動脈硬化進展に伴う Ergonovine 反応性の変化について*

栗 野 孝次郎** 横 山 光 宏** 秋 田 穂 東**
末 松 正 邦** 前 橋 延 光** 福 崎 恒**
渡 辺 嘉 雄***

I. 目 的

われわれはすでに動脈硬化血管の ergonovine に対する反応性が正常血管と比較して著明に亢進していることを *in vitro* における実験から明らかにしているが^{1,2)}, さらに *in vivo* においても動脈硬化の生じた冠動脈が ergonovine に対し過収縮をおこすことが報告され³⁾, ergonovine にて容易に誘発される⁴⁾ 冠動脈攣縮の成因に動脈硬化が何らかの役割を果たしているものと考えている. しかし動脈硬化病変の進展の程度とその反応性との関係は未だ明らかではない. 今回われわれは, 自然発症動脈硬化のモデル動物である遺伝性高脂血症家兎 (Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit: WHHL)⁵⁾ の胸部大動脈を用いて, 動脈硬化の進展に伴う動脈硬化血管の ergonovine に対する収縮反応の変化を調べ, α_1 アドレナリン受容体刺激薬である phenylephrine の収縮反応と比較検討した.

II. 方 法

正常家兎 10羽と WHHL 16羽を実験に供し WHHL を以下のごとく 3 群に分けた.

I 群: 9 か月齢以下 3 羽

II 群: 10~22 か月齢 8 羽

III 群: 23 か月齢以上 5 羽

各家兎を pentobarbital (30 mg/kg, iv) 麻酔後, 胸部大動脈を摘出し, ラセン条片 (長さ約 20 mm, 幅約 2 mm) を作製した. 血管条片を 30 ml の Krebs 溶液 (NaCl 118 mM, KCl 4 mM, CaCl_2 1.5 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, NaHCO_3 25 mM, glucose 5 mM) でみたした tissue bath 中で, 等尺性収縮力測定装置に固定した. tissue bath は 37°C に保ち, 95% O_2 と 5% CO_2 の混合ガスで通気した. 各条片に 1.5 g の前負荷をかけ, 2 時間の stress relaxation を観察後, まず 20 mM KCl に対する反応を調べた. 次に Krebs 液で十分 wash out し, 等尺性張力が静止レベルに復した後, ergonovine (10^{-10} ~ 3×10^{-5} M) および phenylephrine (10^{-8} ~ 3×10^{-5} M) を低濃度より段階的に加えることにより濃度反応曲線を求めた. 実験終了後, 組織を凍結保存し, 後日, Thomas tissue homogenizer にて大動脈組織を homogenize し, 酵素法にて組織コレステロール含量を測定した. 一部の組織はホルマリン固定し, Hematoxyline-Eosin 染色, Azan 染色および elastica Van Gieson 染色を行い, 組織学的検索を行った. また WHHL の血中脂質 (総コレステロールおよび中性脂肪) を酵素法にて測定した.

III. 成 績

1. 解剖学的変化

肉眼的観察において, WHHL-I 群の動脈硬化病変は軽微で, 大動脈弓あるいは肋間動脈分枝部

* 1986年5月, 第18回日本動脈硬化学会総会において発表

** 神戸大学医学部第一内科

*** 同 動物実験施設

の一部にのみ軽微な fatty streak ないし粥状硬化病変を認め、WHHL-II 群は中等度(面積比 50% 以上)の大動脈粥状硬化病変を認めた。WHHL-III 群は大動脈全面に高度な粥状硬化病変を認め、一部に石灰化を伴う例もあった。正常家兎では全く病変を認めなかった。組織学的検索において、WHHL-II 群は内膜の線維性肥厚があり、多数の泡沫細胞を内膜および中膜の一部にも認めた。肥厚した内膜内にコレステリン結晶を認める例もあった。内弾性板の一部断裂や中膜弾性線維の粗鬆化を認め、中膜全体は正常群に比較して軽度肥厚を認めた。WHHL-III 群は内膜の線維性肥厚が

さらに顕著となり、石灰化像も認めた。内弾性板の断裂もさらに著明であり、中膜弾性線維の粗鬆化や中膜全体の肥厚は II 群と同様認められたが、石灰化像を認める部位では中膜は圧排されて菲薄化していた。

2. 血中脂質

WHHL の血中脂質の経時的变化を Fig. 1 に示した。血中総コレステロールは 600 mg/dl 以上の高値を示し、I 群, II 群, III 群間で特に有意な差を認めず、月齢が進むとともにやや低下する傾向を認めた。血中中性脂肪も 300 mg/dl 以上の高値を示し、6 か月齢で 3 群間に全く差を認めず、

Fig. 1 Serial cholesterol and triglyceride concentrations in sera from WHHL rabbits.

Fig. 2 Concentration-response relations for phenylephrine in aortae from control and WHHL rabbits.

同様に月齢が進むとやや低下傾向が認められた。

3. phenylephrine に対する反応

Figure 2 に正常群および WHHL-II 群および

Isometric tension development of
aortae for ergonovine

Fig. 3 Tracing of isometric tension recording to ergonovine in aortae from control and WHHL (group II) rabbits.

III 群の phenylephrine に対する濃度反応曲線を示す。各群の濃度反応曲線はほぼ一致しており、最大収縮力はそれぞれ正常群 759 ± 54 mg, WHHL-II 群 801 ± 31 mg, III 群 721 ± 54 mg で特に有意な差を認めず、WHHL 各群の phenylephrine に対する反応性は正常群と比べて変化を示さなかった。

4. ergonovine に対する反応

Figure 3 に実験結果の一例を示す。すでに報告したごとく¹⁾, WHHL-II 群では ergonovine によって正常群に比べてずっと低い濃度から収縮し、最大収縮力も著明に増加していた。Fig. 4 に正常および WHHL 各群の ergonovine に対する濃度反応曲線を示す。動脈硬化病変の軽微な WHHL-I 群の反応曲線は正常群とほとんど差異を認めなかったが、II 群の反応曲線は 2 相性の曲線を示し、著明な左方への偏位を認めた。III 群では II 群のような反応性亢進は示さず、むしろ正常群に近似した反応曲線を呈した。ergonovine に対する最大収縮力はそれぞれ正常群 570 ± 66 mg, WHHL-I 群 592 ± 20 mg, II 群 774 ± 44 mg, III 群 599 ± 35 mg で II 群のみ有意な増加を認めた。ED₅₀ はそれぞれ正常群 8.1×10^{-7} M, WHHL-I 群 7.9×10^{-7} M, II 群 3.0×10^{-7} M, III 群 7.4×10^{-7} M で II 群のみが有意に低値であり、III 群は正常群と

Fig. 4 Concentration-response relations for ergonovine in aortae from control and WHHL rabbits.

特に有意な差を認めなかった。有効収縮閾値濃度は正常群 3.2×10^{-8} M, WHHL-I 群 2.6×10^{-8} M, II 群 8.7×10^{-10} M, III 群 4.4×10^{-9} M で, II 群, III 群が正常群に比し有意に低値を示したが, II 群の方が著しく低値であった。なお各群の 20 mM KCl に対する収縮反応はそれぞれ正常群 349 ± 31 mg, WHHL-I 群 313 ± 37 mg, II 群 379 ± 29 mg, III 群 332 ± 35 mg で特に有意な差を認めなかった。

5. 大動脈組織コレステロール含量

g 湿重量当たりのコレステロール含量はそれぞれ正常群 22 ± 2 mg, WHHL-I 群 36 ± 6 mg, II 群 42 ± 5 mg, III 群 47 ± 7 mg で, WHHL のいずれの群も正常群より有意に高値であったが, 動脈硬化の程度が強い程高値となる傾向を認めた。

IV. 考 察

食餌性高コレステロール血症家兎あるいは遺伝性高脂血症家兎の動脈硬化血管において ergonovine に対する反応性が正常血管に比較して著明に亢進していることをわれわれはすでに報告した^{1,2)}。しかし動脈硬化の進展度を区別して詳細に反応性の変化を検討した研究は未だなされていない。われわれは自然発症動脈硬化のもっとも良いモデル動物である遺伝性高脂血症家兎 (WHHL)³⁾ から動脈硬化の進展度の異なる血管を得ることができ, これを用いて反応性の変化を検討した。動脈硬化度の軽微な場合は正常血管と反応性に差がなく, 中等度の場合に以前の報告のとおり著明な反応性の亢進を認めた。さらに動脈硬化が進展して高度な動脈硬化病変となると逆に中等度の動脈硬化病変に認められたような反応性亢進は示さず, むしろ正常群に近い反応性を示した。すなわち, 動脈硬化病変が進展して高度となることにより ergonovine に対する反応性亢進が消失することが今回はじめて明らかになった。

組織学的検索にて, WHHL-II 群における動脈硬化病変では, 内膜の線維性肥厚, 泡沫細胞の出現とともに, 中膜全体の軽度肥厚を認めた。さらに WHHL-III 群の高度な動脈硬化病変では, 内膜の著明な線維性肥厚と石灰化像も認め, 中膜全体の軽度の肥厚とともに石灰化のある部位では中

膜の菲薄化を認めた。さらに大動脈レオロジー特性に関して長谷川ら⁶⁾は WHHL 家兎大動脈は月齢の増加とともに壁の肥厚, 壁伸展性の低下, 粘弾性の増大等の変化を報告している。このような形態学および物理的变化より血管反応性が変化する可能性が挙げられる。すなわち, WHHL-II 群においては中膜平滑筋層の肥厚に伴う収縮反応の亢進, III 群においては石灰化部位で認められる中膜菲薄化による収縮反応の低下といった変化が推察される。しかしながら, 今回の検討では ergonovine 以外の 20 mM KCl や phenylephrine に対する反応性にはほとんど差を認めなかったことより, 血管自体の形態学および物理特性の変化のみから生ずるとは考えにくく, むしろ ergonovine に対する特異的な変化と考えられる。確かに WHHL-III 群のうち, 血管条片全面が石灰化しているような例では, KCl に対する収縮も著明に低下していたが, 今回の検討対象からそのような例は除外し, KCl に対する収縮力がなお十分保たれているものを用いて本研究を行った。

最近, 血管の収縮拡張反応において血管内皮の役割が重要と考えられており⁷⁾, 動脈硬化血管において内皮依存性の拡張反応の障害が報告されている⁸⁾。しかしわれわれの検討では家兎大動脈において, 内皮剥離によって ergonovine に対する反応性の変化は認めず, 動脈硬化による変化は内皮の関与によるものではないと考えている。

動脈硬化血管における ergonovine 反応性亢進の機序に関しては ergonovine が作用する受容体が動脈硬化血管と正常血管で異なることが明らかとなっている^{1,2)}。すなわち, 正常家兎大動脈における ergonovine 収縮は α_1 -adrenergic mechanism であり, 動脈硬化大動脈においては主に serotonergic mechanism が関与している。さらに動脈硬化家兎大動脈において, serotonin receptor の数量的⁹⁾あるいは質的¹⁰⁾変化が存在することが示唆されている。動脈硬化進展に伴って ergonovine 反応性亢進が消失する機序に関しては現在のところ明らかではないが, 何らかの serotonin receptor 自体の変化あるいはそれをとりまく細胞環境の変化が存在する可能性を推察している。

WHHL はヒトの家族性高コレステロール血症

(FH) の良い疾患モデルであるとされている¹¹⁾。
ヒトの FH 患者においては、著明な冠動脈硬化病変が認められるにもかかわらず、ergonovine による冠攣縮の発生率は必ずしも高いとは報告されていない。この原因として、本研究で明らかとなったごとく、動脈硬化進展度が関与している可能性が示唆される。

V. 結 論

1) 異なる月齢の WHHL および正常家兎の胸大動脈を用いて、動脈硬化進展に伴い、ergonovine および phenylephrine に対する収縮反応性が変化するかどうかを調べた。

2) phenylephrine に対する反応性は動脈硬化の有無および進展度にかかわらず変化を認めなかった。

3) ergonovine に対する反応性は、動脈硬化病変が軽微な場合、正常血管と差異を認めず、中等度の場合に著明な亢進を認めた。

4) 動脈硬化病変がさらに進展し、高度になると逆に ergonovine に対する反応性の亢進が消失することが明らかになった。

文 献

- 1) Yokoyama, M., Akita, H., Mizutani, T., Fukuzaki, H. and Watanabe, Y.: Hyperreactivity of coronary arterial smooth muscles in response to ergonovine from rabbits with hereditary hyperlipidemia. *Circ. Res.*, **53**: 63-71 (1983).
- 2) Henry, P. D. and Yokoyama, M.: Supersensitivity of atherosclerotic rabbit aorta to ergonovine. Mediation by a serotonergic mechanism. *J. Clin. Invest.*, **66**: 306-313 (1980).
- 3) Kawachi, Y., Tomoike, H., Maruoka, Y., Kikuchi, Y., Araki, H., Ishii, Y., Tanaka, K. and Nakamura, M.: Selective hypercontraction caused by ergonovine in the canine coronary artery under conditions of induced atherosclerosis. *Circulation*, **69**: 441-450 (1984).
- 4) Heupler, F. A., Proudfit, W. L., Razavi, M., Shirey, E. K., Greenstreet, R. and Sheldon, W. C.: Ergonovine maleate provocative test for coronary arterial spasm. *Am. J. Cardiol.*, **41**: 631-640 (1978).
- 5) Watanabe, Y.: Sereal inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis*, **36**: 261-268 (1980).
- 6) 長谷川正光, 渡辺嘉雄: 遺伝性高脂血 (WHHL) 家兎大動脈壁の伸展性. 日本バイオレオロジー学会論文集, **5**: 49 (1982).
- 7) Furchgott, R. F.: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, **53**: 557-573 (1983).
- 8) Verbeuren, T. J., Jordaens, F. H., Zonnekeyn, L. L., Van Hove, C. E., Coene, M. C. and Herman, A. G.: Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ. Res.*, **58**: 552-564 (1986).
- 9) Nanda, V. and Henry, P. D.: Increased serotonergic and alpha adrenergic receptors in aortas from rabbits fed a high cholesterol diet (abstr.). *Clin. Res.*, **30**: 209A (1982).
- 10) Awano, K., Yokoyama, M., Fujii, T., Kashiki, M., Kawashima, S. and Watanabe, Y.: Mechanism of serotonin-induced hyperreactivity in atherosclerotic aortae (abstr.). *Circulation*, **72** (Suppl. II): 82 (1985).
- 11) Tanzawa, K., Shimada, K., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M. and Watanabe, Y.: WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *F.E.B.S. Lett.*, **118**: 81-84 (1980).

Summary

The Responsiveness of Atherosclerotic Rabbit Aorta to Ergonovine: The Effects of Atherosclerotic Progression

Kojiro AWANO*, Mitsuhiro YOKOYAMA*, Hozuka AKITA*,
Masakuni SUEMATSU*, Nobuteru MAEHASHI*,
Hisashi FUKUZAKI* and Yoshio WATANABE**

*The First Department of Internal Medicine, **Experimental Animal Laboratory,
Kobe University School of Medicine

The present study was undertaken to investigate the effects of atherosclerotic progression on the responsiveness of rabbit aortae to ergonovine. For this purpose, we examined the contractile responses of isolated aortae from control rabbits ($n=10$) and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits (WHHL; $n=16$). WHHL rabbits were divided into three groups by their age: group I is composed of rabbits younger than 10 months, group II is from 10 to 22 months and group III is older than 22 months. Macroscopic and microscopic examination of aortae obtained from WHHL-I, II and III revealed that atherosclerotic changes were slight, moderate and severe, respectively. Aortae from control rabbits had no atheromatous lesions. Those helical strips were mounted in tissue baths filled with oxygenated Krebs solution for isometric tension recording.

The concentration-response curves for phenylephrine (10^{-8} – 3×10^{-5} M) in control and WHHL-II and III groups were almost identical with similar maximum contractions. The contractile responses to ergonovine in WHHL-I were almost the same as those in controls, while the concentration-response curve for ergonovine (10^{-10} – 3×10^{-5} M)

in WHHL-II was markedly shifted to the left with significantly low threshold concentration and ED_{50} value as compared with controls. The maximum contraction in WHHL-II was also increased. On the other hand, that for ergonovine in WHHL-III was similar to controls without any changes of ED_{50} values and maximum contractions. Only threshold concentration to ergonovine in WHHL-III was significantly lower than that in controls.

These findings suggest that the contractile responses of rabbit aortae to α_1 -adrenergic stimulation were not affected by the presence of atherosclerosis and by its progression, but those to ergonovine were affected. The contractile responses of aortae with slight atheromatous lesions were not changed as compared with controls, but aortae with moderate atherosclerosis were remarkably hyperreactive to ergonovine. In aortae with severe atherosclerosis, on the other hand, the hyperreactivity to ergonovine was markedly attenuated as compared with those with moderate atherosclerosis.

Key words: Ergonovine, Atherosclerotic progression, WHHL rabbit, Vascular reactivity.