

学位論文題名

Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans

(ヒトにおける室内気吸入時および中等度低酸素負荷時の血漿アデノシン濃度)

学位論文内容の要旨

【背景】

アデノシンは高エネルギー燐酸化合物であるアデノシン三燐酸(ATP)が分解してできるプリンヌクレオシドであり、呼吸循環応答に対する強い生理活性を有する。虚血や高度低酸素負荷時には組織内濃度が上昇し、例えば脳や心臓では直接的にあるいは局所の血流増加を介して組織保護に働く。呼吸調節系においては、外的に投与されたアデノシンは末梢化学受容器を介して換気を刺激する一方、中枢性には換気を抑制する。我々はこれまでに中等度低酸素負荷(SaO₂が80%、20分間)に対する換気応答においても内因性アデノシンが呼吸調節修飾因子として関与している可能性をヒトで初めて示している。しかし、この程度の中等度低酸素負荷でアデノシン組織濃度が本当に上昇していることを確かめた報告はない。そこで本研究は、動・静脈の血漿アデノシン濃度を同時測定することによりヒトの前腕あるいは脳組織アデノシン濃度が実際に上昇しているか否かを確かめることを目的とした。

流血中に入ったアデノシンは赤血球や血管内皮細胞へ直ちに取り込まれるため血中半減期はきわめて短い。そこで、単に動・静脈較差をみるだけでは組織レベルの変化を反映しないかもしれないと考え、実験はジピリダモールを前投与した場合としない場合とに分けて行った。ジピリダモールは、アデノシンの細胞内への取り込みを抑制するため、もしも、前腕あるいは脳組織でアデノシン濃度上昇があれば流出静脈の血漿アデノシン濃度はジピリダモール投与によって組織濃度をより反映しやすくなると考えられる。

【方法】

対象は男性健常者12人(年齢 21 ± 2 (SD)歳、体重 63 ± 5 kg)。検体採血のため橈骨動脈、正中皮静脈、内頸静脈(7人のみ)に留置針を挿入した。実験中プロトコールに基づいた酸素飽和度(SaO₂)と動脈血炭酸ガス分圧(PaCO₂)を得るため、SaO₂と呼気終末炭酸ガス分圧をモニターしながら吸入気の酸素濃度と炭酸ガス濃度を別々に制御した。初めに室内気を吸入させた後、低酸素ガスを負荷し6分間かけて徐々にSaO₂を80%にした。次にSaO₂を20分間80%に維持し、最後に30分間室内気を吸入させた。この間PaCO₂を一定に維持しておくため吸入気炭酸ガス濃度を調節した。検体採血は初めの室内気吸入時、SaO₂が80%になった直後、その10分後、20分後、室内気に戻して30分後の計5回、橈骨動脈、正中皮静脈、内頸静脈から行なった。検体はガス分析とアデノシン濃度測定に用いた。以上の実験は、初めに対照薬として生理食塩水を点滴静注しながら行ない、次に30分間の安静臥床の後、ジピリダモール(0.6 mg/kg)を点滴静注しながら行なった。

血漿アデノシン濃度に対するジピリダモール単独の効果をみるため、別の健常若年男性被験者3人を対象として、室内気吸入下でジピリダモールを同じ方法で投与し正中皮静脈から投与前、投与後10・20・30・60分に採血しアデノシン濃度を測定した。

血漿アデノシン濃度測定のため、採血時には代謝を防ぐ目的でdilazep、EHNA、EDTA、G-EDTA、indomethacinの5種の薬品を含む水溶液0.4 mlをあらかじめ注射器内に入れておき、血液3.6 mlを採取し速やかに混和した。採血後直ちに遠沈し血漿分離して除蛋白・ヌクレオチド除去の処置をして保存した。測定はクロロアセトアルデヒドによりアデノシンをエテノアデノシンに変換してHPLC蛍光法を用いた。C¹⁸カラムを用いて分離し、波長280nmで励起し380nmの蛍光を測定した。試料濃度からヘマトクリットを用いた換算式により血漿アデノシン濃度を求めた。

【結果】

血液ガス分析の結果はプロトコール通りに低酸素負荷が行われたことを示した。室内気吸入時の血漿アデノシン濃度は動脈(12.0±0.9nM)と正中皮静脈(17.7±3.5nM)、内頸静脈(14.0±2.8nM)で動・静脈間に有意差はなかった。対照薬投与時の血漿アデノシン濃度は動脈・正中皮静脈・内頸静脈いずれにおいても低酸素負荷によりどの時間においても有意の上昇はなかった。一方、ジピリダモールを投与したときの血漿アデノシン濃度は、正中皮静脈においては室内気吸入時20.7±2.5nMから低酸素負荷直後25.0±4.2nM、10分後35.9±7.7nM、20分後には50.7±10.7nMと時間依存性に有意に上昇し(p<0.01)、対照薬投与時と比べても低酸素負荷時にはいずれの時間でも有意に高かった(p<0.05 for all)。室内気吸入30分後には元のレベルに戻った。一方、動脈血と内頸静脈においては血漿アデノシン濃度は、ジピリダモール投与時でも低酸素負荷により上昇しなかった。

室内気吸入時にジピリダモール投与のみをした場合には正中皮静脈血漿アデノシン濃度は、投与前、投与後10・20・30・60分において18.9±1.1nM、16.3±3.1nM、16.8±1.8nM、18.6±0.7nM、19.3±1.4nMと有意な変化を示さなかった。

【考案】

本研究はヒト前腕組織においてアデノシン産生が中等度低酸素負荷時に亢進していることを初めて示したものである。しかも、この産生亢進はジピリダモール投与時においてのみ血漿濃度の上昇として確かめられた。ジピリダモールは流血中に入ったアデノシンの赤血球や内皮細胞への取り込みを抑制することが知られている。従って、今回の結果は流出静脈の血漿濃度でさえも組織アデノシン濃度を必ずしも反映しないということをも示している。

低酸素負荷により組織アデノシン濃度が上昇する機序は①ATP異化亢進による産生増加、②乳酸、pH、PaCO₂の変化による細胞外放出の増加、③組織破壊によって細胞内ATPが大量に組織間液に放出され、細胞外でアデノシンに分解される、の3つが考えられる。虚血時には③が主要な上昇機序と考えられており、上昇が顕著であるためにジピリダモール投与がなくとも動・静脈較差として検出されることが過去の研究から知られている。しかし、今回の実験で用いた中等度低酸素では、組織破壊が起こることは考えにくい。また、このレベルでの低酸素負荷では乳酸増加やpHの低下はない。従って、本研究で確認された組織アデノシン濃度の上昇は組織における産生亢進を反映していると考えられる。本実験で認められた血漿アデノシン上昇がジピリダモールの直接効果によるものではないことは、室内気吸入時にはジピリダモール投与で血漿濃度が影響されなかったことから明らかである。

内頸静脈での血漿アデノシン濃度上昇が認められなかったため、脳組織における低酸素負荷時のアデノシン産生亢進は証明できなかった。内頸静脈酸素分圧はむしろ正中皮静脈より低かった。従って、低酸素負荷の程度が脳組織で前腕より軽かったとは考えにくい。この結果は脳組織が低酸素負荷に対して、よりアデノシン産生が起りにくいのか、あるいは、血液脳関門のた

めに脳組織アデノシンが静脈内へ流出しにくかった可能性を示唆する。

【まとめ】

中等度低酸素負荷によりヒト前腕組織ではアデノシン産生が増加する。しかし、それは流出静脈血漿中には必ずしも反映されない。この結果は、中等度低酸素血症時にもアデノシンが局所的には生理活性を有して呼吸循環応答に関与している可能性を支持する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 島 顕
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans

(ヒトにおける室内気吸入時および中等度低酸素負荷時の
血漿アデノシン濃度)

本研究は動・静脈の血漿アデノシン濃度を同時測定することにより、中等度低酸素負荷時にヒトの前腕あるいは脳組織アデノシン濃度が実際に上昇しているか否かを確認することが目的である。流血中に入ったアデノシンは赤血球や血管内皮細胞へ直ちに取り込まれ血中半減期はきわめて短いため、単に動・静脈較差をみるだけでは組織レベルの変化を反映しないかもしれないと考え、実験はアデノシンの細胞内への取り込みを抑制するジピリダモールを前投与した場合としない場合とに分けて行った。

対象は男性健常者12人。検体採血のため橈骨動脈、正中皮静脈、内頸静脈（7人のみ）に留置針を挿入した。室内気吸入後、PaCO₂を一定に維持しながらSaO₂を20分間80%に維持し、最後に30分間室内気を吸入させ、経時的に橈骨動脈、正中皮静脈、内頸静脈から同時に採血しアデノシン濃度を測定した。以上の実験は、初めに対照薬として生理食塩水を点滴静注しながら行ない、次に30分間の安静臥床の後、ジピリダモール(0.6 mg/kg)を点滴静注しながら行なった。採血時には血中のアデノシン濃度変化を防ぐ5種の薬品を用い、HPLC蛍光法にて測定した。

対照薬投与時の血漿アデノシン濃度は動脈・正中皮静脈・内頸静脈いずれにおいても低酸素負荷により変化はなかった。一方、ジピリダモールを投与したときの血中アデノシン濃度は、正中皮静脈においては低酸素負荷により時間依存性に有意に上昇し、対照薬投与時と比べても低酸素負荷時にはいずれの時間でも有意に高かった。そして室内気吸入30分後には元のレベルに戻った。一方、動脈血と内頸静脈においては血漿アデノシン濃度は、ジピリダモール投与時でも低酸素負荷により上昇しなかった。

以上の結果は、ヒト前腕組織においてアデノシン産生が中等度低酸素負荷時に亢進していることを示し、中等度低酸素血症時にもアデノシンが局所的には生理活性を有して呼吸循環応答に関与している可能性を支持する。しかし、この産生亢進はジピリダモー

ル投与時においてのみ血漿濃度の上昇として確かめられた。これは流出静脈の血漿濃度でさえも組織アデノシン濃度を必ずしも反映しないということをも示している。

発表後、主査・副査より、まずアデノシン測定法の信頼性と再現性について質疑があり、申請者は回収率、inter/intra-sequence varianceについての具体的数字を挙げて、測定の信頼性と再現性の高さについて回答した。続いて、中等度低酸素負荷におけるアデノシンの組織内濃度上昇をもたらす生理学的な作用について質疑があり、低酸素換気応答の第一相においては頸動脈体で、第二相においては中枢神経で、そのいずれにおいても内因性アデノシンが重要な意義を持つ可能性を過去の共同研究者の論文を引用して回答した。同一組織内に限らず、血行動態的にきわめて近い臓器間においては流血を介する効果が残る可能性について指摘があり、特殊な場合においては全身的な動脈血血中濃度の上昇がなくても影響が現れうる可能性は否定できないことを回答した。採取血管によってジピリダモールの影響に差がある理由、また正中皮静脈と内頸静脈との結果の違いの原因についての質問があった。申請者は、脳組織では血流などの影響で前腕よりアデノシンが産生されにくい可能性は否定できないが、他に脳には血液脳関門があるため増加した組織アデノシンがそのまま血流に流出しにくい可能性が高いことなど、血管によってアデノシンの収支メカニズムが異なる可能性があるとして回答した。また脳組織内アデノシン濃度についての過去の動物実験に関する質疑があり、猫の脳組織内アデノシン濃度の上昇をマイクロダイアリシスを用いて確かめた共同研究者の過去の研究を引用して回答した。さらにこの結果の臨床的な有用性について質疑があり、睡眠時無呼吸症候群など低酸素血症を来す患者の組織低酸素の程度を知る有用な指標となり、その病態生理解明などに及ぼす将来的な可能性について回答した。会場からも、アデノシンの産生経路としての交感神経末端由来のAMPや、アデノシンの代謝経路におけるecto-adenosine deaminaseのもつ意義について質問があり、申請者は、血中アデノシン濃度を決定する因子の多様性について回答した。その他の質疑においても申請者は、質問者を納得させる妥当な回答を行った。

この論文はヒト前腕組織においてアデノシン産生が中等度低酸素負荷時に亢進していることを初めて示し、内因性アデノシンが生理的役割を有している可能性を示したものとして高く評価され、今後、低酸素換気応答の機序解明への貢献や組織低酸素の評価など臨床的な展開が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。