

一酸化窒素自発発生化合物の家兎視神経乳頭循環への影響

杉山 哲也, 奥 英弘, 小嶋 祥太, 清水 一弘, 石田 理, 東 郁郎

大阪医科大学眼科学教室

要 約

近年, 血管内皮由来弛緩因子の本体が一酸化窒素(NO)であることが判明し, 局所の血流調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。今回, NO自発発生化合物であるS-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン(SNAP)が家兎視神経乳頭循環に及ぼす影響を, 電解式組織血流計などにより検討した。SNAP(20 nmol)を硝子体内に投与すると, 乳頭縁の網膜動脈径, 視神経乳頭組織血流量はともに有意に増加(各々60~120分後, 90~135分後)し, 用量依存性(2~20 nmol)も認められた。これらの変化はNO消去剤の前投与により抑制されたため, SNAPから発生したNOに

よって生じたと考えられる。一方, 血圧は30~45分後に, 眼圧は60~120分後に, 各々下降した。SNAP硝子体内投与により, まず, 乳頭血管抵抗の減弱と乳頭灌流圧の低下が生じ, 後に乳頭灌流圧が上昇する結果, 視神経乳頭組織血流量が増加するものと考えられた。(日眼会誌100:5-10, 1996)

キーワード: 一酸化窒素, S-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン, 視神経乳頭, 組織血流量, 網膜動脈径

Effect of a Nitric Oxide Donor on Optic Nerve Head Circulation

Tetsuya Sugiyama, Hidehiro Oku, Shota Kojima,
Kazuhiro Shimizu, Osamu Ishida and Ikuo Azuma
Department of Ophthalmology, Osaka Medical College

Abstract

Recently the endothelium-derived relaxing factor was proved to be nitric oxide (NO) and it has been found to play an important role in the regulation of local blood flow. In this paper, we studied the effect of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), a NO donor, on the optic nerve head (ONH) circulation in rabbits, using a hydrogen gas clearance flowmeter etc. Intravitreal application of SNAP (20 nmol) increased the caliber of the retinal artery at the edge of the ONH 60 to 120 minutes later and capillary blood flow in the ONH 90 to 135 minutes later. A dose-response relation was found between 2 and 20 nmol. These changes were thought to be caused by NO produced from SNAP because they

were inhibited by pretreatment with a NO trapping agent. Blood pressure and IOP were reduced 30 to 45 minutes later and 60 to 120 minutes later, respectively. It was considered that intravitreal injection of SNAP first reduced both the resistance of the ONH blood vessels and the perfusion pressure in the ONH and that the latter then rose, followed by an increase of the capillary blood flow in the ONH. (J Jpn Ophthalmol Soc 100:5-10, 1996)

Key words: Nitric oxide, S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine, Optic nerve head, Capillary blood flow, Caliber of the retinal artery

I 緒 言

1980年, アセチルコリンによる血管平滑筋弛緩作用に, 血管内皮細胞から遊離される平滑筋弛緩物質が必須であることが報告され, その弛緩物質は血管内皮由来弛

緩因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)と命名された¹⁾。その後, EDRFの本体が一酸化窒素(NO)であることが複数の研究グループにより独自に同定され^{2,3)}、さらに, NOが血管弛緩による血管トーンスの調節作用のみならず, 神経伝達物質としての作用⁴⁾や抗菌・抗

別刷請求先: 569 大阪府高槻市大学町2-7 大阪医科大学眼科学教室 杉山 哲也
(平成7年6月1日受付, 平成7年8月19日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsuya Sugiyama, M.D. Department of Ophthalmology, Osaka Medical College, 2-7, Daigaku-cho, Takatsuki-shi, Osaka-fu 569, Japan
(Received June 1, 1995 and accepted in revised form August 19, 1995)

腫瘍作用⁵⁾なども持つことが明らかにされつつある。眼内においては、NO合成酵素が網脈絡膜の血管・神経細胞、毛様体突起、虹彩などに主として分布していることが報告⁶⁾⁷⁾されている。眼内循環との関係では、NO合成酵素阻害剤の存在下では、ブラディキニンやアセチルコリンなどによる摘出眼動脈の弛緩やサブスタンスPによるイヌ網膜動脈の拡張が抑制されることが報告^{8)~10)}されており、さらに、イヌへのNO合成阻害剤投与により、血圧が上昇したにもかかわらず、脈絡膜、毛様体、虹彩の血流量が有意に減少したと報告¹¹⁾されている。これらのことから、NOが眼循環の調節に関与していることが示唆され、今回は、家兎視神経乳頭循環へのNOの影響をNO自発発生化合物の硝子体内投与により検討した。

II 実験方法

実験動物として、成熟白色家兎45匹(体重2.8~4.0 kg)を用いた。実験1では、全身麻酔薬としてウレタン1.0 g/kgを腹腔内投与し、約2時間後の安定した麻酔深度下で実験を行った。実験2, 3では、塩酸オキシプロカイン(ペノキシール[®], 参天製薬)点眼による局所麻酔のみで実験を行った。視神経乳頭組織血流量の測定には電解式組織血流計(RBF-222, バイオメディカルサイエンス社)を用い、その方法はこれまでの報告¹²⁾¹³⁾と同様である。眼底撮影には手持ち眼底カメラ(RC-2, 興和社)を用い、ミドリリンP[®](参天製薬)散瞳下で撮影して得られた眼底写真のスライドを映写して約40倍に拡大し、乳頭縁での網膜動脈の径(耳側または鼻側)および乳頭の縦径を測定することにより相対的網膜動脈径(網膜動脈径/乳頭径)を算出した。血圧・脈拍数測定には非観血式自動血圧測定装置(BP-98 E, ソフトロン社)を、眼圧測定にはAlcon Applanation Pneumatograph[®]をそれぞれ用いた。使用した薬剤は、試験薬として、NO自発発生化合物であるS-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン(SNAP)(和光純薬)をdimethylsulfoxide(DMSO)100%液で 10^{-1} Mに溶解し、それを眼内灌流液(オベガードMA[®], 千寿製薬)で希釈して 10^{-2} , 10^{-3} , 3.3×10^{-4} , 10^{-4} M液を作成した。また、NO消去剤であるCarboxy-PTIO(和光純薬)をオベガードMA[®]で溶解し、 10^{-2} M液とした。対照液としては各試験薬(各濃度)の溶媒を用いた。硝子体内注入に際しては50 μ l マイクロシリンジ(#705: ハミルトン社)および30 G 針を用いた。

実験1: SNAP単独投与とNO消去剤前投与の視神経乳頭組織血流量への影響

輪部から3 mm 後極側の強膜から30 G 針で硝子体中央部に向けて、1眼にはSNAP(10^{-2} , 10^{-3} , 3.3×10^{-4} , 10^{-4} M)を、他眼には対照液を各20 μ l(それぞれ200, 20, 6.6, 2 nmol)注入し、その後の相対的視神経乳頭組織血流量(処置眼の対照眼に対する比)の経時的变化を15分ごと3時間にわたり測定した(各投与量毎に4匹, 計16

匹を使用した)。

また、別個体(3匹)の1眼にCarboxy-PTIOを、他眼に対照液を各20 μ l(前者は200 nmol)硝子体内投与して15分後、両眼にSNAP(10^{-3} M)20 μ l, すなわち20 nmolを硝子体内注入し、その後の相対的視神経乳頭組織血流量(初期値に対する比)の経時的变化を同様に測定した。

実験2: SNAP単独投与とNO消去剤前投与の相対的網膜動脈径(乳頭縁)への影響

実験1と同様に、1眼にはSNAP(10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} M)を、他眼には対照液を各20 μ l(それぞれ200, 20, 2 nmol)注入し、その後の相対的網膜動脈径(乳頭縁)の経時的变化を30分ごと3時間にわたって測定した(各投与量毎に4匹, 計12匹を使用した)。

また、別個体(4匹)の1眼にCarboxy-PTIOを、他眼に対照液を各20 μ l(前者は200 nmol)硝子体内投与15分後にSNAP(10^{-3} M)20 μ lを両眼の硝子体内に注入し、同様に相対的網膜動脈径の経時的变化を測定した。

実験3: SNAP単独投与の血圧・脈拍数, 眼圧への影響

実験1と同様に、1眼にはSNAP(10^{-3} M)を、他眼には対照液を各20 μ l注入し、橈骨動脈における平均血圧・脈拍数, 眼圧の経時的变化を15分ごと3時間にわたって測定した(血圧・脈拍数には6匹, 眼圧には4匹を使用し、両群は別個体であった)。

なお、統計処理は、初期値や対照眼との間でpaired t-testを行い、有意水準が5%未満のものを統計学的に有意とした。

III 結果

実験1: SNAP単独投与およびNO消去剤前投与の視神経乳頭組織血流量への影響

相対的視神経乳頭組織血流量は、SNAP(20 nmol)投与により90~135分後にかけて初期値に対して有意な増加を

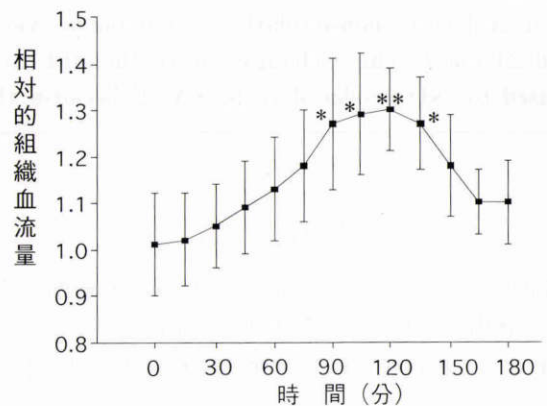


図1 S-ニトロソ-N-アセチル-DL-ペニシラミン(SNAP)(20 nmol)硝子体内投与による視神経乳頭組織血流量の変化。

n=4, バーは標準誤差を示す。*: p<0.05, **: p<0.01 (paired t-testによる初期値との比較)。

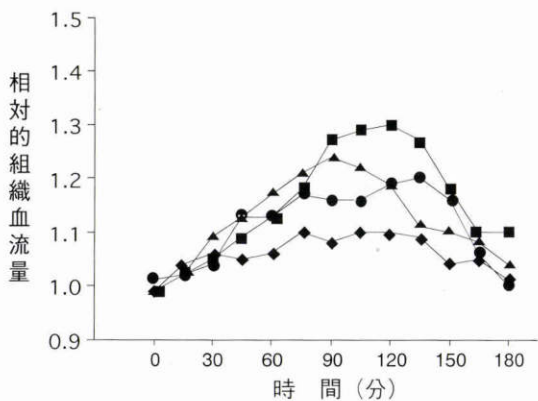


図2 SNAP (20 μl)硝子体内投与による視神経乳頭組織血流量の変化。

◆：2 nmol, ●：6.6 nmol, ■：20 nmol, ▲：200 nmol, 各 n=4.

認め、最大増加率は 29.7% (120 分後)であった(図1) (なお、投与後 12 回の測定を行っており、各々について初期値と比較しているため、繰り返し検定により、実質的な有意水準が大きくなる可能性がある。そういった多重性を考慮した検定を行って見たところ、有意差を認めるポイントは減少したが、なくなりしなかった。図5などにおいても同様であったことを付記し、それらの結果の詳細については省略する)。用量依存性の有無について検討するため、他の投与量の結果もまとめて示したものが図2である。2 nmol, 6.6 nmol, 20 nmol と用量が高いほど最大増加率も大きくなる傾向を示したが、200 nmol では 20 nmol と比べて最大増加率が小さくなる傾向を示した。このことから、少なくとも 2~20 nmol においては用量依存性があるといえる。

次に、Carboxy-PTIO を前投与した場合、SNAP による相対的視神経乳頭血液量の増加は有意に抑制された(図3)。

実験 2：SNAP 単独投与および NO 消去剤前投与の相対的網膜動脈径(乳頭縁)への影響

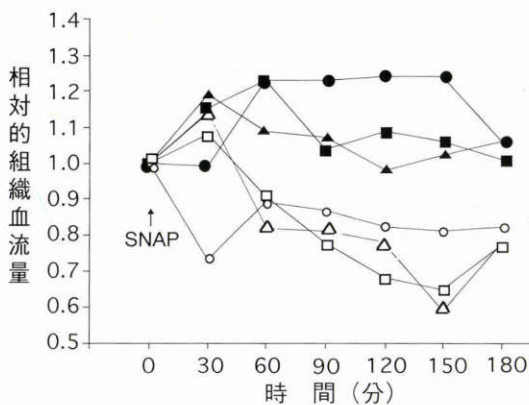


図3 SNAP (20 nmol)による視神経乳頭組織血流量の変化に対する Carboxy-PTIO (200 nmol)前投与の影響。

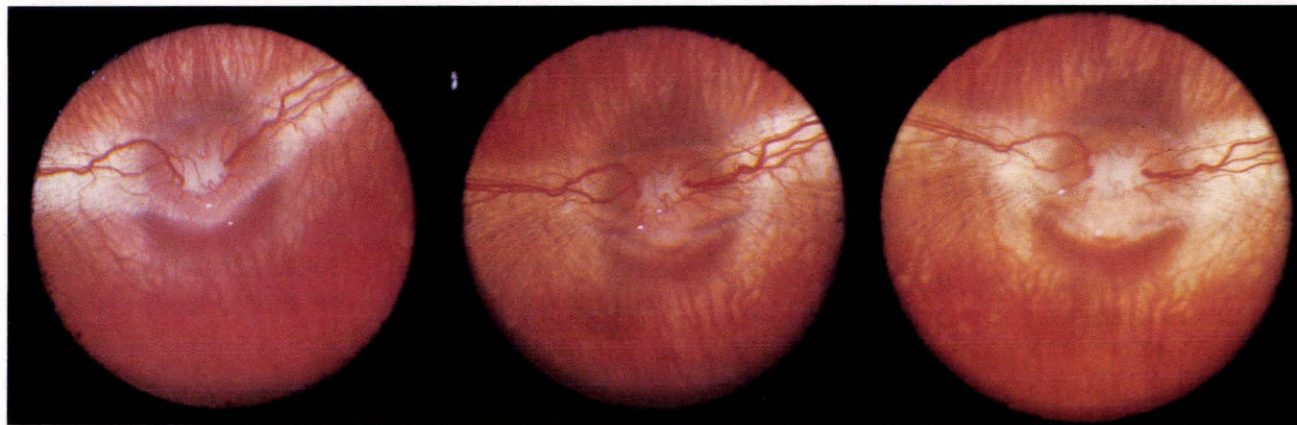
□：Carboxy-PTIO 前投与, ■：対照液前投与, ○●, □■, △▲はそれぞれ対応する眼を表す, n=3. paired t-test では 60~180 分後まで、黑白間に有意差 (p<0.05 または p<0.01) を認めた。

SNAP (20 nmol) 投与時の典型的な眼底変化は図4の通りで、90 分後には網膜および乳頭上血管の著明な拡張を認めたが、3 時間後にはほぼ回復していた。相対的網膜動脈径は、この量の SNAP 投与により 60~120 分後に対照眼に対して有意な増加を示し、最大増加率は約 26% (60 分後)であった(図5)。他の投与量の結果もまとめて示したのが図6である。2 nmol より 20 nmol の方が増加率が大きく、200 nmol は 20 nmol とほぼ同じ増加率であった(なお、この実験では 6.6 nmol については行っていない)。

次に Carboxy-PTIO を前投与した場合、SNAP による相対的網膜動脈径の増加は有意に抑制された(図7)。

実験 3：SNAP 単独投与の血圧・脈拍数、眼圧への影響

橈骨動脈における平均血圧は SNAP (20 nmol) 投与により 30 および 45 分後に有意な下降を示し、最大下降は



投与前

90 分後

3 時間後

図4 SNAP (20 nmol)硝子体内投与による眼底所見の変化。

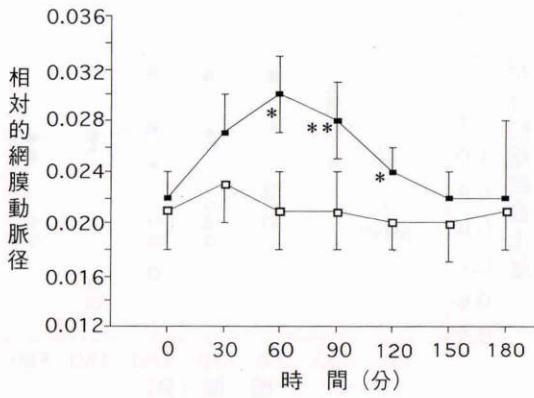


図5 SNAP (20 nmol)硝子体内投与による相対的網膜動脈径の変化。
 ■: SNAP, □: 対照液. n=4, バーは標準偏差を示す. *: p<0.05, **: p<0.01 (paired t-test による対照眼との比較).

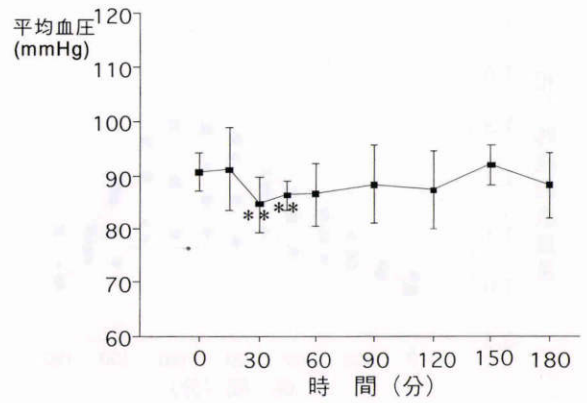


図8 SNAP (20 nmol)硝子体内投与による全身血圧の変化。
 n=6, バーは標準偏差を示す. **: p<0.01 (paired t-test による初期値との比較).

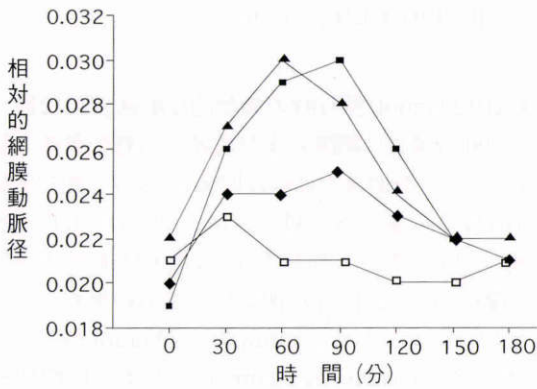


図6 SNAP (20 μl)硝子体内投与による相対的網膜動脈径の変化
 □: 対照液, ◆: 2 nmol, ■: 20 nmol, ▲: 200 nmol, 対照のみ n=12, 他は各 n=4.

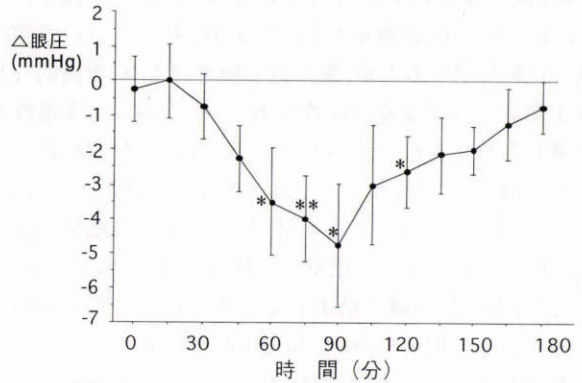


図9 SNAP (20 nmol)硝子体内投与による左右眼圧差 (SNAP 投与眼-対照眼)の変化。
 n=4, バーは標準偏差を示す. *: p<0.05, **: p<0.01 (paired t-test による初期値との比較).

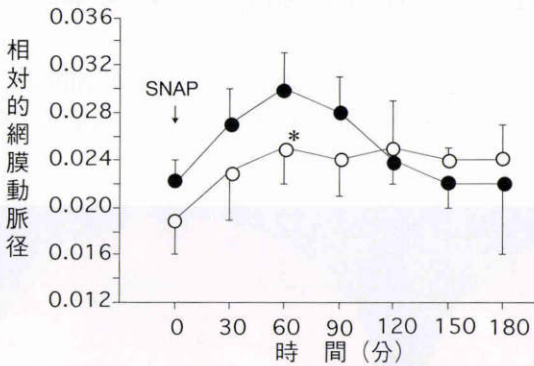


図7 SNAP (20 nmol)による相対的網膜動脈径の変化に対する Carboxy-PTIO (200 nmol) 前投与の影響。
 ○: Carboxy-PTIO 前投与, ●: 対照液前投与. n=4, バーは標準偏差を示す. *: p<0.05 (paired t-test による対照群との比較).

6.1 mmHg (30 分後)であった。その後は投与前と比べて有意差を認めなかった (図 8)。脈拍数は SNAP (20nmol) 投与により測定時間 (3 時間) 中, 有意な変化を示さな

かった。眼圧は SNAP (20 nmol) 投与により 60~120 分後まで有意な下降を示し, 最大下降は 4.5 mmHg (90 分後)であった (図 9)。

IV 考 按

これまでに, 著者らは血管内皮由来収縮因子であるエンドセリンの眼循環や視機能への影響, 延いては正常眼圧緑内障との関連性などを調べ, 報告^{12)~14)}してきた。一方, 近年, それとは相反する作用をもつと考えられる血管内皮由来弛緩因子の本体は NO であることが判明した²⁾³⁾, NO の眼循環に及ぼす影響については, これまでに NO 合成酵素阻害剤による網脈絡膜, 毛様体, 虹彩の血流量や眼動脈, 網膜動脈の変化を調べた報告^{8)~11)}はあるが, NO 自発発生物質の局所投与により直接 NO の視神経乳頭血流量への影響を調べたものは, 今のところ今回の報告以外には見当たらない。なお, SNAP は数少ない NO 自発発生物質の一つであるが, 常温で比較的安定であり, しかも生理的条件下で直接 NO を発生する S-ニト

ロソチオール誘導体である¹⁵⁾。

今回の電解式組織血流計による測定の妥当性については、これまでの報告¹²⁾¹³⁾でも述べた通りであるが、水素クリアランス法という確立された原理を基にしており、かつ、対照眼に対する比を採っているため、麻酔深度の影響や電極刺入または硝子体内注入そのもの影響なども無視でき、血流量変化を捕える方法としての信頼性は高いと思われる。

実験1の結果、SNAP(2~200 nmol)硝子体内投与により視神経乳頭組織血流量は有意に増加し、特に、2~20 nmolでは用量依存性が認められた。しかも、NOと直接反応して生理活性を抑制するNO消去剤(Carboxy-PTIO)¹⁶⁾の前投与により、その増加が抑制された。このことから、SNAPから発生したNOの作用で視神経乳頭組織血流量が増加したものと考えられた。

実験2の結果、SNAP(2~200 nmol)硝子体内投与により相対的網膜動脈径(乳頭縁)は有意に増加し、2 nmolよりは20 nmolの方が増加率が高く、実験1の結果と合致した。この増加も、実験1と同様、NO消去剤の前投与により抑制され、NOそのものの作用であることが裏付けられた。

実験3の結果、SNAP(20 nmol)硝子体内投与により全身血圧は30および45分後に有意に下降した。SNAPによって生じたNOの作用が体循環の血管をも弛緩させた結果、全身血圧を下降させたものと考えられた。また、同量のSNAP投与により眼圧も60~120分後にかけて有意に下降した。その作用機序については別に報告する予定であるが、血圧下降とは経時的变化が全く異なっており、それだけで眼圧の変化を説明できない。

今回の実験結果をまとめると、SNAP硝子体内投与により視神経乳頭組織血流量は増加し、その最大効果投与量は20 nmol近辺と考えられた。その作用機序を考えるため、網膜動脈径(乳頭縁)、血圧、眼圧などを測定したところ、まず、血圧下降、動脈径増加が起こり、その後、血圧が戻り、眼圧下降が起こった。視神経乳頭組織血流量の増加が起こったのはその後である。さて、視神経乳頭組織血流量(BF)は次式で表される¹⁷⁾。

$$BF = P/R$$

ただし、Pは乳頭灌流圧、Rは乳頭血管抵抗で、 $P = BP$ (全身血圧) - IOP

この式で、SNAPから生じたNOにより、まず、BPが下降してPが低下、Rも低下するため、BFは増減せず、やがてBPが戻り、しかもIOPが低下する結果、Pが上昇する。Rの低下が残っている間、BFは増加する、という経過をとると考えられた。

今回の検討の結果、NO自発発生化合物は視神経乳頭循環を増加し得ることが初めて示された。しかし、反面、NOのぶどう膜炎との関連性¹⁸⁾、神経細胞死との関連¹⁹⁾などの報告から不都合な作用を生じる可能性もあり、毒

性についての検討も重要であると考えられる。現在、SNAP投与による視機能、眼圧、瞳孔、屈折などへの影響を検討中である。

稿を終えるにあたり、統計学的処理に関してご指導を賜った近畿大学農学部米虫節夫助教授に深謝致します。なお、本論文の要旨は第99回日本眼科学会総会(平成7年4月、名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
- 2) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- 3) Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS: Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-879, 1987.
- 4) Brecht DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9030-9033, 1989.
- 5) Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR: L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138: 550-565, 1987.
- 6) Osborne NN, Barnett NL, Herrera AJ: NADPH diaphorase localization and nitric oxide synthetase activity in the retina and anterior uvea of the rabbit eye. *Brain Research* 610: 194-198, 1993.
- 7) Yamamoto R, Brecht DS, Snyder SH, Stone RA: The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54: 189-200, 1993.
- 8) Yao K, Tschudi M, Flammer J, Lüscher TF: Endothelium-dependent regulation of vascular tone of the porcine ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1791-1798, 1991.
- 9) Haefliger IO, Flammer J, Lüscher TF: Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2340-2343, 1992.
- 10) Kitamura Y, Okamura T, Kani K, Toda N: Nitric oxide-mediated retinal arteriolar and arterial dilatation induced by substance P. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2859-2865, 1993.
- 11) Deussen A, Sonntag M, Vogel R: L-arginine-derived nitric oxide: A major determinant of uveal blood flow. *Exp Eye Res* 57: 129-134, 1993.
- 12) 杉山哲也, 奥 英弘, 守屋伸一, 清水一弘, 浜田 潤, 東 郁郎: エンドセリン-1の眼循環に及ぼす影響. *日眼会誌* 97: 678-682, 1993.

- 13) Sugiyama T, Moriya S, Oku H, Azuma I: Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma—Clinical and fundamental studies—. *Surv Ophthalmol* 39 (Suppl): S49—S56, 1995.
- 14) 奥 英弘, 杉山哲也, 守屋伸一, 浜田 潤, 東 郁郎: エンドセリン硝子体内投与による視機能変化. *日眼会誌* 97: 467—473, 1993.
- 15) 丹野雅幸, 宮田直樹: 生体内で NO を発生する化合物. *現代化学* 277: 36—41, 1994.
- 16) Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, et al: Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction. *Biochemistry* 32: 827—832, 1993.
- 17) Alm A: Ocular circulation. In: Hart WM Jr (Ed): *Adler's Physiology of the Eye* (9th ed), CV Mosby, St Louis, 198—227, 1992.
- 18) Parks DJ, Cheung MK, Chan CC, Roberge FG: The role of nitric oxide in uveitis. *Arch Ophthalmol* 112: 544—546, 1994.
- 19) Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6368—6371, 1991.