

氏 名（本籍）	お 小 川 ひろ 浩 まさ 正
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 8 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 26 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	低 酸 素 換 気 応 答 に お け る 神 經 伝 達 物 質 に 関 す る 研 究： 延 髓 孤 束 核 に お け る NO の 役 割

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 白 土 邦 男	教 授 佐 々 木 英 忠
	教 授 糸 山 泰 人	

# 論文内容要旨

## 研究目的

低酸素換気応答は、低酸素に対し、呼吸を増加させ、組織が低酸素となるのを防ぐ防御反応と考えられている。しかし、このメカニズムは、まだ明らかではない。低酸素の情報は、末梢化学受容体より、延髄背側部孤束核に送られる。孤束核において末梢化学受容体の活動に伴ってグルタミン酸の放出が起こり、低酸素時の換気が調節されていることを明らかにしてきた。ここでは、孤束核が末梢化学受容体からの情報にどのように介在しているかを明らかにする目的で、孤束核に存在する一酸化窒素 (NO) に着目し、この NO の低酸素換気応答に対する役割を検討した。

## 研究方法

実験はすべて無麻酔無拘束のラット (200~250mg) について行われた。あらかじめ、マイクロインジェクション、マイクロダイアリスのために、麻酔下で、ガイドカニューレを延髄孤束核尾側部に脳定位装置を用いて挿入した。3~4日の回復時期をおいた後、そのガイドカニューレを通して、マイクロインジェクションニードル、マイクロダイアリスプローベを孤束核尾側部に挿入して、実験を開始した。はじめに NO ドナー sodium nitroprusside (SNP)、NO 合成阻害剤 N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) を孤束核内にマイクロインジェクションし、低酸素換気反応に及ぼす影響を、プレチスモグラフィ法を用いて調べた。次に、NO と低酸素に関与するグルタミン酸との関係を検討するため、マイクロダイアリスプローベを通して L-NMMA を孤束核に灌流し、L-NMMA 存在下での低酸素時孤束核のグルタミン酸濃度の変化を調べた。続いて、低酸素時に NO が産生されているかについて、マイクロダイアリス法を用い、NO 産生の間接的指標として同部位でのシトルリン濃度の変動を検討した。また、NO 生成が、グルタミン酸受容体に影響されるかについて、シトルリンに対するグルタミン酸 NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 の効果を検討した。更に、グルタミン酸受容体刺激により、呼吸増加に関与する NO が産生されるかについて、外因性グルタミン酸の孤束核内マイクロインジェクションによる換気増加反応に対する L-NMMA の影響を調べた。

## 研究結果および結論

SNP は孤束核において室内気また低酸素時での換気を共に増加させた。L-NMMA は、低酸素時の換気のみを減弱させた。この L-NMMA の減弱効果は、L-arginine により抑制された。低酸素時孤束核で、末梢化学受容体の活動に反応して、グルタミン酸が増加することは知られている。

今回も、低酸素時グルタミン酸は増加した。このグルタミン酸の増加は、換気同様、L-NMMAによって減弱した。このL-NMMAの効果も、L-arginineにより抑制された。これらより、低酸素時、孤束核でNOが産生され、このNOが、グルタミン酸のリリースを促進し、低酸素時換気を増強させていることが示唆された。孤束核でのシトルリンは、低酸素時増加していた。これは、確かに、低酸素時NOが生成されていることを示している。一方、この低酸素時のシトルリンの増加は、MK-801により抑制され、低酸素時のNO産生は、グルタミン酸 NMDA 受容体の刺激が必要であることが推察された。さらに、L-NMMAは、外因性グルタミン酸投与による換気増加を抑制した。これは、確かにグルタミン酸受容体刺激により、NOが産生され、換気増加を促進させていることを示すものである。

以上の結果を総合すると、低酸素時、末梢の化学受容体の活性化により、孤束核でグルタミン酸がリリースされ、それがNMDA受容体を刺激することにより、NOが産生、そして、そのNOがさらにグルタミン酸のリリースを促進させることにより、低酸素時の換気増加を促進させていることが考えられた。これは、低酸素換気応答において、孤束核にNOによるグルタミン酸リリースのポジティブフィードバックメカニズムの存在を示唆するものである。

### 研究の意義、独創的な点

今回の研究は、これまで明らかではなかった低酸素換気応答における中枢、ここでは延髄孤束核であるが、の役割を神経伝達レベルで解析したことに意義がある。加えて、NO、グルタミン酸という中枢において共に重要な働きを担う神経伝達物質の相互作用が、自律神経調節に重要な役割を持つ孤束核においてもみられることを示したことは、重要な知見である。しかも、その相互作用が、NOが逆行性伝達物質として働く、グルタミン酸リリースのポジティブフィードバック作用であるということは、これまでin vitroの研究で推測されていたにすぎないNOによる逆行性伝達システムが実際生理的条件下で機能していることをはじめてin vivoで証明したという点で大きな意義がある。

## 審査結果の要旨

低酸素時、換気を増加する反応は、生体の重要な防御機構の一つである。この低酸素換気応答の程度には個人差があり、低酸素換気応答の低い喘息症例に喘息死が多いという報告もあり、低酸素換気応答のメカニズムを解明することは、大きな意味をもつ。しかし、これまでこの神経伝達レベルでの解析はほとんどなされていない。申請者らは、ラットを用い、低酸素を感知する末梢化学受容体の刺激により、その投射部位である延髄背側部孤束核尾部でグルタミン酸が遊離され、それにより換気が増加することを初めて示した。低酸素を感知する化学受容体は末梢にしか存在せず、低酸素時の換気の安定のために中枢でその情報を修飾していることが推測されていたが、これまでその機構は不明であった。今回申請者は、中枢でのグルタミン酸と一酸化窒素(NO)の密接な関係に注目し、延髄孤束核でのNOの役割を検討している。研究は、大きく二つに分けられる。第一に、孤束核のNOが低酸素換気応答に関してグルタミン酸の遊離を調節しているかどうかについて検討しており、第二にNOが生成されるための神経伝達の機構について検討している。

方法論上で特筆すべき事は、無麻酔無拘束下でマイクロダイアリス法を用い、生理学的条件下で実際に働く神経伝達物質を直接測定していることである。しかも、マイクロインジェクション法とレトロダイアリス法を組み合わせることにより、脳内神経伝達物質の動態と生理学的反応を結びつけ、神経伝達物質の生理学的役割が明らかにできる構成となっている。また、シトルリン産生が脳内ではNO合成酵素のみによって行われる事に着目して、直接測定が困難なNOの動態の指標としてシトルリンをマイクロダイアリス法を用いて測定している。この方法は、アイソトープを用いることなく行うことができ、今後のNOの研究に極めて有用な方法といえる。

申請者は、この研究の結論として、NOが逆行性伝達物質として働くグルタミン酸のポジティブフィードバックメカニズムの存在を導き出している。この研究は、低酸素換気応答における中枢調節機構の存在を初めて明らかにしたものである。また、NO、アラキドン酸などによる逆行性伝達システムの存在はインビトロの研究でのみ推察されていたにすぎず、実際にインビボで存在し、しかもその生理学的役割を証明したものはこれまでなく、神経科学研究上においても極めて重要な知見である。従って、今回の研究は、呼吸生理学研究上においても、また神経科学研究上においても重要な意味をもち、学位に値するものであると考える。