

主論文の要旨

**Enhancement of Nitric Oxide Production Is  
Responsible for Minimal Intimal Hyperplasia of  
Autogenous Rabbit Arterial Grafts**

〔ウサギ自家動脈グラフトにおける NO 産生の増強と  
内膜肥厚抑制の関連について〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 血管外科学分野

(指導：古森 公浩 教授)

田畑 光紀

## 【緒言】

内皮細胞は Nitric Oxide (NO) と内皮由来過分極因子 (EDHF) を介して血管平滑筋を弛緩させることが知られている。内皮由来の NO は自発的またはアセチルコリン (ACh) や shear stress などの各種刺激により産生される。NO は cGMP を増加させ、平滑筋細胞の弛緩が起こる。また、それらの各種刺激は内皮細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させ、 $Ca^{2+}$  依存性の  $K^+$  チャンネルを活性化させることにより EDHF が発生し平滑筋細胞の過分極と弛緩を引き起こすことが知られている。静脈グラフトでは血管内皮細胞の NO と EDHF の反応がともに障害され、高度な内膜肥厚をきたすことを我々は報告しているが動脈グラフトの NO と EDHF について詳細な検討はない。

今回、ウサギ自家動脈グラフトモデルを用いて、動脈グラフトの内膜肥厚および内皮依存性弛緩反応について NO と EDHF に注目して検討した。

## 【対象及び方法】

オスの日本白色種ウサギ (n=25、体重 2.5-3.0 kg) を用いて、全身麻酔下に頸部を切開し、右総頸動脈を 2.5 cm 摘出した。内腔をヘパリン化生理食塩水で洗浄後、元の部位に戻し、端々吻合を行い、総頸動脈グラフトを作成した。全身麻酔下での総頸動脈グラフトと正常なウサギの総頸動脈の血圧、脈拍、血流量を測定した。

術後 28 日目に右総頸動脈グラフト (G 群) とコントロールとして左総頸動脈 (C 群) を摘出し、HE 染色を行い内膜肥厚の有無を評価した。それぞれの血管をリング標本 (1mm) とし、ACh、 $Ca^{2+}$  イオノフォアである A23187、NO ドナーである NOC-7 による内皮依存性弛緩反応を測定した。また定常状態と ACh 投与下の cGMP の測定をした。さらに内皮細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化として、蛍光  $Ca^{2+}$  指示薬である Fura2 を用いて ACh、A23187 投与下の 6 個の内皮細胞の F340/F380 比を平均値で測定した。EDHF 評価のために微小電極法で ACh、A23187 投与下の平滑筋細胞の膜電位を測定した。

## 【結果】

正常なウサギと動脈グラフトウサギの血圧はそれぞれ  $69.8 \pm 7.9$  mmHg、 $69.0 \pm 5.1$  mmHg (n=5、P=0.937)、脈拍は  $188 \pm 22$ /分、 $167 \pm 16$ /分 (n=5、P=0.486)、血流量は  $20.1 \pm 1.5$  ml/min、 $16.9 \pm 0.5$  ml/min (n=5、P=0.092) でありいずれも有意差は認めなかった。

G 群では非常にわずかな内膜肥厚を認めたが、C 群では全く認めなかった (Figure 1A)。中膜の厚さや細胞数、内腔の大きさは両群で有意差を認めなかった (Figure 1B)。

血管リング標本の ACh 投与による内皮依存性弛緩反応は G 群で C 群に比較し増大した (n=5、P<0.05、Figure 2A)。一方、NO 合成阻害薬である L-NNA の存在下では ACh による内皮依存性弛緩反応は G 群で減少した (n=5、P<0.001、Figure 2A)。これらの弛緩反応は内皮を除去したリング標本では消失した (Figure 2B)。また L-NNA 存在下で A23187 や NOC-7 投与による弛緩反応に有意差は認めなかった (Figure 2C, D)。

cGMP の産生量は何も投与していない定常状態では G 群で C 群よりも有意に高か

った ( $n=5$ ,  $1.15 \pm 0.06 \text{ pmol/mg}$  vs  $1.45 \pm 0.09 \text{ pmol/mg}$ ,  $P < 0.05$  Figure 3)。しかし、ACh 投与下での cGMP 産生量は両群で上昇したが、有意差は認めなかった。

定常状態での内皮細胞  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は両群で有意差はなかったが、ACh 投与による内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は G 群で減少した ( $n=5$ ,  $0.16 \pm 0.04$  vs  $0.04 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ , Figure 4A)。一方 A23187 による  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は両群に有意差を認めなかった (Figure 4B)。

ACh 投与による平滑筋細胞の過分極反応は G 群では減少した ( $n=5$ ,  $10.1 \pm 1.3 \text{ mV}$  vs  $4.7 \pm 1.4 \text{ mV}$ ,  $P < 0.01$  Figure 5A, B, C)。しかし、A23187 による過分極反応に有意差は認めなかった (Figure 5A, B, D)。

### 【考察】

本研究では動脈グラフトの ACh による弛緩反応は増強する一方で NO 合成阻害薬存在下での弛緩反応は低下していた。また NO 阻害薬存在下で NOC-7 や A23187 による弛緩反応は有意差を認めないことから、両群間で平滑筋細胞の機能に変化はないと考えられた。内皮を除去した標本では弛緩反応が消失したことから、動脈グラフトの ACh による内皮依存性弛緩反応の増強は内皮由来の NO 産生が増強していることによると考えられた。しかし、ACh 投与による内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は動脈グラフトで低く、NO による弛緩反応の増強は  $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性の機序が関与していると考えられた。

動脈グラフトでは ACh による内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇、EDHF、NO 合成阻害薬存在下での内皮依存性弛緩反応、これら 3 つの反応はいずれも低下していた。一方、A23187 によるこれらの反応は両群で有意差を認めなかった。従って、動脈グラフトの内皮細胞では ACh による  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させる機序に変化をきたし、EDHF が低下し、NO 合成阻害薬存在下の弛緩反応も低下していると考えられた。

今までの我々の研究では静脈グラフトは NO と EDHF の反応が著しく低下または消失し、高度の内膜肥厚をきたすことがわかっている。今回の研究では動脈グラフトでの EDHF の反応は低下しているが、その反応を補うように NO の産生が増強していた。このように内皮細胞の機能が保たれていることが動脈グラフトの内膜肥厚を最小限におさえていると考えられた。臨床においても冠動脈バイパス術で動脈グラフトは静脈グラフトに比較し良好な開存率を示している。本研究結果より動脈グラフトでは内皮細胞由来の NO の産生が増強するため、グラフトの内膜肥厚が抑制され、動脈グラフトの良好な開存率に寄与している可能性が示唆された。

### 【結論】

本研究は動脈グラフトにおける NO と EDHF の機能変化を示した最初の研究である。ウサギ総頸動脈グラフトモデルでは受容体刺激による内皮細胞の  $\text{Ca}^{2+}$ の反応性が障害され、EDHF は低下していたが、それを補うように自発的および受容体刺激による内皮由来の NO の産生が増強していた。このことが動脈グラフトの内膜肥厚を最小限に抑え、動脈グラフトの良好な開存率に影響していると考えられた。