モノクロタリン肺高血圧における血小板活性化因子の関与

小野貞文*¹⁾, 小野玲子*²⁾, 谷田達男*¹⁾, 小池加保児*³⁾, 藤村重文*¹⁾

Role of platelet-activating factor (PAF) in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats

Monocrotaline (MCT) causes lung inflammation and chronic pulmonary hypertension in rats. We hypothesized that platelet-activating factor (PAF) might play a role in MCT-induced pulmonary hypertension, and measured PAF levels in lung tissue of MCT-treated rats. Then, we examined the effect of specific PAF-antagonists, WEB 2086 and WEB 2170, on MCT-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. The PAF levels in the lung tissue increased at 1 and 3 weeks after MCT-injection. Treatment with WEB 2086 or WEB 2170 significantly reduced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy induced by MCT at 3 weeks after injection.

These results indicate that PAF-antagonists inhibit the development of pulmonary hypertension induced by MCT. We conclude that PAF contributes to the development of pulmonary hypertension induced by MCT in rats.

Sadafumi Ono*¹⁾, Reiko Ono*²⁾, Tatsuo Tanita*¹⁾,
Kaoru Koike*³⁾, Shigefumi Fujimura*¹⁾

key words: platelet-activating factor (PAF),
monocrotaline (MCT), pulmonary
hypertension, right ventricular
hypertrophy, PAF-antagonist

植物アルカロイドの一種であるモノクロタリン(monocrotaline, 以下 MCT)¹⁾は, ラットにおいて, 投与後慢性期の肺高血圧, 右心肥大をもたらすことから^{2,3)}, 肺高血圧症の病態解明のためのよいモデルとされてきた¹⁾. その成因にはいまだ不明の点が多いが, 投与後早期より出現する肺の炎症反応^{4,5)}や, 血小板^{6,7)}の関与が示唆されている.

近年, 炎症反応の重要な mediator の一つとして, 血小板活性化因子(platelet activating factor, PAF)が注目されてきた⁸⁾. PAF は血小板, 肺血管内皮, 白血球などより産生され⁹⁾, 血小板の活

性化, 白血球の活性化や遊走⁹⁾, ロイコトリエンの産生増大¹⁰⁾などをもたらす. さらに, 血管平滑筋の tonus への関与^{11,12)}や, 慢性期肺高血圧への関与¹³⁾が知られてきた.

本研究では, MCT 肺高血圧への PAF の関与について, ① MCT 投与ラット肺組織中 PAF の変化, ② MCT 肺高血圧に対する, 特異的 PAF 拮抗薬 WEB 2086¹⁴⁾/WEB 2170¹⁵⁾ の効果について検討した.

方 法

体重 280~300 g の雄性 Sprague-Dawley ラット(Harlan Sprague-Dawley, Inc. Indianapolis, IN.)を用いた.

(1) 肺組織 PAF の測定

ラットを2群(MCT 群, コントロール群)にわけた. MCT 群には, 体重 1 kg 当たり 60 mg の MCT(Sigma)を, コントロール群には同量の生理食塩水(生食)をそれぞれ1回皮下注した. 投与後0日, および1, 3週間後に, ペントバルビタール(80 mg/kg i.p.)麻酔下, 胸骨正中切開にて開胸, 肺動脈に16 G 注射針を挿入した. 10 ml の生食にて, 肺血管内血液を左室の切開孔より洗い流したあと, ただちに肺を摘出, 0°C, 25 ml のメタノール内でホモジェネートした.

遠心後, 上清液内 PAF を, ラジオイムノアッセイ(Assay Kit, New England Nuclear, Boston)を用いて測定した. 心臓を摘出, 10%ホルマリン液にて3日間固定したあと, 右心肥大の指標として右室壁重量/(左室+中隔重量)比:RV/(LV+S)比を求めた.

(2) MCT による慢性肺高血圧, 右心肥大に及ぼす PAF 拮抗薬の効果

ラットの体重測定後, 生食あるいは特異的 PAF 拮抗薬である, WEB 2086 あるいは WEB 2170 (10 mg/kg B.W.)を胃内投与した. 2 時間後に生食, あるいは MCT (60 mg/kg B.W.)を皮下注した. 翌日より, 生食, あるいは WEB 2086 (10

*¹⁾ Department of Surgery, *²⁾ Department of Medicine, The Research Institute for Chest Diseases and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan
東北大学抗酸菌病研究所 *¹⁾外科, *²⁾同 内科

*³⁾ Respiratory Division, Miyagi Medical Center for Adult Diseases, Natori, Japan 宮城県立成人病センター呼吸器外科

図1 モノクロタリン (MCT) 投与ラット肺組織中の PAF の推移(a), および右室壁重量/(左室+中隔重量)比[RV/(LV+S)]の変化(b)

○: コントロールラット, ●: MCT 投与ラット.
* $p < 0.05$ vs コントロール

mg/kg B.W. 1日1回)または WEB 2170 (3 mg/kg, 10 mg/kg, B.W. 1日2回)を連日胃内投与した。

上記投与法により, コントロール群(生食+生食), MCT 群(MCT+生食), MCT+PAF 拮抗薬群(MCT+PAF 拮抗薬), PAF 拮抗薬単独群(生食+PAF 拮抗薬)の4群にわけた。

3週間後, ketamine hydrochloride(60 mg/kg), xylazine(8 mg/kg)を筋注麻酔し, 体重を測定, 体重増加率を求めた。外頸静脈よりオキシロスコープによる波形モニター下に, カテーテルを肺動脈内に進め, 平均肺動脈圧を測定した。測定後, 胸骨正中切開にて開胸, 右室より 20 G 注射針にて血液を吸引, ヘマトクリット値を求めた。心臓を摘出, 10% ホルマリン液にて3日間固定したあ

図2 生理食塩水あるいはモノクロタリン (MCT) 投与3週間後の平均肺動脈圧(a), および右室壁重量/(左室+中隔重量)比[RV/(LV+S)](b)

WEB 2086, WEB 2170: PAF 拮抗薬. * $p < 0.05$ vs コントロール, † $p < 0.05$ vs MCT

と, RV/(LV+S)比を上述のごとく求めた。

測定値は平均値±標準誤差で示し, 各群間の有意差を分散分析にて統計処理し, $P < 0.05$ を有意とした。

成績

(1) 肺組織 PAF の測定

コントロール群 [5.0 ± 0.7 ng/lung] に比し, MCT 群では, 投与後1, および3週間後有意に上昇した[12.9 ± 1.3 , 12.2 ± 3.0 ng/lung](図1a). RV/(LV+S)比は, 投与1週間後では増加せず, 3週間後に増加した(図1b)。

(2) MCT による慢性肺高血圧に及ぼす PAF 拮抗薬の効果

コントロール群では, 平均肺動脈圧は 16.2 ± 0.5 mmHg, RV/(LV+S) 比は 0.33 ± 0.01 であった。MCT 群では, 投与3週間後には, 肺高血圧[平均肺動脈圧: 36.2 ± 1.3 mmHg], 右心肥大[RV/(LV+S)比: 0.53 ± 0.02]が出現した。WEB 2086, あるいは WEB 2170 の投与は, MCT による肺高血圧, 右心肥大を有意に抑制した[平均肺動脈圧 WEB 2086: 27.0 ± 2.2 , WEB 2170:

図3 生理食塩水あるいはモノクロタリン(MCT)投与3週間後のヘマトクリット(a), および体重増加率($\Delta B.W./pre B.W.$) (b)
WEB 2086, WEB 2170: PAF拮抗薬. * p<0.05 vs コントロール

24.1±1.5 mmHg, RV/(LV+S)比 WEB 2086: 0.41±0.02, WEB 2107: 0.36±0.03]. WEB 2086単独群では, コントロール群との間に差を認めなかった(図2 a, b). ヘマトクリット値は, 群間に有意の差を認めなかった(図3 a). 体重増加は, コントロール群, WEB 2086 単独群に比し, MCT 群, MCT+WEB 2086 群/MCT+WEB 2170群で有意に低値であった(図3 b).

考察

MCT 投与ラットでは, 投与後1, 3週に肺組織中 PAF の増加を認めた. 特異的 PAF 拮抗薬である WEB 2086, あるいは WEB 2170 の投与により, MCT 投与3週後に出現した肺高血圧, 右心肥大は有意に抑制された.

MCT により, ラットでは, 投与後早期より肺腔内への白血球遊走, ロイコトリエンの産生増大⁴⁾などの炎症反応が出現する⁵⁾. 抗炎症剤であるロイコトリエン産生阻害薬が, 慢性期の肺高血圧増悪を抑制する⁴⁾ことから, MCT による慢性期肺高血圧, 右心肥大の成因として, 肺炎症反応の関与が示唆される^{4,5)}.

一方, MCT 肺高血圧の他因として, 血小板の

関与が示唆されている^{6,7)}. MCT 投与ラットでは, 血中血小板は減少し⁶⁾, 抗血小板抗体の投与により, 肺高血圧増悪抑制がみられる⁷⁾.

血小板活性化因子(PAF)が, 血小板の活性化や凝集をもたらすこと⁹⁾, 白血球の活性化や遊走⁹⁾, ロイコトリエンの産生増大¹⁰⁾をもたらすなど, 炎症反応の重要な mediator の一つであること⁸⁾, さらに, 長期の外因性 PAF 投与が慢性期肺高血圧をもたらすこと¹³⁾から, MCT による肺高血圧の成因に PAF が関与している可能性について検討した.

MCT 投与後, 1ないし3週にわたる肺組織中 PAF の増加が認められた. MCT 投与後1週では右心肥大は惹起されていなかったが, 3週後には肺高血圧, 右心肥大が顕著となった. MCT による, PAF 産生を伴う肺炎症反応は, 肺高血圧, 右心肥大の出現に先行すると考えられた. また, MCT 投与ラットでは, コントロールラットに比し, 体重増加率は有意に低値であった. この MCT 投与ラットにみられる体重増加抑制^{3,9)}の機序は不明であるが, PAF 拮抗薬投与は, MCT による体重増加抑制は改善しえなかったことから, PAF を介しない他の因子の関与が考えられる.

PAF 拮抗薬投与は, MCT 投与3週後の肺高血圧, 右心肥大を抑制した. ヘマトクリット値には差がみられなかったことより, MCT 投与ラットでは有意の低酸素血症はなかったこと²⁾, PAF 拮抗薬による肺高血圧の抑制は, 血液の粘調度低下によるものではなかったもの¹⁶⁾と推察される.

一方, PAF は, 血管平滑筋の tonus へ関与することが示唆されている^{11,12)}. ラットでは, 低濃度の PAF は肺血管弛緩をもたらす¹¹⁾. 今回, PAF 拮抗薬のみを慢性投与した群で肺高血圧が招来されなかったことから, 生理的条件下に存在する PAF が肺血管拡張作用を有する可能性は少ないものと考えられた. 一方, MCT 投与により増加した PAF が, 直接血管平滑筋の収縮あるいは弛緩をもたらしているかは現在不明である. PAF 拮抗薬は, 本来抗炎症剤であるが, ラットでは, 高濃度の PAF は肺血管収縮をもたらす¹⁰⁾ことから, PAF 拮抗薬が, 肺血管収縮を抑制することによって肺高血圧の増悪を改善した可能性もあり, 今後の検討が必要と考えられる.

結 語

モノクロタリン投与ラットでは、肺組織中 PAF の上昇を認めた。特異的 PAF 拮抗薬である WEB 2086, あるいは WEB 2170 の投与は、MCT 投与 3 週後に出現する肺高血圧、右心肥大を有意に抑制した。以上より、MCT 肺高血圧における PAF の関与が示唆された。

文 献

- 1) Kay, J.H., Heath, D.: Crotalaria Spectabilis: The Pulmonary Hypertension Plant. Springfield, IL, Thomas, 1969, p 99-110, 133-136.
- 2) Meyrick, B., Gamble, W., Reid, L.: Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. Am. J. Physiol. 239 (Heart Circ. Physiol. 8): H 692-H 702, 1980.
- 3) Ghodsi, F., Will, J.A.: Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. Am. J. Physiol. 240 (Heart Circ. Physiol. 9): H 149-H 155, 1981.
- 4) Wilson, D.W., Segall, H.J., Pan, L.C.W., Dunston, S.K.: Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. Microvascular Research 38: 57-80, 1989.
- 5) Stenmark, K.R., Morganroth, M.L., Remigio, L.K., Voelkel, N.F., Murphy, R.C., Henson, P.M., Mathias, M.M., Reeves, J.T.: Alveolar inflammation and arachidonate metabolism in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Am. J. Physiol. 248 (Heart Circ. Physiol. 17): H 859-H 866, 1985.
- 6) Hilliker, K.S., Bell, T.G., Roth, R.A.: Pneumotoxicity and thrombocytopenia after single injection of monocrotaline. Am. J. Physiol. 242 (Heart Circ. Physiol. 11): H 573-H 579, 1982.
- 7) Hilliker, K.S., Bell, T.G., Lorimer, D., Roth, R.A.: Effects of thrombocytopenia on monocrotaline pyrrole-induced pulmonary hypertension. Am. J. Physiol. 246 (Heart Circ. Physiol. 15): H 747-H 753, 1984.
- 8) Page, C.P., Archer, C.B., Paul, W., Morley, J.: Paf-acether. A mediator of inflammation and asthma. Trends. Pharmacol. Sci. 5: 239-241, 1984.
- 9) Braquet, P., Touqui, L., Shen, T.Y., Vargaftig, B.B.: Perspectives in platelet-activating factor research. Pharmacol. Rev. 39: 97-145, 1987.
- 10) Voelkel, N.F.: Nonimmunological production of leukotrienes induced by platelet-activating factor. Science 218: 286-288, 1982.
- 11) 小野貞文, 小池加保児, 谷田達男, 久保裕司, 芦野有吾, 千田雅之, 鈴木 聡, 磯上勝彦, 那須元一, 斎藤秀行, 相良勇三, 佐久間勉, 仲田 祐: ヒト摘出肺動脈に対する血小板活性化因子(PAF)の作用と血管内皮の関与. 日胸疾会誌 27: 910-916, 1989.
- 12) McMurtry, I.F., Morris, K.G.: Platelet-activating factor causes pulmonary vasodilation in the rat. Am. Rev. Respir. Dis. 134: 757-762, 1986.
- 13) Ohar, J.A., Pyle, J.A., Waller, K.S., Hyers, T.M., Webster, R.O., Lagunoff, D.: A rabbit model of pulmonary hypertension induced by the synthetic platelet-activating factor acetylglycerol ether phosphorylcholine. Am. Rev. Respir. Dis. 141: 104-110, 1990.
- 14) Casal-Stenzel, J., Muaceric, G., Weber, K.H.: Pharmacological actions of WEB 2086, a new and specific antagonist of platelet activating factor (PAF). J. Pharm. Exp. Ther. 241: 974-981, 1987.
- 15) Heuer, H.O., Casal-Stenzel, J., Muaceric, G., Weber, K.H.: Pharmacologic activity of bepafant (WEB 2170), a new and selective hexazepinoic antagonist of platelet activating factor. J. Pharmacol. Exp. Ther. 255: 962-968, 1990.
- 16) Voelkel, N.F., McMurtry, I.F., Reeves, J.T.: Chronic propranolol treatment blunts right ventricular hypertrophy in rats at high altitude. J. Appl. Physiol. 48: 473-478, 1980.