

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

脈管学 (1992.03) 32巻3号:227~232.

ラット摘出主肺動脈の低酸素に対する反応と内皮の役割について

小川裕二、森田一豊、原田貴之、平山智也、川辺淳一、飛  
世克之、小野寺壮吉

# ラット摘出主肺動脈の低酸素に対する反応と内皮の役割について

## Role of Endothelium on Responses to Hypoxia in Isolated Rat Pulmonary Arteries

小川 裕二\* 森田 一豊\* 原田 貴之\* 平山 智也\*  
川辺 淳一\* 飛世 克之\* 小野寺壮吉\*

キー・ワード: Hypoxic pulmonary vasoconstriction : HPV, Endothelium-derived relaxing factor, Anoxia, Isolated rat pulmonary artery

〔要旨〕 ラット摘出主肺動脈を用い、低酸素に対する反応とその反応における血管内皮の役割について検討した。その結果、摘出した肺動脈の太い部分でも、低酸素刺激に対し、血管収縮性物質を加えない状態では張力に変化はなかったが、血管収縮性物質でトーンを上げた状態では張力の増加とそれに続く張力低下が観察された。この低酸素による張力増加の発現には内皮の存在が必要であり、張力の低下は内皮と関連がなかった。また、低酸素性張力の増加は、あらかじめ NO 産生阻害剤である L-NMMA, guanylate cyclase inhibitor である methylene blue で前処置すると減弱したことより、この反応の発現機序のひとつとして、持続的に遊離している EDRF の産生が低酸素により抑制され、相対的に張力増加をもたらした可能性が示唆された。

### 序言

生体において肺血管は低酸素に対して収縮することが古くから知られているが<sup>1)</sup>、その収縮のメカニズムについてはいまだ不明な点が多く残されている。低酸素性肺血管収縮 (hypoxic pulmonary vasoconstriction : HPV) の起こる部位はおもに肺の細小動脈のレベルと考えられているが<sup>2)</sup>、近年、Rodman ら<sup>3)</sup>は、ラットの主肺動脈でも低酸素刺激に対し生体でみられる反応に類似の反応が観察され、摘出主肺動脈が *in vitro* での HPV のモデルになるかもしれないと報告している。一方、ここ数年の間に血管の内皮には多彩な機能があることが明らかにされ、HPV の発現あるいは HPV に伴う肺循環動態の調節にも内皮の機能が関与しているとする成績が相次いで報告された<sup>3-6)</sup>。しかしながら、これらの報告は内皮の役割についての意見が分かれており、統一した見解が得られていない。

そこで本実験では、ラットの摘出した主肺動脈を用い、低酸素刺激で *in vivo* と同様に収縮反応がみられるか否か、また、その反応が発現するうえで血管内皮がどのように関与しているかを検討した。

### 方法

8~12 週齢の Sprague-Dawley ラット (平均体重 331 g) を pentobarbital (40 mg/kg) にて腹腔内麻酔し、開胸後、心臓と肺を一塊として取り出した。ついで、左主肺動脈をすばやく摘出し、内皮温存と内腔にテフロン製のカニューレを挿入し、内皮を機械的に擦過した輪状標本を作製した (長さ 5 mm)。この標本を 37°C に維持した Krebs-Henseleit (NaCl, 118.1; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0; glucose, 11.0 mM) 液 30 ml で満たしたマグナス管にステンレス製 L 字型フックを用いて従来の報告<sup>7)</sup>を参考にして初期張力 1 g で懸垂した。標準ガスとして 15% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>+N<sub>2</sub> balance の混合ガスを用い、0% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>+N<sub>2</sub> balance の混合ガスにすばやく切り換えることで低酸素刺激とした。このときの等尺性張力の変化を force-displacement transducer (日本光電, TB 612 T) にて測定した。標本は約 2 時間の平衡の後、安定化してから、次に示す条件のもとで低酸素刺激に対する反応性を検討した。

① agonist を加えない状態と phenylephrine (Phe)  $2 \times 10^{-8}$  M, KCl 20 mM, 5-HT  $5 \times 10^{-6}$  M で軽度張力を増加させた状態をそれぞれ (a) 内皮擦過標本と (b) 温存標本にて検討した。

② NO 産生阻害薬: L-N<sup>o</sup>-monomethylarginine (L-

\* 旭川医科大学第一内科学教室  
1991年4月9日受付  
1991年10月5日受理

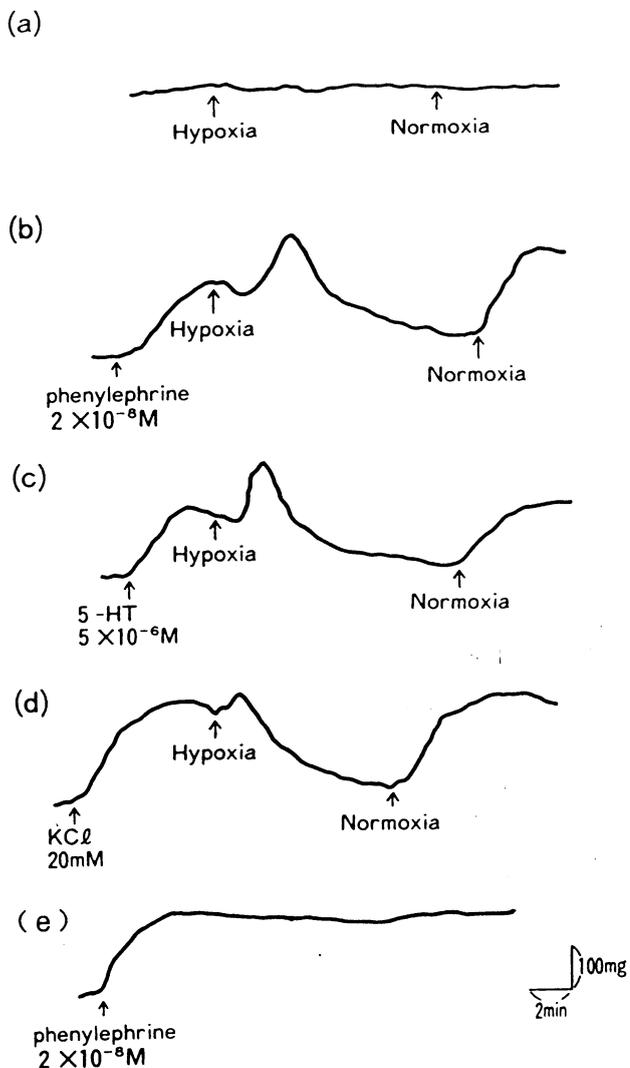


図1 低酸素刺激に対する張力変化の典型例

(a)は agonist を加えない状態, (b), (c), (d)はそれぞれ, phenylephrine, 5-HT, KCl にて軽度張力を増加させた状態での反応を示す。(e)は phenylephrine 単独の time-course を示す。

NMMA, Calbiochem)  $2 \times 10^{-6}$  M 存在下。

③ guanylate cyclase inhibitor : methylene blue (MB)  $10^{-6}$  M 存在下。

内皮存在の有無は, Phe  $10^{-6}$  M による前収縮後 ACh による弛緩反応がみられるかどうかで判定した。また,  $5 \times 10^{-6}$  M の L-NMMA に NO 産生抑制作用があるかどうかを ACh による弛緩反応の抑制作用の程度から確認した。発生張力の変化は Phe により増加した張力がプラトーに達した点を基準点とした。

結果は平均値±標準誤差で示し, 2群間の差の検定には paired もしくは unpaired T-test を用いた。

#### 成績

コントロールの混合ガスから 0%酸素の混合ガスに変換した際の緩衝液中の酸素分圧は  $92.8 \pm 3.0$  Torr より

$34.6 \pm 3.1$  Torr に低下した ( $n=8$ )。

#### ①-(a) 内皮温存標本での反応性

Agonist を加えない状態で低酸素刺激を加えても張力変化はみられなかった。これに対し, Phe, 5-HT, KCl で軽度張力を増加させた状態では, 低酸素刺激により一過性の張力の増加とそれに続く張力の低下が観察された。再酸素化するとほぼ低酸素刺激前の張力に戻った。Phe, 5-HT, KCl による前収縮はそれぞれ,  $120.0 \pm 13.0$  mg,  $168.7 \pm 21.4$  mg,  $146.0 \pm 33.5$  mg, 低酸素による張力増加は  $68.7 \pm 10.0$  mg,  $107 \pm 8.0$  mg,  $40 \pm 8.9$  mg であり, KCl 前処置での低酸素による張力増加は phe 前処置に比べ小さい傾向にあり, 5-HT 前処置に比べ有意に小であった ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ )。なお, 3つの agonist による前処置には多少張力の違いを認めるが, 有意な差ではなかった。また, phe を加えたときの張力の時間変化を図1に示す。

なお, 0%の混合ガスに変換してから張力の増加が発現するまでの時間はおよそ60から90秒後であり, このときの酸素分圧はおよそ 60 Torr であった。

#### ①-(b) 内皮擦過標本での反応性

Agonist を加えない状態では低酸素刺激に対し張力の変化はほとんどみられないかまたは一部の標本ではわずかな張力の低下が観察された ( $-3 \pm 4$  mg,  $n=6$ )。Phe による前収縮の条件では, 低酸素性の張力増加は8.7%に減弱した ( $69 \pm 10$  mgから  $6 \pm 4$  mg)。また, 低酸素性の張力低下についてはほとんど内皮の有無で差はなかった。図2に反応の典型例を, 図3にそのまとめを示す。

② L-NMMA  $2 \times 10^{-6}$  M 前処置により, ACh による弛緩反応は  $EC_{50}$   $2.8 \times 10^{-8}$  M, 最大弛緩反応74%から, それぞれ  $1.25 \times 10^{-7}$  M, 39%に減弱した ( $n=5$ )。また, L-NMMA 存在下での低酸素性の張力増加は52%に減弱した ( $78.1 \pm 11.4$  mgから  $41.1 \pm 13.2$  mg)。ただし, L-NMMA 存在下では Phe による前収縮は  $109.2 \pm 8.6$  mg から  $306.8 \pm 20.9$  mg に増強したので, この影響を考慮し, Phe 単独で同程度の張力増加が起こる濃度 (Phe  $10^{-7}$  M で検討) による前収縮 ( $300 \pm 28.0$  mg) での反応について検討した。その結果, 低酸素性の張力増加は  $97.7 \pm 17.8$  mgであり, L-NMMA 存在下での低酸素性収縮に比べ有意に大であった (図4)。

③ MB  $10^{-6}$  M 存在下では, 低酸素による張力増加は  $113.0 \pm 63.0$  mgから  $57.0 \pm 47.0$  mg と50%に減弱した (図5)。

なお, 今回使用した EDRF 活性阻害剤は高濃度を用いるとそれ自体が張力の増加を引き起こすので, インキュベーションした際に張力に変化を及ぼさない濃度で検討した。

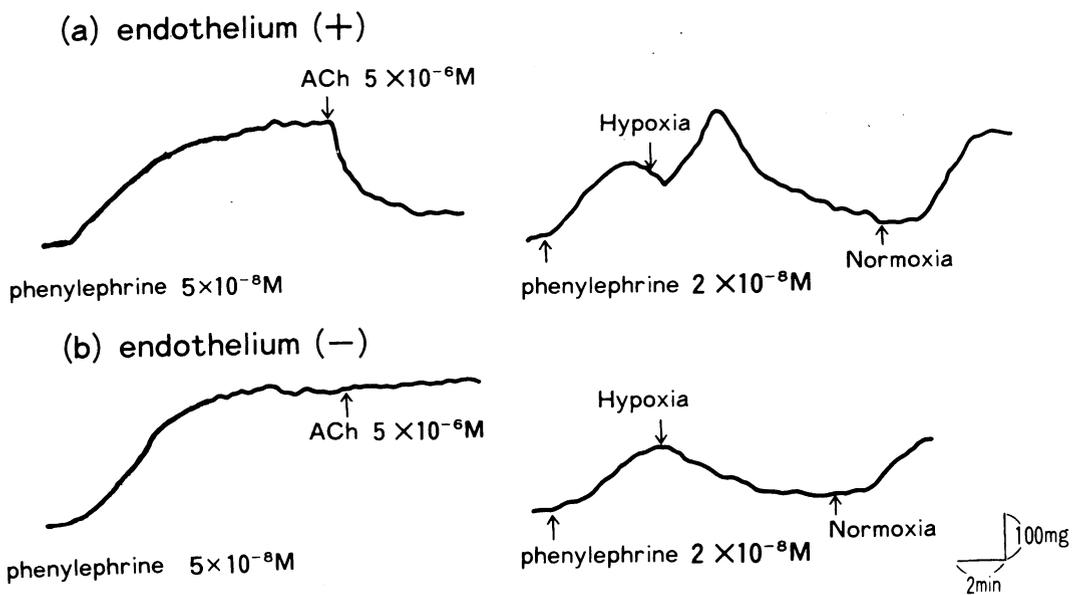


図2 内皮温存標本(a)と内皮擦過標本(b)における低酸素刺激に対する反応の典型例

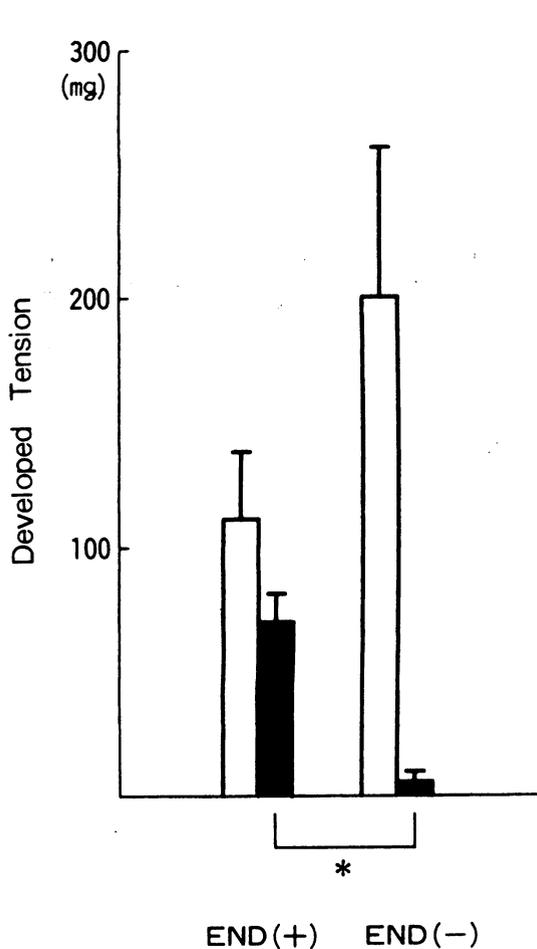


図3 内皮温存標本 END (+) と内皮擦過標本 END (-) における低酸素性張力変化を示す

□は phenylephrine  $2 \times 10^{-8}$  M による張力増加を, ■は低酸素性の張力変化を示す。

mean  $\pm$  SE, \*P < 0.01, n = 5

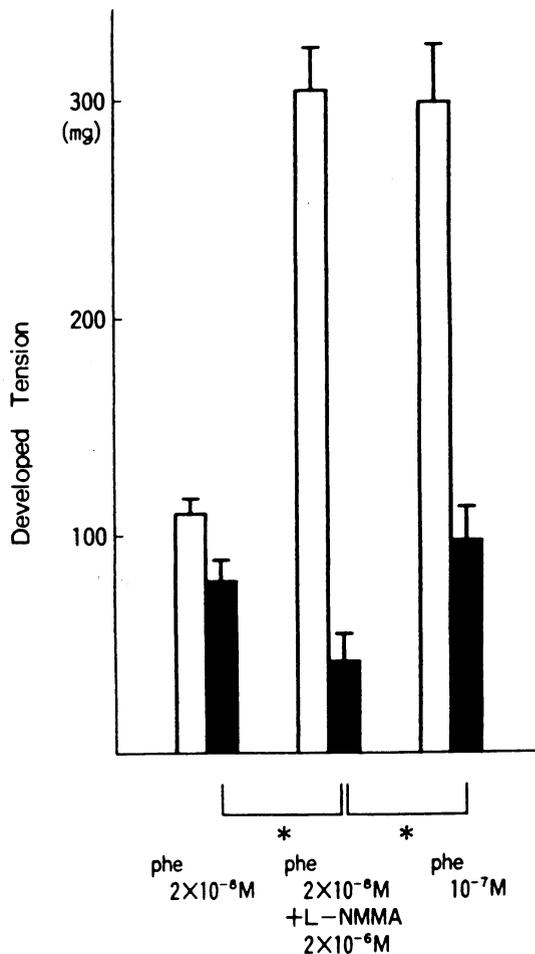


図4 L-NMMA の低酸素性張力増加に及ぼす影響

□は phenylephrine  $10^{-8}$  M による張力増加を, ■は低酸素性張力変化を示す。

mean  $\pm$  SE, \*P < 0.01, n = 9

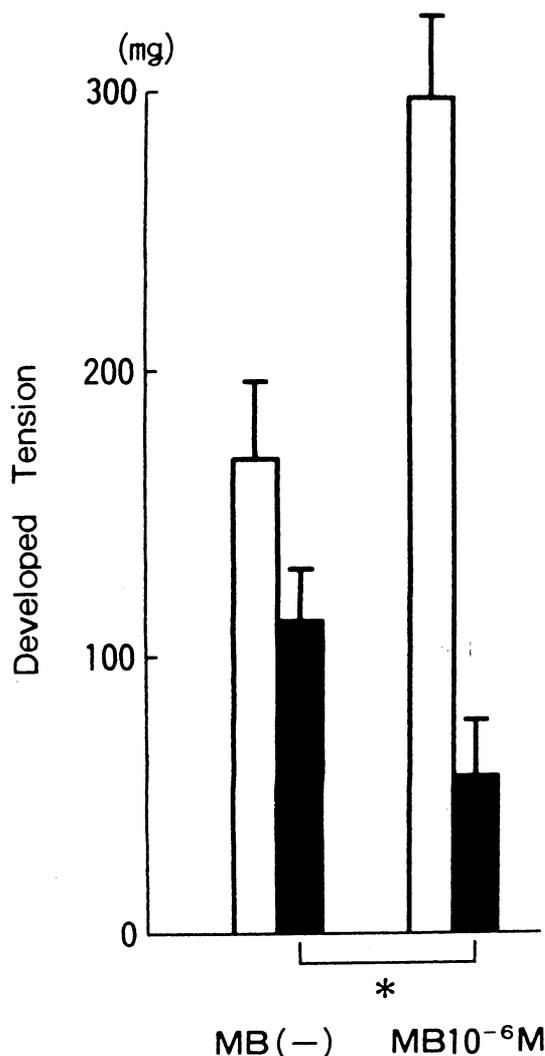


図5 methylene blue の低酸素性張力増加に及ぼす影響  
□は phenylephrine  $2 \times 10^{-8}$  M による張力増加を、■は低酸素性の張力変化を示す。  
mean  $\pm$  SE, \*P < 0.05, n = 6

### 考 察

これまで、低酸素性肺血管攣縮の局在部位についてはおもに細小動脈のレベルとする報告が多いが<sup>2)</sup>、本実験では、まず、摘出した太い肺動脈でも低酸素刺激に対し反応がみられるかどうかを検討した。その結果、内皮を温存した標本にて、agonist を加えない状態では低酸素刺激に対し張力に変化はみられなかったが、低濃度の血管収縮性物質にて軽度張力をあげた状態では、低酸素性の張力増加が観察された。これに対し、Madden<sup>8)</sup>らのネコ摘出肺動脈(直径300  $\mu$ m 以下)を用いた実験およびRodman ら<sup>3)</sup>のラット摘出主肺動脈を用いた実験では血管収縮性物質を加えない状態でも低酸素性の肺血管収縮がみられたとしている。ただし、ここで用いた血管は低酸素刺激前ですでにそれぞれ自発性の収縮反応やトーンスの亢進がみられており、摘出血管を用いた実験では血管の緊張度が低酸素性の収縮反応発現に重要な因子のよ

うに思われた。なぜ血管のトーンスが高い方が発現しやすいのかは不明だが、低酸素による収縮発現機序との相乗効果により起こりやすくなると考えられる。

つぎに、低酸素性の張力増加の発現に内皮の機能が関連しているかどうかを検討した。本実験では、低酸素性の張力増加は内皮を擦過した標本では agonist による前収縮の有無にかかわらず観察されなかったことから、血管内皮がこの反応の発現に重要な役割を果たしていると考えられた。これまでも内皮の重要性を示した報告は多い<sup>3, 4, 7, 9)</sup>。そのなかで、Johns<sup>4)</sup>らや Rodman ら<sup>9)</sup>はそれぞれウサギ、ラットの摘出肺動脈を用いた実験より、低酸素による EDRF 活性の阻害が相対的に収縮反応を引き起こすというメカニズムを推定している。

今回の著者らの実験でも、Johns らの結果と一致し、内皮擦過あるいは L-NMMA や methylene blue 前処置下で、低酸素による張力増加は減弱した。これは、あらかじめ EDRF の遊離を抑制した状態にしておくことで低酸素刺激に対する EDRF 活性の阻害効果、すなわち、相対的な収縮反応が出現しにくくなったためと推察できる。また、この理論からすれば、agonist でトーンスを上げたり、内皮に作用して EDRF の産生を刺激した状態では、低酸素による張力増加が現れやすいことになり、本実験での結果と合致しているものと思われた。また、低酸素性の張力増加が KCl に比べ 5-HT の前収縮で大きかったが、その理由として 5-HT は内皮に作用して EDRF を遊離するので、低酸素に対する張力増加が出現しやすかったのかもしれない。

なお、EDRF 活性阻害薬の前処置により agonist の反応が増強し、そのために低酸素性の張力増加が見かけ上減少した可能性もあるが、図4に示すように、Phe + L-NMMA と同等の反応性をしめす Phe の濃度で検討したところ、phe 単独で低酸素刺激による張力増加の減弱はみられなかったのでその可能性は低いと考えられた。

しかし、内皮が存在しない方が HPV が発現しやすいという報告<sup>10)</sup>や EDRF が低酸素性収縮反応に対し代償的に遊離されるという結果も少なからず報告されている<sup>5, 6)</sup>。このように意見が分かれる原因として、対象とする動物の種差および血管の部位差などが考えられるが、Yuan ら<sup>10)</sup>のラット摘出主肺動脈でも内皮を擦過したほうが hypoxia-induced contraction が発現しやすいとする結果をふまえると、それ以外の要因も考えられる。彼らの実験と著者らの実験との相違点のひとつとして、彼らは前処置として60分間低酸素にさらしてから実験を行っている。Holden ら<sup>7)</sup>も長時間低酸素にさらしてから低酸素刺激を行うと、血管収縮性物質にてトーンスを上げなくても hypoxia-induced contraction が起こるとしている。このような前処置を施すことがどのような意

味を持つのかはわからないが、肺動脈は混合静脈血中の低酸素にさらされていることを考慮すると、今後検討すべき点と思われた。

また、本実験では低酸素により張力の増加に続いて張力の低下が観察された。この張力の低下は、図1で示すように張力の増加がみられる前にも若干みられているが、これは張力低下が増加よりも早く出現したためと考えられる。また、この反応は内皮擦過標本でも同様に観察されたことから、内皮非依存性の反応と考えられる。この反応の詳細なメカニズムは不明だが、細胞内のエネルギー代謝が関係していると思われる。最近、この張力低下の一部はATP感受性Kチャンネルの開口によるのではないかという報告<sup>11)</sup>があり、HPVの発現機構にも関連するものとして興味深く、今後検討が必要と思われた。

なお、本実験での検討は摘出した太い肺動脈で、しかもagonistで張力を増加させた状態あるいはEDRFの遊離を刺激した状態でなければ検出されないことから、これをHPVとしていいかどうかは問題が残るが、肺の細動脈にはある程度のトーンが存在し、しかも肺動脈の末梢の方がEDRFの産生が大であるという報告<sup>12)</sup>をふまえると、前述したメカニズムがHPV発現に関与している可能性があると考えられた。

## 結 論

ラットの摘出主肺動脈を用いて低酸素刺激に対し以下のような知見を得た。

① 摘出した肺動脈の太い部分において、血管収縮性物質でトーンをあげた状態では低酸素性張力の増加と低下が観察された。

② この張力の増加には内皮の存在が必要であり、張力の低下は内皮と関連がないと思われた。

③ 低酸素性の張力増加の発現機序の一つとして、持続的に遊離しているEDRF遊離が低酸素により抑制され、相対的に張力増加を引き起こす可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、L-NMMAをお譲りいただきました北海道大学循環器内科佐久間一郎先生に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第31回日本脈管学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Von Euler, U. S. and Liljestrand, G. : Observation on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta. Physiol. Scand.*, **12** : 301~320, 1946.
- 2) Shirai, M., Sada, K. and Ninomiya I. : Effects of regional alveolar hypoxia and hypercapnea on small pulmonary vessels in cats. *J. Appl. Physiol.*, **61** : 440~448, 1986.
- 3) Rodman, D. M., Yamaguchi, T., O'Brien, R. F. et al. : Hypoxic contraction of isolated rat pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248** : 952~959, 1989.
- 4) Johns, R. A., Linden, J. M. and Peach, M. J. : Endothelium-dependent relaxation and cyclic GMP accumulation in rabbit pulmonary artery are selectively impaired by moderate hypoxia. *Circ. Res.*, **65** : 1508~1515, 1989.
- 5) Wiklund, N. P., Persson, M. G., Gustafsson, L. E. et al. : Modulatory role of endogenous nitric oxide in pulmonary circulation in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, **185** : 123~124, 1990.
- 6) Archer, S. L., Tolins, J. P., Raji, L. et al. : Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **164** : 1198~1205, 1989.
- 7) Holden, W. E. and McCall, E. : Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium. *Exp. Lung Research*, **7** : 101~112, 1984.
- 8) Madden, J. A., Dawson, C. A. and Harder, D. R. : Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J. Appl. Physiol.*, **59** : 113~118, 1985.
- 9) Rodman, D. M., Yamaguchi, T., O'Brien, R. F. et al. : Hypoxic contraction of pulmonary artery is reduced by endothelial denudation, hemoglobin, and methylene blue. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **135** : A131, 1987.
- 10) Yuan, X. J., Tod, M. L., Rubin, L. J. et al. : Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am. J. Physiol.*, **259** : 281~289, 1990.
- 11) Greenberg, B. and Kishiyama, S. S. : Rat pulmonary artery demonstrates a bifasic response to anoxia. *Circulation*, **82** (Suppl. 3) : 22, 1990.
- 12) Ignarro, L. J., Byrns, R. E. and Wood, K. S. : Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated intrapulmonary artery and vein. *Circ. Res.*, **60** : 82~92, 1987.

# Role of Endothelium on Responses to Hypoxia in Isolated Rat Pulmonary Arteries

Ogawa, Y., Morita, K., Harada, T., Hirayama, T., Kawabe, J., Tobise, K. and Onodera, S.

First Department of Internal medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan

**Key Words** : Hypoxic pulmonary vasoconstriction : HPV, Endothelium-derived relaxing factor, Anoxia, Isolated rat pulmonary artery

The responses to hypoxia and the roles of endothelium in these responses were investigated in the isolated main pulmonary artery rings of the rat. Hypoxia was induced by gassing the organ chamber with 95% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>=34.6 Torr) instead of 16% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>=92.8). Although in the rings of resting tension no responses to hypoxia were observed, in the endothelium-intact rings prestimulated with vasoconstrictive agents, phenylephrine, serotonin and KCl, the transient hypoxic contraction and the following relaxation were observed. This hypoxia-

induced contraction was reduced in the endothelium denuded rings. The hypoxia-induced relaxation did not show remarkable difference between the endothelium intact rings and denuded rings. L-NMMA ( $2 \times 10^{-8}$ M) and methylene blue ( $10^{-6}$ M), which were inhibitors of endothelium-derived relaxing factor (EDRF), demonstrated 52% and 50% decrease in hypoxia-induced contractin, respectively. These results suggest that the hypoxia-induced contraction in the rat large pulmonary arteries is partially due to the inhibition of basal EDRF production.