

In vivo での微量成分検定のための直接圧測定法の確立について

高橋ルミ子*, 出海みどり*, 木元 幸一**

(平成9年10月2日受理)

Establishment of Direct Measurements of Blood Pressure for an Examination of Trace Components *in vivo*

Rumiko TAKAHASHI, Midori IZUMI and Koichi KIMOTO

(Received on October 2, 1997)

緒 言

近年、高血圧治療薬(降圧薬)の進歩はめざましく、つぎつぎと新しい薬が開発されている。かつては高血圧治療は数量的に血圧を下げるのが目的であったが、近年では心拍出量、末梢血管の抵抗、循環血液量、血液の粘性、大動脈の弾力といった血圧を規定する因子に、さまざまな機序で作用し、安全かつ効果的に血圧降下をもたらす薬が研究されている。降圧薬を薬理作用で分類すると、 Na^+ 及び水利尿をもたらす、循環血液量を減少させることにより血圧を降下させる利尿薬、血圧調節にきわめて重要な役割を果たしている交感神経系の活性を中枢あるいは末梢で抑制して血圧を降下させる交感神経抑制薬、血管平滑筋細胞内への Ca^{2+} の取り込みを抑制して血管を拡張させるカルシウム拮抗薬、昇圧物質であるアンジオテンシンIIの産生を抑制するとともに、ブラジキニンおよびプロスタグランジンの増量をきたして血管を拡張させるアンジオテンシン変換酵素阻害薬などがある¹⁾。

現在、小動物(ラット)を用いて血圧を測定する方法として尾部にカフをはめ、内圧を高め、血流遮断あるいは血流再開時の脈動を測定する光電方式による非観血的測定法がある²⁾。この方法は同一の動物から、日をおいて繰り返しデータをとることができる。一方、ポリエチレンチューブを動脈内に挿入し、圧トランスデューサを介して直接動脈圧を測定する観血的測定法(直接法)がある³⁾。この方法は血圧を長時間測定することがで

きる。また、薬理学的には、薬の作用様式と機序および生体内動態を直接法による血圧反応によって知ることができる。この手法は経口投与よりも試料の量が少なくすみ、食品中の微量有効成分の降圧効果を調べるには大変都合がよい。そこで今回私達はラットの観血的血圧測定法のためのカテーテル導入手術による、微量成分の降圧効果の測定を試みた。また最近、循環器系改善、心筋代謝賦活などの機能が推定される核酸の⁴⁾構成成分であるアデノシン三リン酸(ATP)を投与し、血圧への影響を検討した。

実験方法

1. 実験動物

12~26週齢の雄性Wister系ラット(体重311.0g~482.4g, 日本クレア, 東京)および18週齢の高血圧自然発症ラット(SHR)(体重320.5g, 日本クレア)を用いた。実験までの馴化期間は飲料水および飼料(CE-2, 日本クレア)は共に自由摂取とした。

2. 使用薬物

エピネフリン(ボスミン[®], 第一製薬, 東京), アセチルコリン(オピソート[®], 第一製薬), アンジオテンシンI(AI)(ペプチド研究所, 大阪), カプトプリル(カプトリル[®], 三共, 東京), 硫酸アトロピン(和光純薬, 大阪), アデノシン三リン酸(オリエンタル酵母, 東京)を用いた。薬物は用時生理食塩水で溶解し用いた。

3. 手術方法および血圧・心拍数測定方法

(1) 頸静脈内へのカテーテル挿入法^{3), 5)}

Photo.1に示したようにラットをウレタン(カルバミル酸エチル, 和光純薬, 大阪)1000mg/kgで麻酔後、ラットは手術台に背臥位に四肢を開いて固定した。正中

* 栄養科 栄養学第1研究室

** 栄養学科 栄養生化学研究室

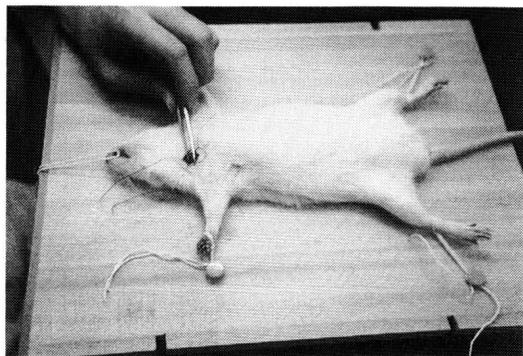


Photo.1 Operation on the jugular vein catheters. The jugular vein is pulled out and freed from surrounding tissues. A ligature was tied to the head and loosely tied around the carotid.

線よりやや外側の左右どちらかの頸部をバリカンで剪毛し、消毒綿で手術部位を清拭した。皮膚上より静脈の位置を確認し、皮膚を眼科用鉏で1 cm程切開し、先細のピンセットで丁寧に筋肉を分けて、静脈を露出した。続いて先細のピンセットで静脈1 cm程を筋肉から剥離し、血管下に糸を通し結び目を作っておいた。中枢側を動脈クレンメではさみ血流を止め、マイクロ鉏で静脈に垂直に切り込みを入れた。約7 cmに切った内径0.8mm、外径1.2mmのポリエチレンチューブ（SP-55、夏目製作所、東京）にヘパリンを加えた生理食塩水を満たし、片側を焼いて閉じたものをカテーテルとし、末梢側の糸を軽く引きながら血管の切り込みに中枢側に向かって挿入した。クレンメをはずし、さらに1 cm程進め、中枢側の糸で血管とカテーテルを共に結紮した。末梢側の糸でカテーテルを固定し、速乾性の接着剤で結び目を止め、カテーテルが抜けるのを防いだ。このチューブより薬物を血管内に投与した。

(2) 大腿動脈内へのカテーテル挿入法^{6)~8)}

ヒトの静脈内持続点滴輸液用のカテーテルを使用した。そのままでは径がラットの大腿動脈に対し太過ぎるため内径0.4mm、外径0.8mmのポリエチレンチューブ（SP28、夏目製作所）を接続し、速乾性の接着剤で止めて使用する。カテーテル内にはヘパリンを加えた生理食塩水を満たしておいた。Photo. 2 に示したが、左右どちらかの鼠径部を剪毛し、消毒綿で清拭後、皮膚上部より血管の位置を確認し、皮膚を血管に沿って2 cm程切開した。血管が露出したら先細ピンセットで神経と静脈を動脈から分離し、頸静脈と同様に糸を掛け、動脈クレン

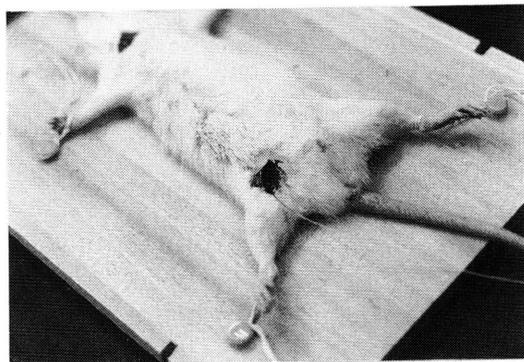


Photo.2 Operation on the femoral artery catheters. Polyethylene tubing was inserted into the femoral artery.

メで血流を止めた。血管に切り込みを入れ、上記のカテーテルを挿入した（切開部がわからなくなることがあるがその場合、25Gの注射針、もしくは尖鋭ピンセットの先を血管を突き破らない様に注意しながら、切り込みに挿入し切開した位置を確認した）。次にクレンメをはずしカテーテルに血液が流入してきたら、さらに腹大動脈に向かって進め、糸で血管とカテーテルを固定し、速乾性の接着剤で止める。Photo. 3 に手術した血管の部

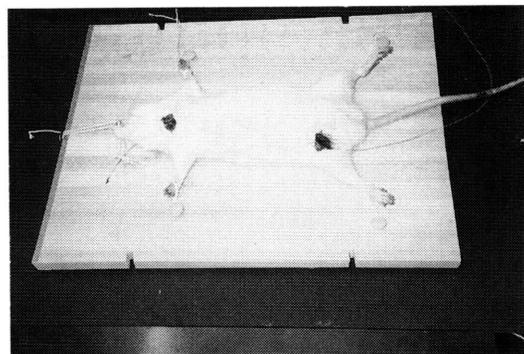


Photo.3 Connecting of polyethylene tubing with vascular.

Polyethylene tubing filled with sodium heparin in saline was inserted into the jugular vein and femoral artery.

位と接続されたポリエチレンカテーテルを示す。

(3) 血圧、心拍数測定

Photo. 4 に示すように大腿動脈より導出したポリエチレンカテーテルに圧トランスデューサ（DX-312、日本光電、東京）を接続し、血圧測定アンプ（AD-641G、日本光電）および心拍計（AT-601G、日本光電）を介

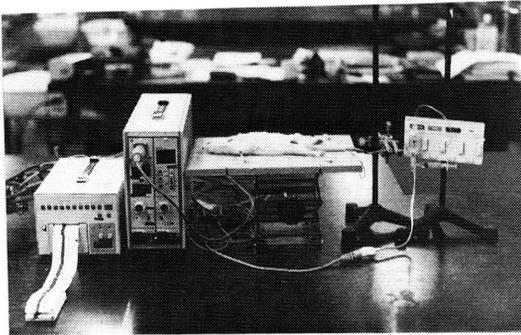


Photo.4 Measurement system of blood pressure and heart rate.

して血圧および心拍数を測定した。また測定結果はレコーダ(RTA-4100, 日本光電)を用いて波形記録を行った。

結果及び考察

1. 麻酔法の検討

カテーテルを挿入して直接動脈圧を測定する観血的血圧測定(直接圧)は、降圧剤やオータコイドの循環系に対する作用及び作用機序を検討する場合に、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ラットの血圧反応で検定する方法である。我々は今回ラットを用いて実験を行った。

ラットの動脈圧連続血圧測定を行ううえで、まず麻酔薬の検討を波形観察(データには示していない)により行った。当初ペントバルビタールナトリウムによる全身麻酔を施していたが、1回の投与(50mg/kg, intravenous)で得られる安定した麻酔時間は30分程度で、追

加投与を必要としたため過剰投与となり、バルビツール酸系の薬理作用である中枢抑制作用により呼吸抑制をもたらし⁹⁾、本実験の目的に適さないと判断した。次にウレタン(1000mg/kg, i. v.)による麻酔を実施し、10時間に及ぶ安定した睡眠を得た。ウレタンは鎮痛作用があり、呼吸系の抑制も少ない⁹⁾ことから以降ウレタンを使用した。

2. 麻酔下ラットの血圧に対する各薬物の作用

頸静脈、大腿動脈へのカテーテル導入後、薬剤の血圧に及ぼす影響を検討した。

A Iは、アンジオテンシン変換酵素(ACE)によりアンジオテンシンII(A II)になり、A IIがA II受容体と結合することにより、強い血管収縮を示す^{10), 11)}。またカプトプリルはACEを阻害して昇圧物質A IIの産生を抑制し、降圧物質であるブラジキニンの増量、それに伴うプロスタグランジンの増量によって血圧降下をもたらす^{10), 12)}と言われており、以下のように静脈投与を行った。Fig. 1-AはA I(2 μ g/kg, i. v.)投与を示す。直後に血圧の急激な上昇(最大上昇74mmHg)を示し、その後ゆるやかに下降し、およそ5分後投与前の血圧に戻った。次に(Fig. 1-B)カプトプリル(70 μ g/kg, i. v.)投与により血圧はゆるやかに下降し(最大下降70mmHg)安定した。そしてA.I(2 μ g/kg, i. v.)を投与したが血圧の上昇は認められなかった。カプトプリルについてはM. Van Den Buuseら¹³⁾がWister系ラットの大腿静脈より投与し、大腿動脈での血圧測定によ

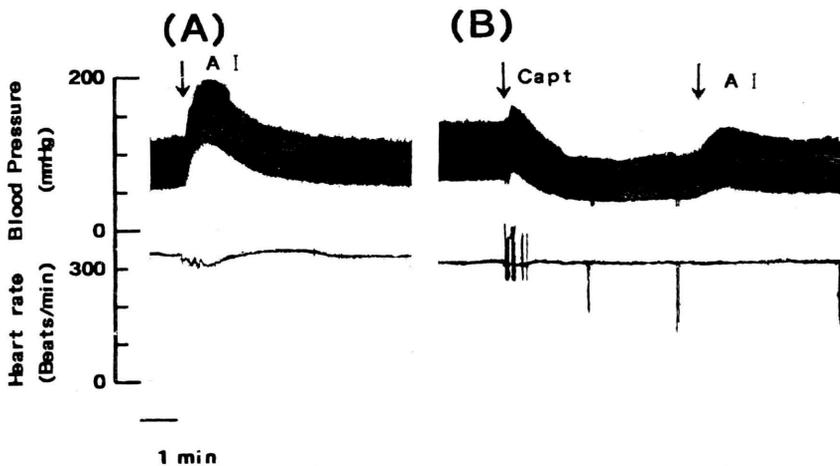


Fig.1 Effect of intravenous administration of A I and captopril on blood pressure and heart rate in anesthetized rat. Blood pressure and heart rate measured femoral artery catheter were recorded an intravenous injection of 2 μ g/kg A I (A); 70 μ g/kg captopril(capt) followed by 2 μ g/kg A I (B)

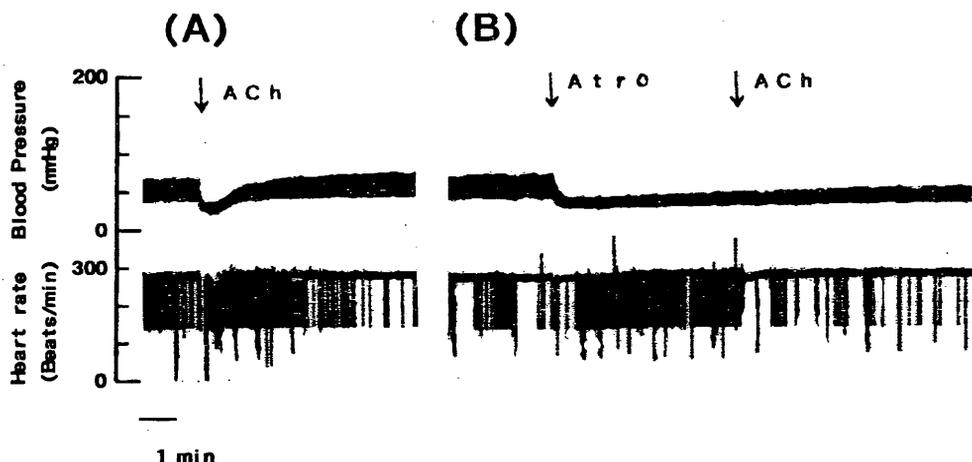


Fig.2 Effect of intravenous administration of acetylcholine and atropine on blood pressure and heart rate in anesthetized rat.

Blood pressure and heart rate were recorded as in Fig.2. 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ acetylcholine (ACh)(A);3mg/kg atropine(Atro) followed by 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ acetylcholine(B).

りA Iの昇圧作用抑制を報告しているが、今回我々はWister系ラットを用いて頸静脈より投与し大腿動脈での血圧測定を行ったところ一致した結果が得られた。蛇毒の研究¹⁴⁾に始まり、経口的にも有効で優れたACE阻害降圧薬であるカプトプリルは、静脈内投与においても、A I投与による血圧上昇を抑制することが示された。アセチルコリンは副交感神経興奮薬として血管運動神経からのノルエピネフリンの遊離を抑制するほかに血管内皮細胞に作用して、内皮由来弛緩因子を遊離させ平滑筋を弛緩し血管を拡張させる薬理作用により、血圧を下降する^{1), 15)}と言われている。またムスカリン性受容体に対する副交感神経遮断薬である¹⁾アトロピンを投与した後のアセチルコリンの血圧反応をみた。Fig. 2-Aに示すように、アセチルコリン(0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i. v.)により血圧は急激な下降を示し(最大下降29mmHg)その後速やかに上昇し、投与前の血圧に戻った。これはアセチルコリンによる血圧降下は一過性であることが示された。次に(Fig. 2-B)硫酸アトロピン(3mg/kg, i. v.)投与により速やかな血圧の下降が見られ持続した。引き続きアセチルコリン(0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i. v.)を投与すると、アセチルコリンによるさらなる血圧降下は認められなかった。これは受容体との結合が作用薬、拮抗薬とも可逆的である場合に生じ、濃度の高い薬物の方が受容体と結合する数が増える可逆的競合である¹⁵⁾。拮抗薬アトロピンの存在で作用薬アセチルコリンの効果は単独投与の

濃度では作用が弱まること示された。この結果は難波ら¹⁶⁾が杜仲葉抽出画分について、アセチルコリンとアトロピンの薬理作用を追跡しており、彼らの結果と一致した。しかし、今回我々は彼らとは異なり、薬物投与を頸静脈より、そして大腿動脈に挿入したカテーテルより血圧を測定した。彼らは投与を大腿静脈より、血圧測定は頸動脈より行っている。このようにカテーテルの挿入位置が異なっても同様の反応が示されることが確認された。

また、今回の実験で結果には示していないが、副交感神経を抑制するアトロピンを静脈投与した後、さまざまな交感神経作用を有し、 α ・ β 両受容体に対応するため血管収縮($\alpha > \beta$)が現れ、速効性の昇圧作用を有する¹⁷⁾と言われているエピネフリンを引き続き投与するとエピネフリンの血圧上昇作用が抑制された。現在、未確認であるがアトロピンとは別の作用であるかもしれない。

3. SHRの血圧に対するATPの作用

現在ATPは障害された脳組織の代謝を亢進し、脳機能の改善としての有効性¹⁷⁾と、心血管系への影響が予測されており、血管内への直接投与によって現れる血圧反応についての報告がある^{18), 19)}。そこで私達は麻酔下のSHRへのATP投与を試みた。Fig. 3-Aに示したように、ATP(1mg/kg, i. v.)投与直後に急激な降圧作用を示した。その後徐々に上昇し、およそ4分後に投

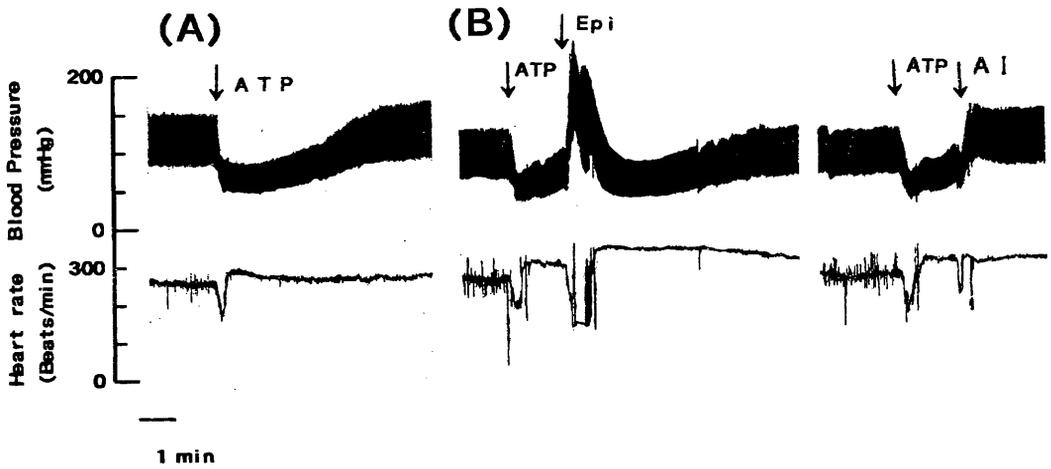


Fig.3 Effect of intravenous administration of ATP, epinephrine and A on blood pressure and heart rate in anesthetized rat.

Blood pressure and heart rate were recorded as in Fig.3. 1mg/kg ATP(A);1mg/kg ATP followed by 10 μg/kg epinephrine(Epi) or 0.5mg/kg A I (B).

与前の血圧に戻った。次に (Fig. 3-B) ATP (1mg/kg, i. v.) 投与による血圧降下後、エピネフリン (10 μg/kg, i. v.) を投与したが、ATPはエピネフリンの昇圧作用に影響を及ぼさなかった。また、A I (0.5mg/kg, i. v.) 投与による血圧上昇にも影響を及ぼさなかった。ATPはSHRの血圧に対し、明確な血圧降下作用を示した。しかしエピネフリン投与による血圧上昇を抑制しなかった。またATPの血圧降下はカプトプリルに類似した作用を示したが、A I 投与による血圧上昇には影響を及ぼさなかった。今回の実験ではATPの降圧効果がこの方法により確認できた。が、そのメカニズムはまだ判明できていない。

今後、さらに種々の降圧作用のメカニズムの解析を行うと共に、また栄養学の立場から、医薬品ではなく、日常の食品中の抗高血圧作用を持つ物質の血圧に対する有効性を動脈圧連続測定法を用いて、確認すると共に作用機序を検討したいと考えている。

要 約

観血的血圧測定法 (直接法) のためのカテーテル導入手術及び微量成分の降圧効果の測定を試みた。

- 1) 麻酔下ラットの頸静脈および大腿動脈へポリエチレンチューブを用いたカテーテルの導入手術を施した。全ての薬物は頸静脈より投与し、血圧および心拍数は

- 大腿動脈より圧トランスデューサーを介して行った。
- 2) カプトプリルによるA Iの血圧上昇抑制効果が静脈内投与によって示され、M. Van Den buuseら¹³⁾の報告と一致した。
- 3) 硫酸アトロピンによりアセチルコリンの血圧降下作用は抑制され、アトロピン、アセチルコリン間の可逆的拮抗が示され、難波ら¹⁶⁾の報告と一致した。
- 4) ATPの投与は明確な血圧降下作用を示した。しかしエピネフリン、A I 投与による血圧上昇には影響を及ぼさなかった。今後、種々の降圧作用のメカニズムの解析を行うと共に、直接法による血圧測定を用いて、日常の食品中の抗高血圧作用を持つ物質の血圧作用の研究を進めていきたい。

謝 辞

終わりに、直接圧手術法をご指導いただきました近畿大学農学部村上哲男教授に心より御礼申し上げます。また実験にご協力いただきました、本学栄養生化学研究室林あつみ先生、大学院食物栄養学専攻山本淳子さん、卒業論文として一生懸命実験に取り組まれた栄養学科栄養学専攻の三井淳子さんに深く感謝致します。

この研究は、本学特色ある教育研究費の援助により行われたものであり、関係各位にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 田中千賀子, 加藤隆一編: NEW薬理学 (改定第3版), 210-214, 380-381, 234-236 (1996) 南江堂
- 2) 局 博一: バイオメディカルリサーチマニュアル Vol.Ⅲ試料投与, 採取, 生体計測, ラットの尾動脈血圧測定法 (伊藤勇夫編) 59-61 (1994) 養賢堂 (東京)
- 3) 今井 潤, 山岸俊男: バイオメディカルリサーチマニュアル Vol.Ⅴ実験外科手技, カテーテル挿入法 (信永利馬編著) 229-230 (1995) 養賢堂
- 4) 須見洋行: 食品機能学への招待, 6 (1996) 三共出版 (東京)
- 5) V. Popovic and Pava: *Journal of applied physiology.*, **15**, 727-728 (1960)
- 6) 小野 歩, 藤田敏郎: 実験医学 (増刊) 14 (12), *in vivo*の血圧, 腎機能, 電解質バランスの解析法 (矢崎義雄監修) 133-134 (1996) 羊土社 (東京)
- 7) C. C. Chiueh, I. J. Kopin: *American journal of physiology.*, **234**, H690-695 (1978)
- 8) 安藤隆一郎, 川村俊介: バイオメディカルリサーチマニュアル Vol.Ⅳ生理・薬理・栄養・安全性, 鎮痛薬の試験法 (降矢強編著) 72-75 (1994) 養賢堂
- 9) 小林嘉代: バイオメディカルリサーチマニュアル Vol.Ⅱ麻酔と実験終了後の処置, マウスの麻酔法, ラットの麻酔法 (倉林譲編著) 52, 60 (1994年) 養賢堂
- 10) Skidgel, R. A. and Erdös, E. G. : ACE阻害剤のすべて改訂版, アンジオテンシン阻害薬の生化学と分子生物学 (萩原俊男, 猿田享男, 日和田邦男編) 294-307 (1994) 先端医学社 (東京)
- 11) 深水昭吉, 村上和雄: 最新医学 (臨時増刊) **51**, 821-828 (1995)
- 12) 三上 洋: 実地診療におけるレニン・アンジオテン系抑制薬の手引 (萩原俊男, 國府達郎, 猿田享男, 日和田邦男編) 28-29 (199)
- 13) M. Van Den Buuse and J. Kerkhoff: *General Pharmacology.*, **22** (4) 759-762 (1991)
- 14) Ondetti, M. A., Williams, N. J., Sabo, E. F. *et al.* : *Biochemistry.*, **10**, 4033-4039 (1971)
- 15) 橋本信也編: イラスト治療薬ハンドブック, 10-11, 105-107 (1997) 羊土社
- 16) 難波恒雄, 服部征雄, 葉加南, 馬永華, 野村靖幸, 金子周司, 北村佳久, 小泉 保, 片山和憲, 廬 煒: 和漢医薬学会誌, **3** (2), 89-97 (1986)
- 17) 津田喜典, 二宮一弥, 金戸 洋: 薬品科学 (改定第6版), 167-168, 182 (1996) 南江堂
- 18) Van Aken, H., Puchstein, W., Fitch, W. and Graham, D. I. : *Br. J. Anesth.*, **56**, 1409-1415 (1984)
- 19) Newberg, L. A., Milde, J. H. and Michenfelder, J. D. : *Anesthesiology*, **62**, 429 (1985)