

氏名	にし 西	はし 橋	つよし 毅
学位(専攻分野)	博 士 (人間・環境学)		
学位記番号	人 博 第 317 号		
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	人間・環境学研究科 関連環境学専攻		
学位論文題目	クモ膜下出血後の脳血管攣縮に関する研究 ——バソプレシンに対する収縮応答性の上昇と内皮細胞依存性収縮の関与——		

論文調査委員 (主査) 教授 五十棲泰人 助教授 倉橋和義 教授 津田謹輔

### 論 文 内 容 の 要 旨

脳循環障害は、(1)脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血後の脳動脈攣縮、(2)脳内出血、(3)脳梗塞に大きく分類されるが、これら3種類の脳循環障害発症機序の詳細は不明である。そのなかで脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血後の脳動脈攣縮に関しては、実験動物によってモデル化が可能である。これまでこの動物実験モデルとして、イヌ、サル、ウサギなどが主に用いられてきた。しかし、遺伝子操作を含む研究を展望すれば、それが比較的容易なラットのような小動物が有利である。このラットモデルの確立は、脳動脈攣縮発症機序の解明にとどまらず、その治療薬の開発に大きく貢献するものと考えられる。そこで申請者は、ラットを用いてクモ膜下出血後の脳動脈攣縮モデルを確立する研究を企画した。その中で、ストレスと深い関係のある神経内分泌ホルモンであるバソプレシンに特に注目して、その作用と内皮細胞との関連を明らかにした。

本論文第一章ではラットモデルの確立を記載している。申請者はラットのクモ膜下出血モデルとして、自家動脈血を大槽内に注射するモデル(動脈血注射モデル)、自家溶血血液を大槽内に注射するモデル(溶血注射モデル)、自家血清を大槽内に注射するモデル(血清注射モデル)の合計3種類を作成した。そして、それらを用いて、脳動脈攣縮の時間経過を14日間追跡した。動脈血注射モデルでは、初期攣縮とそれに続く遅発性攣縮が観察された。すなわち、正常の脳底動脈径が平均値で約250 $\mu$ mであったのに対して、このモデル1時間後では約150 $\mu$ mと正常の約60%まで狭小化していた。この事実は脳底動脈が確かに攣縮していることを示している。この攣縮状態は2日後まで続き、その間の狭小化は正常値の約20%であった。その後攣縮状態から徐々に回復し、脳底動脈径は約7日で正常値に回復した。溶血注射モデルでは動脈血注射モデルの場合よりも、注射による致死率が高かった。溶血血液の投与容量を減少して生存を可能とした場合には、動脈血注射モデルの場合のような、2日後までの持続した狭小化は観察されなかった。血清注射モデルの場合、14日間にわたり動脈径に変化はなかった。以上のように、クモ膜下出血に特徴的な早期攣縮と遅発性攣縮を再現したのは動脈血注射モデルであり、申請者はこれがラットモデルとして最も適切であると判断している。

次に、外来性のバソプレシンの脳底動脈収縮作用が攣縮により修飾されるかを検討した。まず、脳底動脈収縮作用に対するバソプレシンのEC<sub>50</sub>が約3X10<sup>-10</sup>Mであることを実験的に確かめた。動脈血注射モデルで注射1日後、摘出した脳底動脈のバソプレシン濃度をEC<sub>50</sub>になるように調整すると、正常の場合あるいは、クモ膜下出血1時間後および7日後のいずれの場合よりも、その収縮作用は2倍以上大きく統計的に有意であった。さらに、ラットの脳底動脈におけるバソプレシン収縮作用に関与する受容体解析を、拮抗薬ならびに刺激薬を用いて検討した。バソプレシン受容体にはV<sub>1</sub>ならびにV<sub>2</sub>受容体の2種類の亜型が知られている。V<sub>1</sub>受容体拮抗薬はバソプレシンの作用を抑制した。すなわち、バソプレシンの濃度-収縮曲線は右方に移動した。一方、V<sub>2</sub>受容体拮抗薬を用いた場合にはバソプレシンの濃度-収縮曲線にはほとんど変化がなく、バソプレシンの作用に影響しなかった。さらに、V<sub>1</sub>受容体刺激薬は濃度に依存した収縮作用を示したが、V<sub>2</sub>受容体刺激薬ではそうした影響はほとんど見られなかった。これらの実験結果から、脳底動脈のバソプレシン受容体がV<sub>1</sub>受容体であることが明らかにされた。

第二章では、バソプレシンの脳底動脈収縮作用に内皮細胞が関与するかどうかについて議論し、内皮細胞由来因子を解析している。申請者の研究グループでは、種々の血管作動物質に焦点を合わせ内皮細胞依存性の収縮反応の薬理的性質を追求してきたが、こうした実験では内皮細胞の除去が必須である。しかしラットの脳底動脈は約250 $\mu$ mと細く、このことがクモ膜下出血モデルとしてラットを使用しにくいものとしてきた。申請者はこの細い動脈標本の内皮細胞を確実に除去する手法を考案した。すなわち、脳底動脈摘出時に外径120 $\mu$ mの鍼灸針を脳底動脈内に挿入し、それを動脈内腔で数回移動させることによって内皮細胞を除去する手法である。正常の内皮細胞存在時には、プロスタグランジン F<sub>2 $\alpha$</sub>  (10<sup>-5</sup>M) が引き起こす収縮はアセチルコリンによって弛緩されるが、除去操作を加えた脳底動脈ではこの弛緩反応が消失したことから、申請者の内皮細胞除去手法の有効性は確認された。この新しい手法を駆使して実験を繰り返した結果、3X10<sup>-10</sup>M以下の低濃度の外来性バソプレシンによる収縮は、内皮細胞依存性であることが結論づけられた。また、申請者の研究グループはこれまで、収縮因子として内皮細胞由来のシクロオキシゲナーゼ-2と5-リポキシゲナーゼの代謝産物が関与することを解明してきたが、申請者はそれらに加えて化学反応性が高くDNAを損傷させる活性酸素種も関与をすることを明らかにした。すなわち、スーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼの共存時の収縮反応と、内皮細胞を除去した場合の反応とが同程度であったことから、バソプレシンの収縮反応には、内皮細胞由来の活性酸素種も関与することが明らかになった。

### 論文審査の結果の要旨

動物実験モデルが病態生理の解明ならびに治療薬開発にとって、いかに重要であるかは言を待たず、適切な病態モデルなしには、治療薬を効率よく開発することは不可能である。本論文は脳循環障害を解明するための動物実験モデルの開発に関するものである。

脳循環障害を大きく分類すると、(1)脳動脈瘤破裂によるクモ膜下出血後の脳動脈攣縮、(2)脳内出血、(3)脳梗塞がある。申請者は、脳内出血や脳梗塞の場合、それらの部位や広がりの特長が難しく、モデル化研究の対象としては不適当と判断し、その特長がより容易なクモ膜下出血時の脳動脈攣縮を取り上げた。この研究には従来、動物実験モデルとしてイヌ、サル、ウサギなどを使用するのが一般的であったが、申請者はラットモデルの確立を目指した。この企画は先見性あるものと評価できる。なぜなら、将来的にはモデル動物として、遺伝子操作の比較的容易な小動物が重要となり、そうした動物を用いてのモデル研究が脳循環障害の機序解明と治療薬開発に資する可能性が高くなると予想されるからである。また、申請者がストレス時の生体反応に重要な役割を果たす神経内分泌物質であるバソプレシンに注目した点、さらに、バソプレシンによって引き起こされる脳動脈作用に対する攣縮による修飾様式と動脈内皮細胞の役割を指標にして、このモデルの特徴づけを行った点は、脳循環病理学の観点から合理的であると評価できる。

本研究開始時点では、申請者はマウスの使用を試みている。しかしその大腿動脈は非常に細く、採血が困難なため、今回のモデル作成に不適切であると判断した。そこでより大型のラットを用い、(1)自家動脈血、(2)自家血清、(3)自家溶血血液それぞれを大槽内に注射するモデルを考案した。この3種類のモデルについて攣縮の度合いの時間経過を比較検討した結果、まず、動脈血注射モデルと血清注射モデルの比較から、血液中の血球成分が攣縮発生に不可欠であることが明らかになった。さらに、溶血血液注射モデルの場合致死率が高く、そこに毒性の非常に強い成分が生成していると考えられた。申請者は、この毒性成分の特定から定量的な攣縮制御の可能性に言及している。ヒトのクモ膜下出血患者の脳脊髄液は、患者ごとにその赤色の程度が異なるが、それは溶血成分の濃度を反映している。本研究は、その濃度から攣縮の程度を予測する方法を提示したもので、申請者はラットのクモ膜下出血の脳動脈攣縮モデル確立に向けて明確な足跡を残し、作成すべきモデルの基礎を明らかにしたと評価できる。

次に、申請者はバソプレシンの脳動脈作用が攣縮によってどのように修飾されるかを検討した。クモ膜下出血1日後の脳底動脈におけるバソプレシンのEC<sub>50</sub>濃度による収縮作用は、正常ラット、クモ膜下出血モデルの1時間後、および同モデルの7日後のいずれよりも有意に大きかった。この結果は、出血モデル1時間後ならびに7日後とは違った影響が、出血1日後の脳底動脈に発生していることを示している。血腫の量と攣縮とが相関するという報告に従えば、出血モデル1時間後の血腫は最も分布の多い時期であることから、出血1日後の場合よりもバソプレシンの反応性は大きいはずである。血腫の量とバソプレシンの反応性の間に相関がないという申請者の主張は、実験に基づいた合理的なものであり、今後の展開が

興味深い。次に、申請者はラット脳底動脈のバソプレシン収縮に関してバソプレシン受容体の解析を行った。そして V<sub>1</sub> 受容体拮抗薬とその刺激薬を使用した実験結果に基づいて、ラットの脳底動脈に分布するバソプレシン受容体は V<sub>1</sub> 受容体であることを明らかにした。V<sub>1</sub> 受容体を介したバソプレシン収縮応答性の増大をクモ膜下出血 1 日後の脳底動脈に認めたことは新たな発見である。この新知見から、収縮応答性増大が、細胞外からの情報変換過程と、興奮 - 収縮連関過程のいずれによるものか、という今後解決すべき問題が明確化された。申請者が今回ラットモデルで明らかにした、脳動脈攣縮とバソプレシンとの関係はヒトでも成立する可能性が高い。現在 V<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は抗うつ薬として開発されつつあるが、それを抗脳動脈攣縮薬として適用できる可能性を示唆した点で、この研究の意義は大きい。

申請者の研究グループがこれまで実施してきた、種々の血管作動物質についての内皮細胞依存的収縮反応の薬理学的研究に立脚して、申請者は、その収縮反応に DNA を損傷する内皮細胞由来の活性酸素種が関与することを明らかにした。この研究結果も脳循環系病態生理学に対する着実な貢献の一つと評価できる。

以上のように、本学位申請論文はラットによるクモ膜下出血の脳動脈攣縮モデル確立に道を拓き、その研究成果は学会発表と学術論文を通して国内外の研究者に高く評価されている。したがって本学位申請論文は、生体と分子の相関を総合的に考究する相関環境学専攻、分子・生命環境論講座の目的に添ったものである。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成18年1月10日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。