

ブタ舌動脈血管平滑筋に対する 炎症性ケミカルメディエータの影響

西 健, 佐藤 健一

岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座

(主任: 城 茂治 教授)

(受付: 2006年12月11日)

(受理: 2006年12月26日)

Abstract: To elucidate the effects of various chemical mediators, which are considered to appear in inflammation, on vascular smooth muscle, annular specimens of porcine lingual arterial smooth muscle were prepared, and divided into specimens denuded or undenuded of vascular endothelium. These specimens were attached to the thermostat incubator of an intracellular calcium ion concentration measurement unit, stimulated with 40 mM KCl, noradrenalin (NA), or U46619, followed by administration of acetylcholine (ACh) or bradykinin (BK), and the isometric contractile tension generated and fluorescence intensity ratio were simultaneously measured; the following conclusions were drawn.

1. The inhibition by ACh or BK of NA-, high KCl-, or U46619-induced contraction was dependent on the presence of vascular endothelium, suggesting the involvement of a decreased $[Ca^{2+}]_i$ concentration in the contraction inhibition.

2. It was suggested that the inhibition of high KCl-induced contraction by ACh or BK was weaker than that of receptor stimulation-induced contraction.

3. The administration of BK showed biphasic changes in U46619-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$.

Key words: arterial smooth muscle, inflammatory chemical mediators, intracellular calcium ion, acetylcholine, bradykinin

緒 言

超高齢社会の到来と医療の発展により、高齢者が歯科を受診する機会が増加している。高齢者は複数の全身疾患を持っているといわれ、なかでも高血圧症とりわけ動脈硬化が主な要因とされる本態性高血圧症を合併することが多い。

このような患者に対してアドレナリン含有の局所麻酔薬を使用した場合、そのアドレナリンによって血圧は予想以上に変動してコントロールが非常に困難となることが多く、局所麻酔薬の選択とその投与量について常に頭を悩ますところである。

近年、高血圧の原因である動脈硬化は血管壁

Effects of inflammatory chemical mediators on porcine lingual arterial smooth muscle

Takeshi NISHI, Ken-ichi SATOH

Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

の慢性炎症の関与が大きいとして注目され、高血圧性血管障害の発生機序においても炎症が必須の役割を果たすことが明らかになりつつある¹⁾。また、歯科領域においては、生活習慣病といわれている歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* が、大動脈や冠動脈などに進入しその血管壁に炎症を惹起させ、動脈硬化を増悪させているとの報告もある²⁾。

炎症の際に発現する血管応答は、化学伝達物質(ケミカルメディエータ)によって制御され、これらケミカルメディエータには、血管収縮性物質と血管拡張性物質がある。血管収縮性物質にはノルアドレナリン (NA), アドレナリン, セロトニン, トロンボキサン A₂ (TXA₂) などがあり、血管拡張性物質にはブラジキニン (BK), ヒスタミンなどが代表的なものとして挙げられる³⁾。炎症の各ステージにおけるこれらケミカルメディエータの発現機序ないしそれら相互作用についても検討されつつあるが、未だ不明な点が多い。さらに現在われわれが知っているケミカルメディエータの他にも、まだ同定されていない物質がある可能性も示唆されている³⁾。

われわれ歯科医師は、高血圧症をはじめとする血管性病変を合併した患者を診療していかなければならず、より安全な歯科治療が求められる。動脈硬化の原因として“炎症”が注目されている現在、血管に対する炎症性因子の影響についても検討することが必要であると考えられる。なぜなら、血管平滑筋に対する炎症性因子の作用機序が解明されることになれば、動脈硬化を生じた血管の動態把握につながり、ひいては本態性高血圧症患者で安全に使用できる血管収縮薬開発の可能性もありえると考えられるからである。

これまでケミカルメディエータの血管平滑筋に対する作用についての報告は、各種動物の大動脈や冠動脈を用いた実験が多く^{4), 5), 6)}、歯科医師が直接関わる口腔領域での動脈血管平滑筋に対する作用を検討した報告は、われわれが渉猟しえた範囲ではみられない。そこで本実験

では、炎症時のケミカルメディエータの血管作動性物質のなかでも炎症の開始から修復にいたる過程で、重要な位置を占める BK, TXA₂, NA および BK と同様に内皮由来弛緩因子 (EDRF) を放出する内因性の血管弛緩性物質であるアセチルコリン (ACh) と脱分極刺激である高 KCl に注目し、これら各種ケミカルメディエータと ACh, 高 KCl が口腔内動脈の一つである舌動脈血管平滑筋に対し、どのような作用(相互作用)を示すのかを解明することを目的として、等尺性収縮および細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化を同時測定することによって検討した。

材料と方法

1. 材料

屠殺ブタの舌から直径 1~2 mm の舌動脈を摘出し、周囲組織とともに外膜を剥離除去した後、長さ 2~3 mm に切断し、舌動脈血管平滑筋の輪状標本作製した。さらに血管内皮を剥離した標本を血管内皮(-)、血管内皮を剥離しない標本を血管内皮(+)として用いた。

2. 蛍光カルシウム指示薬 Fura-2 / AM の負荷

Fura-2 / AM (同仁化学) 20 μ M, 0.01% PluronicF-127 (BASF) を溶解した Hanks Component Solution (HCS) に標本を浸し、暗所、恒温槽内(約 37°C)にて約 3 時間浸漬した。

HCS の組成は 0.34mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.44mM KH₂PO₄, 0.8mM MgSO₄, 1.26mM CaCl₂ · 2H₂O, 4.2mM NaHCO₃, 5.55mM Glucose, 5.36mM KCl, 0.14M NaCl, PH7.40 とした。

3. 測定方法

Fura-2 / AM を負荷した標本を $[Ca^{2+}]_i$ 測定装置 (AQUACOSMOS™, HAMAMATSU) の恒温槽内に設定し、静止張力 1.0g を負荷し、HCS を約 30 分間灌流した。

収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の同時測定は畠山ら⁷⁾の方法によった。すなわち収縮張力の測定

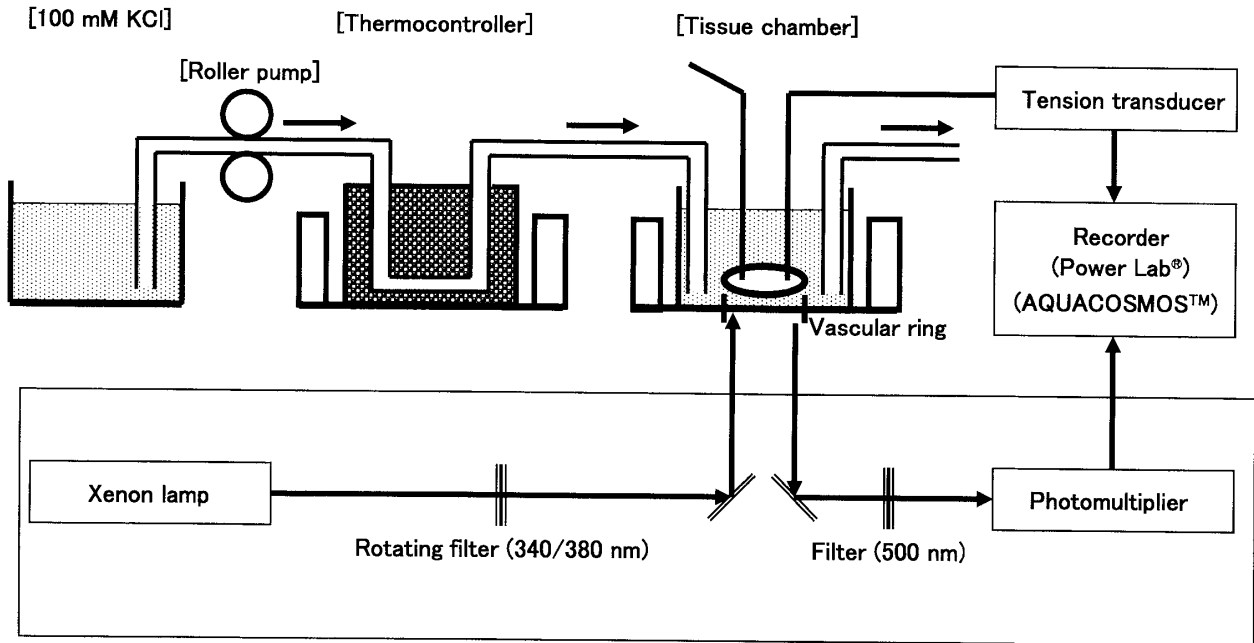


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus.

The vascular smooth muscle ring was mounted on two tungsten hooks, one of which was glued to the arm of a force displacement transducer. Two wavelengths of excitation light (340 nm and 380 nm) were obtained from a xenon lamp source. Surface fluorescence of the tube was introduced through a 500 nm band pass filter into a photomultiplier.

については、標本を細胞内カルシウムイオン測定装置の恒温槽内に、一端をマニピレータ (M-152, ナリシゲ) に固定し、他端はタングステンワイヤーを介して張力トランスデューサー (UL-10GR, ミネビア) に固定し、Power Lab® (ADInstruments) を介して記録した。

これと同時に $[Ca^{2+}]_i$ については、顕微鏡 (TE-2000E Nikon) 下にて測定部位を決定し、細胞内カルシウムイオン測定装置内のキセノンランプから発する励起光を、340nm と 380nm のバンドパスフィルター付き回転盤を使用して標本に照射することにより二波長励起を行った。それにより標本組織から発する蛍光を 500 nm のフィルターを介して光電子増幅管に導き、340nm と 380nm 励起蛍光強度を測定し、その蛍光強度比 (340nm/380nm) をもって、 $[Ca^{2+}]_i$ の指標とした⁷⁾。

(1) 収縮張力および蛍光強度比の基準値の設定

実験の開始時に全ての標本に対して、まず 100mM KCl 溶液を 15分間灌流し (Fig. 1), それによって生じた等尺性収縮張力および蛍光強度比の最大変化値を測定し、各々の標本におけ

る最大収縮張力および最大蛍光強度比の基準値 (以下、基準値) (100%) とした。なお、100mM および 40mM KCl 溶液は、HCS の組成の NaCl を等モル濃度の KCl に置換して作製した。5 μ M NA, 100nM U46619 (TXA₂ 類似物質), 30 μ M ACh および 1 μ M BK は、HCS または 40 mM KCl に添加して作製した。

基準値を測定した後、NA, 40mM KCl, U 46619 の刺激薬による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対する ACh および BK 投与によるそれらの変化を測定した。

(2) 各種刺激薬による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対する ACh 投与の影響

各標本において基準値を測定したのち、約 10 ~ 15分間 HCS を灌流し、等尺性収縮張力および蛍光強度比が 100mM KCl 投与前にほぼ復するのを待って、5 μ M NA を約 15分間灌流し、続いて 30 μ M ACh を 15分間灌流した。さらに HCS を灌流し 5 μ M NA 投与前にほぼ復するのを待って、40mM KCl を約 15分間灌流した後、30 μ M ACh を同時間灌流した。同様に HCS を灌流し、40mM KCl 投与前にほぼ復してから、

100nM U46619を約20分間灌流し, 30 μ M AChを20分間灌流した。その間に発生する等尺性収縮張力および蛍光強度比を連続的に測定し, その最大変化値を求めた。これを内皮細胞 (+) および (-) のそれぞれの標本において行った。(3)各種刺激薬による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対する BK 投与の影響

各標本において基準値を測定したのち, 約15分間 HCS を灌流し, 等尺性収縮張力および蛍光強度比が100mM KCl 投与前にはほぼ復するのを待って, 5 μ M NA を約15分間灌流し, 30 μ M ACh を15分間灌流した。再び HCS を灌流し 5 μ M NA 投与前にはほぼ復するのを待って, 5 μ M NA を約15分間灌流し, 1 μ M BK を同時間灌

流した。以下同様に40mM KCl と 1 μ M BK を約15分間, 100nM U46619 と 1 μ M BK を約20分間灌流し, その間に発生する等尺性収縮張力および蛍光強度比を連続的に測定し, 最大変化値を求めた。これを内皮細胞 (+) および (-) のそれぞれについて行った。

全ての計測値は平均 \pm 標準偏差で表し, 統計学的処理は paired t 検定により行い, $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

結 果

1. 各種刺激薬による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対する ACh 投与の影響

(1)内皮細胞 (+) の場合 (Table., Fig. 2)

Table. Changes of tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by various stimulators with ACh and BK.

The values were relative tension, $[Ca^{2+}]_i$ to tension, and $[Ca^{2+}]_i$ induced by 100mM KCl. Data are represented as mean \pm S.D.

| Tension | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
| | Endothelium(+) | | | Endothelium(-) | | | | Endothelium(+) | | | Endothelium(-) | | |
| | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 | | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 |
| number | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | number | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| control (100 mM KCl) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | control (100 mM KCl) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 30 μ M ACh (-) | 51.3 \pm 22.9% | 73.5 \pm 6.0% | 40.3 \pm 6.2% | 55.4 \pm 5.1% | 65.4 \pm 9.4% | 54.0 \pm 16.5% | 1 μ M BK (-) | 65.2 \pm 25.7% | 80.6 \pm 10.2% | 54.4 \pm 16.2% | 66.0 \pm 15.1% | 76.1 \pm 7.2% | 47.8 \pm 13.9% |
| 30 μ M ACh (+) | 0 | 42.4 \pm 7.9% | 0 | 54.9 \pm 5.4% | 65.4 \pm 9.4% | 53.9 \pm 16.4% | 1 μ M BK (+) | 0 | 52.9 \pm 35.9% | 29.4 \pm 14.0% | 65.3 \pm 15.3% | 76.1 \pm 7.3% | 46.0 \pm 12.5% |

| Ratio | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Endothelium(+) | | | Endothelium(-) | | | | Endothelium(+) | | | Endothelium(-) | | |
| | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 | | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 | 5 μ M NA | 40 mM KCl | 100 nM U46619 |
| number | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | number | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| control (100 mM KCl) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | control (100 mM KCl) | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 30 μ M ACh (-) | 52.5 \pm 16.7% | 83.0 \pm 17.9% | 25.2 \pm 8.7% | 69.6 \pm 13.7% | 87.6 \pm 15.7% | 54.6 \pm 32.9% | 1 μ M BK (-) | 44.5 \pm 10.1% | 69.5 \pm 25.1% | 47.0 \pm 12.8% | 79.3 \pm 3.3% | 93.1 \pm 12.8% | 60.6 \pm 10.7% |
| 30 μ M ACh (+) | 0 | 50.2 \pm 13.2% | 0 | 69.5 \pm 13.7% | 87.5 \pm 15.7% | 54.5 \pm 32.8% | 1 μ M BK (+) | 0 | 44.7 \pm 38.8% | 21.3 \pm 21.0% | 77.8 \pm 3.7% | 92.9 \pm 12.7% | 57.7 \pm 14.6% |

Mean \pm S.D. * $P < 0.05$

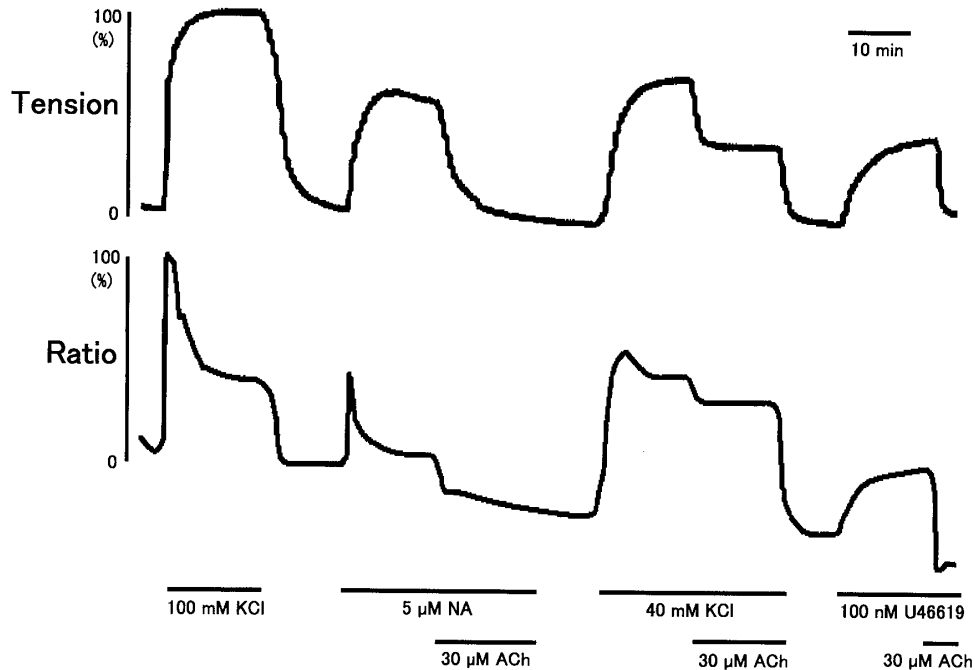


Fig. 2. Effects of ACh on various stimulant-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$ changes in endothelium-undenuded vascular smooth muscle.

The administration of 5 μ M NA, 40 mM KCl, or 100 nM U46619 increased contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$. Additional administration of 30 μ M ACh sharply reduced NA- or U46619-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$, and reduced 40 mM KCl-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$ to almost constant levels.

5 μ M NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は30 μ M ACh 投与により、急激に減少し、30 μ M ACh 投与では、5 μ M NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ がほぼ100%抑制された。

40mM KCl 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は30 μ M ACh 投与により、減少したままほぼ一定となった。40mM KCl による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は30 μ M ACh 投与前後で約30%の差を示し、抑制された。

100nM U46619投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は30 μ M ACh 投与により、急激に減少し、30 μ M ACh 投与では、100nM U46619 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ がほぼ100%抑制された。

(2)内皮細胞 (-) の場合 (Table., Fig. 3)

5 μ M NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は30 μ M ACh を投与しても、変化はみられなかった。

40mM KCl 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$

の増加は30 μ M ACh を投与しても、変化はみられなかった。

100nM U46619投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は30 μ M ACh を投与しても、変化はみられなかった。

2. 各種刺激薬による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化に対する BK 投与の影響

(1)内皮細胞 (+) の場合 (Table., Fig. 4)

5 μ M NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は30 μ M ACh 投与により、急激に減少し、30 μ M ACh 投与では、5 μ M NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ がほぼ100%抑制された。

5 μ M NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は1 μ M BK 投与により、急激に減少し、1 μ M BK 投与では、5 μ M NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ がほぼ100%抑制された。

40mM KCl 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は1 μ M BK 投与により、減少したままほぼ一定となった。40mM KCl 投与による収縮

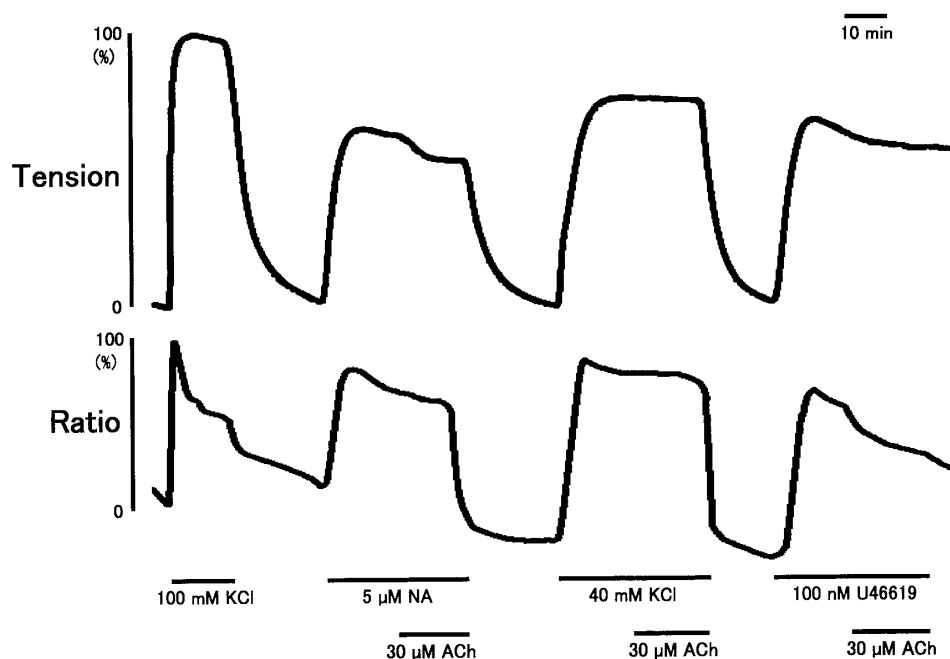


Fig. 3. Effects of ACh on various stimulant-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$ changes in endothelium-denuded vascular smooth muscle. The administration of 5 μ M NA, 40 mM KCl, or 100 nM U46619 increased contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$. Additional administration of 30 μ M ACh induced no changes in NA-, 40 mM KCl- or U46619-induced contractile tension or $[Ca^{2+}]_i$.

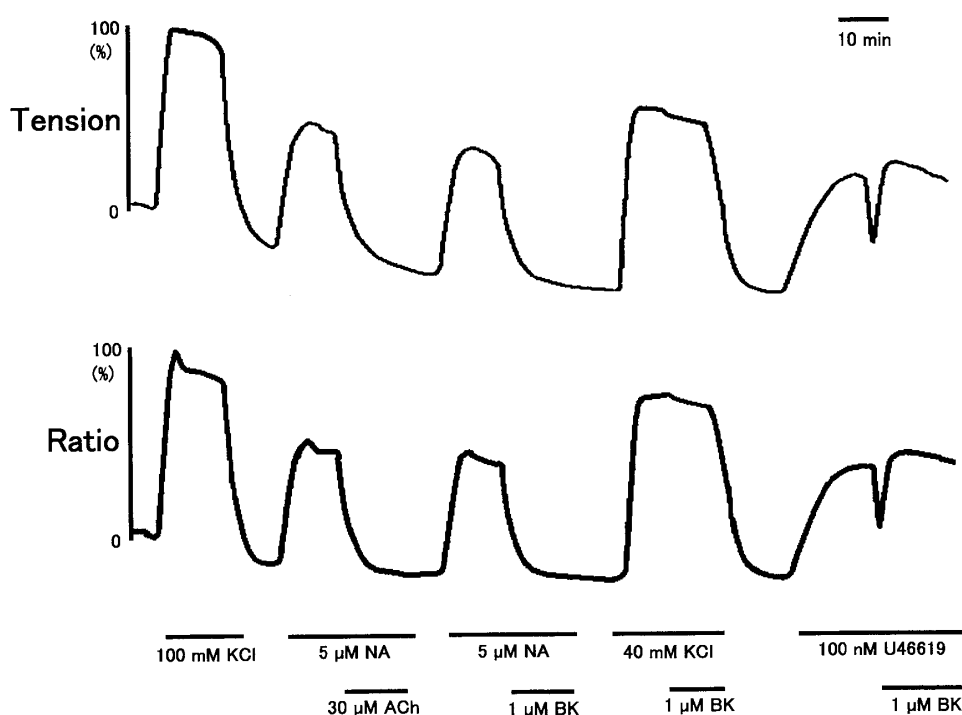


Fig. 4. Effects of BK on various stimulant-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$ changes in endothelium-undenuded vascular smooth muscle. The administration of 5 μ M NA, 40 mM KCl, or 100 nM U46619 increased contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$. Additional administration of 1 μ M BK sharply reduced NA-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$, and reduced 40 mM KCl-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$ to almost constant levels, while it sharply reduced U46619-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$, then restored them to the levels before BK administration.

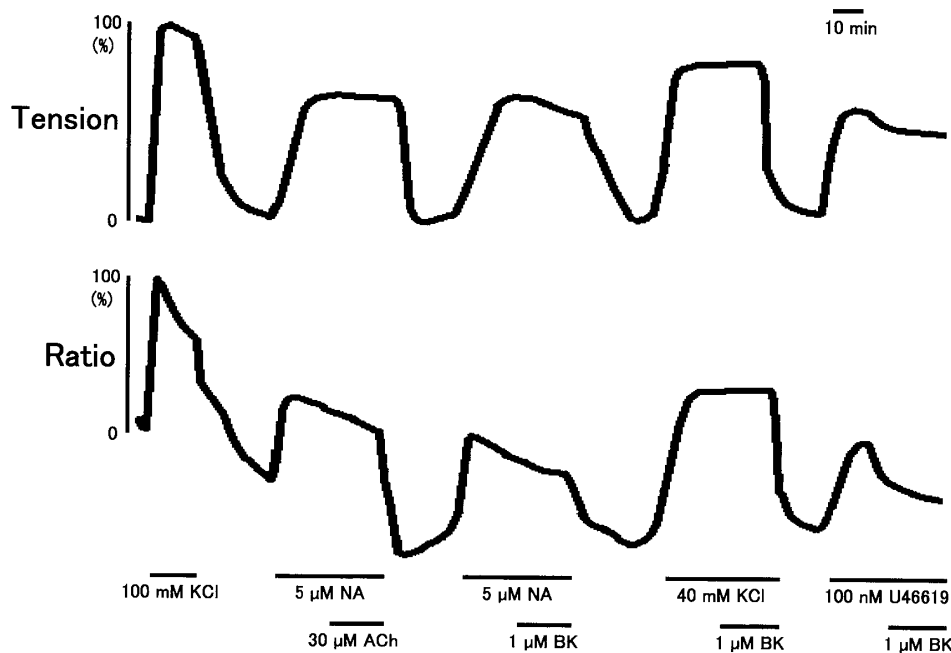


Fig. 5. Effects of BK on various stimulant-induced contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$ changes in endothelium-denuded vascular smooth muscle.

The administration of $5 \mu M$ NA, $40 mM$ KCl, or $100 nM$ U46619 increased contractile tension and $[Ca^{2+}]_i$. Additional administration of $1 \mu M$ BK induced no changes in NA-, $40 mM$ KCl- or U46619-induced contractile tension or $[Ca^{2+}]_i$.

張力および $[Ca^{2+}]_i$ は $1 \mu M$ BK 投与前後で約 30%の差を示し、抑制傾向がみられた。

$100 nM$ U46619投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は $1 \mu M$ BK 投与により、急激に減少した後増加し、BK 投与前値に復した。 $100 nM$ U46619投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は $1 \mu M$ BK 投与前後で約30%の差を示し、抑制傾向がみられた。

(2)内皮細胞(－)の場合 (Table., Fig. 5)

$5 \mu M$ NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は $30 \mu M$ ACh を投与しても、変化はみられなかった。

$5 \mu M$ NA 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は $1 \mu M$ BK を投与しても、変化はみられなかった。

$40 mM$ KCl 投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は増加は $1 \mu M$ BK を投与しても、変化はみられなかった。

$100 nM$ U46619投与による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は $1 \mu M$ BK を投与しても、変化はみられなかった。

考 察

1. ケミカルメディエータの作用と濃度について

炎症の第 I 期すなわち開始期では、まずヒスタミンが遊離されて細動脈拡張、血管透過性亢進を生じ、続いて BK によって、細動脈拡張、血管透過性亢進がさらに強まり、搔痒感、疼痛が起こる。一方、血管内皮では BK が血管内皮型一酸化窒素合成酵素を活性化し、一酸化窒素 (NO) が大量に合成され血管拡張を強める。第 II 期では、急性浸出性反応を引き起こし、細菌を攻撃・排除する。第 III 期では、血小板から TXA_2 が合成され、血小板凝集、線維芽細胞の増殖、血管新生が起こり、肉芽形成が始まって炎症部位は修復に向かう。炎症時にみられる臨床的徴候である発赤、腫脹、疼痛にも NA、ヒスタミン、BK、血管内皮増殖因子 (VEGF)、カリジンなど多くのケミカルメディエータが関与する。ケミカルメディエータには、細菌代謝産物などに由来する外因性のものと障害された組

織に由来する内因性のものがあるが、炎症刺激の直接作用よりも局所に生じた内因性ケミカルメディエータがより重要と考えられている⁸⁾。内因性ケミカルメディエータには多くの種類があるが、なかでも血管作動性物質は動脈硬化や高血圧性血管障害などの炎症性血管障害に深く関係する¹⁾。

各薬剤濃度については、BKは炎症の第I期～第II期にかけて主役的な役割を担い、その濃度は10nM～100nMであるといわれている⁹⁾。ウシ血管内皮細胞を用いた実験では、BKは1nM～0.1 μ Mの濃度で、用量依存性にNO_xを産生するが、0.1 μ Mと1 μ Mの濃度ではその産生量に大きな差はみられないと報告されている¹⁰⁾。また、Kuroiwaら⁴⁾のブタ冠動脈を用いた実験では、1 μ Mを投与し良好な結果が得られていたことから本実験でも1 μ M濃度を使用することにした。

TXA₂は、強力な血管収縮作用をもつが、その収縮機序は、TXA₂受容体を介して行われ、細胞内貯蔵Ca²⁺の遊離に加えてCa²⁺の細胞外からの流入が関与するといわれている⁵⁾。TXA₂は、血中半減期が30～40秒と短く、TXB₂にすぐ代謝されてしまう不安定な物質であるため、炎症部位における測定は非常に困難であるとされている⁵⁾。生体内で測定可能なTXB₂濃度については、ヒトの関節炎で268±24ng/mlという報告がある¹¹⁾。本実験では、安定なTXA₂類似物質であるU46619を使用し、野田ら⁵⁾、Kuroiwaら⁴⁾の実験をもとに100nM濃度を用いた。

NAは、動物の種差および血管平滑筋の採取部位によって感受性に違いがある。最大収縮の50%の反応をおこすのに必要なNA濃度は5nM～10 μ Mと幅が広い¹²⁾。本実験では佐藤ら¹³⁾の実験結果をもとにNAの濃度を5 μ Mとした。

AChは濃度依存性(1nM～100 μ M)に弛緩反応を示し、10 μ M～100 μ Mにかけて最大値を示す^{10),12)}ことおよび佐藤ら¹³⁾の報告をもとに30 μ M濃度を用いた。

高KClの濃度に関しては、K濃度が約40mM以上になると血管平滑筋収縮は最大値に達するとの報告¹²⁾をもとに最も低濃度で十分な収縮力が得られる40mMとした。

2. ケミカルメディエータの作用について

本実験では、ブタ舌動脈血管平滑筋を用いて受容体刺激であるNAおよびU46619、脱分極刺激であるKCl(40mM)刺激に対するAChとBKの作用について、血管内皮細胞の有無で比較検討した。なお、内皮細胞の機能の有無については、ACh投与によってNA投与による収縮張力が完全に抑制された場合に内皮細胞の機能があるものと判断し、ほとんど抑制されなかった場合には内皮細胞の機能がないものと判断した^{13),14)}。

血管内皮細胞(+)では、AChおよびBKはNA刺激による収縮張力および[Ca²⁺]_iの上昇を100%抑制した。AChはU46619刺激による収縮張力および[Ca²⁺]_iの上昇を100%抑制し、BKは収縮張力を平均46.0%、[Ca²⁺]_iを平均54.7%と抑制傾向にあった。また、AChは40mM KCl刺激による収縮張力および[Ca²⁺]_iの上昇を平均42.3%、平均39.5%、BKは平均34.4%、平均35.7%と抑制傾向にあった。血管内皮細胞(-)ではNA、40mM KCl、U46619刺激による収縮張力および[Ca²⁺]_iの上昇を抑制しなかった。このことはブタ舌動脈血管平滑筋においてもAChおよびBKによる収縮抑制は、血管内皮細胞依存性であり、かつ[Ca²⁺]_iの減少が関与することが示唆された。

ACh、BKとともにEDRFを放出させることによって間接的に血管平滑筋を弛緩させる代表的な物質である。そのEDRFの本体はNOであるといわれ¹⁰⁾、そのNOは弛緩物質が内皮細胞の受容体に結合することにより内皮細胞のアイソフォームⅢが活性化して生成される。NOは直ちに平滑筋に取り込まれ、グアニル酸シクラーゼの活性によりcGMPがつくられ、Gキナーゼ(cGMP依存性蛋白質リン酸化酵素)の活性化を介して平滑筋の弛緩をもたらす¹⁵⁾。この弛緩作用の細胞内機序に関しては、①受容体

作動薬によるイノシトールリン脂質代謝回転の活性化の抑制 (IP 3 産生低下による $[Ca^{2+}]_i$ 低下), ② Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルの開口にともなう膜の過分極による Ca^{2+} チャネル開口の間接的抑制 (細胞外 Ca^{2+} 流入の減少), ③ Ca^{2+} ポンプ活性化による $[Ca^{2+}]_i$ の減少, ④ ミオシンのリン酸化抑制による収縮蛋白質の抑制作用などがある¹⁵⁾。ブタ舌動脈血管平滑筋においても, ACh および BK は上述の機序により $[Ca^{2+}]_i$ を減少させることによって NA, U46619 および 40 mM KCl による収縮を抑制したものと考える。

つぎに, 受容体刺激である NA および U46619, 脱分極刺激である 40 mM KCl による収縮張力の ACh および BK による抑制程度には差がみられた。Takai ら¹⁶⁾ は受容体刺激によって活性化されるホスファチジルイノシトール (PI) 代謝回転は G キナーゼによって抑制されること, Rapoport¹⁷⁾ は, cGMP を介する血管作動性物質は PI 代謝回転を抑制することを報告している。辻本ら¹⁸⁾ も G キナーゼの関与する血管弛緩性物質が脱分極刺激による収縮に対してよりも受容体刺激に対して弛緩作用が強いとも指摘している。また, 唐木¹⁵⁾ は, 受容体作動薬によるイノシトールリン脂質代謝回転の活性化を NO が抑制するため受容体を介する収縮を強く抑制することおよび Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルの開口にともなう膜の過分極による Ca^{2+} チャネル開口の抑制が高濃度 K^+ により拮抗されることから NO は K^+ 収縮より受容体刺激による収縮を強く抑制すると述べている。本実験でのブタ舌動脈血管平滑筋においても, 高濃度 KCl (40 mM KCl) 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制 (30~40%) より NA, U46619 刺激すなわち受容体刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制 (100%) の方が強かったことから上記の機構によって収縮張力の抑制に差がみられたと考える。

BK は U46619 による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が, 急激に低下した後, 元に復する変化を示した。BK を各種血管平滑筋に単独投与するとモルモットの回腸では 1 ng/ml で収縮, tonus の高いところでは抑制作用, ラットの十

二指腸では 8 ng/ml で弛緩のみがみられ, ウサギの十二指腸およびラットの結腸では弛緩後に収縮の現れる 2 相性の変化がみられるなど様々な報告がある¹²⁾。すなわち血管平滑筋に対する BK の作用は動物による種差, 血管による部位差がみられ, 投与濃度による差もみられると考えられる。一方, 宮本ら⁹⁾ はブタ脳底動脈を予め収縮させて BK を投与した実験では, 本実験と同じ一過性の抑制変化がみられたとしている。その理由として, まず BK は, 内皮細胞上に存在する B_2 受容体を介して, NO を遊離して弛緩反応を示し, これに続いて, プロスタグランジン H_2 (PGH_2) を遊離して収縮反応を示す, 2 相性の変化を示すと報告している。本実験においても BK が同様な 2 相性変化を示したものと思われる。しかし, 本実験ではブタ舌動脈血管平滑筋という同一の血管に対し, 同一の濃度を投与したにもかかわらず, BK の 2 相性の変化は U46619 投与時にだけみられ, 同じ受容体刺激薬である NA や脱分極刺激薬である高 KCl 投与による収縮に対する抑制では 2 相性変化はみられなかった。このことは PGH_2 遊離が収縮反応の本体であるならば, PGH_2 を基質として生成される TXA_2 の類似体である U46619 と BK の同時投与により PGH_2 は遊離されやすい環境下にあり, NA や高 KCl と BK 同時投与では PGH_2 が遊離されにくい環境であったためではないかと推察されるが, 本実験結果からその原因を推察することはできないと考える。

結 論

各種のケミカルメディエータが舌動脈血管平滑筋に対してどのような作用を示すのかをブタ舌動脈血管平滑筋を用いて, 等尺性収縮および $[Ca^{2+}]_i$ 変化を同時測定し, 検討した結果, 以下の結論を得た。

1. ACh, BK による NA, 高 KCl および U46619 刺激の収縮抑制は, 血管内皮細胞依存性であり, その収縮の抑制には $[Ca^{2+}]_i$ の減少が関与することが示唆された。

2. 高 KCl 刺激の収縮に対する ACh, BK に

よる抑制は受容体刺激に対する抑制より弱いことが示唆された。

3. BK 投与は, U46619刺激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ に対し, 2相性の変化を示した。

謝辞: 稿を終えるにあたり, 終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました城 茂治教授に深甚なる謝意を表します。また, 本研究を進めるにあたりご助言とご協力をいただきました, 佐藤雅仁助教授はじめ歯学部歯科麻酔学講座医局員各位および口腔生化学講座川口高樹講師に厚く感謝いたします。

本論文の要旨の一部は, 第34回日本歯科麻酔学会総会(平成18年10月6日), 岩手医科大学先進歯科医療研究センター第1回研究成果発表会(平成18年11月25日)において発表した。

なお, 本研究の一部は文部科学省ハイテクリサーチプロジェクト(平成17年度~平成21年度)の補助を受けて実施した。

文 献

- 1) 大谷規彰, 江頭健輔: アンジオテンシンの新たな展開 炎症とARB, 分子心血管病, 6: 409-414, 2005.
- 2) 内藤真理子, 玉腰暁子: 心疾患と歯周病の関連について, 現代医学, 53: 125-129, 2005.
- 3) Trowbridge, H. O., and Emiling, R. C.; 下野正基監訳, やさしい炎症論: エンド・ペリオの理解のために, クインテッセンス出版, 東京, 3-28ページ, 1990: Inflammation: a review of the process; 4th ed., Quintessence Pub Co, 1992.
- 4) Kuroiwa, M., Aoki, H., Kobayashi, S., Nishimura, J., and Kanaide, H.: Role of GTP-protein and endothelium in contraction induced by ethanol in pig coronary artery. *J. Physiol.* 470: 521-537, 1993.
- 5) 野田敏雄, 吉田真人, 植田俊彦, 江口一之, 久光正, 小出良平: 微小灌流測定装置によるアンジオテンシンII受容体拮抗薬(CS-088)のウシ網膜血管に対する血管拡張作用, あたらしい眼科, 20: 1465-1468, 2003.
- 6) 宮本 篤, 村田 伸, 石黒 茂, 西尾 晃: ブタ脳底動脈のブラジキニン2相性反応に及ぼす captopril 及び thiorphan の影響, 日本獣医学会学術集会131回講演要旨集, 166, 2001.
- 7) 畠山忠臣, 佐藤健一: ブタ舌動脈血管平滑筋におけるアドレナリン収縮に対するリドカインの抑制機序の検討, 岩医大歯誌, 27: 219-229, 2002.
- 8) 青木重久, 小泉富美朝 編著: 基準病理学, 南江堂, 東京, 89-115ページ, 1988.
- 9) 市岡正道, 中浜 博, 山村秀夫 編集: 痛み-基礎と臨床-, 朝倉書店, 東京, 34-35ページ, 1980.
- 10) 野々村禎昭, 室田誠逸, 祖父江賢治, 永井克孝 編集: 血管: 内皮と平滑筋, 東京化学同人, 東京, 133-143ページ, 1993.
- 11) Duffy, T., Belton, O., Bresnihan, B., FitzGerald, O., and FitzGerald, D.: Inhibition of PGE 2 production by nimesulide compared with diclofenac in the acutely inflamed joint of patients with arthritis. *Drugs.* 63: 31-36, 2003.
- 12) 浦川紀元 監修: 高柳一成, 砂野一成, 唐木英明 編集: 平滑筋の薬物反応, 文永堂, 東京, 106-175ページ, 1986.
- 13) 佐藤 裕, 久慈昭慶: ブタ肺動脈における低酸素性肺血管収縮の発現機序に関する検討-特に血管内皮細胞およびNOとの関係について-, 岩医大歯誌, 26: 33-34, 2001.
- 14) 折茂 肇 編集: 血管壁細胞の機能とその制御機構, 共立出版, 東京, 15-24ページ, 1990.
- 15) 戸田 昇 編集: NO, グロビュー社, 東京, 2-26ページ, 1998.
- 16) Takai, Y., Kikkawa, U., Kaibuchi, K., and Nishizuka, Y.: Membrane phospholipid metabolism and signal transduction for protein phosphorylation. : *Advances in Cyclic Nucleotide & Protein Phosphorylation Research* 18: 119-158, 1984.
- 17) Rapoport, RM.: Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circulation Research* 58: 407-410, 1986.
- 18) 辻本豪三: 加齢に伴う血管平滑筋運動性の変化, *Mebio*, 9(8), 22-29, 1992.