

Interaction between Vasoactive Intestinal Peptide and Acetylcholine in the Coronary Circulation

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8462

正 誤 表

金沢大学十全医学会雑誌 第102巻 第4号 536-543 (1993)

冠循環における血管作用性小腸ペプチドと アセチルコリンの相互作用

— 摘出血管標本による検討 —

金沢大学医学部内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）

新 井 芳 行

	誤	正
536ページ	和文抄録 6行目 …を行った。雑種成熟イヌ <u>両性</u> 14頭、…	…を行った。雑種成熟イヌ <u>雄および雌</u> 14頭、…
537ページ	左段下から3行目 …の成熟イヌ <u>両性</u> (n=14) を用	…の成熟イヌ <u>雄および雌</u> (n=14) を用
540ページ	左段11行目 …がグアノシン三 <u>磷酸</u> 結合蛋白質 右段8行目 …される。今回の著書の実験では、	…がグアノシン三 <u>リン酸</u> 結合蛋白質 …される。今回の著書の実験では、

金沢大学十全医学会雑誌 第102巻 第4号 506-513 (1993)

Clostridium difficile 菌体内トキシンAの精製とその性状

金沢大学医学部微生物学講座（主任：中村信一教授）

孟 筱 琦

	誤	正
513ページ	英文抄録タイトル部分 2行目 … -J. Juzen Med Soc., <u>102, 00-00</u> (1993)	… -J. Juzen Med Soc., <u>102, 506-513</u> (1993)

冠循環における血管作用性小腸ペプチドと アセチルコリンの相互作用

—摘出血管標本による検討—

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

新井 芳 行

血管作用性小腸ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) はアミノ酸28個からなる生理活性ペプチドであり、脳血管から末梢血管に至るほとんどすべての血管 (特に動脈) 周囲には VIP 含有神経がかなり密に分布している。心臓では冠動脈周囲に認められ、副交感神経終末にアセチルコリン (acetylcholine, ACh) と共存しており、副交感神経刺激により ACh と同時に遊離されることより、VIP は ACh の共同伝達物質である可能性が推測されている。そこで VIP の冠循環に対する作用を明らかにするために、摘出イヌ冠動脈標本を用いて、VIP の冠動脈に対する作用とその作用における内皮の関与、ACh の内皮依存性拡張作用に対する VIP の修飾作用の検討を行った。雑種成熟イヌ (両性14頭、体重 10.0-29.0kg) より冠動脈を摘出し、左回旋枝の近位部より螺旋標本を作成した。これを Krebs 液で還流した臓器槽内に装着し、プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ (prostaglandin $F_{2\alpha}$, $PGF_{2\alpha}$) 10^{-5} M により前収縮させ、VIP, ACh を臓器槽内に累積投与して発生する張力を等尺性に記録し、用量-反応曲線を求めた。VIP は用量依存性に冠動脈標本を拡張させ、VIP の拡張作用の生ずる閾値は 3×10^{-8} M であった。高濃度の VIP による冠動脈拡張作用は内皮の剥離により減弱した。ACh 投与による拡張は 10^{-8} M の VIP 前投与により VIP 非存在下に比して増大した (10^{-7} , 10^{-6} M: $P < 0.01$, 3×10^{-7} , 3×10^{-6} M: $P < 0.05$)。pD₂ 値は 10^{-8} M の VIP 前投与下で 7.368 ± 0.105 と VIP 非存在下での 7.152 ± 0.149 に比べ有意に大きく ($P < 0.05$)、ACh の用量-反応曲線は 10^{-8} M の VIP の存在により左方に移動し、直接の血管拡張作用の発現しない低濃度の VIP は ACh の内皮依存性拡張作用を増強した。これらのことより、VIP は直接冠動脈拡張作用を示すだけでなく、ACh との相互作用、内皮由来各種血管拡張因子との作用を介して冠血管の緊張の調節に重要な役割を果たしているものと推定された。

Key words vasoactive intestinal peptide, acetylcholine, interaction, endothelium, coronary circulation

血管作用性小腸ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) は1970年に Said¹⁾によってブタの小腸から抽出単離されたアミノ酸28個からなる内因性生理活性ペプチドであり、構造はグルカゴンやセクレチンと類似し、各種平滑筋の弛緩や分泌促進など多様な作用を有するとともにその名の示すとおり血管拡張作用をもっている。脳血管から末梢血管に至るほとんどすべての血管 (特に動脈) 周囲には VIP 含有神経がかなり密に分布している。心臓では冠動脈周囲に認められ²⁻⁴⁾、また VIP の直接ヒト冠動脈内投与により冠動脈拡張を示す^{5,6)}ことも知られており、冠循環の神経性調節に重要な役割を果たしている可能性が推測されている。また VIP は副交感神経終末にアセチルコリン (acetylcholine, ACh) と共存しており、副交感神経刺激により ACh と同時に遊離される⁷⁾。このことより VIP は ACh の共同伝達物質または修飾物質である可能性が推測されている。さらに生理役割だけでなく、ショックや虚血性心疾患、心不全^{8,9)}などの病的状態においても、それらの病態を修飾

しているものと推測される。しかしながら、その生物学的活性やその作用機序については現在までに多くの研究がなされているが、いまだ明らかでない点も多い。

一方近年血管壁の最内側を被う内皮細胞は血球、血漿成分を保持するための単なる物理的障壁としての機能のみならず、凝固線溶系・血小板凝集の調節、多核白血球・リンパ球の血管壁への接着の制御、抗原の提示、各種生理活性物質の代謝・変換など、多様かつ能動的な生理機能を担う細胞であることが認識されてきた。内皮細胞は体内で唯一血流と接触し、血流中の化学的 (活性物質など) および物理的情報 (流速、圧など) を直接感受する立場にある細胞でもあり、局所および全身の循環調節において重要な役割を担っているものと推測される。実際、1980年の Furchgott らによる内皮由来血管拡張因子 (endothelium derived relaxing factor, EDRF) の発見¹⁰⁾以来、血管内皮細胞が血管平滑筋を、収縮あるいは弛緩させる因子 (エンドセリン¹¹⁾, トロンボキサン A_2 ¹²⁾, EDRF¹⁰⁾, プロスタグランディン I_2

平成5年6月7日受付, 平成5年8月3日受理

Abbreviations: ACh, acetylcholine; A-kinase, cAMP dependent protein kinase; EDRF, endothelium derived relaxing factor; MLCK, myosin light chain kinase; $PGF_{2\alpha}$, prostaglandin $F_{2\alpha}$; PGI_2 , prostaglandin I_2 ; VIP, vasoactive intestinal peptide

(prostaglandin I_2 , PGI_2)¹³, 内皮由来過分極因子 (endothelium derived hyperpolarizing factor, EDHF)¹⁴ 等を種々の刺激に反応して産生, 放出し, 血管収縮性の調節にあずかっていることが明らかになりつつある. このように内皮は血管平滑筋機能の調節に重要な役割を演じており, 血管作動物資の作用機序を考察する上で内皮の関与を検討することは不可欠と思われる.

そこで VIP の冠動脈に対する作用を明かにするために, 摘出イヌ冠動脈を用いて, VIP の冠動脈に対する作用とその作用における内皮の関与, ACh の内皮依存性拡張作用に対する VIP の修飾作用の検討を行った.

対象および方法

1. 対象

実験には体重 10–29kg の雑種の成熟イヌ両性 (n=14) を用いた. 体重の平均値±標準誤差は 15.7 ± 1.5 kg であった. ペントバルビタール (30mg/kg) 静脈内投与による麻酔後, 脱血屠殺

した. すみやかに心臓を取り出し, 氷冷した保生液中で冠動脈を注意深く摘出した. 前下行枝分枝直後の回旋枝近位部 (ヒトではアメリカ心臓病学会分類のセグメント 11 に相当, 外径 2.4 ± 0.1 mm) から血管周囲の結合組織を注意深く剥離した後, 実体顕微鏡下に大橋らの方法¹⁵ に従い, 血管軸と 60 度の交差角で螺旋標本 (長さ 15mm 幅 1.2 mm) を作製した. 作成した標本は 2ml/min の一定の速度の保生液で灌流した臓器槽内 (容量 2.4 ml) に装着した. 標本の下端は臓器槽の底に固定し, 上端を等尺性張力トランスデューサー TB-651T (日本光電, 東京) に結合した. トランスデューサーで検出した等尺性張力の変化は張力用アンプ ET-601G (日本光電) で増幅し, 直記式レコーダー (日本光電) を用いて記録した. 保生液にはクレブス液を使用し, その組成を NaCl 120.0, KCl 5.9, $NaHCO_3$ 25.0, NaH_2PO_4 1.2, $CaCl_2$ 2.5, $MgCl_2$ 1.2, グルコース 5.5mM とした. 実験中は絶えず, 95%酸素, 5%二酸化炭素の混合ガスで通気を行い, pH 7.4 に維持した. また, 恒温ポンプを用いて臓

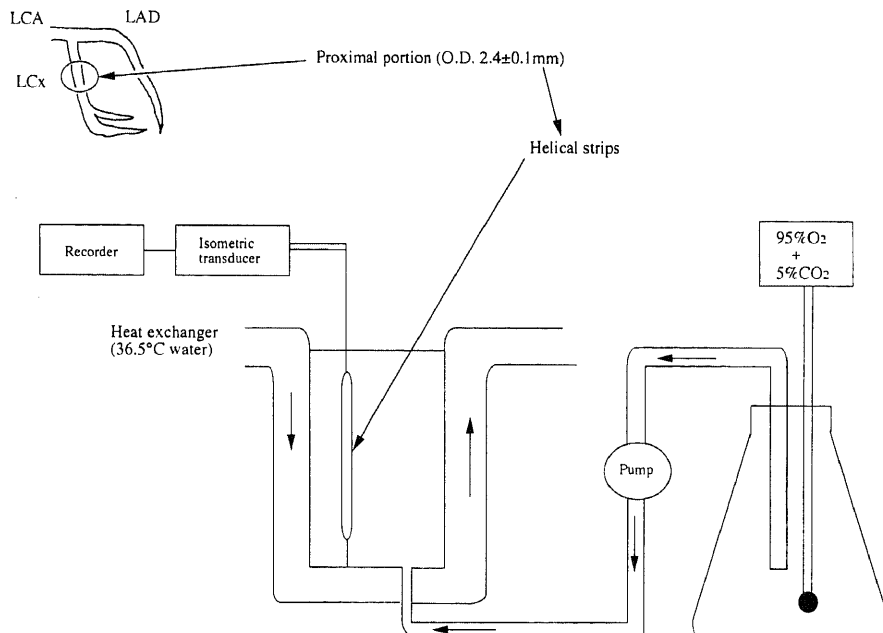


Fig. 1. Schema of the measurement of isometric relaxation. Helical strips prepared from the proximal portions of the left circumflex coronary artery of 14 mongrel dogs (either sex, weight 10.5–29 Kg) were suspended in Krebs Buffer (pH 7.4) gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 at 36.5°C, and the isometric developed tension was recorded. LCA, left coronary artery; LAD, left anterior descending artery; LCX, left circumflex artery; O. D., outside diameter.

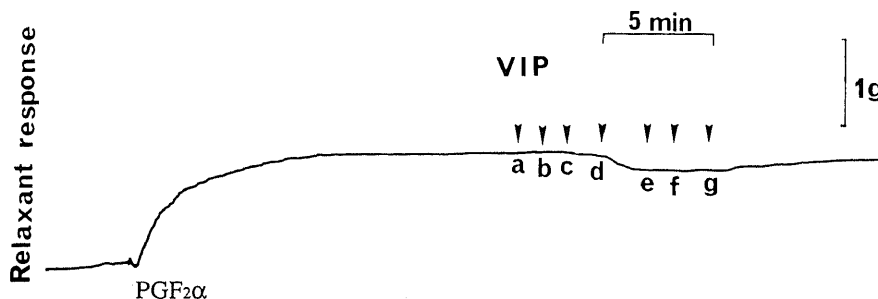


Fig. 2. Relaxant responses of cumulative addition of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the canine coronary artery. Strips were submaximally contracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). VIP were added directly to the bath at arrows (a-g) so that the concentration of VIP in the bath would be 10^{-9} M (a), 3×10^{-9} M (b), 10^{-8} M (c), 3×10^{-8} M (d), 10^{-7} M (e), 3×10^{-7} M (f) and 10^{-6} M (g), respectively.

器槽の周囲に温水を還流し、槽内の温度を 36.5 ± 0.5 度に保った。標本には基本張力として 1.25g を負荷した。標本を臓器槽内に装着後60-90分間の静置観察を施行し、標本の発生する静止張力が安定してから実験を開始した。各薬剤はマイクロシリンジで直接臓器槽内に累積投与法を用いて投与し、これにより標本に発生する等尺性張力を記録し、用量-反応曲線を求めた(図1)。

薬物濃度は全て臓器槽内の濃度として表した。

II. 使用薬剤

実験には合成ヒトVIP(ペプチド研究所, 大阪), プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ (prostaglandin $F_{2\alpha}$, PGF $_{2\alpha}$) (dinoprost, 小野薬品, 大阪), アセチルコリン クロライド(第一製薬, 東京)を用いた。

III. 実験

1. VIPの冠動脈に対する作用の検討

1) VIPの冠動脈に対する直接的作用の検討

内皮を温存した螺旋標本($n=9$)を臓器槽内に装着し、 10^{-5}M のPGF $_{2\alpha}$ の溶解した保生液で還流し、持続的収縮を起こさせた。この前収縮下に臓器槽内の濃度が 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6}M となるように合成ヒトVIPをマイクロシリンジで投与し、各標本におけるVIPの用量-反応曲線を求めた(図2)。60分間保生液で還流し、静置後、再び 10^{-5}M のPGF $_{2\alpha}$ の溶解した保生液で還流し、持続的収縮を起こさせた。この前収縮下に臓器槽内の濃度が 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6}M となるようにAChをマイクロシリンジで投与し、各標本におけるAChの用量-反応曲線を求めた。

2) VIPの冠動脈に対する作用における内皮の関与の検討

同一のイヌより標本を二個採取し、螺旋標本を作成後一つをFurchgottらの方法¹⁰に従い、保生液で濡らした濾紙で冠動脈の内膜面を擦過し、内皮の剝離を機械的に行った。(走査型電子顕微鏡あるいは銀染色後に光学顕微鏡で観察するとこの操作により内皮のほとんどすべてが剝離されるとされ、またこの操作による平滑筋の損傷は無視できるほど小さいとされている¹⁰)。内皮を剝離した標本を 10^{-5}M のPGF $_{2\alpha}$ の溶解した保生液で還流し、持続的収縮を起こさせた。この前収縮下に 10^{-6}M のAChを臓器槽内にマイクロシリンジで投与し、AChによる内皮依存性血管弛緩反応の有無により内皮機能の有無を確認した。AChは血管の内皮機能が正常であればムスカリン受容体の刺激により内皮由来の弛緩因子、EDRFを遊離させる¹⁰ことが知られており、ACh投与により内皮が温存されている標本は弛緩反応を示し、内皮を剝離した標本では弛緩反応は消失した。残りの一つの標本は内皮を温存した。 10^{-5}M のPGF $_{2\alpha}$ の溶解した保生液で還流し、持続的収縮を起こさせた。この前収縮下に臓器槽内の濃度が 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} , 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6}M となるようにヒト合成VIPをマイクロシリンジで投与し、両標本におけるVIPの用量-反応曲線を求めた。得られた両標本におけるVIPの用量-反応曲線の比較を行い、VIPの冠動脈に対する作用における内皮の関与を検討した。

2. ACh内皮依存性拡張作用に対するVIPの修飾作用の検討

内皮を温存した標本($n=5$)を臓器槽内に装着し、 10^{-5}M のPGF $_{2\alpha}$ を溶解した保生液で還流し、持続的収縮を起こさせた。この前収縮下にAChの臓器槽内の濃度が 10^{-9} , 3×10^{-9} , 10^{-8} ,

3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4}M となるようにAChをマイクロシリンジで投与し、各標本におけるAChの用量-反応曲線を求めた。60分間保生液での還流し、静置後、 10^{-5}M のVIPを溶解した保生液で20分間還流し、再度同様の方法でACh投与を施行し、 10^{-5}M のVIP前投与下におけるAChの用量-反応曲線を求めた。また得られた用量-反応曲線より、小池らの方法¹¹に従い、 pD_2 値(各々の最大反応の50%反応を引き起こすのに必要な各薬剤のモル濃度の自然対数を負にした値)を求めた。これらの用量-反応曲線、 pD_2 値の比較を施行し、AChの内皮依存性拡張作用に対するVIPの修飾作用を検討した。またVIP 10^{-5}M 前投与下のAChの用量-反応曲線を求めた後、60分間の保生液での還流し、静置後に再度同様の方法でAChの投与を施行し、AChの用量-反応曲線を求め、最初のAChの用量-反応曲線と差がないことは確認した。

IV. 統計学的検討

得られて成績はすべて平均値±標準誤差として表示し、各群間の平均値の差の検定はStudentのt検定あるいは一元配置、二元配置による分散分析後シェフェの多重比較を用いて行い、危険率が0.05未満をもって有意差ありとした。

成 績

I. VIPの冠動脈に対する作用

1. VIPの冠動脈に対する直接的作用(図3)

得られたVIPの用量-反応曲線を、AChの用量-反応曲線と比較検討した。得られた拡張量は、PGF $_{2\alpha}$ 10^{-5}M による収縮

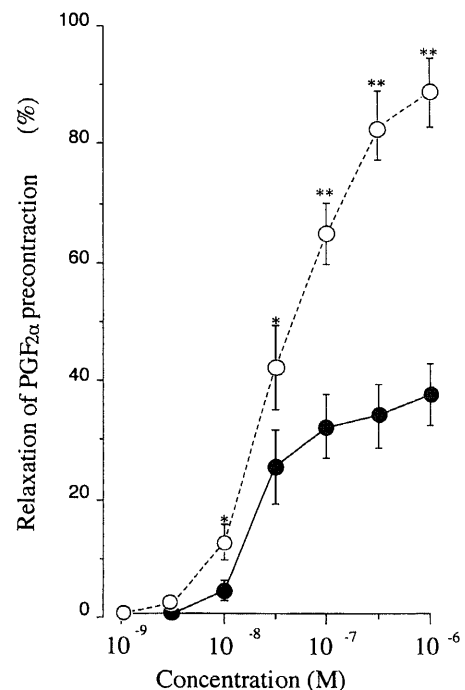


Fig. 3. Concentration-response curves for vasoactive intestinal peptide (VIP) and acetylcholine (ACh). ●, VIP; ○, ACh. Strips were submaximally precontracted with 10^{-5}M prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$). Relaxation induced by VIP and ACh were presented as values to contraction induced by 10^{-5}M PGF $_{2\alpha}$. Vertical bars represent S. E. ($n=9$). *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ vs. VIP induced relaxation by two-way analysis of variance with Scheffe's post hoc test.

量を100%としてこれに対する百分率を表した。標本は、VIPにより用量依存性に拡張反応を示した。摘出イヌ冠動脈に対するVIPの拡張作用は、 10^{-8} M以上の濃度においてAChの拡張作用より有意に小さく ($p < 0.05$)、 10^{-8} Mにおける拡張量はAChによる拡張量の40%であった。またVIPの拡張作用の生ずる閾値は 3×10^{-8} Mであった。

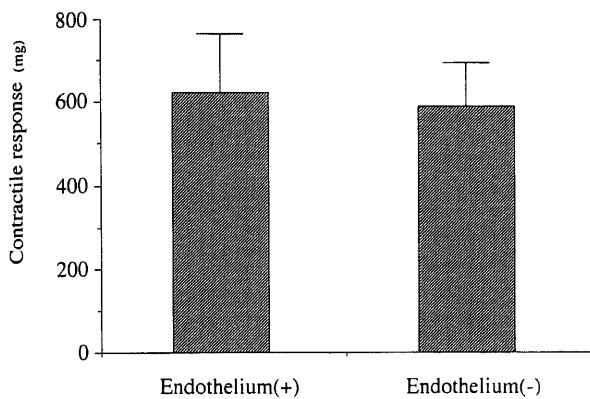


Fig. 4. Contractions induced by 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ with and without endothelium. Vertical bars represent S. E. M. (n=5).

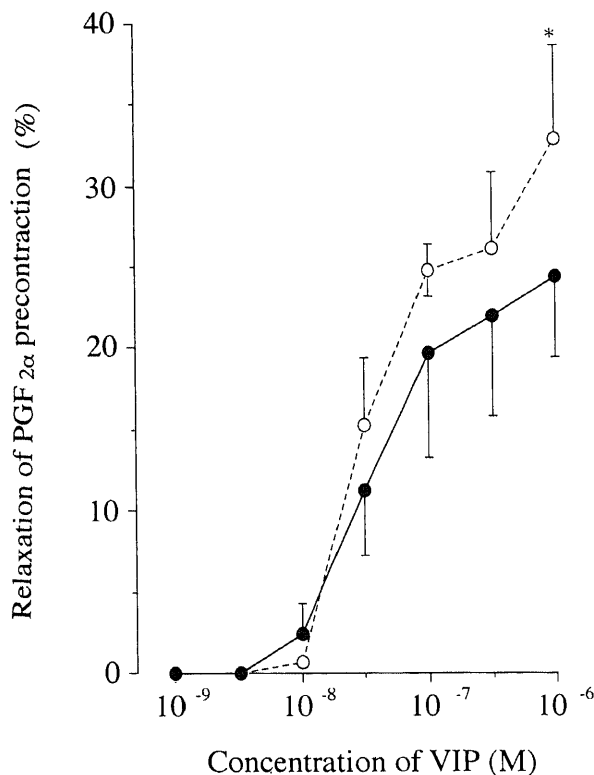


Fig. 5. Concentration-response curves for vasoactive intestinal peptide (VIP). ○, VIP with endothelium; ●, VIP without endothelium. Strips were submaximally precontracted with 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Relaxation induced by VIP were presented as values relative to contraction induced by 10^{-5} M $PGF_{2\alpha}$. Vertical bars represent S. E. M. (n=5). *, $P < 0.05$ vs. VIP induced relaxation without endothelium by two-way analysis of variance with Scheffe's post hoc test.

2. VIPの冠動脈に対する作用における内皮の関与の検討

内皮を温存した標本と剝離した標本の $PGF_{2\alpha} 10^{-5}$ Mによる収縮量は、それぞれ 622 ± 139 mg, 591 ± 103 mgであり、内皮の剝離の有無により、標本の収縮量の有意差は認められなかった(図4)。これより、内皮の剝離作業による冠動脈平滑筋の損傷は無視できるものと思われた。次に内皮を温存した標本と内皮を機械的に剝離した標本におけるVIPの用量-反応曲線の比較を行い、VIPの直接の冠動脈に対する作用における内皮の関与を検討すると、VIPの 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} Mの各濃度における内皮を剝離した標本の拡張量は、内皮温存標本に比して小さかった (10^{-6} M: $P < 0.05$) (図5)。

II. AChの内皮依存性拡張作用に対するVIPの修飾作用の検討

直接の冠動脈拡張作用の認められない 10^{-8} MのVIP前投与下にAChの用量-反応曲線を求め、VIPのAChの内皮依存性拡張反応に対する修飾作用を検討した。得られた拡張量は、ACh投与により生じた最大拡張量を100%として、これに対する百分率を表した。 $PGF_{2\alpha} 10^{-5}$ Mによる収縮量は、 10^{-8} MのVIPの前投与の有無によりそれぞれ 876 ± 95 mg, 866 ± 121 mg (図6)であり、ACh投与による最大弛緩量はVIPの前投与の有無によりそれぞれ 767 ± 125 mg, 743 ± 141 mg (図7)であった。以上のごとく $VIP 10^{-8}$ Mの前投与の有無により、標本の $PGF_{2\alpha}$ による収縮量、AChによる最大弛緩量に有意差は認められなかった。ACh投与により標本は用量依存性に拡張した。ACh投与による拡張は、 10^{-8} MのVIP前投与によりVIP非存在下に比して増大し、 10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-7} , 3×10^{-6} Mでは 10^{-8} MのVIP前投与により有意に増大した (10^{-7} , 10^{-6} M: $P < 0.01$, 3×10^{-7} , 3×10^{-6} M: $P < 0.05$) (図8)。 pD_2 値は、 10^{-8} MのVIP前投与下で 7.368 ± 0.105 とVIP非存在下での 7.152 ± 0.149 に比べ有意に大きく ($P < 0.05$)、AChの用量-反応曲線は 10^{-8} MのVIPの存在により左方に移動した(表1)。

考 察

VIPはアミノ酸28個からなるペプチドで、1970年にブタの腸管から単離され、そのアミノ酸組成からはセクレチンやグルカゴンのグループに属するものであり、当初は消化管ホルモンの

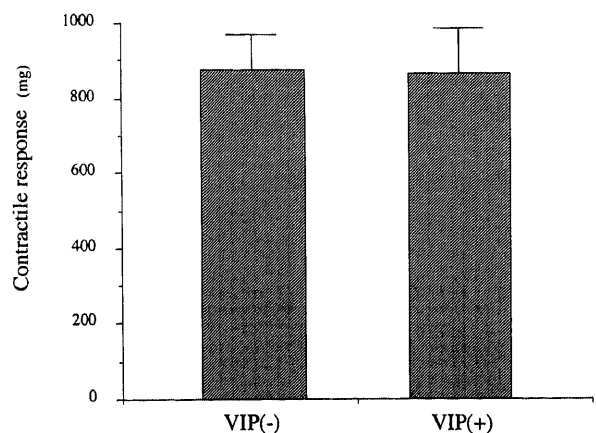


Fig. 6. Contractions induced by 10^{-5} M prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the presence and the absence of predosing with 10^{-8} M vasoactive intestinal peptide (VIP). Vertical bars represent S. E. M. (n=5).

一種と考えられていた。その後中枢や末梢の神経系にも多く含まれることが判明し、代表的な脳消化管ペプチドのひとつと考えられるようになった。各種平滑筋の弛緩や分泌促進など多様な作用を有するとともに、その名の示すとおり血管拡張作用も強く、現在も多くの研究がなされている。脳血管から末梢血管に至るほとんどの動脈周囲には、VIP 含有神経がかなり密に走行している。心臓では冠動脈周囲神経内にその存在が認められており²¹⁻²³、冠循環の神経性調節に重要な役割を果たしている可能性が推測されている。

VIP によるウサギ、ラット腹腔動脈^{19,20} およびラット大動脈²⁰ 拡張の機序としては、VIP がグアノシン三リン酸結合蛋白質 (guanosine triphosphate-binding protein, G 蛋白質) 介してアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase, AC) と共役している VIP 受容体との相互作用により細胞内の cAMP 濃度を増加させる。増加した cAMP は、小胞体へのカルシウムイオン取込み増加、カルシウムイオンポンプの活性化によるカルシウムイオン排出の増大およびナトリウム、カリウム-アデノシントリホスファターゼ (Na-K-ATPase) の活性化によるナトリウムイオン、カルシウムイオン交換の増大の三つの機序により細胞内カルシウムイオンの低下をもたらす。また増加した cAMP は A キナーゼ (cAMP-dependent protein kinase, A-Kinase) を活性化し、活性化された A キナーゼがミオシン軽鎖キナーゼ (myosin light chain kinase, MLCK) をリン酸化し、リン酸化された MLCK はカルシウム-カルモジュリン結

合体に対する親和性が低下し、リン酸化されたミオシンの脱リン酸化を起こす。以上の細胞内カルシウムイオンの低下、リン酸化されたミオシンの脱リン酸化の両機序により平滑筋の弛緩を生じ、血管拡張作用が発現するものと考えられている。しかし近年 VIP はウサギの肺内動脈²¹、ヒトの腹腔動脈分枝²² などにおいては内皮依存性の拡張作用を示すことにより、その作用発現には従来言われている cAMP の関与だけでなく cGMP の関与も推測される。今回の著書の実験では、VIP は用量依存性にイヌ摘出冠動脈を拡張させた。内皮の関与の有無に関する実験において、高濃度の VIP による拡張作用は内皮の剥離により減弱を示しており、VIP のイヌ摘出冠動脈拡張作用の一部に内皮が関与している可能性が示唆された。その機序としては、VIP が内皮に働いて拡張を起こさせる物質 (PGI₂, EDRF, 等) を遊離させる、VIP が内皮から遊離されている EDRF その他の血管作動性物質と相互作用するなど様々な可能性が推定される。

アトロピン (ムスカリン様受容体遮断薬) 存在下にイヌの迷走神経を刺激すると、非アドレナリン非コリン作動性の陽性変時反応が生じる²⁴ が、これはおそらく迷走神経終末に ACh と共存している VIP が刺激により同時に遊離され、作用するた

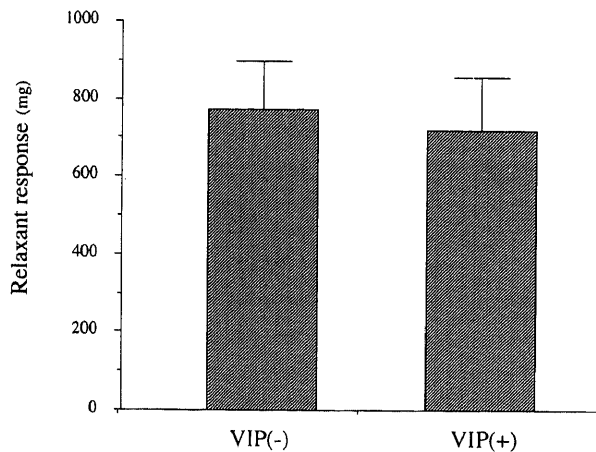


Fig. 7. Relaxations induced by 10^{-4} M acetylcholine (ACh) in the presence and the absence of predosing with 10^{-8} M vasoactive intestinal peptide (VIP). Vertical bars represent S. E. M. (n=5).

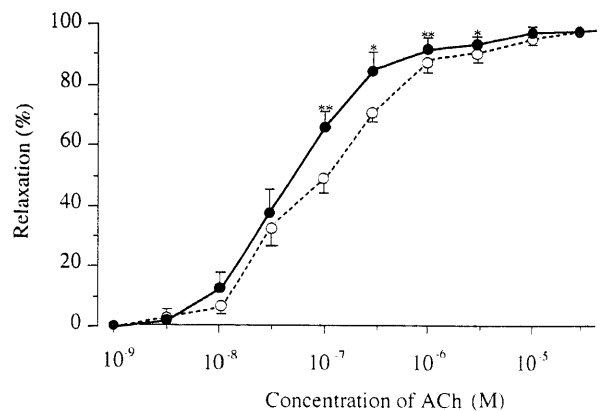


Fig. 8. Concentration-response curves for acetylcholine (ACh) in the presence and the absence of predosing with 10^{-8} M vasoactive intestinal peptide (VIP). Strips were submaximally precontracted with 10^{-5} M prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}). ●, ACh with VIP; ○, ACh without VIP. The relaxing volume obtained was expressed in terms of 100% of the maximum relaxing volume produced by 10^{-4} M ACh. Vertical bars represent S. E. M. (n=5). *, P < 0.05; **, P < 0.01 vs. ACh induced relaxation by Student paired t-test.

Table 1. pD₂ values and maximum relaxation responses for acetylcholine in strips in the presence and the absence of VIP.

Addition of 10^{-8} M of VIP	pD ₂ for ACh (M)		Maximum relaxation response for ACh (%)	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
-	7.152	0.149	105.1	12.8
+	7.368 *	0.105	98.2	11.0

ACh, acetylcholine; VIP, vasoactive intestinal peptide; *, P < 0.05 compared to pD₂ values in control-media by Student t-test.

めと考えられている。ネコの顎下腺やラットの甲状腺を用いた一連の薬理的、生化学的、組織化学的解析によれば、VIP は副交感神経終末に ACh と共存していることが明らかになってきた⁷⁾。また VIP はそれ自体強い血管拡張作用を示すと同時に、副交感神経終末における ACh の生合成を促進したり²⁴⁾、ACh のムスカリン受容体に対する親和性を高めることにより ACh の作用を増強したりする²⁵⁾ 効果のあることが報告されている。これらのことは副交感神経終末より遊離されている VIP が、副交感神経の伝達物質である ACh の共同伝達物質または修飾物質として働いている可能性を示すものである²⁶⁾⁻²⁹⁾。今回著者の検討において、それ自体では拡張作用を示さない低濃度の VIP の前投与により、ACh による冠動脈の内皮依存性拡張作用が増強された。このことは冠動脈の拡張においても VIP が ACh 共同伝達物質または修飾物質として働いている可能性を示す所見と考えられる。この VIP による ACh 増強作用の機序として、ACh のムスカリン受容体に対する親和性を増加させることにより ACh の作用を増強する²⁵⁾、ACh により内皮から遊離される EDRF あるいは PGI₂ の拡張作用を増強する、低濃度の VIP により、拡張効果としては現れないがある程度の cAMP や cGMP の細胞内濃度の上昇が生じている、低濃度の VIP が細胞膜電位には影響することなく、細胞内のカルシウムイオン遊離を抑えて血管の収縮を抑制する¹⁸⁾ 等の可能性が想定される。

今日冠攣縮は異型狭心症³⁰⁾ だけでなく、労作性狭心症や心筋梗塞などを含めた多くの虚血性心疾患の発症要因の一つであると考えられ³¹⁾、その機序の解明は虚血性心疾患の治療上重大な課題となっている。冠動脈の血管平滑筋には内膜側からは内皮由来、血漿由来、血小板由来、白血球由来などの多くの血管作用物質が作用しており、外膜側からは神経性の調節を受けており、種々の収縮性の因子と拡張性の因子の総和により冠動脈は一定の緊張を保っている。従って冠攣縮の発生機序としては、これらの相対的な均衡が収縮側にシフトすることにより起こるとも考えられる。近年副交感神経の伝達物質である ACh 投与により冠攣縮が誘発されること、冠攣縮性狭心症発作が副交感神経の活動が亢進する安静時に出現しやすく、低下する日中運動時には誘発されにくい等の事実により、副交感神経系の異常が冠攣縮性狭心症例の発症要因の一つである可能性が推定されており³²⁾、副交感神経系の伝達物質である ACh、VIP に対する感受性の異常がその発症に関与している可能性も推察され、今後の検討が必要と思われる。

結 論

VIP の冠動脈に対する作用を明らかにするため、イヌ摘出冠動脈標本を用いて VIP の直接の冠動脈に対する作用、VIP の作用における内皮の関与、ACh 内皮依存性拡張作用に対する VIP の修飾作用を検討し、以下の結論を得た。

1. VIP は用量依存性に冠動脈を拡張させた。
2. 高濃度の VIP による冠動脈拡張作用は、内皮の剝離により減弱した。
3. 直接の血管拡張作用の発現しない低濃度の VIP は、ACh の内皮依存性拡張作用を増強した。

以上より VIP は直接冠動脈拡張作用を示すだけでなく、ACh との相互作用、内皮由来各種血管拡張因子との作用を介して冠血管の緊張の調節に重要な役割を果たしているものと推

定された。

謝 辞

稿を終えるに望み、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学第二内科竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また終始、御指導、御教示を戴いた金沢大学第二内科清水賢巳講師および金沢大学第二内科循環器班の諸先生方に心から感謝致します。貴重な御助言を戴いた金沢大学薬学部薬物学教室鈴木永雄助教授に感謝致します。また結果の統計学的処理に関して貴重な御助言を戴いた金沢大学衛生学教室橋本和夫教授に感謝致します。

なお本論文の要旨は第28回日本臨床生理学会総会(盛岡)、第32回日本脈管学会総会(東京)、56回日本循環器学会総会(千葉)において発表した。

文 献

- 1) Said, S. I. & Mutt, V.: Polypeptide with broad biological activity: isolation from normal gut. *Science*, **169**, 1217-1218 (1970).
- 2) Brum, J. M., Bove, A. A., Sufan, F. Q., Reilly, W. & Go, V. W.: Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **7**, 406-413 (1986).
- 3) Della, N. G., Papka, R. E., Furness, J. S. & Costa, M.: Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in nerves associated with the cardiovascular system of guinea-pigs. *Neuroscience*, **9**, 605-649 (1983).
- 4) Unverferth, D. V., O'dorisio, T. M., Muir, III W. W., White, J., Miller, M. M., Hamlin, R. L. & Magorien, R. D.: Effect of vasoactive intestinal polypeptide on the canine cardiovascular system. *J. Lab. Clin. Med.*, **106**, 542-550 (1985).
- 5) Smitherman, T. C., Popma, J. J., Said, S. I., Krejs, G. J. & Dehmer, G. J.: Coronary hemodynamic effects of intravenous vasoactive intestinal peptide in humans. *Am. J. Physiol.*, **257**, H1254-H1262 (1989).
- 6) Popma, J. J., Smitherman, T. C., Bedotto, J. B., Eichhorn, E. J., Said, S. I. & Dehmer, G. J.: Direct coronary vasodilation induced by intravenous vasoactive intestinal peptide. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **16**, 1000-1006 (1990).
- 7) Lundberg, J. M., Anggard, A., Fahrenkrug, J., Hokfelt, T. & Mutt, V.: Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: Functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 1651-1655 (1980).
- 8) Clak, A. J. L., Adrian, T. E., McMichael, H. B. & Bloom, S. R.: Vasoactive intestinal peptide in shock and heart failure. *Lancet*, **1**, 539 (1983).
- 9) Unverferth, D. V., O'Dorisio, T. M., Miller, M. M., Uretsky, B. F., Magorien, R. D., Leier, C. V., Thompson, M. E. & Hamlin, R. L.: Human and canine ventricular vasoactive intestinal polypeptide: decrease with heart failure. *J. Lab. Clin. Med.*, **108**, 11-16 (1986).
- 10) Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth

muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376 (1980).

11) 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*, 332, 411-415 (1985).

12) Hamberg, M., Svensson, J. & Samuelsson, B.: Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 2994-2998 (1975).

13) Forstermann, U., Hertting, G. & Neufang, B.: The role of endothelial and non-endothelial prostaglandins in the relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin. *J. Clin. Invest.*, 62, 923-930 (1987).

14) Suzuki, H. & Chen, G.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF): an endogenous potassium-channel activator. *News in Physiol. Sci.*, 5, 212-215 (1990).

15) 大橋俊夫, 福嶋孝義, 東 健彦: 血管平滑筋の機能的走行に対する生理学的解析. I. 実験. 心臓, 11, 1177-1183 (1979).

16) Caplan, B. A., Gerrity, R. G. & Schwartz, C. J.: Endothelial cell morphology in focal areas of in vivo Evans Blue uptake in the young pig aorta. I. Quantitative light microscopic findings. *Exp. Mol. Pathol.*, 21, 102-117 (1974).

17) 小池勝夫, 高柳一成: 用量作用曲線の解析. 平滑筋の薬物反応 (浦川紀元, 高柳一成, 砂野 哲, 唐木英明編), 第一版, 247-259 頁, 分永堂, 東京, 1986.

18) Itoh, T., Sasaguri, T., Makita, Y., Kanmura, Y. & Kuriyama, H.: Mechanisms of vasodilatation induced by vasoactive intestinal polypeptide in rabbit mesenteric artery. *Am. J. Physiol.*, 249, H231-H240 (1985).

19) Ganz, P., Sandock, A. W., Landis, S. C., Leopold, J., Gimbrone, M. A. & Alexander, R. W.: Vasoactive intestinal peptide: vasodilatation and cyclic AMP generation. *Am. J. Physiol.*, 250, H755-H760 (1986).

20) Schoeffter, P. & Stoclet, J. C.: Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279 (1985).

21) Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. & Wood, K. S.: Mechanisms of endothelium-dependent vascular

smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. *Am. J. Physiol.*, 253, H1078-H1082 (1987).

22) Thom, S., Hughes, A., Martin, G. & Sever, P. S.: Endothelium-dependent relaxation in isolated human arteries and veins. *Clin. Sci.*, 73, 547-552 (1987).

23) Pigel, D. F.: Effect of neuropeptide on heart rate dogs: comparison of VIP, PHI, NPY, CGRP, and NT. *Am. J. Physiol.*, 255, H311-H317 (1988).

24) Luine, V. N., Rostene, W., Rhodes, J. & McEwen, B. S.: Activation of choline acetyltransferase by vasoactive intestinal peptide. *J. Neurochem.*, 42, 1131-1134 (1984).

25) Lundberg, J. M.: Vasoactive intestinal polypeptide enhances muscarinic ligand binding in cat submandibular salivary gland. *Nature*, 295, 147-149 (1982).

26) Burnstock, G.: Mechanisms of interaction of peptide and nonpeptide vascular neurotransmitter systems. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10, s74-s81 (1987).

27) Burnstock, G.: Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. *Journal of Hypertension*, 8 (suppl 7), s95-s106 (1990).

28) Whittaker, V. P.: Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a cholinergic co-transmitter: some recent results. *Cell Biol. Int. Rep.*, 13, 1039-1051 (1989).

29) Behar, J., Guenard, V., Walsh, J. H. & Biancani, P.: VIP and acetylcholine: neurotransmitters in esophageal circular muscle. *Am. J. Physiol.*, 257, G380-G385 (1989).

30) Prinzmetal, M., Kenamer, R., Merliss, R., Wada, T. & Bor, N.: Angina pectoris. I. A variant form of angina pectoris. A preliminary report. *Am. J. Med.*, 27, 375-388 (1959).

31) Yasue, H., Ogawa, H. & Okumura, K.: Coronary artery spasm in the genesis of myocardial ischemia. *Am. J. Cardiol.*, 63, 29E-32E (1989).

32) Yasue, H., Horio, Y., Nakamura, N., Fujii, H., Imoto, N., Sonoda, R., Kugiyama, K., Obata, K., Morikami, Y. & Kimura, T.: Induction of coronary artery spasm by acetylcholine in patients with variant angina: possible role of the parasympathetic nervous system in the pathogenesis of coronary artery spasm. *Circulation*, 74, 955-963 (1986).

Interaction between Vasoactive Intestinal Peptide and Acetylcholine in the Coronary Circulation Yoshiyuki Arai, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 536—543 (1993)

Key words vasoactive intestinal peptide, acetylcholine, interaction, endothelium, coronary circulation

Abstract

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a peptide consisting of 28 amino acids distributed densely around almost all blood vessels (especially arteries) from the cerebral to peripheral blood vessels. VIP is also present in nerves of the epicardial coronary arteries of human and other mammalian species, and coexists with acetylcholine (ACh) at the endings of the parasympathetic nerve and is released by parasympathetic stimulation concomitantly with ACh release, suggesting that VIP modifies the action of ACh. The objective of this study was to elucidate the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the canine coronary artery: the direct effect of VIP, the influence of the endothelium on the effect of VIP, and modulation effect of VIP on endothelium-dependent relaxation of acetylcholine (ACh). Helical strips prepared from the left circumflex coronary arteries of 14 mongrel dogs (both sexes, weighing 10-29 Kg) were suspended in Krebs buffer (pH 7.4) gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ at 36.5°C. After precontraction by 10⁻⁵ prostaglandin F_{2α}, VIP and ACh were given in the organ bath, and the isometrically developed tension was recorded to determine the dose response curve. VIP relaxed prostaglandin F_{2α}-precontracted coronary arterial strips with endothelium dose-dependently. The threshold producing relaxation of VIP was 3 × 10⁻⁸ M. The relaxing action of VIP on the coronary artery was attenuated by removing the endothelium. ACh relaxed the coronary artery with pD₂ value of 7.368 ± 0.105. The relaxing action of ACh was increased in the presence of predosing with 10⁻⁸ M VIP. The relaxation induced by 10⁻⁷, 3 × 10⁻⁷, 10⁻⁶ and 3 × 10⁻⁶ M of ACh was significantly enhanced by predosing with 10⁻⁸ M of VIP (p < 0.01, p < 0.05, p < 0.01, p < 0.05 respectively). The dose-response curve of ACh was shifted to the left in the presence of 10⁻⁸ M of VIP (pD₂: 7.152 ± 0.149, p < 0.05). Thus the endothelium-dependent relaxation of ACh on the coronary artery was enhanced at a low concentration at which VIP itself does not exhibit any direct relaxing action. These findings suggest that VIP not only induces the direct coronary arterial relaxation, but also plays an important role in adjustment of the coronary blood vessels through its interaction with ACh and action on the endothelium.