原 著

ラット動脈による prostacyclin (PGI_2) の産生に関する
研究, とくに高血圧ラット (SHR) における
産生の亢進について

大 熊 稔* 家 森 幸 男** 内 野 治 人*

Studies on Prostacyclin (PGI_2) Production by Rat Aorta
with Special Reference to the Enhanced Production
in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR)

Minoru OKUMA*, Yukio YAMORI** and Haruto UCHINO*

Key words: stroke-prone SHR (SHRSP), stroke-resistant SHR (SHRSR),
platelet aggregation, cyclooxygenase, prostacyclin synthetase

Prostacyclin (PGI_2) production by rat aortae under various conditions was investigated and activities of the aorta to produce this substance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), stroke-resistant SHR (SHRSR) and normotensive control rats from the Wistar-Kyoto (WK) colony were compared.

Except for some preliminary experiments to establish the test system, only age-matched male animals (6 months) before the development of stroke were utilized (5 animals in each group). The descending aorta was removed from each animal, washed and used immediately or stored at -20°C until use. Fine rings of the aorta were routinely incubated in 0.25–1.0 ml of pH 9.0 borate-buffered saline for 1 hr at 20°C . Volumes (1–10 μl) of the buffered saline in which the aortic rings had been incubated were added to 0.2 ml human platelet-rich plasma (PRP) 1 min before the addition of collagen. Platelet aggregation was monitored in a Sienco dual sample aggregometer. The amount of prostacyclin produced by the aorta was estimated by comparison of its anti-aggregatory activity with that produced by known amounts of authentic prostacyclin-Na.

Rings of the aorta incubated as described above produced increasing prostacyclin-like activity, as shown by the strong inhibition of ADP-, collagen- and arachidonate-induced platelet aggregation for up to 1 hr (Fig. 1) and the activity was dependent on the volume of buffered-saline added as well as on the length of aortae incubated. The activity produced by incubation of the aorta in pH 7.4 Tris-buffered saline for longer than 20 min at 20°C decreased progressively during the incubation and disappeared within 1 hr (Fig. 1), confirming the lability of prostacyclin at pH 7.4. Incubation of the aorta boiled for 3 min produced

* 京都大学医学部内科第一講座〔〒606 京都市左京区聖護院川原町54〕, The First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

** 島根医科大学病理, Department of Pathology, Shimane National Medical School, Izumo Japan.

no such activity. The spontaneous generation by the aorta of prostacyclin was inhibited by preincubation of the aorta with indomethacin (cyclo-oxygenase inhibitor), while the generation induced by PGH_2 was not (Fig. 2). These results indicate that the aorta has both cyclo-oxygenase and prostacyclin synthetase.

Amounts of prostacyclin generated by the aorta of SHRSP and SHRSR were significantly higher than those of WK rats (Fig. 3). Although the meaning of the enhanced production of prostacyclin by the aorta of these hypertensive rats is not clear at the moment, it could be a physiological defence mechanism against the development of vascular injuries possibly due to hypertension in these animals and stroke might be triggered by the development of any inhibitory mechanisms against prostacyclin synthesis by the vessel of SHRSP.

はじめに

最近 Vane らによりウシやブタ動脈の microsome が prostaglandin (PG) H_2 から PGX (prostacyclin, PGI_2) と称される不安定な物質を生成し、この物質は強い血小板凝集抑制作用や摘出血管の弛緩作用などを有することが明らかにされた¹⁾。その後ヒトやラットの血管によっても PGI_2 と考えられる物質の産生されることが報告されており²⁾³⁾, PGI_2 は天然の抗血栓性物質ではないかと推察されるに至っている。われわれは、まずラット動脈による PGI_2 産生の定量的な検討を行うべく基礎的な実験を行い、さらに高血圧自然発症ラット (SHR) の大動脈による PGI_2 産生を正常血圧ラットのそれと比較検討しているので得られた知見を報告する。

I. 実験材料および実験方法

基礎的な実験には主として生後 6～10ヶ月のラットを用いた。高血圧ラットと正常ラットの PGI_2 産生を比較した実験では、すべて生後 6ヶ月で雄性のものを用いた。すなわち、まだ脳卒中発作のみられない脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP)⁴⁾、脳卒中難発症高血圧ラット (SHRSR)⁴⁾ および正常血圧の Wistar-Kyoto (WK) 系ラット⁴⁾ で各 5匹ずつを使用した。pentobarbitone sodium の腹腔内注射でラットを麻酔した後、下降大動脈を分離摘出し、冷生食水で洗滌後速やかに使用するか -20℃に保存し 1ヶ月以内に使用した。使用時凍結した大動脈は室温で融解させ、直ちに輪状に切断 (通常

長さ 1～2 mm) し、0℃で保存しながら 1時間以内に用供した。

PGI_2 産生は上記の大動脈片を 0.25～1.0 ml の buffered saline 中に 20℃で incubate した後、上清の aliquot (1～10 μl) を多血小板血漿 (PRP) に加え、1分間 37℃で incubate してから凝集剤をこれに加えた際にみられる血小板凝集抑制効果で検討した。PRP の作成および血小板凝集は既報⁵⁾ に準じて行った。血小板凝集剤としては通常 collagen (Hormon-Chemie) を用い、その濃度は各 PRP について最大の透光度の変化を惹起させるに必要な最少量 (終濃度 0.6～2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とした。 PGI_2 の定量は種々な量の $\text{PGI}_2\text{-Na}$ 塩を PRP に加えた際の collagen 凝集阻害率より作成した標準曲線を用いて行った。buffered saline は各種の buffer (pH 6.7: phosphate; pH 7.4 および pH 8.0: Tris-HCl; pH 9.0 および pH 10.1: borate) に生食水を加えて作成し、ADP および arachidonic acid (AA) は Sigma 製品を、 $\text{PGI}_2\text{-Na}$ および PGH_2 は小野薬品中央研究所より提供されたものをそれぞれ用いた。

II. 実験成績および考察

1. PGI_2 の安定性

PGI_2 は pH 7.4 附近の水溶液中では不安定¹⁾⁶⁾ で、pH > 8.5 では比較的安定⁶⁾ などが報告されているが詳細な点が不明なため、まず PGI_2 の安定性を検討した。すなわち $\text{PGI}_2\text{-Na}$ 塩のエタノール溶液を種々な pH の buffered saline で希釈し、0℃または 20℃に保存しながら経時的に PRP に加えて終濃度を 3nM とし、

Fig. 1 Prostacyclin activity as a function of time. Rings of the aorta were suspended either in pH 7.4 Tris-buffered saline (1 ml) or in pH 9.0 borate-buffered saline (1 ml) and incubated at 20°C. Aliquots (1–10 μ l) of the supernatant were separated at varying periods of time and their prostacyclin contents were estimated as soon as possible.

Fig. 3 Prostacyclin production by the aorta of SHRSP and of SHRSR as compared with that of normotensive WK rats. Each bar denotes mean $\pm$ 1 S. E. Statistical significance was assessed by the t-test as compared with WK rats.

ADP (5 μ M) 凝集におよぼす阻害効果の減弱により PGI₂ の安定性を検討した。その結果 20°C では pH 9.0 で約 1 時間, pH 10.1 では約 6 時間, 0°C では pH 9.0 で約 7 時間, pH 10.1 なら 28 時間後でもそれぞれ安定であるが

Fig. 2 Prostacyclin production from PGH₂ by the indomethacin-treated aorta. Rings of the aorta were incubated with 0.1 mM indomethacin for 15 min at 20°C, washed twice in cold saline and suspended in pH 9.0 borate-buffered saline. These indomethacin-treated aorta were immediately incubated either 2 μ M PGH₂ or with its vehicle (control) at 20°C. Aliquots of the supernatant were taken out at varying periods of time and their prostacyclin contents were estimated without delay.

pH 7.4 では 20°C 20 分後に, また pH 6.7 では 0°C でも 15 分後にはそれぞれほとんど活性のないことがわかった。

2. 大動脈による PGI₂ 産生

種々の pH の buffered saline に血管を加えて 20°C に incubate すると ADP, AA または collagen による血小板凝集を抑制する物質が産生された。pH 8.0 以下の buffered saline 中ではこの物質は 0°C 保存でも速やかに失活し, pH 9.0 以上では 0°C で比較的安定であった。さらに熱処理 (100°C, 3 分) された大動脈ではその活性が生じないことから大動脈片の incubation で生じたこの物質は PGI₂ と考えられた。

3. 血管の長さ (重量) と PGI₂ 産生量

1ml の pH 9.0 borate-buffered saline に, 同一ラットから連続的に切断した種々の長さ (0.5~3 mm) の大動脈片を加えて 20°C で 1 時間 incubate した際に産生される PGI₂ 量は血管の長さにはほぼ比例した。また incubation 終了後に血管を濾紙で拭いたのち, dessicator 中にて室温で一夜乾燥させてから秤量した重量と

PGI₂ 産生量の間にも 比例関係が認められたので、血管による PGI₂ 産生はその単位重量(mg) 当りの数値で表現した。

4. pH 7.4 および pH 9.0 における PGI₂ 産生の時間的経過

異なる pH で incubate された血管により産生される PGI₂ の活性を検討すると図 1 のごとく、pH 7.4 では 10~20 分の incubation で最大となり約 1 時間後にはほとんど消失したが、pH 9.0 では約 1 時間の incubation で最大となった。pH 7.4 では PGI₂ は容易に分解されるためと考えられるので以下の実験は pH 9.0 で 1 時間 incubate した際の PGI₂ を測定した。

5. Indomethacin (IM) 処理血管による PGI₂ 産生

0.1mM IM と 20°C, 15 分間予め incubate した血管を 冷生食水で 2 回洗滌後 pH 9.0 の buffered saline に浮遊させ、PGH₂ (2μM, f.c.) またはその溶媒(acetone)のみを加えて incubate すると図 2 のごとく PGH₂ を加えた場合は速やかな産生が認められたが対照では 10 分後まではその産生が認められなかった。これは IM により大動脈の cyclo-oxygenase が阻害されたため endogenous には PG endoperoxides が生成されず、exogenous に PGH₂ を加えると血管の PGI₂ 合成酵素により PGI₂ が生成されたと考えられる。この実験により血管には AA→PG endoperoxides→PGI₂ の代謝系の存在することがわかった。

6. SHR と正常血圧ラットにおける PGI₂ 産生の比較

SHRSP, SHRSR および WK 系ラットについて得られた成績を図 3 に示した。PGI₂ 産生量の平均は SHRSP>SHRSR>WK ラットの順であり SHRSP と SHRSR 間に有意差は認められなかったが、これらの SHR 群と WK ラット群間にはそれぞれ有意な差が認められた。SHR におけるこのような PGI₂ 産生亢進の機序や意義は目下明らかでないが、高血圧などの血管障害性因子に対する防御反応とも推察される。PGI₂ 産生は正常な状態で血管壁への

血小板の蓄積を防止する機序と考えられており¹⁾、とくに SHRSP においては何らかの機序により血管でのその産生が抑制されると脳卒中を発症させる引金になることも考えられるのでその点を検討中である。

結 論

PGI₂ の血小板凝集抑制効果を指標として、ラット動脈による PGI₂ 産生を定量的に検討し、正常に比し高血圧ラット (SHR) においてはその産生が有意に亢進していることを明らかにした。

文 献

- 1) Moncada S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J. R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, **263**; 663~665, 1976.
- 2) Moncada, S., Higgs, E.A. and Vane, J.R.: Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*, **1**; 18~20, 1977.
- 3) Villa, S., Mysliwiec, M. and de Gaetano, G.: Prostacyclin and atherosclerosis in rats. *Lancet*, **1**; 1216~1217, 1977.
- 4) Okamoto, K., Yamori, Y. and Nagaoka, A.: Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR). *Circul. Res.*, **34** and **35** (Suppl. 1); 143~153, 1974.
- 5) Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Okuma, M. and Hayaishi, O.: Solubilization and resolution of thromboxane synthesizing system from microsomes of bovine blood platelets. *J. Biol. Chem.*, **252**; 5871~5874, 1977.
- 6) Johnson, R. A., Morton, D. R., Kinner, J. H., Gorman, R. R., McGuire, J. C. and Sun, F.F.: The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins*, **12**; 915~928, 1976.