

①

# 血小板活性化因子

## の冠血管に対する作用

大学院医学研究科外科系専攻（外科学（二））

南村 弘佳

主科目担当	木下 博明 教授
研究指導	山本 研二郎教授

## 要 約

血小板活性化因子 (Platelet Activating Factor: 以下 P A F ) は、種々の血管床において血管の拡張および収縮をおこすことが知られている。この血管反応にはアラキドン酸代謝物や内皮由来血管弛緩因子 ( E D R F ) の関与が示唆されているが、その詳細な機序については十分には明らかでない。そこで今回、ラット摘出灌流心を用いて P A F の冠血管に対する作用機序について検討した。

麻酔下に雄性ウィスター系ラット ( 体重 200-400g ) の心臓を摘出、ランゲンドルフ法で Krebs-Henseleit e 溶液による冠灌流をおこなった。冠灌流量をローラーポンプにて調節し一定流量で灌流を行なった。これにより、冠血管の収縮および拡張は冠灌流圧の上昇および低下としてとらえられることができる。初期の冠灌流圧を低い圧 ( 50 mmHg ) 及び高い圧 ( 100 mmHg ) に設定した後、一定流量で灌流

を行ない、P A F を持続注入し冠灌流圧の変化を記録した。それぞれの場合に P A F を 2 分間持続注入し冠灌流圧の変化を記録した。さらに種々の薬剤を前処置し、これらの薬剤が P A F による冠灌流圧の変化にどのように影響するかを検討した。

冠血管の収縮を調べるために、初期の冠灌流圧を 50 mmHg に設定して P A F を灌流回路に投与すると、冠灌流圧は用量依存性に上昇し、この変化は P A F 受容体拮抗薬 CV-6209 250 nM の前処置で抑制された。P A F による灌流圧の上昇は、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるアスピリン 1 mM、イブプロフェン 100  $\mu$ M、PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である S-1452 100 nM 及びトロンボキサン合成酵素阻害薬である OKY-046 10  $\mu$ M の前処置で、いずれも抑制されなかった。従って、冠血管の収縮にはシクロオキシゲナーゼ生成物の関与はないものと考えられた。ペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬である ONO-1078 20 nM の前処置

は、ロイコトリエン C<sub>4</sub> および D<sub>4</sub> による冠血管の収縮を完全に消失させるとともに PAF による灌流圧の上昇を完全に抑制した。以上より、PAF による冠血管収縮は受容体を介し、ペプチドロイコトリエンの遊離を經由して発現するものと考えられた。

冠血管の拡張を調べるために、初期の灌流圧を 100 mmHg に設定して PAF を投与した。PAF による初期の灌流圧の低下は CV-6209 250 nM の前処置で消失した。従って、冠血管の拡張も収縮と同じく PAF 受容体を介するものと考えられる。PAF による冠血管の拡張はイブプロフェン 100 μM の前処置では抑制されず、シクロオキシゲナーゼ生成物の関与はないものと考えられた。この PAF による冠血管の拡張は、冠血管の収縮を抑制する ONO-1078 20 nM で抑制されなかったが、高濃度 2 μM ではじめて抑制された。従って、ペプチドロイコトリエンが冠血管の収縮とは別の受容体を介して拡張をおこしている可能性

が示唆された。そこで、冠灌流圧の高圧状態  
下で外因性にペプチドロイコトリエンを冠血  
管に投与しその作用を検討した。ロイコトリ  
エン C<sub>4</sub> および D<sub>4</sub> を灌流液中に投与すると、  
冠灌流圧は上昇し、この変化は ONO-1078 20  
nM で完全に抑制された。そして、この条件で  
はペプチドロイコトリエンにより冠血管の拡  
張は認められなかった。

次に、PAFによる冠血管の拡張にEDRF  
F (NO) が関与しているかどうかを検討し  
た。NO合成酵素阻害薬であるL-N<sup>o</sup>-ニト  
ロアルギニン(LNNA) 100 μM の灌流により、  
冠灌流圧は50 mmHg から92 mmHg と上昇したが、  
PAF投与により34 mmHg の低下を認めた。こ  
のPAFによる冠灌流圧の低下は、あらかじめ  
めエンドセリン-1 60 pmol の投与によって  
50 mmHg から96 mmHg とLNNA処置と同程度の冠血  
管の収縮をおこさせた状態でも同様に認めら  
れた(-33 mmHg)。従って、このPAFの冠血  
管拡張反応におけるEDRFの関与は認めら

れなかつた。

以上の結果より、PAFはラット摘出灌流心の冠血管においてPAF受容体を介する収縮および拡張をおこし、PAFによる冠血管収縮はペプチドロイコトリエンを介するものと考えられた。そして、PAFによる冠血管の拡張は、ONO-1078の高濃度ではじめて抑制されたが、プロスタグランジンやEDRFの関与は認められなかつた。

## 緒 言

血小板活性化因子 (Platelet Activating Factor: 以下 PAF) は 1972 年 Benveniste ら<sup>1)</sup>により、ウサギ感作好塩基球に抗原を暴露したとき血小板を凝集、活性化する因子として発見され、その構造は 1979 年に Demopoulos ら<sup>2)</sup>により 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphocholine であることが同定された。PAF はアレルギー反応、炎症反応の脂質性メディエーターとして種々の細胞で産生され、血小板凝集、血圧低下、気管支収縮、炎症細胞の遊走活性化など多様な作用を示すとされている<sup>3)</sup>。

PAF の化学合成が可能になって以来、PAF の循環に対する作用についても多くの研究がなされ、循環生理および種々の病態生理についてもその関与が報告されている<sup>4)</sup>。PAF を外因性に投与するとエンドトキシンショック類似のショック症状を惹起し<sup>5)</sup>、著し

い血圧の低下、肺動脈圧の上昇をおこし致死作用を示す。そして、PAFは種々の血管床に対して血管の拡張および収縮をおこすことも知られている。

PAFにより血管拡張がみられる部位としては、ラットの後肢血管<sup>6)</sup>、腸間膜動脈<sup>6)</sup>、腎血管<sup>7)</sup>などが知られており、その機序として、PAFが血管内皮細胞に作用し、イノシトールリン脂質代謝の促進や細胞内Ca濃度の上昇を引き起こし、内皮細胞から血管内皮由来弛緩因子(EDRF)や血管拡張性プロスタグランジンを遊離させるためではないかと考えられている<sup>8)</sup>。一方、ラット冠血管<sup>9)</sup>、<sup>10)</sup>、肺循環<sup>11)</sup>およびイヌの腎血管<sup>12)</sup>などでは、PAFの局所投与によって強い血管収縮がおこることも報告されている。

冠血管においてはPAFの作用はより複雑である。in vivoの実験では、Feuersteinら<sup>13)</sup>は、PAFを豚の冠血管へ投与すると冠灌流量は増加の後減少、すなわち冠血管の拡

張と収縮の2相性の変化がおこることを報告した。しかし、Sybertzら<sup>14)</sup>は、イヌでP A Fを冠血管へ投与すると収縮しか観察できず、Jacksonら<sup>15)</sup>は逆に冠血管の拡張しか観察できなかった。その後の報告でも、冠灌流量の2相性の変化が報告されている<sup>16, 17, 18)</sup>。

摘出灌流心の実験では、P A Fはモルモット<sup>19, 20)</sup>およびラット摘出心<sup>9, 10)</sup>において冠血管の収縮をおこすことが報告されている。その後Manら<sup>21)</sup>は、ラット摘出心の実験でP A Fにより冠血管の拡張がみられると報告した。このように冠血管においてP A Fは収縮および拡張をおこすことが報告されているが、その作用機序については検討されていない。

Piper and Stewart<sup>9, 20)</sup>の研究はラット及びモルモット摘出灌流心の冠血管へP A Fを投与すると、灌流流出液中に6-ケトプロスタグランジン $F_{1\alpha}$ 、トロンボキサン $B_2$ 、ロイコ

トリエンが存在することを報告し、P A F の冠血管収縮反応にアラキドン酸代謝物の関与を示唆した。このように P A F が血管系において引き起こす多様な反応は、P A F の直接的な作用に基づくものと、P A F によって活性化された循環系内の細胞から生成された二次的なメディエーターによるものとの複合であり、これが P A F によっておこる種々の血管反応の解析を複雑困難なものにしていると考えられる<sup>2,2)</sup>。そこで、本実験はラット摘出灌流心を用いて P A F の冠血管に対する作用機序にアラキドン酸代謝物および血管内皮由来弛緩因子 ( E D R F ) がどのように関与しているかを検討した。

## 実験材料と実験方法

### I. 使用動物

体重200-400gのウィスター系雄性ラットを使用した。

### II. 実験方法

#### 1. ラット摘出心臓灌流標本の作成

ラット腹腔内にヘパリン（ノボヘパリン注射液K.K.）3000U/kgを注射し、15分後にペントバルビタール（ネンブタール注射液ダイナボットK.K.）35mg/kgを腹腔内注射し麻酔した。速やかに開胸し心臓を摘出、4°Cに冷却した生理食塩水に浸した後、30秒以内に大動脈にカニューレを挿入し、Krebs-Henseleite溶液で逆行性に冠灌流を行った（ランゲンドルフ法）。Krebs-Henseleite溶液は37°Cに保たれ、95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通気した。Krebs-Henseleite溶液の組成は以下の通りである。 NaCl 118mM, KCl 4.7 mM,

NaHCO<sub>3</sub> 24.88mM, CaCl<sub>2</sub> 2.55mM, MgSO<sub>4</sub> 1.18mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18mM, glucose 11.1mM. 灌流液のpHは7.4となることを確認した。最初、75cm水柱の定圧条件にて5分間の灌流をおこなった。冠灌流圧: Coronary perfusion pressure (CPP) を大動脈挿入カニューラ直前の側枝より圧カトランスジューサー (日本光電: TP-400T) にて測定し、レコーダー (日本光電: WT-685G) 上に記録した。心収縮力 (CF) は心尖部に3gの負荷をかけ等張性収縮力として isotonic transducer (日本光電: TD-111S) を介してレコーダーに記録した。心拍数 (HR) を cardiometer (日本光電: AT-610G) にてCFをトリガーし測定、同じくレコーダーに記録した (Fig. 1)。

## 2. 定流量灌流

5分間の定圧灌流の後、ローラーポンプ (Cole Parmer PA-26B pump, Masterflex quick-load pump head, Masterflex silicon

tube NO. 13) を用い定流量灌流を開始した。  
これより、冠血管の収縮および拡張は冠灌流  
圧の上昇および低下としてとらえられること  
ができた。この際ローラーポンプの流量を調  
節することにより、初期灌流圧が50 mmHg (低  
圧条件) および100 mmHg (高圧条件) になる  
ように設定した。以後、定流量灌流を開始し  
10分後に薬剤を投与した。

### 3. 薬剤投与方法

各種薬剤は以下の方法にてラット摘出心の  
灌流回路に投与した。

#### a) 持続投与方法

各種薬剤の持続投与に際しては、大動脈挿  
入カニューラ直前及びローラーポンプ直前の  
回路内にあらかじめ薬剤注入用として肉厚の  
ゴム管を取りつけておき、27G翼状針(テル  
モ翼付静注針 0.40 X 13 mm) を介して、シリン  
ジポンプ(テルモ-テルフュージョンシリン  
ジポンプ STC-521) で注入を行った。その薬剤

が各標本の灌流量において最終的に一定の濃度になるように、シリンジポンプよりの送液量を適宜調整した。すなわち、低圧条件では  $0.1-0.2\text{ ml/min}$  で、高圧条件では  $0.2-0.4\text{ ml/min}$  で注入を行い、これは冠灌流量の  $1.3\%$  で冠灌流圧に対する影響は少ないと考えられた。なお、それぞれの薬剤は PAF 投与 5 分前より持続注入した。なお、全ての実験で PAF は 2 分間持続注入した。

#### b) 単回投与方法

微量の薬物を注入するために、マイクロシリンジの先端に 27 G 翼状針をポリエチレンチューブ (SP-45 夏目) を介してとりつけ、これを大動脈挿入カニューラ直前部のゴム管より刺入し薬物を投与した。ロイコトリエン  $B_4$ 、ロイコトリエン  $C_4$  およびロイコトリエン  $D_4$  ( $10\ \mu\text{g}/1\text{ ml}$  50% エタノール溶液) を生理食塩水にて希釈し  $10\ \mu\text{l}$  に適量が含まれるように調整し回路内に投与した。エンドセリン-1 は、 $40\text{ pmol}/100\ \mu\text{l}$  に調整して 26 G ツベル

クリン針付注射器（テルモ）を用いて、150  
μlを回路内に投与した。

#### 4. 実験群

ラット摘出心の定流量灌流標本での予備的な実験で、回路内にPAFを持続注入するとしばしば最初に灌流圧の低下すなわち冠血管の拡張を認め、その後灌流圧の上昇すなわち冠血管の収縮がおこることを観察した。このPAFによる初期の灌流圧の低下は、冠灌流量をローラーポンプで調節することにより初期灌流圧の設定を高圧100mmHgにすることで極めて明瞭に観察できた。一方、灌流圧の上昇は低圧50mmHgにすることでよく観察できることがわかった（Fig. 2）。従って、初期灌流圧を50mmHg（低圧条件）および100mmHg（高圧条件）に設定することで、PAFによる冠血管の収縮と拡張を区別して検討した。この方法をもとにして、PAFによる冠血管の収縮および拡張に対してアラキドン酸代謝物お

よび血管内皮由来弛緩因子の関与について以下の検討を行った。

#### A. P A F による冠血管の収縮に関する検討

この実験ではすべて初期灌流圧が50 mmHgになるように灌流量を設定した後、実験を開始した。

##### ① 低圧条件での P A F の冠血管に及ぼす作用

0.25 nM、2.5 nM 及び 25 nM の濃度で P A F を2分間持続投与し灌流圧の変化を記録した。P A F の作用が受容体を介するものかどうかを調べるために、受容体拮抗薬 CV-6209 250 nM を持続注入し、5分後 P A F を 25 nM の濃度で2分間持続注入した。

##### ② P A F による冠血管の収縮に及ぼすシクロオキシゲナーゼ阻害薬の影響

アスピリン 1 mM あるいはイブプロフェン 100  $\mu$ M を持続注入し、5分後 P A F を 25 nM の濃度で2分間持続注入した。対照として生理食塩水を用いた。

③ P A F による冠血管の収縮に及ぼすプロスタグランジン $\text{H}_2$  / トロンボキサン $\text{A}_2$  ( P G H $_2$  / T X A $_2$  ) 受容体拮抗薬 S-1452 の影響

あらかじめ S-1452 の有効性を検討するために、 P G H $_2$  / T X A $_2$  作用薬である U46619 による冠血管の収縮に対する S-1452 の作用を調べた。 U46619 100 nM を 1 分間持続注入し灌流圧の変化を記録した。次に S-1452 30 nM の注入を開始し、5 分後再び U46619 の注入を行った。

P A F による冠血管の収縮におけるプロスタグランジン $\text{H}_2$  およびトロンボキサン $\text{A}_2$  の関与を調べるために、 S-1452 100 nM を持続注入し、5 分後 P A F を 25 nM の濃度で 2 分間持続注入した。

④ P A F による冠血管の収縮に及ぼすトロンボキサン合成酵素阻害薬 O K Y-046 の影響

O K Y-046 10  $\mu$  M を持続注入し、5 分後 P A F を 25 nM の濃度で 2 分間持続注入し灌流圧の変化を記録した。

⑤ P A F による冠血管の収縮に及ぼすペプチ

## ドロイコトリエン受容体拮抗薬 ONO-1078 の影響

まず、ペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬である ONO-1078 の有効性を知るために、ロイコトリエン  $C_4$  および  $D_4$  をそれぞれ 4、20、100 pmol を灌流回路に投与して単独作用を検討し、この作用に対する ONO-1078 20 nM の効果を検討した。

次に ONO-1078 20 nM を持続注入し、5 分後 PAF を 25 nM の濃度で 2 分間持続注入し灌流圧の変化を記録した。

### B. PAF による冠血管の拡張に関する検討

既述のように、PAF による冠血管拡張作用は、灌流圧が高い場合に増強されるので、冠灌流量をローラーポンプで調節することにより灌流圧を 100 mmHg に設定し、以後定流量灌流を行い実験した。

① 高圧条件での PAF の冠血管に及ぼす作用  
25 nM の濃度で PAF を 2 分間持続投与し灌

流圧の変化を記録した。さらに、PAF受容体拮抗薬 CV-6209 250 nM を持続注入し、5分後 PAF を 25 nM の濃度で 2 分間持続注入した。

② PAF による冠血管の拡張に及ぼすシクロオキシゲナーゼ阻害薬の影響

イブプロフェン 100  $\mu$ M を持続注入し、5分後 PAF を 25 nM の濃度で 2 分間持続投与した。

③ PAF による冠血管の拡張に及ぼすペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬 ONO-1078 の影響

ONO-1078 を PAF の冠血管の収縮作用について検討した濃度である 20 nM で前処置し、PAF (25 nM) を 2 分間持続注入し灌流圧の変化を記録した。次に、ONO-1078 を 100 倍の濃度である 2  $\mu$ M で前処置し、PAF を投与した。尚、ペプチドロイコトリエンに冠血管の拡張作用があるかどうかを検討するために、高圧条件でロイコトリエン C<sub>4</sub> および D<sub>4</sub> それぞれ 4、20、100 pmol を灌流回路に投与し、灌

流圧の変化を記録した。次に、ONO-1078を20 nMで前処置した状態で、上記ペプチドロイコトリエンの冠血管に対する作用を検討した。

#### ④ 高圧条件でのロイコトリエン B<sub>4</sub> の冠血管に及ぼす作用

ロイコトリエン B<sub>4</sub> を 4、20、100 pmol 投与した。

#### ⑤ PAFによる冠血管の拡張における血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) の関与

EDRF (NO) の合成酵素阻害薬である L-N<sup>G</sup>-ニトロアルギニン (LNNA) 注入下に、PAF (25 nM) を投与した。初期灌流圧を50 mmHgに設定した後、LNNAを100 μMで持続注入すると灌流圧は緩徐に上昇し、約30分で安定となった。この状態でPAF (25 nM) を2分間注入した。また、LNNA単独投与で冠血管が収縮したので、対照としてエンドセリン-1 60 pmol を投与し、冠血管を同程度に収縮させた状態でPAF (25 nM) を投与した。

### III . 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で表した。有意差検定は多群間の比較には繰り返しのない二元配置分散分析を行った後、個々の比較は Student-Newman-Keuls test を用い、2群間の比較は Student t-test によった。p < 0.05 を有意差ありとした。

### IV . 使用薬物

PAF : 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine は Sigma Chemical Co よりアスピリン (ヴェノピリン) はミドリ十字 K. K. より、イブプロフェンは科研化学 K. K. より L-N<sup>o</sup> - ニトロアルギニンとエンドセリン-1 はペプチド研究所 K. K. より、U46619 : 9, 11-methanoepoxy-PGH<sub>2</sub> は Cayman Chemical Co よりそれぞれ購入した。また、CV-6209 : 2-(N-acetyl-N-(2-methoxy-3-octadecyl-carbamoyloxy-propoxycarbonyl) aminomethyl) -1-ethylpyridinium chloride は武田薬品工業 K. K. より、S-1452 : (±) -5(z) -7-(3-endo-

phenylsulfonylamino (2.2.1.) bicyclohept-2-exo-yl) heptenoic acid は塩野義製薬 K.K. より、OKY-046:(E)-3-(p-(1H-imidazol-1-ylmethyl) phenyl)-2-propenoic acid hydrochloride monohydrate、ONO-1078:4-oxo-8-(p-(4-phenylbutoxy) benzoylamino)-2-(tetrazol-5-yl)-4H-1-benzopyran hemihydrate およびロイコトリエン B<sub>4</sub>、C<sub>4</sub>、および D<sub>4</sub> は小野薬品工業 K.K. よりそれぞれ供与を受けた。

PAF、U46619 および ONO-1078 以外の薬物は、生理食塩水に溶解して用いた。PAF および U46619 はエタノールにて溶解、-30°C で保存し、実験当日室温で N<sub>2</sub> ガスにてエタノールを除去した後、0.25% bovine serum albumin (Sigma Chemical Co) を含む生理食塩水で溶解し使用した。ONO-1078 は、まず 10 mM になるようにエタノールを加え、その溶液 1 ml あたりに 1N NaOH 10 μl を加えて 60°C で加熱溶解、生理食塩水で希釈し使用した。

エンドセリン-1は、10mMリン酸ナトリウム緩衝生理食塩水(pH 7.4)で0.1mMになるように溶解、-30°Cで保存し、使用時に0.05% bovine serum albuminを含む生理食塩水で溶解した。

## 実験結果

### A. P A F による冠血管の収縮に関する検討

#### ① 低圧条件での P A F の冠血管に及ぼす作用

Fig. 3 は P A F を種々の濃度で投与した時の冠灌流圧の時間経過を示す。P A F を 0.25、2.5 および 25 nM で投与すると、用量依存性に灌流圧の上昇をきたし、投与前値よりそれぞれ  $3.0 \pm 1.4$ 、 $13.0 \pm 4.6$  および  $15.1 \pm 2.9$  mmHg の圧上昇を認めた。この上昇は P A F 受容体拮抗薬 CV-6209 250 nM の前処置で完全に消失した (Fig. 4)。

#### ② P A F による冠血管の収縮に及ぼすシクロオキシゲナーゼ阻害薬、PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 受容体拮抗薬およびトロンボキサン合成酵素阻害薬の影響

シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるアスピリン 1 mM、イブプロフェン 100 μM の前処置では、P A F 25 nM による冠灌流圧の上昇は抑制されなかった (Fig. 5-a, b)。PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 受

容体拮抗薬 S-1452 100 nM およびトロンボキササン合成酵素阻害薬 OKY-046 10  $\mu$ M の前処置でも PAF による冠灌流圧の上昇は抑制されなかった (Fig. 6-a, b) 。一方、PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 受容体作用薬である U46619 100 nM を 1 分間持続注入すると灌流圧は 21.6  $\pm$  2.4 mmHg 上昇したが、S-1452 30 nM の前処置によりこの灌流圧の上昇は完全に消失した (Fig. 7)

### ③ PAF による冠血管の収縮に及ぼすペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬の影響

ロイコトリエン C<sub>4</sub> および D<sub>4</sub> を回路内に投与すると、冠灌流圧は速やかに上昇した。この上昇は 4 pmol と 20 pmol において用量依存性で (Table. 1)、100 pmol の投与で灌流圧の上昇とともにしばしば心室細動となることが観察された。ペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬である ONO-1078 20 nM の前処置で、ロイコトリエン C<sub>4</sub> および D<sub>4</sub> 4、20、100 pmol による冠灌流圧の上昇および心室細動の発生は完全に消失した。これと同じ濃度の ONO-1078

20 nM で前処置しておく と、P A F 25 nM による灌流圧の上昇も完全に消失した (Fig. 8)。

## B. P A F による冠血管の拡張に関する検討

① 高圧条件での P A F の冠血管に及ぼす作用  
灌流量を調節し、冠灌流圧を 100 mmHg にして P A F 25 nM を 2 分間注入した。P A F 投与直後より灌流圧の低下を認め、この灌流圧の低下は 20 秒後に最大となり ( $-24.8 \pm 5.1$  mmHg)、以後灌流圧は上昇に転じた。一方、P A F 受容体拮抗薬 CV-6209 250 nM の前処置でこの P A F による灌流圧の低下は完全に消失した (Fig. 9)。

② P A F による冠血管の拡張に及ぼすシクロオキシゲナーゼ阻害薬の影響 (Fig. 10)

対照群で P A F による冠灌流圧の低下は最大  $-16.3 \pm 3.9$  mmHg 認め、イブプロフェン 100  $\mu$ M の前処置群でも、P A F により最大  $-15.5 \pm 3.0$  mmHg 灌流圧は低下し、両群間に統計学的な有意差は認められなかった。

③ P A F による冠血管の拡張に及ぼすペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬 ONO-1078 の影響

対照群では P A F により最大  $-24.8 \pm 5.1$  mmHg の冠灌流圧の低下を認めしたが、ONO-1078 20 nM の前処置によっても、 $-18.4 \pm 3.3$  mmHg の灌流圧の低下を認め、これら両群間に統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 11) 一方、高濃度の ONO-1078 ( $2 \mu\text{M}$ ) により P A F による灌流圧の低下は完全に消失した (Fig. 12)。

ペプチドロイコトリエンに冠血管の拡張作用があるかどうかを調べるために、灌流量を増加させ高圧状態 (100 mmHg) にして、ロイコトリエン  $C_4$  および  $D_4$  をそれぞれ 4 pmol、20 pmol を回路内に投与した。冠灌流圧は用量依存性に上昇した。ONO-1078 20 nM の前処置により、ロイコトリエン  $C_4$  および  $D_4$  による冠灌流圧の上昇は完全に消失した。そして、ロイコトリエン  $C_4$  および  $D_4$  を 100 pmol に増量す

ると冠灌流圧の低下すなわち冠血管の拡張を認めしたが、これはロイコトリエンC<sub>4</sub>およびD<sub>4</sub> 100 pmolの溶媒を投与することでもおこり、この冠血管の拡張は溶媒によるものと思われた(Fig. 13)。

#### ④ 高圧条件でのロイコトリエンB<sub>4</sub>の冠血管に及ぼす作用

ロイコトリエンB<sub>4</sub>を4、20および100 pmol投与し、灌流圧の変化を記録した。ロイコトリエンB<sub>4</sub>では、いずれの用量においても冠灌流圧の変化は溶媒の作用を除き認められなかった。

#### ⑤ PAFの冠血管拡張における内皮由来血管弛緩因子(EDRF)の関与

灌流圧が50 mmHgになるように灌流量を調節し定流量灌流とした後、NO合成酵素阻害薬であるL-N<sup>G</sup>-ニトロアルギニン(LNNA)を100 μM投与すると、灌流圧は徐々に上昇し30分後、92.6 ± 2.5 mmHgとなった。

Fig. 14-aはこの時点で、PAF 25 nMを投与

した時の冠灌流圧の変化を示す。冠灌流圧は最大  $-33.9 \pm 4.4 \text{ mmHg}$  低下した。

次に対照として同程度に冠血管を収縮させた状態で PAF の作用を検討した。灌流圧が  $50 \text{ mmHg}$  になるように灌流量を調節し定流量灌流とした後、エンドセリン  $60 \text{ pmol}$  を回路内に投与すると灌流圧は速やかに上昇し  $96.4 \pm 1.5 \text{ mmHg}$  となった。灌流圧はその後少なくとも15分間は安定であった。この灌流圧は LNNA 注入時とは統計学的に有意差はなく、LNNA 注入時とほぼ同程度の冠血管収縮が得られた。従って、LNNA 処置群に対する対照群として用いることができると考えられた。Fig. 14-b はエンドセリン投与後灌流圧の上昇が安定した時点で、PAF を投与した時の冠灌流圧の変化を示す。PAF により冠灌流圧は最大  $-33.2 \pm 1.3 \text{ mmHg}$  低下した。なお、LNNA 処置群およびエンドセリン処置群での PAF による冠灌流圧の低下には統計学的に有意差は認められなかった (Fig. 15)。

## 考 察

ラット摘出心の定流量灌流実験で、冠血管へP A Fを投与すると、投与後直ちに灌流圧の低下すなわち冠血管の拡張が認められ、その後灌流圧の上昇すなわち冠血管の収縮が観察された。このP A Fによる灌流圧の低下は、灌流量を調節し設定灌流圧を高い圧(100 mmHg)にすることできわめて明瞭に観察されることがわかった。一方、低い圧(50 mmHg)にすることで、P A Fによる冠灌流圧の低下は極めて軽微で、むしろ灌流圧の著名な上昇が観察できた。P A Fは種々の血管床において血管の収縮および拡張をおこすが、ラット摘出灌流心においてはHuら<sup>2,3)</sup>の報告を除いて冠血管の収縮しか報告されていない。この違いは、初期灌流圧の設定の差に基づくものと考えられる。なぜなら、冠血管の収縮のみを示す報告<sup>9, 10)</sup>ではいずれも初期灌流圧は低く50 mmHg前後であり、拡張を報告したHuらの実

験では、初期灌流圧を65～75 mmHgにしているからである。そこで、本実験では灌流量を調節し初期灌流圧を50 mmHgおよび100 mmHgに設定することとした。この方法により、冠血管の収縮および拡張を区別して調べることができた。これをもとにして、PAFによる冠血管の収縮および拡張に対して、アラキドン酸代謝物および内皮由来血管弛緩因子(EDRF)の関与を調べるため薬理的検討を行った。この実験では、薬物の冠血管抵抗に対する作用を直接検討するために定流量灌流を行ったので、冠血管の収縮および拡張は灌流圧の上昇あるいは低下としてとらえられた。

#### 1. PAFによる冠血管の収縮に関する検討

灌流圧を50 mmHgとしPAFを持続投与すると、冠灌流圧は用量依存性に上昇すなわち冠血管の収縮を認めた。PAF 25 nMによる灌流圧の上昇は、PAF受容体拮抗薬であるCV-6209<sup>24, 25)</sup> 250 nMで消失した。従って、

この冠血管の収縮は受容体を介する反応であると考えられた。

P A F による冠血管の収縮はアラキドン酸代謝物をメディエーターとして生じるとする報告がなされているが<sup>9, 20)</sup>、プロスタグランジン、トロンボキサン A<sub>2</sub>、ロイコトリエン等の物質がどう関与しているかについては諸家の報告に食い違いがみられる<sup>9, 10, 23)</sup>。そこで本実験では、まずシクロオキシゲナーゼ生成物の関与について検討した。シクロオキシゲナーゼ阻害薬アスピリン 1 mM、イブプロフェン 100 μM では、P A F による冠血管の収縮は抑制されなかった。Lee ら<sup>26)</sup> は、ラット摘出心の定流量灌流実験でアスピリン 1 mM にて P G I<sub>2</sub> 産生が著しく抑制されたと報告している。Moffat ら<sup>27)</sup> はモルモット摘出心の定流量灌流実験でアスピリン 270 μM およびイブプロフェン 100 μM が 6-ケトプロスタグランジン F<sub>1α</sub> の放出を抑制したと報告している。また、Leremy ら<sup>28)</sup> の実験ではイブ

プロフェンはラット摘出大動脈でのPGI<sub>2</sub>産生を抑制しそのIC<sub>50</sub>が0.01 μMであると発表している。以上の報告から、今回用いたアスピリン1 mMとイブプロフェン100 μMはシクロオキシゲナーゼを阻害するには十分な量であると考えられる。従って、PAFによってもたらされる冠血管収縮の主たる原因は、シクロオキシゲナーゼ生成物によるものではないと考えられる。Piper and Stewart<sup>9)</sup>は、ラットおよびモルモット摘出心でのPAFによる灌流圧の上昇すなわち冠血管の収縮がインドメサシンにより抑制されたと報告し、Feuersteinら<sup>13)</sup>の実験でも、豚の冠血管にPAFを投与した際生ずる冠血管の収縮をインドメサシンが抑制したと報告している。これらの報告はPAFの反応にシクロオキシゲナーゼ生成物が介在することを示唆するものである。この結果との相違は、使用したシクロオキシゲナーゼ阻害薬および動物の違いによるもの、実験方法の相違例えばPAFの投

与法、灌流圧の設定条件に違いがあるのかもしれない。一方、Stahlら<sup>10)</sup>の報告では、ラット摘出心の定流量灌流実験においてシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるナプロキセンの前処置はPAFの冠血管の収縮を抑制しなかった。Huら<sup>23)</sup>もインドメサシンはPAFの血管反応になんら影響を及ぼさなかったと報告し、PAFの冠血管収縮にシクロオキシゲナーゼ生成物の関与を否定する報告もみられる。

シクロオキシゲナーゼ系経路の阻害により血管収縮に働くトロンボキサン $\Lambda_2$ のみならず血管の弛緩に働くプロスタグランジン産生も抑制される。そこで、PAFの血管収縮における両者の関与を調べるために、PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>受容体拮抗薬S-1452<sup>29)</sup>を用いて検討した。今回の実験では、S-1452 100 nMにより、PAFによる冠血管の収縮は抑制されなかった。なお、S-1452は30 nMの濃度で、PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>受容体作用薬U46619 100 nMによる冠血管の収縮

を完全に抑制したので、S-1452 100 nM はトロンボキサン $A_2$ 受容体に拮抗するに十分な量であると考えられる。従って、PAFによる冠血管の収縮作用にプロスタグランジン $H_2$ およびトロンボキサン $A_2$ の関与はないものと考えられる。Stahlら<sup>10)</sup>の報告では、ラット摘出心の定流量灌流実験においてトロンボキサン $A_2$ 受容体拮抗薬(BM-13505)はPAFの灌流圧の上昇を抑制しなかったと報告し、トロンボキサン $A_2$ の関与を否定している。さらに、この考えは今回のトロンボキサン合成酵素阻害薬OKY-046<sup>30)</sup>を用いた実験からも支持される。

Hirakuら<sup>31)</sup>の実験は、ラット腹腔内細胞を用いてアラキドン酸代謝におけるトロンボキサン合成酵素阻害薬OKY-046の効果を検討しているが、OKY-046 1  $\mu$ M以上でトロンボキサン $B_2$ の産生が抑制され、これと同時に6-ケトプロスタグランジン $F_1$ の産生が高まることを示している。以上より、今回用いた

OKY-046 の濃度でトロンボキサン<sub>A<sub>2</sub></sub>の産生は十分に抑制されると考えられる。また、OKY-046 は特異的にトロンボキサン合成酵素を阻害するため、弛緩性のプロスタグランジンの産生はむしろ亢進することも予想される。そして、今回の実験ではOKY-046 10 μM の前処置でも、PAFによる冠血管の収縮は影響されなかった。従って、PAFによる冠血管の収縮におけるシクロオキシゲナーゼ生成物の一つであるトロンボキサン<sub>A<sub>2</sub></sub>の関与は否定された。

次に、PAFによる冠血管収縮におけるもう一方のアラキドン酸代謝物であるロイコトリエンの関与について検討した。ペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬であるONO-1078 20 nM は、ロイコトリエン<sub>C<sub>4</sub></sub>および<sub>D<sub>4</sub></sub>による冠血管の収縮を完全に抑制する濃度である。そして、これと同じ濃度のONO-1078の前処置によりPAFによる灌流圧の上昇は完全に消失した。従って、PAFによる冠血管の収縮は

ペプチドロイコトリエンを介する反応であると結論された。Piper and Stewart<sup>9)</sup>、Feuersteinら<sup>13)</sup> および Fiedler ら<sup>18)</sup> の実験でも、PAFの冠血管収縮反応はロイコトリエン受容体拮抗薬 FPL-55712 により抑制されている。Stahl ら<sup>10)</sup> も、リポキシゲナーゼ阻害薬 propyl gallate およびロイコトリエン受容体拮抗薬 LY-171883 によって冠血管の収縮は抑制されたと報告し、Huら<sup>23)</sup> もロイコトリエン受容体拮抗薬 L-649923 およびロイコトリエン合成酵素阻害薬 MK-886 を用いて同様の結果を示している。以上の実験結果をまとめると、PAFによる冠血管収縮はPAF受容体を介する反応で、シクロオキシゲナーゼ生成物の関与はなくペプチドロイコトリエンを介するものと考えられる。

## 2. PAFによる冠血管の拡張に関する検討

冠灌流量を増加させることにより灌流圧を高圧状態 (100 mmHg) とし、PAF 25 nM を投与

すると約25mmHgの冠灌流圧の低下すなわち冠血管の拡張を観察できることがわかった。ラット摘出灌流心での冠血管の拡張をはじめて報告したHuら<sup>23)</sup>の実験では、この拡張は彼らの用いたPAF受容体拮抗薬であるFR-900452およびBN-52021では抑制されなかった。しかし、今回の実験において、このPAFによる冠血管拡張はPAF受容体拮抗薬であるCV-6209 250nMの前処置で消失したので、この拡張作用も前述の収縮作用と同様にPAF受容体を介する反応であることがはじめて明らかとなった。

Kawaguchiら<sup>33)</sup>は、ラットの培養大動脈平滑筋細胞を用いた実験で、PAFによりプロスタサイクリンの遊離促進がみられることを報告し、PAFによる血管拡張の一つの機序としてシクロオキシゲナーゼ生成物であるプロスタサイクリンの関与を示唆している。そこで、今回シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるイブプロフェンを用いて検討したが、イ

ブプロフェン100  $\mu\text{M}$  ではこのPAFによる灌流圧の低下は抑制されなかった。従って、PAFによる冠血管拡張はその収縮効果と同様にシクロオキシゲナーゼ生成物によるものではないと考えられる。

次に、PAFの冠血管拡張におけるロイコトリエンの関与について検討した。PAFによる冠灌流圧の低下はONO-1078の冠血管の収縮を抑制する濃度である20 nMでは抑制されなかった。次に、ONO-1078を100倍の濃度である2  $\mu\text{M}$  で前処置してはじめて冠灌流圧の低下は抑制された。

Huら<sup>2,3)</sup> は、PAFの冠血管拡張反応はロイコトリエン受容体拮抗薬 L-649,923 および、ロイコトリエン合成酵素阻害薬 MK-886 により抑制され、ロイコトリエンB<sub>4</sub>を投与すると冠灌流圧の低下すなわち冠血管の拡張がおこることより、PAFによる冠血管の拡張にはペプチドロイコトリエンとは別のロイコトリエンB<sub>4</sub>が関与していると報告している。

しかしながら、今回用いたペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬であるONO-1078はロイコトリエン $B_4$ によりもたらされるホルモット気管支の収縮には拮抗せず、ロイコトリエン $D_4$ による気管支の収縮に特異的に拮抗するとされている<sup>34)</sup>。また、実験成績には示さなかったが、ロイコトリエン $B_4$ を種々の濃度で低圧および高圧条件にて回路中に投与したが、灌流圧の変化は認められなかった。同様に、Lettsら<sup>35)</sup>のラット摘出心の定圧灌流実験ではロイコトリエン $B_4$ では何ら冠灌流量に変化をおよぼさなかったし、Karmazynら<sup>36)</sup>の実験でも、ロイコトリエン $B_4$ は何らの血管反応もおこさなかった。従って、Huらの示すようにロイコトリエン $B_4$ がPAFによる冠血管の拡張に関与しているとは考えにくい。

Secrestら<sup>38)</sup>は、イヌの摘出血管の実験でペプチドロイコトリエンによる血管弛緩作用を報告している。また今回の実験では、PAFによる冠血管の拡張が低い濃度のペプチ

ドロイコトリエン受容体拮抗薬では抑制されず、高濃度のペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬ではじめて抑制された。したがって、PAFによって産生されたペプチドロイコトリエンには、冠血管の収縮と拡張を担う別々の受容体が存在し、低い濃度のペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬では冠血管の収縮の受容体が抑制され、高濃度のペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬ではじめて冠血管の拡張の受容体が抑制されたためではないかと考えた。そこで、ペプチドロイコトリエンによる冠血管拡張作用の有無を調べるために、初期の灌流圧の設定を高い圧（100 mmHg）にしてロイコトリエンC<sub>4</sub>およびD<sub>4</sub>を投与し灌流圧の変化を検討した。もしこの仮説が正しければ、冠血管の収縮を抑制する濃度のONO-1078 20 nM 前処置下にロイコトリエンC<sub>4</sub>、D<sub>4</sub>を投与すれば、その冠血管の収縮成分を抑制するために冠血管の拡張がみられるはずである。しかし、本実験では、外因性に投与したペプ

チドロイコトリエンにより冠血管の拡張は認められなかった。この矛盾については、外因性に投与したペプチドロイコトリエンによる冠血管の反応とPAFにより内因性に産生されたペプチドロイコトリエンの反応には何らかの違いがあるのではないかと考えられる。また、ONO-1078がペプチドロイコトリエンとは別の機序でPAFによる冠血管の拡張を抑制する可能性も残されている。しかし、今回用いたペプチドロイコトリエン受容体拮抗薬ONO-1078はトロンボキサン $A_2$ 受容体作用薬であるSTA $_2$ やアセチルコリン、アラキドン酸、ヒスタミンおよびプロスタグランジン $F_2$ 、ロイコトリエン $B_4$ によりもたらされるモルモット気管支の収縮には拮抗しないと報告され、特異的にペプチドロイコトリエン受容体に作用すると考えられている<sup>3,4)</sup>。

Secrestら<sup>3,8)</sup>は、犬の摘出血管の実験でペプチドロイコトリエンにより内皮依存性の血管弛緩作用を示すことを報告し、ロイコト

リエンC<sub>1</sub>およびD<sub>1</sub>が内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) を介して血管の拡張をおこすことを示唆した。一方、PAFがEDRFを産生して血管の拡張をおこす可能性も報告されている<sup>8)</sup>ので、本実験でこの可能性を調べた。

EDRF<sup>3,9)</sup>はL-アルギニンのグアジド窒素に由来する一酸化窒素(NO)と考えられており、L-アルギニンからのNO生成をL-アルギニンと競合的に阻害するL-N<sup>6</sup>-ニトロアルギニン(LNNA)<sup>10)</sup>を用い、PAFによる冠血管拡張がLNNAの前処置でどうなるかを調べた。LNNA 100 μMの投与で、冠灌流圧は徐々に上昇すなわち冠血管の収縮を認めた。この冠血管の収縮はおそらく内因性のEDRFの産生が抑制された結果であると考えられるが、この状態でPAFを投与すると灌流圧の低下を認めた。なお、LNNAの単独作用として冠血管の収縮がおこるので、対照としてエンドセリン-1を用いて同程度に冠血管を収縮させた状態でのPAFの反応を検討した

ところ、LNNA処置時と同程度の冠灌流圧の低下が認められた。このようにPAFによる冠血管の拡張はLNNAでは抑制されず、従って、今回の実験においては、PAFによる冠血管拡張反応にNOすなわちEDRFの関与を見出すことはできなかった。

以上の考察より、PAFはラット摘出灌流心の冠血管においてPAF受容体を介する収縮および拡張をおこし、PAFによる冠血管収縮はペプチドロイコトリエンを介するものと考えられた。そして、PAFによる冠血管の拡張は、ONO-1078の高濃度ではじめて抑制されたが、プロスタグランジンやEDRFの関与は認められなかった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し直接御指導と御教示を頂きました薬理学教室山本研二郎教授、終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました外科学第2教室木下博明教授に深甚なる謝意を表します。また、終始温かい御指導と御助言を頂きました薬理学教室三浦克之講師ならびに外科学第2教室末広茂文講師に厚く感謝します。さらに、数々の御援助を頂いた薬理学教室各位および外科学第2教室各位に心より御礼申しあげます。

## 文 献

1. Benveniste, J., Henson, P.M. and Cochrane, C. G. :Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet activating factor. *J. Exp. Med* 136:1356-1377 (1972)
2. Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N. and Hanahan, D. J. :Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem* 254: 9355-9358(1979)
3. 工藤一郎, 井上圭三: PAF 研究/現状と展望, *炎症* 7:309-325 (1987)
4. Robert Vandongen: Platelet-activating factor and the circulation (Editorial review). *Hypertension* 9:771-778(1991)
5. Bessin, P., Bonnet, J., Apffe, P., Soulard, C., Desgroux, L., Pelas, I. and Benveniste, J. :Acute circulatory collapse caused by PAF in dogs. *Eur. J. Pharmacol* 86:403-413 (1983)
6. Siren, A. L. and Feuerstein, G. :Effects of PAF and BN52021 on cardiac function and regional blood flow in conscious rat. *Am. J. Physiol* 257: H25-32 (1989)
7. Sanchez, C. M., Alonso, F., Inarrea, P., Alvarez, V. and Egido, J. : Vascular actions of synthetic PAF-acether (a synthetic-platelet-activating factor) in the rat: evidence for a platelet independent mechanism. *Immunopharmacology* 4:173-185 (1982)

8. DeFeudis, F. V. :Possible relationship between the synthesis of endothelium derived relaxing factor (EDRF) and PAF-acether. *Gen. Pharmacol* 17:129-131 (1986)
9. Piper, P. J. and Stewart, A. G. : Coronary vasoconstriction in the rats, isolated perfused heart induced by platelet-activating factor is mediated by leukotriene C<sub>4</sub>. *Br. J. Pharmacol* 88:595-605(1986)
10. Stahl, G. L and Lefer, A. M. :Mechanisms of platelet-activating factor-induced cardiac depression in the isolated perfused rat heart. *Circulatory Shock* 23:165-177 (1987)
11. Gillespie, M and Bowdy, B. :Impact of platelet activating factor on vascular responsiveness in isolated rat lungs. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 23:396-402 (1986)
12. Miura, K., Yukimura, T., Yamashita, Y., Shimmen, T., Okumura, M., Yamanaka, S., Imanishi, M and Yamamoto, K. :Renal and femoral vascular responses to endothelin-1 in dogs: role of prostaglandins. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 256 :11-17 (1990)
13. Feuerstein, G., Boyd, L. M., Ezra, D. and Goldstein, R. E. :Effect of platelet-activating factor on coronary circulation of the domestic pig. *Am. J. Physiol.* 246: H466-471(1984)
14. Sybertz, E. J., Watkins, R. W., Baum, T., Pula, K. and Rivelli, M. :Cardiac, coronary and peripheral vascular effects of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine in the anesthetized dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 232:156-162(1985)

15. Jackson, C. V., Schumacher, W. A., Kunkel, S. L., Driscoll, E. M. and Lucchesi, B. R. : Platelet-activating factor and the release of a platelet-derived coronary artery vasodilator substance in the canine. *Circ. Res* 58:218-229 (1986)
16. Mehta, J., Wargovich, T. and Nichols, W. W. : Biphasic effects of platelet-activating factor on coronary blood flow in anesthetized dog. *Prostaglandin Leukotriene Med* 21:87-95(1986)
17. Ezra, D., Laurindo, F. R. M., Czaja, J. F., Snyder, F., Goldstein, R. E. and Feuerstein, G. : Cardiac and coronary consequences of intracoronary platelet activating factor infusion in the domestic pig. *Prostaglandins* 34:41-57 (1987)
18. Fielder, V. B., Mardin, M. and Abram, T. S. : Comparison of cardiac and hemodynamic effects of platelet-activating factor-acether and leukotriene D<sub>4</sub> in anesthetised dogs. *Basic Res. Cardiol* 82:197-208(1987)
19. Levi, R., Burke, J. A., Guo, Z., Hattori, Y., Hoppens, C. M., McManus, L. M., Hanahan, D. J. and Pinckard, R. N. : Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC) a putative mediator of cardiac anaphylaxis in the guinea pig. *Circ. Res* 54: 117-124(1984)
20. Piper, P. J. and Stewart, A. G. : Antagonism of vasoconstriction induced by platelet-activating factor in guinea-pig perfused hearts by selective platelet-activating factor receptor antagonists. *Br. J. Pharmacol* 90: 771-783(1987)
21. Man, R. Y. K., Hu, W. and Kinnaird, A. A. A. : Coronary vascular response to platelet-activating factor in the perfused rat heart. *J. Lipid Mediators* 2:75-83(1990)

22. Snyder, F. : Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am. J. Physiol* 259:C697-C708 (1990)
23. Hu, W., Kinnaird, A. A. A. and Man, R. Y. K. : Mechanisms of the coronary vascular effects of platelet-activating factor in the rat perfused heart. *Br. J. Pharmacol* 103:1097-1102(1991)
24. Terashita, Z., Imura, Y., Takatani, M., Tsushima, S. and Nishikawa, K. : CV-6209 a highly potent antagonist of platelet activating factor (PAF) in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 242:263-268, (1987)
25. Stahl, G. L., Terashita, Z. and Lefer, A. M. : Role of platelet activating factor in propagation of cardiac damage during myocardial ischemia. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 244:898-904 (1987)
26. Lee, S., Levitsky, S. and Feinberg, H. : Effects of exogenous vasoconstrictors on coronary vascular resistance and prostacyclin production of the quiescent heart: The inhibitory effect of aspirin. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 248:44-49 (1989)
27. Moffat, M. P., Karmazyn, M. and Ferrier, G. R. : Prostaglandin involvement in hypersensitivity of ischemic hearts to arrhythmogenic influence of ouabain. *Am. J. Physiol* 249:H57-H63(1985)
28. Jeremy, J. Y., Mikhailidis, D. P. and Dandona, P. : Differential inhibitory potencies of non-steroidal antiinflammatory drugs on smooth muscle prostanoid synthesis. *Eur. J. Pharmacol* 182:83-89(1990)
29. 大谷弘一, 嶋典子, 堤内正美 : 新規トロンボキサンA<sub>2</sub>拮抗薬, S-145 の諸種平滑筋に対する作用, *日薬理誌* 94:319-328(1989)

30. 氏家新生, 平工誠治, 内藤惇:Thromboxane(TX)合成特異的阻害薬(E)-3-[4-(1-imidazolylmethyl)phenyl]-2-propenoic acid(OKY-046)の薬理作用, TXA<sub>2</sub> 産生抑制とそれに伴うPGI<sub>2</sub>産生亢進の有無の検討, 応用薬理 29:659-685 (1985)
31. Hiraku, S., Taniguchi, K., Wakitani, K., Omawari, N., Kira, H., Miyamoto, T., Okegawa, T., Kawasaki, A. and Ujiie, A. :Pharmacological studies on the TXA<sub>2</sub> synthetase inhibitor (E)-3-[p-(1H-imidazol-1-ylmetyl)phenyl]-2-propenoic acid (OKY-046). Jpn. J. Pharmacol 41:393-401 (1986)
33. Kawaguchi, H and Yasuda, H. : Platelet-activating factor stimulates prostaglandin synthesis in cultured cells. Hypertension 8:192-197 (1986)
34. Obata, T., Nambu, F., Kitagawa, T., Terashima, H., Toda, M., Okegawa, T. and Kawasaki, A. ONO-1078 :An antagonist of leukotrienes. :In B. Samuelsson, R. Paoletti, and P. Ramwell (ed. ), Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research, Vol. 17, 540-543, Raven press Inc., New York (1987)
35. Letts, L. G. and Piper, P. J. :Cardiac actions of leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> and E<sub>4</sub> in guinea pig and rat in vitro. :In B. Samuelsson, R. Paoletti, and P. Ramwell (ed. ), Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research, Vol. 11, 391-395, Raven press Inc., New York (1983)
36. Karmazyn, M. and Moffat, M. P. : Positive inotropic effects of low concentrations of leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> in rat heart. Am. J. Physiol 259:H1239-H1246(1990)
37. Mullane, K. M., Read, M., Salmon, J. A. and Moncada, S. :Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: Relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther 228:510-522 (1984)

38. Secrest, R. J. and Chapnick, B. M. :Endothelial-dependent relaxation induced by leukotrienes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, and E<sub>4</sub> in isolated canine arteries. *Circ. Res* 62:983-991 (1988)
39. 戸田昇, 岡村富雄 :血管内皮由来弛緩因子(EDRF). *日薬理誌* 95:295-308 (1990)
40. Toda, N., Minami, Y. and Okamura, T. :Inhibitory effects of L-N<sup>o</sup>-nitroarginine on the synthesis of EDRF and the cerebroarterial response to vasodilator nerve stimulation. *Life Sci* 47:345-351 (1990)



PAF  
25nM 2min

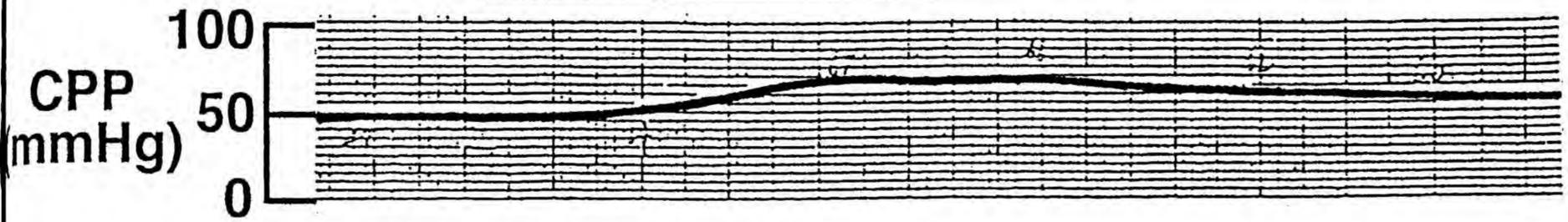


Fig.2-a

PAF  
25nM 2min



Fig.2-b

Fig.2

Typical tracing of effect of PAF (25nM) on coronary perfusion pressure (CPP).

Coronary perfusion pressure was set up initially at 50mmHg (Fig.2-a) and 100mmHg (Fig.2-b) by adjusting coronary flow.

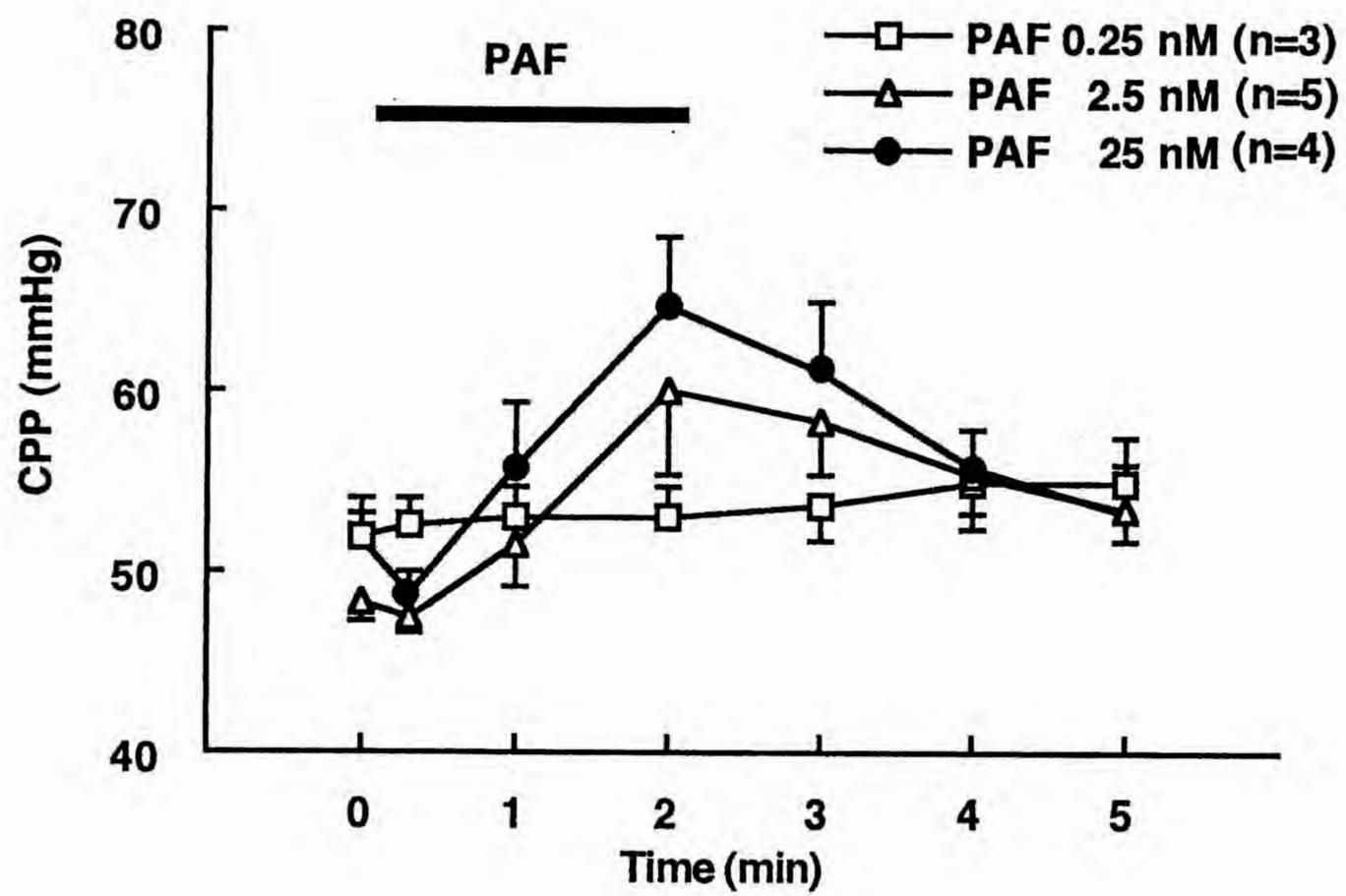


Fig.3

Effect of PAF (0.25,2.5, 25nM) on coronary perfusion pressure (CPP).

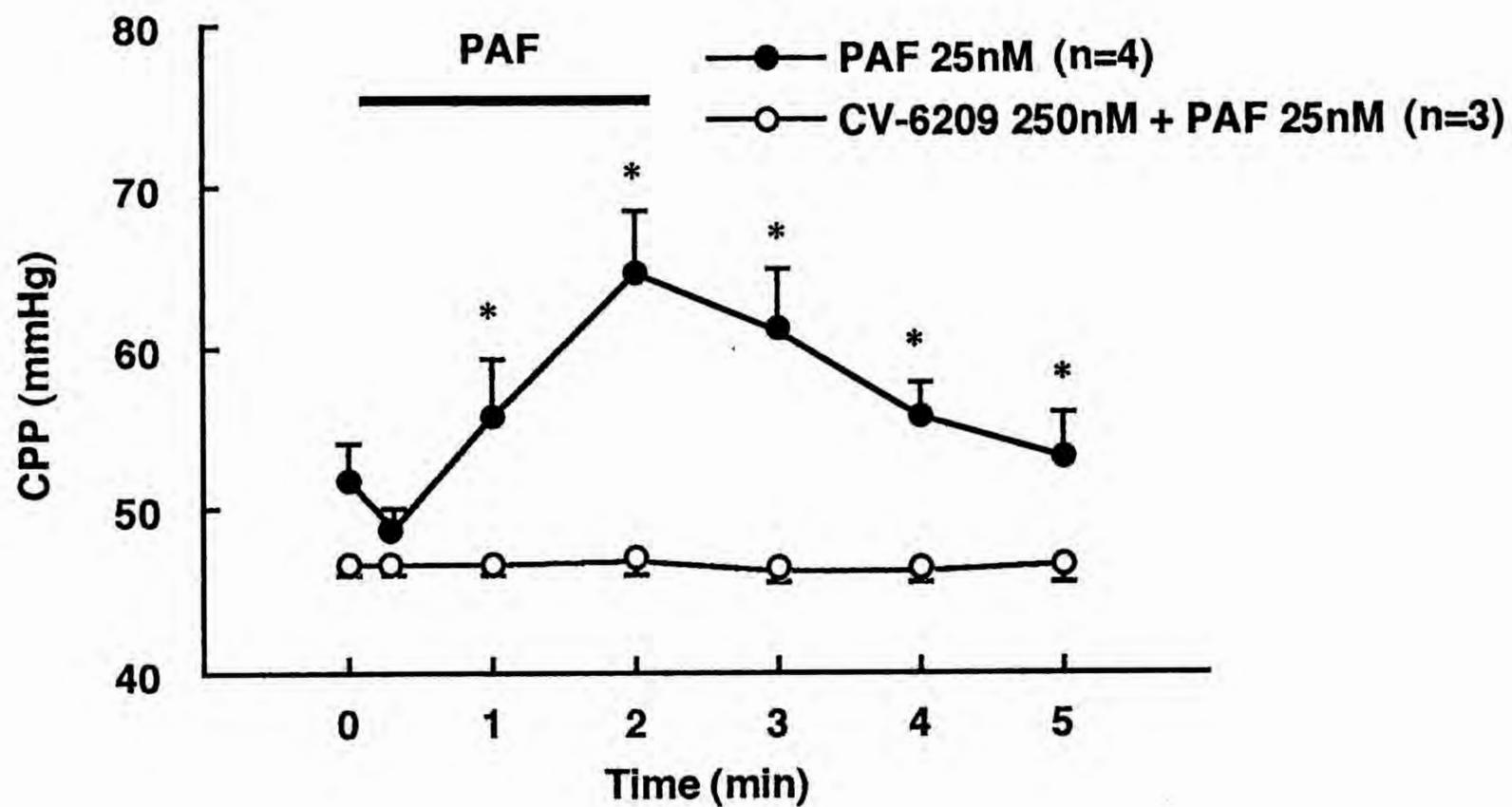


Fig.4

Effect of CV-6209 on coronary vasoconstrictor action of PAF.

All points are means and brackets indicate S.E.M. \*:  $P < 0.05$  compared with the control period just before PAF administration (Time 0).

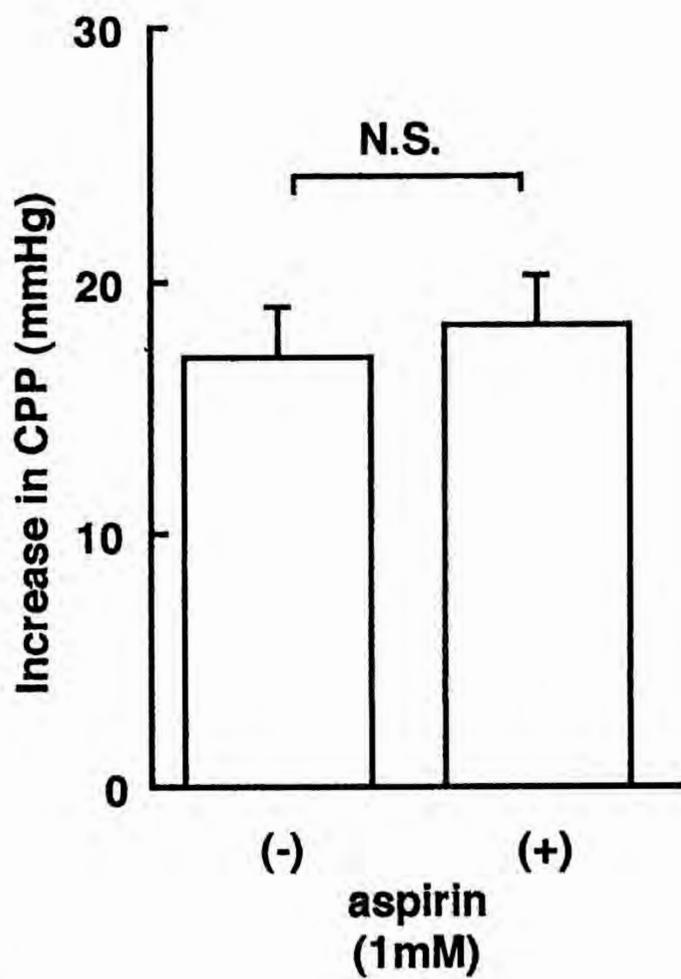


Fig.5-a

Effect of aspirin on coronary vasoconstrictor action of PAF.

(-) : without aspirin (n=13), (+) : with aspirin (n=8).  
Bar heights are means of the maximum increase in coronary perfusion pressure (CPP) by PAF (25nM) and brackets indicate S.E.M. N.S. : not significant.

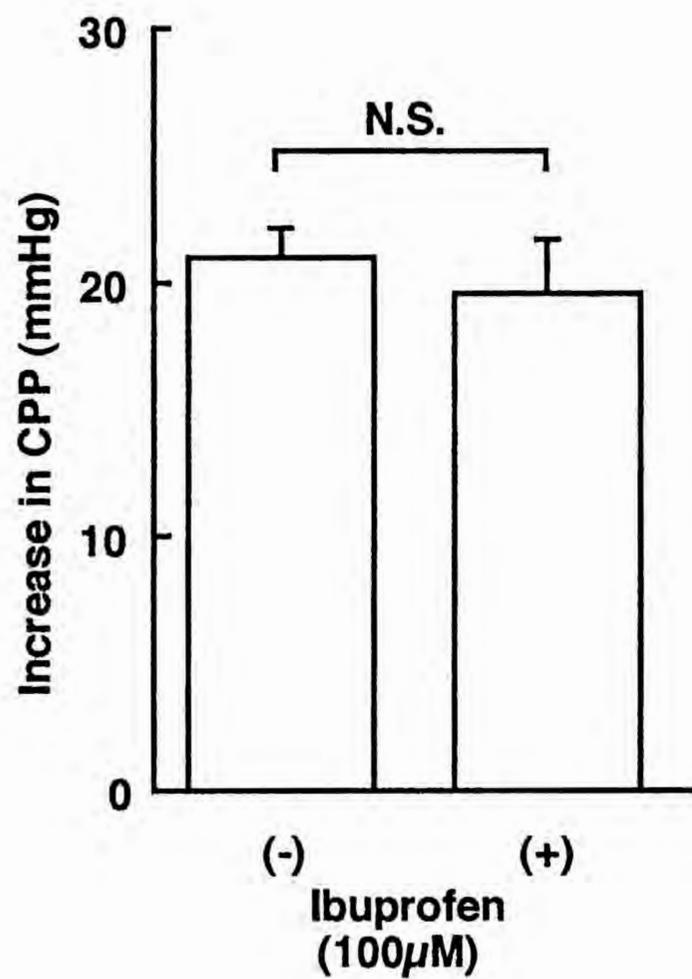


Fig.5-b

Effect of ibuprofen on coronary vasoconstrictor action of PAF.

(-) : without ibuprofen (n=3), (+) : with ibuprofen (n=7).  
Bar heights are means of the maximum increase in coronary perfusion pressure (CPP) by PAF (25nM) and brackets indicate S.E.M. N.S.: not significant.

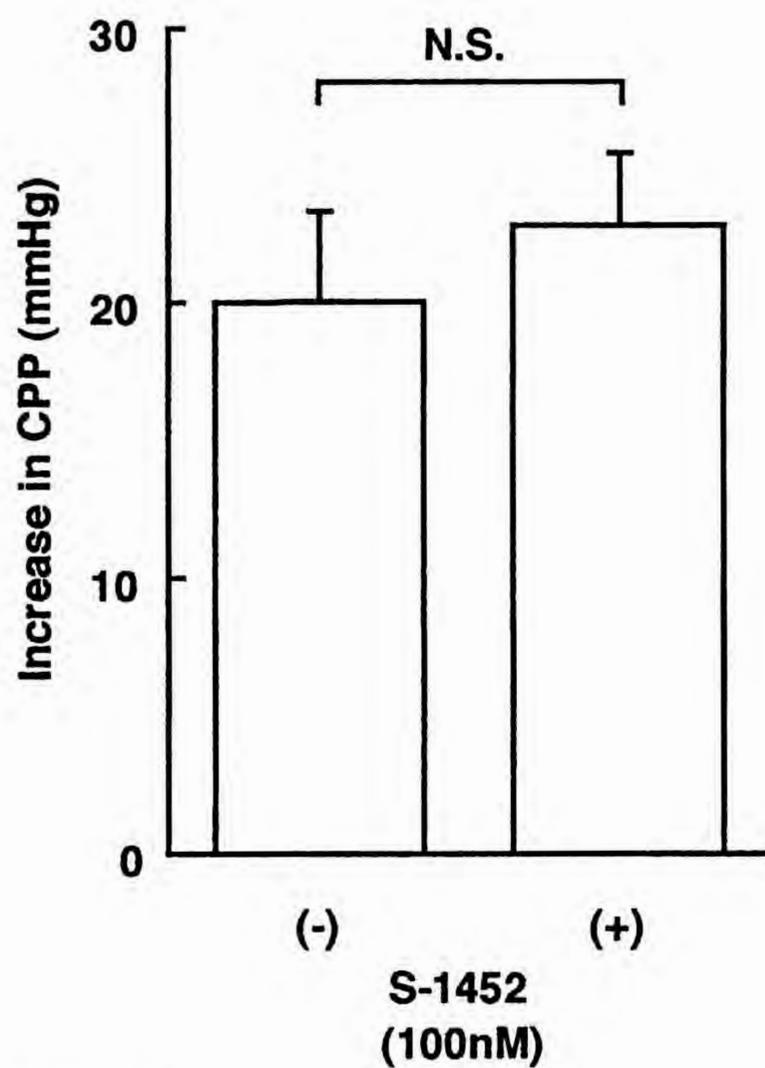


Fig.6-a

Effect of S-1452 on coronary vasoconstrictor action of PAF.

(-) : without S-1452 (n=5), (+) : with S-1452 (n=6).

Bar heights are means of the maximum increase in coronary perfusion pressure (CPP) by PAF (25nM) and brackets indicate S.E.M. N.S. : not significant.

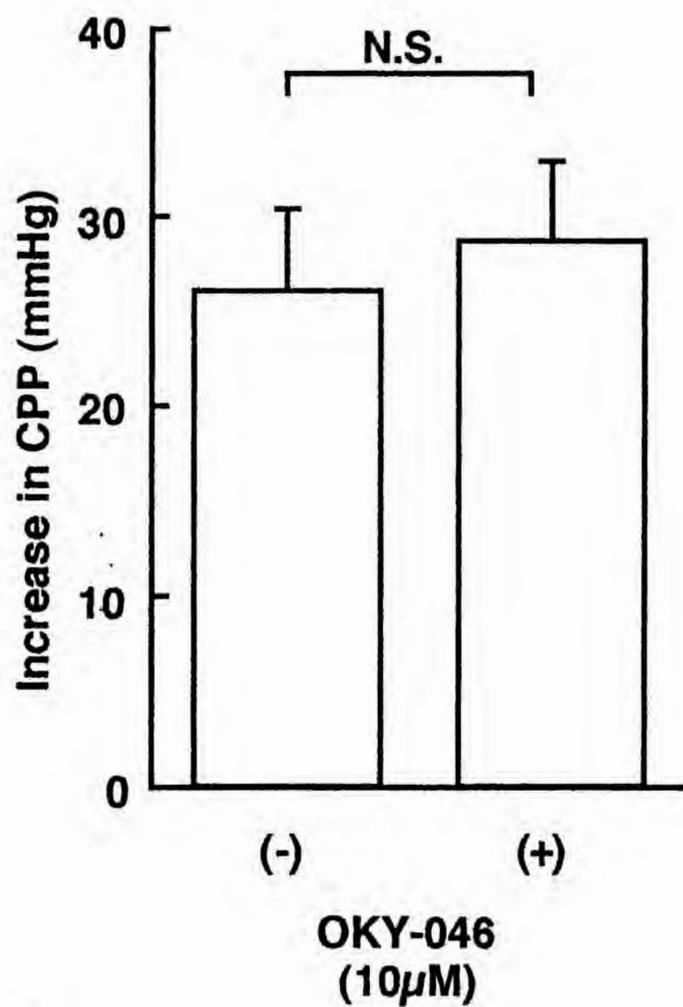


Fig.6-b

Effect of OKY-046 on coronary vasoconstrictor action of PAF.

(-) : without OKY-046 (n=5), (+) : with OKY-046 (n=5).  
Bar heights are means of the maximum increase in coronary perfusion pressure (CPP) by PAF (25nM) and brackets indicate S.E.M. N.S. : not significant.

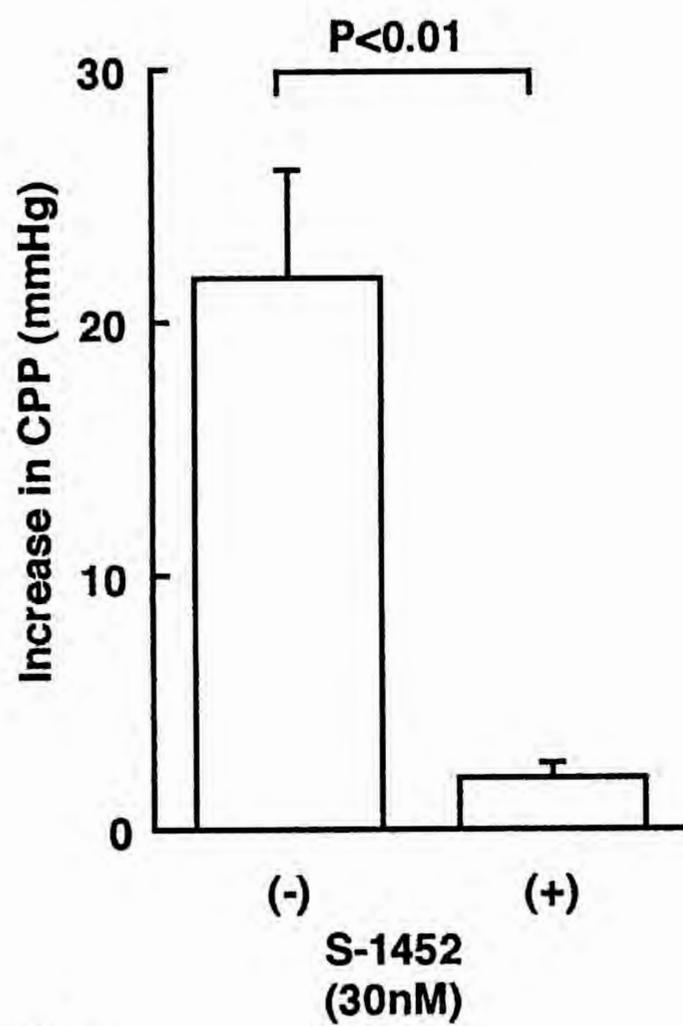


Fig.7

Effect of S-1452 on coronary vasoconstrictor action of U46619.

(-) : without S-1452 (n=5), (+) : with S-1452 (n=5).  
 Bar heights are means of the maximum increase in coronary perfusion pressure (CPP) by U46619 (100nM) and brackets indicate S.E.M.

Table.1 Increase in coronary perfusion pressure by peptide-leukotrienes during low pressure perfusion

	N	Dose of leukotriene C <sub>4</sub> and D <sub>4</sub>	
		4 pmol	20pmol
leukotriene C <sub>4</sub>	3	17.3 ±0.98 (mmHg)	40.3 ±1.09 (mmHg)
leukotriene D <sub>4</sub>	3	15.7 ±4.12 (mmHg)	40.7 ±2.68 (mmHg)

Coronary perfusion pressure was set up at 50mmHg by adjusting coronary flow and subsequently flow rate was left constant.

All values are means ± S.E.M of the maximum increase in coronary perfusion pressure by peptide-leukotrienes. N represents the number of samples.

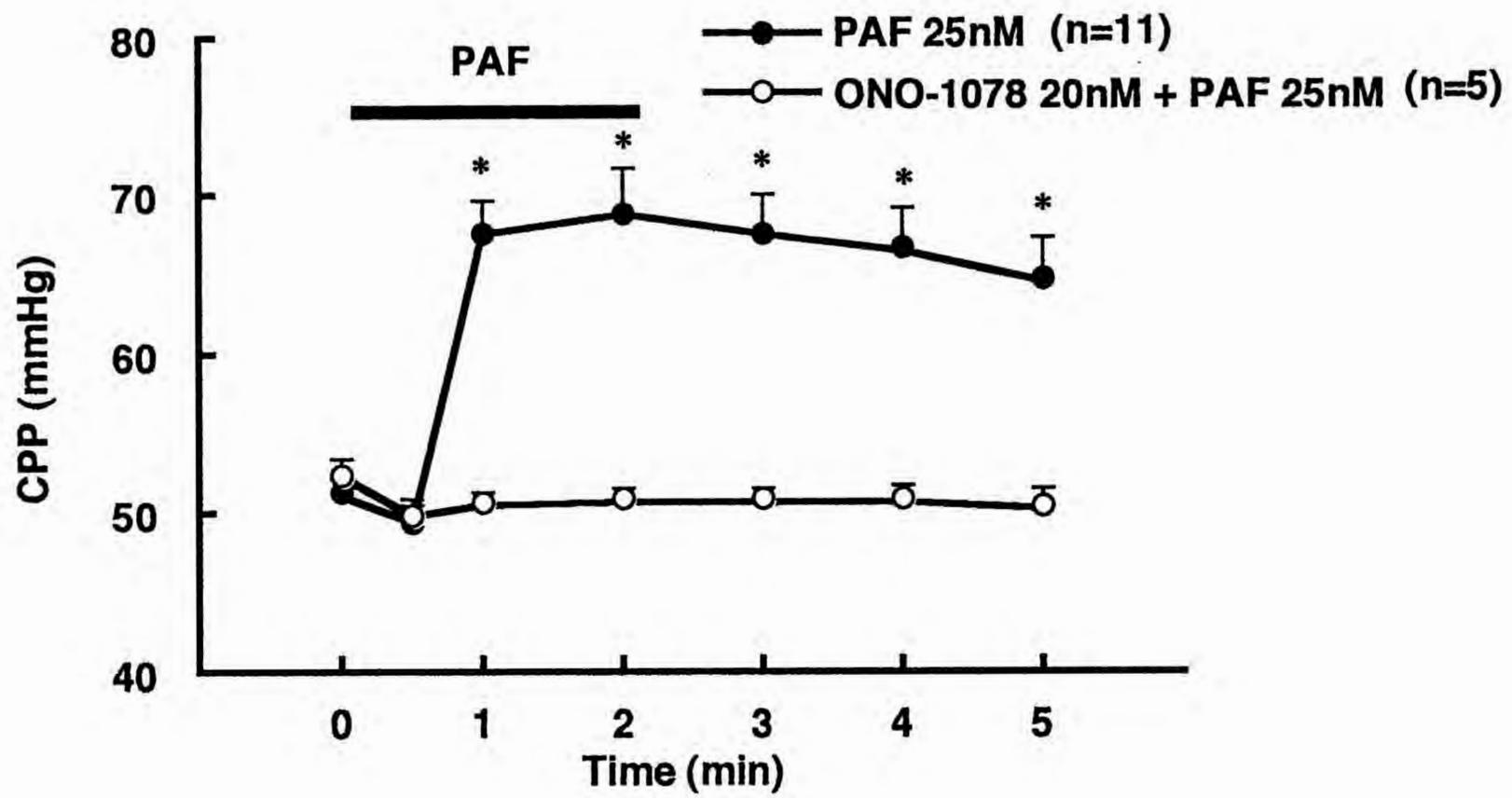


Fig.8

Effect of ONO-1078 on coronary vasoconstrictor action of PAF.

All points are means and brackets indicate S.E.M. \*:P<0.05 compared with the control period just before PAF administration (Time 0).

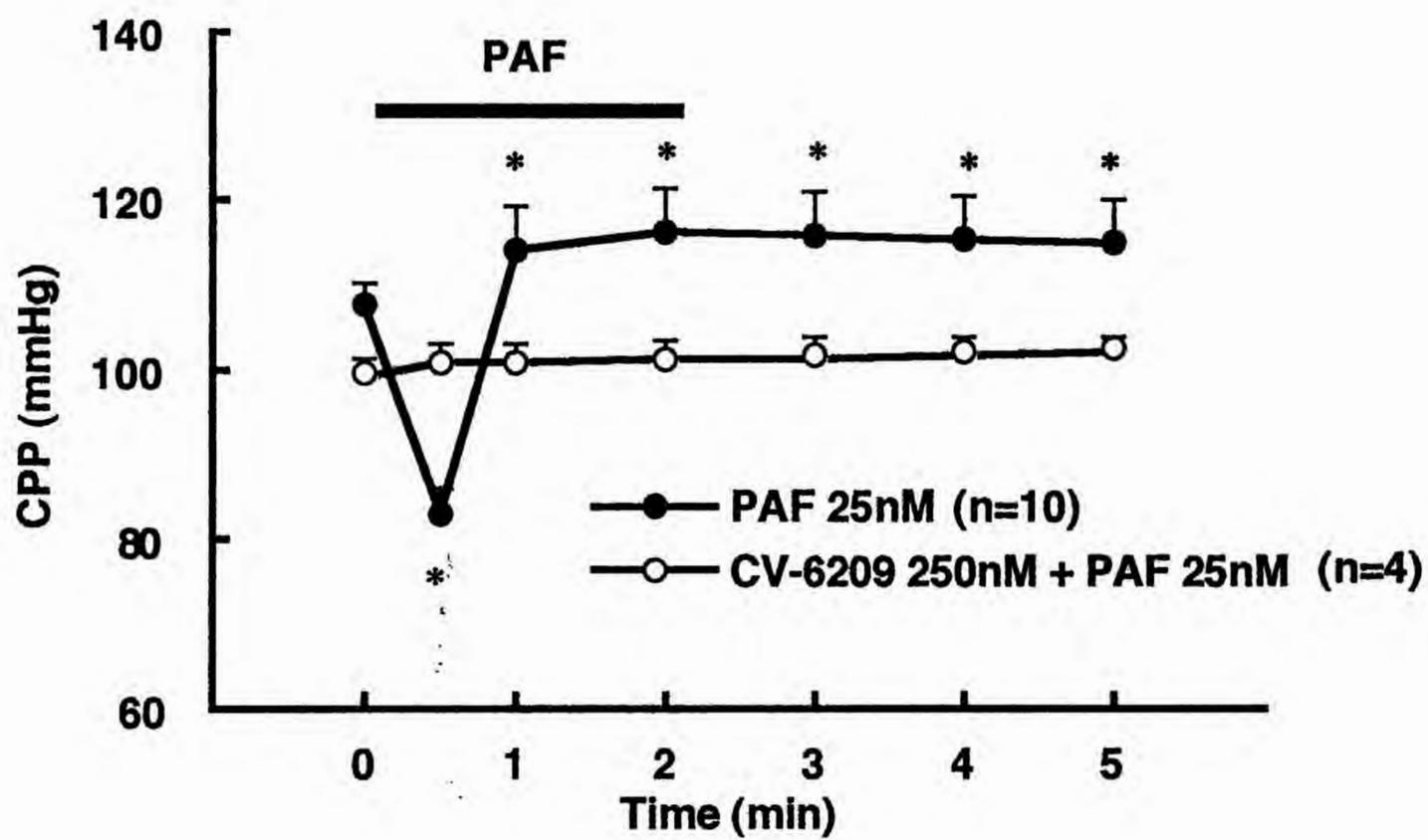


Fig.9

Effect of CV-6209 on coronary vasodilatory action of PAF.

All points are means and brackets indicate S.E.M. \*:P<0.05 compared with the control period just before PAF administration (Time 0).

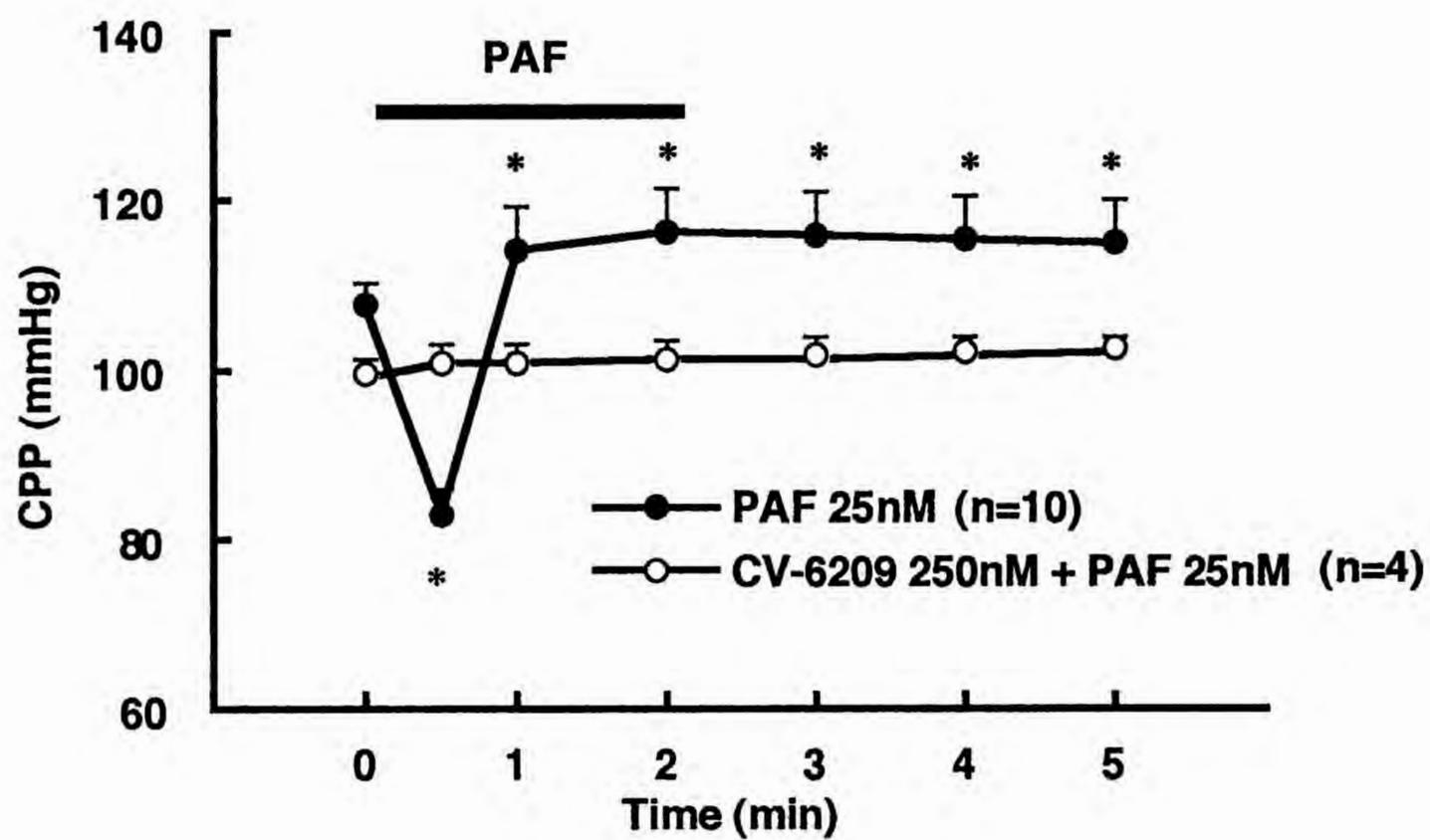


Fig.9

Effect of CV-6209 on coronary vasodilatory action of PAF.

All points are means and brackets indicate S.E.M. \*:P<0.05 compared with the control period just before PAF administration (Time 0).

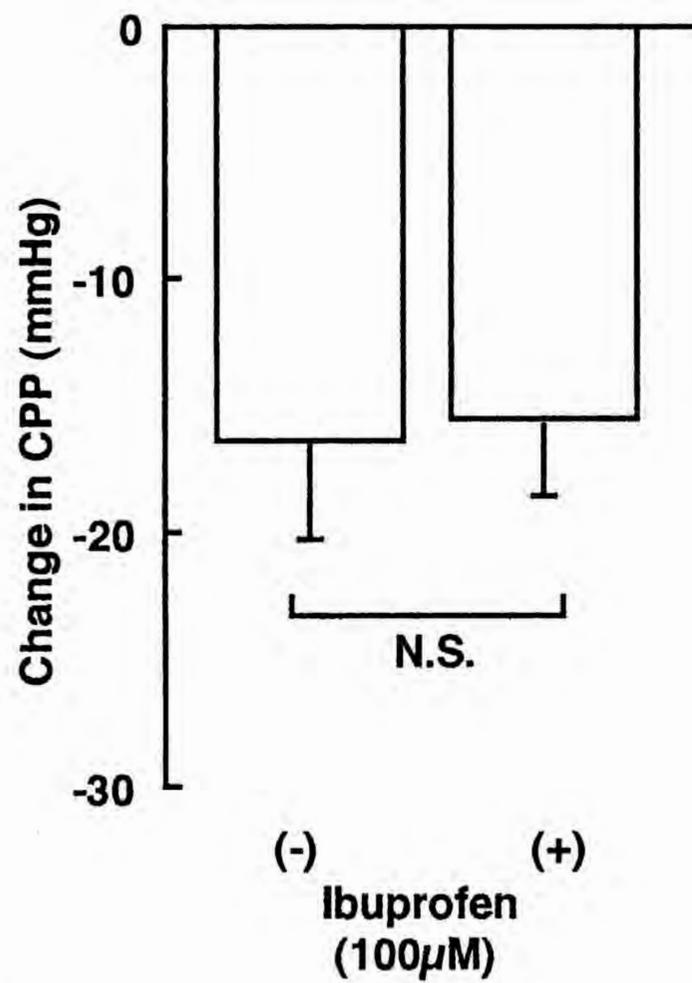


Fig.10

Effect of ibuprofen on coronary vasodilatory action of PAF.

(-) : without ibuprofen (n=3), (+) : with ibuprofen (n=4).

Bar heights are means of the maximum change in coronary perfusion pressure (CPP) by PAF (25nM) and brackets indicate S.E.M. N.S. : not significant.

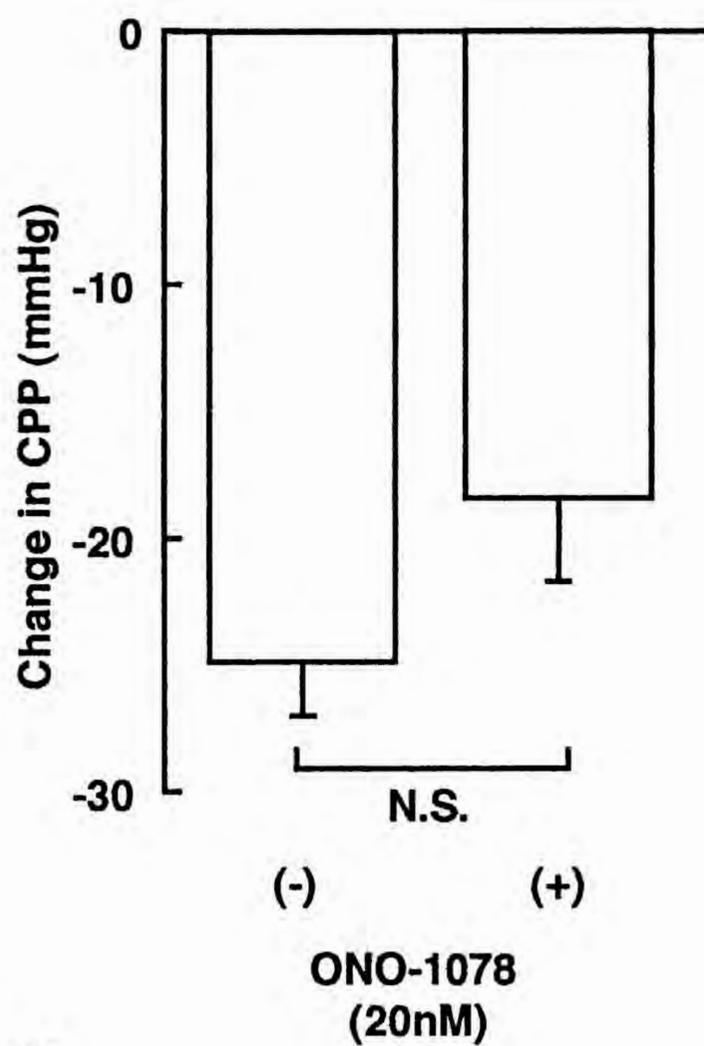


Fig.11

Effect of ONO-1078 (20nM) on coronary vasodilatory action of PAF.

(-): without ONO-1078 (n=10), (+): with ONO-1078 (n=5).  
 Bar heights are means of the maximum change in coronary perfusion pressure (CPP) by PAF (25nM) and brackets indicate S.E.M.  
 N.S.: not significant.

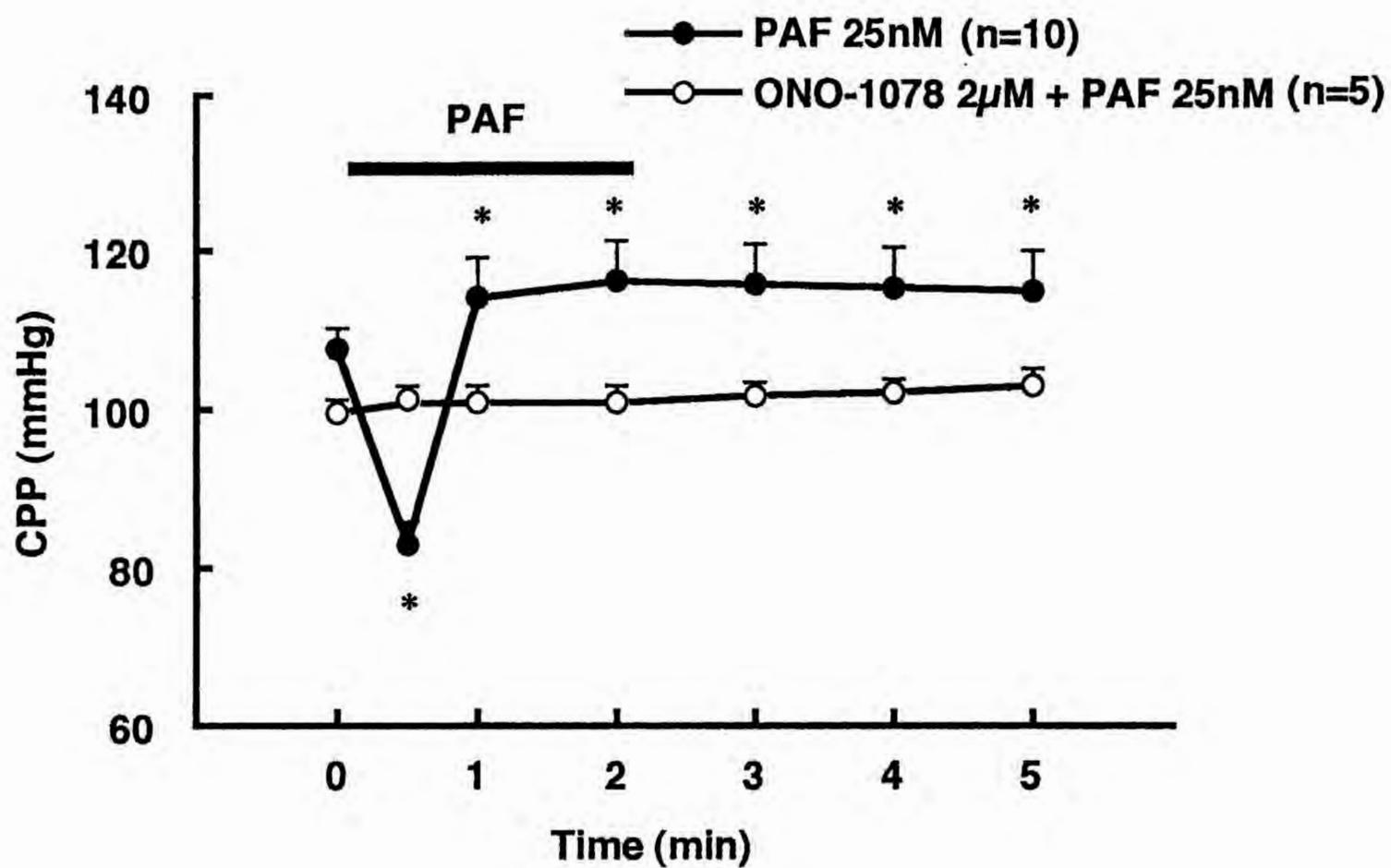


Fig.12

Effect of ONO-1078 (2µM) on coronary vasodilatory action of PAF.

All points are means and brackets indicate S.E.M. \*:P<0.05 compared with the control period just before PAF administration (Time 0).

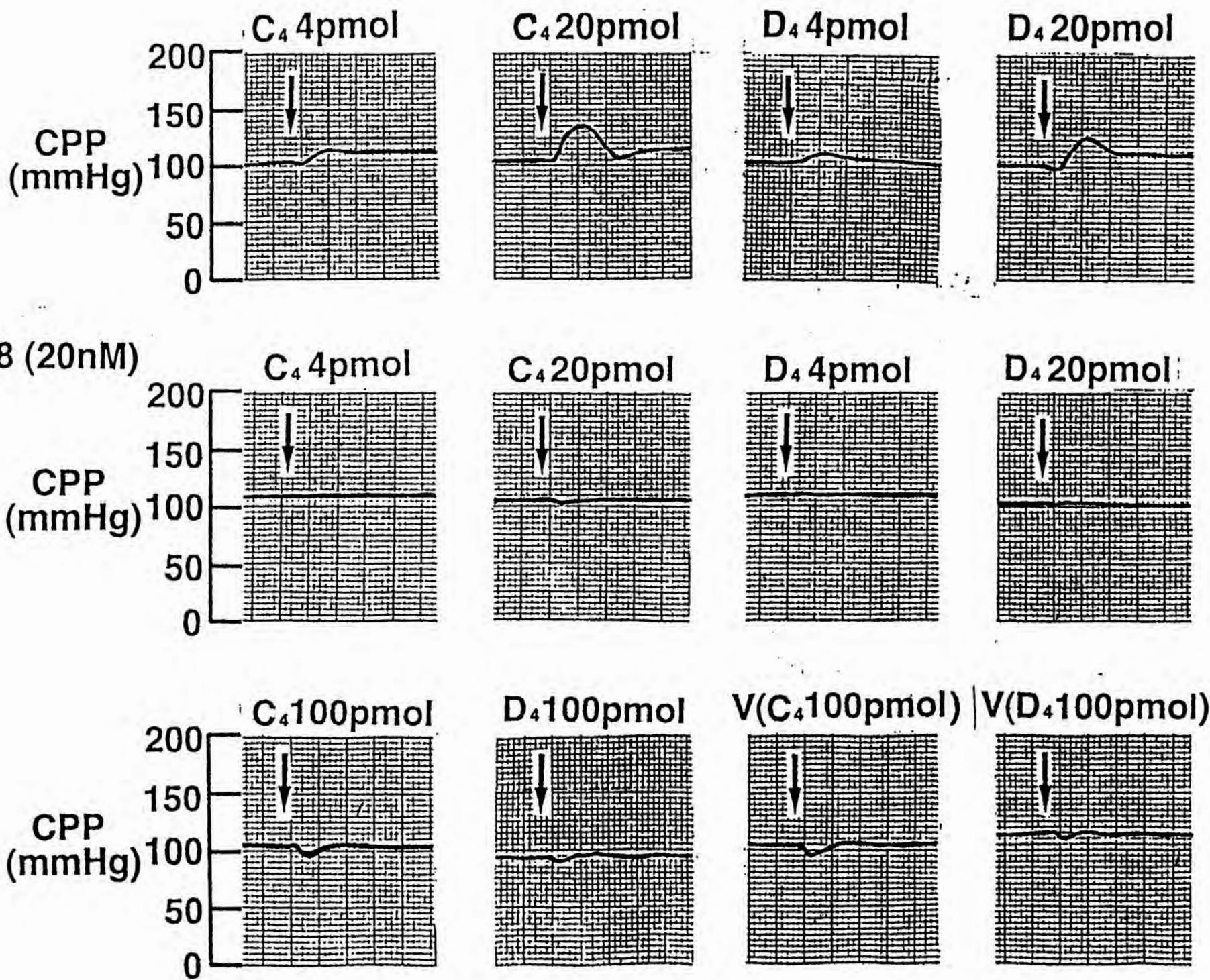


Fig.13

Effect of peptide-leukotrienes on coronary perfusion pressure (CPP) during high pressure perfusion.

Coronary perfusion pressure was set up at 100mmHg by adjusting coronary flow and subsequently flow rate was left constant. C<sub>4</sub>: leukotriene C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>: leukotriene D<sub>4</sub>, V: vehicle solution.

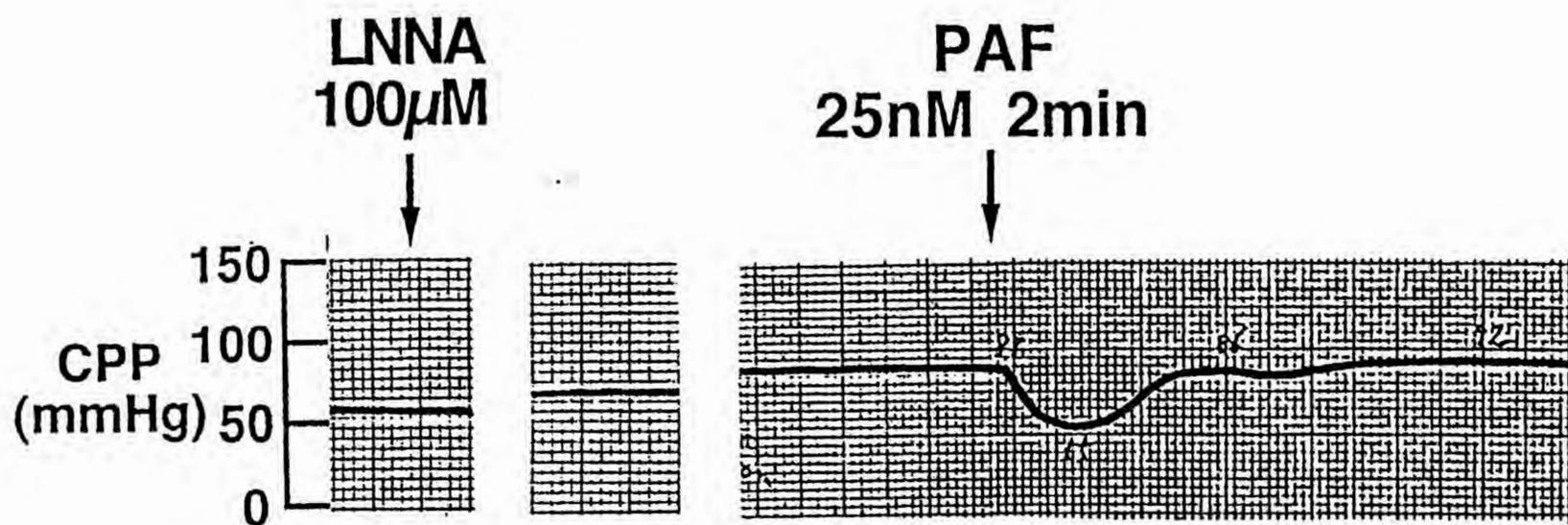


Fig.14-a

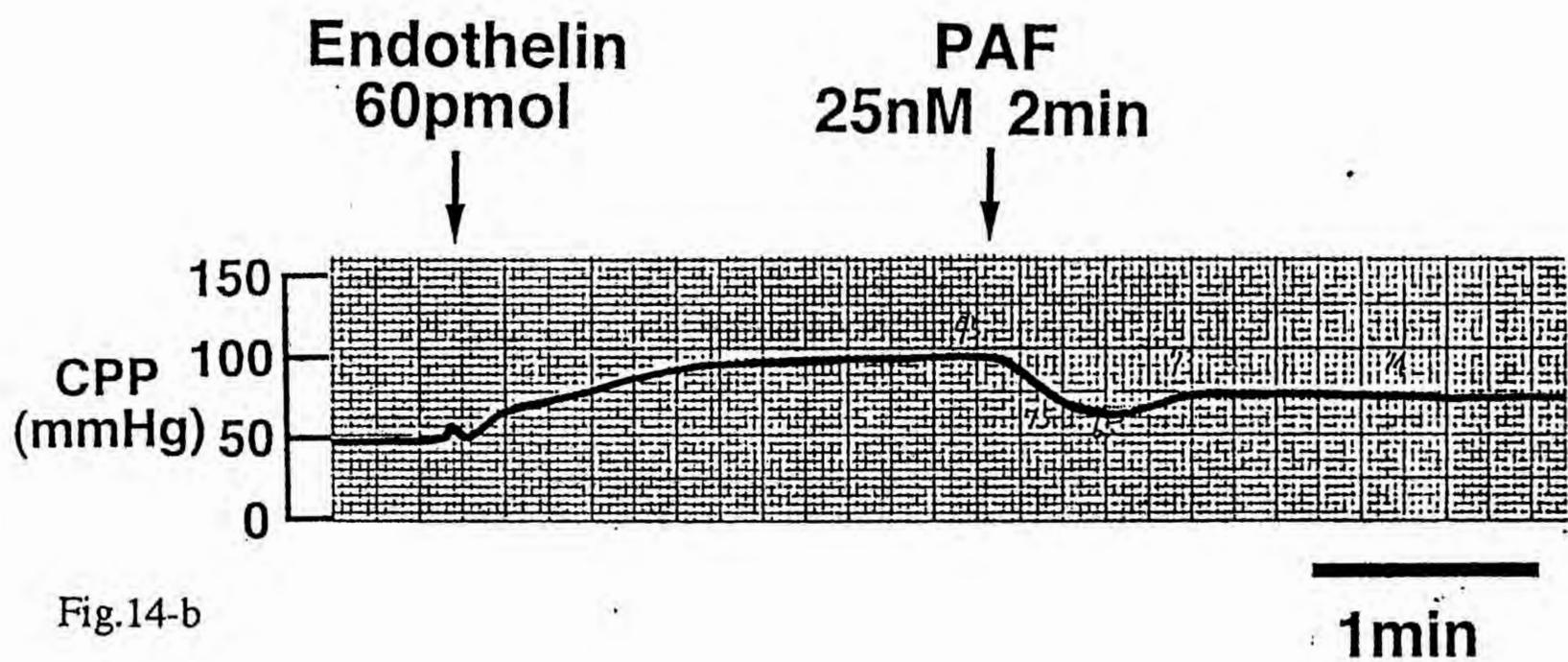


Fig.14-b

Fig.14

Coronary vasodilatory action of PAF after LNNA (Fig.14-a) and endothelin-1(Fig.14-b).

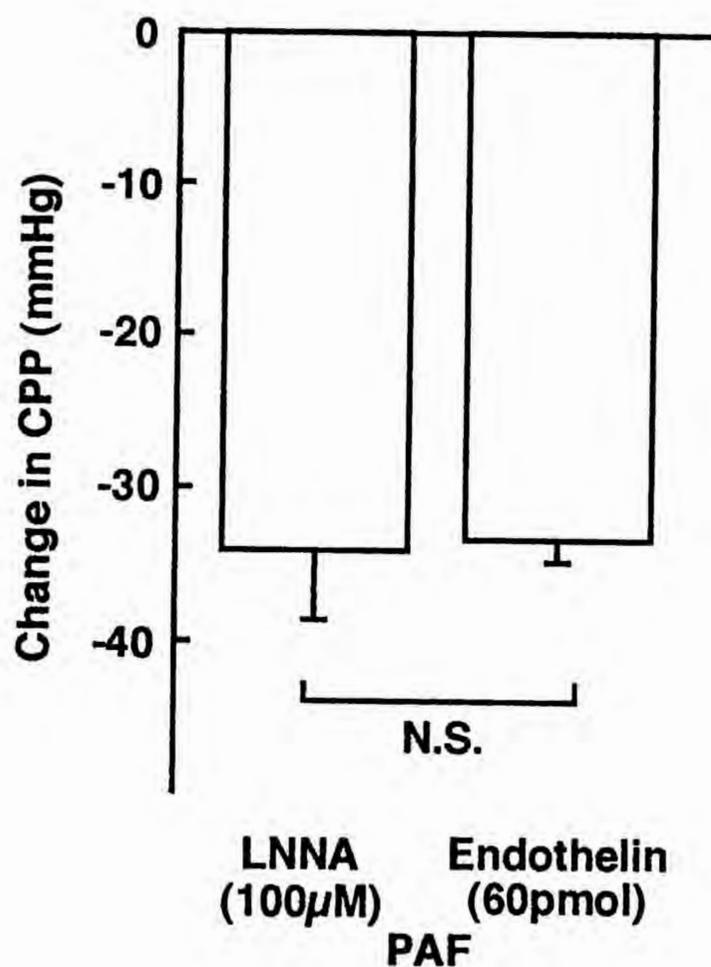
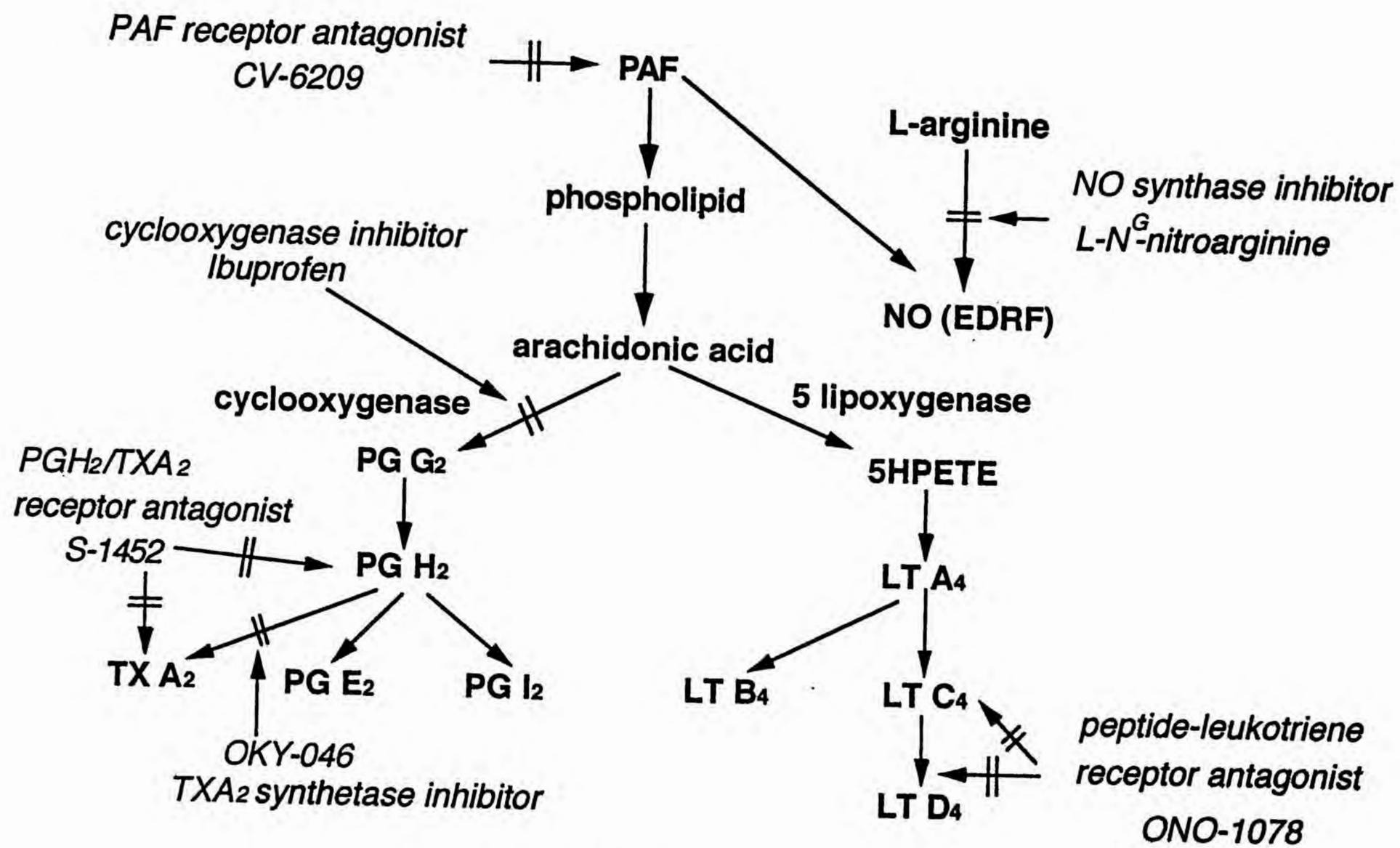


Fig.15

Effect of L-N<sup>G</sup>-nitroarginine (LNNA) on coronary vasodilatory action of PAF.

PAF was administered after treatment with LNNA(n=9) and endothelin(n=5). Bar heights are means of the maximum change in coronary perfusion pressure (CPP) and brackets indicate S.E.M. N.S. : not significant.



付 図