75　血管内膜肥厚の制御–EDHFを標的とした探索研究–	古森　公浩

【目的】ウサギ頸静脈グラフトモデル、ウサギ頸動脈自家動脈グラフトモデルを用いて、静脈グラフト内膜肥厚、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，正常血流モデルおよび異常血流モデルを作製し検討した。

【方法】1. 静脈グラフトモデル作製：ウサギ静脈グラフトモデルを用いて検討した。総頚動脈の一部を外頸静脈グラフトで置換した（正常血流）。また、より内膜肥厚を顕著にするために末梢の 4 本の動脈のうち 3 本を結紮した異常血流モデルを作製しグラフト置換した（異常血流モデル）。

2. 動脈グラフトモデル作製 : オスの日本白色種ウサギを用いて、全身麻酔下に頚部を切開し、右総頚動脈を摘出した。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、総頚動脈グラフトを作製した。

3. 内膜肥厚 : 術後 28 日目に右総頚動脈グラフト（G 群）とコントロールとして左総頚動脈（C 群）を摘出し、HE 染色を行い内膜肥厚の有無を評価した。

4. 等尺性収縮張力法：血管のリング標本を作製し、アセチルコリン（Ach）による内皮依存性弛緩反応を測定した。

5. cGMP の測定：定常状態と ACh 投与下の cGMP を測定した。

6. 微小電極法：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。

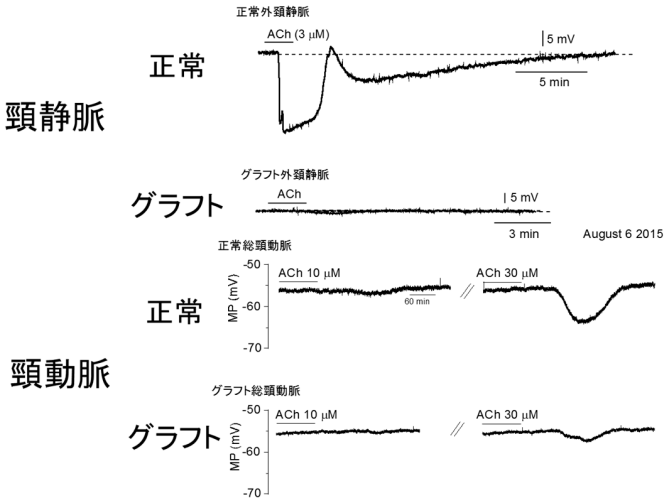
【結果】1. 正常血流頚動脈と異常血流モデルでの動脈の内皮機能

収縮弛緩反応は異常血流モデル作製後 4 週間目の動脈標本を用いた。異常血流動脈の弛緩反応が正常血流に比べ障害されていた。

2. 静脈グラフトでは正常静脈でみられた EDHF の反応が消失していた。一方、動脈グラフトでは EDHF は低下を認めたが残存しており、静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 反応に違いがあることが明らかになった。これらの静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF の反応の違いが、動脈グラフトの良好な開存率に寄与している可能性があると示唆された。

3. 動脈グラフト群では ACh による内皮依存性弛緩反応が増強し、cGMP の産生も増加する傾向であったため、ACh による NO 産生が増強している可能性が考えられた。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。

静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 比較



75. 血管内膜肥厚の制御－EDHF を標的とした探索研究－

古森　公浩

名古屋大学 大学院医学系研究科 血管外科学

Key words：内膜肥厚，静脈グラフト，動脈グラフト，内皮機能，EDHF

緒　言

閉塞性動脈硬化症に対する血管内治療が普及してきているが、自家静脈グラフトを用いたバイパス術も標準治療の一つである［1］。問題点として自家静脈グラフトを用いた下腿へのバイパス手術では術後 5 年で約 20～30%に晩期閉塞を認める点があり、静脈グラフトの内膜肥厚が原因の一つと考えられている［2, 3］。一方で冠動脈バイパス術には動脈グラフトバイパスが使用される。静脈グラフト、動脈グラフトの長期開存のため、グラフトの内膜肥厚を抑制する治療法の確立が望まれるところである。

内皮細胞は Nitric Oxide（NO）［4～6］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［7, 8］。内皮由来の NO は自発的またはアセチルコリン（Ach）や share 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。この EDHF の反応が静脈グラフトや動脈グラフトでどのような変化を生じるのか詳細な検討はない。

ウサギ頸静脈グラフトモデル、ウサギ頸動脈自家動脈グラフトモデルを用いて、静脈グラフト内膜肥厚、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，正常血流モデルおよび異常血流モデルを作成し検討した。

方　法

1. 静脈グラフトモデル作製

ウサギ静脈グラフトモデルを用いて検討した。総頚動脈の一部を外頸静脈グラフトで置換した（正常血流）。また、より内膜肥厚を顕著にするために末梢の 4 本の動脈のうち 3 本を結紮した異常血流モデルを作製しグラフト置換した（異常血流モデル）。

2. 動脈グラフトモデル作製

オスの日本白色種ウサギを用いて、全身麻酔下に頚部を切開し、右総頚動脈を摘出した。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、総頚動脈グラフトを作製した。

3. 内膜肥厚

術後 28 日目に右総頚動脈グラフト（G 群）とコントロールとして左総頚動脈（C 群）を摘出し、HE 染色を行い内膜肥厚の有無を評価した。

4. 等尺性収縮張力法

血管のリング標本（1 mm）を作製し、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。

5. cGMP の測定

定常状態と ACh 投与下の cGMP を測定した。

6. 内皮細胞内 Ca^{2+}濃度

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。

7. 微小電極法

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

1. 正常血流での静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 比較

静脈グラフトでは正常静脈でみられた EDHF の反応は静脈グラフトで消失していた。一方、動脈グラフトでは EDHF は低下を認めたが残存しており、静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 反応に違いがあることが明らかになった（図 1）。これらの静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF の反応の違いが、動脈グラフトの良好な開存率に寄与している可能性があると示唆された。

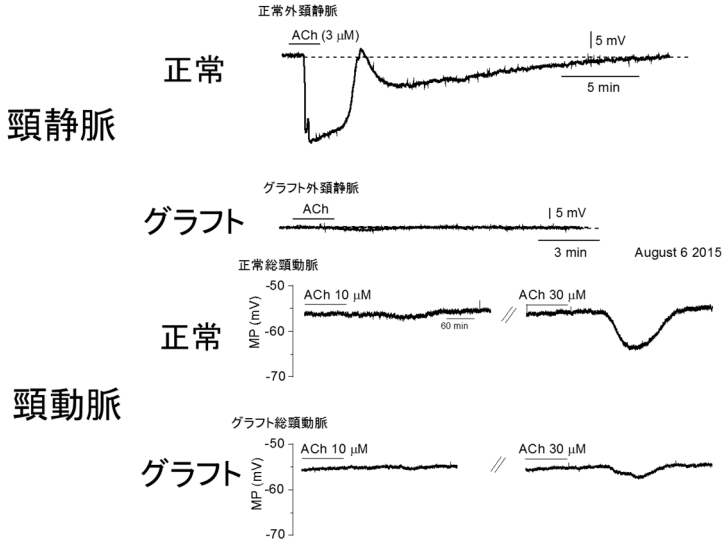


図 1. 静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 比較

2. 動脈グラフト（正常血流）と正常動脈の EDHF と内皮依存性弛緩反応の比較検討

a）血圧と脈拍：正常なウサギと動脈グラフトウサギの血圧、脈拍はいずれも有意差はなかった。

b）内膜肥厚：グラフト群では内膜肥厚をわずかに認めたが静脈グラフトでみられるような著明な内膜肥厚は認めなかった。内皮細胞に特異的な CD31 は両群の内皮細胞に認められた。内膜肥厚部分では増殖型の平滑筋細胞に特異的な SMemb や平滑筋細胞に特異的な SM1 が発現していた。マクロファージに特異的な RAM11 陽性細胞はグラフトの内弾性板直下にわずかに認めるのみであった（図 2）。

c）弛緩反応：血管リング標本の ACh 投与による内皮依存性弛緩反応はグラフト群で正常動脈に比較し増大した（図 3A）。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グラフト群で減少した（図 3A）。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（図 3B）。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。

d）cGMP の産生量：cGMP の産生量は何も投与していていない定常状態ではグラフト群で正常動脈よりも有意に高かった。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。

e）内皮細胞 Ca^{2+}濃度:定常状態での内皮細胞 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 Ca^{2+}濃度上昇はグラフト群で減少した。一方 A23187 による Ca^{2+}濃度上昇は両群に有意差を認めなかった。

f）過分極反応：ACh 投与による平滑筋細胞の過分極反応はグラフト群では減少した。しかし、A23187 による過分極反応に有意差は認めなかった。

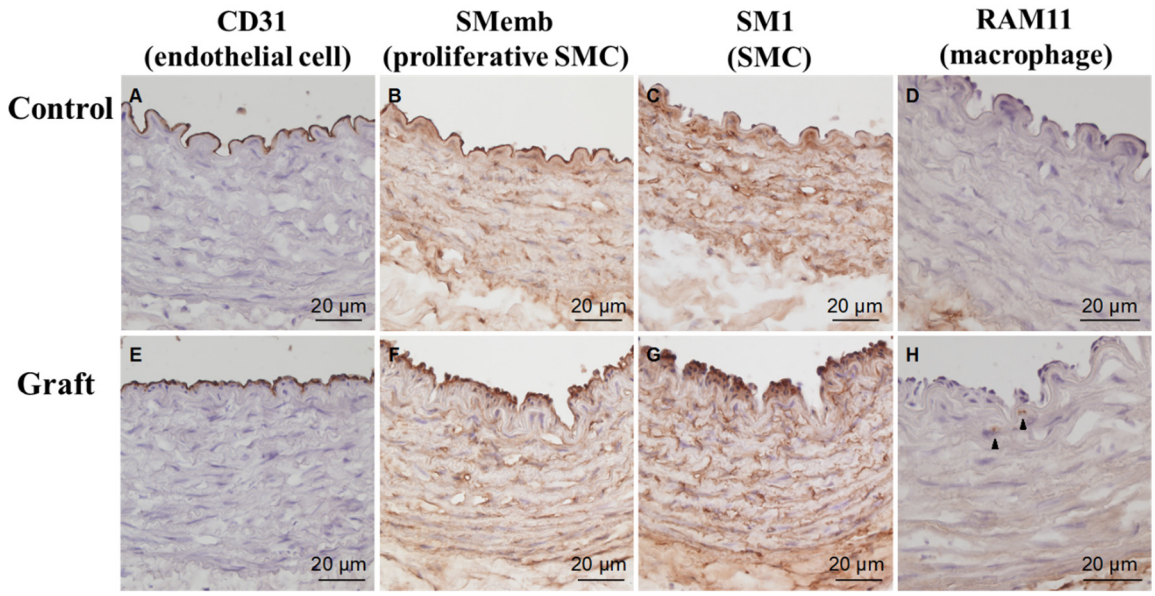


図 2. 免疫組織学的染色

内皮細胞に特異的な CD31 は両群の内皮細胞に認められた。内膜肥厚部分では増殖型の平滑筋細胞に特異的な SMemb や平滑筋細胞に特異的な SM1 が発現していた。マクロファージに特異的な RAM11 陽性細胞はグラフトの内弾性板直下にわずかに認めるのみであった（矢頭）。

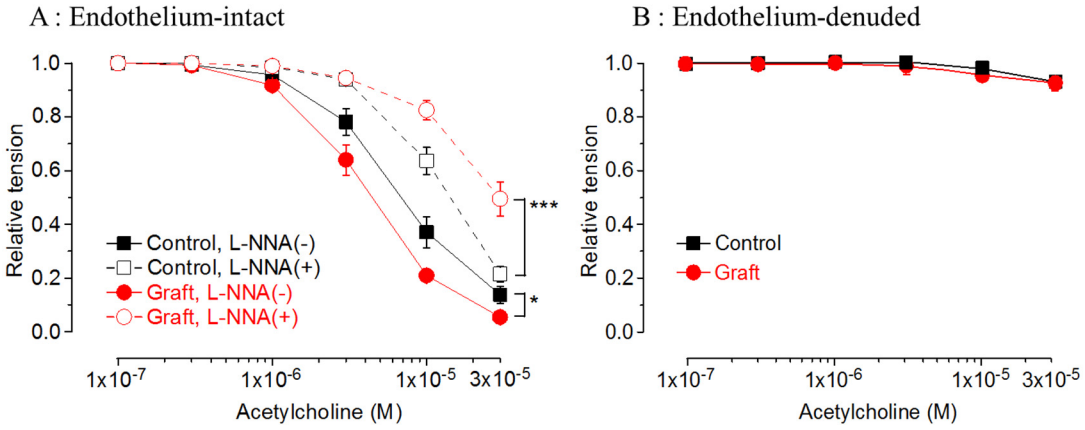


図 3. ACh による内皮依存性弛緩反応

L-NNA 非存在下で、G 群は C 群に比較し、ACh による弛緩反応が有意に増大した（Student unpaired t-test）。しかし L-NNA 存在下では ACh による弛緩反応は C 群に比較し G 群で有意に減少し、最大弛緩反応が減少した（Student unpaired t-test）。これらの弛緩反応は内皮を除去した状態では G 群、C 群ともに消失した。

3. 正常血流頚動脈と異常血流モデルの頚動脈の内皮機能（図 4）

実験方法:収縮弛緩反応は異常血流モデル作成後 4 週間目の動脈標本の中央部（約 1 mm）をリング標本として Krebs 液を満たしたオーガンチャンバーにセットした。アセチルコリン（ACh）による濃度依存性弛緩反応を検討するため，PGF2α で前収縮させた後、ACh を投与した（一部の標本では内皮を除去した)。また内皮由来の NO を検討するため L-NNA 存在下でも同様に実験を行った。

結果：異常血流動脈（青色、n = 4）の弛緩反応が正常血流（赤色、n = 4）に比べ障害されていた。

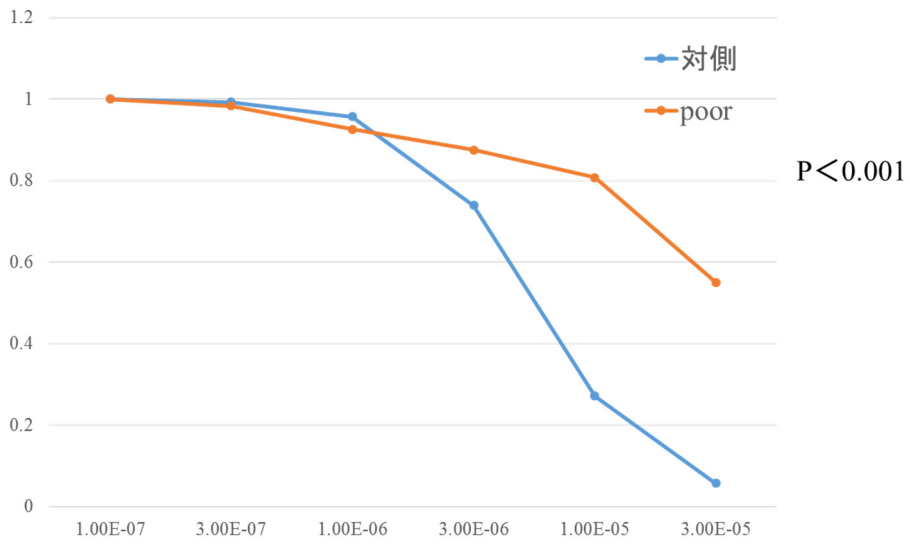


図 4. ACh 弛緩反応（Poor runoff vs 対側）L-NA(-)

考　察

1）静脈グラフトでは正常静脈でみられた EDHF の反応が消失していた。一方、動脈グラフトでは EDHF は低下を認めたが残存しており、静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 反応に違いがあることが明らかになった。これらの静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF の反応の違いが、動脈グラフトの良好な開存率に寄与している可能性があると示唆された。

2）ウサギ総頚動脈グラフトモデルでは受容体刺激による内皮細胞の 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。また basal な状態での cGMPの産生も増加しており、自発的な内皮細胞由来の NO 産生が増強しているとことが考えられた。

3）動脈グラフト群では ACh による内皮依存性弛緩反応が増強し、cGMP の産生も増加する傾向であったため、ACh による NO 産生が増強している可能性が考えられた。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。

4）また本実験で、異常血流頸動脈の内皮依存性弛緩反応は正常血流動脈に比べ有意に障害されていたことが明らかになった。今後、異常血流頸動脈モデルの検討が次の研究課題である。

文 献

1) Nguyen LL, Conte MS, Menard MT, Gravereaux EC, Chew DK, Donaldson MC, et al. Infrainguinal vein bypass graft revision: factors affecting long-term outcome. J Vasc Surg. 2004;40(5):916-923. DOI: 10.1016/j.jvs.2004.08.038.
2) Klinkert P, Post PN, Breslau PJ, van Bockel JH. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2004;27(4):357-362. DOI: 10.1016/j.ejvs.2003.12.027.
3) Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. Circulation. 1998;97(9):916-931. PMID: 9521341.
4) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-6. PMID: 6253831.
5) Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor. J Pharmacol Exp Ther 1986;237:529-38. PMID: 3009791.
6) Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J 1989;3:2007-18. PMID: 2545495.
7) Komori K, Suzuki H. Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. Circ Res 1987;61:586-93. PMID: 2820609.