

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790082
 研究課題名 (和文) 長期開存を目指したヒト冠動脈バイパス血管の薬理的検討
 研究課題名 (英文) Pharmacological studies on responsiveness of 5-hydroxytryptamin to overcome perioperative spasm of coronary artery bypass graft

研究代表者

田中 直子 (TANAKA NAOKO)
 九州保健福祉大学・薬学部・講師
 研究者番号：70322576

研究成果の概要：冠動脈バイパスグラフト血管として多用されている内胸動脈において、塩酸パパペリンの最小有効濃度 (30 μM) を明らかにするとともに、この最小有効濃度の塩酸パパペリンが、血管れん縮誘因物質の一つである セロトニン (5-HT)、ADP、アンギオテンシン II (AngII) およびノルアドレナリン (NA) の血管収縮作用を有意に減弱させることを薬理的に確認した。また、冠動脈バイパスグラフト血管として現在用いられている内胸動脈および大伏在静脈において、5-HT 受容体 (5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体) 拮抗薬の併用が 5-HT の血管収縮反応をほぼ完全に抑制したことから、血管れん縮防止薬として、両受容体拮抗薬の併用が有効であることを示唆した。

冠動脈バイパス術中の血管れん縮防止薬として、現在広く使用されている塩酸パパペリンが、血管機能を減弱させることが知られており、その使用の安全性が問題となりつつある中で、本研究結果より、その使用量の軽減を促せる薬理的知見を得ることができた。さらに、塩酸パパペリン以外のれん縮防止薬として、5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体拮抗薬の併用が、ヒト冠動脈バイパス血管の長期開存に繋がる有効な薬理的ツールであることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,100,000	180,000	1,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患は心筋虚血により発症する心筋障害であり、狭心症と心筋梗塞に代表される。これら冠動脈疾患の主な外科的手術として冠動脈バイパス手術が行われるが、使用する血管の術中および術後の血管れん縮の防止

と術後の血栓性閉塞・狭窄の軽減が動脈の長期開存率ならびに予後の良好な長期成績結果をもたらすとされている。現在、動脈グラフトとして最も多く利用されているのが内胸動脈であり、次いで大伏在静脈がある。近年、狭心症および動脈硬化の予防および治療薬に

関する研究は数多くなされておられ、冠動脈バイパス手術で用いられる動脈グラフトに関する知見も多くなされてきた。その中で、内胸動脈は予後の成績は良好であるが、術中のれん縮防止に現在広く使用されている塩酸パパベリンによる血管平滑筋および内皮機能の減弱が報告されている (Gao Y.J., Yang H., Teoh K., Lee R.M. (2003) Detrimental effects of papaverine on the human internal thoracic artery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **126**, 179-185)。これは、血管平滑筋細胞のアポトーシス (細胞死) と血管内皮細胞からの弛緩物質 (Nitric oxide; NO) の遊離阻害が原因とされているが、塩酸パパベリンの実際の使用濃度はアンプル原液を使用するなど薬理的に見て非常に高く、その安全性が問題となりつつある。従って、内胸動脈の内皮および平滑筋細胞機能が正常のままに保持される塩酸パパベリンの最小有効濃度を明確にし、内胸動脈グラフトの機能保持を検討することが必要である。一方、大伏在静脈に関しては、採取が容易で十分な長さが得られることから、グラフト血管としての使用頻度が高まっている。塩酸パパベリン処置は行われていないにもかかわらず、術後の血管れん縮および血栓性閉塞・狭窄が予後の成績不良の主な原因であることが明らかとされており、その改善が望まれている。

(Raja S.G. (2004) Radial artery as the second choice conduit: some unsolved problems. *Circulation* **110**, e62-63; Peykar S., Angiolillo D.J., Bass T.A., Costa M.A. (2004) Saphenous vein graft disease. *Minerva Cardioangiol.* **52**, 379-390)。

2. 研究の目的

これまでに、グラフト血管におけるセロトニン (5-HT) による血管収縮に対する 5-HT 受容体 (5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体) 拮抗薬の収縮抑制効果について検討し、内胸動脈において 5-HT_{2A} 受容体のみならず、5-HT_{1B} 受容体についても拮抗作用を有する薬物が、血管収縮抑制効果には有効であることを明らかにしてきた。5-HT は血管れん縮に関与することが報告されており、この血管れん縮防止薬として塩酸パパベリンが使用されているが、その使用濃度が非常に高濃度であり、血管機能傷害を引き起こし、これが術後の悪成績の一因となる。従って、1) 塩酸パパベリンの最小有効濃度 (すなわち、血管れん縮を防止し、かつ血管機能傷害を最小限に抑える濃度) を明確にする必要がある。5-HT は活性化血小板より遊離され、血栓の形成に重要な役割を演じる。さらに我々は、大伏在静脈においても 5-HT 受容体が血管収縮に関与することを明らかとしており、血小板血栓による

閉塞・狭窄が予後の悪成績の第一原因とされる大伏在静脈グラフトの長期開存を目指すためには、2) 5-HT をはじめとする血小板由来活性化因子の影響について詳細な薬理的検討を行う必要がある。

3. 研究の方法

ヒト内胸動脈および大伏在静脈は、本学近くに位置する宮崎県立延岡病院心臓血管外科において、冠動脈バイパス手術のためにグラフト材料として摘出された血管の不用部位を使用した。摘出された血管は Krebs-Henseleit 液 (栄養液) に保存し水中にて直ちに本学に移送、実験に供した。これらグラフト血管の処置および塩酸パパベリンの作用濃度等に関しては、これまでの報告 (Gao Y.J., Yang H., Teoh K., Lee R.M. (2003) Detrimental effects of papaverine on the human internal thoracic artery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **126**, 179-185) に従って行った。

(1) 摘出リング状標本における張力変化の測定

内胸動脈および大伏在静脈のリング状標本を Krebs-Henseleit 液を満たしたマグナス管内に懸垂し、張力変化をアナログ・デジタル変換器 (8 チャンネルの Power Lab) を用いて等尺性に記録した。

(2) ヒト内胸動脈に存在する 5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体の同定・確認

5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体に対する抗体を用い、免疫組織学的手法により、内胸動脈平滑筋細胞に存在する 5-HT 受容体を同定し、確認した。

4. 研究成果

(1) 塩酸パパベリンの最小有効濃度と各種血小板由来活性化因子の効果

① ヒト内胸動脈において、一般的にれん縮誘因物質として使用されているエルゴノビンを累積的に作用させると、濃度依存的な収縮反応が観察された。その後、塩酸パパベリンを累積的に作用させると濃度依存的な弛緩反応が観察され、最大抑制効果が見られるその濃度を塩酸パパベリンの最小有効濃度 (30 μM) とした (図1a, b)。また、この最小有効濃度の塩酸パパベリンにより、血管れん縮誘因物質の一つである ADP、5-HT およびアンギオテンシンII (AngII) の血管収縮を有意に減弱することを薬理的に確認した (図2)。その中で、ADP と AngII は最小有効濃度 (30 μM) でほぼ完全に収縮を抑制することができたが、5-HT は 30 μM の濃度では有意には抑制したものの、その収縮を完全には抑制することができなかつた (図2a)。次に、100 μM

の濃度の塩酸パパベリンを使用して同様に、5-HT とノルアドレナリン (NA) の血管収縮に対する影響を検討したところ、ほぼ完全な抑制効果を示した (図2b)。

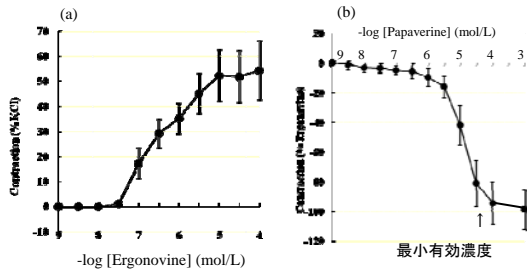


図1. エルゴノピンの収縮反応 (a) と塩酸パパベリンの弛緩作用 (b)

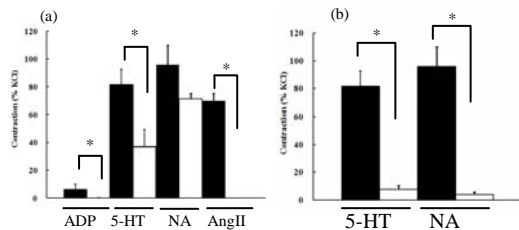


図2. ADP (100 μ M), 5-HT (1 μ M) およびアンジオテンシンII (AngII, 1 μ M) の血管収縮反応に対する塩酸パパベリン 30 μ M (a) および 100 μ M (b) の影響

② 最小有効濃度 (30 μ M) の塩酸パパベリンは、血管弛緩物質 (Nitric oxide ; NO) 供与剤 (SNP) の血管弛緩作用に対して、その弛緩機構を抑制することなく、むしろ増強させることを明らかにした (図3)。

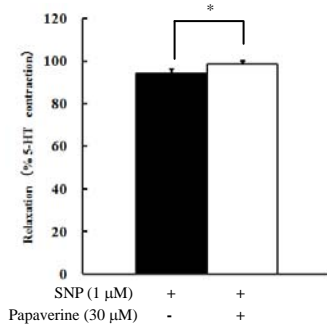


図3. SNP (1 μ M) の弛緩反応に対する塩酸パパベリン 30 μ M の影響

以上のことから、塩酸パパベリン (30 μ M) は、ヒト内胸動脈平滑筋細胞の NO を介した血管弛緩機構には影響しないこと、むしろ弛緩を増強させることが明らかとなった。

これまでの結果より、血管れん縮防止薬として、これまでアンプル原液 (約 100 mM) の高濃度で使用されていた塩酸パパベリンが、より低濃度で使用可能であることを薬理学

的に確認した。

(2) 塩酸パパベリン以外のれん縮防止薬使用の可能性について

① ヒト内胸動脈における 5-HT 受容体の存在の有無を免疫組織学的手法を用いて検討したところ、ヒト内胸動脈平滑筋細胞に 5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体サブタイプが存在することを確認した (図4)。

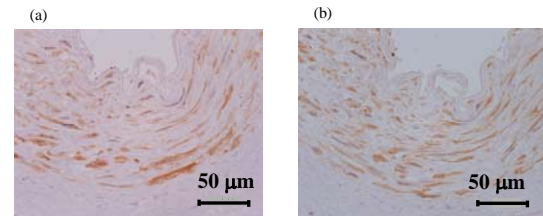


図4. ヒト内胸動脈における 5-HT 受容体(a; -HT_{2A} 受容体および b; 5-HT_{1B} 受容体)

② ヒト内胸動脈において、5-HT による収縮反応が確認され、その収縮に対し、サルボグレラート (5-HT_{2A} 受容体拮抗薬) および SB224289 (5-HT_{1B} 受容体拮抗薬) が有意に抑制作用を示すことを明らかとした (図5a)。

③ ヒト大伏在静脈においても、5-HT による収縮反応が観察され、その収縮に対し、サルボグレラートおよび SB224289 が有意に抑制作用を示すことを明らかとした。また、5-HT による大伏在静脈の収縮には、5-HT_{2A} 受容体を介した収縮の方が 5-HT_{1B} 受容体を介した収縮に比較して大きく寄与する可能性が示唆された (図5b)。

④ ヒト内胸動脈およびヒト大伏在静脈における 5-HT の収縮反応に対し、サルボグレラートおよび SB224289 の両者を併用すると、その収縮反応がほぼ完全に抑制されることを明らかとした (図 5a, b)。

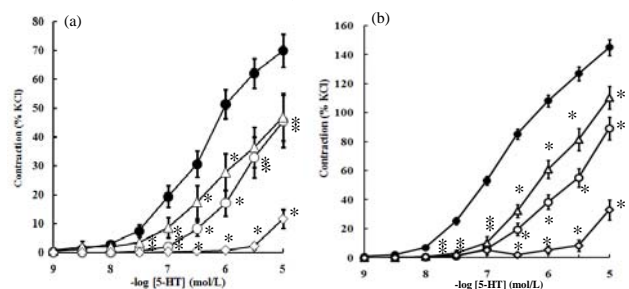


図5. ヒト内胸動脈 (a) および大伏在静脈 (b) における 5-HT による収縮反応に対するサルボグレラート (5-HT_{2A} 受容体拮抗薬) および SB224289 (5-HT_{1B} 受容体拮抗薬) の影響 [1.0 μ mol/L sarpogrelate (○), 1.0 μ mol/L SB224289 (△) or a combination of 1.0 μ mol/L sarpogrelate plus 1.0 μ mol/L SB224289 (◇), (●), control.]

本研究結果より、塩酸パパペリンの最小有効濃度 (30 μM) を明らかとするとともに、血管れん縮をほぼ完全に抑制するためには100 μM の塩酸パパペリンの使用が望ましいことを薬理的に示唆した。冠動脈バイパス手術中の血管れん縮防止薬として現在広く使用されている塩酸パパペリンが血管機能を減弱させ、その使用の安全性が問題となりつつある中で、使用の軽減を促せる薬理的知見を得ることができた。現在使用されている塩酸パパペリンの濃度よりも、少なくとも約 1000~3000 倍薄い濃度の塩酸パパペリンの使用により、血管れん縮を抑制することが出来ることを薬理的に明らかとした。また、塩酸パパペリン以外のれん縮防止薬の可能性としては、5-HT 受容体 (5-HT_{2A} および 5-HT_{1B} 受容体) 拮抗薬の併用が有効であることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Tanaka N., Nakamura E., Ohkura M., Kuwabara M., Yamashita A., Onitsuka T., Asada Y., Hisa H., Yamamoto R. (2008) Both 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptors are involved in the vasoconstrictor response to 5-HT in the human isolated internal thoracic artery. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**, 836-840. 査読有

② Nishihira K., Yamashita A., Tanaka N., Moriguchi-Goto S., Imamura T., Ishida T., Kawashima S., Yamamoto R., Kitamura K., Asada Y. (2008) Serotonin induces vasoconstriction of smooth muscle cell-rich neointima through 5-hydroxytryptamine(2A) receptor in rabbit femoral arteries. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 1207-1214. 査読有

③ Furukoji E., Tanaka N., Yamashita A., Matsumoto M., Fujimura Y., Yamamoto R., Tamura S., Asada Y. (2008) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction. *Thromb. Res.* **121**, 583-585. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 田中直子, 中村栄作, 桑原正知, 浅田祐士郎, 比佐博彰, 山本隆一: 糖尿病のセロトニン誘発性血管収縮増強作用, 日本薬学会第 129 年会, 2009. 3, 京都.

② 大倉正道, 野呂田郁夫, 田中直子, 山本隆一, 石井邦明: セロトニン誘発性 5-HT_{2A} 受容体インターナリゼーションにおける ARF1 の関与, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009. 3, 横浜.

③ 田中直子, 中村栄作, 桑原正知, 浅田祐士郎, 比佐博彰, 山本隆一: 糖尿病患者におけるセロトニン血管反応性について, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009. 3, 横浜.

④ 田中直子, 山本隆一: 長期開存を目指したヒト冠動脈バイパス血管のセロトニン反応性に関する研究, 第 2 回薬学研究フォーラム in 東京, 2008. 12, 東京.

⑤ 田中直子: 長期開存を目指したヒト冠動脈バイパス血管のセロトニン反応性に関する薬理学的研究, 第 25 回日本薬学会九州支部大会, 2008. 12, 延岡.

⑥ 田中直子, 中村栄作, 桑原正知, 浅田祐士郎, 比佐博彰, 山本隆一: 糖尿病はヒト内胸動脈におけるセロトニン誘発性血管収縮反応を増強する, 第 61 回日本薬理学会西南部会, 2008. 11, 米子.

⑦ 山下篤, 西平賢作, 田中直子, 杉田千泰, 隅 専浩, 今村卓郎, 山本隆一, 北村和雄, 浅田祐士郎: 5-HT による平滑筋細胞に富む動脈硬化巣の収縮: 血栓性血管収縮における肥厚内膜の関与, 第 31 回日本血栓止血学会, 2008. 11, 大阪.

⑧ 山下篤, 西平賢作, 田中直子, 今村卓郎, 山本隆一, 北村和雄, 浅田祐士郎: 血栓性血管収縮における肥厚内膜の関与: 平滑筋細胞に富む内膜肥厚巣は 5-HT_{2A} 受容体を介して収縮する, 第 3 回ウサギフォーラム, 2008. 7, 神戸.

⑨ 山下篤, 西平賢作, 田中直子, 今村卓郎, 山本隆一, 北村和雄, 浅田祐士郎: 平滑筋細胞に富む内膜肥厚巣は 5-HT_{2A} 受容体を介して血栓性血管収縮に関与する, 第 5 回血液・血管オルビス研究会, 2007. 8, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 直子 (TANAKA NAOKO)
九州保健福祉大学・薬学部・講師
研究者番号: 70322576

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし