

脊髓穿刺ラットを用いた循環薬理学的研究

高取真吾¹⁾・川崎博己²⁾・見尾光庸¹⁾

¹⁾就実大学薬学部薬効解析学・²⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床薬学

はじめに

薬理学領域において各種血管作動薬による循環器作用の評価方法には、さまざまな動物、またその標本を用いた *in vivo* および *in vitro* 実験系など非常に多くの評価系が存在する。例えば、各種血管のリング標本や腸間膜動脈血管床などを用いた *in vitro* 実験系における検討、脊髓穿刺ラットおよび無麻酔・無拘束ラットなどにおける *in vivo* 実験系での検討が知られている。

脊髓穿刺ラットは、眼窩より rod を挿入することにより脊髓を全て破壊したモデルであり、中枢神経を介した循環反射機構が欠如している特徴を持つ。従って、各種血管作動物質によるピュアな心血管反応を *in vivo* にて観察することができるだけでなく、rod を介した電気刺激により各種神経性の心血管反応も観察できる為、末梢における各種血管作動薬による心血管反応の評価に非常に有用なモデルであると言える。このことは、医薬品開発における非臨床試験において、脊髓穿刺ラットを用いた薬効薬理の評価が実際に行われているということからも裏づけられよう (サンドノーム[®]

錠添付文書)。

そこで本稿では、我々がこのモデルを用いて行ってきた研究の一端を簡単に紹介させて頂き、少しでも多くの方々にその有用性について理解を深めて頂ければ幸いである。

脊髓穿刺ラットの作製方法

Wistar 系雄性ラット (体重 350~400 g) を用い、ペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて眼窩より脊柱内に rod (両先端 5 mm 以外の部分は、絶縁処理を施してある) を挿入し、脊髓を全て破壊する。また、別の rod (絶縁処理なし) を背中 of 皮下より挿入し、不関電極として用いる。脊髓破壊後、人工呼吸器を用いて気管に挿入したカニューレを介し、人工呼吸 (4.5 ml/ breaths/kg, 70 breaths/min) を開始する (図 1)。また、各種薬物の投与は左右の頸静脈に挿入したカニューレより行い、全身血圧および心拍数の測定は頸動脈に挿入したカニューレを介してポリグラフシステムおよび心拍タコメーターにて記録した (図 1)。

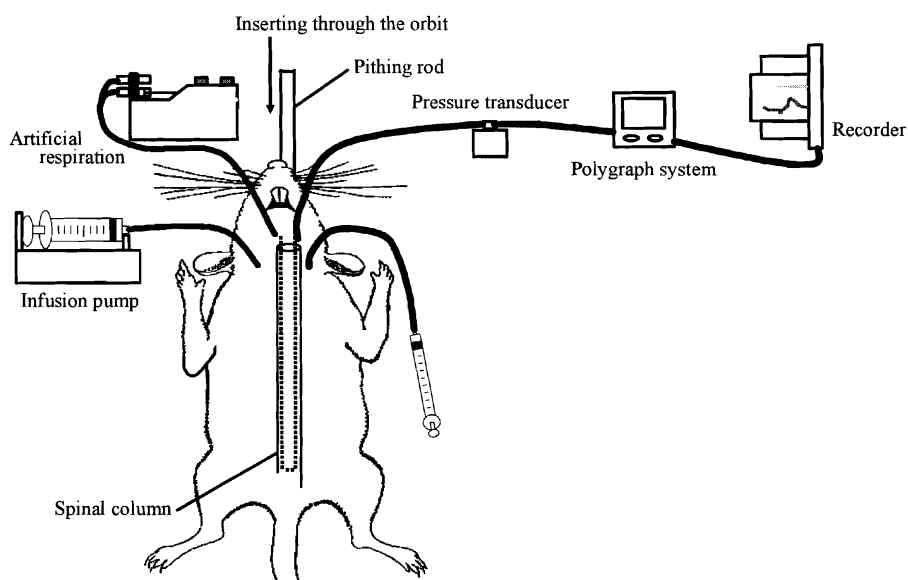


図1. 脊髓穿刺ラットの作製と実験方法の概略

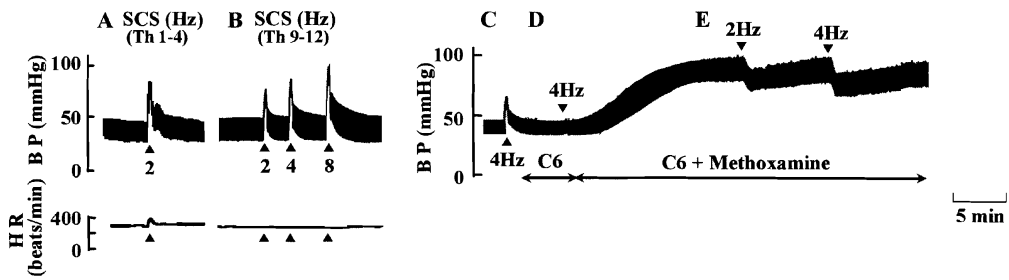


図2. 脊髄電気刺激(SCS)による心血管反応

脊髄電気刺激 (SCS, Spinal Cord Stimulaion) による心血管反応

血圧および心拍数が安定した後、2本のrodを介して2、4および8 Hzの電気刺激(20 V、1ms間隔の矩形波)を30秒間行った。脊柱内に挿入したrodの位置を変化させることにより、交感神経性の心血管反応を観察することができる(図2 AおよびB)。胸髄上部(Th 1-4)における電気刺激(2 Hz)は、心拍数の増加を伴った血圧上昇反応が観察される(図2 A)。一方、胸髄下部(Th 9-12)における電気刺激(2~8 Hz)は、心拍数の増加を伴わない刺激頻度依存性の血圧上昇反応が観察される(図2 B)。血管反応に対する心機能の影響を最小にする目的で、通常は胸髄下部の電気刺激により生じる血管反応を観察する(Takatori *et al.*, 2003; 2006)。

一方、 α_1 受容体刺激薬(methoxamine; 20 μ g/kg/min, i.v.)と自律神経節遮断薬(C6, hexamethonium; 2 mg/kg/min, i.v.)の同時持続投与により平均血圧を約100 mmHgに維持した後、同上条件にて電気刺激(2および4 Hz)を行うと、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP, Calcitonin Gene-Related Peptide)神経性の心血管反応を観察することができる(図2 E)。生体内において強力な血管拡張因子として知られるCGRPは、CGRP神経から分泌される神経伝達物質であり、交感神経刺激による血管収縮作用と拮抗的に働くことにより血管の緊張度調節に関与していると報告されている(Brain *et al.*, 1985; Kawasaki *et al.*, 1988)。

また、上記にて得られた交感神経性の血管収縮反応およびCGRP神経性の血管拡張反応は、それぞれ α_1 受容体拮抗薬(prazosin)およびCGRP受容体拮抗薬(CGRP [8-37])にて抑制されることを確認している(Takatori *et al.*, 2003)。

以上述べたように、脊髄穿刺ラットは脊髄の特定の部位を電気刺激することにより、交感神経およびCGRP神経性の心血管反応をin vivoにて容易に観察することができるという非常にユニークな

特徴を有することが示されている。

様々な病態時における神経機能変化

交感神経およびCGRP神経の両神経による血管緊張度調節の破綻は、様々な障害を引き起こす。高血圧自然発症モデルラット(SHR, Spontaneously Hypertensive Rat)の腸間膜動脈血管床を用いた検討において、SHRではCGRP神経機能の減弱を引き起こしており、結果的に交感神経機能の亢進を招き、このことが高血圧の進展・維持に関与していることを報告している(Kawasaki *et al.*, 1999)。また、芳原らは、加齢に伴いSHRにおけるCGRP神経密度分布が減弱することがその原因の一部ではないかということを示唆している(Hobara *et al.*, 2005)。

一方、我々は飲料水としてフルクトース溶液を長期間与えることにより作製した脊髄穿刺2型糖尿病モデルラットにおいて、慢性的な高インスリン血症の状態が交感神経機能の有意な増加とCGRP神経機能の顕著な減弱を引き起こし、これら両神経の機能的な変化が高血圧症状を誘導するということを報告している(Takatori *et al.*, 2006)。さらに、2型糖尿病自然発症モデルラット(OLETF, Otsuka Long-Evance Tokushima Fatty ラット)の腸間膜動脈血管床を用いたin vitroの研究においても同様の結果が得られることを明らかにしている(not published)。

以上のように、脊髄穿刺ラットを用いた検討は、様々な病態時における神経機能変化に伴う循環薬理的な評価を行うにあたり、非常に有用であるばかりではなく、各種血管作動物質の詳細なメカニズムや各種病態発症のメカニズム解明に至るまで非常に幅広い有益な情報を提供するin vivo実験系のモデルであると考えられる。

現在、ヒスタミンによる心血管反応に及ぼす影響に着目し、アナフィラキシー誘発性低血圧の発症メカニズム解明に取り組んでおり、新しい知見を得ている。その成果は、学会発表および論文等

にて報告させて頂く予定である。今後、多くの研究者および先生方からのご意見・ご指導を頂き、脊髄穿刺ラットが医薬品開発（特に循環器疾患治療薬）において必須の評価モデルとして使用されることを強く願っている。

参考文献

Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, Macintyre I: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 1985; 313: 54-56.

Hobara N, Gessei-tsutsumi N, Goda M, Takayama F, Akiyama S, Kurosaki Y, Kawasaki H: Long-term inhibition of angiotensin prevents reduction of periarterial innervation of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerves in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2005; 28: 465-474.

Kawasaki H, Okazaki M, Nakatsuma A, Mimaki Y, Araki H, Gomita Y: Long-term treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor restores reduced calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator nerve function in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 221-229.

Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K: Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of rat. *Nature* 1988; 335: 164-167.

サンドノーム[®]錠添付文書

Takatori S, Mizote M, Zamami Y, Kurosaki Y, Kawasaki H: Effects of insulin on vascular responses to spinal cord stimulation and vasoactive agents in pithed rats. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1137-1145.

Takatori S, Zamami Y, Mio M, Kurosaki Y, Kawasaki H: Chronic hyperinsulinemia enhances adrenergic vasoconstriction and decreases calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in pithed rats. *Hypertens Res* 2006; 29: 361-368.