, NAME投与群の収縮期血圧はL-ニトロアルギニンおよびL-ニトロアルギニン/L-アルギニン比と正の相関を示した.

心拍数はコントロール群 (約420 bpm) とSHRSP群 (約450 bpm) では心拍数に有意な変化が認められなかった. 低NAME群および高NAME群の心拍数は osmotic pump 埋め込み後数日で410から340 bpm前後まで急激に低下したのち, 徐々に前値に戻った. Telemetry system により測定した血圧の推移は尾動脈カフ法による測定値と同様の結果だった. また, osmotic pump 除去後の血圧はNAME投与群では徐々に回復する傾向を示した. 心拍数は尾動脈カフ法で見られたNAME投与群における一過性の心拍数低下は認められず, ほぼ一定の心拍数 (約400 bpm) を保った.

高NAME群ではコントロール群 (0.13 ± 0.02 ng/ml) に比べノルアドレナリン濃度の有意な上昇 (0.21 ± 0.03) が認められたが, 低NAME群・SHRSP群では変化を認めなかった (0.14 ± 0.02 , 0.15 ± 0.03). アドレナリン・ドーパミン・活性レニン濃度は4群間で差を認めなかった.

高NAME群では, SHRSPに比べ高血圧の程度が低くその持続期間が短いにもかかわらず, 大動脈壁/内腔面積比は 0.39 ± 0.06 と, SHRSP群 (0.39 ± 0.03) と同程度に増大が認められた. 低NAME群 (0.33 ± 0.02) ではコントロール群 (0.25 ± 0.05) と有意差を認めなかった.

左心室壁厚は, コントロール群, 低NAME群, 高NAME群, SHRSP群でそれぞれ 0.25 ± 0.05 , 0.33 ± 0.02 , 0.39 ± 0.06 , 0.38 ± 0.03 と, 高NAME群で最も高値を示した. 高NAME群・SHRSP群はコントロール群と比べ有意な肥厚を示したが, 高NAME群ではSHRSP群に比し, 血圧上昇の程度が小さいにもかかわらず肥厚が著しい傾向が認められた.

考察

本研究で作成したNOS阻害薬投与による慢性高血圧モデルは, 従来の経口投与による高血圧とはほぼ同程度の昇圧を示した. osmotic pump を用いたNOS阻害薬慢性投与により, 血圧上昇の程度が調節可能で, ラットの飲水量や腸管の吸収率に影響を受けない安定した高血圧モデルを作成することが可能となった. Telemetry system を用いて観察した血圧は osmotic pump 除去後, 投与前のレベルに戻る傾向を示した. しかし血圧の正常化が組織変化の正常化を伴うものであるか否かは今後の検討が必要である.

NAME投与群において, NOS阻害薬経口または静脈内投与による他の報告にも多く見られるように, 一過性の心拍数低下が観察された. 静脈内投与による急性実験では圧受容器反射がこの原因であるとの報告があるが, telemetry system による観察ではこれが見られなかったことや, 血圧上昇が明らかになる前から心拍数の低下が生じてくることから, 慢性投与における心拍数の低下はNOS阻害による圧受容器反射の反応性の変化や, 測定時のストレスに対する反応性の変化などによるものと考えられる. また, 後期の心拍数の回復には, 下記に示したように, 交感神経活性の亢進が関与している可能性がある. NOS阻害薬の静脈内投与による実験では交感神経活性が上昇することが報告されているが, 本実験での高NAME群における血中ノルアドレナリンの有意な上昇とドーパミンの低下傾向は, 交感神経終末でのノルアドレナリンの放出増加を示唆し, NOS阻害薬慢性投与においても心循環系に対する交感神経系が関与していると思われる.

また, 高NAME群ではSHRSP群に比べ高血圧の程度が軽度で, しかもその持続時間が短かったにも関わらず, SHRSP と同等またはそれ以上に著しい大動脈や心筋の肥厚が見られた. 高血圧による細胞増殖や肥大に加えて, NOによる細胞増殖抑制作用の減弱, 交感神経系の亢進などが高度の組織肥厚を生じたものと考えられた.

結語

1) NOS合成酵素阻害薬NAMEを osmotic pump を用いて慢性投与することにより血圧上昇の程度が調節可能な安定した慢性高血圧ラットの作製が可能となった.

2) NOS阻害薬慢性投与による循環動態および組織変化の機序として, 交感神経系亢進やNOによる細胞増殖抑制作用の減弱が関与する可能性が示唆された.

学位論文審査の要旨

主 査 ・ 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 安 田 慶 秀

学 位 論 文 題 名

L-arginine-nitric oxide pathway の 心循環系における役割に関する研究

:nitric oxide 合成酵素阻害薬の長期投与による

新たな高血圧ラットモデルを用いた検討

目 的

nitric oxide (NO) は、特に血管内皮細胞由来の endothelium-derived relaxing factor (EDRF) / NO として多くの研究者によってその作用機序が解明されつつある。NOはアルギニンを基質としてNO合成酵素(NOS)により合成され、NOSの阻害により昇圧作用が生じることが知られている。また、急性実験ではNOは交感神経系の制御を介して循環調節に影響を及ぼすことが報告されている。NOS阻害薬による慢性高血圧モデル作製の試みは、従来主に経口投与による報告があるが、消化管吸収率や摂取量の変化により必ずしも効果が一定していない。

本研究では長期間にわたり一定量の薬物を持続的に投与することが可能である osmotic pumpを用い、ラットにNOS阻害薬 L-N ω -nitro-arginine methyl ester (NAME) を慢性投与して安定した高血圧モデルを確立し、このモデルを用いてNOの交感神経系を含めた心循環系における役割を明らかにすることを目的とした。

方 法

Wistar系ラットの腹腔内に生理食塩水（コントロール群：n=8）、0.2M NAME（低NAME群：n=13）、1M NAME（高NAME群：n=12）をそれぞれ充填した osmotic pump を埋め込み、さらに脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP群：n=9）を対照群として加えた4群について、4週間の血圧・心拍数の推移を尾動脈カフ法および一部 telemetry system により測定した。

4週間の観察期間終了後、採血を行い、血漿中活性レニン濃度（RIA法）・血清中カテコールアミン濃度（HPLC法）を測定した。さらに血中L-アルギニン濃度およびL-ニトロアルギニン濃度をアミノ酸分析器を用いて測定した。

さらに胸部下行大動脈および心臓を摘出し、輪状標本を作製した。コンピュータ画像解析装置（Kontron Cardio 500）を用いて大動脈壁の面積と内腔面積との比（wall / lumen area ratio）および左心室壁厚を算出した。

結果

尾動脈カフ法により測定した収縮期血圧は低NAME群および高NAME群でそれぞれ 113.9 ± 3.1 から 144.0 ± 4.4 mmHg (mean $\pm$ S.E.), および 114.1 ± 7.3 から 181.4 ± 9.0 mmHg と上昇した。また, NAME投与群の収縮期血圧はL-ニトロアルギニンおよびL-ニトロアルギニン/L-アルギニン比と正の相関を示した。

同じく心拍数は osmotic pump 埋め込み後数日で 410 から 340 bpm 前後まで急激に低下したのち, 徐々に前値に戻った。

Telemetry system により測定した血圧の推移は尾動脈カフ法による測定値と同様の結果だった。また, osmotic pump 除去後の血圧はNAME投与群では徐々に元に戻る傾向を示した。心拍数はほぼ一定 (約400 bpm) を保った。

高NAME群では他の3群に比べノルアドレナリン濃度の有意な上昇が認められたが, アドレナリン・ドーパミン・活性レニン濃度は4群間で差を認めなかった。

高NAME群では, SHRSPに比べ高血圧の程度が低くその持続期間が短いにもかかわらず, 大動脈壁/内腔面積比は 0.39 ± 0.06 と, SHRSP群 (0.39 ± 0.03) と同程度に大動脈肥厚が認められた。

左心室壁厚は, コントロール群, 低NAME群, 高NAME群, SHRSP群でそれぞれ 0.25 ± 0.05 , 0.33 ± 0.02 , 0.39 ± 0.06 , 0.38 ± 0.03 と, 高NAME群で最も高値を示した。高NAME群ではSHRSP群に比し, 有意に著しい肥大が認められた。

考察

本研究では, osmotic pump を用いたNOS阻害薬慢性投与により, 血圧上昇の程度が調節可能で, ラットの飲水量や腸管の吸収率に影響を受けない安定した高血圧モデルを作成することが可能となった。Telemetry systemを用いて観察した血圧はosmotic pump 除去後, 投与前のレベルに戻る傾向を示した。

NOS阻害薬の静脈内投与による急性実験では交感神経活性が上昇することが報告されているが, 本実験での高NAME群における血中ノルアドレナリンの有意な上昇は, 交感神経終末でのノルアドレナリンの放出増加を示唆し, NOS阻害薬慢性投与においても心循環系に対する交感神経系が関与していると思われた。

また, 高NAME群ではSHRSP群に比べ高血圧の程度が軽度で, 短期間だったにも関わらず, SHRSPと同等またはそれ以上に著しい大動脈や心筋の肥厚が見られた。高血圧による細胞増殖や肥大に加えて, NOによる細胞増殖抑制作用の減弱, 交感神経系の亢進などが高度の組織肥厚を生じたものと考えられた。

口頭発表の審査会において, 菅野教授により血圧および組織変化の可逆性, 他組織の血管の変化, NO作動性神経の関与, 臨床応用などについて質問がなされた。また, 安田教授により血管の種類による肥厚の相違, 動脈硬化との関連, 血圧の上昇率と心肥大の関連について質問がなされた。さらに本間教授によりNO合成阻害薬の中樞作用の有無, および本モデルでの成長ホルモンの関与の有無について質問がなされた。これらに対し申請者は概ね妥当な回答を行った。その後行われた菅野・安田両審査教授との試問においても, 概ね妥当な回答がなされた。

本研究は, NO合成酵素阻害薬を用いた新しい慢性高血圧ラットモデルを作製し, さらにこれを用いて, NOが交感神経系に関与し, 心筋血管肥厚にも影響を及ぼしていることを明らかにしたものであり, 有意義な研究と考えられ, 学位授与に値する。