

---

---

原 著

---

---

## 低酸素時血管収縮機構における外膜の関与

新潟大学医学部麻酔学教室 (主任: 下地恒毅教授)

田 中 剛

Mechanism of Hypoxia-induced Contraction of Porcine Renal Arteries

Tsuyoshi TANAKA

*Department of Anesthesiology,  
Niigata University, School of Medicine  
(Director: Prof. Koki SHIMOJI)*

The mechanism of hypoxia-induced vessel contraction was studied in isolated porcine renal arteries (diameter: 1.5~2.0 mm). The intact arteries exposed to Krebs solution aerated with hypoxic gas (95% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>; PO<sub>2</sub>=15.0±1.7 mmHg) exhibited contraction followed by relaxation (a transient contraction). Removal of endothelium attenuated the transient contraction. Removal of both endothelium and adventitia completely inhibited contraction induced by hypoxia. Phentolamine, 10<sup>-6</sup>M, or  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene adenosine 5'-triphosphate (ATP), 3×10<sup>-6</sup>M, did not significantly affect the hypoxia-induced contraction, indicating that norepinephrine and ATP in sympathetic nerve terminals may not be involved in hypoxia-induced contraction. Aspirin, 10<sup>-6</sup>M, or indomethacin, 10<sup>-5</sup>M, greatly attenuated the transient contraction. These findings suggest that cyclooxygenase related products derived from adventitia and/or endothelium may contribute to a transient contraction. Treatment with 10<sup>-6</sup>M nicardipine or Ca<sup>2+</sup>-free solution also attenuated the transient contractions, but the contraction of the arteries in response to hypoxia for 20~30 min was significantly potentiated by both treatments. These findings suggest that adventitia as well as endothelium modify the renal vascular response to hypoxia. It seems that renal arteries exhibit extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensitive and-insensitive responses to hypoxia.

---

Key words: adventitia, endothelium, cyclooxygenase

外膜, 内皮細胞, シクロオキシゲナーゼ

---

Reprint requests to: Tsuyoshi TANAKA,  
Department of Anesthesiology,  
Niigata University School of Medicine,  
1-754, Asahimachi-dori, Niigata City,  
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町754  
新潟大学医学部麻酔学教室 田中 剛

## 結 言

低酸素時の血管収縮に関する研究は主に肺動脈を対象としたものが多く、その機序としては内皮細胞、 $Ca^{2+}$ の関与が示唆されている<sup>1)-3)</sup>。一方、腎血管に関しては報告が少なく、Lieberthal ら<sup>4)</sup>はラット腎血管において、内皮由来血管拡張物質(EDRF)の異常が虚血後の血管収縮に関与すると報告している。また、Eskinder<sup>5)</sup>らは犬の腎小動脈において、酸素分圧の低下によるノルエピネフリン収縮の増強を血管内皮細胞が制御していると示唆している。しかし、明確な機序は不明であり、血管外膜が低酸素による血管の反応に影響を及ぼすかどうか調べた報告はない。ブタの腎臓は、犬およびラットの腎臓と違って、ヒトの腎臓とかなりの類似点があることが知られている<sup>6)</sup>。そこで本研究では、摘出ブタ腎血管を用い血管内皮細胞および外膜の存在下、非存在下での低酸素時の収縮反応を検討した。

## 方 法

ブタ腎臓から腎動脈を摘出し周囲の結合組織を取り除いた後、輪状血管標本(直径1.5~2.0 mm, 長さ3.0 mm)を作製した。クレス液20 mlの入ったマグス管内で血管内腔に2本の針金を通し、一端を固定、もう一端をトランスジューサー(日本光電社製TB-612T型)に接続し張力を測定した。クレス液を95%酸素+5%二酸化炭素で飽和し、pH 7.4 二酸化炭素分圧を40 mmHgに保った。静止張力時は2.0 gに保った。約1時間後静止張力が安定した後、KCl 80 mMを投与し張力を測定した。その後クレス液で標本を数回洗浄し、ノルエピネフリン  $10^{-6}$ Mを投与し張力安定後、アセチルコリン  $10^{-6}$ Mを投与した。拡張反応の有無により、機能的な内皮細胞の存在を確認した。その後洗浄し、静止張力が安定したところで、95%酸素+5%二酸化炭素による通気を95%窒素+5%二酸化炭素で置換し、30分間低酸素ガスで通気した。低酸素時の張力変化は5分ごとに測定し、KClによる収縮に対する相対値で示した。低酸素時には、溶液中の酸素分圧は血管内酸素分圧モニター(クラレ社製636型)で連続的にモニターした。各々の実験の最後に95%酸素+5%二酸化炭素でクレス液を再び通気し、80 mM KCl投与による収縮を測定した。

第一の実験では、正常血管、内皮細胞のみを剥離した血管、および内皮細胞と外膜を剥離した血管の低酸素負荷後の収縮を調べた。ブタ腎動脈では、外膜を筋層から

剥離することは容易であった。内皮細胞の剥離は木製棒を用いて行ない、アセチルコリン投与による拡張反応の欠如により内皮細胞の剥離を確認した。基礎的な実験から、内皮細胞および外膜を剥離した標本の最適な静止張力は1.5 gであった。実験プロトコールは先に述べたものと同様であった。

第二の実験では、正常血管、内皮細胞剥離血管および内皮細胞外膜剥離血管にヒスタミン( $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$ M)またはセロトニン( $3 \times 10^{-8}$ ~ $3 \times 10^{-7}$ M)を濃度依存的に投与し、その収縮反応を調べた。

第三の実験では、低酸素時の正常血管の収縮に及ぼす $10^{-6}$ M フェントラミンおよび $3 \times 10^{-6}$ M  $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATPの影響を調べた。これらの薬剤は低酸素負荷30分前に投与した。

最後の実験では、低酸素時の正常血管の収縮に及ぼす $10^{-4}$ M アスピリン、 $10^{-5}$ M インドメタシン、 $10^{-7}$ M ONO3708(トロンボキサン  $A_2$  受容体拮抗薬)、 $10^{-6}$ M ニカルジピン、 $Ca^{2+}$ 除去 EGTA(0.1 mM 又は 2.0 mM)含有クレス液の影響を調べた。これらの薬剤および $Ca^{2+}$ 除去クレス液は、低酸素負荷する30分前に投与した。

実験では以下の薬剤を使用した。アセチルコリン(第一製薬)、アスピリン(Sigma Chemical)、ノルエピネフリン(三共製薬)、ニカルジピン(山之内製薬)、ONO3708(小野薬品)、フェントラミン(三共製薬)、 $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATP(Sigma Chemical)。統計処理は一元配置分散分析法で行なった。二者間の有意差は最小有意差検定法にて行ない、危険率5%未満をもって有意とした。

## 結 果

### 1) クレス液の酸素分圧の変化

95%酸素+5%二酸化炭素で飽和したときの酸素分圧は $626 \pm 4$  mmHgであった。95%窒素+5%二酸化炭素で飽和した後、酸素分圧は急激に低下し、6分後には低酸素状態(酸素分圧50 mmHg以下)となり、15分後には14~15 mmHgに達した。

### 2) 低酸素状態での張力変化

血管の張力は低酸素負荷後急激に増加し、5~10分後には最大に達し、その後徐々に低下した(一過性の収縮)。低酸素負荷30分後での張力の平均は、静止張力のレベルに戻った(図1上段, 図2)。しかし38例中27例(71%)は静止張力よりも高いレベルを示し、9例(29%)は静止張力よりも低いレベルを示した。

### 3) 内皮細胞剥離標本および内皮細胞、外膜剥離標本の低酸素時の反応

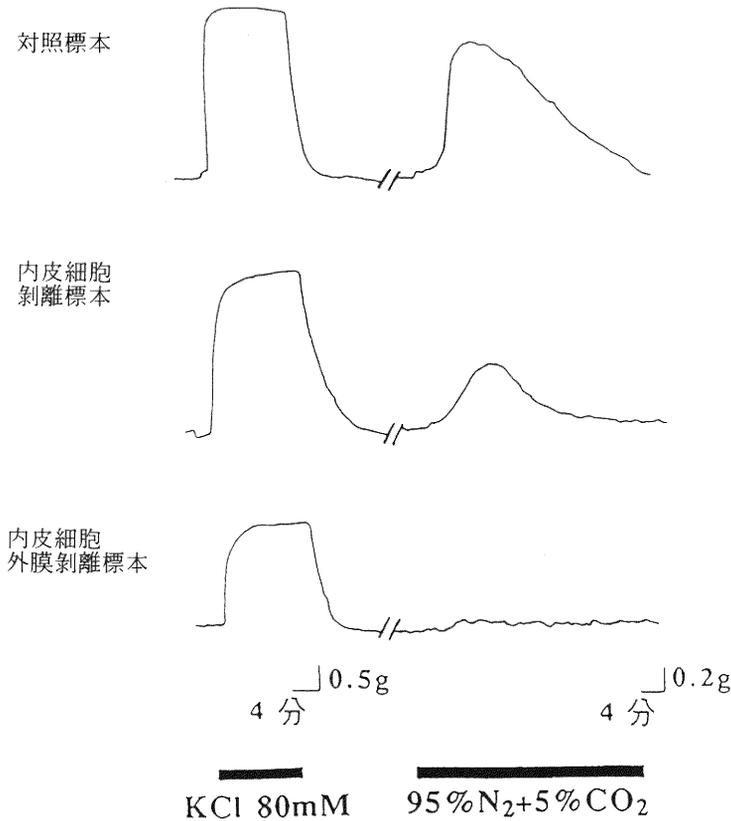


図 1 低酸素負荷後の腎血管の反応のトレース

上段：正常血管のトレース。低酸素負荷後急速に収縮し、その後拡張した。中段：内皮細胞を剥離した血管のトレース。内皮細胞の剥離により一過性収縮は抑制された。下段：内皮細胞、外膜共に剥離した血管のトレース。内皮細胞、外膜共に剥離した血管は低酸素負荷によって、全く収縮しなかった。

内皮細胞を剥離することにより、低酸素時の一過性の収縮は抑制された。低酸素負荷20～30分後での張力は、内皮細胞剥離によっても影響されなかった(図1中段, 図2)。内皮細胞、外膜を共に剥離した血管は全例、低酸素時に全く収縮しなかった(図1下段, 図2)。

4) 正常血管, 内皮細胞剥離血管, 内皮細胞外膜剥離血管のセロトニン, ヒスタミンによる収縮反応

ヒスタミン  $10^{-8}M$  から  $10^{-7}M$ , セロトニン  $3 \times 10^{-8}$  から  $3 \times 10^{-7}M$  投与により, セロトニンでは最大約30%, ヒスタミンでは最大約40%の収縮を示したが, 3種類の血管間の収縮に有意差はなかった(図3)。

5) 正常血管の低酸素時の収縮に及ぼす, フェントラミンおよび $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATP の影響

$\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATP 投与後, 張力は徐々に増加したが, 30分以内に静止時張力に戻った。フェントラミンおよび $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATP どちらも, 低酸素時の収縮に影響を及ぼさなかった(図4)。

6) 正常血管の低酸素時の収縮に及ぼすシクロオキシゲナーゼ阻害薬および ONO3708 の影響

正常血管の低酸素時の一過性の収縮は, アスピリン, インドメタシン処置により有意に抑制された。しかし,

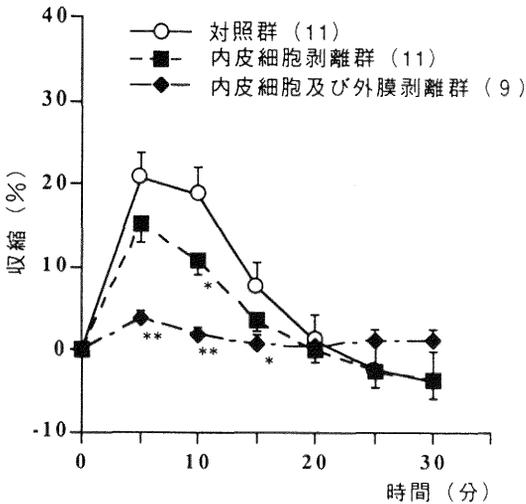


図2 低酸素負荷後の内皮細胞剥離血管および内皮細胞外膜剥離血管の反応

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  は有意差を示す。括弧内の数字は実験数を示す。バーは標準誤差を示す。一過性の収縮は内皮細胞剥離により抑制された。内皮細胞、外膜共に剥離した血管は低酸素後全く収縮しなかった。

ONO3708 は低酸素時の収縮に影響を与えなかった (図5)。

7) 正常血管の低酸素時の収縮に及ぼすニカルジピン,  $Ca^{2+}$  除去クレブス液の影響

ニカルジピンおよび 0.1mM または 2mM の EGTA を加えた  $Ca^{2+}$  除去液で前処置した正常血管は低酸素負荷後徐々に収縮し、20~30分で最大収縮に達した。低酸素負荷5~10分後での収縮はニカルジピンおよび  $Ca^{2+}$  除去液により有意に抑制された。一方、低酸素負荷25~30分後の反応は、これらの処置により増強された (図6)。

考 察

本研究から、低酸素時の腎動脈の収縮は内皮細胞だけでなく外膜によっても修飾されることが示された。低酸素時の血管収縮は、内皮細胞および外膜を共に剥離することにより完全に抑制されたが、内皮細胞のみの剥離では一過性の収縮が部分的に抑制された。この結果は低酸素時の腎血管収縮反応における外膜の重要な役割を示している。セロトニンおよびヒスタミンによる収縮は、内皮細胞や外膜剥離によっても影響を受けなかったことから、内皮細胞、外膜剥離による機械的損傷が低酸素時の

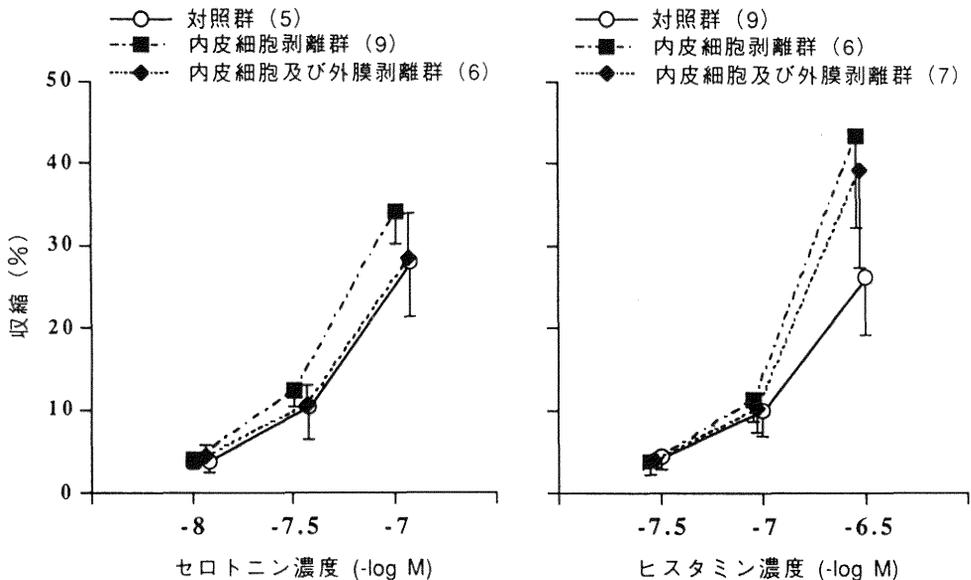


図3 セロトニン投与 (左), およびヒスタミン (右) 投与による腎血管の反応

括弧内の数字は実験数を示す。バーは標準誤差を示す。セロトニン  $10^{-7}M$ , ヒスタミン  $3 \times 10^{-7}M$  投与により、正常血管、内皮細胞剥離血管、内皮細胞外膜剥離血管は KCl による収縮の20%以上の収縮を示し、正常血管における低酸素による収縮とほぼ同程度だった。ヒスタミン  $10^{-8}M$  から  $10^{-7}M$ , セロトニン  $3 \times 10^{-8}$  から  $3 \times 10^{-7}M$  投与では3種類の血管の収縮に有意差はなかった。

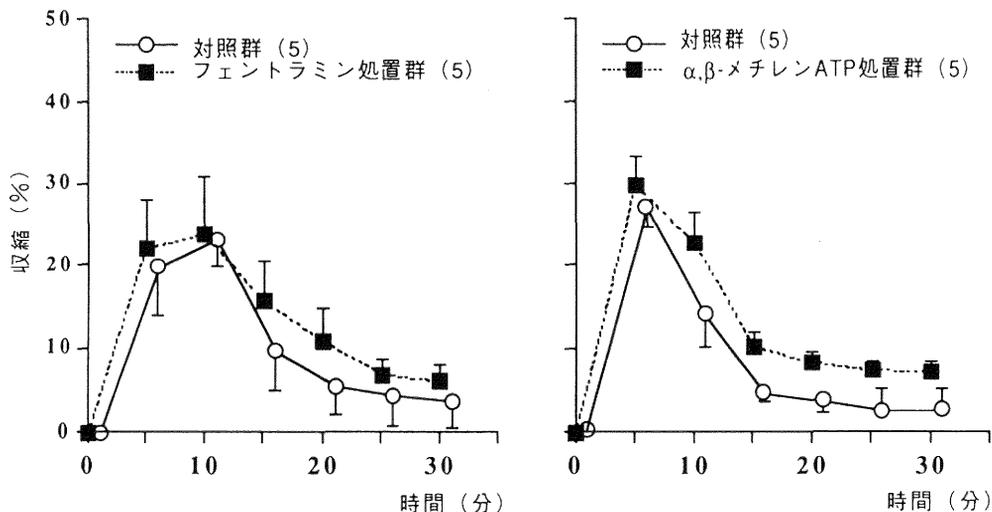


図4 低酸素負荷後のフェントラミン前処置(左), および $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATP(右) 前処置血管の反応

括弧内の数字は実験数を示す。バーは標準誤差を示す。フェントラミンおよび $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン ATP は低酸素負荷後の反応に影響を与えなかった。

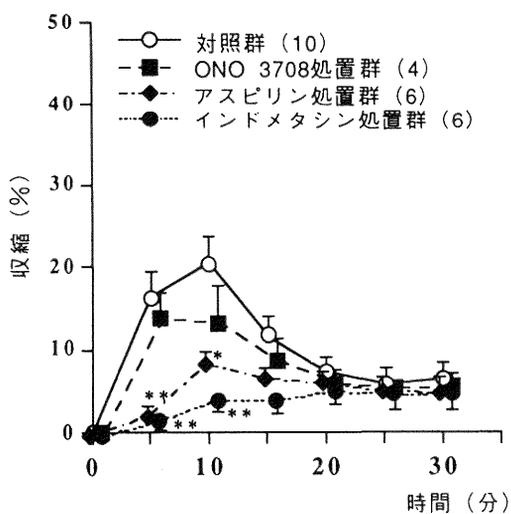


図5 低酸素負荷後の ONO3708, アスピリン, およびインドメタシン前処置血管の反応

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  は有意差を示す。括弧内の数字は実験数を示す。バーは標準誤差を示す。一過性収縮はアスピリン, インドメタシン処置により有意に抑制されたが, ONO3708 処置では影響を受けなかった。

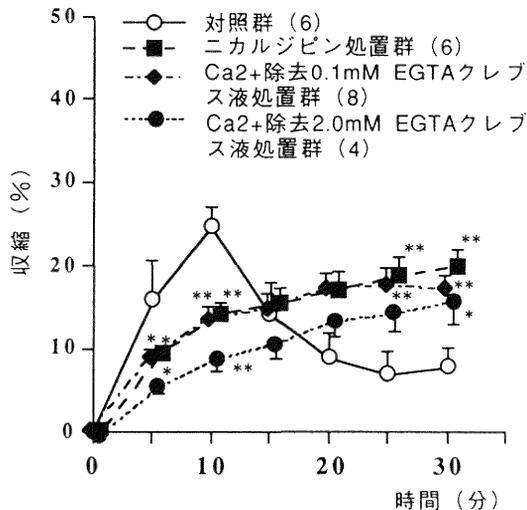


図6 低酸素負荷後のニカルジピン,  $Ca^{2+}$  除去 0.1 mMEGTA クレブス液, および  $Ca^{2+}$  除去 2.0 mMEGTA クレブス液前処置血管の反応

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  は有意差を示す。括弧内の数字は実験数を示す。バーは標準誤差を示す。一過性の収縮はニカルジピンおよび  $Ca^{2+}$  除去 EGTA クレブス液処置により有意に抑制された。低酸素負荷後25~30分での収縮はニカルジピンおよび  $Ca^{2+}$  除去 EGTA クレブス液処置により有意に増強した。

反応に影響を与えたとはいえにくい。低酸素時の血管収縮に外膜が関与するメカニズムの一つとして、外膜に存在する交感神経終末からのノルエピネフリンの放出が考えられる。今回の実験ではフェントラミンは低酸素時の収縮に影響を与えなかったことから、低酸素時の収縮におけるノルエピネフリンの関与は考えにくい。もう一つのメカニズムとしては外膜からの ATP の放出が考えられる。ATP は交感神経終末に存在し、血管平滑筋を収縮することが知られている<sup>7)</sup>。今回の実験では ATP 受容体拮抗薬である  $\alpha$ 、 $\beta$ -メチレン ATP は低酸素時の収縮に影響を与えなかったことから、外膜からの ATP の放出も考えにくい。以上から、低酸素時の血管収縮反応にノルエピネフリン、ATP 以外の血管収縮物質の外膜からの放出が関与することが示唆された。

低酸素時の一過性収縮はインドメタシンおよびアスピリン処置によりある程度抑制された。この結果は Rubanyi らの報告と一致する。それによると、ブタ冠動脈の低酸素時の収縮は、シクロオキシゲナーゼ阻害薬処置により完全に抑制されたと報告している<sup>8)</sup>。今回の実験では、トロンボキササン A<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である ONO3708 は一過性の収縮に影響を与えなかったことから、内皮細胞もしくは外膜由来の、トロンボキササン A<sub>2</sub> 以外のエイコサノイドが、低酸素時の一過性の収縮に関与することが考えられる。

低酸素は Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase を抑制することにより細胞膜を脱分極することが知られている<sup>9)-11)</sup>。脱分極は電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを活性化し、細胞外 Ca<sup>2+</sup> の細胞質内への流入を増加する。低酸素によって脱分極したラット小肺動脈は、ベラパミルに感受性があるという報告がある<sup>3)</sup>。今回の結果では、一過性収縮はニカルジピンおよび Ca<sup>2+</sup> 除去クレブス液処置により、有意に抑制された。この結果から、低酸素負荷後の一過性収縮は、電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを介した Ca<sup>2+</sup> の流入によることが示唆される。またこの結果は、先に述べたシクロオキシゲナーゼ由来のエイコサノイドが一過性収縮に関与するという考えを否定するものではない。なぜなら、エイコサノイドは一部電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを介して血管平滑筋を収縮させるからである<sup>12)</sup>。低酸素負荷25~30分後での反応が、ニカルジピンおよび Ca<sup>2+</sup> 除去 EGTA クレブス液により有意に増強した明確な機序は不明である。持続的な収縮には protein kinase C が関与するといわれるが<sup>13)</sup>、低酸素時の収縮に関与しているかどうかは今後の検討が必要である。

## 結 語

摘出ブタ腎動脈の低酸素時の収縮機構を検討した。

摘出ブタ腎動脈は、低酸素負荷前半、一過性の収縮を示し、71%は低酸素負荷後半においても静止時張力よりも大きな張力を維持していた。

低酸素時の腎血管の収縮には、内皮細胞だけでなく外膜からの血管収縮物質の放出が関与することが示唆された。

稿を終るにあたり、懇切な御指導、御校閲を賜わった新潟大学麻酔学教室下地恒毅教授、福田 悟助教授に深謝いたします。本研究の概要は第39回日本麻酔学会において発表した。

## 参 考 文 献

- 1) Rodman, D.M., Yamaguchi, T., O'Brien, R.H. and Mcmurtry, F.: Hypoxic contraction of isolated rat pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **248**(3): 952~958, 1989.
- 2) Bennie, R.E., Packer, C.S., Powell, D.R., Jin, N. and Rhoades, R.A.: Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am. J. Physiol.*, **261**: L156~L163, 1991.
- 3) Yuan, X.J., Tod, M.L., Rubin, L.J. and Blaustein, M.P.: Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am. J. Physiol.*, **259**: H281~H289, 1990.
- 4) Lieberthal, W., Wolf, E.F., Rennke, H.G., Valeri, C.R. and Levinsky N.G.: Renal ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent vascular relaxation. *Am. J. Physiol.*, **256**: F894~F900, 1989.
- 5) Eskinder, M., Harder, D.R. and Lombard, J.H.: Role of endothelium in regulating the response of small arteries of the dog kidney to transmural pressure elevation and reduced PO<sub>2</sub>. *Circ. Res.*, **66**: 1427~1435, 1990.
- 6) Sandin, R., Wahlberg, J. and Modig, J.: Variation in superficial cortical blood flow and tissue oxygenation: an experimental porcine model. *Acta. Anaesthesiol. Scand.*, **35**: 411~419, 1991.
- 7) Burnstock, G. and Kennedy, C.: A dual function

- for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from prevascular nerve and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ. Res.*, **58**: 319~330, 1985.
- 8) **Rubanyi, G. and Paul, R.J.**: Two distinct effects of oxygen on vascular tone in isolated porcine coronary arteries. *Circ. Res.*, **56**: 1~10, 1985.
- 9) **Bergofsky, E.H. and Holtzman, S.**: A study of the mechanisms involved in the pulmonary arterial response to hypoxia. *Circ. Res.*, **20**: 506~519, 1967.
- 10) **Harder, D.R., Madden, J.A. and Dawson, C.**: Hypoxic induction of  $Ca^{2+}$ -dependent action potentials in small pulmonary arteries of the cat. *J. Appl. Physiol.*, **59**: 1389~1393, 1985.
- 11) **Madden, J.A., Dawson, C.A. and Harder, D.R.**: Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat. *J. Appl. Physiol.*, **59**: 113~118, 1985.
- 12) **Godfraind, T. and Miller, R.C.**: Actions of Prostagrandin  $F_{2\alpha}$  and noradrenaline on Calcium exchange and contraction in rat mesenteric arteries and their sensitivity to calcium entry blockers. *Br. J. Pharmac.*, **75**: 229~236, 1982.
- 13) **Howard, R., Takuwa, Y. and Park, S.**: Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J.*, **1**: 177~185, 1987.

(平成5年2月16日受付)

---