

# 圧力—直径関係からみた血管作動物質の効果

原 川 清 仁

信州大学医学部薬理学教室  
(主任: 千葉 茂俊教授)

## Effect of Vasoactive Agents on Pressure-diameter Relationship

Kiyohito HARAKAWA

Department of Pharmacology, Shinshu University School of Medicine  
(Director: Prof. Shigetoshi CHIBA)

The purpose of the present study is to elucidate effects of vasoactive substances on the arterial wall distensibility by analyzing the pressure (P) and diameter (D) relationship. For this purpose, we constructed an instrument to investigate the diameter response to distending pressure.

Cylindrical segments of canine renal arteries were used and their diameter changes were measured while the transmural pressure was raised continuously from 0 to 150 mmHg at a speed of 0.5 mmHg/sec. The diameter measurement was made noninvasively by using a solid-state linear image sensor. Norepinephrine (NE) and high K solution were used as vasoconstrictor agents. The vasoconstrictor responses were analysed by use of a potent alpha-adrenoceptor blocking agent, phentolamine, a calcium inward current inhibitor, diltiazem, or Ca ion-free solution with EGTA. The experimental data were analyzed by an analysis of variance and by an equation of the P-D relationship. This equation is shown below and includes four parameters:  $D_{min}$ ,  $D_{max}$ ,  $M$ , and  $\epsilon$ .

$$D = D_{min} + (D_{max} - D_{min}) / (1 + M \exp(-P/\epsilon)),$$

where  $M = (D_{max} - D(0)) / (D(0) - D_{min})$  and  $D(0)$  is the diameter at a pressure of zero.

The pharmacological natures of the vasoactive agents, which are reported in the literature, were demonstrated through the effects on the P-D relationships. Their characteristics were observed in the relationships and described satisfactorily by the parameters appearing in the equation. The magnitude of the parameter  $M$  reflected well the experimental data obtained in various degrees of vascular constriction. *Shinshu Med. J.*, 35: 627-639, 1987

(Received for publication March 9, 1987)

**Key words:** pressure-diameter relationship, dog renal artery, vascular smooth muscle, vasoactive agents, mathematical description of pressure-diameter relationship

圧力—直径関係, イヌ腎動脈, 血管平滑筋, 血管作動物質, 圧力—直径関係の数学的記述

### I はじめに

血管, 特に筋性血管, 動脈は, その壁中に多量に含まれる平滑筋の収縮レベルを変えることにより種々の組織に送り込む血流量の調節を行っている。血管の収

縮機構は, 細胞内に遊離する Ca の量を調節することにより行われることが近年の研究により解明されてきた。その遊離機構には, 細胞外から細胞内への流入によるものと, 細胞内の筋小胞体からの Ca 遊離をおこすものがある。前者には細胞膜電位依存によるもの

と、細胞膜上の受容体に作用して細胞膜上の Ca チャネルを開き細胞内へ Ca イオンを流入する経路が解明されている<sup>1)2)</sup>。しかし、生体内では血管内圧が変動し、内径が絶えず変化する。このような状況下では細胞膜は、動的な力学的拘束を受け細胞膜上の Ca イオン調節因子に影響を与えることも予想される。

血液の輸送を始めとする血管の生理機能を理解するためには、血管壁の血圧に対する応答、すなわち変形特性を把握しておく必要がある。平滑筋の収縮レベルによって血管はその変形特性が大きく変わる<sup>3)4)</sup>。さらに、平滑筋収縮の調節機構の違いにより変形特性が変化することも十分に予測される。

本研究の目的の1つは円筒状の摘出血管標本に対し、非接触で外直径を測定しながら、圧力-直径関係を調べるための装置を作製することである。さらに第2の目的は、作用機序の異なる種々の薬物を投与し、その圧力-直径関係の分析から血管壁伸展特性に対する薬物作用効果の差異を調べることである。

## II 実験方法および解析法

### A 実験方法

実験装置の概略を図1に示した。血管に対する加圧は、ポンプ(中川誠光堂, ツルース万能注入機 A-2型)

を用いて保生液を注入し、液柱の高さを挙上する方法によった。圧力(血管内外圧力差, transmural pressure)を0から150mmHgまで、4分間の時間<sup>5)</sup>をかけて上げたときの血管直径の変化を測定した。血管外直径の測定は、実体顕微鏡の写真撮影装置(日本光学 PFX)のスクリーン上に投影された血管の陰影像を、固体撮像素子(イメージセンサ, 松下電子 MN 8090)で検出する方法によった。この素子は、直線上に28 $\mu$ m間隔で1024個並んだフォトダイオードと走査回路を集積している。イメージセンサの駆動回路には、MEL 512K サーキットボード(松下電子)をMN8090用に改良したものを用いた。本研究で開発した装置は、血管の投影像を利用することにより、血管に対し非接触的に直径の変化が測定可能である。内圧の検出には、拡散型半導体圧力変換器(豊田工機, PD 104K)を用いた。

体重5~20kgの雑種成犬55頭をペントバルビタール25mg/kgで麻酔後、脱血屠殺し標本を摘出した。標本には平滑筋を比較的多く含み、 $\alpha$ 受容体密度が大きいと言われる腎動脈を選定した。得られた血管は、4°Cの保生液に保存し48時間以内に実験に供した。外膜に付着している結合組織を十分に剝離した後、標本の両端に血管内径に一致する金属針を挿入した。標本

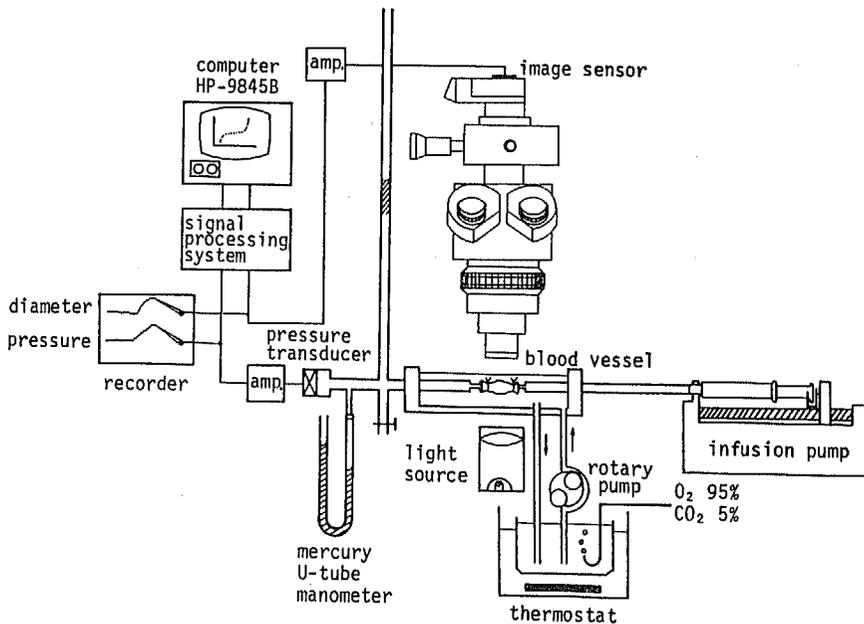


図1 実験装置の模式図

を生体長に伸展し、容量が 35ml のチェンバーにこれを装着した。チェンバーは 37°C に保たれた保生液で循環した。実験に先立ち、血管内腔に対し、15mmHg の一定圧力の負荷の状態、約 1 時間の灌流を行った。保生液は、組成：NaCl 120.0, KCl 5.9, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.2, glucose 5.55, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.5, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1.2 (それぞれ mmol/l) を含み、実験中は、95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> の混合ガス通気を行い pH を 7.4 に保った。

昇圧と減圧のサイクルを 30 分の間隔で 2 回繰り返して行い、2 回目の昇圧時の圧力と直径の関係を無処置対照群のデータとした。実験中は圧力と直径を、ペンレコーダー、U 字管圧力計でモニターしながら、2 秒のサンプリング・タイムでコンピュータ制御 (横川ヒューレットパッカード社, 9845B) のもとに A/D 変換を行い、そのデータをテープに保存した。

Norepinephrine (NE) および高濃度 K 保生液による平滑筋賦活時の圧力—直径関係を得るために、次の手順を取った。一定濃度の NE, KCl を含む保生液を血管内腔より約 15mmHg の一定圧力で灌流し、血管径が安定したのを確認して、昇圧・減圧を行った。NE, KCl に対し圧力—直径関係が得られた後、直ちに正常の保生液に置換し、約 15mmHg の圧力で 20~60 分間の灌流を行った。標本直径が完全に元の状態に戻り NE, KCl の効果が消失したのを確認し、次の薬物を投与し、再び同様な手順で圧力—直径関係を求めた。KCl を含む保生液には、正常保生液中の NaCl を等モルの KCl で置換した等張性高 K 保生液を使用した。また、拮抗薬を作用させるときには、始めに拮抗薬を含む保生液を約 15mmHg の一定圧力で 5~10 分間灌流し、前処置を行った。次に作用薬、拮抗薬を含む保生液で灌流し、血管径が安定した後に昇圧を行った。Ca-free 保生液を用いた実験では、血管内腔・チェンバー内を、EGTA 1mmol/l を含む Ca-free 保生液で置換し、5 分間灌流した。次に血管内腔を EGTA 1mmol/l と作用薬を含む保生液で灌流し、血管径が安定した後に昇圧を行った。

薬物には、dl-noradrenaline hydrochloride (三共), phentolamine mesylate (武田), diltiazem hydrochloride (田辺) を使用した。

## B 解析方法

平滑筋収縮レベルの如何にかかわらず血管の圧力 (P), 直径 (D) の関係を表す方程式として、

$$D = D_{\min} + (D_{\max} - D_{\min}) / (1 + M \exp(-P/\epsilon)) \quad (1)$$

が導かれている<sup>6)</sup>。ここに、 $D_{\min}$ ,  $D_{\max}$ ,  $M (= (D_{\max} - D(0)) / (D(0) - D_{\min}))$ ,  $\epsilon$  は定数である。

この式は次のモデルを想定して導かれた。収縮状態における圧力—直径関係は、図 2 のように、ある圧力に達するまで直径の変化が小さいが、その圧力を境に急激な伸びを生じ、高い圧力で、再び変形が小さくなるという特徴を有する。このときの平滑筋の状態に注目すると、transmural pressure が低いときには平滑筋のほとんどすべてが非伸展状態にあり、十分に高い圧力レベルでは大部分の平滑筋が伸展された状態にあると考えられる。そこで、血管壁中の平滑筋は、一般的には伸展された状態にあるものと、非伸展状態にあるものの 2 つに分けて考えることができる。非伸展平滑筋を含む血管壁のバネ定数を  $E_c$ , 伸展平滑筋層のバネ定数を  $E_s$  とすれば、血管壁の伸展性は、並列に並べた 2 つのバネの伸展性と類推的に考えてよい。それぞれのバネの強さは、伸展あるいは非伸展平滑筋の相対的割合に依存しているもので、圧力が低いときには、伸展平滑筋はほとんどなく壁の伸展性はもっぱら  $E_c$  で与えられ、逆に高い圧力では  $E_s$  によって血管壁伸展特性は特徴付けられる。バネ定数の表記を  $dP/dD$  で表し、このときの  $dD$  の直径変化量を、 $E_c$  に対しては、 $D - D_{\min}$ ,  $E_s$  に対しては、 $D_{\max} - D$  で代表させ、それに対応した圧力の変化量  $dP$  を、一定値  $\epsilon$  とすれば、次式が導かれる。

$$\begin{aligned} dP/dD &= E_c + E_s \\ &= \epsilon / (D - D_{\min}) + \epsilon / (D_{\max} - D) \end{aligned} \quad (2)$$

この式を積分することにより (1) 式が導かれる。ここで  $\epsilon$  は式から理解されるように圧力と同じ次元、すなわち弾性率とも解釈される定数である。

圧力と直径の測定値から (1) 式の 4 つの定数を推定するために、線形化法による非線形回帰分析を行った<sup>7)</sup>。解析に利用した測定値数は、各曲線につき 90~150 点である。

## C 統計解析

作用薬の濃度変化、遮断薬の濃度変化による圧力—直径関係の各群間の比較検討には分散分析を用い、有意水準は 0.05 以下とした。圧力—直径関係の曲線群の分析に供する値としては、横軸 (直径) を規準化したグラフ (図 4) において、圧力を 0mmHg から 150mmHg まで 1mmHg づつ上昇させたときの直径の総和を用いた。

III 結 果

A 圧力-直径関係の再現性と血管の耐久性

血管の伸展性に及ぼす各種薬物の効果を調べるため、実験は長時間にわたり、また 0~150mmHg の昇圧、減圧を繰り返すため血管の耐久性、反応の再現性が保証されなければならない。図2に NE  $1 \times 10^{-5}$ mol/l を投与し11回昇圧・減圧を行った際の昇圧11回分の圧力-直径関係を示した。曲線はほぼ安定しており反応の再現性が保証されていると見なし得る。

B 圧力-直径関係に及ぼす NE の効果、および NE に対する phentolamine と diltiazem の効果

1 圧力-直径関係に及ぼす NE の効果

図3の点線は、同一標本に対して、保生液中の NE の濃度を变化させた場合に得られる圧力と直径の測定

値を示している。NE の濃度が  $1 \times 10^{-5}$ mol/l (点線A) の高濃度では低圧において直径の変化が小さく、80~90mmHg で急激な伸びを生じる。NE の濃度が  $5 \times 10^{-6}$ mol/l では、圧力-直径関係の勾配は低圧レベルにおいて大きく、中圧レベルで減少し、高圧では再び大きくなり逆S字型の曲線を描く。C、Dと濃度が低くなるに従い低圧レベルでの圧力上昇に対する血管壁の伸びは大きくなり、無処置対照群(点線E)では70 mmHg までに直径がほぼ最大(全変形量の90%以上)に達している。

2 NE の濃度変化に対する推定曲線の適合性

図3の5本の実線は、実験測定値(点線)をもとに導かれた推定曲線を示す。図3より推定曲線は、測定値の特性を良く表現しているといえる。実験値と推定曲線の相関係数はすべて0.99以上であった。以上より

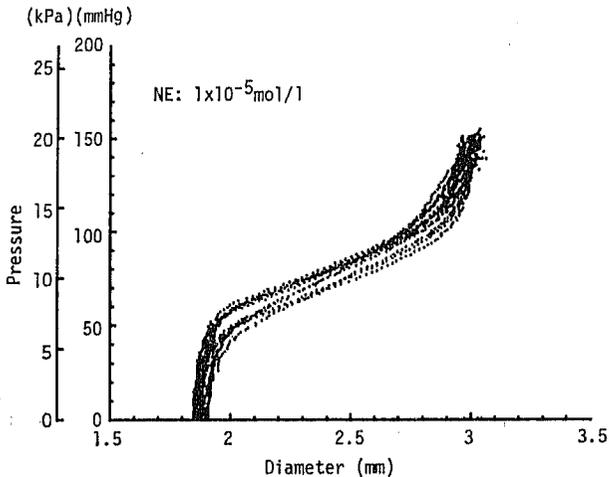


図2 NEにより平滑筋を活性化した際の圧力-直径関係を11回連続記録した例。

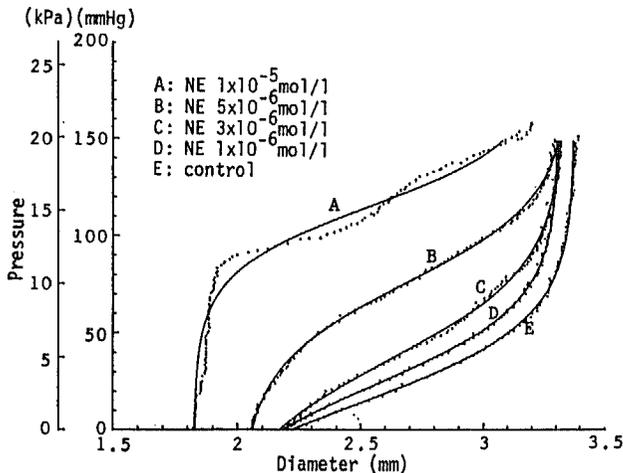


図3 NEの濃度を变化させた場合に得られた圧力-直径の実験データ(点々)と(1)式から推定された解析曲線。

圧力—直径関係からみた血管作動物質の効果

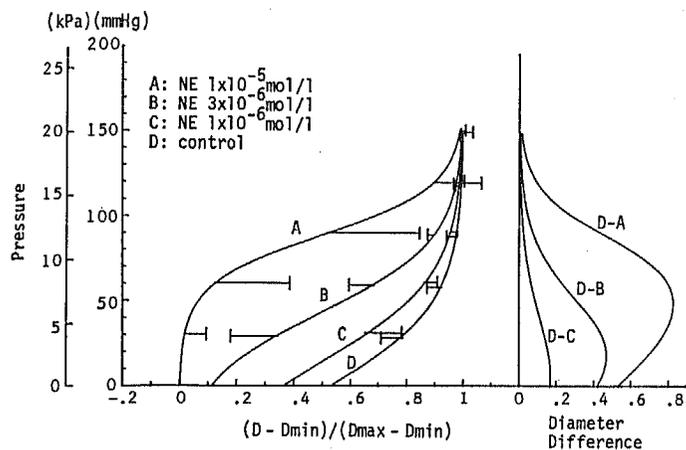


図4 左図は、NE の濃度を変化させた場合の圧力—直径関係 (6例の平均)。横軸の直径は正規化している。30 mmHg ごとにある曲線上の横線は標準偏差の範囲を示す。右図は各圧力における無処置対照群とNE の各濃度の正規化された直径の差、直径短縮量を示す。

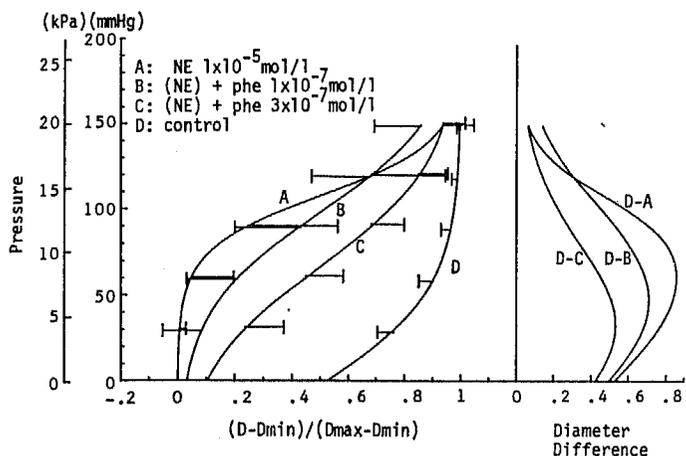


図5 NE の phentolamine に対する効果(6例の平均)。

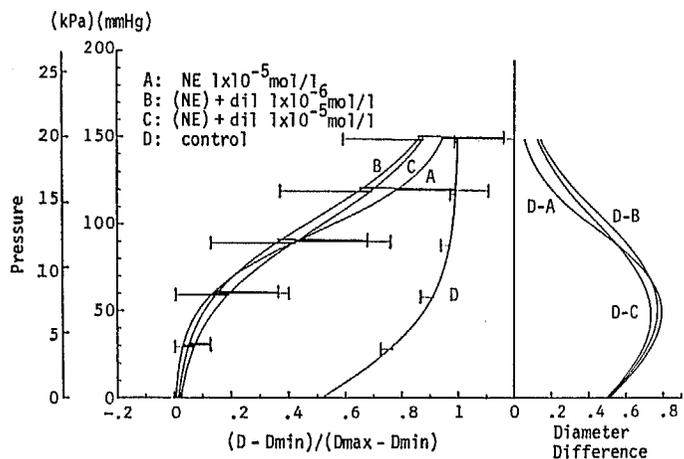


図6 NE の diltiazem に対する効果 (6例の平均)。

表1 NE によって影響される定数M, Rおよび phentolamine と diltiazem の効果 (n=6)

	M		R=1/ε (cm <sup>2</sup> /mmHg)
control	0.887±	0.475	0.0397±0.0095
NE 1×10 <sup>-6</sup> mol/l	1.756±	1.579	0.0396±0.0123
NE 3×10 <sup>-6</sup> mol/l	7.845±	7.335	0.0473±0.0089
NE 1×10 <sup>-5</sup> mol/l	415.476±	416.294	0.0680±0.0090
control	0.901±	0.137	0.0357±0.0103
NE 1×10 <sup>-5</sup> mol/l	890.480±	1523.305	0.0630±0.0134
+phe 1×10 <sup>-7</sup> mol/l	29.831±	16.464	0.0346±0.0123
+phe 3×10 <sup>-7</sup> mol/l	8.571±	9.001	0.0323±0.0132
control	0.943±	0.117	0.0380±0.0088
NE 1×10 <sup>-5</sup> mol/l	144.890±	115.510	0.0519±0.0168
+dil 1×10 <sup>-6</sup> mol/l	59.999±	80.132	0.0393±0.0168
+dil 1×10 <sup>-5</sup> mol/l	39.890±	38.910	0.0375±0.0164

表中の値は、平均±標準偏差を示す

\*p<0.05 (分散分析)

測定値をもとに推定された解析曲線は、血管平滑筋が弛緩した場合のみならず、NE 投与により平滑筋を活性化させた場合にも血管内圧を上昇させたときの直径変化をよく表現できることがわかる。なお、NE の解析以外のすべての解析結果についても、実験値と推定曲線の相関係数は、0.99以上であった。

図4には、保生液中の NE の濃度を変化させた場合の6例について圧力-直径関係の解析結果を示した。横軸には個々の血管の大きさの差をなくすため、(D-D<sub>min</sub>)/(D<sub>max</sub>-D<sub>min</sub>)で無次元化(規準化)した座標を用いた。ここで、各濃度における D<sub>min</sub>, D<sub>max</sub> は、6例の標本に対して、非線形回帰分析より得られた値の平均である。またデータのばらつきを見るため30 mmHg ごとに標準偏差の範囲を示した。横軸を無次元化したことにより、直径の変化が0と1の範囲で示され伸展特性が見やすくなっている。図4の6例の場合にも、図3の結果と同様な NE の濃度変化による伸展特性の特徴が理解できる。A, B, C, Dの曲線間には、統計的に有意な差が認められた。

ある圧力レベルでの NE 投与による平滑筋収縮の効果は、同圧力における無処置対照群と NE 処置群の直径の差と見ることができる<sup>5)</sup>。図4の右図は、無処置対照群(D)の直径から、NE 処置群の直径を引いた直径短縮量を横軸に取って、その効果を示した。高濃度の NE では、0mmHg のとき直径の差は0.52で圧力上昇に従って増加し約50mmHg で0.8と最大になる。圧力が50mmHg を越すと短縮量は徐々に減

少し、150mmHg でほぼゼロとなり NE の効果が消失している。NE の濃度を減少させるにつれ、実験範囲の圧力全体を通して直径短縮量は小さくなり、また、それが最大となる圧力も50mmHg, 20mmHg, 10mmHg と下がる。

### 3 NE の反応に対する phentolamine の効果

α受容体遮断薬の1つである phentolamine の NE の反応に対する効果を、図5に示した。保生液中に phentolamine のみを加えたときの圧力-直径関係は、無処置対照群と同じ曲線を示したので、図には無処置対照群の曲線のみを示し、保生液中に phentolamine を含むときの曲線は省略した。左図から phentolamine の濃度を増加するにつれ NE の効果が抑制され、曲線が右下方に移って来ていることがわかる。A, B, Cの曲線間には有意な差が認められた。各圧力で平滑筋収縮による直径短縮の効果を見た右図では、phentolamine の濃度を増加するに従い短縮量は小さくなり、NE の効果が抑制されている。また最大短縮の圧力も、低圧側に移ってきている。

### 4 NE の反応に対する diltiazem の効果

図6に Ca 拮抗薬の1つである diltiazem の NE の反応に対する効果を示した。Diltiazem の濃度を増加しても(B, C), 実験範囲の圧力では NE のみのもの(A)とほとんど差が無いことがわかる。A, B, C間には有意な差は認められなかった。右図からも直径の短縮量は NE のみのものと差がないことがわかる。以上より使用した量の diltiazem は、実験範囲の圧力

圧力—直径関係からみた血管作動物質の効果

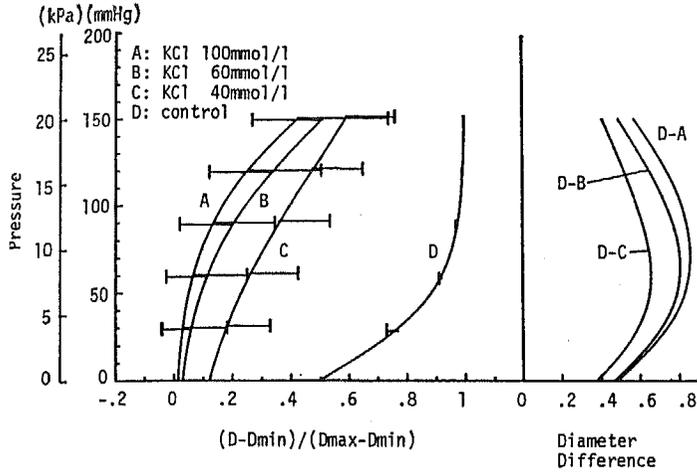


図7 KCl の濃度を 変化させた場合の圧力—直径関係 (6例の平均)。

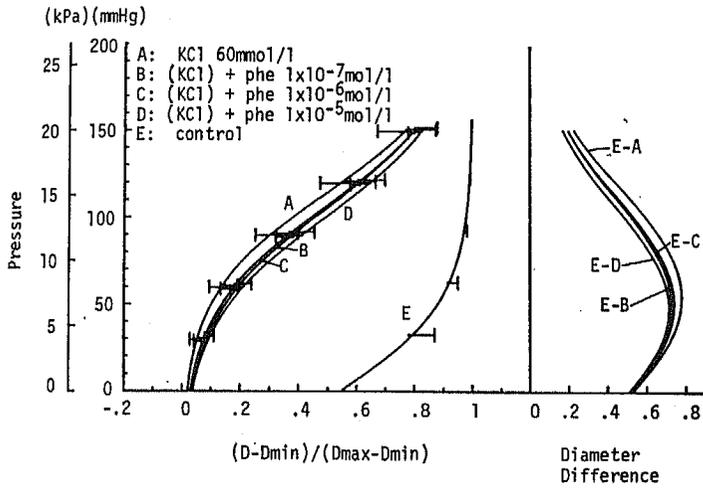


図8 KCl の phentolamine に対する効果(6例の平均)。

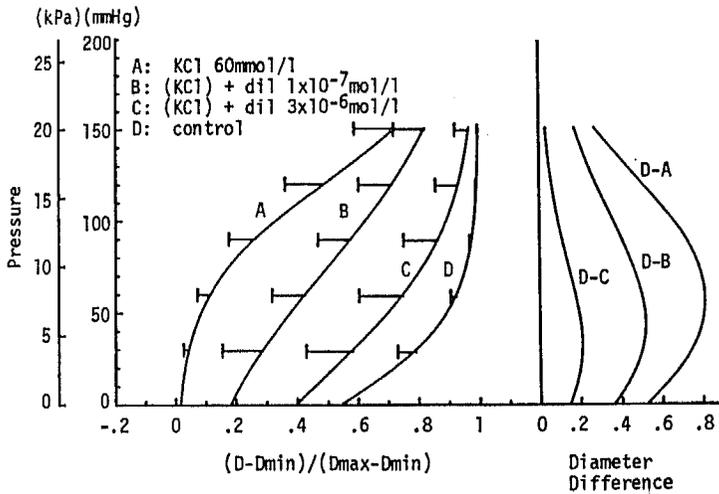


図9 KCl の diltiazem に対する効果 (6例の平均)。

では NE を抑制しないことが示された。

#### 5 NE によって影響される定数 M, R ( $=1/\epsilon$ )

および phentolamine と diltiazem の効果

表1に NE の3濃度における定数 M と R, NE の反応に対する phentolamine, NE の反応に対する diltiazem の効果の定数 M, R の変化を示した。表中の値は、6例の平均値±標準偏差を示している。M の値は、各薬物に対して大きく異なっている。NE の濃度変化に際しては、NE が  $1 \times 10^{-6}$  mol/l と  $3 \times 10^{-6}$  mol/l では1.756と7.845で4.5倍、無処置対照群と  $1 \times 10^{-5}$  mol/l では、470倍もの差がみられる。無処置対照群を含めた4つのMの値には有意な差が認められた。NE に対する phentolamine の効果では、phentolamine  $3 \times 10^{-7}$  mol/l + (NE) と NE 単独での値では100倍ほどの差がみられる。無処置対照群を除いた3つのMの値には、有意な差が認められた。一方、NE の反応に対する diltiazem の効果では、diltiazem  $1 \times 10^{-5}$  mol/l + (NE) と NE 単独群では約3.6倍であり、NE の濃度変化や NE 反応に対する phentolamine 処置群を比べたものに比べて小さい。R の値は、NE の濃度を変化させた場合、NE に対する phentolamine, NE に対する diltiazem の各実験群ともに NE  $1 \times 10^{-5}$  mol/l の場合が0.052~0.068と大きく、他は0.03~0.04と一定している。

### C 圧力—直径関係に及ぼす高濃度 K 保生液の効果、および高濃度 K 保生液に対する phentolamine と diltiazem の効果

#### 1 KCl の濃度変化による圧力—直径関係

図7に、保生液中の KCl の濃度を変化させた場合の、圧力—直径関係を示した。KCl に対しては 15mmHg の灌流下で、30mmol/l 程度から収縮がおこり始め、80~100mmol/l で最大収縮に達した。そこで、KCl の濃度を40, 60, 100mmol/l と変化させた。KCl の濃度を増加するに従い、曲線は左側に移動すると同時に勾配が大きくなる。高濃度 K 保生液では、NE の場合に顕著であった逆 S 字型の反応曲線の特徴は認められなかった。A, B, C, D の曲線間には有意な差が認められなかった。各圧力で、平滑筋収縮による直径短縮の効果を見た右図では、KCl の濃度を減少させるに従い短縮量は小さくなり、最大短縮の圧力レベルも低圧側に移ってきている。NE では 150mmHg で直径の短縮量はほぼゼロになったが、高濃度 K 保生液では 0.4~0.6 程であり、0 mmHg とほぼ同程度の収縮の効果を持つ。

#### 2 高濃度 K 保生液に対する phentolamine の効果

図8に、KCl 60mmol/l の反応に対する phentolamine の効果を示した。Phentolamine の濃度を増加しても (B, C, D), 実験範囲の圧力では KCl のみの反応 (A) との差がほとんど見られない。A, B, C, D の曲線間には、有意な差が認められなかった。右図からも無処置対照群との直径の差には、phentolamine の濃度による影響がほとんど見られない。

以上より、phentolamine は実験範囲の圧力下では KCl を抑制しないといえる。

#### 3 高濃度 K 保生液に対する diltiazem の効果

図9に、KCl 60mmol/l の反応に対する diltiazem の効果を示した。Diltiazem の濃度を増加するに従い、曲線が右側に移動して無処置対照群に近づいてくる。A, B, C 間には有意な差が認められた。また、各圧力で収縮の効果を見た右図では、diltiazem の濃度を増加するに従い、直径の差は小さくなり KCl の効果が抑制されている。直径の差が最大となる位置も低圧側に移ってきている。

以上より、diltiazem は実験範囲内の圧力下では KCl の反応を抑制するといえる。

#### 4 カリウム収縮によって影響される定数 M, R および phentolamine と diltiazem の効果

表2に KCl の3濃度における定数 M と R, KCl 60 mmol/l の反応に対する phentolamine の効果, KCl 60mmol/l の反応に対する diltiazem の効果の定数 M, R の変化を示した。表1と同様に、おのおのの値は6例の解析結果の平均値を示す。M の値は KCl の濃度に依存して、1.021~68.017 と70倍程の変化を示している。この変化の幅は、NE の濃度変化に対する M の470倍程の変化と比べて小さい。また KCl に対する diltiazem では、1.538~57.064 と40倍程の変化を示している。R の値は KCl の濃度差において0.01~0.04と変化が大きいが、他は0.02~0.03と一定している。

### D Ca-free 保生液に対する NE と、高濃度 K 保生液の効果

#### 1 Ca-free 保生液に対する NE の効果

図10に Ca-free 保生液中での NE の効果を示した。保生液中に、EGTA 1mmol/l, NE  $5 \times 10^{-6}$  mol/l を投与した場合の圧力—直径関係は、曲線 B である。B は無処置対照群 (C) に比べてかなり左に移動している、収縮の効果が明瞭に現れている。しかし、高濃度

圧力—直径関係からみた血管作動物質の効果

表2 KCl によって影響される定数M, Rおよび phenolamine と diltiazem の効果 (n=6)

	M	R=1/ε (cm <sup>2</sup> /mmHg)
control	1.021± 0.372	0.0408±0.0050
KCl 40mmol/l	7.344± 3.712	0.0157±0.0028
KCl 60mmol/l	31.413± 19.620	0.0232±0.0048
KCl 100mmol/l	68.017± 34.464	0.0261±0.0090
control	0.846± 0.541	0.0364±0.0035
KCl 60mmol/l	47.594± 22.741	0.0338±0.0033
+phe 1×10 <sup>-7</sup> mol/l	26.922± 16.773	0.0312±0.0058
+phe 1×10 <sup>-8</sup> mol/l	31.302± 21.754	0.0322±0.0061
+phe 1×10 <sup>-9</sup> mol/l	25.000± 19.183	0.0319±0.0047
control	0.855± 0.482	0.0395±0.0069
KCl 60mmol/l	57.064± 19.530	0.0334±0.0045
+dil 1×10 <sup>-7</sup> mol/l	31.955± 21.860	0.0322±0.0105
+dil 1×10 <sup>-8</sup> mol/l	4.531± 3.373	0.0203±0.0100
+dil 3×10 <sup>-9</sup> mol/l	1.538± 1.309	0.0256±0.0056

表中の値は、平均±標準偏差を示す \*\*p<0.01 (分散分析)

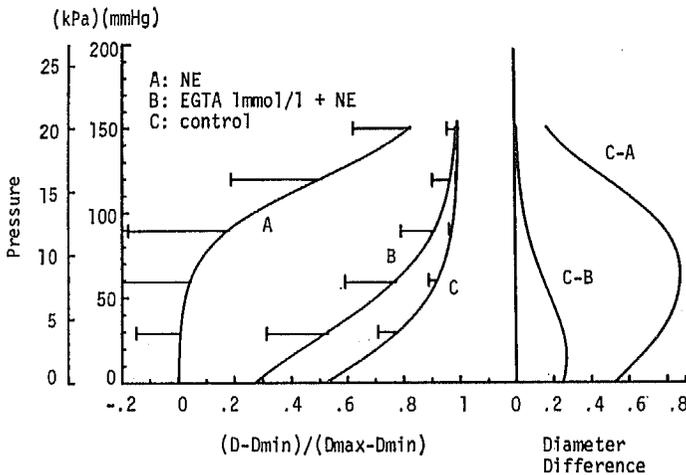


図10 Ca-free 保生液に対する KCl の効果 (6例の平均)。

の NE の場合のような、低圧で勾配が大きい傾向は見られない。B, C の曲線間には、有意な差が認められた。

以上の結果は、細胞外の保生液中の Ca を取り除いても、NE による血管収縮が誘起されることを示している。

2 Ca-free 保生液に対する KCl の効果

図11に、Ca-free 保生液中での KCl の効果を示した。保生液中に、EGTA 1mmol/l, KCl 60mmol/l

を投与した場合の、圧力—直径関係は B の曲線で無処置対照群とほぼ同じ曲線を描いた。B, C 間には有意な差は認められなかった。また、各圧力における曲線 B と C の差は、実験範囲の圧力で 0.1 以下と小さい。以上の結果は血管壁の収縮が、Ca を除いた高 K 保生液ではほとんどおこらないことを示している。

3 Ca-free 保生液の NE 反応と、高濃度 KCl 反応の定数M, R におよぼす影響

表3に Ca-free 保生液中での NE および高濃度

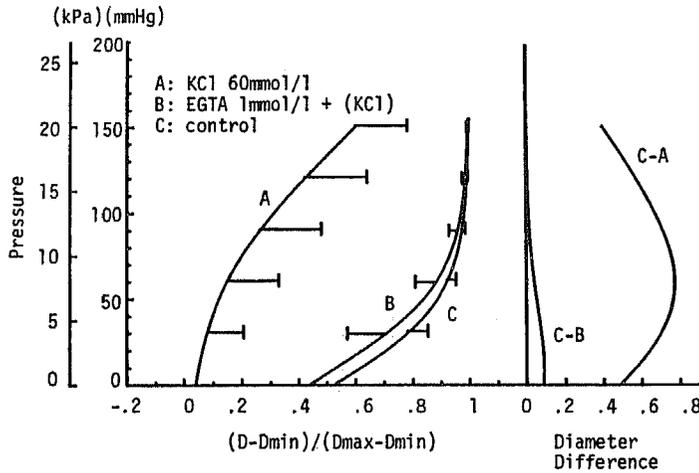


図11 Ca-free 保生液に対する NE の効果 (6例の平均)

表3 Ca-free 保生液の NE 反応と、高濃度 KCl 反応の定数M, R におよぼす影響 (n=6)

	M	R=1/ε (cm <sup>2</sup> /mmHg)
control	0.921 ± 0.466	0.0396 ± 0.0050
NE 5 × 10 <sup>-6</sup> mol/l	463.083 ± 783.110	0.0515 ± 0.0093
+ EGTA 1mmol/l	2.704 ± 2.311	0.0372 ± 0.0059
control	0.921 ± 0.466	0.0396 ± 0.0050
KCl 60mmol/l	24.230 ± 36.785	0.0240 ± 0.0035
+EGTA 1mmol/l	1.298 ± 0.896	0.0380 ± 0.0040

表中の値は、平均±標準偏差を示す \*\*p<0.01 (分散分析)

KCl の効果のみをみた解析結果の、定数M, R の変化を示した。それぞれの値は 6 例の平均値である。M の値からは、Ca-free 保生液中での KCl の反応は、KCl のみの反応に比べて有意に抑制されていることがわかる。一方、Ca-free 保生液中での NE の反応も NE のみの反応に比べて個々のM値は 1/10~1/1000 倍に抑制された。しかしながら NE のみの反応での標準偏差が非常に大きいため、計算上分散分析結果は、NE と Ca-free 保生液中での NE の間には有意な差が出なかった。

#### IV 考 察

血管の伸展特性を調べる際には、その伸展特性に大きな影響を与える平滑筋の弛緩、あるいは収縮の状態、さらに血管壁中での平滑筋の配向に注目しなければならない<sup>1)</sup>。血管平滑筋は、場所によりその配向が異なる

ことが知られている。したがって、血管平滑筋の研究には、その目的に適当な標本、および実験方法を用いる必要がある。平滑筋が縦軸方向に配列している場合には、血管の軸方向に切り開いた標本を、また螺旋状片、リング標本などその目的に応じた標本が利用される<sup>8)</sup>。骨格筋や内臓平滑筋などは、平滑筋細胞が大きいため、単離が可能で生理学的研究も数多く行われてきた<sup>9)-11)</sup>。最近では、血管平滑筋も単離できるようになり、薬理生理学的研究が行われている<sup>12)-14)</sup>。平滑筋を単離した方法は、平滑筋自体の研究には適している。しかし、血管の収縮性を検討する本研究の目的にそえば、血管として円筒状標本を用い、内圧-直径関係から血管の生理学的特性を検討する必要がある<sup>7) 15)</sup>。

円筒状標本を用いて調べるときには、定圧灌流下における血管径の変化、あるいは定流量灌流下での圧力

変化が薬物反応に対する指標となっている。一方血管壁の機械的伸展特性や平滑筋の力学的特性を実験する際には、圧力を変えたときの血管径の変化、すなわち圧力—直径関係が解析の基礎となっている。ところで、血管作動物質に対する平滑筋の反応性は標本の伸展状態に依存している。円筒状標本を用いた場合は血管内圧、つまり壁に作用している圧力の程度によって異なることが推定される。一般的には、平滑筋の発生張力は、*in vivo* の状態に内圧が匹敵するときに最大となることが知られている<sup>16)</sup>。

円筒状標本を用いて血管の力学的特性を調べるとき測定されなければならない量は、圧力と直径である。圧力は圧トランスデューサーの開発により比較的簡単に測定できるようになった。しかし、直径の測定は、困難であり、これまでに多くの装置が開発されてきた。それらの多くは、探触子を直接血管の外部表面に接触させ、探触子の変位を検出する方法である<sup>17)18)</sup>。しかし、この方法は、探触子の腕の重量や大きさが血管に圧迫を与え正確な測定は難しい。さらに、位置設定のために実験状態での正確な較正が行われなければならない。血管に機械的圧迫を与えない方法として、いくつかの装置が開発された。光センサー<sup>19)20)</sup>、ビデオカメラ<sup>21)</sup>を利用した方法などがある。

本研究では円筒状標本を用い、血管内圧を変化させた場合の直径変化を測定できる装置を作製した。この装置は、フォトダイオードを直線上に28 $\mu$ m間隔で1024個並べたイメージセンサを用い、これに血管像を投影することにより、非接触的に血管径の測定を可能としたものである。さらに、実体顕微鏡の対物レンズの倍率を変化させることにより、種々の大きさの血管を対象にできる利点がある。設計上、分解能を血管径の0.5%と仮定すると、200 $\mu$ mから20mmまで測定可能と計算された。この装置を利用して生理的圧力範囲で平滑筋に作用している血管作動物質が、どのように血管壁の伸展特性を修飾しているかを検討した。

#### A 各種薬物の圧力—直径関係に及ぼす効果

$\alpha$ 受容体作用薬の1つであるNEは、細胞膜上の $\alpha$ 受容体に作用して受容体作動性Caチャンネルを開き、細胞内へのCaイオン流入を引き起こす機構と、細胞内でのプールからのCaイオン遊離を導き血管を収縮させる機構の2つが報告されている<sup>22)</sup>。一方、保生液中の高濃度KClは、細胞膜脱分極をおこし、膜電位依存性Caチャンネルを開くことにより、細胞内へのCaイオン流入を引き起こす。このようにNEと高濃

度KClでは、異なったCa移動による収縮機構を有すると考えられている。この収縮機構の違いが、血管の伸展特性に影響を与えることは十分に予測される<sup>18)23)</sup>。今回の実験では、一般的に認識されている平滑筋収縮のメカニズムが圧力—直径関係からも得られることを示した。すなわち、Ca-free保生液を用いた高濃度KClの結果は、無処置対照群と同じ曲線を描き、高濃度KClによる収縮が細胞外のCaに依存していることが確認された。また、Ca-free保生液を用いたNEの結果では、低圧力レベルでの直径短縮は(約15mmHg)、正常保生液中のNEの最大収縮に比べ、1/2程度であったが、高圧力レベルでは無処置対照群に似た圧力—直径関係となっていた。このことから、NEの収縮の一部は細胞内Caイオンの遊離によって引き起こされることがわかる。

本来、Ca拮抗薬は細胞膜脱分極によって開く電位依存性Caチャンネルを通しての、Caイオンの細胞内流入を阻止する薬物である。ところがCa拮抗薬の1つであるdiltiazemに関しては、受容器作動性Caチャンネルを抑制したり、細胞内貯蔵Caイオンの遊離も抑制するという報告もある<sup>24)26)</sup>。しかし、今回の実験では、NEによる収縮反応がKClの収縮を有意に抑制する量のdiltiazemを用いてもほとんど影響を受けなかった。

図4、図7の左のグラフよりNE処置群では、高圧レベルにおいて直径の差が、ゼロに近づき、平滑筋収縮の効果がほとんどなくなるのに対して、高濃度KClでは、高圧レベルにおいても収縮の効果が残っていることがわかる。これにより受容器作動による収縮機構と、膜電位依存の収縮機構の違いが高圧レベルにおいて現れていることがわかる。この原因については高濃度KClが細胞外からのCaイオン流入を増大させることによって、細胞内のCaイオン量の急激な増加を招くのに対し、NEによる活性Caイオン量の増加は総量としてはむしろ小さく、二次的におこるCaイオン代謝機構、たとえば、Caポンプや、Na-Ca交換機構に与える作用の相違によるのかもしれない。しかし、KClが平滑筋以外の血管構成物質に影響を与えるなども推定されるので、この実験結果のみからは判断し難く、さらに詳細な研究が必要と考えられる。

#### B 定数Mに対する考察

これまで血管壁の力学的特性を調べた研究は多くあるが、ほとんどが平滑筋を弛緩させた条件下で行われた。また平滑筋を活性化させた場合でも、その解析は

Bergel の増分弾性率<sup>19)27)</sup>を基礎にしていた。しかし、増分弾性率が線形弾性理論にその基礎をおいている限り、平滑筋の力学に関する適応範囲は限定される<sup>28)</sup>。非線形性を示す血管壁の圧力-直径関係に対して、数学的記述を与えた研究もいくつかある。たとえば、林らは、生理的圧力の範囲内において、血管壁の圧力-直径関係によく一致する式を求め、スティフネスパラメータ<sup>29)</sup>を定義した。しかし、この方法も平滑筋が収縮した条件下でどれほどの有効性を発揮するかは明らかでない。

図3からわかるように、圧力と直径の測定値から定数を求めることにより得られた(1)式は、平滑筋の収縮の程度にかかわらず圧力-直径関係を良く表している。また、表1と表2から各薬物の血管に与える伸展特性を顕著に表すパラメータはMであることがわかる。その値は、高濃度NEや、高濃度K保生液など、血管平滑筋が強く収縮しているときに大きく、無処置対照群のような弛緩した状態で小さい。

ここでMは

$$\begin{aligned} M &= (D_{\max} - D(0)) / (D(0) - D_{\min}) \\ &= \frac{D_{\max} - D(0)}{D_{\max} - D_{\min}} \cdot \frac{D_{\max} - D_{\min}}{D(0) - D_{\min}} \\ &= \left(1 - \frac{D(0) - D_{\min}}{D_{\max} - D_{\min}}\right) \left(\frac{D_{\max} - D_{\min}}{D(0) - D_{\min}}\right) \\ &= (1 - D^*(0)) / D^*(0) \end{aligned}$$

と変形される。ここで  $D^*(0)$  は最大変形量 ( $D_{\max} - D_{\min}$ ) に対して、圧力ゼロのときの直径が相対的にどの程度変形をおこしているかを示している。 $D(0)$  が  $D_{\min}$  に等しい、すなわち  $D^*(0) = 0$  は、血管壁がまだ  $D_{\max} - D_{\min}$  だけの変形をおこし得ることを意味している。また、別の解釈をするならば、すべての平滑筋が収縮状態にあること、すなわち伸展状態にある平滑筋はほとんどないことを意味している。したがって、

$D^*(0)$  の値は伸展状態にある平滑筋の相対的割合を、また  $1 - D^*(0)$  は収縮状態にある平滑筋の相対的割合を与える。M値は両者の比であるから、Mが大なる値をとるということは、圧力がゼロのとき平滑筋の大部分が収縮状態にあり、伸展状態のものが少ないことに対応している。

このようにM値は圧力-直径関係から得られるデータに対して平滑筋緊張の程度を表す1つの目安として用いることができる。

## V 結 語

本研究では、イヌ腎動脈の円筒状標本を用い、その伸展特性に及ぼす種々の血管作動物質の効果を、新たに開発した装置によって検討した。

1 *In vitro* 下で、血管外径変化を非接触的に測定し得る圧力-直径関係測定装置を作製した。

2 圧力-直径関係の曲線群間の分散分析から、血管作動物質の効果を評価することができた。

3、解析に用いた圧力と直径の関係式によって、血管平滑筋が弛緩している場合のみならず、作用薬、拮抗薬を投与し、血管平滑筋の活性の程度を変化させた場合でも、圧力-直径曲線の特性をよく表現できた。

4 方程式に含まれるパラメータMは、血管壁緊張が高いときに大なる値となり、緊張度の指標となることが確認された。

稿を終るにあたり、終始御指導を賜りました恩師千葉茂俊教授、ならびに御指導、御校閲を賜りました心脈管病研究施設病態解析部門本間達二教授、福岡孝義助教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は、第27回日本脈管学会総会(1986年10月)、および第16回日本脈管作動物質学会(1987年2月)において発表した。

## 文 献

- 1) Johansson, B. and Somlyo, A. P. : Electro-physiology and excitation-contraction coupling. In : Bohr, D. F., Somlyo, A. P. and Sparks, H. V. Jr (eds.), Handbook of physiology: The Cardiovascular System, sect. 2, vol. 2, pp. 301-323, Am Physiol Soc, Bethesda, Maryland, 1980
- 2) Bohr, D. F. : Vascular smooth muscle updated. Circ Res, 32 : 665-672, 1973
- 3) Greenwald, S. E., Newman, D. L. and Denyer, H. T. : Effect of smooth muscle activity on the static and dynamic elastic properties of the rabbit carotid artery. Cardiovasc Res, 16 : 86-94, 1982
- 4) Bauer, R. D., Busse R. and Schabert, A. : Mechanical properties of arteries. Fourth international congress of biorheology. Symposium on mechanical properties of living tissues. Biorheology, 19 : 409-424, 1982

- 5) Cox, R.H. : Mechanics of canine iliac artery smooth muscle *in vitro*. Am J Physiol, 230 : 462-470, 1976
- 6) 福嶋孝義, 東 健彦 : 血管壁伸展特性の数理的解析. 日本バイオレオロジー学会論文集, 7 : 159-162, 1984
- 7) Draper, N. and Smith, H. : Applied Regression Analysis. 2nd ed., pp.458-529. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1980
- 8) 小池勝夫, 高柳一成 : 平滑筋の薬物反応. pp.237-339, 文永堂, 東京, 1986
- 9) Bagby, R.M., Young, A.M., Dotson, R.S., Fisher, B.A. and Mckinnon, K. : Contraction of single smooth muscle cells from Buro marinus stomach. Nature, 234 : 351-352, 1971
- 10) Fay, F.S. and Singer, J.J. : Characteristics of response of isolated smooth muscle cells to cholinergic drugs. Am J Physiol, 232 : C144-C154, 1977
- 11) Bitar, K.N., Zfass, A.M. and Makhouf, G.M. : Interraction of acetylcholine and cholecystokinin with dispersed smooth muscle cells. Am J Physiol, 237 : E172-E176, 1979
- 12) David, M.W., John, L.S., Mary, S.H. and John, N.E. : Pharmacology and force development of single freshly isolated bovine carotid artery smooth muscle cells. Circ Res, 58 : 399-406, 1986
- 13) Chamley-Campbel, J., Campbel, G.R. and Ross, R. : The smooth muscle cell in culture. Physiol Rev, 59 : 1-61, 1979
- 14) Defeo, T.T. and Morgan, K.G. : Response of enzymatically isolated mammalian vascular smooth muscle cells to pharmacological and electrical stimuli. Pflügers Arch, 404 : 100-102, 1985
- 15) Dobrin, P.B. and Canfield, T.R. : Series elastic and contractile elements in vascular smooth muscle. Circ Res, 33 : 454-464, 1973
- 16) Dobrin, P.B. : Vascular mechanics. In : Shepherd, J.T. and Abboud, F.M. (eds.), Handbook of physiology : The cardiovascular system, sect. 2, vol. 3, pp.65-102, Am Physiol Soc, Bethesda, Maryland, 1983
- 17) Mallos, A.J. : An electrical caliper for continuous measurement of relative displacement. J Apple Pyhsiol, 17 : 131-134, 1962
- 18) 奥村 厚 : 血管平滑筋の変形特性に関する実験的研究. 日本外科宝函, 46 : 244-257, 1977
- 19) Bergel, D.H. : The dynamic elastic properties of the arterial wall. J Physiol, 156 : 458-469, 1961
- 20) Hutchison, K.H. : Effect of variation of transmural pressure on the frequency response of isolated segments of canine carotid arteries. Circ Res, 35 : 742-751, 1974
- 21) Fronek, K. and Fung, Y.C. : Mechanical properties of arteries as a function of topography. Biorheology, 17 : 227-234, 1980
- 22) Bolton, T.B. : Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol Rev, 59 : 606-718, 1979
- 23) Price, J.M., Davis, D.L. and Knauss, E.B. : Length-dependent sensitivity in vascular smooth muscle. Am J Physiol, 241 : H557-H563, 1981
- 24) Saida, K. and van Breemen, C. : Mechanism of Ca<sup>++</sup> antagonist-induced vasodilation. Circ Res, 52 : 137-142, 1983
- 25) Toda, N. :  $\alpha$ -adrenoceptor subtypes and diltiazem actions in isolated human coronary arteries. Am J Physiol, 250 : H718-H724, 1986
- 26) Cauvin, C., Lukeman, S., Cameron, J., Hwang, O. and van Breemen, C. : Difference in norepinephrine activation and diltiazem inhibition of calcium channels in isolated rabbit aorta and mesentric resistance vessels. Circ Res, 56 : 822-828, 1985
- 27) Bergel, D.H. : The static elastic properties of the arterial wall. J Physiol, 156 : 445-457, 1961
- 28) Dobrin, P.B. : Mechanical properties of arteries. Physiol Rev, 58 : 397-460, 1978
- 29) Hayashi, K. : Mechanical properties of human cerebral arteries. Biorheology, 17 : 211-218, 1980

(62. 3. 9 受稿)