ネコ肺動脈における自律神経支配

—— とくに non adrenergic non cholinergic inhibitory system
の存在について ——

佐賀医科大学 小児科学教室

浜 崎 雄 平

Department of Medicine, University of Oklahoma

Sami I. SAID

AUTONOMIC NERVE INNERVATION OF CAT PULMONARY ARTERY

Yuhei HAMASAKI

Department of Pediatrics, Saga Medical School, Saga

Sami I. SAID

Department of Medicine, University of Oklahoma Health Science Center

Electrical field stimulation (EFS), transmural nerve stimulation, was utilized to investigate autonomic nerve innervation of cat pulmonary artery. EFS (duration; 0.8 msec or 1.0 msec, frequency; 20 Hz, voltage; 70 V, for 15 sec) induced small fast constriction followed by large prolonged relaxation on prostaglandin H_2 analog-precontracted cat pulmonary arterial strip which was suspended in a 10 ml organ bath. The small fast constriction was blocked or considerably reduced by addition of phenoxybenzamine. The relaxation was partially blocked in some strips by addition of atropine and/or propranolol. Tetrodotoxin or lidocaine not only blocked relaxation which was not blocked by atropine or propranolol, but also farther reduced or completely blocked the relaxation which was partially blocked by atropine and/or propranolol. It is concluded that (1) α -adrenergic nerve regulates pulmonary arterial constriction, (2) β -adrenergic and cholinergic regulations may be present, but their roles may be substantially small and (3) non adrenergic non cholinergic nerve may play major roles in inhibitory regulation of cat pulmonary circulation.

I. 緒

言

肺循環系において興奮系 (excitatory), 抑制系 (inhibitory) 両系の自律神経がいかなる調節的役割をはたしているかは、いまだ明確でない。

交感神経線維は主肺動脈, 主肺静脈, 及び小抵抗血管に分布していることが解剖学的に認められており (Bergofsky, 1979) α -, β -交感神経

レセプターも肺動脈平滑筋に豊富に分布していることが良く知られている (Bergofsky, 1979). これらの事実より, α -交感神経系が excitatory に, β -交感神経が inhibitory に何らかの調節作用をおこなっていることは十分に予想される. 一方副交感神経の役割はあまりあきらかではな

い。副交感神経伝達物質である acetylcholine は肺循環系に対して excitatory に働く場合 (Aviado, 1965), inhibitory に働く場合の両方が報告されているが (Rudolph, 1958), トーヌスを上昇した状態においては inhibitory に働くことが知られている (Rudolph, 1958; Hamasaki, 1983). Daley (1957) は神経刺激により、肺動脈にひきおこされた肺血管抗張を、副交感神経由来の線維刺激によるものと報告しているし、副交感神経起原の神経線維が肺血管に分枝を送っていることは認められているものの (Harris, 1977), 肺血管筋層そのものへの分布は明確でなく、副交感神経そのものが何らかの調節的役割をしているかどうかは現在のところ明らかではない。

ところで、近年、種々の哺乳動物の気道、消化管、血管等種々の臓器において、交感神経 (adrenergic) でも副交感神経 (cholinergic) でもない、第3の抑制系 (inhibitory) 自律神経 (non adrenergic, non cholinergic nerve) の存在が証明されてきており、臓器によっては最も主要な inhibitory の調節作用をつかさどっていることが認められてきている (Cobern, 1973; Irvin, 1979; Bülbring, 1966; Hughes, 1967;

Bloom, 1980). この non adrenergic non cholinergic nerve の神経伝達物質は今のところ不明である。また単一の伝達物質をもつ神経系であるのか、複数の伝達物質により作動する種々の神経の集合であるのかも明確でないが、非常に広範に分布していることが次第に明らかになっている。Hand ら (1983) は最近モルモットの肺動脈にも non adrenergic inhibitory nerve の存在を報告している。この第3の自律神経系を含めて、肺循環における自律神経調節の機構及び意義 (特に inhibitory nerve) についてはほとんどといってよいほどわかっていない。

ところで、1955年に Paton らは平滑筋の摘出切片を organ bath 中で灌流し、bath 中に設置した電極で、きわめて短い幅の連続矩形波を用いて刺激することにより (Electrical Field Stimulation, transmural nerve stimulation, EFS) ある条件下では平滑筋を直接刺激することなく、神経刺激を介した筋肉の反応をひきおこすことを見いだした。

我々はこの EFS テクニックスを用いて、ネコ肺動脈における自律神経の調節機序 (特に、肺動脈の拡張をひきおこす inhibitory nerve system) を検討した。

II. 実験材料及び方法

実験には28匹の雑種ネコ (雌雄, 1.3-4.2 kg) を使用した。実験動物はペントバルビタールナトリウム 100 mg/kg 静注にて麻酔し開胸した。主肺動脈から左右の肺動脈分岐部までを摘出し、結合織をとりのぞいたあと、氷冷 Krebs Ringer 液 (組成 mM/l: NaCl; 117.6, KCl; 5.4, MgSO₄; 1.2, NaHCO₃; 25.5, NaH₂PO₄; 1.0, glucose; 11.1, CaCl₂; 2.5) にて洗浄した。肺動脈はらせん状に切り、20 mm × 2 mm の平滑筋切片とした。肺動脈切片は 95% O₂ + 5% CO₂ の混合気で酸素化した Krebs 液をみたした容積 10 ml の organ bath の中につり下げた。Organ bath には 37°C に温めた新鮮な Krebs 液を reservoir より循環ポンプ (Harvard model 2671) をもちいて 4 ml/min で連続的に供給した。肺動脈切片は、この方法により 10 時

間以上にわたって安定した反応を示した。肺動脈切片上端は、張力トランスデューサー (isometric; Harvard 363) に連結し、張力の変化をレコーダー (Beckman) に紙おくり速度 5 mm/min で連続的に記録した。約 20 分後、筋トーヌスが安定したのち、筋の弛緩を検出しやすくする目的で、合成プロスタグランディン H₂ 誘導体 ((15s)-hydroxy-11 α , 9 α -(epoxy-methano) prosta 5z, 13e-dienoic acid) を最終濃度 0.05 μ g/ml となるように Krebs 液 reservoir に加えることにより、肺動脈切片の平滑筋トーヌスを上昇させた。実験に使用した 0.05 μ g/ml の PGH₂ analog は Krebs 液中できわめて安定で、肺動脈切片に submaximal の収縮をひきおこし、PGH₂ analog の灌流を続けるかぎり、そのトーヌスを維持することができた。

図1. 実験装置の概略：肺動脈切片の下端（20 mm×2 mm）を、酸素化した Krebs-Ringer 液をみたした organ bath 底に固定し、切片の上端は張力トランスデューサーに固定した。EFS の目的で、2 本の平行な白金電極を平滑筋切片に平行に留置した。張力の変化を、レコーダーを介して記録用紙上に 5 mm/min の紙おくり速度で記録した。

EFS の目的で organ bath 中に、2 本の白金電極を、つり下げられた肺動脈切片に平行に、かつ切片に直接接触しないように 10 mm の間隔で設置した。電極の他端は、Grass model S-48 electric stimulator に連結した。装置の概略を図 1 に示す。EFS は 20 Hz、70V の連続矩結形波で 15 秒間おこない、刺激波の幅は通常、神経刺激のみをひきおこすとされる 0.8 msec と 1.0 msec を使用した。Phenoxybenzamine, propranolol, atropine, lidocaine（これらの blockers はすべて市販の標品を使用した）はすべて Krebs 液 reservoir 中に加えることにより目的とする濃度を得た。Blocker のうち tetrodotoxin のみは 10 ml organ bath 中に直接加えた。organ bath 中に加えられた薬物は、装置の性状より、連続的に希釈されるわけであるが、便宜上、最初に加えた時の organ bath 中の濃度を計

算によりもとめ示した。EFS によりひきおこされる弛緩（および収縮）の各 blocker による抑制（および増強）は以下の計算式によりもとめた。

% 抑制（増強）＝

$$\frac{\text{各 blocker 投与前の弛緩(収縮)} - \text{各 blocker 投与後の弛緩(収縮)}}{\text{各 blocker 投与前の弛緩(収縮)}}$$

Blockers の投与はまず phenoxybenzamine, 次に atropine, 更に propranolol 最後に lidocaine or tetrodotoxin の順とした。ただし、ある実験では、propranolol と atropine の順序をいれかえた。これらの blockers は tetrodotoxin をのぞいてすべて Krebs 液 reservoir 中に次々と投与したので、一旦投与したのちは、特に言及しない場合、同量が実験を通じて Krebs 液中に入っていることになる。

III. 実験成績

あらかじめ PGH₂ analog でトーンスを上昇させた肺動脈切片は、EFS（1.0 msec, 20 Hz, 70V）で速い、かつ小さい収縮を示したのち、長い大きい弛緩をおこした（図 2A）。1 msec EFS による速い収縮は 2 μg/ml の phenoxybenzamine により全例（13 切片中 13）抑制をうけ、そ

の程度は 67.4±7.6% であった（図 2B, 表 1）。逆に、収縮後の弛緩は、66.8±23.2% の増強を見た（13 切片中 7）。1 μg/ml の atropine（cholinergic blocker）を、Krebs 液 reservoir へ加えたのち（acetylcholine の作用を完全に block する）、1 msec EFS で刺激すると、弛緩は 7 切片

図2. (A) EFS (●; msec, 2 Hz, 70 V for 15 sec) は、小さな速い収縮をひきおこし、ひきつづき長い弛緩をひきおこした。
(B) phenoxybenzamine (PB; 2 μ g/ml) は、小さい速い収縮を抑制し、ひきつづきおこる弛緩を増強した。
(C) Atropine (AT; 1 μ g/ml, これは acetylcholine の作用を block するに十分な濃度) は、この平滑筋切片においては弛緩を抑制しなかった。
(D) (Pro; 2 μ g/ml, isoproterenol の作用を block するに十分な濃度) は、一部弛緩を抑制した。
(E) Lidocaine (Lido; 20 μ g/ml) は、ほぼ完全に弛緩を抑制した。
(F) Reservoir 中 Krebs 液を blockers を含まない Krebs 液に変えたのち、十分に平滑筋片を洗浄し、1 msec の幅の EFS で刺激したところ、弛緩は再びひきおこされた。

中4切片で抑制され、その程度は $24.9 \pm 10\%$ であった(図2c, 表2)。更に、2 μ g/ml の propranolol (β -blocker) を Krebs 液 reservoir へ加えたのち(この濃度は isoproterenol の作用を block した), 1 msec EFS で刺激すると、弛緩は7切片のうち3切片で抑制され、その程度は $21.2 \pm 10.0\%$ であった(図2D, 表2)。この実験で示された如く、atropine, propranolol はある切片において、弛緩を20-25% 抑制するが、inhibitory nerve system において中心的役割は果たしていない。次に20 μ g/ml の lidocaine (local anesthesia) を Krebs 液 reservoir に投与して神経 block を試みた。Lidocaine は propranolol もしくは atropine により抑制を受けなかった切片の弛緩を抑制もしくは完全に block したのみならず propranolol, atropine により部分的に抑制された弛緩も更に抑制もし

表1. Inhibition of small fast contraction and enhancement of large prolonged relaxation induced by EFS after addition of phenoxybenzamine (2 μ g/ml)

	duration of pulse (msec)	
	0.8	1.0
Inhibition of contraction frequencies	11/13	13/13
% inhibition	65.7 ± 9.7	64.7 ± 7.6
Enhancement of relaxation frequencies	8/13	7/13
% enhancement	67.8 ± 27.9	66.8 ± 23.2

くは完全に block した(6例中6例, $74.4 \pm 6.4\%$)(図2E, 表2)。これら一連の実験ののち、この切片では reservoir 中の Krebs 液をいずれの blockers をも含まない新しい Krebs 液にかえ(PGH₂ analog は同量含む)1時間以上灌流し、blockers をあらいながしたのち、同じ1 msec EFS で刺激した。再びほぼ同程度の弛緩がひきおこされた。しかしながら、早い収縮は1時間新しい、blocker を含まない Krebs 液で洗ったにもかかわらず出現しなかった(図2F)。Phenoxybenzamine の作用はきわめて長くつづき、新しい Krebs 液で1時間洗うことによって消失しないことがわかった。

同じプロトコールの実験を0.8 msec 幅の EFS でおこない(図3)同様の結果を得た。各 blocker による抑制(増強)の頻度と程度は表1と表2にまとめて示した。この切片では、図3Eに示す如く、4 μ g/ml tetrodotoxin でも神経 block を試みた。Tetrodotoxin は lidocaine と同じく propranolol, atropine 抵抗性の弛緩を70% 以上抑制した。

ところで、本実験では transmural な神経刺激を得る目的で0.8 msec, 1.0 msec 幅の連続矩形波(20 Hz, 70V, 15秒間)を使用した。刺激波の幅を広くしていくと、神経刺激のみならず、筋肉の直接刺激をもひきおこすことが文献上知られている。したがって、どのくらいの幅の刺激がネコ肺動脈に筋肉刺激をひきおこすかについても検討を加えた。図4に示す如く、肺動脈切片を10 μ g/ml lidocaine 存在下に種々の(0.8-8.0 msec)幅の連続矩形波で刺激してや

図 3. (A) EFS (●; 0.8 msec, 20 Hz 70 V for 15 sec)は、図 2 と同様に小さな速い収縮をひきおこし、ひきつづき長い弛緩をひきおこした。
 (B) Phenoxybenzamine (PB; 2 μ g/ml)は初期の速い収縮を完全に抑制した。
 (C) Atropine (AT; 1 μ g/ml)は、弛緩を抑制できなかった。
 (D) Propranolol (Pro; 2 μ g/ml)も弛緩を抑制できなかった。
 (E) Tetrodotoxin (TTX; 4 μ g/ml)は、明らかに弛緩を抑制した。
 (F) Lidocaine (Lido; 20 μ g/ml)は tetrodotoxin で抑制された弛緩を更に抑制した。

表 2. Inhibition of prolonged relaxation induced by EFS after additions of propranolol, atropine, tetrodotoxin and lidocaine

		duration of pulse (msec)	
		0.8	1.0
propranolol (2 μ g/ml)	frequencies	2/5	3/7
	% inhibition	6.0 $\pm$ 4.5	21.2 $\pm$ 10.0
atropine (1 μ g/ml)	frequencies	4/6	4/7
	% inhibition	40.0 $\pm$ 13.4	24.9 $\pm$ 10.0
tetrodotoxin (4 μ g/ml)	frequencies	1/1	1/1
	% inhibition	70	76.9
lidocaine (20 μ g/ml)	frequencies	5/5	6/6
	% inhibition	79.1 $\pm$ 7.9	74.4 $\pm$ 6.4

ると、0.8 msec, 1 msec 幅の EFS による弛緩は、lidocaine ではほぼ完全に block されたが、1.5 msec 幅の EFS による弛緩は完全には抑制できず、幅を増すにつれて lidocaine により抑制されない弛緩の割合が増加していくことがわかった。この結果より 1 msec 以下の幅の連続矩形波は主に神経刺激を介して筋肉の反応をおこすということが示された。

図 4. (A), (B), (C) 3 つのことなった幅の EFS (A; 0.8 msec, B; 1.0 msec, C; 1.5 msec, 20 Hz, 70 V, for 15 sec)は、ネコ肺動脈平滑筋片に弛緩をひきおこした。(D), (E), (F) Lidocaine 10 μ g/ml を reservoir 中に投与したのち、同様の刺激を与えると、0.8 msec, 1.0 msec ではほぼ完全に、1.5 msec 幅の EFS においても、90% 以上の抑制がみられた。(G), (H) 4.0 msec, 8.0 msec 幅の EFS で刺激すると、弛緩は完全には抑制されず、筋の直接刺激が出現してきた。

図 5. (A) EFS (●; 1 msec, 20 Hz, 70 V for 15 sec)は平滑筋切片に、大きい長くつづく弛緩をひきおこした。
 (B) 200 ng/ml の acetylcholine も、同様に弛緩をひきおこした。
 (C) Lidocaine 20 μ g/ml 投与後、EFS による弛緩は抑制されたが、(D) Acetylcholine による弛緩は抑制されなかった。

局麻剤 lidocaine の作用は、末梢神経の block であり、筋に対する作用はないか、もしくはあっても弱いと考えられているが、本当に本実験で使用した濃度の lidocaine が平滑筋に対し直接抑制作用がないかどうかを検討した。図 5 に示す如く、20 μ g/ml の lidocaine は 1 msec 幅の

EFS による弛緩をほぼ完全に抑制したが、200 ng/ml の acetylcholine は lidocaine 投与にかかわらず同等の弛緩をひきおこし、この濃度

IV. 考

Paton (1955) により確立された Electric Field Stimulation の方法は、神経線維そのものを摘出することなしに平滑筋中の神経を transmural に刺激できることより、平滑筋の摘出切片を用いて容易に自律神経系の支配・役割をしらべることを可能にした。その際問題となるのは、いかなるパラメーターの矩形波を使用することにより純粋に、筋に対する直接刺激なしに神経刺激を引き出すことができるかということである。最も問題になるのは、矩形波の幅である。ネコの肺動脈切片を用いた本実験で、10 μ g/ml の lidocaine は 0.8 msec 及び 1.0 msec の幅の EFS による弛緩をほぼ完全に抑制したが、1.5 msec 以上の幅の EFS による弛緩は完全には抑制できず、更に幅が広がるにつれ抑制の度合は低下した。このことは 1.5 msec 以上の幅の刺激では、神経刺激に加えて筋刺激をひきおこす可能性があることを示している。Coburn ら (1973) は、モルモットの気道平滑筋を使用した同様の実験で、刺激の幅が 0.5 msec 以上になるとすでに筋肉刺激が出現し、幅をますます筋肉刺激の割合が上昇することを報告している。ヒトの気道平滑筋を使用した Richardson ら (1976) は、tetrodotoxin が 2.0 msec 幅までの刺激を block したことを報告しており、種による差、器官による差、organ bath 等の実験条件による影響も考えられる。彼らはまた blockers が、神経に到達するために結合織を十分にとりのぞくことが必要であることも指摘している (Richardson, 1976)。

ところで、EFS による神経刺激は、肺動脈切片にきわめて速い小さな収縮と、ひきつづきおこる長い弛緩をひきおこす。本実験では肺動脈切片は、PGH₂ analog により submaximal の状態にあらかじめ基本的トーンスをあげているので、収縮がはっきりとは示されない場合が多いが、この小さい速い収縮は α -blocker pheno-

では、lidocaine の筋への直接抑制作用は無視してよいことが示された。

察

xybenzamine, により抑制されることにより、 α -adrenergic 由来であることがわかる。また、ひきつづきおこる弛緩が phenoxybenzamine により増強することも α -stimulation による収縮刺激が抑制されたためと考えられ、そのことをうらづけている。いずれにしても、excitatory nerve, α -adrenergic nerve が肺動脈内に存在し、何らかの tonic な調節をおこなっている可能性を示している。またこれは解剖学的な結果と一致している (Bergofsky, 1979)。

次に、本実験の主な目的である inhibitory system に関してのべる。肺循環系は低抵抗系血管であり、生理的な状態においては肺血管のトーンスはほとんどないにひとしい。したがって拡張を支配する自律神経系の役割をしらべるにはトーンスを上げてやる必要がある (Rudolph, 1958)。本実験における如く、基本的トーンスを上昇してやると、あきらかに神経刺激による長い大きい拡張が出現してくる。Propranolol (β -blocker), atropine (cholinergic blocker) により、弛緩は 6-40% 抑制されることが、ある切片では認められた。しかしいずれにしても atropine, propranolol による抑制は軽度であり、個体差も大きく、 β -adrenergic nerve, cholinergic nerve systems は, inhibitory nerve system において主な役割をはたしていないと思われる。ところで、propranolol, atropine により抑制されなかった弛緩も、軽度に抑制された弛緩も、神経 blocker である tetrodotoxin, lidocaine により全例 70% 以上抑制された。このことはネコ肺動脈におけるこの長い大きい弛緩が主に non adrenergic, non cholinergic な神経刺激によるものであることを示している。種々の臓器における non adrenergic, non cholinergic nerve の伝達物質は現在のところ不明である。ATP, ある種の neuropeptides (vasoactive intestinal peptide,

Enkephalin, substance-P)等がその候補としてあげられているが (Bloom, 1980; Matsuzaki, 1980; Lundberg, 1979; Burnstock, 1975) adrenergic nerve, cholinergic nerve に対しての如き特異的 blockers が発見されていないこともあり, 薬理学的に証明することは今のところ困難な状況である.

次に, 肺循環系における inhibitory system の生理学的, 病理学的意義であるが, 前述の如く生理的な状況においては肺血管のトーンスはほとんどないことが知られており, この inhibi-

tory nerve system が通常の状態では, moment to moment の調節をおこなっている可能性は少なく, もっと chronic にトーンスを決定・維持する役割をしているのではないかと予想される. たとえば, 病的に肺血管抵抗が上昇した場合, 種々の原因による肺高血圧症, primary pulmonary hypertension 等病的状況において chronic に抑制する作用が考えられ, 更にはこの inhibitory nerve system が欠除することがこれらの疾患の発病もしくは発症の促進にかかわっている可能性もある.

V. 結 語

1. EFS テクニックを利用して, ネコ肺動脈自律神経 (特に inhibitory nerve system の支配, 作用について検討した.

2. α -交感神経は, ネコの肺動脈を収縮させることより肺循環の調節に寄与している可能性が示された.

3. β -交感神経, choline 作動性 inhibitory

nerve は共に肺動脈拡張に向らかの作用をしている可能性はあるが, 主な system ではない.

4. ネコ肺動脈においては, non adrenergic non cholinergic nerve が inhibitory nerve system の中で主な役割をはたしていることが示された.

文 献

- Aviado, D.M. (1965). *The lung circulation*. vol 1, pp 323-354, Pergamon, Oxford.
- Bergofsky, E.H. (1979). Active control of the normal pulmonary circulation. In: *Pulmonary vascular disease*, ed. by K.M. Moser, pp. 233-273, Marcel Dekker Inc., New York.
- Bloom, S.R. and Edwards, A.V. (1980). Vasoactive intestinal peptide in relation to atropine resistant vasodilatation in the submaxillary gland of the cat. *J. Physiol.* **300**: 41-51.
- Bulbring, E. and Tomita, T. (1966). Properties of the inhibitory potential of smooth muscle as observed in the response to field stimulation of the guinea pig taenia coli. *J. Physiol.* **189**: 299-315.
- Burnstock, G. (1975). Pharmacological review. In: *Handbook of psychopharmacology*, ed. by L.L. Iversen, et al, pp. 509, Plenum, New York.
- Coburn, R.F. and Tomita, T. (1973). Evidence for non adrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. *Amer. J. Physiol.* **224**: 1072-1080.
- Daley, R. (1975). The autonomic nervous system in its relation to some forms of heart and lung disease. *Br. Med. J.* **2**: 173-184.
- Hamasaki, Y. Mojarad, M. and Said, S.I. (1983). Relaxant action of VIP on cat pulmonary artery: comparison with acetylcholine, isoproterenol and PGE₁. *J. Appl. Physiol.* **54**: 1607-1611.
- Hand, J.M., Laravuso, R.B. and Will, J.A. (1983). A non adrenergic relaxant response of isolated guinea pig pulmonary artery to field stimulation. *Fed. Proc.* **42**: 490.
- Harns, P. and Heath, D. (1977). *The human pulmonary circulation*, pp. 37, Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York.
- Hugues, J. and Vane, J.R. (1967). An analysis of the responses of the isolated portal vein of the rabbit to electrical stimulation and drugs. *Br. J. Pharmac. Chemother.* **30**: 46-66.
- Irvin, C.G. et al. (1979). Bronchodilatation: non cholinergic, non adrenergic mediation demonstrat-

- ed in vivo in the cat. *Science* **207** : 791-792.
- Lundberg, J.M. *et al.* (1979). Substance-P-, VIP-, and Enkephalin-like immunoreactivity in the human vagus nerve. *Gastroenterology* **77** : 468-471.
- Matsuzaki, Y. Hamasaki, Y. and Said, S.I. (1980). Vasoactive intestinal peptide: A possible transmitter of non adrenergic relaxation of guinea pig airways. *Science* **210** : 1252-1253.
- Paton, W.D. (1955). The response of the guinea pig ileum to electrical stimulation by co-axial electrodes. *J. Physiol.* **127** : 40-41.
- Richardson, J. and Beland, J. (1976). Non adrenergic inhibitory nervous system in human airway. *J. Appl. Physiol.* **41** : 764-771.
- Rucolph, A.M. Duncan, S.R. and Kurland D. (1958). Effects of drugs on normal and on serotonin-constricted pulmonary vessels. *Fed. Proc.* **17** : 137.

(1984年4月13日受付)