

氏 名	安 吉 弘 毅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2253 号
学位授与の日付	平成 12 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	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Protective Effect of Bradykinin Against Glutamate Neurotoxicity in Cultured Rat Retinal Neurons (ラット網膜初代培養神経細胞におけるグルタミン酸毒性に対するブラジキニンの保護効果)

論文調査委員 (主 査) 教授 成宮 周 教授 中西重忠 教授 本田孔士

論 文 内 容 の 要 旨

目 的: ラット網膜にブラジキニン B2 受容体が内在することを確認し, ラット網膜初代培養神経細胞を用いてグルタミン酸誘発神経細胞死に対するブラジキニンの作用を検討した。

対象と方法: ブラジキニン B2 受容体抗体を用いてラット網膜の免疫組織染色を行い, さらに胎生 17～19 日齢のラット胎児網膜より単離した初代培養神経細胞から得られた RNA を用いて RT-PCR 法でブラジキニン B2 受容体の mRNA の発現を調べた。グルタミン酸毒性は, グルタミン酸 (1 mM) に 10 分間暴露後, グルタミン酸を含まない培養液でさらに 1 時間培養して定量した。またブラジキニンの効果はグルタミン酸と同時投与で評価した。培養神経細胞における薬物の神経細胞毒性はトリパンブルー色素排除法で定量した。

結 果: 免疫組織染色でブラジキニン B2 受容体はラット網膜の神経節細胞層, 内顆粒層, 外顆粒層に分布することが確認され, また実験で用いたラット網膜培養神経細胞にブラジキニン B2 受容体の mRNA の発現が認められた。その培養細胞はグルタミン酸 (1 mM) に 10 分間暴露後, グルタミン酸を含まない培養液でさらに 1 時間培養すると生存率は著明に低下した。しかしブラジキニン (0.001～1 μ M) をグルタミン酸と同時に投与すると, グルタミン酸誘発細胞死に対して用量依存性に拮抗作用を示し, 細胞死は抑制された。またブラジキニン B2 受容体拮抗薬 (Hoe 140, 1 μ M) をブラジキニン (1 μ M) と同時に投与するとブラジキニンの保護作用は抑制された。さらにブラジキニン (1 μ M) は, カルシウムイオンフォアであるイオノマイシン (1 μ M) や一酸化窒素 (NO) 生成剤であるニトロプルシッド (SNP, 500 μ M), 一酸化窒素 (NO) とラジカルを同時に生成する SIN-1 (10 μ M) で誘発される神経細胞死に対しても拮抗作用を示した。

結 論: ラット網膜にはブラジキニン B2 受容体が内在し, 実験で用いたラット網膜培養神経細胞にもブラジキニン B2 受容体の存在が確認された。網膜神経細胞において, ブラジキニンはこの B2 受容体を介してグルタミン酸誘発神経毒性に対して保護効果を持つことが示唆された。このブラジキニンのグルタミン酸毒性に対する拮抗作用は, グルタミン酸による Ca^{2+} の細胞内流入の阻害や, Ca^{2+} が流入した後の NO 生成段階での阻害ではなく, NO 発生後の段階かつラジカル発生前に作用点があると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

虚血性網膜障害の中心的機構が興奮性伝達物質グルタミン酸受容体中の N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体を介する Ca^{2+} の細胞内流入と, それに続く一酸化窒素の発生と活性酸素フリーラジカルとの反応に基づくことが知られている。本論文はグルタミン酸神経毒性に対して, “Ischemic preconditioning” 関連で注目されているブラジキニンの作用を検討したものである。

免疫組織染色でブラジキニン B2 受容体がラット網膜の神経節細胞層，内顆粒層，外顆粒層に分布することが初めて確認された。ブラジキニンはこの B2 受容体を介してグルタミン酸誘発神経毒性に対して拮抗作用を示し，細胞死は抑制された。さらにカルシウムイオノフォアであるイオノマイシン，一酸化窒素 (NO) 生成剤であるニトロプルシッド，NO とラジカルを同時に生成する SIN-1 を用いた実験結果から，ブラジキニンのグルタミン酸毒性に対する拮抗作用は，グルタミン酸による Ca^{2+} の細胞内流入の阻害や， Ca^{2+} が流入した後の NO 生成段階での阻害ではなく，ラジカル生成段階での阻害にその作用点があると考えられた。

以上の研究はグルタミン酸誘発網膜神経細胞死に対して，ラジカル生成段階での阻害剤が急性投与でも有効であることを明らかにしたことで，虚血による網膜神経細胞死の抑制すなわち網膜虚血性疾患の治療に寄与するところが多い。

したがって，本論文は，博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお，本学位授与申請者は，平成 12 年 2 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け，合格と認められたものである。