

## 高肺血流による肺高血圧モデルラットの作製： アンジオテンシン変換酵素阻害剤投与の影響

(平成 12 年 11 月 7 日受付)

(平成 12 年 12 月 25 日受理)

大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学小児発達医学講座小児科

\*現)大阪厚生年金病院小児科

小垣 滋豊 佐野 哲也\* 三輪谷隆史  
北 知子 松下 享 岡田伸太郎

**key words** : 高肺血流, 肺高血圧, 動物モデル, アンジオテンシン変換酵素阻害剤

### 要 旨

ラットを用い、腹部大動脈下大静脈短絡と左肺動脈結紮とを同時に行い、右肺血流を慢性的に増加させるモデルを作製し、血行動態の指標や肺の病理組織像の変化について検討した。6週間後、モデル群は対照群に比し有意に高い右室収縮期圧を示し ( $42.5 \pm 7.9$  mmHg vs.  $24.6 \pm 2.6$  mmHg,  $p < 0.05$ )、右室心筋重量比 (右室/左室 + 中隔) の増加 ( $0.26 \pm 0.02$  vs.  $0.43 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$ ) が認められた。またモデル群では体重増加が不良であり、血中 ANP 濃度の上昇傾向を認めた。本モデルの右肺組織にて、筋性肺動脈中膜の肥厚、肺胞壁肺動脈の筋性が観察され、肺血流増加型先天性心疾患の肺で観察される病理変化に類似していた。これらモデルラットにアンジオテンシン変換酵素阻害剤を投与した結果、右室圧上昇の抑制 ( $24.8 \pm 3.6$  mmHg) と右室心筋重量比増加の抑制 ( $0.32 \pm 0.01$ ) が得られ、本モデルの肺高血圧の進展にアンジオテンシン変換酵素を含む調節系が関与している可能性が示唆された。本モデルは高肺血流量性肺高血圧血管 Remodeling の機構を解析する上で有用である。

### I. 緒 言

先天性心疾患に伴う肺高血圧は、術前・術後および遠隔期に患児の予後を左右する危険因子の一つである<sup>1)</sup>。なかでも左右短絡を有し高肺血流による肺高血圧を合併する心疾患は頻度が高く、その病因・病態の正確な把握は治療法を考える上で重要である。従来より肺高血圧性肺血管については、低酸素暴露<sup>2)</sup>やモノクロータリン投与<sup>3)</sup>による動物モデルの解析が多くなされてきたが、血行動態の変化に基づく肺高血圧動物モデルの解析は少なくその成因は十分に解明されていない。著者らは、ラットを用いた肺血流増加に伴う肺高血圧モデルの作製を試み、肺血管の病理組織学的検討

を行った。また、高血圧性血管 Remodeling に重要な役割を担うレニン・アンジオテンシン系<sup>4)</sup>が、このような高肺血流による肺高血圧性肺血管の形成にどのような影響を及ぼすのかを検討する目的で、作製したモデルラットに、アンジオテンシン変換酵素阻害剤 (ACEI: angiotensin converting enzyme inhibitor) を投与しその影響を検討した。

### II. 対象・方法

生後 6~7 週齢の Sprague-Dawley 雄ラット (体重 200~250 g) を用いた。ペントバルビタール (50 mg/kg) 腹腔内投与にて麻酔した後、18 G ポリエチレンカテーテルを気管内に挿入し人工換気 (1 回換気量 2.5 ml, 呼吸回数 90 回/分) を開始した。麻酔はハロセン投与 (0.1~0.5%) で維持した。腹部正中切開にて腹腔に到達し、腸管を保護した後、後腹膜を鈍的に剥離、左腎静脈流入部の遠位部で腹部大動脈 下大静脈短絡

別刷請求先: (〒565 0871) 大阪府吹田市山田丘 2 2

大阪大学大学院医学系研究科 D 5

生体統合医学小児発達医学講座小児科

松下 享

を作成した。短絡は、露出した大動脈の頭側尾側に血管鉗子により血流を遮断した後、動脈側より静脈側に向けて18Gの注射針を貫通させることで作成した<sup>5)</sup>。このような短絡作成だけで肺血管病変が形成されたとする報告もあるが<sup>6)</sup>、我々の予備的実験では十分な肺動脈圧の上昇を認めなかったことから、左開胸にて左主肺動脈を30シルク糸で二重結紮し、腹部短絡で増加した血流を右肺のみに流すように工夫した。モデルラットを、精製水投与群(PH群, n=6)およびACEI投与群(ACEI群, n=6)に分け6週間飼育した。ACEI群には、処置翌日よりCilazapril 10 mg/kgBW/day<sup>7)</sup>を6週間連日胃内投与した。対照には開胸・開腹のみのsham手術ラット(C群, n=6)を用いた。実験はすべて大阪大学動物実験指針およびGuide for the Care and Use of Laboratory Animals(NIH Publication No. 86-23, revised 1985)に基づいて行われた。

6週間飼育後、全身麻酔・人工換気下に頸動脈および頸静脈カテーテルを挿入し回復した後、ペントバルビタールにて鎮静・自発呼吸下に大動脈圧と右室圧をそれぞれ記録測定した。屠殺後心筋を右室自由壁および左室+中隔に分け重量を測定し、右室心筋重量比(右室/左室+中隔:RV/LV+S)を求めた。また屠殺直前に下大動脈を尖刺して採取した血液にて、血中のANP(atrial natriuretic peptide), ACE(angiotensin converting enzyme), AT-I(angiotensin I), AT-II(angiotensin II), Renin濃度を測定した。さらに右肺組織のパラフィン包埋切片にてHE染色および弾性繊維染色(EVG染色)を行い組織学的検討を行った。

統計処理

結果はすべて平均±標準誤差で示した。各群間の比較には分散分析(ANOVA)を用い、ポストホックテストとしてFisher's PLSD法を用いた。p<0.05を統計学的に有意であるとした。

### III. 結果

#### 1. 体重増加

6週間の体重増加は、PH群 130±13 g, ACEI群 123±7 g, C群 151±7 gであり、各群間に統計学的有意差は認めなかったが、PH群とACEI群にて体重増加が少ない傾向にあった。

#### 2. 右室・大動脈収縮期圧(図1)

非開胸下に測定した右室収縮期圧は、PH群(42.5±7.9 mmHg)ではC群(24.6±2.6 mmHg)に比較し有意に上昇(p<0.05)していたが、ACEI群(24.8±3.6 mmHg)とC群では有意な差を認めなかった。一方大動脈収縮期圧は、各群間に有意な差は認めなかった。また右室/大動脈収縮期圧比(RVP/AoP)では、PH群(0.37±0.06)がACEI群(0.24±0.04)やC群(0.21±0.02)に比較し有意に高かった(p<0.05)。

#### 3. 心筋重量(図2)

モデルラットのPH群では肉眼的に右室肥大が観察され、実測したPH群の右室心筋重量(282±33 mg)はACEI群(187±15 mg)やC群(198±12 mg)に比較し有意に増加していた(p<0.05)。一方(左室+中隔)心筋重量は各群間で有意な変化はなく(PH群; 681±33 mg, ACEI群; 615±22 mg, C群; 729±34 mg)。右室心筋重量比(RV/LV+S)では、PH群(0.43±0.06)はC群(0.26±0.02)に比較し有意に高く(p<0.05)、ACEI群(0.32±0.01)では低下する傾向にあった。

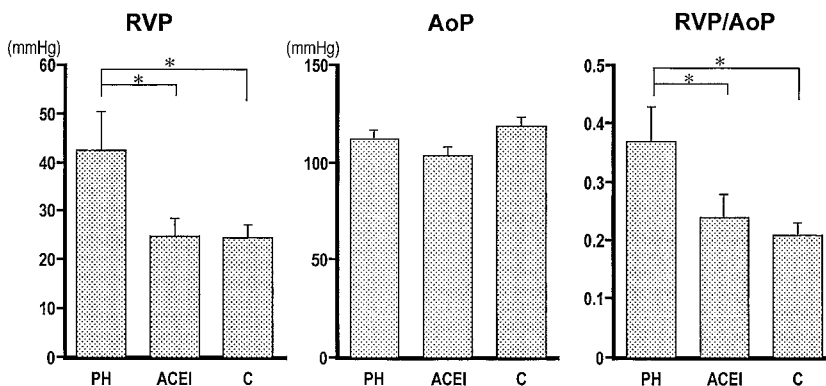


図1 右室、大動脈収縮期圧  
RVP; 右室収縮期圧, AoP; 大動脈収縮期圧, \*; p<0.05 (ANOVA)

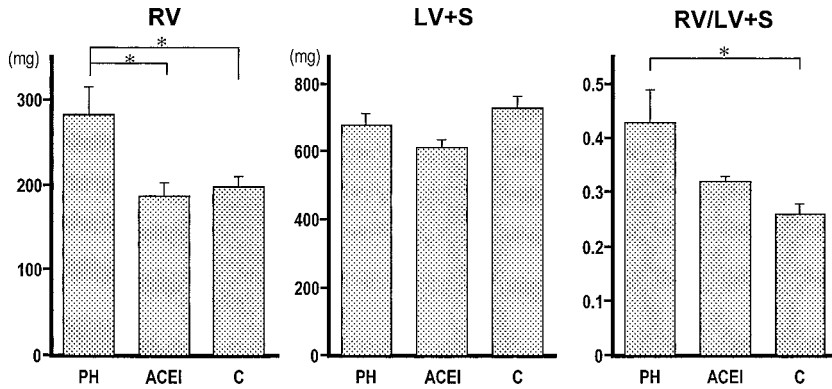


図 2 心筋重量

RV ; 右室心筋重量, LV+S ; (左室 + 中隔) 心筋重量, \* ; p<0.05 (ANOVA)

表 1 血中濃度

Group	ANP (pg/ml)	ACE (U/L)	AT- I (pg/ml)	AT- II (ng/ml)	Renin (ng/ml)
PH 群	60.7 ± 8.4	39.4 ± 0.7	4.5 ± 1.0	19.7 ± 3.5	10.9 ± 1.7
ACEI 群	42.0 ± 4.2	36.7 ± 2.4	3.7 ± 1.5	24.2 ± 9.7	13.2 ± 3.5
C 群	49.3 ± 2.9	37.8 ± 1.5	5.2 ± 1.4	23.0 ± 5.2	13.4 ± 3.2

4. 血中 ANP 濃度 (表 1)

血清中の ANP を測定した結果, 各群間に統計学的有意差は認めなかったが, PH 群は ACEI 群や C 群よりも上昇している傾向にあった. 一方, 血中 ACE, AT-I, AT-II, Renin 濃度は各群間に有意な差を認めなかった.

5. 右肺組織

右肺の組織像では, PH 群で筋性肺小動脈 (alveolar duct level) の中膜肥厚が観察され (図 3), また正常では非筋性動脈である肺胞壁肺動脈 (alveolar wall level) の筋性化も観察された (図 4).

IV. 考 察

肺血流を増加させる実験モデルの報告として, これまでに大腿動静脈短絡<sup>9)</sup>, 腹部大動脈下大静脈短絡<sup>5)6)</sup>, 一側肺切除<sup>10)</sup>, 左肺動脈大動脈吻合<sup>11)12)</sup>, 下行大動脈肺動脈短絡<sup>13)14)</sup>, 鎖骨下動脈肺動脈短絡<sup>15)</sup>などの動物モデルが報告されている. これらの肺血管において血管機能障害や組織形態学的異常が示されているものの, 高肺血流に起因する肺血管病変形成のメカニズムは十分に解析されていない. 著者らは, 高肺血流性肺血管病変を有するモデルラットを作製するにあたり, 予備的実験として腹部大動脈 下大静脈短絡術 (左

右短絡) を行ったが十分な肺動脈圧の上昇が得られず, 新たに左肺動脈結紮術を組み合わせることにより右肺血流を慢性的に増加させるモデルを考案した. 6 週間の飼育期間で, 右室圧の上昇および右室壁の肥厚が認められ, 肺血流増加に伴う肺高血圧モデルラットの作製が可能であった. 本モデルでは sham 手術ラットと比較して体重増加が少ない傾向にあり, また血中 ANP 濃度も上昇傾向にあることから, 血行動態の全身への影響 (心不全傾向) があったものと推察される. このモデルの右肺組織では, 新生内膜肥厚は認めなかったが筋性肺動脈中膜の肥厚・非筋性動脈である肺胞壁肺動脈の筋性化が観察された. これらは, 肺血流増加型先天性心疾患の肺血管でみられる Heath and Edwards type 1 の病理変化<sup>16)</sup>に類似し, 本モデルを用いて肺血流増加を起因とする肺血管 Remodeling を解析することが可能であると思われる.

低酸素暴露モデルや, モノクロタリン投与モデル<sup>3)</sup> また臨床症例<sup>17)</sup> の肺血管病変の研究から, これまでに肺血管 Remodeling に数多くの血管関連物質が関与していることが明らかにされている. これらの因子が高肺血流性肺血管においても同様に影響しているか否か, またどの因子が必須因子であるかを明らかにすること

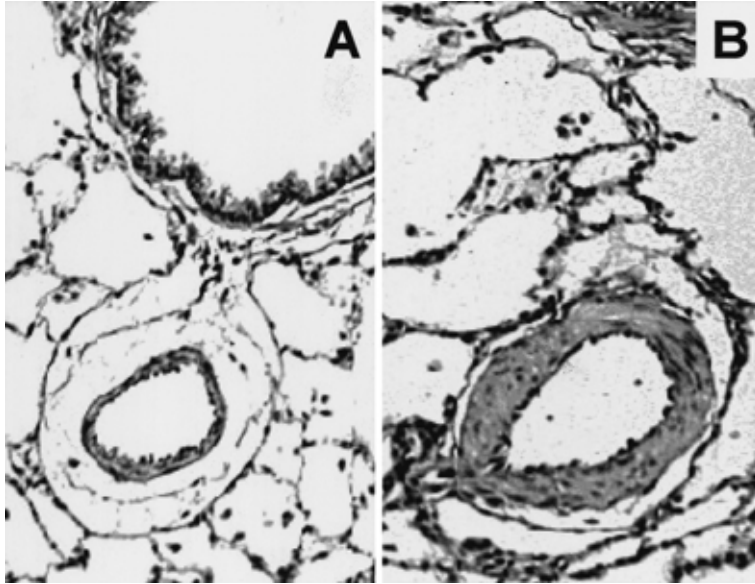


図3 右肺組織像 (HE 染色, 100 倍)  
 左; コントロール群, 右; PH 群  
 PH 群では, 筋性肺小動脈 (alveolar duct level) の中膜肥厚を認める .

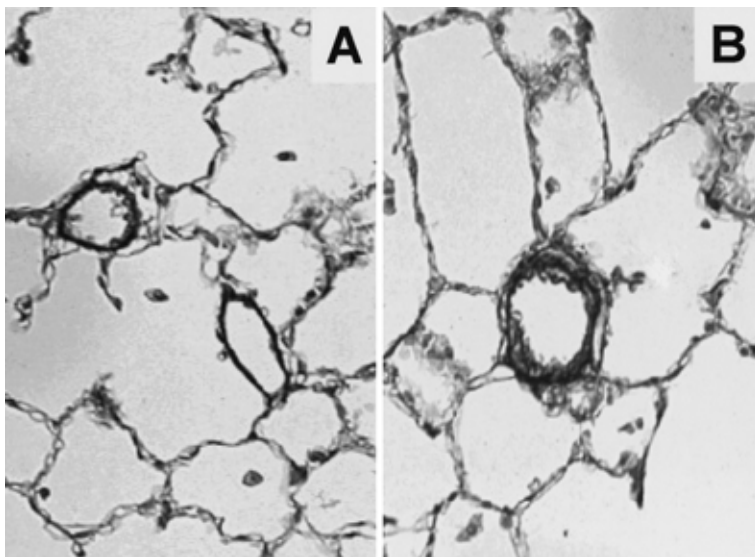


図4 右肺組織像 (EVG 染色, 200 倍)  
 左; コントロール群, 右; PH 群  
 PH 群では, 肺胞壁肺動脈 (alveolar wall level) の筋性を認める .

は重要である。興味深いことに、一酸化窒素合成酵素の発現が、低酸素暴露モデルと高肺血流モデルでは異なっていると報告があり<sup>6,18)</sup>、肺高血圧の成因に

より肺血管病変形成のメカニズムが異なる可能性が示唆されている。今回、我々の高肺血流性肺高血圧モデルに ACE 阻害剤の一つである Cilazapril (10 mg/kg

BW)を慢性投与した結果,肺高血圧進展の抑制傾向が見られた.このことは高肺血流性肺高血圧においてもACEが何らかの関与をしている可能性を示唆するものである.ACE阻害剤が肺血管にどのように作用したかは今回の検討から明らかでないが,低酸素暴露による肺高血圧モデルでは局所ACEの発現が増強しているとの報告もある<sup>19)</sup>.またACE阻害剤には,レニン・アンジオテンシン系の抑制作用のみならず,カリクレイン・キニン・プロスタグランジン系の増強作用(bradykinin, nitric oxide, prostaglandine I<sub>2</sub>産生亢進),末梢血管拡張作用,ナトリウム利尿作用,交感神経部分的抑制作用,活性酸素除去作用があることも知られており<sup>20,21)</sup>,これらの影響についても今後の検討が必要である.

我々は肺血管病変を有する高肺血流性肺高血圧のモデルラット作製に成功した.肺血管Remodelingの分子機構を解明する上で,従来の低酸素暴露モデルおよびモノクロタリン投与モデルに並び有用な実験モデルであると思われる.今後,ACEをはじめ種々の血管関連物質の検討をさらに進めていく必要がある.

#### 謝 辞

本研究,はエーザイ株式会社臨床研究センターおよびウシマ商事動物実験施設の協力のもとに行ったものであり,ここに感謝の意を表します.

#### 文 献

- 1) Bush A, Busst CM, Haworth SG, Hislop AA, Knight WB, Corrin B, Shinebourne EA : Correlations of lung morphology, vascular resistance, and outcome in children with congenital heart disease. *Br Heart J* 1988 ; 59 : 480 485
- 2) Hislop A, Reid L : New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol* 1976 ; 57 : 542 554
- 3) Arcot SS, Lipke DW, Gillespie MN, Olson JW : Alterations of growth factor transcripts in rat lungs during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Biochem Pharmacol* 1993 ; 46 : 1086 1091
- 4) Nakamura Y, Nakamura K, Matsukura T, Nakamura K : Vascular angiotensin converting enzyme activity in spontaneously hypertensive rats and its inhibition with cilazapril. *J Hypertens* 1988 ; 6 : 105 110
- 5) Garcia R, Diebold S : Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunt in the rat. *Cardiovasc Res* 1990 ; 24 : 430 432
- 6) Everett AD, Le Cras TD, Xue C, Johns RA :

eNOS expression is not altered in pulmonary vascular remodeling due to increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol* 1998 ; 274 : L 1058 1065

- 7) Clozel JP, Kuhn H, Hefti F : Effects of chronic ACE inhibition on cardiac hypertrophy and coronary vascular reserve in spontaneously hypertensive rats with developed hypertension. *J Hypertension* 1989 ; 7 : 267 275
- 8) Hopkins RA, Hammon JW Jr, McHale PA, Smith PK, Anderson RW : Pulmonary vascular impedance analysis of adaptation to chronically elevated blood flow in the awake dog. *Circ Res* 1979 ; 45 : 267 274
- 9) Fullerton DA, Mitchell MB, Jones DN, Maki A, McIntyre RC Jr : Pulmonary vasomotor dysfunction is produced with chronically high pulmonary blood flow. *J Thoac Cardiovasc Surg* 1996 ; 111 : 190 197
- 10) Friedli B, Kent G, Kidd BLS : The effect of increased pulmonary flow on the pulmonary vascular bed in pigs. *Pediatr Res* 1975 ; 9 : 547 553
- 11) Fasules JW, Tryka F, Chipman CW, Van Devanter SH : Pulmonary hypertension and arterial changes in calves with a systemic-to-left pulmonary artery connection. *J Appl Physiol* 1994 ; 77 : 867 875
- 12) Bousamra M 2nd, Rossi R, Jacobs E, Parviz M, Busch C, Nelin LD, Haworth S, Dawson CA : Systemic lobar shunting induces advanced pulmonary vasculopathy. *J Thoac Cardiovasc Surg* 2000 ; 120 : 88 98
- 13) De Canniere D, Stefanidis C, Brimiouille S, Naeije R : Effects of a chronic aortopulmonary shunt on pulmonary hemodynamics in piglets. *J Appl Physiol* 1994 ; 77 : 1591 1596
- 14) Reddy VM, Meyrick B, Wong J, Khor A, Liddicoat JR, Hanley FL, Fineman JR : In utero placement of aortopulmonary shunts. A model of postnatal pulmonary hypertension with increased pulmonary blood flow in lamb. *Circulation* 1995 ; 92 : 606 613
- 15) Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD : The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 434 42
- 16) Heath D, Edwards JE : The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease. *Circulation* 1958 ; 18 : 533 537
- 17) Hamada H, Terai M, Kimura H, Hirano K, Oana S, Niimi H : Increased expression of mast cell ch-

- mase in the lung of patients with congenital heart disease associated with early pulmonary vascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 160 : 1303-1308
- 18) Le Cras TD, Tyler RC, Horan MP, Morris KG, McMurtry IF, Johns RA, Abman SH : Effects of chronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide synthase expression in the rat lung. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 795-801
- 19) Morrell NW, Atochina EN, Morris KG, Danilov SM, Stenmark KR : Angiotensin converting enzyme expression is increased in small pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 1823-1833
- 20) Natoff IL, Nixon JS, Franeis RJ, Klevans LR, Brewster M, Budd J, Patel AT, Wenger J, Worth E : Biological properties of the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985 ; 7 : 569-580
- 21) Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C : Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress and bradykinin. *Circulation* 2000 ; 102 : 351-356

Pulmonary hypertension and arterial changes in a newly developed rat model  
with chronically increased pulmonary blood flow

Shigetoyo Kogaki, Tetsuya Sano, Takashi Miwatani, Tomoko Kita,  
Tohru Matsushita and Shintaro Okada

Department of developmental medicine ( Pediatrics ) Osaka university graduate school of medicine

Congenital heart lesions resulting in increased pulmonary blood flow are common and some cases lead to pulmonary hypertension and heart failure if unrepaired. The precise mechanisms whereby increased pulmonary blood flow results in an eventual detrimental remodeling of the pulmonary vasculature remains unknown. We developed a new rat model with increased blood flow in the right lung using a surgical procedure by which both an aortocaval shunt and a ligation of left pulmonary artery were created. Sprague-Dawley rats were divided into three groups and were examined 6 weeks after surgery. PH group ( n=6 ) : operated rats, treated with saline, ACEI Group ( n=6 ) : operated rats, treated with cilazapril ( 10 mg/kgBW/day ) C group ( n=6 ) : control rats, sham operation. Our model ( PH group ) resulted in a significant increase in right ventricular systolic pressure ( PH :  $42.5 \pm 7.9$  mmHg vs. C :  $24.6 \pm 2.6$  mmHg,  $p < 0.05$  ) and right ventricular mass ratio ( PH :  $0.26 \pm 0.02$  vs. C :  $0.43 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$  ). The animals showed poor body weight gain ( PH :  $130 \pm 8.7$  g vs. C :  $151 \pm 7.1$  g ) and high ANP level in the serum ( PH :  $60.7 \pm 8.4$  pg/ml vs. C :  $49.3 \pm 2.9$  pg/ml ). Histological examination revealed that mild thickening of the pulmonary arterial medial wall developed with increased muscularization of small arteries, whereas the intimal layer was unchanged. These changes are similar to the Heath-Edwards type 1 classification of vascular arteriopathy seen in congenital heart disease with increased pulmonary blood flow. The angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril attenuated the development of pulmonary hypertension ( RVSP ; ACEI :  $24.8 \pm 3.6$  mmHg ) and reduced right ventricular hypertrophy ( RV mass ratio ; ACEI :  $0.32 \pm 0.01$  ). Neither was significantly different from the control. This suggests that ACE inhibition may prevent the development of pulmonary hypertension induced by increased blood flow. Our rat model may be a useful tool to analyse mechanisms contributing to the pulmonary vascular remodeling in the presence of increased blood flow and pulmonary hypertension.