

エンドセリンの網膜血管に対する作用

坂上 欧, 桐生 純一, 竹内 篤, 山本 文昭, 本田 孔士

京都大学医学部眼科学教室

要 約

エンドセリンは1988年に発見され、もっとも強い血管収縮物質の一つとして知られている。血管平滑筋の調節に関与し、局所ホルモンとして作用していると考えられている。エンドセリン1は牛網膜血管内皮培地中に見いだされ、又エンドセリン結合部位は牛網膜血管周囲細胞にあることが既に報告されている。今回、各濃度(10^{-6} M から 10^{-10} M まで)のエンドセリン1を0.1 ml, 家兎眼硝子体中に注入し、網膜血管を含む眼底を経時的に写真撮影し、網膜血管に対する作用を観察し、網膜血管径をオキュラーマイクロメーターで計測した。 10^{-6} M では注入直後より収縮を示した。 10^{-7} M, 10^{-8} M では最初血管拡張を示した後、ひき続き血管収縮が認められた。エンドセリンの血管収縮には用量依存性が見られ、最高投与前の53%まで収縮した。エンドセリン1の網膜血管収縮は網膜の虚血、低酸素状態を生じていると思われ、またエンドセリン1は網膜血管の調節に関与する事が示唆された。(日眼会誌 96: 469-472, 1992)

キーワード: エンドセリン, 血管収縮, 網膜, 硝子体内注入, 家兎

Effects of Endothelin on Retinal Blood Vessels

Hiroshi Sakaue, Junichi Kiryu, Atsushi Takeuchi

Fumiaki Yamamoto and Yoshihito Honda

Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Abstract

Endothelins (ETs), which are one of the most potent vasoconstrictors, were discovered in 1988. ETs are involved in the regulation of vascular smooth muscle and are thought to function like a local hormone. In this study, we measured changes in the caliber of retinal blood vessels caused by the intravitreal injection of ET 1 in rabbits, using fundus photography. The retinal artery showed an immediate vasoconstriction after the injection (0.1ml) of ET 1 at 10^{-6} M. However, ET 1 in lower concentrations (10^{-7} M and 10^{-8} M) caused vasodilations initially and subsequently vasoconstrictions. A dose-response relation was found. The blood vessel caliber reduced maximumly to 53% the value before injection. The vasoconstriction due to ET 1 may induce retinal ischemia and hypoxia. We speculate that ET 1 may be involved in the regulation of retinal blood vessels. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 469-472, 1992)

Key words: Endothelin, Vasoconstriction, Retina, Intravitreal injection, Rabbit

別刷請求先: 606 京都市左京区聖護院川原町 54 京都大学医学部眼科学教室 坂上 欧

(平成3年8月19日受付, 平成3年10月14日改訂受理)

Reprint requests to: Hiroshi Sakaue, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

(Received August 19, 1991 and accepted in revised form October 14, 1991)

I 緒 言

エンドセリンは血管内皮細胞培養上清中に放出され、強力かつ著しく持続的な平滑筋収縮作用を有する21残基のペプチドとして1988年に柳沢ら¹⁾により発見された。現在エンドセリンには構造と薬理活性の異なる3種類のアイソペプチド、エンドセリン1、エンドセリン2、エンドセリン3が知られており、エンドセリン・ファミリーを成している。エンドセリンは強力な血管収縮物質として血圧、血流、血管緊張の調節系として働いているのみならず、視床下部、小脳、脳室周囲器官等で中枢神経系のニューロンに存在し神経系に直接作用を持っている事も報告されている²⁾³⁾。しかし、循環血中濃度は極めて低く、例えばエンドセリン1ヒト血中濃度は1.59 pg/mlで循環ホルモンとしてでなく、局所ホルモンとして局所での調節系に関与していると考えられている⁴⁾。

臨床的には虚血性心疾患の冠拳縮⁵⁾やクモ膜下出血後の脳血管拳縮⁶⁾はこのエンドセリンによって引き起こされていると報告されている。眼科領域では虹彩でエンドセリンのmRNAとbinding siteの存在の報告⁷⁾があり、また、エンドセリン1は牛網膜血管内皮培地中に見いだされ、さらにエンドセリン結合部位は牛網膜血管周囲細胞にあることも既に報告されている⁸⁾。生体では家兎の前部硝子体内投与で眼圧の低下を起こす事も知られている⁹⁾。このエンドセリンが網膜血管に対してどのような作用を持つかを眼底写真を用いて観察し、測定した。

II 実験方法

有色家兎5匹(体重2~3kg)5眼を用いた。ウレタン(1g/kg)の腹腔内注射にて麻酔を行い、塩酸ケタミン(10mg/kg)を筋注にて適宜追加した。1%トロピカマイドと0.5%フェニレフリン及び1%アトロピンにて散瞳した。26G針で前房穿刺し0.1ml前房水を吸引した後、各濃度(10^{-6} Mから 10^{-10} Mまで)のエンドセリン1(蛋白研究所、大阪)0.1mlを強膜より家兎眼の前部周辺部硝子体中に注入した。視神経乳頭を含む眼底を投与前と投与後、5分、30分、60分、180分と経時的に眼底カメラ(FD-30、トップコン、東京)を用いカラー眼底写真を撮影した。

血管径測定には光学顕微鏡の接眼レンズ内に組み込んだオキュラーマイクロメーター(MBM 12100、ニコン、東京)を使用した¹⁰⁾。図1に示した様にスケールは

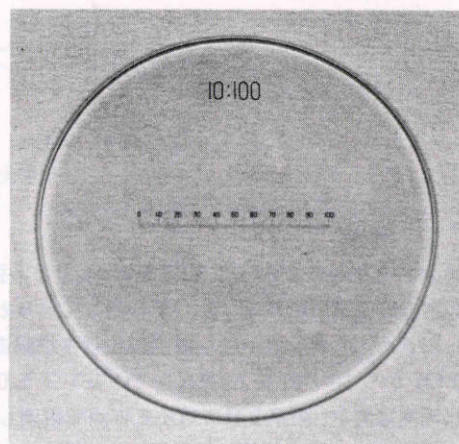


図1 オキュラーマイクロメーターの写真。

10mmを100等分してあり、光学顕微鏡の倍率40倍を併用すると一盛り2.5 μ mまで測定可能である。光学顕微鏡のステージ上にカラースライドを固定し、スライド上で血管内径(血柱)を測定した。各濃度の時間ごとに、焦点のあった2枚のスライドを選び、スライド毎に視神経乳頭を出た直後の動脈(耳側と鼻側の二カ所)の同一部位を測定した。投与前の血管径を対照100%として各数値を表示した。

III 結 果

図2はエンドセリン投与前の眼底写真で、図3は 10^{-7} M投与3時間後の眼底写真を示す。血管は動脈、静脈共に著明に収縮している。

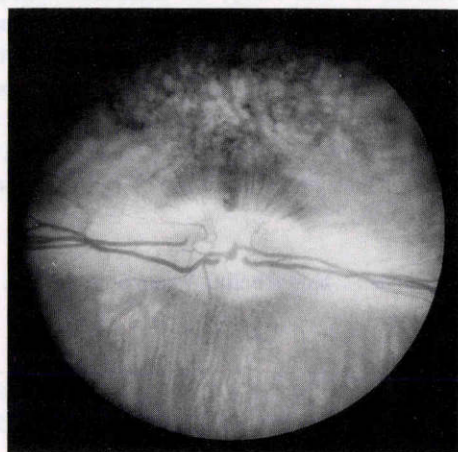


図2 エンドセリン投与前の眼底写真。血管内径を測定し、対照100%とした。

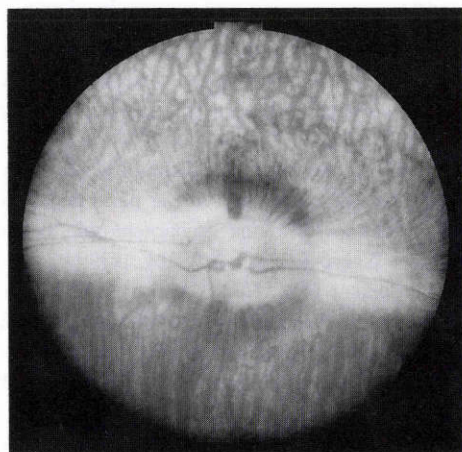


図3 エンドセリン (10^{-7}M) 投与3時間後の眼底写真。動脈、静脈共に収縮している。投与前と同一部位の血管内径を測定し、パーセントで表わした。

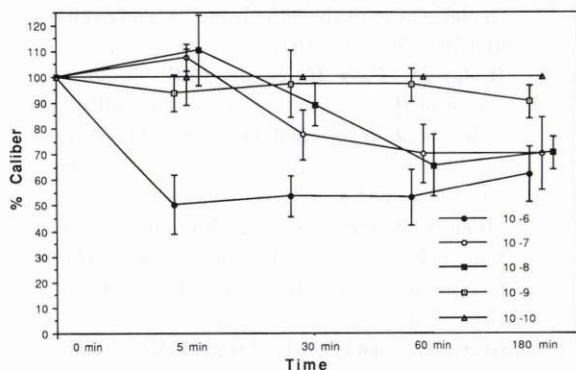


図4 横軸は投与後の時間経過、縦軸は網膜動脈の内径をパーセントで表わしている。各濃度 (M) での時間経過をプロットしている。バーは標準偏差値を示す。

各家兎眼での結果を図4に示した。高濃度 (10^{-6}M) では注入直後より網膜動脈は著明な収縮を示し、5分後の血管径は注入前のほぼ53%まで収縮していた。180分後でも収縮は持続していた。中間の濃度 (10^{-7}M と 10^{-8}M) では注入後5分では血管拡張を示し、その後の30分では血管収縮を示していた。その後も収縮し、180分でも持続していた。180分後の網膜動脈の血管径は 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M で投与前と比べ統計学的に有意な差を認めた (paired t-test, $p < 0.05$)。低濃度 (10^{-9}M と 10^{-10}M) では作用は認められなかった。

図5は投与後60分での各濃度での血管の収縮をグラフにしたもので、各濃度と収縮には dose-response

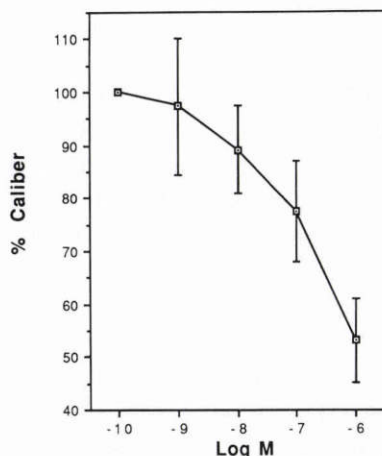


図5 エンドセリン投与60分後での血管収縮を示す。横軸は投与した各濃度 (M) で、縦軸は網膜動脈の内径をパーセントで表わしている。バーは標準偏差値を示す。

の関係が認められている。

IV 考 按

エンドセリン1は他臓器と同様、生体で網膜動脈をも強力に収縮させることが確認された。また、網膜動脈の収縮はエンドセリン用量依存性が示された。エンドセリンは通常、静脈投与による血管内からよりも、髄腔内投与等による血管外からの作用がより効果的であると報告されている¹¹⁾。硝子体内投与も血管外投与である為、効果的な方法の一つと考えられる。しかし硝子体ゲルの存在の為、均一に拡散するには時間を要し、また希釈されるという短所もある。家兎眼での硝子体の容積を 1.47 ml ¹²⁾とした場合、 0.1 ml の投与では約15倍の希釈になる。今回の実験では 10^{-8}M は有効であったので、これが均一に拡散し希釈された場合、 $6.7 \times 10^{-10}\text{M}$ が最少の有効濃度と計算される。これは脳室内投与による脳底動脈の血管収縮の有効濃度が 10^{-10}M のオーダーであるのと同じである⁶⁾。 10^{-9}M と 10^{-10}M の低濃度のエンドセリンまた予備実験の生理食塩水注入では網膜血管に作用が認められなかった事より、前房穿刺、硝子体内注入は網膜血管に影響を及ぼさなかったと考えられる。

エンドセリンは血管拡張物質因子 (EDRF) の放出をも促し、エンドセリンとのバランスにより、投与初期には血管を拡張させると言われており¹³⁾、今回でも低濃度では初期に拡張した後、収縮を認めた。しかし、

これはまず周辺の細い小血管から収縮したため、代償性に中心の大血管が拡張した可能性も否定できない。

今回の実験では3時間までの時間経過を追った。 10^{-6} Mの高濃度を注入した1眼で倒像眼底鏡を用い眼底検査を行ったが、約24時間後では網膜血管径はかなりの回復を示しており、約72時間後では収縮は認められなかった。注入濃度にもよるが、網膜血管への作用の持続は数時間から数日と思われる。エンドセリンによる血管収縮は血流の低下、ひいては網膜虚血、低酸素を生じていると考えられる。これらの検証にはレーザードップラー等による網膜血流測定や酸素電極による網膜酸素分圧測定が必要であろう。

眼科臨床領域では、糖尿病網膜症でCogan¹⁴⁾、Kuwabara¹⁵⁾が網膜血管の血管周囲細胞の消失の後、毛細血管の拡張を報告している。これはエンドセリンのターゲットが平滑筋と血管周囲細胞であることを考慮すれば、エンドセリンによる血管周囲細胞の収縮作用の欠如により引き起こされているとTakahashiら⁸⁾は推察している。

以上のことから、エンドセリンは網膜においても局所ホルモンとして働き、網膜血管の調節に関与していることが推察された。

なお、本研究は文部省科学研究費補助金の助成を受けた。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411—415, 1988.
- 2) Koseki C, Imai M, Hirata Y, et al: Autoradiographic distribution in rat tissue of binding sites for endothelin: A novel peptide? *Am J Physiol* 256: 858—866, 1989.
- 3) Jones CR, Hiley CR, Pelton JT, et al: Autoradiographic visualization of binding sites for [¹²⁵I] endothelin in rat and human brain. *Neurosci Lett* 97: 276—279, 1989.
- 4) Suzuki N, Matsumoto H, Kitaba C, et al: A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J Immunological Methods* 118: 245, 1989.
- 5) Kurihara H, Yamaoki K, Nagai R, et al: Endothelin: A potent vasoconstrictor associated with coronary vasospasm. *Life Sci* 44: 1937—1944, 1989.
- 6) Ide K, Yamakawa K, Nakagomi T, et al: The role of endothelin in the pathogenesis of vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Neuro Res* 11: 101—104, 1989.
- 7) MacCumber MW, Ross CA, Glaser BM, et al: Endothelin: Visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci* 86: 7285—7289, 1989.
- 8) Takahashi K, Brooks RA, Kanse SM, et al: Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericyte. *Diabetes* 38: 1200—1202, 1989.
- 9) MacCumber MW, Jampel HD, Snyder SH: Ocular effects of the endothelins. *Arch Ophthalmol* 109: 705—709, 1991.
- 10) Hodge JV, Parr JC, Spears GFS: Comparison of methods of measuring vessel widths on retinal photographs and the effect of fluorescein injection on apparent retinal vessel calibers. *Am J Ophthalmol* 68: 1060—1068, 1969.
- 11) Mima T, Yanagisawa M, Shigeno T, et al: Endothelin acts in feline and canine cerebral arteries from the adventitial side. *Stroke* 20: 1553—1556, 1989.
- 12) Green H, Sawyer JL, Leopold IH: Elaboration of bicarbonate ion in intraocular fluids. *Arch Ophthalmol* 57: 85—89, 1957.
- 13) Warner TD, DeNucci G, Vane JR: Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur J Pharmacol* 159: 325—326, 1989.
- 14) Cogan DG, Kuwabara T: Capillary shunts in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 12: 293—300, 1963.
- 15) Kuwabara T, Cogan DG: Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of retinal capillaries. *Arch Ophthalmol* 69: 492—502, 1963.