

一酸化窒素供与体(FK 409)によるウシ網膜動脈拡張作用 —マイクロベッセルパーフュージョンシステムを用いての検討—

杉本 佳世¹⁾, 渡辺登三子¹⁾, 佐原 正明¹⁾, 植田 俊彦²⁾, 久光 正¹⁾, 小出 良平²⁾

¹⁾昭和大学医学部第一生理学教室, ²⁾昭和大学医学部眼科学教室

要 約

目的: 一酸化窒素供与体(FK 409)によるウシ眼網膜動脈拡張作用を調べた。

対象と方法: ウシ眼網膜動脈の第二分枝(約3 mm 長, 平均径 110 μ m)を用いた。血管摘出後, 速やかに微小循環測定装置マイクロベッセルパーフュージョンに装着した。トロンボキサン_{A2}類似物質U46619, またはFK 409を灌流し, 血管径を測定した。さらに, 一酸化窒素(NO)の特異的消去剤PTIOを追加しFK 409の機序を検討した。

結果: 10^{-6} MのU46619を灌流したところ, 血管内

径の有意な収縮が誘導された。灌流液に 10^{-3} Mまたは 10^{-4} MのFK 409を加えたところ, U46619の収縮反応が抑制された。さらにPTIOを追加灌流したところ, FK 409の血管拡張作用が消失した。

結論: FK 409から産生されるNOラジカルによってウシ眼網膜動脈が拡張することが推定された。(日眼会誌 106: 338-342, 2002)

キーワード: 一酸化窒素(NO), 網膜動脈, 微小循環測定装置, FK 409, 血管拡張

Vasodilatory Action of FK 409 on Bovine Retinal Arteries —Analysis by a Microvessel Perfusion System—

Kayo Sugimoto¹⁾, Tomiko Watanabe¹⁾, Masaaki Sahara¹⁾, Toshihiko Ueda²⁾
Tadashi Hisamitsu¹⁾ and Ryohei Koide²⁾

¹⁾Department of Physiology, Showa University School of Medicine

²⁾Department of Ophthalmology, Showa University School of Medicine

Abstract

Purpose: We investigated the vasodilatory action of FK 409 on bovine retinal arteries using a microvessel perfusion system *in vitro*.

Materials and Methods: Bovine retinal arteries were obtained from bovine eyes. The arteries, 3 mm long and 110 μ m in diameter, were attached to the microvessel perfusion system. The arteries were perfused with Tyrode solution containing 10^{-6} M U46619, followed by 10^{-6} M U46619 and FK 409 (10^{-3} M or 10^{-4} M). We also perfused the arteries with carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide. The inner diameter of the arteries was measured under a microscope and analyzed by computer.

Results: FK 409 prevented contraction of bovine

retinal arteries induced by perfusion of 10^{-6} M U46619 when the arteries were perfused with 10^{-3} to 10^{-4} M FK 409. Addition of 100 μ M PTIO, an nitric oxide (NO)-specific extinction agent, into the mixture of U46619 and FK 409 had an antagonistic effect on the contractive action of FK 409.

Conclusion: These results suggest that FK 409 has a dilatational effect on bovine retinal arteries and that the dilatational action of FK 409 is possibly produced by NO. (J Jpn Ophthalmol Soc 106: 338-342, 2002)

Key words: Nitric oxide(NO), Retinal artery, Microvessel perfusion system, FK409, Vasodilation

I 緒 言

糖尿病網膜症, 網膜静脈閉塞症, さらには網膜細動脈

瘤などの発症には網膜血管の循環障害が重要な役割を果たしている。また, 緑内障も眼循環障害が重要な発症・増悪化のリスクファクターと考えられ, 近年眼循環の改

別刷請求先: 142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8 昭和大学医学部第一生理学教室 杉本 佳世

(平成13年10月9日受付, 平成14年1月29日改訂受理)

Reprint requests to: Kayo Sugimoto, M.D. Department of Physiology, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan

(Received October 9, 2001 and accepted in revised form January 29, 2002)

善, 特に血管拡張因子である一酸化窒素(NO)の点眼による疾患の治療が試みられ, 良好な成績が報告¹⁾されている. NO 供与体(FK 409)は *Streptomyces griseosporus* の醗酵生成物中から単離された水溶性の化合物で, 安定した NO 供与体である^{2)~4)}. 本化合物をラットやウサギの大動脈, イヌの冠状動脈に作用させるとこれら血管が拡張することが報告され, 網膜血管を含む全身の循環改善薬としてヒトへの応用が期待されている^{2)~4)}. しかしながら, 網膜血管に及ぼす FK 409 の効果については全く検討されていない. また, 網膜血管は大動脈や冠状動脈とは組織学的に全く異なること⁵⁾, さらに, 網膜血管では自律神経による循環の調節があまりみられないことなどが報告されていることから, FK 409 により大動脈や冠状動脈と同様に網膜血管が拡張すると考えるには難があるといえるであろう. そこで今回, FK 409 の網膜動脈に及ぼす効果についてマイクロベッセルパーフュージョンシステムを用いて検討した.

II 実験方法

1. 対象血管とその採取

本実験では屠殺後 4 時間以内に摘出したウシ眼の網膜細動脈第二分枝(内径 100~150 μm , 長さ 3 mm)を使用した. 摘出ウシ眼の赤道部を全周切開し, 硝子体を除去, 網膜を露出後, 実体顕微鏡下で網膜細動脈を剥離・摘出し, 酸素を飽和させたタイロード液に浸漬した. 次に, 摘出血管から眼科用の角膜剪刀あるいは細部用剪刀を用いて網脈動脈第二分枝を切断・分離し, 実験に使用した.

2. マイクロベッセルパーフュージョンシステムへの血管の装着

摘出血管を血管内径測定装置(マイクロベッセルパーフュージョンシステム, LSI Co. Ltd. 米国)の薬物灌流槽に固定し, 一端をシリコンチューブに接続した 2 本の直径 80 μm のガラス管に血管両端を挿入, 単線維にほぐした絹糸で結紮後, 薬物灌流槽を倒立顕微鏡に装着した. なお, 装着された血管周囲には特に付着組織はみられなかった.

3. 血管内径の測定

薬物灌流槽に血管を装着後, その内腔を洗浄するためにペリスタポンプを用いて流入圧 50 mmHg, 流出圧 45 mmHg, 流速 22.0 $\mu\text{l}/\text{分}$ で 30 分間, 37°C の 100% 酸素を通気したタイロード液を灌流した. 次いで, 所定の濃度に調整した各種薬物を上記と同様の方法で血管内腔に 15 分間灌流した. 薬物灌流開始 8 分後から血管内径の変化をビデオカメラで記録, 画像計測ソフト MP 100 WS(BIOPAC System 社) および Acknowledge(BIOPAC System 社)を使用し, 血管内径を測定した. なお, 実験全期間を通じて, 血管外周には 37°C のタイ

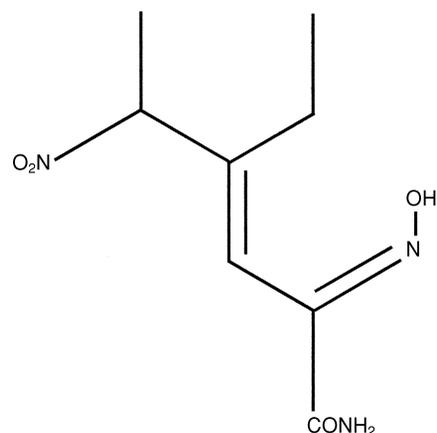


図 1 FK 409 の構造式.

FK 409 : (±)-(E)-4-ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamide

FK 409 は *Streptomyces griseosporus* の醗酵生成物質中から単離された化合物(M. W. 215.2)である. 水溶液中で非酵素的にニトロ基とオキシムの部から一酸化窒素(NO)ラジカルが産生される.

ロード液を上記と同様の条件で灌流した. また, 灌流薬物の種類, 濃度ごとに新たに作製した血管を使用した.

4. 薬物

トロンボキサン A₂類似物質として U 46619(同仁化学研究所)を, NO 消去剤として carboxyl-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide(PTIO, 同仁化学研究所)を使用した. これら両薬剤をタイロード液に最終濃度がそれぞれ 10⁻³M になるように溶解し, 実験に使用した. また, NO 供与体としては藤沢薬品工業株式会社から供与された FK 409 を使用した(図 1).

5. NO ラジカルの測定

タイロード液に溶解した FK 409 液を 100 μl のキャピラリーチューブに充填し, ESR Spectroscopy(JES-RE 1 X, 日本電子株式会社)を用いて NO ラジカル強度を測定した. ESR Spectroscopy の設定条件は center field, 336 \pm 5.0(平均値 \pm 標準誤差)mT, microwave power 8 mW, modulation amplitude 0.1 mT, gain 4 or 5 \times 100, time constant 0.1 s, scanning time 4 minutes⁶⁾であった. また, FK 409 液の NO 濃度を NO₂-/NO₃-assay Kit-C(同仁化学研究所)を用いて測定した.

6. 統計学的検討

血管の内径に及ぼす薬剤の効果を検討する実験では, それぞれの薬剤濃度に対して, 異なったウシから摘出した網膜血管を 6 例使用し, 平均値と標準誤差を求め, 結果として表示した. NO の測定実験では三重に測定した結果から, 平均値と標準誤差を求めた. Fisher's Protected LSD test と分散分析法(ANOVA)の両者で, 危険率の値を求めた.

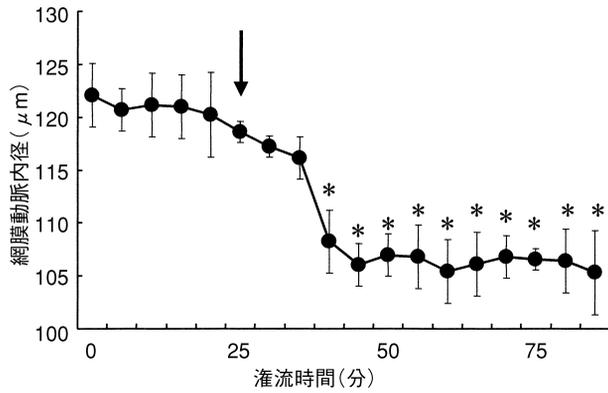


図 2 網膜動脈血管に及ぼす U 46619 と NO 供与体である FK 409 の作用。

●：10⁻⁶M U 46619 灌流開始後約 20 分で血管収縮が始まり、その後 60 分持続した。
 →：U 46619 灌流開始，*：灌流開始時の網膜動脈内径に対する有意差あり (p=0.0001)。

III 結 果

1. 網膜血管内径に及ぼす U 46619 と FK 409 の効果 (図 2, 3 A, B, 表 1)

10⁻⁶M U 46619 を網膜血管に灌流したところ、図 2 ならびに図 3 A, B に示したように灌流開始後約 20 分から血管の収縮が始まり、25 分後には灌流前と比較して約 20% の最大収縮が観察された。次に、10⁻⁶M の U 46619 を含有するタイロード液に 10⁻³M あるいは 10⁻⁴M の FK 409 を添加、血管を灌流したところ、灌流開始 20 分後から血管内径の拡張が始まり、25 分後には表 1 に示したように灌流前の内径にまで回復した。

2. FK 409 の血管拡張作用に及ぼす PTIO の効果 (表 2)

U 46619 の灌流による血管の最大収縮を確認後、FK 409 (10⁻³M) と U 46619 (10⁻⁶M) の混合液に 10⁻⁴M の PTIO を添加、血管を灌流、25 分後に血管内径を測定したところ、血管内径には著明な変動が観察されず、U 46619 による血管の収縮状態が維持されていた (表 2)。

3. NO の測定 (図 4 A, B, 表 3)

FK 409 のタイロード液への溶解によって生成される NO を ESR Spectroscopy を用いて測定するとともに、同溶液中の NO 濃度に及ぼす PTIO の効果を検討した。図 4 A に示したように、タイロード液に FK 409 を添加したところ、その濃度依存的に NO ラジカル強度が上昇した。また、この NO ラジカル強度は、FK 409 溶解 1 時間後でも溶解直後のそれと大差がなかった (図 4 B)。次に、10⁻³M の FK 409 溶解液に 10⁻⁴M の PTIO を添加し、同溶液中の NO 濃度を測定した。表 3 に示したように、FK 409 を溶解したタイロード液で観察された 115.0 ± 15.4 (平均値 ± 標準誤差) μM の NO 濃度は PTIO の添加によって約 1/2 の 54.6 ± 8.4 μM にまで減少し

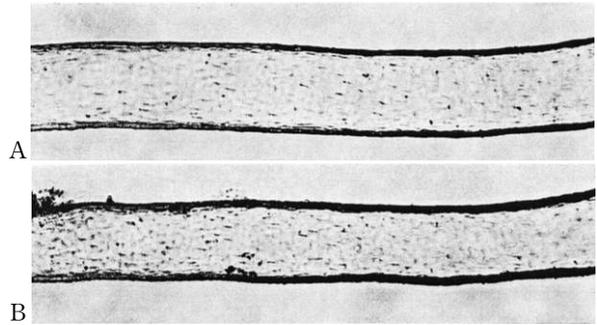


図 3 U 46619 の灌流による網膜血管の収縮。
 A：灌流前，B：灌流後

表 1 網膜動脈血管に及ぼす FK 409 の拡張作用

灌流薬物	血管内径(平均値±標準誤差)μm
灌流液	127.63±7.8
U 46619	97.96±11.7*
FK 409 10 ⁻³ M	114.6±7.4
FK 409 10 ⁻⁴ M	125.5±7.9

各薬液灌流後の最大変化時の値を示す。

FK 409：一酸化窒素(NO)供与体，灌流液：タイロード液，U 46619：Thromboxane A₂ 類似物質，*：対照との間で有意差あり (p=0.0002)

表 2 FK 409 の拡張作用に及ぼす PTIO の抑制作用

灌流薬物	血管内径(平均値±標準誤差)μm
灌流液	114.7±3.6
PTIO	117.8±1.8
U 46619	97.9±11.6
U+F+P	92.7±12.0

灌流液：タイロード液，carboxyl-2 phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO)：Carboxy PTIO，U 46619：Thromboxane A₂ 類似物質，U+F+P：U 46619+FK 409 10⁻³M+PTIO

た。

IV 考 按

従来、*in vitro* で微小血管径を調べる方法には、等尺性張力測定法といわれる輪状や短冊状条片を作製して等尺性張力を測定する方法⁵⁾あるいは血管床灌流圧測定法といわれる二重マグヌス管内で血管の灌流圧変化を圧トランスジューサーで測定する方法^{7,8)}などがあつた。等尺性張力測定法の欠点は、血管標本を損傷させるため長時間の実験では血管に変性があること、また、血管床灌流圧測定法では標本に脂肪などの結合織が含まれるため測定結果の精度が低く、さらに、そこに含まれる物質が影響したり、灌流液に混入する恐れがあることが挙げられる。今回のマイクロベッセルパーフュージョン法で

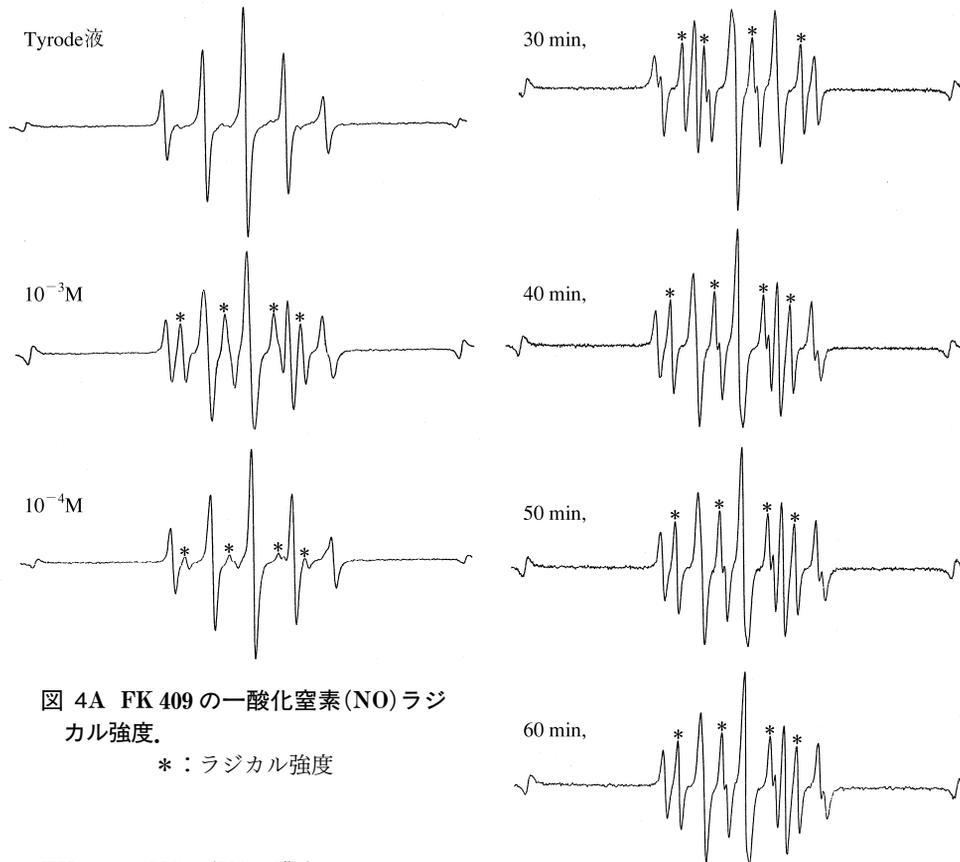


図 4A FK 409 の一酸化窒素(NO)ラジカル強度.

* : ラジカル強度

図 4B FK 409(10⁻³M)の NO ラジカル強度の経時的変動.

* : ラジカル強度

表 3 FK 409 の NO₂⁻/NO₃⁻ 濃度

溶液	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (平均値±標準誤差)μM
FK 409 10 ⁻³ M	115.1±15.4
FK 409 10 ⁻³ M+PTIO	54.6±8.4

は、血管周囲に付着物がなく、また管腔構造のまま測定できるので、内皮損傷が可及的に少なくできる利点⁹⁾があるため、従来の方法と比較し、各種薬物などの血管に及ぼす効果をより生理的に測定できると考えられる。

FK 409 は *Streptomyces griseosporus* の醗酵生成物中から単離された化合物で、比較的安定した NO 供与体である^{10)~12)}。これまで、FK 409 のラット大動脈¹⁰⁾、ウサギ大動脈¹⁰⁾、イヌ冠状動脈¹¹⁾での血管弛緩作用が報告されている。長後毛様体動脈に NO を作用させると同血管が拡張することも報告¹³⁾¹⁴⁾されている。しかし、網膜動脈は、血流の自動調節能を有する点、ノルアドレナリン受容体やアセチルコリンエステラーゼ陽性神経などが少ない点、さらに内皮細胞に tight junction が存在するなどの管壁構成要素に差がある点でこれらの血管と異なるため、今回はウシ眼網膜動脈を対象に FK 409 の効果を観察した。

U 46619 はサルやヒトの脳、冠動脈などを強く収縮させる¹⁵⁾¹⁶⁾ばかりでなく、眼動脈も収縮させる¹³⁾ことが知られている。本実験で網膜動脈に U 46619 を灌流したところ、25 分後に血管の収縮がみられた。そこに FK 409 を追加灌流したところ、U 46619 の収縮作用に反し

て網膜動脈が U 46619 を投与する前の径まで拡張した。この結果は、FK 409 には網膜動脈拡張作用があることを示している。

溶液中の FK 409 から生じる NO ラジカルは水中の酸素と速やかに反応し、さらにより安定な NO₂⁻と NO₃⁻イオンとなる¹⁷⁾。また、NO ラジカルは水中のスーパーオキシドアニオンとも反応し、パーオキシナイトライト(OONO⁻)をも生成する¹⁷⁾¹⁸⁾。したがって、FK 409 による網膜血管の拡張が NO ラジカルそのものによるのか、あるいは NO ラジカルの代謝物の作用によるのかを明確にする必要がある。PTIO は水溶性の安定な有機ラジカルで、水溶液中の PTIO 分子からオキシゲンラジカルが酸化還元反応により NO ラジカルのみを特異的に消去する作用を有している¹⁹⁾²⁰⁾。そこで次に、本剤を FK 409 に添加すると、FK 409 による拡張が有意に抑制された。このことは、FK 409 による網膜血管の拡張が NO ラジカルそのものによっていることを示している。

V ま と め

今回、FK 409 による摘出ウシ網膜動脈に及ぼす影響をマイクロベッセルパーフュージョン法で検討した。本

実験法は従来の方法に比べてより生理的に測定できると考えられた。FK 409 は U 46619 により収縮した網膜動脈の拡張作用を示した。その作用は PTIO で阻害されたことから、NO によるものと考えられた。以上の結果から、FK 409 は網膜動脈の拡張作用を介して網膜循環を改善する可能性がある。

文 献

- 1) **Kanno M** : Effect of topical nipradilol, α -blocking agent with α -blocking and nitroglycerin-like activities, on aqueous humor dynamics and fundus circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 736—743, 1998.
- 2) **Yokota M, Matsunami T, Kodama Y, Sobue T, Nishinaka Y, Iwase M, et al** : Hemodynamic mechanisms of the antianginal action of a novel vasodilator FK 409 in dynamic exercise-induced angina. *J Cardiovasc Pharmacol* 21 : 412—422, 1993.
- 3) **Isono T, Sato N, Koibuchi Y, Sakai S, Yamamoto T, Ozaki R, et al** : Effect of FK 409 a novel nitric oxide donor, on acute experimental myocardial ischemia. *Japan J Pharmacol* 62 : 315—324, 1993.
- 4) **Yamada H, Yoneyama F, Satoh K, Taira N** : Comparison of the effects of the novel vasodilator FK 409 with those of nitroglycerin in isolated coronary artery of the dog. *Br J Pharmacol* 103 : 1713—1718, 1991.
- 5) **Mulvany MJ, Aalkjaer C** : Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 70 : 921—961, 1990.
- 6) **Asano K, Satoh K, Hosaka M, Arakawa H, Inagaki M, Hisamitsu T, et al** : Production of hydrogen peroxide in cancerous tissue by intravenous administration of sodium 5,6-benzylidene-L-ascorbate. *Anticancer Res* 19 : 229—236, 1999.
- 7) **McGregor DD** : The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol (Lond)* 177 : 21—30, 1965.
- 8) **Kawasaki H, Takasaki K** : Vasoconstrictor response induced by 5-Hydroxytryptamine released from vascular adrenergic nerves by periarterial nerve stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 229 : 816—822, 1984.
- 9) **Duling BR, Gore RW, Dacey RG, Damon DN** : Methods for isolation, cannulation and *in vivo* study of single microvessels. *Am J Physiol* 241 : 108—116, 1981.
- 10) **Shibata S, Satake N, Sato N, Masuo M, Koibuchi Y, Hester RK** : Characteristics of the vasorelaxing action of (3E)-4-ethyl-2-hydroximino-5-nitro-3-hexamide FK 409 a new vasodilator isolated from microbial sources, in isolated rabbit arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 : 508—518, 1991.
- 11) **Yamada H, Yoneyama F, Satoh K, Taira N** : Comparison of the effects of the novel vasodilator FK 409 with those of nitroglycerin in isolated coronary artery of the dog. *Br J Pharmacol* 103 : 1713—1718, 1991.
- 12) **Kita Y, Hirasawa Y, Maeda K, Nishio M, Yoshida K** : Spontaneous nitric oxide release accounts for the potent pharmacological actions of FK 409. *Eur J Pharmacol* 257 : 123—130, 1994.
- 13) **Delaey C, Van de Voorde J** : The effect of NO donors on bovine retinal small arteries and posterior ciliary arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : 1642—1646, 1998.
- 14) **Zhu P, Beny JL, Flammer J, Luscher TF, Haefliger IO** : Relaxation by bradykinin in porcine ciliary artery. Role of nitric oxide and K(+)-channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 1761—1767, 1997.
- 15) **Toda N** : Mechanism of action of carbocyclic thromboxane A_2 and its interaction with prostaglandin I₂ and verapamil in isolated arteries. *Circ Res* 51 : 675—682, 1982.
- 16) **Toda N** : Responses of human, monkey and dog coronary arteries *in vitro* to carbocyclic thromboxane A_2 and vasodilators. *Br J Pharmacol* 83 : 399—408, 1984.
- 17) **Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J** : Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258 : 1898—1902, 1992.
- 18) **Saran M, Michel C, Borns W** : Reaction of NO with O_2^- . Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun* 10 : 221—226, 1990.
- 19) **Yoshida K, Akaike T, Doi T, Sato K, Ijiri S, Suga M, et al** : Pronounced enhancement of NO-dependent antimicrobial action by an NO-oxidizing agent, imidazolineoxyl N-oxide. *Infect Immun* 61 : 3552—3555, 1993.
- 20) **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.