

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—

佐藤 裕, 久慈 昭慶*

大阪大学大学院歯学研究科 高次脳口腔機能学講座 顎口腔先端麻酔学分野

* 岩手医科大学歯学部附属病院 障害者歯科診療センター

(指導: 城 茂治 教授)

(受付: 2001年 2月15日)

(受理: 2001年 3月 6日)

Abstract : 1. Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) plays an important role as a physical regulator in matching pulmonary perfusion to ventilation preventing systemic hypoxemia. But its precise mechanism is unknown.

The aim of the present study is to investigate the cellular mechanisms and potential mediators involved in hypoxic constriction of porcine pulmonary arteries.

2. Pulmonary arteries (internal diameter 2 - 3 mm) were isolated from porcine lungs, and loaded with fura-2 /AM, a Ca^{2+} indicator dye. These artery rings were suspended in an organ chamber flooded with physiological salt solution on a microscope stage of a Ca^{2+} imaging spectrofluorimetric system. The light emission ratio of fura-2 for measurement of changes in intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) and the isometric tension of the ring were measured simultaneously. Hypoxia was induced by flooding the reserved chamber with 95% N_2 and 5% CO_2 gas mixture.

3. Hypoxic constriction and increases in $[Ca^{2+}]_i$ were observed in the endothelium-intact rings under precontraction with $10^{-6}M$ noradrenaline. In contrast, there were no hypoxic changes under precontraction with 90mM KCl.

4. In the endothelium-denuded rings which were not relaxed with acetylcholine, hypoxia caused no changes in constriction and $[Ca^{2+}]_i$.

5. Hypoxic vasoconstriction of endothelium-intact rings was abolished by L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthetase.

6. These results suggest that hypoxic constriction of isolated pulmonary artery of porcine lungs is induced partially by inhibition of the release of nitric oxide from the endothelium.

Keywords : Nitric oxide, Endothelium, Hypoxia, Pulmonary artery, Fura-2.

The mechanism of hypoxic constriction in isolated porcine pulmonary arteries : with special reference to the endothelium and nitric oxide

Yu SATO and Yoshiaki KUJI

Department of Dental Anesthesiology.

Division of Functional Oral Neurology,

Graduate School of Dentistry Osaka University

(Chief : Prof . Shigeharu JOH)

緒 言

肺循環では局所の肺酸素分圧が低下すると、それに関連した部分の肺動脈が収縮し、血流をより酸素分圧の高い他の肺胞部分へシフトさせて換気血流比を適切に保ち低酸素血症を防ぐ反応、すなわち低酸素性肺血管収縮 (Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction; 以下 HPV) がみられる。この反応は、低酸素刺激により血管が拡張する体循環とは対照的であり、肺循環に特異的な現象である^{1,2)}。

HPV は歯科麻酔の臨床に用いられる種々の薬剤の影響をうけることが知られている。例えば、揮発性吸入麻酔薬や、高血圧症および狭心症の治療薬である硝酸薬などは、HPV を抑制し、患者の血中酸素分圧の低下を招く可能性が示唆されている³⁾。また慢性閉塞性肺疾患では、この HPV が肺高血圧症の一因となるなど、必ずしも生理的調節反応と位置づけられない面も示唆されている⁴⁾。

このように HPV は生理的反応、病態生理的反応として麻酔臨床において重要な反応であるが、そのメカニズムの本質は未だ明らかにされていない。そこで著者らは、HPV の発現機序の一端を解明する目的で、低酸素状態がブタ肺動脈平滑筋標本 (肺動脈標本) の等尺性張力および細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に及ぼす影響について、以下の順に検討した。

実験 1 では、ノルアドレナリンおよび KCl で収縮した肺動脈標本を低酸素状態として HPV を発生させ、その時の等尺性張力および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ 動態を測定した。

また、現在血管平滑筋の局所性調節因子として一酸化窒素 (NO)^{5,6,7)}、エンドセリンをはじめ、いくつかの収縮および弛緩因子が同定され^{8,9,10)}、HPV との関係が議論されている^{11,12)}。

そこで実験 2 では、まず HPV と内皮細胞の係わりを検討するため、内皮細胞を除去した肺動脈標本をノルアドレナリンを用いて前収縮させながら低酸素状態とし、その時の等尺性張力および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ 動態を測定した。

実験 3 では、HPV における NO の役割を検討するため、NO の特異的合成阻害薬 N⁶-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) を用いて、肺動脈標本に前処置を施し、あらかじめ NO の放出が抑制された状態とし、ノルアドレナリンおよび低酸素刺激による等尺性張力および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ 動態に対する影響を測定した。

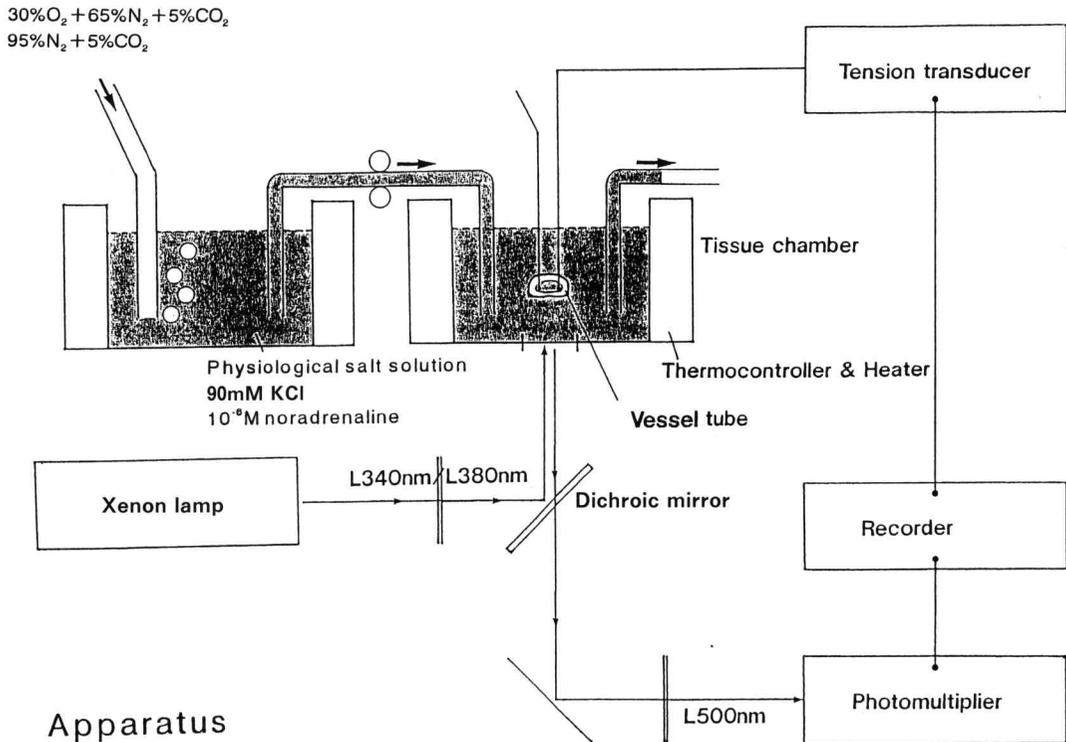
材料と方法

1. 材料の調整 (血管標本の調整法)

屠殺したブタの肺から、直径 2 ~ 3 mm 前後の肺動脈を摘出し、周囲組織を剥離除去した後、長さ 2 ~ 3 mm に切断して肺動脈の輪状標本を作成した。

2. Fura-2 / AM の loading と蛍光観察法 (Fig. 1)

Fura-2 / AM (同仁科学) 30 μ M, 0.01% Pluronic F-127 (BASF) を溶解した physiological salt solution (normal-PSS) に肺動脈標本を入れ、暗所、恒温 (約 37°C) にて約 2 時間振盪した。なお normal-PSS の組成は、140mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 2.5mM MgCl₂, 11.1mM glucose, 3.0 mM 4 - (2 -hydroxy -ethyl) - 1 - piperazine-ethane sulfonic acid (HEPES, 同仁化学) とした。肺動脈標本の血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ (複数細胞) の観察は、Fura-2 / AM を loading した肺動脈標本を、細胞内カルシウムイオン測定装置 (CAF-230 日本分光社製) の恒温槽内 (容量 0.4ml) に浸漬して行った。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介して標本に照射することにより、二波長励起を行い、これによって組織から発する蛍光を 500nm のフィルターを介して光電子倍增管に導いた。340nm と 380nm 励起蛍光強度を測定し、その蛍光強度比 (340nm / 380nm) を求め、血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ の指標とした^{13,14,15)}。



Apparatus

Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus.

The vascular ring was mounted on two tungsten hooks, one of which was attached to the arm of a force displacement transducer.

Two wavelengths of excitation light (340nm and 380nm) were obtained from a xenon lamp source. Surface fluorescence of the ring was introduced into a photomultiplier through a 500nm band pass filter.

また、蛍光強度比はレコーダー（FBR-253A 東亜電波工業）にて記録した。

3. 等尺性収縮の測定法 (Fig. 1)

肺動脈標本の等尺性収縮の測定は、細胞内カルシウムイオン測定装置の恒温槽内で、肺動脈標本の一端をマニピレーター（M-152, ナリシゲ）に固定し、他端をタングステンワイヤーを介した張力トランスジューサ（UL-2 GR, ミネベア）に固定し、増幅ユニット（CARRIER AMPLIFIER AVP-11日本光電）を介してレコーダー（FBR-253A 東亜電波工業）にて記録した。

4. 灌流液の酸素分圧調整

肺動脈標本を2種類の酸素分圧下に維持するため、肺動脈標本が設置された恒温槽を灌流させる PSS と90mMKCl 溶液（高 KCl 溶液）に

ついて高酸素分圧と低酸素分圧に、以下のようにして調整した。高酸素分圧を有する PSS（高酸素 PSS）および高 KCl 溶液（高酸素高 KCl 溶液）はガラス瓶中の PSS および KCl 溶液中に30%O₂, 5%CO₂ および65%N₂ で通気し作成した（高酸素分圧溶液）。一方低い酸素分圧を有する PSS（低酸素 PSS）および高 KCl 溶液（低酸素高 KCl 溶液）は、95%N₂, 5%CO₂ を通気し、作成した（低酸素分圧溶液）。なお90mMKCl 溶液（高 KCl 溶液）は、PSS の NaCl と KCl（和光純薬）を等モル量置換して作製した。

5. 各実験の条件

実験1：肺動脈標本の等尺性張力と血管平滑筋 [Ca²⁺]_i におよぼすノルアドレナリンまたは KCl の影響と、その後の低酸素分圧の影響

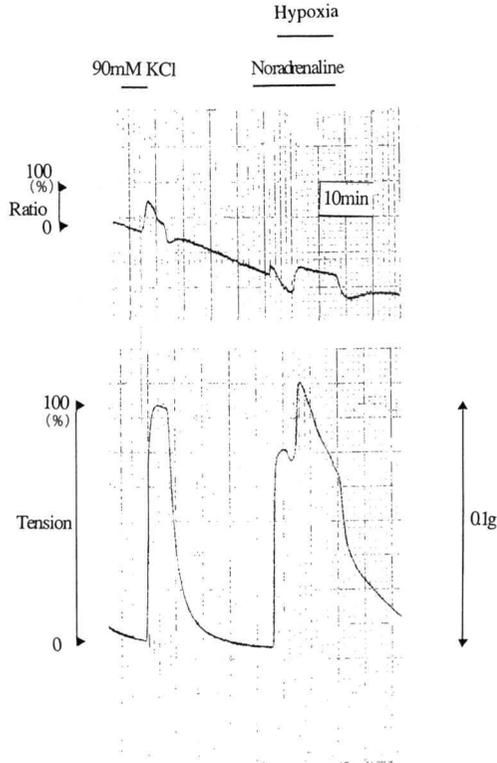


Fig. 2. Representative recordings of responses to hypoxia precontracted with noradrenaline. Noradrenaline induced increases in tension and $[Ca^{2+}]_i$. Hypoxia induced further increases in tension and $[Ca^{2+}]_i$.

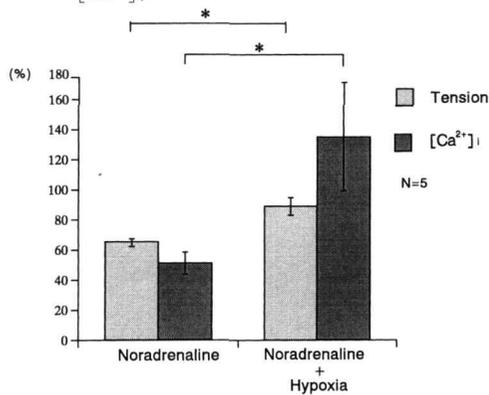


Fig. 3. Changes in tension and $[Ca^{2+}]_i$ by noradrenaline and hypoxia. Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement. Data are presented as mean \pm S.E.M. N represents number of vascular rings. * $p < 0.05$ compared with values induced by noradrenaline

Table 1. Changes in tension and $[Ca^{2+}]_i$ by noradrenaline and hypoxia

N = 5		
Condition	Tension	$[Ca^{2+}]_i$
Noradrenaline	64.60 \pm 2.70	50.82 \pm 7.26
Noradrenaline + Hypoxia	88.69 \pm 5.92*	134.78 \pm 35.84*

(Po_2 at the hypoxia : 47.6 \pm 5.2mmHg)

Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement.

Data are represented as mean \pm S.E.M.

N represents number of vascular rings.

* $P < 0.05$ compared with values induced by noradrenaline

①各標本の基準値の測定

Fura-2 /AM を loading した肺動脈標本を、細胞内カルシウムイオン測定装置恒温槽内 (容量0.4ml) に浸漬し、静止張力1.0g を負荷して高酸素 PSS を約30分間灌流した。実験開始に際し、全ての標本に対して高酸素高 KCl 溶液を約10分間灌流し、生じた等尺性張力および蛍光強度比の最大変化値を測定した。そして、その値を各々の標本の基準値 (100%) とした。その後、高酸素 PSS を約20分から30分間灌流し、等尺性収縮張力および蛍光強度比が基準値測定前の状態に回復安定してから、以下の実験をおこなった。

②測定条件

高酸素 PSS に $10^{-6}M$ ノルアドレナリンを加え、これによって肺動脈標本に生じた等尺性張力の最大変化値と、等尺性張力が最大変化値を示す時の蛍光強度比を測定した。引き続きノルアドレナリンを加えながら高酸素 PSS を低酸素 PSS に切り換え、5分後の等尺性張力および蛍光強度比を測定した (Fig. 2, 3, Table 1)。

KCl についても同様に、高酸素高 KCl 溶液を灌流して肺動脈標本に生じた等尺性張力の最大値と蛍光強度比を測定した。その後、低酸素高 KCl 溶液を灌流し、5分後の等尺性収縮張力および蛍光強度比を測定した (Fig. 4, 5, Table 2)。

実験 2 : 内皮細胞除去肺動脈標本の等尺性張力と血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす、ノルアドレ

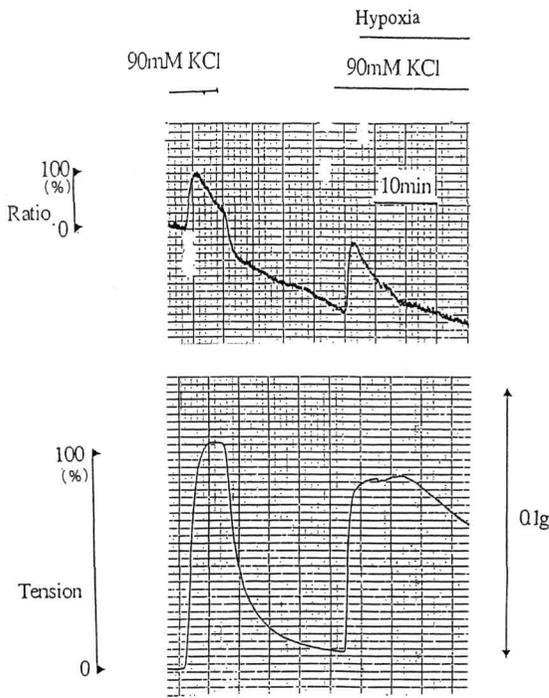


Fig. 4. Representative recordings of responses to hypoxia precontracted with 90mM KCl. 90mM KCl induced increases in tension and $[Ca^{2+}]_i$. Hypoxia induced no change in tension nor $[Ca^{2+}]_i$ either.

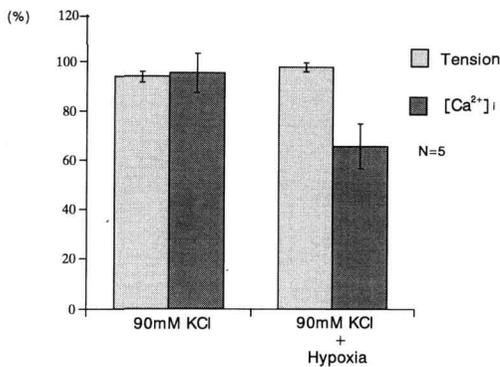


Fig. 5. Changes in tension and $[Ca^{2+}]_i$ by 90mM KCl and hypoxia. Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement. Data are presented as mean \pm S.E.M. N represents number of vascular rings. There was no significant difference in tension or $[Ca^{2+}]_i$ either between 90mM KCl induced precontraction and hypoxia.

Table 2 Changes in tension and $[Ca^{2+}]_i$ by 90 mM KCl and hypoxia

N=5		
Condition	Tension	$[Ca^{2+}]_i$
90mM KCl	93.62 \pm 2.20	95.26 \pm 7.79
90mM KCl + Hypoxia	97.41 \pm 1.96	65.78 \pm 9.15

(P_{O_2} at the hypoxia : 51.1 \pm 4.5mmHg)

The values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement. Data are represented as mean \pm S.E.M. N represents number of vascular rings. There was no significant difference in tension or $[Ca^{2+}]_i$ either between 90mM KCl induced precontraction and hypoxia.

ナリンと低酸素分圧の影響

①血管標本の作製

実験 1 に準じて作製したブタ肺動脈標本の内面 (血管腔側) をピンセットで搔爬し, 血管内皮細胞を除去した。内皮細胞除去の確認にはアセチルコリンを用いた。アセチルコリンは血管平滑筋に対し直接的には収縮作用を示すが, 内皮が存在する場合, 内皮細胞に作用し NO を放出させ血管を弛緩させる⁸⁾。よってアセチルコリンに対して弛緩反応を示さない標本を実験に供した。この肺動脈標本に対し蛍光カルシウム指示薬 Fura-2 /AM を loading した。

②測定条件

各肺動脈標本において, 高酸素高 KCl 溶液にて基準値 (100%) を測定した後, 高酸素分圧下にて 10^{-6} M ノルアドレナリンを加え, これによって肺動脈標本に生じた等尺性張力の最大値およびこのときの蛍光強度比を測定した。引き続き酸素分圧を低下させ, 5 分後の等尺性張力および蛍光強度比を測定した (Fig. 6, 7, Table 3)。

実験 3 : 肺動脈標本の低酸素性反応に及ぼす L-NAME の影響

①測定条件

高酸素高 KCl 溶液を用いて基準値 (100%) を測定した後, 10^{-6} M ノルアドレナリン添加高酸素 PSS を灌流し, これによって生じた等尺性収縮張力の最大値およびこのときの蛍光強度

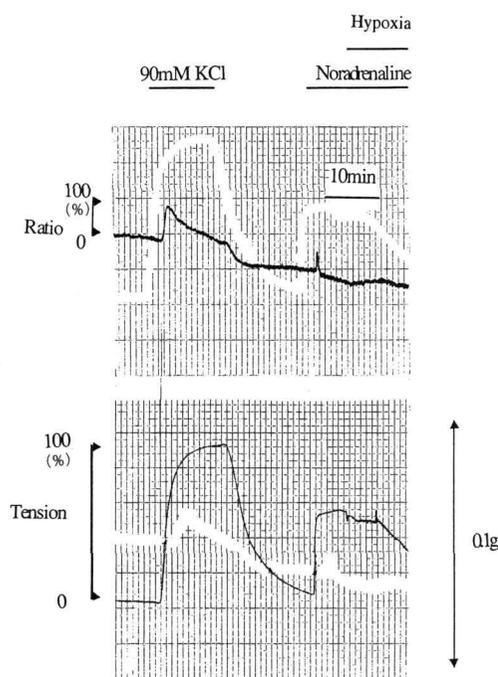


Fig. 6. Representative recordings of the response to hypoxia in the endothelium-denuded pulmonary artery rings. Hypoxia induced no response in tension or $[Ca^{2+}]_i$ in the endothelium-denuded rings.

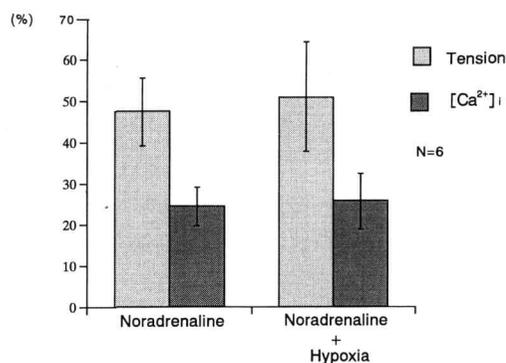


Fig. 7. Tension and $[Ca^{2+}]_i$ under hypoxia in endothelium-denuded rings. Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement. Data are presented as mean \pm S.E.M. N represents number of vascular rings. There was no significant difference in tension or $[Ca^{2+}]_i$ either between noradrenaline induced precontraction and hypoxia.

Table 3 Tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by hypoxia in endothelium-denuded rings

N=6		
Condition	Tension	$[Ca^{2+}]_i$
Noradrenaline	47.32 \pm 8.21	24.33 \pm 4.67
Noradrenaline + Hypoxia	50.83 \pm 13.14	25.62 \pm 6.87

(P_{O_2} at the hypoxia : 46.7 \pm 8.2mmHg)

The values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement. Data are represented as mean \pm S.E.M. N represents number of vascular rings. There was no significant difference in tension or $[Ca^{2+}]_i$ either between noradrenaline induced precontraction and hypoxia.

比を測定した。引き続き酸素分圧を低下させ、生じた5分後の等尺性張力および蛍光強度比を測定した。次に灌流液を高酸素PSSに戻して、等尺性張力および蛍光強度比が基準値に復位した後、今度はL-NAME ($1 \times 10^{-5}M$)を投与してから、再び $10^{-6}M$ ノルアドレナリン添加高酸素PSSを灌流、このときの等尺性張力および蛍光強度比の最大変化値を測定、引き続き酸素分圧を低下させ、5分後の等尺性張力および蛍光強度比を測定した (Fig. 8, 9, Table 4)。

6. 統計処理法

統計処理には正規性の検定, 異常データの検出 (棄却検定), 等分散の検定, 平均値の有意差検定 (F検定) をおこなった。

結 果

実験 1

高酸素分圧下では、ノルアドレナリンの刺激により、等尺性張力、蛍光強度比ともに増加した。それに引き続き酸素分圧を低下させると、等尺性張力および蛍光強度比はさらに増加した (Fig. 2, 3, Table 1)。

高酸素分圧下ではKCl刺激により、収縮張力、蛍光強度比ともに増加した。引き続き酸素分圧を低下させても等尺性張力、蛍光強度比のいずれにも有意な変化はみられなかった (Fig. 4, 5, Table 2)。

実験 2

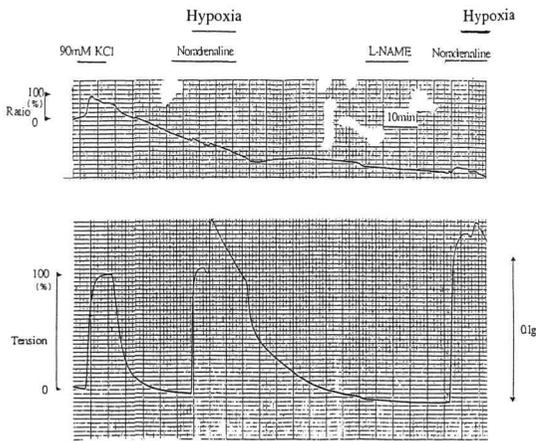


Fig. 8. Representative recordings of the response to hypoxia before and after treatment with L-NAME. The first application of hypoxia before treatment of L-NAME induced increases in tension and $[Ca^{2+}]_i$. The second application of hypoxia after treatment with L-NAME induced no response.

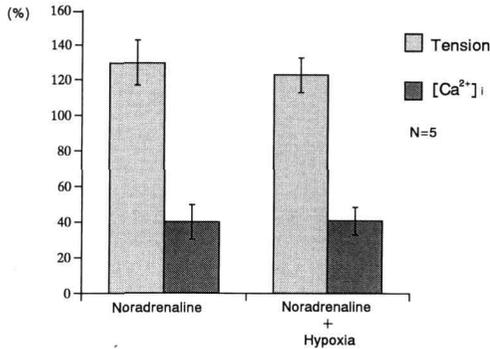


Fig. 9. Changes in tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by hypoxia after treatment of L-NAME. Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement. Data are presented as mean \pm S.E.M. N represents number of vascular rings. After treatment of L-NAME, there was no significant difference in tension or $[Ca^{2+}]_i$ either between noradrenaline induced precontraction and hypoxia.

Table 4 Changes in tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by hypoxia after treatment of L-NAME

N=5		
Condition	Tension	$[Ca^{2+}]_i$
Noradrenaline	129.64 \pm 12.62	39.77 \pm 9.62
Noradrenaline + Hypoxia	123.07 \pm 9.59	40.59 \pm 7.98

(P_{O_2} at the hypoxia : 48.4 \pm 3.8mmHg)

The values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl before the start of each measurement. Data are represented as mean \pm S.E.M. N represents number of vascular rings. There was no significant difference in tension or $[Ca^{2+}]_i$ either between noradrenaline induced precontraction and hypoxia after treatment of L-NAME.

内皮除去肺動脈では、高酸素分圧下でのノルアドレナリン刺激により、等尺性張力と蛍光強度比はともに増加した。ひき続き、酸素分圧を低下させても、等尺性張力および蛍光強度比に、高酸素分圧下の変化との有意な差異はみられなかった (Fig. 6, 7, Table 3)。

実験 3

高酸素分圧下でのノルアドレナリン投与により、肺動脈の等尺性張力および蛍光強度比はともに増加した。引き続き酸素分圧を低下させることにより、等尺性張力および蛍光強度比はさらに増加した。

L-NAME によって前処置した後、高酸素分圧下で 10^{-6} M ノルアドレナリン投与を加えたところ、等尺性張力は、急激に増加し、L-NAME 処置前のノルアドレナリンによる張力より増加した。しかし、それに続いて酸素分圧を低下させたところ、等尺性張力および蛍光強度比ともに変化はなかった (Fig. 8, 9, Table 4)。

考 察

1. 細胞内カルシウムイオン濃度測定法

血管平滑筋の収縮をはじめ、多くの細胞機能は、細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化によって制御・調節されている。特に血管平滑筋の収縮と血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ の関係については、1980年以降 Grynkiewicz と Tsien らによって Fura-2 を代表とする各種蛍光カルシ

ウム指示薬が開発され¹⁶⁾, 収縮張力と血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ を同時測定することが可能となったことから, 徐々に明らかにされてきた。本実験では蛍光指示薬として, この Fura-2 を用いた。Fura-2 による血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ の絶対量の測定は, 蛍光強度比 (340nm/380nm) および Fura-2 とカルシウムの解離定数を基に計算される。しかし, 細胞内で Fura-2 が蛋白質と結合し, カルシウムの解離定数が大幅に増加することが近年明らかとなり, 血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ の絶対量の測定は困難と考えられるため¹⁷⁾, 実験の開始時に各々の標本に高濃度 KCl を投与し, その際発生する蛍光強度比の変化を基準値 (100%) とし, 血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ の変化はこれに対する相対的な量として評価されることが多い。本実験においても同様の方法をとった。

2. 実験材料

本研究では, 屠殺したブタの肺動脈を材料として用いている。全身麻酔下で実験試料を摘出する方法と異なり, 材料は全身麻酔薬の影響を受けないことが利点と考えられる。

また, 材料の大きさは直径 2~3mm のものを用いた。これまでの HPV に関する研究では, イヌ, ネコ, ウサギ, ネズミ, ブタなどが用いられている^{18,19)}。HPV は哺乳類に共通した現象であるものの, M. D. Peake ら¹⁹⁾ は, 吸入酸素分圧と肺動脈圧の関係は動物種によって異なることを報告している。ブタでは吸入酸素分圧を 200mmHg から徐々に小さくしていくと 200mmHg から 100mmHg の間に徐々に肺動脈圧が上昇し, 100mmHg から 50mmHg の間で急激な上昇を示し, 50mmHg 時点で最も上昇した状態となる。しかし, さらに吸入酸素分圧を低下させると, 肺動脈圧はむしろ低下していくといわれている¹⁹⁾。本実験の予備実験においても, 灌流 PSS の酸素分圧が 50mmHg 前後のところで, 顕著な HPV がみられたことから, 本実験も低酸素分圧状態をこの条件に設定した。また高酸素状態は, 高酸素分圧刺激の影響をさけるため, 150mmHg 前後に設定した。従来 HPV は直径 200 μ m 前

後の細動脈で発現すると考えられてきた^{20,21)}。

この部位では解剖学的に血管が肺泡と最も接近しており, 肺泡内の低酸素状態の影響が血管に直接反映するといわれている。しかし, 最近になり Yuan ら²²⁾ は, ラットを用いた実験で, 主肺動脈と直径 500 μ m 以下の細動脈を比較し, 感受性の違いはあるものの, どちらにおいても HPV が発現することを報告している。本実験では, 肺動脈の血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ 変化と同時に等尺性張力をも測定するため, この実験系で測定可能と思われる直径 2~3mm の肺動脈輪状標本を用いたが, 酸素分圧 50mmHg で HPV がみられたことから, ブタ肺動脈においても, 比較的太い肺動脈で, HPV が発生することがわかった。

3. HPV の発現機序

著者らの予備実験では, 低酸素状態のみでは肺動脈リングの発生張力および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ になら変化はみられなかった。

Podman ら²³⁾の研究によれば, 標本を単に低酸素状態にしても HPV は発現しないが, ノルアドレナリンやアンギオテンシン II, フェニレフリンなどで前収縮させた状態では HPV が発現し, とりわけノルアドレナリンによる前収縮で, 最も大きな HPV を観察している。彼等は, この前収縮は平滑筋を resting state から activated state に変えるものであると考察している。

また Ronald ら²⁴⁾ は, ノルアドレナリンやフェニレフリンによる前収縮と比較し, KCl の前収縮による HPV は明らかに小さいことを報告している。

本実験では, 最も大きな HPV 反応を誘発できる受容体刺激薬のノルアドレナリン, および脱分極性刺激薬である高濃度 KCl を用いて肺動脈標本を前収縮させ, その後の低酸素状態で HPV 反応を再現した。ノルアドレナリンによる血管平滑筋の収縮は受容体刺激によるものであり, 受容体活性によって受容体依存性カルシウムチャネル (receptor operated channel: 以下 ROC) を介した細胞外カルシウムイオン

の流入、ひいては血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を引き起こす。また GTP 結合蛋白を介し、ホスホリパーゼ C を活性化して、イノシトール-1, 4, 5-三リン酸 (IP_3) および 1, 2-ジアシルグリセロール (DG) を産生する。この IP_3 は、小胞体の IP_3 受容体に作用して、小胞体からのカルシウムイオン放出を惹起する。一方 DG は、C キナーゼを活性化し、収縮蛋白のカルシウムイオン感受性を増大する^{25, 26, 27)}。これに対して KCl による血管平滑筋の収縮は脱分極性刺激によるものであり、細胞膜の電位依存性カルシウムチャネル (potential dependent channel: PDC) を介して細胞外カルシウムイオン流入を誘発して $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる²⁸⁾。実験 1 では、ノルアドレナリン前収縮後の低酸素状態で、肺動脈にさらなる収縮および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をみたが、高 KCl 溶液前収縮後の低酸素状態では、収縮および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をみなかった。したがって HPV の発生には、受容体反応に特有の経路、言い替えば ROC, あるいは IP_3 を介するいずれかの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機構の関与、および DG を介する収縮蛋白の感受性の増大が考えられた。

近年内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor; 以後 EDRF) の発見や、NO の同定、さらには血管内皮由来収縮因子 (endothelium-derived contracting factor; 以後 EDCF) としてのエンドセリン発見など、血管内皮細胞由来で血管平滑筋に作用する生理活性物質の存在が明らかとなってきた^{8, 9, 10)}。そこで著者は、実験 2 で、ブタ肺動脈の低酸素性収縮と、内皮細胞の関係を検討する目的で、内皮細胞除去標本を用いて実験 1 と同様の方法を試みた。内皮細胞除去標本においては、低酸素状態での張力および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はみられなかった。この結果より、低酸素性収縮に内皮細胞の関与が不可欠であると考えられた。また、実験 2 では実験 1 と比較して 90mM KCl とノルアドレナリンに対する反応が低下している。内皮細胞を除去したことにより各種 EDCF の影響を受けなくなっ

たととも考えられるが、この実験からはその原因は不明である。

現在、EDCF としてエンドセリン、アンギオテンシン II, 酸素ラジカル, トロンボキサン A_2 などが同定されているが^{8, 9, 10)}、これら収縮因子の阻害薬を投与した状態でも HPV の発現は抑制されないことから HPV と EDCF との関係は否定的である¹¹⁾。一方、EDRF としては、NO とプロスタサイクリンが同定されている²⁹⁾。このうち、NO が L-アルギニンと酸素を基質として合成されることから¹²⁾、低酸素状態と、NO 合成の關係に着目し、HPV が NO の放出抑制の結果としての収縮反応である可能性を検討することとした。NO は、強力な血管弛緩物質であり、グアニルサイクラーゼを活性化し、細胞質中のサイクリック GMP (cyclic GMP: 以下 cGMP) を増加して cGMP 依存性蛋白質リン酸化酵素 (cyclic GMP dependent kinase: 以下 G-kinase) を活性化する。これにより PDC 抑制と細胞内貯蔵部位へのカルシウムイオン取り込みが促進され、結果的に血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ が減少する。また、cGMP は PI 代謝回転を抑制し、収縮蛋白のカルシウム感受性を低下させる^{30, 31)}。

実験 3 では、ノルアドレナリン前収縮後の低酸素刺激で収縮を示すことを確認した肺動脈標本に、L-NAME の前処置を行った。L-NAME は、L-アルギニンと競合するため、血管内皮から持続的に放出されている NO³²⁾ を特異的に阻害する。

L-NAME にて前処置した標本は、ノルアドレナリン刺激時、収縮と $[Ca^{2+}]_i$ の増加を示した。しかしながら、実験 1 でのノルアドレナリン刺激中の低酸素刺激での $[Ca^{2+}]_i$ 変化と比較すると、L-NAME 前処置後のノルアドレナリンによる $[Ca^{2+}]_i$ の増加は少なかった。その理由としては、L-NAME 前処置の開始から約 20 分の間に、内皮由来過分極因子や、その他の EDRF など、不特定の要因が、NO の減少ひいては $[Ca^{2+}]_i$ の増加を代償する形で $[Ca^{2+}]_i$ を減少させる方向に作用していた可能性が考えら

れた。しかし、収縮力については、NOによる強力な平滑筋収縮蛋白のカルシウム感受性低下が阻害されていたため、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加が小さくとも、より大きな収縮力の増大を招いたものと考えられる。

実験3では、L-NAME前処置によってNOが減少した状態にあり、低酸素刺激でさらなる収縮と $[Ca^{2+}]_i$ の増大が観察されれば、HPV発生はNO以外の因子によると考えることができる。しかし低酸素刺激は、収縮と $[Ca^{2+}]_i$ にさらなる変化を引き起こさなかったことから、NOがHPV発生の一要因であることが示唆された。

結 語

低酸素性肺血管収縮の機序を検討するため、ブタ肺動脈を用いて低酸素状態の等尺性張力および血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を同時測定した。

低酸素性肺血管収縮は、NO産生の抑制が関与する収縮反応であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、終始ご懇篤なる指導、校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座 城 茂治教授に深甚なる謝意を表します。また、懇切なるご鞭撻を賜りました岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座 佐藤雅仁講師に深謝致します。本研究の遂行に際し、ご協力いただきました岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座医局員各位に厚く感謝いたします。

本研究の要旨は、第41回日本麻酔学会総会(1994年、東京)、第42回日本麻酔学会総会(1995年、静岡)、第23回岩手医科大学歯学会総会(1997年、盛岡)にて発表した。

参 考 文 献

- 1) Alfred F: Hypoxia on the pulmonary circulation. *Circulation Research* 38 : 221-231, 1976.
- 2) 石崎武志, 飴島慎吾, 佐々木文彦: 低酸素性肺血管収縮, 呼吸, 17 : 1170-1182, 1998.
- 3) Marshall, BE., Wyche, MQ.: Hypoxemia during and after anesthesia. *Anesthesiology* 37 : 178-209, 1972.
- 4) Weir EK., Archer, SL., Post, JM., Chester, E., Hume, JR.: 急性低酸素肺血管収縮の機序, 呼吸, 12 : 944-955, 1993.
- 5) 三浦 傳: 血管内皮細胞, 医学のあゆみ, 170 : 315-318, 1994.
- 6) Roger J: Endothelium, Anesthetics, and vascular control. *Anesthesiology* 79 : 1381-1391, 1993.
- 7) Zeliko J: Ion channels in vascular smooth muscle. *Anesthesiology* 79 : 1392-1401, 1993.
- 8) Furchgott, RF., Zawadzki, JV.: The obligatory role of endothelial cells in the regulation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373, 1980.
- 9) Palmer, RMJ., Ferrige, AG., Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524, 1987.
- 10) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 : 411-415, 1988.
- 11) 岡村富夫, 戸田 昇: 血管内皮由来収縮因子, 血管と内皮, 2 : 396-402, 1992.
- 12) 上野修一, 佐野 輝: 内因性NO合成酵素阻害物質, 血管と内皮, 特別: 69-74.
- 13) 佐藤健一: ブタ舌動脈平滑筋におけるアドレナリン収縮機序の検討, 日歯麻誌, 25 : 398-409, 1997.
- 14) 佐藤雅仁: ブタ気管支平滑筋の収縮および細胞内 Ca^{2+} 動態におよぼすハロセンの影響, 岩医大歯誌, 20 : 299-311, 1995.
- 15) 佐藤雅仁, 久慈昭慶, 鹿内理香, 佐藤 裕, 佐藤健一, 坂本 望, 城 茂治: ブタ気管支平滑筋の収縮および細胞内 Ca^{2+} 濃度に対するカフェイン的作用, 岩医大歯誌, 19 : 75-83, 1994.
- 16) Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol.Chem.* 260 : 3440-3450, 1985.
- 17) Konisi, M., Olson, A., Hollingworth, S., Baylor, SM.: Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.* 54 : 1089-1104, 1988.
- 18) Euler, von, US., Lilijestrand, G.: Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 12 : 301-320, 1946.
- 19) Peake, M D., Harabin, A L., Brennan, N J., and Sylmester J T.: Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J. Appl. Physiol.* 59 : 1214-1219, 1981.
- 20) Weir, EK., Mcurmury, IF., Tucker, A. : Prosta-

- glandin synthetase inhibitors do not decrease hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Appl. Physiol.* 41 : 714, 1976.
- 21) Voelkel, NF.: Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133 : 1186, 1986.
- 22) Xiao-jian, Yuan., Mary, L. Tod., Lewis, J. Rubin., Mordecari, P. Blaustein.: Contracting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *American Journal of Physiology* 259 : 281-289, 1990.
- 23) Dabit, M. Rodman., Takashi, Yamaguchi., Richard, F. Obrien., Ivan, F. Mcmurtry.: Hypoxic contraction of isolated rat pulmonary artery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 248 : 952-959, 1989.
- 24) Ronald, F. Coburn., Bill, Grubb., Randy, D. Aronson.: Effect of cyanide on oxygen tension-dependent mechanical tension in rabbit aorta. *Circulation Research* 44 : 368-378, 1982.
- 25) 飯野正光：細胞内 Ca^{2+} 放出機構研究の新局面, 生体の科学, 44 : 192-197, 1993.
- 26) 唐木英明：ミオシンの磷酸化機構と平滑筋の Ca^{2+} 感受性の変化, 生体の科学, 44 : 198-205, 1993.
- 27) 田中利男, 中 充子, 三野照正：平滑筋収縮蛋白質のカルシウム感受性制御機構, 生体の科学, 44 : 206-214, 1993.
- 28) 唐木英明：細胞内カルシウム量, カルシウム感受性と血管収縮, *Mebio.* 9 : 84-89, 1992.
- 29) 大橋俊夫, 河合康明, 松木孝道：EDRF と脈管作動物質, 血管と内皮, 2 : 345-352, 1992.
- 30) 唐木英明：NO と血管平滑筋機能の調節, 医学の歩み, 170 : 329-334, 1994.
- 31) 的場哲哉, 下川宏明：NO と EDHF, 循環器科, 44 : 293-299, 1998.
- 32) 渡辺 亨, 梅 博久, 大谷信夫：低酸素性肺血管攣縮-内因性 NO の役割と吸入 NO の効果, 金医大誌, 22 : 26-34, 1997.