原 著

実験的肺塞栓モデルにおける高血圧の影響

——SHR での観察成績——

間 下 信 昭* 小 林 逸 郎**
本 宮 武 司*** 山 崎 博 男***

ADP-induced experimental pulmonary thromboembolism
in spontaneously hypertensive rats (SHR)

Nobuaki MASHIMO*, Itsuro KOBAYASHI**,
Takeshi MOTOMIYA*** and Hiroh YAMAZAKI***

Key words : platelet aggregation, ADP, pulmonary
thrombolism, hypertension, SHR.

Platelets have been known to be an important factor in thrombogenesis. In an early stage of thrombosis, platelets adhere to exposed subendothelial collagen eliciting release of ADP and aggregate each other. ADP seems to be a very important substance in platelet thrombosis. In this experiment ADP was injected into the vein in 7 control Wistar rats and 6 spontaneously hypertensive rats (SHR). SHR were administered with 0.1 % NaCl as drinking water over a period of 10 weeks and the blood pressure showed to be 200 mmHg or above.

ADP 1 mg/kg was injected rapidly into the jugular vein of the anesthetized rats. Blood samples were collected from carotid cannula before and 30 sec, 3, 10, 20 and 30 min after the injection. EKG and respiration were monitored and recorded continuously. ⁵¹Cr-labeled platelets were infused in 2 rats. They were sacrificed 1 min after ADP injection and the organs were studied for the radioactivity and the histological observation. In control animals, platelet count decreased immediately after the ADP injection. Variable A-V block, premature beats and apnea developed immediately after the injection and subsided by 1 min. Arterial hypotension and rise in the central venous pressure were also observed for a period of 10 min and gradually subsided. In the analysis of platelet radioactivity, platelets were revealed to accumulate unproportionally in the lungs. Histological examination revealed platelet thrombi in the pulmonary microvasculature.

In SHR rats, decrease in platelet count and heart rate, degree of arrhythmia, apnea, systemic hypotension and elevation in central venous pressure after ADP injection were less than in control rats. In the platelet volume study, the mode

* 東京医科歯科大学第三内科〔〒113 東京都文京区湯島1-5-45〕, 3rd Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine, Tokyo, Japan.

** 東京都養育院付属病院神経内科, Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo, Japan.

*** 東京都臨床医学総合研究所循環器, Division of Cardiology Research, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

related volume was at $2.7 \mu^3$ in SHRs as compared with the mode of $2.4 \mu^3$ in controls. The volume distribution curve in SHR shifted to the left indicating a relative increase in smaller platelets in the population.

In summery, ADP injected into the central vein produced platelet aggregation which were trapped in the pulmonary microvasculature causing pulmonary thromboembolism. Arrhythmia and respiratory distress seems to be due to transient pulmonary thromboembolism. These changes were less severe in SHRs. These results would suggest that hypertension and/or possible association of the vascular change cause different attitude of platelets to ADP.

序 言

血小板が血栓の成立機転に深く関与していることはいうまでもない。とくに動脈血栓では、循環血液中の血小板が傷害血管壁における露出した内膜下コラーゲン線維に粘着して、ADPを放出し、互いに凝集することが血栓形成の第一段階と考えられている¹⁾。それ故にADPの血小板凝集における役割の重要性は十分認識されているが、多くはin vitroによる実験検討が多く、in vivoにおける実験は少ない。著者らはすでに、ラットにADPやコラーゲンを急速に静注して、血小板数の減少とともに無呼吸・不整脈の出現することを報告し、これがAspirinやPyridinolcarbamateなどの抗血小板凝集剤の前処置にて軽減されることを報告した²⁾³⁾。このような塞栓・血栓モデルには血小板・血管壁以外にもさまざまな因子が関係すると考えられる。今回は高血圧の影響をとりあげ、高血圧自然発症ラット(SHR)を用いて、ADPをラットに静注することによる実験的肺塞栓モデルにおいて、高血圧のもつ意義を検討しようとした。

I. 実験対象および方法

体重約300gの高血圧自然発症ラット(SHR)7匹および対照として体重約500gのWistar種の雄ラット6匹を使用した。両群とも生後25～30週で、SHRは1%食塩水を飲料水として10～12週負荷し、尾動脈血圧測定時には200mm Hg以上の高血圧を示したものを使用した。ウレタン750mg/kg腹腔内麻酔後、手術台に仰臥位に固定し、気管切開下にカニューレを挿入し

自発呼吸を許した。一側の頸動脈および頸静脈にそれぞれ3F, 10cmのカテーテルを挿入、東洋ボールドウィンMPU-0.5-290およびLPU-0.1-350トランジューサーにおおの接続し、血圧を測定した。同時にラットの四肢および胸部単極誘導心電図と胸囲用ピックアップによる呼吸曲線を三栄測器製ポリグラフ142-8で観察記録した。ADP(Adenosine 5'-diphosphate, Sigma)1mg/kgを中心静脈に急速に注入し、投与前、投与後30秒, 3, 10, 20, 30分に頸動脈カテーテルより3.8%クエン酸ソーダ0.1ml入のプラスチック注射器内に0.9ml採血し、室温静置して多血小板血漿を分離し、Coulter Counter ZBIにて血小板数を、Coulter Channelyzerにて血小板容積分布を測定した。

また対照ラット3匹にて血小板の全身臓器への分布をみるために、⁵¹Crでラベルした血小板を静注した後、ADP 1mg/kgおよび対照として生理的食塩水静注後1分にて屠殺、ホルマリン固定し、Well型シンチレーションカウンターを用いて各臓器の γ 線放射活性を測定した。また肺標本をヘマトキシリン-エオジンにて染色し、組織学的検討を加えた。

II. 結 果

ラットにADP 1mg/kg静注後の血小板数の変化を図1に示す。静注前の血小板数は対照ラットにて $43.5 \pm 23.2 \times 10^4 / \mu l$ (平均値および標準偏差)、SHRにて $52.8 \pm 16.8 \times 10^4 / \mu l$ と有意差はなかった。対照ラットでは、ADP静注後30秒にて前値の $58.8 \pm 20.7\%$ にまで減少した($p < 0.05$)。3分以後はほぼ前値に回復した。一方SHRでは静注後30秒では前値の 90.5 ± 11.3

Fig. 1 Changes of platelet count induced by ADP injection

Fig. 2 Changes of heart rate induced by ADP injection

％の減少にとどまり、3分後に $74.9 \pm 17.9\%$ にまで減少し、30分後にもなお減少を示しているが、この値は前値に比し有意の差はない。

心拍数の変化を図2に示す。対照ラットでは、静注後30秒にて、不整脈の出現とともに心拍数平均値は前値の $30.0 \pm 11.5\%$ と有意の低下を示し、3分後はほぼ前値に戻った。SHRでは心拍数の変化は対照に比し少く、30秒後 87.3% 、3分後 98.7% と有意の減少は認められなかった。

呼吸数の変化を図3に示す。対照ラットでは静注後一過性の無呼吸をきたし、30秒後に 69.5% と減少したが、以後はほぼ前値と同様の値であった。SHRでは静注直後は、前値の 132.0% と増加し、呼吸停止はほとんどみられず、10分後までは呼吸数の一時的に増加する傾向がみられ、30秒にて 106.3% 、3分にて 108.7% と増加し、10分以後になってはじめて減少してゆく

Fig. 3 Changes of respiratory rate induced by ADP injection

傾向を示した。

このときの心電図と呼吸曲線記録をみると1度より3度までの各種房室伝導障害、心室性期外収縮を含む不整脈の出現と一過性の無呼吸が認められる。それぞれの持続時間は、対照ラットでは不整脈は 42.0 ± 14.3 秒、無呼吸は 4.2 ± 3.8 秒であった。一方SHRでは不整脈は 12.1 ± 5.7 秒、無呼吸は 1.3 ± 1.3 秒とその持続時間は短く、両者間に有意の差がみられた。SHRでの無呼吸例は少く、あっても2～3秒間の呼吸停止であった。

頸動脈圧および中心静脈圧の変化を図4に示す。ADP静注前の血圧は、両群ともに麻酔の影響のためか通常測定時より低く、対照群 85.7 ± 24.9 mmHg、SHR群 127.3 ± 11.9 mmHgであった。対照ラット、SHRともADP静注後30秒にて、それぞれ前値の $51.8 \pm 23.7\%$ 、 $69.3 \pm 14.1\%$ と有意の減少を示した。1分後対照群は回復を示したが、SHRでは血圧低下は30分後も 75.7% と続いていた。中心静脈圧は対照群では静注後30秒にて 9.6 ± 6.7 cm H₂Oと一過性の上昇を示したが、SHR群ではほとんど変化はみられなかった。

対照ラットにおけるADP静注後の血小板の放射活性の臓器分布は、両側肺で5,767～10,689 counts/gで生食水静注時に比し4～8倍の増加をみており、心腎肝脾に比して著明に血小板放射活性の増加率が高かった。組織学的に、血小板の凝集塊による充満閉塞した肺微血管を認めた。

Fig. 4 Changes of arterial pressure and central venous pressure induced by ADP injection

Fig. 5 Distribution of platelet volume in control and SHR rats

血小板の容積分布をみると(図5), 対照ラットでは, そのモードは $2.4\mu^3$ にあって, ADP 静注後もほとんど変化がなかった. 一方 SHR では, 血小板の大きさは対照群に比し, やや大きく, そのモードは $2.7\mu^3$ を示し, ADP 静注後血小板が減少する3分で, 血小板容積分布は小さい方へ移動する傾向がみとめられた.

III. 考 案

ADP が血小板凝集を惹起することは1961年 Gaarder ら⁴⁾の報告以来よく知られている. われわれもラットに ADP を静注し, 血小板減少とともに不整脈・無呼吸の出現と動脈圧低下, 中心静脈圧上昇がみられることを報告した²⁾⁵⁾. また ADP と同じく血小板凝集を惹起するコラーゲンを静注しても ADP と同様の変化がみられることも報告した³⁾⁶⁾. これら心肺機能の変化は, ラットの血管内において ADP により血小板凝集がおこって一時的に肺塞栓をおこした

ための生体現象と考えられるが, 今回の実験は ADP 静注後の ^{51}Cr ラベル血小板の肺への集積と組織学的に肺微小血管内血小板血栓の存在を明かにした. これらの結果から流血中血小板の減少度は心肺機能の変化と平行し, また肺血管領域における血栓・塞栓の発生と平行していることが知られた.

近年, 岡本・家森らによって開発された高血圧自然発症ラット(SHR)は, 高血圧およびそれに伴う血管障害の動物モデルとして極めて有用である⁷⁾⁸⁾. 今回われわれの実験では 血圧 200mm Hg 以上の SHR を用いたが, 血小板減少・心肺機能の変化は対照群よりも軽度であるが, 変化の持続は対照群よりも長いことが示された. この理由がどこにあるかはなお不明である. 高血圧における血栓性疾患の関連するごとく, 高血圧の血小板凝集能は亢進しているとの報告⁹⁾もあるが, ADP 静注前の SHR の血小板数, 凝集能は対照と有意の差はない. 血小板の大きさは SHR では対照群に比して大きく, 若

年血小板が多数あることを示唆する可能性はある. この血小板容積は ADP 静注後血小板数の変化に一致して小さくなる傾向を認め, このことから大型血小板が血栓塞栓形成に使用されることも考えられるが, しかし凝集能の増加は対照に比して著差は認められなかった.

大熊ら¹⁰⁾は脳卒中易発症 SHR (SHRSP) に血小板寿命の短縮を認め, この原因は血小板それ自身にあるのではなく血漿因子又は血管傷害によるものと推定している. 本成績が SHR の血小板機能に関連する可能性は否定できないが, 1X-SHR における血圧上昇などによる血管壁での何らかの変化が ADP による血栓・塞栓形成において影響を与えることも考えられる. われわれは同様の ADP 静注実験をウサギで行い, 肺動脈の分岐部周辺の太い血管の部分にも血小板血栓の出現する事実を認めているが, ウサギの場合の血小板減少, 心肺機能の変化はラットに比してはるかに弱い¹¹⁾. 一方対照

ラットの組織学的検討で血小板凝集塊は太い血管にはみられず、細動脈レベルにおいて多発していることを確かめている¹²⁾。さらにウサギ肺動脈壁は ADP 静注により浮腫性変化を示しているに反し、ラットの血管壁は何らの変化をも示していない¹³⁾。このことから類推すると、SHR では高血圧のための血管傷害が動脈のかなり太い部分で起こり、ADP 静注によりその部に血小板塊が粘着凝集するなどの変化をおこすことが末梢血管部における塞栓をおこさぬ結果に結びつき、これが SHR で ADP 静注による血小板、心肺機能の変化が弱いという一見矛盾する成績となつて可能性が考えられ、今後検討を続ける予定である。

結 論

ラットに ADP 1mg/kg を静注し、血小板数の減少とともに無呼吸・不整脈・動脈圧低下・中心静脈圧上昇を認めた。また肺に血小板放射活性の増加と組織学的に血小板凝集塊による細動脈レベルでの血管閉塞を認め、これらの現象が肺塞栓によることを観察した。この肺塞栓モデルを用いて SHR での変化を比較検討した。SHR ではこれらの現象の移度は弱い、血小板変化が長く持続した。この差は血小板自身の性状による可能性も否定できないが、高血圧による血管傷害部と血小板間の反応によることも考えられる。

文 献

- 1) Thomas, D.P.: The role of platelet in arterial and venous thrombogenesis. In Platelet function and thrombogenesis. ed. by Mannucci, P.M., Gorini, S. Plenum Press, New York, p. 23, 1972.
- 2) Kobayashi, I., and Didisheim, P.: Systemic effects of ADP-induced platelet aggregation and their modification by aspirin and by pyridinolcarbamate. *Thrombos. Diathes. haemorrh.*, **30**; 178, 1973.
- 3) Kobayashi, I., Mashimo, N. and Didisheim, P., et al.: Systemic effects of collagen-induced platelet aggregation and their modification by aspirin and pyridinolcarbamate.

In Platelet, thrombosis and inhibitors. ed. by Didisheim, P., Shimamoto, T., Yamazaki, H., *Thrombos. Diathes. haemorrh.*, Suppl. **60**; 389, 1974.

- 4) Gaarder, A., et al.: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature*, **192**; 531, 1961.
- 5) Kobayashi, I., Yamazaki, H. and Didisheim, P.: Cardiopulmonary dysfunctions caused by ADP-induced platelet aggregation. *Jap. Circul. J.*, **39**; 675, 1975.
- 6) 間下信昭: コラーゲン静注によるラット血管内血小板凝集現象とヘパリン前処置効果. *脈管学*, **16**; 175, 1976.
- 7) Okamoto, K. and Aoki, K.: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap. Circul. J.*, **27**; 282, 1963.
- 8) Yamori, Y. et al.: Pathogenetic similarity of stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke*, **7**; 46, 1976.
- 9) Bologna, E.: Anti-hypertensive treatment and platelet aggregation. In Platelet aggregation and drugs. ed. by Caprino, L., and Rossi, E.C., Academic Press. London, p. 213, 1974.
- 10) Okuma, M. and Yamori, Y.: Platelet survival studies in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR). *Stroke*, **7**; 60, 1976.
- 11), 12), 13) 本宮武司, 間下信昭, 山崎博男: unpublished observation.

<DISCUSSION>

船原芳範(神戸大学医学部生理学) ADP 投与による血圧の低下は ADP が血小板を凝集させることも、その原因の 1 つとみなされるかもしれないが、Adenosin 投与においても血圧の低下がみられる故、ADP のアデニン部分が持つ薬理学的活性も無視することはできないと思う。

山崎博男(東京都臨床医学総合研究所循環器) 血圧降下は ADP 静注のみならず Adenosin, AM P, ATP でも同様にみられる。この血圧低下は ADP の場合は Aspirin, Pyridinolcarbamate などの抗血小板剤前処置、または Buslfan 前処置により血小板減少をおこした場合はきわめて軽度

であった。このことから ADP 静注による血圧低下には、血小板凝集塊による肺塞栓が少くとも一部は影響していると考えられる。

山田兼雄（慶応大学医学部小児科） SHR の platelets は control に比して ADP 誘発凝集が異なるということは興味あることと思います。aspirin は、両者に対して同じように effective ですか、前者の方がより effective とお考えになりますか。

間下信昭（東京医科歯科大学第三内科） Aspirin の抑制効果については、まだ検討しておりませ

ん。

蔵本 淳（広島大学原医研内科） 私共も目下検討中ですが、宮下、家森らの成績（第12回 SHR 協議会にて発表、51年10月）では、本系の動脈から抽出したコラーゲンによる血小板凝集は、むしろ、低下・減少していると報告しています。

原因は不明ですが、血小板増多症にみられるコラーゲン、エピネフリン凝集異常（低下）と共通の機序が存在するか否か、興味ある問題と考えています。