ヘモグロビンの脳血管収縮能に関する研究(第2報)

—Ca⁺⁺-blocker および各種拮抗物質の抑制効果について—

谷島 健生・佐野 圭司

Studies on the Contractile Activity of Hemoglobin in Isolated Dog Basilar Arteries:

Part 2—Effects of a Ca⁺⁺-blocker and Several Antagonists on Hemoglobin-induced Contraction

TAKEO TANISHIMA and KEIJI SANO

Department of Neurosurgery, University of Tokyo, Tokyo 113

Summary

In vitro experiments were carried out to determine the inhibitory effects of several agents, especially a Ca⁺⁺-blocker, nifedipine, on hemoglobin-induced contractions of dog basilar arteries.

Agents tested included methysergide, phentolamine, mepyramine, and aspirin. None of these agents significantly inhibited hemoglobin-induced contractions. This indicates that serotonin, norepinephrine, histamine, and prostaglandins are not involved in the contractile activity of hemoglobin. The inhibitory effect of cyclic AMP on hemoglobin-induced contractions was slight even at high concentrations.

In Ca⁺⁺-free solution, basilar arteries showed no response to hemoglobin. Nifedipine was found to be a highly potent inhibitor of hemoglobin-induced contractions. The inhibitory effect of nifedipine on hemoglobin-induced contractions was greater than that of papaverine.

These data suggest that nifedipine might be useful in the treatment of vasospasms following rupture of an aneurysm.

Key words: vasospasm, subarachnoid hemorrhage, nifedipine, calcium

I はじめに

我々は、第1報で hemoglobin の脳血管に対する基本的な収縮作用を明らかにした。この第2報では、脳血管攣縮の治療方針の確立をめざし、どのような薬物により hemoglobin による脳血管収縮が抑制されるかを薬理的に検討する。まずはじめに hemoglobin 収縮が従来知られている各種拮抗物質により抑制されるか否かを調べ、次いで hemoglobin 収縮と細胞外 Ca⁺⁺ との関係を検討し、Ca⁺⁺-blocker である nifedipine が hemoglobin

収縮をどの程度抑制するかを、非特異的平滑筋弛緩物質である papaverine と比較しつつ分析する。

II 実験方法

収縮能の測定方法は第1報と同様である。すなわち、雑種成犬(10~15kg)の摘出脳底動脈を用い、*in vitro*で等尺性張力変化を測定した。標本は長さ4mmのリング状とし、organ bathの容量は20ml、栄養液はKrebs液を用い、95%O₂+5%CO₂の混合ガスを通気し37±0.5℃に保った。pHは7.40~7.50であった。静止時張力は

東京大学脳神経外科

[連絡先: 〒113 東京都文京区本郷7-3-1, 東京大学脳神経外科, 谷島健生]

1980年2月15日 受稿

Fig. 1 Effects of methysergide, phentolamine, mepyramine, and aspirin on the dose-response curve of hemoglobin in dog basilar arteries. Contraction induced by 40 mM K^+ was taken as 100%. The values are means $\pm$ SE; number of preparations in parentheses. Asterisk(*) indicates statistically significant difference from the control value ($P < 0.05$). Note that none of these agents inhibited the hemoglobin-induced contraction.

1.5 g とし、60~90 分間安定化させた後測定を開始した。収縮値は 40 mM K^+ に対する相対値として求め%で表示した。一頭のイヌからは一つの動脈標本のみを用い、一つの動脈標本に対しては hemoglobin の適用は一回限りとした。

各種拮抗物質あるいは収縮抑制物質の適用は、hemoglobin 適用の 15 分前に行った。Methysergide hydrogenmaleinate (Sandoz), phentolamine (CIBA Geigy), mepyramine maleate (吉富) を各々 serotonin, norepinephrine, histamine に対する拮抗物質として用いた。また aspirin (Sigma A5376) を prostaglandin 合成阻害剤として用いた。その他に dibutyryl cyclic AMP (Sigma D 0627), papaverine (Sigma P 3510) を使用した。 Ca^{++} -blocker としては, nifedipine (Bayer) を用いた。Nifedipine は ethanol に溶解した後, ethanol: polyethyleneglycol 400: water = 15 : 15 : 70 となるように polyethy-

Fig. 2 Effect of dibutyryl cyclic AMP on the dose-response curve of hemoglobin for basilar arteries. Values are means $\pm$ SE; number of preparations in parentheses. *: statistically significant ($P < 0.05$)

leneglycol 400 および water を加えた。Nifedipine を用いた実験中は遮光に努めた。

Hemoglobin 溶液としては、この実験では第 1 報に述べたごとくヒト赤血球を蒸留水にて溶血させた後、その上清を Sephadex G 100 カラムに通し得られた hemoglobin 分画を使用した。 K^+ 濃度の測定は炎光光度計 (Radiometer Copenhagen FLM 3) にて行った。

Ⅱ 結 果

赤血球溶血液の K^+ 濃度は 20~30 mEq であり、Sephadex G 100 通過後の hemoglobin 溶液では K^+ はまったく検出されなかった。

Methysergide 10^{-8} M, phentolamine 10^{-6} M, mepyramine 10^{-6} M および aspirin 10^{-5} M 投与後の hemoglobin の各用量反応曲線は、Fig. 1 のごとくである。 10^{-4} M hemoglobin に対する収縮力は、各々 76.7 ± 7.6 ($n=6$), 66.9 ± 4.6 ($n=6$), 62.2 ± 10.9 ($n=6$), および 58.5 ± 6.2 ($n=6$) であり、control 値 $59.1 \pm 2.8\%$ ($n=12$) と比べると、methysergide 投与群のみ有意に収縮力が増強

Fig. 3 Hemoglobin-induced contraction of the basilar artery exposed to Ca^{++} -free media. Upper: control. Lower: The basilar artery was exposed for 60 min to Ca^{++} -free medium and then treated with 10^{-4} M hemoglobin. Note that hemoglobin caused no contraction of the basilar artery in Ca^{++} -free medium.

した ($p < 0.05$). 他は統計学的に有意の差はなかった。

Dibutylryl cyclic AMP 5×10^{-6} g/ml 投与による hemoglobin 収縮の変化をみたのが Fig. 2 である。 10^{-4} M hemoglobin に対する収縮力は、control $59.1 \pm 2.8\%$ ($n = 12$) に対し dibutylryl cyclic AMP 投与後は $47.9 \pm 3.6\%$ ($n = 7$) であり、統計学的に有意の差があった ($p < 0.05$)。 10^{-5} M hemoglobin に対しては有意の差はなかった。なお 1.5 g の静止張力は、上記の量の dibutylryl cyclic AMP の投与によっても変化しなかった。

Ca^{++} -free 栄養液中で 1 時間経過後の 10^{-4} M hemoglobin 適用による収縮をみたのが Fig. 3 である。すなわち、 Ca^{++} -free 栄養液中では hemoglobin による収縮はまったく生じなかった。 Fig. 4 に示すごとく、 Ca^{++} 除去液中にて hemoglobin を投与しても収縮は生じないが、その後 Ca^{++} 2.5 mM を投与すると著明に収縮した。またこの収縮は、 Ca^{++} -blocker である nifedipine の投与により著明に抑制された。そこで hemoglobin 10^{-4} M により収縮させ、次いで nifedipine を 10^{-8} M から 10^{-6} M まで累積的に投与すると、 Fig. 5 に示すごとく濃度依存的に弛緩した。

Nifedipine の抑制効果を定量的に求めたのが Fig. 6 である。 Nifedipine 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} M 前投与による he-

Fig. 4 Effect of nifedipine on the response of the dog basilar artery to hemoglobin and Ca^{++} . Upper: control experiment. Lower: nifedipine-treated experiment. Note that nifedipine markedly attenuates the contraction induced by hemoglobin and Ca^{++} .

moglobin の用量反応曲線を示している。 10^{-4} M hemoglobin に対する収縮力は、control $59.1 \pm 2.8\%$ ($n = 12$) に対し、 nifedipine 10^{-8} M 投与で $47.0 \pm 4.4\%$ ($n = 6$)、 10^{-7} M 投与で $23.2 \pm 2.3\%$ ($n = 6$)、 10^{-6} M 投与で $16.3 \pm 1.4\%$ ($n = 12$) であった。また 10^{-8} M nifedipine は約 1.5 g の静止時張力を 0.26 ± 0.03 g ($n = 12$) 弛緩させた。

Nifedipine の効果を paraverine と比較するため同様の実験を paraverine で行った。 Fig. 7 は、 paraverine 10^{-8} ~ 10^{-5} M 投与による hemoglobin 収縮の抑制を定量的に示している。これを定量的に扱い用量反応曲線を求めたのが Fig. 8 である。 10^{-4} M hemoglobin に対する収縮は control, papaverine 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M にて各々 $59.1 \pm 2.8\%$ ($n = 12$)、 $49.4 \pm 2.4\%$ ($n = 7$)、 $33.5 \pm 4.1\%$ ($n = 7$)、 $5.1 \pm 1.3\%$ ($n = 7$) であった。この数値からも明らかなように nifedipine と papaverine を比較した場合、 nifedipine の方が抑制効果は著明であった。

IV 考 察

この第 2 報では、主として hemoglobin による脳血管収縮の抑制について検討した。今回我々が行ったように、脳血管収縮の原因物質を hemoglobin と規定し、その収縮抑制を調べた報告は今までにない。

Fig. 5 A representative recording showing the inhibitory effect of nifedipine (10^{-8} up to 10^{-6} M) on the contraction induced by hemoglobin (10^{-4} M).

Fig. 6 Inhibitory effects of nifedipine (10^{-8} up to 10^{-6} M) on the dose-response curve of hemoglobin in dog basilar arteries. Contraction induced by 40 mM K^+ was taken as 100%. Values are means $\pm$ SE; number of preparations in parentheses.

Fig. 7 A representative recording showing the inhibitory effect of papaverine (10^{-8} up to 10^{-5} M) on contraction induced by hemoglobin (10^{-4} M).

Fig. 8 Inhibitory effects of papaverine (10^{-7} up to 10^{-5} M) on the dose-response curve of hemoglobin in dog basilar arteries. Contraction induced by 40 mM K^+ was taken as 100%. Values are means $\pm$ SE; number of preparations in parentheses.

Hemoglobin による脳血管収縮が methysergide, phen-tolamine, mepyramine により抑制されないということは、hemoglobin による収縮が serotonin, norepinephrine, histamine (H_1) 等の receptor に作用しているのではないことを示している。なお methysergide 投与群では有意の差をもって hemoglobin 収縮が増強されているが、これは methysergide 自体に若干の脳血管収縮作用が

あるため¹⁾ その分が加味されたものと思われる。また prostaglandin 合成阻害剤である aspirin により hemoglobin による収縮が影響を受けなかったことは、hemoglobin の収縮能発現には prostaglandin が関与していないといつてよいであろう。しかし厳密には、aspirin は血管収縮性に働く thromboxane A_2 への代謝経路と共に血

管拡張物質である prostacyclin への代謝経路も同時に抑制するため、prostacyclin 生合成の経路がより強く抑制された場合には、みかけ上 hemoglobin 収縮は変化しないことになる。したがって aspirin で変化しないことだけをもって prostaglandin の関与を完全に否定することはできないであろう。今後はそれぞれの代謝経路に応じた特異的な阻害剤を用いた実験が必要であると思われる。しかし現段階では、hemoglobin による収縮は以上のような従来知られている収縮物質を媒介としたものではないと言つてよいであろう。

近年、特に β 受容体との関係で cyclic AMP の平滑筋弛緩反応に果たす役割が注目されている⁹⁾。すなわち adenylylase の活性化により ATP より生じた cyclic AMP が細胞膜のリン酸化を起こし、 Ca^{++} イオンの透過性を抑制することにより平滑筋の弛緩反応を起こすと考えられている。そこで我々も細胞内浸透性の高い dibutylryl cyclic AMP を用いて hemoglobin による脳血管収縮が抑制されるか否かをみた。Cyclic AMP は統計的有意の差をもって抑制効果を示したが、nifedipine と比べるとその程度は軽く、むしろ hemoglobin の脳血管収縮に対する cyclic AMP の弛緩反応はごくわずかであるといえる。

これは本来 cyclic AMP の弛緩作用は β 作動薬に関連して明らかにされてきたことであり、脳血管はもともと β 作動薬に対しては反応性が低いわけであるから¹³⁾、このように cyclic AMP が十分な抑制効果を示さないことは当然と言えるかもしれない。

Ca^{++} 除去液中では hemoglobin による収縮反応がまったく起きず、またそこに Ca^{++} イオンを加えると収縮が惹起され、さらにこの収縮は Ca^{++} -blocker である nifedipine により著明に抑制されるという実験事実は、hemoglobin による収縮は細胞外 Ca^{++} イオンの細胞内流入を伴うものであることを強く示唆している。これは noradrenaline の場合には、細胞内結合 Ca^{++} の遊離が重要視されている⁹⁾ のと対照的である。

Ca^{++} -blocker は一般的には、心筋や平滑筋において細胞外から細胞内への Ca^{++} の流入を阻止する物質のことを言い、主として Fleckenstein らにより研究された有機化合物を指すことが多い⁹⁾。冠血管拡張作用と心筋収縮抑制作用の両方を有し、本来抗狭心症薬として開発されたものである。したがって Ca^{++} -blocker の研究は心筋、冠血管に関するものが大部分であり、脳血管に関するものはほとんどなかった。ごく最近 Allen らと Edvinsson らの報告がみられるのみである²⁴⁾。脳血管と Ca^{++} の関係を扱った戸田の報告をみても明らかのように¹²⁾、 Ca^{++} -blocker が脳血管に対しても冠血管と同様に作用

するであろうことは容易に想像される。そこで我々は、 Ca^{++} -blocker が脳血管攣縮の治療薬となりうるのではないかと考えこの研究を行った訳である。

Ca^{++} -blocker としては nifedipine, verapamil, diltiazem などが知られている。この中でも特に nifedipine は心筋に対するよりも冠血管に選択性が強いとされ、その冠血管拡張作用は verapamil, diltiazem の約数十倍と報告されている⁶⁾⁸⁾。したがって我々もこの実験では、 Ca^{++} -blocker として nifedipine を用いた。脳血管における Ca^{++} -blocker の作用をみた報告は Allen らと Edvinsson らのものがあるだけであるが、いずれも収縮物質は potassium, norepinephrine, serotonin 等であり、我々が行ったように収縮物質として hemoglobin を用いた報告は今までにない。今回の我々の実験から hemoglobin による脳血管収縮も Ca^{++} -blocker である nifedipine により著明に抑制されることが判明した。またその抑制効果は、非特異的平滑筋弛緩物質である papaverine よりもかなり強力であることもわかった。したがって脳血管攣縮の原因物質を hemoglobin と規定した場合にも、nifedipine は十分脳血管攣縮の治療薬となりうると思われる。

Nifedipine は冠血管を特異的に拡張すると言われているが、それは次のように説明されている。すなわち nifedipine を全身性に投与した場合、全身血管拡張作用のため血圧降下をもたらす。その結果反射的に noradrenaline の分泌が促進する。 Ca^{++} -blocker は noradrenaline による血管収縮を十分に抑制できないため¹⁰⁾、末梢血管はこの noradrenaline に対し収縮し、nifedipine の拡張作用は相殺される。しかし冠血管は noradrenaline に対し感受性が低いため、nifedipine の冠血管拡張作用がそのまま残るのであるとされている⁷⁾。もしこのような説明が正しいとするならば、脳血管においてもすでに noradrenaline 感受性の低いことが証明されている訳であるから¹¹⁾、nifedipine は脳血管に対しても冠血管と同様の機序で十分効果を発揮するはずである。したがって脳血管攣縮の治療薬として全身投与した場合にも全身性の反応は比較的強く、脳血管を特異的に拡張するものとして十分治療効果の期待できる薬物と思われる。今後この方向に沿った研究を進める予定である。

V 結 論

摘出イヌ脳底動脈を用い、*in vitro* で hemoglobin 収縮の抑制につき、薬理学的検討を加え次の結論を得た。

1. Hemoglobin による脳血管収縮は、各種拮抗物質および合成阻害剤を用いた実験から、serotonin, norepi-

nephrene, histamine および prostaglandin を媒介としたものではない。また cyclic AMP によっても十分には抑制されない。

2. Hemoglobin による脳血管収縮は、細胞外 Ca^{++} の細胞内流入が重要な役割を果している。

3. Hemoglobin による脳血管収縮は、 Ca^{++} -blocker である nifedipine により著明に抑制され、その抑制効果は papaverine より強力である。したがって nifedipine は脳血管攣縮の治療薬として十分期待がもてる。

稿を終えるに当たり、御指導いただいた東京大学脳神経外科 浅野孝雄講師に深謝いたします。

文 献

- 1) ALLEN, G. S., HENDERSON, L. M., CHOU, S. N., et al.: Cerebral arterial spasm. Part 2. *J Neurosurg* 40: 442-450, 1974
- 2) ALLEN, G. S. & BANGHART, S. B.: Cerebral arterial spasm. *Prat 9. Neurosurg* 4: 37-42, 1979
- 3) VAN BREEMEN, C., FARINAS, B. R., GERBA, P., et al.: Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the Lanthanum method for measuring cellular Calcium influx. *Circ Res* 30: 44-54, 1972
- 4) EDVINSSON, L., BRANDT, L., ANDERSSON, K. E., et al.: Effect of a calcium antagonist on experimental constriction of human brain vessels. *Surg Neurol* 11: 327-330, 1979
- 5) FRECKENSTEIN, A.: Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 17: 149-166, 1977
- 6) HIMORI, N., ONO, H. & TAIRA, N.: Simultaneous assessment of effects of coronary vasodilators on the coronary blood flow and the myocardial contractility by using the blood-perfused canine papillary muscle. *Jpn J Pharmacol* 26: 427-435, 1976
- 7) KRONEBERG, G.: Pharmacology of Nifedipine. pp 3-10, In Hashimoto, K., Kimura, E. & Kobayashi, T. (eds): 1st International Nifedipine Symposium, Univ. Tokyo Press, 1975
- 8) NARIMATSU, A. & TAIRA, N.: Effects on arterio-ventricular conduction of calcium-antagonistic coronary vasodilators, local anesthetics and quinidine injected into the posterior and the anterior septal artery of the atrio-ventricular node preparation of the dog. *Arch Pharmacol* 294: 169-177, 1976
- 9) ROBISON, G. A., BUTCHER, R. W. & SUTHERLAND, E. W.: Cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 37: 149-174, 1968
- 10) SCHUEMANN, H. J., GOERLITZ, B. D. & WAGNER, J.: Influence of papaverine, D 600, and nifedipine on the effects of noradrenaline and calcium on the isolated aorta and mesenteric artery of the rabbit. *Arch Pharmacol* 289: 409-418, 1975
- 11) TODA, N. & FUJITA, Y.: Responsiveness of isolated cerebral and peripheral arteries to serotonin, norepinephrine, and transmural electrical stimulation. *Circ Res* 33: 98-104, 1973
- 12) TODA, N.: Responsiveness to potassium and calcium ions of isolated cerebral arteries. *Am J Physiol* 227: 1206-1211, 1974
- 13) TODA, N.: The action of vasodilating drugs on isolated basilar, coronary and mesenteric arteries of the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 191: 139-146, 1974