

氏 名 (本籍)	金 野 敏 <sup>さとし</sup>
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1950 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 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) 医科学専攻
学位論文題目	微弱超音波照射による血管内皮細胞における NO 産生に関する研究

(主 査)

論文審査委員	教授 仁 田 新 一	教授 白 土 邦 男
	教授 伊 藤 貞 嘉	

## 論文内容要旨

近年最も注目を集めている生理活性物質のひとつである一酸化窒素 (NO) は、生体内で血管拡張作用以外にも炎症反応や動脈硬化などとの関連において、多用な役割を果たしていることが明らかになっている。また、これまでの研究により血管内皮細胞では化学的刺激や物理的刺激 (メカニカルストレス) によって細胞内カルシウム濃度の上昇を介した NO 産生が促進されることが知られている。

一方で、超音波の照射が血管内皮細胞に与える影響については過去に数例の報告があるのみで詳細は明らかになっていないが、生体内を粗密波として伝搬する際に細胞に対してメカニカルストレスとして作用する可能性が考えられる。生体組織に障害を与えないような微弱な超音波を照射することで血管内皮細胞における局所的な NO 産生をコントロールすることが可能になれば、特に循環器領域において新たな治療法の開発につながることを期待される。このような背景から、微弱超音波の照射が血管内皮細胞の細胞内カルシウム濃度と NO 産生量に与える影響を、培養ウシ血管内皮細胞を用いて検討した。

はじめに、細胞内カルシウム濃度の変化を測定するため、カルシウムイオンに反応する蛍光色素である Calcium green-1 AM を培養ウシ血管内皮細胞 6 例に 30 分間負荷して観察をおこなった。この細胞に微弱超音波を 1 分間照射して共焦点レーザー顕微鏡で蛍光強度の変化を測定したところ、超音波の照射に一致して一過性の細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。

次に、血管内皮細胞における NO 産生量の変化を測定するため、同様の手順で NO に反応する蛍光色素である DAF-2DA を内皮細胞に 30 分間負荷した。試料を無作為に対照群、超音波照射群 (1 分)、超音波照射群 (30 分)、超音波照射群 (120 分) に割り付け、超音波照射群 (1 分) 5 例、超音波照射群 (30 分) 6 例および超音波照射群 (120 分) 6 例にそれぞれ 1 分間、30 分間、120 分間の微弱超音波の照射をおこなった。共焦点レーザー顕微鏡で蛍光強度を測定し、対照群 9 例と各超音波照射群における平均蛍光強度の比較をおこなったところ、超音波照射群 (30 分) および超音波照射群 (120 分) で蛍光強度の上昇が認められた。

以上の結果は、従来研究されてきたシェアストレスや伸展刺激などのメカニカルストレスによる NO 産生と共通する点が多く、生体組織に障害を与えないような微弱なレベルの超音波を血管内皮細胞に照射することで、細胞内カルシウム濃度の上昇および NO の産生が促進される可能性が示唆された。

今後、研究をすすめることで閉塞性動脈硬化症や膠原病などによる末梢循環障害、あるいは動脈硬化性疾患における内皮機能の改善、さらには虚血性心疾患や原発性肺高血圧症の治療など、局所的な NO 産生のコントロールを利用した全く新しい治療法の開発につながることを期待される。

## 審査結果の要旨

近年最も注目を集めている生理活性物質のひとつである一酸化窒素（NO）は、生体内で血管拡張作用以外にも炎症反応や動脈硬化などとの関連において、多様な役割を果たしていることが明らかになっている。また、これまでの研究により血管内皮細胞では化学的刺激や物理的刺激（メカニカルストレス）によって細胞内カルシウム濃度の上昇を介した NO 産生が促進されることが知られている。

一方で、超音波の照射が血管内皮細胞に与える影響については過去に数例の報告があるのみで詳細は明らかになっていないが、生体内を粗密波として伝搬する際に細胞に対してメカニカルストレスとして作用する可能性が考えられる。生体組織に障害を与えないような微弱な超音波を照射することで血管内皮細胞における局所的な NO 産生をコントロールすることが可能になれば、特に循環器領域において新たな治療法の開発につながることを期待される。このような背景から、培養ウシ血管内皮細胞を用いて微弱超音波の照射が血管内皮細胞の細胞内カルシウム濃度と NO 産生量に与える影響を検討した。

はじめに、細胞内カルシウム濃度の変化を測定するため、カルシウムイオンに反応する蛍光色素である Calcium green-1 AM を培養ウシ血管内皮細胞 6 例に 30 分間負荷して観察をおこなった。この細胞に微弱超音波を 1 分間照射して共焦点レーザー顕微鏡で蛍光強度の変化を測定したところ、超音波の照射に一致して一過性の細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。次に、血管内皮細胞における NO 産生量の変化を測定するため、同様の手順で NO に反応する蛍光色素である DAF-2DA を内皮細胞に 30 分間負荷した。試料を無作為に対照群、超音波照射群（1 分、30 分、120 分）に割り付け、超音波照射群（1 分）5 例、超音波照射群（30 分）6 例および超音波照射群（120 分）6 例にそれぞれ 1 分間、30 分間、120 分間の微弱超音波の照射をおこなった。照射後に共焦点レーザー顕微鏡で蛍光強度を測定し、対照群 9 例と各超音波照射群における平均蛍光強度の比較をおこなったところ、超音波照射群（30 分）および超音波照射群（120 分）で蛍光強度の上昇が認められた。

また、120 分間の微弱超音波の照射後に培養液中の LDH 値を測定したところ LDH 値は対照群と差がなく、微弱超音波の照射が細胞に致命的な影響を与えないことが確認された。

以上の結果は、従来研究されてきたメカニカルストレスによる NO 産生と共通する点が多く、生体組織に障害を与えないような微弱なレベルの超音波を血管内皮細胞に照射することで、細胞内カルシウム濃度の上昇および NO の産生が促進される可能性が示唆された。