

<原著>

## エンドセリンによるラット胎仔の生理的大血管収縮

(平成11年8月19日受付)

(平成12年7月31日受理)

東京女子医科大学付属日本心臓血管研究所循環器小児科

武田 紹 豊島 勝昭 佐々木 康 門間 和夫

**key words** : エンドセリン, エンドセリン受容体拮抗薬, 胎児循環, 肺動脈, 動脈管

### 要 旨

我々は強力な非選択性エンドセリン受容体拮抗薬であるボセンタンを用い正常妊娠満期ラットの胎仔の大血管に対する生理的収縮作用を研究した。ボセンタン群には帝王切開の4時間前にボセンタン30 mg/kgを生食1 mlに溶解し腹腔内注射した。ボセンタンを投与しない在胎21日の同種のラットを対照群とした。ラット胎仔の計測は全身急速凍結法を用い、顕微鏡下でマイクロメーターを使用し主肺動脈・左右肺動脈・動脈管・総頸動脈・左右上大静脈・下大静脈の内径を計測した。ボセンタンを投与した群では上行大動脈, 主肺動脈, 動脈管, 右肺動脈において8ないし15%の拡張が認められた。主肺動脈, 上行大動脈, 動脈管, 右肺動脈中央部, 遠位部にボセンタン投与群と対照群との間に有意差が認められた( $p < 0.01$ )。この結果は妊娠満期の胎仔におけるエンドセリンによる血管収縮の存在を示唆した。

### はじめに

新生児における心血管系の適応は主に胎児, 新生児期の羊において研究され, その生理学が明らかにされている<sup>1,2)</sup>。これらの研究で出生後に肺の小動脈が急速に拡張し, 大きな動脈はゆっくりと拡大, 成長する事が示された<sup>3)-6)</sup>。エンドセリン(ET)は血管内皮由来の強力な血管平滑筋収縮活性を有する新しい血管収縮ペプチドとして同定された<sup>7)</sup>。最近の研究においてエンドセリンは胎生期の肺血管の血管抵抗を保持する役割<sup>8)</sup>や出生後の動脈管の閉鎖に関与する事が報告されている<sup>9)</sup>。ボセンタンは強力な非選択的ET受容体拮抗薬であり, 経口及び経静脈投与にて血圧降下作用を有する<sup>10)</sup>。我々はボセンタンを妊娠満期のラットに投与し, 胎生期におけるエンドセリンの大血管収縮作用について研究した。

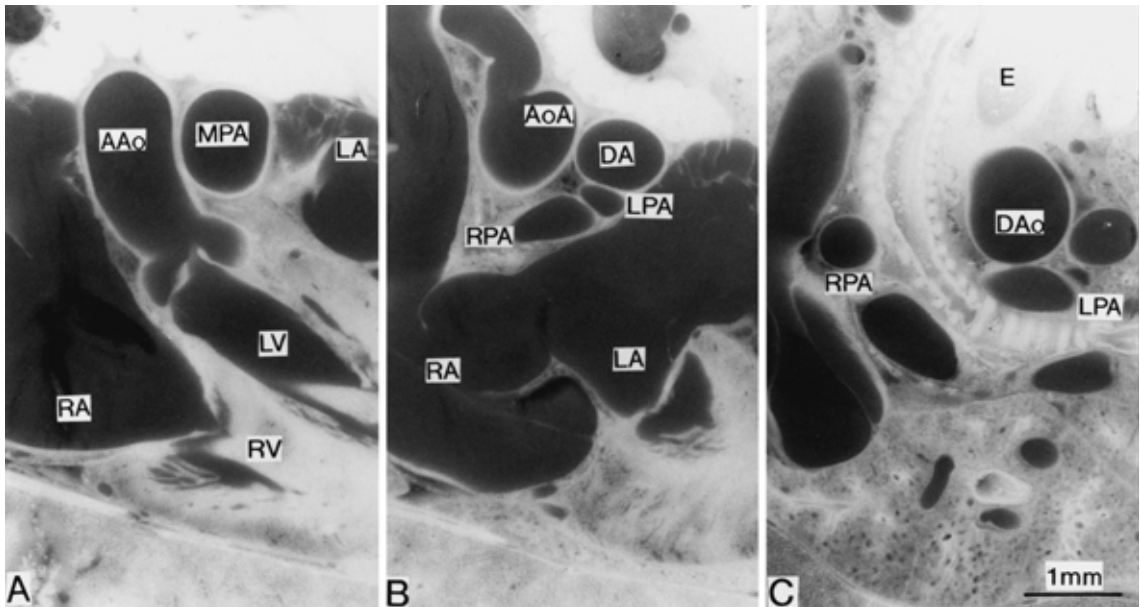
### 対象と方法

ウイスターラット(正常在胎21.5日)を妊娠させ, 陰腔にて妊娠が確認された時を在胎日0とした。満期

新生仔を得るために在胎21日(胎生満期)に帝王切開を施行した。この実験は大学の倫理委員会において承認された。エンドセリンの抑制剤としてボタンセンを使用した。ボセンタンはエンドセリンレセプターの競合的拮抗薬であり, 経口または経静脈投与にてET<sub>A</sub>とET<sub>B</sub>レセプターに拮抗する<sup>10)</sup>。Clozelらの研究に拠れば, ラットにボセンタンを経口投与後45分から6時間にわたりエンドセリンの血管作用を抑制できた<sup>10)</sup>と報告されているので, 我々は腹腔内注射後4時間の効果を調べた。ボセンタン群(妊娠親ラット3匹, 胎仔30匹)には帝王切開の4時間前にボセンタン30 mg/kgを生食1 mlに溶解し腹腔内に注射した。ボセンタンを投与しない在胎21日の同種のラット(親ラット2匹, 胎仔20匹)を対照群とした。計測は全身急速凍結法を用いた<sup>11)-14)</sup>。頸骨を脱臼させた親ラットから帝王切開で胎仔を分娩させ, 直ちにドライアイスを用い-80に冷やしたアセトン中に投入して固定した。ボセンタン投与群の10~12例, 対照群の12~15例を測定に用い, その他は写真の撮影に用いた。測定は, 最初に胎仔の体重を計り, 凍結マイクロームを用い前額断面を肺動脈弁部より下行大動脈部まで100 μmごと

別刷請求先: (〒467 8601) 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

名古屋市立大学小児科 武田 紹



前額面断面、主肺動脈

動脈管(前部)、左右肺動脈

下降大動脈、肺動脈

図1 対照ラットのの前額面断面. A: 上行大動脈と主肺動脈. B: 動脈管と左右肺動脈近位部. C: 下行大動脈と左右肺動脈遠位部. 図1 3の略語. AAo: 上行大動脈, AoA: 大動脈弓, DA: 動脈管, DAo: 下行大動脈, LA: 左房, LPA: 左肺動脈, LSVc: 左上大静脈, LV: 左室, MPA: 主肺動脈, RA: 右房, RPA: 右肺動脈, RV: 右室, SVC: 上大静脈.

に切断し、その断面上で顕微鏡下にマイクロメーターを使用し主肺動脈・左右肺動脈・動脈管・総頸動脈・左右上大静脈・下大静脈の内径を計測した(図1)。大動脈はバルサルバ洞直上、主肺動脈は弁と分岐の中間、左右肺動脈は近位側として主肺動脈からの分岐直後、中央側として主肺動脈からの分岐と上肺野枝の分岐の中間、遠位側として上肺野枝の分岐の直前、総頸動脈は大動脈からの分岐部と腕頭動脈と内頸動脈の分岐の中間、左右上大静脈は右房の流入部の直前、下大静脈は肝静脈分岐と右房流入部の中間、をそれぞれ計測した。統計処理は unpaired t を用い  $p < 0.01$  を有意とした。

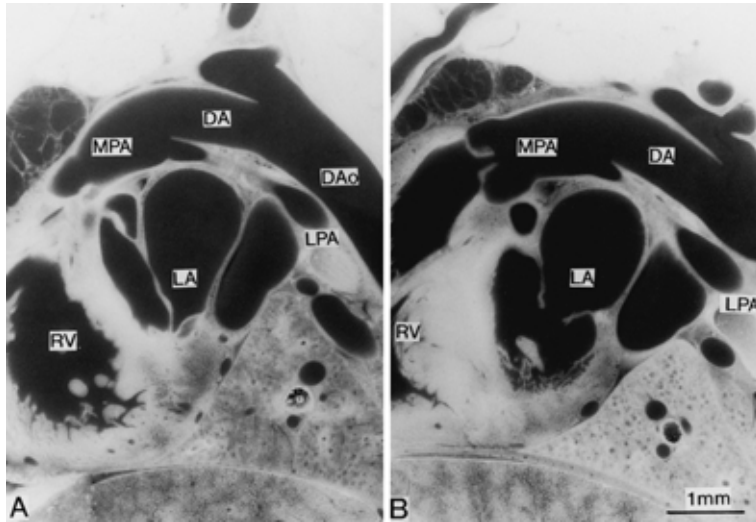
**結 果**

胎仔マウスの体重は両群で差がなかった。ボセンタンを投与した群では上行大動脈、主肺動脈、動脈管、左右肺動脈において血管内径の拡張が認められた(図2,3)。主肺動脈、上行大動脈、動脈管、右肺動脈中央部、遠位部にてボセンタン投与群と対照群との血管内径比はそれぞれ 1.12, 1.11, 1.14, 1.15, 1.13 であり、有意差が認められた ( $p < 0.01$  (表1, 図4,7))。

総頸動脈、左右上大静脈、下大静脈ではいずれも5%未満の拡張率で有意差がなかった。

**考 察**

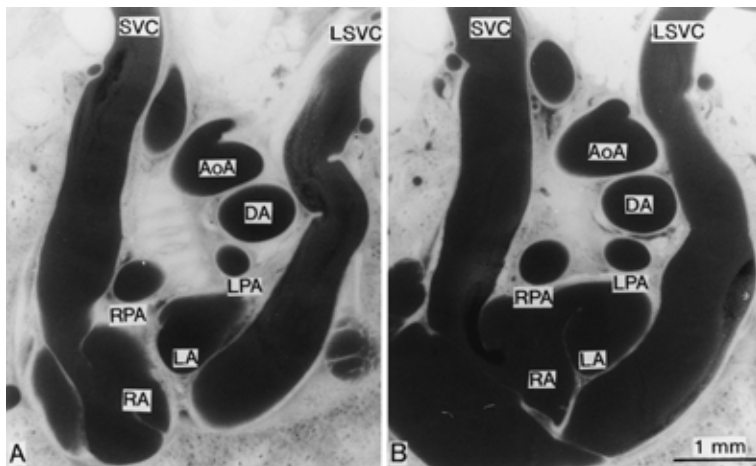
最近の研究で異なる3種類のエンドセリン(ET)が存在することが示され、最初に発見されたものをエンドセリン1(ET-1)と呼び、その他のものはET-2, ET-3と呼ばれている<sup>15)</sup>。また受容体は、ET-1 2選択的受容体(ET<sub>A</sub>受容体)、及びETアイソフォーム非選択的受容体(ET<sub>B1</sub>, ET<sub>B2</sub>受容体)と呼ばれている<sup>16)</sup>。ET<sub>A</sub>受容体は血管平滑筋上に発現し、大部分の血管で収縮性に働く<sup>17)</sup>。ET<sub>B</sub>受容体は主に内皮細胞内に発現し、ET<sub>B1</sub>受容体は血管拡張性にET<sub>B2</sub>受容体は血管収縮性に働く<sup>18)</sup>。ボセンタンは強力な非選択的ET受容体拮抗薬であり、経口及び経静脈的投与にて血压降下作用を有する<sup>10)</sup>。ET受容体への最大抑制効果は30 mg/kgのボセンタンを経静脈投与することで得られる<sup>10)</sup>。ボセンタンの胎児における血中濃度は測られていない。我々の未発表の研究ではインドメサシンの経胎盤投与(親ラット胃内注入)により胎仔動脈管は収縮し、インドメサシンとボセンタン(親ラット腹腔内



A 対照（無投薬）

B ET遮断薬bosentan 30 mg/kg ip 4 hr

図2 対照ラットとボセンタン投与後ラットの動脈管の矢状断面。ボセンタン投与後に動脈管が拡張している（矢状断面は主肺動脈，動脈管，下行大動脈の形態観察に用い，計測は前額面断面で行なった。）



A 対照（無投薬）

B ET遮断薬bosentan 30 mg/kg ip 4 hr

図3 対照ラットとボセンタン投与後ラットの動脈管，左右肺動脈中央部の前額面断面。両血管ともボセンタン投与後に拡張した。

注射)を併用する事により，動脈管の収縮が抑制される。この反応は経胎盤投与後4時間で強い事が確認された。以前の研究で正常の胎生期には内因性のET-1はET<sub>A</sub>受容体を介した血管収縮が顕著な役割である事が示唆されている<sup>19)</sup>。また，妊娠後期においてET受容体活性は血管収縮効果が優位ではないかと示唆さ

れている<sup>20)</sup>。今回の研究ではボセンタンを投与した群では投与しない群に比し，上行大動脈，主肺動脈，動脈管，右肺動脈において血管径の拡張が有意差を持って認められた。この結果はET<sub>B</sub>受容体(特にET<sub>B1</sub>受容体)の抑制効果よりも，主にET-1のET<sub>A</sub>受容体を介した血管収縮を抑制したと考えられ，従来の見解と一

表1 ボセンタン(エンドセリン受容体拮抗薬)投与群と対照群の血管径測定値(平均値±標準誤差),及びその差.NS:有意差なし

測定項目	エンドセリンブロック群	例数	薬なし群	例数	ブロック/薬なし	有意差
体重(g)	5.8±0.1	12	5.8±0.1	15	1.00	NS
上行大動脈径(μm)	830±16	12	750±19	15	1.11	<0.01
総頸動脈径(μm)	380±10	12	370±12	13	1.03	NS
主肺動脈径(μm)	850±13	12	760±18	15	1.12	<0.01
動脈管径(μm)	880±19	12	770±19	15	1.14	<0.01
右肺動脈近位部径(μm)	430±37	12	400±17	14	1.08	NS
中央部径(μm)	540±11	12	470±17	15	1.15	<0.01
遠位部径(μm)	600±10	12	530±19	13	1.13	<0.01
左肺動脈近位部径(μm)	350±11	12	320±18	13	1.09	NS
中央部径(μm)	420±13	12	390±15	15	1.08	NS
遠位部径(μm)	480±13	10	460±15	14	1.04	NS
右上大静脈径(μm)	1,010±12	12	970±18	14	1.04	NS
左上大静脈径(μm)	1,040±18	12	990±16	11	1.05	NS
下大静脈径(μm)	1,040±22	10	1,080±22	9	0.96	NS

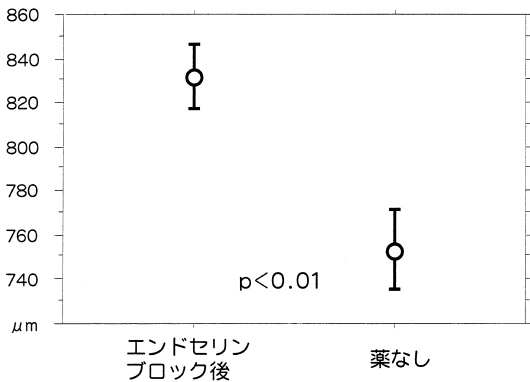


図4 ボセンタン投与後ラットと対照ラットの上行大動脈径.ボセンタン投与後で有意に拡張した(p<0.01).

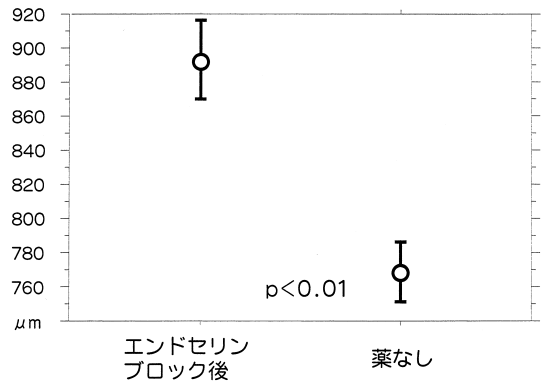


図6 ボセンタン投与後ラットと対照ラットの動脈管径.ボセンタン投与後で有意に拡張した(p<0.01).

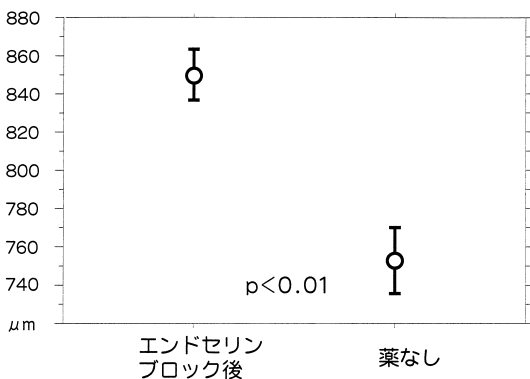


図5 ボセンタン投与後ラットと対照ラットの主肺動脈径.ボセンタン投与後で有意に拡張した(p<0.01).

致した<sup>19)</sup>.

本実験では in vivo の実験なので,ボセンタン投与後の血管拡張がボセンタンの血管への直接作用か間接作用かを区別し難いが,我々は次の理由から主に直接作用であろうと推定している. Clozel らのボセンタンの基礎研究ではボセンタンは投与後に血管拡張と血圧低下を生じる<sup>10)</sup>. 胎生期にこれらの反応が起これば胎仔の大動脈,肺動脈の血圧は低下するので,これらの血圧の変化は導管部分の動脈への作用としては拡張性には働かない.大動脈末梢あるいは肺動脈末梢の血流増加は測定されていないが恐らく生じていたものと思われる.一般に末梢への血流増加は導管となる太い動脈内の血流速度の増加を生じる.ヒトの出生後の大動脈峡部の発育や肺動脈の発育のごとく,導管動脈の中を

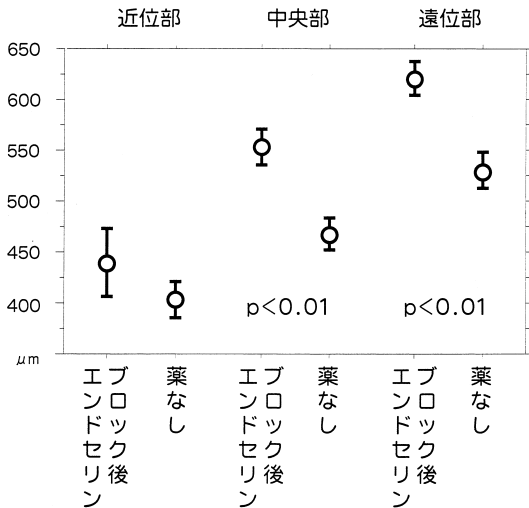


図7 ポセンタン投与後ラットと対照ラットの右肺動脈血管径。中央部と遠位部においてポセンタン投与後で有意に拡張した ( $p < 0.01$ )。

流れる血液量の増加が続けば数カ月あるいは数年を経て導管動脈の拡張が生じる。ラットの新生仔の場合、上行大動脈と大動脈峡部の生後の発育はきわめて急速でそれぞれの血流量の増大に伴って、内径が出生後4日の間に一日に約10%増大する<sup>21)</sup>。本研究においてポセンタン投与後4時間後の各動脈に10%前後の拡大が得られた事は4時間という時間経過の短さから考えて、末梢の血流増加による効果とは考えがたい。したがって本研究で観察された大動脈、肺動脈の拡大は主にポセンタンのこれらの直接作用と考えられる。しかしポセンタンによる血流増大が急激であった場合、血管のずり応力の増大により血管内皮より血管拡張物質が放出され血管が拡張する<sup>22,23)</sup>可能性は否定できない。血流量測定と動脈内径測定は羊胎子を用いて行なう事は可能である<sup>24)</sup>がポセンタンなどエンドセリンブロッカーにおいてそのような研究は行なわれていない。

右肺動脈近位部、左肺動脈、及び総頸動脈において有意差が出なかった事については血管径が細く、測定誤差が相対的に大きい事が考えられた。また、動脈管についてはETが出生後の動脈管の閉鎖に関与している事を示唆する報告がある<sup>9)</sup>。今回の研究では動脈管は有意差を持って拡張している事から、この報告を否定するものではなかった<sup>9)</sup>。ポセンタン投与群と対照群との血管径比は動脈管と主肺動脈、上行大動脈、右

肺動脈中央部、遠位部では差がなく特に動脈管に対し強い効果が得られるわけではなかった。左右上大静脈、下大静脈についてはポセンタンによる効果は認められなかった。我々は最近、一酸化窒素(NO)の生成阻害剤であるL-NAMEの胎生期血管作用を研究し、満期のラット胎仔の大動脈と主肺動脈が一酸化窒素の拡張作用を受けている事を証明した<sup>14)</sup>。したがって胎生期にこれらの血管のトーンが一酸化窒素、エンドセリンなど内皮細胞由来の物質により調節されている事が明らかになった。

我々は以前、左右肺動脈が出生後の肺血流増加に伴い急速に拡張する事を報告<sup>12)</sup>したが、こうした生後の肺動脈のリモデリングにもエンドセリンの関与が推測される。ファロー四徴症において胎内で肺動脈狭窄から肺動脈閉鎖に移行すると肺動脈の低形成が進行すると発表されている<sup>25)</sup>。このような症例に対し、胎盤通過性と、強い血管拡張作用を持つポセンタンは肺動脈の形成を促進する可能性があると考えられた。

## 結 論

エンドセリン受容体拮抗薬であるポセンタンを投与したラット胎仔では投与しない胎仔に比し、上行大動脈、主肺動脈、動脈管、右肺動脈において血管径が拡張した。従って、正常の胎生期のこれら大血管では内因性のET-1のET<sub>A</sub>受容体を介した収縮が存在することが示唆された。

## 文 献

- 1) Dawes GS : Foetal and Neonatal Physiology : Year Book Medical Publishers, Chicago, 1968, pp. 79-89
- 2) Rudolph AM : Congenital Diseases of the Heart : Year Book Medical Publishers, Chicago, 1974, pp. 1-28
- 3) Haworth SG : Pulmonary vascular development. In : Long WA (ed) Saunders WB, Fetal and Neonatal Cardiology. Philadelphia, 1990, pp. 51-63
- 4) Haworth SG, Hislop AA : Adaptation of the pulmonary circulation to extra-uterine life in the pig and its relevance to the human infant : Cardiovas Res ; 1981 ; 15 : 108-119
- 5) Haworth SG : Pulmonary vasculature. In : Anderson R.H., Macartney F.J, Shinebourne EA, Tynan M (eds) Pediatric Cardiology : Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987, pp. 123-157
- 6) Hoernblad PY, Larsson KS : Studies on closure of the ductus arteriosus I. Whole-body freezing as improvement of fixation procedure : Cardiologia, 1967 ; 51 : 231-240

- 7) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988 ; 332 : 411 415
- 8) Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH : Endothelin blockade augments pulmonary vasodilation in the ovine fetus : *J Appl Physiol* 1996 ; 81 : 2481 2487
- 9) Coceani F, Kelsey L, Seidnitz E : Evidence for an effector role of endothelin in closure of the ductus arteriosus at birth : *Can J Physiol Pharmacol* 1992 ; 70 : 1061 1064
- 10) Clozel M, Breu V, Gray GA, Kalina B, Loeffler B-M, Burri K, Cassal J-M, Hirth G, Mueller M, Neidhart W, Ramuz H : Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active non-peptide endothelin receptor antagonist : *J Pharmacol Exper Therap* ; 1994 ; 270 : 228 235
- 11) Momma K, Ito T, Ando M : In situ morphology of the ductus venosus and related vessels in the fetal and neonatal rat : *Pediat Res* 1992 ; 32 : 386 389
- 12) Momma K, Ito T, Mori Y, Yokozawa M : In-situ pulmonary vascular morphology and lung volume in the fetal and neonatal rat : *Early Human Development* 1993 ; 34 : 191 198
- 13) Momma K, Toyono M and Tomita S : Accelerated maturation of fetal ductus arteriosus by maternally administered vitamin A in rats : *Pediat Res* 1998 ; 43 : 629 632
- 14) Momma K, Toyono M : The role of nitric oxide in dilating the fetal ductus arteriosus in rats : *Pediat Res* 1999 ; 46 : 311 315
- 15) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T : The human endothelin family ; Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci* 1989 ; 86 : 2863 2867
- 16) Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M and Goto K : Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation ; implications for vascular function : *Circulation* 1991 ; 84 : 1457 1468
- 17) Ihara M, Fukuroda T, Saeki T, Nishikibe M, Kojiri K, Suda H, Yano M : An endothelin receptor (ETA) antagonist isolated from streptomyces misakiensis : *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 178 : 132 137
- 18) Bax WA, Saxena PR : The current endothelin receptor classification : Time for reconsideration? *Trends Pharmacol Sci* 1994 ; 15 : 379 386
- 19) Wang Y, Coceani F : Isolated pulmonary resistance vessel from fetal lambs : Contractile behavior and responses to indomethacin and endothelin-1 : *Circ Res* 1992 ; 71 : 320 330
- 20) Ivy DD, Abman SH : The role of endothelin in perinatal pulmonary vasoregulation. In : Weir EK, Archer SL, Reeves JT ( eds ), *The Fetal and Neonatal Pulmonary Circulations* : Futura, New York, 2000, pp 279 302
- 21) Momma K, Ito T, Ando M : In situ morphology of the aorta and common iliac artery in the fetal and neonatal rat : *Pediat Res* 1993 ; 33 : 302 306
- 22) Rubanyi GM, Romero C, Vanhouette PM : Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor : *Am J Physiol* 1986 ; 250 : 1115 1119
- 23) Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E : Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo : *Hypertension* 1986 ; 8 : 37 44
- 24) Fox JJ, Ziegler JW, Ivy DD, Halbower AC, Kinsella JP, Abman SH : Role of nitric oxide and cGMP system in regulation of ductus arteriosus tone in ovine fetus : *Am J Physiol* 1996 ; 271 : H 2638 H 2645
- 25) Hornberger LK, Sansers SP, Sahn DJ, Rice MJ, Spevak PJ, Benacerraf BR, McDonald RW, Colan SD : In utero pulmonary artery and aortic growth and potential for progression of pulmonary outflow tract obstruction in tetralogy of Fallot : *J Am Coll Cardiol* 1995 ; 25 : 739 745

### Physiological Constriction of Fetal Great Vessels by Endothelin

Sho Takeda, Katsuaki Toyoshima, Yasushi Sasaki, Kazuo Momma  
Department of Pediatric Cardiology, The Heart Institute of Japan,  
Tokyo Women 's Medical University.

We used a potent mixed blocker of endothelin receptors ( bosentan ) to evaluate the role of endothelin in the fetal circulation in rat. Near-term pregnant Wistar rats at the 21 st day were used. Bosentan was injected intra-peritoneally to the pregnant rats. A control group was not administered any drugs. After maternal atlas dislocation, cesarian section, fetal whole-body freezing, and cutting on the freezing microtome, measurements were made of the inner diameters of the ascending aorta, main pulmonary artery, left and right pulmonary artery, ductus artery, common carotid artery, left and right superior vena cava and inferior vena cava. Bosentan dilated these vessels, and induced significantly increased diameters of the ascending aorta, main pulmonary artery, ductus artery, right center pulmonary artery and right distal pulmonary artery(  $p < 0.01$  ) This result suggests that the balance of endothelin receptor activity favors vasoconstriction in the normal late-gestational fetus.

---