

エンドセリン-1の家兎網膜血管に対する収縮作用

佐藤 剛¹⁾, 武井 一夫²⁾, 野々山智仁¹⁾, 宮内 卓³⁾, 後藤 勝年³⁾, 本村 幸子²⁾¹⁾筑波大学付属病院眼科, ²⁾筑波大学臨床医学系眼科, ³⁾筑波大学基礎医学系薬理

要 約

Endothelin-1 (ET-1)は血管内皮細胞が産生する強力な血管収縮性ペプチドである。我々は、眼内にも存在が確認されている ET-1 が網膜血管に対してどのような生理活性を持つかを調べるため、種々の用量の ET-1 を有色家兎の後部硝子体内に投与し、網膜血管径の経時的変化を観察した。また、高用量の ET-1 投与により網膜血管の完全閉塞が発生するかどうかを蛍光眼底撮影にて検討した。後部硝子体内に投与された ET-1 は、 3×10^{-12} mole の低用量から血管収縮を引き起こした。中用量 ET-1 (10^{-11} mole) 投与時に、網膜血管は経時的に収縮と弛緩を反復する血管攣縮の所見を呈し、一部の動静脈では分節状収縮を示した。高用量 ET-1 (10^{-10} mole) 投与により網膜血管は完全閉塞を来した。また、蛍光眼底撮影にて網膜動静脈の血行は完全に途絶し、しかもこの現象は一過性であることが観察された。後部硝子体内 ET-1 投与は、血管攣縮による一過性の完全閉塞を来す新しい網膜血管閉塞モデルになりうることが示された。(日眼会誌 97: 683-689, 1993)

キーワード: Endothelin-1, 血管攣縮, 硝子体内投与, 実験的網膜血管閉塞, 家兎

Endothelin-1-Induced Vasoconstriction in Retinal Blood Vessels in the Rabbit

Tsuyoshi Sato¹⁾, Kazuo Takei²⁾, Tomohito Nonoyama¹⁾,
Takashi Miyauchi³⁾, Katsutoshi Goto³⁾ and Sachiko Hommura²⁾¹⁾Department of Ophthalmology, University Hospital of Tsukuba²⁾Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba³⁾Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba

Abstract

Endothelin-1 (ET-1) is an endothelium-derived potent vasoconstrictor peptide which is synthesized in retinal vessels. In order to investigate its effect on retinal blood vessels, we injected ET-1 intravitreally (10^{-12} , 3×10^{-12} , 10^{-11} , 3×10^{-11} , 10^{-10} mole) and examined the change in diameters of retinal arteries in rabbits by fundus photography. After injection of a high dose (10^{-10} mole) of ET-1, fluorescein angiography was used to investigate whether complete occlusions of retinal blood vessels occurred or not. 3×10^{-12} mole ET-1 induced contraction of retinal arteries and the contraction of those induced by 10^{-10} mole ET-1 showed complete occlusion. A medium dose (10^{-11} mole) of ET-1 caused repeated vasospasms and segmental vasoconstrictions of retinal blood vessels. Fluorescein angiograms revealed that retinal blood flow was interrupted transiently by injection of a high dose (10^{-10} mole) of ET-1. These findings suggested that intravitreal injection of ET-1 could provide a new

別刷請求先: 305 つくば市天王台1-1-1 筑波大学臨床医学系眼科 本村 幸子
(平成4年9月28日受付, 平成5年2月4日改訂受理)

Reprint requests to: Sachiko Hommura, M.D., Ph.D. Department of Ophthalmology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba. 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305, Japan

(Received September 28, 1992 and accepted in revised form February 4, 1993)

model of experimental transient occlusion of retinal vessels in rabbits. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 683-689, 1993)

Key words: Endothelin-1, Vasospasm, Intravitreal injection, Experimental occlusion of retinal vessels, Rabbit

I 緒 言

Endothelin-1 (ET-1) は 1988 年、柳沢ら¹⁾によってブタ血管内皮細胞の培養上清から単離された強力で持続性の血管収縮活性を持つペプチドである。その後 ET-1 はヒト、ラット、マウスなどの種々の哺乳類の血管内皮細胞で産生されることが判明した²⁾。脳血管を例にとると、*in vitro* の実験では、ET-1 の ED₅₀ 値 (50% 有効濃度) は 10^{-10} ~ 10^{-9} M の範囲であり³⁾⁻⁷⁾、既知の内因性血管収縮物質と比較すると極めて強力である。また、ET-1 の受容体に対する親和性は高く、解離定数は 0.1 ~ 10 nM の範囲であり⁸⁾⁻¹⁰⁾、その収縮作用は極めて持続性である¹¹⁾。実験動物において ET-1 は、脳血管攣縮³⁾、高血圧¹¹⁾や冠血管攣縮¹²⁾に関与する可能性が報告されている。また、臨床的にもクモ膜下出血患者の脳血管攣縮と脳脊髄液中の ET-1 濃度の上昇との関連が示唆され¹³⁾、さらに、宮内¹⁴⁾は、急性心筋梗塞患者の急性期に血漿中の ET-1 濃度が著明に上昇していると報告している。

眼科領域でも、ET-1 が虹彩、毛様体、網膜、脈絡膜に存在し、さらに、ET-1 の硝子体内投与により、網膜の動静脈血管が収縮することが報告されている¹⁵⁾。また、ウン網膜血管を用いた *in vitro* の実験で ET-1 による用量依存性の動脈の収縮反応が観察され、その最大収縮率は 89% であったという報告¹⁶⁾や、家兎網膜血管を用いて ET-1 に対する最大収縮率が 53% であったという報告¹⁷⁾もある。しかし、ET-1 による網膜血管収縮反応がびまん性に起こるのか分節状に起こるのかの詳細は不明であり、また、ET-1 投与により網膜血管の完全閉塞モデルができるのかも不明である。よって、ET-1 の網膜血管に対する生理活性を解明するために、我々は家兎において、種々の用量の ET-1 を用いて *in vivo* での網膜血管に対する反応を経時的に眼底カメラを用いて観察した。

II 実験方法

1. 実験動物

実験には体重 2.0 ~ 2.5 kg の有色家兎を雌雄の別なく使用した。全例、実験は Mydrin P[®] で散瞳し、ウレタン (1.5 g/kg) による静脈麻酔下で行った。

2. 使用薬物

ET-1 (日本ペプチド研究所) を眼内灌流液 (オベガード MA[®]) により希釈し、濃度が 2×10^{-8} 、 6×10^{-8} 、 2×10^{-7} 、 6×10^{-7} 、 2×10^{-6} M となる 5 種類の溶液を作成した。

3. 投与方法

1) 実験 1

手持ち眼底カメラ (KOWA RC-2) で観察しつつ (図 1)、硝子体内に 29 G 針付 1 ml 注射筒 (テルモ) で毛様体扁平部から乳頭直上に上記の各濃度の ET-1 を低用量から 30 分毎に 50 μ l 注入した (n=6)。すなわち、この注入により投与された ET-1 の用量は 10^{-12} 、 3×10^{-12} 、 10^{-11} 、 3×10^{-11} 、 10^{-10} mole となった。つまり、1 匹の家兎に対して上記の 5 段階の用量の ET-1 を累積投与した。また、対照として眼内灌流液 50 μ l を他眼後部硝子体内に注入した (n=6)。

2) 実験 2

実験 1 において最高用量の ET-1 (10^{-10} mole) を投与したとき、網膜動脈および静脈の血流の途絶が観察されたので、1 匹の家兎に対して 10^{-10} mole の ET-1 を 1 回のみ投与して眼底カメラにて眼底を観察した (n=8)。

4. 眼底撮影および計測法

実験 1、2 において手持ち眼底カメラ (KOWA RC-2) を用いて、ET-1 各用量投与後 5 分毎に眼底撮影を行い、網膜血管を観察した。Nikon profile projector により眼底写真を 10 倍に拡大し、乳頭縁網膜上の血管径を難波¹⁸⁾の方法に準じて計測し、投与前後での測定値から血管径の変化率、すなわち収縮率を得た。また、実験 2 において 10^{-10} mole 投与後、家兎の耳静脈からフルオレセインナトリウム (14 mg/kg) を静注し、干

渉フィルターを装着した手持ち眼底カメラを用いて蛍光眼底撮影を行った。

III 結 果

1. 実験1の結果

1) 低用量に ET-1 投与時の経時的変化

10^{-12} mole の ET-1 投与では、全例、網膜血管の収縮は認められなかった。 3×10^{-12} mole の ET-1 投与により動静脈の収縮が引き起こされるのが観察された。動静脈のどちらにおいても観察された血管の収縮は30分後には完全にもとの血管径に戻っているのが観察された。なお、血管拡張の所見は、いずれの用量の ET-1 投与においても観察されなかった。

2) 中用量 ET-1 投与時の経時的変化

中用量 ET-1 (10^{-11} mole) の投与により、低用量投与時よりもさらに強い動静脈の収縮が引き起こされるのが観察された(図2)。また、経時的に収縮と弛緩を反復する血管攣縮の所見も認められた(図2)。一部の動静脈には分節状収縮所見も認められた(図3)。

3) 高用量 ET-1 投与時の経時的変化

高用量 ET-1 (10^{-10} mole) の投与では、全例で1分以内に網膜動静脈は完全に閉塞し血流は途絶した(図4)。一方、対照実験として行った ET-1 を含まない眼内灌流液のみ $50 \mu\text{l}$ の傍眼後部硝子体内への注入では、網膜動脈および静脈のどちらにおいても、血管径の変化は認められなかった ($n=6$)。

4) ET-1 投与による網膜血管収縮反応の用量-反応曲線

眼底写真上で、投与前と各用量の ET-1 投与後の乳頭縁網膜上の動脈血管径を測定し、その収縮率を算出した。血管収縮はいずれの用量でも30分以内に最大となっていたので、この最大収縮時の収縮率により用量-反応曲線を得た(図5)。なお、図5の横軸は投与した ET-1 の $-\log M$ を示したが、ET-1 の投与は累積的に行ったため、実際の濃度はそれより少し高い可能性がある。

2. 実験2の結果

1) ET-1 (10^{-10} mole) の投与後、静脈で 28 ± 11 分(平均値 $\pm$ 標準偏差)、動脈で 54 ± 1 分で血流の再開が認められた ($n=8$)。しかし、一旦、血流が回復し始めても血管は収縮と弛緩を繰り返す血管攣縮、分節状収縮の所見を示した。なお、投与後4時間の観察では網膜出血、網膜浮腫の所見は認められなかった。

2) 10^{-10} mole の ET-1 投与時、眼底カメラにより血

流の途絶が観察された直後に蛍光眼底撮影を行い、全例 ($n=8$) において網膜動静脈の完全閉塞が確認された(図6)。

IV 考 按

本実験において、家兎後部硝子体内に ET-1 を投与したところ、強力な網膜血管収縮作用が観察されたが、これまでに報告された ET-1 の網膜血管に対する作用と比較すると以下ようになる。Nyborg ら¹⁶⁾は摘出したウシ網膜動脈を用いて ET-1 の用量-反応曲線を求めている。それによると 10^{-12} M から収縮反応が認められ、 10^{-7} M で最大収縮となり、 ED_{50} はおよそ 2×10^{-10} M であった。最大収縮率は89%であり、低濃度 ($10^{-13} \sim 10^{-10}$ M) の ET-1 投与で、血管拡張は認められず、網膜循環では内皮依存性弛緩因子 (EDRF)¹⁹⁾ の放出はないと結論している。MacCumber ら¹⁵⁾は、 $10 \mu\text{g}$ の ET-1 および ET-3 をウサギ硝子体内に投与し、血管収縮が30秒以内に起こり、5分で最大収縮に達し、少なくとも数時間、収縮が持続したと報告しているが、完全閉塞が起きたかどうかについては言及していない。また、坂上ら¹⁷⁾は、ウサギ前部硝子体内に ET-1 を投与し、用量-反応曲線を求め、経時的観察も行っているが、高用量 (10^{-9} mole) 投与後にも完全閉塞の所見は得られなかったと報告している。今回の我々の実験において、ET-1 の注入は後部硝子体内に行った。そして、 10^{-10} mole の ET-1 の投与により網膜血管が完全閉塞する所見が得られた。坂上らの報告と我々の実験結果との相違は、ET-1 投与部位の相違(すなわち前部硝子体内と後部硝子体内)により生じたと思われる。

今回の我々の実験では、ET-1 投与により網膜血管は用量依存的に 3×10^{-12} mole から収縮を開始し、 10^{-10} mole では、網膜血管の血流が完全に途絶する所見を呈した。また、低用量 ET-1 投与時に血管拡張の所見は認められなかった。美馬ら²⁰⁾は、イヌおよびネコ脳底動脈における反応を検索し、髄腔内、すなわち血管外膜側から投与したときのみ血管収縮が認められ、血管内への投与では無反応か、逆にイヌでは一過性の血管拡張が観察されたと報告している。同様に、低濃度 ET-1 の静脈内投与時に他の血管においても一過性の拡張反応が起こることが報告されているが、これは ET-1 投与により、血管内皮細胞から EDRF が放出されたために起こるとされている¹⁹⁾。今回の実験では、低用量 ET-1 投与時にも血管拡張反応は認められなかった。これは血管内腔へ投与するのではなく、後部硝子

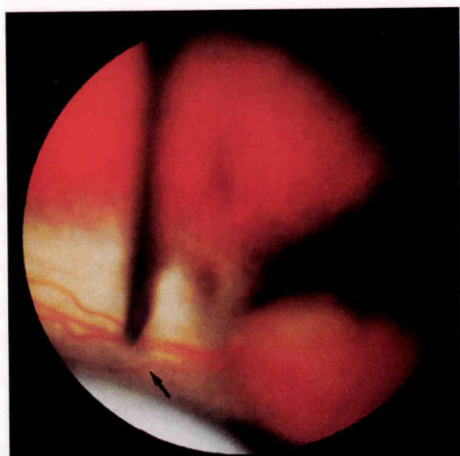
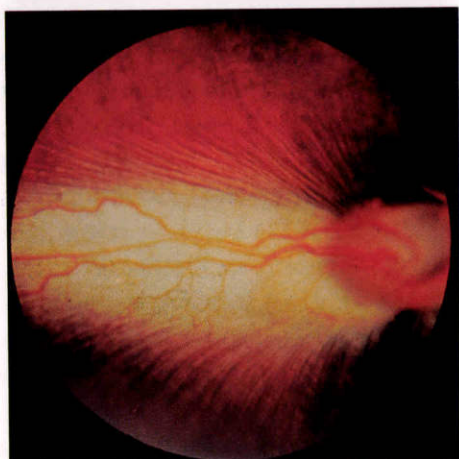


図1 後部硝子体内への endothelin-1 投与時の針先の位置を示す眼底写真。

眼底カメラで針先が乳頭の直上にあることを確認して ET-1 を後部硝子体内に注入している (矢印は針先を示す)。



A



B



C



D

図2 後部硝子体内への中用量 endothelin-1 (10^{-11} mole) 投与前後の眼底写真。
血管は収縮を回復する血管攣縮の所見を呈した。

A: ET-1 投与前の眼底写真, B: 収縮時の眼底写真, C: 収縮の程度がやや減少した時の眼底写真, D: 再び収縮した時の眼底写真。

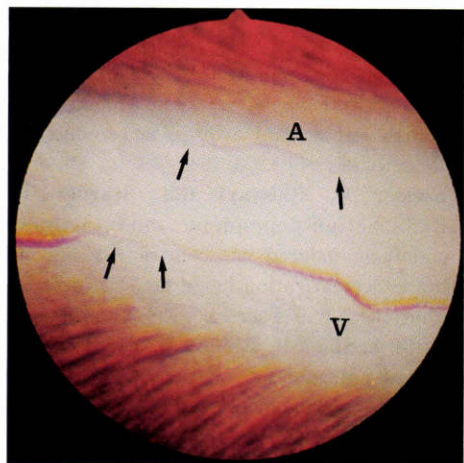


図 3 後部硝子体内への中用量 endothelin-1 (10^{-11} mole) 投与時、動静脈血管は分節状収縮を示した。A: 動脈, V: 静脈, 矢印は分節状に収縮しているところを示す。



図 4 後部硝子体内への高用量 endothelin-1 (10^{-10} mole) 投与時の眼底写真。網膜血管は ET-1 投与後 1 分以内に完全に閉塞し血流は途絶した。

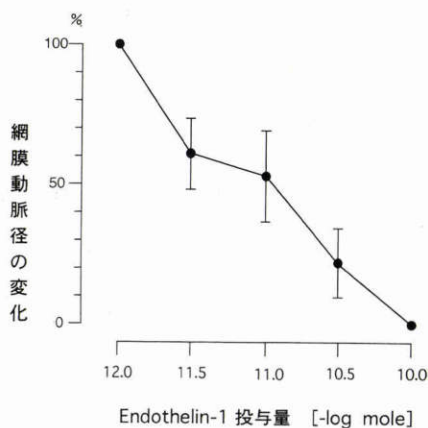


図 5 後部硝子体内への endothelin-1 投与による網膜動脈の収縮反応の用量-反応曲線。横軸は投与した ET-1 の用量 (mole) を表す。縦軸は投与前の血管径を 100% とした % 標示で表した血管径を示す。各点と各バーはそれぞれ 6 例の平均値と標準誤差を表す。

体内への投与であったために、ET-1 は血管外膜から直接血管平滑筋に到達し、内皮細胞よりも血管平滑筋に対する直接作用が優位に働き、血管収縮のみが観察された可能性が考えられる。

実験動物において、ET-1 は脳血管攣縮⁹⁾や高血圧¹¹⁾、冠血管攣縮¹²⁾に関与する可能性が報告されており、ET-1 による血管平滑筋の異常収縮に基づく血管

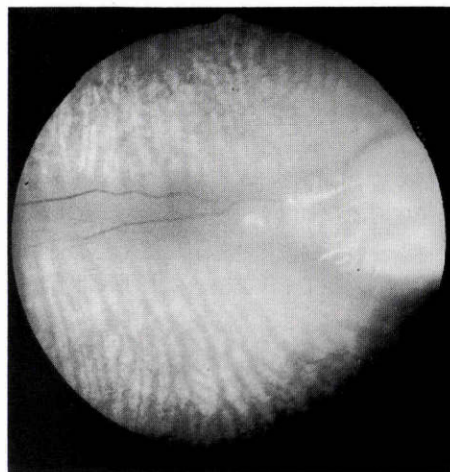


図 6 後部硝子体内への高用量 endothelin-1 (10^{-10} mole) 投与時の蛍光眼底写真。網膜動静脈が完全に閉塞している。

攣縮が脳血管や冠動脈において実際に発生することが示唆される。また、臨床的にもクモ膜下出血患者にて脳血管攣縮と脳脊髄液中の ET-1 濃度の上昇との関係が示唆され¹³⁾、急性心筋梗塞時にも血漿中の ET-1 濃度が上昇していると報告¹⁴⁾されていることなどから、やはり ET-1 は血管攣縮の原因として重要な役割を持つことが推察される。今回の実験でも ET-1 投与により網膜血管において経時的に収縮を反復する血管攣縮

の生じている所見が認められた。中用量投与時には高度の血管収縮を起こしている箇所と殆ど収縮を示さない箇所が同一の血管上で連続する、いわゆる分節状収縮の所見が動脈の両者において観察され、さらに、高用量投与時には網膜血管の血流が途絶する完全閉塞の所見も得られた。なお、ET-1投与後4時間の観察では網膜出血、網膜浮腫の所見は認められなかった。これは、動脈および静脈ともに同時に攣縮が起ることと血流の再開までに要した時間が静脈で 28 ± 11 分(平均値 $\pm$ 標準偏差)、動脈で 54 ± 1 分と比較的短時間であったためと考えられる。

網膜血管閉塞実験に関するこれまでの方法は血管外側から物理的作用により血管腔を閉塞せしめるもの²¹⁾が多く、これらは生体で発生する血管閉塞とは明らかに異なった病態であると考えられる。一戸²²⁾はフルオレセインナトリウムの静注とアルゴンレーザー光線の照射を併用し、血管内皮細胞に損傷を与え壁に血栓により血管閉塞を起こさせ、網膜および脈絡膜血管を閉塞させる方法を報告しているが、これも、レーザー照射による組織損傷が軽微ながら起こることは無視できない。桜庭²³⁾は、家兎網膜血管にトロンビンを滴下し、網膜血管内の血栓作成による火焰状出血を伴う網膜血管閉塞モデルを作成するのに成功している。今回我々は初めて、内因性の血管収縮物質であるET-1を後部硝子体内に投与することによって、血管攣縮作用による一過性の網膜血管の完全閉塞を起こすことに成功した。さらに、ET-1後部硝子体内注入により分節状の網膜血管収縮が起ることを初めて見出した。我々の作成したこのモデルは、血管攣縮によって引き起こされた一過性網膜血管閉塞モデルとして、眼内循環の調節機能の研究や、網膜血管攣縮に対する治療薬の効果の判定に有用であると考えられる。

本論文の要旨は第96回日本眼科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411—415, 1988.
- 2) Yanagisawa M, Masaki T: Molecular biology and biochemistry of endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 10: 374—378, 1989.
- 3) Asano T, Ikegaki I, Suzuki Y, Satoh S, Shibuya M: Endothelin and the production of cerebral vasospasm in dogs. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 1345—1351, 1989.
- 4) Hardebo JE, Kahstrom J, Owman C, Salford LG: Endothelin is a potent constrictor of human intracranial arteries and veins. *Blood Vessels* 26: 249—253, 1989.
- 5) Kauser K, Rubanyi GM, Harder DR: Endothelium-dependent modulation of endothelin-induced vasoconstriction and membrane depolarization in cat cerebral arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 93—97, 1989.
- 6) Saito A, Shiba R, Kimura S, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T: Vasoconstrictor response of large cerebral arteries of cats to endothelin, an endothelium-derived vasoactive peptide. *Eur J Pharmacol* 162: 353—358, 1989.
- 7) Vila JM, De Aguilera EM, Martinez MC, Rodriguez MD, Irurzun A, Lluch S: Endothelin action on goat cerebral arteries. *J Pharm Pharmacol* 42: 370—372, 1990.
- 8) Clozel M, Fishli W, Guilly C: Specific binding of endothelin on human vascular smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 83: 1758—1761, 1989.
- 9) Davenport AP, Nunez DJ, Hall JA, Kaumann AJ, Brown MU: Autoradiographical localization of binding sites for porcine [¹²⁵I] endothelin-1 in humans, pigs and rats: Functional relevance in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 13: S166—S170, 1989.
- 10) Hirata Y, Fukuda Y, Yoshimi H, Emori T, Shichiri M, Marumo F: Specific receptor for endothelin in cultured rat cardiocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 1438—1444, 1989.
- 11) Tomobe Y, Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Masaki T, Goto K: Mechanisms of altered sensitivity to endothelin-1 between aortic smooth muscles of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 555—561, 1991.
- 12) Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Yamaoki K, Nagai R, Takaku F, et al: The possible role of endothelin-1 in the pathogenesis of coronary vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol* 13: S132—S142, 1989.
- 13) Kraus GE, Bucholz RD, Yoon KW, Knuepfer MM, Smith KR: Cerebrospinal fluid endothelin-1 and endothelin-3 levels in normal and neurosurgical patients: A clinical study and literature review. *Surg Neurol* 35: 20—29, 1991.

- 14) **Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, Sugishita Y, Suzuki N, Fujino M, et al:** Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* II: 53—54, 1989.
 - 15) **MacCumber MW, Jampel HD, Snyder SH:** Ocular effect of the endothelins. *Arch Ophthalmol* 109: 705—709, 1991.
 - 16) **Nyborg NC, Prieto D, Benedito S, Nielsen PJ:** Endothelin-1-induced contraction of bovine retinal small arteries is reversible and abolished by nitrendipine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 27—31, 1991.
 - 17) **坂上 欧, 桐生純一, 竹内 篤, 山本文昭, 本田孔士:** エンドセリンの網膜血管に対する作用. *日眼会誌* 96: 469—472, 1992.
 - 18) **難波克彦:** 眼底写真による網膜血管径の計測 (第1法. 万能投影器による方法). *日眼会誌* 75: 1118—1126, 1971.
 - 19) **Masaki T, Yanagisawa M, Goto K, Kimura S:** Role of endothelin in mechanisms of local blood pressure control. *J Hypertens* 8: S107—S112, 1990.
 - 20) **Mima T, Yanagisawa M, Shigeno T, Saito A, Goto K, Takakura K, et al:** Endothelin acts in feline and canine cerebral arteries from the adventitial side. *Stroke* 20: 1553—1556, 1989.
 - 21) **Becker B, Post LT:** Retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol* 34: 677—686, 1951.
 - 22) **一戸 敏, 三上 規, 松橋英昭, 吉本弘志:** 網膜血管閉塞症の新しいモデル (蛍光光化学血栓を利用した網膜血管閉塞法について). *日眼会誌* 91: 670—682, 1987.
 - 23) **桜庭知己:** 経外膜的トロンビン投与による実験的網膜血管閉塞. *日眼会誌* 93: 978—985, 1989.
-