

機関番号： 24701  
 研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20791091  
 研究課題名 (和文) 妊娠高血圧時脳微小血管の血流調節機構の解明と麻酔薬作用に関する研究  
 研究課題名 (英文) The regulatory mechanism of cerebral microvessels and anesthetic effects on micro-circulation in pregnant hypertension.  
 研究代表者  
 堂城 真友子 (DOJO MAYUKO)  
 和歌山県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号： 90347576

研究成果の概要 (和文)： 妊娠を契機に発症する高血圧は、母体および胎児の周産期予後に重大な影響を及ぼすため、麻酔管理においても懸念すべき合併症である。妊娠高血圧症では、一酸化窒素およびカリウムチャンネルを介するアストロサイトとのカップリング機構に何らかの障害があり、その結果血圧の上昇に対する局所脳血流維持機構が正常に機能していない可能性が高い。本研究は、妊娠高血圧モデルラットを用い脳スライス標本を作製し、脳微小血管における血流維持機構を解明することを目的とする。

研究成果の概要 (英文)： Pregnancy-induced hypertension is a pivotal complication which is associated with an increased risk of maternal and fetal morbidity and mortality. We hypothesized that failure of the neurovascular coupling via astrocyte is a key mechanism in developing hypertension and cerebrovascular disorders during pregnancy. This study aimed to reveal the regulatory mechanism of cerebral microvessels and anesthetic effects on micro-circulation in pregnant hypertension.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード： 妊娠高血圧、脳血流、麻酔薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 妊娠を契機に発症する高血圧は、母体および胎児の周産期予後に重大な影響を及ぼすため、麻酔管理においても懸念すべき合併症である。とりわけ、高血圧が重症化した子癇前症 (Pre-eclampsia) および子癇 (Eclampsia) 症例で発症する脳出血は、母体死亡原因の30～40%にも及ぶため、妊娠

高血圧症における脳血管の病態生理の解明は、母子の周産期死亡率を改善させる上で極めて重要な課題である。

(2) 正常妊娠時には、増加する循環血液量および心拍出量を体血管の血管抵抗を低下させることで血圧の過度な上昇を抑制しているが、その代償機構の中心は血管にお

一酸化窒素 (NO: nitric oxide) 合成および内皮細胞依存性過分極因子 (EDHF: endothelium-derived hyperpolarizing factor) の増加である。子宮・胎盤動脈や後大脳動脈に対する研究から、子癇前症・子癇を含む妊娠高血圧症では一酸化窒素を介した血管拡張機構が障害されていることが示されており、妊娠時の高血圧発症機序を説明するものである。

(3) しかしながら、脳浮腫および脳出血の責任血管であると考えられる大脳皮質内に埋没する微小脳血管において、NOあるいはEDHFの血管拡張因子を介する血管拡張機構が妊娠高血圧症で障害されているか否かを直接示した研究はこれまで見当たらない。また、これら病態時における麻酔薬の影響についても、未だ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

妊娠後期のラットに一酸化窒素合成酵素阻害薬であるL-NAMEを与えると、母体の血圧上昇、子宮胎盤血流障害および胎児発育遅延など子癇前症に似た病態を作製することができ、妊娠高血圧モデルとして使用されている。本研究は、上記の妊娠高血圧ラットを用いて脳スライス標本作製し、脳微小血管における血流維持機構の病態生理を解明することを目的とした。

本研究では以下のような仮説を立て、これらを立証することを目的とした。

① 妊娠高血圧ラットでは一酸化窒素合成酵素およびカリウムチャンネルを介する血管拡張機構が障害されている。エンドセリン、トロンボキサンおよびアンギオテンシンIIなどの内因性血管収縮物質は、それ自体強力な血管収縮物質であるが、同時に血管内皮に対してはNOおよびEDHFを遊離させて血管収縮反応を修飾する機能を有するため、妊娠高血圧症ではこれら血管収縮物質の作用が過度に増強している。一方、エストロゲンは障害された血管拡張機能を改善する。但し、本研究で用いる妊娠高血圧ラットは、作製時すでに一酸化窒素合成酵素が阻害されているため、ニトロプルシドなど外因性一酸化窒

素を介する血管拡張反応を比較するに留める。

② 一酸化窒素合成酵素およびカリウムチャンネルを介する血管拡張は、アストロサイトからのカルシウムシグナル伝達を介しており、上記内因性血管収縮物質がこれらカルシウム伝達に影響する。これら血管反応性の正常妊娠との違いは、アストロサイトにおける細胞内カルシウム濃度上昇の程度の違いを反映している。

③ 各種麻酔薬は妊娠高血圧症における脳血流維持機構を修飾し、吸入麻酔薬は血管収縮反応を強く抑制することで脳血管の自動調節能を破綻させるが、静脈麻酔薬はこれに影響しない。各麻酔薬による血管反応性の正常妊娠との違いは、一酸化窒素合成およびカリウムチャンネル活性の程度あるいはアストロサイトからのカルシウム伝達の違いを反映しており、脳浮腫や脳出血を予防するという観点から最も有用な麻酔薬を特定することができる。

## 3. 研究の方法

申請者所属施設の実験動物に関する倫理委員会の承認を得て、妊娠後期ラットを実験に用いる。子癇前症モデルを作製するにあたっては、一酸化窒素合成酵素阻害薬であるnitro-L-arginine (L-NAME) 0.7 g/L/7daysを飲料水に混ぜて妊娠後期に飲ませ、妊娠20週以降に高血圧 (>140/90 mmHg) を確認することで子癇前症類似の病態を同定した。対照として同量のL-NAMEを飲ませた非妊娠ラットを用いる。

ハロタンで麻酔したラットを開胸し、冷却したクレブス液約50mlを100mmHgの圧をかけながら左心室より灌流し、血管内血液をすべて洗い流したあと脳を摘出する。次に、現有のビブラトームを用いて大脳新皮質を含むスライス標本(厚さ約125 μm)を作成する。この際、脳標本は酸素95% + 炭酸ガス5%で通気した4℃冷却クレブス液内を作成する。ついで、この脳スライス標本を酸素93% + 炭酸ガス7%(われわれのシステムではこの条件下でpH=7.4となる)で通気し、37℃に加温

したクレブス液で満たした観察用チャンバーに入れ、光学顕微鏡 (IX71-23DIC、オリンパス) を用いて大脳実質内動脈 (径5-10  $\mu\text{m}$ ) を観察する。顕微鏡に装着したビデオカメラで動脈の画像を撮影し、メディアコンバータを介してコンピュータに取り込んだ後、動脈径の変化をコンピュータ画面上で血管径測定用のソフトウェアを用いて解析する。

1) 妊娠高血圧ラットおよび対照妊娠ラットから作製した脳スライス標本において、プロスタグランدين $F_{2\alpha}$  (0.5  $\mu\text{M}$ ) で標本中の動脈を収縮させたのち、アセチルコリンによる血管拡張反応を観察する。一酸化窒素合成酵素阻害薬L-NAMEを前処置した場合に血管拡張反応の抑制効果が観察されることから、アセチルコリンによる血管拡張は一酸化窒素合成酵素を介したものであることを示す。さらに神経型一酸化窒素合成酵素特異的阻害薬SメチルLチオシトルリン (SMTC) を前処置した場合の血管拡張反応を観察し、脳微小血管近傍の神経細胞もしくはグリア細胞との連関についての知見を得る。また、外因性一酸化窒素に対する拡張反応をみるため、ニトロプルシドを用い血管拡張反応をそれぞれの実験ラットで観察する。

2) カリウムチャンネルを介する血管拡張反応を上記と同様に妊娠高血圧ラットおよび対照ラットで観察する。各種カリウムチャンネル拮抗薬 (イベリオトキシン [large-conductance カルシウム依存性; 0.1 $\mu\text{M}$ ]、カリブドトキシン [intermediate-conductance カルシウム依存性; 0.1 $\mu\text{M}$ ]、アパミン [small-conductance カルシウム依存性; 0.1 $\mu\text{M}$ ]、グリベングラミド [ATP感受性; 5 $\mu\text{M}$ ]、4-アミノピリディン [電位依存性; 1mM]、BaCl<sub>2</sub> [内向き整流性; 10 $\mu\text{M}$ ]) を用い、各種カリウムチャンネル作用薬による脳微小血管の拡張反応を観察する。

3) 以上の実験から子癇前症ラットと対照ラットにおける一酸化窒素合成酵素およびカリウムチャンネルを介する脳微小血管拡張の反応性の違いを明らかにした上で、内因性血管収縮物質であるエンドセリン、トロンボキサンおよびアンギオテンシン II を用い、こ

れらの血管収縮作用にも差があるかどうかを観察する。

4) 続いて脳微小血管近傍のアストロサイトと脳血管との関係について実験を行う。上記と同様に妊娠高血圧ラットおよび対照ラットから脳スライス標本を作製し、カルシウムイオン蛍光色素rhod-2 AM (2 mM) およびカルシウムキレート剤DMNP-EDTA AM (200  $\mu\text{M}$ ) を予めスライスに暴露しておく。レーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV300、オリンパス) の観察チャンバーにスライス標本を乗せ、335 nmのレーザー光によりDMNP-EDTA AMを分解、カルシウムを放出させる。rhod-2 AMを825 nmレーザーで励起させ細胞内カルシウム濃度の上昇を走査検出する。アストロサイトからのカルシウムシグナルが血管壁に到達し、血管の収縮拡張反応を観察できたら、これら血管反応性において妊娠高血圧と対照ラットで違いがあるか検討する。さらに、一酸化窒素合成酵素阻害薬および各種カリウムチャンネル拮抗薬を用い、アストロサイトからのカルシウムシグナル伝達がどのように変化するか観察する。

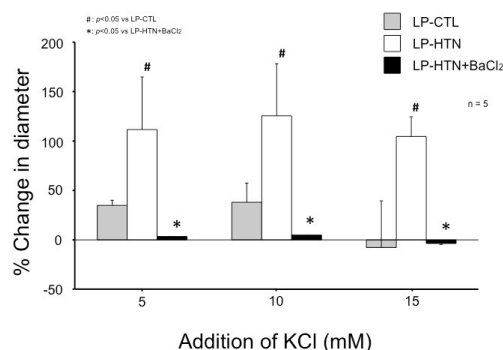
#### 4. 研究成果

1) マイクロベッセル観察システムを用いてラット大脳皮質内の微小血管を観察し、アセチルコリンによる血管弛緩反応のメカニズムを薬理的に検討した。

①ハロセン麻酔下にウイスターラットを開胸し、左心室から人工脳脊髄液を灌注させながら右心房を切開脱血し、迅速に脳組織を摘出した。4℃人工脳脊髄液中でビブラトームを用いて厚さ約125 $\mu\text{m}$ の脳スライス標本を作成した。この標本を酸素93%+炭酸ガス7%で通気した37℃人工脳脊髄液で満たした観察用チャンバーに入れ、倒立顕微鏡にて脳実質内の微小血管を観察した。血管平滑筋が壁在する内径3-10 $\mu\text{m}$ の微小血管を観察した。これらの血管はその径から毛細血管直前の抵抗血管であることが推測された。顕微鏡画像はビデオカメラで取り込み、デジタル変換した後コンピュータ画面上で解析ソフトを用いて血管径を計測した。

②酸素 9.3% + 炭酸ガス 7% ( $PCO_2 = 40 \text{ mmHg}$ ) にて 30 分間通気した脳スライス標本にプロスタグランジン  $F_{2\alpha}$  を加え、標本内動脈を収縮させた。その後、アセチルコリン ( $0.1\text{--}10\mu\text{M}$ ) を灌流液に追加した。アセチルコリンは濃度依存性に脳実質内微小血管を拡張させることが分かった。また、一酸化窒素合成阻害薬である L-NAME 処置下では、アセチルコリンによる血管拡張反応はみられなかった。以上の結果から、我々が以前報告した大脳実質内微小血管と同様、妊娠高血圧モデルラットでも一酸化窒素合成酵素を介する血管拡張反応が確認できた。現在、血管拡張反応結果の解析を続けている。

2) カリウムチャンネルを介する血管拡張反応を上記と同様に妊娠高血圧ラットおよび対照ラットで観察した。各種カリウムチャンネル拮抗薬 (イベリオトキシン [large-conductance カルシウム依存性;  $0.1\mu\text{M}$ ]、カリブドトキシン [intermediate-conductance カルシウム依存性;  $0.1\mu\text{M}$ ]、アパミン [small-conductance カルシウム依存性;  $0.1\mu\text{M}$ ]、グリベンクラミド [ATP 感受性;  $5\mu\text{M}$ ]、4-アミノピリジン [電位依存性;  $1\text{mM}$ ]、 $\text{BaCl}_2$  [内向き整流性;  $10\mu\text{M}$ ]) を用い、各種カリウムチャンネル作用薬による脳微小血管の拡張反応を観察した。現在得られた結果をもとに、解析を進めているところである。内向き整流性カリウムチャンネルを介する血管拡張反応の結果を一部以下の図に示す。妊娠高血圧モデルラットにおいては、カリウムイオンによる脳実質内細動脈の拡張反応を増強するという結果であった。この結果は、以前我々が行った自然発症型高血圧ラットで得られた結果と同様であり、今後この血管反応性の類似点からさらにそのメカニズムを詳細に検討する予定である。



3) 同様に妊娠高血圧ラットおよび対照ラットから脳スライス標本を作製し、カルシウムイオン蛍光色素 rhod-2 AM ( $2 \text{ mM}$ ) を予めスライスに暴露しておいた。レーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV300、オリンパス) の観察チャンバーにスライス標本を乗せ、rhod-2 AM を  $825 \text{ nm}$  レーザーで励起させ細胞内カルシウム濃度の上昇を走査検出した。現在、アストロサイトからのカルシウムシグナルが、血管の収縮拡張反応を惹起するか否か、またこれら血管反応性において妊娠高血圧と対照ラットで違いがあるか検討しているところである。また今後は、一酸化窒素合成酵素阻害薬および各種カリウムチャンネル拮抗薬を用い、アストロサイトからのカルシウムシグナル伝達がどのように変化するかについても観察する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂城 真友子

(DOJO MAYUKO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90347576