

虚血網膜に対する一酸化窒素の保護効果の電気生理学的検討

今井 直樹, 津山 嘉彦, 村山耕一郎, 安達恵美子

千葉大学医学部眼科学教室

要 約

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は、フリーラジカル構造を持ち毒性が強いものと考えられていたが、生体内において重要な伝達物質として機能していることが明らかになった。また、神経組織においても神経伝達物質様の作用をしていることが解明されてきた。さらに、神経組織における虚血障害はグルタミン酸の大量放出が障害の一因であり、この過程においてNOが重要なmediatorの一つとして作用していることが示されている。白色家兎の網膜に網膜虚血状態を作製し、網膜電図(electroretinogram, ERG)を指標として、網膜内におけるNOの作用について検討した。白色家兎の硝子体中にNOの前駆体L-arginine, NO合成酵素阻害剤nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride(L-NAME), NO供与体sodium nitroprusside dihydrate(SNP), および対照として灌流液のみをそれぞれ投与した。次いで、眼内圧を上昇させ網膜循環を途絶させて虚血を誘導し、1時間後に

加圧を解除した。虚血前の状態および再灌流後の網膜機能の回復過程をERGを通して観察した。対照群ではb波の回復率は再疎通4時間後に 36.5 ± 2.5 (平均値 \pm 標準誤差)%であったのに対し、L-arginineの投与群では $46.5 \pm 3.1\%$ と有意に上昇し、その一方、L-NAMEの投与群では $37.7 \pm 1.4\%$ と有意差が検出されなかった。さらに、SNPの投与によっては $45.7 \pm 2.4\%$ と、やはり有意に上昇した。NOの作用は多種報告されているが、網膜内においては虚血性変化に対して保護的な作用が認められた。今回の実験で虚血性疾患に対して、NOの保護効果が応用できる可能性が示唆された。(日眼会誌 101: 639-643, 1997)

キーワード：虚血網膜、一酸化窒素、網膜電図、N-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体

Protective Effect of Nitric Oxide on Ischemic Retina

Naoki Imai, Yoshihiko Tsuyama, Koichiro Murayama
and Emiko Adachi-Usami

Department of Ophthalmology, Chiba University School of Medicine

Abstract

Nitric oxide (NO) is a free radical and was regarded as noxious to life. But recent studies show that NO is an important substance for transcellular signal transduction. It also seems to act as a neurotransmitter in the nervous system. In ischemic nerve tissue a release of glutamate is one of the critical factors that increase neuronal death, and some experiments suggest that NO may be involved in this process. Here we provide evidence that NO provides neuroprotection in ischemic retinas *in vivo*. Albino rabbits' eyes were subjected to 60 minutes of ischemia by raising intraocular pressure. Before ischemia the eyes were treated intravitreally with the NO-precursor L-arginine, the NO synthase-inhibitor nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), the NO-donor sodium

nitroprusside (SNP), or solvent only. The amplitude of the b-wave was measured and the recovery ratio of the b-wave was analyzed hourly after reperfusion. The recovery ratio of b-wave in the eyes with L-arginine and with SNP increased more rapidly than in the controls, while the recovery ratio in the eyes with L-NAME increased in a way similar to that of the controls. These results suggest that NO plays a neuroprotective role in ischemic retina. It may be involved with S-nitrosylation of some proteins, including one of the glutamate receptors, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. (J Jpn Ophthalmol Soc 101: 639-643, 1997)

Key words: Retinal ischemia, Nitric oxide, Electroretinogram, NMDA receptor

別刷請求先：260 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 千葉大学医学部眼科学教室 今井 直樹
(平成8年12月13日受付,平成9年4月14日改訂受理)

Reprint requests to: Naoki Imai, M.D. Department of Ophthalmology, Chiba University School of Medicine, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba-ken 260, Japan

(Received December 13, 1996 and accepted in revised form April 14, 1997)

I 緒 言

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は血管内皮由来平滑筋弛緩因子としての作用が確認されて以来¹⁾,生体内で様々な機能を示していることが明らかにされてきたが,神経系においてもその作用は幅広く認められ,シナプス,神経細胞間の情報伝達に機能していることが示されている²⁾.NOは生体内において,L-アルギニン(L-arginine)からNO合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)によってL-シトルリン(L-citrulline)に変換される反応において生じることが確認され³⁾,そのNOSの網膜の分布が網膜内層を中心に存在していることが報告⁴⁾⁵⁾されている.

虚血—再灌流における障害には様々な因子が関与しているが,グルタミン酸受容体の一つのN-メチル-D-アスパラギン酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受容体を介する一連の障害作用が明らかになっている.NOのメディエーターとしての虚血障害の役割が注目される中で,NOが神経毒性に働くということを示す報告⁶⁾⁷⁾と,神経保護性に働くという報告⁸⁾⁹⁾がある.前者では,NOが虚血再灌流の過程で発生するスーパーオキシドと反応して組織障害性の強いペルオキシニトリドを作るという報告⁶⁾,培養神経細胞に対するNMDA毒性をNOS阻害剤が軽減させるという報告⁷⁾がある.後者には,NOによるNMDA受容体の阻害作用を示唆する報告⁸⁾,あるいはNOのある化学的状態においてはNMDA受容体に結合し,その活性を抑制するという報告⁹⁾が含まれる.

今回,虚血におけるNOの効果を明らかにし,虚血性神経障害に対して応用することを目的とし,家兎を用いて実験的虚血網膜を作り,NO関連物質を硝子体内に前投与した虚血網膜の回復過程を網膜電図(electroretinogram, ERG)で記録し,比較検討した.これまでも網膜虚血からのERG回復とNO関連薬剤の関係に関する報

告はみられるが,同一の実験系で,NOSの賦活化剤,阻害剤,NO供与体を使用して比較検討をし,結果を明確にすることを試みた.

II 実験方法

1. 対 象

白色家兎(体重2.0~3.0 kg)を20匹用いた.虚血前に0.1 ml 注入する薬剤の種類により4つのグループ(各n=5)に分けた.グループ1には1 μ M L-arginineを注入した.これはNOの前駆物質で,NOSの賦活化剤として作用する.グループ2には注入する1 μ M ニトロ-L-アルギニン-メチル-エステル(nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME)を注入した.これはNOSの阻害剤として作用する.グループ3には10 nM ニトロプルシッド(sodium nitroprusside, SNP)を注入した.これはNO供与剤として作用する.グループ4は対照として各群に注入する薬剤の溶媒である眼灌流液(BSSplus[®])のみを注入した.

2. 虚 血 法

動物は,キシラジン筋肉内注射(20 mg/kg),ウレタンの腹腔内注射(1 g/kg)で全身麻酔して虚血を行った.シリコンカテーテルチューブを動物の角膜輪部から前房内に刺入し,チューブに連結してある生理食塩水の満たされたボトルを上昇させ,眼内圧を高めて60分間維持した.実験前にボトルを上昇させた場合のチューブ末端が,ウサギの眼の高さで140 mmHgになることをU字型水銀柱に接続して確認した.虚血中は検眼鏡で網膜中心動脈の拍動の消失を確認した.

3. ERG の記録

瞳孔をミドリンP[®](参天製薬)で極大散瞳させ,suction-cup型の角膜電極(京都コンタクトレンズ製)で記録した.不関電極は眼瞼皮下に刺入した.解析時間を

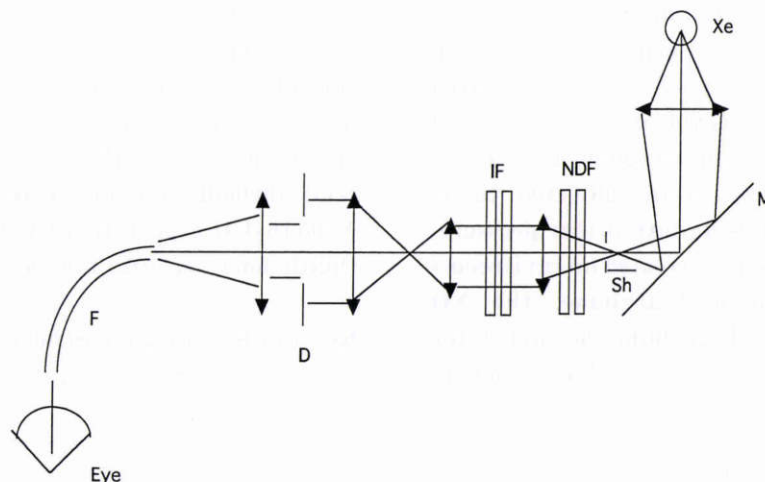


図1 改造した Maxwellian-view 刺激装置.

Xe: 500 W Xe ランプ光源, Sh: 電磁シャッター, NDF: 中性フィルター, IF: 干渉フィルター, M: 鏡, D: しぼり, F: ファイバーオプティクス

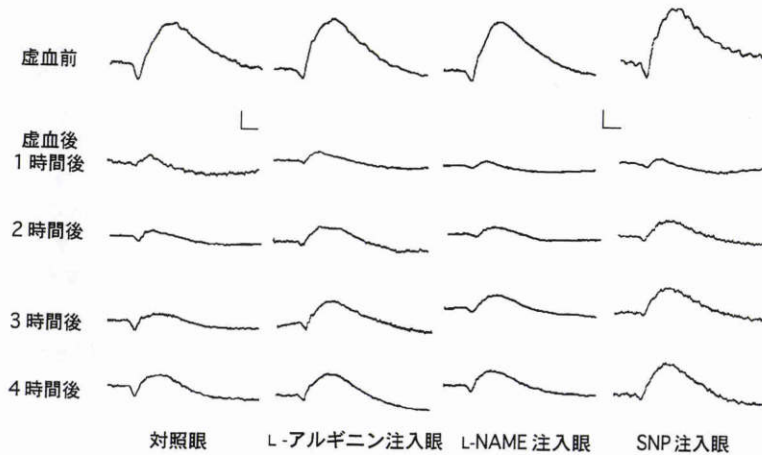


図2 各グループの虚血前後の網膜電図の波形の変化の代表例。

図中のスケールは水平方向 30 ms, 垂直方向 100 μ V を示す。

L-NAMH: ニトロ-L-アルギニン-メチル-エステル, SNP: ニトロプルシッド

300 ms, 前置増幅器の電気フィルタは 1~500 Hz に設定した。

刺激装置は, Maxwellian 視光学系の一部を改造して用いた(図1), 光源は 500 W キセノンアークランプを用い, 光学系の最終ポイントで収斂した光をファイバーオプティクスを用いて眼前 1 cm まで誘導する。角膜面上の照度は 5×10^3 lx とした。刺激持続時間 3 ms の single flash の刺激を 60 分の暗順応後に与えた。得られた波形はニューロパック 2 (日本光電, MEM-7102) で記録した。

ERG は虚血前と虚血を解除後, 60 分おきに 4 時間まで測定した。

III 結果

各グループの ERG 波形の代表例を図 2 に示す。

各グループ(n=5)の再灌流後の ERG の b 波振幅を虚

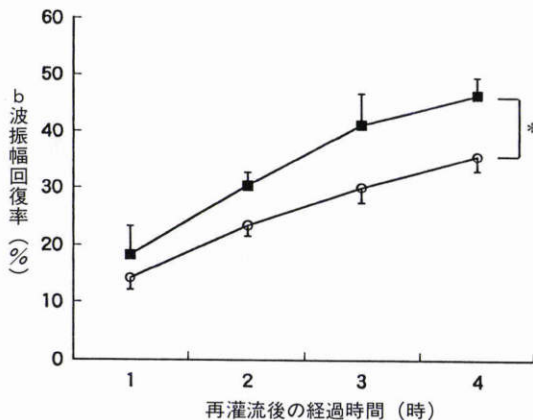


図3 L-arginine 注入群および対照群の再灌流後の b 波の振幅の推移。

再灌流後の b 波の振幅を虚血前の振幅に対する比として示してある。平均値 \pm 標準誤差で表示。

■: アルギニン注入群(n=5), ○: 対照群(n=5), *: $p < 0.01$

血前の b 波振幅に対する比 $\times 100$ (%) として推移を評価した。図 3 は L-arginine 注入群を対照群と比較したものである。1, 2, 3, 4 時間値において, arginine 注入群の % 振幅の平均値が 18.3, 30.4, 41.2, 46.5% で, 対照群の % 振幅の平均値が 14.2, 23.5, 30.1, 35.6% と推移したのと比べると, 一貫して b 波は高い回復率を示し, 4 時間値ではアルギニン注入群は有意に高い回復率を示していた ($p < 0.01$, Bonferroni method)。図 4 は L-NAME 注入群と対照群を同様に比較したものである。L-NAME 注入群では 1, 2, 3, 4 時間値において, % 振幅の平均値が 17.3, 20.8, 30.9, 37.8% と推移したのと比べると, この 2 群間での経過は差がみられない。図 5 は SNP 注入群を対照群と対比して示したものである。SNP 注入群は 1, 2, 3, 4 時間値において, % 振幅の平均値が 14.2, 23.5, 34.7, 45.7% と推移し, arginine 注入群と類似した経過を示し, 4 時間値では SNP 注入群で有意に高い回復

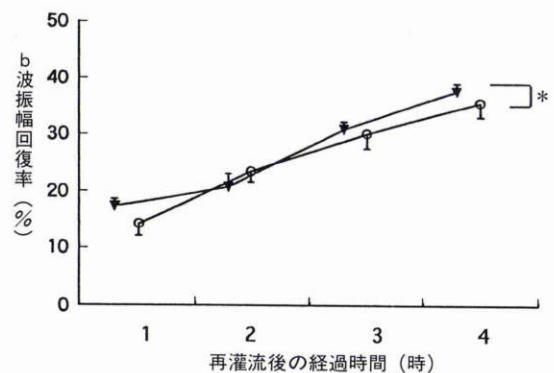


図4 ニトロ-L-アルギニン-メチル-エステル(L-NAME) 注入群および対照群の再灌流後の b 波振幅の推移。

再灌流後の b 波の振幅を虚血前の振幅に対する比として示してある。平均値 \pm 標準誤差で表示。

▼: L-NAME 注入群(n=5), ○: 対照群(n=5), *: $p = 0.6$

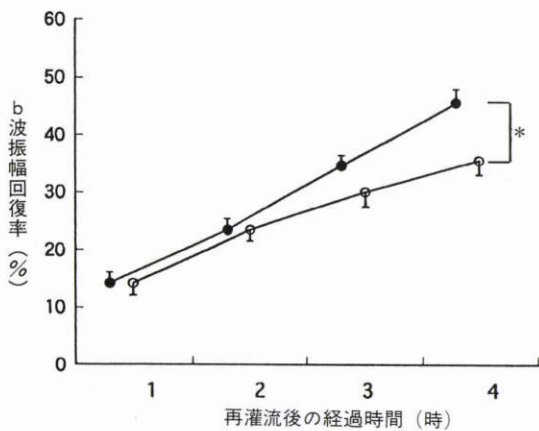


図5 ニトロプルシッド(SNP)注入群および対照群の再灌流後のb波の振幅の推移。
再灌流後のb波振幅を虚血前の振幅に対する比として示してある。平均値±標準誤差で表示。
●: SNP注入群(n=5), ○: 対照群(n=5), *: P<0.01

率であった。

IV 考 按

L-arginineの硝子体注入により、虚血時からのb波の回復が有意に高まるが、L-NAMEの硝子体注入ではb波の回復過程に有意差がみられなかった。NOSの賦活剤と阻害剤の作用として対比してみると、NOの産生がb波の回復を高めていることが示唆され、これはSNPの硝子体注入により、網膜内にNOが発生してb波の回復が高まったことと矛盾しない。b波は網膜のミュラー細胞から生じる電位¹⁰⁾であり、網膜機能の指標の一つとなり得る。これらの結果を考慮すると、虚血前にNOを硝子体に注入することにより、網膜の障害に対する保護作用が生じることが示唆される。

これまでに、Veriacら¹¹⁾はSNP投与後に虚血状態からのb波の回復時間が短縮したという報告をしている。また、Liuら¹²⁾はアルギニンの投与により、虚血—再灌流後のb波の回復が有意に高まったという報告をしている。Ostwaldら¹³⁾はNOS阻害剤投与によって虚血後の回復過程で血流減少を起こすが、それはERGには影響しなかったと報告をしている。これらの報告と我々の結果とは、虚血の方法、実験動物などが異なり同列に比較することはできないが、相反していないものである。これらの報告は、NOの血管拡張作用により、虚血領域の血流が改善され、それが虚血後の回復となるという考え方で説明している。

しかし、虚血—再灌流に伴って生じる神経系へのNOの関与については、血管の拡張以外に次のようなことが知られている。グルタミン酸が大量に発生し、グルタミン酸受容体を介し、細胞障害が惹起される。さらに再疎通後、活性酸素、過酸化水素の発生により、脂質の酸化を含

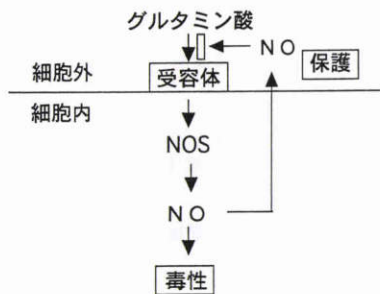


図6 虚血時におけるグルタミン酸毒性に対する一酸化窒素の毒性作用と保護作用の模式図。

む組織の酸化的障害が惹起される¹⁴⁾。虚血時にはNOSの活性化を伴い、NO濃度は実際に高まることが確かめられている¹⁵⁾。また、NOが活性酸素と結合し、組織障害性の強いフリーラジカルを発生することが指摘されている⁶⁾。NOの血管拡張作用は活性酸素をかえって増やす方向になることが障害を高めるとも考えられ、それだけで実験結果を説明するのは不十分と考えられる。そこで、図6のようなシエマを想定してみた。グルタミン酸はNMDA受容体を介し、NOSを活性化させNOを発生させる。これは毒性を高める働きがある。ところが、虚血前に外因性にNOを発生させることにより、これがNMDA受容体を修飾し、毒性の経路を阻害するのである。このNMDA受容体の修飾は、その構造の中に含まれる活性調節領域のチオール(SH)基にNOが結合し、S-nitrosylationという反応を起こし、さらに、分子内にジスルフィド結合(S-S)を形成する。これは、生体内に多くみられる反応の一つであることが示されている¹⁶⁾。

しかし、NOが毒性か保護性かに機能する分岐は、NOの注入のタイミングの問題だけではないであろう。まず、濃度を考える必要がある。注入するSNPの量の決定は虚血を行わないで硝子体に注入し、ERGに影響がないような量に設定した¹⁷⁾。もし、硝子体に注入したSNPが眼球全体に拡散したとすると、その濃度は約 $5\mu\text{M}$ 程度であり、これから発生するNOの量は極めて微量であることが予想される。 $1\mu\text{M}$ L-arginine投与により発生したNOは極めて微量であると考えられる。免疫系細胞において、体外から侵入する微生物に対して産生されるNOは一般に高濃度であり、強い細胞毒性を示す¹⁸⁾。一方、柏井¹⁹⁾は $50\mu\text{M}$ 程度の低濃度のNO生成試薬で、培養網膜神経細胞のNMDAによって惹起される細胞死が抑制されたと報告している。今回の実験では証明されないが、高濃度から低濃度になるにつれ毒性が下がると同時に、NMDA毒性からの神経保護作用が著明になるということが考え得る。さらに、NOの神経保護性と神経毒性という両面性がNOの化学的状態によって決定されるという説明がある⁹⁾。NO⁺の形になることによって、NMDA受容体とS-nitrosylation反応を起こし、グルタミン酸などの興奮毒性を抑え、NOの状態となると活性酸素と反

応し、細胞障害を惹起するというものである。

今後、実験方法でいくつかの考えるべき点がある。一つに、今回の実験はERGを通して経過を観察したが、Geyerら²⁰⁾は組織学的に、虚血後の過程を網膜内層の厚さで虚血による障害を虚血後1週間にモニターしたところ、NOS阻害剤によって網膜障害が軽減されることを報告している。我々の結果では、NOS阻害剤で虚血障害からの回復に对照と有意差はみられなかった。結果が異なるのは、実験方法が異なること、彼らが組織学的に観察していること、さらに観察期間が長いことが考えられる。ERGを用いた実験では、動物の全身状態を考慮すると、1週間単位の長期の観察は困難であると思われる。しかし、今後長期的な結果の評価も必要である。二つに、実験過程での動物の麻酔の深度の差については考慮していない。麻酔の深度がERGのb波と関係していることを考慮して、Imaiら²¹⁾は反対眼と比較することによって麻酔の効果を軽減する方法を考案しており、それを用いればより正確に結論づけられると思われる。

今回の実験の結果は、NOを虚血障害に応用する新たな指針になり得るものと思われる。NOの投与条件、投与方法について詳細な実験を行うことによって、治療としての応用が可能であると考えられる。

文 献

- 1) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- 2) Bred DS, Snyder SH: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9030-9033, 1989.
- 3) Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthase, calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685, 1990.
- 4) Osborne NN, Barnett NL, Herrera AJ: NADPH diaphorase localization and nitric oxide activity in the retina and anterior uvea of the rabbit eye. *Brain Res* 610: 194-198, 1993.
- 5) Yamamoto R, Bredt DS, Snyder SH, Stone RA: The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia. *Neuroscience* 54: 189-200, 1993.
- 6) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624, 1990.
- 7) Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cul-

- ture. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6368-6371, 1991.
- 8) Ujihara H, Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Sasa M, Kashii S, et al: Blockade of retinal NMDA receptors by sodium nitroprusside is probably due to nitric oxide formation. *Jpn J Pharmacol*. 61: 375-377, 1993.
- 9) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen H-SV, Sucher NJ, et al: A redox-based mechanism for the neuroprotective and related nitroso-compounds. *Nature* 367: 626-632, 1993.
- 10) Newman EA, Odette LL: Model of electroretinogram b-wave generation: A test of K⁺ hypothesis. *J Neurophysiol* 51: 164-182, 1984.
- 11) Veriac S, Tissie G, Bonne C: Oxygen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in the rabbit retina under high intraocular pressure. *Exp Eye Res* 56: 85-88, 1993.
- 12) Liu SXL, Chiou GCY, Varma RS: Improvement of retinal functions after ischemia with L-arginine and its derivatives. *J Ocul Pharmacol Ther* 11: 261-265, 1995.
- 13) Ostwald P, Goldstein IM, Pachnanda A, Roth S: Effect of nitric oxide synthase inhibition on blood flow after retinal ischemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2396-2403, 1995.
- 14) McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
- 15) Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M: Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 355-358, 1993.
- 16) Girard P, Potier P: NO, Thiols, and Disulfides *FEBS Lett* 320: 7-8, 1993.
- 17) Nathan CF, Hibbs JB: Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70, 1991.
- 18) 今井直樹, 津山嘉彦, 村山耕一郎, 安達恵美子: 虚血網膜に対するNOの効果の電気生理学的考察, 厚生省特定疾患網脈絡膜萎縮症調査研究班, 平成7年度報告書, 26-27, 1995.
- 19) 柏井 聡: 網膜虚血における一酸化窒素の役割について, *日眼会誌* 99: 1361-1376, 1995.
- 20) Geyer O, Almog J, Lupu-Meire M, Lazar M, Yoram O: Nitric oxide synthase inhibitors protect rat retina against ischemic injury. *FEBS Letters* 374: 399-402, 1995.
- 21) Imai M, Iijima H: Recovery of photopic ERG from pressure-induced retinal ischemia in rabbit eyes. *Jpn J Ophthalmol* 39: 254-9, 1995.