

ラット腸間膜血管床における β アドレナリン受容体を介する血管拡張作用

岩下 眞之*, 遠藤 正之*, 奥村 福一郎*

要 旨

β アドレナリン受容体刺激による血管拡張反応の機序を解明するため、ラット腸間膜血管床灌流標本を用いて腸間膜動脈の灌流圧測定を行った。

1) トロンボキサンA₂の類似体U46619により上昇させた灌流圧は、非選択的 β 刺激薬イソプロテレノールの累積的投与により、濃度依存性に低下した。イソプロテレノールの血管拡張作用は、選択的 β_2 遮断薬ICI-118,551によって有意に抑制された。ICI-118,551存在下に選択的 β_1 遮断薬アテノロールを投与すると、イソプロテレノールの血管拡張作用はさらに抑制される傾向にあった。次に選択的 α_1 および α_2 遮断薬であるプラゾシンとヨヒンビン並びにICI-118,551を前処置した標本において、U46619によって上昇した灌流圧を、ノルエピネフリンは濃度依存性に低下させた。このノルエピネフリンの血管拡張作用は、アテノロールによって有意に抑制された。以上の結果からラット腸間膜血管床灌流標本において、 β_2 受容体のみならず、 β_1 受容体の刺激によっても血管拡張作用が生じることが確認された。

2) ラット腸間膜血管床灌流標本において、界面活性剤CHAPSで血管内皮を除去すると、U46619により上昇した灌流圧に対するイソプロテレノールの血管拡張作用は、低濃度領域で有意に抑制された。また低濃度イソプロテレノールの血管拡張作用は、NO合成酵素阻害薬N^ω-ニトロ-L-アルギニンによって有意に抑制されたが、シクロオキシゲナーゼ阻害薬インドメサシンによつては

抑制されなかった。これらの結果からラット腸間膜血管床灌流標本において、低濃度のイソプロテレノールの血管拡張作用の一部は内皮依存性であり、その機序にはNOが関与していることが示唆された。

はじめに

アドレナリン受容体は、1948年にAhlquistにより各種平滑筋組織の交感神経作動薬に対する反応性の相違からおもに血管、輸精管等に存在する収縮性の α 受容体とおもに気管支、腸管等に存在する弛緩性の β 受容体に大別され¹⁾、その後さらに α 受容体は α_1 、 α_2 のサブタイプに²⁾、 β 受容体は β_1 、 β_2 のサブタイプに細分化されている³⁾。そしてその作用は、一般的に α_1 刺激により血管収縮、 β_2 刺激により血管や気管支の拡張、 β_1 刺激により心拍数の増加、心筋収縮力の増加が生じるとされてきた。しかし、1980年代以降に β_1 刺激によっても血管拡張反応が生じることが、ラット肺動脈、プタ冠状動脈および脳底動脈、ヒト・サル・イヌ冠状動脈などの輪状標本を用いた実験で報告されている⁴⁻⁸⁾。また、従来 β 刺激による平滑筋弛緩作用は平滑筋細胞への直接作用によると考えられていたが、1992年には、 β 受容体刺激によりラット大動脈輪状標本が、1993年にはラット腸間膜動脈輪状標本が内皮依存性に弛緩することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。そこで今回著者らは、血圧や臓器血流に重要な影響を及ぼす抵抗血管領域の研究にしばしば用いられているラット腸間膜血管床灌流標本を用いて、 β 刺激による血管拡張反応に β_1 サブタイプが関与するかどうか、また内皮依存性かどうかを検討した。さらに β 刺激に

*横浜市立大学医学部麻醉科学教室

よる血管拡張反応が内皮依存性であれば、それがどのような機序を介しているのかを検討した。

方 法

エーテル麻酔下の雄性ウイスターラット (200~250 g) にヘパリン (500 U/kg) を静脈内投与したのち、腸間膜血管床を小腸を含めて摘出した。ついでクレブスリンゲル液中で顕微鏡下に小腸を除去し、大動脈を経由して腸間膜動脈にカニューレーションした。5%CO₂-95%O₂の混合ガスで酸素化し (pHは7.35~7.45), 37℃に保たれたクレブスリンゲル液で定流量灌流 (6 ml/min) を行い、灌流圧を測定した¹²⁾。クレブスリンゲル液の組成は、NaCl 119.0; KCl 4.5; MgCl₂ · 6H₂O 0.5; NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.2; CaCl₂ 2.5; NaHCO₃ 2.5; glucose 11.0 mM である。

1. β受容体刺激による血管拡張反応におけるβ₁サブタイプの関与の検討

トロンボキサン A₂ の類似体 U 46619 10⁻⁷M で灌流圧を上昇させ、灌流圧が安定したのち、非選択的β刺激薬イソプロテレノール (10⁻⁹~10⁻⁶M), あるいはβ₁刺激薬ノルエピネフリン (10⁻⁷~3×10⁻⁶M) を累積的に投与した。ノルエピネフリンの投与に際してはα₁, α₂受容体を遮断するためにプラゾシン 10⁻⁶M, ヨヒンビン 10⁻⁶M を前処置した。また選択的β₁遮断薬としてアテノロール 10⁻⁶M, β₂遮断薬として ICI-118,551 10⁻⁷M を使用した。

2. β受容体刺激による血管拡張反応における内皮依存性の検討

腸間膜動脈の内皮細胞の除去は、界面活性剤である CHAPS (5 mg/L) を90秒灌流することにより行った。アセチルコリン 3×10⁻⁶M の内皮依存性弛緩作用が消失することで内皮除去の確認をした。内皮が正常な標本において、NO合成酵素阻害薬としてはN^ω-ニトロ-L-アルギニン10⁻⁷M, シクロオキシゲナーゼ阻害薬としてはインドメサシン10⁻⁵M を使用した。

3. 使用した薬物は次のとおりである：

U 46619 (9, 11-Dideoxy-11α, 9α-epoxymethanoprostaglandin F₂α), CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate), イソプロテレノール, ヨヒンビン, ノルエピネフリン, インドメサシン, アテノロール, アセチルコ

リン, N^ω-ニトロ-L-アルギニン (Sigma), プラゾシン, ニトロプルシドナトリウム (和光純薬), ICI-118, 551 (erythro-DL-1 (7-methylindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol, R.B.I.)。

U 46619 はエタノールで溶解し、アテノロール・インドメサシンは、ジメチルスルホキシドで溶解した。

4. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で表示し、統計解析はANOVA, Bonferroni/Dunn法を用い、P<0.05を統計学的に有意とした。

結 果

1. β受容体刺激による血管拡張反応におけるβ₁サブタイプの関与の検討

U 46619 10⁻⁷M による灌流圧上昇後 (定常圧約15 mmHgが^s, U 46619 10⁻⁷M により約70 mmHgまで上昇), イソプロテレノール (10⁻⁹~10⁻⁶M) の累積的投与により, U 46619 10⁻⁷M による灌流圧の上昇は濃度依存性に減少し, 10⁻⁷M でイソプロテレノール投与前値の23.0±2.5% (n=4) となった。ICI-118,551 10⁻⁷M を前処置するとイソプロテレノール 10⁻⁷M により灌流圧の上昇は, イソプロテレノール投与前値の43.9±5.7% となり, イソプロテレノールの血管拡張作用は, ICI-118,551 によって有意に抑制された。ICI-118,551 10⁻⁷M 存在下にさらにアテノロール 10⁻⁶M を処置すると, イソプロテレノール 10⁻⁷M により灌流圧の上昇は59.0±7.9% となり, イソプロテレノールの血管拡張作用は, 有意ではないがさらに抑制される傾向にあった (図1)。

プラゾシン 10⁻⁶M, ヨヒンビン 10⁻⁶M, ICI-118,551 10⁻⁷M 存在下に, U 46619 10⁻⁷M を投与し灌流圧を上昇させた後, ノルエピネフリン (10⁻⁷~3×10⁻⁶M) を累積的に投与すると灌流圧は濃度依存性に低下し, 10⁻⁶M で灌流圧の上昇はノルエピネフリン投与前値の29.2±6.9% となった (n=3)。アテノロール 10⁻⁶M を前処置するとノルエピネフリン10⁻⁶M により灌流圧の上昇は投与前値の57.4±7.9% となり, ノルエピネフリンの血管拡張作用はアテノロールによって有意に抑制された (図2)。

2. β受容体刺激による血管拡張反応における内皮依存性の検討

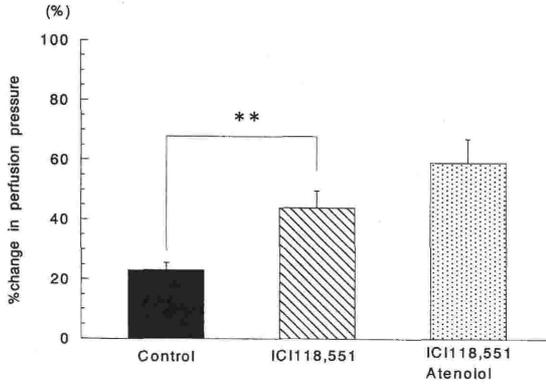


図1 イソプロテレノール $10^{-7}M$ の血管拡張作用 ($n=4$)
 U46619 $10^{-7}M$ によって上昇した灌流圧を100%とした。■ イソプロテレノール $10^{-7}M$ 存在下での灌流圧の上昇の割合。▨ ICI 118, 551 $10^{-7}M$ を前処置後のイソプロテレノール $10^{-7}M$ 存在下での灌流圧の上昇の割合。▩ ICI 118, 551 $10^{-7}M$ およびアテノロール $10^{-6}M$ 前処置後のイソプロテレノール $10^{-7}M$ 存在下での灌流圧の上昇の割合。
 ** : $P < 0.01$ (mean \pm SE)

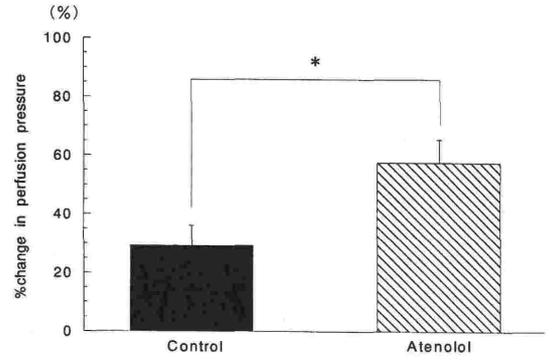


図2 ノルエピネフリン $10^{-6}M$ の血管拡張作用 ($n=3$)
 プラゾシン $10^{-6}M$, ヨヒンビン $10^{-6}M$, ICI 118, 551 $10^{-7}M$ 前処置後, U46619 $10^{-7}M$ によって上昇した灌流圧を100%とした。■ ノルエピネフリン $10^{-6}M$ 存在下での灌流圧の上昇の割合。▨ アテノロール $10^{-6}M$ 前処置後のノルエピネフリン $10^{-6}M$ 存在下での灌流圧の上昇の割合。
 * : $P < 0.05$ (mean \pm SE)

表1 イソプロテレノールの血管拡張作用に及ぼす内皮の影響

イソプロテレノール	弛緩率 (%)	
	内皮 (+) $n=7$	内皮 (-) $n=6$
$10^{-9}M$	36.6 \pm 5.4	22.5 \pm 2.7 *
$10^{-8}M$	80.2 \pm 2.8	53.5 \pm 5.4 **
$10^{-7}M$	87.3 \pm 3.2	78.0 \pm 4.1
$10^{-6}M$	90.2 \pm 2.8	79.9 \pm 4.3

弛緩率は, U46619 $10^{-7}M$ により上昇した灌流圧を100%とし, イソプロテレノールによって減少した灌流圧の割合を示した。
 * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$ (mean \pm SE)

血管内皮細胞が温存された標本では, U46619 $10^{-7}M$ による灌流圧の上昇はアセチルコリン $3 \times 10^{-6}M$ でほぼ完全に抑制された。これに対し CHAPS を処置した標本では, U46619 $10^{-7}M$ により上昇した灌流圧はアセチルコリン $3 \times 10^{-6}M$ で低下しなかった。このことは CHAPS によって, 内皮細胞が適切に除去されていること示している。

血管内皮細胞存在下, 非存在下でのイソプロテレノールの血管拡張作用を表1に示す。U46619 $10^{-7}M$ による灌流圧の上昇に対するイソプロテレノールの血管拡張作用は内皮を除去することにより, 低濃度領域 ($10^{-9}M, 10^{-8}M$) で有意に抑制された。

次に N^{ω} -ニトロ-L-アルギニン $10^{-4}M$ を処置した標本において, U46619 $10^{-7}M$ で灌流圧を上昇させたのちに, イソプロテレノール $10^{-8}M$ を投与すると灌流圧の低下は $28.7 \pm 8.8\%$ であり, N^{ω} -ニトロ-L-アルギニン $10^{-4}M$ 未処置標本での灌流圧の低下 ($62.8 \pm 7.6\%$) に比し有意に小さな値であった (表2)。これに対し, ニトロプルシドナトリウム $10^{-7}M$ の血管拡張作用は, N^{ω} -ニトロ-L-アルギニン $10^{-4}M$ の前処置によって抑制されなかった。(結果は示していない。) インドメサシン $10^{-5}M$ の前処置は, イソプロテレノールの血管拡張作用を抑制しなかった (表2)。

表2 イソプロテレンール (10^{-8} M) の血管拡張作用に及ぼす N^{ω} -ニトロ-L-アルギニンおよびインドメサシンの影響

	弛緩率 (%)	
	対照群	薬物投与群
N^{ω} -ニトロ-L-アルギニン 10^{-4} M (n=7)	62.8±7.6	28.7±8.8 *
インドメサシン 10^{-5} M (n=3)	56.0±5.4	52.9±6.8

弛緩率は、U 46619 10^{-7} M により上昇した灌流圧を100%とし、イソプロテレンールによって減少した灌流圧の割合を示した。
* : $P < 0.05$ (mean±SE)

考 察

1. β 受容体刺激による血管拡張反応における β_1 サブタイプの関与の検討

従来よりアドレナリン受容体を介する血管平滑筋弛緩は β_2 受容体を介するとされており、一方 β_1 刺激では主に心臓に作用し心拍数の増加と心筋収縮力の増加をもたらすとされてきた^{1,3)}。しかし、1981年にラット肺動脈輪状標本が、フェノキシベンザミンおよび ICI-118,551 存在下でノルエピネフリンにより弛緩することから、血管平滑筋の弛緩作用は β_2 受容体のみならず β_1 受容体によっても生じる可能性のあることが示された⁴⁾。心臓においても β_1 のみならず β_2 受容体刺激によっても心拍数の増加、心筋収縮の増大が生ずることが示されており¹³⁾、従来から言われていた心臓は β_1 、平滑筋は β_2 という簡単な図式はもはや成り立たないものと考えられる。しかし、血管における β_1 を介する弛緩作用は、今までのところ太い血管についてのみ検討されている。そこで著者らは、血圧や臓器血流に重要な影響を及ぼす抵抗血管領域の研究にしばしば用いられているラット腸間膜血管床灌流標本を用いて、 β 刺激による血管拡張反応に β_1 サブタイプが関与するかどうかを検討した。今回、 α_1 、 α_2 、 β_2 遮断薬存在下でノルエピネフリン $10^{-7} \sim 3 \times 10^{-6}$ M は、U 46619 10^{-7} M により上昇した灌流圧を濃度依存性に抑制し、かつこの作用は、選択的 β_1 遮断薬であるアテノロールによって有意に抑制された。この結果は抵抗血管レベルにおいても β_1 受容体を介した血管拡張反応が存在しうることを強く示唆している。交感神経終末から放出されたノルエピネフリンは、血管系に対しては収縮作用のみを有すると考えられていたが、交感神経系が β_1 を介して血管拡張作

用をきたすような抵抗血管系が存在するのかもしれない。今後、 β_1 を介する血管拡張作用の生理的意義について検討していく必要がある。

2. β 受容体刺激による血管拡張反応における内皮依存性の検討

一般的に、 β 受容体刺激による血管拡張反応のメカニズムは、次のように考えられている。血管平滑筋細胞膜上に存在する β 受容体への β 作動薬の結合により、アデニル酸シクラーゼが活性化され、細胞内サイクリックAMP (adenosine 3,5,-cyclic monophosphate ; cAMP) が生成される。ついで cAMP 依存性蛋白リン酸化酵素 (protein kinase A ; PKA) の活性化が起こり、ミオシン軽鎖キナーゼがリン酸化されることなどにより血管拡張が生じるとされている¹³⁾。しかし、1988年にラット大動脈輪状標本でイソプレナリンの弛緩作用がグアニル酸シクラーゼの阻害薬であるメチレンブルーにより抑制されることが報告された¹⁴⁾。さらに Gray らは、1992年にラット大動脈輪状標本で、cAMP とサイクリック GMP (guanosine 3,5,-cyclic monophosphate ; cGMP) の増加を伴うイソプレナリン、フォルスコリンの弛緩作用が、内皮除去で完全に消失し、かつ NO 合成酵素阻害薬によって、イソプレナリン、フォルスコリンによる cGMP の生成は抑制されるが、cAMP の生成は抑制されないことから、イソプレナリンは内皮細胞膜上の β 受容体に結合して cAMP を生成し、これが直接あるいは間接的に NO を放出すると結論付けている⁹⁾。また、1993年にはラット腸間膜動脈輪状標本も β 受容体刺激によって内皮依存性に弛緩することが報告されている^{10,11)}。一般的に内皮依存性の血管拡張作用の機序として、NO、プロスタグランジン、あるいは過分極因子によるものが考えられる¹⁵⁾。今回の腸間膜血管床灌流標本におい

ても、イソプロテレノールの血管拡張作用は、内皮除去により 10^{-9}M , 10^{-8}M という低濃度領域で有意に抑制された。このことは、 β 受容体を介する生理的な血管拡張反応には内皮細胞の存在が重要であることを強く示唆している。この内皮依存性の弛緩作用は、インドメサシンで抑制されず、 N^{ω} -ニトロ-L-アルギニンで有意に抑制されたことから、イソプロテレノールの内皮依存性血管拡張作用にはNOが関与していることが示唆された。本実験では、過分極因子に関しては検討していないが、CHAPSにより内皮を除去した標本と N^{ω} -ニトロ-L-アルギニンによってNO合成酵素を抑制した標本で、イソプロテレノール 10^{-8}M の血管拡張作用はいづれの処置によってもほぼ30%減弱した。このようにイソプロテレノールの血管拡張作用が減弱される程度が両者ほぼ同等なことから、過分極因子の関与はあったとしてもわずかであると考えられる。高血圧、動脈硬化、糖尿病などで血管内皮が障害されることは良く知られているが、このような場合には、 β 受容体を介する血管拡張反応が減弱している可能性がある。今後さらに β 受容体を介する内皮依存性血管拡張作用の生理的意義について検討する必要がある。

結 語

ラット腸間膜血管床において、 β_2 アドレリン受容体のみならず、 β_1 アドレナリン受容体の刺激によっても血管拡張反応が生じることを示した。また、低濃度のイソプロテレノールの血管拡張作用の一部は内皮依存性であり、その機序にはNOが関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Ahlquist RP : A study of the adrenergic receptors. *Am J Physiol* 153 : 586-600, 1948
- 2) Berthelsen S, Pettinger WA : A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. *Life Sci* 21 : 595-606, 1977

- 3) Land AM, Arnold A, McAuliff JP, et al : Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature Lond* 214 : 597-598, 1967
- 4) O'donnell SR, Wanstall JC : Demonstration of both β_1 - and β_2 -adrenoceptors mediating relaxation of isolated ring preparations of rat pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 74 : 547-552, 1981
- 5) Horst MA, Robinson CP : Action of agonists and antagonists on adrenergic receptors in isolated porcine coronary arteries. *Can J Physiol Pharmacol* 63 : 867-871, 1985
- 6) Yamada S, Kashiwabara T, Nakayama K, et al : Demonstration of β_1 -adrenoceptor mediating relaxation of porcine coronary artery by radioligand binding and pharmacological methods. *Life Sci* 43 : 1999-2006, 1988
- 7) Miyamoto A, Ito K, Nishio A : Characterization of beta-adrenoceptors in Pig basilar artery from functional and radioligand binding studies. *Jpn J Pharmacol* 61 : 93-99, 1993
- 8) Toda N, Okamura, T : Beta adrenoceptor subtype in isolated human, monkey and dog epicardial coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 253 : 518-524, 1990
- 9) Gray DW, Marshall I : Novel signal transduction pathway mediating endothelium dependent β -adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 107 : 684-690, 1992
- 10) W Matthijs Blankesteijn, Theo Thien : Effect of NG-monomethyl-L-arginine on the β -adrenoceptor mediated relaxation of rat mesenteric resistance arteries. *Life Sci* 52 : 135-139, 1993
- 11) Graves J, L Poston : β -adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries, a role for the endothelium and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108 : 631, 1993
- 12) MacGregor DD : The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol* 177 : 21-30, 1965
- 13) Opie LH : Receptors and signal transduction. In : *The heart physiology, from cell to circulation* 3rd ed, New York, Raven Press, 1997, pp.173-207
- 14) Grace GC, Macdonald PS, Dusting GJ : Cyclic nucleotide interactions involved in endothelium- dependent dilatation in rat aortic rings. *Eur J Pharmacol* 148 : 17-24, 1988
- 15) Cooks TM : Endothelium-dependent vasodilator mechanisms. In : Garland CJ, Angus JA eds, *Pharmacology of vascular smooth muscle*, Oxford university press, 1996, pp.233-251

On the Mechanism of β -adrenoceptor-induced Vasodilation in Rat Mesenteric Vascular Beds

Masayuki Iwashita*, Masayuki Endou*, Fukuichiro Okumura*

*Department of Anesthesiology, Yokohama City University School of Medicine,
Kanagawa, Japan

Adrenoceptors were initially classified by Ahlquist as α and β based on the different contractile effects of epinephrine, norepinephrine and other related agonists on the smooth muscles. The β adrenoceptors were further subdivided into two categories, namely β_1 and β_2 . The former mediates chronotropic and inotropic responses of the heart, while the latter produces peripheral vasodilation. However, recent studies demonstrated that activation of β_1 -adrenoceptors also produced vasodilation of isolated pulmonary or coronary arteries in various species including human. In principle, β -adrenoceptor agonists are thought to produce their vasodilatory effects by activation of

adenylate cyclase-cyclicAMP-proteinkinase A pathway within the smooth muscles. Interestingly, possible involvement of nitric oxide in β -adrenoceptor-mediated vasodilation was suggested in rat aortic and mesenteric preparations. Therefore, we investigated the mechanism of β -adrenoceptor-mediated vasodilation in rat mesenteric vascular beds. The results suggest that β_1 -as well as β_2 -adrenoceptor stimulation produces vasodilation, and that nitric oxide released from the endothelium might be involved in the vasodilatory effect of isoproterenol at lower concentrations.

Key words : β_1 -Adrenoceptor, Endothelium, Nitric oxide, Mesenteric vascular beds

(Circ Cont 20 : 4 ~ 9 , 1999)