3. 血管作動物質の動脈硬化血管における反応性

横山 光宏¹⁾ 栗野 孝次郎¹⁾ 秋田 穂東¹⁾
福崎 恒¹⁾ 渡辺 嘉雄²⁾

神戸大学医学部 第一内科¹⁾, 同 動物実験施設²⁾

Altered Responsiveness of Atherosclerotic Arteries to Vasoactive Substances

Mitsuhiro YOKOYAMA,¹⁾ Kojiro AWANO,¹⁾ Hozuka AKITA,¹⁾
Hisashi FUKUZAKI¹⁾ and Yoshio WATANABE²⁾

*First Department of Medicine¹⁾ and Institute for Experimental Animals,²⁾
Kobe University School of Medicine, Kobe*

Summary

The interactions between platelets and vascular walls have special significance for atherosclerotic heart disease. The aims of this study were to determine whether atherosclerosis is associated with altered vascular reactivity to aggregating platelets and to elucidate the responsible underlying mechanisms. Isolated helical strips of aortae and coronary arteries from age-matched control and Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits (WHHL rabbits) (average age = 10 months for aortic study and 22 months for coronary study) were mounted for isometric tension recording in oxygenated buffer. All the segments of aortae and coronary arteries from WHHL rabbits showed atherosclerotic lesions macroscopically. Cumulative additions of suspended platelets (10^4 – 3×10^6 /μl) activated with thrombin into the organ bath resulted in platelet count-related aortic contractions. The maximum serotonin (5HT) and thromboxane (TX) B_2 concentration in the bath solution averaged 148 ng/ml and 24 ng/ml. Contractile responses of atherosclerotic aortae to aggregating platelets were markedly augmented as compared to controls. An incubation of platelets with aspirin, which completely inhibited TX A_2 synthesis without any alterations of 5HT release, did not attenuate hyperreactivity of atherosclerotic aortae compared to controls. Prior exposure to phentolamine or diphenhydramine also did not alter contractile responses to aggregating platelets. The treatment of aortic strips with methysergide inhibited responses to aggregating platelets in both atherosclerotic and control groups, indicating a serotonergic mechanism of its hyperreactivity. To further elucidate its responsible mechanism, contractile responses to exogenously administered 5HT, histamine and TX A_2 were examined in aortic strips from control and WHHL rabbits. Responsiveness of atherosclerotic aortae to 5HT was significantly augmented compared to controls. There were no differences in the responses to histamine between two groups. Atherosclerotic aortae exhibited impaired responses to TX A_2 prepared by incubation of PG H_2 with calf platelet microsomes or ST A_2 , a stable TX-like analogue, as compared to controls. These results also can help to explain the mechanisms responsible for hyperreactivity of atherosclerotic aortae to aggregating platelets.

In addition, atherosclerotic coronary arteries exhibited a markedly enhanced reactivity to aggregating platelets and 5HT.

結 言

冠動脈攣縮は異型狭心症を含む種々の虚血性心疾患の病因として重視されているが、その発症機序はまだ

明らかでない。われわれは多くの臨床観察に基づき、冠動脈攣縮の原因として最も重要なのは血管自体の収縮反応の亢進であって、この異常反応に動脈硬化の

Fig.1. Concentration-response relations for ergonovine in aortic strips. Vertical bars indicate SEM.

初期病変が関与しているとの仮説を立て、種々の血管作働物質に対する動脈硬化血管の反応性を検討してきた^{1,2)}。実際、動脈硬化に陥った動脈の収縮性は低下するものと従前から考えられていたのに反し、臨床冠動脈攣縮誘発試験に頻用されている ergonovine に対して動脈硬化大動脈と冠動脈は健康血管に比べて著明な収縮反応の亢進を示し、この反応性の亢進はセロトニン受容体機序によることを明らかにした (Fig. 1, Table I³⁾)。一方、動脈硬化血管の phenylephrine や KCl に対する反応性には差異を認めなかった。動脈硬化のモデル動物として、最初高コレステロール食飼育家兎の大動脈を使用した⁴⁾が、本モデルの最大の欠点は易病性に個体によるばらつきが大きく、大動脈における動脈硬化病変の分布と程度も一様でなく、しかも冠動脈病変の発生がきわめて稀である点にある。この意味で、WHHL rabbits は動脈硬化のモデル動物として最適と思われる⁵⁻⁷⁾。

血小板は thrombin, collagen, ADP 等によって活性化され、凝集反応が惹起され、強力な血管収縮物質である serotonin や thromboxane (TX) A₂ 等の生理活性物質が放出される。種々の虚血性心疾患患者において血小板凝集反応の亢進や血小板由来の血小板第4因子、 β -thromboglobulin, TX A₂ などの血中増加が報告されている^{8,9)}。本研究では血小板活性化によって惹起される血管収縮機序を検討し、WHHL rabbits から摘出した大動脈と冠動脈の血小板活性化による収縮効果の変化につき調べた。

方 法

WHHL rabbits と正常家兎 (いずれも月齢10カ月) を用いて実験を行った。Pentobarbital sodium (30

mg/kg, i.v.) 麻酔後、胸部大動脈と一部の実験では月齢20カ月の正常および WHHL rabbits の冠動脈を摘出し、ラセン条片を作製した。血管条片を30mlの Krebs-Henseleit 溶液で満たした tissue bath 中に懸垂固定し、等尺性収縮力を測定した。Tissue bath 中の栄養液は95% O₂ と5% CO₂ の混合ガスで通気され、pH は7.38、温度は37°C に保たれた。適当な preload を与え、2時間にわたり stress relaxation を観察し、まず20mM KCl に対する血管反応性を調べたのち、実験に用いた。

正常家兎の大動脈より ACD 採血し、Ardlie らの方法に従って洗浄血小板浮遊液を作製後、血小板数を計測し、 $10^4 \sim 3 \times 10^6 / \mu\text{l}$ の血小板浮遊液を作製した¹⁰⁾。次に各濃度の洗浄血小板浮遊液を37°C、5分間 incubate したのち、0.2 U/ml thrombin で1分間刺激し、その0.3mlを直接30mlの tissue bath 中に順次加え、収縮反応を調べた。次に、5-hydroxytryptamine (5 HT) と TX A₂ の作用を分離する目的で、5 HT antagonists として methysergide (0.3 μM) で血管を処理したのち、thrombin 刺激血小板に対する収縮反応を調べた。TX A₂ 産生阻害の目的で、血小板を aspirin (0.5 mM) 処理したのち、thrombin 刺激し、tissue bath 中に加え、収縮反応を調べた。最後に、tissue bath 中の5 HT, TX B₂, norepinephrine (NE), histamine の濃度を調べた。

次に、外因性に投与した5 HT と TX A₂ に対する濃度-反応関係を WHHL rabbits と正常家兎の大動脈ラセン条片を用いて検討した。TX A₂ は prostaglandin (PG) H₂ ($10^{-8} \sim 10^{-4}$ M) と牛血小板 microsome (2 mg protein/ml) を反応させることにより作成するか、または安定な TX A₂ analogue である ST A₂ ($10^{-12} \sim 10^{-7}$ M) を用いた。

結 果

本実験に用いた WHHL rabbits の大動脈と冠動脈は全例肉眼的に粥状硬化病変を認めた。

正常家兎の大動脈は thrombin 刺激血小板によって血小板数に依存して収縮反応を生じた (Fig. 2)。WHHL rabbits の大動脈では血小板活性化によって生じる収縮反応は著しく亢進していた。一方、20mM KCl による収縮は両群の血管でまったく差異を認めなかった。血小板添加後の tissue bath 中の5 HT, TX B₂, histamine, NE 濃度はおのおの 148 ± 11 ng/ml, 24 ± 2 ng/ml, 16 ± 2 $\mu\text{g/dl}$, 測定閾値以下であった。Aspirin 前処理血小板に対しても動脈硬化大動脈

Table I
Threshold concentrations, ED₅₀ values, and maximum responses in arterial strips from normal and WHHL rabbits.

	Ergonovine		Phenylephrine		Test contraction with 20 mM KCl
	Threshold	ED ₅₀ Max cont	Threshold	ED ₅₀ Max cont	
Aorta					
C	(3.7±0.9) × 10 ⁻⁷ M	(2.7±0.4) × 10 ⁻⁶ M n = 10	(7.7±2.7) × 10 ⁻⁸ M	(5.0±0.8) × 10 ⁻⁷ M n = 8	239 ± 20 (mg/CSA) n = 8 (mg/CSA)
W	(3.6±1.0) × 10 ⁻¹⁰ M* ¹	(8.4±1.6) × 10 ⁻⁷ M* ² n = 10	(2.5±0.7) × 10 ⁻⁸ M	(5.9±0.7) × 10 ⁻⁷ M n = 8	237 ± 19 (mg/CSA) n = 8 (mg/CSA)
Coronary					
C	(7.2±0.6) × 10 ⁻¹⁰ M	(3.0±1.1) × 10 ⁻⁸ M n = 9	(2.4±1.1) × 10 ⁻⁶ M	(4.3±0.4) × 10 ⁻⁵ M n = 8	137 ± 25 (mg) n = 8 (mg)
W	(5.9±1.4) × 10 ⁻¹¹ M* ¹	(9.3±2.4) × 10 ⁻⁹ M* ⁴ n = 9	(5.3±1.3) × 10 ⁻⁶ M	(4.6±0.3) × 10 ⁻⁵ M n = 8	127 ± 29 (mg) n = 8 (mg)

Threshold concentration represents the minimum concentration of an agonist required to evoke a significant ($p < 0.05$; t -test for paired samples) increase in tone. All results were expressed as mean±SEM. p values were calculated on the basis of t -test for unpaired samples.

^{*1} $p < 0.005$, ^{*2} $p < 0.001$, ^{*3} $p < 0.05$, ^{*4} $p < 0.01$, Threshold : threshold concentration, Max cont : maximum contraction, C : control rabbits, W : WHHL rabbits, CSA : cross-sectional area.

Fig.2. Contractile response of aortic strips to cumulative addition of 300 μ l platelet suspensions stimulated with thrombin (0.2 U/ml) to 30 ml organ bath.

Fig.3. Concentration-response relations for serotonin in aortic strips.

は健常大動脈に比べて依然として収縮反応の著明な亢進を示した。Tissue bath 中の $TX B_2$ 濃度は aspirin 処理によって 0.4 ± 0.1 ng/ml に抑制されたが、5 HT 濃度は 148 ± 15 ng/ml であった。大動脈の methysergide 前処理によって、血小板活性化に伴う収縮反応は著明に抑制されたが、WHHL rabbits の大動脈のほうが健常大動脈に比べて抑制が大であった。大動脈の phentolamine と diphenhydramine 前処理によって、血小板活性化による収縮はまったく抑制されなかった。

次に WHHL rabbits の大動脈の 5 HT, histamine, $TX A_2$ 自体の収縮効果を調べた。WHHL rabbits の大動脈の 5 HT に対する濃度-反応曲線は健常血管に比べて左上方へ偏位し、動脈硬化血管の外因性に投与

した 5 HT に対する収縮反応の亢進が認められた (Fig.3)。動脈硬化血管の histamine に対する濃度-反応曲線は健常血管と差異を認めなかった。PG H_2 と血小板 microsome を反応させることにより生成した $TX A_2$ に対する動脈硬化大動脈の濃度-反応曲線は健常大動脈に比べて右下方へ偏位し、 $TX A_2$ に対する収縮反応の低下を認めた (Fig.4)。また、 $ST A_2$ に対しても WHHL rabbits の大動脈は健常血管に比べて収縮反応の低下を示した (Fig.5)。

最後に WHHL rabbits の冠動脈は、大動脈の成績と同様に、健常冠動脈に比べて thrombin 刺激血小板と外因性に投与した 5 HT に対して著明な収縮反応の亢進を示した (Fig.6, 7)。

考 案

遺伝性高脂血症家兎は家族性高脂血症のモデル動物として脂質代謝異常の解明にきわめて有用であることが広く知られているが、大動脈硬化症および冠動脈硬

Fig. 5. Concentration-response relations for ST A₂ in aortic strips.

Fig. 6. Contractile response of coronary arteries to cumulative addition of 300 μ l platelet suspensions stimulated with thrombin (0.2 U/ml) to 30 ml organ bath.

化症の自然発症モデル動物としても重要である。WHHL rabbits の大動脈と冠動脈の粥状硬化の組織学的変化はヒトの粥状硬化病変と類似している¹¹⁾。本研究においてわれわれは WHHL rabbits を用いて粥状硬化病変を有する大動脈および冠動脈の収縮特性を調べた。

血小板は TX A₂ や 5 HT などの生理活性物質の産生、貯蔵の場であり、血小板活性化に伴ってこれらの物質が放出される。今回血小板活性化によって惹起される大動脈と冠動脈の収縮効果を各種受容体遮断薬とプロスタグランジン合成阻害薬を用いて調べた結果、血小板から放出される 5 HT が主たる血管収縮物質であり、TX A₂ の関与は僅少であることが判明した。動脈硬化大動脈と冠動脈は血小板活性化によって惹起される収縮反応の著明な亢進を示したが、その原

Fig. 7. Concentration-response relations for 5 HT in coronary arteries.

因として血小板から放出される 5 HT に対する収縮反応の亢進によることが明らかとなった。一方、動脈硬化血管は TX A₂ に対しては収縮反応の低下を認めた。このように動脈硬化血管が 5 HT に対して選択的に収縮反応の亢進を示したことは、脂質蓄積によるイオン透過性の亢進¹²⁾や血管平滑筋細胞の増殖では説明できず、血管細胞における受容体と刺激応答連関の機能異常が示唆される。

文 献

- 1) Yokoyama, M., Akita, H. and Fukuzaki, H. : *Cardioangiolog*y, **11**, 250 (1982) (in Japanese)
- 2) Yokoyama, M., Akita, H. and Sakamoto, S. : *J. Jpn. Coll. Angiol.*, **25**, 177 (1985) (in Japanese)
- 3) Yokoyama, M., Akita, H., Mizutani, T., Fukuzaki, H. and Watanabe, Y. : *Circ. Res.*, **53**, 63 (1983)
- 4) Henry, P. and Yokoyama, M. : *J. Clin. Invest.*, **66**, 306 (1980)
- 5) Watanabe, Y. : *Atherosclerosis*, **36**, 261 (1980)
- 6) 渡辺嘉雄 : 疾患モデルハンドブック, 川俣順一, 松下 宏編, 医歯薬出版, 東京, p. 93 (1979)
- 7) Watanabe, Y., Ito, T. and Shiomi, M. : *Atherosclerosis*, **56**, 71 (1985)
- 8) Salky, N. and Dugdale, M. : *Am. J. Cardiol.*, **32**, 612 (1973)
- 9) Yokoyama, M., Kawashima, S., Sakamoto, S., Akita, H., Okada, T., Mizutani, T. and Fukuzaki, H. : *Br. Heart J.*, **49**, 20 (1983)
- 10) Ardlie, N.G., Packham, M.A. and Mustard, J.F. : *Br. J. Haematol.*, **19**, 7 (1970)
- 11) Buja, L.M., Kita, T., Goldstein, J.L., Watanabe, Y. and Brown, M.S. : *Arteriosclerosis*, **3**, 87 (1983)
- 12) Yokoyama, M. and Henry, P.D. : *Circ. Res.*, **45**, 479 (1979)