

Title	Nonendothelial Source of Nitric Oxide in Arterioles But Not in Venule : Alternative Source Revealed In Vivo by Diaminofluorescein Microfluorography.
Sub Title	細動脈における非血管内皮由来の一酸化窒素分画と細静脈における内皮由来の分画の重要性について：一酸化窒素感受性蛍光色素を用いた生体内顕微鏡の適応により解明された微小循環床における一酸化窒素の多様な産生源
Author	柏木, 哲
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.21-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0021

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Nonendothelial Source of Nitric Oxide in Arterioles But Not in Venule : Alternative Source Revealed In Vivo by Diaminofluorescein Microfluorography.

(細動脈における非血管内皮由来の一酸化窒素分画と細静脈における内皮由来の分画の重要性について：一酸化窒素感受性蛍光色素を用いた生体内顕微鏡の適応により解明された微小循環床における一酸化窒素の多様な産生源)

柏 木 哲

内容の要旨

一酸化窒素 (NO) は血管の弛緩作用を始め多くの生理作用が報告されている。NOは二原子分子のラジカルであり、その低分子量と高い反応性からその局在など生理学上必須の情報を得ることがきわめて困難である。Diaminofluorescein (DAF-2) は、NOと特異的に反応するNO感受性蛍光プローブである。本研究では、主にNOによる微小循環分子統御機構の解析を目的に、DAF-2を腸間膜微小循環に適用し、臓器組織レベルでのNOの産生や局在をバイオイメージング法により検討した。

DAF-2をラット腸間膜にローディング、微小血管床の蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡にて撮像し、コンピュータ支援下に蛍光強度を半定量的にデジタル解析した。同時に腸間膜におけるNO合成酵素 (NOS) のアイソザイムの局在を、それぞれに対するモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学及びフローサイトメトリにて検討した。

その結果、(1) 腸間膜微小循環を構成する細胞群のうち、細動脈・細静脈内皮および肥満細胞にて強い蛍光上昇がみられた。(2) NOSの非選択的な阻害薬投与では細静脈側での蛍光が有意に減少したのに対し、neural NOS (nNOS) 選択的阻害薬投与では細動脈側で有意に蛍光が減少した。細静脈での蛍光は白血球の膠着現象と逆相関を示した。(3) 免疫組織化学では、細動脈側では血管周囲の神経終末および肥満細胞に豊富にnNOSの存在が認められたのに対し、endothelial NOS (eNOS) は認められなかった。細静脈側ではeNOSのみが血管内皮に認められた。(4) フローサイトメトリ法にて肥満細胞に豊富なnNOSが証明された。

以上より、細動脈では支配神経中のnNOS及び間質の肥満細胞が収縮性を調節する因子としてのNOを供給し、細静脈では内皮に存在するeNOSが白血病や血小板膠着抑制因子としてのNOを供給していると考えられた。また、いずれの系においても、過剰量のNOS阻害剤の投与によっても蛍光の上昇は完全に抑制されなかったことから、非酵素的に産生されるNOの存在も示唆された。脳の微小循環のNOSアイソザイムの分布も免疫組織化学により検討されたが、ほぼ類似した結果であったことから、これらの結果は全身の他の臓器組織に普遍的に適用できるものと考えられた。

細動脈・細静脈が異なるNOによる循環制御機構を持ち、これがアイソザイムの発現と産生局在の差によって達成されているという事実は、NOが内皮より産生され血管を弛緩させるという一義的な既成概念に大きな修正を加えた。また、NOの酵素非依存性分画の存在はその局在を半定量的に解析できなければ知りえない事実であり、これは現在本研究で確立された手法を用いる以外に達成され得ない。以上、本研究は今後の本手法の適用の拡大によりNOの生物学の展開に大きく貢献できるものと考えられた。

論文審査の要旨

一酸化窒素 (NO) は血管内皮由来弛緩因子と同定されたガス状媒質であるが、フリーラジカルであり、生化学的なアプローチは技術的に非常に困難である。このため、とりわけ微小循環床でのNOによる微小循環分子統御機構には不明な点が多い。本研究では、主にNO感受性蛍光プローブであるdiaminofluorescein (DAF-2) を用いNOのバイオイメージング法をin vivoにて確立し、NOの分布・産生の局在を検討した。その結果、細動脈では主に周囲の神経由来のnNOS (neuronal nitric oxide synthase)、細静脈では血管内皮由来のeNOS (endothelial NOS) をNOの主要な供給源としていることを明らかにした。これは、内皮由来のNOが循環系を統御するという一義的既成概念とは異なり、実際は微小循環床を構成する脈管がNOSアイソザイムの発現と局在を制御することでその生理的に固有な機能を実現していることが示唆された。また、NO分布の半定量的解析から、以前からその存在が推測されてきた酵素非依存性の分画の存在も強く示唆された。

審査ではまず、肥満細胞が多量のnNOSを保持することの意義につき質問がなされた。これに対し、文献を引用しconstitutiveなNO産生により自らの脱顆粒を制御していること、周囲のリンパ管のpermeabilityの制御をしている可能性が高い旨回答された。これに対し、肥満細胞欠如ラットを用いた実験をデザインすることで本方法により肥満細胞の生理的役割の解析が可能な旨助言がなされた。次に、本研究で免疫組織化学において使用されたホモロジーの高い3つのNOSアイソザイムに対する特異的なモノクローナル抗体での染色の特異性について質問がなされた。使用経験の大きい市販抗体であることや、フローサイトメトリなどの方法を併用することで結果につきさらに検証を加えている旨の回答がなされた。また、detergent使用によって染色結果が影響を受ける可能性について指摘がなされ、使用・不使用の比較において差が見られなかった旨回答があった。次に、本研究において、径の異なる細動脈で得られた結論は定性的なものであり、モデルとした腸間膜の細動脈系を径や生理機能に基づき分類し、各々の特有の機能と関連付けて検討すべきではないかとの指摘がなされた。これに対し、免疫組織化学の結果が定性的であり、定量的な分類と対応させることは試みたが技術的に不可能であった旨回答がなされた。また、動脈硬化などの病態において本研究での結論はどのように関与しているかとの質問がなされ、各種病態モデル動物に本法を適用した検討が必要な旨回答があった。

以上により本研究には、今後なお検討すべき課題が残るものの、細動脈・細静脈がそれぞれ異なるNOによる循環制御機構を持つという事実を明らかにし、これまで信じられてきた一義的な既成概念に大きな修正を加えた研究として、微小循環学の分野において価値のある論文であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
解剖学 相磯 貞和 内科学 池田 康夫
産婦人科学 野澤 志朗
学力確認担当者：
審査委員長：相磯 貞和

試問日：平成16年2月13日