

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460877

研究課題名(和文)慢性アルコール投与ラットにおける血管反応性 アルコール誘発性突然死の観点から

研究課題名(英文) Studying alcohol-induced sudden death by examining vascular response in ethanol-fed rats

研究代表者

羽竹 勝彦 (Hatake, Katsuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40164842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性アルコール摂取ラットから摘出した上腸間膜動脈の等尺性張力変化を検討したところ、アセチルコリンによる内皮細胞依存性弛緩反応が増大した。また、この弛緩反応の増大はEDHF阻害剤により抑制された。一方、血管平滑筋を介する弛緩反応や、カルシウムイオノフォアによる弛緩反応は増大しなかった。このことから、エタノールは、内皮細胞のレセプターレベルのいずれかの部分に作用してEDHFを介する弛緩反応を増大させることが示唆された。慢性アルコール摂取により、弛緩反応が増大したことから、血管には血圧上昇に対し、予防的あるいはそれ以上の昇圧を防ぐ機能が備わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The endothelium-dependent relaxation (EDR) in response to acetylcholine (ACh) was greater in ethanol-fed rats than that in the controls. In the combined presence of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) inhibitors, the relaxation response to ACh did not differ significantly between the two groups. Furthermore, neither A23187, which causes EDR in a manner unrelated to any receptor mechanism, nor levcromakalim, which activates the KATP channel on smooth muscle membranes, caused an increased EDR in ethanol-fed rats. These results suggest that the increased EDR in response to ACh in ethanol-fed rats may be caused by the increase in EDHF-mediated relaxation response. Thus, the present study suggests that the endothelium can exert a protective effect during chronic ethanol-induced hypertension through the EDHF-mediated backup system.

研究分野：アルコール医学

キーワード：アルコール ラット 上腸間膜動脈 一酸化窒素 内皮由来過分極因子 等尺性張力

1. 研究開始当初の背景

法医学では予期されない突然の急死（内因性急死）にしばしば遭遇する。また、内因性急死の剖検死体からアルコールが検出される頻度も高く、特に心疾患や脳血管疾患にもとづく突然死においてアルコールの関与が指摘されている。

そこで我々は、血管に及ぼすアルコールの影響に着目し、ラットの血管を用いて種々の血管作動性物質に対するアルコールの効果を検討してきた。その結果、エタノールは内皮細胞依存性の弛緩反応を抑制することを見出し、その機序についても明らかにした (Eur. J. Pharmacol. 168, 277, 1989 Eur. J. Pharmacol. 238, 441, 1993)。

また近年、血管に分布する神経から血管作動性物質 (NO, CGRP 等) が遊離され、血管の収縮・弛緩に関与していることが明らかとなり、この神経を介した弛緩反応に対してもエタノールは抑制するとの成績を得た (日本アルコール・薬物医学会雑誌. Vol.46、241-249、2011)。

しかし、これらの研究は、正常ラットから摘出した血管を *in vitro* でアルコールに暴露した急性実験であり、急性効果を検討した研究であった。

アルコールと血管反応性の検討には、主に *in vitro* の急性実験と慢性実験（一定の期間アルコールを投与し、*in vivo* でアルコールに暴露後、摘出した血管を用いて検討）がある。急性実験の報告は、我々の報告も含め多々あるが、慢性実験は飼育方法や長い飼育期間、飼育費やアルコールの投与方法などの問題から報告例は少ない。

2. 研究の目的

本研究は、慢性のアルコール投与においてほぼ確立された飼料として液体飼料を用い、10 週間飼育し、ヒトでの常用飲酒者や大酒家に相当する慢性アルコール摂取ラットの血管反応性がどのように変化しているのかを検討し、アルコール摂取時の内因性急死の原因の1つが血管機能の変化に基づくものという観点から検討することを目的とし、多量飲酒者あるいは大酒家の循環病態を探る上で重要である。

血管機能は、収縮と拡張がバランスよく機能し血流調節などを行っている。拡張作用は内皮細胞から合成・放出される一酸化窒素 (NO) と内皮由来の過分極因子 (EDHF) が知られている。また血管周囲の外膜側に神経が分布しており、拡張反応をおこす NO を遊離する NO 神経と CGRP (calcitonin gene related peptide) を遊離する感覚神経がある (図1)。

したがって、拡張反応が減弱あるいは収縮反応が亢進した場合に血管が攣縮に傾くものと考えられる。これらのことから、アルコールが内皮細胞あるいは神経由来の生理活性物質による拡張反応を抑制したり、あるいは

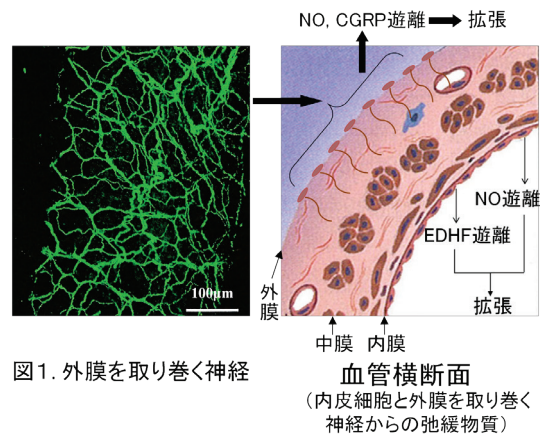


図1. 外膜を取り巻く神経  
血管横断面  
(内皮細胞と外膜を取り巻く神経からの弛緩物質)

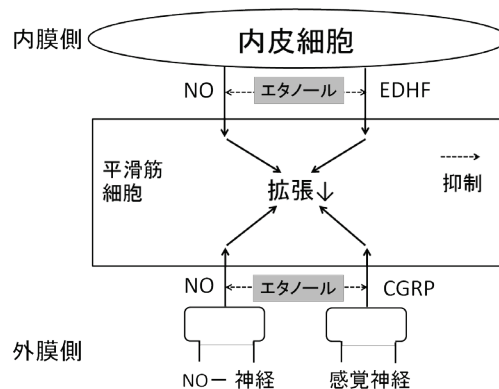


図2. 拡張反応における予想されるエタノールの作用部位

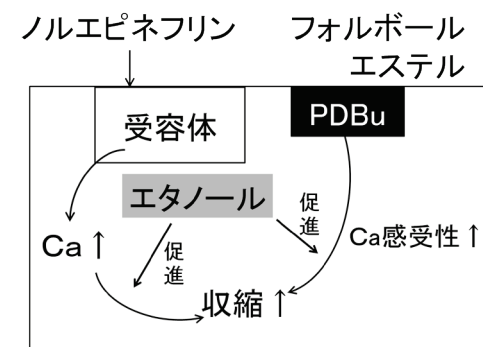


図3. 収縮反応における予想されるエタノールの作用部位

は異常収縮を引き起こすことにより攣縮を引き起こし、突然死にいたるのではないかと推測される (図2、図3)。

本研究では、ラットにアルコールを含む液体飼料を 10 週間投与し、摘出した血管を使い、弛緩反応と収縮反応の2つの観点から血管反応性を検討する。

(1) 弛緩反応の観点から

①内皮細胞由来の NO や EDHF を介した弛緩反応の減弱の有無を検討する。減弱があれば、NO を介した弛緩反応か EDHF を介した弛緩反応のいずれによるものか検討する。これには NO 合成酵素阻害剤で NO の合成遊離を阻害した血管による弛緩反応の減弱の有無を等尺性張力で測定 (EDHF の関与の測定)、内皮細胞にある eNOS (NO 合成酵素) の westernblot による蛋白発現量および eNOS を免疫染色による発現の程度を検討す

ることにより NO の関与を検討することから判断する。

②神経を介した NO や CGRP を介した弛緩反応の減弱の有無を検討する。血管壁を電気刺激すると NO あるいは CGRP を介して拡張する。減弱が確認されれば、NO あるいは CGRP いずれによるものか検討する。これには NO 合成酵素阻害剤を用いた等尺性張力測定さらに神経にある nNOS の wesern blot による蛋白発現量および免疫染色による発現の程度を検討することにより判断する。

#### (2) 収縮反応の観点から

収縮反応には血管平滑筋細胞内のカルシウムイオンの上昇をとまなう収縮 (カテコラミンなどの収縮) とカルシウムイオンの上昇をとまなわない収縮 (カルシウムの感受性の亢進による; フォルボールエステル (PDBu) などによる収縮) がある。いずれの収縮反応が増強しているかをフェニレフリンや PDBu を使って検討する。また、慢性アルコール摂取では、平滑筋細胞に存在する誘導型 NOS (iNOS) が発現し、収縮に影響を与えているとの報告から、本研究においても iNOS の収縮反応に及ぼす影響を検討する。

本研究で得られた結果は、飲酒による循環器関連の突然死や高血圧の発症の機序などの病態の解明に役立つものと考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) Wistar 系雄性ラット (9 週齢) に 10% エタノールを含む液体飼料 (Lieber 食) を 10 週間投与し、慢性アルコール摂取ラットを作製し、エタノール群とした。また、エタノールを含まない同カロリーの液体飼料 (エタノールを等カロリーの炭水化物で置き換えた試料) を 10 週間投与し、総摂取カロリーを合わせたラットを対照群とした。

両群の各ラットの体重を毎週測定し、10 週間飼育した後、エーテル麻酔下にて頸動脈から採血し、失血死させ、上腸間膜動脈と主要臓器を摘出した。各臓器はホルマリン固定し、組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色し、肝組織については脂肪染色 (ズダン染色) も行い、両群で比較検討した。また、得られた血液については、ガスクロマトグラフィー法を用いたエタノール濃度測定と血清生化学検査を行った。

(2) 摘出した上腸間膜動脈を用い、張力測定用に輪状標本を作製し、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> を通気した 37°C の恒温バスに標本を懸垂し、0.2g の張力を負荷し安定後、等尺性張力変化を測定した。

①懸垂した標本に収縮惹起剤であるフェニレフリンを投与し、アセチルコリンによる血管内皮細胞依存性の弛緩反応 (NO と EDHF の両者が合わさった反応) を張力の測定によって対照群と比較した。また、NO 合成酵素阻害剤で NO の合成・遊離を阻害した血管による弛緩反応 (EDHF を介する弛緩反応) と、アパミン (AP) とカリブドトキシシン (ChTX)

により EDHF の経路を阻害した血管による弛緩反応 (NO を介する弛緩反応) の減弱の有無を検討することにより、NO と EDHF を介した弛緩反応を分離し、いずれの弛緩反応が減弱しているか検討した。

②懸垂した標本にフェニレフリンを投与し、電気刺激装置を使って段階的に刺激を与え (2-20Hz)、得られた神経を介する弛緩反応 (NO と CGRP の両者が合わさった反応) を対照群と比較する。NO 合成阻害剤と CGRP アンタゴニストにより両者の弛緩反応を分離し、いずれの反応が減弱しているか検討した。

③血管平滑筋細胞内のカルシウムイオンの増加をとまなうフェニレフリン収縮、およびカルシウムイオンの増加をとまなわず、カルシウム感受性亢進による PDBu 収縮を両群で比較し、収縮増強の有無を検討した。

(3) 上腸間膜動脈における eNOS、nNOS、iNOS の western blot による蛋白発現量および免疫染色による発現の程度を両群で比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 組織検査: ヘマトキシリン・エオジン染色については、対照群では、いずれの組織においても異常はみられず、エタノール群では、肝組織で脂肪沈着がみられた以外に、他の組織での異常は見られなかった。肝組織のズダン染色については、対照群では染色されなかったのに対し、エタノール群では脂肪組織が赤く染色された。

血中エタノール濃度測定: 対照群の血液からはエタノールは検出されず、エタノール群の血液からは平均 1.6 mg/ml のエタノールが検出された。

血清生化学検査: エタノール群の HDL-コレステロールは対照群に比べ有意に高値を示した。それ以外の脂質代謝および肝機能等については両群に差はみられなかった (表 1)。体重については、対照群に比べエタノール群がやや低値を示したが、有意な差はみられなかった。さらに、NO 酸化物濃度も測定したが、両群の値に顕著な差はみられなかった。

表 1. 血清生化学検査データ

Parameters	Control Rat	EtOH Rat
Plasma triglyceride, mg/dl	147.2±36.3	145.6±44.9
Plasma phospholipid, mg/dl	149.6±19.6	159.8±13.3
Plasma cholesterol, mg/dl	81.0±11.6	90.2±8.7
Plasma HDL, mg/dl	22.6±2.8	27.5±3.2*↑
Plasma LDL, mg/dl	9.1±1.4	9.4±2.3
Plasma AST, IU/L	100.1±74.8	97.8±32.7
Plasma ALT, IU/L	31.8±10.7	39.1±14.8
Plasma glucose, mg/dl	157.6±24.9	150.1±20.7

Values are mean ± SD. \*p < 0.01 vs. controls.

(2) ①エタノール群は対照群と比べ、アセチルコリンによる内皮細胞依存性弛緩反応が増大した (図 4 A)。また、弛緩反応の増大



はNO合成酵素阻害剤存在下でもみられたが(図4B)、EDHF阻害剤存在下ではみられなかった。このことから、エタノール群での弛緩反応の増大はNOではなくEDHFを介する反応の増大によることが明らかになった。さらに、カリウムチャネルアゴニストのレブクロマカリムやカルシウムイオノフォアA23187による弛緩反応については両群での差がみられなかったことから(図5)、エタノールは、内皮細胞のレセプターレベルのいずれかの部分に作用してEDHFを介する弛緩反応を増大させることが示唆された。

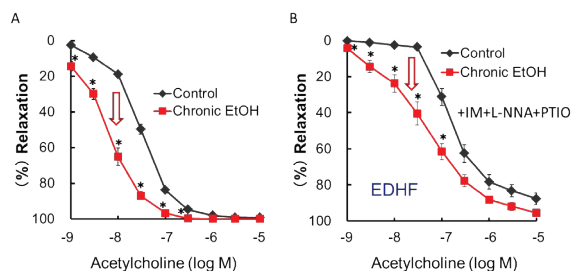


図4. アセチルコリンによる弛緩反応に及ぼす慢性エタノールの影響

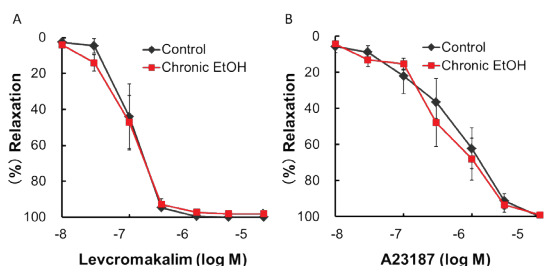


図5. レブクロマカリムおよびA23187による弛緩反応に及ぼす慢性エタノールの影響

②電気刺激による神経系を介する弛緩反応は、対照群に比べエタノール群で有意に低下した(図6A)。また、この弛緩反応はカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)阻害剤のCGRP8-37によって完全に阻害されたが、NO合成酵素阻害剤による有意な抑制はみられなかったことから、この弛緩反応にはNO神経は関与しておらず、CGRPを介する弛緩反応であることが明らかになった。さらに、CGRPアゴニストによる弛緩反応については、両群での差がみられなかったことから(図6B)、CGRPを介する弛緩反応に対するエタノールの抑制は、血管平滑筋レベルではなく、神経末端レベルで生じていることが示唆された。

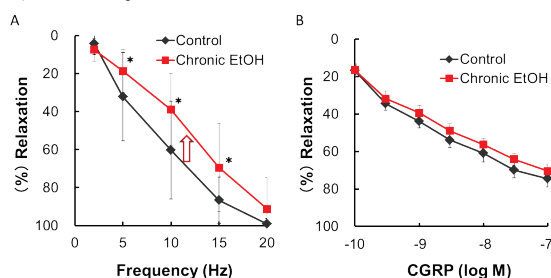


図6. 電気刺激およびCGRPによる弛緩反応に及ぼす慢性エタノールの影響

③血管平滑筋におけるフェニレフリンによる収縮とPDBuによる収縮反応を両群で比較したところ、いずれの収縮反応においても両群での差はみられなかった。このことから、エタノールは、収縮反応に関しては、カルシウム依存性の経路と非依存性のカルシウム感受性亢進による経路のいずれに対しても影響を及ぼさないことが示唆された。

(3) western blotにより両群の上腸間膜動脈における各種蛋白発現量を比較したところ、eNOSとnNOSの発現量については両群の差はみられなかった。iNOSは両群とも発現していなかった。さらに、免疫染色により両群の上腸間膜動脈における各種蛋白発現レベルを比較したところ、血管内皮細胞におけるeNOS発現レベルには差はみられなかった。また、血管外膜付近に局在するnNOSの発現レベルにも差はみられなかった。iNOSについては血管内皮細胞にも血管平滑筋にも発現していないことが明らかになった。

これらの結果から、本研究で用いた慢性エタノール摂取モデルラットの上腸間膜動脈は、長期間エタノールに暴露されたにも関わらず、iNOSの発現がみられなかったことから、血管内に炎症は生じていないことが明らかになった。両群におけるeNOS発現量に差がみられなかったことから、エタノールによる血管内皮依存性弛緩反応の増大は、eNOSによるものではなくEDHFによることが明らかになった。また、両群におけるnNOS発現量にも差がみられなかったことから、エタノールによる神経性弛緩反応の抑制にはnNOSは関与せず、CGRPが関与するものと考えられる。

慢性アルコール摂取は、高血圧を発症することが知られているが、本研究では、神経レベルではアルコール摂取により弛緩反応が抑制されたが、血管内皮細胞レベルでは、むしろ逆に、弛緩反応が増大しており、血管には血圧上昇に対し、予防的あるいはそれ以上の昇圧を防ぐ機能が備わっていることが示唆された。

## 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4件)

① Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K. Ethanol attenuates vasorelaxation via inhibition of inducible nitric oxide synthase in rat artery exposed to interleukin-1 $\beta$ . Human and Experimental Toxicology, in Press.

② Yuui K, Kudo R, Kasuda S, Hatake K. The Inhibitory Effect of Ethanol on Interleukin-1 $\beta$ -Induced Suppression of Contractile Response in the Rat Superior Mesenteric Artery. Jpn. J. Alcohol & Drug

Dependence Vol.50(3), 158-166, 2015.

③工藤利彩, 勇井克也, 粕田承吾, 羽竹勝彦.  
総説: 血管の収縮弛緩機能へのアルコールの  
影響. 日本アルコール・薬物医学会雑誌,  
Vol.50(3), 123-134, 2015.

④工藤利彩, 勇井克也, 羽竹勝彦. ラット上腸  
間膜動脈における TRPV4 チャンネルを介す  
る血管弛緩反応に及ぼすエタノールの影響.  
アルコールと医学生物学. 2013; 32: p127-130.  
東京

[学会発表] (計 9 件)

①工藤利彩, 勇井克也, 羽竹勝彦. スフィン  
ゴシルホスホリルコリン (SPC) による血管  
収縮反応に及ぼす慢性エタノールの影響. 第  
50 回日本アルコール・薬物医学会総会 (2015  
年 10 月 13 日, 神戸)

②勇井克也, 工藤利彩, 粕田承吾, 川島渉, 中西  
真理, 石谷昭子, 羽竹勝彦. IL-18 暴露下におけ  
るラット上腸間膜動脈の塩化カリウム収縮  
反応に及ぼすエタノールの影響. 第 99 次日本  
法医学会学術全国集会 (2015 年 6 月 12 日, 高  
知)

③工藤利彩, 粕田承吾, 勇井克也, 川島渉, 中西  
真理, 石谷昭子, 羽竹勝彦. スフィンゴシルホス  
ホリルコリン (SPC) によって誘発されるラ  
ット血管収縮反応に及ぼすエタノールの影  
響. 第 99 次日本法医学会学術全国集会 (2015  
年 6 月 12 日, 高知)

④Yuui K, Kudo R, Morimura Y, Kasuda S,  
Kawashima W, Nakanishi M, Ishitani A,  
Hatake K. Increased endothelium-  
dependent vascular relaxation in  
ethanol-fed rats. 9th International  
Symposium Advances in Legal Medicine.  
(Fukuoka, 2014. 6. 20)

⑤工藤利彩, 勇井克也, 羽竹勝彦. 血管系へ  
のアルコールの影響. 第 49 回日本アルコー  
ル・薬物医学会総会 (2014 年 10 月 3 日, 横  
浜)

⑥勇井克也, 工藤利彩, 羽竹勝彦.  
Phenylephrine 収縮下における IL-18 による  
弛緩反応に及ぼす Ethanol の影響. 第 49 回  
日本アルコール・薬物医学会総会 (2014 年  
10 月 3 日, 横浜)

⑦勇井克也, 工藤利彩, 森村佳史, 粕田承吾, 川  
島渉, 中西真理, 石谷昭子, 羽竹勝彦. IL-18 で刺  
激されたラット上腸間膜動脈の血管反応に  
おけるエタノール影響. 第 97 次日本法医学会  
学術全国集会 (2013 年 6 月 27 日, 札幌)

⑧工藤利彩, 勇井克也, 森村佳史, 粕田承吾, 川  
島渉, 中西真理, 石谷昭子, 羽竹勝彦. EDHF を  
介した弛緩反応に及ぼすエタノールの抑制  
作用. 第 97 次日本法医学会学術全国集会  
(2013 年 6 月 27 日, 札幌)

⑨勇井克也, 工藤利彩, 羽竹勝彦. IL-18 暴露下  
におけるラット血管反応に及ぼすエタノール  
影響. 第 48 回日本アルコール・薬物医学会  
総会 (2013 年 10 月 4 日, 岡山)

[その他]

ホームページ等

URL:

<http://www.naramed-u.ac.jp/~legalmed/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

羽竹勝彦 (HATAKE, Katsuhiko)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40164842

### (2) 研究分担者

工藤利彩 (KUDO, Risa)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20347545

森村佳史 (MORIMURA, Yoshifumi)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50305710