

| | |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 南 喜 幸 (滋賀県) |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 医博第69号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成2年3月24日 |
| 学位論文題目 | Possible Involvement of 5-Lipoxygenase Products in the Generation of Endothelium-Derived Relaxing Factor (内皮由来血管拡張因子の合成における5-lipoxygenase系の関与) |

| | | |
|---------|-------|---------|
| 審 査 委 員 | 主査 教授 | 野 崎 光 洋 |
| | 副査 教授 | 戸 田 昇 |
| | 副査 教授 | 木之下 正彦 |

論 文 内 容 要 旨

〔目 的〕

Furchgott たちにより報告された内皮由来血管拡張因子 (EDRF) の本体およびその前駆体に関する研究は、現在まで多くの研究者によってすすめられてきた。Furchgott たちは当初 lipoxygenase 阻害薬が EDRF を介する反応を抑制することから、EDRF は arachidonic acid より lipoxygenase を介して産生される物質であろうと推測した。しかし、当初使用された lipoxygenase 阻害薬には antioxidant としての作用が有り、また antioxidant は superoxide anion の産生を介して EDRF の効果を消失させることが明らかとなった。他方、最近 EDRF 合成に cytochrome P450 や phospholipase A₂ の関与を示唆する報告も見られる。従って EDRF 合成における lipoxygenase 系の関与は結論を見ていない。最近、5-lipoxygenase を低濃度で選択的に阻害する薬物 AA861 と TMK777 が開発されたので、我々はこれらの薬物を用いて EDRF の合成、遊離に lipoxygenase 系が関与するか否かを検討した。

〔方 法〕

麻酔イヌより摘出した内皮が正常の大腿動脈 segment を donor tissue として装置の上流に配し、内皮を剥離した冠動脈ラセン状条片を bioassay tissue として下流に配した灌流装置を作成した。これにより、acetylcholine と substance P によって donor tissue から遊離される EDRF の量を測定した。標本は 37℃ 酸素飽和 Ringer-Locke 液を 5 ml/min の速度で灌流し、種々の薬物は途中の側管より注入した。bioassay tissue は予め prostaglandin F_{2α} で収縮させ EDRF、

nitroglycerinなどの弛緩作用を等尺性トランスデューサーを介して記録した。灌流液中には indomethacin を加え、prostaglandin の遊離を除外した。

〔結果〕

bioassay tissue は、donor tissue の下流より適用した acetylcholine および substance P により弛緩しなかったが、上流より適用すると用量に応じて弛緩した。これらの弛緩反応は donor tissue の下流より前処置した oxyhemoglobin、methylene blue および hydroquinone により著明に抑制された。AA861 10^5 M で bioassay tissue を前処置しても、acetylcholine の donor tissue への適用による弛緩反応は影響を受けなかった。しかし、donor tissue を同用量の AA861 で処置すると、acetylcholine による弛緩反応は約 50% に減弱した。この時、substance P の反応も acetylcholine と同様に抑制されたが、nitroglycerin の弛緩作用は有意の影響を受けなかった。別の 5-lipoxygenase 阻害薬である TMK777 (10^5 M) で bioassay tissue を前処置しても substance P の donor tissue への適用による弛緩反応は抑制されなかったが、donor tissue を前処置しておくとも substance P の弛緩作用は約 30% 減弱した。

superoxide dismutase (SOD) 20U/ml の前処置は acetylcholine および substance P による弛緩反応を増強した。しかし、AA861 と TMK777 の acetylcholine と substance P による弛緩に対する抑制作用には全く影響しなかった。一方、antioxidant である pyrogallol 10^6 M は AA861 以上に acetylcholine の作用を強く抑制したが、SOD 処置下ではその抑制作用は完全に阻止された。

〔考察〕

acetylcholine と substance P の弛緩作用は oxyhemoglobin (EDRF の捕捉剤)、methylene blue (guanylate cyclase 阻害薬)、pyrogallol および hydroquinone (antioxidant) により抑制されたことより、EDRF を介する反応であると結論される。この様な条件下で、5-lipoxygenase 活性を 90% 以上抑制する濃度の AA861 と TMK777 を donor tissue に適用した時にのみ EDRF を介する反応が抑制されたことから、これらの薬物は donor tissue に作用して EDRF の合成ないしは遊離を阻害したと考えられる。

nordihydroguaiaretic acid、BW755C などの従来の lipoxygenase 阻害薬は antioxidant としての作用を有すること、antioxidant は superoxide anion を産生して EDRF を分解しその効果を消失させることが報告されている。このことは、antioxidant である pyrogallol が EDRF の作用を消失し、SOD 処置がこの抑制に拮抗した本実験のデータにより支持される。他方、AA861 と TMK777 による EDRF 作用の抑制は SOD の処置によって全く影響を受けなかった。このことは、AA861 と TMK777 による抑制には superoxide anion を介する antioxidant としての作用が関与しないことを示している。

〔結 論〕

以上の成績は、イヌ大腿動脈の内皮細胞における EDRF の合成または遊離の少なくとも一部に 5-lipoxygenase 系が関与する可能性を強く示唆する。

学位論文審査の結果の要旨

内皮由来血管拡張因子 (EDRF) の本体およびその前駆体は、多くの研究にも関わらず未だ結論を見ていない。当初示唆された lipoxygenase 系の EDRF 合成への関与は、当時使用された酵素阻害剤に抗酸化作用が発見されたこと、および抗酸化剤に EDRF 分解作用が見出されたために最近では否定的である。

今回の実験では、EDRF を遊離する血管とこれを定量する血管を分離した実験系を使用して、5-lipoxygenase 阻害薬である AA861 と TMK777 が EDRF の合成・遊離に作用するか、これら阻害薬に抗酸化作用がみられるか否かについて検討を試みた。

donor tissue である内皮が正常な大腿動脈 segment に acetylcholine と substance P を適用すると EDRF が遊離されるが、その量を内皮を剥離した冠動脈ラセン状条片 (bioassay tissue) の弛緩反応の程度で測定した。AA861 と TMK777 で bioassay tissue を前処置しても、donor tissue から遊離された EDRF による弛緩反応は影響をうけなかった。しかし、donor tissue をこれらの薬物で処置すると、EDRF による弛緩反応は有意に抑制された。superoxide dismutase (SOD) の前処置は EDRF による弛緩反応を増強したが、AA861 と TMK777 の EDRF 作用抑制効果には全く影響を及ぼさなかった。一方、抗酸化剤である pyrogallol は EDRF の作用を強く抑制したが、SOD 処置によってその抑制効果は完全に阻止された。

以上の成績から、AA861 と TMK777 は donor tissue に作用して EDRF の合成ないし遊離を阻害するが、その作用には superoxide anion を介する抗酸化剤としての作用が関与しないことが示唆される。したがって、内皮細胞における EDRF 合成の少なくとも一部に 5-lipoxygenase 系が関与するようである。

本実験は、抗酸化作用を示さない lipoxygenase 阻害薬を使って、初めて 5-lipoxygenase 系が EDRF の合成に深いかかわりを持つことを示した独創的な業績であり、今後 EDRF 合成とその調節系を解析するうえに重要な貢献を果たしたと評価される。