

氏名(本籍) ^{わた} 渡 ^{なべ} 辺 ^{かつ} 勝 ^{ひろ} 宏

学位の種類 薬 学 博 士

学位記番号 薬 第 1 0 0 号

学位授与年月日 昭和 4 9 年 1 2 月 1 1 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 骨格筋の血流調節機構における代謝性
因子に関する研究

(主 査)

論文審査委員 教授 小 澤 光 教授 鶴 藤 丞

教授 加 藤 鉄 三

論 文 内 容 要 旨

本研究は、骨格筋の血流の局所性調節機構において中心的役割をになっていると考えられる生理的代謝性因子を解明し、その作働機序を追求することを目的としたものである。現在、生理的局所性因子としてあげられているものは、運動性充血では組織の低酸素、カリウムイオンの遊出、局所に生ずる高滲透圧、無機燐の遊出などである。反応性充血では、筋原性反応が主体になっていて代謝性因子は不明であるとされている。そこで、以下の検討を行った。

(1) 定圧交叉灌流における犬後肢筋群の循環特性

生体から完全に分離し剥皮した犬後肢筋標本を供血犬の動脈血で灌流し、運動性充血、反応性充血及び乏血性運動時の循環動態について検討した。一定時間人為的に血流を遮断して乏血にした後に血流を開放すると、血管が拡張しているため前値よりも血流が増大する(反応性充血)。この増大した血流量(hyperemic blood volume)とその持続時間を表わすquarter timeとの間に高い相関関係が認められ($P < 0.001$)、反応性充血中の代謝性因子を解明するにはquarter time中に流出する静脈血を分析するのが最も妥当であると考えられた。また特に高い安静時血流を示したものが2例に認められたが、そのhyperemic blood volumeは正常例のそれと等しかった。しかし、筋原性仮説によれば、血管平滑筋のtoneが低いほど安静時血流が大きいとされており、このような例では、乏血後に再流入してくる血液の流入圧に対して血管平滑筋の収縮反応が弱くhyperemic blood volume、従って反応性充血が大きくなるはずである。しかし、これは上述の観察事実と矛盾するので反応性充血において筋原性反応が主体となっているという説は否定できよう。

(2) 骨格筋の局所性血流調節に関与する代謝性因子の再評価

組織内に生ずる代謝性因子の変化は静脈血中の変化として反映されるものと考え、同じ犬後肢筋標本を自己血で灌流し、流出静脈血中の調節に関与すると考えられている代謝性因子を測定した。2秒に1回の短いtetanus刺激、または毎秒2回のtwitch刺激による等張性収縮中、刺激開始後30秒以内には安定する血管抵抗に相関して変化したのは、カリウム($P < 0.05$)と酸素分圧($P < 0.001$)のみで、無機燐、滲透圧、pH、炭酸ガス分圧は一時わずかに逆方向に変化した後、血管抵抗が安定しているにもかかわらず、時間経過とともに大きく変化していった。従って、カリウムイオンと酸素分圧は運動性充血の原因の可能性があるが、その他の因子はある程度の作用はあるにしても原因とは考えられない。また、上述の各因子は比較的安定なものであるが、これらの他に血中で速かに分解代謝されてしまうような因子があれば、それを証明するためには、それに見合うだけのtime lagの小さい測定方法を用いる必要がある。そこで腎血管をassay organとして骨格筋静脈血

中の物質の bioassay を行った。毎秒 1 回の twitch 刺激によって筋標本の血管は拡張し、腎血管は軽度に収縮した。3 分間の乏血後、特に運動中の乏血後において、骨格筋静脈血中に腎血管を拡張させる因子（カリウム濃度及び炭酸ガス分圧の高値、pH の低値）が存在するにもかかわらず、腎血管は著明に収縮した。ここで用いた坐骨神経の電気刺激は、自律神経を興奮させない長さのものであるから Catecholamine の遊出による腎血管の収縮ではない。5 分間の乏血中に停滞した血中に serotonin が放出されるが、その増加量は 6.5 ng/ml 程度といわれ、この実験に用いた腎標本は $50,000 \text{ ng}$ (0.05 mg) の動注で軽度の収縮を示したにすぎないので serotonin によるものではない。catecholamine や serotonin の他に骨格筋の血管を拡張させ、腎血管を収縮させる内因性物質で現在知られているものは、AMP, adenosine, DPN (diphosphopyridine nucleotide) と UDP (uridine diphosphate) のみである。また反応性充血は dipyridamole の前処置によって増強される。この増強作用は乏血性運動後に著明に認められている。骨格筋と腎血管で逆の作用を示す上記物質のうち dipyridamole で増強されるのは、adenosine, AMP, DPN のみである。しかし DPN は脱水素酵素の補酵素であり、このような物質が生理的状态で血中に遊出しているとは考えがたい。以上より、adenosine または AMP が骨格筋の血流を局所性に調節している化学的因子であろうと想定した。

(3) AMP, adenosine の蓄積に関する生化学的検討

骨格筋の AMP deaminase 活性はきわめて強力で、阻害物質の影響を受けにくいとされており、AMP は産生されても直ちに脱アミノ化されて血管作働性のない IMP になるため AMP や adenosine が筋肉内に蓄積して血管平滑筋に作用するということが疑問視されていた。しかし上述の如く、adenosine, AMP の遊出の可能性は大きいので、骨格筋及び心筋から adenosine deaminase, AMP deaminase を抽出し、これらの酵素の活性調節因子について検討した。ここで用いた抽出法では、心筋からは AMP deaminase 活性のある画分は、得られなかった。基質 100 n mole/ml の存在下で $1,000 \text{ n mole/ml}$ の ammonia は、骨格筋 adenosine deaminase, AMP deaminase, 心筋 adenosine deaminase 活性をそれぞれ 22, 24, 18% 抑制した。lactate 濃度、炭酸ガス分圧の上昇も抑制作用を示した。カリウムイオン濃度や酸素分圧の上昇で活性化が認められた。これは運動性充血、反応性充血中に組織内や静脈血中に生じる変化、即ち、酸素分圧の低下、ammonia 及び lactate 濃度、炭酸ガス分圧の増加、さらに組織内のカリウムイオンの減少が、adenosine deaminase, AMP deaminase 活性を抑制することを示すものであり、その結果骨格筋内に adenosine あるいは AMP が蓄積され得る事を示唆しているものと思われる。

(4) 骨格筋から血液中に遊出する adenosine (または AMP) の総量の測定

adenosine や AMP は血中できわめて不安定であり、採血分析の過程で相当分解し、また除蛋

白によって約40%が沈殿するので測定はきわめて困難である。そこでここで用いた測定法における血液からの adenosine の回収率について検討した。血液に adenosine-8-¹⁴C を加えた後直ちに0℃, 17,000 rpm で遠心し, 得られた血漿に活性炭を加えて吸着させ, ammonia でpH10にした50% ethanol でカラム上で抽出し, その抽出液を butanol - ammonia - 水系の展開溶媒で, paper chromatography を行った。chromatogram からの total¹⁴C の放射活性の回収率は, 血漿で $87.7 \pm 5.4\%$, adenosine spot では $9.29 \pm 1.41\%$ であった。これらの結果から, 血漿中で分解される量, 血球中に取り込まれる量, 組織に再吸収される量を考慮して, 骨格筋から遊出する adenosine の総量を算出する理論式を作り, paper chromatogram 上の adenosine spot から抽出し Kalckar の方法により酵素的に測定した実測値を補正して, 実際に組織から血中に遊出すると考えられる量 (Total amount of adenosine and/or AMP released: TAAR と略す) を得る方法を確立した。(AMP の血中での代謝上の運命は多少の time lag はあるが大體 adenosine と同じで, ここで用いた分離法では adenosine から AMP を分離することはできなかった。)定圧灌流下では, 安静時の TAAR は 31.0 ± 5.6 (平均 \pm S.D, n mole/ml blood であるのに対し運動性充血中でも 34.4 ± 7.8 とほぼ一定に保たれた。しかし, 定流量灌流下では安静時 32.8 ± 9.4 から運動性充血中 74.6 ± 5.7 と有意 ($P < 0.001$) に増加した。定圧灌流では TAAR は, 安静時 31.0 ± 5.6 , 反応性充血中 33.0 ± 8.3 とほぼ等しく, 定流量灌流では安静時 32.8 ± 9.4 から反応性充血中 48.1 ± 12.6 と有意 ($P < 0.001$) に増加した。

(5) 骨格筋血流の局所性調節機構における adenosine, 局所低酸素ならびにカリウムの協働作用
骨格筋に運動を負荷すると, 組織の酸素分圧が低下し, カリウムイオンが放出して血管平滑筋を弛緩させるとともに, 骨格筋内の炭酸ガス, ammonia, 無機燐, lactate などが増加する。この結果, deaminase 活性が抑制されて AMP から IMP, adenosine から inosine の代謝系が抑制されるため AMP また adenosine が蓄積して遊出し, これが主体となって血管平滑筋の弛緩をひきおこして血流を増加させる。特に乏血性運動では, lactate や無機燐の濃度が著明に増加するので, 血管平滑筋内の deaminase も強力に抑制されて adenosine の作用が増強されると考えられる。反応性充血においては, adenosine または AMP に加えて局所低酸素が関与しているものと考えられる。

(6) 代謝性因子の作働機序の解釈及び結論

骨格筋の血流は各毛細血管の分岐部にある血管平滑筋 precapillary sphincter によって調節されている。sphincter の弛緩によって開いている毛細血管の数が増加し血流が増加すると考えられる。この sphincter は組織中の代謝性因子が閾値にまで蓄積されると弛緩し, 毛細血管に血液を流入させる。このようにして十分に供給された血液は代謝性因子と, sphincter における deaminase 活性を低下させている因子を洗い出す。その結果, 増加した deaminase 活性が

adenosine やAMPを血管作働性のない代謝産物へと脱アミノ化する。代謝性因子の濃度が閾値以下に低下すると sphincter は収縮して毛細血管の血流を阻止する。このようにして真の調節物質の静脈血中濃度は、定圧灌流においては閾値付近の値に一定に保たれるのであろう。一方、定流量灌流で静脈血中の調節物質の濃度が閾値以上に増加するのは、血流量が一定に制限されているからである。また定流量灌流のみならず定圧灌流でも、運動性充血中の酸素含量及びカリウムの動・静脈較差は安静時に比べて有意に増加した。定圧灌流下では反応性充血中に酸素含量の動・静脈較差は有意に増加した。しかし、上述したように定圧灌流下では調節因子は一定に保たれるはずであり、このように増加するカリウム、酸素含量は局所性血流調節に関与しているとしてもその主体をになっているのではない。以上より、adenosine またはAMP が主体となって、骨格筋の血流を調節し、局所性低酸素とカリウムイオンがこれを支持しているものと結論した。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、骨格筋の血流の局所性の調節機構において中心的役割をしていると考えられる代謝因子を解明し、そのメカニズムを解明したものである。

内容は次の5部よりなっている。

1. 定圧交叉灌流におけるイヌ後肢筋群の循環特性
2. 骨格筋の局所性血流調節に関与する代謝性因子の再評価
3. AMP, adenosine の蓄積に関する生化学的検討
4. 骨格筋から血流中に放出する adenosine の総量の測定
5. 骨格筋血流の局所性調節機構における adenosine, 局所低酸素ならびに K^+ の共働作用

骨格筋の血流調節機構の因子の検討を試み、まず血管平滑筋の sphincter は組織中の代謝因子の蓄積により弛緩し、deaminase 活性が増加して adenosine や AMP を脱アミノ化して不活化する。ついで代謝因子の濃度が低下すると sphincter は収縮して血流は阻止され、このようにして一定に維持されていることを明らかにした。

一方、定流量灌流でも定圧灌流でも静脈血の調節物質の濃度が増加し、特に運動性充血中の O_2 含量と K^+ は安静時に比べて有意に増加することを認めた。

以上の観点から adenosine また AMP が主体となって骨格筋の血流を調節し、さらに局所の O_2 と K^+ とが、これをコントロールしていることを証明した研究で、本論文は骨格筋の血流調節機構の解明に多大の寄与をしたもので、学位論文に充分価いする。