

モルモット摘出気管のエンドセリン-1収縮反応 における炭酸ガス分圧の影響

新潟大学医学部麻酔学教室 (主任: 下地恒毅教授)

津久井 淳

The effects of P_{CO_2} on endothelin-1 contractions in
isolated guinea pig tracheae

Atsushi TSUKUI

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

Contractile responses of isolated guinea pig tracheae to endothelin-1 (ET-1), a vasoactive substance recently isolated from endothelium, were studied at extremely low P_{CO_2} (15 ± 1 mmHg, $n=32$), moderately low P_{CO_2} (28 ± 1 mmHg, $n=23$), normal P_{CO_2} (38 ± 1 mmHg, $n=57$) and high P_{CO_2} (92 ± 1 mmHg, $n=32$). The minimum concentration of ET-1 (10^{-10} M) needed to induce contractions was lower than that of acetylcholine (10^{-7} M) and histamine (10^{-7} M) at normal P_{CO_2} . P_{CO_2} did not affect acetylcholine- or histamine-induced contractions. In contrast, extremely low and moderately low P_{CO_2} attenuated the contractions induced by ET-1, but high P_{CO_2} potentiated those induced by a high concentration of ET-1. In the presence of aspirin (10^{-4} M) and indomethacin (3×10^{-6} M), the responses to endothelin-1 were not influenced by extremely low P_{CO_2} . The results suggest that cyclooxygenase-related eicosanoids are involved in the effects of P_{CO_2} on ET-1-induced contractions.

Key words: Tracheal smooth muscle, Carbon dioxide, Endothelin-1, Eicosanoids.

気管平滑筋, 炭酸ガス分圧, エンドセリン-1, エイコサノイド

近年同定された血管収縮物質エンドセリン-1¹⁾は気管平滑筋収縮物質としての作用も有する²⁾ことが報告されている。また気道上皮はエンドセリン-1を生成し³⁾, 喘息患者の肺胞気管支洗浄液からは高濃度のエンドセリ

ン-1が証明されている⁴⁾ことから, 気管・気管支痙攣時にはアセチルコリン, ヒスタミンなどととも気道のトーンズに影響することが考えられる。このような患者の呼吸管理をする上で, 血中炭酸ガス分圧 (P_{CO_2})

Reprint requests: Atsushi TSUKUI,
Department of Anesthesiology,
Niigata University School of Medicine.
Niigata City, 951, JAPAN.

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

がエンドセリン-1の反応性にどのように影響するかは重要であると考えられるが、現在まで炭酸ガス分圧のエンドセリン-1気道収縮性に対する影響については知られていない。一方、エンドセリン-1の気道収縮は、サイクロオキシゲナーゼ関連のエイコサノイドを介することが知られている⁵⁾⁻⁷⁾。そこで、モルモット摘出気管において、種々の炭酸ガス分圧時のエンドセリン-1反応性をアセチルコリン、ヒスタミンと比較検討した。さらに、エンドセリン-1気道収縮に及ぼす内因性エイコサノイドの関与を検索するため、アスピリンおよびインドメタシンの存在下での反応を検討した。

方 法

モルモット(体重300~500g)を、ペントバルビタール(100mg/kg, i.p.)で麻酔後、気管(直径2~2.5mm)を摘出し、周囲の結合織を取り除いた。長さ3mmの輪状気管標本を作成し、37℃で95% O₂と5% CO₂で飽和したKrebs液中に懸垂し、静止時張力を2gに保った。Krebs液の組成は、Na⁺143.0; K⁺5.9; Ca²⁺2.5; Mg²⁺1.2; Cl⁻153.9; HCO₃⁻25.0; SO₄²⁻1.2; H₂PO₄⁻1.2; dextrose 10.0 (mM)であった。標本は圧トランスデューサー(日本光電社製TB612-T)に接続し等尺性張力を記録した。張力が安定した後、正常炭酸ガス分圧下でKCl 80mMによる収縮を得た。

洗浄後再び張力が安定した後、エンドセリン-1用量作用曲線(10⁻¹⁰~10⁻⁷M)、アセチルコリン用量作用曲線(10⁻⁸~10⁻³M)、ヒスタミン用量作用曲線(10⁻⁸~10⁻⁴M)を描いた。なお、エンドセリン-1のより高濃度の投与は製剤上不可能であった。超低炭酸ガス分圧群では、1.2% CO₂及び98.8% O₂、低炭酸ガス分圧群では、3.2% CO₂及び96.8% O₂、高炭酸ガス分圧群では12.0% CO₂及び88.0% O₂で10分間Krebs液を飽和した後、それぞれの用量作用曲線を得た。

別の実験では、エンドセリン-1収縮反応における内因性エイコサノイドの影響を検索するため、アスピリン10⁻⁴Mまたはインドメタシン3×10⁻⁶Mの存在下に各炭酸ガス分圧下での用量作用曲線を得た。

それぞれの収縮反応はKCl 80mMによる収縮を100%としてその相対値で表わした。Krebs液中のpHおよび炭酸ガス分圧はRadiometer社製ABL-3で測定した。結果の統計計算は一元配置分散分析により行ない、群間の比較は最小有意差検定法により行ない、p<0.05を有意とした。

結 果

各実験群のpHおよび炭酸ガス分圧を表1に示す。正常炭酸ガス分圧下での気管平滑筋収縮閾値濃度はエンドセリン-1 10⁻¹⁰M、アセチルコリン 10⁻⁷M、ヒスタミン 10⁻⁷Mでエンドセリン-1の気管平滑筋収縮感受性はアセチルコリン、ヒスタミンの約1000倍強力であることが解った(図1)。

アセチルコリン、ヒスタミンの収縮反応は、超低炭酸ガス分圧、低炭酸ガス分圧、高炭酸ガス分圧により影響されなかった(図2, 上・中段)。一方、エンドセリン-1の収縮反応は高炭酸ガス分圧により最高濃度において増強され、超低炭酸ガス分圧および低炭酸ガス分圧により有意に抑制された(図2, 下段)。

アスピリン 10⁻⁴M、インドメタシン 3×10⁻⁶Mの存在下ではエンドセリン-1の収縮反応は超低炭酸ガス分圧に影響されなかった(図3)。インドメタシン 3×10⁻⁶

表1 各実験群のpHおよびPco₂

実験群	n	pH	Pco ₂ (mmHg)
超低炭酸ガス分圧	32	7.80±0.01	15±1
低炭酸ガス分圧	23	7.55±0.01	28±1
正常炭酸ガス分圧	57	7.38±0.00	38±1
高炭酸ガス分圧	32	7.00±0.01	92±1

値：平均±標準誤差

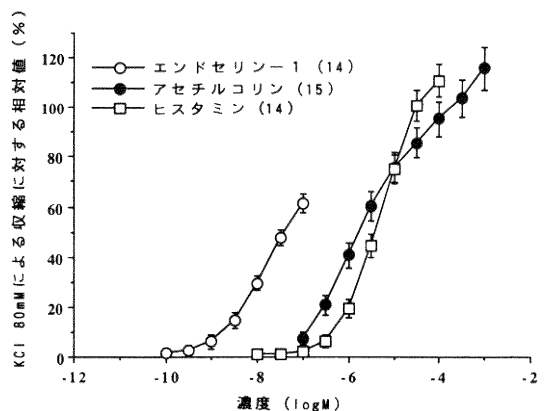


図1 正常炭酸ガス分圧におけるエンドセリン-1、アセチルコリン、ヒスタミンの用量作用曲線。括弧内は実験数を示す。気管平滑筋収縮閾値はエンドセリン-1がアセチルコリン、ヒスタミンと比較して有意に(p<0.01)低い。

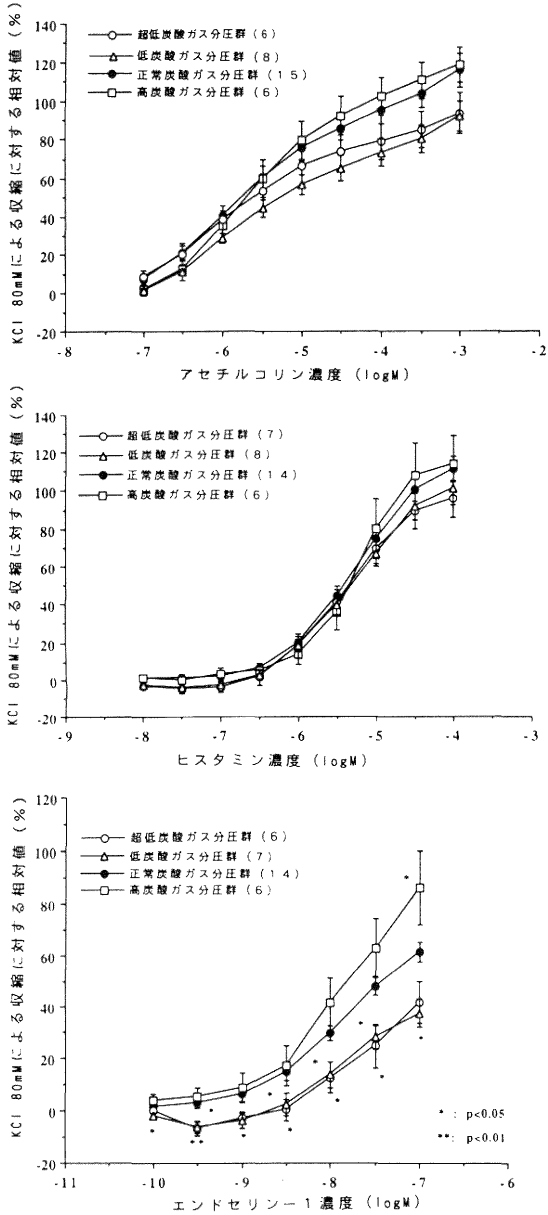


図 2 各実験群におけるアセチルコリン (上段), ヒスタミン (中段), エンドセリン-1 (下段) の用量作用曲線。

括弧内は実験数を示す。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ は正常炭酸ガス分圧群に対する有意差を表す。

アセチルコリン, ヒスタミンの収縮反応は炭酸ガス分圧に影響されない。エンドセリン-1の収縮反応は高炭酸ガス分圧により最高濃度において増強され, 超低炭酸ガス分圧により有意に抑制された。

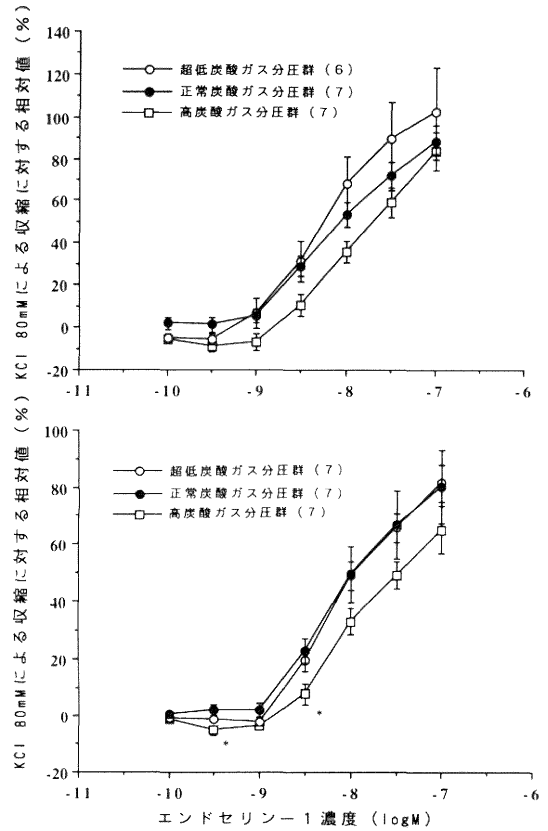


図 3 アスピリン 10^{-4} M (上段) およびインドメタシン 3×10^{-6} M (下段) の存在下での各実験群におけるエンドセリン-1の用量作用曲線。

括弧内は実験数を示す。* : $p < 0.05$ は正常炭酸ガス分圧群に対する有意差を表す。エンドセリン-1の収縮反応はアスピリン 10^{-4} M およびインドメタシン 3×10^{-6} M の存在下では超低炭酸ガス分圧に影響されない。

M の存在下ではエンドセリン-1 3×10^{-9} M, 3×10^{-8} M の収縮反応は高炭酸ガス分圧により抑制された (図 3, 下段)。

考 察

本研究より, モルモット摘出気管のエンドセリン-1収縮反応は炭酸ガス分圧により修飾されることがわかった。他方, アスピリン 10^{-4} M およびインドメタシン 3×10^{-6} M の存在下ではエンドセリン-1の収縮反応は超低炭酸ガス分圧により影響されなかった。したがって, エンドセリン-1気管収縮反応における炭酸ガス分圧の

影響に内因性エイコサノイドが関与することが示唆された。

エンドセリン-1の気道収縮におけるサイクロオキシゲナーゼ阻害薬の影響については見解の一致が得られていない。Hay⁸⁾は *in vitro* においてインドメタシンにより $3 \times 10^{-7}M$ エンドセリン-1の収縮が増強されたと報告している。Maggi ら⁹⁾, Macquin-Mavier ら⁶⁾は逆に *in vivo* および *in vitro* においてサイクロオキシゲナーゼ阻害薬によりエンドセリン-1の収縮が抑制されたと報告している。一方, Schumacher ら¹⁰⁾は *in vitro* においてインドメタシンはエンドセリン-1の用量作用曲線に影響しなかったと報告している。本研究の結果では, アスピリンおよびインドメタシン前処置標本でエンドセリン-1収縮反応の超低炭酸ガス分圧による抑制がみられず, インドメタシン前処置標本で逆に高炭酸ガス分圧下で抑制がみられた。したがって上記の結果の相異は炭酸ガス分圧の違いによる可能性もある。

エンドセリン-1はプロスタグランジン E_2 , I_2 およびトロンボキサン A_2 の産成を促進する⁵⁾とされている。これらのサイクロオキシゲナーゼ関連のエイコサノイドは気道のトーンに影響する⁶⁾⁷⁾ことが知られている。なかでもプロスタグランジン E_2 は気道拡張性に働くことが報告されている¹¹⁾¹²⁾。どのようなエイコサノイドがエンドセリン-1の気道収縮におよぼす P_{CO_2} の影響に関与するかを今後明らかにする必要がある。

われわれの従来の報告¹³⁾¹⁵⁾によると, ラット大動脈の血管平滑筋において高炭酸ガス分圧はノルエピネフリンによる収縮反応を抑制した。気管平滑筋のエンドセリン-1収縮反応においても血管平滑筋と同様の高炭酸ガス分圧による抑制作用が観察される可能性があった。しかし, 本研究の結果ではエンドセリン-1, アセチルコリン, ヒスタミンの収縮反応は高炭酸ガス分圧により抑制されなかった。他方, インドメタシンの存在下ではエンドセリン-1の収縮反応は高炭酸ガス分圧により抑制された。すなわち, サイクロオキシゲナーゼ関連のエイコサノイドの関与を排除した場合のエンドセリン-1の収縮反応は高炭酸ガス分圧により抑制されたと考えられる。

今回得られたエンドセリン-1の気管平滑筋収縮閾値濃度はアセチルコリン, ヒスタミンの約1/1000であり, エンドセリン-1はアセチルコリン, ヒスタミンよりもはるかに強力な気道収縮物質であることがわかった。この結果はこれまでの報告⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾¹⁶⁾とも一致している。本研究で得られたエンドセリン-1の気管平滑筋収縮閾

値 ($10^{-10}M$) は成人男子の正常血漿濃度 (1.59 pg/ml : $0.64 \times 10^{-12}M$)¹⁷⁾ のほぼ100倍である。しかしながら, 肺におけるエンドセリン-1の主たる産生部位は細気管支の上皮細胞であり¹⁸⁾, 喘息患者の気管支洗浄液からは高濃度のエンドセリン-1が検出⁴⁾されている。さらに最近の知見からは, エンドセリン-1は全身的に働くよりはむしろ局所的に働く物質であるとの見解¹⁸⁾¹⁹⁾が得られている。気管支局所のエンドセリン-1濃度は測定していないが, 本研究の結果は炭酸ガス分圧が特に気管・気管支痙攣患者において気道のトーンに影響することを示唆している。

以上をまとめると, エンドセリン-1の気管収縮反応は, 炭酸ガス分圧により修飾され, その炭酸ガス分圧の作用に内因性エイコサノイドが関与することが示唆された。

稿を終えるにあたり, 原稿を御校閲頂きました下地恒毅教授に謹んで感謝の意を表します。また, 終始御指導, 御助言頂きました福田悟助教授をはじめ, 麻酔学教室の皆様が心から感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**: 411~415, 1988.
- 2) Uchida, Y., Ninomiya, H., Saotome, M., Nomura, A., Ohtsuka, M., Yanagisawa, M., Goto, K., Masaki, T. and Hasegawa, S.: Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol*, **154**: 227~228, 1988.
- 3) Black, P.N., Ghatei, M.A., Bretherton-Watl, D., Takakashi, K., Krausz, T. and Bloom, S.R.: Endothelin is formed by cultured tracheal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis*, **139**: A52, 1989 (suppl).
- 4) Nomura, A., Uchida, Y., Kameyama, M., Saotome, M., Oki, K. and Hasegawa, S.: Endothelin and bronchial asthma. *Lancet* 747~748, Sep 23, 1989.

- 5) **Zoja, C., Benigni, A., Renze, D., Piccinelli, A., Perico, N. and Remuzzi, G.:** Endothelin and eicosanoid synthesis in cultured mesangial cells. *Kidney International*, **37**: 927~933, 1990.
- 6) **Macquin-Mavier, I., Leveau, M., Istin, N. and Harf, A.:** Mechanisms of endothelin-mediated bronchoconstriction in the guinea pig. *J Pharmacol Exp Therap*, **250**: 740~745, 1989.
- 7) **Battistini, B., Filep, J. and Sirois, P.:** Potent thromboxane-mediated in vitro bronchoconstrictor effect of endothelin in the guinea-pig. *Eur J Pharmacol*, **178**: 141~142, 1990.
- 8) **Hay, D.W.P.:** Mechanism of endothelin-induced contraction in guinea-pig trachea: comparison with rat aorta. *Br J Pharmacol*, **100**: 383~392, 1990.
- 9) **Maggi, C.A., Patachini, R., Giuliani, S. and Meli, A.:** Potent contractile effect of endothelin in isolated guinea-pig airways. *Eur J Pharmacol*, **160**: 179~182, 1989.
- 10) **Schumacher, W.A., Steinbacher, T.E., Allen, G.T. and Ogletree, M.L.:** Role of thromboxane receptor activation in the bronchospastic response to endothelin. *prostaglandins*, **40**: 71~79, 1990.
- 11) **Ito, Y. and Tajima, K.:** Actions of indomethacin and prostaglandins on neurotransmission in dog trachea. *J Physiol Lond*, **319**: 379~392, 1981.
- 12) **Walters, E.H., O'byrne, L.M., Fabbri, P.D., Graf, M., Holtzman, M.J. and Nedel, J.A.:** Control of neurotransmission by prostaglandins in canine trachealis smooth muscle. *J Appl Physiol*, **57**: 129~134, 1984.
- 13) **Fukuda, S., Matsumoto, M., Nishimura, N. et al:** Endothelial modulation of norepinephrine-induced constriction of rat aorta at normal and high CO₂ tensions. *Am J Physiol*, **258**: H1049~1054, 1990.
- 14) **福田 悟:** 高炭酸ガスと血管内皮細胞機能—加齢の影響. *新潟医学会雑誌*, **104**: 1~6, 1990.
- 15) **福田 悟:** 血管内皮細胞の生理・薬理学的意義. *臨床麻酔*, **11**: 1261~1268, 1987.
- 16) **Cardell, L.O., Uddman, R. and Edvinsson, L.:** Analysis of endothelin-1-induced contractions of guinea-pig trachea, pulmonary veins and different types of pulmonary arteries. *Acta Physiol Scand*, **139**: 103~111, 1990.
- 17) **Suzuki, N., Matsumoto, H., Kitada, C., Masaki, T. and Fujino, M.:** A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J Immunol Methods*, **118**: 245~250, 1989.
- 18) **MacCumber, M.W., Ross, C.A., Glaser, B.M. and Snyder, S.H.:** Endothelin visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 7285~7289, 1989.
- 19) **Mima, T., Yanagisawa, M., Shigeno, T., Saito, A., Goto, K., Takakura, K. and Masaki, T.:** Endothelin acts in feline and Canine cerebral arteries from the adventitial side. *Stroke*, **20**: 1553~1556, 1989.

(平成4年1月27日受付)