

氏名	クリスティナ コリナ トランダフィル Cristina Corina Trandafir
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人博第318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	Study on Participation of Arginine Vasopressin and Leukotrienes in Development of Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage (クモ膜下出血後の脳血管攣縮における arginine vasopressin と leukotrienes の関与に関する研究)
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

神経内分泌物質バソプレシンはストレスおよびうつ病の発症に重要な役割を果たしていることが知られている。また、臨床においてクモ膜下出血患者の脳脊髄液および血漿中のバソプレシン濃度が高値であることが報告されているが、クモ膜下出血、すなわち動脈瘤の破裂の原因であるのか、あるいは結果であるのかは不明である。申請者の属する研究グループでは、以前からラットを用いてクモ膜下出血につづく脳動脈攣縮モデルの確立を目指し、その全体像を明らかにしてきた。それとともに、外来性のバソプレシン収縮が内皮細胞依存性の収縮であり、DNAの損傷活性を有する活性酸素種や起炎物質であるプロスタグランジンが内皮細胞由来の収縮因子であることを明らかにしてきた。ところが、内因性のバソプレシンが脳動脈攣縮に関与するかは未だ不明である。申請者は内因性のバソプレシンがラットのクモ膜下出血モデルの脳動脈攣縮に関与するかを検討し、その機能を明確化することを目的として研究を実施した。さらに、申請者はバソプレシン収縮に免疫機構の活性化作用を有するロイコトリエン (LT) 類が関与する可能性について検討した。

第一章から三章まで、本研究の概要、序論、実験材料および方法の記載がある。

第四章と第五章には結果と考察が記載されている。申請者は所属する研究グループがこれまで開発してきた方法に従って、ラットのクモ膜下出血につづく時間経過の異なる脳動脈攣縮モデル3種類を作成した。すなわち、それらはクモ膜下出血1時間後、2時間後および7日後の3種類の攣縮である。正常の脳底動脈径は平均値で250 μ mであったが、クモ膜下出血後の脳底動脈径平均値は、140 μ m (1時間後)、180 μ m (2日後) および260 μ m (7日後) であり、それらは1時間および2日後で正常値に比較して有意に狭小化し、7日後には正常値に回復していた。この3種類の時間経過に伴う攣縮を対象としてバソプレシン V_1 受容体拮抗薬の影響を検討した。拮抗薬 (SR 49059) を前もって注射しておく、クモ膜下出血1時間後の動脈径の平均値は140 μ m から200 μ m、2時間後の平均値は180 μ m から250 μ m へと有意に拡張した。一方、攣縮から回復したクモ膜下出血7日後の脳底動脈径はその拮抗薬によって影響されなかった。この作用が V_1 受容体拮抗薬によるものであることを証明する目的で、バソプレシンが脳動脈収縮作用を示すことを確認した。すなわち、動脈血注射に替えてバソプレシンを大槽内に注射すると、注射10分および1時間後の動脈径は正常値に比較して、それぞれは16%および13%狭小化していた。これらの結果によって、内因性のバソプレシンが攣縮に関与することが明らかになった。

これまで申請者の研究グループは、脳底動脈収縮に対するプロスタグランジンおよび活性酸素種の関与を検討してきた。申請者は新たな課題として、免疫機構の活性化作用が知られている LT 類を取り上げ、脳底動脈収縮にそれらの関与する可能性について検討した。LT 類は5-リポキシゲナーゼを介して生成されるが、その阻害薬 (ZM 230487 および AA-861) はバソプレシンの脳底動脈収縮を有意に抑制した。この結果から、バソプレシンによる脳底動脈収縮に5-リポキシゲナーゼの代謝産物の関与することが明らかとなった。次に、その活性がいずれの LT に起因するか特定するため、LTC₄、LTD₄ および LTB₄ それぞれで処置し、その収縮活性を検討した。その結果、それぞれに収縮活性があり、最大収縮は LTC₄ > LTD₄ > LTB₄ の順であった。次に LT 受容体拮抗薬の影響を検討し、バソプレシンの脳底動脈収縮に対する LT 類の関与

を明らかにした。すなわち、LTC₄、D₄受容体拮抗薬（MK 571）およびLTB₄受容体拮抗薬（CP 105696およびLY 255283）はそれぞれバソプレシン収縮を有意に抑制した。この結果から、バソプレシン収縮にLTC₄、LTD₄およびLTB₄が関与することが明らかとなった。この結論を確実にするため、次に3種類の標本についてLT類の遊離量をラジオイムノアッセイ法により定量した。すなわち、正常脳動脈にバソプレシン刺激を加えない標本（対照標本）に比較して、それを加えた標本ではLT類の遊離量が1.3倍増加した。さらに、クモ膜下出血2日後のモデルにバソプレシン刺激を加えた標本では、対照標本に比べLT類の遊離量が3倍増加した。

以上、申請者はラットのクモ膜下出血の脳動脈攣縮に内因性のバソプレシンが関与することを明らかにし、さらに、バソプレシンによるラットの脳底動脈収縮に免疫機構の活性化作用が知られているロイコトリエン類の関与を明らかにした。

第六章から八章までは、結語、謝辞、引用文献が記載されている。

論文審査の結果の要旨

神経内分泌物質バソプレシンはストレスや脳循環障害との関連で注目されている。外来性バソプレシンに関する研究が比較的進展している一方、その機能解明が新規治療薬開発に資すると期待される、内因性バソプレシンについては未知の部分が多い。申請者は、ラットのクモ膜下出血モデルの攣縮時に内因性バソプレシンの関与の有無を検討し、次にバソプレシン収縮にその免疫機構活性化作用が注目されているロイコトリエン（LT）類の同定研究を遂行した。

申請者は、ラットのクモ膜下出血モデルの脳底動脈攣縮時に内因性バソプレシンが関与するかを検討するため、強攣縮時、すなわち出血後1時間および2日後についてバソプレシンV₁受容体拮抗薬（SR 49059）の影響を検討した。その拮抗薬の処置が有意に攣縮を抑制した結果は、クモ膜下出血モデルの脳底動脈攣縮に内因性バソプレシンが関与することを明確に示した。大槽内への自家血の注射がバソプレシン濃度を上昇させる機序は不明であるが、それを引き起こす重要な原因を示すことができた。すなわち、(1)自家血成分あるいは溶血成分の下垂体に対する直接刺激、(2)自家血注射の容積による下垂体刺激、(3)自家血注射による二次的な神経系を介する下垂体刺激がその原因となる可能性を示した。さらに、クモ膜下出血2日後まで血液が局在するとは考えられないから、原因(2)の可能性は除外できるであろう。申請者のV₁受容体拮抗薬の作用が内因性バソプレシンを介するという結論は、脳底動脈攣縮治療薬の開発につながる興味深い研究成果である。

これまで申請者の属する研究グループは、内皮細胞由来の収縮因子としてプロスタグランジンや活性酸素種を追求してきたが、LT類については不明である。そこで、免疫機構活性化との関連に注目してLT類のバソプレシン収縮に対する関与を検討した。まず、LT類を生成する5-リポキシゲナーゼ阻害薬のバソプレシン収縮に対する影響を検討した。阻害薬（ZM 230487およびAA-861）はバソプレシンの脳底動脈収縮を有意に抑制した。この結果は本酵素代謝産物がLT類であることを示唆したことから、次に、LT類受容体拮抗薬を用いてその特定を試みた。まず、LTC₄、LTD₄およびLTB₄がラットの脳底動脈を収縮させることを確かめた。次に、それらの収縮強度を検討した結果、最大収縮はLTC₄>LTD₄>LTB₄の順であった。さらに、LT受容体拮抗薬の影響を検討し、バソプレシンの脳底動脈収縮におけるLT類の関与を明らかにした。すなわち、LTC₄、LTD₄受容体拮抗薬（MK 571）およびLTB₄受容体拮抗薬（CP 105696およびLY 255283）はそれぞれバソプレシン収縮を有意に抑制した結果から、バソプレシン収縮にそれらLT類が関与することが明らかになった。さらに、内皮細胞を除去した標本においてバソプレシンは収縮を引き起こさなかったことは、LTC₄、LTD₄およびLTB₄が内皮細胞由来であること示した。平滑筋の持続的収縮という観点からは、バソプレシン収縮と喘息には共通項があり、この実験結果はそれらとともにLTC₄とLTD₄を原因物質とすることを示したもので興味深い。また、強力な走化因子として働き、免疫系細胞を集めるLTB₄の関与は病態の慢性化への始まりであるとする申請者の主張は合理的である。

次に、申請者は脳底動脈標本からのLT類の遊離量をラジオイムノアッセイ法によって定量した。すなわち、正常脳動脈にバソプレシン刺激を加えない標本（対照標本）に比較して、それを加えた標本ではLT類の遊離量が1.3倍増加した。さらに、クモ膜下出血2日後のモデルにバソプレシン刺激を加えた標本では、対照標本に比べLT類の遊離量が3倍増加した。これらの結果は、LT類が攣縮因子の一つであるという結論をさらに支持するものである。これらの研究計画は論理的に組み立てられており、その実証も十分であると評価できる。

以上のように、本学位申請論文は脳動脈攣縮に内因性バソプレシンが関与することを示し、さらにバソプレシン刺激が

LT 類遊離をともなう脳動脈収縮を引き起こすことを明らかにした。これらの成果はラット脳動脈攣縮モデルの完成度を高めただけでなく、脳循環障害の機序の解明に資するものであり、ひいては治療薬の開発に貢献するものと高く評価できる。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。